(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114478801 A
(43)申请公布日 2022.05.13

(21)申请号 202210104739.1

(22)申请日 2017.01.24

(30)优先权数据
62/286858 2016.01.25 US

(62)分案原申请数据
201780007977.8 2017.01.24

(71)申请人 里珍纳龙药品有限公司
地址 美国纽约州.塔里敦.旧锯木厂河路777号

(72)发明人 T·尼特托里 T·P·马克谭

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 彭昶

(51)Int.Cl.
C07K 19/00(2006.01)

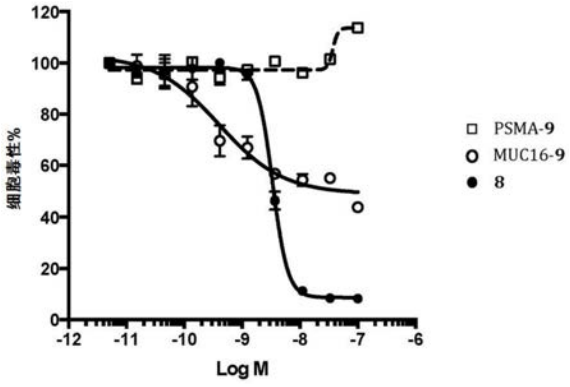
权利要求书2页 说明书220页 附图9页

(54)发明名称

美登素类化合物衍生物、其偶联物和使用方法

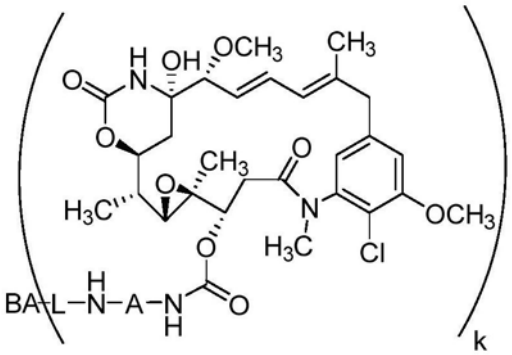
(57)摘要

本发明提供了美登素类化合物、其衍生物、其偶联物，和用其治疗或预防增殖性疾病的方法。



CN 114478801 A

1.式(I)所示化合物：

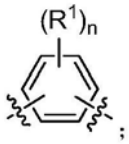


(I)，

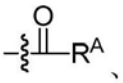
或其药学上可接受的盐，

其中：

A是：



；

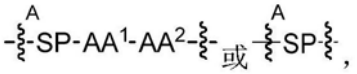
R^1在每次出现时独立地选自C_{1-12}烷基、C_{2-12}烯基、C_{2-12}炔基、C_{1-12}烷氧基、C_{6-20}芳基、C_{1-12}烷基-C_{6-10}-芳基、C_{6-10}-芳基-C_{1-6}-烷基、卤素、C_{1-12}卤代烷基、C_{1-12}卤代烷氧基、C_{1-12}杂烷基、C_{5-20}杂芳基、C_{1-20}杂环烷基、氰基、硝基、、、  和叠氮基；

R^A是C_{1-12}烷基；

n是从0至4的整数；和

 各自表示由A连接至-NH-的键；

L是连接体，其中所述连接体是共价连接BA与-NH-A-的二价基团部分；其中L是

 ，

其中：

SP是间隔基团，其中所述间隔基团是连接-NH-A与结合剂的二价基团部分；其中所述间隔基团包括聚乙二醇或C_{2-8}亚烷基；并且其中所述间隔基团还包括结合剂连接体基团；

 是与所述结合剂连接的一个或多个键；

 是由L连接至-NH-A-的键；

AA^1是氨基酸；和

AA^2是氨基酸；

BA是结合剂，其选自抗体或抗体的抗原结合片段；和

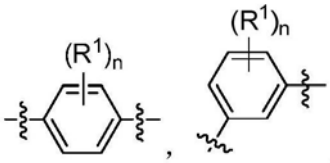
k是从1至30的整数。

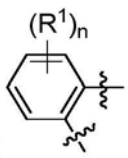
2.根据权利要求1所述的化合物，其中，

R^1在每次出现时独立地选自C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、卤素、C_{1-6}卤代烷基、和C_{1-20}杂环烷基。

3.根据权利要求1所述的化合物，其中：

A选自：




和

n是0、1或2。

4.根据权利要求1所述的化合物，其中，R^1在每次出现时独立地选自甲基、甲氧基、氟、氯、溴、三氟甲基、吡咯烷基、和吗啉基。

5.根据权利要求1所述的化合物，其中，R^1是甲基。

6.根据权利要求1所述的化合物，其中，R^1在每次出现时独立地选自氟、氯、和溴。

7.根据权利要求1所述的化合物，其中，R^1是氯。

8.根据权利要求1所述的化合物，其中，R^1是三氟甲基。

9.根据权利要求1所述的化合物，其中，R^1是甲氧基。

10.根据权利要求1所述的化合物，其中，R^1在每次出现时独立地选自甲基、吗啉基、和吡咯烷基。

美登素类化合物衍生物、其偶联物和使用方法

[0001] 本申请要求并享有于2016年1月25日提交的、发明名称为“MAYTANSINOID DERIVATIVES,CONJUGATES THEREOF AND METHODS OF USE”的美国临时专利申请号62/286,858的优先权。所述临时专利申请的内容通过引用其整体并入本文用于所有目的。

发明领域

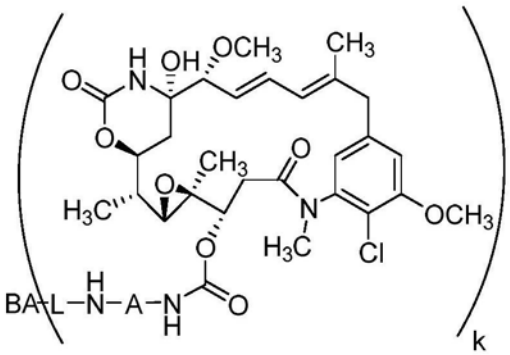
[0002] 本发明涉及美登素类化合物、其衍生物、其偶联物,和用其治疗或预防增殖性疾病的方法。

发明背景

[0003] 增殖性疾病,例如癌症,其特征在于异常细胞不受控制的生长。当前增殖性疾病的治疗包括手术、放射疗法、化学疗法、基于激素疗法和/或免疫疗法。许多这些治疗,特别是化学疗法,利用限制异常细胞扩散的抗增殖药物。然而,这些药物通常不加区别地杀伤细胞,而同时影响正常细胞和异常细胞。为了解决此问题,已探索靶向药物递送的各种方法,包括使用肿瘤靶向探针(如抗体或生长因子)与毒素类的偶联物,来选择性地靶向异常细胞。抗体药物偶联物(ADCs)是经由化学连接体与细胞毒类药物连接的抗体构成的化合物。此类化合物利用抗体对其靶标的结合特异性,从而将细胞毒类药物递送至异常细胞。因此,需要抗增殖化合物及其偶联物。

发明摘要

[0004] 本发明提供了式(I)所示化合物:



(I)

或其药学上可接受的盐,

其中:

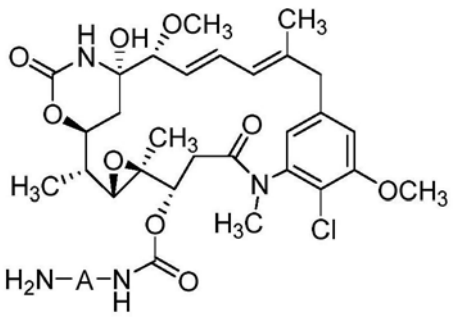
A是亚芳基或亚杂芳基,所述亚芳基和亚杂芳基均是任选取代的,如本发明所述;

L是连接体,所述连接体是任选取代的,如本发明所述;

BA是结合剂;和

k是从1至30的整数。本发明还提供了式(I)所示化合物的立体异构体。

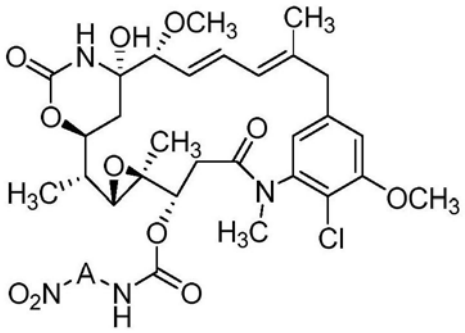
[0005] 本发明还提供了式(II)所示化合物:



(II)

或其药学上可接受的盐，其中A是亚芳基或亚杂芳基，所述亚芳基和亚杂芳基均是任选取代的，如本发明所述。本发明还提供了式(II)所示化合物的立体异构体。

[0006] 本发明还提供了式PP5所示化合物：



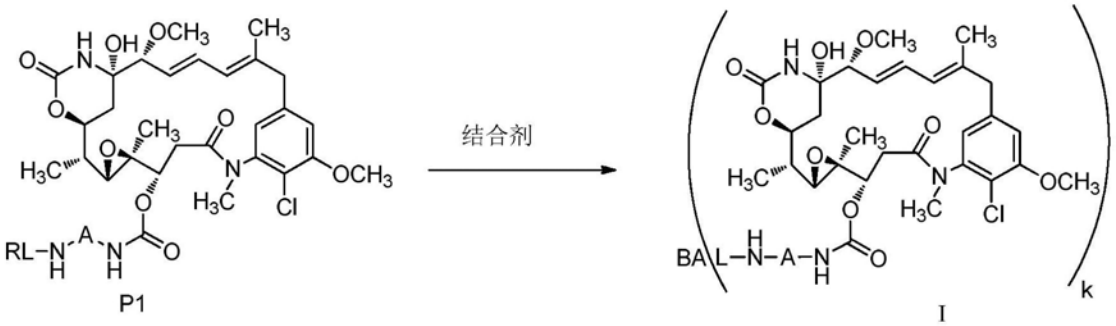
PP5

或其盐，其中A是亚芳基或亚杂芳基，所述亚芳基和亚杂芳基均是任选取代的，如本发明所述。本发明还提供了式PP5所示化合物的立体异构体。

[0007] 此外，本发明提供了治疗增殖性疾病的方法，所述方法包含施用本发明所述化合物。

[0008] 此外，本发明提供了治疗增殖性疾病的方法，所述方法包含施用本发明所述偶联物。

[0009] 此外，本发明提供了制备式(I)所示化合物的方法，其包括使式P1所示化合物与结合剂接触，



P1 I

[0010] 此外，本发明提供了制备式P1所示化合物的方法，其包括使式(II)所示化合物与本发明所述活性连接体(RL)接触。

[0011] 此外，本发明提供了制备式(II)所示化合物的方法，其包括使式PP5所示化合物与合适的还原剂接触。

[0012] 此外，本发明提供了制备式PP5所示化合物的方法，其包括使美登醇与硝基-苯基-异氰酸酯接触。

附图简要说明

[0013] 图.1描绘了实施例28中测试的某些化合物的细胞活力(OVCAR3)％与Log_{10}[M]的关系曲线。

[0014] 图.2描绘了实施例28中测试的某些化合物的细胞活力(SKBr3)％与Log_{10}[M]的关系曲线。

[0015] 图.3描绘了实施例28中测试的某些化合物的细胞活力(SKBr3)％与Log_{10}[M]的关系曲线。

[0016] 图.4描绘了实施例28中测试的某些化合物的细胞活力(SKBr3)％与Log_{10}[M]的关系曲线。

[0017] 图.5描绘了实施例28中测试的某些化合物的细胞活力(SKBr3)％与Log_{10}[M]的关系曲线。

[0018] 图.6描绘了实施例28中测试的某些化合物的细胞活力(C4-2)％与Log_{10}[M]的关系曲线。

[0019] 图.7描绘了实施例28中测试的某些化合物的细胞活力(C4-2)％与Log_{10}[M]的关系曲线。

[0020] 图.8描绘了实施例28中测试的某些化合物的细胞活力(C4-2)％与Log_{10}[M]的关系曲线。

[0021] 图.9描绘了实施例1中提及的反应方案。

[0022] 图.10描绘了实施例2中提及的反应方案。

[0023] 图.11描绘了实施例3中提及的反应方案。

[0024] 图.12描绘了实施例4中提及的反应方案。

[0025] 图.13描绘了实施例5中提及的反应方案。

[0026] 图.14描绘了实施例6中提及的反应方案。

[0027] 图.15描绘了实施例7中提及的反应方案。

[0028] 图.16描绘了实施例8中提及的反应方案。

[0029] 图.17描绘了实施例9中提及的反应方案。

[0030] 图.18示出了来自实施例26的MCC-DM1偶联mAb的去卷积质谱。

发明详述

A.定义

[0031] 本发明使用的“烷基”是指一价、饱和的烃基基团部分。烷基是任选取代的，并可以是直链、支链、或环的即环烷基。烷基包括，但不限于，那些具有1-20个碳原子，即C_{1-20}烷基；1-12个碳原子，即C_{1-12}烷基；1-8个碳原子，即C_{1-8}烷基；1-6个碳原子，即C_{1-6}烷基；和1-3个碳原子，即C_{1-3}烷基。烷基基团部分的实例包括，但不限于甲基、乙基、n-丙基、i-丙基、n-丁基、s-丁基、t-丁基、i-丁基、戊基基团部分、己基基团部分、环丙基、环丁基、环戊基、和环己基。

[0032] 本发明使用的“卤代烷基”是指上述定义的烷基，其中所述烷基包括至少一个选自卤素，如F、Cl、Br、或I的取代基。

[0033] 本发明使用的“烯基”是指含有至少两个碳原子和一个或多个非芳香性碳-碳双键

的一价烃基基团部分。烯基是任选取代的，并可以是直链、支链、或环的。烯基包括，但不限于，那些具有2-20个碳原子，即C_{2-20}烯基；2-12个碳原子，即C_{2-12}烯基；2-8个碳原子，即C_{2-8}烯基；2-6个碳原子，即C_{2-6}烯基；和2-4个碳原子，即C_{2-4}烯基。烯基基团部分的实例包括，但不限于乙烯基、丙烯基、丁烯基、和环己烯基。

[0034] 本发明使用的“炔基”是指含有至少两个碳原子和一个或多个碳-碳三键的一价烃基基团部分。炔基是任选取代的，并可以是直链、支链、或环的。炔基包括，但不限于，那些具有2-20个碳原子，即C_{2-20}炔基；2-12个碳原子，即C_{2-12}炔基；2-8个碳原子，即C_{2-8}炔基；2-6个碳原子，即C_{2-6}炔基；和2-4个碳原子，即C_{2-4}炔基。炔基基团部分的实例包括，但不限于乙炔基、丙炔基、和丁炔基。

[0035] 本发明使用的“烷氧基”是指一价、饱和的烃基基团部分，其中所述烃包括与氧原子连接的单键，和其中所述自由基位于所述氧原子上，例如CH_3CH_2-O·表示乙氧基。烷氧基取代基是通过所述烷氧基取代基的氧原子取代，而与化合物结合。烷氧基是任选取代的，并可以是直链、支链、或环的即环烷氧基。烷氧基包括，但不限于，那些具有1-20个碳原子，即C_{1-20}烷氧基；1-12个碳原子，即C_{1-12}烷氧基；1-8个碳原子，即C_{1-8}烷氧基；1-6个碳原子，即C_{1-6}烷氧基；和1-3个碳原子，即C_{1-3}烷氧基。烷氧基基团部分的实例包括，但不限于甲氧基、乙氧基、n-丙氧基、i-丙氧基、n-丁氧基、s-丁氧基、t-丁氧基、i-丁氧基、戊氧基基团部分、己氧基基团部分、环丙氧基、环丁氧基、环戊氧基、和环己氧基。

[0036] 本发明使用的“卤代烷氧基”是指上述定义的烷氧基，其中所述烷氧基包括至少一个选自卤素，如F、Cl、Br、或I的取代基。

[0037] 本发明使用的“芳基”是指芳香性化合物的自由基/基团的一价基团部分，其中所述环原子均为碳原子。芳基是任选取代的，并可以是单环或多环，譬如，二环或三环。芳基基团部分的实例包括，但不限于，那些具有6至20个环碳原子，即C_{6-20}芳基；6至15个环碳原子，即C_{6-15}芳基，和6至10个环碳原子，即C_{6-10}芳基。芳基基团部分的实例包括，但不限于苯基、萘基、芴基、蒽基、葸基、菲基、和芘基。

[0038] 本发明使用的“亚芳基”是指芳香性化合物的二价基团部分，其中所述环原子均仅为碳原子。亚芳基是任选取代的，并可以是单环或多环，譬如，二环或三环。亚芳基基团部分的实例包括，但不限于，那些具有6至20个环碳原子，即C_{6-20}亚芳基；6至15个环碳原子，即C_{6-15}亚芳基，和6至10个环碳原子，即C_{6-10}亚芳基。

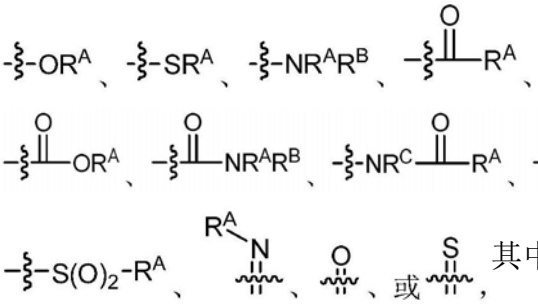
[0039] 本发明使用的“烷芳基”是指被至少一个烷基取代的芳基。烷芳基是任选取代的。

[0040] 本发明使用的“杂烷基”是指其中一个或多个碳原子被杂原子替代的烷基。本发明使用的“杂烯基”是指其中一个或多个碳原子被杂原子替代的烯基。本发明使用的“杂炔基”是指其中一个或多个碳原子被杂原子替代的炔基。合适的杂原子包括，但不限于氮、氧、和硫原子。杂烷基是任选取代的。

[0041] 本发明使用的“杂芳基”是指芳香性化合物的自由基/基团的一价基团部分，其中所述环原子包含碳原子和至少一个氧、硫、氮、或磷原子。杂芳基基团部分的实例包括，但不限于，具有5至20个环原子；5至15个环原子；和5至10个环原子的那些。杂芳基是任选取代的。

[0042] 本发明使用的“亚杂芳基”是指其中所述芳环的一个或多个环原子被氧、硫、氮、或磷原子替代的亚芳基。亚杂芳基是任选取代的，并可以是单环或多环的，如二环或三环。

[0043] 本发明使用的“任选取代的”，当用于描述基团部分，譬如，任选取代的烷基，是指此基团部分任选地与一个或多个取代基连接。这些取代基的实例包括，但不限于卤素、氰基、硝基、卤代烷基、叠氮基、环氧基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂环烷基、



其中R^A、R^B和R^C在每次出现时独立地为氢原子、烷基、烯基、炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、杂烷基、杂芳基、或杂环烷基，或者R^A、R^B、和与其连接的原子一起形成饱和或不饱和的碳环，其中所述环是任选取代的，和其中一个或多个环原子可任选地被杂原子替代。在一些实施方案，R^A、R^B、和R^C均不为氢原子。

[0044] 本发明使用的“结合剂”是指能够与给定结合配偶体特异性结合的任何分子。

[0045] 本发明使用的“连接体”是指使所述结合剂与本发明所述美登素类化合物和衍生物共价连接的二价基团部分。

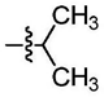
[0046] 本发明使用的“酰胺合成条件”是指适于形成酰胺，譬如，通过羧酸、活化的羧酸、或酰卤与胺进行反应的反应条件。在一些实施例，酰胺合成条件是指适于在羧酸和胺之间形成酰胺键的反应条件。在所述这些实施例中的一些，所述羧酸首先在活化羧酸与胺反应形成酰胺之前转化为活化羧酸。适于形成酰胺的条件包括，但不限于，利用试剂来实现羧酸与胺之间反应的那些，包括但不限于，二环己基碳二亚胺(DCC)、二异丙基碳二亚胺(DIC)、(苯并三氮唑-1-基氧基)三(二甲基氨基)磷鎓六氟磷酸盐(BOP)、(苯并三唑-1-基氧基)三吡咯烷基鏻六氟磷酸盐(PyBOP)、(7-偶氮苯并三氮唑-1-基氧基)三吡咯烷基鏻六氟磷酸盐(PyAOP)、三吡咯烷基溴化鏻六氟磷酸盐(PyBrOP)、O-(苯并三氮唑-1-基)-N,N,N’,N’-四甲基脲六氟磷酸盐(HBTU)、O-(苯并三氮唑-1-基)-N,N,N’,N’-四甲基脲六氟硼酸盐(TBTU)、1-[双(二甲氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三氮唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化六氟磷酸盐(HATU)、2-乙氧基-1-乙氧羰基-1,2-二氢喹啉(EEDQ)，1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)、2-氯-1,3-二甲基咪唑鎓六氟磷酸盐(CIP)、2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪(CDMT)、和羰二咪唑(CDI)。在一些实施例，首先将羧酸转化为活化的羧酸酯，然后与胺反应形成酰胺键。在一些实施方案，羧酸与试剂反应。所述试剂通过使羧酸去质子来活化羧酸，然后由于去质子化的羧酸亲核进攻到质子化试剂上，从而与去质子化的羧酸形成产物复合物。对于某些羧酸，相较羧酸转化成活化酯之前，所述活化酯更容易受到胺的亲核进攻。此举导致酰胺键形成。因此，所述羧酸被描述为活化的。示例性试剂包括DCC和DIC。

[0047] 本发明使用的“治疗有效量”是指足以在患者治疗或控制疾病或病症，或延迟或最小化与疾病或病症相关的一种或多种症状时，提供治疗益处的(化合物的)量。

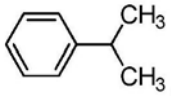
[0048] 本发明使用的“路易斯酸”是指接受孤对电子的分子或离子。本发明所述方法中使用的路易斯酸是质子以外的路易斯酸。路易斯酸包括但不限于非金属酸类、金属酸类、硬路易斯酸类、和软路易斯酸类。路易斯酸包括但不限于铝、硼、铁、锡、钛、镁、铜、锑、磷、银、镱、钪、镍和锌的路易斯酸。示例性路易斯酸包括但不限于$AlBr_3$、$AlCl_3$、BCl_3、三氯化硼甲基硫

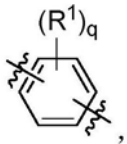
醚、BF_3、三氟化硼甲基醚合物、三氟化硼甲基硫化物、三氟化硼四氢呋喃、二环己基硼三氟甲磺酸盐、溴化铁(III)、氯化铁(III)，氯化锡(IV)、氯化钛(IV)、异丙醇钛(IV)、$Cu(OTf)_2$、$CuCl_2$、$CuBr_2$、氯化锌，烷基铝卤化物类(R_nAlX_{3-n}，其中R是烃基)、$Zn(OTf)_2$、$ZnCl_2$、$Yb(OTf)_3$、$Sc(OTf)_3$、$MgBr_2$、$NiCl_2$、$Sn(OTf)_2$、$Ni(OTf)_2$、和$Mg(OTf)_2$。

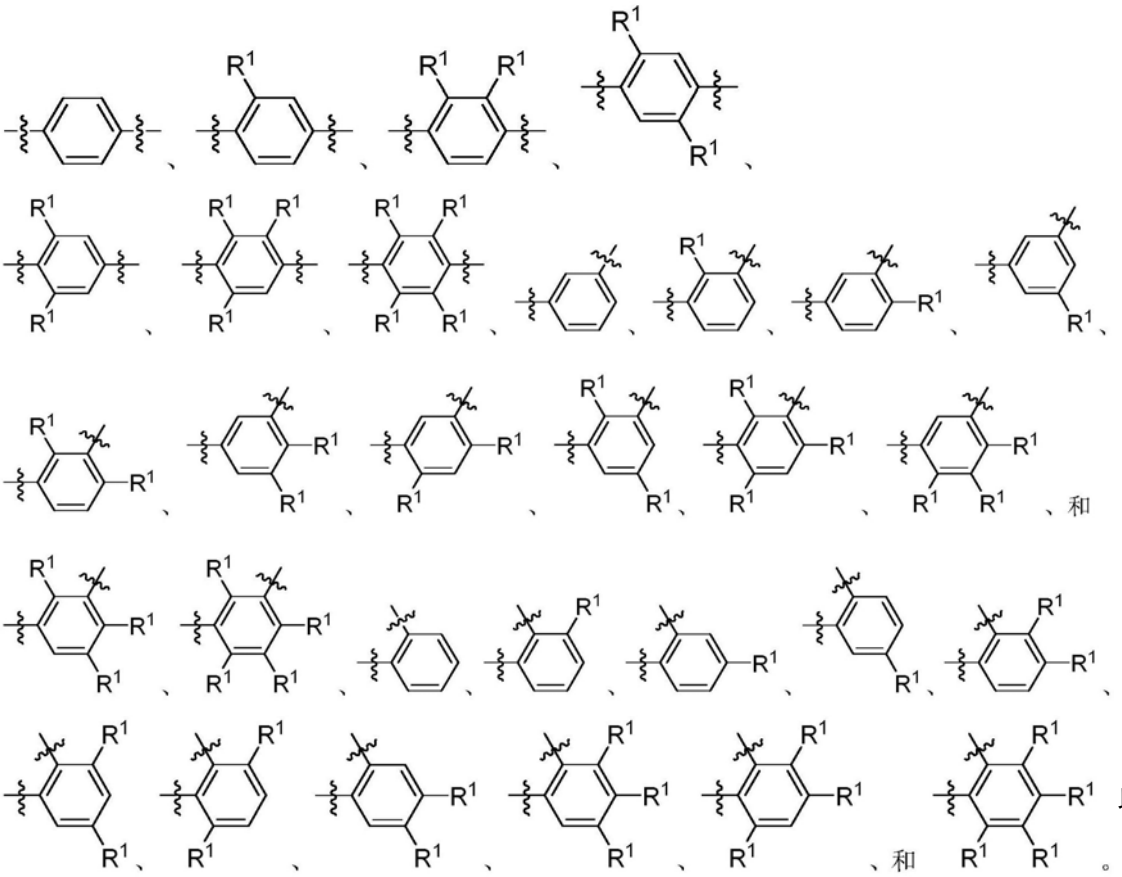
[0049] 某些基团、分子/基团部分、取代基、和原子被描述为具有与键相交的波浪线，以指示所述基团、分子部分、取代基、原子通过其进行连接的原子。譬如，被丙基基团取代的苯基基团可表示为：



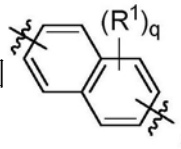
具有下述结构：

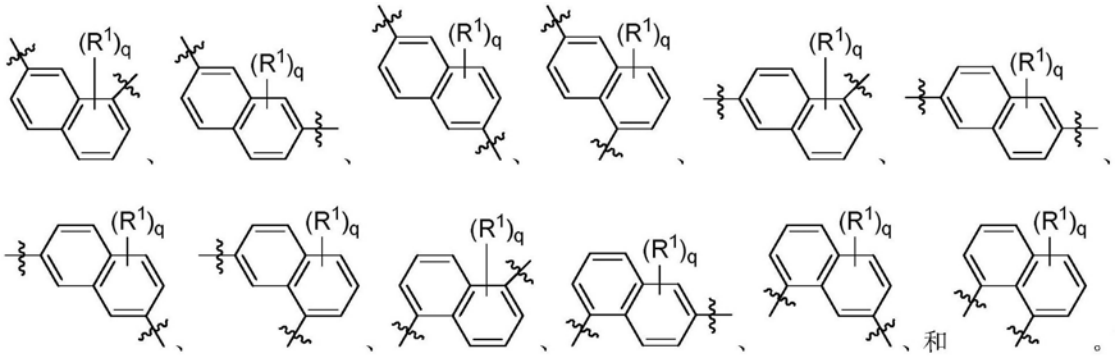


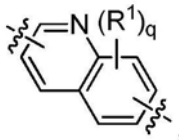
本发明使用的，通过环原子之间的键连接到环状基团(例如，芳环、杂芳环、稠环、和饱和或不饱和环烷基或杂环烷基)的取代基的图示说明意在表示，除非另有说明，环状基团可根据本发明所阐述的技术或即时公开的涉及本领域已知的技术，在环状基团的任何环位置或稠环基团的任何环上被取代基取代。譬如，所述基团  其中下标q是从0至4的整数，和其中取代基R^1的位置一般包括以下具体描述取代基R^1位置的基团：

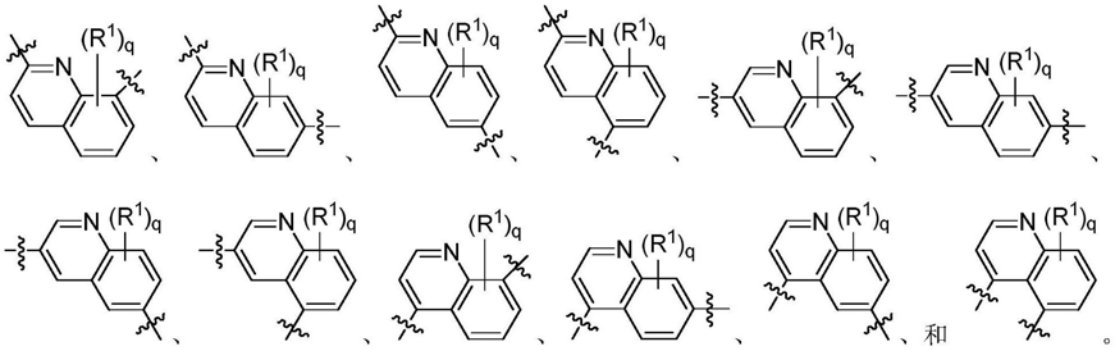


此外，例

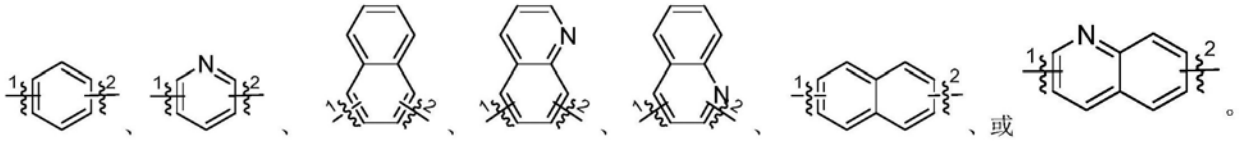
如，所述基团  其中通过环原子之间的键连接到环状基团的除R^1以外的取代基的位置，一般被描述为包括其中除R^1以外的这些取代基的位置，具体描述为以下基团：



同理，例如，所述基团  其中通过环原子之间的键连接到环状基团的除R^1以外的取代基的位置，一般被描述为包括其中除R^1以外的这些取代基的位置，具体描述为以下基团：

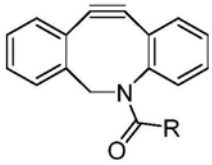
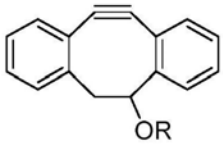
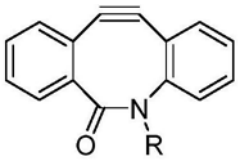
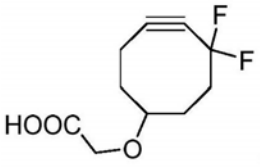
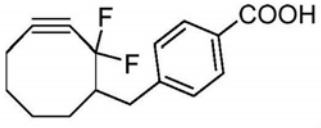
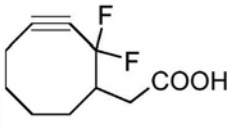
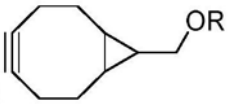
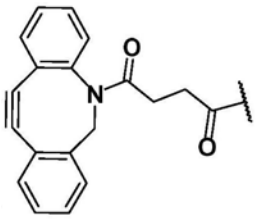
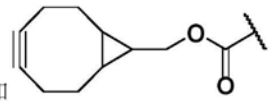


在所述这些结构中的每一个，其中除了R^1以外的取代基的位置，具体描述为，取代基R^1可连接至环状基团的任何环位置或稠环基团的任何环上的任何环位置，其不被除了R^1之外的这些取代基中的任何一个所占据。以下非限制性的代表性图示表明所述环状基团可在稠环基团的任何环位置或任一个环上被指定的取代基取代：

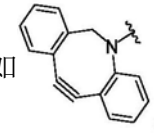


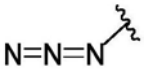
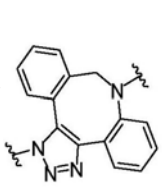
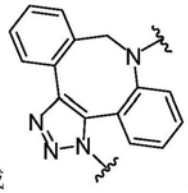
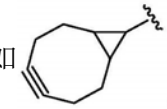
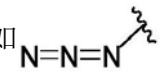
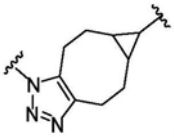
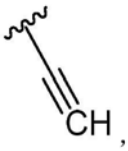
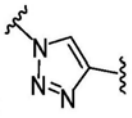
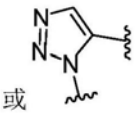
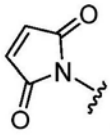
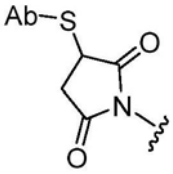
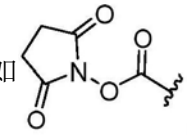
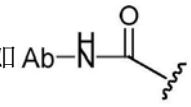
[0050] 当本发明所述的基团任选被取代时，除非另有说明，与所述基团连接的取代基是未取代的。

[0051] 本发明使用的短语“活性连接体”或缩写“RL”是指包含活性基团和间隔基团的一价基团，譬如描述为RG-SP-，其中RG是活性基团，和SP是间隔基团。如本发明所述，活性连接体可包括一个以上的活性基团和一个以上间隔基团。间隔基团是将所述活性基团桥接至另一个一个基团的任何二价基团部分，例如有效负载。所述活性连接体(RL)与它们所连接

的有效负载一同提供可用作合成前体的中间体(“连接体-有效负载”),用于制备本发明所述的抗体偶联物。所述活性连接体含有活性基团(“RG”),其是能够与另一基团(例如抗体、修饰的抗体或其抗原结合片段、或增强基团)的活性部分反应的官能团或基团部分。由活性基团与抗体、修饰的抗体或其抗原结合片段以及连接基团反应产生的基团部分包括本发明所述的偶联物的“结合剂连接体”(“BL”)部分。在某些实施方案,所述“活性基团”是与抗体或其抗原结合片段的半胱氨酸或赖氨酸残基反应的官能团或分子部分(例如,马来酰亚胺或N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯)。在某些实施方案,所述“活性基团”是能够进行点击化学反应的官能团或分子/基团部分(参见例如,click chemistry,Huisgen Proc.Chem.Soc.1961,Wang et al.J.Am.Chem.Soc.2003,and Agard et al.J.Am.Chem.Soc.2004)。在所述点击化学反应的一些实施方案中,活性基团是能够与叠氮化物进行1,3-环加成反应的炔烃。此种合适的活性基团包括但不限于应变炔烃,例如适用于应变促进的炔烃-叠氮化物环加成(SPAAC),环炔烃,例如环辛炔,苯并环化的炔烃,和在不存在铜催化剂的情况下能够与炔烃进行1,3-环加成反应的炔烃。合适的炔烃还包括,但不限于,二苯并氮杂环辛炔或  (DIBAC),二苯并环辛炔  或  (DIBO),二芳基氮杂环辛炔酮或(BARAC),二氟化环辛炔或  ,或  ,或  (DIFO),取代的,譬如,氟化炔烃类,氮杂环炔烃类,二环[6.1.0]壬炔或  (BCN,其中R是烷基、烷氧基、或酰基),和其衍生物。特别有用的炔烃包括  和  。

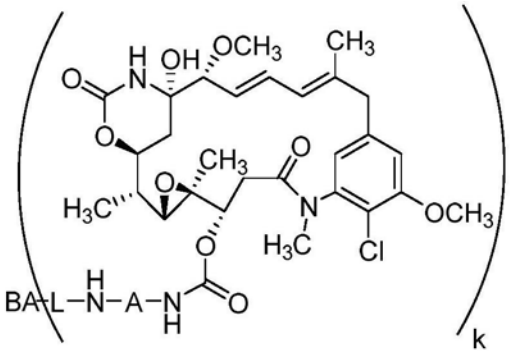
包含此类活性基团的连接体-有效负载可用于偶联已用叠氮基团官能化的抗体。此类官能化抗体包括用叠氮基-聚乙二醇基团官能化的抗体。在某些实施方案,通过在酶转谷氨酰胺酶存在下用带有叠氮基的化合物处理具有至少一个谷氨酰胺残基(例如重链Gln195)的抗体,从而得到此官能化抗体。

[0052] 在一些实施例,所述活性基团是炔烃,譬如  ,其可通过点击化学与叠氮化

物如  反应，从而得到点击化学产物，如  或  。在一些实施例，所述基团可与修饰的抗体或其抗原结合片段上的叠氮化物反应。在一些实施例，所述活性基团是炔烃，例如  ，其可通过点击化学与叠氮化物如  反应，从而形成点击化学产物，如  。在一些实施例，所述活性基团是炔烃，例如  ，其可通过点击化学与叠氮化物如  反应，从而形成点击化学产物，如  或  。在一些实施例，所述活性基团是官能团如  ，其可与抗体或其抗原结合片段上的半胱氨酸残基反应，从而与其形成连接键，如  ，其中Ab是指抗体或其抗原结合片段，和S是指半胱氨酸残基上的S原子，所述官能团通过此原子与所述Ab连接。在一些实施例，所述活性基团是官能团如  ，其可与抗体或其抗原结合片段上的赖氨酸残基反应，从而与其形成连接键，如  ，其中Ab是指抗体或其抗原结合片段，和NH是指赖氨酸侧链残基上的NH原子，所述官能团通过此原子与所述Ab连接。

B.偶联物

[0053] 本发明提供了式(I)所示化合物：



(I)

或其药学上可接受的盐，

其中：

A是亚芳基或亚杂芳基；

L是连接体；

BA是结合剂；和

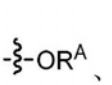
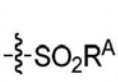
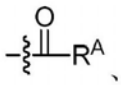
k是从1至30的整数。

1.“A”部分

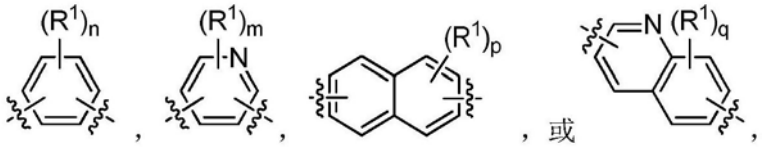
[0054] 在一些实施方案，A是亚芳基。在一些实施方案，A是亚杂芳基。在一些实施方案，所述亚芳基或亚杂芳基被一个或多个吸电子基团和/或一个或多个供电子基团取代。

[0055] 在一些实施方案，A是苯、吡啶、萘、或喹诺酮的二价基团，所述苯、吡啶、萘、和喹诺酮是任选取代的。

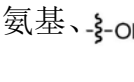
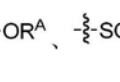
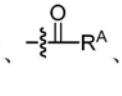
[0056] 在一些实施方案，A是苯的二价基团，所述苯任选地被选自由氨基、酰胺基、烷基、卤素、卤代烷基、烷氧基、和卤代烷氧基组成的组的成员取代。

[0057] 在一些实施方案，A是苯的二价基团，所述苯任选地被选自由烷基、烷氧基、卤代烷基、和卤素组成的组的成员取代。在一些实施方案，A是苯的二价基团，所述苯任选地被选自由甲基、甲氧基、三氟甲基、氟、氯和溴组成的组的成员取代。在一些实施方案，A是苯的二价基团，所述苯任选地被选自由卤素、卤代烷基、卤代烷氧基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、芳烷基、杂芳基、杂烷基、杂环烷基、氰基、硝基、氨基、  、  、  、或叠氮基组成的组的成员取代，其中R^A是烷基。

[0058] 在一些实施方案，A是：



其中：

R^1在每次出现时独立地为卤素、卤代烷基、卤代烷氧基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、芳烷基、杂芳基、杂烷基、杂环烷基、氰基、硝基、氨基、  、  、  、或叠氮基，

其中R^A是烷基；

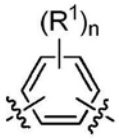
n是从0至4的整数；

m是从0至3的整数；

p是从0至6的整数；和

q是从0至5的整数。

[0059] 在一些实施方案，A是：



，

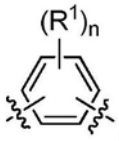
其中：

R^1在每次出现时独立地为卤素、卤代烷基、卤代烷氧基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、芳烷基、杂芳基、杂烷基、杂环烷基、氰基、硝基、氨基、  、  、  、或叠氮基，

其中R^A是烷基；和

n是从0至4的整数；在一些实施方案，n是0、1、2、或3。在一些实施方案，n是0、1、或2。在一些实施方案，n是0或1。在一些实施方案，n是1。

[0060] 在一些实施方案，A是：



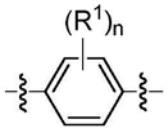
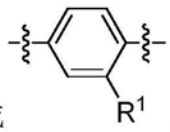
，

其中：

R^1在每次出现时独立地选自烷基、烷氧基、卤素、卤代烷基、和杂环烷基；和

n是从0至4的整数；在一些实施方案，n是0、1、2、或3。在一些实施方案，n是0、1、或2。在一些实施方案，n是0或1。在一些实施方案，n是1。

[0061] 在一些实施方案，A是：


或

，

其中：

R^1在每次出现时独立地为卤素、卤代烷基、卤代烷氧基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、芳烷基、杂芳基、杂烷基、杂环烷基、氰基、硝基、氨基、  、  、  、或叠氮基，

其中R^A是烷基；和

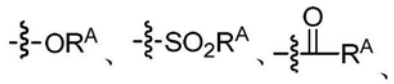
n是从0至4的整数；

m是从0至3的整数；

p是从0至6的整数；和

q是从0至5的整数；

在一些实施方案，R^1在每次出现时独立地为卤素、卤代烷基、卤代烷氧基、烷基、烯

基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、芳烷基、杂芳基、杂烷基、杂环烷基、氰基、硝基、氨基、  或叠氮基，

其中R^A是烷基。

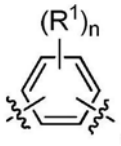
[0062] 在一些实施方案，R^1在每次出现时独立地选自烷基、烷氧基、卤素、卤代烷基、和杂环烷基。

[0063] 在一些实施方案，R^1是C_{1-6}烷基或C_{1-6}烷氧基。在一些实施方案，R^1是C_1烷基。在一些实施方案，R^1是C_1烷氧基。在一些实施方案，R^1是卤素。在一些实施方案，R^1是卤代烷基。在一些实施方案，R^1是杂环烷基。在所述这些实施方案中的一些，R^1是甲基、乙基、甲氧基、或乙氧基。在所述这些实施方案中的一些，R^1是甲基。在所述这些实施方案中的一些，R^1是甲氧基。在所述这些实施方案中的一些，R^1是三氟甲基。在所述这些实施方案中的一些，R^1是氟、氯、或溴。在所述这些实施方案中的一些，R^1是氟。在所述这些实施方案中的一些，R^1是氯。在所述这些实施方案中的一些，R^1是溴。在所述这些实施方案中的一些，R^1是吡咯烷基。在所述这些实施方案中的一些，R^1是吗啉基。

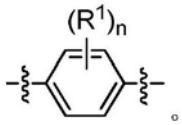
[0064] 在一些实施方案，各R^1独立地为烷基或卤素。在一些实施方案，各R^1独立地为C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、或卤素。在一些实施方案，各R^1独立地为卤素。在一些实施方案，各R^1独立地为氟、氯、溴、碘、或三氟甲基。在一些实施方案，n、m、p、或q是0、1或2。在一些实施方案，n、m、p、或q是0或1。在一些实施方案，n、m、p、或q是0。

[0065] 在一些实施方案，各R^1独立地为烷基、烷氧基、或卤素。在一些实施方案，各R^1独立地为C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}卤代烷氧基、或卤素。在一些实施方案，各R^1独立地为卤素。在一些实施方案，各R^1独立地为氟、氯、溴、碘、或三氟甲基。在一些实施方案，R^1是C_1烷氧基。在一些实施方案，R^1是卤素。在所述这些实施方案中的一些，R^1是甲基。在所述这些实施方案中的一些，R^1是甲氧基。在所述这些实施方案中的一些，R^1是三氟甲基。在一些实施方案，R^1是氟、氯、或溴。在一些实施方案，R^1是氟。在一些实施方案，R^1是氯。在一些实施方案，R^1是溴。在一些实施方案，n、m、p、或q是0、1或2。在一些实施方案，n、m、p、或q是0或1。在一些实施方案，n、m、p、或q是0。

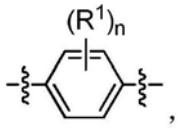
[0066] 在一些实施方案，A是：



[0067] 在一些实施方案，A是：

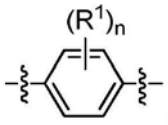


[0068] 在一些实施方案，A是：



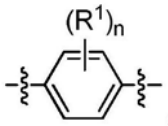
其中，n是0、1、2、3或4。

[0069] 在一些实施方案，A是：



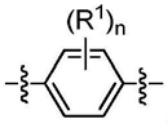
其中n是0、1或2。在一些实施例，n是0或1；和R^1是烷基、烷氧基、卤素、卤代烷基、或卤代烷氧基。在一些实施例，R^1是烷基、烷氧基、卤素、卤代烷基、或杂环烷基。在一些实施方案，R^1在每次出现时独立地为卤素、卤代烷基、卤代烷氧基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、芳烷基、杂芳基、杂烷基、杂环烷基、氰基、硝基、氨基、、、  、和叠氮基，其中R^A是烷基。

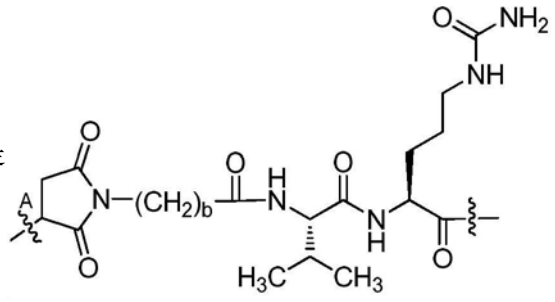
[0070] 在一些实施方案，A是：



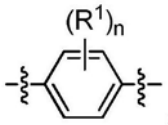
其中n是0、1或2。在一些实施例，n是0或1；和R^1是C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、卤素、C_{1-6}卤代烷基、或C_{1-6}卤代烷氧基。在一些实施例，R^1是杂环烷基。在一些实施方案，R^1是甲基、甲氧基、三氟甲基、氟、氯、或溴。在一些实施方案，R^1是甲基。在一些实施方案，R^1是甲氧基。在一些实施方案，R^1是三氟甲基。在一些实施方案，R^1是氟。在一些实施方案，R^1是溴。在一些实施方案，R^1是氯。在一些实施例，R^1是吡咯烷基。在一些实施例，R^1是吗啉基。

[0071] 在一些实施方案，A是：



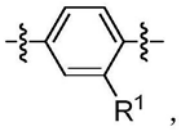
其中n是0、1或2。在一些实施例，n是0或1；R^1是C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、卤素、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}卤代烷氧基、或杂环烷基；和L是  其中b是从2至8的整数，和  是与所述结合剂连接的键。

[0072] 在一些实施方案，A是：



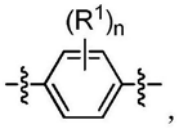
其中n是0、1、2、3或4。

[0073] 在一些实施方案，A是：



其中R^1是C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、卤素、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}卤代烷氧基、或杂环烷基。在所述这些实施方案中的一些，R^1是甲氧基、或甲基。在所述这些实施方案中的一些，R^1是甲氧基。在一些实施方案，R^1是甲基。在一些实施方案，R^1是甲基、甲氧基、三氟甲基、氟、氯、或溴。在一些实施方案，R^1是甲基。在一些实施方案，R^1是甲氧基。在一些实施方案，R^1是三氟甲基。在一些实施方案，R^1是氟。在一些实施方案，R^1是溴。在一些实施方案，R^1是氯。在一些实施例，R^1是吡咯烷基。在一些实施例，R^1是吗啉基。在一些实施例，R^1是烷基、烷氧基、卤素、卤代烷基、或杂环烷基。在一些实施例，R^1在每次出现时独立地为卤素、卤代烷基、卤代烷氧基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、芳烷基、杂芳基、杂烷基、杂环烷基、氰基、硝基、氨基、  或叠氮基，其中R^A是烷基。

[0074] 在一些实施方案，A是：

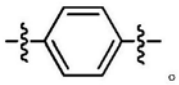


其中：

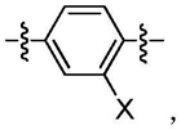
R^1是卤素、甲基、甲氧基、或三氟甲基；和

n是0、1、或2。

[0075] 在一些实施方案，A是：



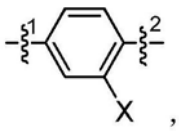
[0076] 在一些实施方案，A是：



其中：

X是氢原子、卤素、甲基、甲氧基、或三氟甲基。

[0077] 在一些实施方案，A是：

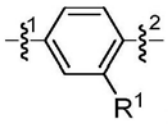


其中：

X是氢原子、卤素、甲基、甲氧基、或三氟甲基；

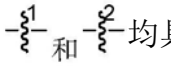
 是与氨基酯的氮原子连接的键，所述氨基酯直接连接至所述药物分子；和是与氮原子连接的键，所述氮原子与所述连接体连接。

[0078] 在一些实施方案，A是：

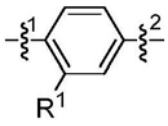


其中：

R^1在每次出现时独立地为氢原子、烷基、烷氧基、芳基、杂烷基、杂环烷基、卤素、卤代烷基、或卤代烷氧基；

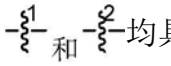
 均具有如上所述定义。在一些实施方案，R^1是1-甲基乙基-巯基、苯基、2-氟苯基、吡啶基、4-吡啶基、吡咯烷基、或1-吡咯烷基。在一些实施方案，R^1是三氟甲基。在一些实施方案，R^1是甲基。在一些实施方案，R^1是甲氧基。在一些实施方案，R^1是氟。在一些实施方案，R^1是氯。在一些实施方案，R^1是溴。在一些实施方案，R^1是氢。

[0079] 在一些实施方案，A是：

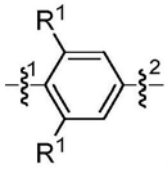


其中：

R^1在每次出现时独立地为氢原子、烷基、烷氧基、芳基、杂烷基、杂环烷基、卤素、卤代烷基、或卤代烷氧基；

 均具有如上所述定义。在一些实施方案，R^1是1-甲基乙基-硫基、苯基、2-氟苯基、吡啶基、4-吡啶基、吡咯烷基、或1-吡咯烷基。在一些实施方案，R^1是三氟甲基。在一些实施方案，R^1是甲基。在一些实施方案，R^1是甲氧基。在一些实施方案，R^1是氟。在一些实施方案，R^1是氯。在一些实施方案，R^1是溴。在一些实施方案，R^1是氢。

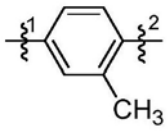
[0080] 在一些实施方案，A是：



其中：

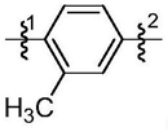
R^1在每次出现时独立地为氢原子、烷基、烷氧基、芳基、杂烷基、杂环烷基、卤素、卤代烷基、或卤代烷氧基；  均具有如上所述定义。在一些实施方案，R^1在每次出现时独立地为氢原子、烷基、烷氧基、芳基、杂烷基、杂环烷基、卤素、卤代烷基、或卤代烷氧基。在一些实施方案，R^1是烷基或烷氧基。在一些具体实施方案，R^1是丙氨基、二氟甲氧基、苯基、2-氟苯基。在一些实施方案，R^1是三氟甲基。在一些实施方案，R^1是甲氧基。在一些实施方案，R^1是甲基。在一些实施方案，R^1是氟。在一些实施方案，R^1是氯。在一些实施方案，R^1是溴。在一些实施方案，R^1是氢。在一些实施例，R^1是吡咯烷基。在一些实施例，R^1是吗啉基。

[0081] 在一些实施方案，A是：



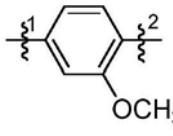
 和  均具有如上所述定义。

[0082] 在一些实施方案,A是:



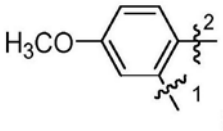
 和  均具有如上所述定义。

[0083] 在一些实施方案,A是:



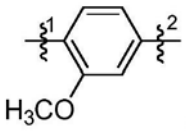
 和  均具有如上所述定义。

[0084] 在一些实施方案,A是:



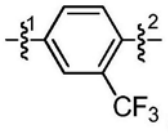
 和  均具有如上所述定义。

[0085] 在一些实施方案,A是:



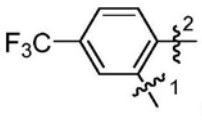
 和  均具有如上所述定义。

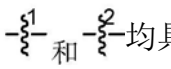
[0086] 在一些实施方案,A是:



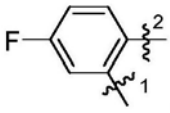
 和  均具有如上所述定义。

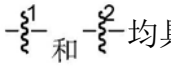
[0087] 在一些实施方案,A是:



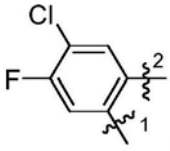

和均具有如上所述定义。

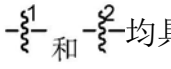
[0088] 在一些实施方案,A是:


;

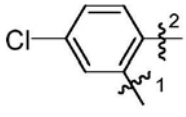

和均具有如上所述定义。

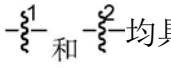
[0089] 在一些实施方案,A是:


;

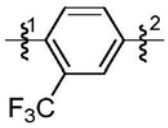

和均具有如上所述定义。

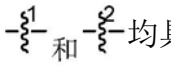
[0090] 在一些实施方案,A是:


;

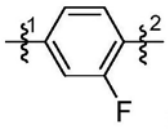

和均具有如上所述定义。

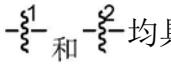
[0091] 在一些实施方案,A是:


;

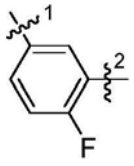

和均具有如上所述定义。

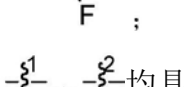
[0092] 在一些实施方案,A是:


;

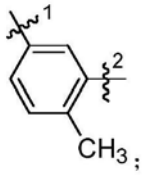

和均具有如上所述定义。

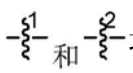
[0093] 在一些实施方案,A是:


;

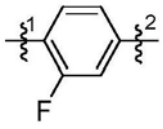

和均具有如上所述定义。

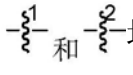
[0094] 在一些实施方案,A是:



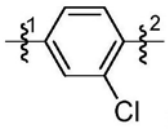
 和均具有如上所述定义。

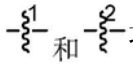
[0095] 在一些实施方案,A是:

 ;

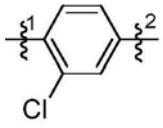
 和均具有如上所述定义。

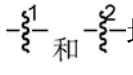
[0096] 在一些实施方案,A是:

 ;

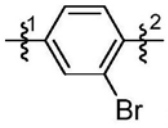
 和均具有如上所述定义。

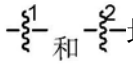
[0097] 在一些实施方案,A是:

 ;

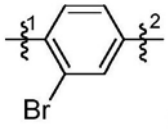
 和均具有如上所述定义。

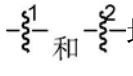
[0098] 在一些实施方案,A是:

 ;

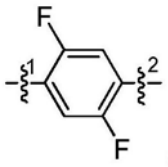
 和均具有如上所述定义。

[0099] 在一些实施方案,A是:

 ;

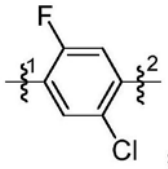
 和均具有如上所述定义。

[0100] 在一些实施方案,A是:



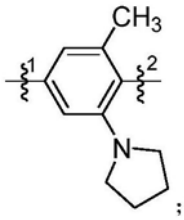
和均具有如上所述定义。

[0101] 在一些实施方案,A是:



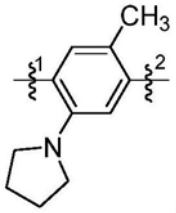
和均具有如上所述定义。

[0102] 在一些实施方案,A是:



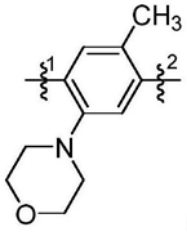
 和  均具有如上所述定义。

[0103] 在一些实施方案,A是:



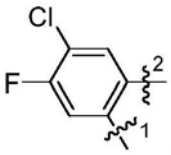
 和  均具有如上所述定义。

[0104] 在一些实施方案,A是:



 和  均具有如上所述定义。

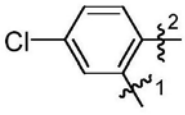
[0105] 在一些实施方案,A是:



；

 和  均具有如上所述定义。

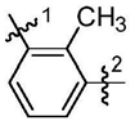
[0106] 在一些实施方案，A是：



；

 和  均具有如上所述定义。

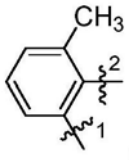
[0107] 在一些实施方案，A是：



；

 和  均具有如上所述定义。

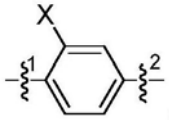
[0108] 在一些实施方案，A是：



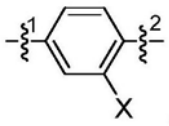
；

 和  均具有如上所述定义。

[0109] 在一些实施方案，A是：

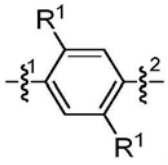
 ，其中X是F、Cl、Br、CN、甲氧基、甲基、三氟甲基、二甲氨基、或环丙基；

 和  均具有如上所述定义。在一些实施方案，A是：

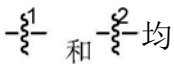
 ，其中X是F、Cl、Br、CN、甲氧基、甲基、三氟甲基、二甲氨基、1-甲基-乙基-巯基、或环丙基；

 和  均具有如上所述定义。

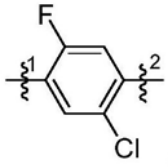
[0110] 在一些实施方案，A是：

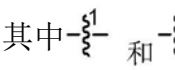


其中，各R^1在每次出现时独立地为氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷基、或卤代烷氧基；

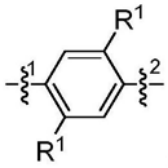
 均具有如上所述定义。在一些实施方案，R^1是氢、氟、甲基、三氟甲基、或甲氧基。在一些实施方案，R^1是氟、氯、溴、或碘。

[0111] 在一些实施方案，A是：

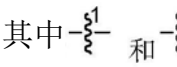


其中  均具有如上所述定义。

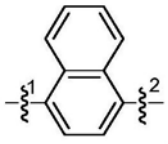
[0112] 在一些实施方案，A是：

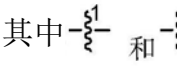


其中，各R^1在每次出现时独立地为氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷基、或卤代烷氧基；

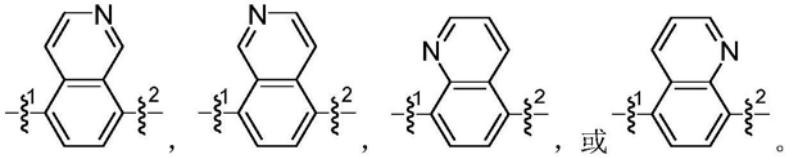
其中  均具有如上所述定义。

[0113] 在一些实施方案，A是：

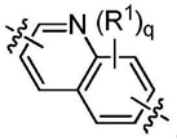


其中  均具有如上所述定义。

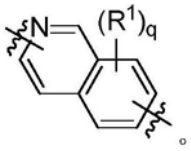
[0114] 在一些实施方案，A是：



[0115] 在一些实施方案，A是：

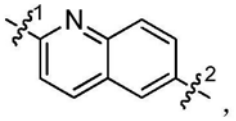


[0116] 在一些实施方案,A是:



。

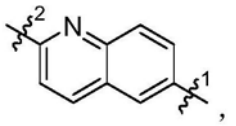
[0117] 在一些实施方案,A是:



,

其中  和均具有如上所述定义。

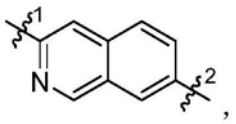
[0118] 在一些实施方案,A是:



,

其中  和均具有如上所述定义。

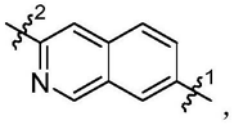
[0119] 在一些实施方案,A是:



,

其中  和均具有如上所述定义。

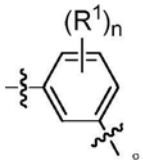
[0120] 在一些实施方案,A是:



,

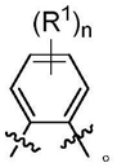
其中  和均具有如上所述定义。

[0121] 在一些实施方案,A是:



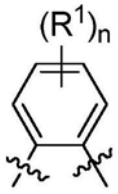
。

[0122] 在一些实施方案,A是:



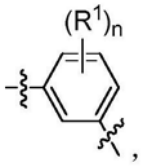
。

[0123] 在一些实施方案,A是:



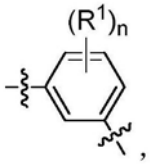
其中n是0、1、2、或3。

[0124] 在一些实施方案，A是：



其中n是0、1、2、或3。

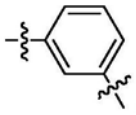
[0125] 在一些实施方案，A是：



其中：

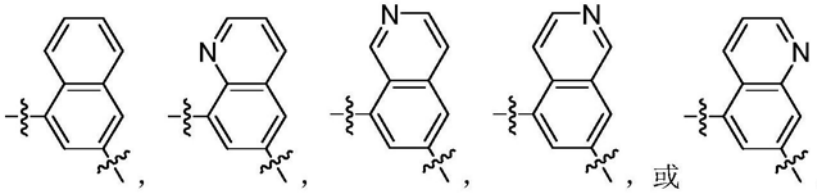
R^1是C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、卤素、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}卤代烷氧基、C_{1-6}杂烷基、或杂环烷基；和n是0、1、2、3或4。在一些实施方案，R^1是C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、卤素、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}卤代烷氧基、C_{1-6}杂烷基、或杂环烷基。

[0126] 在一些实施方案，A是：



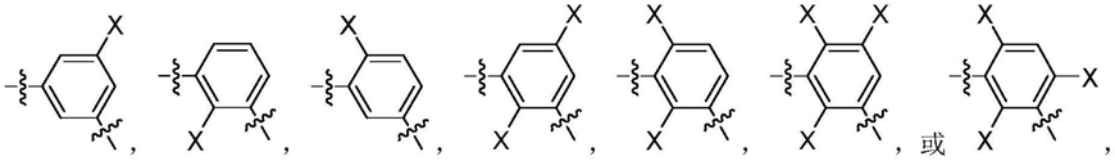
。

[0127] 在一些实施方案，A是：



或 。

[0128] 在一些实施方案，A是：



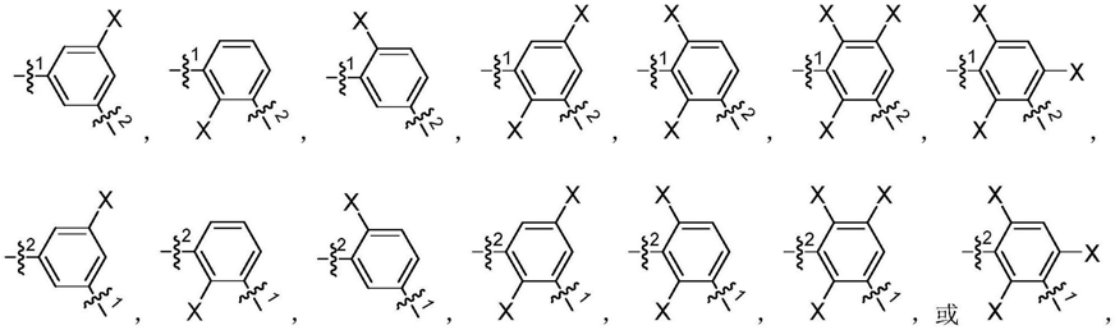
或 ，

其中：

X在每次出现时独立地为氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、杂烷基、或杂环烷基。在一些实施方案，X在每次出现时独立地为氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、杂烷基、或杂环烷基。在一些实施方案，X是氟、氯、溴、碘、二甲氨基、甲氨基、甲基、甲氧基、乙氧基、或三氟甲基。在一些实施方案，X是甲基。在一些实施方案，X是

甲氧基。在一些实施方案，X是三氟甲基。在一些实施方案，X是氟。在一些实施方案，X是氯。在一些实施方案，X是溴。在一些实施方案，X是吗啉基。在一些实施方案，X是吡咯烷基。

[0129] 在一些实施方案，A是：

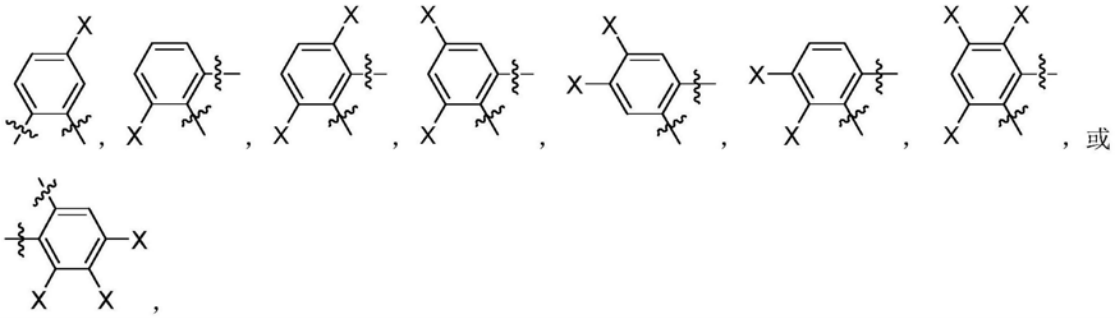


其中：

X在每次出现时独立地为氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、杂烷基、或杂环烷基。在一些实施方案，X在每次出现时独立地为氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、杂烷基、或杂环烷基。在一些实施方案，X在每次出现时独立地为氟、氯、溴、碘、二甲氨基、甲基、甲氨基、甲氧基、乙氧基、三氟甲基甲氧基、吡咯烷基、或吗啉基；

其中，  和  均具有如上所述定义。在一些实施方案，X是甲基。在一些实施方案，X是甲氧基。在一些实施方案中，X是三氟甲基。在一些实施方案，X是氟。在一些实施方案中，X是氯。在一些实施方案，X是溴。在一些实施方案中，X是吗啉基。在一些实施方案，X是吡咯烷基。

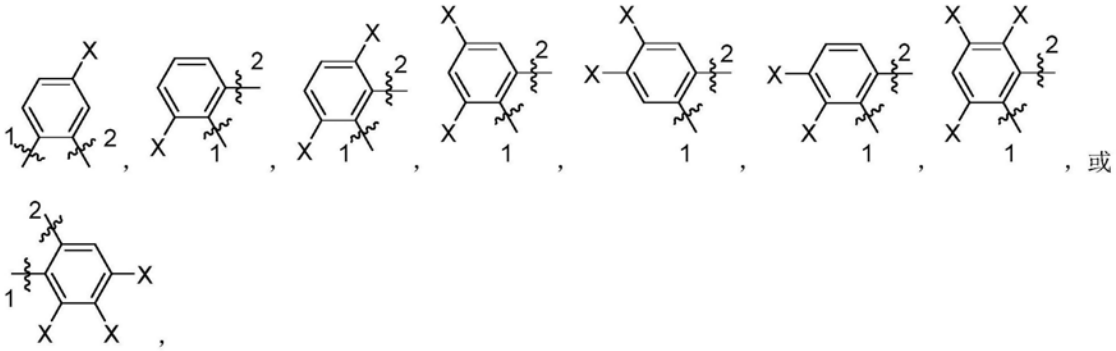
[0130] 在一些实施方案，A是：



其中：

X在每次出现时独立地为氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、杂烷基、或杂环烷基。在一些实施方案，X在每次出现时独立地为氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、杂烷基、或杂环烷基。在一些实施方案，X是氟、氯、溴、碘、二甲氨基、甲氨基、甲基、甲氧基、乙氧基、或三氟甲基。在一些实施方案，X是甲基。在一些实施方案，X是甲氧基。在一些实施方案，X是三氟甲基。在一些实施方案中，X是氟。在一些实施方案中，X是氯。在一些实施方案，X是溴。在一些实施方案，X是吗啉基。在一些实施方案中，X是吡咯烷基。

[0131] 在一些实施方案，A是：



其中：

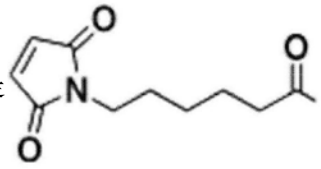
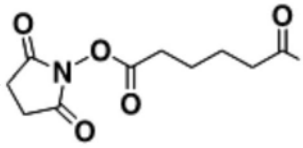
X在每次出现时独立地为氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、杂烷基、或杂环烷基。在一些实施方案，X在每次出现时独立地为氟、氯、溴、碘、二甲氨基、甲基、甲氨基、甲氧基、乙氧基、三氟甲基甲氧基、吡咯烷基、或吗啉基；

其中，  均具有如上所述定义。在一些实施方案，X是甲基。在一些实施方案，X是甲氧基。在一些实施方案，X是三氟甲基。在一些实施方案，X是氟。在一些实施方案，X是氯。在一些实施方案，X是溴。在一些实施方案，X是吗啉基。在一些实施方案，X是吡咯烷基。

2.连接体

[0132] 本发明所述偶联物的连接体部分是将所述结合剂共价连接至本发明所述美登素类化合物和衍生物上的二价基团部分。合适的连接体包括在酶存在下或在特定pH值范围或pH值下释放至少所述美登素类化合物部分的那些。

[0133] 在一些实施方案，所述连接体包含可酶切部分。示例性可酶切部分包括，但不限于肽键类、酯键类、腙类、和二硫键类。在一些实施方案，所述连接体包含可进行组织蛋白酶切的连接体。

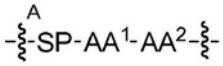
[0134] 在一些实施方案，所述连接体包含不可裂解/切割部分。在一些实施方案，所述不可裂解的活性连接体是  药物或其残基。在一些实施方案，所述不可裂解的活性连接体是  药物或其残基。

[0135] 合适的连接体还包括，但不限于与单一结合剂如抗体的两个半胱氨酸残基进行化学键合的那些。此类连接体可用于摸拟由于偶联过程而被破坏的所述抗体的二硫键。

[0136] 在一些实施方案，所述连接体包含一个或多个氨基酸。合适的氨基酸包括天然、非天然的、标准、非标准的、蛋白原、非蛋白原的、和L-或D-型氨基酸。在一些实施方案，所述连接体包含丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、或瓜氨酸，或其衍生物。

[0137] 在一些实施方案,所述连接体包含缬氨酸和瓜氨酸。

[0138] 在一些实施方案,所述连接体是:



其中:

SP是间隔基团;

 是与所述结合剂连接的一个或多个键;

AA^1是氨基酸;和

AA^2是氨基酸。

[0139] 在一些实施方案,所述连接体是:



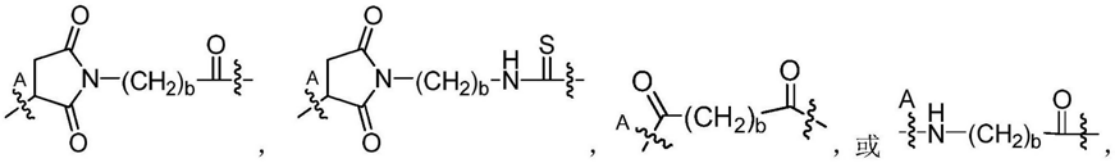
其中:

SP是间隔基团;和

 是与所述结合剂连接的一个或多个键。

[0140] 在一些实施例,所述间隔基团是将所述AA^1-AA^2部分连接至所述结合剂(BA)上的二价基团部分。合适的间隔基团包括,但不限于,包含亚烷基或聚乙二醇的那些。所述间隔基团的末端,即所述间隔基团直接与所述结合剂或AA^1连接的部分,可以是衍生自活性部分的部分,所述活性部分用于在偶联物的化学合成过程中,将裸抗体或AA^1与间隔基团进行连接。在一些实施例,所述间隔基团的末端,即所述间隔基团直接与所述结合剂或AA^1连接的部分,可以是活性部分的部分,所述活性部分用于在偶联物的化学合成过程中,将裸抗体或AA^1与所述间隔基团进行连接。

[0141] 在一些实施方案,所述间隔基团包含亚烷基。在一些实施方案,所述间隔基团包含C_{5-7}亚烷基。在一些实施方案,所述间隔基团是:

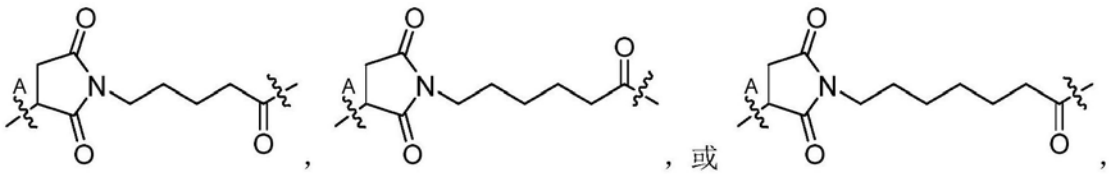


其中:

 是与所述结合剂连接的键;和

b是从2至8的整数。在一些实施例,b选自2、3、4、5、6、7、或8。在一些实施例,b是2。在一些实施例,b是3。在一些实施例,b是4。在一些实施例,b是5。在一些实施例,b是6。在一些实施例,b是7。在一些实施例,b是8。

[0142] 在一些实施方案,所述间隔基团是:



其中：

是与所述结合剂连接的键。

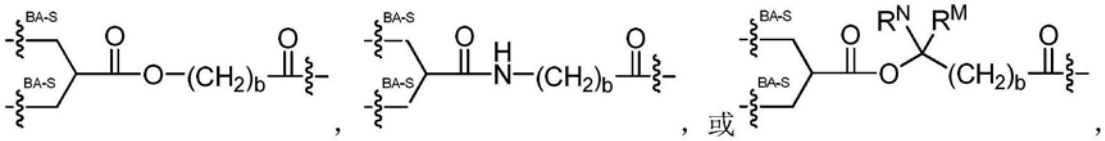
[0143] 在一些实施方案，所述间隔基团是：

，

其中：

 是与所述结合剂连接的键。

[0144] 在一些实施方案，所述间隔基团是：

 ，或，

其中：

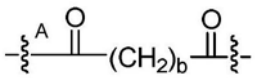
R^N是氢原子或烷基；

R^M是烷基；

由  表示的两个键均是与结合剂的半胱氨酸连接的键；和

b是从2至8的整数。

[0145] 在一些实施方案，所述间隔基团是：

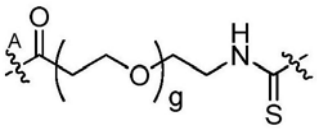


其中：

 是与所述结合剂连接的键；和

b是从2至8的整数。

[0146] 在一些实施方案，所述间隔基团是：

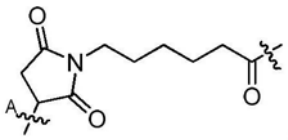


其中：

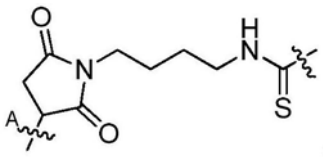
 是与所述结合剂连接的键；和

g是从2至20的整数。在一些实施方案，g是2-8。在一些实施方案，g是2、4、6、或8。

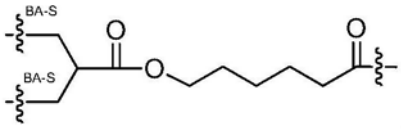
[0147] 在一些实施方案，所述间隔基团是：

 。

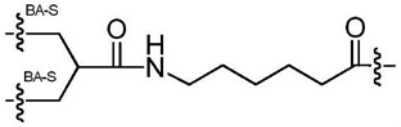
[0148] 在一些实施方案，所述间隔基团是：



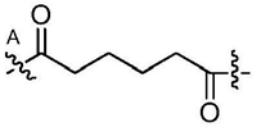
[0149] 在一些实施方案,所述间隔基团是:



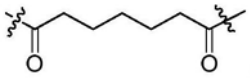
[0150] 在一些实施方案,所述间隔基团是:



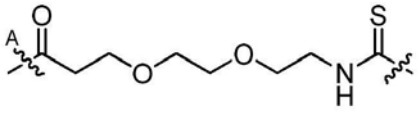
[0151] 在一些实施方案,所述间隔基团是:



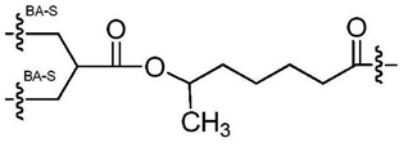
[0152] 在一些实施方案,所述间隔基团是:



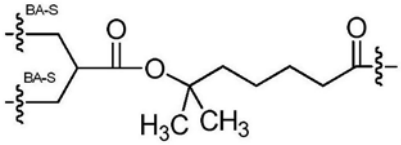
[0153] 在一些实施方案,所述间隔基团是:



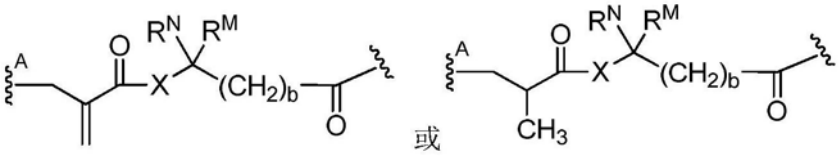
[0154] 在一些实施方案,所述间隔基团是:



[0155] 在一些实施方案,所述间隔基团是:



[0156] 在一些实施方案,所述间隔基团是:



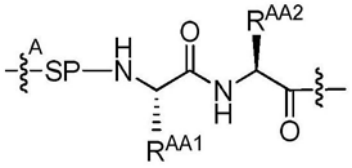
[0157] 其中  是与所述结合剂连接的键;

X是N或O;R^N和R^M各自独立地为氢或烷基;和b是从1至8的整数。

[0158] 在一些实施方案，AA^1-AA^2是：缬氨酸-瓜氨酸，瓜氨酸-缬氨酸，赖氨酸-苯丙氨酸，苯丙氨酸-赖氨酸，缬氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-缬氨酸，天冬酰胺-苏氨酸，苏氨酸-天冬酰胺，丝氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-丝氨酸，苯丙氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-苯丙氨酸，亮氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-亮氨酸，异亮氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-异亮氨酸，甘氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-甘氨酸，谷氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-谷氨酸，瓜氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-瓜氨酸，丙氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-丙氨酸，缬氨酸-丙氨酸，丙氨酸-缬氨酸，缬氨酸-甘氨酸，或甘氨酸-缬氨酸。

[0159] 在一些实施方案，AA^1-AA^2是：缬氨酸-瓜氨酸或瓜氨酸-缬氨酸。在一些实施方案，AA^1-AA^2是：缬氨酸-瓜氨酸。

[0160] 在一些实施方案，所述连接体是：



其中：

SP是间隔基团；



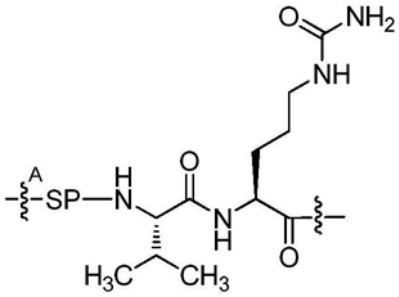
是与所述结合剂连接的一个或多个键；

R^{AA1}是氨基酸侧链；和

R^{AA2}是氨基酸侧链。

[0161] 本发明使用的“氨基酸侧链”是指与α-氨基酸包括如天然和非天然氨基酸的α-碳连接的一价、非氢取代基。氨基酸侧链的实例包括，但不限于丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、和瓜氨酸的α-碳取代基。

[0162] 在一些实施方案，所述连接体是：



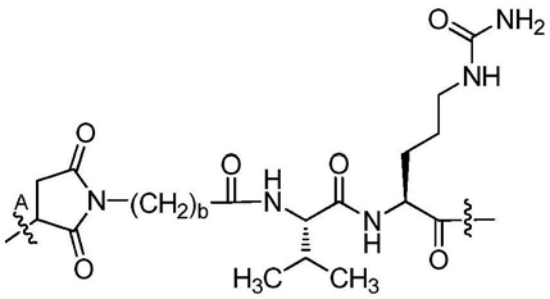
其中：

SP是间隔基团；和



是与所述结合剂连接的一个或多个键。

[0163] 在一些实施方案，所述连接体是：

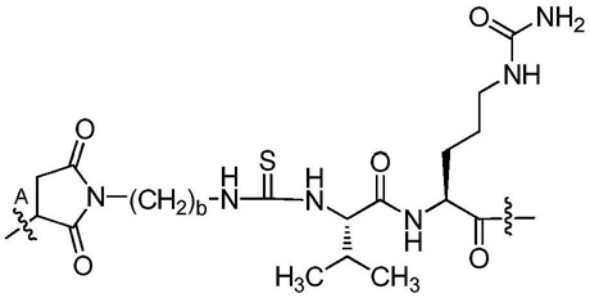


其中：

-A-是与所述结合剂连接的键；和

b是从2至8的整数。

[0164] 在一些实施方案，所述连接体是：

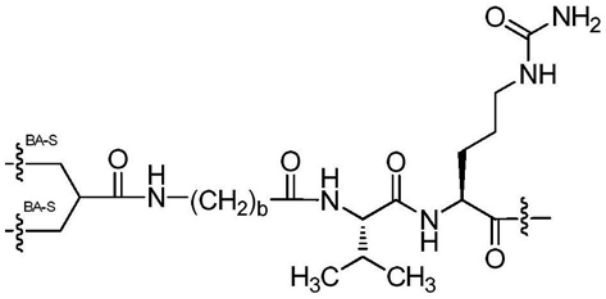


其中：

-A-是与所述结合剂连接的键；和

b是从2至8的整数。

[0165] 在一些实施方案，BA是抗体和所述连接体是：

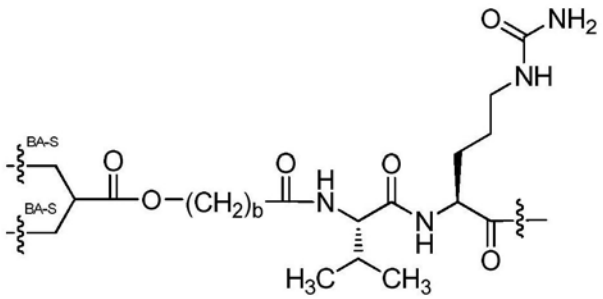


其中：

由-BA-S-表示的两个键均是与所述抗体的半胱氨酸连接的键；和

b是从2至8的整数。

[0166] 在一些实施方案，BA是抗体和所述连接体是：

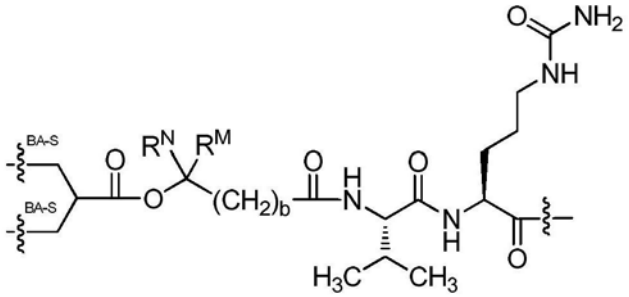


其中：

由  表示的两个键均是与所述抗体的半胱氨酸连接的键；和

b是从2至8的整数。

[0167] 在一些实施方案，BA是抗体和所述连接体是：



其中：

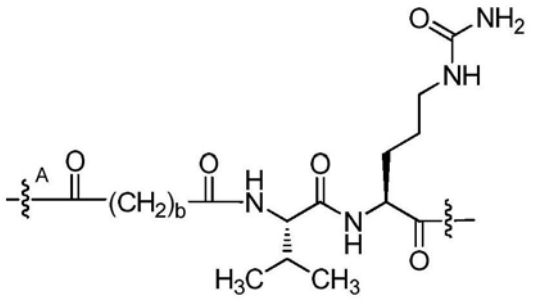
R^N是氢原子或烷基；

R^M是烷基；

由  表示的两个键均是与所述抗体的半胱氨酸连接的键；和

b是从2至8的整数。

[0168] 在一些实施方案，所述连接体是：

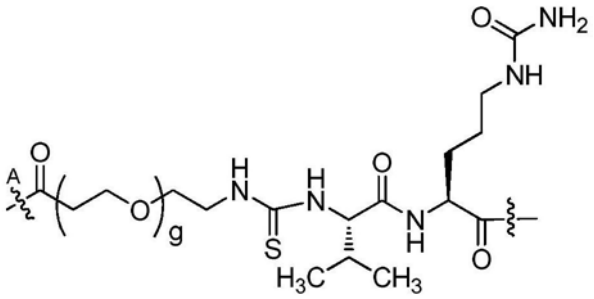


其中：

 是与所述结合剂连接的键；和

b是从2至8的整数。

[0169] 在一些实施方案，所述连接体是：

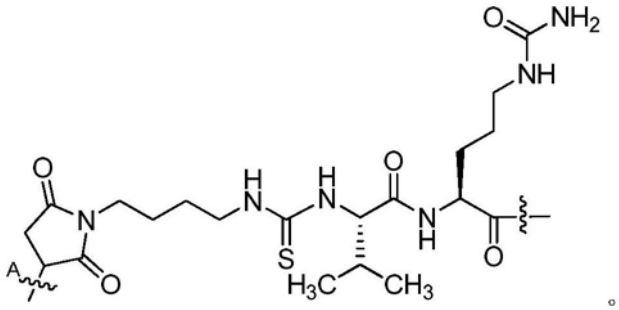


其中：

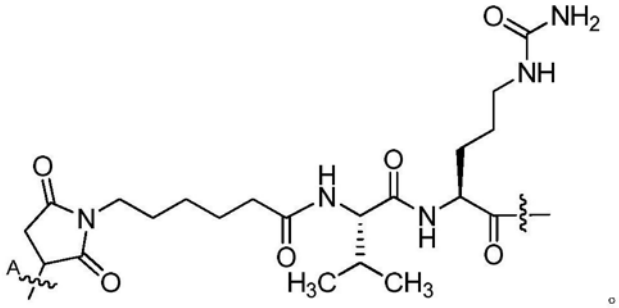
 是与所述结合剂连接的键；和

g是从2至20的整数。在一些实施方案，g是2至8。在一些实施方案，g是2、4、6、或8。

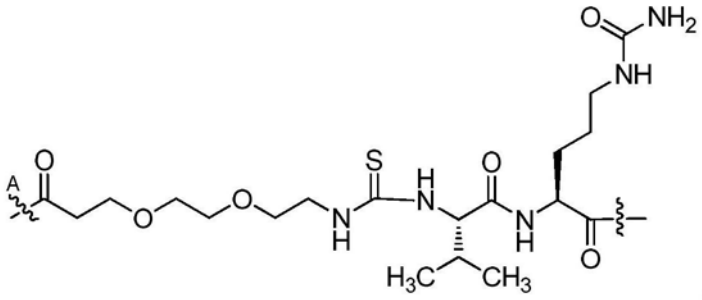
[0170] 在一些实施方案，所述连接体是：



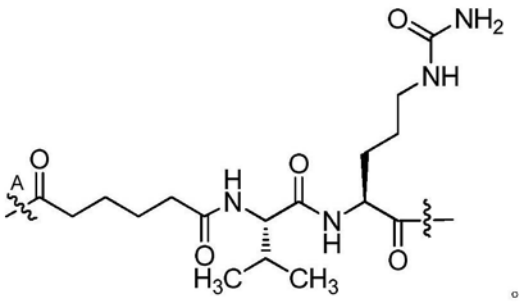
[0171] 在一些实施方案，所述连接体是：



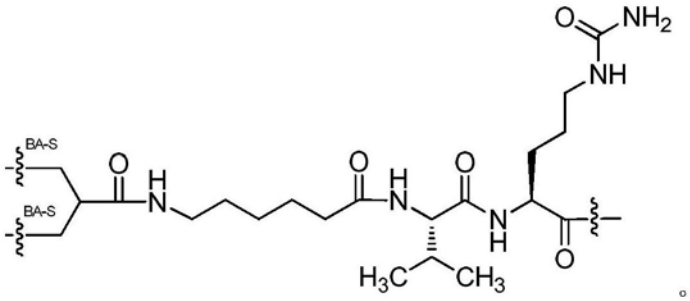
[0172] 在一些实施方案，所述连接体是：



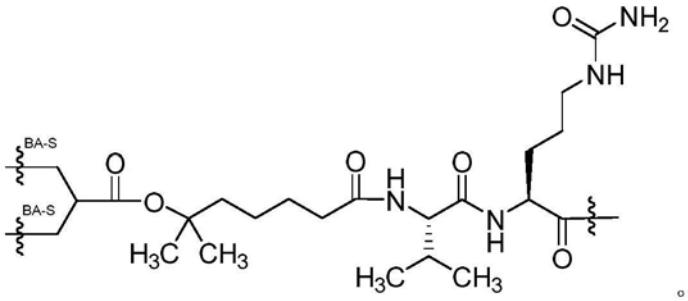
[0173] 在一些实施方案，所述连接体是：



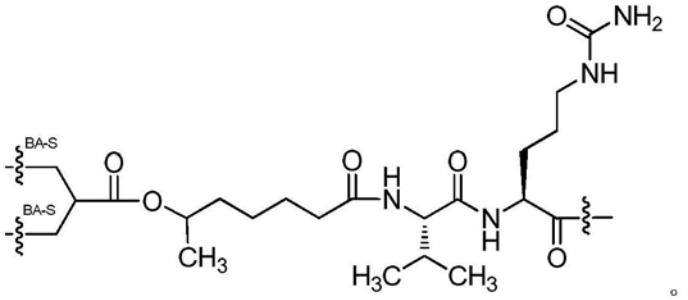
[0174] 在一些实施方案,所述连接体是:



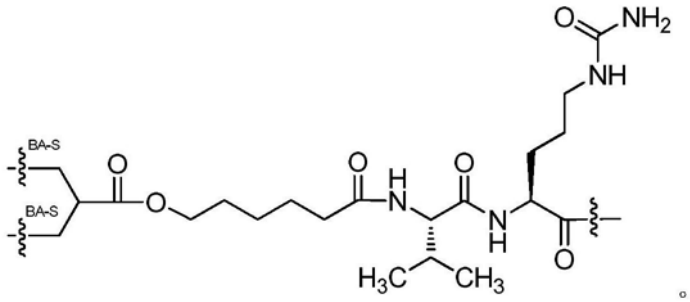
[0175] 在一些实施方案,所述连接体是:



[0176] 在一些实施方案,所述连接体是:



[0177] 在一些实施方案,所述连接体是:



3.结合剂

[0178] 合适的结合剂包括,但不限于抗体类、淋巴因子类、激素类、生长因子类、病毒受体

类、白介素类、或任何其他细胞结合或肽结合分子类或物质类。

[0179] 在一些实施方案，所述结合剂是抗体。在一些实施方案，所述抗体是单克隆抗体，多克隆抗体，抗体片段(Fab、Fab'、和F(ab)2、微抗体、双体抗体、三体抗体等)，或双特异性抗体。本发明所述抗体可使用美国专利号6,596,541和美国公开号2012/0096572中所述方法进行人源化，所述此两篇美国专利/申请各自通过引用其全部内容并入本文。

[0180] 当所述结合剂是抗体时，其结合作为多肽的抗原结合配偶体，且可以是跨膜分子(譬如，受体)或可能被糖基化或磷酸化的生长因子。示例性抗原包括，但不限于，分子类如肾素；生长激素，包括人生长激素和牛生长激素；生长激素释放因子；甲状旁腺激素；促甲状腺激素；脂蛋白类；α1-抗胰蛋白酶；胰岛素A链；胰岛素B链；胰岛素原；促卵泡激素；降钙素；促黄体激素；胰高血糖素；凝血因子如因子vmc，因子IX，组织因子(TF)和血管性血友病因子；抗凝血因子如蛋白C；心房利钠因子；肺表面活性剂；纤溶酶原激活物，如尿激酶或人尿或组织型纤溶酶原激活物(t-PA)；蛙皮素；凝血酶；造血生长因子；肿瘤坏死因子-α和-β；脑啡肽酶；RANTES(调节激活正常T细胞表达和分泌)；人巨噬细胞炎症蛋白(MlP-I-α)；血清白蛋白，如人血清白蛋白；缪勒管(Muellerian)抑制物质；松弛素A链；松弛素B链；松弛素原(prorelaxin)；小鼠促性腺激素相关肽；微生物蛋白，如β-内酰胺酶；脱氧核糖核酸酶；19E；细胞毒性T淋巴细胞相关抗原(CTLA)，如CTLA-4；抑制素；激活素；血管内皮生长因子(VEGF)；激素或生长因子受体类；蛋白A或D；类风湿因子类；神经营养因子如骨源性神经营养因子(BDNF)，神经营养因子-3、-4、-5或-6(NT-3、NT4、NT-5、或NT-6)，或神经生长因子如NGF-β；血小板源生长因子(PDGF)；成纤维细胞生长因子如aFGF和bFGF；成纤维细胞生长因子受体2(FGFR2)，表皮生长因子(EGF)；转化生长因子(TGF)如TGF-α和TGF-β，包括TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3、TGF-β4、或TGF-β5；胰岛素样生长因子-1和-II(IGF-1和IGF-II)；des(I-3)-IGF-1(脑IGF-1)，胰岛素样生长因子结合蛋白类，EpCAM，GD3，FLT3，PSMA，PSCA，MUC1，MUC16，STEAP，CEA，TENB2，EphA受体类，EphB受体类，叶酸受体，FOLRI，间皮素，cripto，αvβ6，整合素类，VEGF，VEGFR，EGFR，转铁蛋白受体，IRTA1，IRTA2，IRTA3，IRTA4，IRTA5；CD蛋白类如CD2，CD3，CD4，CD5，CD6，CD8，CD11，CD14，CD19，CD20，CD21，CD22，CD25，CD26，CD28，CD30，CD33，CD36，CD37，CD38，CD40，CD44，CD52，CD55，CD56，CD59，CD70，CD79，CD80，CD81，CD103，CD105，CD134，CD137，CD138，CD152，或与美国专利公开号2008/0171040或美国专利公开号2008/0305044中公开的一种或多种肿瘤相关抗原或细胞表面受体结合的抗体，所述专利通过引用其全部内容并入本文；促红细胞生成素；骨诱导因子类；免疫毒素类；骨形态发生蛋白(BMP)；干扰素，如干扰素-α、β和γ；集落刺激因子(CSFs)，例如M-CSF，GM-CSF，和G-CSF；白介素类(ILs)，例如，IL-1至IL-10；超氧化物歧化酶；T细胞受体类；表面膜蛋白类；衰变加速因子；病毒抗原，例如，HIV包膜的一部分；转运蛋白类；归巢受体类；禀呈素类(addressins)；调节蛋白类；整合素类如CD11a，CD11b，CD11c，CD18，ICAM，VLA-4和VCAM；肿瘤相关抗原如AFP，ALK，B7H4，BAGE蛋白类，β-连环蛋白，brc-abl，BRCA1，BORIS，CA9(碳酸酐酶IX)，半胱天冬酶-8，CD20，CD40，CD123，CDK4，CEA，CLEC12A，c-kit，cMET，CTLA4，细胞周期素-B1，CYP1B1，EGFR，EGFRvIII，内皮糖蛋白，上皮细胞粘附分子(Epcam)，EphA2，ErbB2/Her2，ErbB3/Her3，ErbB4/Her4，ETV6-AML，Fra-1，FOLR1，GAGE蛋白类，GD2，GD3，GloboH，磷脂酰肌醇聚糖-3，GM3，gp100，Her2，HLA/B-raf，HLA/EBNA1，HLA/k-ras，HLA/MAGE-A3，hTERT，IGF1R，LGR5，LMP2，MAGE蛋白类，MART-1，间皮素，ML-IAP，Muc1，Muc16，CA-125，MUM1，

NA17,NGEP,NY-BR1,NY-BR62,NY-BR85,NY-ESO1,OX40,p15,p53,PAP,PAX3,PAX5,PCTA-1,PDGFR-α,PDGFR-β,PDGF-A,PDGF-B,PDGF-C,PDGF-D,PLAC1,PRLR,PRAME,PSCA,PSGR,PSMA(FOLH1),RAGE蛋白类,Ras,RGS5,Rho,SART-1,SART-3,Steap-1,Steap-2,STn,生存素,TAG-72,TGF-β,TMPRSS2,Tn,TNFRSF17,TRP-1,TRP-2,酪氨酸酶,和尿路上皮特异蛋白-3(uroplakin-3),和任何上述列举的多肽类的片段。在一些实施例,所述GAGE蛋白类是选自GAGE-1和GAGE-2。在一些实施例,所述MAGE蛋白是选自MAGE-1、-2、-3、-4、-6、和-12。

[0181] 示例性抗原还包括,但不限于BCMA,SLAMF7,B7H4,GPNMB,UPK3A,和LGR5。示例性抗原还包括,但不限于MUC16、PSMA、STEAP2、和HER2。

[0182] 在一些实施方案,所述抗原包括催乳素受体(PRLR)或前列腺特异性膜抗原(PSMA)。在一些实施方案,所述抗原包括MUC16。在一些实施方案,所述抗原包括STEAP2。在一些实施方案,所述抗原包括PSMA。在一些实施方案,所述抗原包括HER2。在一些实施方案,所述抗原是催乳素受体(PRLR)或前列腺特异性膜抗原(PSMA)。在一些实施方案,所述抗原是MUC16。在一些实施方案,所述抗原包括PSMA。在一些实施方案,所述抗原是HER2。在一些实施方案,所述抗原是STEAP2。

[0183] 结合剂还包括,但不限于锚蛋白重复蛋白类,干扰素类,淋巴因子类如IL-2或IL-3,激素类如胰岛素和糖皮质激素类,生长因子类如EGF、转铁蛋白和纤连蛋白III型。

[0184] 在一些实施方案,所述结合剂与肿瘤抗原相互作用或与肿瘤抗原结合,包括对特定类型肿瘤共享、过表达或修饰的一类肿瘤或抗原具有特异性的抗原。实例包括,但不限于:具有肺癌的α-辅肌动蛋白-4,具有黑素瘤的ARTC1,具有慢性骨髓性白血病的BCR-ABL融合蛋白,具有黑素瘤的B-RAF、CLPP或Cdc27,具有鳞状细胞癌的CASP-8和具有肾细胞癌的hsp70-2,以及以下共享的肿瘤特异性抗原,例如:BAGE-1、GAGE、GnTV、KK-LC-1、MAGE-A2、NA88-A、TRP2-INT2。

[0185] 在一些实施方案,所述结合剂是抗体。在一些实施方案,所述结合剂是单克隆抗体。在一些实施方案,所述结合剂是多克隆抗体。在一些实施方案,所述抗体是抗PSMA、抗MUC16、抗HER2、或抗EGFRvIII、或抗STEAP-2抗体。

[0186] 所述连接体可通过抗体或抗原结合分子内特定氨基酸的附接物与结合剂例如抗体或抗原结合分子结合。可在本发明公开的上下文中使用的示例性氨基酸附接物包括,譬如,赖氨酸(参见,如US 5,208,020;US 2010/0129314;Hollander et al.,Bioconjugate Chem.,2008,19:358-361;WO 2005/089808;US 5,714,586;US 2013/0101546;和US 2012/0585592),半胱氨酸(参见,如US 2007/0258987;WO 2013/055993;WO 2013/055990;WO 2013/053873;WO 2013/053872;WO 2011/130598;US 2013/0101546;和US 7,750,116),硒代半胱氨酸(参见,如WO 2008/122039;和Hofer et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,2008,105:12451-12456),甲酰甘氨酸(参见,如Carrico et al.,Nat.Chem.Biol.,2007,3:321-322;Agarwal et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,2013,110:46-51,和Rabuka et al.,Nat.Protocols,2012,10:1052-1067),非天然氨基酸类(参见,如WO 2013/068874,和WO 2012/166559),和酸性氨基酸类(参见,如WO 2012/05982)。连接体可通过谷氨酰胺通过基于转谷氨酰胺酶的化学酶偶联进行偶联(参见,如Dennler et al.,Bioconjugate Chem.2014,25,569-578)。连接体还可通过连接至碳水化合物附接物(参见,如US 2008/0305497,WO 2014/065661,和Ryan et al.,Food&Agriculture Immunol.,2001,13:127-

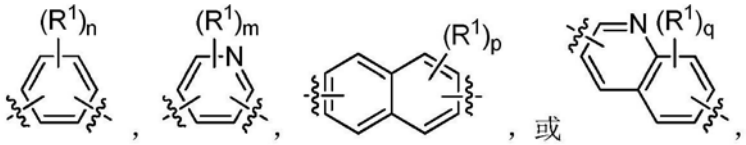
130)和二硫化物连接体(参见,如WO 2013/085925,WO 2010/010324,WO 2011/018611,WO 2014/197854,和Shaunak et al.,Nat.Chem.Biol.,2006,2:312-313),从而与抗原结合蛋白偶联。

[0187] 在一些实施方案,所述结合剂是抗体,和所述抗体是通过赖氨酸残基与所述连接体结合。在一些实施方案,所述抗体是通过半胱氨酸残基与所述连接体结合。

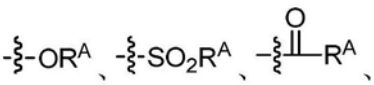
4.示例性性实施方案/实施例

[0188] 在一些实施方案,

A是:



其中:

R^1在每次出现时独立地为卤素、卤代烷基、卤代烷氧基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、芳烷基、杂烷基、杂芳基、杂环烷基、氰基、硝基、  或叠氮基,

其中R^A是烷基;

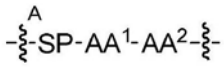
n是从0至4的整数;

m是从0至3的整数;

p是从0至6的整数;和

q是从0至5的整数;和

L是:



其中:

SP是间隔基团;

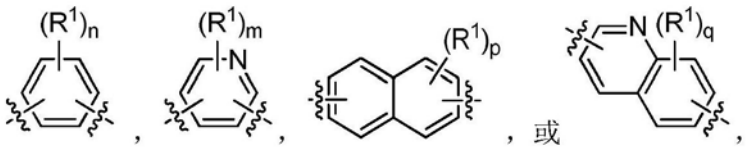
 是与所述结合剂连接的一个或多个键;

AA^1是氨基酸;和

AA^2是氨基酸。

[0189] 在一些实施方案,

A是:



其中:

R^1在每次出现时独立地为C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}卤代烷氧基、或卤素;

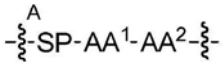
n是从0至4的整数;

m是从0至3的整数；

p是从0至6的整数；和

q是从0至5的整数；和

L是：



其中：

SP是间隔基团；

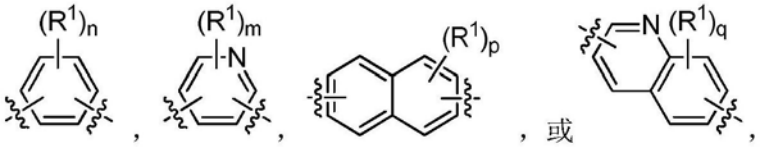
 是与所述结合剂连接的一个或多个键；

AA^1是氨基酸；和

AA^2是氨基酸。

[0190] 在一些实施方案，

A是：



其中：

R^1在每次出现时独立地为卤素、卤代烷基、卤代烷氧基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、芳烷基、杂烷基、杂芳基、杂环烷基、氰基、硝基、  或叠氮基，

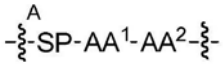
其中R^A是烷基；

m是从0至3的整数；

p是从0至6的整数；和

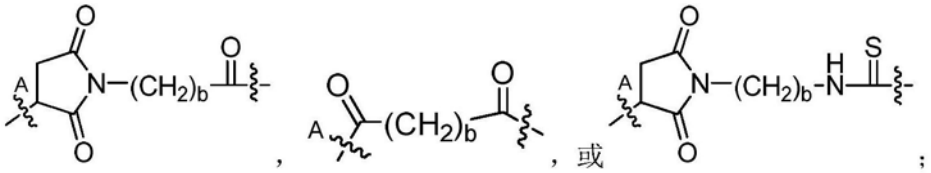
q是从0至5的整数；和

L是：



其中：

SP是：



其中：

 是与所述结合剂连接的键；和

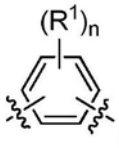
b是从0至8的整数；和

AA^1是氨基酸；和

AA^2是氨基酸。

[0191] 在一些实施方案,其中,

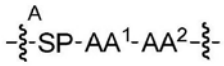
A是:



R^1在每次出现时独立地选自烷基、烷氧基、卤素、卤代烷基、和杂环烷基;

n是从0至4的整数;和

L是:



其中:

SP是间隔基团;

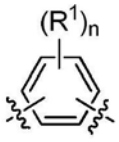
 是与所述结合剂连接的一个或多个键;

AA^1是氨基酸;和

AA^2是氨基酸。

[0192] 在一些实施方案,其中,

A是:



R^1在每次出现时独立地选自烷基、烷氧基、卤素、卤代烷基、和杂环烷基;

n是从0至4的整数;和

L是:



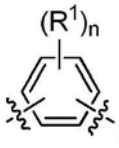
其中:

SP是间隔基团;和

 是与所述结合剂连接的一个或多个键。

[0193] 在一些实施方案,

A是:

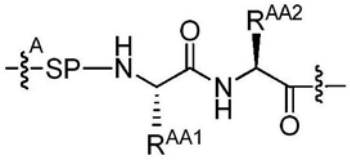


其中:

R^1在每次出现时独立地为C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}卤代烷氧基、卤素、或杂环烷基;和

n是0、1、或2;和

L是:



其中:

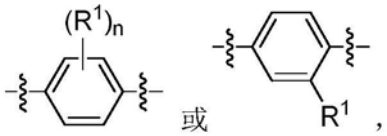
SP是间隔基团;

 是与所述结合剂连接的一个或多个键;

R^{AA1}是氨基酸侧链;和

R^{AA2}是氨基酸侧链。

[0194] 在一些实施方案,A是:



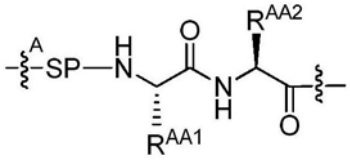
其中:

R^1在每次出现时独立地为卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、芳烷基、杂芳基、杂烷基、杂环烷基、氰基、硝基、  或叠氮基,

其中R^A是烷基;

其中,n是从0至4的整数;

L是:



其中:

SP是间隔基团;

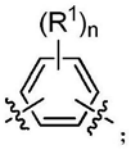
 是与所述结合剂连接的一个或多个键;

R^{AA1}是氨基酸侧链;和

R^{AA2}是氨基酸侧链。

[0195] 在一些实施方案,

A是:

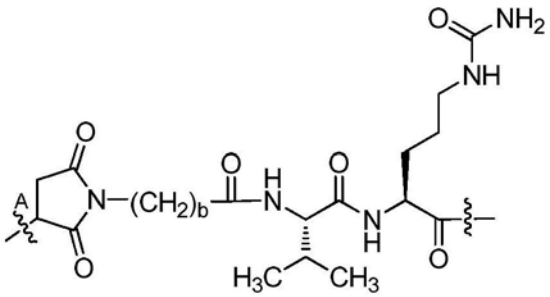


其中:

R^1在每次出现时独立地为卤素;和

n是0、1或2;和

L是:

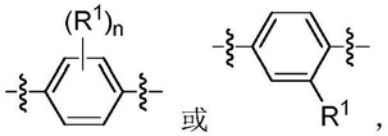


其中:

 是与所述结合剂连接的键;和

b是从2至8的整数。

[0196] 在一些实施方案,A是:

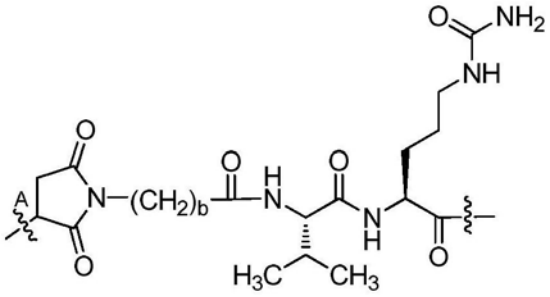


其中:

R^1在每次出现时独立地为卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、芳烷基、杂芳基、杂烷基、杂环烷基、氰基、硝基、  或叠氮基,

其中R^A是烷基;

L是:



其中:

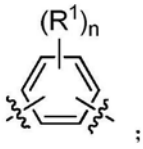
 是与所述结合剂连接的键;

其中n是从0至4的整数;和

b是从2至8的整数。

[0197] 在一些实施方案,

A是:



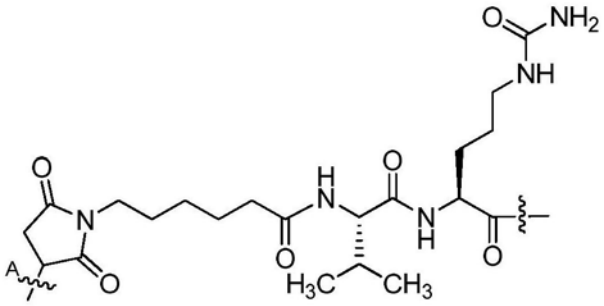
;

其中：

R^1在每次出现时独立地为卤素；和

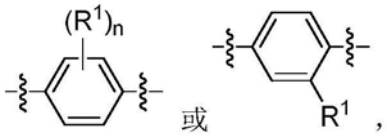
n是0、1或2；和

L是：

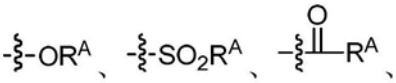


其中，  是与所述结合剂连接的键。

[0198] 在一些实施方案，A是：



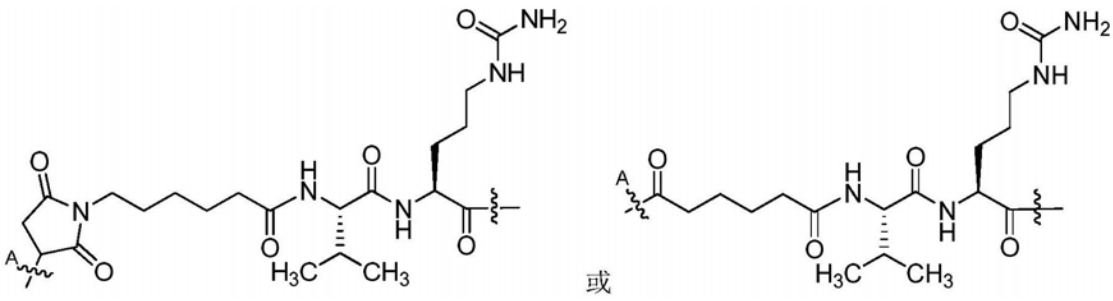
其中：

R^1在每次出现时独立地为卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、芳烷基、杂芳基、杂烷基、杂环烷基、氰基、硝基、  或叠氮基，

其中R^A是烷基；

其中n是从0至4的整数；

L是：



其中，  是与所述结合剂连接的键。

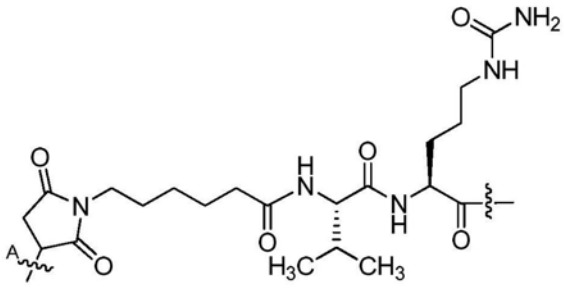
[0199] 在一些实施方案，

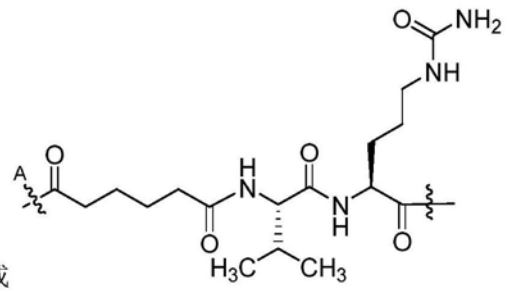
A是：


和

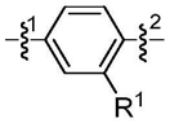
；

L是：


或


。

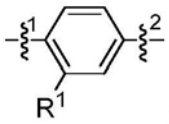
[0200] 在一些实施方案，A是：



其中：

R^1在每次出现时独立地为氢原子、烷基、烷氧基、芳基、杂烷基、卤素、卤代烷氧基、或卤代烷基；是与氨基酯的氮原子连接的键，所述氨基酯直接连接至所述药物分子；和  是与氮原子连接的键，所述氮原子与所述连接体连接。在一些实施方案，R^1是1-甲基乙基-巯基、苯基、2-氟苯基、吡啶基、4-吡啶基、吡咯烷基、或1-吡咯烷基。在一些实施方案，R^1是三氟甲基。在一些实施方案，R^1是甲基。在一些实施方案，R^1是甲氧基。在一些实施方案，R^1是氟。在一些实施方案，R^1是氯。在一些实施方案，R^1是溴。在一些实施方案，R^1是氢。

[0201] 在一些实施方案，A是：


；

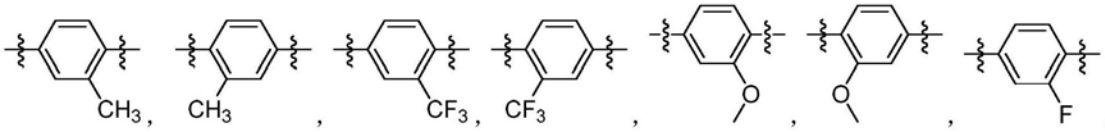
其中

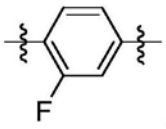
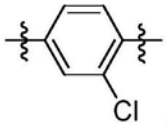
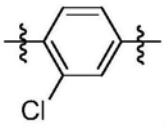
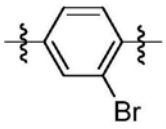
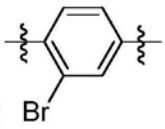
R^1在每次出现时独立地为氢原子、烷基、烷氧基、芳基、杂烷基、卤素、卤代烷基、或卤代烷氧基；

 是与氨基酯的氮原子连接的键，所述氨基酯直接连接至药物分子；和  是与氮原子连接的键，所述氮原子与所述连接体连接。在一些实施方案，R^1是1-甲基乙基-巯基、苯基、2-氟苯基、吡啶基、4-吡啶基、吡咯烷基、或1-吡咯烷基。在一些实施方案，R^1是三氟甲基。在一些实施方案，R^1是甲基。在一些实施方案，R^1是甲氧基。在一些实施方案，R^1是氟。在一些实施方案，R^1是氯。在一些实施方案，R^1是溴。在一些实施方案，R^1是氢。

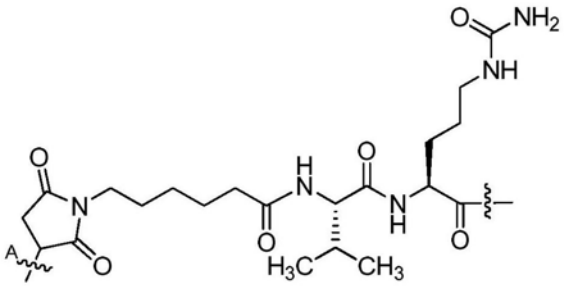
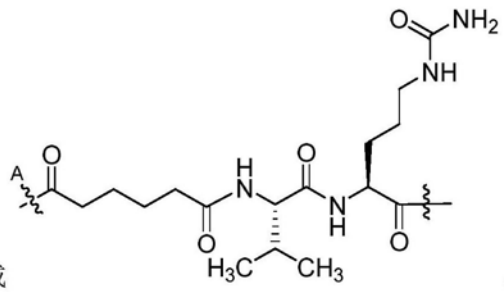
[0202] 在一些实施方案，

A是：



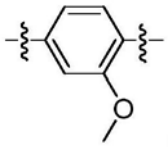

， 
， 
， 
，或 
和；

L是：

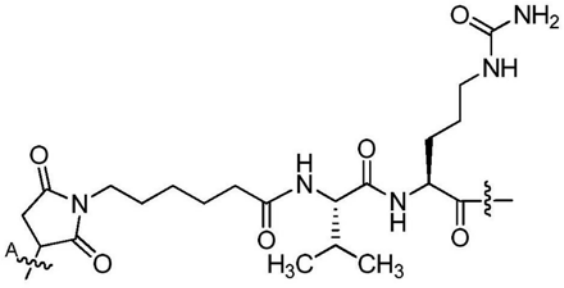
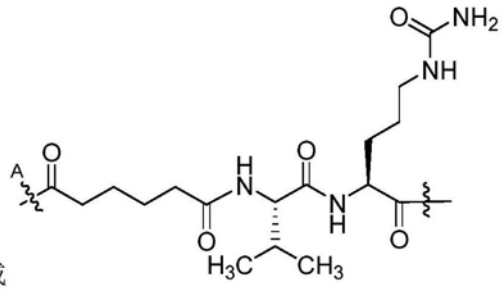

或 
。

[0203] 在一些实施方案，

A是：


和；

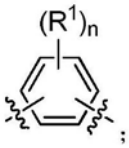
L是：


或 
。

[0204] 在一些实施方案，

BA是抗体，

A是：

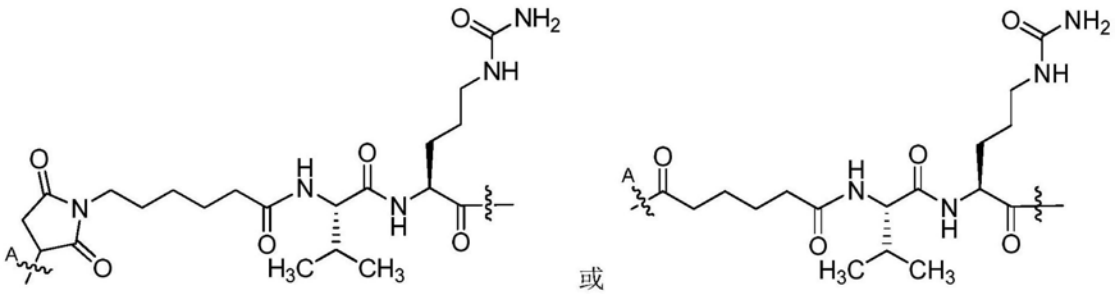

；

其中

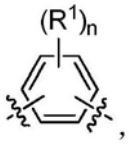
R^1在每次出现时独立地为卤素；和

n是0、1、或2；和

L是：



其中-A-是与所述结合剂连接的键。

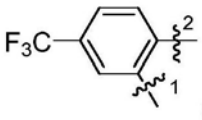
[0205] 在一些实施方案，包括任何前述实施方案，A是：  ，

其中：

R^1在每次出现时独立地选自烷基、烷氧基、卤素、卤代烷基、和杂环烷基；和

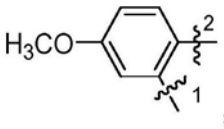
n是从0至4的整数。

[0206] 在一些实施方案，包括任何前述实施方案，A是：

 ；

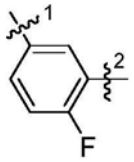
-1- 和 -2-均具有如上所述定义。

[0207] 在一些实施方案，包括任何前述实施方案，A是：

 ；

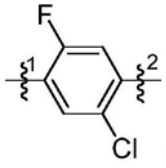
-1- 和 -2-均具有如上所述定义。

[0208] 在一些实施方案，包括任何前述实施方案，A是：

 ；

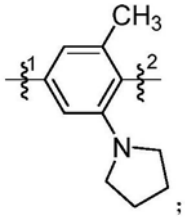
-1- 和 -2-均具有如上所述定义。

[0209] 在一些实施方案，包括任何前述实施方案，A是：

 ；

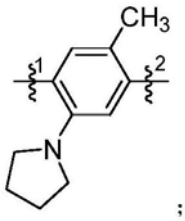
-1- 和 -2-均具有如上所述定义。

[0210] 在一些实施方案,包括任何前述实施方案,A是:



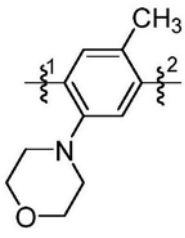
 和 均具有如上所述定义。

[0211] 在一些实施方案,包括任何前述实施方案,A是:



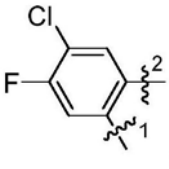
 和 均具有如上所述定义。

[0212] 在一些实施方案,A是:



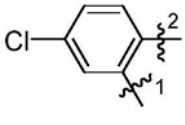
 和 均具有如上所述定义。

[0213] 在一些实施方案,A是:



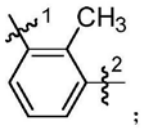
 和 均具有如上所述定义。

[0214] 在一些实施方案,包括任何前述实施方案,A是:



 和 均具有如上所述定义。

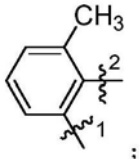
[0215] 在一些实施方案,包括任何前述实施方案,A是:



；

 和均具有如上所述定义。

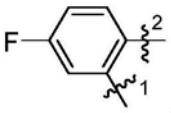
[0216] 在一些实施方案，包括任何前述实施方案，A是：



；

 和均具有如上所述定义。

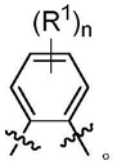
[0217] 在一些实施方案，包括任何前述实施方案，A是：



；

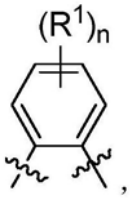
 和均具有如上所述定义。

[0218] 在一些实施方案，包括任何前述实施方案，A是：



。

[0219] 在一些实施方案，包括任何前述实施方案，A是：

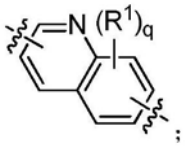


，

其中n是0、1、2或3。

[0220] 在一些实施方案，

A是：



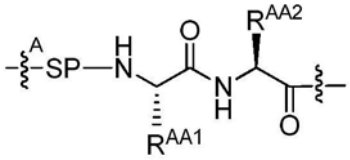
；

其中

R^1在每次出现时独立地为卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、芳烷基、杂芳基、杂烷基、杂环烷基、氰基、硝基、  、、、或叠氮基；和

q是从0至5的整数;和

L是:



其中:

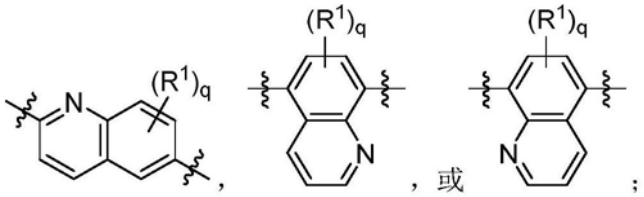
SP是间隔基团;

 是与所述结合剂连接的一个或多个键;

R^{AA1}是氨基酸侧链;和

R^{AA2}是氨基酸侧链。

[0221] 在一些实施方案,A是:

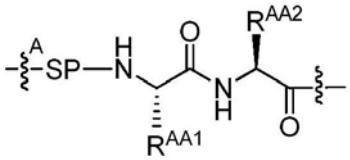


其中:

R^1在每次出现时独立地为卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、芳烷基、杂芳基、杂烷基、杂环烷基、氰基、硝基、  、  、  、或叠氮基;

其中q是从0至5的整数;

L是:



其中:

SP是间隔基团;

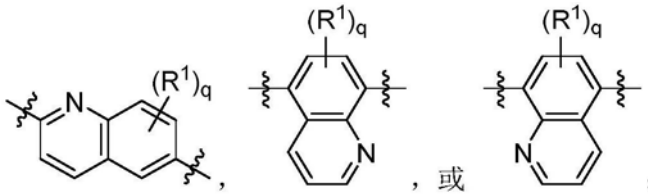
 是与所述结合剂连接的一个或多个键;

R^{AA1}是氨基酸侧链;和

R^{AA2}是氨基酸侧链。

[0222] 在一些实施方案,

A是:

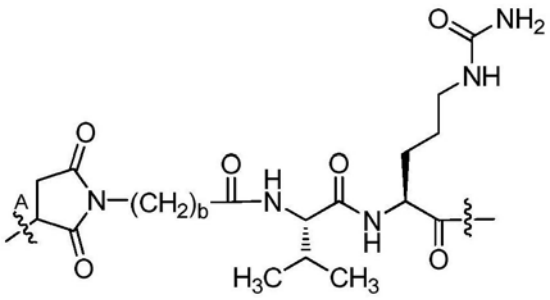


其中：

R^1在每次出现时独立地为卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、芳烷基、杂芳基、杂烷基、杂环烷基、氰基、硝基、  、或叠氮基；

其中q是从0至5的整数；和

L是：



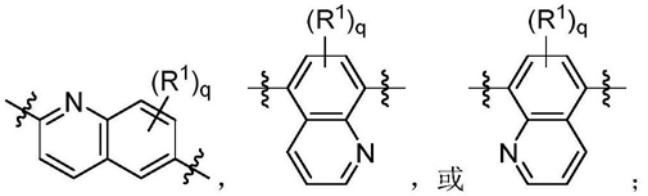
其中：

 是与所述结合剂连接的键；和

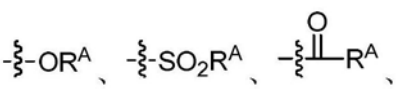
b是从2至8的整数。

[0223] 在一些实施方案，

A是：

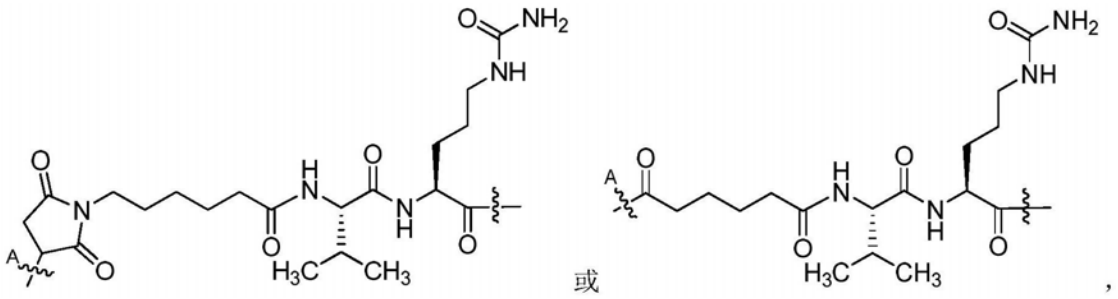


其中：

R^1在每次出现时独立地为卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、芳烷基、杂芳基、杂烷基、杂环烷基、氰基、硝基、  、或叠氮基；和

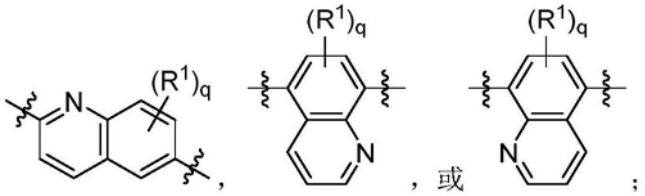
q是从0至5的整数；和

L是：



其中，$-\overset{A}{\sim}-$是与所述结合剂连接的键。

[0224] 在一些实施方案，A是：

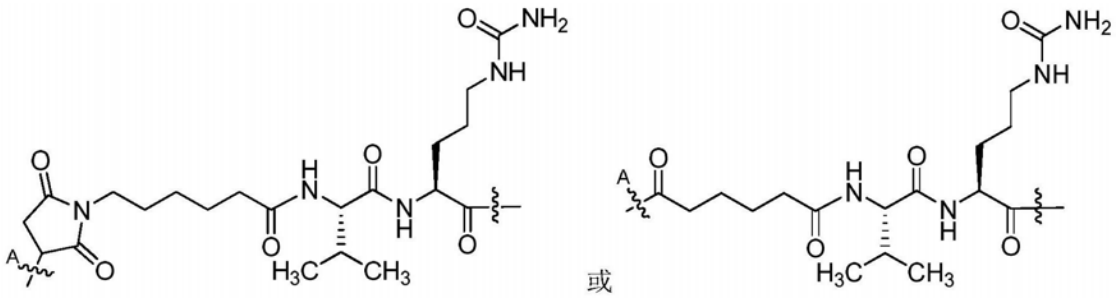


其中：

R^1在每次出现时独立地为卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、芳烷基、杂芳基、杂烷基、杂环烷基、氰基、硝基、$-\overset{}{\sim}-OR^A$、$-\overset{}{\sim}-SO_2R^A$、$-\overset{O}{\overset{\|}{\sim}}-R^A$、或叠氮基；

其中q是从0至5的整数；

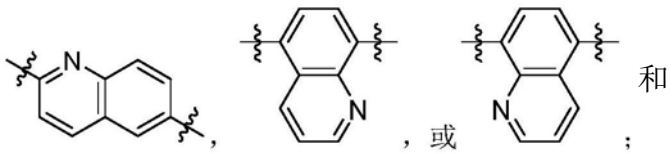
L是：



其中，$-\overset{A}{\sim}-$是与所述结合剂连接的键。

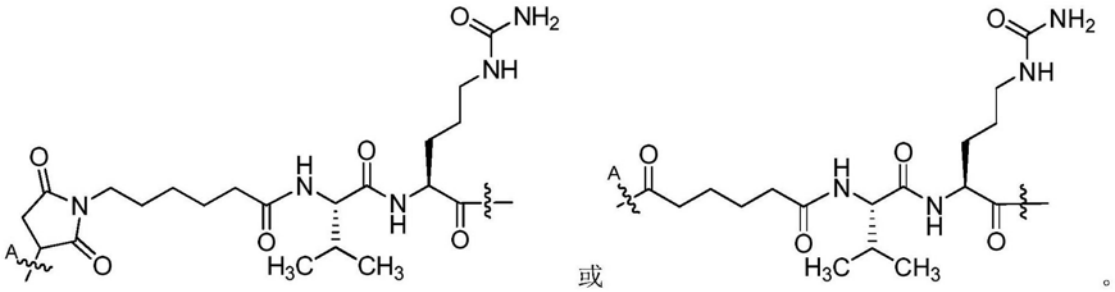
[0225] 在一些实施方案，

A是：

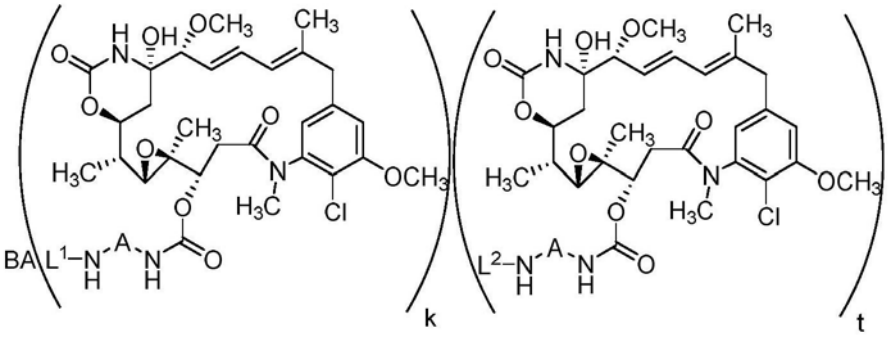


和

L是：

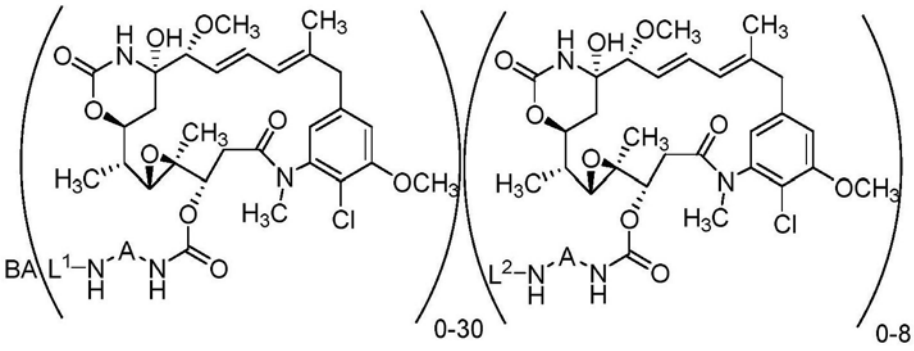


在一些实施方案，式I所示化合物是：



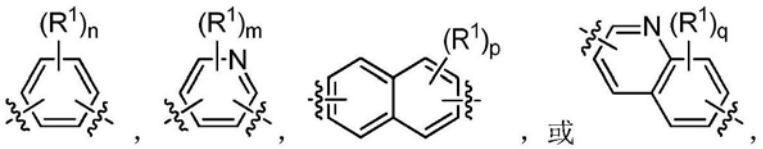
其中，A是亚芳基或亚杂芳基，L^1和L^2均为连接体，BA是结合剂，k是从0至30的整数，和t是从0至8的整数。在所述这些实施方案中的一些，L^1是通过赖氨酸残基与所述BA连接的连接体。在所述这些实施方案中的一些，所述下标k表示连接体L^1的个数，连接体L^1通过所述BA上赖氨酸残基与所述BA连接。在所述这些实施方案中的一些，L^2是通过半胱氨酸残基与所述BA连接的连接体。在所述这些实施方案中的一些，所述下标t表示连接体L^2的个数，连接体L^2通过所述BA上半胱氨酸残基与所述BA连接。在一些实施方案，当所述连接体L^2为单配位基连接体，则t是从0至8的整数。在一些实施方案，当所述连接体L^2为双配位基连接体，则t是从0至4的整数。在所述这些实施例中的一些，k+t的和等于1-8。

[0226] 在一些实施方案，式I所示化合物是：

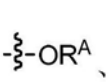
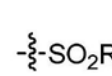
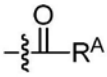


其中，A是亚芳基或亚杂芳基，L^1和L^2均为连接体，和BA是结合剂。在所述这些实施方案中的一些，L^1是通过赖氨酸残基与所述BA连接的连接体。在所述这些实施方案中的一些，L^2是通过半胱氨酸残基与所述BA连接的连接体。

[0227] 在一些实施方案，A是：



其中：

R^1在每次出现时独立地为卤素、卤代烷基、卤代烷氧基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、芳烷基、杂烷基、杂芳基、杂环烷基、氰基、硝基、  、  、  、或叠氮基，

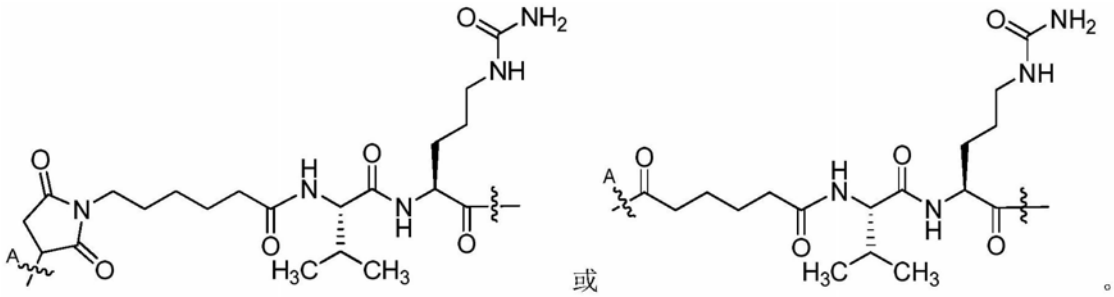
其中R^A是烷基；

m是从0至3的整数；

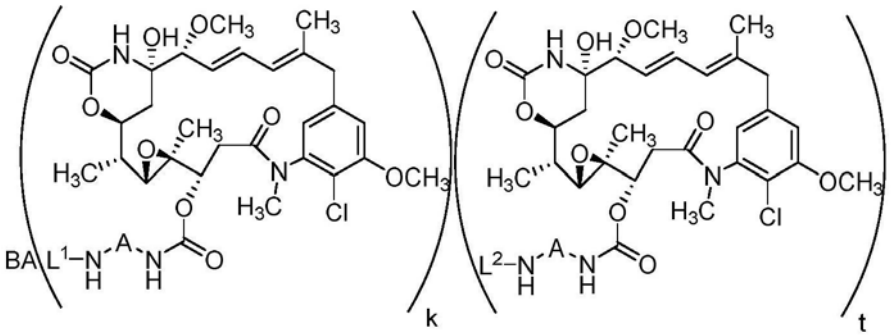
p是从0至6的整数；和

q是从0至5的整数；

L是：

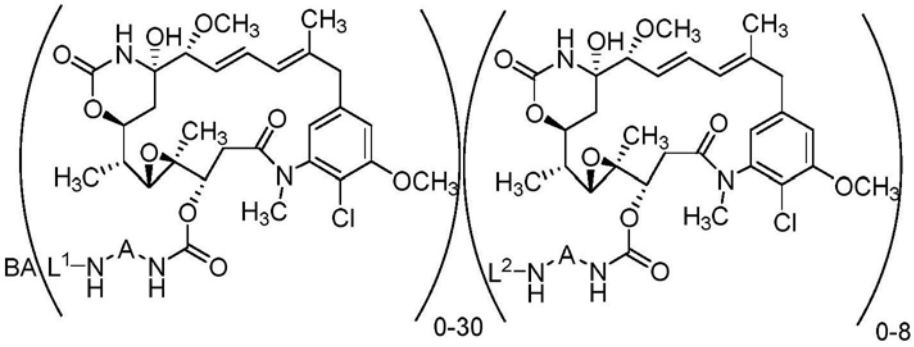


在一些实施方案，式I所示化合物是：



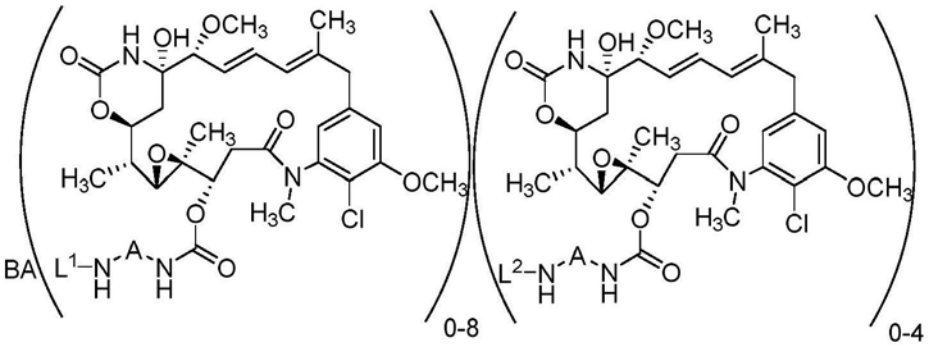
其中，A是亚芳基或亚杂芳基，L^1和L^2均为连接体，BA是结合剂，k是从0至30的整数，和t是从0至8的整数。在所述这些实施方案中的一些，L^1是通过赖氨酸残基与所述BA连接的连接体。在所述这些实施方案中的一些，所述下标k表示连接体L^1的个数，连接体L^1通过所述BA上赖氨酸残基与所述BA连接。在所述这些实施方案中的一些，L^2是通过半胱氨酸残基与所述BA连接的连接体。在所述这些实施方案中的一些，所述下标t表示连接体L^2的个数，连接体L^2通过所述BA上半胱氨酸残基与所述BA连接。在一些实施方案，当所述连接体L^2为单配位基连接体，则t是从0至8的整数。在一些实施方案，当所述连接体L^2为双配位基连接体，则t是从0至4的整数。在所述这些实施例中的一些，k+t的和等于1-8。

[0228] 在一些实施方案，式I所示化合物是：



其中，A是亚芳基或亚杂芳基，L^1和L^2均为连接体，和BA是结合剂。在所述这些实施方案中的一些，L^1是通过赖氨酸残基与所述BA连接的连接体。在所述这些实施方案中的一些，L^2是通过半胱氨酸残基与所述BA连接的连接体。

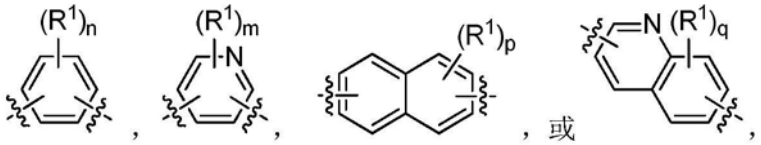
[0229] 在一些实施方案，式I所示化合物是：



其中，A是亚芳基或亚杂芳基，L^1和L^2均为连接体，和BA是结合剂。在所述这些实施方案中的一些，L^1是通过赖氨酸残基与所述BA连接的连接体。在所述这些实施方案中的一些，L^2是通过半胱氨酸残基与所述BA连接的连接体。

[0230] 在一些实施方案，

A是：



其中：

R^1在每次出现时独立地为卤素、卤代烷基、卤代烷氧基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、芳烷基、杂烷基、杂芳基、杂环烷基、氰基、硝基、  或叠氮基，

其中R^A是烷基；

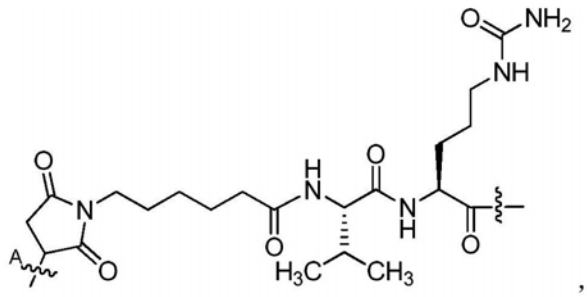
n是从0至4的整数；

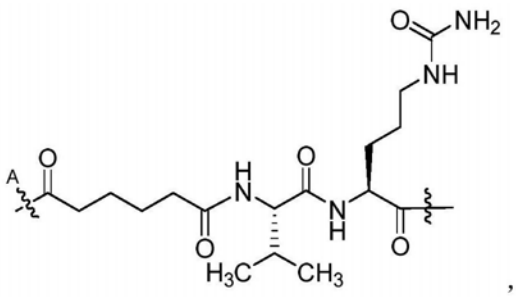
m是从0至3的整数；

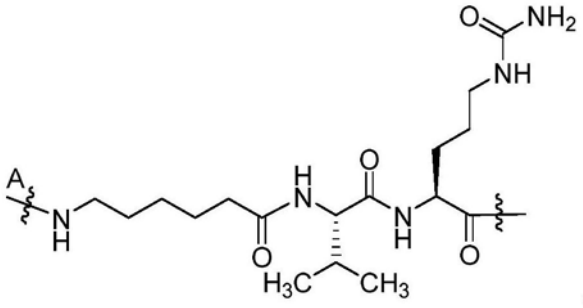
p是从0至6的整数；和

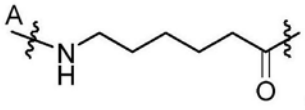
q是从0至5的整数；

L是：

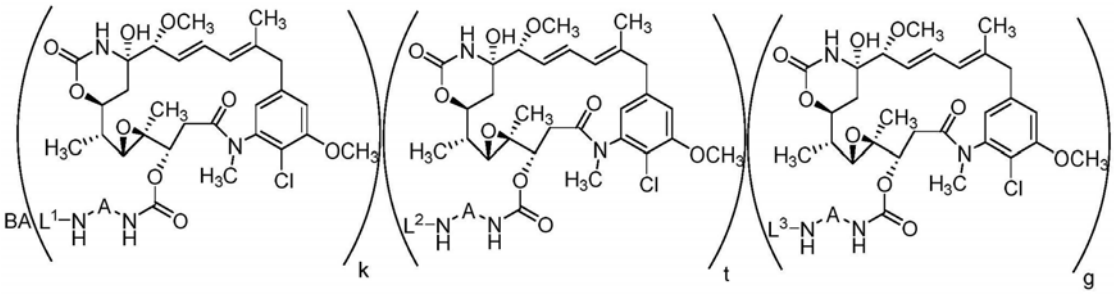

，


，


，或

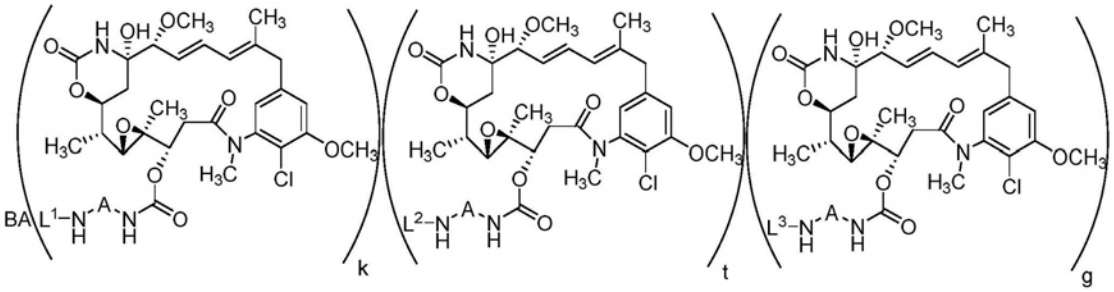

。

在一些实施方案，式I所示化合物是：



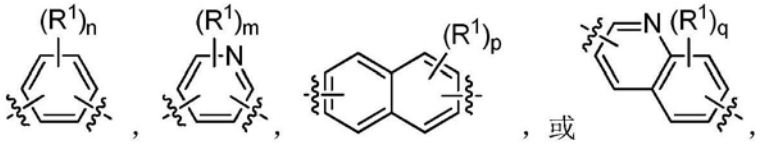
其中，A是亚芳基或亚杂芳基，L^1、L^2和L^3均为连接体，BA是结合剂，k是从0至30的整数，和t是从0至8的整数，和g是从0至4的整数。在所述这些实施方案中的一些，L^1是通过赖氨酸残基与所述BA连接的连接体。在所述这些实施方案中的一些，所述下标k表示连接体L^1的个数，连接体L^1通过所述BA上赖氨酸残基与所述BA连接。在所述这些实施方案中的一些，L^2是通过半胱氨酸残基与所述BA连接的连接体。在所述这些实施方案中的一些，所述下标t表示连接体L^2的个数，连接体L^2通过所述BA上半胱氨酸残基与所述BA连接。在一些实施方案，当所述连接体L^2为单配位基连接体，则t是从0至8的整数。在一些实施方案，当所述连接体L^2为双配位基连接体，则t是从0至4的整数。在所述这些实施例中的一些，k+t的和等于1-8。在所述这些实施方案中的一些，L^3是通过谷氨酰胺残基与所述BA连接的连接体。在所述这些实施方案中的一些，所述下标g表示连接体L^3的个数，连接体L^3通过所述BA上谷氨酰胺残基与所述BA连接。

[0231] 在一些实施方案，式I所示化合物是：



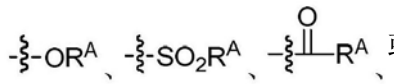
其中，A是亚芳基或亚杂芳基，L^1、L^2和L^3均为连接体，BA是结合剂。在所述这些实施方案中的一些，L^1是通过赖氨酸残基与所述BA连接的连接体。在所述这些实施方案中的一些，L^2是通过半胱氨酸残基与所述BA连接的连接体。在所述这些实施方案中的一些，L^3是通过谷氨酰胺残基与所述BA连接的连接体。

[0232] 在一些实施方案，A是：



其中：

R^1在每次出现时独立地为卤素、卤代烷基、卤代烷氧基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、卤代烷氧基、芳基、烷芳基、芳烷基、杂芳基、杂烷基、杂环烷基、氰基、硝基、



或叠氮基，

其中R^A是烷基；

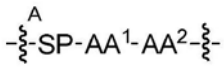
n是从0至4的整数；

m是从0至3的整数；

p是从0至6的整数；和

q是从0至5的整数。

[0233] 在一些实施方案，所述连接体是：



其中：

SP是间隔基团；



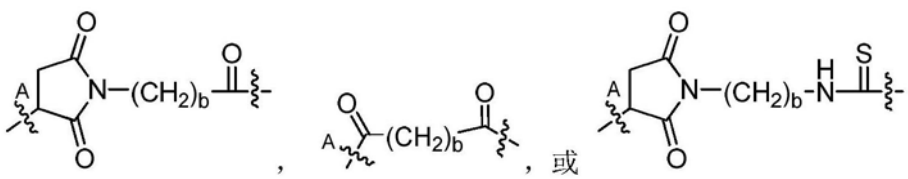
是与所述结合剂连接的一个或多个键；

AA^1是氨基酸；和

AA^2是氨基酸。

[0234] 所述间隔基团是使所述AA^1-AA^2部分连接至所述结合剂(BA)上的二价基团部分。合适的间隔基团包括，但不限于，包含亚烷基或聚乙二醇的那些。间隔基团的末端，即直接与所述结合剂或AA^1连接的间隔基团的部分，可以是衍生自活性部分的基团部分，所述活性部分用于在偶联物的化学合成过程中，使抗体或AA^1连接至间隔基团的目的。

[0235] 在一些实施方案，所述间隔基团包含亚烷基。在一些实施方案，所述间隔基团包含C_{5-7}亚烷基。在一些实施方案，所述间隔基团是：



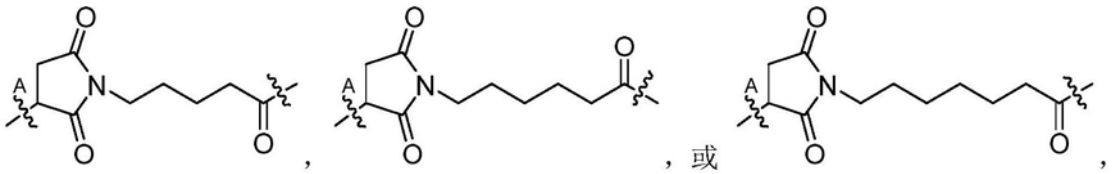
其中：



是与所述结合剂连接的键；和

b是从2至8的整数。

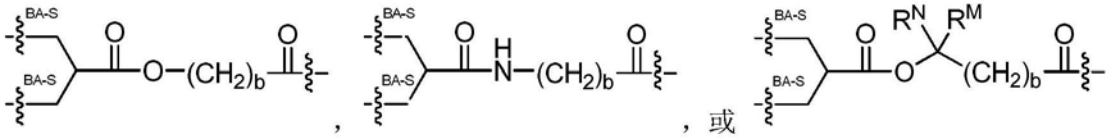
[0236] 在一些实施方案,所述间隔基团是:



其中:

 是与所述结合剂连接的键。

[0237] 在一些实施方案,所述间隔基团是:



其中:

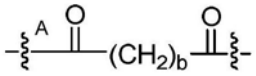
R^N是氢原子或烷基;

R^M是烷基;

由  表示的两个键均是与结合剂的半胱氨酸连接的键;和

b是从2至8的整数。

[0238] 在一些实施方案,所述间隔基团是:

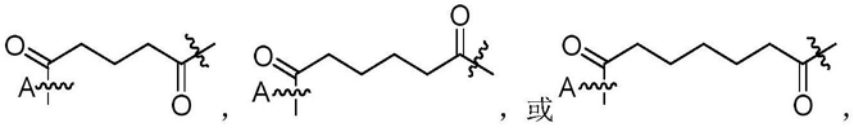


其中:

 是与所述结合剂连接的键;和

b是从2至8的整数。

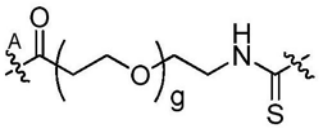
[0239] 在一些实施方案,所述间隔基团是:



其中:

 是与所述结合剂连接的键。

[0240] 在一些实施方案,所述间隔基团是:

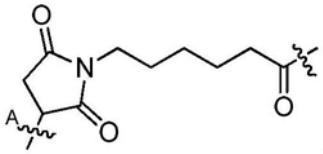


其中:

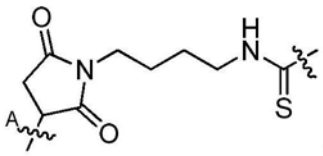
 是与所述结合剂连接的键;和

g是从2至20的整数。在一些实施方案,g是2-8。在一些实施方案,g是2、4、6、或8。

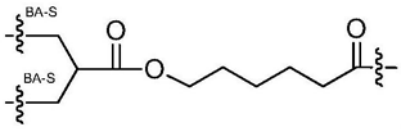
[0241] 在一些实施方案,所述间隔基团是:



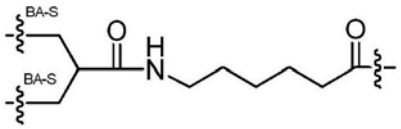
[0242] 在一些实施方案,所述间隔基团是:



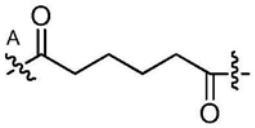
[0243] 在一些实施方案,所述间隔基团是:



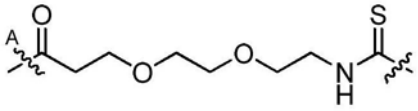
[0244] 在一些实施方案,所述间隔基团是:



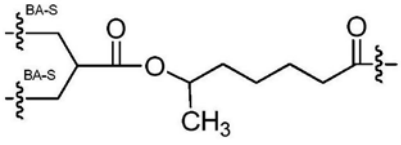
[0245] 在一些实施方案,所述间隔基团是:



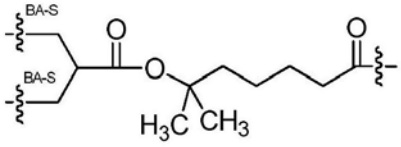
[0246] 在一些实施方案,所述间隔基团是:



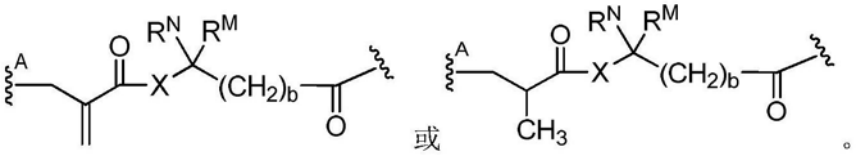
[0247] 在一些实施方案,所述间隔基团是:



[0248] 在一些实施方案,所述间隔基团是:



[0249] 在一些实施方案,所述间隔基团是:



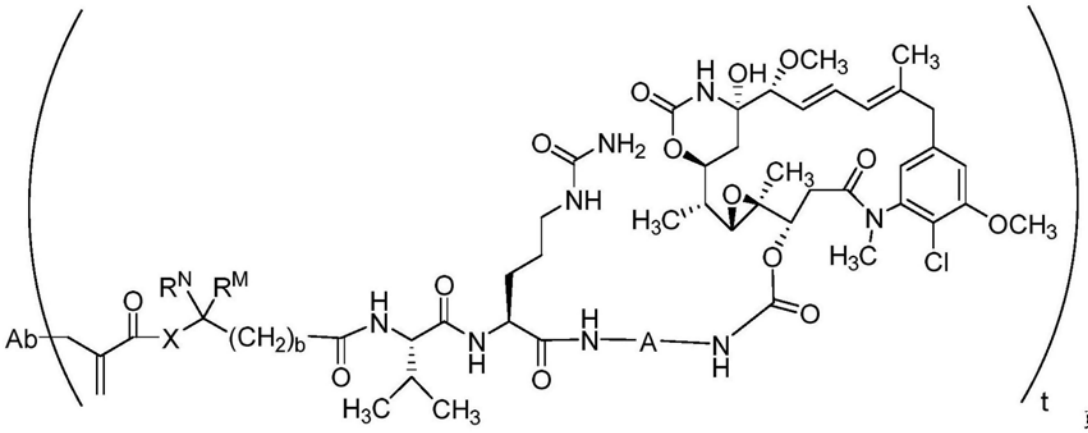
[0250] 其中，$\overset{A}{\sim}$是与所述结合剂连接的键；

X是N或O；R^N和R^M各自独立地为氢或烷基；和b是从1至8的整数。

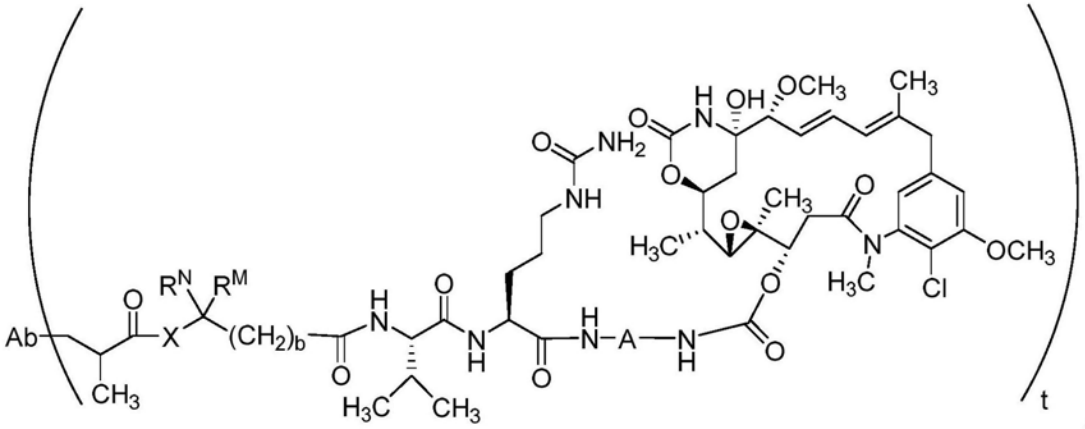
[0251] 在一些实施方案，AA^1-AA^2是：缬氨酸-瓜氨酸，瓜氨酸-缬氨酸，赖氨酸-苯丙氨酸，苯丙氨酸-赖氨酸，缬氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-缬氨酸，天冬酰胺-苏氨酸，苏氨酸-天冬酰胺，丝氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-丝氨酸，苯丙氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-苯丙氨酸，亮氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-亮氨酸，异亮氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-异亮氨酸，甘氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-甘氨酸，谷氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-谷氨酸，瓜氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-瓜氨酸，丙氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-丙氨酸，缬氨酸-丙氨酸，丙氨酸-缬氨酸，缬氨酸-甘氨酸，或甘氨酸-缬氨酸。

