



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119488607 A

(43) 申请公布日 2025. 02. 21

(21) 申请号 202411470468.7

(22) 申请日 2018.07.09

(62) 分案原申请数据

201880096817.X 2018.07.09

(71) 申请人 辛瑟斯治疗股份有限公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 D·A·托马斯-卡亚特

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 张文辉

(51) Int. Cl.

A61K 47/68 (2017.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

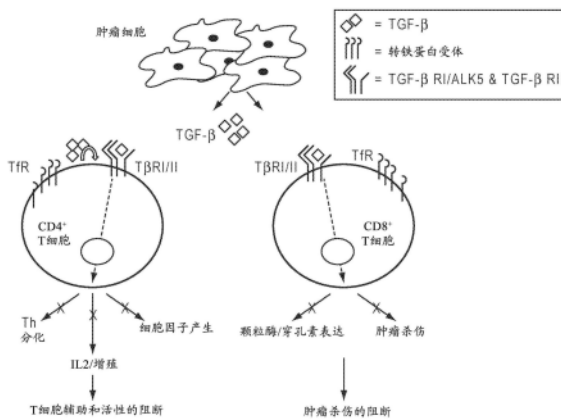
权利要求书2页 说明书64页 附图22页

(54) 发明名称

抗体-ALK5抑制剂偶联物及其用途

(57) 摘要

本公开内容涉及包含ALK5抑制剂的抗体-药物偶联物及其用途。



1. 抗体-ALK5抑制剂偶联物(ADC),其包含可操作地连接至与T细胞表面分子结合的抗体或抗原结合片段的ALK5抑制剂。
2. 根据权利要求1所述的ADC,其中所述ALK5抑制剂的IC₅₀为至少20nM。
3. 根据权利要求1所述的ADC,其中所述ALK5抑制剂是咪唑类化合物、吡唑类化合物或噻唑类化合物。
4. 根据权利要求3所述的ADC,其中所述ALK5抑制剂是咪唑-苯并二氧杂环戊烯化合物、咪唑-喹喔啉化合物、吡唑-吡咯化合物或噻唑类化合物。
5. 根据权利要求1所述的ADC,其中所述ALK5抑制剂通过不可裂解接头或可裂解接头连接至所述抗体或抗原结合片段。
6. 根据权利要求5所述的ADC,其中所述ALK5抑制剂通过不可裂解接头连接至所述抗体或抗原结合片段,所述不可裂解接头是N-马来酰亚胺基甲基环己烷1-羧酸酯、马来酰亚胺基己酰基或巯基乙酰氨基己酰基的接头。
7. 根据权利要求5所述的ADC,其中所述ALK5抑制剂通过可裂解接头连接至所述抗体或抗原结合片段,所述可裂解接头是二肽接头、二硫化物接头或脰接头。
8. 根据权利要求7所述的ADC,其中所述接头是对蛋白酶敏感的缬氨酸-瓜氨酸二肽接头、对谷胱甘肽敏感的二硫化物接头或对酸敏感的二硫化物接头。
9. 根据权利要求1所述的ADC,其中所述ALK5抑制剂通过所述抗体或抗原结合片段上的一个或多个半胱氨酸残基或所述抗体或抗原结合片段上的一个或多个赖氨酸残基偶联,任选地,其中所述ALK5抑制剂通过接头偶联。
10. 根据权利要求1所述的ADC,其中每个抗体或抗原结合片段分子的ALK5抑制剂分子的平均数量的范围为2至8。
11. 根据权利要求1所述的ADC,其中所述抗体是单克隆抗体。
12. 根据权利要求11所述的ADC,其中所述抗体是人的或人源化的。
13. 根据权利要求1所述的ADC,其中所述抗原结合片段是Fab、Fab'、F(ab')₂或Fv片段。
14. 根据权利要求13所述的ADC,其中所述抗原结合片段是人或人源化抗体的抗原结合片段。
15. 根据权利要求1所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是CD1、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD25、CD28、CD70、CD71、CD103、CD184、Tim3、LAG3、CTLA4或PD1。
16. 根据权利要求1所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是能够通过核内体再循环的T细胞表面分子。
17. 根据权利要求16所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是CD5或CD7。
18. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1所述的ADC和药学上可接受的载体。
19. 一种治疗癌症的方法,其包括向有此需要的受试者施用根据权利要求1所述的ADC。
20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述癌症是:
 - (a) 免疫原性癌症;
 - (b) 包含免疫浸润物的实体瘤;
 - (c) 可通过免疫疗法治疗的实体瘤;或
 - (d) 可通过ALK5抑制剂治疗的。
21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述癌症是表达肿瘤抗原的实体瘤。

22. 根据权利要求20所述的方法,其中所述癌症是可通过免疫疗法治疗的,并且所述免疫疗法是细胞因子疗法、过继性T细胞疗法、嵌合抗原受体(CAR)疗法或T细胞检查点抑制剂疗法。

23. 根据权利要求19所述的方法,其中所述ADC作为单一疗法或作为组合疗法方案的一部分施用。

抗体-ALK5抑制剂偶联物及其用途

[0001] 本申请是基于申请日为2018年7月9日,申请号为201880096817.X,发明名称为:“抗体-ALK5抑制剂偶联物及其用途”的中国发明专利申请的分案申请。

技术背景

[0002] 细胞因子的转化生长因子- β (TGF- β) 家族的成员是多功能蛋白,其在正常组织发育期间以及在疾病状态下调节多种生物学过程。TGF- β 家族成员参与炎症、伤口愈合、细胞外基质积累、骨形成、组织发育、细胞分化、心脏瓣膜重塑、组织纤维化和肿瘤进展等。(Barnard等,1990,Biochim Biophys Acta.1032:79-87;Sporn等,1992,J Cell Biol 119:1017-1021;Yingling等,2004,Nature Reviews,3:1011-1022;Janssens等,2005,Endocr Rev.,26(6):743-74)。迄今为止,已鉴定出三种哺乳动物同种型:TGF- β 1、TGF- β 2和TGF- β 3。(Massague,1990,Annu Rev Cell Biol 6:597-641)。转化生长因子超家族的其他成员包括活化素、抑制素、骨形态发生蛋白、生长和分化因子以及米勒抑制物。

[0003] TGF- β 1通过两个高度保守的单跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶受体,I型(ALK5)和II型TGF- β 受体转导信号。在配体诱导的结合和低聚后,II型受体使ALK5的GS区的丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化,导致ALK5活化并产生新的SMAD对接位点。SMAD是一种细胞内蛋白,其专门用于将TGF- β 的信号从细胞外环境传导到细胞核中。活化后,ALK5在其C-末端SS \times S-基序处使Smad2和Smad3磷酸化,从而导致它们与受体解离并与Smad4形成复合物。然后,Smad复合物易位到细胞核中,与细胞特异性DNA结合辅因子组装,以修饰调节细胞生长、分化和发育的基因的表达。

[0004] 活化素以类似于TGF- β 的方式转导信号。活化素与丝氨酸/苏氨酸激酶,活化素II型受体(ActRIIB)结合,并且活化的II型受体使ALK4的GS区中的丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化。活化的ALK4依次使Smad2和Smad3磷酸化。随后与Smad4形成异源Smad复合物导致活化素诱导的基因转录调控。

[0005] TGF- β 信号传导通过调节先天和适应性免疫细胞(包括T和B淋巴细胞、NK细胞和抗原呈递细胞,例如树突状细胞)来维持免疫稳态是必不可少的。TGF- β 通常被认为是一种免疫抑制性细胞因子,在胸腺T细胞发育以及维持外周耐受中起着至关重要的作用。TGF- β 抑制CD4⁺和CD8⁺T细胞增殖、细胞因子产生、细胞毒性和向T辅助细胞亚群的分化(Li等,2008,Ce11134:392-404)。TGF- β 还在由胸腺产生的天然调节性T细胞(nT_{regs})的发育中以及在炎症和各种疾病(例如癌症)的应答中在外周产生的诱导性T_{regs}(iT_{regs})中起着重要作用(Tran等,2012,J Mol Cell Bio 4:29-37,2012)。nT_{reg}是CD4⁺T细胞亚群的一小部分,通常是CD25⁺Fo \times P3⁺,并且主动抑制T细胞活化以帮助维持外周T细胞耐受。TGF- β 对于nT_{reg}存活和在外周中的扩增至关重要(Marie等,2005,J E \times p Med 201:1061-67)。在适当的炎症条件下,TGF- β 将幼稚CD4⁺T细胞转化为Fo \times P3⁺iT_{regs},以抑制局部的组织性驻留T细胞。在肿瘤自身中经常发现iT_{regs}水平升高,以防止T细胞介导的肿瘤清除(Whiteside,2014,E \times pert Opin Biol Ther 14:1411-25)。

[0006] 通常,高水平的TGF- β 表达与较差的临床预后有关。通常,肿瘤指定TGF- β 途径并利

用它来避免T细胞介导的肿瘤清除 (Yang等, Trends Immunol 31:220-7, 2010; Tu等, Cytokine Growth Factor Rev 25:423-35, 2014)。这以两种方式发生。一种是, TGF- β 直接抑制CD4⁺和CD8⁺T细胞扩增、细胞因子产生和肿瘤细胞杀伤。其次, TGF- β 分别对nT_{regs}和iT_{regs}的存活和/或转化至关重要, 它们也抑制了免疫介导的肿瘤清除。在多个临床前小鼠模型中, 由于T细胞介导的肿瘤清除增加, TGF- β 的中和作用已证明降低了肿瘤负担。重要的是, 通过显性阴性TGF- β RII的表达或可溶性TGF- β 受体对T细胞中TGF- β 信号传导的抑制足以恢复体内有效的免疫介导的肿瘤清除。Gorelik等, 2001, Nat Med 7:1118-22; Thomas等, 2005, Cancer Cell 8:369-80。

[0007] 除了其对免疫系统的作用外, TGF- β 信号传导在肿瘤发展中具有突出但复杂的作用。临床前研究表明, TGF- β 对肿瘤自身具有悖论作用, 并且对周围基质细胞具有混杂作用。在癌症进展的早期阶段, TGF- β 通过调节细胞周期介质来抑制肿瘤的生长和扩增。然而, 在晚期阶段, TGF- β 通过诱导上皮到间质转化 (EMT) 以及通过其对基质成纤维细胞、血管生成和细胞外基质 (ECM) 的作用而失去其生长抑制特性, 并促进肿瘤转移 (Connolly等, 2012, Int J Bio 8:964-78)。如果在错误阶段进行递送, 则TGF- β 信号传导的广泛抑制具有促进肿瘤转移和/或抑制间接加重肿瘤进展的非肿瘤基质细胞群的风险 (Cui等, 1996, Cell 86:531-; Siegel等, 2003, PNAS 100:8430-35; Connolly等, 2011, Cancer Res 71:2339-49; Achyut等, 2013, PLOS Genetics 9:1-15)。TGF- β 抑制剂可能促使肿瘤变得更具侵袭性和转移性, 代替预期的生长抑制作用。

[0008] 尽管对肿瘤自身具有悖论作用并且TGF- β 受体广泛表达, 但是长期以来一直关注抑制TGF- β 途径作为癌症疗法。抑制剂已包括中和的TGF- β 抗体、TGF- β 2反义RNA和小分子ATP竞争性ALK5激酶抑制剂。已开发的一些经典ALK5抑制剂是吡唑基、咪唑基和三唑基的 (Bonafoux等, 2009, Expert Opin Ther Patents 19:1759-69; Ling等, 2011, Current Pharma Biotech 12:2190-2202)。许多ALK5抑制剂已在基于体外细胞的测定以及体内小鼠异种移植和同基因肿瘤模型中进行了测试, 并且已证明显著的功效 (Neuzillet等, 2015, Pharm&Therapeutics 147:22-31)。然而, 由于对宿主毒性的担忧, 因为TGF- β 受体无处不在地表达, 并且担心无意地促进肿瘤生长, 所以大多数TGF- β 抑制剂, 尤其是ALK5抑制剂, 仍处于临床前发现阶段。例如, 在大鼠的临床前毒理学研究中, 两种不同系列的ALK5抑制剂显示出以瓣膜间质细胞的出血、炎症、变性和增殖为特征的心脏瓣膜病变 (Anderton等, 2011, Tox Pathol 39:916-24)。

[0009] 因此, 需要将ALK5抑制剂靶向在其中TGF- β 信号传导的抑制在治疗上有用的细胞类型, 同时使宿主组织毒性 (例如在心脏组织中观察到的毒性) 最小化。

发明内容

[0010] 为了避免靶标上的宿主毒性以及防止由于ALK5抑制剂疗法而导致的肿瘤进展的无意恶化, 本发明人开发了一种将化合物仅导向那些赋予治疗益处的细胞的新的方法。

[0011] 对于癌症的治疗, 该方法涵盖通过抗体将ALK5抑制剂导向T细胞区室, 以促进T细胞介导的肿瘤清除并建立长期缓解而不引起全身毒性。不受理论的束缚, 据信不仅抑制T细胞中的TGF- β 信号传导会直接增强T细胞介导的清除, 而且它还会抑制T细胞向诱导性T_{regs}的转化并降低肿瘤中天然T_{reg}生存力。因此, 抑制T细胞中TGF- β 信号传导不仅恢复CD4⁺和CD8⁺

$^{+}$ T细胞活性,而且去除T细胞上的 T_{reg} “刹车”,以有效地重新参与免疫系统。更重要的是,从肿瘤的角度以及宿主组织的毒性来看,仅在T细胞中抑制TGF- β 信号传导会比广泛TGF- β 抑制更安全。

[0012] 因此,本公开内容提供了抗体-药物偶联物(ADC),其中所述药物是ALK5抑制剂。ADC的抗体组分可以是与T细胞表面分子结合的抗体或抗原结合片段。第4.2部分描述了可以在本公开内容的ADC中使用的示例性抗体组分。在一些实施方案中,ALK5抑制剂是咪唑-苯并二氧杂环戊烯化合物、咪唑-喹啉化合物、吡唑-吡咯化合物或噻唑类化合物。示例性的ALK5抑制剂在第4.3部分和表1-3中描述。

[0013] ALK5抑制剂可以直接偶联至抗体组分或通过接头连接至抗体组分。接头可以是不可裂解接头,或优选地,可裂解接头。示例性的不可裂解接头和可裂解接头在第4.4部分中描述。每个抗体或抗原结合片段连接的ALK5抑制剂分子的平均数量可以变化,并且通常每个抗体或抗原结合片段2至8个ALK5抑制剂分子。载药量在第4.5部分中详细描述。

[0014] 本公开内容还提供了包含本公开内容的ADC的药物组合物。可用于配制包含本公开内容的ADC的药物组合物的示例性药物赋形剂在第4.6部分中描述。

[0015] 本公开内容还提供了一种治疗癌症的方法,其通过向有此需要的受试者施用本公开内容的ADC或本公开内容的药物组合物。本公开内容的ADC和药物组合物可以作为单一疗法或作为组合疗法的一部分施用。可以用本公开内容的ADC和药物组合物治疗的示例性癌症以及示例性的组合疗法在第4.7部分中描述。

附图说明

[0016] 图1示出了TGF- β 对 $CD4^{+}$ 和 $CD8^{+}$ T细胞的作用。在肿瘤进展期间,可衍生自肿瘤和T细胞自身的TGF- β 抑制 $CD4^{+}$ T细胞功能,例如细胞因子产生、增殖和Th分化。同时,TGF- β 还抑制细胞毒性 $CD8^{+}$ T细胞中颗粒酶和穿孔素的表达,从而抑制肿瘤的杀伤。抑制 $CD4^{+}$ 和 $CD8^{+}$ T细胞群二者都可以显著抑制T细胞介导的肿瘤清除。

[0017] 图2示出了在肿瘤进展期间TGF- β 对 T_{reg} 细胞的作用。在肿瘤进展期间,通常在肿瘤内发现 nT_{reg} 和 iT_{reg} 细胞,以原位控制T细胞介导的功能。TGF- β 促进 nT_{reg} 细胞生存力和 iT_{reg} 细胞转化,以抑制T细胞介导的肿瘤清除。在肿瘤部位处 T_{reg} 细胞的增加确保了浸润肿瘤的T细胞也被阻止清除肿瘤。

[0018] 图3示出了本公开内容的ADC对 $CD4^{+}$ 和 $CD8^{+}$ T细胞的作用机制。T细胞靶向性抑制TGF- β 信号传导恢复 $CD4^{+}$ T细胞活性和 $CD8^{+}$ T细胞介导的肿瘤杀伤。

[0019] 图4示出了本公开内容的ADC对 T_{reg} 细胞的作用机制。T细胞靶向性抑制TGF- β 信号传导也阻断原位 T_{reg} 介导的免疫介导的肿瘤清除抑制。

[0020] 图5A-5D示出了在HEK293T细胞中化合物A-D抑制TGF- β 诱导的荧光素酶活性。图5A:化合物A;图5B:化合物B;图5C:化合物C;图5D:化合物D。

[0021] 图6A-6C示出了化合物A-D的MTS增殖测定数据。化合物A-C在经TGF- β 处理的 $CD4^{+}$ T细胞中恢复增殖。图6A:化合物A-D的数据。在图6A中,在“无TGF- β ”上方的标有“A”、“B”、“C”和“D”的条示出了使用化合物以100nM且在没有TGF- β 的情况下进行的实验结果。图6B:化合物B的数据;图6C:化合物C的数据。

[0022] 图7A-7B示出了本公开内容的示例性ADC(ADC2)的LC-MS数据。图7A:ADC重链的LC-

MS数据;图7B:ADC轻链的LC-MS数据。

[0023] 图8是通过SEC纯化的S-4FB/Ab比为6的ADC2的色谱图。纯化的ADC2的SEC分析表明聚集低于5%。

[0024] 图9A-9F示出了本公开内容的示例性抗体(抗-转铁蛋白受体抗体R17217)在原代小鼠CD4⁺T细胞上诱导抗体靶标转铁蛋白受体(TfR)的内在化。图9A:没有抗-转铁蛋白受体抗体的对照;图9B:与抗-转铁蛋白受体抗体一起孵育15min;图9C:与抗转铁蛋白受体抗体一起孵育30min;图9D:与抗转铁蛋白受体抗体一起孵育60min;图9E:与抗转铁蛋白受体抗体一起孵育180min;图9F:在3小时过程中的平均荧光强度(MFI)。

[0025] 图10示出了通过本公开内容的示例性ADC(ADC1)在小鼠CTLL2细胞中逆转TGF- β 介导的增殖抑制。

[0026] 图11示出了通过本公开内容的示例性ADC(ADC1)对TGF- β 活化的原代CD8⁺T细胞中颗粒酶B表达的抑制。与游离ALK5抑制剂相比,ADC1部分恢复颗粒酶B表达。

[0027] 图12示出了本公开内容的示例性ADC(ADC1)降低了iT_{reg}产生,类似于100mM的游离ALK5抑制剂。

[0028] 图13A-13D示出了将CD5(图13A和图13C)和CD2(图13B和图13D)内在化到原代活化的小鼠CD3⁺T细胞中。

[0029] 图14示出了在T3A#2-#5的存在下将活化的小鼠CD3⁺T细胞孵育36小时后表达颗粒酶(GzmB)的CD8⁺T细胞的水平。

[0030] 图15示出了在T3A#2-#5的存在下将活化的小鼠CD3⁺T细胞孵育36小时后分泌的IL2水平。

[0031] 图16示出了在T3A#2-#5的存在下将活化的小鼠CD3⁺T细胞孵育36小时后分泌的IFN- γ 水平。

[0032] 图17示出了在T3A#2-#5的存在下将活化的小鼠CD3⁺T细胞孵育72小时后T细胞增殖的量。

[0033] 图18示出了将CD7内在化到原代活化的人CD3⁺T细胞中。

具体实施方式

[0034] 本公开内容提供了可用于治疗癌症的抗体-药物偶联物(ADC),其包含直接或通过接头与ALK5抑制剂共价结合的抗体组分。本公开内容的ADC的概述在第4.1部分中给出。ADC的抗体组分可以是完整抗体或其片段。可在本公开内容的ADC中使用的抗体在第4.2部分中详细描述。可以在本公开内容的ADC中使用的ALK5抑制剂在第4.3部分中描述。本公开内容的ADC通常包含在抗体与ALK5抑制剂之间的接头。可以在本公开内容的ADC中使用的示例性接头在第4.4部分中描述。本公开内容的ADC的每个抗体可以包含不同数量的ALK5抑制剂部分。载药量将在第4.5部分中详细讨论。本公开内容还提供了包含本公开内容的ADC的药物制剂。包含ADC的药物制剂在第4.6部分中描述。本公开内容还提供使用本公开内容的ADC治疗各种癌症的方法。使用本公开内容的ADC作为单一疗法或作为组合疗法的一部分来治疗癌症的方法在第4.7部分中描述。

[0035] 4.1抗体药物偶联物

[0036] 本公开内容的ADC通常由ALK5抑制剂组成,该ALK5抑制剂通常通过接头共价附接

至抗体,使得共价附接不干扰与抗体靶标结合。

[0037] 用于将药物与抗体偶联的技术是本领域众所周知的(参见,例如Hellstrom等, *Controlled Drug Delivery*, 第二版, 第623-53页 (Robinson等, 编辑, 1987)); Thorpe等, 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58; Dubowchik等, 1999, *Pharmacology and Therapeutics* 83: 67-123; 和Zhou, 2017, *Biomedicines* 5(4):E64)。ALK5抑制剂优选通过位点特异性偶联附接至本公开内容的ADC中的抗体组分。例如, ALK5抑制剂可以通过一个或更多个天然或工程化的半胱氨酸、赖氨酸或谷氨酰胺残基、一种或更多种非天然氨基酸(例如, 对乙酰基苯丙氨酸(pAcF)、对叠氮基甲基-L-苯丙氨酸(pAMF)或硒代半胱氨酸(Sec))、一种或更多种聚糖(例如, 岩藻糖、6-硫代岩藻糖、半乳糖、N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)或唾液酸(SA))、或一种或更多种四至六个氨基酸的短肽标签于抗体组分偶联。参见例如Zhou, 2017, *Biomedicines* 5(4):E64, 其内容通过引用整体并入本文。

[0038] 在一个实施例中, 抗体或其片段通过共价键(例如, 肽键)经抗体的N-末端或C-末端或在内部与另一种蛋白质的氨基酸序列(或其部分, 例如, 该蛋白质的至少10、20或50个氨基酸部分)融合。抗体或其片段可以在抗体恒定结构域的N-末端与另一种蛋白质连接。重组DNA程序可用于产生此类融合, 例如, 如WO 86/01533和EP0392745中描述的。在另一个实施例中, 效应分子可以增加体内半衰期, 和/或增强抗体穿过上皮屏障到达免疫系统的递送。这种类型的合适效应分子的实例包括聚合物、白蛋白、白蛋白结合蛋白或白蛋白结合化合物, 例如在PCT公开号No. WO 2005/117984中描述的那些。

[0039] 代谢过程或反应可以是酶促过程, 例如ADC的肽接头的蛋白水解裂解, 或官能团(例如酰胺、酯或酰胺)的水解。细胞内代谢物包括但不限于在进入、扩散、摄取或转运到细胞后已经历细胞内裂解的抗体和游离药物。

[0040] 术语“细胞内裂解的”和“细胞内裂解”是指在细胞内部在抗体-药物偶联物(ADC)上的代谢过程或反应, 由此在药物部分(D)与抗体(Ab)之间的共价附接, 即接头断裂, 导致游离药物从细胞内部的抗体解离。因此, ADC的裂解部分是细胞内代谢物。

[0041] 4.2 抗体组分

[0042] 本公开内容提供了抗体药物偶联物, 其中抗体组分与T细胞表面分子结合。除非另有说明, 否则术语“抗体”(Ab)是指与特定抗原特异性结合或与之发生免疫反应的免疫球蛋白分子, 包括多克隆、单克隆、基因工程化和其他修饰形式的抗体, 包括但不限于嵌合抗体、人源化抗体、异源偶联抗体(例如, 双特异性抗体、双抗体、三抗体和四抗体)和抗体的抗原结合片段, 包括例如Fab'、F(ab')₂、Fab、Fv、rIgG和scFv片段。此外, 除非另有说明, 否则术语“单克隆抗体”(mAb)意指包括完整分子以及能够与蛋白质特异性结合的抗体片段(例如Fab和F(ab')₂片段)。Fab和F(ab')₂片段缺少完整抗体的Fc片段, 从动物或植物的循环中清除更快, 并且与完整抗体相比可能具有更少的非特异性组织结合(Wahl等, 1983, *J. Nucl. Med.* 24:316)。

[0043] 术语“scFv”是指单链Fv抗体, 其中来自传统抗体的重链和轻链的可变结构域已连接形成一条链。

[0044] 提及“VH”是指抗体的免疫球蛋白重链的可变区, 包括Fv、scFv或Fab的重链。提及“VL”是指免疫球蛋白轻链的可变区, 包括Fv、scFv、dsFv或Fab的轻链。抗体(Abs)和免疫球蛋白(Igs)是具有相同结构特征的糖蛋白。尽管抗体表现出与特定靶标的结合特异性, 但是

免疫球蛋白包括抗体和缺乏靶标特异性的其他抗体样分子二者。天然抗体和免疫球蛋白通常是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)构成。每条重链在氨基末端具有可变结构域(VH),随后是许多恒定结构域。每条轻链在氨基末端(VL)具有可变结构域,并且在羧基末端具有恒定结构域。

[0045] 为了在细胞内最优递送ALK5抑制剂,优选使抗体内在化。内在化抗体与细胞表面的靶分子结合后,由于结合而被细胞内在化。这样的结果是ADC被细胞摄取。允许在结合其抗原后确定抗体的内在化的方法是技术人员已知的,并且例如在PCT公开号W0 2007/070538的第80页和下文的第5.11部分中描述。一旦内在化,如果使用可裂解接头将ALK5抑制剂附接至抗体(例如,如第4.4部分中描述的),则可以通过在溶酶体中裂解或通过其他细胞机制从抗体中释放ALK5抑制剂。

[0046] 术语“抗体片段”是指全长抗体的一部分,通常是靶标结合或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段。“Fv”片段是包含完整靶标识别和结合位点的最小抗体片段。该区域由紧密的非共价缔合的一条重链和一条轻链可变结构域的二聚体(VH-VL二聚体)组成。以此配置,每个可变结构域的三个CDR相互作用以在VH-VL二聚体的表面上限定靶标结合位点。通常,六个CDR赋予靶标与抗体的结合特异性。然而,在一些情况下,甚至单个可变结构域(或仅包含三个对靶标特异性的CDR的Fv的一半)也可以具有识别和结合靶标的能力。“单链Fv”或“scFv”抗体片段在单条多肽链中包含抗体的VH和VL结构域。通常,Fv多肽在VH与VL结构域之间还包含多肽接头,其使得scFv能够形成用于靶标结合的所需结构。“单一结构域抗体”由对TNF- α 表现出足够亲和力的单一VH或VL结构域构成。在一个具体的实施方案中,单一结构域抗体是骆驼科动物抗体(参见,例如,Riechmann,1999,Journal of Immunological Methods 231:25-38)。

[0047] Fab片段包含轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab'片段与Fab片段的区别在于,在重链CH1结构域的羧基末端添加了一些残基,包括来自抗体铰链区的一个或更多个半胱氨酸。F(ab')₂片段通过在F(ab')₂胃蛋白酶消化产物的铰链半胱氨酸处的二硫键裂解而产生。抗体片段的另外的化学偶联是本领域普通技术人员已知的。

[0048] 在某些实施方案中,本公开内容的抗体是单克隆抗体。如本文所用,术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。术语“单克隆抗体”是指衍生自单个克隆的抗体,包括任何真核、原核或噬菌体克隆,而不是其产生方法。可以使用本领域已知的多种技术来制备可用于本公开内容的单克隆抗体,包括使用杂交瘤、重组和噬菌体展示技术或其组合。本公开内容的抗体包括嵌合抗体、灵长类化抗体、人源化抗体或人抗体。

[0049] 本公开内容的抗体可以是嵌合抗体。如本文所用,术语“嵌合”抗体是指具有衍生自非人免疫球蛋白的可变序列的抗体,例如大鼠或小鼠抗体,以及通常选自人免疫球蛋白模板的人免疫球蛋白恒定区。用于产生嵌合抗体的方法是本领域已知的。参见,例如,Morrison,1985,Science 229(4719):1202-7; Oi等,1986,BioTechniques 4:214-221; Gillies等,1985,J.Immunol.Methods125:191-202;美国专利号5,807,715;4,816,567;和4,816,397,其通过引用整体并入本文。

[0050] 本公开内容的抗体可以是人源化的。非人(例如,鼠)抗体的“人源化”形式是嵌合免疫球蛋白,免疫球蛋白链或其片段(例如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其他靶标结合亚结构域),其包含非人免疫球蛋白的最小序列。通常,人源化抗体将包含至少一个,并且通常

是两个可变结构域的基本上全部,其中全部或基本上全部的CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些,并且全部或基本上全部的FR区是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体还可以包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白共有序列的一部分。抗体人源化的方法是本领域已知的。参见,例如,Riechmann等,1988,Nature332:323-7;Queen等的美国专利号5,530,101;5,585,089;5,693,761;5,693,762;和6,180,370;欧洲专利公开号EP239400;PCT公开W0 91/09967;美国专利号5,225,539;欧洲专利公开号EP592106;欧洲专利公开号EP519596;Padlan,1991,Mol.Immunol.,28:489-498;Studnicka等,1994,Prot.Eng.7:805-814;Roguska等,1994,Proc.Natl.Acad.Sci.91:969-973;和美国专利号5,565,332,其全部通过引用整体并入本文。

[0051] 本公开内容的抗体可以是人抗体。完全“人”抗体可能是人患者的疗法治疗所需的。如本文所用,“人抗体”包括具有人免疫球蛋白氨基酸序列的抗体,并且包括从人免疫球蛋白文库或从针对一种或更多种人免疫球蛋白转基因的动物中分离的且不表达内源性免疫球蛋白的抗体。人抗体可以通过本领域已知的多种方法来制造,包括使用衍生自人免疫球蛋白序列的抗体文库的噬菌体展示方法。参见美国专利号4,444,887和4,716,111;和PCT公开号W0 98/46645、W0 98/50433、W0 98/24893、W0 98/16654、W0 96/34096、W0 96/33735和W0 91/10741,其每一个通过引用整体并入本文。人抗体也可以使用不能表达功能性内源性免疫球蛋白但可以表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠产生。参见,例如,PCT公开W0 98/24893、W0 92/01047、W0 96/34096、W0 96/33735;美国专利号5,413,923、5,625,126、5,633,425、5,569,825、5,661,016、5,545,806、5,814,318、5,885,793、5,916,771和5,939,598,其通过引用整体并入本文。此外,可以聘请例如Medare×(新泽西州普林斯顿)、Astellas Pharma(伊利诺伊州迪尔菲尔德)、Amgen(加利福尼亚州千橡市)和Regeneron(纽约州塔里敦)的公司使用类似于下述的技术提供针对所选抗原的人抗体。可以使用称为“指导选择”的技术来生成识别所选表位的完全人抗体。在这种方法中,所选非人单克隆抗体,例如小鼠抗体,被用来指导识别相同表位的完全人抗体的选择(Jespers等,1988,Biotechnology12:899-903)。

[0052] 本公开内容的抗体可以是灵长类化的。术语“灵长类化抗体”是指包含猴可变区和人恒定区的抗体。用于产生灵长类化抗体的方法是本领域已知的。参见,例如,美国专利No.5,658,570;5,681,722;和5,693,780,其通过引用整体并入本文。

[0053] 本公开内容的抗体包括衍生抗体。例如但不限于,衍生抗体通常通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、由已知保护/封闭基团的衍生化、蛋白水解裂解、与细胞配体或其他蛋白质的连接(参见讨论抗体偶联物的第4.1部分)等进行修饰。可以通过已知技术进行许多化学修饰,包括但不限于特异性化学裂解、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。此外,衍生物可以包含一种或更多种非天然氨基酸,例如使用ambr×技术(参见,例如,Wolfson,2006,Chem.Biol.13(10):1011-2)。

[0054] 在本公开内容的另一个实施方案中,抗体或其片段可以是其序列已被修饰以相对于相应的野生型序列改变至少一个恒定区介导的生物学效应子功能的抗体或抗体片段。例如,在一些实施方案中,可以修饰本公开内容的抗体以相对于未经修饰的抗体减少至少一种恒定区介导的生物学效应子功能,例如,减少与Fc受体(Fc γ R)或与C1q的结合。可以通过在Fc γ R或C1q相互作用所必需的特定区域使抗体的免疫球蛋白恒定区片段突变来减少Fc

γ R和C1q结合(参见,例如,Canfield and Morrison,1991,J.E×p.Med.173:1483-1491;Lund等,1991,J.Immunol.147:2657-2662;Lo.等,2017,J Biol Chem 292:3900-08;Wang等,2018,Protein Cell 9:63-73)。

[0055] 抗体的Fc γ R结合能力的降低还可以降低依赖于Fc γ R相互作用的其他效应子功能,例如调理作用、吞噬作用和抗体依赖性细胞毒性(“ADCC”),而C1q结合的减少可以降低补体依赖性细胞毒性(“CDCC”)。因此,效应子功能的减少或消除可以防止被本公开内容的ADC靶向的T细胞通过ADCC或CDC被破坏。因此,在一些实施方案中,通过抗体的Fc部分的选择性突变来修饰抗体的效应子功能,从而其保持抗原特异性和内在化能力,但是消除了ADCC/CDC功能。

[0056] 在本领域中已描述了许多用于减少Fc γ R和C1q结合的突变,并且此类突变可以包括在本公开内容的ADC中。例如,美国专利号US 6,737,056公开了在位置238、265、269、270、292、294、295、298、303、324、327、329、333、335、338、373、376、414、416、419、435、438或439的单一Fc区氨基酸修饰导致与Fc γ RII和Fc γ RIII的结合减少。美国专利号9,790,268公开了在氨基酸位置298处的天冬酰胺残基和在氨基酸位置300处的丝氨酸或苏氨酸残基减少了Fc γ R结合。PCT公开号W0 2014/190441描述了具有减少的Fc γ R结合的经修饰的Fc结构域具有L234D/L235E:L234R/L235R/E233K、L234D/L235E/D265S:E233K/L234R/L235R/D265S、L234D/L235E/E269K:E233K/L234R/L235R/E269K、L234D/L235E/K322A:E233K/L234R/L235R/K322A、L234D/L235E/P329W:E233K/L234R/L235R/P329W、L234D/L235E/E269K/D265S/K322A:E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322A、L234D/L235E/E269K/D265S/K322E/E333K:E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322E/E333K突变,其中分号之前的突变设置在第一Fc多肽中,分号之后的突变在Fc二聚体的第二Fc多肽中。可以减少Fc γ R受体结合以及C1q结合的突变包括N297A、N297Q、N297G、D265A/N297A、D265A/N297G、L235E、L234A/L235A和L234A/L235A/P329A(Lo.等,2017,J Biol Chem 292:3900-08;Wang等,2018,Protein Cell 9:63-73)。

[0057] 作为使恒定区突变以减少效应子功能的替代方案,例如如上所述使Fc结构域突变,可以通过利用抗体片段(例如,Fab、Fab'或F(ab')₂片段)消除效应子功能。

[0058] 在本公开内容的另一些实施方案中,可以修饰抗体或其片段以相对于未经修饰的抗体获得或改善至少一种恒定区介导的生物学效应子功能,例如以增强Fc γ R相互作用(参见,例如,US2006/0134709)。例如,本公开内容的抗体可以具有以比相应的野生型恒定区更大的亲和力结合Fc γ RIIA、Fc γ RIIB和/或Fc γ RIIIA的恒定区。

[0059] 因此,本公开内容的抗体可以具有生物学活性的改变,导致调理作用、吞噬作用或ADCC降低。此类改变是本领域已知的。例如,降低ADCC活性的抗体修饰在美国专利号5,834,597中描述。

[0060] 在又一方面,抗体或其片段可以是已被修饰以增加或降低其与胎儿Fc受体FcRn的结合亲和力的抗体或抗体片段,例如,通过使免疫球蛋白恒定区片段在参与FcRn相互作用的特定区域突变(参见,例如W0 2005/123780)。此类突变可以增加抗体与FcRn的结合,这保护抗体免于降解并增加其半衰期。

[0061] 在又一方面,抗体具有插入其一个或更多个高变区中的一个或更多个氨基酸,例如,如Jung和Plückthun,1997,Protein Engineering 10(9):959-966;Yazaki等,2004,

Protein Eng.Des Sel.17(5):481-9;和美国专利公开号2007/0280931中描述的。

[0062] 抗体的靶标将取决于ADC的所需治疗应用。通常,靶标是存在于期望将ALK5抑制剂(例如T细胞)和抗体(优选在与靶标结合时内在化)递送到其中的细胞表面上的分子。内在化抗体在例如Franke等,2000,Cancer Biother.Radiopharm.15:459-76;Murray,2000,Semin.Oncol.27:64-70;Breitling等,Recombinant Antibodies,John Wiley,和Sons,New York,1998中描述。

[0063] 期望产生与T细胞表面分子结合的抗体,用于ADC旨在通过降低TGF- β 活性来刺激免疫系统的应用。不受理论的束缚,据信ALK5抑制剂向T细胞的递送尤其可以活化CD4⁺和/或CD8⁺T细胞活性并抑制调节性T细胞活性,这两者均有助于肿瘤的免疫耐受。因此,在本公开内容的ADC中使用与T细胞表面分子结合的抗体可用于治疗各种癌症,例如,如以下第4.7部分中描述的。在多个实施方案中,抗体与CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、T_{REG}细胞或前述的任何组合结合。在一些实施方案中,抗体与泛T细胞表面分子结合。适用于靶向的T细胞表面分子的实例包括但不限于CD1、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD25、CD28、CD70、CD71、CD103、CD184、Tim3、LAG3、CTLA4和PD1。与T细胞表面分子结合并被认为是在内在化的抗体的实例包括OKT6(抗-CD1;ATCC保藏号CRL8020)、OKT11(抗-CD2;ATCC保藏号CRL8027)、OKT3(抗-CD3;ATCC保藏号CRL8001)、OKT4(抗-CD4;ATCC保藏号CRL8002)、OKT8(抗-CD8;ATCC保藏号CRL8014)、7D4(抗-CD25;ATCC保藏号CRL1698)、OKT9(抗-CD71;ATCC保藏号CRL8021)、CD28.2(抗-CD28,BD Biosciences目录号556620)、UCHT1(抗-CD3,Bio×Cell目录号BE0231)、M290(抗-CD103,Bio×Cell目录号BE0026)和FR70(抗CD70,Bio×Cell目录号BE0022)。

[0064] 在一些实施方案中,靶向的T细胞表面分子是能够在内在化后通过核内体再循环回到细胞表面的T细胞表面分子(参见,Goldenring,2015Curr.Opin.Cell Biol.,35:117-22)。据信能够通过核内体再循环的示例性T细胞表面分子包括CD5和CD7。不受理论的束缚,据信靶向可以通过核内体再循环的T细胞表面分子可以促进ALK5抑制剂向ALK5的递送,因为ALK5也可以经核内体再循环。因此,靶向可以通过核内体再循环的T细胞表面分子可能有助于使ALK5抑制剂更接近ALK5。

[0065] 4.3ALK5抑制剂

[0066] 本公开内容的ALK5抑制剂优选是与ALK5受体的细胞质激酶结构域中的ATP结合位点竞争性且可逆地结合的小分子,防止下游R-Smad磷酸化。

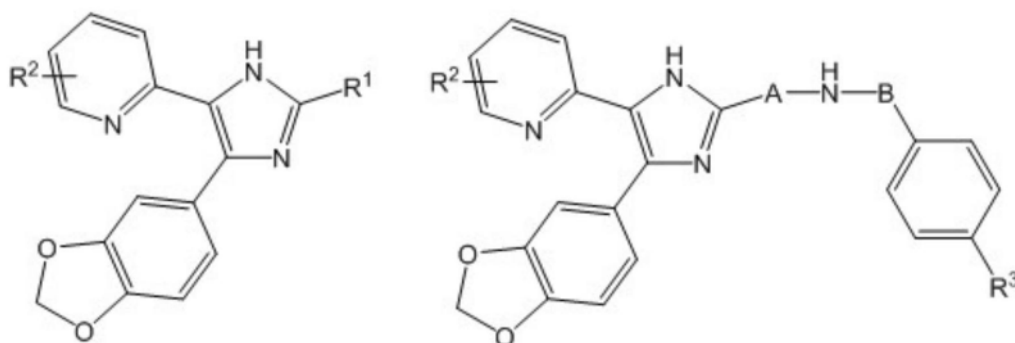
[0067] 但是与其他TGF- β 家族受体,例如ALK4和/或ALK7和/或TGF- β 受体II相比,ALK5抑制剂可以不需要是对ALK5特异性的或选择性的。在一些实施方案中,ALK5抑制剂对ALK5和TGF- β 受体II均具有活性。尽管优选的是,ALK5抑制剂对BMP II受体具有有限的抑制活性,但是这不是必需的,因为本公开内容的ADC靶向其中BMP II活性最小或不存在的T细胞。

