

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910173556.X

[51] Int. Cl.

C07D 487/04 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/42 (2006.01)
C07K 14/765 (2006.01)
A61K 31/407 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 3 月 17 日

[11] 公开号 CN 101671335A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 38/38 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[22] 申请日 2002.5.31

[21] 申请号 200910173556.X

分案原申请号 02802159.2

[30] 优先权

[32] 2001.5.31 [33] US [31] 60/295,196

[32] 2001.5.31 [33] US [31] 60/295,259

[32] 2001.5.31 [33] US [31] 60/295,342

[32] 2001.7.11 [33] US [31] 60/304,908

[71] 申请人 梅达莱克斯公司

地址 美国新泽西

[72] 发明人 H·P·恩格 D·P·C·麦克吉

伍国贤 李志宏 S·甘格沃

O·L·萨恩德斯 V·马逊施诺克

I·阿斯塔菲瓦 J·莫勒

G·T·雅兰顿 D·J·金

S·博伊德 T·J·罗布尔

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 唐晓峰

权利要求书 29 页 说明书 74 页 附图 28 页

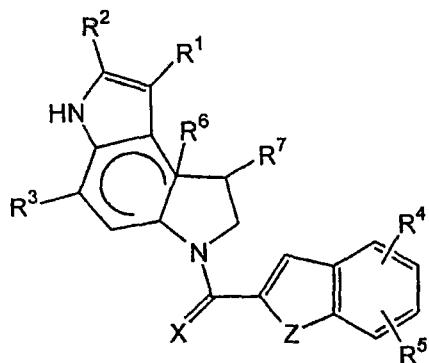
[54] 发明名称

细胞毒素、其有用的前体药物、连接基团和
稳定剂

[57] 摘要

本发明提供细胞毒素 duocarmycin 的类似物，其
有用的前体药物、连接基团和稳定剂。还提供了体
内裂解的肽基和二硫化物连接基团。连接基团可
用于生成本发明细胞毒素以及其他诊断和治疗部分的
前体药物和缀合物。本发明提供带有本发明连接基
团臂的 duocarmycin 类似物的前体药物和缀合物。

1、具有下列结构的化合物：



其中

X 是 O 并且 Z 独立选自 O 和 NR²³,

其中

R²³ 是选自 H、取代或未取代的 C₁₋₆ 杂烃基的成员；

R¹ 是 CO₂CH₃,

R² 是 H、或取代或未取代的 C₁₋₆ 烃基；

R³ 是选自 (=O) 和 OR¹¹ 的成员，

其中

R¹¹ 是选自 H、C(O)R¹²、C(O)OR¹²、C(O)NR¹²R¹³、P(O)(OR¹²)₂、和 SiR¹²R¹³R¹⁴ 的成员，

其中

R¹²、R¹³ 和 R¹⁴ 是独立选自 H、取代或未取代的 C₁₋₂₄ 烃基、取代或未取代的 C₁₋₂₄ 杂烃基和取代或未取代的 1-3 环芳基的成员，其中 R¹² 和 R¹³ 与它们所连接的氮原子一起可选地连接构成 4 至 6 元取代或未取代的杂环烃基环系，可选地含有两个或多个杂原子，并且一个或多个 R¹²、R¹³ 和 R¹⁴ 可选地包含酶可裂解的基团；

R⁴ 和 R⁵ 是独立选自 H、NO₂、NR¹⁵R¹⁶、NHC(O)R¹⁵、和 OR¹⁵ 的成员，

其中

R^{16} 是H，并且 R^{15} 独立地选自H、取代或未取代的C₁₋₂₄烃基、取代或未取代的C₁₋₂₄杂烃基、取代或未取代的1-3环芳基、取代或未取代的具有选自N、O和S的1-4个杂原子的1-3环杂芳基、和取代或未取代的肽基，

R^6 是单键，它可以存在也可以不存在，当存在时， R^6 和 R^7 连接构成环丙基环；并且

R^7 是CH₂-X¹或-CH₂-，在所述环丙基环内与 R^6 连接，其中X¹是卤素，并且

其中所述取代的烃基、取代的杂烃基和取代的杂环烃基被-OR'、=O、=NR'、=N-OR'、NR'R''、SR'、-卤素、SiR'R''R'''、OC(O)R'、C(O)R'、CO₂R'、CONR'R''、OC(O)NR'R''、NR''C(O)R'、NR'-C(O)NR''R'''、NR''C(O)₂R'、NR-C(NR'R'')=NR'''、-NR-C(NR'R'')=NR'''、-S(O)R'、S(O)₂R'、-NR'R''、-NRSO₂R'、CN和-NO₂中的一个或多个取代，其中R'、R''、R'''和R''''各自优选地独立指氢、取代或未取代的C₁₋₂₄杂烃基、取代或未取代的1-3环芳基、取代或未取代的C₁₋₂₄烃基、烃氨基或硫代烃氨基或C₁₋₂₄芳基烃基，

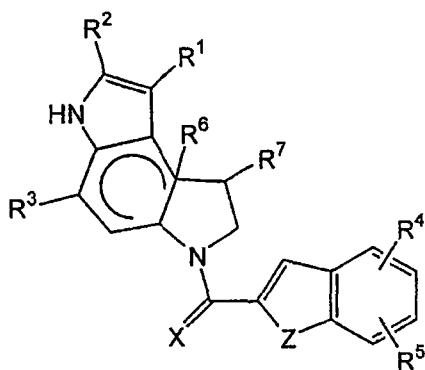
并且当所述取代的芳基和取代的杂芳基被卤素、OR'、=O、=NR'、=N-OR'、NR'R''、SR'、卤素、SiR'R''R'''、OC(O)R'、C(O)R'、CO₂R'、CONR'R''、OC(O)NR'R''、NR''C(O)R'、NR'-C(O)NR''R'''、NR''CO₂R'、-NR-C(NR'R'')=NR'''、S(O)R'、SO₂R'、SO₂NR'R''、NROR'、CN和-NO₂、R'、-N₃、CH(ph)₂、氟(C₁-C₄)烃氨基和氟(C₁-C₄)烃基中的一个或多个取代时，其中R'、R''、R'''和R''''独立地选自氢、(C₁-C₈)烃基和杂烃基、未取代的芳基和杂芳基、(未取代的芳基)-(C₁-C₄)烃基和(未取代的芳基)氨基-(C₁-C₄)烃基。

2、根据权利要求1的化合物，其中R²不是CF₃。

3、根据权利要求1的化合物，其中R⁷是Cl或Br。

4、根据权利要求1的化合物，其中R²是CH₃。

5、具有下列结构的化合物：



其中

X是O，并且Z选自O和NR²³，

其中

R²³是选自H、取代或未取代的C₁₋₆杂烃基成员；

R¹是H、取代或未取代的C_{1-C₆}烃基、或C(O)OR⁹，其中R⁹是H、取代或未取代的C_{1-C₂₄}烃基；

R²是CH₃；

R³是选自(=O)和OR¹¹的成员，

其中

R¹¹是选自H、C(O)R¹²、C(O)OR¹²、C(O)NR¹²R¹³、P(O)(OR¹²)₂、和SiR¹²R¹³R¹⁴的成员，

其中

R¹²、R¹³和R¹⁴是独立选自H、取代或未取代的C₁₋₂₄烃基、取代或未取代的C₁₋₂₄杂烃基和取代或未取代的1-3环芳基的成员，其中R¹²和R¹³与它们所连接的氮原子一起可选地连接构成6元取代或未取代的杂环烃基环系，可选地含有两个或多个氮原子，并且一个或多个R¹²、R¹³和R¹⁴可选地包含酶可裂解的基团；

R⁴和R⁵是独立选自H、NO₂、NR¹⁵R¹⁶、NHC(O)R¹⁵、和OR¹⁵的成员，

其中

R¹⁶是H，并且R¹⁵是H、取代或未取代的C₁₋₂₄烃基、取代或未

取代的 C₁₋₂₄ 杂烃基、取代或未取代的 1-3 环芳基、取代或未取代的 1-3 环杂芳基、取代或未取代的肽基；

R⁶ 是单键，它可以存在也可以不存在，当存在时，R⁶ 和 R⁷ 连接构成环丙基环；并且

R⁷ 是 CH₂-X¹ 或 -CH₂-，在所述环丙基环内与 R⁶ 连接，其中 X¹ 是卤素、并且

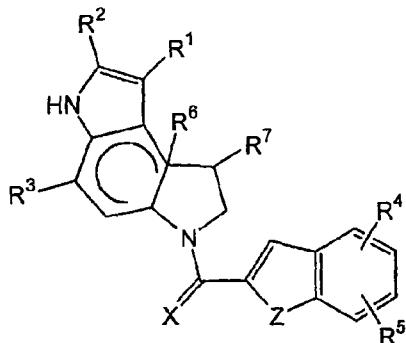
其中所述取代的烃基、取代的杂烃基和取代的杂环烃基被-OR'、=O、=NR'、=N-OR'、NR'R''、SR'、-卤素、SiR'R''R'''、OC(O)R'、C(O)R'、CO₂R'、CONR'R''、OC(O)NR'R''、NR''C(O)R'、NR'-C(O)NR''R'''、NR''C(O)₂R'、NR-C(NR'R'')=NR'''、-NR-C(NR'R'')=NR'''、-S(O)R'、S(O)₂R'、-NR'R''、-NRSO₂R'、CN 和-NO₂ 中的一个或多个取代，其中 R'、R''、R''' 和 R'''' 各自优选地独立指氢、取代或未取代的 C₁₋₂₄ 杂烃基、取代或未取代的 1-3 环芳基、取代或未取代的 C₁₋₂₄ 烃基、烃氧基或硫代烃氧基或 C₁₋₂₄ 芳基烃基，并且当所述取代的芳基和取代的杂芳基被卤素、OR'、=O、=NR'、=N-OR'、NR'R''、SR'、卤素、SiR'R''R'''、OC(O)R'、C(O)R'、CO₂R'、CONR'R''、OC(O)NR'R''、NR''C(O)R'、NR'-C(O)NR''R'''、NR''CO₂R'、-NR-C(NR'R'')=NR'''、S(O)R'、SO₂R'、SO₂NR'R''、NROR'、CN 和-NO₂、R'、-N₃、CH(ph)₂、氟(C₁-C₄)烃氧基和氟(C₁-C₄)烃基中的一个或多个取代时，其中 R'、R''、R''' 和 R'''' 独立地选自氢、(C₁-C₈)烃基和杂烃基、未取代的芳基和杂芳基、(未取代的芳基)-(C₁-C₄)烃基和(未取代的芳基)氨基-(C₁-C₄)烃基。

6、根据权利要求 5 的化合物，其中 R¹ 是 CO₂CH₃，R² 是 CH₃。

7、根据权利要求 6 的化合物，其中 R⁴ 和 R⁵ 是独立选自 H、NH₂ 和 NO₂ 的成员。

8、根据权利要求 1 的化合物，其中 R⁴ 和 R⁵ 中至少一个不是选自 H 和 OCH₃ 的成员。

9、具有下列结构的化合物：



其中

X是O，并且Z选自O和NR²³，

其中

R²³是选自H、取代或未取代的C₁₋₆杂烃基；

R¹是H、取代或未取代的C₁₋₆烃基、或C(O)R⁹，其中R⁹是H、或取代或未取代的C₁₋₂₄烃基；

R²是H、或取代或未取代的C₁₋₆烃基；

R³是选自(=O)和OR¹¹的成员，

其中

R¹¹是选自H、C(O)R¹²、C(O)OR¹²、C(O)NR¹²R¹³、P(O)(OR¹²)₂、和SiR¹²R¹³R¹⁴的成员，

其中

R¹²、R¹³和R¹⁴是独立选自H、取代或未取代的C₁₋₂₄烃基、取代或未取代的C₁₋₂₄杂烃基和取代或未取代的1-3环芳基的成员，其中R¹²和R¹³与它们所连接的氮原子一起可选地连接构成6元取代或未取代的杂环烃基环系，可选地含有两个或多个氮原子，并且一个或多个R¹²、R¹³和R¹⁴可选地包含酶可裂解的基团；

R⁴和R⁵是独立选自H、NO₂、NR¹⁵R¹⁶、NHC(O)R¹⁵、和OR¹⁵的成员，

其中

R¹⁶是氢和R¹⁵独立地选自H、取代或未取代的C₁₋₂₄烃基、取代或未取代的C₁₋₂₄杂烃基、取代或未取代的1-3环芳基、取代或未取代

的 1-3 环杂芳基、取代或未取代的肽基；

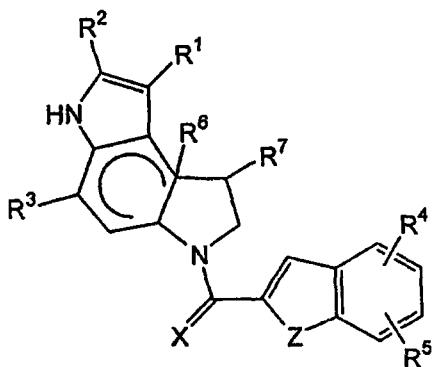
R^6 是单键，它可以存在也可以不存在，当存在时， R^6 和 R^7 连接构成环丙基环；并且

R^7 是 CH_2-X^1 或 $-CH_2-$ ，在所述环丙基环内与 R^6 连接，其中 X^1 是卤素；

其中所述取代的烃基、取代的杂烃基和取代的杂环烃基被- OR' 、 $=O$ 、 $=NR'$ 、 $=N-OR'$ 、 $NR'R''$ 、 SR' 、-卤素、 $SiR'R''R'''$ 、 $OC(O)R'$ 、 $C(O)R'$ 、 CO_2R' 、 $CONR'R''$ 、 $OC(O)NR'R''$ 、 $NR''C(O)R'$ 、 $NR'-C(O)NR''R'''$ 、 $NR''C(O)_2R'$ 、 $NR-C(NR'R'')=NR''''$ 、 $-NR-C(NR'R'')=NR'''$ 、 $-S(O)R'$ 、 $S(O)_2R'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-NRSO_2R'$ 、 CN 和 $-NO_2$ 中的一个或多个取代，其中 R' 、 R'' 、 R''' 和 R'''' 各自优选地独立指氢、取代或未取代的 C_{1-24} 杂烃基、取代或未取代的 1-3 环芳基、取代或未取代的 C_{1-24} 烃基、烃氧基或硫代烃氧基或 C_{1-24} 芳基烃基，并且当所述取代的芳基和取代的杂芳基被卤素、 OR' 、 $=O$ 、 $=NR'$ 、 $=N-OR'$ 、 $NR'R''$ 、 SR' 、卤素、 $SiR'R''R'''$ 、 $OC(O)R'$ 、 $C(O)R'$ 、 CO_2R' 、 $CONR'R''$ 、 $OC(O)NR'R''$ 、 $NR''C(O)R'$ 、 $NR'-C(O)NR''R'''$ 、 $NR''CO_2R'$ 、 $-NR-C(NR'R'')=NR''''$ 、 $S(O)R'$ 、 SO_2R' 、 $SO_2NR'R''$ 、 $NROR'$ 、 CN 和 $-NO_2$ 、 R' 、 $-N_3$ 、 $CH(ph)_2$ 、氟(C_1-C_4)烃氧基和氟(C_1-C_4)烃基中的一个或多个取代时，其中 R' 、 R'' 、 R''' 和 R'''' 独立地选自氢、(C_1-C_8)烃基和杂烃基、未取代的芳基和杂芳基、(未取代的芳基)-(C_1-C_4)烃基和(未取代的芳基)氨基-(C_1-C_4)烃基，并且

其中 R^4 、 R^5 、 R^{15} 和 R^{16} 至少一个包含可裂解的二硫化物基团。

10、具有下列结构的化合物：



其中

X 是 O，并且 Z 选自 O 和 NR²³，

其中

R²³ 是选自 H、取代或未取代的 C₁₋₆ 杂烃基；

R¹ 是 H、取代或未取代的 C₁₋₆ 烃基、或 C(O)R⁹，其中 R⁹ 是 H、或取代或未取代的 C₁₋₂₄ 烃基；

R² 是 H、或取代或未取代的 C₁₋₆ 烃基；

R³ 是选自 (=O) 和 OR¹¹ 的成员，

其中

R¹¹ 是选自 H、C(O)R¹²、C(O)OR¹²、C(O)NR¹²R¹³、P(O)(OR¹²)₂、和 SiR¹²R¹³R¹⁴ 的成员，

其中

R¹²、R¹³ 和 R¹⁴ 是独立选自 H、取代或未取代的 C₁₋₂₄ 烃基、取代或未取代的 C₁₋₂₄ 杂烃基和取代或未取代的 1-3 环芳基的成员，其中 R¹² 和 R¹³ 与它们所连接的氮原子一起可选地连接构成 4 至 6 元取代或未取代的杂环烃基环系，可选地含有两个或多个氮原子，并且一个或多个 R¹²、R¹³ 和 R¹⁴ 可选地包含酶可裂解的基团；

R⁴ 和 R⁵ 是独立选自 H、NO₂、NR¹⁵R¹⁶、NHC(O)R¹⁵、和 OR¹⁵ 的成员，

其中

R¹⁶ 是 H，并且 R¹⁵ 选自 H、取代或未取代的 C₁₋₂₄ 烃基、取代或未取代的 C₁₋₂₄ 杂烃基、取代或未取代的 1-3 环芳基、取代或未取代的具有选自 N、O 和 S 的 1-4 个杂原子的 1-3 环杂芳基、取代或未取代的肽基；

R⁶ 是单键，它可以存在也可以不存在，当存在时，R⁶ 和 R⁷ 连接构成环丙基环；并且

R⁷ 是 CH₂-X¹ 或 -CH₂-，在所述环丙基环内与 R⁶ 连接，其中 X¹ 是

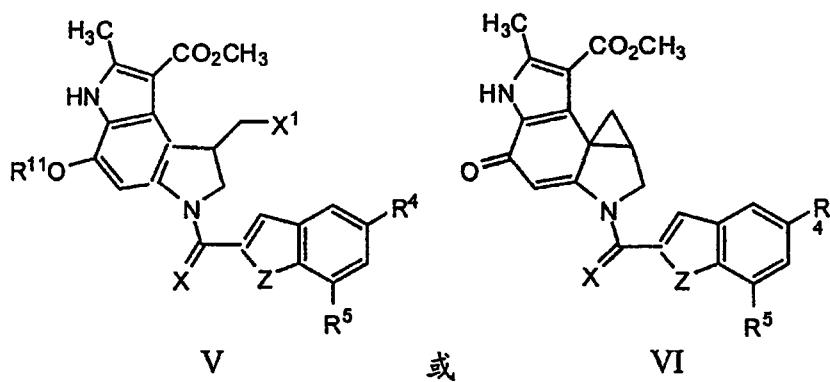
卤素，

其中所述取代的烃基、取代的杂烃基和取代的杂环烃基被-OR'、=O、=NR'、=N-OR'、NR'R''、SR'、-卤素、SiR'R''R'''、OC(O)R'、C(O)R'、CO₂R'、CONR'R''、OC(O)NR'R''、NR''C(O)R'、NR'-C(O)NR''R'''、NR''C(O)₂R'、NR-C(NR'R'')=NR''''、-NR-C(NR'R'')=NR'''、-S(O)R'、S(O)₂R'、-NR'R''、-NRSO₂R'、CN和-NO₂中的一个或多个取代，其中R'、R''、R'''和R''''各自优选地独立指氢、取代或未取代的C₁₋₂₄杂烃基、取代或未取代的1-3环芳基、取代或未取代的C₁₋₂₄烃基、烃氧基或硫代烃氧基或C₁₋₂₄芳基烃基，并且当所述取代的芳基和取代的杂芳基被卤素、OR'、=O、=NR'、=N-OR'、NR'R''、SR'、卤素、SiR'R''R'''、OC(O)R'、C(O)R'、CO₂R'、CONR'R''、OC(O)NR'R''、NR''C(O)R'、NR'-C(O)NR''R'''、NR''CO₂R'、-NR-C(NR'R'')=NR''''、S(O)R'、SO₂R'、SO₂NR'R''、NROR'、CN和-NO₂、R'、-N₃、CH(ph)₂、氟(C₁-C₄)烃氧基和氟(C₁-C₄)烃基中的一个或多个取代时，其中R'、R''、R'''和R''''独立地选自氢、(C₁-C₈)烃基和杂烃基、未取代的芳基和杂芳基、(未取代的芳基)-(C₁-C₄)烃基和(未取代的芳基)氧基-(C₁-C₄)烃基，并且

其中至少一个选自R⁴、R⁵、R¹⁵和R¹⁶的成员包含靶向剂或可检测的标记。

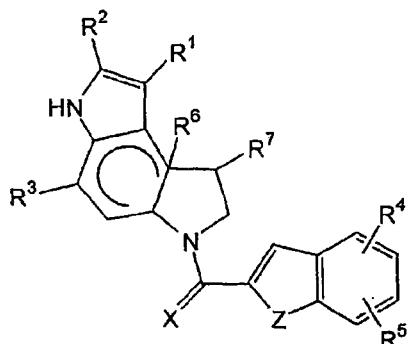
11、根据权利要求10的化合物，其中所述靶向剂是抗体。

12、根据权利要求6的化合物，具有下列结构：



13、根据权利要求 6 的化合物，其中 X 是 O，Z 是 O。

14、具有下列结构的化合物：



其中

X 是 O，并且 Z 选自 O 和 NR²³，

其中

R²³是选自 H、取代或未取代的 C₁₋₆ 杂烃基；

R¹是 H、取代或未取代的 C₁₋₆ 烃基或 C(O)R⁹，其中 R⁹是 H、或取代或未取代的 C₁₋₂₄ 烃基；

R²是 H、或取代或未取代的 C₁₋₆ 烃基；

R³是 OR¹¹；

R⁴和 R⁵是独立选自 H、NO₂、NR¹⁵R¹⁶、NHC(O)R¹⁵、和 OR¹⁵的成员；

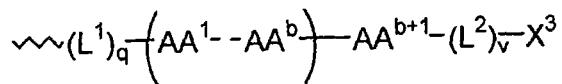
其中

R¹⁶是氢和 R¹⁵独立地选自 H、取代或未取代的 C₁₋₂₄ 烃基、取代或未取代的 C₁₋₂₄ 杂烃基、取代或未取代的 1-3 环芳基、取代或未取代的具有选自 N、O 和 S 的 1-4 个杂原子的 1-3 环杂芳基、取代或未取代的肽基；

R⁶是单键，它可以存在也可以不存在，当存在时，R⁶和 R⁷连接构成环丙基环；并且

R⁷是 CH₂-X¹或-CH₂-，在所述环丙基环内与 R⁶连接，其中 X¹是卤素，

其中 R¹¹ 是具有下列结构的肽基部分：



其中

X³ 是选自保护或未保护的反应性官能团、可检测的标记和靶向剂的成员；

L¹ 是连接基团，选自取代或未取代的 C₁₋₂₄ 烃基和取代或未取代的 C₁₋₂₄ 杂烃基；

AA¹、AA^b 和 AA^{b+1} 是独立选自天然与非天然 α-氨基酸的成员；

L² 是连接基团，选自取代或未取代的 C₁₋₂₄ 烃基和取代或未取代的 C₁₋₂₄ 杂烃基；

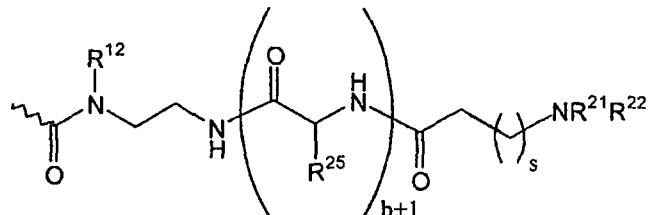
q 和 v 是独立选自 0 和 1 的整数；

b 是 0 至 20 的整数。

其中所述取代的烃基、取代的杂烃基和取代的杂环烃基被-OR'、=O、=NR'、=N-OR'、NR'R''、SR'、-卤素、SiR'R''R'''、OC(O)R'、C(O)R'、CO₂R'、CONR'R''、OC(O)NR'R''、NR''C(O)R'、NR'-C(O)NR''R'''、NR''C(O)₂R'、NR-C(NR'R'')=NR''''、-NR-C(NR'R'')=NR'''、-S(O)R'、S(O)₂R'、-NR'R''、-NRSO₂R'、CN 和-NO₂ 中的一个或多个取代，其中 R'、R''、R''' 和 R'''' 各自优选地独立指氢、取代或未取代的 C₁₋₂₄ 杂烃基、取代或未取代的 1-3 环芳基、取代或未取代的 C₁₋₂₄ 烃基、烃氧基或硫代烃氧基或 C₁₋₂₄ 芳基烃基，并且当所述取代的芳基和取代的杂芳基被卤素、OR'、=O、=NR'、=N-OR'、NR'R''、SR'、卤素、SiR'R''R'''、OC(O)R'、C(O)R'、CO₂R'、CONR'R''、OC(O)NR'R''、NR''C(O)R'、NR'-C(O)NR''R'''、NR''CO₂R'、-NR-C(NR'R'')=NR''''、S(O)R'、SO₂R'、SO₂NR'R''、NROR'、CN 和-NO₂、R'、-N₃、CH(ph)₂、氟(C_{1-C4})烃氧基和氟(C_{1-C4})烃基中的一个或多个取代时，其中 R'、R''、R''' 和 R'''' 独立地选自氢、(C_{1-C8})烃基和杂烃基、未取代的芳基和杂芳基、(未取代的芳基)-(C_{1-C4})烃基和(未取代的芳基)氨基-(C_{1-C4})烃基。

15、根据权利要求 14 的化合物，其中至少一个选自 L¹ 和 L² 的成员包含聚乙二醇部分。

16、根据权利要求 14 的化合物，其中所述肽基部分具有下列结构：



其中

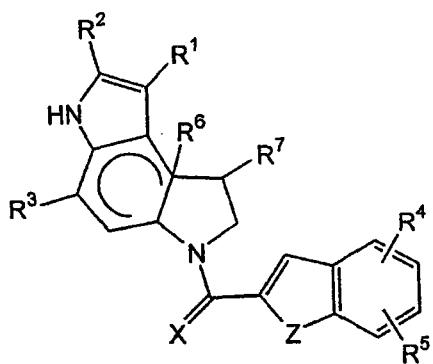
R²¹ 和 R²² 是独立选自 H、取代或未取代的 C₁₋₂₄ 烃基、取代或未取代的 C₁₋₂₄ 杂烃基、取代或未取代的 1-3 环芳基、取代或未取代的具有选自 N、O 和 S 的 1-4 个杂原子的 1-3 环杂芳基、取代或未取代的杂环烃基、可检测的标记和靶向剂的成员；

R¹² 和 R²⁵ 是独立选自 H、取代或未取代的 C₁₋₆ 烃基、氨基酸侧链、可检测的标记和靶向剂的成员；并且

s 是 0 至 20 的整数。

17、根据权利要求 14 的化合物，其中 b 是在 1 与 5 之间的整数。

18、具有下列结构的化合物：



其中

X 是 O，并且 Z 选自 O 和 NR²³，

其中

R²³ 是选自 H、取代或未取代的 C₁₋₆ 杂烃基；

R^1 是H、取代或未取代的 C_{1-6} 烃基、或 $C(O)R^9$ ，其中 R^9 是H、或取代或未取代的 C_{1-24} 烃基；

R^2 是H、或取代或未取代的 C_{1-6} 烃基；

R^3 是选自(=O)和 OR^{11} 的成员，

其中

R^{11} 是选自H、取代或未取代的 C_{1-24} 烃基、取代或未取代的 C_{1-24} 杂烃基、酰基、 $C(O)R^{12}$ 、 $C(O)OR^{12}$ 、 $C(O)NR^{12}R^{13}$ 、 $P(O)(OR^{12})_2$ 和 $SiR^{12}R^{13}R^{14}$ 的成员，

其中

R^{12} 、 R^{13} 和 R^{14} 是独立选自H、取代或未取代的 C_{1-24} 烃基、取代或未取代的 C_{1-24} 杂烃基和取代或未取代的1-3环芳基的成员，其中 R^{12} 和 R^{13} 与它们所连接的氮原子一起可选地连接构成4至6元取代或未取代的杂环烃基环系，可选地含有两个或多个氮原子，并且一个或多个 R^{12} 、 R^{13} 和 R^{14} 可选地包含酶可裂解的基团；

R^4 和 R^5 是独立选自H、 NO_2 、 $NR^{15}R^{16}$ 、 $NHC(O)R^{15}$ 、和 OR^{15} 的成员，

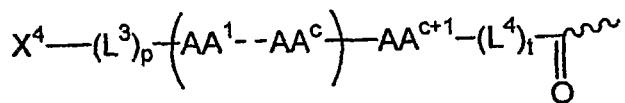
其中

R^{16} 是H，并且 R^{15} 是独立地选自H、取代或未取代的 C_{1-24} 烃基、取代或未取代的 C_{1-24} 杂烃基、取代或未取代的1-3环芳基、取代或未取代的含有两个或多个选自N、O和S的杂原子的1-3杂芳基、和取代或未取代的肽基；

R^6 是单键，它可以存在也可以不存在，当存在时， R^6 和 R^7 连接构成环丙基环；并且

R^7 是 CH_2-X^1 或 $-CH_2-$ ，在所述环丙基环内与 R^6 连接，其中 X^1 是卤素，

其中至少一个选自 R^{15} 和 R^{16} 的成员具有下列结构：



其中

X^4 是选自保护或未保护的反应性官能团、可检测的标记和靶向剂的成员；

L^3 是连接基团，选自取代或未取代的 C_{1-24} 烃基和取代或未取代的 C_{1-24} 杂烃基；

AA^1 、 AA^c 和 AA^{c+1} 是独立选自天然与非天然 α -氨基酸的成员；

L^4 是连接基团，选自取代或未取代的 C_{1-24} 烃基和取代或未取代的 C_{1-24} 杂烃基；

R^{24} 是选自 H、取代或未取代的 C_{1-24} 烃基和取代或未取代的 C_{1-24} 杂烃基的成员；

p 和 t 是独立选自 0 和 1 的整数；并且

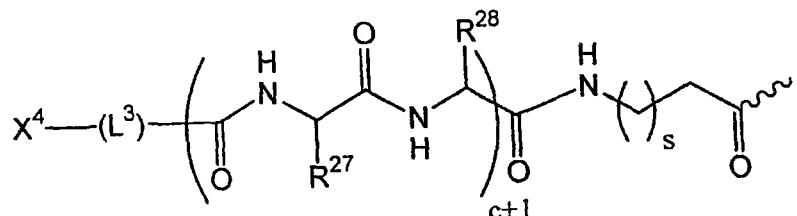
c 是 0 至 20 的整数。

其中所述取代的烃基、取代的杂烃基和取代的杂环烃基被- OR' 、
 $=O$ 、 $=NR'$ 、 $=N-OR'$ 、 $NR'R''$ 、 SR' 、-卤素、 $SiR'R''R'''$ 、 $OC(O)R'$ 、
 $C(O)R'$ 、 CO_2R' 、 $CONR'R''$ 、 $OC(O)NR'R''$ 、 $NR''C(O)R'$ 、
 $NR'-C(O)NR''R'''$ 、 $NR''C(O)_2R'$ 、 $NR-C(NR'R')=NR''''$ 、
 $-NR-C(NR'R')=NR'''$ 、 $-S(O)R'$ 、 $S(O)_2R'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-NRSO_2R'$ 、 CN 和- NO_2 中的一个或多个取代，其中 R' 、 R'' 、 R''' 和 R'''' 各自优选地独立指氢、取代或未取代的 C_{1-24} 杂烃基、取代或未取代的 1-3 环芳基、取代或未取代的 C_{1-24} 烃基、烃氧基或硫代烃氧基或 C_{1-24} 芳基烃基，并且当所述取代的芳基和取代的杂芳基被卤素、 OR' 、 $=O$ 、 $=NR'$ 、 $=N-OR'$ 、 $NR'R''$ 、 SR' 、卤素、 $SiR'R''R'''$ 、 $OC(O)R'$ 、 $C(O)R'$ 、 CO_2R' 、 $CONR'R''$ 、 $OC(O)NR'R''$ 、 $NR''C(O)R'$ 、 $NR'-C(O)NR''R'''$ 、 $NR''CO_2R'$ 、 $-NR-C(NR'R')=NR'''$ 、 $S(O)R'$ 、 SO_2R' 、 $SO_2NR'R''$ 、 $NROR'$ 、 CN 和- NO_2 、 R' 、 $-N_3$ 、 $CH(ph)_2$ 、氟(C_1-C_4)烃氧基和氟(C_1-C_4)烃基中的一个或多个取代时，其中 R' 、 R'' 、 R''' 和 R'''' 独立地选自氢、(C_1-C_8)烃基和杂烃基、未取代的芳基和杂芳基、(未取代的芳基)-(C_1-C_4)烃基和(未取代的芳基)氨基-(C_1-C_4)烃基。

19、根据权利要求 18 的化合物，其中至少一个选自 L^3 和 L^4 的成

员包含聚乙二醇部分。

20、根据权利要求 18 的化合物，其中所述成员具有下列结构：



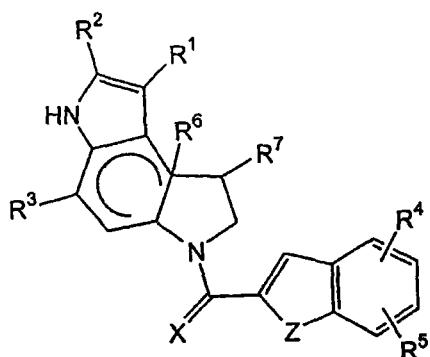
其中

R^{27} 和 R^{28} 是独立选自 H、取代或未取代的 C₁₋₆ 烷基、氨基酸侧链、可检测的标记和靶向剂的成员；

s 是 0 至 20 的整数。

21、根据权利要求 18 的化合物，其中 c 是 2 至 3 的整数。

22、具有下列结构的化合物：



其中

X 是 O，并且 Z 选自 O 和 NR²³，

其中

R^{23} 是选自 H、取代或未取代的 C₁₋₆ 杂烃基；

R^1 是 H、取代或未取代的 C₁₋₆ 烷基或 C(O)R⁹，其中 R⁹ 是 H 或取代或未取代的 C₁₋₂₄ 烷基；

R^2 是 H 或取代或未取代的 C₁₋₆ 烷基；

R^3 是 OR¹¹，

R^4 和 R^5 是独立选自 H、 NO_2 、 $NR^{15}R^{16}$ 、 $NHC(O)R^{15}$ 、和 OR^{15} 的成员，

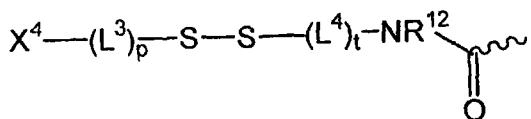
其中

R^{16} 是 H，并且 R^{15} 选自 H、取代或未取代的 C_{1-24} 烃基、取代或未取代的 C_{1-24} 杂烃基、取代或未取代的 1-3 环芳基、取代或未取代的具有选自 N、O 和 S 的 1-4 个杂原子的 1-3 环杂芳基、取代或未取代的肽基；

R^6 是单键，它可以存在也可以不存在，当存在时， R^6 和 R^7 连接构成环丙基环；并且

R^7 是 CH_2-X^1 或 $-CH_2-$ ，在所述环丙基环内与 R^6 连接，其中 X^1 是卤素，

其中 R^{11} 具有下列结构：



其中

X^4 是选自被保护的反应性官能团、未保护的反应性官能团、可检测的标记和靶向剂的成员；

L^3 是连接基团，选自取代或未取代的 C_{1-24} 烃基和取代或未取代的 C_{1-24} 杂烃基；

L^4 是连接基团，选自取代或未取代的 C_{1-24} 烃基和取代或未取代的 C_{1-24} 杂烃基；

R^{12} 是选自 H、取代或未取代的 C_{1-24} 烃基，取代或未取代的 C_{1-24} 杂烃基，聚乙二醇，酰基，靶向剂和可检测的标记的成员；并且

p 和 t 是独立选自 0 和 1 的整数。

其中所述取代的烃基、取代的杂烃基和取代的杂环烃基被- OR' 、 $=O$ 、 $=NR'$ 、 $=N-OR'$ 、 $NR'R''$ 、 SR' 、-卤素、 $SiR'R''R'''$ 、 $OC(O)R'$ 、 $C(O)R'$ 、 CO_2R' 、 $CONR'R''$ 、 $OC(O)NR'R''$ 、 $NR''C(O)R'$ 、 $NR'-C(O)NR''R'''$ 、 $NR''C(O)_2R'$ 、 $NR-C(NR'R'')=NR'''$ 、

-NR-C(NR'R'')=NR'''、-S(O)R'、S(O)₂R'、-NR'R''、-NRSO₂R'、CN和-NO₂中的一个或多个取代，其中R'、R''、R'''和R''''各自优选地独立指氢、取代或未取代的C₁₋₂₄杂烃基、取代或未取代的1-3环芳基、取代或未取代的C₁₋₂₄烃基、烃氨基或硫代烃氨基或C₁₋₂₄芳基烃基，并且当所述取代的芳基和取代的杂芳基被卤素、OR'、=O、=NR'、=N-OR'、NR'R''、SR'、卤素、SiR'R''R'''、OC(O)R'、C(O)R'、CO₂R'、CONR'R''、OC(O)NR'R''、NR''C(O)R'、NR'-C(O)NR''R'''、NR''CO₂R'、-NR-C(NR'R'')=NR'''、S(O)R'、SO₂R'、SO₂NR'R''、NROR'、CN和-NO₂、R'、-N₃、CH(ph)₂、氟(C₁-C₄)烃氨基和氟(C₁-C₄)烃基中的一个或多个取代时，其中R'、R''、R'''和R''''独立地选自氢、(C₁-C₈)烃基和杂烃基、未取代的芳基和杂芳基、(未取代的芳基)-(C₁-C₄)烃基和(未取代的芳基)氨基-(C₁-C₄)烃基。

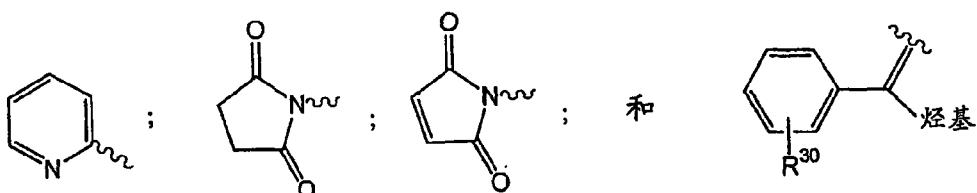
23、根据权利要求22的化合物，其中L⁴是取代或未取代的亚乙基部分。

24、根据权利要求22的化合物，其中X⁴是选自R²⁹、COOR²⁹、C(O)NR²⁹和C(O)NNR²⁹的成员，

其中

R²⁹是选自取代或未取代的C₁₋₂₄烃基、取代或未取代的C₁₋₂₄杂烃基和取代或未取代的具有选自N、O和S的1-4个杂原子的杂芳基的成员。

25、根据权利要求22的化合物，其中R²⁹是选自H；OH；NH₂；



的成员，

其中

R^{30} 代表终止于反应性官能团的取代或未取代的 C_{1-24} 烃基、终止于官能团的取代或未取代的具有选自 N、O 和 S 的 1-4 个杂原子的 1-3 环杂芳基和 $-(L^3)_p X^4$ ，其中每个 L^3 、 X^4 和 p 是独立地加以选择的。

26、根据权利要求 14、18 或 22 的化合物，其中所述可检测的标记是荧光团。

27、根据权利要求 14、18 或 22 的化合物，其中所述靶向剂是生物分子。

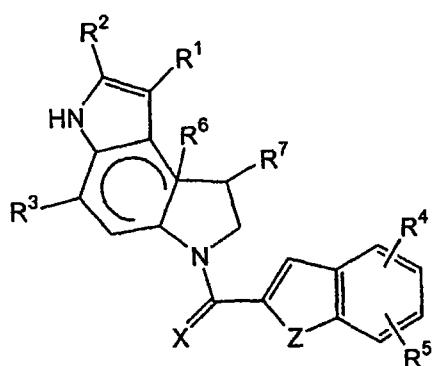
28、根据权利要求 18 或 22 的化合物，其中 X^4 是靶向剂，所述靶向剂是选自抗体、受体、肽、凝集素、糖、核酸及其组合的成员。

29、根据权利要求 1 的化合物，其中 R^{15} 和 R^{16} 至少一个携带适合于缀合所述化合物到另一分子的反应性基团。

30、根据权利要求 29 的化合物，其中 R^{15} 和 R^{16} 至少一个是选自取代的 C_{1-24} 烃基和取代的 C_{1-24} 杂烃基的成员，所述成员具有所述反应性官能团作为其游离的末端。

31、根据权利要求 29 的化合物，其中所述化合物是经由所述反应性官能团与所述另一分子缀合的。

32、具有下列结构的化合物：



其中

X 是 O，并且 Z 选自 O 和 NR^{23} ，

其中

R^{23} 是选自 H、取代或未取代的 C_{1-6} 杂烃基；

R^1 是H、取代或未取代的 C_{1-6} 烃基或 $C(O)R^9$,其中 R^9 是H、取代或未取代的 C_{1-24} 烃基;

R^2 是H或取代或未取代的 C_{1-6} 烃基;

R^3 是选自($=O$)和 OR^{11} 的成员,

其中

R^{11} 是选自H、取代或未取代的 C_{1-24} 烃基、取代或未取代的 C_{1-24} 杂烃基、酰基、 $C(O)R^{12}$ 、 $C(O)OR^{12}$ 、 $C(O)NR^{12}R^{13}$ 、 $P(O)(OR^{12})_2$ 和 $SiR^{12}R^{13}R^{14}$ 的成员,

其中

R^{12} 、 R^{13} 和 R^{14} 是独立选自H、取代或未取代的 C_{1-24} 烃基、取代或未取代的 C_{1-24} 杂烃基和取代或未取代的1-3环芳基的成员,其中 R^{12} 和 R^{13} 与它们所连接的氮原子一起可选地连接构成4至6元取代或未取代的杂环烃基环系,可选地含有两个或多个氮原子,并且一个或多个 R^{12} 、 R^{13} 和 R^{14} 可选地包含酶可裂解的基团;

R^4 和 R^5 是独立选自H、 NO_2 、 $NR^{15}R^{16}$ 、 $NHC(O)R^{15}$ 、和 OR^{15} 的成员,

其中

R^{16} 是H,并且 R^{15} 独立地选自H、取代或未取代的 C_{1-24} 烃基、取代或未取代的 C_{1-24} 杂烃基、取代或未取代的1-3环芳基、取代或未取代的具有选自N、O和S的1-4个杂原子的1-3环杂芳基和取代或未取代的肽基;

R^6 是单键,它可以存在也可以不存在,当存在时, R^6 和 R^7 连接构成环丙基环;并且

R^7 是 CH_2-X^1 或 $-CH_2-$,在所述环丙基环内与 R^6 连接,其中 X^1 是卤素,

其中所述取代的烃基、取代的杂烃基和取代的杂环烃基被 $-OR'$ 、 $=O$ 、 $=NR'$ 、 $=N-OR'$ 、 $NR'R''$ 、 SR' 、-卤素、 $SiR'R''R'''$ 、 $OC(O)R'$ 、 $C(O)R'$ 、 CO_2R' 、 $CONR'R''$ 、 $OC(O)NR'R''$ 、 $NR''C(O)R'$ 、 $NR'-C(O)NR''R'''$ 、 $NR''C(O)_2R'$ 、 $NR-C(NR'R'')=NR'''$ 、

-NR-C(NR'R'')=NR'''、-S(O)R'、S(O)₂R'、-NR'R''、-NRSO₂R'、CN和-NO₂中的一个或多个取代，其中R'、R''、R'''和R''''各自优选地独立指氢、取代或未取代的C₁₋₂₄杂烃基、取代或未取代的1-3环芳基、取代或未取代的C₁₋₂₄烃基、烃氨基或硫代烃氨基或C₁₋₂₄芳基烃基，并且当所述取代的芳基和取代的杂芳基被卤素、OR'、=O、=NR'、=N-OR'、NR'R''、SR'、卤素、SiR'R''R'''、OC(O)R'、C(O)R'、CO₂R'、CONR'R''、OC(O)NR'R''、NR''C(O)R'、NR'-C(O)NR''R'''、NR''CO₂R'、-NR-C(NR'R'')=NR'''、S(O)R'、SO₂R'、SO₂NR'R''、NROR'、CN和-NO₂、R'、-N₃、CH(ph)₂、氟(C₁-C₄)烃氨基和氟(C₁-C₄)烃基中的一个或多个取代时，其中R'、R''、R'''和R''''独立地选自氢、(C₁-C₈)烃基和杂烃基、未取代的芳基和杂芳基、(未取代的芳基)-(C₁-C₄)烃基和(未取代的芳基)氨基-(C₁-C₄)烃基，

其中R¹⁵和R¹⁶之一包含可裂解的部分。

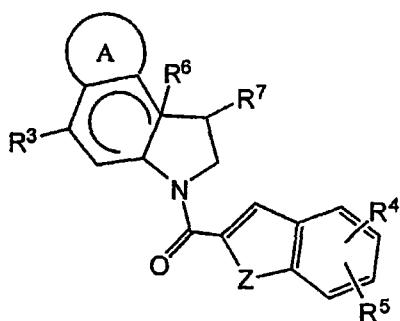
33、药物制剂，包含根据权利要求1-32任一项的化合物和药学上可接受的载体。

34、根据权利要求1-32任一项的化合物在制备用于杀死细胞的药物中的用途。

35、根据权利要求1-32任一项的化合物在制备用于杀死癌细胞的药物中的用途。

36、根据权利要求1-32任一项的化合物在制备用于延缓或终止哺乳动物受治疗者肿瘤生长的药物中的用途。

37、具有下列结构的化合物：



其中

环系 A 是选自苯基和吡咯的成员；

Z 选自 O 和 NR²³, 其中 R²³ 是选自 H、和取代或未取代的 C₁₋₆ 杂烃基的成员；

R³ 是 OR¹¹；

其中，R¹¹ 选自 H、取代或未取代的 C₁₋₂₄ 烃基、取代或未取代的 C₁₋₂₄ 杂烃基、酰基、C(O)R¹²、C(O)OR¹²、C(O)NR¹²R¹³、P(O)(OR¹²)₂，或 SiR¹²R¹³R¹⁴，并且 R¹¹ 可选地包含酶可裂解的基团，

其中，R¹²、R¹³ 和 R¹⁴ 独立选自 H、取代或未取代的 C₁₋₂₄ 烃基、取代或未取代的 C₁₋₂₄ 杂烃基和取代或未取代的 1-3 环芳基，其中 R¹² 和 R¹³ 与它们所连接的氮原子一起可选地连接构成 4 至 6 元取代或未取代的杂环烃基，可选地含有两个或多个氮原子，并且一个或多个 R¹²、R¹³ 或 R¹⁴ 可选地包含酶可裂解的基团；

R⁴ 和 R⁵ 是独立选自 H、NO₂、NR¹⁵R¹⁶、NHC(O)R¹⁵、和 OR¹⁵ 的成员，

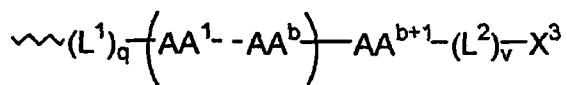
其中

R¹⁶ 是 H，并且 R¹⁵ 选自 H、取代或未取代的 C₁₋₂₄ 烃基、取代或未取代的 C₁₋₂₄ 杂烃基、取代或未取代的 1-3 环芳基、取代或未取代的具有选自 N、O 和 S 的 1-4 个杂原子的 1-3 环杂芳基和取代或未取代的肽基，并且一个或多个 R⁴、R⁵、R¹⁵ 和 R¹⁶ 可选地包含酶可裂解的基团；