[0252] 在一些实施方案，AA^1-AA^2是：缬氨酸-瓜氨酸或瓜氨酸-缬氨酸。在一些实施方案，AA^1-AA^2是：缬氨酸-瓜氨酸。

[0253] 在一些实施方案，式I所示化合物是：



或



，

其中X是N或O，

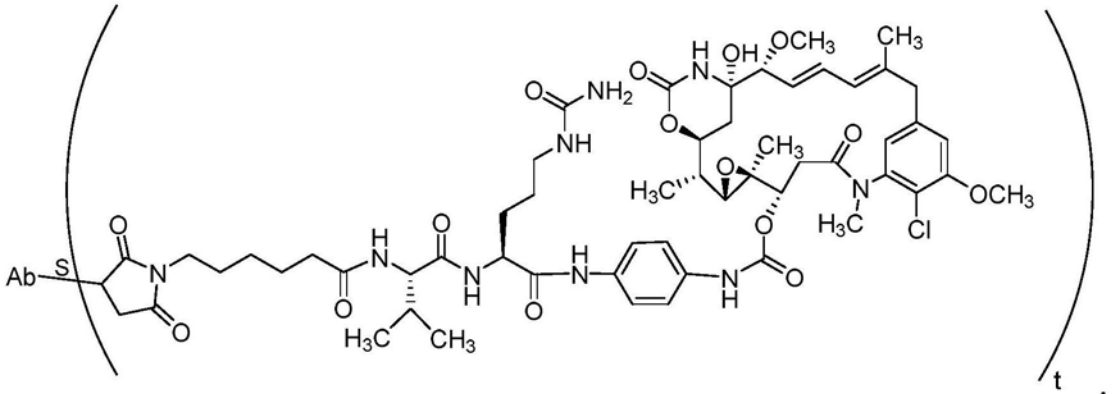
R^N和R^M各自独立地为氢或芳基，

b是从1至8的整数，

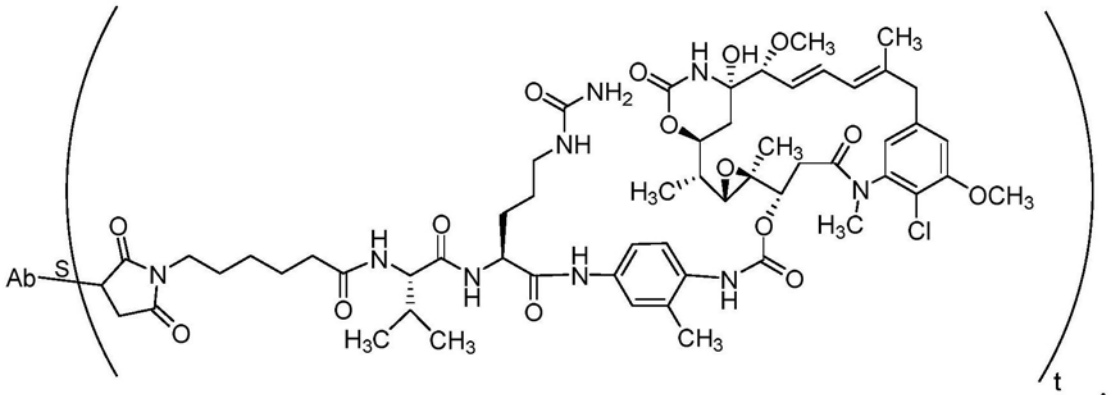
A是芳基或杂芳基，和

t是1-8的整数。

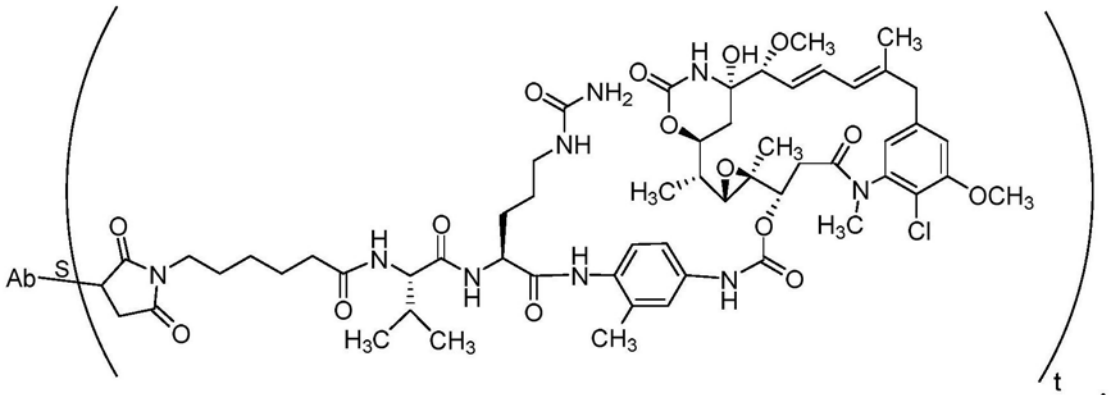
[0254] 在一些实施方案，式I所示化合物是：



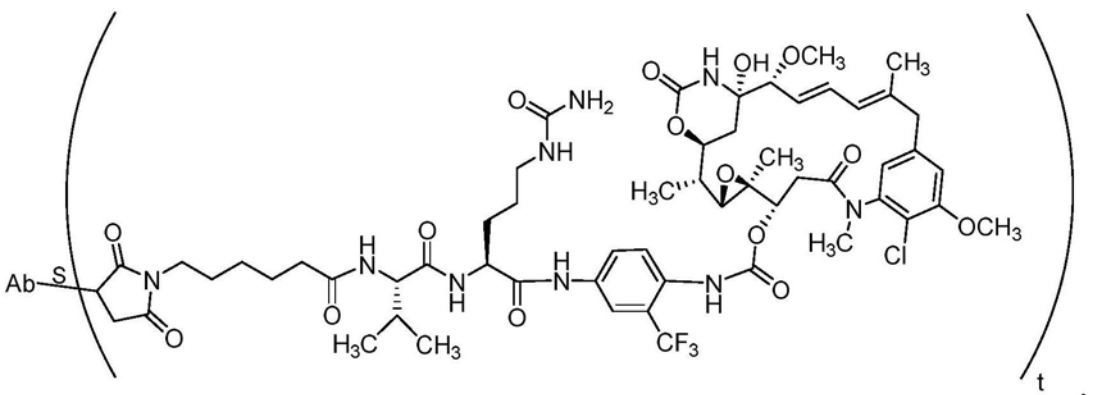
t ,



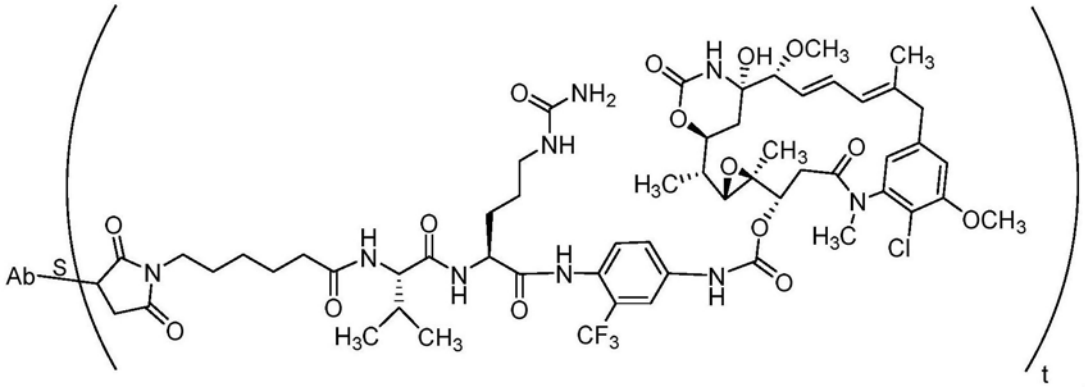
t ,



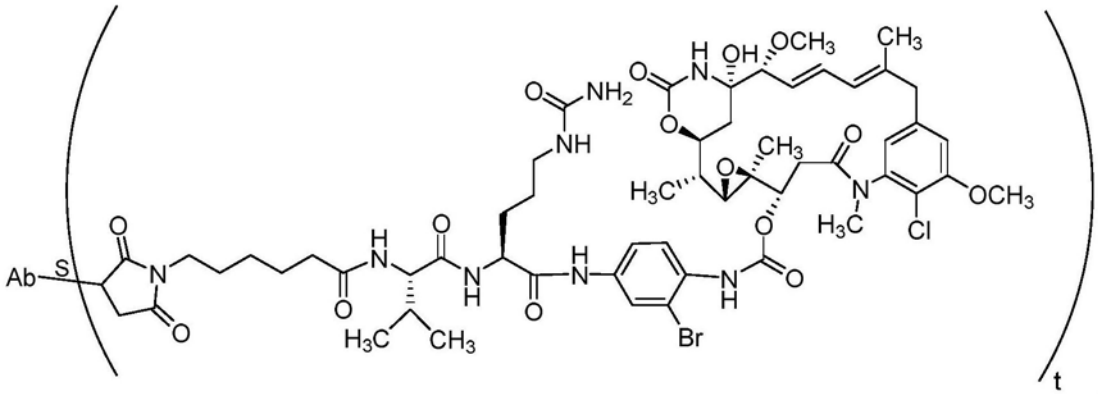
t ,



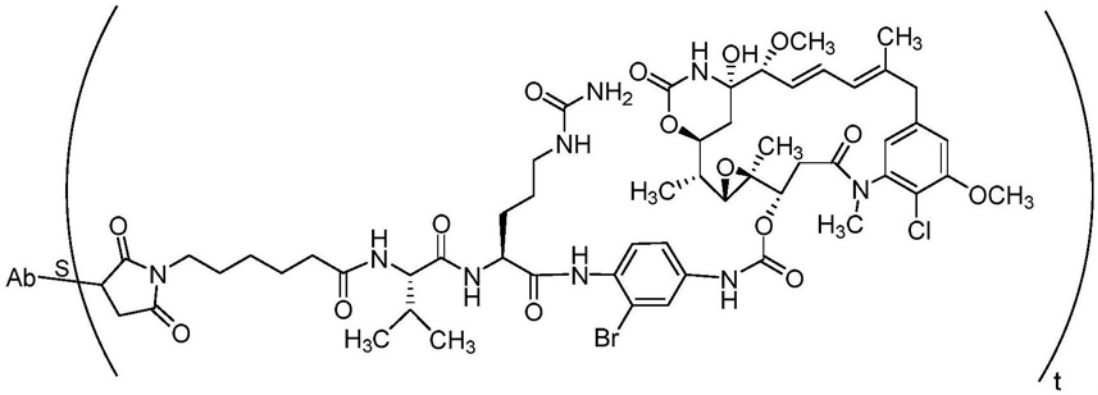
t ,



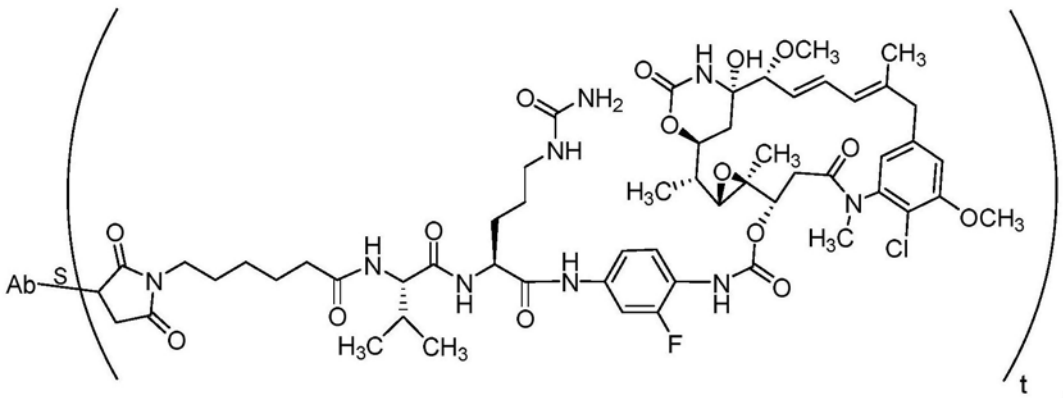
t ,



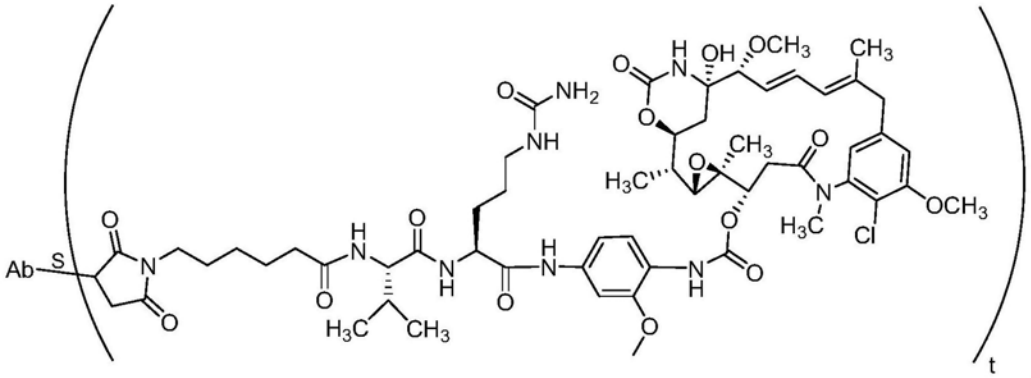
t ,



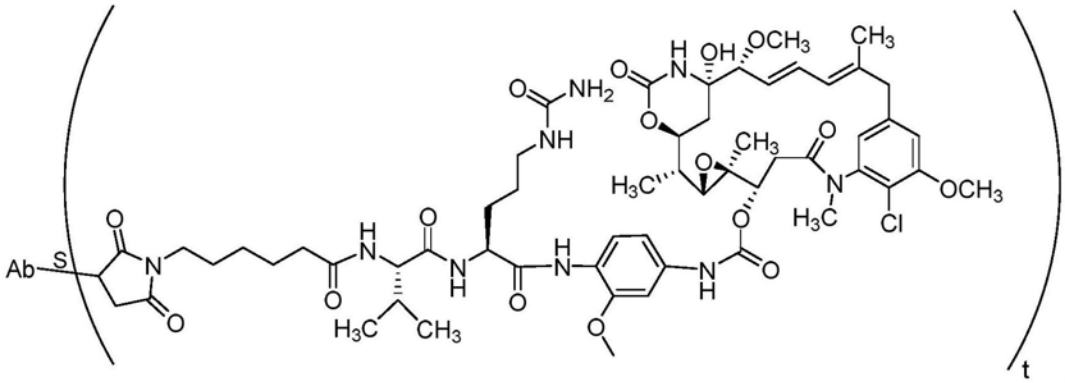
t ,



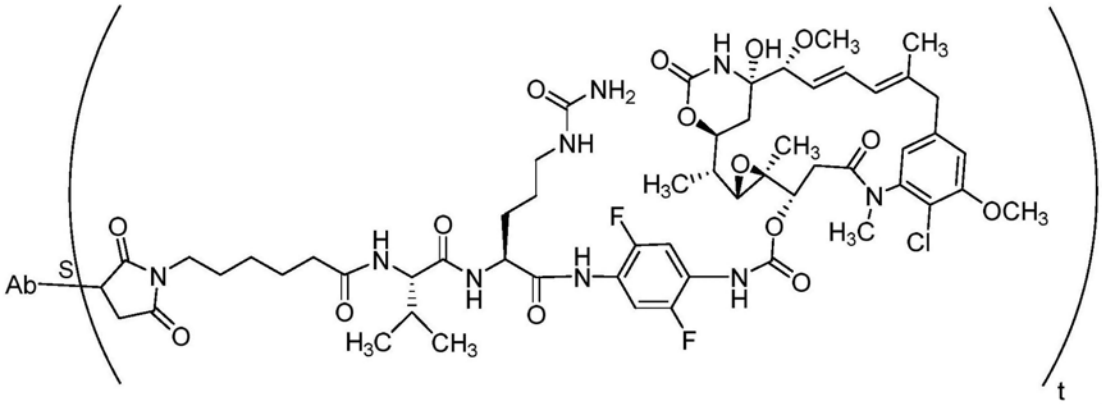
t ,



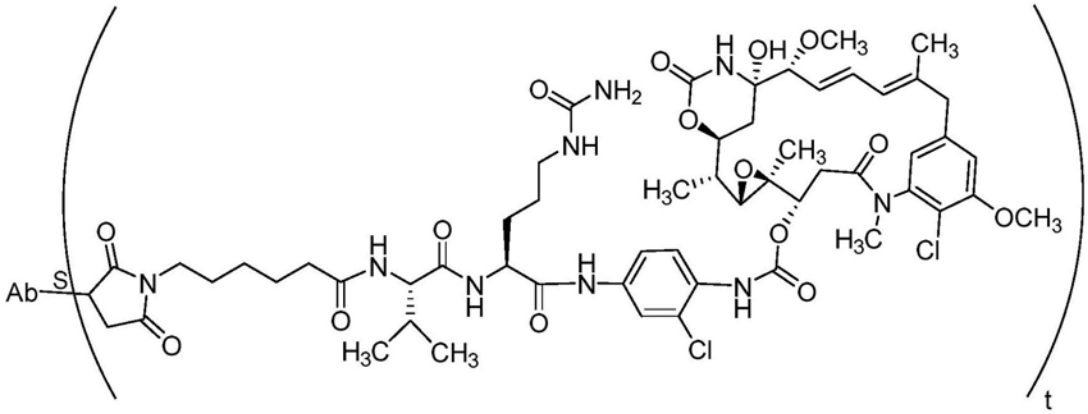
t ,



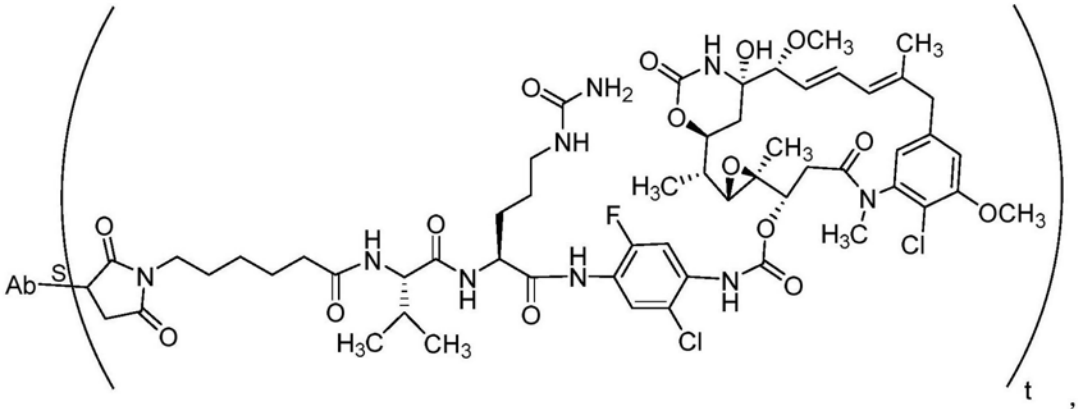
t ,



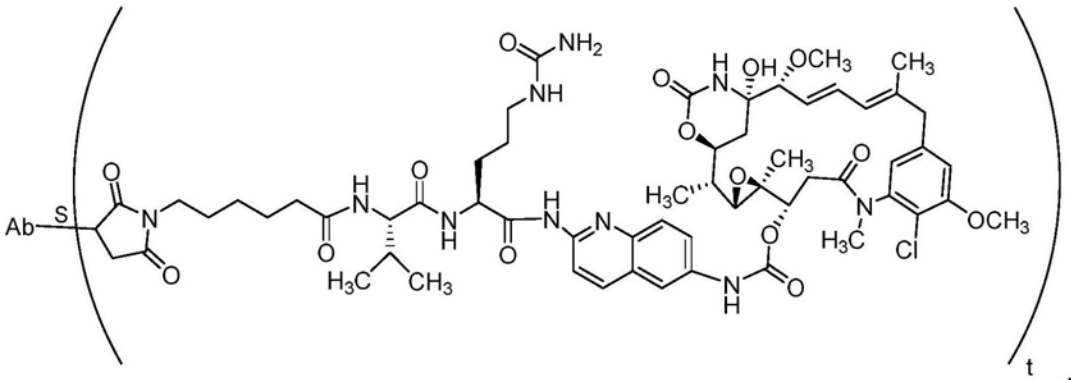
t ,



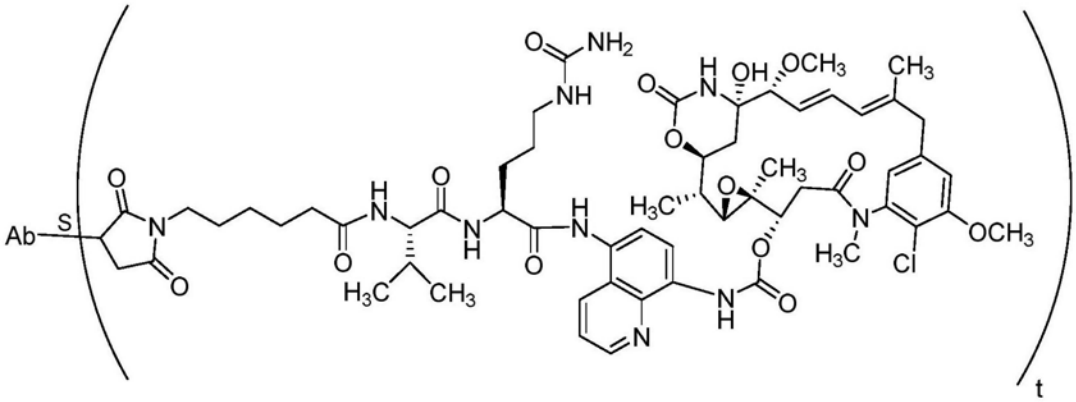
t ,



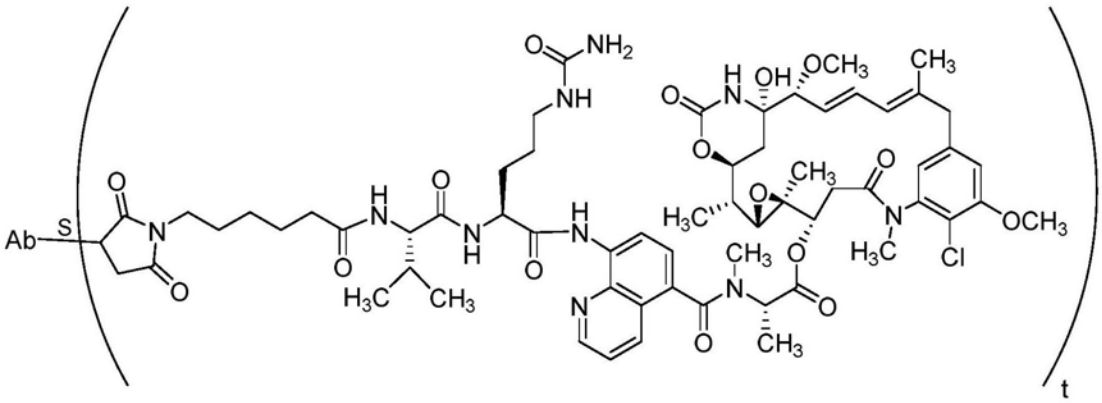
t ,



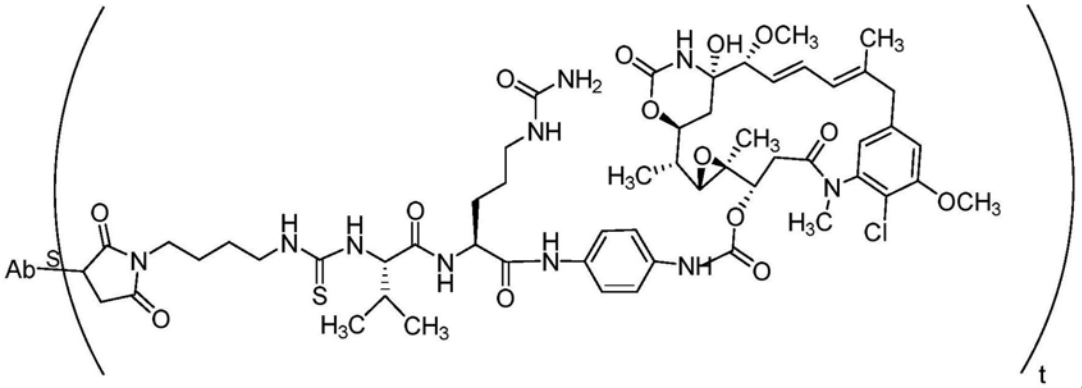
t ,



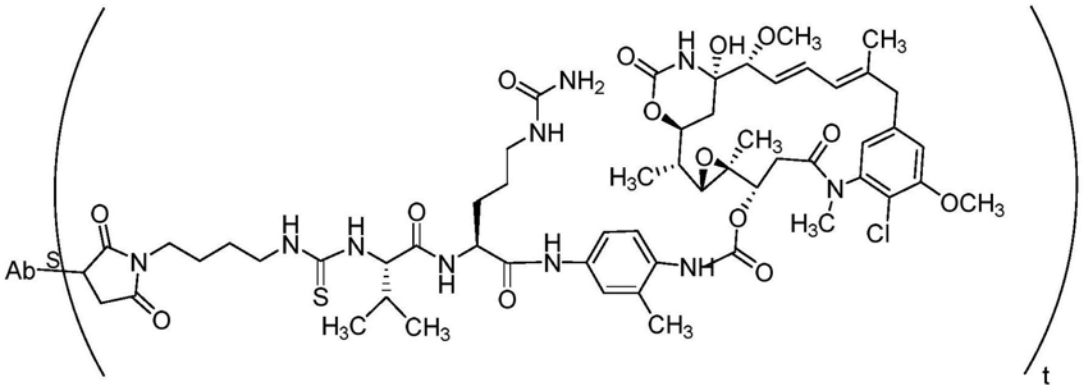
t ,



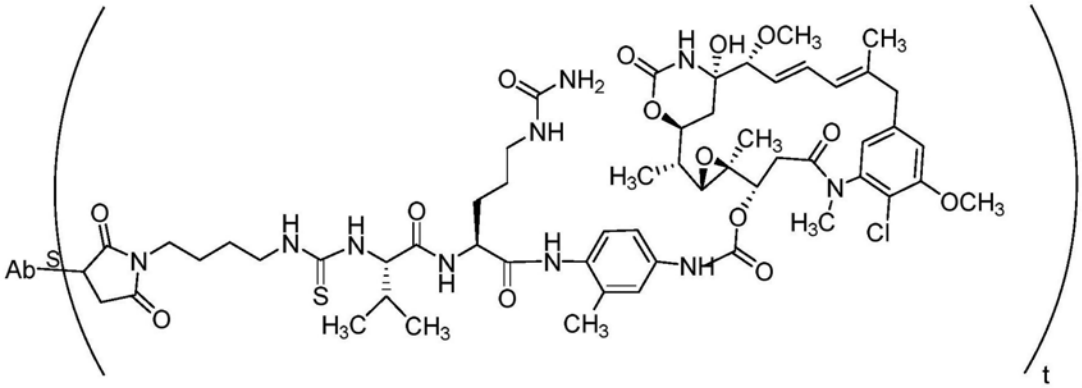
t ,



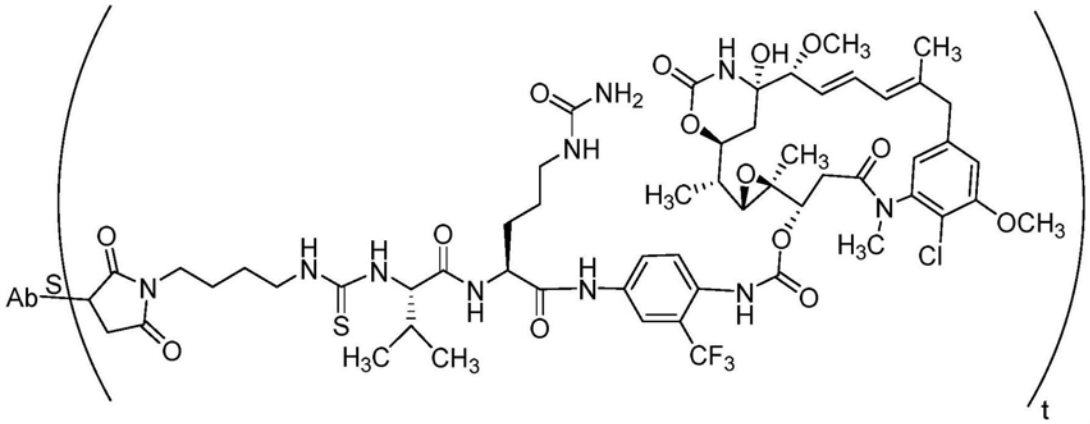
t ,



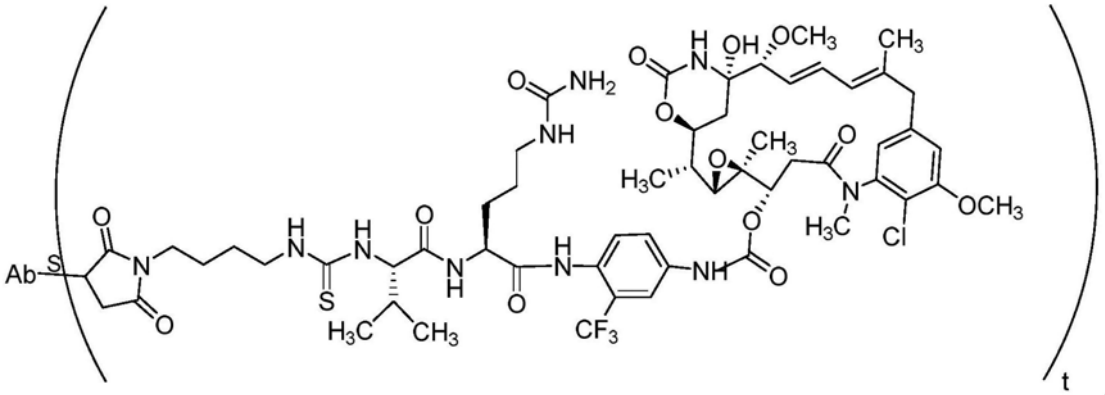
t ,



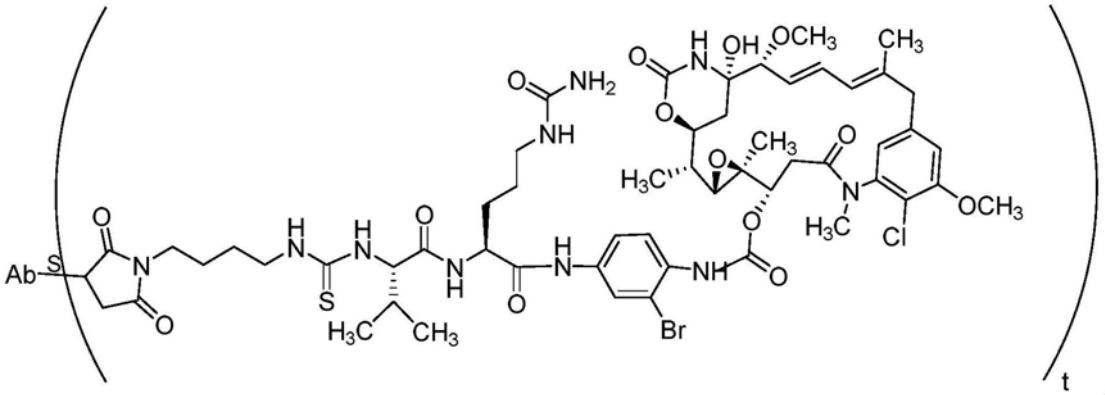
t ,



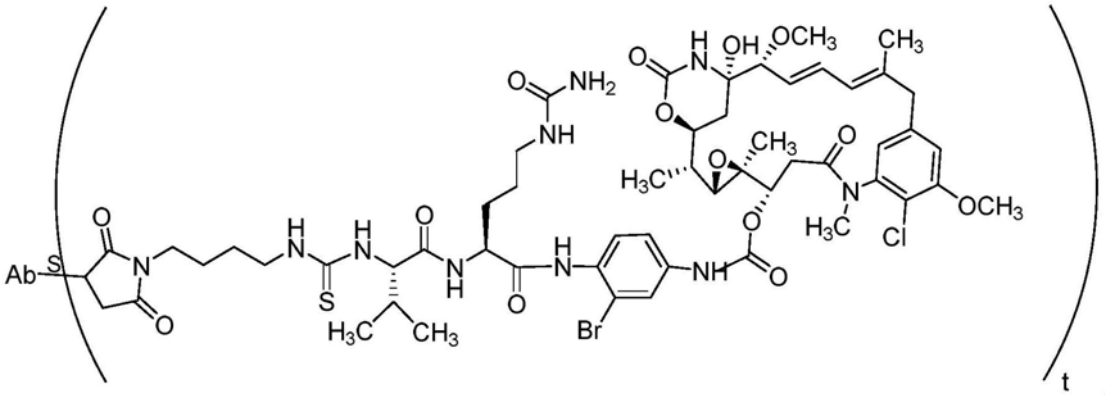
t ,



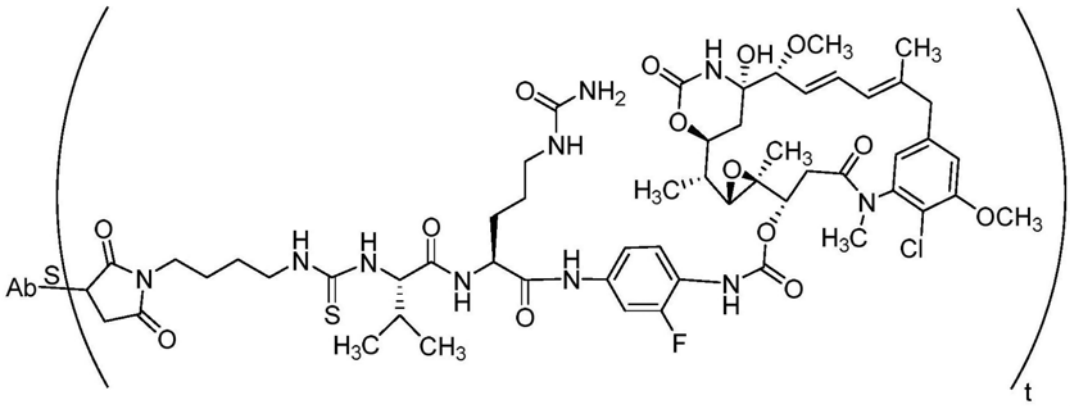
t ,



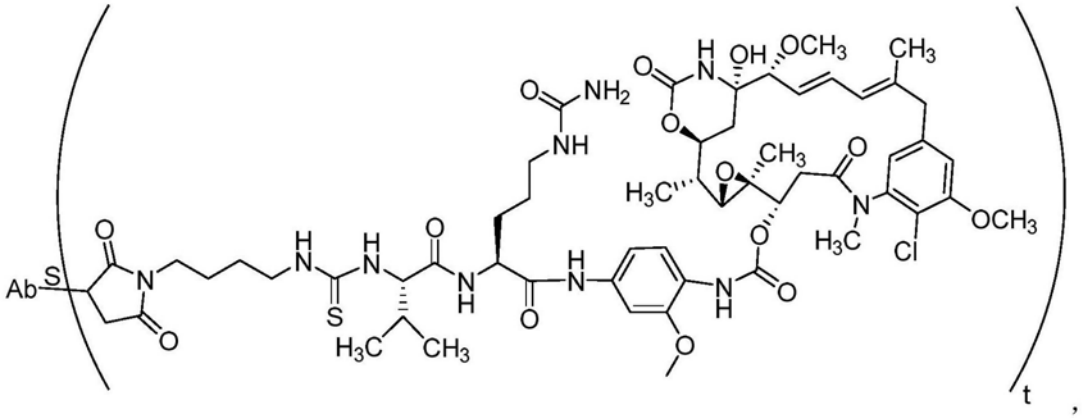
t ,



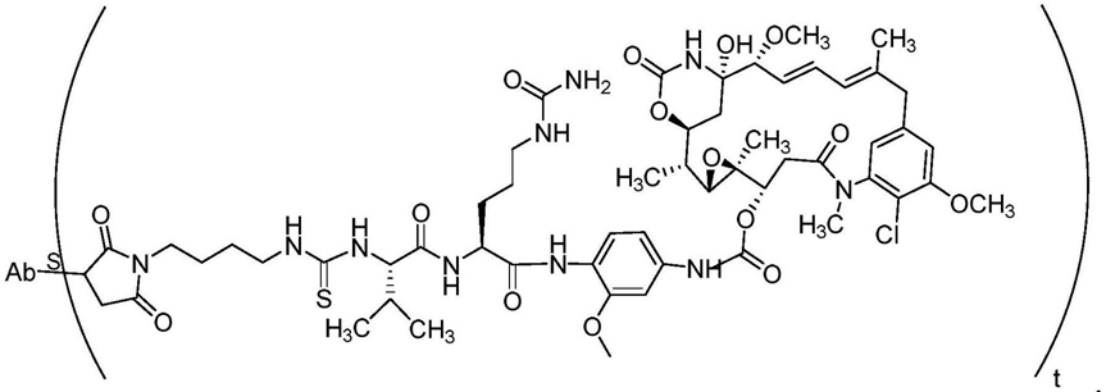
t ,



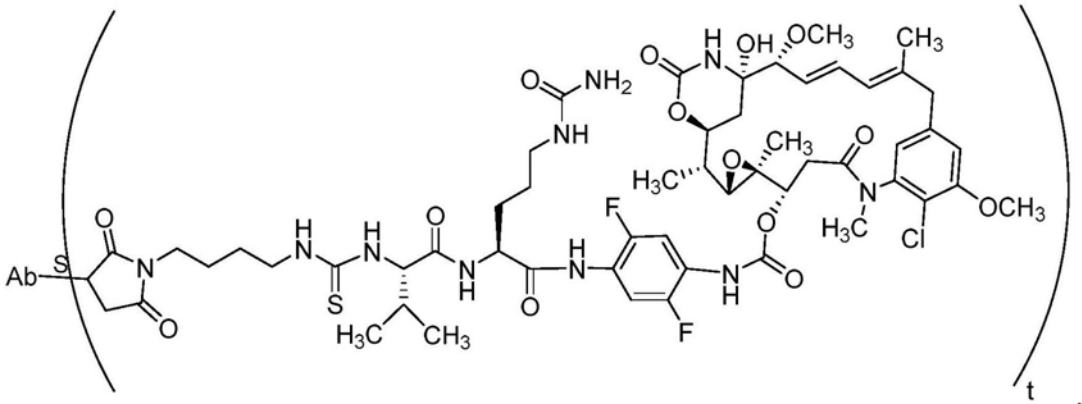
t ,



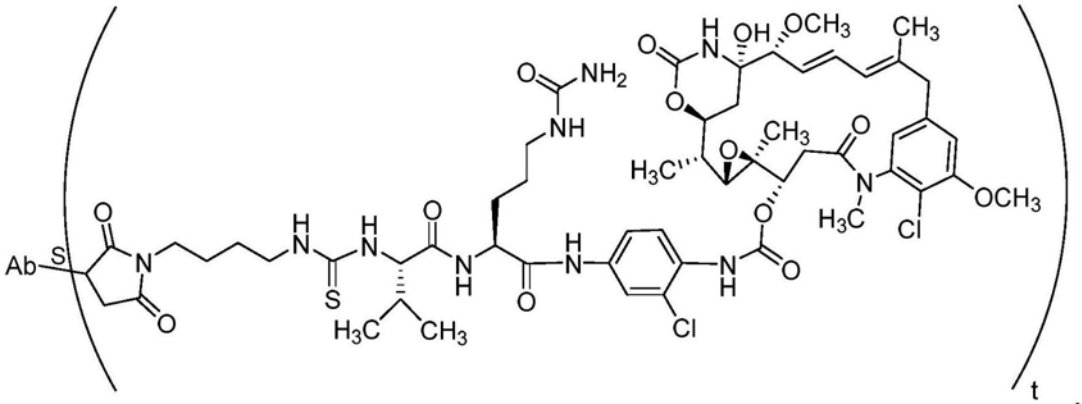
t ,



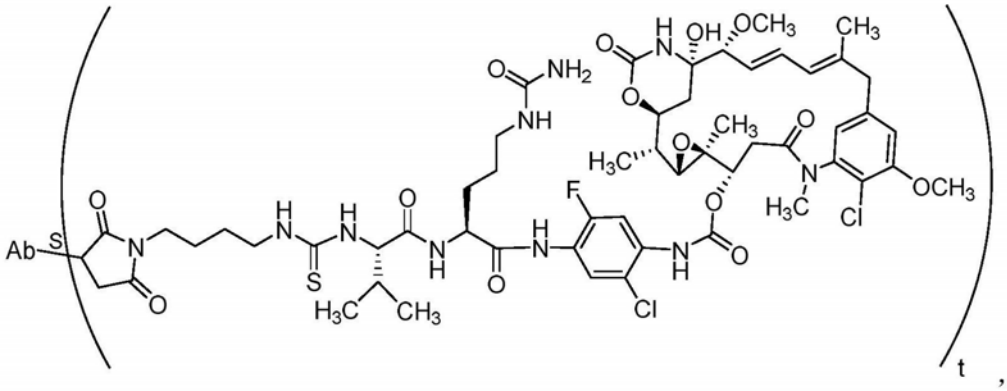
t ,



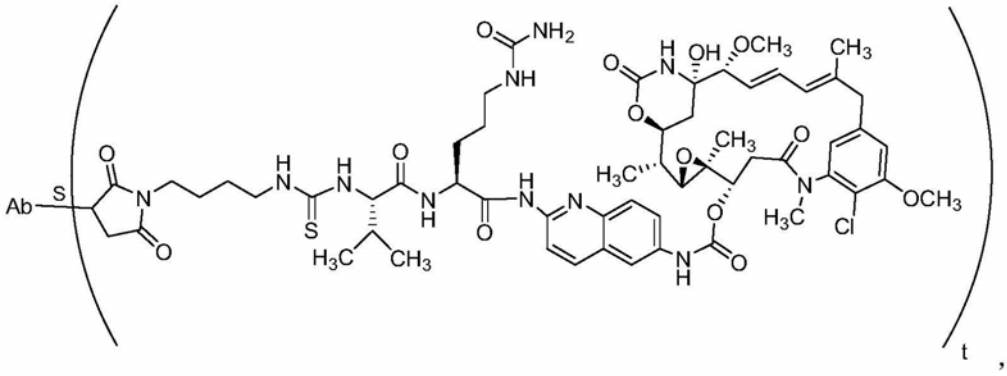
t ,



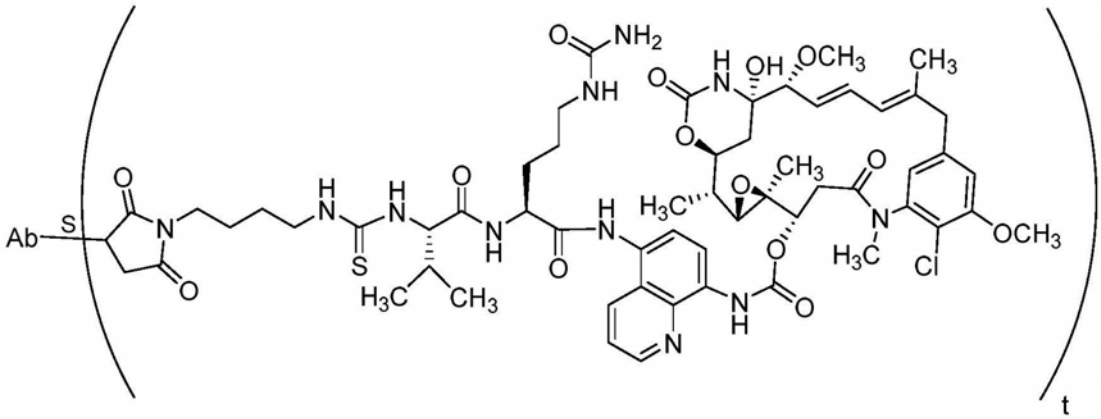
t ,



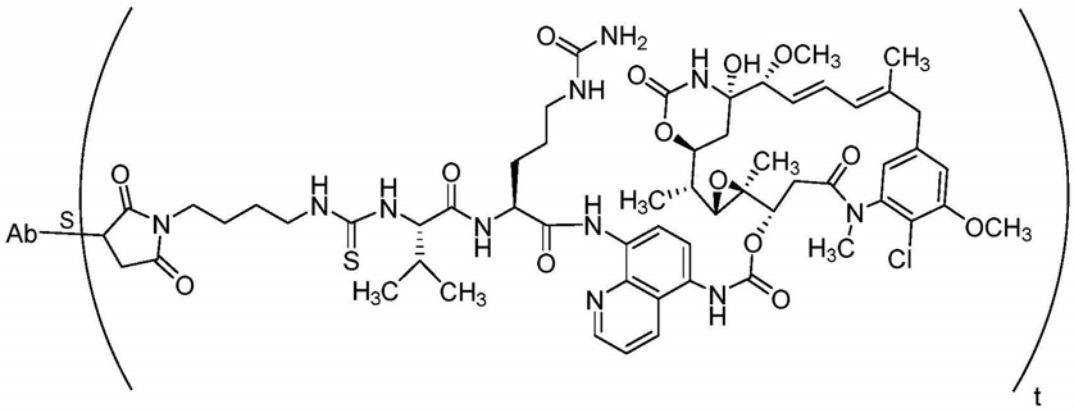
t ,



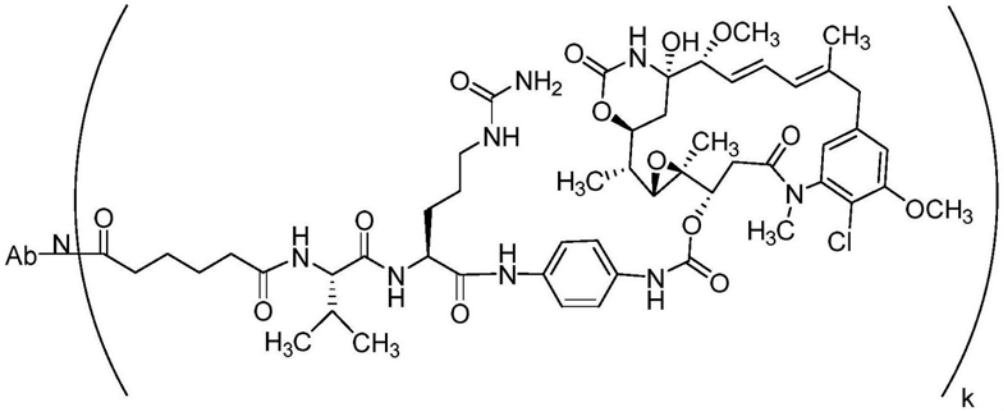
t ,



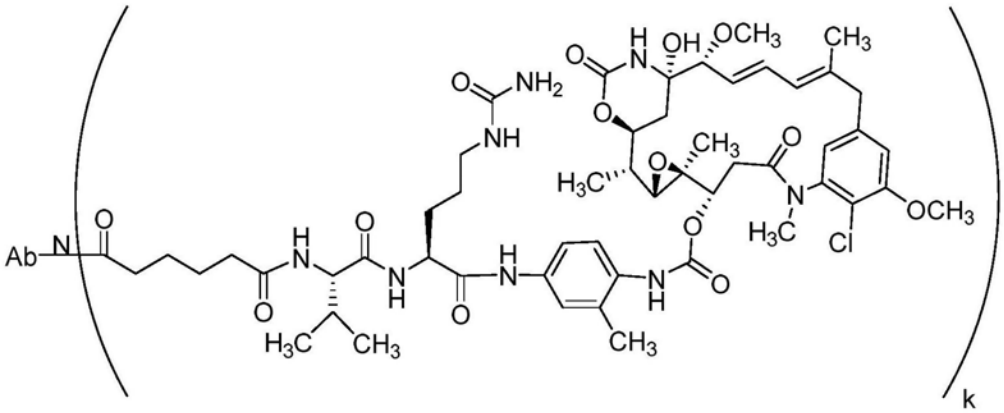
t ,



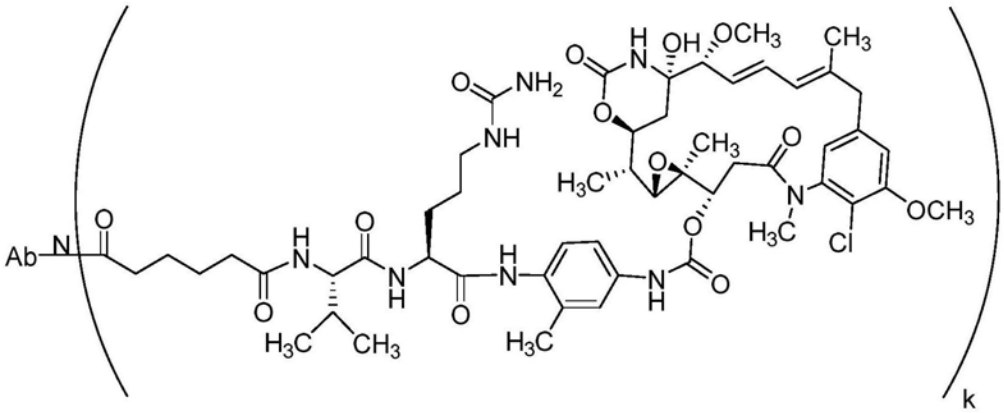
t ,



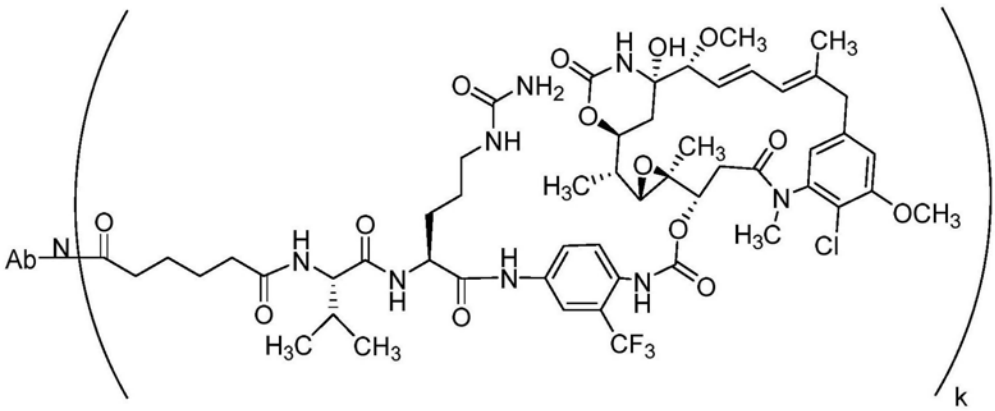
,



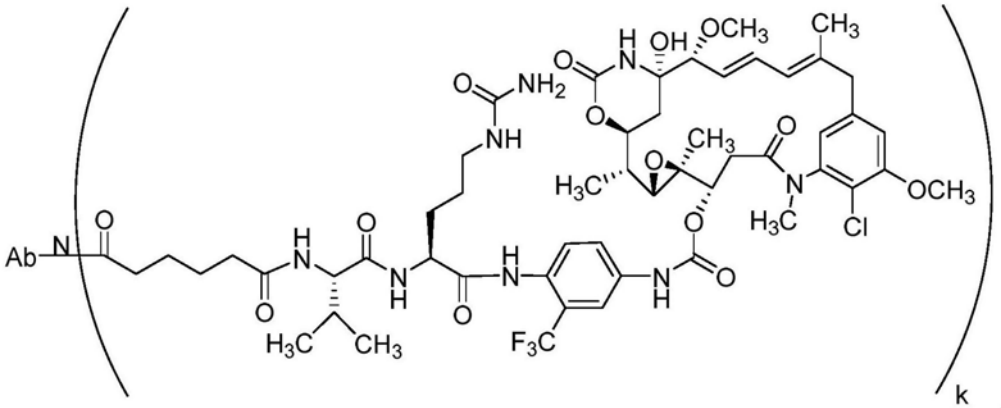
,



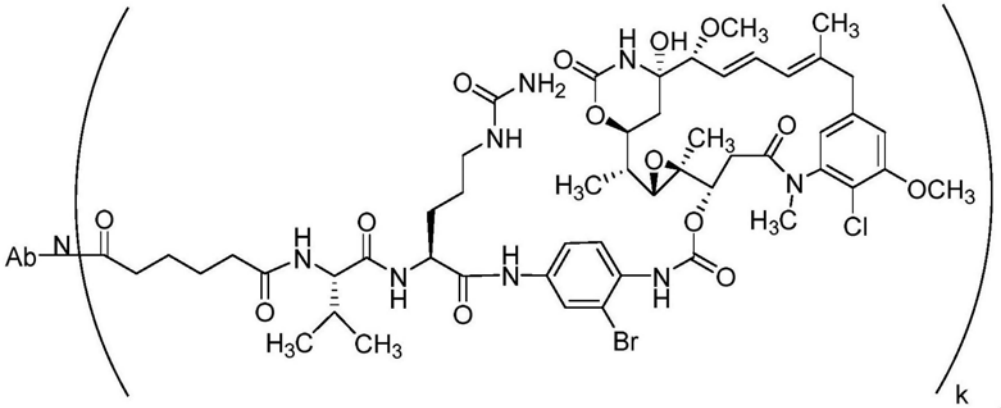
,



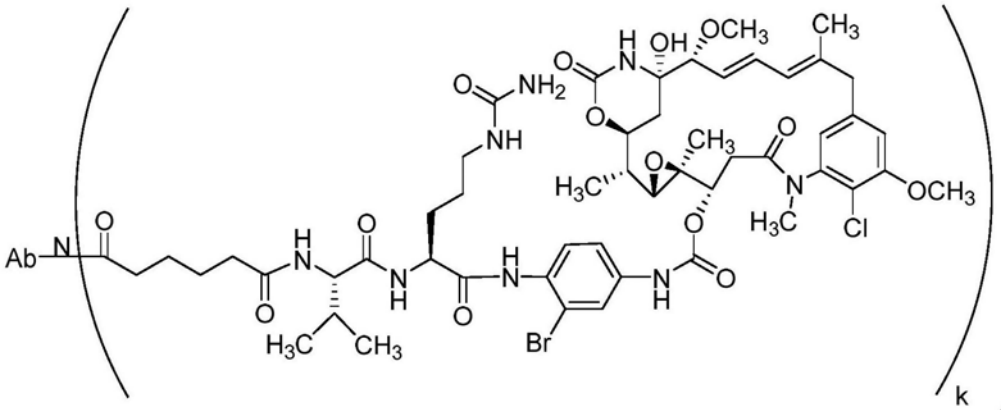
,



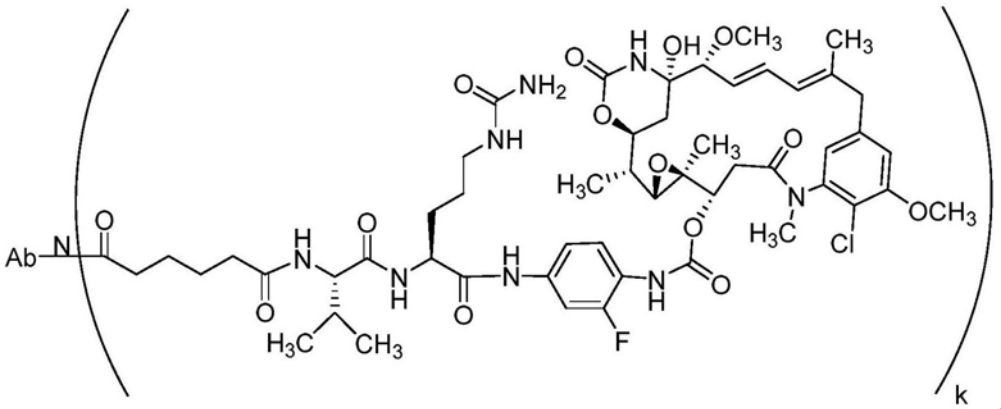
,



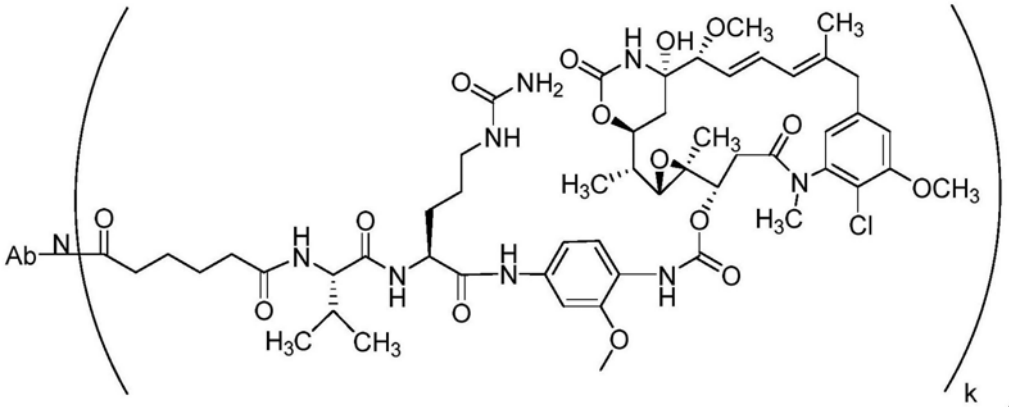
,



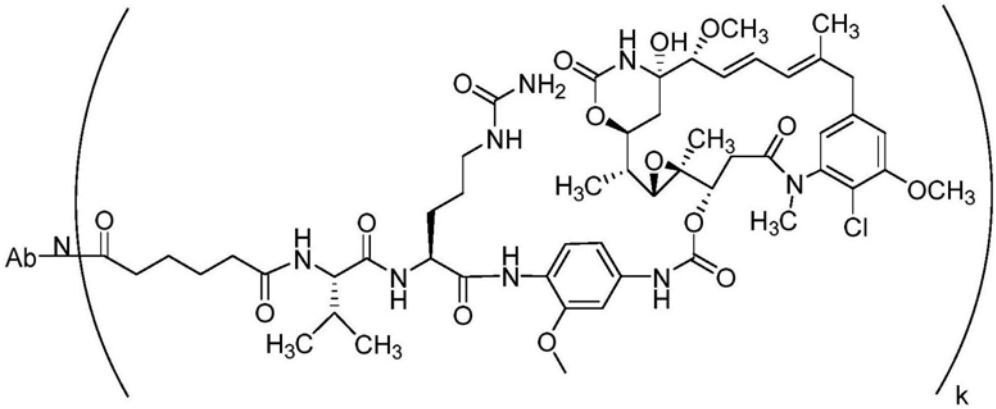
,



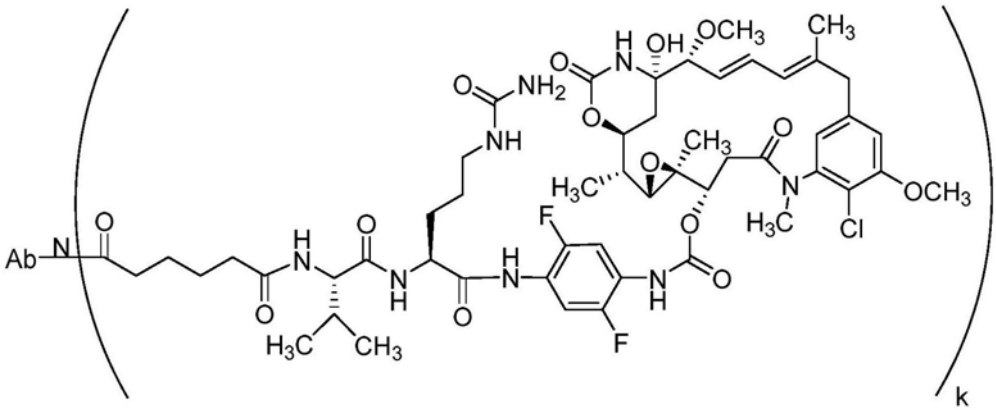
,



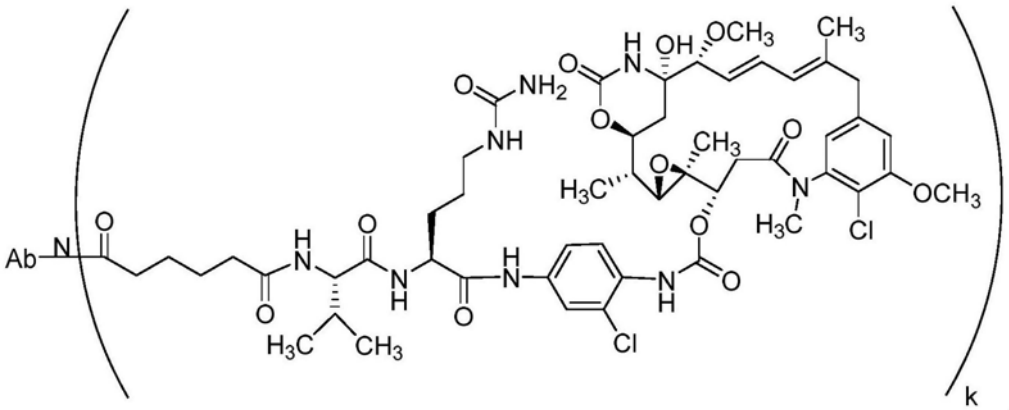
,



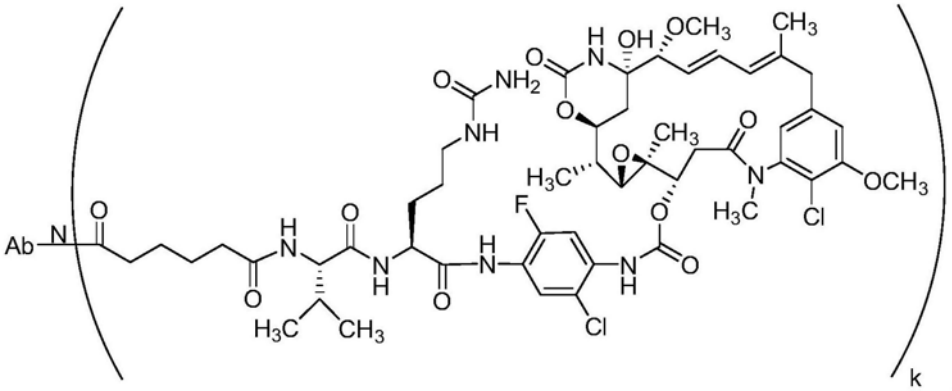
,

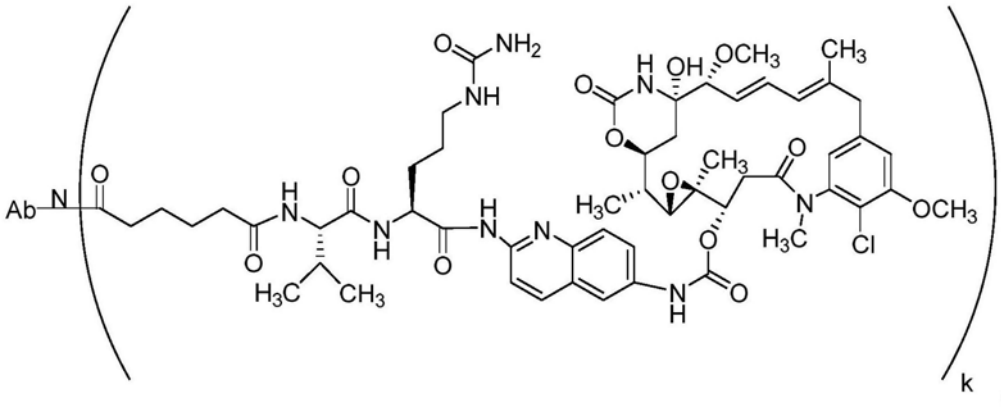


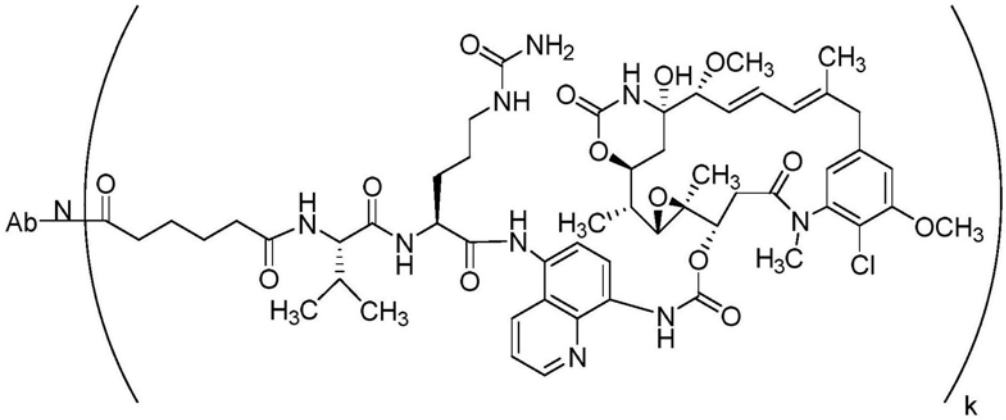
,

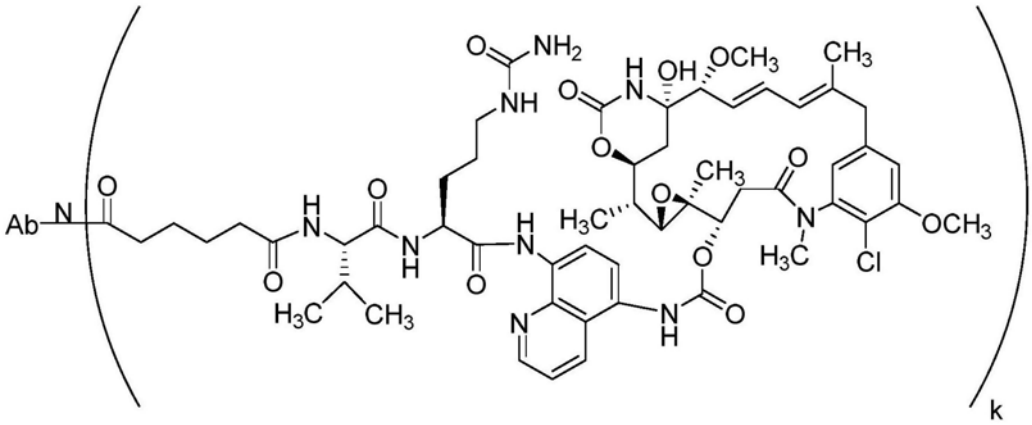


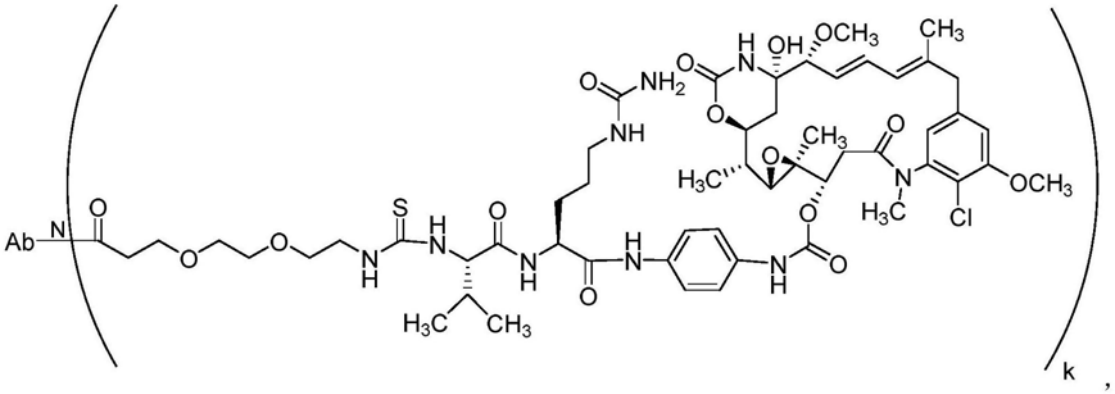
,



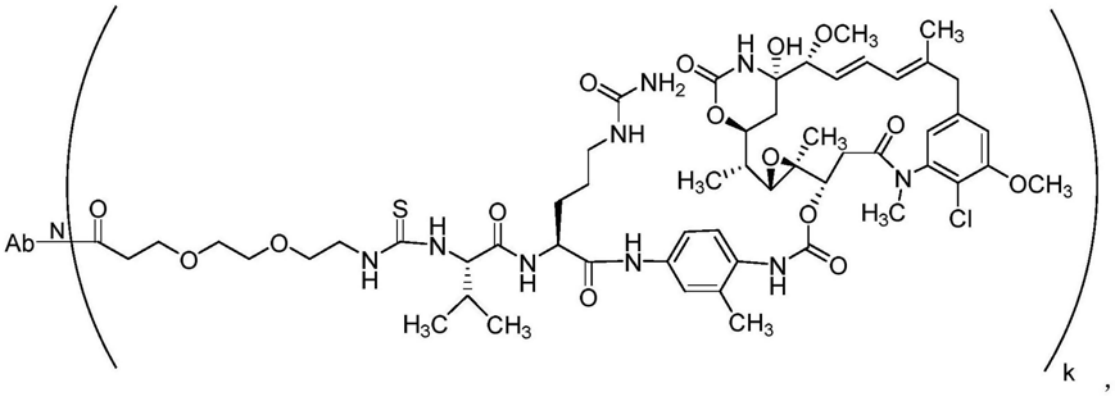




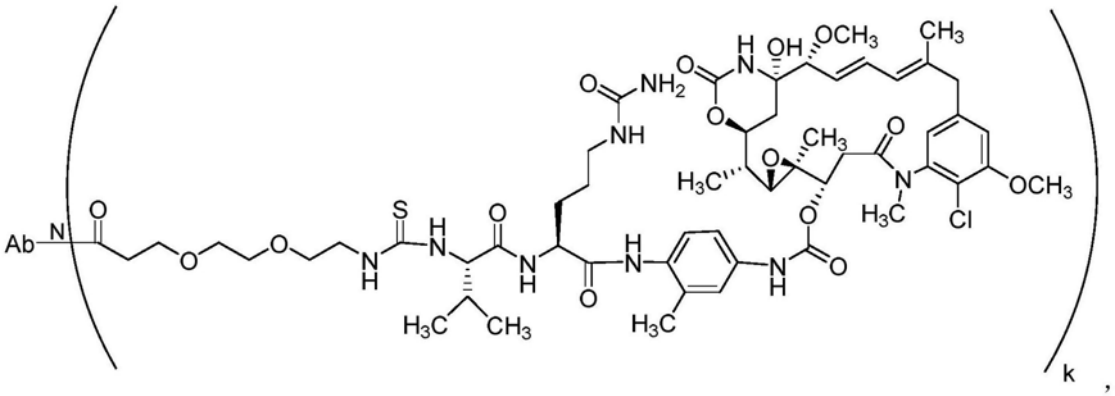




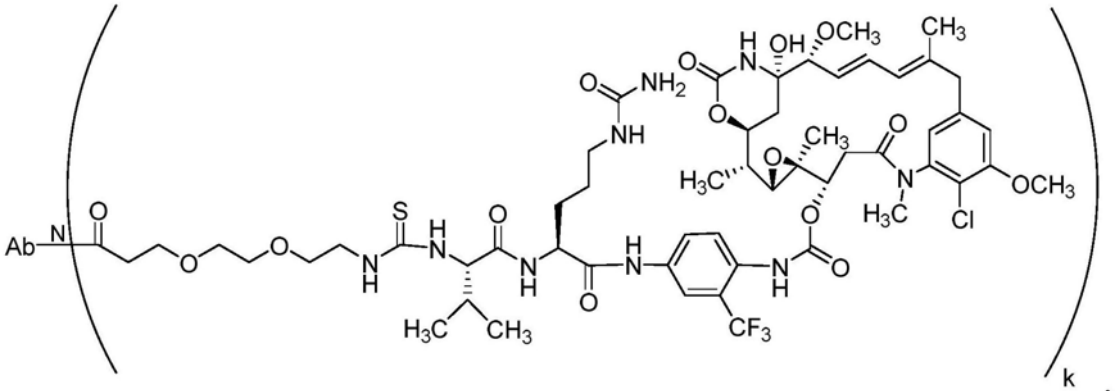
,



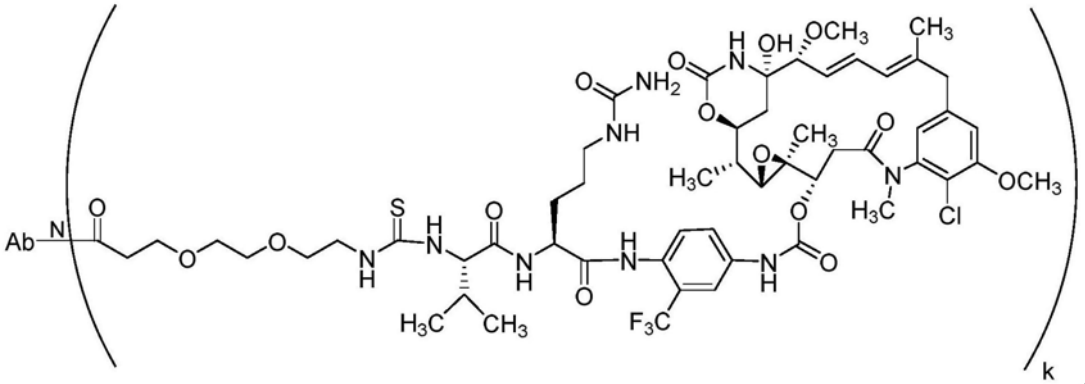
,

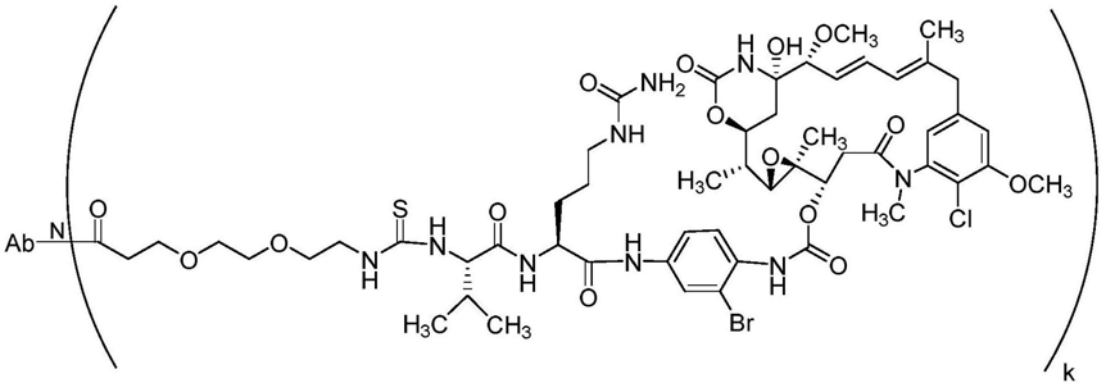


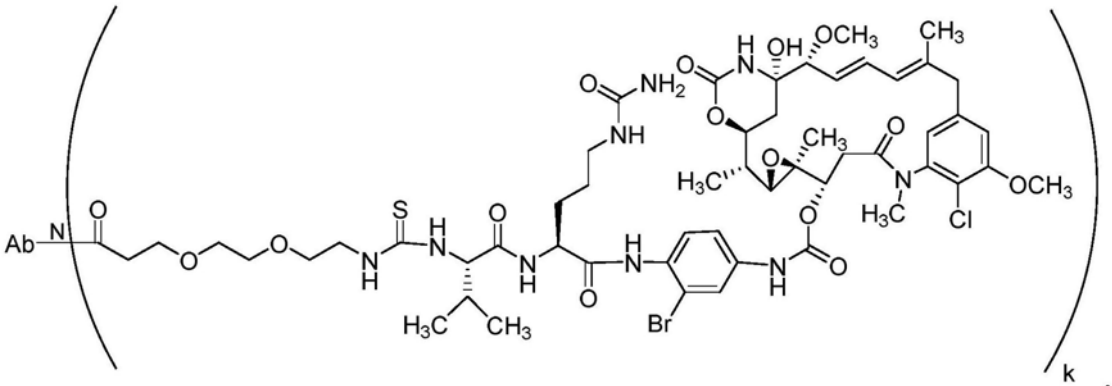
,

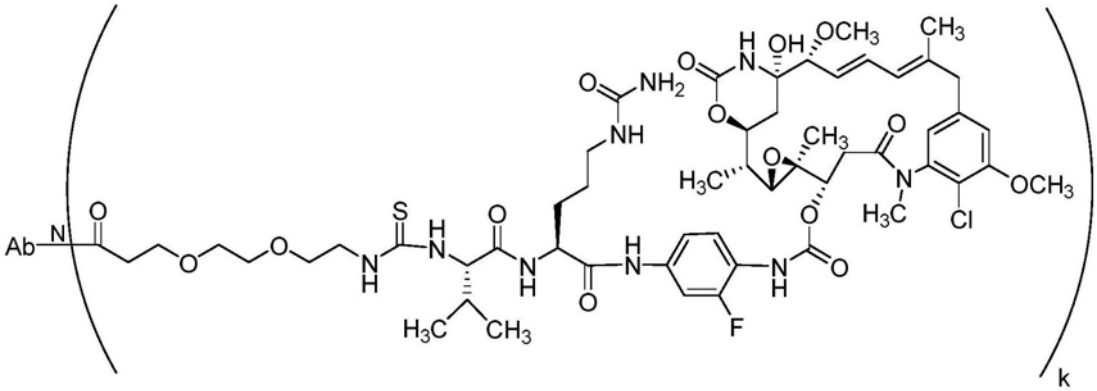


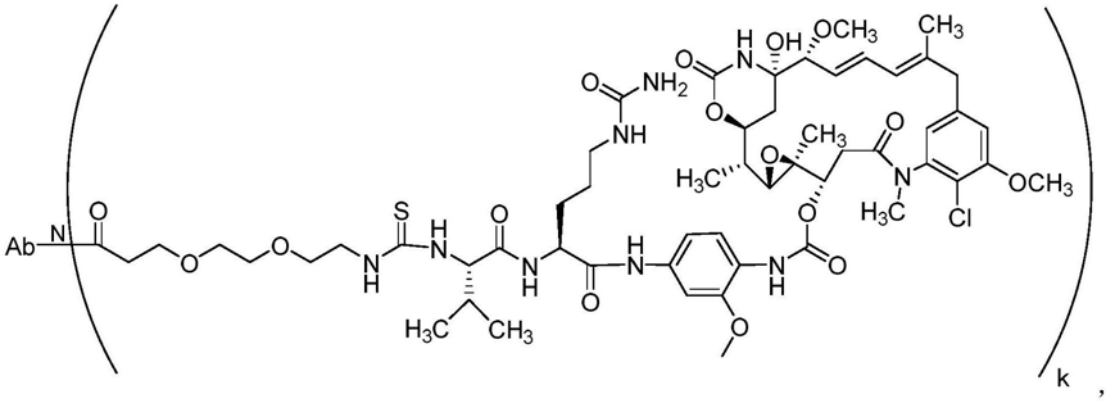
,



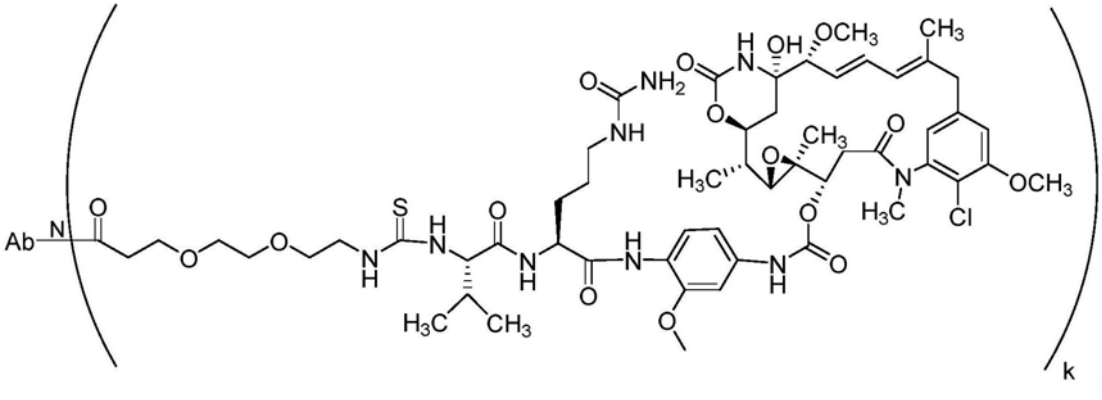




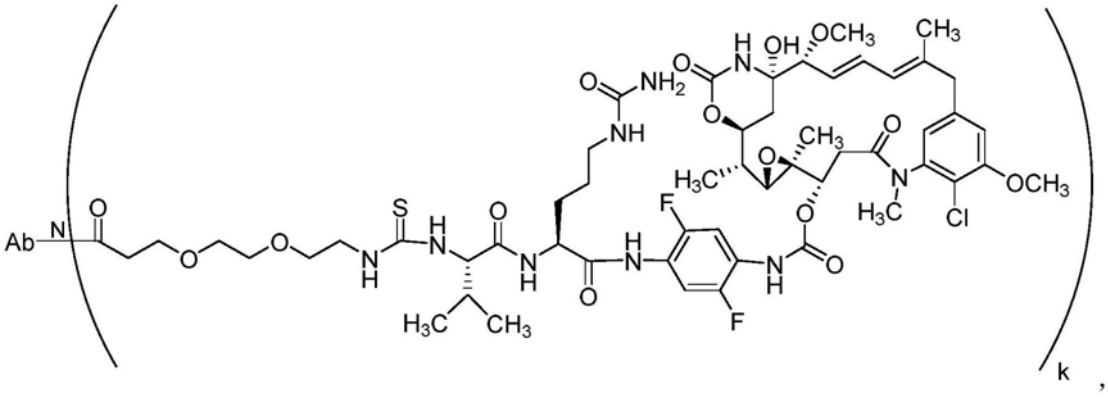




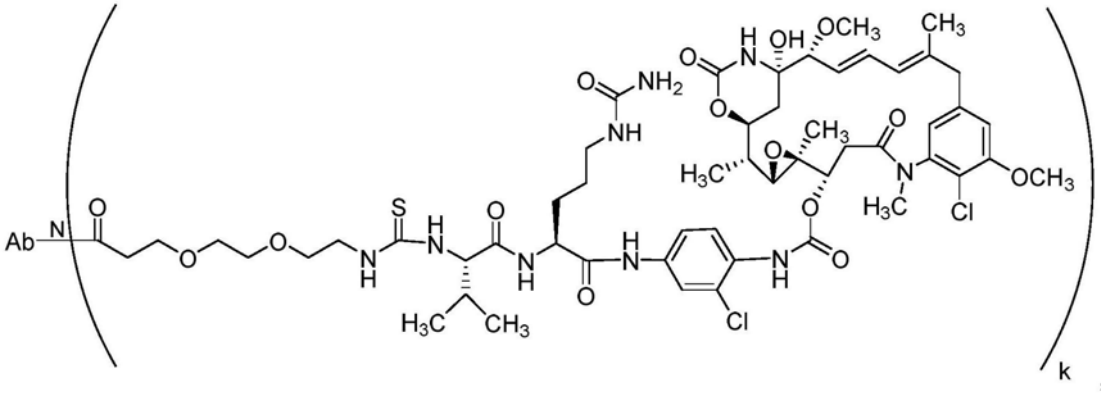
,



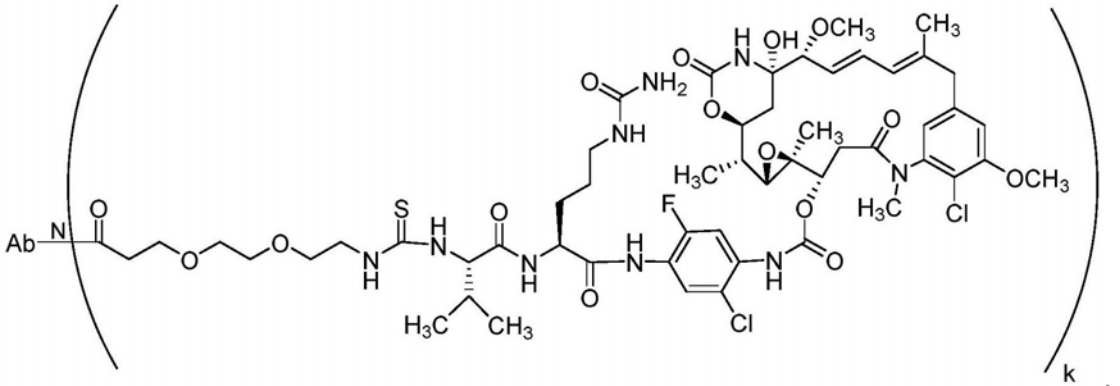
,

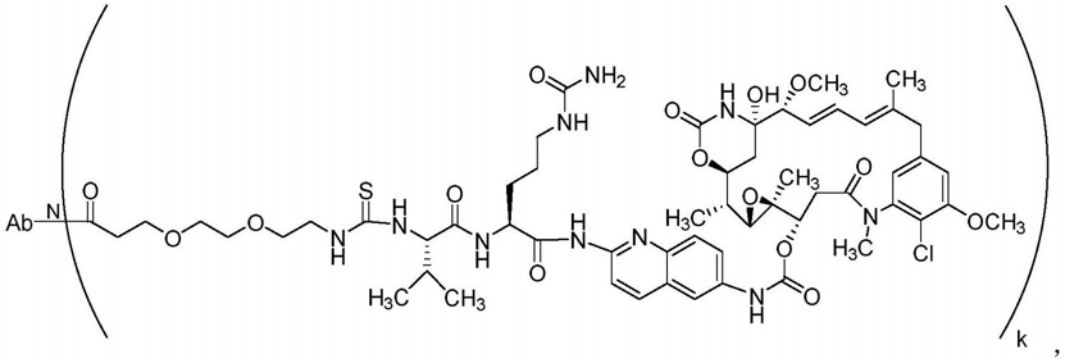


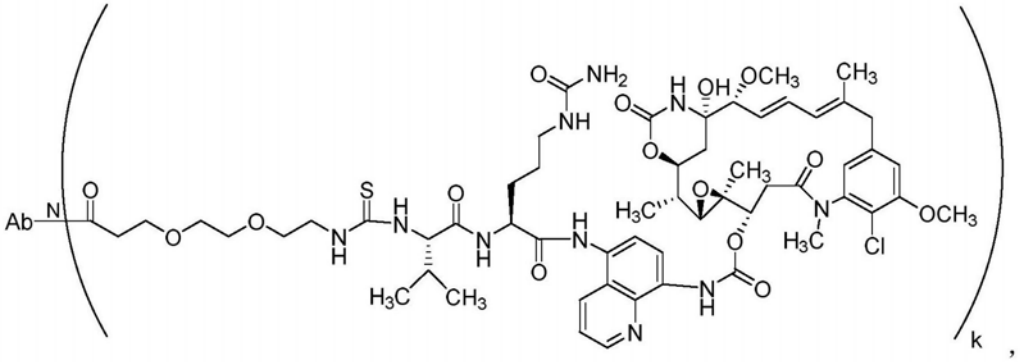
,

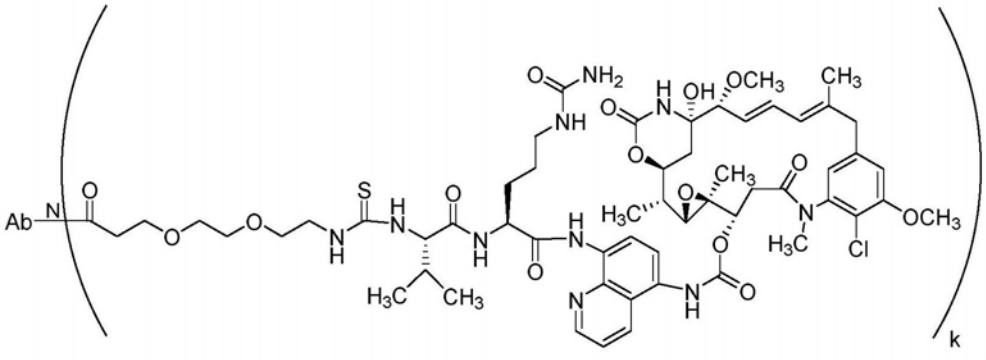


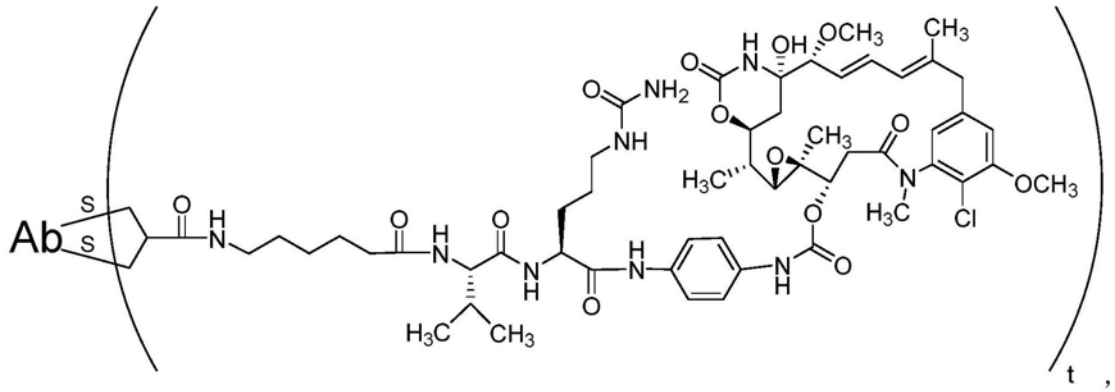
,



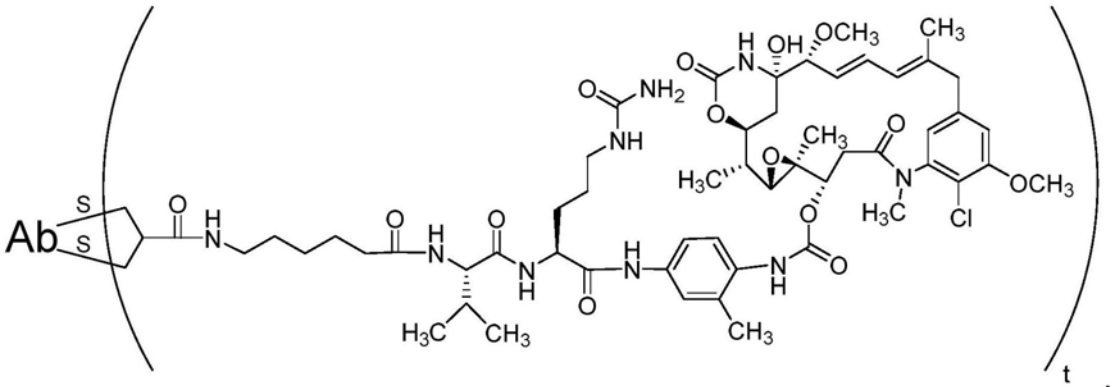




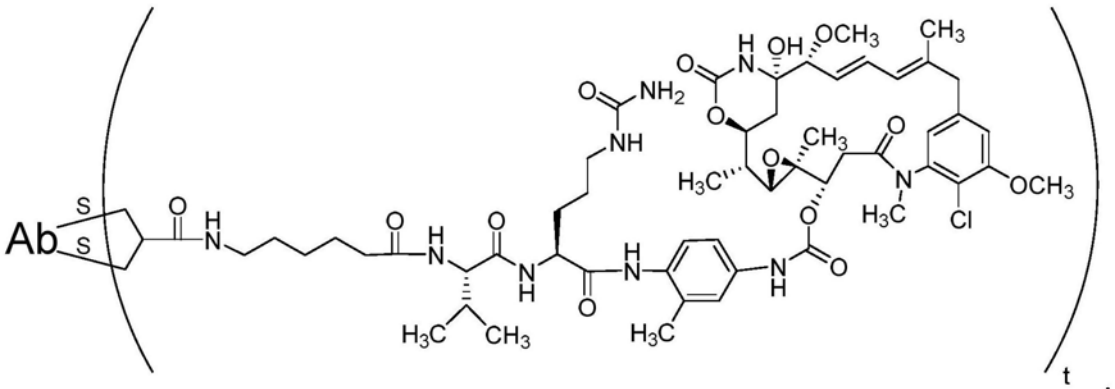




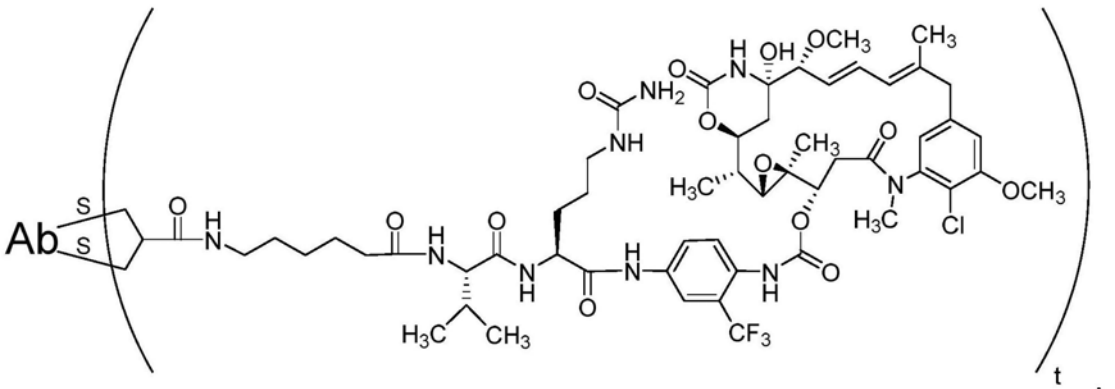
t ,



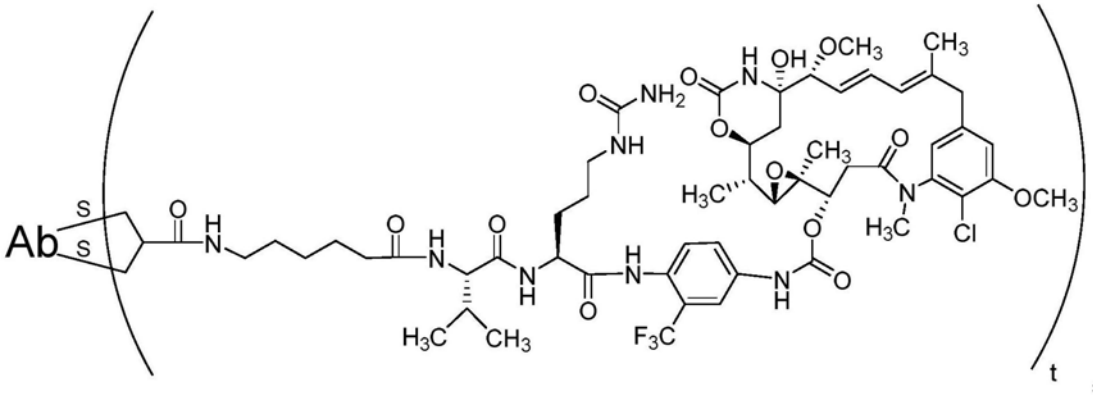
t ,



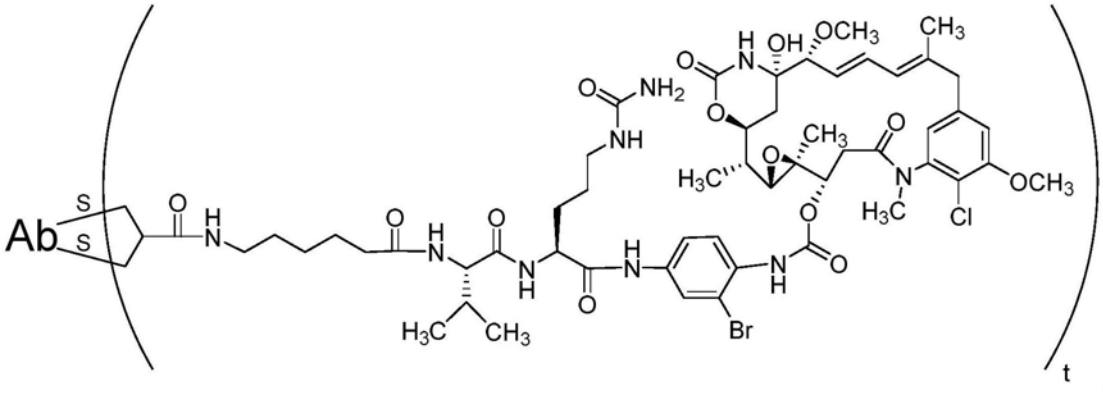
t ,



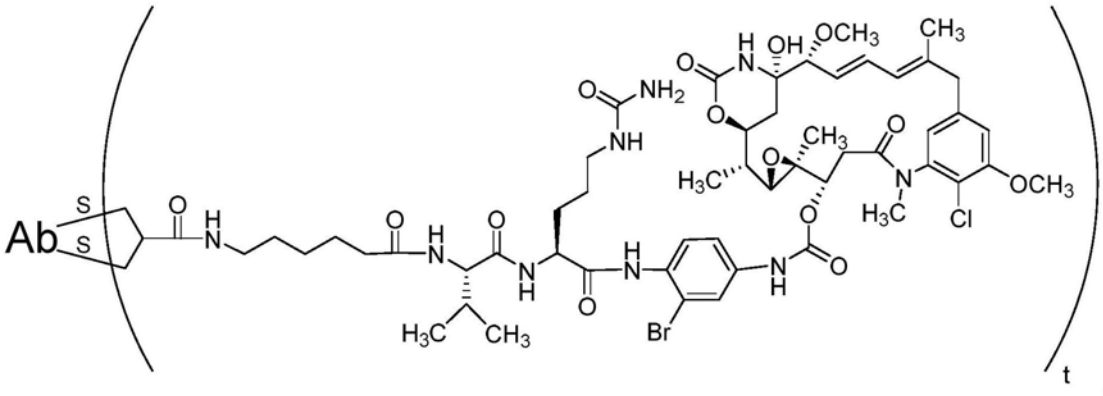
t ,



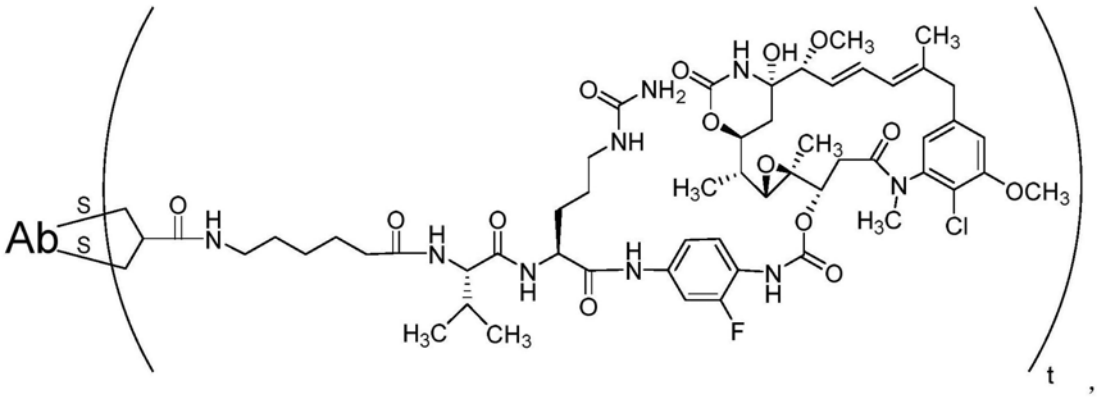
t ,



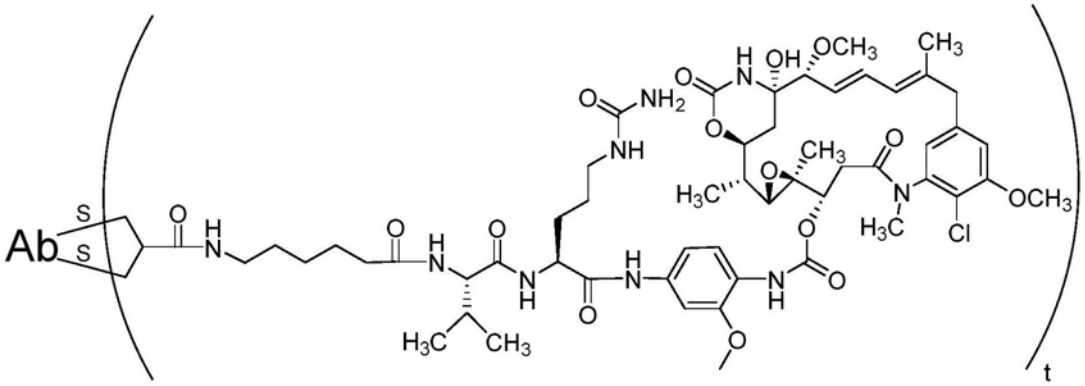
t ,

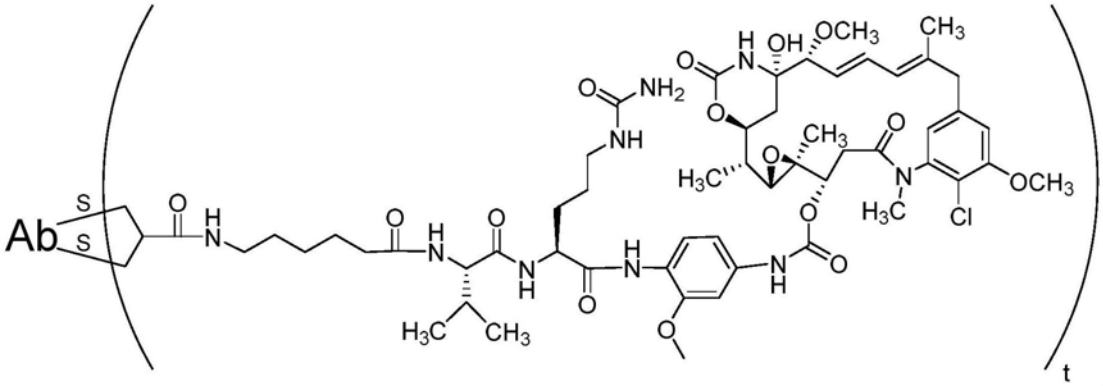


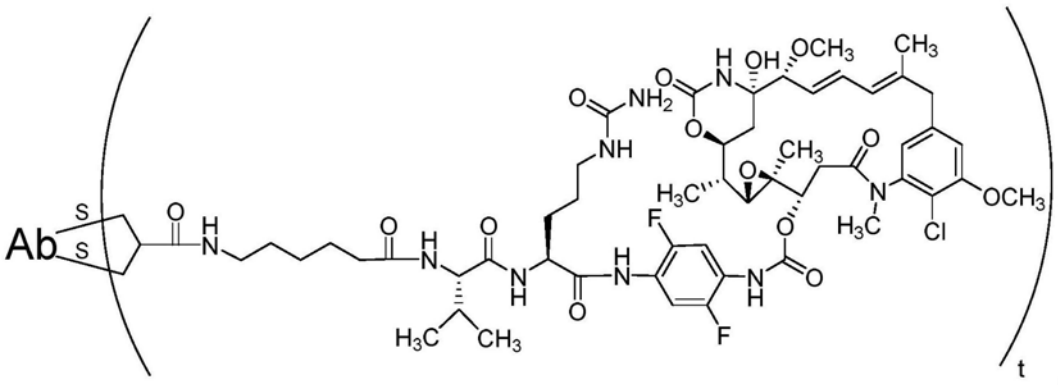
t ,

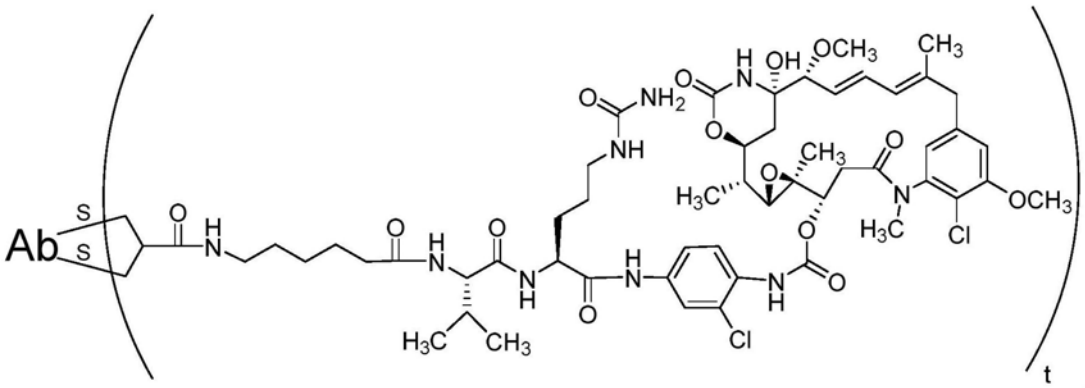


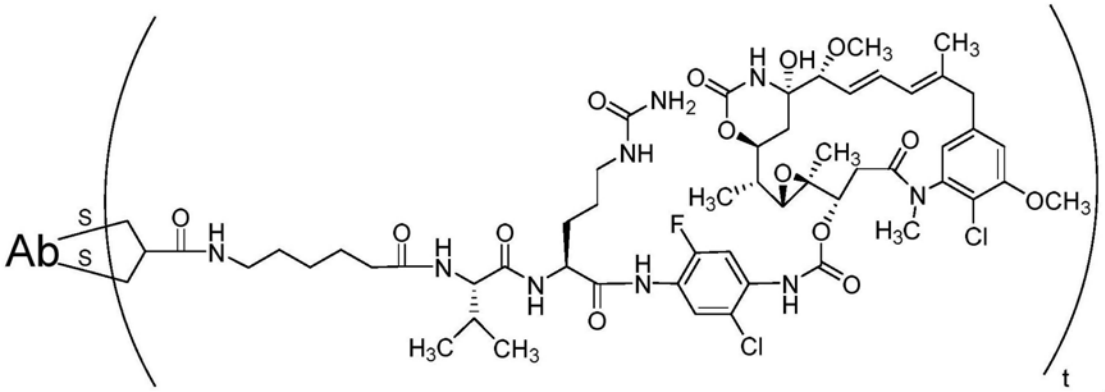
t ,



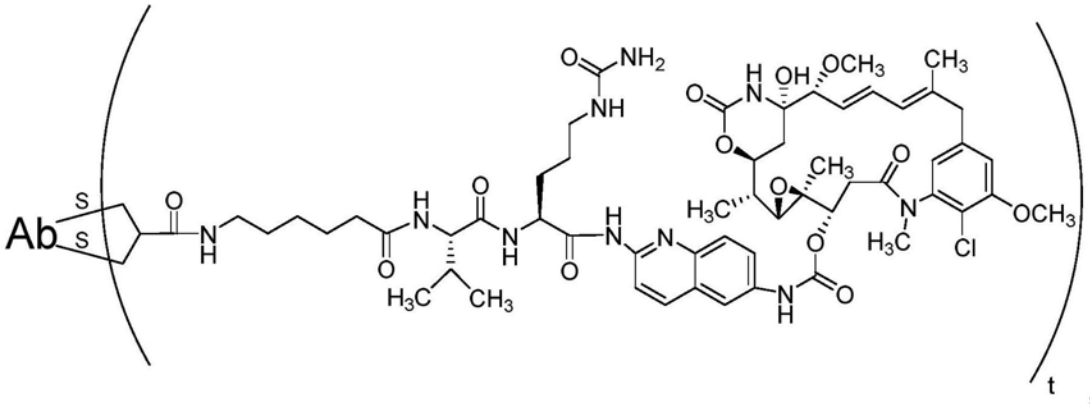




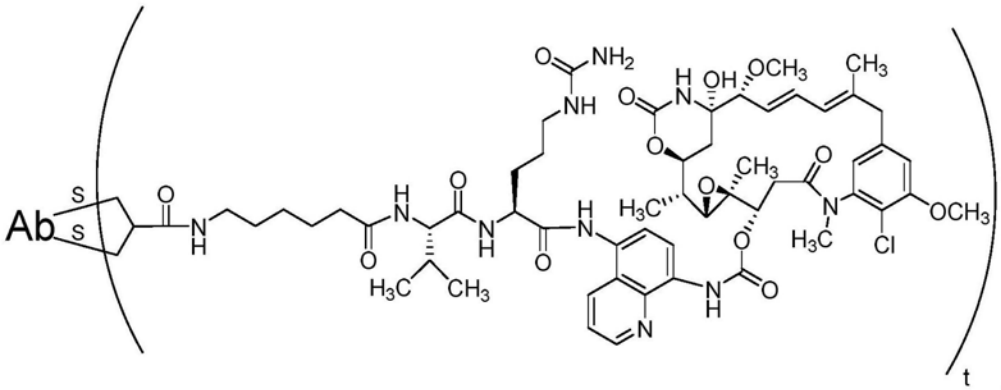




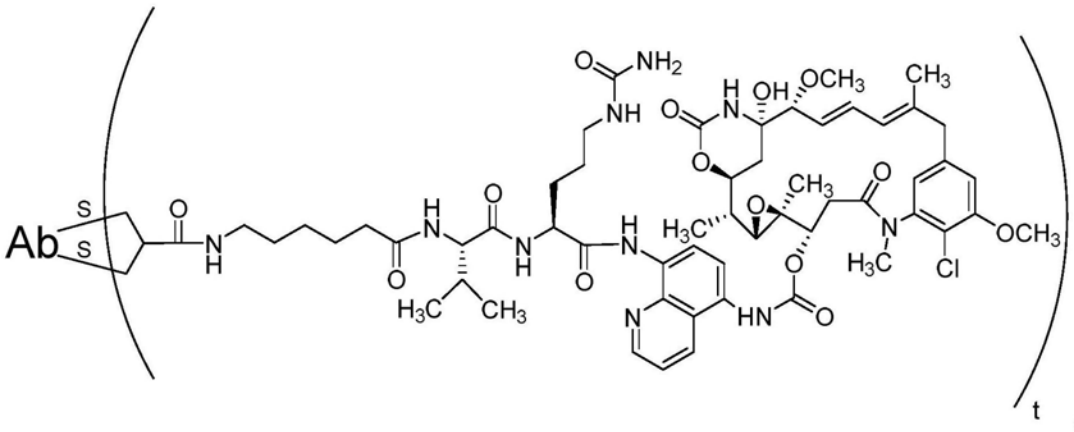
t ,



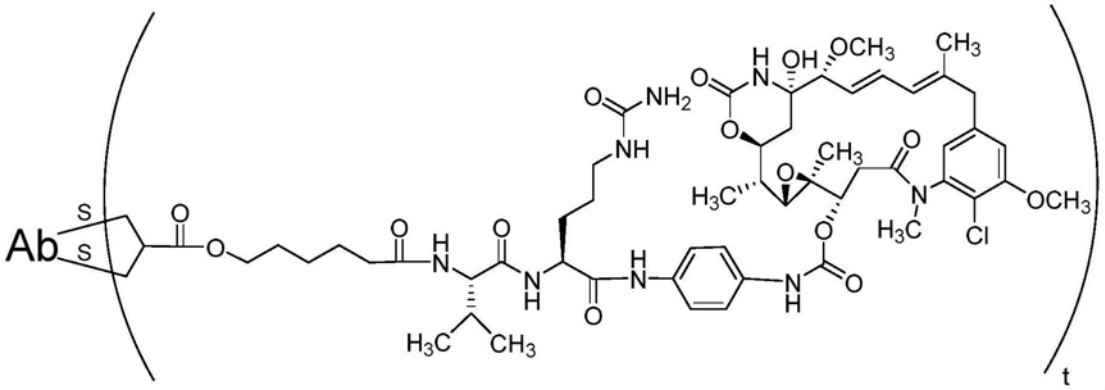
t ,

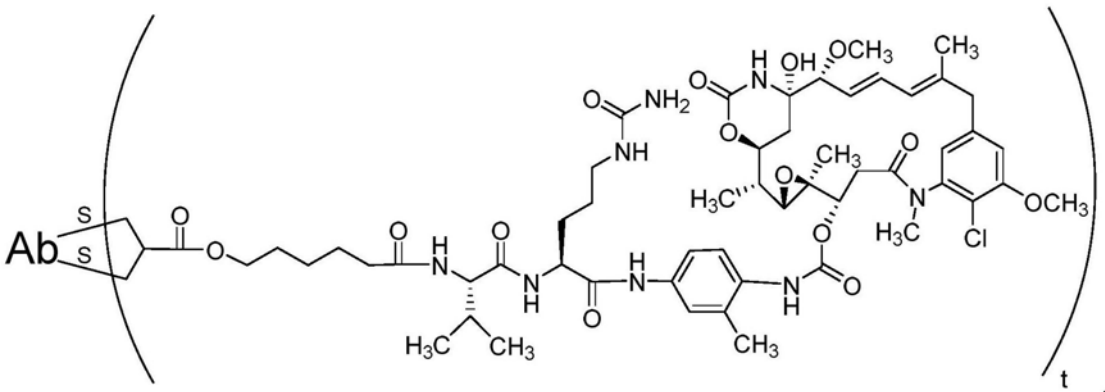


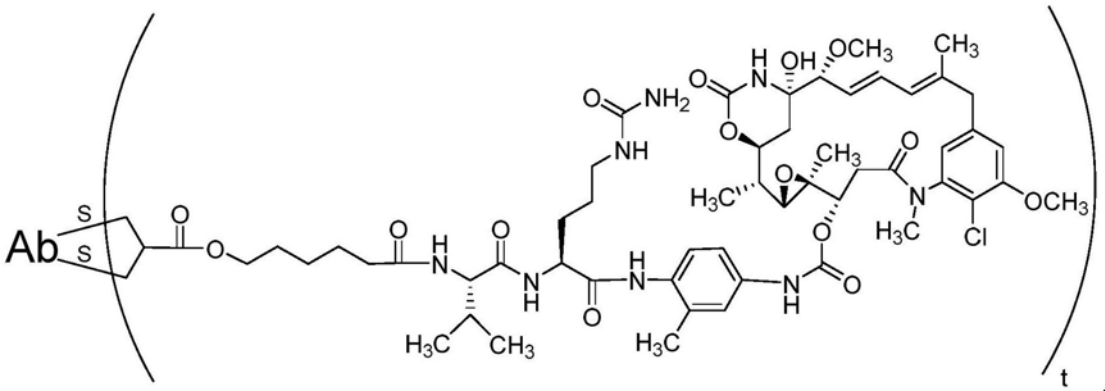
t ,

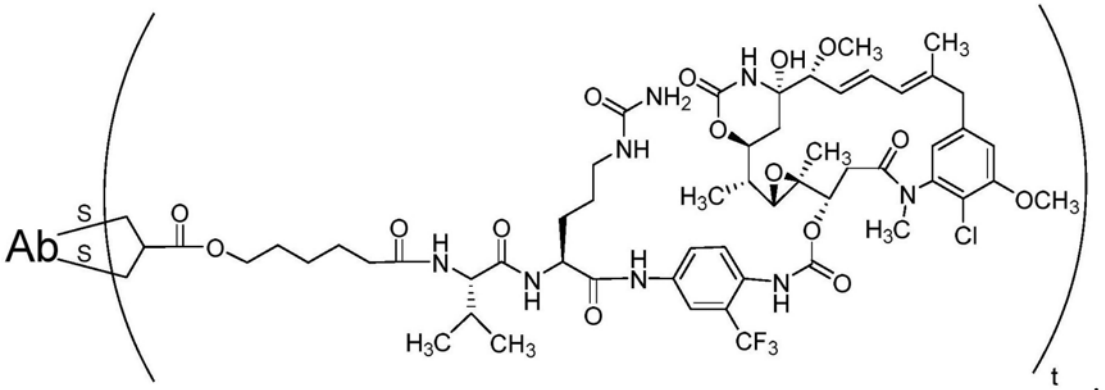


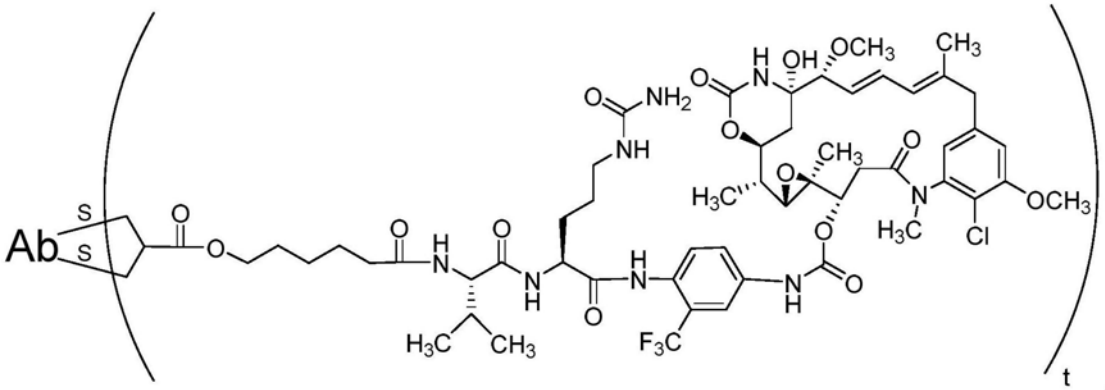
t ,



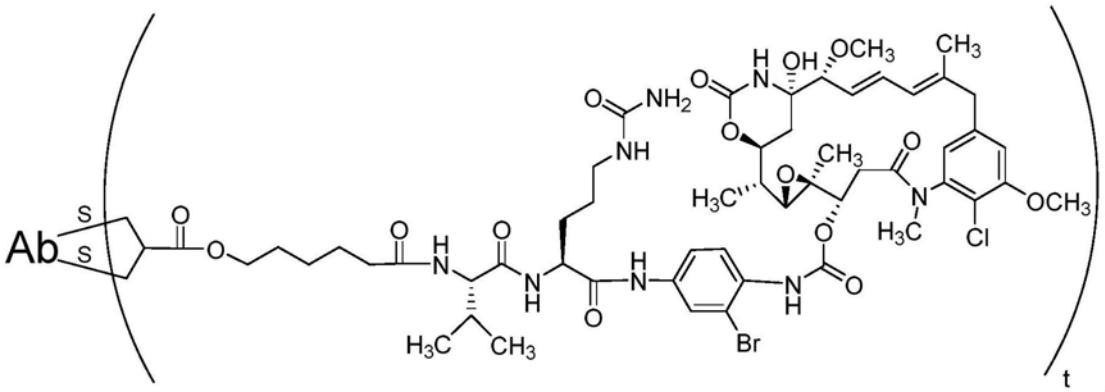




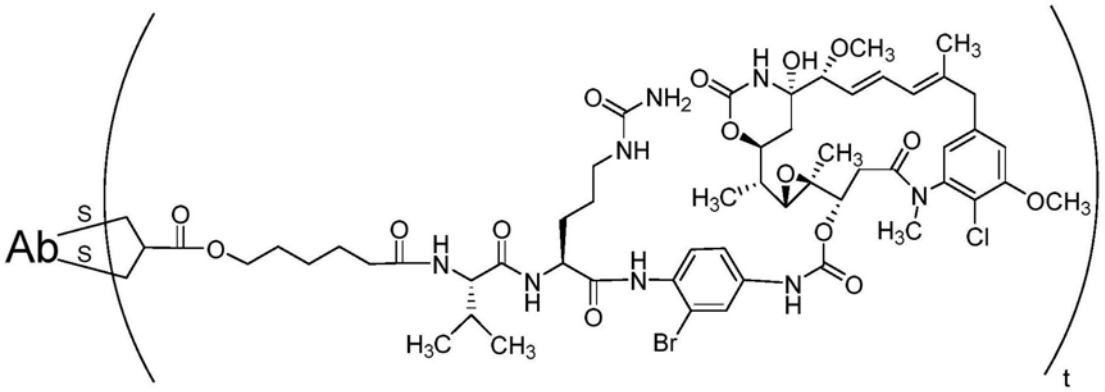




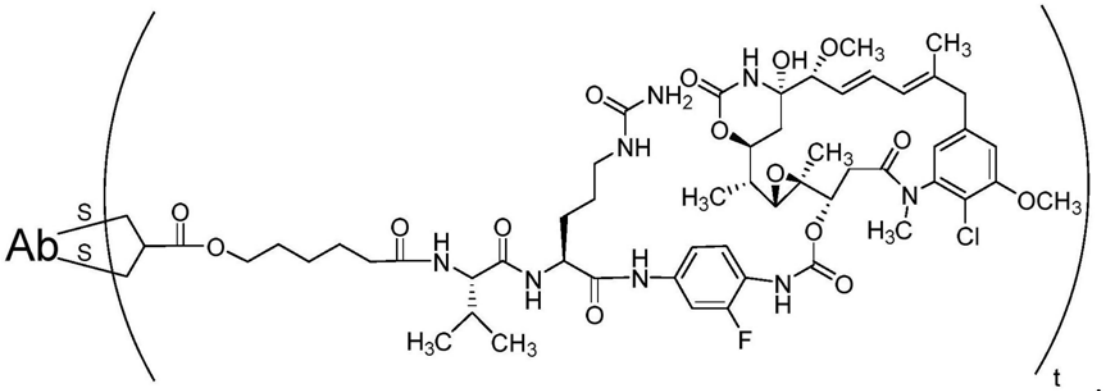
t ,



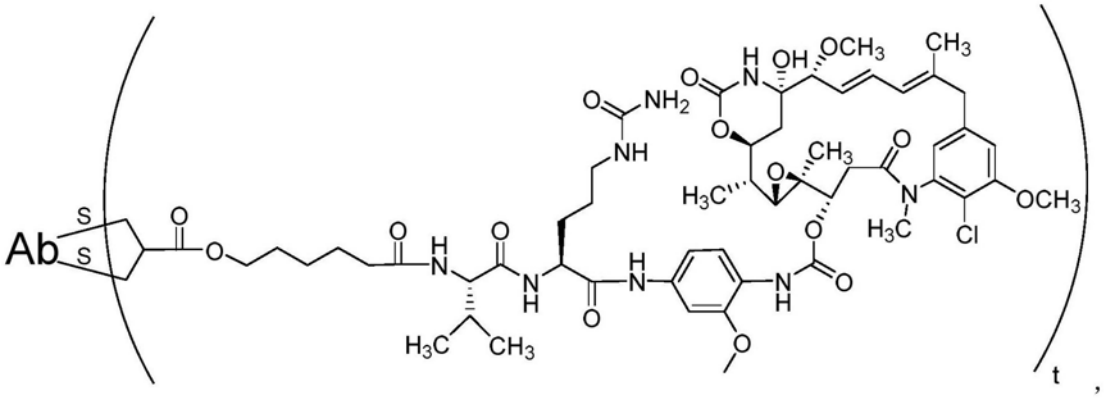
t ,

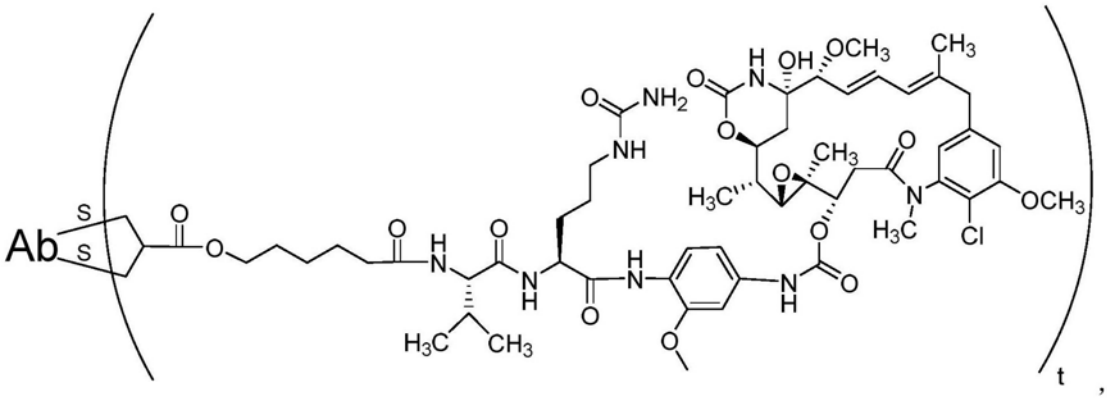


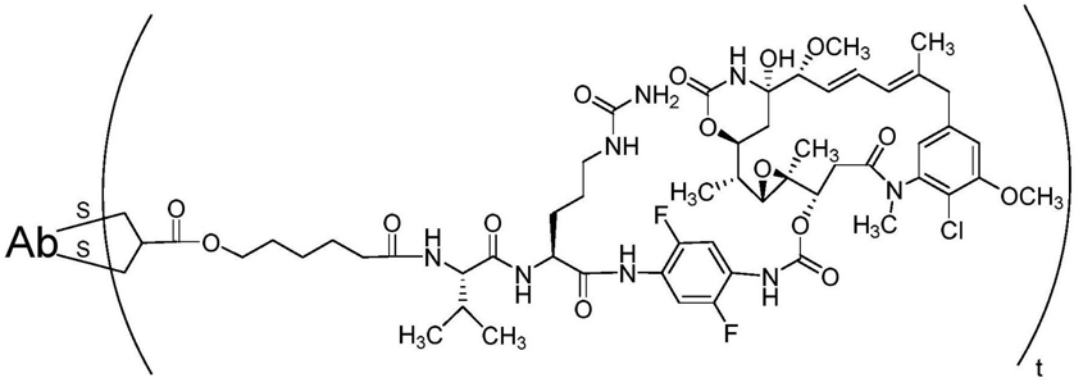
t ,

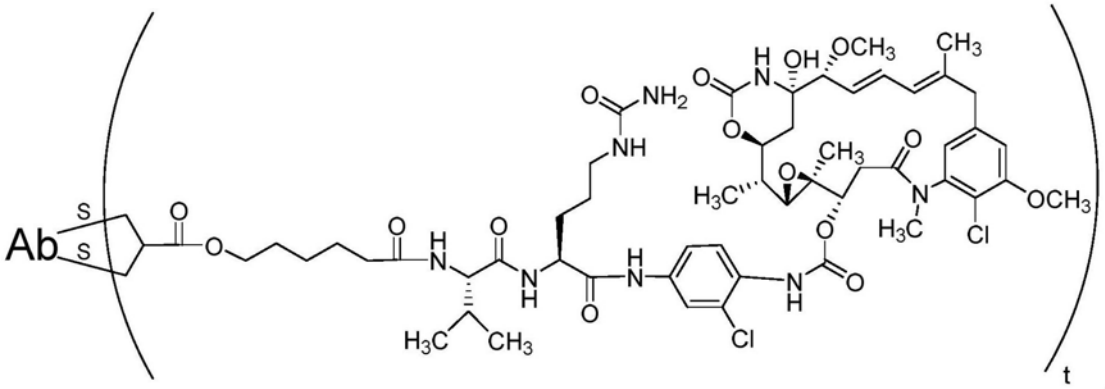


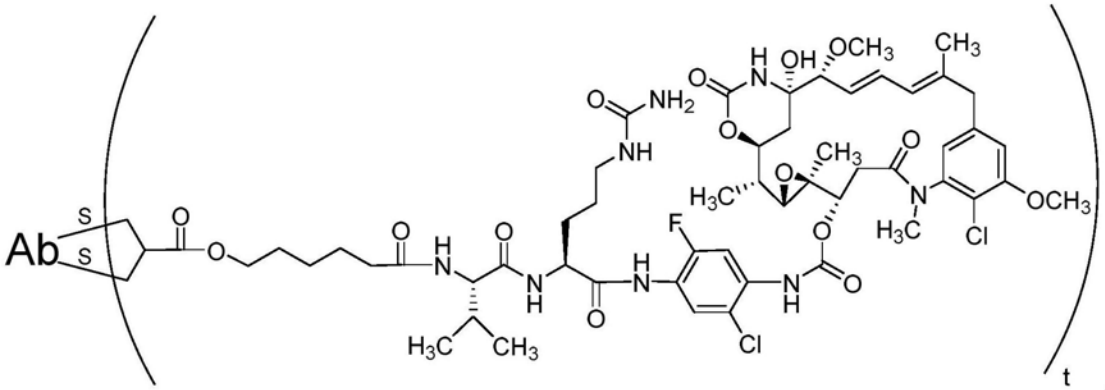
t ,



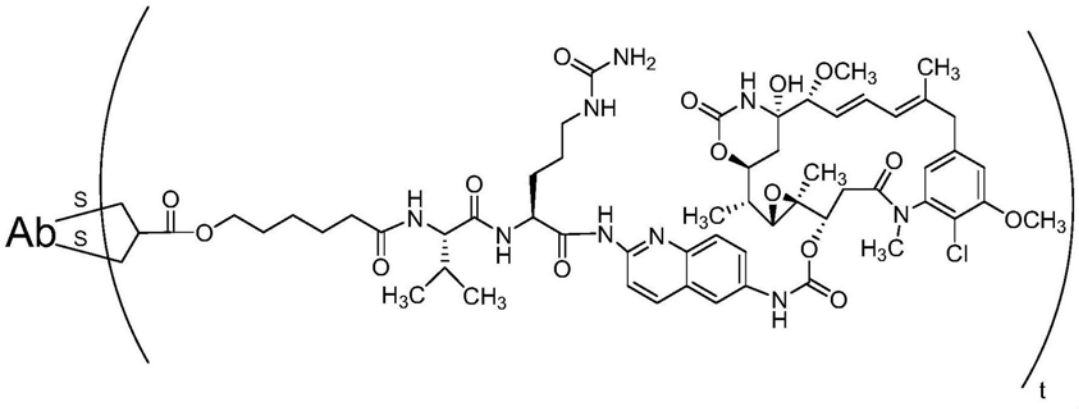




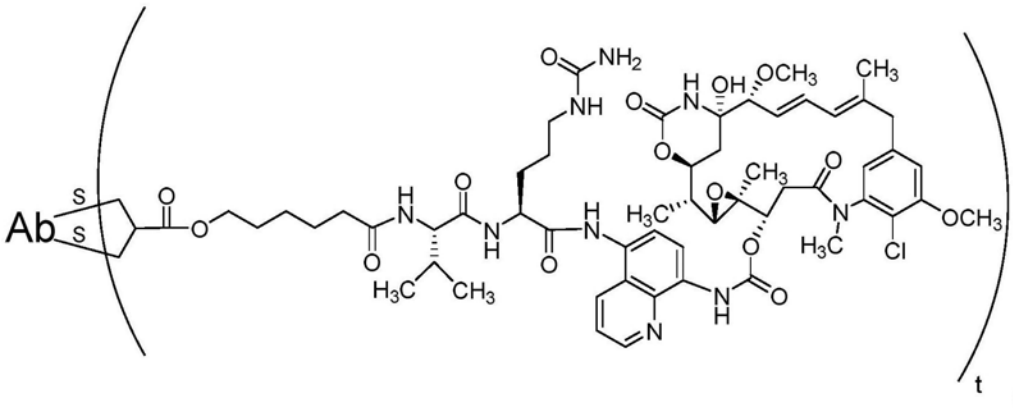




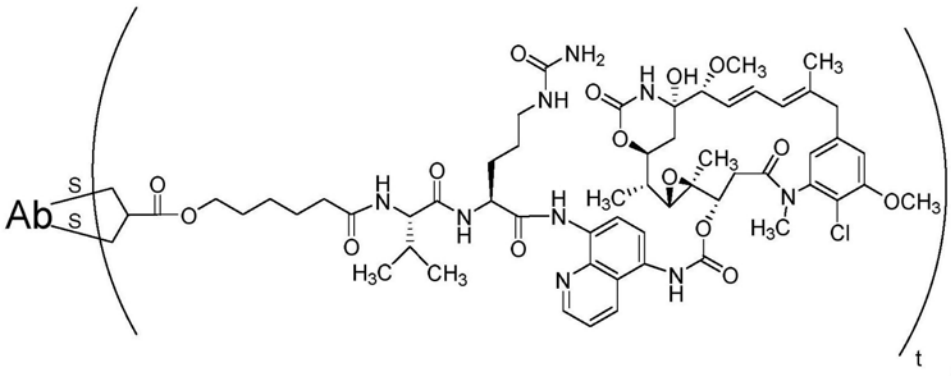
t ,



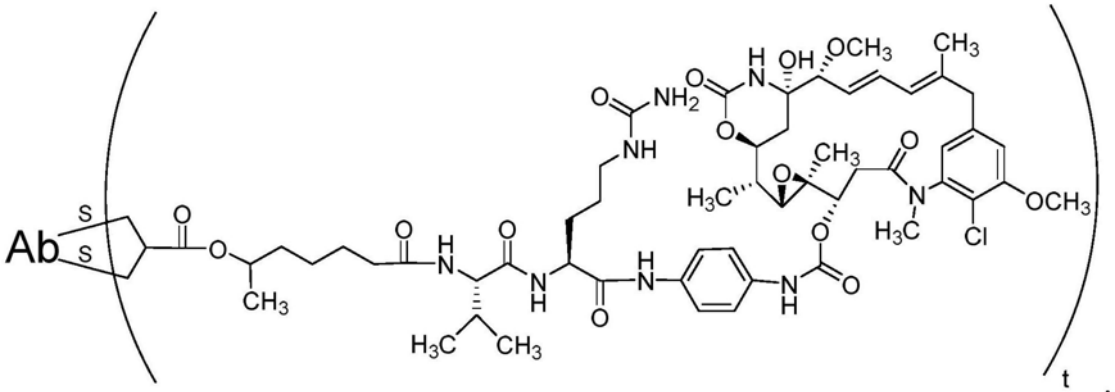
t ,



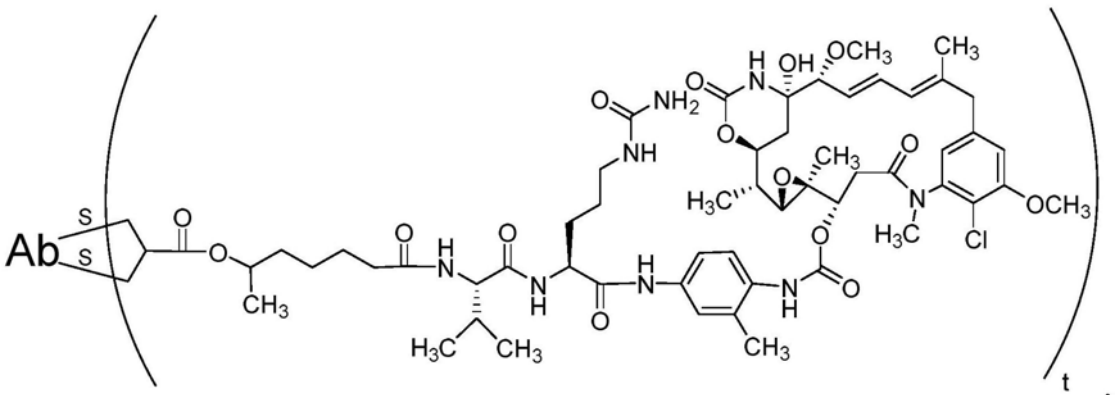
t ,



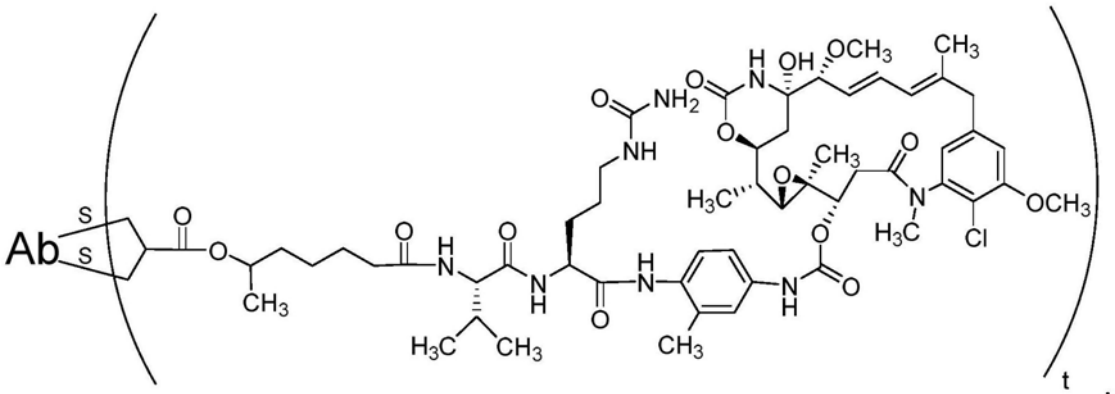
t ,



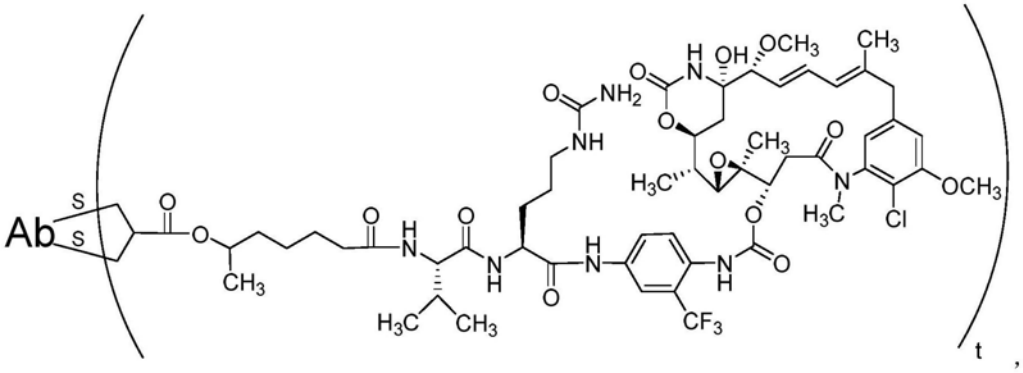
,

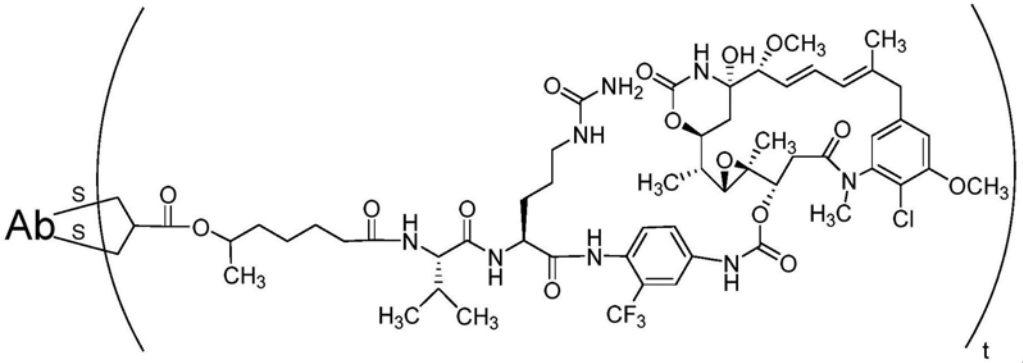


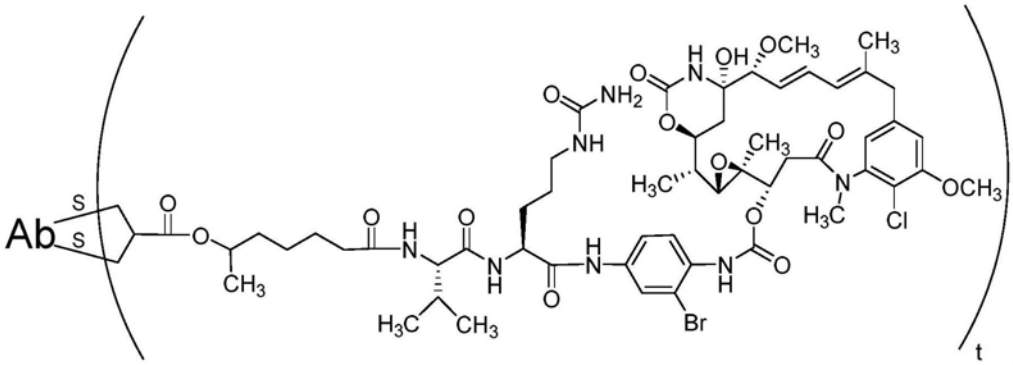
,

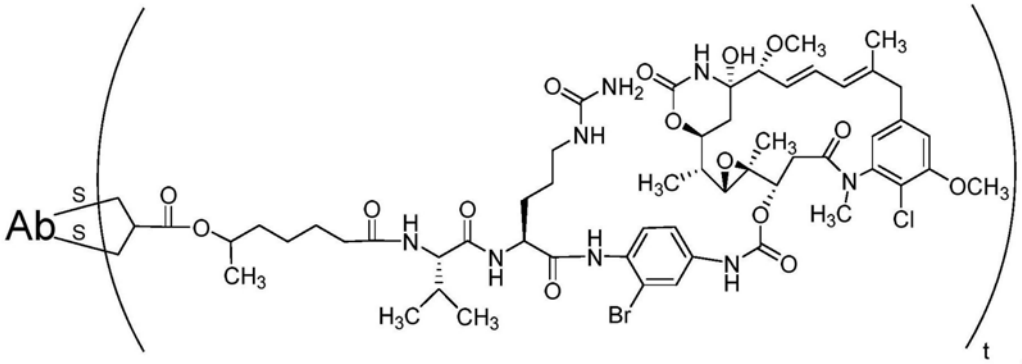


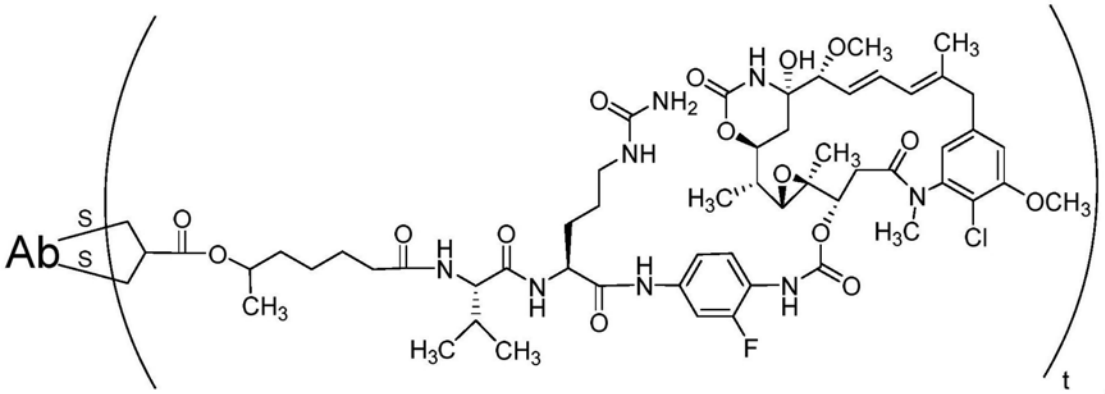
,



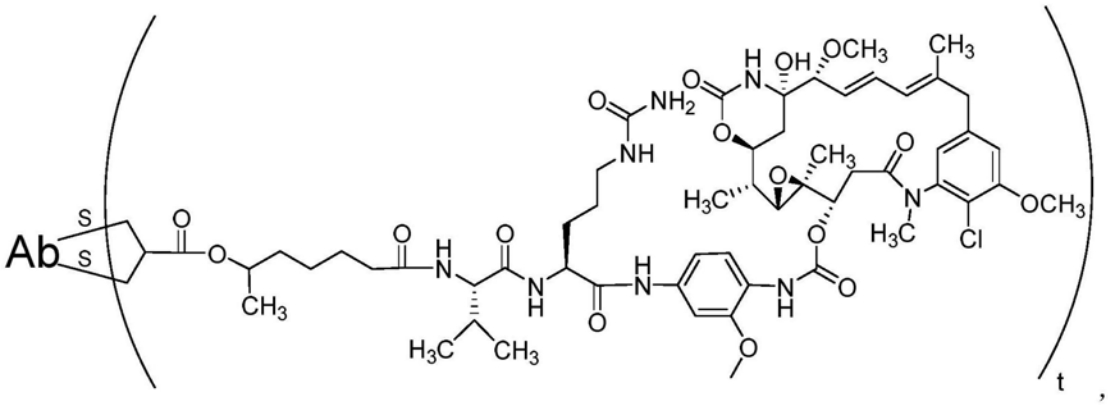




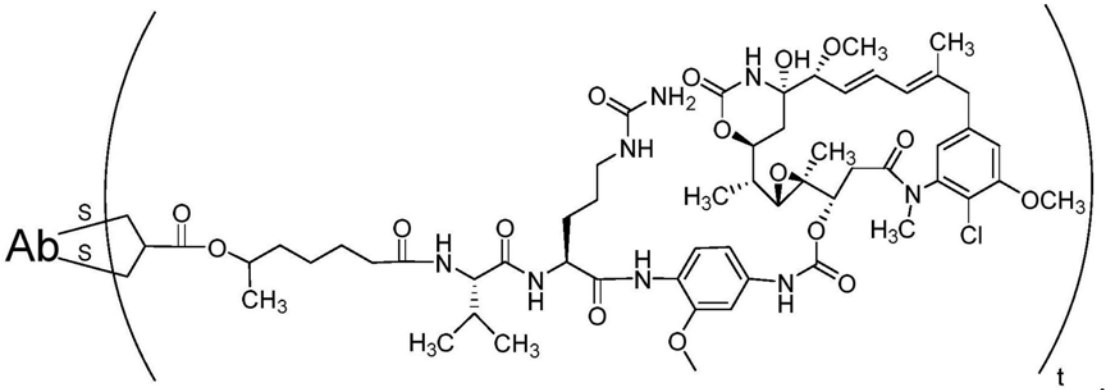




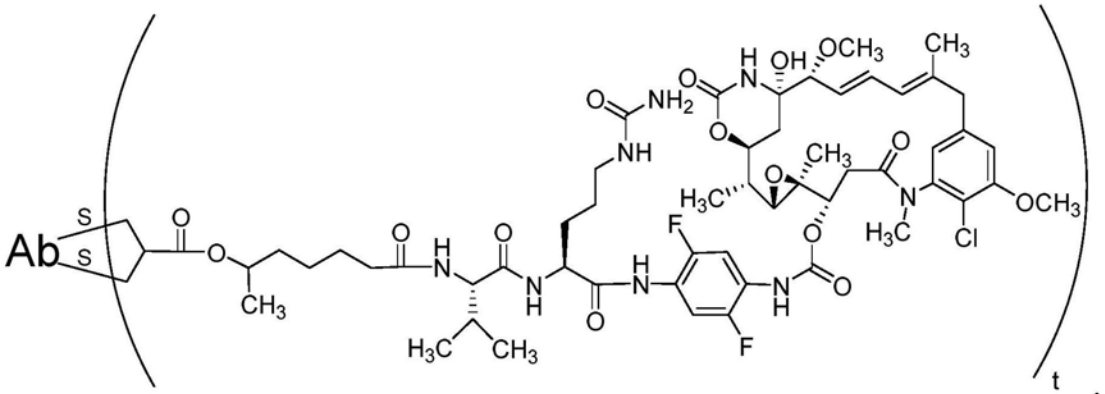
t ,



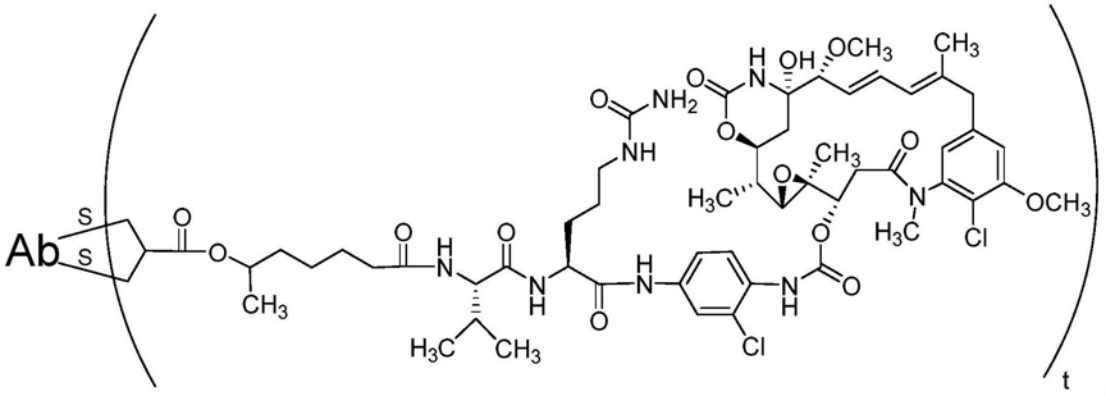
t ,



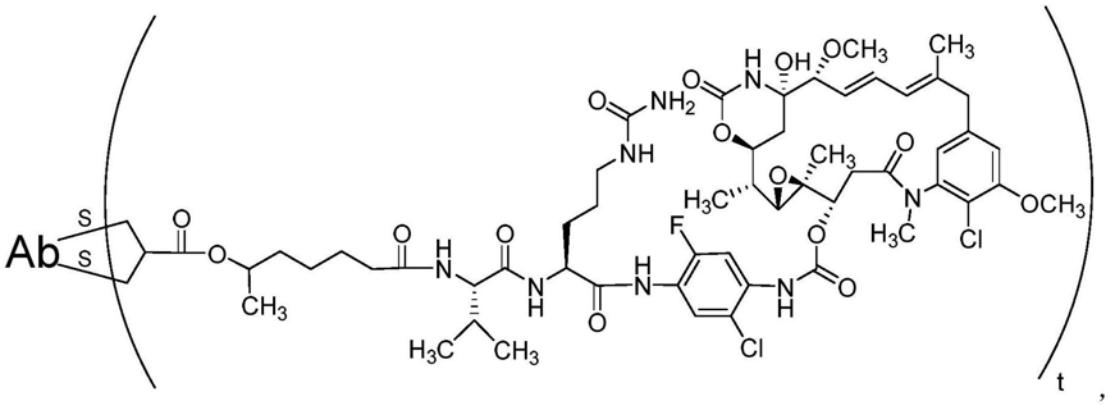
t ,



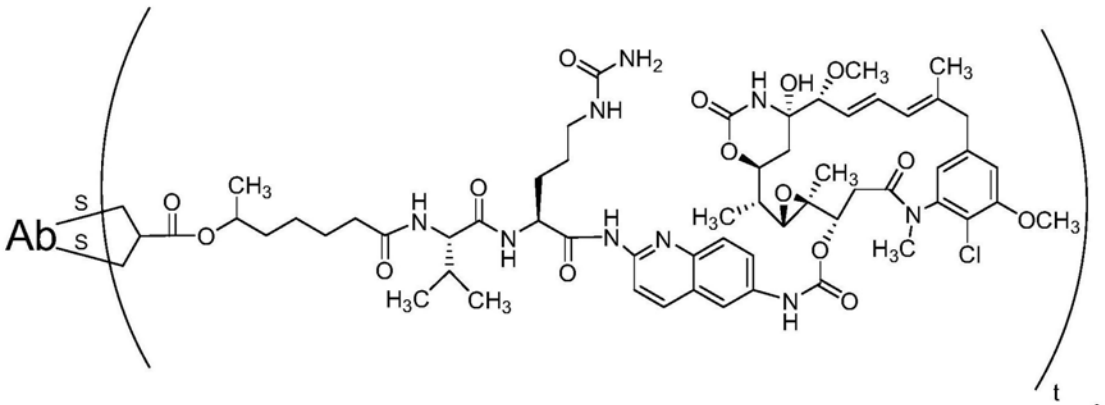
t ,



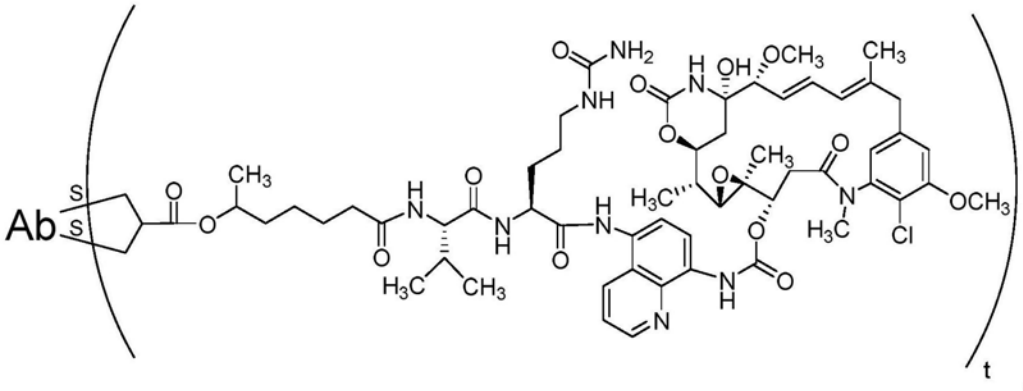
t ,



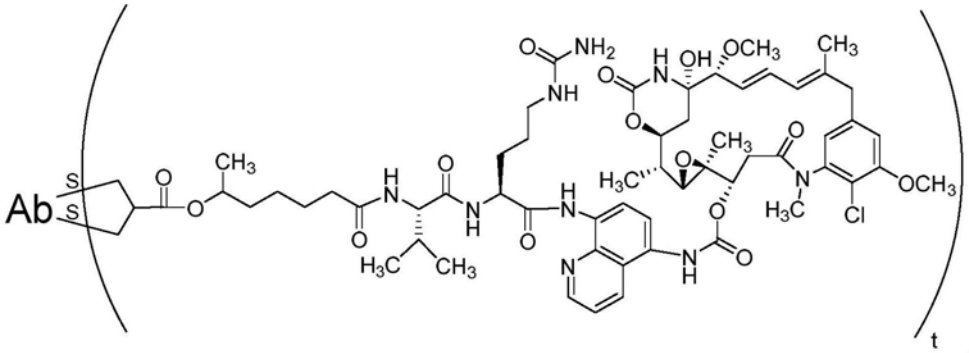
t ,

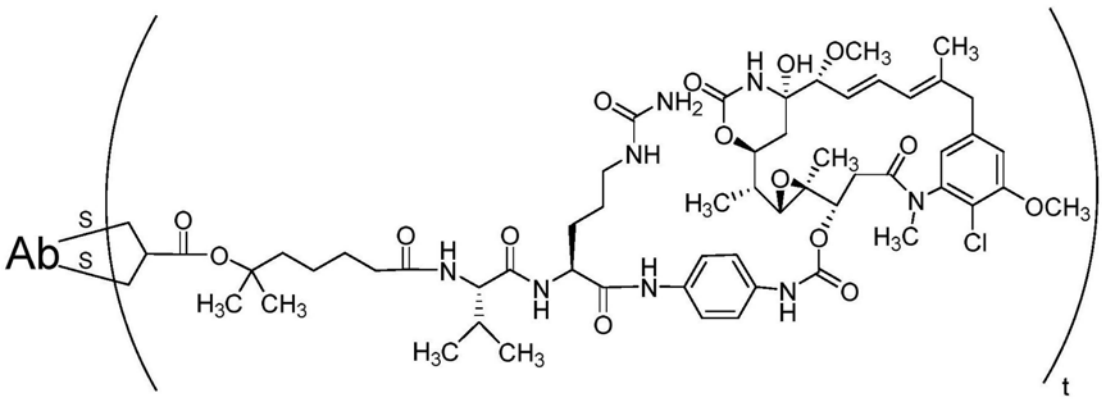


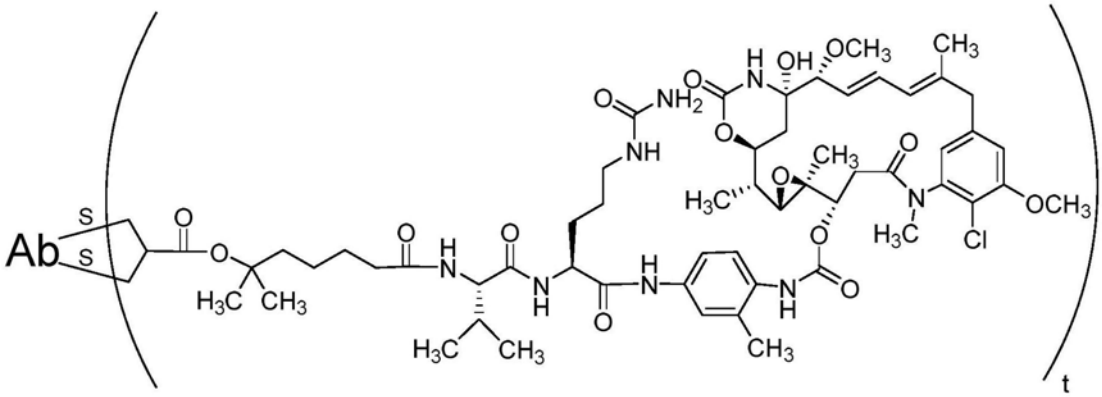
t ,

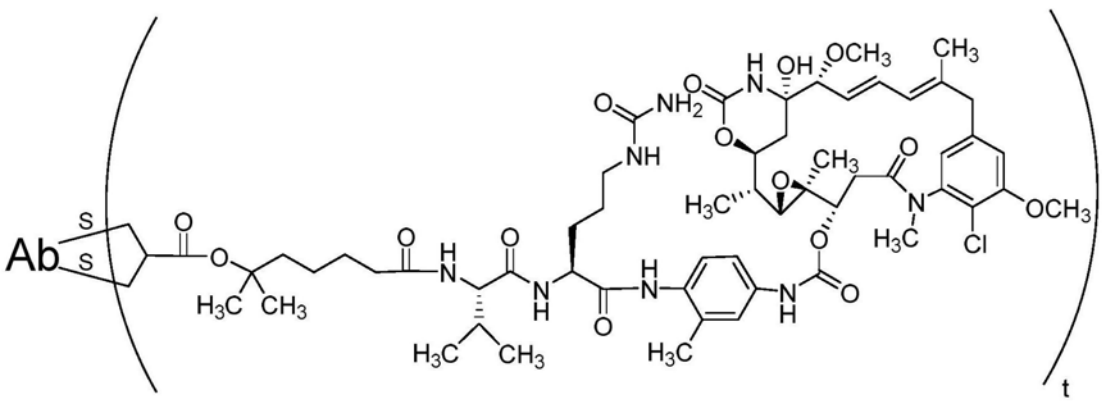


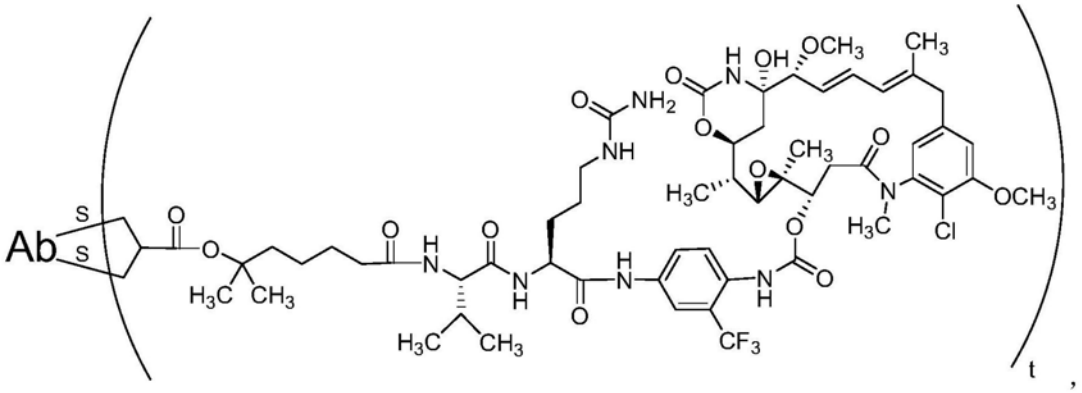
t ,



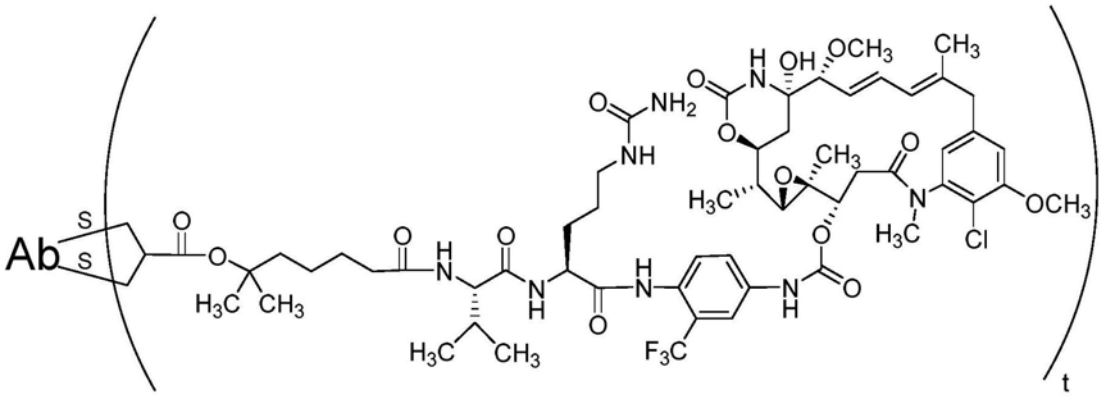




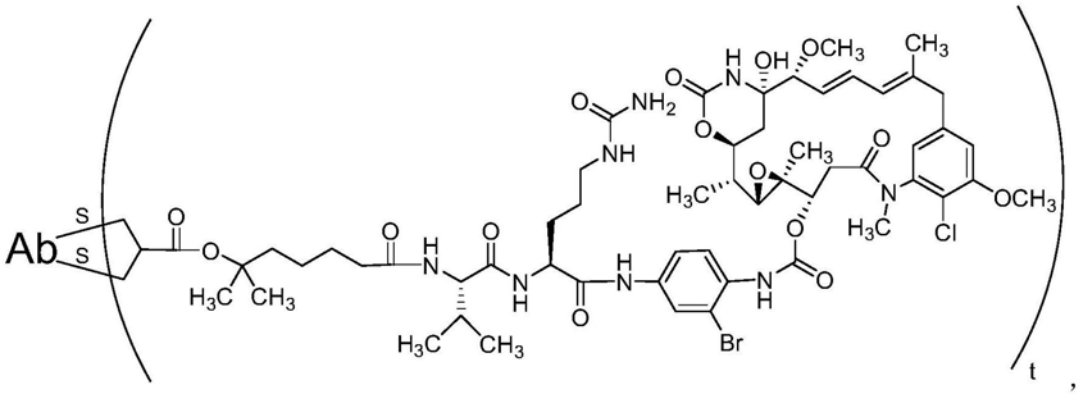




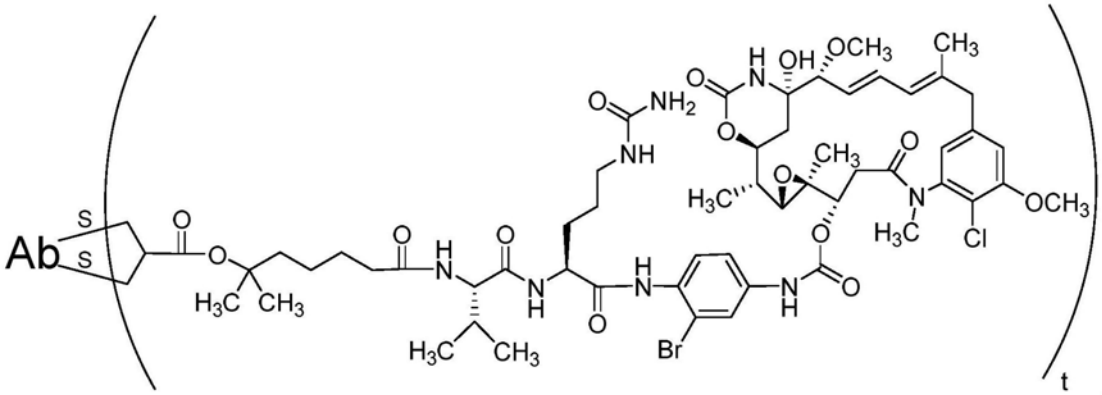
t ,



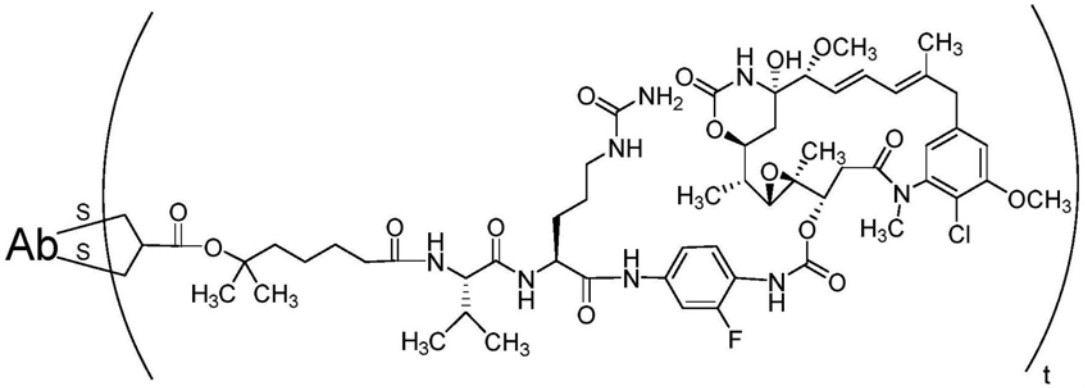
t ,

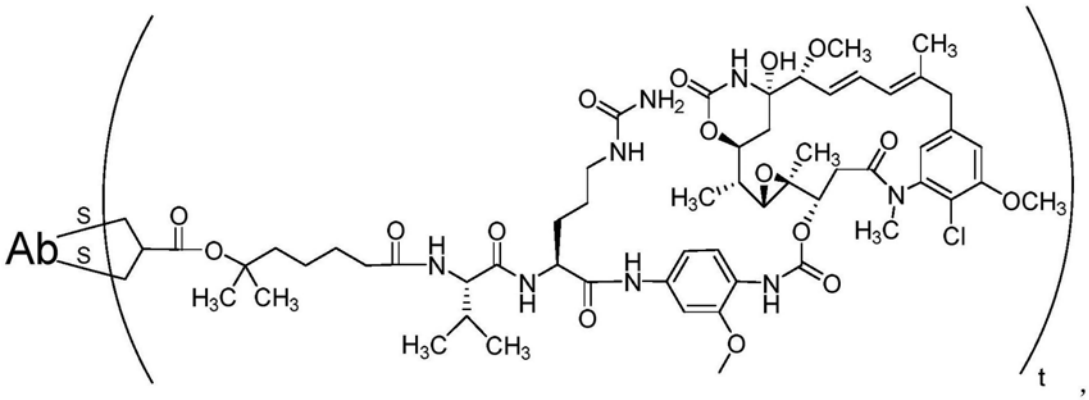


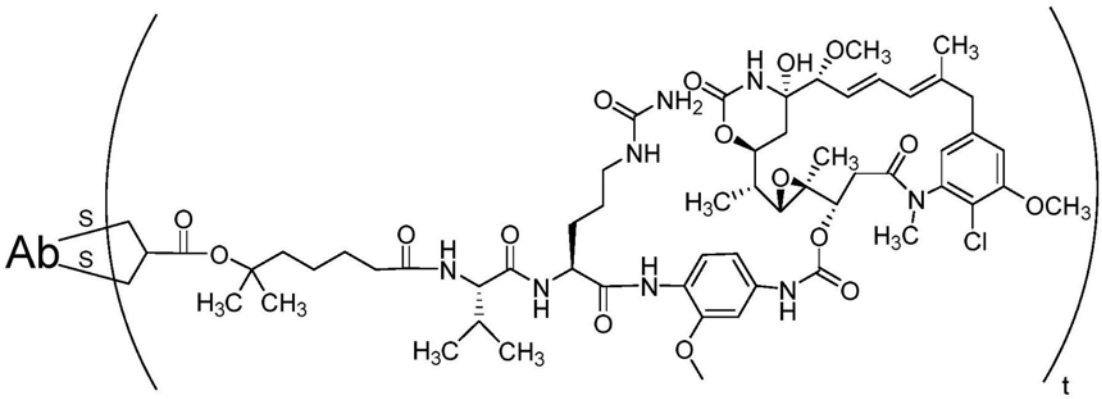
t ,

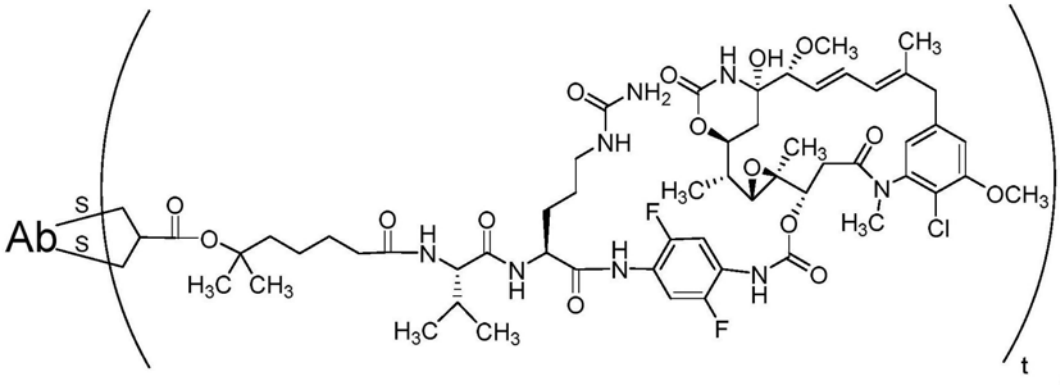


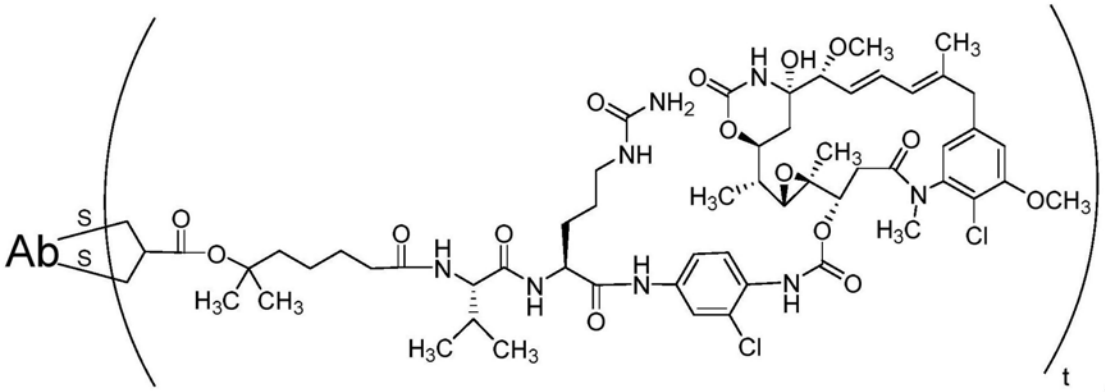
t ,

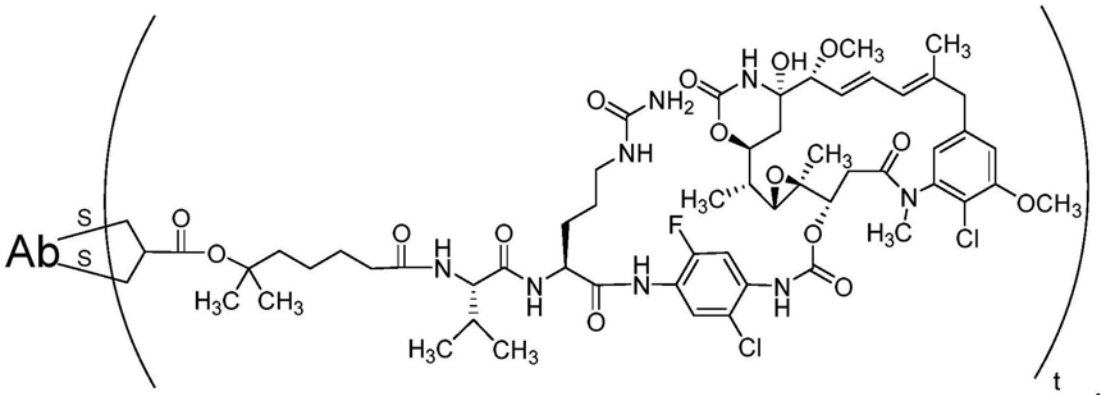


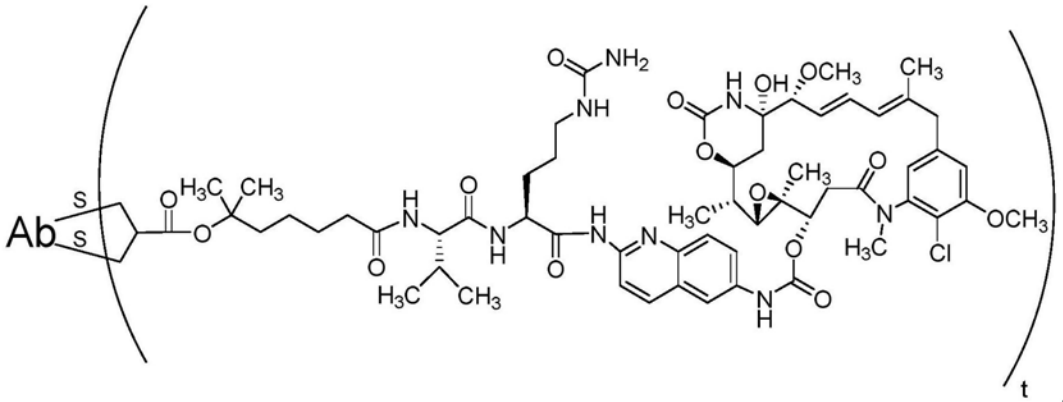


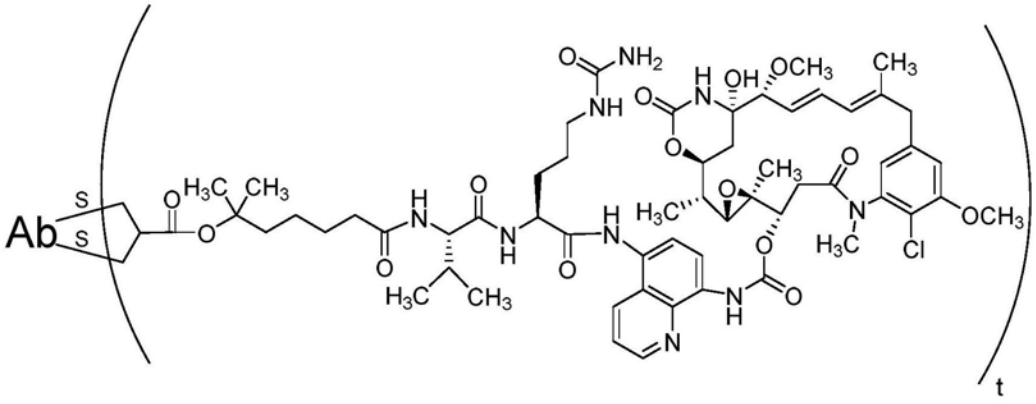


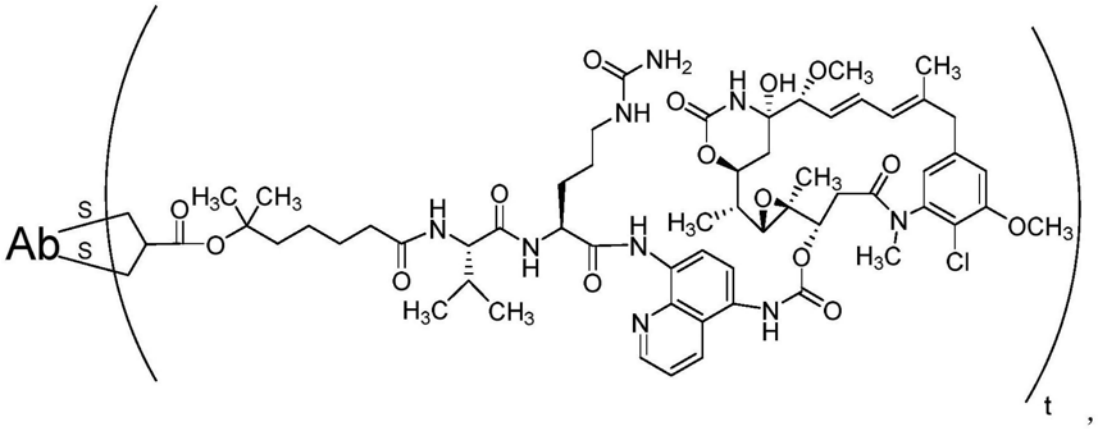




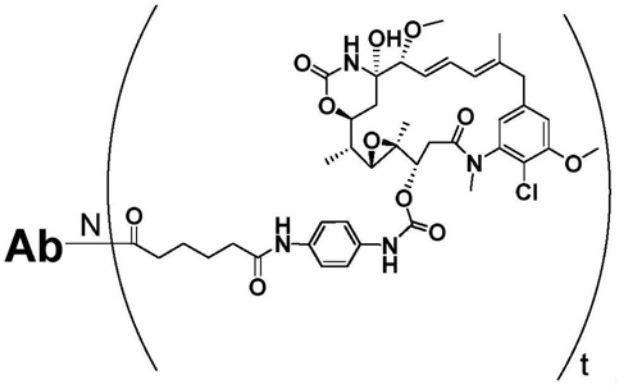




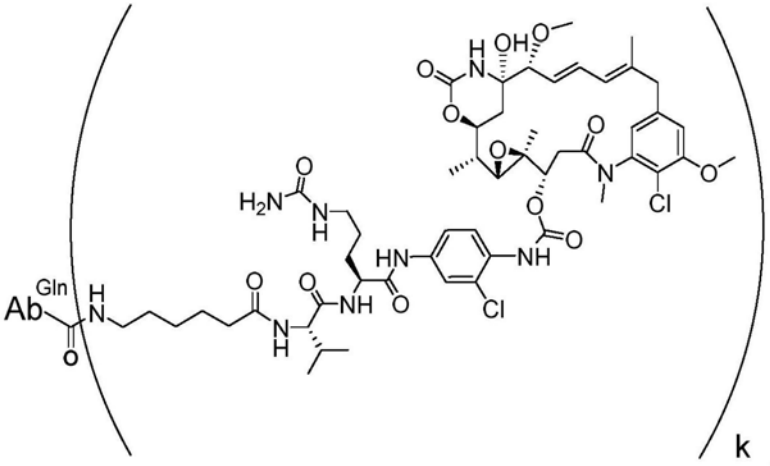




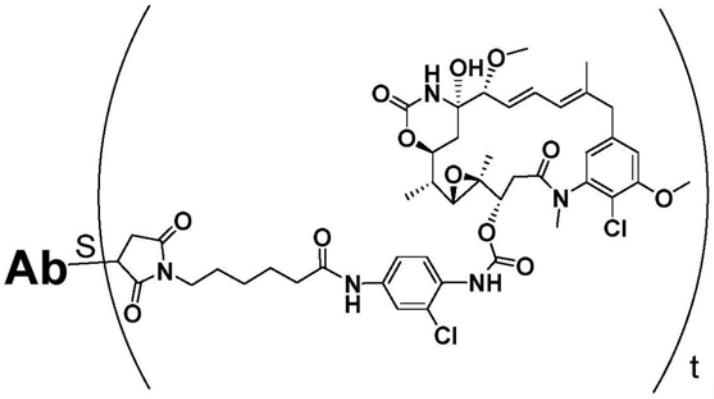
t ，



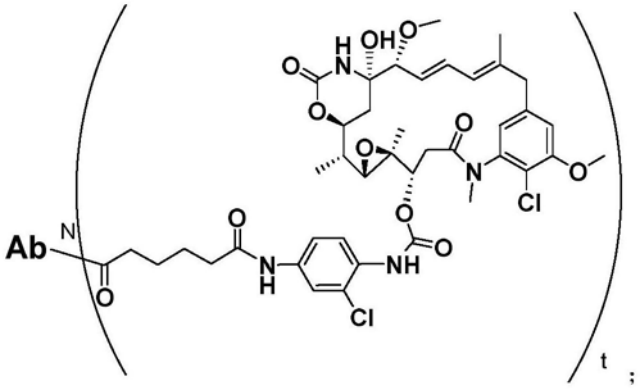
t ，



k ，



t ，和



其中：

Ab是抗体；