[0068] 当使用至少3个受试者、至少5个受试者或至少10个受试者的T细胞在体外细胞测定中测量时,本公开内容的ALK5抑制剂的IC₅₀优选为100nM或更小,更优选50nM或更小,最优选20nM或更小。在下文第5.6部分中阐述示例性细胞测定。当ADC靶向人而不是小鼠T细胞表面分子时,可以使用人细胞代替小鼠细胞以及识别人体的抗体代替识别小鼠CD28和CD3的抗体。

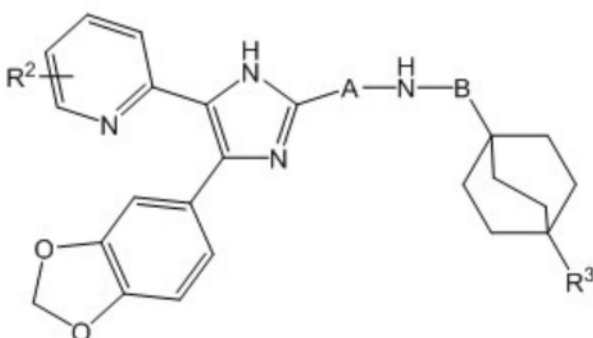
[0069] 适用于本公开内容的抗体-药物偶联物的ALK5抑制剂的说明性实例包括咪唑-苯

并二氧杂环戊烯化合物、咪唑-喹啉化合物、吡唑-吡咯化合物或噻唑类化合物。

[0070] 根据本公开内容的一方面,咪唑-苯并二氧杂环戊烯类ALK5抑制剂具有下式:

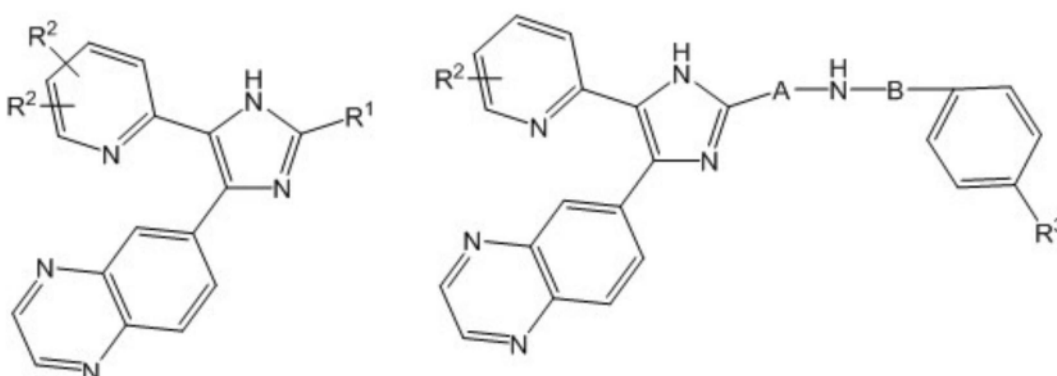


[0071]



[0072] 其中 R^1 是氢或具有1至约5个碳原子的低级烷基, R^2 是氢或具有1至约5个碳原子的低级烷基, R^3 是酰胺、腈、具有1至约3个碳原子的炔基、具有1至约5个碳原子的羧基或烷醇基,A是直接键或具有1至约5个碳原子的烷基,并且B是直接键或具有1至约5个碳原子的烷基。在本公开内容的一些单独的优选实施方案中, R^2 是氢或甲基,A具有1个碳原子,并且B是与苄基的直接键,并且 R^3 是酰胺。在本公开内容的一个组合的优选实施方案中, R^2 是氢或甲基,A具有1个碳原子,并且B是与苄基的直接键。

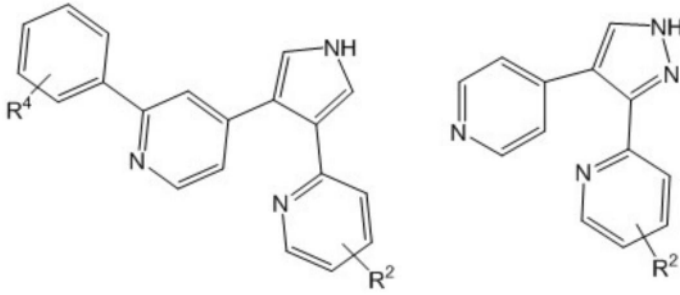
[0073] 根据本公开内容的另一方面,咪唑-喹啉类ALK5抑制剂具有下式:



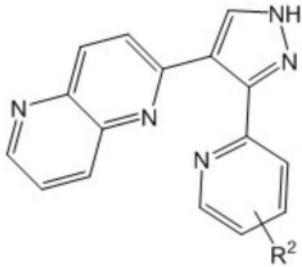
[0074]

[0075] 其中 R^1 是氢或具有1至约5个碳原子的低级烷基, R^2 是氢、卤素或具有1至约5个碳原子的低级烷基, R^3 是酰胺、腈、具有1至约3个碳原子的炔基、具有1至约5个碳原子的羧基或烷醇基,A是直接键或具有1至约5个碳原子的烷基,B是直接键或具有1至约5个碳原子的烷基。在本公开内容的一些单独的优选实施方案中, R^2 是氢或甲基、卤素(包括氟或氯),A具有1个碳原子,并且B是与苄基的直接键,并且 R^3 是酰胺。在本公开内容的一个组合的优选实施方案中, R^2 是氢或甲基,A具有1个碳原子,并且B是与苄基的直接键。

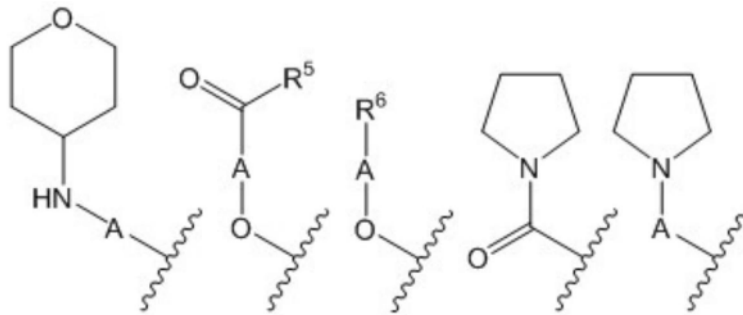
[0076] 根据本公开内容的另一方面,吡唑类ALK5抑制剂具有下式:



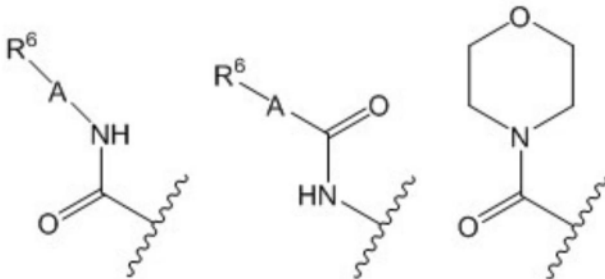
[0077]



[0078] 其中R²是氢、卤素或具有1至约5个碳原子的低级烷基,R⁴是氢、卤素、具有1至约5个碳原子的低级烷基、具有1至约5个碳原子的烷氧基、卤代烷基、羧基、羧基烷基酯、腈、烷基胺或具有下式的基团:

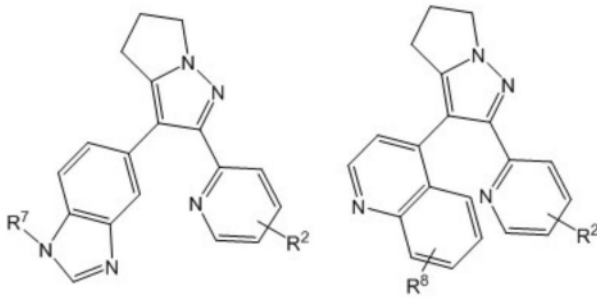


[0079]

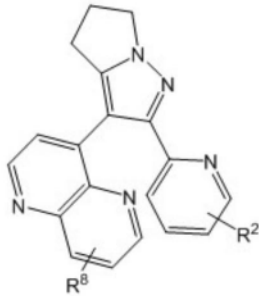


[0080] 其中R⁵是具有1至约5个碳原子的低级烷基、卤素或吗啉代,并且R⁶是吡咯、环己基、吗啉代、吡唑、吡喃、咪唑、噁烷、吡咯烷基或烷基胺,并且A是直接键或具有1至约5个碳原子的烷基。

[0081] 根据本公开内容的另一方面,吡唑-吡咯类ALK5抑制剂具有下式:



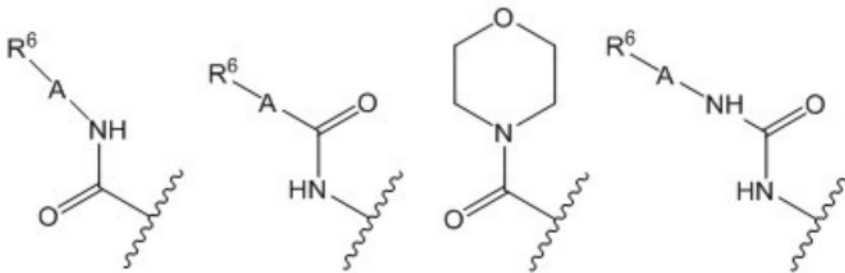
[0082]



[0083] 其中 R^7 是氢、卤素、具有1至约5个碳原子的低级烷基、链烷醇、吗啉代或烷基胺, R^2 是氢、卤素或具有1至约5个碳原子的低级烷基,并且 R^6 是氢、羟基、氨基、卤素或具有下式的基团:



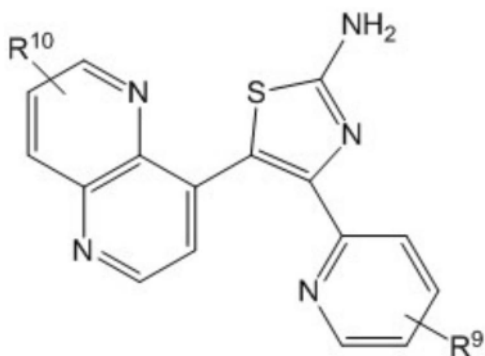
[0084]



[0085] 其中 R^5 是哌嗪基, R^6 是吗啉代、哌啶基、哌嗪基、烷氧基、羟基、噁烷、卤素、硫代烷基或烷基胺,并且A是具有1至约5个碳原子的低级烷基。

[0086] 根据本公开内容的另一方面,噻唑类ALK5抑制剂具有下式:

[0087]



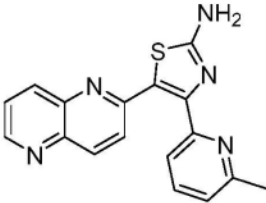
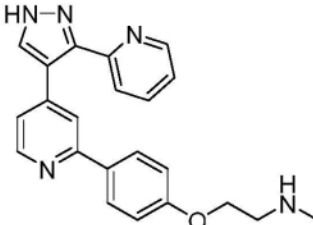
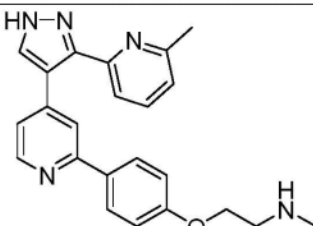
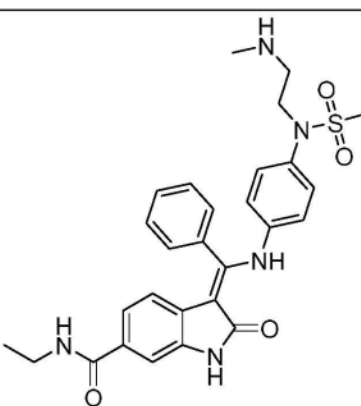
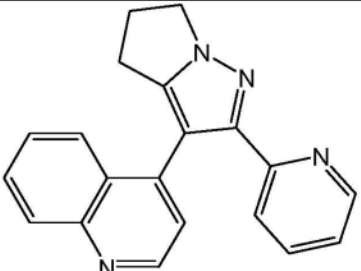
[0088] 其中R⁹是氢、卤素或具有1至约5个碳原子的低级烷基,并且R¹⁰是氢或具有1至约5个碳原子的低级烷基。

[0089] 在某些实施方案中,ALK5抑制剂选自下表1中命名为A至N的任何化合物:

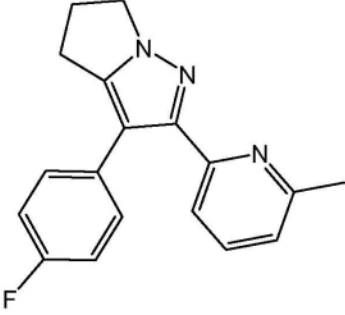
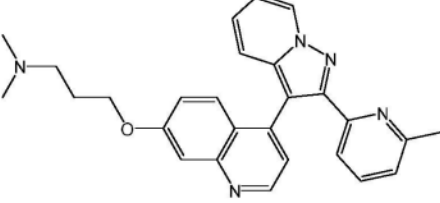
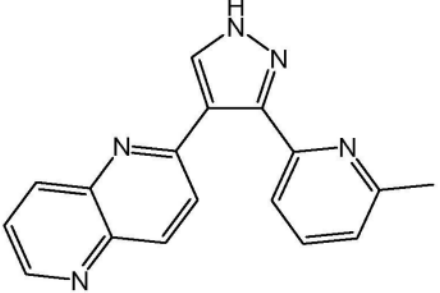
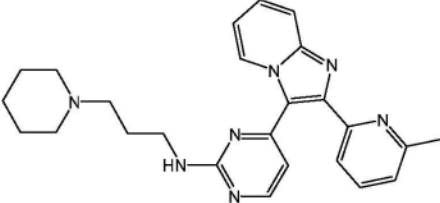
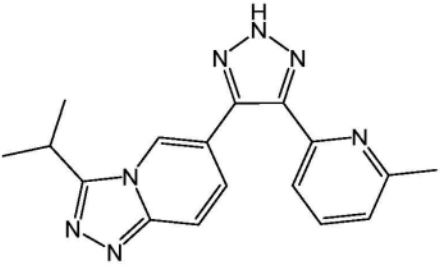
[0090]

表 1		
命名	结构	名称

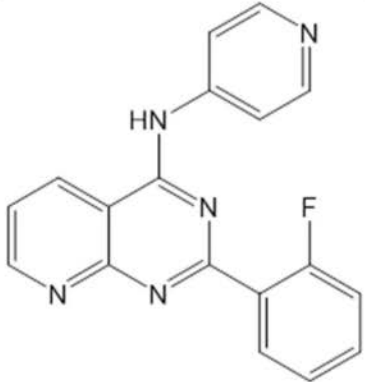
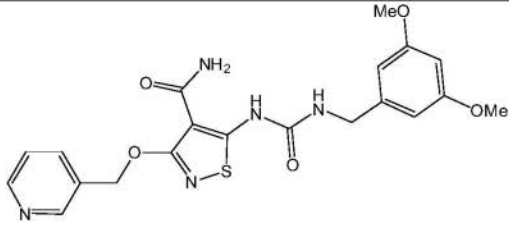
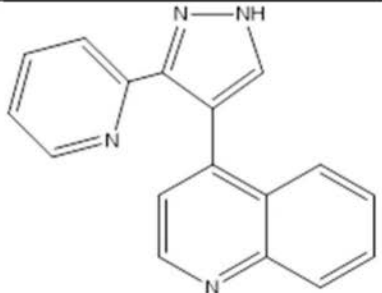
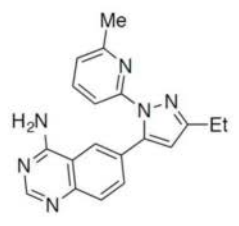
表 1

命名	结构	名称
A		4-(6-甲基吡啶-2-基)-5-(1,5- 苯噻唑-2-基)噻唑-2-胺
B		N-甲基-2-(4-(4-(3-(吡啶-2- 基)-1H-吡唑-4-基)吡啶-2-基) 苯氧基)乙烷-1-胺
C		N-甲基-2-(4-(4-(3-(6-甲基吡 啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶 -2-基)苯氧基)乙烷-1-胺
D		(Z)-N-乙基-3-(((4-(N-(2-(甲 基氨基)乙基)甲基磺酰氨基)苯 基)氨基)(苯基)亚甲基)-2-咪唑 酮-6-甲酰胺
E		4-(2-(吡啶-2-基)-5,6-二氢 -4H-吡咯[1,2-b]吡唑-3-基)喹 啉

[0091]

表 1		
命名	结构	名称
F		3-(4-氟苯基)-2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯[1,2-b]吡唑
G		N,N-二甲基-3-((4-(2-(6-甲基吡啶-2-基)吡唑并[1,5-a]吡啶-3-基)喹啉-7-基)氧基)丙烷-1-胺
H		2-(3-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-1,5-萘啶
I		4-(2-(6-甲基吡啶-2-基)咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基)-N-(3-(哌啶-1-基)丙基)嘧啶-2-胺
J		3-异丙基-6-(5-(6-甲基吡啶-2-基)-2H-1,2,3-三唑-4-基)-[1,2,4]三唑并[4,3-a]吡啶

[0092]

命名	结构	名称
K		2-(2-氟苯基)-N-(吡啶-4-基)吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-胺
L		5-(3-(2,5-二甲氧基苄基)脲基)-3-(吡啶-3-基甲氧基)异噻唑-4-羧酰胺
M		4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)喹诺酮
N		

[0093]

[0094] 在一些另外的特定实施方案中,ALK5抑制剂选自下表2中命名为1至283的任何化合物:

[0095]

命名	化合物名称

[0096]

表 2	
命名	化合物名称
1	4-(4-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-5-(吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)苯甲酰胺
2	4-((4-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基氨基)甲基)苯并胍
3	3-((4-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基氨基)苯并胍
4	3-((4-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基氨基)苯甲酰胺
5	4-((4-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-5-(6-乙基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基氨基)苯甲酰胺
6	4-(4-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-5-(吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)苯甲酰胺
7	3-((4-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基氨基)甲基)苯并胍
8	4-(4-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-5-(吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)苯甲酰胺
9	4-((4-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基氨基)甲基)苯并胍
10	3-((4-(3a,4-二氢苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-5-(6-乙基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基氨基)苯并胍
11	4-(3a,4-二氢苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-N-(4-乙炔基苄基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-胺
12	4-((4-(3a,4-二氢苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基氨基)甲基)苯并胍
13	4-((4-(3a,4-二氢苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基氨基)苯并胍
14	4-((4-(3a,4-二氢苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基氨基)苯甲酰胺
15	4-((4-(3a,4-二氢苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-5-(6-乙基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)甲基氨基)苯并胍
16	4-(4-(3a,4-二氢苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-5-(吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)苯甲酸
17	4-(4-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-5-(吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)苯甲酰胺
18	4-(4-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-5-(吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)苯甲酸
19	4-(4-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-5-(吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)苯甲酸
20	4-(4-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-5-(吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)苯甲酰胺
21	3-((4-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基氨基)甲基)苯并胍
22	(4-(4-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-5-(吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)苄基)甲醇
23	4-(4-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-5-(吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)苯并胍
24	2-(4-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-2-叔丁基-1H-咪唑-5-基)-6-甲基吡啶
25	2-(4-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-2-叔丁基-1H-咪唑-5-基)-6-甲基吡啶
26	3-((5-(6-甲基吡啶-2-基)-4-(喹啉-6-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)苯甲酰胺
27	4-((5-(6-甲基吡啶-2-基)-4-(1,4,4a,8a-四氢喹啉-6-基)-1H-咪唑-2-基)甲基氨基)苯甲酰胺
28	3-((5-(6-甲基吡啶-2-基)-4-(喹啉-6-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)苯甲酰胺

[0097]

表 2	
命名	化合物名称
29	3-((5-(6-甲基吡啶-2-基)-4-(喹喔啉-6-基)-1H-咪唑-2-基)甲基氨基)苯并胍
30	6-(2-叔丁基-5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-4-基)喹喔啉
31	4-(5-氟-6-甲基吡啶-2-基)-5-(喹喔啉-6-基)-1H-咪唑-2-胺
32	4-((5-(6-乙基吡啶-2-基)-4-(1,4,4a,8a-四氢喹喔啉-6-基)-1H-咪唑-2-基)甲基氨基)苯并胍
33	N-((5-(6-乙基吡啶-2-基)-4-(1,4,4a,8a-四氢喹喔啉-6-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)-3-乙炔基苯胺
34	4-((5-(6-乙基吡啶-2-基)-4-(1,4,4a,8a-四氢喹喔啉-6-基)-1H-咪唑-2-基)甲基氨基)苯甲酰胺
35	2-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-1,5-萘啶
36	3-((5-(6-甲基吡啶-2-基)-4-(1,5-萘啶-2-基)-1H-吡唑-1-基)甲基)苯甲酰胺
37	2-(3-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-1,5-萘啶
38	3-((3-(6-甲基吡啶-2-基)-4-(1,5-萘啶-2-基)-1H-吡唑-1-基)甲基)苯甲酰胺
39	2-(3-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-1,5-萘啶
40	2-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-1,5-萘啶
41	3-((5-(6-甲基吡啶-2-基)-4-(1,5-萘啶-2-基)-1H-吡唑-1-基)甲基)苯并胍
42	2-(3-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-1,5-萘啶
43	2-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-1,5-萘啶
44	3-((3-(6-甲基吡啶-2-基)-4-(1,5-萘啶-2-基)-1H-吡唑-1-基)甲基)苯并胍
45	2-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-1,5-萘啶
46	二甲基-2-((4-(4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-2-吡啶基)苯基)氧基)乙基)胺
47	2-(4-氟苯基)-4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶
48	[(4-(4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-吡啶-2-基)苯基)-甲基]四氢-2H-吡喃-4-基胺
49	2-4-[(2-氟乙基)氧基]苯基-4-[3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基]吡啶
50	N-(2-甲氧基乙基)-4-(4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶-2-基)苯甲酰胺
51	2-[4-甲基苯基]-4-(3-吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基 吡啶
52	4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-2-(3-(三氟甲基)苯基)吡啶
53	N-(2-甲氧基乙基)-4-(4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶-2-基)苯甲酰胺
54	2-(4-氟苯基)-4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶
55	2-[2-(三氟甲基)苯基]-4-(3-吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶
56	2-(2-氟苯基)-4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶

[0098]

表 2	
命名	化合物名称
57	2-(4-(2-(1H-咪唑-1-基)乙氧基)苯基)-4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶
58	2-[4-异丙基苯基]-4-[3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基]吡啶
59	N-(4-(4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶-2-基)苯基)四氢-2H-吡喃-4-羧酰胺
60	2-苯基-4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶
61	2-(4-(2-环己基乙氧基)苯基)-4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶
62	2-吡咯烷-1-基-N-{4-[4-(3-吡啶-2-基-1H-吡唑-4-基)-吡啶-2-基]苯基}乙酰胺
63	4-[3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基]-2-[4-(1-吡咯烷基甲基)苯基]吡啶
64	2-(3-甲氧基苯基)-4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶
65	4-(4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶-2-基)苯并腈
66	4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-2-(4-(三氟甲基)苯基)吡啶
67	2-(2-氟苯基)-4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶
68	N-甲基-4-(4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶-2-基)-N-(四氢-2H-吡喃-4-基)苯甲酰胺
69	2-(4-氟苯基)-4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶
70	4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-2-(3-(三氟甲基)苯基)吡啶
71	2-(3-甲氧基苯基)-4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶
72	N-甲基-4-(4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶-2-基)-N-(四氢-2H-吡喃-4-基)苯甲酰胺
73	2-[3-甲基苯基]-4-(3-吡啶-2-基-1H-吡唑-4-基)吡啶
74	4-{2-[(4-[4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基]-吡啶-2-基)-苯基]氧基]乙基}吗啉
75	2-(2-甲基苯基)-4-[3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基]吡啶
76	4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-2-(4-(三氟甲基)苯基)吡啶
77	4-(4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶-2-基)苯并腈
78	1-(4-(4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶-2-基)苯氧基)丙烷-2-酮
79	4-(4-(4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶-2-基)苄基)吗啉
80	4-(4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶-2-基)-N-(四氢-2H-吡喃-4-基)苯甲酰胺
81	N-(4-(4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶-2-基)苄基)四氢-2H-吡喃-3-胺
82	1-(4-(4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶-2-基)苯氧基)丙烷-2-酮
83	4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-2-(4-(2-(吡咯烷-1-基)乙氧基)苯基)吡啶
84	4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-2-(4-(2-(吡咯烷-1-基)乙氧基)苯基)吡啶

[0099]

表 2	
命名	化合物名称
85	4-(4-(4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡啶-4-基)吡啶-2-基)苄基)吗啉
86	4-[4-(3-吡啶-2-基-1H-吡啶-4-基)吡啶-2-基]苯甲酸甲基酯 4-(4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡啶-4-基)吡啶-2-基) 苯甲酸
87	N-(4-(4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡啶-4-基)吡啶-2-基)苄基)-2-(吡咯烷-1-基)乙酰胺
88	N,N-二甲基-3-(3-(4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡啶-4-基)吡啶-2-基)苄基)丙烷-1-胺
89	2-[4-甲氧基苄基]-4-(3-吡啶-2-基-1H-吡啶-4-基)吡啶
90	4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡啶-4-基)喹啉
91	4-(1-苄基-3-(吡啶-2-基)-1H-吡啶-4-基)喹啉
92	3-((5-(6-甲基吡啶-2-基)-4-(喹啉-6-基)-1H-吡啶-1-基)甲基)苯甲酰胺
93	4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡啶-4-基)喹啉
94	3-((4-(6-甲基吡啶-2-基)-3-(喹啉-6-基)-1H-吡啶-1-基)甲基)苯甲酰胺
95	3-((5-(6-甲基吡啶-2-基)-4-(喹啉-6-基)-1H-吡啶-1-基)甲基)苯并脒
96	4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡啶-4-基)喹啉
97	3-((3-(6-甲基吡啶-2-基)-4-(喹啉-6-基)-1H-吡啶-1-基)甲基)苯甲酰胺
98	4-(3-(5-氟吡啶-2-基)-1H-吡啶-4-基)喹啉
99	4-(5-环丙基-3-(吡啶-2-基)-1H-吡啶-4-基)喹啉
100	4-(4-(吡啶-2-基)-1H-吡啶-3-基)喹啉
101	4-(3-(5-氟吡啶-2-基)-1H-吡啶-4-基)喹啉
102	4-(1-苄基-3-(吡啶-2-基)-1H-吡啶-4-基)喹啉
103	4-(3-(5-氟吡啶-2-基)-1H-吡啶-4-基)喹啉
104	4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡啶-4-基)喹啉
105	4-[3-(6-溴-吡啶-2-基)-1H-吡啶-4-基]-喹啉
106	4-(3-(5-氟吡啶-2-基)-1H-吡啶-4-基)喹啉
107	4-(1-苄基-3-(吡啶-2-基)-1H-吡啶-4-基)喹啉
108	4-(3-(5-氟吡啶-2-基)-1H-吡啶-4-基)喹啉
109	4-(3-(3-(三氟甲基)苄基)-1H-吡啶-4-基)喹啉
110	3-((4-(6-甲基吡啶-2-基)-3-(喹啉-6-基)-1H-吡啶-1-基)甲基)苯并脒
111	4-[3-(6-甲基-吡啶-2-基)-1H-吡啶-4-基]-喹啉
112	4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡啶-4-基)喹啉

[0100]

表 2	
命名	化合物名称
113	4-(1-苄基-3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)喹啉
114	4-(3-(3-(三氟甲基)苯基)-1H-吡唑-4-基)喹啉
115	3-((3-(6-甲基吡啶-2-基)-4-(喹啉-6-基)-1H-吡唑-1-基)甲基)苯并脲
116	4-(3-(噻吩-2-基)-1H-吡唑-4-基)喹啉
117	4-[5-甲基-3-(6-甲基-吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基]-喹啉
118	4-[5-甲基-3-(6-甲基-吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基]-喹啉
119	4-(3-(噻吩-2-基)-1H-吡唑-4-基)喹啉
120	4-[5-甲基-3-(6-甲基-吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基]-喹啉
121	1,2-二甲基-4-苯基-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
122	4-(3-氟苯基)-1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
123	4-(3-氟苯基)-1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
124	甲基 3-(1,2-二甲基-3-氧代-5-(喹喔啉-6-基)-2,3-二氢-1H-吡唑-4-基) 苯甲酸酯
125	1,2-二甲基-4-(2-甲基吡啶-4-基)-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
126	1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-4-间甲苯基-1H-吡唑-3(2H)-酮
127	4-(2-羟基苯基)-1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
128	4-(1H-咪唑-5-基)-1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
129	1-(3-(1,2-二甲基-3-氧代-5-(喹喔啉-6-基)-2,3-二氢-1H-吡唑-4-基)苯基)-3-甲基脲
130	4-(3-乙酰基苯基)-1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
131	4-(3-(甲氧基甲基)苯基)-1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
132	4-(2-氨基苯基)-1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
133	3-(1,2-二甲基-3-氧代-5-(喹喔啉-6-基)-2,3-二氢-1H-吡唑-4-基)苯并脲
134	4-(3-甲氧基苯基)-1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
135	1,2-二甲基-4-(吡啶-3-基)-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
136	1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-4-(噻吩-2-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
137	1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-4-(3-乙烯基苯基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
138	2-(3-(1,2-二甲基-3-氧代-5-(喹喔啉-6-基)-2,3-二氢-1H-吡唑-4-基)苯基)乙脲
139	N-(3-(1,2-二甲基-3-氧代-5-(喹喔啉-6-基)-2,3-二氢-1H-吡唑-4-基)苯基)乙酰胺 3-(1,2-二甲基-3-氧代-5-(喹喔啉-6-基)-2,3-二氢-1H-吡唑-4-基)苯甲酰胺

[0101]

表 2	
命名	化合物名称
140	1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-4-(噻吩-3-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
141	4-(呋喃-2-基)-1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
142	4-(呋喃-3-基)-1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
143	4-(苯并[c][1,2,5]噁二唑-5-基)-1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
144	N-(3-(1,2-二甲基-3-氧代-5-(喹喔啉-6-基)-2,3-二氢-1H-吡唑-4-基) 苯基)乙烷磺酰胺
145	1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-4-(3-(三氟甲基)苯基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
146	4-(4-氨基苯基)-1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
147	4-(3-乙基苯基)-1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
148	4-(3-羟基苯基)-1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
149	4-(3-氨基苯基)-1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
150	4-(3-异丙基苯基)-1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
151	2-(1,2-二甲基-3-氧代-5-(喹喔啉-6-基)-2,3-二氢-1H-吡唑-4-基)苯并胍
152	1,2-二甲基-4-(6-甲基吡啶-2-基)-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
153	N-(3-(1,2-二甲基-3-氧代-5-(喹喔啉-6-基)-2,3-二氢-1H-吡唑-4-基) 苯基)甲烷磺酰胺
154	1,2-二甲基-4-(吡啶-2-基)-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
155	1,2-二甲基-4-(3-(甲基硫代)苯基)-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
156	4-(3-(氨基甲基)苯基)-1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
157	4-(4-羟基苯基)-1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
158	4-(苯并[b]噻吩-3-基)-1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
159	4-(3-溴苯基)-1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
160	4-(3-(羟甲基)苯基)-1,2-二甲基-5-(喹喔啉-6-基)-1H-吡唑-3(2H)-酮
161	1-甲基-5-(2-吡啶-2-基-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)-1H-苯并咪唑
162	1-甲基-6-[2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并-[1,2-b]吡唑-3-基]-1H-苯并咪唑
163	N,N-二乙基-3-(6-(2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)丙烷-1-胺
164	N,N-二乙基-3-(6-(2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)丙烷-1-胺
165	N,N-二乙基-3-(6-(2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)丙烷-1-胺
166	3-[6-(2-吡啶-2-基-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)-苯并咪唑-1-基]-丙烷-1-醇
167	3-[6-(2-吡啶-2-基-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)-苯并咪唑-1-基]-丙烷-1-醇

[0102]

表 2	
命名	化合物名称
168	3-(6-(2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)丙烷-1-醇
169	1-甲基-5-(2-吡啶-2-基-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)-1H-苯并咪唑
170	3-(6-(2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)丙烷-1-醇
171	1-甲基-5-(2-吡啶-2-基-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)-1H-苯并咪唑
172	二甲基-3-[6-(2-吡啶-2-基-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)-苯并咪唑-1-基]-丙基}-胺
173	5-[2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基]-1-[3-(四氢吡喃-2-基氧基)-丙基]-1H-苯并咪唑
174	3-[6-(2-吡啶-2-基-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)-苯并咪唑-1-基]-丙烷-1-醇
175	5-(2-吡啶-2-基-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)-1-[3-(四氢吡喃-2-基氧基)-丙基]-1H-苯并咪唑
176	6-[2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基]-1-(3-吡咯烷-1-基-丙基)-1 H-苯并咪唑
177	1-甲基-6-[2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基]-1H-苯并咪唑
178	1-甲基-6-(2-吡啶-2-基-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)- 苯并咪唑
179	N,N-二乙基-3-(6-(2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)丙烷-1-胺
180	5-(2-吡啶-2-基-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)-1-[3-(四氢吡喃-2-基氧基)-丙基]-1H-苯并咪唑
181	6-[2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基]-1-(3-吡咯烷-1-基-丙基)-1 H-苯并咪唑
182	5-(2-吡啶-2-基-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)-1-[3-(四氢吡喃-2-基氧基)-丙基]-1 H-苯并咪唑
183	6-(2-吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)-1-(3-(吡咯烷-1-基)丙基)-1 H-苯并[d]咪唑
184	5-(2-吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)-1H-苯并[d]咪唑
185	3-(6-(2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)丙烷-1-醇
186	1-甲基-6-(2-吡啶-2-基-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)-1 苯并咪唑
187	6-[2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基]-1H 苯并咪唑 e
188	6-[2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基]-1-(3-哌啶-1-基-丙基)-1H-苯并咪唑
189	6-(2-吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)-1-(3-(吡咯烷-1-基)丙基)-1H-苯并[d]咪唑
190	4-(3-(6-(2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)丙基)吗啉
191	6-[2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基]-1-(3-哌啶-1-基-丙基)-1H-苯并咪唑
192	4-(3-(6-(2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)丙基)吗啉
193	6-[2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基]-1H 苯并咪唑
194	1-甲基-5-(2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)- H-苯并[d]咪唑
195	N,N-二甲基-3-(5-(2-(吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)丙烷-1-胺

[0103]

表 2	
命名	化合物名称
196	6-(2-(吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)-1-(3-(吡咯烷-1-基)丙基)-1H-苯并[d]咪唑
197	二甲基-(3-{6-[2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基]-苯并咪唑-1-基}-丙基)-胺
198	4-(3-(6-(2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)丙基)吗啉
199	3-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-2-(吡啶-2-基)-6,7-二氢-5H-吡咯并[1,2-a]咪唑
200	3-羟基-N-(4-(2-(吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)喹啉-7-基)丙烷酰胺
201	4-(2-(吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)-2-(吡咯烷-1-基)喹诺酮
202	4-[4-(2-吡啶-2-基-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)-喹啉-7-基氧基]-苯并胍
203	1-(3-(二甲基氨基)丙基)-3-(4-(2-(吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)喹啉-7-基)脒
204	4-[4-(2-吡啶-2-基-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)-喹啉-7-基氧基]-苯甲酰胺
205	甲基 4-(2-(吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)喹啉-7-基氨基甲酸酯
206	二甲基-{5-[4-(2-吡啶-2-基-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)-喹啉-7-基氧基]-戊基}-胺
207	二甲基-{4-[4-(2-吡啶-2-基-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)-喹啉-7-基氧基]-苄基}-胺
208	2-羟基乙基 4-(2-(吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)喹啉-7-基氨基甲酸酯
209	乙基-甲基-{2-[4-(2-吡啶-2-基-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)-喹啉-7-基氧基]-乙基}-胺
210	4-(2-(6-乙基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)喹啉
211	2-(二甲基氨基)-N-(4-(2-(吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)喹啉-7-基)乙酰胺
212	2-(4-(2-(吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)喹啉-7-基氧基)乙醇
213	3-甲基-N-(4-(2-(吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)喹啉-7-基)丙烷酰胺
214	1-(2-(二甲基氨基)乙基)-3-(4-(2-(吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)喹啉-7-基)脒
215	N-(4-(2-(吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)喹啉-7-基)乙酰胺
216	2-(乙基硫代)-4-(2-(吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)喹诺酮
217	7-[3-(4-甲基-咪唑-1-基)-丙氧基]-4-(2-(吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)-喹啉
218	4-(2-(吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)喹啉-7-胺
219	N-(2-(二甲基氨基)乙基)-4-(2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)喹啉-6-羧酰胺
220	4-(2-(5-氟吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)喹啉
221	7-(2-氟-乙氧基)-4-(2-(吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)-喹啉
222	N,N-二甲基-4-[4-(2-(吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)-喹啉-7-基氧基]-苯甲酰胺
223	4-(2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)喹啉

[0104]

表 2	
命名	化合物名称
224	4-(2-(吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)喹啉
225	4-[4-(2-吡啶-2-基-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)-喹啉-7-基氧基]-苯甲酸
226	4-(2-吡啶-2-基-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)-喹啉-7-醇
227	2-氯-4-(2-(吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)喹诺酮
228	7-[3-(1-甲基-吡咯烷-2-基)-丙氧基]-4-(2-吡啶-2-基-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)-喹啉
229	甲基 4-(2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)喹啉-6-羧酸酯
230	4-(2-吡啶-2-基-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)-7-(四氢-咪喃-2-基甲氧基)-喹啉
231	7-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-乙氧基]-4-(2-吡啶-2-基-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)-喹啉
232	[4-(2-吡啶-2-基-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)-喹啉-7-基氧基]-乙酸乙酯
233	2-甲氧基-4-(2-(吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)喹诺酮
234	二甲基-2-[4-(2-吡啶-2-基-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡啶-3-基)-喹啉-7-基氧基]-乙基)-胺
235	4-[[4-(5,6-Di 甲基-2-吡啶-2-基-吡啶-3-基)氧基吡啶-2-基]氧基]-N,N 二甲基-苯甲酰胺
236	4-(5,6-二甲基-2-吡啶-2-基-吡啶-3-基)氧基-N-(3-甲氧基苯基)吡啶-2-胺
237	4-(5,6-二甲基-2-吡啶-2-基-吡啶-3-基)氧基-N-(2-吗啉-4-基苯基)吡啶-2-胺
238	4-(5,6-二甲基-2-吡啶-2-基-吡啶-3-基)氧基-N-(2-甲氧基苯基)吡啶-2-胺
239	4-[[4-(5,6-二甲基-2-吡啶-2-基-吡啶-3-基)氧基吡啶-2-基]氧基]苯磺酰胺
240	4-(2-甲基吡啶-3-基)氧基-N-(3,4,5-三甲氧基苯基)-吡啶-2-胺
241	4-(2-甲基吡啶-3-基)氧基-N-(3,4,5-三甲氧基苯基)-吡啶-2-胺
242	4-(5,6-二甲基-2-吡啶-2-基-吡啶-3-基)氧基-N-(4-甲氧基苯基)吡啶-2-胺
243	4-(5,6-二甲基-2-吡啶-2-基-吡啶-3-基)氧基-N-(2-甲氧基苯基)吡啶-2-胺
244	4-(2,6-二甲基吡啶-3-基)氧基-N-(3,4,5-三甲氧基苯基)-吡啶-2-胺
245	4-([4-(2,6-二甲基吡啶-3-基)氧基]吡啶-2-基)氧基]苯磺酰胺
246	4-(5,6-二甲基-2-吡啶-2-基-吡啶-3-基)氧基-N-(4-吗啉-4-基苯基)吡啶-2-胺
247	4-[5,6-二甲基-2,2'-二吡啶-3-基-氧基]-N-(3,4,5-三甲氧基苯基)吡啶-2-胺
248	4-(5,6-二甲基-2-吡啶-2-基-吡啶-3-基)氧基-N-(4-吗啉-4-基苯基)吡啶-2-胺
249	4-吡啶-3-基氧基-N-(3,4,5-三甲氧基苯基)吡啶-2-胺
250	4-(6-甲基-2-吡啶-2-基-吡啶-3-基)氧基-N-(3,4,5-三甲氧基苯基)吡啶-2-胺
251	4-[[4-(5,6-二甲基-2-吡啶-2-基-吡啶-3-基)氧基吡啶-2-基]氧基]苯磺酰胺