R⁶ 是单键，它可以存在也可以不存在，当存在时，R⁶ 和 R⁷ 连接构成环丙基环；并且

R⁷ 是 CH₂-X¹ 或 -CH₂-，在所述环丙基环内与 R⁶ 连接，其中 X¹ 是卤素，

其中 R¹¹ 是具有下列结构的肽基部分：



其中

X³ 是选自保护或未保护的反应性官能团、可检测的标记和靶向剂

的成员；

L^1 是连接基团，选自取代或未取代的C₁₋₂₄烃基和取代或未取代的C₁₋₂₄杂烃基；

AA^a、AA^b和AA^{b+1}是独立选自天然与非天然α-氨基酸的成员；

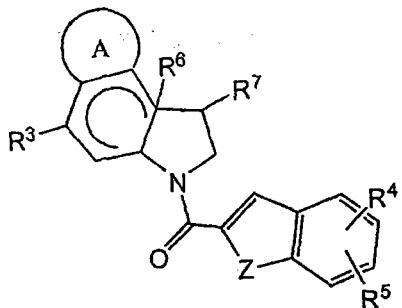
L^2 是连接基团，选自取代或未取代的C₁₋₂₄烃基和取代或未取代的C₁₋₂₄杂烃基；

q和v是独立选自0和1的整数；

b是0至20的整数。

其中所述取代的烃基、取代的杂烃基和取代的杂环烃基被-OR'、=O、=NR'、=N-OR'、NR'R''、SR'、-卤素、SiR'R''R'''、OC(O)R'、C(O)R'、CO₂R'、CONR'R''、OC(O)NR'R''、NR''C(O)R'、NR'-C(O)NR''R'''、NR''C(O)₂R'、NR-C(NR'R'')=NR''''、-NR-C(NR'R'')=NR'''、-S(O)R'、S(O)₂R'、-NR'R''、-NRSO₂R'、CN和-NO₂中的一个或多个取代，其中R'、R''、R'''和R''''各自优选地独立指氢、取代或未取代的C₁₋₂₄杂烃基、取代或未取代的1-3环芳基、取代或未取代的C₁₋₂₄烃基、烃氧基或硫代烃氧基或C₁₋₂₄芳基烃基，并且当所述取代的芳基和取代的杂芳基被卤素、OR'、=O、=NR'、=N-OR'、NR'R''、SR'、卤素、SiR'R''R'''、OC(O)R'、C(O)R'、CO₂R'、CONR'R''、OC(O)NR'R''、NR''C(O)R'、NR'-C(O)NR''R'''、NR''CO₂R'、-NR-C(NR'R'')=NR''''、S(O)R'、SO₂R'、SO₂NR'R''、NROR'、CN和-NO₂、R'、-N₃、CH(ph)₂、氟(C₁-C₄)烃氧基和氟(C₁-C₄)烃基中的一个或多个取代时，其中R'、R''、R'''和R''''独立地选自氢、(C₁-C₈)烃基和杂烃基、未取代的芳基和杂芳基、(未取代的芳基)-(C₁-C₄)烃基和(未取代的芳基)氧基-(C₁-C₄)烃基。

38、具有下列结构的化合物：



其中

环系 A 是选自苯基和吡咯的成员；

Z 选自 O 和 NR²³ 的成员，

其中，

R²³ 是选自 H、取代或未取代的 C₁₋₆ 杂烃基的成员；

R³ 是选自 (=O) 和 OR¹¹ 的成员，

其中

R¹¹ 是选自 H、取代或未取代的烃基、C(O)R¹²、C(O)OR¹²、C(O)NR¹²R¹³、P(O)(OR¹²)₂ 和 SiR¹²R¹³R¹⁴ 的成员，R¹¹ 可选地包含酶可裂解的基团，

其中

R¹²、R¹³ 和 R¹⁴ 是独立选自 H、取代或未取代 C₁₋₂₄ 的烃基、取代或未取代的 C₁₋₂₄ 杂烃基和取代或未取代的 1-3 环芳基的成员，其中 R¹² 和 R¹³ 与它们所连接的氮原子一起可选地连接构成 4 至 6 元取代或未取代的杂环烃基环系，可选地含有两个或多个氮原子，并且一个或多个 R¹²、R¹³ 和 R¹⁴ 可选地包含酶可裂解的基团；

R⁴ 和 R⁵ 是独立选自 H、NO₂、NR¹⁵R¹⁶、NHC(O)R¹⁵、和 OR¹⁵ 的成员，

其中

R¹⁶ 是 H，并且 R¹⁵ 选自 H、取代或未取代的 C₁₋₂₄ 烃基、取代或未取代的 C₁₋₂₄ 杂烃基、取代或未取代的 1-3 环芳基、取代或未取代的具有选自 N、O 和 S 的 1-4 个杂原子的 1-3 环杂芳基和取代或未取代的肽基；并且一个或多个 R⁴、R⁵、R¹⁵ 和 R¹⁶ 可选地包含酶可裂解的基团，

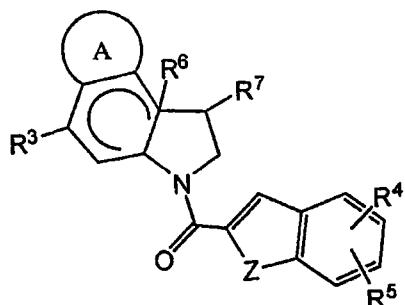
其中 R^4 、 R^5 和 R^{15} 和 R^{16} 中至少一个含有可裂解的二硫基；

R^6 是单键，它可以存在也可以不存在，当存在时， R^6 和 R^7 连接构成环丙基环；并且

R^7 是 CH_2-X^1 或 $-CH_2-$ ，在所述环丙基环内与 R^6 连接，其中 X^1 是卤素，

其中所述取代的烃基、取代的杂烃基和取代的杂环烃基被- OR' 、 $=O$ 、 $=NR'$ 、 $=N-OR'$ 、 $NR'R''$ 、 SR' 、-卤素、 $SiR'R''R'''$ 、 $OC(O)R'$ 、 $C(O)R'$ 、 CO_2R' 、 $CONR'R''$ 、 $OC(O)NR'R''$ 、 $NR''C(O)R'$ 、 $NR'-C(O)NR''R'''$ 、 $NR''C(O)_2R'$ 、 $NR-C(NR'R'')=NR''''$ 、 $-NR-C(NR'R'')=NR'''$ 、 $-S(O)R'$ 、 $S(O)_2R'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-NRSO_2R'$ 、 CN 和 $-NO_2$ 中的一个或多个取代，其中 R' 、 R'' 、 R''' 和 R'''' 各自优选地独立指氢、取代或未取代的 C_{1-24} 杂烃基、取代或未取代的 1-3 环芳基、取代或未取代的 C_{1-24} 烃基、烃氧基或硫代烃氧基或 C_{1-24} 芳基烃基，并且当所述取代的芳基和取代的杂芳基被卤素、 OR' 、 $=O$ 、 $=NR'$ 、 $=N-OR'$ 、 $NR'R''$ 、 SR' 、卤素、 $SiR'R''R'''$ 、 $OC(O)R'$ 、 $C(O)R'$ 、 CO_2R' 、 $CONR'R''$ 、 $OC(O)NR'R''$ 、 $NR''C(O)R'$ 、 $NR'-C(O)NR''R'''$ 、 $NR''CO_2R'$ 、 $-NR-C(NR'R'')=NR''''$ 、 $S(O)R'$ 、 SO_2R' 、 $SO_2NR'R''$ 、 $NROR'$ 、 CN 和 $-NO_2$ 、 R' 、 $-N_3$ 、 $CH(ph)_2$ 、氟(C_1-C_4)烃氧基和氟(C_1-C_4)烃基中的一个或多个取代时，其中 R' 、 R'' 、 R''' 和 R'''' 独立地选自氢、(C_1-C_8)烃基和杂烃基、未取代的芳基和杂芳基、(未取代的芳基)-(C_1-C_4)烃基和(未取代的芳基)氨基-(C_1-C_4)烃基。

39、具有下列结构的化合物：



其中

环系 A 是选自苯基和吡咯的成员；

Z 选自 O 和 NR²³ 的成员，R²³ 是选自 H 和取代或未取代的 C₁₋₆ 杂烃基的成员；

R³ 是 OR¹¹，

R⁴ 和 R⁵ 是独立选自 H、NO₂、NR¹⁵R¹⁶、NHC(O)R¹⁵、和 OR¹⁵ 的成员，

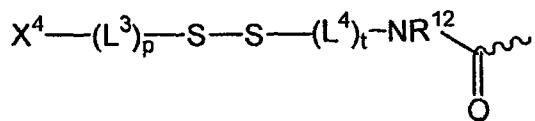
其中

R¹⁶ 是 H，并且 R¹⁵ 选自 H、取代或未取代的 C₁₋₂₄ 烃基、取代或未取代的 C₁₋₂₄ 杂烃基、取代或未取代的 1-3 环芳基、取代或未取代的具有选自 N、O 和 S 的 1-4 个杂原子的 1-3 环杂芳基和取代或未取代的肽基；并且一个或多个 R⁴、R⁵、R¹⁵ 和 R¹⁶ 可选地包含酶可裂解的基团；

R⁶ 是单键，它可以存在也可以不存在，当存在时，R⁶ 和 R⁷ 连接构成环丙基环；并且

R⁷ 是 CH₂-X¹ 或 -CH₂-，在所述环丙基环内与 R⁶ 连接，其中 X¹ 是卤素，

其中 R¹¹ 具有下列结构：



其中

X⁴ 是选自被保护的反应性官能团、未保护的反应性官能团、可检测的标记和靶向剂的成员；

L³ 是连接基团，选自取代或未取代的 C₁₋₂₄ 烃基和取代或未取代的 C₁₋₂₄ 杂烃基；

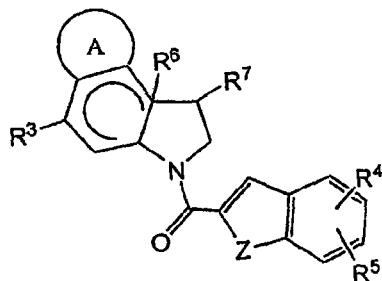
L⁴ 是连接基团，选自取代或未取代的 C₁₋₂₄ 烃基和取代或未取代的 C₁₋₂₄ 杂烃基；

p 和 t 是独立选自 0 和 1 的整数。

其中所述取代的烃基、取代的杂烃基和取代的杂环烃基被-OR'、

=O、=NR'、=N-OR'、NR'R''、SR'、-卤素、SiR'R''R'''、OC(O)R'、C(O)R'、CO₂R'、CONR'R''、OC(O)NR'R''、NR''C(O)R'、NR'-C(O)NR''R'''、NR''C(O)₂R'、NR-C(NR'R'')=NR''''、-NR-C(NR'R'')=NR''''、-S(O)R'、S(O)₂R'、-NR'R''、-NRSO₂R'、CN和-NO₂中的一个或多个取代，其中R'、R''、R'''和R''''各自优选地独立指氢、取代或未取代的C₁₋₂₄杂烃基、取代或未取代的1-3环芳基、取代或未取代的C₁₋₂₄烃基、烃氧基或硫代烃氧基或C₁₋₂₄芳基烃基，并且当所述取代的芳基和取代的杂芳基被卤素、OR'、=O、=NR'、=N-OR'、NR'R''、SR'、卤素、SiR'R''R'''、OC(O)R'、C(O)R'、CO₂R'、CONR'R''、OC(O)NR'R''、NR''C(O)R'、NR'-C(O)NR''R'''、NR''CO₂R'、-NR-C(NR'R'')=NR''''、S(O)R'、SO₂R'、SO₂NR'R''、NROR'、CN和-NO₂、R'、-N₃、CH(ph)₂、氟(C₁-C₄)烃氧基和氟(C₁-C₄)烃基中的一个或多个取代时，其中R'、R''、R'''和R''''独立地选自氢、(C₁-C₈)烃基和杂烃基、未取代的芳基和杂芳基、(未取代的芳基)-(C₁-C₄)烃基和(未取代的芳基)氨基-(C₁-C₄)烃基。

40、具有下列结构的化合物：



其中

环系 A 是选自苯基和吡咯的成员；

Z 选自 O 和 NR²³ 的成员，

其中，

R²³ 是选自 H 和取代或未取代的 C₁₋₆ 杂烃基的成员；

R³ 是 OR¹¹，

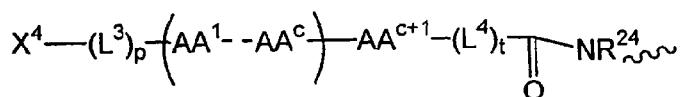
R⁴ 和 R⁵ 是独立选自 H、NO₂、NR¹⁵R¹⁶、NHC(O)R¹⁵、和 OR¹⁵

的成员；

其中

R^{16} 是H，并且 R^{15} 选自H、取代或未取代的C₁₋₂₄烃基、取代或未取代的C₁₋₂₄杂烃基、取代或未取代的1-3环芳基、取代或未取代的具有选自N、O和S的1-4个杂原子的1-3环杂芳基和取代或未取代的肽基；并且一个或多个 R^4 、 R^5 、 R^{15} 和 R^{16} 可选地包含酶可裂解的基团，

其中至少一个选自 R^{15} 和 R^{16} 的成员具有下列结构：



其中

X^4 是选自保护或未保护的反应性官能团、可检测的标记和靶向剂的成员；

L^3 是连接基团，选自取代或未取代的C₁₋₂₄烃基和取代或未取代的C₁₋₂₄杂烃基；

AA^1 、 AA^c 和 AA^{c+1} 是独立选自天然与非天然 α -氨基酸的成员；

L^4 是连接基团，选自取代或未取代的C₁₋₂₄烃基和取代或未取代的C₁₋₂₄杂烃基；

R^{24} 是选自H、取代或未取代的C₁₋₂₄烃基和取代或未取代的C₁₋₂₄杂烃基的成员；

p 和 t 是独立选自0和1的整数；

c 是0至20的整数；

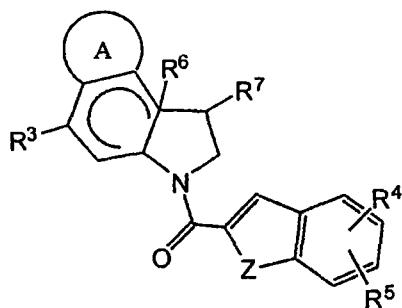
R^6 是单键，它可以存在也可以不存在，当存在时， R^6 和 R^7 连接构成环丙基环；并且

R^7 是CH₂-X¹或-CH₂-，在所述环丙基环内与 R^6 连接，其中X¹是卤素。

其中所述取代的烃基、取代的杂烃基和取代的杂环烃基被-OR'、=O、=NR'、=N-OR'、NR'R''、SR'、-卤素、SiR'R''R'''、OC(O)R'、

$\text{C(O)R}'$ 、 $\text{CO}_2\text{R}'$ 、 $\text{CONR}'\text{R}''$ 、 $\text{OC(O)NR}'\text{R}''$ 、 $\text{NR}''\text{C(O)R}'$ 、 $\text{NR}'\text{-C(O)NR}''\text{R}'''$ 、 $\text{NR}''\text{C(O)}_2\text{R}'$ 、 $\text{NR-C(NR}'\text{R}''\text{)=NR}'''$ 、 $\text{-NR-C(NR}'\text{R}''\text{)=NR}'''$ 、 $\text{-S(O)R}'$ 、 $\text{S(O)}_2\text{R}'$ 、 $\text{-NR}'\text{R}''$ 、 $\text{-NRSO}_2\text{R}'$ 、 CN 和 -NO_2 中的一个或多个取代，其中 R' 、 R'' 、 R''' 和 R'''' 各自优选地独立指氢、取代或未取代的 C_{1-24} 杂烃基、取代或未取代的1-3环芳基、取代或未取代的 C_{1-24} 烃基、烃氧基或硫代烃氧基或 C_{1-24} 芳基烃基，并且当所述取代的芳基和取代的杂芳基被卤素、 OR' 、 $=\text{O}$ 、 $=\text{NR}'$ 、 $=\text{N-OR}'$ 、 $\text{NR}'\text{R}''$ 、 SR' 、卤素、 $\text{SiR}'\text{R}''\text{R}'''$ 、 $\text{OC(O)R}'$ 、 $\text{C(O)R}'$ 、 $\text{CO}_2\text{R}'$ 、 $\text{CONR}'\text{R}''$ 、 $\text{OC(O)NR}'\text{R}''$ 、 $\text{NR}''\text{C(O)R}'$ 、 $\text{NR}'\text{-C(O)NR}''\text{R}'''$ 、 $\text{NR}''\text{CO}_2\text{R}'$ 、 $\text{-NR-C(NR}'\text{R}''\text{)=NR}'''$ 、 $\text{S(O)R}'$ 、 $\text{SO}_2\text{R}'$ 、 $\text{SO}_2\text{NR}'\text{R}''$ 、 NROR' 、 CN 和 -NO_2 、 R' 、 -N_3 、 CH(ph)_2 、氟($\text{C}_1\text{-C}_4$)烃氧基和氟($\text{C}_1\text{-C}_4$)烃基中的一个或多个取代时，其中 R' 、 R'' 、 R''' 和 R'''' 独立地选自氢、 $(\text{C}_1\text{-C}_8)$ 烃基和杂烃基、未取代的芳基和杂芳基、(未取代的芳基)- $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ 烃基和(未取代的芳基)氧基- $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ 烃基。

41、具有下列结构的化合物：



其中

环系A是选自苯基和吡咯的成员；

Z选自O和NR²³的成员，

其中，

R²³是选自H和取代或未取代的C₁₋₆杂烃基的成员；

R³是选自(=O)和OR¹¹的成员，

其中

R¹¹是选自H、C(O)R¹²、C(O)OR¹²、C(O)NR¹²R¹³、P(O)(OR¹²)₂、

和 $\text{SiR}^{12}\text{R}^{13}\text{R}^{14}$ 的成员， R^{11} 可选地包含酶可裂解的基团，

其中

R^{12} 、 R^{13} 和 R^{14} 是独立选自 H、取代或未取代的 C_{1-24} 烷基、取代或未取代的 C_{1-24} 杂烃基和取代或未取代的 1-3 环芳基的成员，其中 R^{12} 和 R^{13} 与它们所连接的氮原子一起可选地连接构成 4 至 6 元取代或未取代的杂环烃基环系，可选地含有两个或多个杂原子，并且一个或多个 R^{12} 、 R^{13} 和 R^{14} 可选地包含酶可裂解的基团；

R^4 和 R^5 是独立选自 H、 NO_2 、 $\text{NR}^{15}\text{R}^{16}$ 、 NCH(O)R^{15} 、和 OR^{15} 的成员，

其中

R^{16} 是 H，并且 R^{15} 选自 H、取代或未取代的 C_{1-24} 烷基、取代或未取代的 C_{1-24} 杂烃基、取代或未取代的 1-3 环芳基、取代或未取代的具有选自 N、O 和 S 的 1-4 个杂原子的 1-3 环杂芳基和取代或未取代的肽基；并且一个或多个 R^4 、 R^5 、 R^{15} 和 R^{16} 可选地包含酶可裂解的基团；

R^6 是单键，它可以存在也可以不存在，当存在时， R^6 和 R^7 连接构成环丙基环；

R^7 是 $\text{CH}_2\text{-X}^1$ 或 $-\text{CH}_2-$ ，在所述环丙基环内与 R^6 连接，其中 X^1 是卤素；

其中所述取代的烃基、取代的杂烃基和取代的杂环烃基被- OR' 、 $=\text{O}$ 、 $=\text{NR}'$ 、 $=\text{N-OR}'$ 、 $\text{NR}'\text{R}''$ 、 SR' 、-卤素、 $\text{SiR}'\text{R}''\text{R}'''$ 、 $\text{OC(O)R}'$ 、 $\text{C(O)R}'$ 、 $\text{CO}_2\text{R}'$ 、 $\text{CONR}'\text{R}''$ 、 $\text{OC(O)NR}'\text{R}''$ 、 $\text{NR}''\text{C(O)R}'$ 、 $\text{NR}'\text{-C(O)NR}''\text{R}'''$ 、 $\text{NR}''\text{C(O)}_2\text{R}'$ 、 $\text{NR-C(NR}'\text{R}'')=\text{NR}'''$ 、 $-\text{NR-C(NR}'\text{R}'')=\text{NR}'''$ 、 $-\text{S(O)R}'$ 、 $\text{S(O)}_2\text{R}'$ 、 $-\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NRSO}_2\text{R}'$ 、CN 和- NO_2 中的一个或多个取代，其中 R' 、 R'' 、 R''' 和 R'''' 各自优选地独立指氢、取代或未取代的 C_{1-24} 杂烃基、取代或未取代的 1-3 环芳基、取代或未取代的 C_{1-24} 烷基、烃氧基或硫代烃氧基或 C_{1-24} 芳基烃基，并且当所述取代的芳基和取代的杂芳基被卤素、 OR' 、 $=\text{O}$ 、 $=\text{NR}'$ 、 $=\text{N-OR}'$ 、 $\text{NR}'\text{R}''$ 、 SR' 、卤素、 $\text{SiR}'\text{R}''\text{R}'''$ 、 $\text{OC(O)R}'$ 、 $\text{C(O)R}'$ 、 $\text{CO}_2\text{R}'$ 、

CONR'R''、OC(O)NR'R''、NR"C(O)R'、NR'-C(O)NR''R'''、NR"CO₂R'、-NR-C(NR'R'')=NR'''、S(O)R'、SO₂R'、SO₂NR'R''、NROR'、CN和-NO₂、R'、-N₃、CH(ph)₂、氟(C₁-C₄)烃氨基和氟(C₁-C₄)烃基中的一个或多个取代时，其中R'、R''、R'''和R''''独立地选自氢、(C₁-C₈)烃基和杂烃基、未取代的芳基和杂芳基、(未取代的芳基)-(C₁-C₄)烃基和(未取代的芳基)氨基-(C₁-C₄)烃基，

其中至少一个选自R⁴、R⁵、R¹⁵和R¹⁶的成员包含靶向剂或可检测的标记。

42、根据权利要求41的化合物，其中所述靶向剂是抗体。

43、根据权利要求37-42任一项的化合物，其中A是取代或未取代的苯基。

44、根据权利要求37-42任一项的化合物，其中A是取代或未取代的吡咯。

细胞毒素、其有用的前体药物、连接基团和稳定剂

相关申请的交叉引用

本申请是 2001 年 5 月 31 日提交的美国临时专利申请 No. 60/295,196、2001 年 5 月 31 日提交的 No. 60/295,259、2001 年 5 月 31 日提交的 No. 60/295,342 和 2001 年 7 月 11 日提交的 No. 60/304,908 的非临时性提交。每份临时申请的公开内容全部引用在此作为参考。

发明背景

很多治疗剂、特别是在癌症化学疗法中尤其有效的那些经常表现体内急性毒性，尤其是骨髓和粘膜毒性，以及慢性心脏和神经病学毒性。这么高的毒性限制了它们的应用。开发更多和更安全的特异性治疗剂、特别是抗肿瘤剂需要对肿瘤细胞具有更大的有效性，并且减少这些产品的副作用（毒性、对非肿瘤细胞的破坏等）的数量和严重性。有些现有治疗剂的另一种困难是它们在血浆中的稳定性不太理想。为了稳定这些化合物而加入的官能团导致活性的显著降低。因此，需要确定在稳定化合物的同时维持可接受的治疗活性水平的方法。

关于更高选择性细胞毒性剂的研究几十年来一直是极为活跃的，限制剂量的毒性（也就是细胞毒素对正常组织的不可取的活性）是癌症疗法失败的主要原因之一。例如，CC-1065 和 duocarmycins 已知是极为有力的细胞毒素。

CC-1065 首先是由 Upjohn Company 于 1981 年从 *Streptomyces zelensis* 分离的(Hanka 等, J. Antibiot. 31: 1211 (1978); Martin 等, J. Antibiot. 33: 902 (1980); Martin 等, J. Antibiot. 34: 1119 (1981)), 并且发现在体外和实验动物中都具有有力的抗肿瘤和抗微生物活性(Li 等, Cancer Res. 42: 999 (1982))。CC-1065 在小沟内与双链 B-DNA 结合(Swenson 等, Cancer Res. 42: 2821 (1982)), 具有 5'-d(A/GNTTA)-3' 和 5'-d(AAAAA)-3' 的序列优选，并且通过其分子中的 CPI 左手单位烷

基化 3'-腺嘌呤的 N3 位(Hurley 等, *Science* 226: 843 (1984)). 尽管具有有力和广泛的抗肿瘤活性, CC-1065 也不能用于人, 因为它导致延迟的实验动物死亡。

CC-1065 的很多类似物和衍生物和 duocarmycins 是本领域已知的。有人已经回顾了很多化合物的结构、合成和性质的研究。例如参见 Boger 等, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35: 1438 (1996); Boger 等, *Chem. Rev.* 97: 787 (1997)。

Kyowa Hakko Kogya Co., Ltd. 的一个小组已经制备了大量 CC-1065 衍生物。例如参见美国专利 No. 5,101,038、5,641,780、5,187,186、5,070,092、5,703,080、5,070,092、5,641,780、5,101,038、5,084,468、公开的 PCT 申请 WO 96/10405 和公开的欧洲申请 0 537 575 A1。这些专利或申请都没有公开通过生成可裂解前体药物增强细胞毒素稳定性的策略。

Upjohn Company (Pharmacia Upjohn) 也一直积极地制备 CC-1065 的衍生物。例如参见美国专利 No. 5,739,350、4,978,757、5,332,837 和 4,912,227。所颁布的美国专利没有公开或提示前体药物策略将可用于提高这些专利所公开的化合物的体内稳定性或者减少毒性。

也有研究集中于开发新的治疗剂, 它们是前体药物的形式, 也就是通过对它们的结构进行某些化学或酶学修饰能够体内转化为药物(活性治疗性化合物)的化合物。出于减少毒性的目的, 这种转化作用优选地限于作用部位或靶组织而不是循环系统或非靶组织。不过, 即使前体药物也是成问题的, 因为由于酶的存在, 很多是以血液和血清中的低稳定性为特征的, 这些酶在前体药物到达患者体内所需部位之前降解或者激活前体药物。

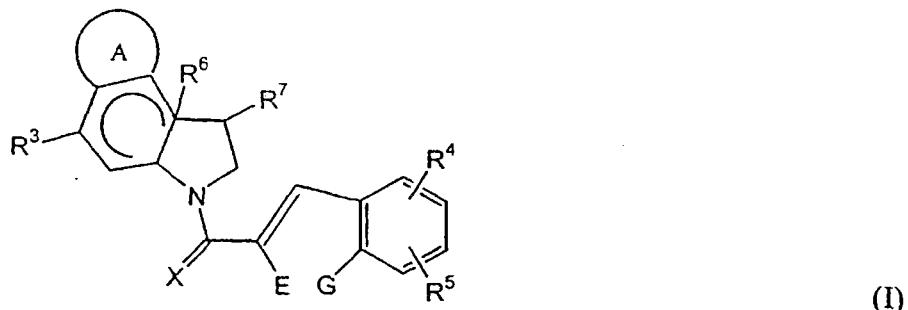
因此, 尽管本领域已经取得了一定进展, 也仍然需要开发改进的治疗剂, 用于治疗哺乳动物, 特别是人, 治疗剂更具体为细胞毒素, 它们相对于相似结构的已知化合物而言表现较高的作用特异性、减少的毒性和提高的血液稳定性。本发明致力于这些需求。

发明概述

本发明涉及细胞毒素，它们是 CC-1065 和 duocarmycins 的类似物。本发明还提供连接基团臂，它们在体内例如发生酶裂解或还原裂解，从包括连接基团臂的前体药物衍生物中释放活性药物部分。此外，本发明包括在本发明连接基团臂与细胞毒素之间的缀合物，和连接基团臂、细胞毒素与定向剂之间的缀合物，定向剂例如抗体或肽。

本发明还涉及可用于稳定治疗剂和标记物的基团。稳定基团是这样选择的，以限制治疗剂或标记物被可能存在于血液或非靶组织中的酶所廓清和代谢，并且进一步是这样选择的，以限制药物或标记物转运进入细胞。稳定基团起到阻滞药物或标记物降解的作用，还可以提供药物或标记物的其他物理特征。稳定基团还可以提高药物或标记物在贮存期间的稳定性，无论是经过配制的形式还是未经过配制的形式。

在第一方面，本发明提供具有式 I 结构的细胞毒性化合物：



其中环系 A 是选自取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基和取代或未取代的杂环烃基的成员。符号 E 和 G 代表 H、取代或未取代的烃基、取代或未取代的杂烃基、杂原子或单键。E 和 G 可选地连接构成环系，选自取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基和取代或未取代的杂环烃基。

在示范性实施方式中，环系 A 是取代或未取代的苯基环。环系 A 优选地被一个或多个如本文定义一节所述的芳基取代基取代。在一种优选的实施方式中，苯基环被 CN 部分取代。

与 R^3 连接的六元环内的曲线表示环系可以在环内任意位置具有一个或一个以上不饱和度，并且可以表示芳香性。

符号 X 代表选自 O、S 和 NR²³ 的成员。R²³ 是选自 H、取代或未取代的烃基、取代或未取代的杂烃基和酰基的成员。

符号 R³ 代表选自 (=O)、SR¹¹、NHR¹¹ 和 OR¹¹ 的成员，其中 R¹¹ 是 H、取代或未取代的烃基、取代或未取代的杂烃基、酰基、C(O)R¹²、C(O)OR¹²、C(O)NR¹²R¹³、C(O)OR¹²、P(O)(OR¹²)₂、C(O)CHR¹²R¹³、C(O)OR¹²、SR¹² 或 SiR¹²R¹³R¹⁴。符号 R¹²、R¹³ 和 R¹⁴ 独立地代表 H、取代或未取代的烃基、取代或未取代的杂烃基和取代或未取代的芳基，其中 R¹² 和 R¹³ 与它们所连接的氮原子一起可选地连接构成 4 至 6 元取代或未取代的杂环烃基环系，可选地含有两个或多个杂原子。

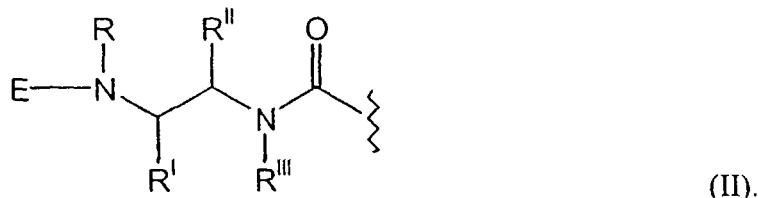
R⁴ 和 R⁵ 是独立地选自 H、取代或未取代的烃基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂环烃基、取代或未取代的芳基烃基、卤素、NO₂、NR¹⁵R¹⁶、NC(O)R¹⁵、OC(O)NR¹⁵R¹⁶、OC(O)OR¹⁵、C(O)R¹⁵、OP(O)OR¹⁵OR¹⁶ 和 OR¹⁵ 的成员。R¹⁵ 和 R¹⁶ 独立地代表 H、取代或未取代的烃基、取代或未取代的杂烃基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂环烃基、芳基烃基和取代或未取代的肽基，其中 R¹⁵ 和 R¹⁶ 与它们所连接的氮原子一起可选地连接构成 4 至 6 元取代或未取代的杂环烃基环系，可选地含有两个或多个杂原子。

R⁴、R⁵、R¹¹、R¹²、R¹³、R¹⁵ 和 R¹⁶ 可选地在它们的结构内含有一个或多个可裂解基团。示范性可裂解基团包括但不限于肽、氨基酸和二硫化物。

R⁶ 是单键，它可以存在也可以不存在。当 R⁶ 存在时，R⁶ 和 R⁷ 连接构成环丙基环。R⁷ 是 CH₂-X¹ 或 -CH₂-。当 R⁷ 是 -CH₂- 时，它是环丙烷环的组分。符号 X¹ 代表离去基团。技术人员将理解 R⁶ 和 R⁷ 的组合方式不会违反化合价的原理。

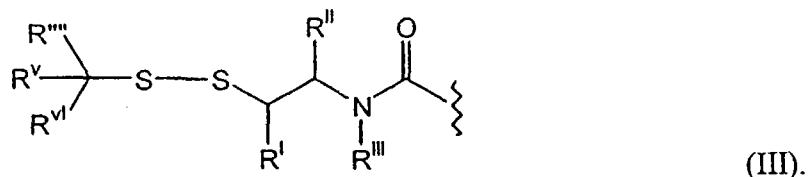
本发明在另一方面提供可裂解的连接基团臂，它包括可被酶裂解的基团。可裂解的连接基团一般赋予构成物以体内可裂解性。因而，连接基团可以包括一个或多个将体内裂解的基团，例如在血流中，速率高于缺少这类基团的构成物。还提供了连接基团臂与治疗和诊断剂

的缀合物。连接基团可用于生成治疗剂的前体药物类似物，可逆地连接治疗或诊断剂与定向剂、可检测的标记或固体载体。连接基团可以结合成包括本发明细胞毒素的配合物。连接基团具有式 II 所述通式：



上式中，符号 E 代表酶可裂解部分（例如肽、酯等）。符号 R、R^I、R^{II}和 R^{III}代表例如包括 H、取代或未取代的烃基、取代或未取代的杂烃基、聚(乙二醇)、酰基、定向剂、可检测的标记的成员。在目前优选的实施方式中，羧基部分的氧连接可检测的标记、治疗性部分或固体载体。

在进一步的方面，本发明提供可裂解的连接基团臂，它是基于二硫化物部分的。因而，提供了具有式 III 结构的化合物：



由符号 R、R^I、R^{II}、R^{III}、R^{IV}、R^V和 R^{VI}所代表的原子团是如上 R、R^I、R^{II}和 R^{III}所述的。

本发明的其他方面、优点和目的将因下列详细说明而显而易见。

附图的简要说明

图 1 阐明本发明的示范性可裂解尿烷连接基团，与细胞毒素缀合。

图 2 阐明本发明的示范性细胞毒素。

图 3 阐明本发明的示范性可裂解二硫化物连接基团，与细胞毒素缀合。

本发明和优选实施方式的详细说明

缩写

本文所用的“Ala”表示丙氨酸。“Boc”表示叔丁氧羰基。“DDQ”

表示 2,3-二氯-5,6-二氯基-1,4-苯醌。本文所用的符号“E”代表酶可裂解基团。“EDCI”是 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺。本文所用的“Fmoc”表示 9-芴基甲氧羰基。“Leu”是亮氨酸。符号“PMB”表示对甲氧基苄基。“TBAF”表示氟化四丁铵。缩写“TBSO”表示叔丁基二甲基甲硅烷基醚。“TFA”表示三氟乙酸。符号“Q”表示治疗剂、诊断剂或可检测的标记。

定义

除非有相反的定义，本文所用的全部技术和科学术语一般具有本发明所属领域普通技术人员所公认的含义。一般而言，本文所用的命名法和下述细胞培养、分子遗传学、有机化学与核酸化学和杂交中的实验室操作都是本领域熟知的和常用的。采用标准工艺进行核酸和肽的合成。一般而言，酶反应和纯化步骤是按照厂商的规范进行的。工艺和操作一般是按照本领域和各种一般性参考文献中的常规方法进行的(一般参见 Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 引用在此作为参考文献)，这些方法遍及该文献。本文所用的命名法和下述分析化学和有机合成中的实验室操作都是本领域熟知的和常用的。采用标准工艺或其改进进行化学合成和化学分析。术语“治疗剂”打算表示这样一种化合物，当存在治疗有效量时，对哺乳动物产生所需的治疗效果。关于治疗癌症，需要该治疗剂还能够进入靶细胞。

术语“细胞毒素”打算表示这样一种治疗剂，它具有所需的对癌细胞而言是细胞毒性的效果。示范性细胞毒素包括——仅供举例而非限制——*combretastatins*、*duocarmycins*、*CC-1065* 抗肿瘤抗生素、*anthracyclines* 和有关的化合物。其他细胞毒素包括霉菌毒素、蓖麻素及其类似物、*calicheamycins*、*doxorubicin* 和 *maytansinoids*。

术语“标记物”打算表示可用于肿瘤或其他医学条件特征鉴别的化合物，例如诊断、肿瘤的进展和由肿瘤细胞分泌的因子的测定。标记物被视为“诊断剂”的子集。

术语“定向基团”打算表示这样一种部分，它(1)能够使它所连接的实体（例如治疗剂或标记物）指向靶细胞，例如特殊类型的肿瘤细胞，或者(2)优先在靶组织被激活，例如肿瘤。定向基团可以是小分子，它打算包括非肽类和肽类。定向基团还可以是大分子，包括糖、凝集素、受体、受体的配体、蛋白质（例如 BSA）、抗体等。

术语“可裂解基团”打算表示在体内不稳定的部分。优选地，“可裂解基团”允许标记物或治疗剂通过从缀合物其余部分上裂解而被活化。有效的定义是连接基团优选地被生物环境体内裂解。裂解可以无限制地来自任意过程，例如酶的、还原性、pH 等。优选地，可裂解基团是这样选择的，以便活化作用发生在所需的作用部位，这可以是靶细胞（例如癌细胞）或组织内部或附近的部位，例如治疗作用或标记物活性的部位。这样的裂解作用是酶的裂解作用，示范性酶可裂解基团包括天然氨基酸或终止于天然氨基酸的肽序列，在它们的羧基末端与连接基团连接。尽管裂解速率增强程度不是本发明的关键，不过可裂解连接基团的优选实例是这样的，其中在给药 24 小时内在血流中裂解至少约 10% 可裂解基团，最优选为至少约 35%。优选的可裂解基团是肽键、酯键和二硫键。

术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中是可互换使用的，表示氨基酸残基的聚合物。这些术语适用于这样的氨基酸聚合物，其中一个或多个氨基酸残基是对应的天然存在的氨基酸的人工化学模拟物，还适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。这些术语还涵盖术语“抗体”。

术语“氨基酸”表示天然存在的和合成的氨基酸，以及氨基酸类似物和氨基酸模拟物，它们发挥作用的方式类似于天然存在的氨基酸。天然存在的氨基酸是被遗传密码编码的那些，以及后来被修饰的那些氨基酸，例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸盐和 O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物表示这样的化合物，它们具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构，也就是与氢键合的 α 碳、羧基、氨基和 R 基团，例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砜、甲硫氨酸甲基锍。这样的类似物具

有经过修饰的 R 基团（例如正亮氨酸）或经过修饰的肽骨架，但是保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物表示具有这样一种结构的化合物，它不同于氨基酸的一般化学结构，但是发挥作用的方式类似于天然存在的氨基酸。术语“非天然氨基酸”打算代表上述二十种天然存在的氨基酸的“D”立体化学构型。进一步可以理解，术语非天然氨基酸包括天然氨基酸的同系物和天然氨基酸的合成修饰形式。合成修饰形式包括但不限于亚烷基链缩短或延长至多两个碳原子的氨基酸、包含可选被取代的芳基的氨基酸和包含卤代基团、优选为卤代烃基和芳基的氨基酸。当与本发明的连接基团或缀合物连接时，氨基酸是“氨基酸侧链”的形式，其中氨基酸的羧酸基团已经被酮基(C(O))代替。因而例如，丙氨酸侧链是-C(O)-CH(NH₂)-CH₃，等等。

“核酸”表示脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其单链或双链形式的聚合物。该术语涵盖含有已知核苷酸类似物或经过修饰的骨架残基或键的核酸，它们是合成的、天然存在的和非天然存在的，具有与参考核酸相似的结合性质，被代谢的方式也类似于参考核苷酸。这类类似物的实例无限制地包括硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基膦酸酯、手性甲基膦酸酯、2-O-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNAs)。

除非有相反的指示，特定的核酸序列还隐含地涵盖其经过保守修饰的变体（例如退化的密码子取代）和补充序列以及详细指出的序列。具体而言，退化的密码子取代可以通过生成这样的序列加以实现，其中一个或多个选定的（或全部的）密码子的第三位被混合的碱和/或脱氧肌苷残基取代(Batzer 等, Nucleic Acid Res. 19: 5081 (1991); Ohtsuka 等, J. Biol. Chem. 260: 2605-2608 (1985); Rossolini 等, Mol. Cell Probes 8: 91-98 (1994))。术语核酸与基因、cDNA、mRNA、寡核苷酸和多核苷酸可互换使用。

符号—无论用作一条键还是显示一条键的垂直位置都表示所显示的部分与分子、固体载体等其余部分连接的点。

术语“烃基”独自或者作为另一个取代基的一部分表示——除非

有相反规定——直链或支链或环状烃原子团或其组合，它可以是完全饱和的、单-或多-不饱和的，可以包括二-和多-价原子团，具有所指定的碳原子数（也就是说 C₁-C₁₀ 表示一至十个碳）。饱和烃原子团的实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、环己基、(环己基)甲基、环丙基甲基、例如正戊基、正己基、正庚基、正辛基的同系物和异构体等。不饱和的烃基是具有一条或多条双键或叁键者。不饱和的烃基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-与 3-丙炔基、3-丁炔基和高级同系物和异构体。术语“烃基”除非有相反注解，还意味着包括下列详细定义的那些烃基衍生物，例如“杂烃基”。限于烃类基团的烃基也称“均烃基”。

术语“亚烷基”独自或者作为另一取代基的一部分表示从烷烃衍生的二价原子团，例如但不限于-CH₂CH₂CH₂CH₂-，进一步包括下述“杂亚烷基”的那些基团。通常，烃基（或亚烷基）将具有 1 至 24 个碳原子，具有 10 个或更少碳原子的那些基团在本发明中是优选的。“低级烃基”或“低级亚烷基”是短链烃基或亚烷基，一般具有八个或更少碳原子。

术语“杂烃基”独自或者与另一个术语联合表示——除非有相反规定——稳定的直链或支链或环状烃原子团或其组合，由规定数量的碳原子和至少一个杂原子组成，杂原子选自由 O、N、Si 和 S 组成的组，其中氮、碳和硫原子可以可选地是氧化的，氮杂原子可以可选地是季铵化的。杂原子 O、N、S 和 Si 可以位于杂烃基的任意内部位置或烃基与分子其余部分连接的位置。实例包括但不限于-CH₂-CH₂-O-CH₃、-CH₂-CH₂-NH-CH₃、-CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃、-CH₂-S-CH₂-CH₃、-CH₂-CH₂-S(O)-CH₃、-CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃、-CH=CH-O-CH₃、-Si(CH₃)₃、-CH₂-CH=N-OCH₃ 和-CH=CH-N(CH₃)-CH₃。至多两个杂原子可以是连续的，例如-CH₂-NH-OCH₃ 和-CH₂-O-Si(CH₃)₃。类似地，术语“杂亚烷基”独自或者作为另一个取代基的一部分表示从杂烃基衍生的二价原子团，例

如但不限于-CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂-和-CH₂-S-CH₂-CH₂-NH-CH₂-。关于杂亚烷基，杂原子也可以占据一个或两个链末端（例如亚烃氨基、亚烃二氧化基、亚烃氨基、亚烃二氨基等）。术语“杂烃基”和“杂亚烷基”涵盖聚(乙二醇)及其衍生物（例如参见 Shearwater Polymers Catalog, 2001）。进而，关于亚烷基和杂亚烷基连接基团，连接基团结构式书写的方向并不意味着连接基团的取向。例如，式-C(O)₂R'-代表-C(O)₂R'-和-R'C(O)₂-。

与术语“烃基”或“杂烃基”联合的术语“低级”表示具有1至6个碳原子的部分。

术语“烃氨基”、“烃基氨基”和“烃硫基”（或硫代烃氨基）使用它们的常规含义，表示分别经由氧原子、氨基或硫原子与分子其余部分连接的那些烃基。

一般而言，“酰基取代基”也选自上述基团。本文所用的术语“酰基取代基”表示与羰基碳连接并且满足其化合价的基团，该羰基碳直接或间接与本发明化合物的多环核连接。

术语“环烃基”和“杂环烃基”独自或者与其他术语联合分别代表——除非有相反规定——取代或未取代的“烃基”和取代或未取代的“杂烃基”的环状变型。另外，关于杂环烃基，杂原子可以占据杂环与分子其余部分连接的位置。环烃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。杂环烃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。环状结构的杂原子和碳原子可选地是氧化的。

术语“卤代”或“卤素”独自或者作为另一个取代基的一部分表示——除非有相反规定——氟、氯、溴或碘原子。另外，“卤代烃基”等术语意味着包括单卤代烃基和多卤代烃基。例如，术语“卤代(C₁-C₄)烃基”意味着包括但不限于三氟甲基、2,2,2-三氟乙基、4-氯丁基、3-溴丙基等。

术语“芳基”表示——除非有相反规定——取代或未取代的、多不饱和的、芳族烃取代基，它可以是单一的环或多个稠合在一起或共价连接的环（优选1至3个环）。术语“杂芳基”表示含有一至四个选自N、O和S的杂原子的芳基（或环），其中氮、碳和硫原子可选地是氧化的，氮原子可选地是季铵化的。杂芳基可以通过杂原子与分子其余部分连接。芳基和杂芳基的非限制性实例包括苯基、1-萘基、2-萘基、4-联苯、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-噁唑基、4-噁唑基、2-苯基-4-噁唑基、5-噁唑基、3-异噁唑基、4-异噁唑基、5-异噁唑基、2-噻唑基、4-噻唑基、5-噻唑基、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-苯并噻唑基、嘌呤基、2-苯并咪唑基、5-吲哚基、1-异喹啉基、5-异喹啉基、2-喹喔啉基、5-喹喔啉基、3-喹啉基和6-喹啉基。每个上述芳基和杂芳基环系的取代基选自下述可接受的取代基。“芳基”和“杂芳基”还涵盖这样的环系，其中一个或多个非芳族环系与芳基或杂芳基系统稠合或者键合。

为简便起见，术语“芳基”当与其他术语联合使用时（例如芳氧基、芳硫基、芳基烃基）包括如上所定义的芳基和杂芳基环。因而，术语“芳基烃基”意味着包括这样的原子团，其中芳基与烃基连接（例如苄基、苯乙基、吡啶基甲基等），该烃基包括这样的烃基，其中碳原子（例如亚甲基）已经例如被氧原子代替（例如苯氧基甲基、2-吡啶氧基甲基、3-(1-萘氧基)丙基等）。

每个上述术语（例如“烃基”、“杂烃基”、“芳基”和“杂芳基”）包括所示原子团的取代和未取代的形式。下面提供每种类型原子团的优先取代基。

烃基和杂烃基原子团（包括经常称为亚烷基、链烯基、杂亚烷基、杂链烯基、炔基、环烃基、杂环烃基、环烯基和杂环烯基的那些基团）的取代基一般分别称为“烃基取代基”和“杂烃基取代基”，它们可以是各种基团的一种或多种，选自但不限于：-OR'、=O、=NR'、=N-OR'、-NR'R''、-SR'、-卤素、-SiR'R''R'''、-OC(O)R'、-C(O)R'、-CO₂R'、

