



(10) 申请公布号 CN 116897054 A

(43) 申请公布日 2023.10.17

(21) 申请号 202180092533.5

(22) 申请日 2021.12.10

(30) 优先权数据

63/124,421 2020.12.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.07.31

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/062833 2021.12.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/125915 EN 2022.06.16

(71) 申请人 博尔特生物治疗药物有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 S·E·阿克曼 M·N·阿隆索

R·顾迪尔卡 A·李 B·萨菲纳

M·周

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

A61K 47/68 (2006.01)

权利要求书12页 说明书95页

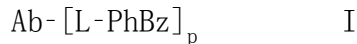
(54) 发明名称

抗HER2免疫缀合物及其用途

(57) 摘要

本发明提供式I的免疫缀合物,其包含通过与一种或多种8-苯基-2-氨基苯并氮杂 草 衍生物缀合而连接的抗HER2抗体。本发明还提供了包含反应性官能团的8-苯基-2-氨基苯并氮杂 草 衍生物中间体组合物。这类中间体组合物是用于通过接头或连接部分形成免疫缀合物的合适底物。本发明进一步提供了用免疫缀合物治疗癌症的方法。

1. 一种免疫缀合物,其包含通过接头与一个或多个8-苯基-2-氨基苯并氮杂~~草~~部分共价连接的抗体,并且具有式I:



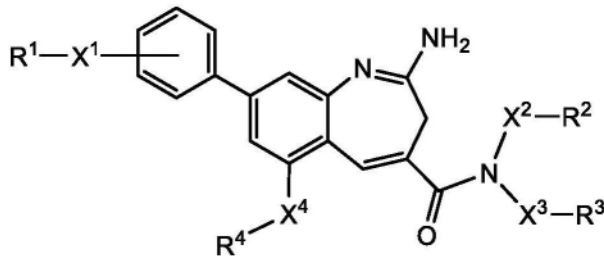
或其药学上可接受的盐,

其中:

Ab是具有结合HER2的抗原结合结构域的抗体构建体;

p是1至8的整数;

PhBz是具有下式的8-苯基-2-氨基苯并氮杂~~草~~部分:



R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 独立地选自由H、 C_1 - C_{12} 烷基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、 C_3 - C_{12} 碳环基、 C_6 - C_{20} 芳基、 C_2 - C_9 杂环基和 C_1 - C_{20} 杂芳基组成的组,其中烷基、烯基、炔基、碳环基、芳基、杂环基和杂芳基独立且任选被一个或多个选自以下的基团取代:

- (C_1 - C_{12} 烷基二基) - $N(R^5)$ -*
- (C_1 - C_{12} 烷基二基) - $N(R^5)_2$;
- (C_1 - C_{12} 烷基二基) - OR^5 ;
- (C_3 - C_{12} 碳环基) ;
- (C_3 - C_{12} 碳环基) -*
- (C_3 - C_{12} 碳环基) - (C_1 - C_{12} 烷基二基) - NR^5 -*
- (C_3 - C_{12} 碳环基) - (C_1 - C_{12} 烷基二基) - $N(R^5)_2$;
- (C_3 - C_{12} 碳环基) - NR^5 - $C(=NR^5)NR^5$ -*
- (C_6 - C_{20} 芳基) ;
- (C_6 - C_{20} 芳基二基) -*
- (C_6 - C_{20} 芳基二基) - $N(R^5)$ -*
- (C_6 - C_{20} 芳基二基) - (C_1 - C_{12} 烷基二基) - $N(R^5)$ -*
- (C_6 - C_{20} 芳基二基) - (C_1 - C_{12} 烷基二基) - (C_2 - C_{20} 杂环基二基) -*
- (C_6 - C_{20} 芳基二基) - (C_1 - C_{12} 烷基二基) - $N(R^5)_2$;
- (C_6 - C_{20} 芳基二基) - (C_1 - C_{12} 烷基二基) - NR^5 - $C(=NR^{5a})N(R^5)$ -*
- (C_2 - C_{20} 杂环基) ;
- (C_2 - C_{20} 杂环基) -*
- (C_2 - C_9 杂环基) - (C_1 - C_{12} 烷基二基) - NR^5 -*
- (C_2 - C_9 杂环基) - (C_1 - C_{12} 烷基二基) - $N(R^5)_2$;
- (C_2 - C_9 杂环基) - $C(=O)$ - (C_1 - C_{12} 烷基二基) - $N(R^5)$ -*
- (C_2 - C_9 杂环基) - NR^5 - $C(=NR^{5a})NR^5$ -*

- (C₂-C₉杂环基) -NR⁵ - (C₆-C₂₀芳基二基) - (C₁-C₁₂烷基二基) -N(R⁵) -*
- (C₂-C₉杂环基) - (C₆-C₂₀芳基二基) -*
- (C₁-C₂₀杂芳基) ;
- (C₁-C₂₀杂芳基) -*
- (C₁-C₂₀杂芳基) - (C₁-C₁₂烷基二基) -N(R⁵) -*
- (C₁-C₂₀杂芳基) - (C₁-C₁₂烷基二基) -N(R⁵)₂ ;
- (C₁-C₂₀杂芳基) -NR⁵ -C(=NR^{5a})N(R⁵) -*
- (C₁-C₂₀杂芳基) -N(R⁵)C(=O) - (C₁-C₁₂烷基二基) -N(R⁵) -*
- C(=O) -*
- C(=O) - (C₁-C₁₂烷基二基) -N(R⁵) -*
- C(=O) - (C₂-C₂₀杂环基二基) -*
- C(=O)N(R⁵)₂ ;
- C(=O)N(R⁵) -*
- C(=O)N(R⁵) - (C₁-C₁₂烷基二基) -N(R⁵)C(=O)R⁵ ;
- C(=O)N(R⁵) - (C₁-C₁₂烷基二基) -N(R⁵)C(=O)N(R⁵)₂ ;
- C(=O)NR⁵ - (C₁-C₁₂烷基二基) -N(R⁵)CO₂R⁵ ;
- C(=O)NR⁵ - (C₁-C₁₂烷基二基) -N(R⁵)C(=NR^{5a})N(R⁵)₂ ;
- C(=O)NR⁵ - (C₁-C₁₂烷基二基) -NR⁵C(=NR^{5a})R⁵ ;
- C(=O)NR⁵ - (C₁-C₈烷基二基) -NR⁵(C₂-C₅杂芳基) ;
- C(=O)NR⁵ - (C₁-C₂₀杂芳基二基) -N(R⁵) -*
- C(=O)NR⁵ - (C₁-C₂₀杂芳基二基) -*
- C(=O)NR⁵ - (C₁-C₂₀杂芳基二基) - (C₁-C₁₂烷基二基) -N(R⁵)₂ ;
- C(=O)NR⁵ - (C₁-C₂₀杂芳基二基) - (C₂-C₂₀杂环基二基) -C(=O)NR⁵ - (C₁-C₁₂烷基二基) -NR⁵ -*
- N(R⁵)₂ ;
- N(R⁵) -*
- N(R⁵)C(=O)R⁵ ;
- N(R⁵)C(=O) -*
- N(R⁵)C(=O)N(R⁵)₂ ;
- N(R⁵)C(=O)N(R⁵) -*
- N(R⁵)CO₂R⁵ ;
- NR⁵C(=NR^{5a})N(R⁵)₂ ;
- NR⁵C(=NR^{5a})N(R⁵) -*
- NR⁵C(=NR^{5a})R⁵ ;
- N(R⁵)C(=O) - (C₁-C₁₂烷基二基) -N(R⁵) -*
- N(R⁵) - (C₂-C₅杂芳基) ;
- N(R⁵) -S(=O)₂ - (C₁-C₁₂烷基) ;
- O - (C₁-C₁₂烷基) ;
- O - (C₁-C₁₂烷基二基) -N(R⁵)₂ ;

-O-(C₁-C₁₂烷基二基)-N(R⁵)-*;
 -O-C(=O)N(R⁵)₂;
 -O-C(=O)N(R⁵)-*;
 -S(=O)₂-(C₂-C₂₀杂环基二基)-*;
 -S(=O)₂-(C₂-C₂₀杂环基二基)-(C₁-C₁₂烷基二基)-N(R⁵)₂;
 -S(=O)₂-(C₂-C₂₀杂环基二基)-(C₁-C₁₂烷基二基)-NR⁵-*;
 和
 -S(=O)₂-(C₂-C₂₀杂环基二基)-(C₁-C₁₂烷基二基)-OH;

或者R²和R³一起形成5或6元杂环基环;

X¹、X²、X³和X⁴独立地选自由键、C(=O)、C(=O)N(R⁵)、O、N(R⁵)、S、S(O)₂和S(O)₂N(R⁵)组成的组;

R⁵独立地选自由H、C₆-C₂₀芳基、C₃-C₁₂碳环基、C₆-C₂₀芳基二基、C₁-C₁₂烷基和C₁-C₁₂烷基二基组成的组,或者两个R⁵基团一起形成5或6元杂环基环;

R^{5a}选自由C₆-C₂₀芳基和C₁-C₂₀杂芳基组成的组;

其中星号*指示L的连接位点,且其中R¹、R²、R³和R⁴中的一者连接于L;

L是选自由以下组成的组的接头:

-C(=O)-PEG-;
 -C(=O)-PEG-C(=O)N(R⁶)-(C₁-C₁₂烷基二基)-C(=O)-Gluc-;
 -C(=O)-PEG-O-;
 -C(=O)-PEG-O-C(=O)-;
 -C(=O)-PEG-C(=O)-;
 -C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-;
 -C(=O)-PEG-N(R⁶)-;
 -C(=O)-PEG-N(R⁶)-C(=O)-;
 -C(=O)-PEG-N(R⁶)-PEG-C(=O)-PEP-;
 -C(=O)-PEG-N⁺(R⁶)₂-PEG-C(=O)-PEP-;
 -C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂烷基二基)-;
 -C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂烷基二基)N(R⁶)C(=O)-(C₂-C₅单杂环基二基)-;

-C(=O)-PEG-SS-(C₁-C₁₂烷基二基)-OC(=O)-;

-C(=O)-PEG-SS-(C₁-C₁₂烷基二基)-C(=O)-;

-C(=O)-(C₁-C₁₂烷基二基)-C(=O)-PEP-;

-C(=O)-(C₁-C₁₂烷基二基)-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂烷基二基)-;

-C(=O)-(C₁-C₁₂烷基二基)-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂烷基二基)-N(R⁵)-C(=O);

-C(=O)-(C₁-C₁₂烷基二基)-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂烷基二基)-N(R⁶)C(=O)-(C₂-C₅单杂环基二基)-;

-琥珀酰亚胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-;

-琥珀酰亚胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-C(=O)N(R⁶)-(C₁-C₁₂烷基二基)-C(=O)-Gluc-;

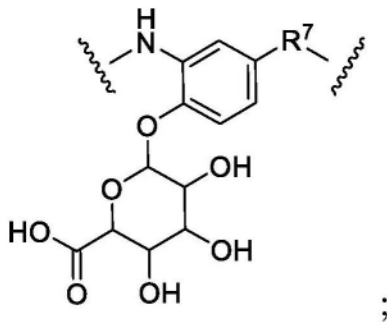
-琥珀酰亚胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-O-;

-琥珀酰亚胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-O-C(=O)-;
 -琥珀酰亚胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-C(=O)-;
 -琥珀酰亚胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-N(R⁵)-;
 -琥珀酰亚胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-N(R⁵)-C(=O)-;
 -琥珀酰亚胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-C(=O)-PEP-;
 -琥珀酰亚胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-SS-(C₁-C₁₂烷基二基)-OC(=O)-;
 -琥珀酰亚胺基-(CH₂)_m-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂烷基二基)-;
 -琥珀酰亚胺基-(CH₂)_m-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂烷基二基)N(R⁶)C(=O)-;和
 -琥珀酰亚胺基-(CH₂)_m-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂烷基二基)N(R⁶)C(=O)-(C₂-C₅单杂
 环基二基)-;

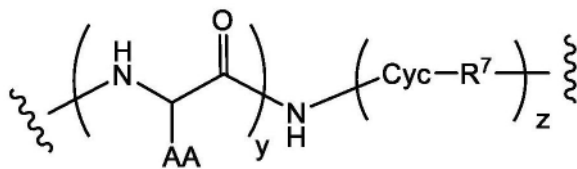
R⁶独立地为H或C₁-C₆烷基;

PEG具有下式:-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_m-;m是1至5的整数,且n是2至50的整数;

Gluc具有下式:

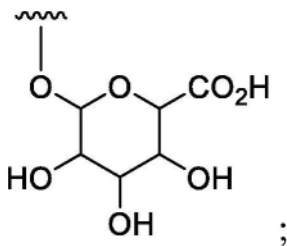


PEP具有下式:



其中AA独立地选自天然或非天然氨基酸侧链,或者AA中的一者或多者和相邻的氮原子形成五元环脯氨酸氨基酸,且波浪线指示连接点;

Cyc选自C₆-C₂₀芳基二基和C₁-C₂₀杂芳基二基,任选被一个或多个选自F、Cl、NO₂、-OH、-OCH₃和具有如下结构的葡糖醛酸的基团取代:



R⁷选自由-CH(R⁸)O-、-CH₂-、-CH₂N(R⁸)-和-CH(R⁸)O-C(=O)-组成的组,其中R⁸选自H、C₁-C₆烷基、C(=O)-C₁-C₆烷基和-C(=O)N(R⁹)₂,其中R⁹独立地选自由H、C₁-C₁₂烷基和-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_m-OH组成的组,其中m是1至5的整数,且n是2至50的整数,或者两个R⁹基团一起形成5或6元杂环基环;

y是2至12的整数；

z是0或1；且

烷基、烷基二基、烯基、烯基二基、炔基、炔基二基、芳基、芳基二基、碳环基、碳环基二基、杂环基、杂环基二基、杂芳基和杂芳基二基独立且任选被一个或多个独立地选自以下的基团取代：F、Cl、Br、I、-CN、-CH₃、-CH₂CH₃、-CH=CH₂、-C≡CH、-C≡CCH₃、-CH₂CH₂CH₃、-CH(CH₃)₂、-CH₂CH(CH₃)₂、-CH₂OH、-CH₂OCH₃、-CH₂CH₂OH、-C(CH₃)₂OH、-CH(OH)CH(CH₃)₂、-C(CH₃)₂CH₂OH、-CH₂CH₂SO₂CH₃、-CH₂OP(O)(OH)₂、-CH₂F、-CHF₂、-CF₃、-CH₂CF₃、-CH₂CHF₂、-CH(CH₃)CN、-C(CH₃)₂CN、-CH₂CN、-CH₂NH₂、-CH₂NHSO₂CH₃、-CH₂NHCH₃、-CH₂N(CH₃)₂、-CO₂H、-COCH₃、-CO₂CH₃、-CO₂C(CH₃)₃、-COCH(OH)CH₃、-CONH₂、-CONHCH₃、-CON(CH₃)₂、-C(CH₃)₂CONH₂、-NH₂、-NHCH₃、-N(CH₃)₂、-NHC(O)CH₃、-N(CH₃)C(O)CH₃、-NHS(O)₂CH₃、-N(CH₃)C(CH₃)₂CONH₂、-N(CH₃)CH₂CH₂S(O)₂CH₃、-NHC(=NH)H、-NHC(=NH)CH₃、-NHC(=NH)NH₂、-NHC(=O)NH₂、-NO₂、=O、-OH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-OCH₂CH₂OCH₃、-OCH₂CH₂OH、-OCH₂CH₂N(CH₃)₂、-O(CH₂CH₂O)_n(CH₂)_mCO₂H、-O(CH₂CH₂O)_nH、-OCH₂F、-OCHF₂、-OCF₃、-OP(O)(OH)₂、-S(O)₂N(CH₃)₂、-SCH₃、-S(O)₂CH₃和-S(O)₃H。

2. 如权利要求1所述的免疫缀合物，其中所述抗体选自曲妥珠单抗和帕妥珠单抗或其生物仿制药或生物改良药。

3. 如权利要求1和2中任一项所述的免疫缀合物，其中X¹是键，且R¹是H。

4. 如权利要求1和2中任一项所述的免疫缀合物，其中X²是键，且R²是C₁-C₈烷基。

5. 如权利要求1和2中任一项所述的免疫缀合物，其中X²和X³各自是键，且R²和R³独立地选自C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₁₂烷基)、-(C₁-C₁₂烷基二基)-OR⁵、-(C₁-C₈烷基二基)-N(R⁵)CO₂R⁵、-(C₁-C₁₂烷基)-OC(O)N(R⁵)₂、-O-(C₁-C₁₂烷基)-N(R⁵)CO₂R⁵和-O-(C₁-C₁₂烷基)-OC(O)N(R⁵)₂。

6. 如权利要求5所述的免疫缀合物，其中R²是C₁-C₈烷基，且R³是-(C₁-C₈烷基二基)-N(R⁵)CO₂R⁵。

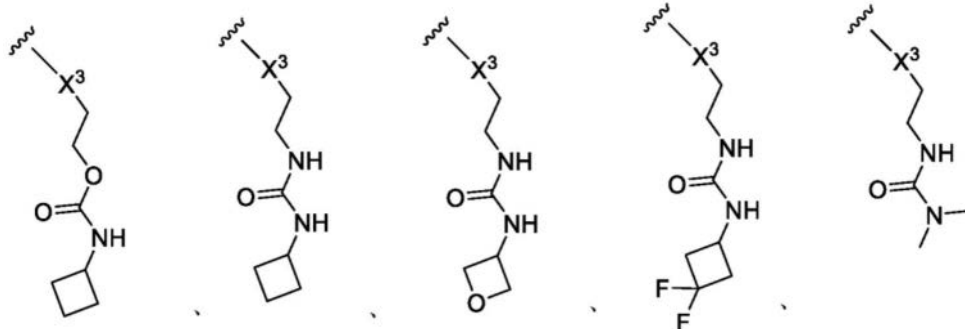
7. 如权利要求6所述的免疫缀合物，其中R²是-CH₂CH₂CH₃，且R³选自-CH₂CH₂CH₂NHCO₂(t-Bu)、-OCH₂CH₂NHCO₂(环丁基)和-CH₂CH₂CH₂NHCO₂(环丁基)。

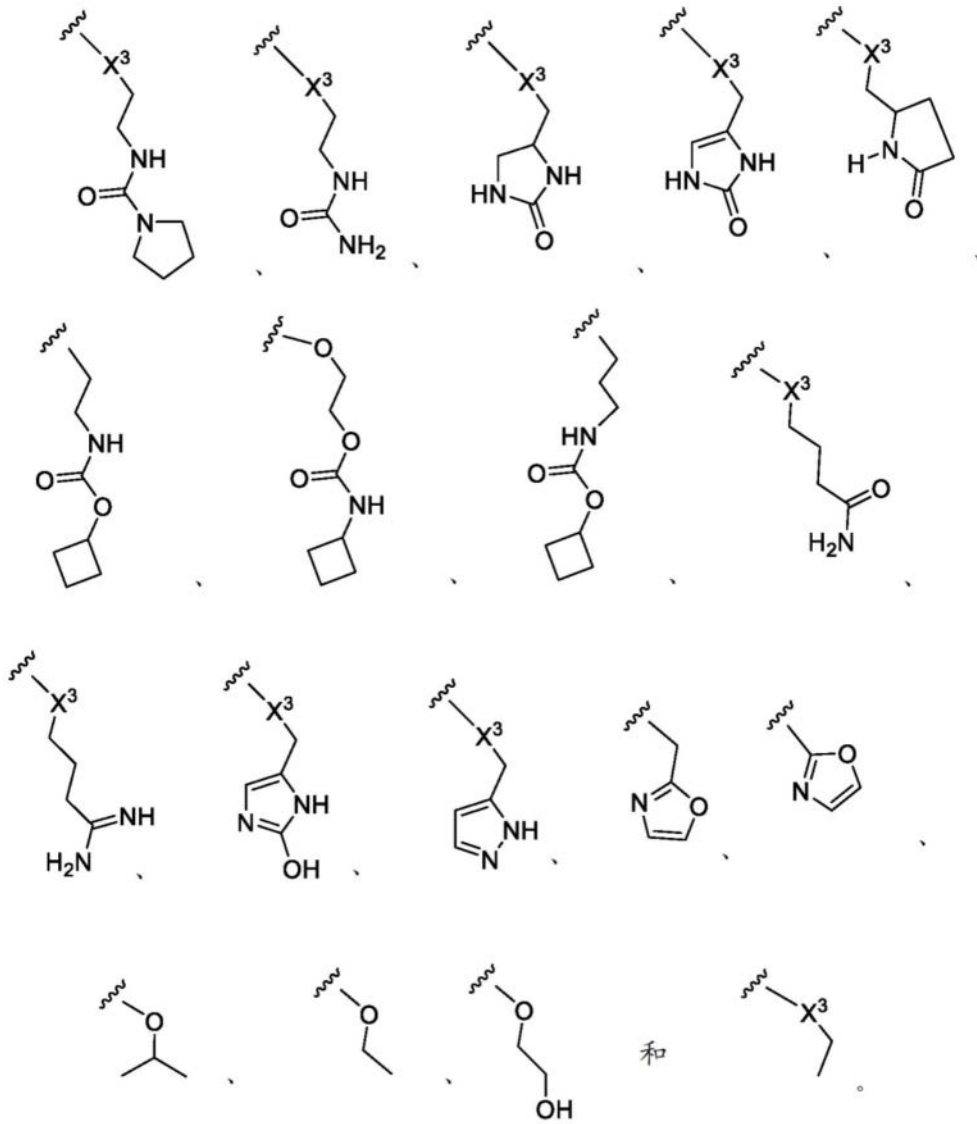
8. 如权利要求5所述的免疫缀合物，其中R²和R³各自独立地选自-CH₂CH₂CH₃、-OCH₂CH₃、-OCH₂CF₃、-CH₂CH₂CF₃、-OCH₂CH₂OH和-CH₂CH₂CH₂OH。

9. 如权利要求8所述的免疫缀合物，其中R²和R³各自是-CH₂CH₂CH₃。

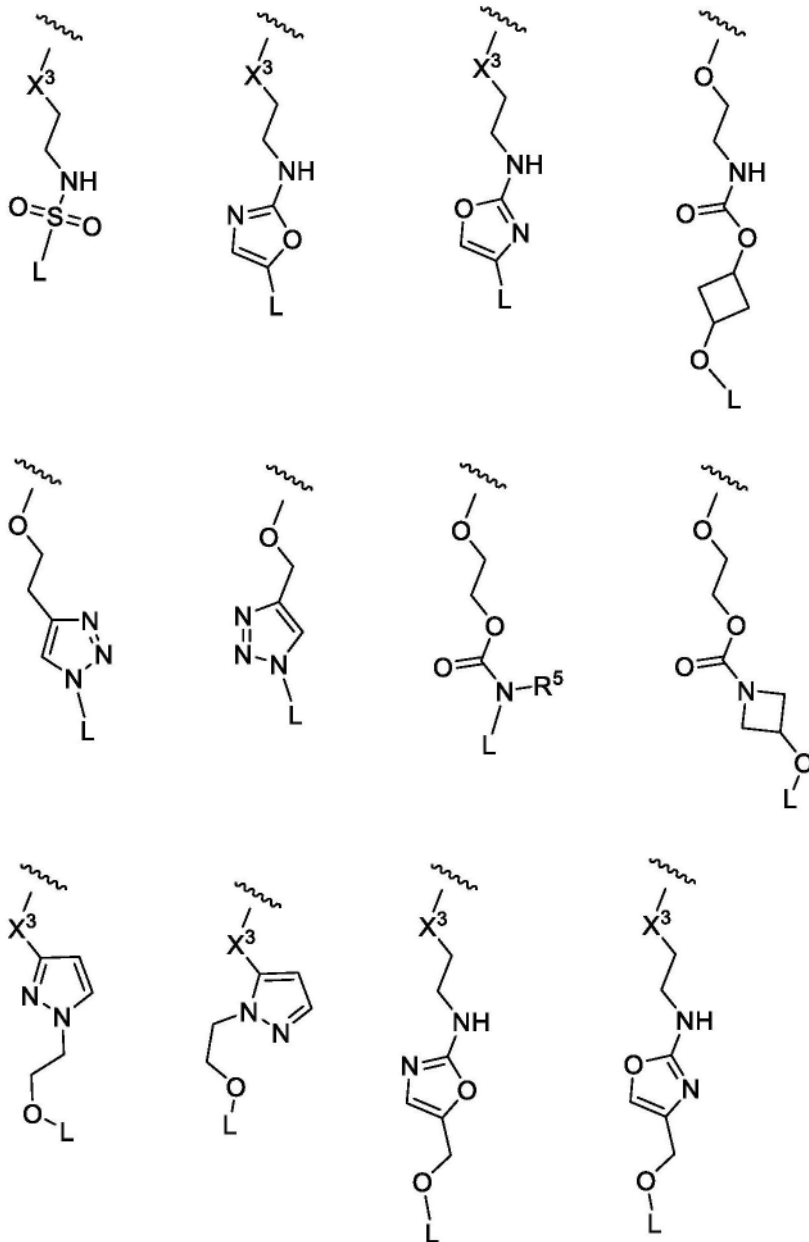
10. 如权利要求8所述的免疫缀合物，其中R²是-CH₂CH₂CH₃，且R³是-OCH₂CH₃。

11. 如权利要求1和2中任一项所述的免疫缀合物，其中X³-R³选自由以下组成的组：





12. 如权利要求1和2中任一项所述的免疫缀合物,其中 X^4 是键,且 R^4 是H。
13. 如权利要求1和2中任一项所述的免疫缀合物,其中 R^1 连接于L。
14. 如权利要求1和2中任一项所述的免疫缀合物,其中 R^2 或 R^3 连接于L。
15. 如权利要求14所述的免疫缀合物,其中 X^3 - R^3 -L选自由以下组成的组:



其中所述波浪线指示与N的连接点。

16. 如权利要求1和2中任一项所述的免疫缀合物,其中 R^4 是 C_1 - C_{12} 烷基。

17. 如权利要求1和2中任一项所述的免疫缀合物,其中 R^4 是-(C_1 - C_{12} 烷基二基)-N(R^5)-*;其中所述星号*指示L的连接位点。

18. 如权利要求1和2中任一项所述的免疫缀合物,其中L是-C(=O)-PEG-或-C(=O)-PEG-C(=O)-。

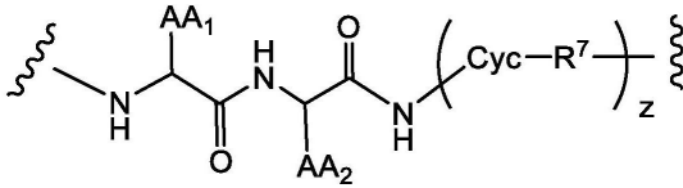
19. 如权利要求1和2中任一项所述的免疫缀合物,其中L连接于所述抗体的半胱氨酸硫酸醇。

20. 如权利要求1和2中任一项所述的免疫缀合物,其中对于所述PEG,m是1或2,且n是2至10的整数。

21. 如权利要求20所述的免疫缀合物,其中n是10。

22. 如权利要求1和2中任一项所述的免疫缀合物,其中L包含PEP,并且PEP是二肽且具

有下式：

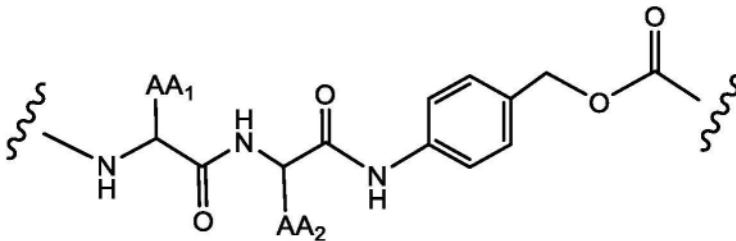


23. 如权利要求22所述的免疫缀合物，其中AA₁和AA₂独立地选自H、-CH₃、-CH(CH₃)₂、-CH₂(C₆H₅)、-CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂、-CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂、-CHCH(CH₃)CH₃、-CH₂SO₃H和-CH₂CH₂CH₂NHC(O)NH₂；或者AA₁和AA₂形成5元环脯氨酸氨基酸。

24. 如权利要求22所述的免疫缀合物，其中AA₁是-CH(CH₃)₂，且AA₂是-CH₂CH₂CH₂NHC(O)NH₂。

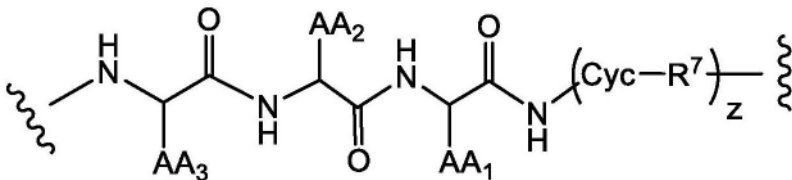
25. 如权利要求22所述的免疫缀合物，其中AA₁和AA₂独立地选自GlcNAc天冬氨酸、-CH₂SO₃H和-CH₂OPO₃H。

26. 如权利要求22所述的免疫缀合物，其中PEP具有下式：

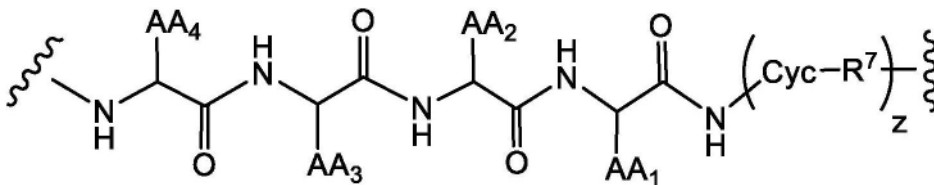


其中AA₁和AA₂独立地选自天然存在的氨基酸的侧链。

27. 如权利要求1和2中任一项所述的免疫缀合物，其中L包含PEP，并且PEP是三肽且具有下式：



28. 如权利要求1和2中任一项所述的免疫缀合物，其中L包含PEP，并且PEP是四肽且具有下式：



29. 如权利要求28所述的免疫缀合物，其中

AA₁选自由Abu、Ala和Val组成的组；

AA₂选自由Nle(O-Bzl)、Oic和Pro组成的组；

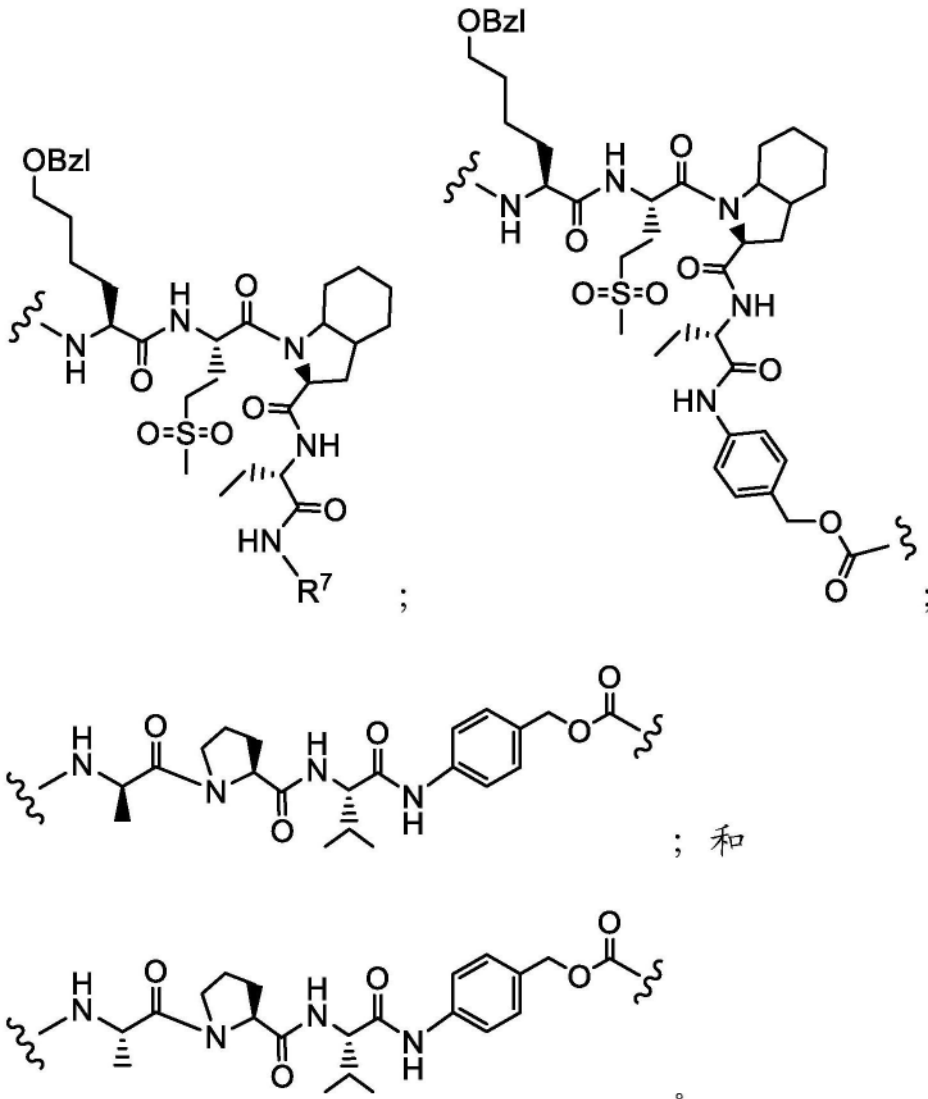
AA₃选自由Ala和Met(O)₂组成的组；且

AA₄选自由Oic、Arg(NO₂)、Bpa和Nle(O-Bzl)组成的组。

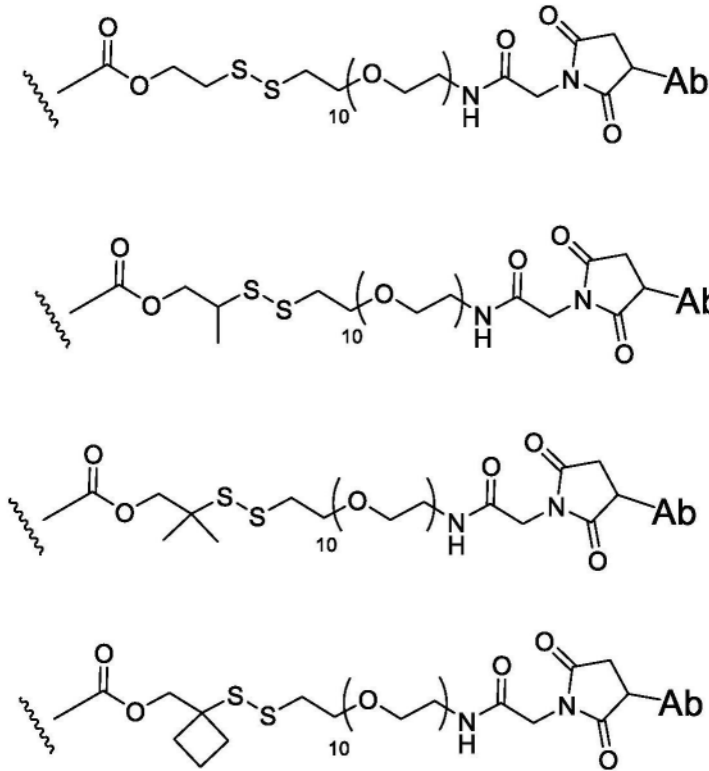
30. 如权利要求1和2中任一项所述的免疫缀合物，其中L包含PEP，且PEP选自由Ala-

Pro-Val、Asn-Pro-Val、Ala-Ala-Val、Ala-Ala-Pro-Ala、Ala-Ala-Pro-Val和Ala-Ala-Pro-Nva组成的组。

31. 如权利要求1和2中任一项所述的免疫缀合物,其中L包含PEP,且PEP选自以下结构:

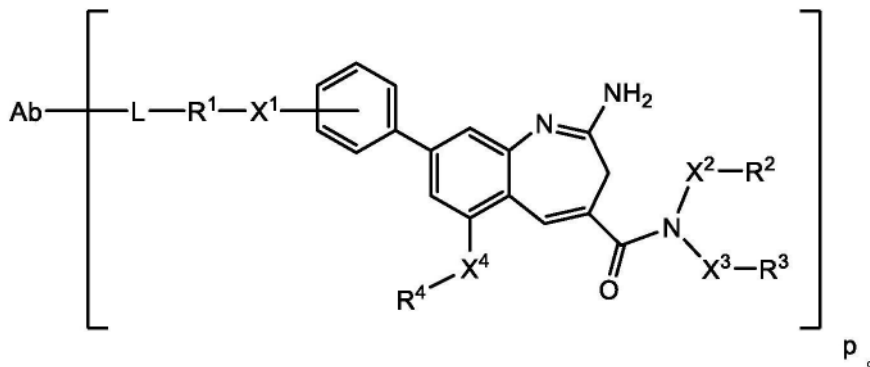


32. 如权利要求1和2中任一项所述的免疫缀合物,其中L选自以下结构:



其中所述波浪线指示与 R^5 的连接。

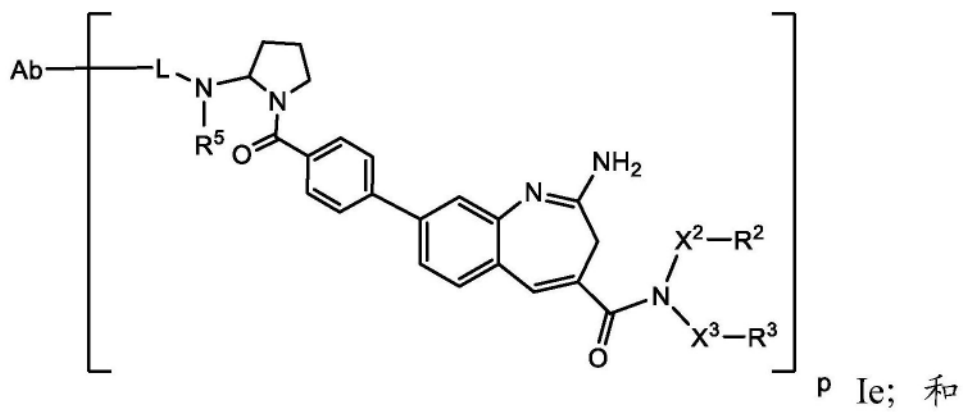
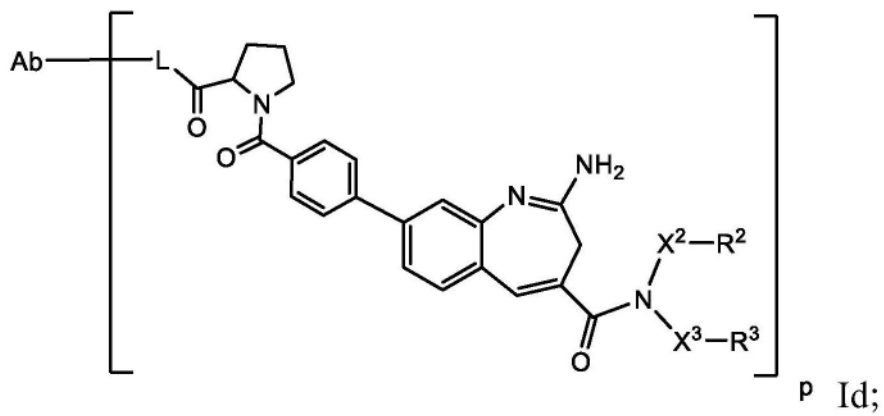
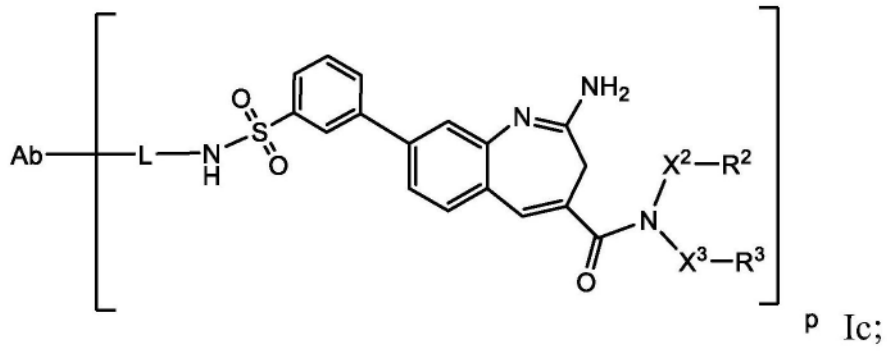
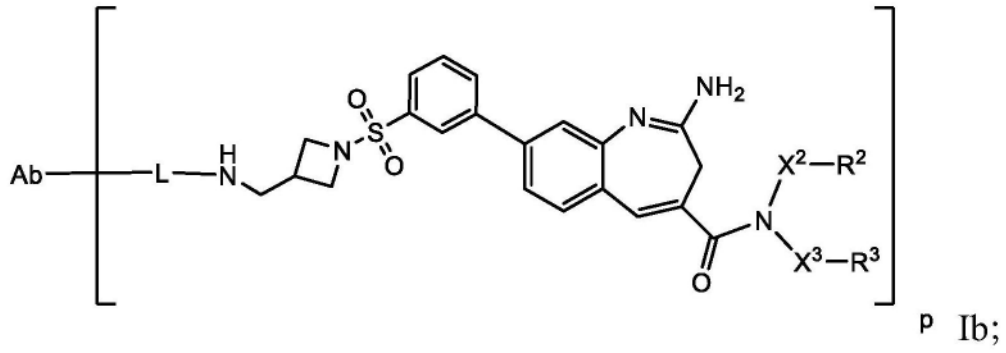
33. 如权利要求1和2中任一项所述的免疫缀合物,其具有式Ia:

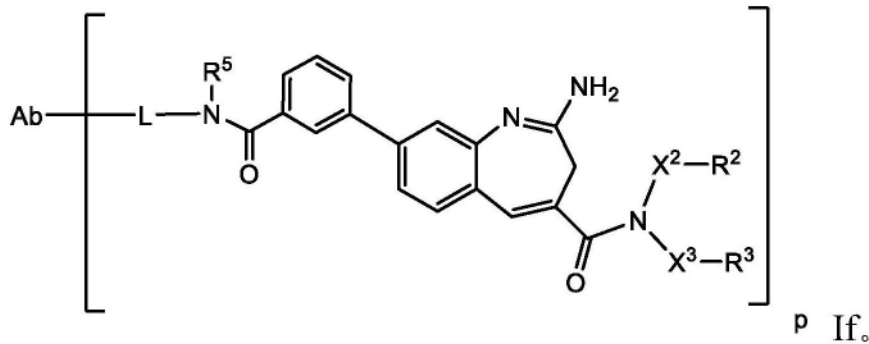


34. 如权利要求33所述的免疫缀合物,其中 X^4 是键,且 R^4 是H。

35. 如权利要求33所述的免疫缀合物,其中 X^2 和 X^3 各自是键,且 R^2 和 R^3 独立地选自 C_1-C_8 烷基、-O-(C_1-C_{12} 烷基)、-(C_1-C_{12} 烷基二基)- OR^5 、-(C_1-C_8 烷基二基)- $N(R^5)CO_2R^5$ 、-(C_1-C_{12} 烷基)- $OC(O)N(R^5)_2$ 、-O-(C_1-C_{12} 烷基)- $N(R^5)CO_2R^5$ 和-O-(C_1-C_{12} 烷基)- $OC(O)N(R^5)_2$ 。

36. 如权利要求33所述的免疫缀合物,其选自式Ib-I f:





37. 如权利要求36所述的免疫缀合物,其中 X^2 和 X^3 各自是键,且 R^2 和 R^3 独立地选自 C_1-C_8 烷基、 $-O-(C_1-C_{12})$ 烷基)、 $-(C_1-C_{12})$ 烷基二基)、 $-OR^5$ 、 $-(C_1-C_8)$ 烷基二基)、 $-N(R^5)CO_2R^5$ 和 $-O-(C_1-C_{12})$ 烷基)、 $-N(R^5)CO_2R^5$ 。

38. 如权利要求36所述的免疫缀合物,其中 X^2 和 X^3 各自是键, R^2 是 C_1-C_8 烷基,且 R^3 选自 $-O-(C_1-C_{12})$ 烷基)和 $-O-(C_1-C_{12})$ 烷基)、 $-N(R^5)CO_2R^5$ 。

39. 一种8-苯基-2-氨基苯并氮杂 草 -接头化合物,其选自表2a和2b。

40. 一种免疫缀合物,其通过将抗HER2抗体与选自表2的8-苯基-2-氨基苯并氮杂 草 -接头化合物缀合而制备。

41. 一种药物组合物,其包含治疗有效量的根据权利要求1和2中任一项所述的免疫缀合物和一种或多种药学上可接受的稀释剂、媒介物、载体或赋形剂。

42. 一种治疗癌症的方法,其包括对有需要的患者施用治疗有效量的根据权利要求1和2中任一项所述的免疫缀合物,其中所述癌症选自膀胱癌、泌尿道癌、尿路上皮癌、肺癌、非小细胞肺癌、默克尔细胞癌、结肠癌、结直肠癌、胃癌和乳腺癌。

43. 如权利要求42所述的方法,其中所述癌症对由TLR7和/或TLR8激动所诱导的促炎反应敏感。

44. 如权利要求42所述的方法,其中所述癌症是表达HER2的癌症。

45. 如权利要求42所述的方法,其中所述乳腺癌是三阴性乳腺癌。

46. 如权利要求42所述的方法,其中所述默克尔细胞癌癌症是转移性默克尔细胞癌。

47. 如权利要求42所述的方法,其中所述癌症是胃食管连接部腺癌。

48. 如权利要求42所述的方法,其中对所述患者静脉内、肿瘤内或皮下施用所述免疫缀合物。

49. 如权利要求42所述的方法,其中以约0.01至20mg/kg体重的剂量对所述患者施用所述免疫缀合物。

50. 根据权利要求1至40中任一项所述的免疫缀合物用于治疗癌症的用途,其中所述癌症选自宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、食管癌、膀胱癌、泌尿道癌、尿路上皮癌、肺癌、非小细胞肺癌、默克尔细胞癌、结肠癌、结直肠癌、胃癌和乳腺癌。

51. 一种制备如权利要求1所述的式I的免疫缀合物的方法,其中将如权利要求39所述的8-苯基-2-氨基-噻吩并氮杂 草 -接头化合物与所述抗HER2抗体缀合。

抗HER2免疫缀合物及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本非临时申请要求2020年12月11日提交的美国临时申请第63/124,421号的优先权的权益,该临时申请以引用的方式全文并入。

技术领域

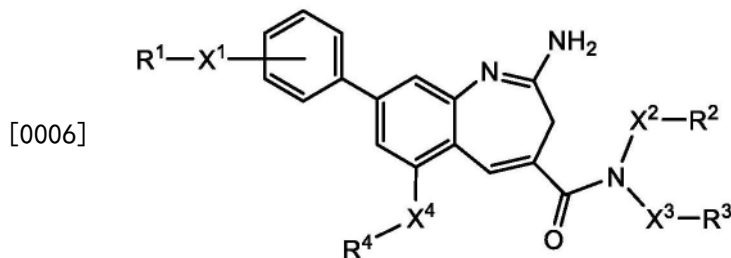
[0003] 本发明通常涉及包含与一个或多个8-苯基-2-氨基苯并氮杂 草 分子缀合的抗HER2抗体的免疫缀合物。

背景技术

[0004] 需要用于递送抗体和免疫佐剂的新组合物和方法,以便到达难以接近的肿瘤和/或扩展癌症患者及其他受试者的治疗选择。本发明提供这类组合物和方法。

发明内容

[0005] 本发明通常涉及包含通过与一种或多种8-苯基-2-氨基苯并氮杂 草 衍生物缀合而连接的抗HER2抗体的免疫缀合物。本发明进一步涉及包含反应性官能团的8-苯基-2-氨基苯并氮杂 草 衍生物中间体组合物。这类中间体组合物是用于形成免疫缀合物的合适底物,其中抗体可通过接头L与具有下式的8-Phe-2-氨基苯并氮杂 草 (PhBz) 部分共价结合:



[0007] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 中的一者连接于L。 R^{1-4} 和 X^{1-4} 取代基在本文中定义。

[0008] 本发明进一步涉及这类免疫缀合物在治疗特别是癌症的疾病中的用途。

[0009] 本发明的一个方面是包含与接头共价连接的抗HER2抗体的免疫缀合物,所述接头与一个或多个8-Phe-2-氨基苯并氮杂 草 部分共价连接。

[0010] 本发明的另一方面是8-苯基-2-氨基苯并氮杂 草 -接头化合物。

[0011] 本发明的另一方面是治疗癌症的方法,包括施用治疗有效量的免疫缀合物,所述免疫缀合物包含通过与一个或多个8-Phe-2-氨基苯并氮杂 草 部分缀合而连接的抗HER2抗体。

[0012] 本发明的另一方面是免疫缀合物用于治疗癌症的用途,所述免疫缀合物包含通过与一个或多个8-Phe-2-氨基苯并氮杂 草 部分缀合而连接的抗HER2抗体。

[0013] 本发明的另一方面是通过将一个或多个8-Phe-2-氨基苯并氮杂 草 部分与抗HER2抗体缀合来制备免疫缀合物的方法。

具体实施方式

[0014] 现在将详细参考本发明的某些实施方案,其实施例在所附的结构和化学式中说明。虽然将结合列举的实施方案描述本发明,但将要理解的是,它们并不旨在将本发明限于这些实施方案。相反,本发明旨在涵盖所有的替代、修改和等同方案,这些可以被包括在如权利要求所限定的本发明的范围内。

[0015] 本领域技术人员将会认识到,许多方法和材料类似或等同于本文描述的那些,它们可用于实施本发明。本发明决不限于所描述的方法和材料。

[0016] 定义

[0017] 术语“免疫缀合物”或“免疫刺激抗体缀合物”是指经由接头与佐剂部分共价键合的抗体构建体。术语“佐剂”是指能够在暴露于所述佐剂的受试者中引发免疫反应的物质。

[0018] “佐剂部分”是指例如通过如本文所述的接头与抗体构建体共价键合的佐剂。佐剂部分可以在与抗体构建体键合时或在对受试者施用免疫缀合物之后自抗体构建体切割(例如,酶促切割)后引发免疫反应。

[0019] “佐剂”是指能够在暴露于所述佐剂的受试者中引发免疫反应的物质。

[0020] 术语“To11样受体”和“TLR”是指高度保守的哺乳动物蛋白质家族的任何成员,其识别病原体相关的分子模式,并且充当先天免疫中的关键信号传导元件。TLR多肽共享特征结构,所述特征结构包括具有富亮氨酸重复序列的细胞外结构域、跨膜结构域和参与TLR信号传导的细胞内结构域。

[0021] 术语“To11样受体7”和“TLR7”是指与公众可获得的TLR7序列(例如,人TLR7多肽的GenBank登录号AAZ99026或鼠TLR7多肽的GenBank登录号AAK62676)共享至少约70%、约80%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更多序列同一性的核酸或多肽。

[0022] 术语“To11样受体8”和“TLR8”是指与公众可获得的TLR8序列(例如,人TLR8多肽的GenBank登录号AAZ95441或鼠TLR8多肽的GenBank登录号AAK62677)共享至少约70%、约80%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更多序列同一性的核酸或多肽。

[0023] “TLR激动剂”是直接或间接与TLR(例如,TLR7和/或TLR8)结合以诱导TLR信号传导的物质。TLR信号传导的任何可检测到的差异可指示激动剂刺激或激活TLR。信号传导差异可被表现为例如靶基因表达、信号转导部件的磷酸化、下游组分诸如核因子- κ B(NF- κ B)的细胞内定位、某些组分(诸如IL-1受体相关激酶(IRAK))与其他蛋白质或细胞内结构的缔合、或诸如激酶(诸如丝裂原活化蛋白激酶(MAPK))的组分的生化活性的变化。

[0024] “抗体”是指包含来自免疫球蛋白基因或其片段的抗原结合区(包括互补决定区(CDR))的多肽。术语“抗体”具体地涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和表现出所需生物活性的抗体片段。示例性免疫球蛋白(抗体)结构单元包含四聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链构成,每一对具有通过二硫键连接的一条“轻”(约25kDa)链和一条“重”链(约50-70kDa)。每条链由被称为免疫球蛋白结构域的结构域组成。这些结构域按大小和功能分为不同的类别,例如轻链和重链上的可变结构域或区域(分别为 V_L 和 V_H)和轻链和重链上的恒定结构域或区域(分别为 C_L 和 C_H)。每条链的N端界定了主要负责抗原识别的具有约100至110个或更多个氨基酸的可变区,所述可变区被称为互补位,即抗原结合结构域。轻链被分类为 κ 或 λ 。重链被分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,它们分别又定义了免疫球蛋白类别IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。IgG抗体是由四条肽链组成的