[0105]

表 2	
命名	化合物名称
252	4-(2,6-二甲基吡啶-3-基)氧基-N-(3,4,5-三甲氧基苯基)-吡啶-2-胺
253	4-(6-甲基吡啶-3-基)氧基-N-(3,4,5-三甲氧基苯基)-吡啶-2-胺
254	4-(5,6-二甲基-2-吡啶-2-基-吡啶-3-基)氧基-N-(3-吗啉-4-基苯基)吡啶-2-胺
255	4-({4-[(2,6-二甲基吡啶-3-基)氧基]吡啶-2-基}氨基)苯磺酰胺
256	4-(5,6-二甲基-2-吡啶-2-基-吡啶-3-基)氧基-N-(4-甲氧基苯基)吡啶-2-胺
257	4-(5,6-二甲基-2-吡啶-2-基-吡啶-3-基)氧基-N-(4-氟苯基)吡啶-2-胺
258	4-(6-甲基吡啶-3-基)氧基-N-(3,4,5-三甲氧基苯基)-吡啶-2-胺
259	4-(6-甲基-2-吡啶-2-基-吡啶-3-基)氧基-N-(3,4,5-三甲氧基苯基)吡啶-2-胺
260	5-(6-乙氧基-[1,5]萘啶-2-基)-4-吡啶-2-基-噻唑-2-基胺
261	4-(3-氟苯基)-5-(1,5-萘啶-2-基)噻唑-2-胺
262	4-(4-氟苯基)-5-(1,5-萘啶-2-基)噻唑-2-胺
263	5-(6-乙氧基-[1,5]萘啶-2-基)-4-吡啶-2-基-噻唑-2-基胺
264	4-(6-甲基-吡啶-2-基)-5-[1,5]萘啶-2-基-噻唑-2-基胺
265	5-(1,5-萘啶-2-基)-4-(吡啶-2-基)噻唑-2-胺
266	4-(3-氟苯基)-5-(1,5-萘啶-2-基)噻唑-2-胺
267	4-(4-氟苯基)-5-(1,5-萘啶-2-基)噻唑-2-胺
268	4-(3-氟苯基)-5-(1,5-萘啶-2-基)噻唑-2-胺
269	5-(6-甲基-1,5-萘啶-4-基)-4-(吡啶-2-基)噻唑-2-胺
270	5-[1,8]萘啶-4-基-4-吡啶-2-基-噻唑-2-基胺
271	5-(1,5-萘啶-2-基)-4-(吡啶-2-基)噻唑-2-胺
272	5-(8-甲基-[1,5]萘啶-2-基)-4-吡啶-2-基-噻唑-2-基胺
273	5-(6-甲基-1,5-萘啶-4-基)-4-(吡啶-2-基)噻唑-2-胺
274	4-(3-甲基吡啶-2-基)-5-(1,5-萘啶-2-基)噻唑-2-胺
275	5-[1,8]萘啶-4-基-4-吡啶-2-基-噻唑-2-基胺
276	4-[5-苯并[1,3]二氧杂环戊烯-5-基-4-(6-乙基-吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基]-二环[2.2.2]辛烷-1-羧酸酰胺
277	4-[5-苯并[1,3]二氧杂环戊烯-5-基-4-(6-乙基-吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基]-二环[2.2.2]辛烷-1-羧酸
278	4-[5,6-二氯-2-(2-吡啶基)-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基]-7-[2-(4-吗啉基)乙氧基]-喹啉
279	4-[5,6-二氯-2-(6-甲基-2-吡啶基)-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基]-6-喹啉羧酰胺

表 2	
命名	化合物名称
[0106] 280	2-(5-氯-2-氟苯基)-4-[(4-吡啶基)氨基]咪唑
281	2-(5-苯并[1,3]二氧杂环戊烯-5-基-2-叔丁基-3H-咪唑-4-基)-6-甲基吡啶 HCl
282	4-(5-苯并[1,3]二氧杂环戊烯-5-基-4-吡啶-2-基-1H-咪唑-2-基)-苯甲酰胺
283	[3-(吡啶-2-基)-4-(4-酰基)]-1H 吡唑

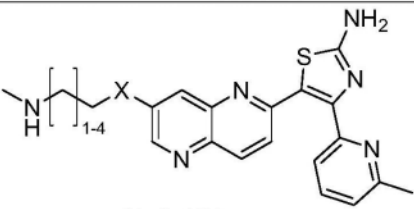
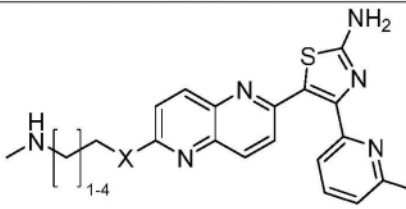
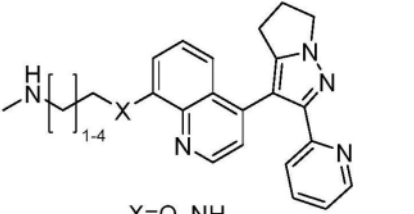
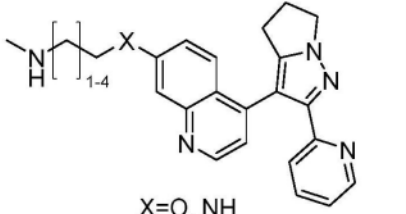

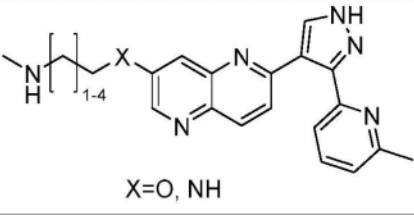
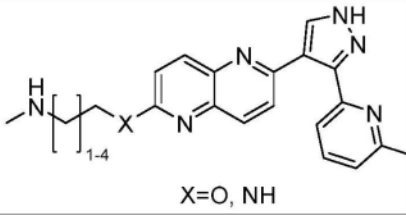
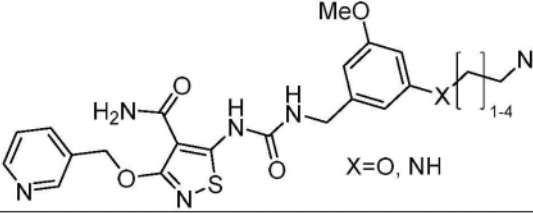
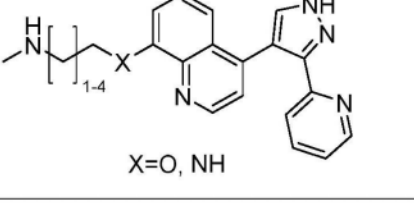
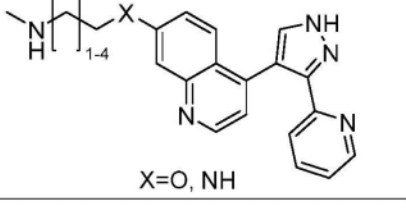
[0107] ALK5抑制剂的制备和使用是众所周知的,并且在科学和专利文献中详细记录。PCT公开号WO 2000/61576和美国专利公开号No.US2003/0149277公开了三芳基咪唑衍生物及其作为ALK5抑制剂的用途。PCT公开号WO 2001/62756公开了吡啶基咪唑衍生物及其作为ALK5抑制剂的用途。PCT公开号WO 2002/055077公开了咪唑基环状缩醛衍生物作为ALK5抑制剂的用途。PCT公开号WO 2003/087304公开了三取代的杂芳基及其作为ALK5和/或ALK4抑制剂的用途。WO 2005/103028、美国专利公开号No.US2008/0319012和美国专利号7,407,958公开了经2-吡啶基取代的咪唑作为ALK5和/或ALK4抑制剂。代表性化合物之一IN-1130在几种动物模型中显示出ALK5和/或ALK4抑制剂活性。以下专利和专利公开提供了ALK5抑制剂的另外的实例,并且提供了使用ALK5抑制剂的说明性合成方案和方法:美国专利号6,465,493、6,906,089、7,365,066、7,087,626、7,368,445、7,265,225、7,405,299、7,407,958、7,511,056、7,612,094、7,691,865、7,863,288、8,410,146、8,410,146、8,420,685、8,513,228、614,226、8,791,113、8,815,893、8,846,931;8,912,216、8,987,301、9,051,307、9,051,318、9,073,918和PCT公开号号WO 2004/065392、WO 2009/050183、WO 2009/133070、WO 2011/146287和WO 2013/009140。前述专利和专利公开通过引用整体并入本文。

[0108] 数种ALK5抑制剂是可商购获得,包括SB-525334 (CAS 356559-20-1)、SB-505124 (CAS 694433-59-5)、SB-431542 (CAS 301836-41-9)、SB-202474 (EMD4 Biosciences Merck KGaA,德国达姆施塔特)、LY-364947 (CAS

[0109] 396129-53-6)、IN-1130、GW-788388和D4476 (EMD4 Biosciences Merck KGaA,德国达姆施塔特)。

[0110] 本文所述的ALK5抑制剂的结构和名称是指附接至抗体和/或接头之前的分子。

[0111] 优选的ALK5抑制剂是可以通过游离NH或NH₂基团(优选附接至NH或NH₂基团)或者烷基、杂芳基或芳基的部分附接至接头的那些(例如,如表2所示的化合物1-23、26-29、31、35、37、39、40、42、43、45-48、50-85、87-90、93、96、98-104、106、108、109、111、112、114、116-120、132、146、149、156、184、187、193、218、260-277、282和283)。可以将ALK5抑制剂衍生化以添加游离NH或NH₂基团。衍生化的ALK5抑制剂的设计应优选考虑抑制剂的结构活性关系(SAR),以减少添加NH或NH₂基团时消除抑制活性的可能性,尽管该活性也可以凭经验确定。表1中所示的数种化合物的示例性衍生化的对应物示于表3中。

表 3		
表 1 命名	衍生物 1	衍生物 2
[0112] A	 <p>X=O, NH</p>	 <p>X=O, NH</p>
[0112] E	 <p>X=O, NH</p>	 <p>X=O, NH</p>
[0112] F	 <p>X=O, NH</p>	
[0112] H	 <p>X=O, NH</p>	 <p>X=O, NH</p>
[0113] L	 <p>X=O, NH</p>	
[0113] M	 <p>X=O, NH</p>	 <p>X=O, NH</p>

[0114] 4.4 接头

[0115] 通常,ADC包含在ALK5抑制剂与抗体之间的接头。接头是包含共价键或将抗体共价附接至药物部分的原子链的部分。在多个实施方案中,接头包括二价基团,例如烷基二基、芳基二基、杂芳基二基、例如 $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ 的部分、烷氧基的重复单元(例如,聚乙烯基氧基、PEG、聚亚甲基氧基)和烷基氨基(例如,聚乙烯基氨基、Jeffamine™);以及二酸酯和酰胺,包括琥珀酸酯、琥珀酰胺、二甘醇酸酯、丙二酸酯和己酰胺。

[0116] 接头可以包含一个或更多个接头组分,例如延伸和间隔部分。例如,肽基接头可以包含两个或更多个氨基酸和任选一个或更多个延伸和/或间隔部分的肽基组分。各种接头

组分是本领域已知的,下文描述其中一些。

[0117] 接头可以是“可裂解接头”,促进药物在细胞中的释放。例如,可以使用酸不稳定的接头(例如脞)、对蛋白酶敏感的(例如对肽酶敏感的)接头、光不稳定的接头、二甲基接头或含二硫键的接头(Chari等,1992,Cancer Research52:127-131;美国专利号5,208,020)。

[0118] 本领域已知的接头和接头组分的实例包括马来酰亚胺基己酰基(mc);马来酰亚胺基己酰基-对氨基苄基氨基甲酸酯;马来酰亚胺基己酰基-肽-氨基苄基氨基甲酸酯接头,例如,马来酰亚胺基己酰基-L-苯丙氨酸-L-赖氨酸-对氨基苄基氨基甲酸酯和马来酰亚胺基己酰基-L-缬氨酸-L-瓜氨酸-对氨基苄基氨基甲酸酯(vc);N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(也称为N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶基二硫代)戊酸酯或SPP);4-琥珀酰亚胺基-氧基羰基-2-甲基-2-(2-吡啶基二硫代)-甲苯(SMPT);N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP);N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯(SPDB);2-亚氨基硫烷;S-乙酰基琥珀酸酐;二硫化苄基氨基甲酸酯;碳酸酯;脞接头;N-(α -马来酰亚胺基乙酰氧基)琥珀酰亚胺酯;N-[4-(对-叠氮基水杨酰氨基)丁基]-3'-(2'-吡啶基二硫代)丙酰胺(AMAS);N[β -马来酰亚胺基丙氧基]琥珀酰亚胺酯(BMPS);[N- ϵ -马来酰亚胺基己酰氧基]琥珀酰亚胺酯(EMCS);N-[γ -马来酰亚胺基丁酰氧基]琥珀酰亚胺酯(GMBS);琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-羧基-[6-酰氨基己酸酯](LC-SMCC);琥珀酰亚胺基6-(3-[2-吡啶基二硫代]-丙酰氨基)己酸酯(LC-SPDP);间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS);N-琥珀酰亚胺基[4-碘乙酰基]氨基苯甲酸酯(SIAB);琥珀酰亚胺基4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-羧酸酯(SMCC);N-琥珀酰亚胺基3-[2-吡啶基二硫代]-丙酰氨基(SPDP);[N- ϵ -马来酰亚胺基己酰氧基]磺基琥珀酰亚胺酯(磺酸基-EMCS);N-[γ -马来酰亚胺基丁酰氧基]磺基琥珀酰亚胺酯(磺酸基-GMBS);4-磺基琥珀酰亚胺基-6-甲基- α -(2-吡啶基二硫代)苯胺基己酸酯(磺酸基-LC-SMPT);磺基琥珀酰亚胺基6-(3'-[2-吡啶基二硫代]-丙酰氨基)己酸酯(磺酸基-LC-SPDP);间-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯(磺酸基-MBS);N-磺基琥珀酰亚胺基[4-碘乙酰基]氨基苯甲酸酯(磺酸基-SIAB);磺基琥珀酰亚胺基4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-羧酸酯(磺酸基-SMCC);磺基琥珀酰亚胺基4-[对-马来酰亚胺基苯基]丁酸酯(磺酸基-SMPB);乙二醇-双(琥珀酸N-羟基琥珀酰亚胺酯)(EGS);酒石酸二琥珀酰亚胺酯(DST);1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA);二亚乙基三胺-五乙酸(DTPA);硫脲接头;以及含脞的接头。

[0119] 在一些实施方案中,接头在细胞内或细胞外条件下是可裂解的,使得接头的裂解在合适的环境中从抗体释放ALK5抑制剂。在又一些实施方案中,接头是不可裂解的,并且药物例如通过在溶酶体中的抗体降解来释放(参见,美国专利公开2005/0238649,出于所有目的,其通过引用整体并入本文)。

[0120] 可用于本公开内容的ADC中的不可裂解接头的实例包括N-马来酰亚胺基甲基环己烷1-羧酸酯、马来酰亚胺基己酰基或巯基酰氨基乙酰氨基己酰基的接头。

[0121] 在一些实施方案中,接头可被细胞内环境(例如,在溶酶体或核内体或胞膜室内)中存在的裂解剂裂解。接头可以是例如被细胞内肽酶或蛋白酶裂解的肽基接头,包括但不限于溶酶体或核内体蛋白酶。在一些实施方案中,肽基接头包含至少两个氨基酸长度或至少三个氨基酸长度或更多的肽基组分。

[0122] 裂解剂可以包括但不限于组织蛋白酶B和D和纤溶酶,已知其都能水解二肽药物衍

生物,导致靶细胞内活性药物的释放(参见,例如Dubowchik和Walker,1999,Pharm.Therapeutics 83:67-123)。例如,可被硫醇依赖性蛋白酶组织蛋白酶-B裂解的肽基接头(例如,Phe-Leu或Gly-Phe-Leu-Gly接头)。此类接头的其他实例在例如美国专利No.6,214,345中描述,出于所有目的,其通过引用整体并入本文。

[0123] 在一些实施方案中,可被细胞内蛋白酶裂解的肽基接头是Val-Cit接头或Phe-Lys接头(参见,例如,美国专利号6,214,345,其描述了用val-cit接头合成阿霉素)。

[0124] 在另一些实施方案中,可裂解接头是对pH敏感的,也就是说,在某些pH值下对水解敏感。通常,对pH敏感的接头在酸性条件下可水解。例如,可以使用在溶酶体中可水解的酸不稳定的接头(例如,脞、缩氨基脞、氨硫脞、顺式乌头酰胺、原酸酯、乙缩醛、缩酮等)(参见,例如,美国专利号5,122,368、5,824,805、5,622,929;Dubowchik和Walker,1999,Pharm.Therapeutics83:67-123;Neville等,1989,Biol.Chem.264:14653-14661)。此类接头在中性pH条件下(例如,在血液中的那些)相对稳定,但是在pH 5.5或5.0(溶酶体的近似pH)以下不稳定。在某些实施方案中,可水解的接头是硫醚接头(例如,通过酰基脞键连接至治疗剂上的硫醚(参见,例如,美国专利号5,622,929))。

[0125] 在又一些实施方案中,接头在还原条件下是可裂解的(例如,二硫化物接头)。各种二硫键是本领域已知的,包括例如可以使用SATA(N-琥珀酰亚胺基-5-乙酰基硫代乙酸酯)、SPDP(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯)、SPDB(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯)和SMPT(N-琥珀酰亚胺基-氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基二硫代)甲苯)-、SPDB和SMPT形成的那些(参见,例如,Thorpe等,1987,Cancer Res.47:5924-5931;Wawrzynczak等,In Immunoconjugates:Antibody Conjugates in Radioimager y and Therapy of Cancer (C.W.Vogel编辑,0×ford U.Press,1987,还参见美国专利号4,880,935)。

[0126] 在另一些实施方案中,接头是丙二酸酯接头(Johnson等,1995,Anticancer Res.15:1387-93)、马来酰亚胺基苯甲酰基接头(Lau等,1995,Bioorg-Med-Chem.3(10):1299-1304)或3'-N-酰胺类似物(Lau等,1995,Bioorg-Med-Chem.3(10):1305-12)。

[0127] 通常,接头对细胞外环境基本上不敏感。如本文所用,在接头的上下文中,“对细胞外环境基本上不敏感”意指当ADC存在于细胞外环境(例如血浆)中时在ADC样品中,不超过约20%、15%、10%、5%、3%或不超过约1%的接头裂解。

[0128] 例如,可以通过将ADC与血浆一起孵育预定时间段(例如,2、4、8、16或24小时)并然后定量血浆中存在的游离药物的量来确定接头是否对细胞外环境基本上不敏感。

[0129] 在另一些非互斥的实施方案中,接头可以促进细胞内在化。在某些实施方案中,当与治疗剂偶联时(即,如本文所述的ADC的接头-治疗剂部分的环境中),接头促进细胞内在化。在又一些实施方案中,当与ALK5抑制剂和抗体二者偶联时,接头促进细胞内在化。

[0130] 在许多实施方案中,接头是自杀式的。如本文所用,术语“自杀式”是指能够将两个间隔开的化学部分共价连接在一起成为稳定的三分子的双官能化学部分。如果其与第一部分的键被裂解,则接头将自发地与第二化学部分分开。参见,例如,PCT公开号WO 2007/059404、WO 2006/110476、WO 2005/112919、WO 2010/062171、WO 2009/017394、WO 2007/089149、WO 2007/018431、WO 2004/043493和WO 2002/083180,其涉及药物可裂解的底物偶联物,其中药物和可裂解的底物任选地通过自杀式接头连接,并且均通过引用明确地并入。

可用于生成自杀式接头的自杀式间隔单元的实例在下式I中描述。

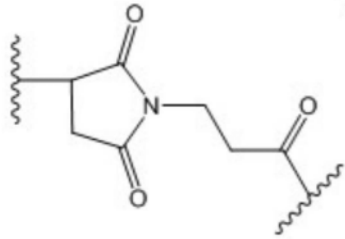
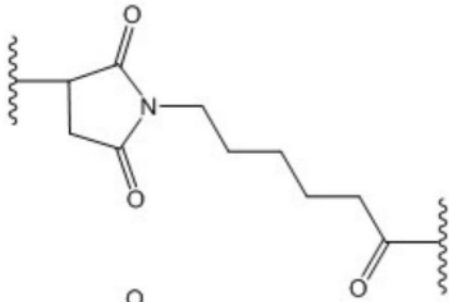
[0131] 可以与本发明的组合物和方法一起使用的各种示例性接头在PCT公开号W0 2004/010957、美国专利公开号US2006/0074008、美国专利公开号2005/0238649和美国专利公开号US2006/0024317(出于所有目的,其每一个通过引用整体并入本文)。

[0132] 本公开内容的ADC可以具有下式I,其中抗体(Ab)通过任选的接头(L)与一个或更多个ALK5抑制剂药物部分(D)偶联。

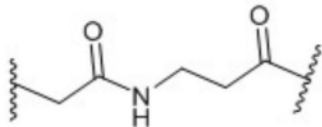
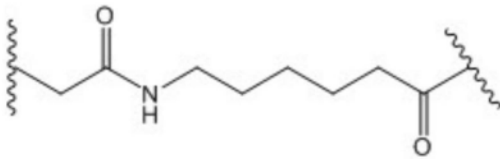
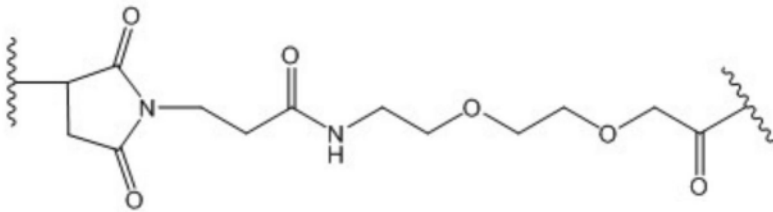
[0133] $Ab-(L-D)_p$ I

[0134] 因此,抗体可以直接或通过接头与药物偶联。在式I中,p是每个抗体的药物(即ALK5抑制剂)部分的平均数量,其范围可以为例如每个抗体约1至约20个药物部分,并且在某些实施方案中,每个抗体2至约8个药物部分。载药量的另外的详细信息在下文第4.5部分中描述。

[0135] 在一些实施方案中,接头组分可以包含“延伸物”,其例如通过半胱氨酸残基将抗体连接至另一接头组分或药物部分。示例性的延伸物如下所示(其中左波浪线表示与抗体共价附接的位点,右波浪线表示与另一接头组分或药物部分共价附接的位点):



[0136]



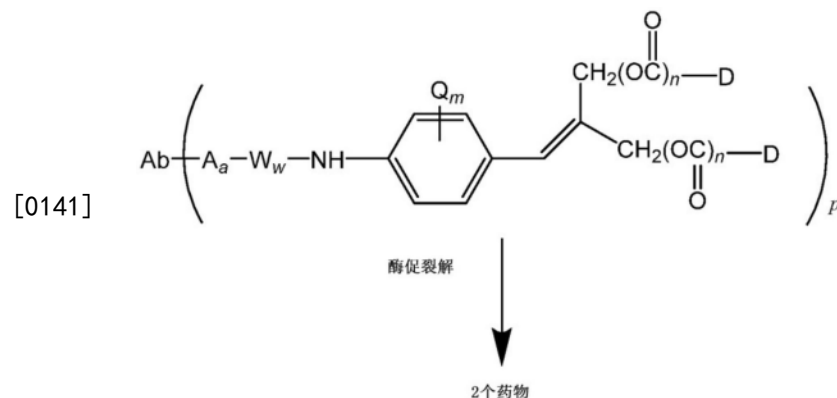
[0137] 参见,美国专利号9,109,035;Ducry等,2010,Bioconjugate Chem.21:5-13。

[0138] 在一些实施方案中,接头组分可以包含氨基酸单元。在一个此类实施方案中,氨基酸单元允许蛋白酶裂解接头,从而在暴露于细胞内蛋白酶例如溶酶体酶时促进药物从ADC释放。参见,例如Doronina等,2003,Nat.Biotechnol.21:778-784。示例性氨基酸单元包括但不限于二肽、三肽、四肽和五肽。示例性二肽包括:缬氨酸-瓜氨酸(VC或val-cit)、丙氨酸-苯丙氨酸(AF或ala-phe)、苯丙氨酸-赖氨酸(FK或phe-lys)或N-甲基-缬氨酸-瓜氨酸(Me-val-cit)。示例性三肽包括:甘氨酸-缬氨酸-瓜氨酸(gly-val-cit)和甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(gly-gly-gly)。氨基酸单元可以包含天然存在的氨基酸残基以及次要氨基酸和非天然存在的氨基酸类似物,例如瓜氨酸。氨基酸单元可以针对通过特定酶进行酶促裂解的选择性进行设计和优化,例如,组织蛋白酶B、C和D或纤溶酶蛋白酶。

[0139] 在一些实施方案中,接头组分可以包含“间隔”单元,其直接或通过担架和/或氨基酸单元将抗体连接至药物部分。间隔单元可以是“自杀式”或“非自杀式”。“非自杀式”间隔单元是一种间隔单元,其中部分或全部间隔单元在ADC的酶促(例如,蛋白水解)裂解后保持

与药物部分结合。非自杀式间隔单元的实例包括但不限于甘氨酸间隔单元和甘氨酸-甘氨酸间隔单元。“自杀式”间隔单元允许释放药物部分,而无需单独的水解步骤。在某些实施方案中,接头的间隔单元包含对氨基苄基单元。在一个此类实施方案中,对氨基苯甲醇通过酰胺键附接至氨基酸单元,并且在苯甲醇与细胞毒性剂之间形成氨基甲酸酯、甲基氨基甲酸酯或碳酸酯。参见,例如,Hamann等,2005,E×pert Opin.Ther.Patents 15:1087-1103。在一个实施方案中,间隔单元是对氨基苄氧基羰基(PAB)。在某些实施方案中,对氨基苄基单元的亚苄基部分被 Q_m 取代,其中 Q 是 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-O-$ (C_1-C_8 烷基)、-卤素、-硝基或-氰基;并且 m 为0至4的整数。自杀式间隔单元的实例还包括但不限于电子上类似于对氨基苯甲醇的芳香族化合物(参见,例如美国专利公开号US2005/0256030),例如2-氨基咪唑-5-甲醇衍生物(Hay等,1999,Bioorg.Med.Chem.Lett.9:2237)和邻-或对-氨基苄基缩醛。可以使用在酰胺键水解后经历环化作用的间隔物,例如经取代和未经取代的4-氨基丁酸酰胺(Rodrigues等,1995,Chemistry Biology 2:223);适当经取代的双环[2.2.1]和双环[2.2.2]环系统(Storm等,1972,Amer.Chem.Soc.94:5815);和2-氨基苯基丙酸酰胺(Amsberry等,1990,J.Org.Chem.55:5867)。消除在甘氨酸的 α -位置被取代的含胺药物(Kingsbury等,1984,J.Med.Chem.27:1447)也是在ADC中有用的自杀式间隔物的实例。

[0140] 在一个实施方案中,间隔单元是如下所述的支化的双(羟甲基)苯乙烯(BHMS)单元,其可用于并入和释放多种药物。



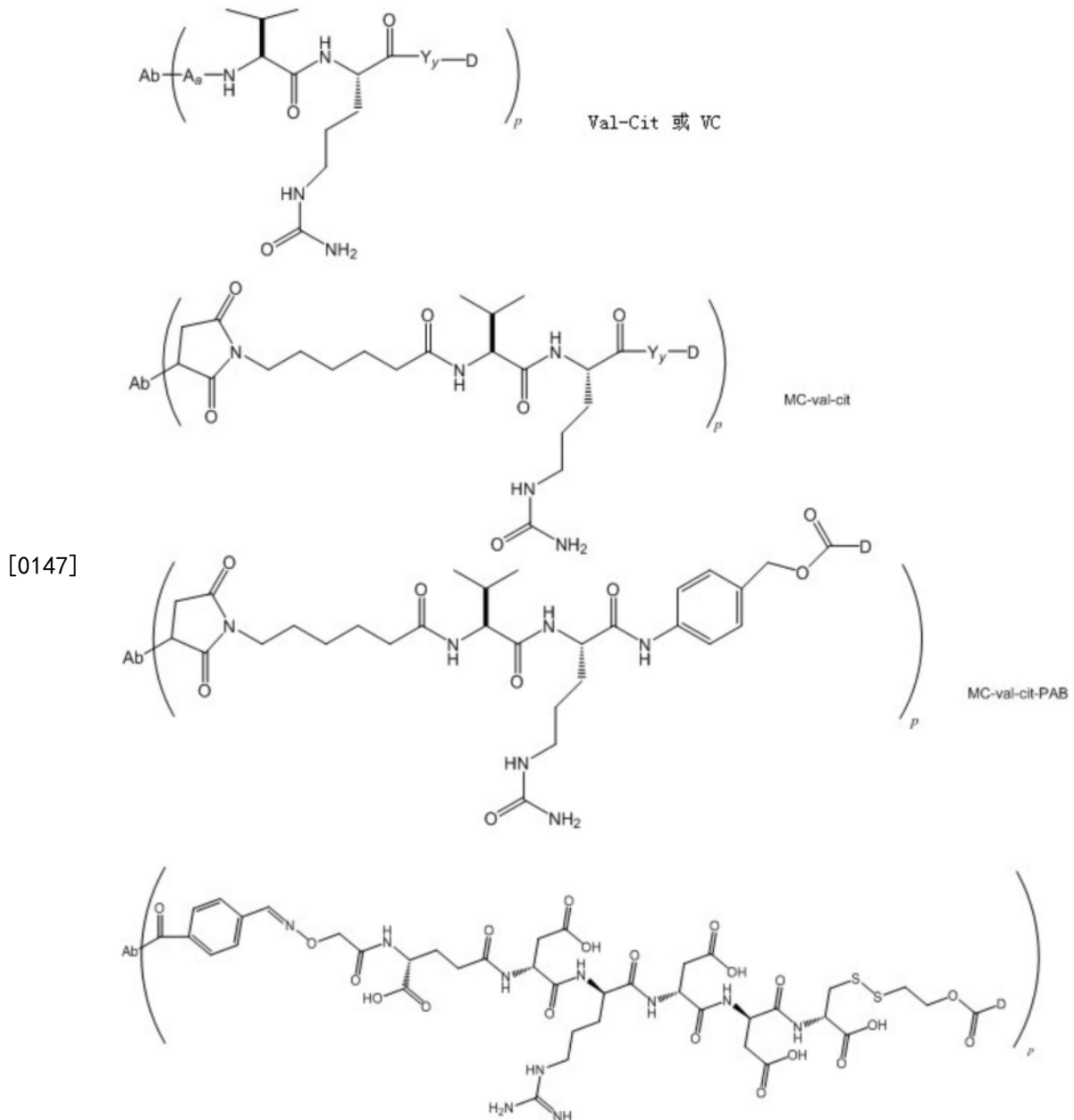
[0142] 其中Ab和D是如上对式I所定义的;A是延伸物,a是0至1的整数;W是氨基酸单元,并且w是0至12的整数;Q是 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-O-$ (C_1-C_8 烷基)、-卤素、-硝基或-氰基;m是0至4的整数;n是0或1;p的范围是1至约20。

[0143] 接头可以包含上述接头组分中的任一种或更多种。在某些实施方案中,接头是如以下ADC式的括号中所示的:



[0145] 其中Ab、A、a、W、w、D和p是如前段所定义的;Y是间隔单元,y是0、1或2;和。此类接头的示例性实施方案在美国专利公开号2005/0238649A1中描述,其通过引用并入本文。

[0146] 示例性接头组分及其组合在式II的ADC的上下文中下文示出:



[0148] 接头组分,包括延伸物、间隔物和氨基酸单元,可以通过本领域已知的方法合成,例如美国专利公开号2005/0238649中描述的那些。

[0149] 4.5载药量

[0150] 载药量由p表示,并且是分子中每个抗体的ALK5抑制剂部分的平均数量。载药量(“p”)可以是每个抗体1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个部分(D),尽管通常平均数量为分数或小数。通常,ALK5抑制剂的负载平均为每个抗体2至8个药物部分,更优选地每个抗体2至4个药物部分或每个抗体5至7个药物部分。

[0151] 如本领域技术人员将理解的,在许多情况下,提及ADC是ADC分子的群体或集合的简写(有时在药物组合物的上下文中),每个分子由共价附接至一个或多个ALK5抑制剂部分的抗体构成,载药率表示群体或集合中的平均载药量,尽管群体中基于单个分子的比率可能一个ADC分子与另一个ADC分子不同。在一些实施方案中,群体或集合包含ADC分子,该ADC分子包含共价附接至1至30个药物部分的任何地方的抗体,在一些实施方案中,1至20之

间、1至15之间、2至12之间或2至8个药物部分的任何地方。优选地,群体中的平均值如前段所述,例如,每个抗体2至8个药物部分,更优选每个抗体4至8个药物部分或每个抗体5至7个药物部分。

[0152] 一些ADC群体可以是包含本文所述的ADC和缺乏药物部分的抗体分子的组合物形式,例如附接ALK5抗体不成功的抗体。

[0153] 来自偶联反应的ADC配制品中每个抗体的ALK5抑制剂部分的平均数量可以通过常规方法例如质谱术和ELISA测定法来表征。

[0154] 还可以确定以 p 表示的ADC的定量分布。在一些情况下,均质ADC的分离、纯化和表征可以通过例如电泳的方式获得,其中 p 为具有其他ALK5抑制剂负载的ADC的某一值。

[0155] 对于一些抗体-药物偶联物, p 可能受到抗体上附接位点数量的限制。例如,在附接是半胱氨酸硫醇的情况下,如在以上示例性实施方案中,抗体可以仅具有一个或数个半胱氨酸硫醇基,或者可以仅具有一个或数个足够反应性的硫醇基,可以通过它们附接至接头。在某些实施方案中,较高的载药量,例如 $p > 5$,可能引起某些抗体-药物偶联物的聚集、不溶性、毒性或细胞通透性的损失。在某些实施方案中,本公开内容的ADC的载药量为1至约8、约2至约6、约3至约5、约3至约4、约3.1至约3.9、约3.2至约3.8、约3.2至约3.7、约3.2至约3.6、约3.3至约3.8或约3.3至3.7。实际上,已经表明,对于某些ADC,每个抗体的药物部分的最优比率可以小于8,并且可以为约2至约5。参见美国专利公开号US2005/0238649(通过引用整体并入本文)。

[0156] 在某些实施方案中,在偶联反应期间,少于理论上最大的药物部分与抗体偶联。抗体可以包含例如不与药物-接头中间体或接头试剂反应的赖氨酸残基,如下讨论的。通常,抗体不包含可能与药物部分连接的许多游离和反应性半胱氨酸硫醇基;实际上,抗体中的大多数半胱氨酸硫醇残基以二硫桥形式存在。在某些实施方案中,可以在部分或全部还原条件下,用还原剂例如二硫苏糖醇(DTT)或三羰基乙基膦(TCEP)还原抗体,以生成反应性半胱氨酸硫醇基。在某些实施方案中,使抗体经受变性条件以揭示反应性亲核基团,例如赖氨酸或半胱氨酸。

[0157] ADC的负载(药物/抗体比)可以以不同方式控制,例如,通过以下方式:(i)限制药物-接头中间体或接头试剂相对于抗体的摩尔过量,(ii)限制偶联反应时间或温度,(iii)半胱氨酸硫醇修饰的部分或限制性还原条件,(iv)通过重组技术将抗体的氨基酸序列基因工程化,使得半胱氨酸残基的数量和位置被修饰,用以控制接头-药物附接的数量和/或位置(例如,如PCT公开号WO 2006/034488中公开的制备的thioMab或thioFab(通过引用整体并入本文))。

[0158] 应理解,在多于一个亲核基团与药物-接头中间体或接头试剂反应,然后与药物部分试剂反应的情况下,则所得产物是ADC化合物的混合物,其具有一个或更多个附接至抗体的药物部分分布。可以通过双重ELISA抗体测定法从混合物中计算出每个抗体的药物的平均数量,该双重ELISA抗体测定法对抗体具有特异性并且对药物具有特异性。可以通过质谱术鉴定混合物中的各个ADC分子,并且通过HPLC(例如疏水性相互作用色谱术)分离。

[0159] 在一些实施方案中,可以通过电泳或色谱术从偶联混合物中分离具有单一负载值的均质ADC。

[0160] 4.6制剂和施用

[0161] ADC合适的施用途径包括但不限于经口、肠胃外、经直肠、经粘膜、经肠施用、髓内、鞘内、直接心室内、静脉内、玻璃体内、腔内、腹膜内或肿瘤内注射。优选的施用途径是肠胃外,更优选静脉内。或者,可以例如通过将化合物直接注射到实体瘤或血液肿瘤中以局部而非全身方式施用化合物。

[0162] 可以根据已知方法配制免疫偶联物以制备药学上可用的组合物,由此将ADC与药学上合适的赋形剂组合在混合物中。无菌磷酸盐缓冲盐水是药学上合适的赋形剂的一个实例。其他合适的赋形剂是本领域技术人员众所周知的。参见,例如,Ansel等, *Pharmaceutical Dosage Forms And Drug Delivery Systems*, 5th Edition (Lea&Febiger 1990) 和Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Mack Publishing Company 1990) 及修订版。

[0163] 在一个优选的实施方案中,使用选自以下的缓冲液在Good's生物缓冲液(pH 6-7)中配制ADC:N-(2-乙酰氨基)-2-氨基乙磺酸(ACES)、N-(2-乙酰氨基)亚氨基二乙酸(ADA)、N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸(BES)、4-(2-羟乙基)哌嗪-1-乙磺酸(HEPES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)、3-(N-吗啉基)-2-羟基丙磺酸(MOPSO)和哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸)[Pipes]。更优选的缓冲液是MES或MOPS,优选浓度为20至100mM,更优选约25mM。最优选为25mM MES, pH 6.5。制剂还可以包含25mM海藻糖和0.01% v/v聚山梨酯80作为赋形剂,由于添加的赋形剂,最终缓冲液浓度改为22.25mM。优选的储存方法是作为偶联物的冻干制剂,储存的温度为-20℃至2℃,最优选的储存在2℃至8℃下。

[0164] ADC可以配制成用于通过例如推注(bolus injection)、缓慢灌注或连续灌注的静脉内施用。优选地,在少于约4小时,并且更优选在少于约3小时的时间内灌注ADC。例如,最初的25-50mg可以在30min内,优选甚至在15min内灌注,并且剩余的在接下来的2-3小时内灌注。注射用制剂可以以单位剂型存在,例如在安瓿或多剂量容器中,其中添加有防腐剂。该组合物可以采取例如在油性或水性载剂中的悬浮液、溶液或乳液的形式,并且可以包含配制剂,例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者,活性成分可以是粉末形式,以在使用前与合适的载剂例如无菌无热原水一起构成。

[0165] 可以采用其他药学方法来控制ADC作用的持续时间。可以通过使用聚合物络合或吸附ADC来制备控释配制品。例如,生物相容性聚合物包括聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)的基质和硬脂酸二聚体和癸二酸的聚酸酐共聚物的基质Sherwood等,1992, *Bio/Technology* 10: 1446。ADC从此种基质中释放的速率取决于ADC的分子量、基质内ADC的量以及分散颗粒的大小。Saltzman等,1989, *Biophys. J.* 55: 163; Sherwood等,同上。其他固体剂型在Ansel等, *Pharmaceutical Dosage Forms And Drug Delivery Systems*, 第5版 (Lea&