S是与所述抗体的半胱氨酸连接的键；

N是与所述抗体的赖氨酸连接的键；

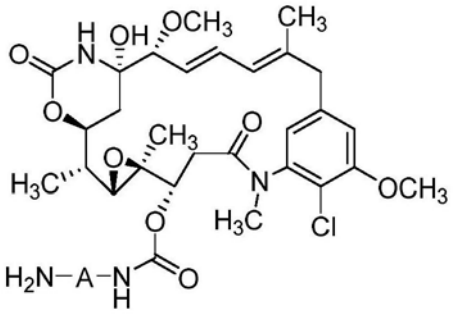
k是从1至30的整数；和

t是从1至8的整数。在一些实施例，k是从1至8的整数。在一些实施例，t是从1至4的整数。在一些实施例，当S是与所述抗体的半胱氨酸连接的键，则本发明所述的多达8个偶联物可与所述抗体结合。在一些实施例，当N是与所述抗体的赖氨酸连接的键，则本发明所述的多达30个偶联物可与所述抗体结合。

[0255] 在一些实施方案，k是从1至30的整数。在一些实施方案，k是从1至8的整数。在一些实施方案，k是从1至6的整数。在一些实施方案，k是从1至4的整数。在一些实施方案，k是从1至3的整数。在一些实施方案，所述偶联物的药物-抗体比率(DRA)是从1至30。

C.化合物

[0256] 本发明提供了式(II)所示化合物：



(II)

或其药学上可接受的盐，

其中A是亚芳基或亚杂芳基。

[0257] 在一些实施方案，所述这些化合物代表本发明所述偶联物的有效负载部分，并且在将所述偶联物内化入细胞后，例如通过酶蛋白水解进行释放。本发明提供的方法包括治疗增殖性疾病(例如癌症)的方法，包括向患者施用治疗有效量的偶联物，例如在所述偶联物内化入所述患者的细胞后，释放式(II)所示化合物的抗体-药物偶联物。

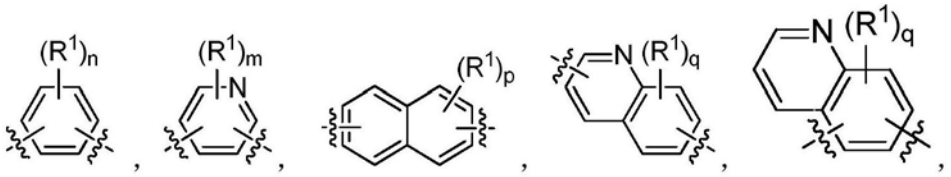
[0258] 在一些实施方案，所述这些化合物表示本发明所述偶联物的代谢产物，例如酶蛋白水解产物。在一些实施方案，所述这些化合物表示本发明所述偶联物的分解代谢产物。在

一些实施方案,所述这些化合物表示本发明所述偶联物的细胞产物。

[0259] 在一些实施方案,A是苯、吡啶、萘、或喹诺酮的二价基团,所述苯、吡啶、萘、或喹诺酮是任选取代的。

[0260] 在一些实施方案,A是亚芳基。

[0261] 在一些实施方案,A是:



其中:

R^1在每次出现时独立地为卤素、卤代烷基、卤代烷氧基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、芳烷基、杂芳基、杂烷基、杂环烷基、氰基、硝基、氨基、  或叠氮基,

其中R^A是烷基;

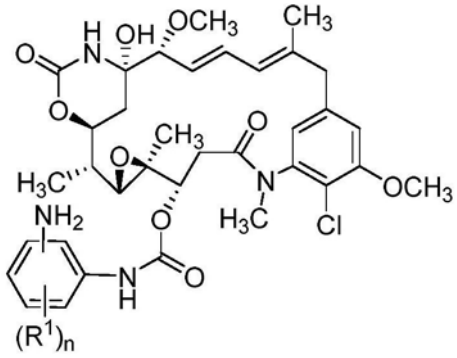
n是从0至4的整数;

m是从0至3的整数;

p是从0至6的整数;和

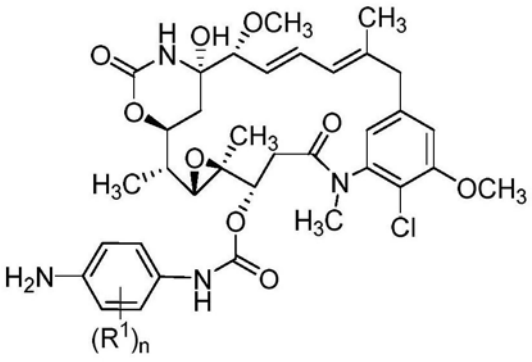
q是从0至5的整数。

[0262] 在一些实施方案,式(II)所示化合物是具有以下结构通式的化合物:



其中R^1和n均具有本发明所述定义。

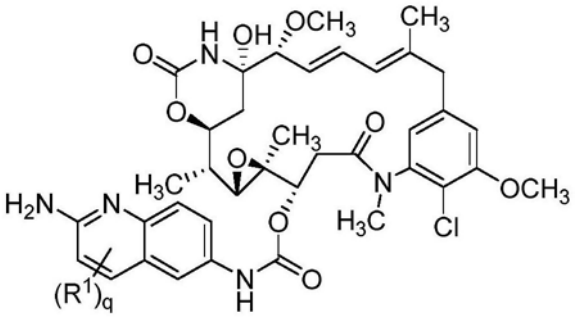
[0263] 在一些实施方案,式(II)所示化合物是式(IIA)的化合物:



(IIA)

其中R^1和n均具有本发明所述定义。在一些实施方案,R^1是烷基、烷氧基、卤代烷基、或卤素。在一些实施方案,R^1是甲基、三氟甲基、甲氧基、氟、氯、或溴。在一些实施方案,R^1是甲基。在一些实施方案,R^1是甲氧基。在一些实施方案,R^1是三氟甲基。在一些实施方案,R^1是氟。在一些实施方案,R^1是氯。在一些实施方案,R^1是溴。

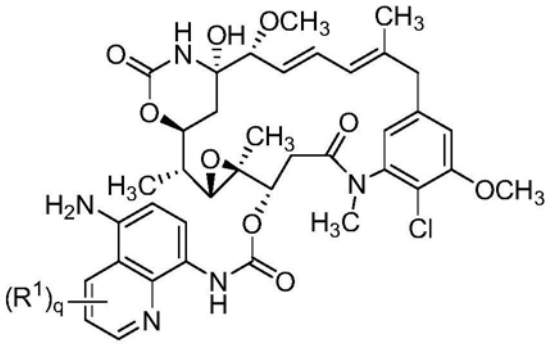
[0264] 在一些实施方案,式(II)所示化合物是式(IIB)的化合物:



(IIB)

其中R^1和q均具有本发明所述定义。

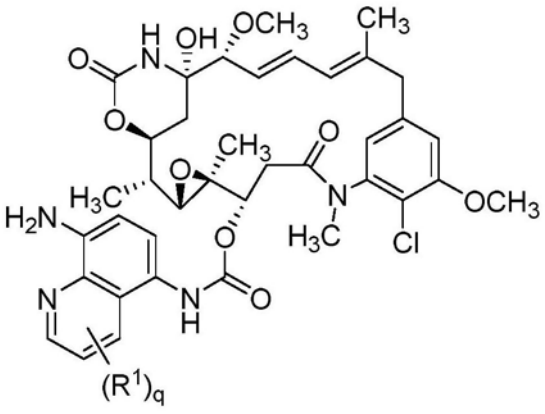
[0265] 在一些实施方案,式(II)所示化合物是式(IIB2)的化合物:



(IIB2)

其中R^1和q均具有本发明所述定义。

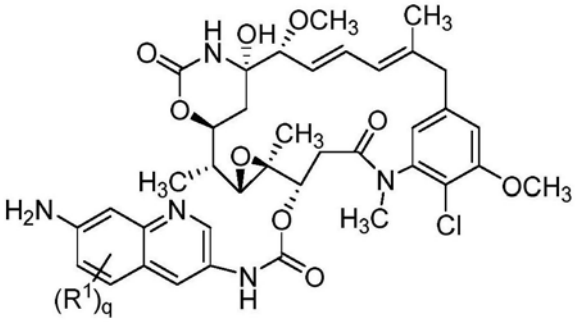
[0266] 在一些实施方案,式(II)所示化合物是式(IIB3)的化合物:



(IIB3)

其中R^1和q均具有本发明所述定义。

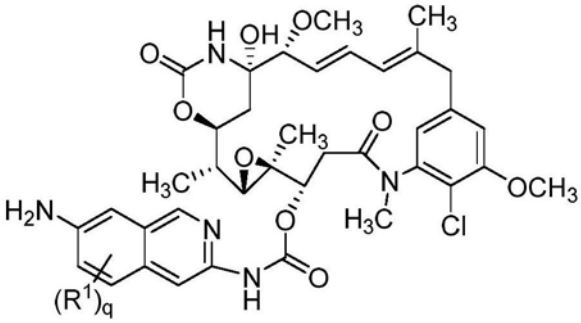
[0267] 在一些实施方案,式(II)所示化合物是式(IIC)的化合物:



(IIC)

其中R^1和q均具有本发明所述定义。

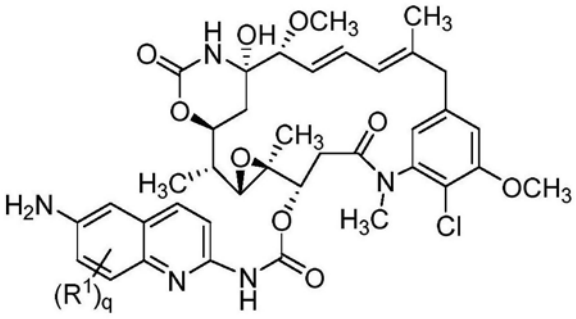
[0268] 在一些实施方案,式(II)所示化合物是式(IID)的化合物:



(IID)

其中R^1和q均具有本发明所述定义。

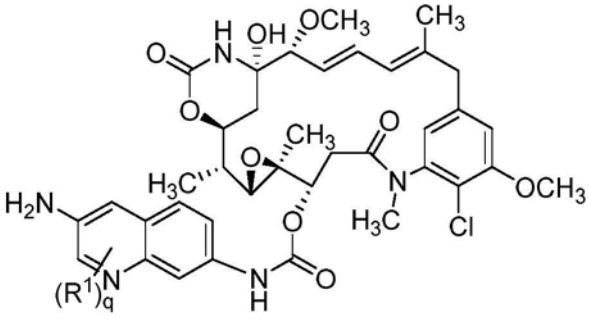
[0269] 在一些实施方案,式(II)所示化合物是式(IIE)的化合物:



(IIE)

其中R^1和q均具有本发明所述定义。

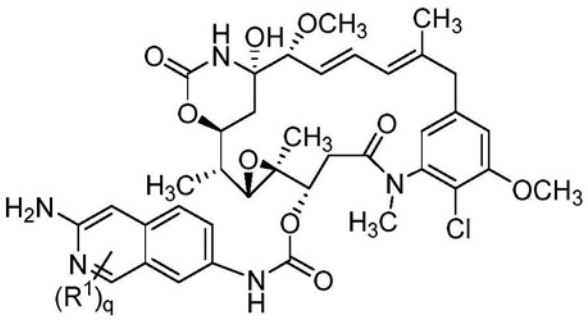
[0270] 在一些实施方案,式(II)所示化合物是式(IIF)的化合物:



(IIF)

其中R^1和q均具有本发明所述定义。

[0271] 在一些实施方案，式(II)所示化合物是式(IIG)的化合物：



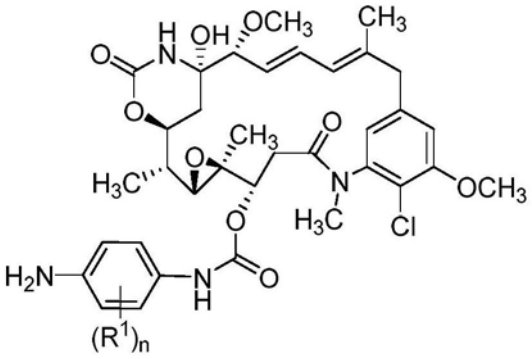
(IIG)

其中R^1和q均具有本发明所述定义。

[0272] 在一些实施方案，各R^1独立地为烷基或卤素。在一些实施方案，各R^1独立地为C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、或卤素。在一些实施方案，各R^1独立地为C_{1-6}卤代烷基、或卤素。在一些实施方案，各R^1独立地为卤素。在一些实施方案，各R^1独立地为氟、氯、溴、碘、或三氟甲基。在一些实施方案，n、m、p、或q是0、1或2。在一些实施方案，n、m、p、或q是0或1。在一些实施方案，n、m、p、或q是0。

[0273] 在一些实施方案，各R^1独立地为烷基、烷氧基、杂烷基、卤素、卤代烷基、或卤代烷氧基。在一些实施方案，各R^1独立地为C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}卤代烷氧基、或卤素。在一些实施方案，各R^1独立地为C_{1-6}烷基、或C_{1-6}烷氧基。在一些实施方案，各R^1独立地为烷氧基。在一些实施方案，各R^1独立地为甲氧基、乙氧基、或丙氧基。在一些实施方案，n、m、p、或q是0、1或2。在一些实施方案，n、m、p、或q是0或1。在一些实施方案，n、m、p、或q是0。

[0274] 在一些实施方案，式(II)所示化合物是式(IIA)的化合物：

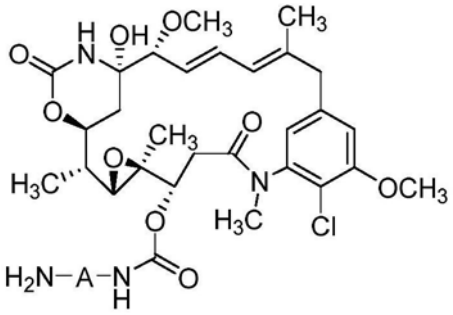


(IIA)

其中：

R^1在每次出现时独立地为卤素、甲基、甲氧基、或三氟甲基；和n是0、1、或2。在一些实施方案，R^1是烷基、烷氧基、卤代烷基、或卤素。在一些实施方案，R^1是甲基、三氟甲基、甲氧基、氟、氯、或溴。在一些实施方案，R^1是甲基。在一些实施方案，R^1是甲氧基。在一些实施方案，R^1是三氟甲基。在一些实施方案，R^1是氟。在一些实施方案，R^1是氯。在一些实施方案，R^1是溴。在一些实施例，R^1是杂环烷基。在一些实施例，R^1是吡咯烷基。在一些实施例，R^1是吗啉基。

[0275] 式IIA1-3所示化合物：

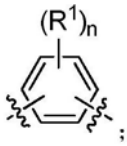


(IIA1-3)

或其药学上可接受的盐，

其中：

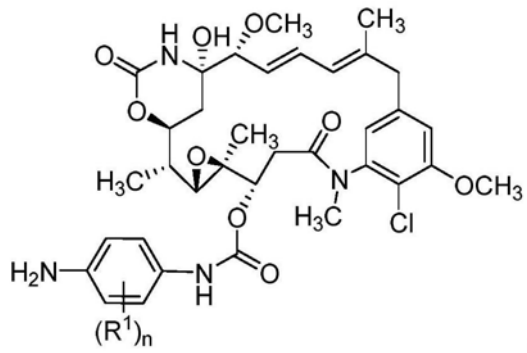
A是：



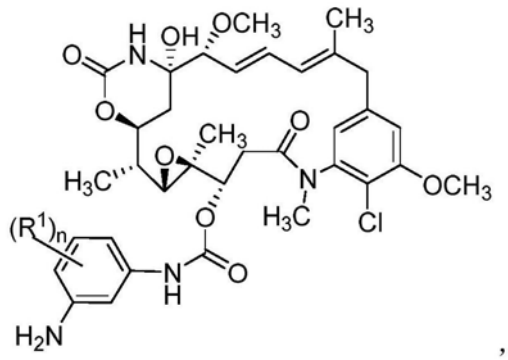
；

R^1在每次出现时独立地选自烷基、烷氧基、卤素、卤代烷基、和杂环烷基；和n是从0至4的整数。

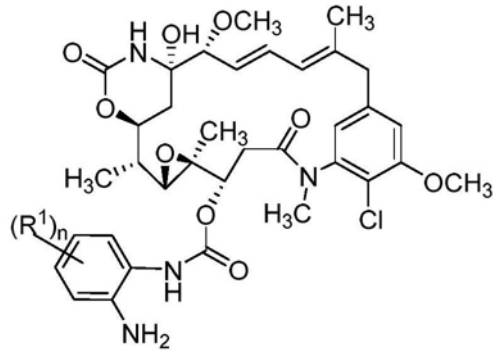
[0276] 在一些实施方案，所述化合物是选自式(IIA1)的化合物，式(IIA2)的化合物，和式(IIA3)的化合物：



(IIA1)，



(IIA2)，



(IIA3)。

[0277] 在一些实施方案，本发明所述化合物，其中n是0、1、或2。

[0278] 在一些实施方案，本发明所述化合物，其中R^1在每次出现时独立地选自C_{1-6}烷基、

C_{1-6}烷氧基、卤素、C_{1-6}卤代烷基、和杂环烷基。

[0279] 在一些实施方案，R^1在每次出现时独立地选自甲基、甲氧基、氟、氯、溴、三氟甲基、吡咯烷基、和吗啉基。

[0280] 在一些实施方案，R^1是甲基。

[0281] 在一些实施方案，R^1在每次出现时独立地选自氟、氯、和溴。

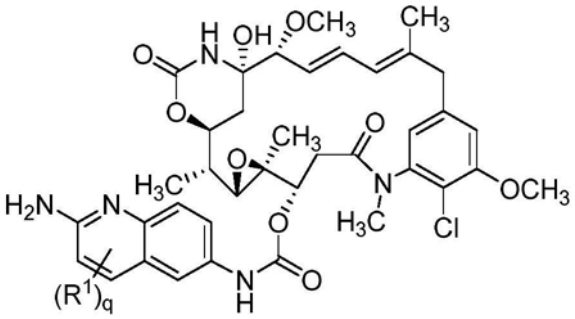
[0282] 在一些实施方案，R^1是氯。

[0283] 在一些实施方案，R^1是三氟甲基。

[0284] 在一些实施方案，R^1是甲氧基。

[0285] 在一些实施方案，R^1在每次出现时独立地选自甲基、吗啉基、和吡咯烷基。

[0286] 在一些实施方案，式(II)所示化合物是式(IIB)的化合物：



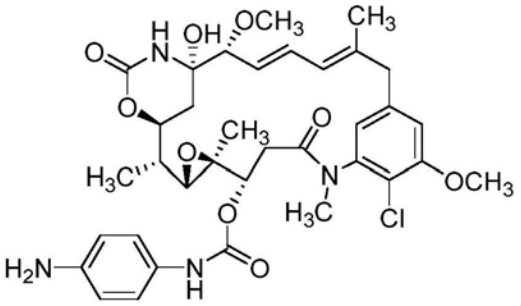
(IIB)

其中：

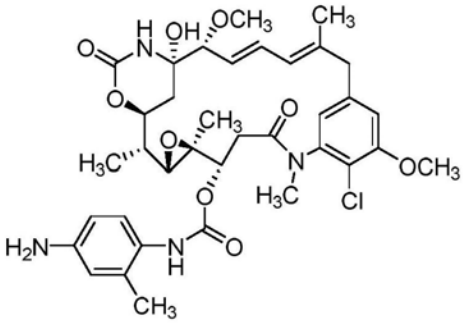
R^1在每次出现时独立地为卤素或三氟甲基；和

q是0、1或2。

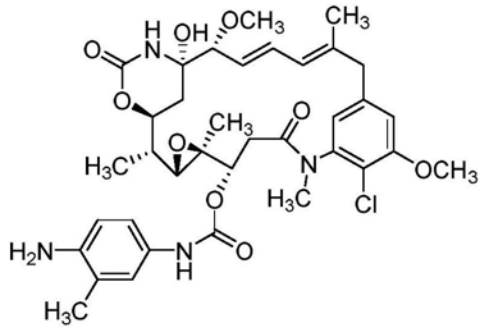
[0287] 在一些实施方案，式(II)所示化合物是：



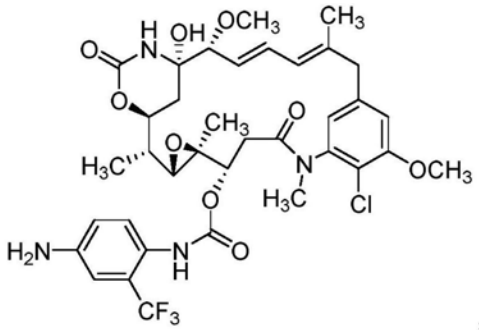
，



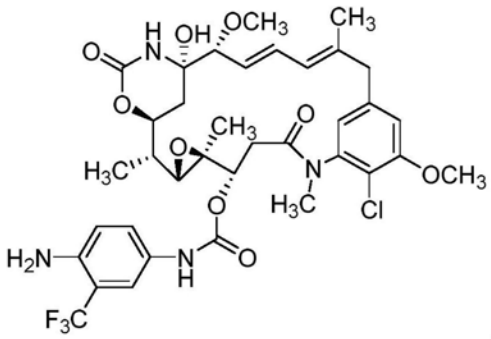
，



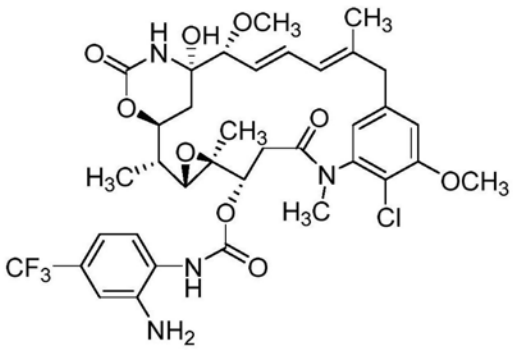
,



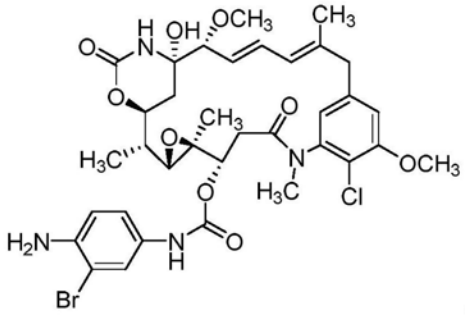
,



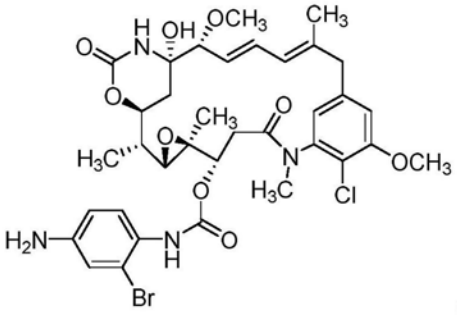
,



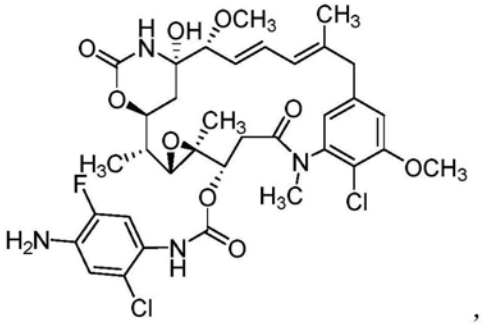
,



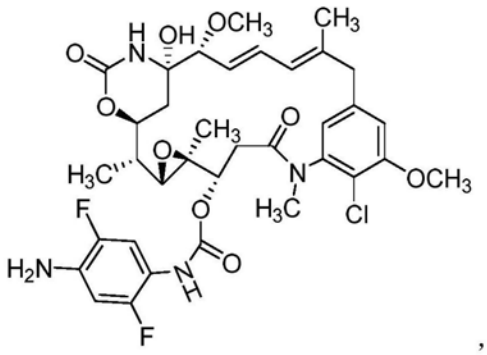
,



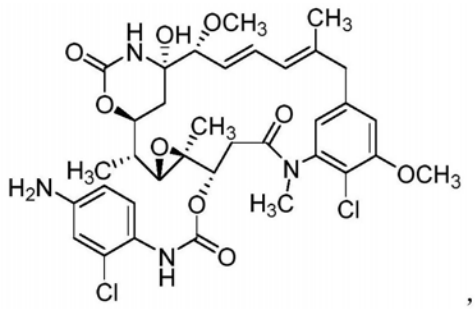
,



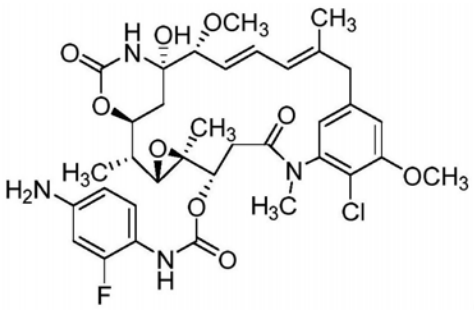
,



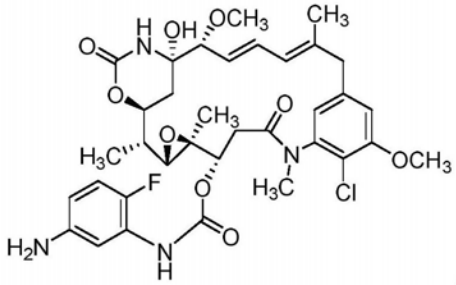
,



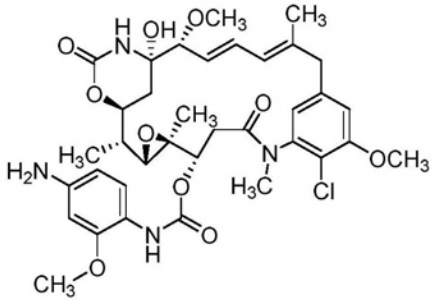
,



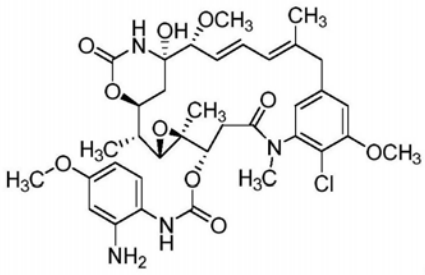
,



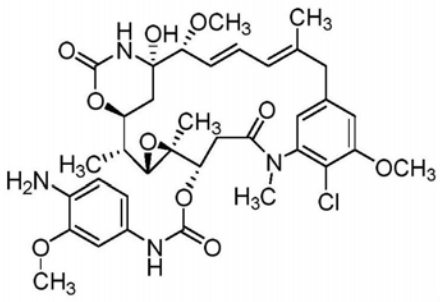
,



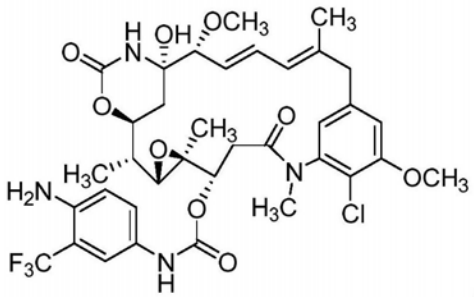
,



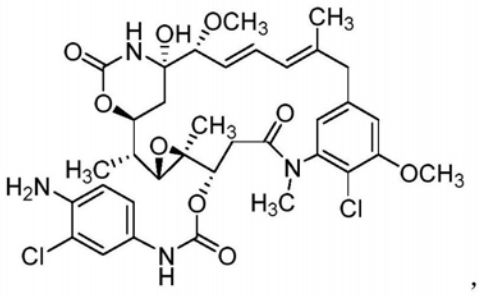
,



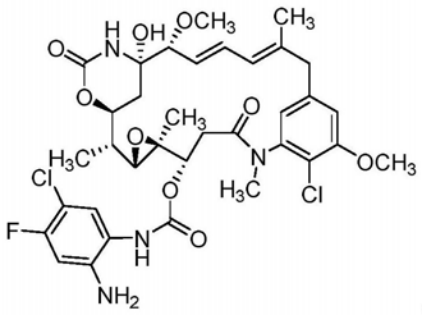
,



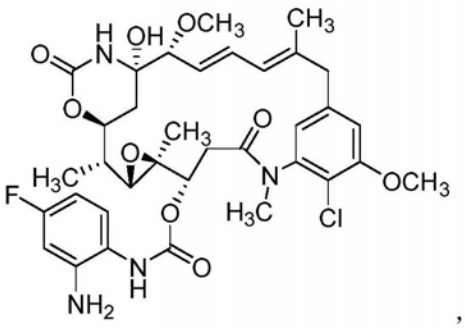
,



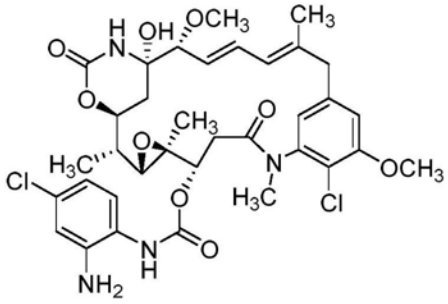
,

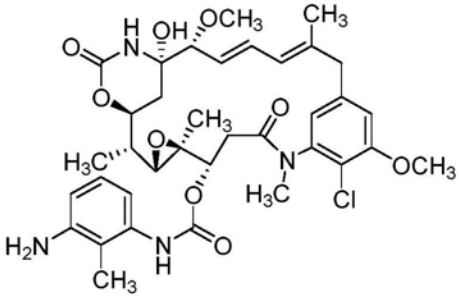


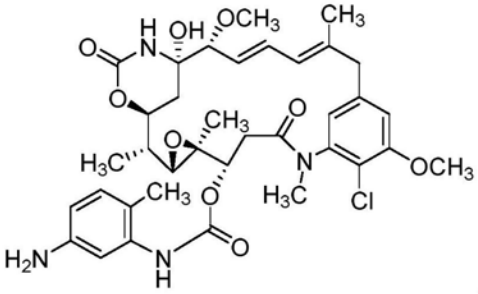
,

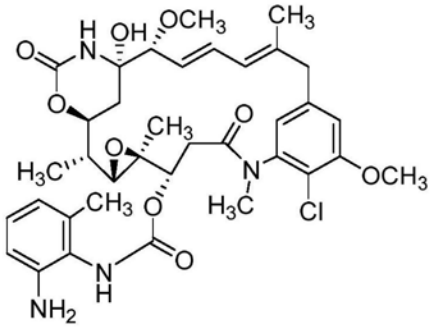


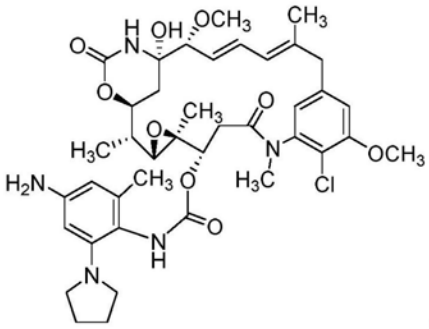
,

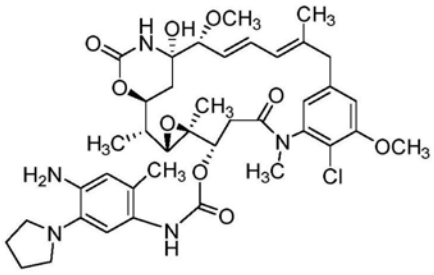

，

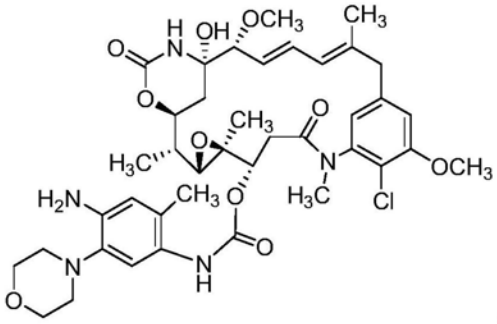

，


，

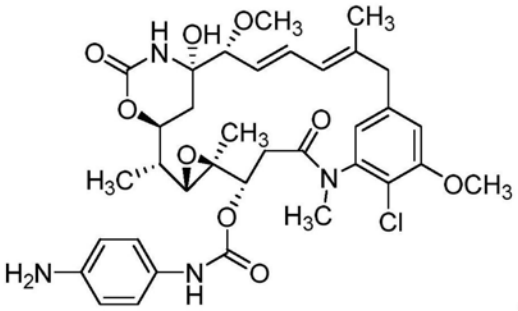

，


，

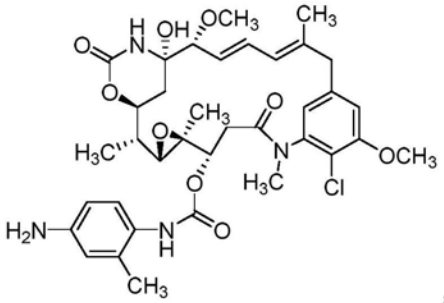

，和


。

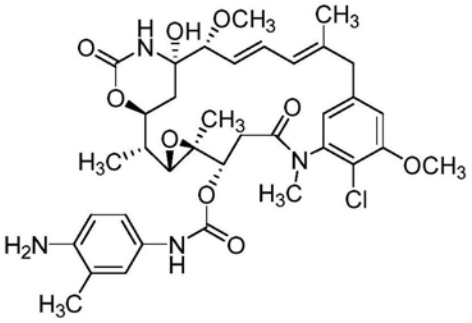
[0288] 在一些实施方案，式(II)所示化合物是：



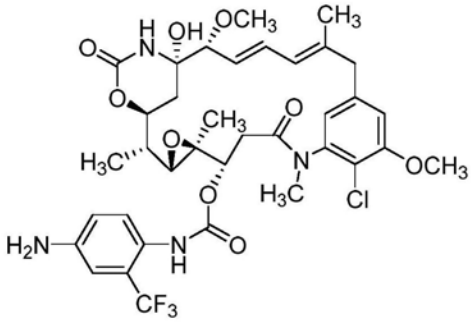
,



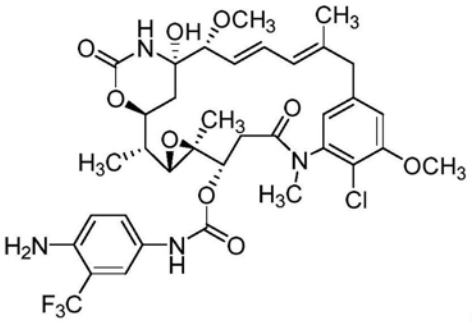
,



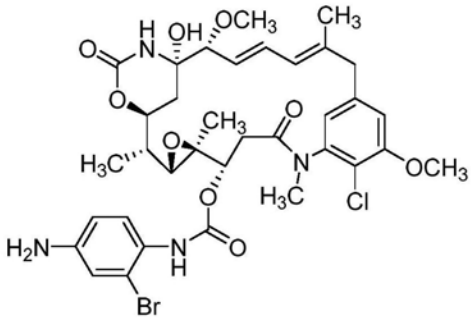
,



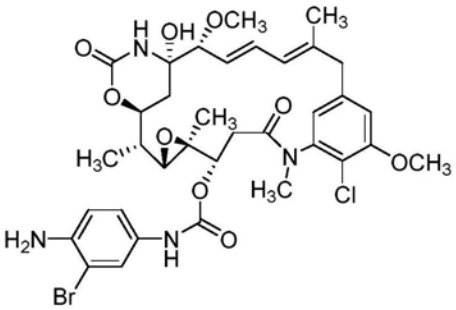
,



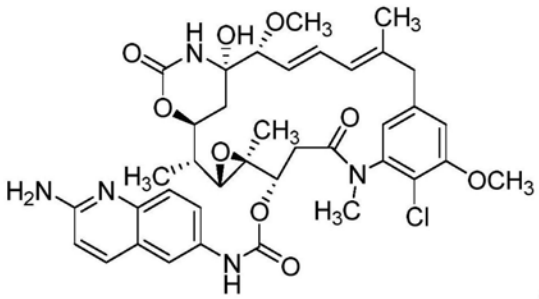
,



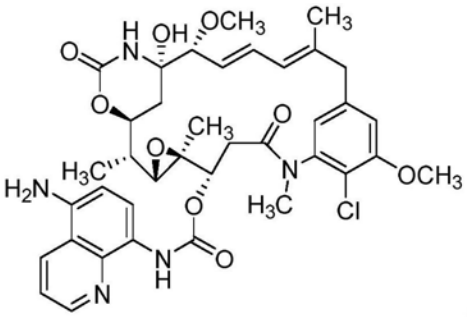
,



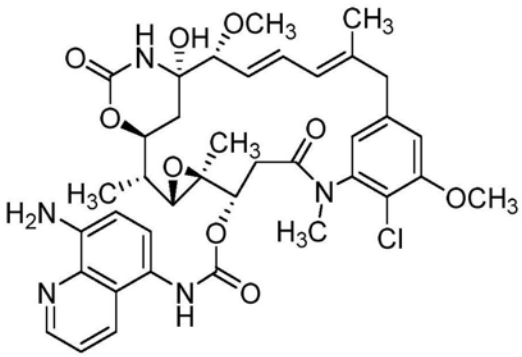
,



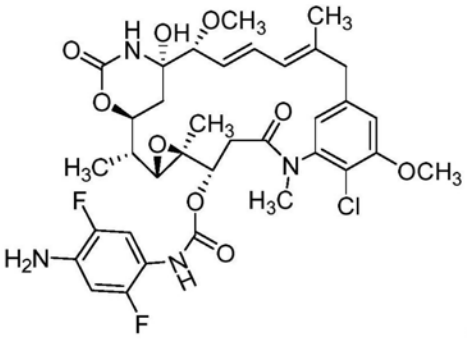
,



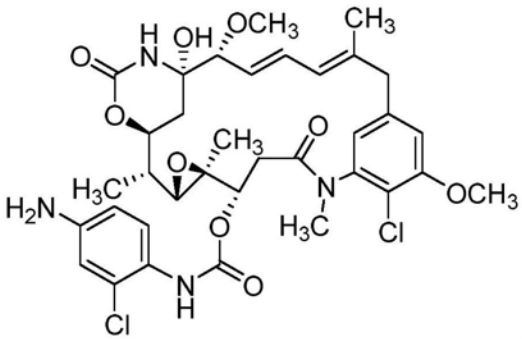
,



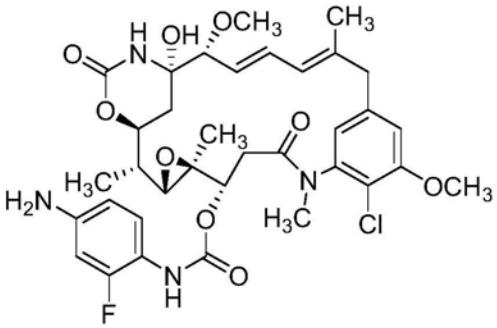
,



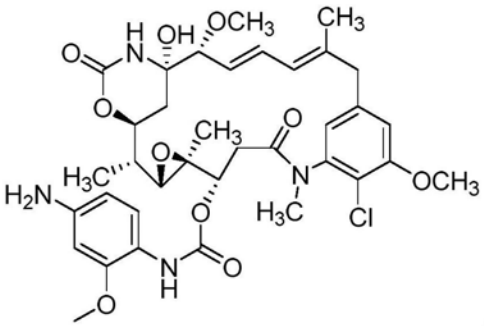
,



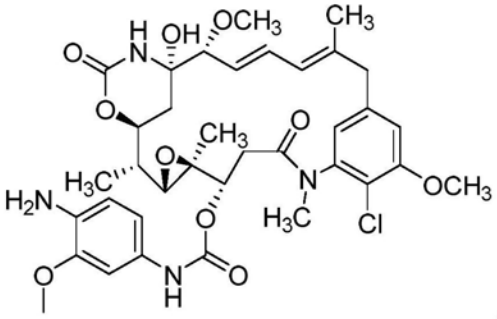
,



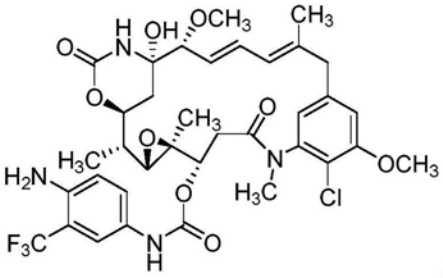
,



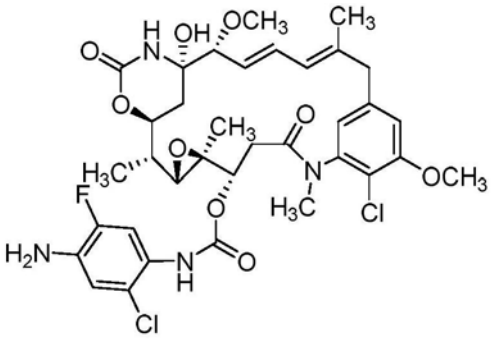
,



,



，或



。

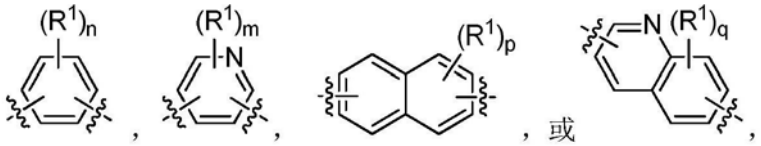
[0289] 在一些实施方案，所述这些化合物代表本发明所述偶联物的有效负载部分，并且在将所述偶联物内化入细胞后，例如通过酶蛋白水解进行释放。本发明提供的方法包括治疗增殖性疾病(例如癌症)的方法，包括向患者施用治疗有效量的偶联物，例如在所述偶联物内化入所述患者的细胞后，释放式(II)所示化合物的抗体-药物偶联物。