约150kDa的大分子。IgG抗体含有约50kDa的两条相同的 γ 类重链和约25kDa的两条相同的轻链,因此具有四聚体四级结构。两条重链彼此连接,并通各自通过二硫键与轻链连接。所得四聚体具有两个相同的半体,它们一起形成Y样形状。叉的每一端含有相同的抗原结合结构域。人有四个IgG亚类(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4),它们按在血清中的丰度顺序命名(即,IgG1是最丰度的)。通常,抗体的抗原结合结构域在与癌细胞结合的特异性和亲和力方面将最为关键。

[0025] “抗体构建体”是指包含(i)抗原结合结构域和(ii)Fc结构域的抗体或融合蛋白。

[0026] 在一些实施方案中,结合剂是抗原结合抗体“片段”,其是包含抗体的至少抗原结合区的构建体,单独或与一起构成抗原结合构建体的其它组分一起。许多不同类型的抗体“片段”是本领域中已知的,包括例如(i)Fab片段,其是由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 CH_1 结构域组成的单价片段,(ii) $F(ab')_2$ 片段,其是包含在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段,(iii)由抗体的单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的Fv片段,(iv)Fab'片段,其是采用温和还原条件破坏 $F(ab')_2$ 片段的二硫桥产生的,(v)二硫化物稳定的Fv片段(dsFv),和(vi)单链Fv(scFv),其是通过合成接头连接的Fv片段的两个结构域(即, V_L 和 V_H)组成的单价分子,所述合成接头使得两个结构域能够作为单个多肽链合成。

[0027] 抗体或抗体片段可以是更大构建体的一部分,例如抗体片段与另外的区域的缀合物或融合构建体。例如,在一些实施方案中,抗体片段可以与如本文所述的Fc区融合。在其它实施方案中,抗体片段(例如,Fab或scFv)可以是嵌合抗原受体或嵌合T细胞受体的一部分,例如通过与跨膜结构域(任选具有居间接头或“茎”(例如,铰链区))和任选的细胞间信号传导结构域融合。

[0028] “表位”意指与抗原结合结构域结合的抗原的任何抗原决定簇或表位决定簇(即,在抗原结合结构域的互补位)。抗原决定簇通常由分子的化学活性表面组群组成,如氨基酸或糖侧链,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。

[0029] 术语“Fc受体”或“FcR”是指与抗体的Fc区结合的受体。Fc受体主要有三类:(1)与IgG结合的 $Fc\gamma R$, (2)与IgA结合的 $Fc\alpha R$,和(3)与IgE结合的 $Fc\epsilon R$ 。 $Fc\gamma R$ 家族包括若干成员,如 $Fc\gamma I$ (CD64)、 $Fc\gamma RIIA$ (CD32A)、 $Fc\gamma RIIB$ (CD32B)、 $Fc\gamma RIIIA$ (CD16A)和 $Fc\gamma RIIIB$ (CD16B)。 $Fc\gamma$ 受体对IgG的亲和力不同,并且对IgG亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)也具有不同的亲和力。

[0030] 如本文所提到的核酸或氨基酸序列“同一性”可通过将所关注的核酸或氨基酸序列与参考核酸或氨基酸序列进行比较来确定。同一性百分比是与所关注的最佳比对的序列与参考序列之间相同(即,是同一)的核苷酸或氨基酸残基数除以最长序列的长度(即,所关注的序列或参考序列任一者的长度,以较长者为准)。可以使用可获得的软件程序进行序列的比对和同一性百分比的计算。这类程序的实例包括CLUSTAL-W、T-Coffee和ALIGN(用于核酸和氨基酸序列的比对)、BLAST程序(例如,BLAST 2.1、BL2SEQ、BLASTp、BLASTn等)和FASTA程序(例如,FASTA3x、FASTM和SSEARCH)(用于序列比对和序列相似性搜索)。序列比对算法还公开于例如以下文献中:Altschul等人,J.Molecular Biol.,215(3):403-410(1990);Beigert等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,106(10):3770-3775(2009);Durbin等人编著,Biological Sequence Analysis:Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids,Cambridge University Press,Cambridge,UK(2009);Soding,Bioinformatics,21

(7):951-960(2005);Altschul等人,Nucleic Acids Res.,25(17):3389-3402(1997);和Gusfield,Algorithms on Strings,Trees and Sequences,Cambridge University Press,Cambridge UK(1997)。序列的同一性百分比(%)也可以例如计算为 $100x[(\text{同一的位置})/\min(TG_A, TG_B)]$,其中 TG_A 和 TG_B 是在使 TG_A 和 TG_B 最小化的比对中肽序列A和B中的残基数和内部缺口位置的总和。参见例如Russell等人,J.Mol Biol.,244:332-350(1994)。

[0031] 结合剂包含一起形成抗原结合位点的Ig重链和轻链可变区多肽。重链和轻链可变区中的每一者为包含通过框架区连接的三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)。结合剂可以是本领域中已知的包含Ig重链和轻链的多种类型的结合剂中的任一种。例如,结合剂可以是抗体、抗原结合抗体“片段”或T细胞受体。

[0032] “生物仿制药”是指经批准的抗体构建体,其活性特性类似于例如HER2靶向抗体,如曲妥珠单抗(HERCEPTIN™,Genentech, Inc.)或帕妥珠单抗(PERJETA,Genentech, Inc.)。

[0033] “生物改良药”是指经批准的抗体构建体,其改善先前批准的抗体构建体,如拉贝珠单抗。生物改良药可具有优于先前批准的抗体构建体的一种或多种修饰(例如,改变的聚糖谱或独特的表位)。生物改良药是重组蛋白质药物,与现有的生物药品属于同一类,但并不完全相同;并且比原来的更优。生物改良药不仅仅是新药,也不是药物的仿制品。生物仿制药和生物改良药都是生物制品的变体;前者是原研药的近似复制品,而后者在功效、安全性和耐受性或给药方案方面有所改善。

[0034] “氨基酸”是指可以并入肽、多肽或蛋白质中的任何单体单元。氨基酸包括天然存在的 α -氨基酸及其立体异构体以及非天然(非天然存在的)氨基酸及其立体异构体。给定氨基酸的“立体异构体”是指具有相同分子式和分子内键但键和原子的三维排列不同的异构体(例如,L-氨基酸和相应的D-氨基酸)。氨基酸可以被糖基化(例如,N-连接的聚糖、O-连接的聚糖、磷酸聚糖、C-连接的聚糖或糖基磷脂酰肌醇化)或去糖基化。氨基酸在本文中可以用通常已知的三字母符号或由IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的单字母符号表示。

[0035] 天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些以及后来经修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。天然存在的 α -氨基酸包括但不限于丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、异亮氨酸(Ile)、精氨酸(Arg)、赖氨酸(Lys)、亮氨酸(Leu)、甲硫氨酸(Met)、天冬酰胺(Asn)、脯氨酸(Pro)、谷氨酰胺(Gln)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、缬氨酸(Val)、色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)及其组合。天然存在的 α -氨基酸的立体异构体包括但不限于D-丙氨酸(D-Ala)、D-半胱氨酸(D-Cys)、D-天冬氨酸(D-Asp)、D-谷氨酸(D-Glu)、D-苯丙氨酸(D-Phe)、D-组氨酸(D-His)、D-异亮氨酸(D-Ile)、D-精氨酸(D-Arg)、D-赖氨酸(D-Lys)、D-亮氨酸(D-Leu)、D-甲硫氨酸(D-Met)、D-天冬酰胺(D-Asn)、D-脯氨酸(D-Pro)、D-谷氨酰胺(D-Gln)、D-丝氨酸(D-Ser)、D-苏氨酸(D-Thr)、D-缬氨酸(D-Val)、D-色氨酸(D-Trp)、D-酪氨酸(D-Tyr)及其组合。

[0036] 天然存在的氨基酸包括通过翻译后修饰在蛋白质中形成的那些,如瓜氨酸(Cit)。


[0037] 非天然(非天然存在的)氨基酸包括但不限于以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的L-或D-构型的氨基酸类似物、氨基酸模拟物、合成氨基酸、N-取代的甘氨酸和N-甲基氨基酸。例如,“氨基酸类似物”可以是具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构(即,与氢键合的碳、羧基、氨基)但具有修饰的侧链基团或修饰的肽主链的非天然氨基酸,

例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷和甲硫氨酸甲基硫。“氨基酸模拟物”是指结构不同于氨基酸的一般化学结构、但以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的化学化合物。

[0038] “接头”是指将化合物或材料中的两个或更多个部分共价键合的官能团。例如,连接部分可用来将免疫缀合物中的佐剂部分与抗体构建体共价键合。

[0039] “连接部分”是指将化合物或材料中的两个或更多个部分共价键合的官能团。例如,连接部分可用来将免疫缀合物中的佐剂部分与抗体共价键合。用于将连接部分与蛋白质及其它材料连接的有用的键包括但不限于酰胺、胺、酯、氨基甲酸酯、脲、硫醚、硫代氨基甲酸酯、硫代碳酸酯和硫脲。

[0040] “二价”是指含有用于连接两个官能团的两个连接点的化学部分;多价连接部分可具有用于连接进一步的官能团的另外的连接点。二价基团可以用后缀“二基”表示。例如,二价连接部分包括二价聚合物部分如二价聚(乙二醇)、二价环烷基、二价杂环烷基、二价芳基和二价杂芳基。“二价环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基”是指具有用于共价连接分子或材料中的两个部分的两个连接点的环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基。环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基可以是取代的或未取代的。环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基可以被一个或多个选自卤代、羟基、氨基、烷基氨基、酰氨基、酰基、硝基、氰基和烷氧基的基团取代。

[0041] 波浪线(“”)代表指定化学部分的连接点。如果指定的化学部分有两条波浪线存在,则将要理解的是,所述化学部分可以双向使用,即从左到右或从右到左读取。

[0042] “烷基”是指具有指示的碳原子数的直链(线性)或支链饱和脂族基团。烷基可包括任何数目的碳,例如一至十二个。烷基的实例包括但不限于甲基(Me, $-\text{CH}_3$)、乙基(Et, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$)、1-丙基(n-Pr, 正丙基, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)、2-丙基(i-Pr, 异丙基, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、1-丁基(n-Bu, 正丁基, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)、2-甲基-1-丙基(i-Bu, 异丁基, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、2-丁基(s-Bu, 仲丁基, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$)、2-甲基-2-丙基(t-Bu, 叔丁基, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$)、1-戊基(正戊基, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)、2-戊基($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)、3-戊基($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$)、2-甲基-2-丁基($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)、3-甲基-2-丁基($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、3-甲基-1-丁基($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、2-甲基-1-丁基($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$)、1-己基($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)、2-己基($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)、3-己基($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)$)、2-甲基-2-戊基($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)、3-甲基-2-戊基($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$)、4-甲基-2-戊基($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、3-甲基-3-戊基($-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$)、2-甲基-3-戊基($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、2,3-二甲基-2-丁基($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、3,3-二甲基-2-丁基($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3$)、1-庚基、1-辛基等。烷基可以是取代的或未取代的。“取代的烷基”可以被一个或多个选自卤代、羟基、氨基、氧代(=O)、烷基氨基、酰氨基、酰基、硝基、氰基和烷氧基的基团取代。

[0043] 术语“烷基二基”是指二价烷基。烷基二基的实例包括但不限于亚甲基($-\text{CH}_2-$)、亚乙基($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$)、亚丙基($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$)等。烷基二基也可以被称为“亚烷基”。

[0044] “烯基”是指具有指示的碳原子数和至少一个碳-碳双键sp²的直链(线性)或支链不饱和脂族基团。烯基可包括两个至约12个或更多的碳原子。烯基是具有“顺式”和“反式”取向或替代而言“E”和“Z”取向的基团。实例包括但不限于乙烯基(ethylenyl/vinyl, $-\text{CH}=\text{CH}_2$)、烯丙基($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$)、丁烯基、戊烯基及其异构体。烯基可以是取代的或未取代的。“取代的烯基”可以被一个或多个选自卤代、羟基、氨基、氧代(=O)、烷基氨基、酰氨基、酰基、硝基、氰基和烷氧基的基团取代。

[0045] 术语“亚烯基”或“烯基二基”是指直链或支链二价烃基。实例包括但不限于亚乙烯基(ethylenylene/vinylene, $-\text{CH}=\text{CH}-$)、烯丙基($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$)等。

[0046] “炔基”是指具有指示的碳原子数和至少一个碳-碳三键 sp 的直链(线性)或支链不饱和脂族基团。炔基可包括两个至约12个或更多的碳原子。例如, C_2 - C_6 炔基包括但不限于乙炔基($-\text{C}\equiv\text{CH}$)、丙炔基(炔丙基, $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$)、丁炔基、戊炔基、己炔基及其异构体。炔基可以是取代的或未取代的。“取代的炔基”可以被一个或多个选自卤代、羟基、氨基、氧代($=\text{O}$)、烷基氨基、酰氨基、酰基、硝基、氰基和烷氧基的基团取代。

[0047] 术语“亚炔基”或“炔基二基”是指二价炔基。

[0048] 术语“碳环”、“碳环基”、“碳环状环”和“环烷基”是指含有3至12个环原子或指示的原子数的饱和或部分不饱和、单环、稠合双环或桥接的多环状环组合。饱和单环碳环状环包括例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基和环辛基。饱和双环和多环碳环状环包括例如降冰片烷、[2.2.2]双环辛烷、十氢萘和金刚烷。碳环基团也可以是部分不饱和的,在环中具有一个或多个双键或三键。部分不饱和的代表性碳环基团包括但不限于环丁烯、环戊烯、环己烯、环己二烯(1,3-和1,4-异构体)、环庚烯、环庚二烯、环辛烯、环辛二烯(1,3-、1,4-和1,5-异构体)、降冰片烯和降冰片二烯。

[0049] 术语“环烷基二基”是指二价环烷基。

[0050] “芳基”是指通过从母体芳族环体系的单个碳原子上移除一个氢原子得到的6-20个碳原子(C_6 - C_{20})的一价芳族烃基。芳基基团可以是单环的,稠合以形成双环或三环基团,或通过键连接以形成联芳基基团。代表性的芳基包括苯基、萘基和联苯基。其它芳基包括具有亚甲基连接基团的苄基。一些芳基具有6至12个环成员,如苯基、萘基或联苯基。其它芳基具有6至10个环成员,如苯基或萘基。

[0051] 术语“亚芳基”或“芳基二基”意指通过从母体芳族环体系的两个碳原子上移除两个氢原子得到的6-20个碳原子(C_6 - C_{20})的二价芳族烃基。一些芳基二基在示例性结构中表示为“Ar”。芳基二基包括包含与饱和、部分不饱和的环或芳族碳环状环稠合的芳族环的双环基团。典型的芳基二基包括但不限于衍生自苯(苯基二基)、取代的苯、萘、蒽、亚联苯基、亚茛基、亚茛满基、1,2-二氢萘、1,2,3,4-四氢萘基等的基团。芳基二基也被称为“亚芳基”,并且任选被一个或多个本文所述的取代基取代。

[0052] 术语“杂环”、“杂环基”和“杂环状环”在本文中可互换使用,并且是指3至约20个环原子的饱和或部分不饱和(即,在环内具有一个或多个双键和/或三键)碳环基团,其中至少一个环原子是选自氮、氧、磷和硫的杂原子,剩余的环原子是C,其中一个或多个环原子任选独立地被一个或多个下述取代基取代。杂环可以是具有3至7个环成员(2至6个碳原子和1至4个选自N、O、P和S的杂原子)的单环或具有7至10个环成员(4至9个碳原子和1至6个选自N、O、P和S的杂原子)的双环,例如:双环[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]体系。以下文献中描述了杂环:Paquette, Leo A.; “Principles of Modern Heterocyclic Chemistry” (W.A. Benjamin, New York, 1968), 特别是第1、3、4、6、7和9章; “The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs” (John Wiley & Sons, New York, 1950年至今), 特别是第13、14、16、19和28卷; 和 J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566。“杂环基”还包括其中杂环基团与饱和、部分不饱和的环或芳族碳环或杂环状环稠合的基团。杂环状环的实例包括但不限于吗啉-4-基、哌啶-1-基、哌嗪基、哌嗪-4-基-2-酮、哌嗪-4-基-3-酮、吡咯

烷-1-基、硫代吗啉-4-基、S-二氧化硫代吗啉-4-基、氮杂环辛烷-1-基、氮杂环丁烷-1-基、八氢吡啶并[1,2-a]吡嗪-2-基、[1,4]二氮杂环庚烷-1-基、吡咯烷基、四氢呋喃基、二氢呋喃基、四氢噻吩基、四氢吡喃基、二氢吡喃基、四氢噻喃基、哌啶子基、吗啉代、硫代吗啉代、噻噁烷基、高哌嗪基、氮杂环丁烷基、氧杂环丁烷基、硫杂环丁烷基、高哌啶基、氧杂环庚烷基、硫杂环庚烷基、氧氮杂^草基、二氮杂^草基、硫氮杂^草基、2-吡咯啉基、3-吡咯啉基、吲哚啉基、2H-吡喃基、4H-吡喃基、二噁烷基、1,3-二氧戊环基、吡啶啉基、二噻烷基、二硫戊环基、二氢吡喃基、二氢噻吩基、二氢呋喃基、吡啶啉基咪啶啉基、咪啶啉基、3-氮杂双环[3.1.0]己烷基、3-氮杂双环[4.1.0]庚烷基、氮杂双环[2.2.2]己烷基、3H-吲哚基喹啉基和N-吡啶基脒。螺杂环基部分也包括在此定义的范围。螺杂环基部分的实例包括氮杂螺[2.5]辛烷基和氮杂螺[2.4]庚烷基。其中2个环原子被氧代(=O)部分取代的杂环基团的实例有嘧啶酮基和1,1-二氧化-硫代吗啉基。本文的杂环基团任选独立地被一个或多个本文所述的取代基取代。

[0053] 术语“杂环基二基”是指3至约20个环原子的二价饱和或部分不饱和(即在环内具有一个或多个双键和/或三键)碳环基团,其中至少一个环原子是选自氮、氧、磷和硫的杂原子,剩余的环原子是C,其中一个或多个环原子任选独立地被一个或多个如所述的取代基取代。5元和6元杂环基二基的实例包括吗啉基二基、哌啶基二基、哌嗪基二基、吡咯烷基二基、二噁烷基二基、硫代吗啉基二基和S-二氧化硫代吗啉基二基。

[0054] 术语“杂芳基”是指5、6或7元环的单价芳族基团,并且包括5-20个原子的稠环体系(其中的至少一个是芳族的),含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子。杂芳基的实例有吡啶基(包括例如2-羟基吡啶基)、咪唑基、咪唑并吡啶基、嘧啶基(包括例如4-羟基嘧啶基)、吡啶基、三唑基、吡嗪基、四唑基、呋喃基、噻吩基、异噻唑基、噻唑基、噁二唑基、噁唑基、异噻唑基、吡咯基、喹啉基、异喹啉基、四氢异喹啉基、吲哚基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、噌啉基、吲唑基、吲嗪基、酞嗪基、哒嗪基、三嗪基、异吲哚基、蝶啶基、嘌呤基、噁二唑基、噻二唑基、咪唑基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、喹啉基、喹啉基、萘啶基和呋喃并吡啶基。杂芳基任选独立地被一个或多个本文所述的取代基取代。

[0055] 术语“杂芳基二基”是指5、6或7元环的二价芳族基团,并且包括5-20个原子的稠环体系(其中的至少一个是芳族的),含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子。5元和6元杂芳基二基的实例包括吡啶基二基、咪唑基二基、嘧啶基二基、吡啶基二基、三唑基二基、吡嗪基二基、四唑基二基、呋喃基二基、噻吩基二基、异噻唑基二基、噻唑基二基、噁二唑基二基、噁唑基二基、异噻唑基二基和吡咯基二基。

[0056] 杂环或杂芳基在可能的情况下可以是碳(碳连接)或氮(氮连接)键合的。举例而非限制,碳键合的杂环或杂芳基键合在吡啶的2、3、4、5或6位;哒嗪的3、4、5或6位;嘧啶的2、4、5或6位;吡嗪的2、3、5或6位;呋喃、四氢呋喃、硫代呋喃、噻吩、吡咯或四氢吡咯的2、3、4或5位;噁唑、咪唑或噻唑的2、4或5位;异噻唑、吡啶或异噻唑的3、4或5位;氮丙啶的2或3位;氮杂环丁烷的2、3或4位;喹啉的2、3、4、5、6、7或8位;或异喹啉的1、3、4、5、6、7或8位。

[0057] 举例而非限制,氮键合的杂环或杂芳基键合在氮丙啶、氮杂环丁烷、吡咯、吡咯烷、2-吡咯啉、3-吡咯啉、咪唑、咪唑烷、2-咪唑啉、3-咪唑啉、吡啶、吡啶啉、2-吡啶啉、3-吡啶啉、哌啶、哌嗪、吲哚、吲哚啉、1H-吲唑的1位;异吲哚或异吲哚啉的2位;吗啉的4位;和咪唑

或β-咪啉的9位。

[0058] 术语“卤代”和“卤素”本身或作为另一取代基的一部分是指氟、氯、溴或碘原子。

[0059] 术语“羰基”本身或作为另一取代基的一部分是指C(=O)或-C(=O)-,即碳原子与氧双键键合,并与具有羰基的部分中的两个其它基团结合。

[0060] 如本文所用,短语“季铵盐”是指已被烷基取代基(例如,C₁-C₄烷基,如甲基、乙基、丙基或丁基)季铵化的叔胺。

[0061] 术语“治疗(treat/treatment/treating)”是指成功治疗或改善损伤、病理、疾患(例如,癌症)或症状(例如,认知障碍)的任何标志,包括任何客观或主观参数,如减轻;缓解;减少症状或使患者更容易忍受症状、损伤、病理或疾患;降低症状进展的速率;减少症状或疾患的频率或持续时间;或者在一些情况下预防症状发作。症状的治疗或改善可基于任何客观或主观参数,包括例如身体检查的结果。

[0062] 术语“癌症”、“赘生物”和“肿瘤”在本文中用于指这样的细胞,其表现出自主的、不受调控的生长,使得细胞表现出以细胞增殖显著失控为特征的异常生长表型。在本发明的上下文中用于检测、分析和/或治疗的所关注的细胞包括癌细胞(例如,来自患有癌症的个体的癌细胞)、恶性癌细胞、转移前癌细胞、转移性癌细胞和非转移性癌细胞。几乎每种组织的癌症都是已知的。短语“癌症负担”是指受试者体内的癌细胞数量或癌症体积。减少癌症负担相应地是指减少受试者体内的癌细胞数量或癌细胞体积。如本文所用的术语“癌细胞”是指癌细胞(例如,来自个体可以被治疗的任何癌症,例如分离自患有癌症的个体)或来源于癌细胞(例如,癌细胞的克隆)的任何细胞。例如,癌细胞可来自已确立的癌细胞系,可以是分离自患有癌症的个体的原代细胞,可以是来自分离自患有癌症的个体的原代细胞的子代细胞等。在一些实施方案中,该术语也可以指癌细胞的一部分,如癌细胞的亚细胞部分、细胞膜部分或细胞裂解物。许多类型的癌症是本领域技术人员已知的,包括实体肿瘤如癌、肉瘤、成胶质细胞瘤、黑素瘤、淋巴瘤和骨髓瘤,以及循环癌如白血病。

[0063] 如本文所用,术语“癌症”包括任何形式的癌症,包括但不限于实体肿瘤癌症(例如,皮肤癌、肺癌、前列腺癌、乳腺癌、胃癌、膀胱癌、结肠癌、卵巢癌、胰腺癌、肾癌、肝癌、成胶质细胞瘤、髓母细胞瘤、平滑肌肉瘤、头颈部鳞状细胞瘤、黑素瘤和神经内分泌癌)和液体癌(例如,血液学癌症);癌;软组织肿瘤;肉瘤;畸胎瘤;黑素瘤;白血病;淋巴瘤;和脑癌,包括微小残留病,并且包括原发性肿瘤和转移性肿瘤两者。

[0064] 癌症的“病理学”包括损害患者健康的所有现象。这包括但不限于异常或不可控的细胞生长、转移、干扰邻近细胞的正常功能、以异常水平释放细胞因子或其他分泌产物、抑制或加重炎症或免疫应答、瘤形成、癌前病变、恶性肿瘤,以及侵袭周围或远处的组织或器官,诸如淋巴结。

[0065] 如本文所用,短语“癌症复发”和“肿瘤复发”及其语法变型是指肿瘤或癌细胞在癌症诊断后的进一步生长。特别地,当在癌组织中发生进一步的癌细胞生长时,可能发生了复发。类似地,“肿瘤扩散”发生在肿瘤细胞散布到局部或远端组织和器官中时,因此,肿瘤扩散涵盖肿瘤转移。当肿瘤生长局部向外扩散以通过压迫、破坏或阻止正常器官功能而损害所涉及的组织的功能时,就发生了“肿瘤侵袭”。

[0066] 如本文所用,术语“转移”是指癌性肿瘤在器官或身体部位中的生长,其与原始癌性肿瘤的器官没有直接联系。转移将被理解为包括微转移,其是在与原始癌性肿瘤的器官

没有直接联系的器官或身体部位中存在不可检测量的癌细胞。转移也可以被定义为过程的若干步骤,如癌细胞从原始肿瘤部位离开,以及癌细胞迁移和/或侵入身体的其它部位。

[0067] 短语“有效量”和“治疗有效量”是指诸如免疫缀合物的物质产生施用的治疗效果的剂量或量。确切的剂量将取决于治疗的目的,并且将可由本领域技术人员采用已知的技术确定(参见例如,Lieberman,Pharmaceutical Dosage Forms(第1-3卷,1992);Lloyd,The Art,Science and Technology of Pharmaceutical Compounding(1999);Pichkar,Dosage Calculations(1999);Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,第11版(McGraw-Hill,2006);和Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第22版,(Pharmaceutical Press,London,2012))。在癌症的情况下,治疗有效量的免疫缀合物可减少癌细胞的数量;缩小肿瘤尺寸;抑制(即,在一定程度上减缓且优选停止)癌细胞向外周器官的浸润;抑制(即,在一定程度上减缓且优选停止)肿瘤转移;在一定程度上抑制肿瘤生长;和/或在一定程度上缓解与癌症相关的一种或多种症状。到免疫缀合物可阻止生长和/或杀死现有癌细胞的程度,所述免疫缀合物可能是细胞抑制的和/或细胞毒性的。对于癌症治疗来说,功效可以例如通过评估疾病进展时间(TTP)和/或确定反应速率(response rate,RR)来测量。

[0068] “接受者”、“个体”、“受试者”、“宿主”和“患者”可互换使用并且是指希望诊断、治疗或疗法的任何哺乳动物受试者(例如,人)。用于治疗目的的“哺乳动物”是指被归类为哺乳动物的任何动物,包括人、家养动物和农场动物以及动物园动物、赛场动物或宠物动物,如狗、马、猫、母牛、绵羊、山羊、猪、骆驼等。在某些实施方案中,哺乳动物是人。

[0069] 本发明的上下文中的短语“协同佐剂”或“协同组合”包括两种免疫调节剂的组合,如受体激动剂、细胞因子和佐剂多肽,其组合相对于任一者的单独施用引发免疫的协同效应。特别地,本文公开的免疫缀合物包含要求保护的佐剂和抗体构建体的协同组合。这些协同组合在施用后引发更大的免疫效应,例如相对于不存在其它部分的情况下施用抗体构建体或佐剂。进一步地,与单独施用抗体构建体或佐剂时相比,可以施用的免疫缀合物的量减少(如通过作为免疫缀合物的一部分施用的抗体构建体的总数量或佐剂的总数量来测量)。

[0070] 如本文所用,术语“施用”是指对受试者进行肠胃外、静脉内、腹膜内、肌内、肿瘤内、病灶内、鼻内或皮下施用、口服施用、作为栓剂施用、局部接触、鞘内施用或植入缓释装置,例如微型渗透泵。

[0071] 如本文用于修饰数值的术语“约”和“大约”表示围绕该数值的紧密范围。因此,如果“X”是所述值,则“约X”或“大约X”表示 $0.9X$ 至 $1.1X$ 的值,例如 $0.95X$ 至 $1.05X$ 或 $0.99X$ 至 $1.01X$ 。提到“约X”或“大约X”具体表示至少值 X 、 $0.95X$ 、 $0.96X$ 、 $0.97X$ 、 $0.98X$ 、 $0.99X$ 、 $1.01X$ 、 $1.02X$ 、 $1.03X$ 、 $1.04X$ 和 $1.05X$ 。因此,“约X”和“大约X”旨在教导和提供对权利要求限制(例如“ $0.98X$ ”)的书面描述支持。

[0072] HER2抗体

[0073] 本发明的免疫缀合物包含抗体构建体,所述抗体构建体包含特异性识别和结合HER2的抗原结合结构域。

[0074] 在某些实施方案中,本发明的免疫缀合物包含抗HER2抗体。在本发明的一个实施方案中,本发明的免疫缀合物的抗HER2抗体包括人源化抗HER2抗体,例如huMAb4D5-1、huMAb4D5-2、huMAb4D5-3、huMAb4D5-4、huMAb4D5-5、huMAb4D5-6、huMAb4D5-7和huMAb4D5-

8,如在US 5821337的表3中所述,该专利以引用的方式具体并入本文。这些抗体含有人框架区和与HER2结合的鼠抗体(4D5)的互补决定区。人源化抗体huMAb4D5-8也称为曲妥珠单抗,其以商品名HERCEPTIN™(Genentech, Inc.)商购可得。

[0075] 曲妥珠单抗(CAS180288-69-1, **HERCEPTIN®**, huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Genentech)是一种重组DNA来源的IgG1 κ 单克隆抗体,其是鼠抗HER2抗体(4D5)的人源化形式,在基于细胞的测定中以高亲和力(Kd=5nM)与HER2的细胞外结构域选择性结合(US 5677171;US 5821337;US 6054297;US 6165464;US 6339142;US 6407213;US 6639055;US 6719971;US 6800738;US 7074404;Coussens等人,(1985)Science 230:1132-9;Slamon等人,(1989)Science 244:707-12;Slamon等人,(2001)New Engl. J. Med. 344:783-792)。

[0076] 在本发明的实施方案中,抗体构建体或抗原结合结构域包含曲妥珠单抗的CDR区。在本发明的实施方案中,抗HER2抗体还包含曲妥珠单抗的框架区。在本发明的实施方案中,抗HER2抗体还包含曲妥珠单抗的一个或两个可变区。

[0077] 在本发明的另一实施方案中,本发明的免疫缀合物的抗HER2抗体包括人源化抗HER2抗体,例如人源化2C4,如US 7862817中所述。示例性人源化2C4抗体有帕妥珠单抗(CAS登记号380610-27-5)、PERJETA™(Genentech, Inc.)。帕妥珠单抗是一种HER二聚化抑制剂(HDI),并且用于抑制HER2与其它HER受体(如EGFR/HER1、HER2、HER3和HER4)形成活性异二聚体或同二聚体的能力。参见例如Harari和Yarden, Oncogene 19:6102-14(2000);Yarden和Sliwkowski. Nat Rev Mol Cell Biol 2:127-37(2001);Sliwkowski Nat Struct Biol 10:158-9(2003);Cho等人, Nature 421:756-60(2003);和Malik等人, Pro Am Soc Cancer Res 44:176-7(2003)。PERJETA™被批准用于治疗乳腺癌。

[0078] 在本发明的实施方案中,抗体构建体或抗原结合结构域包含帕妥珠单抗的CDR区。在本发明的实施方案中,抗HER2抗体还包含帕妥珠单抗的框架区。在本发明的实施方案中,抗HER2抗体还包含帕妥珠单抗的一个或两个可变区。

[0079] 本发明的免疫缀合物包含靶向、结合或识别HER2的抗体。本发明的实施方案的范围内包括本文所述的抗体构建体或抗原结合结构域的功能变体。如本文所用的术语“功能变体”是指具有与亲本抗体构建体或抗原结合结构域具有实质或显著序列同一性或相似性的抗原结合结构域的抗体构建体,所述功能性变体保留了其为变体的抗体构建体或抗原结合结构域的生物活性。功能变体涵盖例如本文所述的抗体构建体或抗原结合结构域(亲本抗体构建体或抗原结合结构域)的那些变体,其以与亲本抗体构建体或抗原结合结构域相似的程度、相同的程度或更高的程度保留了识别表达HER2的靶细胞的能力。

[0080] 关于抗体构建体或抗原结合结构域,功能变体与所述抗体构建体或抗原结合结构域在氨基酸序列上可以例如是至少约30%、约50%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更多同一的。

[0081] 功能变体可例如包含具有至少一个保守氨基酸取代的亲本抗体构建体或抗原结合结构域的氨基酸序列。替代地或另外地,功能变体可包含具有至少一个非保守氨基酸取代的亲本抗体构建体或抗原结合结构域的氨基酸序列。在这种情况下,优选非保守氨基酸取代不干扰或抑制功能变体的生物活性。非保守氨基酸取代可增强功能变体的生物活性,使得功能变体的生物活性与亲本抗体构建体或抗原结合结构域相比增加。

[0082] 包含本发明的免疫缀合物的抗体包括Fc工程化变体。在一些实施方案中,Fc区中

导致与一种或多种Fc受体的结合受到调节的突变可包括以下突变中的一者或多者:SD (S239D)、SDIE (S239D/I332E)、SE (S267E)、SELF (S267E/L328F)、SDIE (S239D/I332E)、SDIEAL (S239D/I332E/A330L)、GA (G236A)、ALIE (A330L/I332E)、GASD ALIE (G236A/S239D/A330L/I332E)、V9 (G237D/P238D/P271G/A330R) 和V11 (G237D/P238D/H268D/P271G/A330R), 和/或在以下氨基酸处的一个或多个突变:E345R、E233、G237、P238、H268、P271、L328和A330。用于调节Fc受体结合的另外的Fc区修饰描述于例如美国专利申请公布2016/0145350以及美国专利7,416,726和5,624,821,上述专利文献特此以全文引用的方式并入本文。

[0083] 包含本发明的免疫缀合物的抗体包括聚糖变体,如无岩藻糖基化。在一些实施方案中,结合剂的Fc区被修饰成与天然未修饰的Fc区相比具有改变的Fc区糖基化模式。

[0084] 本发明的抗体构建体或抗原结合结构域的氨基酸取代优选为保守氨基酸取代。保守氨基酸取代是本领域中已知的,并且包括这样的氨基酸取代,在所述氨基酸取代中一种具有一定的物理和/或化学性质的氨基酸被交换为具有相同或相似化学或物理性质的另一种氨基酸。例如,保守氨基酸取代可以是酸性/带负电荷的极性氨基酸取代为另一种酸性/带负电荷的极性氨基酸(例如,Asp或Glu)、具有非极性侧链的氨基酸取代为另一种具有非极性侧链的氨基酸(例如,Ala、Gly、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Cys、Val等)、碱性/带正电荷的极性氨基酸取代为另一种碱性/带正电荷的极性氨基酸(例如,Lys、His、Arg等)、具有极性侧链的不带电荷的氨基酸取代为另一种具有极性侧链的不带电荷的氨基酸(例如,Asn、Gln、Ser、Thr、Tyr等)、具有 β -支链侧链的氨基酸取代为另一种具有 β -支链侧链的氨基酸(例如,Ile、Thr和Val)、具有芳族侧链的氨基酸取代为另一种具有芳族侧链的氨基酸(例如,His、Phe、Trp和Tyr)等。

[0085] 抗体构建体或抗原结合结构域可基本上由本文所述的一个或多个指定氨基酸序列组成,使得其它组分(例如,其它氨基酸)不实质性改变抗体构建体或抗原结合结构域功能变体的生物活性。

[0086] 在一些实施方案中,免疫缀合物中的抗体含有修饰的Fc区,其中所述修饰调节Fc区与一种或多种Fc受体的结合。

[0087] 在一些实施方案中,免疫缀合物中的抗体(例如,与至少两个佐剂部分缀合的抗体)在Fc区含有一个或多个修饰(例如,氨基酸插入、缺失和/或取代),与Fc区中缺乏突变的天然抗体相比,所述一个或多个修饰导致与一种或多种Fc受体(例如,Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIA (CD32A)、Fc γ RIIB (CD32B)、Fc γ RIIIA (CD16a) 和/或Fc γ RIIIB (CD16b))的结合受到调节(例如,增加的结合或减少的结合)。在一些实施方案中,免疫缀合物中的抗体在Fc区含有减少抗体的Fc区与Fc γ RIIB的结合的一个或多个修饰(例如,氨基酸插入、缺失和/或取代)。在一些实施方案中,免疫缀合物中的抗体在抗体的Fc区中含有一个或多个修饰(例如,氨基酸插入、缺失和/或取代),其减少抗体与Fc γ RIIB的结合,同时与在Fc区中缺乏突变的天然抗体相比维持与Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIA (CD32A) 和/或Fc γ RIIIA (CD16a)相同的结合或与之结合增加。在一些实施方案中,免疫缀合物中的抗体在Fc区中含有增加抗体的Fc区与Fc γ RIIB的结合的一个或多个修饰。

[0088] 在一些实施方案中,通过抗体的Fc区中相对于抗体的天然Fc区的突变提供受调节的结合。突变可以在CH2结构域、CH3结构域或其组合中。“天然Fc区”与“野生型Fc区”同义,并且包含与见于自然界中的Fc区的氨基酸序列同一或与见于天然抗体(例如,西妥昔单抗)

中的Fc区的氨基酸序列同一的氨基酸序列。天然序列人Fc区包括天然序列人IgG1 Fc区、天然序列人IgG2 Fc区、天然序列人IgG3 Fc区和天然序列人IgG4 Fc区以及其天然存在的变体。天然序列Fc包括Fc的各种同种异型(Jefferis等人, (2009)mAbs, 1(4):332-338)。

[0089] 在一些实施方案中, Fc区中导致与一种或多种Fc受体的结合受到调节的突变可包括以下突变中的一者或多者: SD (S239D)、SDIE (S239D/I332E)、SE (S267E)、SELF (S267E/L328F)、SDIE (S239D/I332E)、SDIEAL (S239D/I332E/A330L)、GA (G236A)、ALIE (A330L/I332E)、GASDALIE (G236A/S239D/A330L/I332E)、V9 (G237D/P238D/P271G/A330R), and V11 (G237D/P238D/H268D/P271G/A330R), 和/或在以下氨基酸处的一个或多个突变: E233、G237、P238、H268、P271、L328和A330。用于调节Fc受体结合的另外的Fc区修饰描述于例如US2016/0145350以及US 7416726和US 5624821中, 上述专利文献特此以引用的方式全文并入。

[0090] 在一些实施方案中, 免疫缀合物的抗体的Fc区被修饰以具有与天然未修饰的Fc区相比改变的Fc区糖基化模式。

[0091] 人免疫球蛋白在每条重链的C γ 2结构域中的Asn297残基处被糖基化。这种N-连接的寡糖由核心七糖N-乙酰葡萄糖胺4甘露糖3 (G1cNAc4Man3) 组成。已知用内切糖苷酶或PNG酶F移除七糖导致抗体Fc区的构象变化, 这可显著降低与激活Fc γ R的抗体结合亲和力, 并导致效应子功能降低。核心七糖通常用半乳糖、二等分G1cNAc、岩藻糖或唾液酸修饰, 这会有差别地影响Fc与激活和抑制性Fc γ R的结合。另外, 已证明 α 2,6-唾液酸化增强体内抗炎活性, 而去岩藻糖基化导致Fc γ RIIIa结合改善, 并使抗体依赖性细胞毒性和抗体依赖性吞噬作用增加10倍。因此, 特定的糖基化模式可用于控制炎症性效应子功能。

[0092] 在一些实施方案中, 改变糖基化模式的修饰是突变。例如, 在Asn297处的取代。在一些实施方案中, Asn297突变为谷氨酰胺 (N297Q)。例如, 在美国专利7,416,726和美国专利申请公开2007/0014795和2008/0286819中描述了用调节经Fc γ R调控的信号传导的抗体控制免疫应答的方法, 这些专利的全部内容据此以引用方式并入。

[0093] 在一些实施方案中, 免疫缀合物的抗体被修饰成以非天然存在的糖基化模式含有工程化Fab区。例如, 可以对杂交瘤进行基因工程化以分泌具有特定突变的无岩藻糖基化mAb、去唾液酸化mAb或去糖基化Fc, 所述特定突变使得能够增加FcR γ IIIa结合和效应子功能。在一些实施方案中, 免疫缀合物的抗体被工程化为无岩藻糖基化的。

[0094] 在一些实施方案中, 免疫缀合物中的抗体的整个Fc区与不同的Fc区交换, 从而使抗体的Fab区与非天然Fc区缀合。在一些实施方案中, 具有非天然Fc结构域的Fc修饰的抗体还包含一个或多个氨基酸修饰, 如IgG4 Fc内的S228P突变, 其调节所述Fc结构域的稳定性和。在一些实施方案中, 具有非天然Fc结构域的Fc修饰的抗体还包含一个或多个本文所述的调节Fc与FcR结合的氨基酸修饰。

[0095] 在一些实施方案中, 当与天然未修饰的抗体相比时, 调节Fc区与FcR结合的修饰不改变抗体的Fab区与其抗原的结合。在其它实施方案中, 当与天然未修饰的抗体相比时, 调节Fc区与FcR结合的修饰还增加抗体的Fab区与其抗原的结合。

[0096] 在一些实施方案中, 免疫缀合物中的抗体是糖基化的。

[0097] 在一些实施方案中, 免疫缀合物中的抗体是半胱氨酸工程化抗体, 其通过在工程化半胱氨酸可用于缀合的位点处的半胱氨酸取代来提供佐剂、标记或药物部分与抗体的位

点特异性缀合,但不扰乱免疫球蛋白折叠和组装或改变抗原结合及效应子功能(Junutula等人,2008b Nature Biotech.,26(8):925-932;Dornan等人,(2009)Blood114(13):2721-2729;US 7521541;US 7723485;US2012/0121615;WO 2009/052249)。“半胱氨酸工程化抗体”或“半胱氨酸工程化抗体变体”是其中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基取代的抗体。半胱氨酸工程化抗体可以作为具有均匀化学计量的8-苯基-2-氨基苯并氮杂 草 -接头化合物与8-Phe-2-氨基苯并氮杂 草 佐剂部分缀合(例如,在具有单个工程化半胱氨酸位点的抗体中,每个抗体最多两个8-Phe-2-氨基苯并氮杂 草 部分)。

[0098] 在一些实施方案中,用于制备表3的免疫缀合物的半胱氨酸工程化抗体具有在轻链的149-赖氨酸位点(LC K149C)处引入的半胱氨酸残基。在其它实施方案中,半胱氨酸工程化抗体具有在重链的118-丙氨酸位点(EU编号)(HC A118C)处引入的半胱氨酸残基。此位点替代地按顺序编号法编号为121,或者按Kabat编号法编号为114。在其它实施方案中,半胱氨酸工程化抗体具有根据Kabat编号法在轻链中的G64C或R142C处或根据Kabat编号法在重链中的D101C、V184C或T205C处引入的半胱氨酸残基。

[0099] 8-苯基-2-氨基苯并氮杂 草 佐剂化合物

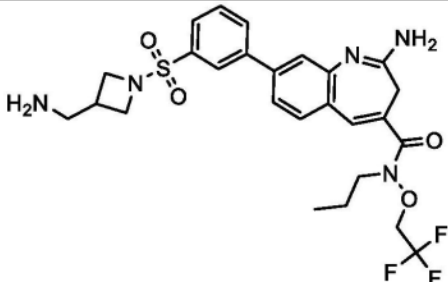
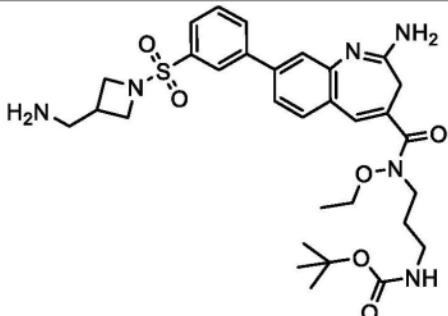
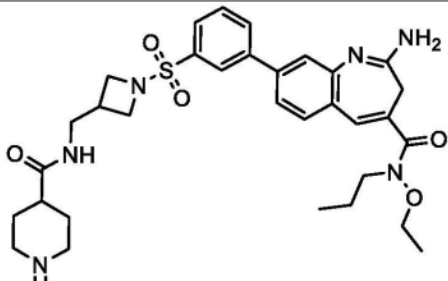
[0100] 本发明的免疫缀合物包含8-Phe-2-氨基苯并氮杂 草 佐剂部分。本文所述的佐剂部分是引发免疫反应的化合物(即,免疫刺激剂)。一般地,本文所述的佐剂部分是TLR激动剂。TLR是负责启动脊椎动物的先天免疫应答的I型跨膜蛋白。TLR识别来自细菌、病毒和真菌的多种病原体相关分子模式,并作为抵御入侵病原体的第一道防线。由于细胞表达和它们引发的信号传导通路的差异,TLR引发重叠但不同的生物学反应。一旦接合(例如,通过天然刺激物或合成的TLR激动剂),TLR就启动信号转导级联,导致经由衔接蛋白骨髓分化初级反应基因88(MyD88)激活核因子- κ B(NF- κ B)和募集IL-1受体相关激酶(IRAK)。IRAK的磷酸化然后导致TNF受体相关因子6(TRAF6)的募集,这导致NF- κ B抑制剂I- κ B的磷酸化。结果,NF- κ B进入细胞核并引发启动子含有NF- κ B结合位点的基因(诸如细胞因子)的转录。调控TLR信号传导的另外模式包括含有TIR结构域的衔接子诱导干扰素- β (TRIF)依赖性诱导TNF-受体相关因子6(TRAF6)和经由TRIF和TRAF3激活MyD88非依赖性途径,导致干扰素反应因子三(IRF3)的磷酸化。类似地,MyD88依赖性途径也激活若干IRF家族成员,包括IRF5和IRF7,而TRIF依赖性途径也激活NF- κ B途径。

[0101] 通常,本文所述的佐剂部分是TLR7和/或TLR8激动剂。TLR7和TLR8均在单核细胞和树突细胞中表达。在人中,TLR7也在浆细胞样树突细胞(pDC)和B细胞中表达。TLR8主要在骨髓来源的细胞中表达,即单核细胞、粒细胞和髓样树突细胞。TLR7和TLR8能够检测细胞内“外来”单链RNA的存在,作为应对病毒入侵的手段。用TLR8激动剂处理表达TLR8的细胞可导致产生高水平的IL-12、IFN- γ 、IL-1、TNF- α 、IL-6及其它炎性细胞因子。类似地,用TLR7激动剂刺激表达TLR7的细胞如pDC可导致产生高水平的IFN- α 及其它炎性细胞因子。TLR7/TLR8接合及由此所致的细胞因子产生可激活树突细胞及其它抗原呈递细胞,从而驱动多种先天和获得性免疫反应机制,导致肿瘤破坏。

[0102] 本发明的示例性8-苯基-2-氨基苯并氮杂 草 化合物(PhBz)示于表1中。合成、纯化和通过质谱法表征每种化合物,并显示具有指示的质量。另外的实验程序见于实施例。根

据实施例202测量针对表达人TLR7或人TLR8的HEK293 NFKB报告细胞的活性。表1的8-苯基-2-氨基苯并氮杂萘化合物证明了TLR8激动剂选择性的意外和出乎意料特性,这可预测治疗癌症及其它病症的有用的治疗活性。

[0103] 表1:8-苯基-2-氨基苯并氮杂萘化合物(PhBz)

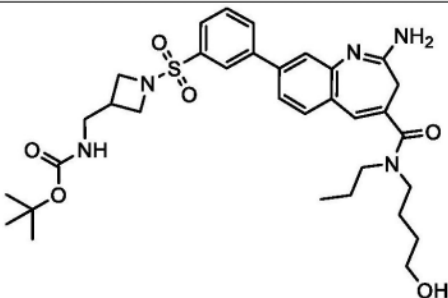
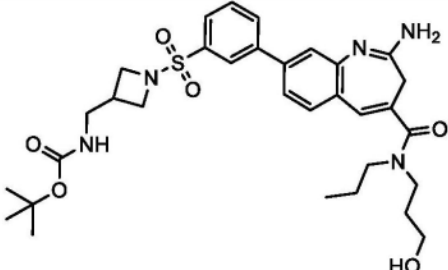
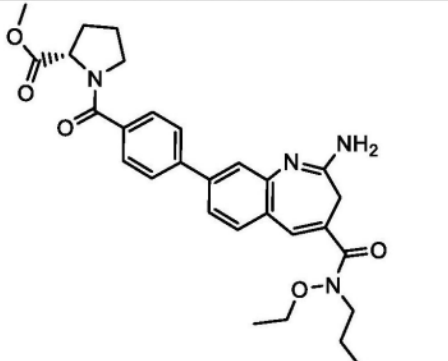
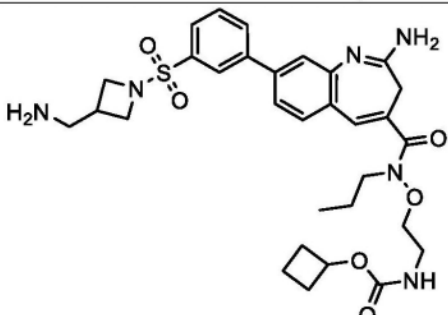
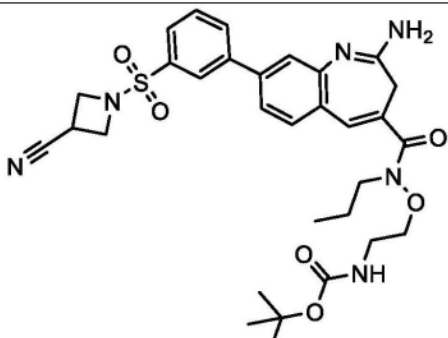
PhBz 编号	结构	MW	HEK293 hTLR7 EC50 (nM)	HEK293 hTLR8 EC50 (nM)
PhBz-1		565.6	3932	461
PhBz-2		626.8		
PhBz-3		622.8	9000	4189

[0104]

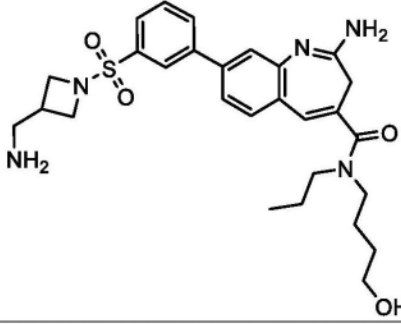
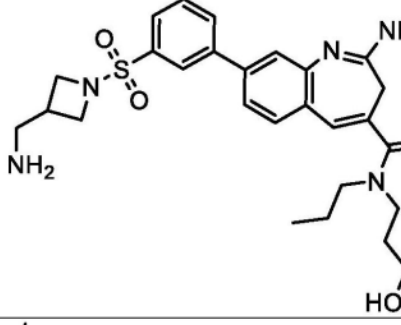
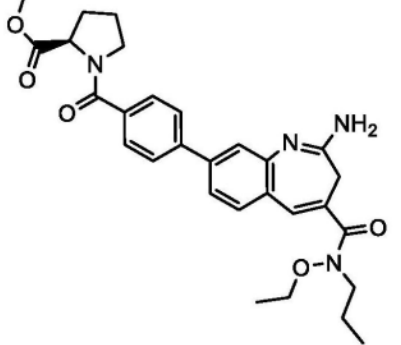
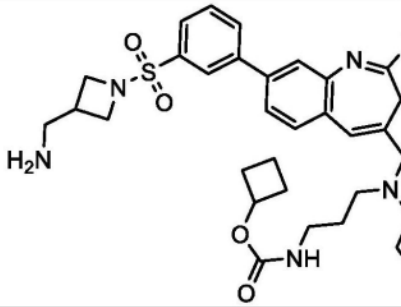
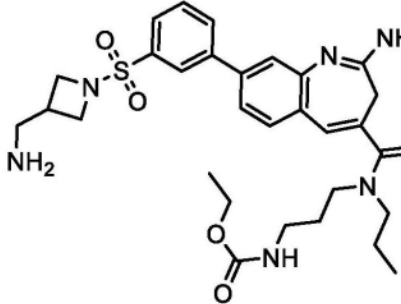
[0105]

PhBz-4		421.5	5764	629
PhBz-5		626.8		
PhBz-6		475.6	3089	860
PhBz-7		575.7	3682	377
PhBz-8		624.8		

[0106]

PhBz-9		639.8	5140	1080
PhBz-10		625.8	7152	374
PhBz-11		518.6	47	6
PhBz-12		624.8	738	163
PhBz-13		622.7		

