



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112469441 A

(43) 申请公布日 2021.03.09

(21) 申请号 201980050932.8

(22) 申请日 2019.05.24

(30) 优先权数据

62/678356 2018.05.31 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.01.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2019/054344 2019.05.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/229613 EN 2019.12.05

(71) 申请人 葛兰素史克知识产权开发有限公司

地址 英国米德尔塞克斯郡

(72) 发明人 A·M·费多里 S·科伦丘克

H·穆罕默德 C·S·谢克

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 任晓华 彭昶

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/415 (2006.01)

A61K 31/4155 (2006.01)

A61K 31/472 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 47/68 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书7页 说明书51页

序列表7页 附图16页

(54) 发明名称

用ICOS结合蛋白和精氨酸甲基转移酶抑制剂的组合疗法

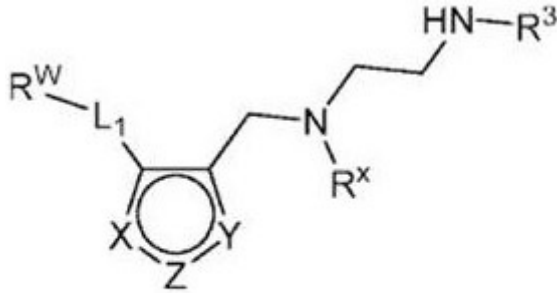
(57) 摘要

本公开提供了治疗有此需要的人中的癌症的方法,该方法包括向人施用治疗有效量的I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂,并且向人施用治疗有效量的ICOS(CD278,诱导型T细胞共刺激物)结合蛋白或其抗原结合片段。

1. 一种治疗有此需要的人中的癌症的方法,所述方法包括向所述人施用治疗有效量的I型蛋白质精氨酸甲基转移酶 (I型PRMT) 抑制剂,并且向所述人施用治疗有效量的ICOS结合蛋白或其抗原结合部分。

2. 权利要求1的方法,其中所述I型PRMT抑制剂是蛋白质精氨酸甲基转移酶1 (PRMT1) 抑制剂、蛋白质精氨酸甲基转移酶3 (PRMT3) 抑制剂、蛋白质精氨酸甲基转移酶4 (PRMT4) 抑制剂、蛋白质精氨酸甲基转移酶6 (PRMT6) 抑制剂、或蛋白质精氨酸甲基转移酶8 (PRMT8) 抑制剂。

3. 权利要求1或2的方法,其中所述I型PRMT抑制剂是式(I)的化合物:



I

或其药学上可接受的盐,

其中

X是N,Z是NR⁴,且Y是CR⁵;或

X是NR⁴,Z是N,且Y是CR⁵;或

X是CR⁵,Z是NR⁴,且Y是N;或

X是CR⁵,Z是N,且Y是NR⁴;

R^x是任选取代的C₁₋₄烷基或任选取代的C₃₋₄环烷基;

L₁是键、-O-、-N(R^B)-、-S-、-C(O)-、-C(O)O-、-C(O)S-、-C(O)N(R^B)-、-C(O)N(R^B)N(R^B)-、-OC(O)-、-OC(O)N(R^B)-、-NR^BC(O)-、-NR^BC(O)N(R^B)-、-NR^BC(O)N(R^B)N(R^B)-、-NR^BC(O)O-、-SC(O)-、-C(=NR^B)-、-C(=NNR^B)-、-C(=NOR^A)-、-C(=NR^B)N(R^B)-、-NR^BC(=NR^B)-、-C(S)-、-C(S)N(R^B)-、-NR^BC(S)-、-S(O)-、-OS(O)₂-、-S(O)₂O-、-SO₂-、-N(R^B)SO₂-、-SO₂N(R^B)-、或者任选取代的C₁₋₆饱和或不饱和烃链,其中所述烃链的一个或多个亚甲基单元任选地且独立地由以下替换:-O-、-N(R^B)-、-S-、-C(O)-、-C(O)O-、-C(O)S-、-C(O)N(R^B)-、-C(O)N(R^B)N(R^B)-、-OC(O)-、-OC(O)N(R^B)-、-NR^BC(O)-、-NR^BC(O)N(R^B)-、-NR^BC(O)N(R^B)N(R^B)-、-NR^BC(O)O-、-SC(O)-、-C(=NR^B)-、-C(=NNR^B)-、-C(=NOR^A)-、-C(=NR^B)N(R^B)-、-NR^BC(=NR^B)-、-C(S)-、-C(S)N(R^B)-、-NR^BC(S)-、-S(O)-、-OS(O)₂-、-S(O)₂O-、-SO₂-、-N(R^B)SO₂-或-SO₂N(R^B)-;

每个R^A独立地选自氢、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的碳环基、任选取代的杂环基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、当附着至氧原子时的氧保护基团、以及当附着至硫原子时的硫保护基团;

每个R^B独立地选自氢、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的碳环基、任选取代的杂环基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基和氮保护基团,或者同一氮原子上的R^B和R^W可以连同间插氮一起形成任选取代的杂环;

R^W 是氢、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的碳环基、任选取代的杂环基、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基；条件是当 L_1 是键时， R^W 不是氢、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基；

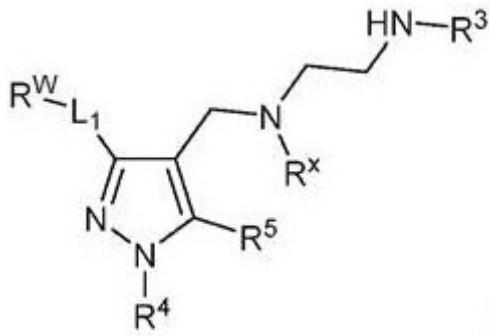
R^3 是氢、 C_{1-4} 烷基或 C_{3-4} 环烷基；

R^4 是氢、任选取代的 C_{1-6} 烷基、任选取代的 C_{2-6} 烯基、任选取代的 C_{2-6} 炔基、任选取代的 C_{3-7} 环烷基、任选取代的4至7元杂环基；或任选取代的 C_{1-4} 烷基-Cy；

Cy是任选取代的 C_{3-7} 环烷基、任选取代的4至7元杂环基、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基；和

R^5 是氢、卤素、-CN、任选取代的 C_{1-4} 烷基或任选取代的 C_{3-4} 环烷基。

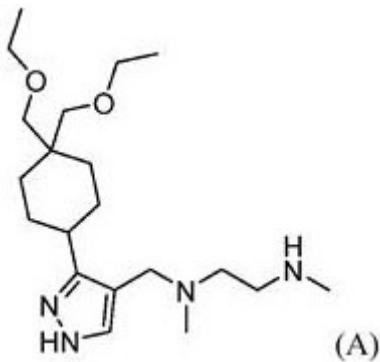
4. 权利要求1-3中任一项的方法，其中所述I型PRMT抑制剂是式(II)的化合物：



或其药学上可接受的盐。

5. 权利要求3或4的方法，其中所述I型PRMT抑制剂是式(I)或(II)的化合物，其中 $-L_1-R^W$ 是任选取代的碳环基。

6. 权利要求1-5中任一项的方法，其中所述I型PRMT抑制剂是化合物A：



或其药学上可接受的盐。

7. 权利要求1-6中任一项的方法，其中所述ICOS结合蛋白是抗ICOS抗体或其抗原结合片段。

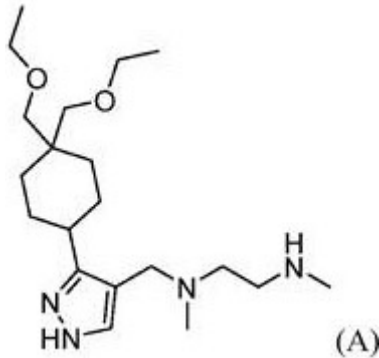
8. 权利要求1-7中任一项的方法，其中所述ICOS结合蛋白是ICOS激动剂。

9. 权利要求1-8中任一项的方法，其中所述ICOS结合蛋白或其抗原结合部分包含以下中的一种或多种：如SEQ ID NO:1中所示的CDRH1；如SEQ ID NO:2中所示的CDRH2；如SEQ ID NO:3中所示的CDRH3；如SEQ ID NO:4中所示的CDRL1；如SEQ ID NO:5中所示的CDRL2，和/或如SEQ ID NO:6中所示的CDRL3或每个CDR的直接等同物，其中直接等同物具有在所述CDR中的不多于两个氨基酸取代。

10. 权利要求1-9中任一项的方法，其中所述ICOS结合蛋白或其抗原结合部分包含 V_H 结

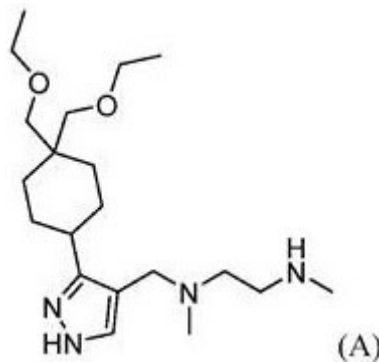
构域和/或 V_L 结构域,所述 V_H 结构域包含与SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,所述 V_L 结构域包含与SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,其中所述ICOS结合蛋白与人ICOS特异性结合。

11. 一种治疗有此需要的人中的癌症的方法,所述方法包括向所述人施用治疗有效量的I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂,并且向所述人施用治疗有效量的ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述I型PRMT抑制剂是化合物A:



或其药学上可接受的盐,并且所述ICOS结合蛋白或其抗原结合片段包含以下中的一种或多种:如SEQ ID NO:1中所示的CDRH1;如SEQ ID NO:2中所示的CDRH2;如SEQ ID NO:3中所示的CDRH3;如SEQ ID NO:4中所示的CDRL1;如SEQ ID NO:5中所示的CDRL2,和/或如SEQ ID NO:6中所示的CDRL3或每个CDR的直接等同物,其中直接等同物具有在所述CDR中的不多于两个氨基酸取代。

12. 一种治疗有此需要的人中的癌症的方法,所述方法包括向所述人施用治疗有效量的I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂,并且向所述人施用治疗有效量的ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述I型PRMT抑制剂是化合物A:



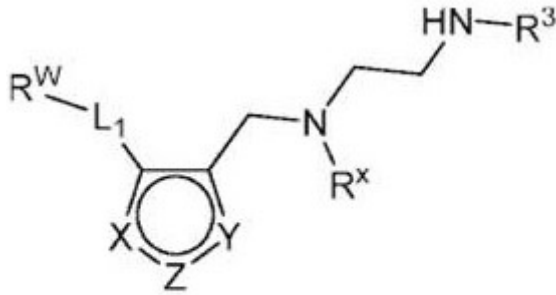
或其药学上可接受的盐,并且所述ICOS结合蛋白或其抗原结合部分包含 V_H 结构域和/或 V_L 结构域,所述 V_H 结构域包含与SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,所述 V_L 结构域包含与SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,其中所述ICOS结合蛋白与人ICOS特异性结合。

13. 一种I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,其用于治疗有此需要的人中的癌症。

14. 权利要求14的I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述I型PRMT抑制剂是蛋白质精氨酸甲基转移酶1 (PRMT1)抑制剂、蛋白质精氨酸甲基转移酶3 (PRMT3)抑制剂、蛋白质精氨酸甲基转移酶4 (PRMT4)抑制剂、蛋

白质精氨酸甲基转移酶6 (PRMT6) 抑制剂、或蛋白质精氨酸甲基转移酶8 (PRMT8) 抑制剂。

15. 根据权利要求13或14的I型蛋白质精氨酸甲基转移酶 (I型PRMT) 抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段, 其中所述I型PRMT抑制剂是式 (I) 的化合物:



I

或其药学上可接受的盐,

其中

X是N, Z是NR⁴, 且Y是CR⁵; 或

X是NR⁴, Z是N, 且Y是CR⁵; 或

X是CR⁵, Z是NR⁴, 且Y是N; 或

X是CR⁵, Z是N, 且Y是NR⁴;

R^x是任选取代的C₁₋₄烷基或任选取代的C₃₋₄环烷基;

L₁是键、-O-、-N(R^B)-、-S-、-C(O)-、-C(O)O-、-C(O)S-、-C(O)N(R^B)-、-C(O)N(R^B)N(R^B)-、-OC(O)-、-OC(O)N(R^B)-、-NR^BC(O)-、-NR^BC(O)N(R^B)-、-NR^BC(O)N(R^B)N(R^B)-、-NR^BC(O)O-、-SC(O)-、-C(=NR^B)-、-C(=NNR^B)-、-C(=NOR^A)-、-C(=NR^B)N(R^B)-、-NR^BC(=NR^B)-、-C(S)-、-C(S)N(R^B)-、-NR^BC(S)-、-S(O)-、-OS(O)₂-、-S(O)₂O-、-SO₂-、-N(R^B)SO₂-、-SO₂N(R^B)-、或者任选取代的C₁₋₆饱和或不饱和烃链, 其中所述烃链的一个或多个亚甲基单元任选地且独立地由以下替换: -O-、-N(R^B)-、-S-、-C(O)-、-C(O)O-、-C(O)S-、-C(O)N(R^B)-、-C(O)N(R^B)N(R^B)-、-OC(O)-、-OC(O)N(R^B)-、-NR^BC(O)-、-NR^BC(O)N(R^B)-、-NR^BC(O)N(R^B)N(R^B)-、-NR^BC(O)O-、-SC(O)-、-C(=NR^B)-、-C(=NNR^B)-、-C(=NOR^A)-、-C(=NR^B)N(R^B)-、-NR^BC(=NR^B)-、-C(S)-、-C(S)N(R^B)-、-NR^BC(S)-、-S(O)-、-OS(O)₂-、-S(O)₂O-、-SO₂-、-N(R^B)SO₂-或-SO₂N(R^B)-;

每个R^A独立地选自氢、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的碳环基、任选取代的杂环基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、当附着至氧原子时的氧保护基团、以及当附着至硫原子时的硫保护基团;

每个R^B独立地选自氢、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的碳环基、任选取代的杂环基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基和氮保护基团, 或者同一氮原子上的R^B和R^W可以连同间插氮一起形成任选取代的杂环;

R^W是氢、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的碳环基、任选取代的杂环基、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基; 条件是当L₁是键时, R^W不是氢、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基;

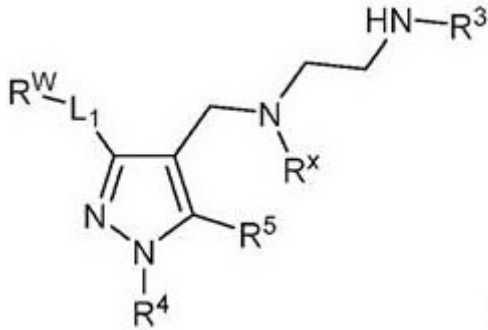
R³是氢、C₁₋₄烷基或C₃₋₄环烷基;

R⁴是氢、任选取代的C₁₋₆烷基、任选取代的C₂₋₆烯基、任选取代的C₂₋₆炔基、任选取代的C₃₋₇环烷基、任选取代的4至7元杂环基; 或任选取代的C₁₋₄烷基-Cy;

Cy是任选取代的C₃₋₇环烷基、任选取代的4至7元杂环基、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基；和

R⁵是氢、卤素、-CN、任选取代的C₁₋₄烷基或任选取代的C₃₋₄环烷基。

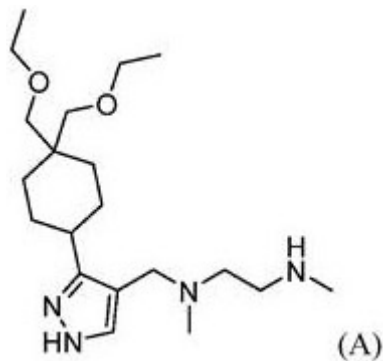
16. 权利要求13-15中任一项的I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述I型PRMT抑制剂是式(II)的化合物:



或其药学上可接受的盐。

17. 权利要求15-16中任一项的I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述I型PRMT抑制剂是式(I)或(II)的化合物,其中-L₁-R^W是任选取代的碳环基。

18. 权利要求13-17中任一项的I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述I型PRMT抑制剂是化合物A:



或其药学上可接受的盐。

19. 权利要求13-18中任一项的I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述ICOS结合蛋白是抗ICOS抗体或其抗原结合片段。

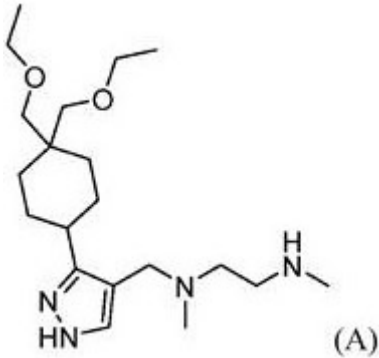
20. 权利要求13-19中任一项的I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述ICOS结合蛋白是ICOS激动剂。

21. 权利要求13-20中任一项的I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述ICOS结合蛋白或其抗原结合部分包含以下中的一种或多种:如SEQ ID NO:1中所示的CDRH1;如SEQ ID NO:2中所示的CDRH2;如SEQ ID NO:3中所示的CDRH3;如SEQ ID NO:4中所示的CDRL1;如SEQ ID NO:5中所示的CDRL2,和/或如SEQ ID NO:6中所示的CDRL3或每个CDR的直接等同物,其中直接等同物具有在所述CDR中的不多于两个氨基酸取代。

22. 权利要求13-21中任一项的I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述ICOS结合蛋白或其抗原结合部分包含V_H结构域和/

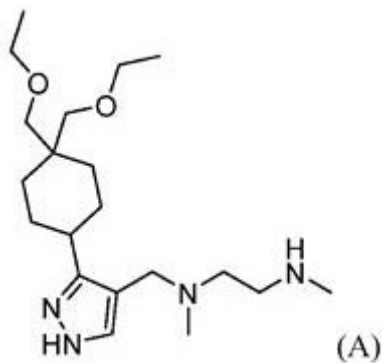
或 V_L 结构域,所述 V_H 结构域包含与SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,所述 V_L 结构域包含与SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,其中所述ICOS结合蛋白与人ICOS特异性结合。

23. 一种I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,其用于治疗有此需要的人中的癌症,其中所述I型PRMT抑制剂是化合物A:



或其药学上可接受的盐,并且所述ICOS结合蛋白或其抗原结合片段包含以下中的一种或多种:如SEQ ID NO:1中所示的CDRH1;如SEQ ID NO:2中所示的CDRH2;如SEQ ID NO:3中所示的CDRH3;如SEQ ID NO:4中所示的CDRL1;如SEQ ID NO:5中所示的CDRL2,和/或如SEQ ID NO:6中所示的CDRL3或每个CDR的直接等同物,其中直接等同物具有在所述CDR中的不多于两个氨基酸取代。

24. 一种I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,其用于治疗有此需要的人中的癌症,其中所述I型PRMT抑制剂是化合物A:



或其药学上可接受的盐,并且所述ICOS结合蛋白或其抗原结合部分包含 V_H 结构域和/或 V_L 结构域,所述 V_H 结构域包含与SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,所述 V_L 结构域包含与SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,其中所述ICOS结合蛋白与人ICOS特异性结合。

25. 权利要求1-12中任一项的方法、或者权利要求13-24中任一项的I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述I型PRMT抑制剂或者ICOS结合蛋白或其抗原结合片段以选自以下的途径施用于患者:同时、序贯、以任何次序、全身、经口、静脉内和瘤内。

26. 权利要求1-12中任一项的方法、或者权利要求13-25中任一项的I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述I型PRMT抑制剂经口施用。

27. 权利要求1-12中任一项的方法、或者权利要求13-26中任一项的I型蛋白质精氨酸甲基转移酶 (I型PRMT) 抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述ICOS结合蛋白或其抗原结合片段静脉内施用。

28. 权利要求1-12中任一项的方法、或者权利要求13-27中任一项的I型蛋白质精氨酸甲基转移酶 (I型PRMT) 抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述癌症选自结肠直肠癌 (CRC)、胃癌、食道癌、宫颈癌、膀胱癌、乳腺癌、头颈癌、卵巢癌、黑色素瘤、肾细胞癌 (RCC)、EC鳞状细胞癌、非小细胞肺癌、间皮瘤、胰腺癌、前列腺癌和淋巴瘤。

29. I型蛋白质精氨酸甲基转移酶 (I型PRMT) 抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,用于制造治疗癌症的药剂的用途。

30. I型蛋白质精氨酸甲基转移酶 (I型PRMT) 抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,用于治疗癌症的用途。

用ICOS结合蛋白和精氨酸甲基转移酶抑制剂的组合疗法

发明领域

[0001] 本发明涉及治疗哺乳动物中的癌症的方法,以及可用于此类治疗中的组合。特别地,本发明涉及I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂和抗ICOS抗体的组合。

[0002] 发明背景

过度增殖性病征包括癌症的有效治疗是肿瘤学领域中的持续目标。一般地,癌症起因于控制细胞分裂、分化和凋亡性细胞死亡的正常过程的失调,并且特征在于恶性细胞的增殖,所述恶性细胞具有无限制生长、局部扩张和全身转移的潜力。正常过程的失调包括信号转导途径中的异常,以及对不同于正常细胞中发现的因子的应答。

[0003] 精氨酸甲基化是对参与各种范围的细胞过程的蛋白质的重要翻译后修饰,所述细胞过程例如基因调控、RNA加工、DNA损伤应答和信号转导。含有甲基化精氨酸的蛋白质存在于核和胞质级分两者中,提示了在这些亚细胞区室各处也存在催化甲基转移至精氨酸上的酶(在以下中进行综述:Yang, Y. & Bedford, M. T. Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat Rev Cancer* 13,37-50,doi:10.1038/nrc3409 (2013);Lee, Y. H. & Stallcup, M. R. Minireview:protein arginine methylation of nonhistone proteins in transcriptional regulation. *Mol Endocrinol* 23,425-433,doi:10.1210/me.2008-0380 (2009))。在哺乳动物细胞中,甲基化的精氨酸以三种主要形式存在: ω - N^G -单甲基精氨酸(MMA)、 ω - N^G, N^G -非对称性二甲基精氨酸(ADMA)、或 ω - N^G, N^G -对称性二甲基精氨酸(SDMA)。每种甲基化状态可以以不同方式影响蛋白质-蛋白质相互作用,并且因此具有对于底物的生物活性赋予不同功能后果的潜力(Yang, Y. & Bedford, M. T. Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat Rev Cancer* 13,37-50,doi:10.1038/nrc3409 (2013))。

[0004] 精氨酸甲基化在很大程度上在富含甘氨酸、精氨酸(GAR)的基序的背景下,通过蛋白质精氨酸甲基转移酶(PRMT)家族的活性而发生,所述PRMT家族将甲基从S-腺苷-L-甲硫氨酸(SAM)转移到底物精氨酸侧链,产生S-腺苷-高半胱氨酸(SAH)和甲基化的精氨酸。该蛋白质家族由10个成员组成,其中9个已显示具有酶促活性(Bedford, M. T. & Clarke, S. G. Protein arginine methylation in mammals:who, what, and why. *Mol Cell* 33,1-13,doi:10.1016/j.molcel.2008.12.013 (2009))。根据酶促反应的产物,将PRMT家族分类成四个亚型(I-IV型)。IV型酶使内部胍基氮甲基化,并且仅在酵母中得到描述(Fisk, J. C. & Read, L. K. Protein arginine methylation in parasitic protozoa. *Eukaryot Cell* 10,1013-1022,doi:10.1128/EC.05103-11 (2011));I-III型酶通过单一甲基化事件生成单甲基精氨酸(MMA, Rme1)。MMA中间产物被视为相对低丰度的中间产物,然而,PRMT7的主要III型活性的选定底物可以保持单甲基化,而I和II型酶分别催化从MMA到非对称性二甲基精氨酸(ADMA, Rme2a)或对称性二甲基精氨酸(SDMA, Rme2s)的进展。II型PRMT包括PRMT5和PRMT9,然而,PRMT5是负责形成对称二甲基化的主要酶。I型酶包括PRMT1, PRMT3、PRMT4、PRMT6和PRMT8。PRMT1、PRMT3、PRMT4和PRMT6是遍在表达的,而PRMT8主要限于脑(综述在 Bedford, M. T. & Clarke, S. G. Protein arginine methylation in mammals:who,

what, and why. *Mol Cell* 33,1-13,doi:10.1016/j.molcel.2008.12.013(2009)中)。

[0005] PRMT1的错误调控和过表达已与许多实体癌和造血癌症相关(Yang, Y. & Bedford, M. T. Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat Rev Cancer* 13,37-50,doi:10.1038/nrc3409(2013);Yoshimatsu, M.等人Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers. *Int J Cancer* 128,562-573,doi:10.1002/ijc.25366(2011))。PRMT1与癌症生物学之间的联系在很大程度上是通过在相关底物上发现的精氨酸残基的甲基化调控。在几种肿瘤类型中,PRMT1可以通过组蛋白H4的甲基化(Takai, H.等人5-Hydroxymethylcytosine plays a critical role in glioblastomagenesis by recruiting the CHTOP-methylosome complex. *Cell Rep* 9,48-60,doi:10.1016/j.celrep.2014.08.071(2014);Shia, W. J.等人PRMT1 interacts with AML1-ETO to promote its transcriptional activation and progenitor cell proliferative potential. *Blood* 119,4953-4962,doi:10.1182/blood-2011-04-347476(2012);Zhao, X.等人Methylation of RUNX1 by PRMT1 abrogates SIN3A binding and potentiates its transcriptional activity. *Genes Dev* 22,640-653,doi:10.1101/gad.1632608(2008)),以及通过其对非组蛋白底物的活性(Wei, H., Mundade, R., Lange, K. C. & Lu, T. Protein arginine methylation of non-histone proteins and its role in diseases. *Cell Cycle* 13,32-41,doi:10.4161/cc.27353(2014)),来驱动异常致癌程序的表达。在这些实验系统的许多中,其底物的PRMT1依赖性ADMA修饰的破坏降低癌细胞的增殖能力(Yang, Y. & Bedford, M. T. Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat Rev Cancer* 13,37-50,doi:10.1038/nrc3409(2013))。相应地,已认识到PRMT1的抑制剂作为用于治疗过度增殖性病症的抗增殖剂均应具有价值。

[0006] 免疫疗法是治疗过度增殖性病症的另一种方法。增强抗肿瘤T细胞功能并诱导T细胞增殖是强大而新颖的癌症治疗方法。目前上市了三种免疫肿瘤学抗体(例如,免疫调节剂)。抗CTLA-4(YERVOY®/伊匹木单抗)被认为在T细胞引发的节点加强免疫应答,而抗PD-1抗体(OPDIVO®/纳武单抗和KEYTRUDA®/帕博利珠单抗),被认为通过缓解已经引发且激活的肿瘤特异性T细胞中的抑制性检查点,在局部肿瘤微环境中起作用。

[0007] ICOS是与CD28/CTLA-4-Ig超家族具有结构和功能关系的共刺激性T细胞受体(Hutloff等人,“ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28”,*Nature*,397:263-266(1999))。ICOS的激活通过ICOS-L(B7RP-1/B7-H2)结合而发生。B7-1和B7-2(CD28和CTLA4的配体)两者均不结合或激活ICOS。然而,ICOS-L已显示与CD28和CTLA-4两者弱结合(Yao S等人,“B7-H2 is a costimulatory ligand for CD28 in human”,*Immunity*,34(5);729-40(2011))。ICOS的表达似乎仅限于T细胞。ICOS表达水平在不同的T细胞亚群之间以及在T细胞激活状态上不同。ICOS表达已在静息TH17细胞、T滤泡辅助(TFH)细胞和调节性T(Treg)细胞上显示;然而,与CD28不同;它在幼稚的T_H1和T_H2效应T细胞群体上并未高度表达(Paulos CM等人,“The inducible costimulator(ICOS) is critical for the development of human Th17 cells”,*Sci Transl Med*,2(55);55ra78(2010))。在通过TCR接合激活之后,ICOS表达在CD4+和CD8+效应T细胞上被高度诱导(Wakamatsu E等人,“Convergent and divergent effects of

costimulatory molecules in conventional and regulatory CD4⁺ T cells”, Proc Natl Acad Sci USA, 110(3);1023-8(2013)。通过ICOS受体的共刺激信号传导仅在在接受同时存在的TCR激活信号的T细胞中发生(Sharpe AH和Freeman GJ. “The B7-CD28 Superfamily”, Nat. Rev Immunol, 2(2);116-26(2002))。在激活的抗原特异性T细胞中, ICOS调控T_H1和T_H2细胞因子两者的产生, 所述细胞因子包括IFN- γ 、TNF- α 、IL-10、IL-4、IL-13及其它。ICOS还刺激效应T细胞增殖, 尽管程度不如CD28(Sharpe AH和Freeman GJ. “The B7-CD28 Superfamily”, Nat. Rev Immunol, 2(2);116-26(2002))。

[0008] 越来越多的文献支持以下观点: 激活CD4⁺和CD8⁺效应T细胞上的ICOS具有抗肿瘤潜力。在具有SA-1(肉瘤)、Meth A(纤维肉瘤)、EMT6(乳腺癌)和P815(肥大细胞瘤)和EL-4(浆细胞瘤)同基因肿瘤的小鼠中, ICOS-L-Fc融合蛋白引起肿瘤生长延迟和完全根除肿瘤, 而在已知为弱免疫原性的B16-F10(黑色素瘤)肿瘤模型中, 并未观察到活性(Ara G等人, “Potent activity of soluble B7RP-1-Fc in therapy of murine tumors in syngeneic hosts”, Int. J Cancer, 103(4);501-7(2003))。ICOS-L-Fc的抗肿瘤活性依赖于完整的免疫应答, 因为该活性在裸鼠中生长的肿瘤中完全丧失。来自ICOS-L-Fc处理的小鼠的肿瘤分析证实, 对处理有响应的肿瘤中的CD4⁺和CD8⁺ T细胞浸润中的显著增加, 支持了ICOS-L-Fc在这些模型中的免疫刺激效应。

[0009] 使用ICOS^{-/-}和ICOS-L^{-/-}小鼠的另一篇报道证实, 需要ICOS信号传导介导抗CTLA4抗体在B16/B16黑色素瘤同基因肿瘤模型中的抗肿瘤活性(Fu T等人, “The ICOS/ICOSL pathway is required for optimal antitumor responses mediated by anti-CTLA-4 therapy”, Cancer Res, 71(16);5445-54(2011))。在抗CTLA4抗体处理后, 与野生型小鼠相比, 缺乏ICOS或ICOS-L的小鼠具有显著降低的存活率。在分开的研究中, B16/B16肿瘤细胞进行转导, 以过表达重组鼠ICOS-L。与用对照蛋白转导的B16/B16肿瘤细胞相比, 发现这些肿瘤对于抗CTLA4处理明显更敏感(Allison J等人, “Combination immunotherapy for the treatment of cancer”, WO2011/041613 A2(2009))。这些研究提供了单独以及与其它免疫调节抗体组合的ICOS激动剂的抗肿瘤潜力的证据。

[0010] 来自用抗CTLA4抗体治疗的患者的新出现的数据也指出, ICOS⁺效应T细胞在介导抗肿瘤免疫应答中的积极作用。与在其中观察到很少增加或没有增加的患者相比, 在伊匹木单抗治疗后具有循环和肿瘤浸润性CD4⁺ICOS⁺和CD8⁺ICOS⁺ T细胞的绝对计数增加的患者具有明显更好的治疗相关的结果, 所述患者患有转移性黑色素瘤(Giacomo AMD等人, “Long-term survival and immunological parameters in metastatic melanoma patients who respond to ipilimumab 10 mg/kg within an expanded access program”, Cancer Immunol Immunother., 62(6);1021-8(2013)); 尿路上皮癌(Carthon BC等人, “Preoperative CTLA-4 blockade: Tolerability and immune monitoring in the setting of a presurgical clinical trial” Clin Cancer Res., 16(10);2861-71(2010)); 乳腺癌(Vonderheide RH等人, “Tremelimumab in combination with exemestane in patients with advanced breast cancer and treatment-associated modulation of inducible costimulator expression on patient T cells”, Clin Cancer Res., 16(13);3485-94(2010)); 以及前列腺癌。重要的是, 显示伊匹木单抗改变了ICOS⁺ T效应物:T_{reg}比率, 将治疗前的T_{reg}丰度逆转为治疗之后的T效应物相对于T_{reg}的显著

丰度(Liakou CI等人,“CTLA-4 blockade increases IFN-gamma producing CD4+ICOShi cells to shift the ratio of effector to regulatory T cells in cancer patients”,*Proc Natl Acad Sci USA*. 105(39);14987-92(2008))以及(Vonderheide RH等人,*Clin Cancer Res.*,16(13);3485-94(2010))。因此,ICOS阳性T效应细胞是伊匹木单抗应答的阳性预测生物标记物,其指出了用激动剂ICOS抗体激活这种细胞群体的潜在优点。

[0011] 尽管在癌症治疗中存在许多最近进展,但仍然存在对于遭受癌症影响的个体的更有效和/或增强治疗的需要。

[0012] 附图简述

图1:精氨酸残基上的甲基化的类型。来自Yang,Y. & Bedford,M. T. Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat Rev Cancer* 13,37-50,doi:10.1038/nrc3409(2013)。

[0013] 图2:癌症相关的PRMT1底物的功能类别。PRMT1的已知底物及其与癌症相关生物学的关联(Yang,Y. & Bedford,M. T. Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat Rev Cancer* 13,37-50,doi:10.1038/nrc3409(2013);Shia,W. J.等人PRMT1 interacts with AML1-ETO to promote its transcriptional activation and progenitor cell proliferative potential. *Blood* 119,4953-4962,doi:10.1182/blood-2011-04-347476(2012);Wei,H.,Mundade,R.,Lange,K. C. & Lu,T. Protein arginine methylation of non-histone proteins and its role in diseases. *Cell Cycle* 13,32-41,doi:10.4161/cc.27353(2014);Boisvert,F. M.,Rhie,A.,Richard,S. & Doherty,A. J. The GAR motif of 53BP1 is arginine methylated by PRMT1 and is necessary for 53BP1 DNA binding activity. *Cell Cycle* 4,1834-1841,doi:10.4161/cc.4.12.2250(2005);Boisvert,F. M.,Dery,U.,Masson,J. Y. & Richard,S. Arginine methylation of MRE11 by PRMT1 is required for DNA damage checkpoint control. *Genes Dev* 19,671-676,doi:10.1101/gad.1279805(2005);Zhang,L.等人Cross-talk between PRMT1-mediated methylation and ubiquitylation on RBM15 controls RNA splicing. *Elife* 4,doi:10.7554/eLife.07938(2015);Snijders,A. P.等人Arginine methylation and citrullination of splicing factor proline- and glutamine-rich (SFPQ/PSF) regulates its association with mRNA. *RNA* 21,347-359,doi:10.1261/rna.045138.114(2015);Liao,H. W.等人PRMT1-mediated methylation of the EGF receptor regulates signaling and cetuximab response. *J Clin Invest* 125,4529-4543,doi:10.1172/JCI82826(2015);Ng,R. K.等人Epigenetic dysregulation of leukaemic HOX code in MLL-rearranged leukaemia mouse model. *J Pathol* 232,65-74,doi:10.1002/path.4279(2014);Bressan,G. C.等人Arginine methylation analysis of the splicing-associated SR protein SFRS9/SRP30C. *Cell Mol Biol Lett* 14, 657-669,doi:10.2478/s11658-009-0024-2(2009))。