[0166] Febiger 1990) 和Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 第18版 (Mack Publishing Company 1990) 以及修订版中描述。

[0167] 通常,对人施用的ADC的剂量将根据例如患者的年龄、体重、身高、性别、一般医疗状况和先前医疗历史因素而变化。可能期望为接受者提供范围为约0.3mg/kg至5mg/kg的ADC剂量作为单次静脉内灌注,尽管根据情况需要,也可以施用较低或较高的剂量。对于70kg的患者,例如0.3-5mg/kg的剂量为21-350mg,或对于1.7米的患者为12-20⁶mg/m₂。可以根据需要重复剂量,例如,每周一次持续2-10周,每周一次持续8周,或每周一次持续4周。根据维持疗法的需要,也可以减少频率,例如隔周一次持续数月,或者每月一次或每季一次持

续几个月。优选的剂量可以包括但不限于0.3mg/kg、0.5mg/kg、0.7mg/kg、1.0mg/kg、1.2mg/kg、1.5mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kg、3.0mg/kg、3.5mg/kg、4.0mg/kg、4.5mg/kg和5.0mg/kg。对于每周使用,更优选的剂量为0.6mg/kg,对于较不频繁的给药,为1.2mg/kg。可以使用0.3至5mg/kg的任何量。该剂量优选每周一次多次施用。可以使用4周、更优选8周、更优选16周或更长的最小剂量方案,其剂量频率取决于毒性副作用和从中的恢复,这主要与血液毒性有关。施用方案可以包括每周一次或两次施用,周期选自:(i)每周;(ii)隔周;(iii)治疗一周,然后休息两周、三周或四周;(iv)治疗两周,然后休息一周、二周、三周或四周;(v)治疗三周,然后休息一周、二周、三周、四周或五周;(vi)治疗四周,然后休息一周、二周、三周、四周或五周;(vii)治疗五周,然后休息一周、二周、三周、四周或五周;(viii)每月。该周期可以重复2、4、6、8、10或12次或更多次。

[0168] 或者,可以每2或3周以一个剂量的方式施用ADC,重复总共至少3个剂量。或者,每周两次持续4-6周。剂量可以隔周一次,甚至频率更低,因此患者可以从任何的药物相关毒性中恢复。或者,可以减少剂量方案,即每2或3周持续2-3个月。给药方案可以任选地以其他间隔重复,并且可以通过各种胃肠外途径给予剂量,适当调整剂量和方案。

[0169] 4.7 治疗方法

[0170] 本公开内容的ADC可以用于治疗各种癌症。ADC可以用作单一疗法或作为组合治疗方案的一部分,例如与标准护理剂或方案一起使用。用于治疗癌症的包含在ADC中的合适抗体是靶向T细胞表面抗原的那些。示例性抗体在第4.2部分中描述。

[0171] 可以使用本公开内容的ADC治疗的癌症的实例包括但不限于胰腺癌、成胶质细胞瘤、骨髓增生异常综合症、前列腺癌、肝癌(例如,肝细胞癌)、黑素瘤、乳腺癌和尿路上皮癌(例如,膀胱癌、尿道癌和输尿管癌)。

[0172] 对于携带BRAF突变的黑素瘤的治疗,本公开内容的ADC可以与特异性靶向BRAF突变的药物(例如,威罗菲尼、达帕菲尼和曲美替尼)组合使用。

[0173] 对于恶性黑素瘤的治疗,本公开内容的ADC可以与检查点抑制剂(例如伊匹单抗或纳武单抗或派姆单抗)组合使用。

[0174] 对于非小细胞肺癌(NSCLC)的治疗,本公开内容的ADC可以与标准护理化学疗法(例如顺铂、卡铂、紫杉醇、吉西他滨、长春瑞滨、伊立替康、依托泊苷或长春碱包括在内)组合使用。此外,ADC可以与靶向疗法(例如贝伐单抗或爱必妥)组合使用。

[0175] 对于膀胱癌的治疗,本公开内容的ADC可以与标准护理治疗组合使用,包括但不限于顺铂、丝裂霉素-C、卡铂、多西他赛、紫杉醇、阿霉素、5-FU、甲氨蝶呤、长春碱、异环磷酰胺和培美曲塞。

[0176] 对于肾癌的治疗,本公开内容的ADC可以与标准护理治疗组合使用,例如阻断血管生成和/或特定酪氨酸激酶的药剂,例如索拉非尼、舒尼替尼、替西罗莫司、依维莫司、帕唑帕尼和阿昔替尼。

[0177] 对于乳腺癌的治疗,本公开内容的ADC可以与标准护理化疗剂组合使用,例如蒽环类(阿霉素或表阿霉素)和紫杉烷类(紫杉醇或多西紫杉醇)以及氟尿嘧啶、环磷酰胺和卡铂。此外,本公开内容的ADC可以与靶向疗法组合使用。HER2/neu阳性肿瘤的靶向疗法包括曲妥珠单抗和帕妥珠单抗,雌激素受体(ER)阳性肿瘤的靶向疗法包括他莫昔芬、托瑞米芬和氟维司群。

[0178] 对于胰腺癌,本公开内容的ADC可以与标准护理化疗剂(例如,吉西他滨、5-氟尿嘧啶、伊立替康、奥沙利铂、紫杉醇、卡培他滨、顺铂或多西他赛)组合使用。此外,ADC可以与抑制EGFR的靶向疗法(例如,厄洛替尼)组合使用。

[0179] 对于胶质母细胞瘤,本公开内容的ADC可以与标准护理化疗剂(例如卡铂、环磷酰胺、依托泊苷、洛莫斯汀、甲氨蝶呤或丙卡巴嗪)组合使用。

[0180] 对于前列腺癌,本公开内容的ADC可以与标准护理化疗剂(包括多西紫杉醇,任选地与类固醇泼尼松或卡巴他赛)组合使用。

[0181] 5. 实施例

[0182] 在整个实施例中有以下缩写:

[0183] Boc-叔丁氧羰基

[0184] DCM-二氯甲烷

[0185] DMA-二甲胺

[0186] DMF-二甲基甲酰胺

[0187] DIPEA-N,N-二异丙基乙胺

[0188] EtOAc-乙酸乙酯

[0189] EtOH-乙醇

[0190] Fmoc-苄基甲氧基羰基

[0191] HOBt-羟基苯并三唑

[0192] MeOH-甲醇

[0193] NaHMDS-六甲基二硅叠氮化钠

[0194] RT-室温,约21°C

[0195] TBTU-O-(苯并三氮唑-1-基)-N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸酯

[0196] TEA-三乙胺

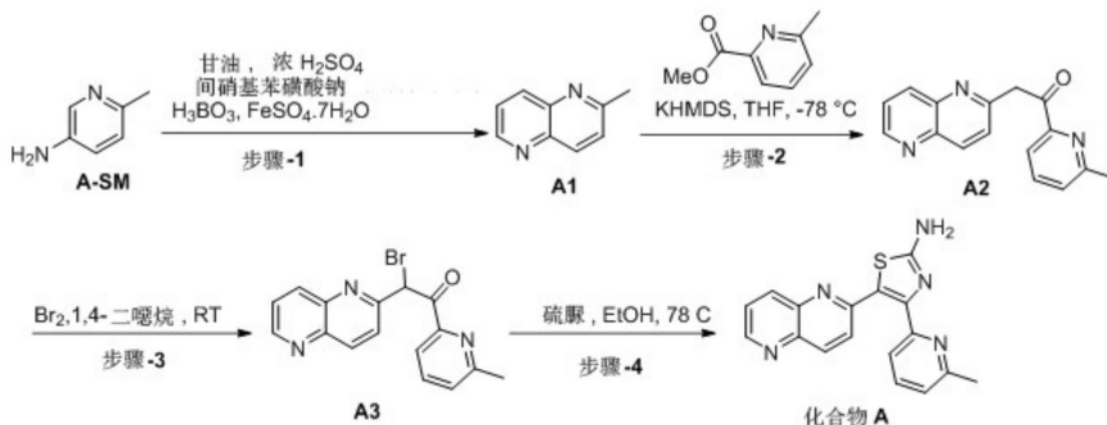
[0197] THF-四氢呋喃

[0198] TFA-三氟乙酸

[0199] TMS-咪唑-1-(三甲基甲硅烷基)咪唑

[0200] 5.1 实施例1:4-(6-甲基吡啶-2-基)-5-(1,5-萘啶-2-基)-1,3-噻唑-2-胺(化合物A)的合成

[0201] 根据以下方案1中的一般方法制备化合物A:



[0203] 方案1

[0204] 5.1.1 2-甲基-1,5-萘啶(A1)

[0205] 在室温下搅拌浓硫酸(2.5ml)、间硝基苯磺酸钠(2.08g,9.24mmol)、硼酸(445mg,7.21mmol)和七水合硫酸亚铁(167mg,0.60mmol)的混合物。向反应混合物中添加甘油(1.5ml),然后添加5-氨基-2-甲基吡啶(A-SM)(500mg,4.62mmol)和水(2.5ml),并在135°C加热18h。通过TLC测量反应完成后,将反应混合物冷却至约21°C,使用4N NaOH碱化,并用EtOAc(2×100ml)提取。合并有机提取物,用水(200ml)洗涤,经Na₂SO₄干燥并减压蒸发,以得到粗化合物A1。将粗产物通过硅胶柱色谱法使用(2%MeOH/CH₂Cl₂)纯化,以获得呈浅棕色结晶固体的化合物A1(200mg,30%)。

[0206] ¹H NMR(500MHz,CDCl₃):δ8.92(d,J=3.0Hz,1H),8.35(d,J=9.0Hz,1H),8.31(d,J=5.9Hz,1H),7.62(dd,J=8.5,4.5Hz,1H),7.54(d,J=5.9Hz,1H),2.8(s,3H)

[0207] LC-MS(ESI):m/z 145[M+H]⁺

[0208] 5.1.2 1-(6-甲基吡啶-2-基)-2-(1,5-萘啶-2-基)乙烷-1-酮(A2)

[0209] 将在无水THF(10ml)中的A1(200mg,1.38mmol)和6-甲基吡啶甲酸甲酯(209mg,1.38mmol)的溶液置于N₂气氛下并冷却至-78°C。在5min内逐滴添加双(三甲基甲硅烷基)酰胺钾(在甲苯中0.5M,6.9ml,3.47mmol)。将反应混合物在-78°C下搅拌1h,并然后温热至约21°C并保持20h。反应完成后(通过TLC测量),将反应混合物用饱和氯化铵溶液(20ml)淬灭。用EtOAc(2×20ml)提取水层。将合并的有机提取物用水(100ml)洗涤,经Na₂SO₄干燥并蒸发,以得到粗化合物A2。将粗物质通过柱色谱法(1% MeOH/CH₂Cl₂)纯化,以获得呈橙黄色固体的化合物A2(110mg,30.5%)。

[0210] ¹H NMR(400MHz,CDCl₃:Enol form):δ15.74(brs,-OH),8.69(t,J=3.6,1H),8.12(d,J=9.2Hz,1H),8.06(dd,J=8.4,4.4Hz,2H),7.82(t,J=7.6Hz,1H),7.55(dd,J=8.4,4.8Hz,1H),7.45(d,J=9.6Hz,1H),7.3(dd,J=7.6,4.0Hz,1H),7.16(s,1H),2.75(s,3H)

[0211] LC-MS(ESI):m/z264[M+H]⁺

[0212] 5.1.3 4-(6-甲基吡啶-2-基)-5-(1,5-萘啶-2-基)-1,3-噻唑-2-胺(化合物A)

[0213] 用溴(0.025ml,0.501mmol)处理在1,4-二噁烷(10ml)中的A₂(110mg,0.418mmol)的溶液。将所得反应混合物在约21°C搅拌1h,并然后减压浓缩,以获得粗A3(120mg),其无需进一步纯化即可用于下一步。将粗A3(120mg)溶解在乙醇(15ml)中。然后添加硫脲(3.5mg,0.046mmol),并将反应混合物在78°C下加热4h(直到通过TLC观察到起始材料完全消耗)。将反应混合物冷却至约21°C,并在温和搅拌下添加氨溶液(25%,1.5ml)。蒸发溶剂,然后将残留物溶解在CH₂Cl₂(2×20ml)中,并用水(50.0ml)洗涤。然后将分离的有机层用1N HCl(30ml×2)洗涤。将合并的水层用35%氢氧化钠水溶液(20ml)碱化,并用CH₂Cl₂(2××20ml)提取。有机层经硫酸钠干燥并蒸发,以得到粗化合物A。将粗化合物A从乙腈(2ml)中重结晶,以获得呈黄色结晶固体的纯化的化合物A(35mg,经过2个步骤产率49%)。

[0214] ¹H NMR(400MHz,CDCl₃):δ8.86(dd,J=4.4,1.6Hz,1H),8.29(t,J=8.4Hz,1H),8.06(d,J=9.2Hz,1H),7.64(t,J=7.6Hz,1H),7.60-7.55(m,2H),7.46(d,J=8Hz,1H),7.20(d,J=7.6,1H),5.32(brs,2H),2.57(s,3H)

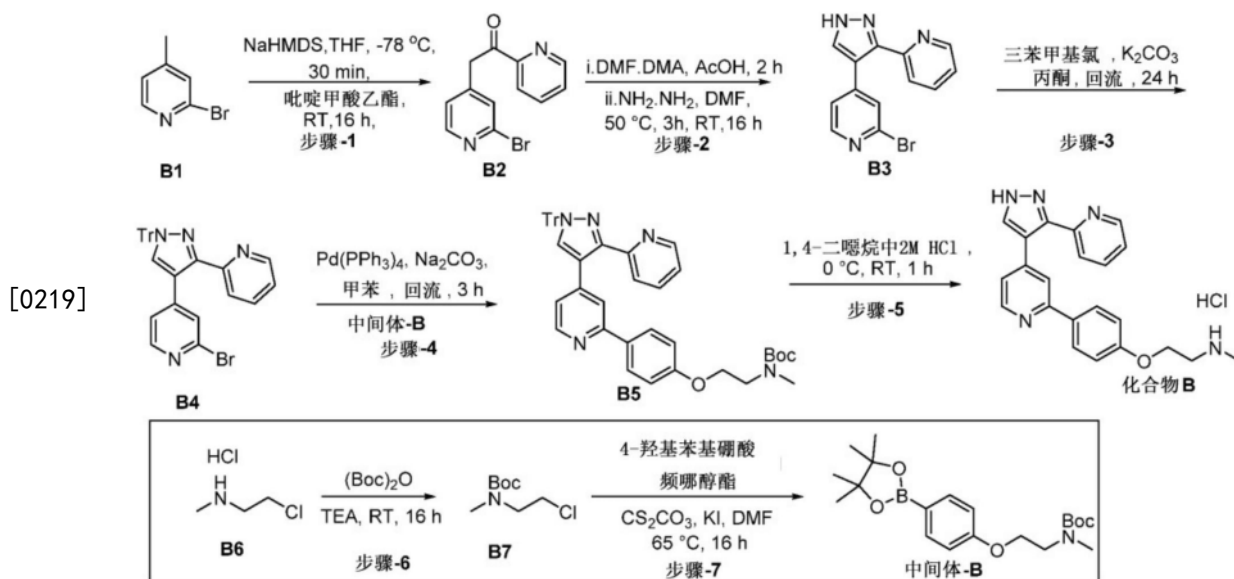
[0215] LC-MS(ESI):m/z320[M+H]⁺

[0216] UPLC纯度:97.6%

[0217] 5.2实施例2:N-甲基-2-(4-{4-[3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基]吡啶-2-基}苯氧

基)乙烷-1-胺(化合物B)的合成

[0218] 根据以下方案2中的一般方法制备化合物B:



[0220] 方案2

[0221] 5.2.1叔丁基(2-氯乙基)(甲基)氨基甲酸酯(B7)

[0222] 在1h的时间内向在THF(4ml)中的Boc酸酐(1.7ml,7.30mmol)的搅拌溶液中同时添加在水(4ml)中的B6(1g,7.69mmol)的溶液和在THF(4ml)中的TEA(1ml,7.69mmol)的溶液。将所得混合物在约21°C下搅拌16h。将反应混合物用饱和NaCl溶液(20ml)稀释,并用DCM(3×50ml)提取。将合并的有机提取物经Na₂SO₄干燥,真空浓缩,以获得粗化合物,将其通过硅胶柱色谱法使用10%EtOAc/己烷纯化,以获得呈浅黄色液体形式的化合物B7(1g,5.18mmol,71%)。

[0223] ¹H NMR(400MHz,CDCl₃):δ3.58-3.52(m,4H),2.93(s,3H),1.46(s,9H)

[0224] 5.2.2叔丁基甲基(2-(4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯氧基)乙基)氨基甲酸酯(中间体-B)

[0225] 在氩气氛下向在DMF(13ml)中的4-羟基苯基硼酸频哪醇酯(789mg,3.58mmol)的搅拌溶液中添加B7(900mg,4.66mmol)、KI(18mg,0.10mmol)和Cs₂CO₃(2.57g,7.88mmol)。将反应混合物加热至65°C并搅拌16h。将反应混合物倒入水(20ml)中,并用EtOAc(3×20ml)提取。将合并的有机层减压浓缩以获得粗产物,将其通过柱色谱法使用7%EtOAc/己烷纯化,以获得呈浅黄色固体的中间体-B(580mg,1.53mmol,43%)。

[0226] ¹H NMR(400MHz,CDCl₃):δ7.74(d,J=8.4Hz,2H),6.87(d,J=8.8Hz,2H),4.16-4.06(m,2H),3.65-3.59(m,2H),2.97(s,3H),1.45(s,9H),1.33(s,12H)

[0227] 5.2.3 2-(2-溴吡啶-4-基)-1-(吡啶-2-基)乙烷-1-酮(B2)

[0228] 在氩下于-78°C下,向在THF(30ml)中的2-溴-4-甲基吡啶(B1)(2g,11.62mmol)的搅拌溶液中逐滴添加NaHMDS(在THF中2M,12.7ml,25.58mmol)的溶液。将黄色溶液在-78°C下搅拌30min。然后添加在THF(10ml)中的吡啶甲酸乙酯(1.72ml,12.79mmol)的溶液,将反应混合物加热至约21°C并搅拌16h。减压蒸发溶剂,并将固体残留物用二乙醚研磨,过滤并用二乙醚洗涤。然后将固体用饱和NH₄Cl溶液(30ml)稀释,并将水相用EtOAc(2×200ml)提

取。有机层经 Na_2SO_4 干燥并浓缩。将粗产物通过硅胶柱色谱法使用10%EtOAc/己烷纯化,以获得呈黄色固体的化合物B2(2.06g,7.46mmol,64.3%)。

[0229] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 8.75(d, J=5.2Hz, 1H), 8.32(d, J=5.2Hz, 1H), 8.08(d, J=8.0Hz, 1H), 7.89(t, J=7.6Hz, 1H), 7.56-7.51(m, 2H), 7.28-7.25(m, 1H), 4.55(s, 2H)

[0230] LC-MS(ESI):m/z 277[M]⁺

[0231] 5.2.4 2-溴-4-[3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基]吡啶(B3)

[0232] 在氩下将在干燥的DMF(3.4ml)中的B2(850mg,3.07mmol)的溶液用在DMF中的冰醋酸(0.45ml,7.39mmol)处理。逐滴添加DMA(0.6ml,4.61mmol),并将混合物在氩气氛下于约21°C下搅拌2h。逐滴添加胍一水合物(1.15ml,23.09mmol),并将所得混合物在50°C下加热3h,并在约21°C下加热16h。将反应混合物倒入水(30ml)中,并用 CH_2Cl_2 (3×30ml)提取。有机层经 Na_2SO_4 干燥并过滤。减压蒸发溶剂,以获得粗化合物。将粗产物通过硅胶柱色谱法使用30%EtOAc/己烷纯化,以获得呈黄色固体的化合物B3(560mg,1.86mmol,60.6%)。

[0233] ^1H NMR(500MHz, CDCl_3): δ 8.74(brs, 1H), 8.34(d, J=5.0Hz, 1H), 7.83(brs, 1H), 7.81(t, J=6.0Hz, 1H), 7.56(s, 1H), 7.49(d, J=8.0Hz, 1H), 7.39-7.84(m, 1H), 7.31-7.26(m, 1H)

[0234] LC-MS(ESI):m/z 301[M]⁺

[0235] 5.2.5 2-溴-4-(3-(吡啶-2-基)-1-三苯甲基-1H-吡唑-4-基)吡啶(B4)

[0236] 向在丙酮(10ml)中的B3(500mg,1.66mmol)的搅拌溶液中添加 K_2CO_3 (1.37g,9.99mmol)和三苯甲基氯(464mg,2.49mmol)。随后将反应混合物加热至回流并搅拌24h。将反应混合物过滤并将滤液浓缩,然后在 CH_2Cl_2 (20ml)与水(10ml)之间分配。有机相经 Na_2SO_4 干燥并浓缩。将粗固体通过硅胶柱色谱法使用2% MeOH/ CH_2Cl_2 纯化,以获得呈浅黄色固体的化合物B4(402mg,0.74mmol,44%)。

[0237] ^1H NMR(500MHz, CDCl_3): δ 8.53(d, J=4.5Hz, 1H), 8.20(d, J=5.5Hz, 1H), 7.75-7.05(m, 2H), 7.56(s, 1H), 7.51(s, 1H), 7.35-7.32(m, 9H), 7.25-7.22(m, 8H)

[0238] 5.2.6叔丁基甲基(2-(4-(4-(3-(吡啶-2-基)-1-三苯甲基-1H-吡唑-4-基)吡啶-2-基)苯氧基)乙基)氨基甲酸酯(B5)

[0239] 在氩气氛下向在甲苯(2ml)中的B4(100mg,0.18mmol)的搅拌溶液中添加在EtOH(0.75ml)中的中间体-B(185mg,0.49mmol)的溶液,然后添加2M Na_2CO_3 溶液(0.45ml)。将反应混合物用氩脱气20min,然后添加 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (16mg,0.01mmol)并回流3h。起始材料完全消耗(通过TLC监测)后,将反应混合物倒入水中,并用甲苯(3×15ml)提取。有机层经 Na_2SO_4 干燥并减压浓缩,以获得粗产物,将其通过硅胶柱色谱法使用30%EtOAc/己烷纯化,以获得呈无色固体的化合物B5(70mg,0.09mmol,53%)。

[0240] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 8.53(s, 1H), 8.49(d, J=4.8Hz, 1H), 7.82(d, J=8.8Hz, 2H), 7.74-7.76(m, 3H), 7.60(s, 1H), 7.40-7.34(s, 8H), 7.31-7.30(m, 2H), 7.24-7.19(m, 4H), 7.12-7.10(m, 1H), 6.93(d, J=8.8Hz, 2H), 4.19-4.12(m, 2H), 3.66-3.58(m, 2H), 2.98(s, 3H), 1.46(s, 9H)

[0241] 5.2.7N-甲基-2-(4-(4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶-2-基)苯氧基)乙烷-1-胺盐酸盐(化合物B)

[0242] 在0°C下,向在 CH_2Cl_2 (6ml)中的B5(70mg,0.09mmol)搅拌溶液中添加在1,4-二噁烷

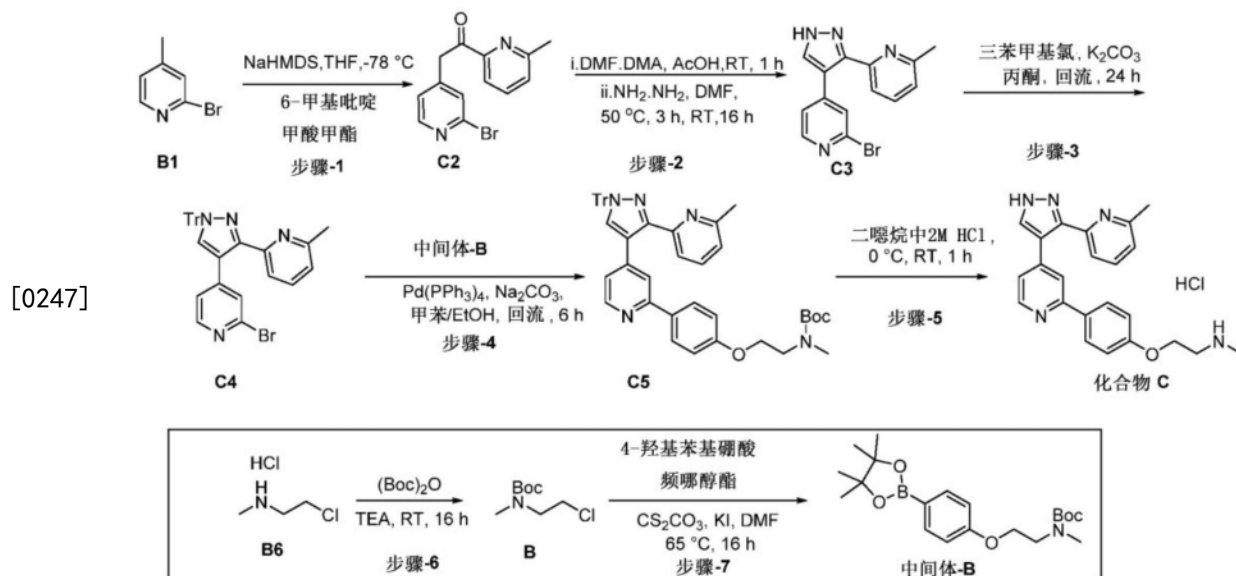
(0.5ml)中的4N HCl。将反应混合物在氩气氛下搅拌1h。起始材料完全消耗(通过TLC监测)后,减压蒸发溶剂,以获得粗化合物,用正戊烷(2×1ml)研磨并干燥,以获得呈无色固体的化合物B HCl盐(25mg,0.06mmol,69%)。

[0243] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) : δ 8.94 (brs, 2H), 8.62-8.56 (m, 3H), 8.30 (brs, 1H), 8.03-7.96 (m, 3H), 7.86 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.69 (brs, 1H), 7.49 (dd, $J=7.2, 5.6\text{Hz}$, 1H), 7.29 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.20 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 4.36 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 2H), 3.39-3.35 (m, 2H), 2.67-2.63 (m, 3H)

[0244] LC-MS (ESI) : m/z 372 [M+H] $^+$

[0245] 5.3实施例3:N-甲基-2-(4-{4-[3-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基]吡啶-2-基}苯氧基)乙烷-1-胺(化合物C)的合成

[0246] 根据以下方案3中的一般方法制备化合物C:



[0248] 方案3

[0249] 5.3.1 2-(2-溴吡啶-4-基)-1-(6-甲基吡啶-2-基)乙烷-1-酮(C2)

[0250] 在氩下于-78°C下,向在THF(15ml)中的2-溴-4-甲基吡啶(B1)(1g,5.81mmol)的搅拌溶液中逐滴添加NaHMDS(在THF中2M,6.39ml,12.8mmol)的溶液。将黄色溶液在-78°C下搅拌30min。然后添加在THF(7ml)中的6-甲基吡啶甲酸甲酯(1.19ml,8.72mmol)的溶液,并使反应混合物升温至约21°C并搅拌16h。减压蒸发溶剂,并将固体残留物用二乙醚研磨,过滤并用二乙醚洗涤。然后将固体用饱和 NH_4Cl 溶液(20ml)稀释,并将水相用EtOAc(2×150ml)提取。有机层经 Na_2SO_4 干燥并浓缩。将粗产物通过硅胶柱色谱法使用10%EtOAc/己烷纯化,以获得呈黄色固体的化合物C2(1.1g,3.79mmol,65.4%)。

[0251] ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) : δ 8.30 (d, $J=5.0\text{Hz}$, 1H), 7.86 (d, $J=8\text{Hz}$, 1H), 7.73 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.36 (d, $J=8\text{Hz}$, 1H), 7.24 (d, $J=5\text{Hz}$, 1H), 4.52 (s, 2H), 2.64 (s, 3H)

[0252] LC-MS (ESI) : m/z 291 [M] $^+$

[0253] 5.3.2 2-溴-4-[3-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基]吡啶(C3)

[0254] 在氩下将在干燥的DMF(1ml)中的C2(300mg,1.03mmol)的溶液用在DMF中的冰醋酸

(0.14ml, 2.48mmol) 处理。逐滴添加DMA (0.2ml, 1.55mmol), 并将混合物在氩气氛下于约21℃下搅拌1h。逐滴添加胍一水合物 (0.37ml, 7.75mmol), 并将所得混合物在50℃下加热3h, 并在约21℃下加热16h。将反应混合物倒入水 (20ml) 中, 并用CH₂Cl₂ (3×20ml) 提取。有机层经Na₂SO₄干燥并过滤。减压蒸发溶剂, 以获得粗C3。将粗C3通过硅胶柱色谱法使用2% MeOH/DCM纯化, 以获得呈黄色固体的纯化的C3 (172mg, 0.54mmol, 53%)。

[0255] ¹H NMR (500MHz, CDCl₃): δ 11.40 (brs, 1H), 8.37 (d, J=5.0Hz, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.58 (t, J=8.0Hz, 1H), 7.34 (d, J=6.0Hz, 1H), 7.26 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.17 (d, J=8.0Hz, 1H), 2.60 (s, 3H)

[0256] LC-MS (ESI): m/z 315 [M+H]⁺

[0257] 5.3.3 2-溴-4-(3-(6-甲基吡啶-2-基)-1-三苯甲基-1H-吡啶-4-基)吡啶 (C4)

[0258] 向在丙酮 (2ml) 中的C3 (40mg, 0.12mmol) 的搅拌溶液中添加K₂CO₃ (53mg, 0.38mmol) 和三苯甲基氯 (53mg, 0.19mmol)。随后将反应混合物加热至回流并搅拌24h。将反应混合物过滤并将滤液浓缩, 并然后在CH₂Cl₂ (5ml) 与水 (5ml) 之间分配。有机相经Na₂SO₄干燥并浓缩。将粗固体通过硅胶柱色谱法使用2% MeOH/CH₂Cl₂纯化, 以获得呈浅黄色固体的化合物C4 (30mg, 0.05mmol, 41%)。

[0259] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 8.22 (d, J=4.8Hz, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.59 (s, 3H), 7.39-7.35 (m, 9H), 7.31 (s, 1H), 7.28-7.25 (m, 6H), 7.24 (d, J=12Hz,

[0260] 1H), 2.53 (s, 3H)

[0261] LC-MS (ESI): m/z 558 [M+H]⁺

[0262] 5.3.4叔丁基甲基(2-(4-(4-(3-(6-甲基吡啶-2-基)-1-三苯甲基-1H-吡啶-4-基)吡啶-2-基)苯氧基)乙基)氨基甲酸酯 (C5)

[0263] 在氩气氛下向在甲苯 (5ml) 中的C4 (150mg, 0.26mmol) 的搅拌溶液中添加在EtOH (1ml) 中的中间体-B (152mg, 0.40mmol) 的溶液, 然后添加2M Na₂CO₃溶液 (0.7ml)。将反应混合物用氩气脱气20min, 然后添加Pd (PPh₃)₄ (25mg, 0.02mmol) 并回流6h。起始材料完全消耗 (通过TLC监测) 后, 将反应混合物倒入水中并用甲苯 (3×10ml) 提取。有机层经Na₂SO₄干燥并减压浓缩, 以获得粗C5, 将其通过硅胶柱色谱法使用30% EtOAc/己烷纯化, 以获得呈棕色固体的纯化的C5 (51mg, 0.07mmol, 26%)。

[0264] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 8.48 (d, J=5.2Hz, 1H), 7.82 (d, J=8.8Hz, 3H), 7.74 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.56 (d, J=15.2Hz, J=7.6Hz, 2H), 7.35-7.33 (m, 8H), 7.28-7.27 (m, 6H), 7.08 (d, J=6.8Hz, 2H), 6.93 (d, J=8.8Hz, 2H), 4.16-4.08 (m, 2H), 3.63-3.58 (m, 2H), 2.98 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 1.46 (s, 9H)

[0265] 5.3.5N-甲基-2-(4-4-[3-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-吡啶-4-基]吡啶-2-基)苯氧基)乙烷-1-胺 (化合物C)

[0266] 在0℃下, 向在CH₂Cl₂ (5ml) 中的C5 (51mg, 0.07mmol) 的搅拌溶液中添加在1,4-二噁烷 (0.3ml) 中的4N HCl。然后将反应混合物在氩气氛下搅拌1h。起始材料完全消耗 (通过TLC监测) 后, 减压蒸发溶剂, 以获得粗化合物C。然后将粗化合物C用正戊烷 (2×1ml) 研磨并干燥, 以获得呈棕色固体的化合物C的HCl盐 (20mg, 0.05mmol, 74%)。

[0267] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ 8.93 (brs, 2H), 8.61 (d, J=5.6Hz,

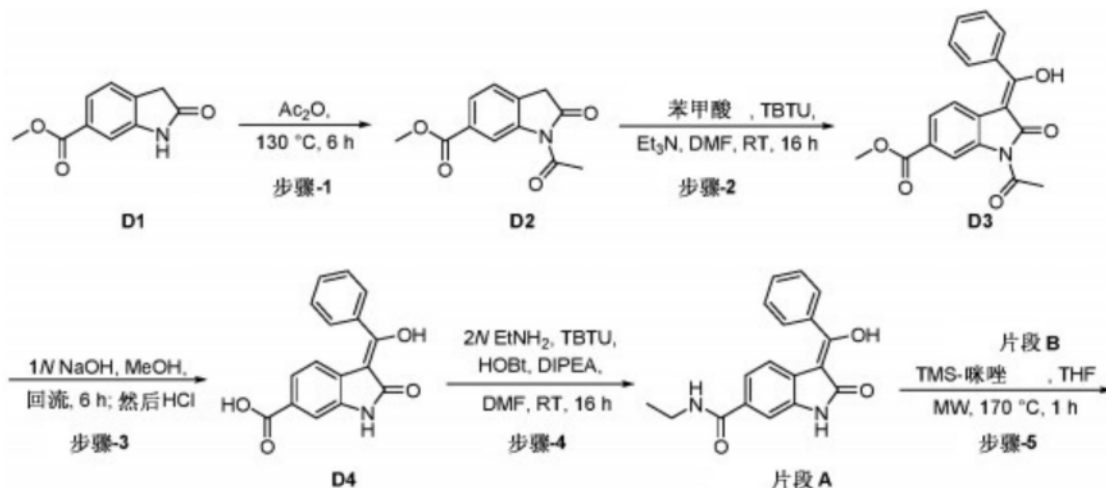
[0268] 1H), 8.56 (brs, 1H), 8.33 (brs, 1H), 8.03 (d, J=8.8Hz, 2H), 7.88 (t, J=7.6Hz,

[0269] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) : δ 7.78-7.74 (m, 1H) , 7.65 (d, J=7.2Hz, 1H) , 7.38 (d, J=7.6Hz, 1H) , 7.20 (d, J=8.4Hz, 2H) , 4.36 (t, J=5.2Hz, 2H) , 3.36 (t, J=5.2Hz, 2H) , 2.66-2.63 (m, 3H) , 2.50-2.46 (m, 3H)

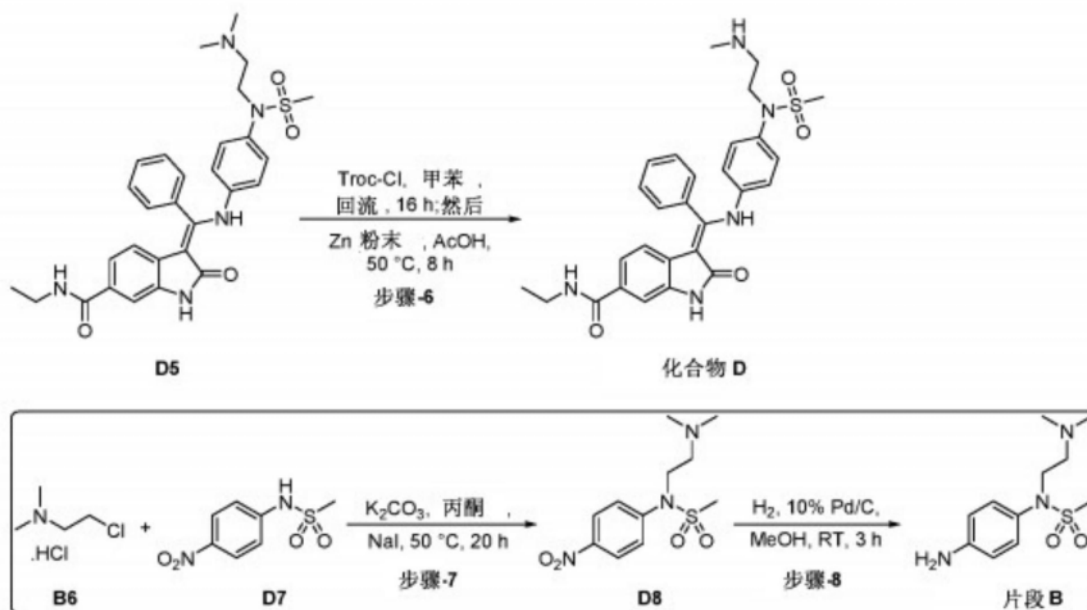
[0270] LC-MS (ESI) : m/z 386 [M+H] $^+$

[0271] 5.4 实施例4: (Z)-N-乙基-3-(((4-(N-(2-(甲基氨基)乙基)甲基磺酰氨基)苯基)氨基)(苯基)亚甲基)-2-氧代吡啶-6-羧酰胺(化合物D)的合成

[0272] 根据以下方案4中的一般方法制备化合物D:



[0273]



[0274] 方案4

[0275] 5.4.1 1-乙酰基-2-氧代吡啶-6-羧酸甲酯(D2)

[0276] 将在乙酸酐(16ml)中的2-氧代吡啶-6-羧酸甲酯(D1)(2.0g, 10.47mmol)的搅拌溶液在惰性气氛下加热至130℃持续6h。在起始材料完全消耗(通过TLC监测)后,将反应混合物冷却至约21℃。过滤沉淀物,用正己烷(2×50ml)洗涤,并真空干燥,以获得呈黄色固体的化合物D2(1.5g, 61.5%)。

[0277] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) : δ 8.66 (s, 1H) , 7.82 (d, J=8.0Hz, 1H) , 7.48 (d, J=8.0Hz, 1H) , 3.91 (s, 2H) , 3.87 (s, 3H) , 2.57 (s, 3H)

[0278] 5.4.2(Z)-1-乙酰基-3-(羟基(苯基)亚甲基)-2-氧代吡啶-6-羧酸甲酯(D3)

[0279] 在惰性气氛下于0℃下,向在DMF(10ml)中的化合物D2(1.5g,6.43mmol)的搅拌溶液中添加TBTU(2.69g,8.36mmol)、苯甲酸(903mg,7.40mmol)和三乙胺(2.2ml)。将反应混合物温热至约21℃并搅拌16h。起始材料完全消耗(通过TLC监测)后,将反应混合物用冰冷的水(30ml)淬灭,并用EtOAc(2×40ml)提取。合并的有机提取物经Na₂SO₄干燥,过滤并真空浓缩,以获得粗产物D3,将其通过硅胶柱色谱法使用80%EtOAc/己烷纯化,以获得呈黄色固体的化合物D3(900mg,42%)。

[0280] ¹H NMR(400MHz,CDCl₃):δ14.01(brs,1H),8.93(s,1H),7.76-7.70(m,3H),7.67-7.63(m,1H),7.59-7.56(m,2H),7.12(d,J=8.0Hz,1H),3.90(s,3H),2.83(s,3H)

[0281] LC-MS(ESI):m/z 338.3[M+H]⁺

[0282] 5.4.3(Z)-3-(羟基(苯基)亚甲基)-2-氧代吡啶-6-羧酸(D4)

[0283] 在约21℃下,向在MeOH(15ml)中的化合物D3(900mg,2.67mmol)的搅拌溶液中添加1N NaOH溶液(15ml)。将混合物加热至100℃并搅拌6h。起始材料完全消耗(通过TLC监测)后,将反应混合物冷却至约21℃,用1N HCl水溶液(13ml)淬灭并搅拌30min。过滤沉淀的固体,用20%EtOAc/己烷洗涤,以获得呈灰白色固体的化合物D4(580mg,77%),其无需进一步纯化即可用于下一步。