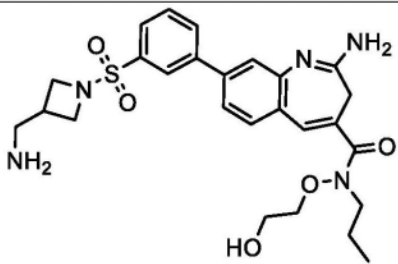
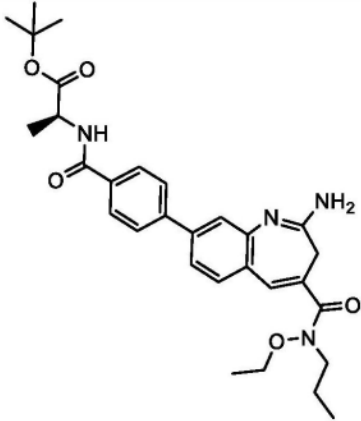
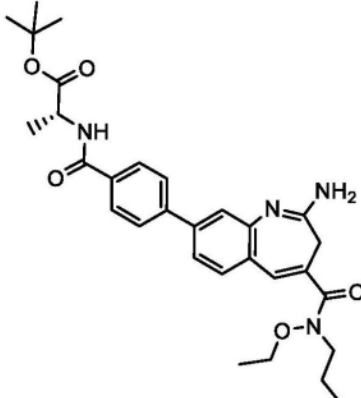
[0107]

PhBz-14		539.7	9000	4661
PhBz-15		525.7	9000	3606
PhBz-16		518.6	3429	97
PhBz-17		622.8	2311	1564
PhBz-18		596.7		

[0108]

PhBz-19		460.6	3014	256
PhBz-20		511.6	9000	4909
PhBz-21		611.8	3525	423
PhBz-22		567.7	9000	9000
PhBz-23		666.8		
PhBz-24		664.8		

[0109]

PhBz-25		527.6	9000	822
PhBz-26		534.7	1917	12
PhBz-27		534.7	4751	86

[0110] 8-苯基-2-氨基苯并氮杂^草-接头化合物

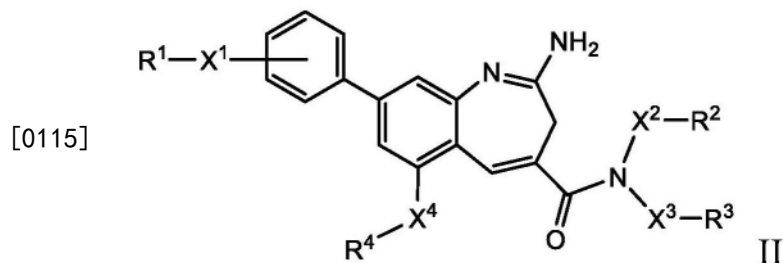
[0111] 通过抗HER2抗体与8-苯基-2-氨基苯并氮杂^草-接头化合物PhBzL的缀合来制备本发明的免疫缀合物。8-苯基-2-氨基苯并氮杂^草-接头化合物包含与接头单元共价连接的8-Phe-2-氨基苯并氮杂^草 (PhBz) 部分。接头单元包含影响免疫缀合物的稳定性、渗透性、溶解度及其它药代动力学、安全性和功效特性的官能团和亚基。接头单元包括反应性官能团，其与抗体的反应性官能团反应，即缀合。例如，抗体的亲核基团如赖氨酸侧链氨基与PhBzL接头化合物的亲电反应性官能团反应，形成免疫缀合物。还有，例如，抗体的半胱氨酸硫醇与Hx-接头化合物的马来酰亚胺或溴乙酰胺基团反应形成免疫缀合物。

[0112] 适用于PhBzL接头化合物的亲电反应性官能团包括但不限于N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 酯和N-羟基磺基琥珀酰亚胺 (磺基-NHS) 酯 (胺反应性)；碳二亚胺 (胺和羧基反应性)；羟甲基磷 (胺反应性)；马来酰亚胺 (硫醇反应性)；卤代乙酰胺如N-碘乙酰胺 (硫醇反应性)；芳基叠氮化物 (伯胺反应性)；氟化芳基叠氮化物 (经由碳-氢 (C-H) 插入的反应性)；五氟苯基 (PFP) 酯 (胺反应性)；四氟苯基 (TFP) 酯 (胺反应性)；亚氨酸酯 (胺反应性)；异氰酸酯 (羟基反应性)；乙烯基砜 (硫醇、胺和羟基反应性)；吡啶基二硫化物 (硫醇反应性)；和二苯甲酮

衍生物(经由C-H键插入的反应性)。进一步的试剂包括但不限于Hermanson, Bioconjugate Techniques第2版, Academic Press, 2008中描述的那些。

[0113] 本发明为免疫缀合物的设计、制备和使用方面的限制和挑战提供了解决方案。一些接头在血流中可能不稳定,从而在于靶细胞中内化之前释放不可接受量的佐剂/药物(Khot, A. 等人, (2015) Bioanalysis 7 (13) : 1633-1648)。其它接头可提供在血流中的稳定性,但细胞内释放的有效性可能会受到负面影响。提供所需细胞内释放的接头通常在血流中稳定性差。或者说,血流稳定性和细胞内释放通常是逆相关的。此外,在标准缀合过程中,抗体上加载的佐剂/药物部分的量(即载药量)、缀合反应中形成的聚集物的量和可以获得的最最终纯化缀合物的产量是相互关联的。例如,聚集物形成通常与同抗体缀合的佐剂/药物部分及其衍生物的当量数正相关。在高载药量的情况下,用于治疗应用必须移除形成的聚集物。结果,载药量介导的聚集物形成降低免疫缀合物产率,并且可能使工艺放大变得困难。

[0114] 示例性实施方案包括式II的8-苯基-2-氨基苯并氮杂萘-接头化合物:



[0116] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 独立地选自由H、 C_1 - C_{12} 烷基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、 C_3 - C_{12} 碳环基、 C_6 - C_{20} 芳基、 C_2 - C_9 杂环基和 C_1 - C_{20} 杂芳基组成的组,其中烷基、烯基、炔基、碳环基、芳基、杂环基和杂芳基独立且任选被一个或多个选自以下的基团取代:

[0117] - (C_1 - C_{12} 烷基二基) - $N(R^5)$ - *;

[0118] - (C_1 - C_{12} 烷基二基) - $N(R^5)_2$;

[0119] - (C_1 - C_{12} 烷基二基) - OR^5 ;

[0120] - (C_3 - C_{12} 碳环基);

[0121] - (C_3 - C_{12} 碳环基) - *;

[0122] - (C_3 - C_{12} 碳环基) - (C_1 - C_{12} 烷基二基) - NR^5 - *;

[0123] - (C_3 - C_{12} 碳环基) - (C_1 - C_{12} 烷基二基) - $N(R^5)_2$;

[0124] - (C_3 - C_{12} 碳环基) - NR^5 - $C(=NR^5)NR^5$ - *;

[0125] - (C_6 - C_{20} 芳基);

[0126] - (C_6 - C_{20} 芳基) - *;

[0127] - (C_6 - C_{20} 芳基二基) - $N(R^5)$ - *;

[0128] - (C_6 - C_{20} 芳基二基) - (C_1 - C_{12} 烷基二基) - $N(R^5)$ - *;

[0129] - (C_6 - C_{20} 芳基二基) - (C_1 - C_{12} 烷基二基) - (C_2 - C_{20} 杂环基二基) - *;

[0130] - (C_6 - C_{20} 芳基二基) - (C_1 - C_{12} 烷基二基) - $N(R^5)_2$;

[0131] - (C_6 - C_{20} 芳基二基) - (C_1 - C_{12} 烷基二基) - NR^5 - $C(=NR^{5a})N(R^5)$ - *;

[0132] - (C_2 - C_{20} 杂环基);

[0133] - (C_2 - C_{20} 杂环基) - *;

- [0134] - (C₂-C₉杂环基) - (C₁-C₁₂烷基二基) - NR⁵-*;
 [0135] - (C₂-C₉杂环基) - (C₁-C₁₂烷基二基) - N(R⁵)₂;
 [0136] - (C₂-C₉杂环基) - C(=O) - (C₁-C₁₂烷基二基) - N(R⁵) -*;
 [0137] - (C₂-C₉杂环基) - NR⁵ - C(=NR^{5a}) NR⁵ -*;
 [0138] - (C₂-C₉杂环基) - NR⁵ - (C₆-C₂₀芳基二基) - (C₁-C₁₂烷基二基) - N(R⁵) -*;
 [0139] - (C₂-C₉杂环基) - (C₆-C₂₀芳基二基) -*;
 [0140] - (C₁-C₂₀杂芳基);
 [0141] - (C₁-C₂₀杂芳基二基) -*;
 [0142] - (C₁-C₂₀杂芳基) - (C₁-C₁₂烷基二基) - N(R⁵) -*;
 [0143] - (C₁-C₂₀杂芳基) - (C₁-C₁₂烷基二基) - N(R⁵)₂;
 [0144] - (C₁-C₂₀杂芳基) - NR⁵ - C(=NR^{5a}) N(R⁵) -*;
 [0145] - (C₁-C₂₀杂芳基) - N(R⁵) C(=O) - (C₁-C₁₂烷基二基) - N(R⁵) -*;
 [0146] - C(=O) -*;
 [0147] - C(=O) - (C₁-C₁₂烷基二基) - N(R⁵) -*;
 [0148] - C(=O) - (C₂-C₂₀杂环基二基) -*;
 [0149] - C(=O) N(R⁵)₂;
 [0150] - C(=O) N(R⁵) -*;
 [0151] - C(=O) N(R⁵) - (C₁-C₁₂烷基二基) - N(R⁵) C(=O) R⁵;
 [0152] - C(=O) N(R⁵) - (C₁-C₁₂烷基二基) - N(R⁵) C(=O) N(R⁵)₂;
 [0153] - C(=O) NR⁵ - (C₁-C₁₂烷基二基) - N(R⁵) CO₂R⁵;
 [0154] - C(=O) NR⁵ - (C₁-C₁₂烷基二基) - N(R⁵) C(=NR^{5a}) N(R⁵)₂;
 [0155] - C(=O) NR⁵ - (C₁-C₁₂烷基二基) - NR⁵ C(=NR^{5a}) R⁵;
 [0156] - C(=O) NR⁵ - (C₁-C₈烷基二基) - NR⁵ (C₂-C₅杂芳基);
 [0157] - C(=O) NR⁵ - (C₁-C₂₀杂芳基二基) - N(R⁵) -*;
 [0158] - C(=O) NR⁵ - (C₁-C₂₀杂芳基二基) -*;
 [0159] - C(=O) NR⁵ - (C₁-C₂₀杂芳基二基) - (C₁-C₁₂烷基二基) - N(R⁵)₂;
 [0160] - C(=O) NR⁵ - (C₁-C₂₀杂芳基二基) - (C₂-C₂₀杂环基二基) - C(=O) NR⁵ - (C₁-C₁₂烷基二基) - NR⁵ -*;
 [0161] - N(R⁵)₂;
 [0162] - N(R⁵) -*;
 [0163] - N(R⁵) C(=O) R⁵;
 [0164] - N(R⁵) C(=O) -*;
 [0165] - N(R⁵) C(=O) N(R⁵)₂;
 [0166] - N(R⁵) C(=O) N(R⁵) -*;
 [0167] - N(R⁵) CO₂R⁵;
 [0168] - NR⁵ C(=NR^{5a}) N(R⁵)₂;
 [0169] - NR⁵ C(=NR^{5a}) N(R⁵) -*;
 [0170] - NR⁵ C(=NR^{5a}) R⁵;
 [0171] - N(R⁵) C(=O) - (C₁-C₁₂烷基二基) - N(R⁵) -*;

- [0172] $-N(R^5) - (C_2-C_5 \text{杂芳基})$;
- [0173] $-N(R^5) - S(=O)_2 - (C_1-C_{12} \text{烷基})$;
- [0174] $-O - (C_1-C_{12} \text{烷基})$;
- [0175] $-O - (C_1-C_{12} \text{烷基二基}) - N(R^5)_2$;
- [0176] $-O - (C_1-C_{12} \text{烷基二基}) - N(R^5) - *$;
- [0177] $-O - C(=O)N(R^5)_2$;
- [0178] $-O - C(=O)N(R^5) - *$;
- [0179] $-S(=O)_2 - (C_2-C_{20} \text{杂环基二基}) - *$;
- [0180] $-S(=O)_2 - (C_2-C_{20} \text{杂环基二基}) - (C_1-C_{12} \text{烷基二基}) - N(R^5)_2$;
- [0181] $-S(=O)_2 - (C_2-C_{20} \text{杂环基二基}) - (C_1-C_{12} \text{烷基二基}) - NR^5 - *$; 和 $-S(=O)_2 - (C_2-C_{20} \text{杂环基二基}) - (C_1-C_{12} \text{烷基二基}) - OH$;
- [0182] 或者 R^2 和 R^3 一起形成5或6元杂环基环 ;
- [0183] X^1, X^2, X^3 和 X^4 独立地选自由键、 $C(=O)$ 、 $C(=O)N(R^5)$ 、 O 、 $N(R^5)$ 、 S 、 $S(O)_2$ 和 $S(O)_2N(R^5)$ 组成的组 ;
- [0184] R^5 独立地选自由 H 、 C_6-C_{20} 芳基、 C_3-C_{12} 碳环基、 C_6-C_{20} 芳基二基、 C_1-C_{12} 烷基和 C_1-C_{12} 烷基二基组成的组,或者两个 R^5 基团一起形成5或6元杂环基环 ;
- [0185] R^{5a} 选自由 C_6-C_{20} 芳基和 C_1-C_{20} 杂芳基组成的组 ;
- [0186] 其中星号*指示L的连接位点,且其中 R^1, R^2, R^3 和 R^4 中的一者连接于L ;
- [0187] L是选自由以下组成的组的接头 :
- [0188] $Q - C(=O) - PEG -$;
- [0189] $Q - C(=O) - PEG - C(=O)N(R^6) - (C_1-C_{12} \text{烷基二基}) - C(=O) - Gluc -$;
- [0190] $Q - C(=O) - PEG - O -$;
- [0191] $Q - C(=O) - PEG - O - C(=O) -$;
- [0192] $Q - C(=O) - PEG - C(=O) -$;
- [0193] $Q - C(=O) - PEG - C(=O) - PEP -$;
- [0194] $Q - C(=O) - PEG - N(R^6) -$;
- [0195] $Q - C(=O) - PEG - N(R^6) - C(=O) -$;
- [0196] $Q - C(=O) - PEG - N(R^6) - PEG - C(=O) - PEP -$;
- [0197] $Q - C(=O) - PEG - N^+(R^6)_2 - PEG - C(=O) - PEP -$;
- [0198] $Q - C(=O) - PEG - C(=O) - PEP - N(R^6) - (C_1-C_{12} \text{烷基二基}) -$;
- [0199] $Q - C(=O) - PEG - C(=O) - PEP - N(R^6) - (C_1-C_{12} \text{烷基二基})N(R^6)C(=O) - (C_2-C_5 \text{单杂环基二基}) -$;
- [0200] $Q - C(=O) - PEG - SS - (C_1-C_{12} \text{烷基二基}) - OC(=O) -$;
- [0201] $Q - C(=O) - PEG - SS - (C_1-C_{12} \text{烷基二基}) - C(=O) -$;
- [0202] $Q - C(=O) - (C_1-C_{12} \text{烷基二基}) - C(=O) - PEP -$;
- [0203] $Q - C(=O) - (C_1-C_{12} \text{烷基二基}) - C(=O) - PEP - N(R^6) - (C_1-C_{12} \text{烷基二基}) -$;
- [0204] $Q - C(=O) - (C_1-C_{12} \text{烷基二基}) - C(=O) - PEP - N(R^6) - (C_1-C_{12} \text{烷基二基}) - N(R^5) - C(=O) -$;
- [0205] $Q - C(=O) - (C_1-C_{12} \text{烷基二基}) - C(=O) - PEP - N(R^6) - (C_1-C_{12} \text{烷基二基}) - N(R^6)C(=O) -$

(C₂-C₅单杂环基二基) -;

[0206] Q-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-;

[0207] Q-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-C(=O)N(R⁶)-(C₁-C₁₂烷基二基)-C(=O)-Gluc-;

[0208] Q-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-O-;

[0209] Q-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-O-C(=O)-;

[0210] Q-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-C(=O)-;

[0211] Q-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-N(R⁵)-;

[0212] Q-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-N(R⁵)-C(=O)-;

[0213] Q-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-C(=O)-PEP-;

[0214] Q-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-SS-(C₁-C₁₂烷基二基)-OC(=O)-;

[0215] Q-(CH₂)_m-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂烷基二基)-;

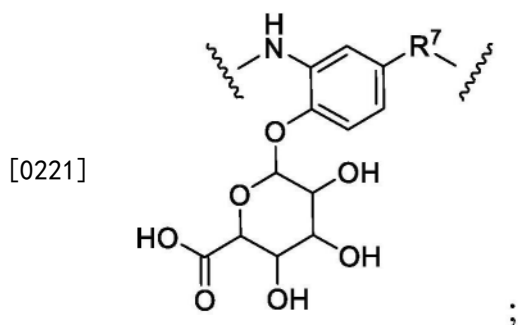
[0216] Q-(CH₂)_m-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂烷基二基)N(R⁶)C(=O)-;和

[0217] Q-(CH₂)_m-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂烷基二基)N(R⁶)C(=O)-(C₂-C₅单杂环基二基)-;

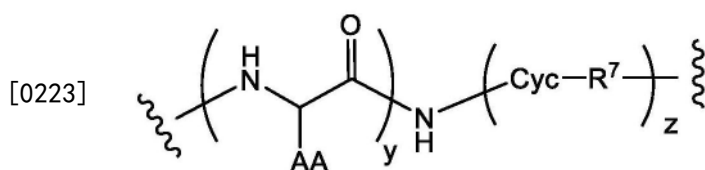
[0218] R⁶独立地为H或C₁-C₆烷基;

[0219] PEG具有下式:-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_m-;m是1至5的整数,且n是2至50的整数;

[0220] Gluc具有下式:

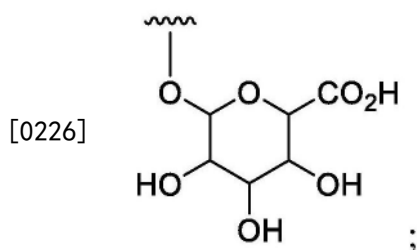


[0222] PEP具有下式:



[0224] 其中AA独立地选自天然或非天然氨基酸侧链,或者AA中的一者或多者和相邻的氮原子形成五元环脯氨酸氨基酸,且波浪线指示连接点;

[0225] Cyc选自C₆-C₂₀芳基二基和C₁-C₂₀杂芳基二基,任选被一个或多个选自F、Cl、NO₂、-OH、-OCH₃和具有如下结构的葡糖醛酸的基团取代:



[0227] R^7 选自自由 $-\text{CH}(R^8)\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{N}(R^8)-$ 和 $-\text{CH}(R^8)\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ 组成的组,其中 R^8 选自 H 、 C_1-C_6 烷基、 $\text{C}(=\text{O})-\text{C}_1-\text{C}_6$ 烷基和 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(R^9)_2$,其中 R^9 独立地选自自由 H 、 C_1-C_{12} 烷基和 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2)_m-\text{OH}$ 组成的组,其中 m 是1至5的整数,且 n 是2至50的整数,或者两个 R^9 基团一起形成5或6元杂环基环;

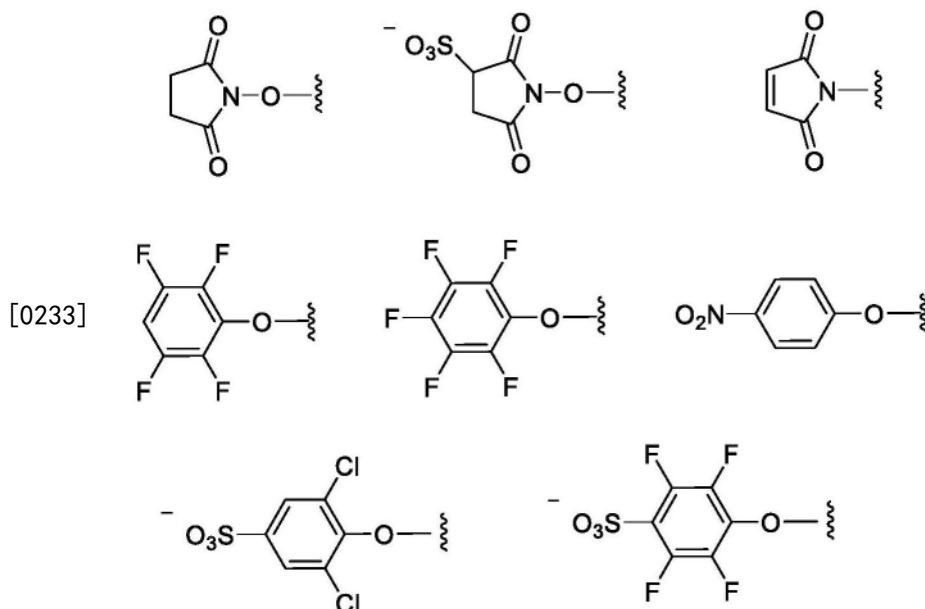
[0228] y 是2至12的整数;

[0229] z 是0或1;

[0230] Q 选自自由以下组成的组: N -羟基琥珀酰亚胺基、 N -羟基磺基琥珀酰亚胺基、马来酰亚胺和被一个或多个独立地选自 F 、 Cl 、 NO_2 和 SO_3^- 的基团取代的苯氧基;且

[0231] 烷基、烷基二基、烯基、烯基二基、炔基、炔基二基、芳基、芳基二基、碳环基、碳环基二基、杂环基、杂环基二基、杂芳基和杂芳基二基独立且任选被一个或多个独立地选自以下的基团取代: F 、 Cl 、 Br 、 I 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 $-\text{C}\equiv\text{CH}$ 、 $-\text{C}\equiv\text{CCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CN}$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHSO}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{COCH}_3$ 、 $-\text{CO}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{COCH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CONHCH}_3$ 、 $-\text{CON}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHCH}_3$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{NHCOCCH}_3$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{COCH}_3$ 、 $-\text{NHS}(\text{O})_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}(\text{O})_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{NHC}(=\text{NH})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(=\text{NH})\text{CH}_3$ 、 $-\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $=\text{O}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 、 $-\text{OC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{SCH}_3$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{CH}_3$ 和 $-\text{S}(\text{O})_3\text{H}$ 。

[0232] 式II的8-苯基-2-氨基苯并氮杂 草 -接头化合物的示例性实施方案包括其中 Q 选自:



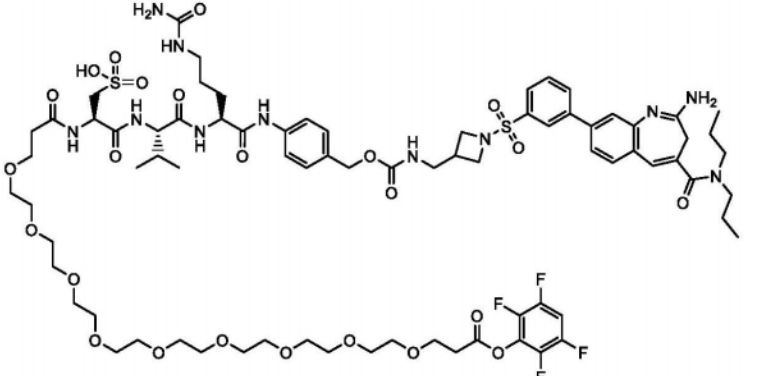
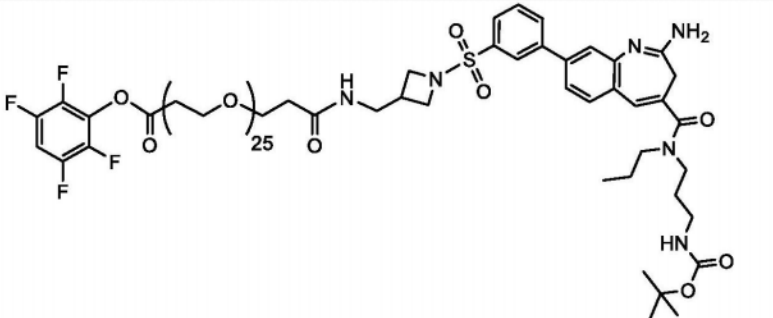
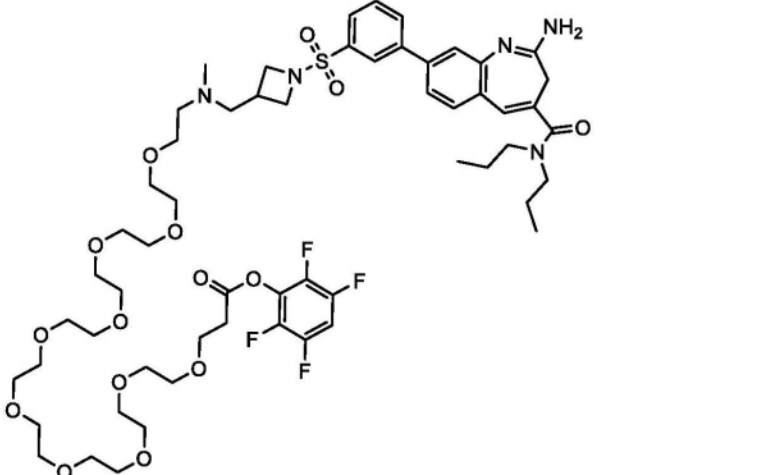
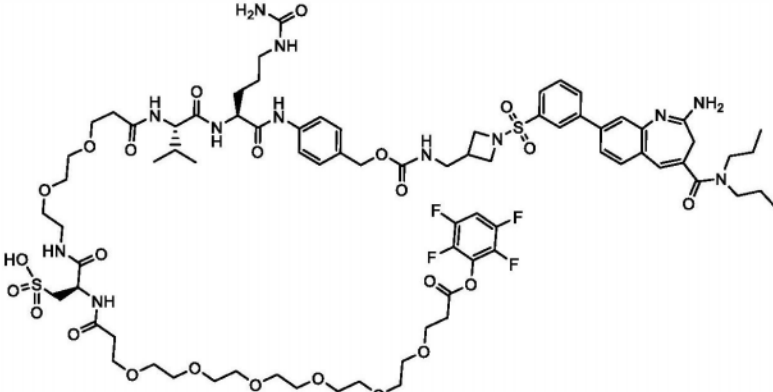
[0234] 式II的8-苯基-2-氨基苯并氮杂 草 -接头化合物的示例性实施方案包括其中 Q 是被一个或多个 F 取代的苯氧基。

[0235] 式II的8-苯基-2-氨基苯并氮杂 草 -接头化合物的示例性实施方案包括其中 Q 是2,

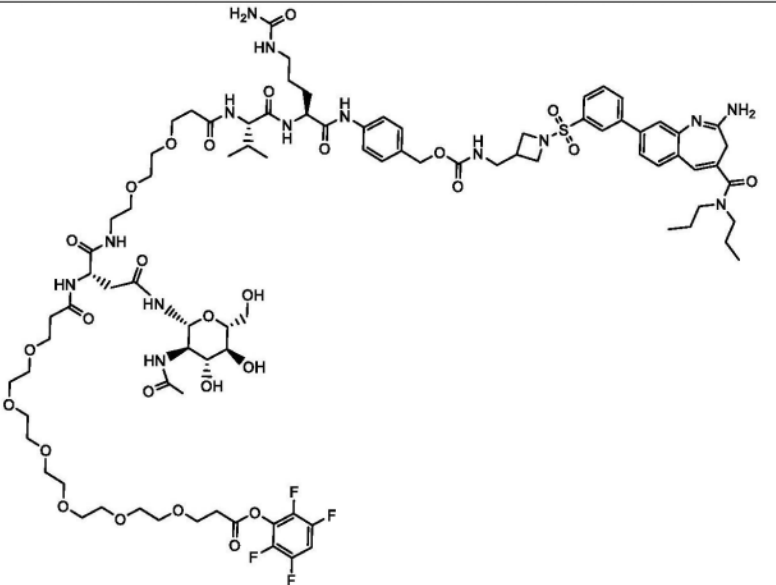
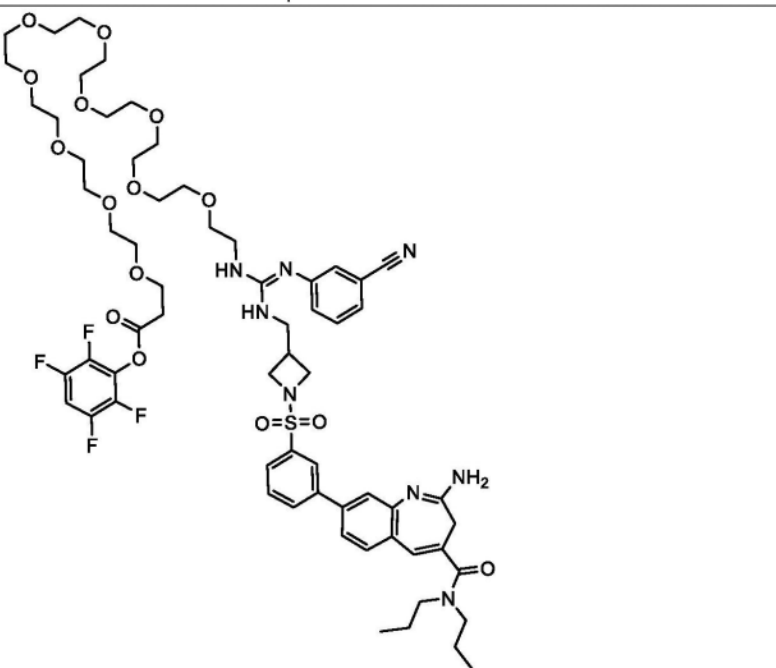
3,5,6-四氟苯氧基。

[0236] 8-苯基-2-氨基苯并氮杂 草 -接头 (PhBzL) 化合物的示例性实施方案选自表2a和2b。合成、纯化和通过质谱法表征每种化合物,并显示具有指示的质量。另外的实验程序见于实施例。表2的8-苯基-2-氨基苯并氮杂 草 -接头化合物证明了TLR8激动剂选择性的意外和出乎意料特性,这可预测治疗癌症及其它病症的有用的治疗活性。表2a和2b的8-苯基-2-氨基苯并氮杂 草 -接头中间体式II化合物用于通过实施例201的方法与抗体缀合以形成表3a和3b的免疫缀合物。

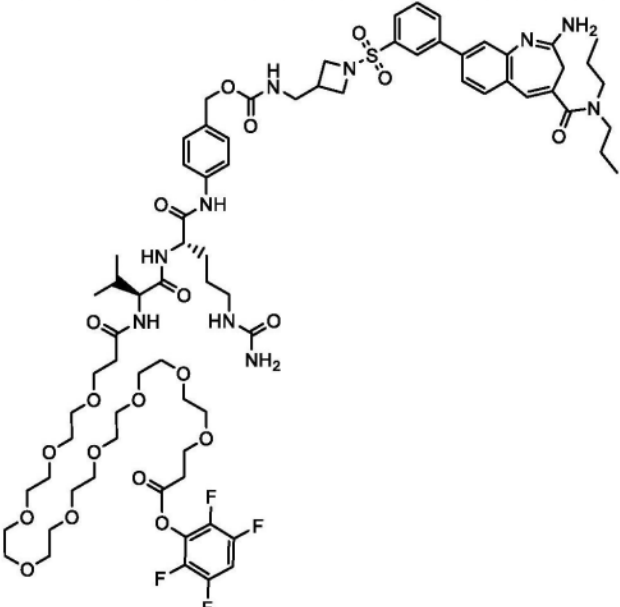
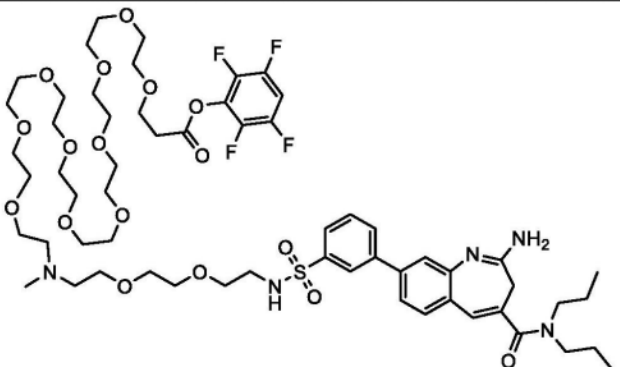
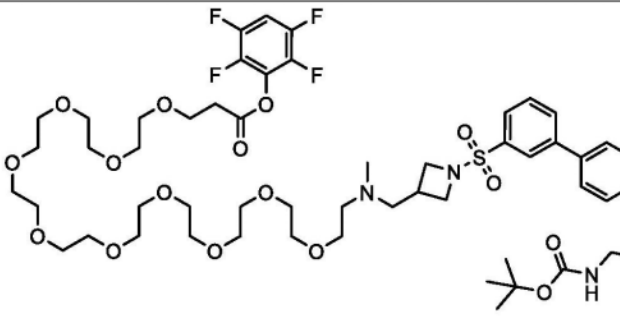
[0237] 表2a 8-苯基-2-氨基苯并氮杂 草 -接头中间体式II化合物(PhBzL)

PhBzL 编号	结构	MW
PhBzL-1		1710.9
PhBzL-2		1974.2
PhBzL-3		1184.3
PhBzL-4		1737.9

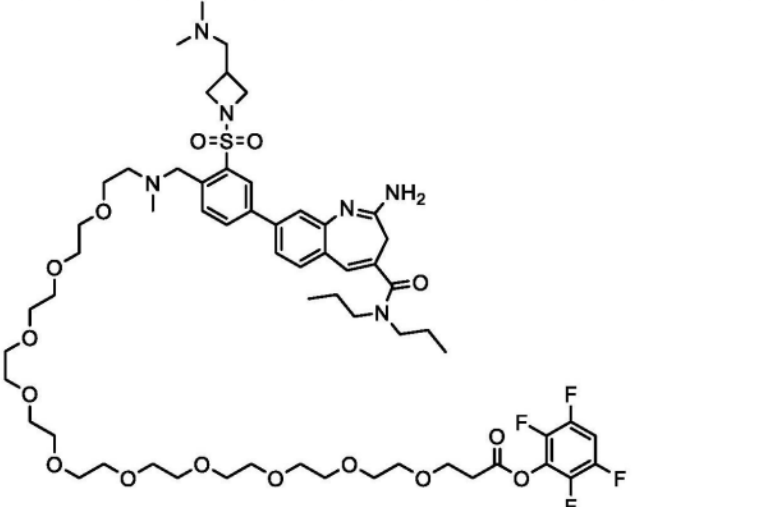
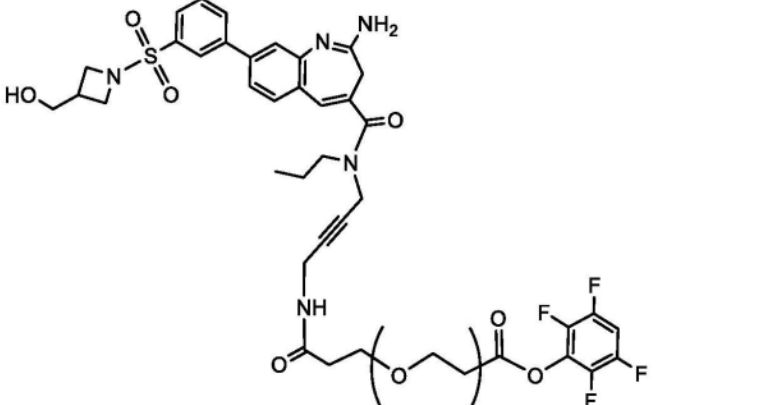
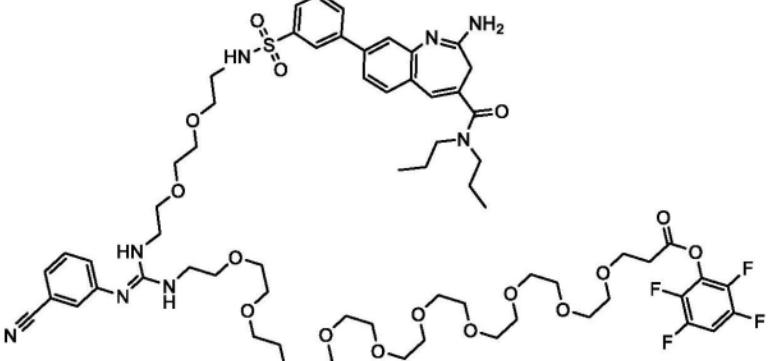
[0238]

PhBzL-5	 <p>The chemical structure of PhBzL-5 is a complex molecule. It features a long, flexible polyether chain (poly(2-ethylhexafluoroethyl ether)) that is functionalized with several groups. At one end, there is a primary amide group (-NH₂) and a secondary amide group (-NH-). The chain is also linked to a 2,4,6-trifluorophenyl group via an ester linkage. Another part of the chain is connected to a 4-aminopyridine ring system, which is further substituted with a propyl group and a carbonyl group. The structure is highly branched and contains multiple amide and ether linkages.</p>	1904
[0239] PhBzL-6	 <p>The chemical structure of PhBzL-6 is a complex molecule. It features a long, flexible polyether chain (poly(2-ethylhexafluoroethyl ether)) that is functionalized with several groups. At one end, there is a primary amide group (-NH₂) and a secondary amide group (-NH-). The chain is also linked to a 2,4,6-trifluorophenyl group via an ester linkage. Another part of the chain is connected to a 4-aminopyridine ring system, which is further substituted with a propyl group and a carbonyl group. The structure is highly branched and contains multiple amide and ether linkages.</p>	1313.5

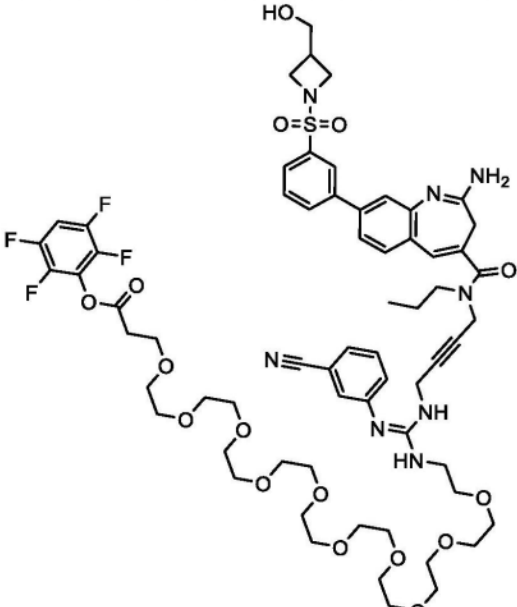
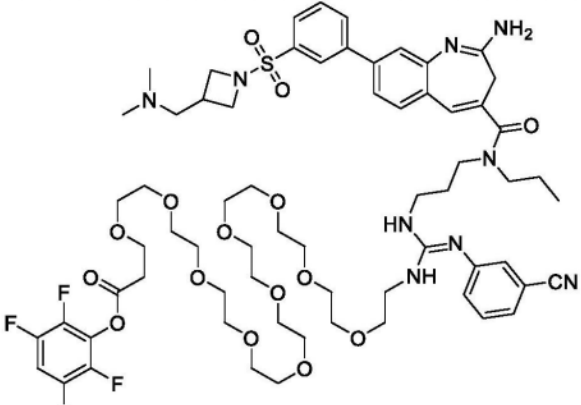
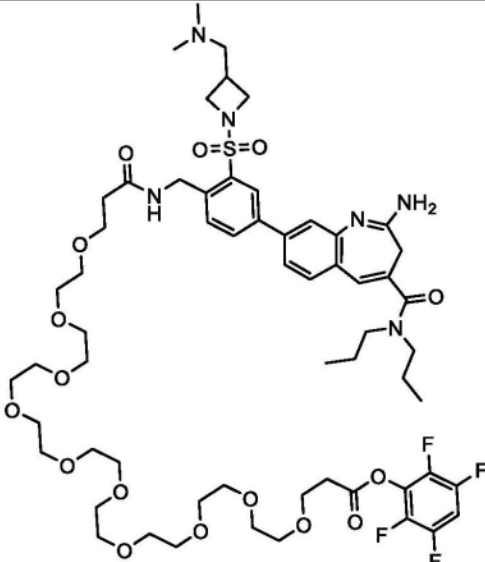
[0240]

PhBzL-7	 <p>The structure of PhBzL-7 is a complex molecule. It features a central benzimidazole ring system. One nitrogen of the benzimidazole is substituted with a propyl group. The 2-position of the benzimidazole is linked to a piperazine ring, which is further substituted with a tert-butyl group. The 5-position of the benzimidazole is connected to a para-substituted phenyl ring. This phenyl ring is linked via a sulfonamide group (-NH-SO₂-) to another para-substituted phenyl ring. This second phenyl ring is connected to a methylene group, which is in turn linked to a carbonyl group (-CO-). This carbonyl group is part of a chain that includes a piperazine ring, a methylene group, a carbonyl group, and a piperazine ring. The second piperazine ring is substituted with a propyl group. The chain continues with a methylene group, a carbonyl group, and a piperazine ring. The second piperazine ring is substituted with a propyl group. The chain ends with a methylene group, a carbonyl group, and a piperazine ring. The second piperazine ring is substituted with a propyl group.</p>	1394.7
PhBzL-8	 <p>The structure of PhBzL-8 is a complex molecule. It features a central benzimidazole ring system. One nitrogen of the benzimidazole is substituted with a propyl group. The 2-position of the benzimidazole is linked to a piperazine ring, which is further substituted with a tert-butyl group. The 5-position of the benzimidazole is connected to a para-substituted phenyl ring. This phenyl ring is linked via a sulfonamide group (-NH-SO₂-) to another para-substituted phenyl ring. This second phenyl ring is connected to a methylene group, which is in turn linked to a carbonyl group (-CO-). This carbonyl group is part of a chain that includes a piperazine ring, a methylene group, a carbonyl group, and a piperazine ring. The second piperazine ring is substituted with a propyl group. The chain continues with a methylene group, a carbonyl group, and a piperazine ring. The second piperazine ring is substituted with a propyl group. The chain ends with a methylene group, a carbonyl group, and a piperazine ring. The second piperazine ring is substituted with a propyl group.</p>	1246.4
PhBzL-9	 <p>The structure of PhBzL-9 is a complex molecule. It features a central benzimidazole ring system. One nitrogen of the benzimidazole is substituted with a propyl group. The 2-position of the benzimidazole is linked to a piperazine ring, which is further substituted with a tert-butyl group. The 5-position of the benzimidazole is connected to a para-substituted phenyl ring. This phenyl ring is linked via a sulfonamide group (-NH-SO₂-) to another para-substituted phenyl ring. This second phenyl ring is connected to a methylene group, which is in turn linked to a carbonyl group (-CO-). This carbonyl group is part of a chain that includes a piperazine ring, a methylene group, a carbonyl group, and a piperazine ring. The second piperazine ring is substituted with a propyl group. The chain continues with a methylene group, a carbonyl group, and a piperazine ring. The second piperazine ring is substituted with a propyl group. The chain ends with a methylene group, a carbonyl group, and a piperazine ring. The second piperazine ring is substituted with a propyl group.</p>	1299.5

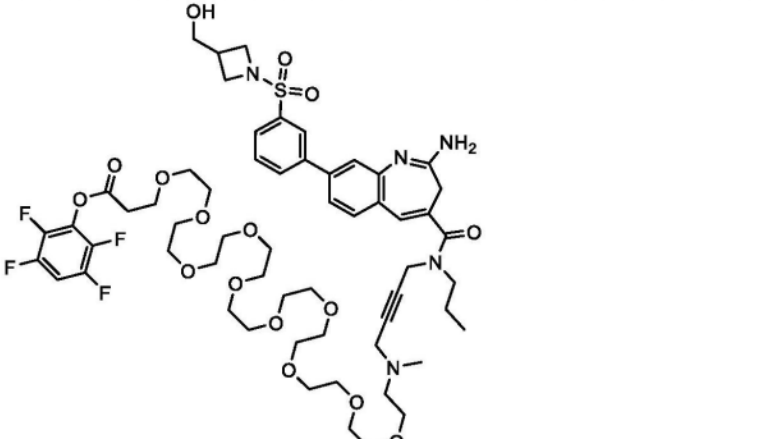
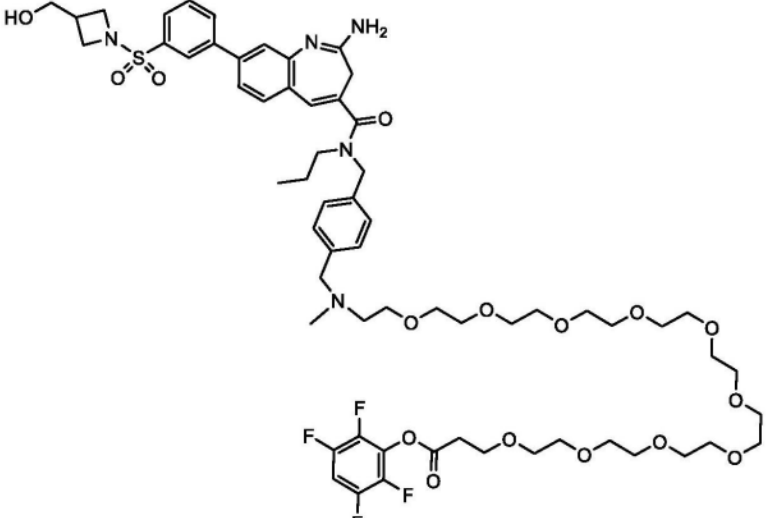
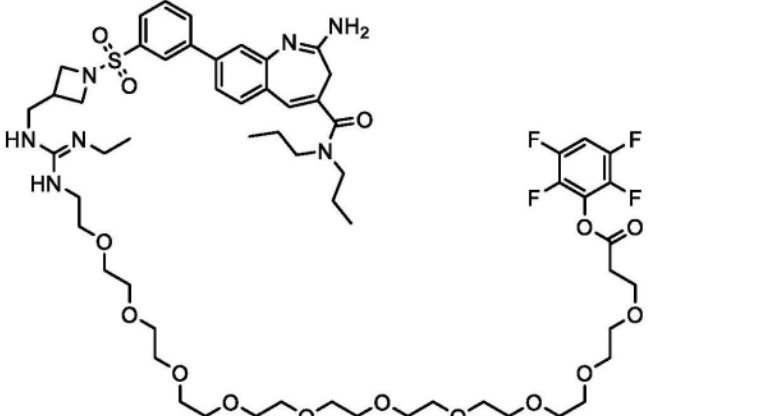
[0241]

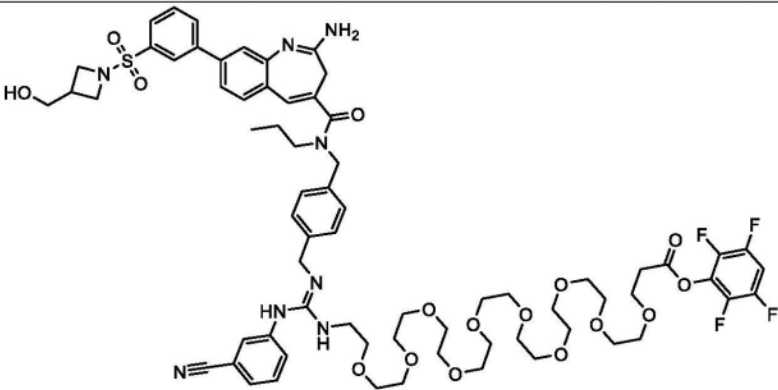
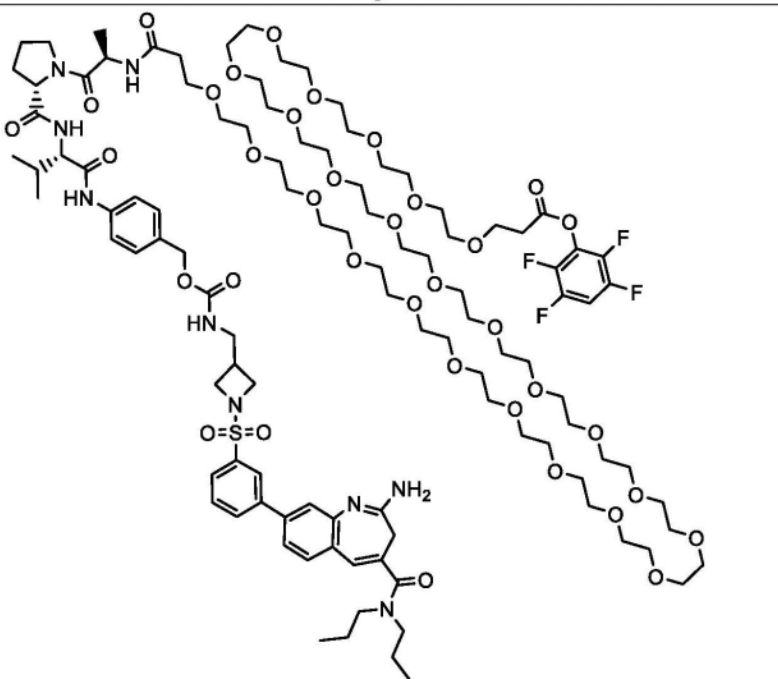
PhBzL-10	 <p>Chemical structure of PhBzL-10: A complex molecule featuring a central benzimidazole ring system. One nitrogen of the benzimidazole is substituted with a diethylamino group. The 2-position of the benzimidazole is linked to a benzene ring, which is further substituted with a dimethylamino group and a sulfonamide group (-SO₂N(CH₃)₂). This benzene ring is connected via a methylene group to a long, flexible poly(ethylene glycol) (PEG) chain. The PEG chain is terminated with a pentafluorophenyl ester group.</p>	1241.4
PhBzL-11	 <p>Chemical structure of PhBzL-11: A complex molecule featuring a central benzimidazole ring system. One nitrogen of the benzimidazole is substituted with a diethylamino group. The 2-position of the benzimidazole is linked to a benzene ring, which is further substituted with a sulfonamide group (-SO₂N(CH₂)₂OH) and a hydroxymethyl group (-CH₂OH). This benzene ring is connected via a methylene group to a long, flexible poly(ethylene glycol) (PEG) chain. The PEG chain is terminated with a pentafluorophenyl ester group.</p>	1885.1
PhBzL-12	 <p>Chemical structure of PhBzL-12: A complex molecule featuring a central benzimidazole ring system. One nitrogen of the benzimidazole is substituted with a diethylamino group. The 2-position of the benzimidazole is linked to a benzene ring, which is further substituted with a sulfonamide group (-SO₂NH₂) and a hydroxymethyl group (-CH₂OH). This benzene ring is connected via a methylene group to a long, flexible poly(ethylene glycol) (PEG) chain. The PEG chain is terminated with a pentafluorophenyl ester group.</p>	1375.5

[0242]