[0014] 图3:用化合物D处理的细胞系的甲基扫描评估。具有甲基化变化(不依赖于变化的方向性)的蛋白质百分比按如所示的官能团进行分类。

[0015] 图4:通过化合物A针对PRMT1的抑制模式。在18分钟PRMT1反应之后,并且将数据对

3参数剂量应答方程拟合,来确定 IC_{50} 值。(A)代表性实验,其显示了作为 $[SAM]/K_m^{app}$ 的函数,对非竞争性抑制方程 $IC_{50}=K_i/(1+(K_m/[S]))$ 拟合而标绘的化合物A IC_{50} 值。(B)代表性实验,其显示了作为 $[肽]/K_m^{app}$ 的函数标绘的 IC_{50} 值。插图显示了对混合抑制方程的数据拟合,以评估就肽H4 1-21底物而言,PRMT1的化合物A抑制($v = V_{max} * [S]/(K_m * (1+[I]/K_i) + [S] * (1+[I]/K'))$)。 >0.1 但 <10 的 α 值($\alpha = K_i'/K_i$)指示混合抑制剂。

[0016] 图5:化合物A针对PRMT1的效力。使用测量从SAM到H4 1-21肽的 3H 转移,在平衡条件下(底物浓度等于 K_m^{app})运行的放射性测定,来监测PRMT1活性。通过将数据对3参数剂量应答方程拟合来确定 IC_{50} 值。(A) 作为PRMT1:SAM:化合物A-三HCl预温育时间的函数标绘的 IC_{50} 值。空心圆圈和实心圆圈代表了两个独立的实验(0.5 nM PRMT1)。插图显示了在60分钟PRMT1:SAM:化合物A-三HCl预温育之后,PRMT1活性的化合物A-三HCl抑制的代表性 IC_{50} 曲线。(B) 按盐形式分类的PRMT1的化合物A抑制。在60分钟PRMT1:SAM:化合物A预温育和20分钟反应之后确定 IC_{50} 值。

[0017] 图6:关于与化合物A(橙色)和SAH(紫色)复合的PRMT1,在2.48Å下解析的晶体结构。插图揭示了该化合物在肽结合袋中结合,并且与PRMT1侧链进行关键相互作用。

[0018] 图7:通过化合物A的PRMT1直系同源物抑制。使用测量从SAM到H4 1-21肽的 3H 转移,在平衡条件下(底物浓度等于 K_m^{app})运行的放射性测定,来监测PRMT1活性。通过将数据对3参数剂量应答方程拟合来确定 IC_{50} 值。(A) 对于大鼠(○)和犬(●)直系同源物,作为PRMT1:SAM:化合物A预温育时间的函数标绘的 IC_{50} 值。(B) 作为大鼠(○)、犬(●)或人(□)PRMT1浓度的函数标绘的 IC_{50} 值。(C) 在60分钟PRMT1:SAM:化合物A预温育和20分钟反应之后确定 IC_{50} 值。数据是来自测试化合物A的多重盐形式的平均值。基于非竞争性抑制剂的方程 $K_i=IC_{50}/(1+(K_m/[S]))$,以及 IC_{50} 测定是ESI*构象的代表的假设来计算 K_i^{*app} 值。

[0019] 图8:化合物A针对PRMT家族成员的效力。在60分钟PRMT:SAM:化合物A预温育之后,使用在平衡条件下(以 K_m^{app} 的底物浓度)运行的放射性测定,来监测PRMT活性。通过将数据对3参数剂量应答方程拟合,来确定化合物A的 IC_{50} 值。(A) 数据是来自测试化合物A的多重盐形式的平均值。基于非竞争性抑制剂的方程 $K_i=IC_{50}/(1+(K_m/[S]))$,以及 IC_{50} 测定是ESI*构象的代表的假设来计算 K_i^{*app} 值。(B) 作为PRMT3(●)、PRMT4(○)、PRMT6(■)或PRMT8(□):SAM:化合物A预温育时间的函数标绘的 IC_{50} 值。

[0020] 图9:MMA细胞内蛋白质分析(in-cell-western)。RK0细胞用化合物A-三HCl、化合物A-单HCl、化合物A-游离碱和化合物A-二-HCl处理72小时。将细胞固定,用检测MMA的抗Rme1GG以及使信号标准化的抗微管蛋白进行染色,并且使用Odyssey成像系统进行成像。使用双相曲线拟合方程,针对化合物浓度标绘相对于微管蛋白的MMA,以在GraphPad中生成曲线拟合(A)。 EC_{50} (第一拐点)、标准差和N的概括显示于(B)中。

[0021] 图10:在肿瘤中的PRMT1表达。mRNA表达水平得自用于癌症基因组学的cBioPortal。显示了ACTB水平和TYR,以分别指示对应于遍在表达的基因相对于具有限制表达的基因的表达水平。

[0022] 图11:化合物A在细胞培养物中的抗增殖活性。在6天生长测定中,评估了196个人癌细胞系对化合物A的敏感性。关于每个细胞系的 gIC_{50} 值显示为具有预测的人暴露的条形图,如(A)中所示。 $Y_{min}-T_0$,细胞毒性的量度,在(B)中标绘为条形图,其中关于每个细胞系的 gIC_{100} 值显示为红色点。由大鼠14天MTD计算的 C_{ave} (150 mg/kg, $C_{ave} = 2.1 \mu M$)指示为红

色虚线。

[0023] 图12:化合物A对培养细胞中的精氨酸甲基化标记的作用的时间过程。(A)在用化合物A处理的Toledo DLBCL细胞中的ADMA、SDMA和MMA中的变化。显示了相对于微管蛋白标准化的甲基化中的变化 \pm SEM (n=3)。(B)精氨酸甲基化标记的代表性Western印迹。定量的区域由凝胶右侧上的黑色条表示。

[0024] 图13:化合物A对精氨酸甲基化的剂量应答。(A)来自U2932细胞系中的化合物A剂量应答的MMA和ADMA的代表性Western印迹图像。关于(B)定量的区域由凝胶左侧上的黑条表示。(B)在暴露72小时后,在5个淋巴瘤细胞系中,关于MMA的最大诱导的50%或ADMA的50%最大减少所需的最小有效化合物A浓度 \pm 标准差 (n=2)。在6天生长死亡测定中相应的 gIC_{50} 值如以红色指示的。

[0025] 图14:在淋巴瘤细胞中响应化合物A的精氨酸甲基化标记的持久性。(A)在用化合物A培养的Toledo DLBCL细胞系中的ADMA、SDMA和MMA变化的稳定性。显示了相对于微管蛋白标准化的甲基化中的变化 \pm SEM (n=3)。(B)精氨酸甲基化标记的代表性Western印迹。关于(A)定量的区域由凝胶侧面上的黑色条表示。

[0026] 图15:淋巴瘤细胞系的增殖时间过程。在Toledo (A) 和Daudi (B) 细胞系中,经过10天的时间过程评价了细胞生长 (n=2/细胞系)。显示了关于单次生物学重复的代表性数据。

[0027] 图16:在6和10天时,化合物A在淋巴瘤细胞系中的抗增殖效应。(A)来自淋巴瘤细胞系中的第6天(浅蓝色)和第10天(深蓝色)增殖测定的平均 gIC_{50} 值。(B)在第6天(浅蓝色)和10天(深蓝色)时的 $Y_{min}-T_0$,和相应的 gIC_{100} (红色点)。

[0028] 图17:如按亚型分类的化合物A在淋巴瘤细胞系中的抗增殖效应。(A)关于每个细胞系的 gIC_{50} 值显示为条形图。 $Y_{min}-T_0$,细胞毒性的量度,在(B)中标绘为条形图,其中关于每个细胞系的 gIC_{100} 值显示为红色点。从ATCC或DSMZ细胞系储库中收集亚型信息。

[0029] 图18:人淋巴瘤细胞系中的细胞周期的碘化丙啶FACS分析。3个淋巴瘤细胞系Toledo (A)、U2932 (B) 和OCI-Ly1 (C) 用0、1、10、100、1000和10,000 nM化合物A处理10天,并且在处理后的第3、5、7、10天时获取样品。数据代表生物学重复的平均值 \pm SEM, n=2。

[0030] 图19:用化合物A处理的淋巴瘤细胞系中的半胱天冬酶-3/7激活。在Toledo (A) 和Daudi (B) 细胞系中,经过10天的时间过程评价了凋亡。半胱天冬酶3/7激活显示为相对于DMSO处理的细胞的诱导倍数。对于每个细胞系执行两次独立的重复。对于各自显示了代表性数据。

[0031] 图20:化合物A在荷有Toledo异种移植物的老鼠中的功效。经过28 (A) 或24 (B) 天的时期,用化合物A经口QD (37.5、75、150、300、450或600 mg/kg) 或用75 mg/kg (B) BID来处理小鼠,并且每周两次测量肿瘤体积。

[0032] 图21:在6和10天时,化合物A在AML细胞系中的效应。(A)来自AML细胞系中的第6天(浅蓝色)和第10天(深蓝色)增殖测定的平均 gIC_{50} 值。(B)在第6天(浅蓝色)和10天(深蓝色)时的 $Y_{min}-T_0$,和相应的 gIC_{100} (红色点)。

[0033] 图22:用化合物A的ccRCC系的体外增殖时间过程。(A)关于2个ccRCC细胞系,相对于对照(DMSO)的生长。显示了来自单次重复的代表性曲线。(B)在时间过程期间,关于ccRCC细胞系的 gIC_{50} 和%生长抑制的概括(平均值 \pm SD;关于每个系, n=2)。

[0034] 图23:化合物A在ACHN异种移植植物中的功效。经过28天的时期,每天用化合物A经口

处理小鼠,并且每周两次测量肿瘤体积。

[0035] 图24:化合物A在乳腺癌细胞系中的抗增殖效应。在6天增殖测定中,对于化合物A标绘了关于乳腺癌细胞系的 gIC_{50} 和生长抑制(%) (红色圆圈)的条形图。代表三阴性乳腺癌(TNBC)的细胞系以橙色显示;其它亚型为蓝色。

[0036] 图25:在7和12天时,化合物A在乳腺癌细胞系中的效应。来自乳腺癌细胞系中的第7天(浅蓝色)和10天(深蓝色)增殖测定的平均生长抑制(%)值,和相应的 gIC_{50} (红色点)。在用乳腺癌而非淋巴瘤或AML细胞系的长期增殖测定中,观察到效力和抑制百分比中的增加,提示了某些肿瘤类型需要对化合物A的更长暴露,以充分显示抗增殖活性。

[0037] 图26:在同基因肿瘤模型中,抗小鼠ICOS激动剂抗体与化合物D组合的协同活性。用单独和组合的5mg/kg抗ICOS(Icos17G9-GSK)和300mg/kg化合物D,处理荷有CT26(结肠)或EMT6(乳腺)的皮下同种异体移植物的免疫活性小鼠。关于CT26(A)和EMT6(B)的存活曲线:化合物D和抗ICOS的组合在本研究中具有超过任一种单一试剂的显著存活益处(Grehan-Breslow-Wilcoxon检验)。(C)来自比较媒介物、抗ICOS、化合物D和抗ICOS/化合物D组合的两项功效研究的各个肿瘤生长曲线。

[0038] 发明概述

在一个方面,本发明提供了治疗有此需要的人中的癌症的方法,该方法包括向人施用治疗有效量的I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂,并且向人施用治疗有效量的ICOS结合蛋白或其抗原结合部分。

[0039] 在一个方面,本发明提供了I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,其用于治疗有此需要的人中的癌症。

[0040] 在一个方面,本发明提供了I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,用于制造治疗癌症的药剂的用途。

[0041] 在一个方面,本发明提供了I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,用于治疗癌症的用途。

[0042] 发明详述

定义

如本文使用的,“I型蛋白质精氨酸甲基转移酶抑制剂”或“I型PRMT抑制剂”,意指抑制下述中的任何一种或多种的试剂:蛋白质精氨酸甲基转移酶1(PRMT1)、蛋白质精氨酸甲基转移酶3(PRMT3)、蛋白质精氨酸甲基转移酶4(PRMT4)、蛋白质精氨酸甲基转移酶6(PRMT6)抑制剂、以及蛋白质精氨酸甲基转移酶8(PRMT8)。在一些实施方案中,I型PRMT抑制剂是小分子化合物。在一些实施方案中,I型PRMT抑制剂选择性抑制下述中的任何一种或多种:蛋白质精氨酸甲基转移酶1(PRMT1)、蛋白质精氨酸甲基转移酶3(PRMT3)、蛋白质精氨酸甲基转移酶4(PRMT4)、蛋白质精氨酸甲基转移酶6(PRMT6)抑制剂、以及蛋白质精氨酸甲基转移酶8(PRMT8)。在一些实施方案中,I型PRMT抑制剂是PRMT1、PRMT3、PRMT4、PRMT6和PRMT8的选择性抑制剂。

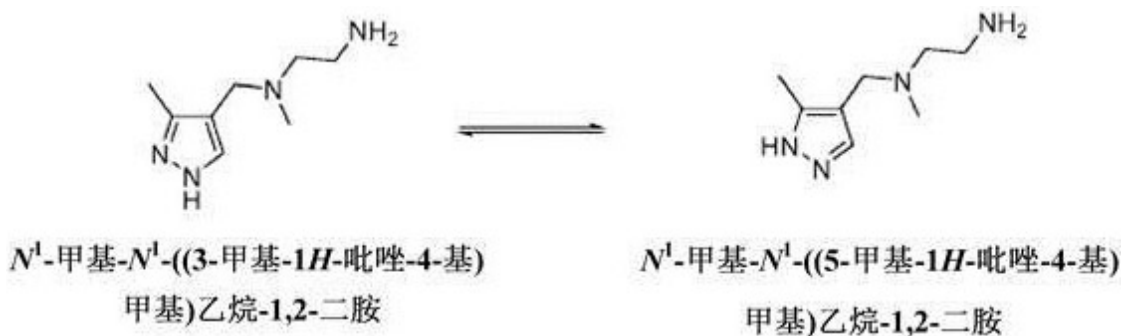
[0043] 鉴于其在各种生物过程的调控中的作用,精氨酸甲基转移酶是有吸引力的调节靶。目前已发现,本文所述的化合物及其药学上可接受的盐和组合物,作为精氨酸甲基转移酶的抑制剂是有效的。

[0044] 特异性官能团和化学术语的定义在下文更详细地描述。化学元素根据元素周期表

(CAS版本,Handbook of Chemistry and Physics,第75版,封二)进行鉴定,并且特异性官能团一般如其中所述的进行定义。另外,有机化学的一般原理、以及特异性功能部分和反应性在以下中描述:Thomas Sorrell,Organic Chemistry,University Science Books,Sausalito,1999;Smith和March,March's Advanced Organic Chemistry,第5版,John Wiley & Sons,Inc.,New York,2001;Larock,Comprehensive Organic Transformations,VCH Publishers,Inc.,New York,1989;以及Carruthers,Some Modern Methods of Organic Synthesis,第3版,Cambridge University Press,Cambridge,1987。

[0045] 本文所述的化合物可以包含一个或多个不对称中心,并且因此可以以各种异构体形式存在,例如对映异构体和/或非对映异构体。例如,本文所述的化合物可以是个别对映异构体、非对映异构体或几何异构体的形式,或者可以是立体异构体的混合物的形式,包括外消旋混合物和富含一种或多种立体异构体的混合物。可以通过本领域技术人员已知的方法,包括手性高压液相层析(HPLC)以及手性盐的形成和结晶,从混合物中分离异构体;或者可以通过不对称合成来制备优选的异构体。参见例如,Jacques等人,Enantiomers,Racemates and Resolutions(Wiley Interscience,New York,1981);Wilen等人,Tetrahedron 33:2725(1977);Eliel,Stereochemistry of Carbon Compounds(McGraw-Hill,NY,1962);以及Wilen,Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions第268页(E.L. Eliel,编辑,Univ. of Notre Dame Press,Notre Dame,IN 1972)。本公开内容另外涵盖了本文描述的化合物,其作为基本上不含其它异构体的个别异构体、以及可替代地作为各种异构体的混合物。

[0046] 应理解,本发明的化合物可以描述为不同的互变异构体。还应当理解,当化合物具有互变异构形式时,所有互变异构形式都预期包括在本发明的范围内,并且本文所述的任何化合物的命名都不排除任何互变异构形式。



[0047] 除非另有说明,否则本文所述的结构还意欲包括仅在一个或多个同位素富集的原子的存在下不同的化合物。例如,除了用氘或氚替换氢,用¹⁸F替换¹⁹F,或用富含¹³C或¹⁴C的碳替换碳之外,具有本结构的化合物都在本公开内容的范围内。此类化合物例如可用作生物测定中的分析工具或探针。

[0048] 当列出值的范围时,它预期涵盖在该范围内的每个值和子范围。例如,“C₁₋₆烷基”预期涵盖C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₁₋₆、C₁₋₅、C₁₋₄、C₁₋₃、C₁₋₂、C₂₋₆、C₂₋₅、C₂₋₄、C₂₋₃、C₃₋₆、C₃₋₅、C₃₋₄、C₄₋₆、C₄₋₅和C₅₋₆烷基。

[0049] “基”指特定基团上的附着点。基包括特定基团的二价基。

[0050] “烷基”指具有1至20个碳原子的直链或支链饱和烃基的基(“C₁₋₂₀烷基”)。在一些实施方案中,烷基具有1至10个碳原子(“C₁₋₁₀烷基”)。在一些实施方案中,烷基具有1至9个

碳原子 (“C₁₋₉烷基”)。在一些实施方案中,烷基具有1至8个碳原子 (“C₁₋₈烷基”)。在一些实施方案中,烷基具有1至7个碳原子 (“C₁₋₇烷基”)。在一些实施方案中,烷基具有1至6个碳原子 (“C₁₋₆烷基”)。在一些实施方案中,烷基具有1至5个碳原子 (“C₁₋₅烷基”)。在一些实施方案中,烷基具有1至4个碳原子 (“C₁₋₄烷基”)。在一些实施方案中,烷基具有1至3个碳原子 (“C₁₋₃烷基”)。在一些实施方案中,烷基具有1至2个碳原子 (“C₁₋₂烷基”)。在一些实施方案中,烷基具有1个碳原子 (“C₁烷基”)。在一些实施方案中,烷基具有2至6个碳原子 (“C₂₋₆烷基”)。C₁₋₆烷基的实例包括甲基 (C₁)、乙基 (C₂)、正丙基 (C₃)、异丙基 (C₃)、正丁基 (C₄)、叔丁基 (C₄)、仲丁基 (C₄)、异丁基 (C₄)、正戊基 (C₅)、3-戊酰基 (pentanyl) (C₅)、戊烷基 (C₅)、新戊基 (C₅)、3-甲基-2-丁烷基 (C₅)、叔戊烷基 (C₅) 和正己基 (C₆)。烷基的另外实例包括正庚基 (C₇)、正辛基 (C₈) 等等。在某些实施方案中,烷基的每个实例独立地是任选取代的,例如未取代的 (“未取代的烷基”) 或者由一个或多个取代基取代的 (“取代的烷基”)。在某些实施方案中,烷基是未取代的C₁₋₁₀烷基 (例如, -CH₃)。在某些实施方案中,烷基是取代的C₁₋₁₀烷基。

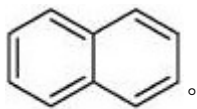
[0051] 在一些实施方案中,烷基由一个或多个卤素取代。“全卤代烷基”是如本文定义的取代的烷基,其中所有氢原子都独立地替换为卤素,例如氟、溴、氯或碘。在一些实施方案中,烷基部分具有1至8个碳原子 (“C₁₋₈全卤代烷基”)。在一些实施方案中,烷基部分具有1至6个碳原子 (“C₁₋₆全卤代烷基”)。在一些实施方案中,烷基部分具有1至4个碳原子 (“C₁₋₄全卤代烷基”)。在一些实施方案中,烷基部分具有1至3个碳原子 (“C₁₋₃全卤代烷基”)。在一些实施方案中,烷基部分具有1至2个碳原子 (“C₁₋₂全卤代烷基”)。在一些实施方案中,所有氢原子都由氟替换。在一些实施方案中,所有氢原子都由氯替换。全卤代烷基的实例包括 -CF₃、-CF₂CF₃、-CF₂CF₂CF₃、-CCl₃、-CFC1₂、-CF₂Cl 等等。

[0052] “烯基”指具有2至20个碳原子和一个或多个碳-碳双键 (例如1、2、3或4个双键),以及任选地一个或多个三键 (例如1、2、3或4个三键) 的直链或支链烃基的基 (“C₂₋₂₀烯基”)。在某些实施方案中,烯基不包含三键。在一些实施方案中,烯基具有2至10个碳原子 (“C₂₋₁₀烯基”)。在一些实施方案中,烯基具有2至9个碳原子 (“C₂₋₉烯基”)。在一些实施方案中,烯基具有2至8个碳原子 (“C₂₋₈烯基”)。在一些实施方案中,烯基具有2至7个碳原子 (“C₂₋₇烯基”)。在一些实施方案中,烯基具有2至6个碳原子 (“C₂₋₆烯基”)。在一些实施方案中,烯基具有2至5个碳原子 (“C₂₋₅烯基”)。在一些实施方案中,烯基具有2至4个碳原子 (“C₂₋₄烯基”)。在一些实施方案中,烯基具有2至3个碳原子 (“C₂₋₃烯基”)。在一些实施方案中,烯基具有2个碳原子 (“C₂烯基”)。一个或多个碳-碳双键可以是内部的 (例如在2-丁烯基中) 或末端的 (例如在1-丁烯基中)。C₂₋₄烯基的实例包括乙烯基 (C₂)、1-丙烯基 (C₃)、2-丙烯基 (C₃)、1-丁烯基 (C₄)、2-丁烯基 (C₄)、丁二烯基 (C₄) 等等。C₂₋₆烯基的实例包括上述C₂₋₄烯基以及戊烯基 (C₅)、戊二烯基 (C₅)、己烯基 (C₆) 等等。烯基的另外实例包括庚烯基 (C₇)、辛烯基 (C₈)、辛三烯基 (C₈) 等等。在某些实施方案中,烯基的每个实例独立地是任选取代的,例如未取代的 (“未取代的烯基”) 或者由一个或多个取代基取代的 (“取代的烯基”)。在某些实施方案中,烯基是未取代的C₂₋₁₀烯基。在某些实施方案中,烯基是取代的C₂₋₁₀烯基。

[0053] “炔基”指具有2至20个碳原子和一个或多个碳-碳三键 (例如1、2、3或4个三键),以及任选地一个或多个双键 (例如1、2、3或4个双键) 的直链或支链烃基的基 (“C₂₋₂₀炔基”)。在某些实施方案中,炔基不包含双键。在一些实施方案中,炔基具有2至10个碳原子 (“C₂₋₁₀炔基”)。在一些实施方案中,炔基具有2至9个碳原子 (“C₂₋₉炔基”)。在一些实施方案中,炔基具

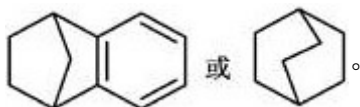
有2至8个碳原子(“C₂₋₈炔基”)。在一些实施方案中,炔基具有2至7个碳原子(“C₂₋₇炔基”)。在一些实施方案中,炔基具有2至6个碳原子(“C₂₋₆炔基”)。在一些实施方案中,炔基具有2至5个碳原子(“C₂₋₅炔基”)。在一些实施方案中,炔基具有2至4个碳原子(“C₂₋₄炔基”)。在一些实施方案中,炔基具有2至3个碳原子(“C₂₋₃炔基”)。在一些实施方案中,炔基具有2个碳原子(“C₂炔基”)。一个或多个碳-碳三键可以是内部的(例如在2-丁炔基中)或末端的(例如在1-丁炔基中)。C₂₋₄炔基的实例包括但不限于乙炔基(C₂)、1-丙炔基(C₃)、2-丙炔基(C₃)、1-丁炔基(C₄)、2-丁炔基(C₄)等等。C₂₋₆炔基的实例包括上述C₂₋₄炔基以及戊炔基(C₅)、己炔基(C₆)等等。炔基的另外实例包括庚炔基(C₇)、辛炔基(C₈)等等。在某些实施方案中,炔基的每个实例独立地是任选取代的,例如未取代的(“未取代的炔基”)或者由一个或多个取代基取代的(“取代的炔基”)。在某些实施方案中,炔基是未取代的C₂₋₁₀炔基。在某些实施方案中,炔基是取代的C₂₋₁₀炔基。

[0054] “稠合的”或“邻位稠合的”在本文中可互换使用,并且指具有两个原子和一个共同键的两个环,例如,

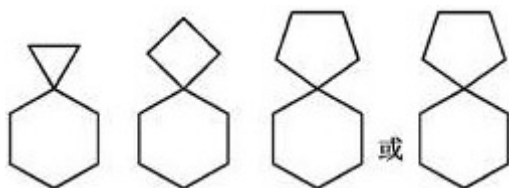


萘

[0055] “桥连的”指含有以下的环系统:(1)连接同一环的两个或更多个不相邻位置的桥头原子或一组原子;或(2)连接环系统的不同环的两个或更多个位置,并且从而不形成邻位稠合环的桥头原子或一组原子,例如,



[0056] “螺”或“螺稠合的”指这样的一组原子,其连接至碳环或杂环系统的同一原子(偕附着),从而形成环,例如,



还考虑了在桥头原子处的螺稠合。

[0057] “碳环基”或“碳环的”指在非芳环系统中具有3至14个环碳原子、以及零个杂原子的非芳环状烃基的基(“C₃₋₁₄碳环基”)。在某些实施方案中,碳环基指在非芳环系统中具有3至10个环碳原子、以及零个杂原子的非芳环状烃基的基(C₃₋₁₀碳环基”)。在一些实施方案中,碳环基具有3至8个环碳原子(“C₃₋₈碳环基”)。在一些实施方案中,碳环基具有3至6个环碳原子(“C₃₋₆碳环基”)。在一些实施方案中,碳环基具有3至6个环碳原子(“C₃₋₆碳环基”)。在一些实施方案中,碳环基具有5至10个环碳原子(“C₅₋₁₀碳环基”)。示例性的C₃₋₆碳环基包括但不限于环丙基(C₃)、环丙烯基(C₃)、环丁基(C₄)、环丁烯基(C₄)、环戊基(C₅)、环戊烯基(C₅)、环己基(C₆)、环己烯基(C₆)、环己二烯基(C₆)等等。示例性的C₃₋₈碳环基包括但不限于上述C₃₋₆碳环基以及环庚基(C₇)、环庚烯基(C₇)、环庚二烯基(C₇)、环庚三烯基(C₇)、环辛基

(C₈)、环辛烯基(C₈)、双环[2.2.1]庚烷基(C₇)、双环[2.2.2]辛烷基(C₈)等等。示例性的C₃₋₁₀碳环基包括但不限于上述C₃₋₈碳环基以及环壬基(C₉)、环壬烯基(C₉)、环癸基(C₁₀)、环癸烯基(C₁₀)、八氢-1H-茛基(C₉)、十氢萘基(C₁₀)、螺[4.5]癸基(C₁₀)等等。如前述实例所示,在某些实施方案中,碳环基是单环的(“单环碳环基”),或者稠合、桥接或螺稠合的环系统例如双环系统(“双环碳环基”),并且可以是饱和的或可以是部分不饱和的。“碳环基”还包括其中如上文定义的碳环基环与一个或多个芳基或杂芳基稠合的环系统,其中附着点在碳环基环上,并且在这种情况下,碳数目继续指定碳环系统中的碳数目。在某些实施方案中,碳环基的每个实例独立地是任选取代的,例如未取代的(“未取代的碳环基”)或者由一个或多个取代基取代的(“取代的碳环基”)。在某些实施方案中,碳环基是未取代的C₃₋₁₀碳环基。在某些实施方案中,碳环基是取代的C₃₋₁₀碳环基。

[0058] 在一些实施方案中,“碳环基”是具有3至14个环碳原子的单环、饱和碳环基(“C₃₋₁₄环烷基”)。在一些实施方案中,“碳环基”是具有3至10个环碳原子的单环、饱和碳环基(“C₃₋₁₀环烷基”)。在一些实施方案中,环烷基具有3至8个环碳原子(“C₃₋₈环烷基”)。在一些实施方案中,环烷基具有3至6个环碳原子(“C₃₋₆环烷基”)。在一些实施方案中,环烷基具有5至6个环碳原子(“C₅₋₆环烷基”)。在一些实施方案中,环烷基具有5至10个环碳原子(“C₅₋₁₀环烷基”)。C₅₋₆环烷基的实例包括环戊基(C₅)和环己基(C₆)。C₃₋₆环烷基的实例包括上述C₅₋₆环烷基以及环丙基(C₃)和环丁基(C₄)。C₃₋₈环烷基的实例包括上述C₅₋₆环烷基以及环庚基(C₇)和环辛基(C₈)。在某些实施方案中,环烷基的每个实例独立地是未取代的(“未取代的环烷基”)或者由一个或多个取代基取代的(“取代的环烷基”)。在某些实施方案中,环烷基是未取代的C₃₋₁₀环烷基。在某些实施方案中,环烷基是取代的C₃₋₁₀环烷基。

[0059] “杂环基”或“杂环的”指具有环碳原子和1至4个环杂原子的3至14元非芳环系统的基,其中每个杂原子独立地选自氮、氧和硫(“3-14元杂环基”)。在某些实施方案中,杂环基或杂环的指具有环碳原子和1-4个环杂原子的3-10元非芳环系统的基,其中每个杂原子独立地选自氮、氧和硫(“3-10元杂环基”)。当化合价允许时,在含有一个或多个氮原子的杂环基中,附着点可以是碳或氮原子。杂环基可以是单环的(“单环杂环基”),或者稠合、桥接或螺稠合的环系统例如双环系统(“双环杂环基”),并且可以是饱和的或可以是部分不饱和的。杂环基双环系统可以包括在一个或两个环中的一个或多个杂原子。“杂环基”还包括其中如上文定义的杂环基环与一个或多个碳环基稠合的环系统,其中附着点在碳环基或杂环基环上,或者其中如上文定义的杂环基环与一个或多个芳基或杂芳基稠合的环系统,其中附着点在杂环基环上,并且在这种情况下,环成员数目继续指定杂环基环系统中的环成员数目。在某些实施方案中,杂环基的每个实例独立地是任选取代的,例如未取代的(“未取代的杂环基”)或者由一个或多个取代基取代的(“取代的杂环基”)。在某些实施方案中,杂环基是未取代的3-10元杂环基。在某些实施方案中,杂环基是取代的3-10元杂环基。

[0060] 在一些实施方案中,杂环基是具有环碳原子和1-4个环杂原子的5-10元非芳环系统(“5-10元杂环基”),其中每个杂原子独立地选自氮、氧和硫。在一些实施方案中,杂环基是具有环碳原子和1-4个环杂原子的5-8元非芳环系统(“5-8元杂环基”),其中每个杂原子独立地选自氮、氧和硫。在一些实施方案中,杂环基是具有环碳原子和1-4个环杂原子的5-6元非芳环系统(“5-6元杂环基”),其中每个杂原子独立地选自氮、氧和硫。在一些实施方案中,5-6元杂环基具有独立地选自氮、氧和硫的1-3个环杂原子。在一些实施方案中,5-6元杂

环基具有独立地选自氮、氧和硫的1-2个环杂原子。在一些实施方案中,5-6元杂环基具有选自氮、氧和硫的一个环杂原子。

[0061] 含有一个杂原子的示例性的3元杂环基包括但不限于氮杂环丙烷基、氧杂环丙烷基和硫杂环丙烷基。含有一个杂原子的示例性的4元杂环基包括但不限于氮杂环丁烷基、氧杂环丁烷基和硫杂环丁烷基。含有一个杂原子的示例性的5元杂环基包括但不限于四氢咪喃基、二氢咪喃基、四氢噻吩基、二氢噻吩基、吡咯烷基、二氢吡咯基和吡咯基-2,5-二酮。含有两个杂原子的示例性的5元杂环基包括但不限于二氧戊环基、氧硫杂环戊烷基、二硫杂环戊烷基和噁唑烷-2-酮。含有三个杂原子的示例性的5元杂环基包括但不限于三唑啉基、噁二唑啉基和噻二唑啉基。含有一个杂原子的示例性的6元杂环基包括但不限于哌啶基、四氢吡喃基、二氢吡啶基和硫杂环己烷基。含有两个杂原子的示例性的6元杂环基包括但不限于哌嗪基、吗啉基、二硫杂环己烷基和二噁烷基。含有三个杂原子的示例性的6元杂环基包括但不限于三嗪烷基。含有一个杂原子的示例性的7元杂环基包括但不限于氮杂环庚烷基、氧杂环庚烷基和硫杂环庚烷基。含有一个杂原子的示例性的8元杂环基包括但不限于氮杂环辛基、氧杂环辛基和硫杂环辛基。与C₆芳基环稠合的示例性的5元杂环基(在本文中也称为5,6-双环杂环)包括但不限于二氢吡啶基、异二氢吡啶基、二氢苯并咪喃基、二氢苯并噻吩基、苯并噁唑啉酮基等等。与芳基环稠合的示例性的6元杂环基(在本文中也称为6,6-双环杂环)包括但不限于四氢喹啉基、四氢异喹啉基等等。