[0290] 在一些实施方案，所述这些化合物代表本发明所述偶联物的代谢产物，例如酶蛋白水解产物。

[0291] 在一些实施方案，A是苯、吡啶、萘、或喹诺酮的二价基团，所述苯、吡啶、萘、和喹诺酮是任选取代的。

[0292] 在一些实施方案，A是亚芳基。

[0293] 在一些实施方案，A是：



其中：

R^1在每次出现时独立地为烷基、烯基、炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、卤素、卤代烷氧基、杂芳基、杂环烷基、氰基、硝基、  或叠氮基，

其中R^A是烷基；

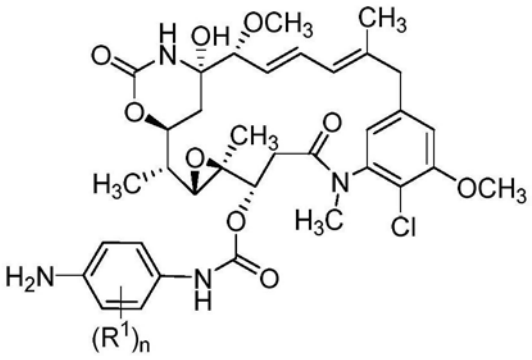
n是从0至4的整数；

m是从0至3的整数；

p是从0至6的整数；和

q是从0至5的整数。

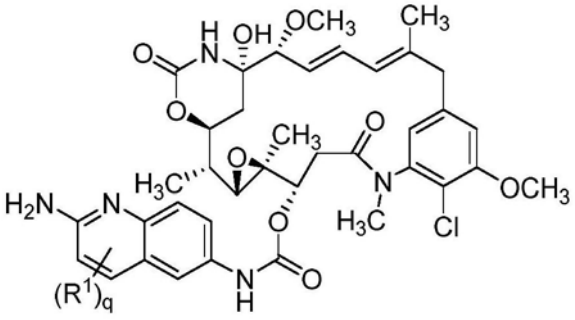
[0294] 在一些实施方案，式(II)所示化合物是式(IIA)的化合物：



(IIA)

其中R^1在每次出现时独立地为甲基、甲氧基、卤素、或三氟甲基;和n是0、1、或2。在一些实施方案,R^1是甲基、三氟甲基、甲氧基、氟、氯、或溴。在一些实施方案,R^1是甲基。在一些实施方案,R^1是甲氧基。在一些实施方案,R^1是三氟甲基。在一些实施方案,R^1是氟。在一些实施方案,R^1是氯。在一些实施方案,R^1是溴。

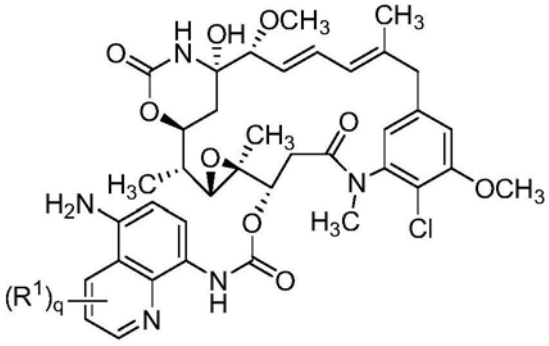
[0295] 在一些实施方案,式(II)所示化合物是式(IIB)的化合物:



(IIB)

其中R^1在每次出现时独立地为甲氧基、甲基、卤素、或三氟甲基;和q是0、1、或2。

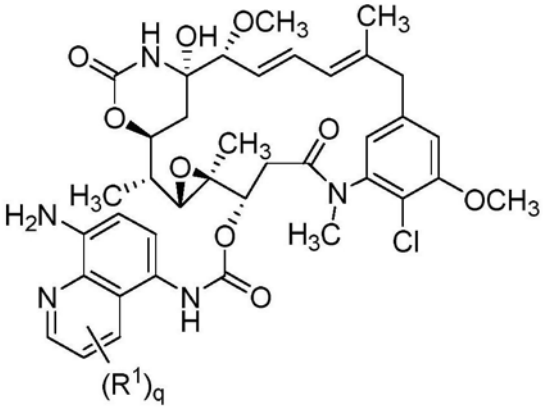
[0296] 在一些实施方案,式(II)所示化合物是式(IIB2)的化合物:



(IIB2)

其中R^1在每次出现时独立地为甲氧基、卤素、或三氟甲基;和q是0、1、或2。

[0297] 在一些实施方案,式(II)所示化合物是式(IIB3)的化合物:



(IIB3)。

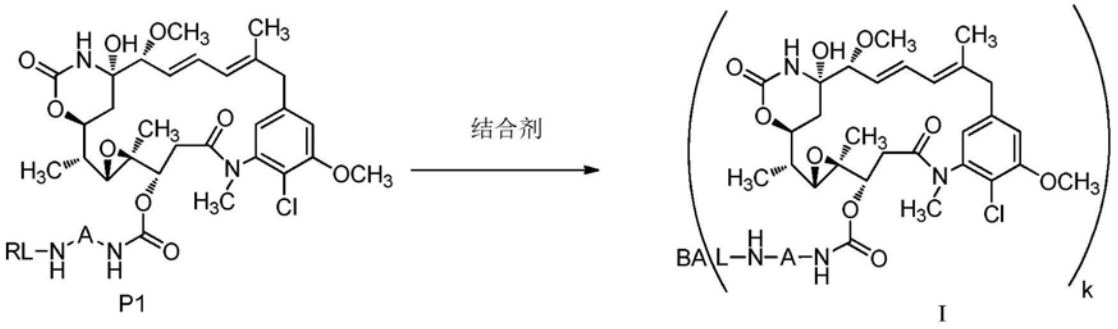
[0298] 其中R^1在每次出现时独立地为甲氧基、卤素、或三氟甲基;和q是0、1、或2。在一些实施方案,各R^1独立地为烷基或卤素。在一些实施方案,各R^1独立地为C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、或卤素。在一些实施方案,各R^1独立地为C_{1-6}卤代烷基或卤素。在一些实施方案,各R^1独立地为卤素。在一些实施方案,各R^1独立地为氟、氯、溴、碘、或三氟甲基。在一些实施方案,n、m、p、或q是0、1或2。在一些实施方案,n、m、p、或q是0或1。在一些实施方案,n、m、p、或q是0。

[0299] 在一些实施方案,各R^1独立地为烷基、烷氧基、杂烷基、卤素、卤代烷基、或卤代烷氧基。在一些实施方案,各R^1独立地为C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}卤代烷氧基、或卤素。在一些实施方案,各R^1独立地为C_{1-6}烷基、或C_{1-6}烷氧基。在一些实施方案,各R^1独立地为烷氧基。在一些实施方案,各R^1独立地为甲氧基、乙氧基、或丙氧基。在一些实施方案,n、m、p、或q是0、1或2。在一些实施方案,n、m、p、或q是0或1。在一些实施方案,n、m、p、或q是0。

[0300] 在一些实施方案,本发明提供的化合物包括与本发明所述连接体和/或结合剂共价连接的本发明所述的任何化合物。在一些实施例,本发明提供了与本发明所述连接体和/或结合剂共价连接的本发明所述的任何美登素类化合物。

D.化合物的制备

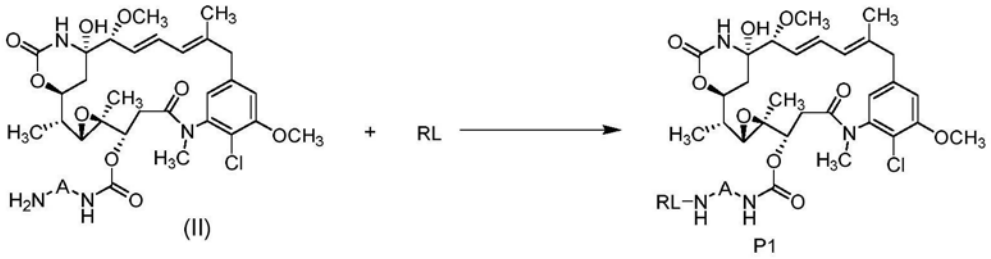
[0301] 式I所示化合物可通过使式P1的化合物与结合剂如抗体在标准偶联条件下(参见如Doronina et al.,Nature Biotechnology 2003,21,7,778,其通过引用并入本文)进行偶联合成得到。当所述结合剂是抗体时,所述抗体可通过所述抗体的一个或多个半胱氨酸或赖氨酸残基与式P1的化合物偶联。式P1的化合物可与半胱氨酸残基偶联,譬如,通过使抗体经还原剂,如二硫苏糖醇,来裂解所述抗体的二硫键,通过例如凝胶过滤来纯化还原的抗体,随后使抗体与含有活性部分如马来酰亚胺基基团的式P1的化合物反应。适宜的溶剂包括,但不限于水、DMA、DMF、和DMSO。含有活性部分如活化酯或酰卤基团的式P1的化合物,可与赖氨酸残基偶联。适宜的溶剂包括,但不限于水、DMA、DMF、和DMSO。式I所示化合物可使用已知蛋白技术,包括譬如体积排阻色谱法、透析法、和超滤/渗滤法进行纯化。



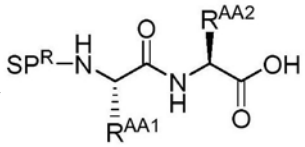
其中RL是活性连接体，A是亚芳基或亚杂芳基，L是连接体，和BA是结合剂。

[0302] 在一些实施例，本发明涉及制备式(I)化合物的方法，其中所述方法包括使式P1的化合物与结合剂接触。在所述这些方法中的一些，所述接触是在标准抗体偶联条件下进行的。在所述这些实施例中的一些，所述结合剂是抗体。在所述这些实例中的一些，所述结合剂是抗体的片段。在本发明的一些实施例中，所述方法包括使式P1所示化合物与抗体的一个或多个半胱氨酸或赖氨酸残基接触。在本发明的一些实施例中，所述方法包括使式P1所示化合物与抗体的一个或多个半胱氨酸或赖氨酸残基在溶剂中接触。在一些实施方案，所述溶剂是单一化合物。在一些实施方案，所述溶剂是两种或更多种化合物的混合物。在一些实施例，所述方法包括使式P1所示化合物与抗体的一个或多个半胱氨酸或赖氨酸残基在选自水、DMA、DMF或DMSO的溶剂中接触。

[0303] 在一些实施例，本发明涉及制备式P1所示化合物的方法，其中所述方法包括使式(II)所示化合物与活性连接体(RL)反应，其中RL为本发明所述的活性连接体。



[0304] 在一些实施例，本发明涉及制备式P1所示化合物的方法，其中所述方法包括使式(II)所示化合物与本发明所述的活性连接体反应。在一些实施例，所述方法包括在溶剂存在下使式P1所示的化合物与RL反应。在一些实施例，所述溶剂是DCM。在一些其他实施例，所述溶剂是甲醇。在一些其他实施例，所述溶剂是无水甲醇。在某些其他实施例，所述溶剂是DCM和甲醇的组合。在一些其他实施例，所述溶剂是DCM和无水甲醇的组合。

[0305] 在一些实施例，所述RL是选自式PP7的化合物  其中SP^R是活性间隔基团；R^{AA1}是氨基酸侧链；R^{AA2}是氨基酸侧链。在一些实施例，R^{AA1}和R^{AA2}独立地为天然或非天然氨基酸侧链。在制备式P1所示化合物的方法的一些实施例中，所述方法包括在酰胺合成条件下使式(II)所示化合物与式PP7所示化合物反应。在所述这些实施例中的一些，式PP7所示化合物在与式(II)所示化合物反应之前转化为活化酯。

PP7

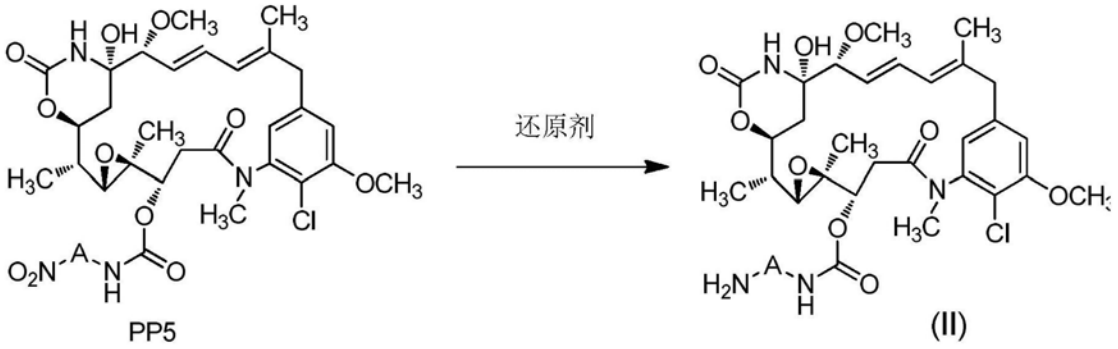
[0306] 在制备式P1所示化合物的方法的一些实施例中，所述方法包括使式(II)所示化合物与RL接触。在所述这些实施例中的一些，所述方法包括在酰胺合成条件下使式(II)所示化合物与RL接触。在一些实施例，所述RL在RL化合物的一个末端包含羧酸基团。如式(II)所示，式(II)所示化合物在所述化合物的一个末端包含至少一个氨基基团。在一些实施例，所述方法包括将所述RL化合物的羧酸基团转化为活化酯。在一些实施例，所述方法还包括使所述活化酯与式(II)所示化合物上的氨基基团反应。在本发明的一些实施例中，将所述羧酸转化为活化酯的方法包括使所述羧酸与试剂接触。在本发明的一些实施例中，将所述RL的羧酸转化为活化酯的方法包括使所述RL与选自二环己基碳二亚胺(DCC)、二异丙基碳二亚胺(DIC)、(苯并三氮唑-1-基氧基)三(二甲基氨基)磷鎓六氟磷酸盐(BOP)、(苯并三唑-1-基氧基)三吡咯烷基鏻六氟磷酸盐(PyBOP)、(7-偶氮苯并三氮唑-1-基氧基)三吡咯烷基鏻六氟磷酸盐(PyAOP)、三吡咯烷基溴化鏻六氟磷酸盐(PyBrOP)、O-(苯并三氮唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐(HBTU)、O-(苯并三氮唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟硼酸盐(TBTU)、1-[双(二甲氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三氮唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化六氟磷酸盐(HATU)、2-乙氧基-1-乙氧羰基-1,2-二氢喹啉(EEDQ)，1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)、2-氯-1,3-二甲基咪唑鎓六氟磷酸盐(CIP)、2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪(CDMT)、和羰二咪唑(CDI)的试剂接触。在一些实施例，所述方法包括将所述RL化合物的羧酸基团转化为酰氯。在一些实施例，所述方法包括将所述RL化合物的羧酸基团转化为酰氯，例如通过使RL的羧酸与EEDQ接触。在本发明的一些实施例中，所述RL的羧酸被转化为混合酸酐，例如通过使所述RL的羧酸与EEDQ接触。在本发明的一些实施例中，将所述RL的羧酸转化为混合酸酐的方法包括使所述RL的羧酸与EEDQ接触。在本发明的一些实施例中，将所述RL的羧酸转化为混合酸酐的方法包括使所述RL的羧酸与EEDQ在选自DCM的溶剂中接触。

[0307] 在一些实施例，本发明涉及制备式P1所示化合物的方法，其中所述方法包括使式(II)所示化合物与RL反应，其中RL为6-马来酰亚胺基-己酰胺基-L-缬氨酸-L-瓜氨酸。在一些实施例，在与式(II)所示化合物反应之前，使6-马来酰亚胺基-己酰胺基-L-缬氨酸-L-瓜氨酸活化以形成活化酯。在一些实施例，本发明方法包括通过使BOC保护的L-缬氨酸-L-瓜氨酸与2-(2-氨基-3-甲基-丁酰氨基)-5-脲基-戊酸以及6-(2,5-二氧-2,5-二氢-吡咯-1-基)-己酸2,5-二氧-吡咯烷-1-基酯反应来提供6-马来酰亚胺基-己酰胺基-L-缬氨酸-L-瓜氨酸。在一些本发明所述方法中，所述方法包括使BOC保护的L-缬氨酸-L-瓜氨酸与2-(2-氨基-3-甲基-丁酰氨基)-5-脲基-戊酸以及6-(2,5-二氧-2,5-二氢-吡咯-1-基)-己酸2,5-二氧-吡咯烷-1-基酯在DMF中反应来提供6-马来酰亚胺基-己酰胺基-L-缬氨酸-L-瓜氨酸。在一些本发明所述方法中，所述方法包括使BOC保护的L-缬氨酸-L-瓜氨酸与2-(2-氨基-3-甲基-丁酰氨基)-5-脲基-戊酸以及6-(2,5-二氧-2,5-二氢-吡咯-1-基)-己酸2,5-二氧-吡咯烷-1-基酯在DIEA中反应来提供6-马来酰亚胺基-己酰胺基-L-缬氨酸-L-瓜氨酸。

[0308] 在制备式P1所示化合物的方法的一些实施例中，所述方法包括使式(II)所示化合物与己二酸酐反应。在所述这些方法中，所述己二酸酐是活化酯。在所述这些实施例中的一些，所述方法包括使式(II)所示化合物与己二酸酐和三乙胺反应。在一些实施例，所述方法包括使式(II)所示化合物与己二酸酐和三乙胺在四氢呋喃中反应。在所述这些实施例中的一些，所述方法包括使式(II)所示化合物与己二酸酐和三乙胺在二甲基甲酰胺中反应。在所述这些实施例中的一些，所述方法包括使式(II)所示化合物与己二酸酐和三乙胺在四氢

呋喃和二甲基甲酰胺(DMF)中反应。在一些实施例,所述这些方法还包括使N-羟基琥珀酰亚胺与前述方法的产物反应。在所述这些实施例的一些其他中,所述这些方法还包括使N-羟基琥珀酰亚胺和EDC盐酸盐与上述方法所得产物反应。

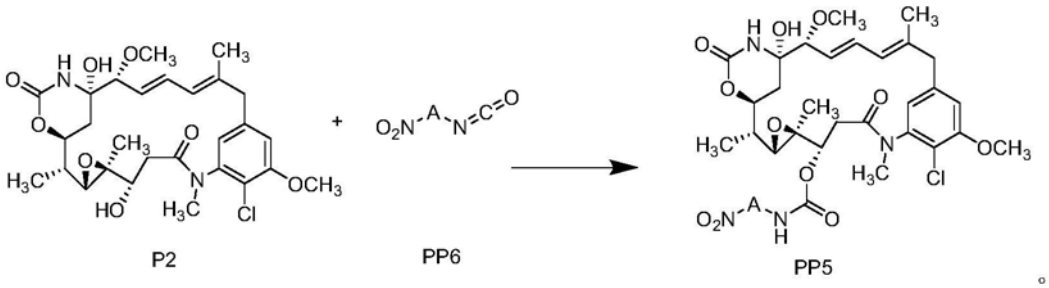
[0309] 在一些实施例,本发明涉及制备式(II)所示化合物的方法。在一些实施例,所述这些方法包括使式PP5的化合物与合适的还原剂反应。



PP5 (II)

[0310] 在制备式(II)所示化合物的这些方法中的一些,所述合适的还原剂包括金属、金属箔、金属粉、金属尘、金属汞齐或金属屑。在某些实施方案,所述金属选自锌、铁、铝、钯或雷尼镍。在所述这些方法中的一些方法中,所述合适的还原剂是Zn箔、Zn粉、Zn尘、Zn汞齐或Zn屑。在所述这些方法中的一些中,所述合适的还原剂是Zn箔。在所述这些方法中的一些中,所述合适的还原剂是Zn粉。在所述这些方法中的一些中,所述合适的还原剂是Zn尘。在所述这些方法中的一些中,所述合适的还原剂是Zn汞齐。在所述这些方法的一些中,所述合适的还原剂是Zn屑。在一些方法中,所述方法还包括在溶剂存在下还原式PP5所示化合物。在一些实施例,所述溶剂是乙酸。在一些实施例,所述溶剂是四氢呋喃。在一些实施例,所述溶剂是乙酸和四氢呋喃的组合。在一些实施例,所述溶剂是乙腈。在一些实施例,所述溶剂是乙腈和水。

[0311] 在一些实施例,本发明涉及制备式PP5所示化合物的方法。在一些实施例,所述这些方法包括使式P2所示化合物与式PP6所示化合物反应。



P2 PP6 PP5

在所述这些实施例的一些中,A是亚芳基或亚杂芳基,所述亚芳基或亚杂芳基是任选取代的,如本发明所述。

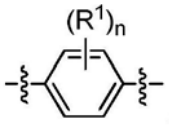
[0312] 在制备式PP5所示化合物的方法的一些实施例中,所述方法包括在路易斯酸条件下使式P2所示化合物与式PP6所示化合物反应。在一些实施例,PP6的化合物是对硝基-苯基-异氰酸酯。在一些实施例,PP6的化合物是间硝基-苯基-异氰酸酯。在一些实施例,所述路易斯酸条件包括在式P2所示化合物与式PP6所示化合物反应期间使用路易斯酸。在一些实施例,式P2所示化合物在路易斯酸存在下与式PP6所示化合物反应。合适的路易斯酸包括但不限于$AlBr_3$、$AlCl_3$、BCl_3、三氯化硼甲基硫化物、BF_3、三氟化硼甲基醚合物、三氟化硼甲

基硫化物、三氟化硼四氢呋喃、二环己基硼三氟甲磺酸盐、溴化铁(III)、氯化铁(III)、氯化锡(IV)、氯化钛(IV)、异丙醇钛(IV)、$Cu(OTf)_2$、$CuCl_2$、$CuBr_2$、氯化锌、烷基铝卤化物类(R_nAlX_{3-n},其中R是烃基和n是从0至3)、$Zn(OTf)_2$、$Yb(OTf)_3$、$Sc(OTf)_3$、$MgBr_2$、$NiCl_2$、$Sn(OTf)_2$、$Ni(OTf)_2$、或$Mg(OTf)_2$。在一些实施例,所述路易斯酸是$ZnCl_2$。在一些实施例,所述路易斯酸条件包括在式P2所示化合物与式PP6所示化合物反应期间使用路易斯酸和有机溶剂。在一些实施例,式P2所示化合物是在路易斯酸和有机溶剂存在下与式PP6所示化合物反应。在一些实施例,所述有机溶剂是二氯甲烷(DCM)。在一些实施例,式P2所示化合物在$ZnCl_2$和DCM存在下与式PP6所示化合物反应。在一些实施例,式P2所示化合物在$ZnCl_2$、DCM和乙醚存在下与式PP6所示化合物反应。在一些实施例,式P2所示化合物在DCM存在下以及$ZnCl_2$的乙醚溶液存在下与式PP6所示化合物反应。在一些实施例,式P2所示化合物与式PP6所示化合物在DCM存在下反应,其中在所述反应过程中加入$ZnCl_2$作为$ZnCl_2$的乙醚溶液。在一些实施例,本发明方法包括使式P2的化合物与式PP6的化合物在路易斯酸条件下反应至少2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22或24小时。在一些实施例,本发明方法包括使式P2的化合物与式PP6的化合物在路易斯酸条件下反应2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22或24小时。在一些实施例,本发明方法包括使式P2的化合物与式PP6的化合物在路易斯酸条件下反应16小时。在一些实施例,本发明方法包括使式P2所示化合物与式PP6所示化合物在路易斯酸条件下反应18小时。在一些实施例,本发明方法包括使式P2所示化合物与式PP6所示化合物在路易斯酸条件下反应20小时。在一些实施例,本发明方法包括使式P2所示化合物与式PP6所示化合物在路易斯酸条件下反应24小时。

[0313] 在一些实施例,在式P2所示化合物与式PP6所示化合物反应后,将所得产物用水稀释并用有机溶剂萃取一次、两次或三次。在一些实施例,用于所述萃取的有机溶剂选自乙酸乙酯(EtOAc)。

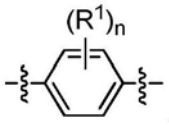
[0314] 在一些实施例,在式P2所示化合物与式PP6所示化合物反应后,将所得产物浓缩至干。在一些实施例,在式P2所示化合物与式PP6所示化合物反应后,将所得产物浓缩至干并通过色谱法纯化。

[0315] 在一些实施方案,式P1所示化合物包括A,其中A是:



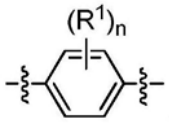
其中n是0或1;和R^1是烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、或卤代烷基。

[0316] 在一些实施方案,式P1所示化合物包括A,其中A是:

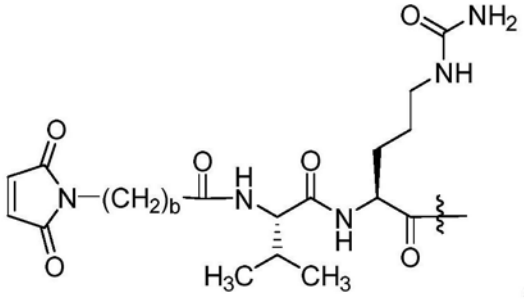


其中n是0或1;和R^1是C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、卤素、C_{1-6}卤代烷氧基、或C_{1-6}卤代烷基。

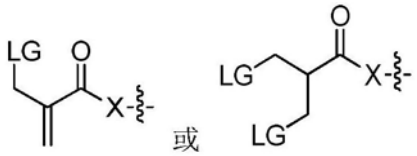
[0317] 在一些实施方案,式P1所示化合物包括A,其中A是:



其中n是0或1;R^1是C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、卤素、C_{1-6}卤代烷氧基、或C_{1-6}卤代烷基;和

RL是  其中b是从2至8的整数,和-A-是与所述结合剂连接的键。在一些实施方案,R^1是烷基、烷氧基、卤代烷基、或卤素。在一些实施方案,R^1是甲基、三氟甲基、甲氧基、氟、氯、或溴。在一些实施方案,R^1是甲基。在一些实施方案,R^1是甲氧基。在一些实施方案,R^1是三氟甲基。在一些实施方案,R^1是氟。在一些实施方案,R^1是氯。在一些实施方案,R^1是溴。

[0318] 所述活性连接体是包含其上能够与结合剂反应(例如,与抗体在其半胱氨酸或赖氨酸残基处进行反应)以形成式I所示化合物的结构部分的基团部分。与所述结合剂偶联之后,所述活性连接体成为式I所示化合物的连接体(L)部分。示例性活性连接体包括,但不限于包含卤代乙酰基,异硫氰酸酯,末端伯胺,或能够与所述结合剂反应的马来酰亚胺部分的那些。活性部分还包括具有以下结构的基团部分:



其中X是-O-或-NH-,和LG是离去基团,例如Br。

[0319] 在一些实施方案,所述活性连接体是:

$SP^R-AA^1-AA^2-$

其中:

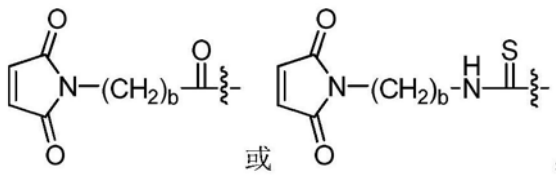
SP^R是活性间隔基团;

AA^1是氨基酸;和

AA^2是氨基酸。

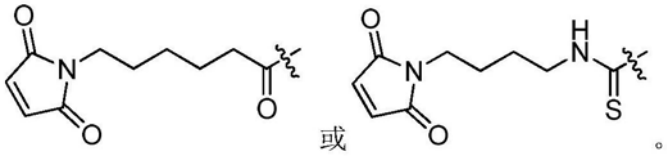
[0320] 所述活性间隔基团是包含上述活性连接体部分的基团部分,所述活性连接体部分能够与结合剂反应,并使所述部分与AA^1连接。合适的间隔基团包括,但不限于包含使AA^1与所述部分连接的亚烷基或聚乙二醇的那些,所述部分能够与结合剂(例如,卤代乙酰基、异硫氰酸酯、或马来酰亚胺)反应。

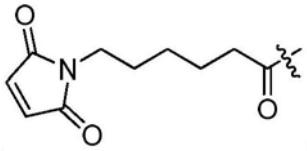
[0321] 在一些实施方案,所述活性间隔基团是:

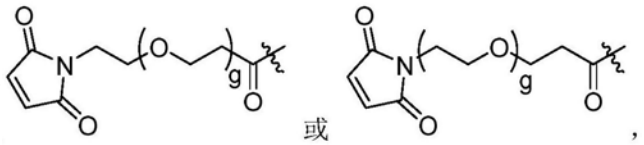


其中b是从2至8的整数。

[0322] 在一些实施方案,所述活性间隔基团是:


或

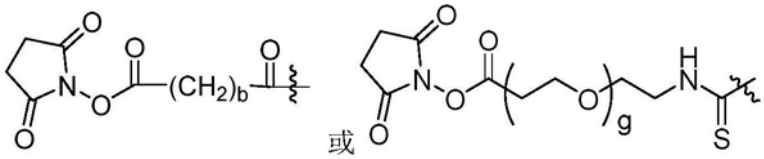
[0323] 在一些实施方案,所述间隔基团是  。

[0324] 在一些实施方案,所述间隔基团是 
或

,

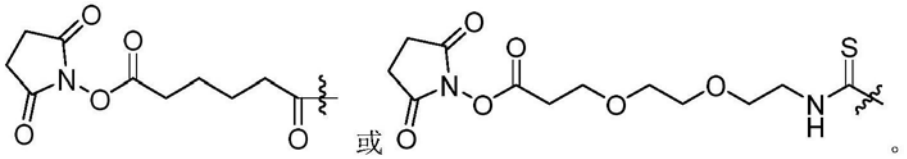
其中g是从1至24的整数。

[0325] 在一些实施方案,所述活性间隔基团是:


或

其中b是从2至8的整数,和g是从2至20的整数。

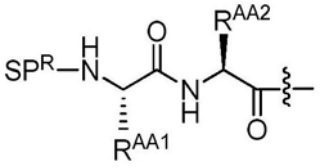
[0326] 在一些实施方案,所述活性间隔基团是:


或
。

[0327] 在一些实施方案,AA^1-AA^2是:缬氨酸-瓜氨酸,瓜氨酸-缬氨酸,赖氨酸-苯丙氨酸,苯丙氨酸-赖氨酸,缬氨酸-天冬酰胺,天冬酰胺-缬氨酸,苏氨酸-天冬酰胺,天冬酰胺-苏氨酸,丝氨酸-天冬酰胺,天冬酰胺-丝氨酸,苯丙氨酸-天冬酰胺,天冬酰胺-苯丙氨酸,亮氨酸-天冬酰胺,天冬酰胺-亮氨酸,异亮氨酸-天冬酰胺,天冬酰胺-异亮氨酸,甘氨酸-天冬酰胺,天冬酰胺-甘氨酸,谷氨酸-天冬酰胺,天冬酰胺-谷氨酸,瓜氨酸-天冬酰胺,天冬酰胺-瓜氨酸,丙氨酸-天冬酰胺,天冬酰胺-丙氨酸,缬氨酸-丙氨酸,丙氨酸-缬氨酸,缬氨酸-甘氨酸,或甘氨酸-缬氨酸。

[0328] 在一些实施方案,AA^1-AA^2是:缬氨酸-瓜氨酸,或瓜氨酸-缬氨酸。在一些实施方案,AA^1-AA^2是:缬氨酸-瓜氨酸。

[0329] 在一些实施方案,所述活性连接体是:



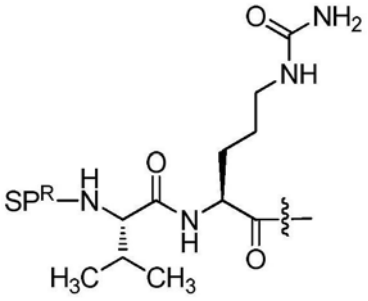
其中:

SP^R是活性间隔基团;

R^{AA1}是氨基酸侧链;和

R^{AA2}是氨基酸侧链。

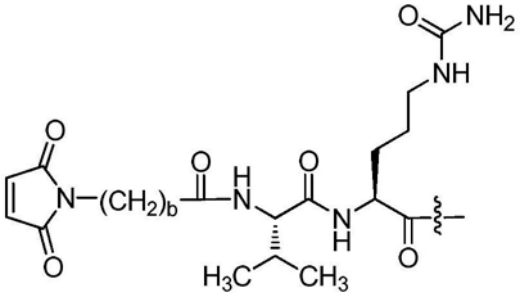
[0330] 在一些实施方案,所述活性连接体是:



其中:

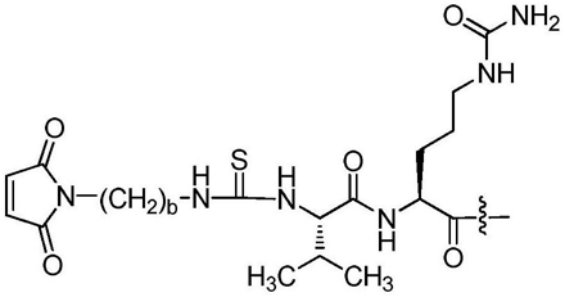
SP是活性间隔基团。

[0331] 在一些实施方案,所述活性连接体是:



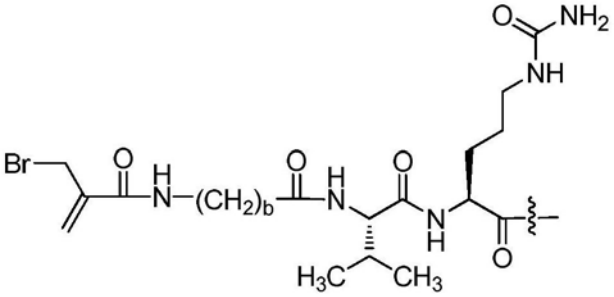
其中b是从2至8的整数。

[0332] 在一些实施方案,所述活性连接体是:



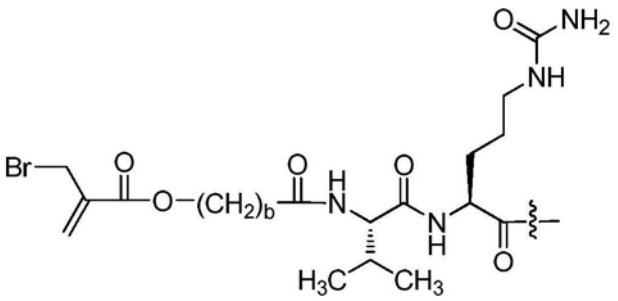
其中b是从2至8的整数。

[0333] 在一些实施方案,所述活性连接体是:



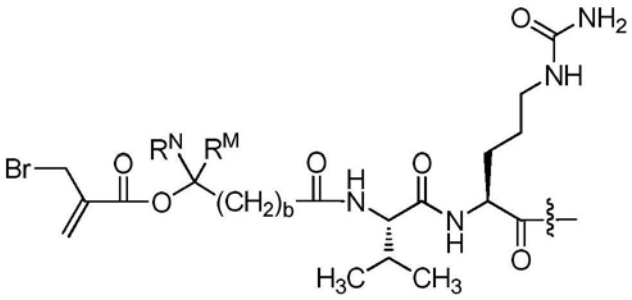
其中b是从2至8的整数。

[0334] 在一些实施方案,所述活性连接体是:



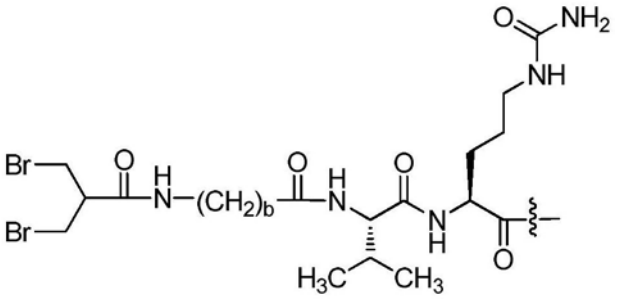
其中b是从2至8的整数。

[0335] 在一些实施方案,所述活性连接体是:



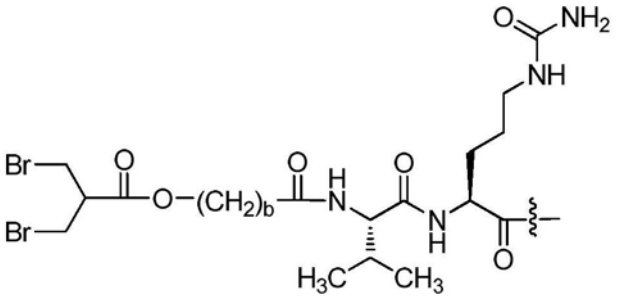
其中b是从2至8的整数,R^N是氢原子或烷基,和R^M是烷基。

[0336] 在一些实施方案,所述活性连接体是:



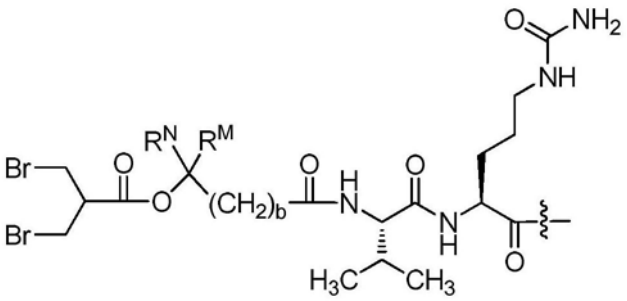
其中b是从2至8的整数。

[0337] 在一些实施方案,所述活性连接体是:



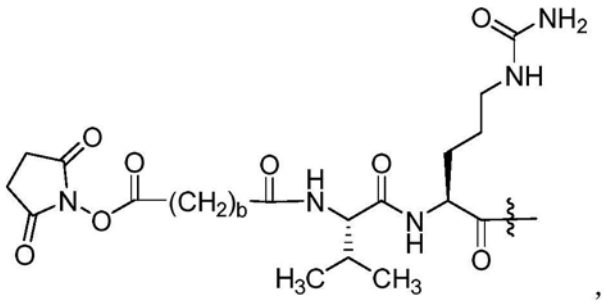
其中b是从2至8的整数。

[0338] 在一些实施方案,所述活性连接体是:



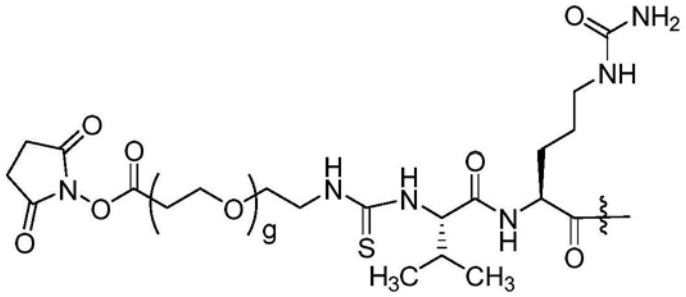
其中b是从2至8的整数;R^N是氢原子或烷基;和R^M是烷基。

[0339] 在一些实施方案,所述活性连接体是:



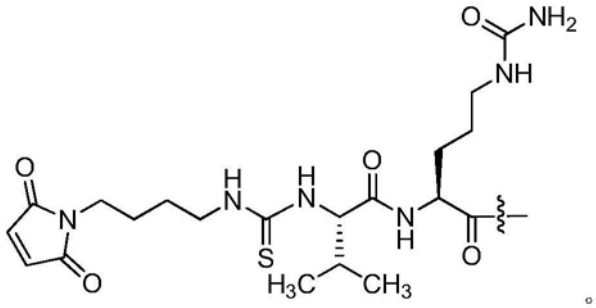
其中b是从2至8的整数。

[0340] 在一些实施方案,所述活性连接体是:

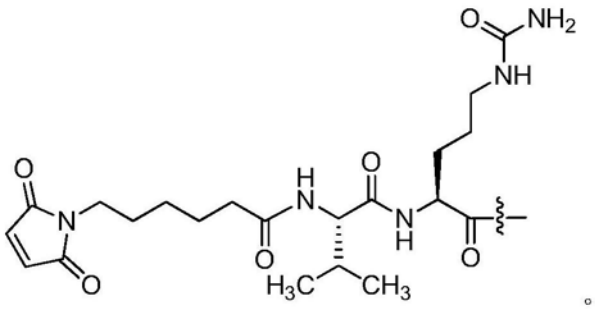


其中g是从2至8的整数。

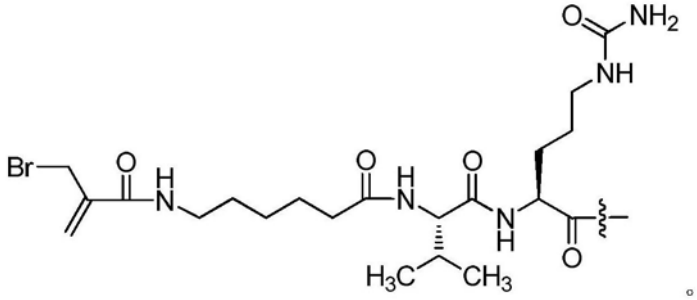
[0341] 在一些实施方案,所述活性连接体是:



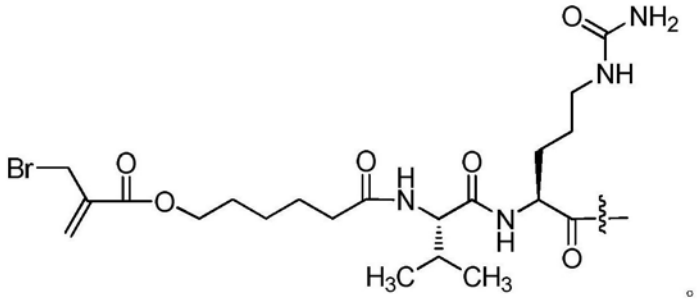
[0342] 在一些实施方案,所述活性连接体是:



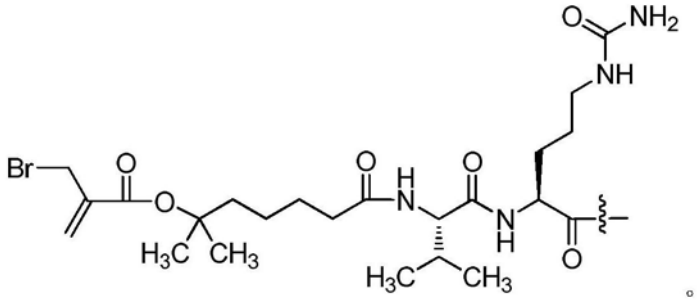
[0343] 在一些实施方案,所述活性连接体是:



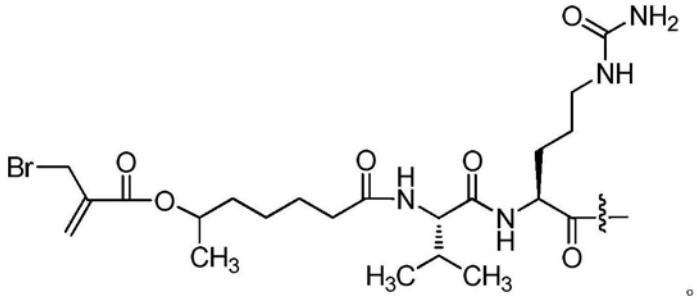
[0344] 在一些实施方案,所述活性连接体是:



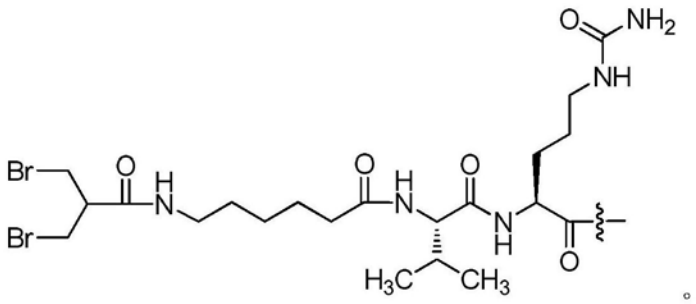
[0345] 在一些实施方案,所述活性连接体是:



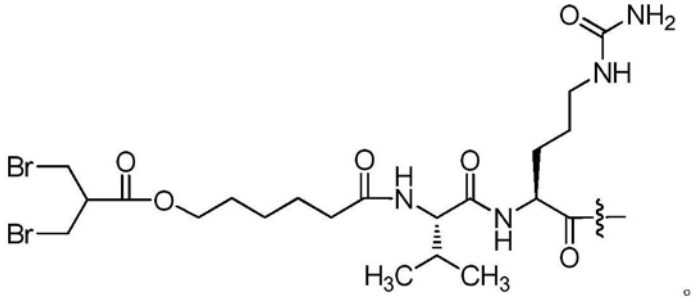
[0346] 在一些实施方案,所述活性连接体是:



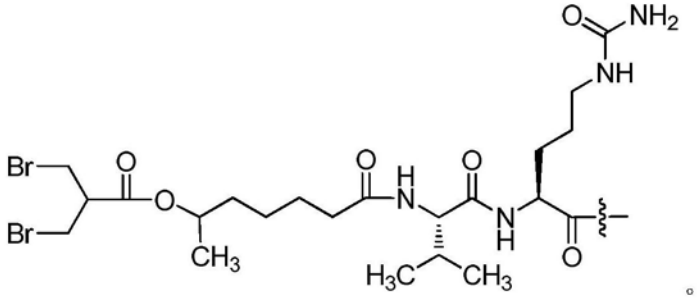
[0347] 在一些实施方案,所述活性连接体是:



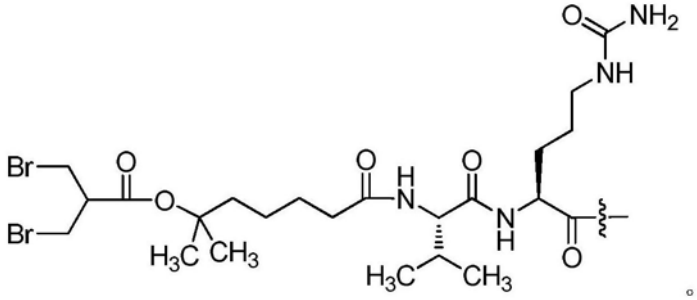
[0348] 在一些实施方案,所述活性连接体是:



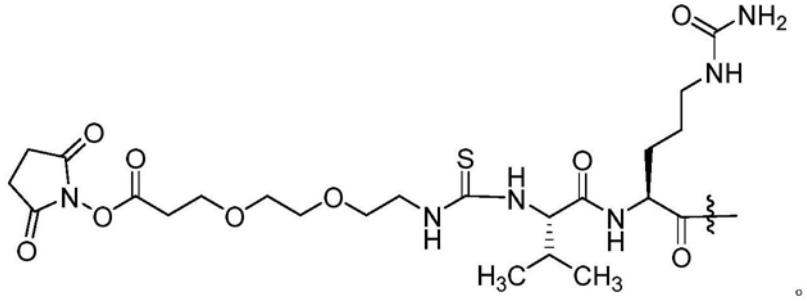
[0349] 在一些实施方案,所述活性连接体是:



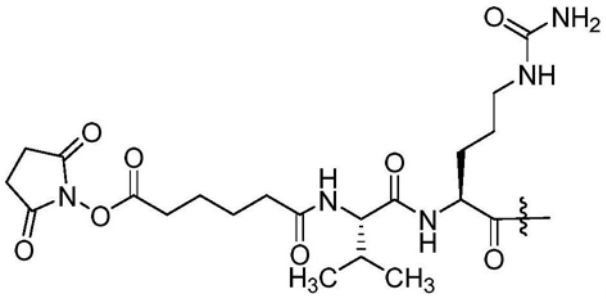
[0350] 在一些实施方案,所述活性连接体是:



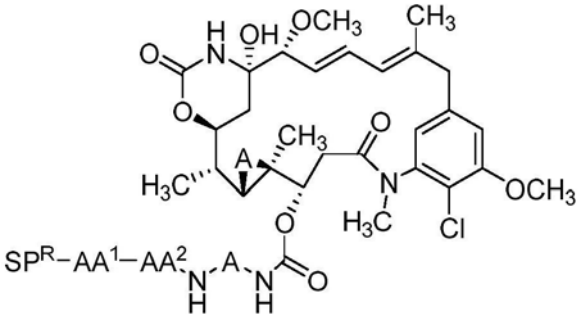
[0351] 在一些实施方案,所述活性连接体是:



[0352] 在一些实施方案,所述活性连接体是:



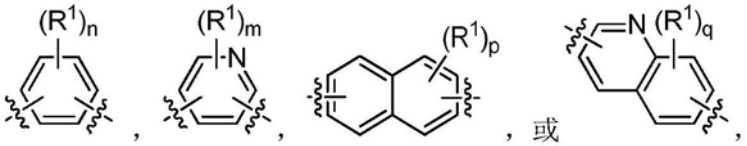
[0353] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1A的化合物：



P1A

其中：

A是：



其中：

R^1是卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、芳烷基、杂烷基、杂芳基、杂环烷基、氰基、硝基、  、、  或叠氮基，其中R^A是烷基；

n是从0至4的整数；

m是从0至3的整数；

p是从0至6的整数；和

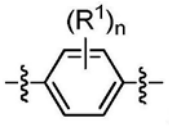
q是从0至5的整数；

SP^R是活性间隔基团；

AA^1是氨基酸；和

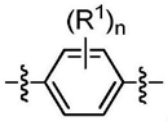
AA^2是氨基酸。

[0354] 在一些实施方案，式P1A的化合物是包括A的化合物，其中A是：



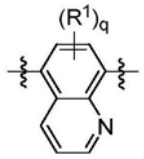
其中n是0或1；和R^1是烷氧基、烷基、卤素、卤代烷氧基、或卤代烷基。

[0355] 在一些实施方案，式P1A的化合物是包括A的化合物，其中A是：



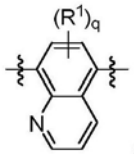
其中n是0或1；和R^1是C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}烷基、卤素、C_{1-6}卤代烷氧基、或C_{1-6}卤代烷基。在一些实施方案，R^1是烷基、烷氧基、卤代烷基、或卤素。在一些实施方案，R^1是甲基、三氟甲基、甲氧基、氟、氯、或溴。在一些实施方案，R^1是甲基。在一些实施方案，R^1是甲氧基。在一些实施方案，R^1是三氟甲基。在一些实施方案，R^1是氟。在一些实施方案，R^1是氯。在一些实施方案，R^1是溴。

[0356] 在一些实施方案，式P1A的化合物是包括A的化合物，其中A是：



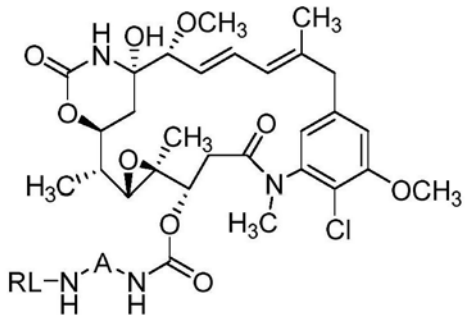
其中q是从0至5的整数；和R^1是C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}烷基、卤素、C_{1-6}卤代烷氧基、或C_{1-6}卤代烷基。

[0357] 在一些实施方案，式P1A的化合物是包括A的化合物，其中A是：



其中q是从0至5的整数；和R^1是C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}烷基、卤素、C_{1-6}卤代烷氧基、或C_{1-6}卤代烷基。

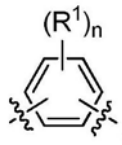
[0358] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1A1-3的化合物：



(P1A1-3)

其中

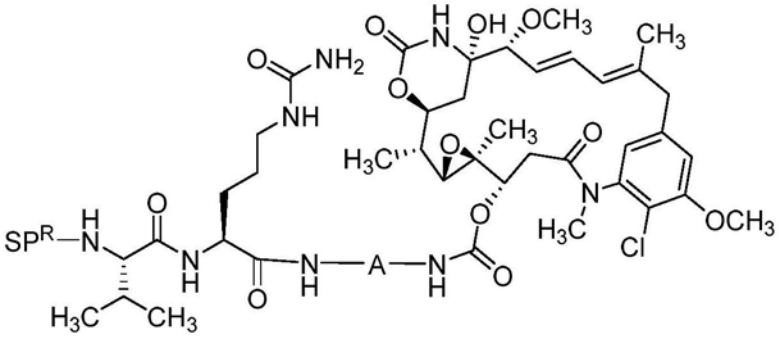
A是：



R^1在每次出现时独立地选自烷基、烷氧基、卤素、卤代烷基、和杂环烷基；

n是从0至4的整数；和RL是活性连接体。

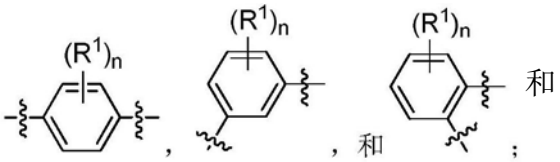
[0359] 在一些实施方案，式P1A1-3所示化合物是式P2A1-3的化合物：



(P2A1-3)

其中：

A选自：



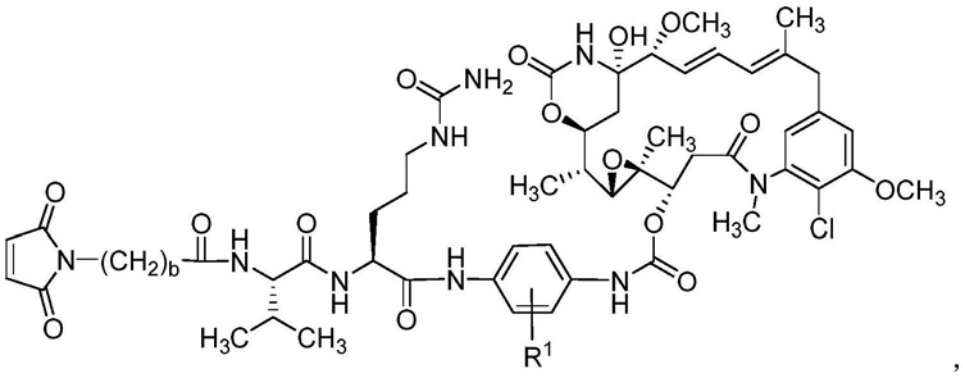
和

；

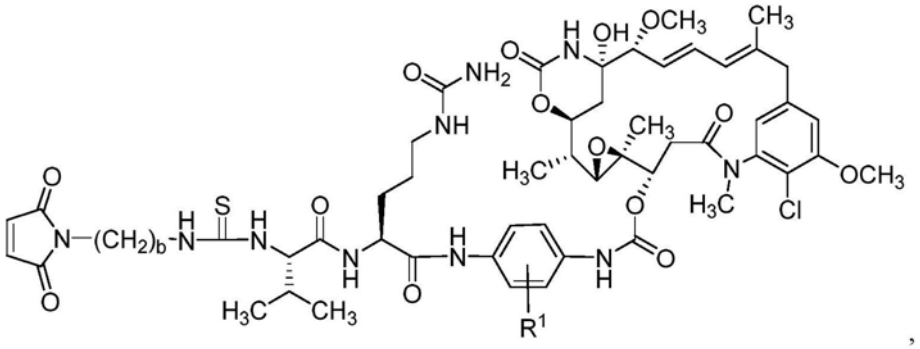
SP^R是活性间隔基团。

[0360] 在一些实施方案，式P1A1-3所示化合物选自式P1H1的化合物，式P1I1的化合物，式P1V1的化合物，式P1W1的化合物，式P1K1的化合物，式P1TG1的化合物，式P1ZZ1的化合物，和式P1ZZ2的化合物，

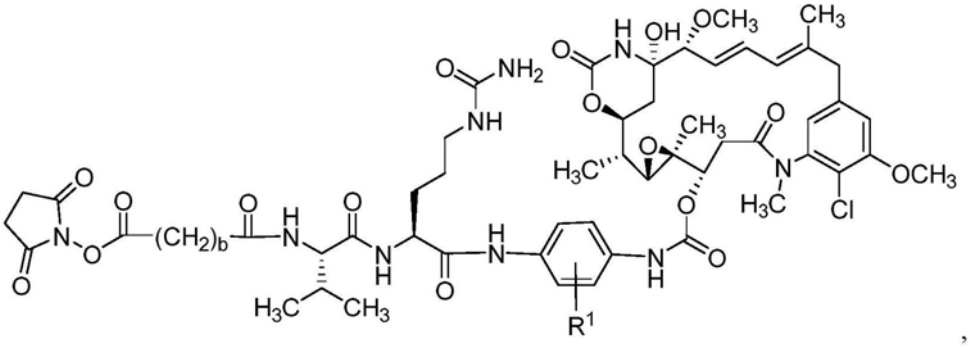
其中b是从2至8的整数：



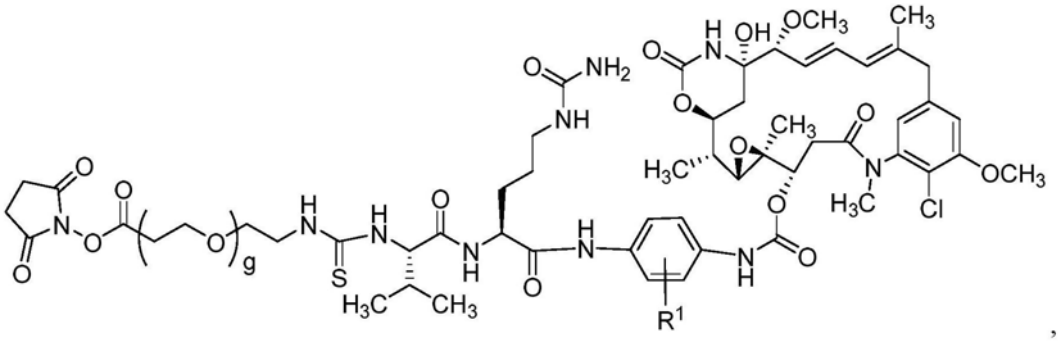
(P1H1)



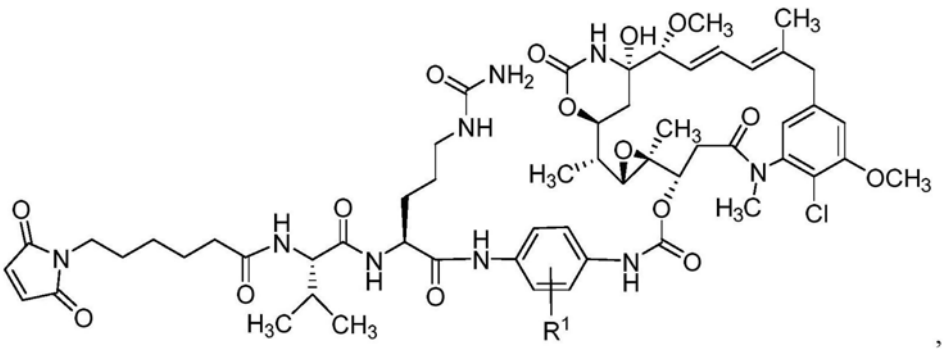
(P1I1)



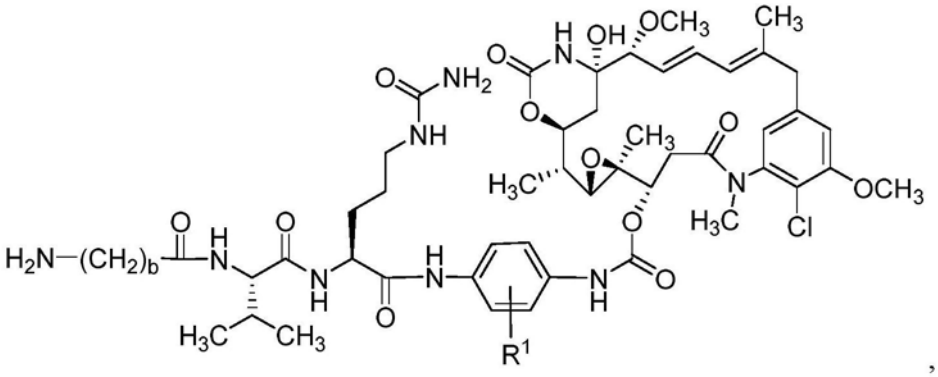
(P1V1)



(P1W1)

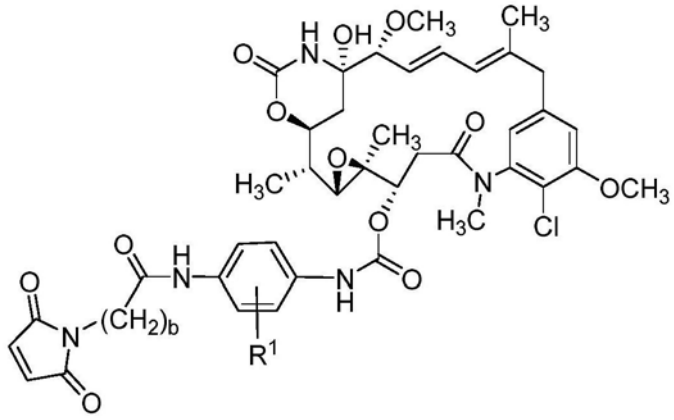


(P1K1)



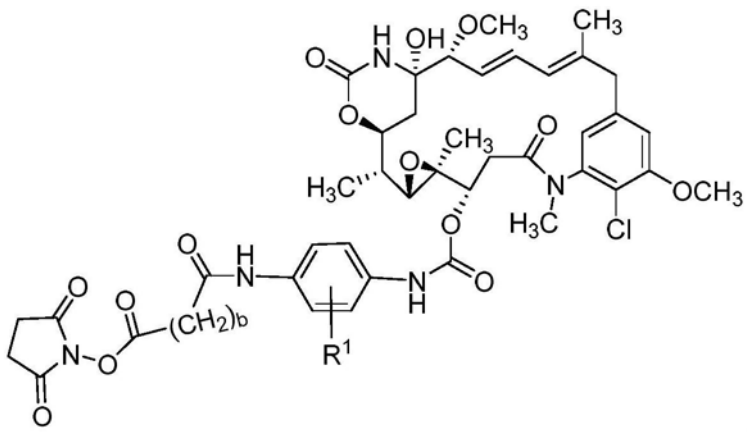
，

(P1TG1)



，和

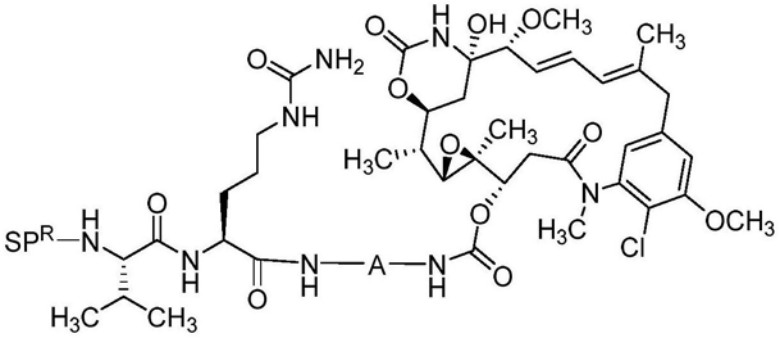
(P1ZZ1)



。

(P1ZZ2)

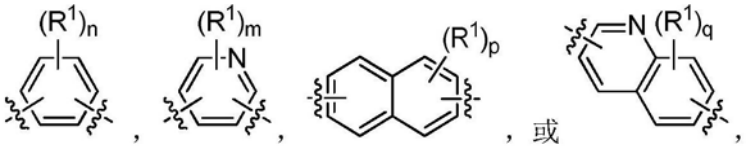
[0361] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1B的化合物：



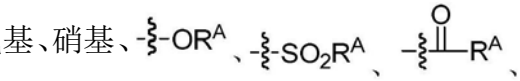
P1B

其中：

A是：



其中：

R^1是卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、芳烷基、杂烷基、杂芳基、杂环烷基、氰基、硝基、  或叠氮基，其中R^A是烷基；

n是从0至4的整数；

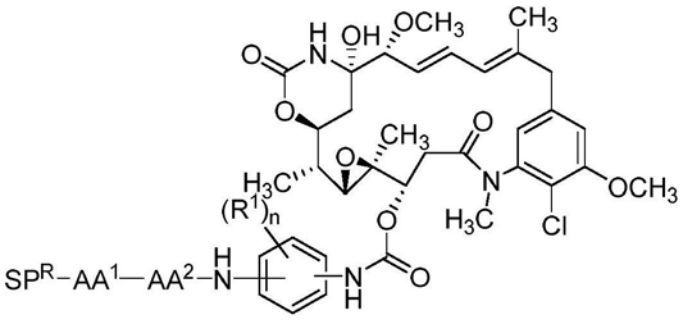
m是从0至3的整数；

p是从0至6的整数；和

q是从0至5的整数；和

SP^R是活性间隔基团。

[0362] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1C的化合物：



P1C

其中：

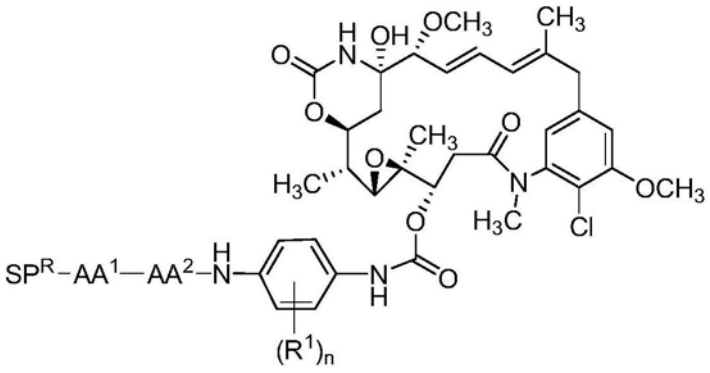
SP^R是活性间隔基团；

AA^1是氨基酸；

AA^2是氨基酸；

R^1在每次出现时独立地为烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、或三氟甲基，和n是0、1、或2。

[0363] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1D的化合物：



P1D

其中：

SP^R是活性间隔基团；

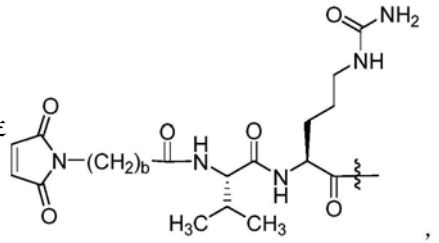
AA^1是氨基酸；

AA^2是氨基酸；

R^1在每次出现时独立地为烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、或三氟甲基，和n是0、1、或2。在一些实施方案，n是0。在一些实施方案，n是1。在一些实施方案，n是2。

[0364] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1D的化合物，其中R^1是烷氧基、烷基、卤素、卤代烷氧基、或卤代烷基。在一些实施方案，R^1是C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}烷基、卤素、C_{1-6}卤代烷氧基、或C_{1-6}卤代烷基。在一些实施方案，n是0。在一些实施方案，n是1。在一些实施方案，n是2。

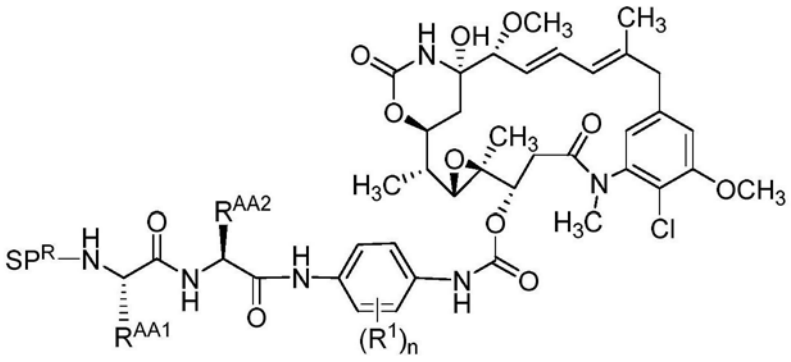
[0365] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1D的化合物，其中R^1是C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}烷基、卤素、C_{1-6}卤代烷氧基、或C_{1-6}卤代烷基；和SP^R-AA^1-AA^2是



，

其中b是从2至8的整数，和  是与所述结合剂连接的键。在一些实施方案，n是0。在一些实施方案，n是1。在一些实施方案，n是2。在一些实施方案，b是2。在一些实施方案，b是3。在一些实施方案，b是4。在一些实施方案，b是5。在一些实施方案，b是6。在一些实施方案，b是7。在一些实施方案，b是8。

[0366] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1E的化合物：



P1E

其中：

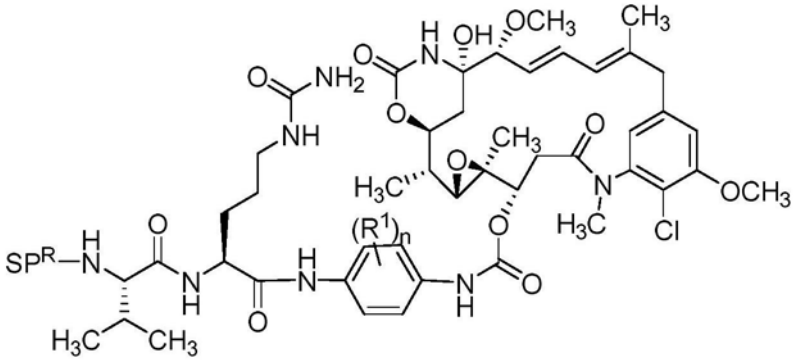
SP^R是活性间隔基团；

R^{AA1}是氨基酸侧链；

R^{AA2}是氨基酸侧链；

R^1在每次出现时独立地为烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、或三氟甲基，和n是0、1、或2。

[0367] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1F的化合物：



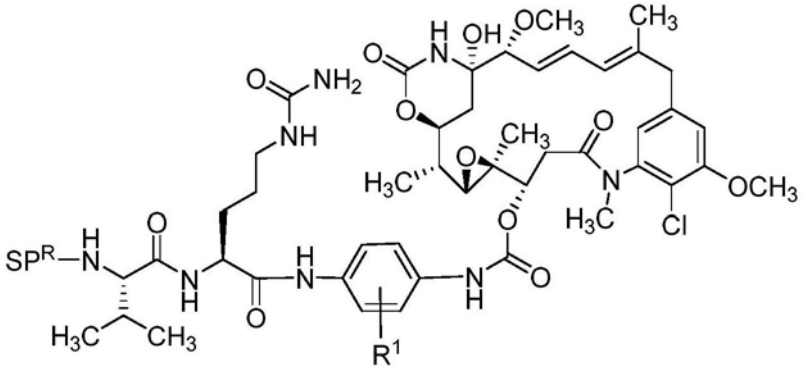
P1F

其中：

SP^R是活性间隔基团；

R^1在每次出现时独立地为烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、或三氟甲基，和n是0、1、或2。

