



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117999254 A

(43) 申请公布日 2024. 05. 07

(21) 申请号 202280053086.7

N·伯格

(22) 申请日 2022.07.20

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限
公司 31100

(30) 优先权数据

专利代理师 陈扬扬

285208 2021.07.28 IL

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2024.01.29

C07C 211/46 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61P 35/00 (2006.01)

PCT/IL2022/050782 2022.07.20

C07K 16/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

C07K 16/32 (2006.01)

W02023/007481 EN 2023.02.02

C07C 69/00 (2006.01)

(71) 申请人 特拉维夫大学拉玛特有限公司

地址 以色列特拉维夫

申请人 默克专利有限公司

(72) 发明人 D·沙巴特 R·萨特奇-法纳洛

S·斯维尼-拉什 C·德伊世

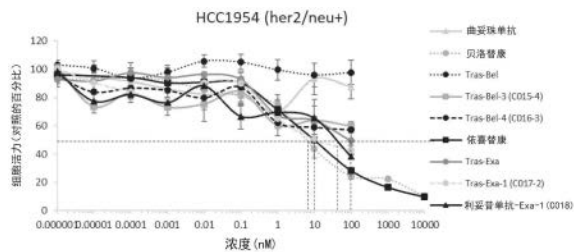
权利要求书9页 说明书31页 附图7页

(54) 发明名称

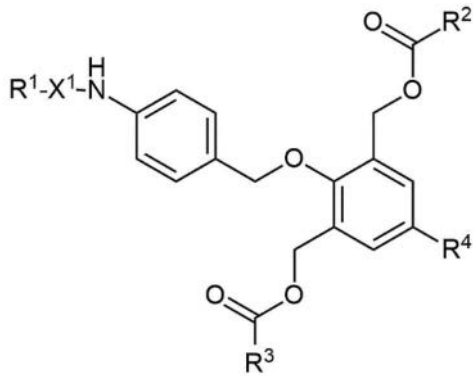
水溶性前药、偶联物及其用途

(57) 摘要

本发明提供前药及其偶联物、用途、试剂盒及其药物组合物。



1. 一种如式 (I) 所示的化合物:



(I)

其中

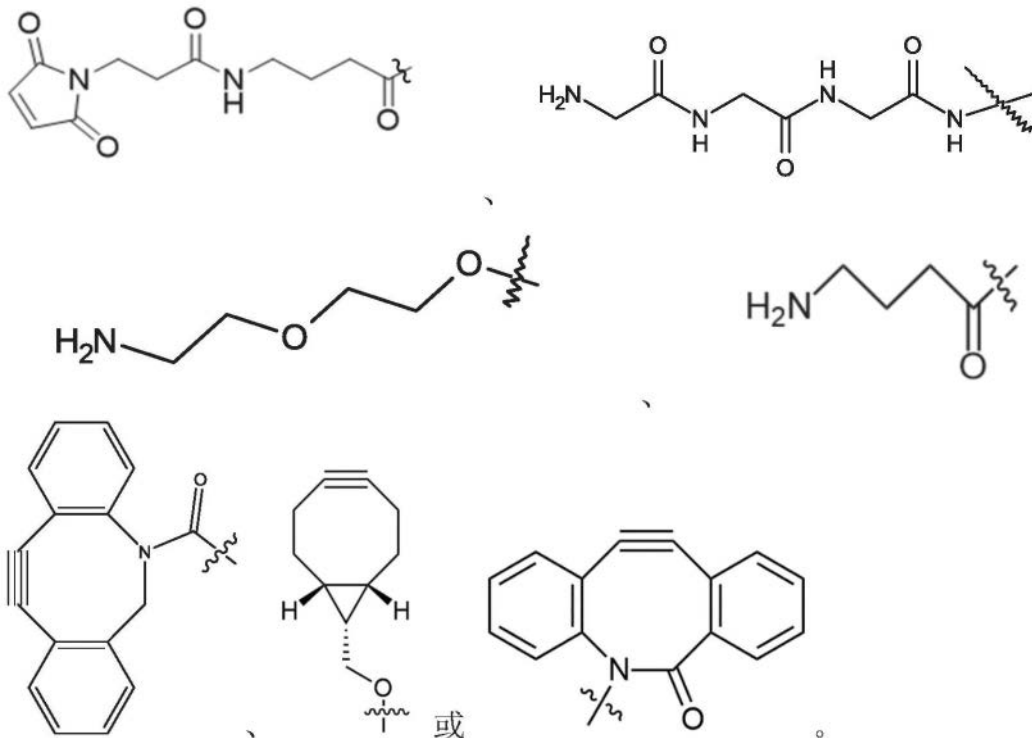
R¹是反应性部分,其包含马来酰亚胺、溴乙酰胺、四嗪、炔烃、胺部分或其任意组合;

R²和R³是相同或不同的活性药物成分部分;

R⁴包含低聚-或聚-羧酸部分或低聚-或聚-乙二醇或低聚-或聚-乙醇或低聚-或聚-乙烯醇或低聚-或聚-甘油部分;和

X¹是单-、二-、三-、四-、低聚-或多肽部分,低聚或聚乙二醇或低聚或聚乙烯醇或低聚-或聚-甘油部分。

2. 如权利要求1所述的化合物,其中,R¹由下式表示



3. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中R²是抗癌剂、免疫刺激剂或免疫抑制剂部分。

4. 如权利要求3所述的化合物,其中R²是依喜替康、贝洛替康、喜树碱、奥瑞他汀、单甲基奥瑞他汀E(MMAE)或多柔比星部分。

5. 如权利要求4所述的化合物,其中R²是依喜替康、奥瑞他汀、单甲基奥瑞他汀E(MMAE)或贝洛替康部分。

6. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中R³是抗癌剂、免疫刺激剂或免疫抑制剂部分。

7. 如权利要求6所述的化合物,其中R³是依喜替康、贝洛替康、喜树碱、奥瑞他汀、单甲基奥瑞他汀E(MMAE)或多柔比星部分。

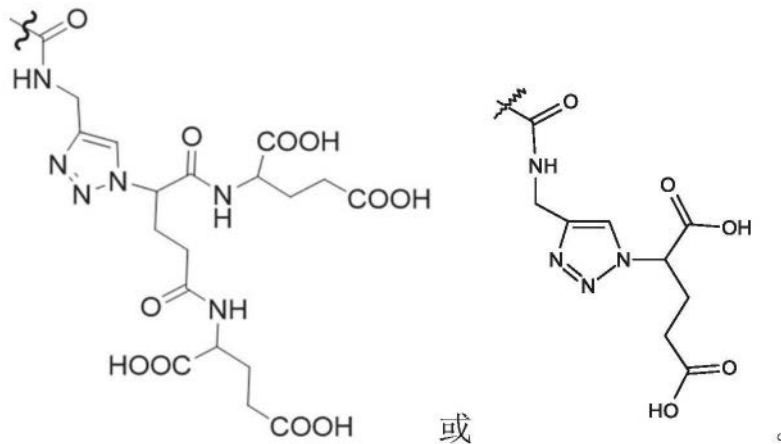
8. 如权利要求7所述的化合物,其中R³是依喜替康、奥瑞他汀、单甲基奥瑞他汀E(MMAE)或贝洛替康部分。

9. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中R²和R³是抗癌剂、免疫刺激剂或免疫抑制剂部分。

10. 如权利要求9所述的化合物,其中R²和R³各自独立地是依喜替康、贝洛替康、喜树碱、奥瑞他汀、单甲基奥瑞他汀E(MMAE)或多柔比星部分。

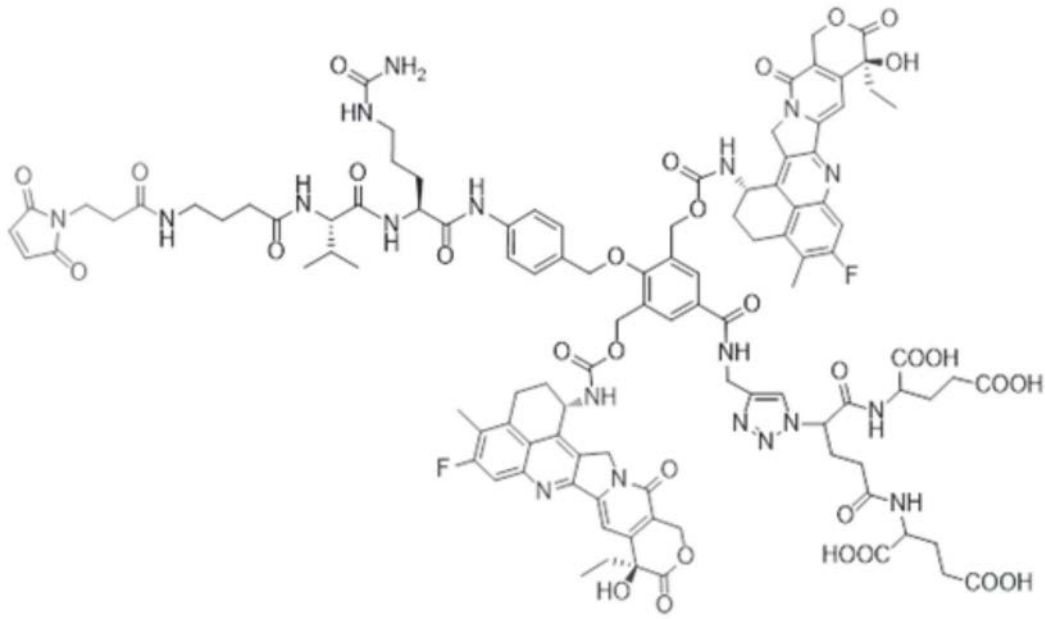
11. 如权利要求10所述的化合物,其中R²和R³是依喜替康、奥瑞他汀或贝洛替康部分。

12. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中R⁴由下式表示:

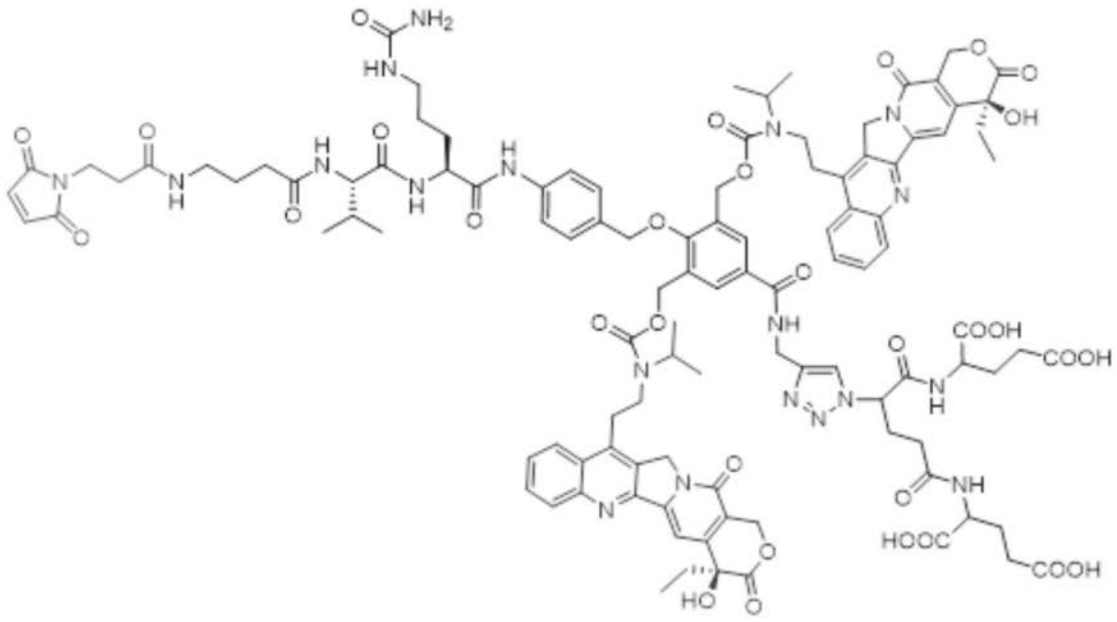


13. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中X¹是-Val-Cit-、-Ala-Ala-、AAN、GGFG、-Val-Ala-或-Val-Arg-。

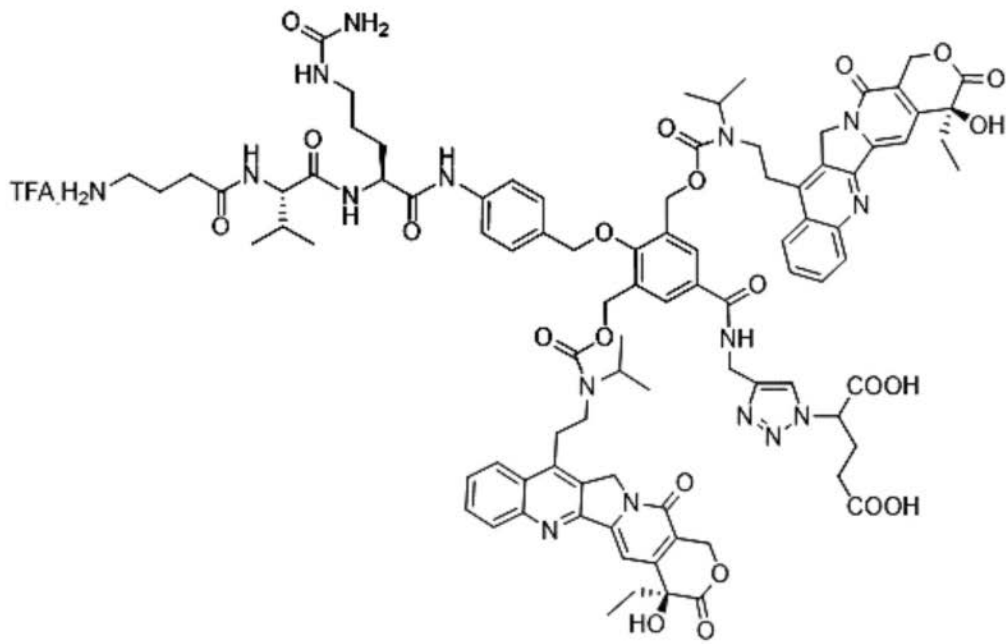
14. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,由式1、17、18、19或20的结构所示:



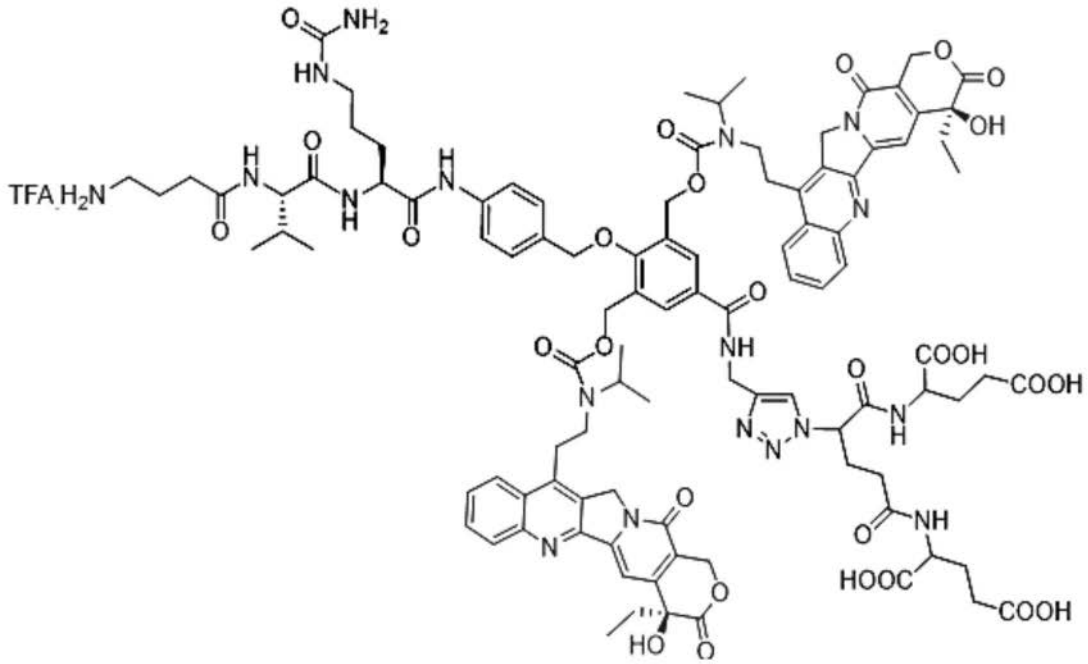
1 ;



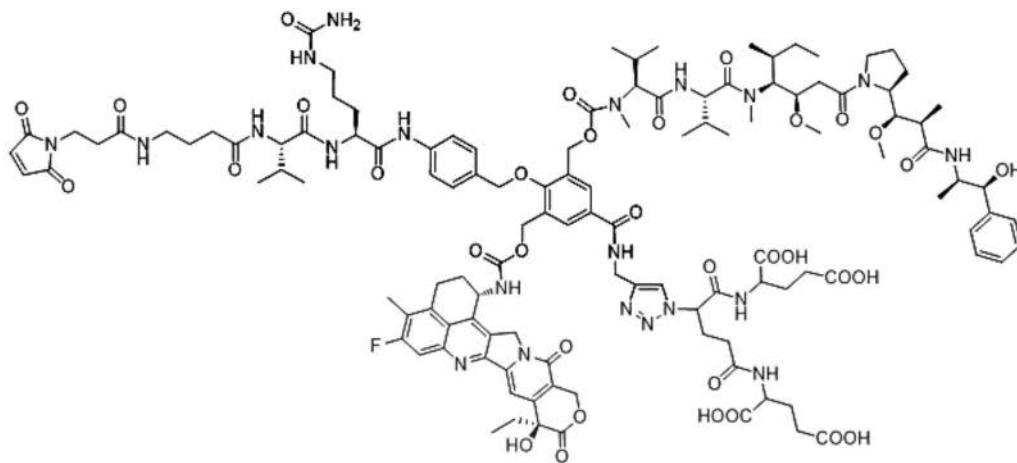
17;



18;



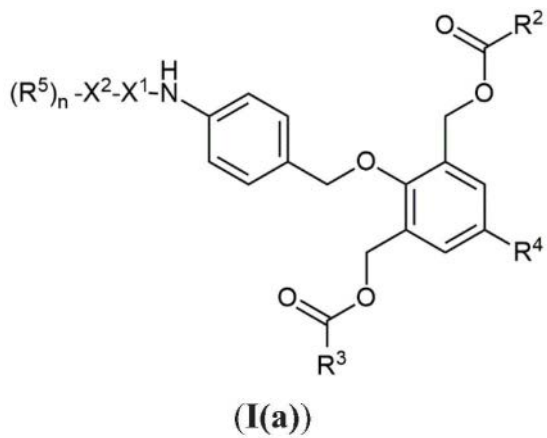
19; 或



20,

其中TFA是三氟乙酸。

15. 一种如式 (I(a)) 所示的偶联物:



其中

R^2 和 R^3 是相同或不同的活性药物成分部分；

R^4 包括低聚-或聚-羧酸部分或低聚-或聚-乙二醇或低聚-或聚-乙醇或低聚-或聚-乙醇或低聚-或聚-甘油部分；

R^5 是抗体或抗原部分；

X^1 是单-、二-、三-、四-、低聚-或多肽部分、低聚或聚乙二醇或低聚或聚乙烯醇或低聚-或聚-甘油部分；

X^2 是接头,所述接头包括琥珀酰亚胺、乙酰胺、二氢吡嗪、烯炔或胺部分或其任意组合；以及

n 是0.01-10之间的数字。

16. 如权利要求15所述的偶联物,其中 R^2 是抗癌剂、免疫刺激剂或免疫抑制剂部分。

17. 如权利要求16所述的偶联物,其中 R^2 是依喜替康、贝洛替康、喜树碱、奥瑞他汀、单甲基奥瑞他汀E (MMAE) 或多柔比星部分。

18. 如权利要求17所述的偶联物,其中 R^2 是依喜替康、奥瑞他汀、单甲基奥瑞他汀E (MMAE) 或贝洛替康部分。

19. 如权利要求15-18中任一项所述的偶联物,其中 R^3 抗癌剂、免疫刺激剂或免疫抑制剂部分。

20. 如权利要求19所述的偶联物,其中 R^3 是依喜替康、贝洛替康、喜树碱、奥瑞他汀、单甲基奥瑞他汀E (MMAE) 或多柔比星部分。

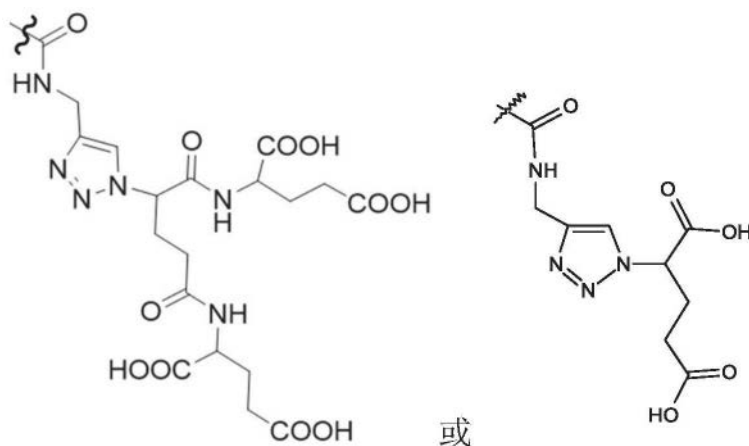
21. 如权利要求20所述的偶联物,其中 R^3 是依喜替康、奥瑞他汀、单甲基奥瑞他汀E (MMAE) 或贝洛替康部分。

