



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104861067 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 26

(21) 申请号 201410011324. 5

(22) 申请日 2014. 01. 10

(71) 申请人 博笛生物科技有限公司

地址 开曼群岛大开曼岛卡玛纳湾卡西亚庭院 2547 赛尔图斯信箱

(72) 发明人 李立新

(74) 专利代理机构 北京金思港知识产权代理有限公司 11349

代理人 邵毓琴 李晶

(51) Int. Cl.

C07K 16/32(2006. 01)

A61K 31/4745(2006. 01)

A61K 31/522(2006. 01)

A61K 47/48(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

A61P 35/02(2006. 01)

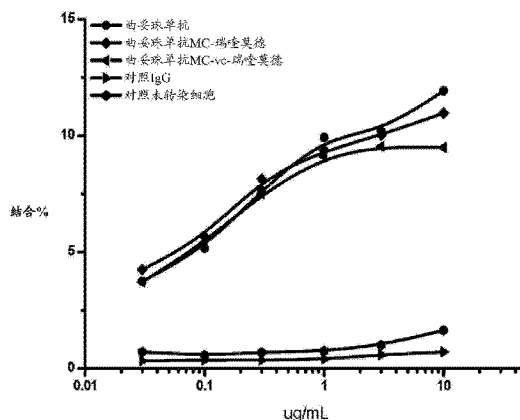
权利要求书6页 说明书56页 附图9页

(54) 发明名称

用于免疫疗法的化合物和组合物

(57) 摘要

本发明涉及用于靶向免疫疗法的化合物以及含有该化合物的组合物。本发明还涉及所述化合物在治疗诸如癌症之类的疾病中的应用。





0)-R<sub>4</sub>, --S(O)<sub>2</sub>-R<sub>4</sub>, --NH-S(O)<sub>2</sub>-R<sub>4</sub>, --烷基-S-R<sub>4</sub>, --烷基-S(O)<sub>2</sub>-R<sub>4</sub>, --NHR<sub>4</sub>, --NR<sub>4</sub>R<sub>4</sub>, --NH-烷基-R<sub>4</sub>, 卤素, --CN 和 -SH, 其中, R<sub>4</sub>独立地为: 氢, 烷基, 烯基, 烷氧基, --烷基-羟基, 芳基, 杂芳基, 杂环基, 或卤代烷基;

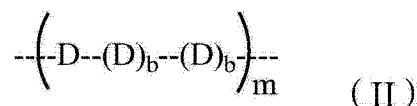
n 为 0, 1, 2, 3 或 4;

Y 为 -NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>, -CR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>R<sub>8</sub>或 -烷基-NH<sub>2</sub>, 它们中的每一个可被一个或一个以上选自下列基团的取代基任选地取代: 羟基, 烷氧基, 烷基, 烯基, 炔基, --NH<sub>2</sub>, 卤素, --N(R<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, --烷氧基-烷基, --烷氧基-烯基, --C(O)-烷基, --C(O)-O-烷基, --C(O)-N(R<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, 芳基, 杂芳基, --CO-芳基和 -CO-杂芳基,

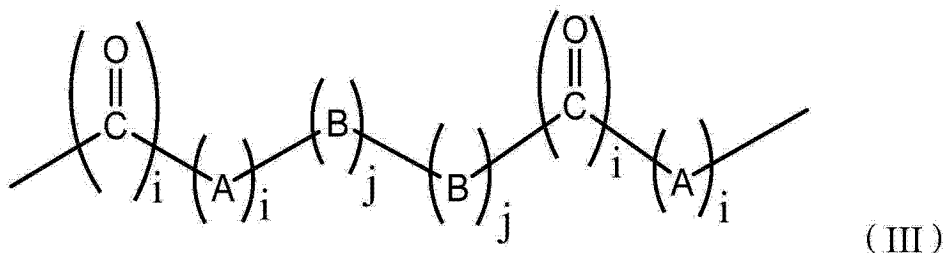
其中, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>和 R<sub>8</sub>独立地为: 氢, 烷基, 烯基, 烷氧基, 烷基氨基, 二烷基氨基, 烷硫基, 芳硫基, --烷基-羟基, --烷基-C(O)-O-R<sub>9</sub>, --烷基-C(O)-R<sub>9</sub>或 -烷基-O-C(O)-R<sub>9</sub>, 其中, R<sub>5</sub>分别独立地为氢, 烷基, 卤代烷基, --烷基-芳基或-烷基-杂芳基, 其中, R<sub>9</sub>为氢, 烷基, 烯基, 卤素或卤代烷基;

任选地, X 和 Z 一同形成 5 至 9 元环。

2. 如权利要求 1 所述的化合物, 其中, L 由下述通式(II)的结构表示:



m 为 1, 2, 3, 4, 5 或 6, b 分别独立地为 0 或 1, 并且 D 由下述通式(III)的结构独立地表示:



其中, i 分别独立地为 0 或 1;

j 分别独立地为 0, 1, 2, 3, 4, 5 或 6;

A 分别独立地为 S, O 或 N-Ra, 其中, Ra 为氢, 烷基, 烯基或烷氧基;

B 分别独立地为烷基, 烯基, --O-烷基--, --烷基-O--, --S-烷基--, --烷基-S--, 芳基, 杂芳基, 杂环基或肽, 它们中的每一个被一个或一个以上选自下列基团的取代基任选地取代: 羟基, 烷氧基, 烷基, 烯基, 炔基, 环烷基, --烷基-芳基, --烷基-杂芳基, --烷基-杂环基, --O-R<sub>4</sub>, --O-烷基-R<sub>4</sub>, --C(O)-R<sub>4</sub>, --C(O)-O-R<sub>4</sub>, --S-R<sub>4</sub>, --S(O)<sub>2</sub>-R<sub>4</sub>, --NHR<sub>4</sub>, --NH-烷基-R<sub>4</sub>, 卤素, --CN, --NO<sub>2</sub>, 和 -SH, 其中, R<sub>4</sub>为: 烷基, 烯基, --烷基-羟基, 芳基, 杂芳基, 杂环基或卤代烷基。

3. 如权利要求 1 所述的化合物, 其中, X 是 -NR<sub>1</sub>, R<sub>1</sub>为: 烷基, --烷基-W<sub>4</sub>, --烷基-O-W<sub>4</sub>, --烷基-NH-C(O)-W<sub>4</sub>, --烷氧基-NH-C(O)-W<sub>4</sub>, --烷基-NH-C(O)-NH-W<sub>4</sub>, --烷氧基-NH-C(O)-NH-W<sub>4</sub>, --烷基-S(O)<sub>2</sub>-W<sub>4</sub>或 --烷基-NH-C(S)-W<sub>4</sub>。

4. 如权利要求 1 所述的化合物, 其中, X 为 S。

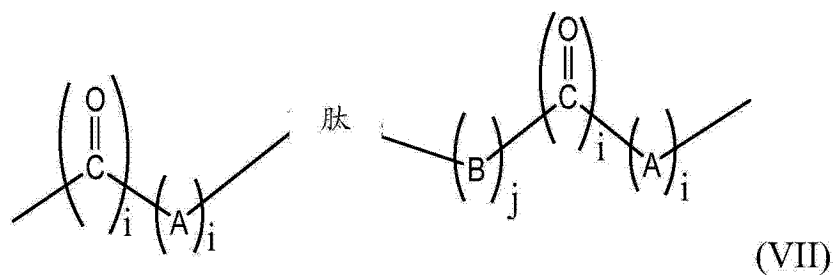
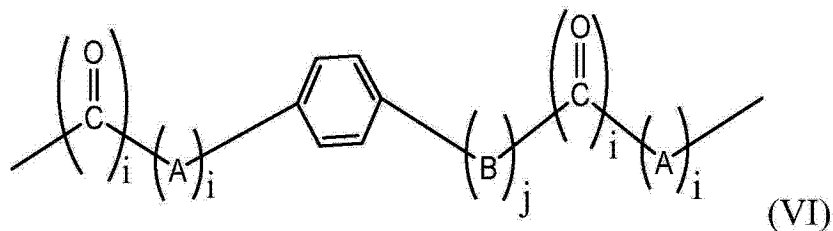
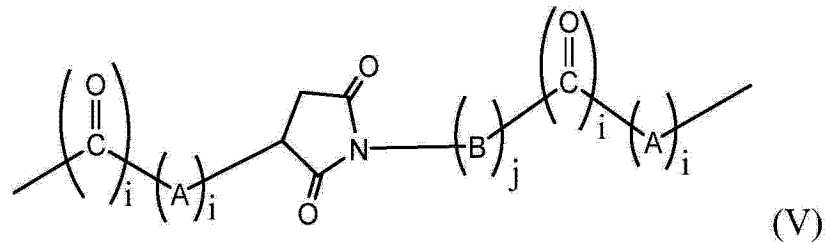
5. 如权利要求 1 至 4 任一项所述的化合物, 其中, Z 为氢, 烷基, 烷氧基, 芳基, 杂芳基, 卤代烷基, 它们中的每一个被一个至三个选自下列基团的取代基任选地取代: 羟基, 烷基,

芳基,杂芳基,杂环基,氰基,--烷氧基-烷基,硝基和 $-N(R_5)_2$ ,其中, $R_5$ 分别独立地为:氢,烷基,卤代烷基,--烷基-芳基或-烷基杂芳基。

6. 如权利要求 1 至 5 任一项所述的化合物,其中, $n$  为 1 或 2, $R$  为芳基或杂芳基,这两者中的每一个被一个至三个选自下列基团的取代基任选地取代:羟基,烷氧基,--烷基-羟基,-- $O-R_4$ ,-- $O$ -烷基- $R_4$ ,--烷基- $O-R_4$ ,-- $C(O)-R_4$ ,-- $C(O)-NH-R_4$ ,-- $C(O)-NR_4R_4$ ,--烷基- $C(O)-R_4$ ,--烷基- $C(O)-O-R_4$ ,-- $C(O)-O-R_4$ ,-- $O-C(O)-R_4$ ,-- $S-R_4$ ,-- $C(O)-S-R_4$ ,-- $S-C(O)-R_4$ ,-- $S(O)_2-R_4$ ,-- $NH-S(O)_2-R_4$ ,--烷基- $S-R_4$ ,--烷基- $S(O)_2-R_4$ ,-- $NHR_4$ ,-- $NR_4R_4$ ,-- $NH$ -烷基- $R_4$ ,卤素,-- $CN$  和  $-SH$ ,其中, $R_4$ 独立地为氢,烷基,烯基,烷氧基,--烷基-羟基,芳基,杂芳基,杂环基,或卤代烷基。

7. 如权利要求 1 至 6 任一项所述的化合物,其中, $Y$  为 $-NH_2$ ,--烷基- $NH_2$ ,它们中的每一个被一个至三个选自下列基团的取代基任选地取代:烷基,烷氧基,烯基和炔基。

8. 如权利要求 2 至 7 任一项所述的化合物,其中,连接体部分中的  $D$  选自下述通式 (V) 至通式 (VII) 的结构:



A、B、 $i$  和  $j$  为上文中所界定的。

9. 如权利要求 1 至 8 任一项所述的化合物,其中,  $TM$  包含免疫球蛋白、蛋白质、小分子、纳米颗粒或核酸。

10. 如权利要求 9 所述的化合物,其中,  $TM$  特异性结合肿瘤细胞,或者相对于非肿瘤细胞优先结合肿瘤细胞。

11. 如权利要求 10 所述的化合物,其中,  $TM$  特异性结合所述肿瘤细胞上的肿瘤抗原。

12. 如权利要求 11 所述的化合物,其中,所述肿瘤抗原选自:  $CD2$ ,  $CD19$ ,  $CD20$ ,  $CD22$ ,  $CD$

27, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD47, CD52, CD56, CD70, CD79, CD137, 4-1BB, 5T4, AGS-5, A GS-16, 血管生成素 2, B7. 1, B7. 2, B7DC, B7H1, B7H2, B7H3, BT-062, BTLA, CAIX, 癌胚抗原, CT LA4, Cripto, ED-B, ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFL7, EpCAM, EphA2, EphA3, EphB2, FAP, 纤连蛋白, 叶酸盐受体, 神经节苷酯 GM3, GD2, 糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体 (GITR), gp100, gpA33, GPNMB, ICOS, IGF1R, 整联蛋白, KIR, LAG-3, Lewis Y, 间皮素, c-MET, MN 碳酸酐酶 IX, MUC1, MUC16, 粘连蛋白 -4, NKGD2, NOTCH, OX40, OX40L, PD-1, PDL1, PSCA, PSMA, RANK L, ROR1, ROR2, SLC44A4, 多配体蛋白聚糖 -1, TACI, TAG-72, 腱生蛋白, TIM3, TRAILR1, TRAIL R2, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 和它们的变体。

13. 如权利要求 9 所述的化合物, 其中, TM 包含抗体或其功能片段。

14. 如权利要求 9 所述的化合物, 其中, TM 包含: 美罗华(利妥昔单抗)、赫赛汀(曲妥珠单抗)、爱必妥(西妥昔单抗)、维克替比(帕尼单抗)、Arzerra (Ofatumumab)、Benlysta (贝利木单抗)、Yervoy (伊匹单抗)、Perjeta (帕妥珠单抗)、Tremelimumab、Nivolumab、Dacetuzumab、Urelumab、MPDL3280A、Lambrolizumab、Blinatumomab、阿地白介素(aldesleukin)、aemtuzumab、阿里维 A 酸(alitretinoin)、别嘌醇、六甲蜜胺(altretamine)、氨磷汀(amifostine)、阿那曲唑(anastrozole)、三氧化砷、门冬酰胺酶、BCG Live、蓓萨罗丁胶囊(bexarotene capsules)、蓓萨罗丁凝胶(bexarotene gel)、博来霉素、静脉内用白消安、口服用白消安、卡普睾酮(calusterone)、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀(carmustine)、带有 poifeprosan20iplant 的卡莫司汀、塞来昔布、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨(cladribine)、环磷酰胺、阿糖胞苷、阿糖胞苷脂质体、达卡巴嗪(dacarbazine)、放线菌素 D、更生霉素、阿法达贝泊汀(dabepoetin alfa)、盐酸柔红霉素脂质体、盐酸柔红霉素、柔红霉素、dnileukin diftitox、右雷佐生(dexrazoxane)、多西他赛、多柔比星、多柔比星脂质体、丙酸屈膜斯酮(domostanolone propionate)、eliott's B soution、表阿霉素、eoetin alfa estramustine、磷酸依托泊苷、依托泊苷(VP-16)、依西美坦、flgrastim、氟脲苷(动脉内用)、氟达拉滨(fludarabine)、氟尿嘧啶(5-FU)、氟维司群(fulvestrant)、吉妥单抗(gemtuzumab ozogamicin)、醋酸戈舍瑞林、羟基脲、替伊莫单抗(Ibritumomab Tiuxetan)、伊达比星、异环磷酰胺、甲磺酸伊马替尼、干扰素  $\alpha$ -2a、干扰素  $\alpha$ -2b、伊立替康、曲来唑、亚叶酸钙、左旋咪唑(levamisole)、洛莫司汀(CCNU)、二氯甲基二乙胺(氮芥)、醋酸甲地孕酮、美法仑(L-PAM)、巯嘌呤(6-MP)、美司那、甲氨蝶呤、甲氧沙林、丝裂霉素 C、米托坦、米托蒽醌、苯丙酸诺龙(nandrolone phenpropionate)、nfetumomab、LOddC、orelvekin、奥沙利铂、紫杉醇、帕米膦酸盐(pamidronate)、培加酶(pegademase)、培门冬酶(Pegaspargase)、乙二醇化非格司亭(Pegfilgrastim)、喷司他丁、哌泊溴烷、普卡霉素、光辉霉素、吡吩姆钠、丙卡巴肼、阿的平(quinacrine)、拉布立酶、沙格司亭、链佐星、替比夫定(talbutidine, LDT)、滑石、他莫昔芬、替莫唑胺、替尼泊苷(VM-26)、睾内酯、硫鸟嘌呤(6-TG)、塞替派、拓扑替康、托瑞米芬(toremifene)、托西莫单抗(Tositumomab)、维 A 酸(ATRA)、乌拉莫司汀(Uracil Mustard)、戊柔比星、泛托西他滨(valtorcitabine, monoval LDC)、长春碱、长春瑞滨、唑来膦酸(zoledronate), 以及它们的混合物。

15. 一种药物组合物, 所述药物组合物包含有效量的权利要求 1 至 14 任一项所述的化合物, 以及一种或一种以上药学上可接受的载体。

16. 如权利要求 15 所述的药物组合物, 所述药物组合物还包含有效量的其他治疗剂。

17. 如权利要求 16 所述的药物组合物,其中,所述其他治疗剂为抗癌剂。

18. 如权利要求 16 所述的药物组合物,其中,所述抗癌剂为抗代谢药物、拓扑异构酶 I 和拓扑异构酶 II 的抑制剂、烷基化剂、微管抑制剂、抗雄性激素剂、GnRH 调节剂或者它们的混合物。

19. 一种抑制肿瘤细胞增殖的方法,所述方法包括将权利要求 1 至 14 任一项所述的化合物给药于所述肿瘤细胞。

20. 一种治疗受治者体内的疾病的方法,所述方法包括将权利要求 1 至 14 任一项所述的化合物给药于所述受治者。

21. 如权利要求 20 所述的方法,其中,所述疾病为癌症,所述癌症选自:胃癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、子宫颈癌、子宫体癌、卵巢癌、睾丸癌、膀胱癌、肾癌、脑癌/中枢神经系统癌症、头颈癌、咽喉癌、霍奇金氏疾病、非霍奇金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病、黑色素瘤、非黑色素瘤皮肤癌、急性淋巴细胞性白血病、急性粒细胞性白血病、尤因氏肉瘤、小细胞肺癌、绒毛膜上皮癌、横纹肌肉瘤、Wilms 肿瘤、神经母细胞瘤、多毛细胞白血病、口咽癌、食道癌、喉癌或淋巴瘤。

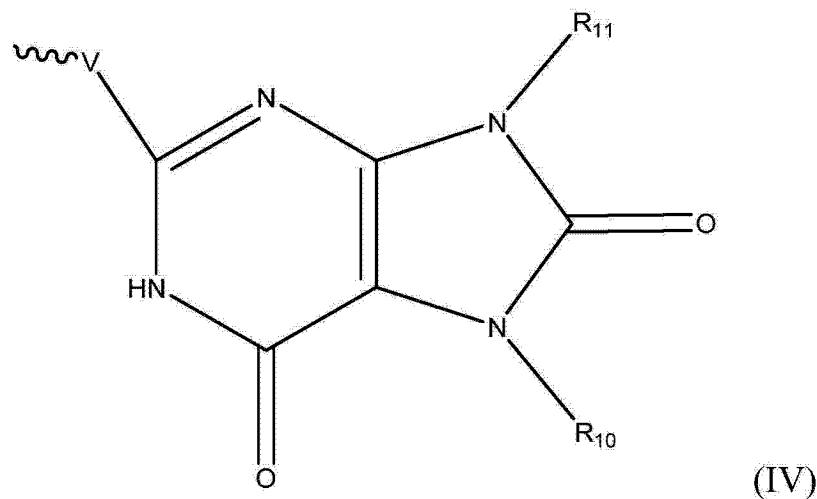
22. 权利要求 1 至 14 任一项所述的化合物在制备用于治疗受治者体内的疾病的药物中的应用。

23. 权利要求 15 至 18 任一项所述的药物组合物在制备用于治疗受治者体内的疾病的药物中的应用。

24. 一种具有通式 (Ib) 的结构化合物或其药学上可接受的盐或其溶剂化物:

TM-L-AM (Ib)

其中, TM 为靶向部分, L 为连接体, AM 是由下述通式 (IV) 的结构表示的活化部分:



其中,  $\sim$  是待与连接体连接的点;

其中, V 是  $-NR_6R_7$ , 其中,  $R_6$  和  $R_7$  分别独立地为氢, 烷基, 烯基, 烷氧基, 烷基氨基, 二烷基氨基, 烷硫基, 芳硫基,  $--$  烷基  $-$  羟基,  $--$  烷基  $-C(O)-O-R_9$ ,  $--$  烷基  $-C(O)-R_9$  或  $-$  烷基  $-O-C(O)-R_9$ , 其中,  $R_9$  是氢, 烷基, 烯基, 卤素或卤代烷基;

$R_{10}$  和  $R_{11}$  独立地为氢, 烷基, 烯基, 芳基, 卤代烷基, 杂芳基, 杂环基或环烷基, 它们中的每一个被一个或一个以上选自下列基团的取代基任选地取代: 羟基, 烷氧基, 烷基, 烯基, 炔基, 卤素,  $--N(R_5)_2$ ,  $--$  烷氧基  $-$  烷基,  $--$  烷氧基  $-$  烯基,  $--C(O)-$  烷基,  $--C(O)-O-$  烷

基,  $-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}_5)_2$ , 芳基, 杂芳基,  $-\text{CO}-$  芳基, 以及  $-\text{CO}-$  杂芳基, 其中,  $\text{R}_5$  分别独立地为氢, 烷基, 卤代烷基,  $-\text{烷基}-\text{芳基}$  或  $-\text{烷基}-\text{杂芳基}$ 。

25. 一种药物组合物, 所述药物组合物包含有效量的权利要求 24 所述的化合物, 以及一种或一种以上药学上可接受的载体。

26. 如权利要求 25 所述的药物组合物, 所述药物组合物还包含有效量的其他治疗剂。

## 用于免疫疗法的化合物和组合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于靶向免疫疗法的化合物以及含有该化合物的组合物。本发明还涉及所述化合物在治疗诸如癌症之类的疾病中的应用。

### 背景技术

[0002] 治疗性抗体已用于临床应用二十多年。目前已有十五种抗肿瘤抗体药物用于临床, 这些药物包括: Rituxan(1997), Herceptin(1998), Mylotarg(2000), Campath(2001), Zevalin(2002), Bexxer(2003), Avastin(2004), Erbitux(2004), Vectibix(2006); Arzerra(2009); Benlysta(2011); Yervoy(2011); Adcetris(2011); Perjeta(2012); 和 Kadcylla(2013)。这些抗体主要靶定四种分子: EGFR、Her2、CD20 和 VEGF。

[0003] 总体而言, 治疗性抗体通过三种机制(Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. Nat Rev Cancer. (2012), 12:278-87) 杀伤肿瘤细胞: (1) 抗体直接作用, 也就是阻断或激动配体 / 受体信号转导活性, 诱导细胞凋亡并递送药物或细胞毒素剂。抗体受体活化活性可产生直接杀伤肿瘤细胞的作用。例如, 一些抗体可与肿瘤细胞表面的受体结合, 活化受体, 导致细胞凋亡(例如, 在线粒体中)。抗体还可通过受体拮抗活性介导肿瘤细胞杀伤。例如, 一些抗体可与细胞表面受体结合并阻断二聚化作用、激酶活化以及下游信号转导, 从而抑制增殖并促进细胞凋亡。抗体与酶的结合可导致中和作用、信号阻断以及细胞死亡。(2) 免疫介导的细胞杀伤机制, 该机制包括补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、T 细胞功能调节, 等等。免疫介导的肿瘤细胞杀伤可通过如下方式完成: 诱导吞噬作用、活化补体、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性、通过单链可变片段(scFv)使基因修饰的 T 细胞靶定肿瘤, 通过树突细胞的抗体介导的抗原交叉呈递活化 T 细胞、抑制 T 细胞抑制性受体(例如, 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (CTLA4))。其中, 抗体的 Fc 部分的特性对于 CDC 和 ADCC 介导的肿瘤细胞杀伤作用特别重要。(3) 抗体对肿瘤脉管系统和基质的特异性效应, 通过捕获血管受体拮抗剂或配体诱导血管和基质细胞消融, 包括: 抑制基质细胞、将毒素递送至基质细胞以及将毒素递送至脉管系统(Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. Nat Rev Cancer. 2012, 12(4):278-87)。

[0004] 治疗性单克隆抗体药物推进了抗癌药物的研究和开发。然而, 仍然存在一些问题需要进一步研究解决, 例如, 抗体的免疫原性、长期使用肿瘤靶标的耐受性以及单纯地单一阻断信号转导通路的长期作用。简言之, 大多数抗体难以实现对肿瘤细胞长期有效的抑制和杀伤作用。

[0005] 1964 年, “自然(Nature)”杂志发表了抗体 - 药物偶联(ADC)技术这一新观点, 该观点近年来得到突破性发展。ADC 使抗体与高毒性药物(毒素)通过化学连接体(连接体)共价连接。抗体识别癌细胞表面抗原分子, 内吞作用将 ADC 带入细胞质内, 具体而言, 连接体水解之后释放的细胞内环境毒素杀伤细胞。

[0006] Seattle Genetics 已研发了 Brentuximab Vedotin (商品名为 Adcetris) 这种药



物,其已被 FDA 批准上市。其为单甲基 auristatin E(MMAE),一种合成的毒性抗癌药物,其与靶向淋巴瘤细胞特异性 CD30 分子的抗体连接,具有改进的杀伤肿瘤细胞的效用。

[0007] 目前,已对几十种这样的 ADC 药物开展了临床试验。其中,Genentech 和 Immunogen 联合开发了用于治疗乳腺癌的与美登素(maytansine)偶联的曲妥珠单抗,一种名为 ado- 曲妥珠单抗 emtansine 的药物(Kadcyla),其也被称为 T-DM1。2013 年 2 月,FDA 已批准 T-DM1 用于人表皮生长因子受体 2 (Her2)- 阳性转移性乳腺癌。美登素是一种小分子毒素,其可与微管蛋白结合并可通过形成非还原性双 - 马来酰亚胺 - 丙二醇复合物防止微管形成。曲妥珠单抗通过靶向人 Her2 对乳腺癌和胃癌起作用。曲妥珠单抗已被批准用于 Her2- 阳性癌症。然而,曲妥珠单抗无法促进所有的 Her2- 阳性细胞的细胞凋亡。T-DM1 使选择性靶向 Her2 受体的曲妥珠单抗与有效的细胞毒性剂美登素结合,从而杀伤肿瘤细胞。T-DM1 抗体结合 Her2 受体,导致从偶联物中释放的美登素产生细胞内在化作用,从而杀伤肿瘤细胞。T-DM1 具有更好的整体疗效、药代动力学性质以及较低的毒性。

[0008] 传统的小分子化疗药物具有很强的毒性和药代动力学优势,但是在治疗 肿瘤的过程中传统的小分子化疗药物可影响其他生理靶标,产生严重的副作用。抗体 - 药物偶联物使靶向作用和具有特定的药代动力学的小分子药物结合。抗体 - 药物偶联物的结构为具有靶向功能的单克隆抗体与具有特定的药理学性质的化合物的连接。这种技术需要治疗性抗体与靶标特异性结合,与诸如细胞毒素之类的具有治疗作用或其他功能的分子偶联。诸如偶联的抗体的内吞作用、偶联的稳定性以及毒素的释放和杀伤活性之类的许多因素影响这种类型的抗体的作用。

[0009] 目前正在使用的毒素分子包括微管蛋白抑制剂 Auristatin 类似物单甲基 auristatin E、单甲基 auristatin F 和美登素。单甲基 auristatin E 为合成的微管聚合物抑制剂,其可抑制微管聚集,干扰肿瘤细胞有丝分裂并且可诱导细胞凋亡(Naumovski L and Junutula JR. Glembatumumab vedotin, a conjugate of an anti-glycoprotein non-metastatic melanoma protein B mAb and monomethyl auristatin E for treatment of melanoma and breast cancer. *Curr Opin Mol Ther* 2003;12(2):248-57. Francisco JA, Cervený CG 等人, cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. *Blood* 102(4):1458-65)。单甲基 auristatin F 为抗有丝分裂 Auristatin 衍生物,在 C 末端具有带电荷的苯丙氨酸残基。与不带电荷的 MMAE 相比,单甲基 auristatin F 最小化对细胞信号通路的破坏并且最小化细胞毒性。大量 CD30 细胞测试发现 mAb- 马来酰亚胺己酰基 - 缬氨酸 - 瓜氨酸 -p- 氨基苄氧基羰基 -MMAF (mAb-L1-MMAF) 的毒性比单独的 MMAF 的毒性强 2, 200 倍(Doronina SO 等人, Enhanced activity of monomethylauristatin F through monoclonal antibody delivery: effects of linker technology on efficacy and toxicity. *Bioconjug Chem*, 2006;17(1):p114-24)。美登素是一种抗有丝分裂剂,其充当微管蛋白聚合的抑制剂,干扰细胞核内的微管的形成。美登素还抑制 DNA、RNA 和蛋白质合成,已经发现美登素对于 DNA 合成的影响最大。

[0010] 抗体 - 药物偶联物具有直接和间接抗癌作用。抗体阻断或活化配体 / 受体信号转导,诱导细胞凋亡,并且同时抗体可直接或间接地向肿瘤细胞呈递或递送有效载荷药物(例如,药物、毒素、小干扰 RNA 或放射性同位素)。治疗性抗体药物偶联物使用抗体和偶联的药

物的双重特性,第一为与靶标分子特异性结合的结合功能,第二为抗体自身的肿瘤细胞杀伤功能,以及第三为偶联的药物的特定作用。目前使用的抗体-药物偶联药物限于如何直接杀伤肿瘤细胞。然而,由于在抗体、连接体分子、毒素分子、偶联方面的严格的技术要求以及能够将毒素带入肿瘤微环境内的分子有限,在实际的临床研究中仍然存在一些难题。

### 发明内容

[0011] 一方面,本发明提供一种具有通式(Ia)的结构的化合物:

[0012] TM-Ln-AM (Ia),

[0013] 其中, TM 为靶向部分, AM 为能够活化人免疫细胞的活化部分, Ln 为连接体, n 为选自 0 和 1 的整数,所述人免疫细胞包括但不限于:树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、髓样抑制细胞、NK 细胞、B 细胞、T 细胞或肿瘤细胞或者它们的组合。

[0014] 在一些实施方式中,人树突细胞为浆细胞样树突细胞。在一些实施方式中,人树突细胞为髓样树突细胞。

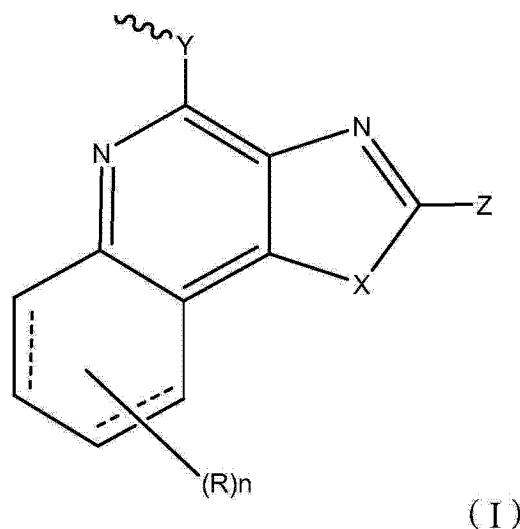
[0015] 在一些实施方式中,AM 能够特异性结合人 toll 样受体 7 (TLR7)和 / 或人 TLR8 或者能够通过 TLR7 和 / 或 TLR8 活化人免疫细胞。

[0016] 另一方面,本发明提供一种具有通式(Ib)的结构的化合物或其药学上可接受的盐或其溶剂化物:

[0017] TM-L-AM (Ib),

[0018] 其中, TM 为靶向部分, L 为连接体, AM 是由下述通式(I)的结构表示的活化部分:

[0019]



[0020] 其中,虚线表示存在化学键或不存在化学键,  $\sim$  为待与连接体连接的点;

[0021] X 是 S 或  $-NR_1$ ,  $R_1$  是  $-W_0-W_1-W_2-W_3-W_4$ ;

[0022]  $W_0$  是化学键,烷基,烯基,炔基,烷氧基或  $-S-$  烷基  $-$ ,

[0023]  $W_1$  是化学键,  $-O-$ , 或  $-NR_2-$ , 其中,  $R_2$  是氢,烷基或烯基,

[0024]  $W_2$  是化学键,  $-O-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(S)-$  或  $-S(O)_2-$ ,

[0025]  $W_3$  是化学键,  $-NR_3-$ , 其中,  $R_3$  是氢,烷基或烯基,

[0026]  $W_4$  是氢,烷基,烯基,炔基,烷氧基,环烷基,芳基,芳氧基,杂芳基或杂环基,它们中的每一个被一个或一个以上选自下列基团的取代基任选地取代:羟基,烷氧基,烷基,烯

基,炔基,环烷基,芳基,杂芳基,杂环基,  $-\text{NH}_2$ , 硝基,  $--$  烷基 - 羟基,  $--$  烷基 - 芳基,  $--$  烷基 - 杂芳基,  $--$  烷基 - 杂环基,  $--\text{O}-\text{R}_4$ ,  $-\text{O}-$  烷基  $-\text{R}_4$ ,  $--$  烷基  $-\text{O}-\text{R}_4$ ,  $--\text{C}(\text{O})-\text{R}_4$ ,  $--$  烷基  $-\text{C}(\text{O})-\text{R}_4$ ,  $--$  烷基  $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}_4$ ,  $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}_4$ ,  $--\text{S}-\text{R}_4$ ,  $--\text{S}(\text{O})_2-\text{R}_4$ ,  $--\text{NH}-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}_4$ ,  $--$  烷基  $-\text{S}-\text{R}_4$ ,  $--$  烷基  $-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}_4$ ,  $-\text{NHR}_4$ ,  $--\text{NR}_4\text{R}_4$ ,  $--\text{NH}-$  烷基  $-\text{R}_4$ , 卤素,  $--\text{CN}$ ,  $--\text{NO}_2$  和  $- \text{SH}$ , 其中,  $\text{R}_4$  独立地为氢, 烷基, 烯基,  $--$  烷基 - 羟基, 芳基, 杂芳基, 杂环基或卤代烷基;

[0027] Z 是氢, 烷基, 烯基, 炔基, 烷氧基, 芳基, 卤代烷基, 杂芳基, 杂环基, 它们中的每一个可被一个或一个以上选自下列基团的取代基任选地取代: 羟基, 烷氧基, 烷基, 烯基, 炔基, 芳基, 杂芳基, 杂环基, 卤素, 氰基, 硝基,  $--\text{N}(\text{R}_5)_2$ ,  $--$  烷氧基 - 烷基,  $--$  烷氧基 - 烯基,  $--\text{C}(\text{O})-$  烷基,  $--\text{C}(\text{O})-\text{O}-$  烷基,  $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$  烷基,  $--\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}_5)_2$ , 芳基, 杂芳基,  $--\text{CO}-$  芳基和  $- \text{CO}-$  杂芳基, 其中,  $\text{R}_5$  分别独立地为氢, 烷基, 卤代烷基,  $--$  烷基 - 芳基或  $-$  烷基 - 杂芳基;

[0028] R 为氢, 烷基, 烷氧基, 卤代烷基, 卤素, 芳基, 杂芳基, 杂环基, 它们中的每一个被一个或一个以上选自下列基团的取代基任选地取代: 羟基, 烷氧基, 烷基, 烯基, 炔基, 环烷基, 芳基, 杂芳基, 杂环基,  $--\text{NH}_2$ , 硝基,  $--$  烷基 - 羟基,  $--$  烷基 - 芳基,  $--$  烷基 - 杂芳基,  $--$  烷基 - 杂环基,  $--\text{O}-\text{R}_4$ ,  $-\text{O}-$  烷基  $-\text{R}_4$ ,  $--$  烷基  $-\text{O}-\text{R}_4$ ,  $--\text{C}(\text{O})-\text{R}_4$ ,  $--\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{R}_4$ ,  $--\text{C}(\text{O})-\text{NR}_4\text{R}_4$ ,  $--$  烷基  $-\text{C}(\text{O})-\text{R}_4$ ,  $--$  烷基  $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}_4$ ,  $--\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}_4$ ,  $--\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{R}_4$ ,  $--\text{S}-\text{R}_4$ ,  $--\text{C}(\text{O})-\text{S}-\text{R}_4$ ,  $--\text{S}-\text{C}(\text{O})-\text{R}_4$ ,  $--\text{S}(\text{O})_2-\text{R}_4$ ,  $--\text{NH}-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}_4$ ,  $--$  烷基  $-\text{S}-\text{R}_4$ ,  $--$  烷基  $-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}_4$ ,  $--\text{NHR}_4$ ,  $--\text{NR}_4\text{R}_4$ ,  $--\text{NH}-$  烷基  $-\text{R}_4$ , 卤素,  $--\text{CN}$  和  $- \text{SH}$ , 其中,  $\text{R}_4$  独立地为氢, 烷基, 烯基, 烷氧基,  $--$  烷基 - 羟基, 芳基, 杂芳基, 杂环基, 或卤代烷基;