[0368] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1G的化合物：



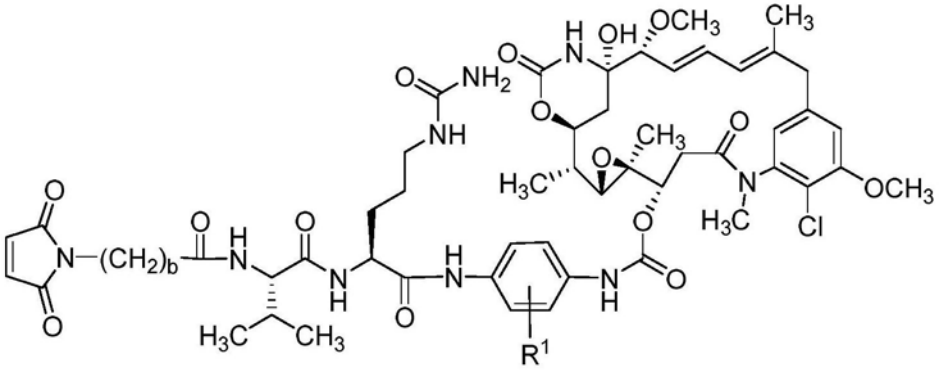
P1G

其中：

SP^R是活性间隔基团；和

R^1是氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、或三氟甲基。

[0369] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1H的化合物：

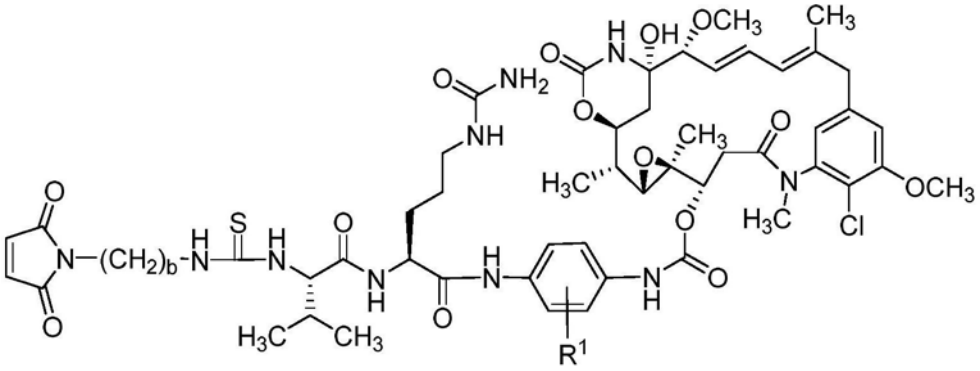


P1H

其中：

R^1是氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、或三氟甲基；和b是从2至8的整数。

[0370] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1I的化合物：

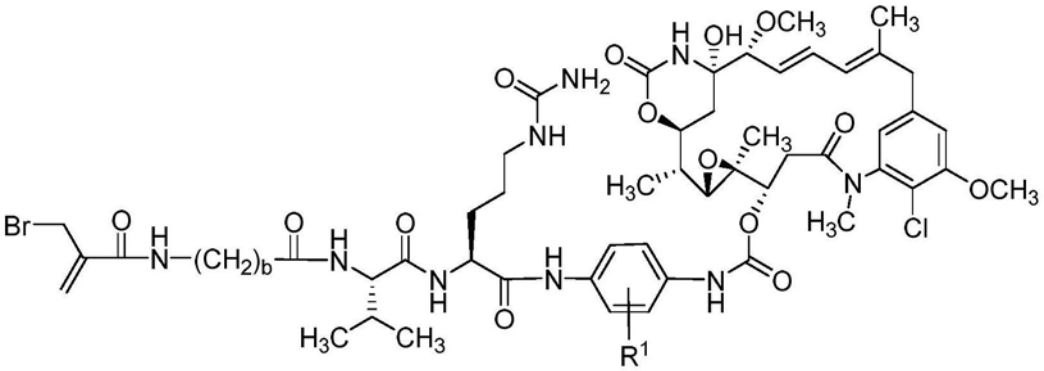


P1I

其中：

R^1是氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、或三氟甲基；和b是从2至8的整数。

[0371] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1J的化合物：

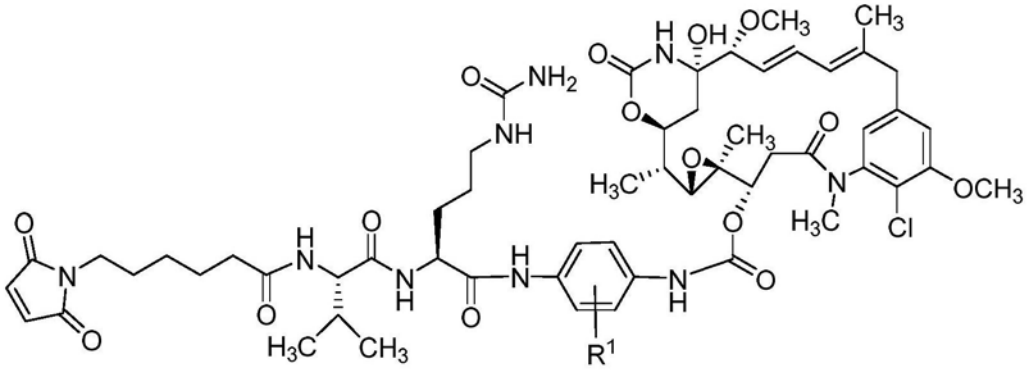


P1J

其中：

R^1是氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、或三氟甲基；和b是从2至8的整数。

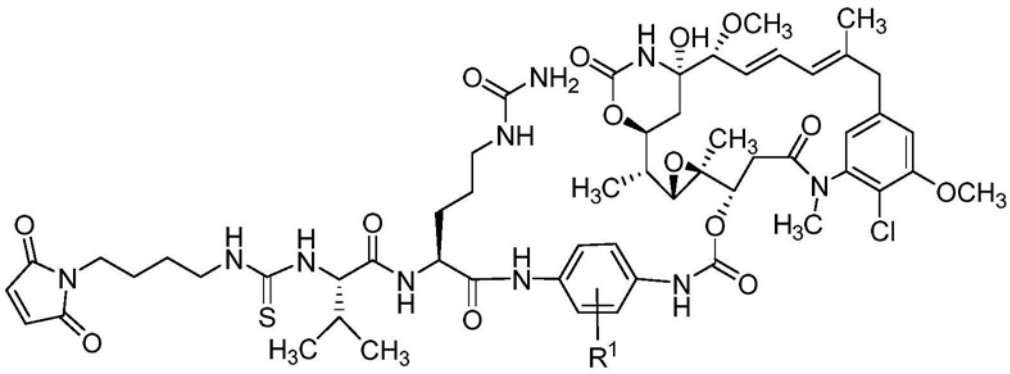
[0372] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1K的化合物：



P1K

其中R^1是氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、或三氟甲基。

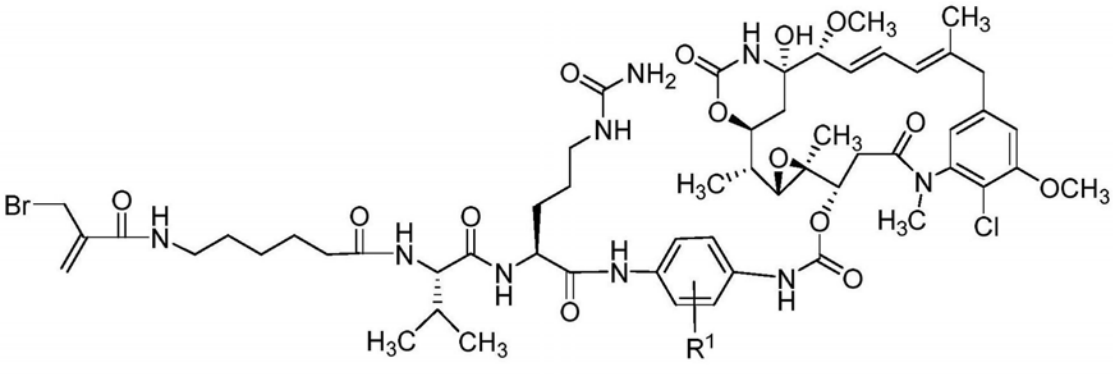
[0373] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1L的化合物：



P1L

其中R^1是氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、或三氟甲基。

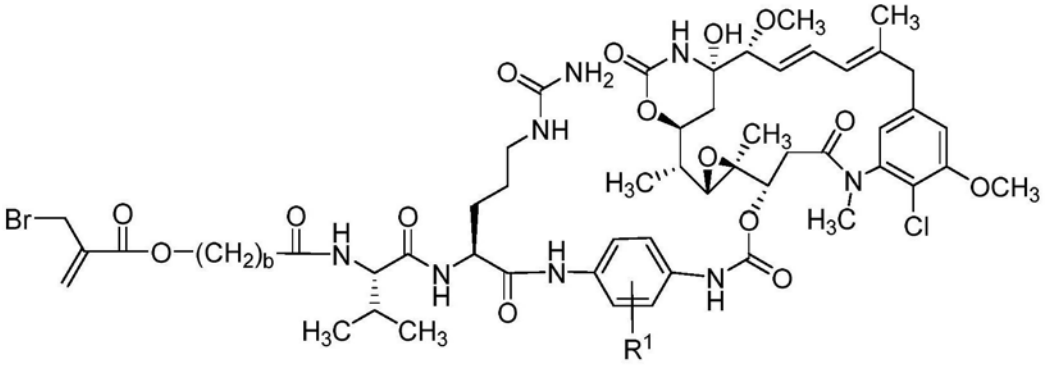
[0374] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1M的化合物：



P1M

其中R^1是氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、或三氟甲基。

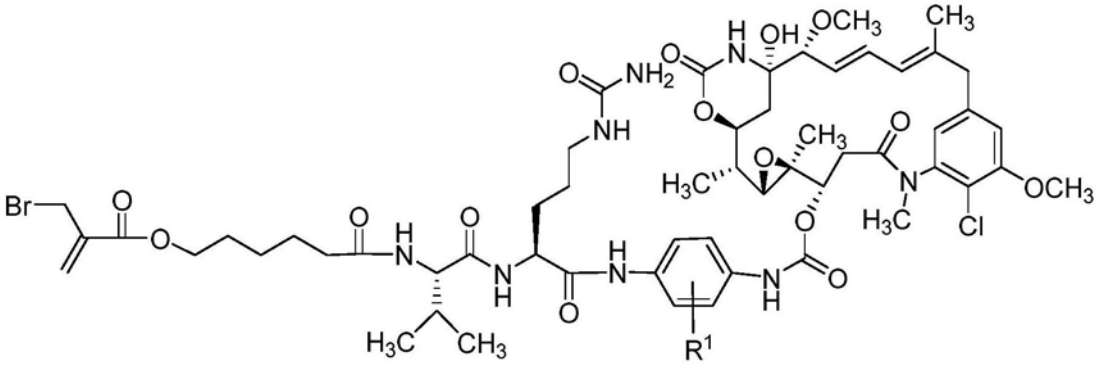
[0375] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1N的化合物：



P1N

其中R^1是氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、或三氟甲基，和b是从2至8的整数。

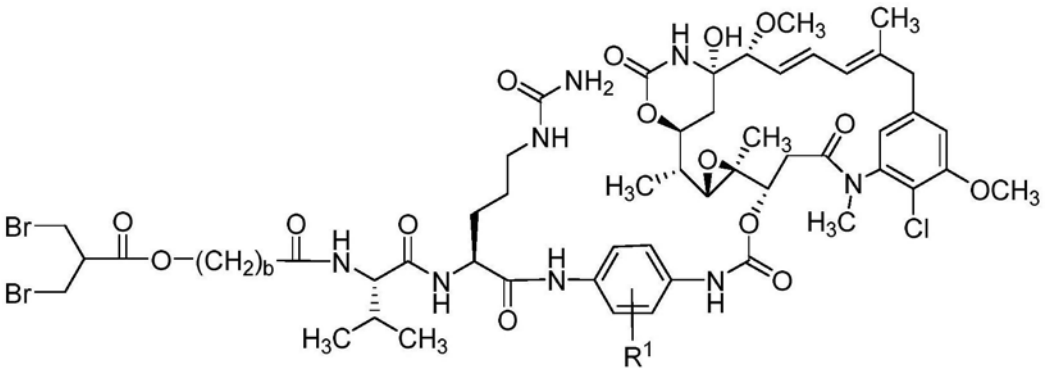
[0376] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1O的化合物：



P1O

其中R^1是氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、或三氟甲基。

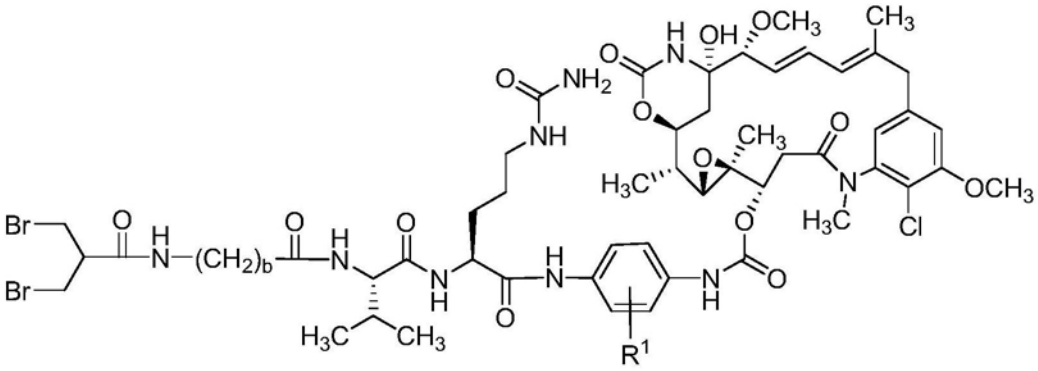
[0377] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1P的化合物：



P1P

其中R^1是氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、或三氟甲基，和b是从2至8的整数。

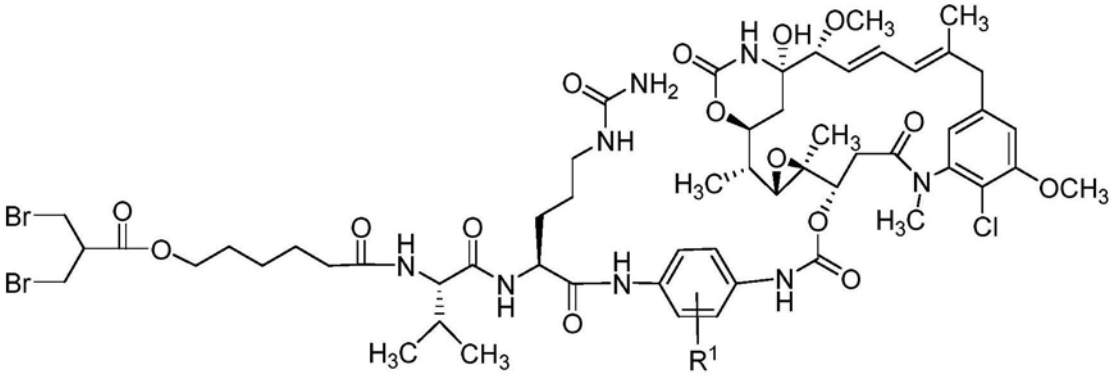
[0378] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1Q的化合物：



P1Q

其中R^1是氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、或三氟甲基，和b是从2至8的整数。

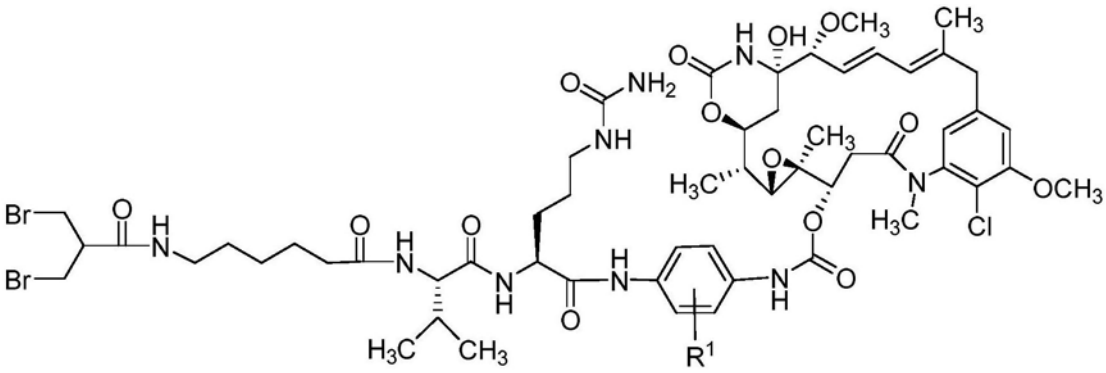
[0379] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1R的化合物：



P1R

其中R^1是氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、或三氟甲基。

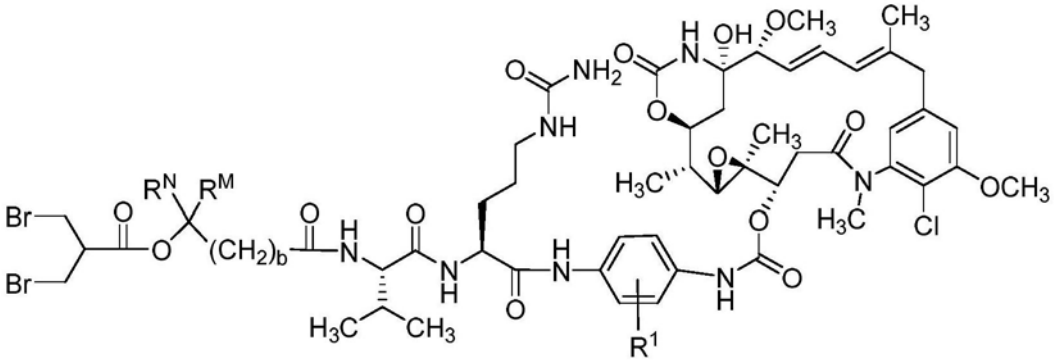
[0380] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1S的化合物：



P1S

其中R^1是氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、或三氟甲基。

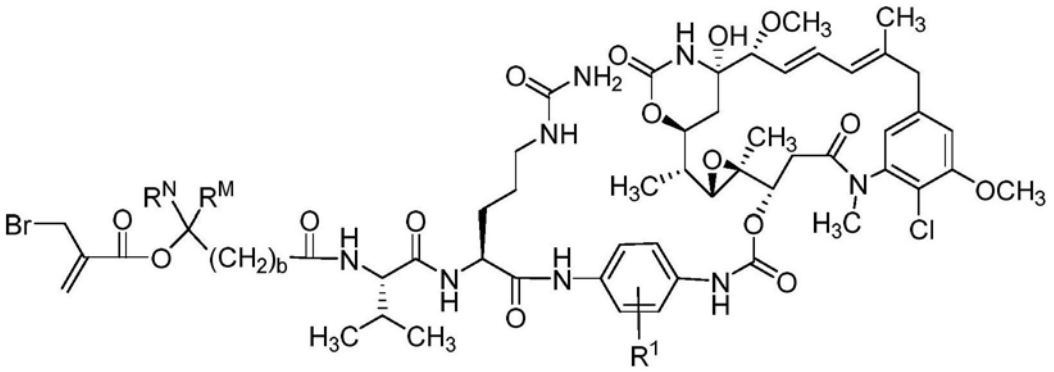
[0381] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1T的化合物：



P1T

其中R^N是氢原子或烷基，R^M是烷基，R^1是氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、或三氟甲基，和b是从2至8的整数。

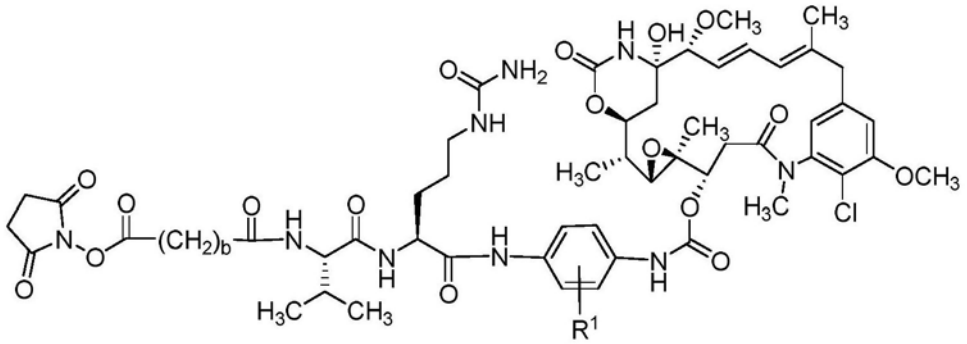
[0382] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1U的化合物：



P1U

其中R^N是氢原子或烷基，R^M是烷基，R^1是氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、或三氟甲基，和b是从2至8的整数。

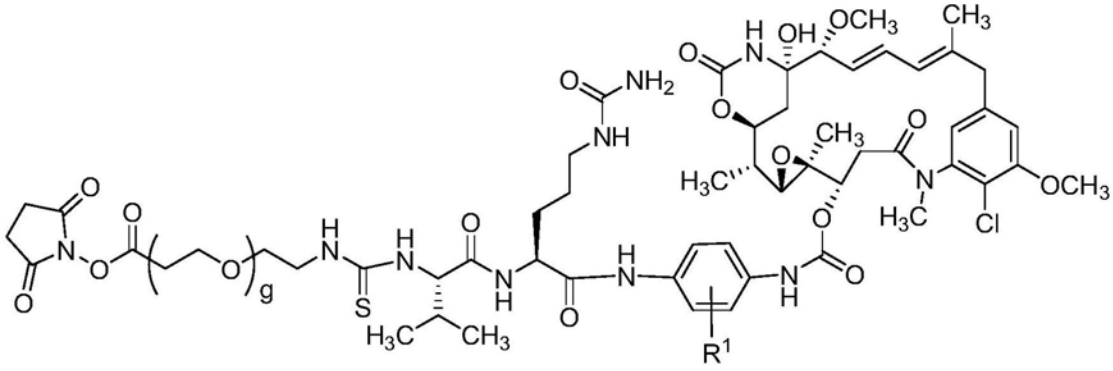
[0383] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1V的化合物：



P1V

其中R^1是氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、或三氟甲基，和b是从2至8的整数。

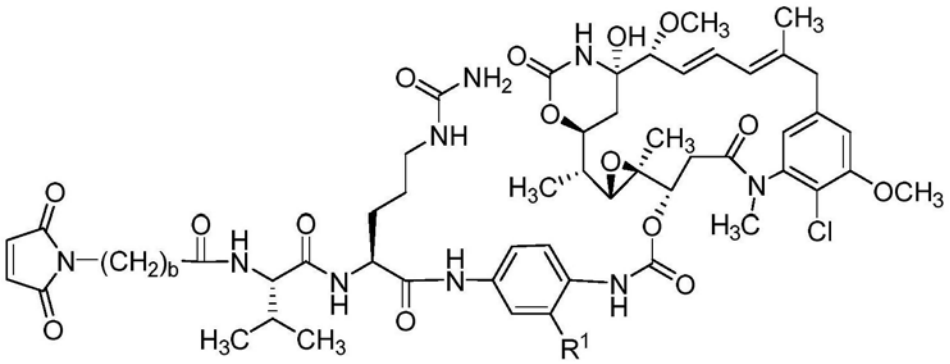
[0384] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1W的化合物：



P1W

其中R^1是氢原子、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷氧基、卤代烷基、或三氟甲基，g是从2至20的整数；和b是从2至8的整数。

[0385] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1X的化合物：

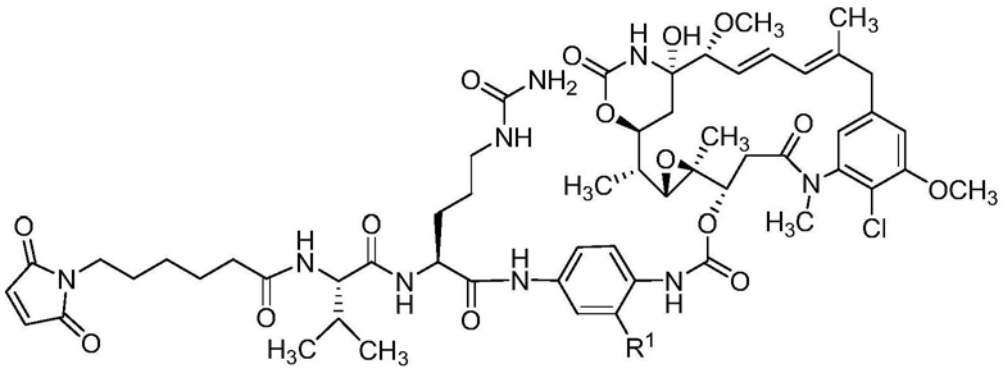


P1X

其中：

R^1是烷基、烯基、炔基、烷氧基、杂烷基、卤素、卤代烷基、或卤代烷氧基；和b是从2至8的整数。在一些实施方案，R^1是甲基、乙基、甲氧基、或乙氧基。在所述这些实施方案中的一些，R^1是甲氧基。在一些实施方案，R^1是1-甲基乙基-巯基、苯基、2-氟苯基、吡啶基、4-吡啶基、吡咯烷基、或1-吡咯烷基。在一些实施方案，R^1是三氟甲基。在一些实施方案，R^1是氟。在一些实施方案，R^1是氢。

[0386] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1Y的化合物：

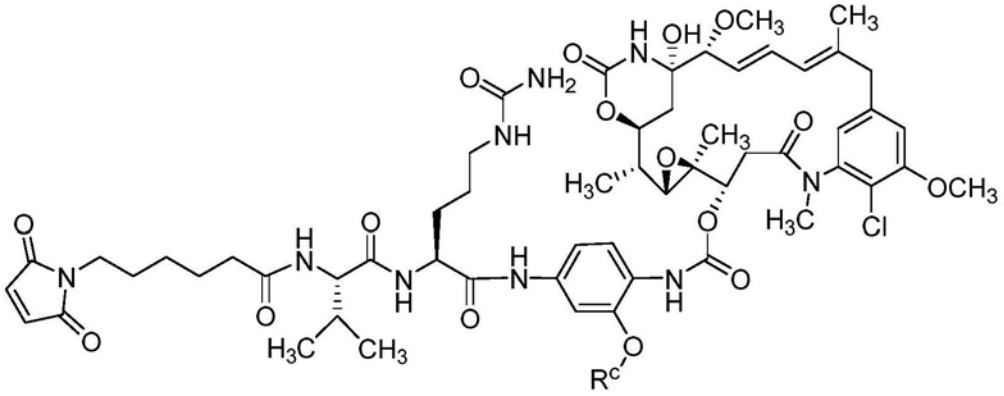


P1Y

其中，R^1是烷基、烯基、炔基、烷氧基、杂烷基、卤素、卤代烷基、或卤代烷氧基。在一些实施方案，R^1是甲基、乙基、甲氧基、或乙氧基。在所述这些实施方案中的一些，R^1是甲氧

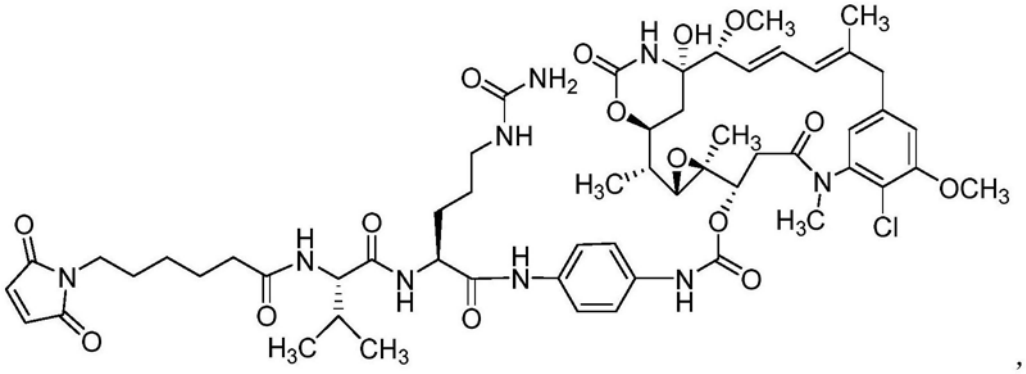
基。在一些实施方案，R^1是1-甲基乙基-巯基、苯基、2-氟苯基、吡啶基、4-吡啶基、吡咯烷基、或1-吡咯烷基。在一些实施方案，R^1是三氟甲基。在一些实施方案，R^1是氟。在一些实施方案，R^1是氢。

[0387] 在一些实施方案，式P1所示化合物是式P1Z的化合物：

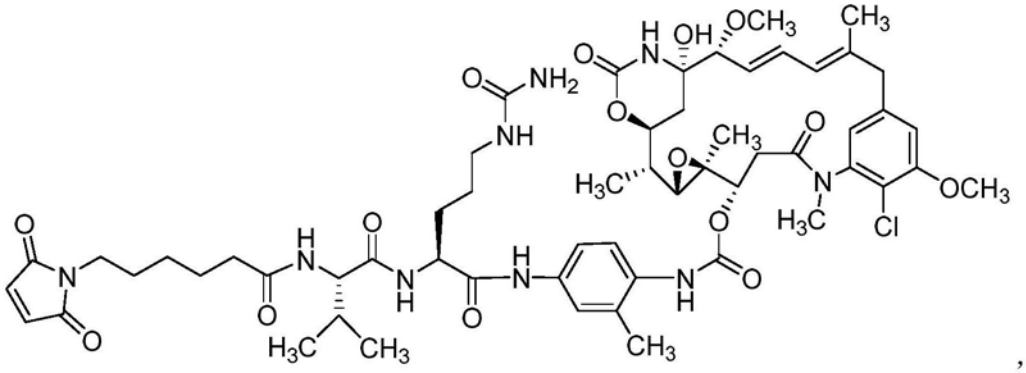


P1Z，

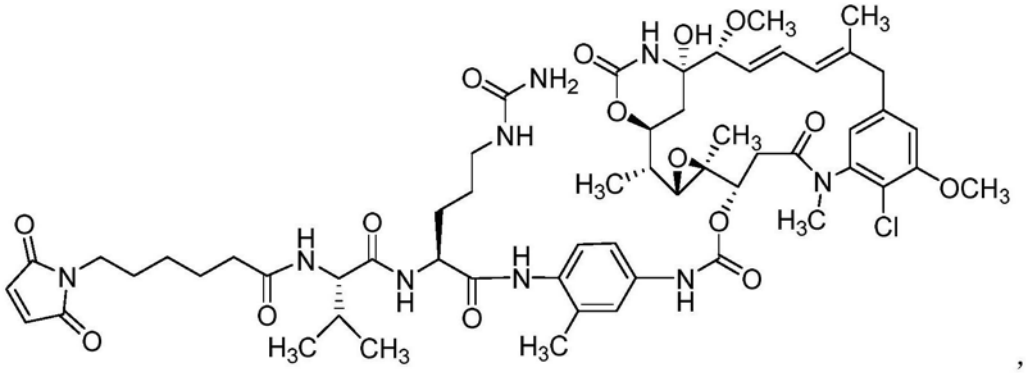
其中，R^c选自烷基或卤代烷基，和其中所述烷基或卤代烷基是直链、支链、或环的。在一些实施方案，式P1所示化合物是具有以下结构之一的化合物：