22. 如权利要求15-21中任一项所述的偶联物,其中 R^2 和 R^3 是抗癌剂、免疫刺激剂或免疫抑制剂部分。

23. 如权利要求22所述的偶联物,其中 R^2 和 R^3 各自独立地是依喜替康、贝洛替康、喜树碱、奥瑞他汀、单甲基奥瑞他汀E (MMAE) 或多柔比星部分。

24. 如权利要求23所述的偶联物,其中 R^2 和 R^3 是依喜替康、奥瑞他汀、单甲基奥瑞他汀E (MMAE) 或贝洛替康部分。

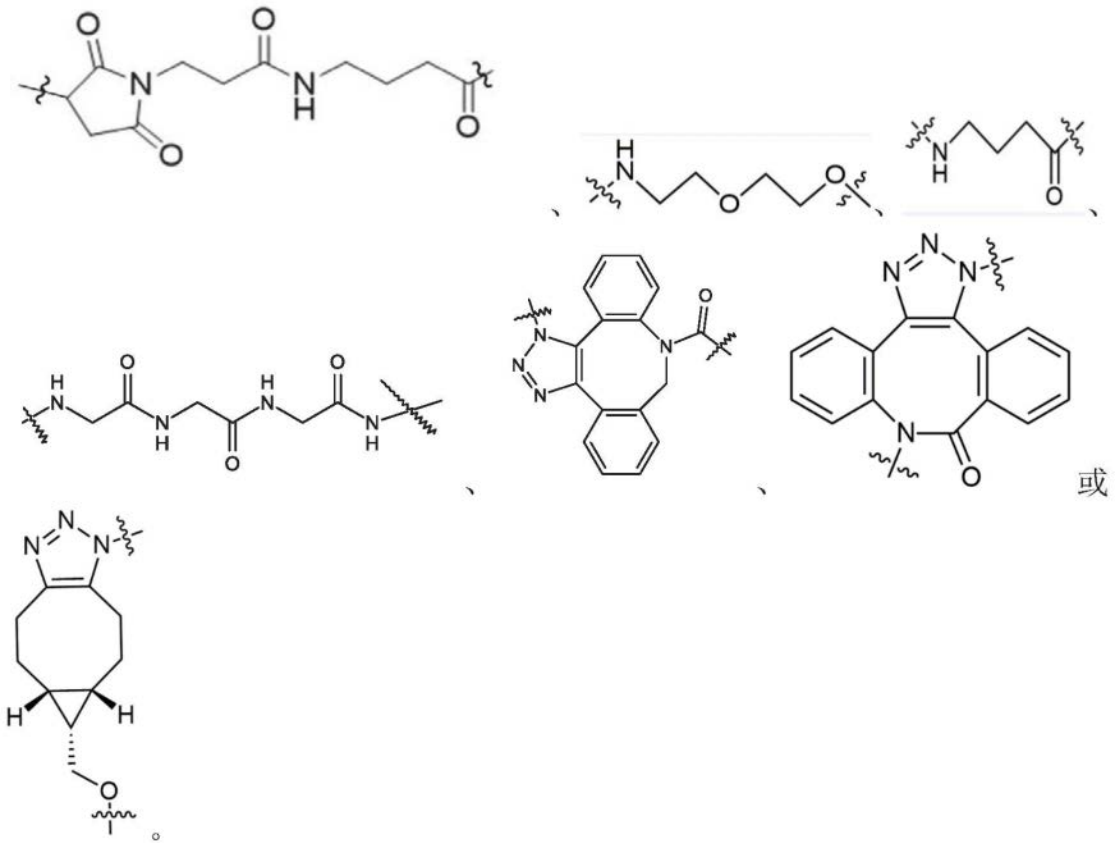
25. 如权利要求15-24中任一项所述的偶联物,其中 R^4 由下式表示:



26. 如权利要求15-25中任一项所述的偶联物,其中 X^1 是-Val-Cit-、-Ala-Ala-、AAN、

GGFG、-Val-Ala-或-Val-Arg-。

27. 如权利要求15-26中任一项所述的偶联物,其中 X^2 由下式表示:

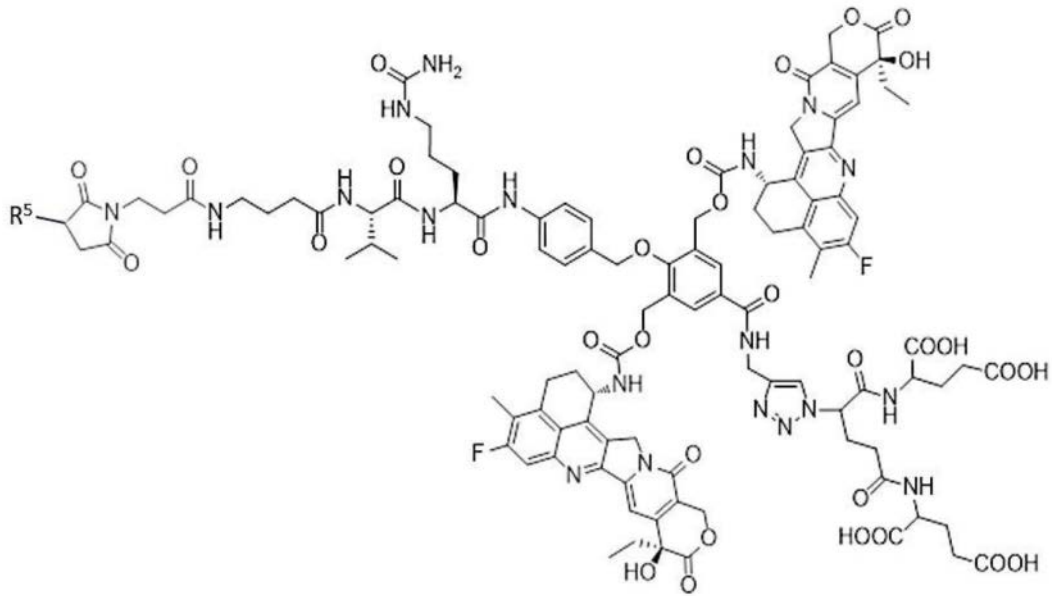


28. 如权利要求15-27中任一项所述的偶联物,其中 R^5 是抗-EGFR或抗-CD33抗体。

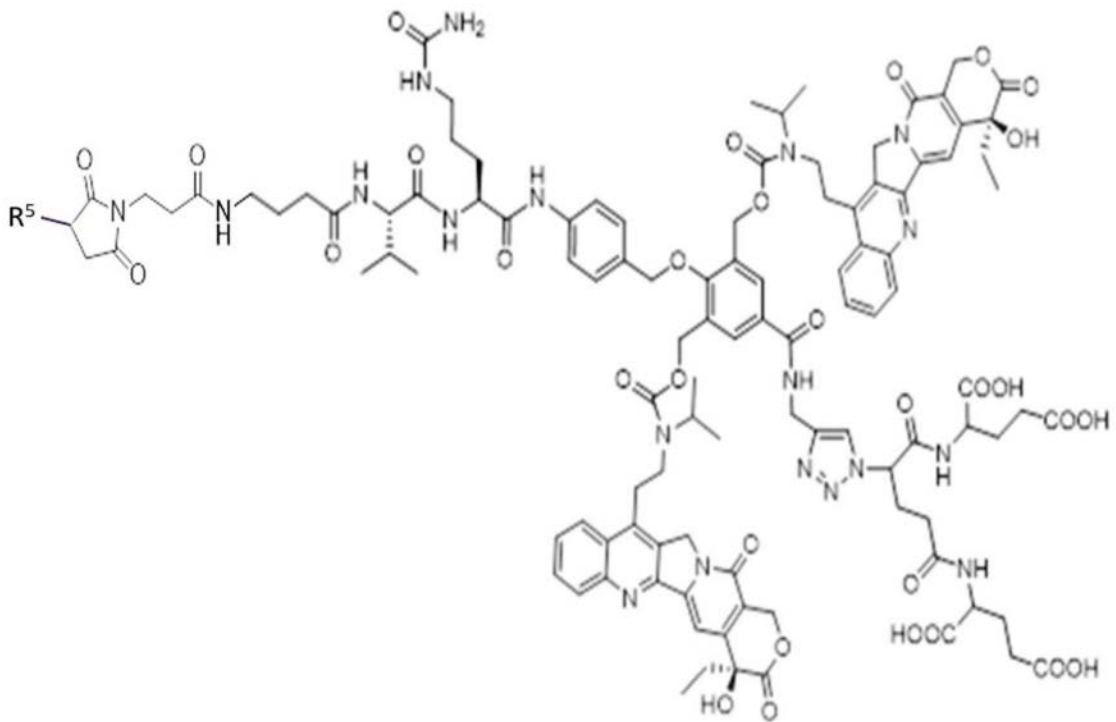
29. 如权利要求15-28中任一项所述的偶联物,其中 R^5 是曲妥珠单抗或利妥昔单抗或CGKRK部分。

30. 如权利要求29所述的偶联物,其中 R^5 是曲妥珠单抗部分。

31. 如权利要求15-30中任一项所述的偶联物,其由1(a)或2(a)的结构所示:



1(a) ; 或

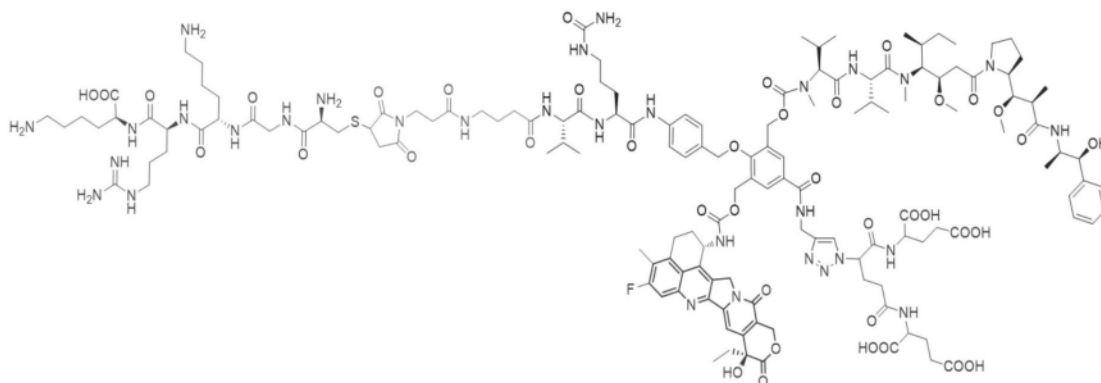


2(a)。

32. 如权利要求31所述的偶联物,其中R5是曲妥珠单抗或利妥昔单抗部分。

33. 如权利要求32所述的偶联物,其中R5是曲妥珠单抗部分。

34. 如权利要求15-29中任一项所述的偶联物,其由化合物21的结构所示:



35. 如权利要求15-34中任一项所述的偶联物,其中药物/抗体比(DAR)为0.5至200。

36. 如权利要求15-35中任一项所述的偶联物,其中n范围在0.1-1之间。

37. 如权利要求1-14中任一项所述的化合物,或权利要求15-36中任一项所述的偶联物用于治疗癌症。

38. 如权利要求37所述的化合物或偶联物,其中,所述癌是乳腺癌、肾癌、脑癌、皮肤癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌、结肠癌、头/颈癌、前列腺癌、子宫内膜癌、肝癌、血癌、胃癌、纤维肉瘤、骨肿瘤、骨肉瘤或十二指肠癌。

39. 一种试剂盒,其包含:

- i) 权利要求1-14中任一项所述的化合物;和
- ii) 抗体或抗原。

水溶性前药、偶联物及其用途

技术领域

[0001] 本发明提供前药及其偶联物、用途、试剂盒及其药物组合物。

背景技术

[0002] 使用小分子或生物制剂的靶向治疗在过去十年中获得了更多关注。一类特殊的靶向治疗是ADC (抗体药物偶联物)。抗体药物偶联物 (ADC) 提供了一个独特的机会,通过利用抗体的特异性将强效药物靶向递送至特定组织,从而提高剧毒药物的安全性。ADC的成功很大程度上归功于抗体和治疗有效载荷之间的连接设计方面的技术进步。

为了使ADC具有选择性和效力,所采用的接头技术应努力实现三个关键特性:

- (1) 循环稳定性高。
- (2) 高水溶性,有助于生物偶联并避免形成无活性的ADC聚集体。
- (3) 高效释放高细胞毒性的有效载荷-接头代谢物。

[0003] 尽管由于其适用范围,可裂解接头通常优于不可裂解接头,但在循环中存在更大的不稳定可能性。因此,可裂解接头的成功取决于它们有效区分循环条件和靶细胞条件的能力。大型IgG抗体的肿瘤渗透性差,加上任何内化、胞内运输和药物释放效率低下,导致需要强大的可裂解接头方法,以最大限度地向癌细胞递送有效的细胞毒素。

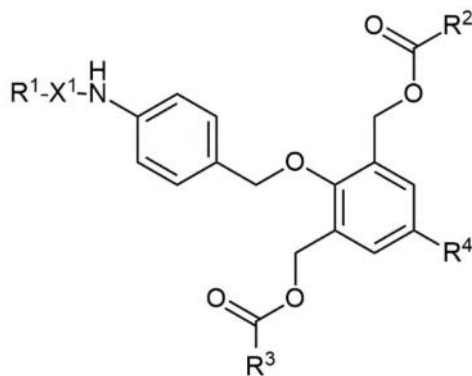
[0004] 因此,ADC接头的稳定性不仅由可切割接头技术决定,而且还由抗体上的附着位点决定。与大抗体的偶联使得接头的化学和酶促可及性更低,从而提高血浆稳定性并减慢靶细胞释放速率。

[0005] 当采用位点选择性生物偶联技术将接头-有效载荷附接至溶剂可及性较低的位点时,该效应可以进一步放大。

[0006] 尽管围绕偶联技术以及裂解机制进行了大量的工作,但是尚未很好地探索每个裂解位点添加多于一种药物。考虑到低效药物需要更高的DAR (药物抗体比率),鉴定这样的模块将是有益的,因为它可能允许每个裂解步骤释放更多的药物。

发明内容

[0007] 在一个实施方式中,本发明提供了式 (I) 所示的化合物:



(I)

其中

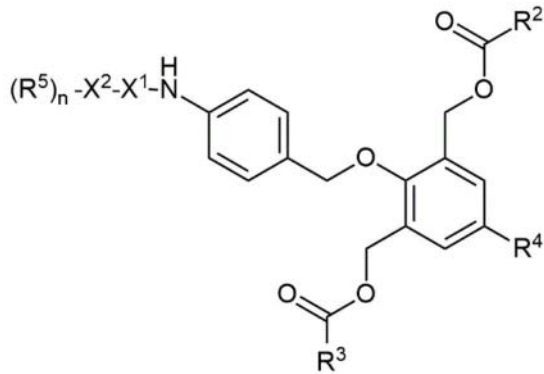
R^1 是反应性部分；

R^2 和 R^3 是相同或不同的活性药物成分部分；

R^4 是亲水部分；且

X^1 是单-、二-、三-、四-、低聚-或多肽部分、低聚或聚乙二醇或低聚或聚乙烯醇或低聚-或聚-甘油部分。

[0008] 在又一个实施方式中,本发明提供了式(I(a))所示的偶联物:



(I(a))

其中

R^2 和 R^3 是相同或不同的活性药物成分部分；

R^4 是亲水部分；

R^5 是抗体或抗原部分；

X^1 是单-、二-、三-、四-、低聚-或多肽部分、低聚或聚乙二醇或低聚或聚乙烯醇或低聚-或聚-甘油部分；

X^2 是接头；且

n 是0.01-10之间的数字。

[0009] 在又一个实施方式中,本发明提供了如本文以上所述的化合物或偶联物,用于治疗癌症。

[0010] 在又一个实施方式中,本发明提供了一种试剂盒,其包含:

i) 如本文以上所述的化合物;以及

ii) 抗体或抗原。

附图简要说明

[0011] 本发明的主题在说明书的结论部分中特别指出并明确要求保护。然而,本发明的组织和操作方法以及其目的、特征和优点可以通过在结合附图阅读时参考以下详细描述来最好地理解,其中:

[0012] 图1A-1D描述了本发明的偶联物在多种细胞活力试验上的细胞毒性作用(暴露时间:5天)。图1A:用系列稀释的偶联物处理120小时(5天)后的HCC1954细胞活力;图1B:用系列稀释的偶联物处理120小时(5天)后的MDA-MB-231细胞活力;图1C:总结HCC1954细胞中不同处理的 IC_{50} 值的表格;图1D:总结MDA-MB-231细胞中不同处理的 IC_{50} 值的表格。在图1A-1D中,数据代表平均值 \pm SD;代表2个单独的实验。

[0013] 图2A-2D描述了本发明的偶联物在多种细胞活力试验上的细胞毒性作用(暴露时间:6天)。图2A:HCC1954的活力;图2B:JIMT-1的活力;和图2C:用系列稀释的曲妥珠单抗、依喜替康或Tras-Exa-1处理144小时(6天)后MDA-MB-468细胞的活力;和图2D:总结不同处理的IC₅₀值的表,其中前两行是IC₅₀值,“Tras-Exa/Exa倍数变化”是Tras-Exa除以exa值,和“-”、“+”和“++”表示文献中发现的her2水平——分别为未检测到、低水平和高水平(相对水平,如,例如,Yang,L.;Li,Y.;Bhattacharya,A.;Zhang,Y.S.靶向HER2的重组人蛋白克服了HER2阳性乳腺癌的耐药性(A recombinant human protein targeting HER2 overcomes drug resistance in HER2-positive breast cancer.)Sci.Transl.Med.2019,11,11)。在图2A-2D中,数据代表平均值±SD;代表3个单独的实验。

[0014] 图3A-3D显示了基于曲妥珠单抗的ADC导致肿瘤生长的剂量依赖性抑制。图3A-3C:以三种浓度(n=9只小鼠/组):10mg/kg(3A);3mg/kg(3B)和1mg/kg(3C),单次静脉内注射基于曲妥珠单抗的ADC后HCC1954肿瘤的生长曲线。图3D:体重变化,表示为自肿瘤细胞接种之日起的百分比变化。数据表示为平均值±s.e.m.。

[0015] 图4A-4D显示了基于曲妥珠单抗的ADC以剂量依赖性方式延长小鼠的存活。图4A-4C:以三种浓度(n=9只小鼠/组):10mg/kg(4A);3mg/kg(4B)和1mg/kg(4C),用单次注射基于曲妥珠单抗的ADC静脉内注射治疗的HCC1954荷瘤SCID小鼠的Kaplan-Meier总生存曲线。图4D:中位生存期和个体死亡时间点。虚线标记了预先定义的研究终点(第152天)。

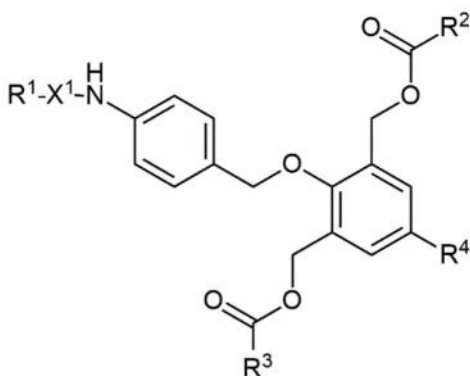
[0016] 应理解,为了说明的简单和清晰起见,图中说明的元件不一定按比例绘制。例如,为了清楚起见,一些元件的尺寸可能相对于其他元件被夸大了。此外,在认为适当的情况下,附图中的参考标记可以重复以指示相应或类似的元件。

发明详述

[0017] 在下面的具体说明中,阐述了许多具体细节以便提供对本发明的透彻理解。然而,本领域的技术人员将理解,可以在没有这些具体细节的情况下实践本发明。在其他情况中,未详细描述众所周知的方法、过程和组分,以免模糊本发明。

前药

[0018] 在一种实施方式中,本发明提供了式(I)所示的化合物:



(I)

其中

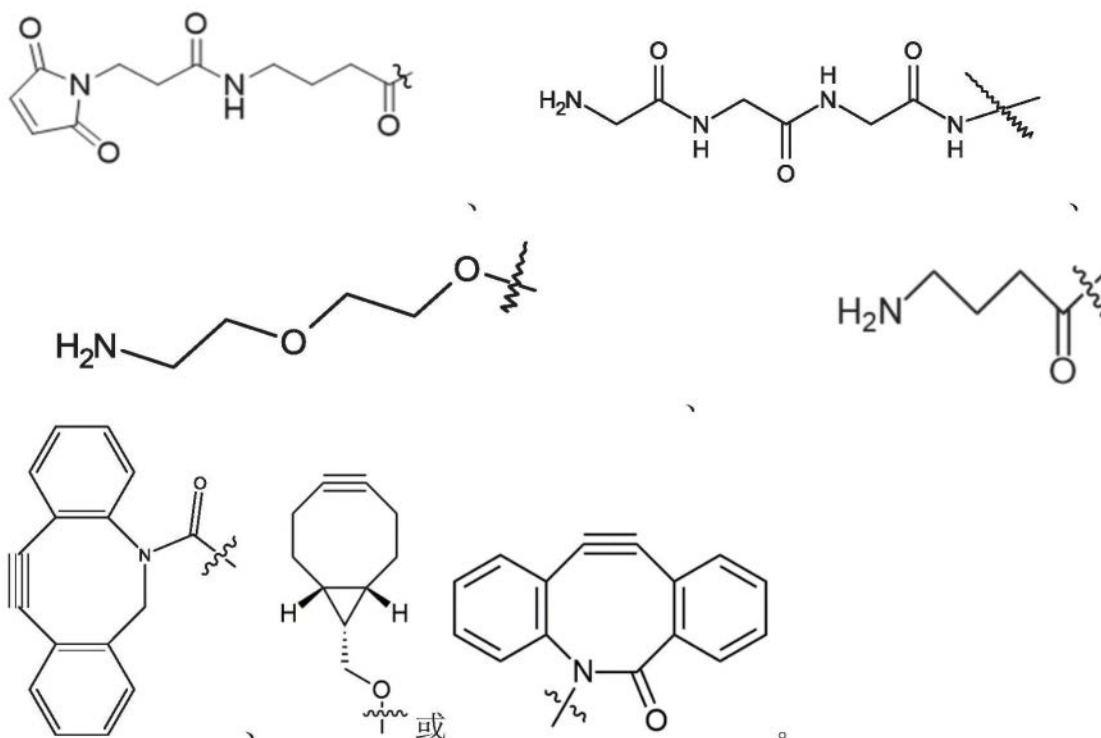
R^1 是反应性部分;