[0029] n 为 0, 1, 2, 3 或 4;

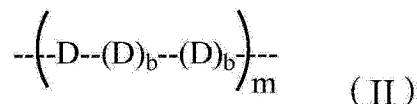
[0030] Y 为  $-\text{NR}_6\text{R}_7$ ,  $-\text{CR}_6\text{R}_7\text{R}_8$  或  $-$  烷基  $-\text{NH}_2$ , 它们中的每一个可被一个或一个以上选自下列基团的取代基任选地取代: 羟基, 烷氧基, 烷基, 烯基, 炔基,  $--\text{NH}_2$ , 卤素,  $--\text{N}(\text{R}_5)_2$ ,  $--$  烷氧基 - 烷基,  $--$  烷氧基 - 烯基,  $--\text{C}(\text{O})-$  烷基,  $--\text{C}(\text{O})-\text{O}-$  烷基,  $--\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}_5)_2$ , 芳基, 杂芳基,  $--\text{CO}-$  芳基和  $- \text{CO}-$  杂芳基,

[0031] 其中,  $\text{R}_6$ ,  $\text{R}_7$  和  $\text{R}_8$  独立地为氢, 烷基, 烯基, 烷氧基, 烷基氨基, 二烷基氨基, 烷硫基, 芳硫基,  $--$  烷基 - 羟基,  $--$  烷基  $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}_9$ ,  $--$  烷基  $-\text{C}(\text{O})-\text{R}_9$  或  $-$  烷基  $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{R}_9$ , 其中,  $\text{R}_5$  分别独立地为氢, 烷基, 卤代烷基,  $--$  烷基 - 芳基或  $-$  烷基 - 杂芳基, 其中,  $\text{R}_9$  为氢, 烷基, 烯基, 卤素或卤代烷基;

[0032] 任选地, X 和 Z 一同可形成 5 至 9 元环。

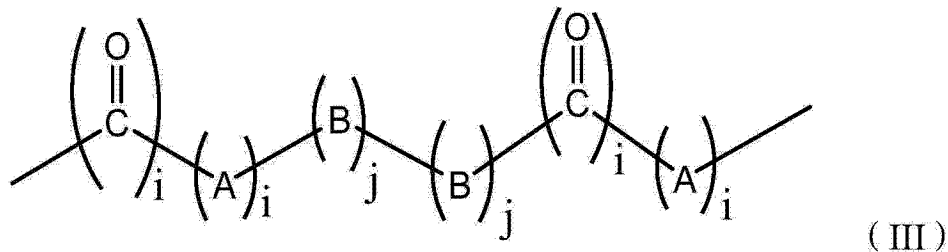
[0033] 在一些实施方式中, L 是由下述通式(II)的结构表示的连接体或其药学上可接受的盐或其溶剂化物:

[0034]



[0035] m 为 1, 2, 3, 4, 5 或 6, b 分别独立地为 0 或 1, 并且 D 由下述通式(III)的结构独立地表示:

[0036]



[0037] 其中,  $i$  分别独立地为 0 或 1 ;

[0038]  $j$  分别独立地为 0, 1, 2, 3, 4, 5 或 6 ;

[0039] A 分别独立地为 S, O 或 N-R<sub>a</sub>, 其中, R<sub>a</sub> 为氢, 烷基, 烯基或烷氧基 ;

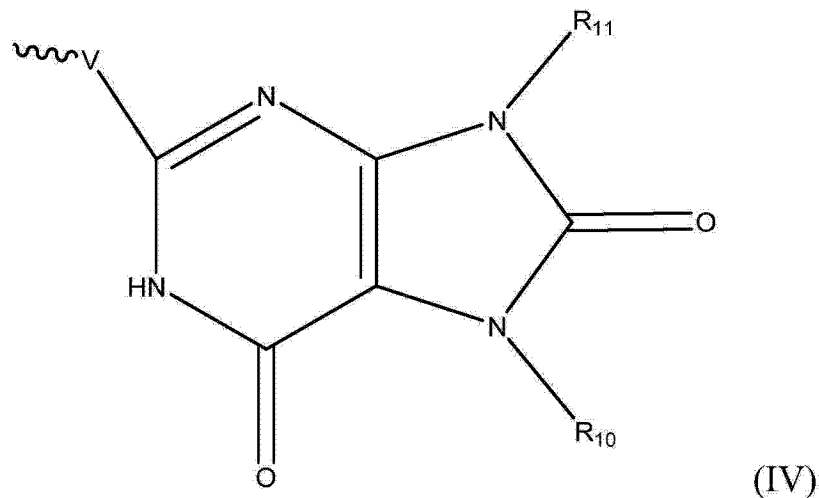
[0040] B 分别独立地为烷基, 烯基, --O-烷基--, --烷基-O--, --S-烷基--, --烷基-S--, 芳基, 杂芳基, 杂环基或肽, 它们中的每一个被一个或一个以上选自下列基团的取代基任选地取代: 羟基, 烷氧基, 烷基, 烯基, 炔基, 环烷基, --烷基-芳基, --烷基-杂芳基, --烷基-杂环基, --O-R<sub>4</sub>, --O-烷基-R<sub>4</sub>, --C(O)-R<sub>4</sub>, --C(O)-O-R<sub>4</sub>, --S-R<sub>4</sub>, --S(O)<sub>2</sub>-R<sub>4</sub>, --NHR<sub>4</sub>, --NH-烷基-R<sub>4</sub>, 卤素, --CN, --NO<sub>2</sub>, 和 -SH, 其中, R<sub>4</sub> 为烷基, 烯基, --烷基-羟基, 芳基, 杂芳基, 杂环基或卤代烷基。

[0041] 在另一方面, 本发明提供一种具有下述通式 (Ib) 的结构化合物或其药学上可接受的盐或其溶剂化物:

[0042] TM-L-AM (Ib)

[0043] 其中, TM 为靶向部分, L 为连接体, AM 是由下述通式 (IV) 的结构表示的活化部分:

[0044]



[0045] 其中,  $\sim$  是待与连接体连接的点 ;

[0046] 其中, V 是 -NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>, 其中, R<sub>6</sub> 和 R<sub>7</sub> 分别独立地为氢, 烷基, 烯基, 烷氧基, 烷基氨基, 二烷基氨基, 烷硫基, 芳硫基, --烷基-羟基, --烷基-C(O)-O-R<sub>9</sub>, --烷基-C(O)-R<sub>9</sub> 或 -烷基-O-C(O)-R<sub>9</sub>, 其中, R<sub>9</sub> 是氢, 烷基, 烯基, 卤素或卤代烷基 ;

[0047] R<sub>10</sub> 和 R<sub>11</sub> 独立地为氢, 烷基, 烯基, 芳基, 卤代烷基, 杂芳基, 杂环基或环烷基, 它们中的每一个被一个或一个以上选自下列基团的取代基任选地取代: 羟基, 烷氧基, 烷基, 烯基, 炔基, 卤素, --N(R<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, --烷氧基-烷基, --烷氧基-烯基, --C(O)-烷基, --C(O)-O-烷基, --C(O)-N(R<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, 芳基, 杂芳基, --CO-芳基, 以及 -CO-杂芳基, 其中, R<sub>5</sub> 分别独立地为氢, 烷基, 卤代烷基, --烷基-芳基或 -烷基-杂芳基 ; TM 和 L 如上文和下文中所述的那样界

定。

[0048] 在一些实施方式中, TM 特异性结合肿瘤细胞或者相对于非肿瘤细胞优先结合肿瘤细胞。在一些实施方式中, 所述肿瘤细胞为癌细胞、肉瘤细胞、淋巴瘤细胞、骨髓瘤细胞或中枢神经系统癌症细胞。

[0049] 在一些实施方式中, TM 特异性结合肿瘤细胞上的肿瘤抗原或者相对于非肿瘤抗原优先结合肿瘤细胞上的肿瘤抗原。在一些实施方式中, 所述肿瘤抗原选自: CD2, CD19, CD20, CD22, CD27, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD47, CD52, CD56, CD70, CD79 和 CD137。

[0050] 在一些实施方式中, 所述肿瘤抗原选自: 4-1BB, 5T4, AGS-5, AGS-16, 血管生成素 2, B7. 1, B7. 2, B7DC, B7H1, B7H2, B7H3, BT-062, BTLA, CAIX, 癌胚抗原, CTLA4, Cripto, ED-B, ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFL7, EpCAM, EphA2, EphA3, EphB2, FAP, 纤连蛋白, 叶酸盐受体, 神经节苷酯 GM3, GD2, 糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体 (GITR), gp100, gpA33, GPNMB, ICOS, IGF1R, 整联蛋白  $\alpha v$ , 整联蛋白  $\alpha v \beta$ , KIR, LAG-3, Lewis Y, 间皮素, c-MET, MN 碳酸酐酶 IX, MUC1, MUC16, 粘连蛋白 -4, NKGD2, NOTCH, OX40, OX40L, PD-1, PDL1, PSCA, PSMA, RANKL, ROR1, ROR2, SLC44A4, 多配体蛋白聚糖 -1, TACI, TAG-72, 腱生蛋白, TIM3, TRAILR1, TRAILR2, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 和它们的变体。

[0051] 在一些实施方式中, TM 包含免疫球蛋白、蛋白质、肽、小分子、纳米颗粒或核酸。

[0052] 在一些实施方式中, TM 包含抗体或其功能片段。在一些实施方式中, 所述抗体选自: 美罗华(利妥昔单抗)、赫赛汀(曲妥珠单抗)、爱必妥(西妥昔单抗)、维克替比(帕尼单抗)、Arzerra (Ofatumumab)、Benlysta (贝利木单抗)、Yervoy (伊匹单抗)、Perjeta (帕妥珠单抗)、Tremelimumab、Nivolumab、Dacetuzumab、Urelumab、MPDL3280A、Lambrolizumab 和 Blinatumomab。

[0053] 在一些实施方式中, TM 包含 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、单结构域抗体、T 和 Abs 二聚物、Fv、scFv、dsFv、ds-scFv、Fd、线性抗体、微抗体、双体抗体、双特异性抗体片段、bibody、tribody、sc- 双体抗体、 $\kappa$  ( $\lambda$ )body、BiTE、DVD-Ig、SIP、SMIP、DART 或者含有一个或一个以上 CDR 的抗体类似物。

[0054] 在一些实施方式中, TM 包含 VEGFR 的 ATWLPPR 多肽、血小板反应蛋白 -1 模拟物、CDCRGDCFCG (环状) 多肽、SCH221153 片段、NCNGRC (环状) 多肽、CTTHWGFTLC 多肽、CGNKRTRGC 多肽 (LyP-1)、奥曲肽、伐普肽、兰乐肽、C-3940 多肽、达必佳、利普安、诺雷德或西曲瑞克。

[0055] 在一些实施方式中, TM 包含叶酸或其衍生物。

[0056] 在一些实施方式中, TM 包含细胞外结构域 (ECD) 或 PD-1, CTLA4, BTLA, KIR, TIM3, 4-1BB, LAG3 的可溶形式、全长的部分表面配体双调蛋白、 $\beta$  动物纤维素、EGF、肝配蛋白、epigen、上皮调节蛋白、IGF、神经调节蛋白、TGF、TRAIL 或 VEGF。

[0057] 在一些实施方式中, TM 包含纳米颗粒。

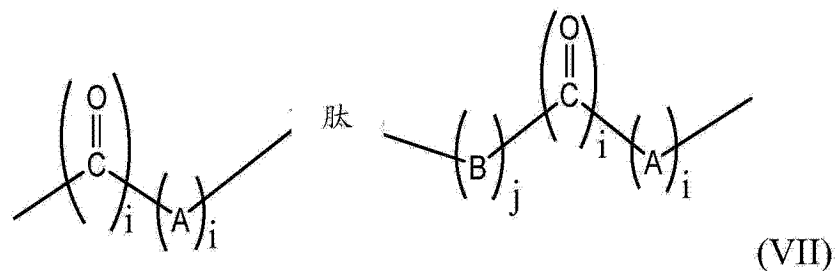
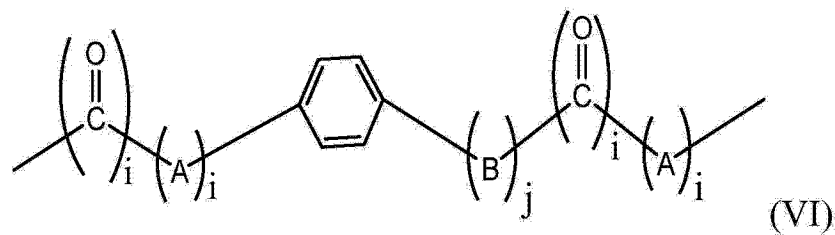
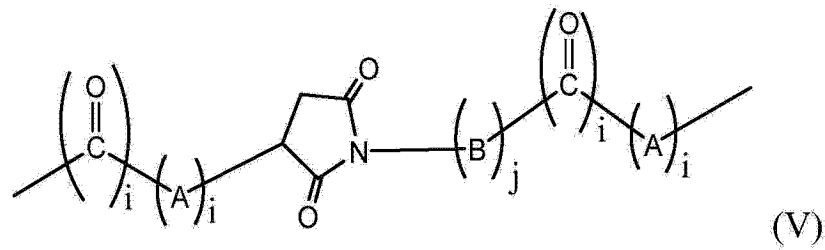
[0058] 在一些实施方式中, TM 包含适体。

[0059] 在一些实施方式中, TM 包含: 美罗华(利妥昔单抗)、赫赛汀(曲妥珠单抗)、爱必妥(西妥昔单抗)、维克替比(帕尼单抗)、Arzerra (Ofatumumab)、Benlysta (贝利木单抗)、Yervoy (伊匹单抗)、Perjeta (帕妥珠单抗)、Tremelimumab、Nivolumab、Dacetuzumab、Urelumab、MPDL3280A、Lambrolizumab、Blinatumomab、阿地白介素(aldesleukin)、

aemtuzumab、阿里维 A 酸(alitretinoin)、别嘌醇、六甲蜜胺(altretamine)、氨磷汀(amifostine)、阿那曲唑(anastrozole)、三氧化砷、门冬酰胺酶、BCG Live、蓓萨罗丁胶囊(bexarotene capsules)、蓓萨罗丁凝胶(bexarotene gel)、博来霉素、静脉内用白消安、口服用白消安、卡普睾酮(calusterone)、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀(carmustine)、带有 poifeprosan20iplant 的卡莫司汀、塞来昔布、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨(cladribine)、环磷酰胺、阿糖胞苷、阿糖胞苷脂质体、达卡巴嗪(dacarbazine)、放线菌素 D、更生霉素、阿法达贝泊汀(dabepoetin alfa)、盐酸柔红霉素脂质体、盐酸柔红霉素、柔红霉素、dnileukin diftitox、右雷佐生(dexrazoxane)、多西他赛、多柔比星、多柔比星脂质体、丙酸屈膜斯酮(domostanolone propionate)、eliott's B soution、表阿霉素、eoetin alfa estramustine、磷酸依托泊苷、依托泊苷(VP-16)、依西美坦、flgrastim、氟脲苷(动脉内用)、氟达拉滨(fludarabine)、氟尿嘧啶(5-FU)、氟维司群(fulvestrant)、吉妥单抗(gemtuzumab ozogamicin)、醋酸戈舍瑞林、羟基脲、替伊莫单抗(Ibritumomab Tiuxetan)、伊达比星、异环磷酰胺、甲磺酸伊马替尼、干扰素  $\alpha$ -2a、干扰素  $\alpha$ -2b、伊立替康、曲来唑、亚叶酸钙、左旋咪唑(levamisole)、洛莫司汀(CCNU)、二氯甲基二乙胺(氮芥)、醋酸甲地孕酮、美法仑(L-PAM)、巯嘌呤(6-MP)、美司那、甲氨蝶呤、甲氧沙林、丝裂霉素 C、米托坦、米托蒽醌、苯丙酸诺龙(nandrolone phenpropionate)、nfetumomab、LOddC、orelvekin、奥沙利铂、紫杉醇、帕米膦酸盐(pamidronate)、培加酶(pegademase)、培门冬酶(Pegaspargase)、乙二醇化非格司亭(Pegfilgrastim)、喷司他丁、哌泊溴烷、普卡霉素、光辉霉素、吡吩姆钠、丙卡巴肼、阿的平(quinacrine)、拉布立酶、沙格司亭、链佐星、替比夫定(talbutidine, LDT)、滑石、他莫昔芬、替莫唑胺、替尼泊苷(VM-26)、睾内酯、硫鸟嘌呤(6-TG)、塞替派、拓扑替康、托瑞米芬(toremifene)、托西莫单抗(Tositumomab)、维 A 酸(ATRA)、乌拉莫司汀(Uracil Mustard)、戊柔比星、泛托西他滨(valtorcitabine, monoval LDC)、长春碱、长春瑞滨、唑来膦酸(zoledronate), 以及它们的混合物。

[0060] 在一些实施方式中, 连接体部分("L")中的 D 选自下述通式(V)至通式(VII)的结构:

[0061]



[0062] A、B、i 和 j 为上文中所界定的。

[0063] 在一些实施方式中，本发明提供一种药物组合物，所述药物组合物包含本文提供的化合物或其药学上可接受的盐和 / 或一种或一种以上药学上可接受的载体。

[0064] 在一些实施方式中，所述药物组合物还包含其他治疗剂。在一些实施方式中，所述其他治疗剂为抗癌剂。在一些实施方式中，所述其他治疗剂为抗代谢药物、拓扑异构酶 I 和拓扑异构酶 II 的抑制剂、烷基化剂、微管抑制剂、抗雄性激素剂、GNRh 调节剂或者它们的混合物。在一些实施方式中，所述其他治疗剂选自：它莫西芬 (tamoxifen)、雷洛昔芬 (raloxifene)、阿那曲唑 (anastrozole)、依西美坦 (exemestane)、来曲唑 (letrozole)、imatinib、紫杉醇、环磷酰胺、洛伐他汀 (lovastatin)、minosine、吉西他滨 (gemcitabine)、阿糖胞苷 (cytarabine)、5-氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、多西他赛 (docetaxel)、戈舍瑞林 (goserelin)、长春新碱、长春碱、噻氨酯吡唑 (nocodazole)、替尼泊苷 (teniposide)、依托泊苷 (etoposide)、吉西他滨、埃博霉素、长春瑞滨 (vinorelbine)、喜树碱、道诺霉素 (daunorubicin)、放线菌素 D、米托蒽醌、吡啶、阿霉素、表柔比星或去甲氧基柔红霉素。

[0065] 又一方面，本发明提供一种抑制肿瘤细胞增殖的方法，所述方法包括将本发明的化合物给药于所述肿瘤细胞。

[0066] 在一些实施方式中，本发明提供一种治疗受治者体内的疾病的方法，所述方法包括将本发明的化合物给药于所述受治者。在一些实施方式中，所述疾病为癌症 / 肿瘤。在

一些实施方式中,所述疾病为癌症,所述癌症选自:胃癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、子宫颈癌、子宫体癌、卵巢癌、睾丸癌、膀胱癌、肾癌、脑癌/中枢神经系统癌症、头颈癌、咽喉癌、霍奇金氏疾病、非霍奇金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病、黑色素瘤、非黑色素瘤皮肤癌、急性淋巴细胞性白血病、急性粒细胞性白血病、尤因氏肉瘤、小细胞肺癌、绒毛膜上皮癌、横纹肌肉瘤、wilms 肿瘤、神经母细胞瘤、多毛细胞白血病、口咽癌、食道癌、喉癌或淋巴瘤。

[0067] 在一些实施方式中,所述疾病为肿瘤。在一些实施方式中,所述疾病包括异常细胞增殖。在一些实施方式中,所述异常细胞增殖包含癌前病变。在一些实施方式中,异常增殖的细胞为癌细胞。

#### 附图说明

[0068] 本发明的新特点在所附的权利要求书中具体说明。通过结合后面列举的对示例性的实施方式的详细描述可更好地对本发明的特点和优势加以理解,其中,使用了本发明的原理,并且具有如下附图:

[0069] 图 1 表示偶联的化合物的特性。如通过 FACS 分析所确定的,将曲妥珠单抗 MC-vc-瑞喹莫德和曲妥珠单抗-瑞喹莫德偶联物与表达 Her2 的 L 细胞的结合与未偶联的曲妥珠单抗(作为参比)、对照人 IgG 和不相关人 IgG1 抗体比较。

[0070] 图 2 表示曲妥珠单抗、曲妥珠单抗 MC-vc-To11 样受体的配体(TLRL)和曲妥珠单抗 MC--To11 样受体的配体(TLRL)偶联物的体外抗体依赖性细胞毒性(ADCC)分析。PBMC(效应细胞)与 SKBR3 细胞(靶细胞)一同加至含有不同浓度的对照人 IgG1、曲妥珠单抗或曲妥珠单抗 MC-vc-TLRL 和曲妥珠单抗 MC-TLRL 偶联物的 96 孔平板(靶标/效应物比例为 1/60)中持续 17 小时。所有实验一式两份进行。分析基于阴性 SKBR3 群测定。用 LDH 对死细胞进行染色。

[0071] 图 3A 表示富集前后的 DC 百分数。上部的两个图中的数字表示谱系消减前后总细胞中的 DC (HLA-DR+Lin-)百分数。下部图中的数字表示谱系消减前后总 DC 中的 mDC (CD11C+CD123-)和 pDC (CD123+CD11C-)的百分数。图 3B 至图 3D 表示纯化的人 DC 的细胞因子产量分析。纯化的人 DC 被接种在 96 孔平板中并且与异基因的未处理的(培养基)或处理的不同浓度的 TLRL 或曲妥珠单抗 MC-vc-TLRL 和曲妥珠单抗 MC-TLRL 在 37°C 下的孵育箱中直接培养 20 小时至 22 小时。在另一实验中,提供浓度逐渐增加的西妥昔单抗 MC-vc-TLRL 和西妥昔单抗 MC-TLRL 与人 DC 一同处理。收集上清液,通过 ELISA 分析人 IFN- $\alpha$ , IL-6, IL-12 (p70) 和 TNF- $\alpha$ 。数据表示为一式三份的培养物的平均值  $\pm$ SD 并且数据代表来自三个健康供体中的两个的独立的实验。

[0072] 图 4A 至图 4C 表示 PDX 胃肿瘤模型中曲妥珠单抗 MC-vc-TLRL 和曲妥珠单抗 MC-TLRL 的治疗效果。皮下带有来源于患者的胃肿瘤的 6 至 8 周龄的雌性 BALB/c 裸鼠(nu/nu)通过静脉注射 10mg/kg 曲妥珠单抗 MC-vc-TLRL,曲妥珠单抗 MC-TLRL 或未偶联的曲妥珠单抗或盐水进行治疗(每组 12 只小鼠)。每周进行治疗持续 45 天的周期。当肿瘤达到平均尺寸为 170mm<sup>3</sup>时开始治疗。图 4A:数据表示平均肿瘤体积(平均值  $\pm$ SD)。当肿瘤达到尺寸为 2000mm<sup>3</sup>时肿瘤生长曲线停止。图 4B:治疗过程中和治疗后小鼠体重的变化。没有观察到可检测的失重。图 4C:治疗组和对照组的存活曲线;接受曲妥珠单抗 MC-vc-TLRL 或



未偶联的曲妥珠单抗的小鼠的寿命大幅度延长。

[0073] 图 5A 至图 5B 表示裸鼠 /H1650 人肺癌模型中西妥昔单抗 MC-vc-TLRL 的疗效。皮下带有 H1650 肺癌细胞的 6 至 8 周龄雌性 BALB/c 裸鼠 (nu/nu) 通过静脉注射 10mg/kg 西妥昔单抗 MC-vc-TLRL 或未偶联的西妥昔单抗或盐水进行治疗 (每组 12 只小鼠)。每周进行治疗持续 45 天的周期。当肿瘤达到平均尺寸为 170mm<sup>3</sup>时开始治疗。数据表示平均肿瘤体积 (平均值 ±SD)。当肿瘤达到 尺寸为 2000mm<sup>3</sup>时肿瘤生长曲线停止。图 5A :人肺癌模型中西妥昔单抗 MC-vc-TLRL 的疗效。图 5B :治疗过程中和治疗后小鼠体重的变化。没有观察到可检测的失重。

### 具体实施方式

[0074] 通过结合用于举例说明的示例性应用,在下文中对本发明的多个方面进行描述。应当理解的是,列举出许多具体的细节、关系以及方法来全面理解本发明。然而,本领域普通技术人员可容易地意识到本发明可不按照具体细节中的一种或一种以上来实施或者可以其他方法来实施。本发明不受举例说明的操作顺序或事件的限制,因为,一些操作可以不同的顺序进行和 / 或可同时与其他操作或事件一同进行。

[0075] 进一步地,不是所有举例说明的操作或事件都需要根据本发明的方法来实施。

[0076] 本文使用的术语是仅仅是为了说明具体实施方式,而无意限定本发明。除非另有明确说明,如本文使用的不指明具体数目的冠词 (“a”, “an” 和 “the”) 意在包括复数形式。此外,在具体实施方式部分和 / 或权利要求中使用的术语 “包括 (“including”, “include”)”、具有 (“having”, “has”, “with”) 或其变体意在包括与术语 “包含 (comprising)” 类似的方式。

[0077] 术语 “约” 或 “大约” 是指由本领域普通技术人员测定的特定值在可接受的误差范围内,该误差范围部分取决于该值如何测量或确定,即,测量系统的限制。例如,“约” 可意味着在本领域中每一操作在 1 个标准偏差范围内或超过一个标准偏差。可选地,“约” 可意味着高达给定值的 20% 的范围,优选地高达给定值的 10% 的范围,更优选地高达给定值的 5% 的范围并且更优选地高达给定值的 1% 的范围。可选地,尤其对于生物系统或过程而言,该术语可意味着在某个值的某个数量级范围内,优选地在某个值的 5 倍范围内,更优选地在某个值的 2 倍范围内。在本申请和权利要求书中描述特定值的条件下,除非另有说明,应当假定术语 “约” 意味着在特定值的可接受的误差范围内。

### [0078] 释义和缩写

[0079] 除非另有说明,本文使用的所有技术术语和科学术语通常具有与本发明 所属技术领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。一般而言,本文使用的命名系统和细胞培养、分子遗传学、有机化学和核酸化学以及杂交中的实验操作是本领域熟知的且普遍使用的那些命名系统和实验操作。标准技术用于核酸和肽的合成。所述技术和操作通常根据本领域的常规方法和各种不同的常规参考文献进行,本领域的常规方法和各种不同的常规参考文献在本文中提供。本文使用的命名系统和下面描述的分析化学和有机合成中的实验操作是本领域熟知的且普遍使用的命名系统和实验操作。标准技术或其改良用于化学合成和化学分析。

[0080] 除非另有说明,术语 “烷基” 其自身或作为另一取代基的一部分是指含有指定数目

的碳原子(即,  $C_1-C_{10}$ 是指 1 至 10 个碳原子)的直链或支链或环状烃自由基或者其组合, 所述直链或支链或环状烃自由基或者其组合可为完全饱和的、单不饱和的或多不饱和的并且可包括二价和多价自由基。饱和的烃自由基的实例包括但不限于如下基团, 例如, 甲基、乙基、*n*-丙基、异丙基、*n*-丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、环己基、(环己基)甲基、环丙基甲基、它们的同系物或异构体, 例如, *n*-戊基、*n*-己基、*n*-庚基、*n*-辛基等等。不饱和烷基为具有一个或一个以上双键或三键的烷基。不饱和烷基的实例包括但不限于: 乙烯基、2-丙烯基、巴豆基、2-异戊烯基、2-(丁二烯基)、2,4-戊二烯基、3-(1,4-戊二烯基)、乙炔基、1-丙炔基和 3-丙炔基、3-丁炔基以及高级同系物和异构体。除非另有说明, 术语“烷基”还意在包括下面更加详细定义的那些烷基衍生物, 例如, “杂烷基”。限定为烃基的烷基基团被称为“均烷基(homoalkyl)”。

[0081] 术语“烯炔”其自身或作为另一取代基的一部分是指从烯炔衍生得到的二价自由基, 例如, 但不限于:  $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ , 并且还包括下面如“杂烯炔”所描述的那些基团。通常, 烷基(或烯炔)基团可具有 1 至 24 个碳原子, 本发明中优选地为具有 10 个或更少的碳原子的那些基团。“低级烷基”或“低级烯炔”是较短链烷基或烯炔基团, 通常具有 8 个或更少的碳原子。

[0082] 术语“烷氧基”、“烷基氨基”和“烷硫基”(或硫代烷氧基)以其常规含义使用, 并且分别是指通过氧原子、氨基基团或硫原子与分子的剩余部分连接的那些烷基基团。

[0083] 除非另有说明, 术语“杂烷基”其自身或与另一术语结合是指由规定数目的碳原子和至少一个选自 O、N、Si 和 S 的杂原子构成的、稳定的直链或支链或环状烃自由基或者其组合, 并且, 其中, 氮和硫原子可被任选地氧化并且氮杂原子可被任选地季铵化。杂原子 O、N 和 S 以及 Si 可位于杂烷基的任何内部位置或者位于烷基与分子的剩余部分连接的位置。实例包括但不限于:  $-CH_2-CH_2-O-CH_3$ ,  $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$ ,  $-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$ ,  $-CH_2-S-CH_2-CH_3$ ,  $-CH_2-CH_2-S(O)-CH_3$ ,  $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$ ,  $-CH=CH-O-CH_3$ ,  $-Si(CH_3)_3$ ,  $-CH_2-CH=N-OCH_3$ , 和  $-CH=CH-N(CH_3)-CH_3$ 。最多两个杂原子可以连续, 例如,  $-CH_2-NH-OCH_3$  和  $-CH_2-O-Si(CH_3)_3$ 。类似地, 术语“杂烯炔”其自身或作为另一取代基的一部分是指从杂烷基衍生得到的二价自由基, 例如但不限于:  $-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-$  和  $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$ 。对于杂烯炔基团而言, 杂原子还可占据链端中的一个末端或者链端的两个末端(例如, 烯炔氧、烯炔二氧、烯炔氨基、烯炔二氨基, 等等)。而且, 对于烯炔和杂烯炔的连接基团而言, 所写的连接基团的分子式中的方向并不暗示连接基团的方向。例如, 分子式  $-C(O)_2R'$  代表  $-C(O)_2R'$  和  $-R'C(O)_2-$ 。

[0084] 一般而言, “酰基取代基”也选自上面列举的基团。如本文使用的术语“酰基取代基”是指连接至本发明的化合物的多环核心的基团且该基团满足直接或间接地连接至本发明的化合物的多环核心的羰基碳的化合价。

[0085] 除非另有说明, 术语“环烷基”和“杂环烷基”其自身或者与其他术语的组合分别表示“烷基”和“杂烷基”的环状形式。此外, 对于杂环烷基而言, 杂原子可占据杂环与分子的剩余部分连接的位置。环烷基的实例包括但不限于: 环戊基、环己基、1-环己烯基、3-环己烯基、环庚基, 等等。杂环烷基的实例包括但不限于: 1-(1,2,5,6-四氢吡啶基)、1-哌啶基、2-哌啶基、3-哌啶基、4-吗啉基、3-吗啉基、四氢呋喃-2-基、四氢呋喃-3-基、四氢噻吩-2-基、四氢噻吩-3-基、1-哌嗪基、2-哌嗪基, 等等。

[0086] 除非另有说明,术语“卤代”或“卤素”其自身或作为另一取代基的一部分是指氟、氯、溴或碘原子。此外,诸如“卤代烷基”之类的术语意在包括单卤代烷基和多卤代烷基。例如,术语“卤代(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基”意在包括但不限于:三氟甲基、2,2,2-三氟乙基、4-氯代丁基、3-溴代丙基,等等。

[0087] 本文使用的术语“卤代烷基”是指被一个或一个以上本文所定义的卤素基团取代的本文定义的烷基。卤代烷基优选地可为单卤代烷基、二卤代烷基或多卤代烷基(包括全卤代烷基)。单卤代烷基在烷基基团中可具有一个碘、溴、氯或氟。二卤代烷基和多卤代烷基在烷基基团中可具有两个或两个以上相同的卤素原子或不同的卤素基团的组合。优选地,多卤代烷基包含多达12个,10个或8个,或6个,或4个,或3个,或2个卤素基团。卤代烷基的非限定性实例包括氟代甲基、二氟代甲基、三氟代甲基、氯代甲基、二氯代甲基、三氯代甲基、五氟代乙基、七氟代丙基、二氟代氯代甲基、二氯代氟代甲基、二氟代乙基、二氟代丙基、二氯代乙基和二氯代丙基。全卤代烷基是指所有的氢原子均被卤素原子取代的烷基。

[0088] 本文使用的术语“杂芳基”是指具有1至8个选自N、O、S或Se的杂原子的5元至14元单环或双环或稠合的多环系统。优选地,杂芳基为5元至10元环系统。典型的杂芳基基团包括2-噻吩基或3-噻吩基,2-呋喃基或3-呋喃基,2-吡咯基或3-吡咯基,2-咪唑基、4-咪唑基或5-咪唑基,3-吡唑基、4-吡唑基或5-吡唑基,2-噻唑基、4-噻唑基或5-噻唑基,3-异噻唑基、4-异噻唑基或5-异噻唑基,2-恶唑基、4-恶唑基或5-恶唑基,3-异恶唑基、4-异恶唑基或5-异恶唑基,3-1,2,4-三唑基或5-1,2,4-三唑基,4-1,2,3-三唑基或5-1,2,3-三唑基,四唑基,2-吡啶基、3-吡啶基或4-吡啶基,3-哒嗪基或4-哒嗪基,3-吡嗪基、4-吡嗪基或5-吡嗪基,2-吡嗪基,2-嘧啶基、4-嘧啶基或5-嘧啶基。

[0089] 术语“杂芳基”还指杂芳香族环与一个或一个以上芳基环、环状脂肪族环或杂环烷基环稠合的基团,其中,自由基或连接点位于杂芳香族环上。非限定性实例包括但不限于:1-中氮茛基(indoliziny1),2-中氮茛基,3-中氮茛基,5-中氮茛基,6-中氮茛基,7-中氮茛基或8-中氮茛基,1-异吡啶基,3-异吡啶基,4-异吡啶基,5-异吡啶基,6-异吡啶基或7-异吡啶基,2-吡啶基,3-吡啶基,4-吡啶基,5-吡啶基,6-吡啶基或7-吡啶基,2-吡唑基,3-吡唑基,4-吡唑基,5-吡唑基,6-吡唑基或7-吡唑基,2-嘌呤基,4-嘌呤基,5-嘌呤基,6-嘌呤基,7-嘌呤基或8-嘌呤基,1-喹啉基,2-喹啉基,3-喹啉基,4-喹啉基,6-喹啉基,7-喹啉基,8-喹啉基或9-喹啉基,2-喹啉基,3-喹啉基,4-喹啉基,5-喹啉基,6-喹啉基,7-喹啉基或8-喹啉基,1-异喹啉基,3-异喹啉基,4-异喹啉基,5-异喹啉基,6-异喹啉基,7-异喹啉基或8-异喹啉基,1,2,3-二氮杂萘基,4,2,3-二氮杂萘基,5-2,3-二氮杂萘基,6-2,3-二氮杂萘基,7-2,3-二氮杂萘基或8-2,3-二氮杂萘基,2-1,5-二氮杂萘基,3-1,5-二氮杂萘基,4-1,5-二氮杂萘基,5-1,5-二氮杂萘基或6-1,5-二氮杂萘基,2-喹啉基,3-喹啉基,5-喹啉基,6-喹啉基,7-喹啉基或8-喹啉基,3-噌啉基,4-噌啉基,5-噌啉基,6-噌啉基,7-噌啉基或8-噌啉基,2-蝶啶基,4-蝶啶基,6-蝶啶基或7-蝶啶基,1-4aH 呋唑基,2-4aH 呋唑基,3-4aH 呋唑基,4-4aH 呋唑基,5-4aH 呋唑基,6-4aH 呋唑基,7-4aH 呋唑基或8-4aH 呋唑基,1-呋唑基,2-呋唑基,3-呋唑基,4-呋唑基,5-呋唑基,6-呋唑基,7-呋唑基或8-呋唑基,1-呋啉基,3-呋啉基,4-呋啉基,5-呋啉基,6-呋啉基,7-呋啉基,8-呋啉基或9-呋啉基,1-菲啶基,2-菲啶基,3-菲啶基,4-菲啶基,6-菲啶基,7-菲啶基,8-菲啶基,9-菲啶基