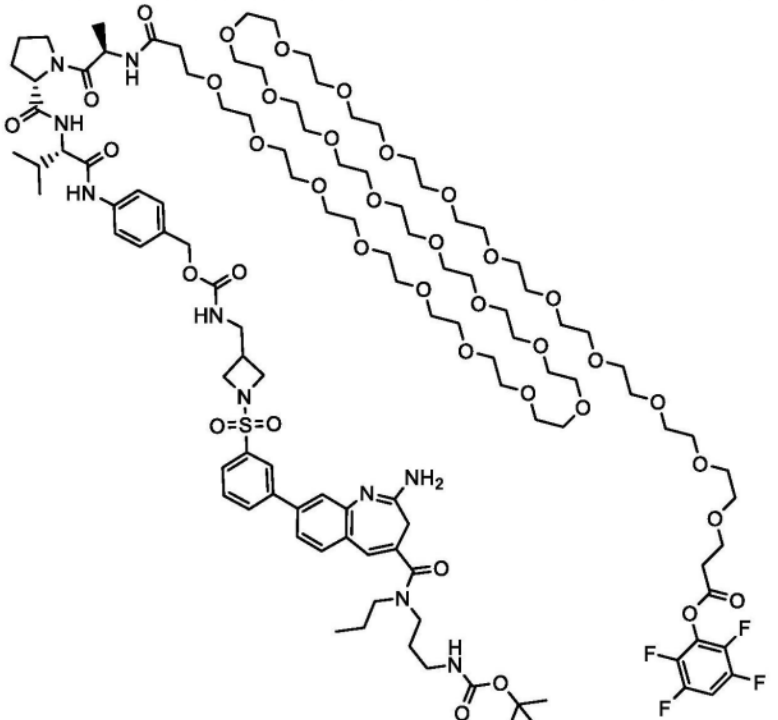
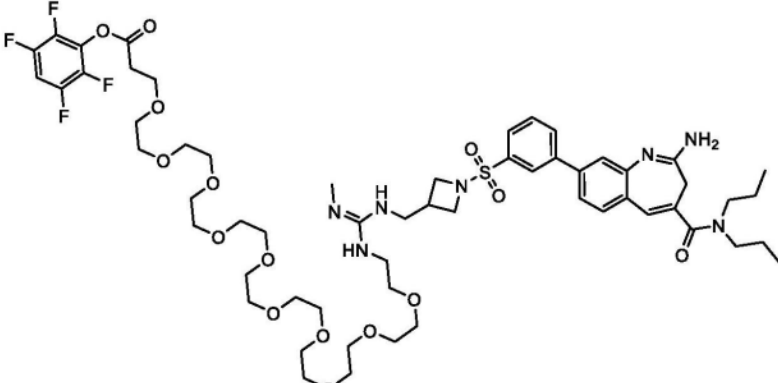
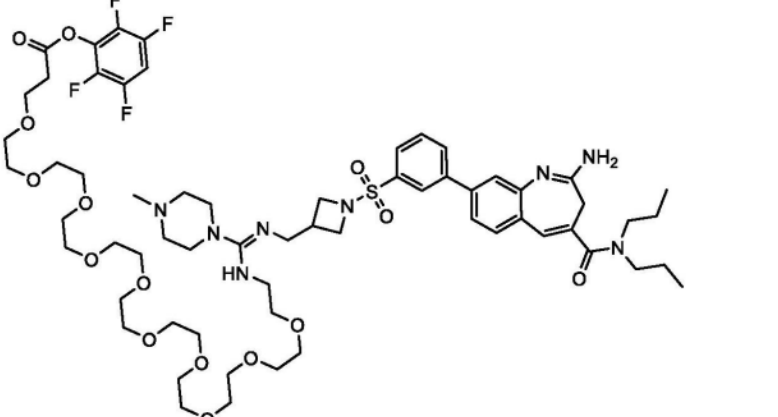
<p>PhBzL-13</p>	 <p>The structure of PhBzL-13 features a central benzimidazole ring system. One nitrogen of the benzimidazole is substituted with an amino group (-NH₂). The 2-position of the benzimidazole is linked to a propylamine group (-N(CH₂)₃-). The 5-position is connected to a 4-(hydroxymethyl)imidazole ring via a sulfonyl group (-SO₂-). The 6-position is linked to a 2,3,4,5-tetrafluorophenyl ring through an ester linkage (-O-CO-). A long, flexible polyether chain, consisting of multiple ethylene glycol units, is attached to the 2,3,4,5-tetrafluorophenyl ring via an ether linkage (-O-).</p>	<p>1339.5</p>
<p>PhBzL-14</p>	 <p>The structure of PhBzL-14 features a central benzimidazole ring system. One nitrogen of the benzimidazole is substituted with an amino group (-NH₂). The 2-position of the benzimidazole is linked to a propylamine group (-N(CH₂)₃-). The 5-position is connected to a 4-(dimethylamino)pyrrolidine-1-sulfonyl group (-SO₂-). The 6-position is linked to a 2,3,4,5-tetrafluorophenyl ring through an ester linkage (-O-CO-). A long, flexible polyether chain, consisting of multiple ethylene glycol units, is attached to the 2,3,4,5-tetrafluorophenyl ring via an ether linkage (-O-). Additionally, a 4-cyanophenyl ring is attached to the polyether chain via an imine linkage (-NH=N-).</p>	<p>1356.5</p>
<p>PhBzL-15</p>	 <p>The structure of PhBzL-15 features a central benzimidazole ring system. One nitrogen of the benzimidazole is substituted with an amino group (-NH₂). The 2-position of the benzimidazole is linked to a propylamine group (-N(CH₂)₃-). The 5-position is connected to a 4-(dimethylamino)pyrrolidine-1-sulfonyl group (-SO₂-). The 6-position is linked to a 2,3,4,5-tetrafluorophenyl ring through an ester linkage (-O-CO-). A long, flexible polyether chain, consisting of multiple ethylene glycol units, is attached to the 2,3,4,5-tetrafluorophenyl ring via an ether linkage (-O-). Additionally, a 4-cyanophenyl ring is attached to the polyether chain via an imine linkage (-NH=N-).</p>	<p>1255.4</p>

[0243]

<p>PhBzL-16</p>	 <p>The structure of PhBzL-16 features a central benzimidazole ring system. One nitrogen of the benzimidazole is substituted with a hydroxymethyl group (-CH₂OH). The 2-position of the benzimidazole is substituted with a propyl group (-CH₂CH₂CH₃). The 5-position is substituted with a long, branched polyether chain consisting of several tetraethylene glycol units. The 6-position is substituted with a piperidine ring, which is further substituted with a hydroxymethyl group (-CH₂OH) and a sulfonamide group (-SO₂NH-). The 7-position is substituted with a 2,3,4,5-tetrafluorophenyl group (-C₆H₂F₄).</p>	<p>1210.3</p>
<p>PhBzL-17</p>	 <p>The structure of PhBzL-17 features a central benzimidazole ring system. One nitrogen of the benzimidazole is substituted with a hydroxymethyl group (-CH₂OH). The 2-position is substituted with a propyl group (-CH₂CH₂CH₃). The 5-position is substituted with a long, branched polyether chain consisting of several tetraethylene glycol units. The 6-position is substituted with a piperidine ring, which is further substituted with a hydroxymethyl group (-CH₂OH) and a sulfonamide group (-SO₂NH-). The 7-position is substituted with a 2,3,4,5-tetrafluorophenyl group (-C₆H₂F₄).</p>	<p>1262.4</p>
<p>PhBzL-18</p>	 <p>The structure of PhBzL-18 features a central benzimidazole ring system. One nitrogen of the benzimidazole is substituted with a hydroxymethyl group (-CH₂OH). The 2-position is substituted with a propyl group (-CH₂CH₂CH₃). The 5-position is substituted with a long, branched polyether chain consisting of several tetraethylene glycol units. The 6-position is substituted with a piperidine ring, which is further substituted with a hydroxymethyl group (-CH₂OH) and a sulfonamide group (-SO₂NH-). The 7-position is substituted with a 2,3,4,5-tetrafluorophenyl group (-C₆H₂F₄).</p>	<p>1240.4</p>

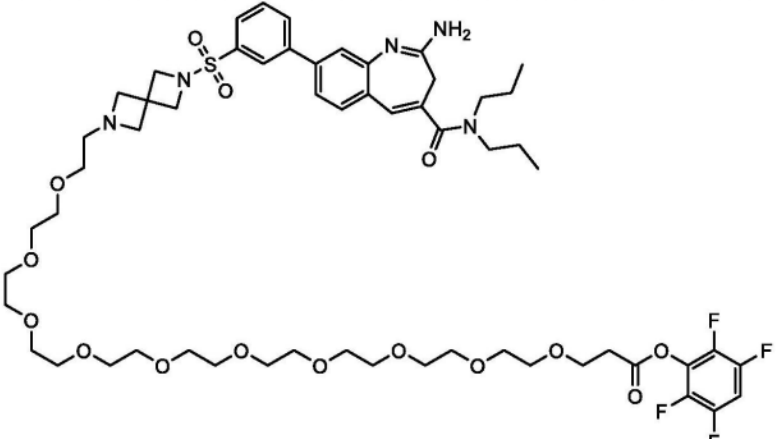
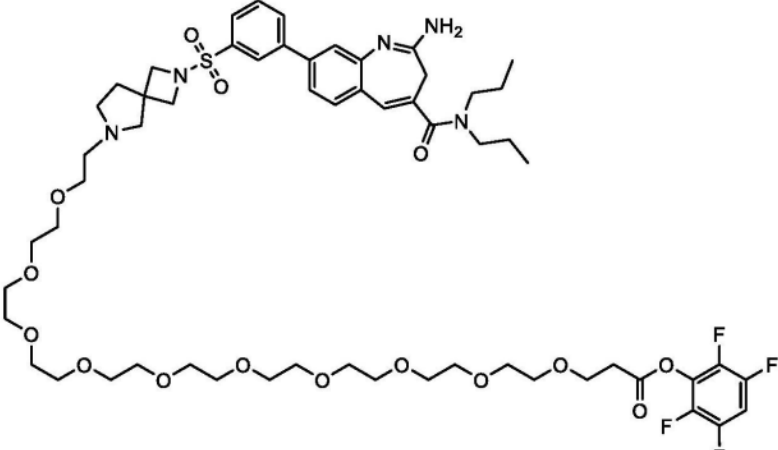
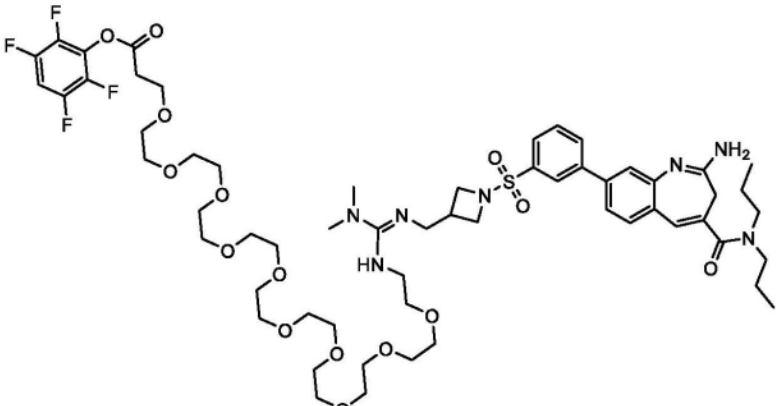
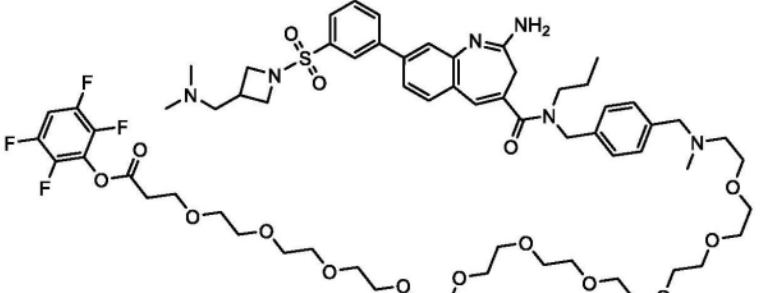
PhBzL-19	 <p>The chemical structure of PhBzL-19 features a central benzimidazole ring system. It is substituted with a primary amine group (-NH₂) at the 2-position, a diethylamino group (-N(CH₂CH₃)₂) at the 3-position, and a carbonyl group (-C(=O)-) at the 4-position. A 4-(hydroxymethyl)imidazole-2-sulfonyl group is attached to the 5-position of the benzimidazole ring. A 4-(4-cyano-2-((2,2,2,2-tetrafluoroethyl)oxy)ethyl)phenyl group is connected to the carbonyl oxygen via a methylene bridge (-CH₂-). The 4-cyano-2-((2,2,2,2-tetrafluoroethyl)oxy)ethyl group is further linked to a long, flexible polyether chain consisting of multiple ethylene glycol units.</p>	1391.5
PhBzL-20	 <p>The chemical structure of PhBzL-20 is a complex molecule. It contains a benzimidazole core with a primary amine group (-NH₂) at the 2-position, a diethylamino group (-N(CH₂CH₃)₂) at the 3-position, and a carbonyl group (-C(=O)-) at the 4-position. A 4-(hydroxymethyl)imidazole-2-sulfonyl group is attached to the 5-position. A 4-(4-cyano-2-((2,2,2,2-tetrafluoroethyl)oxy)ethyl)phenyl group is connected to the carbonyl oxygen via a methylene bridge (-CH₂-). The 4-cyano-2-((2,2,2,2-tetrafluoroethyl)oxy)ethyl group is further linked to a long, flexible polyether chain consisting of multiple ethylene glycol units. Additionally, the structure includes a 2-(2-((2,2,2,2-tetrafluoroethyl)oxy)ethyl)propanoic acid derivative and a 2-(2-((2,2,2,2-tetrafluoroethyl)oxy)ethyl)propanoic acid derivative.</p>	2275.6

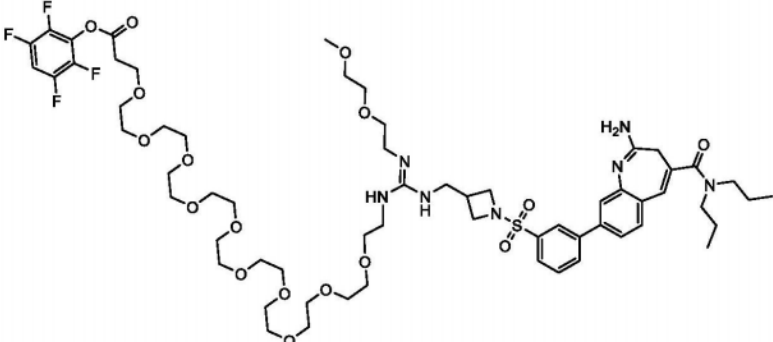
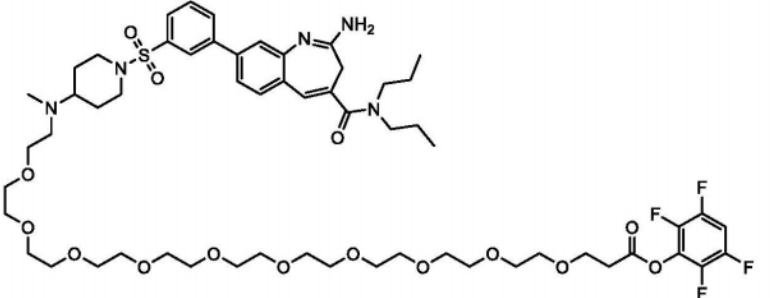
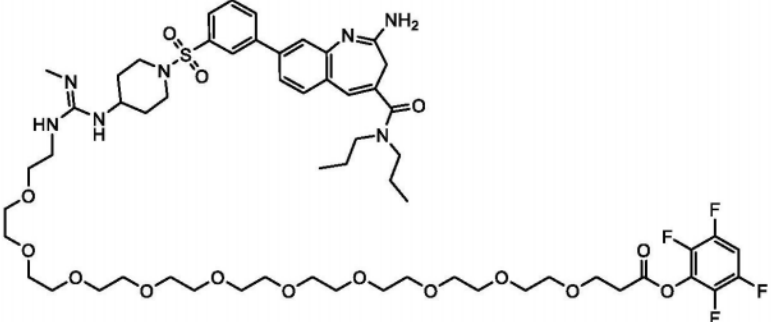
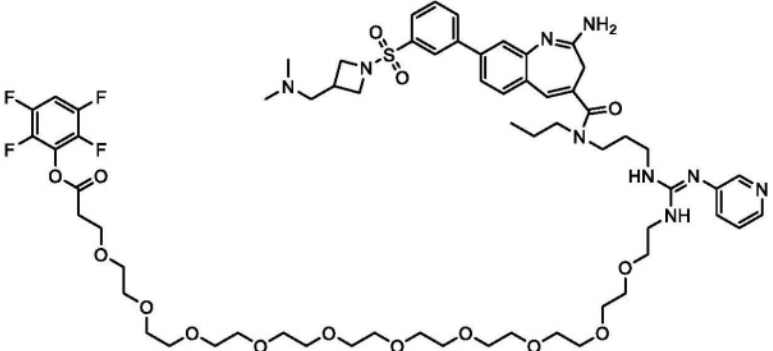
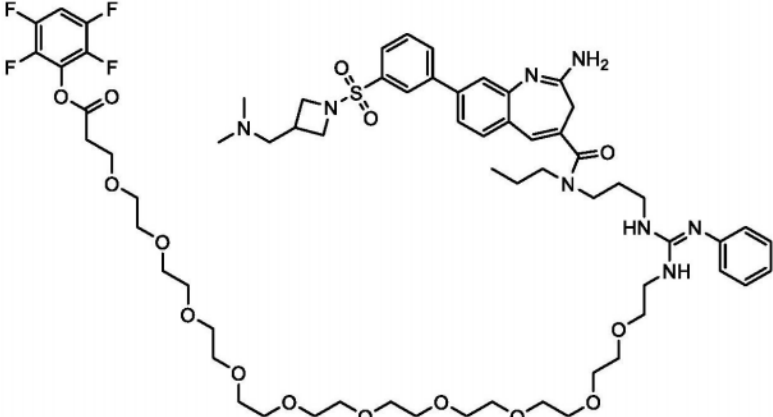
[0244]

PhBzL-21	 <p>The chemical structure of PhBzL-21 is a complex molecule. It features a central benzimidazole ring system. One of the benzimidazole nitrogens is substituted with an amino group (-NH₂). The 2-position of the benzimidazole is substituted with a carbonyl group (-C(=O)-), which is further substituted with a diethylamino group (-N(CH₂CH₂)₂). The 5-position of the benzimidazole is substituted with a sulfonamide group (-SO₂-NH-), which is linked to a piperidine ring. The piperidine ring is further substituted with a long, branched polyether chain consisting of multiple ethylene glycol units. The other end of this polyether chain is terminated with a trifluoromethyl ether group (-O-CF₃).</p>	2390.7
PhBzL-22	 <p>The chemical structure of PhBzL-22 is a complex molecule. It features a central benzimidazole ring system. One of the benzimidazole nitrogens is substituted with an amino group (-NH₂). The 2-position of the benzimidazole is substituted with a carbonyl group (-C(=O)-), which is further substituted with a diethylamino group (-N(CH₂CH₂)₂). The 5-position of the benzimidazole is substituted with a sulfonamide group (-SO₂-NH-), which is linked to a piperidine ring. The piperidine ring is further substituted with a long, branched polyether chain consisting of multiple ethylene glycol units. The other end of this polyether chain is terminated with a trifluoromethyl ether group (-O-CF₃).</p>	1226.4
PhBzL-23	 <p>The chemical structure of PhBzL-23 is a complex molecule. It features a central benzimidazole ring system. One of the benzimidazole nitrogens is substituted with an amino group (-NH₂). The 2-position of the benzimidazole is substituted with a carbonyl group (-C(=O)-), which is further substituted with a diethylamino group (-N(CH₂CH₂)₂). The 5-position of the benzimidazole is substituted with a sulfonamide group (-SO₂-NH-), which is linked to a piperidine ring. The piperidine ring is further substituted with a long, branched polyether chain consisting of multiple ethylene glycol units. The other end of this polyether chain is terminated with a trifluoromethyl ether group (-O-CF₃).</p>	1295.5

[0245]

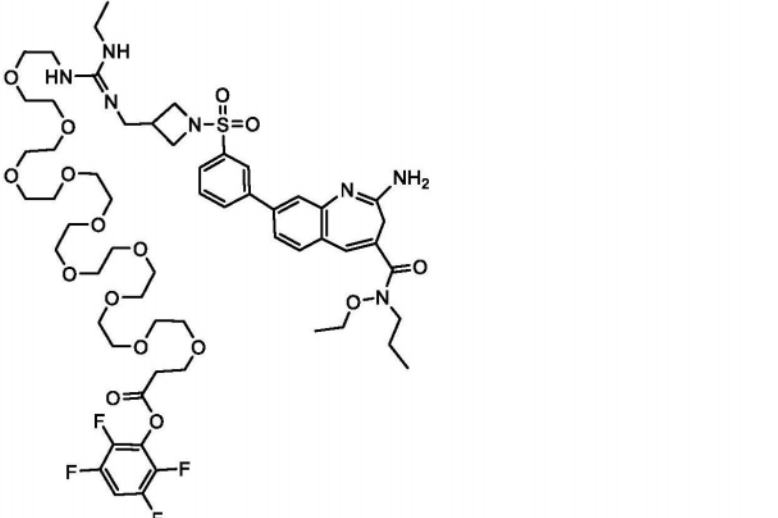
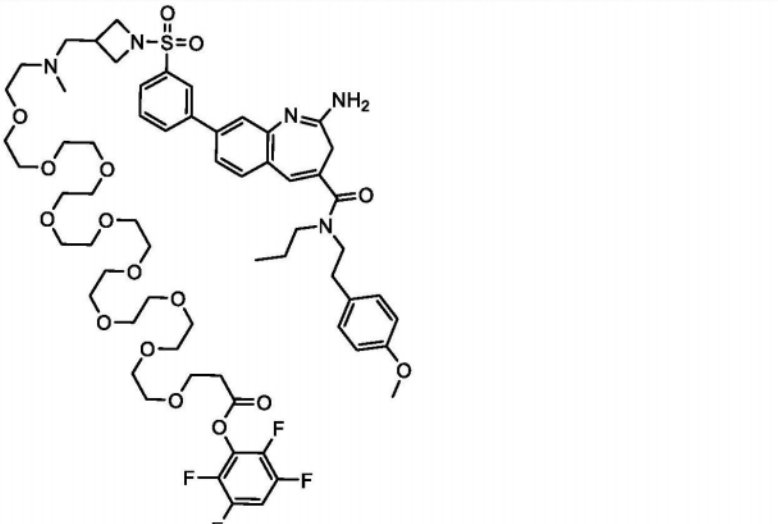
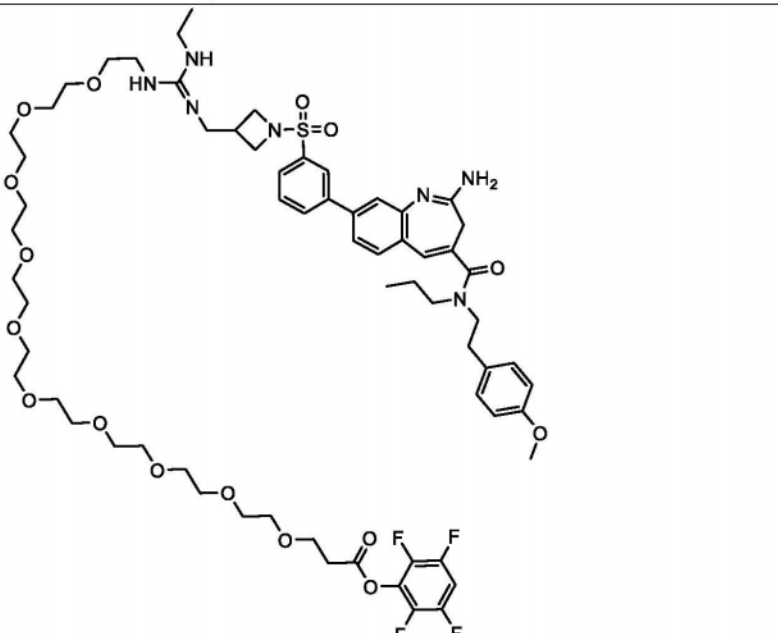
[0246]

<p>PhBzL-24</p>		<p>1182.3</p>
<p>PhBzL-25</p>		<p>1196.4</p>
<p>PhBzL-26</p>		<p>1240.4</p>
<p>PhBzL-27</p>		<p>1289.5</p>

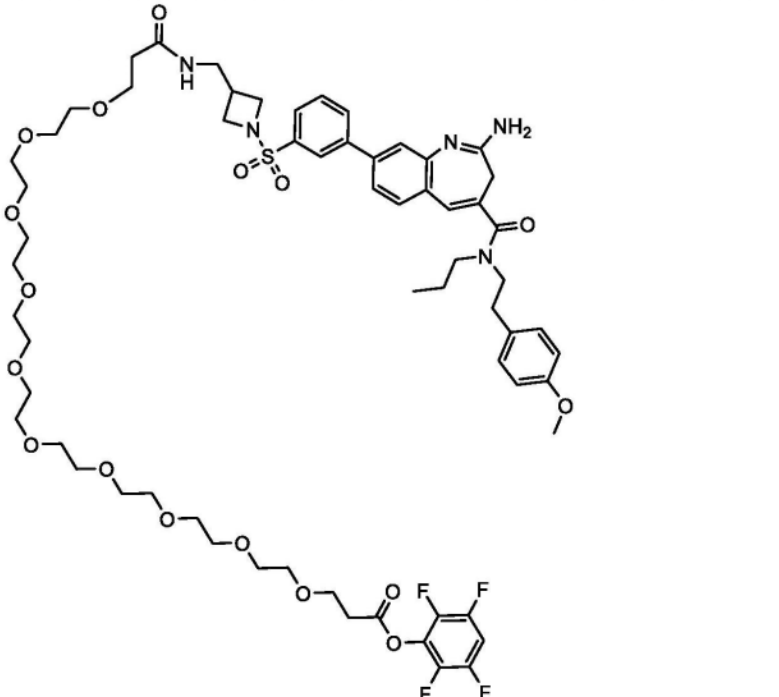
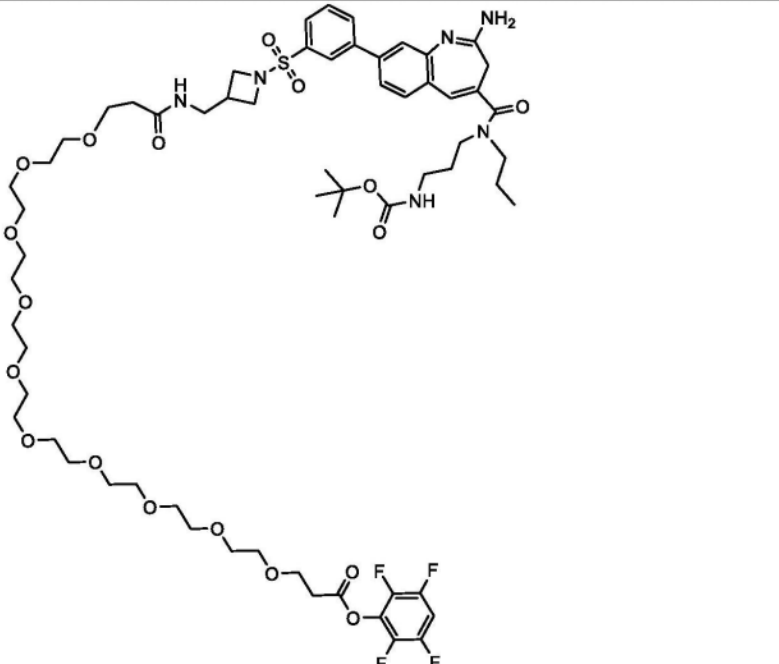
PhBzL-28		1314.5
PhBzL-29		1198.4
PhBzL-30		1240.4
PhBzL-31		1332.5
PhBzL-32		1331.5

[0247]

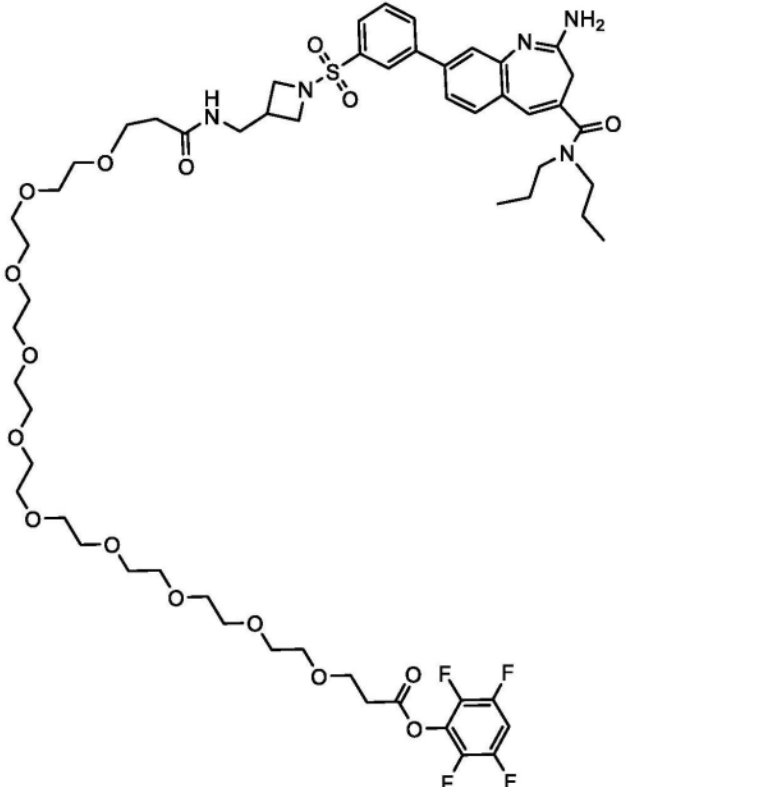
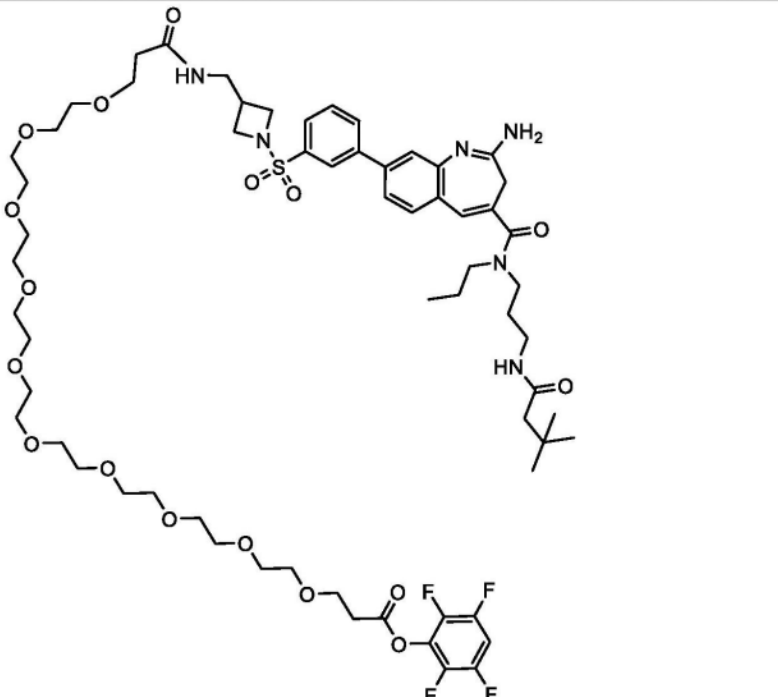
[0248]

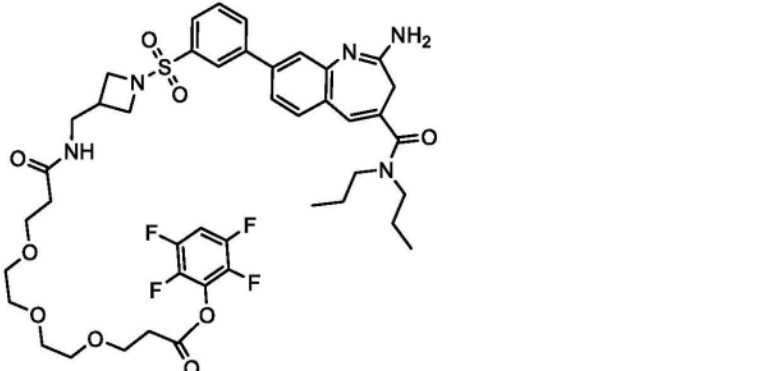
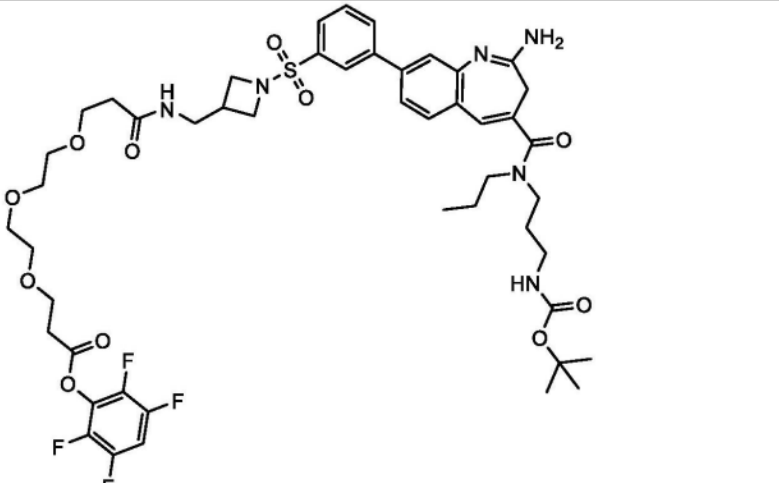
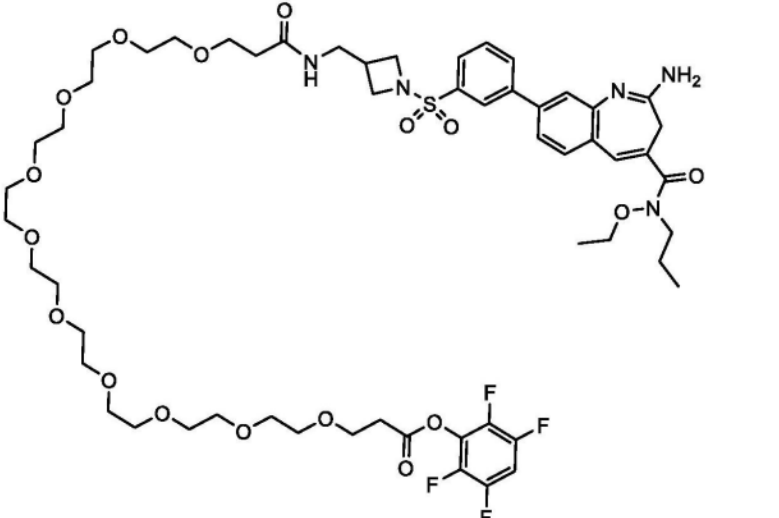
<p>PhBzL-33</p>	 <p>The structure of PhBzL-33 features a central benzimidazole ring system. One benzimidazole nitrogen is substituted with a primary amine group (-NH₂). The 2-position of the benzimidazole is linked to a carbonyl group (-C(=O)-), which is further connected to a nitrogen atom substituted with an ethyl group and a propyl group. The 5-position of the benzimidazole is linked to a phenyl ring. This phenyl ring is substituted at the para position with a sulfonamide group (-NH-S(=O)₂-) and at the other para position with a chain of five tetraethylene glycol units. The terminal oxygen of this chain is linked to a nitrogen atom that is part of a secondary amine group (-NH-), which is also substituted with an ethyl group. The nitrogen of this secondary amine is further linked to a chain of five tetraethylene glycol units. The terminal oxygen of this second chain is linked to a carbonyl group (-C(=O)-), which is attached to a 2,3,4,5-tetrafluorophenyl ring.</p>	<p>1242.4</p>
<p>PhBzL-34</p>	 <p>The structure of PhBzL-34 is similar to PhBzL-33, but with several modifications. The secondary amine group (-NH-) is substituted with a methyl group and a propyl group. The chain of five tetraethylene glycol units is replaced by a chain of six tetraethylene glycol units. The terminal oxygen of this chain is linked to a carbonyl group (-C(=O)-), which is attached to a 2,3,4,5-tetrafluorophenyl ring. The other tetraethylene glycol chain is also present, but its terminal oxygen is linked to a carbonyl group (-C(=O)-) that is attached to a 4-methoxyphenyl ring.</p>	<p>1276.4</p>
<p>PhBzL-35</p>	 <p>The structure of PhBzL-35 is similar to PhBzL-34, but with a different secondary amine group. The secondary amine group (-NH-) is substituted with a methyl group and a propyl group. The chain of six tetraethylene glycol units is replaced by a chain of seven tetraethylene glycol units. The terminal oxygen of this chain is linked to a carbonyl group (-C(=O)-), which is attached to a 2,3,4,5-tetrafluorophenyl ring. The other tetraethylene glycol chain is also present, but its terminal oxygen is linked to a carbonyl group (-C(=O)-) that is attached to a 4-methoxyphenyl ring.</p>	<p>1332.5</p>

[0249]

PhBzL-36	 <p>The chemical structure of PhBzL-36 features a long, flexible polyether chain consisting of 12 repeating units of ethylene glycol (–CH₂–CH₂–O–). The chain is terminated at one end by a carbonyl group (–C(=O)–) which is linked via an amide bond to a pyrrolidine ring. The nitrogen atom of the pyrrolidine ring is substituted with a p-toluenesulfonyl group (–SO₂–C₆H₄–). The para-substituted phenyl ring of the tosyl group is further connected to a benzimidazole ring system. The benzimidazole ring has an amino group (–NH₂) at the 2-position and a carbonyl group (–C(=O)–) at the 4-position. This carbonyl group is linked to a nitrogen atom that is substituted with an ethyl group and a 4-methoxyphenyl group (–C₆H₄–O–CH₃).</p>	1290.4
PhBzL-37	 <p>The chemical structure of PhBzL-37 is similar to PhBzL-36, featuring the same long polyether chain and tosyl-benzimidazole core. However, the nitrogen atom of the pyrrolidine ring is substituted with a p-toluenesulfonyl group and a carbonyl group (–C(=O)–). This carbonyl group is linked to a nitrogen atom that is substituted with an ethyl group and a tert-butyl carbamate group (–NH–C(=O)–O–C(CH₃)₃).</p>	1313.5

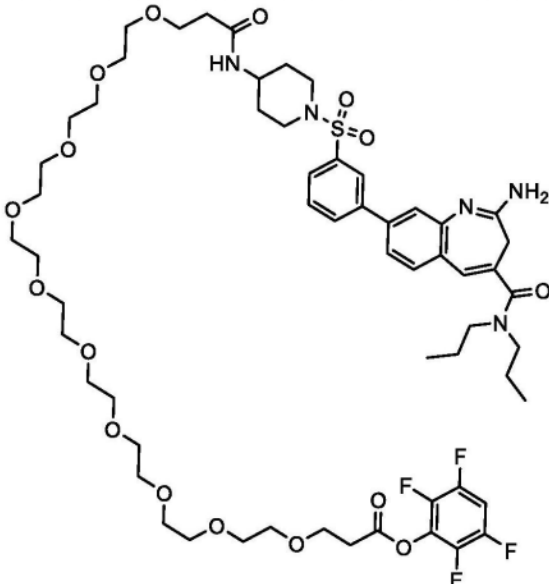
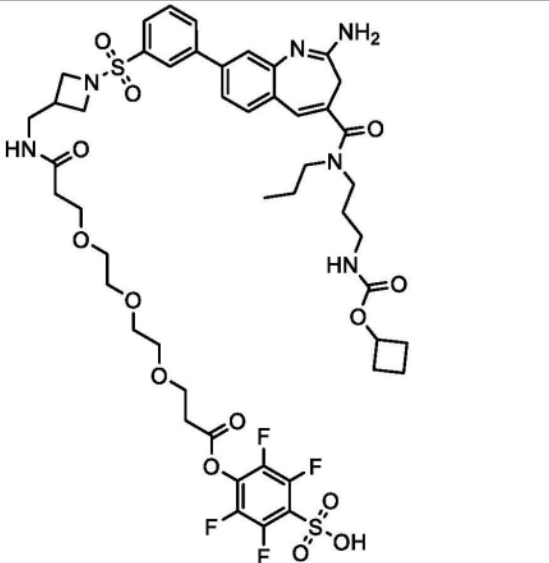
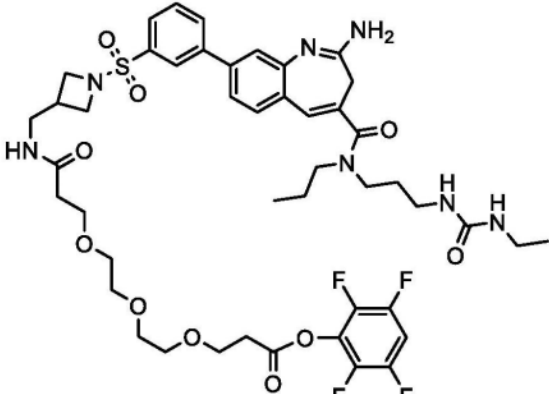
[0250]

PhBzL-38	 <p>The chemical structure of PhBzL-38 features a long, flexible polyether chain consisting of 12 repeating units of ethylene glycol (–CH₂–CH₂–O–). The chain is terminated at one end by a hydroxyl group and at the other by a carboxylic acid group. The carboxylic acid group is esterified with a 2,3,4,5-tetrafluorophenyl ring. The hydroxyl end is linked via an amide bond to a 2-imino-1,2,3,4-tetrahydroquinoline ring system. This ring system is further substituted with a benzene ring that has a sulfonamide group (–SO₂–NH₂) at the para position relative to the quinoline ring.</p>	1198.3
PhBzL-39	 <p>The chemical structure of PhBzL-39 is similar to PhBzL-38, featuring a long polyether chain with a 2,3,4,5-tetrafluorophenyl ester group at one end. However, the other end of the chain is terminated with a hydroxyl group that is linked via an amide bond to a 2-imino-1,2,3,4-tetrahydroquinoline ring system. This ring system is substituted with a benzene ring that has a sulfonamide group (–SO₂–NH₂) at the para position. Additionally, the nitrogen atom of the tetrahydroquinoline ring is substituted with a tert-butyl group.</p>	1311.5

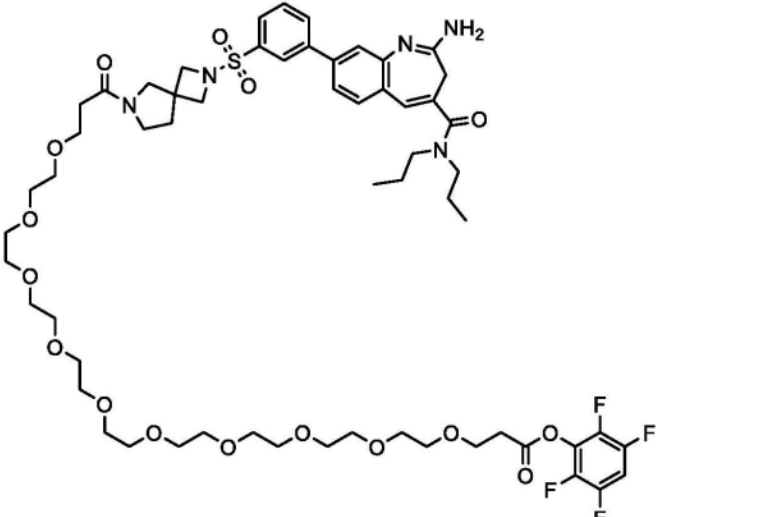
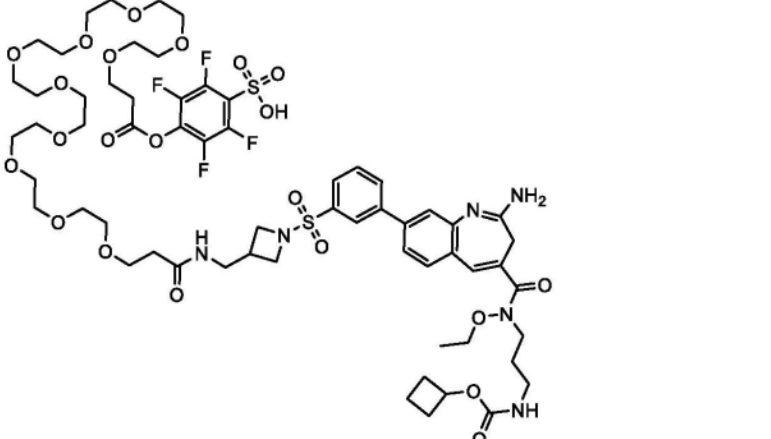
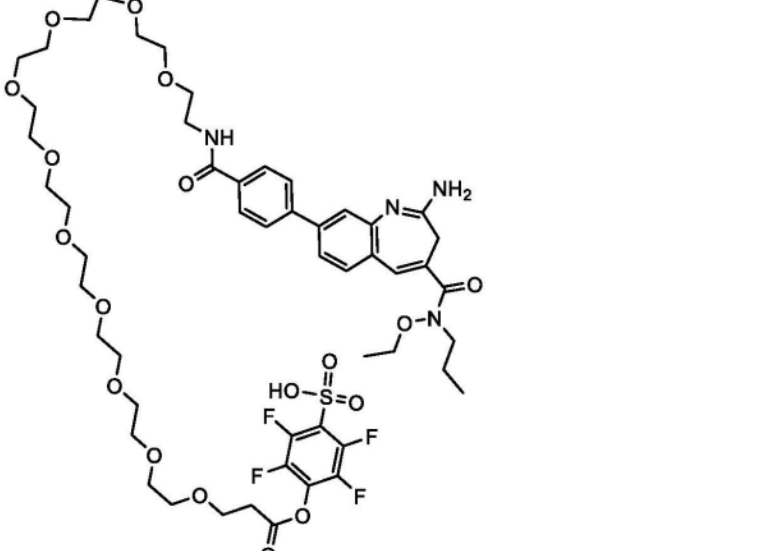
PhBzL-40	 <p>Chemical structure of PhBzL-40: A large macrocyclic molecule. It features a central benzimidazole ring system with an amino group (NH₂) and a carbonyl group (C=O). The carbonyl group is linked to a nitrogen atom, which is further connected to a propyl chain. The nitrogen atom is also linked to a sulfonamide group (-SO₂-NH-), which is connected to a benzene ring. This benzene ring is linked to another benzene ring, which is part of a larger fused ring system. The macrocycle is completed by a long chain of ether linkages (-O-) and a carbonyl group (C=O) that is linked to a fluorinated benzene ring (1,2,3,4-tetrafluorophenyl).</p>	724.9
PhBzL-41	 <p>Chemical structure of PhBzL-41: A large macrocyclic molecule. It features a central benzimidazole ring system with an amino group (NH₂) and a carbonyl group (C=O). The carbonyl group is linked to a nitrogen atom, which is further connected to a propyl chain. The nitrogen atom is also linked to a sulfonamide group (-SO₂-NH-), which is connected to a benzene ring. This benzene ring is linked to another benzene ring, which is part of a larger fused ring system. The macrocycle is completed by a long chain of ether linkages (-O-) and a carbonyl group (C=O) that is linked to a fluorinated benzene ring (1,2,3,4-tetrafluorophenyl). Additionally, there is a tert-butyl ester group attached to the propyl chain.</p>	1005.1
PhBzL-42	 <p>Chemical structure of PhBzL-42: A large macrocyclic molecule. It features a central benzimidazole ring system with an amino group (NH₂) and a carbonyl group (C=O). The carbonyl group is linked to a nitrogen atom, which is further connected to a propyl chain. The nitrogen atom is also linked to a sulfonamide group (-SO₂-NH-), which is connected to a benzene ring. This benzene ring is linked to another benzene ring, which is part of a larger fused ring system. The macrocycle is completed by a long chain of ether linkages (-O-) and a carbonyl group (C=O) that is linked to a fluorinated benzene ring (1,2,3,4-tetrafluorophenyl). Additionally, there is an ethoxy group attached to the propyl chain.</p>	1200.3

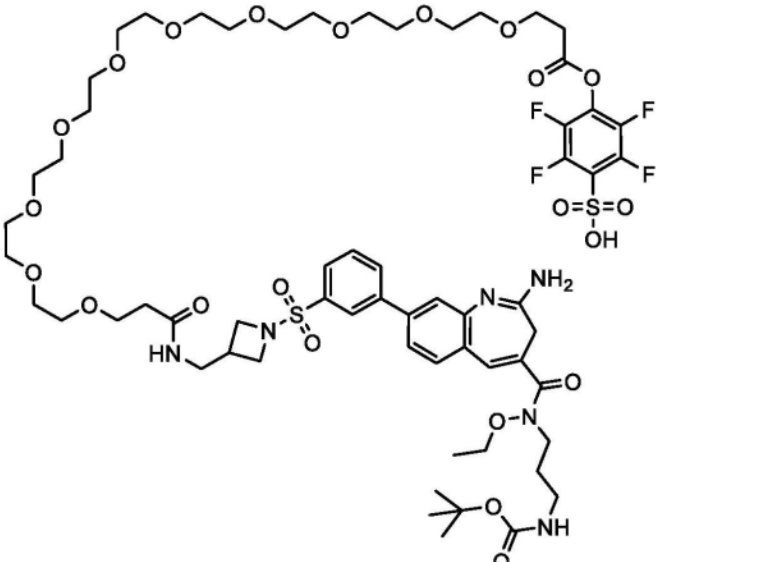
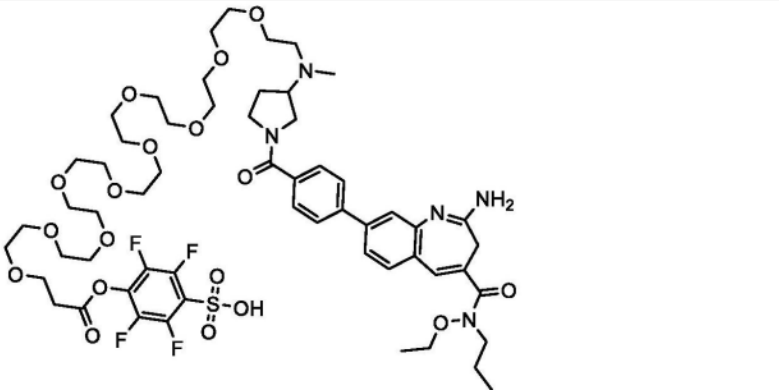
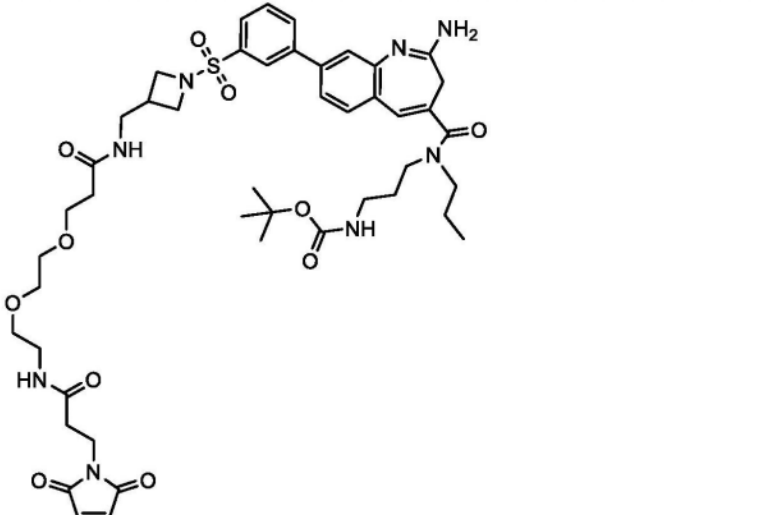
[0251]

[0252]

<p>PhBzL-43</p>		<p>1212.4</p>
<p>PhBzL-44</p>		<p>1083.1</p>
<p>PhBzL-45</p>		<p>1056.1</p>

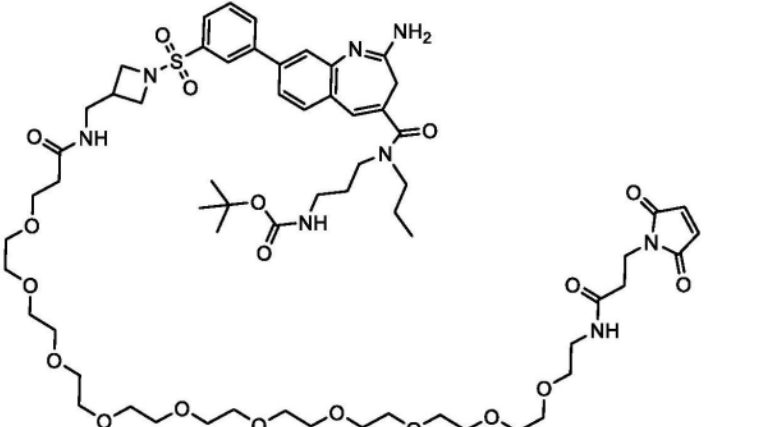
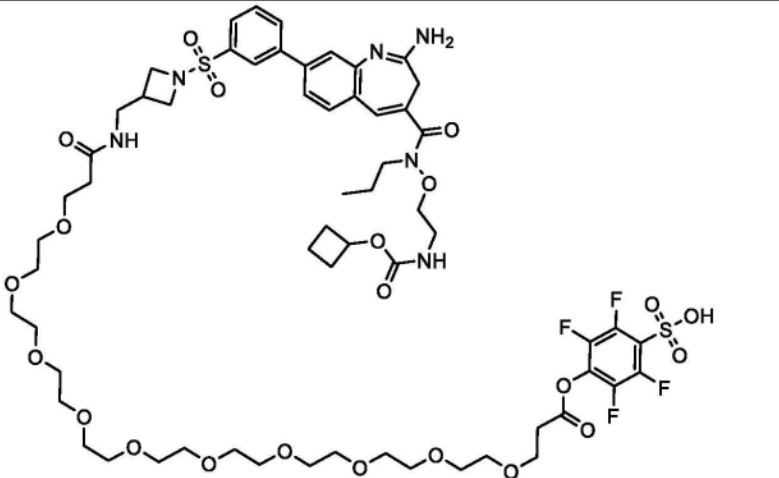
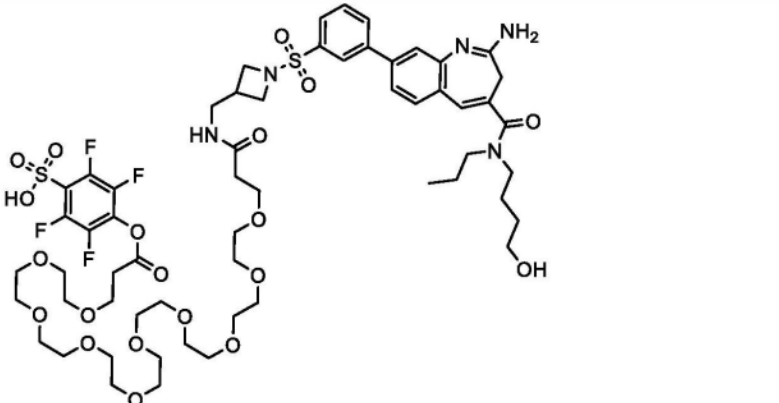
[0254]