-CONR'R''、-OC(O)NR'R''、-NR"C(O)R'、-NR'-C(O)NR''R'''、-NR''C(O)₂R'、-NR-C(NR'R''R''')=NR'''、-NR-C(NR'R'')=NR'''、-S(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)₂NR'R''、-NRSO₂R'、-CN 和-NO₂，数量范围从 0 至(2m'+1)，其中 m'是这类原子团中碳原子的总数。R'、R''、R'''和 R''''各自优选独立地表示氢、取代或未取代的杂烃基、取代或未取代的芳基——例如被 1-3 个卤素取代的芳基——、取代或未取代的烃基、烃氧基或硫代烃氧基、或芳基烃基。当本发明化合物包括一个以上 R 基团时，例如每个 R 基团是独立地加以选择的，当存在一个以上 R'、R''、R'''和 R''''基团时，它们也是如此。当 R'和 R''与相同的氮原子连接时，它们可以与氮原子联合构成 5-、6-或 7-元环。例如，-NR'R''意味着包括但不限于 1-吡咯烷基和 4-吗啉基。本领域技术人员从上述取代基的讨论将理解到，术语“烃基”意味着包括其中碳原子与除氢以外的基团键合的基团，例如卤代烃基（例如-CF₃ 和-CH₂CF₃）和酰基（例如-C(O)CH₃、-C(O)CF₃、-C(O)CH₂OCH₃ 等）。

类似于关于烃基原子团所述的取代基，芳基的取代基和杂芳基的取代基一般分别称为“芳基取代基”和“杂芳基取代基”；并且是各不相同的，例如选自：卤素、-OR'、=O、=NR'、=N-OR'、-NR'R''、-SR'、-卤素、-SiR'R''R''''、-OC(O)R'、-C(O)R'、-CO₂R'、-CONR'R''、-OC(O)NR'R''、-NR''C(O)R'、-NR'-C(O)NR''R''''、-NR''C(O)₂R'、-NR-C(NR'R'')=NR''''、-S(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)₂NR'R''、-NRSO₂R'、-CN、-NO₂、-R'、-N₃、-CH(Ph)₂、氟代(C₁-C₄)烃氧基和氟代(C₁-C₄)烃基，数量范围从零至芳族环系上开放化合价的总数；其中 R'、R''、R'''和 R''''优选独立地表示氢、(C₁-C₈)烃基与杂烃基、未取代的芳基与杂芳基、(未取代的芳基)-(C₁-C₄)烃基和(未取代的芳基)氧基-(C₁-C₄)烃基。当本发明化合物包括一个以上 R 基团时，例如每个 R 基团是独立地加以选择的，当存在一个以上 R'、R''、R'''和 R''''基团时，它们也是如此。

芳基或杂芳基环的相邻原子上两个芳基取代基可以可选地被式-T-C(O)-(CRR')_q-U-取代基代替，其中 T 和 U 独立地是-NR-、-O-、

-CRR'-或单键，q是0至3的整数。或者，芳基或杂芳基环的相邻原子上两个取代基可以可选地被式-A-(CH₂)_r-B-取代基代替，其中A和B独立地是-CRR'-、-O-、-NR-、-S-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂NR'-或单键，r是1至4的整数。如此构成的新环的单键之一可以可选地被双键代替。或者，芳基或杂芳基环的相邻原子上两个取代基可以可选地被式-(CRR')_s-X-(CR"R'")_d-取代基代替，其中s和d独立地是0至3的整数，X是-O-、-NR'-、-S-、-S(O)-、-S(O)₂-或-S(O)₂NR'-。取代基R、R'、R"和R'"优选独立地选自氢或取代或未取代的(C₁-C₆)烃基。

本文所用的术语“杂原子”包括氧(O)、氮(N)、硫(S)和硅(Si)。

符号“R”是代表取代基的通用缩写，取代基选自取代或未取代的烃基、取代或未取代的杂烃基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基和取代或未取代的杂环基。

术语“药学上可接受的盐”包括活性化合物的盐，它们是利用相对无毒性的酸或碱制备的，这取决于本文所述化合物上的特定取代基。当本发明化合物含有相对酸性的官能度时，可以这样得到碱加成盐，使这类化合物的中性形式与足量所需的碱接触，纯净地或者在适合的惰性溶剂中。药学上可接受的碱加成盐的实例包括钠、钾、钙、铵、有机氨基或镁的盐，或相似的盐。当本发明化合物含有相对碱性的官能度时，可以这样得到酸加成盐，使这类化合物的中性形式与足量所需的酸接触，纯净地或者在适合的惰性溶剂中。药学上可接受的酸加成盐的实例包括从无机酸衍生的那些，酸例如盐酸、氢溴酸、硝酸、碳酸、一氢碳酸、磷酸、一氢磷酸、二氢磷酸、硫酸、一氢硫酸、氢碘酸或磷酸等，以及从相对无毒性的有机酸衍生的盐，酸例如乙酸、丙酸、异丁酸、马来酸、丙二酸、苯甲酸、琥珀酸、辛二酸、富马酸、乳酸、扁桃酸、邻苯二甲酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、柠檬酸、酒石酸、甲磺酸等。还包括氨基酸的盐，例如精氨酸盐等，和葡萄糖醛酸或半乳糖醛酸等有机酸的盐（例如参见Berge等，“Pharmaceutical Salts”，Journal of Pharmaceutical Science, 1977, 66, 1-19）。本发明的某些具体化合物含有碱性和酸性官能度，允许化合物转化为碱或酸加成盐。

化合物的中性形式优选地这样再生，使盐与碱或酸接触，再按常规方式分离母体化合物。化合物的母体形式在某些物理性质上不同于各种盐形式，例如在极性溶剂中的溶解度，但是出于本发明的目的，盐等同于化合物的母体形式。

除了盐形式以外，本发明提供前体药物形式的化合物。本文所述化合物的前体药物是这样的化合物，它们在生理条件下容易经历化学变化，提供本发明的化合物。另外，前体药物可以在 *ex vivo* 环境中通过化学或生化方法转化为本发明的化合物。例如，当置于含有适合的酶或化学试剂的透皮贴剂药库中时，前体药物可以缓慢地转化为本发明的化合物。

某些本发明化合物可以存在未溶剂化的形式以及溶剂化的形式，包括水合的形式。一般而言，溶剂化的形式等同于未溶剂化的形式，都涵盖在本发明的范围内。某些本发明化合物可以存在多晶型或无定形。一般而言，所有物理形式在本发明所涉及的用途上都是等同的，都属于本发明的范围。

某些本发明化合物具有不对称的碳原子（旋光中心）或双键；外消旋物、非对映体、几何异构体和个别的异构体都涵盖在本发明的范围内。

本发明的化合物还可以在构成这类化合物的一个或多个原子上含有非天然部分的原子同位素。例如，化合物可以用放射性同位素放射性标记，例如氟(³H)、碘-125 (¹²⁵I)或碳-14 (¹⁴C)。本发明化合物的所有同位素变体无论是否是放射性的都打算涵盖在本发明的范围内。

术语“连接部分”或“连接定向基团的部分”表示允许定向基团与连接基团连接的部分。典型的连接基团包括——仅供阐述而非限制——烃基、氨基烃基、氨基羰基烃基、羧基烃基、羟基烃基、烃基-马来酰亚胺、烃基-N-羟基琥珀酰亚胺、聚(乙二醇)-马来酰亚胺和聚(乙二醇)-N-羟基琥珀酰亚胺，它们全部可以被进一步取代。连接基团还可以使连接部分事实上附于定向基团。

本文所用的术语“离去基团”表示在反应中从反应物上裂解的反

应物部分。

“抗体”一般表示这样一种多肽，它包含来自免疫球蛋白或其片段的框架区，特异性地结合和识别抗原。所识别的免疫球蛋白包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因，以及无数的免疫球蛋白可变区基因。 κ 或 λ 归属于轻链。 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ 归属于重链，继而分别定义免疫球蛋白种类 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE.

示范性免疫球蛋白（抗体）结构单位包含四聚物。每个四聚物由两对相同的多肽链组成，每对具有一条“轻”链（约 25kDa）和一条“重”链（约 50 – 70kDa）。每条链的 N-末端定义约 100 至 110 个或以上氨基酸的可变区，主要负责抗原识别。术语可变的轻链(VL)和可变的重链(VH)分别表示这些轻链和重链。

抗体例如以完整的免疫球蛋白形式存在，或者以大量被充分鉴别的片段形式存在，这些片段是被各种肽酶的消化作用产生的。因而例如，胃蛋白酶消化铰链区二硫键以下的抗体，生成 F(ab)'2，即 Fab 的二聚物，它本身是通过二硫键与 VH-CH1 连接的轻链。F(ab)'2 可以在温和条件下分解，断开铰链区的二硫键，由此转化 F(ab)'2 二聚物为 Fab' 单体。Fab' 单体本质上是具有一部分铰链区的 Fab (Fundamental Immunology, Paul ed., 3rd ed. 1993). 尽管各种抗体片段是根据完整抗体的消化作用定义的，不过技术人员将领会到，这类片段可以利用化学或重组 DNA 方法重新合成。因而，本文所用的术语抗体还包括通过全部抗体的修饰作用产生的抗体片段或利用重组 DNA 方法重新合成的那些（例如单链 Fv）。

关于单克隆或多克隆抗体的制备，可以使用本领域已知的任意工艺（例如参见 Kohler & Milstein, Nature 256: 495-497 (1975); Kozbor 等, Immunology Today 4: 72 (1983); Cole 等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc. (1985)）。

多克隆抗体的生产方法是本领域技术人员已知的。将同系繁殖的小鼠（例如 BALB/C 小鼠）或兔子用蛋白质致免疫，使用标准的佐剂，例如 Freund 佐剂，和标准的致免疫方案。动物对免疫原制备物的免疫

应答是这样监测的，进行试验性放血，测定对β亚单位的反应性效价。当得到适当高的抗体对免疫原的效价时，采集动物的血液，制备抗血清。如果需要的话可以进行抗血清的进一步分离，以富集对蛋白质呈反应性的抗体。

单克隆抗体可以通过本领域技术人员熟悉的各种工艺得到。简而言之，将用所需抗原致免疫的动物的脾细胞不死化，普遍通过与骨髓瘤细胞融合(Kohler & Milstein, Eur. J. Immunol. 6: 511-519 (1976))。不死化的替代方法包括用 EB 病毒、致癌基因或逆病毒转化，或本领域熟知的其他方法。

在进一步优选的实施方式中，抗体是人或人化抗体。“人化”表示非人的多肽序列，它已经经过修饰，以最小化对人的免疫反应性，通常通过改变氨基酸序列，以模拟现有的人序列，基本上不改变多肽序列的功能（例如参见 Jones 等, Nature 321: 522-525 (1986)，和公开的英国专利申请 No. 8707252）。“人”抗体完全由来自人抗体基因的多肽序列组成，例如可以通过噬菌体显示法得到或者得自遗传上变为含有人免疫球蛋白基因的小鼠。

本文所用的“固体载体”表示这样一种材料，它基本上不溶于所选择的溶剂系统，或者可以容易从所选择的可溶性溶剂系统中分离(例如通过沉淀法)。可用于实施本发明的固体载体可以包括活化的或者能够活化的基团，以允许所选择的种类与固体载体结合。固体载体还可以是一种底物，例如芯片、晶片或井，本发明的个体或一种以上化合物结合其上。

本文所用的“反应性官能团”表示这样的基团，包括但不限于烯烃、炔烃、醇、酚、醚、氧化物、卤化物、醛、酮、羧酸、酯、酰胺、氰酸盐、异氰酸盐、硫氰酸盐、异硫氰酸盐、胺、肼、腙、酰肼、重氮、重氮鎓、硝基、腈、硫醇、硫化物、二硫化物、亚砜、砜、磺酸、亚磺酸、缩醛、缩酮、酸酐、硫酸盐、次磺酸、异腈、脒、亚酰胺、亚胺酸盐、硝酮、羟胺、肟、异羟肟酸、硫代异羟肟酸、丙二烯、原酸酯、亚硫酸盐、烯胺、炔胺、脲、假脲、氨基脲、碳二亚胺、氨基

甲酸酯、亚胺、叠氮化物、偶氮化合物、氧化偶氮化合物和亚硝基化合物。反应性官能团还包括用于制备生物缀合物的那些，例如 N-羟基琥珀酰亚胺酯、马来酰亚胺等（例如参见 Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic press, San Diego, 1996）。制备每种这些官能团的方法是本领域熟知的，它们应用于特定的目的或者根据特定的目的而修改都在本领域技术人员的能力范围内（例如参见 Sandler and Karo, eds. *Organic Functional Group Preparations*, Academic Press, San Diego, 1989）。

本发明的化合物被制成单一的异构体（例如对映体、顺-反式、位置的、非对映体）或异构体的混合物。在优选的实施方式中，化合物被制成基本上单一的异构体。制备基本上异构体纯的化合物的方法是本领域已知的。例如，富集对映体的混合物和纯的对映体化合物可以这样制备，利用对映体纯的合成中间体与这类反应的组合，这些反应维持手性中心的立体化学不变，或者导致其完全反转。或者，终产物或合成沿途的中间体可以被拆分为单一的立体异构体。用于反转特定的立体中心或者维持其不变的工艺和用于拆分立体异构体混合物的工艺是本领域熟知的，本领域技术人员完全在其能力范围内根据特定的情形选择适当的方法。一般参见 Furniss 等(eds.), *Vogel's Encyclopedia of Practical Organic Chemistry* 5th ed., Longman Scientific and Technical Ltd., Essex, 1991, pp. 809-816; Heller, Acc. Chem. Res. 23: 128 (1990)。

细胞毒素

很多治疗剂、特别是对癌症化疗法尤其有效的那些经常表现急性体内毒性，尤其是骨髓和肌肉毒性，以及慢性心脏和神经病学毒性。这么高的毒性限制了它们的应用。开发更多和更安全的特异性治疗剂、特别是抗肿瘤剂需要对肿瘤细胞具有更大的有效性，并且减少这些产品的副作用（毒性、对非肿瘤细胞的破坏等）的数量和严重性。

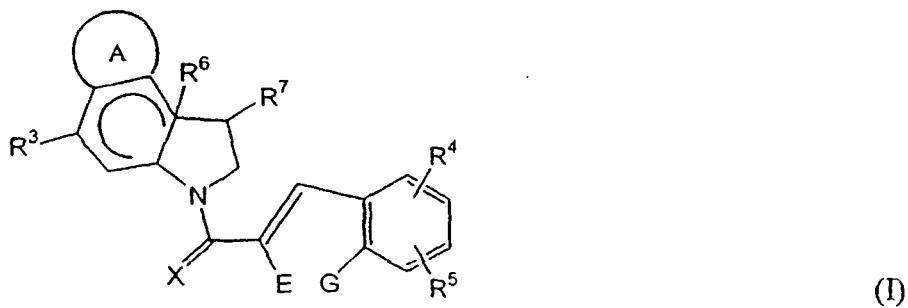
关于更高选择性细胞毒性剂的研究几十年来一直是极为活跃的，限制剂量的毒性（也就是细胞毒素对正常组织的不可取的活性）是癌

症疗法失败的主要原因之一。例如，CC-1065 和 duocarmycin 已知是极为有力的细胞毒素。为评价这些化合物的类似物已经进行了大量尝试；不过，多数已经显示在治疗剂量下表现不可取的毒性。因此，目标是提高抗肿瘤剂的特异性，增加对抗肿瘤细胞的有效性，同时减少不良的副作用，例如毒性和对非肿瘤细胞的破坏。

有研究集中于开发新的治疗剂，它们是前体药物的形式，也就是通过对它们的结构进行某些化学或酶学修饰能够体内转化为药物（活性治疗性化合物）的化合物。出于减少毒性的目的，这种转化作用优选地限于作用部位或靶组织而不是循环系统或非靶组织。不过，即使前体药物也是成问题的，因为由于酶的存在，很多是以血液和血清中的低稳定性为特征的，这些酶在前体药物到达患者体内所需部位之前降解或者激活前体药物。

因此，尽管本领域已经取得了一定进展，也仍然需要开发改进的治疗剂，用于治疗哺乳动物，特别是人，治疗剂更具体为细胞毒素和有关的前体药物，它们相对于相似结构的已知化合物而言表现较高的作用特异性、减少的毒性和提高的血液稳定性。

在第一方面，本发明提供具有式 I 结构的细胞毒性化合物：



其中环系 A 是选自取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基和取代或未取代的杂环烃基的成员。示范性环系包括苯基和吡咯。

符号 E 和 G 代表 H、取代或未取代的烃基、取代或未取代的杂烃基、杂原子或单键。E 和 G 可选地连接构成环系，选自取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基和取代或未取代的杂环烃基。

符号 X 代表选自 O、S 和 NR²³ 的成员。R²³ 是选自 H、取代或未

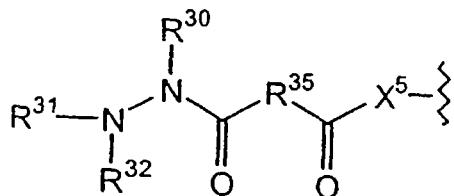
取代的烃基、取代或未取代的杂烃基和酰基的成员。

符号 R^3 代表选自($=O$)、 SR^{11} 、 NHR^{11} 和 OR^{11} 的成员，其中 R^{11} 是 H、取代或未取代的烃基、取代或未取代的杂烃基、酰基、 $C(O)R^{12}$ 、 $C(O)OR^{12}$ 、 $C(O)NR^{12}R^{13}$ 、 $C(O)OR^{12}$ 、 $P(O)(OR^{12})_2$ 、 $C(O)CHR^{12}R^{13}$ 、 $C(O)OR^{12}$ 、 SR^{12} 或 $SiR^{12}R^{13}R^{14}$ 。符号 R^{12} 、 R^{13} 和 R^{14} 独立地代表 H、取代或未取代的烃基、取代或未取代的杂烃基和取代或未取代的芳基，其中 R^{12} 和 R^{13} 与它们所连接的氮原子一起可选地连接构成 4 至 6 元取代或未取代的杂环烃基环系，可选地含有两个或多个杂原子。一个或多个 R^{12} 、 R^{13} 或 R^{14} 可以在其结构内包括可裂解的基团。

R^4 和 R^5 是独立地选自 H、取代或未取代的烃基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂环烃基、取代或未取代的芳基烃基、卤素、 NO_2 、 $NR^{15}R^{16}$ 、 $NC(O)R^{15}$ 、 $OC(O)NR^{15}R^{16}$ 、 $OC(O)OR^{15}$ 、 $C(O)R^{15}$ 、 SR^{15} 和 OR^{15} 的成员。 R^{15} 和 R^{16} 独立地代表 H、取代或未取代的烃基、取代或未取代的杂烃基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂环烃基、芳基烃基和取代或未取代的肽基，其中 R^{15} 和 R^{16} 与它们所连接的氮原子一起可选地连接构成 4 至 6 元取代或未取代的杂环烃基环系，可选地含有两个或多个杂原子。

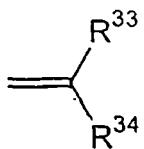
R^4 、 R^5 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{15} 和 R^{16} 可选地在它们的结构内含有一个或多个可裂解基团。示范性可裂解基团包括但不限于肽、氨基酸和二硫化物。

在另一种示范性实施方式中，本发明提供根据式 I 的化合物，其中至少一个 R^4 、 R^5 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{15} 和 R^{16} 包含：



其中 R^{30} 是选自 H、取代或未取代的烃基和取代或未取代的杂烃基的成员。符号 R^{31} 和 R^{32} 独立地代表 H、取代或未取代的烃基、取代

或未取代的杂烃基、取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂芳基，或者 R³¹ 和 R³² 一起是：



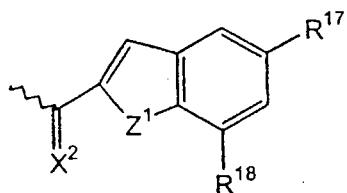
其中 R³³ 和 R³⁴ 独立地代表 H、取代或未取代的烃基、取代或未取代的杂烃基、取代或未取代的芳基或取代或未取代的杂芳基。符号 R³⁵ 代表取代或未取代的烃基、取代或未取代的杂烃基或 NR³⁶。R³⁶ 是选自 H、取代或未取代的烃基和取代或未取代的杂烃基的成员。X⁵ 是 O 或 NR³⁷，其中 R³⁷ 是选自 H、取代或未取代的烃基和取代或未取代的杂烃基的成员。在进一步的实施方式中，至少一个 R³³ 和 R³⁴ 选自 L⁵X⁶，其中 “L” 和 “X” 一般是如本文所述的。

在示范性实施方式中，上述结构中的至少一个 R³¹、R³²、R³³ 和 R³⁴ 是被这样一个部分取代的芳基或杂芳基部分，它包括保护或未保护的反应性官能团、定向剂或可检测的标记。

在进一步的示范性实施方式中，至少一个 R⁴、R⁵、R¹¹、R¹²、R¹³、R¹⁵ 和 R¹⁶ 携带适合于缀合根据式 I 的化合物与另一种分子的反应性基团。在进一步的示范性实施方式中，R⁴、R⁵、R¹¹、R¹²、R¹³、R¹⁵ 和 R¹⁶ 独立地选自取代的烃基和取代的杂烃基，并且在烃基或杂烃基部分的游离末端具有反应性官能团。一个或多个 R⁴、R⁵、R¹¹、R¹²、R¹³、R¹⁵ 和 R¹⁶ 可以与另一种分子缀合，例如定向剂、可检测的标记、固体载体等。

从本文的讨论可以明显看出，当至少一个 R¹⁵ 和 R¹⁶ 是反应性官能团时，该基团可以是在根据式 I 的化合物与另一种分子之间的键的组分。在示范性实施方式中，其中至少一个 R¹⁵ 和 R¹⁶ 是式 I 化合物与另一种分子之间的键，至少一个 R¹⁵ 和 R¹⁶ 是被酶裂解的部分。

在进一步的示范性实施方式中，至少一个 R⁴ 和 R⁵ 是：

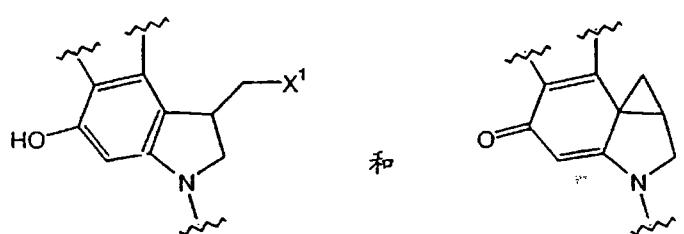


上式中，符号 X^2 和 Z^1 代表独立地选自 O、S 和 NR²³ 的成员。基团 R^{17} 和 R^{18} 独立地选自 H、取代或未取代的烃基、取代或未取代的杂烃基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂环烃基、卤素、NO₂、NR¹⁹R²⁰、NC(O)R¹⁹、OC(O)NR¹⁹、OC(O)OR¹⁹、C(O)R¹⁹、SR¹⁹ 或 OR¹⁹。

符号 R^{19} 和 R^{20} 独立地代表取代或未取代的烃基、取代或未取代的杂烃基、取代或未取代的芳基、取代或取代的杂芳基、取代或未取代的杂环烃基、取代或未取代的肽基，其中 R^{19} 和 R^{20} 与它们所连接的氮原子一起可选地构成 4 至 6 元取代或未取代的杂环烃基环系，可选地含有两个或多个杂原子，其条件是当 Z^1 是 NH 时， R^{17} 和 R^{18} 都不是 H， R^{17} 不是 NH₂。遍及本说明书的符号 R^{19} 和 R^{20} 还涵盖 R^4 和 R^5 所述基团。因而例如，在本发明的范围内提供这样的化合物，它具有两个或多个如上刚才所述的相连的稠合苯基-杂环环系或稠合环与连接基团的组合。而且，在存在连接基团的那些实施方式中，连接基团可以以 R^4 或 R^5 取代基的形式存在或者以 R^{17} 或 R^{18} 取代的形式存在。

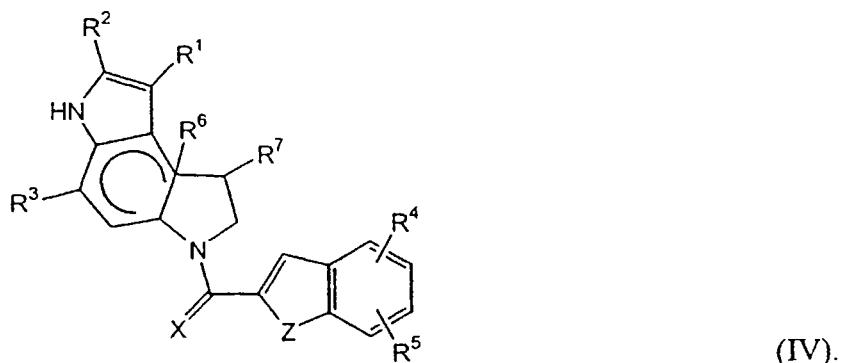
R^6 是单键，它可以存在也可以不存在。当 R^6 存在时， R^6 和 R^7 连接构成环丙基环。 R^7 是 CH₂-X¹ 或 -CH₂-。当 R^7 是 -CH₂- 时，它是环丙烷环的组分。符号 X^1 代表离去基团。技术人员将理解 R^6 和 R^7 的组合方式不会违反化合价的原理。

六元环内的曲线表示该环可以具有一个或多个不饱和度，并且可以是芳香性的。因而，例如下述等环结构和有关的结构都属于式 I 的范围：



在示范性实施方式中，环系 A 是取代或未取代的苯基环。环系 A 优选地被一个或多个如本文定义一节所述的芳基取代基取代。在一种优选的实施方式中，苯基环被 CN 部分取代。

在另一种示范性实施方式中，本发明提供具有式 IV 结构的化合物：



在这种实施方式中，原子团 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 和 X 是如上所述的取代基。符号 Z 是独立地选自 O、S 和 NR^{23} 的成员。符号 R^{23} 代表选自 H、取代或未取代的烃基、取代或未取代的杂烃基和酰基的成员。当 X 和 Z 都是 NR^{23} 时，每个 R^{23} 是独立地加以选择的。符号 R^1 代表 H、取代或未取代的低级烃基或 $C(O)R^8$ 。 R^8 是选自 NR^9R^{10} 、 NR^9NHR^{10} 和 OR^9 的成员。 R^9 和 R^{10} 独立地选自 H、取代或未取代的烃基和取代或未取代的杂烃基。原子团 R^2 是 H 或取代或未取代的低级烃基。一般优选的是当 R^2 是取代的烃基时，它不是全氟烃基，例如 CF_3 。

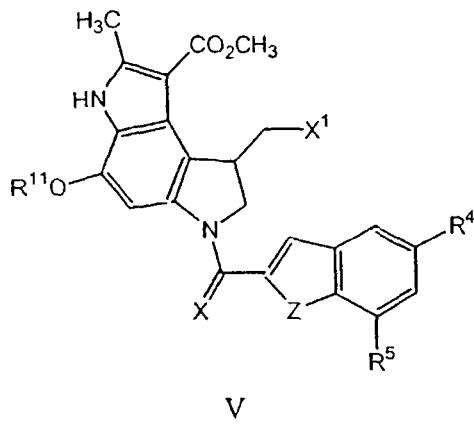
正如上面所讨论的， X^1 可以是离去基团。有用的离去基团包括但不限于卤化物、叠氮化物、磺酸酯（例如烃基磺酰基、芳基磺酰基）、氧𬭩离子、烃基高氯酸酯、铵烷磺酸酯、烃基氟代磺酸酯和氟代化合物（例如三氟甲磺酸酯、nonaflate、甲苯磺酸酯）等。适合于特定的一套反应条件的这些与其他离去基团的选择在本领域技术人员的能力范围内（例如参见 March J, Advanced Organic Chemistry, 2nd Edition, John Wiley and Sons, 1992; Sandler SR, Karo W, Organic Functional Group Preparations, 2nd Edition, Academic Press, Inc., 1983; Wade

LG, Compendium of Organic Synthetic Methods, John Wiley and Sons, 1980).

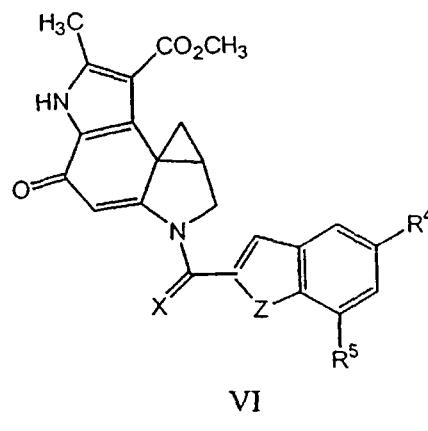
在示范性实施方式中, R^1 是酯部分, 例如 CO_2CH_3 。在进一步的示范性实施方式中, R^2 是低级烷基, 它可以是取代或未取代的。目前优选的低级烃基是 CH_3 。在进一步的实施方式中, R^1 是 CO_2CH_3 , R^2 是 CH_3 。

在另一种示范性实施方式中, R^4 和 R^5 是独立地选自 H、卤素、 NH_2 、 $O(CH_2)_2N(Me)_2$ 和 NO_2 的成员。 R^4 和 R^5 优选地不是 H 或 OCH_3 。

在另一种示范性实施方式中, 本发明提供具有式 V 和 VI 结构的化合物:

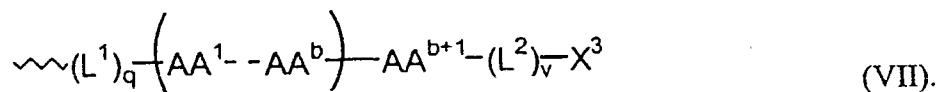


和



上式中, X 优选地是 O; Z 优选地是 O。

根据式 I 的化合物还可以包括肽基连接基团作为取代基。连接基团可以位于化合物上任意所需位置。在示范性实施方式中, 至少一个 R^4 、 R^5 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{15} 和 R^{16} 具有根据式 VII 的结构:

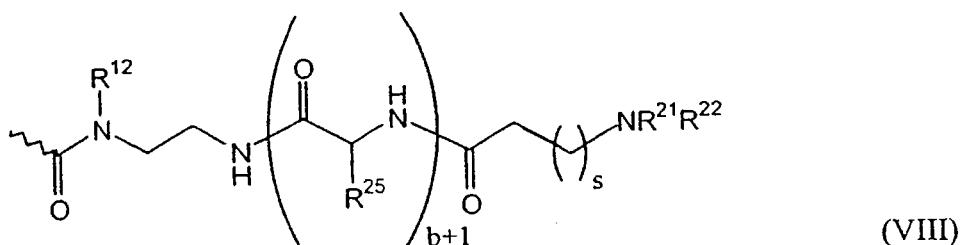


在下面的讨论中, 根据式 VII 的连接基团是如 R^{11} 所例证的。集中讨论仅仅为了清楚起见, 将为本领域技术人员所显而易见的是, 连接基团可以在本发明化合物的任意位置。

式 VII 中, 符号 X^3 代表保护或未保护的反应性官能团、可检测的

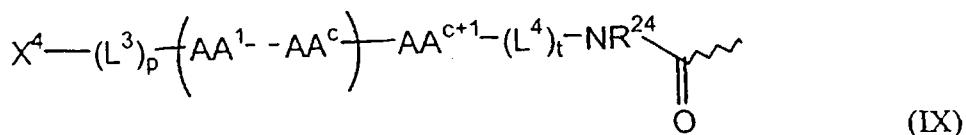
标记或定向剂。基团 L¹ 和 L² 是连接基团，选自取代或未取代的烃基和取代或未取代的杂烃基。示范性连接基团 L¹ 和 L² 包含聚(乙二醇)部分。连接基团可以存在也可以不存在，因而，q 和 v 是独立地选自 0 和 1 的整数。符号 AA¹、AA^b 和 AA^{b+1} 代表天然和非天然的α-氨基酸。AA¹ 与 AA^b 之间的虚线表示任意数量的氨基酸可以位于两个所引用的氨基酸之间。在示范性实施方式中，括号内的氨基酸总数(“b”)从约 0 至约 20。在进一步的示范性实施方式中，“b”是从约 1 至约 5 的整数。

根据式 VII 的示范性连接基团如式 VIII 所述：



其中符号 R²¹ 和 R²² 独立地代表取代或未取代的烃基、取代或未取代的杂烃基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂环烃基、可检测的标记和定向剂。基团 R¹² 和 R²⁵ 独立地选自 H、取代或未取代的低级烃基、氨基酸侧链、可检测的标记和定向剂。该结构中由 AA¹、AA^b 和 AA^{b+1} 代表的氨基酸部分基本上类似于式 VII。

在另一种实施方式中，根据式 I 的化合物包括具有式 IX 结构的连接基团：

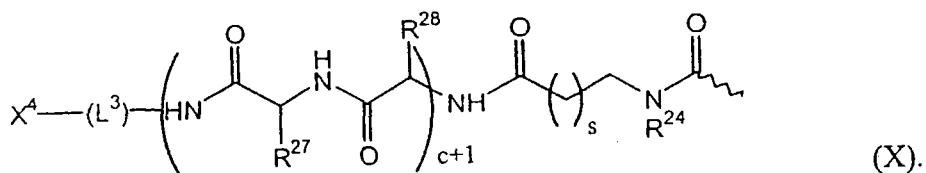


其中符号 X⁴ 代表保护或未保护的反应性官能团、可检测的标记或定向剂。符号 L³ 和 L⁴ 代表这样的连接基团，它们是取代或未取代的烃基或取代或未取代的杂烃基。连接基团的氨基酸部分基本上类似于式 VII 所述。示范性连接基团在其框架内包括聚(乙二醇)类似物。每个连接基团可以存在也可以不存在，因而，p 和 t 是独立地选自 0 和 1

的整数。

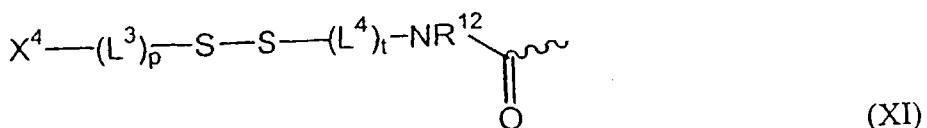
根据式 IX 的连接基团可以取代在根据式 I 的分子的任意部位。在示范性实施方式中，根据式 IX 的连接基团是选自 R^4 、 R^5 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{15} 和 R^{16} 的成员。本领域技术人员将领会到，连接基团还可以是一个或多个 R^{17} 或 R^{18} 的组分，或者在式 I 化合物的高级同系物中的相似位置。

根据式 IX 的示范性连接基团如式 X 所述：



式 X 中， R^{27} 和 R^{28} 是独立地选自 H、取代或未取代的低级烃基、氨基酸侧链、可检测的标记和定向剂的成员。符号“s”代表一个整数，整数的选择可以提供任意所需长度的连接基团。目前优选的是这样的连接基团，其中“s”是 0 至 6 的整数，更优选在 1 与 5 之间。

在另一种示范性实施方式中，本发明提供根据式 I 的分子，它被一个或多个连接基团取代，连接基团在它们的结构中包括可裂解的二硫化物部分，例如式 XI 所述：



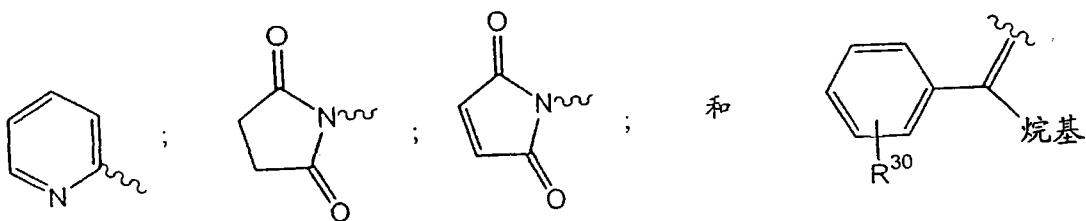
其中 X^4 是选自被保护的反应性官能团、未保护的反应性官能团、可检测的标记和定向剂的成员。 L^3 是连接基团，选自取代或未取代的烃基、取代或未取代的杂烃基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的环烃基。 L^4 是连接基团，选自取代或未取代的烃基、取代或未取代的杂烃基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的环烃基。符号 p 和 t 代表独立地选自 0 和 1 的整数。

在根据式 XI 的示范性实施方式中，连接基团 L^4 是取代或未取代

的亚乙基部分。

基团 X^4 是选自 R^{29} 、 $COOR^{29}$ 、 $C(O)NR^{29}$ 和 $C(O)NNR^{29}$ 的成员，其中 R^{29} 是选自取代或未取代的烃基、取代或未取代的杂烃基和取代或未取代的杂芳基的成员。

在另一种示范性实施方式中， R^{29} 是选自 H ； OH ； $NHNH_2$ ；



的成员，其中 R^{30} 代表终止于反应性官能团的取代或未取代的烃基、终止于官能团的取代或未取代的杂芳基和 $-(L^3)_pX^4$ ，其中每个 L^3 、 X^4 和 p 是独立地加以选择的。

多价的本发明化合物也属于本发明的范围，例如包括本发明化合物或其反应性类似物的二聚物、三聚物、四聚物和高级同系物。多价物可以从单一或一个以上本发明化合物装配而成。例如，二聚构成物可以是“均二聚的”或“杂二聚的”。而且，其中本发明化合物或其反应性类似物与低聚或聚合框架（例如聚赖氨酸、葡聚糖、羟乙基淀粉等）连接的多价构成物也在本发明的范围内。框架优选地是多官能性的（例如具有用于连接本发明化合物的一组反应性部位）。而且，框架可以是利用单一或一个以上本发明化合物衍生的。

而且，本发明包括这样的化合物，它们被官能化后，所得化合物的水溶性相对于没有被类似官能化的相似化合物增强了。因而，本文所述的任意取代基都可以被水溶性更强的相似原子团代替。例如，在本发明范围内的是，用二醇代替羟基，或者用季胺、羟胺或水溶性更高的相似部分代替胺。在优选的实施方式中，对本文所述化合物离子通道而言不是活性必需的部位用增强母体化合物水溶性的部分取代，赋予额外的水溶性。增强有机化合物水溶性的方法是本领域已知的。

这类方法包括但不限于将有机核用永久带电的部分官能化，例如季铵，或者用在生理学有关的 pH 下带电的基团官能化，例如羧酸、胺。其他方法包括向有机核附加含有羟基或胺的基团，例如醇、多元醇、聚醚等。代表性实例包括但不限于聚赖氨酸、聚环乙亚胺、聚(乙二醇)和聚(丙二醇)。适合于这些化合物的官能化化学和策略是本领域已知的。例如参见 Dunn, R. L., 等, Eds. *Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991.*

本发明的示范性细胞毒素如图 2 所述。

前体药物和可裂解的连接基团

除了在上节中详细例证的与本发明细胞毒素连接的连接基团以外，本发明还提供适合于连接本质上任意分子的可裂解连接基团臂。本发明的连接基团臂方面在本文中参照它们与治疗性部分的连接加以例证。不过，将为本领域技术人员容易显而易见的是，连接基团可以与不同的种类连接，包括但不限于诊断剂、分析剂、生物分子、定向剂、可检测的标记等。

本发明在一方面涉及可用于连接定向基团与治疗剂和标记物的连接基团。本发明在另一方面提供这样的连接基团，它们赋予化合物以稳定性，减少它们的体内毒性，或者有利地影响它们的药动学、生物利用度和/或药效学。一般优选的是在这类实施方式中，一旦药物被释放至它的作用部位，连接基团即被裂解，释放活性药物。因而，在本发明的一种实施方式中，本发明的连接基团是无痕迹的，以便一旦从治疗剂或标记物上除去(例如在活化期间)，不再存在连接基团的痕迹。

在本发明的另一种实施方式中，连接基团是以它们在靶细胞内或附近的部位被裂解的能力为特征的，例如治疗作用或标记物活性的部位。这类裂解作用优选地实际上是由酶的作用。这种特性有助于减少治疗剂或标记物的全身活化作用，减少毒性和全身副作用。

连接基团还起到稳定化治疗剂或标记物的作用，抵抗处于循环中的降解作用。这种特性提供显著的益处，因为这类稳定作用延长所连

接的药物或标记物的循环半衰期。连接基团还起到减弱所连接的药物或标记物活性的作用，以便缀合物处于循环中是相对良性的，并且在所需作用部位活化后具有所需的效果，例如是毒性的。关于治疗剂缀合物，连接基团的这种特性起到提高药物治疗指数的作用。

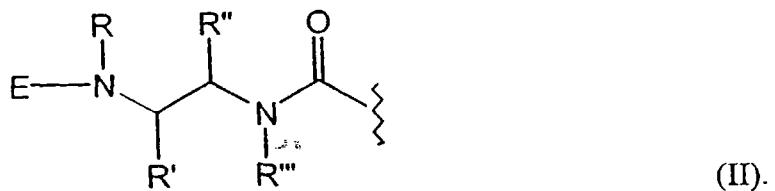
稳定基团优选地是这样选择的，以限制治疗剂或标记物被可能存在于血液或非靶组织中的酶所廓清和代谢，并且进一步是这样选择的，以限制药物或标记物转运进入细胞。稳定基团起到阻滞药物或标记物降解的作用，还可以提供药物或标记物的其他物理特征。稳定基团还可以提高药物或标记物在贮存期间的稳定性，无论是经过配制的形式还是未经过配制的形式。

理想的是，如果稳定基团起到防护药物或标记物降解的作用，那么当药物或标记物在 37°C 人血液中贮存 2 小时后，导致少于 20%、优选少于 2% 的药物或标记物在给定测定条件下被存在于人血液中的酶裂解，说明它可用于稳定治疗剂或标记物。

本发明还涉及含有这些连接基团的缀合物。更确切地，本发明涉及可以用于治疗疾病、尤其是癌症化疗法的前体药物。具体而言，本文所述连接基团的使用为前体药物提供相对于相似结构的前体药物而言更高的作用特异性、减少的毒性和提高的血液稳定性。

因而，所提供的连接基团可以含有任意各种基团作为其链的一部分，它们将在体内裂解，例如在血流中，速率高于缺少这类基因的构成物。还提供了连接基团臂与治疗和诊断剂的缀合物。连接基团可用于生成治疗剂的前体药物类似物，可逆地连接治疗或诊断剂与定向剂、可检测的标记或固体载体。连接基团可以结合成包括本发明细胞毒素的配合物。

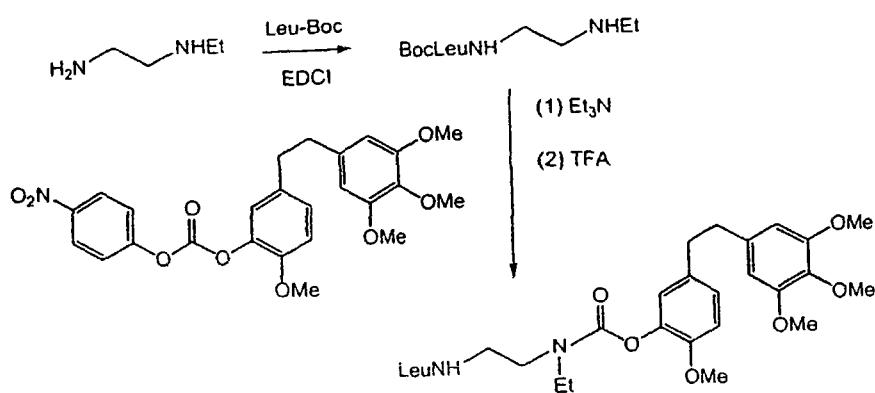
在一种实施方式中，本发明提供连接基团具有式 II 所述通式的连接基团：



上式中，符号 E 代表酶可裂解部分（例如肽、酯等）。符号 R、R^I、R^{II}和 R^{III}代表例如包括 H、取代或未取代的烃基、取代或未取代的杂烃基、聚(乙二醇)、酰基、定向剂、可检测的标记的成员。在示范性实施方式中，羧基部分的氧连接可检测的标记、治疗性部分或固体载体。羧基部分可以进一步与氧、硫、氮或碳连接在该片段被截断的位置。在进一步的示范性实施方式中，羧基部分是尿烷的组分。与羧基部分连接的氧连接定向剂、细胞毒素、固体载体等。

肽类连接基团

在示范性实施方式中，酶可裂解的基团是氨基酸或终止于在其羧基末端与连接基团其余部分连接的氨基酸的肽序列。目前优选的氨基酸或肽是被肿瘤激活的那些。被肿瘤激活的肽是酶可裂解的基团，在肿瘤部位被特异性裂解。可以采用与所选择的肿瘤有关的特异性肽，它们被特异性酶所激活；大量这样的肽是本领域已知的。用在连接基团中的氨基酸可以是天然的或非天然的氨基酸。在优选的实施方式中，序列中至少一个氨基酸是天然氨基酸。结合有氨基酸部分的连接基团的示范性制备如流程 1 所述，详细描述 Combrestatin 与本发明连接基团的缀合作用。

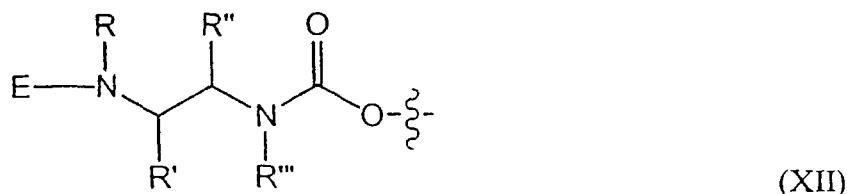


流程 1

流程 1 中，EDCI 介导的伯胺与 t-Boc 保护的亮氨酸的脱水偶联作用得到被保护的亮氨酸-胺缀合物。使缀合物与被对硝基苯基碳酸酯激

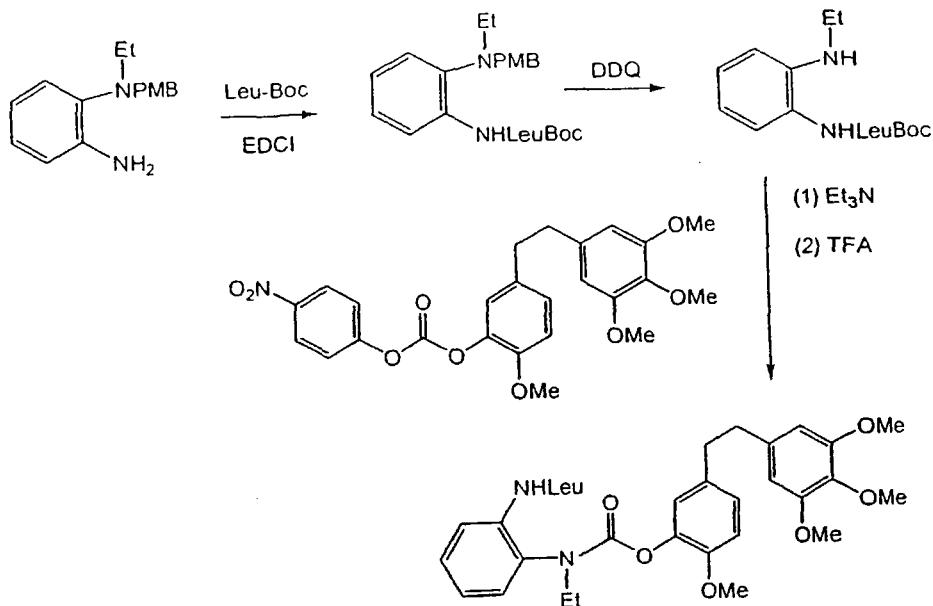
活的 Combrestatin 偶联，再用三氟乙酸裂解 t-Boc 基团使产物去保护。

在另一种示范性实施方式中，连接基团是如式 XII 所述的氨基甲酸环状氨基酯。



上式中的原子团基本上与线性连接基团所述那些相同。R、R'、R'' 和 R''' 中的两个与它们所连接的原子一起构成取代或未取代的环烃基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基或取代或未取代的杂环烃基部分。

本发明氨基甲酸环状氨基酯的示范性合成途径如流程 2 所述。

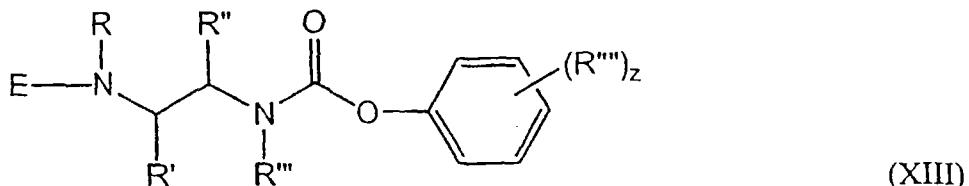


流程 2

流程 2 中，利用 EDCI 使对甲氧基苄基保护的苯基二胺在未保护的苯胺氮上与 t-Boc 保护的亮氨酸偶联。经由 DDQ 的作用除去对甲氧基苄基，再利用被对硝基苯基碳酸酯激活的 Combrestatin 使连接基团臂与 Combrestatin 偶联。用 TFA 除去 t-Boc 基团，得到 Combrestatin-

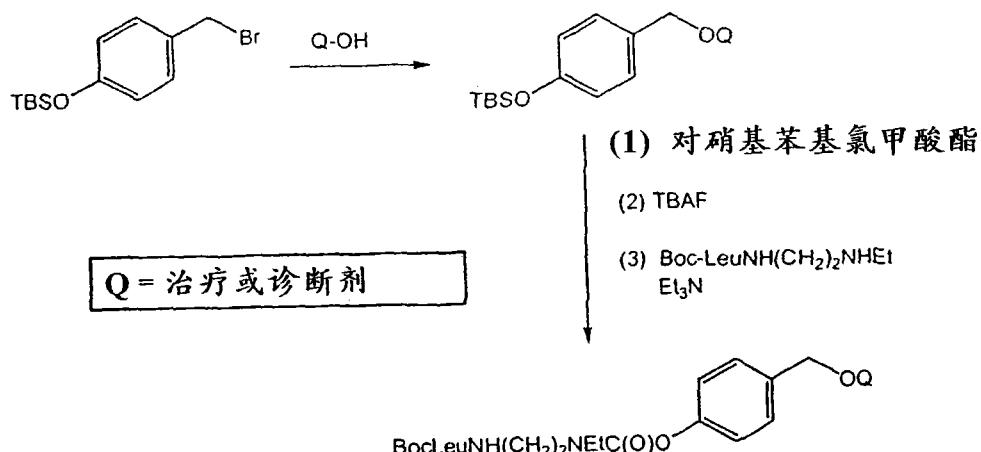
连接基团配合物。

在另一种实施方式中，提供了如下式 XIII 所述的氨基甲酸氨基酯苯甲醇连接基团。



上述结构中的原子团基本上类似于上述那些。R'''代表上文讨论过的芳基部分的任意取代基。当存在一个以上 R'''基团时，每个 R'''基团是独立地加以选择的，z 是 0 至 5 的整数。

本发明的氨基甲酸氨基酯苯甲醇连接基团的示范性合成如流程 3 所述。



流程 3

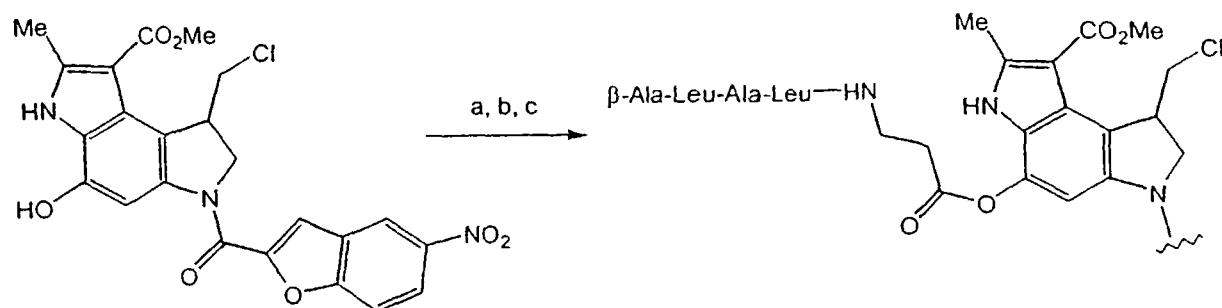
流程 3 中，使具有活化苄型位置的叔丁基二甲基甲硅烷基 O-保护的苯酚与治疗或诊断剂偶联。将缀合物用氟化四丁铵处理，除去叔丁基二甲基甲硅烷基保护基团。将游离 OH 基团用对硝基苯基氯甲酸酯转化为活性碳酸酯。活化的碳酸酯中间体用于偶联被保护的 BocLeuNH(CH₂)₂NHEt 与 OH 基团，生成连接基团-药物缀合物。

肽连接基团-duocarmycin 缀合物

CC-1065 和 duocarmycins 已知是极为有力的抗肿瘤细胞毒素，它们在治疗剂量下表现不可取的毒性。通过连接被肿瘤激活的肽与该细

胞毒素，减少了全身毒性，增加了治疗指数。因而，本发明还提供 duocarmycins 的前体药物缀合物以及 duocarmycin 与定向剂或其他式 I 试剂之间的缀合物。

本发明缀合物的示范性合成流程如流程 4 所述。在所附加的实施例中提供了另外的合成途径。



a：对硝基苯基氯甲酸酯； b： β -Ala(FMOC)-Leu-Ala-Leu-NH(CH₂)₂NHEt； c：哌啶

流程 4

流程 4 中，将细胞毒素用对-硝基苯基氯甲酸酯转化为活性碳酸酯，再使活化的衍生物与 FMOC-保护的被肿瘤激活的肽接触，生成缀合物。将缀合物用哌啶处理，除去 FMOC 基团，得到所需化合物。

很多被血清、肝、肠等中的酶裂解的肽序列是本领域已知的。本发明的示范性肽序列包括被蛋白酶裂解的肽序列。下列关于蛋白酶-敏感性序列的使用的集中讨论仅供清楚地阐述，不起到限制本发明范围的作用。

当裂解肽的酶是一种蛋白酶时，连接基团一般包括含有该蛋白酶的裂解识别序列的肽。蛋白酶的裂解识别序列是在蛋白裂解期间被蛋白酶识别的特异性氨基酸序列。很多蛋白酶裂解部位是本领域已知的，这些和其他裂解部位可以包括在连接基团部分中。例如参见 Matayoshi 等, Science 247: 954 (1990); Dunn 等, Meth. Enzymol. 241: 254 (1994); Seidah 等, Meth. Enzymol. 244: 175 (1994); Thornberry, Meth. Enzymol. 244: 615 (1994); Weber 等, Meth. Enzymol. 244: 595 (1994); Smith 等, Meth. Enzymol. 244: 412 (1994); Bouvier 等, Meth. Enzymol.