或 10- 菲啶基, 1- 吡啶基, 2- 吡啶基, 3- 吡啶基, 4- 吡啶基, 5- 吡啶基, 6- 吡啶基, 7- 吡啶基, 8- 吡啶基或 9- 吡啶基, 1- 萘嵌二氮杂苯基, 2- 萘嵌二氮杂苯基, 4- 萘嵌二氮杂苯基, 5- 萘嵌二氮杂苯基, 6- 萘嵌二氮杂苯基, 7- 萘嵌二氮杂苯基, 8- 萘嵌二氮杂苯基或 9- 萘嵌二氮杂苯基(perimidinyl), 2- 菲咯啉基, 3- 菲咯啉基, 4- 菲咯啉基, 5- 菲咯啉基, 6- 菲咯啉基, 8- 菲咯啉基, 9- 菲咯啉基或 10- 菲咯啉基, 1- 吩嗪基, 2- 吩嗪基, 3- 吩嗪基, 4- 吩嗪基, 6- 吩嗪基, 7- 吩嗪基, 8- 吩嗪基或 9- 吩嗪基, 1- 噻吩嗪基, 2- 噻吩嗪基, 3- 噻吩嗪基, 4- 噻吩嗪基, 6- 噻吩嗪基, 7- 噻吩嗪基, 8- 噻吩嗪基, 9- 噻吩嗪基或 10- 噻吩嗪基, 1- 吩恶嗪基, 2- 吩恶嗪基, 3- 吩恶嗪基, 4- 吩恶嗪基, 6- 吩恶嗪基, 7- 吩恶嗪基, 8- 吩恶嗪基, 9- 吩恶嗪基或 10- 吩恶嗪基, 1- 苯并异喹啉基, 3- 苯并异喹啉基, 4- 苯并异喹啉基, 5- 苯并异喹啉基, 6- 苯并异喹啉基, 7- 苯并异喹啉基, 8- 苯并异喹啉基, 9- 苯并异喹啉基或 10- 苯并异喹啉基, 2- 噻吩并 [2, 3-b] 呋喃基, 3- 噻吩并 [2, 3-b] 呋喃基, 4- 噻吩并 [2, 3-b] 呋喃基或 5- 噻吩并 [2, 3-b] 呋喃基, 2-7H- 吡嗪并 [2, 3-c] 咪唑基, 3-7H- 吡嗪并 [2, 3-c] 咪唑基, 5-7H- 吡嗪并 [2, 3-c] 咪唑基, 6-7H- 吡嗪并 [2, 3-c] 咪唑基, 7-7H- 吡嗪并 [2, 3-c] 咪唑基, 8-7H- 吡嗪并 [2, 3-c] 咪唑基, 9-7H- 吡嗪并 [2, 3-c] 咪唑基, 10-7H- 吡嗪并 [2, 3-c] 咪唑基或 11-7H- 吡嗪并 [2, 3-c] 咪唑基, 2-2H- 呋喃并 [3, 2-b]- 吡喃基, 3-2H- 呋喃并 [3, 2-b]- 吡喃基, 5-2H- 呋喃并 [3, 2-b]- 吡喃基, 6-2H- 呋喃并 [3, 2-b]- 吡喃基或 7-2H- 呋喃并 [3, 2-b]- 吡喃基, 2-5H- 吡啶并 [2, 3-d]-o- 恶嗪基, 3-5H- 吡啶并 [2, 3-d]-o- 恶嗪基, 4-5H- 吡啶并 [2, 3-d]-o- 恶嗪基, 5-5H- 吡啶并 [2, 3-d]-o- 恶嗪基, 7-5H- 吡啶并 [2, 3-d]-o- 恶嗪基或 8-5H- 吡啶并 [2, 3-d]-o- 恶嗪基, 1-1H- 吡啶并 [4, 3-d]- 恶唑基, 3-1H- 吡啶并 [4, 3-d]- 恶唑基或 5-1H- 吡啶并 [4, 3-d]- 恶唑基, 2-4H- 咪唑并 [4, 5-d] 噻唑基, 4-4H- 咪唑并 [4, 5-d] 噻唑基或 5-4H- 咪唑并 [4, 5-d] 噻唑基, 3- 吡嗪并 [2, 3-d] 哒嗪基, 5- 吡嗪并 [2, 3-d] 哒嗪基或 8- 吡嗪并 [2, 3-d] 哒嗪基, 2- 咪唑并 [2, 1-b] 噻唑基, 3- 咪唑并 [2, 1-b] 噻唑基, 5- 咪唑并 [2, 1-b] 噻唑基或 6- 咪唑并 [2, 1-b] 噻唑基, 1- 呋喃并 [3, 4-c] 噌啉基, 3- 呋喃并 [3, 4-c] 噌啉基, 6- 呋喃并 [3, 4-c] 噌啉基, 7- 呋喃并 [3, 4-c] 噌啉基, 8- 呋喃并 [3, 4-c] 噌啉基或 9- 呋喃并 [3, 4-c] 噌啉基, 1-4H- 吡啶并 [2, 3-c] 咪唑基, 2-4H- 吡啶并 [2, 3-c] 咪唑基, 3-4H- 吡啶并 [2, 3-c] 咪唑基, 4-4H- 吡啶并 [2, 3-c] 咪唑基, 5-4H- 吡啶并 [2, 3-c] 咪唑基, 6-4H- 吡啶并 [2, 3-c] 咪唑基, 8-4H- 吡啶并 [2, 3-c] 咪唑基, 9-4H- 吡啶并 [2, 3-c] 咪唑基, 10-4H- 吡啶并 [2, 3-c] 咪唑基或 11-4H- 吡啶并 [2, 3-c] 咪唑基, 2- 咪唑并 [1, 2-b][1, 2, 4] 三嗪基, 3- 咪唑并 [1, 2-b][1, 2, 4] 三嗪基, 6- 咪唑并 [1, 2-b][1, 2, 4] 三嗪基或 7- 咪唑并 [1, 2-b][1, 2, 4] 三嗪基, 7- 苯并 [b] 噻吩基, 2- 苯并恶唑基, 4- 苯并恶唑基, 5- 苯并恶唑基, 6- 苯并恶唑基或 7- 苯并恶唑基, 2- 苯并咪唑基, 4- 苯并咪唑基, 5- 苯并咪唑基, 6- 苯并咪唑基或 7- 苯并咪唑基, 2- 苯并噻唑基, 4- 苯并噻唑基, 4- 苯并噻唑基, 5- 苯并噻唑基, 6- 苯并噻唑基或 7- 苯并噻唑基, 1- 苯并氧杂革基, 2- 苯并氧杂革基, 4- 苯并氧杂革基, 5- 苯并氧杂革基, 6- 苯并氧杂革基, 7- 苯并氧杂革基, 8- 苯并氧杂革基或 9- 苯并氧杂革基(benzoxapinylyl), 2- 苯并恶嗪基, 4- 苯并恶嗪基, 5- 苯并恶嗪基, 6- 苯并恶嗪基, 7- 苯并恶嗪基或 8- 苯并恶嗪基, 1-1H- 吡咯并 [1, 2-b][2] 苯并氮杂革基, 2-1H- 吡咯并 [1, 2-b][2] 苯并氮杂革基, 3-1H- 吡咯并 [1, 2-b][2] 苯并氮杂革基, 5-1H- 吡咯并 [1, 2-b][2] 苯并氮杂革基, 6-1H- 吡咯并 [1, 2-b][2] 苯并氮杂革基, 7-1H- 吡咯并 [1, 2-b][2] 苯

并氮杂革基, 8-1H-吡咯并[1, 2-b][2] 苯并氮杂革基, 9-1H-吡咯并[1, 2-b][2] 苯并氮杂革基, 10-1H-吡咯并[1, 2-b][2] 苯并氮杂革基或 11-1H-吡咯并[1, 2-b][2] 苯并氮杂革基(benzazapinylyl)。典型的稠合杂芳基基团包括但不限于: 2-喹啉基, 3-喹啉基, 4-喹啉基, 5-喹啉基, 6-喹啉基, 7-喹啉基或 8-喹啉基, 1-异喹啉基, 3-异喹啉基, 4-异喹啉基, 5-异喹啉基, 6-异喹啉基, 7-异喹啉基或 8-异喹啉基, 2-吡啶基, 3-吡啶基, 4-吡啶基, 5-吡啶基, 6-吡啶基或 7-吡啶基, 2-苯并[b]噻吩基, 3-苯并[b]噻吩基, 4-苯并[b]噻吩基, 5-苯并[b]噻吩基, 6-苯并[b]噻吩基或 7-苯并[b]噻吩基, 2-苯并恶唑基, 4-苯并恶唑基, 5-苯并恶唑基, 6-苯并恶唑基或 7-苯并恶唑基, 2-苯并咪唑基, 4-苯并咪唑基, 5-苯并咪唑基, 6-苯并咪唑基或 7-苯并咪唑基, 2-苯并噻唑基, 4-苯并噻唑基, 5-苯并噻唑基, 6-苯并噻唑基或 7-苯并噻唑基。

[0090] 如本文使用的术语“杂环基”或“杂环”是指被任选地取代的完全饱和的或不饱和的、芳香族的或非芳香族的环基团, 例如, 其为 4 元至 7 元单环系统, 7 元至 12 元双环系统或者 10 元至 15 元三环系统, 其在至少一个含有碳原子的环中具有至少一个杂原子。含有杂原子的杂环基团中的每一个环可具有选自氮原子、氧原子和硫原子的 1 个, 2 个或 3 个杂原子, 其中, 氮原子和硫原子还可被任选地氧化。杂环基团可在杂原子或碳原子处连接。

[0091] 示例性的单环杂环基团包括: 吡咯烷基、吡咯基、吡啶基、氧杂环丁烷基、吡啶基、咪唑基、咪唑基、咪唑基、咪唑基、三唑基、恶唑基、恶唑基、异恶唑基、异恶唑基、噻唑基、噻二唑基、噻唑基、异噻唑基、异噻唑基、呋喃基、四氢呋喃基、噻吩基、恶二唑基、哌啶基、哌嗪基、2-氧代哌嗪基、2-氧代哌啶基、2-氧代吡咯烷基、2-氧代氮杂卓基(2-oxoazepinylyl)、氮杂卓基(azepinylyl)、4-哌啶酮基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、四氢吡喃基、吗啉基、噻吗啉基、噻吗啉基亚砷、噻吗啉基砷、1, 3-二氧戊环和四氢-1, 1-二氧代噻吩基、1, 1, 4-三氧代-1, 2, 5-噻二唑烷-2-基, 等等。

[0092] 示例性的双环杂环基团包括: 吡啶基、二氢吡啶基、苯并噻唑基、苯并恶唑基、苯并恶唑基、苯并噻吩基、苯并噻吩基、奎宁环基、喹啉基、四氢喹啉基、十氢喹啉基、异喹啉基、四氢异喹啉基、十氢异喹啉基、苯并咪唑基、苯并吡喃基、中氮茛基、苯并呋喃基、色酮基(chromonylyl)、香豆素基、苯并吡喃基、噌啉基、喹啉基、吡啶基、吡咯并吡啶基、呋喃并吡啶基(例如, 呋喃并[2, 3-c]吡啶基、呋喃并[3, 2-b]吡啶基或呋喃并[2, 3-b]吡啶基)、二氢异吡啶基、1, 3-二氧-1, 3-二氢异吡啶-2-基、二氢喹啉基(例如, 3, 4-二氢-4-氧代-喹啉基)、2, 3-二氮杂萘基, 等等。

[0093] 示例性的三环杂环基团包括: 咪唑基、二苯并氮杂卓基、二噻吩并氮杂卓基、苯并吡啶基、菲咯啉基、吡啶基、菲啶基、吩恶嗪基、吩噻嗪基、咕吨基、咪唑基, 等等。

[0094] 术语“杂环基”进一步是指被 1 个、2 个或 3 个选自下列基团的取代基取代的如上所定义的杂环基团:

- [0095] (a) 烷基;
- [0096] (b) 羟基(或者被保护的羟基);
- [0097] (c) 卤素;
- [0098] (d) 氧, 即, =O;
- [0099] (e) 氨基, 烷基氨基或二烷基氨基;
- [0100] (f) 烷氧基;

- [0101] (g) 环烷基；
- [0102] (h) 羧基；
- [0103] (i) 杂环氧基,其中,杂环氧基是指通过氧桥键连接的杂环基团；
- [0104] (j) 烷基  $-O-C(O)-$ ；
- [0105] (k) 巯基；
- [0106] (l) 硝基；
- [0107] (m) 氰基；
- [0108] (n) 氨磺酰基或亚磺酰氨基；
- [0109] (o) 芳基；
- [0110] (p) 烷基  $-C(O)-O-$ ；
- [0111] (q) 芳基  $-C(O)-O-$ ；
- [0112] (r) 芳基  $-S-$ ；
- [0113] (s) 芳氧基；
- [0114] (t) 烷基  $-S-$ ；
- [0115] (u) 甲酰基,即,  $HC(O)-$ ；
- [0116] (v) 氨基甲酰基；
- [0117] (w) 芳基-烷基-；以及
- [0118] (x) 被烷基、环烷基、烷氧基、羟基、氨基、烷基  $-C(O)-NH-$ 、烷基氨基、二烷基氨基或卤素取代的芳基。

[0119] 本文使用的术语“烯基”是指具有 2 个至 20 个碳原子且含有至少一个双键的直链或支链烃基。所述烯基优选地具有约 2 个至 8 个碳原子。

[0120] 除非另有说明,术语“芳基”是指多不饱和芳香族烃取代基,其可为单环或多环(优选地为 1 个环至 3 个环),其可为稠合的或共价连接的。术语“杂芳基”是指含有 1 个至 4 个选自 N、O 和 S 的杂原子的芳基基团(或芳环),其中,氮原子和硫原子可被任选地氧化并且氮原子可被任选地季铵化。杂芳基基团可通过杂原子连接至分子的剩余部分。芳基和杂芳基的非限定性实例包括:苯基、1-萘基、2-萘基、4-联苯基、1-吡咯基、2-吡咯基、3-吡咯基、3-吡唑基、2-咪唑基、4-咪唑基、吡嗪基、2-恶唑基、4-恶唑基、2-苯基-4-恶唑基、5-恶唑基、3-异恶唑基、4-异恶唑基、5-异恶唑基、2-噁唑基、4-噁唑基、5-噁唑基、2-呋喃基、3-呋喃基、2-噻吩基、3-噻吩基、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-苯并噁唑基、嘌呤基、2-苯并咪唑基、5-吡啶基、1-异喹啉基、5-异喹啉基、2-喹啉基、5-喹啉基、3-喹啉基和 6-喹啉基。上述芳基和杂芳基环系统的每一个的取代基选自下述可接受的取代基基团。

[0121] 为了简洁起见,当与其他术语(例如,芳氧基、芳硫氧基、芳基烷基)组合使用时,术语“芳基”包括上述芳环和杂芳环。因此,术语“芳基烷基”意在包括其中芳基连接至烷基的那些自由基(例如,苄基、苯乙基、吡啶甲基,等等),所述烷基包括碳原子(例如,亚甲基)被例如氧原子取代的那些烷基(例如,苯氧基甲基、2-吡啶基氧甲基、3-(1-萘基氧)丙基,等等)。

[0122] 上述术语(例如“烷基”、“杂烷基”、“芳基”和“杂芳基”)的每一个包括所指定的自由基的取代形式和未取代形式这两者。每种类型的自由基的优选的取代基在下文提供。

[0123] 烷基和杂烷基自由基(包括通常称为烯烃、烯基、杂烯烃、杂烯基、炔基、环烷基、杂环烷基、环烯基和杂环烯基的那些基团)的取代基通常分别被称为“烷基取代基”和“杂烷基取代基”,并且它们可为选自下列多种基团中的一种或一种以上,但不限于下列基团: $-\text{OR}'$ ,  $=\text{O}$ ,  $=\text{NR}'$ ,  $=\text{N-OR}'$ ,  $-\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{SR}'$ , - 卤素,  $-\text{SiR}'\text{R}''\text{R}'''$ ,  $-\text{OC(O)R}'$ ,  $-\text{C(O)R}'$ ,  $-\text{CO}_2\text{R}'$ ,  $-\text{CONR}'\text{R}''$ ,  $-\text{OC(O)NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{NR}''\text{C(O)R}'$ ,  $-\text{NR}'-\text{C(O)NR}''\text{R}'''$ ,  $-\text{NR}''\text{C(O)}_2\text{R}'$ ,  $-\text{NR}-\text{C(NR}'\text{R}''\text{R}''')=\text{NR}''''$ ,  $-\text{NR}-\text{C(NR}'\text{R}''')=\text{NR}''''$ ,  $-\text{S(O)R}'$ ,  $-\text{S(O)}_2\text{R}'$ ,  $-\text{S(O)}_2\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{NRSO}_2\text{R}'$ ,  $-\text{CN}$  和  $-\text{NO}_2$ , 数量为 0 至  $(2m'+1)$ , 其中,  $m'$  为该自由基的碳原子总数。 $\text{R}'$ ,  $\text{R}''$ ,  $\text{R}'''$  和  $\text{R}''''$  优选地分别独立地指氢、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的芳基(例如,被 1 个至 3 个卤素取代的芳基),取代或未取代的烷基、烷氧基或硫代烷氧基,或者芳基烷基基团。例如,当本发明的化合物包括一个以上 R 基团时, R 基团中的每一个独立地选自各  $\text{R}'$ ,  $\text{R}''$ ,  $\text{R}'''$  和  $\text{R}''''$  基团(当存在这些基团中的一个以上时)。当  $\text{R}'$  和  $\text{R}''$  连接至相同的氮原子时,它们可与氮原子结合形成 5 元环、6 元环或 7 元环。例如,  $-\text{NR}'\text{R}''$  意在包括但不限于:1-吡咯烷基和 4-吗啉基。通过以上对取代基的讨论,本领域技术人员会理解的是,术语“烷基”意在包括如下基团:该基团包括连接至除了氢基团以外的基团的碳原子,例如,卤代烷基(例如,  $-\text{CF}_3$  和  $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ ) 和酰基(例如,  $-\text{C(O)CH}_3$ ,  $-\text{C(O)CF}_3$ ,  $-\text{C(O)CH}_2\text{OCH}_3$ , 等等)。

[0124] 类似于对于烷基自由基的取代基的描述,芳基取代基和杂芳基取代基通常被分别称为“芳基取代基”和“杂芳基取代基”,并且为不同的,选自例如,卤素,  $-\text{OR}'$ ,  $=\text{O}$ ,  $=\text{NR}'$ ,  $=\text{N-OR}'$ ,  $-\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{SR}'$ , - 卤素,  $-\text{SiR}'\text{R}''\text{R}'''$ ,  $-\text{OC(O)R}'$ ,  $-\text{C(O)R}'$ ,  $-\text{CO}_2\text{R}'$ ,  $-\text{CONR}'\text{R}''$ ,  $-\text{OC(O)NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{NR}''\text{C(O)R}'$ ,  $-\text{NR}'-\text{C(O)NR}''\text{R}'''$ ,  $-\text{NR}''\text{C(O)}_2\text{R}'$ ,  $-\text{NR}-\text{C(NR}'\text{R}''')=\text{NR}''''$ ,  $-\text{S(O)R}'$ ,  $-\text{S(O)}_2\text{R}'$ ,  $-\text{S(O)}_2\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{NRSO}_2\text{R}'$ ,  $-\text{CN}$  和  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{R}'$ ,  $-\text{N}_3$ ,  $-\text{CH(Ph)}_2$ , 氟代 ( $\text{C}_1-\text{C}_4$ ) 烷氧基和氟代 ( $\text{C}_1-\text{C}_4$ ) 烷基,数量为 0 至芳香族环系统上开放的化合价的总数,并且其中,  $\text{R}'$ ,  $\text{R}''$ ,  $\text{R}'''$  和  $\text{R}''''$  优选地独立地选自:氢、( $\text{C}_1-\text{C}_8$ ) 烷基和杂烷基、未取代的芳基和杂芳基, (未取代的芳基)-( $\text{C}_1-\text{C}_4$ ) 烷基以及 (未取代的芳基)氧-( $\text{C}_1-\text{C}_4$ ) 烷基。例如,当本发明的化合物包含一个以上 R 基团时, R 基团中的每一个独立地选自各  $\text{R}'$ ,  $\text{R}''$ ,  $\text{R}'''$  和  $\text{R}''''$  基团(当存在这些基团中的一个以上时)。

[0125] 芳环或杂芳环的相邻原子上的芳基取代基中的两个可任选地被通式  $-\text{T-C(O)-(CRR}')_q-\text{U}-$  的取代基取代,其中, T 和 U 独立地为  $-\text{NR}-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{CRR}'-$  或单个化学键,并且 q 为 0 至 3 的整数。可选地,芳环或杂芳环的相邻原子上的取代基中的两个可任选地被通式  $-\text{A-(CH}_2)_r-\text{B}-$  的取代基取代,其中, A 和 B 独立地为  $-\text{CRR}'-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{NR}-$ ,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{S(O)}-$ ,  $-\text{S(O)}_2-$ ,  $-\text{S(O)}_2\text{NR}'-$  或单个化学键,并且 r 为 1 至 4 的整数。由此形成的新环中的单个化学键中的一个可被双键任选地取代。可选地,芳基环或杂芳基环的相邻原子上的取代基中的两个可任选地被通式  $-(\text{CRR}')_s-\text{X}-(\text{CR}''\text{R}''')_d-$  的取代基取代,其中, s 和 d 独立地为 0 至 3 的整数,并且 X 为  $-\text{O}-$ ,  $-\text{NR}'-$ ,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{S(O)}-$ ,  $-\text{S(O)}_2-$ , 或  $-\text{S(O)}_2\text{NR}'-$ 。取代基  $\text{R}$ ,  $\text{R}'$ ,  $\text{R}''$  和  $\text{R}'''$  优选地独立地选自氢或者取代或未取代的 ( $\text{C}_1-\text{C}_6$ ) 烷基。

[0126] 本文使用的术语“杂原子”包括氧(O)、氮(N)、硫(S)、磷(P)和硅(Si)。

[0127] 本文使用的术语“芳氧基”是指  $-\text{O}-$  芳基和  $-\text{O}-$  杂芳基这两者,其中,芳基和杂芳基是本文所定义的。

[0128] 本文使用的术语“药学上可接受的盐”是指保持本发明的化合物的生物功效和性质的盐,其不是生物学上不理想的也不是其他不理想的。在许多情况下,本发明的化合物

能够通过存在的氨基和 / 或羧基或类似基团(例如, 苯酚或羟肟酸(hydroxyamic acid)) 形成酸式盐和 / 或碱式盐。药学上可接受的酸加成盐可通过无机酸和有机酸形成。可衍生形成盐的无机酸包括, 例如, 盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸, 等等。可衍生形成盐的有机酸包括, 例如, 醋酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸, 等等。药学上可接受的碱加成盐可通过无机碱和有机碱形成。可衍生形成盐的无机碱包括, 例如, 钠盐、钾盐、锂盐、铵盐、钙盐、镁盐、铁盐、锌盐、铜盐、锰盐、铝盐, 等等, 特别优选地为铵盐、钾盐、钠盐、钙盐和镁盐。可衍生形成盐的有机碱包括, 例如, 伯胺、仲胺和叔胺、取代的胺(包括天然生成的取代的胺)、环胺、碱性离子交换树脂, 等等, 尤其例如, 异丙基胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺和乙醇胺。本发明的药学上可接受的盐可通过常规化学方法由母体化合物, 碱性基团或酸性基团合成。一般而言, 这种盐可通过这些化合物的游离酸形式与化学计量量的合适的碱(例如, 氢氧化钠, 氢氧化钙, 氢氧化镁或氢氧化钾, 碳酸盐, 碳酸氢盐, 等等) 的反应来制备或者可通过这些化合物的游离碱形式与化学计量量的合适的酸的反应来制备。这些反应通常在水或有机溶剂中进行, 或者在水和有机溶剂的混合物中进行。通常, 在实际应用中, 非水性介质(例如, 醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈) 为优选的。其他合适的盐的列表可在例如, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 20 版, Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985) 中找到, 该参考文献通过引用并入本文。

[0129] 本文使用的术语“药学上可接受的载体 / 赋形剂”包括本领域普通技术人员已知的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如, 抗菌剂、抗真菌剂)、等渗剂、吸收延迟剂、盐、药物、药物稳定剂、结合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、染料, 等等, 以及它们的组合(参见, 例如, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329, 该参考文献通过引用并入本文)。除了迄今已知的与活性成分不相容的任何常规载体之外, 上述药学上可接受的载体 / 赋形剂可用于治疗组合物或药物组合物。

[0130] 本文使用的术语“受治者”是指动物。优选地, 所述动物为哺乳动物。受治者还指例如, 灵长类动物(例如, 人类), 牛、绵羊、山羊、马、狗、猫、兔子、大鼠、小鼠、鱼、鸟, 等等。在优选的实施方式中, 所述受治者为人类。

[0131] 化合物和组合物

[0132] 一方面, 本发明提供一种具有通式(Ia) 的结构化合物:

[0133] TM-Ln-AM (Ia),

[0134] 其中, TM 为靶向部分, AM 为活化树突细胞、自然杀伤细胞或肿瘤细胞或者它们的组合的活化部分, Ln 为连接体, n 为选自 0 和 1 的整数。

[0135] 本文中的“活化部分”是指能够刺激或增强个体的免疫系统或肿瘤细胞的分子或药剂。总体而言, 活化部分直接或间接地作用于 toll 样受体、核苷酸-寡聚结构域样受体、RIG-I 样受体、c 型植物凝集素受体或细胞溶质 DNA 传感器, 或者它们的组合。

[0136] 在一些实施方式中, 所述活化部分活化人免疫细胞或肿瘤细胞, 或者它们的组合, 所述人免疫细胞包括但不限于: 树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、髓样抑制细胞、NK 细胞、B 细胞、T 细胞。

[0137] 树突细胞为最强的抗原呈递细胞。树突细胞在启动先天性免疫反应和获得性免疫



反应中发挥主要作用。树突细胞还在诱导和维持免疫耐受方面发挥关键作用。

[0138] 本文中的“树突细胞(DC)”是指异质细胞群,其包括两个主要的亚型,即髓样 DC (mDC) 和浆细胞样 DC (pDC) (Steinman 等人, 1979, *J. Exp. Med.*, 149, 1-16)。这两种血液 DC 亚组最初通过它们的 CD11c (整合素补体受体) 和 CD123 (IL-3R $\alpha$ ) 的表达来区分。pDC 和 mDC 群中的每一种构成人体内 PBMC 群的约 0.2% 至约 0.6%。

[0139] 本文中的“pDC”是指浆细胞样树突细胞,并且它们代表了在血液和外周淋巴器官中发现的树突细胞的亚型。这些细胞表达表面标记物 CD123、BDCA-2 (CD303) 和 BDCA-4 (CD304) 和 HLA-DR, 但是不表达 CD11c, CD14, CD3, CD20 或 CD56, 这使 pDC 与一般树突细胞、单核细胞、T 细胞、B 细胞和 NK 细胞得以区分。作为先天性免疫系统的成分,这些细胞表达细胞内 Toll 样受体 7 和 9, 这使病毒和细菌核酸能够得到检测, 所述病毒和细菌核酸例如, ssRNA 或 CpG DNA 基序。在刺激和随后的活化之后, 这些细胞产生大量 I 型干扰素 (主要为 IFN- $\alpha$  和 IFN- $\beta$ ) 和 III 型干扰素 (例如, IFN- $\lambda$ ), 这两种干扰素是介导多种作用的重要的多效性抗病毒化合物。通过产生大量 I 型干扰素、细胞因子和趋化因子, 浆细胞样树突细胞广泛参与人体先天性免疫反应和获得性免疫反应。它们可调节 NK 细胞、T 细胞、B 细胞和其他涉及免疫反应强度、持续期和反应模式的细胞, 因此, 它们在肿瘤、感染和自体免疫疾病中发挥非常重要的作用 (Liu YJ. IPC: professional type I interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23: 275-306. Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol.* 2008 Aug; 8(8): 594-606)。

[0140] 本文中的“mDC”是指髓样树突细胞, 并且它们表示血液和外周淋巴器官中发现的循环树突细胞的亚型。这些细胞表达表面标记物 CD11c, CD1a, HLA-DR 以及 BDCA-1 (CD1c) 和 BDCA-3 (CD141) 中的任一种。它们不表达 BDCA-2 或 CD123, 这使 mDC 与 pDC 得以区分。mDC 也不表达 CD3, CD20 或 CD56。作为先天性免疫系统的成分, mDC 表达 Toll 样受体 (TLR), 该受体包括 TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6 和 TLR8, 其使细菌和病毒成分能够得到检测。在刺激和随后的活化之后, 这些细胞为最有效的抗原呈递细胞, 从而活化抗原特异性 CD4 和 CD8T 细胞。此外, mDC 具有产生大量 IL-12 和 IL23 的能力, 这种能力对于诱导 Th1 介导的或 Th17 细胞介导的免疫非常重要。

[0141] 研究发现许多实体瘤 (例如, 乳腺癌和头颈癌, 卵巢癌) 具有 pDC 浸润 (Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N 等人, *Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. Clin Cancer Res* 2004; 10: 7466-7474, Hartmann E, Wollenberg B, Rothenfusser S 等人, *Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. Cancer Res* 2003; 63: 6478-6487. Zou WP, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, 等人, *Stromal-derived factor-1 $\alpha$  human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. Nat Med* 2001; 7: 1339-1346) 和由肿瘤细胞分泌的因子抑制 DC 成熟 (Gabrilovich DI, Corak J, Ciernik IF 等人, *Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. Clin Cancer Res* 1997; 3: 483-490. Bell D, Chomarat P, Broyles D 等人, *In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature*

dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med*1999;190:1417-1425. Menetrier-Caux C, Montmain G, Dieu MC 等人, Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood*1998;92:4778-4791)。这些未成熟的 DC 细胞无法在提高抗肿瘤免疫方面发挥作用。相比之下,肿瘤微环境中的 DC 通过抑制抗肿瘤免疫和促进血管生成而促进肿瘤生长。有证据表明 Toll 样受体 7 激动剂咪喹莫特和 Toll 样受体 9 激动剂 CpG 药物可刺激肿瘤微环境中的 pDC,从而抑制肿瘤发展 (Dummer R, Urosevic M, Kempf W 等人, Imiquimod in basal cell carcinoma: how does it work? *Br J Dermatol*2003;149:57-58. Miller RL, Gerster JF, Owens ML 等人, Imiquimod applied topically: a novel immune response modifier and new class of drug. *Int J Immunopharmacol*1999;21:1-14. Hofmann MA, Kors C, Audring H 等人, Phase I evaluation of intralesionally injected TLR9-agonist PF-3512676 in patients with basal cell carcinoma or metastatic melanoma. *J Immunother*2008;31:520-527)。

[0142] 自然杀伤(NK)细胞为一类细胞毒性淋巴细胞,其构成免疫系统的主要成分。NK 细胞为由 CD56 或 CD16 的表达和 T 细胞受体(CD3)的缺乏界定的外周血液淋巴细胞的一个亚型。所述自然杀伤细胞在不引发 MHC 非限制性方式的条件下识别并杀伤转化的细胞系。NK 细胞在抑制肿瘤和防止细胞受到病毒感染方面发挥重要作用。NK 细胞识别靶细胞并递送足够的信号以触发靶标溶解的过程由细胞表面上的大量抑制性受体和活化受体确定。将 NK 自身与改变的 NK 自身区分开涉及抑制性受体对 MHC-1 分子和诸如 CD48 和 Clr-1b 之类的非 MHC 配体的识别。感染的或损伤的细胞(改变的自身)的 NK 识别通过由各种活化受体(包括, NKG2D, Ly49H 和 Nkp46/Ncr1)识别的应激诱导的配体(例如, MICA, MICB, Rael, H60, Mult1)或病毒编码的配体(例如, m157, 血凝素)调节。

[0143] NK 细胞代表异体或自体干细胞移植之后数月外周血液中的主要淋巴样细胞,并且它们在这个时间段对病原体免疫发挥主要作用(Reittie 等人(1989) *Blood*73:1351-1358; Lowdell 等人(1998) *Bone Marrow Transplant*21:679-686)。NK 细胞在移植、移植物抗宿主疾病、抗白血病活性和移植后感染方面的作用在如下文献中回顾: Lowdell(2003) *Transfusion Medicine*13:399-404。

[0144] 人 NK 细胞通过天然细胞毒性和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)介导肿瘤细胞的溶解和病毒感染的细胞的溶解。

[0145] 人 NK 细胞由阳性和阴性细胞溶解信号控制。阴性(抑制性)信号通过包含受体 CD94/NKG2A 的 C-植物凝集素结构域和一些杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)转导。通过抑制性信号对 NK 溶解的调节被称为“自我缺失”假说,其中,特异性 HLA (在靶细胞表面表达的 I 类等位基因)与 NK 细胞上的抑制性受体结合。肿瘤细胞和一些病毒感染的细胞(例如, CMV)上的 HLA 分子的下调使这种抑制降低至目标阈值以下并且如果靶细胞还携带 NK 引发和活化分子,那么靶细胞可变得易受 NK 细胞介导的溶解影响。TLR7、TLR8 或 TLR9 激动剂可活化 mDC 和 pDC 这两者,从而生成 I 型 IFN 并表达诸如 GITR 配体之类的共刺激分子,随后活化 NK 细胞,从而生成 IFN- $\gamma$  并有效促进 NK 细胞杀伤功能。

[0146] 抑制性受体归为两组,一组为称为杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)的 Ig-超家族,另一组为植物凝集素家族(NKG2,在细胞表面与 CD94 形成二聚体)。KIR 具有 2 个结构域的细

胞外结构或 3 个结构域的胞外结构并且与 HLA-A、HLA-B 或 HLA-C 结合。NKG2/CD94 复合物结合 HLA-E。

[0147] 抑制性 KIR 具有多达 4 个细胞内结构域,所述结构域包含 ITIM 并且被表征得最好的抑制性 KIR 为已知与 HLA-C 分子结合的 KIR2DL1、KIR2DL2 和 KIR2DL3。KIR2DL2 和 KIR2DL3 结合第一组 HLA-C 等位基因,而 KIR2DL1 结合第二组等位基因。一些白血病/淋巴瘤细胞表达第一组 HLA-C 等位基因和第二组 HLA-C 等位基因这两者并且已知这些白血病/淋巴瘤细胞为抗 NK 介导的细胞溶解的。

[0148] 关于阳性活化信号,ADCC 被认为是通过 CD16 介导的,并且已识别了大量导致天然细胞毒性的触发受体,包括 CD2, CD38, CD69, NKRP-I, CD40, B7-2, NK-TR, NKp46, NKp30 和 NKp44。此外,带有短胞浆内尾部的几种 KIR 分子也为刺激性的。已知这些 KIR (KIR2DS1, KIR2DS2 和 KIR2DS4) 与 HLA-C 结合,它们的胞外结构域与它们的相关抑制性 KIR 相同。活化 KIR 缺乏 ITIM,反而与导致 NK 细胞活化的 DAP12 结合。控制抑制性 KIR 和活化 KIR 的表达的机制仍然还不清楚。