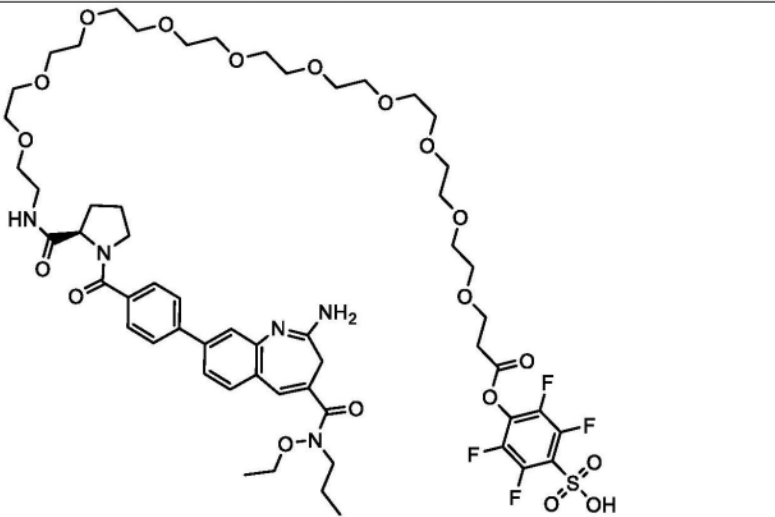
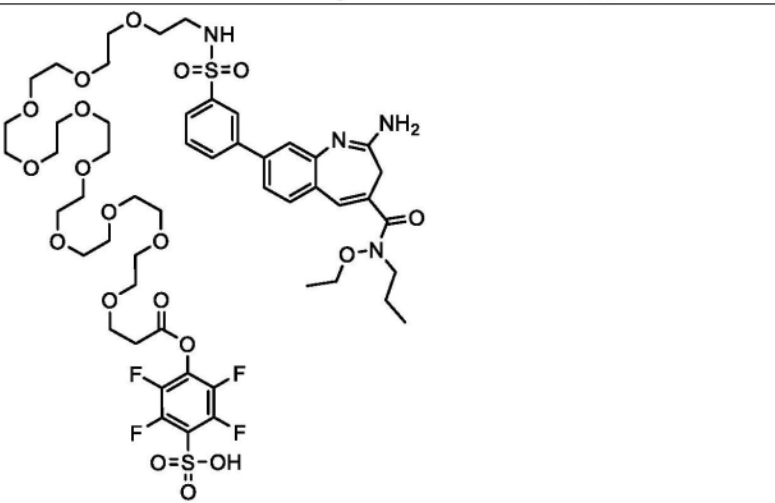
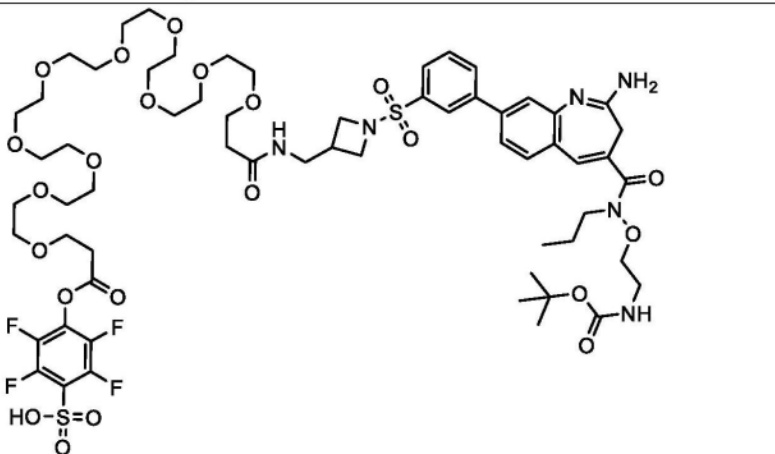
<p>PhBzL-49</p>		<p>1224.4</p>
<p>PhBzL-50</p>		<p>1393.5</p>
<p>PhBzL-51</p>		<p>1147.2</p>

PhBzL-52	 <p>The structure of PhBzL-52 features a central benzimidazole ring system. One nitrogen of the benzimidazole is substituted with an amino group (-NH₂). The 2-position of the benzimidazole is linked to a carbonyl group (-C(=O)-), which is further connected to a nitrogen atom. This nitrogen atom is substituted with an ethyl group and a tert-butyl carbamate group (-NH-C(=O)-C(CH₃)₃). The 5-position of the benzimidazole is linked to a para-substituted phenyl ring. This phenyl ring is connected to the nitrogen of a pyrrolidine ring. The nitrogen of the pyrrolidine ring is substituted with a hydrogen atom and a long poly(ethylene glycol) (PEG) chain. The PEG chain is terminated with a pentafluorobenzoate group (-O-C(=O)-C₆H₂(F)₅-SO₃H).</p>	1395.5
PhBzL-53	 <p>The structure of PhBzL-53 features a central benzimidazole ring system. One nitrogen of the benzimidazole is substituted with an amino group (-NH₂). The 2-position of the benzimidazole is linked to a carbonyl group (-C(=O)-), which is further connected to a nitrogen atom. This nitrogen atom is substituted with an ethyl group and a tert-butyl carbamate group (-NH-C(=O)-C(CH₃)₃). The 5-position of the benzimidazole is linked to a para-substituted phenyl ring. This phenyl ring is connected to the nitrogen of a pyrrolidine ring. The nitrogen of the pyrrolidine ring is substituted with a methyl group and a long poly(ethylene glycol) (PEG) chain. The PEG chain is terminated with a pentafluorobenzoate group (-O-C(=O)-C₆H₂(F)₅-SO₃H).</p>	1230.3
PhBzL-54	 <p>The structure of PhBzL-54 features a central benzimidazole ring system. One nitrogen of the benzimidazole is substituted with an amino group (-NH₂). The 2-position of the benzimidazole is linked to a carbonyl group (-C(=O)-), which is further connected to a nitrogen atom. This nitrogen atom is substituted with an ethyl group and a tert-butyl carbamate group (-NH-C(=O)-C(CH₃)₃). The 5-position of the benzimidazole is linked to a para-substituted phenyl ring. This phenyl ring is connected to the nitrogen of a pyrrolidine ring. The nitrogen of the pyrrolidine ring is substituted with a hydrogen atom and a long poly(ethylene glycol) (PEG) chain. The PEG chain is terminated with a pentafluorobenzoate group (-O-C(=O)-C₆H₂(F)₅-SO₃H).</p>	935.1

[0255]

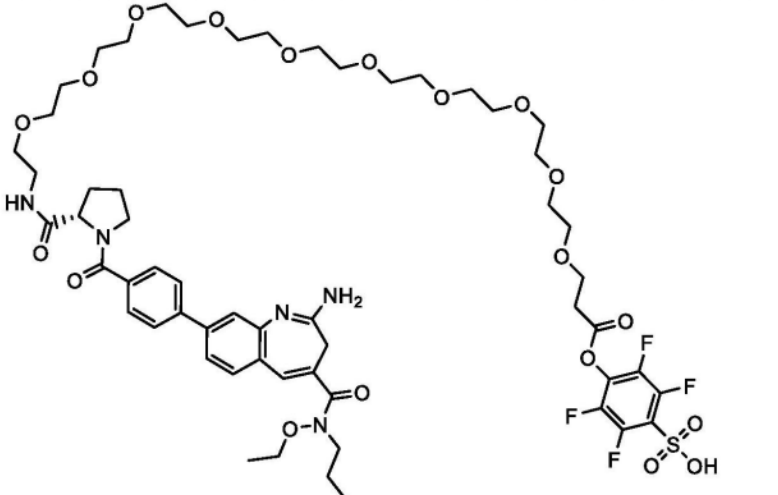
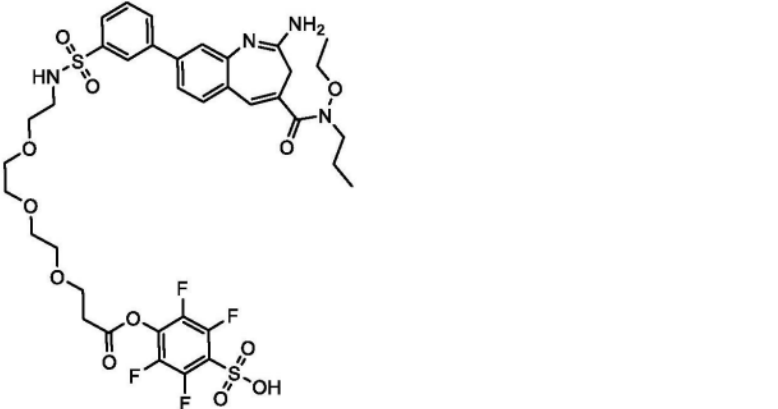
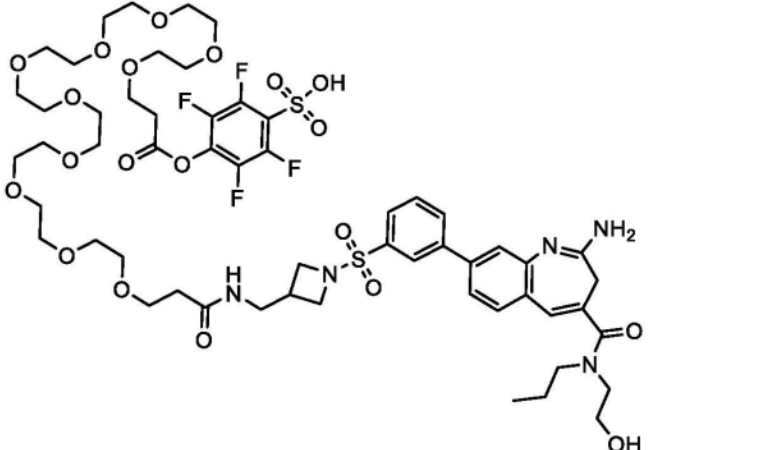
[0256]

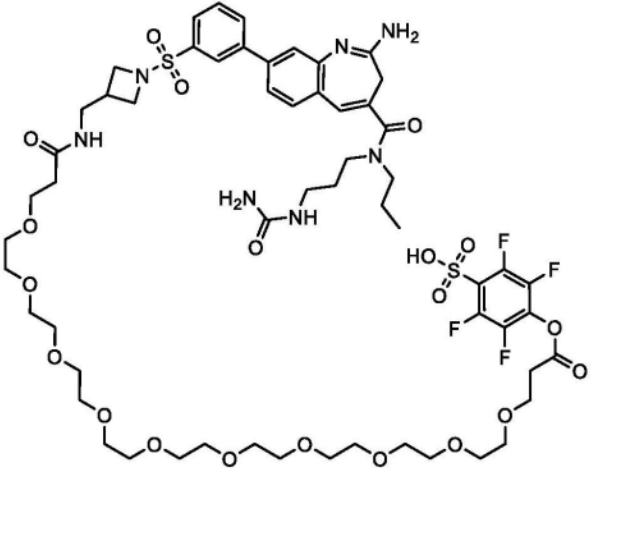
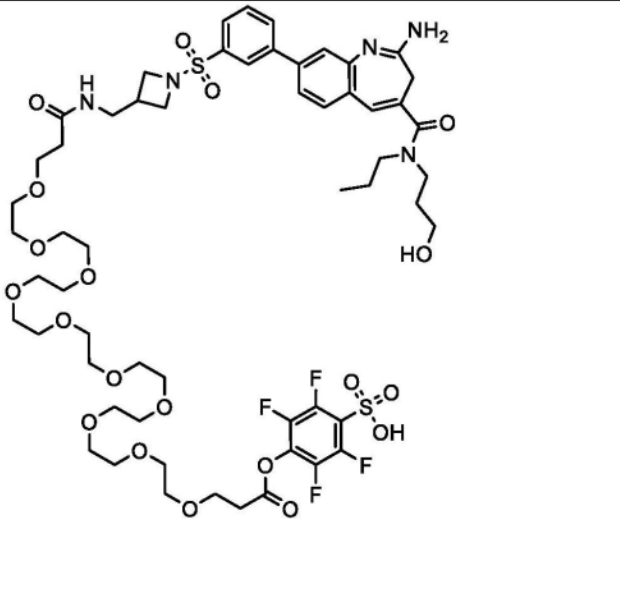
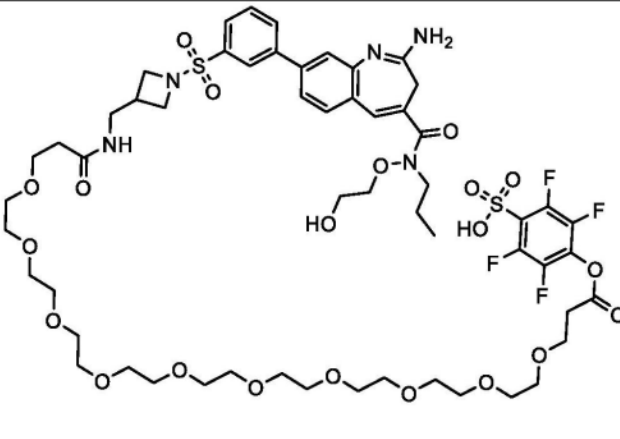
PhBzL-55	 <p>Chemical structure of PhBzL-55, a macrocyclic compound. It features a central benzimidazole ring system with an amino group (NH₂) and a sulfonamide group (SO₂NH) attached. The macrocycle is formed by a long chain of repeating units, including a tert-butyl amide group, a cyclohexane ring, and a sulfonamide group. The chain is terminated by a hydroxyl group and a sulfonamide group.</p>	1287.5
PhBzL-56	 <p>Chemical structure of PhBzL-56, a macrocyclic compound. It features a central benzimidazole ring system with an amino group (NH₂) and a sulfonamide group (SO₂NH) attached. The macrocycle is formed by a long chain of repeating units, including a cyclohexane ring, a sulfonamide group, and a pentafluorophenyl group. The chain is terminated by a hydroxyl group and a sulfonamide group.</p>	1393.5
PhBzL-57	 <p>Chemical structure of PhBzL-57, a macrocyclic compound. It features a central benzimidazole ring system with an amino group (NH₂) and a sulfonamide group (SO₂NH) attached. The macrocycle is formed by a long chain of repeating units, including a pentafluorophenyl group, a sulfonamide group, and a hydroxyl group. The chain is terminated by a hydroxyl group and a sulfonamide group.</p>	1308.4

PhBzL-58	 <p>Chemical structure of PhBzL-58, a large macrocyclic molecule. It features a long, flexible chain of repeating ether units (polyoxyethylene) forming a large ring. Attached to this chain are a piperidine ring, a benzimidazole core, and a 2,3,4,5-tetrafluorobenzoic acid moiety.</p>	1244.3
PhBzL-59	 <p>Chemical structure of PhBzL-59, a macrocyclic molecule. It consists of a long chain of ether units (polyoxyethylene) with a terminal primary amine group. This amine is linked to a benzimidazole core, which is further substituted with a piperidine ring and a 2,3,4,5-tetrafluorobenzoic acid moiety.</p>	1183.2
PhBzL-60	 <p>Chemical structure of PhBzL-60, a macrocyclic molecule. It features a long chain of ether units (polyoxyethylene) with a terminal primary amine group. This amine is linked to a piperidine ring, which is further substituted with a benzimidazole core and a 2,3,4,5-tetrafluorobenzoic acid moiety. The piperidine ring is also substituted with a tert-butyl group.</p>	1395.5

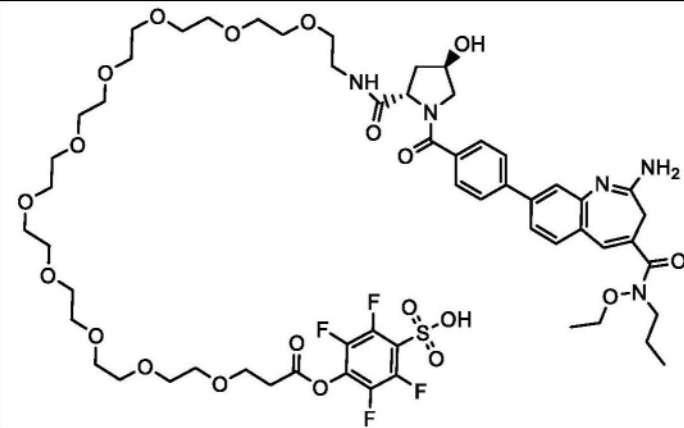
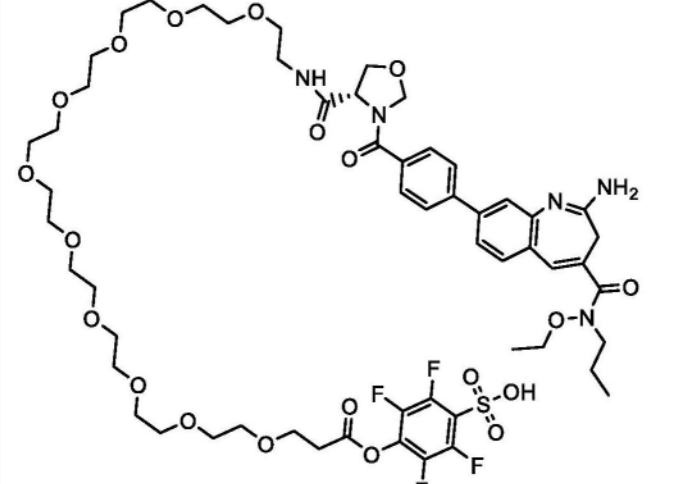
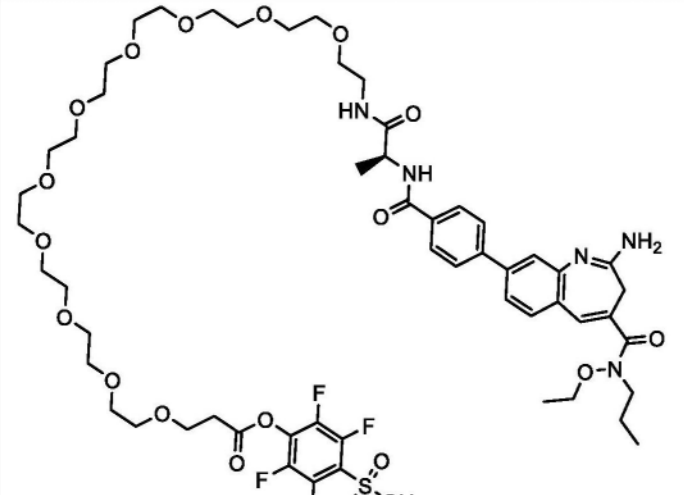
[0257]

[0258]

<p>PhBzL-61</p>		<p>1244.3</p>
<p>PhBzL-62</p>		<p>874.9</p>
<p>PhBzL-63</p>		<p>1280.4</p>

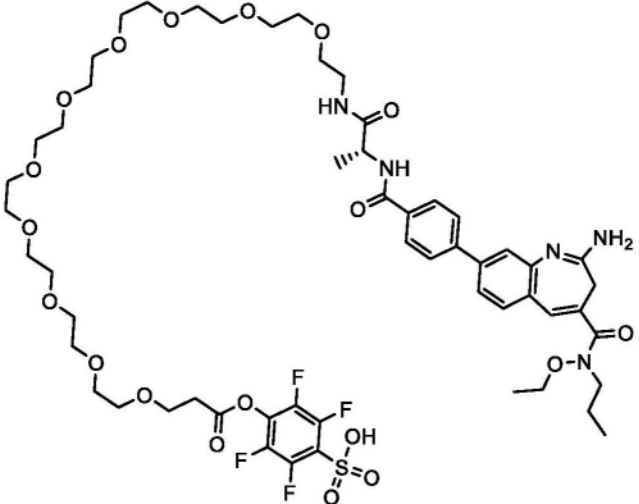
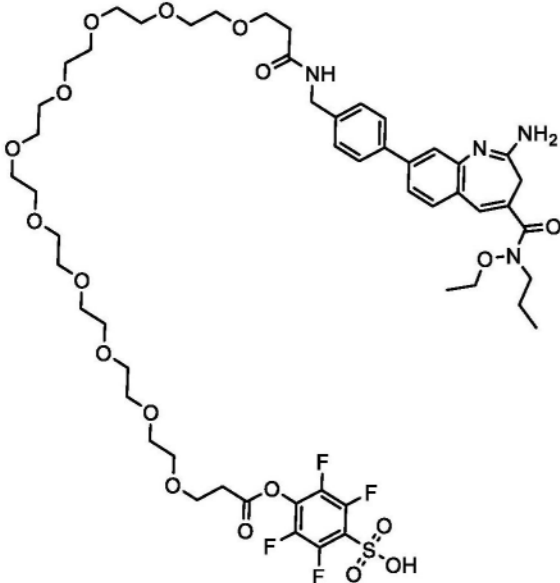
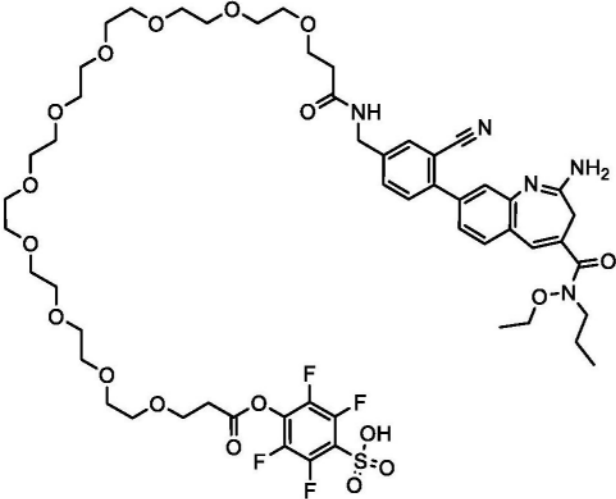
PhBzL-64		1336.4
PhBzL-65		1294.4
PhBzL-66		1296.4

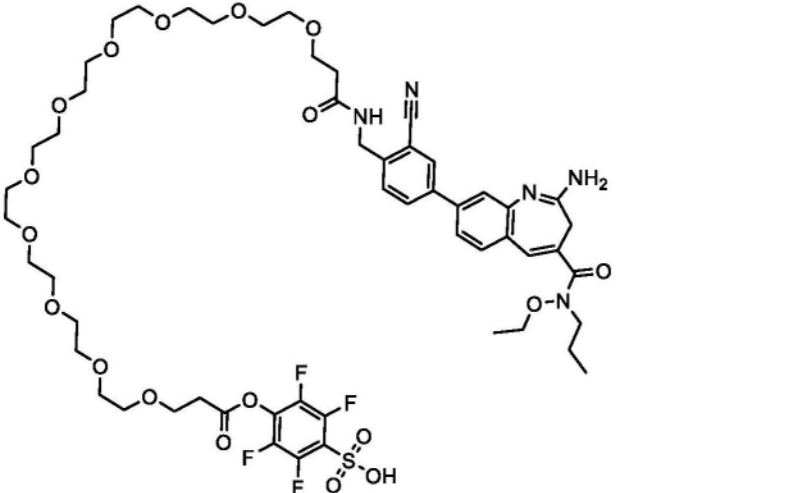
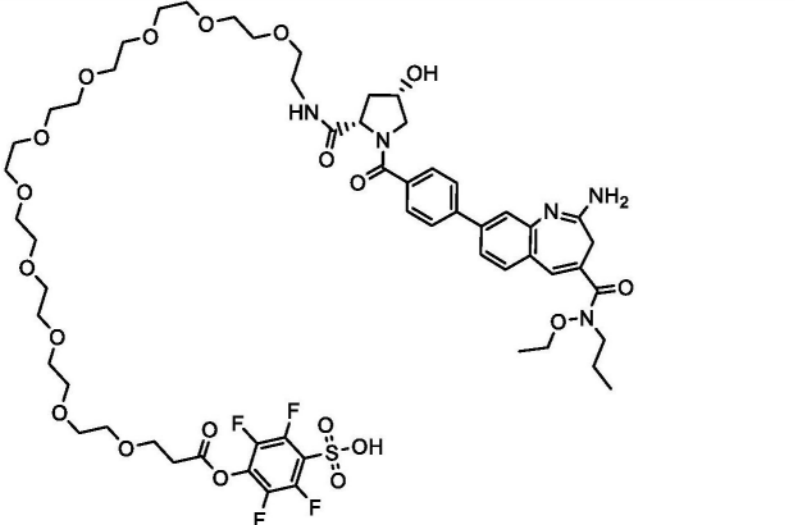
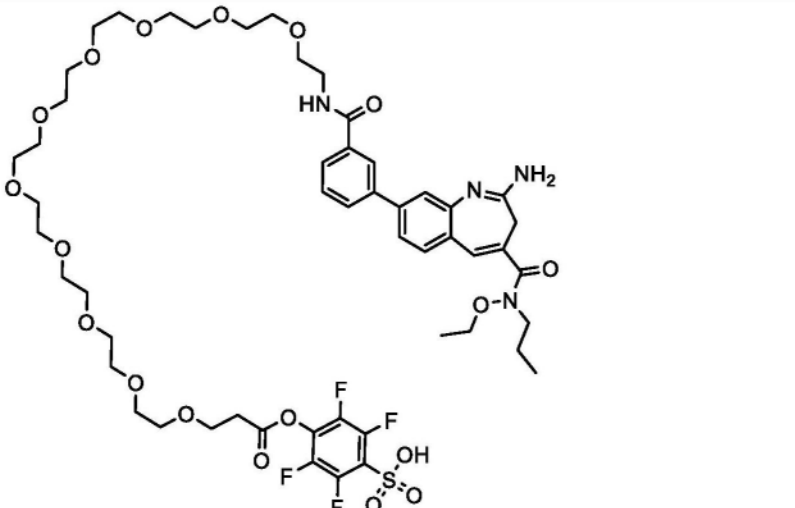
[0260] 表2b 8-苯基-2-氨基苯并氮杂草-接头中间体式II化合物(PhBzL)

PhBzL 编号	结构	MW
PhBzL-67	 <p>Chemical structure of PhBzL-67. It features a large macrocyclic polyether chain (12-membered ring) with a terminal hydroxyl group. The chain is linked via an amide bond to a 5-membered ring containing a hydroxyl group and a carbonyl group. This carbonyl group is further linked to a para-substituted benzene ring, which is connected to a quinoline ring system. The quinoline ring has an amino group (NH₂) at the 2-position and a carbonyl group at the 3-position. This carbonyl group is linked to a nitrogen atom that is also bonded to an ethoxy group and a propyl group. A separate 2,4,6-trifluorophenylsulfonic acid group is shown, consisting of a benzene ring with three fluorine atoms and a sulfonic acid group (-SO₃H).</p>	1260.3
PhBzL-68	 <p>Chemical structure of PhBzL-68. It is very similar to PhBzL-67, but the 5-membered ring containing the hydroxyl group is replaced by a 5-membered ring containing an oxygen atom (an oxazolidinone derivative). The rest of the structure, including the macrocyclic chain, the quinoline system, and the trifluorophenylsulfonic acid group, remains the same.</p>	1246.3
PhBzL-69	 <p>Chemical structure of PhBzL-69. It is similar to PhBzL-67, but the 5-membered ring is replaced by a 5-membered ring containing a nitrogen atom and a carbonyl group. The nitrogen atom is bonded to a hydrogen atom and a propyl group. The rest of the structure, including the macrocyclic chain, the quinoline system, and the trifluorophenylsulfonic acid group, remains the same.</p>	1218.3

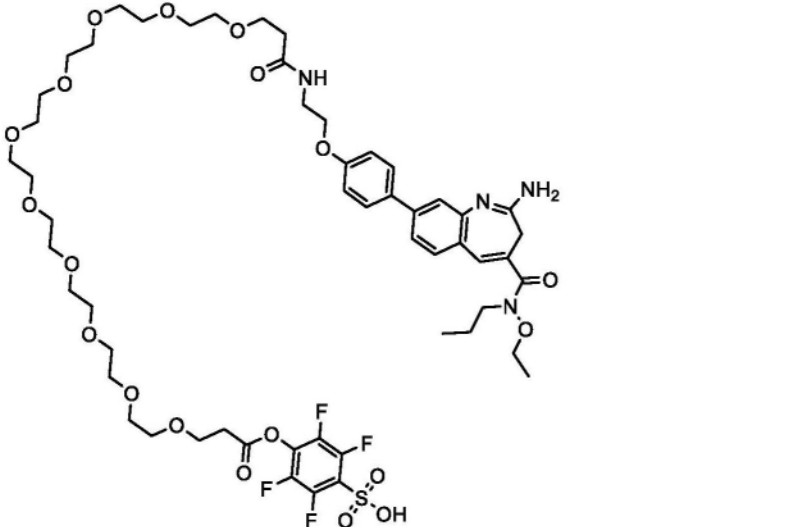
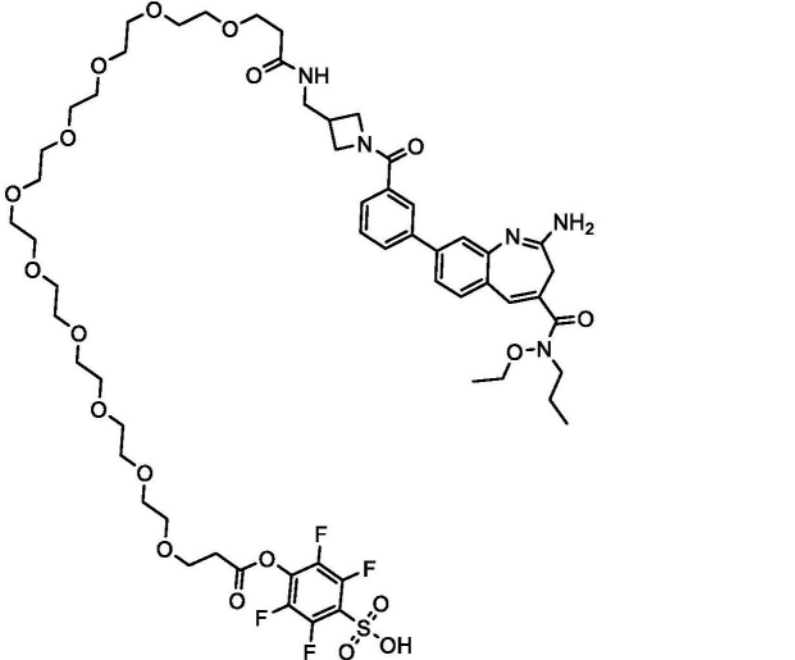
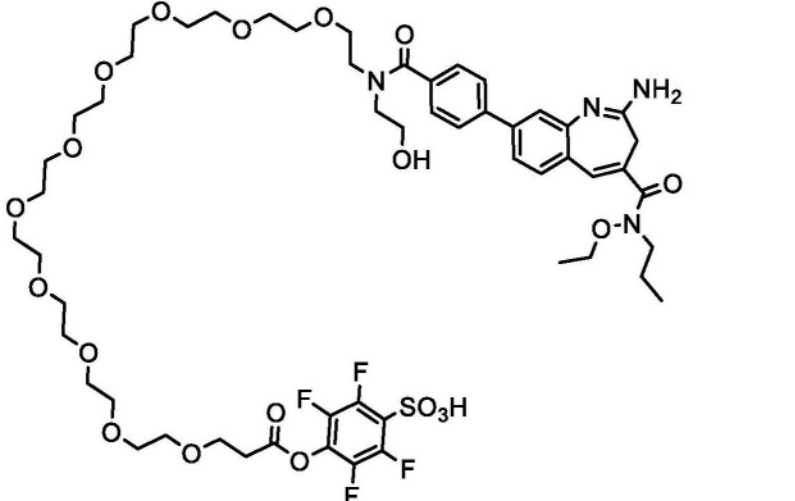
[0261]

[0262]

<p>PhBzL-70</p>		<p>1218.3</p>
<p>PhBzL-71</p>		<p>1161.2</p>
<p>PhBzL-72</p>		<p>1186.2</p>

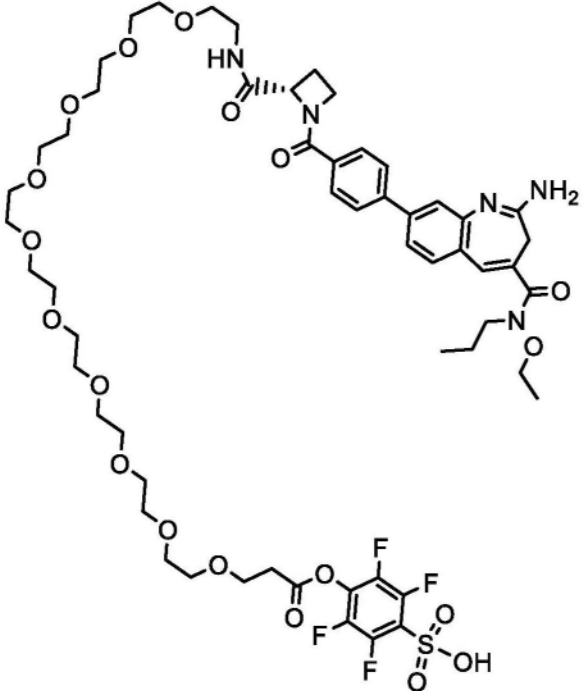
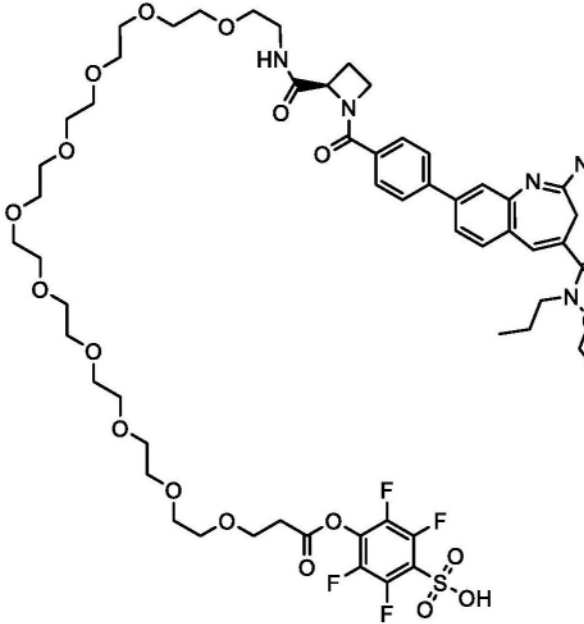
PhBzL-73	 <p>The structure of PhBzL-73 features a large 18-membered macrocyclic polyether ring. One end of the ring is connected via a propyl chain to a pentafluorophenyl group, which is further substituted with a sulfonic acid group (-SO₃H). The other end of the ring is connected via a propyl chain to a benzamide group (-NH-C(=O)-C₆H₄-). This benzamide group is linked to a quinoline ring system. The quinoline ring has an amino group (-NH₂) at the 2-position and a carbonyl group (-C(=O)-N(Et)₂) at the 3-position. A nitrile group (-C≡N) is attached to the benzamide ring at the para position.</p>	1186.2
PhBzL-74	 <p>The structure of PhBzL-74 is similar to PhBzL-73, featuring the same macrocyclic polyether ring and pentafluorophenyl sulfonic acid moiety. However, the benzamide group is linked to a quinoline ring system that has an amino group (-NH₂) at the 2-position and a carbonyl group (-C(=O)-N(Et)₂) at the 3-position. The benzamide ring is substituted with a hydroxyl group (-OH) at the para position.</p>	1260.3
PhBzL-75	 <p>The structure of PhBzL-75 is similar to PhBzL-73, featuring the same macrocyclic polyether ring and pentafluorophenyl sulfonic acid moiety. The benzamide group is linked to a quinoline ring system that has an amino group (-NH₂) at the 2-position and a carbonyl group (-C(=O)-N(Et)₂) at the 3-position. The benzamide ring is unsubstituted.</p>	1147.2

[0263]

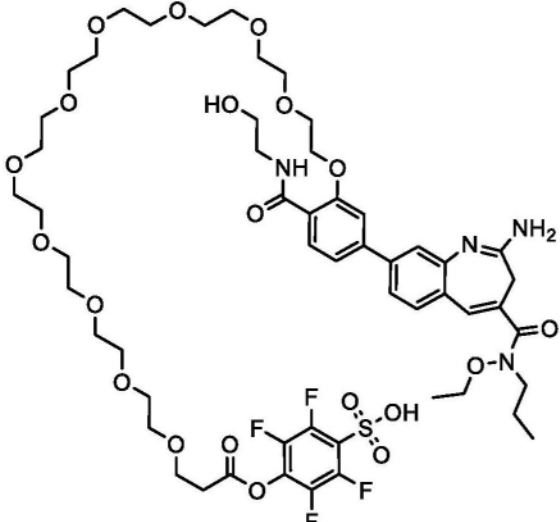
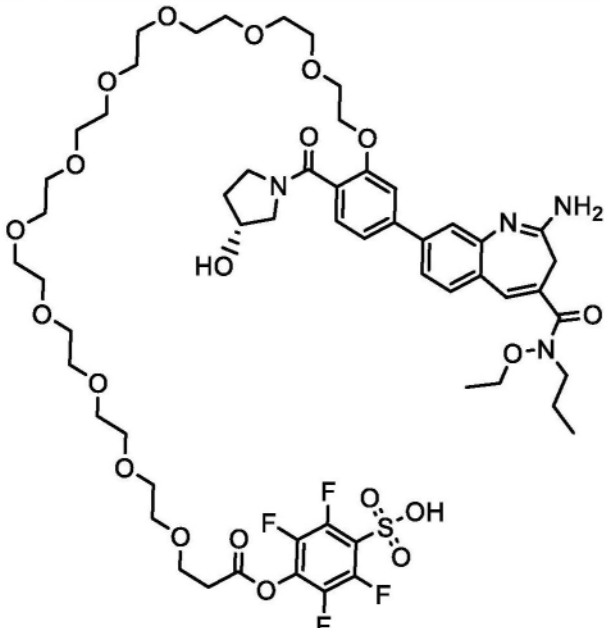
PhBzL-76	 <p>Chemical structure of PhBzL-76: A large macrocyclic molecule consisting of a 12-membered polyether ring (12 oxygens) connected to a 2,6-difluorophenyl group via an ester linkage. The 2,6-difluorophenyl group is further substituted with a sulfonic acid group (-SO₃H) at the 4-position. The polyether ring is also linked to a 4-((2-ethyl-1-ethoxyethylideneamino)oxy)phenyl group, which is connected to a 2-aminobenzimidazole ring system. The benzimidazole ring has a 2-ethyl-1-ethoxyethylideneamino group at the 2-position.</p>	1191.3
PhBzL-77	 <p>Chemical structure of PhBzL-77: A large macrocyclic molecule consisting of a 12-membered polyether ring (12 oxygens) connected to a 2,6-difluorophenyl group via an ester linkage. The 2,6-difluorophenyl group is further substituted with a sulfonic acid group (-SO₃H) at the 4-position. The polyether ring is also linked to a 4-((2-ethyl-1-ethoxyethylideneamino)oxy)phenyl group, which is connected to a benzimidazole ring system. The benzimidazole ring has a 2-ethyl-1-ethoxyethylideneamino group at the 2-position.</p>	1244.3
PhBzL-78	 <p>Chemical structure of PhBzL-78: A large macrocyclic molecule consisting of a 12-membered polyether ring (12 oxygens) connected to a 2,6-difluorophenyl group via an ester linkage. The 2,6-difluorophenyl group is further substituted with a sulfonic acid group (-SO₃H) at the 4-position. The polyether ring is also linked to a 4-((2-ethyl-1-ethoxyethylideneamino)oxy)phenyl group, which is connected to a benzimidazole ring system. The benzimidazole ring has a 2-ethyl-1-ethoxyethylideneamino group at the 2-position.</p>	1191.2

[0264]

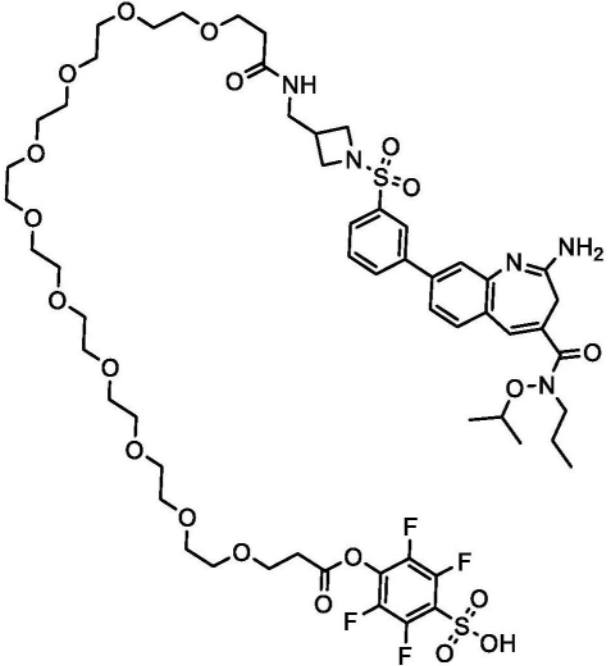
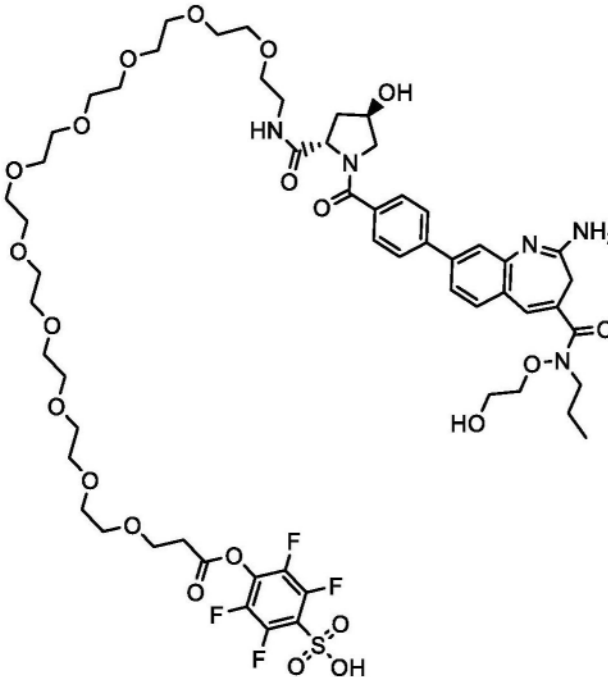
[0265]

<p>PhBzL-79</p>	 <p>The structure of PhBzL-79 features a long, flexible polyether chain (polyethylene glycol) with a terminal primary amine group. This amine is acylated with a proline derivative. The proline ring is further substituted with a benzimidazole moiety. The benzimidazole ring system is linked to a benzene ring, which is in turn connected to a pyridine ring. The pyridine ring has an amino group (NH₂) at the 2-position and a carbonyl group at the 3-position. This carbonyl group is further substituted with a diethylamino group. The polyether chain is also linked to a pentafluorophenyl ring, which is substituted with a sulfonic acid group (-SO₃H).</p>	<p>1230.3</p>
<p>PhBzL-80</p>	 <p>The structure of PhBzL-80 is identical to PhBzL-79, but the proline ring is shown with a different stereochemistry at the acylation site, specifically a dashed bond to the nitrogen atom.</p>	<p>1230.3</p>

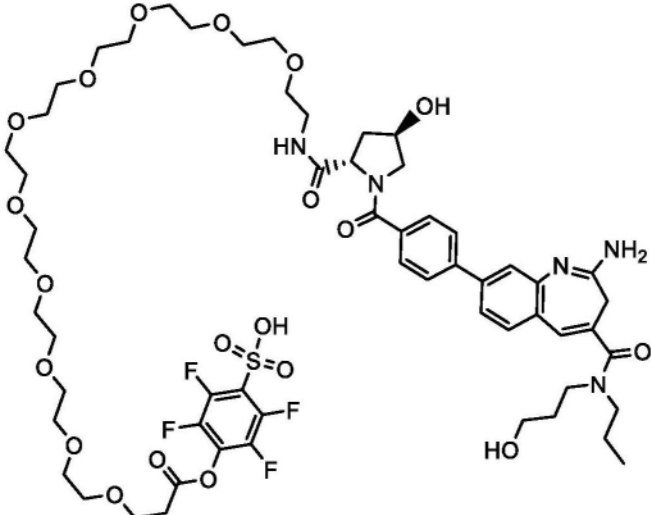
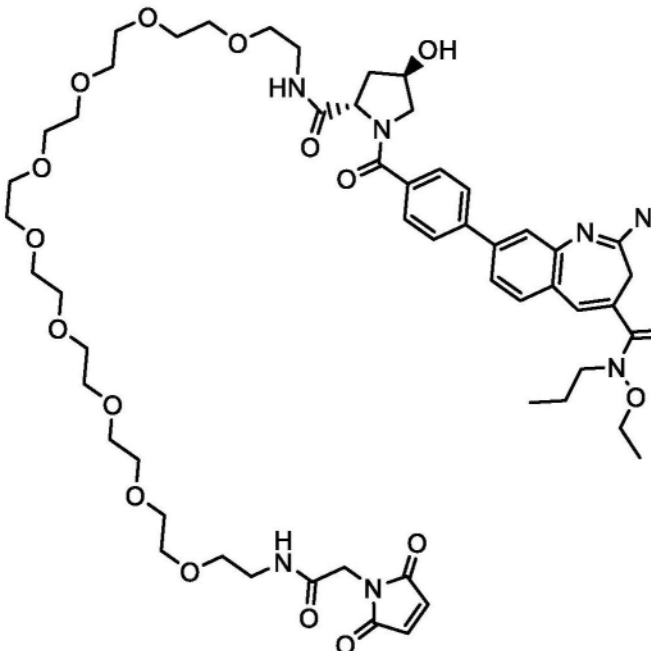
[0266]

<p>PhBzL-81</p>	 <p>The structure of PhBzL-81 features a large macrocyclic polyether chain (12-membered ring) with a terminal hydroxyl group. This chain is linked via an amide bond to a benzimidazole core. The benzimidazole core is substituted with a primary amine group (-NH₂) and a propylamino group (-N(CH₂)₂CH₃). A 2,4,6-trifluorophenyl group is attached to the benzimidazole ring, which is further substituted with a propylsulfonic acid group (-CH₂CH₂SO₃H).</p>	<p>1207.3</p>
<p>PhBzL-82</p>	 <p>The structure of PhBzL-82 is similar to PhBzL-81, featuring the same macrocyclic polyether chain and benzimidazole core. However, the benzimidazole core is substituted with a primary amine group (-NH₂) and an ethylamino group (-N(CH₂)₂CH₃). The 2,4,6-trifluorophenyl group is substituted with a propylpiperidine-4-ylmethoxy group (-CH₂CH₂CH₂N(CH₂)₅OH).</p>	<p>1233.3</p>

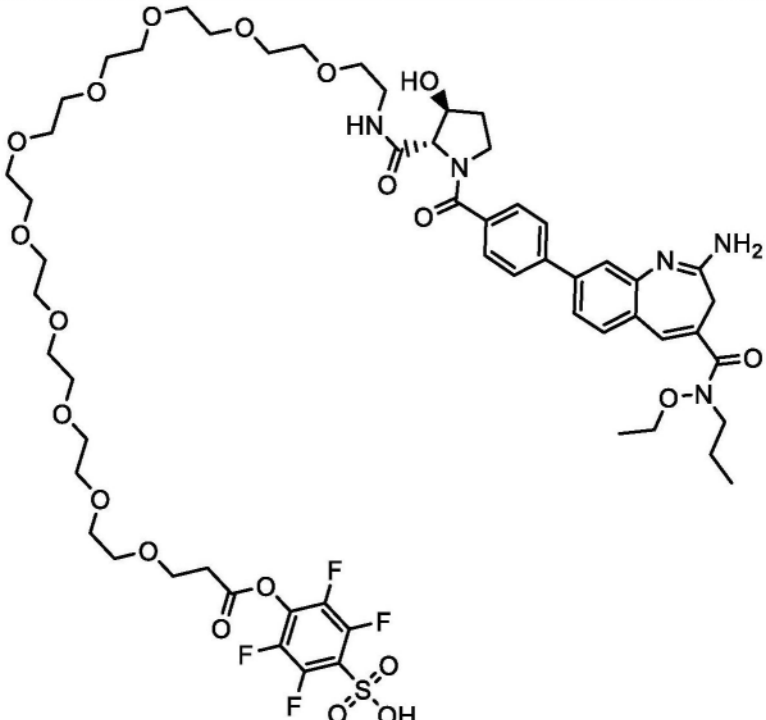
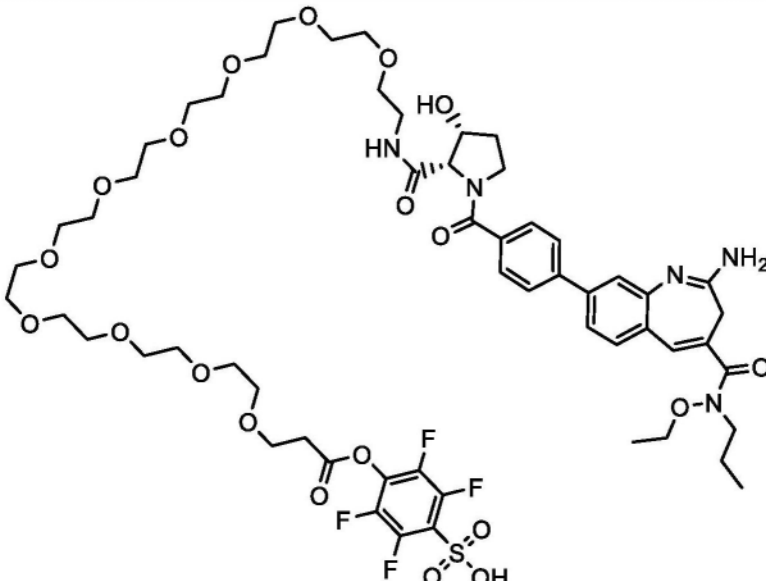
[0267]

PhBzL-83	 <p>The chemical structure of PhBzL-83 features a long, flexible poly(ethylene glycol) (PEG) chain. One end of the PEG chain is terminated with a hydroxyl group, and the other end is linked via an ester bond to a 2,3,4,5-tetrafluorophenyl ring. This ring is further substituted with a sulfonic acid group (-SO₃H) and a sulfonamide group (-SO₂NH-). The sulfonamide group is connected to a pyrrolidine ring, which is in turn linked to a benzimidazole moiety. The benzimidazole moiety has an amino group (-NH₂) and a carbonyl group (-C=O) attached to its imidazole ring. The carbonyl group is further substituted with a morpholine ring, which is in turn linked to a propyl group.</p>	1293.5
PhBzL-84	 <p>The chemical structure of PhBzL-84 is similar to PhBzL-83, featuring a long, flexible PEG chain. One end of the PEG chain is terminated with a hydroxyl group, and the other end is linked via an ester bond to a 2,3,4,5-tetrafluorophenyl ring. This ring is further substituted with a sulfonic acid group (-SO₃H) and a sulfonamide group (-SO₂NH-). The sulfonamide group is connected to a pyrrolidine ring, which is in turn linked to a benzimidazole moiety. The benzimidazole moiety has an amino group (-NH₂) and a carbonyl group (-C=O) attached to its imidazole ring. The carbonyl group is further substituted with a morpholine ring, which is in turn linked to a propyl group.</p>	1276.3