248: 614 (1995), Hardy 等, Amyloid Protein Precursor in Development, Aging, and Alzheimer's Disease, ed. Masters 等, pp. 190-198 (1994).

蛋白酶已经参与癌症转移。在很多癌症中, 蛋白酶尿激酶的合成增加与转移能力增加有相互关系。尿激酶激活纤溶酶原变为纤溶酶, 前者普遍位于细胞外的空间, 它的活化作用可以导致细胞外基质中的蛋白质的降解作用, 转移中的肿瘤细胞正是通过这种作用侵袭的。纤溶酶还可以激活胶原酶, 从而促进围绕毛细管和淋巴系统的基膜中胶原的降解作用, 由此允许肿瘤细胞侵袭靶组织(Dano 等, Adv. Cancer Res., 44: 139 (1985))。因而, 属于本发明范围的是采用被尿激酶裂解的肽序列作为连接基团。

本发明还提供对类胰蛋白酶裂解敏感的肽序列的用途。人肥大细胞表达至少四种不同的类胰蛋白酶, 称为 $\alpha\beta\text{I}$ 、 βII 和 βIII 。这些酶不受血浆蛋白酶抑制剂的控制, 并且体外仅裂解少数生理学底物。丝氨酸蛋白酶的类胰蛋白酶家族已经参与各种牵涉肥大细胞的变应性和炎性疾病, 因为在患有这些障碍的患者生物体液中发现类胰蛋白酶水平升高。不过, 类胰蛋白酶在疾病病理生理学中的确切角色仍然有待描绘。类胰蛋白酶的生物学功能和对应生理学后果的范围基本上是由它们的底物特异性所定义的。

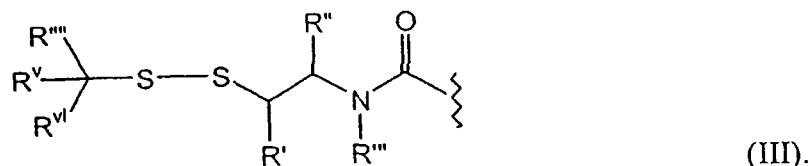
类胰蛋白酶是前尿激酶纤溶酶原激活物(uPA)的有力激活物, 即与肿瘤转移和侵袭有关的蛋白酶的酶原形式。纤溶酶原级联的活化作用导致用于细胞外渗和移行的细胞外基质的破坏, 这种活化作用可能是前尿激酶纤溶酶原激活物在 P4-P1 序列 Pro-Arg-Phe-Lys 的类胰蛋白酶活化作用的函数(Stack, 等, Journal of Biological Chemistry 269(13): 9416-9419 (1994))。作用于血管的肠肽、即神经肽参与血管透过的调节, 也被类胰蛋白酶裂解, 主要在 Thr-Arg-Leu-Arg 序列(Tam, 等, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 3: 27-32 (1990))。与 G 蛋白偶联的受体 PAR-2 能够在 Ser-Lys-Gly-Arg 序列被类胰蛋白酶裂解和激活, 驱动成纤维细胞的增殖, 而被凝血酶激活的受体 PAR-1 在 Pro-Asn-Asp-Lys 序列被类胰蛋白酶灭活(Molino 等, Journal of Biological Chemistry 272(7):

4043-4049 (1997))。总之，该证据提示了类胰蛋白酶在作为疾病后果的组织改型中的中心角色。这与在若干肥大细胞介导的障碍中所观察到的深刻变化是一致的。慢性气喘和其他长期呼吸疾病的一种证明是纤维变性和病变组织增厚，这可能是类胰蛋白酶对其生理靶的活化作用的结果。类似地，一系列报道已经显示，在各种癌症中，血管生成与肥大细胞密度、类胰蛋白酶活性和预后不良有关(Coussens 等, Genes and Development 13(11): 1382-97 (1999)); Takanami 等, Cancer 88(12): 2686-92 (2000); Toth-Jakatics 等, Human Pathology 31(8): 955-960 (2000); Ribatti 等, International Journal of Cancer 85(2): 171-5 (2000))。

用于评价特定的蛋白酶是否裂解所选择的肽序列的方法是本领域已知的。例如，7-氨基-4-甲基香豆素(AMC)荧光肽底物的使用是关于蛋白酶特异性测定的成熟方法(Zimmerman, M.等, (1977) Analytical Biochemistry 78: 47-51)。N-酰苯胺键的特异性裂解释放荧光 AMC 离去基团，允许简单地测定单个底物的裂解速率。最近，通过在单一的实验中取广泛的样本，已经采用一组 AMC 肽底物文库(Lee, D., 等, (1999) Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 9: 1667-72)和位置扫描文库(Rano, T. A., 等, (1997) Chemistry and Biology 4: 149-55)来快速描绘蛋白酶的 N-末端特异性。因而，本领域技术人员可以容易评价一组肽序列，以确定它们在本发明中的实用性，无需诉诸过多的实验方法。

二硫化物连接基团

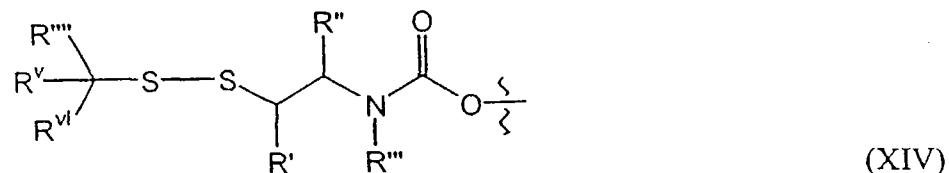
本发明在进一步的方面提供基于二硫化物部分的可裂解的连接基团臂。因而，提供了具有式 III 结构的化合物：



由符号 R、R^I、R^{II}、R^{III}、R^{IV}、R^V 和 R^{VI} 代表的原子团是如上 R、

R^I 、 R^{II} 和 R^{III} 所述的。

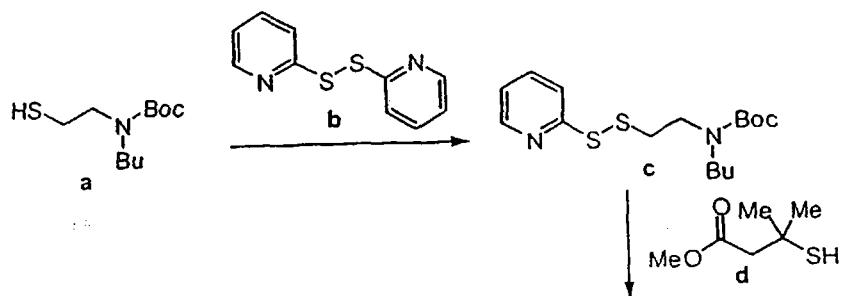
在另一种实施方式中，本发明提供二硫化物氨基甲酸酯连接基团，例如式 XIV 所述：

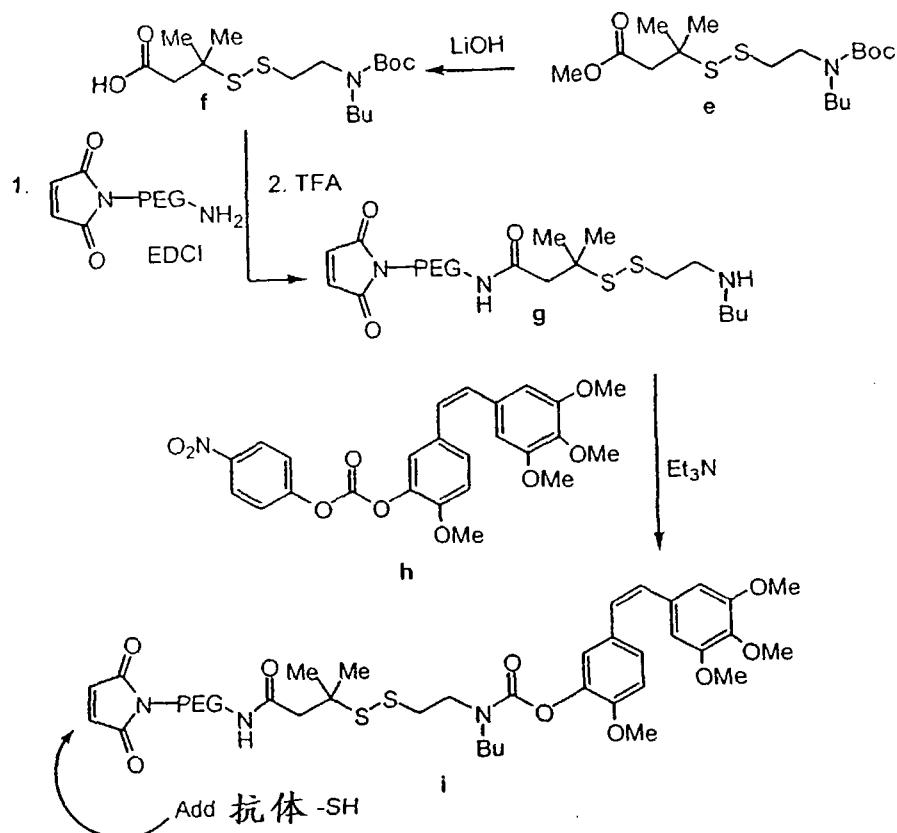


由符号 R 、 R^I 、 R^{II} 、 R^{III} 、 R^{IV} 、 R^V 和 R^VI 代表的原子团是如上所述的。

正如上面所讨论的，本发明的连接基团可以用于生成缀合物，其中包含细胞毒素作为治疗剂，例如 combretastatin 或 duocarmycin。duocarmycins 在血浆中是不稳定的。本发明的连接基团发现在稳定处于循环中的 duocarmycin 上具有特别的实用性，一旦到达所需作用部位即释放药物（活化作用）。另外，为了在活化作用后再次获得 combretastatin 或 duocarmycin 的最大活性，连接基团和定向基因优选地都被除去。因此，在本发明的一种实施方式中，连接基团是无痕迹的连接基团。包含细胞毒素、例如 duocarmycin 作为治疗剂的缀合物也是特别令人感兴趣的。本发明的连接基团起到稳定处于循环中的 duocarmycin 和在靶细胞内或附近、在活化作用后释放最佳有力的细胞毒素的作用。由于细胞毒素是在靶细胞内或附近被裂解的，减少了由随机活化作用引起的全身毒性。进而，循环稳定性的增加也增加了细胞毒素的半衰期和总体有效性。

用于制备本发明的二硫化物连接基团臂-细胞毒素缀合物的示范性途径如流程 5 所述。

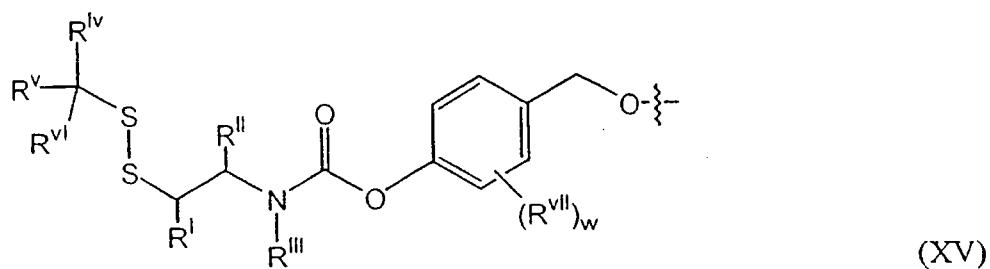




流程 5

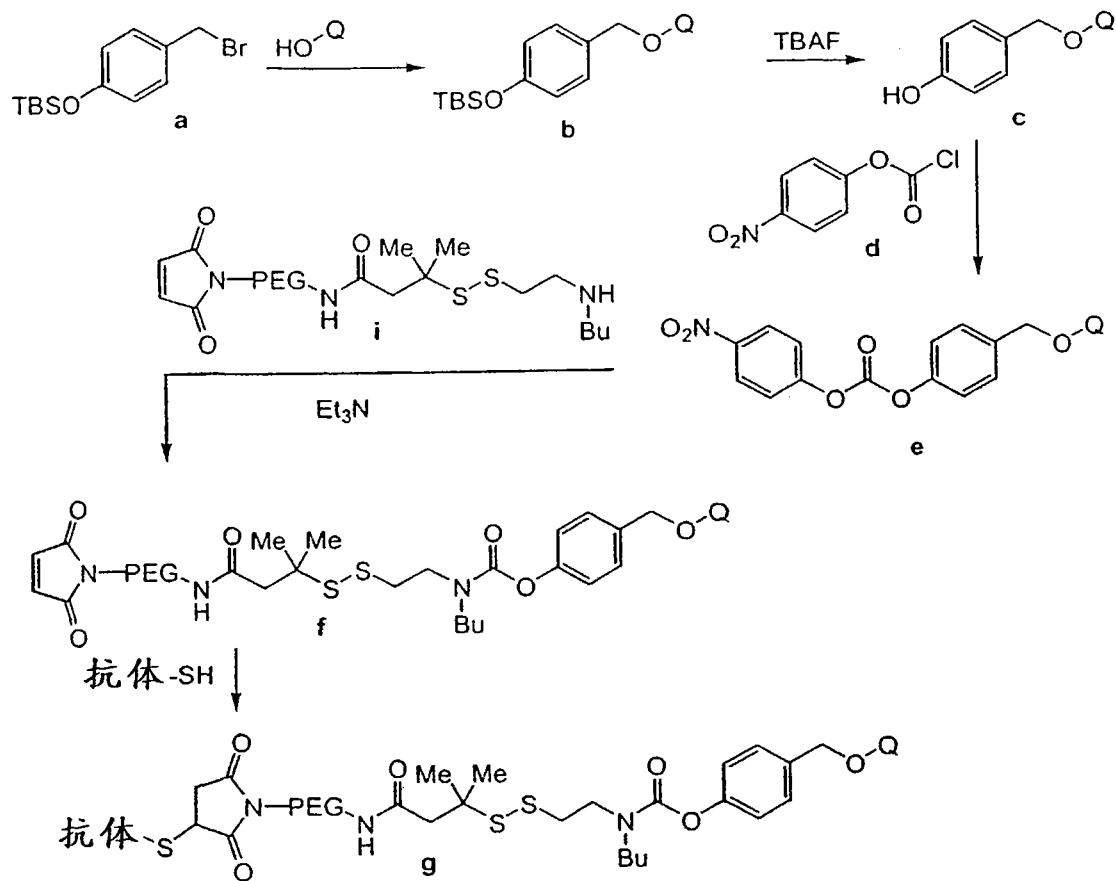
流程 5 中，使胺-保护的巯基 a 与 2,2'-二吡啶基二硫化物 b 反应，生成胺-保护的、活化的二硫化物 c。使活化的二硫化物与携带游离巯基 d 的羧酸酯接触，消去吡啶基硫醇，生成胺-保护的羧酸酯，其中包括二硫化物部分 e。甲基酯被 LiOH 的作用裂解，生成对应的羧酸 f。通过 EDCI 的作用，使羧酸与杂二官能的 PEG 分子偶联，后者包括马来酰亚胺基团和胺，生成化合物 g。使 PEG 衍生物与 Combrestatin 的活性碳酸酯 h 接触，生成缀合物 i。如果需要的话，缀合物 i 可以通过马来酰亚胺部分连接定向剂、可检测的标记等。

在另一种实施方式中，本发明提供二硫化物氨基甲酸酯连接基团，其中该尿烷键的非碳基氧是从芳基衍生的。本发明的代表性连接基团如式 XV 所述：



原子团本质上如上所述。R^{VII}是如定义一节所述的芳基取代基。符号 w 代表 0 至 4 的整数。当存在一个以上 R^{VII} 时，每个基团都是独立地加以选择的。

式 XV 化合物的示范性途径如流程 6 所述。



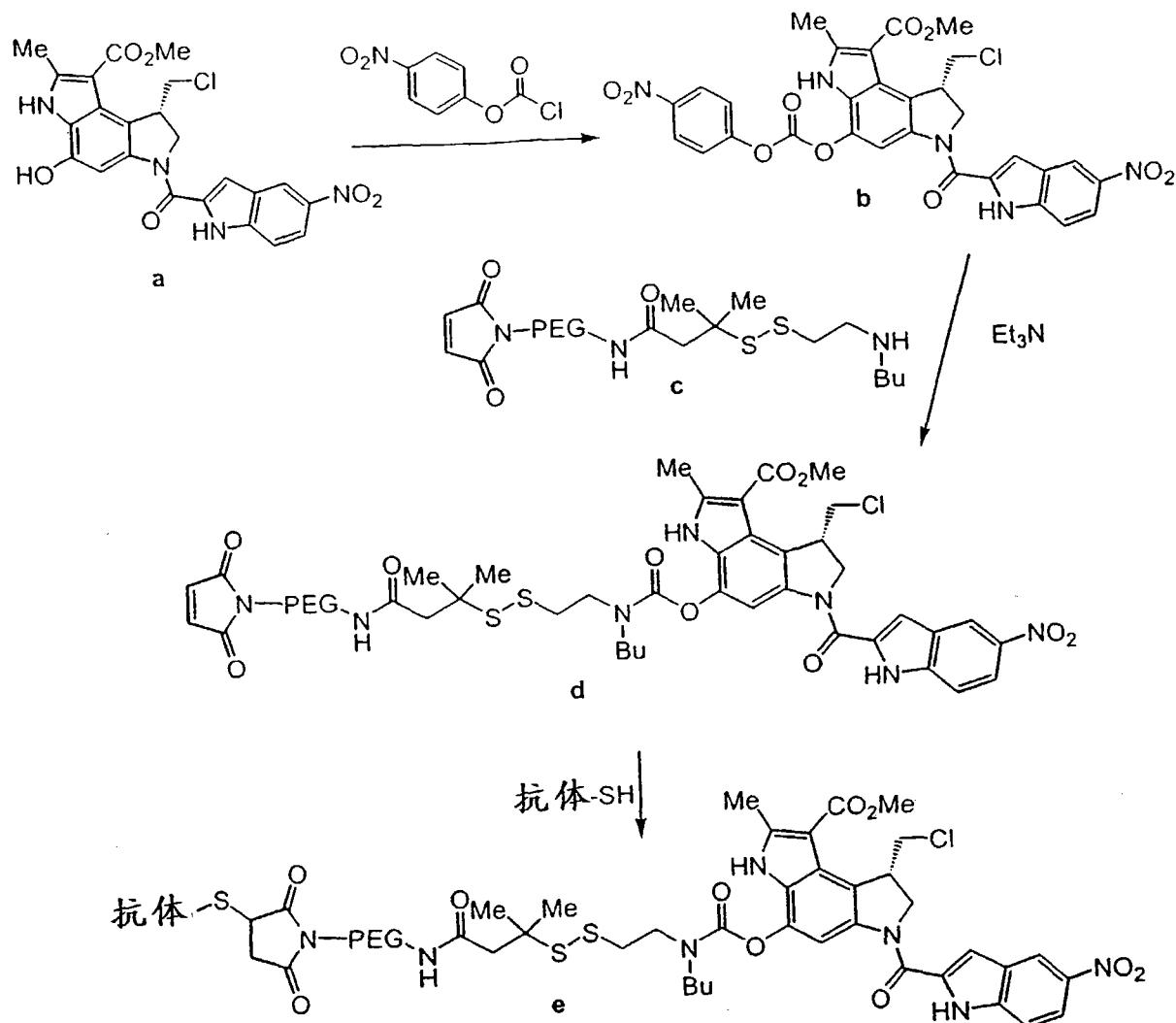
流程 6

流程 6 中，使 TBS-醇保护的苄基溴衍生物与 Q-OH 在烷基化条件下

下反应，生成 b。化合物 b 被氟化四丁铵的作用去保护，生成 c，用 d 酰化，生成碳酸酯 e。使碳酸酯 e 与来自上述流程 5 的杂二官能的 PEG 衍生物 i 反应。所得 PEG 加合物 f 可以与另一种分子通过马来酰亚胺部分缀合。

二硫化物连接基团-duocarmycin 缔合物

正如上面所讨论的，本发明的二硫化物连接基团还是有用的组分，可用于体内稳定治疗或诊断部分、生成前体药物和缀合药物与定向剂和可检测的标记。因而，本发明在另一方面提供 duocarmycin 与本发明式 I 二硫化物连接基团之间的缔合物。流程 7 提供本发明缔合物的灵巧途径。



流程 7

流程 7 中，将本发明的 duocarmycin 细胞毒素 a 用对硝基苯基氯甲酸酯转化为活化的碳酸酯 b。使化合物 b 与来自流程 5 的杂二官能的 PEG 连接基团偶联，生成化合物 d，随后可以与抗体通过马来酰亚胺-巯基偶联反应偶联，生成缀合物 e。

正如上面所讨论的，某些毒性剂的治疗功效被这样的策略所戏剧性地提高了，即选择性释放药物至所需部位，和/或保持药物的本质上无活性形式，直至它被释放至所需作用部位。本发明还提供连接基团臂，它发挥作用的原理是使药物定向至所选择的部位，和/或使生物活性药物灭活，直至它到达所需部位。

因而，在某些实施方式中，本发明提供上述细胞毒素以及其他药物与具有有效性质的连接基团臂的缀合物。在一种实施方式中，连接基团臂缀合治疗或诊断部分与一种试剂，后者选择性释放前者至体内所需部位。该部分与定向剂之间的连接基团可以是体内稳定的，或者可以被裂解。如果该试剂被裂解，那么它优选地主要在到达所需作用部位之后被裂解。

在另一种实施方式中，本发明提供这样的连接基团，它不连接诊断或治疗部分与另一种试剂，但是在本质上使该部分灭活，直至它到达所需活性部位；活性种类在所需活性部位裂解连接基团，优选地恢复该部分的活性形式。这种策略提供了减轻很多有毒又非常有用的药物的全身毒性的手段。

在与本发明的代表性 duocarmycin 类似物的缀合作用中，以本发明的尿烷和二硫化物连接基团为例。分别参见图 1 和图 3。

定向剂

本发明的连接基团臂和细胞毒素可以与定向剂连接，后者选择性释放负载至细胞、器官或机体区域。示范性定向剂例如抗体（例如嵌合的、人化的和人抗体）、受体的配体、凝集素、糖、抗体等，是本领

域所公认的，没有限制地可用于实施本发明。其他定向剂包括一类化合物，它们不包括特异性分子识别基序，包括大分子，例如聚(乙二醇)、多糖、聚氨基酸等，它们增加细胞毒素的分子质量。额外的分子质量影响细胞毒素的药动学，例如血清半衰期。

在示范性实施方式中，本发明提供细胞毒素、连接基团或细胞毒素-连接基团与定向剂的缀合物，定向剂是一种生物分子，例如抗体、受体、肽、凝集素、糖、核酸或其组合。本发明的示范性缀合物途径如上流程所述。

可用于实施本发明的生物分子可以是从任意来源衍生的。生物分子可以是从天然来源分离的，或者可以利用合成方法制备。蛋白质可以是天然的蛋白质或突变的蛋白质。突变作用可以通过化学诱变、指向位点的诱变或本领域技术人员已知的其他诱导突变的手段加以进行。可用于实施本发明的蛋白质例如包括酶、抗原、抗体和受体。抗体可以是多克隆的或单克隆的。肽和核酸可以是从天然来源分离的，或者可以原本是完全或部分合成的。

在其中识别部分是蛋白质或抗体的那些实施方式中，蛋白质可以通过蛋白质表面上任意可利用的反应性肽残基与 SAM 组分或间隔基团臂连接。在优选的实施方式中，反应性基团是胺或羧酸酯。在特别优选的实施方式中，反应性基团是赖氨酸残基的 ϵ -氨基。此外，这些分子可以被非特异性相互作用（例如化学吸附、物理吸附）吸附在底物或 SAM 的表面上。

抗体识别部分可以用于识别分析物，它们是蛋白质、肽、核酸、糖或小分子，例如药物、除草剂、农药、工业化学品和弹药。唤起抗体对特异性分子活性的方法是本领域技术人员熟知的。参见 1992 年 9 月 15 日颁给 Feng 等的美国专利 No. 5/147,786; 1994 年 8 月 2 日颁给 Stanker 等的美国专利 No. 5/334,528; 1997 年 11 月 11 日颁给 Al-Bayati, M.A.S. 的美国专利 No. 5/686,237 和 1996 年 11 月 12 日颁给 Hoess 等的美国专利 No. 5/573,922。用于连接抗体与表面的方法也是本领域已知的。参见 Delamarche 等, Langmuir 12: 1944-1946 (1996)。

定向剂可以通过任意可利用的反应性基团连接本发明的连接基团。例如，通过胺、羧基、巯基或羟基可以连接肽。这样一种基团可以位于肽链的末端或内部位置。通过碱（例如环外胺）上的反应性基团或糖部分上的可利用的羟基（例如 3'-或 5'-羟基）可以连接核酸。肽和核酸链可以进一步在一个或多个位置被衍生，以便在链上连接适当的反应性基团。参见 Chrisey 等, Nucleic Acids Res. 24: 3031-3039 (1996)。

当肽或核酸是完全或部分合成的分子时，可以在合成过程期间结合反应性基团或被掩蔽的反应性基团。很多适合于在肽和核酸中结合反应性基团的经过衍生的单体都是本领域技术人员已知的。例如参见 The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 2: "Special Methods in Peptide Synthesis", Gross, E. and Melenhofer, J., Eds., Academic Press, New York (1980)。很多有用的单体是商业上可得到的(Bachem, Sigma, etc.)。这种被掩蔽的基团然后可以在合成后去除掩蔽，此时它可以与本发明化合物组分反应。

在另一种示范性实施方式中，使定向基团经由包合配合物与本发明化合物连接。例如，本发明的化合物或连接基团可以包括这样一种部分，例如环糊精或改性环糊精。环糊精是由大量微生物产生的一类环状寡糖。环糊精具有篮样形状的环结构。这种形状允许环糊精在它们的内腔中包括很多种类的分子。例如参见 Szejtli, J., Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes; Akademiai Kado, Budapest, 1982; 和 Bender 等, Cyclodextrin Chemistry, Springer-Verlag, Berlin, 1978.

环糊精能够与一组有机分子生成包合配合物，例如包括药物、农药、除草剂和弹药。参见 Tenjarla 等, J. Pharm. Sci. 87: 425-429 (1998); Zughul 等, Pharm. Dev. Technol. 3: 43-53 (1998) 和 Albers 等, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 12: 311-337 (1995)。重要的是，环糊精能够在它们的包合配合物中区别化合物的对映体。因而，在一种优选的实施方式中，本发明提供在对映体混合物中检测特定的对映体。参见 Koppenhoefer 等 J. Chromatogr. A 793: 153-164 (1998)。大量用于连

接环糊精与其他分子的途径是本领域已知的。例如参见 Yamamoto 等, J. Phys. Chem. B 101: 6855-6860 (1997); 和 Sreenivasan, K. J. Appl. Polym. Sci. 60: 2245-2249 (1996)。

本发明的细胞毒素-定向剂缀合物进一步例如反义寡核苷酸-细胞毒素缀合物。集中于细胞毒素-寡核苷酸缀合物仅仅为了阐述清楚，并不限制能够与本发明细胞毒素缀合的定向剂的范围。

示范性核酸定向剂包括适体、反义化合物和构成三螺旋的核酸。通常，糖残基的羟基、来自碱残基的氨基或核苷酸的磷酸氧用作必要的化学官能度，使核苷酸类定向剂与细胞毒素偶联。不过，本领域技术人员将容易领会到，其他“非天然”反应性官能度能够利用常规工艺附加于核酸上。例如，糖残基的羟基可以利用本领域熟知的工艺转化为巯基或氨基。

适体（或核酸抗体）是结合特异性分子靶的单链或双链 DNA 或单链 RNA 分子。一般而言，适体通过抑制分子靶——例如蛋白质——的作用、结合在血液中循环的靶集合而发挥作用。适体具有化学官能度，因而能够与细胞毒素共价键合，如本文所述。

尽管各种分子靶能够与适体生成非共价性而特殊的缔合作用，包括小分子药物、代谢产物、辅因子、毒素、糖类药物、核苷酸类药物、糖蛋白等，不过一般而言分子靶将包含蛋白质或肽，包括血清蛋白、激肽、二十碳化合物、细胞表面分子等。适体的实例包括 Gilead 氏抗凝血酶抑制剂 GS 522 及其衍生物(Gilead Science, Foster City, Calif.)。另见 Macaya 等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3745-9 (1993); Bock 等, Nature (London) 355: 564-566 (1992) 和 Wang 等, Biochem. 32: 1899-904 (1993)。

对给定生物分子呈特异性的适体可以利用本领域已知的工艺鉴别。例如参见 Toole 等, (1992) PCT 公报 No. WO 92/14843; Tuerk and Gold (1991) PCT 公报 No. WO 91/19813; Weintraub and Hutchinson (1992) PCT 公报 No. WO 92/05285 和 Ellington and Szostak, Nature 346: 818 (1990)。简而言之，这些工艺通常牵涉分子靶与寡核苷酸随机

混合物的配合作用。适体-分子靶配合物是从未配合的寡核苷酸中分离的。将适体从所分离的配合物中回收，扩增。重复这种循环，以鉴别对分子靶具有最高亲合性的适体序列。

关于由基因的不适当表达所引起的疾病，特异性防止或减少这类基因的表达代表了理想的疗法。原则上，特定基因产物的产生可以被单链脱氧核苷酸或核糖脱氧核苷酸的杂交所抑制、减少或切断，这些核苷酸与 mRNA 中的可用序列或前-mRNA 加工所必需的转录体内的序列是互补性的，或者与基因本身内的序列是互补性的。这种遗传控制范例经常称为反义或反基因抑制。烷基化剂与核酸的缀合作用赋予额外的功效，例如本发明的那些烷基化剂。

反义化合物是核酸，被设计用来结合 mRNA，使 mRNA 失去能力，或者防止 mRNA 的产生，该 mRNA 负责生成特定的蛋白质。反义化合物包括反义 RNA 或 DNA，单链或双链的，寡核苷酸或它们的类似物，它们能够与单个的 mRNA 特异性杂交，防止 mRNA 的转录和/或 RNA 加工和/或所编码的多肽的转译，由此减少各自所编码的多肽的数量(Ching 等，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10006-10010 (1989); Broder 等，Ann. Int. Med. 113: 604-618 (1990); Loreau 等，FEBS Letters 274: 53-56 (1990); Holcnenberg 等，WO 91/11535; WO 91/09865; WO 91/04753; WO 90/13641; WO 91/13080; WO 91/06629 和 EP 386563)。由于它们的敏锐的靶敏感性和选择性，反义寡核苷酸可用于释放治疗剂至所需分子靶，例如本发明的细胞毒素。

其他人已经报道，核酸能够经由三螺旋形成与双螺旋 DNA 结合，抑制转录和/或 DNA 合成。三螺旋化合物（也称为三链药物）是这样的寡核苷酸，它们结合双链 DNA 的序列，打算选择性抑制致病基因的转录，例如病毒基因，例如 HIV 和单纯性疱疹病毒，和致癌基因，也就是说它们终止细胞核上的蛋白质产生。这些药物直接结合细胞基因组中的双链 DNA，形成三螺旋体，防止细胞制备靶蛋白。例如参见 PCT 公报 No. WO 92/10590、WO 92/09705、WO 91/06626 和美国专利 No. 5,176,996。因而，本发明的细胞毒素还与构成三螺旋的核酸序

列缀合。

核酸（例如反义化合物和三螺旋药物）的位点特异性并不显著地受磷酸二酯键的修饰或寡核苷酸末端的化学修饰的显著影响。所以，这些核酸能够被化学修饰；增强总体的结合稳定性，增加关于化学降解的稳定性，增加寡核苷酸转运进入细胞的速率，赋予分子以化学反应性。构建各种可用于反义疗法的核酸的通用方法已经总结在 van der Krol 等, *Biotechniques* 6: 958-976 (1988) 和 Stein 等, *Cancer Res.* 48: 2659-2668 (1988)。因此，在示范性实施方式中，本发明的细胞毒素通过磷酸二酯键的修饰作用与核酸缀合。

而且，携带本发明细胞毒素的适体、反义化合物和三螺旋药物还可以包括核苷酸的取代、加成、删去或移位，只要保留与有关靶序列的特异性杂交或缔合作用作为寡核苷酸的功能性质即可。例如，有些实施方式将采用硫代磷酸酯类似物，它们比它们的天然存在的磷酸二酯相应物更加耐受核酶的降解作用，因而预期具有更高的体内持续性和更大的效力（例如参见 Campbell 等, *J. Biochem. Biophys. Methods* 20: 259-267 (1990)）。寡核苷酸的氨基磷酸酯衍生物也已知结合互补性多核苷酸，具有另外容纳共价连接的配体的能力，将适用于本发明的方法。例如参见 Froehler 等, *Nucleic Acids Res.* 16(11): 4831 (1988)。

在有些实施方式中，适体、反义化合物和三螺旋药物将包含 O-甲基核糖核苷酸(EP 公报 No. 360609)。还可以使用嵌合的寡核苷酸(Dagle 等, *Nucleic Acids Res.* 18: 4751 (1990))。关于有些应用，反义寡核苷酸和三螺旋可以包含聚酰胺核酸(Nielsen 等, *Science* 254: 1497 (1991) 和 PCT 公报 No. WO 90/15065)或其他阳离子衍生物(Letsinger 等, *J. Am. Chem. Soc.* 110: 4470-4471 (1988))。其他应用可以利用这样的寡核苷酸，其中一个或多个磷酸二酯键已经被等排基团取代，例如 2-4 个原子长的核苷酸间键，如 PCT 公报 No. WO 92/05186 和 91/06556 所述，或者被甲缩醛基团(Matteucci 等, *J. Am. Chem. Soc.* 113: 7767-7768 (1991))或酰胺基团(Nielsen 等, *Science* 254: 1497-1500 (1991))取代。

另外，本发明可以采用核苷酸类似物，例如其中糖或碱是被化学修饰的。嘌呤和嘧啶的“类似物”形式是本领域公知的那些，它们很多用作化疗剂。示范性而非详尽的列表包括 4-乙酰胞嘧啶、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羧基甲氨基甲基-2-硫尿嘧啶、5-羧基甲氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、肌昔、N⁶-异戊烯基腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、1-甲基假尿嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌昔、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N⁶-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧氨基甲基-2-硫尿嘧啶、β-D-甘露糖基 queosine、5'-甲氧羰基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N⁶-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氨基乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氨基乙酸(v)、wybutoxosine、假尿嘧啶、queosine、2-硫代胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、N-尿嘧啶-5-氨基乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氨基乙酸(v)、假尿嘧啶、queosine、2-硫代胞嘧啶和 2,6-二氨基嘌呤。另外，常规的碱例如卤代的碱。此外，碱上的 2'-呋喃糖位置可以被不带电的大体积基团取代。不带电的大体积基团的实例包括支链烃基、糖和支链糖。

末端修饰也提供有用的工艺，可用于缀合细胞毒素与核酸，修改寡核苷酸药物的细胞类型特异性、药动学、核透过性和绝对细胞摄取速率。例如，为包括反应性基团而在 5' 和 3' 末端取代是已知的，这样允许共价连接细胞毒素。例如参见 Oligodeoxynucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression, (1989) Cohen, Ed., CRC Press; Prospects for Antisense Nucleic Acid Therapeutics for Cancer and AIDS, (1991), Wickstrom, Ed., Wiley-Liss; Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA, (1992), Erickson and Izant, Eds., Raven Press 和 Antisense RNA and DNA, (1992), Murray, Ed., Wiley-Liss. 关于涉及反义化合物的通用方法，参见 Antisense RNA and DNA, (1988), D. A. Melton, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y..

定向剂一般是经由共价键与细胞毒素偶联的。共价键可以是不可

逆的、部分可逆的或完全可逆的。可逆性的程度相当于定向剂-细胞毒素配合物对体内降解作用的敏感性。

在优选的实施方式中，该键是可逆的（例如容易裂解的）或部分可逆的（例如部分或缓慢裂解的）。键的裂解可以通过生物或生理过程发生。生理/生物过程裂解配合物内任意所选择的位置上的键（例如除去与不同敏感性化学官能度偶联的酯基或其他保护基团），在此之后或之前裂解细胞毒素与连接基团之间的键，得到部分降解的配合物。还可以发生其他裂解作用，例如在连接基团与定向剂之间。

关于配合物在给药后的快速降解，一般依赖于循环在血浆中的酶（例如酰胺酶、还原酶）裂解药物上的 dendrimer。这些酶可以包括非特异性氨基肽酶与酯酶、二肽基羧基肽酶、凝血级联的蛋白酶等。

或者，裂解是通过非酶过程进行的。例如，配合物在释放后所经历的 pH 差异可以引发化学水解。在这样一种情况下，配合物可以是以生理 pH 7.4 下的高度化学不稳定性为特征的，同时在释放载体中的酸性或碱性 pH 下表现更高的稳定性。在这样一种过程中裂解的示范性配合物是在其框架内结合有 N-曼尼希碱键的配合物。

在大多数情况下，配合物的裂解将发生在给药期间或之后不久。不过，在其他实施方式中，直到配合物到达药物的作用部位才发生裂解。

细胞毒素-定向剂配合物对降解作用的敏感性可以通过配合物向未键合的药物的水解转化或酶转化作用研究加以确定。一般而言，利用这种方法发现在体外与体内活性之间存在良好的相互关系。例如参见 Phipps 等, *J. Pharm. Sciences* 78: 365 (1989)。转化速率是容易测定的，例如通过分光光度法或气相-液相或高效液相色谱法。然后可以利用标准工艺计算半衰期和其他动力学参数。例如参见 Lowry 等, *Mechanism and Theory in Organic Chemistry*, 2nd Ed., Harper & Row, Publishers, New York (1981)。

间隔基团(“L^x”)

除了可裂解的基团以外，可选地在细胞毒素与定向剂之间引入一

个或多个连接基团。间隔基团含有至少两个反应性官能团。通常，间隔基团的一个化学官能度与细胞毒素的化学官能度键合，而间隔基团的另一个化学官能度用于与定向剂或可裂解的连接基团的化学官能度键合。间隔基团的化学官能度的实例包括羟基、巯基、羧基、羧基、氨基、酮和巯基。间隔基团还可以是可裂解的连接基团的组分，在这种情况下它一般以 L^x 表示，其中“ x ”是整数。

由 L^x 代表的连接基团一般是取代或未取代的烃基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基或取代或未取代的杂烃基。

示范性间隔基团例如包括 6-氨基己醇、6-巯基己醇、10-羟基癸酸、甘氨酸与其他氨基酸、1,6-己二醇、 β -丙氨酸、2-氨基乙醇、半胱胺(2-氨基乙二醇)、5-氨基戊酸、6-氨基己酸、3-马来酰亚氨基苯甲酸、邻羟甲基苯甲酸内酯、 α -取代的邻羟甲基苯甲酸内酯、羧基、缩醛胺酯、核酸、肽等。

间隔基团能够起到向细胞毒素-定向剂配合物引入额外的分子质量和化学官能度的作用。一般而言，额外的质量和官能度将影响配合物的血清半衰期和其他性质。因而，通过谨慎地选择间隔基团，可以制备具有一定范围血清半衰期的细胞毒素配合物。

反应性官能团

为了清楚起见，后续讨论集中于本发明细胞毒素与定向剂的缀合作用。以本发明的一种实施方式为例，由此本领域技术人员容易推导出其他实施方式。讨论集中于单一的实施方式并不限制本发明。

本发明的示范性化合物携带反应性官能团，它一般位于取代或未取代的烃基或杂烃基链，允许它们容易连接另一种基团。反应性基团的常规位置是链的末端位置。

可用于实施本发明的反应性基团和反应种类一般是生物缀合物化学领域熟知的那些。目前可取的可与反应性细胞毒素类似物进行的反应种类是在相对温和的条件下进行的那些。它们包括但不限于亲核取代(例如胺和醇与酰卤、活性酯的反应)、亲电取代(例如烯胺反应)和向碳-碳与碳-杂原子多重键的加成(例如 Michael 反应、Diels-Alder

加成)。这些和其他有用的反应例如讨论在 March, Advanced Organic Chemistry, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1985; Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego, 1996 和 Feeney 等, Modification of Proteins, Advances in Chemistry Series, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

示范性反应类型包括羧基及其各种衍生物的反应, 羧基衍生物包括但不限于 N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基苯并三唑酯、酰卤、酰基咪唑、硫代酸酯、对硝基苯基酯、烷基、烯基、炔基与芳族酯。羟基可以转化为酯、醚、醛等。卤代烃基转化为新的基团, 例如通过与胺、羧酸阴离子、硫醇阴离子、阴碳离子或醇化物离子的反应。亲双烯体(例如马来酰亚胺)基团参与 Diels-Alder 反应。醛或酮基可以转化为亚胺、腙、缩氨基脲或肟, 或者经由 Grignard 加成或烷基锂加成等机理。磺酰卤容易与胺反应, 例如生成磺酰胺。胺或巯基例如是酰化的、烷基化的或氧化的。利用环加成、酰化、Michael 加成等, 烯烃可以转化为一组新的化合物。环氧化物容易与胺和羟基化合物反应。

本领域技术人员将容易领会到, 这些键很多都可以按各种方式和利用各种条件生成。关于酯的制备, 例如参见 March, 出处同上, 1157; 关于硫代酸酯的制备, 参见 March, 出处同上, 362-363, 491, 720-722, 829, 941 和 1172; 关于碳酸酯的制备, 参见 March, 出处同上, 346-347; 关于氨基甲酸酯的制备, 参见 March, 出处同上, 1156-57; 关于酰胺的制备, 参见 March, 出处同上, 1152; 关于脲和硫脲的制备, 参见 March, 出处同上, 1174; 关于缩醛和缩酮的制备, 参见 Greene 等, 出处同上, 178-210 和 March, 出处同上, 1146; 关于酰氨基烷基衍生物的制备, 参见 Prodrugs: Topical and Ocular Drug Delivery, K. B. Sloan, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1992; 关于烯醇酯的制备, 参见 March, 出处同上, 1160; 关于 N-磺酰亚胺酸盐的制备, 参见 Bundgaard 等, J. Med. Chem., 31: 2066 (1988); 关于酸酐的制备, 参见 March, 出处同上, 355-56, 636-37, 990-91 和 1154; 关于 N-酰基酰胺的制备, 参见 March, 出处同上, 379; 关于 N-曼尼希碱的制备, 参

见 March, 出处同上, 800-02 和 828; 关于羟甲基酮酯的制备, 参见 Petracek 等, Annals NY Acad. Sci., 507: 353-54 (1987); 关于二硫化物的制备, 参见 March, 出处同上, 1160; 关于膦酸酯和氨基膦酸酯的制备。

反应性官能团可以是这样选择的, 以便它们不参与或干扰装配反应性自诱导剂类似物所必要的反应。或者, 通过保护基团的存在, 可以保护反应性官能团不参与反应。本领域技术人员将理解如何保护特定的官能团不干扰所选择的一套反应条件。关于有用的保护基团的实例, 参见 Greene 等, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 1991.