[0149] 一些报道已描述了 TLR 在小鼠或人癌症或癌症细胞系中的表达。例如,TLR1 至 TLR6 通过结肠、肺、前列腺和黑色素瘤小鼠肿瘤细胞系表达(Huang B 等人, *Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. Cancer Res.* 2005;65(12):5009 - 5014), TLR3 在人乳腺癌细胞中表达(Salaun B, Coste I, Risoan MC, Lebecque SJ, Renno T. *TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. J Immunol.* 2006;176(8):4894 - 4901), 肝癌和胃癌细胞表达 TLR2 和 TLR4 (Huang B 等人, *Listeria monocytogenes promotes tumor growth via tumor cell toll-like receptor2 signaling. Cancer Res.* 2007;67(9):4346 - 4352), 并且 TLR9 (Droemann D 等人, *Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor9. Respir Res.* 2005;6:1) 和 TLR4 (He W, Liu Q, Wang L, Chen W, Li N, Cao X. *TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. Mol Immunol.* 2007;44(11):2850 - 2859) 通过人肺癌细胞表达。在人肺癌肿瘤细胞中发现 TLR7 和 TLR8 (Cherfils-Vicini J, Platonova S, Gillard M, Laurans L, Validire P, Caliandro R, Magdeleinat P, Mami-Chouaib F, Dieu-Nosjean MC, Fridman WH, Damotte D, Sautès-Fridman C, Cremer I. *J. Clin Invest.* 2010;120(4):1285 - 1297)。

[0150] TLR 为感应微生物产物和/或启动获得性免疫反应的蛋白质家族。TLR 活化树突细胞(DC)。TLR 为含有富含亮氨酸的重复单元胞外结构域、跨膜结构域和细胞内 TIR (Toll/白介素受体)结构域的保守跨膜分子。TLR 识别微生物中的不同结构,通常称为“PAMP”(病原体相关分子模式)。与 TLR 结合的配体引起细胞内信号通路的级联反应,该级联反应诱导参与炎症和免疫的因子的生成。

[0151] 在一些实施方式中,所述活化部分为 TLR7 和/或 TLR8 激动剂。TLR7 和 TLR8 在系统发育和结构上相关。TLR7 由人 pDC 和 B 细胞选择性表达。TLR8 主要由 mDC、单核细胞、巨噬细胞和骨髓抑制细胞表达。TLR7 特异性激动剂 活化浆细胞样 DC (pDC),从而生成大量 I 型 IFN 并且表达高水平的共刺激分子,所述共刺激分子促进 T 细胞、NK 细胞、B 细胞和 mDC 的活化。TLR8 特异性激动剂活化髓样 DC、单核细胞、巨噬细胞或髓样抑制细胞,从而生

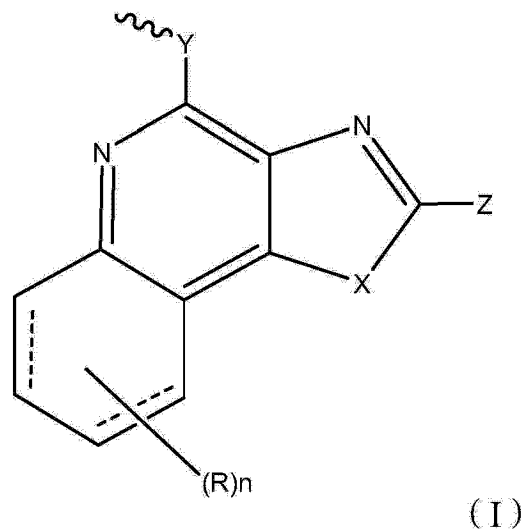
成大量 1 型 IFN、IL-12 和 IL-23, 并且表达高水平的 MHC I 类分子、MHC II 类分子和共刺激分子, 所述 MHC I 类分子、MHC II 类分子和共刺激分子促进抗原特异性 CD4 和 CD8+T 细胞的活化。

[0152] 另一方面, 本发明提供一种具有通式 (Ib) 的结构化合物或其药学上可接受的盐或其溶剂化物:

[0153] TM-L-AM (Ib)

[0154] 其中, TM 为靶向部分, L 为连接体, AM 为由通式 (I) 的结构表示的活化部分:

[0155]



[0156] 其中, 虚线表示存在化学键或不存在化学键,  $\sim$  为待与连接体连接的点;

[0157] X 是 S 或  $-NR_1$ ,  $R_1$  是  $-W_0-W_1-W_2-W_3-W_4$ ;

[0158]  $W_0$  是化学键, 烷基, 烯基, 炔基, 烷氧基或  $-S-$  烷基  $-$ ;

[0159]  $W_1$  是化学键,  $-O-$ , 或  $-NR_2-$ , 其中,  $R_2$  是氢, 烷基或烯基,

[0160]  $W_2$  是化学键,  $-O-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(S)-$  或  $-S(O)_2-$ ,

[0161]  $W_3$  是化学键,  $-NR_3-$ , 其中,  $R_3$  是氢, 烷基或烯基,

[0162]  $W_4$  是氢, 烷基, 烯基, 炔基, 烷氧基, 环烷基, 芳基, 芳氧基, 杂芳基或杂环基, 它们中的每一个被一个或一个以上选自下列基团的取代基任选地取代: 羟基, 烷氧基, 烷基, 烯基, 炔基, 环烷基, 芳基, 杂芳基, 杂环基,  $-NH_2$ , 硝基,  $-$  烷基-羟基,  $-$  烷基-芳基,  $-$  烷基-杂芳基,  $-$  烷基-杂环基,  $-O-R_4$ ,  $-O-$  烷基  $-R_4$ ,  $-O-$  烷基  $-O-R_4$ ,  $-C(O)-R_4$ ,  $-$  烷基  $-C(O)-R_4$ ,  $-$  烷基  $-C(O)-O-R_4$ ,  $-C(O)-O-R_4$ ,  $-S-R_4$ ,  $-S(O)_2-R_4$ ,  $-NH-S(O)_2-R_4$ ,  $-$  烷基  $-S-R_4$ ,  $-$  烷基  $-S(O)_2-R_4$ ,  $-NHR_4$ ,  $-NR_4R_4$ ,  $-NH-$  烷基  $-R_4$ , 卤素,  $-CN$ ,  $-NO_2$  和  $-SH$ , 其中,  $R_4$  独立地为氢, 烷基, 烯基,  $-$  烷基-羟基, 芳基, 杂芳基, 杂环基或卤代烷基;

[0163] Z 是氢, 烷基, 烯基, 炔基, 烷氧基, 芳基, 卤代烷基, 杂芳基, 杂环基, 它们中的每一个可被一个或一个以上选自下列基团的取代基任选地取代: 羟基, 烷氧基, 烷基, 烯基, 炔基, 芳基, 杂芳基, 杂环基, 卤素, 氰基, 硝基,  $-N(R_5)_2$ ,  $-$  烷氧基-烷基,  $-$  烷氧基-烯基,  $-C(O)-$  烷基,  $-C(O)-O-$  烷基,  $-O-C(O)-$  烷基,  $-C(O)-N(R_5)_2$ , 芳基, 杂芳基,  $-CO-$  芳基和  $-CO-$  杂芳基, 其中,  $R_5$  分别独立地为氢, 烷基, 卤代烷基,  $-$  烷基-芳基或  $-$  烷基-杂芳基;

[0164] R 为氢, 烷基, 烷氧基, 卤代烷基, 卤素, 芳基, 杂芳基, 杂环基, 它们中的每一个被一

个或一个以上选自下列基团的取代基任选地取代：羟基，烷氧基，烷基，烯基，炔基，环烷基，芳基，杂芳基，杂环基， $-\text{NH}_2$ ，硝基， $-\text{烷基}-\text{羟基}$ ， $-\text{烷基}-\text{芳基}$ ， $-\text{烷基}-\text{杂芳基}$ ， $-\text{烷基}-\text{杂环基}$ ， $-\text{O}-\text{R}_4$ ， $-\text{O}-\text{烷基}-\text{R}_4$ ， $-\text{烷基}-\text{O}-\text{R}_4$ ， $-\text{C}(\text{O})-\text{R}_4$ ， $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{R}_4$ ， $-\text{C}(\text{O})-\text{NR}_4\text{R}_4$ ， $-\text{烷基}-\text{C}(\text{O})-\text{R}_4$ ， $-\text{烷基}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}_4$ ， $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}_4$ ， $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{R}_4$ ， $-\text{S}-\text{R}_4$ ， $-\text{C}(\text{O})-\text{S}-\text{R}_4$ ， $-\text{S}-\text{C}(\text{O})-\text{R}_4$ ， $-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}_4$ ， $-\text{NH}-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}_4$ ， $-\text{烷基}-\text{S}-\text{R}_4$ ， $-\text{烷基}-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}_4$ ， $-\text{NHR}_4$ ， $-\text{NR}_4\text{R}_4$ ， $-\text{NH}-\text{烷基}-\text{R}_4$ ，卤素， $-\text{CN}$  和  $-\text{SH}$ ，其中， $\text{R}_4$ 独立地为氢，烷基，烯基，烷氧基， $-\text{烷基}-\text{羟基}$ ，芳基，杂芳基，杂环基，或卤代烷基；

[0165]  $n$  为 0, 1, 2, 3 或 4；

[0166]  $Y$  为  $-\text{NR}_6\text{R}_7$ ， $-\text{CR}_6\text{R}_7\text{R}_8$  或  $-\text{烷基}-\text{NH}_2$ ，它们中的每一个可被一个或一个以上选自下列基团的取代基任选地取代：羟基，烷氧基，烷基，烯基，炔基， $-\text{NH}_2$ ，卤素， $-\text{N}(\text{R}_5)_2$ ， $-\text{烷氧基}-\text{烷基}$ ， $-\text{烷氧基}-\text{烯基}$ ， $-\text{C}(\text{O})-\text{烷基}$ ， $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{烷基}$ ， $-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}_5)_2$ ，芳基，杂芳基， $-\text{CO}-\text{芳基}$  和  $-\text{CO}-\text{杂芳基}$ ，

[0167] 其中， $\text{R}_6$ ， $\text{R}_7$  和  $\text{R}_8$  独立地为氢，烷基，烯基，烷氧基，烷基氨基，二烷基氨基，烷硫基，芳硫基， $-\text{烷基}-\text{羟基}$ ， $-\text{烷基}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}_9$ ， $-\text{烷基}-\text{C}(\text{O})-\text{R}_9$  或  $-\text{烷基}-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{R}_9$ ，其中， $\text{R}_5$  分别独立地为氢，烷基，卤代烷基， $-\text{烷基}-\text{芳基}$  或  $-\text{烷基}-\text{杂芳基}$ ，其中， $\text{R}_9$  为氢，烷基，烯基，卤素或卤代烷基；

[0168] 任选地， $X$  和  $Z$  一同可形成 5 至 9 元环。

[0169] 在一些实施方式中，通式(I)中的  $X$  为  $S$ 。

[0170] 在一些实施方式中，通式(I)中的  $X$  为  $-\text{NR}_1$ ， $\text{R}_1$  为烷基， $-\text{烷基}-\text{W}_4$ ， $-\text{烷基}-\text{O}-\text{W}_4$ ， $-\text{烷基}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{W}_4$ ， $-\text{烷氧基}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{W}_4$ ， $-\text{烷基}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{W}_4$ ， $-\text{烷氧基}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{W}_4$ ， $-\text{烷基}-\text{S}(\text{O})_2-\text{W}_4$ ，或  $-\text{烷基}-\text{NH}-\text{C}(\text{S})-\text{W}_4$ ，其中， $\text{W}_4$  为上面所定义的。

[0171] 在一些实施方式中，通式(I)中的  $Z$  为氢、烷基、烷氧基、芳基、杂芳基、卤代烷基，它们中的每一个被一个至三个选自下列基团的取代基任选地取代：羟基、烷基、芳基、杂芳基、杂环基、氰基、 $-\text{烷氧基}-\text{烷基}$ 、硝基和  $-\text{N}(\text{R}_5)_2$ ，其中， $\text{R}_5$  分别独立地为氢、烷基、卤代烷基、 $-\text{烷基}-\text{芳基}$  或  $-\text{烷基}-\text{杂芳基}$ 。

[0172] 在一些实施方式中，通式(I)中的  $Y$  为  $-\text{NH}_2$ ， $-\text{烷基}-\text{NH}_2$ ，它们中的每一个被一个至三个选自烷基、烷氧基、烯基和炔基的取代基任选地取代。

[0173] 在一些实施方式中，通式(I)中的  $n$  为 1 或 2。

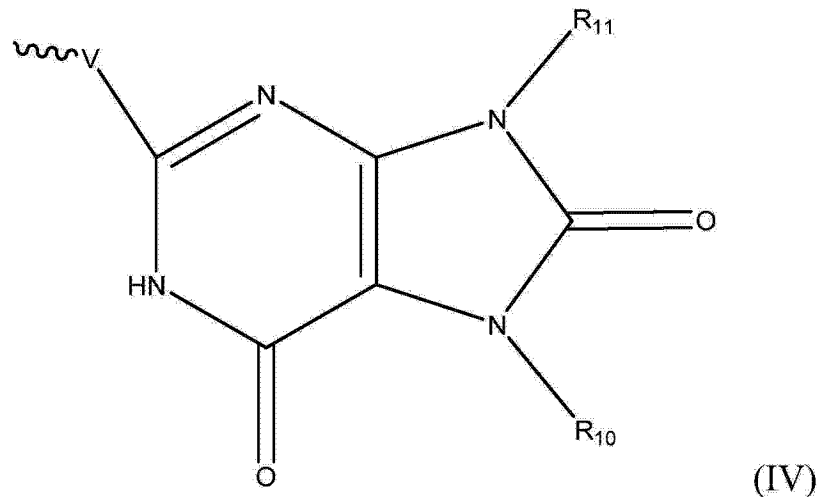
[0174] 在一些实施方式中，通式(I)中的  $R$  为芳基或杂芳基，它们中的每一个被一个至三个选自下列基团的取代基任选地取代：羟基，烷氧基， $-\text{烷基}-\text{羟基}$ ， $-\text{O}-\text{R}_4$ ， $-\text{O}-\text{烷基}-\text{R}_4$ ， $-\text{烷基}-\text{O}-\text{R}_4$ ， $-\text{C}(\text{O})-\text{R}_4$ ， $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{R}_4$ ， $-\text{C}(\text{O})-\text{NR}_4\text{R}_4$ ， $-\text{烷基}-\text{C}(\text{O})-\text{R}_4$ ， $-\text{烷基}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}_4$ ， $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}_4$ ， $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{R}_4$ ， $-\text{S}-\text{R}_4$ ， $-\text{C}(\text{O})-\text{S}-\text{R}_4$ ， $-\text{S}-\text{C}(\text{O})-\text{R}_4$ ， $-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}_4$ ， $-\text{NH}-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}_4$ ， $-\text{烷基}-\text{S}-\text{R}_4$ ， $-\text{烷基}-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}_4$ ， $-\text{NHR}_4$ ， $-\text{NR}_4\text{R}_4$ ， $-\text{NH}-\text{烷基}-\text{R}_4$ ，卤素， $-\text{CN}$  和  $-\text{SH}$ ，其中， $\text{R}_4$  独立地为氢，烷基，烯基，烷氧基， $-\text{烷基}-\text{羟基}$ ，芳基，杂芳基，杂环基或卤代烷基。

[0175] 另一方面，本发明提供一种具有通式(Ib)的结构的化合物或其药学上可接受的盐或其溶剂化物：

[0176] TM-L-AM (Ib)

[0177] 其中，TM 为靶向部分，L 为连接体，AM 是由下述通式(IV)的结构表示的活化部分：

[0178]



[0179] 其中， $\sim$  是待与连接体连接的点；

[0180] 其中，V 是  $-NR_6R_7$ ，其中， $R_6$  和  $R_7$  分别独立地为氢，烷基，烯基，烷氧基，烷基氨基，二烷基氨基，烷硫基，芳硫基，-- 烷基 - 羟基，-- 烷基 -  $C(O)-O-R_9$ ，-- 烷基 -  $C(O)-R_9$  或 - 烷基 -  $O-C(O)-R_9$ ，其中， $R_9$  是氢，烷基，烯基，卤素或卤代烷基；

[0181]  $R_{10}$  和  $R_{11}$  独立地为氢，烷基，烯基，芳基，卤代烷基，杂芳基，杂环基或环烷基，它们中的每一个被一个或一个以上选自下列基团的取代基任选地取代：羟基，烷氧基，烷基，烯基，炔基，卤素，-- $N(R_5)_2$ ，-- 烷氧基 - 烷基，-- 烷氧基 - 烯基，-- $C(O)-$  烷基，-- $C(O)-O-$  烷基，-- $C(O)-N(R_5)_2$ ，芳基，杂芳基，-- $CO-$  芳基，以及 - $CO-$  杂芳基，其中， $R_5$  分别独立地为氢，烷基，卤代烷基，-- 烷基 - 芳基或 - 烷基 - 杂芳基；TM 和 L 如上文和下文所述的那样界定。

[0182] 靶向部分

[0183] 总体而言，本发明的化合物包含靶向部分。

[0184] 本文中的“靶向部分(TM)”或“靶向剂”是指特异性地或选择性地与目标分子、细胞、颗粒、组织或聚集体结合的分子、复合物或聚集体，所述目标分子、细胞、颗粒、组织或聚集体通常称为“靶标”或“标记物”并且本文将进一步详细讨论这些目标分子、细胞、颗粒、组织或聚集体。

[0185] 在一些实施方式中，靶向部分包含免疫球蛋白、蛋白质、肽、小分子、纳米颗粒或核酸。

[0186] 诸如抗体(例如，嵌合抗体、人源化抗体和人抗体)、受体的配体、植物凝集素和糖类以及一些酶的底物之类的示例性的靶向剂在本领域中被识别并且不受限制地用于实施本发明。其他靶向剂包括一类如下化合物：该化合物不包括特异性分子识别基序，该化合物包括将分子量加至活化部分的纳米颗粒、诸如聚(乙二醇)之类的大分子、多糖，以及聚氨基酸。额外的分子量影响活化部分的药代动力学，例如血清半衰期。

[0187] 在一些实施方式中，靶向部分为抗体，抗体片段，双特异性抗体或其他基于抗体的分子或化合物。然而，靶向部分的其他实例为本领域已知的并且可使用靶向部分的其他实例，例如，适体、avimer、受体结合配体、核酸、生物素 - 亲和素结合对、结合肽或蛋白质，等等。术语“靶向部分”和“结合部分”在本文中同义使用。

[0188] 本文中的“靶标”或“标记物”是指能够特异性结合特定的靶向部分的任何实体。在一些实施方式中，靶标与一个或一个以上特定细胞或组织类型特别相关。在一些实施方式中，靶标与一种或一种以上特定疾病状态特别相关。在一些实施方式中，靶标与一种或一种以上特定发育阶段特别相关。例如，细胞类型特异性标记物在该细胞类型中的表达水平通常比在参比细胞群中的表达水平高至少两倍。在一些实施方式中，细胞类型特异性标记物的水平比在参比群中的平均表达高至少 3 倍、至少 4 倍、至少 5 倍、至少 6 倍、至少 7 倍、至少 8 倍、至少 9 倍、至少 10 倍、至少 50 倍、至少 100 倍或者至少 1,000 倍。细胞类型特异性标记物的检测或测量可将一种目标细胞类型或多种目标细胞类型与许多其他细胞类型、大多数其他细胞类型或所有其他细胞类型区分开。在一些实施方式中，靶标可包含本文所描述的蛋白质、碳水化合物、脂质和 / 或核酸。

[0189] 如果一种物质与核酸的靶向部分特异性结合，那么该物质可被认为是为了本文所述的目的而“被靶向的”。在一些实施方式中，核酸靶向部分在严格条件下与靶标特异性结合。如果靶向部分与靶标特异性结合，那么含有靶向部分的本发明的复合物或化合物被认为是“被靶向的”，从而将整个复合物或化合物组合物递送至特定的器官、组织、细胞、细胞外基质成分和 / 或细胞内腔室。

[0190] 在一些实施方式中，根据本发明的化合物包含靶向部分，所述靶向部分特异性结合与器官、组织、细胞、细胞外基质成分和 / 或细胞内腔室有关的一个或一个以上靶标(例如，抗原)。在一些实施方式中，化合物包含靶向部分，所述靶向部分特异性结合与特定器官或器官系统有关的靶标。在一些实施方式中，根据本发明的化合物包含核靶向部分，该核靶向部分特异性结合一个或一个以上细胞内靶标(例如，细胞器、细胞内蛋白质)。在一些实施方式中，化合物包含靶向部分，所述靶向部分特异性结合与病态的器官、组织、细胞、细胞外基质成分和 / 或细胞内腔室有关的靶标。在一些实施方式中，化合物包含靶向部分，所述靶向部分特异性结合与特定细胞类型(例如，内皮细胞、癌细胞、恶性癌细胞、前列腺癌细胞，等等)有关的靶标。

[0191] 在一些实施方式中，根据本发明的化合物包含靶向部分，所述靶向部分与对一种或一种以上特定组织类型(例如，肝脏组织和前列腺组织)具有特异性的靶标结合。在一些实施方式中，根据本发明的化合物包含靶向部分，所述靶向部分与对一种或一种以上特定细胞类型(例如，T 细胞和 B 细胞)具有特异性的靶标结合。在一些实施方式中，根据本发明的化合物包含靶向部分，所述靶向部分与对一种或一种以上特定疾病状态(例如，肿瘤细胞和健康细胞)具有特异性的靶标结合。在一些实施方式中，根据本发明的化合物包含靶向部分，所述靶向部分与对一种或一种以上特定发育阶段(例如，干细胞和分化的细胞)具有特异性的靶标结合。

[0192] 在一些实施方式中，靶标可为标记物，所述标记物仅仅或主要与一种或几种细胞类型、一种或几种疾病和 / 或一种或几种发育阶段有关。细胞类型特异性标记物在该细胞类型中的表达水平通常比在参比细胞群中的表达水平高至少两倍，例如，所述参比细胞群可由含有几乎等量的来自多种(例如，5-10 种，或者更多)不同的组织或器官的细胞的混合物构成。在一些实施方式中，细胞类型特异性标记物的表达水平比在参比群中的平均表达水平高至少 3 倍、至少 4 倍、至少 5 倍、至少 6 倍、至少 7 倍、至少 8 倍、至少 9 倍、至少 10 倍、至少 50 倍、至少 100 倍或至少 1000 倍。细胞类型特异性标记物的检测和测量可将一种目

标细胞类型或多种目标细胞类型与许多其他细胞类型、大多数其他细胞类型或所有其他细胞类型区分开。

[0193] 在一些实施方式中,靶标包含蛋白质、碳水化合物、脂质和 / 或核酸。在一些实施方式中,靶标包含蛋白质和 / 或其特征部分,例如,肿瘤标记物、整联蛋白、细胞表面受体、跨膜蛋白、细胞间蛋白、离子通道、膜转运蛋白、酶、抗体、嵌合蛋白、糖蛋白,等等。在一些实施方式中,靶标包含碳水化合物和 / 或其特征部分,例如,糖蛋白,糖(例如,单糖、二糖、多糖)、多糖包被(即,大多数真核细胞的外表面上富集碳水化合物的外周区域),等等。在一些实施方式中,靶标包含脂质和 / 或其特征部分,例如,油、脂肪酸、甘油酯、激素、类固醇(例如,胆固醇、胆汁酸)、维生素(例如,维生素 E)、磷脂、神经鞘脂、脂蛋白,等等。在一些实施方式中,靶标包含核酸和 / 或其特征部分,例如,DNA 核酸、RNA 核酸、修饰的 DNA 核酸、修饰的 RNA 核酸、包括 DNA、RNA、修饰的 DNA 和修饰的 RNA 的任何组合在内的核酸。

[0194] 本领域已知多种标记物。典型的标记物包括细胞表面蛋白质,例如,受体。示例性的受体包括但不限于:转铁蛋白受体、LDL 受体、生长因子受体(例如,表皮生长因子受体家族成员(例如,EGFR、Her2、Her3、Her4))或血管内皮生长因子受体、细胞因子受体、细胞粘附分子、整联蛋白、选择素和 CD 分子。所述标记物可为仅仅存在于或大量存在于恶性肿瘤细胞上的分子,例如,肿瘤抗原。

[0195] 在一些实施方式中,所述靶向部分特异性结合肿瘤细胞,或者相对于非肿瘤细胞优先结合肿瘤细胞。

[0196] 靶向部分与肿瘤细胞的结合可使用本领域已知的方法检测。

[0197] 在一些实施方式中,所述肿瘤细胞为癌细胞、肉瘤细胞、淋巴瘤细胞、骨髓瘤细胞或中枢神经系统癌症细胞。

[0198] 在一些实施方式中,所述靶向部分能够特异性结合肿瘤抗原,或者相对于非肿瘤抗原优先结合非肿瘤抗原。

[0199] 本文中的“特异性结合”或“优先结合”是指在两个结合搭档之间(例如,在靶向部分及其结合搭档之间)的结合对两个结合搭档具有选择性并且可不从非特异性相互作用中区分出来。例如,抗原结合部分结合特异性抗原决定簇的能力可通过酶联免疫吸附分析法(ELISA)或其他本领域技术人员熟悉的技术(例如,表面等离子共振技术(在 BIAcore 仪器上分析)(Liljebblad 等人, *Glyco* J17, 323-329(2000))和传统的结合分析(Heeley, *Endocr Res*28, 217-229(2002)))测量。术语“抗-[抗原]抗体”和“与[抗原]结合的抗体”是指能够通过足够的亲和力结合各自的抗原的抗体,这样,所述抗体用作靶向抗原的诊断剂和 / 或治疗剂。在一些实施方式中,抗-[抗原]抗体结合不相关的蛋白质的程度小于所测量(例如,通过放射性免疫分析(RIA))的抗体抗原结合程度的约 10%。在一些实施方式中,结合[抗原]的抗体的解离常数(KD)小于 1  $\mu$ M、小于 100nM、小于 10nM、小于 1nM、小于 0.1nM、小于 0.01nM 或小于 0.001nM(例如,  $10^{-8}$ M 或更小,例如,  $10^{-8}$ M 至  $10^{-13}$ M, 例如,  $10^{-9}$ M 至  $10^{-13}$ M)。应当理解的是,上述定义还可应用于与抗原结合的抗原结合部分。

[0200] 在一些特定的实施方式中,靶标为肿瘤标记物。在一些实施方式中,肿瘤标记物为存在于肿瘤中的抗原,所述抗原不存在于正常器官、组织和 / 或细胞中。在一些实施方式中,肿瘤标记物为抗原,所述抗原在肿瘤中比在正常器官、组织和 / 或细胞中更加普遍。在一些实施方式中,肿瘤标记物为抗原,所述抗原在恶性癌症细胞中比在正常细胞中更加普



遍。

[0201] 本文中的“肿瘤抗原”是指肿瘤细胞中产生的抗原性物质,即,该物质触发宿主体内的免疫反应。体内的正常蛋白质由于自体耐受而不是抗原性的,所述自体耐受为如下过程:在该过程中,自身反应性的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)和产生自身抗体的 B 淋巴细胞在初级淋巴组织(BM)中被“中心性地”剔除并在次级淋巴组织(产生 T 细胞的大多数胸腺和产生 B 细胞的脾/淋巴结)中被“外周性地”剔除。因此,未暴露于免疫系统的任何蛋白质触发免疫反应。这可包括与免疫系统完全隔绝的正常蛋白质、以极少的量正常生成的蛋白质、仅仅在某些发育阶段正常生成的蛋白质或者结构由于突变而发生改变的蛋白质。

[0202] 在一些实施方式中,相对于在正常组织和/或细胞中的表达,靶标优先在肿瘤组织和/或细胞中表达。

[0203] 在本发明的一些实施方式中,标记物为肿瘤标记物。所述标记物可为多肽,所述多肽在分裂的细胞中的表达水平比在未分裂的细胞中的表达水平高。例如,Her-2/neu(也称为 ErbB-2)为 EGF 受体家族成员并在与乳腺癌相关的肿瘤细胞表面表达。另一实例为称为 F3 的肽,该肽为用于将纳米颗粒引向核仁蛋白的合适的靶向剂(Porkka et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 99:7444; and Christian 等人, 2003, J. Cell Biol., 163:871)。包含纳米颗粒和 A10 适体(与 PSMA 特异性结合)的靶向颗粒表现出能够特异性且有效地将多西他赛递送至前列腺癌肿瘤。

[0204] 特异性靶向这些肿瘤靶标的抗体或其他药物特异性地干扰并调节肿瘤细胞生物行为的信号通路,直接调节或阻断信号通路,从而抑制肿瘤细胞生长或诱导细胞凋亡。迄今为止,已批准了几十种靶向药物用于实体瘤或血液系统恶性肿瘤的临床研究和治疗,并且已有多种用于血液系统恶性肿瘤的靶向药物。

[0205] 在一些实施方式中,肿瘤抗原(或肿瘤靶标)选自:CD2, CD19, CD20, CD22, CD27, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD47, CD52, CD56, CD70, CD79 和 CD137。

[0206] 在一些实施方式中,肿瘤抗原(或肿瘤靶标)选自:4-1BB, 5T4, AGS-5, AGS-16, 血管生成素 2, B7.1, B7.2, B7DC, B7H1, B7H2, B7H3, BT-062, BTLA, CAIX, 癌胚抗原, CTLA4, Cripto, ED-B, ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFL7, EpCAM, EphA2, EphA3, EphB2, FAP, 纤连蛋白, 叶酸受体, 神经节苷酯 GM3, GD2, 糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体(GITR), gp100, gpA33, GPNMB, ICOS, IGF1R, 整联蛋白  $\alpha v$ , 整联蛋白  $\alpha v \beta$ , KIR, LAG-3, Lewis Y 抗原, 间皮素, c-MET, MN 碳酸酐酶 IX, MUC1, MUC16, 粘连蛋白-4, NKGD2, NOTCH, OX40, OX40L, PD-1, PDL1, PSCA, PSMA, RANKL, ROR1, ROR2, SLC44A4, 多配体蛋白聚糖-1, TACI, TAG-72, 髓生蛋白, TIM3, TRAILR1, TRAILR2, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 和它们的变体。肿瘤抗原的变体包括本领域已知的和/或天然生成的各种不同的突变体或多形态。

[0207] 在一些实施方式中,靶向部分包含抗体或其功能片段。

[0208] 本文使用的“免疫球蛋白”或“抗体”是指全长(即,天然生成的或通过正常免疫球蛋白基因片段重组过程形成的)免疫球蛋白分子(例如, IgG 抗体)或免疫球蛋白分子的免疫活性(即,特异性结合)部分,例如抗体片段。在本发明要求保护的范围内,抗体或抗体片段可被偶联或衍生。这些抗体包括 IgG1, IgG2a, IgG3, IgG4(以及 IgG4 亚型)和 IgA 同种型。

[0209] 本文的术语“抗体”以其广义使用并包含各种不同的抗体结构,包括但不限于:单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出

期望的抗原结合活性并且包含免疫球蛋白的 Fc 区域或等同于该 Fc 区域的区域。本文中可互换使用的术语“全长抗体”、“完整抗体”和“整个抗体”是指具有与天然抗体结构基本类似的结构或具有含本文定义的 Fc 区域的重链的抗体。

[0210] 本文的“天然抗体”是指具有不同结构的天然生成的免疫球蛋白分子。例如，天然 IgG 抗体为约 150,000 道尔顿的异源四聚体糖蛋白，其由被二硫键连接的两个相同的轻链和两个相同的重链构成。从 N 端至 C 端，每一重链具有可变区 (VH)，也称为可变重链结构域或重链可变结构域，重链之后为三个恒定结构域 (CH1、CH2 和 CH3)，也称为重链恒定区。类似地，从 N 端至 C 端，每一轻链具有可变区 (VL)，也称为可变轻链结构域或轻链可变结构域，轻链之后为恒定轻链结构域 (CL)，也称为轻链恒定区。基于抗体恒定结构域的氨基酸序列，抗体的轻链可指定为两种类型 (称为  $\kappa$  和  $\lambda$ ) 中的一种。

[0211] 本文中的“抗体片段”是指不同于完整抗体的分子，所述分子包含结合抗原的完整抗体的一部分，所述抗原与完整抗体结合。抗体片段的实例包括但不限于：Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, 双体抗体，线性抗体，单链抗体分子 (例如，scFv)，单结构域抗体和由抗体片段形成的多特异性抗体。关于一些抗体片段的综述请参见 Hudson 等人, Nat Med9, 129-134 (2003)。关于 scFv 片段的综述请参见例如, Pliickthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg 和 Moore 编辑, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); 以及 W093/16185; 和美国专利第 5,571,894 号和第 5,587,458 号。关于含有挽救受体结合表位残基且具有提高的体内半衰期的 Fab 和 F(ab')<sub>2</sub> 片段的讨论, 请参见美国专利第 5,869,046 号。双体抗体为可为二价的或双特异性的具有两个抗原结合位点的抗体片段。请参见例如, EP404,097; W01993/01161; Hudson 等人, Nat Med9, 129-134 (2003); 和 Hollinger 等人, Proc Natl Acad Sci USA90, 6444-6448 (1993)。三体抗体和四体抗体也在 Hudson 等人, Nat Med9, 129-134 (2003) 中描述。单结构域抗体为含有抗体的所有或部分重链可变结构域或者含有抗体的所有或部分轻链可变结构域的抗体片段。在一些实施方式中, 单结构域抗体为人单结构域抗体 (Domantis, Inc., Waltham, MA; 参见例如, 美国专利 No. 6,248,516B1)。抗体片段可通过各种不同的技术制备, 所述技术包括但不限于: 如本文描述的, 完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞 (例如, 大肠杆菌或噬菌体) 生成。

[0212] 本文中的“抗原结合结构域”是指包含与抗原的全部或部分特异性结合且互补的区域的抗体的一部分。抗原结合结构域可通过例如, 一个或一个以上抗体可变结构域 (也称为抗体可变区) 来提供。具体而言, 抗原结合结构域包含抗体轻链可变区 (VL) 和抗体重链可变区 (VH)。

[0213] 本文中的“可变区”或“可变结构域”是指涉及使抗体与抗原结合的抗体重链结构域或轻链结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域 (分别为 VH 和 VL) 通常具有类似的结构, 其中, 每一结构域包含四个保守的框架区 (FR) 和三个高变区 (HVR)。参见例如, Kindt 等人, Kuby Immunology, 第六版, W.H. Freeman and Co., 第 91 页 (2007)。单个 VH 或 VL 结构域可足以带来抗原结合特异性。

[0214] 本文中的“高变区”或“HVR”是指序列高度可变和 / 或形成结构限定的环 (“高变环”) 的抗体可变结构域的各个区域。一般而言, 天然四链抗体包含六个 HVR, 三个在 VH (H1、H2、H3) 中, 三个在 VL (L1、L2、L3) 中。HVR 通常包含来自高变环的氨基酸残基和 / 或来自

互补决定区(CDR)的氨基酸残基,后者具有最高的序列可变性和/或涉及抗原识别。除了VH中的CDR1,CDR通常包含形成高变环的氨基酸残基。高变区(HVR)也被称为“互补决定区(CDR)”并且与形成抗原结合区的可变区部分有关的这些术语在本文中互换使用。该特定区域已由Kabat等人,U.S.Dept.of Health and Human Services,Sequences of Proteins of Immunological Interest(1983)和Chothia等人,J Mol Biol196:901-917(1987)描述,其中,当彼此比较时,定义包括氨基酸残基的重叠或子集。然而,关于抗体的CDR或其变体的任何定义的应用意在本文定义的和本文使用的术语的范围内。包含特定CDR的确切的残基数目随CDR的序列和尺寸的不同而不同。在给出抗体的可变区氨基酸序列的条件下,本领域技术人员可常规确定哪些残基包含特定CDR。