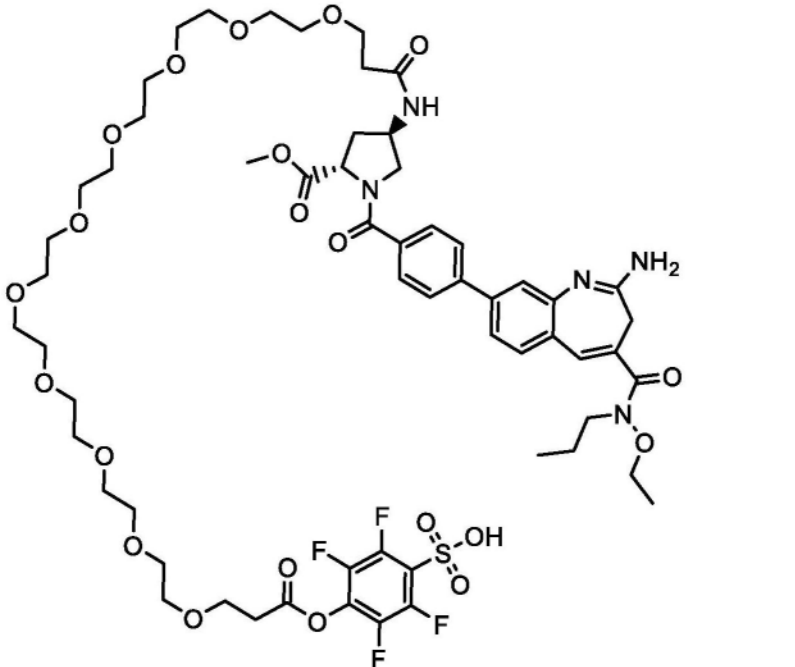
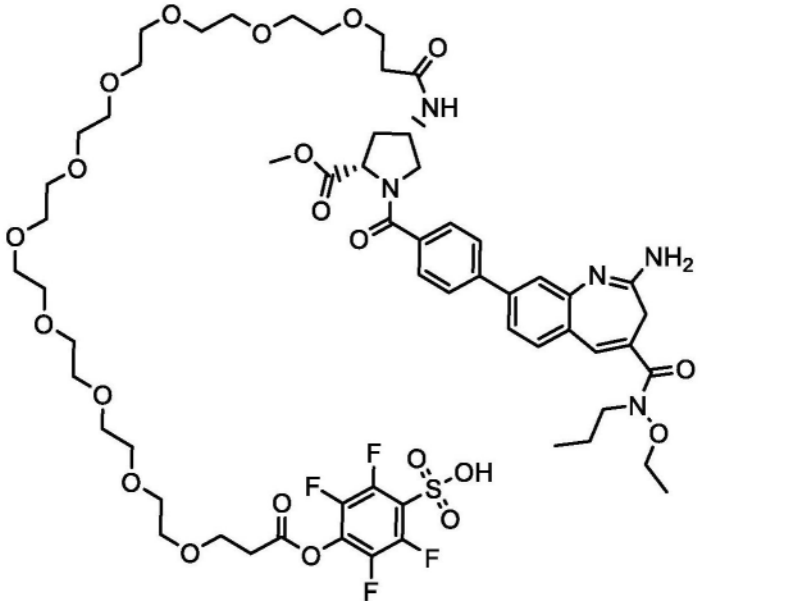
[0268]

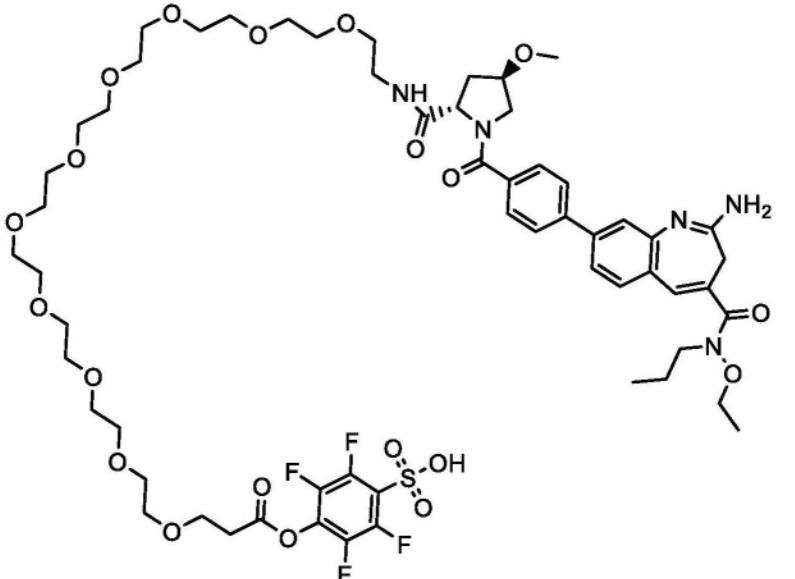
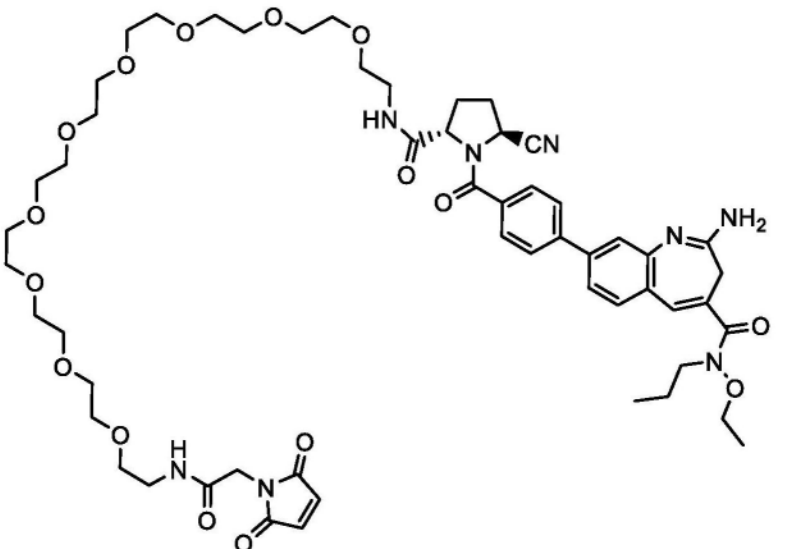
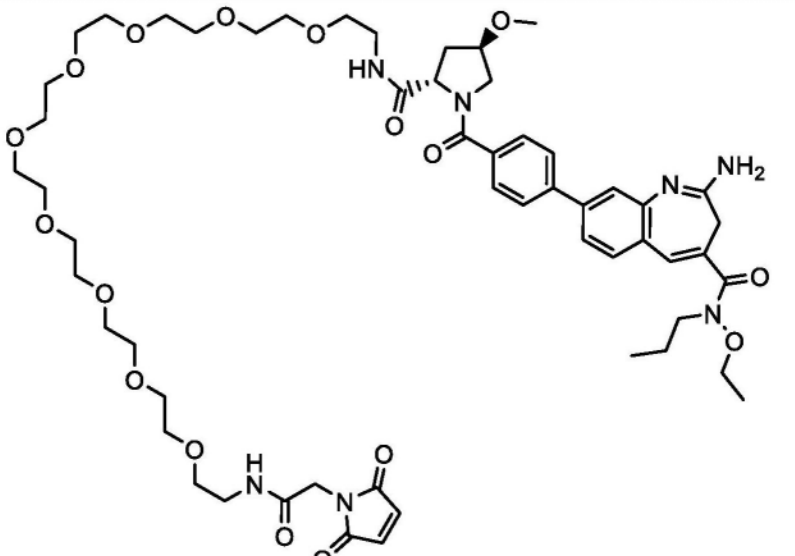
<p>PhBzL-85</p>	 <p>The structure of PhBzL-85 features a long, flexible polyether chain (12-oxa-dodecane) attached to a central core. The core consists of a 2-hydroxy-1-pyrrolidine ring connected via an amide bond to a 4-phenyl ring. This phenyl ring is further linked to a benzimidazole ring system. The benzimidazole ring has an amino group (-NH₂) at the 2-position and a carbonyl group (-C(=O)-) at the 4-position. This carbonyl group is attached to a nitrogen atom that is also bonded to a propyl group and a 2-hydroxyethyl group.</p>	<p>1274.3</p>
<p>PhBzL-86</p>	 <p>The structure of PhBzL-86 is similar to PhBzL-85, featuring the same long polyether chain and central core. However, the nitrogen atom attached to the carbonyl group of the benzimidazole ring is bonded to an ethyl group and an ethoxy group (-OCH₂CH₃) instead of the propyl and 2-hydroxyethyl groups seen in PhBzL-85.</p>	<p>1096.2</p>

[0269]

<p>PhBzL-87</p>	 <p>The structure of PhBzL-87 features a long, flexible polyether chain (polyethylene glycol) attached to a 2,4,6-trifluorophenylsulfonic acid moiety via an ester linkage. The polyether chain is further connected to a chiral auxiliary consisting of a pyrrolidine ring with a hydroxyl group and a carbonyl group, which is in turn linked to a biphenyl system. The biphenyl system is substituted with an amino group and a carbonyl group, which is further linked to a nitrogen atom bonded to ethyl and propyl groups.</p>	<p>1260.3</p>
<p>PhBzL-88</p>	 <p>The structure of PhBzL-88 is identical to PhBzL-87, but the hydroxyl group on the pyrrolidine ring is shown with a different stereochemistry (wedge bond instead of dash bond).</p>	<p>1260.3</p>

[0270]

PhBzL-89	 <p>The chemical structure of PhBzL-89 is a large, complex molecule. It features a long, flexible polyether chain consisting of 11 oxygen atoms and 22 carbon atoms, forming a macrocyclic-like structure. This chain is linked to a central core. The core includes a piperazine ring substituted with a methyl ester group and a carbonyl group. This carbonyl group is further linked to a benzene ring, which is connected to a quinoline ring system. The quinoline ring has an amino group (NH₂) and a carbonyl group. This carbonyl group is linked to a nitrogen atom that is also bonded to two ethyl groups. Additionally, the polyether chain is linked to a 2,3,4,5-tetrafluorophenyl ring, which is substituted with a sulfonic acid group (SO₃H).</p>	1302.4
PhBzL-90	 <p>The chemical structure of PhBzL-90 is identical to PhBzL-89, as shown in the image above. It features a long, flexible polyether chain linked to a central core containing a piperazine ring, a benzene ring, a quinoline ring, and a 2,3,4,5-tetrafluorophenyl ring.</p>	1302.4

PhBzL-91		1274.3
PhBzL-92		1105.3
PhBzL-93		1110.3

[0271]

[0272] 免疫缀合物

[0273] 免疫缀合物的示例性实施方案包含通过接头共价连接于一个或多个8-Phe-2-氨

基苯并氮杂 葸 (PhBz) 部分的抗HER2抗体, 并且具有式I:

[0274] $\text{Ab} - [\text{L} - \text{PhBz}]_p$ I

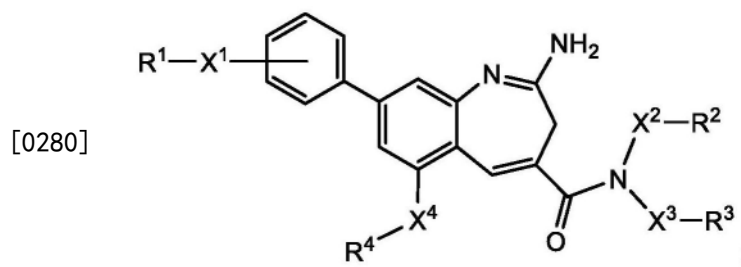
[0275] 或其药学上可接受的盐,

[0276] 其中:

[0277] Ab是具有结合HER2的抗原结合结构域的抗体构建体;

[0278] p是1至8的整数;

[0279] PhBz是具有下式的8-苯基-2-氨基苯并氮杂 葸 部分:



[0281] R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 独立地选自由H、 C_1 - C_{12} 烷基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、 C_3 - C_{12} 碳环基、 C_6 - C_{20} 芳基、 C_2 - C_9 杂环基和 C_1 - C_{20} 杂芳基组成的组, 其中烷基、烯基、炔基、碳环基、芳基、杂环基和杂芳基独立且任选被一个或多个选自以下的基团取代:

[0282] $-(\text{C}_1 - \text{C}_{12} \text{烷基二基}) - \text{N}(\text{R}^5) - *$;

[0283] $-(\text{C}_1 - \text{C}_{12} \text{烷基二基}) - \text{N}(\text{R}^5)_2$;

[0284] $-(\text{C}_1 - \text{C}_{12} \text{烷基二基}) - \text{OR}^5$;

[0285] $-(\text{C}_3 - \text{C}_{12} \text{碳环基})$;

[0286] $-(\text{C}_3 - \text{C}_{12} \text{碳环基}) - *$;

[0287] $-(\text{C}_3 - \text{C}_{12} \text{碳环基}) - (\text{C}_1 - \text{C}_{12} \text{烷基二基}) - \text{NR}^5 - *$;

[0288] $-(\text{C}_3 - \text{C}_{12} \text{碳环基}) - (\text{C}_1 - \text{C}_{12} \text{烷基二基}) - \text{N}(\text{R}^5)_2$;

[0289] $-(\text{C}_3 - \text{C}_{12} \text{碳环基}) - \text{NR}^5 - \text{C}(=\text{NR}^5) \text{NR}^5 - *$;

[0290] $-(\text{C}_6 - \text{C}_{20} \text{芳基})$;

[0291] $-(\text{C}_6 - \text{C}_{20} \text{芳基}) - *$;

[0292] $-(\text{C}_6 - \text{C}_{20} \text{芳基二基}) - \text{N}(\text{R}^5) - *$;

[0293] $-(\text{C}_6 - \text{C}_{20} \text{芳基二基}) - (\text{C}_1 - \text{C}_{12} \text{烷基二基}) - \text{N}(\text{R}^5) - *$;

[0294] $-(\text{C}_6 - \text{C}_{20} \text{芳基二基}) - (\text{C}_1 - \text{C}_{12} \text{烷基二基}) - (\text{C}_2 - \text{C}_{20} \text{杂环基二基}) - *$;

[0295] $-(\text{C}_6 - \text{C}_{20} \text{芳基二基}) - (\text{C}_1 - \text{C}_{12} \text{烷基二基}) - \text{N}(\text{R}^5)_2$;

[0296] $-(\text{C}_6 - \text{C}_{20} \text{芳基二基}) - (\text{C}_1 - \text{C}_{12} \text{烷基二基}) - \text{NR}^5 - \text{C}(=\text{NR}^{5a}) \text{N}(\text{R}^5) - *$;

[0297] $-(\text{C}_2 - \text{C}_{20} \text{杂环基})$;

[0298] $-(\text{C}_2 - \text{C}_{20} \text{杂环基}) - *$;

[0299] $-(\text{C}_2 - \text{C}_9 \text{杂环基}) - (\text{C}_1 - \text{C}_{12} \text{烷基二基}) - \text{NR}^5 - *$;

[0300] $-(\text{C}_2 - \text{C}_9 \text{杂环基}) - (\text{C}_1 - \text{C}_{12} \text{烷基二基}) - \text{N}(\text{R}^5)_2$;

[0301] $-(\text{C}_2 - \text{C}_9 \text{杂环基}) - \text{C}(=\text{O}) - (\text{C}_1 - \text{C}_{12} \text{烷基二基}) - \text{N}(\text{R}^5) - *$;

[0302] $-(\text{C}_2 - \text{C}_9 \text{杂环基}) - \text{NR}^5 - \text{C}(=\text{NR}^{5a}) \text{NR}^5 - *$;

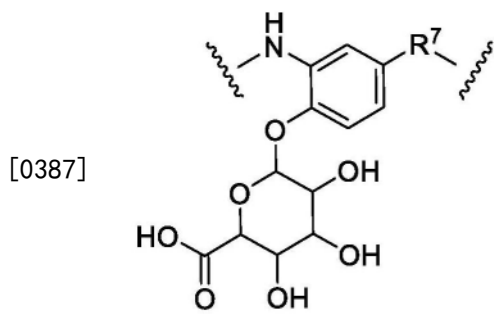
[0303] $-(\text{C}_2 - \text{C}_9 \text{杂环基}) - \text{NR}^5 - (\text{C}_6 - \text{C}_{20} \text{芳基二基}) - (\text{C}_1 - \text{C}_{12} \text{烷基二基}) - \text{N}(\text{R}^5) - *$;

[0304] $-(\text{C}_2 - \text{C}_9 \text{杂环基}) - (\text{C}_6 - \text{C}_{20} \text{芳基二基}) - *$;

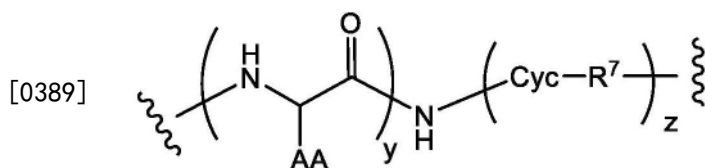
- [0305] - (C₁-C₂₀杂芳基) ;
- [0306] - (C₁-C₂₀杂芳基) -* ;
- [0307] - (C₁-C₂₀杂芳基) - (C₁-C₁₂烷基二基) -N(R⁵) -* ;
- [0308] - (C₁-C₂₀杂芳基) - (C₁-C₁₂烷基二基) -N(R⁵)₂ ;
- [0309] - (C₁-C₂₀杂芳基) -NR⁵-C(=NR^{5a})N(R⁵) -* ;
- [0310] - (C₁-C₂₀杂芳基) -N(R⁵)C(=O) - (C₁-C₁₂烷基二基) -N(R⁵) -* ;
- [0311] -C(=O) -* ;
- [0312] -C(=O) - (C₁-C₁₂烷基二基) -N(R⁵) -* ;
- [0313] -C(=O) - (C₂-C₂₀杂环基二基) -* ;
- [0314] -C(=O)N(R⁵)₂ ;
- [0315] -C(=O)N(R⁵) -* ;
- [0316] -C(=O)N(R⁵) - (C₁-C₁₂烷基二基) -N(R⁵)C(=O)R⁵ ;
- [0317] -C(=O)N(R⁵) - (C₁-C₁₂烷基二基) -N(R⁵)C(=O)N(R⁵)₂ ;
- [0318] -C(=O)NR⁵- (C₁-C₁₂烷基二基) -N(R⁵)CO₂R⁵ ;
- [0319] -C(=O)NR⁵- (C₁-C₁₂烷基二基) -N(R⁵)C(=NR^{5a})N(R⁵)₂ ;
- [0320] -C(=O)NR⁵- (C₁-C₁₂烷基二基) -NR⁵C(=NR^{5a})R⁵ ;
- [0321] -C(=O)NR⁵- (C₁-C₈烷基二基) -NR⁵(C₂-C₅杂芳基) ;
- [0322] -C(=O)NR⁵- (C₁-C₂₀杂芳基二基) -N(R⁵) -* ;
- [0323] -C(=O)NR⁵- (C₁-C₂₀杂芳基二基) -* ;
- [0324] -C(=O)NR⁵- (C₁-C₂₀杂芳基二基) - (C₁-C₁₂烷基二基) -N(R⁵)₂ ;
- [0325] -C(=O)NR⁵- (C₁-C₂₀杂芳基二基) - (C₂-C₂₀杂环基二基) -C(=O)NR⁵- (C₁-C₁₂烷基二基) -NR⁵ -* ;
- [0326] -N(R⁵)₂ ;
- [0327] -N(R⁵) -* ;
- [0328] -N(R⁵)C(=O)R⁵ ;
- [0329] -N(R⁵)C(=O) -* ;
- [0330] -N(R⁵)C(=O)N(R⁵)₂ ;
- [0331] -N(R⁵)C(=O)N(R⁵) -* ;
- [0332] -N(R⁵)CO₂R⁵ ;
- [0333] -NR⁵C(=NR^{5a})N(R⁵)₂ ;
- [0334] -NR⁵C(=NR^{5a})N(R⁵) -* ;
- [0335] -NR⁵C(=NR^{5a})R⁵ ;
- [0336] -N(R⁵)C(=O) - (C₁-C₁₂烷基二基) -N(R⁵) -* ;
- [0337] -N(R⁵) - (C₂-C₅杂芳基) ;
- [0338] -N(R⁵) -S(=O)₂ - (C₁-C₁₂烷基) ;
- [0339] -O- (C₁-C₁₂烷基) ;
- [0340] -O- (C₁-C₁₂烷基二基) -N(R⁵)₂ ;
- [0341] -O- (C₁-C₁₂烷基二基) -N(R⁵) -* ;
- [0342] -O-C(=O)N(R⁵)₂ ;

- [0343] $-O-C(=O)N(R^5)-*$;
- [0344] $-S(=O)_2-(C_2-C_{20}$ 杂环基二基) $-*$;
- [0345] $-S(=O)_2-(C_2-C_{20}$ 杂环基二基) $-(C_1-C_{12}$ 烷基二基) $-N(R^5)_2$;
- [0346] $-S(=O)_2-(C_2-C_{20}$ 杂环基二基) $-(C_1-C_{12}$ 烷基二基) $-NR^5-*$;和
- [0347] $-S(=O)_2-(C_2-C_{20}$ 杂环基二基) $-(C_1-C_{12}$ 烷基二基) $-OH$;
- [0348] 或者 R^2 和 R^3 一起形成5或6元杂环基环;
- [0349] X^1, X^2, X^3 和 X^4 独立地选自由键、 $C(=O)$ 、 $C(=O)N(R^5)$ 、 O 、 $N(R^5)$ 、 S 、 $S(O)_2$ 和 $S(O)_2N(R^5)$ 组成的组;
- [0350] R^5 独立地选自由 H 、 C_6-C_{20} 芳基、 C_3-C_{12} 碳环基、 C_6-C_{20} 芳基二基、 C_1-C_{12} 烷基和 C_1-C_{12} 烷基二基组成的组,或者两个 R^5 基团一起形成5或6元杂环基环;
- [0351] R^{5a} 选自由 C_6-C_{20} 芳基和 C_1-C_{20} 杂芳基组成的组;
- [0352] 其中星号*指示L的连接位点,且其中 R^1, R^2, R^3 和 R^4 中的一者连接于L;
- [0353] L是选自由以下组成的组的接头:
- [0354] $-C(=O)-PEG-$;
- [0355] $-C(=O)-PEG-C(=O)N(R^6)-(C_1-C_{12}$ 烷基二基) $-C(=O)-Gluc-$;
- [0356] $-C(=O)-PEG-O-$;
- [0357] $-C(=O)-PEG-O-C(=O)-$;
- [0358] $-C(=O)-PEG-C(=O)-$;
- [0359] $-C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-$;
- [0360] $-C(=O)-PEG-N(R^6)-$;
- [0361] $-C(=O)-PEG-N(R^6)-C(=O)-$;
- [0362] $-C(=O)-PEG-N(R^6)-PEG-C(=O)-PEP-$;
- [0363] $-C(=O)-PEG-N^+(R^6)_2-PEG-C(=O)-PEP-$;
- [0364] $-C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}$ 烷基二基) $-$;
- [0365] $-C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}$ 烷基二基) $N(R^6)C(=O)-(C_2-C_5$ 单杂环基二基) $-$;
- [0366] $-C(=O)-PEG-SS-(C_1-C_{12}$ 烷基二基) $-OC(=O)-$;
- [0367] $-C(=O)-PEG-SS-(C_1-C_{12}$ 烷基二基) $-C(=O)-$;
- [0368] $-C(=O)-(C_1-C_{12}$ 烷基二基) $-C(=O)-PEP-$;
- [0369] $-C(=O)-(C_1-C_{12}$ 烷基二基) $-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}$ 烷基二基) $-$;
- [0370] $-C(=O)-(C_1-C_{12}$ 烷基二基) $-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}$ 烷基二基) $-N(R^5)-C(=O)$;
- [0371] $-C(=O)-(C_1-C_{12}$ 烷基二基) $-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}$ 烷基二基) $-N(R^6)C(=O)-(C_2-C_5$ 单杂环基二基) $-$;
- [0372] $-琥珀酰亚胺基-(CH_2)_m-C(=O)N(R^6)-PEG-$;
- [0373] $-琥珀酰亚胺基-(CH_2)_m-C(=O)N(R^6)-PEG-C(=O)N(R^6)-(C_1-C_{12}$ 烷基二基) $-C(=O)-Gluc-$;
- [0374] $-琥珀酰亚胺基-(CH_2)_m-C(=O)N(R^6)-PEG-O-$;
- [0375] $-琥珀酰亚胺基-(CH_2)_m-C(=O)N(R^6)-PEG-O-C(=O)-$;
- [0376] $-琥珀酰亚胺基-(CH_2)_m-C(=O)N(R^6)-PEG-C(=O)-$;

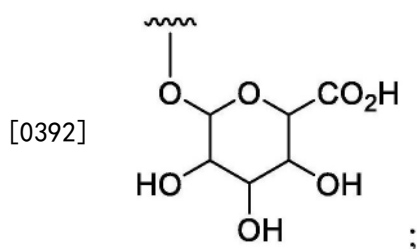
- [0377] -琥珀酰亚胺基- $(\text{CH}_2)_m-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^6)-\text{PEG}-\text{N}(\text{R}^5)-$;
- [0378] -琥珀酰亚胺基- $(\text{CH}_2)_m-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^6)-\text{PEG}-\text{N}(\text{R}^5)-\text{C}(=\text{O})-$;
- [0379] -琥珀酰亚胺基- $(\text{CH}_2)_m-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^6)-\text{PEG}-\text{C}(=\text{O})-\text{PEP}-$;
- [0380] -琥珀酰亚胺基- $(\text{CH}_2)_m-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^6)-\text{PEG}-\text{SS}-(\text{C}_1-\text{C}_{12}\text{烷基二基})-\text{OC}(=\text{O})-$;
- [0381] -琥珀酰亚胺基- $(\text{CH}_2)_m-\text{C}(=\text{O})-\text{PEP}-\text{N}(\text{R}^6)-(\text{C}_1-\text{C}_{12}\text{烷基二基})-$;
- [0382] -琥珀酰亚胺基- $(\text{CH}_2)_m-\text{C}(=\text{O})-\text{PEP}-\text{N}(\text{R}^6)-(\text{C}_1-\text{C}_{12}\text{烷基二基})\text{N}(\text{R}^6)\text{C}(=\text{O})-$;和
- [0383] -琥珀酰亚胺基- $(\text{CH}_2)_m-\text{C}(=\text{O})-\text{PEP}-\text{N}(\text{R}^6)-(\text{C}_1-\text{C}_{12}\text{烷基二基})\text{N}(\text{R}^6)\text{C}(=\text{O})-(\text{C}_2-\text{C}_5$
单杂环基二基)-;
- [0384] R^6 独立地为H或 C_1-C_6 烷基;
- [0385] PEG具有下式: $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2)_m-$;m是1至5的整数,且n是2至50的整数;
- [0386] Gluc具有下式:



- [0388] PEP具有下式:



- [0390] 其中AA独立地选自天然或非天然氨基酸侧链,或者AA中的一者或多者和相邻的氮原子形成五元环脯氨酸氨基酸,且波浪线指示连接点;
- [0391] Cyc选自 C_6-C_{20} 芳基二基和 C_1-C_{20} 杂芳基二基,任选被一个或多个选自F、Cl、 NO_2 、-OH、 $-\text{OCH}_3$ 和具有如下结构的葡糖醛酸的基团取代:



- [0393] R^7 选自由 $-\text{CH}(\text{R}^8)\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^8)-$ 和 $-\text{CH}(\text{R}^8)\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ 组成的组,其中 R^8 选自H、 C_1-C_6 烷基、 $\text{C}(=\text{O})-\text{C}_1-\text{C}_6$ 烷基和 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^9)_2$,其中 R^9 独立地选自由H、 C_1-C_{12} 烷基和 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2)_m-\text{OH}$ 组成的组,其中m是1至5的整数,且n是2至50的整数,或者两个 R^9 基团一起形成5或6元杂环基环;
- [0394] y是2至12的整数;
- [0395] z是0或1;且

[0396] 烷基、烷基二基、烯基、烯基二基、炔基、炔基二基、芳基、芳基二基、碳环基、碳环基二基、杂环基、杂环基二基、杂芳基和杂芳基二基独立且任选被一个或多个独立地选自以下的基团取代：F、Cl、Br、I、-CN、-CH₃、-CH₂CH₃、-CH=CH₂、-C≡CH、-C≡CCH₃、-CH₂CH₂CH₃、-CH(CH₃)₂、-CH₂CH(CH₃)₂、-CH₂OH、-CH₂OCH₃、-CH₂CH₂OH、-C(CH₃)₂OH、-CH(OH)CH(CH₃)₂、-C(CH₃)₂CH₂OH、-CH₂CH₂SO₂CH₃、-CH₂OP(O)(OH)₂、-CH₂F、-CHF₂、-CF₃、-CH₂CF₃、-CH₂CHF₂、-CH(CH₃)CN、-C(CH₃)₂CN、-CH₂CN、-CH₂NH₂、-CH₂NHSO₂CH₃、-CH₂NHCH₃、-CH₂N(CH₃)₂、-CO₂H、-COCH₃、-CO₂CH₃、-CO₂C(CH₃)₃、-COCH(OH)CH₃、-CONH₂、-CONHCH₃、-CON(CH₃)₂、-C(CH₃)₂CONH₂、-NH₂、-NHCH₃、-N(CH₃)₂、-NHCOCH₃、-N(CH₃)COCH₃、-NHS(O)₂CH₃、-N(CH₃)C(CH₃)₂CONH₂、-N(CH₃)CH₂CH₂S(O)₂CH₃、-NHC(=NH)H、-NHC(=NH)CH₃、-NHC(=NH)NH₂、-NHC(=O)NH₂、-NO₂、=O、-OH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-OCH₂CH₂OCH₃、-OCH₂CH₂OH、-OCH₂CH₂N(CH₃)₂、-O(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_mCO₂H、-O(CH₂CH₂O)_nH、-OCH₂F、-OCHF₂、-OCF₃、-OP(O)(OH)₂、-S(O)₂N(CH₃)₂、-SCH₃、-S(O)₂CH₃和-S(O)₃H。

[0397] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中所述抗体选自曲妥珠单抗和帕妥珠单抗或其生物仿制药或生物改良药。

[0398] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中X²是键，且R²是C₁-C₈烷基。

[0399] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中X²和X³各自是键，且R²和R³独立地选自C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₁₂烷基)、-(C₁-C₁₂烷基二基)-OR⁵、-(C₁-C₈烷基二基)-N(R⁵)CO₂R⁵、-(C₁-C₁₂烷基)-OC(O)N(R⁵)₂、-O-(C₁-C₁₂烷基)-N(R⁵)CO₂R⁵和-O-(C₁-C₁₂烷基)-OC(O)N(R⁵)₂。

[0400] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中R²是C₁-C₈烷基，且R³是-(C₁-C₈烷基二基)-N(R⁵)CO₂R⁵。

[0401] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中R²是-CH₂CH₂CH₃，且R³选自-CH₂CH₂CH₂NHCO₂(t-Bu)、-OCH₂CH₂NHCO₂(环丁基)和-CH₂CH₂CH₂NHCO₂(环丁基)。

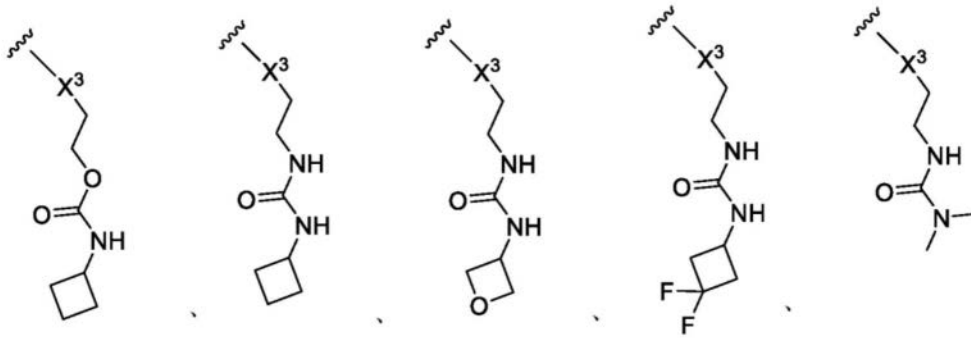
[0402] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中R²和R³各自独立地选自-CH₂CH₂CH₃、-OCH₂CH₃、-OCH₂CF₃、-CH₂CH₂CF₃、-OCH₂CH₂OH和-CH₂CH₂CH₂OH。

[0403] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中R²和R³各自为-CH₂CH₂CH₃。

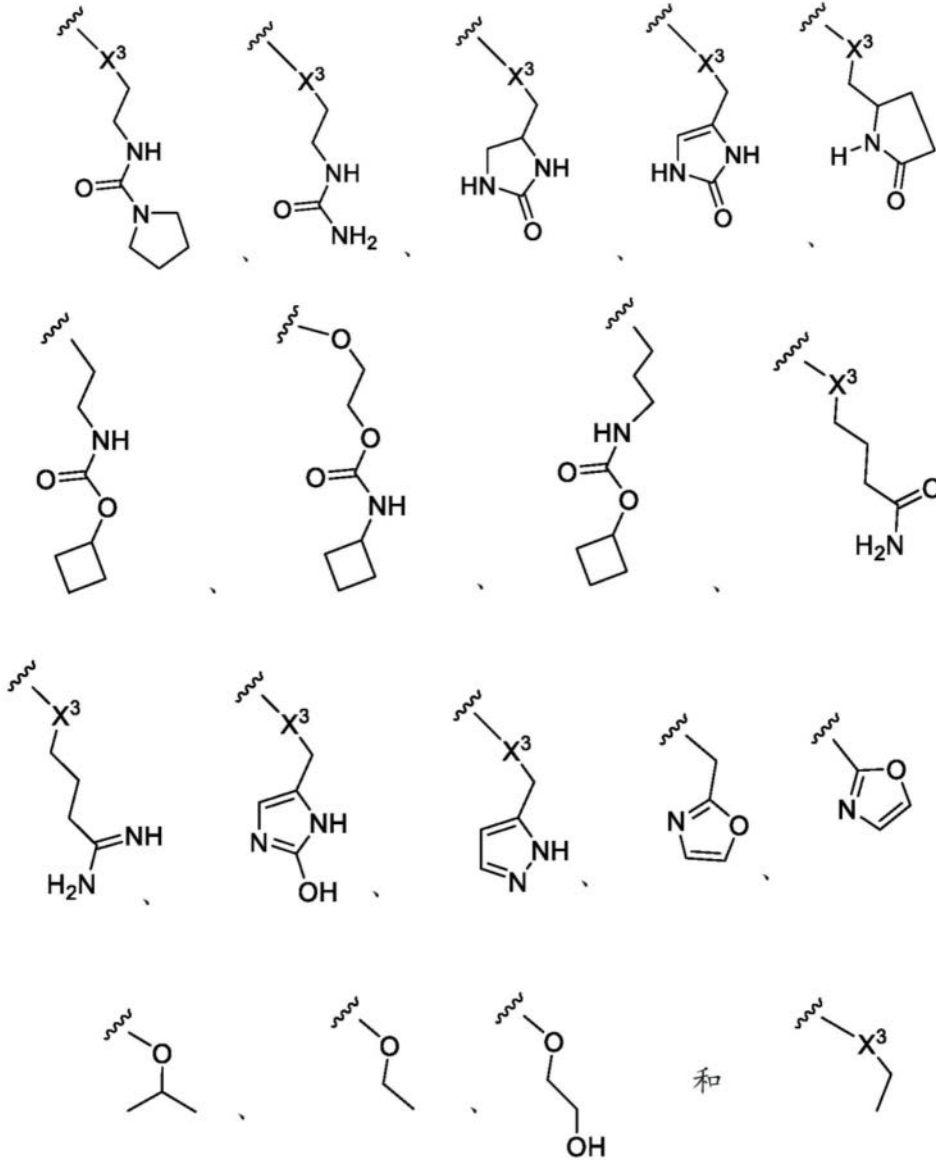
[0404] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中R²是-CH₂CH₂CH₃，且R³是-OCH₂CH₃。

[0405] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中X³-R³选自由以下组成的组：

[0406]



[0407]

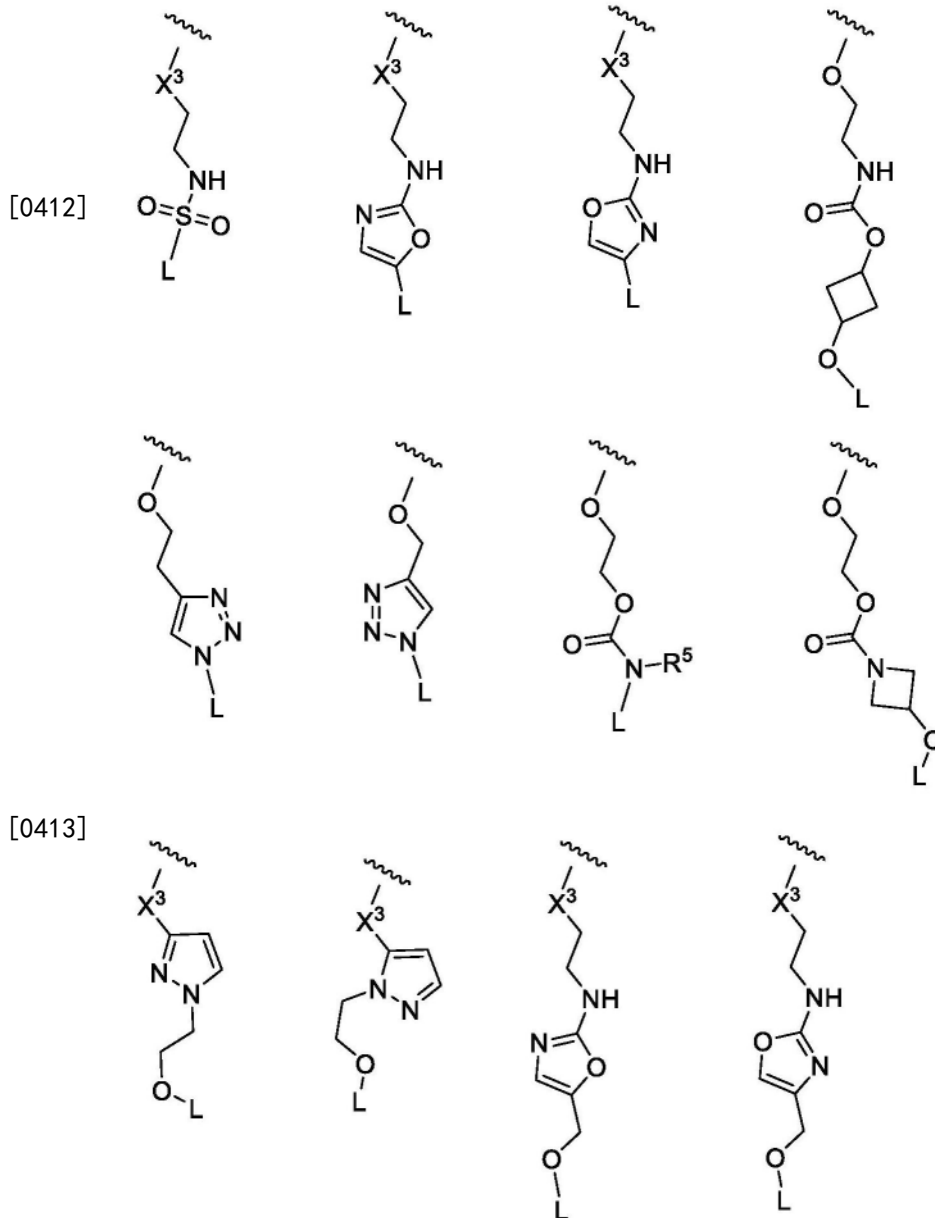


[0408] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中X⁴是键,且R⁴是H。

[0409] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中R¹连接于L。

[0410] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中R²或R³连接于L。

[0411] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中X³-R³-L选自由以下组成的组:



[0414] 其中波浪线指示与N的连接点。

[0415] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中R⁴是C₁-C₁₂烷基。

[0416] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中R⁴是-(C₁-C₁₂烷基二基)-N(R⁵)-*；其中星号*指示L的连接位点。

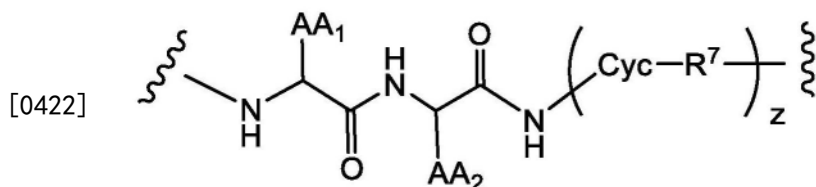
[0417] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中L是-C(=O)-PEG-或-C(=O)-PEG-C(=O)-。

[0418] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中L连接于抗体的半胱氨酸硫醇。

[0419] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中对于PEG, m是1或2, 且n是2至10的整数。

[0420] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中对于PEG, n是10。

[0421] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中L包含PEP, 且PEP是二肽, 并具有下式:

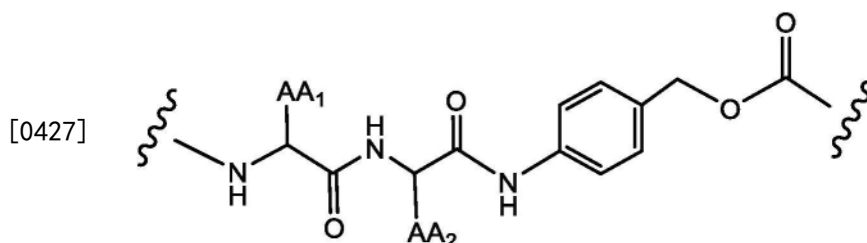


[0423] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中AA₁和AA₂独立地选自H、-CH₃、-CH(CH₃)₂、-CH₂(C₆H₅)、-CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂、-CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂、-CHCH(CH₃)CH₃、-CH₂SO₃H和-CH₂CH₂CH₂NHC(O)NH₂；或者AA₁和AA₂形成5元环脯氨酸氨基酸。

[0424] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中AA₁是-CH(CH₃)₂，且AA₂是-CH₂CH₂CH₂NHC(O)NH₂。

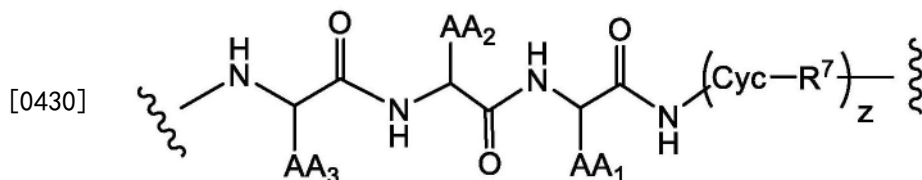
[0425] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中AA₁和AA₂独立地选自GlcNAc天冬氨酸、-CH₂SO₃H和-CH₂OPO₃H。

[0426] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中PEP具有下式：

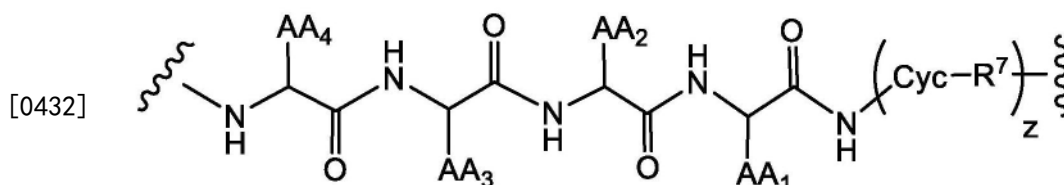


[0428] 其中AA₁和AA₂独立地选自天然存在的氨基酸的侧链。

[0429] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中L包含PEP，且PEP是三肽，并具有下式：



[0431] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中L包含PEP，且PEP是四肽，并具有下式：



[0433] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中：

[0434] AA₁选自由Abu、Ala和Val组成的组；

[0435] AA₂选自由Nle(O-Bzl)、Oic和Pro组成的组；

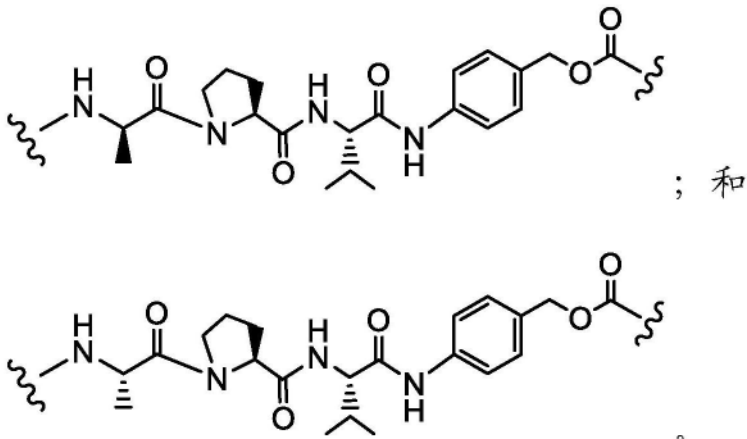
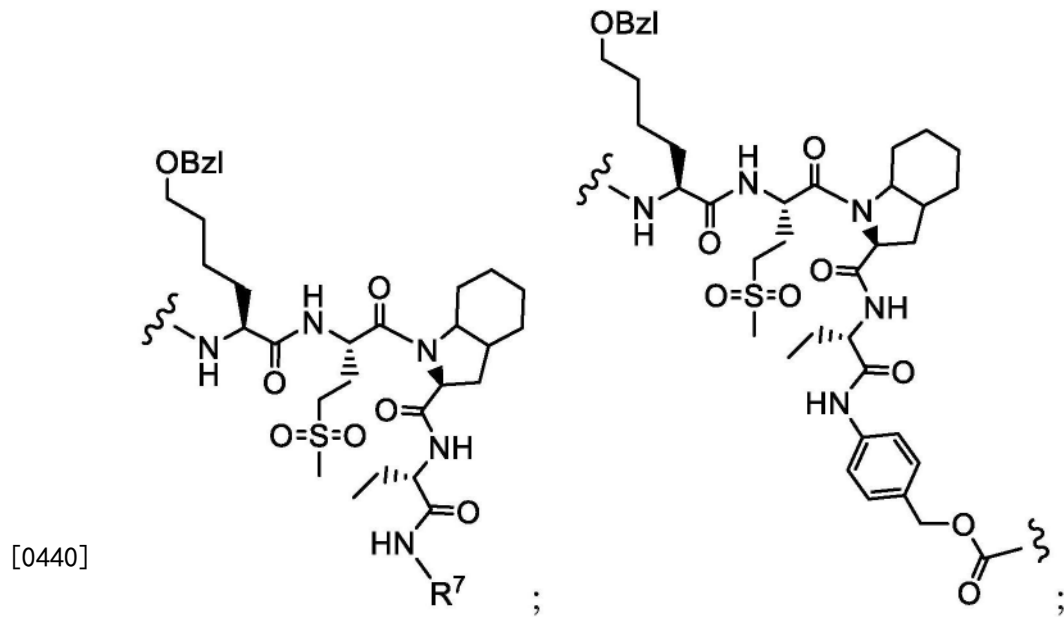
[0436] AA₃选自由Ala和Met(O)₂组成的组；且

[0437] AA₄选自由Oic、Arg(NO₂)、Bpa和Nle(O-Bzl)组成的组。

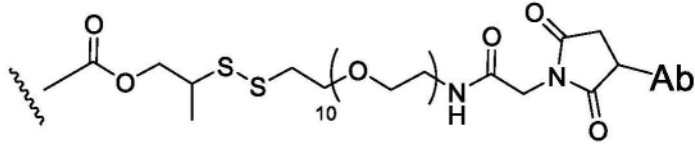
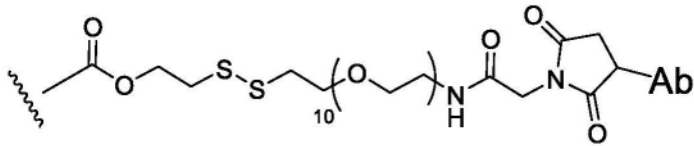
[0438] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中L包含PEP，且PEP选自由Ala-Pro-Val、Asn-Pro-Val、Ala-Ala-Val、Ala-Ala-Pro-Ala、Ala-Ala-Pro-Val和Ala-Ala-Pro-Nva

组成的组。

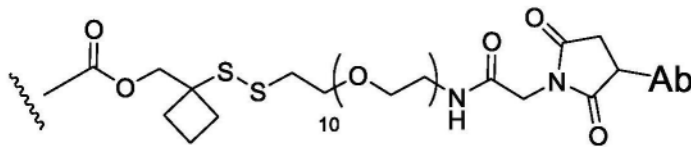
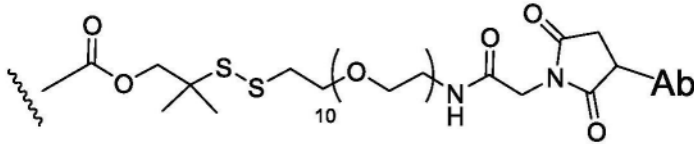
[0439] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中L包含PEP,且PEP选自以下结构:



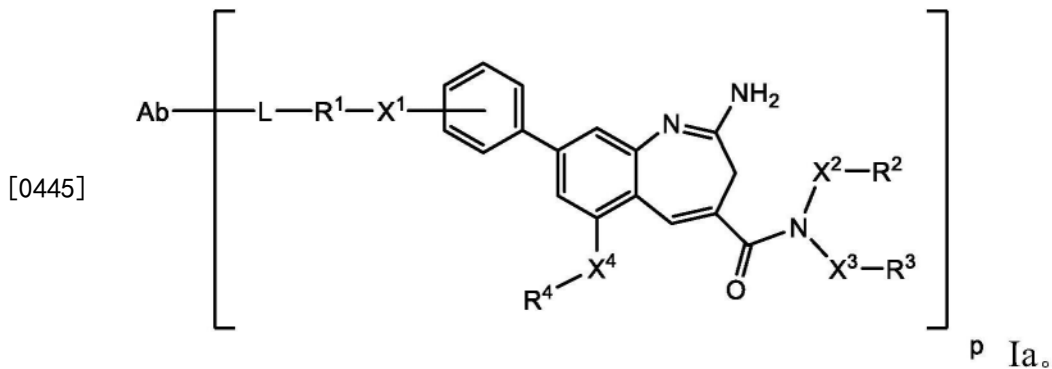
[0441] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中L选自以下结构:



[0442]

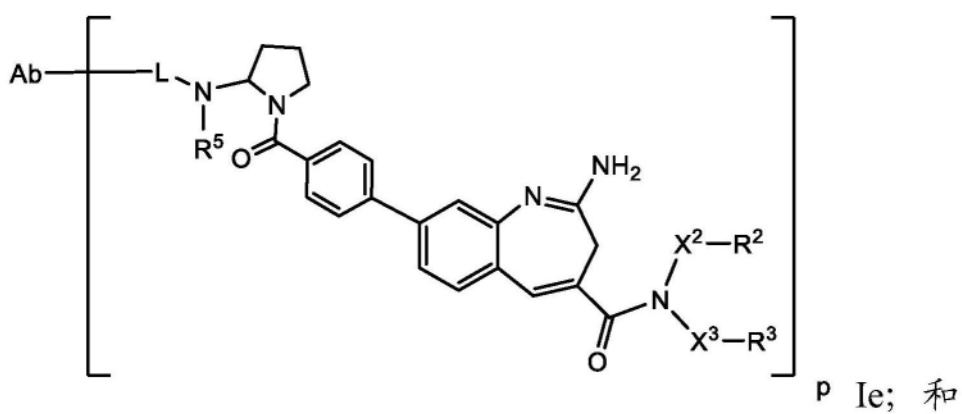
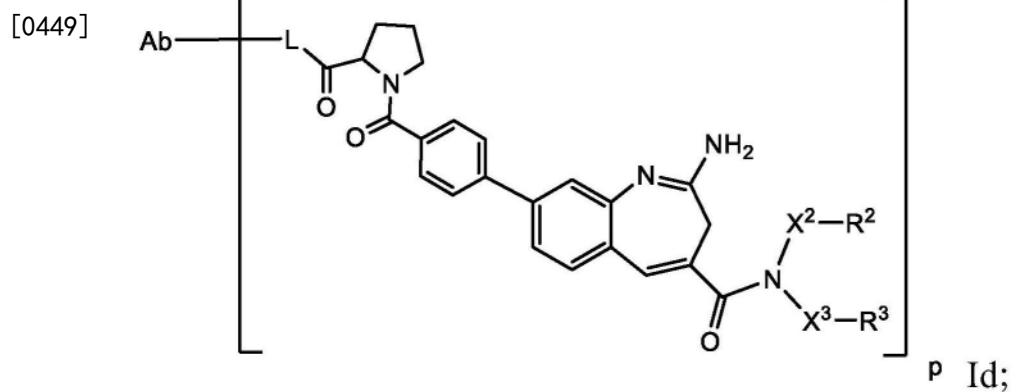
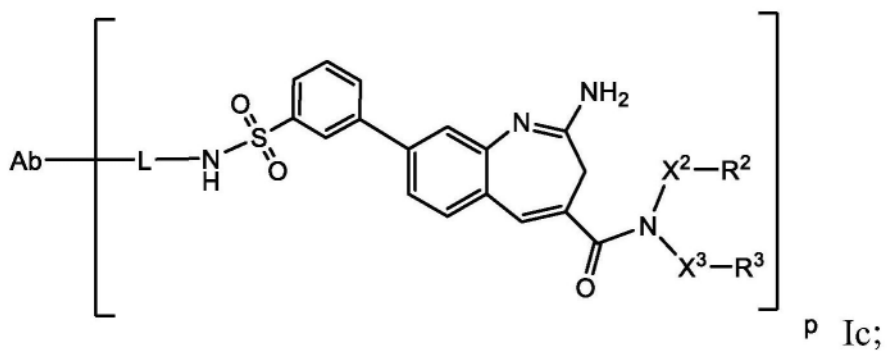
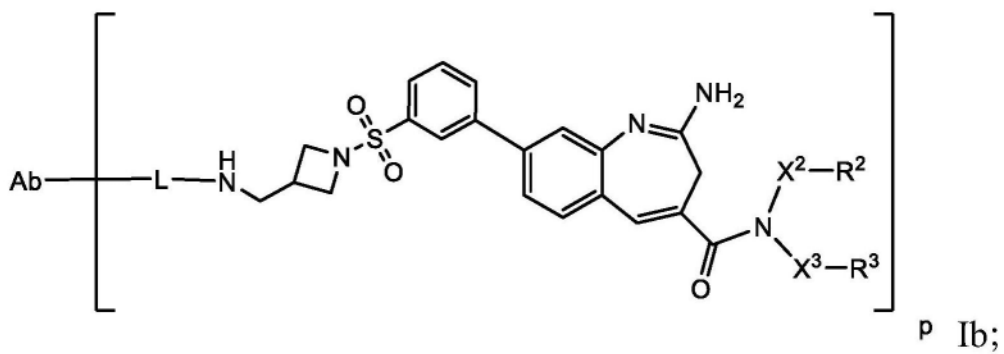
[0443] 其中波浪线指示与R⁵的连接。