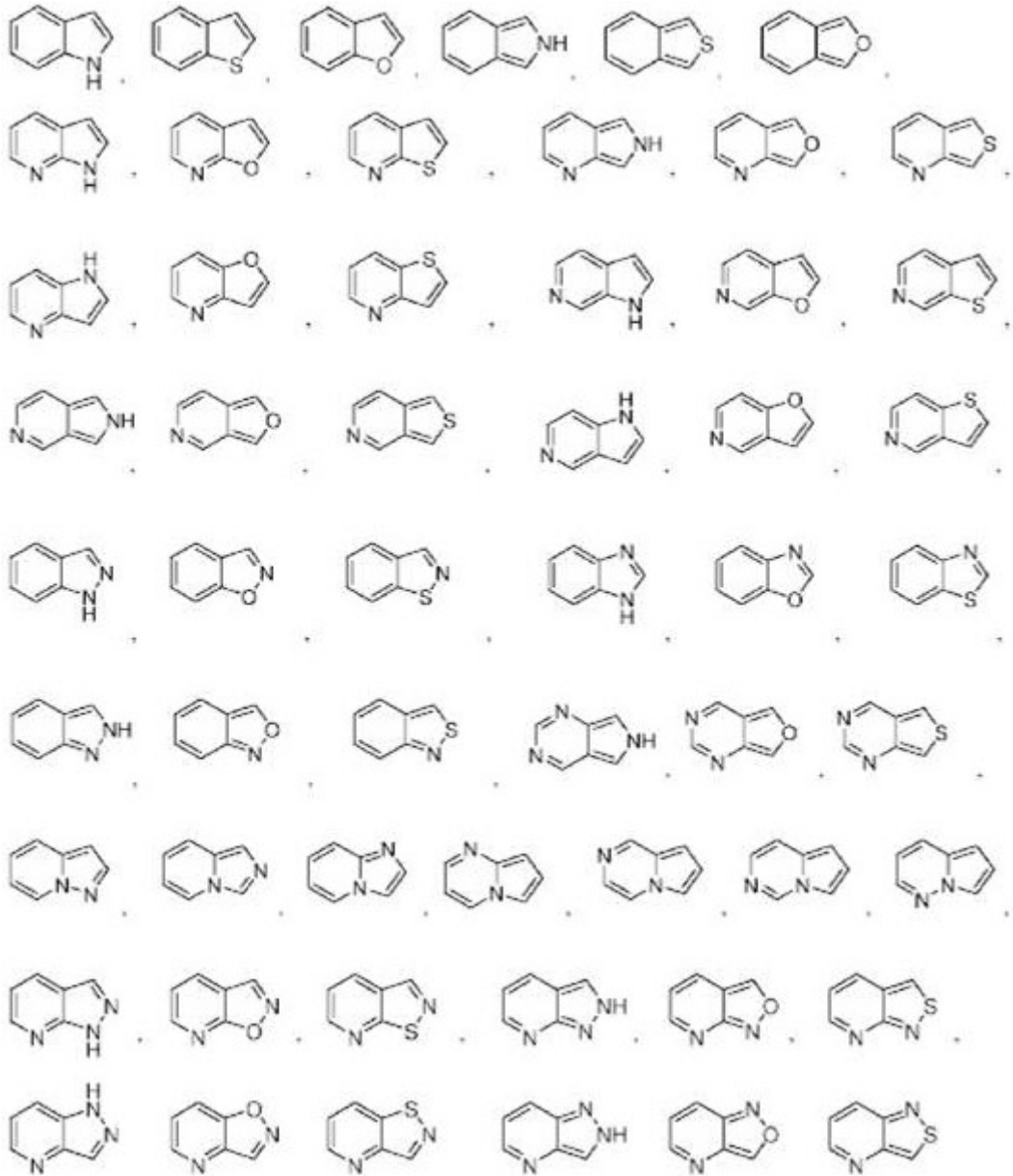
[0062] “芳基”指单环或多环(例如,双环或三环)4n+2芳环系统(例如,具有在环状阵列中共享的6、10或14个π电子)的基(“C₆₋₁₄芳基”),其具有在芳环系统中提供的6-14个环碳原子和零个杂原子。在一些实施方案中,芳基具有六个环碳原子(“C₆芳基”;例如苯基)。在一些实施方案中,芳基具有十个环碳原子(“C₁₀芳基”;例如萘基,例如1-萘基和2-萘基)。在一些实施方案中,芳基具有十四个环碳原子(“C₁₄芳基”;例如蒽基)。“芳基”还包括其中如上文定义的芳基环与一个或多个碳环基或杂环基稠合的环系统,其中基或附着点在芳基环上,并且在这种情况下,碳原子数目继续指定芳基环系统中的碳原子数目。在某些实施方案中,芳基的每个实例独立地是任选取代的,例如未取代的(“未取代的芳基”)或者由一个或多个取代基取代的(“取代的芳基”)。在某些实施方案中,芳基是未取代的C₆₋₁₄芳基。在某些实施方案中,芳基是取代的C₆₋₁₄芳基。

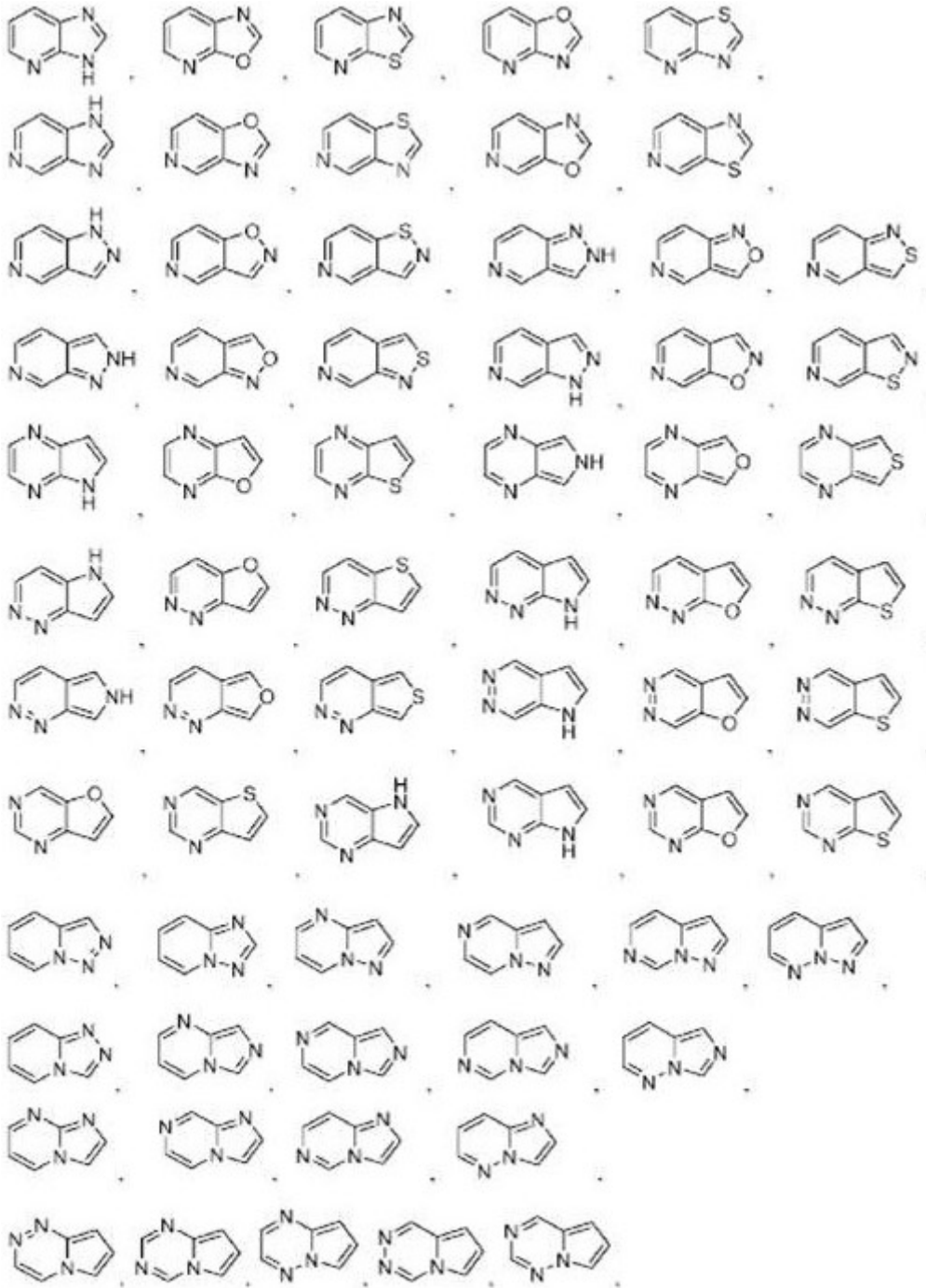
[0063] “杂芳基”指5-14元单环或多环(例如,双环或三环)4n+2芳环系统(例如,具有在环状阵列中共享的6或10个π电子)的基(“5-14元杂芳基”),其具有在芳环系统中提供的环碳原子和1-4个环杂原子,其中每个杂原子独立地选自氮、氧和硫。在某些实施方案中,杂芳基指5-10元单环或双环4n+2芳环系统的基(“5-10元杂芳基”),其具有在芳环系统中提供的环碳原子和1-4个环杂原子,其中每个杂原子独立地选自氮、氧和硫。当化合价允许时,在含有一个或多个氮原子的杂芳基中,附着点可以是碳或氮原子。杂芳基双环系统可以包括在一个或两个环中的一个或多个杂原子。“杂芳基”包括其中如上文定义的杂芳基环与一个或多个碳环基或杂环基稠合的环系统,其中附着点在杂芳基环上,并且在这种情况下,环成员数目继续指定杂芳基环系统中的环成员数目。“杂芳基”还包括其中如上文定义的杂芳基环与一个或多个芳基稠合的环系统,其中附着点在芳基或杂芳基环上,并且在这种情况下,环成员数目指定稠合的(芳基/杂芳基)环系统中的环成员数目。其中一个环不含有杂原子的双环杂芳基(例如吡啶基、喹啉基、咪唑基等等),附着点可以在任一环上,例如带有杂原子的

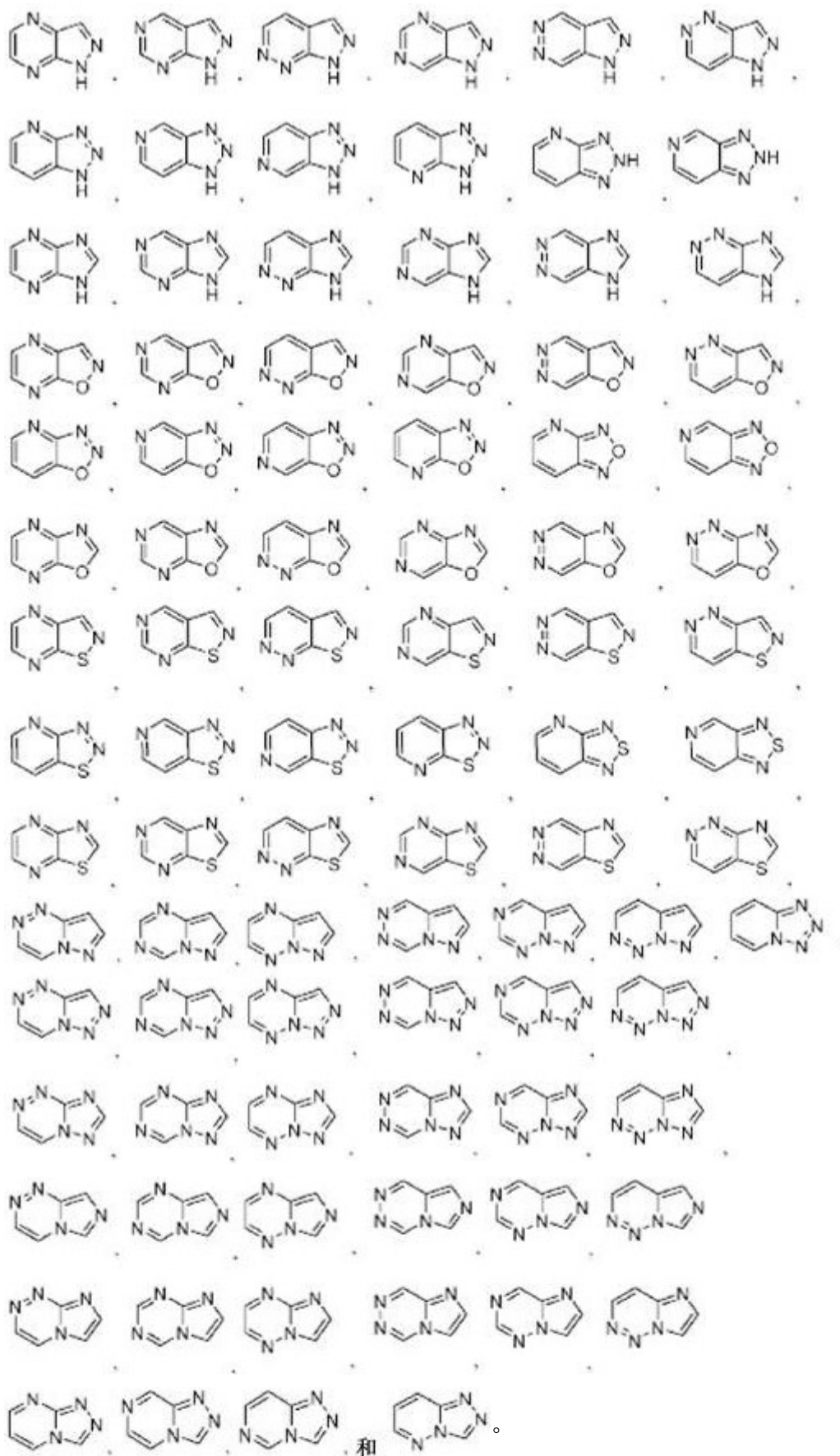
环(例如2-吡啶基)或不含有杂原子的环(例如5-吡啶基)。

[0064] 在一些实施方案中,杂芳基是具有在芳环系统中提供的环碳原子和1-4个环杂原子的5-14元芳环系统(“5-14元杂芳基”),其中每个杂原子独立地选自氮、氧和硫。在一些实施方案中,杂芳基是具有在芳环系统中提供的环碳原子和1-4个环杂原子的5-10元芳环系统(“5-10元杂芳基”),其中每个杂原子独立地选自氮、氧和硫。在一些实施方案中,杂芳基是具有在芳环系统中提供的环碳原子和1-4个环杂原子的5-8元芳环系统(“5-8元杂芳基”),其中每个杂原子独立地选自氮、氧和硫。在一些实施方案中,杂芳基是具有在芳环系统中提供的环碳原子和1-4个环杂原子的5-6元芳环系统(“5-6元杂芳基”),其中每个杂原子独立地选自氮、氧和硫。在一些实施方案中,5-6元杂芳基具有独立地选自氮、氧和硫的1-3个环杂原子。在一些实施方案中,5-6元杂芳基具有独立地选自氮、氧和硫的1-2个环杂原子。在一些实施方案中,5-6元杂芳基具有选自氮、氧和硫的1个环杂原子。在某些实施方案中,杂芳基的每个实例独立地是任选取代的,例如未取代的(“未取代的杂芳基”)或者由一个或多个取代基取代的(“取代的杂芳基”)。在某些实施方案中,杂芳基是未取代的5-14元杂芳基。在某些在实施方案中,杂芳基是取代的5-14元杂芳基。

[0065] 含有一个杂原子的示例性的5元杂芳基包括但不限于吡咯基、呋喃基和噻吩基。含有两个杂原子的示例性的5元杂芳基包括但不限于咪唑基、吡唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基和异噻唑基。含有三个杂原子的示例性的5元杂芳基包括但不限于三唑基、噁二唑基和噻二唑基。含有四个杂原子的示例性的5元杂芳基包括但不限于四唑基。含有一个杂原子的示例性的6元杂芳基包括但不限于吡啶基。含有两个杂原子的示例性的6元杂芳基包括但不限于哒嗪基、嘧啶基和吡嗪基。含有三个或四个杂原子的示例性的6元杂芳基分别包括但不限于三嗪基和四嗪基。含有一个杂原子的示例性的7元杂芳基包括但不限于氮杂环庚三烯基、氧杂环庚三烯基和硫杂环庚三烯基。示例性的6,6-双环杂芳基包括但不限于萘啶基、蝶啶基、喹啉基、异喹啉基、噌啉基、喹喔啉基、酞嗪基和喹唑啉基。示例性的5,6-双环杂芳基包括但不限于下式中的任何一个:







[0066] 当化合价允许时,在任何单环或双环杂芳基中,附着点可以是任何碳或氮原子。

[0067] “部分不饱和的”指包括至少一个双键或三键的基团。术语“部分不饱和的”预期涵盖具有多重不饱和位点的环,但并不预期包括如本文定义的芳族基团(例如,芳基或杂芳基)。同样地,“饱和的”指不含有双键或三键,即,全部含有单键的基团。

[0068] 在一些实施方案中,如本文定义的烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基和杂芳基是任选取代的(例如,“取代的”或“未取代的”脂族、“取代的”或“未取代的”烷基、“取代的”或“未取代的”烯基、“取代的”或“未取代的”炔基、“取代的”或“未取代的”碳环基、“取代的”或“未取代的”杂环基、“取代的”或“未取代的”芳基、或者“取代的”或“未取代的”杂芳基)。一般而言,术语“取代的”,无论之前是否为术语“任选地”,意指基团(例如碳或氮原子)上存在的至少一个氢由允许的取代基替换,所述允许的取代基例如在取代后导致稳定化合物的取代基,所述稳定化合物例如不会自发地经历例如通过重排、环化、消除或其它反应的转化的化合物。除非另有说明,否则“取代的”基团在该基团的一个或多个可取代位置处具有取代基,并且当任何给定结构中的多于一个位置被取代时,取代基在每个位置处是相同的或不同的。考虑术语“取代的”包括由有机化合物的所有允许的取代基的取代,包括导致稳定化合物形成的本文所述的任何取代基。本公开内容考虑了任何和所有此类组合,以便得到稳定化合物。为了本公开内容的目的,杂原子如氮可以具有氢取代基和/或如本文所述的任何合适的取代基,其满足杂原子的化合价并导致稳定部分的形成。

[0069] 示例性的碳原子取代基包括但不限于卤素、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{ON}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_3^+\text{X}$ 、 $-\text{N}(\text{OR}^{\text{cc}})\text{R}^{\text{bb}}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SSR}^{\text{cc}}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CHO}$ 、 $-\text{C}(\text{OR}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OCO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{C}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{CO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OC}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OC}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{OC}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{C}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{bb}}\text{SO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{SO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OSO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{S}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OS}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{Si}(\text{R}^{\text{aa}})_3$ 、 $-\text{OSi}(\text{R}^{\text{aa}})_3$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{SR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{SR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SC}(=\text{S})\text{SR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SC}(=\text{O})\text{SR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{SR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SC}(=\text{O})\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SC}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{P}(=\text{O})_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{R}^{\text{aa}})_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{R}^{\text{aa}})_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})_2\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})_2\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{NR}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{NR}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{P}(=\text{O})(\text{OR}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{P}(=\text{O})(\text{NR}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{P}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{P}(\text{R}^{\text{cc}})_3$ 、 $-\text{OP}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{OP}(\text{R}^{\text{cc}})_3$ 、 $-\text{B}(\text{R}^{\text{aa}})_2$ 、 $-\text{B}(\text{OR}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{BR}^{\text{aa}}(\text{OR}^{\text{cc}})$ 、 C_{1-10} 烷基、 C_{1-10} 全卤代烷基、 C_{2-10} 烯基、 C_{2-10} 炔基、 C_{3-10} 碳环基、3-14元杂环基、 C_{6-14} 芳基和5-14元杂芳基,其中每个烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基和杂芳基独立地由0、1、2、3、4或5个 R^{dd} 基团取代;

或者碳原子上的两个偕氢由以下替换:基团= O 、 $=\text{S}$ 、 $=\text{NN}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $=\text{NNR}^{\text{bb}}\text{C}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $=\text{NNR}^{\text{bb}}\text{C}(=\text{O})\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $=\text{NNR}^{\text{bb}}\text{S}(=\text{O})_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $=\text{NR}^{\text{bb}}$ 或 $=\text{NOR}^{\text{cc}}$; R^{aa} 的每个实例独立地选自 C_{1-10} 烷基、 C_{1-10} 全卤代烷基、 C_{2-10} 烯基、 C_{2-10} 炔基、 C_{3-10} 碳环基、3-14元杂环基、 C_{6-14} 芳基和5-14元杂芳基,或者两个 R^{aa} 基团连接以形成3-14元杂环基或5-14元杂芳基环,其中每个烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基和杂芳基独立地由0、1、2、3、4或5个 R^{dd} 基团取代;

R^{bb} 的每个实例独立地选自氢、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{cc}})\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{cc}})\text{N}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^{\text{cc}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{OR}^{\text{cc}}$ 、 $-\text{SOR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{SR}^{\text{cc}}$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{SR}^{\text{cc}}$ 、 $-\text{P}(=\text{O})_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{R}^{\text{aa}})_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})_2\text{N}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{NR}^{\text{cc}})_2$ 、 C_{1-10} 烷基、 C_{1-10} 全卤代烷基、 C_{2-10} 烯基、 C_{2-10} 炔基、 C_{3-10} 碳环基、3-14元杂环基、 C_{6-14} 芳基和5-14元杂芳基,或者两个 R^{bb} 基团连接以形成3-14元杂环基或5-14元杂芳基环,

其中每个烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基和杂芳基独立地由0、1、2、3、4或5个R^{dd}基团取代；

R^{cc}的每个实例独立地选自氢、C₁₋₁₀烷基、C₁₋₁₀全卤代烷基、C₂₋₁₀烯基、C₂₋₁₀炔基、C₃₋₁₀碳环基、3-14元杂环基、C₆₋₁₄芳基和5-14元杂芳基，或者两个R^{cc}基团连接以形成3-14元杂环基或5-14元杂芳基环，其中每个烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基和杂芳基独立地由0、1、2、3、4或5个R^{dd}基团取代；

R^{dd}的每个实例独立地选自卤素、-CN、-NO₂、-N₃、-SO₂H、-SO₃H、-OH、-OR^{ee}、-ON(R^{ff})₂、-N(R^{ff})₂、-N(R^{ff})₃⁺X⁻、-N(OR^{ee})R^{ff}、-SH、-SR^{ee}、-SSR^{ee}、-C(=O)R^{ee}、-CO₂H、-CO₂R^{ee}、-OC(=O)R^{ee}、-OCO₂R^{ee}、-C(=O)N(R^{ff})₂、-OC(=O)N(R^{ff})₂、-NR^{ff}C(=O)R^{ee}、-NR^{ff}CO₂R^{ee}、-NR^{ff}C(=O)N(R^{ff})₂、-C(=NR^{ff})OR^{ee}、-OC(=NR^{ff})R^{ee}、-OC(=NR^{ff})OR^{ee}、-C(=NR^{ff})N(R^{ff})₂、-OC(=NR^{ff})N(R^{ff})₂、-NR^{ff}C(=NR^{ff})N(R^{ff})₂、-NR^{ff}SO₂R^{ee}、-SO₂N(R^{ff})₂、-SO₂R^{ee}、-SO₂OR^{ee}、-OSO₂R^{ee}、-S(=O)R^{ee}、-Si(R^{ee})₃、-OSi(R^{ee})₃、-C(=S)N(R^{ff})₂、-C(=O)SR^{ee}、-C(=S)SR^{ee}、-SC(=S)SR^{ee}、-P(=O)₂R^{ee}、-P(=O)(R^{ee})₂、-OP(=O)(R^{ee})₂、-OP(=O)(OR^{ee})₂、C₁₋₆烷基、C₁₋₆全卤代烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₁₀碳环基、3-10元杂环基、C₆₋₁₀芳基、5-10元杂芳基，其中每个烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基和杂芳基独立地由0、1、2、3、4或5个R^{sg}基团取代，或者两个偕R^{dd}取代基可以连接以形成=O或=S；

R^{ee}的每个实例独立地选自C₁₋₆烷基、C₁₋₆全卤代烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₁₀碳环基、C₆₋₁₀芳基、3-10元杂环基和3-10元杂芳基，其中每个烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基和杂芳基独立地由0、1、2、3、4或5个R^{sg}基团取代；

R^{ff}的每个实例独立地选自氢、C₁₋₆烷基、C₁₋₆全卤代烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₁₀碳环基、3-10元杂环基、C₁₋₆芳基和5-10元杂芳基，或者两个R^{ff}基团连接以形成3-14元杂环基或5-14元杂芳基环，其中每个烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基和杂芳基独立地由0、1、2、3、4或5个R^{sg}基团取代；

R^{sg}的每个实例独立地是卤素、-CN、-NO₂、-N₃、-SO₂H、-SO₃H、-OH、-O₁₋₆烷基、-ON(C₁₋₆烷基)₂、-N(C₁₋₆烷基)₂、-N(C₁₋₆烷基)₃⁺X⁻、-NH(C₁₋₆烷基)₂⁺X⁻、-NH₂(C₁₋₆烷基)⁺X⁻、-NH₃⁺X⁻、-N(OC₁₋₆烷基)(C₁₋₆烷基)、-N(OH)(C₁₋₆烷基)、-NH(OH)、-SH、-S₁₋₆烷基、-SS(C₁₋₆烷基)、-C(=O)(C₁₋₆烷基)、-CO₂H、-CO₂(C₁₋₆烷基)、-OC(=O)(C₁₋₆烷基)、-OCO₂(C₁₋₆烷基)、-C(=O)NH₂、-C(=O)N(C₁₋₆烷基)₂、-OC(=O)NH(C₁₋₆烷基)、-NHC(=O)(C₁₋₆烷基)、-N(C₁₋₆烷基)C(=O)(C₁₋₆烷基)、-NHCO₂(C₁₋₆烷基)、-NHC(=O)N(C₁₋₆烷基)₂、-NHC(=O)NH(C₁₋₆烷基)、-NHC(=O)NH₂、-C(=NH)O(C₁₋₆烷基)、-OC(=NH)(C₁₋₆烷基)、-OC(=NH)OC₁₋₆烷基、-C(=NH)N(C₁₋₆烷基)₂、-C(=NH)NH(C₁₋₆烷基)、-C(=NH)NH₂、-OC(=NH)N(C₁₋₆烷基)₂、-OC(NH)NH(C₁₋₆烷基)、-OC(NH)NH₂、-NHC(NH)N(C₁₋₆烷基)₂、-NHC(=NH)NH₂、-NHSO₂(C₁₋₆烷基)、-SO₂N(C₁₋₆烷基)₂、-SO₂NH(C₁₋₆烷基)、-SO₂NH₂、-SO₂C₁₋₆烷基、-SO₂OC₁₋₆烷基、-OSO₂C₁₋₆烷基、-SOC₁₋₆烷基、-Si(C₁₋₆烷基)₃、-OSi(C₁₋₆烷基)₃、-C(=S)N(C₁₋₆烷基)₂、C(=S)NH(C₁₋₆烷基)、C(=S)NH₂、-C(=O)S(C₁₋₆烷基)、-C(=S)SC₁₋₆烷基、-SC(=S)SC₁₋₆烷基、-P(=O)₂(C₁₋₆烷基)、-P(=O)(C₁₋₆烷基)₂、-OP(=O)(C₁₋₆烷基)₂、-OP(=O)(OC₁₋₆烷基)₂、C₁₋₆烷基、C₁₋₆全卤代烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₁₀碳环基、C₆₋₁₀芳基、3-10元杂环基、5-10元杂芳基；或者两个偕R^{sg}取代基可以连接以形成=O或=S；其中X是抗衡离子。

[0070] “抗衡离子”或“阴离子抗衡离子”是与阳离子季氨基结合的带负电荷的基团，以便维持电子中性。示例性的抗衡离子包括卤素离子(例如F⁻、Cl⁻、Br⁻、I⁻)、NO₃⁻、ClO₄⁻、OH⁻、

H_2PO_4^- 、 HSO_4^- 、磺酸根离子(例如甲磺酸根、三氟甲烷磺酸根、对甲苯磺酸根、苯磺酸根、10-樟脑磺酸根、萘-2-磺酸根、萘-1-磺酸-5-磺酸根、乙烷-1-磺酸-2-磺酸根等等)、以及羧酸根离子(例如乙酸根、乙烷酸根、丙酸根、苯甲酸根、甘油酸根、乳酸根、酒石酸根、乙醇酸根等等)。

[0071] “卤代”或“卤素”指氟(氟代,-F),氯(氯代,-Cl),溴(溴代,-Br)或碘(碘代,-I)。

[0072] 当化合价允许时,氮原子可以是取代的或未取代的,并且包括伯、仲、叔和季氮原子。示例性的氮原子取代基包括但不限于氢、-OH、-OR^{aa}、-N(R^{cc})₂、-CN、-C(=O)R^{aa}、-C(=O)N(R^{cc})₂、-CO₂R^{aa}、-SO₂R^{aa}、-C(=NR^{bb})R^{aa}、-C(=NR^{cc})OR^{aa}、-C(=NR^{cc})N(R^{cc})₂、-SO₂N(R^{cc})₂、-SO₂R^{cc}、-SO₂OR^{cc}、-SOR^{aa}、-C(=S)N(R^{cc})₂、-C(=O)SR^{cc}、-C(=S)SR^{cc}、-P(=O)R^{aa}、-P(=O)(R^{aa})₂、-P(=O)₂N(R^{cc})₂、-P(=O)(NR^{cc})₂、C₁₋₁₀烷基、C₁₋₁₀全卤代烷基、C₂₋₁₀烯基、C₂₋₁₀炔基、C₃₋₁₀碳环基、3-14元杂环基、C₆₋₁₄芳基和5-14元杂芳基,或者附着至氮原子的两个R^{cc}基团连接以形成3-14元杂环基或5-14元杂芳基环,其中每个烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基和杂芳基独立地由0、1、2、3、4或5个R^{dd}基团取代,并且其中R^{aa}、R^{bb}、R^{cc}和R^{dd}如上文定义。

[0073] 在某些实施方案中,存在于氮原子上的取代基是氮保护基团(也称为氨基保护基团)。氮保护基团包括但不限于-OH、-OR^{aa}、-N(R^{cc})₂、-C(=O)R^{aa}、-C(=O)N(R^{cc})₂、-CO₂R^{aa}、-SO₂R^{aa}、-C(=NR^{cc})R^{aa}、-C(=NR^{cc})OR^{aa}、-C(=NR^{cc})N(R^{cc})₂、-SO₂N(R^{cc})₂、-SO₂R^{cc}、-SO₂OR^{cc}、-SOR^{aa}、-C(=S)N(R^{cc})₂、-C(=O)SR^{cc}、-C(=S)SR^{cc}、C₁₋₁₀烷基{例如芳烷基、杂芳烷基}、C₂₋₁₀烯基、C₂₋₁₀炔基、C₃₋₁₀碳环基、3-14元杂环基、C₆₋₁₄芳基和5-14元杂芳基,其中每个烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳烷基、芳基和杂芳基独立地由0、1、2、3、4或5个R基团取代,并且其中R^{aa}、R^{bb}、R^{cc}和R^{dd}如本文定义。氮保护基团是本领域众所周知的,并且包括在引入本文作为参考的下述中详细描述的那些:Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene 和 P. G. M. Wuts, 第3版, John Wiley & Sons, 1999。

[0074] 酰胺氮保护基团(例如-C(=O)R^{aa})包括但不限于甲酰胺、乙酰胺、氯乙酰胺、三氯乙酰胺、三氟乙酰胺、苯乙酰胺、3-苯丙酰胺、吡啶酰胺、3-吡啶甲酰胺、N-苯甲酰基苯丙氨酰基衍生物、苯甲酰胺、对苯基苯甲酰胺、邻硝基苯乙酰胺、邻硝基苯氧基乙酰胺、乙酰乙酰胺、(N'-二硫代苯氧基酰氨基)乙酰胺、3-[对羟基苯基]丙酰胺、3-(邻硝基苯基)丙酰胺、2-甲基-2-(邻硝基苯氧基)丙酰胺、2-甲基-2-(邻苯基偶氮苯氧基)丙酰胺、4-氯丁酰胺、3-甲基-3-硝基丁酰胺、邻硝基肉桂酰胺、N-乙酰甲硫氨酸、邻硝基苯甲酰胺和邻(苯甲酰氧基甲基)苯甲酰胺。

[0075] 氨基甲酸酯氮保护基团(例如-C(=O)OR^{aa})包括但不限于甲基氨基甲酸酯、乙基氨基甲酸酯、9-芴甲基氨基甲酸酯(Fmoc)、9-(2-磺基)芴甲基氨基甲酸酯、9-(2,7-二溴)芴甲基氨基甲酸酯、2,7-二叔丁基-[9-(10,10-二氧化-10,10,10,10-四氢噻吨基)]甲基氨基甲酸酯(DBD-Tmoc)、4-甲氧基苯甲酰甲基氨基甲酸酯(Phenoc)、2,2,2-三氯乙基氨基甲酸酯(Troc)、2-三甲基甲硅烷基乙基氨基甲酸酯(Teoc)、2-苯乙基氨基甲酸酯(hZ)、1-(1-金刚烷基)-1-甲基乙基氨基甲酸酯(Adpoc)、1,1-二甲基-2-卤乙基氨基甲酸酯、1,1-二甲基-2,2-二溴乙基氨基甲酸酯(DB-t-BOC)、1,1-二甲基-2,2,2-三氯乙基氨基甲酸酯(TCBOC)、1-甲基-1-(4-联苯基)乙基氨基甲酸酯(Bpoc)、1-(3,5-二叔丁基苯基)-1-甲基乙基氨基甲酸酯(t-Bumeoc)、2-(2'-和4'-吡啶基)乙基氨基甲酸酯(Pyoc)、2-{N,N-二环己基甲酰氨基}乙基氨基甲酸酯、叔丁基氨基甲酸酯(BOC)、1-金刚烷基氨基甲酸酯(Adoc)、乙烯基氨基甲

酸酯 (Voc)、烯丙基氨基甲酸酯 (Alloc)、1-异丙基烯丙基氨基甲酸酯 (Ipaoc)、肉桂基氨基甲酸酯 (Coc)、4-硝基肉桂基氨基甲酸酯 (Noc)、8-喹啉基氨基甲酸酯、*N*-羟基哌啶基氨基甲酸酯、烷基二硫代氨基甲酸酯、苄基氨基甲酸酯 (Cbz)、对甲氧基苄基氨基甲酸酯 (Moz)、对硝基苄基氨基甲酸酯、对溴苄基氨基甲酸酯、对氯苄基氨基甲酸酯、2,4-二氯苄基氨基甲酸酯、4-甲基亚磺酰基苄基氨基甲酸酯 (MsZ)、9-蒎基甲基氨基甲酸酯、二苯基甲基氨基甲酸酯、2-甲基硫代乙基氨基甲酸酯、2-甲基磺酰基乙基氨基甲酸酯、2-(对甲苯磺酰基)乙基氨基甲酸酯、[2-(1,3-二硫杂环己烷基)]甲基氨基甲酸酯 (Dmoc)、4-甲基硫代苄基氨基甲酸酯 (Mtpc)、2,4-二甲基硫代苄基氨基甲酸酯 (Bmpc)、2-磷鎓基乙基氨基甲酸酯 (Peoc)、2-三苯基磷鎓基异丙基氨基甲酸酯 (Ppoc)、1,1-二甲基-2-氰乙基氨基甲酸酯、间氯对酰氧基苄基氨基甲酸酯、对(二羟基硼基)苄基氨基甲酸酯、5-苯并异噁唑基甲基氨基甲酸酯、2-(三氟甲基)-6-色酮基甲基氨基甲酸酯 (Tcroc)、间硝基苄基氨基甲酸酯、3,5-二甲氧基苄基氨基甲酸酯、邻硝基苄基氨基甲酸酯、3,4-二甲氧基-6-硝基苄基氨基甲酸酯、苄基(邻硝基苄基)甲基氨基甲酸酯、叔戊基氨基甲酸酯、*S*-苄基硫代氨基甲酸酯、对氰基苄基氨基甲酸酯、环丁基氨基甲酸酯、环己基氨基甲酸酯、环戊基氨基甲酸酯、环丙基甲基氨基甲酸酯、对癸氧基苄基氨基甲酸酯、2,2-二甲氧基酰基乙烯基氨基甲酸酯、邻(*N,N*-二甲基甲酰氨基)苄基氨基甲酸酯、1,1-二甲基-3-(*N,N*-二甲基甲酰氨基)丙基氨基甲酸酯、1,1-二甲基丙炔基氨基甲酸酯、二(2-吡啶基)甲基氨基甲酸酯、2-咪喃基甲基氨基甲酸酯、2-碘乙基氨基甲酸酯、异冰片基氨基甲酸酯、异丁基氨基甲酸酯、异烟肼基氨基甲酸酯、对-(*p'*-甲氧基苯基偶氮)苄基氨基甲酸酯、1-甲基环丁基氨基甲酸酯、1-甲基环己基氨基甲酸酯、1-甲基-1-环丙基甲基氨基甲酸酯、1-甲基-1-(3,5-二甲氧基苯基)乙基氨基甲酸酯、1-甲基-1-(对苯基偶氮苯基)乙基氨基甲酸酯、1-甲基-1-苄乙基氨基甲酸酯、1-甲基-1-(4-吡啶基)乙基氨基甲酸酯、苄基氨基甲酸酯、对-(苯基偶氮)苄基氨基甲酸酯、2,4,6-三叔丁基苄基氨基甲酸酯、4-(三甲基铵)苄基氨基甲酸酯和2,4,6-三甲基苄基氨基甲酸酯。