[0215] 本发明的抗体可为嵌合抗体、人源化抗体、人抗体或抗体融合蛋白。

[0216] 本文中的“嵌合抗体”是指包含抗体重链和轻链这两者的可变结构域的重组蛋白质,所述可变结构域包括来源于一个物种的抗体(优选地为啮齿动物抗体,更优选地为鼠科动物抗体)的互补决定区(CDR),而抗体分子的恒定结构域来源于人抗体的恒定结构域。对于兽医应用而言,嵌合抗体的恒定结构域可来源于其它物种的恒定结构域,所述其它物种例如,类人类灵长类动物、猫或狗。

[0217] 本文中的“人源化抗体”是指如下重组蛋白:在该重组蛋白中,来自于一个物种的抗体(例如,啮齿动物抗体)的CDR从啮齿动物抗体的可变重链和可变轻链转移至人重链可变结构域和人轻链可变结构域中。抗体分子的恒定结构域来源于人抗体的恒定结构域。在一些实施方式中,人源化抗体的框架区的特定残基,尤其是接触或靠近CDR序列的那些特定残基,可被修饰,例如可被来自于原始啮齿动物、类人类灵长类动物的相应残基或其他抗体代替。

[0218] 本文中的“人抗体”是指例如从转基因小鼠中获得的抗体,所述转基因小鼠已被“改造”为响应抗原刺激生成特定的人抗体。在该技术中,人重链基因座和人轻链基因座的元件被引入来源于胚胎干细胞系的小鼠品系中,所述胚胎干细胞系包含内源性重链基因座和轻链基因座的靶向断裂。转基因小鼠可合成对人抗原具有特异性的人抗体,并且小鼠可用于生成分泌人抗体的杂交瘤。从转基因小鼠中获得人抗体的方法由Green等人,Nature Genet. 7:13(1994),Lonberg等人,Nature368:856(1994),Taylor等人,Int. Immun. 6:579(1994)描述。完全人抗体还可通过基因转染法或染色体转染法以及噬菌体展示技术来构建,所有这些方法为本领域已知的。请参见例如,McCafferty等人,Nature348:552-553(1990),其中描述了通过来自于未免疫的供体的免疫球蛋白可变结构域基因谱系体外生成抗体及其片段。在该技术中,抗体可变结构域基因框内克隆至丝状噬菌体的主要或次要外壳蛋白基因中,并且在噬菌体颗粒的表面上展示为功能抗体片段。因为丝状颗粒包含噬菌体基因组的单链DNA拷贝,基于抗体的功能性质的选择还导致对编码表现出那些性质的抗体的基因的选择。通过该方式,噬菌体模仿B细胞的一些性质。噬菌体展示可以多种形式进行,关于噬菌体展示的综述请参见例如,Johnson和Chiswell,Current Opinion in Structural Biology3:5564-571(1993)。人抗体还可通过体外活化B细胞产生。请参见美国专利第5,567,610号和第5,229,275号,该美国专利的全部内容通过引用并入本文。

[0219] 本文中的“抗体融合蛋白”是指通过重组产生的抗原结合分子,其中,连接相同或

不同的天然抗体、具有相同或不同特异性的单链抗体或抗体片段中的两个或两个以上。融合蛋白包含至少一个特异性结合位点。融合蛋白的化合价表示融合蛋白具有的与抗原或表位结合的结合臂或结合位点的总数,即,单价的、二价的、三价的或多价的。多价的抗体融合蛋白是指该抗体融合蛋白可利用多种与抗原结合的相互作用,因此增加与抗原或不同抗原结合的亲合力。特异性表示抗体融合蛋白能够与多少种不同类型的抗原或表位结合,即,单特异性、双特异性、三特异性、多特异性。使用这些定义,天然抗体(例如,IgG)为二价的,因为其具有两个结合臂,但是其为单特异性的,因为其结合一种类型的抗原或表位。单特异性多价融合蛋白具有一个以上用于相同抗原或表位的结合位点。例如,单特异性双抗体为具有两个与相同的抗原反应的结合位点的融合蛋白。融合蛋白可包含不同抗体成分的多价或多特异性组合或同一抗体成分的多个拷贝。融合蛋白还可包含治疗剂。

[0220] 在一些实施方式中,靶向部分为抗体或抗体片段,该靶向部分基于其对抗原的特异性进行选择,所述抗原在目标靶细胞或靶点上表达。已识别出多种不同的肿瘤特异性抗原或其他疾病特异性抗原,并且那些抗原的抗体已用于或计划用于治疗这些肿瘤或其他疾病。本领域已知的抗体可用于本发明的化合物,尤其用于治疗与靶抗原有关的疾病。可被本发明的抗体-连接体-药物偶联物靶定的目标抗原(及其相关疾病)的实例包括:CD2, CD19, CD20, CD22, CD27, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD47, CD52, CD56, CD70, CD79, CD137, 4-1BB, 5T4, AGS-5, AGS-16, 血管生成素 2, B7. 1, B7. 2, B7DC, B7H1, B7H2, B7H3, BT-062, BTLA, CAIX, 癌胚抗原, CTLA4, Cripto, ED-B, ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFL7, EpCAM, EphA 2, EphA3, EphB2, FAP, 纤连蛋白, 叶酸盐受体, 神经节苷酯 GM3, GD2, 糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体 (GITR), gp100, gpA33, GPNMB, ICOS, IGF1R, 整联蛋白  $\alpha v$ , 整联蛋白  $\alpha v \beta$ , KIR, LAG-3, Lewis Y, 间皮素, c-MET, MN 碳酸酐酶 IX, MUC1, MUC16, 粘连蛋白 -4, NK GD2, NOTCH, OX40, OX40L, PD-1, PDL1, PSCA, PSMA, RANKL, ROR1, ROR2, SLC44A4, 多配体蛋白聚糖 -1, TACI, TAG-72, 腱生蛋白, TIM3, TRAILR1, TRAILR2, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3。

[0221] 在一些实施方式中,抗体选自:美罗华(利妥昔单抗)、赫赛汀(曲妥珠单抗)、爱必妥(西妥昔单抗)、维克替比(帕尼单抗)、Arzerra (Ofatumumab)、Blenlysta(贝利木单抗)、Yervoy(伊匹单抗)、Perjeta(帕妥珠单抗)、Tremelimumab、Nivolumab、Dacetuzumab、Urelumab、MPDL3280A、Lambrolizumab 和 Blinatumomab。

[0222] 美罗华(利妥昔单抗)为用于治疗 B 细胞非霍奇金淋巴瘤的嵌合抗体。其作用于表达 CD20 抗原的 B 细胞表面,CD20 抗原在 90% 的 B 细胞非霍奇金淋巴瘤上表达。美罗华与 CD20 结合,从而诱导 B 细胞通过 CDC 和 ADCC 溶解并且敏化对一些细胞毒性化疗具有耐药性的人淋巴细胞。

[0223] 赫赛汀(曲妥珠单抗)为作用于 Her2 人表皮生长因子受体细胞外结构域的人源化单克隆抗体,Her2 在 25% 至 30% 的乳腺癌中表达。曲妥珠单抗被认为具有通过以下三方面的抗肿瘤作用:(1)下调 Her2 受体,抑制 Her2 细胞内信号转导通路以及诱导细胞凋亡;(2)使抗体依赖性 ADCC 和 CDC 与杀伤肿瘤细胞相关联的免疫机制;(3)提高化疗效果。

[0224] 爱必妥(西妥昔单抗)为作用于表皮生长因子受体(EGFR)的嵌合抗体。爱必妥结合 EGFR,从而抑制 EGFR 的信号转导通路,影响细胞增殖、浸润和转移,以及血管生成。对 EGFR 信号转导通路的抑制可提高化疗药物的疗效和放疗的疗效。

[0225] 阿瓦斯汀(贝伐单抗)为靶定血管内皮生长因子(VEGF)的人源化单克隆抗体。阿

瓦斯汀与 VEGFR 的结合抑制 VEGF 和信号转导,从而抑制了肿瘤血管生成。

[0226] 目前正在研发的其他抗体也可用作靶向部分。例如,正在研发用于治疗肿瘤的针对下列靶标的治疗性单克隆抗体:CD2, CD19, CD20, CD22, CD27, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD47, CD52, CD56, CD70, CD79, CD137。并且也正在研发用于治疗肿瘤的针对下列靶标的治疗性单克隆抗体:4-1BB, 5T4, AGS-5, AGS-16, 血管生成素 2, B7. 1, B7. 2, B7DC, B7H1, B7H2, B7H3, BT-062, BTLA, CAIX, 癌胚抗原, CTLA4, Cripto, ED-B, ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFL7, EpCAM, EphA2, EphA3, EphB2, FAP, 纤连蛋白, 叶酸盐受体, 神经节苷酯 GM3, GD2, 糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体 (GITR), gp100, gpA33, GPNMB, ICOS, IGF1R, 整联蛋白  $\alpha v$ , 整联蛋白  $\alpha v \beta$ , KIR, LAG-3, Lewis, 间皮素, c-MET, MN 碳酸酐酶 IX, MUC1, MUC16, 粘连蛋白-4, NKGD2, NOTCH, OX40, OX40L, PD-1, PDL1, PSCA, PSMA, RANKL, ROR1, ROR2, SLC44A4, 多配体蛋白聚糖-1, TACI, TAG-72, 腱生蛋白, TIM3, TRAILR1, TRAILR2, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, 以及它们的变体。(Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody Therapy of Cancer. Nat Rev Cancer. 2012Mar22;12(4):278-87)。

[0227] 在一些实施方式中,靶向部分包含 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, 单结构域抗体, T 和 Abs 二聚物, Fv, scFv, dsFv, ds-scFv, Fd, 线性抗体, 微小抗体、双体抗体、双特异性抗体片段、bibody、tribody、sc- 双体抗体、 $\kappa(\lambda)$ body, BiTE, DVD-Ig, SIP, SMIP, DART, 或者含有一个或一个以上 CDR 的抗体类似物。

[0228] 下表显示正在研究的各种不同的抗体结构和靶标:

[0229] 表 1

[0230]

抗体结构	示例性靶标
scFv	CC49, ERBB2, Ley
双体抗体	Ley 和 TAG-72
亲合体 (Affibody)	ERBB2
微小抗体	CEA, ERBB2
蛋白质 - Fc	血管生成素 1, 血管生成素 2, VEGFR1, VEGFR2
完整 IgG	CD20, CD33, EGFR, ERBB2, VEGF
IgE 和 IgM	GM2
药物偶联物	CD30, CD33 和 ERBB2
负载的纳米颗粒	A33, EGFR 和转铁蛋白
双特异性	CD19 - CD3, EPCAM - CD3, gp100 - CD3

[0231] 在一些实施方式中,靶向部分包含 VEGFR 的 ATWLPPR 多肽、血小板反应蛋白-1 模拟物、CDCRGDCFCG (环状) 多肽、SCH221153 片段、NCNGRC (环状) 多肽、CTTHWGFTLC 多肽、CGNKRTRGC 多肽 (LyP-1)、奥曲肽、伐普肽、兰乐肽、C-3940 多肽、达必佳、利普安、诺雷德或西曲瑞克。

[0232] 在一些实施方式中,靶向部分包含叶酸或其衍生物。

[0233] 近年来,关于叶酸的研究取得了很大进步。叶酸为一种细胞分裂必需的小分子维生素。肿瘤细胞分裂异常,叶酸盐受体 (FR) 在肿瘤细胞表面高表达以捕获足以支持细胞分裂的叶酸。

[0234] 数据显示 FR 在肿瘤细胞中的表达比在正常细胞中的表达高 20 倍至 200 倍。FR 在各种不同的恶性肿瘤中的表达率为:在卵巢癌中为 82%,在非小细胞肺癌中为 66%,在肾癌中为 64%,在结肠癌中为 34%,在乳腺癌中为 29%(Xia W, Low PS. Late-targeted therapies

for cancer. *J Med Chem.* 2010;14;53 (19):6811-24)。FA 的表达率和上皮肿瘤浸润和转移的恶性程度正相关。FA 通过 FR 介导的内吞作用进入细胞,并且 FA 通过其羧基基团与进入细胞的药物形成 FA 复合物。在酸性(pH 值为 5)条件下,FR 从 FA 中分离出来,并且 FA 将药物释放进入细胞质。

[0235] 临床上,此系统可用于递送选择性攻击肿瘤细胞的药物。叶酸具有小分子量,不具有免疫原性且具有高稳定性,并且叶酸的合成并不昂贵。更重要的是,药物和载体之间的化学偶联简单,因此,使用 FA 作为靶向分子构建药物递送系统用于癌症治疗已成为研究热点。目前,临床实验中的 EC145(FA 化疗药物偶联化合物)可有效攻击癌细胞(Pribble P 和 Edelman MJ. EC145: a novel targeted agent for adenocarcinoma of the lung. *Expert Opin. Investig. Drugs* (2012) 21:755-761)。

[0236] 在一些实施方式中,靶向部分包含细胞外结构域(ECD)或 PD-1, CTLA4, CD47, BTLA, KIR, TIM3, 4-1BB 和 LAG3 的可溶形式,全长的部分表面配体双调蛋白,  $\beta$  动物纤维素, EGF, 肝配蛋白, Epigen, 上皮调节蛋白, IGF, 神经调节蛋白, TGF, TRAIL 或 VEGF。

[0237] 在一些实施方式中,靶向部分包含颗粒(靶向颗粒),优选地为纳米颗粒,任性地,为连接至靶向分子的靶向纳米颗粒,所述靶向分子可特异性结合或优先结合靶标。在一些实施方式中,靶向颗粒其自身引导本发明的化合物(例如,通过在肿瘤细胞或肿瘤组织中的富集),而无需与其连接额外的靶向分子。

[0238] 本文中的“纳米颗粒”是指直径小于 1000nm 的任何颗粒。在一些实施方式中,治疗剂和 / 或靶向分子可与聚合物基体结合。在一些实施方式中,靶向分子可与聚合物基体的表面共价结合。在一些实施方式中,共价结合由连接体介导。在一些实施方式中,治疗剂可与聚合物基体表面结合,封装在聚合物基体内,被聚合物基体包围,和 / 或分散于整个聚合物基体。美国专利第 8, 246, 968 号,该美国专利的全部内容在此通过引用并入本文。

[0239] 总体而言,本发明的纳米颗粒包含任何类型的颗粒。根据本发明可使用任何颗粒。在一些实施方式中,颗粒为可生物降解的且生物相容的。总体而言,生物相容性物质对细胞无毒。在一些实施方式中,如果将某种物质加至细胞中产生小于细胞死亡的某一阈值的结果,那么认为该物质为生物相容的。在一些实施方式中,如果将某种物质加至细胞中不诱导副作用,那么认为该物质为生物相容的。总体而言,可生物降解的物质为经过治疗相关时间段(例如,数周、数月或者数年)在生理学条件下发生分解的物质。在一些实施方式中,可生物降解的物质为可通过细胞机制进行分解的物质。在一些实施方式中,可生物降解的物质为可通过化学过程分解的物质。在一些实施方式中,颗粒为生物相容且可生物降解的物质。在一些实施方式中,颗粒为生物相容物质,但不为可生物降解的物质。在一些实施方式中,颗粒为可生物降解的物质,但不为生物相容物质。

[0240] 在一些实施方式中,颗粒的粒度大于肾排泄极限(例如,直径大于 6nm 的颗粒)。在一些实施方式中,颗粒尺寸为足以避免通过肝脏从血流中清除的大小(例如,直径小于 1000nm 的颗粒)。总体而言,颗粒的生理化学特性应当允许靶向颗粒通过降低肾排泄和肝脏清除在血浆中长期循环。

[0241] 通常,理想的是使用尺寸、形状和 / 或组成相对均匀的颗粒群,这样,每一颗粒具有类似的性质。例如,至少 80% 的颗粒,至少 90% 的颗粒或至少 95% 的颗粒的直径或最大尺寸为平均直径或最大尺寸加减 5%, 10% 或 20%。在一些实施方式中,颗粒群的尺寸、形状和 /

或组成可为不均一的。

[0242] 根据本发明可使用多种不同的颗粒。在一些实施方式中,颗粒为球形或类球形。在一些实施方式中,颗粒为球形或类球形。在一些实施方式中,颗粒为扁平的或板状的。在一些实施方式中,颗粒为立方体或类立方体。在一些实施方式中,颗粒为卵形或椭圆形。在一些实施方式中,颗粒为圆柱形、圆锥形或金字塔形。

[0243] 在一些实施方式中,颗粒为微颗粒(例如,微球)。总体而言,“微颗粒”是指直径小于 1000  $\mu\text{m}$  的任何颗粒。在一些实施方式中,颗粒为微微型颗粒(picoparticle)(例如,微微球体)。总体而言,“微微型颗粒”是指直径小于 1nm 的任何颗粒。在一些实施方式中,颗粒为脂质体。在一些实施方式中,颗粒为胶束。

[0244] 颗粒可为实心的或中空的并且可包含一个或一个以上层(例如,纳米壳,纳米环)。在一些实施方式中,每层相对于其他各层具有独特的组成和独特的性质。例如,颗粒可具有核/壳结构,其中,核为一层,壳为另一层。颗粒可包含多个不同的层。在一些实施方式中,一层可为充分交联的,另一层不 充分交联,等等。在一些实施方式中,不同层中的一层,几层或所有层可包含一种或一种以上待递送的治疗剂或诊断剂。在一些实施方式中,一层包含待递送的药剂,另一层不含待递送的药剂,等等。在一些实施方式中,每个单独的层包含不同的待递送的药剂或药剂的集合。

[0245] 在一些实施方式中,颗粒为多孔的,其是指颗粒包含孔或通道,所述孔或通道通常比颗粒的尺寸小。例如,颗粒可为多孔二氧化硅颗粒,例如,介孔二氧化硅纳米颗粒,或者颗粒可具有介孔二氧化硅涂层(Lin 等人, 2005, J. Am. Chem. Soc., 17:4570)。颗粒可具有直径为约 1nm 至约 50nm 的孔,例如,直径为约 1nm 至 20nm 的孔。颗粒体积的约 10% 至 95% 可由孔或通道内的空隙构成。

[0246] 颗粒可具有涂层。例如,如果颗粒包含对细胞具有毒性的物质,那么生物相容性涂层的使用可为有优势的。合适的涂层物质包括但不限于:诸如牛血清白蛋白(BSA)之类的天然蛋白质、诸如聚乙二醇(PEG)或 PEG 衍生物之类的生物相容性亲水聚合物、磷脂-(PEG)、二氧化硅、脂质、聚合物、诸如葡萄糖聚糖之类的碳水化合物、可与本发明的纳米颗粒结合的其他纳米颗粒,等等。涂层可通过诸如浸蘸、使用层-层技术、自组装、共轭作用等的多种方式涂敷或组装。自组装是指自发地组装成高级结构的过程,该过程依赖于高级结构的成分(例如,分子)彼此之间的自然吸引作用。该过程通常基于尺寸、形状、组成或化学性质通过分子的随机运动和键的形成而发生。

[0247] 聚合物的实例包括聚烯烃(例如,聚乙烯),聚碳酸酯(例如,聚(1,3-二氧杂环己烷-2 酮)),聚酞(例如,聚(癸二酸酞)),聚羧基酸(例如,聚( $\beta$ -羧基链烷酸酯)),聚延胡索酸酯,聚己酸内酯,聚酰胺(例如,聚己内酰胺),聚缩醛树脂,聚醚,聚酯(例如,聚乳酸,聚乙醇酸交酯),聚(原酸酯),聚乙烯醇,聚氨酯,聚磷腈,聚丙烯酸酯,聚甲基丙烯酸酯,聚氰基丙烯酸酯,聚脲,聚苯乙烯和聚胺。在一些实施方式中,根据本发明的聚合物包括已由美国食品药品监督管理局(FDA)根据 21C.F.R. § 177.2600 批准用于人体的聚合物,包括但不限于:聚酯(例如,聚乳酸,聚乙醇酸,聚(乳酸-co-乙醇酸)),聚己酸内酯,聚戊内酯,聚(1,3-二氧杂环己烷-2 酮)),聚酞(例如,聚(癸二酸酞)),聚醚(例如,聚乙二醇),聚氨酯,聚甲基丙烯酸酯,聚丙烯酸酯和聚氰基丙烯酸酯。

[0248] 在一些实施方式中,颗粒可为非聚合颗粒(例如,金属颗粒,量子点,陶瓷颗粒,含

有无机材料的聚合物,骨衍生的材料,骨代用品,病毒颗粒,等等)。在一些实施方式中,待递送的治疗剂或诊断剂可与这样的非聚合颗粒的表面结合。在一些实施方式中,非聚合颗粒为非聚合成分的聚集体,例如,金属原子(例如,金原子)的聚集体。在一些实施方式中,待递送的治疗剂或诊断剂可与非聚合成分的聚集体的表面结合和/或封装在非聚合成分的聚集体内、被非聚合成分的聚集体围绕和/或分散于整个非聚合成分的聚集体。

[0249] 颗粒(例如,纳米颗粒,微颗粒)可使用本领域已知的任何方法制备。例如,颗粒剂型可通过下列方法以及本领域普通技术人员熟知的其他方法形成:例如纳米沉淀,流动聚焦流体通道,喷雾干燥,单乳液和双乳液溶剂蒸发,溶剂萃取,相分离,研磨,微乳液操作,微制造,纳米制造,牺牲层,简单和复合凝聚。可选地或额外地,已经描述了用于单分散半导体纳米颗粒,导电性纳米颗粒,磁性纳米颗粒,有机纳米颗粒和其他纳米颗粒的水性和有机溶剂合成方法(Pellegrino 等人,2005,Small,1:48;Murray 等人,2000,Ann. Rev. Mat. Sci.,30:545;以及 Trindade 等人,2001,Chem. Mat.,13:3843)。

[0250] 制备用于递送封装的药剂的微颗粒的方法在文献中描述(参见,例如,Doubrow,编辑,“Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy,”CRC Press,Boca Raton,1992;Mathiowitz 等人,1987,J. Control. Release,5:13;Mathiowitz 等人,1987,Reactive Polymers,8:275;以及 Mathiowitz 等人,1988,J. Appl. Polymer Sci.,35:755)。

[0251] 在一些实施方式中,靶向部分包含核酸靶向部分。

[0252] 总体而言,核酸靶向部分为结合与器官、组织、细胞、细胞外基质成分和/或细胞内腔室有关的成分(靶标)的任何多核苷酸。

[0253] 在一些实施方式中,核酸靶向部分为适体。

[0254] 适体通常为与特定目标结构结合的多核苷酸,所述特定目标结构与特定器官、组织、细胞、细胞外基质成分和/或细胞内腔室有关。总体而言,适体的靶向功能基于适体的三维结构。在一些实施方式中,适体与靶标的结合通常由适体和靶标这两者的二维和/或三维结构之间的相互作用介导。在一些实施方式中,适体与靶标的结合不仅仅基于适体的基本序列,还取决于适体和/或靶标的三维结构。在一些实施方式中,适体通过 Watson-Crick 互补碱基配对与其靶标结合,所述 Watson-Crick 碱基配对被破坏碱基配对的结构(例如,发夹环)阻碍。

[0255] 在一些实施方式中,核酸靶向部分为 spiegelmers (PCT 公布 W098/08856,W002/100442 和 W006/117217)。总体而言,spiegelmers 为合成的镜像核酸,其可特异性结合靶标(即,镜像适体)。spiegelmers 通过如下结构特征表征:所述结构特征使得它们不易受外切-核酸酶和内切-核酸酶的影响。

[0256] 本领域普通技术人员会意识到的是,根据本发明可使用任何能够特异性结合靶标的核酸靶向部分(例如,适体或 spiegelmers)。在一些实施方式中,根据本发明待使用的核酸靶向部分可靶定与疾病、失调和/或病症有关的标记物。在一些实施方式中,根据本发明待使用的核酸靶向部分可靶定癌相关靶标。在一些实施方式中,根据本发明待使用的核酸靶向部分可靶定肿瘤标记物。使用根据本发明的核酸靶向部分可靶定任何类型的癌症标记物和/或任何肿瘤标记物。举例而言,核酸靶向部分可靶定与前列腺癌、肺癌、乳腺癌、直肠结肠癌、膀胱癌、胰腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、骨癌、食管癌、肝癌、胃癌、脑肿瘤、皮肤黑色



素瘤和 / 或白血病有关的标记物。

[0257] 本发明的核酸(包括核酸靶向部分和 / 或待递送的功能性 RNA, 例如, RNAi- 诱导实体, 核酶, tRNA, 等等, 下面进一步详细描述)可根据任何可获得的技术制备, 包括但不限于: 化学合成、酶合成、较长的前体的酶裂解或化学裂解, 等等。合成 RNA 的方法为本领域已知的(参见例如, Gait, M. J. (编辑) *Oligonucleotide synthesis: a practical approach*, Oxford [Oxfordshire], Washington, D. C.: IRL Press, 1984; 和 Herdewijn, P. (编辑) *Oligonucleotide synthesis: methods and applications*, *Methods in molecular biology*, v. 288 (Clifton, N. J.) Totowa, N. J.: Humana Press, 2005)。

[0258] 形成核酸靶向部分的核酸可包含天然生成的核苷, 修饰的核苷, 具有在一个或一个以上核苷之间插入的烃连接体(例如, 烯烃)或聚醚连接体(例如, PEG 连接体)的天然生成的核苷, 具有在一个或一个以上核苷之间插入的烃连接体或 PEG 连接体的修饰的核苷, 或它们的组合。在一些实施方式中, 核酸靶向部分的核苷酸或修饰的核苷酸可被烃连接体或聚醚连接体取代, 只要核酸靶向部分的结合亲合力和选择性基本不会由于取代(例如, 核酸靶向部分对靶标的解离常数不应大于约  $1 \times 10^{-3} \text{M}$ ) 而降低。

[0259] 本领域普通技术人员已知, 根据本发明的核酸可包含天然生成的核酸中发现的全部类型的核苷酸或者可包括一种或一种以上核苷酸类似物或具有与天然生成的核酸的结构不同的结构。美国专利第 6, 403, 779 号、第 6, 399, 754 号、第 6, 225, 460 号、第 6, 127, 533 号、第 6, 031, 086 号、第 6, 005, 087 号、第 5, 977, 089 号, 这些美国专利中的参考文献公开了多种不同的具体核苷类似物和可使用的修饰。参见 Crooke, S. (编辑) *Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications* (第一版), Marcel Dekker; ISBN: 0824705661; 第一版 (2001) 以及其中的参考文献。例如, 2'-修饰包括卤代、烷氧基和烯丙氧基。在一些实施方式中, 2'-OH 基团被选自下列的基团取代: H, OR, R, 卤素, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NR<sub>2</sub> 或 CN, 其中, R 为 C1-C6 烷基, 烯基, 或炔基, 并且卤素为 F, Cl, Br 或 I。修饰的连接键的实例包括硫代磷酸酯和 5'-N-亚磷酰胺连接键。

[0260] 根据本发明可使用包含多种不同的核苷酸类似物、修饰的骨架或非天然生成的核苷间连接键的核酸。本发明的核酸可包括天然核苷(即, 腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷、脱氧胞苷)或修饰的核苷。修饰的核苷酸的实例包括碱基修饰的核苷(例如, 阿糖胞苷(aracytidine)、肌核苷、异鸟苷、水粉葶素(nebularine)、假尿苷、2, 6-二氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、2-硫代胸苷、3-脱氮-5-氮杂胞苷、2'-脱氧尿苷、3-硝基吡咯、4-甲基吡咯、4-硫代尿苷、4-硫代胸苷、2-氨基腺苷、2-硫代胸苷、2-硫代尿苷、5-溴代胞苷、5-碘代尿苷、肌核苷、6-氮尿苷、6-氯代嘌呤、7-脱氮腺苷、7-脱氮鸟苷、8-氮杂腺苷、8-叠氮腺苷、苯并咪唑、M1-甲基腺苷、吡咯并嘧啶、2-氨基-6-氯代嘌呤、3-甲基腺苷、5-丙炔基胞苷、5-丙炔基尿苷、5-溴代尿苷、5-氟代尿苷、5-甲基胞苷、7-脱氮腺苷、7-脱氮鸟苷、8-氧腺苷、8-氧鸟苷、O(6)-甲基鸟嘌呤和 2-硫代胞苷), 化学或生物修饰的碱基(例如, 甲基化的碱基), 修饰的糖类(例如, 2'-氟代核糖、2'-氨基核糖、2'-叠氮核糖、2'-O-甲基核糖、L-对映异构体核苷阿糖和己糖), 修饰的磷酸酯基团(例如, 硫代磷酸酯和 5'-N-亚磷酰胺连接键)以及它们的组合。用于核酸的化学合成的天然核苷酸单体和修饰的核苷酸单体易于获得。在一些情况下, 含有这些修饰的核酸相对于仅由天然生成的核苷酸构成的核酸表现出改善的性质。在一些实施方式中, 本文所述的核酸修饰被用于降低和

/ 或防止核酸酶(例如,核酸外切酶,核酸内切酶,等等)消化。例如,核酸的结构可通过在一条链或两条链的 3' 端包括核苷酸类似物以降低消化来稳定。

[0261] 修饰的核酸不需要沿着分子的全长进行一致性修饰。不同的核苷酸修饰和 / 或骨架结构可存在于核酸的各个不同位置。本领域普通技术人员可理解的是,核苷酸类似物或其他修饰可位于使核酸的功能基本不受影响的核酸的任何位置。举例而言,修饰可位于使核酸靶向部分特异性结合靶标的能力基本不受影响的核酸靶向部分的任何位置。修饰的区域可位于一条链或两条链的 5' 端和 / 或 3' 端。例如,已使用如下修饰的核酸靶向部分:位于该修饰的核酸靶向部分中的两条链中的任一条链的 5' 端和 / 或 3' 端处的大约 1 至 5 个残基为核苷酸类似物和 / 或具有骨架修饰。所述修饰可为 5' 或 3' 末端修饰。一条或两条核酸链可包含至少 50% 未修饰的核苷酸,至少 80% 未修饰的核苷酸,至少 90% 未修饰的核苷酸或 100% 未修饰的核苷酸。

[0262] 例如,根据本发明的核酸可包含对糖类、核苷或核苷间连接键的修饰,例如,美国专利申请公开第 2003/0175950 号,第 2004/0192626 号,第 2004/0092470 号,第 2005/0020525 号以及第 2005/0032733 号中描述的那些。本发明包括具有本文所述的修饰中的任何一种或一种以上的任何核酸的应用。例如,已报道了多种末端偶联物(例如,脂质(例如,胆固醇)、石胆酸、月桂酸(aluric acid)、长支链烷基)改善细胞摄取。例如,可使用本领域已知的任何合适的测试方法检测类似物和修饰,从而选择使治疗剂或诊断剂的递送得以改善、使核酸的靶向部分与靶标的特异性结合得以改善等等的那些类似物和修饰。在一些实施方式中,根据本发明的核酸可包括一个或一个以上非天然核苷连接键。在一些实施方式中,一个或一个以上位于核酸靶向部分的 3' 端、5' 端或 3' 端和 5' 端这两端的内在核苷酸被倒转生成诸如 3' -3' 连接键或 5' -5' 连接键之类的连接键。

[0263] 在一些实施方式中,根据本发明的核酸不是合成的,其为已从其天然环境中分离出来的天然生成的实体。

[0264] 可使用任何方法来设计新的核酸靶向部分(请参见例如下列美国专利:6,716,583;6,465,189;6,482,594;6,458,543;6,458,539;6,376,190;6,344,318;6,242,246;6,184,364;6,001,577;5,958,691;5,874,218;5,853,984;5,843,732;5,843,653;5,817,785;5,789,163;5,763,177;5,696,249;5,660,985;5,595,877;5,567,588 和 5,270,163 以及下列美国专利申请公开:2005/0069910, 2004/0072234, 2004/0043923, 2003/0087301, 2003/0054360 和 2002/0064780)。本发明提供一种用于设计新的核酸靶向部分的方法。本发明还提供一种用于从候选核酸靶向部分的混合物中分离或识别新的核酸靶向部分的方法。

[0265] 可设计和 / 或识别与蛋白质、碳水化合物、脂质和 / 或核酸结合的核酸靶向部分。在一些实施方式中,核酸靶向部分可被设计和 / 或识别为在与蛋白质和 / 或其特征部分结合的本发明的复合物中使用,所述蛋白质和 / 或其特征部分例如,肿瘤标记物、整合素、细胞表面受体、跨膜蛋白、细胞间蛋白质、离子通道、膜转运蛋白、酶、抗体、嵌合蛋白,等等。在一些实施方式中,核酸靶向部分可被设计和 / 或识别为在与碳水化合物和 / 或其特征部分结合的本发明的复合物中使用,所述碳水化合物和 / 或其特征部分例如,糖蛋白、糖类(例如,单糖、二糖和多糖)、多糖包被(即,大多数真核细胞的外表面上的碳水化合物富集的外周区域),等等。在一些实施方式中,核酸靶向部分可被设计和 / 或识别为在与脂质和 / 或其特征部分结合的本发明的复合物中使用,所述脂质和 / 或其特征部分例如,油、饱和脂肪

酸、不饱和脂肪酸、甘油酯、激素、类固醇(例如,胆固醇、胆汁酸)、维生素(例如,维生素 E)、磷脂、神经鞘脂、脂蛋白,等等。在一些实施方式中,核酸靶向部分可被设计和 / 或识别为在与核酸和 / 或其特征部分结合的本发明的复合物中使用,所述核酸和 / 或其特征部分例如, DNA 核酸、RNA 核酸、修饰的 DNA 核酸、修饰的 RNA 核酸和包括 DNA、RNA、修饰的 DNA 和修饰的 RNA 的任何组合的核酸,等等。

[0266] 可使用任何可获得的方法设计和 / 识别核酸靶向部分(例如,适体或 spiegelmer)。在一些实施方式中,核酸靶向部分通过从候选的核酸混合物中识别核酸靶向部分来设计和 / 或识别。指数富集配体系统进化(SELEX)或其改良方法为从候选的核酸混合物中识别与靶标结合的核酸靶向部分的常用方法。

[0267] 选择性结合任何靶标的核酸靶向部分可通过 SELEX 方法或其改良方法分离,条件是所述靶标可用作 SELEX 方法中的靶标。

#### [0268] 连接体

[0269] 总体而言,本发明的化合物包含连接体,所述连接体将靶向部分和活化部分连接。然而,一些化合物不含连接体,活化部分和靶向部分直接连接。

[0270] 本文中的“连接体”是指使第一分子与第二分子通过化学键连接的部分。在本发明的连接体中,可割断连接,从而释放第一和 / 或第二分子的生物活性形式。连接体的优选实例为包含在中性 pH 条件下稳定但在较低 pH 条件下易于发生裂解的化学键的部分。具体而言,优选的连接体的实例为包含在 pH 为 7 至 8 的条件下稳定但在 pH 为 4 至 6 的条件下易于裂解的化学键的部分。连接体的另一实例为包含在存在酶的条件下易于裂解的化学键的部分。这些对酶敏感的连接体的优选实例为肽,所述肽包含内涵体肽酶的识别序列。连接体的另一实例为对氧化还原电位敏感的连接体,该连接体在低还原电位(例如,低浓度的硫醇或谷胱甘肽)条件下稳定但在高还原电位(例如,高浓度的硫醇或谷胱甘肽)条件下裂解。这些对氧化还原电位敏感的连接体的优选实例包括二硫化物和次磺酰胺。具体而言,优选的实例包括取代的芳基-烷基二硫化物,其中,芳基被有空间需求的且吸电子或给电子的取代基取代,从而控制趋于与硫醇反应的二硫键的敏感性。连接体的另一实例为包含在暴露于辐射之后易于裂解的化学键的部分。这些对辐射敏感的连接体的优选实例为 2-硝基苄基醚,其在暴露于光之后裂解。具体而言,这些连接体的优选实例为如下部分:在连接键被割断之前该部分掩盖两个连接的分子中的一个的生物活性。