通常, 利用标准的化学工艺, 使定向剂与细胞毒素通过它们各自的化学官能团共价连接。可选地, 使 dendrimer 或药物与该试剂通过一个或多个间隔基团偶联。间隔基团当联合使用时, 可以是相同的或不同的。

一般而言, 在细胞毒素与定向剂(或其他试剂)和可选的间隔基团之间生成键之前, 至少一个化学官能团将被激活。本领域技术人员将领会到, 各种化学官能团——包括羟基、氨基和羧基——都可以利用各种标准方法和条件激活。例如, 细胞毒素或定向剂的羟基可以这样被激活, 用光气处理, 生成对应的氯甲酸酯, 或者用对硝基苯基氯甲酸酯处理, 生成对应的碳酸酯。

在示范性实施方式中, 本发明采用包括羧基官能度的定向剂。羧基例如可以通过转化为对应的酰卤或活性酯而被激活。该反应可以在各种条件下进行, 如 March, 出处同上, pp. 388-89 所述。在示范性实施方式中, 酰卤是通过含有羧基的基团与草酰氯的反应加以制备的。使活化的试剂与细胞毒素或细胞毒素-连接基团臂的组合反应, 生成本发明的缀合物。本领域技术人员将领会到, 含有羧基的定向剂的使用仅仅是说明性的, 具有很多其他官能团的试剂可以与本发明的 dendrimer 缀合。

当本发明的化合物与可检测的标记缀合时, 标记优选地是选自下

组的成员：放射性同位素、荧光剂、荧光剂前体、发色团、酶及其组合。用于缀合各种基团与抗体的方法是本领域熟知的。例如，经常与抗体缀合的可检测的标记是一种酶，例如辣根过氧化酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶和葡萄糖氧化酶。

可检测的标记

用于本发明化合物和方法的特定标记或可检测的基团一般不是本发明的关键所在，只要它不会显著干扰本发明化合物的活性或实用性即可。可检测的基团可以是具有可检测的物理或化学性质的任意材料。这类可检测的标记在免疫测定领域已经是成熟的，一般而言大多数任意可用于这类方法的标记都可以适用于本发明。因而，标记是任意可被光谱、光化学、生物化学、免疫化学、电学、光学或化学手段检测的组合物。可用于本发明的标记包括磁性珠粒（例如 DYNABEADSTM）、荧光染剂（例如荧光素异硫氰酸酯、德克萨斯红、若丹明等）、放射性标记（例如³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C 或 ³²P）、酶（例如辣根过氧化酶、碱性磷酸酶和其他 ELISA 常用的酶）、和比色标记，例如胶体金或有色玻璃或塑料珠（例如聚苯乙烯、聚丙烯、胶乳等）。

按照本领域熟知的方法，标记可以直接或间接与本发明化合物偶联。如上所示，可以使用各种标记，标记的选择取决于所需敏感性、与化合物缀合的容易程度、稳定性要求、可利用的器械操作和处理规定。

非放射性标记经常借助间接手段连接。一般而言，使配体分子（例如生物素）与缀合物组分共价键合。配体然后结合另一种分子（例如链霉抗生物素），后者本来是可检测的或者与信号系统共价键合，例如可检测的酶、荧光化合物或化学发光化合物。

本发明缀合物的组分还可以与信号发生化合物直接缀合，例如与酶或荧光团缀合。作为标记的有关酶将主要是水解酶，确切为磷酸酶、酯酶或糖苷酶，或氧化酶，确切为过氧化物酶。荧光化合物包括荧光素及其衍生物、若丹明及其衍生物、丹磺酰、伞形酮等。化学发光化合物包括虫荧光素、和 2,3-二氢酞嗪二酮，例如鲁米诺。关于各种可

以使用的标记系统或信号产生系统的评论，参见美国专利 No. 4,391,904。

检测标记的手段是本领域技术人员熟知的。因而，例如，若标记是放射性标记，检测手段包括闪烁计数器或照相膜，如同放射自显影法。若标记是荧光标记，它可以这样检测，用适当波长的光激发荧光染料，再检测所得荧光。荧光在检测时可以用肉眼、借助照相膜、利用电子检测器，例如电荷耦合设备(CCDs)或光电倍增管等。类似地，酶标记可以这样检测，为酶提供适当的底物，再检测所得反应产物。最后，简单的比色标记可以简单地通过观察与标记有关的颜色进行检测。因而，在各种浸量尺测定法中，所缀合的金经常呈现粉红色，而各种所缀合的珠粒呈现珠粒的颜色。

荧光标记是目前优选的，因为它们的优点是在操作上需要很少的预防措施和适用于高通量造影工艺（光学分析，包括分析图象在包含计算机的集成系统中的数字化）。优选的标记通常具有一个或多个下列特征：高敏感性、高稳定性、低背景、低环境敏感性和标记时的高特异性。很多荧光标记都是商业上可得到的：SIGMA 化学公司(Saint Louis, MO)、Molecular Probes (Eugene, OR)、R&D systems (Minneapolis, MN)、Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, NJ)、CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA)、Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI)、Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD)、Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland)和 Applied Biosystems (Foster City, CA)，以及技术人员已知的很多其他商业来源。此外，本领域技术人员将确认如何根据特定的应用选择适当的荧光团，并且如果不是商业上容易得到的话，也将能够重新合成必要的荧光团或者借助合成手段修饰商业上可得到的荧光化合物，以得到所需的荧光标记。

除了小分子荧光团以外，天然存在的荧光蛋白和这类蛋白质的人工类似物也可用于本发明。这类蛋白质例如包括 cnidarians 的绿荧光

蛋白(Ward 等, Photochem. Photobiol. 35: 803-808 (1982); Levine 等, Comp. Biochem. Physiol., 72B: 77-85 (1982))、来自弧菌属 fischeri 种的黄荧光蛋白(Baldwin 等, Biochemistry 29: 5509-15 (1990))、来自腰鞭毛目 Symbiodinium sp. 的 Peridinin-叶绿素(Morris 等, Plant Molecular Biology 24: 673-77 (1994))、来自海洋 cyanobacteria (例如 Synechococcus) 的藻胆蛋白质(例如藻红蛋白和藻蓝蛋白)(Wilbanks 等, J. Biol. Chem. 268: 1226-35 (1993))等。

药物制剂

在另一种优选的实施方式中，本发明提供药物制剂，包含本发明化合物和药学上可接受的载体。

在进一步优选的实施方式中，本发明提供药物制剂，包括药学上可接受的载体和本发明的定向剂与细胞毒素的缀合物。

本文所述的化合物或其药学上可接受的加成盐或水合物可以利用各种给药途径或方式释放至患者。适合的给药途径包括但不限于吸入、透皮、口服、直肠、经粘膜、肠内和肠胃外给药，肠胃外给药包括肌内、皮下和静脉内注射。

本文所用的术语“给药”打算涵盖所有直接与间接释放化合物至其预期作用部位的手段。

本文所述的化合物或其药学上可接受的盐和/或水合物可以单独给药，与其他本发明化合物联合给药，和/或以与其他治疗剂联合的鸡尾酒形式给药。当然，能够与本发明化合物共同给药的治疗剂的选择将在部分程度上取决于所治疗的疾病。

例如，当对患有由依赖于自诱导剂的生物体导致的疾病状态的患者给药时，本发明化合物可以以鸡尾酒形式给药，其中含有用于治疗疼痛、感染和与疾病有关的其他症状和副作用的药物。这类药物例如包括止痛剂、抗生素等。

当对接受癌症治疗的患者给药时，化合物可以以鸡尾酒形式给药，其中含有抗癌剂和/或补充强化剂。化合物还可以以鸡尾酒形式给药，其中含有治疗放射疗法副作用的药物，例如止吐剂、放射保护剂等。

能够与本发明化合物共同给药的补充强化剂例如包括三环抗抑郁药（例如米帕明、地昔帕明、阿米替林、氯米帕明、曲米帕明、多塞平、去甲替林、普罗替林、阿莫沙平和马普替林）；非三环抗抑郁药（例如舍曲林、曲唑酮和西酞普兰）； Ca^{2+} 拮抗剂（例如维拉帕米、硝苯地平、尼群地平和卡罗维林）；两性霉素；曲帕拉醇类似物（例如他莫昔芬）；抗心律失常药（例如奎尼丁）；抗高血压药（例如利血平）；硫醇排除剂（例如 buthionine 和 sulfoximine）；和亚叶酸钙。

本发明的活性化合物是以本身形式给药的，或者以药物组合物形式给药，其中活性化合物是与一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂混合的。按照本发明使用的药物组合物通常是按常规方式配制的，使用一种或多种生理学上可接受的载体，包含赋形剂和助剂，它们有利于将活性化合物加工成可以在药学上使用的制备物。适当的制剂取决于所选择的给药途径。

关于注射，本发明药物可以被配制成水溶液，优选地在生理学上可相容的缓冲液中，例如 Hank 氏溶液、Ringer 氏溶液或生理盐水缓冲液。关于经粘膜给药，在制剂中使用适用于所要渗透的屏障的渗透剂。这类渗透剂是本领域公知的。

关于口服给药，化合物可以是容易这样配制的：将活性化合物与本领域熟知的药学上可接受的载体结合。这类载体使本发明化合物能够配制成片剂、丸剂、锭剂、胶囊剂、液体、凝胶、糖浆剂、浆液、悬液等，用于被所要治疗的患者口服。口用药物制备物可以这样得到，与固体赋形剂混合，可选地研磨所得混合物，加工颗粒的混合物，如果需要的话加入适合的助剂，得到片剂或锭剂芯。适合的赋形剂确切地是填充剂，例如糖，包括乳糖、蔗糖、甘露糖醇或山梨糖醇；纤维素制备物，例如玉米淀粉、小麦淀粉、稻米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶、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，可以加入崩解剂，例如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或藻酸或其盐，例如藻酸钠。

为锭剂芯提供适合的包衣。为此，可以使用浓糖溶液，其中可以

可选地含有阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、Carbopol凝胶、聚乙二醇和/或二氧化钛；漆溶液；和适合的有机溶剂或溶剂混合物。可以向片剂或锭剂芯加入染料或色素，用于鉴别或区分不同的活性化合物剂量组合。

可以口用的药物制备物包括推入配合的胶囊剂，由明胶制成，以及软的密封胶囊剂，由明胶和一种增塑剂制成，例如甘油或山梨糖醇。推入配合的胶囊剂可以含有活性成分与下列成分的混合物：填充剂，例如乳糖；粘合剂，例如淀粉；和/或润滑剂，例如滑石或硬脂酸镁；和可选的稳定剂。在软胶囊剂中，活性化合物可以是溶解或悬浮在适合的液体中的，例如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇。另外，可以加入稳定剂。所有口服给药制剂都应当是适合于这类给药的剂量。

关于颊给药，组合物可以采取片剂或糖锭剂的形式，按常规方式配制。

关于通过吸入给药，按照本发明使用的化合物适宜以气雾剂的形式从加压包装或雾化器中释放出来，其中利用适合的推进剂，例如二氯二氟甲烷、三氯氟代甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他适合的气体。在加压气雾剂的情况下，通过提供计量释放的阀门可以确定剂量单位。用在吸入器或吹入器内的明胶胶囊和药筒可以配制成含有化合物与适合的粉末基质的粉末混合物，例如乳糖或淀粉。

化合物可以配制用于肠胃外给药，通过注射，例如大丸剂注射或连续输注。注射用制剂可以是单位剂型，例如在安瓿或多剂量容器内，其中加入防腐剂。组合物可以采取在油性或水性载体中的悬液、溶液或乳液的形式，并且可以含有配制用试剂，例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂，例如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或藻酸或其盐，例如藻酸钠。

肠胃外给药用药物制剂包括水溶性活性化合物的水溶液。酌情可以制备活性化合物的油性注射悬液。适合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。水性注射悬液可以含有增加悬液粘性的物质，例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。可选地，悬液还可以含有适合的稳定

剂或增加化合物溶解度的试剂，以便制备高浓缩的溶液。

或者，活性成分可以是粉末形式，在使用前用适合的载体再生，例如无菌无热原的水。

化合物还可以配制成直肠组合物，例如栓剂或保留灌肠剂，例如含有常规的栓剂基质，例如可可脂或其他甘油酯。

除了前述制剂以外，化合物还可以配制成药库制备物。这类长效制剂可以通过植入或经皮释放（例如皮下或肌内）、肌内注射或透皮贴剂给药。因而，例如，化合物可以与适合的聚合或疏水性材料（例如在可接受的油中的乳液）或离子交换树脂一起配制，或者配制成微溶性衍生物，例如微溶性盐。

药物组合物还可以包含适合的固体或凝胶相载体或赋形剂。这类载体或赋形剂的实例包括但不限于碳酸钙、磷酸钙、各种糖、淀粉、纤维素衍生物、明胶、和聚合物，例如聚乙二醇。

文库

在本发明范围内还包括本发明的细胞毒素、细胞毒素与连接基因的细胞毒素-连接基因与药物-连接基因缀合物的文库。示范性文库包括至少 10 种化合物，更优选至少 100 种化合物，进而更优选至少 1,000 种化合物，进而更优选至少 100,000 种化合物。文库的形式容易就特定性质进行查询，例如细胞毒性、酶或其他裂解试剂对连接基因的裂解作用。示范性形式包括芯片格式、microarray 等。

平行或组合合成的主要目的是生成不同分子的文库，它们共享一个共同的特性，在本说明书中称为脚手架。通过在脚手架分子的每个可变部分上取代不同的部分，文库中可开发的空间数量增加了。理论和现代医药化学主张所占据的空间的概念，它是测定给定化合物对给定生物靶的功效的关键因素。通过创建不同的分子文库，开发大比例的所定向的空间，开发高效的前导化合物的几率戏剧性地增加了。

平行合成一般是在固相载体上进行的，例如聚合树脂。脚手架或其他适合的中间体被化学连接基因可裂解地连接在树脂上。进行反应，以修饰连接在树脂上的脚手架。试剂和/或反应条件的变化产生结构多

样性，这是每个文库的品质所在。

“小”分子（分子量 200 – 1000 的非低聚物）的平行合成在 1990 年以前鲜有尝试。例如参见 Camps 等, Annals de Quimica, 70: 848 (1990)。最近, Ellmann 公开了十一种苯并二氮杂革类似物以及一些前列腺素和 β -模拟物的固相支撑的平行（也称“组合”）合成。这些公开文献例如美国专利 No. 5,288,514。小分子平行合成的另一份相关公开文献可以参见美国专利 No. 5,324,483。该专利公开了在十六种不同的脚手架中各自合成了 4 至 40 种化合物。Chen 等也应用有机合成策略，在聚合物载体上利用多步过程合成非肽文库(Chen 等, J. Am. Chem. Soc., 116: 2661-2662 (1994))。

一旦制备了独特化合物的文库，就可以使用自诱导剂的文库作为起点，利用本文所述的方法制备免疫缀合物或抗体的文库。

试剂盒

本发明在另一方面提供试剂盒，含有一种或多种本发明的化合物或组合物和关于使用化合物或组合物的指导。在示范性实施方式中，本发明提供用于缀合本发明的连接基团臂与另一种分子的试剂盒。试剂盒包括连接基团和关于连接连接基团与特定官能团的指导。其他试剂盒格式将为本领域技术人员所显而易见，也属于本发明的范围。

方法

除了上述组合物和构成物以外，本发明还提供大量可以利用本发明化合物和缀合物的方法。

纯化

在另一种示范性实施方式中，本发明提供用于分离本发明细胞毒素的分子靶的方法，它结合这样一种分子，具有根据式 I 的基团作为其结构的一部分。该方法优选地包含使包括靶的细胞制备物与固定化的式 I 化合物接触，由此在受体与固定化的化合物之间生成配合物。

本发明的细胞毒素可以利用任何本领域公认的手段固定在亲合载体上。或者，细胞毒素可以利用一种或多种本发明的连接基团加以固定。

在另一种示范性实施方式中，本发明提供包括本发明连接基团的亲合纯化基质。

用于分离靶的本发明方法通常将采用一种或多种亲合色谱工艺。亲合色谱法利用生物分子或生物聚合物对某些支撑的化学结构的具有高度选择性的识别部位，能够有效分离它们。文献中有很多文章、专刊和书籍是关于亲合色谱法的，包括亲合色谱法载体、交联成员、配体和它们的制备与用途等主题。这些参考文献的实例包括：Ostrove, Methods Enzymol. 182: 357-71 (1990); Ferment, Bioeng. 70: 199-209 (1990); Huang 等, J. Chromatogr. 492: 431-69 (1989); “Purification of enzymes by heparin-Sepharose affinity chromatography”, J. Chromatogr., 184: 335-45 (1980); Farooqi, Enzyme Eng., 4: 441-2 (1978); Nishikawa, Chem. Technol., 5(9): 564-71 (1975); Guilford 等, Pract. High Perform. Liq. Chromatogr., Simpson (ed.), 193-206 (1976); Nishikawa, Proc. Int. Workshop Technol. Protein Sep. Improv. Blood Plasma Fractionation, Sandberg (ed.), 422-35 (1977); “Affinity chromatography of enzymes”, Affinity Chromatogr., Proc. Int. Symp. 25-38 (1977) (Pub. 1978); Affinity Chromatography: A Practical Approach, Dean 等, (ed.), IRL Press Limited, Oxford, England (1985)。本领域技术人员在开发采用本发明材料的特定亲合色谱方法时具有大量教导。

在本方法中，可以使用各种化学结构的亲合色谱介质作为载体。例如，琼脂糖凝胶和交联琼脂糖凝胶可用作载体材料，因为它们的亲水性使它们相对不存在非特异性键合。其他有用的载体例如包括受控多孔玻璃(CPG)珠粒、纤维素粒子、聚丙烯酰胺凝胶珠粒和由葡聚糖和环氧氯丙烷制成的 SephadexTM 凝胶珠粒。

疾病的治疗

本发明的细胞毒素是活性的、有力的 duocarmycin 衍生物。母体药物是格外有力的抗肿瘤抗生素，它们的生物学作用来自可逆的、立体电子控制的序列选择性 DNA 烷基化作用(Boger 等, J. Org. Chem.

55: 4499 (1990); Boger 等, J. Am. Chem. Soc. 112: 8961 (1990); Boger 等, J. Am. Chem. Soc. 113: 6645 (1991); Boger 等, J. Am. Chem. Soc. 115: 9872 (1993); Boger 等, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2: 759 (1992)). 在最初公开了 duocarmycin 之后, 人们又投入了广泛的努力, 以阐明 duocarmycin 的 DNA 烷基化作用选择性及其结构起源。

在进一步的实施方式中, 本发明提供杀死细胞的方法。该方法包括对细胞给以一定量的本发明化合物, 给药量足以杀死所述细胞。在示范性实施方式中, 化合物是对携带该细胞的受治疗者给药的。在进一步的示范性实施方式中, 给药起到延缓或终止包括该细胞的肿瘤的生长的作用。

有效剂量

适用于本发明的药物组合物包括这样的组合物, 其中含有治疗有效量的活性成分, 也就是有效实现其预期目的的量。对特定应用有效的真实量将尤其取决于所治疗的疾病。例如, 当在就地减少镰状细胞脱水和/或延迟红细胞镰状化或变形发生的方法中给药时, 这类组合物将含有一定量的活性成分, 含量有效实现这种结果。有效量的确定完全在本领域技术人员的能力范围内, 尤其根据本文详细公开的内容。

关于本文所述的任意化合物, 治疗有效量可以最初是从细胞培养测定法确定的。靶血浆浓度将是这样的活性化合物浓度, 它能够抑制细胞的生长或分化。在优选的实施方式中, 细胞活性被抑制了至少 25%。能够诱导至少约 50%、75% 或者甚至 90% 或者更高的细胞活性抑制作用的活性化合物的靶血浆浓度是目前优选的。可以对患者细胞活性的抑制百分率进行监测, 以评估所达到的血浆药物浓度的适当性, 并且可以向上或向下调整剂量, 以达到所需的抑制百分率。

正如本领域所熟知的, 用于人类的治疗有效量也可以从动物模型确定。例如, 可以制定人用剂量, 以达到已经发现对动物有效的循环浓度。如上所述, 监测细胞抑制作用, 并向上或向下调整剂量, 可以调整人用剂量。

治疗有效量还可以从关于已知表现相似药理活性的化合物的人类

数据加以确定。所用剂量可以基于所给药的化合物与已知化合物相比的相对生物利用度和效力加以调整。

基于上述方法和本领域熟知的其他方法调整剂量以实现对人的最大功效完全在普通技术人员的能力范围内。

在局部给药的情况下，所给药的化合物的全身循环浓度将不是特别重要的。在这类情形下，将化合物给药的目的是在局部区域达到有效实现预期效果的浓度。

关于在涉及异常细胞增殖的疾病的预防和/或治疗中的用途，所给药的化合物的循环浓度优选为约 $0.001\mu\text{M}$ 至 $20\mu\text{M}$ ，而约 $0.01\mu\text{M}$ 至 $5\mu\text{M}$ 是优选的。

本文所述化合物对患者口服给药的剂量通常从约 $1\text{mg}/\text{天}$ 至约 $10,000\text{mg}/\text{天}$ ，更通常从约 $10\text{mg}/\text{天}$ 至约 $1,000\text{mg}/\text{天}$ ，最通常从约 $50\text{mg}/\text{天}$ 至约 $500\text{mg}/\text{天}$ 。根据患者的体重，典型的剂量从约 0.01 至约 $150\text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ ，更通常从约 0.1 至约 $15\text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ ，最通常从约 1 至约 $10\text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ 。

关于其他给药方式，剂量和间隔的调整可以因人而异，以提供所给药的化合物对所治疗的特定临床适应症有效的血浆水平。例如，在一种实施方式中，根据本发明的化合物可以按相对高的浓度给药，每天多次。或者，可能更可取的是按最小有效浓度给以本发明化合物，并且使用不太频繁的给药方案。这将提供与个体疾病严重性相称的治疗方案。

利用本文提供的教导，可以规划有效的治疗性处理方案，既不会导致实质性毒性，又完全有效地治疗由特定患者所表现的临床症状。这种规划应当牵涉考虑下列因素谨慎地选择活性化合物：化合物效力、相对生物利用度、患者体重、不利副作用的存在与严重性、优选的给药方式和所选择的药物的毒性曲线。

下列实施例进一步阐述本发明的化合物、组合物和方法。这些实施例仅供举例说明，不限制所要求保护的发明。

实施例

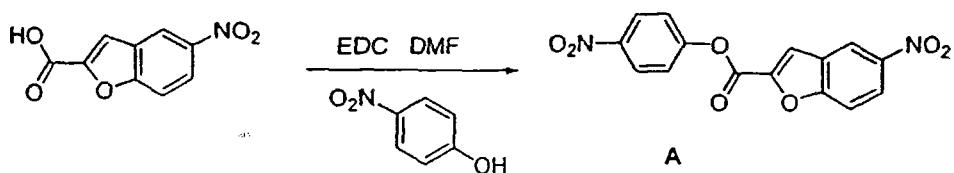
实施例 1

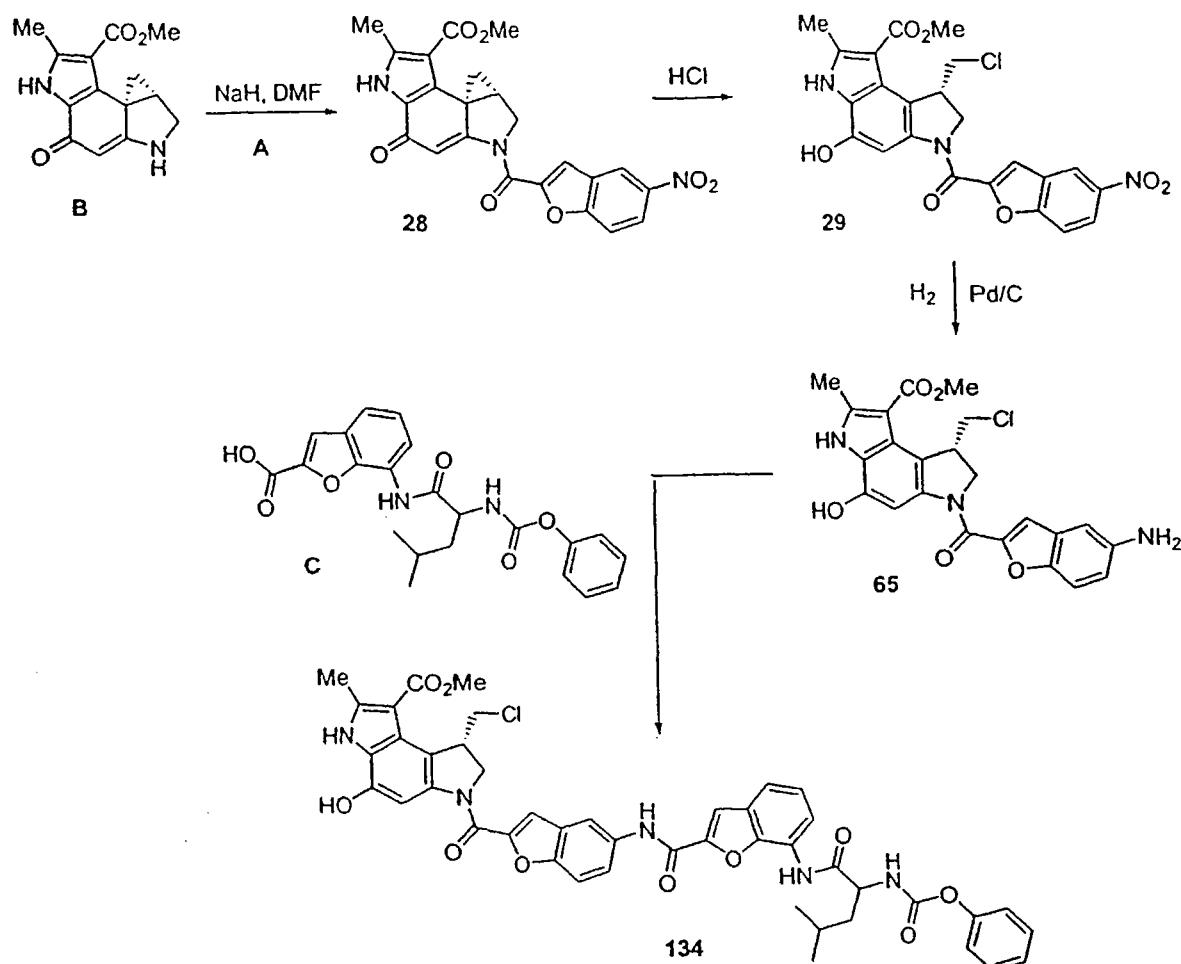
1.1 材料和方法

在下列实施例中，除非有相反的规定，温度是以摄氏度(°C)给出的；操作是在室温或环境温度（通常为约 18 - 25°C）下进行的；溶剂的蒸发是利用旋转蒸发器、在减压（通常 4.5 - 30mmHg）下进行的，浴温至多 60°C；反应的过程通常继之以 TLC，反应时间仅供举例说明；熔点是未经校正的；产物表现令人满意的 ¹H-NMR 和/或微量分析数据；收率仅供举例说明；还使用下列常规缩写：mp（熔点），L（升），mL（毫升），mmol（毫摩尔），g（克），mg（毫克），min（分钟），LC-MS（液相色谱-气相光谱）和 h（小时）。

¹H-NMR 光谱是在 Varian Mercury 300MHz 光谱计上测量的，与指定的结构一致。化学漂移是以偏离四甲基硅烷的百万分之份数(ppm)报告的。电子喷雾质谱是在 Perkin Elmer Sciex API 365 质谱计上记录的。元素分析是由 Robertson Microlit Laboratories, Madison, NJ 进行的。快速色谱法用硅胶是 E. Merck 级 (230 - 400 目)。反相分析型 HPLC 是在 HP 1100 或 Varian ProStar 210 仪器上进行的，带有 Phenomenex Luna 5μm C-18(2) 150mm x 4.6mm 柱或 Varian Microsorb-MV 0.1μm C-18 150mm x 4.6mm 柱。流速为 1mL/min，它是 0% 至 50% 缓冲液 B 历经 15 分钟的梯度或 10% 至 100% 缓冲液 B 历经 10 分钟的梯度，在 254nm 下 UV 检测。缓冲液 A 是 20mM 甲酸铵 + 20% 乙腈或含 0.1% 三氟乙酸的乙腈，缓冲液 B 是 20mM 甲酸铵 + 80% 乙腈或 0.1% 三氟乙酸水溶液。反相制备型 HPLC 是在 Varian ProStar 215 仪器上进行的，带有 Waters Delta Pak 15μm C-18 300mm x 7.8mm 柱。

1.2 合成方法





1.2a 化合物 134 的合成

式 I 化合物容易这样制备，使用氢化钠，在 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 或四氢呋喃 (THF) 中，使适当的螺环丙基环己二烯基类似物 (化合物 B) 与活化的杂环化合物 A 反应。所得化合物 28 然后用适当的卤代酸处理，例如氢氯酸，转化为化合物 29。化合物 29 被催化氢化作用还原，得到化合物 65，再与活化的酯偶联，得到化合物 134，即式 I 化合物。

其他式 I 化合物是按照所公开的工艺制备的，利用本领域技术人员熟知的工艺加以修改，以制备另外的类似物，例如还原、氧化、加成、水性萃取、蒸发和纯化。

1.2b 化合物 A 的合成

在 0°C 下，向 5-硝基-2-羧酸 (0.83g, 4.0mmol) 的 N,N-二甲基甲酰胺 (60mL) 溶液加入 EDC (1.15g, 6.0mmol)。将所得悬液在 0°C 下搅拌

45min, 此时 EDC 已经完全溶解。加入 4-硝基苯酚(0.83g, 6.0mmol)和 DMAP (0.73g, 6.0mmol), 在环境温度下搅拌所得混合物。13 小时后, 将混合物用乙酸乙酯稀释, 用 10% 柠檬酸水溶液洗涤两次, 然后用水和盐水洗涤, 然后经 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 在真空中浓缩。所得残余物经过硅胶快速柱色谱纯化 (含 7% 乙酸乙酯的二氯甲烷), 得到 1.02g (78%) A, 为黄色固体: $^1\text{H NMR} (\text{CDCl}_3) \delta 9.0 (\text{br s}, 1 \text{ H}), 8.2 (\text{d}, 2 \text{ H}), 7.8 (\text{m}, 2 \text{ H}), 7.4 (\text{d}, 2 \text{ H}), 7.3 (\text{s}, 1 \text{ H}), 6.8 (\text{s}, 1 \text{ H})$.

1.2c 化合物 28 的合成

在-40°C 下, 向 B (20mg, 0.08mmol) 的 N,N -二甲基甲酰胺(1.0mL) 溶液加入氯化钠(4.0mg, 0.1mmol, 含 60% 的油)的 N,N -二甲基甲酰胺(1.0mL) 悬液。使所得混合物缓慢(1.5h)温热至 0°C, 然后冷却回到 -40°C。加入 A (37mg, 0.1mmol), 使混合物缓慢(1.5h)温热至 0°C, 保持 20min. 将混合物冷却至-30°C, 用乙酸(10 μL)猝灭反应, 搅拌 10min, 用乙酸乙酯稀释, 然后用水和盐水洗涤。分离有机层, 经 MgSO_4 干燥, 过滤, 在真空中浓缩。经过硅胶快速柱色谱纯化 (含 50% 至 100% 乙酸乙酯的二氯甲烷), 得到 16.3mg (43%) 28, 为浅黄色固体:

$^1\text{H NMR} (\text{CDCl}_3) \delta 11.3 (\text{br s}, 1 \text{ H}), 9.4 (\text{br s}, 1 \text{ H}), 7.4 (\text{m}, 2 \text{ H}), 7.1 (\text{s}, 1 \text{ H}), 6.95 (\text{s}, 1 \text{ H}), 6.8 (\text{s}, 1 \text{ H}), 4.4 (\text{s}, 2 \text{ H}), 3.8 (\text{s}, 3 \text{ H}), 3.8 (\text{m}, 1 \text{ H}), 2.6 (\text{s}, 3 \text{ H}), 2.4 (\text{dd}, 1 \text{ H}), 1.4 (\text{m}, 1 \text{ H})$. ESMS m/z 490 ($\text{M} - \text{H}$)⁻.

1.2d 化合物 29 的合成

将 28 (50mg, 0.103mmol) 的 N,N -二甲基甲酰胺(1.0mL) 溶液用 1mL 无水氢氯酸 (1.0M 二噁烷溶液) 处理。将所得溶液在环境温度下搅拌 30min, 然后浓缩溶剂。所得残余物经过硅胶快速柱色谱纯化 (含 50% 至 100% 乙酸乙酯的二氯甲烷), 得到 50mg (100%) 29, 为浅黄色固体: $^1\text{H NMR} (\text{CDCl}_3) \delta 11.3 (\text{br s}, 1 \text{ H}), 9.4 (\text{br s}, 1 \text{ H}), 7.4 (\text{m}, 2 \text{ H}), 7.1 (\text{s}, 1 \text{ H}), 6.95 (\text{s}, 1 \text{ H}), 6.8 (\text{s}, 1 \text{ H}), 4.4 (\text{s}, 2 \text{ H}), 3.8 (\text{s}, 3 \text{ H}), 3.8 (\text{m}, 1 \text{ H}), 2.6 (\text{s}, 3 \text{ H}), 2.4 (\text{dd}, 1 \text{ H}), 1.4 (\text{m}, 1 \text{ H})$.

1.2d 化合物 65 的合成

向 29 (110mg, 0.184mmol)的 1:1 甲醇:二氯甲烷(20ml)溶液加入 10% 披钯碳(100mg)。使混合物在 Parr 装置上、在 50psi 下氢化一小时。将混合物经 C 盐过滤，用二氯甲烷冲洗，然后在真空中浓缩，得到 94mg (90%) 65，为黄色固体：

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.8-7.3 (m, 5 H), 4.4 (m, 3 H), 3.8 (m, 5 H), 3.4 (s, 3 H). ESMS m/z 454 (M-H)⁻.

1.2e 化合物 134 的合成

将化合物 C (19mg, 0.044mmol) 和 HATU (50mg, 0.132mmol) 溶于二甲基甲酰胺(2mL)，加入 N-甲基吗啉(19.3μL, 0.176mmol)。15 分钟后，加入 65 (20mg, 0.044mmol) 的二甲基甲酰胺(1mL)溶液。将反应混合物在室温下搅拌 16 小时，然后在真空中浓缩。将所得固体用水和饱和碳酸氢钠水溶液冲洗，经真空干燥，然后用乙酸乙酯洗涤。粗产物经过硅胶快速色谱纯化，用 5% 甲醇/二氯甲烷洗脱，得到 15mg (39%) 134：

¹H NMR (DMSO): δ 11.4 (br s, 1H), 11.0 (br s, 1H), 10.9 (s, 1H), 8.5 (s, 1H), 8.3 (br s, 2H), 8.0 (m, 2H), 7.9 (s, 1H), 7.7 (m, 3H), 7.5 (d, 1H), 7.3 (t, 2H), 4.6 (m, 2H), 4.5 (d, 2H), 4.3 (m, 1H), 3.8 (s, 3H), 3.7 (d, 1H), 3.5 (t, 1H), 2.7 (s, 3H), 1.7 (m, 2H), 0.9 (d, 6H).

按相似的方式制备下列化合物：

46: ¹H NMR (CDCl₃): δ 8.9 (s, 1H), 8.7 (s, 1H), 8.4 (dd, 1H), 8.1 (br s, 1H), 7.75 (d, 1H), 7.65 (s, 1H), 4.8 (d, 1H), 4.55 (m, 2H), 3.9 (s, 3H), 3.85 (s, 1H), 3.7 (m, 4H), 3.4 (t, 1H), 2.7 (s, 3H), 2.5 (br s, 4H), 2.4 (s, 3H).

95: ¹H NMR (DMSO): δ 12 (s, 1H), 10.6 (d, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.2 (br s, 1H), 8.1 (s, 1H), 7.7 (m, 5H), 7.5 (d, 1H), 4.6 (t, 1H), 4.5 (d, 1H), 4.4 (m, 2H), 4.1 (m, 1H), 3.9 (d, 2H), 3.8 (s, 3H), 3.3 (m, 10H), 2.8 (s, 3H), 2.6 (s, 3H), 1.6 (br s, 3H), 0.9 (s, 6H).

47: ¹H NMR (CDCl₃): δ 9.1 (br s, 1H), 8.1 (br s, 1H), 7.4 (t, 2H), 6.9 (s, 1H), 6.8 (dd, 1H), 4.8 (d, 1H), 4.5 (m, 2H), 3.9 (s, 3H), 3.85 (m, 3H), 3.7 (m, 2H), 3.4 (t, 1H), 2.7 (s, 3H), 2.6 (br s, 4H), 2.4 (s, 3H).

52: ^1H NMR (DMSO): δ 12.5 (s, 1H), 11.8 (s, 1H), 10.4 (s, 1H), 8.4 (s, 1H), 7.8 (m, 5H), 7.5 (m, 2H), 7.3 (t, 1H), 7.1 (t, 1H), 6.7 (s, 1H), 4.6 (m, 4H), 3.8 (s, 3H), 2.5 (s, 3H).

108: ^1H NMR (DMSO): δ 10.9 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 10.0 (s, 1H), 8.5 (s, 1H), 8.3 (s, 1H), 8.1 (m, 5H), 7.8 (m, 5H), 7.5 (m, 2H), 7.3 (m, 5H), 7.1 (m, 5H), 5.0 (m, 2H), 4.8 (m, 1H), 4.6 (m, 2H), 4.3 (m, 2H), 4.1 (t, 2H), 3.9 (m, 1H), 3.7 (m, 4H), 3.0 (m, 6H), 2.6 (s, 2H), 2.3 (t, 1H), 1.8 (s, 3H), 1.5 (m, 9H), 1.3 (m, 4H), 0.8 (m, 6H).

43: ^1H NMR (DMSO): δ 12.1 (s, 2H), 11.8 (s, 1H), 10.5 (d, 1H), 8.3 (s, 1H), 8.0 (s, 1H), 7.8 (m, 5H), 7.6 (s, 1H), 7.2 (d, 2H), 4.7 (m, 2H), 4.5 (m, 3H), 3.8 (s, 3H), 3.5 (m, 2H), 3.2 (m, 2H), 2.9 (s, 3H), 2.7 (s, 3H), 2.3 (s, 4H).

153: ^1H NMR (DMSO): δ 12.3 (br s, 1H), 11.7 (br s, 1H), 10.5 (br s, 1H), 10.0 (br s, 1H), 8.3 (m, 2H), 7.9 (m, 4H), 7.5 (s, 1H), 7.4 (d, 1H), 7.0 (m, 1H), 4.5 (m, 5H), 4.1 (m, 1H), 3.9 (d, 1H), 3.8 (s, 3H), 3.4 (m, 8H), 2.9 (br s, 3H), 2.8 (s, 3H), 2.7 (s, 3H), 1.8 (s, 2H), 1.6 (br s, 4H), 1.4 (m, 2H), 1.2 (d, 4H), 0.9 (m, 16H).

45: ^1H NMR (DMSO): δ 12.0 (s, 1H), 11.6 (s, 1H), 10.8 (s, 1H), 8.4 (s, 1H), 8.3 (d, 2H), 8.0 (s, 1H), 7.8 (m, 3H), 7.6 (s, 1H), 7.4 (t, 1H), 4.6 (m, 5H), 3.8 (s, 3H), 3.4 (m, 8H), 2.9 (s, 3H), 2.7 (s, 3H).

115: ^1H NMR (CDCl_3): δ 9.1 (br s, 1H), 8.4 (s, 1H), 8.3 (s, 1H), 7.7 (d, 1H), 7.5 (m, 3H), 7.2 (m, 3H), 6.9 (s, 2H), 4.7 (d, 1H), 4.5 (m, 4H), 3.9 (s, 3H), 3.5 (m, 14H), 2.6 (s, 3H), 1.3 (t, 3H).

109: ^1H NMR (DMSO): δ 11.9 (s, 1H), 10.5 (s, 1H), 10.2 (d, 1H), 8.2 (s, 1H), 7.7 (m, 6H), 7.2 (d, 1H), 7.1 (t, 1H), 6.8 (d, 1H), 4.6 (m, 1H), 4.4 (d, 2H), 4.3 (m, 2H), 3.7 (s, 3H), 2.6 (s, 3H).

135: ^1H NMR (DMSO): δ 11.4 (br s, 1H), 11.0 (br s, 1H), 10.9 (s, 1H), 8.5 (s, 1H), 8.3 (br s, 2H), 8.0 (m, 2H), 7.9 (s, 1H), 7.7 (m, 3H), 7.5 (d, 1H), 7.3 (t, 2H), 4.6 (m, 2H), 4.5 (d, 2H), 4.3 (m, 1H), 3.8 (s, 3H), 3.7 (d, 1H), 3.5 (t, 1H), 2.7 (s, 3H), 1.7 (m, 2H), 0.9 (d, 6H).

24: ^1H NMR (DMSO): δ 10.8 (s, 1H), 8.6 (s, 1H), 8.3 (m, 5H), 7.9 (s, 1H), 7.8 (d, 2H), 7.7 (d, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.6 (d, 2H), 7.4 (m, 5H), 5.3 (s, 2H), 4.9 (t, 1H), 4.7 (d, 1H), 4.4 (m, 1H), 4.0 (m, 2H).

ESMS m/z 696 (M-H)⁺.

25: ^1H NMR (DMSO): δ 8.6 (s, 1H), 8.3 (m, 5H), 7.8 (m, 3H), 7.6 (m, 3H), 7.4 (m, 1H), 4.8 (m, 1H), 4.6 (m, 1H), 4.3 (m, 1H), 4.1 (m, 2H).

ESMS m/z 605 (M-H)⁺.

27: ^1H NMR (DMSO): δ 10.9 (s, 1H), 10.3 (s, 1H), 8.6 (s, 1H), 8.3 (s, 1H), 8.2 (d, 1H), 8.1 (m, 2H), 7.8 (m, 3H), 7.6 (d, 1H), 7.3 (s, 1H), 6.9 (d, 1H), 6.8 (t, 1H), 6.4 (d, 1H), 4.8 (t, 1H), 4.6 (d, 1H), 4.3 (m, 1H), 4.0 (m, 2H).

154: ^1H NMR (DMSO): δ 10.7 (s, 1H), 10.0 (s, 1H), 8.6 (s, 1H), 8.4 (s, 1H), 8.2 (s, 1H), 8.1 (m, 3H), 7.9 (m, 5H), 7.7 (m, 1H), 7.6 (m, 3H), 7.3 (m, 5H), 5.0 (s, 2H), 4.8 (t, 1H), 4.6 (d,

1H), 4.3 (m, 3H), 4.1 (d, 1H), 3.9 (m, 1H), 3.1 (s, 1H), 3.0 (m, 1H), 2.7 (s, 1H), 2.3 (m, 5H), 1.6 (m, 5H), 1.4 (t, 2H), 1.2 (d, 3H), 0.9 (m, 12H).

ESMS m/z 1134 (M-H)⁻.

162: ¹H NMR (DMSO): δ 11.6 (s, 1H), 10.9 (s, 1H), 10.5 (s, 1H), 9.9 (s, 1H), 8.6 (s, 1H), 8.3 (s, 1H), 8.2 (d, 1H), 8.0 (m, 5H), 7.8 (m, 4H), 7.6 (d, 1H), 7.5 (m, 3H), 7.1 (t, 1H), 4.8 (t, 1H), 4.6 (d, 2H), 4.3 (m, 3H), 4.1 (d, 1H), 3.9 (m, 1H), 2.4 (m, 2H), 2.3 (m, 3H) 1.5 (m, 9H), 1.2 (m, 3H), 0.9 (m, 12H).

ESMS m/z 1044 (M-H)⁻.

79: ¹H NMR (CDCl₃): δ 9.4 (s, 1H), 8.5 (s, 1H), 8.1 (s, 2H), 8.0 (br s, 1H), 7.9 (d, 2H), 7.6 (s, 2H), 7.5 (s, 1H), 7.0 (d, 2H), 6.9 (d, 3H), 4.7 (d, 1H), 4.5 (m, 2H), 4.2 (m, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.7 (m, 4H), 3.4 (m, 1H), 2.7 (s, 3H), 2.5 (s, 3H), 2.4 (t, 2H), 1.1 (s, 9H), 0.4 (br s, 6H).

80: ¹H NMR (CDCl₃): δ 9.3 (br s, 1H), 8.3 (s, 1H), 8.2 (br s, 1H), 8.0 (m, 3H), 7.5 (m, 4H), 7.4 (m, 2H), 7.0 (m, 4H), 4.7 (d, 1H), 4.6 (m, 1H), 4.4 (m, 1H), 4.2 (m, 5H), 3.9 (s, 3H), 3.4 (m, 1H), 2.7 (s, 3H), 2.9 (s, 3H), 2.3 (m, 2H), 1.1 (s, 9H), 0.4 (br s, 6H).