R^2 和 R^3 是相同或不同的活性药物成分部分;

R^4 是亲水部分;且

X^1 是单-、二-、三-、四-、低聚-或多肽部分,低聚或聚乙二醇或低聚或聚乙烯醇或低聚-或聚-甘油部分。

[0019] 在一个实施方式中, R^1 是反应性部分。在另一实施方式中,在本发明上下文中的“反应性部分”被定义为可含有一个或多个官能团(相同的或不同的)的化学部分(例如亚烷基),其中至少一个这样的官能团能够与抗体或抗原反应或相互作用以使该部分与抗体或抗原偶联。在一些其他实施方式中,来自抗体或抗原的Cys的硫醇或Lys的胺与该部分以1,4(迈克尔)加成反应。在另一个实施方式中, R^1 包括二氢吡嗪马来酰亚胺、溴乙酰胺、四嗪、炔烃或胺部分或其任意组合。在另一个实施方式中, R^1 包括炔烃部分。在另一个实施方式中, R^1 包括受约束的炔烃部分。在另一个实施方式中, R^1 包括环炔烃部分。在另一个实施方式中,环辛炔部分的非限制性实例包括二苯并环辛炔(DBCO)、双环[6.1.0]壬炔(BCN)和二芳基氮杂环辛炔(BARAC)部分。在另一实施方式中, R^1 由下式表示:



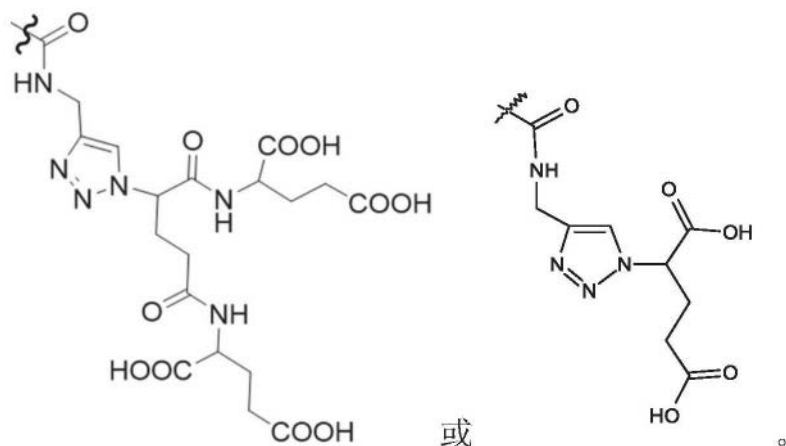
[0020] 在一个实施方式中,式(I)的 R^2 是抗癌剂、免疫刺激剂(用于免疫-肿瘤)或免疫抑制剂(例如用于免疫的类固醇)。在另一个实施方式中, R^2 是用于免疫学、免疫肿瘤学、治疗癌症相关疾病和/或病症或治疗免疫系统缺陷/功能障碍的药剂。在其他实施方式中,与癌症和/或免疫系统缺陷/功能障碍相关/相关联的病况/病症包括以下非限制性实例中的至少一种:自身免疫性疾病、关节炎、异位性皮炎、克罗恩病、结肠炎、IBD、纤维化、银屑病、狼疮、多发性硬化症、神经退行性疾病(帕金森病、阿尔兹海默症、ALS、重症肌无力、格雷夫斯氏病、强直性脊柱炎)和呼吸系统疾病(COPD、哮喘)。在另一个实施方式中, R^2 是依喜替康、贝洛替康、喜树碱、奥瑞他汀、单甲基奥瑞他汀E(MMAE)或多柔比星部分。在另一个实施方式中, R^2 是依喜替康、奥瑞他汀或贝洛替康。

[0021] 在一个实施方式中,式(I)的 R^3 是抗癌剂、免疫刺激剂(用于免疫-肿瘤)或免疫抑制剂(例如用于免疫的类固醇)。在另一个实施方式中, R^3 是用于免疫学、免疫肿瘤学、治疗

癌症相关疾病和/或病症或治疗免疫系统缺陷/功能障碍的药剂。在其他实施方式中,与癌症和/或免疫系统缺陷/功能障碍相关/相关联的病况/病症包括以下非限制性实例中的至少一种:自身免疫性疾病、关节炎、异位性皮炎、克罗恩病、结肠炎、IBD、纤维化、银屑病、狼疮、多发性硬化症、神经退行性疾病(帕金森病、阿尔兹海默症、ALS、重症肌无力、格雷夫斯氏病、强直性脊柱炎)和呼吸系统疾病(COPD、哮喘)。在另一个实施方式中, R^3 是依喜替康、贝洛替康、喜树碱、奥瑞他汀、单甲基奥瑞他汀E(MMAE)或多柔比星部分。在另一个实施方式中, R^3 是依喜替康、奥瑞他汀、单甲基奥瑞他汀E(MMAE)或贝洛替康。

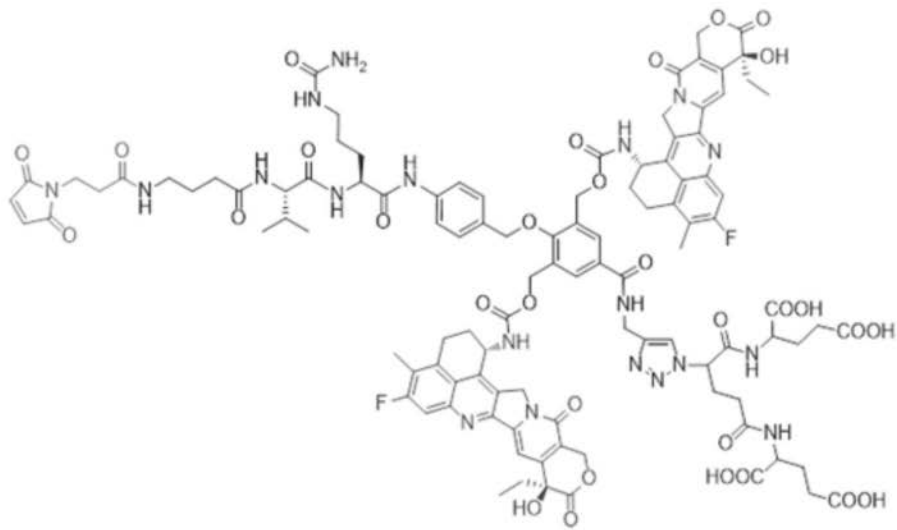
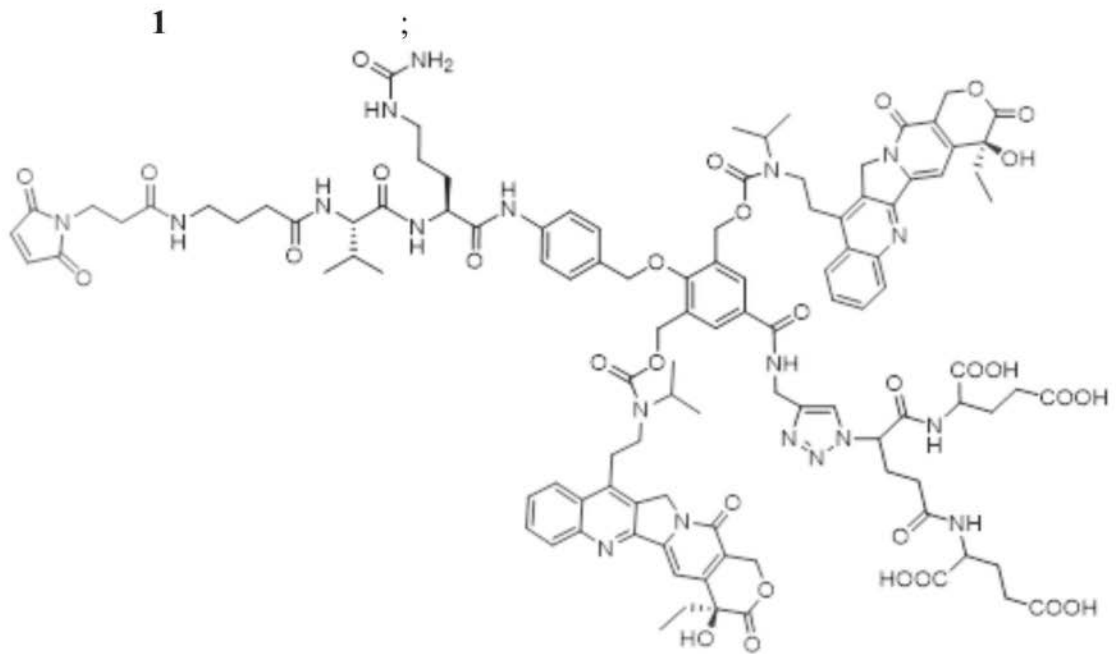
[0022] 在一个实施方式中,式(I)的 R^2 和 R^3 是抗癌剂、免疫刺激剂(用于免疫-肿瘤)或免疫抑制剂(例如类固醇),或是用于免疫学、免疫肿瘤学、治疗癌症相关疾病和/或病症或治疗免疫系统缺陷/功能障碍的药剂,其中所述与癌症和/或免疫系统缺陷/功能障碍相关/相关联的病况/病症如上文所述(参见 R^2 和/或 R^3 实施方式)。在一个实施方式中, R^2 和 R^3 各自独立地是依喜替康、贝洛替康、奥瑞他汀、单甲基奥瑞他汀E(MMAE)喜树碱或多柔比星部分。在另一个实施方式中, R^2 和 R^3 各自独立地是依喜替康、奥瑞他汀、单甲基奥瑞他汀E(MMAE)或贝洛替康部分。在另一个实施方式中, R^2 和 R^3 各自独立地是依喜替康部分。在另一个实施方式中, R^2 和 R^3 是贝洛替康部分。

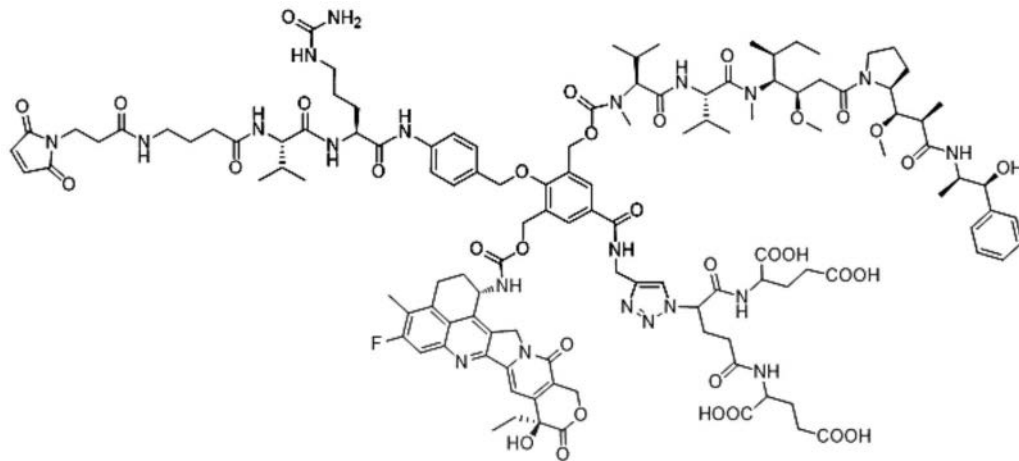
[0023] 在一个实施方式中,式(I)的 R^4 包含低聚-或聚-羧酸部分或低聚-或聚-乙二醇或低聚-或聚-乙醇或低聚-或聚-乙烯醇或低聚-或聚-甘油部分。在另一个实施方式中, R^4 由下式表示:



在一个实施方式中,式(I)的 X^1 是单-、二-、三-、四-、低聚-或多肽部分或低聚-或聚-乙二醇或低聚-或聚-乙烯醇或低聚-或聚-甘油部分。在另一个实施方式中, X^1 是单-、二-、三-、四-、低聚-或多肽,其包含任何氨基酸:天然的、非天然的(人造的)、标准的或非标准的、或其组合,以任何顺序/序列。在一个其他实施方式中, X^1 是CGKRRK、-Val-Cit-、-Ala-Ala-、-AAN、GGFG、-Val-Arg-或-Val-Ala-或其任意组合。在一个其他实施方式中, X^1 是-Val-Cit-、-Ala-Ala-、-AAN、GGFG、-Val-Arg-或-Val-Ala-或其任意组合。在另一个实施方式中, X^1 包含可被特定蛋白酶裂解的序列(例如Ala-Ala),非限制性实例包括组织蛋白酶B和豆荚蛋白(Legumain)。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0024] 在一个实施方式中,式(I)化合物由式1、17、18、19或20的结构表示:

**1****17;**



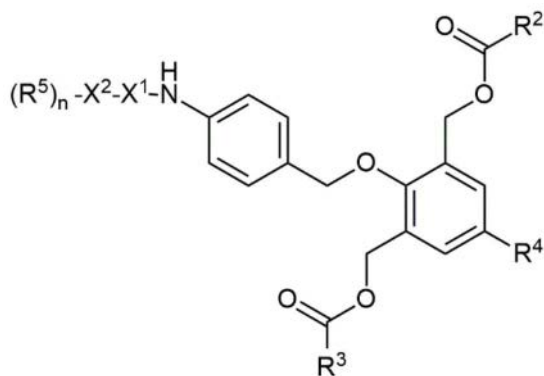
20.

其中TFA是三氟乙酸。

[0025] 在一些实施方式中,式(I)化合物是前药,其通过 R^1 与抗体或抗原偶联, R^1 与抗体或抗原的相关部分(moiety)/部分(portion)/官能团/氨基酸反应和/或相互作用,其中所述反应的产物是本文下文中呈现的偶联物,例如由式(I(a))、1(a)、2(a)和/或化合物21表示。在一个具体实施方式中,抗体或抗原的赖氨酸或半胱氨酸通过迈克尔加成与作为马来酰亚胺部分的 R^1 反应。在一个进一步的实施方式中, R^1 与人工氨基酸(例如叠氮基-酪氨酸)或与炔烃反应形成所述偶联物。在另一个实施方式中,抗体/抗原与式(I)的化合物反应,然后其与所述化合物的一些部分(例如某些肽识别基序/触发物)相互作用,这种相互作用可能触发化合物释放共价负载药物。在一个实施方式中,所述抗体是曲妥珠单抗或利妥昔单抗。

前药和抗体或抗原的偶联物

[0026] 在一个实施方式中,本发明提供了式(I(a))所示的偶联物:



(I(a))

其中

R^5 是抗体或抗原部分;

X^2 是接头;

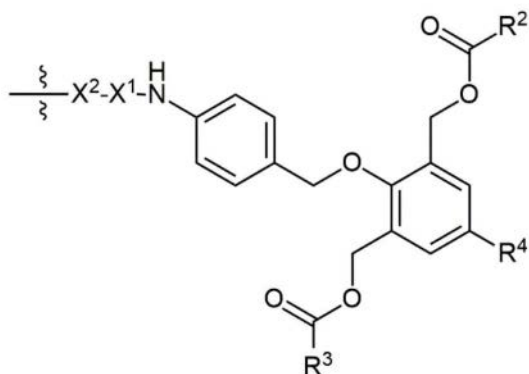
n 是0.01-10之间的数字;

以及

R^2 - R^4 和 X^1 如上所述。

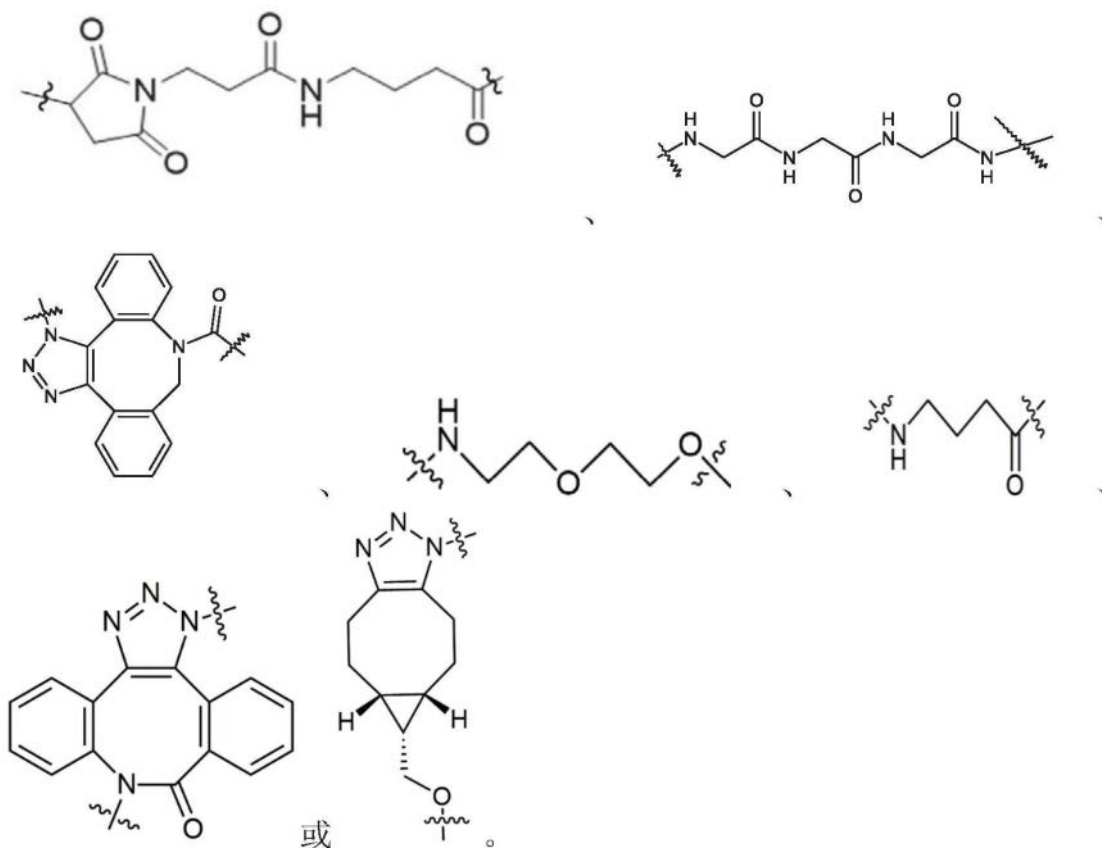
[0027] 在一个实施方式中,本发明提供了由式(I(a))表示的偶联物,其通过使式(I)的前药或化合物与抗体或抗原反应而制备,其中式的所有定义和结构如上文和/或以下所述。

[0028] 在一些实施方式中,抗原/抗体部分(R^5)与式(I(a))的其余部分之间的键可以是共价的或非共价的。术语“非共价键”在本发明的含义内是指任何非共价相互作用/键,例如范德华/相互作用/伦敦色散力、氢键合、卤素键合、 π - π 相互作用、离子键合(例如 R^5 的抗体或抗原与 X^1 的肽部分之间的盐桥)等,如本领域已知的。在一些实施方式中, R^5 在其多于一个位置处以相同或不同的相互作用/键在各个位置连接至式(I(a))的其余部分。在一个具体的实施方式中, R^5 与式(I(a))其余部分的一种或多种化合物共价连接,并且还在与共价连接点相比的不同位置与一种或多种这样的化合物非共价连接/相互作用。在一个实施方式中,“式(I(a))的其余部分”是指



其中卷曲键表示与 R^5 的键(未呈现)。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

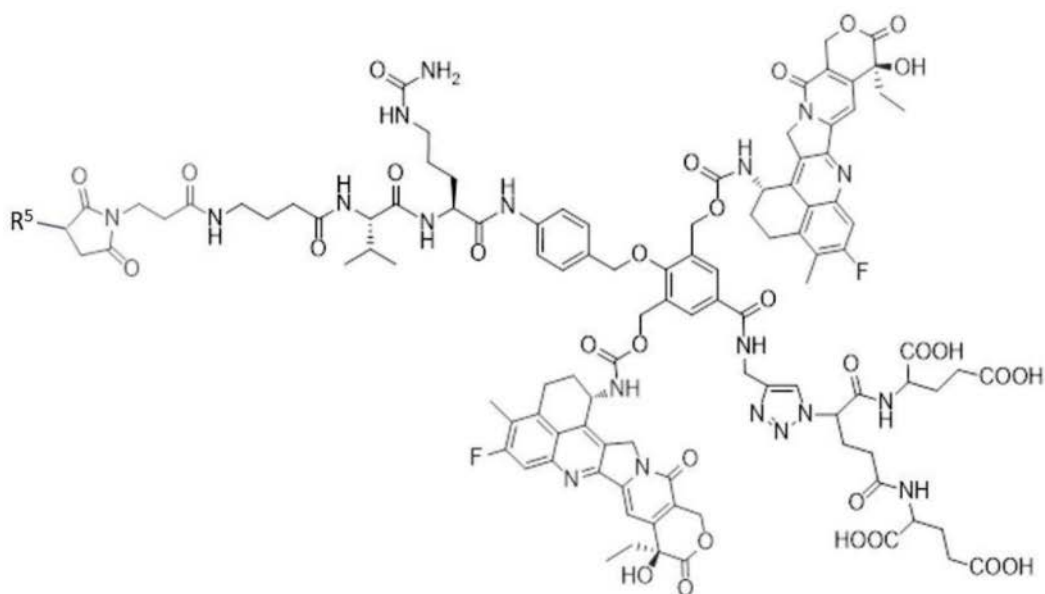
[0029] 在一个实施方式中,式(I(a))的 X^2 包括琥珀酰亚胺、乙酰胺、二氢吡嗪、烯炔或胺部分或其任意组合。在另一个实施方式中, X^2 包括烯炔部分。在另一个实施方式中, X^2 包括受约束的烯炔部分。在另一个实施方式中, X^2 由下式表示