[0076] 磺酰胺氮保护基团(例如-S(=O)₂R^{aa})包括但不限于对甲苯磺酰胺(Ts)、苯磺酰胺、2,3,6-三甲基-4-甲氧基苯磺酰胺(Mtr)、2,4,6-三甲氧基苯磺酰胺(Mtb)、2,6-二甲氧基-4-甲氧基苯磺酰胺(Pme)、2,3,5,6-四甲基-4-甲氧基苯磺酰胺(Mte)、4-甲氧基苯磺酰胺(Mbs)、2,4,6-三甲基苯磺酰胺(Mts)、2,6-二甲氧基-4-甲基苯磺酰胺(iMds)、2,2,5,7,8-五甲基色满-6-磺酰胺(Pmc)、甲磺酰胺(Ms)、β-三甲基甲硅烷基乙磺酰胺(SES)、9-蒎磺酰胺、4-(4',8'-二甲氧基萘甲基)苯磺酰胺(DNMBs)、苄基磺酰胺、三氟甲基磺酰胺和苯甲酰甲基磺酰胺。

[0077] 其它氮保护基团包括但不限于吩噻嗪基-(10)-酰基衍生物、*N'*-对甲苯磺酰基氨基酰基衍生物、*N'*-苄基氨基硫代酰基衍生物、*N*-苯甲酰基苯丙酰基衍生物、*N*-乙酰甲硫氨酸衍生物、4,5-二苯基-3-噁唑啉-2-酮、*N*-邻苯二甲酰亚胺、*N*-二硫杂琥珀酰亚胺(Dts)、*N*-2,3-二苯基马来酰亚胺、*N*-2,5-二甲基吡咯、*N*-1,1,4,4-四甲基二甲硅烷基氮杂环戊烷加合物(STABASE)、5-取代的1,3-二甲基-1,3,5-三氮杂环己-2-酮、5-取代的1,3-二苄基-1,3,5-三氮杂环己-2-酮、1-取代的3,5-二硝基-4-吡啶酮、*N*-甲胺、*N*-烯丙胺、*N*-[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲胺(SEM)、*N*-3-乙酰氧基丙胺、*N*-(1-异丙基-4-硝基-2-氧代-3-吡咯啉-3-基)胺、季铵盐、*N*-苄胺、*N*-二(4-甲氧基苯基)甲胺、*N*-5-二苯并环庚基胺、*N*-三苯基甲胺(Tr)、*N*-[(4-甲氧基苯基)二苯基甲基]胺(MMTr)、*N*-9-苯基苄基胺(PhF)、*N*-2,7-二氯-9-

芴基亚甲基胺、*N*-二茂铁基甲基氨基 (Fcm)、*N*-2-吡啶甲基氨基 N' -氧化物、*N*-1,1-二甲基硫代亚甲基胺、*N*-亚苄基胺、*N*-对甲氧基亚苄基胺、*N*-二苯基亚甲基胺、*N*-[(2-吡啶基)均三甲苯基]亚甲基胺、*N*-(N' , N' -二甲基氨基亚甲基)胺、*N,N'*-亚异丙基二胺、*N*-对硝基亚苄基胺、*N*-亚水杨基胺、*N*-5-氯亚水杨基胺、*N*-(5-氯-2-羟苯基)苯基亚甲基胺、*N*-环己亚基胺、*N*-(5,5-二甲基-3-氧代-1-环己烯基)胺、*N*-硼烷衍生物、*N*-二苯基硼酸衍生物、*N*-[苯基(戊酰基铬或钨)酰基]胺、*N*-铜螯合物、*N*-锌螯合物、*N*-硝胺、*N*-亚硝胺、*N*-氧化胺、二苯基膦酰胺 (Dpp)、二甲基硫代膦酰胺 (Mpt)、二苯基硫代膦酰胺 (Ppt)、二烷基氨基磷酸酯、二苄基氨基磷酸酯、二苯基氨基磷酸酯、苯亚磺酰胺、邻硝基苯亚磺酰胺 (Nps)、2,4-二硝基苯亚磺酰胺、五氯苯亚磺酰胺、2-硝基-4-甲氧基苯亚磺酰胺、三苯甲基亚磺酰胺和3-硝基吡啶亚磺酰胺 (Npys)。

[0078] 在某些实施方案中,存在于氧原子上的取代基是氧保护基团(也称为羟基保护基团)。氧保护基团包括但不限于 $-R^{aa}$ 、 $-N(R^{bb})_2$ 、 $-C(=O)SR^{aa}$ 、 $-C(=O)R^{aa}$ 、 $-CO_2R^{aa}$ 、 $-C(=O)N(R^{bb})_2$ 、 $-C(=NR^{bb})R^{aa}$ 、 $-C(=NR^{bb})OR^{aa}$ 、 $-C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$ 、 $-S(=O)R^{aa}$ 、 $-SO_2R^{aa}$ 、 $-Si(R^{aa})_3$ 、 $-P(R^{cc})_2$ 、 $-P(R^{cc})_3$ 、 $-P(=O)_2R^{aa}$ 、 $-P(=O)(R^{aa})_2$ 、 $-P(=O)(OR^{cc})_2$ 、 $-P(=O)_2N(R^{bb})_2$ 和 $-P(=O)(NR^{bb})_2$,其中 R^{aa} 、 R^{bb} 和 R^{cc} 如本文定义。氧保护基团是本领域众所周知的,并且包括在引入本文作为参考的下述中详细描述的那些:Protecting Groups in Organic Synthesis,T. W. Greene和P. G. M. Wuts,第3版,John Wiley & Sons,1999。

[0079] 示例性的氧保护基团包括但不限于甲基、甲氧基甲基(MOM)、甲硫基甲基(MTM)、叔丁基硫甲基、(苯基二甲基甲硅烷基)甲氧基甲基(SMOM)、苄氧基甲基(BOM)、对甲氧基苄氧基甲基(PMBM)、(4-甲氧基苯氧基)甲基(*p*-AOM)、愈创木酚甲基(GUM)、叔丁氧基甲基、4-戊烯氧基甲基(POM)、甲硅烷氧基甲基、2-甲氧基乙氧基甲基(MEM)、2,2,2-三氯乙氧基甲基、双(2-氯乙氧基)甲基、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基甲基(SEMOR)、四氢吡喃基(THP)、3-溴四氢吡喃基、四氢噻喃基、1-甲氧基环己基、4-甲氧基四氢吡喃基(MTHP)、4-甲氧基四氢噻喃基、4-甲氧基四氢噻喃基 S,S -二氧化物、1-[(2-氯-4-甲基)苯基]-4-甲氧基哌啶-4-基(CTMP)、1,4-二噁烷-2-基、四氢呋喃基、四氢硫代呋喃基、2,3,3a,4,5,6,7,7a-八氢-7,8,8-三甲基-4,7-甲基苯并呋喃-2-基、1-乙氧基乙基、1-(2-氯乙氧基)乙基、1-甲基-1-甲氧基乙基、1-甲基-1-苄氧基乙基、1-甲基-1-苄氧基-2-氟乙基、2,2,2-三氯乙基、2-三甲基甲硅烷基乙基、2-(苯基硒基)乙基、叔丁基、烯丙基、对氯苯基、对甲氧基苯基、2,4-二硝基苯基、苄基(Bn)、对甲氧基苄基、3,4-二甲氧基苄基、邻硝基苄基、对硝基苄基、对卤代苄基、2,6-二氯苄基、对氰基苄基、对苯基苄基、2-吡啶甲基、4-吡啶甲基、3-甲基-2-吡啶甲基 N -氧化物、二苯基甲基、*p,p'*-二硝基二苯甲基、5-二苯并环庚基、三苯基甲基、 α -萘基二苯基甲基、对甲氧基苯基二苯基甲基、二(对甲氧基苯基)苯基甲基、三(对甲氧基苯基)甲基、4-(4'-溴苯甲酰甲基氧基苯基)二苯基甲基、4,4',4''-三(4,5-二氯邻苯二甲酰亚胺基苯基)甲基、4,4',4''-三(乙酰丙酰基氧基苯基)甲基、4,4',4''-三(苯甲酰氧基苯基)甲基、3-(咪唑-1-基)双(4',4''-二甲氧基苯基)甲基、1,1-双(4-甲氧基苯基)-1'-萘甲基、9-蒎基、9-(9-苯基)咕吨基、9-(9-苯基-10-氧代)蒎基、1,3-苯并连硫-2-基、苯并异噻唑基 S,S -二氧化物、三甲基甲硅烷基(TMS)、三乙基甲硅烷基(TEs)、三异丙基甲硅烷基(TIPS)、二甲基异丙基甲硅烷基(IPDMS)、二乙基异丙基甲硅烷基(DEIPS)、二甲基叔己基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS)、叔丁基二苯基甲硅烷基(TBDPS)、三苄基甲硅烷基、三对二甲苯基甲

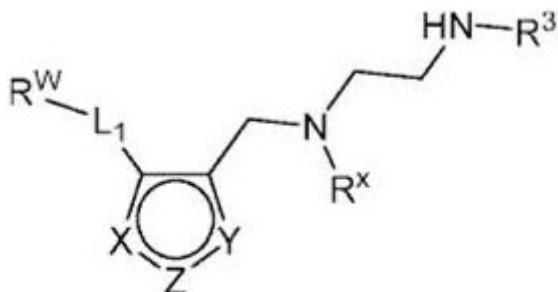
硅烷基、三苯基甲硅烷基、二苯基甲基甲硅烷基 (DPMS)、叔丁基甲氧基苯基甲硅烷基 (TBMPs)、甲酸酯、苯甲酰甲酸酯、乙酸酯、氯乙酸酯、二氯乙酸酯、三氯乙酸酯、三氟乙酸酯、甲氧基乙酸酯、三苯基甲氧基乙酸酯、苯氧乙酸酯、对氯苯氧乙酸酯、3-苯基丙酸酯、4-氧代戊酸酯 (乙酰丙酸酯)、4,4- (亚乙基二硫代) 戊酸酯 (乙酰丙酰基二硫代缩醛)、新戊酸酯、金刚酸酯、巴豆酸酯、4-甲氧基巴豆酸酯、苯甲酸酯、对苯基苯甲酸酯、2,4,6-三甲基苯甲酸酯 (三甲基苯甲酸酯 (mesitoate))、叔丁基碳酸酯 (BOC)、烷基甲基碳酸酯、9-芴甲基碳酸酯 (Fmoc)、烷基乙碳酸酯、烷基2,2,2-三氯乙基碳酸酯 (Troc)、2- (三甲基甲硅烷基) 乙基碳酸酯 (TMSEC)、2- (苯磺酰基) 乙基碳酸酯 (Psec)、2- (三苯基磷鎓基) 乙基碳酸酯 (Peoc)、烷基异丁基碳酸酯、烷基乙烯基碳酸酯、烷基烯丙基碳酸酯、烷基对硝基苯基碳酸酯、烷基苄基碳酸酯、烷基对甲氧基苄基碳酸酯、烷基3,4-二甲氧基苄基碳酸酯、烷基邻硝基苄基碳酸酯、烷基对硝基苄基碳酸酯、烷基S-苄基硫代碳酸酯、4-乙氧基-1-萘基碳酸酯、甲基二硫代碳酸酯、2-碘代苯甲酸酯、4-叠氮基丁酸酯、4-硝基-4-甲基戊酸酯、邻- (二溴甲基) 苯甲酸酯、2-甲酰基苯磺酸酯、2- (甲硫基甲氧基) 乙基、4- (甲硫基甲氧基) 丁酸酯、2- (甲硫基甲氧基甲基) 苯甲酸酯、2,6-二氯-4-甲基苯氧基乙酸酯、2,6-二氯-4- (1,1,3,3-四甲基丁基) 苯氧基乙酸酯、2,4-双 (1,1-二甲基丙基) 苯氧基乙酸酯、氯二苯基乙酸酯、异丁酸酯、单琥珀酸酯、(E)-2-甲基-2-丁烯酸酯、邻 (甲氧基酰基) 苯甲酸酯、 α -萘甲酸酯、硝酸酯、烷基N, N, N', N'-四甲基磷酰二酰胺、烷基N-苯基氨基甲酸酯、硼酸酯、二甲基膦硫酰基、烷基2,4-二硝基苯基亚磺酸酯、硫酸酯、甲烷磺酸酯 (甲磺酸酯)、苄基磺酸酯和甲苯磺酸酯 (Ts)。

[0080] 在某些实施方案中,存在于硫原子上的取代基是硫保护基团 (也称为硫醇保护基团)。硫保护基团包括但不限于 $-R^{aa}$ 、 $-N(R^{bb})_2$ 、 $-C(=O)SR^{aa}$ 、 $-C(=O)R^{aa}$ 、 $-CO_2R^{aa}$ 、 $-C(=O)N(R^{bb})_2$ 、 $-C(=NR^{bb})R^{aa}$ 、 $-C(=NR^{bb})OR^{aa}$ 、 $-C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$ 、 $-S(=O)R^{aa}$ 、 $-SO_2R^{aa}$ 、 $-Si(R^{aa})_3$ 、 $-P(R^{cc})_2$ 、 $-P(R^{cc})_3$ 、 $-P(=O)_2R^{aa}$ 、 $-P(=O)(R^{aa})_2$ 、 $-P(=O)(OR^{cc})_2$ 、 $-P(=O)_2N(R^{bb})_2$ 和 $-P(=O)(NR^{bb})_2$, 其中 R^{aa} 、 R^{bb} 和 R^{cc} 如本文定义。硫保护基团是本领域众所周知的,并且包括在引入本文作为参考的下述中详细描述的那些: Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene 和 P. G. M. Wuts, 第3版, John Wiley & Sons, 1999。

[0081] “药学上可接受的盐”指这样的盐,其在合理的医学判断的范围内,适用于与人和其它动物的组织接触,而无过度毒性、刺激、变应性应答等等,并且与合理的利益/风险比相称。药学上可接受的盐是本领域众所周知的。例如, Berge 等人在 J. Pharmaceutical Sciences (1977) 66:1-19 中详细描述了药学上可接受的盐。本文描述的化合物的药学上可接受的盐包括衍生自合适的无机和有机酸和碱的那些。药学上可接受的、无毒的酸加成盐的实例是由无机酸 (例如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸和高氯酸) 或有机酸 (例如乙酸、草酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸) 形成的氨基盐,或者通过使用本领域中使用的其它方法例如离子交换形成的氨基盐。其它药学上可接受的盐包括己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、葡萄糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘化物、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲烷磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石

酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等等。衍生自适当碱的盐包括碱金属、碱土金属、铵和 $N^+(C_{1-4}\text{烷基})_4$ 盐。代表性的碱金属或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等等。在适当时,进一步的药学上可接受的盐包括季盐。

[0082] 本发明提供了I型PRMT抑制剂。在一个实施方案中,I型PRMT抑制剂是式(I)的化合物:



I

或其药学上可接受的盐,

其中

X是N,Z是 NR^4 ,且Y是 CR^5 ;或

X是 NR^4 ,Z是N,且Y是 CR^5 ;或

X是 CR^5 ,Z是 NR^4 ,且Y是N;或

X是 CR^5 ,Z是N,且Y是 NR^4 ;

R^X 是任选取代的 C_{1-4} 烷基或任选取代的 C_{3-4} 环烷基;

L_1 是键、-O-、-N(R^B)-、-S-、-C(O)-、-C(O)O-、-C(O)S-、-C(O)N(R^B)-、-C(O)N(R^B)N(R^B)-、-OC(O)-、-OC(O)N(R^B)-、-NR B C(O)-、-NR B C(O)N(R^B)-、-NR B C(O)N(R^B)N(R^B)-、-NR B C(O)O-、-SC(O)-、-C(=NR B)-、-C(=NNR B)-、-C(=NOR A)-、-C(=NR B)N(R^B)-、-NR B C(=NR B)-、-C(S)-、-C(S)N(R^B)-、-NR B C(S)-、-S(O)-、-OS(O) $_2$ -、-S(O) $_2$ O-、-SO $_2$ -、-N(R^B)SO $_2$ -、-SO $_2$ N(R^B)-、或者任选取代的 C_{1-6} 饱和或不饱和烃链,其中所述烃链的一个或多个亚甲基单元任选地且独立地由以下替换:-O-、-N(R^B)-、-S-、-C(O)-、-C(O)O-、-C(O)S-、-C(O)N(R^B)-、-C(O)N(R^B)N(R^B)-、-OC(O)-、-OC(O)N(R^B)-、-NR B C(O)-、-NR B C(O)N(R^B)-、-NR B C(O)N(R^B)N(R^B)-、-NR B C(O)O-、-SC(O)-、-C(=NR B)-、-C(=NNR B)-、-C(=NOR A)-、-C(=NR B)N(R^B)-、-NR B C(=NR B)-、-C(S)-、-C(S)N(R^B)-、-NR B C(S)-、-S(O)-、-OS(O) $_2$ -、-S(O) $_2$ O-、-SO $_2$ -、-N(R^B)SO $_2$ -或-SO $_2$ N(R^B)-;

每个 R^A 独立地选自氢、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的碳环基、任选取代的杂环基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、当附着至氧原子时的氧保护基团、以及当附着至硫原子时的硫保护基团;

每个 R^B 独立地选自氢、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的碳环基、任选取代的杂环基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基和氮保护基团,或者同一氮原子上的 R^B 和 R^W 可以连同间插氮一起形成任选取代的杂环;

R^W 是氢、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的碳环基、任选取代的杂环基、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基;条件是当 L_1 是键时, R^W 不是氢、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基;

R^3 是氢、 C_{1-4} 烷基或 C_{3-4} 环烷基;

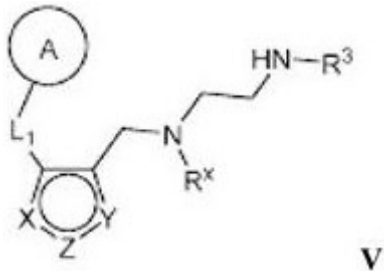
R^4 是氢、任选取代的 C_{1-6} 烷基、任选取代的 C_{2-6} 烯基、任选取代的 C_{2-6} 炔基、任选取代的 C_{3-7} 环烷基、任选取代的4至7元杂环基；或任选取代的 C_{1-4} 烷基-Cy；

Cy是任选取代的 C_{3-7} 环烷基、任选取代的4至7元杂环基、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基；和

R^5 是氢、卤素、-CN、任选取代的 C_{1-4} 烷基或任选取代的 C_{3-4} 环烷基。在一个方面， R^3 是 C_{1-4} 烷基。在一个方面， R^3 是甲基。在一个方面， R^4 是氢。在一个方面， R^5 是氢。在一个方面， L_1 是键。

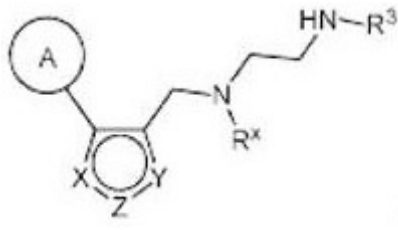
[0083] 在一个实施方案中，I型PRMT抑制剂是式(I)的化合物，其中 $-L_1-R^W$ 是任选取代的碳环基。

[0084] 在一个实施方案中，I型PRMT抑制剂是式(V)的化合物



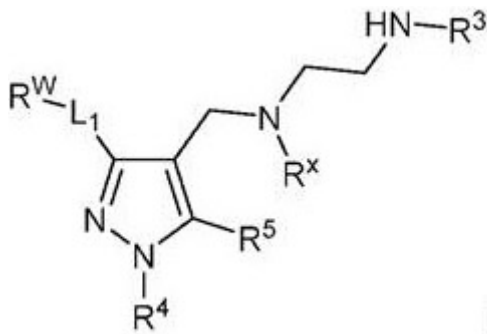
或其药学上可接受的盐，其中环A是任选取代的碳环基、任选取代的杂环基、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基。在一个方面，环A是任选取代的碳环基。在一个方面， R^3 是 C_{1-4} 烷基。在一个方面， R^3 是甲基。在一个方面， R^x 是未取代的 C_{1-4} 烷基。在一个方面， R^x 是甲基。在一个方面， L_1 是键。

[0085] 在一个实施方案中，I型PRMT抑制剂是式(VI)的化合物



或其药学上可接受的盐。在一个方面，环A是任选取代的碳环基。在一个方面， R^3 是 C_{1-4} 烷基。在一个方面， R^3 是甲基。在一个方面， R^x 是未取代的 C_{1-4} 烷基。在一个方面， R^x 是甲基。

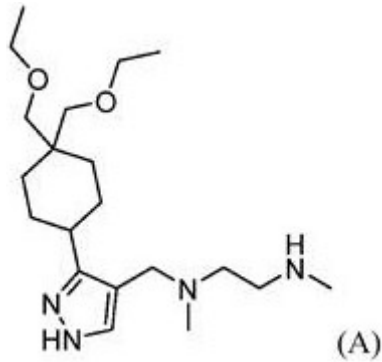
[0086] 在一个实施方案中，I型PRMT抑制剂是式(II)的化合物：



或其药学上可接受的盐。在一个方面， $-L_1-R^W$ 是任选取代的碳环基。在一个方面，

R^3 是 C_{1-4} 烷基。在一个方面, R^3 是甲基。在一个方面, R^x 是未取代的 C_{1-4} 烷基。在一个方面, R^x 是甲基。在一个方面, R^4 是氢。

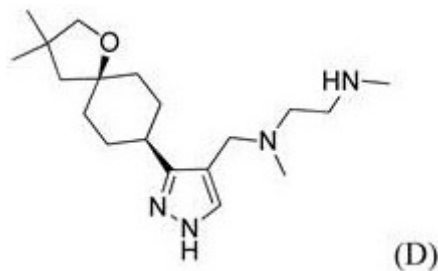
[0087] 在一个实施方案中,I型PRMT抑制剂是化合物A:



或其药学上可接受的盐。化合物A和制备化合物A的方法公开于PCT/US2014/029710的至少第171页(化合物158),以及第266页的第[00331]段中。

[0088] 在一个实施方案中,I型PRMT抑制剂是化合物A·三HCl,化合物A的三HCl形式。在另一个实施方案中,I型PRMT抑制剂是化合物A·单HCl,化合物A的单HCl盐形式。在又一个实施方案中,I型PRMT抑制剂是化合物A·游离碱,化合物A的游离碱形式。在再一个实施方案中,I型PRMT抑制剂是化合物A·二HCl,化合物A的·二HCl盐形式。

[0089] 在一个实施方案中,I型PRMT抑制剂是化合物D:



或其药学上可接受的盐。

[0090] I型PRMT抑制剂进一步公开于PCT/US2014/029710中,其引入本文作为参考。示例性的I型PRMT抑制剂公开于PCT/US2014/029710的表1A和表1B中,并且制备I型PRMT抑制剂的方法至少在PCT/US2014/029710的第226页第[00274]段至第328页第[00050]段中进行描述。

[0091] “抗原结合蛋白(ABP)”意指结合抗原的蛋白,包括以与抗体相似的方式起作用的抗体或改造分子。此类替代抗体形式包括三抗体、四抗体、微型抗体和微体。还包括的是替代支架,其中根据本公开内容的任何分子的一个或多个CDR可以排列到合适的非免疫球蛋白蛋白支架或骨架上,例如亲和体、SpA支架、LDL受体A类结构域、avimer(参见例如,美国专利申请公开号2005/0053973、2005/0089932、2005/0164301)或EGF结构域。ABP还包括此类抗体或其它分子的抗原结合片段。进一步地,ABP可以包含本发明的VH区,当与适当的轻链配对时,所述VH区格式化为全长抗体、(Fab')₂片段、Fab片段、双特异性或双互补位分子或其等同物(例如scFv,双-三-或四体,Tandab等)。ABP可以包含其为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4;或IgM;IgA、IgE或IgD或其修饰的变体的抗体。抗体重链的恒定结构域可以相应地加以选择。轻链恒定结构域可以是 κ 或 λ 恒定结构域。ABP也可以是W086/01533中所述类型的嵌合抗

体,其包含抗原结合区和非免疫球蛋白区。术语“ABP”、“抗原结合蛋白”和“结合蛋白”在本文可互换使用。

[0092] 如本文使用的,“ICOS”意指任何诱导型T细胞共刺激蛋白。ICOS(诱导型T细胞共刺激物)的别名包括AILIM;CD278;CVID1、JTT-1或JTT-2、MGC39850或8F4。ICOS是在激活的T细胞上表达的CD28超家族共刺激分子。由该基因编码的蛋白质属于CD28和CTLA-4细胞表面受体家族。它形成同型二聚体,并且在细胞间信号传导、免疫应答和细胞增殖的调控中起重要作用。人ICOS(同种型2)的氨基酸序列(登录号:UniProtKB -Q9Y6W8-2)在下文显示为SEQ ID NO:9。

```
MKSGLWYFFLFCLRIKVLVTGEINGSANYEMFIFHNGGVQILCKYPDIVQQFKMQLLKGGQILCDLT
KTKGSGNTVSIKSLKFCHSQLSNNSVVSFFLYNLDHSHANYFYFCNLSIFDPPPPFKVTLTGGYLHIYE
SQLCCQLKFWLPIGCAAFVVVCILGCILICWLTKKM (SEQ ID NO:9)
```

[0093] 人ICOS(同种型1)的氨基酸序列(登录号:UniProtKB -Q9Y6W8-1)在下文显示为SEQ ID NO:10。

```
MKSGLWYFFL FCLRIKVLTG EINGSANYEM FIFHNGGVQI LCKYPDIVQQ
FKMQLLKGGQ ILCDLTKTKG SGNTVSIKSL KFCHSQLSNN SVSFFLYNLD
HSHANYFYFCN LSIFDPPPFK VTLTGGYLHI YESQLCCQLK FWLPIGCAAF
VVVCILGCIL ICWLTKKKYS SSVHDPNGEY MFMRAVNTAK KSRLTDVTL
(SEQ ID NO: 10)
```

[0094] ICOS的激活通过经由ICOS-L(B7RP-1/B7-H2)结合而发生。B7-1和B7-2(CD28和CTLA4的配体)两者均不结合或激活ICOS。然而,ICOS-L已显示与CD28和CTLA-4两者弱结合(Yao S等人,“B7-H2 is a costimulatory ligand for CD28 in human”,*Immunity*,34(5);729-40(2011))。ICOS的表达似乎仅限于T细胞。ICOS表达水平在不同的T细胞亚群之间以及在T细胞激活状态上不同。ICOS表达已在静息TH17细胞、T滤泡辅助(TFH)细胞和调节性T(Treg)细胞上显示;然而,与CD28不同;它在幼稚的 T_H1 和 T_H2 效应T细胞群体上并未高度表达(Paulos CM等人,“The inducible costimulator(ICOS)is critical for the development of human Th17 cells”,*Sci Transl Med*,2(55);55ra78(2010))。在通过TCR接合激活之后,ICOS表达在CD4+和CD8+效应T细胞上被高度诱导(Wakamatsu E等人,“Convergent and divergent effects of costimulatory molecules in conventional and regulatory CD4+ T cells”,*Proc Natl Acad Sci USA*,110(3);1023-8(2013))。通过ICOS受体的共刺激信号传导仅在接受同时存在的TCR激活信号的T细胞中发生(Sharpe AH和Freeman GJ. “The B7-CD28 Superfamily”,*Nat. Rev Immunol*,2(2);116-26(2002))。在激活的抗原特异性T细胞中,ICOS调控 T_H1 和 T_H2 细胞因子两者的产生,所述细胞因子包括IFN- γ 、TNF- α 、IL-10、IL-4、IL-13及其它。ICOS还刺激效应T细胞增殖,尽管程度不如CD28(Sharpe AH和Freeman GJ. “The B7-CD28 Superfamily”,*Nat. Rev Immunol*,2(2);116-26(2002))。针对ICOS的抗体以及在疾病治疗中的使用方法,例如在WO 2012/131004、US20110243929和US20160215059中进行描述。US20160215059引入本文作为参考。具有激动剂活性的针对人ICOS的鼠抗体的CDR显示于PCT/EP2012/055735(WO 2012/131004)中。针对ICOS的抗体还公开于WO 2008/137915、WO 2010/056804、EP 1374902、EP1374901和

EP1125585中。针对ICOS或ICOS结合蛋白的激动剂抗体还公开于W02012/13004、W02014/033327、W02016/120789、US20160215059和US20160304610中。US2016/0304610中的示例性抗体包括37A10S713。37A10S713的序列在下文作为SEQ ID NO:11-18再现。

[0095] 37A10S713重链可变区:

EVQLVESGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYWMDWVRQA PGKGLVWVSN IDEDGSITEY
SPFVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCTRWG RFGFDSWGQG TLVTVSS (SEQ. ID
NO:11)

37A10S713轻链可变区:

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLI SGSFNYLTWY QKPGQPPKL LIFYASTRHT
GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCHHHYNAPP TFGPGTKVDI K (SEQ. ID NO:12)

37A10S713 V_H CDR1: GFTFSDYWMD (SEQ. ID NO:13)

37A10S713 V_H CDR2: NIDEDGSITEYSPFVKG (SEQ. ID NO: 14)

37A10S713 V_H CDR3: WGRFGFDS (SEQ. ID. NO: 15)

37A10S713 V_L CDR1: KSSQSLLSGSFNYLT (SEQ. ID NO: 16)

37A10S713 V_L CDR2: YASTRHT (SEQ. ID NO: 17)

37A10S713 V_L CDR3: HHHYNAPPT (SEQ. ID NO: 18)

[0096] “针对ICOS的试剂”意指能够结合ICOS的任何化学化合物或生物分子。在一些实施方案中,针对ICOS的试剂是ICOS结合蛋白。在一些其它实施方案中,针对ICOS的试剂是ICOS激动剂。

[0097] 如本文使用的,术语“ICOS结合蛋白”指能够与ICOS结合的抗体和其它蛋白质构建体,例如结构域。在一些情况下,ICOS是人ICOS。术语“ICOS结合蛋白”可以与“ICOS抗原结合蛋白”互换使用。因此,如本领域理解的,抗ICOS抗体和/或ICOS抗原结合蛋白被视为ICOS结合蛋白。如本文使用的,“抗原结合蛋白”是与抗原例如ICOS结合的任何蛋白质,包括但不限于本文所述的抗体、结构域和其它构建体。如本文使用的,ICOS结合蛋白的“抗原结合部分”将包括能够与ICOS结合的ICOS结合蛋白的任何部分,包括但不限于抗原结合抗体片段。

[0098] 在一个实施方案中,本发明的ICOS抗体包含下述CDR的任何一种或组合:

CDRH1: DYAMH (SEQ ID NO:1)

CDRH2: LISIYSDHTNYNQKFQG (SEQ ID NO:2)

CDRH3: NNYGNYGWYFDV (SEQ ID NO:3)

CDRL1: SASSSVSYM (SEQ ID NO:4)

CDRL2: DTSKLAS (SEQ ID NO:5)

CDRL3: FQGS GYPYT (SEQ ID NO:6)

[0099] 在一些实施方案中,本发明的抗ICOS抗体包含与SEQ ID NO:7具有至少90%序列同一性的重链可变区。适当地,本发明的ICOS结合蛋白可以包含与SEQ ID NO:7具有约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的重链

可变区。

[0100] 人源化重链 (V_H) 可变区 (H2) :

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFT DYAMHWVRQA PGQGLEWMGL
ISIYSDHTNY NQKFQGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCGRNN
YGNYGWYFDV WGQGTITVTS S

(SEQ ID NO:7)

[0101] 在本发明的一个实施方案中, ICOS抗体包含在具有SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列的轻链可变区中的CDRL1 (SEQ ID NO:4)、CDRL2 (SEQ ID NO:5) 和CDRL3 (SEQ ID NO:6)。包含SEQ ID NO:8中所示的人源化轻链可变区的本发明的ICOS结合蛋白被指名为“L5”。因此, 包含SEQ ID NO:7的重链可变区和SEQ ID NO:8的轻链可变区的本发明的ICOS结合蛋白, 在本文中可以被指名为H2L5。

[0102] 在一些实施方案中, 本发明的ICOS结合蛋白包含与SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变区。适当地, 本发明的ICOS结合蛋白可以包含与SEQ ID NO:8具有约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的轻链可变区。

[0103] 人源化轻链 (V_L) 可变区 (L5)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSASSSVS YMHWYQQKPG QAPRLLIYDT
SKLASGIPAR FSGSGSGTDY TLTISSLEPE DFAVYYCFQG SGYPYTFGQG
TKLEIK (SEQ ID NO:8)

[0104] CDR或最小结合单位可以通过至少一个氨基酸取代、缺失或添加进行修饰, 其中所述变体抗原结合蛋白基本上保留未修饰蛋白, 例如包含SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8的抗体的生物学特性。

[0105] 应了解, CDR H1、H2、H3、L1、L2、L3各自可以单独进行修饰, 或者以任何排列或组合与任何其它CDR组合进行修饰。在一个实施方案中, 通过至多3个氨基酸, 例如1或2个氨基酸, 例如1个氨基酸的取代、缺失或添加来修饰CDR。通常, 修饰是取代, 特别是保守取代, 例如如下表1中所示。

[0106] 表1

侧链	成员
疏水的	Met、Ala、Val、Leu、Ile
中性亲水的	Cys、Ser、Thr
酸性的	Asp、Glu
碱性的	Asn、Gln、His、Lys、Arg
影响链取向的残基	Gly、Pro
芳族的	Trp、Tyr、Phe

[0107] 抗体的亚类部分决定了次级效应物功能, 例如补体激活或Fc受体 (FcR) 结合、以及抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) (Huber等人, Nature 229 (5284):419-20 (1971); Brunhouse等人, Mol Immunol 16 (11):907-17 (1979))。在鉴定用于特定应用的最佳抗体类型时, 可以将抗体的效应物功能考虑进去。例如, hIgG1抗体具有相对长的半衰期, 在固定补

体方面非常有效,并且它们与Fc γ RI和Fc γ RII两者结合。相比之下,人IgG4抗体具有较短的半衰期,并不固定补体,并且对于FcR具有较低的亲和力。在IgG4的Fc区中用脯氨酸替换丝氨酸228(S228P)减少了用hIgG4观察到的异质性,并且延长了血清半衰期(Kabat等人,“Sequences of proteins of immunological interest” 5.sup.th Edition(1991); Angal等人,Mol Immunol 30(1):105-8(1993))。用谷氨酸替换亮氨酸235(L235E)的第二种突变消除了残留的FcR结合和补体结合活性(Alegre等人,J Immunol 148(11):3461-8(1992))。具有两种突变的所得到的抗体被称为IgG4PE。hIgG4氨基酸的编号衍生自EU编号参考:Edelman,G.M.等人,Proc. Natl. Acad. USA,63,78-85(1969)。PMID:5257969。在本发明的一个实施方案中,ICOS抗体是IgG4同种型。在一个实施方案中,包括包含替换S228P和L235E的IgG4 Fc区的ICOS抗体可以具有指名IgG4PE。

[0108] 如本文使用的,“ICOS-L”和“ICOS配体”可互换使用,并且指人ICOS的膜结合的天然配体。ICOS配体是在人中由*ICOSLG*基因编码的蛋白质。ICOSLG还已被指名为CD275(分化簇275)。ICOS-L的别名包括B7RP-1和B7-H2。