81: ¹H NMR (CDCl₃): δ 10.5 (s, 1H), 8.8 (s, 1H), 8.6 (d, 2H), 8.0 (d, 2H), 7.8 (d, 2H), 7.4 (m, 3H), 7.3 (d, 2H), 7.0 (m, 2H), 6.9 (d, 2H), 4.6 (m, 3H), 4.4 (m, 2H), 3.9 (m, 4H), 3.4 (m, 1H), 2.7 (s, 3H), 2.5 (s, 3H), 1.0 (s, 9H), 0.3 (s, 6H).

82: ¹H NMR (CDCl₃): δ 8.5 (s, 2H), 8.4 (s, 1H), 8.2 (s, 1H), 8.0 (m, 4H), 7.6 (m, 4H), 7.5 (s, 1H), 7.3 (s, 1H), 7.1 (s, 2H), 4.7 (m, 3H), 4.55 (m, 1H), 4.45 (m, 1H), 3.9 (m, 4H), 3.4 (m, 1H), 2.7 (s, 3H), 2.5 (s, 3H), 1.0 (s, 9H), 0.4 (br s, 6H).

83: ¹H NMR (CDCl₃): δ 9.6 (s, 1H), 8.4 (s, 1H), 8.1 (s, 2H), 8.0 (m, 1H), 7.8 (s, 1H), 7.6 (m, 2H), 7.5 (s, 1H), 7.35 (q, 2H), 7.0 (s, 1H), 4.7 (d, 1H), 4.55 (m, 1H), 4.45 (m, 1H), 3.9 (m, 4H), 3.4 (m, 1H), 2.7 (s, 3H), 1.0 (s, 9H), 0.4 (br s, 6H).

89: ¹H NMR (CDCl₃): δ 9.3 (br s, 1H), 8.4 (br s, 1H), 8.2 (s, 1H), 8.0 (br s, 2H), 7.5 (m, 9H), 7.2 (s, 1H), 7.1 (d, 1H), 6.9 (s, 1H), 5.1 (s, 2H), 4.7 (d, 1H), 4.55 (m, 1H), 4.45 (m, 1H), 3.9 (m, 4H), 3.4 (m, 1H), 2.7 (s, 3H), 1.05 (s, 9H), 0.4 (br s, 6H).

90: ¹H NMR (CDCl₃): δ 9.6 (br s, 1H), 8.5 (br s, 1H), 8.2 (s, 1H), 8.0 (m, 2H), 7.5 (m, 8H), 7.3 (m, 2H), 7.1 (d, 1H), 6.6 (d, 1H), 5.2 (s, 2H), 4.7 (d, 1H), 4.55 (m, 1H), 4.45 (m, 1H), 3.9 (m, 4H), 3.4 (m, 1H), 2.7 (s, 3H), 1.05 (s, 9H), 0.3 (br s, 6H).

163: ¹H NMR (DMSO): δ 12.0 (s, 1H), 11.6 (s, 1H), 10.4 (s, 1H), 10.2 (s, 1H), 8.4 (s, 1H), 8.1 (m, 4H), 7.9 (m, 3H), 7.5 (m, 3H), 7.2 (d, 2H), 4.9 (s, 2H), 4.7 (m, 1H), 4.6 (m, 1H), 4.5 (m, 1H), 3.9 (m, 4H), 3.6 (m, 1H), 2.7 (s, 3H), 2.5 (s, 3H), 1.1 (s, 9H), 0.7 (s, 6H).

92: ¹H NMR (DMSO): δ 12.0 (s, 1H), 10.4 (s, 1H), 10.2 (s, 1H), 8.3 (s, 1H), 7.9 (s, 1H), 7.8 (m, 4H), 7.5 (d, 2H), 7.25 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 6.9 (m, 3H), 4.7 (m, 3H), 4.6 (m, 1H), 4.5 (m, 1H), 3.9 (m, 2H), 3.8 (m, 4H), 3.5 (m, 1H), 3.2 (m, 2H), 2.9 (s, 3H), 2.7 (s, 3H), 2.6 (s, 3H).

98: ¹H NMR (CDCl₃): δ 8.3 (br s, 1H), 8.1 (d, 1H), 8.0 (br s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.85 (d, 2H), 7.65 (s, 1H), 7.6 (d, 2H), 7.5 (s, 1H), 7.4 (m, 2H), 7.0 (s, 1H), 6.85 (d, 2H), 4.8 (m, 3H), 4.55

(m, 1H), 4.45 (m, 1H), 3.9 (m, 6H), 3.4 (m, 1H), 2.7 (s, 3H), 2.5 (s, 3H), 2.4 (m, 2H), 1.05 (s, 9H), 0.4 (br s, 6H).

110: ^1H NMR ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$): δ 11.3 (br s, 1H), 9.7 (s, 1H), 9.6 (d, 1H), 8.2 (s, 1H), 7.9 (m, 2H), 7.7 (d, 2H), 7.6 (m, 3H), 7.5 (d, 1H), 7.2 (m, 3H), 6.9 (m, 3H), 6.8 (s, 1H), 4.9 (m, 2H), 4.7 (m, 1H), 4.6 (m, 1H), 4.5 (m, 1H), 3.8 (m, 25H), 3.5 (m, 1H), 3.2 (m, 2H), 2.7 (s, 3H), 2.3 (m, 4H), 2.0 (s, 3H).

113: ^1H NMR ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$): δ 11.3 (br s, 1H), 10.1 (s, 1H), 9.9 (s, 1H), 8.4 (s, 1H), 7.9 (m, 3H), 7.7 (m, 2H), 7.5 (m, 3H), 7.4 (m, 1H), 7.2 (s, 1H), 7.1 (d, 2H), 6.9 (t, 1H), 5.0 (s, 2H), 4.6 (d, 1H), 4.5 (m, 1H), 4.4 (m, 1H), 3.9 (d, 1H), 3.7 (s, 3H), 3.4 (m, 1H), 2.6 (s, 3H), 2.4 (s, 3H).

114: ^1H NMR (DMSO): δ 11.9 (br s, 1H), 11.7 (s, 1H), 10.4 (d, 1H), 10.2 (t, 1H), 8.3 (s, 1H), 7.9 (s, 1H), 7.8 (m, 7H), 7.5 (m, 2H), 7.0 (m, 6H), 4.9 (s, 2H), 4.6 (m, 1H), 4.5 (m, 1H), 4.4 (m, 1H), 3.9 (d, 1H), 3.8 (s, 3H), 3.7 (m, 2H), 3.5 (m, 25H), 2.9 (s, 3H), 2.7 (s, 3H), 2.2 (m, 2H).

159: ^1H NMR (DMSO): δ 12.0 (m, 1H), 11.9 (br s, 1H), 8.3 (m, 2H), 8.0 (m, 4H), 7.6 (m, 2H), 7.3 (s, 1H), 7.1 (d, 1H), 6.9 (s, 1H), 4.5 (m, 3H), 4.3 (m, 2H), 3.9 (d, 1H), 3.8 (s, 6H), 3.5 (m, 8H), 3.2 (m, 4H), 2.7 (s, 3H), 2.3 (m, 4H), 1.4 (m, 9H), 1.1 (m, 3H), 0.8 (m, 12H).

131: ^1H NMR (DMSO): δ 11.9 (s, 1H), 10.2 (s, 1H), 7.7 (m, 1H), 7.5 (s, 1H), 7.0 (m, 3H), 6.7 (d, 1H), 4.7 (m, 1H), 4.4 (d, 1H), 4.3 (m, 2H), 3.9 (d, 1H), 3.8 (s, 3H), 2.6 (s, 3H).

129: ^1H NMR (DMSO): δ 11.9 (s, 1H), 10.2 (s, 1H), 7.8 (m, 4H), 4.5 (m, 2H), 4.3 (m, 1H), 3.9 (s, 3H), 3.8 (d, 1H), 3.7 (s, 3H), 3.4 (t, 1H), 2.5 (s, 3H).

136: ^1H NMR (DMSO): δ 11.9 (s, 1H), 10.2 (s, 1H), 7.65 (d, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.3 (d, 1H), 7.1 (dd, 1H), 4.6 (m, 1H), 4.5 (m, 1H), 4.3 (m, 1H), 3.85 (m, 1H), 3.8 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.5 (m, 1H), 2.6 (s, 3H).

137: ^1H NMR (DMSO): δ 11.9 (s, 1H), 10.2 (s, 1H), 8.0 (m, 1H), 7.5 (m, 3H), 7.2 (s, 1H), 7.0 (m, 1H), 4.6 (m, 1H), 4.5 (m, 1H), 4.4 (m, 1H), 3.9 (m, 2H), 3.8 (d, 1H), 3.7 (s, 3H), 3.4 (m, 1H), 2.6 (s, 3H), 2.4 (m, 2H), 1.3 (s, 9H).

143: ^1H NMR (DMSO): δ 11.9 (s, 1H), 10.2 (s, 1H), 8.0 (m, 2H), 7.7 (m, 3H), 7.3 (s, 1H), 7.1 (d, 1H), 4.6 (m, 1H), 4.5 (m, 1H), 4.3 (m, 1H), 4.2 (m, 2H), 3.9 (d, 1H), 3.8 (s, 3H), 3.4 (m, 1H), 3.3 (m, 2H), 2.6 (s, 3H).

148: ^1H NMR (DMSO): δ 11.9 (s, 1H), 10.1 (s, 1H), 7.7 (d, 2H), 7.5 (s, 1H), 7.3 (s, 1H), 7.1 (d, 1H), 4.5 (m, 1H), 4.4 (d, 1H), 4.3 (m, 3H), 3.8 (m, 1H), 3.7 (s, 3H), 3.5 (m, 3H), 2.8 (s, 6H), 2.5 (s, 3H).

150: ^1H NMR (DMSO): δ 10.3 (s, 1H), 9.4 (s, 1H), 7.8 (m, 1H), 7.5 (m, 2H), 7.1 (s, 1H), 6.9 (dd, 1H), 4.5 (m, 4H), 4.3 (m, 1H), 3.8 (s, 3H), 3.75 (d, 1H), 3.5 (m, 1H), 3.1 (m, 2H), 2.75 (s, 6H), 2.65 (s, 3H), 2.1 (m, 2H).

151: ^1H NMR (DMSO): δ 11.9 (s, 1H), 10.2 (s, 1H), 7.7 (d, 2H), 7.65 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.25 (d, 1H), 4.6 (m, 1H), 4.5 (m, 1H), 4.4 (m, 1H), 3.9 (d, 1H), 3.8 (s, 3H), 3.5 (m, 1H), 3.3 (br m, 8H), 2.9 (s, 3H), 2.6 (s, 3H).

251: ^1H NMR (CDCl_3): δ 12.0 (s, 1H), 7.9 (m, 1H), 7.7 (d, 1H), 7.6 (s, 1H), 7.4 (s, 1H), 7.2 (dd, 1H), 4.6 (m, 3H), 4.4 (m, 2H), 3.9 (m, 1H), 3.8 (s, 3H), 3.7 (m, 1H), 3.6 (m, 2H), 3.4 (m, 4H), 3.2 (m, 2H), 3.0 (m, 4H), 2.9 (s, 6H), 2.7 (m, 4H), 2.6 (s, 2H), 1.6 (m, 2H), 1.3 (m, 8H), 0.9 (q, 2H).

227: ^1H NMR (CDCl_3): δ 10.3 (s, 1H), 8.7 (s, 1H), 7.7 (d, 2H), 7.5 (m, 3H), 7.1 (m, 2H), 6.9 (d, 2H), 4.6 (m, 5H), 4.25 (m, 2H), 4.15 (m, 2H), 3.9 (s, 3H), 3.4 (m, 1H), 3.1 (s, 2H), 2.9 (m, 12H), 2.7 (s, 3H), 2.5 (s, 6H), 2.3 (s, 3H).

230: ^1H NMR (CDCl_3): δ 10.3 (s, 1H), 8.6 (s, 1H), 7.7 (d, 2H), 7.5 (m, 3H), 7.1 (m, 2H), 6.9 (d, 2H), 6.7 (s, 2H), 4.7 (m, 4H), 4.1 (m, 4H), 3.9 (s, 3H), 3.5 (m, 2H), 3.4 (m, 1H), 3.2 (m, 4H), 3.1 (s, 2H), 2.8 (m, 5H), 2.4 (m, 10H), 2.2 (m, 7H).

166: ESMS m/z 532 (M-H) $^-$.

165: ESMS m/z 920 (M-H) $^-$.

9: ESMS m/z 966 (M-H) $^-$.

17: ESMS m/z 753 (M-H) $^-$.

19: ESMS m/z 696 (M-H) $^-$.

50: ESMS m/z 800 (M-H) $^-$.

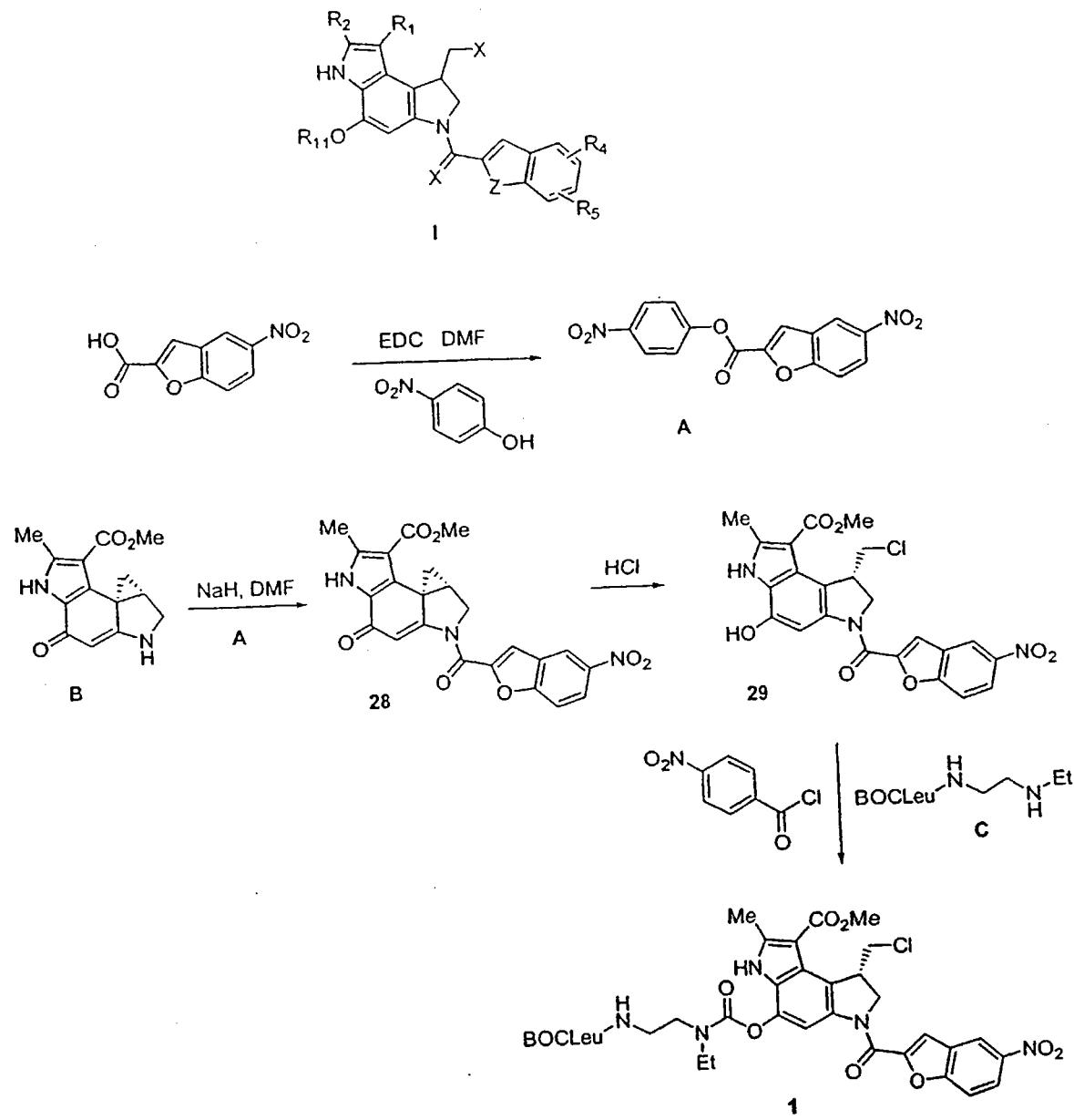
174: ^1H NMR (CDCl_3): δ 8.4 (s, 1H), 7.9 (m, 1H), 7.5 (m, 2H), 7.2 (m, 2H), 4.75 (m, 3H), 4.6 (m, 1H), 4.45 (m, 1H), 3.9 (m, 4H), 3.4 (m, 1H), 2.7 (s, 3H), 1.05 (s, 9H), 0.4 (br s, 6H); ESMS m/z 627 (M-H) $^-$.

176: ^1H NMR (CDCl_3): δ 8.4 (s, 1H), 7.9 (m, 1H), 7.5 (m, 2H), 7.1 (m, 2H), 4.7 (m, 3H), 4.6 (m, 1H), 4.45 (m, 1H), 3.9 (m, 4H), 3.4 (m, 1H), 2.7 (s, 3H), 1.05 (s, 9H), 0.4 (br s, 6H).

94: ^1H NMR (CDCl_3): δ 8.5 (d, 2H), 8.2 (d, 2H), 7.9 (s, 2H), 7.8 (d, 2H), 7.5 (m, 2H), 7.4 (m, 4H), 6.8 (d, 2H), 4.7 (d, 1H), 4.5 (m, 1H), 4.4 (m, 1H), 3.9 (m, 6H), 3.3 (m, 1H), 2.9 (t, 2H), 2.7 (s, 3H), 2.5 (s, 3H), 2.1 (m, 2H), 1.6 (s, 6H), 1.0 (s, 9H), 0.3 (br s, 6H).
ESMS m/z 1038 (M-H) $^-$.

实施例 2

2.1 合成方法



2.1a 化合物 1 的合成

式 I 化合物容易这样制备，使用氢化钠，在 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 或四氢呋喃 (THF) 中，使适当的螺环丙基环己二烯基类似物 (化合物 B) 与活化的杂环化合物 A 反应。所得化合物 28 然后用适当的卤代酸处理，例如氯化氢，转化为化合物 29。通过就地活化作用与化合物 29 偶联，得到化合物 1，即式 I 化合物。

其他式 I 化合物是按照所公开的工艺制备的，利用本领域技术人员

员熟知的工艺加以修改，以制备另外的类似物，例如还原、氧化、加成、水性萃取、蒸发和纯化。

2.1b 化合物 A 的合成

在 0°C 下，向 5-硝基-2-羧酸(0.83g, 4.0mmol)的 N,N-二甲基甲酰胺(60mL)溶液加入 EDC (1.15g, 6.0mmol)。将所得悬液在 0°C 下搅拌 45min，此时 EDC 已经完全溶解。加入 4-硝基苯酚(0.83g, 6.0mmol)和 DMAP (0.73g, 6.0mmol)，在环境温度下搅拌所得混合物。13 小时后，将混合物用乙酸乙酯稀释，用 10% 柠檬酸水溶液洗涤两次，然后用水和盐水洗涤，然后经 Na₂SO₄ 干燥，过滤，在真空中浓缩。所得残余物经过硅胶快速柱色谱纯化（含 7% 乙酸乙酯的二氯甲烷），得到 1.02g (78%) A，为黄色固体：¹H NMR (CDCl₃) δ 9.0 (br s, 1 H), 8.2 (d, 2 H), 7.8 (m, 2 H), 7.4 (d, 2 H), 7.3 (s, 1 H), 6.8 (s, 1 H).

2.1c 化合物 28 的合成

在 -40°C 下，向 B (20mg, 0.08mmol)的 N,N-二甲基甲酰胺(1.0mL)溶液加入氢化钠(4.0mg, 0.1mmol, 含 60% 的油)的 N,N-二甲基甲酰胺(1.0mL)悬液。使所得混合物缓慢(1.5h)温热至 0°C，然后冷却回到 -40°C。加入 A (37mg, 0.1mmol)，使混合物缓慢(1.5h)温热至 0°C，保持 20min. 将混合物冷却至 -30°C，用乙酸(10μL)猝灭反应，搅拌 10min，用乙酸乙酯稀释，然后用水和盐水洗涤。分离有机层，经 MgSO₄ 干燥，过滤，在真空中浓缩。经过硅胶快速柱色谱纯化（含 50% 至 100% 乙酸乙酯的二氯甲烷），得到 16.3mg (43%) 28，为浅黄色固体：

¹H NMR (CDCl₃) δ 11.3 (br s, 1 H), 9.4 (br s, 1 H), 7.4 (m, 2 H), 7.1 (s, 1 H), 6.95 (s, 1 H), 6.8 (s, 1 H), 4.4 (s, 2 H), 3.8 (s, 3 H), 3.8 (m, 1 H), 2.6 (s, 3 H), 2.4 (dd, 1 H), 1.4 (m, 1 H). ESMS m/z 490 (M - H)⁻.

2.1d 化合物 29 的合成

将 28 (50mg, 0.103mmol)的 N,N-二甲基甲酰胺(1.0mL)溶液用 1mL 无水氢氯酸 (1.0M 二噁烷溶液) 处理。将所得溶液在环境温度下搅拌 30min，然后浓缩溶剂。所得残余物经过硅胶快速柱色谱纯化（含

50%至100%乙酸乙酯的二氯甲烷), 得到50mg(100%)**29**, 为浅黄色固体: ^1H NMR (CDCl_3) δ 11.3 (br s, 1 H), 9.4 (br s, 1 H), 7.4 (m, 2 H), 7.1 (s, 1 H), 6.95 (s, 1 H), 6.8 (s, 1 H), 4.4 (s, 2 H), 3.8 (s, 3 H), 3.8 (m, 1 H), 2.6 (s, 3 H), 2.4 (dd, 1 H), 1.4 (m, 1 H).

2.1e 化合物**1**的合成

在-70°C下, 向**29**(66mg, 0.136mmol)的无水二氯甲烷(10mL)溶液加入4-硝基苯基氯甲酸酯(55mg, 0.273mmol), 然后加入三乙胺(27mg, 0.273mmol)。使所得混合物缓慢温热。2小时后, 将混合物置于冰浴中, 一次性加入胺**C**(82mg, 0.273mmol)。将所得混合物在环境温度下搅拌过夜。22小时后, 将混合物倒入饱和 NaHCO_3 水溶液中。分离含水层, 用二氯甲烷萃取。合并有机萃取液, 经 MgSO_4 干燥, 过滤, 在真空中浓缩。经过硅胶快速柱色谱纯化(含1%至2%甲醇的二氯甲烷), 得到42mg(38%)**1**, 为浅黄色固体:

^1H NMR (CDCl_3) δ 11.0 (s, 1 H), 8.6 (s, 1 H), 8.4 (d, 1 H), 8.2 (br d, 1 H), 7.6 (m, 2 H), 6.8 (m, 1 H), 4.8 (m, 1 H), 4.7 (m, 1 H), 4.5 (m, 1 H), 4.1 (m, 2 H), 3.9 (s, 3 H), 3.4 (m, 5 H), 2.7 (d, 3 H), 1.6 (s, 6 H), 1.4 (s, 9 H), 1.2 (m, 4 H), 0.9 (m, 9 H).

按相似的方式制备下列化合物:

220: ^1H NMR (CDCl_3): δ 11.4 (d, 1H), 8.7 (s, 1H), 8.4 (dd, 1H), 8.1 (br s, 1H), 7.75 (d, 1H), 7.65 (s, 1H), 5.8 (br s, 2H), 4.7 (m, 1H), 4.5 (m, 2H), 4.2 (m, 1H), 3.9 (s, 3H), 3.4 (m, 1H), 3.0 (s, 2H), 2.75 (s, 3H), 2.65 (s, 3H).
ESMS m/z 613 (M-H)⁻.

222: ^1H NMR (CDCl_3): δ 10.3 (s, 1H), 8.7 (d, 2H), 8.4 (d, 1H), 8.1 (m, 1H), 7.7 (d, 2H), 7.6 (m, 1H), 6.9 (d, 2H), 4.9 (d, 1H), 4.7 (m, 1H), 4.5 (m, 3H), 3.95 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.6 (m, 1H), 3.4 (m, 1H), 3.1 (s, 3H), 2.7 (s, 3H), 2.3 (s, 3H).
ESMS m/z 745 (M-H)⁻.

224: ESMS m/z 899 (M-H)⁻.

235: ESMS m/z 913 (M-H)⁻.

229: ESMS m/z 598 (M-H)⁻.

8: ESMS m/z 856 (M-H)⁻.

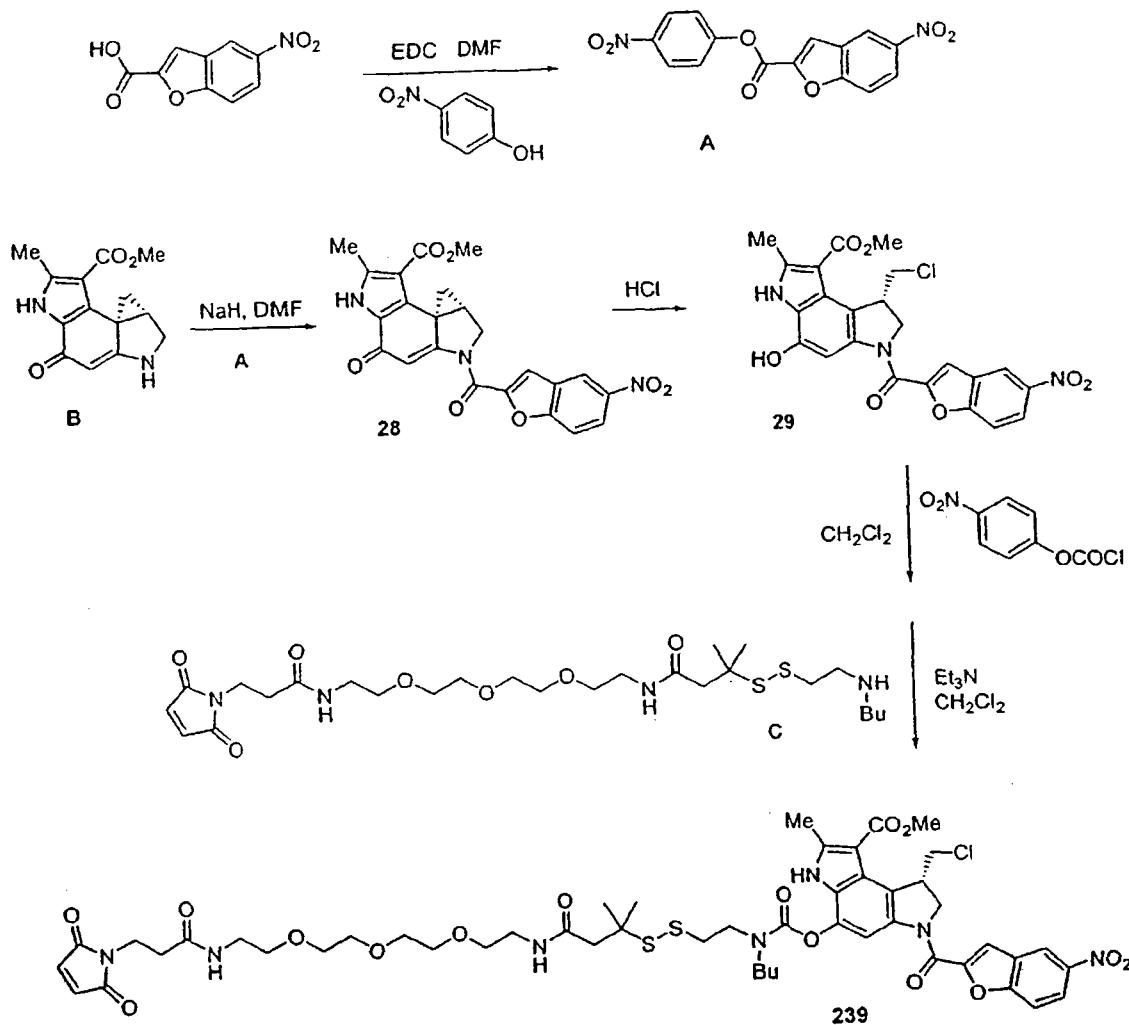
233: ESMS m/z 816 (M-H)⁻.

232: ESMS m/z 612 (M-H)⁻.

234: ESMS m/z 952 (M-H)⁻.

实施例 3

3.1 合成方法



3.1a 化合物 239 的合成

式 I 化合物容易这样制备，使用氢化钠，在 N,N -二甲基甲酰胺(DMF)或四氢呋喃(THF)中，使适当的螺环丙基环己二烯基类似物(化合物 B)与活化的杂环化合物 A 反应。所得化合物 28 然后用适当的卤代酸处理，例如氯化氢，转化为化合物 29。将化合物 29 活化为 4-硝基苯基酯，与化合物 C 偶联，得到化合物 239，即式 I 化合物。

其他式 I 化合物是按照所公开的工艺制备的，利用本领域技术人员熟知的工艺加以修改，以制备另外的类似物，例如还原、氧化、加成、水性萃取、蒸发和纯化。

3.1b 化合物 A 的合成

在 0°C 下, 向 5-硝基-2-羧酸(0.83g, 4.0mmol)的 N,N-二甲基甲酰胺(60mL)溶液加入 EDC (1.15g, 6.0mmol)。将所得悬液在 0°C 下搅拌 45min, 此时 EDC 已经完全溶解。加入 4-硝基苯酚(0.83g, 6.0mmol)和 DMAP (0.73g, 6.0mmol), 在环境温度下搅拌所得混合物。13 小时后, 将混合物用乙酸乙酯稀释, 用 10% 柠檬酸水溶液洗涤两次, 然后用水和盐水洗涤, 然后经 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 在真空中浓缩。所得残余物经过硅胶快速柱色谱纯化 (含 7% 乙酸乙酯的二氯甲烷), 得到 1.02g (78%) A, 为黄色固体:

¹H NMR (CDCl₃) δ 9.0 (br s, 1 H), 8.2 (d, 2 H), 7.8 (m, 2 H), 7.4 (d, 2 H), 7.3 (s, 1 H), 6.8 (s, 1 H).

3.1c 化合物 28 的合成

在 -40°C 下, 向 B (20mg, 0.08mmol)的 N,N-二甲基甲酰胺(1.0mL)溶液加入氢化钠(4.0mg, 0.1mmol, 含 60% 的油)的 N,N-二甲基甲酰胺(1.0mL)悬液。使所得混合物缓慢(1.5h)温热至 0°C, 然后冷却回到 -40°C。加入 A (37mg, 0.1mmol), 使混合物缓慢(1.5h)温热至 0°C, 保持 20min. 将混合物冷却至 -30°C, 用乙酸(10μL)猝灭反应, 搅拌 10min, 用乙酸乙酯稀释, 然后用水和盐水洗涤。分离有机层, 经 MgSO₄ 干燥, 过滤, 在真空中浓缩。经过硅胶快速柱色谱纯化 (含 50% 至 100% 乙酸乙酯的二氯甲烷), 得到 16.3mg (43%) 28, 为浅黄色固体:

¹H NMR (CDCl₃) δ 11.3 (br s, 1 H), 9.4 (br s, 1 H), 7.4 (m, 2 H), 7.1 (s, 1 H), 6.95 (s, 1 H), 6.8 (s, 1 H), 4.4 (s, 2 H), 3.8 (s, 3 H), 3.8 (m, 1 H), 2.6 (s, 3 H), 2.4 (dd, 1 H), 1.4 (m, 1 H). ESMS m/z 490 (M - H)⁻.

3.1d 化合物 29 的合成

将 28 (50mg, 0.103mmol)的 N,N-二甲基甲酰胺(1.0mL)溶液用 1mL 无水氢氯酸 (1.0M 二噁烷溶液) 处理。将所得溶液在环境温度下搅拌 30min, 然后浓缩溶剂。所得残余物经过硅胶快速柱色谱纯化 (含 50% 至 100% 乙酸乙酯的二氯甲烷), 得到 50mg (100%) 29, 为浅黄色固体:

¹H NMR (CDCl₃) δ 11.3 (br s, 1 H), 9.4 (br s, 1 H), 7.4 (m, 2 H), 7.1 (s, 1 H), 6.95 (s, 1 H), 6.8 (s, 1 H), 4.4 (s, 2 H), 3.8 (s, 3 H), 3.8 (m, 1 H), 2.6 (s, 3 H), 2.4 (dd, 1 H), 1.4 (m, 1 H).

3.1e 化合物 239 的合成

在-78°C 下, 向 29 (24mg, 0.05mmol)的二氯甲烷(5mL)悬液加入 4-硝基苯基氯甲酸酯(40mg, 0.2mmol)和三乙胺(28μL, 0.2mmol)。使反应混合物温热至室温, 然后在真空中浓缩。将所得残余物用二乙醚洗涤, 然后经真空干燥, 得到 9, 为黄色固体。将黄色固体 9 (19mg, 0.029mmol)溶于二氯甲烷(3mL), 加入胺 C (20mg, 0.029mmol), 然后加入三乙胺(8.3μL, 0.06mmol)。将反应搅拌 16 小时, 然后在真空中浓缩。所得残余物经过硅胶快速色谱纯化, 用 40:1 二氯甲烷:甲醇洗脱, 得到 12mg (45%) 239, 为黄色固体: ¹H NMR

(CDCl₃): δ 9.9 (s, 1H), 9.7 (s, 1H), 8.7 (s, 1H), 8.4 (dd, 1H), 8.3 (d, 1H), 8.1 (br s, 1H), 7.75(d, 1H), 7.65 (s, 1H), 6.7(m, 2H), 4.75 (m, 1H), 4.55 (m, 2H), 3.9 (m, 4H), 3.8 (m, 4H), 3.5 (m, 18H), 3.0 (m, 2H), 2.7 (s, 3H), 2.5 (m, 4H), 1.7 (m, 2H), 1.4 (m, 10H), 1.0 (m, 2H).

ESMS m/z 1100 (M-H)⁻.

按相似的方式制备下列化合物:

238: ¹H NMR (CDCl₃): δ 10.3 (s, 1H), 8.7 (s, 1H), 8.5 (m, 1H), 8.4 (d, 1H), 8.2 (br s, 1H), 7.7 (m, 4H), 7.2 (m, 1H), 4.8 (m, 1H), 4.6 (m, 2H), 3.9 (m, 4H), 3.7 (m, 2H), 3.4 (m, 1H), 3.2 (m, 2H), 2.9 (s, 3H), 2.5 (s, 3H).

ESMS m/z 710 (M-H)⁻.

242: ¹H NMR (CDCl₃): δ 9.7 (br s, 1H), 9.0 (br s, 1H), 8.6 (s, 1H), 8.4 (d, 1H), 8.1 (br s, 1H), 7.7 (m, 1H), 7.5 (m, 1H), 7.4 (m, 1H), 4.7 (d, 1H), 4.5 (m, 2H), 3.9 (s, 4H), 3.8 (m, 1H), 3.6 (m, 1H), 3.4 (m, 1H), 3.0 (m, 5H), 2.6 (s, 3H), 2.5 (m, 2H), 1.5 (m, 9H), 1.4 (m, 6H).

244: ¹H NMR (CDCl₃): δ 8.6 (br s, 1H), 8.4 (d, 1H), 8.1 (m, 1H), 7.7 (m, 6H), 6.9 (m, 2H), 4.75 (m, 1H), 4.55 (m, 2H), 4.1(m, 2H), 3.9 (m, 4H), 3.7 (m, 12H), 3.5 (m, 2H), 3.4 (m, 3H), 3.2 (m, 3H), 3.1 (m, 5H), 2.7 (s, 6H), 2.1 (m, 2H), 1.5 (s, 6H).

248: ¹H NMR (CDCl₃): δ 9.9 (s, 1H), 9.3 (br s, 1H), 8.1 (m, 1H), 7.5 (m, 3H), 7.1 (m, 2H), 4.8 (d, 1H), 4.5 (m, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.8 (m, 1H), 3.7 (m, 2H), 3.4 (m, 1H), 3.0 (m, 8H), 2.5 (m, 2H), 1.5 (dd, 6H), 1.3 (s, 9H).

250: ¹H NMR (CDCl₃): δ 9.4 (s, 1H), 8.6 (s, 1H), 8.3 (m, 1H), 8.1 (m, 1H), 7.9 (m, 2H), 7.5 (m, 7H), 7.1 (m, 4H), 4.8 (m, 1H), 4.5 (m, 2H), 4.3 (m, 1H), 4.95 (s, 3H), 4.85 (s, 3H), 4.7 (m, 1H), 3.4 (m, 1H), 3.1 (m, 4H), 2.7 (s, 3H), 2.2 (s, 3H), 1.5 (s, 6H).

272: ¹H NMR (DMSO): δ 12.0 (m, 1H), 8.8 (br s, 1H), 8.3 (m, 1H), 7.9 (m, 3H), 7.7 (m, 3H), 6.9 (m, 2H), 4.85 (s, 1H), 4.7 (m, 1H), 4.5 (m, 3H), 3.8 (m, 4H), 3.6 (m, 4H), 3.4 (m, 5H), 3.1 (m, 6H), 2.7 (s, 3H), 2.2 (m, 2H), 1.4 (s, 6H).

实施例 4

增殖测定法

选择用于测量细胞毒性化合物的生物活性的测定法是成熟的³H-胸昔增殖测定法。这是一种适宜于量化细胞增殖的方法，因为它通过测量外源性放射性标记的³H-胸昔的结合，评价DNA合成。这种测定法是非常可再现的，能够适应大量的化合物。

在含有10%热灭活的胎牛血清(FCS)的RPMI培养基中培养前髓细胞的白血病细胞HL-60。在研究当天，收集细胞，洗涤，按 0.5×10^6 细胞/mL的浓度再悬浮在含有10%FCS的RPMI中。将100μL细胞悬液加入到96孔平板中。进行阿霉素或供试化合物的系列稀释(3倍增量)，每孔加入100μL化合物。最后，每孔加入10μL 100μCi/mL³H-胸昔，将平板培育24小时。利用96孔收获器(Packard Instruments)收获平板，在Packard Top Count计数器上计数。根据四参数逻辑曲线测定³H-胸昔的结合，作为药物体积摩尔浓度的函数，使用Prism软件测定IC₅₀值。

本发明化合物在上述测定法中的IC₅₀值一般从约1pM至约100nM，优选从约10pM至约10nM。

在本说明书中提到或涉及的每份专利申请、专利、出版物和其他公开的文献都全部引用在此作为参考，相当于每份单独的专利申请、专利、出版物和其他公开的文献都是具体和单独引用在此作为参考的。

尽管已经参照具体实施方式描述了本发明，不过应当为本领域技术人员所理解的是，可以进行各种改变，可以代替等价方式，而不背离本发明和所附权利要求的真正精神和范围。另外，可以进行很多修改，以适应特定的情形、材料、物质组成、方法、方法步骤，适应本发明的目的、精神和范围。所有这类修改都打算属于所附权利要求的范围。

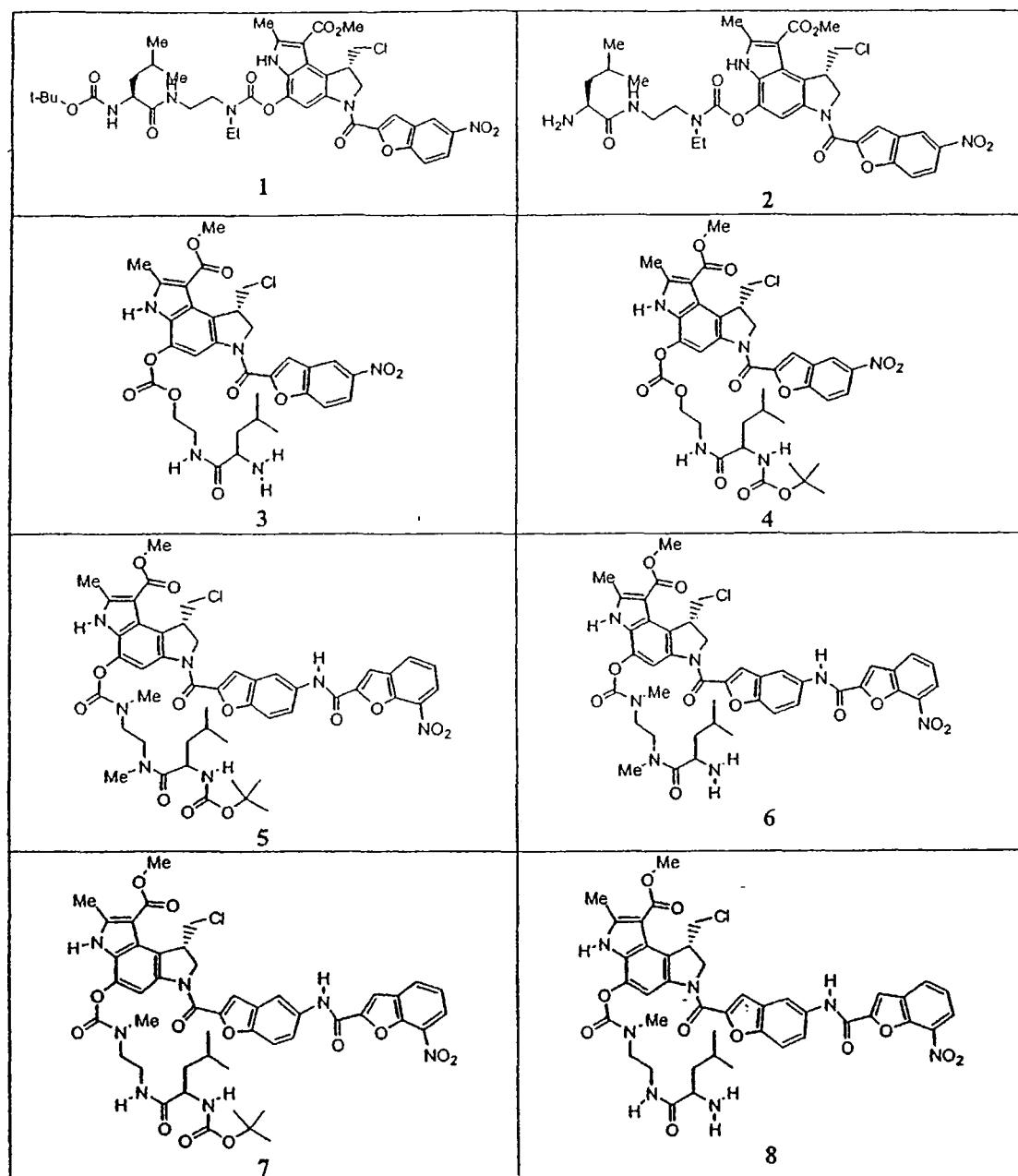


图 1

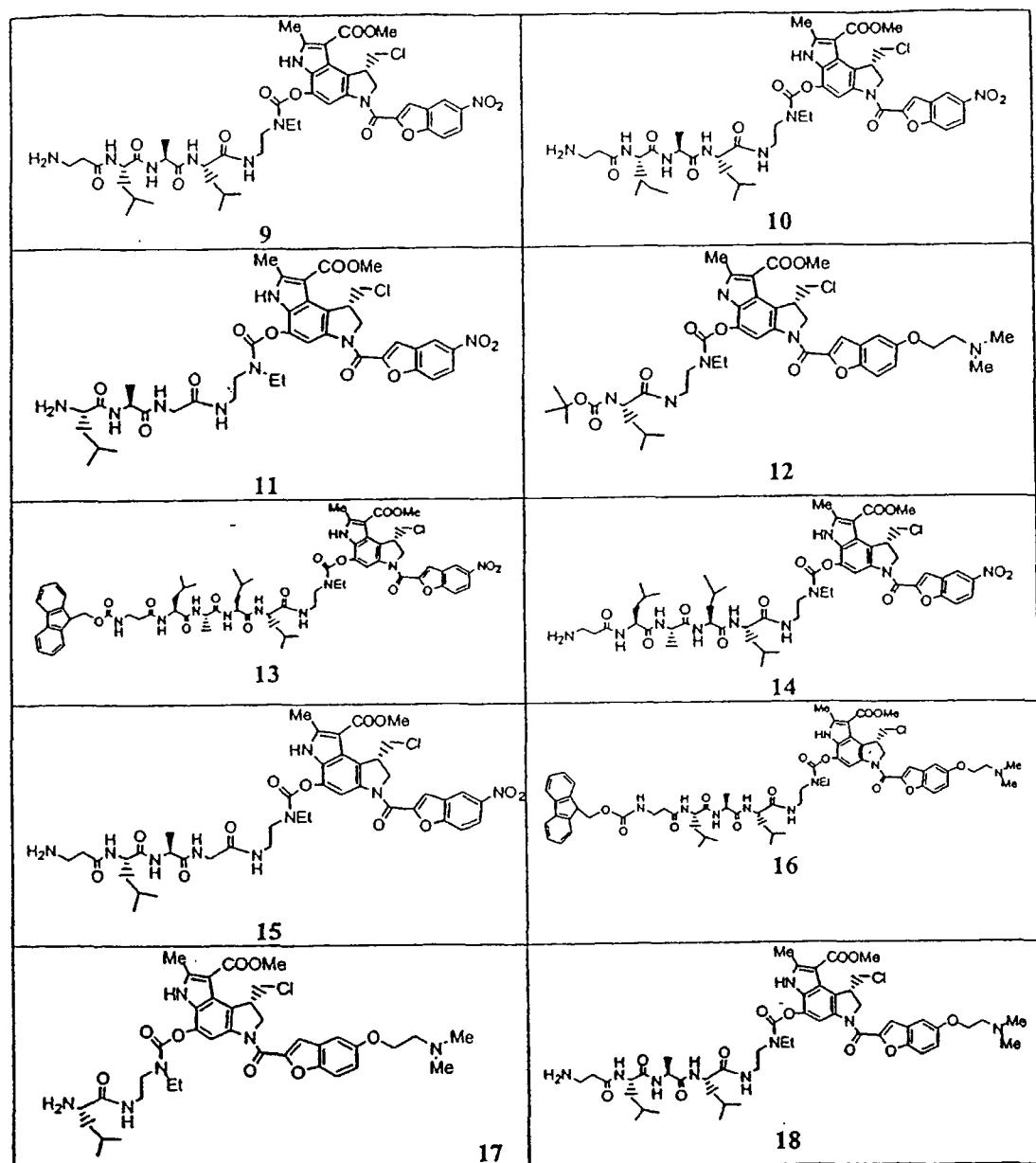


图 1 (续)