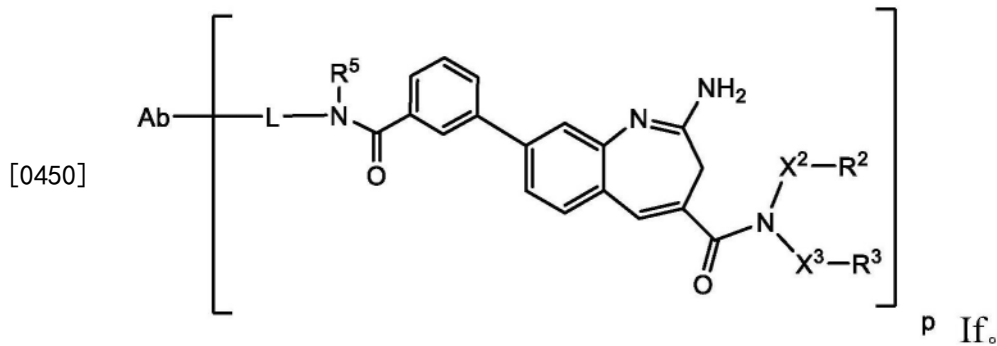
[0444] 具有式Ia的式I的免疫缀合物的示例性实施方案：

[0446] 式Ia的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中X⁴是键,且R⁴是H。

[0447] 式Ia的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中X²和X³各自是键,且R²和R³独立地选自C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₁₂烷基)、-(C₁-C₁₂烷基二基)-OR⁵、-(C₁-C₈烷基二基)-N(R⁵)CO₂R⁵、-(C₁-C₁₂烷基)-OC(O)N(R⁵)₂、-O-(C₁-C₁₂烷基)-N(R⁵)CO₂R⁵和-O-(C₁-C₁₂烷基)-OC(O)N(R⁵)₂。

[0448] 选自式Ib-I f的式Ia的免疫缀合物的示例性实施方案：





[0451] 式Ia的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中 X^2 和 X^3 各自是键,且 R^2 和 R^3 独立地选自 C_1 - C_8 烷基、-O- (C_1 - C_{12} 烷基)、- (C_1 - C_{12} 烷基二基) -OR⁵、- (C_1 - C_8 烷基二基) -N(R^5)CO₂R⁵和-O- (C_1 - C_{12} 烷基) -N(R^5)CO₂R⁵。

[0452] 式Ia的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中 X^2 和 X^3 各自是键, R^2 是 C_1 - C_8 烷基,且 R^3 选自-O- (C_1 - C_{12} 烷基)和-O- (C_1 - C_{12} 烷基) -N(R^5)CO₂R⁵。

[0453] 本发明包括式I实施方案的特征的所有合理的组合及排列。

[0454] 在某些实施方案中,本发明的免疫缀合物化合物包括具有免疫刺激活性的那些免疫缀合物化合物。本发明的抗体-药物缀合物向肿瘤组织选择性地递送有效剂量的8-苯基-2-氨基苯并氮杂^草药物,由此可以实现更大的选择性(即,更低的有效剂量),同时相对于未缀合的8-苯基-2-氨基苯并氮杂^草增加了治疗指数(“治疗窗口”)。

[0455] 载药量由p表示,即式I的免疫缀合物中每个抗体的PhBz部分的数目。载药(PhBz)量的范围可以是每个抗体1至约8个药物部分(D)。式I的免疫缀合物包括与范围在1至约8个药物部分缀合的抗体的混合物或集合。在一些实施方案中,可与抗体缀合的药物部分的数目受限于反应性或可用的氨基酸侧链残基如赖氨酸和半胱氨酸的数目。在一些实施方案中,通过本文所述的方法将游离半胱氨酸残基引入到抗体氨基酸序列中。在这样的方面中,p可以是1、2、3、4、5、6、7或8及其范围,如1至8或2至5。在任何这样的方面中,p和n相等(即,p=n=1、2、3、4、5、6、7或8,或它们之间的某个范围)。式I的示例性免疫缀合物包括但不限于具有1、2、3或4个工程化的半胱氨酸氨基酸的抗体(Lyon,R.等人,(2012) Methods in Enzym. 502:123-138)。在一些实施方案中,一个或多个游离半胱氨酸残基已经存在于抗体中形成链内二硫键,而无需使用工程化,在这种情况下,存在的游离半胱氨酸残基可用于使抗体与药物缀合。在一些实施方案中,在抗体的缀合之前使抗体暴露于还原条件,以便产生一个或多个游离半胱氨酸残基。

[0456] 对于一些免疫缀合物,p可受限于抗体上的连接位点的数目。例如,在连接是半胱氨酸硫醇的情况下,如在本文所述的某些示例性实施方案中,抗体可具有仅一个或有限数目的半胱氨酸硫醇基团,或者可仅具有一个或有限数目的可与药物连接的足够反应性的硫醇基团。在其它实施方案中,抗体中的一个或多个赖氨酸氨基对于与式II的Hx-接头化合物缀合可以是可用的和反应性的。在某些实施方案中,更高的载药量(例如p>5)可能导致某些抗体-药物缀合物的聚集、不溶性、毒性或细胞渗透性的丧失。在某些实施方案中,免疫缀合物的平均载药量范围是1至约8;约2至约6;或约3至约5。在某些实施方案中,使抗体经受变性条件以展现反应性亲核基团,如赖氨酸或半胱氨酸。

[0457] 可以以不同的方式控制免疫缀合物的加载(药物/抗体比率),例如通过:(i)限制

Hx-接头中间体化合物相对于抗体的摩尔过量, (ii) 限制缀合反应时间或温度, 和 (iii) 部分或限制性还原变性条件以优化抗体反应性。

[0458] 要理解的是, 在抗体的多于一个亲核基团与药物反应的情况下, 所得产物是与抗体连接的一个或多个药物部分分布的免疫缀合物化合物的混合物。可以通过双重ELISA抗体测定由混合物计算每个抗体的药物平均数, 其对于抗体是特异性的, 并且对于药物是特异性的。可以通过质谱法鉴定混合物中的各个免疫缀合物分子, 并通过HPLC分离, 例如疏水相互作用色谱法 (参见例如, McDonagh等人, (2006) Prot. Engr. Design&Selection 19(7): 299-307; Hamblett等人, (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Hamblett, K.J. 等人, “Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate,” 摘要号624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, 2004年3月27-31日, Proceedings of the AACR, 第45卷, 2004年3月; Alley, S.C. 等人, “Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates,” 摘要号627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, 2004年3月27-31日, Proceedings of the AACR, 第45卷, 2004年3月)。在某些实施方案中, 可以通过电泳或色谱法从缀合混合物中分离具有单一加载值的均质免疫缀合物。

[0459] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案选自表3a和3b的免疫缀合物。根据实施例203的方法进行免疫缀合物体外活性的评估。

[0460] 表3a抗HER2 PhBz免疫缀合物(IC)

[0461]

免疫缀合物 编号	PhBzL 表 2a	抗体	DAR	cDC 共培养物 测定 IL-12p70 分泌 EC50 [nM]
IC-1	PhBzL-1	曲妥珠单抗	1.54	
IC-2	PhBzL-3	曲妥珠单抗	2.6	
IC-3	PhBzL-4	曲妥珠单抗	1.6	
IC-4	PhBzL-5	曲妥珠单抗	1.5	
IC-5	PhBzL-6	曲妥珠单抗	2.5	
IC-6	PhBzL-7	曲妥珠单抗	2.2	
IC-7	PhBzL-9	曲妥珠单抗	2.8	
IC-8	PhBzL-10	曲妥珠单抗	2.2	
IC-9	PhBzL-8	曲妥珠单抗	2.4	13.3
IC-10	PhBzL-11	曲妥珠单抗	3.0	
IC-11	PhBzL-13	曲妥珠单抗	2.8	
IC-12	PhBzL-12	曲妥珠单抗	2.5	
IC-13	PhBzL-14	曲妥珠单抗	2.1	
IC-14	PhBzL-16	曲妥珠单抗	2.1	

[0462]

IC-15	PhBzL-18	曲妥珠单抗	2.2	
IC-16	PhBzL-15	曲妥珠单抗	2.6	
IC-17	PhBzL-17	曲妥珠单抗	2.0	
IC-18	PhBzL-19	曲妥珠单抗	1.5	
IC-19	PhBzL-20	曲妥珠单抗	2.4	
IC-20	PhBzL-21	曲妥珠单抗	2.3	
IC-21	PhBzL-22	曲妥珠单抗	2.2	
IC-22	PhBzL-23	曲妥珠单抗	2.5	
IC-23	PhBzL-24	曲妥珠单抗	2.6	
IC-24	PhBzL-25	曲妥珠单抗	2.6	
IC-25	PhBzL-26	曲妥珠单抗	2.2	
IC-26	PhBzL-28	曲妥珠单抗	2.1	
IC-27	PhBzL-29	曲妥珠单抗	2.0	
IC-28	PhBzL-27	曲妥珠单抗	2.4	
IC-29	PhBzL-30	曲妥珠单抗	2.6	
IC-30	PhBzL-32	曲妥珠单抗	2.1	
IC-31	PhBzL-33	曲妥珠单抗	2.5	
IC-32	PhBzL-31	曲妥珠单抗	2.4	
IC-33	PhBzL-34	曲妥珠单抗	1.8	
IC-34	PhBzL-1	Tras-G1f-N297A	2.3	
IC-35	PhBzL-35	曲妥珠单抗	2.4	
IC-36	PhBzL-36	曲妥珠单抗	2.2	
IC-37	PhBzL-37	曲妥珠单抗	3.0	3.1
IC-38	PhBzL-37	Tras-G1f-N297A	2.4	
IC-39	PhBzL-38	曲妥珠单抗	2.4	3.2
IC-40	PhBzL-39	曲妥珠单抗	2.4	
IC-41	PhBzL-42	曲妥珠单抗	2.4	1.1
IC-42	PhBzL-41	曲妥珠单抗	1.2	91.1
IC-43	PhBzL-43	曲妥珠单抗	2.1	5.2
IC-44	PhBzL-40	曲妥珠单抗	1.5	
IC-45	PhBzL-41	曲妥珠单抗	2.9	
IC-46	PhBzL-44	曲妥珠单抗	2.6	11.1
IC-47	PhBzL-47	曲妥珠单抗	2.2	
IC-48	PhBzL-46	曲妥珠单抗	2.6	7.0
IC-49	PhBzL-45	曲妥珠单抗	2.4	
IC-50	PhBzL-49	曲妥珠单抗	2.3	
IC-51	PhBzL-48	曲妥珠单抗	2.7	2.1
IC-52	PhBzL-50	曲妥珠单抗	2.4、3.2	
IC-53	PhBzL-51	曲妥珠单抗	2.2	0.5
IC-54	PhBzL-50	曲妥珠单抗		
IC-55	PhBzL-53	曲妥珠单抗	2.8	
IC-56	PhBzL-58	曲妥珠单抗	2.8	2.1
IC-57	PhBzL-52	曲妥珠单抗	2.9	

[0463]

IC-58	PhBzL-56	曲妥珠单抗	2.4	0.7
IC-59	PhBzL-57	曲妥珠单抗	2.2	
IC-60	PhBzL-59	曲妥珠单抗	2.0	10.0
IC-61	PhBzL-62	曲妥珠单抗	2.3、2.4	
IC-62	PhBzL-60	曲妥珠单抗	3.0	1.4
IC-63	PhBzL-61	曲妥珠单抗	2.4	8.4
IC-64	PhBzL-54	Tras-K107C	2.0	
IC-65	PhBzL-55	Tras-K107C	2.0	
IC-66	PhBzL-54	Tras-K414C	2.0	
IC-67	PhBzL-64	曲妥珠单抗	2.5	
IC-68	PhBzL-54	V205C Thiomab	1.9	
IC-69	PhBzL-55	V205C Thiomab	1.9	
IC-70	PhBzL-56	Tras-G1f-N297A	2.3	
IC-71	PhBzL-55	曲妥珠单抗	2.0	
IC-72	PhBzL-46	Tras-G1f-N297A	2.2	
IC-73	PhBzL-54	曲妥珠单抗	3.6	
IC-74	PhBzL-55	曲妥珠单抗	2.9	1.2
IC-75	PhBzL-63	曲妥珠单抗	2.5	
IC-76	PhBzL-65	曲妥珠单抗	2.3	
IC-77	PhBzL-54	曲妥珠单抗	8.3	
IC-78	PhBzL-55	曲妥珠单抗	7.6	1.5
IC-79	PhBzL-66	曲妥珠单抗	2.2	

[0464] 表3b抗HER2 PhBz免疫缀合物(IC)

[0465]

免疫缀合物 编号	PhBzL 表 2a	抗体	DAR	cDC 共培养物 测定 IL-1270 分泌 EC50 [nM]
IC-80	PhBzL-67	曲妥珠单抗	2.5	1.3
IC-81	PhBzL-68	曲妥珠单抗	2.6	
IC-82	PhBzL-74	曲妥珠单抗	2.2	
IC-83	PhBzL-70	曲妥珠单抗	2.7	
IC-84	PhBzL-69	曲妥珠单抗	2.5	
IC-85	PhBzL-73	曲妥珠单抗	2.5	
IC-86	PhBzL-72	曲妥珠单抗	2.4	
IC-87	PhBzL-71	曲妥珠单抗	2.4	
IC-88	PhBzL-76	曲妥珠单抗	2.6	
IC-89	PhBzL-75	曲妥珠单抗	2.5	
IC-90	PhBzL-80	曲妥珠单抗	2.5	
IC-91	PhBzL-79	曲妥珠单抗	2.6	
IC-92	PhBzL-78	曲妥珠单抗	2.9	
IC-93	PhBzL-77	曲妥珠单抗	2.7	
IC-94	PhBzL-83	曲妥珠单抗	2.6	

[0466]	IC-95	PhBzL-82	曲妥珠单抗	2.4	
	IC-96	PhBzL-81	曲妥珠单抗	2.5	
	IC-97	PhBzL-84	曲妥珠单抗	2.6	
	IC-98	PhBzL-85	曲妥珠单抗	2.5	4.7
	IC-99	PhBzL-86	曲妥珠单抗	3.4	0.9
	IC-100	PhBzL-89	曲妥珠单抗	2.5	
	IC-101	PhBzL-90	曲妥珠单抗	2.4	
	IC-102	PhBzL-87	曲妥珠单抗	2.5	
	IC-103	PhBzL-91	曲妥珠单抗	2.4	
	IC-104	PhBzL-88	曲妥珠单抗	2.4	
	IC-105	PhBzL-92	曲妥珠单抗	4.2	
	IC-106	PhBzL-93	曲妥珠单抗	4.1	

[0467] 免疫缀合物的组合物

[0468] 本发明提供组合物，例如药学上或药理学上可接受的组合物或制剂，其包含如本文所述的多种免疫缀合物和任选用于其的载体，例如药学上或药理学上可接受的载体。组合物中的免疫缀合物可以是相同的或不同的，即组合物可包含具有与抗体构建体上的相同位置连接的相同数目的佐剂的免疫缀合物和/或具有与抗体构建体上的不同位置连接的相同数目的Hx佐剂的免疫缀合物、具有与抗体构建体上的相同位置连接的不同数目的佐剂的免疫缀合物或具有与抗体构建体上的不同位置连接的不同数目的佐剂的免疫缀合物。

[0469] 在示例性实施方案中，包含免疫缀合物化合物的组合物包含免疫缀合物化合物的混合物，其中免疫缀合物化合物的混合物中每个抗体的平均载药 (Hx) 量为约2至约5。

[0470] 本发明的免疫缀合物的组合物可具有约0.4至约10的平均佐剂与抗体构建体比率 (DAR)。技术人员将认识到，在包含多种本发明的免疫缀合物的组合物中，与抗体构建体缀合的8-Phe-2-氨基苯并氮杂~~草~~佐剂的数目可能因免疫缀合物而异，因此佐剂与抗体构建体 (例如，抗体) 比率可以被测量为平均值，其可以被称为药物与抗体比率 (DAR)。可以通过任意合适的方法评估佐剂与抗体构建体 (例如，抗体) 比率，其中的许多方法是本领域中已知的。

[0471] 来自缀合反应的免疫缀合物的制剂中的每个抗体的平均佐剂部分数 (DAR) 可以通过常规方法来表征，如质谱法、ELISA测定和HPLC。也可以确定以p表示的免疫缀合物在组合物中的定量分布。在一些情形下，可以通过诸如反相HPLC或电泳的方法实现均质免疫缀合物的分离、纯化和表征，其中p是来自具有其它载药量的免疫缀合物的某一值。

[0472] 在一些实施方案中，组合物还包含一种或多种药学上或药理学上可接受的赋形剂。例如，本发明的免疫缀合物可以被配制用于肠胃外施用，如IV施用或施用到体腔或器官的内腔中。或者，可以肿瘤内注射免疫缀合物。注射用组合物将通常包含免疫缀合物溶解在药学上可接受的载体中的溶液。可以使用的可接受的媒介物和溶剂当中有水 and 一种或多种盐如氯化钠的等渗溶液，例如林格氏溶液。此外，无菌不挥发油可常规用作溶剂或悬浮介质。为此，可以使用任何温和的不挥发油，包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外，脂肪酸如油酸同样可用于制备注射剂。这些组合物理想地是无菌的，并且通常不含不期望的物质。可以通过常规的熟知灭菌技术对这些组合物进行灭菌。组合物可以含有接近生理条件所需的

药学上可接受的辅助物质,如pH调节和缓冲剂、毒性调节剂,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。

[0473] 组合物可含有任意合适浓度的免疫缀合物。组合物中免疫缀合物的浓度可以广泛变化,并且将根据选择的特定施用模式和患者的需要,主要基于流体体积、粘度、体重等来选择。在某些实施方案中,注射用溶液制剂中免疫缀合物的浓度范围为约0.1% (w/w) 至约10% (w/w)。

[0474] 用免疫缀合物治疗癌症的方法

[0475] 本发明提供了治疗癌症的方法。所述方法包括对有需要的受试者施用治疗有效量的如本文所述的免疫缀合物(例如,作为如本文所述的组合物),所述有需要的受试者例如为患有癌症并需要治疗癌症的受试者。所述方法包括施用治疗有效量的选自表3a和3b的免疫缀合物(IC)。

[0476] 预期本发明的免疫缀合物可用于治疗各种过度增殖性疾病或病症,例如以肿瘤抗原的过表达为特征。示例性的过度增殖性疾病包括良性或恶性实体肿瘤和血液疾患,诸如白血病和淋巴恶性肿瘤。

[0477] 另一方面,提供了用作药物的免疫缀合物。在某些实施方案中,本发明提供了用于治疗个体的方法的免疫缀合物,所述方法包括对所述个体施用有效量的所述免疫缀合物。在一个这样的实施方案中,所述方法还包括对所述个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,例如,如本文所述。

[0478] 在进一步的方面中,本发明提供免疫缀合物在制造或制备药物中的用途。在一个实施方案中,所述药物用于治疗癌症,所述方法包括对患有癌症的个体施用有效量的所述药物。在一个这样的实施方案中,所述方法还包括对所述个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,例如,如本文所述。

[0479] 癌是起源于上皮组织的恶性肿瘤。上皮细胞覆盖身体的外表面,内衬内腔,并形成腺体组织的内衬。癌的实例包括但不限于腺癌(始于腺(分泌)细胞的癌症,如乳腺癌、胰腺癌、肺癌、前列腺癌、胃癌、胃食管连接部癌和结肠癌)肾上腺皮质癌;肝细胞癌;肾细胞癌;卵巢癌;原位癌;导管癌;乳腺癌;基底细胞癌;鳞状细胞癌;移行细胞癌;结肠癌;鼻咽癌;多房囊性肾细胞癌;燕麦细胞癌;大细胞肺癌;小细胞肺癌;非小细胞肺癌;等等。癌可见于前列腺、胰腺、结肠、脑(通常作为继发性转移)、肺、乳房和皮肤中。在一些实施方案中,治疗非小细胞肺癌的方法包括施用含有能够结合HER2的抗体构建体的免疫缀合物(例如,曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、其生物仿制药或其生物改良药)。

[0480] 软组织肿瘤是源自结缔组织的一组高度多样化的罕见肿瘤。软组织肿瘤的实例包括但不限于肺泡样软组织肉瘤;血管瘤样纤维组织细胞瘤;软骨粘液样纤维瘤;骨骼软骨肉瘤;骨外粘液样软骨肉瘤;透明细胞肉瘤;促纤维增生性小圆细胞瘤;隆突性皮肤纤维肉瘤;子宫内间质瘤;尤因氏肉瘤;纤维瘤病(硬纤维瘤);婴儿型纤维肉瘤;胃肠道间质瘤;骨巨细胞瘤;腱鞘巨细胞瘤;炎性肌纤维母细胞瘤;子宫肌瘤;平滑肌肉瘤;脂母细胞瘤;典型脂肪瘤;梭形细胞或多形性脂肪瘤;非典型脂肪瘤;软骨样脂肪瘤;分化良好的脂肪肉瘤;粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤;多形性脂肪肉瘤;粘液样恶性纤维组织细胞瘤;高度恶性纤维组织细胞瘤;粘液纤维肉瘤;恶性周围神经鞘瘤;间皮瘤;神经母细胞瘤;骨软骨瘤;骨肉瘤;原始神经外胚层瘤;腺泡状横纹肌肉瘤;胚胎性横纹肌肉瘤;良性或恶性神经鞘瘤;滑膜肉瘤;埃

文氏瘤(Evan's tumor);结节性筋膜炎;韧带样型纤维瘤病;孤立性纤维瘤;隆突性皮肤纤维肉瘤(DFSP);血管肉瘤;上皮样血管内皮瘤;腱鞘巨细胞瘤(TGCT);色素沉着绒毛结节性滑膜炎(PVNS);纤维发育不良;粘液纤维肉瘤;纤维肉瘤;滑膜肉瘤;恶性周围神经鞘瘤;神经纤维瘤;软组织多形性腺瘤;以及源自成纤维细胞、成肌纤维细胞、组织细胞、血管细胞/内皮细胞和神经鞘细胞的瘤形成。

[0481] 肉瘤是罕见类型的癌症,其起源于间充质来源的细胞,例如身体的骨骼或软组织,包括软骨、脂肪、肌肉、血管、纤维组织或其它结缔或支持组织。不同类型的肉瘤基于癌症形成的位置。例如,骨肉瘤在骨骼中形成,脂肪肉瘤在脂肪中形成,且横纹肌肉瘤在肌肉中形成。肉瘤的实例包括但不限于阿斯金瘤;葡萄状肉瘤;软骨肉瘤;尤因氏肉瘤;恶性血管内皮瘤;恶性神经鞘瘤;骨肉瘤;和软组织肉瘤(例如,肺泡样软组织肉瘤;血管肉瘤;叶状囊肉瘤隆突性皮肤纤维肉瘤(DFSP);硬纤维瘤;促结缔组织增生性小圆细胞瘤;上皮样肉瘤;骨骼外软骨肉瘤;骨骼外骨肉瘤;纤维肉瘤;胃肠道间质瘤(GIST);血管外皮细胞瘤;血管内皮瘤(更通常称为“血管肉瘤”);卡波西肉瘤;平滑肌肉瘤;脂肪肉瘤;淋巴管肉瘤;恶性周围神经鞘瘤(MPNST);神经纤维肉瘤;滑膜肉瘤;和未分化多形性肉瘤)。

[0482] 畸胎瘤是一种类型的生殖细胞肿瘤,其可含有若干不同类型的组织(例如,可包括源自任何和/或所有三个胚层的组织:内胚层、中胚层和外胚层),包括例如毛发、肌肉和骨骼。畸胎瘤最常发生在女性的卵巢、男性的睾丸和儿童的尾椎骨中。

[0483] 黑素瘤是始于黑素细胞(产生黑色素的细胞)的癌症形式。黑素瘤可始于痣(皮肤黑素瘤),但也可始于其它有色素组织,如眼睛或肠。

[0484] 默克尔细胞癌是罕见类型的皮肤癌,通常表现为面部、头部或颈部的肉色或蓝红色结节。默克尔细胞癌也称为皮肤神经内分泌癌。在一些实施方案中,治疗默克尔细胞癌的方法包括施用含有能够结合HER2的抗体构建体的免疫缀合物(例如,曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、其生物仿制药或其生物改良药)。在一些实施方案中,在进行施用,默克尔细胞癌已经转移。

[0485] 白血病是在形成血液的组织如骨髓中开始的癌症,并且导致产生大量异常的血细胞并进入血流。例如,白血病可起源于通常在血流中成熟的骨髓源性细胞。白血病根据疾病发生和进展有多快(例如,急性与慢性)和受影响的白细胞类型(例如,髓样与淋巴样)来命名。髓样白血病也称为骨髓性或成髓细胞白血病。淋巴样白血病也称为淋巴母细胞或淋巴细胞白血病。淋巴样白血病细胞可聚集在淋巴结中,所述淋巴结会肿胀。白血病的实例包括但不限于急性髓样白血病(AML)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性髓样白血病(CML)和慢性淋巴细胞白血病(CLL)。

[0486] 淋巴瘤是始于免疫系统的细胞的癌症。例如,淋巴瘤可起源于通常在淋巴系统中成熟的骨髓源性细胞。有两种淋巴瘤的基本类别。一类淋巴瘤是霍奇金淋巴瘤(HL),其特征是存在一种称为Reed-Sternberg细胞的细胞。目前有6种公认的HL类型。霍奇金淋巴瘤的示例包括结节性硬化经典霍奇金淋巴瘤(CHL)、混合细胞CHL、淋巴细胞耗竭型CHL、富含淋巴细胞的CHL和结节性淋巴细胞为主型HL。

[0487] 另一种类别的淋巴瘤是非霍奇金淋巴瘤(NHL),其包括大量不同的免疫系统细胞的癌症。非霍奇金淋巴瘤可进一步分为具有惰性(缓慢生长)病程的癌症和具有侵袭性(快速生长)病程的癌症。NHL目前有61种公认的类型。非霍奇金淋巴瘤的示例包括但不限于

AIDS相关淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞淋巴瘤、母细胞性NK细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、伯基特样淋巴瘤(小无裂细胞淋巴瘤)、慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、肠病型T细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、肝脾 γ - δ T细胞淋巴瘤、T细胞白血病、成淋巴细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、鼻T细胞淋巴瘤、小儿淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、转化淋巴瘤、治疗相关T细胞淋巴瘤和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症。

[0488] 脑癌包括脑组织的任何癌症。脑癌的实例包括但不限于神经胶质瘤(例如,成胶质细胞瘤、星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤、室管膜瘤等)、脑膜瘤、垂体腺瘤和前庭神经鞘瘤、原始神经外胚层瘤(髓母细胞瘤)。

[0489] 本发明的免疫缀合物可以单独使用或与疗法中的其它剂组合使用。例如,免疫缀合物可以与至少一种另外的治疗剂如化学治疗剂共同施用。这类组合疗法涵盖组合施用(其中在同一或分开的制剂中包括两种或更多种治疗剂)和单独施用,在后一种情况下,免疫缀合物的施用可以在另外的治疗剂和/或佐剂的施用之前、同时和/或之后进行。本发明的免疫缀合物也可以与放射疗法组合使用。

[0490] 可以通过任意合适的方式施用本发明的免疫缀合物(和任何另外的治疗剂),包括肠胃外、肺内和鼻内施用,并且如果需要局部治疗,则进行病灶内施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。可以通过任意合适的途径给药,例如通过注射,如静脉内或皮下注射,这部分地取决于施用是短暂的还是长期的。本文考虑了各种给药方案,包括但不限于在各种时间点单次或多次施用、推注施用和脉冲输注。

[0491] 采用任意合适的给药方案,如用于拉贝珠单抗、其生物仿制药及其生物改良药的给药方案,以任何治疗有效量对有需要的受试者施用免疫缀合物。例如,所述方法可包括施用免疫缀合物以向受试者提供约100ng/kg至约50mg/kg的剂量。免疫缀合物的剂量范围可为约5mg/kg至约50mg/kg、约10 μ g/kg至约5mg/kg、或约100 μ g/kg至约1mg/kg。免疫缀合物剂量可以为约100、200、300、400或500 μ g/kg。免疫缀合物剂量可以为约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10mg/kg。免疫缀合物剂量也可以在这些范围之外,这取决于特定缀合物以及所治疗癌症的类型和严重程度。施用频率的范围可以从每周一次剂量到多次剂量,或者更频繁。在一些实施方案中,施用免疫缀合物约每月一次到约每周五次。在一些实施方案中,每周一次施用免疫缀合物。

[0492] 另一方面,本发明提供预防癌症的方法。所述方法包括对受试者施用治疗有效量的免疫缀合物(例如,作为如上所述的组合物)。在某些实施方案中,受试者易患某种要预防的癌症。

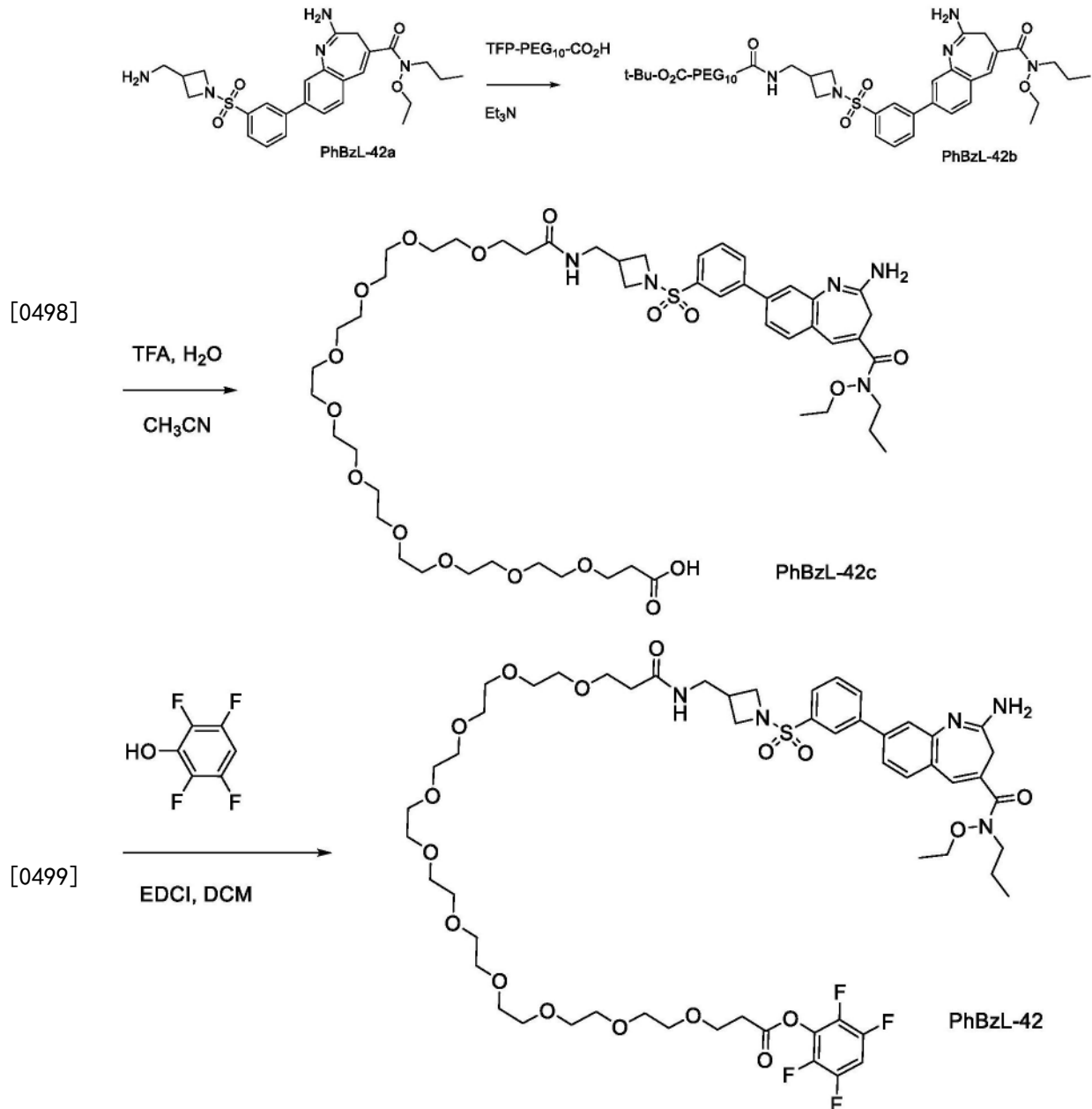
[0493] 本发明的一些实施方案提供治疗如上所述的癌症的方法,其中所述癌症是乳腺癌。乳腺癌可起源于乳房的不同区域,并且已经表征了许多不同类型的乳腺癌。例如,本发明的免疫缀合物可用于治疗导管原位癌;浸润性导管癌(例如,管癌;髓样癌;粘液癌;乳头状癌;或乳腺筛状癌);小叶原位癌;浸润性小叶癌;炎性乳腺癌;及其它形式的乳腺癌,如三阴性(对于雌激素受体、孕酮受体和过量的HER2蛋白测试呈阴性)乳腺癌。在一些实施方案中,治疗乳腺癌的方法包括施用含有能够结合HER2或肿瘤过表达的HER2的抗体构建体的免疫缀合物(例如,曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、其生物仿制药或生物改良药)。

[0494] 在一些实施方案中,所述癌症对由TLR7和/或TLR8诱导的促炎性反应敏感。

[0495] 在一些实施方案中,对有需要的患者施用治疗有效量的免疫缀合物以治疗宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、食管癌、膀胱癌、泌尿道癌、尿路上皮癌、肺癌、非小细胞肺癌、默克尔细胞癌、结肠癌、结直肠癌、胃癌或乳腺癌。默克尔细胞癌可以是转移性默克尔细胞癌。乳腺癌可以是三阴性乳腺癌。食管癌可以是胃食管连接部腺癌。

[0496] 实施例

[0497] 实施例L-42 2,3,5,6-四氟苯基1-(1-((3-(2-氨基-4-(乙氧基(丙基)氨基甲酰基)-3H-苯并[b]氮杂草-8-基)苯基)磺酰基)氮杂环丁烷-3-基)-3-氧代-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-十氧杂-2-氮杂三十六碳-36-烷酸酯,PhBzL-42的合成



[0500] 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-[[1-[3-[2-氨基-4-[乙氧基(丙基)氨基甲酰基]-3H-1-苯并氮杂草-8-基]苯基]磺酰基氮杂环丁烷-3-基]甲氨基]-3-氧代-丙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸叔丁酯, PhBzL-42b的制备

[0501] 向2-氨基-8-[3-[3-(氨甲基)氮杂环丁烷-1-基]磺酰基苯基]-N-乙氧基-N-丙基-3H-1-苯并氮杂**草**-4-甲酰胺, PhBzL-42a (270mg, 431 μ mol, 1当量, TFA) 在DMF (2mL) 中的溶液中添加Et₃N (131mg, 1.29mmol, 180 μ L, 3当量) 和3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(3-叔丁氧基-3-氧代-丙氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸(2,3,5,6-四氟苯基)酯, TFP-PEG10-CO₂H (329mg, 431 μ mol, 1当量), 然后在0°C 下搅拌1小时。将混合物过滤, 并通过制备型HPLC纯化(柱: Phenomenex Luna 80*30mm*3 μ m; 流动相: [水 (0.1% TFA) - ACN]; B%: 35% - 57%, 8分钟), 得到PhBzL-42b (270mg, 243 μ mol, 56.45%收率), 为无色油状物。

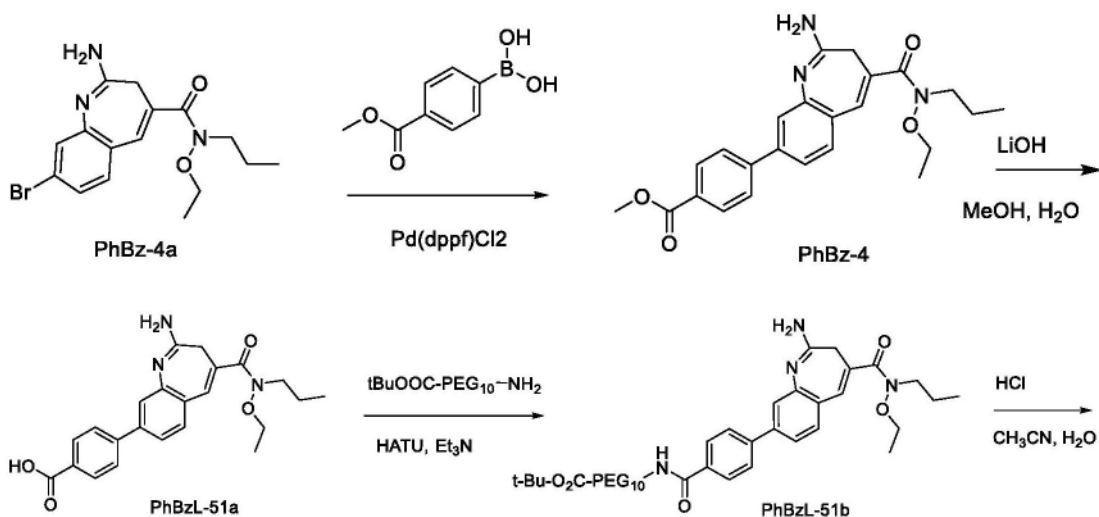
[0502] 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-[[1-[3-[2-氨基-4-[乙氧基(丙基)氨基甲酰基]-3H-1-苯并氮杂**草**-8-基]苯基]磺酰基氮杂环丁烷-3-基]甲氨基]-3-氧代-丙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸, PhBzL-42c 的制备

[0503] 向PhBzL-42b (270mg, 243 μ mol, 1当量) 在CH₃CN (2mL) 和H₂O (2mL) 中的溶液中添加TFA (222mg, 1.95mmol, 144 μ L, 8当量), 然后在80°C 下搅拌1小时。将混合物浓缩, 并用水 (10mL) 稀释残留物, 然后通过逐渐添加NaHCO₃水溶液将水相的pH调节至~5, 并用DCM: i-PrOH=3:1 (10mL x 3) 萃取, 将有机相经Na₂SO₄干燥, 过滤并浓缩。通过制备型HPLC(柱: Phenomenex Luna C1875*30mm*3 μ m; 流动相: [水 (0.2% FA) - ACN]; B%: 20% - 50%, 8分钟) 纯化残留物, 得到PhBzL-42c (50mg, 47.52 μ mol, 19.51%收率), 为无色油状物。¹H NMR (400MHz, MeOD) δ 8.16-8.09 (m, 2H), 7.94-7.79 (m, 2H), 7.75 (s, 1H), 7.73-7.62 (m, 2H), 7.41 (s, 1H), 3.97 (q, J=7.0Hz, 2H), 3.86 (t, J=8.2Hz, 2H), 3.79-3.69 (m, 4H), 3.66-3.49 (m, 40H), 3.32 (s, 2H), 3.18 (d, J=6.4Hz, 2H), 2.71-2.61 (m, 1H), 2.48 (t, J=6.5Hz, 2H), 2.30 (t, J=6.0Hz, 2H), 1.78 (sxt, J=7.2Hz, 2H), 1.21 (t, J=7.2Hz, 3H), 1.01 (t, J=7.2Hz, 3H)。

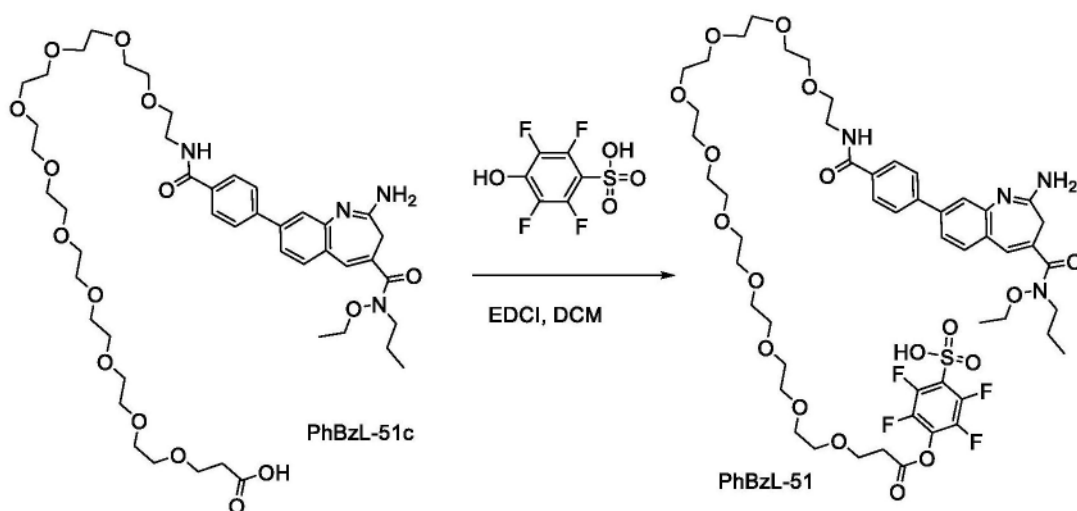
[0504] PhBzL-42的制备

[0505] 向PhBzL-42c (50mg, 72 μ mol, 1当量, TFA) 在DCM (2mL) 和DMA (0.1mL) 中的溶液中添加2,3,5,6-四氟苯酚 (95mg, 503 μ mol, 8当量) 和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐, EDCI (140mg, 700 μ mol, 10当量), 然后将混合物在25°C 下搅拌0.5h。将反应混合物用水稀释, 并通过HPLC纯化, 得到PhBzL-42 (0.046g, 0.038mmol, 53%)。LC/MS [M+H]⁺ 1200.50 (计算值); LC/MS [M+H]⁺ 1200.80 (实测值)。

[0506] 实施例L-51 4-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[4-[2-氨基-4-[乙氧基(丙基)氨基甲酰基]-3H-1-苯并氮杂**草**-8-基]苯甲酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酰氧基]-2,3,5,6-四氟-苯磺酸, PhBzL-51的合成



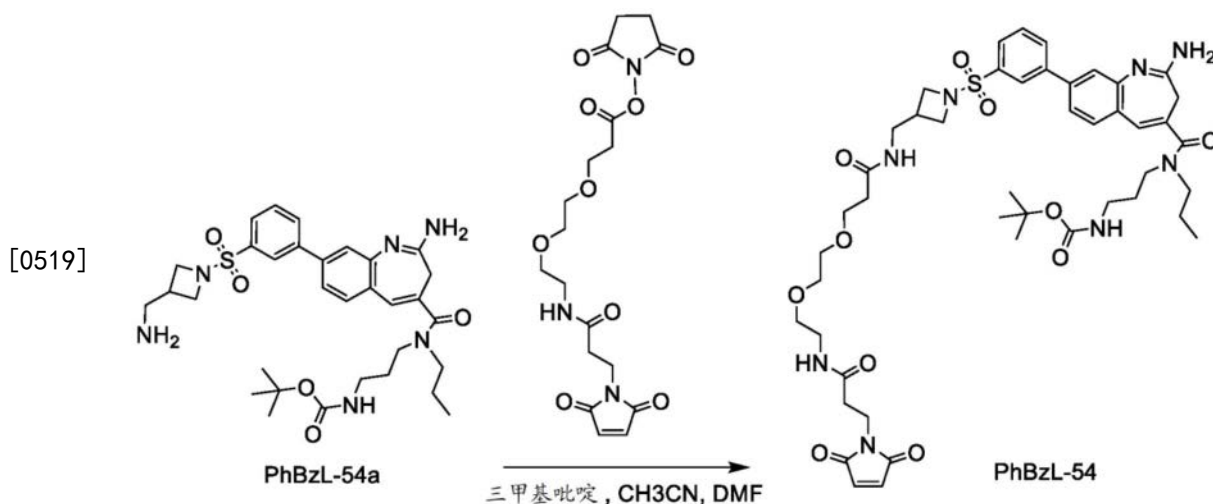
[0507]



[0508] 4-[2-氨基-4-[乙氧基(丙基)氨基甲酰基]-3H-1-苯并氮杂^草-8-基]苯甲酸甲酯, PhBz-4的制备

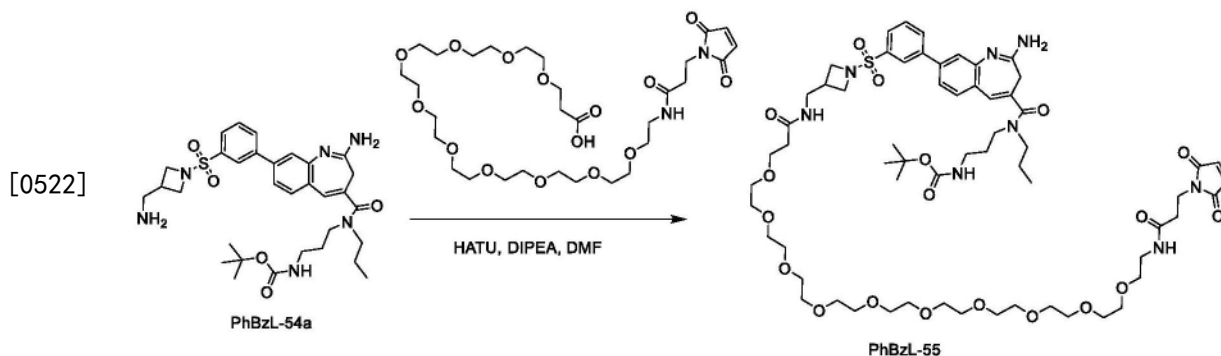
[0509] 将2-氨基-8-溴-N-乙氧基-N-丙基-3H-1-苯并氮杂^草-4-甲酰胺, PhBz-4a (0.2g, 546 μmol , 1当量)、(4-甲氧基羰基苯基)硼酸(98.3mg, 546 μmol , 1当量)、 K_2CO_3 (151mg, 1.09mmol, 2当量)、[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯(II), Pd(dppf) Cl_2 (40.0mg, 54.6 μmol , 0.1当量)在二噁烷(50mL)和 H_2O (5mL)中的混合物脱气,并用 N_2 吹扫3次,然后在90 $^\circ\text{C}$ 和 N_2 气氛下搅拌2小时。将混合物用 H_2O (10mL)稀释,并用EtOAc(30mL x 3)萃取。将合并的有机层用盐水(50mL x 2)洗涤,经 Na_2SO_4 干燥,过滤并在减压下浓缩,得到残留物。通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Synergi C18 150*25*10 μm ;流动相:[水(0.1% TFA)-ACN];B%:25%-45%,8分钟)纯化残留物,得到PhBz-4(0.25g,粗),为白色固体。 ^1H NMR(MeOD, 400MHz) δ 8.15(d, J=8.4Hz, 2H), 7.84(d, J=8.4Hz, 2H), 7.79-7.75(m, 1H), 7.71-7.67(m, 2H), 7.45(s, 1H), 4.01-3.96(m, 2H), 3.95(s, 3H), 3.76(t, J=7.2Hz, 2H), 3.43(s, 2H), 1.80-1.75(m, 2H), 1.21(t, J=7.2Hz, 3H), 1.01(t, J=7.6Hz, 3H)。HPLC:98.776%(220nm)、99.813%(254nm)。LC/MS[M+H] $^+$ 422.2(计算值);LC/MS[M+H] $^+$ 422.1(实测值)。

[0510] 4-[2-氨基-4-[乙氧基(丙基)氨基甲酰基]-3H-1-苯并氮杂^草-8-基]苯甲酸,



[0520] 向(3-(2-氨基-8-(3-((3-(氨甲基)氮杂环丁烷-1-基)磺酰基)苯基)-N-丙基-3H-苯并[b]氮杂^草-4-甲酰氨基)丙基)氨基甲酸叔丁酯, PhBzL-54a (50mg, 0.08mmol, 1当量)和3-(2-(2-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丙酰氨基)乙氧基)乙氧基)丙酸2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯(34mg, 0.08mmol, 1当量)在2:1ACN:DMF(3ml)中的溶液中添加2,4,6-三甲基吡啶(21 μ l, 0.16mmol, 2当量)。在室温下搅拌反应两小时,然后用水稀释,并通过制备型HPLC纯化,冻干后得到PhBzL-54(39mg, 0.041mmol, 52%),为白色固体。LC/MS[M+H]935.4(计算值);LC/MS[M+H]935.8(实测值)。

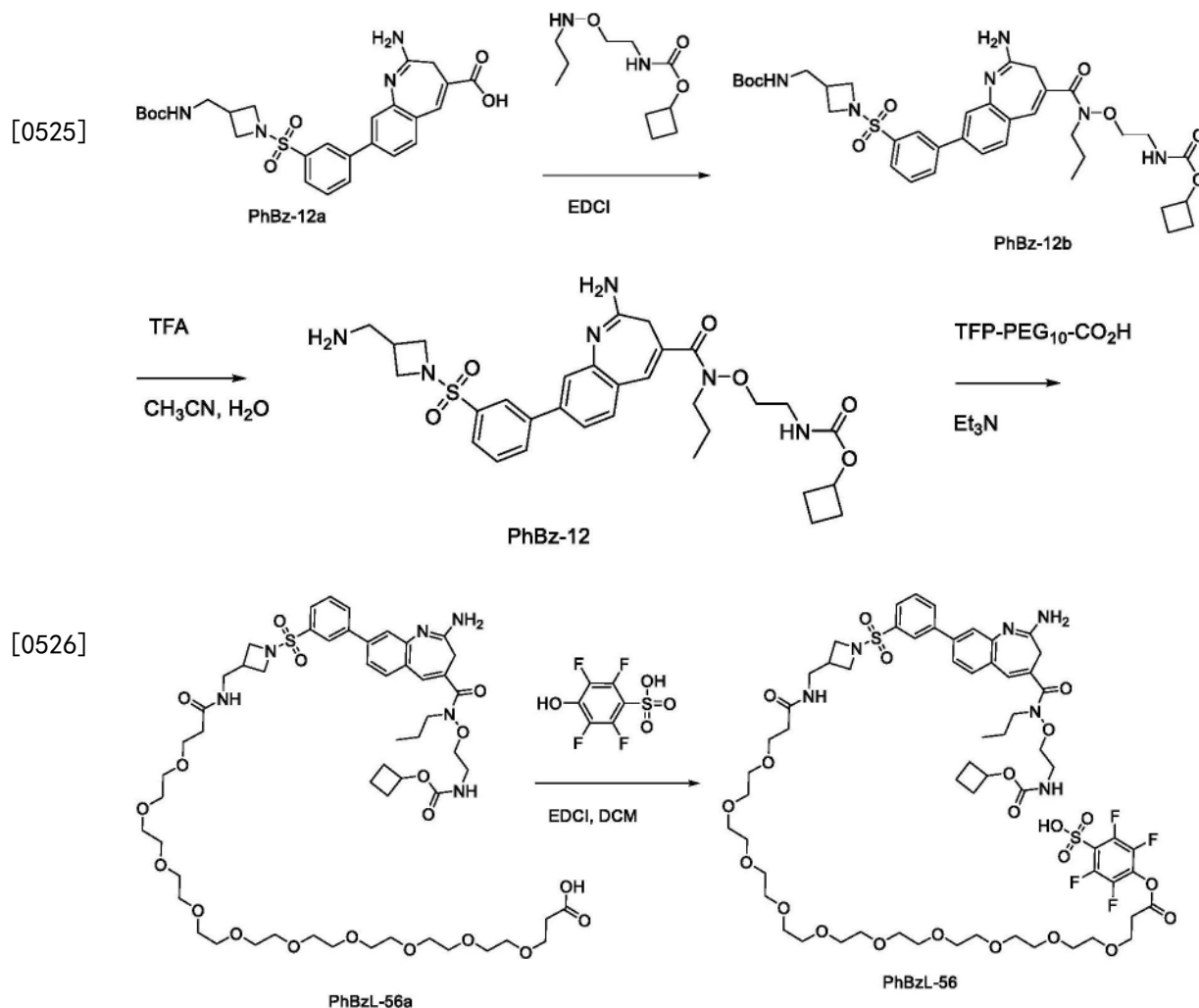
[0521] 实施例L-55(3-(2-氨基-8-(3-((3-(39-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-3,37-二氧代-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-十氧杂-2,36-二氮杂三十九烷基)氮杂环丁烷-1-基)磺酰基)苯基)-N-丙基-3H-苯并[b]氮杂^草-4-甲酰氨基)丙基)氨基甲酸叔丁酯, PhBzL-55的合成