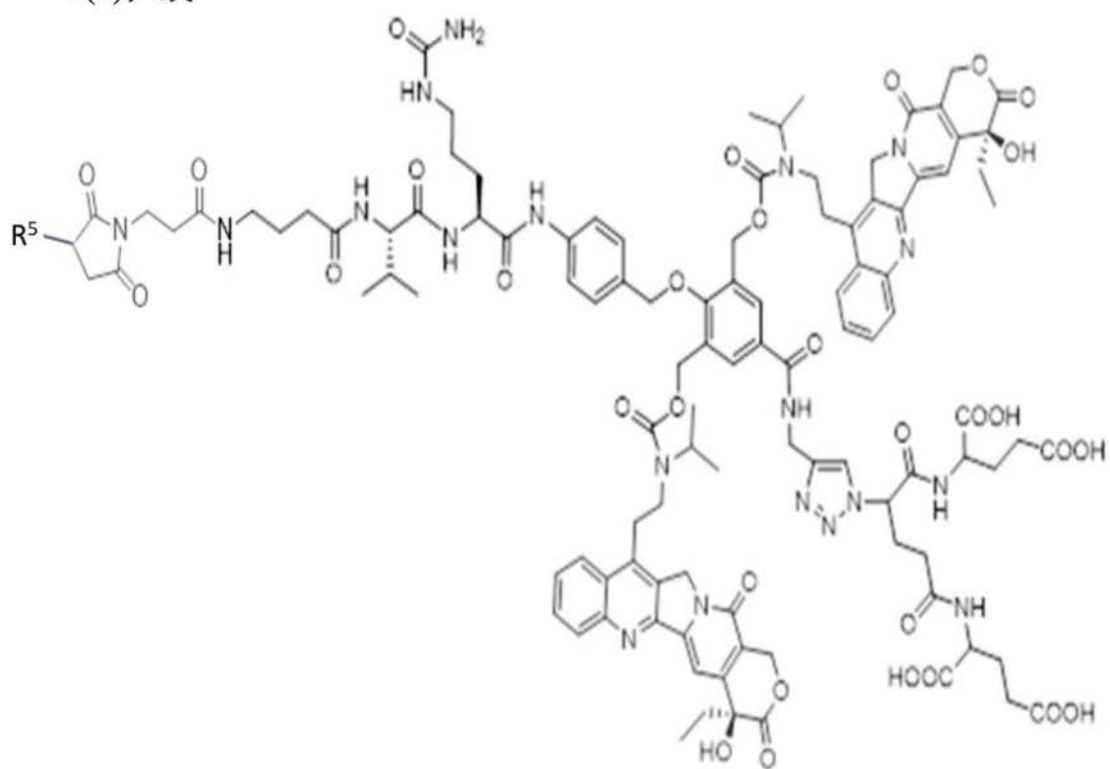
[0030] 在一些实施方式中,n范围在0.01-10之间。在一个实施方式中,n范围在0.01-1之间。在另一个实施方式中,n范围在0.01-2之间。在另一个实施方式中,n范围在0.01-5之间。在另一个实施方式中,n范围在0.05-1之间。在另一个实施方式中,n范围在0.05-2之间。在另一个实施方式中,n范围在0.1-1之间。在另一个实施方式中,n范围在0.1-2之间。在另一个实施方式中,n范围在0.5-1之间。在另一个实施方式中,n范围在0.01-0.5之间。在另一个实施方式中,n范围在0.1-0.5之间。在另一个实施方式中,n范围在0.5-2之间。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0031] 在一个实施方式,式(I(a))的 R^5 是抗体或抗原。在另一个实施方式中, R^5 是靶向肿瘤的抗体。在另一个实施方式中, R^5 是免疫细胞特异性抗原。在其他实施方式中, R^5 是抗-EGFR或抗-CD33抗体。在另一个实施方式中, R^5 的抗体是模型抗体或“模拟”抗体的部分/片段,其中此类模型/部分/片段尤其以CGKRK肽为例。在另一个实施方式中, R^5 是以下中的任一个:CEACAM家族、叶酸受体、ER、PR、Notch受体、Notch配体、PSMA、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、间皮素、MET、EGFR、Erb2、EpCAM、NCAM、肝配蛋白A4、IGF-1R、FAP、Ly6E、钙粘蛋白家族、VEGFR-2、RNF43、MUC家族、PD-1、PD-L1、FAK、CCR2、CCR4、CXCR1、CXCR2、柄蛋白-4、转铁蛋白、TIM-1、LAG-3、Ax1、CTLA-4、4-1BB、MART-1、TIGIT、SLAMF6、OX40、曲妥珠单抗或利妥昔单抗。在另一个实施方式中, R^5 是曲妥珠单抗或利妥昔单抗或CGKRK部分。在另一个实施方式中, R^5 是曲妥珠单抗部分。在另一个实施方式中, R^5 利妥昔单抗部分。在另一个实施方式中, R^5 是CGKRK部分。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0032] 在一个实施方式中,式(I(a))化合物由式1(a)或2(a)的结构表示:



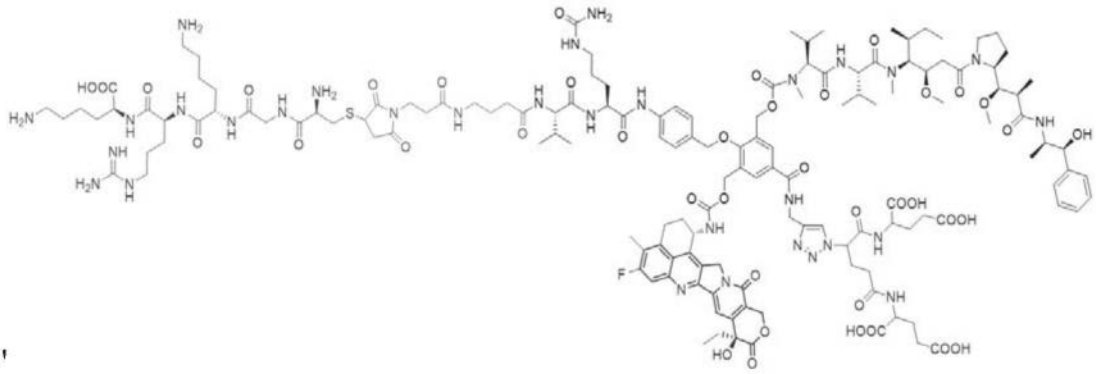
1(a); 或



2(a)。

其中R⁵是如上文所述的。

[0033] 在一个实施方式中,式(I(a))化合物由式21的结构表示:



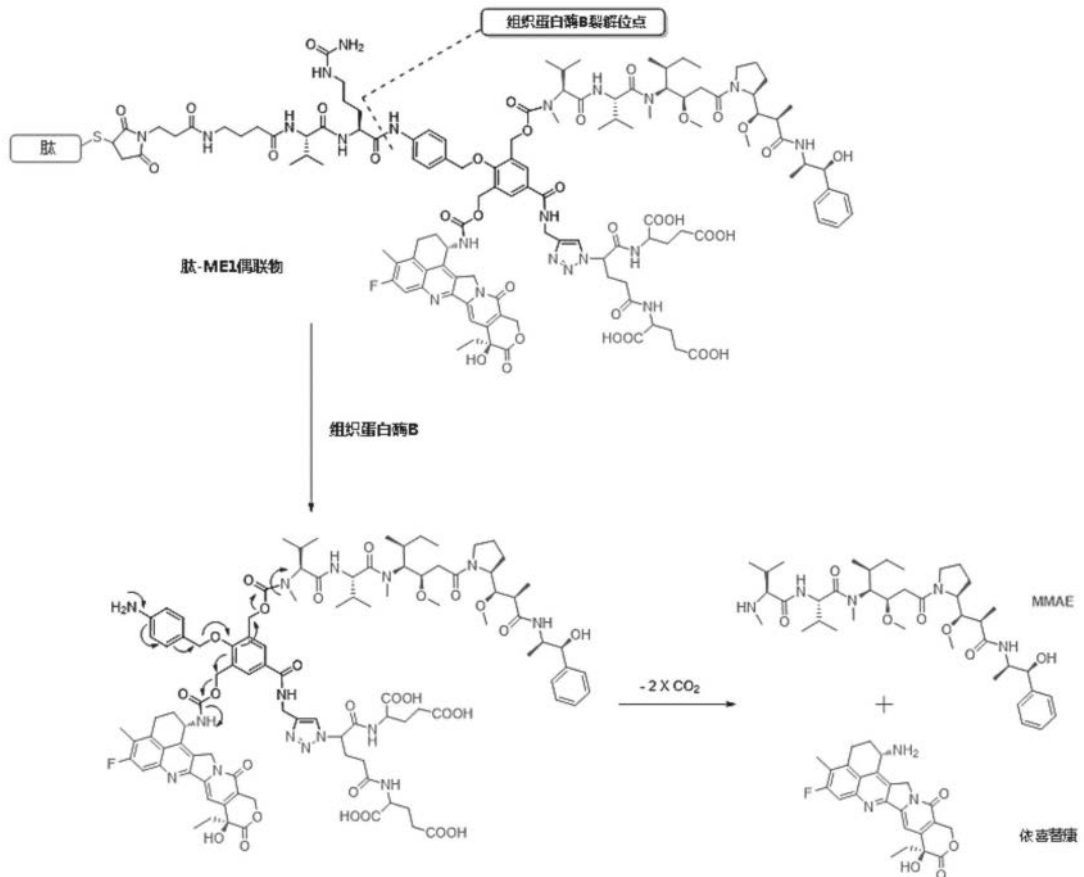
21.

[0034] 在一些实施方式中,由例如式(I)或1、17、18、19或20的结构表示的化合物也称为“前药”并且其可以与抗体或抗原偶联以形成偶联物。在本发明的上下文中,术语“偶联物”可以互换地称为“抗体-药物偶联物”(ADC)。

拟议的释放机制

在一些实施方式中,不受任何机制或理论的束缚,预期药物通过与蛋白酶和/或水解酶和/或其他酶的反应从共价偶联物释放,所述反应随后导致另外的级联反应。在一个实施方式中,所述机制/级联的实例如下所示(组织蛋白酶B是所呈现的蛋白酶):

方案1: 药物释放机制的示例



因此,上述方案中的肽或R⁵的任何其他可行的抗体/抗原提供将偶联物靶向递送至期望的(生物)位点,在该位点中它被一些触发物激活,例如与上述水解酶/蛋白酶的反

应。

包含前药、抗体或抗原和/或其偶联物的药物组合物

[0035] 在一个实施方式中,本发明提供了一种药物组合物,其包含治疗有效量的如上所述的前药或其偶联物和任选的至少一种药学上可接受的运载体、稀释剂、载剂或赋形剂。在其他实施方式中,组合物包含前药和抗体或抗原的组合,以及至少一种药学上可接受的运载体、稀释剂、载剂或赋形剂。在另一个实施方式中,药物组合物是选自片剂(包括例如薄膜包衣片剂)、粉剂、颗粒剂、胶囊剂(包括软胶囊)、口腔崩解片剂、丸剂、粒剂、锭剂、小袋、扁囊剂、贴剂、酏剂、混悬剂、分散剂、乳剂、溶液剂、糖浆剂、气雾剂、软膏剂、软和硬明胶胶囊、栓剂、无菌可注射溶液、无菌包装粉剂和缓释制剂,如本领域公知的。在另一个实施方式中,组合物是固态组合物(例如片剂、丸剂、胶囊、粒剂、颗粒剂、粉剂等)。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0036] 在一些实施方式中,可以在本发明的上下文中使用的药理学上可接受的运载体、稀释剂、载剂或赋形剂,包括但不限于表面活性剂、润滑剂、粘合剂、填充剂、压缩助剂、崩解剂、水溶性聚合物、无机盐、防腐剂、抗氧化剂、着色剂、甜味剂、酸味剂、起泡剂和调味剂。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0037] 在一些实施方式中,本发明内合适的运载体、稀释剂、载剂或赋形剂的具体非限制性实例包括例如乳糖、D-甘露醇、淀粉、玉米淀粉、结晶纤维素、轻质硅酸酐和氧化钛。每种可能性代表本发明的单独实施方式。合适的表面活性剂包括例如卵磷脂和磷脂酰胆碱。每种可能性代表本发明的单独实施方式。合适的润滑剂包括例如硬脂酸镁、蔗糖脂肪酸酯、聚乙二醇、滑石粉和硬脂酸。每种可能性代表本发明的单独实施方式。合适的粘合剂包括例如羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、结晶纤维素、 α -淀粉、聚乙烯吡咯烷酮、阿拉伯树胶粉、明胶、普鲁兰多糖和低取代羟丙基纤维素。每种可能性代表本发明的单独实施方式。合适的崩解剂包括例如交联聚维酮(任何交联1-乙烯基-2-吡咯烷酮均聚物,包括聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)和1-乙烯基-2-吡咯烷酮均聚物)、交联羧甲基纤维素钠、羧甲基纤维素钙、羧甲基淀粉钠、低取代羟丙基纤维素、玉米淀粉等。每种可能性代表本发明的单独实施方式。合适的水溶性聚合物包括例如纤维素衍生物如羟丙基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素和羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、聚乙烯醇、海藻酸钠、瓜尔胶等。每种可能性代表本发明的单独实施方式。合适的无机盐包括例如钠、钾、镁和/或钙的碱性无机盐。每种可能性代表本发明的单独实施方式。具体实施方式包括镁和/或钙的碱性无机盐。钠的碱性无机盐包括例如碳酸钠、碳酸氢钠、磷酸氢二钠等。每种可能性代表本发明的单独实施方式。钾的碱性无机盐包括例如碳酸钾、碳酸氢钾等。每种可能性代表本发明的单独实施方式。镁的碱性无机盐包括例如重质碳酸镁、碳酸镁、氧化镁、氢氧化镁、偏硅酸铝酸镁、硅酸镁、铝酸镁、合成水滑石、氢氧化铝镁等。每种可能性代表本发明的单独实施方式。钙的碱性无机盐包括例如沉淀碳酸钙、氢氧化钙等。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0038] 合适的防腐剂包括例如苯甲酸钠、苯甲酸和山梨酸。每种可能性代表本发明的单独实施方式。合适的抗氧化剂包括例如亚硫酸盐、抗坏血酸和 α -生育酚。每种可能性代表本发明的单独实施方式。合适的着色剂包括例如食用色素如食用色素黄5号、食用色素红2号和食用色素蓝2号等。每种可能性代表本发明的单独实施方式。合适的甜味剂包括例如甘草次酸二钾、阿斯巴甜、甜叶菊和索马甜。每种可能性代表本发明的单独实施方式。合适的酸

味剂包括例如柠檬酸(柠檬酸酐)、酒石酸和苹果酸。每种可能性代表本发明的单独实施方式。合适的起泡剂包括例如碳酸氢钠。合适的调味剂包括合成物质或天然存在的物质,包括例如,柠檬、酸橙、橙子、薄荷醇和草莓。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0039] 在一个实施方式中,本发明的化合物(前药和/或其偶联物)可用于作用于医学治疗的药物。因此,本发明提供了药物组合物,其包含本文公开的前药或其偶联物,或前药与抗体或抗原的组合,以及至少一种药学上可接受的运载体、稀释剂、载剂或赋形剂。本发明的化合物可以安全地口服或非口服给予。给予途径包括但不限于口服、局部、皮下、腹膜内、直肠、静脉内、动脉内、透皮、肌内、局部和鼻内。每种可能性代表本发明的单独实施方式。其他给予途径包括但不限于粘膜、鼻、肠胃外、胃肠、脊柱内、子宫内、眼内、皮内、颅内、气管内、阴道内、脑室内、脑内、眼、颊、硬膜外和舌下。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0040] 在另一个实施方式中,本文描述的药物组合物的片剂和其他固体剂型可以任选地用包衣和壳来储存或制备,例如肠溶衣和本领域熟知的其他包衣。它们也可被配制为,使用例如变化比例的羟丙基甲基纤维素以提供所需的释放特性,其它聚合物基质等,来提供其中的活性成分的缓慢或受控释放。活性成分也可以是微胶囊形式,如果合适,其中具有一种或多种上述赋形剂。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

前药和偶联物的用途

[0041] 在一个实施方式中,本发明提供了一种治疗癌症或相关病症/病况的方法,包括向有需要的对象给予前药(例如式(I)的化合物)、其偶联物(例如式(I(a))的化合物)或前药与抗体或抗原的组合或包含前药/偶联物/组合和至少一种药学上可接受的运载体、稀释剂、载剂或赋形剂的药物组合物的步骤。在另一个实施方式中,本发明提供了一种治疗癌症或相关病症/病况的方法,包括向有需要的对象给予偶联物(例如式(I(a))的化合物)或前药(例如式I的化合物)与抗体或抗原的组合或包含偶联物/组合和至少一种药学上可接受的运载体、稀释剂、载剂或赋形剂的药物组合物的步骤。在其他实施方式中,该方法是免疫学方法。在另一个实施方式中,该方法是免疫肿瘤学方法。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0042] 在一个实施方式中,本发明提供了一种治疗免疫系统缺陷/功能障碍相关联的病况/病症的方法,包括向有需要的对象给予前药(例如式(I)的化合物)、其偶联物(例如式(I(a))的化合物)或前药与抗体或抗原的组合或包含前药/偶联物/组合和至少一种药学上可接受的运载体、稀释剂、载剂或赋形剂的药物组合物的步骤。在另一个实施方式中,本发明提供了一种治疗癌症或相关病症/病况的方法,包括向有需要的对象给予偶联物(例如式(I(a))的化合物)或前药(例如式I的化合物)与抗体或抗原的组合或包含偶联物/组合和至少一种药学上可接受的运载体、稀释剂、载剂或赋形剂的药物组合物的步骤。在其他实施方式中,该方法是免疫学方法。在另一个实施方式中,该方法是免疫肿瘤学方法。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0043] 在其他实施方式中,与癌症和/或免疫系统缺陷/功能障碍相关/相关联的病况/病症包括以下非限制性实例中的至少一种:自身免疫性疾病、关节炎、异位性皮炎、克罗恩病、结肠炎、IBD、纤维化、银屑病、狼疮、多发性硬化症、神经退行性疾病(帕金森病、阿尔兹海默症、ALS、重症肌无力、格雷夫斯氏病、强直性脊柱炎)和呼吸系统疾病(COPD、哮喘)。在一个实施方式中,本发明提供了一种治疗癌症的方法,包括给予:

a) 前药(例如式(I)的化合物);和

b) 抗体或抗原;或

将前药和抗体或抗原的偶联物给予有需要的对象。

[0044] 在一些实施方式中,所述癌是乳腺癌、肾癌、脑癌、皮肤癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌、结肠癌、头/颈癌、前列腺癌、子宫内膜癌、肝癌、血癌、胃癌、纤维肉瘤、骨肿瘤/骨肉瘤或十二指肠癌。在一个实施方式中,癌症是乳腺癌。在另一个实施方式中,前药(例如式(I)的化合物和抗体或抗原的给予是随后的或联合的。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0045] 在一些实施方式中,对象是哺乳动物,优选人。

[0046] 在一些实施方式中,本发明提供前药(例如式(I)化合物、其偶联物(例如式(I(a))化合物)或前药与抗体或抗原的组合或包含前药/偶联物/组合和至少一种药学上可接受的载体、稀释剂、载剂或赋形剂的药物组合物-用于治疗癌症或与癌症和/或免疫系统缺陷/功能障碍相关/相关联的病况/病症,如上述方法实施方式中所描述的。

[0047] 在一个实施方式中,本发明提供了一种试剂盒,其包含:

i) 如本文以上所述的前药(例如式(I)的化合物);和

ii) 抗体或抗原。

在其他实施方式中,试剂盒进一步包含使用说明。

定义

[0048] 本文定义,本文使用的术语“治疗有效量”是指在向对象给予单剂量或多剂量时有效为对象提供治疗益处的药剂的量。在另外的实施方式中,本发明的晶型用于制备用于治疗前述疾病或病症的药物。

[0049] 本文定义,关于本文所用的医学治疗/处理,术语“治疗/处理”是指在对象中出现/鉴定出医学病况、疾病或病症之后对其进行医疗护理,或者减轻或抑制或预防相同的情况。

[0050] 本文定义术语“DAR”或“药物-抗体比”等于每一当量抗体或抗原的药物当量数。在一个实施方式中,DAR在0.5和200之间。在另一个实施方式中,DAR在0.5和50之间。在另一个实施方式中,DAR在0.5和20之间。在另一个实施方式中,DAR在0.5和10之间。在另一个实施方式中,DAR在0.5和5之间。在另一个实施方式中,DAR在1和10之间。在另一个实施方式中,DAR在1和20之间。在另一个实施方式中,DAR在1和50之间。在另一个实施方式中,DAR在1和100之间。在另一个实施方式中,DAR在1和200之间。在另一个实施方式中,DAR在5和10之间。在另一个实施方式中,DAR在5和20之间。在另一个实施方式中,DAR在5和50之间。在另一个实施方式中,DAR在10和20之间。在另一个实施方式中,DAR在20和50之间。在另一个实施方式中,DAR在50和100之间。在另一个实施方式中,DAR在50和200之间。在另一个实施方式中,DAR在100和200之间。在一些实施方式中,明确提及DAR(例如实施例4中的表1)。在其他实施方式中,DAR可以通过式(I(a))含义内的“n”来计算。下面给出所述计算的几个例子,其中已知对于本发明的化合物/偶联物,即式(I(a)),每个与R⁵连接的化合物-存在2(两个)不同或相同的药物/API部分R²和R³:

-n=1,因此1个化合物中的2个药物部分连接至R⁵,得出2/1或2的DAR。

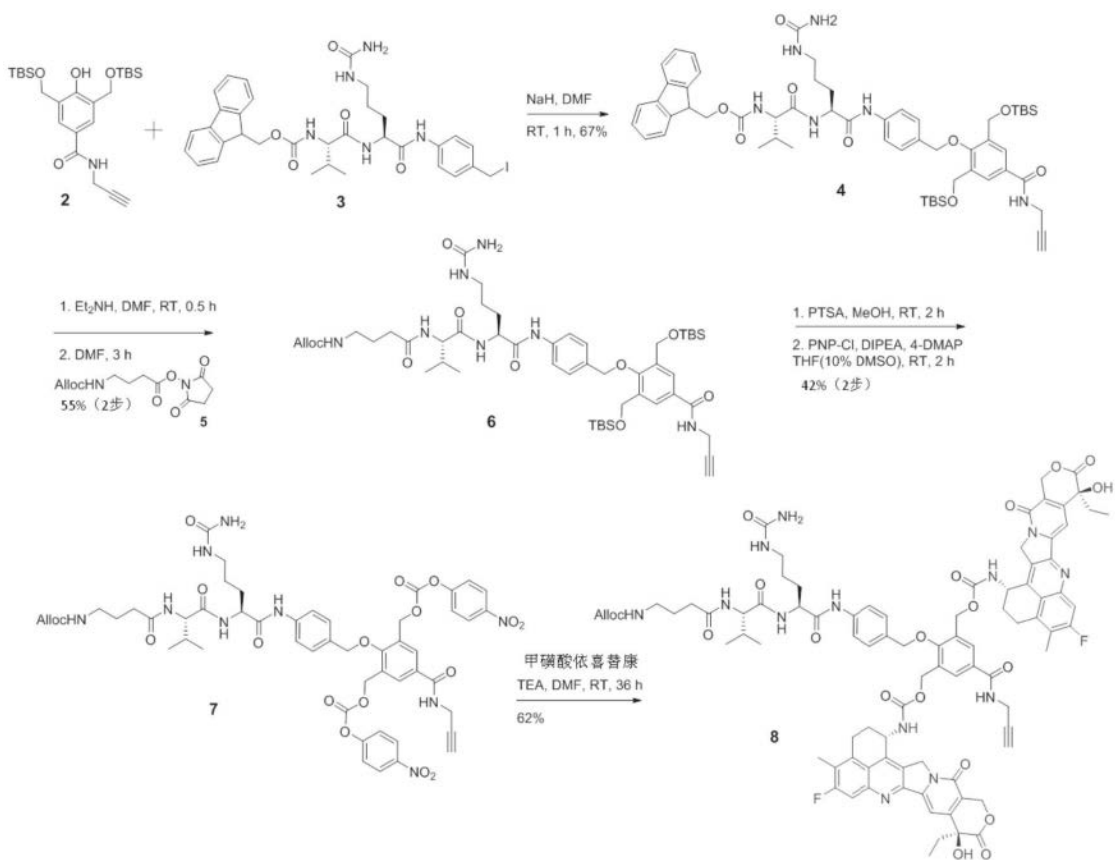
-n=0.5,因此1个化合物中的2个药物部分连接至R⁵,得出2/0.5或4的DAR。

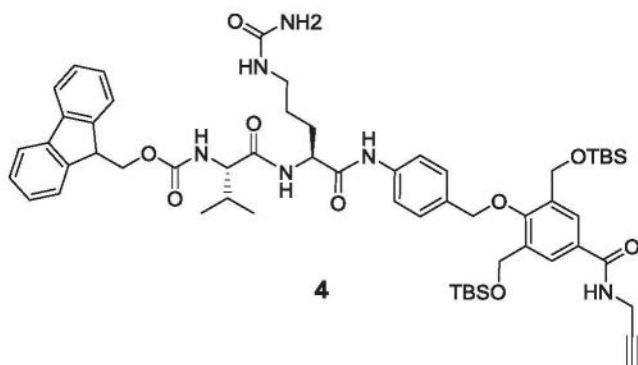
-n=0.33,因此1个化合物中的2个药物部分连接至R⁵,得出2/0.33或6的DAR。

实施例

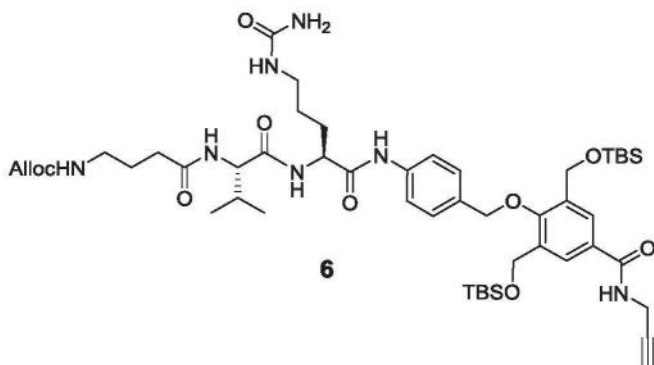
实施例1:化合物1的合成

方案2:化合物1的总体合成



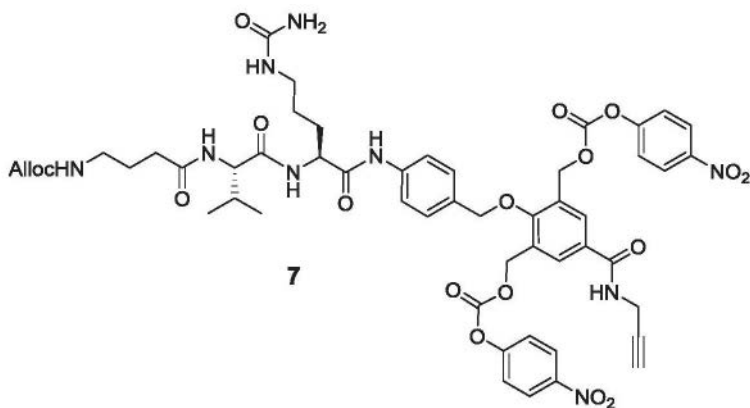


化合物4:化合物2(参见Danieli, D. Shabat, *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 7318-7324; R. J. Amir, E. Danieli, D. Shabat, *Chem. - Eur. J.* 2007, 13, 812-821; 和A. Gopin, S. Ebner, B. Attali, D. Shabat, *Bioconjug. Chem.* 2006, 17, 1432-1440) (1.07g, 2.32mmol) 在氩气气氛下溶解在无水的DMF (5mL) 中, 并冷却至0°C。添加氢化钠 (97mg, 2.44mmol) 并将反应温热至室温。室温搅拌15分钟后, 加入化合物3 (M. E. Roth-Konforti, C. R. Bauer, D. Shabat, *Angew. Chemie Int. Ed.* 2017, 56, 15633-15638) (1.65g, 2.32mmol) 然后通过TLC (MeOH: EtOAc 5:95) 监测反应。完成后, 反应用EtOAc (20mL) 和NH₄Cl (10mL) 稀释。然后用EtOAc (3×20mL) 萃取双相混合物, 用盐水 (20mL) 洗涤, 经Na₂SO₄干燥并减压蒸发。通过硅胶柱色谱法纯化粗产物, 得到标题所述化合物4, 为灰白色固体 (1.61g, 67%)。C₅₇H₇₈N₆O₉Si₂的MS (ES+) m/z 计算为: 1046.5, [M+2H]⁺实测值1048.9。

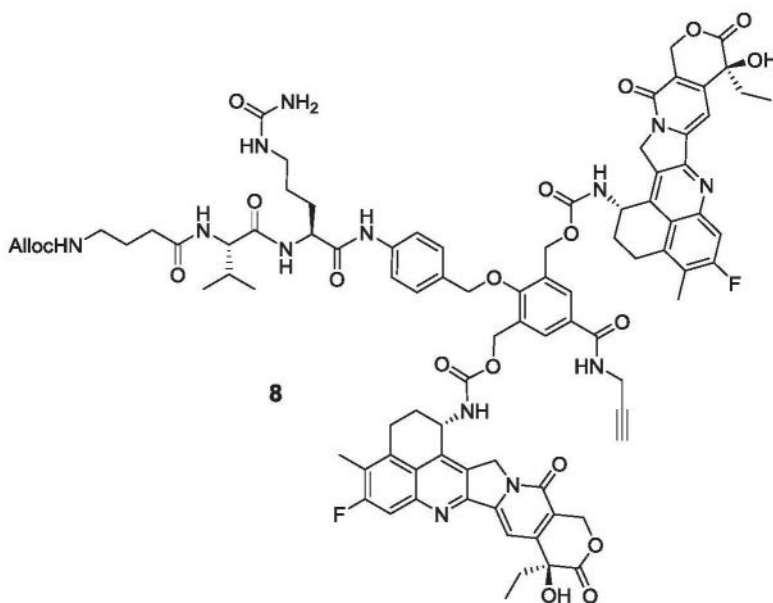


化合物6:将化合物4 (1.2g, 1.15mmol) 溶解在DMF (6ml) 中并添加二乙胺 (2ml)。用TLC对反应进行监测。原料消失后, 减压下去除溶剂和二乙胺。将产物真空下干燥, 直接用于下一步反应。

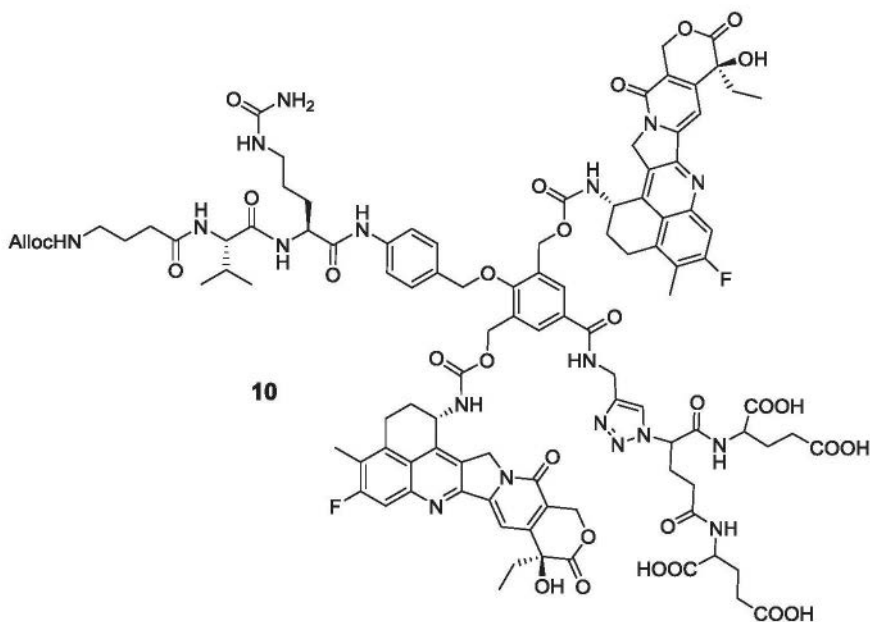
将粗物质溶解在DMF (5mL) 中并添加化合物5 (327mg, 1.15mmol)。将混合物在室温下搅拌3小时并通过TLC监测反应。完成后, 减压下去除溶剂。通过硅胶柱色谱法纯化粗产物, 得到标题所述化合物6, 为灰白色固体 (630mg, 2步收率55%)。C₅₀H₇₉N₇O₁₀Si₂的MS (ES+) m/z 计算为: 993.5, [M+2H]⁺实测值995.0。



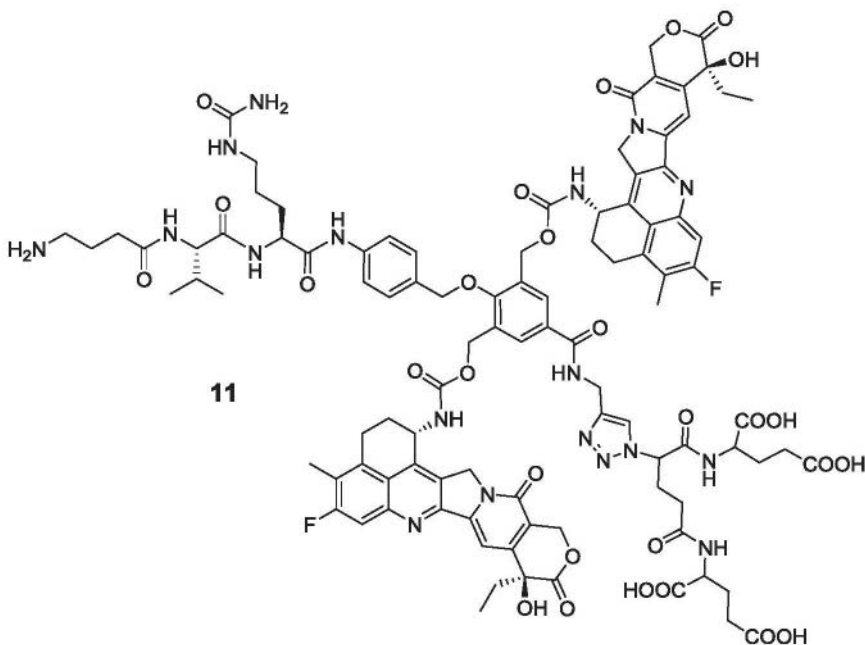
化合物7:将化合物6 (625mg, 0.63mmol) 溶解在MeOH (4ml) 中并添加一水4-甲苯磺酸(4-touenesulfonic acid monohydrate) (PTSA, 12mg, 0.063mmol)。用TLC对反应进行监测。完成后,将反应混合物用EtOAc (20mL) 稀释并添加饱和NaHCO₃ (5mL)。然后用EtOAc (3×20mL) 萃取双相混合物,用盐水 (20mL) 洗涤,经Na₂SO₄干燥并减压蒸发。将粗产物溶解于无水THF/DMSO溶剂系统 (8mL, THF:DMSO 10:1) 中,然后添加DIPEA (0.45mL, 2.52mmol) 和4-DMAP (4mg, 0.03mmol)。将混合物冷却至0℃。然后分批添4-硝基氯甲酸苯酯(4-Nitrophenyl chloroformate) (PNP-Cl, 317mg, 1.58mmol) 并将反应混合物在室温下搅拌2小时。通过TLC监测反应进程。完成后,将溶液直接加载到硅胶上,并通过柱色谱法纯化产物,得到呈灰白色固体的化合物7 (289mg, 2步收率42%)。C₅₂H₅₇N₉O₁₈的MS (ES+) m/z 计算为:1095.4, [M+2H]⁺ 实测值1096.9。分析型RP-HPLC: 色谱柱C18 5μ, 250x 4.6mm。洗脱液:ACN/H₂O (H₂O含0.1% TFA)。方法:30-100%ACN梯度。化合物7的t_R:15.1分钟。



化合物8:在室温下将化合物7 (80mg, 0.07mmol) 溶解于无水DMF (2mL) 中。依喜替康甲磺酸盐 (77mg, 0.14mmol) 然后添加Et₃N (60μL, 0.44mmol)。将反应混合物搅拌2天,并通过RP-HPLC监测反应进程。原料消失后,将产物通过添加MeOH (5mL) 沉淀。过滤沉淀物并用EtOAc反复洗涤并在真空下干燥,得到化合物8,为黄色固体 (76mg, 62%)。C₈₈H₉₁F₂N₁₃O₂₀的MS (ES+) m/z 计算为:1687.6, [M+2+H]⁺ 实测值845.5。分析型RP-HPLC: 色谱柱C18 5μ, 250x 4.6mm。洗脱液:ACN/H₂O (H₂O含0.1% TFA)。方法:30-100%ACN梯度。化合物8的t_R:11.2分钟。

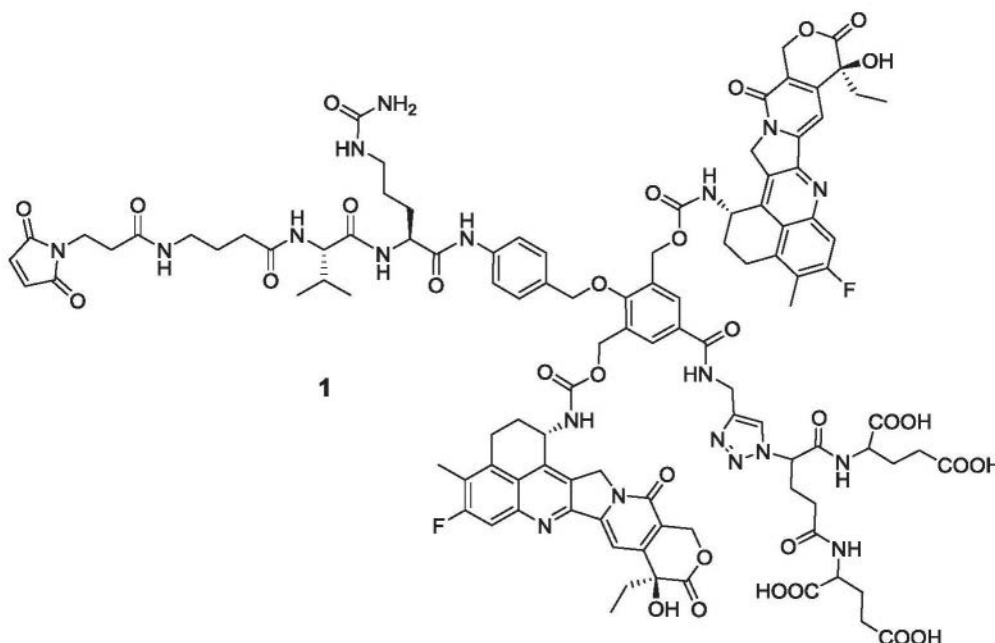


化合物10:将化合物8 (65mg, 0.04mmol) 和叠氮化物9 (86mg, 0.2mmol) 溶解在溶剂系统DMSO/H₂O (10:1, 2mL) 中, 然后添加CuSO₄·5H₂O (5mg, 0.02mmol) 和抗坏血酸钠 (3.2mg, 0.03mmol)。将溶液用氩气脱气30分钟, 然后在室温下搅拌。搅拌30分钟后, 通过RP-HPLC监测反应进程。完成后, 通过反相制备型HPLC (含0.1% TFA的30-100% ACN水溶液, 20分钟) 分离产物, 得到呈黄色固体状的化合物10 (64mg, 79%)。C₁₀₃H₁₁₂F₂N₁₈O₃₀的MS (ES⁺) m/z 计算为: 2119.9, [M/2+H]⁺实测值1061.4。分析型RP-HPLC: 色谱柱C18 5μ, 250x 4.6mm。洗脱液: ACN/H₂O (H₂O含0.1% TFA)。方法: 30-100% ACN梯度。化合物10的t_R: 10.7分钟。



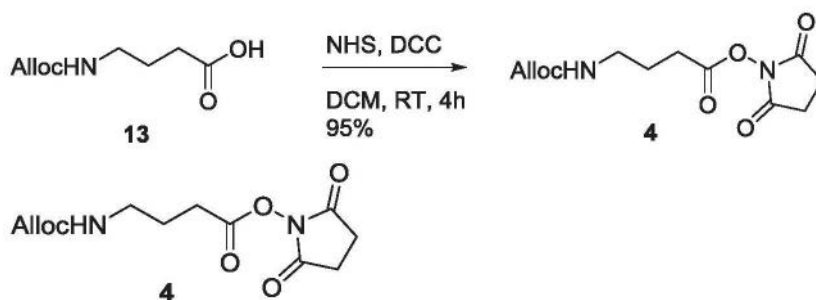
化合物11:在氩气下将化合物10 (52mg, 0.025mmol) 溶解于DMF (2mL) 中, 然后加入Pd (PPh₃)₄ (15mg, 0.012) 和1,3-二甲基巴比妥酸 (8.0mg, 0.05mmol)。将混合物在氩气下于45℃搅拌, 并通过RP-HPLC监测反应进程。30分钟后, HPLC色谱图显示已发生约50%的转化。由此, 添加另一批Pd (PPh₃)₄ 和1,3-二甲基巴比妥酸。2小时后反应完成后, 通过反相制备型

HPLC (含0.1% TFA的10-90% ACN水溶液, 20分钟) 分离产物, 得到呈黄色固体状的化合物11 (30mg, 61%)。C₉₉H₁₀₈F₂N₁₈O₂₈的MS (ES+) m/z 计算为: 2035.7, [M/2+H]⁺实测值1019.2。分析型RP-HPLC: 色谱柱C18 5μ, 250x 4.6mm。洗脱液: ACN/H₂O (H₂O含0.1% TFA)。方法: 10-90% ACN梯度。化合物11的t_R: 12.3分钟。



化合物1: 将化合物11 (25mg, 0.012mmol) 和化合物12 (4mg, 0.014mmol) 溶解于无水DMF (1.5mL) 中。添加Et₃N并将反应混合物在室温下搅拌1小时。完成后, 如通过RP-HPLC监测, 产物通过反相制备型HPLC (10-90% ACN水溶液, 含0.1% TFA, 20分钟) 纯化, 得到最终的前药1, 为黄色固体 (19mg, 71%)。C₁₀₆H₁₁₃F₂N₁₉O₃₁的MS (ES+) m/z 计算为: 2186.79, [M/2+H]⁺实测值1094.8。分析型RP-HPLC: 色谱柱C18 5μ, 250x 4.6mm。洗脱液: ACN/H₂O (H₂O含0.1% TFA)。方法: 10-90% ACN梯度。化合物1的t_R: 13.2分钟。