[0284] ¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆):δ12.76(brs,1H),11.61(brs,1H),7.77-7.50(m,8H),7.13(brs,1H)

[0285] 5.4.4(Z)-N-乙基-3-(羟基(苯基)亚甲基)-2-氧代吡啶-6-羧酰胺化物(片段A)

[0286] 在惰性气氛下于约21℃下,向在DMF(10ml)中的化合物D4(580mg,2.06mmol)的搅拌溶液中添加TBTU(729mg,2.27mmol)、HOBt(306mg,2.27mmol)和N,N-二异丙基乙胺(1.9ml,10.32mmol)。30min后,在0℃下添加在THF(2.1ml,4.12mmol)中的2N乙胺并搅拌1h。然后将反应混合物温热至约21℃,并再搅拌16h。起始材料完全消耗(通过TLC监测)后,真空除去挥发物。残留物用水(15ml)稀释,过滤并用20%EtOAc/己烷(2×10ml)洗涤,以获得粗产物,将其通过硅胶柱色谱使用10%MeOH/CH₂Cl₂纯化,以获得呈灰白色固体的片段A(410mg,64.5%)。

[0287] ¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆):δ13.62(brs,1H),11.39(brs,1H),8.35-8.33(m,1H),7.76-7.52(m,5H),7.44-7.36(m,3H),3.29-3.22(m,2H),1.10(t,J=7.2Hz,3H)

[0288] LC-MS(ESI):m/z 307.1(M-H)⁺

[0289] 5.4.5N-(2-(二甲基氨基)乙基)-N-(4-硝基苯基)甲磺酰胺(D8)

[0290] 在惰性气氛下于0℃下,向在丙酮(15ml)中的化合物D7(800mg,3.70mmol)的搅拌溶液中添加碳酸钾(1.32g,9.62mmol)、碘化钠(110mg,0.74mmol)和化合物B6(799mg),5.55mmol)。将反应混合物加热至50℃并搅拌20h。起始材料完全消耗(通过TLC监测)后,真空除去挥发物。残留物用水(20ml)稀释,并用EtOAc(2×40ml)提取。将合并的有机提取物经Na₂SO₄干燥,过滤并真空浓缩,以获得粗产物,将其通过硅胶柱色谱法使用5%MeOH/CH₂Cl₂纯化,以获得呈浅黄色固体的化合物D8(460mg,43%)。

[0291] ¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆):δ8.27(d,J=9.5Hz,2H),7.68(d,J=9.5Hz,2H),3.85(t,J=6.5Hz,2H),3.13(s,3H),2.31(t,J=6.5Hz,2H),2.12(s,6H)

[0292] LC-MS(ESI):m/z 288.3[M+H]⁺

[0293] 5.4.6N-(4-氨基苯基)-N-(2-(二甲基氨基)乙基)甲磺酰胺(片段B)

[0294] 向在MeOH(10ml)中的化合物D8(460mg,1.60mmol)的搅拌溶液中添加10% Pd/C(40mg),并在氢氛(气球压力)下于约21℃下搅拌3h。起始材料完全消耗(通过TLC监测)后,将反应混合物通过Celite®垫过滤,并用MeOH(10ml)洗涤。真空浓缩滤液,以获得粗产物,将其通过硅胶柱色谱法使用10% MeOH/CH₂Cl₂纯化,以获得呈浅黄色固体的片段B(300mg,73%)。

[0295] ¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆):δ6.99(d,J=8.8Hz,2H),6.54(d,J=8.8Hz,2H),5.25(s,2H),3.55(t,J=7.2Hz,2H),2.91(s,3H),2.24(t,J=7.2Hz,2H),2.12(s,6H)

[0296] LC-MS(ESI):m/z 258.2[M+H]⁺

[0297] 5.4.7(Z)-3-(((4-(N-(2-(二甲基氨基)乙基)甲基磺酰氨基)苯基)氨基)(苯基)亚甲基)-N-乙基-2-氧代吡啶啉-6-羧酰胺(D5)

[0298] 将在THF(5ml)中的片段A(200mg,0.64mmol)、片段B(500mg,1.94mmol)和TMS-咪唑(455mg,3.24mmol)的溶液在微波下加热至170℃持续1h。起始原料消耗(通过TLC和LC-MS监测)后,真空除去挥发物。残留物用水(10ml)稀释,并用EtOAc(3×25ml)提取,以获得粗产物,将其通过制备型HPLC纯化,以获得呈浅黄色固体的化合物D5(150mg,42%)。

[0299] ¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆):δ12.14(s,1H),10.91(s,1H),8.17(t,J=5.6Hz,1H),7.64-7.57(m,3H),7.53-7.51(m,2H),7.34(s,1H),7.17(d,J=8.8Hz,2H),7.06(d,J=8.4Hz,1H),6.84(d,J=8.8Hz,2H),5.73(d,J=8.4Hz,1H),3.58(t,J=6.8Hz,2H),3.23-3.20(m,2H),2.93(s,3H),2.13(t,J=6.8Hz,2H),1.90(s,6H),1.06(t,J=7.2Hz,3H)

[0300] LC-MS(ESI):m/z 548.6[M+H]⁺

[0301] 5.4.8(Z)-N-乙基-3-(((4-(N-(2-(甲基氨基)乙基)甲基磺酰氨基)苯基)氨基)(苯基)亚甲基)-2-氧代吡啶啉-6-羧酰胺(化合物D)

[0302] 在惰性气氛下于约21℃下,向在干燥的甲苯(3ml)中的化合物D5(70mg,0.12mmol)的搅拌溶液中添加2,2,2-三氯乙氧基羰基氯(0.04ml,0.19mmol)。将反应混合物加热至回流温度(120℃)并保持16h。起始材料消耗(通过TLC监测)后,将反应混合物冷却至约21℃,用EtOAc(30ml)稀释,并用1N HCl水溶液(15ml)洗涤。将有机层经Na₂SO₄干燥,过滤并真空浓缩,以用二-troc保护的化合物(40mg)进行单去甲基化。

[0303] 将来自以上反应的粗产物溶解在乙酸(3ml)中,并在惰性气氛下于约21℃下添加锌粉(9mg,0.13mmol)。将反应混合物加热至50℃并搅拌8h。起始材料完全消耗(通过TLC监测)后,将反应混合物冷却至约21℃,并真空除去挥发物。残留物用水(20ml)稀释,并用EtOAc(2×25ml)提取。将合并的有机提取物用饱和NaHCO₃溶液(20ml)洗涤,经Na₂SO₄干燥,过滤并减压浓缩,以获得粗化合物D,将其通过硅胶柱色谱法使用5-6%MeOH/CH₂Cl₂纯化,以获得12mg化合物D,HPLC纯度为83%。

[0304] 以60mg规模重复反应,并将所得粗产物与以上批料合并,并通过制备型HPLC纯化,以获得呈浅黄色固体的化合物D(8.0mg,6.3%)。

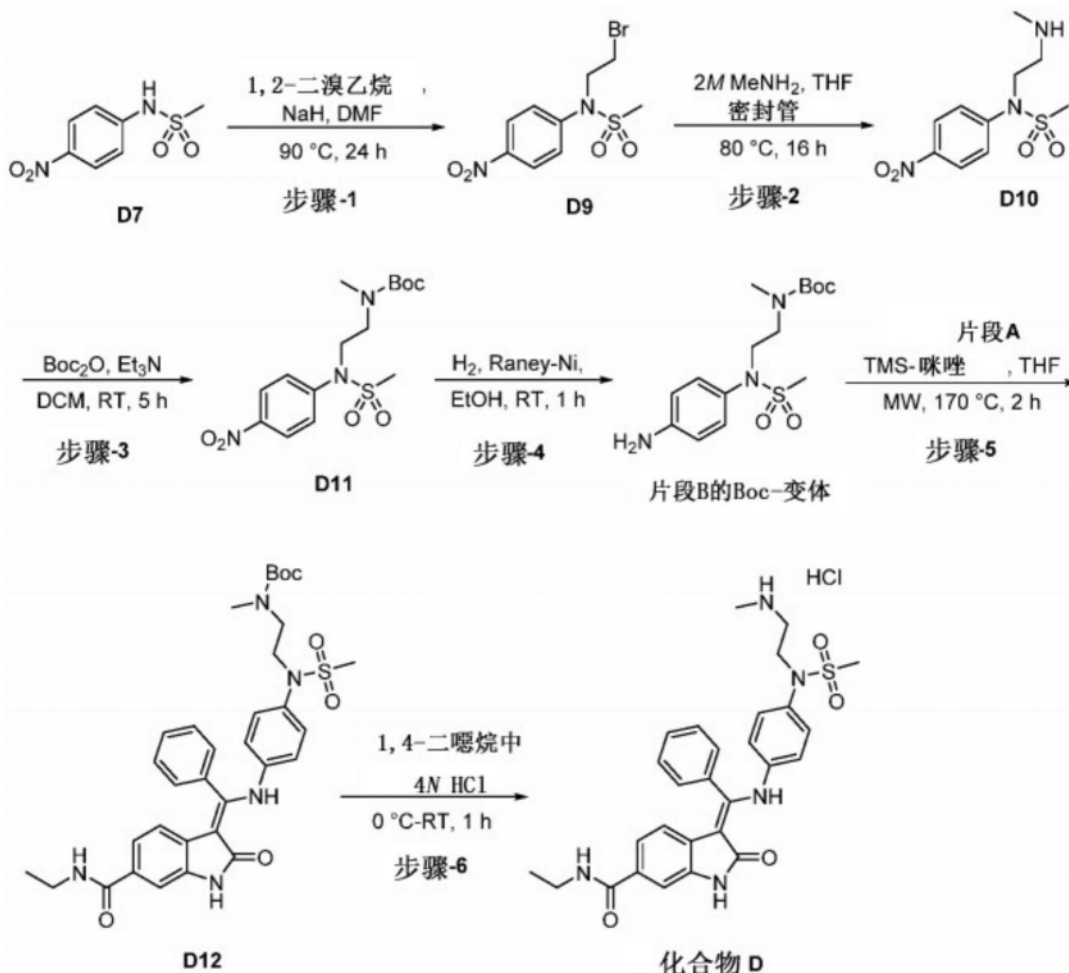
[0305] ¹H NMR(400MHz,CD₃OD):δ7.65-7.59(m,3H),7.52-7.50(m,2H),7.40(s,1H),7.31(d,J=8.8Hz,2H),7.07(d,J=8.4Hz,1H),6.90(d,J=8.8Hz,2H),5.95(d,J=8.4Hz,1H),3.95(t,J=5.6Hz,2H),3.39-3.32(m,2H),3.05(t,J=5.6Hz,2H),2.93(s,3H),2.71(s,3H),1.19(t,J=7.2Hz,3H)

[0306] LC-MS(ESI) :m/z 534.6[M+H]⁺

[0307] UPLC纯度:99.18%

[0308] 5.5实施例5: (Z)-N-乙基-3-(((4-(N-(2-(甲基氨基)乙基)甲基磺酰氨基)苯基)氨基)(苯基)亚甲基)-2-氧代吡啶啉-6-羧酰胺(化合物D)的替代合成

[0309] 还根据以下方案5中的一般方法制备化合物D:



[0310]

[0311] 方案5

[0312] 5.5.1N-(2-溴乙基)-N-(4-硝基苯基)甲磺酰胺(D9)

[0313] 在惰性气氛下,向在DMF(10ml)中的化合物D7(1.0g,4.65mmol)的搅拌溶液中添加氢化钠(在矿物油中60%;320mg,7.99mmol),并在约21°C下搅拌30min。向该混合物中,在约21°C下添加1,2-二溴乙烷(2.18g,11.60mmol)。将混合物加热至90°C并搅拌24h。通过TLC监测反应。将反应混合物冷却至约21°C,用冰冷的水(30ml)淬灭,并用EtOAc(2×40ml)提取。将合并的有机提取物用Na₂SO₄干燥,过滤并真空浓缩,以获得粗产物,将其通过硅胶柱色谱使用5% MeOH/CH₂Cl₂纯化,以获得1.2g D9混合物,为含有40%未反应的起始材料的混合物。所得混合物不经进一步纯化直接用于下一步反应。

[0314] ¹H NMR(500MHz,CDCl₃):δ8.29(d,J=8.5Hz,2H),7.56(d,J=8.5Hz,2H),4.12(t,J=7.0Hz,2H),3.44(t,J=7.0Hz,2H),3.01(s,3H)

[0315] 5.5.2N-(2-(甲基氨基)乙基)-N-(4-硝基苯基)甲磺酰胺(D10)

[0316] 在惰性气氛下于约21°C下,在密封管中向在THF(10ml)中的化合物D9(1.2g,不纯)

的搅拌溶液中添加三乙胺 (1.6ml) 和甲胺 (在THF中2M;9.3ml, 18.63mmol)。将反应混合物加热至80℃并保持16h。起始材料完全消耗 (通过TLC监测) 后, 将反应混合物冷却至约21℃并减压浓缩, 以获得粗D10。将粗D10通过使用硅胶柱色谱法15% MeOH/CH₂Cl₂纯化, 以获得呈黄色固体的化合物D10 (500mg, 两步总产率39%)。

[0317] ¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆): δ8.94 (brs, 1H), 8.31 (d, J=9.0Hz, 2H), 7.80 (d, J=8.5Hz, 2H), 4.06 (t, J=6.0Hz, 2H), 3.15 (s, 3H), 3.00 (t, J=6.0Hz, 2H), 2.55 (s, 3H)

[0318] 5.5.3叔丁基甲基 (2- (N- (4-硝基苯基) 甲基磺酰氨基) 乙基) 氨基甲酸酯 (D11)

[0319] 在惰性条件下于约21℃下, 向在CH₂Cl₂ (10ml) 中的D10 (500mg, 1.83mmol) 的搅拌溶液中添加三乙胺 (0.4ml, 2.61mmol) 和Boc-酸酐 (659mg, 3.02mmol) 并保持5h。起始材料完全消耗 (通过TLC监控) 后, 真空除去挥发物, 以获得粗产物, 将其通过硅胶柱色谱法使用5% MeOH/CH₂Cl₂纯化, 以获得呈无色浓浆料的D11 (320mg, 47%)。

[0320] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ8.27 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.68 (d, J=8.4Hz, 2H), 3.91 (t, J=6.4Hz, 2H), 3.28-3.25 (m, 2H), 3.07 (s, 3H), 2.72-2.70 (m, 3H), 1.33-1.27 (m, 9H)

[0321] LC-MS (ESI): m/z 274.2 (M⁺-B⁺C)

[0322] 5.5.4叔丁基 (2- (N- (4-氨基苯基) 甲基磺酰氨基) 乙基) (甲基) 氨基甲酸酯 (片段B的Boc变体)

[0323] 在氢气氛 (气球压力) 下于约21℃下, 向在EtOH (10ml) 中的化合物D11 (250mg, 0.67mmol) 的溶液中添加Raney-Ni (40mg) 并搅拌1h。起始材料完全消耗 (通过TLC监测) 后, 将反应混合物通过Celite®垫过滤, 并用EtOH (10ml) 洗涤。将合并的滤液真空浓缩, 以获得粗产物, 将其通过硅胶柱色谱法使用10% MeOH/CH₂Cl₂纯化, 以获得呈浅黄色固体的片段B的Boc-变体 (180mg, 77%)。

[0324] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ7.01 (d, J=8.4Hz, 2H), 6.53 (d, J=8.4Hz, 2H), 5.24 (s, 2H), 3.60 (t, J=6.4Hz, 2H), 3.18 (t, J=6.4Hz, 2H), 2.88 (s, 3H), 2.75-2.71 (m, 3H), 1.36-1.33 (m, 9H)

[0325] LC-MS (ESI): m/z 244.2 (M⁺-B⁺C)

[0326] 5.5.5叔丁基 (Z) - (2- (N- (4- (((6- (乙基氨基甲酰基) -2-氧代吡啶-3-亚基) (苯基) 甲基) 氨基) 苯基) 甲基磺酰氨基) 乙基) (甲基) 氨基甲酸酯 (D10)

[0327] 将在THF (3ml) 中的片段A (70mg, 0.22mmol)、片段B的Boc-变体 (155mg, 0.45mmol) 和TMS-咪唑 (159mg, 1.13mmol) 的溶液在微波下加热至170℃持续160min。起始材料消耗 (通过TLC和LC-MS监测) 后, 真空除去挥发物, 以获得残留物, 将其通过制备型HPLC纯化, 以获得呈浅黄色固体的化合物D10 (50mg, 36%)。

[0328] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ12.13 (brs, 1H), 8.01 (brs, 1H), 7.61-7.51 (m, 3H), 7.44-7.41 (m, 3H), 7.13-7.11 (m, 2H), 6.98 (d, J=8.4Hz, 1H), 6.75 (d, J=8.4Hz, 2H), 5.96-5.91 (m, 2H), 3.74-3.71 (m, 2H), 3.49-3.41 (m, 2H), 3.30-3.27 (m, 2H), 2.80 (s, 6H), 1.40-1.36 (m, 9H), 1.19 (t, J=7.2Hz, 3H)

[0329] LC-MS (ESI): m/z 634.6 [M+H]⁺

[0330] 5.5.6 (Z) -N-乙基-3- (((4- (N- (2- (甲基氨基) 乙基) 甲基磺酰氨基) 苯基) 氨基) (苯基) 亚甲基) -2-氧代吡啶-6-羧酰胺盐酸盐 (HCl盐的化合物D)

[0331] 在惰性气氛下于0℃下, 向在乙醚 (3ml) 中的化合物D10 (20mg, 0.03mmol) 的搅拌溶

液中添加在1,4-二噁烷(0.3ml)中的4N HCl。将反应混合物在约21℃搅拌1h。起始材料完全消耗(通过TLC监测)后,真空除去挥发物,以获得粗产物,将其用正戊烷(2×4ml)研磨,以获得呈浅黄色固体的HCl盐的化合物D(12mg,71%)。

[0332] ^1H NMR (400MHz, CD_3OD): δ 7.65-7.59(m, 3H), 7.52-7.50(m, 2H), 7.40(s, 1H), 7.31(d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 7.07(d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 6.90(d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 5.95(d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 3.95(t, $J=5.6\text{Hz}$, 2H), 3.39-3.32(m, 2H), 3.05(t, $J=5.6\text{Hz}$, 2H), 2.93(s, 3H), 2.71(s, 3H), 1.19(t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H)。

[0333] LC-MS (ESI): m/z 534.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0334] UPL纯度:96.26%

[0335] 5.6实施例6:化合物A-D测试活性的体外测定

[0336] 5.6.1N-(2-溴乙基)-N-(4-硝基苯基)甲磺酰胺(2)

[0337] 测试化合物A-D以确定它们是否可以在HEK293T细胞中体外抑制TGF- β 诱导的荧光素酶活性。

[0338] 将30,000个HEK293T细胞接种在96孔白色平底板中过夜。第二天,使用脂质转染胺将每孔100ng SMAD荧光素酶报告质粒转染到细胞中持续24h。第二天,用化合物A-D和100pM TGF β 处理细胞24h。使用Dual-Glo[®]荧光素酶测定试剂盒(Promega)测量了荧光素酶活性。对于化合物A、B和D进行两次测定,对于化合物C进行三次。结果示于表4中。

表 4			
化合物	实验 1 IC ₅₀ (nM)	实验 2 IC ₅₀ (nM)	实验 3 IC ₅₀ (nM)
[0339] 化合物 A	18.7	29.8	---
化合物 B	51.8	11.3	---
化合物 C	10.1	21.2	13.2
[0340] 化合物 D	1070	1520	---

[0341] 实验1的活性数据示于图5中。

[0342] 化合物A-C显示出最大的抑制活性。

[0343] 5.6.2MTS增殖测定

[0344] 测试化合物A-D以确定它们是否可以在原代小鼠CD4⁺T细胞中抑制TGF- β 信号传导。

[0345] 使用RoboSep[™]细胞分离系统(Stemcell Technologies)从C57/B6小鼠的脾中分离出原代小鼠CD4⁺T细胞。将0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的仓鼠抗-小鼠CD3e抗体(145-2C11;eBioscience)包被在96孔平底板上过夜。将 1×10^5 纯化的CD4⁺T细胞用1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 可溶性仓鼠抗小鼠CD28抗体(37.51,BD Biosciences)、1nM TGF- β 1和化合物A-D的8倍系列稀释液孵育。72小时后,按照制造商的说明书使用MTS测定(Promega)测量细胞增殖。结果示于表5中。

表 5		
化合物	实验 1 IC ₅₀ (nM)	实验 2 IC ₅₀ (nM)
化合物 A	未获得值	153
化合物 B	60	34
化合物 C	20	33
化合物 D	未获得值	未获得值

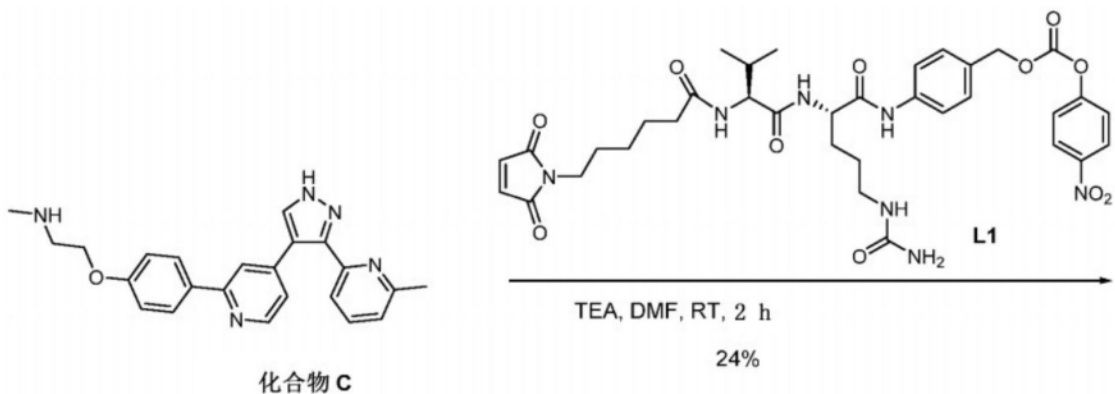
[0347] 实验1的数据示于图6中。

[0348] 在两个不同的实验中,未获得化合物D的IC₅₀值。化合物A在小鼠CD4⁺T细胞中也未显示出一致的作用。然而,化合物B和C都逆转了TGFβ介导的对T细胞增殖的抑制。

[0349] 基于两种测定,选择化合物C来偶联到ADC中。

[0350] 5.7实施例7:4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2H-吡咯-1(5H)-基)己酰氨基)-3-甲基丁酰氨基)-5-脲基戊酰氨基)苄基甲基(2-(4-(4-(3-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-吡啶-4-基)吡啶-2-基)苯氧基)乙基)氨基甲酸酯的合成

[0351] 根据以下方案6中的一般方法,将化合物C连接至缬氨酸-瓜氨酸接头:



[0352]

[0353] 方案6

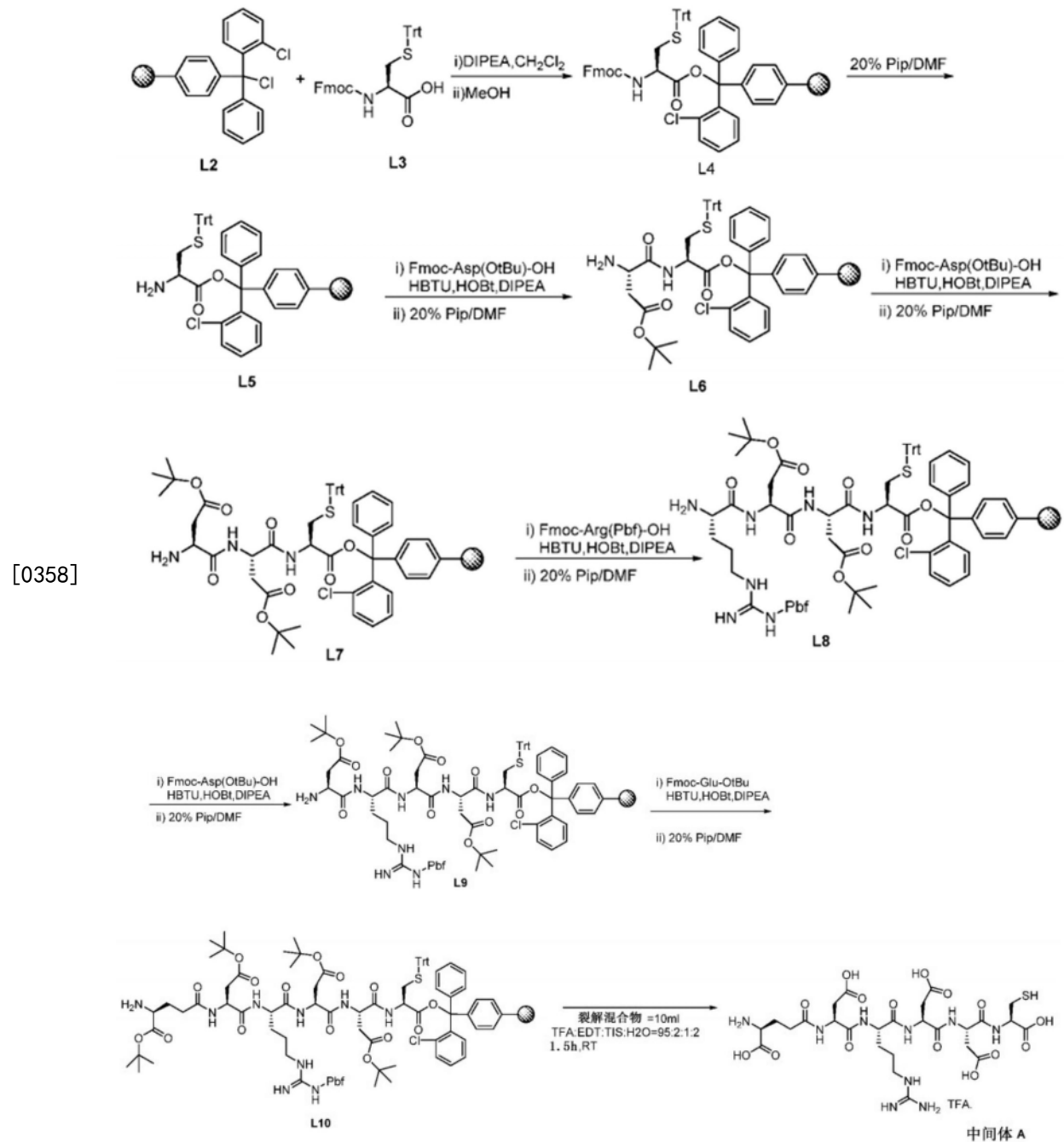
[0354] 在0°C下,将L1(122mg,0.165mmol,1.1当量)和TEA(52μl,0.375mmol,2.5当量)添加到在DMF(2ml)中的化合物C(58mg,0.150mmol,1.0当量)的溶液中,并将反应混合物在约21°C下搅拌2h,以获得粗ADC-1。将粗ADC-1通过制备型HPLC纯化,以获得呈白色固体的纯化的ADC-1(34mg,24%产率)。

[0355] 5.8实施例8:抗体药物偶联物1(ADC1)的生成

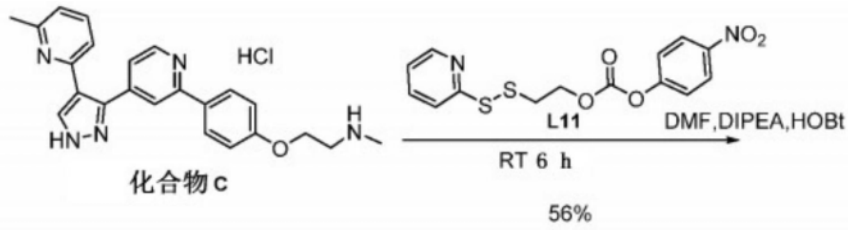
[0356] 将抗-小鼠转铁蛋白受体抗体R17217和大鼠抗-小鼠IgG2A同种型对照抗体(Bio×Cell)在偶联缓冲液(25mM硼酸钠/25mM NaCl和0.3mM EDTA,最终pH 7.4)中透析过夜。使用

三(2-羧乙基)膦(TCEP)以10-30的还原比还原抗体2h。将ADC-1溶解在DMSO中至最终浓度10mM,并然后在15%DMSO存在下以5-30的偶联比与抗体偶联。所有反应均在约21°C下进行。对于一些药物抗体比(DAR),在偶联步骤期间使用50%丙二醇作为有机溶剂。最终ADC在PBS中透析过夜,使用0.22 μ m过滤器过滤,并通过HPLC-HIC分析以确定DAR并通过HPLC-SEC分析以确定聚集水平。对于HPLC-HIC,样品在TSKgel®丁基-NPR柱上以0.5ml/min的流速运行。A相为pH 6.95的25mM磷酸钠和1.5M硫酸铵,而B相为pH 6.95的75%25mM磷酸钠和25%异丙醇。对于HPLC-SEC分析,使用TSKgel®G3000SW柱(Tosoh Bioscience),在280nm下0.25ml/min的流速,25min。

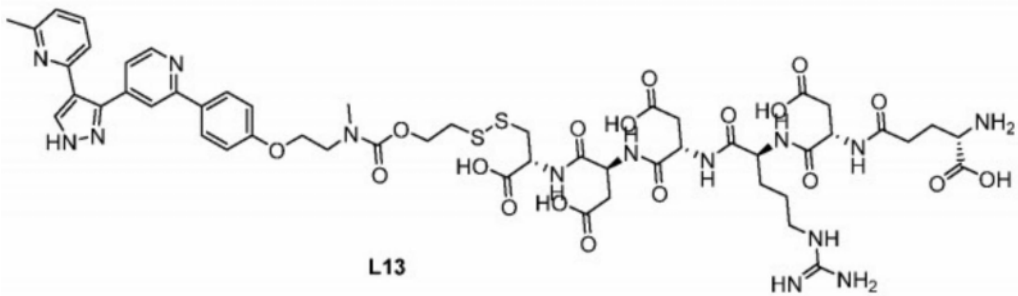
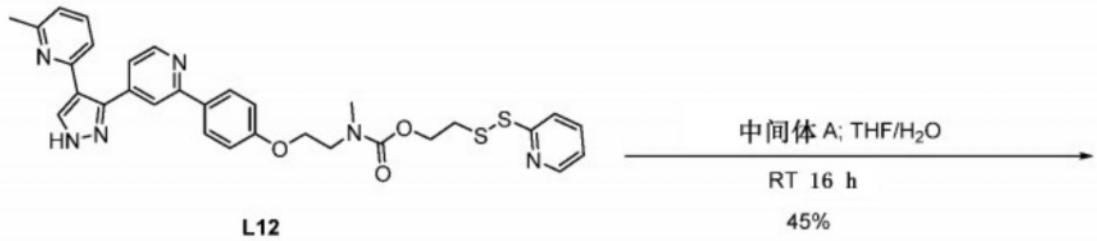
[0357] 5.9实施例9:连接至二硫化物接头(ADC-2)的化合物C的合成根据以下方案7A-B中的一般方法,将化合物C连接至二硫化物接头:



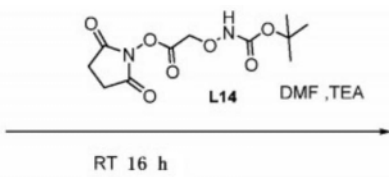
[0359] 方案7A



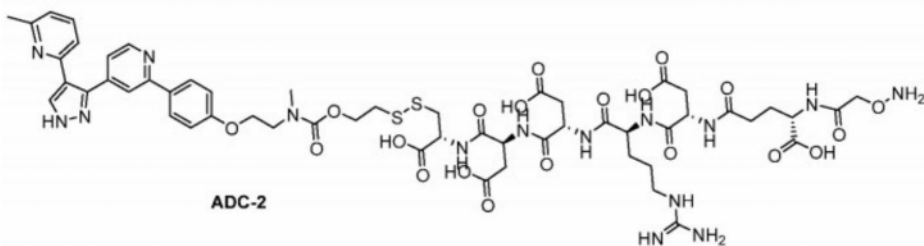
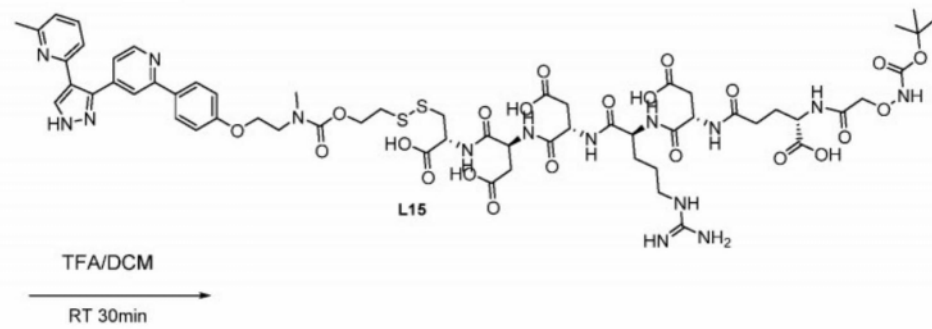
[0360]



[0361] 方案7B



[0362]



[0363] 方案7B(续)

[0364] 5.9.1 中间体A的合成

[0365] 将2-氯三苯甲基氯树脂(L2) (4g, 4mmol) 用DCM(2×40ml) 洗涤, 在50ml DCM中溶胀10min, 并然后排干。将Fmoc-Cys(Trt)-OH(L3) (7.03g, 12mmol) 溶解在40ml DCM中, 并添加到包含2-氯三苯甲基氯树脂的容器中。将8.7ml DIPEA(6.8ml, 40mmol) 添加到容器中, 并将混合物在约21℃下涡旋2h。然后将10ml 甲醇添加到混合物中并涡旋30min。然后将所得树脂(L4) 排干并用DMF洗涤五次。然后通过向树脂L4中添加约40ml 在DMF中的20%哌啶的溶液来使树脂L4脱保护, 以提供树脂L5, 摇动混合物, 并然后从树脂中排出液体。向树脂中添加另外的40ml 在DMF中的20%哌啶并摇动15min。然后排出树脂L5的液体并用DMF(6×40ml) 洗涤。

[0366] 通过单独地组合Fmoc-Asp(OtBu)-OH(4.93g, 12mmol)、Fmoc-Asp(OtBu)-OH(4.93g, 12mmol)、Fmoc-Arg(Pbf)-OH(7.79g, 12mmol)、Fmoc-Asp(OtBu)-OH(4.93g, 12mmol) 和Fmoc-Glu-OtBu(5.1g, 12mmol) 与HBTU/HOBT(4.55g, 12mmol/1.62g, 12mmol) 和DIPEA(2ml, 12mmol) 来制备Fmoc-氨基酸溶液。

[0367] 将Fmoc-Asp(OtBu)-OH溶液添加到树脂L5中并摇动60min以提供树脂L6。用DMF(6×40ml) 洗涤树脂L6, 并然后如上所述, 用在DMF中的20%哌啶使其脱保护。然后, 通过使用Fmoc-氨基酸溶液进行顺序偶联和用于从树脂L5制备树脂L6的相同程序来制备树脂L7、L8、L9和L10。

[0368] 在示例性合成中, 将干燥的树脂L10(8g) 添加到烧瓶中, 并添加80ml 裂解溶液(TFA:TES:EDT:H₂O=90:5:3:2, v/v/v/v)。使反应进行1.5h。然后通过压滤将反应混合物中分离树脂。然后将树脂用TFA洗涤两次。合并滤液, 并逐滴添加10倍体积的冷MTBE。然后将沉淀的肽(中间体A) 离心并用冷MTBE洗涤四次。然后将中间体A减压干燥, 并通过制备型HPLC纯化, 以提供呈白色固体的1.1g 中间体A(产率:37%)。LC-MS(ESI)m/z:752[M+H]⁺。

[0369] 5.9.2 2-(吡啶-2-基二硫烷基) 乙基甲基(2-(4-(4-(4-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-吡啶-3-基) 吡啶-2-基) 苯氧基) 乙基) 氨基甲酸酯(L12)

[0370] 向在DMF(5ml) 中的化合物C(40mg, 0.1038mmol) 和4-硝基苯基2-(吡啶-2-基二硫烷基) 乙基碳酸酯(L11) (80mg, 0.2272mmol) 的溶液中添加DIPEA(0.5ml) 和HOBT(14mg, 0.1038mmol)。将混合物在约21℃下在N₂下搅拌16h以提供L12。粗L12通过制备型HPLC纯化, 以得到35mg的呈白色固体的纯化的L12(产率56%)。

[0371] 5.9.3 (2R, 5S, 8S, 11S, 14S, 19S)-19-氨基-5, 8, 14-三(羧甲基)-11-(3-胍基丙基)-2-(((2-(甲基(2-(4-(4-(4-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-吡啶-3-基) 吡啶-2-基) 苯氧基) 乙基) 氨基甲酰氧基) 乙基) 二硫烷基) 甲基)-4, 7, 10, 13, 16-五氧代-3, 6, 9, 12, 15-五氮杂二十烷-1, 20-二酸(L13)

[0372] 在N₂下, 向在THF/H₂O(5ml/5ml) 中的L12(35mg, 0.058mmol) 的溶液中添加中间体A(80mg, 0.106mmol)。将混合物在约21℃下搅拌16h以提供L13。粗L13通过制备型HPLC纯化, 以提供23mg的呈白色固体的纯化的L13(产率31%)。

[0373] 5.9.4 (2R, 5S, 8S, 11S, 14S, 19S)-19-(2-(叔丁氧基羰基氨基氧基) 乙酰氨基)-5, 8, 14-三(羧甲基)-11-(3-胍基丙基)-2-(((2-(甲基(2-(4-(4-(4-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-吡啶-3-基) 吡啶-2-基) 苯氧基) 乙基) 氨基甲酰氧基) 乙基) 二硫烷基) 甲基)-4, 7, 10, 13, 16-五氧代-3, 6, 9, 12, 15-五氮杂二十烷-1, 20-二酸(L15)

[0374] 向在DMF(3ml) 中的L13(32mg, 0.025mmol) 的溶液中添加2, 5-二氧代吡咯烷-1-基

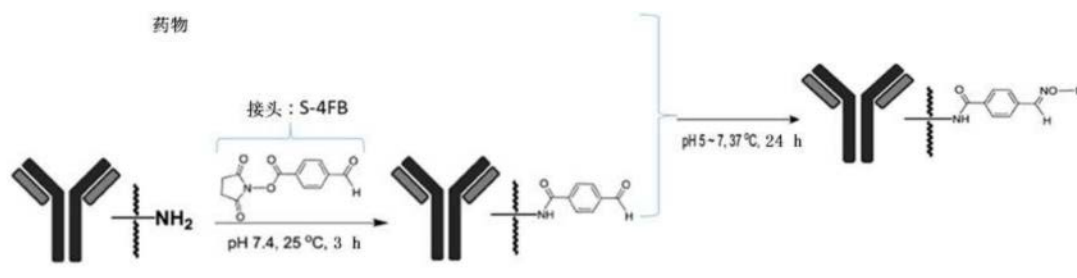
2-(叔丁氧基羰基氨基氧基)乙酸酯(L14)(28mg,0.097mmol),然后添加TEA(0.5ml)。将反应混合物在N₂气氛下于约21°C下搅拌16h以提供L15。粗L15通过制备型HPLC纯化,以提供12mg的呈白色固体的纯化的L15(产率33%)。

[0375] 5.9.5(2R,5S,8S,11S,14S,19S)-19-(2-(氨基氧基)酰氨基乙酰氨基)-5,8,14-三(羧甲基)-11-(3-胍基丙基)-2-(((2-(甲基(2-(4-(4(4-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-吡唑-3-基)吡啶-2-基)苯氧基)乙基)氨基甲酰氧基)乙基)二硫烷基)甲基)-4,7,10,13,16-五氧代-3,6,9,12,15-五氮杂二十烷-1,20-二酸(ADC-2)