[0523] 向(3-(2-氨基-8-(3-((3-(氨甲基)氮杂环丁烷-1-基)磺酰基)苯基)-N-丙基-3H-苯并[b]氮杂^草-4-甲酰氨基)丙基)氨基甲酸叔丁酯, PhBzL-54a (50mg, 0.08mmol, 1当量)和1-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-3-氧代-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34-十氧杂-4-氮杂三十七-37-烷酸(52.8mg, 0.078mmol, 0.97当量)在DMF(1ml)中的溶液中添加DIPEA(28 μ l, 0.16mmol, 2当量),接着添加HATU(36.5mg, 0.096mmol, 1.2当量)。在室温下搅拌反应2小时,然后浓缩,并通过制备型HPLC纯化,得到PhBzL-55(28.9mg, 0.022mmol, 28%)。LC/MS[M+H]1287.6(计算值);LC/MS[M+H]1288.1(实测值)。

[0524] 实施例L-56 4-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-[[1-[3-[2-氨基-4-[2-(环

丁氧基羰基氨基)乙氧基-丙基-氨基甲酰基]-3H-1-苯并氮杂^草-8-基]苯基]磺酰基氮杂环丁烷-3-基]甲氨基]-3-氧代-丙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酰氧基]-2,3,5,6-四氟-苯磺酸, PhBzL-56的合成



[0527] N-[2-[[2-氨基-8-[3-[3-[(叔丁氧羰基氨基)甲基]氮杂环丁烷-1-基]磺酰基苯基]-3H-1-苯并氮杂^草-4-羰基]-丙基-氨基]氧乙基]氨基甲酸环丁酯, PhBz-12b的制备

[0528] 在25℃和N₂下向N-[2-(丙基氨基氧基)乙基]氨基甲酸环丁酯(288mg, 1.14mmol, 1.5当量, HCl)和2-氨基-8-[3-[3-[(叔丁氧羰基氨基)甲基]氮杂环丁烷-1-基]磺酰基苯基]-3H-1-苯并氮杂^草-4-甲酸, PhBz-12a(400mg, 760μmol, 1.0当量)在DCM(10mL)和DMA(3mL)中的混合物中一次性添加EDCI(582mg, 3.04mmol, 4.0当量),然后在25℃下搅拌2小时。真空移除DCM(10mL),添加水(15mL),并将水相用乙酸乙酯(10mL*4)萃取,将合并的有机相用盐水(20mL*2)洗涤,用无水Na₂SO₄干燥,过滤并真空浓缩。通过硅胶色谱法(柱高:250mm,直径:100mm,100-200目硅胶,石油醚/乙酸乙酯=10/1,0/1)纯化残留物,得到PhBz-12b(340mg, 469μmol, 61.7%收率),为棕色固体。¹H NMR(400MHz, MeOD) δ8.12-8.05(m, 2H), 7.90-7.83(m, 1H), 7.82-7.76(m, 1H), 7.58-7.50(m, 2H), 7.49-7.42(m, 1H), 7.33(s, 1H), 4.76-4.67(m, 1H), 3.96(t, J=5.2Hz, 2H), 3.85(t, J=8.0Hz, 2H), 3.75(t, J=7.2Hz, 2H), 3.61-3.53(m, 2H), 3.05(d, J=6.8Hz, 2H), 2.63-2.54(m, 1H), 2.19(d, J=8.9Hz, 2H), 1.95-

1.85 (m, 2H), 1.83-1.75 (m, 2H), 1.66 (d, J=10.0Hz, 1H), 1.60-1.48 (m, 1H), 1.39 (s, 9H), 1.00 (t, J=7.2Hz, 3H)。

[0529] N-[2-[[2-氨基-8-[3-[3-(氨甲基)氮杂环丁烷-1-基]磺酰基苯基]-3H-1-苯并氮杂^草-4-羰基]-丙基-氨基]氧乙基]氨基甲酸环丁酯, PhBz-12的制备

[0530] 在25℃和N₂下向PhBz-12b(290mg, 400umol, 1.0当量)在MeCN(5mL)和H₂O(5mL)中的溶液中一次性添加TFA(456mg, 4.00mmol, 296uL, 10当量), 将混合物在80℃搅拌1小时。真空移除MeCN(5mL), 将水相用甲基叔丁基醚(5mL*3)萃取以移除过量的TFA, 然后将水相冷冻干燥, 得到PhBz-12(280mg, 379umol, 94.7%收率, TFA), 为黄色固体。

[0531] 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-[[1-[3-[2-氨基-4-[2-(环丁氧基羰基氨基)乙氧基]-丙基-氨基甲酰基]-3H-1-苯并氮杂^草-8-基]苯基]磺酰基氮杂环丁烷-3-基]甲氨基]-3-氧代-丙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸, PhBzL-56a的制备

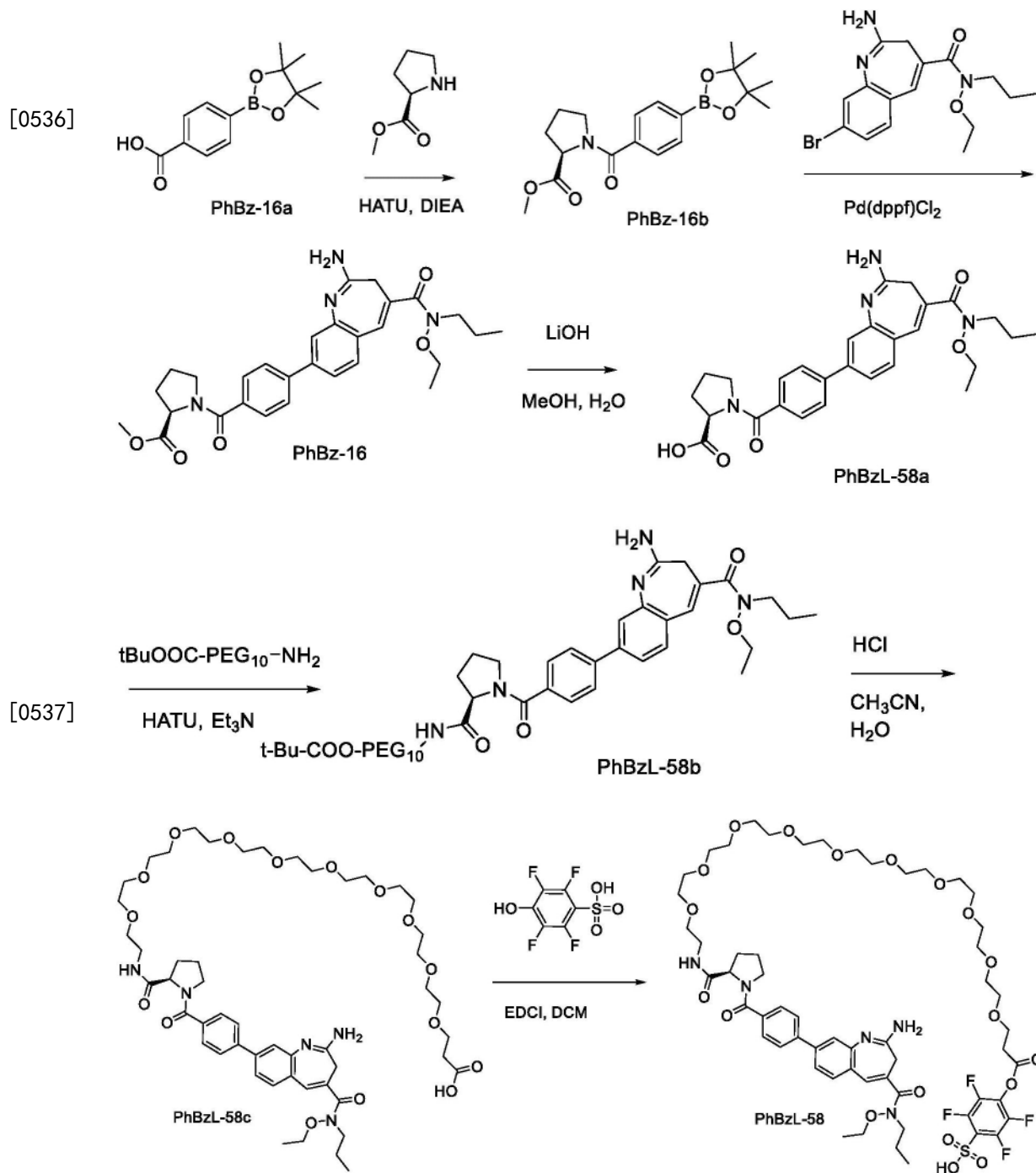
[0532] 在0℃和N₂下向PhBz-12(100mg, 160umol, 1.0当量)和Et₃N(48.6mg, 480umol, 66.8uL, 3.0当量)在THF(2mL)中的混合物中一次性添加3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-氧代-3-(2,3,5,6-四氟苯氧基)丙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸, TFP-PEG₁₀-CO₂H(113mg, 160umol, 1.0当量), 将混合物在0℃下搅拌30分钟, 然后加热到25℃, 并再搅拌0.5小时。在0℃下用TFA淬灭反应混合物, 直到pH为6, 然后添加水(5mL), 并将水相用乙酸乙酯(3mL)萃取, 弃去乙酸乙酯相, 然后将水相用DCM:i-PrOH/3:1(5mL*3)进一步萃取, 并将合并的有机相真空浓缩, 得到PhBzL-56a(160mg, 137umol, 85.7%收率), 为黄色油状物。

[0533] PhBzL-56的制备

[0534] 在25℃和N₂下向PhBzL-56a(80.0mg, 68.6umol, 1.0当量)和(2,3,5,6-四氟-4-羟基-苯基)磺酰氧基钠(92.0mg, 343umol, 5.0当量)在DCM(1mL)和DMA(0.2mL)中的混合物中一次性添加EDCI(65.8mg, 343umol, 5.0当量), 将混合物在25℃下搅拌1小时。将反应混合物过滤, 并通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Synergi C18150*25*10um; 流动相:[水(0.1% TFA)-ACN]; B%:30%-60%, 8分钟)纯化滤液, 得到PhBzL-56(45.0mg, 25.2umol, 36.6%收率, 78.0%纯度), 为黄色油状物, 通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Synergi C18150*25*10um; 流动相:[水(0.1% TFA)-ACN]; B%:25%-50%, 8分钟)进一步纯化粗产物, 得到PhBzL-56(13.8mg, 9.37umol, 29.0%收率, 94.6%纯度), 为黄色油状物。¹H NMR(400MHz, MeOD) δ8.16-8.08 (m, 2H), 7.93 (d, J=7.6Hz, 1H), 7.89-7.80 (m, 3H), 7.79 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 4.69-4.66 (m, 1H), 3.99 (t, J=4.8Hz, 2H), 3.93-3.84 (m, 4H), 3.81-3.74 (m, 2H), 3.72-3.50 (m, 40H), 3.46 (s, 2H), 3.18 (d, J=6.4Hz, 2H), 2.99 (t, J=5.6Hz, 2H), 2.74-2.64 (m, 1H), 2.30 (t, J=6.0Hz, 2H), 2.24-2.15 (m, 2H), 1.94-1.84 (m, 2H), 1.79 (br dd, J=7.2, 14.4Hz, 2H), 1.71-1.62 (m, 1H), 1.59-1.49 (m, 1H), 1.02 (t, J=7.2Hz, 3H)。LC/MS[M+H] 1393.5(计算值); LC/MS[M+H] 1393.2(实测值)。

[0535] 实施例L-58 4-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2R]-1-[4-[2-氨基-4-[乙氧基(丙基)氨基甲酰基]-3H-1-苯并氮杂^草-8-基]苯甲酰基]吡咯烷-2-羰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酰氧

基]-2,3,5,6-四氟-苯磺酸, PhBzL-58的合成



[0540] (2R)-1-[4-[2-氨基-4-[乙氧基(丙基)氨基甲酰基]-3H-1-苯并氮杂^草-8-基]苯甲酰基]吡咯烷-2-甲酸酯, PhBz-16的制备

[0541] 将PhBz-16b(0.7g, 1.95mmol, 1当量)、2-氨基-8-溴-N-乙氧基-N-丙基-3H-1-苯并氮杂^草-4-甲酰胺(714mg, 1.95mmol, 1当量)、K₂CO₃(539mg, 3.90mmol, 2当量)、Pd(dppf)Cl₂(143mg, 195umol, 0.1当量)在二噁烷(20mL)和H₂O(2mL)中的混合物脱气,并用N₂吹扫3次,然后在90℃和N₂气氛下搅拌2小时。用EtOAc(30mL x 3)萃取反应混合物。将合并的有机层用盐水(20mL)洗涤,经Na₂SO₄干燥,过滤并在减压下浓缩,得到残留物。通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Synergi C18 150*25*10um;流动相:[水(0.1%TFA)-ACN];B%:25%-50%,8分钟)纯化残留物,得到PhBz-16(0.5g, 964umol, 49.48%收率),为白色固体。¹H NMR(MeOH, 400MHz) δ7.86-7.64(m, 7H), 7.45(s, 1H), 4.64(dd, J=5.2, 8.4Hz, 1H), 3.98(q, J=7.2Hz, 2H), 3.83-3.73(m, 5H), 3.72-3.58(m, 2H), 3.48(s, 2H), 2.50-2.33(m, 1H), 2.14-1.91(m, 3H), 1.78(t, J=7.2Hz, 2H), 1.21(t, J=7.2Hz, 3H), 1.01(t, J=7.6Hz, 3H)。LC/MS[M+H] 519.3(计算值);LC/MS[M+H] 519.2(实测值)。

[0542] (R)-1-(4-(2-氨基-4-(乙氧基(丙基)氨基甲酰基)-3H-苯并[b]氮杂^草-8-基)苯甲酰基)吡咯烷-2-甲酸, PhBzL-56a的制备

[0543] 向PhBz-16(0.5g, 964umol, 1当量)在MeOH(20mL)中的溶液中添加在H₂O(2mL)中的LiOH·H₂O(121mg, 2.89mmol, 3当量),然后在20℃下搅拌2小时。用HCl(4M)将反应混合物的pH调节至~5,然后过滤,得到PhBzL-56a(0.2g, 396umol, 41.11%收率),为棕色固体。

[0544] 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(2R)-1-[4-[2-氨基-4-[乙氧基(丙基)氨基甲酰基]-3H-1-苯并氮杂^草-8-基]苯甲酰基]吡咯烷-2-羰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸叔丁酯, PhBzL-58b的制备

[0545] 向PhBzL-58a(0.2g, 396umol, 1当量)和3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸叔丁酯(279mg, 476umol, 1.2当量)在DMF(2mL)中的溶液中添加DIEA(256mg, 1.98mmol, 3.45uL, 5当量)和HATU(166mg, 436umol, 1.1当量),然后在20℃下搅拌2小时。将反应混合物过滤,并通过制备型HPLC纯化(柱:Phenomenex Synergi C18 150*25*10um;流动相:[水(0.1%TFA)-ACN];B%:20%-50%,8分钟),得到PhBzL-58b(0.15g, 139.89umol, 35.29%收率),为黄色油状物。

[0546] 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(2R)-1-[4-[2-氨基-4-[乙氧基(丙基)氨基甲酰基]-3H-1-苯并氮杂^草-8-基]苯甲酰基]吡咯烷-2-羰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸, PhBzL-58c的制备

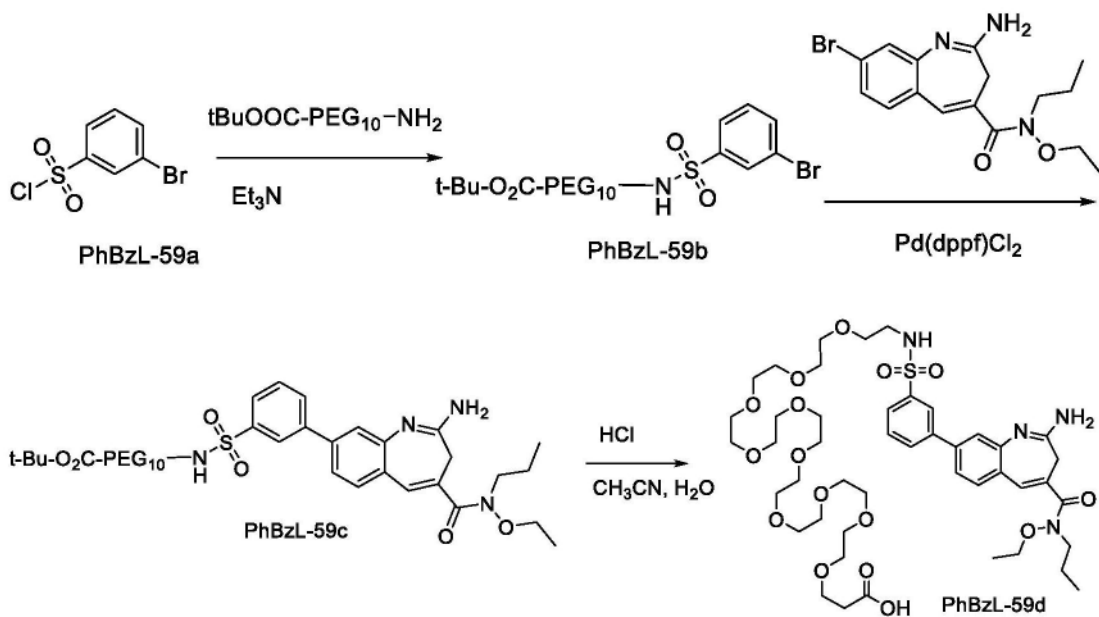
[0547] 向PhBzL-58b(0.15g, 140umol, 1当量)在MeCN(2mL)和H₂O(1mL)中的溶液中添加HCl(12M, 233uL, 20当量),然后在80℃下搅拌1小时。将反应混合物在减压下浓缩,得到PhBzL-56c(0.11g, 108umol, 77.38%收率),为黄色油状物。

[0548] PhBzL-58的制备

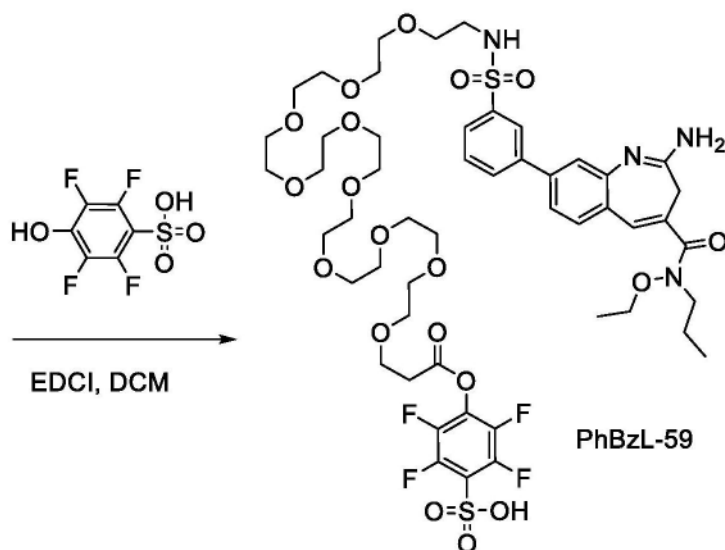
[0549] 向PhBzL-58c(0.11g, 108umol, 1当量)和(2,3,5,6-四氟-4-羟基-苯基)磺酰氧基钠(116mg, 433umol, 4当量)在DCM(2mL)和DMA(0.1mL)中的溶液中添加EDCI(83.0mg,

433 μ mol, 4当量), 然后在20 $^{\circ}$ C下搅拌1小时。将反应混合物过滤并真空浓缩, 得到残留物。通过制备型HPLC(柱: Phenomenex Synergi C18 150*25*10 μ m; 流动相: [水(0.1% TFA) - ACN]; B%: 15% - 40%, 8分钟)纯化残留物, 得到PhBzL-58(53.8mg, 43.24 μ mol, 39.94%收率), 为黄色油状物。 1 H NMR(MeOH, 400MHz) δ 7.85-7.64(m, 6H), 7.56(br d, J=8.0Hz, 1H), 7.45(s, 1H), 4.62-4.39(m, 1H), 3.98(q, J=7.2Hz, 2H), 3.86(t, J=5.6Hz, 2H), 3.82-3.70(m, 4H), 3.69-3.49(m, 36H), 3.49-3.35(m, 5H), 3.24-3.05(m, 1H), 2.96(t, J=6.0Hz, 2H), 2.49-2.26(m, 1H), 2.12-1.87(m, 3H), 1.84-1.71(m, 2H), 1.28-1.15(m, 3H), 1.01(t, J=7.6Hz, 3H)。LC/MS[M+H]⁺1244.5(计算值); LC/MS[M+H]⁺1244.4(实测值)。

[0550] 实施例L-59 4-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-[2-氨基-4-[乙氧基(丙基)氨基甲酰基]-3H-1-苯并氮杂~~草~~-8-基]苯基]磺酰基氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酰氧基]-2,3,5,6-四氟-苯磺酸, PhBzL-59的合成



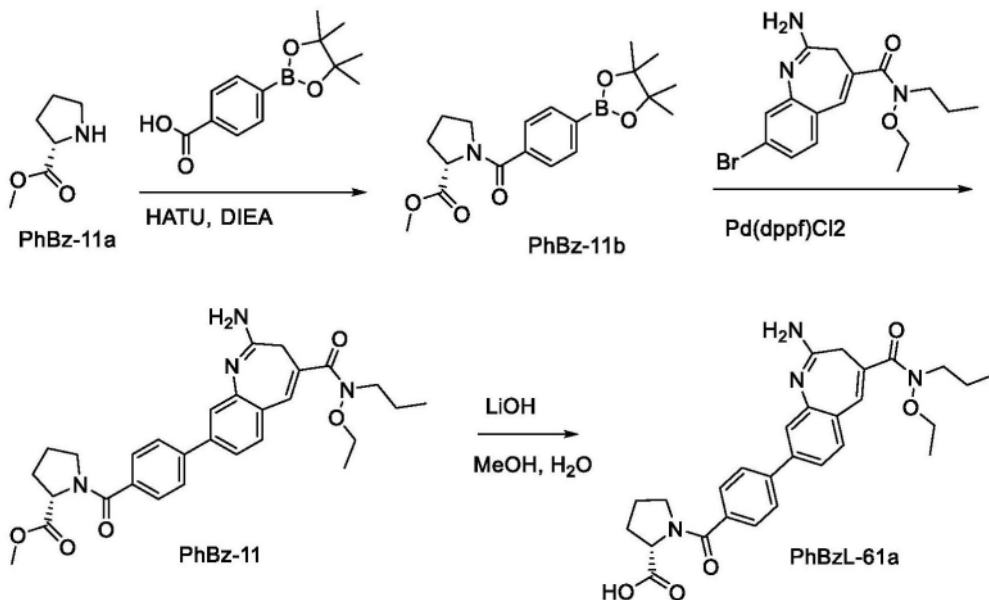
[0551]



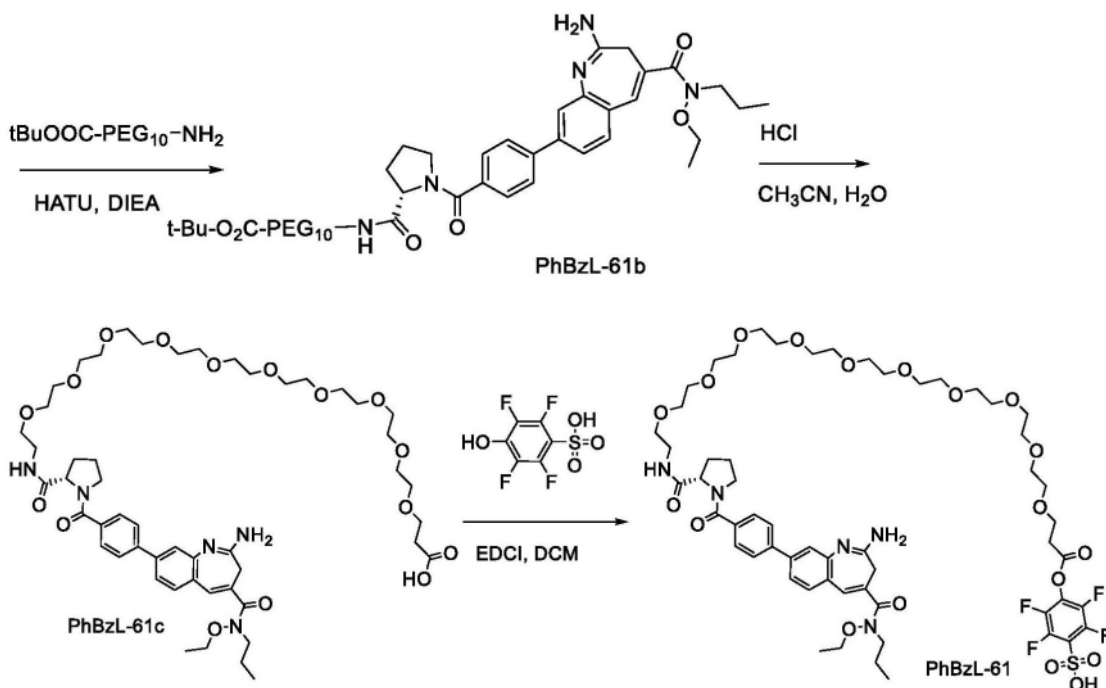
[0552] 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(3-溴苯基)磺酰基氨基]乙氧基]乙氧基]

(t, J=7.2Hz, 3H), 1.03 (t, J=7.6Hz, 3H)。LC/MS [M+H] 1183.4 (计算值); LC/MS [M+H] 1183.6 (实测值)。

[0560] 实施例L-61 4-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(2S)-1-[4-[2-氨基-4-[乙氧基(丙基)氨基甲酰基]-3H-1-苯并氮杂^草-8-基]苯甲酰基]吡咯烷-2-羰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酰氧基]-2,3,5,6-四氟-苯磺酸, PhBzL-61的合成



[0561]



[0562] (2S)-1-[4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯甲酰基]吡咯烷-2-甲酸甲酯, PhBz-11b的制备

[0563] 在25℃和N₂下向4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯甲酸(500mg, 2.02mmol, 1.0当量)和(S)-吡咯烷-2-甲酸甲酯, PhBz-11a(367mg, 2.22mmol, 1.1当

量, HCl) 在 DMF (3mL) 中的混合物中一次性添加 DIEA (1.04g, 8.06mmol, 1.40mL, 4.0 当量) 和 HATU (766mg, 2.02mmol, 1.0 当量), 将混合物在 25℃ 下搅拌 1.5 小时。添加水 (10mL), 并将水相用乙酸乙酯 (10mL*3) 萃取, 将合并的有机相用盐水 (10mL*2) 洗涤, 用无水 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并真空浓缩, 得到 PhBz-11b (700mg, 粗), 为无色油状物。

[0564] 1-[4-[2-氨基-4-[乙氧基(丙基)氨基甲酰基]-3H-1-苯并氮杂^草-8-基]苯甲酰基]吡咯烷-2-甲酸甲酯, PhBz-11 的制备

[0565] 将在二噁烷 (8mL) 和 H₂O (2mL) 中的中间体 PhBz-11b (650mg, 1.81mmol, 1.0 当量)、2-氨基-8-溴-N-乙氧基-N-丙基-3H-1-苯并氮杂^草-4-甲酰胺 (663mg, 1.81mmol, 1.0 当量)、Pd(dppf)Cl₂ (132mg, 181umol, 0.1 当量) 和 K₂CO₃ (500mg, 3.62mmol, 2.0 当量) 脱气, 然后在 N₂ 下加热到 95℃ 持续 2 小时。真空移除二噁烷, 然后添加水 (10mL), 并将水相用乙酸乙酯 (10mL*3) 萃取, 将合并的有机相用盐水 (10mL) 洗涤, 用无水 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并真空浓缩。通过硅胶色谱法 (柱高: 250mm, 直径: 100mm, 100-200 目硅胶, 石油醚/乙酸乙酯 = 10/1, 0/1) 纯化残留物, 得到 PhBz-11 (700mg, 1.35mmol, 74.6% 收率), 为黄色固体。

[0566] 1-[4-[2-氨基-4-[乙氧基(丙基)氨基甲酰基]-3H-1-苯并氮杂^草-8-基]苯甲酰基]吡咯烷-2-甲酸, PhBzL-61a 的制备

[0567] 在 25℃ 和 N₂ 下向 PhBz-11 (300mg, 578umol, 1.0 当量) 在 MeOH (5mL) 和 H₂O (5mL) 中的溶液中一次性添加 LiOH·H₂O (97.1mg, 2.31mmol, 4.0 当量), 然后在 25℃ 下搅拌 10 小时。用 HCl (4M) 淬灭反应混合物, 直到 pH = 7, 并真空移除 MeOH (5mL), 然后将水相用 DCM/iPr-OH = 3/1 (5mL*3) 萃取, 将合并的有机相用无水 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并真空浓缩, 得到 PhBzL-61a (280mg, 555umol, 95.9% 收率), 为棕色油状物。

[0568] 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2S)-1-[4-[2-氨基-4-[乙氧基(丙基)氨基甲酰基]-3H-1-苯并氮杂^草-8-基]苯甲酰基]吡咯烷-2-羰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸叔丁酯, PhBzL-61b 的制备

[0569] 在 0℃ 和 N₂ 下向 PhBzL-61a (200mg, 396umol, 1.0 当量)、3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2S)-1-[4-[2-氨基-4-[乙氧基(丙基)氨基甲酰基]-3H-1-苯并氮杂^草-8-基]苯甲酰基]吡咯烷-2-羰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸叔丁酯 (348mg, 594umol, 1.5 当量) 和 DIEA (102mg, 793umol, 138uL, 2 当量) 在 DMF (3mL) 中的混合物中一次性添加 HATU (151mg, 396umol, 1.0 当量), 并将其在 0℃ 下搅拌 30 分钟, 然后加热到 25℃, 并再搅拌 0.5 小时。将反应混合物过滤, 并通过制备型 HPLC (柱: Phenomenex Synergi C18 150*25*10um; 流动相: [水 (0.1% TFA) - ACN]; B%: 5% - 55%, 8 分钟) 纯化滤液, 得到 PhBzL-61b (250mg, 233umol, 58.8% 收率), 为黄色油状物。

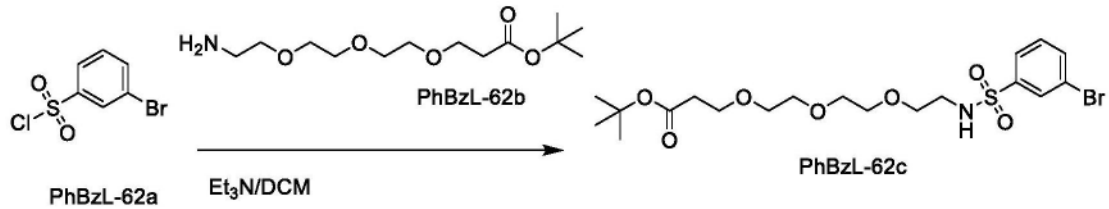
[0570] 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2S)-1-[4-[2-氨基-4-[乙氧基(丙基)氨基甲酰基]-3H-1-苯并氮杂^草-8-基]苯甲酰基]吡咯烷-2-羰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸, PhBzL-61c 的制备

[0571] 在 25℃ 和 N₂ 下向 PhBzL-61b (120mg, 112umol, 1.0 当量) 在 MeCN (1mL) 和 H₂O (2mL) 中的溶液中一次性添加 HCl (12M, 280uL, 30 当量), 然后在 80℃ 下搅拌 1 小时。将反应混合物真空浓缩, 得到 PhBzL-61c (110mg, 108umol, 96.7% 收率), 为黄色油状物。

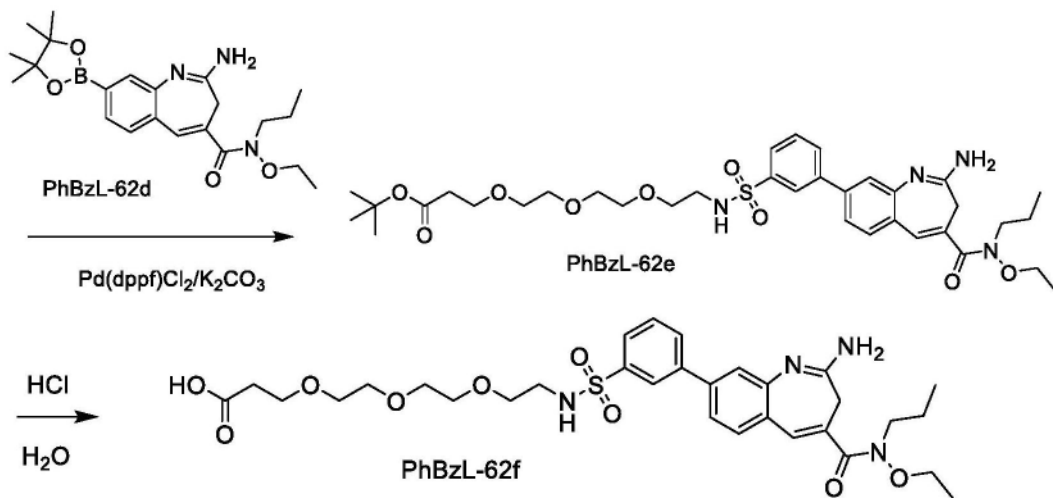
[0572] PhBzL-61 的制备

[0573] 在25℃和N₂下向PhBzL-61c (110mg, 108μmol, 1.0当量) 和(2,3,5,6-四氟-4-羟基-苯基)磺酰氨基钠(145mg, 541μmol, 5.0当量)在DCM(2mL)和DMA(0.3mL)中的混合物中一次性添加EDCI(103mg, 541μmol, 5.0当量), 并将其在25℃下搅拌1小时。将反应混合物过滤, 并通过制备型HPLC(柱: Phenomenex Synergi C18 150*25*10μm; 流动相: [水(0.1% TFA) - ACN]; B%: 20% - 45%, 8分钟)纯化滤液, 得到PhBzL-61 (26.3mg, 20.1μmol, 18.5%收率, 94.9%纯度), 为亚麻色固体。¹H NMR(400MHz, MeOD) δ7.86-7.74(m, 5H), 7.71-7.66(m, 1H), 7.58(d, J=8.4Hz, 1H), 7.47(s, 1H), 4.63-4.42(m, 1H), 4.00(q, J=7.2Hz, 2H), 3.88(t, J=6.0Hz, 2H), 3.78(t, J=7.2Hz, 4H), 3.71-3.55(m, 38H), 3.49-3.40(m, 5H), 2.99(t, J=6.0Hz, 2H), 2.43-2.31(m, 1H), 2.11-1.99(m, 2H), 1.97-1.87(m, 1H), 1.80(d, J=7.2Hz, 2H), 1.23(t, J=7.2Hz, 3H), 1.03(t, J=7.2Hz, 3H)。LC/MS[M+H]⁺ 1144.5(计算值); LC/MS[M+H]⁺ 1144.3(实测值)。

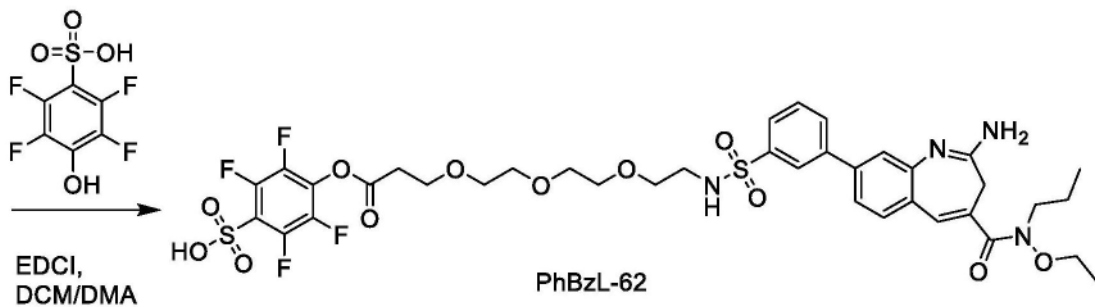
[0574] 实施例L-62 4-((3-(2-(2-(2-((3-(2-氨基-4-(乙氧基(丙基)氨基甲酰基)-3H-苯并[b]氮杂萘-8-基)苯基)磺酰氨基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)丙酰基)氧基)-2,3,5,6-四氟苯磺酸, PhBzL-62的合成



[0575]



[0576]



[0577] 3-[2-[2-[2-[(3-溴苯基)磺酰基氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸叔丁酯,

PhBzL-62c的制备

[0578] 在0℃下向3-[2-[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]乙氧基]丙酸叔丁酯,PhBzL-62b (0.47g,1.69mmol,1当量)在DCM(5mL)中的混合物中添加Et₃N(514mg,5.08mmol,708uL,3当量)和3-溴苯磺酰氯,PhBzL-62a(433mg,1.69mmol,245uL,1当量),然后在20℃下搅拌3小时。用水(5ml)洗涤混合物,然后将有机相经Na₂SO₄干燥,浓缩,得到PhBzL-62c(0.8g,1.61mmol,95.1%收率),为无色油状物。¹H NMR(400MHz,MeOD) δ8.10(d,J=1.6Hz,1H),7.96-7.83(m,2H),7.59(t,J=7.8Hz,1H),3.79(t,J=6.4Hz,2H),3.72-3.64(m,6H),3.60-3.52(m,4H),3.18-3.14(m,2H),2.57(t,J=6.4Hz,2H),1.54(s,9H)。

[0579] 3-[2-[2-[2-[[3-[2-氨基-4-[乙氧基(丙基)氨基甲酰基]-3H-1-苯并氮杂^草-8-基]苯基]磺酰基氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸叔丁酯,PhBzL-62e的制备

[0580] 向PhBzL-62c(300mg,605umol,1当量)和2-氨基-N-乙氧基-N-丙基-8-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-3H-1-苯并氮杂^草-4-甲酰胺,PhBzL-62d(250mg,605umol,1当量)在二噁烷(10mL)和H₂O(1mL)中的混合物中添加Pd(dppf)Cl₂(22.1mg,30.2umol,0.05当量)和K₂CO₃(209mg,1.51mmol,2.5当量),然后在100℃和N₂下搅拌1小时。将混合物通过硅藻土过滤并浓缩,得到残留物。用EtOAc(20mL)和水(10ml)稀释残留物。将有机层分离,并经Na₂SO₄干燥,浓缩,得到残留物。通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Synergi C18 150*25*10um;流动相:[水(0.1%TFA)-ACN];B%:30%-55%,8分钟)纯化残留物,得到PhBzL-62e(0.2g,285umol,47.0%收率),为无色油状物。LC/MS[M+H]703.3(计算值);LC/MS[M+H]703.2(实测值)。

[0581] 3-[2-[2-[2-[[3-[2-氨基-4-[乙氧基(丙基)氨基甲酰基]-3H-1-苯并氮杂^草-8-基]苯基]磺酰基氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸,PhBzL-62f的制备

[0582] 向PhBzL-62e(240mg,341umol,1当量)在水(10mL)中的混合物中添加HCl(12M,569uL,20当量),然后在80℃下搅拌0.5小时。将混合物浓缩,得到PhBzL-62f(0.2g,309umol,90.6%收率),为黄色油状物。LC/MS[M+H]647.3(计算值);LC/MS[M+H]647.3(实测值)。

[0583] PhBzL-62的制备

[0584] 向PhBzL-62f(0.2g,309umol,1当量)和2,3,5,6-四氟-4-羟基-苯磺酸钠(415mg,1.55mmol,5当量)在DMA(0.3mL)和DCM(3mL)中的混合物中添加1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐,EDCI,CAS登记号1892-57-5(296mg,1.55mmol,5当量),然后在20℃下搅拌0.5小时。将混合物浓缩,得到残留物。通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Synergi C18 150*25*10um;流动相:[水(0.1%TFA)-ACN];B%:15%-45%,8分钟)纯化残留物,得到PhBzL-62(80.7mg,87.4umol,28.3%收率,94.70%纯度),为白色固体。¹H NMR(400MHz,MeOD) δ8.18(d,J=1.6Hz,1H),8.02-7.83(m,2H),7.81-7.63(m,4H),7.46(s,1H),4.00(q,J=7.2Hz,2H),3.90-3.71(m,4H),3.69-3.42(m,12H),3.16-3.10(m,2H),2.96(t,J=5.6Hz,2H),1.88-1.69(m,2H),1.23(t,J=7.2Hz,3H),1.03(t,J=7.2Hz,3H)。LC/MS[M+H]875.2(计算值);LC/MS[M+H]875.3(实测值)。

[0585] 实施例201免疫缀合物(IC)的制备

[0586] 为了制备赖氨酸缀合的免疫缀合物,使用G-25SEPHADEX™脱盐柱(Sigma-Aldrich,

St.Louis,MO)或Zeba™旋转脱盐柱(Thermo Fisher Scientific),将抗体以缓冲液交换到含有100mM硼酸、50mM氯化钠、1mM乙二胺四乙酸的pH 8.3的缀合缓冲液中。然后使用缓冲液将洗脱液各自调节至约1-10mg/ml的浓度,然后无菌过滤。将抗体预温热至20-30℃,并与溶解在二甲亚砜(DMSO)或二甲基乙酰胺(DMA)中的2-20(例如,7-10)摩尔当量的四氟苯基(TFP)或磺酸四氟苯基(磺基TFP)酯、式II的8-苯基-2-氨基苯并氮杂~~草~~-接头(PhBzL)化合物快速混合到5至20mM的浓度。允许反应在30℃下进行约16小时,并通过在pH 7.2的磷酸盐缓冲液(PBS)中平衡的两个连续的G-25脱盐柱或Zeba™旋转脱盐柱上运行将免疫缀合物(IC)从反应物中分离出来,得到表3a和3b的免疫缀合物(IC)。使用与XEVO™ G2-XS TOF质谱仪(Waters Corporation)连接的H级ACQUITY™ UPLC(Waters Corporation,Milford,MA)上的C4反相柱,通过液相色谱质谱分析确定佐剂-抗体比率(DAR)。

[0587] 为了制备半胱氨酸缀合的免疫缀合物,使用Zeba™旋转脱盐柱(Thermo Fisher Scientific)将抗体以缓冲液交换到含有PBS(pH 7.2)与2mM EDTA的缀合缓冲液中。使用2-4摩尔过量的三(2-羧乙基)膦(TCEP)或二硫苏糖醇(DTT)在37℃下还原链间二硫化物30分钟-2小时。使用用缀合缓冲液预平衡的Zeba™旋转脱盐柱移除过量的TCEP或DTT。使用缀合缓冲液将缓冲液交换的抗体的浓度调节至大约5至20mg/ml,并进行无菌过滤。将马来酰亚胺-PhBzL化合物溶解在二甲亚砜(DMSO)或二甲基乙酰胺(DMA)中至浓度为5至20mM。为了缀合,使抗体与10至20摩尔当量的马来酰亚胺-PhBzL混合。在一些情形下,添加多达20%(v/v)的另外的DMA或DMSO以提高马来酰亚胺-PhBzL在缀合缓冲液中的溶解度。使反应在20℃下进行大约30分钟至4小时。使用两个连续的Zeba™旋转脱盐柱使所得缀合物脱离未反应的马来酰亚胺-PhBzL纯化。所述柱用pH 7.2的磷酸盐缓冲液(PBS)预平衡。使用与XEVO™ G2-XS TOF质谱仪(Waters Corporation)连接的H级ACQUITY™ UPLC(Waters Corporation,Milford,MA)上的C4反相柱,通过液相色谱质谱分析来估计佐剂与抗体比率(DAR)。

[0588] 为了缀合,可以将抗体溶解在本领域中已知将不会对抗体的稳定性或抗原结合特异性产生不利影响的水性缓冲系统中。可以使用磷酸盐缓冲液。将PhBzL化合物溶解在包含至少一种如本文别处所述的极性非质子溶剂的溶剂系统中。在一些这样的方面中,将PhBzL在pH 8的Tris缓冲液(例如,50mM Tris)中溶解至浓度为约5mM、约10mM、约20mM、约30mM、约40mM或约50mM及其范围,如约5mM至约50mM或约10mM至约30mM。在一些方面,将PhBzL溶解在DMSO(二甲亚砜)、DMA(二甲基乙酰胺)、乙腈或另一种合适的偶极非质子溶剂中。

[0589] 或者在缀合反应中,可以稀释等量过量的PhBzL溶液,并与抗体溶液合并。PhBzL溶液可以合适地用至少一种极性非质子溶剂和至少一种极性质子溶剂稀释,其实例包括水、甲醇、乙醇、正丙醇和乙酸。8-Het-2-氨基苯并氮杂~~草~~-接头中间体与抗体的摩尔当量可以为约1.5:1、约3:1、约5:1、约10:1、约15:1或约20:1及其范围,如约1.5:1至约20:1、约1.5:1至约15:1、约1.5:1至约10:1、约3:1至约15:1、约3:1至约10:1、约5:1至约15:1或约5:1至约10:1。可以通过本领域中已知的方法如LC-MS合适地监测反应的完成。缀合反应通常在约1小时至约16小时的范围内完成。反应完成后,可以向反应混合物中添加试剂以淬灭反应。如果抗体硫醇基团与硫醇反应性基团(如8PhBzL的马来酰亚胺)反应,则未反应的抗体硫醇基

团可与封端试剂反应。合适的封端试剂的一个实例是乙基马来酰亚胺。

[0590] 在缀合之后,可以通过本领域中已知的纯化方法将免疫缀合物纯化并与未缀合的反应物和/或缀合物聚集体分离,所述纯化方法例如但不限于尺寸排阻色谱法、疏水相互作用色谱法、离子交换色谱法、色谱聚焦、超滤、离心超滤、切向流过滤及其组合。例如,纯化之前可以稀释免疫缀合物,如在pH 5的20mM琥珀酸钠中稀释。将经稀释的溶液施加到阳离子交换柱上,接着用例如至少10个柱体积的pH5的20mM琥珀酸钠洗涤。可以合适地用缓冲液如PBS洗脱缀合物。

[0591] 实施例202HEK报告子测定

[0592] 表达人TLR7或人TLR8的HEK293报告细胞购自Invivogen,并遵循供应商方案进行细胞繁殖和实验。简言之,使细胞在补充有10%FBS、吉欧霉素和杀稻瘟菌素的DMEM中在5%CO₂条件下生长至80-85%汇合度。然后将细胞以4x10⁴个细胞/孔接种在96孔平板中,底物含有HEK检测培养基和免疫刺激分子。使用读板器在620-655nm波长下测量活性。

[0593] 实施例203体外免疫缀合物活性的评估

[0594] 本实施例显示本发明的免疫缀合物有效引发免疫激活,因此用于治疗癌症。

[0595] a) 人抗原呈递细胞的分离:使用含有针对CD14、CD16、CD40、CD86、CD123和HLA-DR的单克隆抗体的ROSETTESEP™人单核细胞富集混合物(Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada),通过密度梯度离心从获自健康献血者的人外周血(Stanford Blood Center, Palo Alto, California)中负向选择髓样抗原呈递细胞(APC)。随后使用EASYSEP™人单核细胞富集试剂盒(Stem Cell Technologies)经由负向选择将不成熟的APC纯化至>90%纯度,所述试剂盒不含CD16耗竭,含有针对CD14、CD16、CD40、CD86、CD123和HLA-DR的单克隆抗体。

[0596] b) 髓样APC激活测定:在96孔板(Corning, Corning, NY)中温育2x10⁵个APC,所述96孔板含有iscove改良杜氏培养基IMDM(Lonza),其补充有10% FBS、100U/mL青霉素、100μg/mL(微克/毫升)链霉素、2mM L-谷氨酰胺、丙酮酸钠、非必需氨基酸以及(在指出的情况下)各种浓度的未缀合(裸)抗体和本发明的免疫缀合物(如根据上述实施例制备)。18小时后经由ELISA分析无细胞上清液,以测量作为促炎反应的读数的TNFα分泌。

[0597] c) PBMC激活测定:通过密度梯度离心从获自健康献血者的人外周血(Stanford Blood Center, Palo Alto, California)中分离人外周血单核细胞。在96孔板(Corning, Corning, NY)中将PBMC在以10:1效应细胞与靶细胞比率与表达CEA的肿瘤细胞(例如MKN-45、HPAF-II)的共培养物中温育。用各种浓度的未缀合(裸)抗体和本发明的免疫缀合物(如根据上述实施例制备)刺激细胞。使用LegendPlex™试剂盒,根据制造商指南(BioLegend®, San Diego, CA)通过细胞因子珠粒阵列分析无细胞上清液。

[0598] d) 人常规树突细胞的分离:通过密度梯度离心从获自健康献血者的人外周血(Stanford Blood Center, Palo Alto, California)中负向选择人常规树突细胞(cDC)。简言之,首先通过使用ROSETTESEP™人CD3耗竭混合物(Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada)从细胞制剂中移除T细胞来富集细胞。然后使用EASYSEP™人髓样DC富集试剂盒(Stem Cell Technologies)经由负向选择进一步富集cDC。

[0599] e) cDC激活测定:将8x10⁴个APC与表达ISAC靶抗原的肿瘤细胞以10:1的效应子(cDC)与靶标(肿瘤细胞)比率共培养。将细胞在含有RPMI-1640培养基的96孔板(Corning,

Corning, NY) 中温育, 所述培养基补充有10%FBS和(在指出的情况下) 各种浓度的本发明指示的免疫缀合物(如根据上述实施例制备)。过夜温育约18小时之后, 收集无细胞上清液, 并使用BioLegend LEGENDPLEX细胞因子珠粒阵列分析细胞因子分泌(包括TNF α)。

[0600] 除了所描述的利用不同的髓样群体的测定之外, 还可以采用各种筛选测定法来测量髓样细胞类型的激活。这些可包括以下: 分离自健康供体血液的单核细胞、M-CSF分化的巨噬细胞、GM-CSF分化的巨噬细胞、GM-CSF+IL-4单核细胞源性树突细胞、分离自健康供体血液的常规树突细胞(cDC) 和极化至免疫抑制状态的髓样细胞(也称为髓样源性抑制细胞或MDSC)。MDSC极化细胞的实例包括向免疫抑制状态分化的单核细胞, 如M2a M Φ (IL4/IL13)、M2c M Φ (IL10/TGF β)、GM-CSF/IL6 MDSC和肿瘤培养的单核细胞(TEM)。可以使用肿瘤条件培养基(例如786.0、MDA-MB-231、HCC1954) 进行TEM分化。原发性肿瘤相关髓样细胞还可以包括存在于解离的肿瘤细胞悬浮液中的原发性细胞(Discovery Life Sciences)。

[0601] 对所述髓样细胞群体的激活的评估可以作为单一培养物或作为与表达所关注的抗原的细胞的共培养物进行, 免疫缀合物可经由抗体的CDR区与所关注的抗原结合。温育18-48小时之后, 可通过采用流式细胞术上调细胞表面共刺激分子或通过测量分泌的促炎细胞因子来评估激活。对于细胞因子测量, 收获无细胞上清液, 并采用流式细胞术通过细胞因子珠粒阵列(例如来自Biolegend的LegendPlex) 进行分析。

[0602] 本文引用的所有参考文献(包括出版物、专利申请和专利) 以引用的方式特此并入, 其程度如同指示每个参考文献单独且具体地以引用的方式并入, 并且在本文中全文阐述。