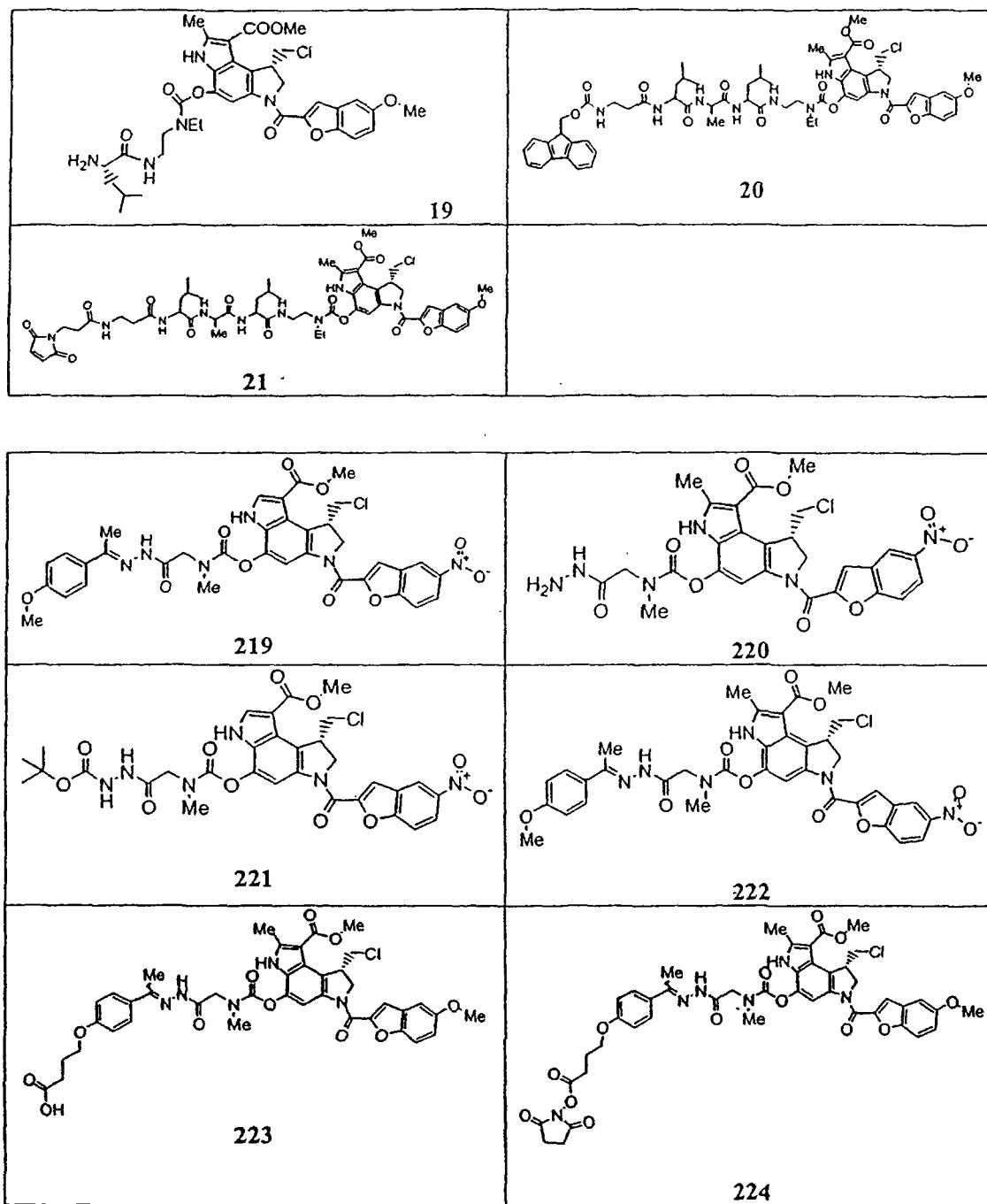


图 1 (续)

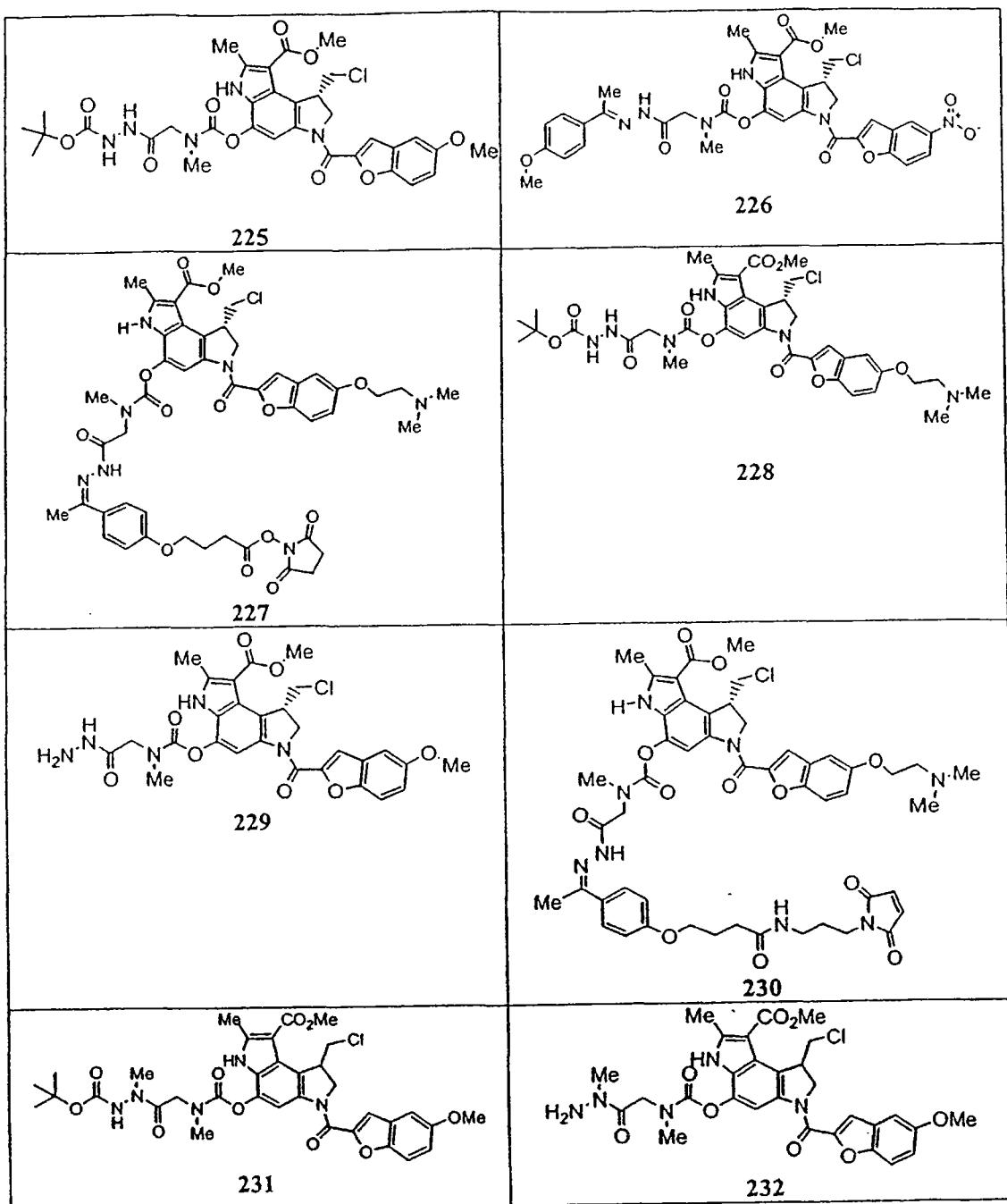


图 1 (续)

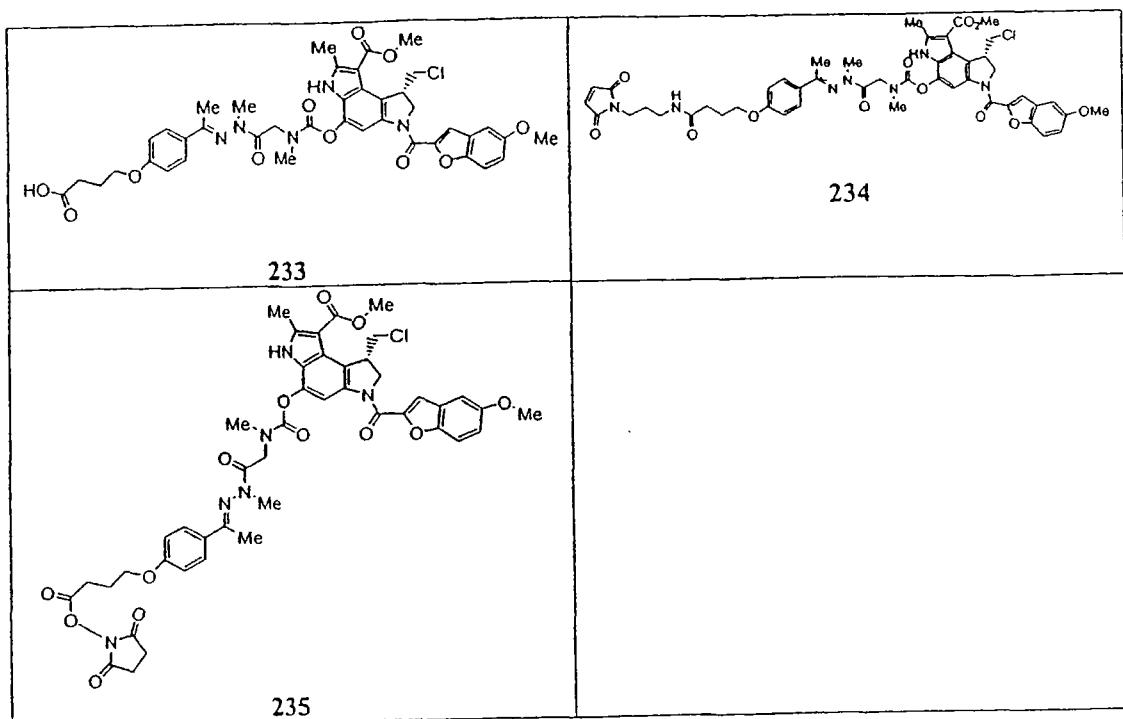


图 1(续)

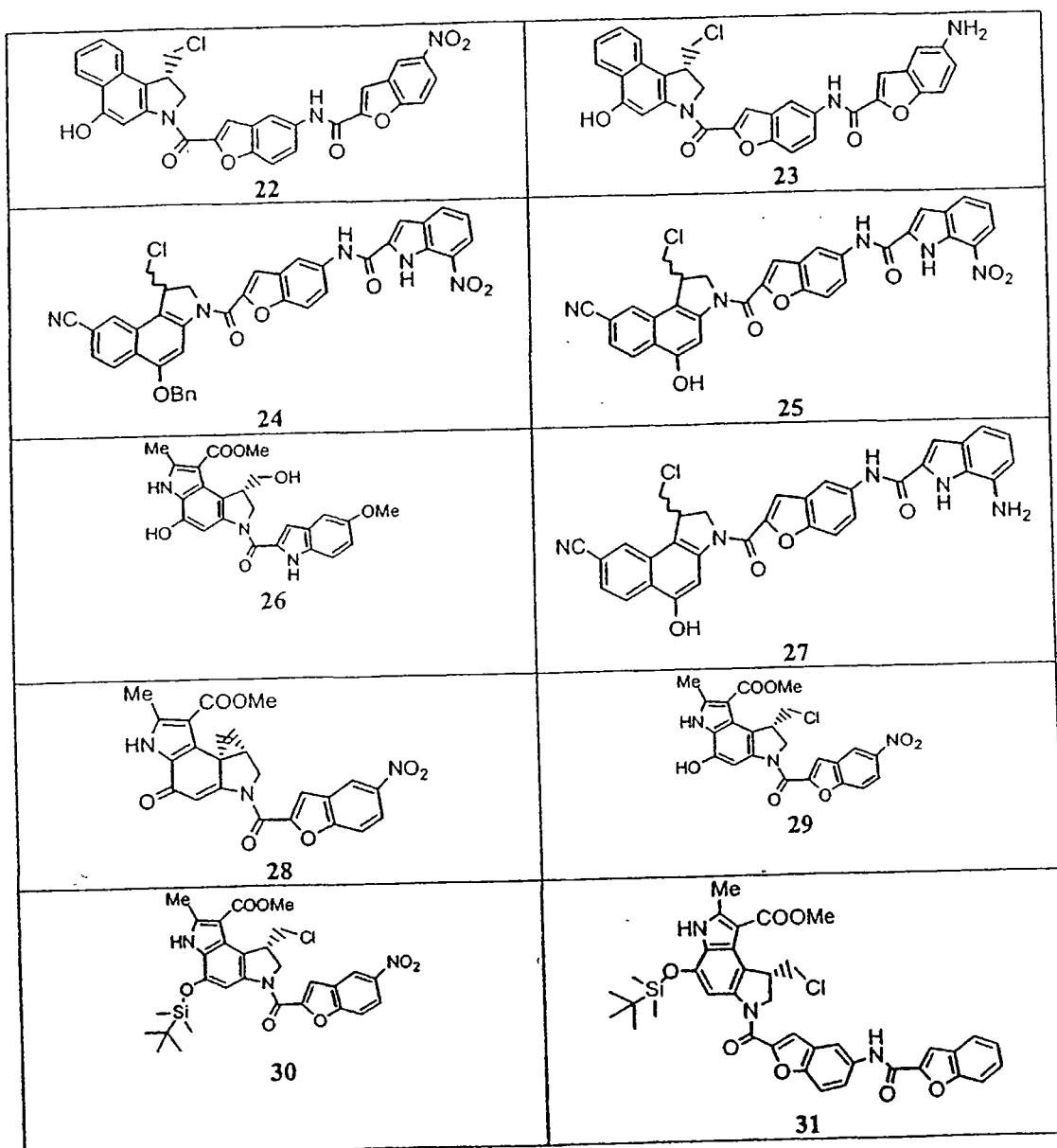


图 2(续)

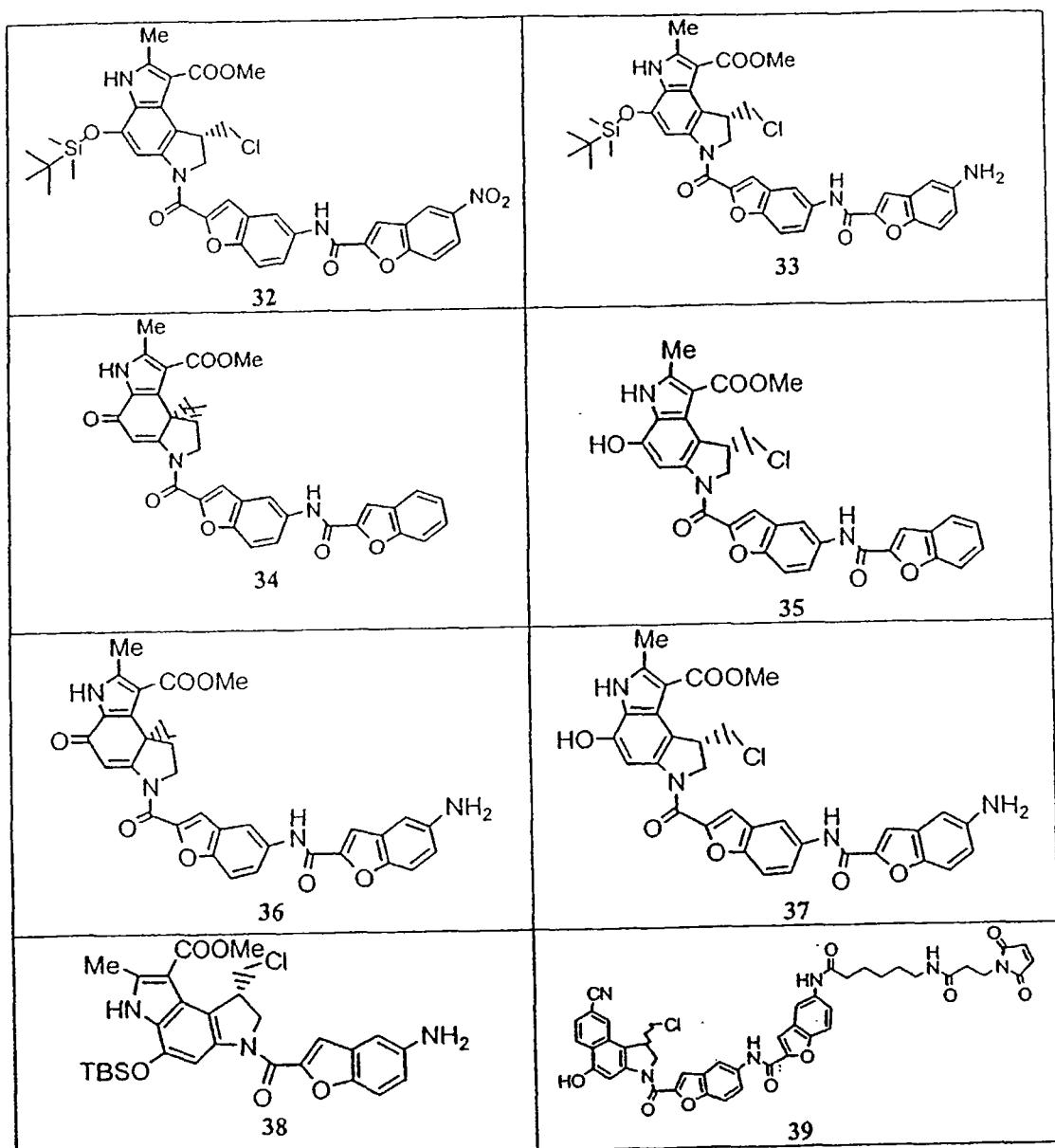


图 2(续)

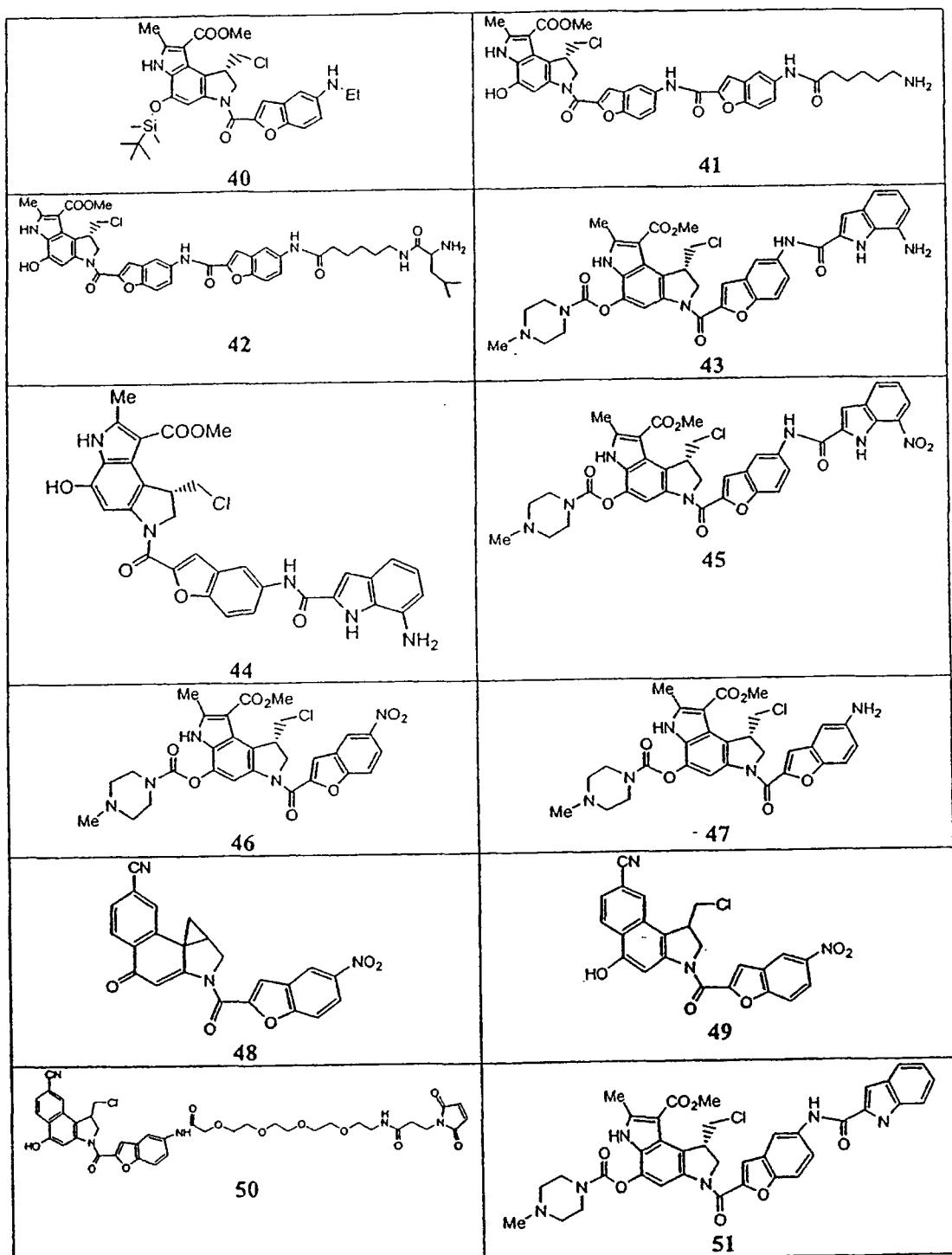


图 2 (续)

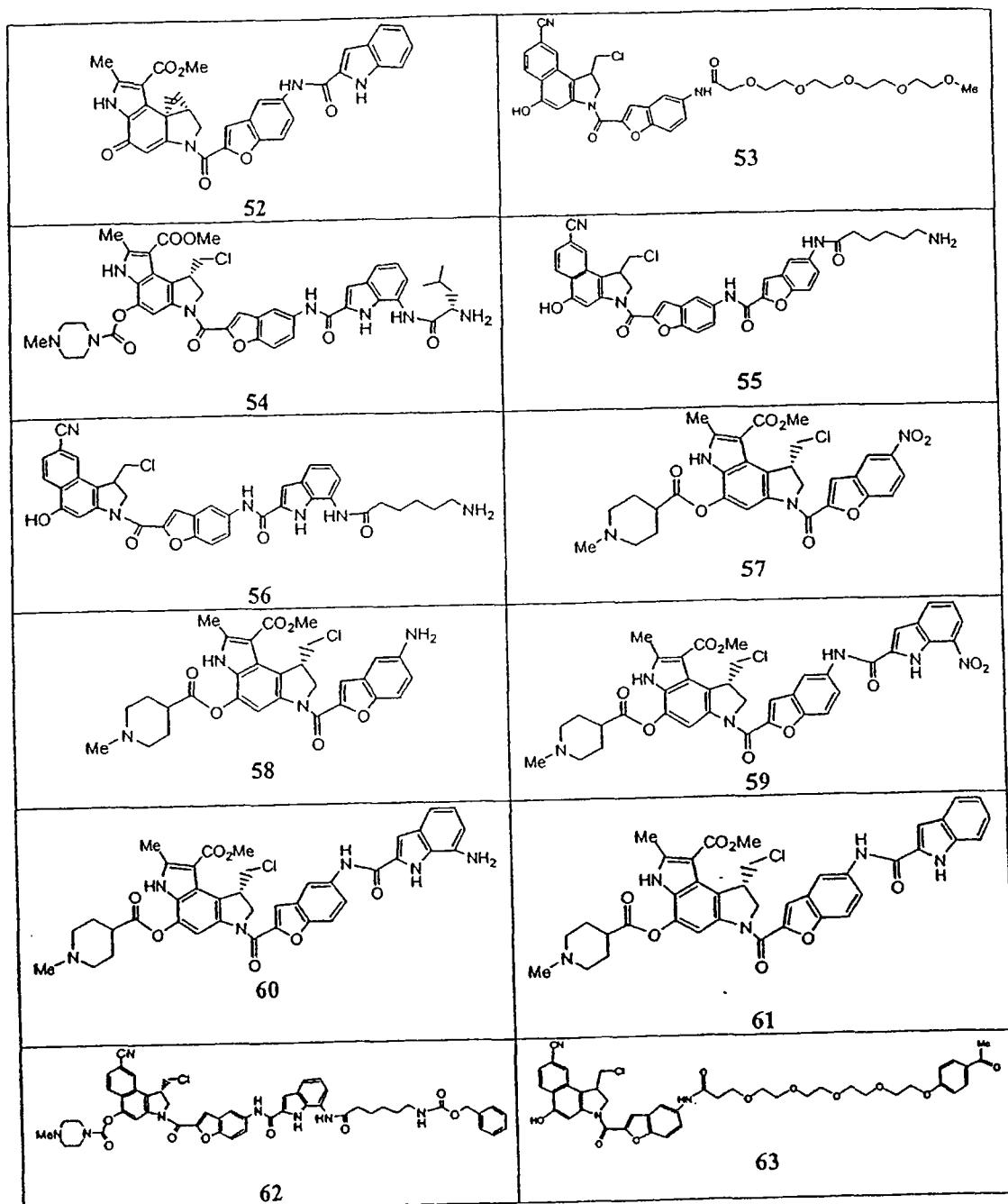


图 2(续)

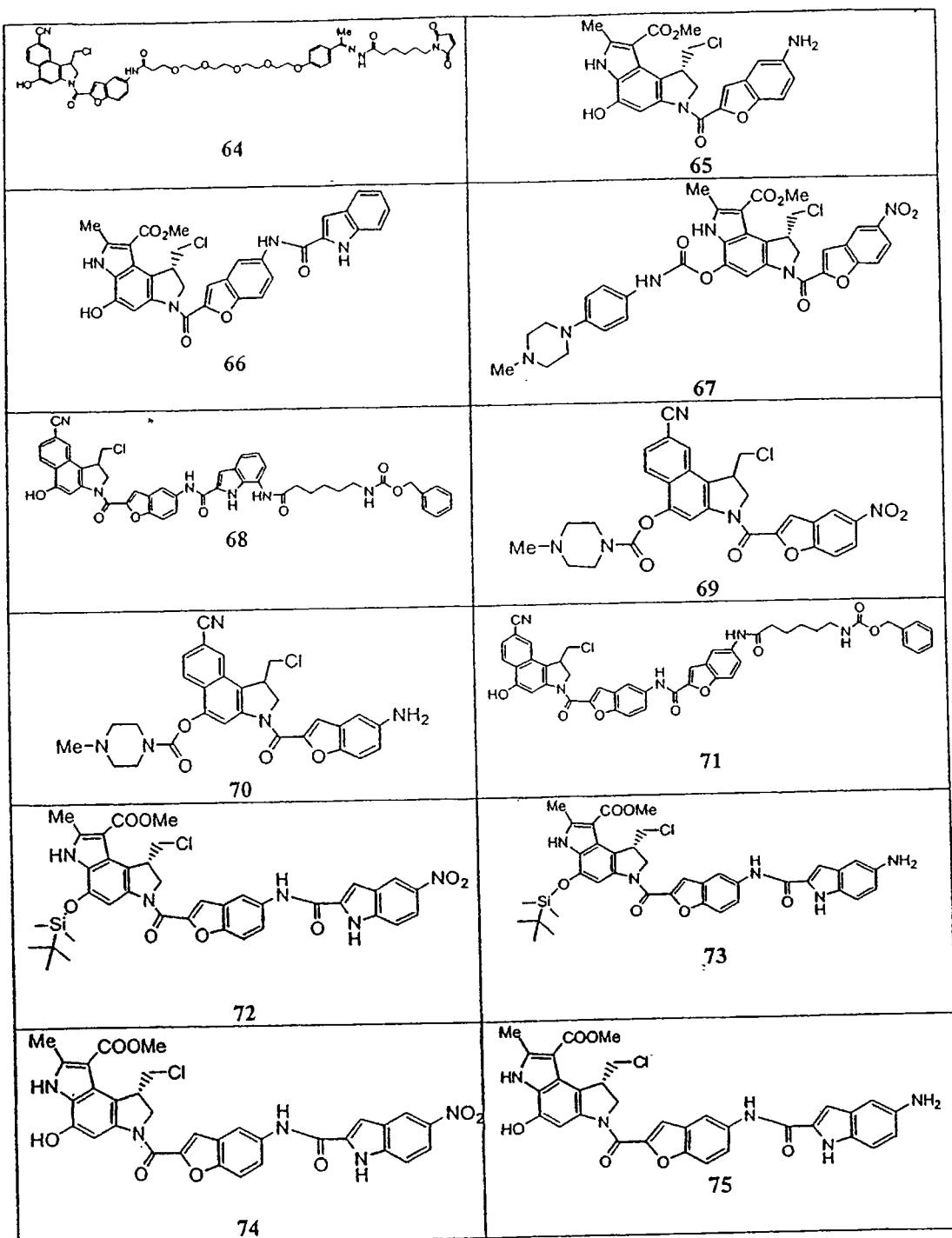


图 2(续)

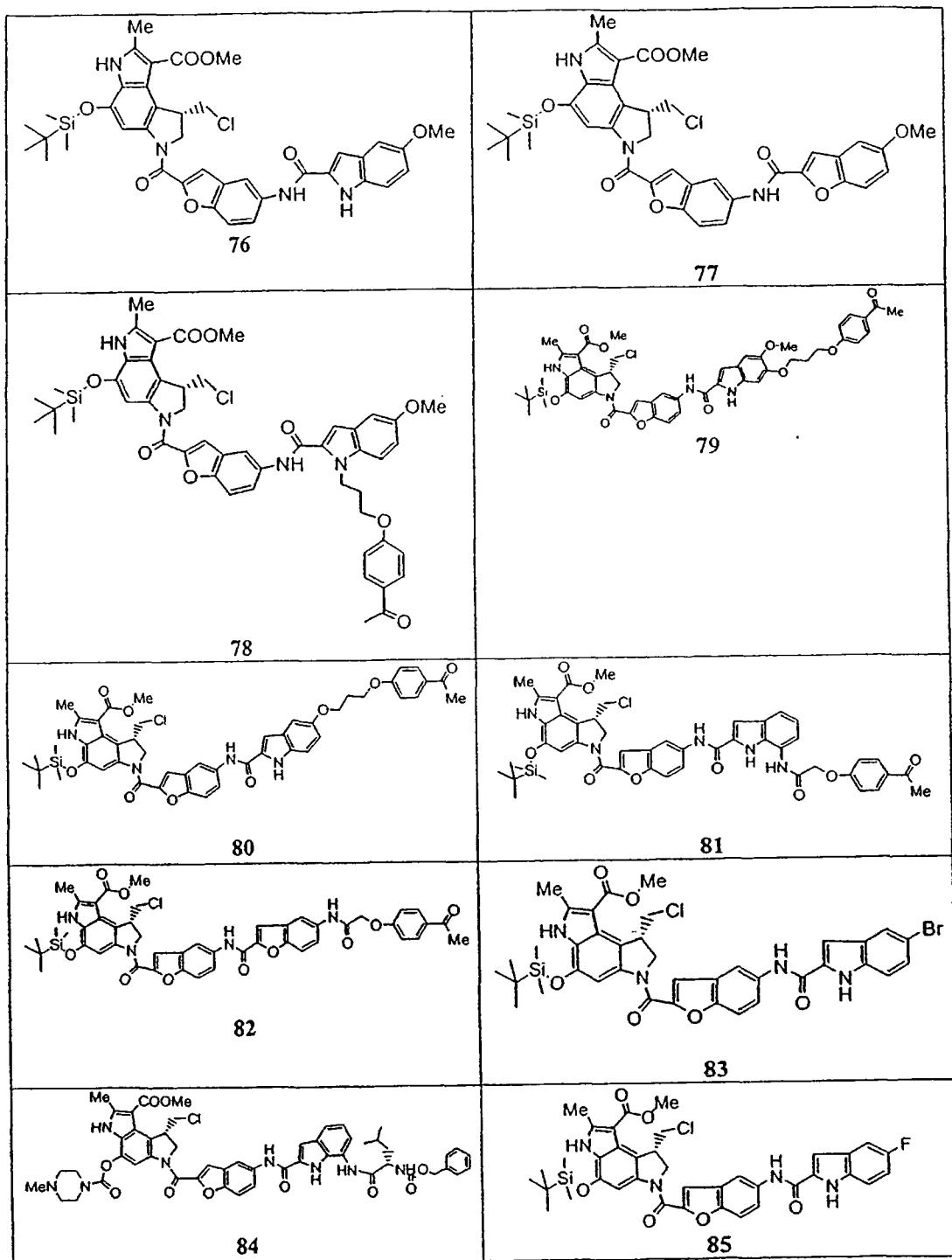


图 2 (续)

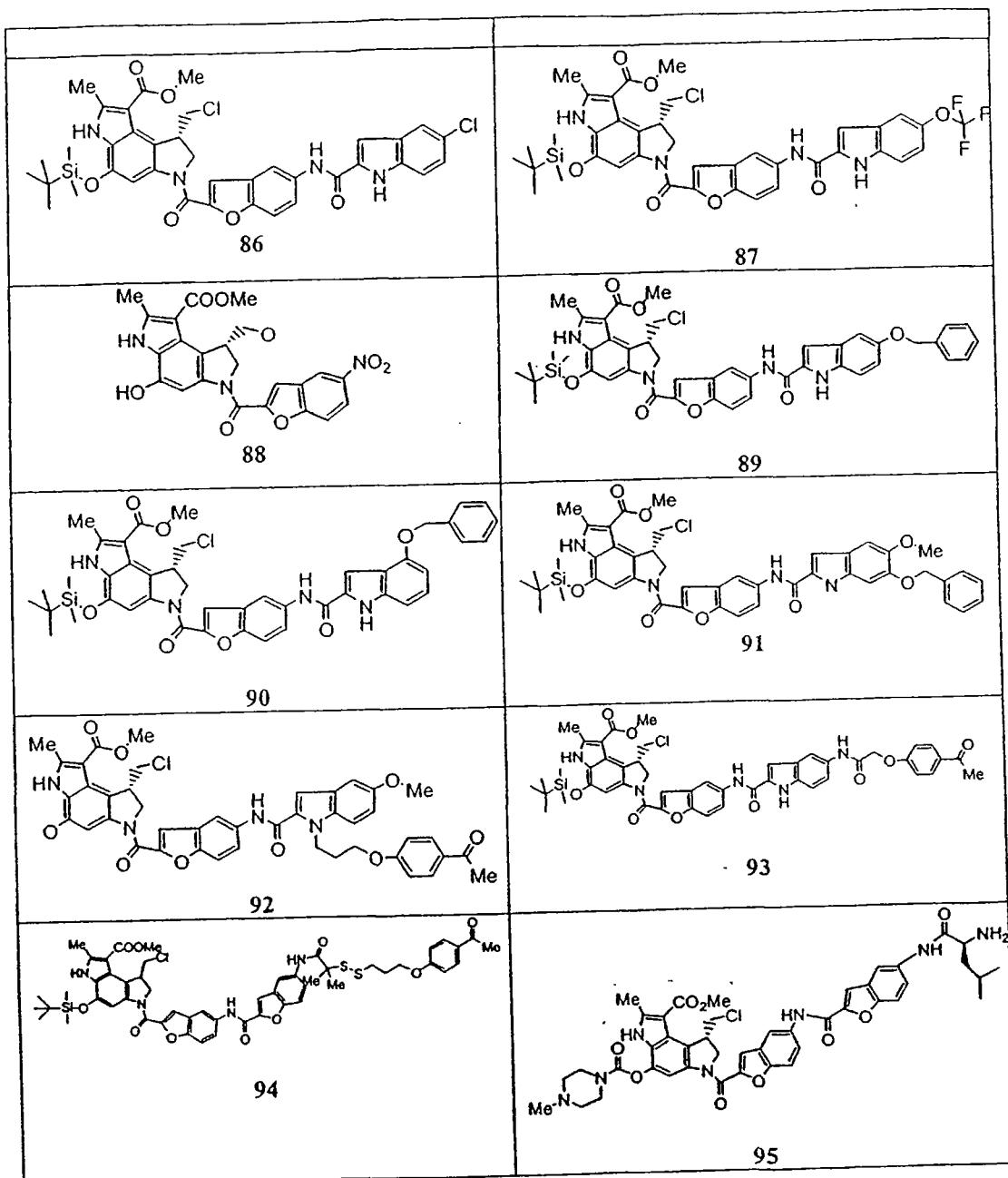


图 2 (续)

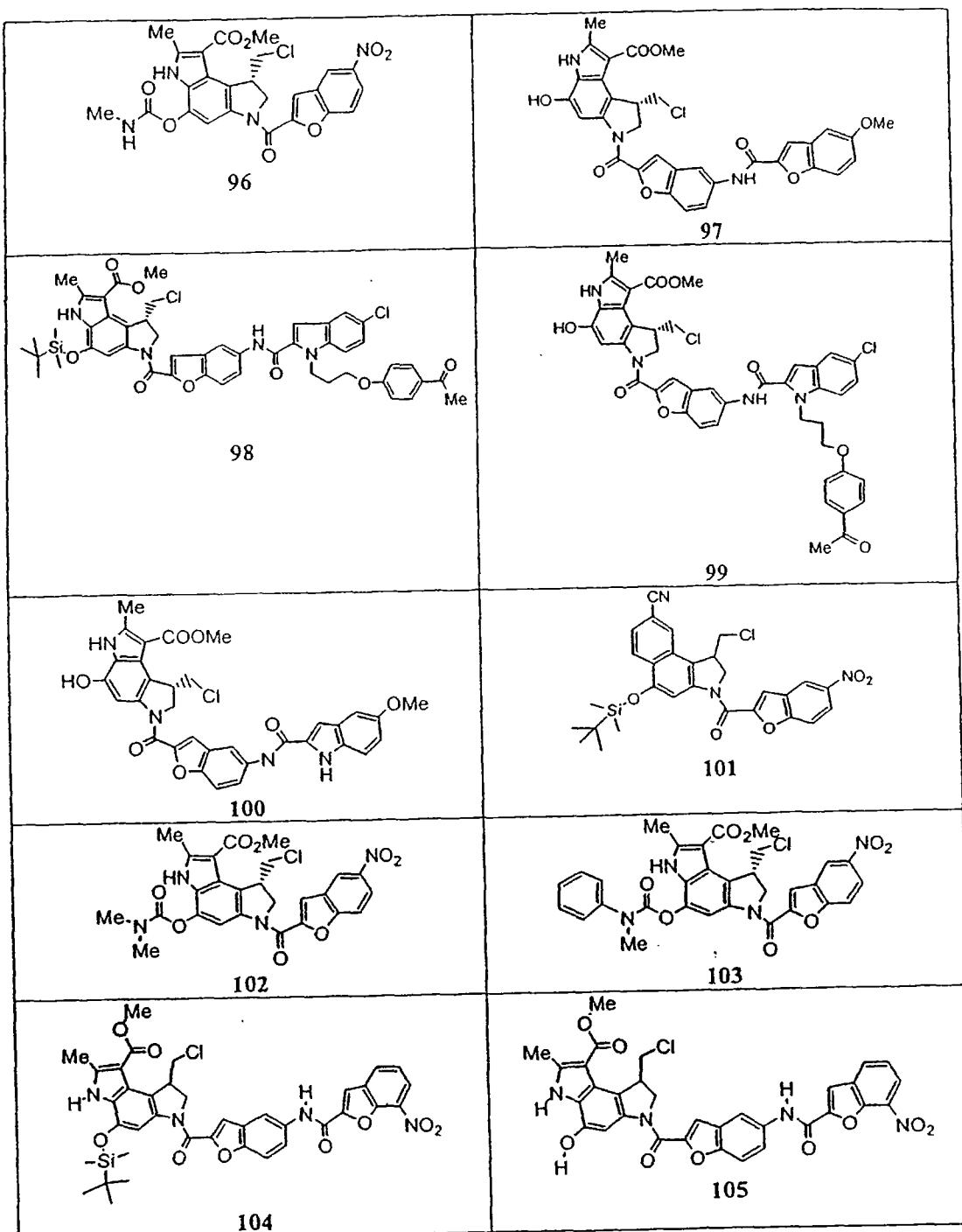


图 2 (续)

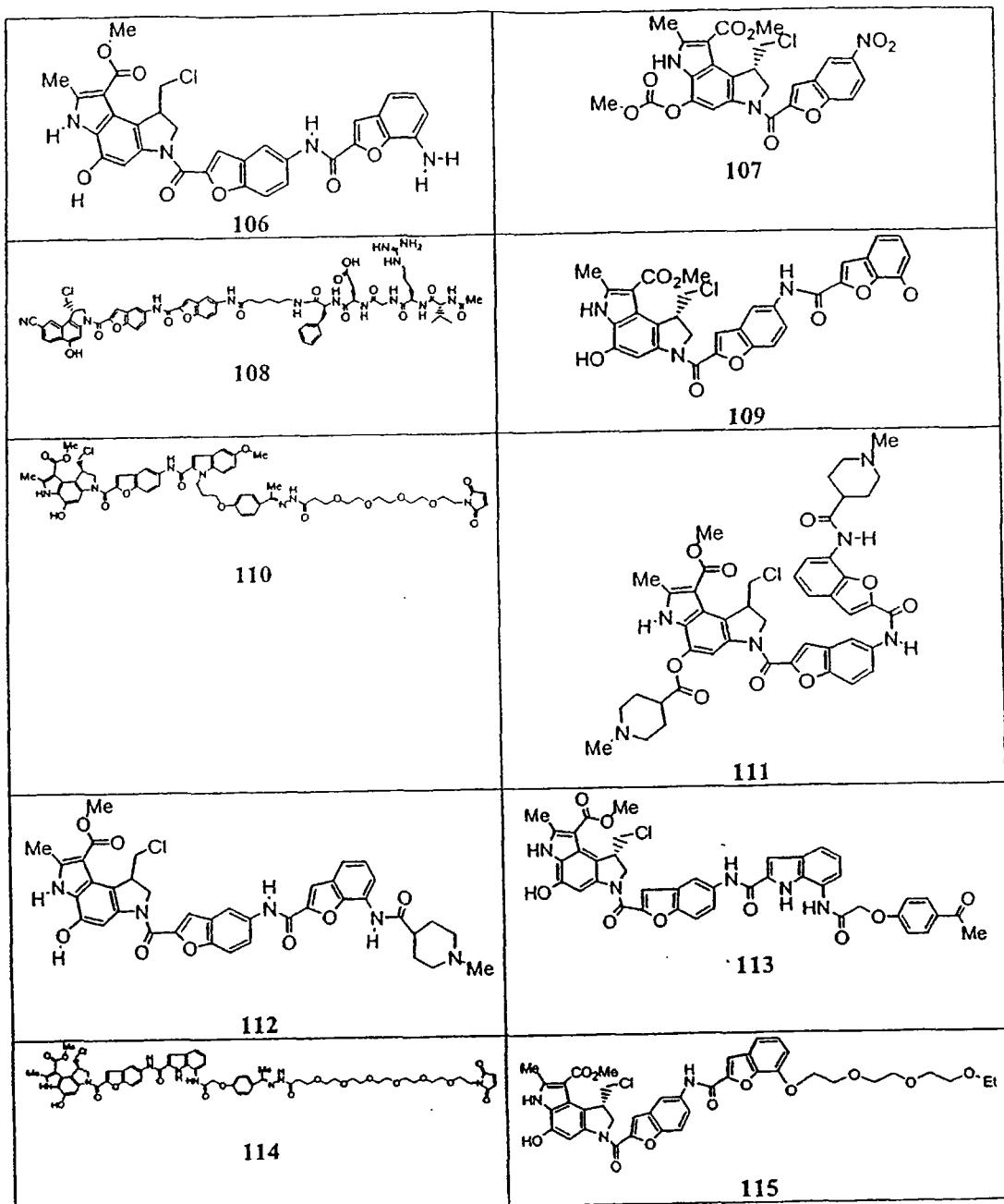


图 2(续)

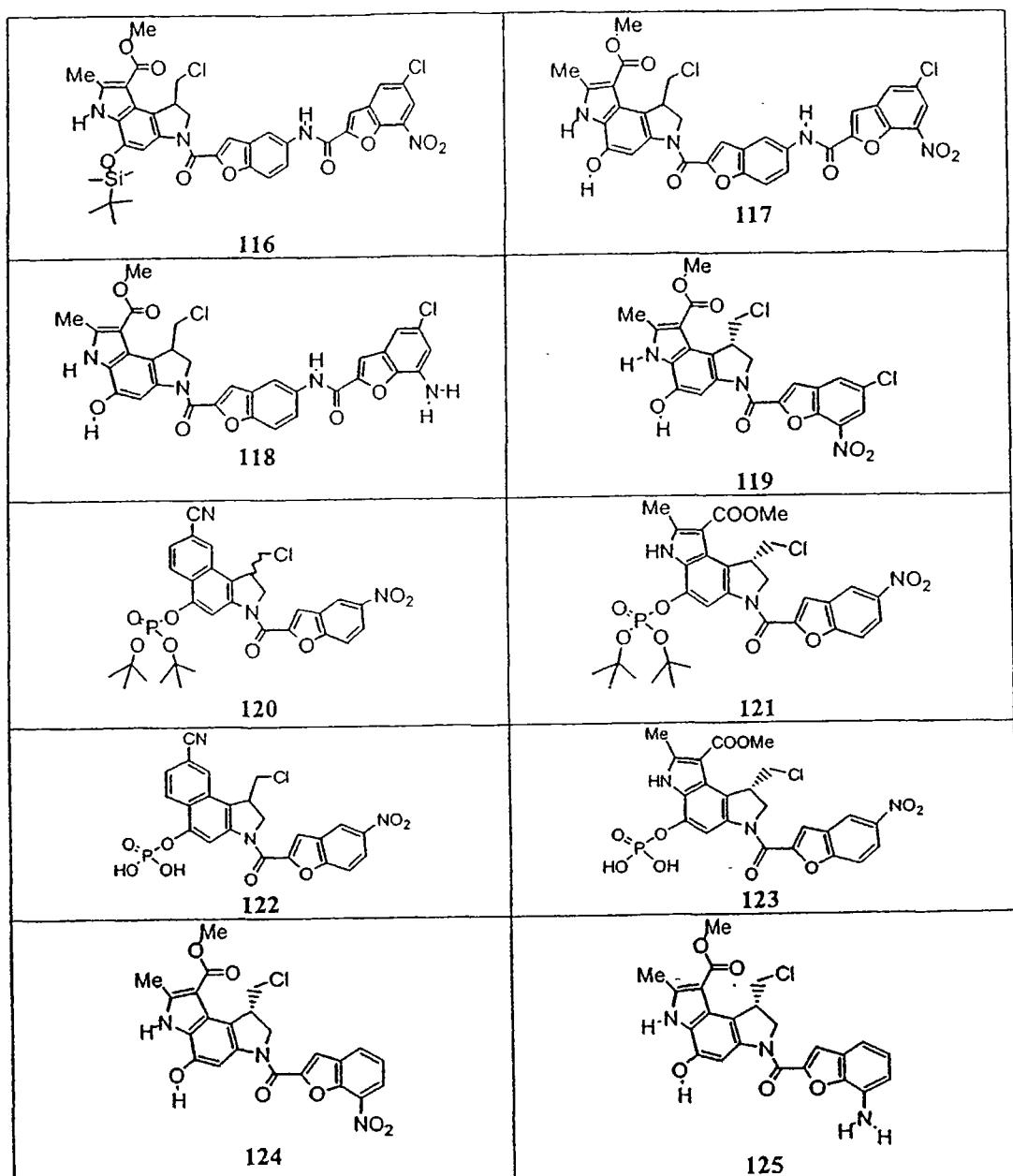


图 2(续)