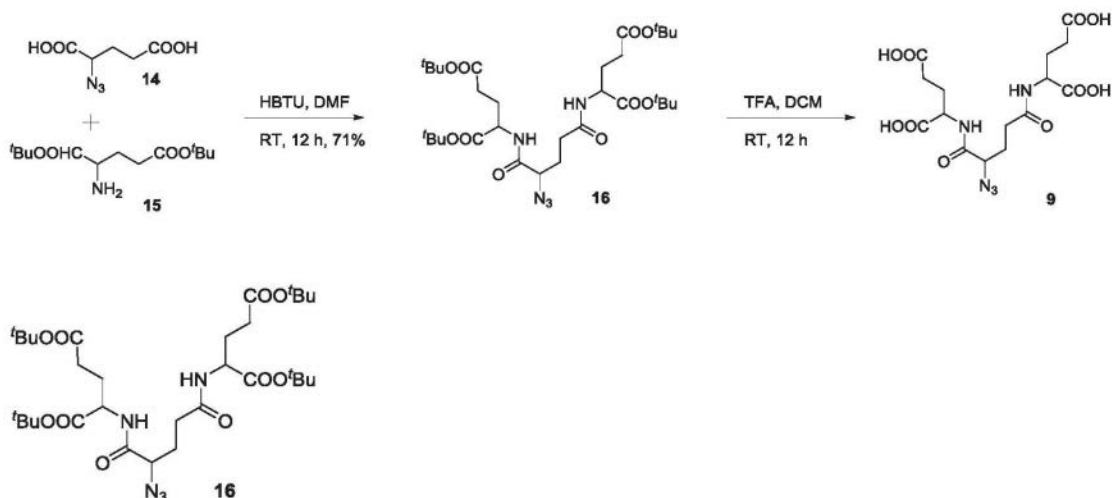
方案3: 化合物4的合成



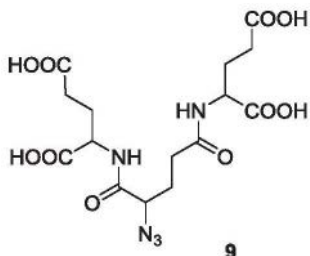
化合物4: 将化合物13 (P.D. Jeffrey, S.W. McCombie, J. Org. Chem. 1982, 47, 587-590) (750mg, 4.0mmol) 溶解在DCM (8mL) 中并冷却至0°C。添加N-羟基琥珀酰亚胺 (692mg, 6.0mmol), 随后添加N,N'-二环己基碳二亚胺 (908mg, 4.4mmol)。使反应升温至室温并继续搅拌4小时。完成后, 过滤浑浊的混合物, 用DCM洗涤。将合并的有机溶液浓缩, 并通过硅胶柱色谱法纯化产物, 得到化合物4 (1.08g, 95%), 为白色固体。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 5.95-5.85 (m, 1H), 5.28 (dd, J=17.2, 1.1Hz, 1H), 5.19 (dd, J=10.4, 1.1Hz, 1H), 4.54 (d, J=5.2Hz, 2H), 3.28 (q, J=6.5Hz, 2H), 2.82 (s, 4H), 2.66 (t, J=7.3Hz, 2H), 1.99-1.92 (m, 2H)

. $C_{12}H_{16}N_2O_6$ 的MS(ES+)m/z计算为:284.1, $[M+H]^+$ 实测值285.3。

方案4:化合物9的合成:



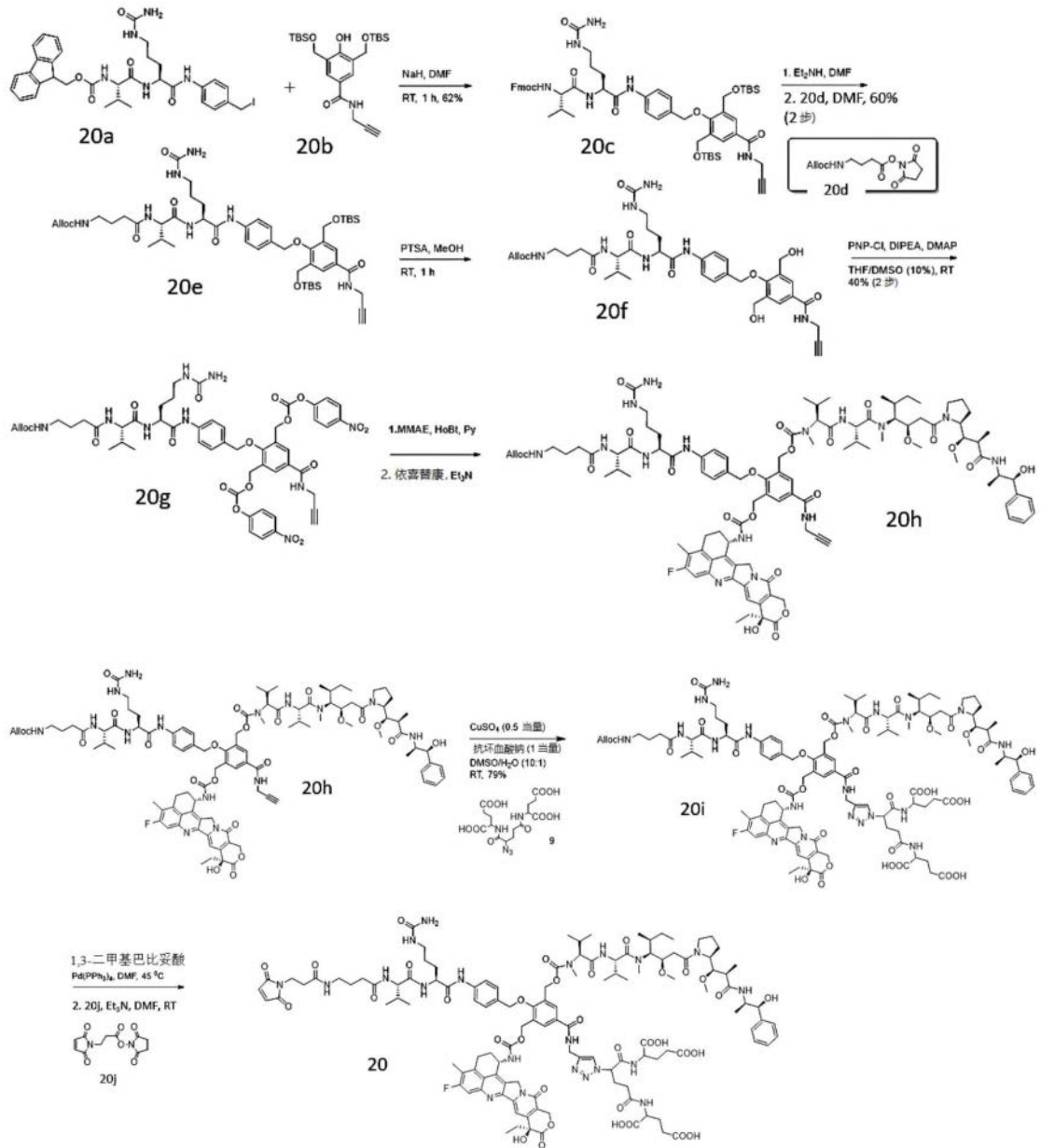
化合物16:根据文献程序制备化合物16(E.Roussakis,Z.Li,N.H.Nowell,A.J.Nichols,C.L.Evans,Angew.Chemie Int.Ed.2015,54,14728-14731)。将L-叠氮谷氨酸14(J.Bachl,J.Mayr,F.J.Sayago,C.Cativuela,D.Díaz Díaz,Chem.Commun.2015,51,5294-5297)(222mg,1.3mmol)在氩气气氛下溶解在无水DMF(10mL)中。将HBTU(1.23g,3.25mmol)添加至溶液中并将混合物在室温下搅拌5分钟。将DIPEA(2.30mL,13.0mmol)一次性添加至溶液中,随后立即添加L-谷氨酸二叔丁基酯15(760mg,2.6mmol)。将反应混合物搅拌过夜,然后真空除去溶剂。通过硅胶柱色谱法纯化粗产物,得到呈粘性液体的化合物16(597mg,相对于14的71%)。 $C_{31}H_{53}N_5O_{10}$ 的MS(ES+)m/z计算为:655.4, $[M+H]^+$ 实测值656.7。



化合物9:将化合物16(550mg,mmol)溶解于DCM(3ml)中并添加TFA(3ml)。将反应搅拌过夜。完成后,根据TLC监测,减压下除去溶剂和TFA。产物的形成经MS确认,粗物质直接用于点击反应。 $C_{12}H_{16}N_2O_6$ 的MS(ES+)m/z计算为:431.1, $[M+H]^+$ 实测值432.3。

实施例2:化合物20的合成

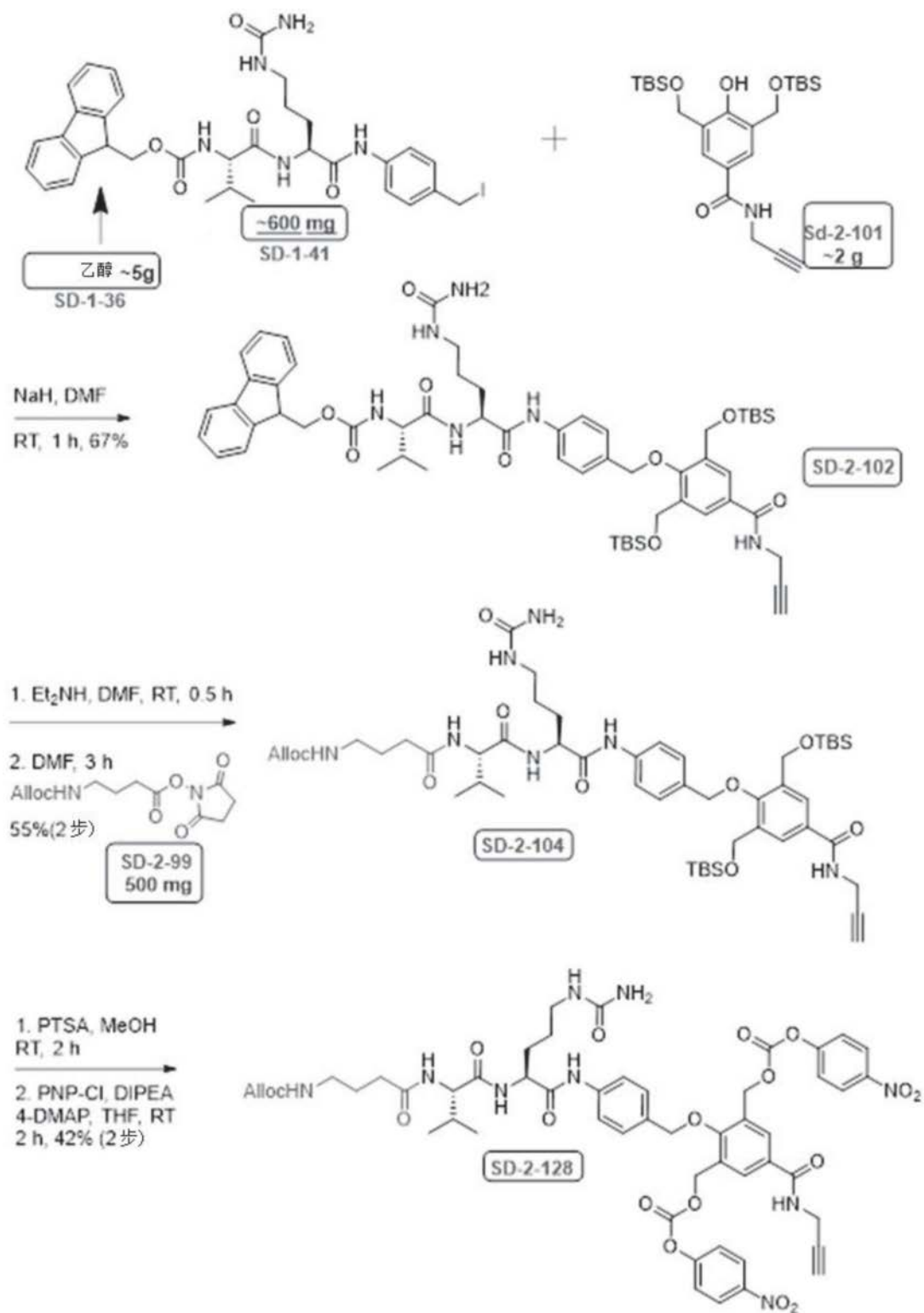
方案5:化合物20的总体合成

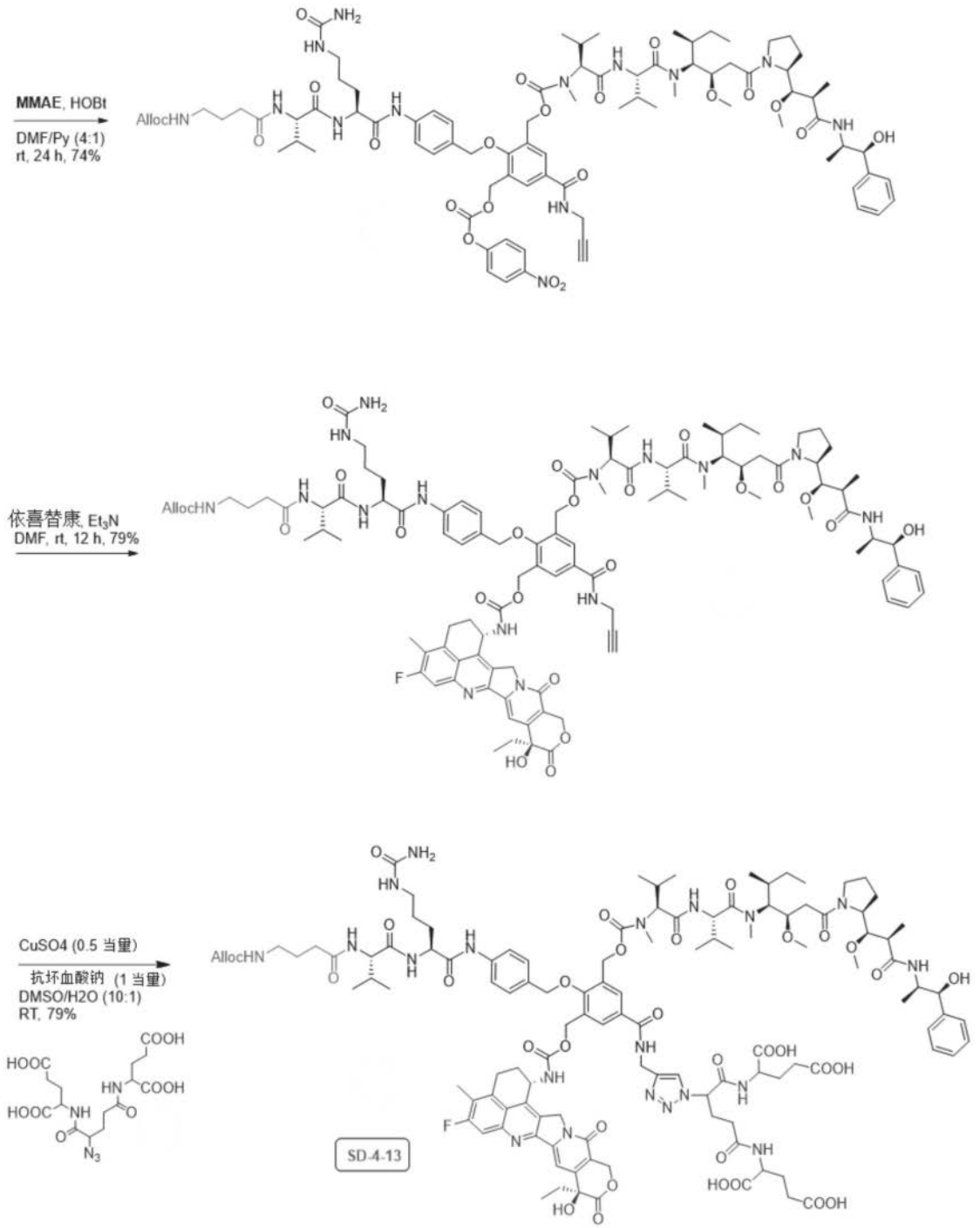


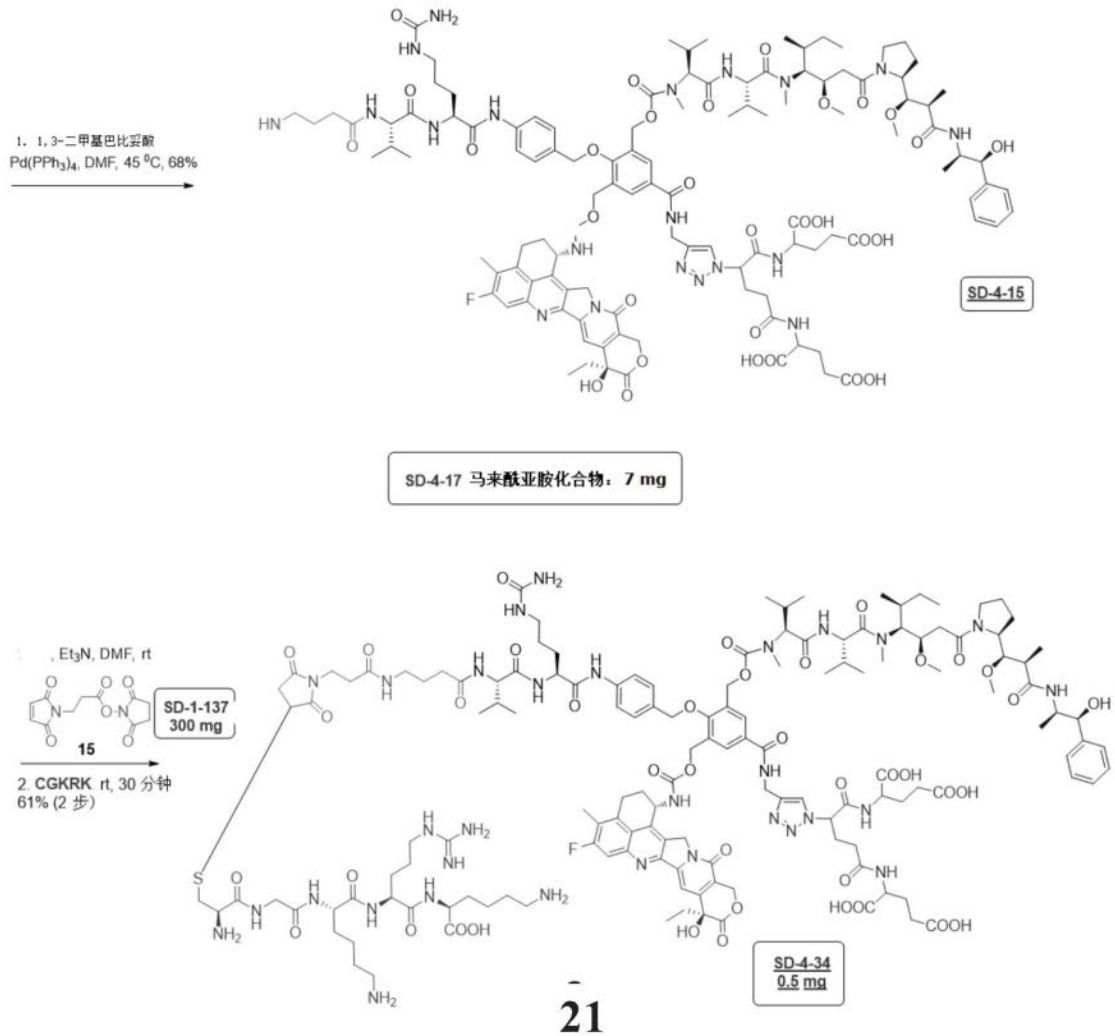
根据上述方案合成化合物20。

实施例3:化合物21的合成

方案6:化合物21的总体合成







根据上述方案合成化合物21,并通过质谱确认。

实施例4:曲妥珠单抗-依喜替康/贝洛替康偶联物抑制HER2-阳性HCC1954细胞的增殖

材料和方法

细胞系

[0051] HCC1954和MDA-MB-468人乳腺癌细胞获自美国典型培养物保藏中心(ATCC,弗吉尼亚州玛纳萨斯)。HCC1954细胞在补充有10%胎牛血清(FBS)、100IU/ml青霉素、100μg/ml链霉素、12.5U/ml制霉菌素、2mM L-谷氨酰胺和100μg/丙酮酸钠的达氏改良的伊氏培养基(DMEM)中培养。MDA-MD-468细胞在补充有10%胎牛血清(FBS)、100IU/ml青霉素、100μg/ml链霉素、12.5U/ml制霉菌素、2mM L-谷氨酰胺的RPMI中培养。细胞在37°C和5%CO₂中生长。

细胞活力试验

将人乳腺HCC1954和MDA-MB231细胞铺板至24孔培养板(分别为5,000个细胞/孔和10,000个细胞/孔)并孵育24小时。然后将细胞暴露于依喜替康(Exatecan)或贝洛替康(Belotecan)(游离的或与曲妥珠单抗偶联的)的系列稀释液中。孵育5-6天后,使用MTT(3μg/ml,西格玛(Sigma))评估细胞活力。使用SpectraMax M5e多重检测读板器在570nm处测量MTT吸光度。

结果

曲妥珠单抗-依喜替康/贝洛替康偶联物抑制HER2阳性HCC1954细胞的增殖

从ITL获得了几批与依喜替康或贝洛替康偶联的曲妥珠单抗(表1)。与游离药物相比,评估了不同偶联物对两种人乳腺癌细胞系HCC1954(HER2阳性)和MDA-MB-468细胞(HER2阴性)增殖的抑制作用。贝洛替康和依喜替康在两种测试的细胞系中表现出相似的IC₅₀值(HCC1954中为7和10nM;MDA-MB-468中为5和2.5nM)。然而,在HCC1954细胞中,偶联物的细胞毒性与游离药物相似(Tras-Bel PPB-4435除外),而在MDA-MB-468细胞中,偶联物的活性稍低。曲妥珠单抗对两种细胞系的增殖均无抑制作用(图1A-1D)。

表1. 曲妥珠单抗-依喜替康/贝洛替康偶联物

批次	ADC		抗体浓度 (mg/ml)	DAR	ADC Mw (Da)	ADC 浓度 (μM)
C015-1	曲妥珠单抗-Bel-3	NBE00778	2.16	5.14	155393.47	13.87
C015-2	曲妥珠单抗-Bel-3	NBE00778	2.65	4.59	154334.83	17.14
C015-3	曲妥珠单抗-Bel-3	NBE00778	1.31	7.36	159666.53	8.23
C015-4	曲妥珠单抗-Bel-3	NBE00778	1.59	7.94	160782.91	9.89
C016-1	曲妥珠单抗-Bel-4	NBE00778	2.24	2.19	150278.14	14.89
C016-2	曲妥珠单抗-Bel-4	NBE00778	1.83	5.06	156539.91	11.67
C016-3	曲妥珠单抗-Bel-4	NBE00778	0.97	7.22	161252.60	6.00
C016-4	曲妥珠单抗-Bel-4	NBE00778	1.11	6.89	160532.60	6.94
C017-1	曲妥珠单抗-Exa-1	DOK00401	3.07	6.81	160385.30	19.14
C017-2	曲妥珠单抗-Exa-1	DOK00401	2.44	7.84	162636.67	15.03
C017-3	曲妥珠单抗-Exa-1	DOK00401	3.70	7.78	162505.52	22.77
C018	利妥昔单抗-Exa-1	DOK00401	1.30	7.50	161893.50	8.02
	曲妥珠单抗-Bel	PPB-4435	2.38	4.30	153776.64	15.50
	曲妥珠单抗-Exa	PPB-5624	3.30	8.00	160898.40	20.51