[0271] 在一些实施方式中,本发明的化合物包含选自如下基团的连接体:胍基团、多肽、二硫化物基团和硫醚基团。

[0272] 本文中的“胍基团”或“胍连接体”或“自环化胍连接体”是指在改变条件(例如, pH 改变)之后可发生环化反应并形成一个或一个以上环的连接体部分。当连接时,胍基团被转化为脲。这种连接可通过例如在 L4 部分与酮基团反应而发生。因此,术语胍连接体也可用于描述本发明的连接体,因为这种向脲的转化发生在连接之后。

[0273] 本文中的“五元胍连接体”是指含有胍的分子部分,该部分在条件发生改变(例如, pH 发生改变)之后会进行环化反应并形成一个或一个以上五元环。可选地,该五元连接体可被类似地描述为五元胍连接体。

[0274] 本文中的“六元胍连接体”是指含有胍的分子部分,该部分在条件发生改变(例如, pH 发生改变)之后会进行环化反应并形成一个或一个以上六元环。该六元连接体可被类似

地描述为六元胍连接体。

[0275] 本文中的“环化反应”是指肽、胍或二硫化物连接体的环化,该“环化反应”表示连接体环化形成环并且启动药物配体复合物的分离。环化速率可异地测量并且当至少 90%、95% 或 100% 的产物形成时完成环化。

[0276] 在一些实施方式中,本发明的化合物包含位于靶向部分和活化部分之间的连接体区域,并且所述连接体可被存在于细胞内环境(例如,溶酶体或内涵体或小凹内)中的裂解剂裂解。连接体可为例如,肽基连接体,该肽基连接体由细胞内肽酶或蛋白酶(包括但不限于:溶酶体蛋白酶或内涵体蛋白酶)裂解。通常,肽基连接体的长度为至少两个氨基酸的长度或至少三个氨基酸的长度。裂解剂可包括组织蛋白酶 B、组织蛋白酶 D 和纤溶酶,已知组织蛋白酶 B、组织蛋白酶 D 和纤溶酶均可水解二肽药物衍生物,导致靶细胞内部的活性药物释放(参见例如, Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123)。最典型的连接体为肽基连接体,其可由存在于靶细胞或组织中的酶裂解。例如,可使用可由硫醇依赖性蛋白酶组织蛋白酶 -B 裂解的肽基连接体(例如, Phe-Leu 或 (Gly-Phe-Leu-Gly) 连接体),所述硫醇依赖性蛋白酶组织蛋白酶 -B 在癌组织中高表达。其他这类连接体例如在美国专利第 6, 214, 345 号中描述。在一些实施方式中,可由细胞内蛋白酶裂解的肽基连接体为 Val-Cit 连接体或 Phe-Lys 连接体(参见例如,美国专利第 6, 214, 345 号,该美国专利描述了带有 val-cit 连接体的阿霉素的合成)。使用细胞内蛋白水解释放治疗剂的一个优势为所述治疗剂通常在偶联时被弱化并且偶联物的血清稳定性通常较高。

[0277] 在一些实施方式中,可裂解的连接体为 pH 敏感的,即对某一 pH 值条件敏感而发生水解。通常, pH 敏感的连接体在酸性条件下可水解。例如,可使用在溶酶体中可水解的酸不稳定连接体(例如,脲、缩氨基脲、硫代缩氨基脲、顺式乌头酰胺、原酸酯、缩醛、缩酮,等等),参见例如,美国专利第 5, 122, 368 号,第 5, 824, 805 号,第 5, 622, 929 号, Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville 等人, 1989, Biol. Chem. 264:14653-14661。这些连接体在中性 pH 条件下相对稳定,例如,在血液中的那些连接体,但是在低于 5.5 或 5.0 的 pH 条件(大约为溶酶体的 pH)下不稳定。在一些实施方式中,可水解的连接体为硫醚连接体(例如,通过酰基脲化学键与治疗剂连接的硫醚,参见例如,美国专利第 5, 622, 929 号)。

[0278] 在其他实施方式中,连接体为在还原性条件下可裂解的(例如,二硫化物连接体)。本领域已知多种二硫化物连接体,包括例如,可使用 SATA (N-琥珀酰亚胺基 -5-乙酰基硫代乙酸酯), SPDP (N-琥珀酰亚胺基 -3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯), SPDB (N-琥珀酰亚胺基 -3-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯)和 SMPT (N-琥珀酰亚胺基 -氧羰基 - $\alpha$  -甲基 - $\alpha$  -(2-吡啶基二硫代)甲苯), SPDB 和 SMPT (参见例如, Thorpe 等人, 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak 等人, In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer (C. W. Vogel 编辑), Oxford U. 出版, 1987。还参见美国专利第 4, 880, 935 号)形成的那些连接体。

[0279] 在其他具体实施方式中,连接体为丙二酸酯连接体(Johnson 等人, 1995, Anticancer Res. 15:1387-93), 马来酰亚胺苯甲酰基连接体(Lau 等人, 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1299-1304)或 3'-N-酰胺类似物(Lau 等人, 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1305-12)。

[0280] 通常,连接体对细胞外环境基本不敏感。本文在连接体的部分使用的“对细胞外环境基本不敏感”是指在本发明的化合物样品中,当本发明的化合物存在于细胞外环境(例如,血浆中)时,不超过约 20% 的连接体裂解,典型地不超过约 15% 的连接体裂解,更加典型地不超过约 10% 连接体裂解,甚至更加典型地不超过约 5% 的连接体裂解,不超过约 3% 的连接体裂解,或者不超过约 1% 的连接体裂解。例如,可通过将(a)本发明的化合物(“化合物样品”)和(b)等摩尔量的未偶联的抗体或治疗剂(“对样品”)独立地与血浆一同孵育一段预定的时间段(例如,2 小时、4 小时、8 小时、16 小时或 24 小时)并随后比较存在于化合物样品中的未偶联的抗体或治疗剂的量和存在于对样品中的未偶联的抗体或治疗剂的量(例如通过高效液相色谱测量)来测定连接体是否对细胞外环境基本不敏感。

[0281] 在其他不相互排斥的实施方式中,连接体促进细胞内在化。在一些实施方式中,当连接体偶联于活化部分时,连接体促进细胞内在化。在其他实施方式中,当连接体偶联于靶向部分和活化部分这两者时,连接体促进细胞内在化。

[0282] 可在本发明的组合物和方法中使用的多种连接体在 WO2004010957 (名称为“Drug Conjugates and Their Use for Treating Cancer, An Autoimmune Disease or an Infectious Disease”)以及 US20120141509A1 和 US20120288512A1 (其公开的内容通过引用并入本文)中描述。

[0283] 在一些实施方式中,连接体单元具有如下通式:

[0284]  $-T_a-W_w-Y_y-$

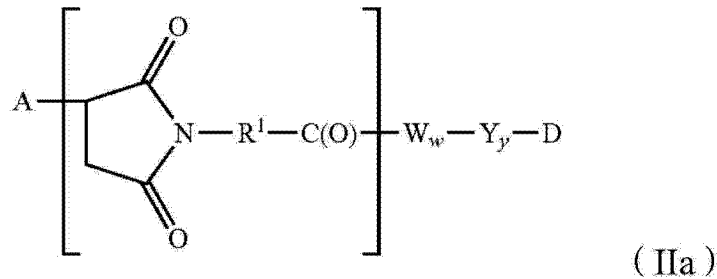
[0285] 其中,-T- 为支架单元,a 为 0 或 1,-W- 分别独立地为氨基酸单元,w 独立地为 2 至 12 的整数,-Y- 为间隔单元,y 为 0、1 或 2。

[0286] 支架单元

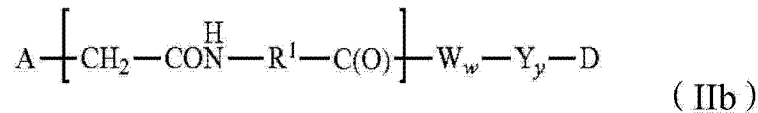
[0287] 当存在支架单元(-T-)时,该支架单元将靶向部分连接至氨基酸单元(-W-)。可天然地或通过化学操作存在于靶向部分(例如,抗体)上的有用的官能团包括但不限于:巯基、氨基、羟基、碳水化合物的异头羟基和羧基。合适的官能团为巯基和氨基。巯基可通过还原抗体的分子内二硫键生成。可选地,巯基可通过抗体的赖氨酸基团的氨基与 2-亚氨基硫杂环戊烷(Traut 试剂)或其他巯基生成试剂的反应生成。在一些实施方式中,抗体为重组抗体并且被设计为带有一个或一个以上赖氨酸。在其他实施方式中,重组抗体被设计为带有额外的巯基基团,例如,额外的半胱氨酸。

[0288] 在一些实施方式中,支架单元与抗体的硫原子形成化学键。所述硫原子可来源于还原的抗体(A)的巯基基团(-SH)。这些实施方式的代表性的支架单元在通式(IIa)和(IIb)的方括号中描述,其中,A-、-W-、-Y-、-D、w 和 y 为如上所定义的,并且 R<sup>1</sup>选自:-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烯烴-、-C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>- 碳环-、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基)-、-亚芳基-、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烯烴-亚芳基-、-亚芳基-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-烯烴-、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-烯烴-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>碳环)-、-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>碳环)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烯烴-、-C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-杂环-、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-烯烴-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>杂环)-、-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>杂环)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烯烴-、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>- 和 -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-,并且 r 为 1 至 10 的整数。

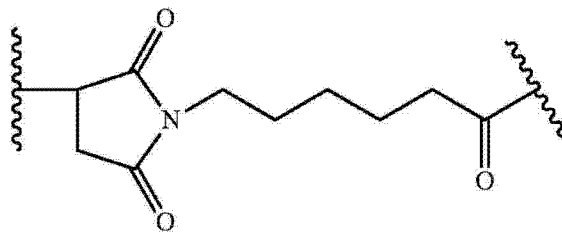
[0289]



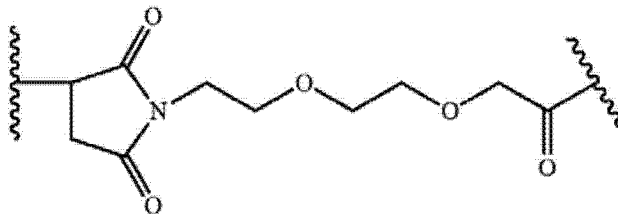
[0290]

[0291] 示例性的支架单元为 R<sup>1</sup>为 -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>- 时的通式(IIa)的支架单元：

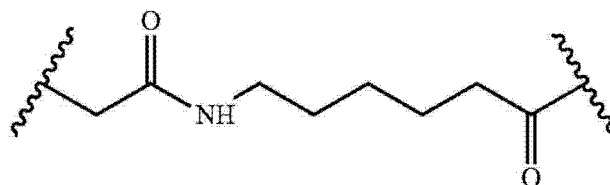
[0292]

[0293] 另一示例性的支架单元为 R<sup>1</sup>为 -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>- 并且 r 为 2 时的通式(IIa)的支架单元：

[0294]

[0295] 另一示例性的支架单元为 R<sup>1</sup>为 -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>- 时的通式(IIb)的支架单元：

[0296]

[0297] 在一些其他具体实施方式中, 支架单元通过抗体单元的硫原子和支架单元的硫原子之间的二硫键连接至抗体单元(A)。本实施方式的代表性的支架单元在通式(III)的方括号中描述, 其中, R<sup>1</sup>、A-、-W-、-Y-、-D、w 和 y 是如上所定义的。

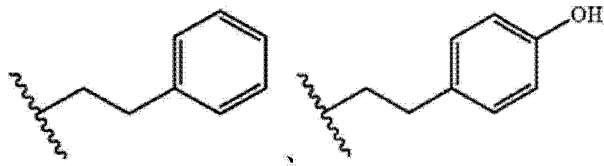
[0298]



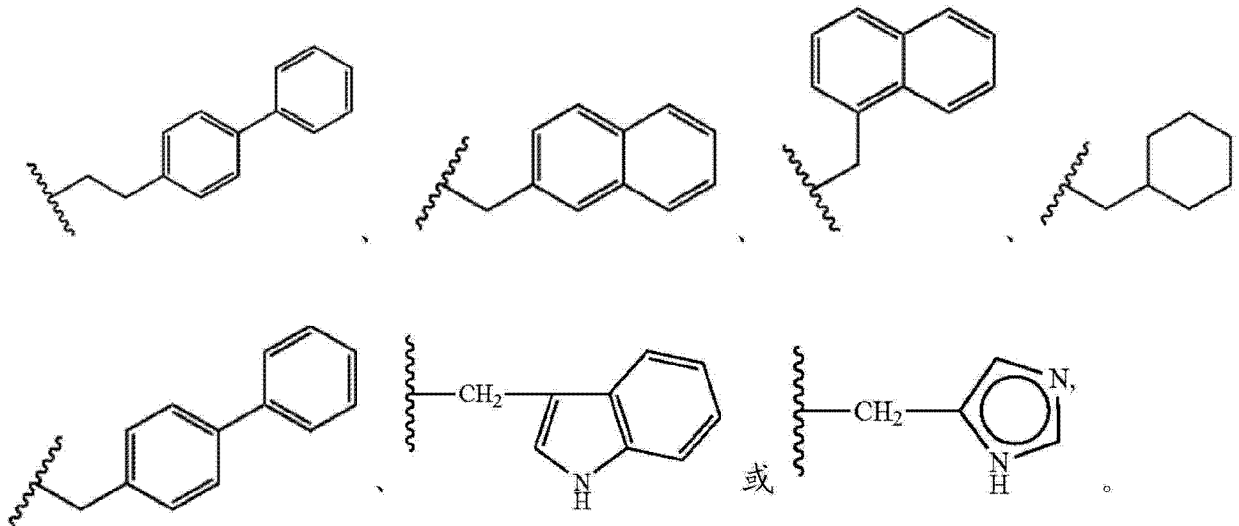
[0299] 在其他具体实施方式中, 支架的反应性基团包含可与抗体的氨基基团反应的反应位点。氨基基团可为精氨酸或赖氨酸。合适的胺反应位点包括但不限于: 活化的酯(例如,



(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>、—(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>、—(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCOCH<sub>3</sub>、—(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCHO、—(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>、—(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>、—(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCOCH<sub>3</sub>、—(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCHO、—(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>、—(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCONH<sub>2</sub>、—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、2-吡啶基甲基-、3-吡啶基甲基-、4-吡啶基甲基-、苯基、环己基、



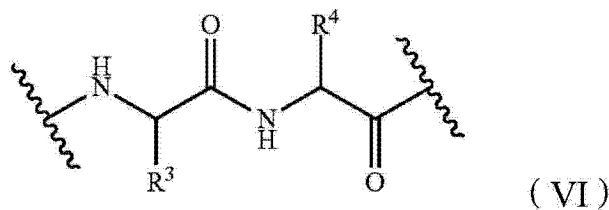
[0307]



[0308] 连接体单元的氨基酸单元可通过酶(包括但不限于:肿瘤相关蛋白酶)的方式被酶裂解,从而释放出活化部分(-D),释放后该活化部分在体内被质子化,从而产生活化分子(D)。

[0309] 示例性的 W<sub>w</sub>单元由通式(VI)至(VIII)表示:

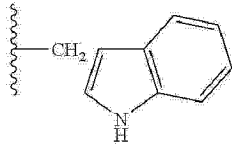
[0310]



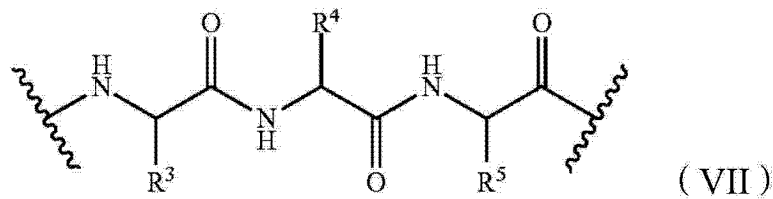
[0311] 其中, R<sup>3</sup>和 R<sup>4</sup>如下表所示:

[0312]



R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
苄基	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ;
甲基	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ;
异丙基	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ;
异丙基	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHCONH <sub>2</sub> ;
苄基	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHCONH <sub>2</sub> ;
异丁基	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHCONH <sub>2</sub> ;
仲丁基	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHCONH <sub>2</sub> ;
	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHCONH <sub>2</sub> ;
苄基	甲基; 和
苄基	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHC(=NH)NH <sub>2</sub> ;

[0313]

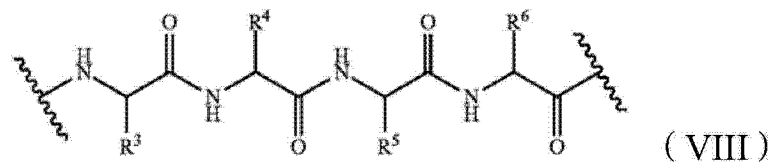


[0314] 其中, R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>和 R<sup>5</sup>如下表所示 :

[0315]

R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>
苄基	苄基	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ;
异丙基	苄基	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ; 和
H	苄基	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ;

[0316]



[0317] 其中, R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>和 R<sup>6</sup>如下表所示 :

[0318]

R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>
H	苄基	异丁基	H
甲基	异丁基	甲基	异丁基

[0319] 合适的氨基酸单元包括但不限于：通式(VI)单元，其中，R<sup>3</sup>为苄基，R<sup>4</sup>为-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>，R<sup>3</sup>为异丙基并且R<sup>4</sup>为-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>，或者R<sup>3</sup>为异丙基并且R<sup>4</sup>为-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>。另一合适的氨基酸单元为通式(VII)单元，其中，R<sup>3</sup>为苄基、R<sup>4</sup>为苄基并且R<sup>5</sup>为-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>。-Ww-单元可在其选择性方面被设计并优化为通过特定的肿瘤相关蛋白酶进行酶裂解。合适的-Ww-单元为那些通过蛋白酶(组织蛋白酶B、组织蛋白酶C和组织蛋白酶D)以及纤溶酶催化其裂解的单元。

[0320] 一些实施方式中，-Ww-为二肽、三肽或四肽单元。

[0321] 在R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>或R<sup>6</sup>不为氢的条件下，R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>或R<sup>6</sup>所连接的碳原子为手性的。与R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>或R<sup>6</sup>连接的每个碳原子独立地为(S)构型或(R)构型。

[0322] 在一些实施方式中，氨基酸单元为苯基丙氨酸-赖氨酸二肽(Phe-Lys或FK连接体)。在一些实施方式中，氨基酸单元为缬氨酸-瓜氨酸二肽(Val-Cit或VC连接体)。在一些实施方式中，氨基酸单元为5-氨基戊酸、均苯基丙氨酸赖氨酸、四异喹啉羧酸酯赖氨酸、环己基丙氨酸赖氨酸、异哌啶酸(isonepepotic acid)赖氨酸、β-丙氨酸赖氨酸、甘氨酸丝氨酸缬氨酸谷酰胺或异哌啶酸。

[0323] 氨基酸单元可包含天然氨基酸。在其他实施方式中，氨基酸单元可包含非天然氨基酸。

#### [0324] 间隔单元

[0325] 当存在间隔单元(-Y-)时，该间隔单元将氨基酸单元连接至药物单元。间隔单元为两个大类：自切除的(self-immolative)和非自切除的。非自切除的间隔单元为在TM-连接体-AM偶联物或药物连接体化合物中的氨基酸单元酶裂解之后间隔单元的一部分或全部仍然连接于活化部分单元的间隔单元。非自切除间隔单元的实例包括但不限于：(甘氨酸-甘氨酸)间隔单元和甘氨酸间隔单元。当含有甘氨酸-甘氨酸间隔单元或甘氨酸间隔单元的TM-连接体-AM偶联物通过肿瘤细胞相关蛋白酶、癌细胞相关蛋白酶或淋巴细胞相关蛋白酶发生酶裂解时，甘氨酸-甘氨酸-药物部分或甘氨酸-药物部分从A-T-Ww-中裂解出来。为了释放出AM，应当在靶细胞中进行独立的水解反应，从而使甘氨酸-药物单元化学键裂解。

[0326] 在典型的实施方式中，-Y<sub>m</sub>-为可被Q<sub>m</sub>取代的对氨基苄基醚，其中，Q为-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基，-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷氧基、-卤素、-硝基或-氰基，并且m为0至4的整数。

[0327] 在一些实施方式中，非自切除间隔单元(-Y-)为-Gly-Gly-。

[0328] 在一些实施方式中，非自切除间隔单元(-Y-)为-Gly-。

[0329] 在一种实施方式中，AM-连接体化合物或TM-连接体-AM偶联物缺乏间隔单元(y=0)。

[0330] 可选地，含有自切除间隔单元的TM-连接体-AM偶联物可释放AM(D)，无需单独的水解步骤。在这些实施方式中，-Y-为对氨基苄基醇(PAB)单元，该对氨基苄基醇(PAB)单元通过PAB基团的氮原子与-Ww-连接并且通过碳酸酯基团、氨基甲酸酯基团或醚基团直接

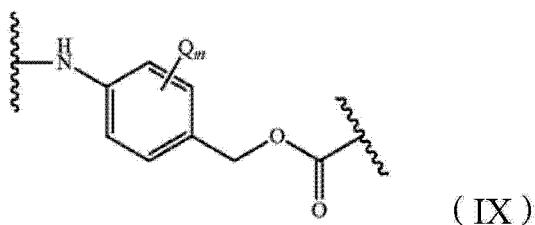
连接于 -D。

[0331] 自切除间隔单元的其他实例包括但不限于：与 PAB 基团电子等价的芳香族化合物，例如，2-氨基咪唑基-5-甲醇衍生物（参见例如，Hay 等人，1999, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237）和邻位或对位-氨基苄基缩醛。可使用酰胺键水解后易于发生环化的间隔单元，例如，取代和未取代的 4-氨基丁酸酰胺（Rodrigues 等人，1995, Chemistry Biology 2:223），适当取代的双环 [2.2.1] 和双环 [2.2.2] 环系统（Storm 等人，1972, J. Amer. Chem. Soc. 94:5815）以及 2-氨基苄基丙酸酰胺（Amsberry 等人，1990, J. Org. Chem. 55:5867）。甘氨酸的  $\alpha$ -位被取代的含胺药物的消除（Kingsbury 等人，1984, J. Med. Chem. 27:1447）也是自切除间隔单元的策略的实例，该策略可用于 TM-连接体-AM 偶联物。

[0332] 在可选的实施方式中，间隔单元为支链双（羟甲基）苯乙烯（BHMS）单元，其可用于合并多个部分。

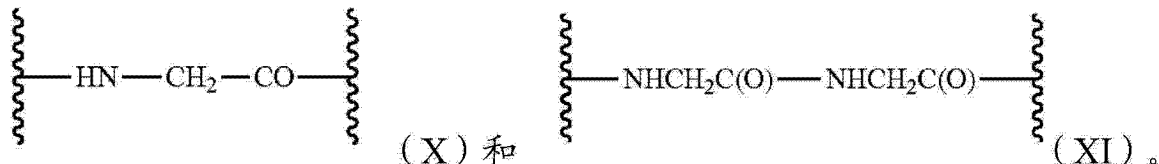
[0333] 典型的间隔单元（-Y<sub>y</sub>-）由通式（IX）-（XI）表示：

[0334]



[0335] 其中，Q 为 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷氧基、卤素、硝基或氰基，并且 m 为 0 至 4 的整数。

[0336]

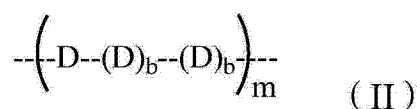


[0337] 在一些实施方式中，连接体为酶可裂解的。在一些实施方式中，连接体不为酶可裂解的。

[0338] 在一些实施方式中，所述连接体由下述通式（III）的结构表示：

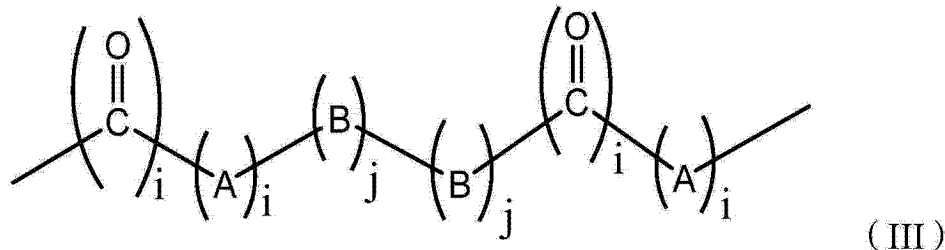
[0339] 其中，L 由通式（II）的结构表示：

[0340]



[0341] m 为 1, 2, 3, 4, 5 或 6, b 分别独立地为 0 或 1, 并且 D 由下述通式（III）的结构独立地表示：

[0342]



[0343] 其中,  $i$  分别独立地为 0 或 1;

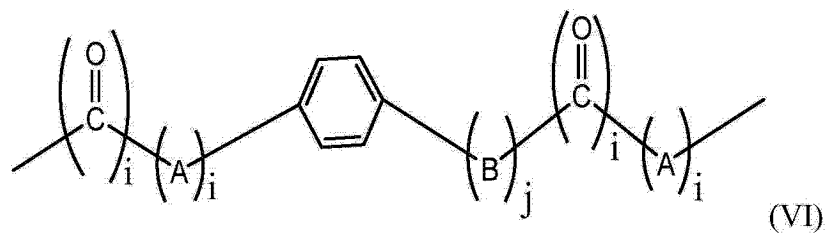
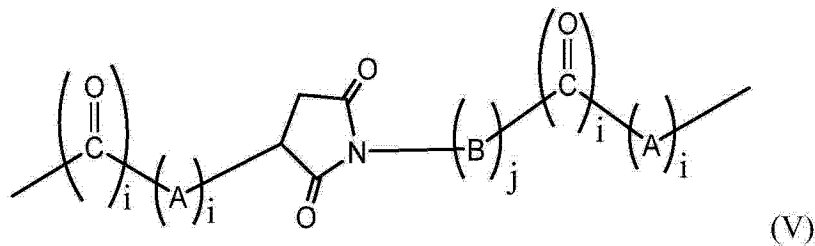
[0344]  $j$  分别独立地为 0, 1, 2, 3, 4, 5 或 6;

[0345]  $A$  分别独立地为 S, O 或 N-R<sub>a</sub>, 其中, R<sub>a</sub> 为氢, 烷基, 烯基或烷氧基;

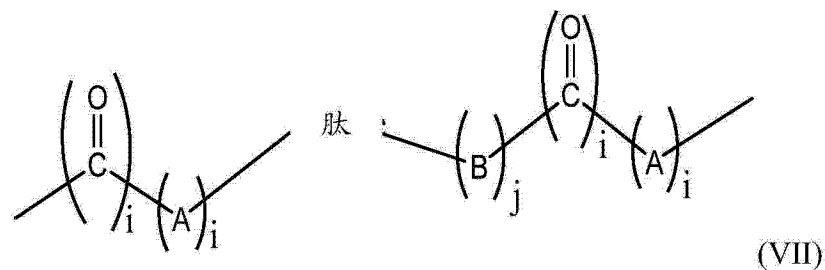
[0346]  $B$  分别独立地为烷基, 烯基, --O-烷基--, --烷基-O--, --S-烷基--, --烷基-S--, 芳基, 杂芳基, 杂环基或肽, 它们中的每一个被一个或一个以上选自下列基团的取代基任选地取代: 羟基, 烷氧基, 烷基, 烯基, 炔基, 环烷基, --烷基-芳基, --烷基-杂芳基, --烷基-杂环基, --O-R<sub>4</sub>, --O-烷基-R<sub>4</sub>, --C(O)-R<sub>4</sub>, --C(O)-O-R<sub>4</sub>, --S-R<sub>4</sub>, --S(O)<sub>2</sub>-R<sub>4</sub>, --NHR<sub>4</sub>, --NH-烷基-R<sub>4</sub>, 卤素, --CN, --NO<sub>2</sub>, 和 -SH, 其中, R<sub>4</sub> 为烷基, 烯基, --烷基-羟基, 芳基, 杂芳基, 杂环基或卤代烷基。

[0347] 在一些实施方式中, 所述连接体由下述通式(V)至通式(VII)的结构表示:

[0348]



[0349]



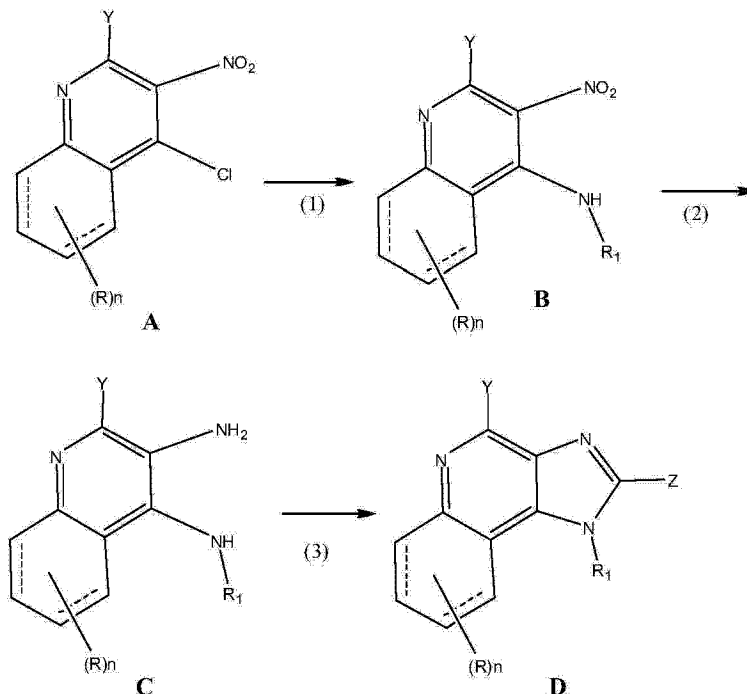
[0350]  $A$ ,  $B$ ,  $i$  和  $j$  为上面所定义的。

[0351] 化合物的制备

[0352] 总体而言, 通式(I)的结构表示的活化部分可使用下列列出的合成步骤制备。在

步骤(1)中,通式 A 的 4- 氯代 -3- 硝基喹啉与通式  $R_1NH_2$  的胺反应生成通式 B 的 3- 硝基喹啉 -4- 胺。在步骤 2 中,通式 B 的 3- 硝基喹啉 -4- 胺被还原,从而生成通式 C 的喹啉 -3-4- 二胺。在步骤 3 中,通式 C 的喹啉 -3-4- 二胺与羧酸或其等同物反应,生成通式 D 的 1H- 咪唑并 [4, 5c] 喹啉。

[0353]



[0354] 可选地,通式(I)的化合物可根据 US6, 331, 539B1, US6, 451, 810B1, US7, 157, 452 和 US7, 301027B2 中所述的合成方法制备。

[0355] 另一方面,通式(Ia)和通式(Ib)的化合物可通过使用连接体以连接靶向部分和活化部分这两者来制备。所述连接体使用其反应位点与靶向部分和活化部分结合。在一些实施方式中,所述结合通过在连接体与靶向部分和活化部分之间形成共价键进行。在一些实施方式中,所述反应位点为亲核基团。在一些实施方式中,所述反应位点为亲电基团。连接体中有用的亲核基团包括但不限于:酰肼基团、肟基团、氨基基团、胍基团、缩氨基硫脲基团、胍羧酸酯基团和芳基酰肼基团。有用的亲电基团包括但不限于:马来酰亚胺基团、碳酸酯基团和卤代乙酰胺基团。

[0356] 药物剂型和给药方式

[0357] 本发明还涉及药物组合物,所述药物组合物包含本发明的化合物或其药学上可接受的盐,以及一种或一种以上药学上可接受的载体。

[0358] 本文所述的化合物(例如,其加成盐或水合物)以及药学上可接受的载体可使用多种不同的给药模式或途径递送至患者。合适的给药途径包括但不限于:吸入给药、透皮给药、口服给药、直肠给药、透过粘膜给药、肠道给药和肠胃外给药(包括肌肉内、皮下和静脉注射)。优选地,包含作为靶向部分的抗体或抗体片段的本发明的化合物以肠胃外的方式给药,更优选地,以静脉注射方式给药。

[0359] 本文使用的术语“给药”意在包括直接和间接地将化合物递送至期望的作用位点的所有方式。

[0360] 本文所述的化合物或其药学上可接受的盐和 / 或其水合物可单独给药, 与本发明的其他化合物联合给药和 / 或与其他治疗剂联合以混合剂的形式给药。当然, 对可与本发明的化合物联合给药的治疗剂的选择部分取决于治疗中的病症。

[0361] 例如, 当向患有由依赖于自诱导物的生物体引起的疾病病症的患者给药时, 本发明的化合物可以混合剂的形式给药, 所述混合剂含有用于治疗疼痛、感染和其他症状以及通常与疾病有关的副作用的药剂。这些药剂包括例如, 镇痛剂、抗生素, 等等。

[0362] 当向正在进行癌症治疗的患者给药时, 化合物可以混合剂的形式给药, 所述混合剂包含抗癌剂和 / 或补充增效剂。所述化合物还可以含有治疗放疗的副作用的药剂的混合剂的形式给药, 所述治疗放疗的副作用的药剂例如, 止吐药, 防辐射剂, 等等。

[0363] 可与本发明的化合物联合给药的补充增效剂包括例如, 三环类抗抑郁药 (例如, 米帕明(imipramine)、地昔帕明(desipramine)、阿米替林(amitriptyline)、氯米帕明(clomipramine)、曲米帕明(trimipramine)、多塞平(doxepin)、去甲替林(nortriptyline)、普罗替林(protriptyline)、阿莫沙平(amoxapine) 和 马普替林(maprotiline)), 非三环类抗抑郁药 (例如, 舍曲林(sertraline)、曲唑酮(trazodone) 和 西酞普兰(citalopram)),  $Ca^{2+}$  拮抗剂 (例如, 维拉帕米(verapamil)、硝苯地平(nifedipine)、尼群地平(nitrendipine) 和 卡罗维林(caroverine)), 两性霉素, 三苯乙醇类似物 (例如, 它莫昔芬(tamoxifen)), 抗心律失常药物 (例如, 奎尼丁(quinidine)), 抗高血压药物 (例如, 利血平(reserpine)), 硫醇消耗物 (例如, 丁硫氨酸和亚砷亚胺) 以及甲酰四氢叶酸钙。

[0364] 本发明的活性化合物以其自身的形式给药或者以药物组合物的形式给药, 在所述药物组合物中, 所述活性化合物与一种或一种以上药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂混合。根据本发明使用的药物组合物通常使用一种或一种以上生理学可接受的载体以常规方式配制, 所述生理学可接受的载体包含赋形剂和佐剂, 所述生理学可接受的载体有利于将活性化合物加工成可在药学上使用的制剂。合适的剂型取决于所选择的给药途径。

[0365] 对于透过粘膜给药而言, 在剂型中使用适于待穿透的屏障的渗透剂。这些渗透剂通常为本领域已知的。

[0366] 对于口服给药而言, 化合物易于通过将活性化合物与本领域已知的药学上可接受的载体结合配制。这些载体能够使本发明的化合物配制成由待治疗的患者口服的片剂、药丸、糖衣药丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆状物和悬浮液。口服的药物制剂可通过如下方式获得: 将固体赋形剂与活性剂化合物混合, 任选地研磨得到的混合物, 并对颗粒混合物进行加工, 如果想要得到片剂或糖衣片芯的话, 需要在该过程之前加入合适的佐剂。具体而言, 合适的赋形剂为填充剂 (例如, 包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇的糖), 纤维素制剂 (例如, 玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、土豆淀粉、明胶、黄耆胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠) 和 / 或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。如果需要的话, 可加入崩解剂, 例如, 交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐 (例如, 海藻酸钠)。