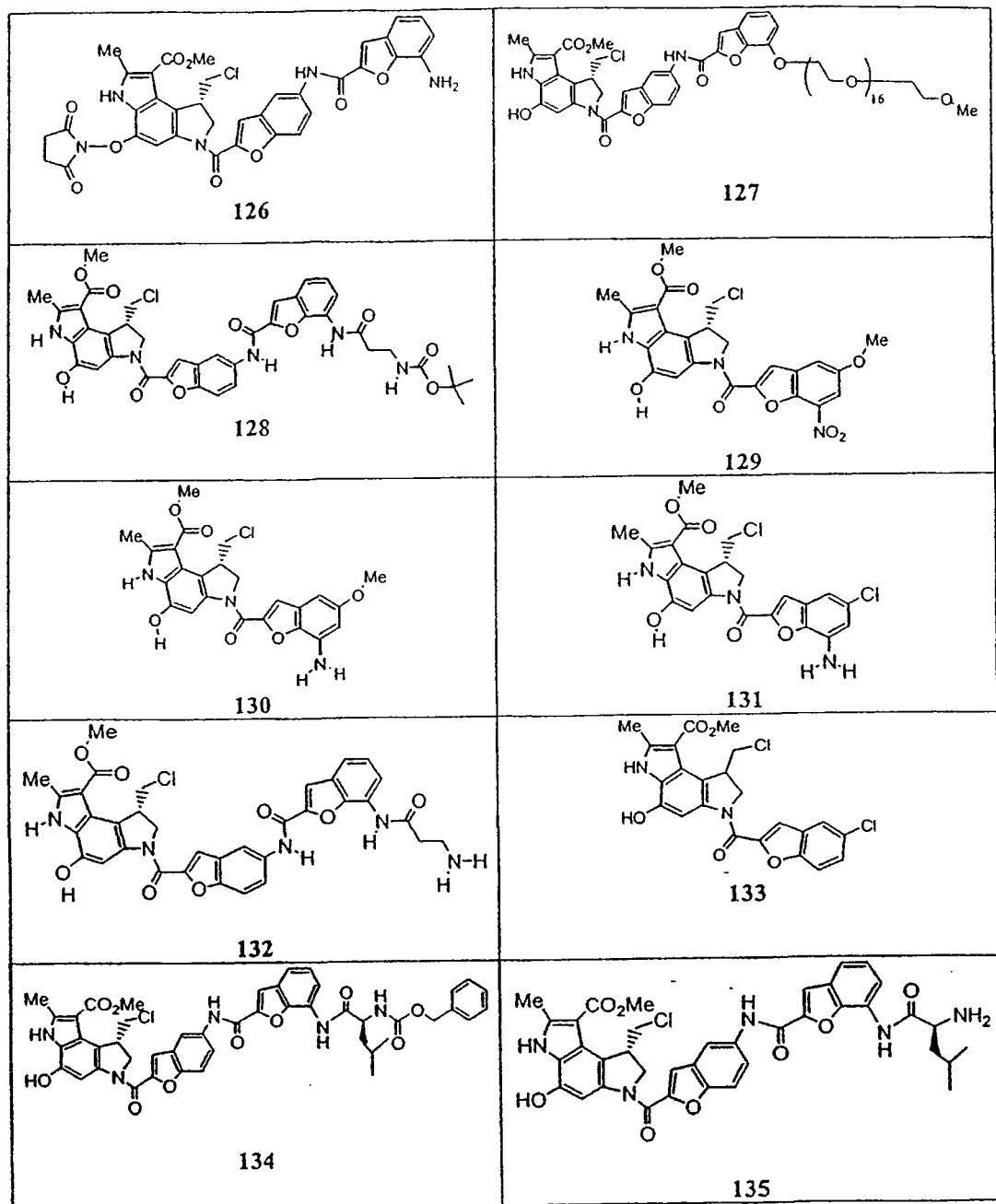


图 2 (续)

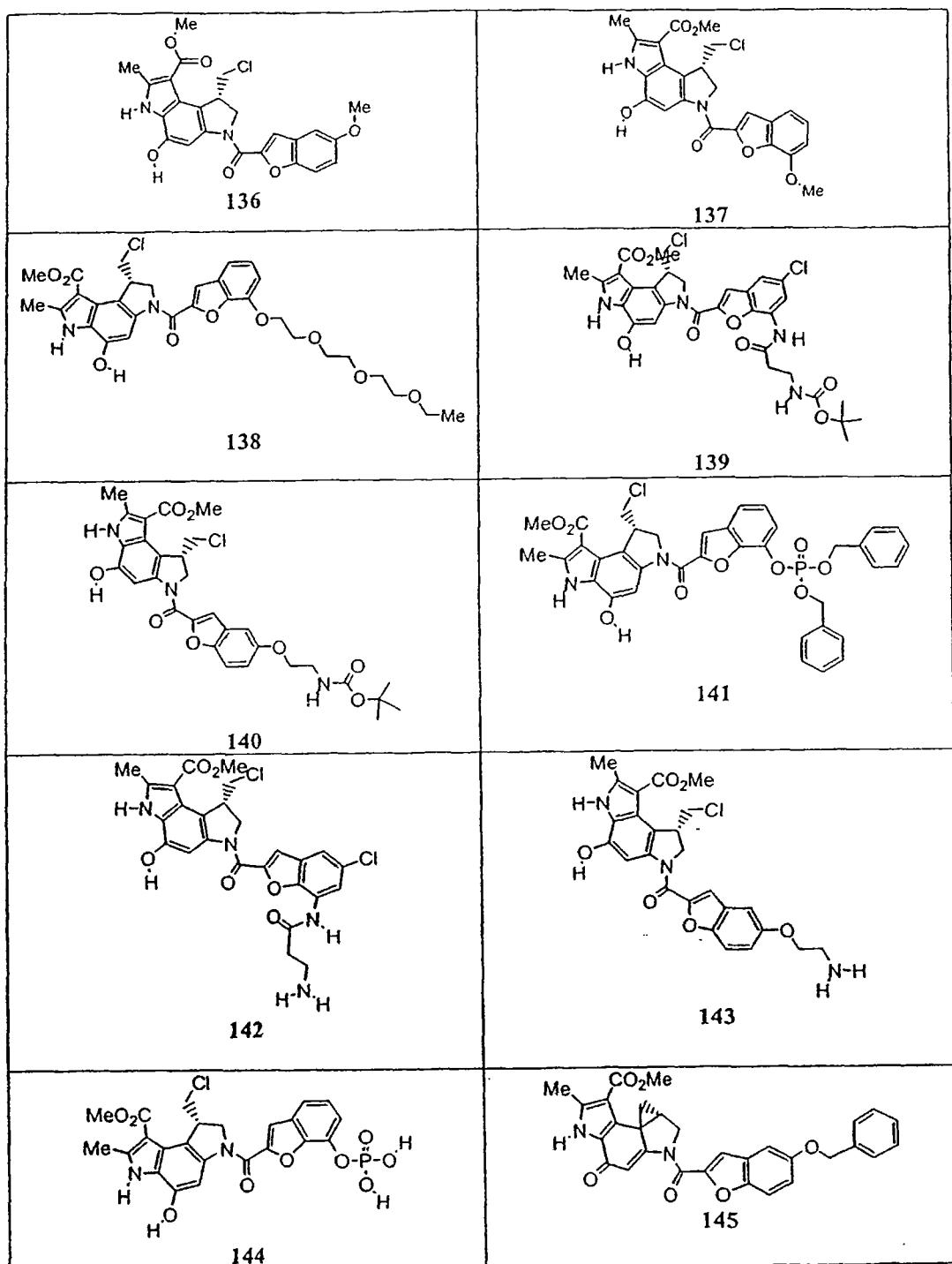


图 2(续)

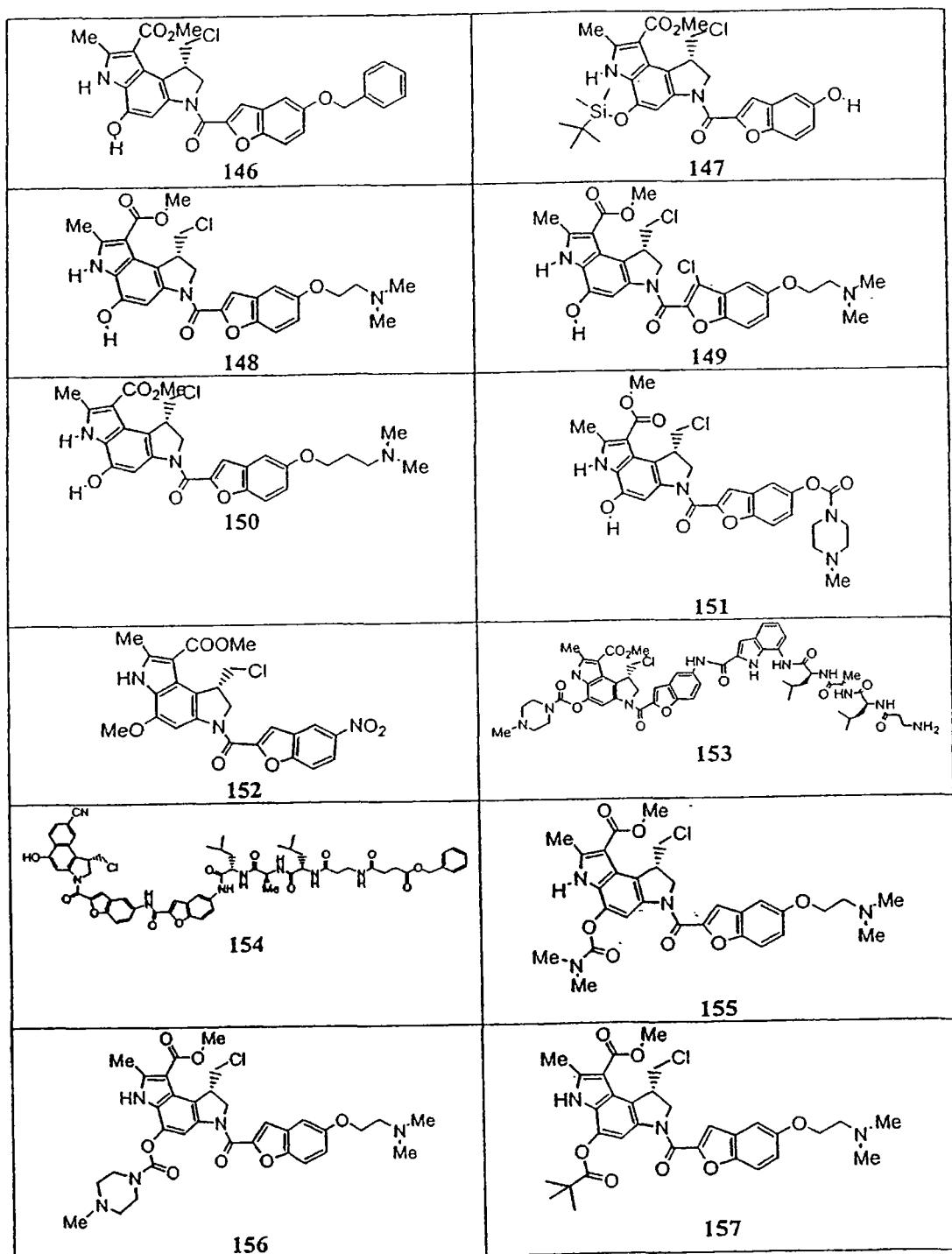


图 2(续)

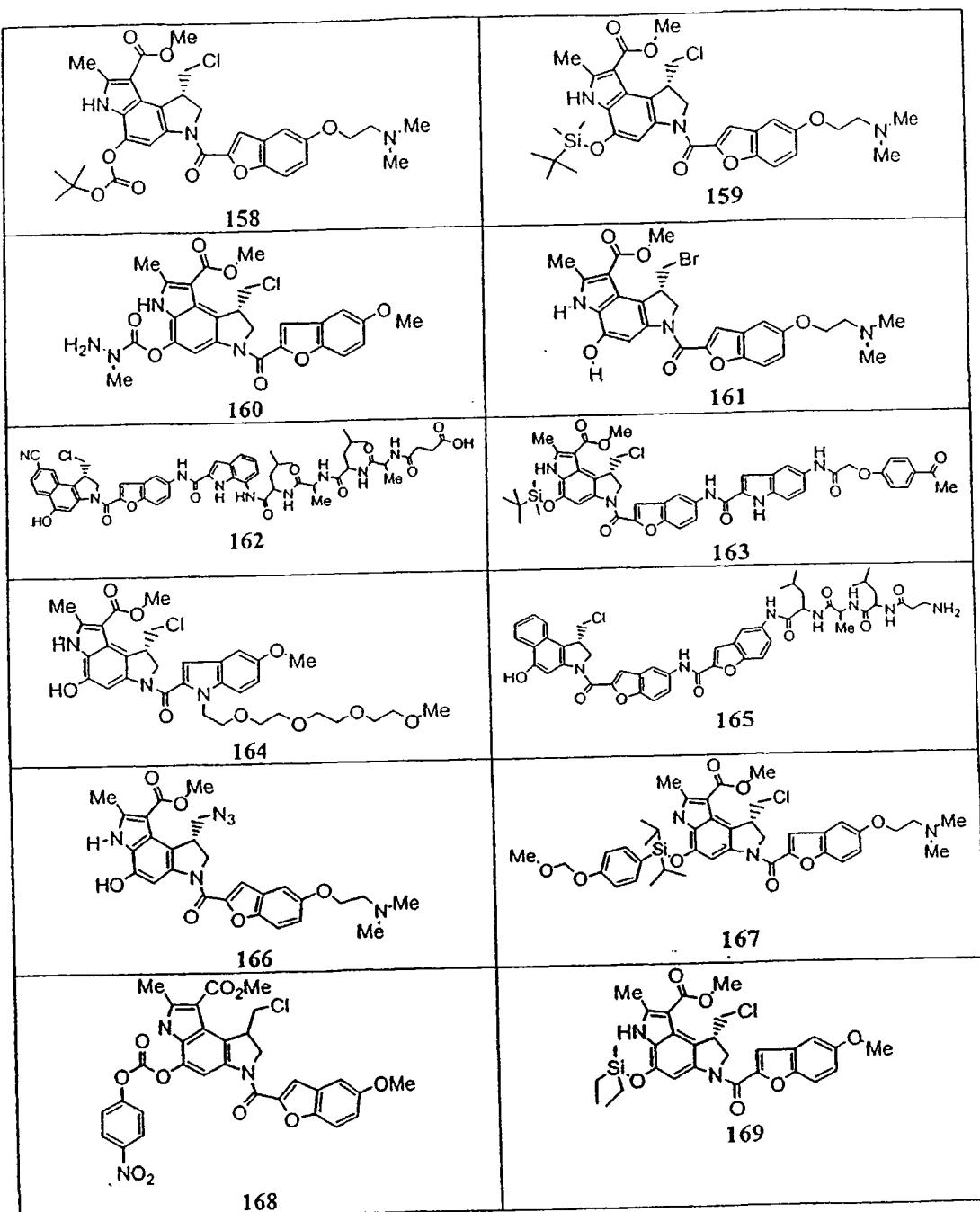


图 2(续)

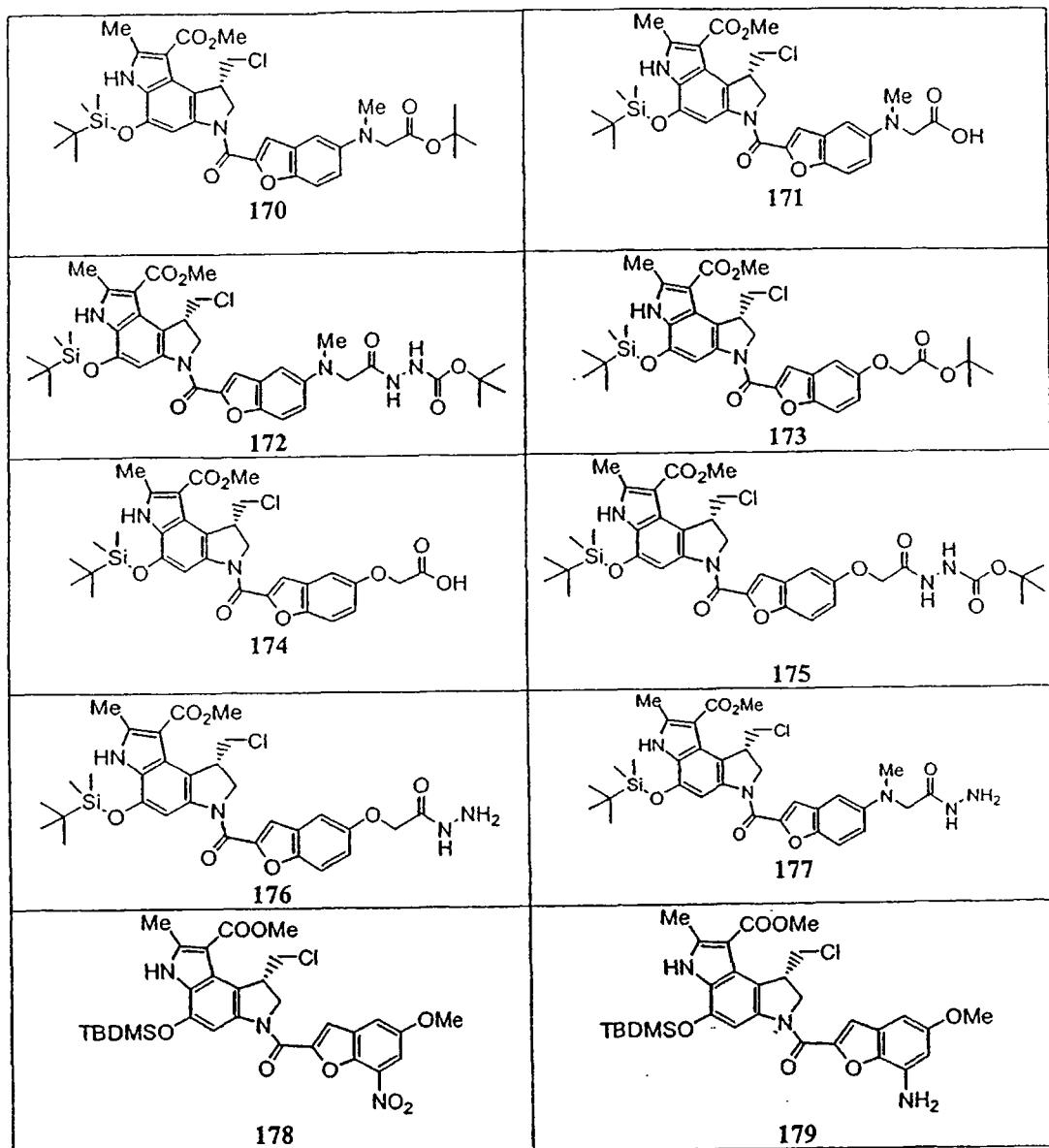


图 2(续)

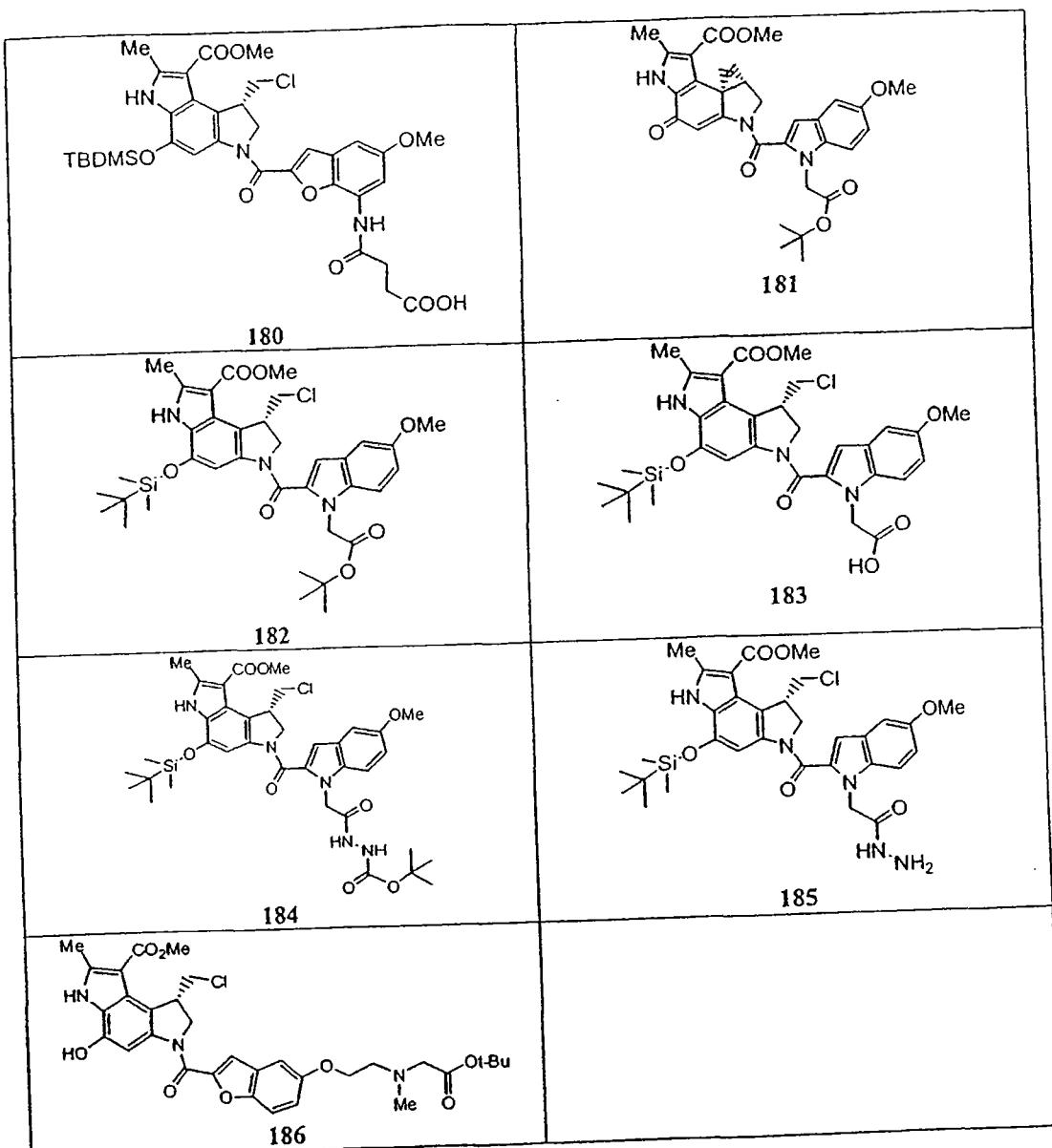


图 2 (续)

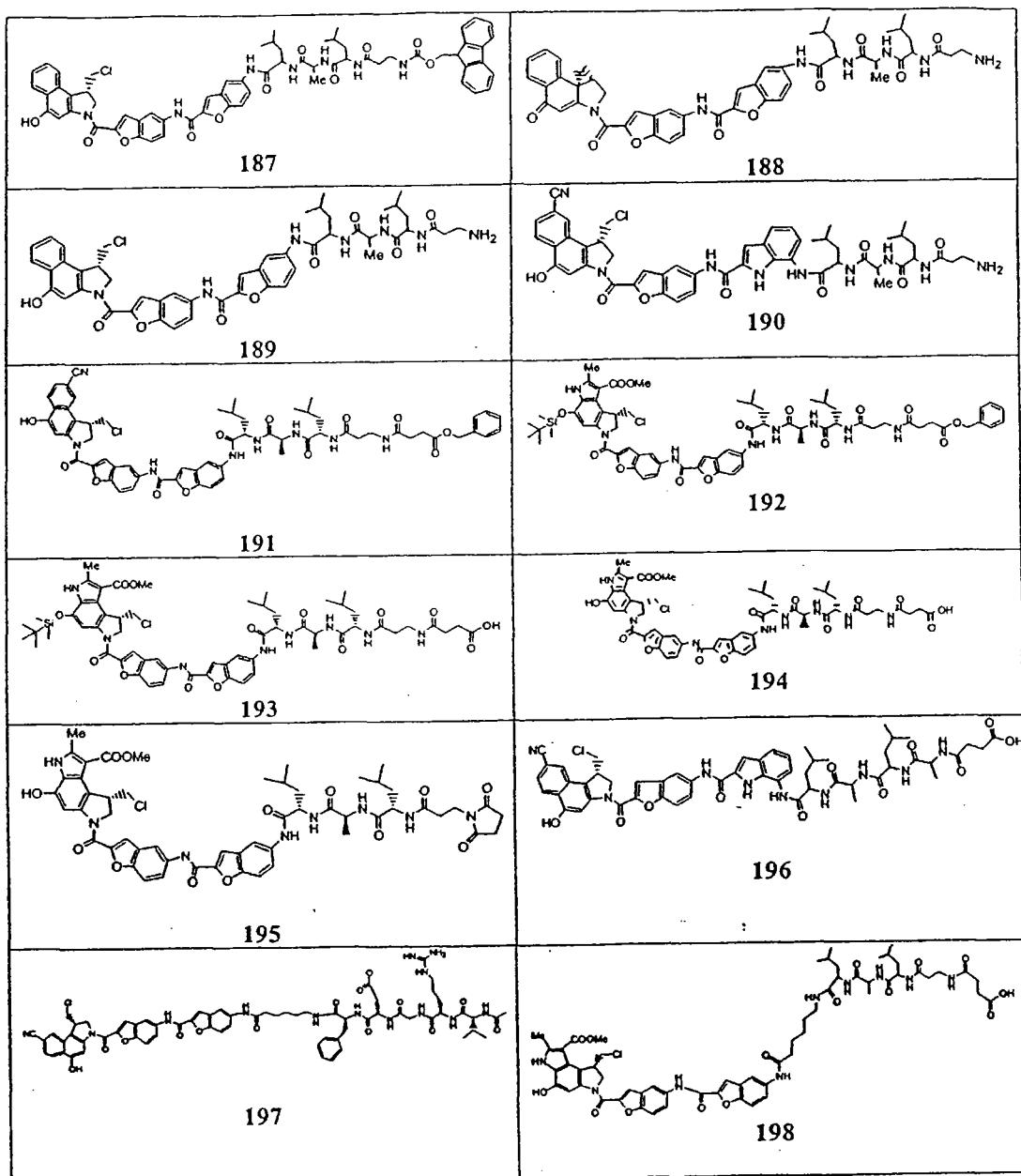


图 2(续)

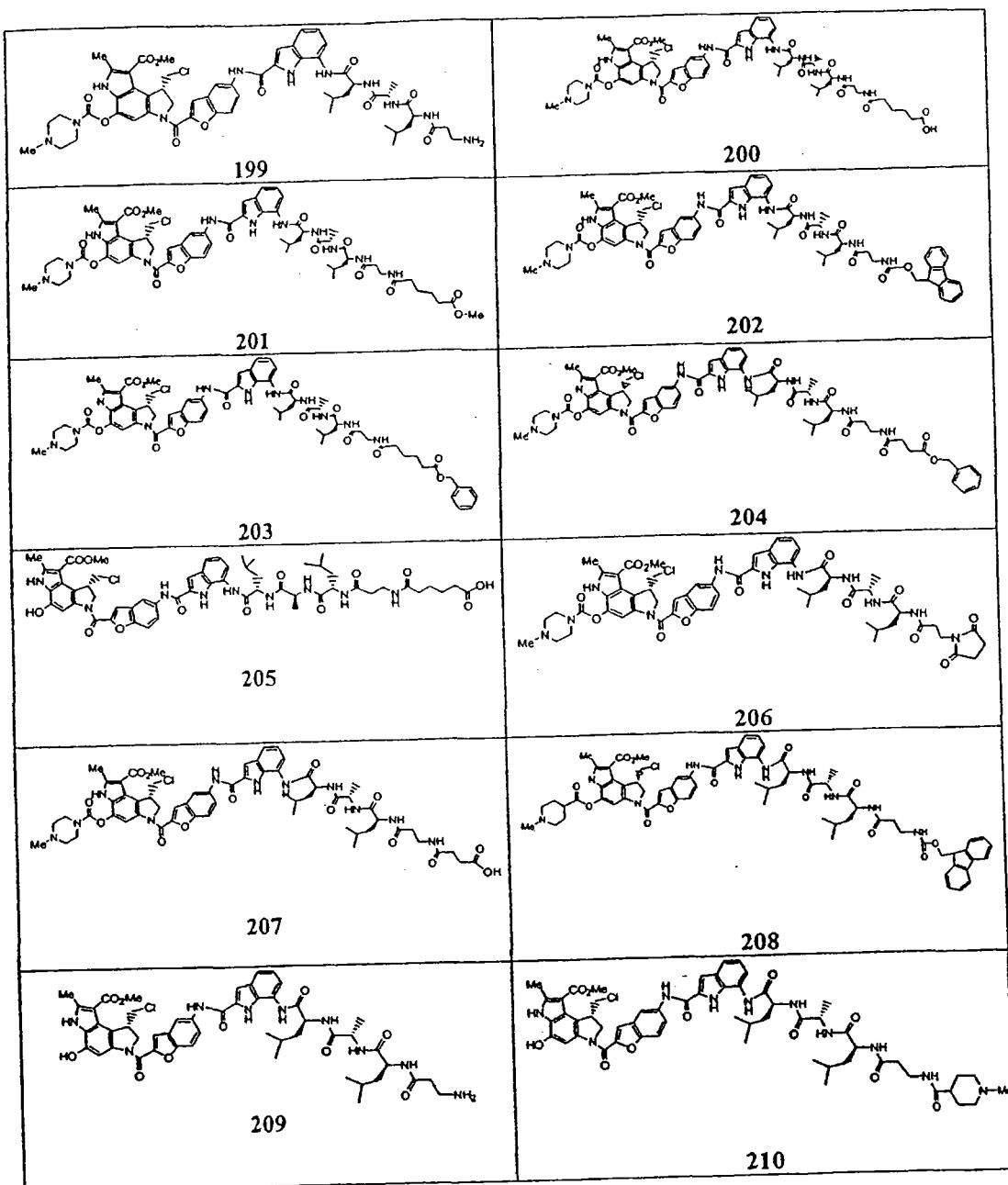


图 2(续)

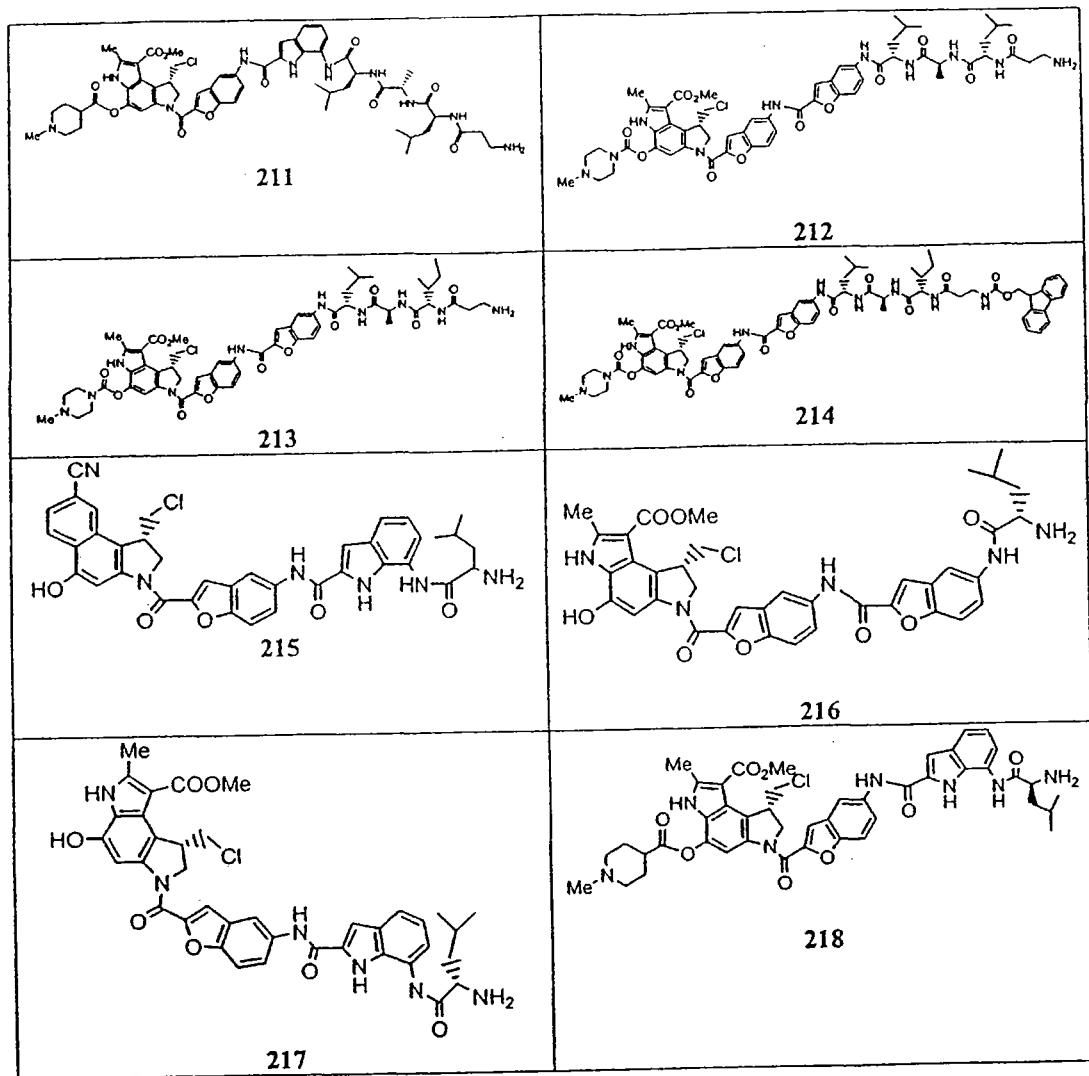


图 2 (续)

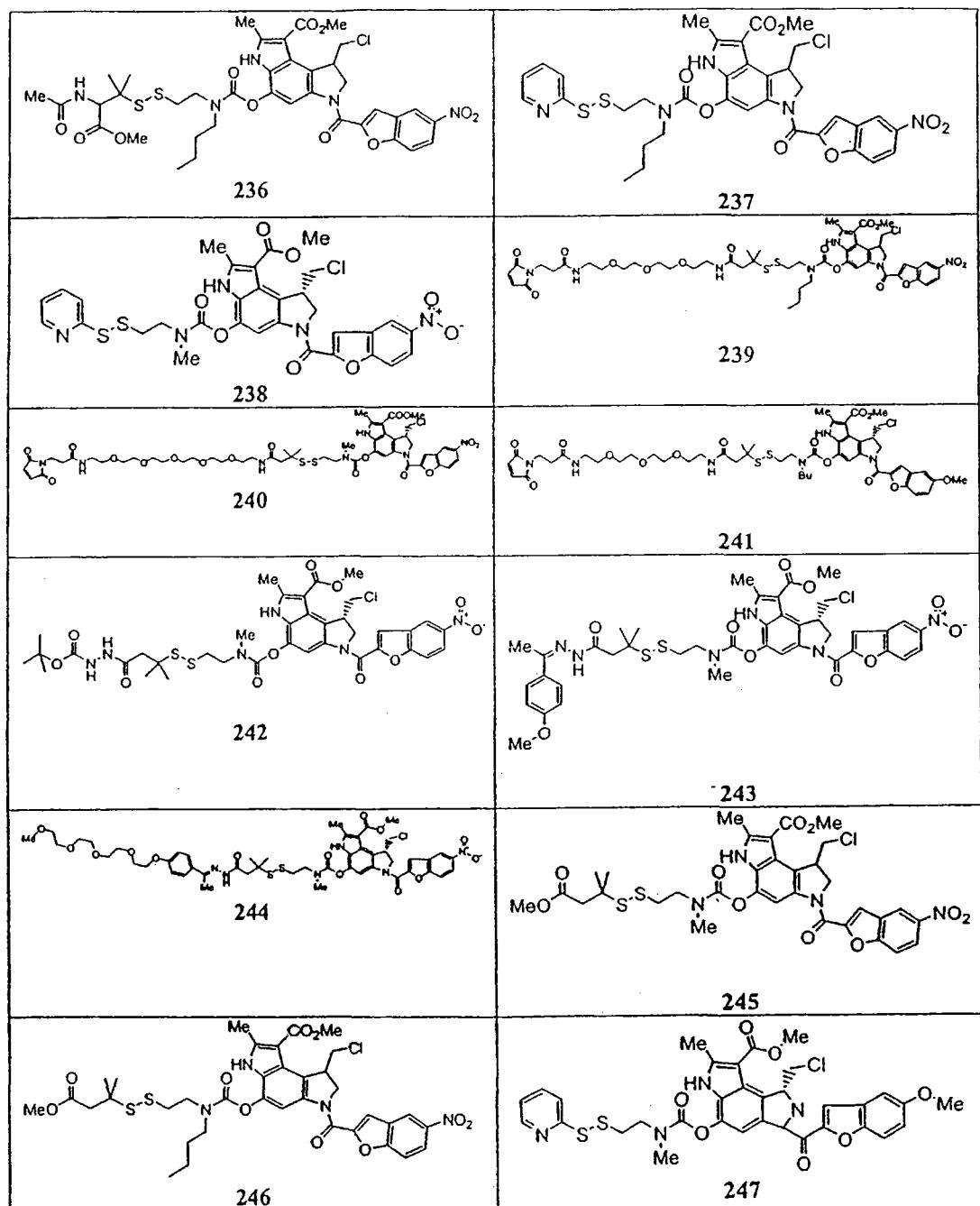


图 3

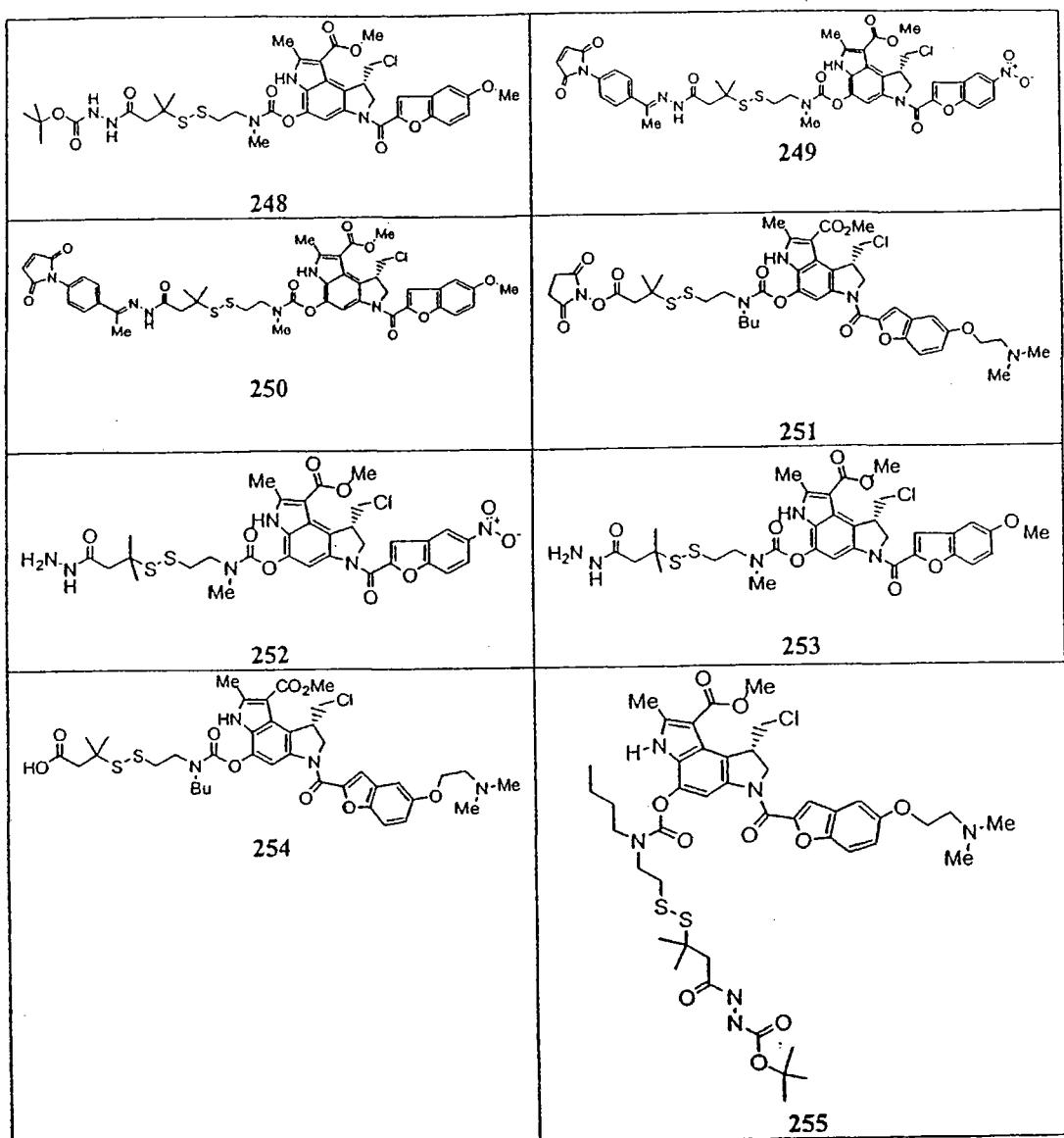


图 3 (续)

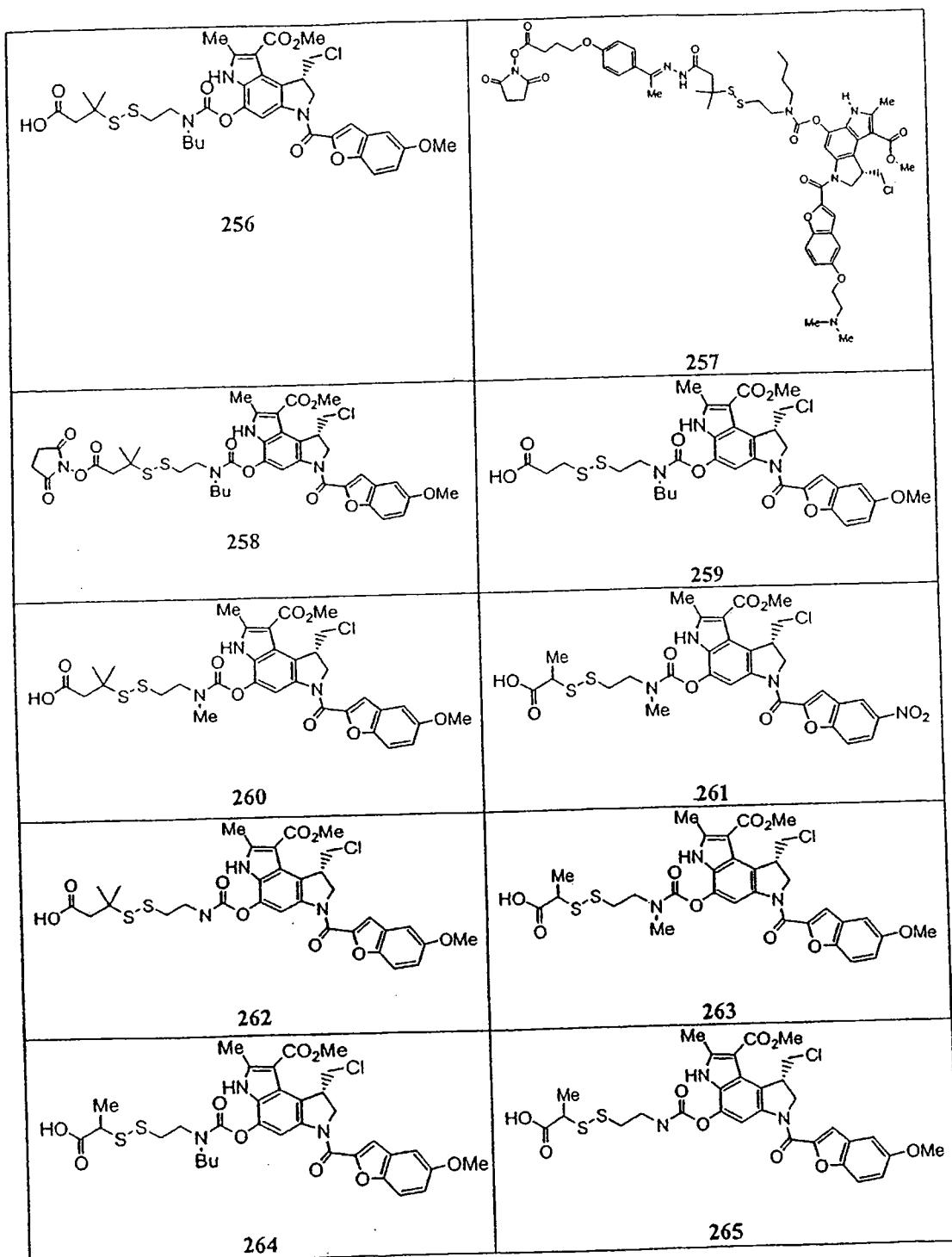


图 3 (续)

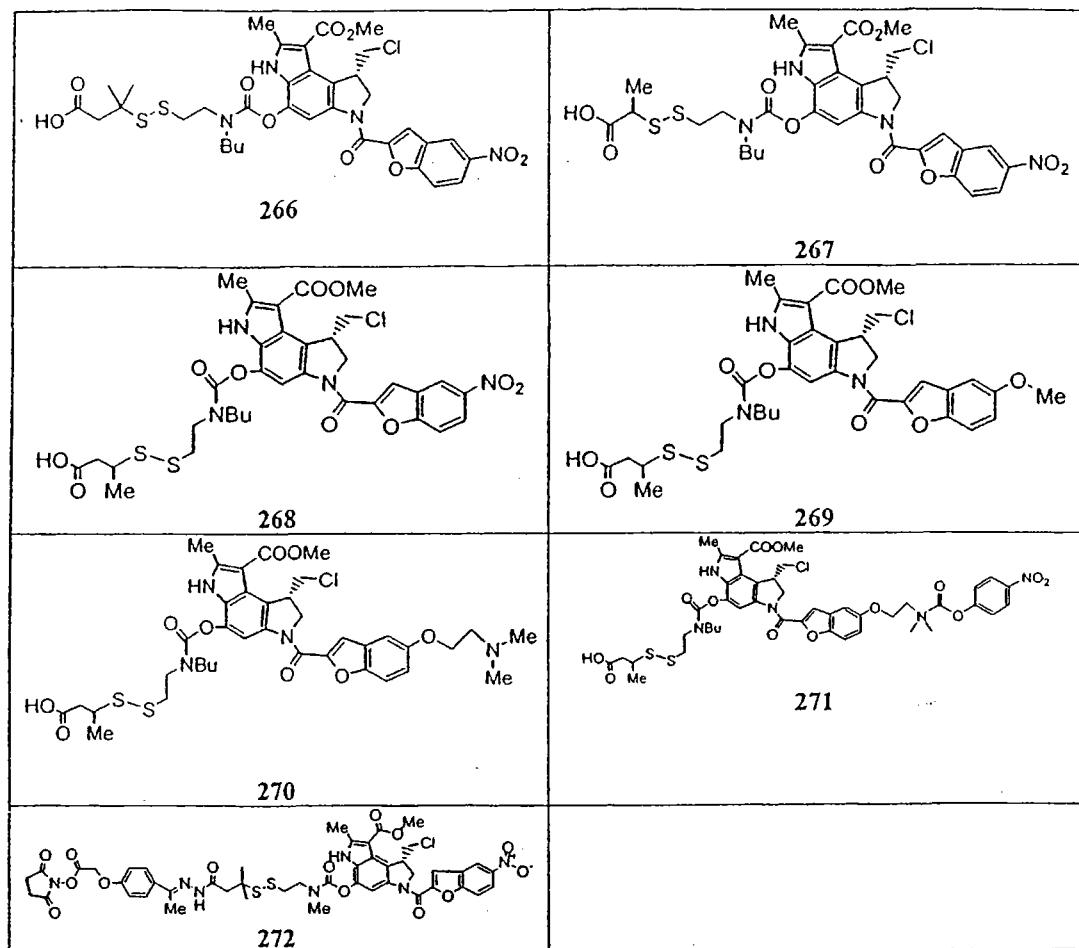


图 3 (续)