[0109] 如本文使用的,“免疫调节剂”或“免疫调节试剂”指影响免疫系统的任何物质包括单克隆抗体。在一些实施方案中,免疫调节剂或免疫调节试剂上调免疫系统。免疫调节剂可以用作用于癌症治疗的抗肿瘤剂。例如,免疫调节剂包括但不限于抗PD-1抗体(Opdivo/纳武单抗和Keytruda/帕博利珠单抗)、抗CTLA-4抗体例如伊匹木单抗(YERVOY)和抗ICOS抗体。

[0110] 如本文使用的,术语“激动剂”指抗原结合蛋白包括但不限于抗体,其在与共信号传导受体接触时引起下述中的一种或多种:(1)刺激或激活受体,(2)增强、增加或促进、诱导或延长受体的活性、功能或存在,和/或(3)增强、增加、促进或诱导受体的表达。激动剂活性可以通过本领域已知的各种测定在体外进行测量,例如但不限于细胞信号传导、细胞增殖、免疫细胞激活标记物、细胞因子产生的测量。激动剂活性还可以通过测量替代终点的各种测定在体内进行测量,例如但不限于T细胞增殖或细胞因子产生的测量。

[0111] 如本文使用的,术语“拮抗剂”指抗原结合蛋白包括但不限于抗体,其在与共信号传导受体接触时引起下述中的一种或多种:(1)使受体减弱、阻断或失活和/或阻断受体通过其天然配体的激活,(2)减少、降低或缩短受体的活性、功能或存在,和/或(3)减少、降低、取消受体的表达。拮抗剂活性可以通过本领域已知的各种测定在体外进行测量,例如但不限于细胞信号传导、细胞增殖、免疫细胞激活标记物、细胞因子产生中的增加或减少的测量。拮抗剂活性还可以通过测量替代终点的各种测定在体内进行测量,例如但不限于T细胞增殖或细胞因子产生的测量。

[0112] 术语“抗体”在本文中以最广泛的含义使用,以指具有免疫球蛋白样结构域分子(例如IgG、IgM、IgA、IgD或IgE),并且包括单克隆、重组、多克隆、嵌合、人、人源化、多特异性抗体,包括双特异性抗体和异源缀合物抗体;单个可变结构域(例如V_H、V_{HH}、VL、结构域抗体(dAbTM))、抗原结合抗体片段、Fab、F(ab')₂、Fv、二硫键连接的Fv、单链Fv、二硫键连接的scFv、双抗体、TANDABSTM等,以及前述任一种的修改版本(关于替代“抗体”形式的概括,参见Holliger和Hudson,Nature Biotechnology,2005,第23卷,第9期,1126-1136)。

[0113] 替代抗体形式包括替代支架,其中抗原结合蛋白的一个或多个CDR可以排列到合适的非免疫球蛋白蛋白支架或骨架上,例如亲和体、SpA支架、LDL受体A类结构域、avimer

(参见例如,美国专利申请公开号2005/0053973、2005/0089932、2005/0164301)或EGF结构域。

[0114] 术语“结构域”指折叠的蛋白质结构,其不依赖于蛋白质的剩余部分而保留其三级结构。一般地,结构域负责蛋白质的离散功能特性,并且在许多情况下,可以添加、去除或转移至其它蛋白质,而无蛋白质的其余部分和/或结构域的功能丧失。

[0115] 术语“单个可变结构域”指包含抗体可变结构域特征性序列的折叠的多肽结构域。因此,它包括完整的抗体可变结构域,例如 V_H 、 V_{HH} 和 V_L ,以及修饰的抗体可变结构域,例如其中一个或多个环已替换为并非抗体可变结构域特征性的序列,或者已截短或者包含N或C末端延伸的抗体可变结构域,以及至少保留全长结构域的结合活性和特异性的可变结构域的折叠片段。单个可变结构域能够不依赖于不同的可变区或结构域来结合抗原或表位。“结构域抗体”或“dAb^(TM)”可以被视为与“单个可变结构域”相同。单个可变结构域可以是人单个可变结构域,但也包括来自其它物种的单个可变结构域,所述其它物种例如啮齿类动物、护士鲨和骆驼科动物 V_{HH} dAbsTM。骆驼科动物 V_{HH} 是免疫球蛋白单个可变结构域多肽,其衍生自包括骆驼、美洲驼、羊驼、单峰骆驼和原驼的物种,其产生天然缺乏轻链的重链抗体。此类 V_{HH} 结构域可以根据本领域中可获得的标准技术进行人源化,并且此类结构域被视为“单个可变结构域”。如本文使用的, V_H 包括骆驼科动物 V_{HH} 结构域。

[0116] 可以借助于在非抗体蛋白支架上排列一个或多个CDR来提供抗原结合片段。如本文使用的,“蛋白质支架”包括但不限于免疫球蛋白(Ig)支架,例如IgG支架,其可以是四链或双链抗体,或者可以仅包含抗体的Fc区,或者可以包含来自抗体的一个或多个恒定区,所述恒定区可以具有人或灵长类动物起源,或者可以是人和灵长类动物恒定区的人工嵌合体。

[0117] 蛋白质支架可以是Ig支架,例如IgG或IgA支架。IgG支架可以包含抗体的一些或全部结构域(即, $CH1$ 、 $CH2$ 、 $CH3$ 、 V_H 、 V_L)。抗原结合蛋白可以包含选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgG4PE的IgG支架。例如,支架可以是IgG1。支架可以由抗体的Fc区组成或包含抗体的Fc区,或者是其部分。

[0118] 亲和力(affinity)是一种分子例如本发明的抗原结合蛋白,与另一种分子例如其靶抗原在单个结合位点处的结合强度。抗原结合蛋白与其靶的结合亲和力可以通过平衡方法(例如酶联免疫吸附测定(ELISA)或放射性免疫测定(RIA)),或动力学(例如BIACORETM分析)来确定。

[0119] 亲合力(avidity)是两种分子在多重位点处彼此结合的结合强度的总和,例如考虑到相互作用的化合价。

[0120] “分离的”意指将分子例如抗原结合蛋白或核酸,从它可能在自然界中在其中发现的环境中取出。例如,分子可以纯化掉它在自然界中通常与其一起存在的物质。例如,样品中的分子质量可以是总质量的95%。

[0121] 如本文使用的,术语“表达载体”意指分离的核酸,其可以用于将目的核酸引入细胞如真核细胞或原核细胞、或者无细胞表达系统内,其中目的核酸序列作为肽链如蛋白质进行表达。此类表达载体可以是例如包含目的核酸的粘粒、质粒、病毒序列、转座子和线性核酸。一旦将表达载体引入细胞或无细胞表达系统(例如网织红细胞裂解产物)内,就通过转录/翻译机制产生由目的核酸编码的蛋白质。在本公开内容的范围内的表达载体可以提

供用于真核或原核表达的必要元件,并且包括病毒启动子驱动的载体,例如CMV启动子驱动的载体,例如pcDNA3.1、pCEP4及其衍生物,杆状病毒表达载体,果蝇(*Drosophila*)表达载体,以及由哺乳动物基因启动子(例如人Ig基因启动子)驱动的表达载体。其它实例包括原核表达载体,例如T7启动子驱动的载体例如pET41、乳糖启动子驱动的载体和阿拉伯糖基因启动子驱动的载体。本领域普通技术人员将认识到许多其它合适的表达载体和表达系统。

[0122] 如本文使用的,术语“重组宿主细胞”意指包含目的核酸序列的细胞,所述目的核酸序列在其引入细胞内之前是分离的。例如,目的核酸序列可以在表达载体中,而细胞可以是原核或真核的。示例性的真核细胞是哺乳动物细胞,例如但不限于COS-1、COS-7、HEK293、BHK21、CHO、BSC-1、HepG2、653、SP2/0、NS0、293、HeLa、骨髓瘤、淋巴瘤细胞或其任何衍生物。最优选地,真核细胞是HEK293、NS0、SP2/0或CHO细胞。大肠杆菌(*E. coli*)是示例性的原核细胞。根据本公开内容的重组细胞可以通过转染,细胞融合,永生物化学或本领域众所周知的其它程序来生成。转染到细胞内的目的核酸序列,例如表达载体,可以是染色体外的或稳定整合到细胞的染色体内。

[0123] “嵌合抗体”指一类改造抗体,其含有与衍生自受体抗体的轻链和重链恒定区结合的、衍生自供体抗体的天然存在的可变区(轻链和重链)。

[0124] “人源化抗体”指其CDR衍生自非人供体免疫球蛋白的一类改造抗体,所述分子的剩余免疫球蛋白衍生的部分衍生自一种或多种人免疫球蛋白。另外,可以改变构架支持残基,以保存结合亲和力(参见例如,Queen等人Proc. Natl Acad Sci USA,86:10029-10032 (1989),Hodgson等人,*Bio/Technology*,9:421 (1991))。合适的人受体抗体可以通过与供体抗体的核苷酸和氨基酸序列的同源性,而选自常规数据库,例如KABAT™数据库、Los Alamos数据库和Swiss Protein数据库的抗体。特征在于与供体抗体的构架区的同源性(在氨基酸的基础上)的人抗体,可以适合提供用于插入供体CDR的重链恒定区和/或重链可变构架区。可以以相似的方式选择能够捐献出轻链恒定区或可变构架区的合适的受体抗体。应当注意,受体抗体的重链和轻链不需要源自相同的受体抗体。现有技术描述了产生此类人源化抗体的几种方式 - 参见例如,EP-A-0239400和EP-A-054951。

[0125] 术语“全人抗体”包括具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区(如果存在的话)的抗体。本发明的人序列抗体可以包括未由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或者通过体内体细胞突变引入的突变)。全人抗体包含仅由最终具有人起源的多核苷酸编码的氨基酸序列,或与此类序列等同的氨基酸序列。如本文意指的,由插入转基因小鼠中产生的小鼠基因组内的编码人免疫球蛋白的DNA编码的抗体是全人抗体,因为它们由最终具有人起源的DNA编码。在这种情形下,编码人免疫球蛋白的DNA可以在小鼠内重排(以编码抗体),并且也可能发生体细胞突变。在小鼠中已经历此类改变的由最初人DNA编码的抗体是如本文意指的全人抗体。此类转基因小鼠的使用使得能够选择针对人抗原的全人抗体。如本领域理解的,可以使用噬菌体展示技术来制备全人抗体,其中将人DNA文库插入噬菌体中,用于生成包含人种系DNA序列的抗体。

[0126] 术语“供体抗体”指将其可变区、CDR或其它功能片段或其类似物的氨基酸序列贡献给第一免疫球蛋白配偶体的抗体。因此,供体提供了改变的免疫球蛋白编码区,并且所得到的表达的改变的抗体具有供体抗体的抗原特异性和中和活性特征。

[0127] 术语“受体抗体”指与供体抗体异源的抗体,其将编码其重链和/或轻链构架区和/

或其重链和/或轻链恒定区的氨基酸序列的全部(或任何部分),贡献给第一免疫球蛋白配偶体。人抗体可以是受体抗体。

[0128] 术语“ V_H ”和“ V_L ”在本文中分别用于指抗原结合蛋白的重链可变区和轻链可变区。

[0129] “CDR”定义为抗原结合蛋白的互补决定区氨基酸序列。这些是免疫球蛋白重链和轻链的高变区。在免疫球蛋白的可变部分中存在三个重链和三个轻链CDR(或CDR区)。因此,如本文使用的,“CDR”指所有三个重链CDR、所有三个轻链CDR、所有重链和轻链CDR、或至少两个CDR。

[0130] 在本说明书全文,可变结构域序列和全长抗体序列中的氨基酸残基根据Kabat编号约定进行编号。类似地,实施例中使用的术语“CDR”、“CDRL1”、“CDRL2”、“CDRL3”、“CDRH1”、“CDRH2”、“CDRH3”遵循Kabat编号约定。关于进一步信息,参见Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health(1991)。

[0131] 对于本领域技术人员显而易见的是,对于可变结构域序列和全长抗体序列中的氨基酸残基、存在替代的编号约定。对于CDR序列也存在其它的编号约定,例如Chothia等人(1989) *Nature* 342:877-883中阐述的那些。抗体的结构和蛋白质折叠可能意味着其它残基被视为CDR序列的部分,并且由技术人员理解为如此。

[0132] 关于技术人员可获得的CDR序列的其它编号约定包括“AbM”(University of Bath)和“接触”(University College London)方法。可以使用Kabat、Chothia、AbM和接触方法中的至少两种来确定最小重叠区域,以提供“最小结合单位”。最小结合单位可以是CDR的子部分。

[0133] 在一个方面,提供了I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,其用于治疗有此需要的人中的癌症。

[0134] 在另一个方面,提供了治疗有此需要的人中的癌症的方法,该方法包括向人施用治疗有效量的I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂,并且向人施用治疗有效量的ICOS结合蛋白或其抗原结合部分。

[0135] 在仍另一个方面,提供了I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,用于制造治疗癌症的药剂的用途。

[0136] 在另一个方面,提供了I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,用于治疗癌症的用途。

[0137] 在一个方面,本发明提供了包含治疗有效量的I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂的药物组合物、以及包含治疗有效量的ICOS结合蛋白或其抗原结合片段的第二药物组合物。

[0138] 在另一个方面,本发明提供了药物组合物,其包含治疗有效量的I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段。

[0139] 在仍另一个方面,本发明提供了I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段的组合。

[0140] 在另一个方面,提供了作为组合制剂的含有I型PRMT抑制剂和抗ICOS抗体或其抗原结合片段的产物,其用于治疗人受试者中的癌症。

[0141] 在一个实施方案中,ICOS结合蛋白或其抗原结合片段是抗ICOS抗体或其抗原结合

片段。在另一个实施方案中,ICOS结合蛋白或其抗原结合片段是ICOS激动剂。在一个实施方案中,ICOS结合蛋白或其抗原结合片段包含以下中的一种或多种:如SEQ ID NO:1中所示的CDRH1;如SEQ ID NO:2中所示的CDRH2;如SEQ ID NO:3中所示的CDRH3;如SEQ ID NO:4中所示的CDRL1;如SEQ ID NO:5中所示的CDRL2,和/或如SEQ ID NO:6中所示的CDRL3或每个CDR的直接等同物,其中直接等同物具有在所述CDR中的不多于两个氨基酸取代。在另一个实施方案中,ICOS结合蛋白或其抗原结合部分包含V_H结构域和/或V_L结构域,所述V_H结构域包含与SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,所述V_L结构域包含与SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,其中所述ICOS结合蛋白与人ICOS特异性结合。在一个实施方案中,ICOS结合蛋白包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:1;SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:4;SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。在一个实施方案中,ICOS结合蛋白包括包含SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列的V_H结构域、以及包含如SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列的V_L结构域。在另一个实施方案中,ICOS结合蛋白或其抗原结合部分包含选自人IgG1同种型和人IgG4同种型的支架。在另一个实施方案中,ICOS结合蛋白或其抗原结合部分包含hIgG4PE支架。在一个实施方案中,ICOS结合蛋白是单克隆抗体。在另一个实施方案中,ICOS结合蛋白是人源化单克隆抗体。在一个实施方案中,ICOS结合蛋白是全人单克隆抗体。

[0142] 在一个实施方案中,I型PRMT抑制剂是蛋白质精氨酸甲基转移酶1 (PRMT1) 抑制剂、蛋白质精氨酸甲基转移酶3 (PRMT3) 抑制剂、蛋白质精氨酸甲基转移酶4 (PRMT4) 抑制剂、蛋白质精氨酸甲基转移酶6 (PRMT6) 抑制剂、或蛋白质精氨酸甲基转移酶8 (PRMT8) 抑制剂。在一个实施方案中,I型PRMT抑制剂是式I、II、V或VI的化合物。在一个实施方案中,I型PRMT抑制剂是化合物A。在另一个实施方案中,I型PRMT抑制剂是化合物D。

[0143] 在一个方面,本发明提供了I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT) 抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,其用于治疗有此需要的人中的癌症,其中所述I型PRMT抑制剂是化合物A或其药学上可接受的盐,并且所述ICOS结合片段或其抗原结合片段包含以下中的一种或多种:如SEQ ID NO:1中所示的CDRH1;如SEQ ID NO:2中所示的CDRH2;如SEQ ID NO:3中所示的CDRH3;如SEQ ID NO:4中所示的CDRL1;如SEQ ID NO:5中所示的CDRL2,和/或如SEQ ID NO:6中所示的CDRL3或每个CDR的直接等同物,其中直接等同物具有在所述CDR中的不多于两个氨基酸取代。

[0144] 在另一个方面,本发明提供了I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT) 抑制剂和ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,其用于治疗有此需要的人中的癌症,其中所述I型PRMT抑制剂是化合物A或其药学上可接受的盐,并且所述ICOS结合蛋白或其抗原结合部分包含V_H结构域和/或V_L结构域,所述V_H结构域包含与SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,所述V_L结构域包含与SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,其中所述ICOS结合蛋白与人ICOS特异性结合。

[0145] 在一个方面,提供了治疗有此需要的人中的癌症的方法,该方法包括向人施用治疗有效量的I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT) 抑制剂,并且向人施用治疗有效量的ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述I型PRMT抑制剂是化合物A或其药学上可接受的盐,并且所述ICOS结合片段或其抗原结合片段包含以下中的一种或多种:如SEQ ID NO:1中所示的CDRH1;如SEQ ID NO:2中所示的CDRH2;如SEQ ID NO:3中所示的CDRH3;如SEQ ID

NO:4中所示的CDRL1;如SEQ ID NO:5中所示的CDRL2,和/或如SEQ ID NO:6中所示的CDRL3或每个CDR的直接等同物,其中直接等同物具有在所述CDR中的不多于两个氨基酸取代。

[0146] 在另一个方面,提供了治疗有此需要的人中的癌症的方法,该方法包括向人施用治疗有效量的I型蛋白质精氨酸甲基转移酶(I型PRMT)抑制剂,并且向人施用治疗有效量的ICOS结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述I型PRMT抑制剂是化合物A或其药学上可接受的盐,并且所述ICOS结合蛋白或其抗原结合部分包含V_H结构域和/或V_L结构域,所述V_H结构域包含与SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,所述V_L结构域包含与SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,其中所述ICOS结合蛋白与人ICOS特异性结合。

[0147] 在一个实施方案中,癌症是实体瘤或血液学癌症。在一个实施方案中,癌症是黑色素瘤、淋巴瘤或结肠癌。

[0148] 在一个实施方案中,癌症选自头颈癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、卵巢癌、前列腺癌、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、多形性胶质母细胞瘤、Bannayan-Zonana综合征、考登病、Lhermitte-Duclos病、炎症性乳腺癌、肾母细胞瘤、尤文氏肉瘤、横纹肌肉瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、肾癌、肝癌、黑色素瘤、胰腺癌、肉瘤、骨肉瘤、骨巨细胞瘤、甲状腺癌、成淋巴细胞性T细胞白血病、慢性粒细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、毛细胞白血病、急性成淋巴细胞性白血病、急性粒细胞性白血病、AML、慢性嗜中性粒细胞性白血病、急性成淋巴细胞性T细胞白血病、浆细胞瘤、免疫母细胞性大细胞白血病、套细胞白血病、多发性骨髓瘤、巨核母细胞性白血病、多发性骨髓瘤、急性巨核细胞白血病、早幼粒细胞性白血病、红白血病、恶性淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、成淋巴细胞性T细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、神经母细胞瘤、膀胱癌、尿路上皮癌、外阴癌、宫颈癌、子宫内膜癌、肾癌、间皮瘤、食道癌、唾液腺癌、肝细胞癌、胃癌、鼻咽癌、口腔癌、口癌、GIST(胃肠道间质瘤)和睾丸癌。

[0149] 在一个实施方案中,人患有实体瘤。在一个实施方案中,肿瘤选自头颈癌、胃癌、黑色素瘤、肾细胞癌(RCC)、食道癌、非小细胞肺癌、前列腺癌、结肠直肠癌、卵巢癌和胰腺癌。在另一个实施方案中,人患有液体肿瘤,例如弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、多发性骨髓瘤、慢性成淋巴细胞性白血病(CLL)、滤泡性淋巴瘤、急性髓样白血病和慢性粒细胞性白血病。

[0150] 本公开内容还涉及用于治疗或减轻选自以下的癌症的严重性的方法:脑(神经胶质瘤)、胶质母细胞瘤、Bannayan-Zonana综合征、考登病、Lhermitte-Duclos病、乳腺、炎症性乳腺癌、肾母细胞瘤、尤文氏肉瘤、横纹肌肉瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、结肠、头与颈、肾、肺、肝、黑色素瘤、卵巢、胰腺、前列腺、肉瘤、骨肉瘤、骨巨细胞瘤、甲状腺、成淋巴细胞性T细胞白血病、慢性粒细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、毛细胞白血病、急性成淋巴细胞性白血病、急性粒细胞性白血病、慢性嗜中性粒细胞性白血病、急性成淋巴细胞性T细胞白血病、浆细胞瘤、免疫母细胞性大细胞白血病、套细胞白血病、多发性骨髓瘤、巨核母细胞性白血病、多发性骨髓瘤、急性巨核细胞白血病、早幼粒细胞性白血病、红白血病、恶性淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、成淋巴细胞性T细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、神经母细胞瘤、膀胱癌、尿路上皮癌、肺癌、外阴癌、宫颈癌、子宫内膜癌、肾癌、间皮瘤、食道癌、唾液腺癌、肝细胞癌、胃癌、鼻咽癌、口腔癌、口癌、GIST(胃肠道间质瘤)和睾丸

癌。

[0151] 如本文使用的,术语“治疗”及其语法变化意指治疗性疗法。在提及特定状况时,治疗意指:(1)改善状况的一种或多种生物学表现的状况,(2)干扰(a)导致或负责状况的生物学级联中的一个或多个点、或(b)状况的一种或多种生物学表现,(3)减轻与状况或其治疗相关的一种或多种症状、效应或副作用,或(4)减缓状况或者状况的一种或多种生物学表现的进展。由此也考虑了预防性疗法。技术人员应了解,“预防”不是绝对术语。在医学中,“预防”应理解为指药物的预防性施用,以基本上减小状况或其生物学表现的可能性或严重性、或者延迟此类状况或其生物学表现的发作。例如,当受试者被视为处于发展癌症的高风险时,例如当受试者具有强癌症家族史或受试者已暴露于致癌物时,预防性疗法是适当的。

[0152] 如本文使用的,术语“癌症”、“赘生物”和“肿瘤”可互换使用,并且以单数或复数形式,指已经历使其对宿主生物病理性的恶性转化的细胞。通过充分建立的技术,特别是组织学检查,可以容易地将原发性癌细胞与非癌性细胞区分开。如本文使用的,癌细胞的定义不仅包括原发性癌细胞,还包括衍生自癌细胞祖先的任何细胞。这包括转移的癌细胞,以及衍生自癌细胞的体外培养物和细胞系。当提及通常表现为实体瘤的癌症类型时,“临床可检测的”肿瘤是基于肿瘤块可检测的肿瘤;例如,通过程序如在物理检查时的计算机断层摄影(CT)扫描、磁共振成像(MRI)、X射线、超声或触诊,和/或由于在可得自患者的样品中的一种或多种癌症特异性抗原的表达而可检测的肿瘤。肿瘤可以是造血的(或血液、血液学或血液相关的)癌症,例如衍生自血细胞或免疫细胞的癌症,其可以被称为“液体肿瘤”。基于血液肿瘤的临床状况的具体实例包括白血病,例如慢性髓性白血病、急性髓性白血病、慢性淋巴细胞性白血病和急性淋巴细胞性白血病;浆细胞恶性肿瘤,例如多发性骨髓瘤、MGUS和华氏巨球蛋白血症;淋巴瘤,例如非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤;等等。

[0153] 癌症可以是其中存在异常数目的胚细胞或不需要的细胞增殖、或者被诊断为血液学癌症的任何癌症,所述血液学癌症包括淋巴样和髓样恶性肿瘤两者。髓样恶性肿瘤包括但不限于急性髓样(或髓性或粒细胞性或成髓细胞性)白血病(未分化或分化型)、急性前髓样白血病(或早幼粒细胞性或前骨髓细胞性或前成髓细胞性)白血病、急性骨髓单核细胞性(或粒单核细胞性)白血病、急性单核细胞性(或单核母细胞性)白血病、红白血病和巨核细胞性(或巨核母细胞性)白血病。这些白血病可以统称为急性髓样(或髓性或粒细胞性)白血病(AML)。髓样恶性肿瘤还包括骨髓增殖性病症(MPD),其包括但不限于慢性粒细胞性(或髓样)白血病(CML)、慢性骨髓单核细胞性白血病(CMML)、原发性血小板增多症(或血小板增多)和真性红细胞增多症(PCV)。髓样恶性肿瘤还包括骨髓增生异常(或骨髓增生异常综合症或MDS),其可以被称为难治性贫血(RA)、难治性贫血伴原始细胞增多(RAEB)、以及转化中的难治性贫血伴原始细胞增多(RAEBT);以及伴有或不伴有原因不明性髓样化生的骨髓纤维化(MFS)。

[0154] 造血系统癌症还包括淋巴样恶性肿瘤,其可能影响淋巴结、脾、骨髓、外周血和/或结节外部位。淋巴样癌症包括B细胞恶性肿瘤,其包括但不限于B细胞非霍奇金淋巴瘤(B-NHL)。B-NHL可能是惰性的(或低分级的)、中等分级的(或侵袭性的)或高分级的(高度侵袭性的)。惰性B细胞淋巴瘤包括滤泡性淋巴瘤(FL);小淋巴细胞淋巴瘤(SLL);边缘区淋巴瘤(MZL),包括淋巴结MZL、结节外MZL、脾MZL和伴有绒毛淋巴细胞的脾MZL;淋巴浆细胞性淋巴瘤(LPL);和粘膜相关淋巴样组织(MALT或结节外边缘区)淋巴瘤。中等分级B-NHL包括伴有

或不伴有白血病牵涉的套细胞淋巴瘤 (MCL), 弥漫性大细胞淋巴瘤 (DLBCL), 滤泡性大细胞 (或3级或3B级) 淋巴瘤和原发性纵隔淋巴瘤 (PML)。高分级B-NHL包括伯基特淋巴瘤 (BL), 伯基特样淋巴瘤, 小无裂细胞淋巴瘤 (SNCCCL) 和淋巴母细胞淋巴瘤。其它B-NHL包括免疫母细胞性淋巴瘤 (或免疫细胞瘤), 原发性渗出性淋巴瘤, HIV相关 (或AIDS相关) 淋巴瘤、以及移植后淋巴增殖性病症 (PTLD) 或淋巴瘤。B细胞恶性肿瘤还包括但不限于慢性淋巴细胞性白血病 (CLL), 幼淋巴细胞性白血病 (PLL), 华氏巨球蛋白血症 (WM), 毛细细胞白血病 (HCL), 大颗粒淋巴细胞 (LGL) 白血病, 急性淋巴样 (或淋巴细胞性或成淋巴细胞性) 白血病和Castleman病。NHL还可以包括T细胞非霍奇金淋巴瘤 (T-NHL), 其包括但不限于非特指型T细胞非霍奇金淋巴瘤 (NOS)、外周T细胞淋巴瘤 (PTCL)、间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL)、血管免疫母细胞淋巴瘤样病症 (AILD)、鼻天然杀伤 (NK) 细胞/T细胞淋巴瘤、 γ/δ 淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、蕈样肉芽肿和塞扎里综合症。

[0155] 造血系统癌症还包括霍奇金淋巴瘤 (或疾病), 其包括经典霍奇金淋巴瘤、结节性硬化性霍奇金淋巴瘤、混合细胞性霍奇金淋巴瘤、淋巴细胞为主型 (LP) 霍奇金淋巴瘤、结节性LP霍奇金淋巴瘤和淋巴细胞消减型霍奇金淋巴瘤。造血系统癌症还包括浆细胞疾病或癌症, 例如多发性骨髓瘤 (MM) 包括冒烟型MM、意义未明 (或未知或不确定) 的单克隆丙种球蛋白病 (MGUS)、浆细胞瘤 (骨、髓外)、淋巴浆细胞性淋巴瘤 (LPL)、华氏巨球蛋白血症、浆细胞白血病和原发性淀粉样变性 (AL)。造血系统癌症还可以包括另外的造血细胞的其它癌症, 所述另外的造血细胞包括多形核白细胞 (或嗜中性粒细胞)、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、树突状细胞、血小板、红细胞和天然杀伤细胞。在本文中称为“造血细胞组织”的包括造血细胞的组织包括骨髓; 外周血; 胸腺; 以及外周淋巴样组织, 例如脾、淋巴结、与粘膜相关的淋巴样组织 (例如与肠相关的淋巴样组织)、扁桃体、派尔集合淋巴结和阑尾、以及与其它粘膜相关的淋巴样组织例如支气管衬里。

[0156] 在一个实施方案中, 本发明的组合的一种或多种组分静脉内施用。在一个实施方案中, 本发明的组合的一种或多种组分经口施用。在另一个实施方案中, 本发明的组合的一种或多种组分瘤内施用。在另一个实施方案中, 本发明的组合的一种或多种组分全身例如静脉内施用, 并且本发明的组合的一种或多种其它组分瘤内施用。在任何实施方案中, 例如在本段中, 本发明的组分作为一种或多种药物组合物施用。

[0157] 在一个实施方案中, I型PRMT抑制剂或者ICOS结合蛋白或其抗原结合片段以选自以下的途径施用于患者: 同时、序贯、以任何次序、全身、经口、静脉内和瘤内。在一个实施方案中, I型PRMT抑制剂经口施用。在另一个实施方案中, ICOS结合蛋白或其抗原结合片段静脉内施用。

[0158] 在一个实施方案中, 本发明的方法进一步包括向所述人施用至少一种肿瘤剂。本发明的方法也可以与癌症治疗的其它治疗方法一起采用。

[0159] 通常, 相对于待治疗的易感肿瘤具有活性的任何抗肿瘤剂可以在本发明的癌症治疗中共施用。此类试剂的实例可以在通过V.T. Devita, T.S. Lawrence和S.A. Rosenberg (编辑)的Cancer Principles and Practice of Oncology, 第10版 (2014年12月5日), Lippincott Williams & Wilkins Publishers中找到。基于药物的特定特征和所涉及的癌症, 本领域普通技术人员能够辨别哪种试剂组合将是有用的。可用于本发明的典型抗肿瘤剂包括但不限于抗微管剂或抗有丝分裂剂, 例如二萜类和长春花生物碱; 铂配合络合物; 烷

化剂,例如氮芥、氧氮杂膦、烷基磺酸盐、亚硝基脲和三氮烯;抗生素,例如放线菌素、蒽环素和博来霉素;拓扑异构酶I抑制剂,例如喜树碱;拓扑异构酶II抑制剂,例如表鬼臼毒素;抗代谢物,例如嘌呤和嘧啶类似物以及抗叶酸化合物;激素和激素类似物;信号转导途径抑制剂;非受体酪氨酸激酶血管生成抑制剂;免疫治疗剂;促凋亡剂;细胞周期信号传导抑制剂;蛋白酶体抑制剂;热休克蛋白抑制剂;癌症代谢抑制剂;和癌症基因疗法试剂,例如遗传修饰的T细胞。

[0160] 用于与本方法或组合以组合使用或共施用的进一步的一种或多种活性成分的实例是抗肿瘤剂。抗肿瘤剂的实例包括但不限于化学治疗剂;免疫调节试剂;免疫调节剂;和免疫刺激性佐剂。

实施例

[0161] 下述实施例示出了本发明的各种非限制性方面。

[0162] 实施例1

精氨酸甲基化和PRMT

精氨酸甲基化是对涉及各种范围的细胞过程的蛋白质的重要翻译后修饰,所述细胞过程例如基因调控、RNA加工、DNA损伤应答和信号转导。含有甲基化精氨酸的蛋白质存在于核和胞质级分两者中,提示了在这些亚细胞区室各处也存在催化甲基转移至精氨酸上的酶(在以下中进行综述:Yang, Y. & Bedford, M. T. Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat Rev Cancer* 13,37-50,doi:10.1038/nrc3409 (2013);Lee, Y. H. & Stallcup, M. R. Minireview:protein arginine methylation of nonhistone proteins in transcriptional regulation. *Mol Endocrinol* 23,425-433, doi:10.1210/me.2008-0380 (2009))。在哺乳动物细胞中,甲基化的精氨酸以三种主要形式存在: ω - N^G -单甲基精氨酸(MMA)、 ω - N^G, N^G -非对称性二甲基精氨酸(ADMA)、或 ω - N^G, N^G -对称性二甲基精氨酸(SDMA)。每种甲基化状态可以以不同方式影响蛋白质-蛋白质相互作用,并且因此具有对于底物的生物活性赋予不同功能后果的潜力(Yang, Y. & Bedford, M. T. Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat Rev Cancer* 13,37-50,doi:10.1038/nrc3409 (2013))。

[0163] 精氨酸甲基化在很大程度上在富含甘氨酸、精氨酸(GAR)的基序的背景下,通过蛋白质精氨酸甲基转移酶(PRMT)家族的活性而发生,所述酶家族将甲基从S-腺苷-L-甲硫氨酸(SAM)转移到底物精氨酸侧链,产生S-腺苷-高半胱氨酸(SAH)和甲基化的精氨酸(图1)。该蛋白质家族由10个成员组成,其中9个已显示具有酶促活性(Bedford, M. T. & Clarke, S. G. Protein arginine methylation in mammals:who, what, and why. *Mol Cell* 33, 1-13,doi:10.1016/j.molcel.2008.12.013 (2009))。根据酶促反应的产物,将PRMT家族分类成四个亚型(I-IV型)(图1)。IV型酶使内部胍基氮甲基化,并且仅在酵母中得到描述(Fisk, J. C. & Read, L. K. Protein arginine methylation in parasitic protozoa. *Eukaryot Cell* 10,1013-1022,doi:10.1128/EC.05103-11 (2011));I-III型酶通过单一甲基化事件生成单甲基精氨酸(MMA, Rme1)。MMA中间产物被视为相对较低丰度的中间产物,然而,PRMT7的主要III型活性的选定底物可以保持单甲基化,而I和II型酶分别催化从MMA到非对称性二甲基精氨酸(ADMA, Rme2a)或对称性二甲基精氨酸(SDMA, Rme2s)的进展。II型

PRMT包括PRMT5和PRMT9,然而,PRMT5是负责形成对称二甲基化的主要酶。I型酶包括PRMT1, PRMT3、PRMT4、PRMT6和PRMT8。PRMT1、PRMT3、PRMT4和PRMT6是遍在表达的,而PRMT8主要限于脑(在Bedford, M. T. & Clarke, S. G. Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell* 33,1-13,doi:10.1016/j.molcel.2008.12.013 (2009) 中进行综述)。