[0367] 向糖衣片芯提供合适的包衣。为了实现这个目的, 可使用浓缩的糖溶液, 该溶液可任选地含有阿拉伯树胶、滑石粉、聚乙烯吡咯烷酮、卡波姆凝胶、聚乙二醇和 / 或二氧化钛、漆用溶液和合适的有机溶剂或溶剂混合物。可将染料或颜料加至片剂或糖衣药丸包衣中, 用于识别或表征不同的活性化合物剂量组合。

[0368] 可口服使用的药物制剂包括由明胶制成的推合式胶囊和由明胶和增塑剂(例如,丙三醇或山梨糖醇)制成的软的密封的胶囊。推合式胶囊可含有与诸如乳糖之类的填充剂、诸如淀粉之类的粘合剂和 / 或诸如滑石粉或硬脂酸镁之类的润滑剂和任选地稳定剂混合的活性成分。在软胶囊中,活性化合物可溶解于或悬浮于合适的液体中,例如,脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇。此外,可加入稳定剂。用于口服给药的所有剂型的剂量应当适于这种给药方式。

[0369] 对于口腔给药而言,组合物可以通过常规方式配制的片剂或含片的形式给药。

[0370] 对于吸入给药而言,根据本发明使用的化合物便于通过使用合适的推进剂(例如,二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合适的气体)以由加压包或喷雾器提供的喷雾的形式递送。在使用加压喷雾的情况下,剂量单位可通过提供递送计量的量的阀来确定。在吸入器或吹入器中使用的胶囊和药筒(例如,明胶胶囊和药筒)可被配制为含有化合物和合适粉末基体(例如,乳糖或淀粉)的粉末混合物的剂型。

[0371] 化合物可被配制为通过注射(例如,快速注射或连续输注)方式肠胃外给药的剂型。注射为本发明的组合物的优选的给药方法。用于注射的剂型可以带有添加的防腐剂的单位剂量形式提供,例如,以安瓶或多剂量容器的形式提供。组合物可采用诸如油性载体或水性载体中的悬浮液、溶液或乳液之类的形式并且可含有诸如悬浮剂、稳定剂和 / 或分散剂之类的调配剂(formulatory),并且可加入例如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐(例如,海藻酸钠)。

[0372] 用于肠胃外给药的药物剂型包括水溶性形式的活性化合物的水溶液。此外,活性化合物的悬浮液可制备成合适的油性注射悬浮液。合适的亲脂性溶剂或载体包括脂肪油(例如,芝麻油)或合成的脂肪酸酯(例如,油酸乙酯或甘油三酯)或脂质体。水性注射悬浮液可包含如下物质:该物质增加悬浮液的粘度,例如,羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。任选地,悬浮液还可含有合适的稳定剂或药剂,该稳定剂或药剂增加化合物的溶解度,从而制备高度浓缩的溶液。对于注射而言,本发明的药剂可被配制成水性溶液,优选地配制成生理相容性缓冲液(例如,Hanks 溶液、林格氏溶液或生理盐水缓冲液)。

[0373] 可选地,活性成分可为使用前溶解于合适的载体中的粉末形式,所述合适的载体例如,无菌无热原水。

[0374] 化合物还可被配制成直肠用组合物,例如,栓剂或保留灌肠剂型,例如含有常规栓剂基体(例如可可油或其他甘油酯)。

[0375] 除了前述剂型之外,化合物还可被配制成长效制剂。这种长期起效的剂型可通过植入或经皮递送(例如,皮下递送或肌肉内递送)、肌肉内注射或透皮贴剂给药。因此,例如,化合物可通过合适的聚合材料或疏水性材料(例如,可接受的油中的乳液)或离子交换树脂配制或可将化合物配制成微溶衍生物,例如,配制成微溶的盐。

[0376] 药物组合物还可包含合适的固体或凝胶相载体或赋形剂。这些载体或赋形剂的实例包括碳酸钙、磷酸钙、各种糖类、淀粉、纤维素衍生物、明胶和诸如聚乙二醇之类的聚合物。

[0377] 优选的药物组合物为配制成注射剂型的组合物,例如,静脉注射剂型,并且该优选的药物组合物包含基于总的 100 重量%的药物组合物的约 0.01 重量%至约 100 重量%的本发明的化合物。药物配体偶联物可为抗体-细胞毒素偶联物,其中,选择靶向特定癌症的

抗体。

[0378] 在一些实施方式中,本发明的药物组合物还包含其他治疗剂。

[0379] 在一些实施方式中,所述其他治疗剂为抗癌剂。

[0380] 在一些实施方式中,其他抗癌剂选自:抗代谢药物、拓扑异构酶 I 和拓扑异构酶 II 的抑制剂、烷基化剂、微管抑制剂、抗雄性激素剂、GnRH 调节剂或者它们的混合物。

[0381] 在一些实施方式中,所述其他治疗剂为化疗剂。

[0382] 本文中的“化疗剂”是指在治疗癌症中有用的化学化合物。实例包括但不限于:吉西他滨(Gemcitabine),伊立替康(Irinotecan),阿霉素(Doxorubicin),5-氟尿嘧啶(5-Fluorouracil),阿糖胞苷(Cytosine arabinoside,“Ara-C”),环磷酰胺(Cyclophosphamide),塞替派(Thiotepa),白消安(Busulfan),细胞毒素,紫杉酚,甲氨蝶呤(Methotrexate),顺铂(Cisplatin),美法仑(Melphalan),长春碱(Vinblastine)和卡铂(Carboplatin)。

[0383] 在一些实施方式中,第二化疗剂选自:他莫昔芬(tamoxifen),雷洛昔芬(raloxifene),阿那曲唑(anastrozole),依西美坦(exemestane),来曲唑(letrozole),伊马替尼(imatinib),紫杉醇(paclitaxel),环磷酰胺(cyclophosphamide),洛伐他汀(lovastatin),含羞草素(minosine),吉西他滨(gemcitabine),阿糖胞苷(cytarabine),5-氟尿嘧啶,甲氨蝶呤,多西他赛(docetaxel),戈舍瑞林(goserelin),长春新碱(vincristine),长春碱(vinblastine),诺考达唑(nocodazole),替尼泊苷(teniposide),依托泊苷(etoposide),吉西他滨,埃博霉素(epothilone),长春瑞滨(vinorelbine),喜树碱(camptothecin),柔红霉素(daunorubicin),放线菌素 D(actinomycin D),米托蒽醌(mitoxantrone),吡啶(acridine),阿霉素(doxorubicin),表柔比星(epirubicin)或去甲氧基柔红霉素(idarubicin)。

#### [0384] 试剂盒

[0385] 另一方面,本发明提供一种试剂盒,所述试剂盒包含本发明的化合物或组合物中的一种或一种以上以及使用所述化合物或组合物的说明书。在示例性的实施方式中,本发明提供用于将本发明的连接体臂与另一分子偶联的试剂盒。所述试剂盒包括连接体和用于使连接体与特定的官能团连接的说明书。所述试剂盒还包括细胞毒性药物、靶向剂、可检测的标记、药学上可接受的盐或缓冲剂中的一种或一种以上。所述试剂盒还可包括容器和任选地一种或一种以上小瓶、测试管、烧瓶、瓶子或注射器。其他形式的试剂盒对于本领域技术人员而言是显而易见的并且在本发明的范围内。

#### [0386] 医疗用途

[0387] 另一方面,本发明提供一种用于治疗需要这种治疗的受治者体内的疾病病症的方法,所述方法包括将药物组合物给药于所述受治者,所述药物组合物包含治疗有效量的本发明的化合物或其药学上可接受的盐,以及药学上可接受的载体。

[0388] 除了上述组合物和构建体之外,本发明还提供本发明的化合物的多种用途。本发明的化合物的用途包括:杀死肿瘤细胞或癌细胞或者抑制肿瘤细胞或癌细胞的生长、增殖或复制,治疗癌症、治疗癌前症状、预防肿瘤细胞或癌细胞繁殖、预防癌症、预防表达自体免疫抗体的细胞繁殖。这些用途包括将有效量的本发明的化合物给药于有此需要的诸如哺乳动物或人类之类的动物。



[0389] 本发明的化合物可用于治疗诸如人类之类的动物体内的疾病(例如,癌症)。本发明提供组合物及其在治疗肿瘤中的用途,所述用途包括以药学上可接受的方式向受治者提供药学有效量的本发明的组合物。

[0390] 本文中的“癌症”是指人体内的病理状态,其特征为不受控制的细胞增殖。实例包括但不限于:癌症、淋巴瘤、母细胞瘤和白血病。癌症的更加具体的实例包括但不限于:肺(小细胞和非小细胞)癌、乳腺癌、前列腺癌、类癌性癌症、膀胱癌、胃癌、胰腺癌、肝癌(肝细胞癌)、肝母细胞瘤、结肠直肠癌、头颈癌、鳞状细胞癌、食管癌、卵巢癌、子宫癌、子宫内膜癌、间皮瘤、黑色素瘤、肉瘤、骨肉瘤、脂肪肉瘤、甲状腺癌、硬纤维瘤、急性髓细胞白血病(AML)和慢性髓细胞白血病(CML)。

[0391] 本文中的“抑制”或“治疗”是指降低、治疗性和预防性治疗,其中,目的是降低或预防指定的病理性失调或病症。在一个实施例中,给药本发明的化合物之后,癌症患者可经历肿瘤尺寸减小。“治疗”包括(1)抑制患有或表现出疾病的病理或症状的受治者体内的疾病;(2)缓解患有或表现出疾病的病理或症状的受治者体内的疾病;和/或(3)影响患有或表现出疾病的病理或症状的受治者或患者体内的疾病的任何可测量的降低。本发明的化合物在一定程度上可防止癌细胞生长和/或杀死癌细胞,在该程度上的本发明的化合物可为抑制细胞生长的和/或细胞毒性的。

[0392] 本文中的“治疗有效量”是指有效“治疗”受治者或哺乳动物体内的失调的本文提供的化合物的量。在治疗癌症的情况下,治疗有效量的药物可降低癌细胞的数目,使肿瘤尺寸减小,抑制癌细胞浸润进入外周器官,抑制肿瘤转移,抑制肿瘤生长至某一程度,和/或一定程度地减轻与癌症相关的症状中的一种或一种以上。

[0393] 与一种或一种以上其他治疗剂“联合”给药包括同时给药和以任何顺序连续给药。本文使用的术语“药物组合”是指通过混合活性成分或组合活性成分得到的产品,并且包括活性成分的固定组合和非固定组合这两者。术语“固定组合”是指活性成分(例如通式(1)的化合物)和联合药剂以单个实体或剂量同时给药于患者。术语“非固定组合”是指活性成分(例如通式(1)的化合物)和联合药剂作为分开的实体同时或按顺序(没有特定的时间限制)给药于患者,这种给药向患者体内提供治疗有效量的活性成分。后者还用于混合剂治疗,例如,给药三种或三种以上活性成分。

[0394] 在一些实施方式中,所述疾病病症为肿瘤或癌症。在一些实施方式中,癌症或肿瘤选自:胃癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、子宫颈癌、子宫体癌、卵巢癌、睾丸癌、膀胱癌、肾癌、脑癌/中枢神经系统癌症、头颈癌、咽喉癌、霍奇金氏疾病、非霍奇金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病、黑色素瘤、非黑色素瘤皮肤癌、急性淋巴细胞性白血病、急性粒细胞性白血病、尤因氏肉瘤、小细胞肺癌、绒毛膜上皮癌、横纹肌肉瘤、Wilms 肿瘤、神经母细胞瘤、多毛细胞白血病、口咽癌、食道癌、喉癌或淋巴瘤。

[0395] 在一些实施方式中,所述疾病病症包括异常细胞增殖,例如癌前病变。

[0396] 本发明尤其对于治疗动物体内的癌症和抑制动物体内的肿瘤细胞的繁殖或癌细胞的繁殖有用。癌症或癌前病症包括肿瘤、转移或任何特征为不受控制的细胞生长的疾病或失调,癌症或癌前病症可通过给药本发明的药物-配体复合物来治疗或预防。化合物将活化部分递送至肿瘤细胞或癌细胞。在一些实施方式中,靶向部分与癌细胞或肿瘤细胞相关抗原特异性结合。由于活化部分靠近配体,所以在内在化之后,活化部分可通过例如受体

介导的内吞作用被摄取进入肿瘤细胞或癌细胞的内部。抗原可连接至肿瘤细胞或癌细胞或者可为与肿瘤细胞或癌细胞有关的细胞外基质蛋白质。一旦进入细胞内部,连接体以水解的方式裂解或被肿瘤细胞相关蛋白酶或癌细胞相关蛋白酶以酶的方式裂解,从而释放活化部分。释放的活化部分随后自由扩散并诱导或提高免疫细胞或肿瘤细胞的免疫活性。在可选的实施方式中,活化部分从化合物肿瘤微环境中裂解出来,随后药物渗入细胞。

[0397] 可被本发明的化合物靶定的癌前症状的代表性的实例包括:化生、增生、异常、结肠直肠息肉、光化性角化病、光化性唇炎、人乳头瘤病毒、白斑、扁平苔藓和博温氏病。

[0398] 可被本发明的化合物靶定的癌症或肿瘤的代表性实例包括:肺癌、结肠癌、前列腺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、乳腺癌、卵巢癌、睾丸癌、中枢神经系统癌、肾脏癌、肾癌、胰腺癌、胃癌、口腔癌、鼻咽癌、子宫颈癌和白血病。对于本领域普通技术人员来说明显的是,可选择使活化部分靶定待用药物治疗的肿瘤组织的在化合物中使用的特定靶向部分(即,选择对肿瘤特异性抗原具有特异性的靶向剂)。这种靶向部分的实例是本领域已知的,实例包括用于治疗乳腺癌的抗 Her2,用于治疗淋巴瘤的抗 CD20,用于治疗前列腺癌的抗 PSMA 和用于治疗淋巴瘤(包括非霍奇金淋巴瘤)的抗 CD30。

[0399] 在一些实施方式中,异常增殖的细胞是癌细胞。

[0400] 在一些实施方式中,癌症选自:乳腺癌、结肠直肠癌、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、子宫内膜癌、滤泡性淋巴瘤、胃癌、胶质母细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、肺癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌和肾细胞癌。

[0401] 在一些实施方式中,本发明提供用于杀伤细胞的化合物。所述化合物以足以杀伤所述细胞的量给药于细胞。在示例性的实施方式中,所述化合物给药于带有所述细胞的受治者。在另一示例性的实施方式中,所述给药使肿瘤的生长延迟或停止,所述肿瘤包括所述细胞(例如,所述细胞可为肿瘤细胞)。对于延迟生长的给药而言,所述细胞的生长速度应当为比给药前的生长速度小至少 10%。优选地,生长速度会延迟至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或完全停止。

[0402] 此外,本发明提供用作药物的本发明的化合物或药物组合物。本发明还提供用于杀伤肿瘤细胞或癌细胞、抑制或延迟肿瘤细胞或癌细胞的增殖或者用于治疗涉及 TLR7 和/或 TLR8 的疾病的化合物或药物组合物。

[0403] 有效剂量

[0404] 适用于本发明的药物组合物包括包含治疗有效量的活性成分的组合,所述治疗有效量即为有效实现期望目的的量。对特定应用有效的实际量将(尤其)取决于治疗中的病症。有效量的确定恰好在本领域技术人员的能力范围内(尤其是根据本文具体公开的内容)。

[0405] 对于本文所述的任何化合物而言,治疗有效量可最先通过细胞培养检测法确定。目标血药浓度为能够抑制细胞生长或分裂的活性化合物的浓度。在优选的实施方式中,细胞活性的至少 25% 被抑制。能够诱导至少约 30%、50%、75% 或甚至 90% 或者更高的细胞活性抑制的活性化合物的目标血药浓度为目前优选的。可监测患者体内的细胞活性抑制的百分数,从而评估所达到的血药浓度的适当性,并且可上调或下调剂量以实现期望的抑制百分数。

[0406] 如本领域已知的,用于人体的治疗有效量还可通过动物模型来确定。例如,用于人

体的剂量可被配制实现已在动物体内发现的有效循环浓度。如上所述,人体内的剂量可通过监测细胞抑制和上调或下调剂量来调节。

[0407] 治疗有效剂量还可通过已知的表现出类似药理学活性的化合物的数据来确定。所使用的剂量可基于与已知化合物比较的所给药的化合物的相对生物利用度和效力来调节。

[0408] 基于上述方法和本领域熟知的其他方法为实现人体内的最大效力对剂量进行调节恰好在本领域普通技术人员的能力范围内。

[0409] 在局部给药的情况下,所给药的化合物的全身循环浓度不是特别重要。在这种情况下,给药化合物以达到在局部区域有效实现期望的结果的浓度。

[0410] 对于预防和/或治疗与异常细胞增殖有关的疾病方面的应用而言,优选的是,所给药的化合物的循环浓度为约 0.001  $\mu\text{M}$  至 20  $\mu\text{M}$ ,优选地约 0.01  $\mu\text{M}$  至 5  $\mu\text{M}$ 。

[0411] 本文所述的化合物的口服给药的患者剂量典型地为约 1mg/天至约 10,000mg/天,更加典型地为约 10mg/天至约 1,000mg/天,最典型地为约 50mg/天至约 500mg/天。按照患者体重而言,典型的剂量为约 0.01mg/kg/天至约 150mg/kg/天,更加典型地为约 0.1mg/kg/天至约 15mg/kg/天,最典型地为约 1mg/kg/天至约 10mg/kg/天,例如,5mg/kg/天或 3mg/kg/天。

[0412] 在至少一些实施方式中,延迟或抑制肿瘤生长的患者剂量可为 1  $\mu\text{mol/kg/天}$  或更少。例如,患者剂量可为 0.9  $\mu\text{mol/kg/天}$ 、0.6  $\mu\text{mol/kg/天}$ 、0.5  $\mu\text{mol/kg/天}$ 、0.45  $\mu\text{mol/kg/天}$ 、0.3  $\mu\text{mol/kg/天}$ 、0.2  $\mu\text{mol/kg/天}$ 、0.15  $\mu\text{mol/kg/天}$  或 0.1  $\mu\text{mol/kg/天}$  或更少(参考药物的摩尔数)。优选地,当以每日剂量给药持续至少五天的时间段时,抗体药物偶联物延迟肿瘤生长。

[0413] 对于其他给药模式而言,剂量和间隔可分开调节,从而提供对于治疗中的特定临床适应症有效的给药的化合物的血药浓度。例如,在一种实施方式中,根据本发明的化合物可以相对高的浓度每天多次给药。可选地,更加理想的是,以最小有效浓度给药本发明的化合物并且使用较低频率的给药方案。这会提供与个体的疾病的严重程度相称的治疗方案。

[0414] 使用本文的教导可安排有效的治疗方案,而不导致较大的毒性,并且还完全有效地治疗特定患者表现出的临床症状。这种安排应当包括通过考虑多种因素仔细选择活性化合物,所述多种因素例如,化合物效力、相对生物利用度、患者体重、存在的不良副作用及其严重性、优选的给药模式和所选择的药剂的毒性特征。

[0415] 虽然本文描述并显示了本发明的优选的实施方式,但是对于本领域技术人员而言显而易见的是,这些实施方式仅仅是举例说明。本领域技术人员可对这些实施方式作出多种改变、修改和替换,而不背离本发明。应当理解的是,本文所述的本发明的可选实施方式可用于实践本发明。通过所附的权利要求来限定本发明的范围,并且这些权利要求范围内的方法和结构及其等同物也被所附的权利要求涵盖。

[0416] 实施例

[0417] 本发明进一步通过下述实施例举例说明,但本发明不限于此,下述实施例举例说明本发明的化合物的制备方法。

[0418] 实施例 1

[0419] her2或 egfr转染的 L细胞系的生成

[0420] 试剂:来自 ATCC(Manassas, VA; Cat No. CRL2648)的 L 细胞,购自 Sino Biological Inc., (Cat No. H10004) 或 GeneCopoeia, (Cat No. Z2866) 的 Her2/pEZ-Lv105 或 egfr/pCMV cDNA, 葡萄糖 DMEM, L- 谷酰胺, Lipofectamine2000 (Invitrogen; Carlsbad, CA)。

[0421] 为了制备用于筛选偶联的曲妥珠单抗的细胞系,生成表达标记的 Her2 或 EGFR 的 L 细胞。Her2/pEZ-Lv105 或 egfr/pCMV cDNA 构建体通过标准 Lipofectamine2000 操作规程转染至 L 细胞(该细胞在高浓度葡萄糖 DMEM+10%FBS+2mM L- 谷酰胺中生长)。

[0422] 结合分析(FACS分析)

[0423] 为了确定偶联的曲妥珠单抗的结合能力,对表达人 her2 的 L 细胞进行 FACS 分析。简言之,将 100  $\mu$ l 大约  $10^6$  个带有瞬时转染的 her2 的 L 细胞与不同量的曲妥珠单抗偶联的抗体一同孵育,使用 PBS 或单独的二抗或不相关 huIgG 作为阴性对照。洗涤之后,将细胞重悬于 FACS 缓冲液中并在 100  $\mu$ l 反应体积中在室温下与偶联至藻红蛋白(Mu 抗人 PE)二抗的 20  $\mu$ l 小鼠抗人 IgG 一同孵育 30 分钟。洗涤之后,将细胞固定在 200  $\mu$ l 2% 多聚甲醛/PBS 中,随后进行流式细胞仪分析。将相同的步骤用于作为同种型对照的不相关人 IgG 抗体以设定基线 PMT/ 细胞系。在 BD FACSCalibur® 上进行流式细胞仪分析并且记录每个样品的几何平均荧光强度。使用 FlowJo 软件分析记录的数据。结果在图 1 中显示。

[0424] 抗体 toll样受体配体偶联物的生成

[0425] 试剂:曲妥珠单抗(Roche/Genentech Corporation, South San Francisco, CA)、西妥昔单抗(Merck)、与瑞喹莫德连接的 MC-val-cit-PAB (MC-vc-PAB-TLRL)或与瑞喹莫德连接的 MC- (MC-TLRL) (在 Contract Research Organization, China 合成)、硼酸钠、氯化钠、二硫苏糖醇(DTT)、Sephadex G25、DTPA、DTNB 和马来酰亚胺基己酰基 - 单甲基(Sigma-Aldrich, Milwaukee, Wisconsin)。

[0426] 用于生成抗体 TLR 配体偶联物的药物包括曲妥珠单抗和瑞喹莫德(TLRL),在一些情况下,西妥昔单抗用于偶联物。用于生成 TLAC 的连接体为可裂解的连接体 MC-vc-PAB 或非可裂解的连接体 MC。

[0427] 曲妥珠单抗 MC-TLRL或西妥昔单抗 MC-TLRL的制备

[0428] 曲妥珠单抗通过 20mg/mL 浓度下的缓冲液交换从 HERCEPTIN® 中纯化出来,在 pH 为 8.0 的条件下溶解于 500mM 硼酸钠和 500mM 氯化钠的抗体用过量的 100mM 二硫苏糖醇(DTT)处理。在 37°C 孵育约 30 分钟之后,通过在 Sephadex G25 树脂上的洗脱交换缓冲液并用含有 1mM DTPA 的 PBS 进行洗脱。硫醇 /Ab 值通过测定还原的抗体的浓度和硫醇浓度来检测,所述还原的抗体的浓度通过溶液在 280nm 的吸光度来检测,所述硫醇浓度通过与 DTNB (Sigma-Aldrich, Milwaukee, Wisconsin)反应以及在 412nm 处的吸光度来确定。溶解于 PBS 中的还原的抗体在冰上冷冻。在已知浓度下在乙腈和水中稀释溶解于 DMSO 的药物连接体试剂(与瑞喹莫德连接的 Mc-),并且将其加至 PBS 中的冷冻的还原抗体中。约 1 小时后,加入过量的马来酰亚胺淬灭反应并遮盖任何未反应的抗体硫醇基团。在一些情况下,通过标准步骤与免疫球蛋白的赖氨酸进行偶联。反应混合物通过离心超滤浓缩,偶联的抗体通过 PBS 中的 G25 树脂的洗脱进行纯化和脱盐,在无菌条件下通过 0.2  $\mu$ m 的过滤器过滤,并冷冻储存。西妥昔单抗 MC-TLRL 使用相同的步骤制备。

[0429] 曲妥珠单抗 MC-vc-TLRL或西妥昔单抗 MC-vc-TLRL的制备

[0430] 抗体通过半胱氨酸由马来酰亚胺基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸(vc)-p-氨基苄氧基羰基(MC-vc-PAB)连接至TLRL。MC-vc-PAB连接体可通过诸如组织蛋白酶B之类的细胞间蛋白酶裂解,当裂解时,释放游离药物(Doronina等人,Nat. Biotechnol., 21:778-784(2003)),而MC连接体为抗细胞间蛋白酶裂解的。纯化的曲妥珠单抗在pH为8.0的条件下溶解于500mM硼酸钠和500mM氯化钠中,并且进一步用过量的100mM二硫苏糖醇(DTT)处理。在37℃下孵育约30分钟后,通过Sephadex G25树脂上的洗脱交换缓冲液并且用含有1mM DTPA的PBS洗脱。硫醇/Ab值通过测定还原的抗体的浓度和硫醇浓度来检测,所述还原的抗体的浓度通过溶液在280nm处的吸光度来检测,所述硫醇浓度通过与DTNB(Sigma-Aldrich, Milwaukee, Wisconsin)反应以及在412nm处的吸光度(消光系数=13600cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>)来检测。溶解于PBS中的还原的抗体在冰上冷冻。DMSO中的与瑞喹莫德连接的MC-val-cit-PAB-PNP溶解于乙腈和水中,并将其加至PBS中的冷冻的还原的抗体中。孵育1小时后,加入过量的马来酰亚胺淬灭反应并遮盖任何未反应的抗体硫醇基团。在一些情况下,通过标准步骤与免疫球蛋白的赖氨酸进行偶联。通过离心超滤浓缩反应混合物,抗体药物偶联物通过PBS中的G25树脂的洗脱进行纯化和脱盐,在无菌条件下通过0.2 μm的过滤器过滤,并冷冻储存。西妥昔单抗MC-vc-TLRL使用相同的步骤制备。

[0431] 通常,抗体与MC-TLRL或MC-vc-TLRL的偶联反应生成非均一混合物,该混合物包含与不同数量的TLRL药物连接的、偶联的抗体,即,药物分配为1至约8的药物装载。因此,抗体MC-TLRL或抗体MC-vc-TLRL包括分离的纯化的物种分子和平均药物装载为1至8的混合物。通过控制加工过程,药物装载为3至5。通过偶联反应得到的化合物制剂中,每个抗体中TLRL药物部分的平均数目可由常规方式表征,例如质谱法、ELISA分析法、电泳分离法和HPLC。也可确定根据药物的抗体MC-TLRL或抗体MC-vc-TLRL的量分配。通过ELISA,可确定抗体与TLRL偶联的特定制剂中的药物有效装载数目的平均值(Hamblett等人(2004)Clinical Cancer Res. 10:7063-7070;Sanderson等人(2005)Clinical Cancer Res. 11:843-852)。然而,药物的分配值不能通过抗体-抗原结合和ELISA检测限辨别。而且,用于检测抗体药物偶联物的ELISA分析不能确定药物部分与抗体在哪个位置连接,例如,重链或轻链片段或特定的氨基酸残基。在一些情况下,均一的曲妥珠单抗MC-TLRL或曲妥珠单抗MC-vc-TLRL的分离、纯化和表征(其中,具有其他药物装载的曲妥珠单抗MC-TLRL或曲妥珠单抗MC-vc-TLRL中的药物为特定值)可通过诸如反相HPLC或电泳分离之类的方式实现。

[0432] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性分析(ADCC)

[0433] 试剂:SKBR3细胞(ATCC, Cat No. HTB-30), McCoy's 5A (Invitrogen, Cat No. 22400, Lot No. 747809), RPMI-1640 (Invitrogen, Cat No. 11835, Lot No. 764956), FCS (Hyclone, Cat No. SH30084.03, Lot No. GRH0054), Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Cat No. 17-1440-02), 96孔板(Costar, Cat No. 3599, Cat No. 3916), 台盼蓝(Invitrogen Cat No. 15250-061), LDH试剂盒(Promega, Cat No. G7891), ELISA测读仪MD5 (Molecule device)。人源化抗体Herceptin<sup>®</sup> (Genentech Corporation, South San Francisco, CA; 商品名曲妥珠单抗)在使用前复溶于水中以制成10mg/ml原液。

[0434] 为了确定与高效负载的 TLRL 偶联的曲妥珠单抗是否仍然具有效应功能,检测几种不同偶联形式的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)活性并且与已显示出具有显著提高的 ADCC 活性的曲妥珠单抗参比材料相比。使用来自于健康供体的外周血单核细胞(PBMC)作为效应细胞、使用人 SKBR3 细胞系作为靶细胞进行 ADCC 分析。第一天,将  $1 \times 10^4/100 \mu\text{L}$  SKBR3 细胞接种于 96 孔平板上,随后在  $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  条件下,孵育 48 小时。

[0435] 在第三天,由从健康自愿供体获得的人血液制备新鲜的人 PBMC。人静脉血样品收集在柠檬酸铵(ACD-A)管中。将管颠倒数次,将全部血液转移至一个 50ml 圆锥管中。用 2%FBS 中的 PBS 以 1:3 稀释血液。将 Ficoll-Hypaque 缓慢分配至血液/PBS 混合物底部。在室温下以 2400rpm 的速度对样品进行离心分离持续 30 分钟,随后通过抽吸除去上层(血浆/PBS)。血沉层(Buffy coat)用无菌移液管收集并汇集在 50ml 圆锥管中。如果在血沉层下仍然可见 WBC 块,那么收集所有 WBC 物质,小心不要除去过多的 Ficoll-Hypaque。加入无菌 PBS-2%FBS 并通过倒置混合。在室温、 $250 \times g$  的条件下对稀释的 PBMC 悬浮液进行离心分离持续 20 分钟,收集细胞小粒。PBMC 小粒悬浮于具有 2% 热灭活的 FBS 的 RPMI-1640 培养基,洗涤并通过台盼蓝排除法检查活细胞数。制备  $1.2 \times 10^7$  细胞/mL 的密度待用。同时,在 RPMI-1640 中制备抗体的最终浓度为从  $12 \mu\text{g/mL}$ 、 $4 \mu\text{g/mL}$ 、 $1.2 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.4 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.12 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.04 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.012 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.004 \mu\text{g/mL}$  至  $0 \mu\text{g/mL}$ 。

[0436] 随后将一系列测试抗体和对照抗体的稀释液加至含有靶细胞的孔中,将  $50 \mu\text{L}$  RPMI-1640 培养基中的 PBMC 效应细胞加至每个孔中(效应细胞与靶细胞的比例为 60:1),并且再孵育 17 小时。在孵育结束时对平板进行离心处理并使用 LDH 测量试剂盒分析上清液中的乳酸盐脱氢酶(LDH)活性。细胞溶解使用酶标仪通过 490nm 处的吸光度定量。仅含有靶细胞的孔的吸光度作为背景对照,而含有用 Triton-X100 溶解的靶细胞的孔提供最大可获得信号。非抗体依赖性细胞毒性在含有靶细胞和效应细胞而未加入抗体的孔中测量。细胞毒性根据下列方程计算:

[0437]  $\% \text{ 细胞毒性} = 100\% \times [\text{A}_{490\text{nm}}(\text{样品}) - \text{A}_{490}(\text{靶细胞}) - \text{A}_{490}(\text{效应细胞})] / [\text{A}_{490\text{nm}}(\text{溶解的靶细胞}) - \text{A}_{490\text{nm}}(\text{靶细胞})]$

[0438] 相对于抗体浓度绘制一式两份样品稀释液中的平均 ADCC 值,并且通过拟合至 Prism5 (GraphPad) 得到 EC50 值和 ADCC (%) 最大程度。

[0439] 从 PBMC 中富集人树突细胞(DC)

[0440] 通过 Ficoll 离心,由从健康的自愿供体中获得的血沉层制备人 PBMC。通过使用负向消减,由具有来自人 PBMC 的抗 CD3 抗体、抗 CD19 抗体、抗 CD20 抗体、抗 CD14 抗体和抗 CD16 抗体的混合物的磁珠(Miltenyi Biotec)富集树突细胞。用山羊抗小鼠 FITC (谱系)、HLA-DR-APCCy7、CD123-BV421 和 CD11C-APC 对富集的 DC 进行染色。染色的细胞在 BD LSR Fortessa 上进行分析。抗 CD3 单克隆抗体、抗 CD4 单克隆抗体、抗 CD11C 单克隆抗体、抗 CD19 单克隆抗体、抗 CD14 单克隆抗体、抗 CD16 单克隆抗体、抗 CD123 单克隆抗体购自 BD Biosciences 或 Biolgend。

[0441] 图 3A 表示富集前后 DC 的百分数。上部的两个图中的数字表示谱系消减前后总细胞的 DC (HLA-DR+Lin-) 百分数。下部图中的数字表示谱系消减前后总 DC 的 mDC (CD11C+CD123-) 和 pDC (CD123+CD11C-) 的百分数。

[0442] 对富集的人 DC 的刺激以及细胞因子表达

[0443] 将  $1-2 \times 10^5$  富集的 DC 接种于  $100 \mu\text{l}$  培养基中的 96 孔平板中, 将  $100 \mu\text{l}$  稀释的刺激剂加至平板中并在  $37^\circ\text{C}$  的孵育器中培养 20 至 22 小时。收集上清液并通过 ELISA (Mabtech AB) 分析人 IFN- $\alpha$ , IL-6, IL-12(p70) 和 TNF- $\alpha$ 。

[0444] 统计学分析

[0445] 所有比较的显著性使用 Student 双尾 t 检测计算, 假设模拟组和样品组之间的方差不相等, 当  $p < 0.05$  时认为结果是显著的。参数之间的相关性使用斯皮尔曼秩相关测试评价, P 值  $< 0.05$  被认为是统计学上显著的。

[0446] 使用曲妥珠单抗 TLRL 偶联物或西妥昔单抗 TLRL 偶联物进行体内肿瘤细胞杀伤试验

[0447] 对于源自患者的胃癌异种移植物 (PDX) 小鼠模型的研究而言, 将 6 至 8 周龄的雌性 Balb/c 裸鼠 (获自 SLAC, Shanghai, China) 用于肿瘤碎片移植。根据动物护理和使用委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee) 的实验室动物护理和使用指南和规程, 用正常裸鼠饮食饲养动物并且将动物养在 SPF 动物设施中。将尺寸为约  $15\text{mm}^3$  至  $30\text{mm}^3$  的患者 ST0#69 胃肿瘤碎片移植 (皮下地) 到 Balb/c 裸鼠的右侧。

[0448] 对于肺癌异种移植物模型的研究而言, 将 6 至 8 周龄的雌性 Balb/c 裸鼠用于肿瘤碎片移植。在含有 10% 血清的 RPMI-1640 培养基中培养人肺癌细胞系 H1650 (ATCC, Cat. #CRL5883), 并且将其移植 (皮下地) 到 Balb/c 裸鼠的右侧。每个小鼠每次接种接受  $100 \mu\text{l}$  基底膜中的  $2 \times 10^6$  个细胞。

[0449] 通过静脉注射途径给药含有  $5\text{mg}/\text{kg}$  至  $20\text{mg}/\text{kg}$  抗体的药物或含有  $20\text{mg}/\text{kg}$  特罗凯 (Tarceva) 或参比药物 (QWKx3) 的药物。通过卡尺每周测量一次肿瘤以确定其皮下生长。用卡尺每周测量两次肿瘤的二维尺寸。使用如下方程式计算肿瘤体积: 肿瘤体积 = (长度  $\times$  宽度  $^2$ )  $\times 0.5$ 。平均肿瘤体积或体重使用画图程序 Prism5 (GraphPad) 绘制。效力研究的终点设置在第一次治疗后 30 天至 45 天或者当肿瘤尺寸达到  $2000\text{mm}^3$  以上时 (无论哪个先达到)。如果小鼠失去超过 20% 的体重或者病得很重并且无法得到足够的食物或水, 那么将其从研究中除去并实施安乐死。在终点收集小鼠的肿瘤, 在  $\text{LN}_2$  中半冷冻并在福尔马林中半固定, 用于制备 FFPE 组织。