由于其增强的细胞毒性,选择Tras-Exa-1进行进一步评估。为了评估与游离依喜替康相比,增加细胞与偶联物的暴露时间是否会导致活性增强,将细胞再暴露于药物24小时(总共6天)。此外,为了进一步证明偶联物在HER2阳性细胞中的优势,对另一种HER2+乳腺癌细胞系JIMT-1进行了评估。与之前的实验相关,与MDA-MB-468相比,HCC1954细胞对Tras-Exa-1显著更敏感。在JIMT-1细胞中,与游离依喜替康相比,Tras-Exa-1没有显示出任何优势(图2A-2D)。

实施例5:与市售**Enhertu®**相比曲妥珠单抗-依喜替康/贝洛替康偶联物肿瘤生长材料和方法
细胞系

HCC1954人乳腺癌细胞获自美国典型培养物保藏中心(ATCC,美国弗吉尼亚州玛纳萨斯)。细胞在补充有10%胎牛血清(FBS)、100IU/ml青霉素、100μg/ml链霉素、12.5U/ml制霉菌素、2mM L-谷氨酰胺和100μg/ml丙酮酸钠的达氏改良的伊氏培养基(DMEM)中培养。细胞在37°C和5%CO₂中生长。

体内研究

所有动物均饲养在特拉维夫大学无特定病原体(SPF)动物设施中。该实验得到了特拉维夫大学动物护理和使用委员会(IACUC)的批准(批准号:01-19-088),并按照NIH指南进行。

将HCC1954细胞(1x10⁶)注射到6周龄雌性严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠的乳腺脂肪垫中。通过卡尺监测肿瘤生长,体积定义为0.52x宽度x长度²。当肿瘤体积达到约95mm³时,将小鼠随机分组(n=9)并以三种不同浓度(1,3或10mg/kg)静脉内注射单剂量曲妥珠单抗-德鲁替康(**Enhertu®**;DAR=8)、曲妥珠单抗-依喜替康(Tras-Exa;DAR=4)或曲妥珠单抗-贝洛替康(Tras-Bel;DAR=4)。作为对照,小鼠用10mg/kg利妥昔单抗-德鲁替康(Ritux-DXd;DAR=8)或载剂对照(10mM组氨酸、3%海藻糖、100mM NaCl,pH 5.5)处理。所有处理均以200μl/20g小鼠的体积给予。当肿瘤体积达到1000mm³、肿瘤坏死和溃烂或小鼠体重减轻

15%时,对小鼠实施安乐死。

统计学分析

除非另有说明,数据以平均值±平均值标准误差(SEM)表示。使用Graphpad Prism 9软件通过对数秩(Mantel-Cox)检验确定总生存期的统计学显著性。统计学显著性定义为 $p < 0.05$ 。

结果

评估与依喜替康("Tras-Exa"; DAR=4)或贝洛替康("Tras-Bel"; DAR=4)连接的基于曲妥珠单抗的抗体药物偶联物(ADC)的体内抗肿瘤功效。为此,用三种浓度(1、3和10mg/kg)的单剂量的Tras-Exa或Tras-Bel处理负荷HCC1954(HER2+)人乳腺癌异种移植物的的小鼠,并监测肿瘤生长和存活。我们的ADC的治疗功效与也以三种浓度(1、3和10mg/kg)给予的市售**Enhertu**®(Tras-德鲁替康; DAR=8)比较,以及与仅以最高剂量10mg/kg给予的利妥昔单抗-德鲁替康同型对照("Ritux-DXd", DAR=8)进行比较。另外一个对照组用载剂进行处理。观察到肿瘤生长的剂量依赖性抑制,其中三种基于曲妥珠单抗的ADC在10mg/kg时观察到最强效的抗肿瘤作用(图3A-3C)。有趣的是,最高浓度(10mg/kg)的单剂量Tras-Exa或**Enhertu**®导致肿瘤完全消退。相反,经Tras-Bel(10mg/kg)处理的小鼠中,9只中有4只(44%)在处理60天后复发(图3A)。此外,所有ADC在3mg/kg剂量下均观察到中等抗肿瘤活性,其中**Enhertu**®在不同ADC中表现出更强的肿瘤生长抑制作用(图3B)。总体而言,与3和10mg/kg的Tras-Bel ADC相比,Tras-Exa和**Enhertu**®显示出更优异的抗肿瘤活性,但这两种ADC在两种浓度下的功效没有统计学上的显著差异。相比之下,与任一ADC的对照相比,最低剂量(1mg/kg)的处理对肿瘤生长没有影响(图3C)。

值得注意的是,处理后,所有实验组的小鼠,包括载剂和同种型对照,均表现出短暂的体重减轻,并在5天后恢复(图3D)。总体而言,我们基于曲妥珠单抗的ADC以及**Enhertu**®在所有评估浓度下均具有良好的耐受性,与载剂或同种型对照类似,在研究过程中体重净增加为正值(图3D)。

与上述数据一致,Kaplan-Meier分析证明了所评估的不同ADC具有剂量依赖性生存获益。研究结束时(第152天),用10mg/kg Tras-Exa或**Enhertu**®处理的小鼠100%存活,而用相同浓度的Tras-Bel处理的小鼠89%存活;而对照组处理的小鼠在第109天(载剂)和第116天(Ritux-DXd)后均没有存活(图4A和4D)。此外,与载剂对照(60天)和Ritux-DXd(71天)相比,3mg/kg处理显著延长了Tras-Exa(116天)或**Enhertu**®(137天)处理小鼠的中位生存期(图4B、4D和表2)。与对照组相比,Tras-Bel(3mg/kg)对小鼠的生存没有显著影响,中位生存期为84天(图4B和4D以及表2)。在1mg/kg的最低剂量下,与载剂和同种型对照相比,两种ADC均未显示出任何治疗功效(图4C和4D以及表2)。

表2. 使用对数秩(Mantel-Cox)检验分析不同处理组之间生存曲线的统计显著性。 $P < 0.05$; ns = 不显著。

生存曲线比较	对数秩 (Mantel-Cox) 检验
载剂 vs. Ritux-Dxd 10 mg/kg	ns
载剂 vs. Enhertu 10mg/kg	<0.0001
载剂 vs. Enhertu 3 mg/kg	<0.0001
载剂 vs. Enhertu 1 mg/kg	ns
载剂 vs. Tras-Exa 10 mg/kg	<0.0001
载剂 vs. Tras-Exa 3 mg/kg	0.0007
载剂 vs. Tras-Exa 1 mg/kg	ns
载剂 vs. Tras-Bel 10 mg/kg	<0.0001
载剂 vs. Tras-Bel 3 mg/kg	ns
载剂 vs. Tras-Bel 1 mg/kg	ns
Ritux-Dxd 10 mg/kg vs. Enhertu 10mg/kg	<0.0001
Ritux-Dxd 10 mg/kg vs. Enhertu 3 mg/kg	0.0001
Ritux-Dxd 10 mg/kg vs. Enhertu 1 mg/kg	ns
Ritux-Dxd 10 mg/kg vs. Tras-Exa 10 mg/kg	<0.0001
Ritux-Dxd 10 mg/kg vs. Tras-Exa 3 mg/kg	0.0017
Ritux-Dxd 10 mg/kg vs. Tras-Exa 1 mg/kg	ns
Ritux-Dxd 10 mg/kg vs. Tras-Bel 10 mg/kg	<0.0001
Ritux-Dxd 10 mg/kg vs. Tras-Bel 3 mg/kg	ns
Ritux-Dxd 10 mg/kg vs. Tras-Bel 1 mg/kg	ns
Enhertu 10 mg/kg vs. Enhertu 3 mg/kg	0.0101
Enhertu 10 mg/kg vs. Enhertu 1 mg/kg	<0.0001
Enhertu 3 mg/kg vs. Enhertu 1 mg/kg	0.0002
Tras-Exa 10 mg/kg vs. Tras-Exa 3 mg/kg	0.0008
Tras-Exa 10 mg/kg vs. Tras-Exa 1 mg/kg	<0.0001
Tras-Exa 3 mg/kg vs. Tras-Exa 1 mg/kg	0.003
Tras-Bel 10 mg/kg vs. Tras-Bel 3 mg/kg	<0.0001
Tras-Bel 10 mg/kg vs. Tras-Bel 1 mg/kg	<0.0001
Tras-Bel 3 mg/kg vs. Tras-Bel 1 mg/kg	0.0016

Enhertu 10 mg/kg vs. Tras-Exa 10 mg/kg	ns
Enhertu 10 mg/kg vs. Tras-Bel 10 mg/kg	ns
Tras-Exa 10 mg/kg vs. Tras-Bel 10 mg/kg	ns
Enhertu 3 mg/kg vs. Tras-Exa 3 mg/kg	ns
Enhertu 3 mg/kg vs. Tras-Bel 3 mg/kg	0.0012
Tras-Exa 3 mg/kg vs. Tras-Bel 3 mg/kg	0.0076
Enhertu 1 mg/kg vs. Tras-Exa 1 mg/kg	ns
Enhertu 1 mg/kg vs. Tras-Bel 1 mg/kg	ns
Tras-Exa 1 mg/kg vs. Tras-Bel 1 mg/kg	ns

实施例6: 抗体偶联技术

通过标准方法,用野生型微生物转谷氨酰胺酶(从德国Zedira购买的WT转谷氨酰胺酶)通过转谷氨酰胺酶与曲妥珠单抗-T的轻链进行连接,遵循的程序也描述于Dickgiesser等,Bioconjugate Chem. (2020),卷31(4),第1070-1076页。为此,将含有150mM NaCl、25mM Tris (pH 8.0)的缓冲液中的1eq抗体与各个有效载荷(比抗体浓度多出10倍或20倍,具体取决于连接位点的数量)的溶液以及6U/ml转谷氨酰胺酶混合。将混合物在热混合器中在37°C和450rpm下孵育16小时。

为了通过马来酰亚胺化学连接,制备了PBS (pH 7.4)中各抗体组分的5mg/mL溶液(~33 μ M抗体)。用TCEP(三(2-羧乙基)膦)还原抗体;抗体组分与TCEP的比率为1:2至1:6,具体取决于所需的DAR;TCEP以2mM储存液使用,pH 7.0)或某些情况下使用DTT(二硫苏糖醇;20mM)。在37°C水浴中孵育0.5-2小时(取决于要激活的半胱氨酸的数量)后,使反应冷却至室温。在Sephadex G25柱上将溶液脱盐至偶联缓冲液(10mM磷酸钠,pH6.0,2mM EDTA,N2脱气),并在偶联缓冲液中调节至0.2mg/mL的抗体浓度。通过以合适的比率将还原的抗体添加到适当的马来酰亚胺激活的接头-有效载荷构建体的溶液中来启动偶联(例如,对于DAR=4,抗体与接头-有效载荷构建体的比率为1:4至1:8;例如,对于DAR=8,抗体与接头有效载荷构建体的比率为1:20)。将反应在22°C下缓慢摇动孵育1小时,然后通过LCMS检查偶联情况。如有必要,继续反应直至达到所需的DAR。

偶联的样品在15PHE(苯基)柱(GE医疗公司(GE Healthcare))或HiTrap HP或FF丁基琼脂糖柱(GE医疗公司)上通过疏水相互作用色谱(HIC)纯化。浓缩洗脱级分,并将缓冲液更换为PBS pH 7.4或10mM磷酸钾、200mM NaCl、10mM组氨酸、50mM海藻糖,pH 7.0。通过LC-MS和SDS-PAGE确认了每个制备的ADC的同一性和纯度。根据HIC(疏水相互作用色谱)数据和质谱数据计算并确认了每个制备的ADC的DAR。

通过冻融实验测试了每个制备的ADC的稳定性。具体地,将组氨酸缓冲液中的ADC在液氮中速冻至-80°C,并在此温度下保存数周至数月。将样品置于室温直至样品完全解冻后,对样品进行SE-HPLC(尺寸排阻-高效液相色谱)分析以测试化合物降解,并检查解冻的ADC的活性。具体地,通过Octet结合试验检查靶抗原结合,并通过阳性和阴性细胞系的细胞滴度发光试验(cell titer glow assay)测试有效载荷介导的细胞毒性。将冻融ADC的结果与相应未经冻融的ADC进行比较。在每种情况下,都发现带有溶解性标签的ADC在此冻融过

程中是稳定的。

内毒素通过PTS (便携式测试系统) 盒法 (Nexgen) 根据制造商的说明在标准条件下测定。对于每个制备的ADC, 发现内毒素水平 <5.0 内毒素单位 (EU) /mg。

虽然已经说明和描述了本发明的某些实施方式, 但是显然本发明不限于本文描述的实施方式。在不脱离所附权利要求所描述的本发明的精神和范围的情况下, 许多修改、改变、变化、取代和等同物对于本领域技术人员来说将是显而易见的。

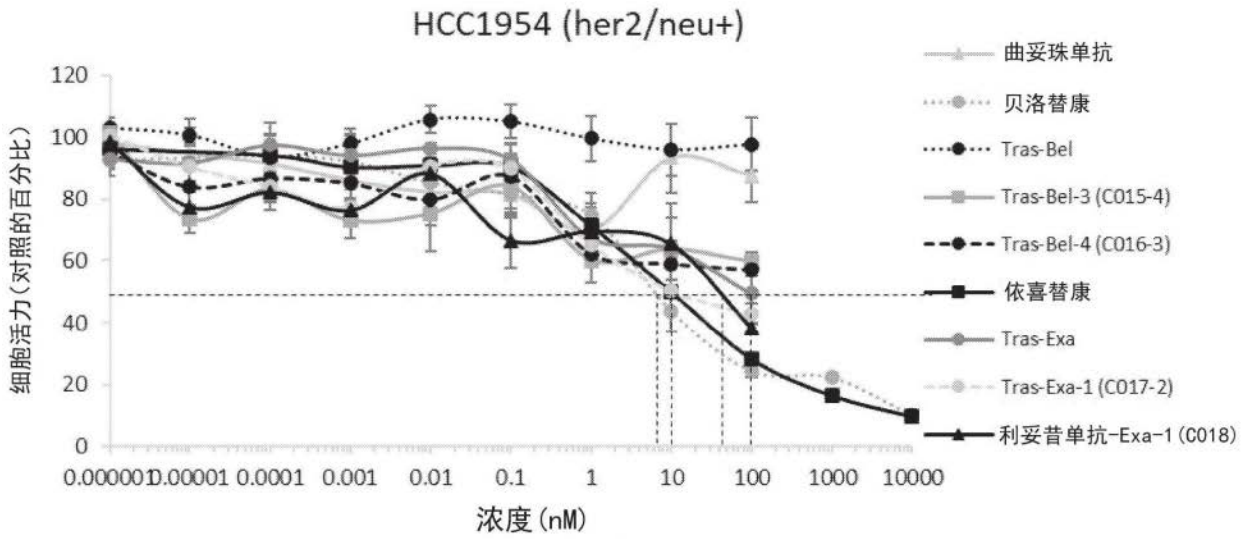


图1A

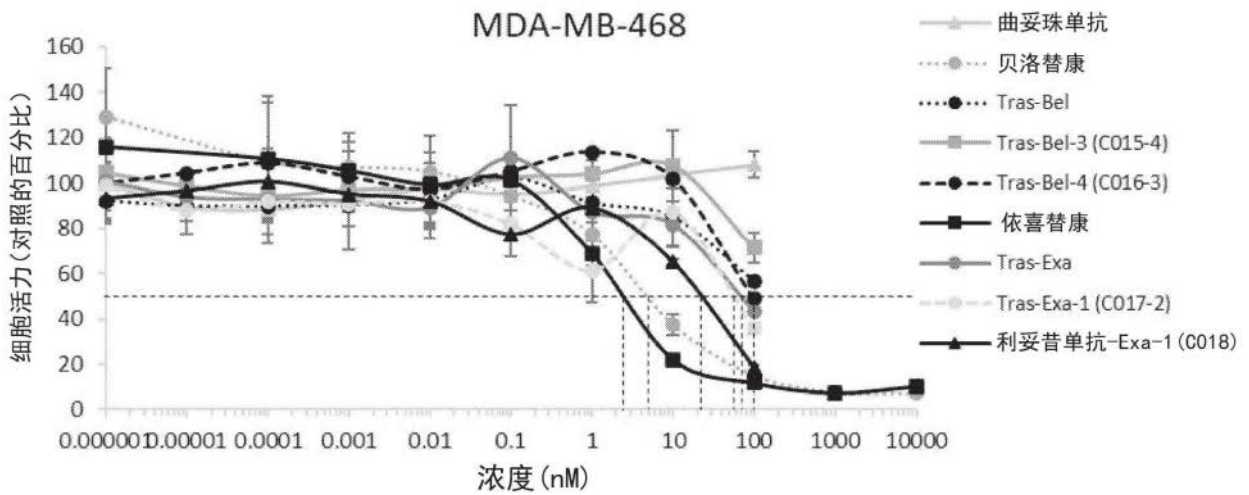


图1B

处理	IC50 (nM)
曲妥珠单抗	N/A
Bel	7
Tras-Bel	N/A
Tras-Bel-3 (C015-4)	N/A
Tras-Bel-4 (C016-3)	N/A
Exa	10
Tras-Exa	100
Tras-Exa-1 (C017-2)	10
利妥昔单抗-Exa-1(C018)	40

图1C

处理	IC50 (nM)
曲妥珠单抗	N/A
Bel	5
Tras-Bel	N/A
Tras-Bel-3 (C015-4)	N/A
Tras-Bel-4 (C016-3)	N/A
Exa	2.5
Tras-Exa	70
Tras-Exa-1 (C017-2)	60
利妥昔单抗-Exa-1(C018)	20

图1D

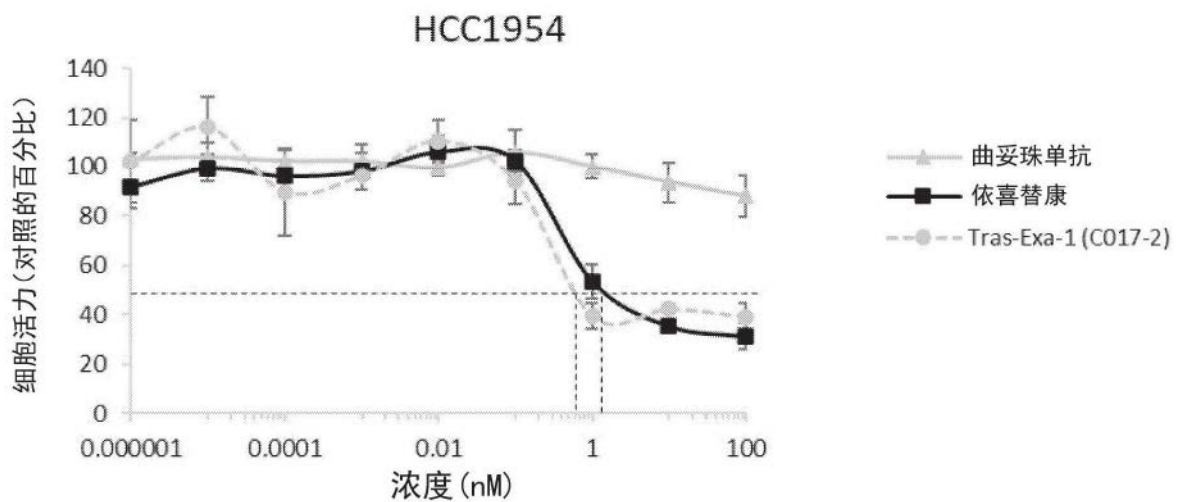


图2A

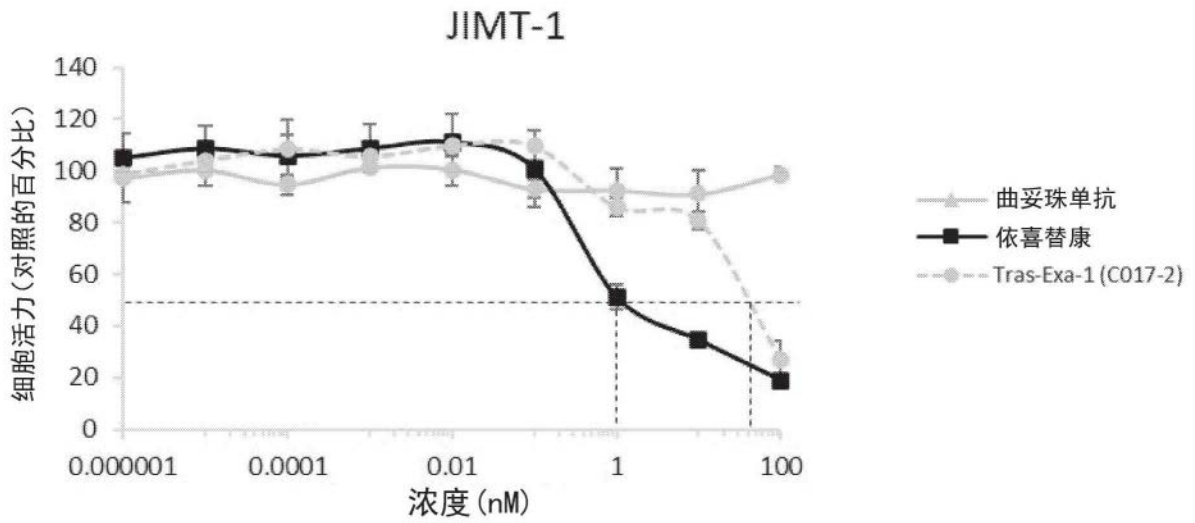


图2B

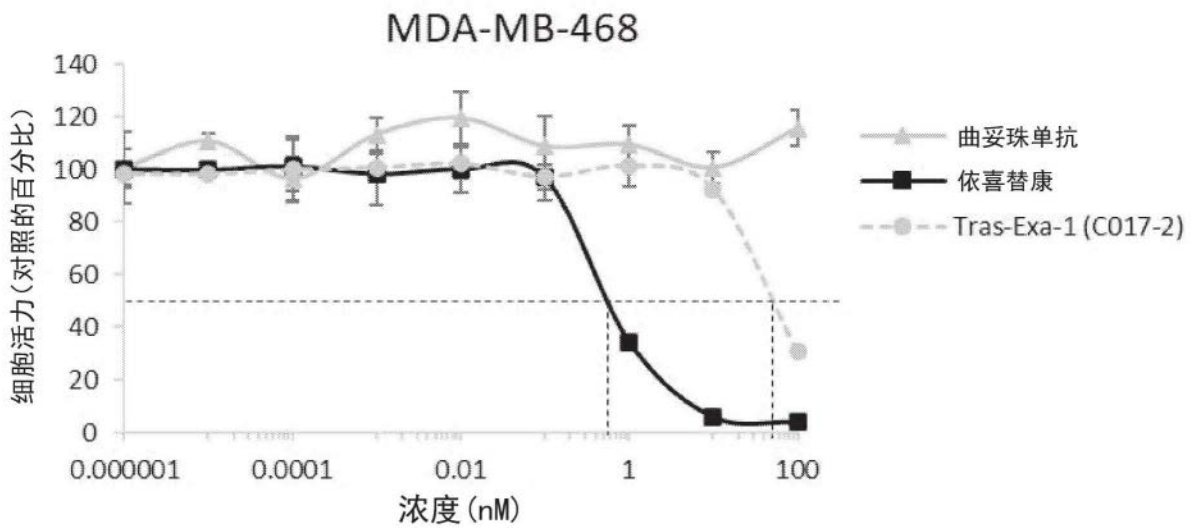


图2C

	HCC1954	JIMT-1	MDA-MB-468
曲妥珠单抗	N/A	N/A	N/A
依喜替康	1.5	1	0.6
曲妥珠单抗-Exa-1 (C017-2)	0.6	40	50
Tras-Exa/Exa 倍数变化	0.4	40	83
her2 水平	++	+	-