[0164] PRMT1是主要的I型酶,其能够催化众多细胞底物上的MMA和ADMA形成(Bedford, M. T. & Clarke, S. G. Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell* 33,1-13,doi:10.1016/j.molcel.2008.12.013 (2009))。在许多情况下,PRMT1依赖性ADMA修饰是其底物的生物活性和运输所需的(Nicholson, T. B., Chen, T. & Richard, S. The physiological and pathophysiological role of PRMT1-mediated protein arginine methylation. *Pharmacol Res* 60,466-474,doi:10.1016/j.phrs.2009.07.006 (2009)),并且PRMT1的活性占细胞ADMA水平的~85%(Dhar, S.等人Loss of the major Type I arginine methyltransferase PRMT1 causes substrate scavenging by other PRMTs. *Sci Rep* 3,1311,doi:10.1038/srep01311 (2013);Pawlak, M. R., Scherer, C. A., Chen, J., Roshon, M. J. & Ruley, H. E. Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. *Mol Cell Biol* 20,4859-4869 (2000))。PRMT1的完全敲除导致跨越众多底物的MMA中的显著增加,提示了PRMT1的主要生物学功能是将MMA转换为ADMA,而其它PRMT可以建立且维持MMA(Dhar, S.等人Loss of the major Type I arginine methyltransferase PRMT1 causes substrate scavenging by other PRMTs. *Sci Rep* 3,1311,doi:10.1038/srep01311 (2013))。另外,SDMA水平在PRMT1丧失后增加,可能是ADMA丧失和相应的MMA增加的结果,所述MMA可以充当SDMA生成II型PRMT的底物。通过ADMA的丧失、MMA中的增加、或可替代地与SDMA相关的独特甲基化模式的转换,I型PRMT的抑制可能导致改变的底物功能(Dhar, S.等人Loss of the major Type I arginine methyltransferase PRMT1 causes substrate scavenging by other PRMTs. *Sci Rep* 3,1311,doi:10.1038/srep01311 (2013))。

[0165] 小鼠中的*Prmt1*基因座破坏导致早期胚胎致死性,并且纯合子胚胎未能发育到超过E6.5,指示了PRMT1在正常发育中的需求(Pawlak, M. R., Scherer, C. A., Chen, J., Roshon, M. J. & Ruley, H. E. Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. *Mol Cell Biol* 20,4859-4869 (2000);Yu, Z., Chen, T., Hebert, J., Li, E. & Richard, S. A mouse PRMT1 null allele defines an essential role for arginine methylation in genome maintenance and cell proliferation. *Mol Cell Biol* 29, 2982-2996,doi:10.1128/MCB.00042-09 (2009))。需要条件性或组织特异性敲除,以更好地了解PRMT1在成体中的作用。衍生自*Prmt1*缺失型小鼠的小鼠胚胎成纤维细胞经历与DNA损伤应答蛋白MRE11的低甲基化相关的生长停滞、多倍性、染色体不稳定和自发性DNA损伤,提示了PRMT1在基因组维持和细胞增殖中的作用(Yu, Z., Chen, T., Hebert, J., Li, E. & Richard, S. A mouse PRMT1 null allele defines an essential role for arginine methylation in genome maintenance and cell proliferation. *Mol Cell Biol* 29,

2982-2996,doi:10.1128/MCB.00042-09(2009))。PRMT1蛋白和mRNA可以在广泛范围的胚胎和成年组织中检测到,与其作为负责大多数细胞精氨酸甲基化的酶的功能一致。尽管PRMT本身可以经历翻译后修饰,并且与相互作用的调控蛋白相结合,但PRMT1保留了基础活性,而无关于另外修饰的需求(综述于Yang,Y. & Bedford,M. T. Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat Rev Cancer* 13,37-50,doi:10.1038/nrc3409(2013)中)。

[0166] PRMT1和癌症

PRMT1的错误调控和过表达已与许多实体癌和造血癌症相关(Yang,Y. & Bedford,M. T. Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat Rev Cancer* 13,37-50,doi:10.1038/nrc3409(2013);Yoshimatsu,M.等人Dysregulation of PRMT1 and PRMT6,Type I arginine methyltransferases,is involved in various types of human cancers. *Int J Cancer* 128,562-573,doi:10.1002/ijc.25366(2011))。PRMT1与癌症生物学之间的联系在很大程度上是通过在相关底物上发现的精氨酸残基的甲基化调控。在几种肿瘤类型中,PRMT1可以通过组蛋白H4的甲基化(Takai,H.等人5-Hydroxymethylcytosine plays a critical role in glioblastomagenesis by recruiting the CHTOP-methylosome complex. *Cell Rep* 9,48-60,doi:10.1016/j.celrep.2014.08.071(2014);Shia,W. J.等人PRMT1 interacts with AML1-ETO to promote its transcriptional activation and progenitor cell proliferative potential. *Blood* 119,4953-4962,doi:10.1182/blood-2011-04-347476(2012);Zhao,X.等人Methylation of RUNX1 by PRMT1 abrogates SIN3A binding and potentiates its transcriptional activity. *Genes Dev* 22,640-653,doi:10.1101/gad.1632608(2008)),以及通过其对非组蛋白底物的活性(Wei,H.,Mundade,R.,Lange,K. C. & Lu,T. Protein arginine methylation of non-histone proteins and its role in diseases. *Cell Cycle* 13,32-41,doi:10.4161/cc.27353(2014)),来驱动异常致癌程序的表达。在这些实验系统的许多中,其底物的PRMT1依赖性ADMA修饰的破坏降低癌细胞的增殖能力(Yang,Y. & Bedford,M. T. Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat Rev Cancer* 13,37-50,doi:10.1038/nrc3409(2013))。

[0167] 几项研究已将PRMT1与血液学肿瘤和实体瘤的发展相联系。PRMT1通过关键驱动因素(例如MLL和AML1-ETO融合物)的甲基化与白血病发展相关,导致致癌途径的激活(Shia,W. J.等人PRMT1 interacts with AML1-ETO to promote its transcriptional activation and progenitor cell proliferative potential. *Blood* 119,4953-4962,doi:10.1182/blood-2011-04-347476(2012);Cheung,N.等人Targeting Aberrant Epigenetic Networks Mediated by PRMT1 and KDM4C in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* 29,32-48,doi:10.1016/j.ccell.2015.12.007(2016))。在衍生自AML1-ETO表达小鼠的骨髓细胞中的PRMT1敲低抑制了克隆形成,证实了PRMT1在维持该模型的白血病表型中的关键需求(Shia,W. J.等人PRMT1 interacts with AML1-ETO to promote its transcriptional activation and progenitor cell proliferative potential. *Blood* 119,4953-4962,doi:10.1182/blood-2011-04-347476(2012))。PRMT1也是MLL融合复合物的组分,促进与H4R3甲基化相关的异常转录激活,并且PRMT1的敲低可以压制MLL-EEN介导

的造血干细胞转化(Cheung,N.,Chan,L. C.,Thompson,A.,Cleary,M. L. & So,C. W. Protein arginine-methyltransferase-dependent oncogenesis. *Nat Cell Biol* 9, 1208-1215,doi:10.1038/ncb1642(2007))。在乳腺癌患者中,发现PRMT1的高表达与较短的无疾病存活和组织学分级较高的肿瘤相关联(Mathioudaki,K.等人Clinical evaluation of PRMT1 gene expression in breast cancer. *Tumour Biol* 32,575-582,doi:10.1007/s13277-010-0153-2(2011))。为此,PRMT1已牵涉转移和癌细胞侵袭的促进(Gao,Y.等人The dual function of PRMT1 in modulating epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence in breast cancer cells through regulation of ZEB1. *Sci Rep* 6,19874,doi:10.1038/srep19874(2016);Avasarala,S.等人PRMT1 Is a Novel Regulator of Epithelial-Mesenchymal-Transition in Non-small Cell Lung Cancer. *J Biol Chem* 290,13479-13489,doi:10.1074/jbc.M114.636050(2015)),并且PRMT1介导的雌激素受体 α (ER α) 甲基化可以加强促进生长的信号转导途径。即使在抗雌激素的存在下,这种甲基化驱动的机制也可以对乳腺癌细胞提供生长优势(Le Romancer,M.等人Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol Cell* 31,212-221,doi:10.1016/j.molcel.2008.05.025(2008))。另外,PRMT1通过调控同源重组和非同源末端连接DNA修复途径两者,来促进基因组稳定性以及对DNA损伤剂的抗性(Boisvert,F. M.,Rhie,A.,Richard,S. & Doherty,A. J. The GAR motif of 53BP1 is arginine methylated by PRMT1 and is necessary for 53BP1 DNA binding activity. *Cell Cycle* 4,1834-1841,doi:10.4161/cc.4.12.2250(2005);Boisvert,F. M.,Dery,U.,Masson,J. Y. & Richard,S. Arginine methylation of MRE11 by PRMT1 is required for DNA damage checkpoint control. *Genes Dev* 19,671-676,doi:10.1101/gad.1279805(2005))。因此,PRMT1的抑制可能使癌症对DNA损伤剂敏感,特别是在其中DNA修复机制可能因突变(例如乳腺癌中的BRCA1)而受损的肿瘤中(O'Donovan,P. J. & Livingston,D. M. BRCA1 and BRCA2:breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis* 31,961-967,doi:10.1093/carcin/bgq069(2010))。这些观察共同证实了PRMT1在肿瘤生物学的临床相关方面的关键作用,并且提示了用于探索与疗法如促进DNA损伤的那些疗法组合的理论基础。

[0168] RNA结合蛋白和剪接机制是PRMT1底物的主要类别,并且已通过其生物学功能以及白血病中的复发突变而牵涉癌症生物学(Bressan,G. C.等人Arginine methylation analysis of the splicing-associated SR protein SFRS9/SRP30C. *Cell Mol Biol Lett* 14,657-669,doi:10.2478/s11658-009-0024-2(2009);Sveen,A.,Kilpinen,S.,Ruusulehto,A.,Lothe,R. A. & Skotheim,R. I. Aberrant RNA splicing in cancer; expression changes and driver mutations of splicing factor genes. *Oncogene* 35,2413-2427,doi:10.1038/onc.2015.318(2016);Hsu,T. Y.等人The spliceosome is a therapeutic vulnerability in MYC-driven cancer. *Nature* 525,384-388,doi:10.1038/nature14985(2015))。在最近的研究中,在急性巨核细胞白血病中,显示了PRMT1使RNA结合蛋白RBM15甲基化(Zhang,L.等人Cross-talk between PRMT1-mediated methylation and ubiquitylation on RBM15 controls RNA splicing. *Elife* 4,doi:

10.7554/eLife.07938 (2015))。PRMT1介导的RBM15甲基化调控其表达;因而,显示了PRMT1在AML细胞系中的过表达通过下调RBM15来阻断分化,从而阻止其结合对于分化重要的基因的前mRNA内含子区的能力。为了鉴定推定的PRMT1底物,蛋白质组学方法(Methylscan, Cell Signaling Technology)用于鉴定响应工具PRMT1抑制剂,化合物D,具有精氨酸甲基化状态中的变化的蛋白质。使用甲基精氨酸特异性抗体(ADMA、MMA、SDMA),使来自化合物D和DSMO处理的细胞提取物的蛋白质片段免疫沉淀,并且通过质谱法来鉴定肽。尽管许多蛋白质经历精氨酸甲基化中的变化,但鉴定的大多数底物是用工具化合物处理的AML细胞系中的转录调控因子和RNA加工蛋白质(图3)。

[0169] 总之,PRMT1对癌症相关途径的影响提示了抑制可能导致抗肿瘤活性,对于AML、淋巴瘤和实体瘤适应症的治疗提供了新型治疗机制。如新出现的文献中所述的,几种机制支持在血液学肿瘤和实体瘤中使用PRMT1抑制剂的理论基础,所述机制包括:抑制白血病中AML-ETO驱动的肿瘤发生、抑制乳腺癌中促进生长的信号转导、以及通过RNA结合蛋白的甲基化和剪接体机制来调节剪接。I型PRMT包括PRMT1的抑制代表了压制异常癌细胞增殖和存活的易驾驭策略。

[0170] 生物化学

用化合物A进行了详细的体外生物化学研究,以表征针对I型PRMT的效力和抑制机制。

[0171] 抑制机制

通过底物竞争实验探索了化合物A对于PRMT1的抑制机制。通过根据底物浓度除以 K_m^{app} 来标绘化合物A IC_{50} 值,然后将所得到的图与关于竞争性、非竞争性和反竞争性抑制的Cheng-Prusoff关系进行比较,来检查抑制剂模式(Copeland, R. A. Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists. *Methods Biochem Anal* 46,1-265 (2005))。化合物A IC_{50} 值随着SAM浓度的增加而降低,指示了当对反竞争性抑制方程拟合时,通过化合物A的PRMT1抑制就SAM而言是反竞争的,具有15 nM的 K_i^{app} 值(图4A)。当根据H 4 1-21肽标绘化合物A IC_{50} 值时,并未观察到明确的模式趋势(图4B),提示了混合型抑制。使用总体分析执行进一步分析,导致3.7的 α 值,将肽机制确认为混合的,并且产生19 nM的 K_i^{app} 值(图4B,插图)。

[0172] 时间依赖性和可逆性

在不同的SAM:PRMT1:化合物A预温育时间和20分钟反应之后,通过测量 IC_{50} 值来评估化合物A的时间依赖性抑制。与SAM反竞争的抑制机制暗示需要SAM:PRMT1复合物的生成,以支持化合物A的结合,因此在预温育期间包括SAM(保持在 K_m^{app} 下)。化合物A证实了PRMT1甲基化的时间依赖性抑制,其通过伴随较长的预温育时间在效力中的增加而显而易见(图5A)。由于观察到时间依赖性抑制,因此进一步的 IC_{50} 测定包括60分钟SAM:PRMT1:化合物A预温育和40分钟反应时间,以提供化合物效力的更佳表示。这些条件产生 3.1 ± 0.4 nM的 IC_{50} (n=29),其高于该测定的理论紧密结合极限(0.25 nM) >10倍。检查在不同的PRMT1浓度下的 IC_{50} 值揭示,实际的紧密结合极限将显著低于0.25 nM,可能是由于低活性级分(图5B)。化合物A的盐形式并未显著影响针对PRMT1确定的 IC_{50} 值(图5B)。

[0173] 关于时间依赖性抑制的两种解释是缓慢结合可逆抑制和不可逆抑制。为了区分这两种机制,亲和力选择质谱法(ASMS)用于检查化合物A与PRMT1的结合。ASMS首先将结合的

配体与未结合的配体分开,然后通过MS检测可逆结合的配体。PRMT1: SAM与化合物A的2小时预温育,用于确保基于图5A中所示的曲线,完全形成时间依赖性复合物(ESI *),其中在预温育20分钟后观察到最大效力。在这些条件下,化合物A使用ASMS是可检测的。这提示了主要机制本质上是可逆的,因为ASMS不能检测不可逆结合的化合物A。确定性可逆性研究包括解离速率分析尚未执行,并且将进一步验证该机制。

[0174] 晶体学

为了确定抑制剂结合模式,测定了与PRMT1和SAH结合的化合物A的共晶体结构(2.48 Å分辨率)(图6)。SAH是通过PRMT1从SAM中去除甲基后形成的产物;因此,SAH和SAM应该类似地占据PRMT1的同一袋。该抑制剂在与SAH袋直接相邻的通常由底物肽占据的裂隙中结合,并且其二胺侧链占据假定的精氨酸底物位点。末端甲胺与Glu162侧链残基形成氢键,所述Glu162侧链残基与SAH的硫醚相距3.6 Å,并且SAH结合袋通过Tyr57和Met66桥接至化合物A。化合物A通过在化合物A的吡唑氮的质子与Glu65的酸性侧链之间的氢键形成而结合PRMT1;二乙氧基支化的环己基部分沿着溶剂的暴露表面,位于由Tyr57、Ile62、Tyr166和Tyr170形成的疏水沟槽中。SAH和抑制剂结合之间的空间分离、以及与残基例如Tyr57的相互作用,可以支持酶研究中揭示的SAM反竞争性机制。化合物A在底物肽袋中结合,并且二胺侧链可以模拟底物精氨酸残基的胺的发现,暗示了抑制剂模式可能是与肽竞争。抑制研究的生物化学模式支持化合物A是关于肽的混合抑制剂(图4B)。化合物A的时间依赖性行为、以及肽裂隙外部的底物肽的异位点结合的可能性,两者均可以导致与肽非竞争的抑制模式,解释了通过结构和生物化学研究提示的模式中的差异。

[0175] 直系同源物

为了促进毒理学研究的解释,针对PRMT1的大鼠和犬直系同源物评估了化合物A的效力。与人PRMT1一样,化合物A显示针对大鼠和犬PRMT1的时间依赖性抑制,其 IC_{50} 值伴随预温育的增加而降低(图7A)。另外,跨越一系列的酶浓度(0.25-32 nM)并未观察到化合物A效力中的转变,提示了所测量的 IC_{50} 值并未接近关于人、大鼠或犬的测定的紧密结合极限(图7B)。使用与用于评价人PRMT1的那些等价的条件确定 IC_{50} 值,并且揭示了化合物A效力跨越所有物种改变< 2倍(图7C)。

[0176] 选择性

跨越PRMT家族成员的实验对象组评价了化合物A的选择性。在60分钟SAM:酶:化合物A预温育之后,针对代表性的I型(PRMT3、PRMT4、PRMT6和PRMT8)和II型(PRMT5/MEP50和PRMT9)家族成员确定 IC_{50} 值。化合物A以不同效力抑制了测试的所有I型PRMT的活性,但未能抑制II型家族成员(图8A)。I型PRMT的另外表征揭示,化合物A是PRMT4、PRMT6和PRMT8的时间依赖性抑制剂,这是由于在增加酶: SAM: 化合物A的预温育时间后观察到效力中的增加;然而,PRMT3并未展示时间依赖性行为(图8B)。

[0177] 为了进一步表征化合物A的选择性,在单一浓度的化合物A(10 μM, Reaction Biology)下,评估了21种甲基转移酶的抑制。观察到针对PRDM9的最高抑制程度,18%。总体而言,化合物A显示了测试的甲基转移酶的最小抑制,提示了它是I型PRMT的选择性抑制剂(表2)。另外的选择性测定在安全性节段中进行描述。

[0178] 表2就通过化合物A的抑制测试的甲基转移酶。不依赖于SAM K_m 值,在SAM的固定浓度(1 μM)下测定酶。

甲基转移酶	底物	平均%抑制
PRDM9	组蛋白H3	17.99
NSD2	核小体	14.97
MLL3复合物	核心组蛋白	13.67
EZH1复合物	核心组蛋白	11.97
SMYD2	组蛋白H4	9.26
PRMT3	组蛋白H4	9.01
EZH2复合物	核心组蛋白	8.17
MLL2复合物	核心组蛋白	6.21
SET1B复合物	核心组蛋白	5.96
NSD1	核小体	3.81
G9a	组蛋白H3 (1-21)	3.72
SET7	核心组蛋白	3.47
SETD2	核小体	3.15
Dot1L	核小体	2.75
GLP	组蛋白H3 (1-21)	1.86
MLL4复合物	核心组蛋白	0.27
MLL1复合物	核小体	0.27
SUV420H1-tv2	核小体	0.00
SUV39H1	组蛋白H3	0.00
SET8	核小体	0.00
SUV39H2	组蛋白H3	0.00

[0179] 总之,化合物A是I型PRMT家族成员的有力、可逆、选择性抑制剂,显示了针对PRMT1、PRMT6和PRMT8等价的生物化学效力,具有范围为3-5 nM的 IC_{50} 值。与化合物A复合的PRMT1的晶体结构揭示,化合物A在肽袋中结合,并且晶体结构以及酶促研究两者均与SAM反竞争性机制一致。

[0180] 生物学

细胞机制效应

预测PRMT1的抑制导致细胞PRMT1底物(包括组蛋白H4的精氨酸3(H4R3me2a))上的ADMA降低,具有MMA和SDMA中的伴随增加(Dhar,S.等人Loss of the major Type I arginine methyltransferase PRMT1 causes substrate scavenging by other PRMTs. *Sci Rep* 3,1311,doi:10.1038/srep01311 (2013))。为了评估化合物A对精氨酸甲基化的作用,使用检测MMA的抗体,在细胞内蛋白质测定中评估了与增加的MMA相关的剂量应答,并且测定了 10.1 ± 4.4 nM的细胞机制 EC_{50} (图9)。剂量应答似乎是双相性的,可能是由于I型PRMT之间的差异活性或针对特定底物子集的差异效力。描述双相曲线的方程用于拟合数据,并且由于在测试的浓度范围内,不存在与第二拐点相关的明显平台期,因此报告了第一拐点。以这种测定形式测试了各种盐形式,并且全都证实了相似的 EC_{50} 值,并且因此,被视为对于所有生物学研究可互换(图9)。如下文所示执行了另外的研究,以检查在选定的肿瘤类型中的时机、持久性以及对其它甲基化状态的影响。化合物A对MMA诱导的效力指示,化合物

A可以用于调查与细胞中1型PRMT抑制相关的生物学机制。

[0181] 癌症中的I型PRMT表达

来自从通过癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas)(TCGA)的> 100项癌症研究中收集的多重肿瘤类型的基因表达数据的分析、以及cBioPortal中代表的其它原发性肿瘤数据库,指示了PRMT1在癌症中是高度表达的,相对于其它实体和血液学恶性肿瘤,在淋巴瘤(弥漫性大B细胞淋巴瘤,DLBCL)中具有最高水平(图10)。还调查了ACTB(常见的管家基因)和TYR(在皮肤中选择性表达的基因)的表达,以分别表征与高遍在表达或组织限制性表达相关的范围。在其它癌症中,在淋巴瘤中的高表达提供了另外的信心,即化合物A抑制的靶存在于原发性肿瘤中,所述原发性肿瘤对应于临床前研究中评估的细胞系。PRMT 3、4和6也跨越一系列肿瘤类型表达,而鉴于其组织特异性表达,PRMT8表达似乎如预测的更受限制(Lee, J., Sayegh, J., Daniel, J., Clarke, S. & Bedford, M. T. PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family. *J Biol Chem* 280, 32890-32896, doi:10.1074/jbc.M506944200 (2005))。

[0182] 细胞表型效应

使用定量作为细胞数目替代物的ATP的Cell Titer Glo(Promega),在6天生长-死亡测定中,分析了化合物A抑制培养的肿瘤细胞系生长的能力。跨越广泛范围的接种密度,随着时间过去评估所有细胞系的生长,以鉴定在整个6天测定自始至终允许增殖的条件。将细胞以最佳接种密度铺平板,并且在过夜温育后,加入20点2倍滴定的化合物,并且使平板温育6天。在化合物添加时收获细胞的重复平板,以定量细胞的起始数目(T_0)。在6天处理后获得的值表示为 T_0 值的函数,并且针对化合物浓度进行标绘。将 T_0 值标准化为100%,并且表示在化合物添加时的细胞数目。用4参数方程拟合数据,以生成浓度应答曲线,并且确定生长 IC_{50} (gIC_{50})。 gIC_{50} 是‘生长窗口’的中点,即在化合物添加时的细胞数目(T_0)和6天后的细胞数目(DMSO对照)之间的差异。生长-死亡测定可以用于定量净群体变化,将细胞死亡(细胞毒性)明确地定义为与化合物添加时的数目(T_0)相比更少的细胞。负 $Y_{min}-T_0$ 值指示细胞死亡,而 gIC_{100} 值表示对于100%的生长抑制所需的化合物浓度。使用该测定在代表实体和血液学恶性肿瘤的196个人癌细胞系中,评估了化合物A的生长抑制效应(图11)。

[0183] 化合物A在大多数细胞系中诱导了接近或完全的生长抑制,其子集显示了细胞毒性应答,如通过负 $Y_{min}-T_0$ 值所指示的(图11B)。这种效应在AML和淋巴瘤癌细胞系中最明显,其中50%和54%的细胞系分别显示了细胞毒性应答。由大鼠14天MTD计算的总AUC或暴露(C_{ave}) (150 mg/kg, $C_{ave}=2.1 \mu\text{M}$),用作用于敏感性评估的化合物A的临床相关浓度的估计值。虽然淋巴瘤细胞系显示了具有低于 $2.1 \mu\text{M}$ 的 gIC_{100} 值的细胞毒性,但跨越所有评估的肿瘤类型的许多细胞系显示了 $\leq 2.1 \mu\text{M}$ 的 gIC_{100} 值,提示了在患者中可以达到与抗肿瘤活性相关的浓度。犬21天MTD略微更高(25 mg/kg;总AUC或 $C_{ave}=3.2 \mu\text{M}$),因此来自大鼠的较低浓度提供了用于了解细胞系敏感性的更保守靶。淋巴瘤细胞系对I型PRMT抑制是高度敏感的,具有 $0.57 \mu\text{M}$ 的中值 gIC_{50} 以及在54%中观察到的细胞毒性。在实体瘤类型中,在黑色素瘤和肾癌细胞系(主要代表透明细胞肾癌)中,观察到了化合物A的有力的抗增殖活性,然而,在这种测定形式中,应答占优势地是细胞抑制性的(图11,表3)。

[0184] 表3 化合物A的6天增殖概括。基于在大鼠14天MTD中达到的浓度(150 mg/kg, $C_{ave} =$

2.1 μM), 将 $\text{gIC}_{50} \leq 2.1 \mu\text{M}$ 用作靶。

	总计	AML	淋巴瘤	膀胱	乳腺	结肠	肾	NSCLC	黑色素瘤	前列腺
中值 gIC_{50} (μM)	2.12	0.54	0.57	5.32	5.95	5.51	1.66	2.81	0.28	1.86
中值 gIC_{100} (μM)	29.33	16.72	21.62	29.33	29.36	29.33	29.35	29.33	29.33	29.34
%细胞毒性	23%	50%	54%	0%	10%	3%	0%	16%	0%	0%
% $\text{gIC}_{50} < 2 \mu\text{M}$	49%	80%	69%	28%	41%	29%	60%	28%	71%	75%
% $\text{gIC}_{100} < 2 \mu\text{M}$	4%	0%	14%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
总细胞系	196	10	59	18	29	34	10	25	7	4

[0185] 化合物A的抗增殖效应的评估指示, PRMT1的抑制导致跨越细胞系的有力的抗肿瘤活性, 所述细胞系代表一系列实体和血液学恶性肿瘤。总之, 这些数据提示了在实体和血液学恶性肿瘤中的临床开发是有正当理由的。优先适应症包括:

- 淋巴瘤: 54%的细胞系中的细胞毒性
- AML: 50%的细胞系中的细胞毒性
- 肾细胞癌: 60%的细胞系中的 $\text{gIC}_{50} \leq 2.1 \mu\text{M}$
- 黑色素瘤: 71%的细胞系中的 $\text{gIC}_{50} \leq 2.1 \mu\text{M}$
- 乳腺癌包括TNBC: 41%的细胞系中的 $\text{gIC}_{50} \leq 2.1 \mu\text{M}$ 。

[0186] 淋巴瘤生物学
细胞机制效应

为了评估化合物A对淋巴瘤中的精氨酸甲基化的作用, 人DLBCL细胞系(Toledo)用 $0.4 \mu\text{M}$ 化合物A或媒介物处理至多120小时, 这之后通过使用关于各种精氨酸甲基化状态的抗体的蛋白质分析, 来评估蛋白质裂解产物。如预测的, 在化合物暴露时, ADMA甲基化降低而MMA增加(图12)。还观察到SDMA水平中的增加, 提示了MMA中的增加可能已导致PRMT5(SDMA形成的主要催化剂)的潜在底物池中的累积。鉴于具有变化动力学的众多底物的检测、以及在DMSO处理的样品中ADMA水平的可变性, 整个泳道和突出的45kDa条带两者均进行表征, 以评价ADMA。MMA中的增加到24小时是显而易见的, 并且到48小时接近最大, 而45 kDa ADMA条带中的降低需要72-96小时来达到最大效应。在化合物暴露48小时后, SDMA中的增加是显而易见的, 并且持续增加直到120小时, 这与MMA通过I型PRMT转换为ADMA通过II型PRMT转换为SDMA的潜在转变相一致(图12)。

[0187] 在淋巴瘤细胞系的实验对象组中, 确定了与化合物A对精氨酸甲基化(MMA、ADMA、SDMA)的作用相关的剂量应答(图13)。跨越整个泳道和单个45 kDa条带(其跨越所有评估的细胞系中降低至无法检测的水平)测量了ADMA降低。总体而言, 达到最大效应的50%所需的浓度跨越细胞系是相似的, 并且并不对应于6天生长死亡测定中的 gIC_{50} , 提示了敏感性的缺乏无法通过弱靶接合加以解释。

[0188] 为了确定响应化合物A的精氨酸甲基化中的总体变化的持久性, 在化合物洗出后, 在用化合物A处理的细胞中评价了ADMA、SDMA和MMA水平(图14)。将Toledo细胞用 $0.4 \mu\text{M}$ 化合物A培养72小时, 以建立对精氨酸甲基化标记的稳固作用。然后将细胞洗涤, 在无化合物A的培养基中进行培养, 每天收集样品直到120小时, 并且通过蛋白质分析检查精氨酸甲基化水平。MMA水平快速降低, 到化合物A洗出后24小时恢复至基线, 而ADMA和SDMA分别到24小时和96小时恢复至基线。值得注意的是, 相对于ADMA的Western印迹中的大多数其它种类, 45kDa ADMA条带的恢复似乎是延迟的, 提示了通过化合物A的精氨酸甲基化变化的持久性可能因底物而异。即使在洗出6小时后, SDMA似乎仍继续增加。这与以下相一致: 直到120小

时观察到的持续增加,而无明显平台期(图12),加上MMA中的持久增加,其在洗出后仍未恢复至基线。每种修饰的持久性一般反映了由化合物A造成的精氨酸甲基化变化的动力学,其中MMA是最快速的。

[0189] 细胞表型效应

为了评价与通过化合物A的生长抑制相关的时间过程,在淋巴瘤细胞系的子集中,执行了延长持续时间的生长-死亡测定。与先前描述的6天增殖测定相似,优化了接种密度,以确保在测定的持续时间自始至终的生长,并且在从第3-10天开始的选定时间点,通过CTG评价了细胞数目。在Toledo和Daudi淋巴瘤细胞系中,早在6天就观察到生长抑制,并且到8天达到最大(图15)。

[0190] 在第6天和第10天时,评估了更大的细胞系集合,以测量对化合物A的延长暴露的效应,并且确定在6天测定中展示细胞抑制性应答的细胞系,是否可能在以后的时间点经历细胞毒性。对化合物A的延长时间暴露跨越评估的淋巴瘤细胞系,对效力(gIC_{50})或细胞毒性($Y_{min}-T_0$)具有最低限度的作用(图16),指示了6天增殖评估可以用于敏感性的评价。

[0191] 考虑到生长抑制在第6天时是显而易见的,并且延长暴露对效力或抑制百分比具有最低限度的影响,因此代表霍奇金和非霍奇金亚型的淋巴瘤细胞系的广泛实验对象组,以6天生长-死亡测定形式进行评估(图17)。所有亚型在这种形式中似乎同等敏感,并且不依赖于分类,许多细胞系经历了细胞毒性(如通过负 $Y_{min}-T_0$ 指示的),提示了化合物A在所有评估的淋巴瘤亚型中都具有抗肿瘤效应。

[0192] 增殖测定结果提示,PRMT1的抑制在淋巴瘤细胞系的子集中诱导显而易见的细胞毒性。为了进一步阐明这种效应,使用碘化丙锭染色,随后为流式细胞术,评估用化合物A处理的淋巴瘤细胞系中的细胞周期分布。在6天增殖测定中显示一系列 $Y_{min}-T_0$ 和 gIC_{50} 值的细胞系以低密度接种,以允许经过测定的持续时间的对数生长,并且用不同浓度的化合物A进行处理。与生长-死亡测定结果一致,在用浓度 ≥ 1000 nM的化合物A处理3天后开始,在Toledo细胞中观察到以时间和剂量依赖性方式的、指示细胞死亡的处于亚G1($<G1$)的细胞累积(图18)。到第7天,亚G1群体中的增加在浓度 ≥ 100 nM下是显而易见的。在6天增殖测定中经历显而易见的细胞抑制性生长抑制的细胞系,U2932和OCI-Ly1中,这种效应仅在10 μ M化合物A下是明显的。在该测定形式中,并未揭示在任何其它细胞周期阶段中的显著效应。

[0193] 为了确认细胞周期的FACS分析,在10天的时间过程期间执行了半胱天冬酶切割的评估,作为凋亡的另外量度。优化接种密度,以确保在测定的持续时间自始至终的一致生长,并且使用发光Caspase-Glo 3/7测定(Promega)评价半胱天冬酶激活。Caspase-Glo 3/7信号针对细胞数目(通过CTG评价的)进行标准化,并且显示为相对于对照(DMSO处理的)细胞的诱导倍数。在DLBCL细胞系中,经过10天的时间过程,监测半胱天冬酶3/7活性,显示了对化合物A的细胞毒性(Toledo)和细胞抑制性(Daudi)应答(图19)。与生长-死亡测定中观察到的概况一致,Toledo细胞系在所有时间点显示了稳固的半胱天冬酶激活,同时伴随细胞数目中的降低,而Daudi细胞系中的半胱天冬酶活性诱导较不明显,并且限于化合物A的最高浓度。

[0194] 这些数据连同细胞周期概况一起指示,化合物A在Toledo DLBCL细胞系中诱导半胱天冬酶介导的凋亡,提示了在其它淋巴瘤细胞系中观察到的细胞毒性可能反映了通过化

合物A的凋亡途径激活。

[0195] 小鼠异种移植植物中的抗肿瘤效应

在Toledo (人DLBCL) 异种移植模型中,评价了化合物A对肿瘤生长的作用。将荷有皮下Toledo肿瘤的雌性SCID小鼠称重,用测径器测量肿瘤,并且根据肿瘤大小,将小鼠随机区块分组到各10只小鼠的处理组内。小鼠用赋形剂或化合物A (150 mg/kg- 600 mg/kg) 进行经口给药,每天一次,共28天。在研究自始至终,将小鼠称重,并且每周两次进行肿瘤测量。在所有剂量下都观察到显著的肿瘤生长抑制(TGI),并且在 ≥ 300 mg/kg的剂量下观察到消退(图20,表5)。在任何剂量组中均不存在显著的体重减轻。

[0196] 鉴于在所有评估的剂量下都观察到完全TGI,执行第二项研究以测试以较低剂量的化合物A的抗肿瘤效应,以及比较每天两次(BID)相对于每天一次(QD)的给药。在该第二项研究中,小鼠用媒介物或化合物A (37.5 mg/kg- 150 mg/kg) 进行经口给药,共24天QD或75 mg/kg BID。在该研究中,75 mg/kg的BID施用导致与150 mg/kg相同的TGI(分别为95%和96%),而 ≤ 75 mg/kg QD导致部分TGI($\leq 79\%$) (图20,表5)。在任何剂量组中均未观察到显著的体重减轻。这些数据提示,用相同的日总剂量的BID或QD给药应该导致相似的功效。

[0197] 另外的肿瘤类型

AML

除淋巴瘤细胞系之外,在6天增殖测定中检查的AML细胞系子集中,化合物A具有有力的细胞毒性活性(表3)。10个细胞系中的8个具有 $< 2\mu\text{M}$ 的 $g\text{IC}_{50}$ 值,并且化合物A在5个细胞系中诱导了细胞毒性。尽管PRMT1与M2 AML亚型特有的AML-ETO融合物相互作用(Shia,W. J.等人PRMT1 interacts with AML1-ETO to promote its transcriptional activation and progenitor cell proliferative potential. *Blood* 119,4953-4962,doi:10.1182/blood-2011-04-347476 (2012)),但携带这种融合蛋白的细胞系(Kasumi-1和SKNO-1)并非显示对化合物A的敏感性(如通过 $g\text{IC}_{50}$ 测量的)或经历细胞毒性的仅有系(表4,图21),因此,这种致癌融合蛋白的存在并不唯一地预测AML细胞系对化合物A的敏感性。