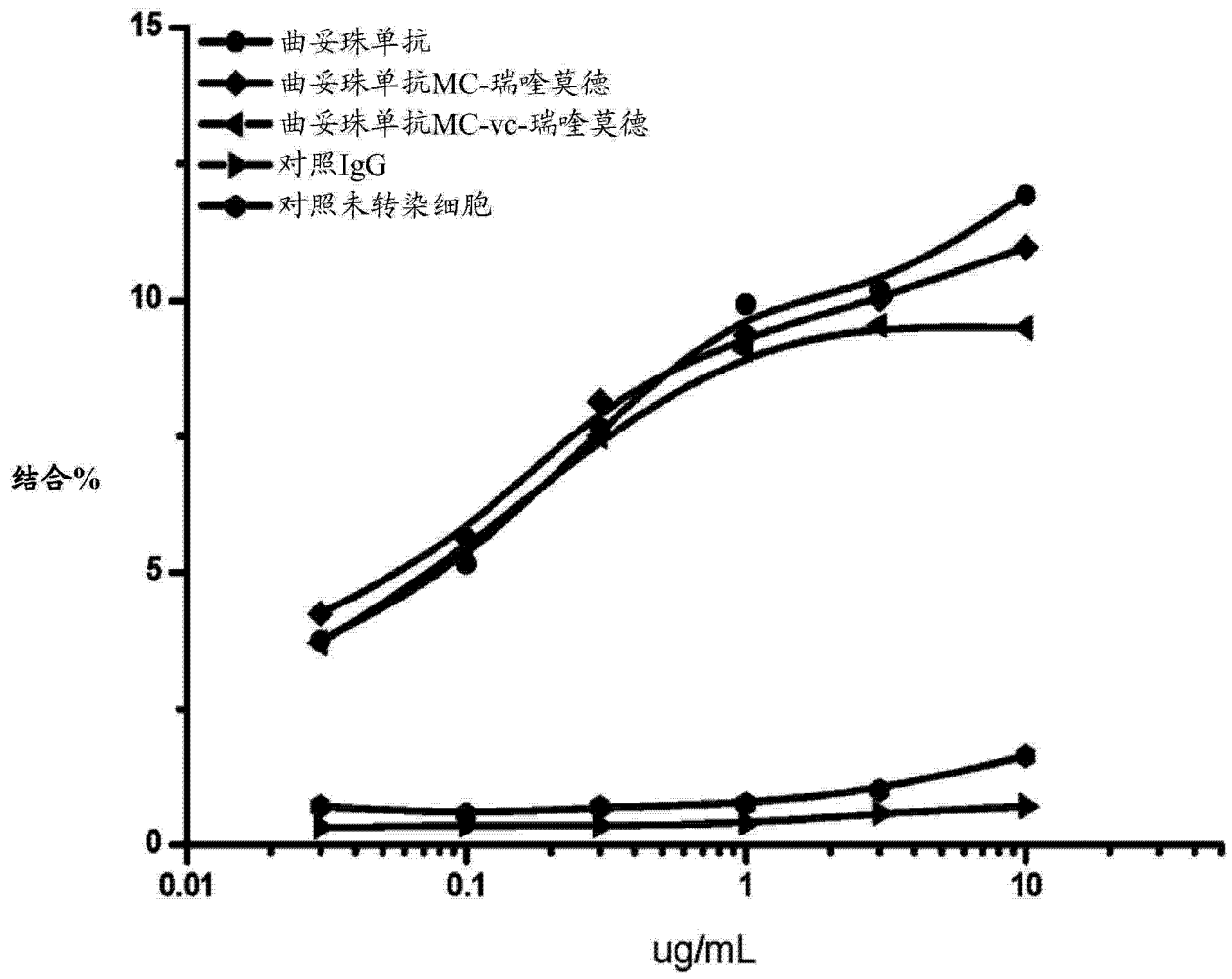


图 1



ADCC 分析

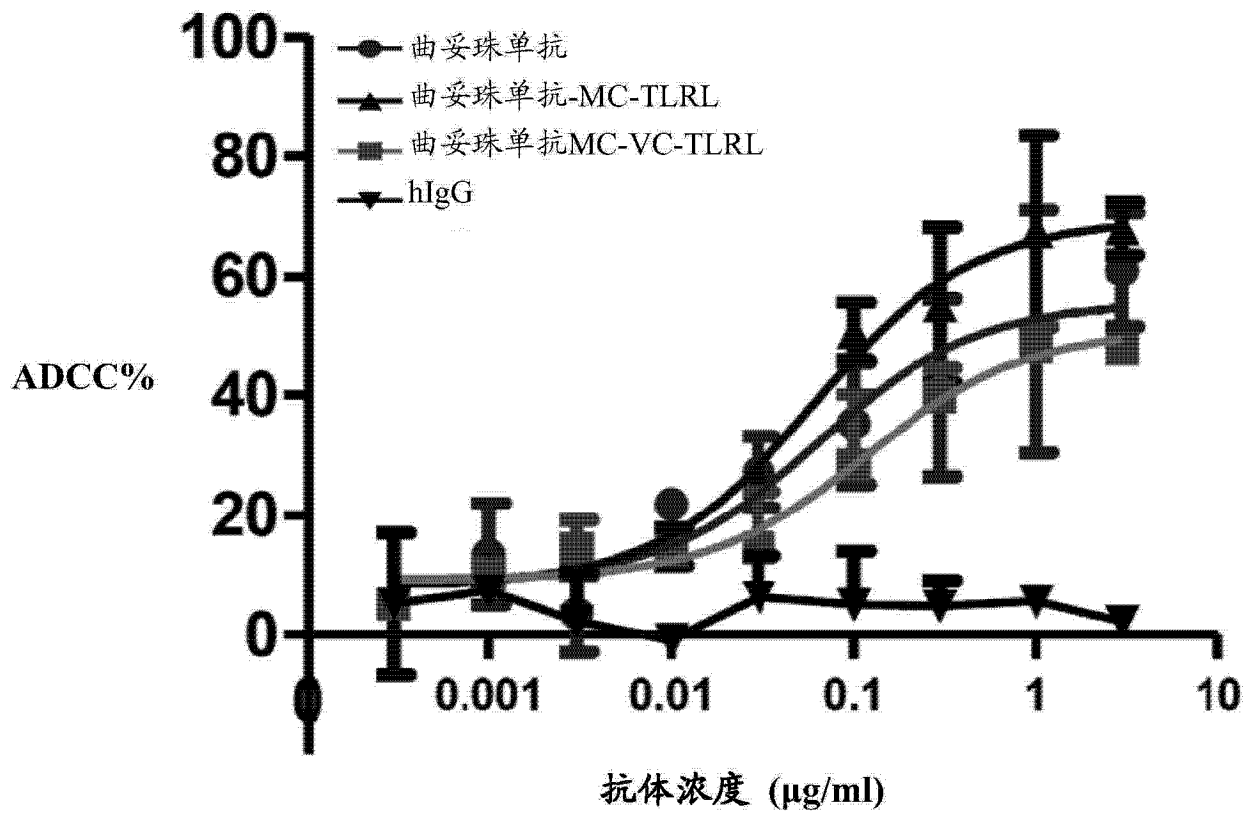


图 2

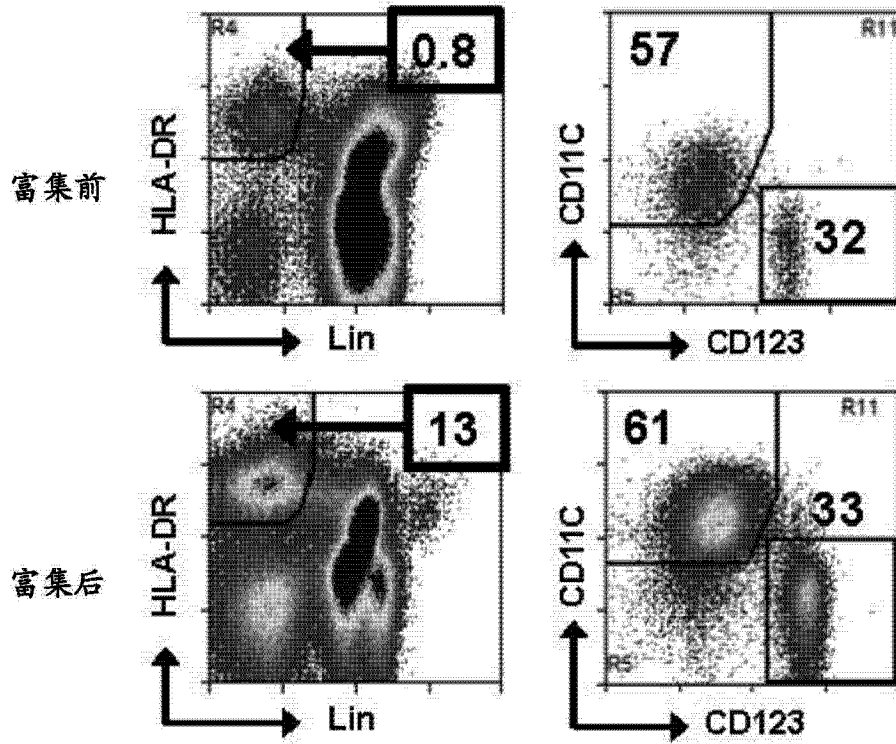


图 3A

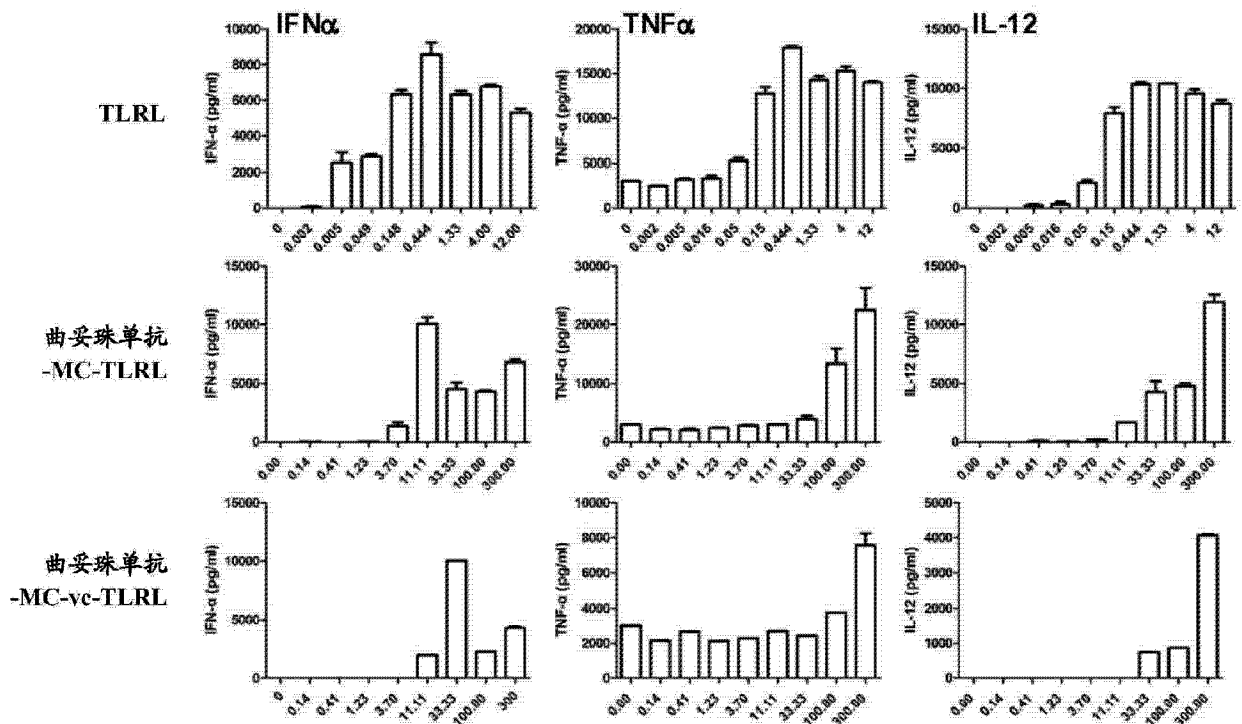


图 3B

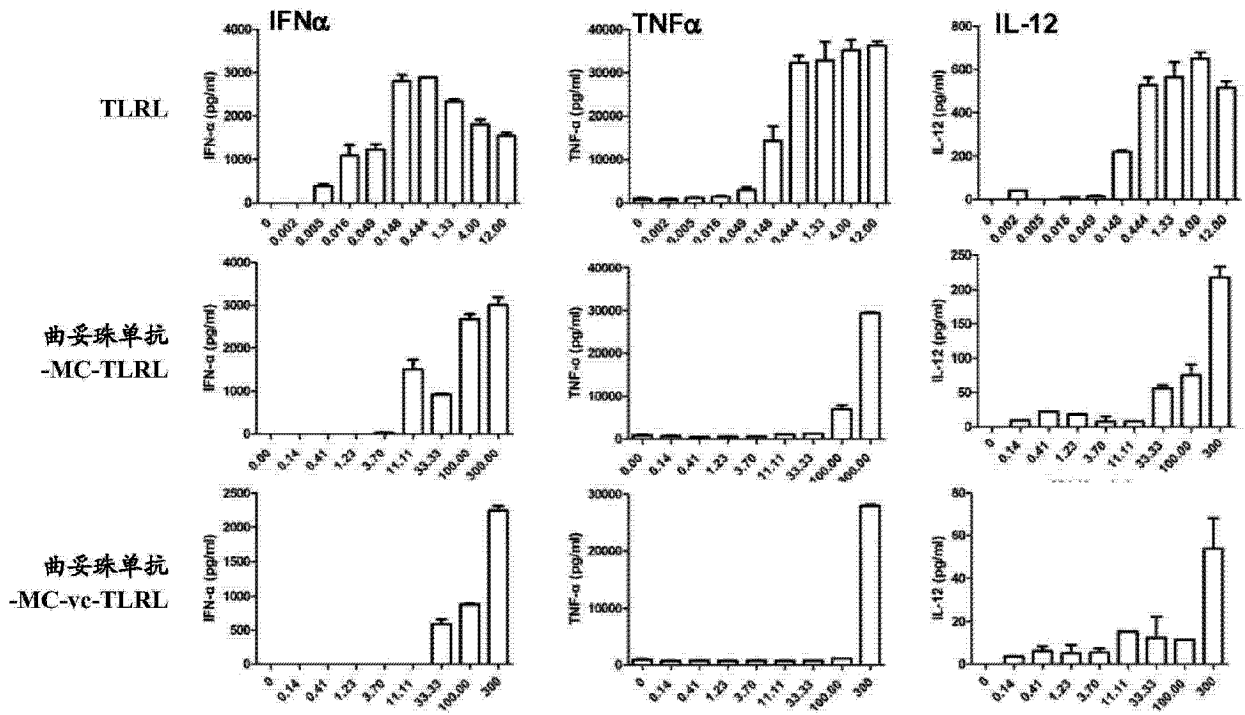


图 3C

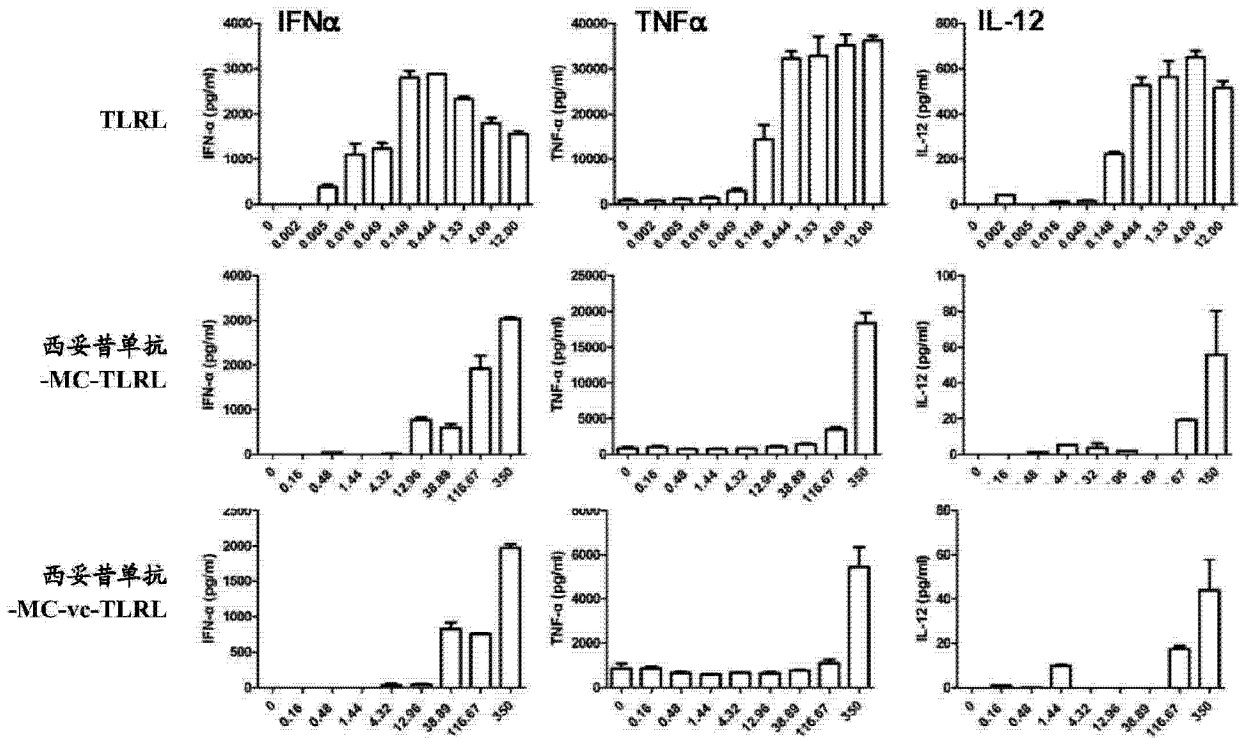


图 3D

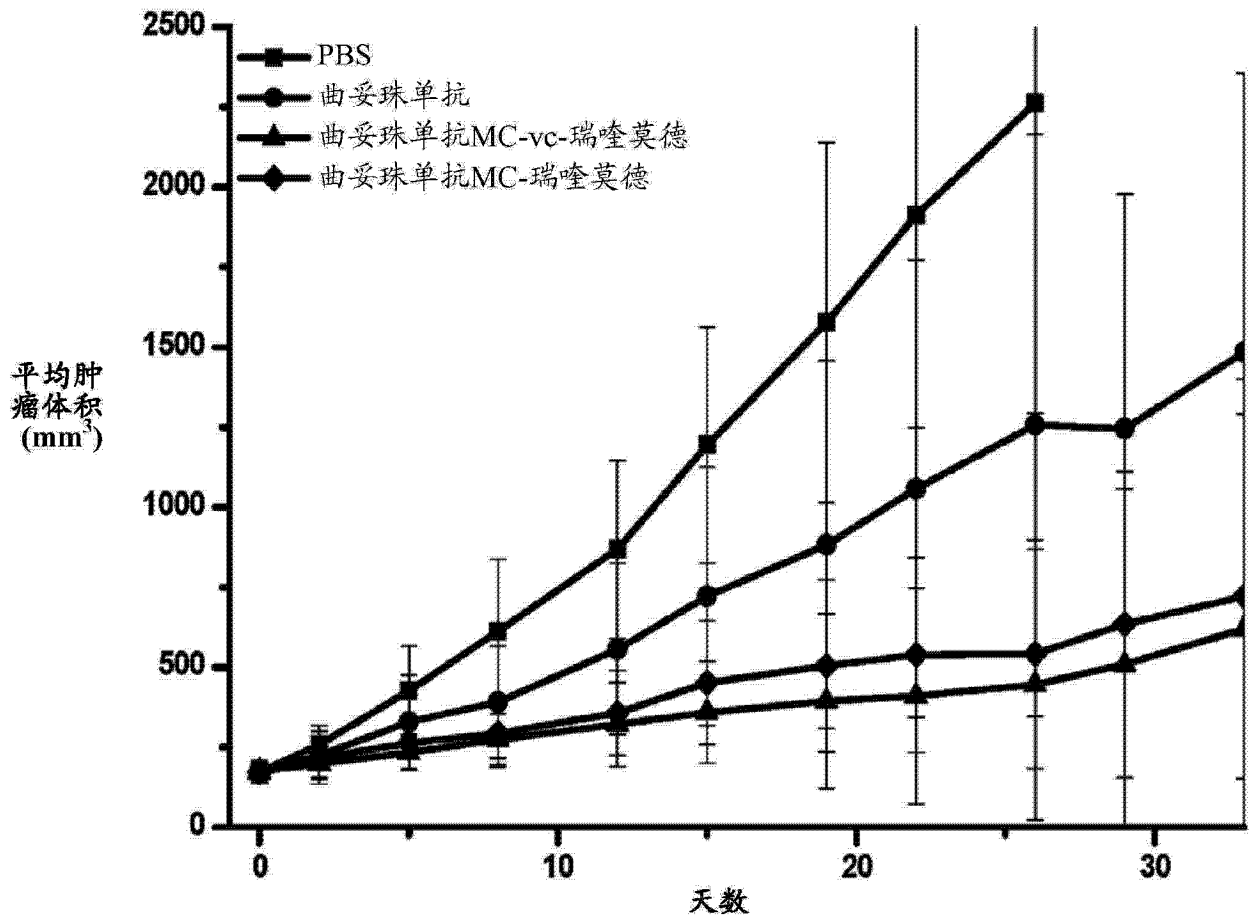


图 4A

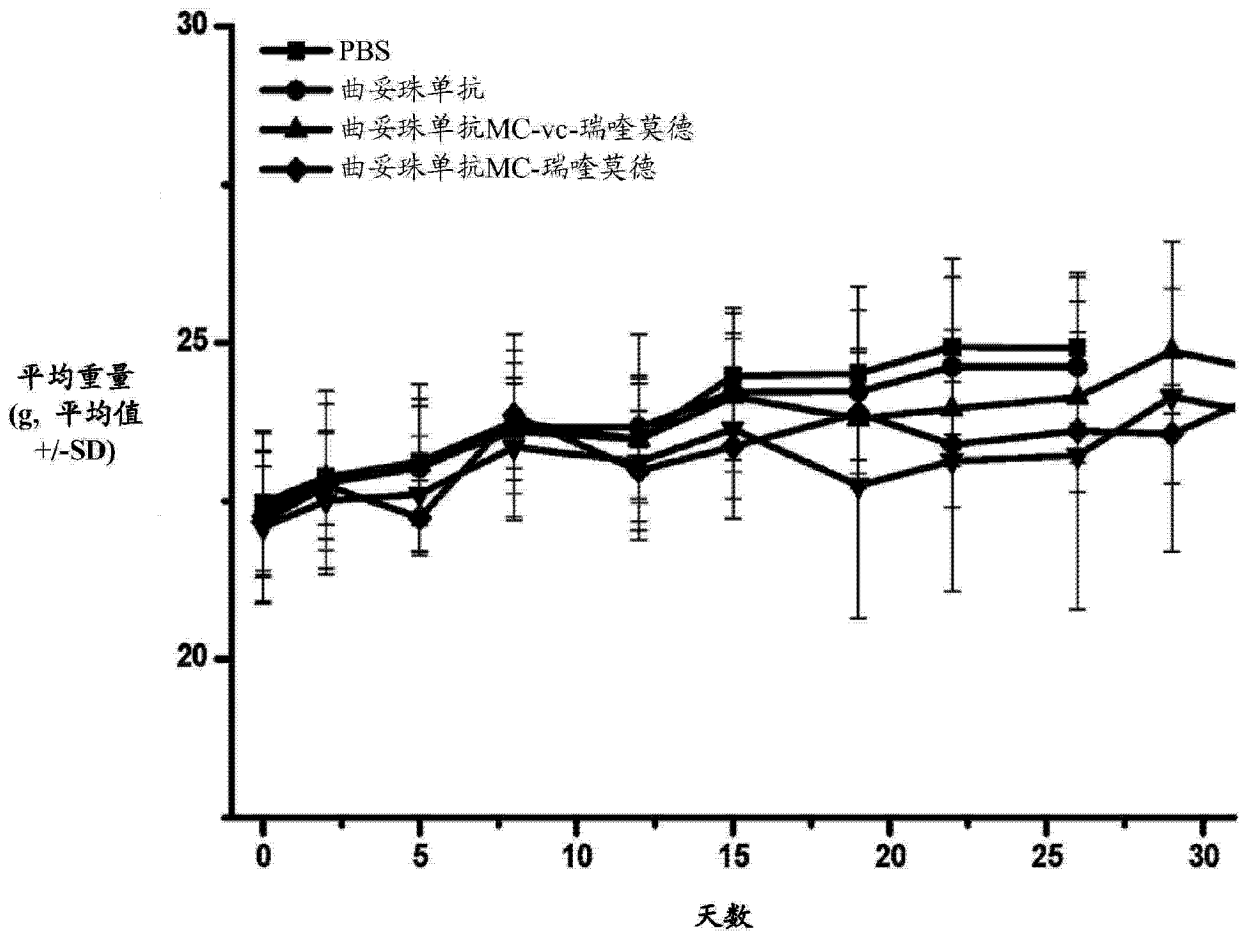


图 4B

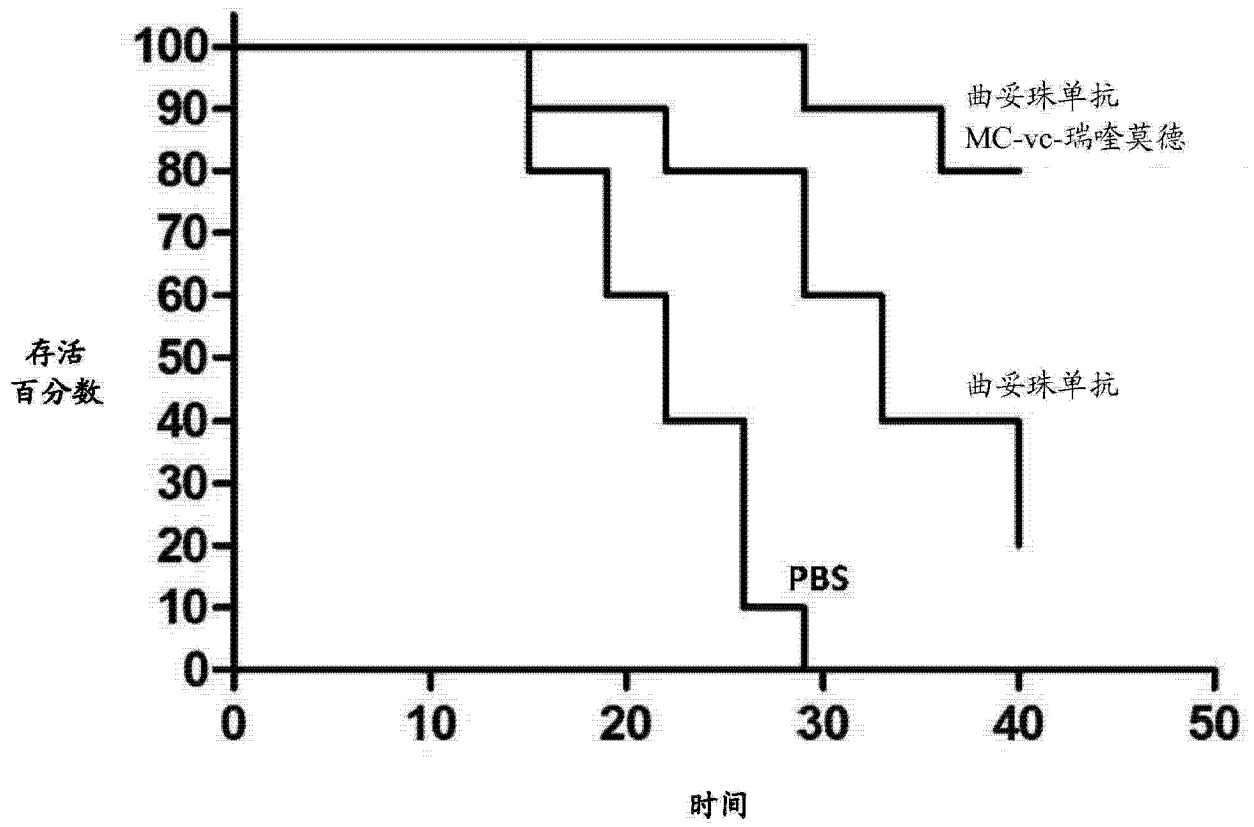


图 4C

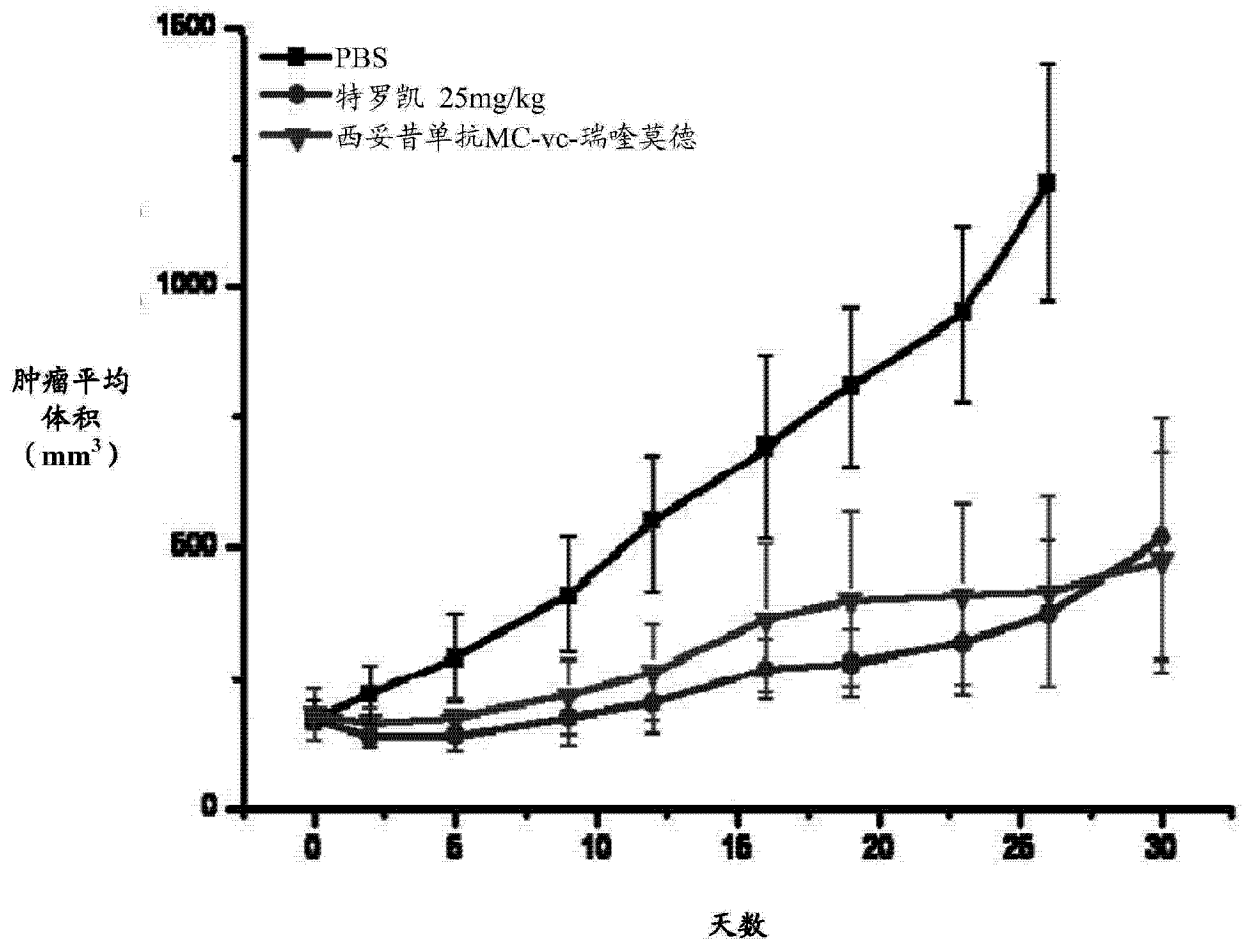


图 5A

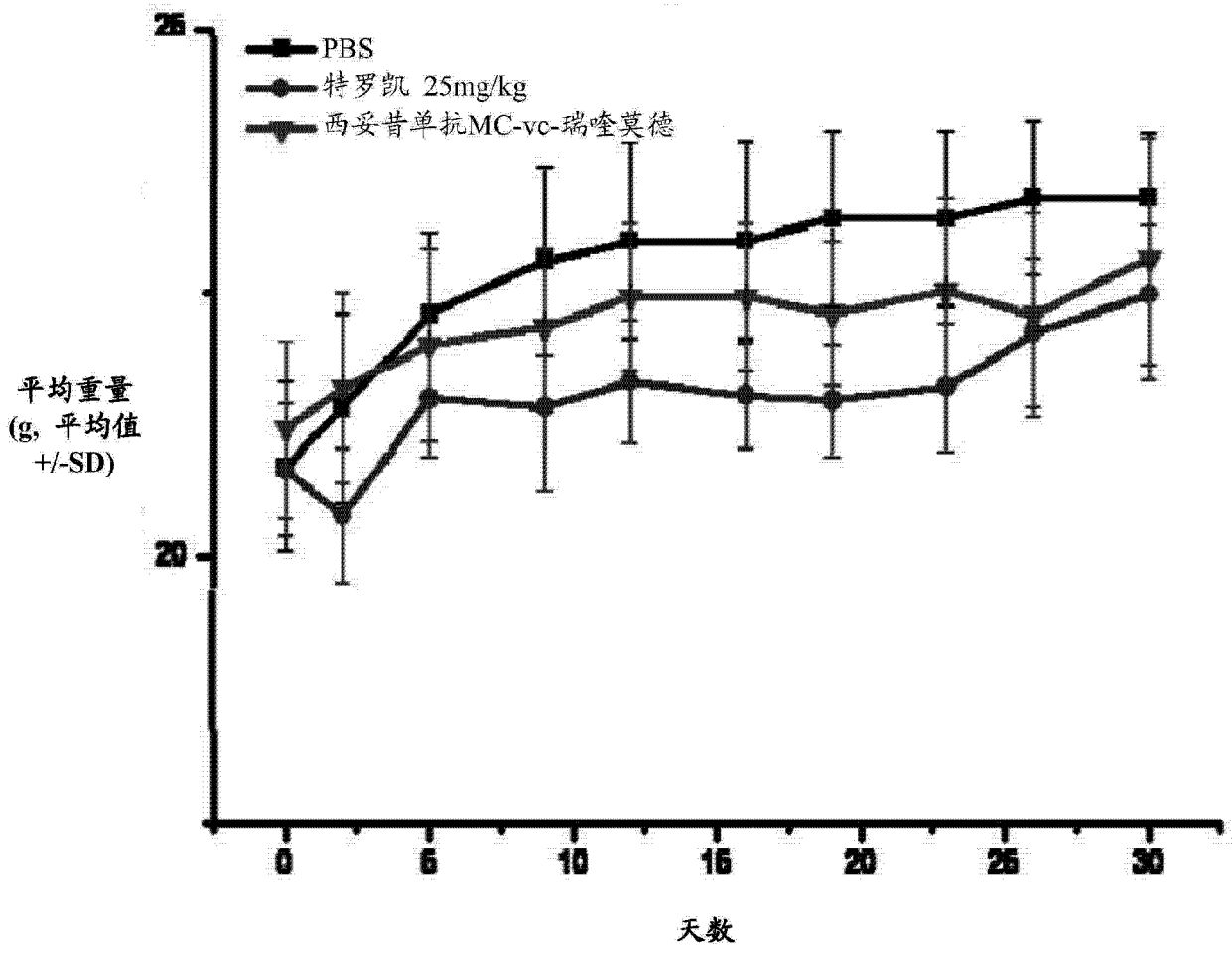


图 5B