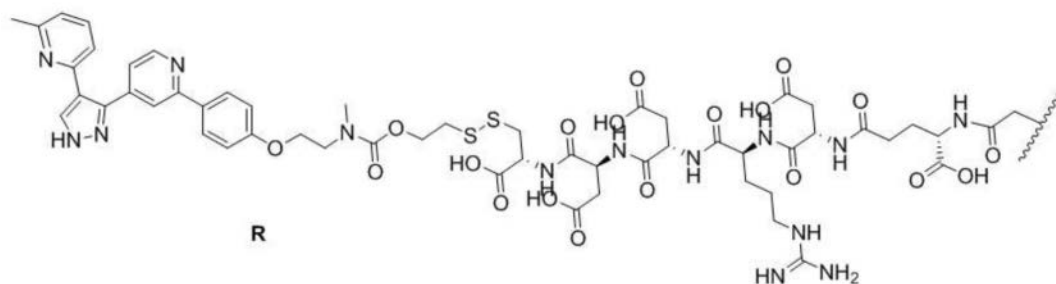
[0376] 向在DCM(5ml)中的L15(12mg,0.0085mmol)的混合物中添加TFA(1ml)。将混合物在约21°C下搅拌30min以提供ADC-2。将粗ADC-2浓缩并用制备型HPLC纯化,以提供3.5mg的呈白色固体的纯化的ADC-2(产率31%)。

[0377] 5.10实施例10:抗体药物偶联物2(ADC2)的生成

[0378] 根据以下方案8中的一般方法,通过抗体赖氨酸残基将ADC-2附接至抗-TfR抗体:



[0379]



[0380] 方案8

[0381] 异双功能接头S-4FB购自Solulink。将大鼠抗-小鼠IgG2a和抗-小鼠转铁蛋白受体抗体R17217透析到pH 7.4的PBS中。将S-4FB以不同摩尔比添加到在pH 7.4的PBS中的抗体中,并在约21°C下孵育3h。将经S-4FB修饰的抗体溶液与2-胍基吡啶溶液(0.5mM,在100mM MES缓冲液中,pH 5.0)组合,并在37°C下以5-50的各种偶联比孵育30min。通过UV-Vis在A354下确定S4FB/Ab摩尔取代比。使用Zeba™旋转脱盐柱纯化经修饰的抗体,将缓冲液交换至50mM磷酸盐缓冲液(pH 6.5,150mM NaCl)中,并然后以不同摩尔比与接头-S-S-药物ADC-2(10mM,在DMSO中)在37°C下混合持续24h以提供ADC2。第二天,将ADC2样品针对PBS透析过夜。过滤样品,并然后通过HPLC-SEC、SDS-PAGE和LC-MS进行测试。采用S-4FB/Ab比为6并且ADC-2/Ab比为20制备的ADC2的示例性LC-MS数据示于图7中。图7示出了经测试的ADC2样品的平均DAR为4.99,重链的DAR为1.97,并且轻链的DAR为0.53。

[0382] 如果通过HPLC-SEC检测到ADC2聚集超过5%,则通过具有SEC柱的AKTA(GE Healthcare Life Sciences,Superdex 200increase 10/300GL)分离出聚集的组分,并再次通过HPLC-SEC进行分析。通过SEC纯化以去除聚集体的ADC2的色谱图示于图8中。

[0383] 5.11 实施例11: 抗体诱导的受体内在化测定

[0384] 用抗-小鼠CD3e抗体在4度下包被96孔平底板过夜。使用RoboSep™细胞分离系统(Stemcell Technologies)从小鼠脾中分离出CD4⁺T细胞。在37度下,每孔约2×10⁵个细胞用可溶性抗-CD28抗体铺板24-48h。活化后,收获CD4⁺T细胞,洗涤并用5μg/ml(抗转铁蛋白受体)第一抗体在37度下在指定的时间点重新铺板,以诱导内在化。用冰冷的染色缓冲液终止反应,并在冰上保持以终止内在化。在测定结束时,将细胞在冰冷的染色缓冲液中洗涤两次以除去未结合的抗体。沉淀细胞,然后用偶联有PE的山羊抗-大鼠二抗染色,并在冰上孵育30min。用染色缓冲液洗涤细胞,并然后通过FACS分析表达。如图9所示,TfR表达在1h内和3h内开始在初级CD4⁺T细胞中内在化,通过抗转铁蛋白受体抗体R17217已使超过70%的TfR内在化。

[0385] 5.12 实施例12: 体外测定

[0386] 5.12.1 增殖测定

[0387] 将小鼠CTLL2细胞在0.2ng/ml IL2中以1×10⁵细胞/孔培养。如所示,向每个孔中添加1nM TGF-β、1μg/ml ADC和/或100nM ALK5抑制剂。将化合物C添加至这些孔中24h。通过向每个孔中添加BrdU试剂(Abcam)再持续12h来定量化增殖,并然后通过ELISA分析。

[0388] 如图10所示,用TGF-β处理CTLL2细胞抑制约60%的增殖。然而,添加ADC1(DAR 2-4、4-6或6-8)导致TGF-β抑制几乎完全逆转和CTLL2增殖恢复,类似于单独用ALK5抑制剂处理细胞。用大鼠抗-小鼠IgG2A同种型对照ALK5 ADC处理的细胞未恢复CTLL2增殖。在不存在TGF-β的情况下用ADC1处理的细胞或单独用裸Tfr抗体处理的细胞中,没有抑制增殖,表明ADC1不影响增殖,除非存在TGF-β(数据未示出)。

[0389] 5.12.2 颗粒酶B表达测定

[0390] 使用EasySep™小鼠T细胞分离试剂盒(阴性选择)(Stemcell Technologies)从小鼠脾中纯化小鼠CD3⁺T细胞。如前所述,使用结合于板的抗CD3e和可溶性抗-CD28活化CD3⁺T细胞48h。洗涤T细胞,并用具有5%血清加1nMTGF-β-/+ADC的培养基重新铺板。

[0391] 在最后4h添加Golgi终止试剂,然后对细胞进行针对表面CD8(BD)和细胞内GzmB(eBioscience)的免疫染色,并通过流式细胞术进行分析。颗粒酶B(GzmB)是一种由CD8⁺T细胞释放的丝氨酸蛋白酶,用以杀伤肿瘤细胞。因此,GzmB的表达增加表明CD8⁺细胞毒性T细胞活化。

[0392] 如图11所示,尽管TGF-β抑制在原代CD8⁺T细胞中的GzmB表达,但是,在所有3种DARS2-4、4-6和6-8上用ADC1处理还可以恢复GzmB表达,与ALK5化合物相当。此外,大鼠抗-小鼠IgG2A同种型对照ALK5 ADC无法恢复GzmB表达。

[0393] 5.12.3 iTreg转化测定

[0394] 使用阴性选择试剂盒从分离的小鼠脾细胞中分离出幼稚CD4T细胞。将细胞密度调节至0.4×10⁶细胞/ml,并将10ng/ml的小鼠IL-2、20ng/ml的TGF-β和1μg/ml的可溶性抗-CD28添加到细胞悬浮液中。

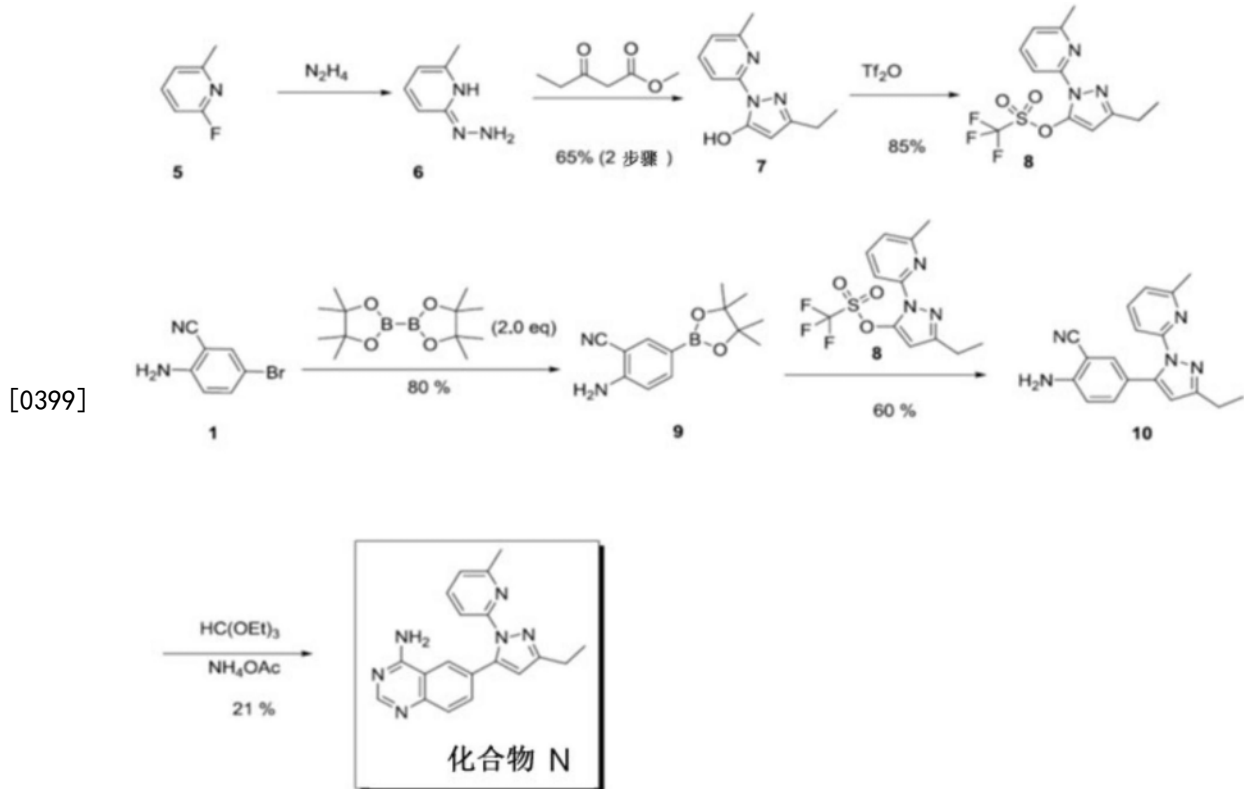
[0395] 将抗-小鼠CD3抗体以10μg/ml包被在24孔板上,并在4℃下孵育过夜。然后从板上吸出抗体。将1ml细胞悬浮液添加到24孔板的每个孔中。将3μg/ml和5μg/ml的ADC1(DAR 4-6)、抗转铁蛋白受体抗体、大鼠抗-小鼠IgG2A同种型对照ALK5 ADC以及100nM和1μM的ALK5抑制剂化合物C添加到24孔板的单独的孔中。然后将细胞培养72h。在48h时测试了TfR表达

(数据未示出)。对细胞进行针对Fo×P3的染色(eBioscience Fo×P3染色缓冲液),并在72h时通过FACS分选。

[0396] 如图12所示,5 μ g/ml的ADC1(+CD71-ALK5 ADC)适度降低iTreg生成的量,类似于单独的100nM游离ALK5抑制剂(+ALK5 inh 100nM)。相反,对照ALK5 ADC(+Iso-ALK5 ADC)和裸抗-TfR抗体(+抗-CD71)对iTreg Fo×P3表达没有影响。

[0397] 5.13实施例13:化合物N的合成和表征

[0398] 根据以下方案9中的一般方法合成化合物N:



[0400] 方案9

[0401] 在许多体外测定中将化合物N与化合物C进行比较。它们在重组激酶测定中的IC₅₀活性及其K_i值的总结示于表6中。表6还示出了化合物C在人HEK细胞和小鼠T细胞中抑制TGF- β 信号传导的活性。在重组测定中,发现化合物C的效力比化合物N强10倍。

[0402]

ALK5 小分子抑制	IC ₅₀ (nM) (激酶= 25 nM)	IC ₅₀ (nM) (激酶= 1.5 nM)	K _i (nM) (稳态方程)	K _i (nM) (莫里森方程/ 5 μ M ATP)	HEK 荧光素酶测定 (nM)	小鼠 T 细胞增殖测定 (nM)
化合物 C	10	1.8	2.25	0.11	11.7	26
化合物 N	18	12	18.4	2.1	-	-

[0403] 5.14实施例14:将CD2和CD5内在化到T细胞中

[0404] 在分别用抗-CD2和抗-CD5抗体孵育T细胞之后,进行了两项不同的内在化研究以测量CD2和CD5内在化。

[0405] 5.14.1研究1:无抗体洗脱

[0406] 用结合于板的抗-CD3抗体(1 μ g/ml)加可溶性抗-CD28抗体(2 μ g/ml)活化小鼠CD3⁺T细胞36h。洗涤细胞,并在37度下在指定时间点(0、15min或0.5、1、3或6h)用1 μ g/ml大鼠抗-小鼠CD2抗体(克隆12-15,Southern Biotech,目录号1525)、大鼠抗-小鼠CD5抗体(克隆53-7.3,Southern Biotech,目录号1547)或大鼠同种型对照抗体孵育。在每个时间点,通过将细胞置于冰上来终止测定。使用荧光偶联的二抗来检测CD2和CD5表达。

[0407] 在6h时超过60%的CD5和超过50%的CD2内在化到小鼠CD3⁺T细胞中(分别地图13A和图13B)。

[0408] 5.14.2研究2:抗体洗脱

[0409] 重复研究1,不同之处在于将游离抗体与细胞在4度下孵育30min,以使细胞表面的所有受体饱和。在时间过程开始之前,将上清液中的剩余抗体洗掉。

[0410] 在6h时,近90%的CD5和超过50%的CD2内在化到小鼠CD3⁺T细胞中(分别地图13C和图13D)。

[0411] 5.14.3讨论

[0412] 在研究1中,如果存在的话,新的和再循环的受体可以在整个时间过程中一直到达细胞表面,并且可以与培养基中的游离抗体结合。在研究2中,未结合的抗体在时间过程开始之前被洗掉,因此只能监测在时间过程开始时存在的那些受体的内在化。对于CD2,研究1和研究2的结果相似,表明CD2不能快速翻转。对于CD5,在洗脱研究(研究2)中,内在化增加了约20%,表明在6h的时间过程范围内,新受体再循环,或通过从头合成增加。据信再循环是可能的选择,因为在6小时的时间过程中不期望大量的从头合成。因此,研究1和研究2的结果表明,与CD2相比,CD5可以更多地再循环回细胞表面。

[0413] 5.15实施例15:靶向CD2和CD5的ADC的生成和表征

[0414] 5.15.1实施例15:ADC的生成

[0415] 使用大鼠抗-小鼠CD2抗体(克隆12-15,Southern Biotech,目录号1525)和大鼠抗-小鼠CD5抗体(克隆53-7.3,Southern Biotech,目录号1547)制备在该实施例中称为靶向T细胞的TGF- β 拮抗剂(T3A)的四种ALK5-ADC。使用两个接头-ALK5抑制剂有效负载来制备T3A,其中一个包含附接至ALK5-化合物C的可裂解的Val-Cit(VC)接头,另一个包含附接至化合物N的不可裂解的马来酰亚胺己酰基(MC)接头。

[0416] 四种T3A的抗体、接头和ALK5有效负载组合示于表7中:

名称	抗体	接头	ALK5有效负载
T3A #2	抗-CD2	MC	化合物 N
T3A #3	抗-CD2	VC	化合物 C
T3A #4	抗-CD5	MC	化合物 N
T3A #5	抗-CD5	VC	化合物 C

[0417]

[0418] 通过尺寸排阻色谱法 (SEC) 纯化T3A#2-#5,并通过疏水相互作用色谱法 (HIC) 计算药物抗体比。每个T3A#2-#5的聚集百分比、未结合抗体的百分比和DAR值示于表8中。

名称	聚集%	未结合抗体%	DAR
T3A #2	10.6	6.6	4.84
T3A #3	4.1	1.6	5.19
T3A #4	5.5	0	4.85
T3A #5	5.5	0	4.4

[0420] 5.15.2ADC的表征

[0421] 为了确定T3A#2-5在逆转TGF- β 介导的免疫抑制中的功效,从脾中纯化小鼠CD3⁺T细胞,并在1nM TGF- β 加小分子ALK5抑制剂化合物C (阳性对照)、T3A#2-5或同种型对照T3A (阴性对照)的存在下用抗-CD3加抗-CD28抗体活化36-72h。36h后,测量表达颗粒酶 (GzmB)的CD8⁺T细胞的水平作为细胞毒性的标志物 (图14),并通过ELISA测量分泌的细胞因子IL2 (图15)和IFN- γ 的水平 (图16)。最后,72h后,通过Cell Titer Glo (Promega) 测量T细胞增殖的量 (图17)。所有这些测定与体内肿瘤清除有关。

[0422] 相对于活化的T细胞 (设定为100%) 观察到的功能量在图14-图17的每一个中显示。T3A#5恢复了GzmB表达和T细胞增殖,但是仅部分恢复了IFN- γ 表达。没有观察到对IL2表达的影响。

[0423] 5.15.3讨论

[0424] 以上实施例的数据表明,T细胞上靶标表达的水平对于在原代T细胞测定中的功效是重要的。CD2和CD5二者在超过85%的幼稚T细胞和活化T细胞中高度表达,与CD71不同,CD71仅在20%-50%的活化T细胞中高度表达。然而,尽管CD2和CD5二者在T细胞上高度表达,但是观察到靶向CD5的ADC比靶向CD2的ADC具有更高的功效。基于在实施例14中用CD2和CD5观察到的受体内在化模式,在6h时,约85%的CD5内在化,但是仅53%的CD2内在化到原代小鼠T细胞中。此外,CD5似乎开始比CD2更快地内在化。该数据表明内在化的量也影响功效。

[0425] 数据还表明,将ALK5抑制剂附接至抗体的接头和释放机制对于功效都是重要的。可组织蛋白酶B裂解的VC接头与抗-CD5抗体 (T3A#5) 组合是最有效的T3A。然而,不可裂解MC与抗-CD5抗体 (T3A#4) 接头组合在与抗CD5抗体附接时也具有一些活性。

[0426] 基于在原代小鼠T细胞中的测试,可以对T3A的功效进行如下排序:1) T3A#5、2) T3A#4、3) T3A#3和4) T3A#2。

[0427] 不受理论的束缚,据信对于高ADC活性,ADC应靶向T细胞靶标,该靶标在幼稚T细胞和活化T细胞中广泛表达 (例如,在 $\geq 70\%$ 的细胞中表达) 并迅速内在化,并且具有建立的细胞内释放机制 (例如蛋白水解加工)。

[0428] 5.16实施例16:将CD7内在化到T细胞中

[0429] 进行内在化研究以测量T细胞与两种不同的抗-CD7抗体孵育后的CD7内在化。

[0430] 用结合于板的抗-CD3抗体 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 加可溶性抗-CD28抗体 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 活化人CD3⁺T细胞40h。洗涤细胞并与1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗-人CD7抗体 (克隆124-D1和4H9, Caprico Biotech) 或大鼠

同种型对照抗体在4度下孵育30min,以使细胞表面的所有受体饱和。洗去上清液中剩余的抗体,然后将细胞在37度下孵育0至6h。在每个时间点(5、15、30、60、180和360min),通过将细胞置于冰上来终止测定。使用荧光偶联的二抗检测CD7表达。

[0431] 在6h时,近70%-80%的CD7内在化(图18)。内在化的量与CD2和CD5相当,表明CD7作为ADC靶标的适用性。

[0432] 6. 具体实施方案

[0433] 通过以下具体实施方案举例说明本公开内容。

[0434] 1. 一种抗体-ALK5抑制剂偶联物(ADC),其包含可操作地连接至与T细胞表面分子结合的抗体或抗原结合片段的ALK5抑制剂。

[0435] 2. 根据实施方案1所述的ADC,其中所述ALK5抑制剂的 IC_{50} 为至少20nM。

[0436] 3. 根据实施方案1或实施方案2所述的ADC,其中所述ALK5抑制剂是咪唑类化合物、吡唑类化合物或噻唑类化合物。

[0437] 4. 根据实施方案3所述的ADC,其中所述ALK5抑制剂是咪唑类化合物。

[0438] 5. 根据实施方案3所述的ADC,其中所述ALK5抑制剂是吡唑类化合物。

[0439] 6. 根据实施方案3所述的ADC,其中所述ALK5抑制剂是噻唑类化合物。

[0440] 7. 根据实施方案3所述的ADC,其中所述ALK5抑制剂是咪唑类化合物,其是咪唑-苯并二氧杂环戊烯化合物或咪唑-喹啉化合物。

[0441] 8. 根据实施方案7所述的ADC,其中所述ALK5抑制剂是咪唑-苯并二氧杂环戊烯化合物。

[0442] 9. 根据实施方案7所述的ADC,其中所述ALK5抑制剂是咪唑-喹啉化合物。

[0443] 10. 根据实施方案3所述的ADC,其中所述ALK5抑制剂是吡唑类化合物,其是吡唑-吡咯化合物。

[0444] 11. 根据实施方案3所述的ADC,其中,所述ALK5抑制剂是咪唑-苯并二氧杂环戊烯化合物、咪唑-喹啉化合物、吡唑-吡咯化合物或噻唑类化合物。

[0445] 12. 根据实施方案1至11中任一项所述的ADC,其中所述ALK5抑制剂通过接头连接至所述抗体或抗原结合片段。

[0446] 13. 根据实施方案12所述的ADC,其中,所述接头是不可裂解接头。

[0447] 14. 根据实施方案13所述的ADC,其中所述不可裂解接头是N-马来酰亚胺基甲基环己烷1-羧酸酯,马来酰亚胺基己酰基或巯基乙酰氨基己酰基的接头。

[0448] 15. 根据实施方案14所述的ADC,其中所述不可裂解接头是N-马来酰亚胺基甲基环己烷1-羧酸酯接头。

[0449] 16. 根据实施方案14所述的ADC,其中所述不可裂解接头是马来酰亚胺基己酰基接头。

[0450] 17. 根据实施方案14所述的ADC,其中所述不可裂解接头是巯基乙酰氨基己酰基接头。

[0451] 18. 根据实施方案12所述的ADC,其中所述接头是可裂解接头。

[0452] 19. 根据实施方案18所述的ADC,其中所述可裂解接头是二肽接头、二硫化物接头或脲接头。

[0453] 20. 根据实施方案19所述的ADC,其中所述可裂解接头是二肽接头。

- [0454] 21. 根据实施方案19所述的ADC,其中所述可裂解接头是二硫化物接头。
- [0455] 22. 根据实施方案19所述的ADC,其中所述可裂解接头是脲接头。
- [0456] 23. 根据实施方案19所述的ADC,其中所述接头是对蛋白酶敏感的缬氨酸-瓜氨酸二肽接头。
- [0457] 24. 根据实施方案19所述的ADC,其中所述接头是对谷胱甘肽敏感的二硫化物接头。
- [0458] 25. 根据实施方案19所述的ADC,其中所述接头是对酸敏感的二硫化物接头。
- [0459] 26. 根据实施方案1至25中任一项所述的ADC,其中所述ALK5抑制剂通过位点特异性偶联与所述抗原或抗原结合片段偶联。
- [0460] 27. 根据实施方案26所述的ADC,其中所述ALK5抑制剂通过所述抗体或抗原结合片段上的一个或多个半胱氨酸、赖氨酸或谷氨酰胺残基偶联。
- [0461] 28. 根据实施方案27所述的ADC,其中所述ALK5抑制剂通过所述抗体或抗原结合片段上的一个或多个半胱氨酸残基偶联。
- [0462] 29. 根据实施方案27所述的ADC,其中所述ALK5抑制剂通过所述抗体或抗原结合片段上的一个或多个赖氨酸残基偶联。
- [0463] 30. 根据实施方案27所述的ADC,其中所述ALK5抑制剂通过所述抗体或抗原结合片段上的一个或多个谷氨酰胺残基偶联。
- [0464] 31. 根据实施方案26所述的ADC,其中所述ALK5抑制剂通过所述抗体或抗原结合片段上的一种或更多种非天然氨基酸残基偶联。
- [0465] 32. 根据实施方案31所述的ADC,其中一种或更多种非天然氨基酸残基包含对乙酰基苯丙氨酸(pAcF)。
- [0466] 33. 根据实施方案31所述的ADC,其中一种或更多种非天然氨基酸残基包含对叠氮基甲基-L-苯丙氨酸(pAMF)。
- [0467] 34. 根据实施方案31所述的ADC,其中一种或更多种非天然氨基酸残基包含硒代半胱氨酸(Sec)。
- [0468] 35. 根据实施方案26所述的ADC,其中所述ALK5抑制剂通过所述抗体或抗原结合片段上的一种或更多种聚糖偶联。
- [0469] 36. 根据实施方案35所述的ADC,其中所述一种或更多种聚糖包含岩藻糖。
- [0470] 37. 根据实施方案35所述的ADC,其中所述一种或更多种聚糖包含6-硫代岩藻糖。
- [0471] 38. 根据实施方案35所述的ADC,其中所述一种或更多种聚糖包含半乳糖。
- [0472] 39. 根据实施方案35所述的ADC,其中一种或更多种聚糖包含N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。
- [0473] 40. 根据实施方案35所述的ADC,其中所述一种或更多种聚糖包含N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)。
- [0474] 41. 根据实施方案35所述的ADC,其中所述一种或更多种聚糖包括唾液酸(SA)。
- [0475] 42. 根据实施方案26至41中任一项所述的ADC,其中所述ALK5抑制剂通过接头偶联。
- [0476] 43. 根据实施方案1至42中任一项所述的ADC,其中每个抗体或抗原结合片段分子的ALK5抑制剂分子的平均数量为2至8。

- [0477] 44. 根据实施方案1至43中任一项所述的ADC,其中所述抗体是单克隆抗体。
- [0478] 45. 根据实施方案44所述的ADC,其中所述抗体是人的或人源化的。
- [0479] 46. 根据实施方案45所述的ADC,其中所述抗体是人的。
- [0480] 47. 根据实施方案45所述的ADC,其中所述抗体是人源化的。
- [0481] 48. 根据实施方案1至47中任一项所述的ADC,其中所述抗原结合片段是Fab、Fab'、F(ab')₂或Fv片段。
- [0482] 49. 根据实施方案48所述的ADC,其中所述抗原结合片段是Fab。
- [0483] 50. 根据实施方案48所述的ADC,其中所述抗原结合片段是Fab'。
- [0484] 51. 根据实施方案48所述的ADC,其中抗原结合片段是F(ab')₂。
- [0485] 52. 根据实施方案48所述的ADC,其中所述抗原结合片段是Fv片段。
- [0486] 53. 根据实施方案48至52中任一项所述的ADC,其中所述抗原结合片段是人或人源化抗体的抗原结合片段。
- [0487] 54. 根据实施方案53所述的ADC,其中所述抗原结合片段是人抗体的抗原结合片段。
- [0488] 55. 根据实施方案53所述的ADC,其中所述抗原结合片段是人源化抗体的抗原结合片段。
- [0489] 56. 根据实施方案1至47中任一项所述的ADC,其包含抗体。
- [0490] 57. 根据实施方案1至55中任一项所述的ADC,其包含抗原结合片段。
- [0491] 58. 根据实施方案1至57中任一项所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是CD1、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD25、CD28、CD70、CD71、CD103、CD184、Tim3、LAG3、CTLA4或PD1。
- [0492] 59. 根据实施方案58所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是CD1。
- [0493] 60. 根据实施方案58所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是CD2。
- [0494] 61. 根据实施方案58所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是CD3。
- [0495] 62. 根据实施方案58所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是CD4。
- [0496] 63. 根据实施方案58所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是CD5。
- [0497] 64. 根据实施方案58所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是CD6。
- [0498] 65. 根据实施方案58所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是CD7。
- [0499] 66. 根据实施方案58所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是CD8。
- [0500] 67. 根据实施方案58所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是CD25。
- [0501] 68. 根据实施方案58所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是CD28。
- [0502] 69. 根据实施方案58所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是CD70。
- [0503] 70. 根据实施方案58所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是CD71。
- [0504] 71. 根据实施方案58所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是CD103。
- [0505] 72. 根据实施方案58所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是CD184。
- [0506] 73. 根据实施方案58所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是Tim3。
- [0507] 74. 根据实施方案58所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是LAG3。
- [0508] 75. 根据实施方案58所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是CTLA4。
- [0509] 76. 根据实施方案58所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是PD1。
- [0510] 77. 根据实施方案1至57中任一项所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是能够通过

核内体再循环的T细胞表面分子。

- [0511] 78. 根据实施方案77所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是CD5或CD7。
- [0512] 79. 根据实施方案78所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是CD5。
- [0513] 80. 根据实施方案78所述的ADC,其中所述T细胞表面分子是CD7。
- [0514] 81. 根据实施方案1至80中任一项所述的ADC,其包含具有一种或更多种降低效应子功能的氨基酸取代的Fc结构域。
- [0515] 82. 根据实施方案81所述的ADC,其中一种或更多种取代包括N297A、N297Q、N297G、D265A/N297A、D265A/N297G、L235E、L234A/L235A、L234A/L235A/P329A、L234D/L235E、L234R/L235R/E233K、L234D/L235E/D265S:E233K/L234R/L235R/D265S、L234D/L235E/E269K:E233K/L234R/L235R/E269K、L234D/L235E/K322A:E233K/L234R/L235R/K322A、L234D/L235E/P329W:E233K/L234R/L235R/P329W、L234D/L235E/E269K/D265S/K322A:E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322A或L234D/L235E/E269K/D265S/K322E/E333K:E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322E/E333K。
- [0516] 83. 根据实施方案82所述的ADC,其中所述一种或更多种取代包括N297A。
- [0517] 84. 根据实施方案82所述的ADC,其中所述一种或更多种取代包括N297Q。
- [0518] 85. 根据实施方案82所述的ADC,其中所述一种或更多种取代包括N297G。
- [0519] 86. 根据实施方案82所述的ADC,其中所述一种或更多种取代包括D265A/N297A。
- [0520] 87. 根据实施方案82所述的ADC,其中所述一种或更多种取代包括D265A/N297G。
- [0521] 88. 根据实施方案82所述的ADC,其中所述一种或更多种取代包括L235E。
- [0522] 89. 根据实施方案82所述的ADC,其中所述一种或更多种取代包括L234A/L235A。
- [0523] 90. 根据实施方案82所述的ADC,其中所述一种或更多种取代包括L234A/L235A/P329A。
- [0524] 91. 根据实施方案82所述的ADC,其中所述一种或更多种取代包括L234D/L235E:L234R/L235R/E233K。
- [0525] 92. 根据实施方案82所述的ADC,其中所述一种或更多种取代包括L234D/L235E/D265S:E233K/L234R/L235R/D265S。
- [0526] 93. 根据实施方案82所述的ADC,其中所述一种或更多种取代包括L234D/L235E/E269K:E233K/L234R/L235R/E269K。
- [0527] 94. 根据实施方案82所述的ADC,其中所述一种或更多种取代包括L234D/L235E/K322A:E233K/L234R/L235R/K322A。
- [0528] 95. 根据实施方案82所述的ADC,其中所述一种或更多种取代包括L234D/L235E/P329W:E233K/L234R/L235R/P329W。
- [0529] 96. 根据实施方案82所述的ADC,其中所述一种或更多种取代包括L234D/L235E/E269K/D265S/K322A:E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322A。
- [0530] 97. 根据实施方案82所述的ADC,其中所述一种或更多种取代包括L234D/L235E/E269K/D265S/K322E/E333K:E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322E/E333K。
- [0531] 98. 一种药物组合物,其包含根据实施方案1至97中任一项所述的ADC和药学上可接受的载体。
- [0532] 99. 一种治疗癌症的方法,其包括向有此需要的受试者施用根据实施方案1至97中

任一项所述的ADC或根据实施方案98所述的药物组合物。

- [0533] 100. 根据实施方案99所述的方法,其中所述癌症是免疫原性癌症。
- [0534] 101. 根据实施方案100所述的方法,其中所述癌症是表达肿瘤抗原的实体瘤。
- [0535] 102. 根据实施方案101所述的方法,其中所述肿瘤抗原是gp100、melanA或MAGE A1。
- [0536] 103. 根据实施方案102所述的方法,其中所述肿瘤抗原是gp100。
- [0537] 104. 根据实施方案102所述的方法,其中所述肿瘤抗原是melanA。
- [0538] 105. 根据实施方案102所述的方法,其中所述肿瘤抗原是MAGE A1。
- [0539] 106. 根据实施方案99所述的方法,其中所述癌症是包含免疫浸润的实体瘤。
- [0540] 107. 根据实施方案99至106中任一项所述的方法,其中所述癌症可通过免疫疗法治疗。
- [0541] 108. 根据实施方案107所述的方法,其中所述免疫疗法是细胞因子疗法、过继性T细胞疗法、嵌合抗原受体 (CAR) 疗法或T细胞检查点抑制剂疗法。
- [0542] 109. 根据实施方案108所述的方法,其中所述免疫疗法是细胞因子疗法。
- [0543] 110. 根据实施方案108所述的方法,其中所述免疫疗法是过继性T细胞疗法。
- [0544] 111. 根据实施方案108所述的方法,其中所述免疫疗法是嵌合抗原受体 (CAR) 疗法。
- [0545] 112. 根据实施方案108所述的方法,其中所述免疫疗法是T细胞检查点抑制剂疗法。
- [0546] 113. 根据实施方案108或实施方案112所述的方法,其中所述T细胞检查点抑制剂是PD1、PDL1或CTLA4的抑制剂。
- [0547] 114. 根据实施方案113所述的方法,其中所述T细胞检查点抑制剂是PD1的抑制剂。
- [0548] 115. 根据实施方案113所述的方法,其中所述T细胞检查点抑制剂是PDL1的抑制剂。
- [0549] 116. 根据实施方案113所述的方法,其中所述T细胞检查点抑制剂是CTLA4的抑制剂。
- [0550] 117. 根据实施方案99至116中任一项所述的方法,其中所述癌症是非小细胞肺癌 (NSCLC)、肝癌、尿路上皮癌、肾癌、乳腺癌或黑素瘤。
- [0551] 118. 根据实施方案117所述的方法,其中所述癌症是NSCLC。
- [0552] 119. 根据实施方案117所述的方法,其中所述癌症是肝癌。
- [0553] 120. 根据实施方案120所述的方法,其中所述肝癌是肝细胞癌。
- [0554] 121. 根据实施方案117所述的方法,其中所述癌症是尿路上皮癌。
- [0555] 122. 根据实施方案121所述的方法,其中所述癌症是膀胱癌。
- [0556] 123. 根据实施方案117所述的方法,其中所述癌症是肾癌。
- [0557] 124. 根据实施方案117所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌。
- [0558] 125. 根据实施方案117所述的方法,其中所述癌症是黑素瘤。
- [0559] 126. 根据实施方案99至125中任一项所述的方法,其中所述癌症可通过ALK5抑制剂治疗。
- [0560] 127. 根据实施方案99至126中任一项所述的方法,其中所述ADC或药物组合物作为

单一疗法施用。

[0561] 128. 根据实施方案99至126中任一项所述的方法,其中所述ADC或药物组合物作为组合疗法方案的一部分施用。

[0562] 129. 根据实施方案128所述的方法,其中所述ADC或药物组合物与标准护理疗法或治疗方案组合施用。

[0563] 尽管已说明和描述了各种具体实施方案,但是将理解的是,可以在不脱离本公开内容的精神和范围的情况下进行各种改变。

[0564] 7. 参考文献的引用

[0565] 出于所有目的,在本申请中引用的所有出版物、专利、专利申请和其他文献在此通过引用整体并入本文,其程度与如果每个单独的出版物、专利、专利申请或其他文献被单独指示为出于所有目的通过引用并入相同。在并入本文的一个或更多个参考文献的教导与本公开内容之间存在不一致的情况下,意在本说明书的教导。