[0198] 表4 AML细胞系中的化合物A活性概括

细胞系	$g\text{IC}_{50}$ (μM)	$g\text{IC}_{100}$ (μM)	Ymin-T ₀	亚型
HL-60	0.02 ± 0.01	6.38 ± 12.83	-33.4	M3
MV-4-11	0.12 ± 0.08	14.55 ± 4.27	565.6	M5
MOLM-13	0.21 ± 0.01	8.64 ± 0.39	-100.0	M5
SKM-1	0.22 ± 0.11	11.61 ± 5.52	-19.1	M5
KASUMI-1	0.36 ± 0.25	18.88 ± 10.55	-17.7	M2
MOLM-16	0.65 ± 0.01	9.69 ± 10.58	-68.6	M0
OCI-AML3	0.87 ± 0.14	29.33 ± 0.00	523.2	M4
TF-1	1.67 ± 0.36	29.33 ± 0.00	788.1	M6
NOMO-1	3.85 ± 2.10	29.33 ± 0.00	259.1	M5
SHI-1	4.29 ± 3.52	29.33 ± 0.02	292.0	M5

[0199] 与淋巴瘤中的研究相似,在第6天和第10天时评估了细胞系集合,以测量对化合物A的延长暴露的效应,并且确定在6天测定中展示细胞抑制性应答的AML细胞系,是否可能在

以后的时间点经历细胞毒性。与淋巴瘤结果一致,对化合物A的延长暴露跨越评估的AML细胞系,对效力 (gIC_{50}) 或细胞毒性 ($Y_{min}-T_0$) 具有最低限度的作用(图21)。

[0200] 肾细胞癌

与其它实体瘤类型相比,肾细胞癌细胞系具有最低的中值 gIC_{50} 。尽管所测试的系无一显示了在用化合物A处理后的细胞毒性应答,但全都显示了完全生长抑制,并且10个中的6个具有 $< 2 \mu M$ 的 gIC_{50} 值(表5)。概况分析的10个系中的7个代表透明细胞肾癌(ccRCC),肾癌的主要临床亚型。

[0201] 表5 在肾细胞癌细胞中的化合物A抗增殖效应的概括

细胞系	gIC_{50} (μM)	$Y_{min}-T_0$	亚型
ACHN	0.10 ± 0.05	96.5	ccRCC
CAKI-1	0.28 ± 0.23	178.7	ccRCC
G-401	0.35 ± 0.04	353.7	Wilm's
786-O	0.59 ± 0.41	643.7	ccRCC
SK-NEP-1	1.43 ± 0.86	25.3	Wilm's
769-P	1.89 ± 0.82	119.0	ccRCC
A498	2.73 ± 2.81	313.4	ccRCC
G-402	2.89 ± 2.05	92.6	平滑肌母细胞瘤
SW156	3.51 ± 2.01	346.7	ccRCC
CAKI-2	4.23 ± 1.51	169.6	ccRCC

[0202] 为了评价通过化合物A在肾癌细胞系中的生长抑制的时间进程,在第3、4、5和6天,在4个ccRCC细胞系的实验对象组中,通过CTG评价了细胞生长(图22)。活性中的最大转变在第3天和第4天之间发生,其中所有细胞系都显示了降低的 gIC_{50} 值和增加的生长抑制。在4个系中的3个中,化合物A的效力(通过 gIC_{50} 评价的)到4天达到最大,并且直到6天的测定持续时间并未进一步改变。另外,在所有评估的细胞系中,生长抑制百分比达到100%。因此,在细胞系筛选策略中利用的6天生长窗口内,ccRCC细胞系中的最大生长抑制是显而易见的。

[0203] 在增殖时间过程期间评估了半胱天冬酶激活,并且与如通过 $Y_{min}-T_0$ 值指示的明显细胞毒性的缺乏相一致,半胱天冬酶切割仅在最高浓度 ($30 \mu M$) 下发生,指示了凋亡对ccRCC细胞系中通过化合物A诱导的总体生长抑制效应具有最低限度的贡献。

[0204] 在荷有人肾细胞癌异种移植物(ACHN)的小鼠中,评价了化合物A对肿瘤生长的作用。将荷有皮下ACHN细胞系肿瘤的雌性SCID小鼠称重,并且通过测径器测量肿瘤,并且根据肿瘤大小,随机区块分组到各10只小鼠的处理组内。小鼠用赋形剂或化合物A (150 mg/kg -

600 mg/kg) 进行经口给药, 每天一次, 直到59天。在研究自始至终, 将小鼠称重, 并且每周两次进行肿瘤测量。在所有剂量下都观察到显著的肿瘤生长抑制, 并且在 ≥ 300 mg/kg的剂量下观察到消退。在每天用600 mg/kg处理的动物中观察到显著的体重减轻, 并且因此, 给药组在第31天时终止 (图23, 表6)。

[0205] 表6 化合物A的体内功效

细胞系 (肿瘤类型)	剂量 (mg/kg)	TGI (消退)	天	体重差异 (相对于媒介物)
Toledo (DLBCL)	150 QD	99%*	28	-4%
	300 QD	100%* (37%)		-3%
	450 QD	100%* (58%)		-8%
	600 QD	100%* (62%)		-7%
Toledo (DLBCL)	37.5 QD	63%*	25	-5%
	75 QD	79%*		-5%
	75 BID	95%*		-4%
ACHN (ccRCC)	150 QD	96%*	59	-7%
	150 QD	98%*		-3%
	300 QD	100%* (2%)		-4%
	450 QD	100%* (15%)		-7%
	600 QD**	100%* (6%)		-17%

* $p < 0.05$, 双尾t检验

** ACHN功效研究的600 QD臂在第31天终止

[0206] 总之, 这些数据提示, 在人实体和血液学肿瘤的皮下异种移植物中, 可以以相似的剂量达到100% TGI。

[0207] 乳腺癌

乳腺癌细胞系展示对化合物A的一系列敏感性, 并且在许多情况下, 在6天增殖测定中显示了部分生长抑制 (图24)。与非TNBC细胞系相比, 代表三阴性乳腺癌 (TNBC) 的细胞系具有略微更低的中值 gIC_{50} 值 (对于TNBC和非TNBC, 分别为 $3.6 \mu M$ 和 $6.8 \mu M$)。由于通过化合物A对增殖的作用是细胞抑制性的, 并且在大多数乳腺癌细胞系中并未导致完全生长抑制, 因此执行了延长持续时间的生长-死亡测定, 以确定对化合物A的敏感性是否随着延长

的暴露而增加。在测试的7/17个细胞系中,存在 $\geq 10\%$ 的最大抑制百分比增加和 gIC_{50} 中的 ≥ 2 倍降低(图25)。在延长暴露测定中,11/17个细胞系具有 $\leq 2 \mu M$ 的 gIC_{50} (65%),而7/17个(41%)符合7天测定形式中的这个标准。

[0208] 黑色素瘤

在实体瘤类型中,化合物A在黑色素瘤细胞系中具有最有力的抗增殖效应(图11)。评价的7个系中的6个具有小于 $2 \mu M$ 的 gIC_{50} 值(表7)。无论 gIC_{50} 值如何,化合物A的效应在所有黑色素瘤系中都是细胞抑制性的。

[0209] 表7 黑色素瘤细胞系中的化合物A活性的概括

细胞系	gIC_{50} (μM)	gIC_{100} (μM)	$Y_{min}-T_0$
A375	0.05 ± 0.03	29.33 ± 0.00	91.9
SK-MEL-5	0.09 ± 0.03	27.09 ± 3.92	31.8
IGR-1	0.27 ± 0.14	29.33 ± 0.00	507.0
SK-MEL-2	0.28 ± 0.14	22.37 ± 12.11	35.9
COLO741	0.43 ± 0.37	28.55 ± 1.40	12.5
HT144	3.46 ± 2.68	29.33 ± 0.00	124.9
MDA-MB-435S	29.36 ± 0.00	29.33 ± 0.00	19.1

[0210] 实施例2

在同基因癌症模型中,ICOS激动与I型PRMT抑制组合的协同活性

我们探索了通过化合物D的I型PRMT抑制的组合,是否可以增加抗ICOS抗体在免疫活性的肿瘤模型中的功效。化合物D单独给药,以及与抗ICOS激动剂抗体(Icos17G9-GSK)组合给药。在CT26和EMT6肿瘤模型两者中,该组合提供了超过任一单一试剂的显著存活益处(图26A、图26B)。在3周给药期过程中,在两个模型中的组合组中观察到个别肿瘤生长的延迟(图26C)。

[0211] 使用下述材料和方法获得了实施例2中描述的结果:

小鼠、肿瘤攻击和处理

7周龄的雌性BALB/c小鼠(BALB/cAnNCr1, Charles River)用于遵守USDA实验室动物福利法(Laboratory Animal Welfare Act),在完全认可的AAALAC设施(Charles River Laboratories)中的体内研究。将 3×10^5 (CT26)或 5×10^6 (EMT6)个细胞皮下接种到右肋腹内。每周两次用测径器在两个维度上测量肿瘤,并且使用下式计算肿瘤体积: $0.5 \times \text{长度} \times \text{宽度}^2$ 。当肿瘤达到 100 至 150mm^3 时,将小鼠($n=10$ 只/处理的组)随机分组,并且接受盐水(每天一次,经口施用)、 300mg/kg 化合物D(每天一次,经口施用)、 5mg/kg 抗ICOS(17G9;每周两次经由腹膜内注射)、或化合物D和抗ICOS的组合。对于所有研究,化合物D施用3周;CT26和

EMT6模型分别接受3或4个剂量的抗ICOS抗体。对于各个小鼠大于2,000 mm³的肿瘤测量和/或开放性溃疡的发展,导致小鼠从研究中去除。

<211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 5
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 6
 Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 7
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 氨基酸序列
 <400> 7
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Leu Ile Ser Ile Tyr Ser Asp His Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Gly Arg Asn Asn Tyr Gly Asn Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 8
 <211> 106
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 氨基酸序列

<400> 8

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met
			20					25					30		
His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr
		35					40					45			
Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
		50				55					60				
Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu
65					70					75					80
Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	Gly	Tyr	Pro	Tyr	Thr
				85					90						95
Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys						
			100						105						

<210> 9

<211> 168

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人ICOS同种型2的氨基酸序列

<400> 9

Met	Lys	Ser	Gly	Leu	Trp	Tyr	Phe	Phe	Leu	Phe	Cys	Leu	Arg	Ile	Lys
1				5					10					15	
Val	Leu	Thr	Gly	Glu	Ile	Asn	Gly	Ser	Ala	Asn	Tyr	Glu	Met	Phe	Ile
			20					25					30		
Phe	His	Asn	Gly	Gly	Val	Gln	Ile	Leu	Cys	Lys	Tyr	Pro	Asp	Ile	Val
		35					40					45			
Gln	Gln	Phe	Lys	Met	Gln	Leu	Leu	Lys	Gly	Gly	Gln	Ile	Leu	Cys	Asp
		50				55					60				
Leu	Thr	Lys	Thr	Lys	Gly	Ser	Gly	Asn	Thr	Val	Ser	Ile	Lys	Ser	Leu
65					70					75					80
Lys	Phe	Cys	His	Ser	Gln	Leu	Ser	Asn	Asn	Ser	Val	Ser	Phe	Phe	Leu
				85					90						95
Tyr	Asn	Leu	Asp	His	Ser	His	Ala	Asn	Tyr	Tyr	Phe	Cys	Asn	Leu	Ser
			100						105					110	

Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu
 115 120 125
 His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro
 130 135 140
 Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu
 145 150 155 160
 Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Met
 165
 <210> 10
 <211> 199
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人ICOS同种型1的氨基酸序列
 <400> 10
 Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys
 1 5 10 15
 Val Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile
 20 25 30
 Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val
 35 40 45
 Gln Gln Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp
 50 55 60
 Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu
 85 90 95
 Tyr Asn Leu Asp His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser
 100 105 110
 Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu
 115 120 125
 His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro
 130 135 140
 Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu
 145 150 155 160
 Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro
 165 170 175
 Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser
 180 185 190

<220>

<223> 37A10S713的氨基酸序列

<400> 16

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Gly Ser Phe Asn Tyr Leu Thr
1 5 10 15

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 37A10S713的氨基酸序列

<400> 17

Tyr Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 37A10S713的氨基酸序列

<400> 18

His His His Tyr Asn Ala Pro Pro Thr
1 5

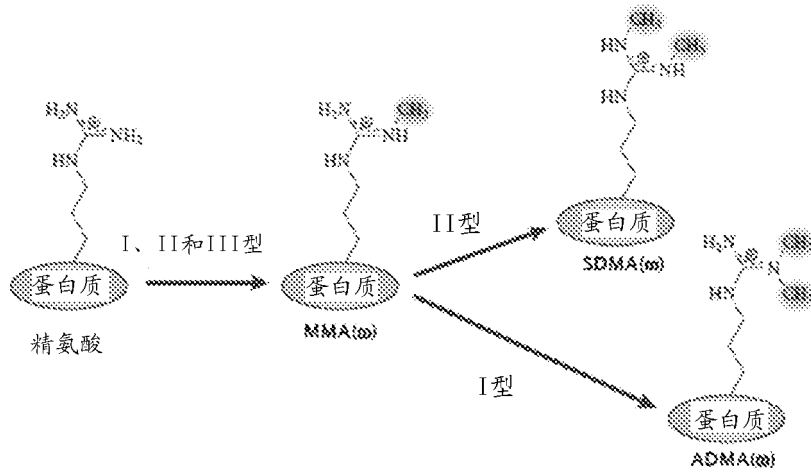


图 1

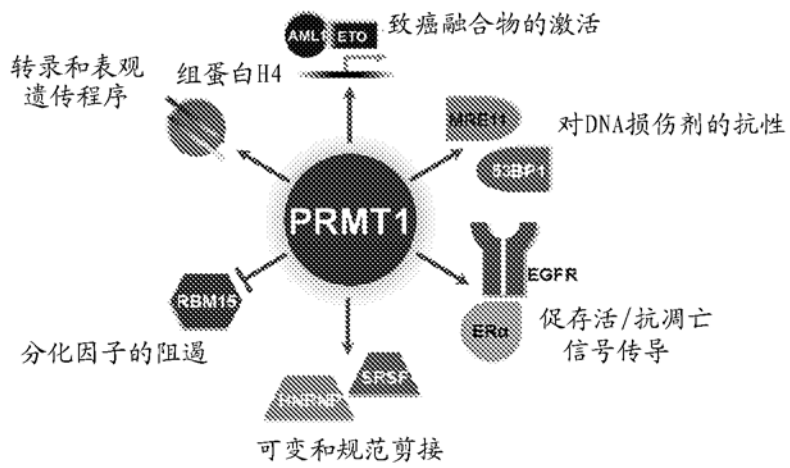


图 2

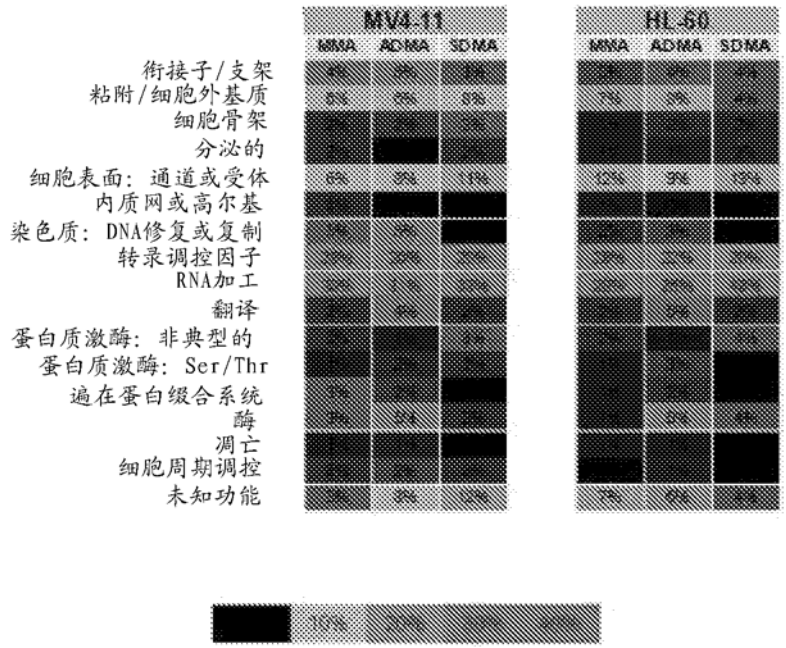


图 3

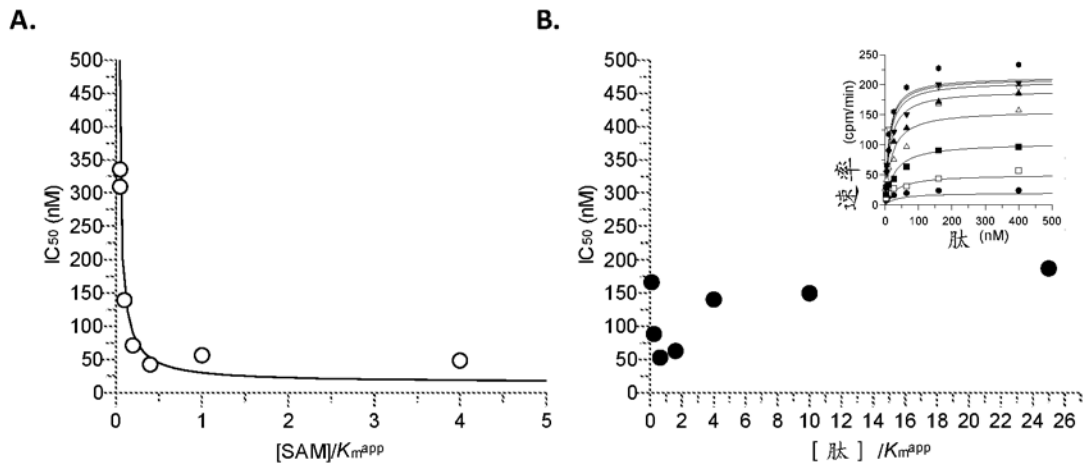


图 4

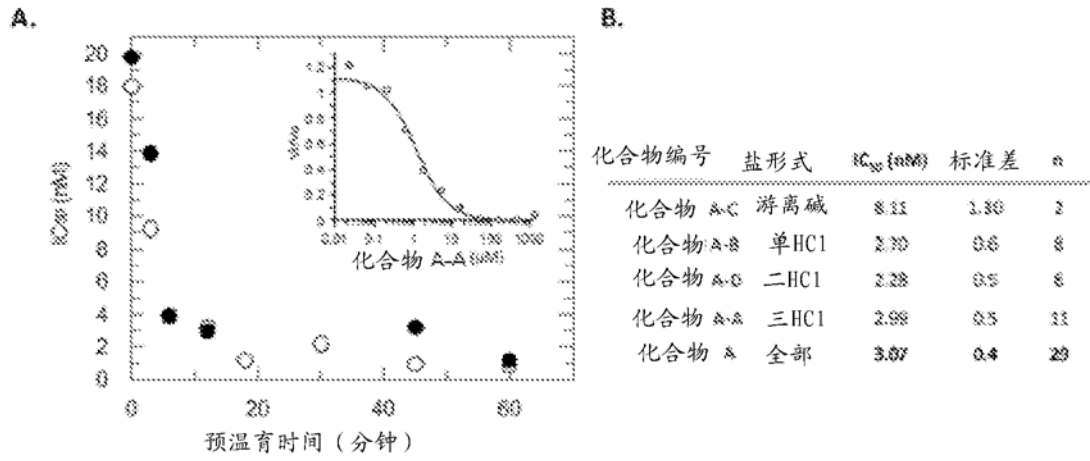


图 5

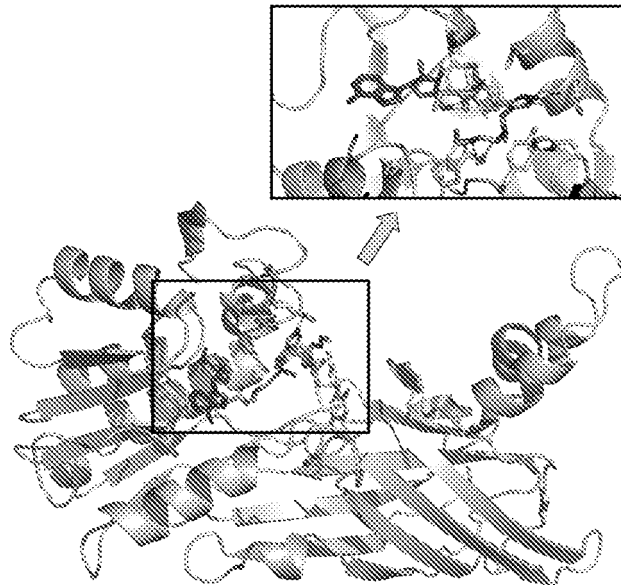


图 6

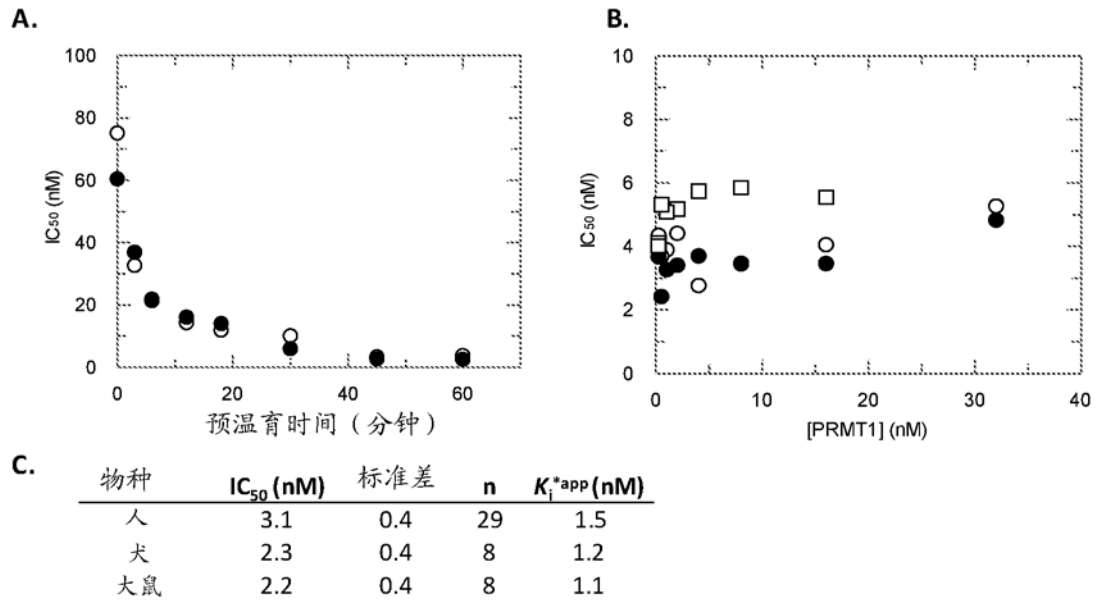


图 7

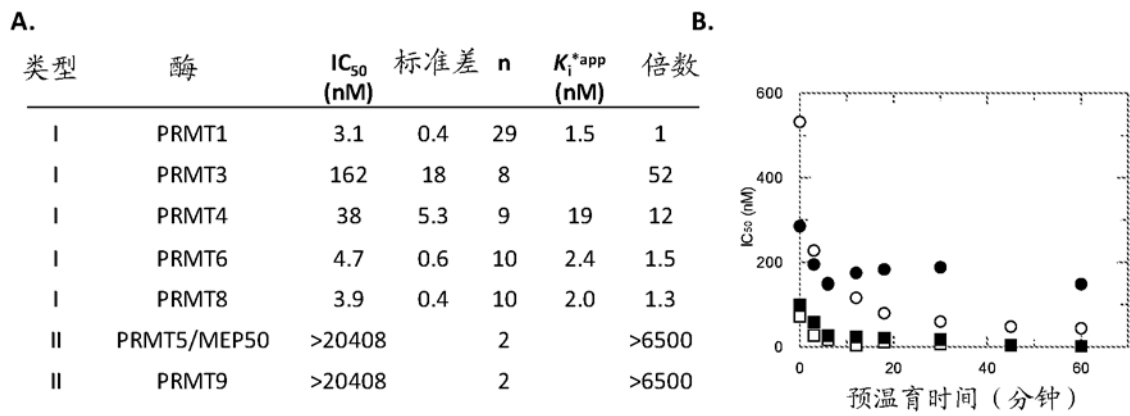
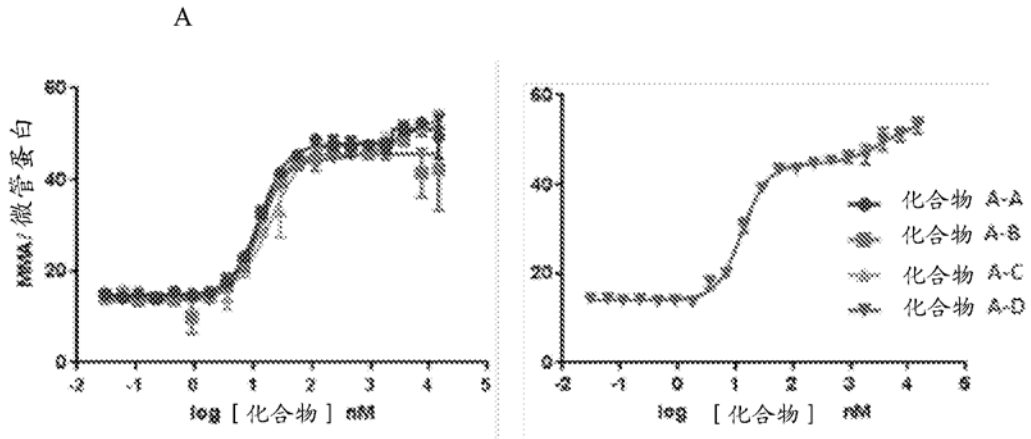


图 8



B

化合物	EC ₅₀ (nM)	标准差 (nM)	N
化合物 A-A	10.13	4.44	5
化合物 A-B	13.46	2.12	2
化合物 A-B	13.83	2.44	2
化合物 A-C	19.16	1.65	2
化合物 A-C	17.39	3.43	2
化合物 A-D	18.01	6.04	4