图2D

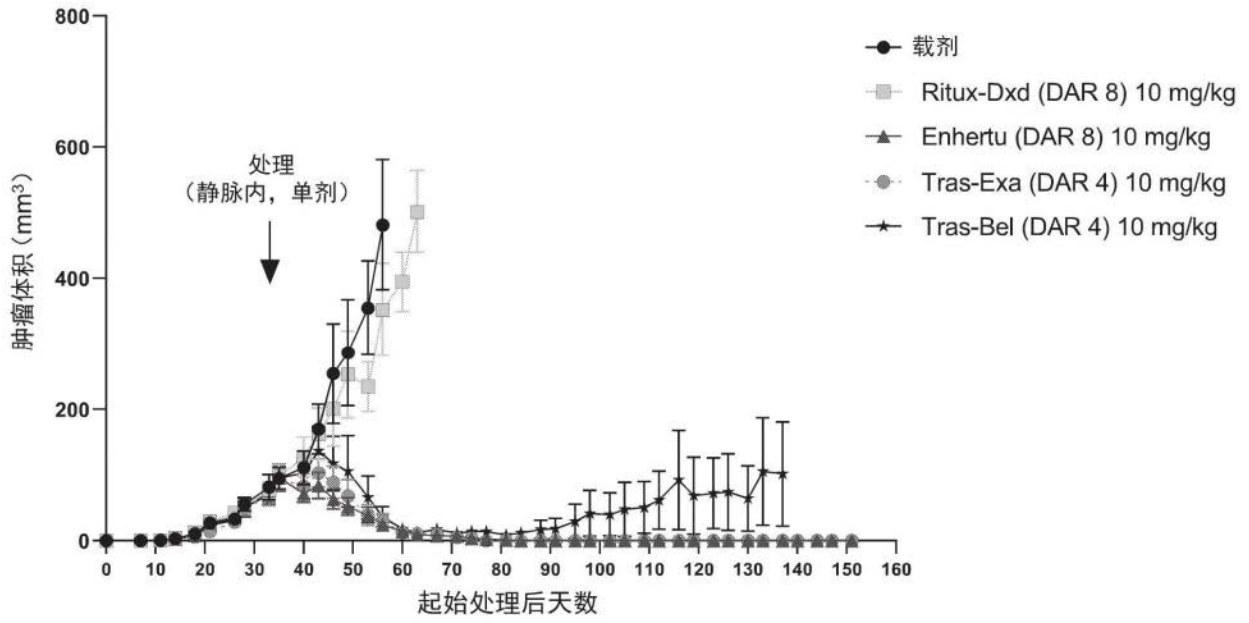


图3A

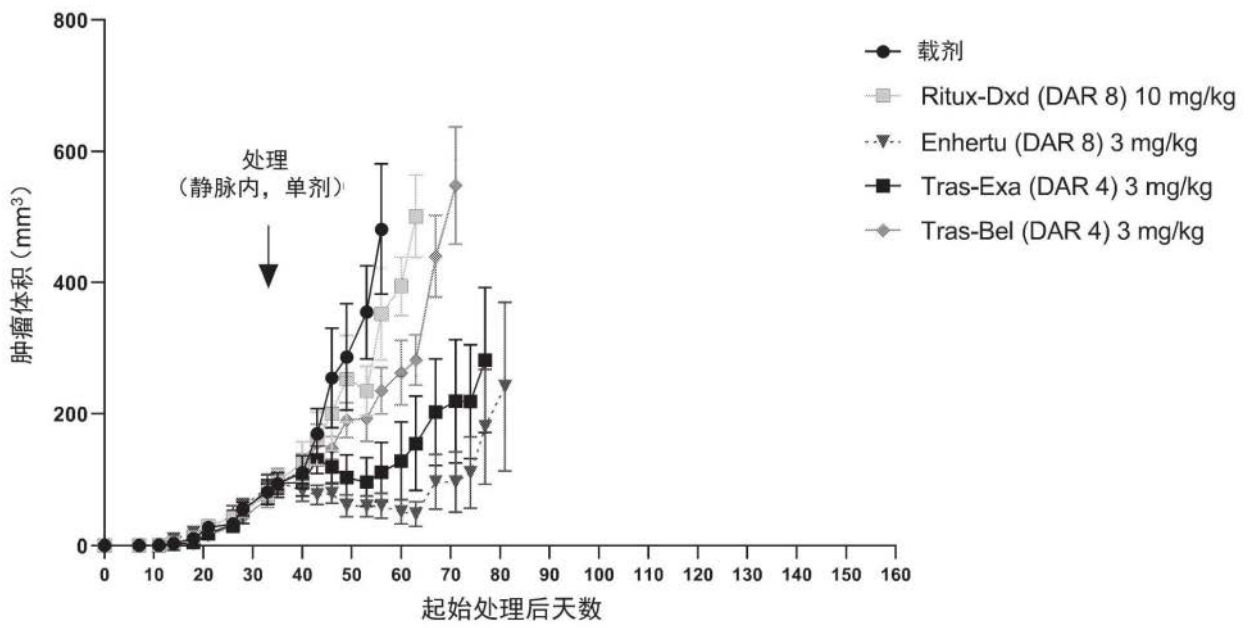


图3B

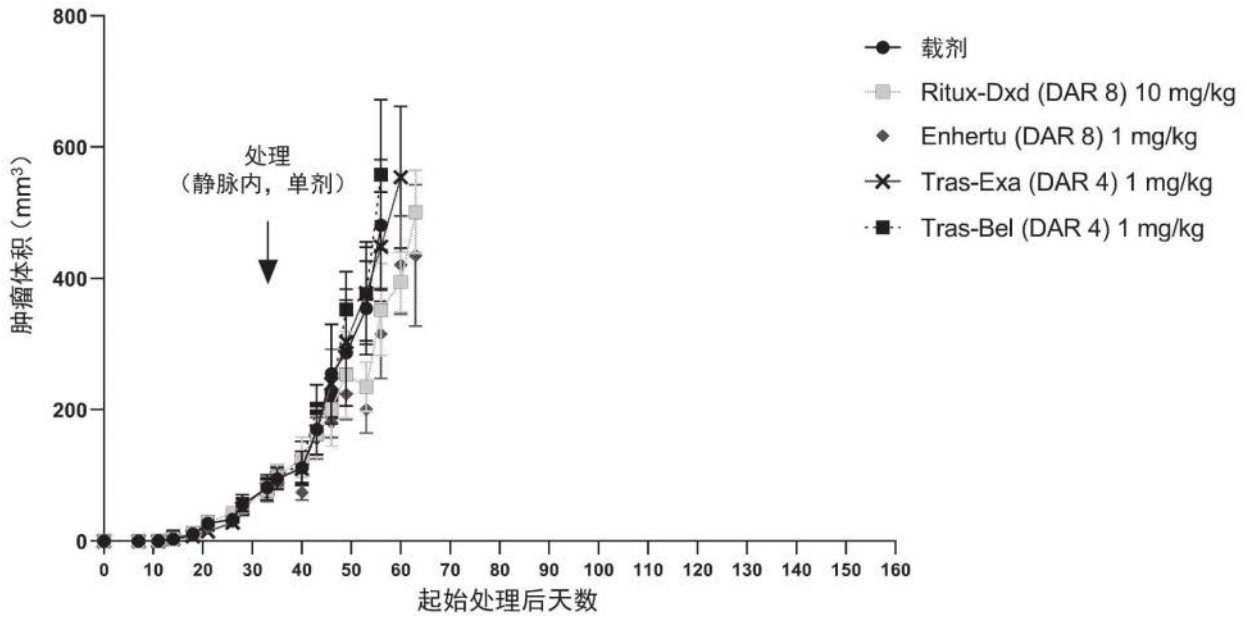


图3C

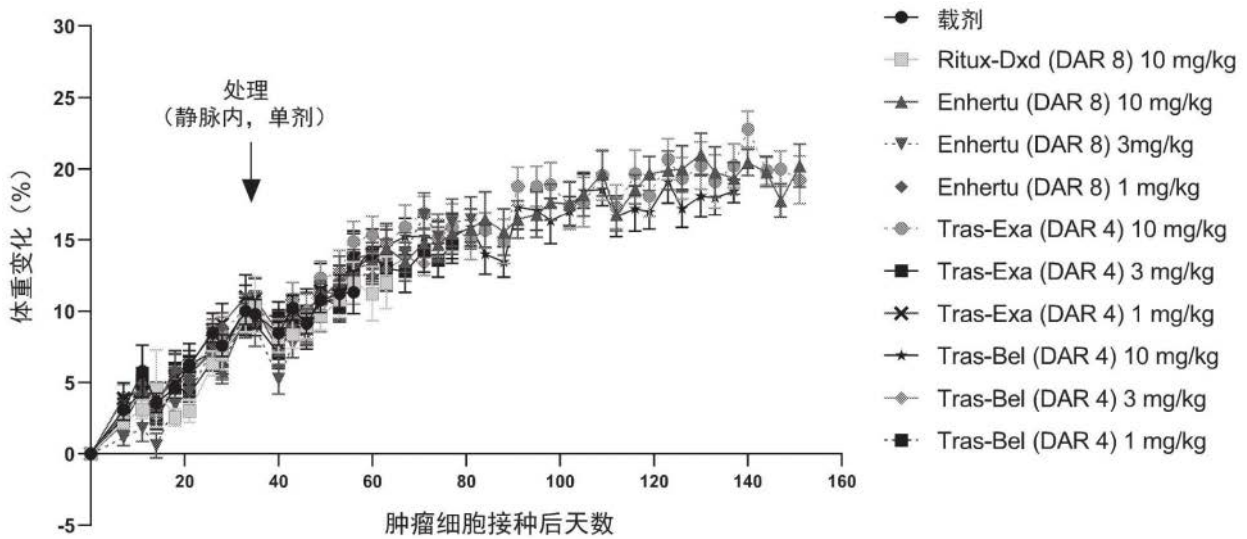


图3D

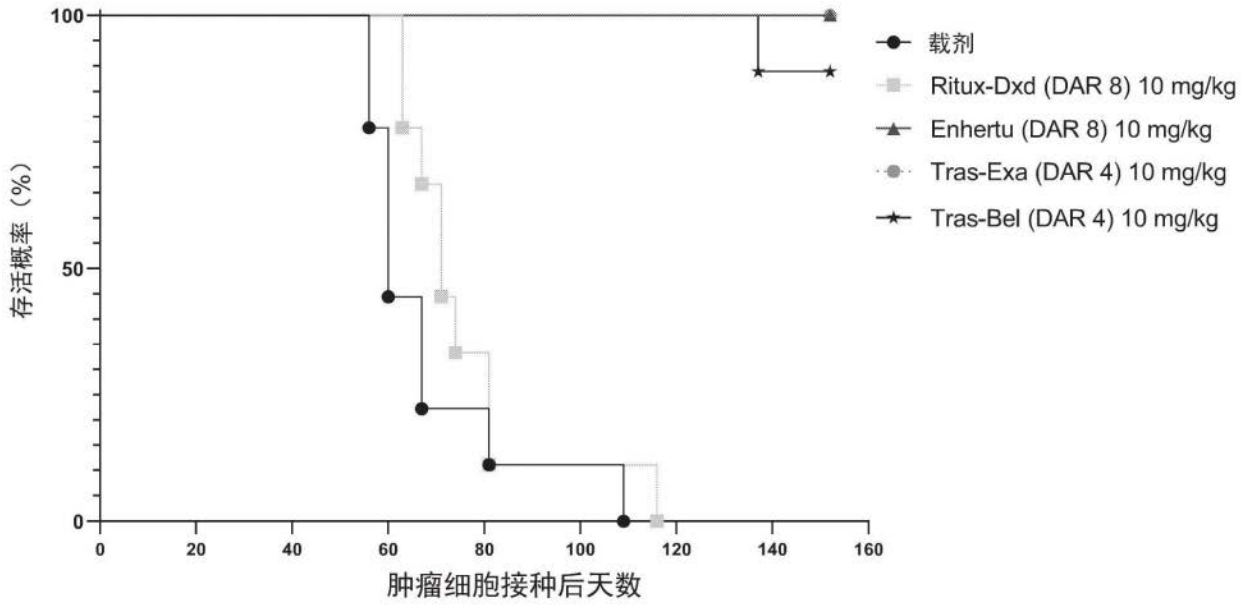


图4A

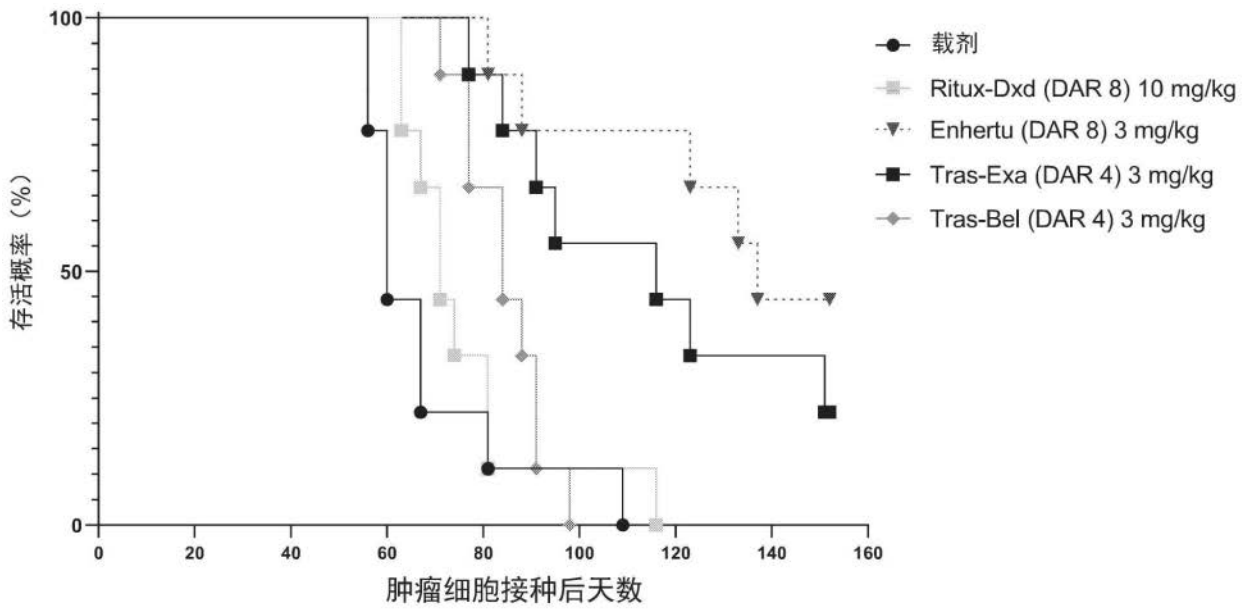


图4B

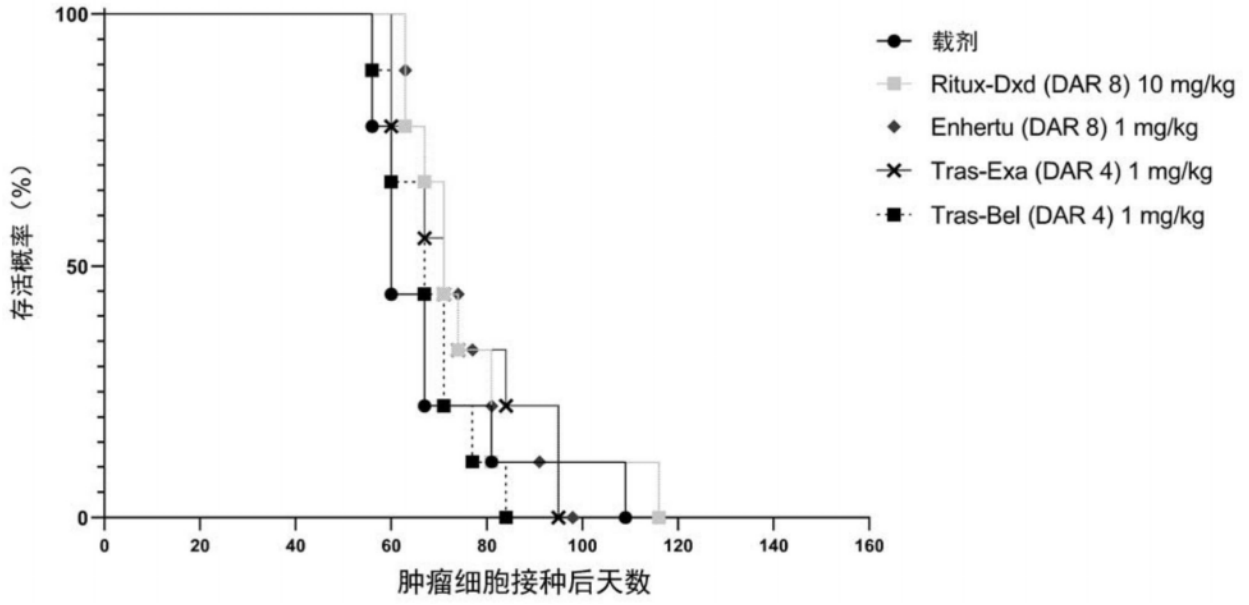


图4C

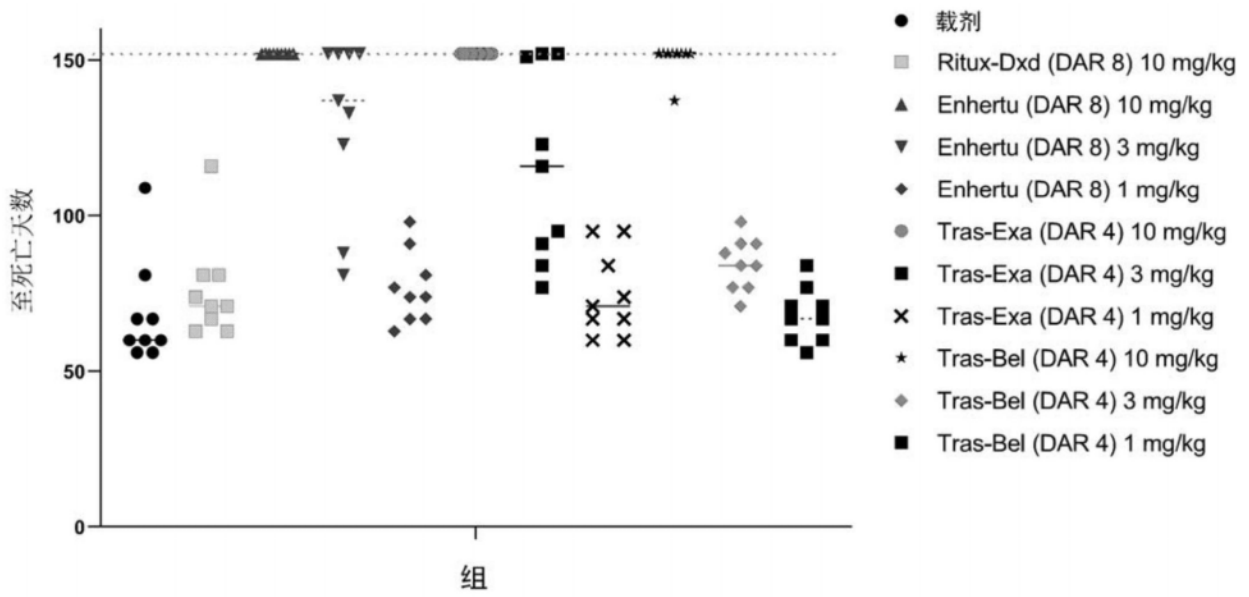


图4D