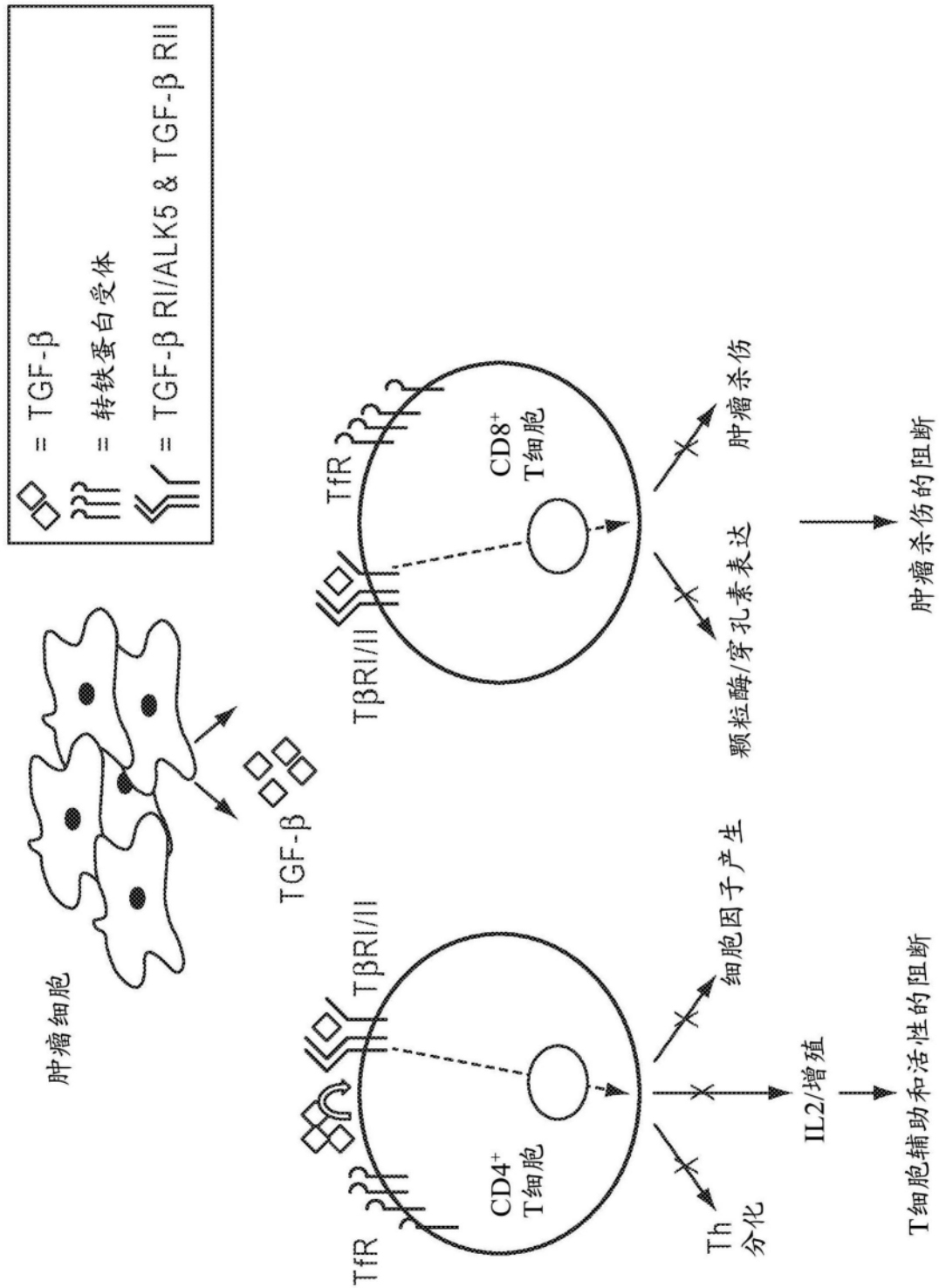


图1

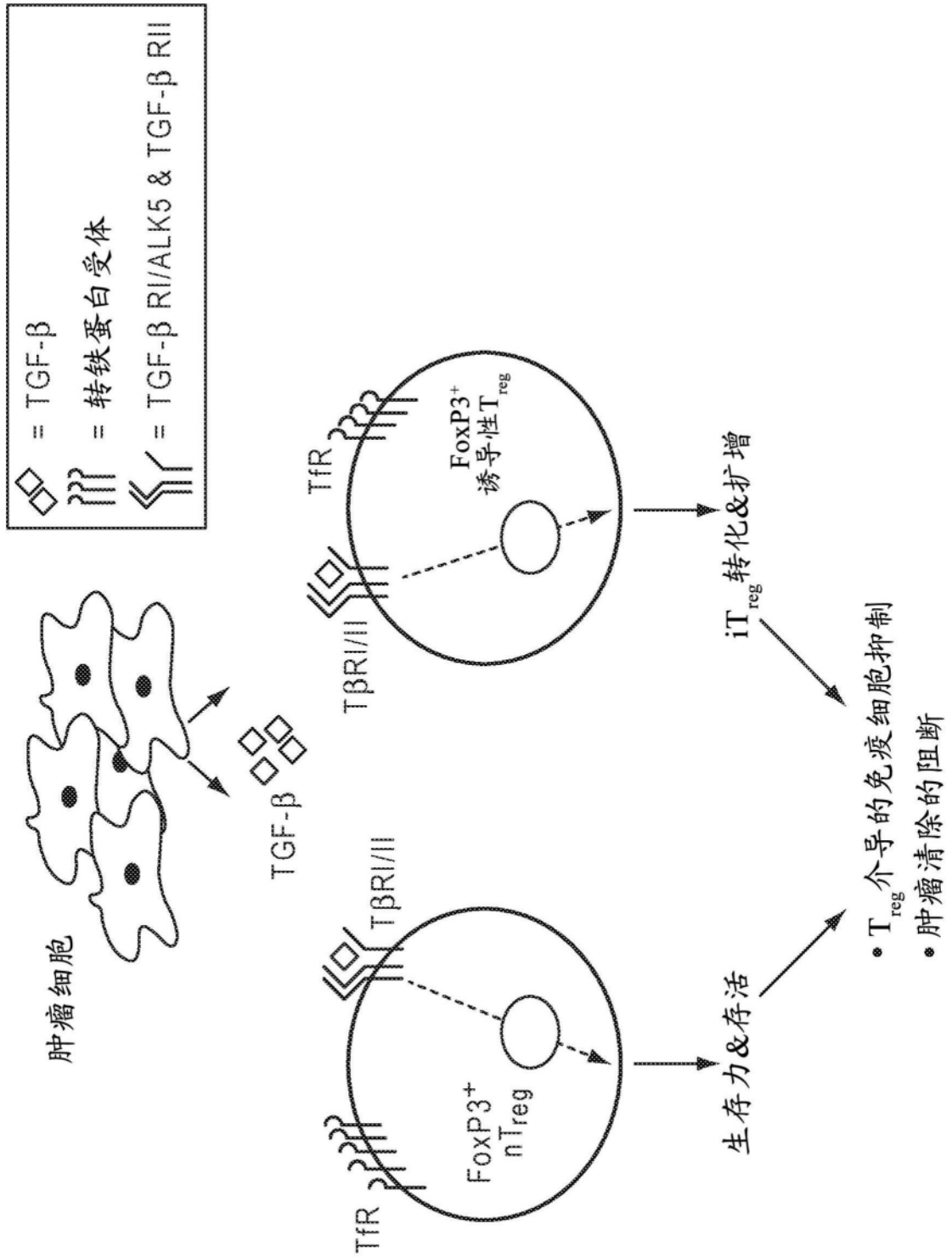


图2

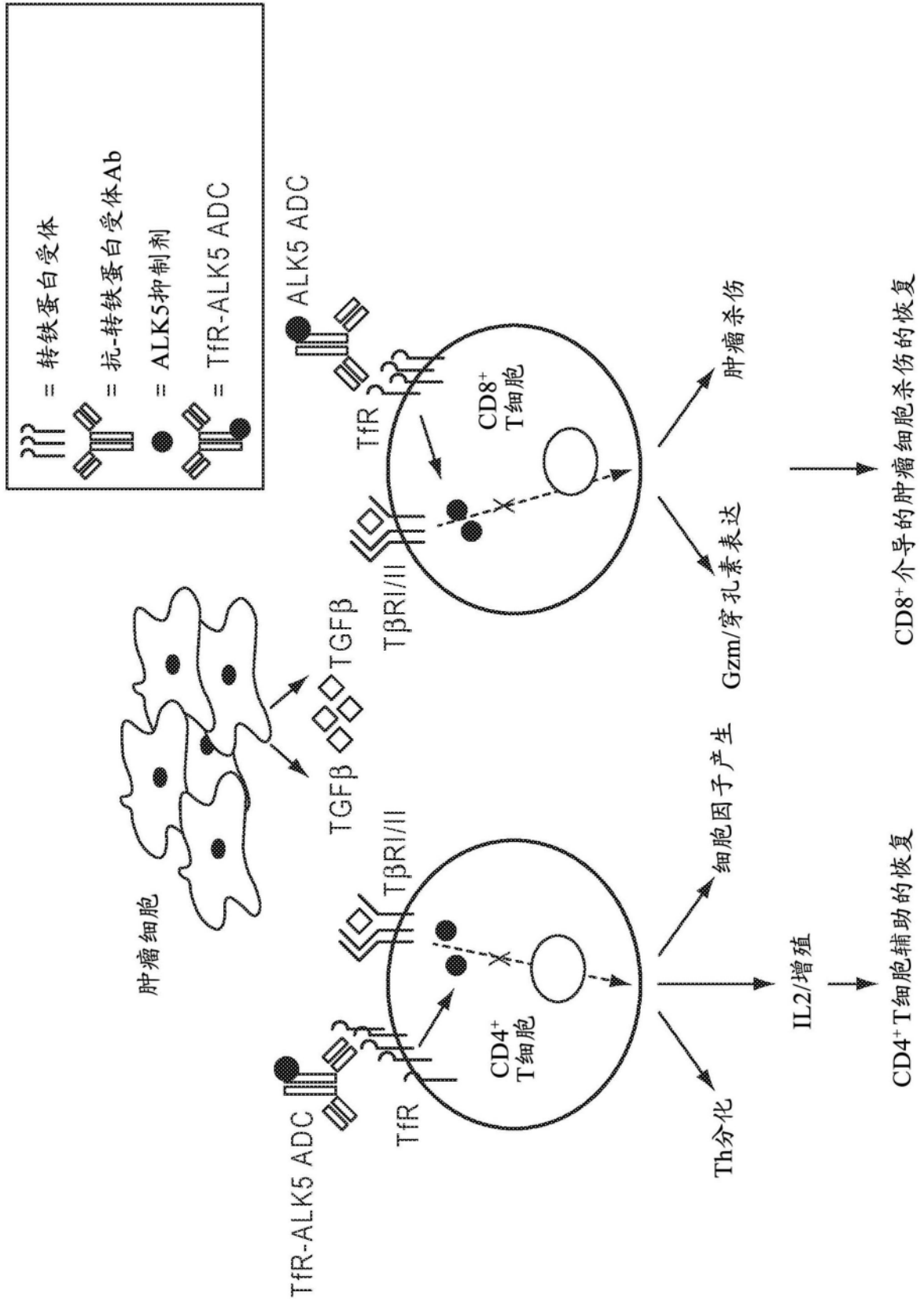


图3

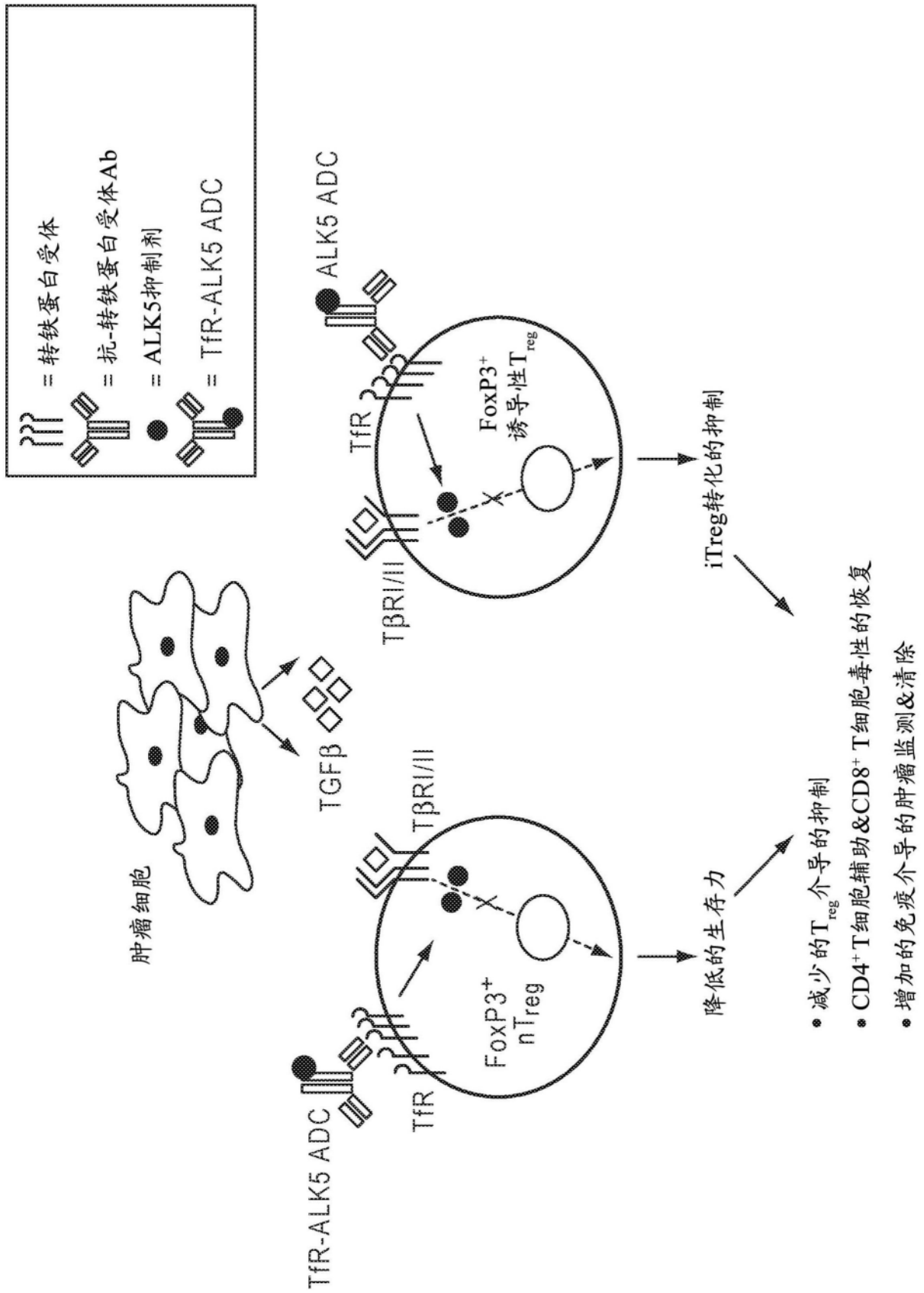


图4

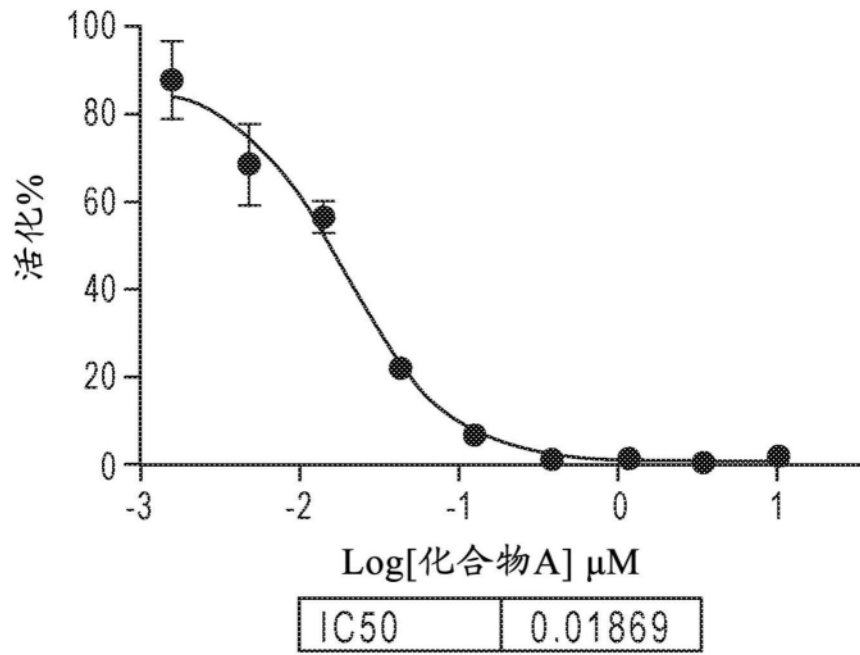


图5A

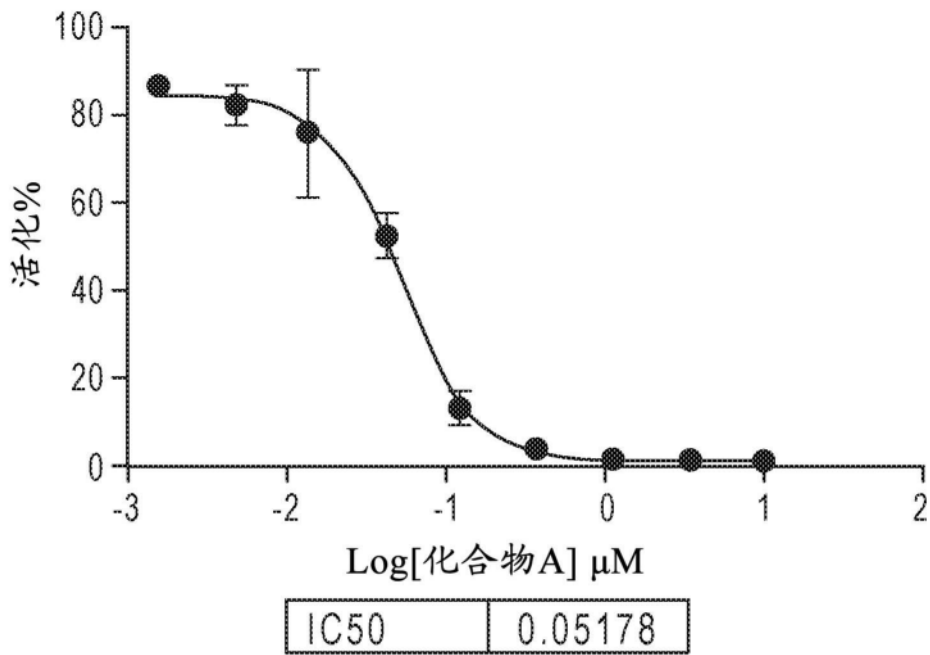


图5B

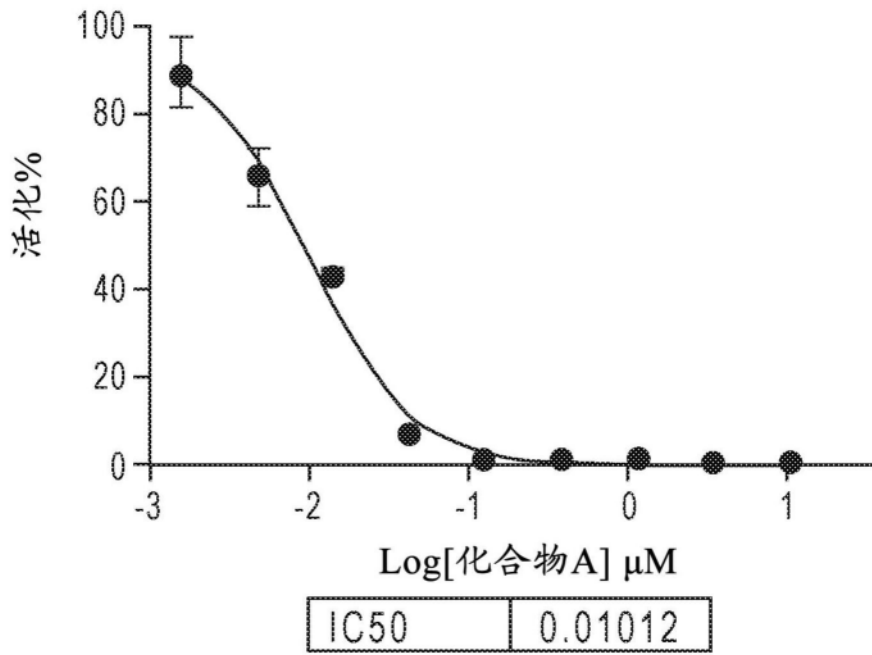


图5C

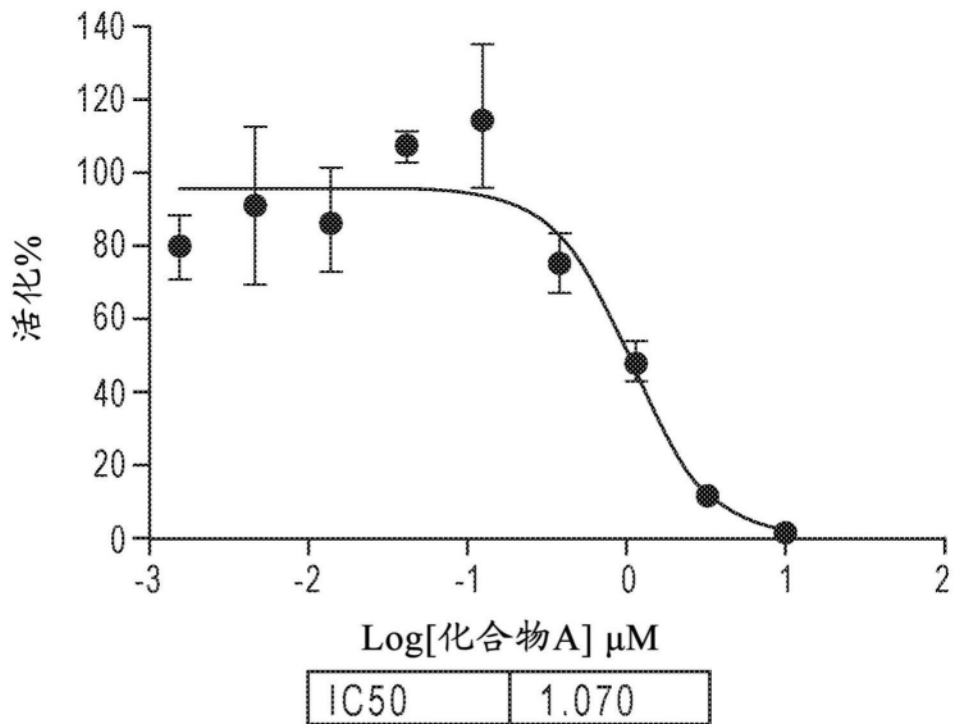


图5D

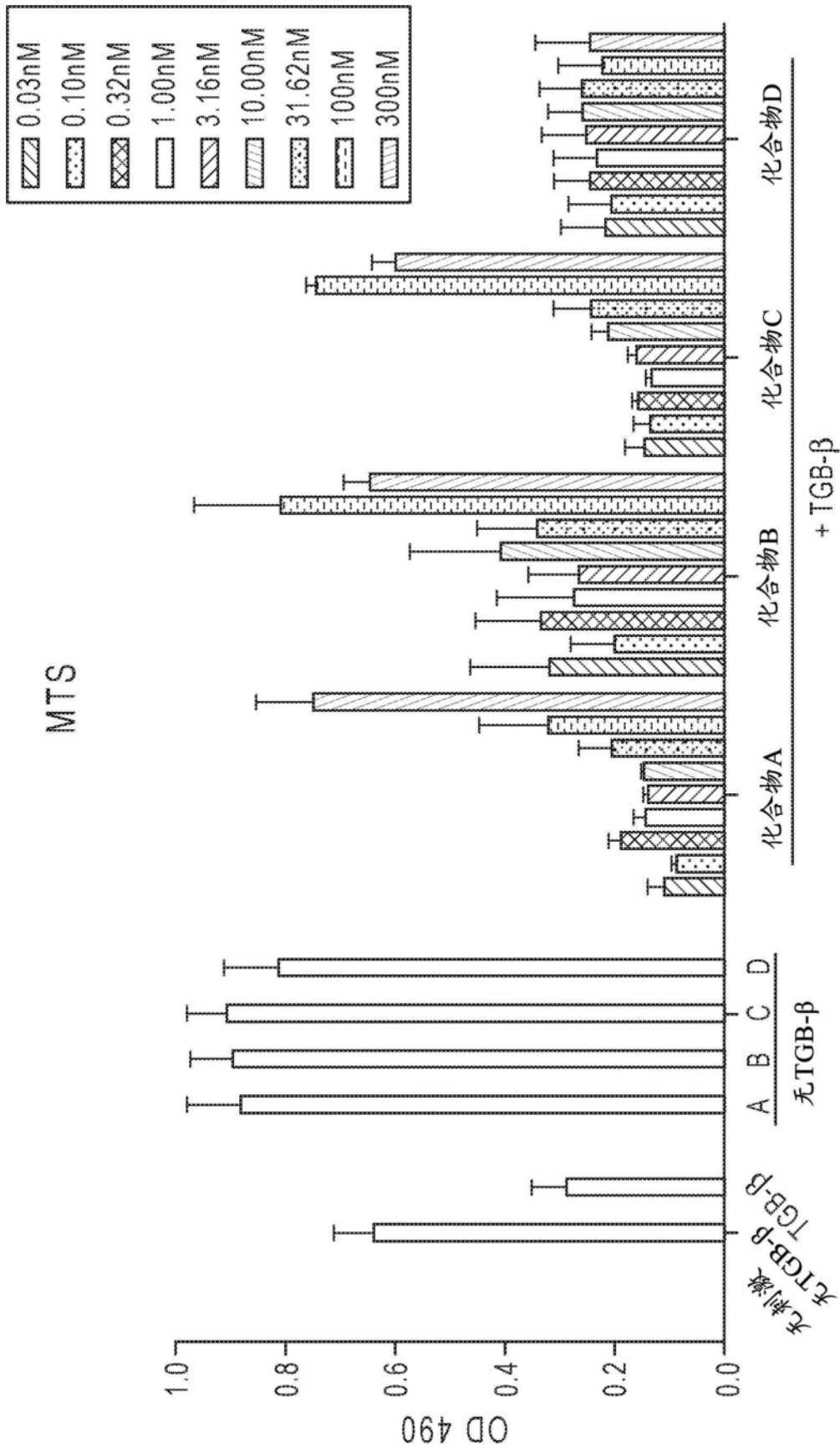


图6A

MTS IC50-化合物B

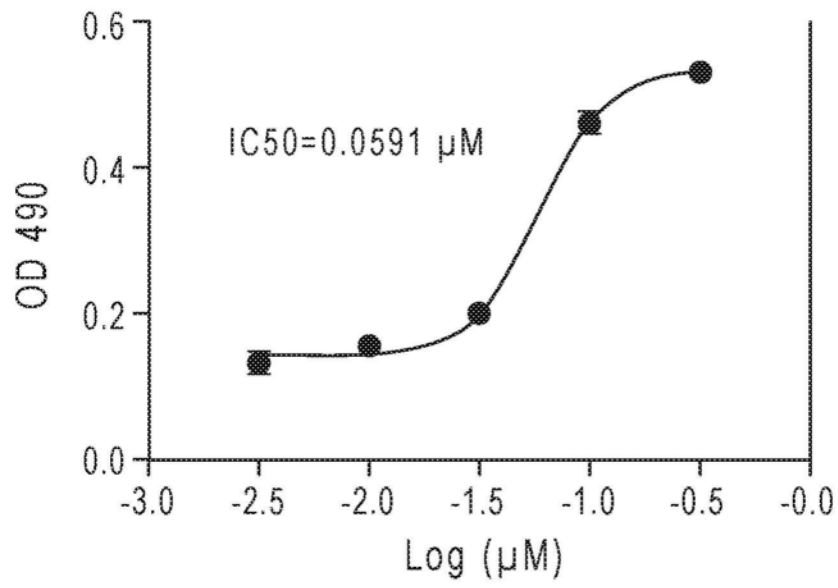


图6B

MTS IC50-化合物C

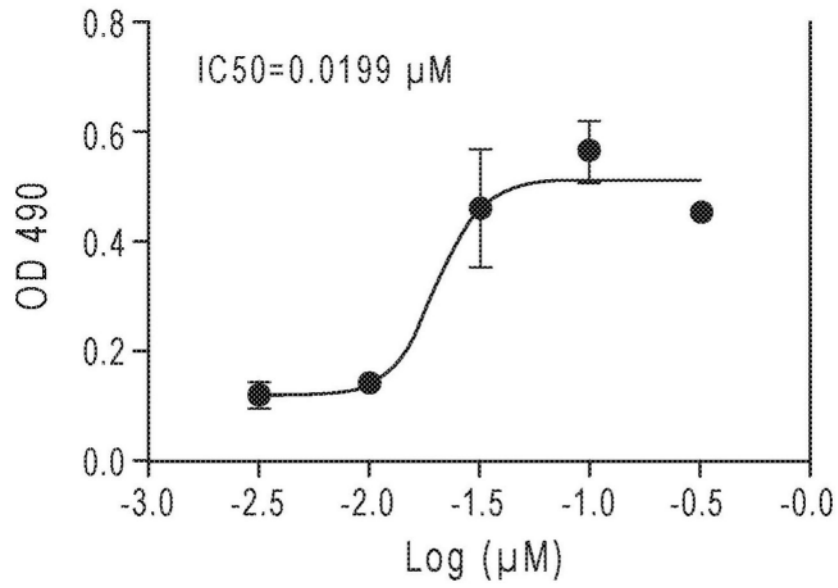


图6C

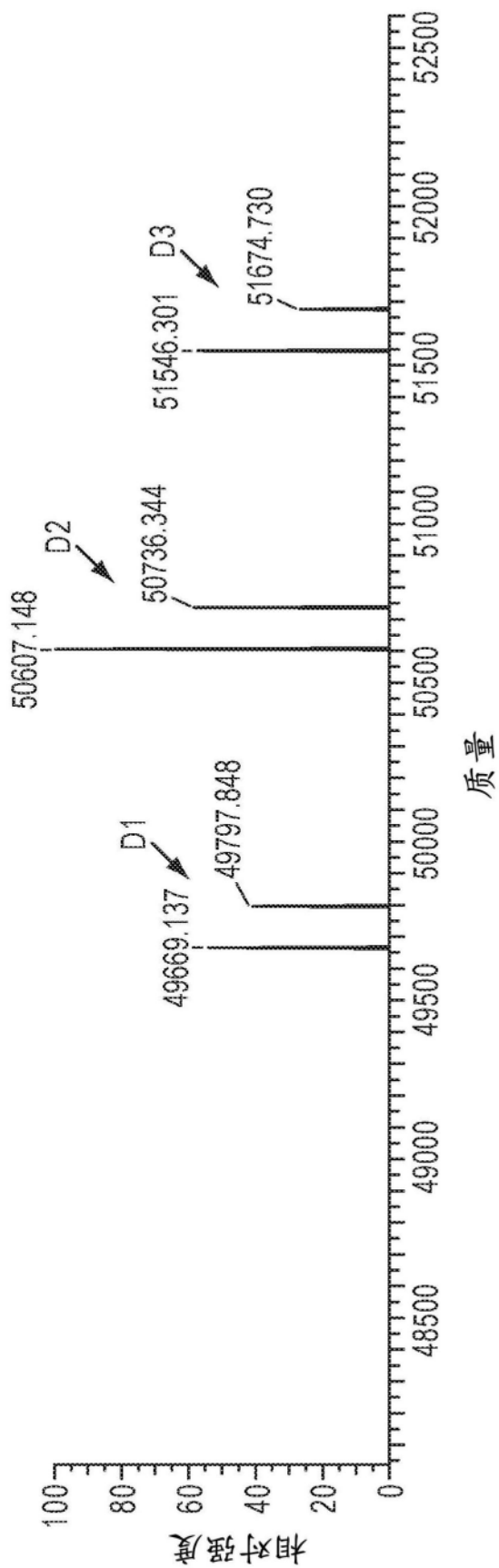


图7A

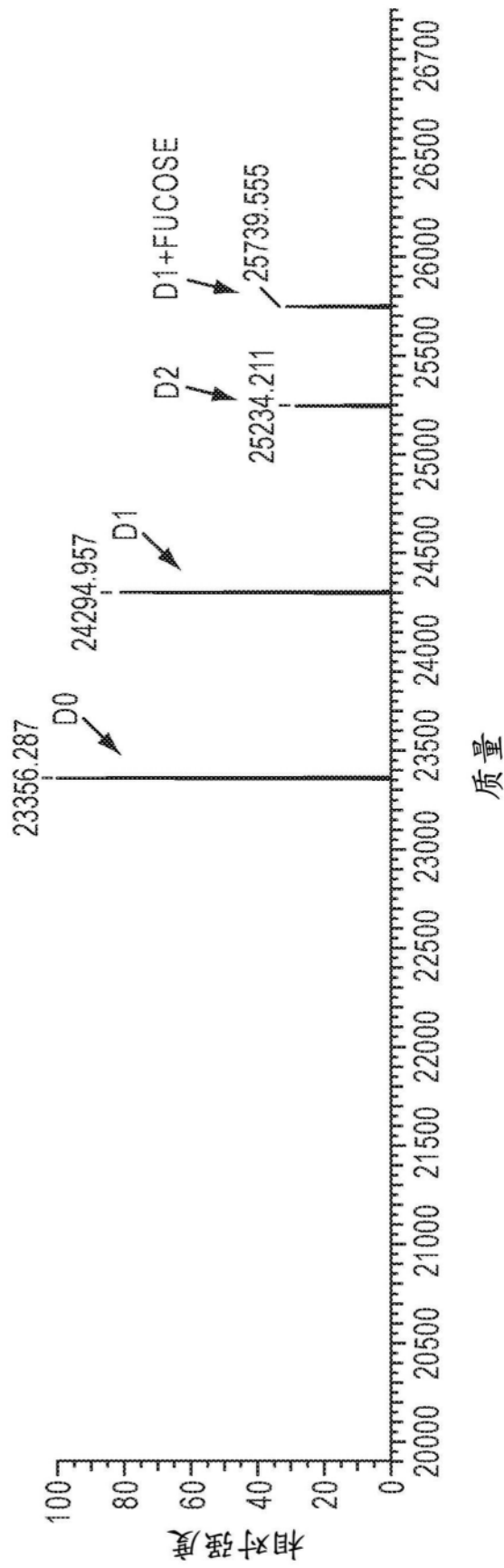


图7B

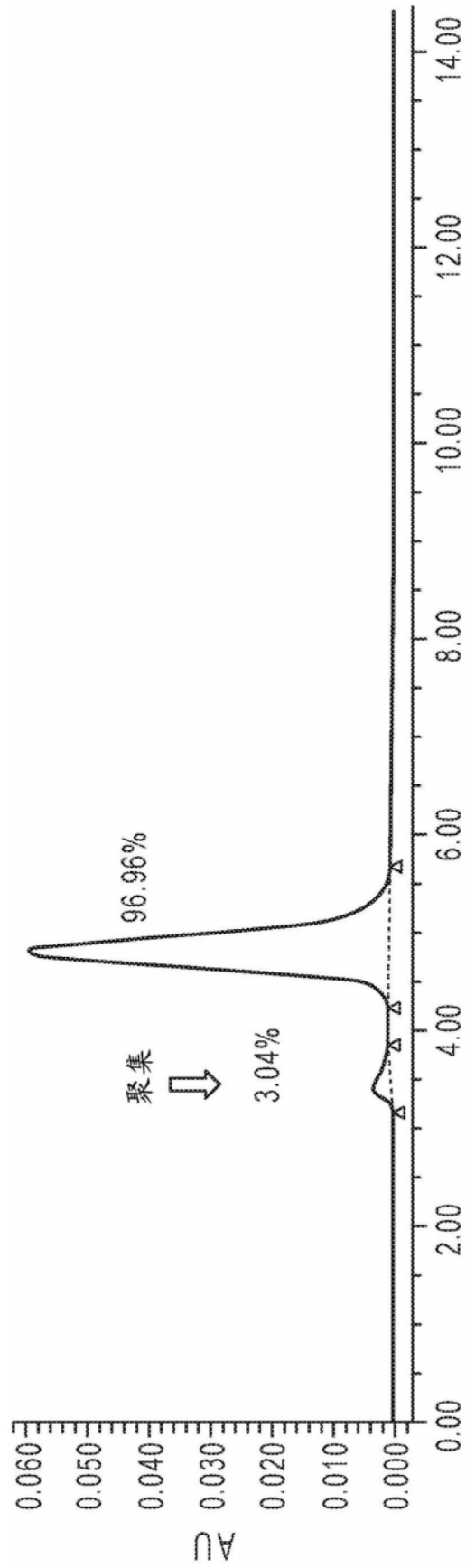


图8

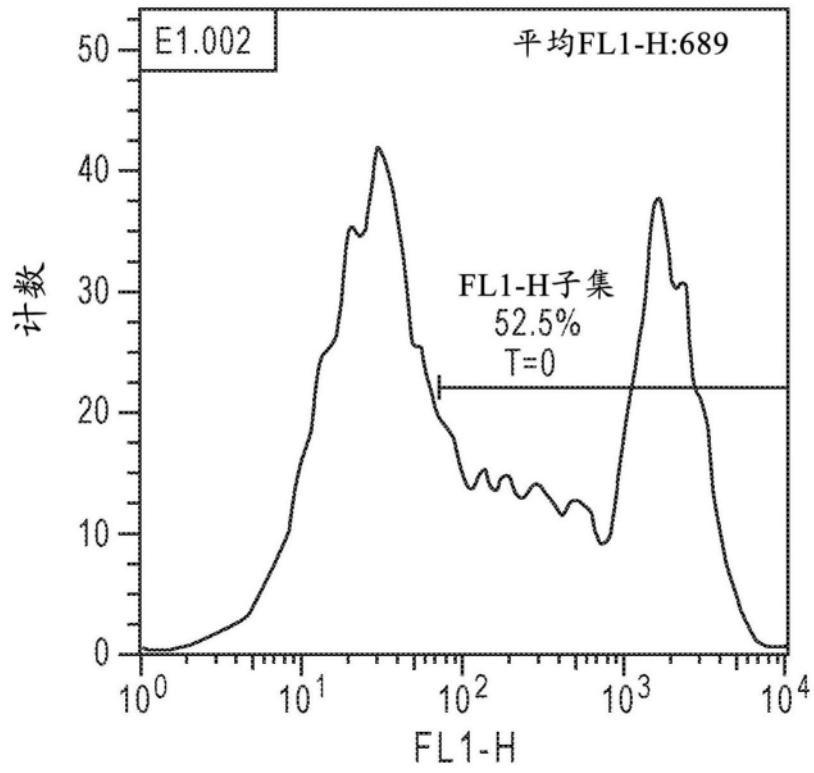


图9A

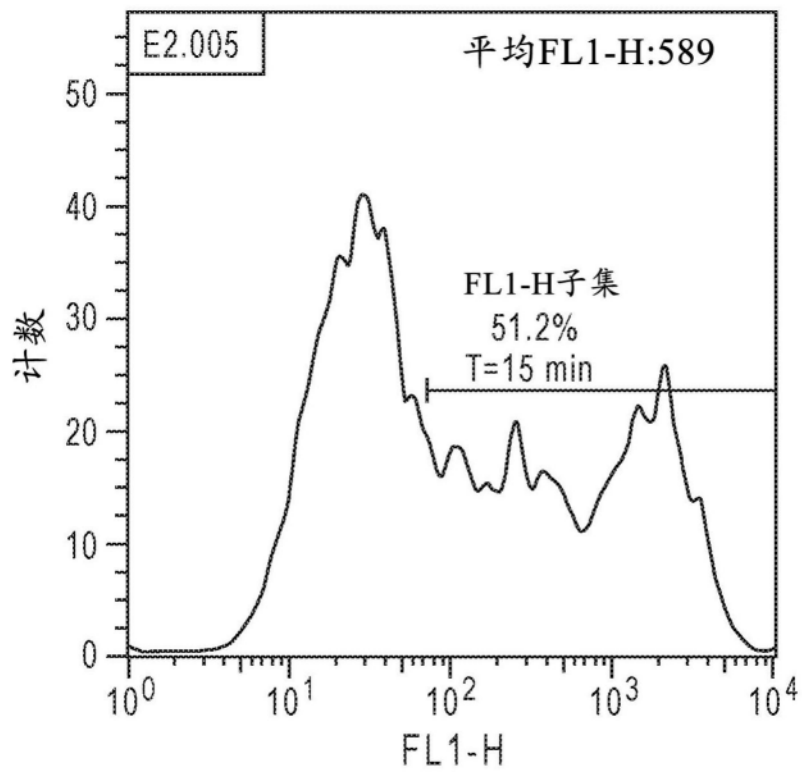