图 9

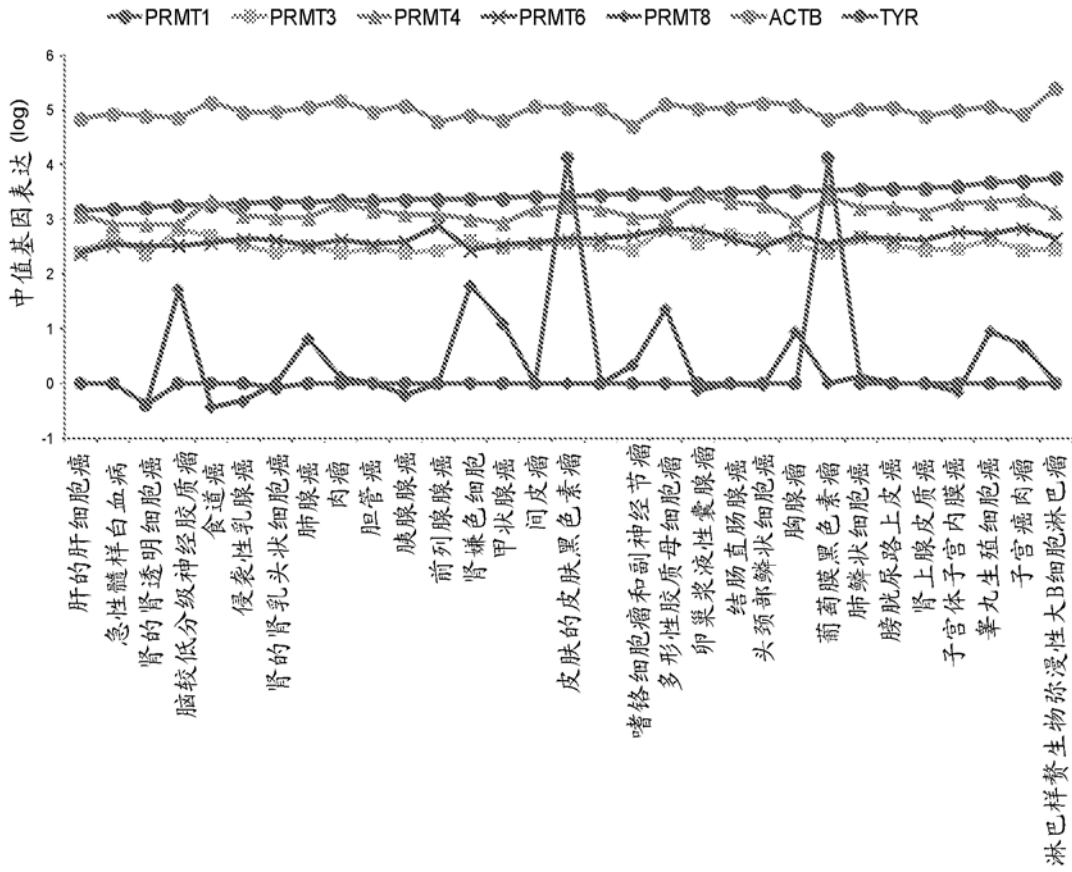


图 10

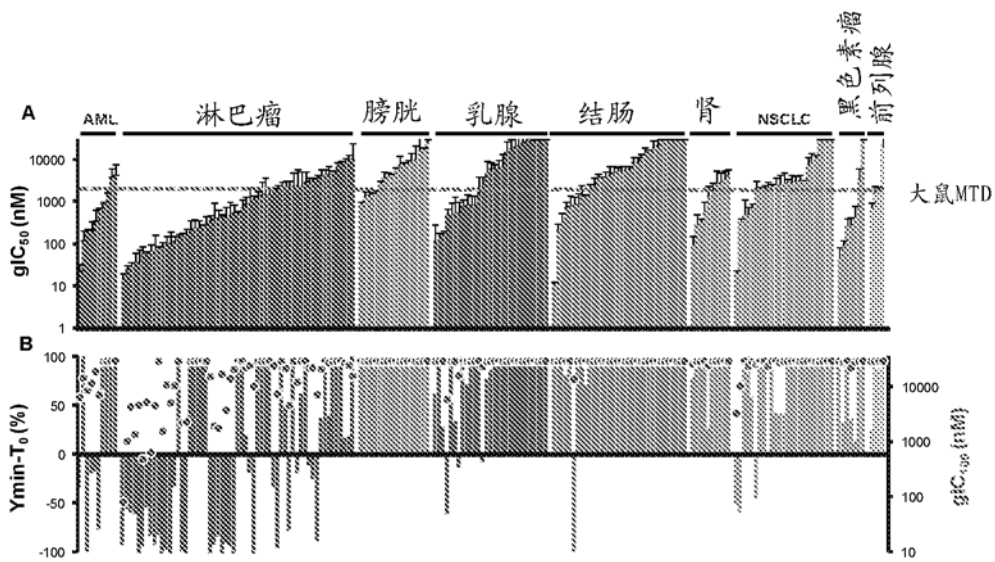


图 11

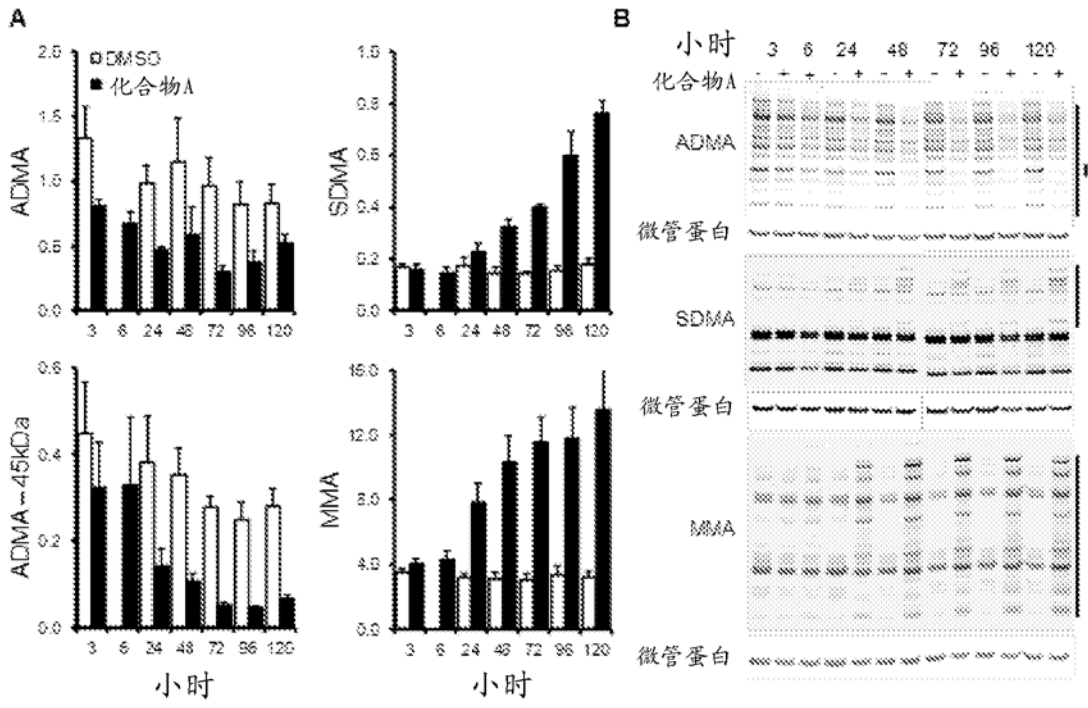


图 12

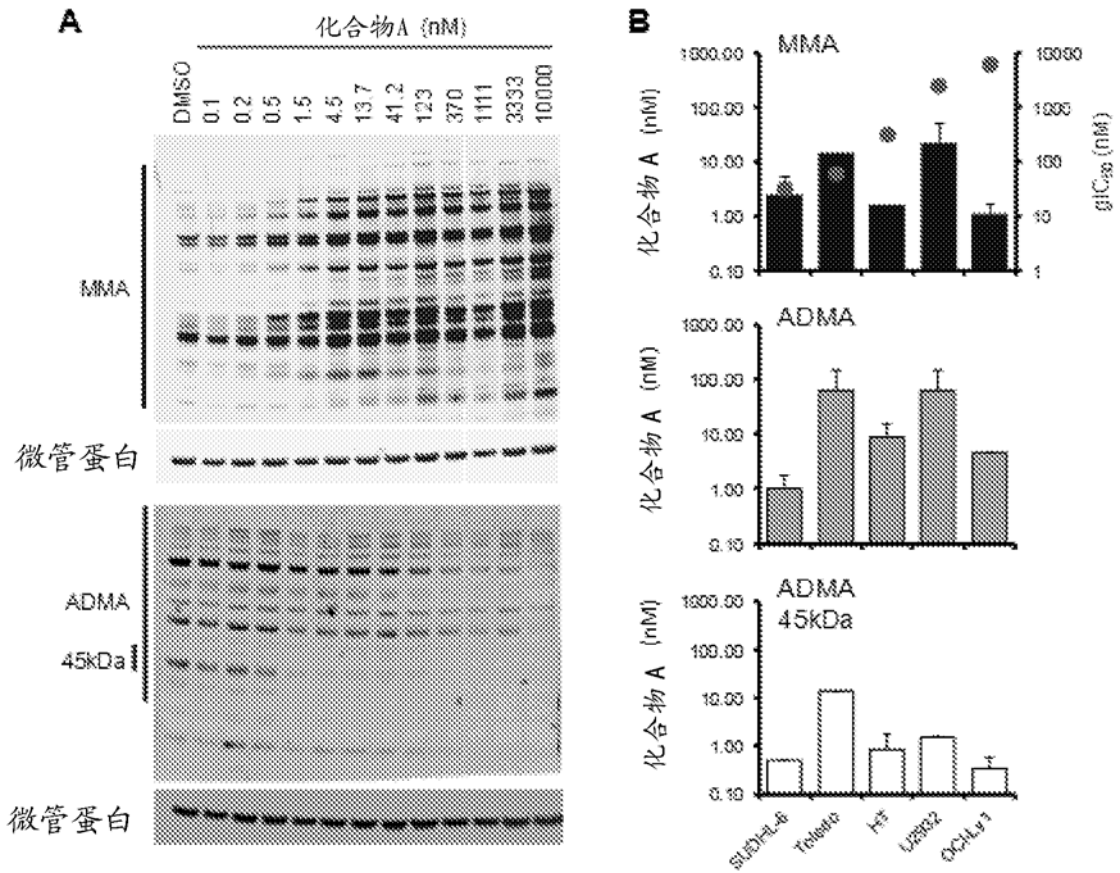


图 13

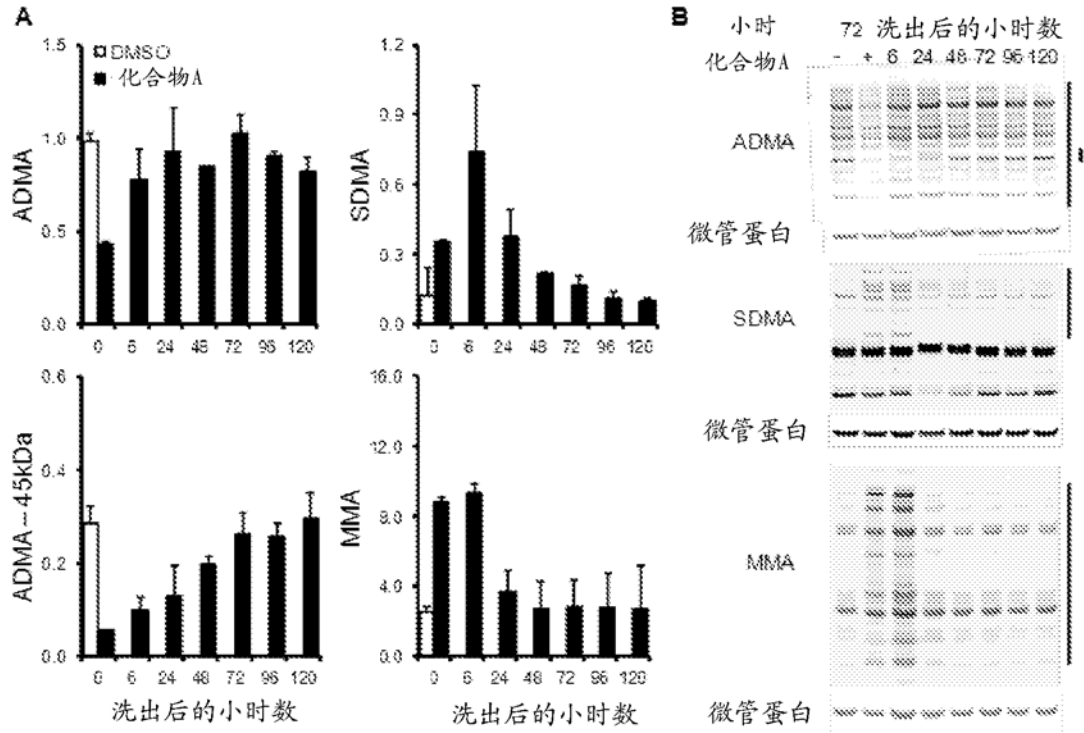


图 14

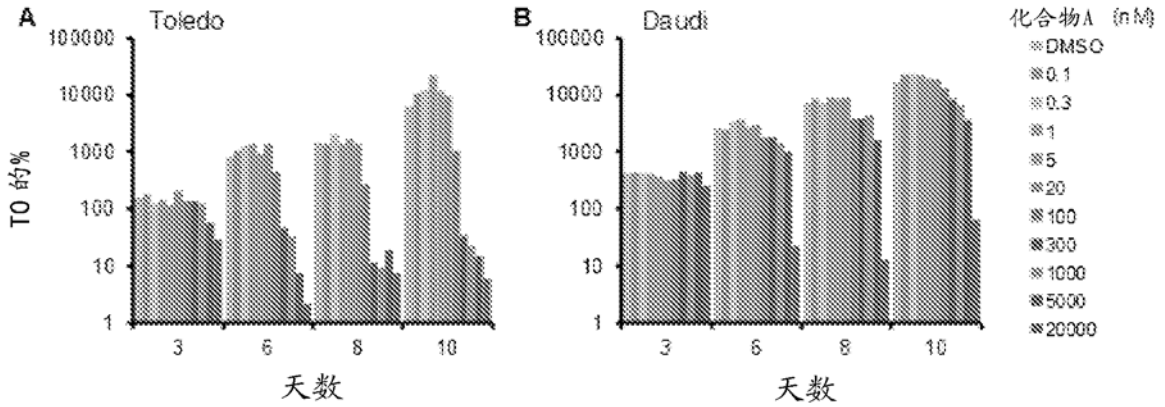


图 15

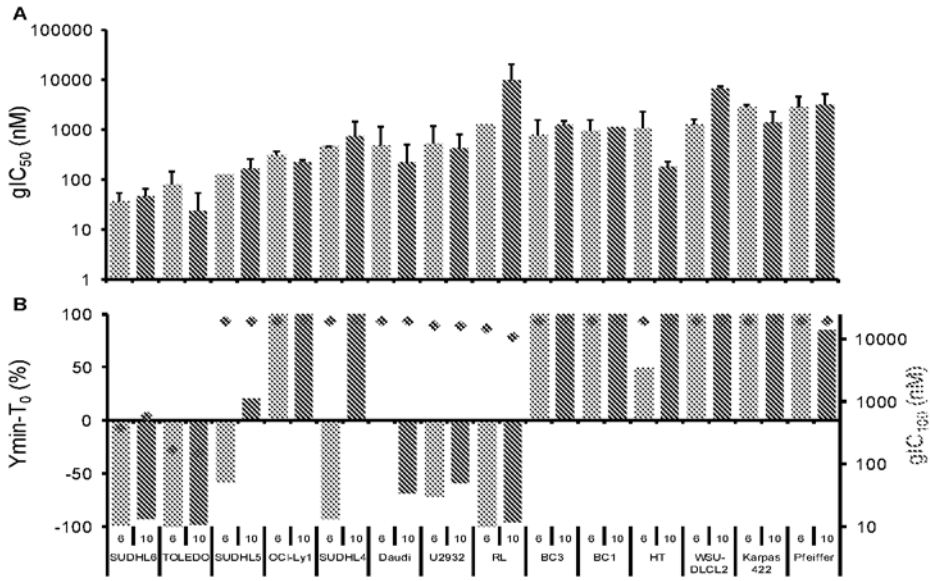


图 16

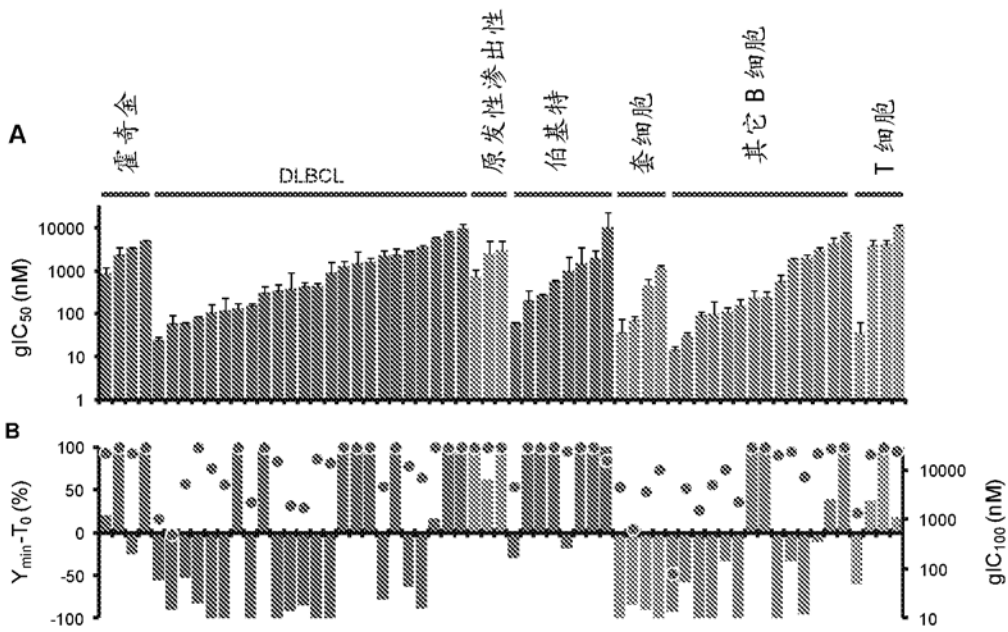


图 17

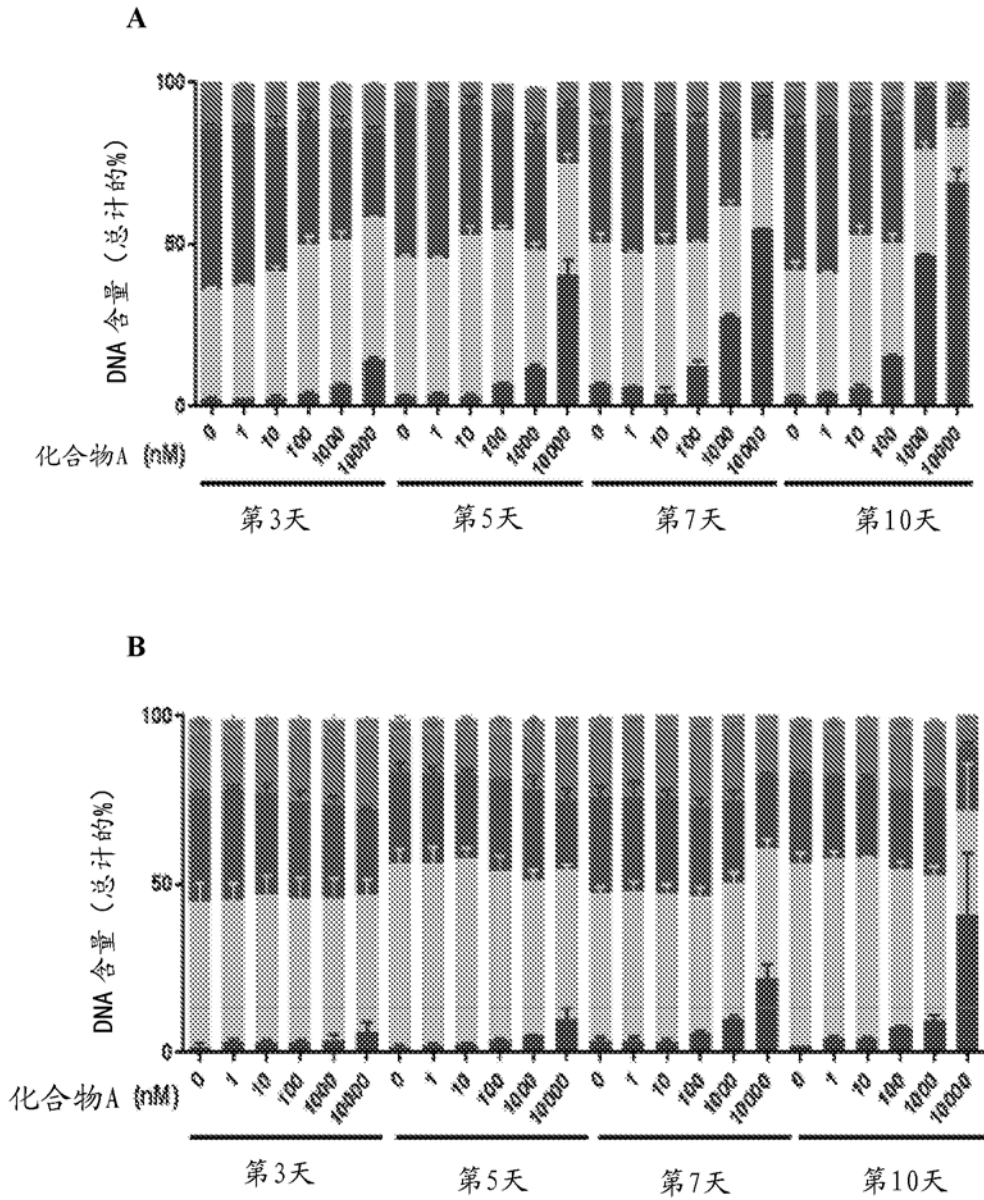


图 18

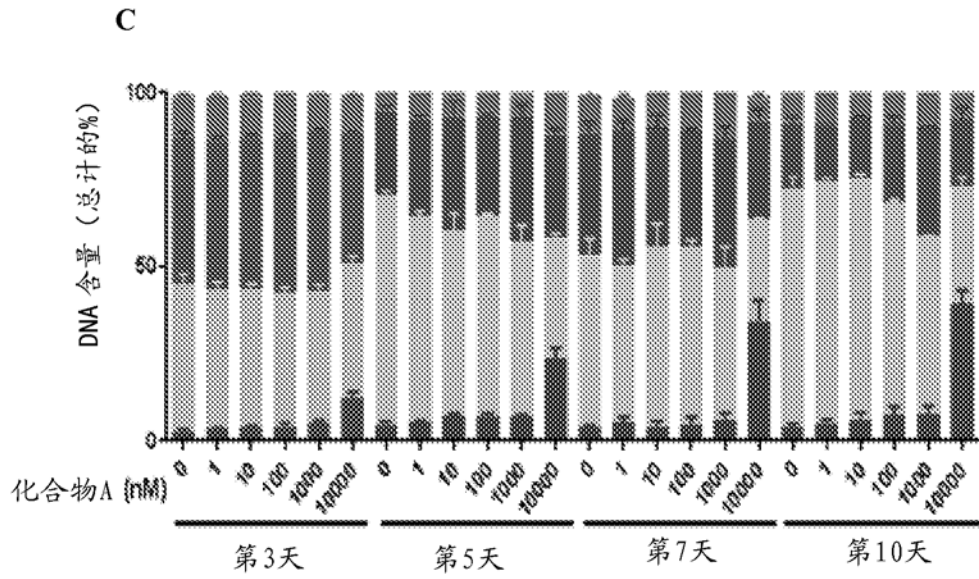


图 18(续)

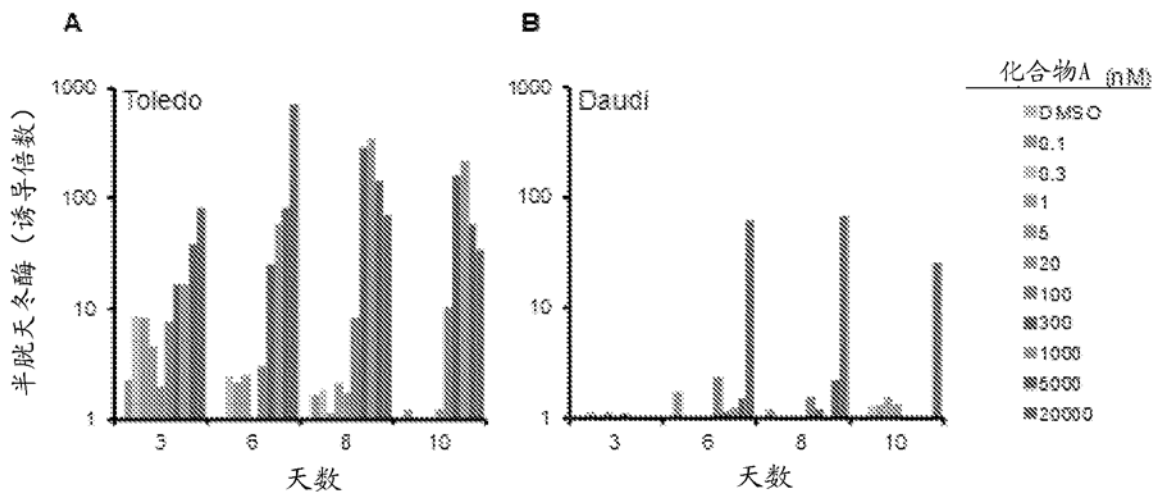


图 19

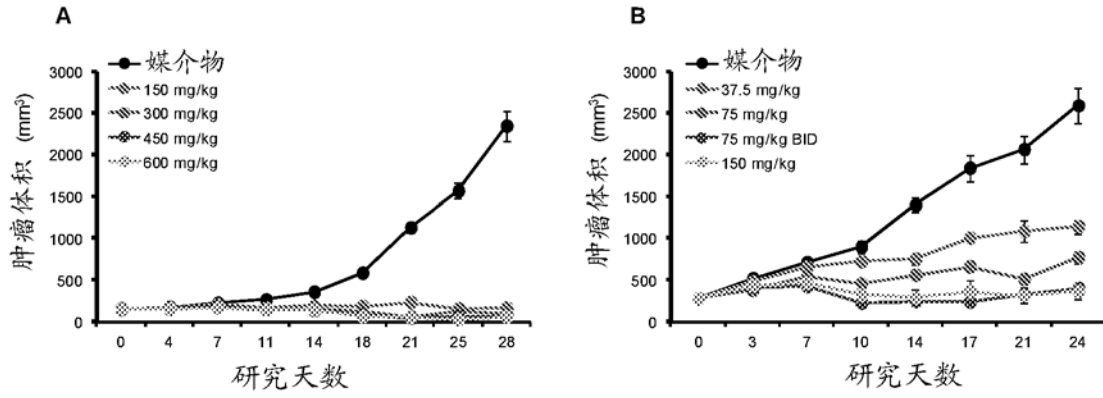


图 20

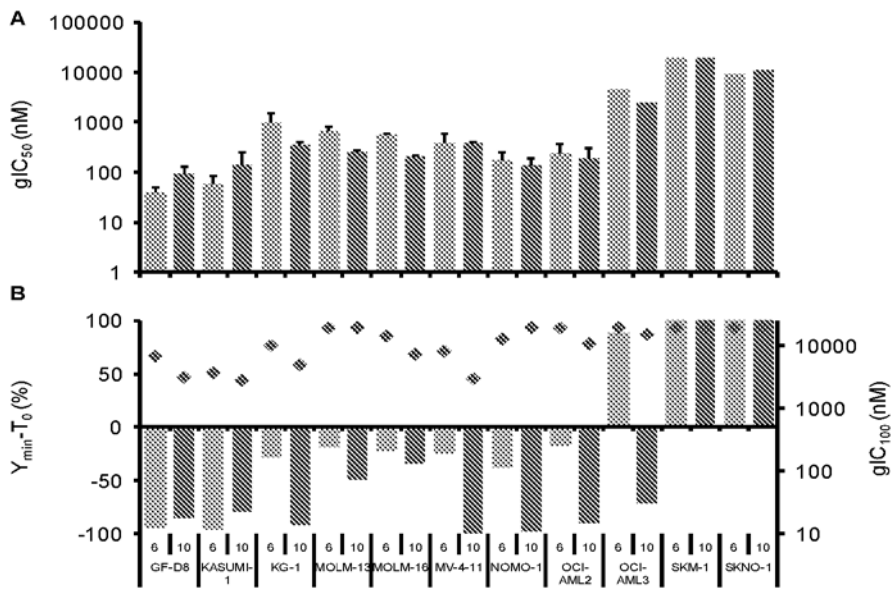


图 21

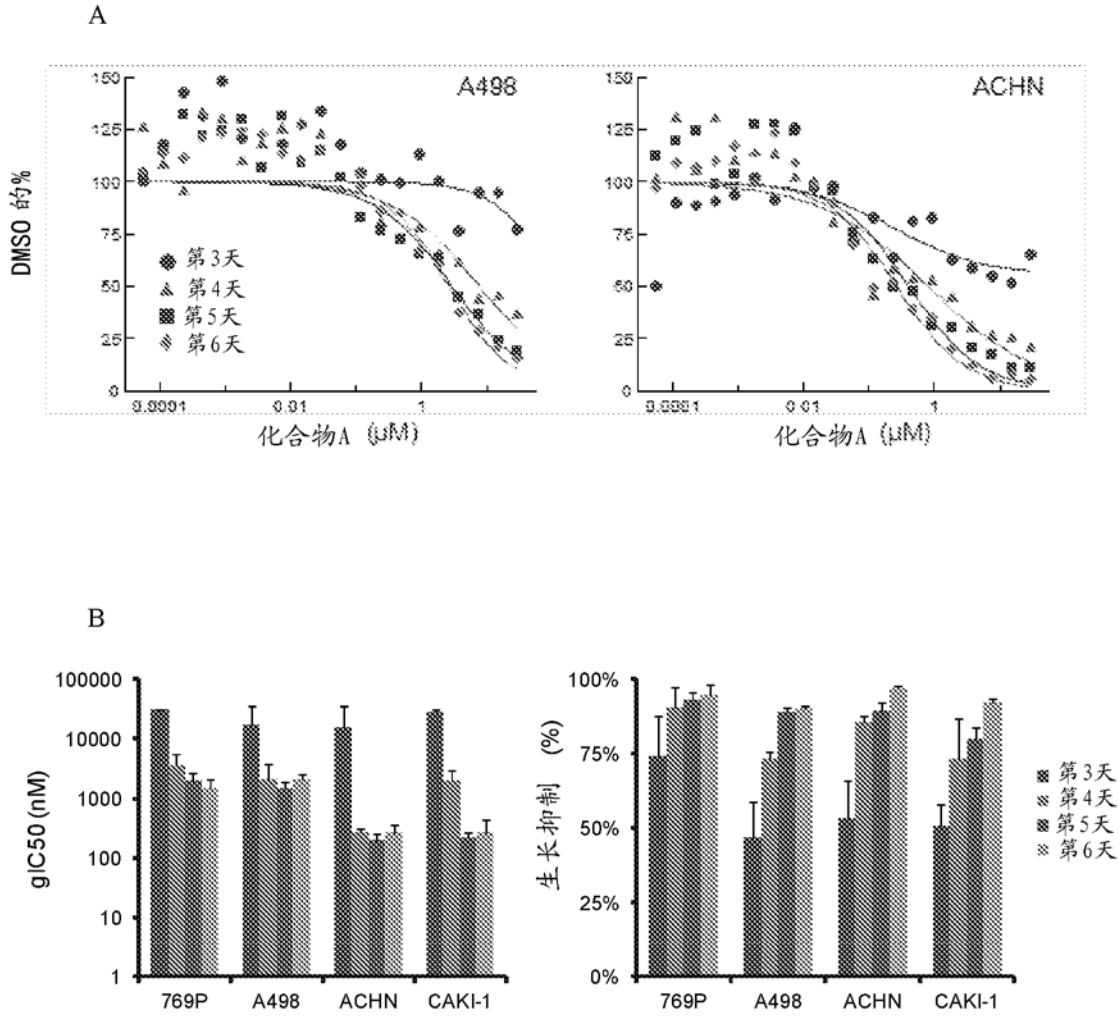


图 22

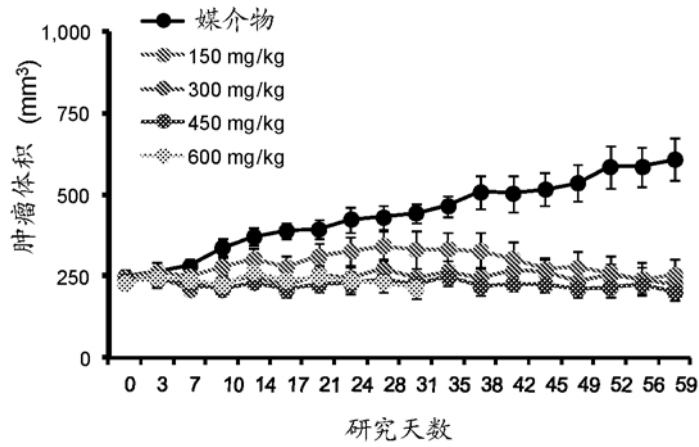


图 23

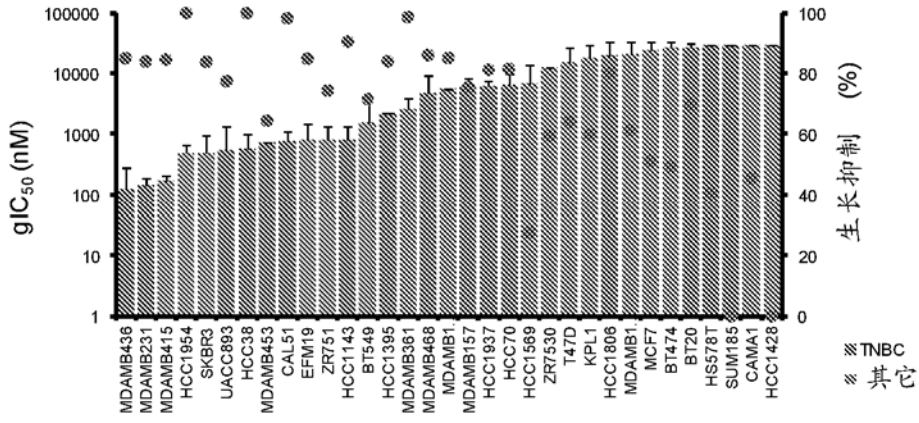


图 24

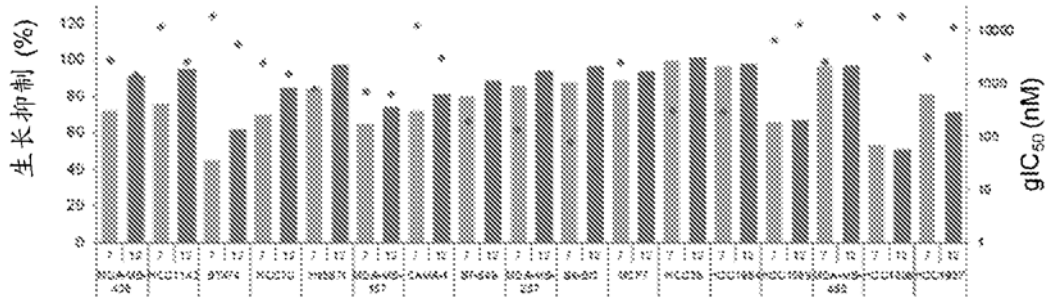


图 25

关于CT26的Kaplan-Meier图

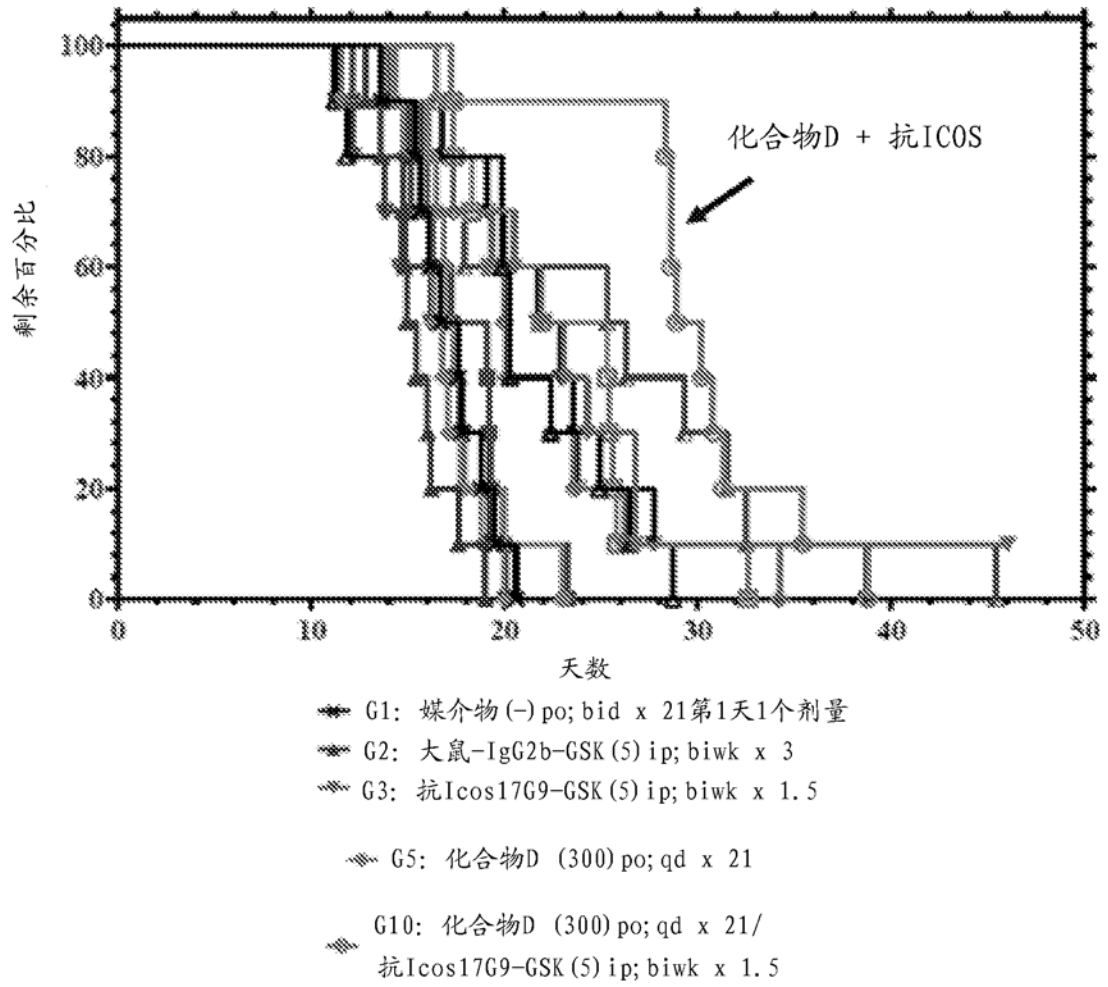


图 26A

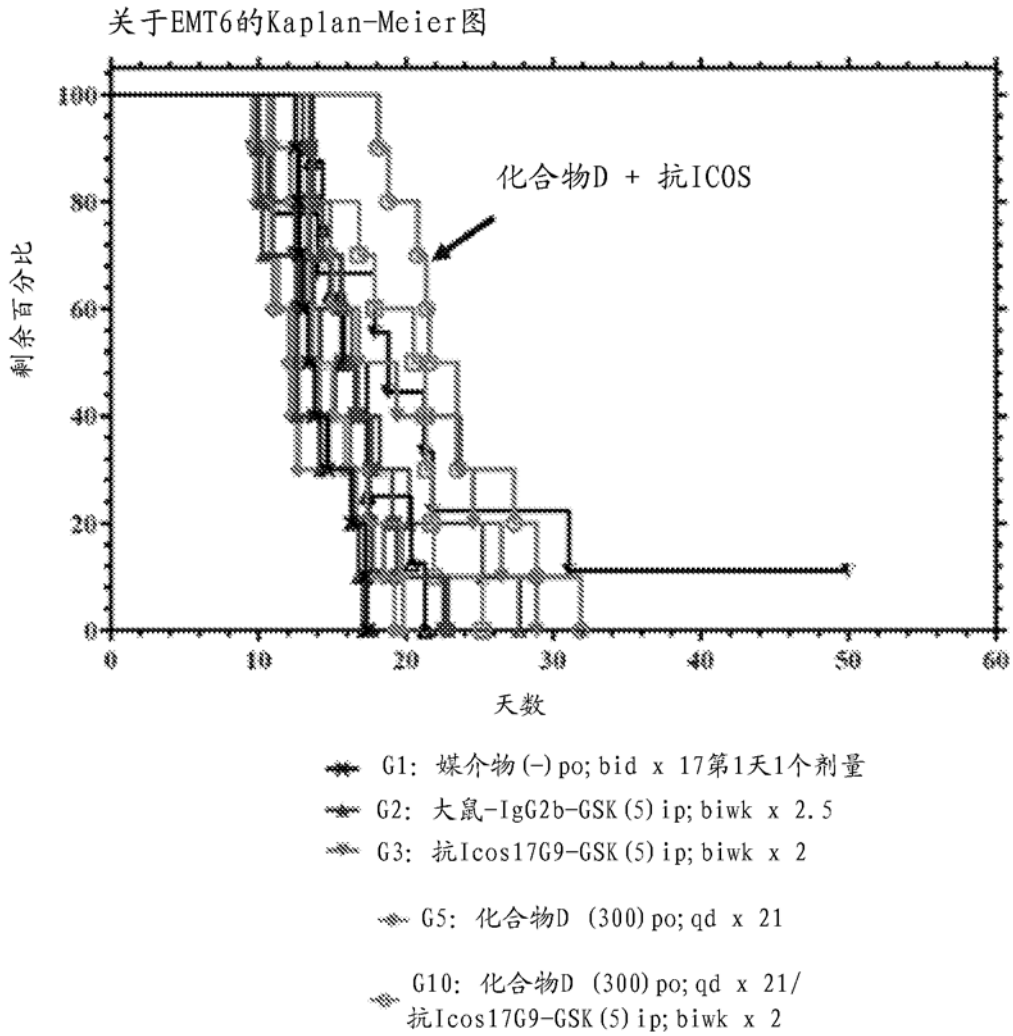


图 26B

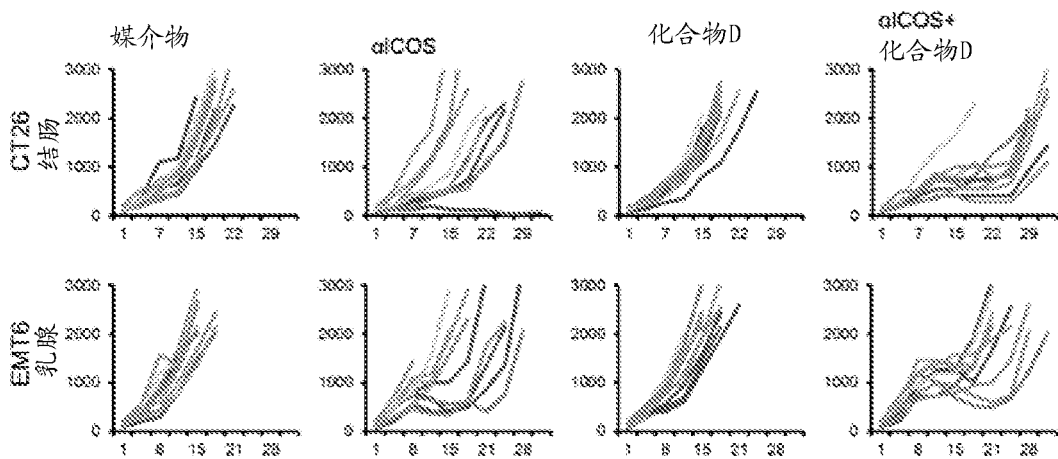


图 26C