图9B

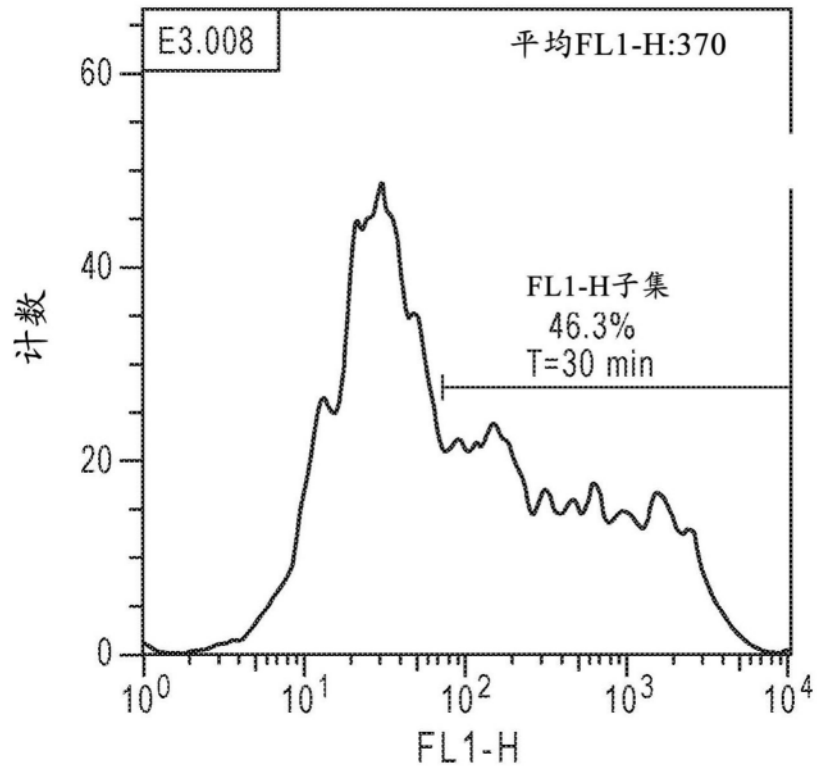


图9C

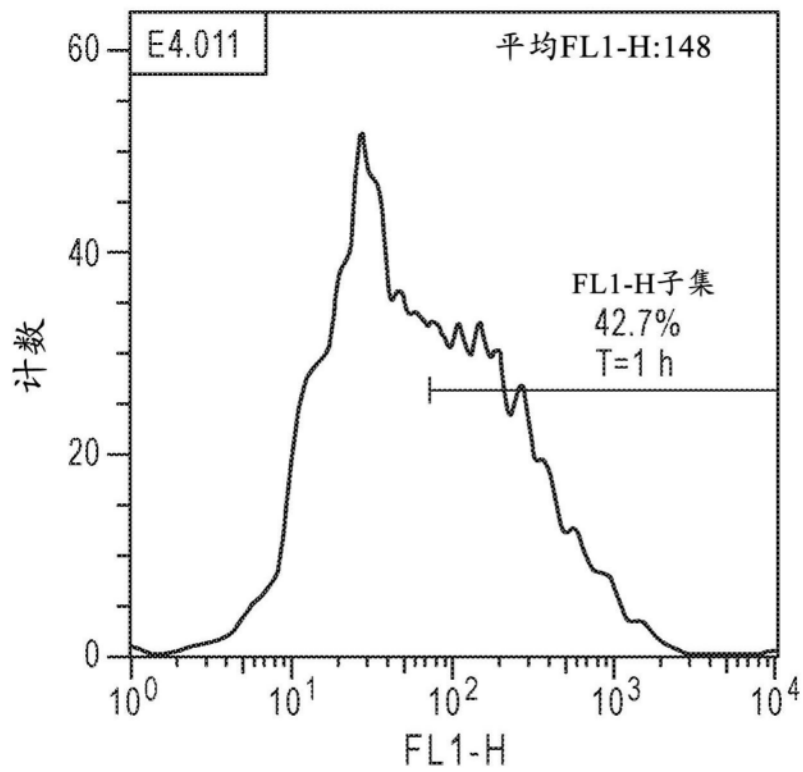


图9D

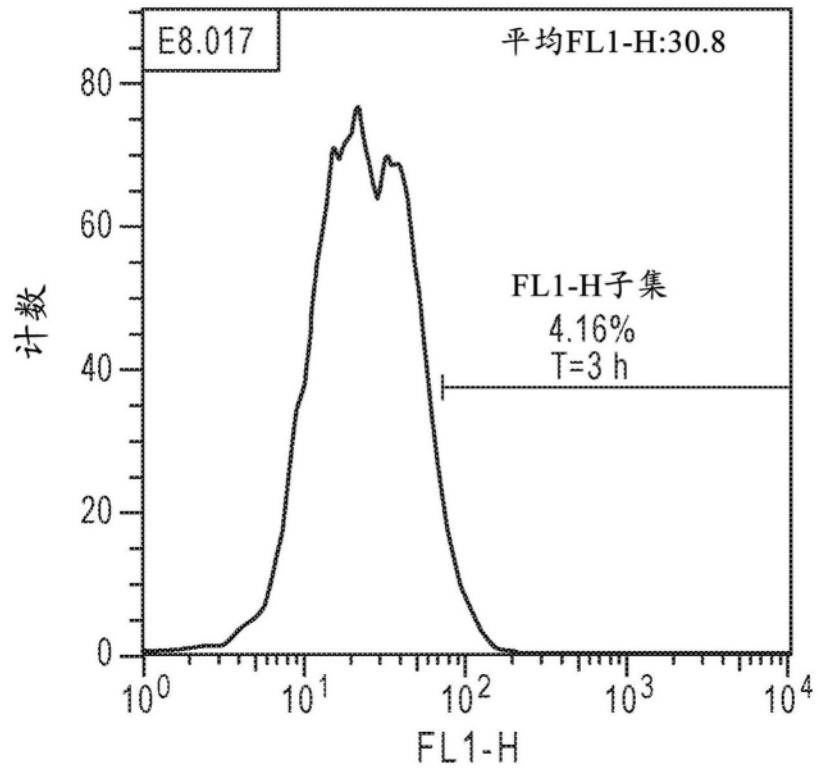


图9E

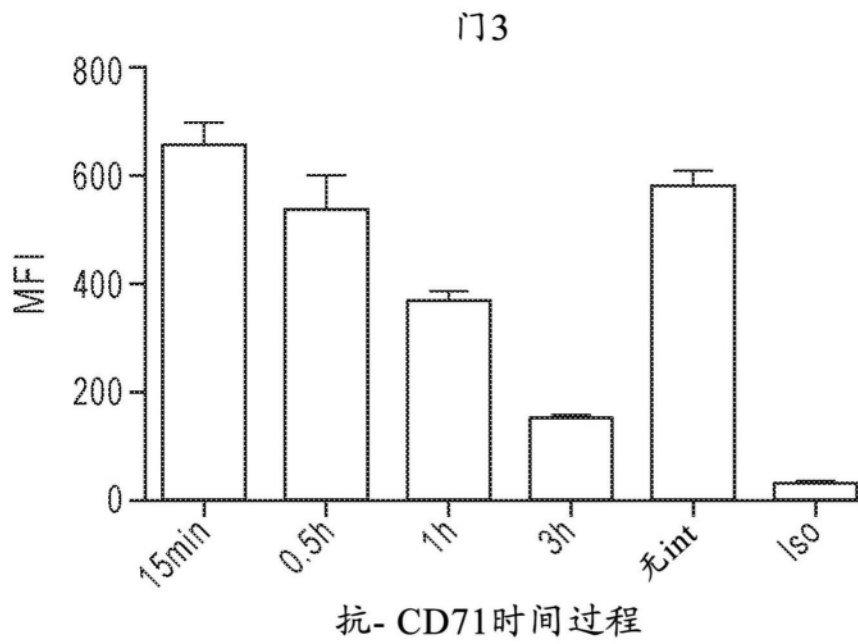


图9F

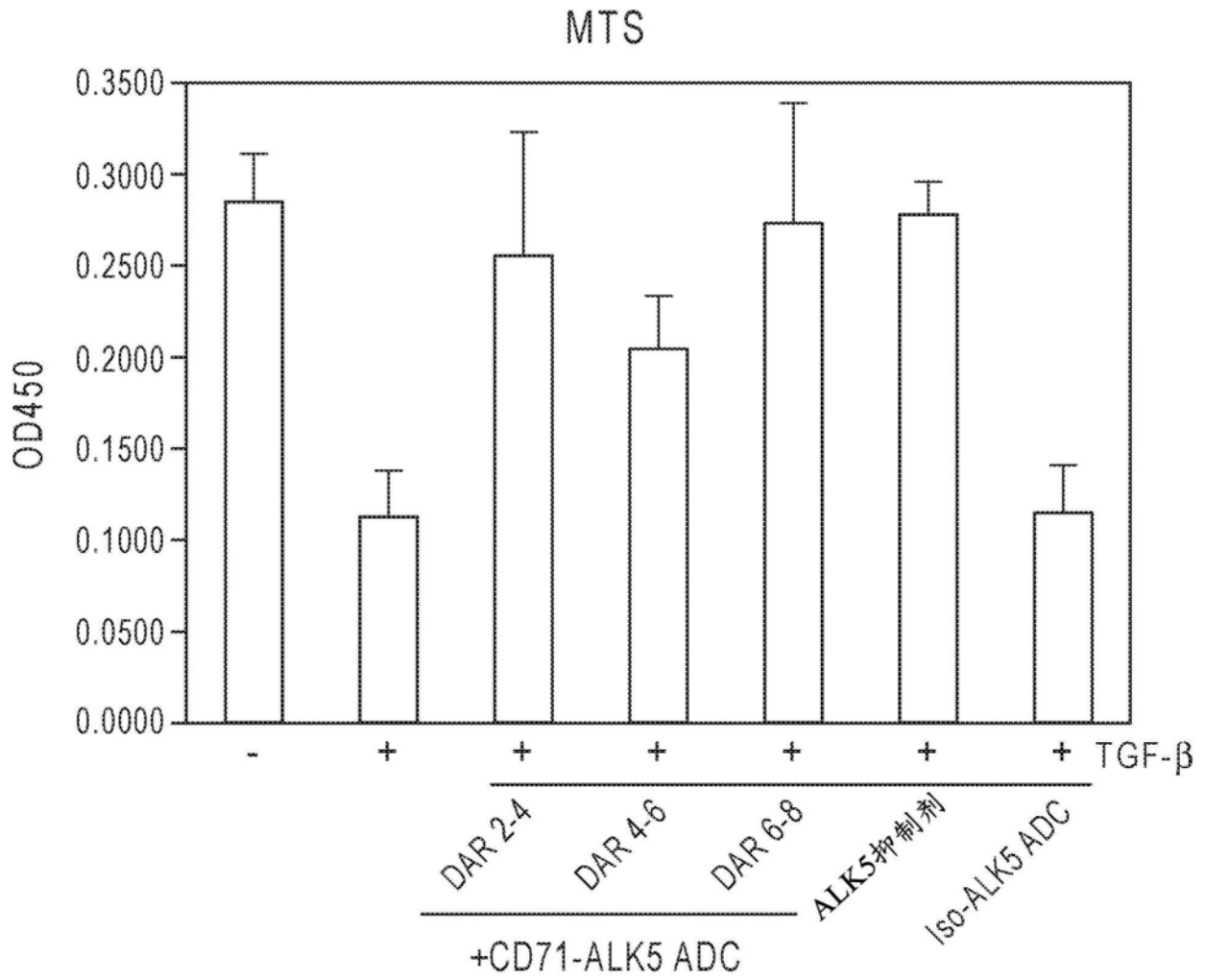


图10

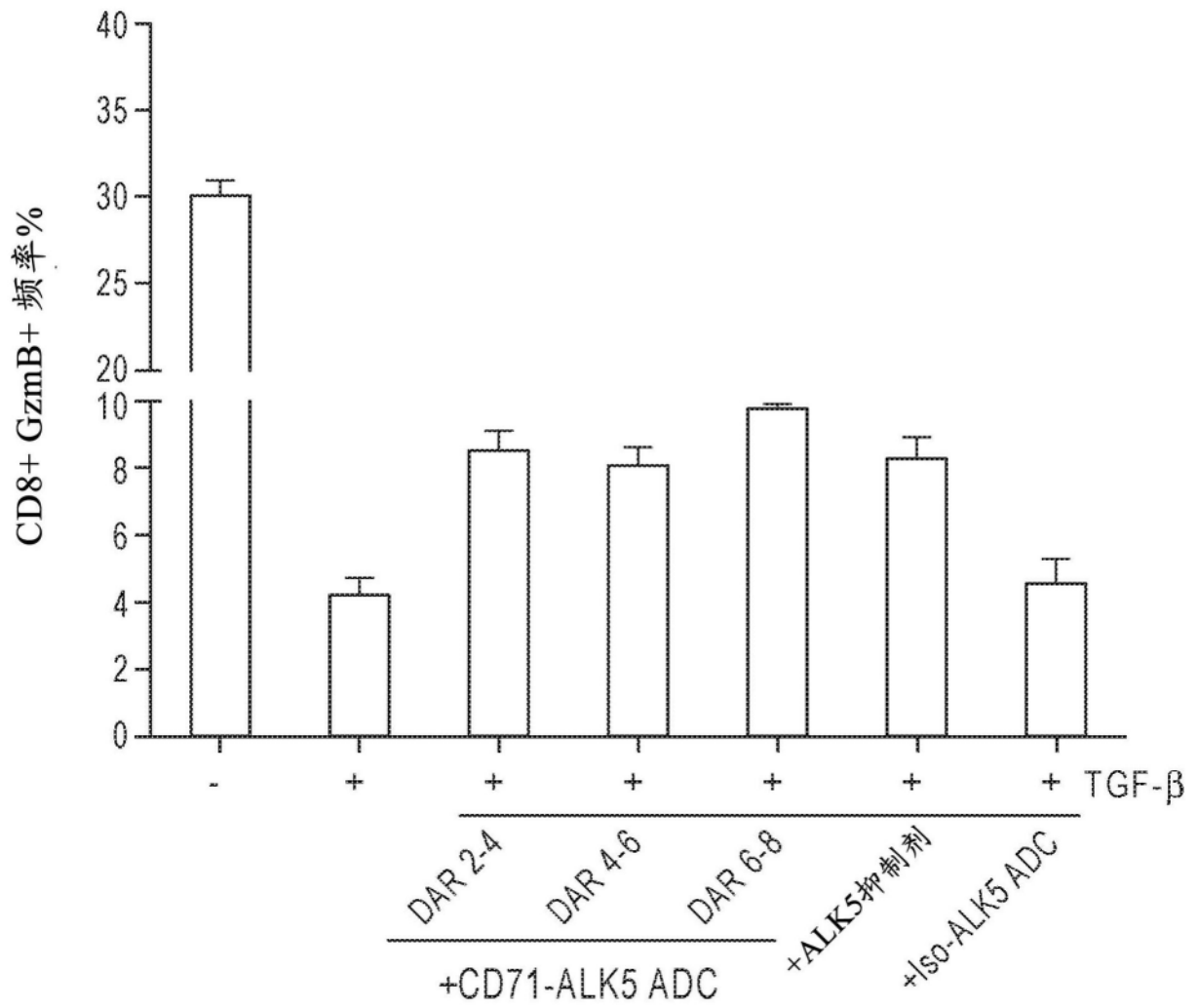


图11

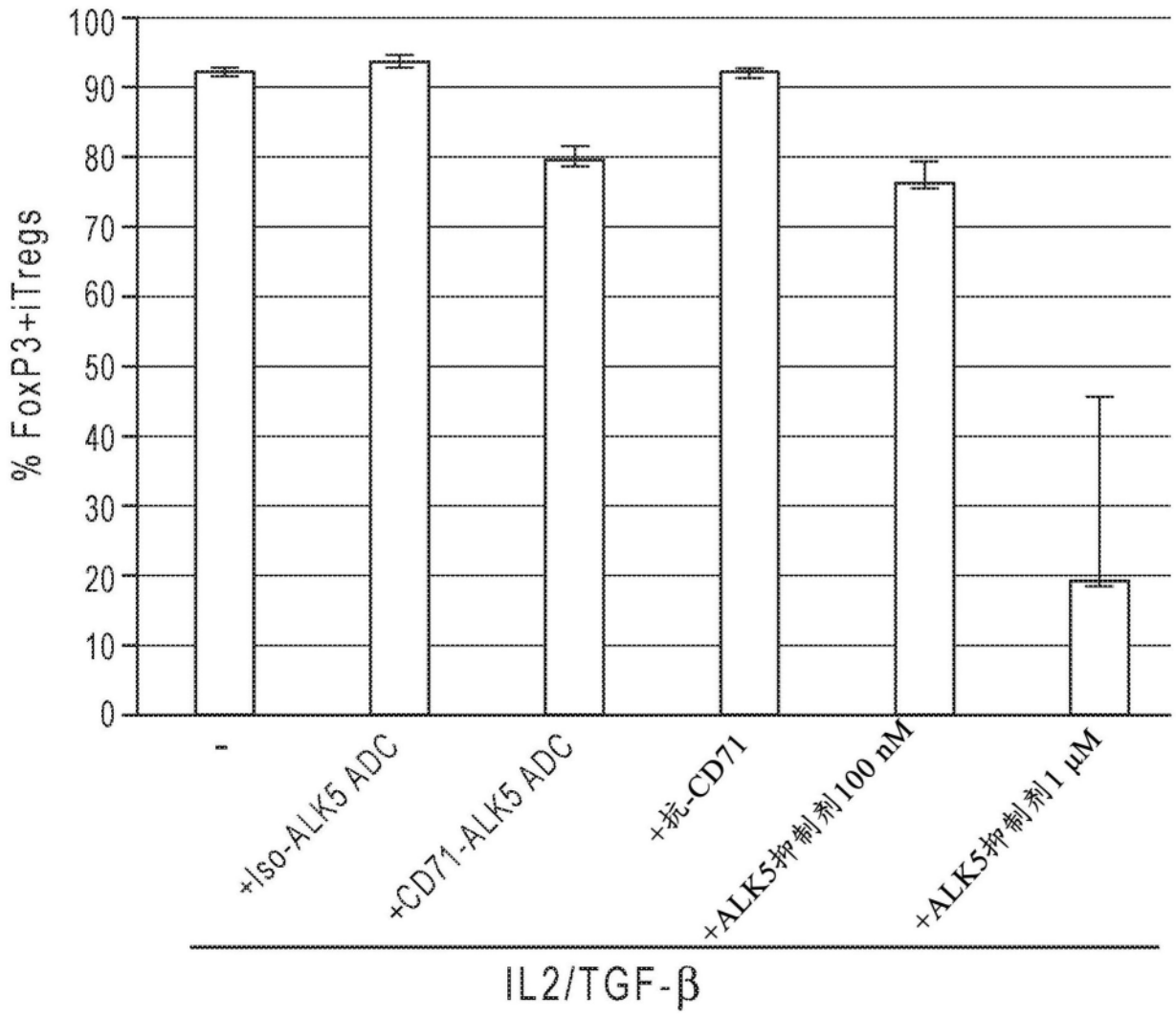


图12

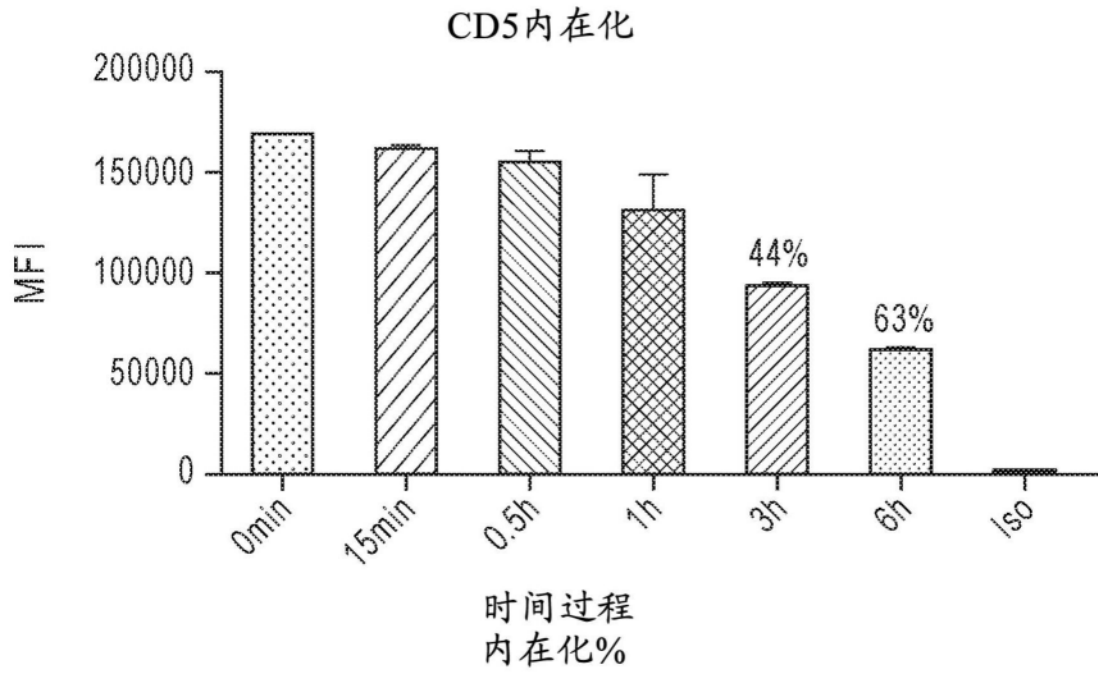


图13A

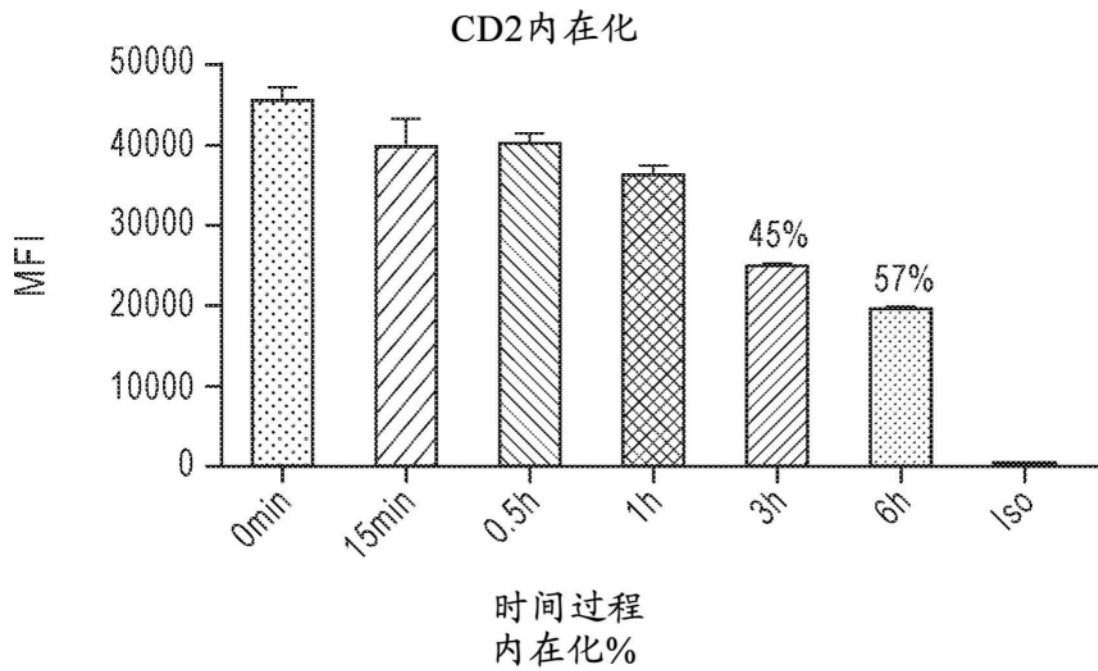


图13B

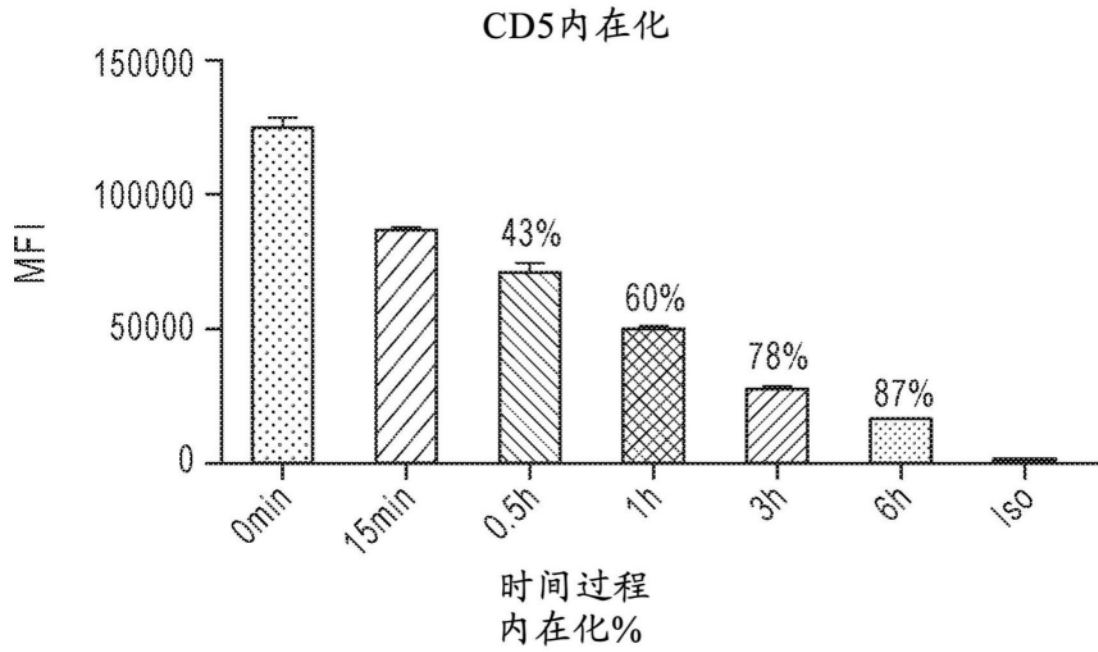


图13C

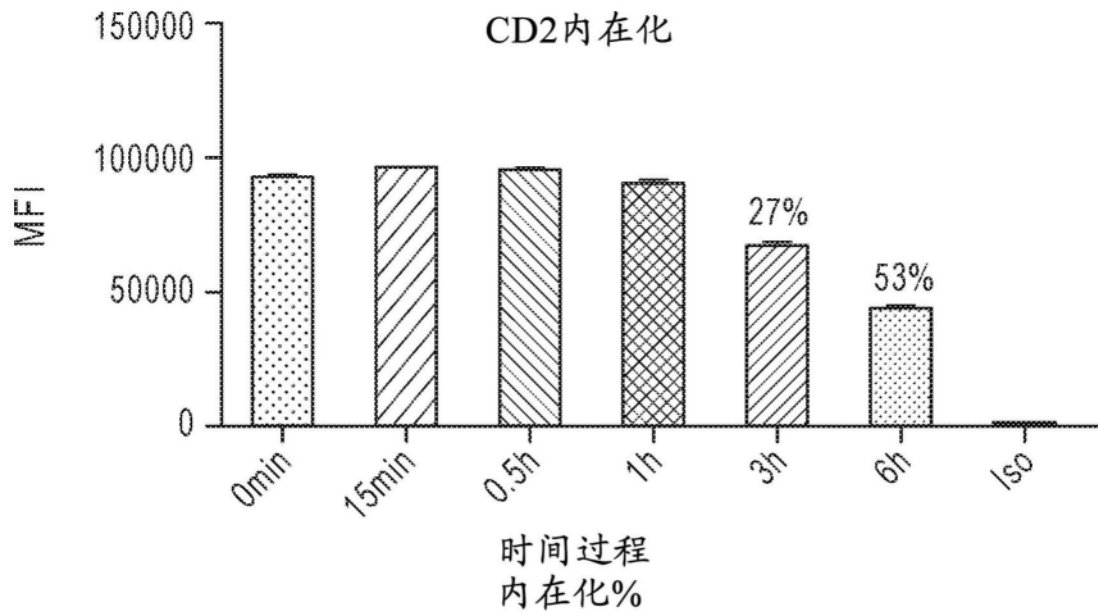


图13D

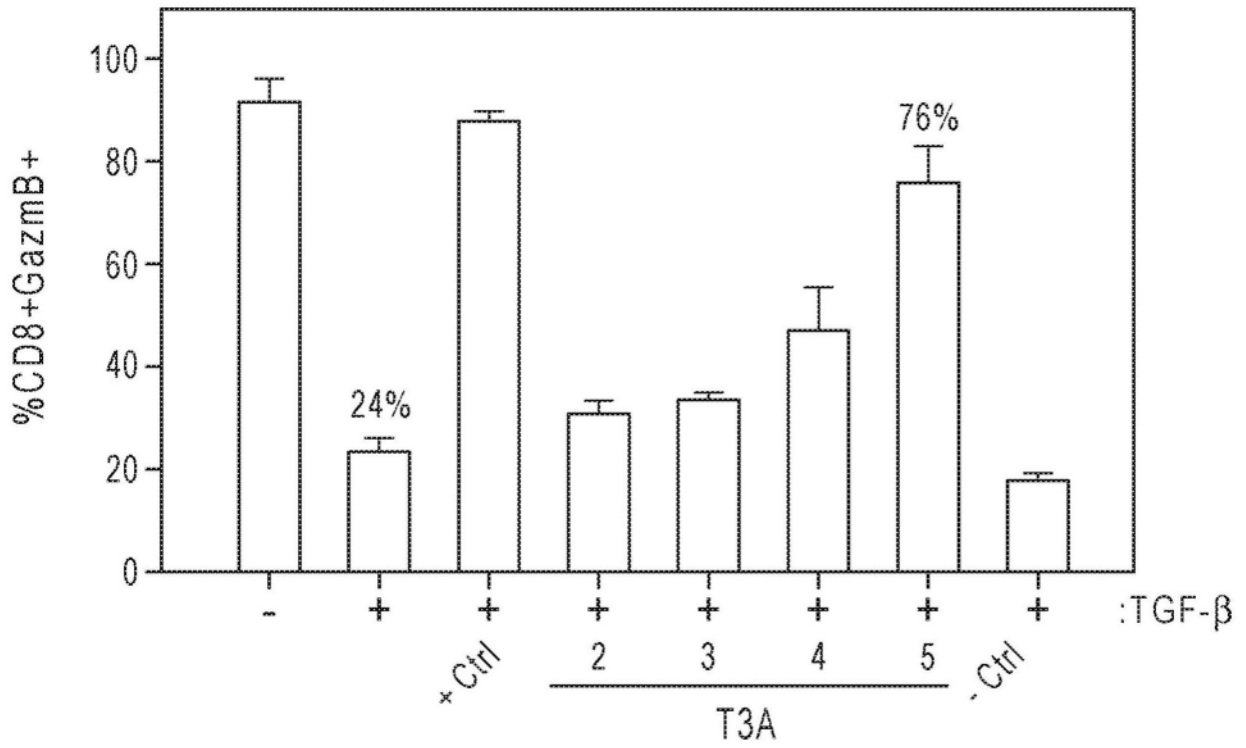


图14

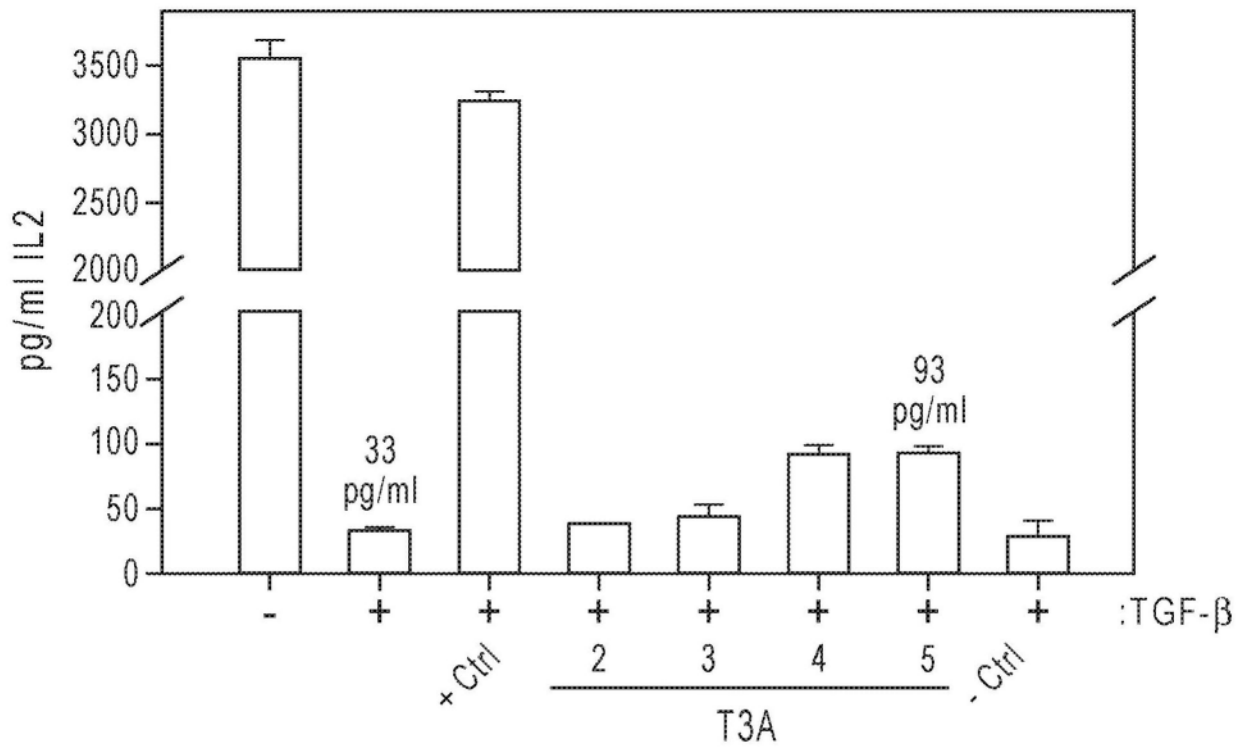


图15

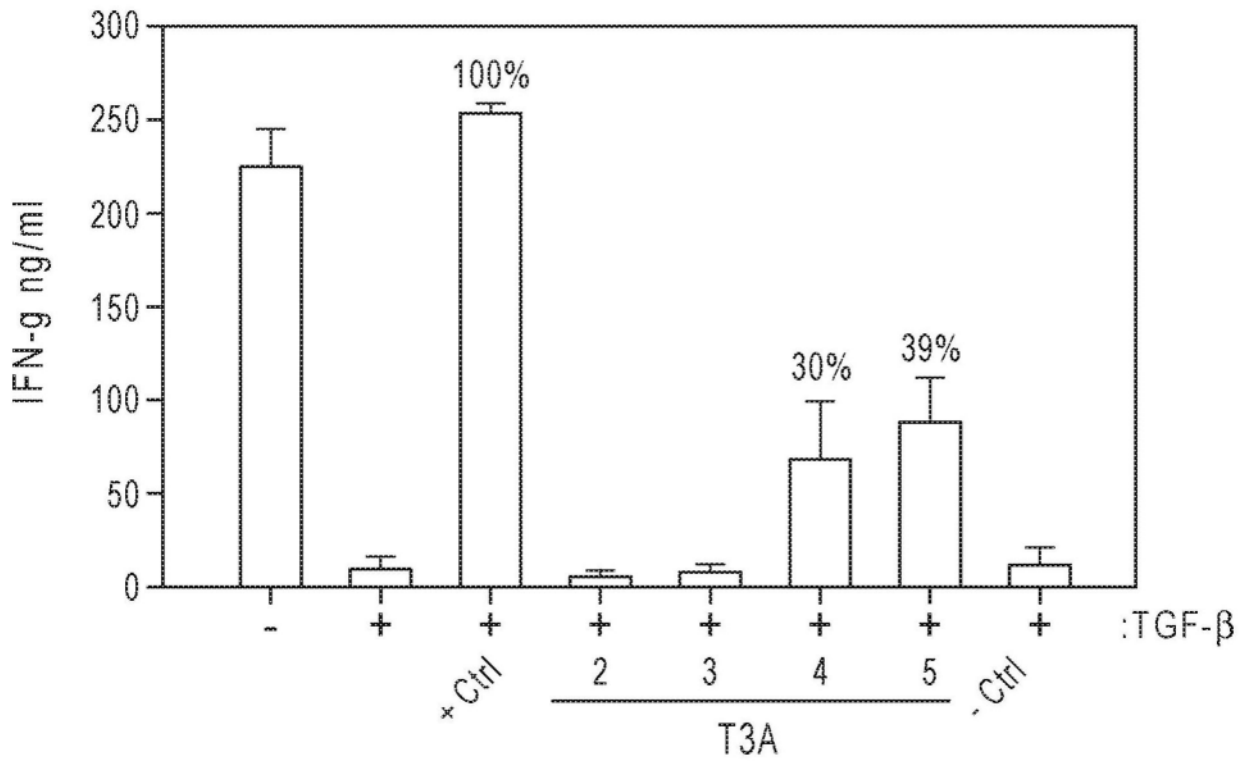


图16

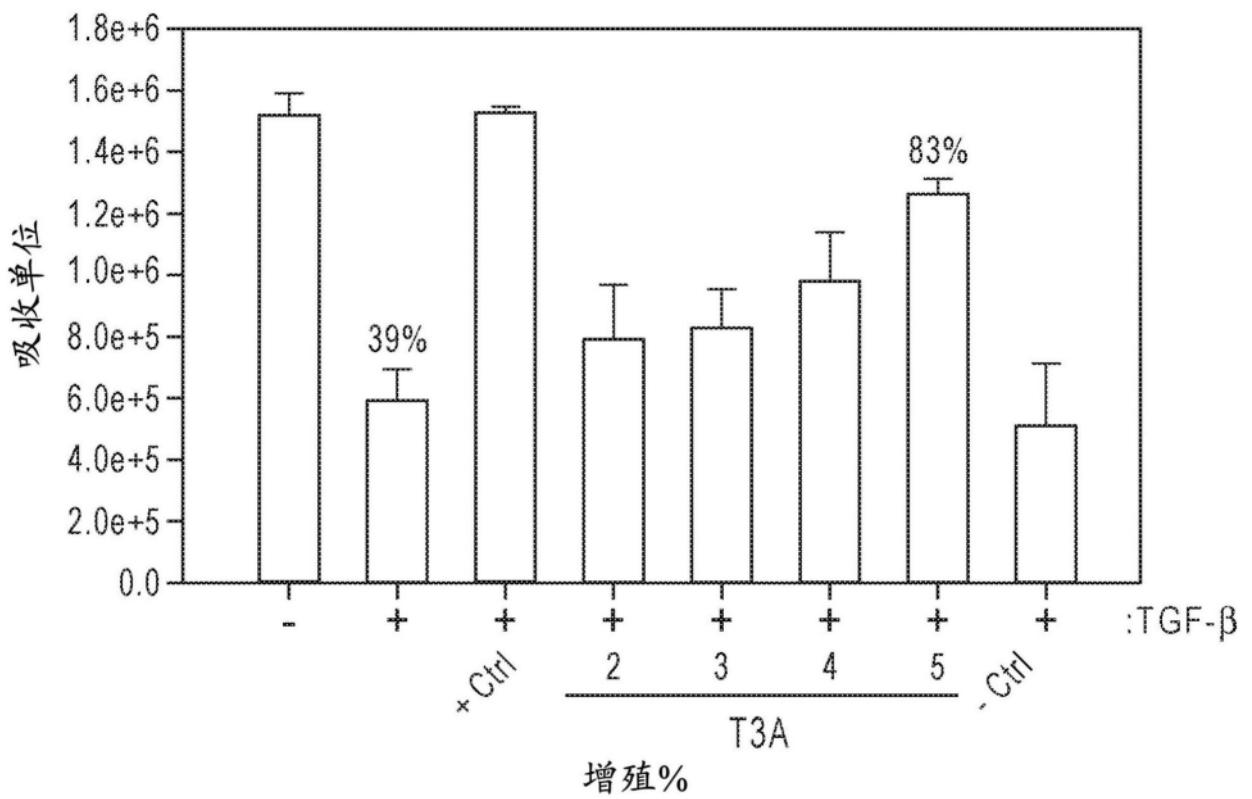


图17

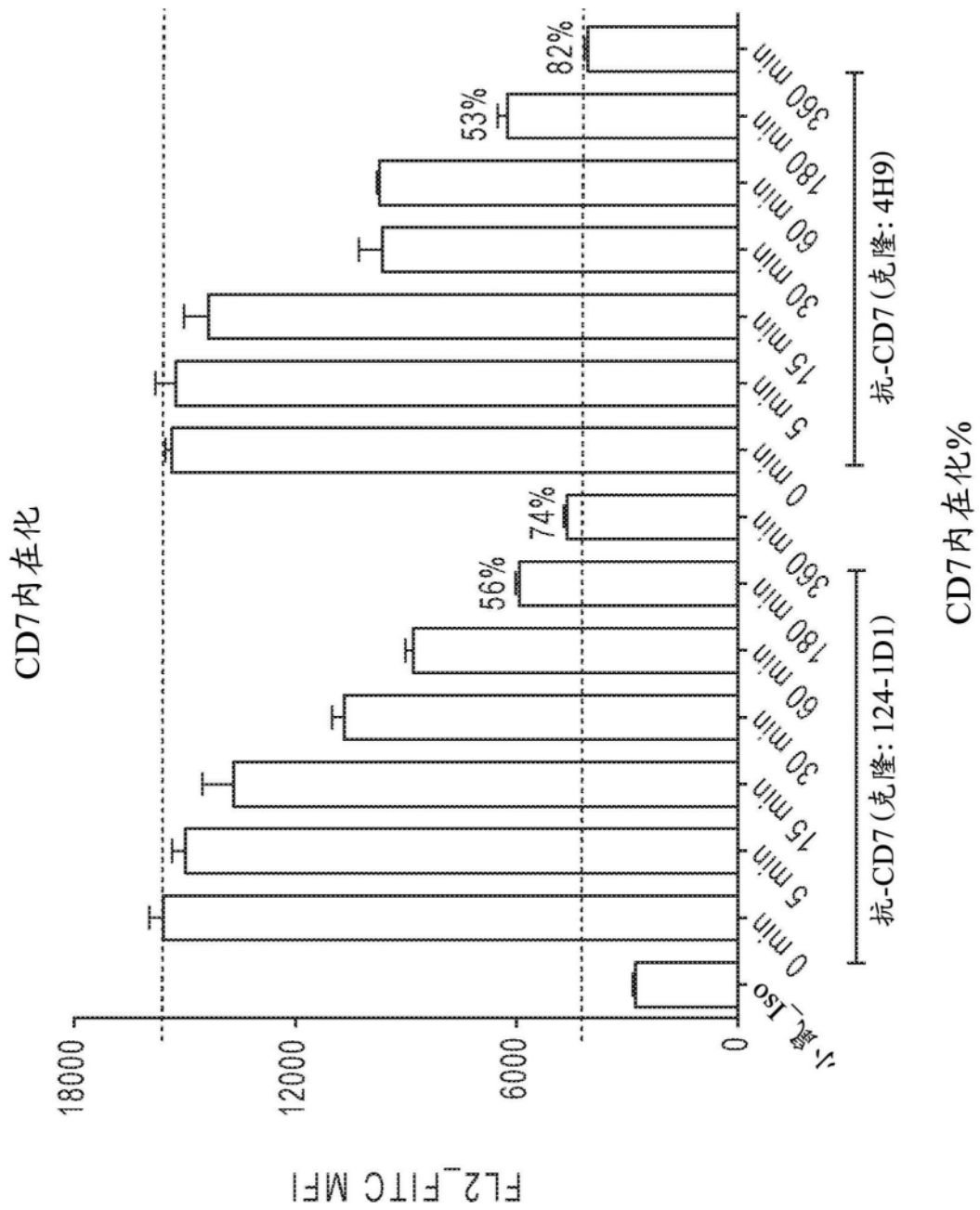


图18