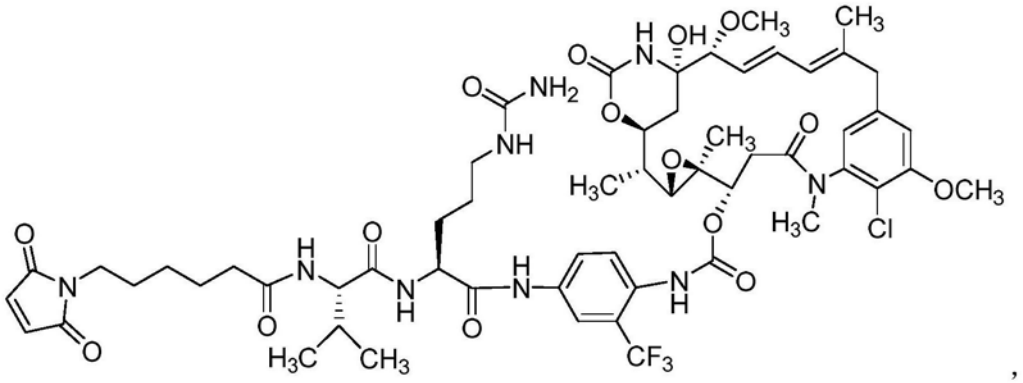
，



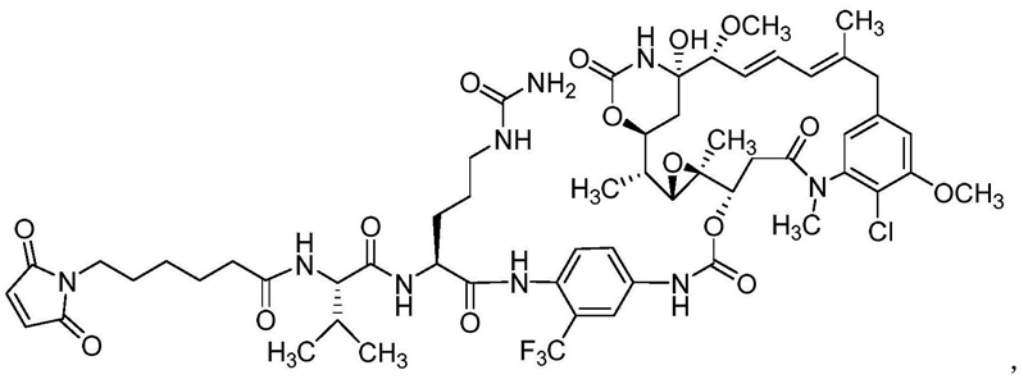
,



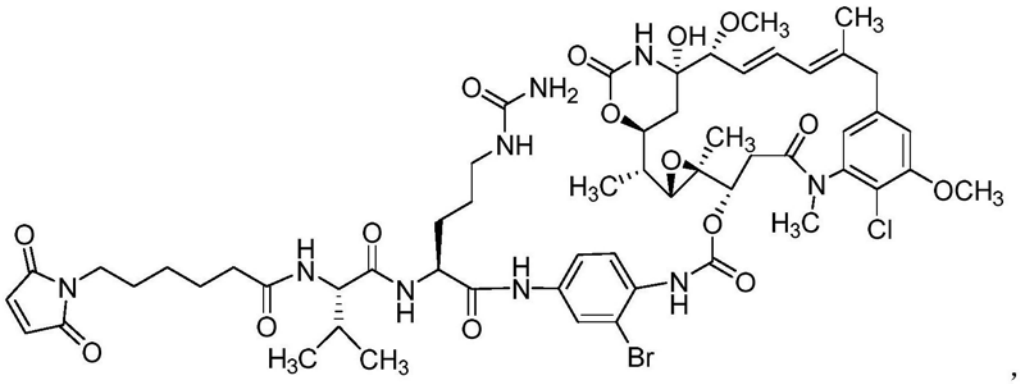
,



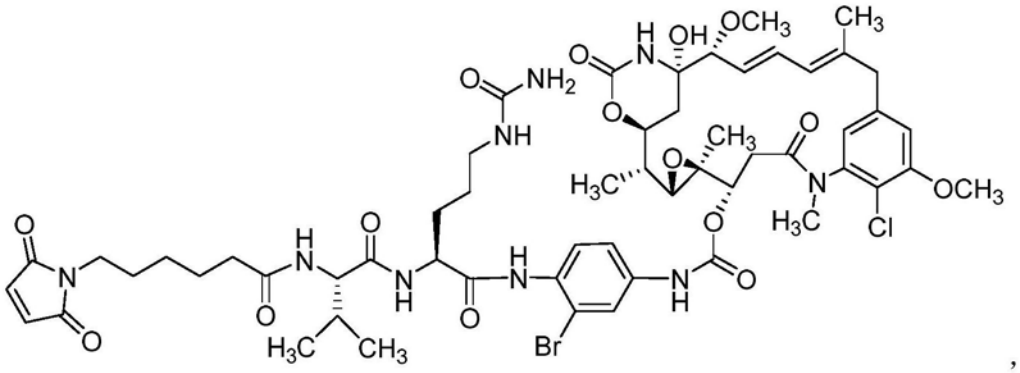
,



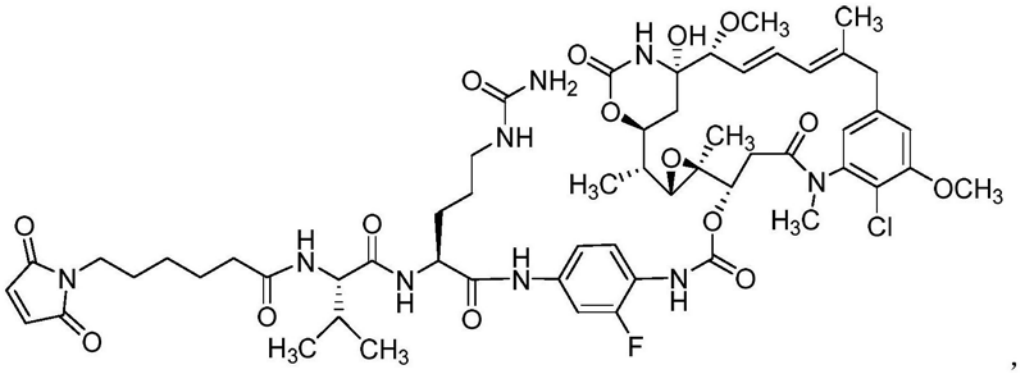
,



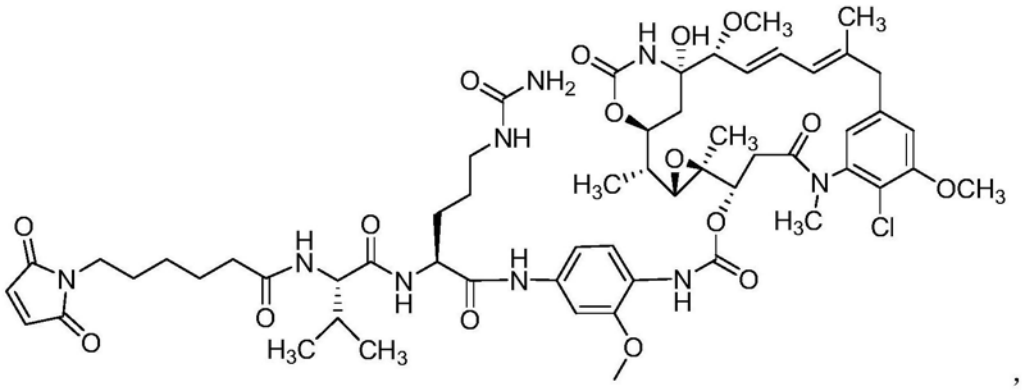
,



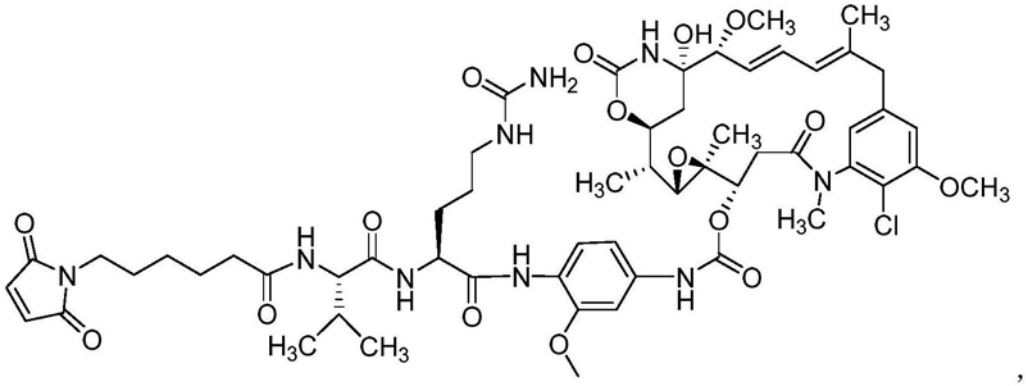
,



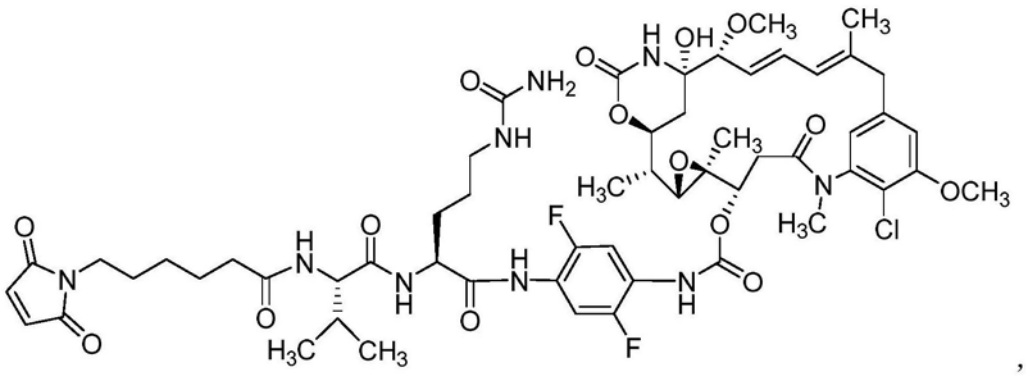
,



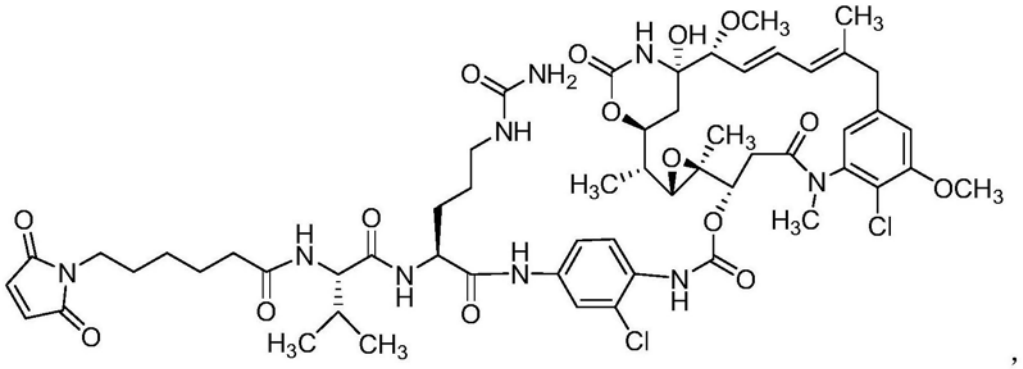
,



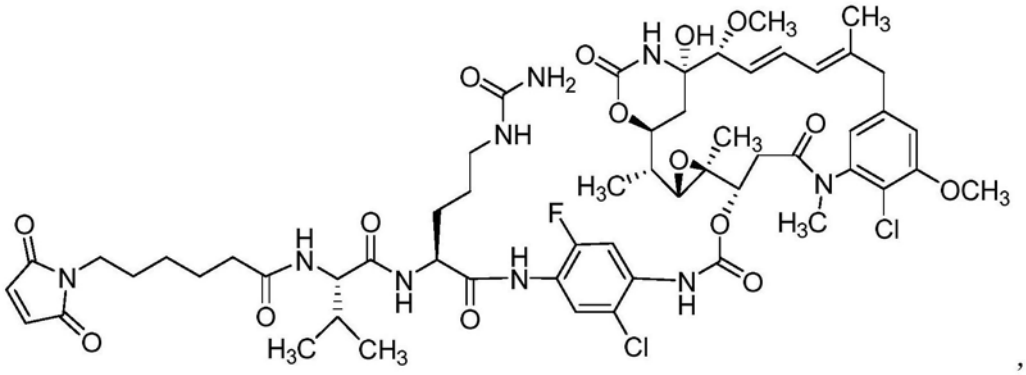
,



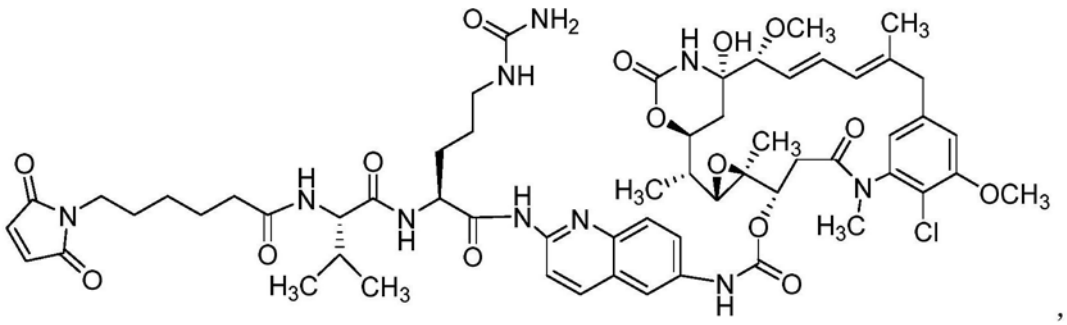
,



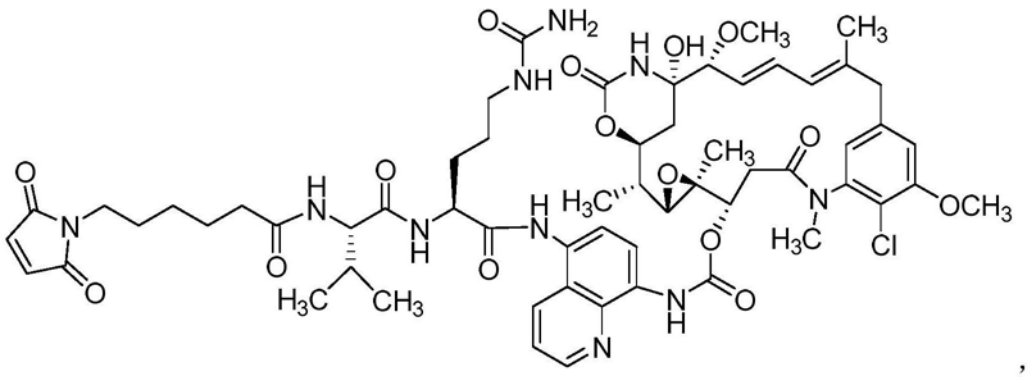
,



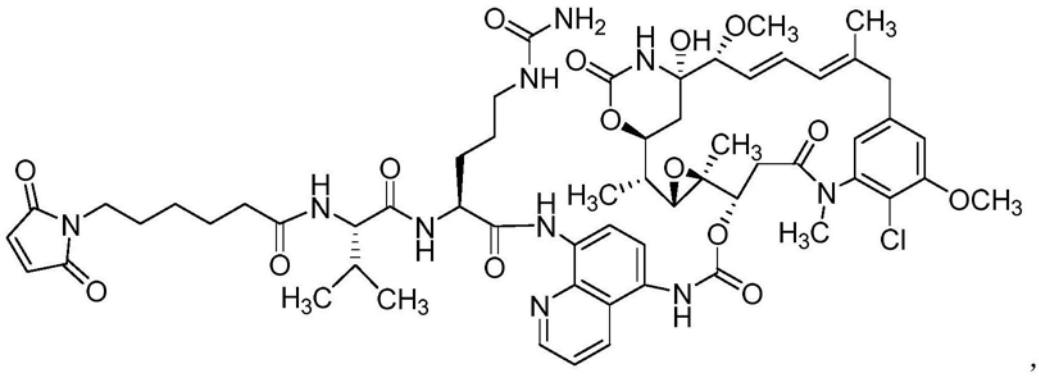
,



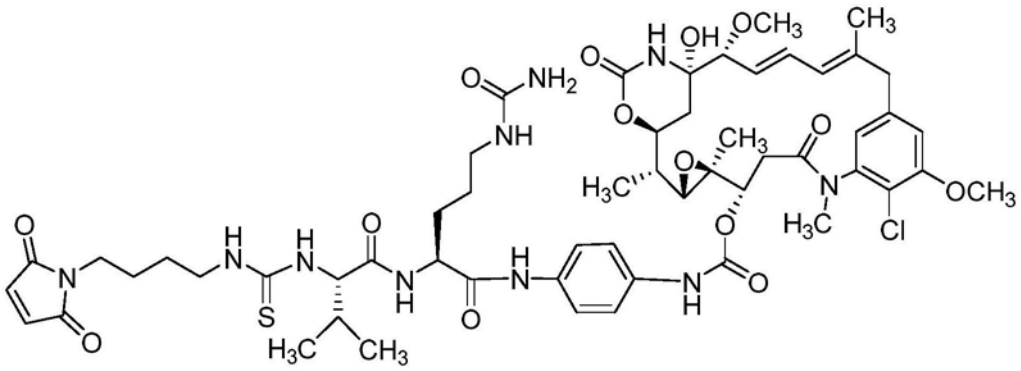
,



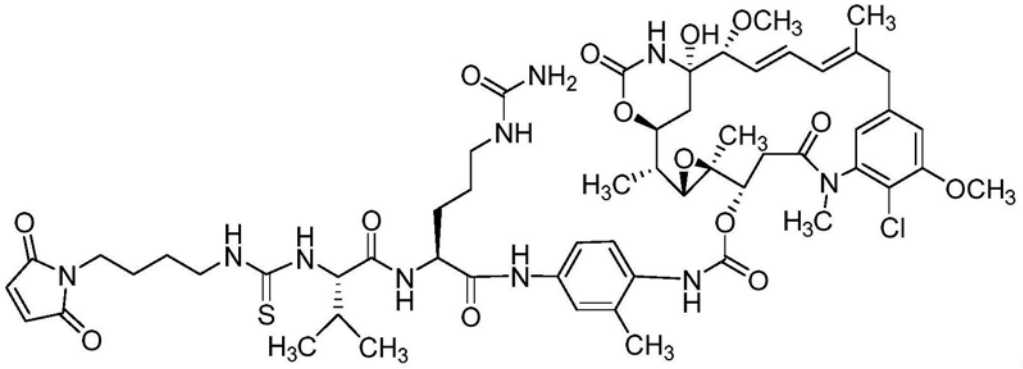
,



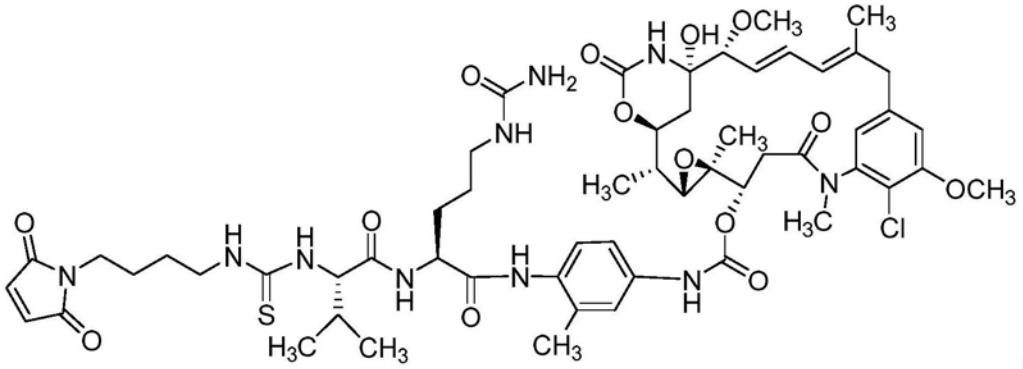
,



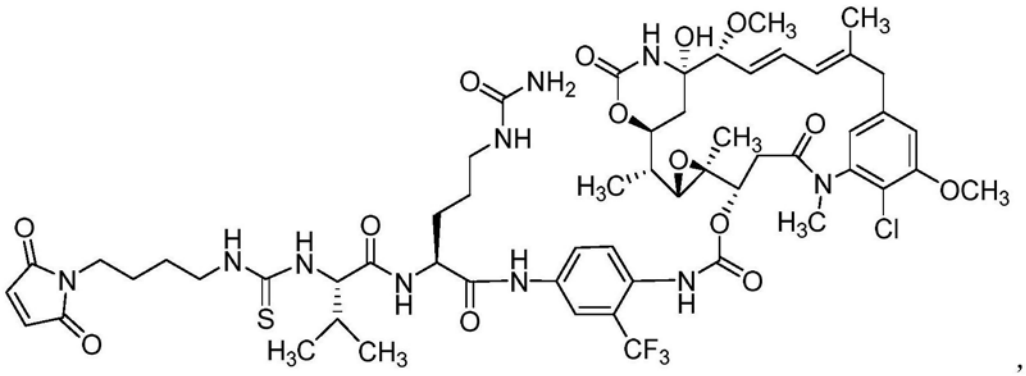
,



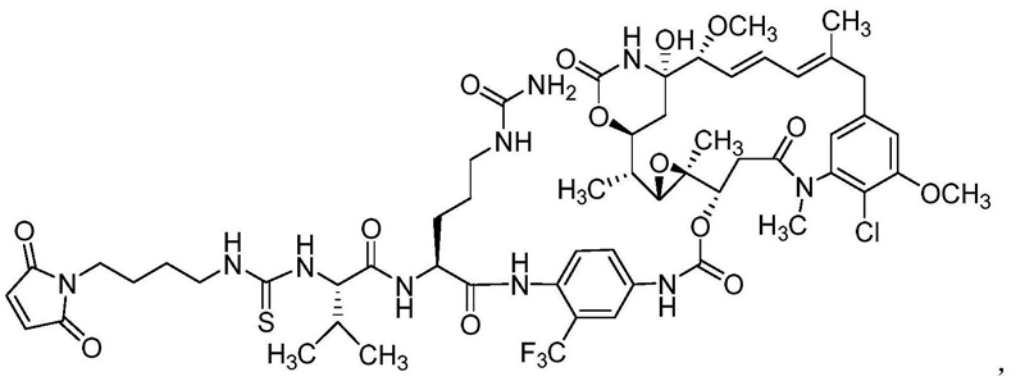
,



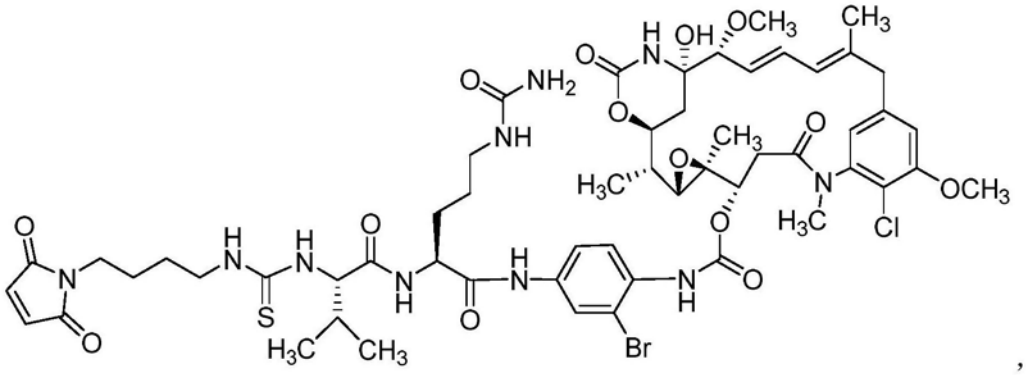
,



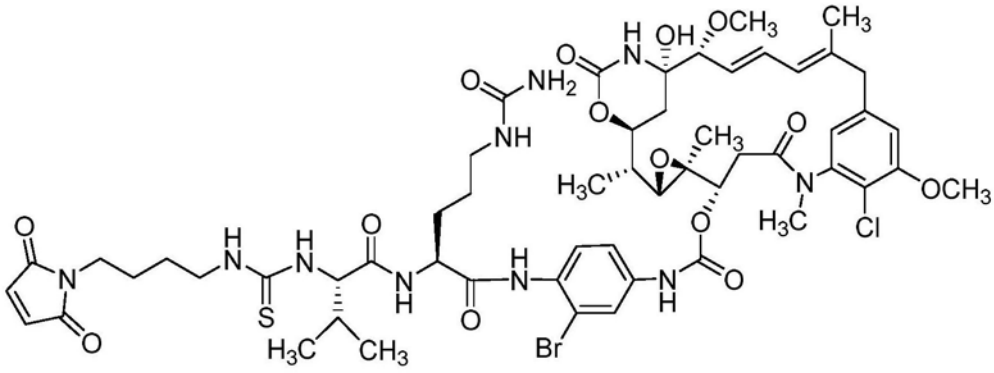
,



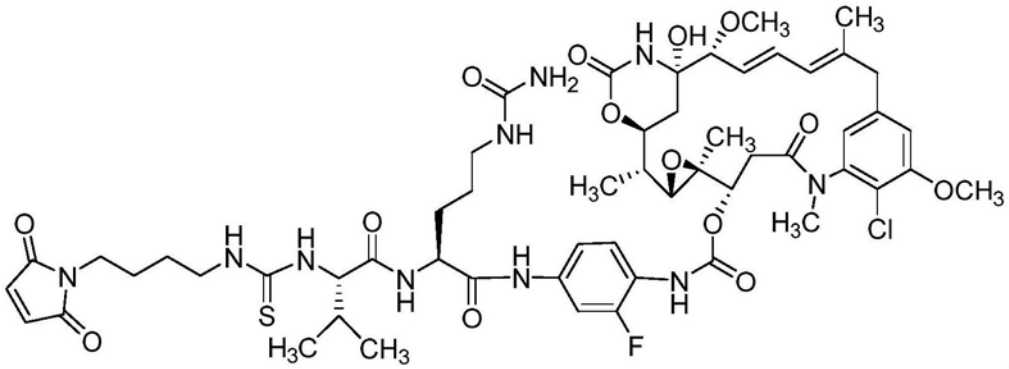
,



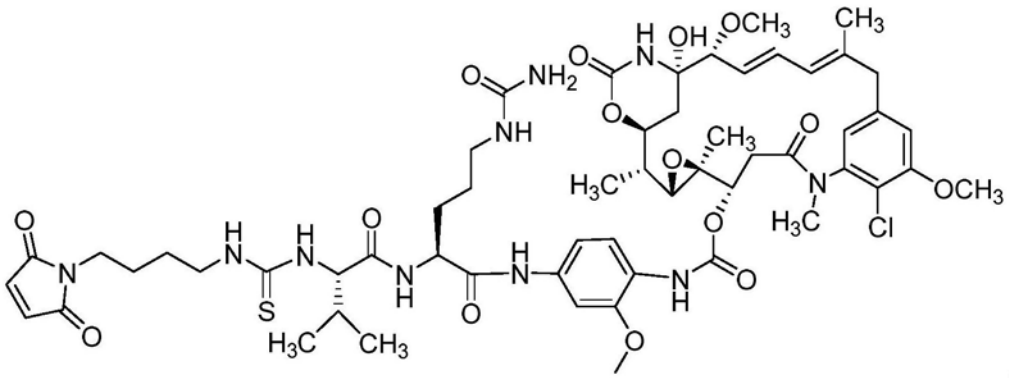
,



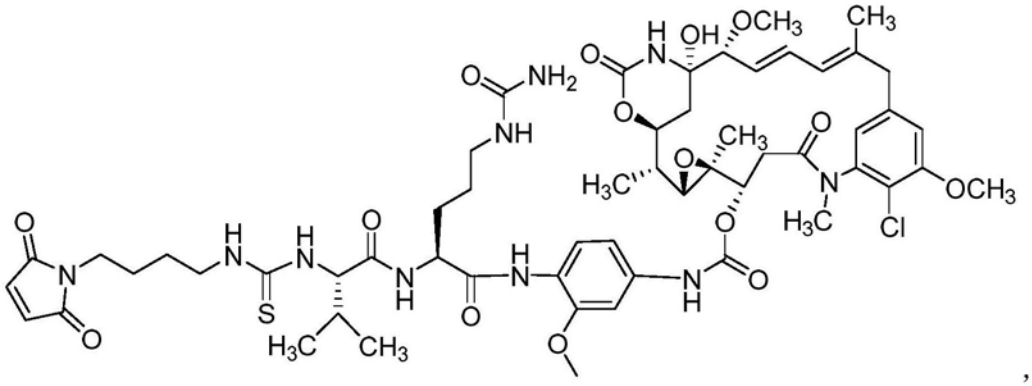
,



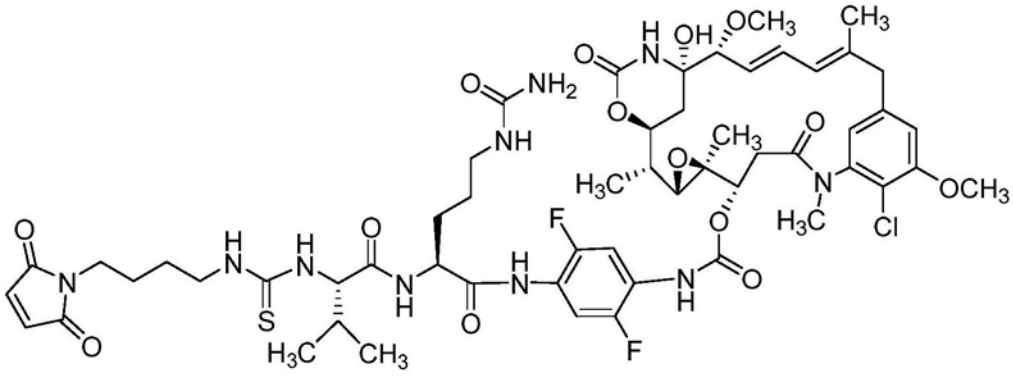
,



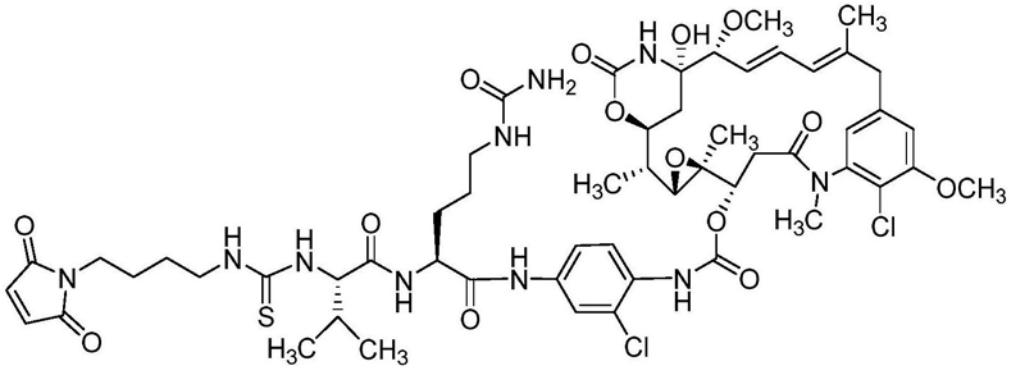
,



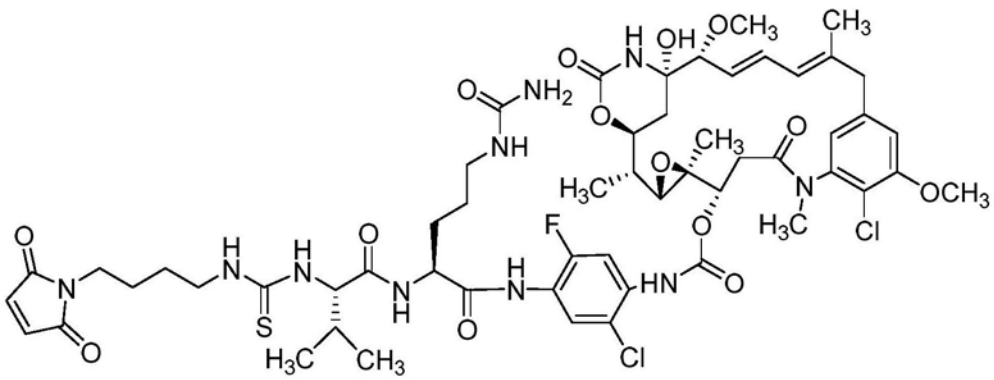
,



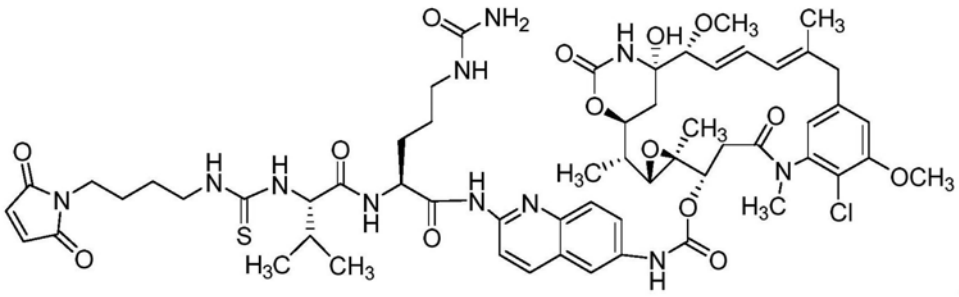
,



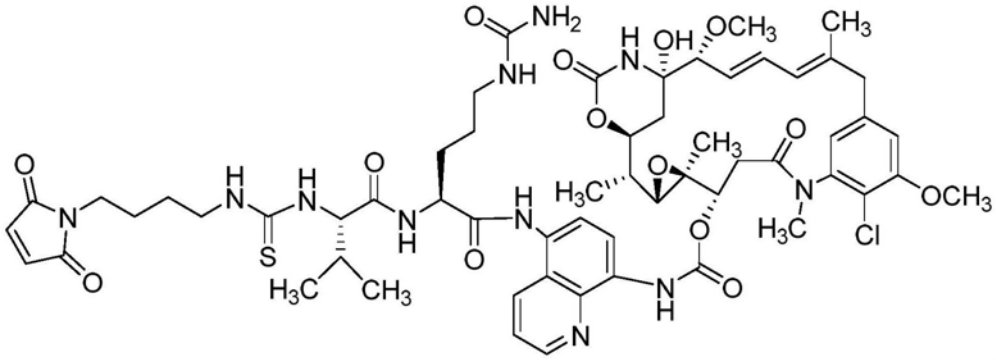
,



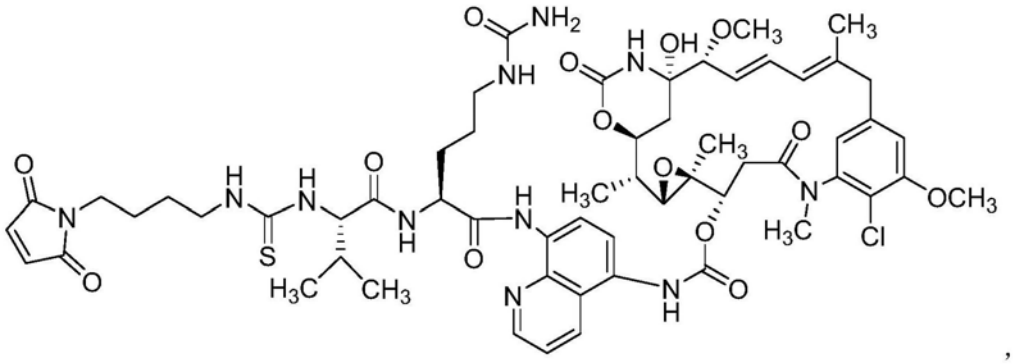
,



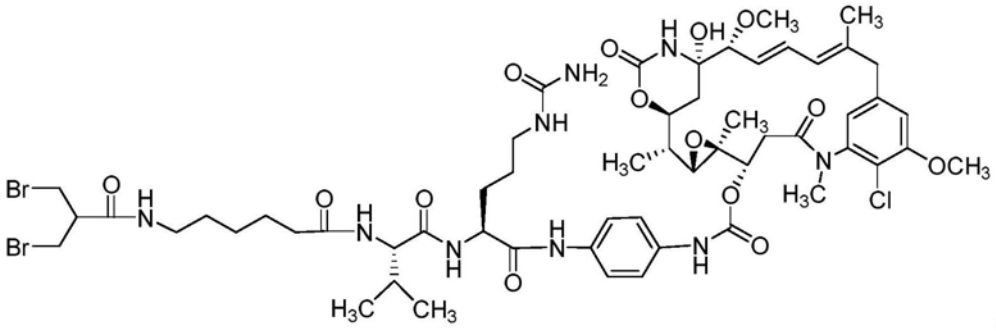
,



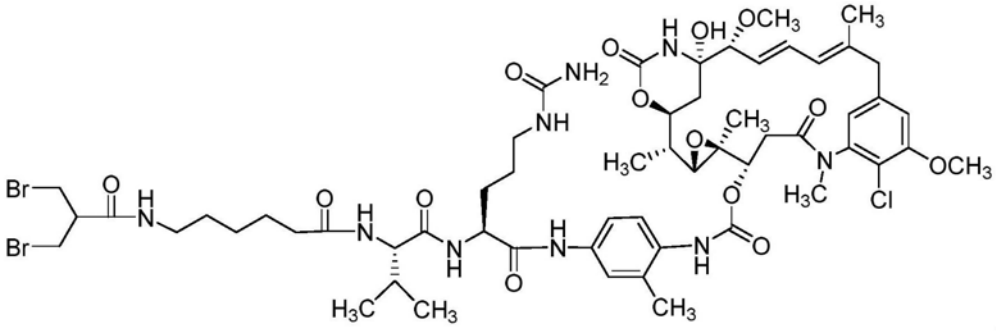
,



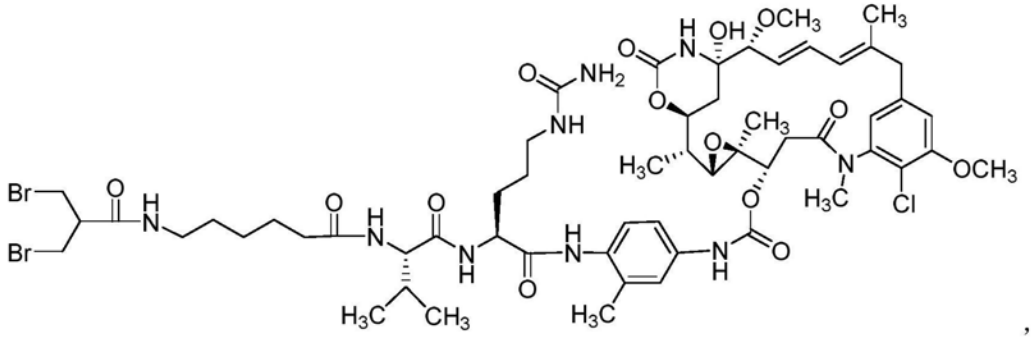
,



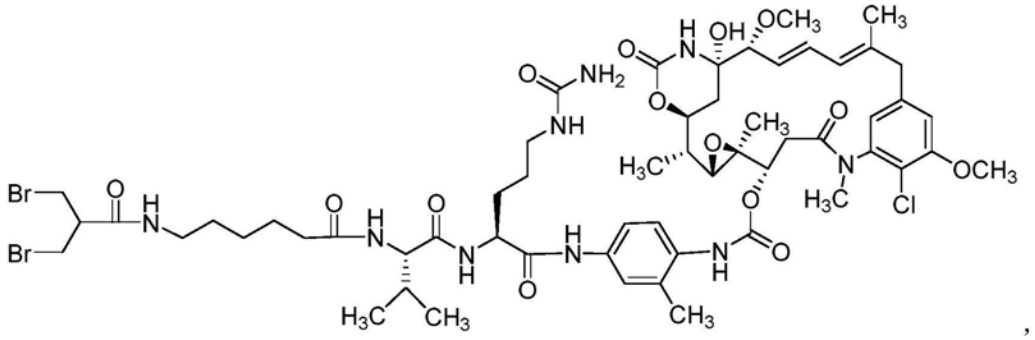
,



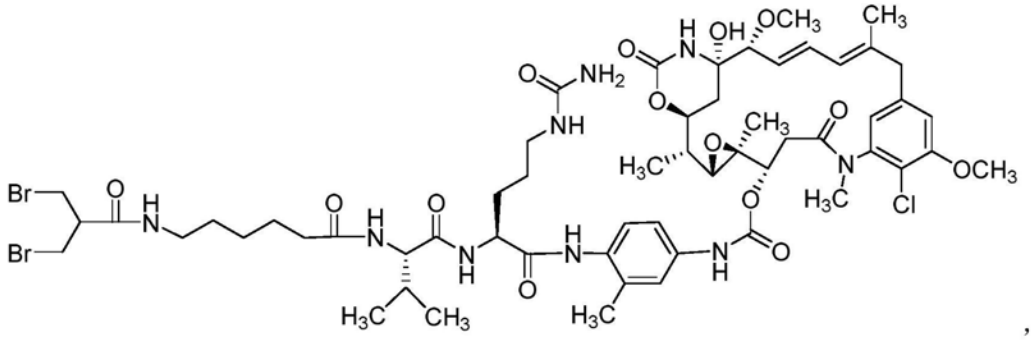
,



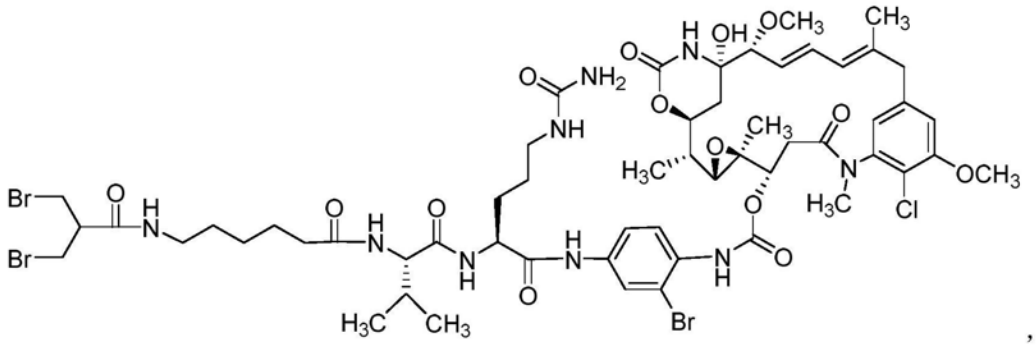
,



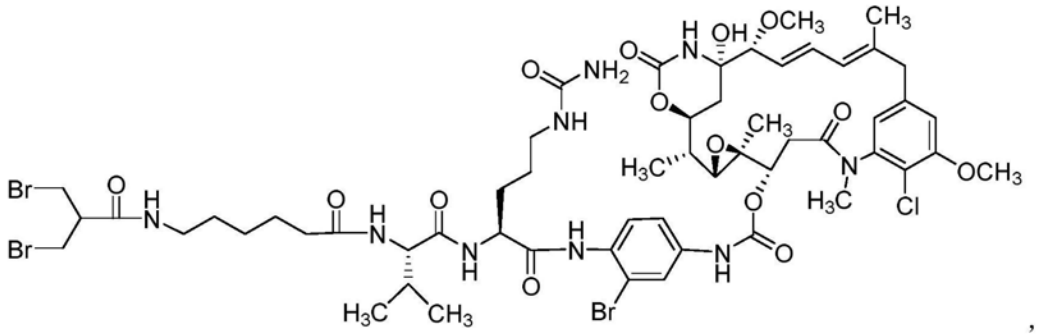
,



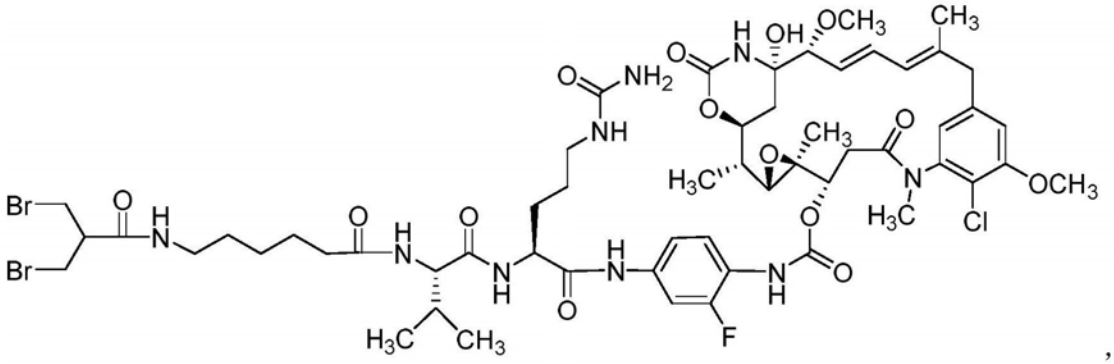
,



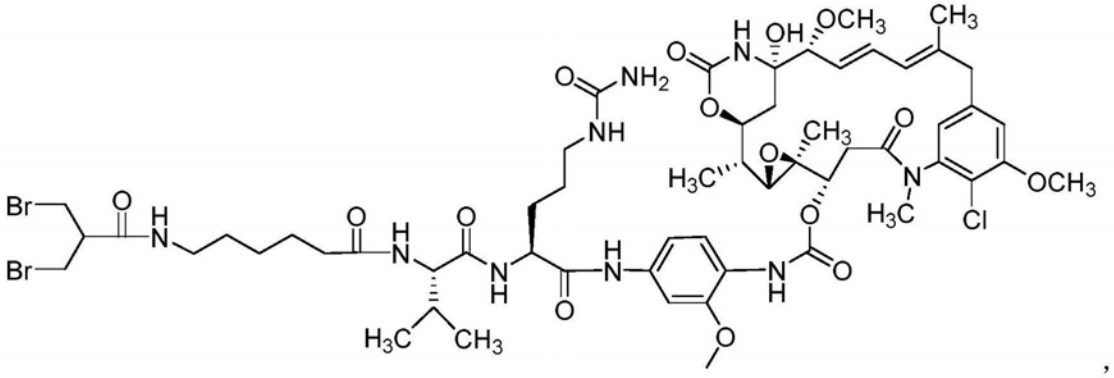
,



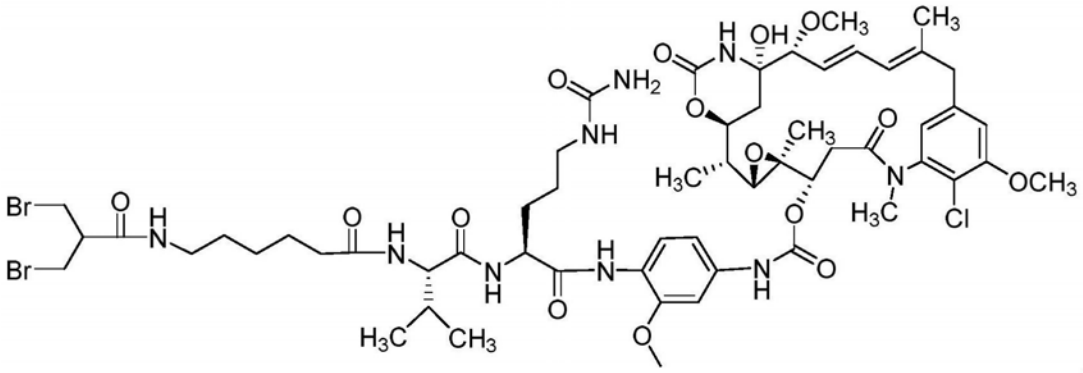
,



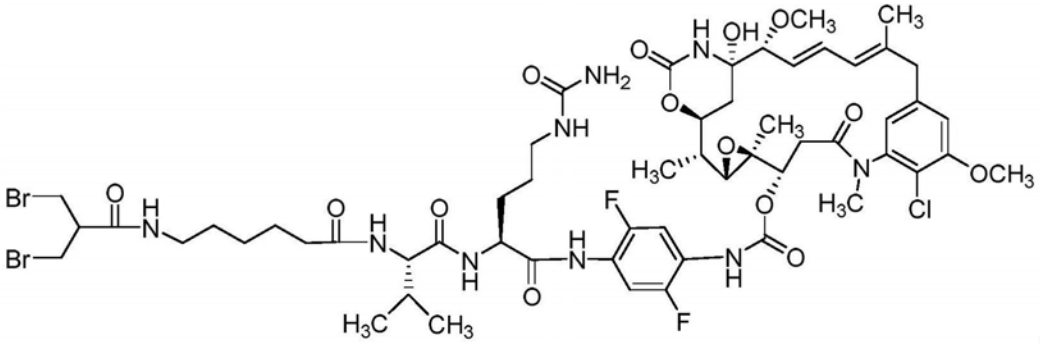
,



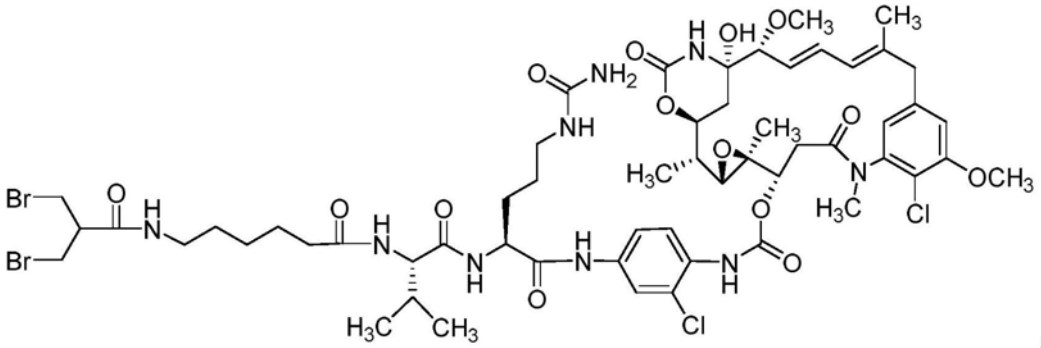
,



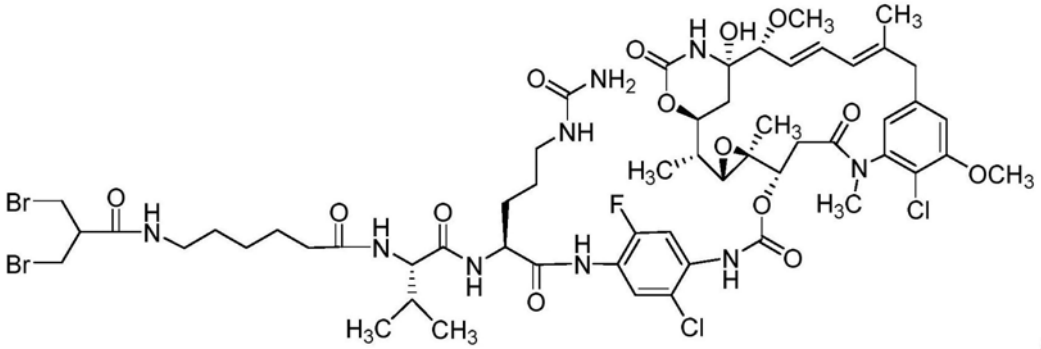
,



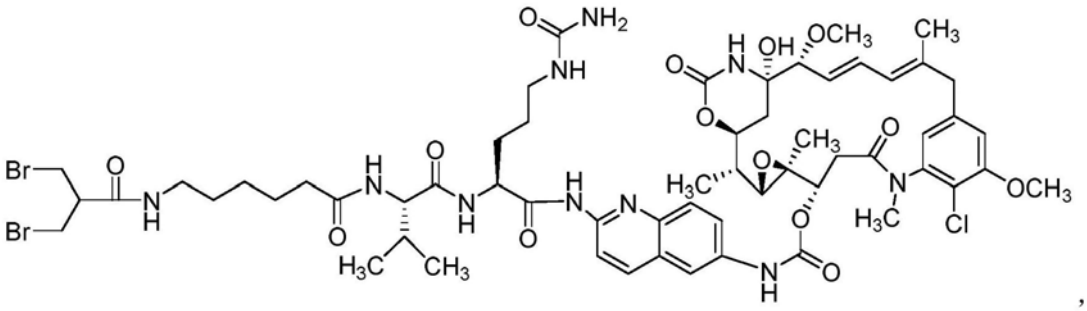
,



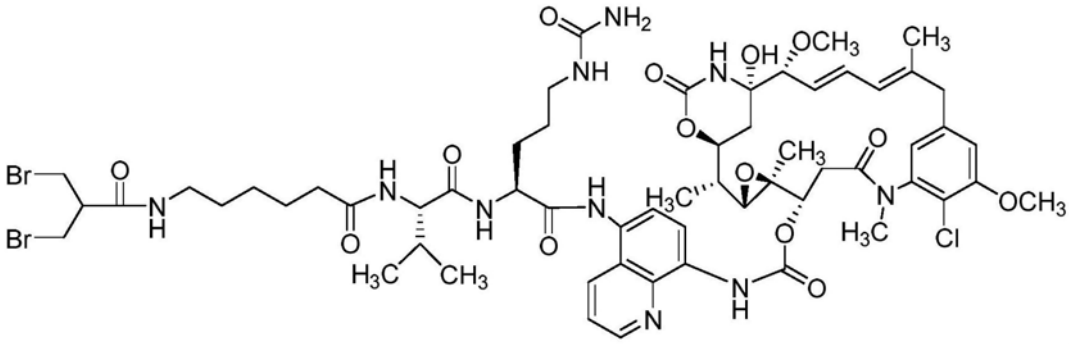
,



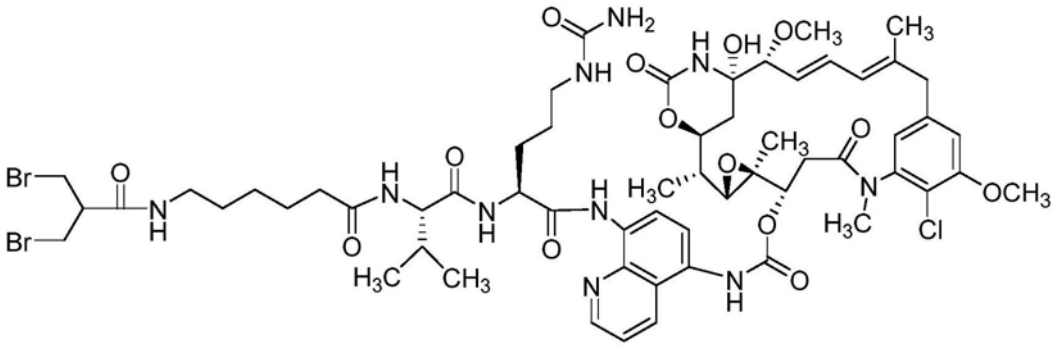
,



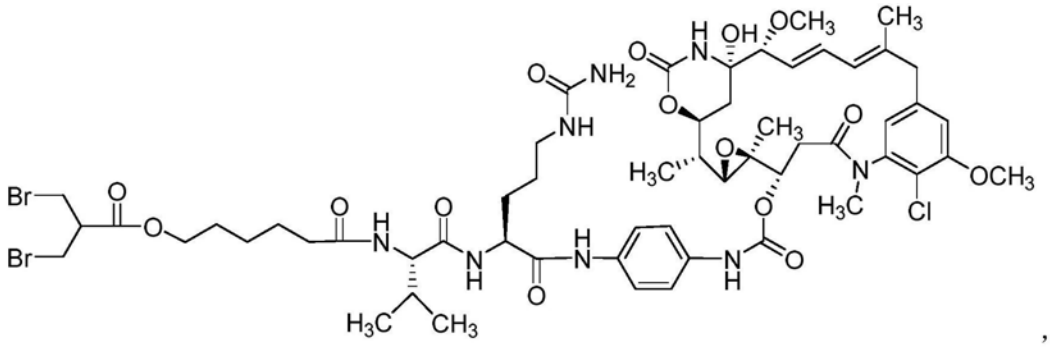
,



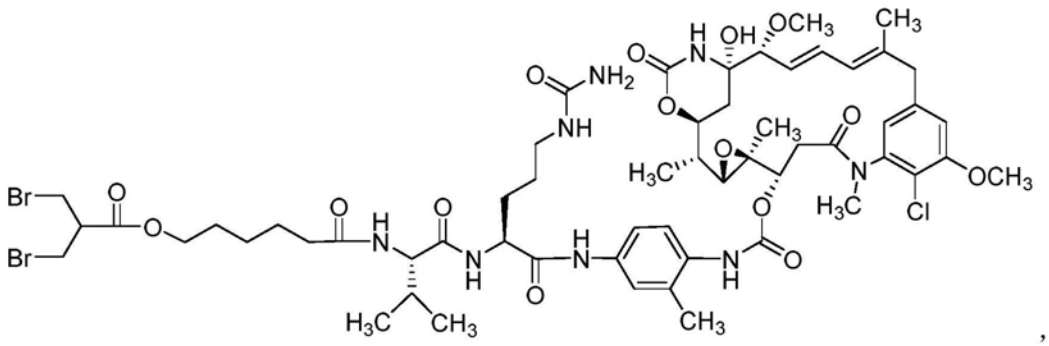
,



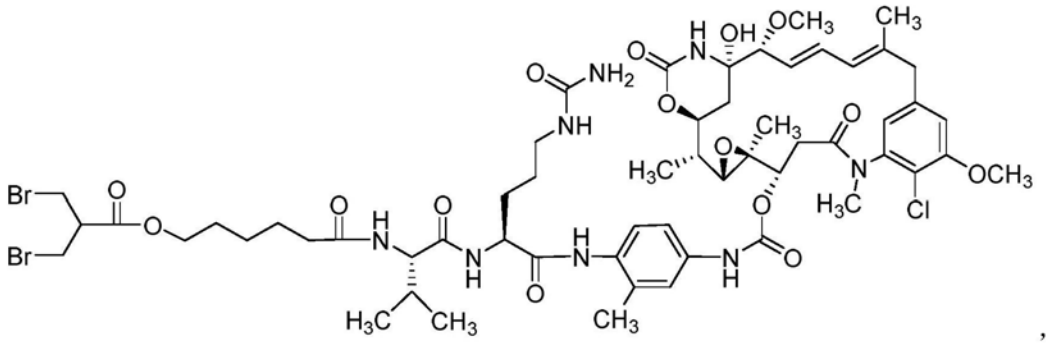
,



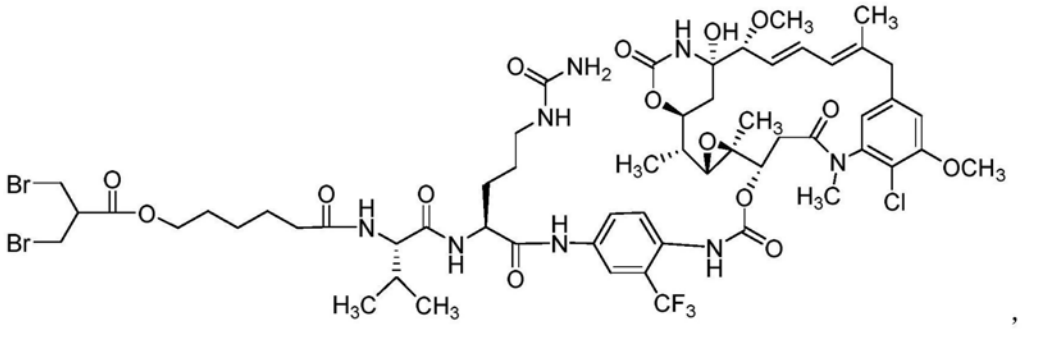
,



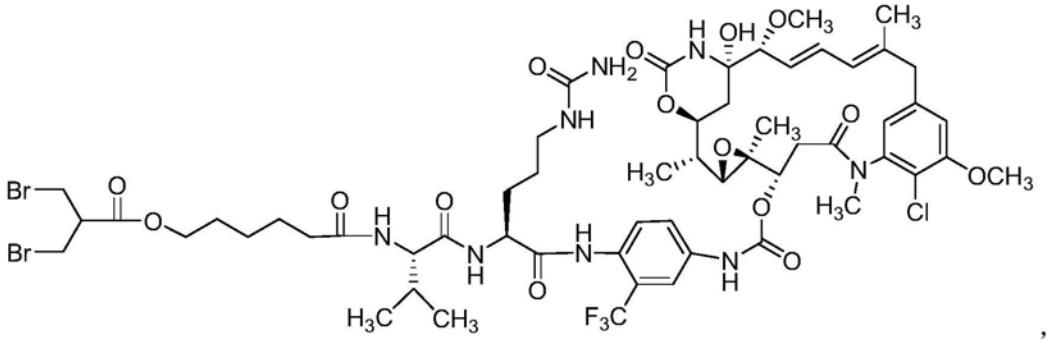
,



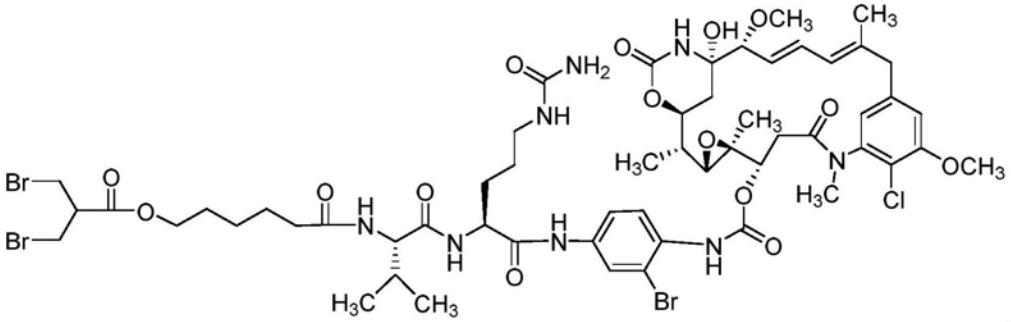
,



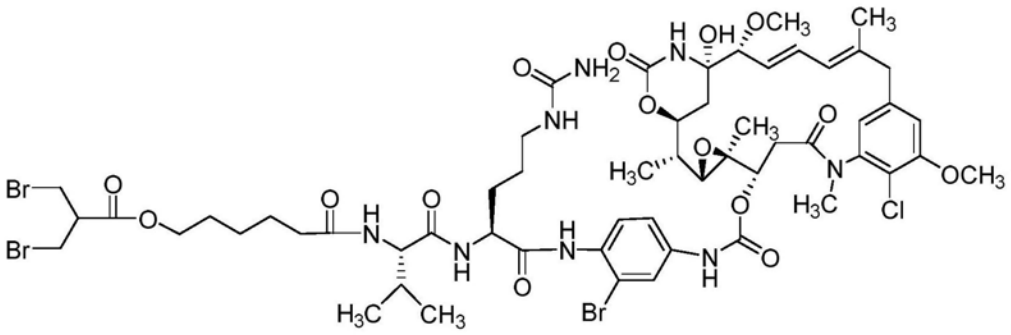
,



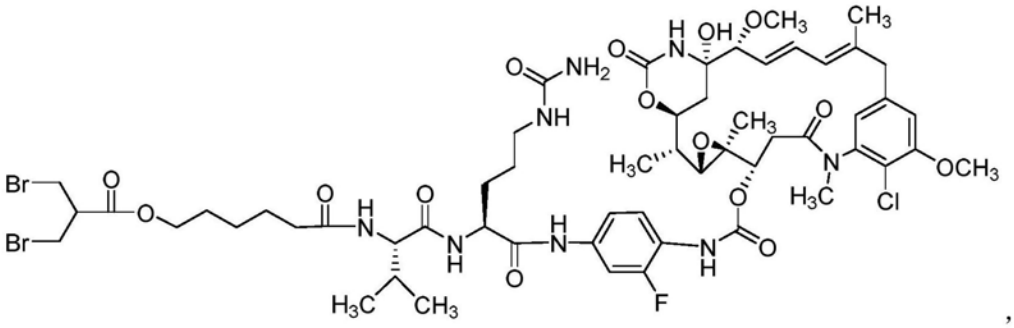
,



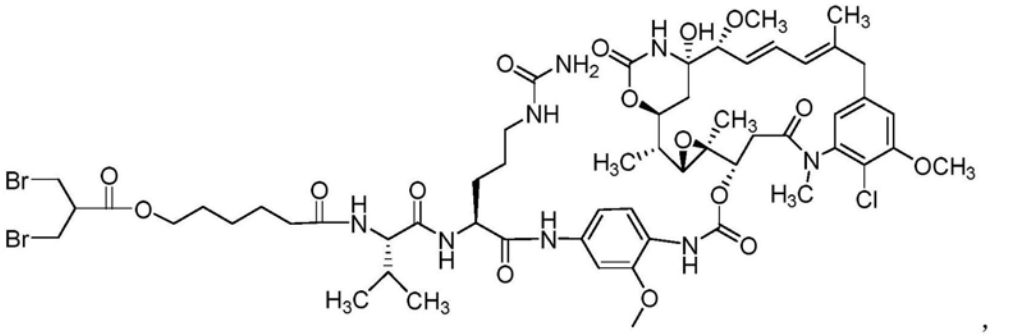
,



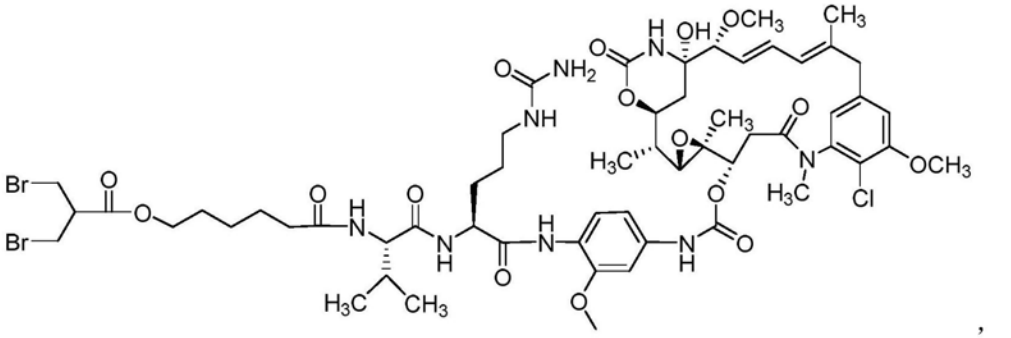
,



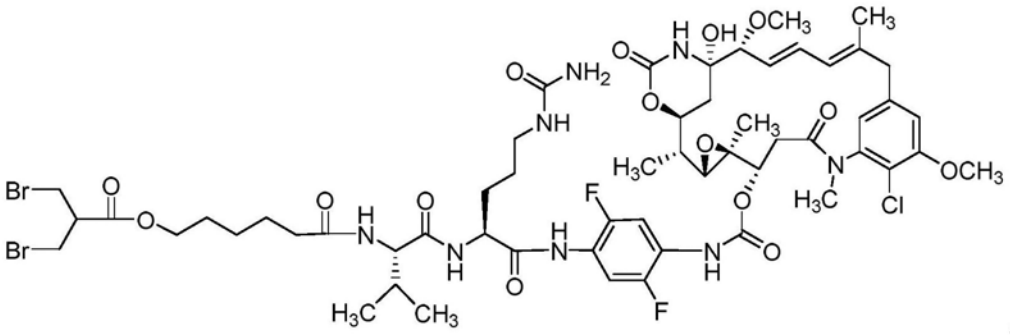
,



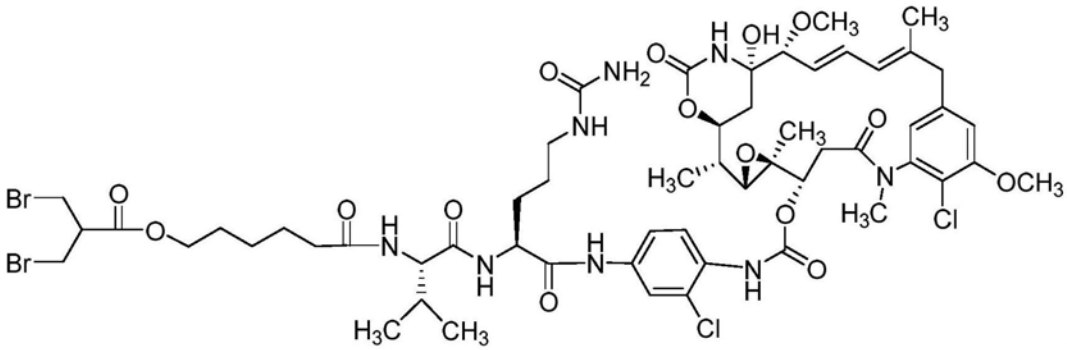
,



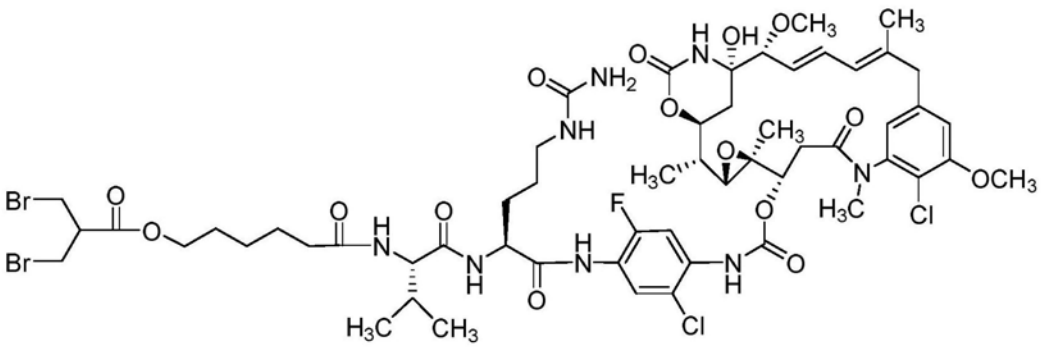
,



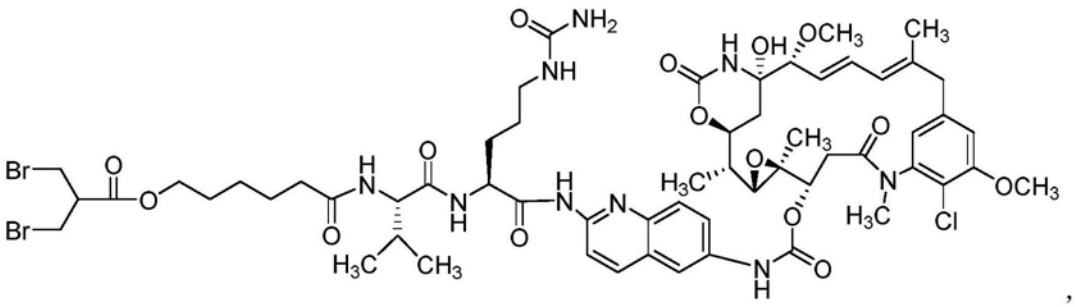
,



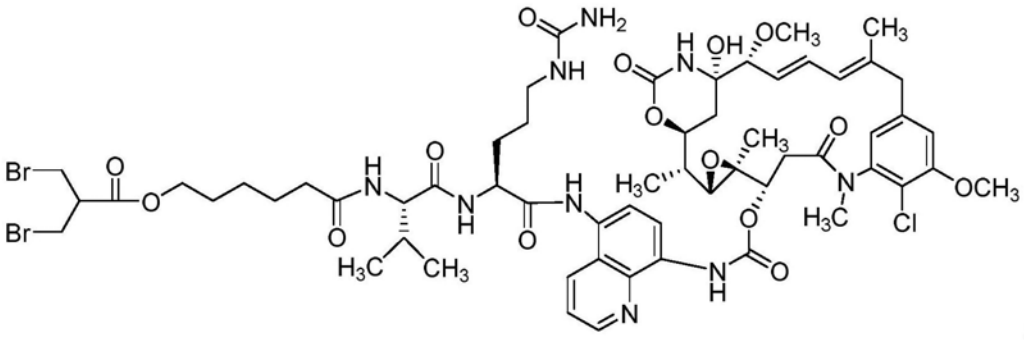
,



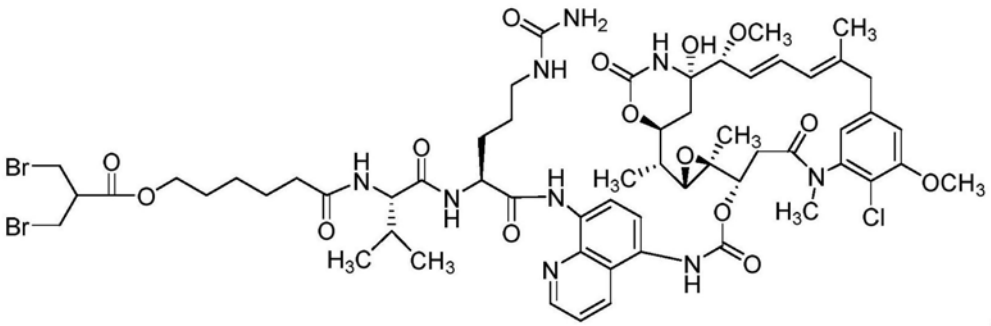
,



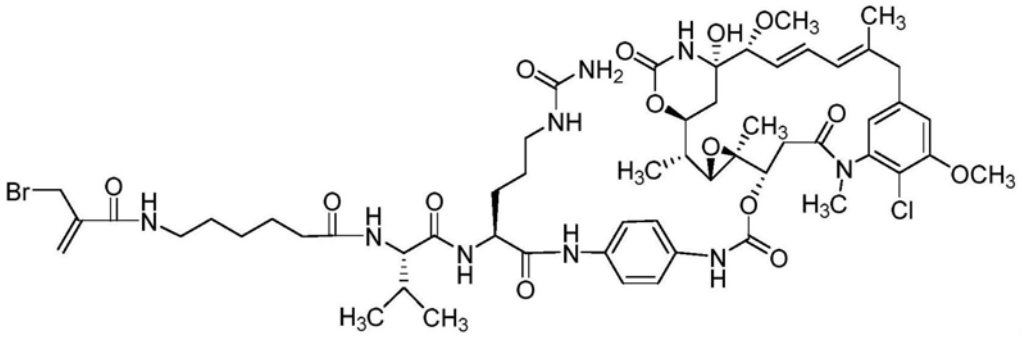
,



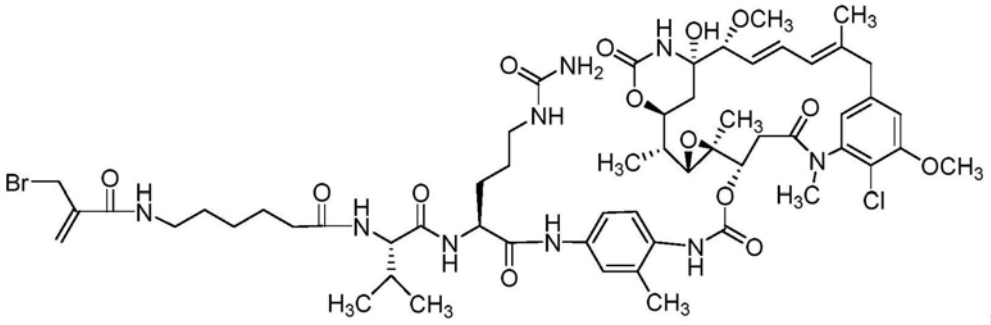
,



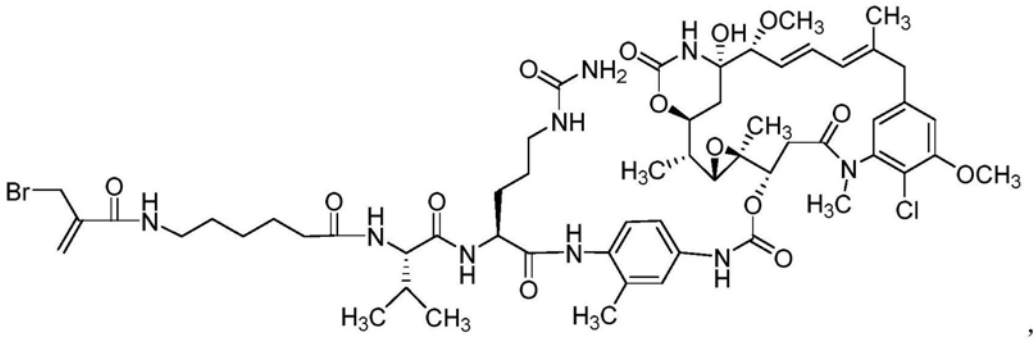
,



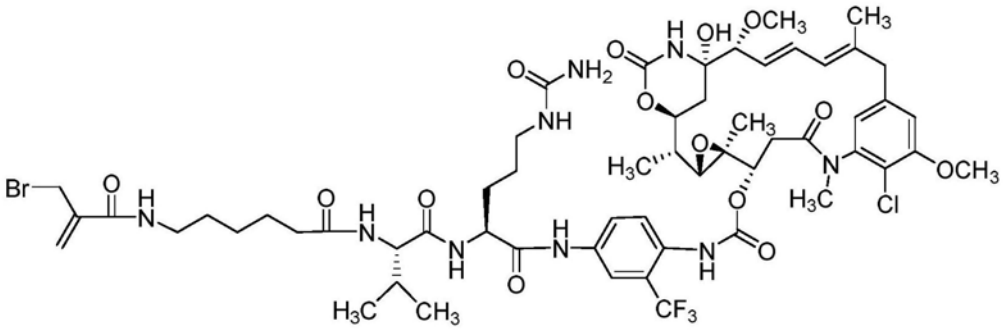
,



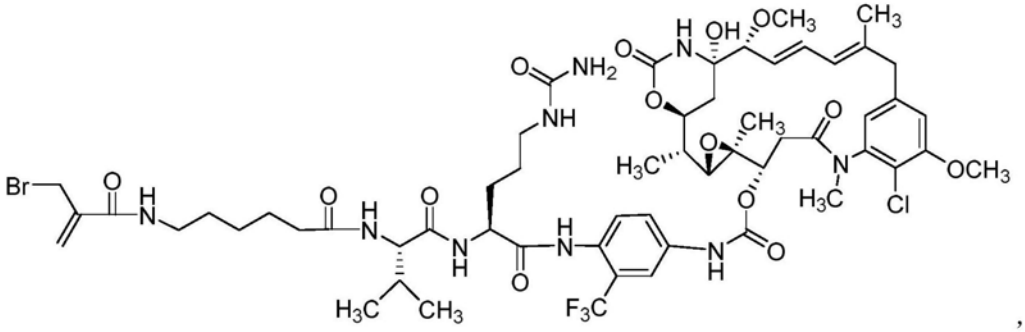
,



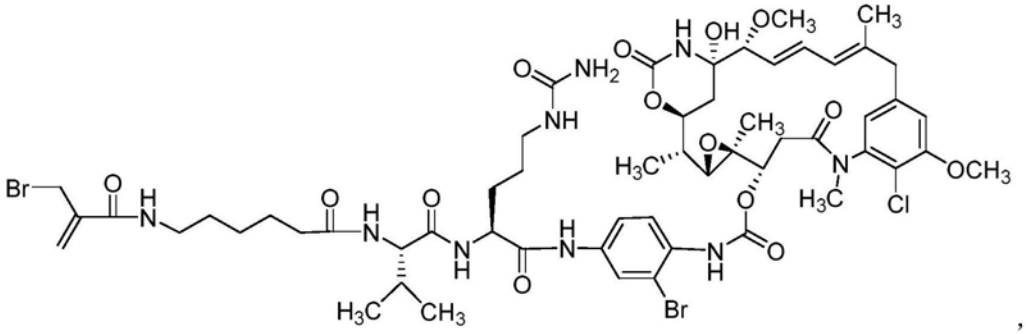
,



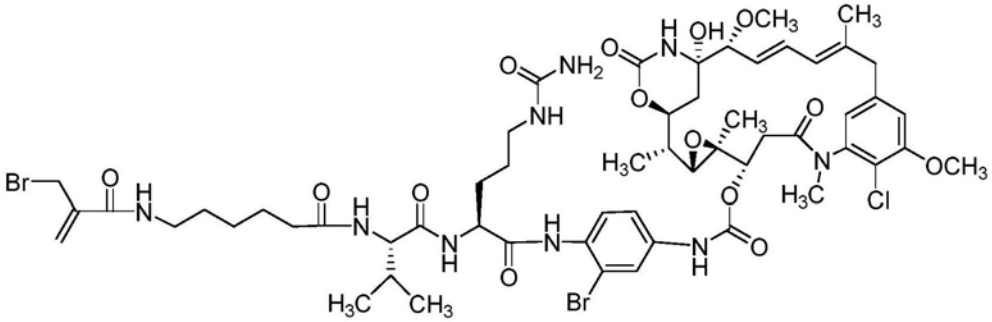
,



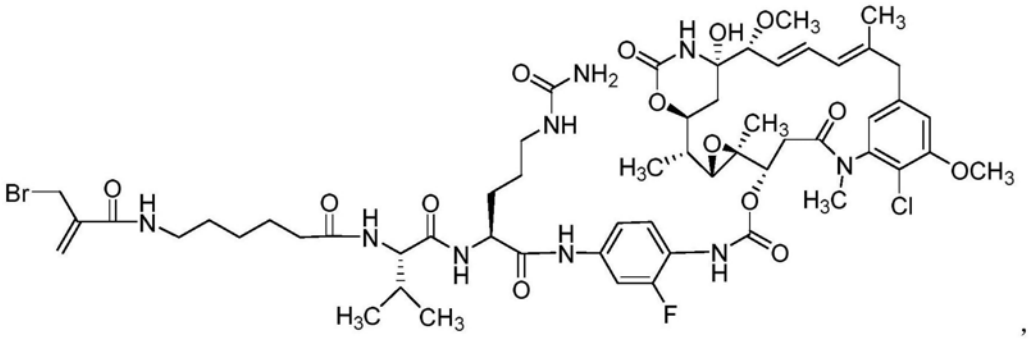
,



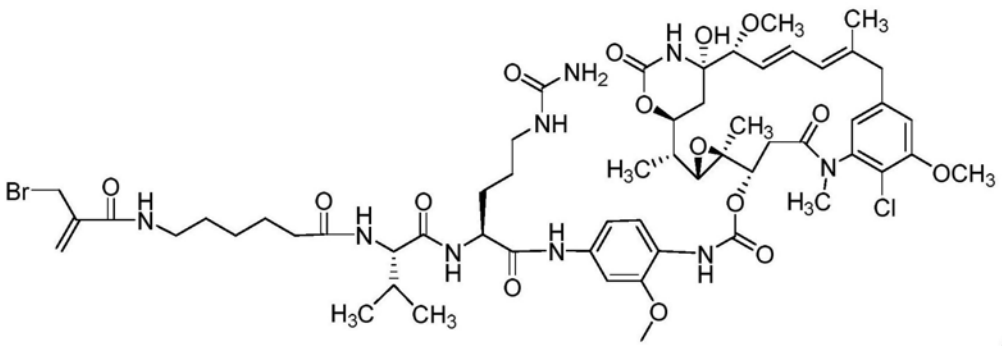
,



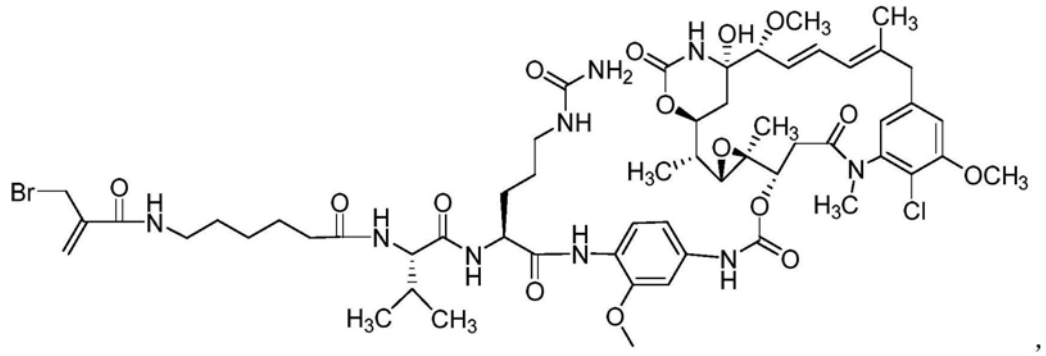
,



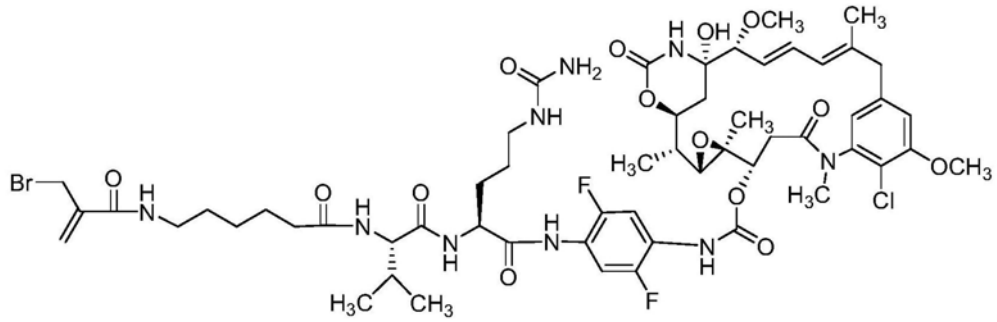
,



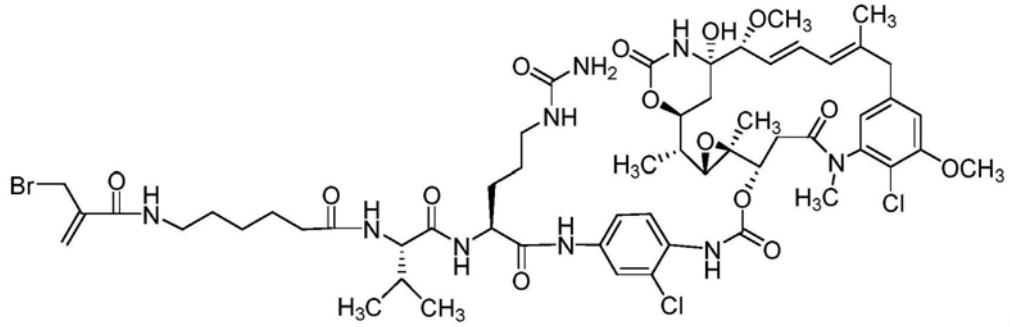
,



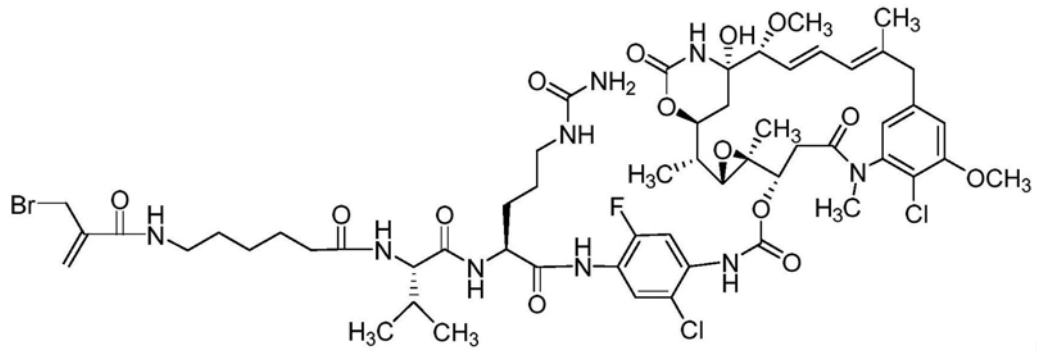
,



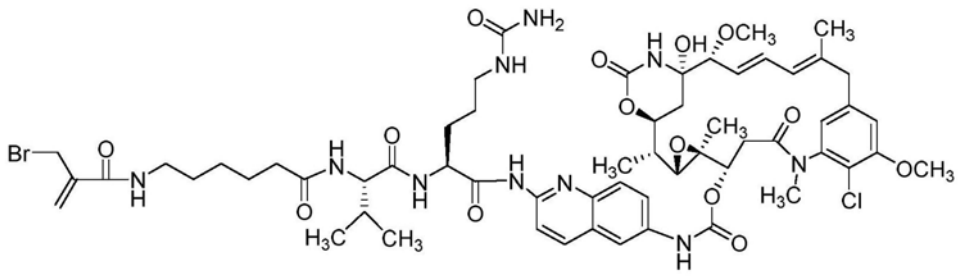
,



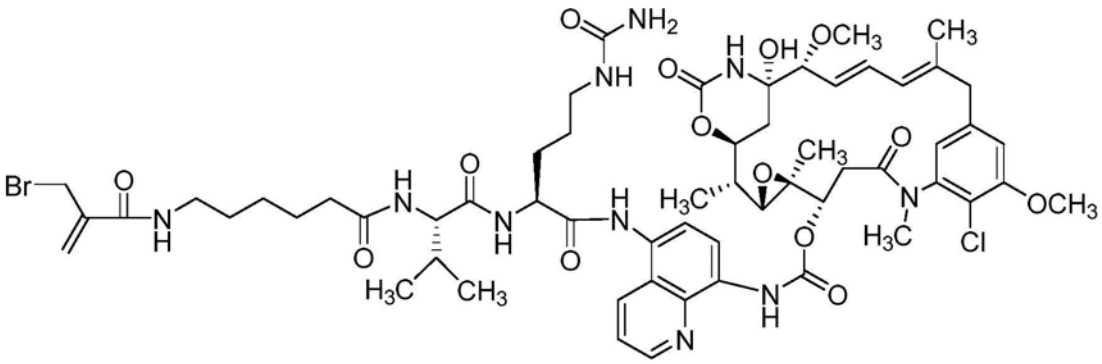
,



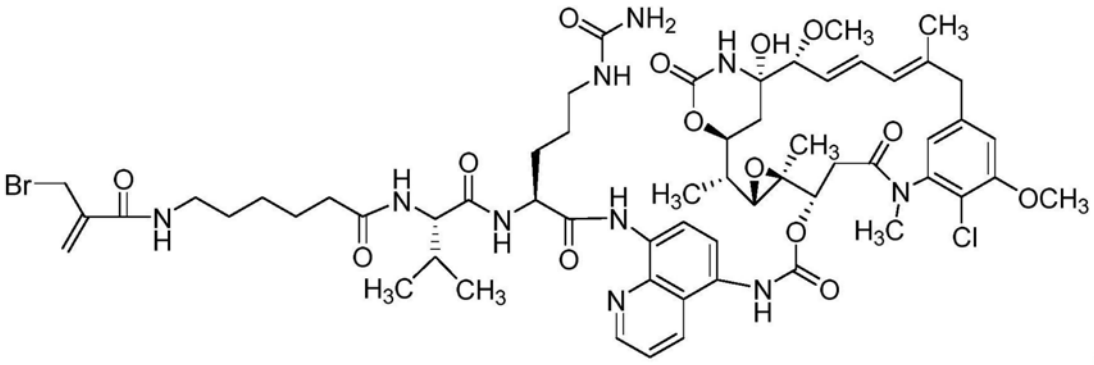
,



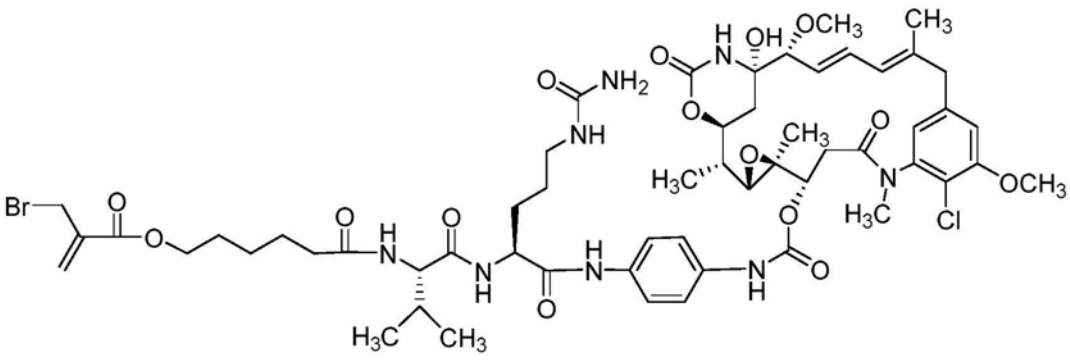
,



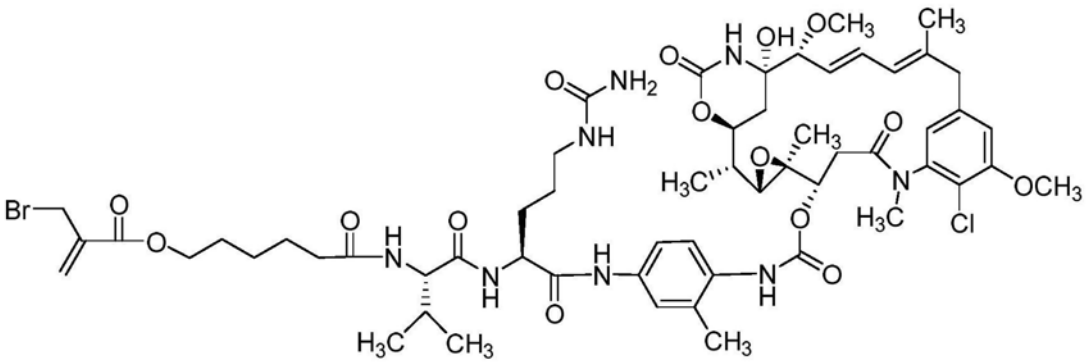
,



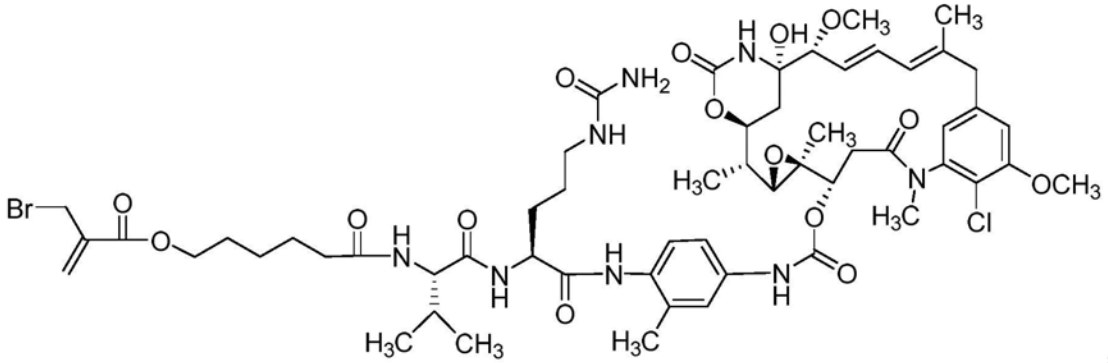
,



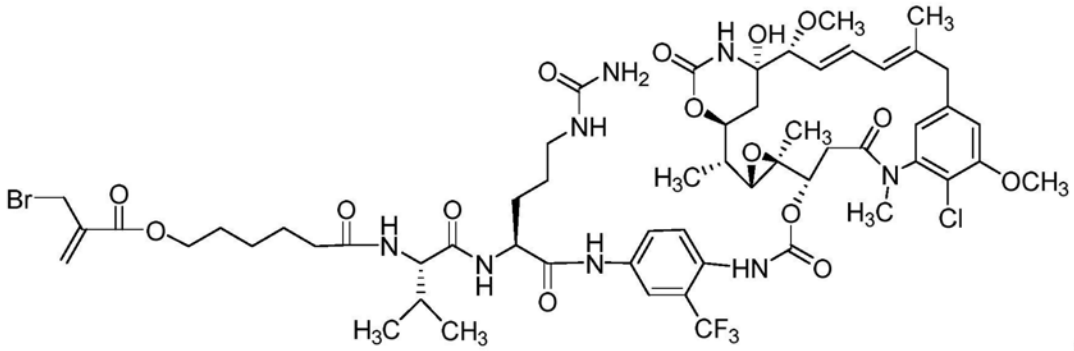
,



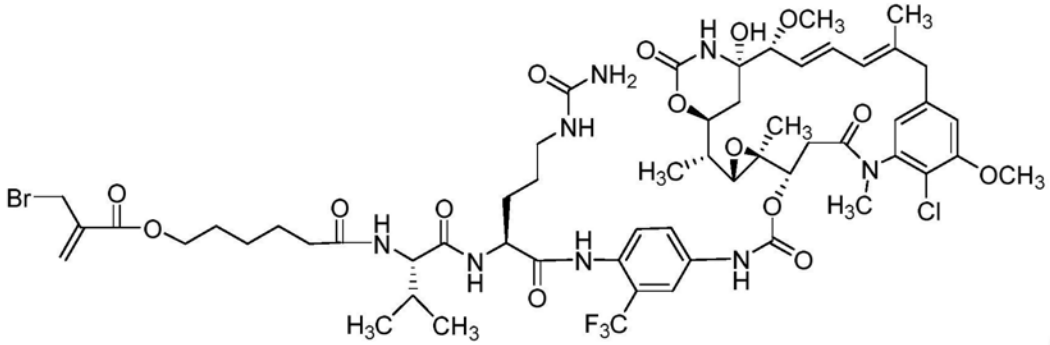
,



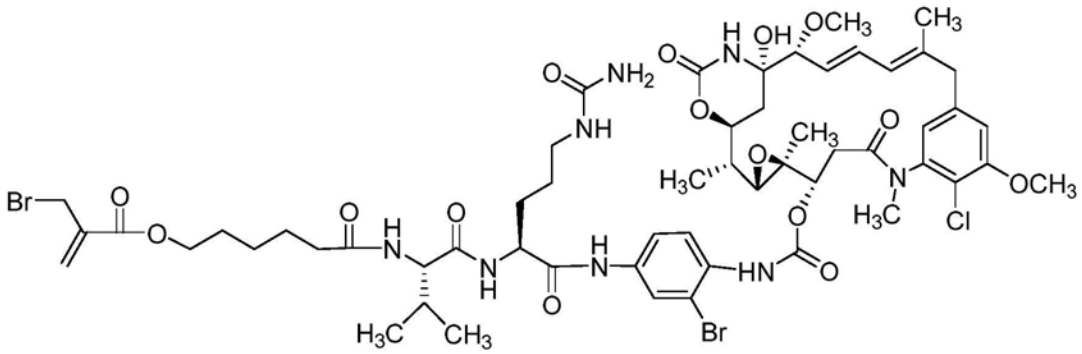
,



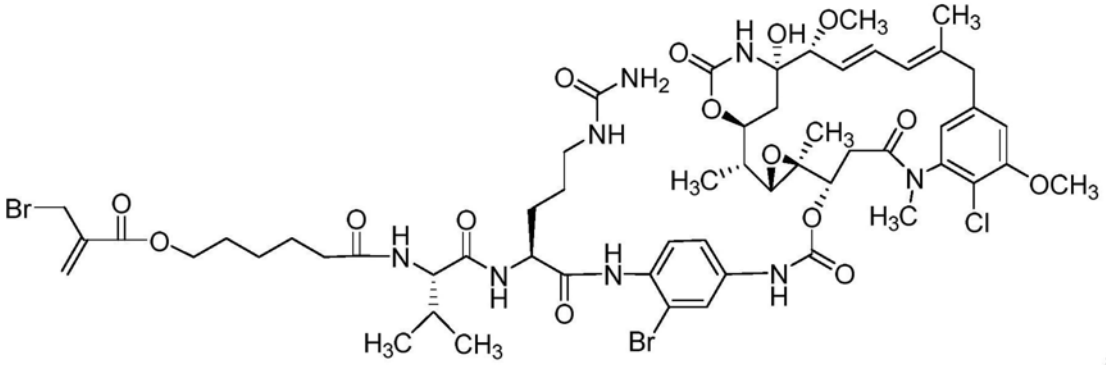
,

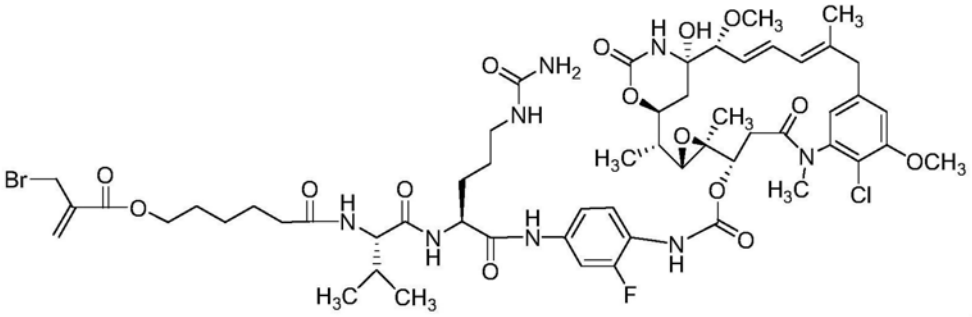


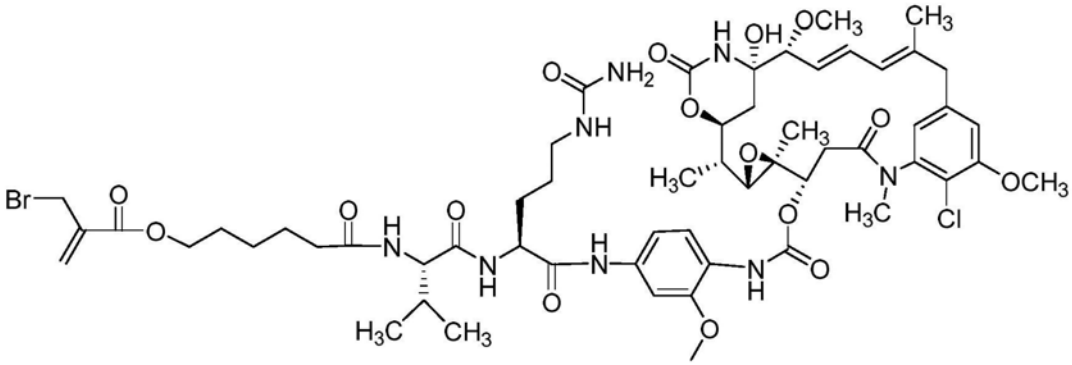
,

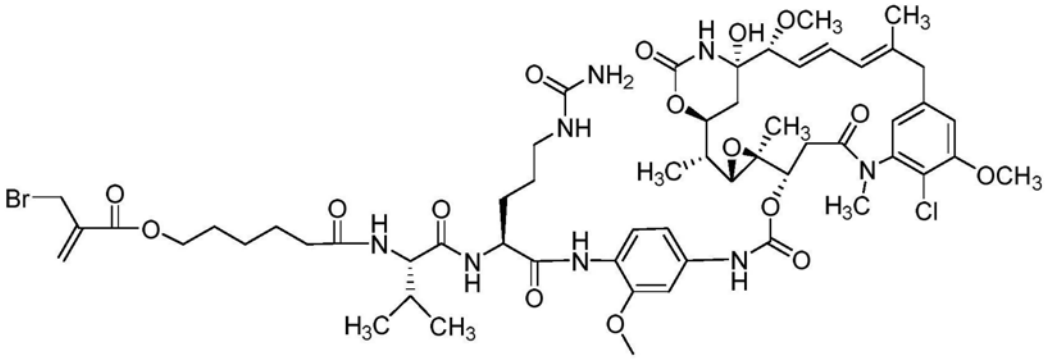


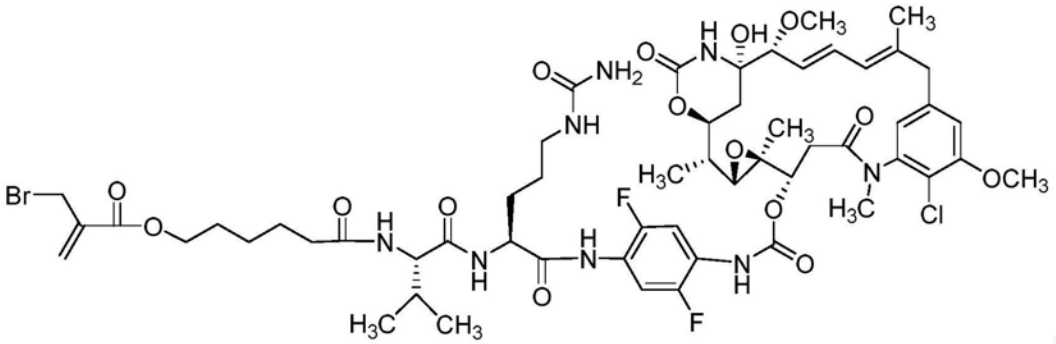
,



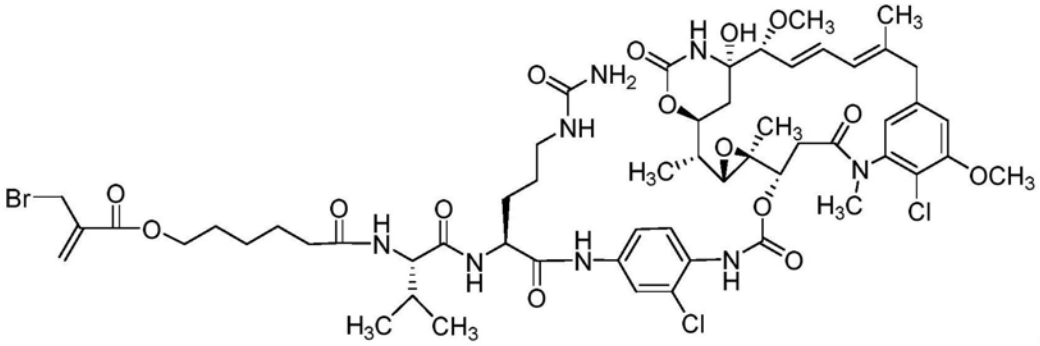




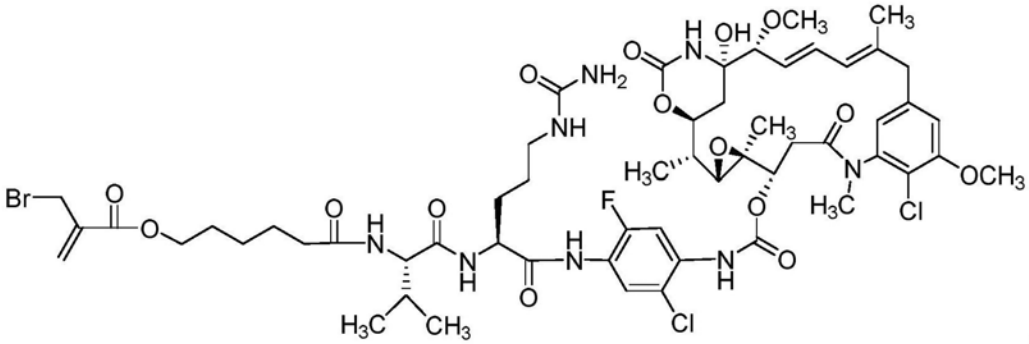




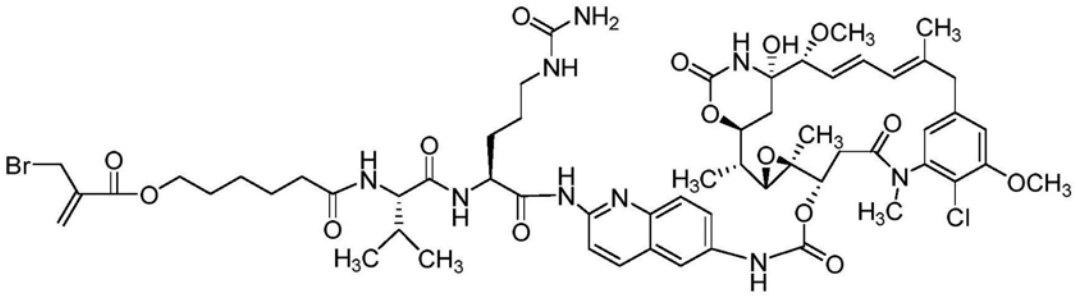
,



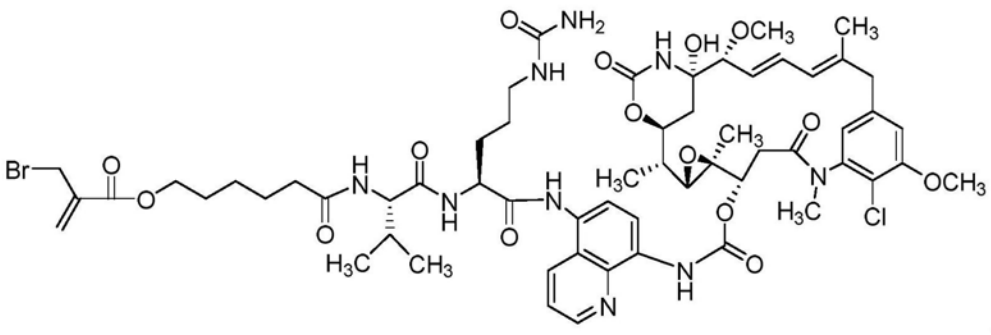
,



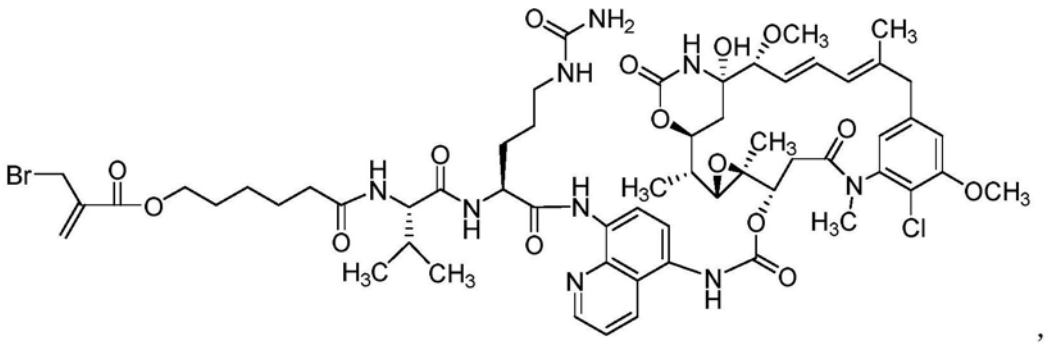
,



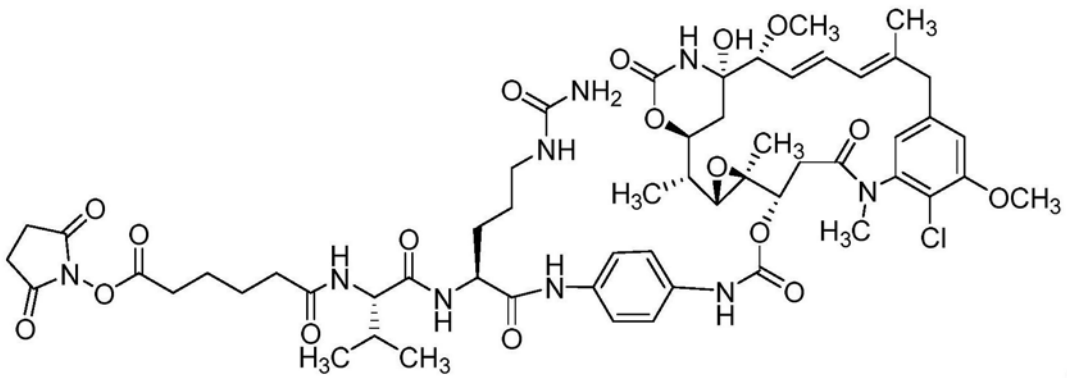
,



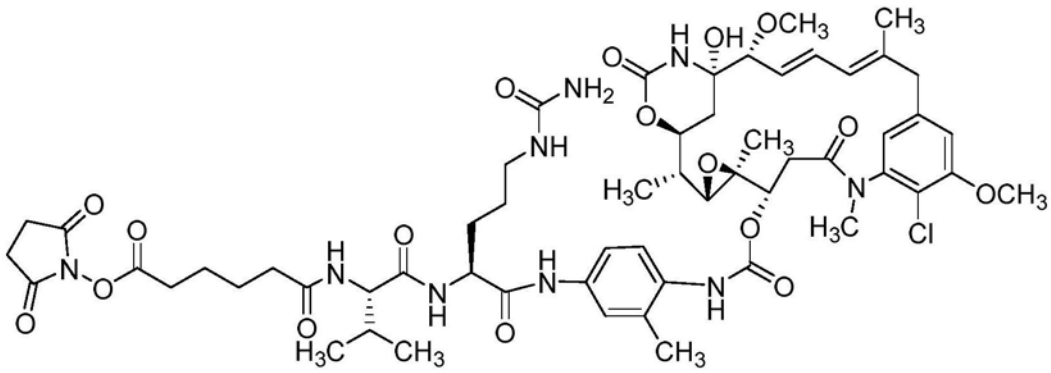
,



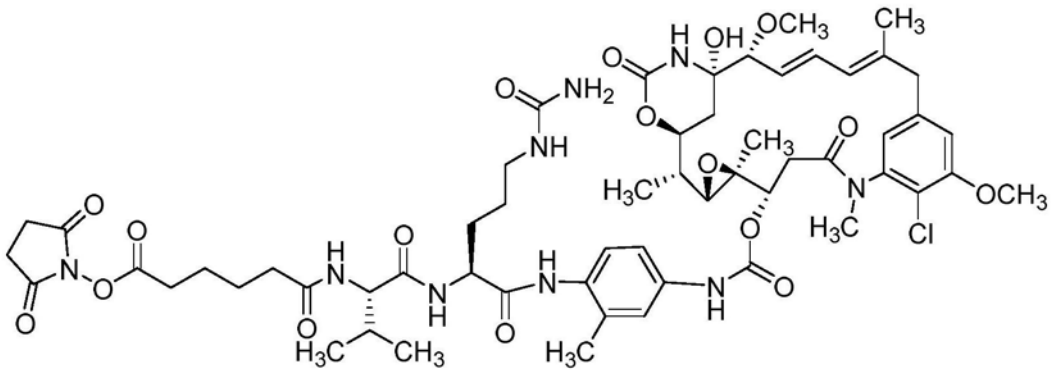
,



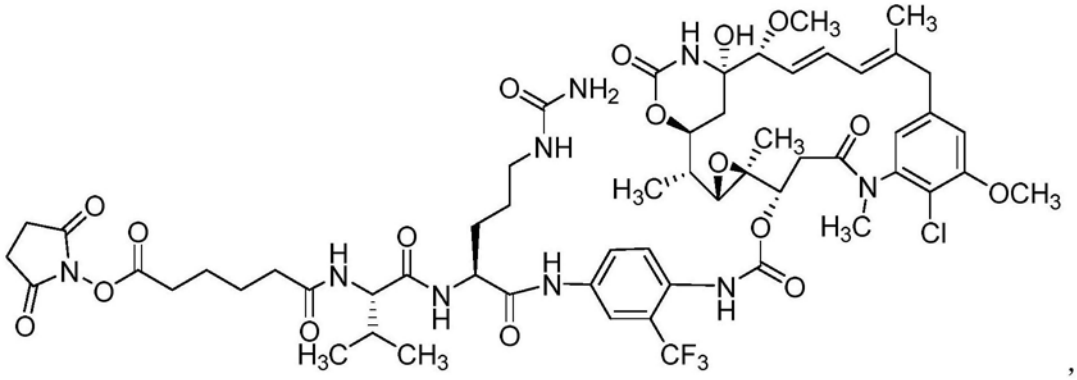
,



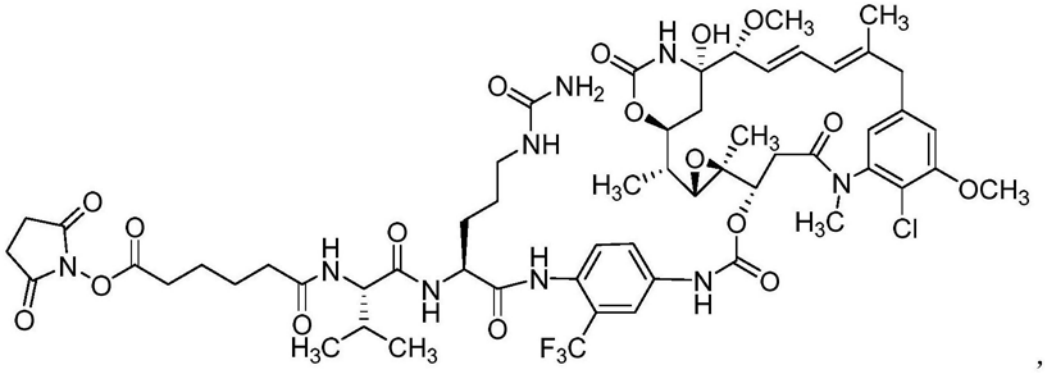
,



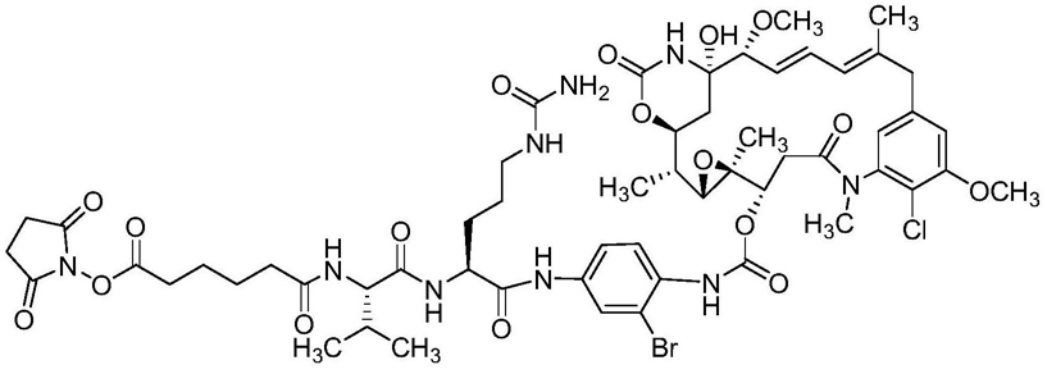
,



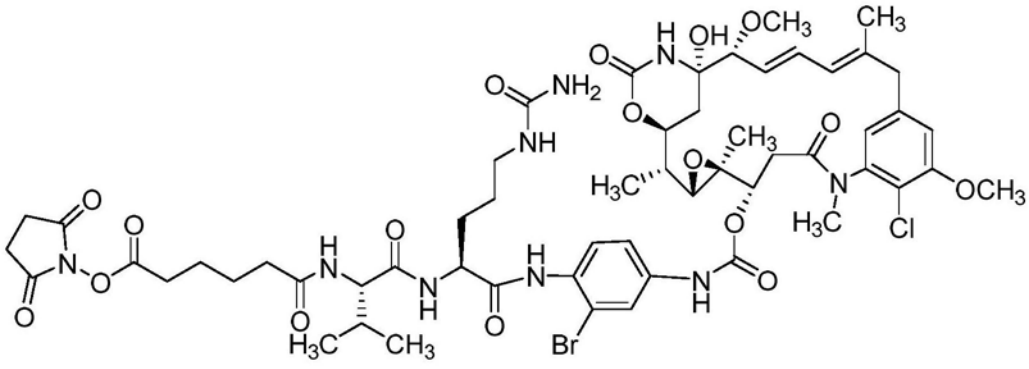
,



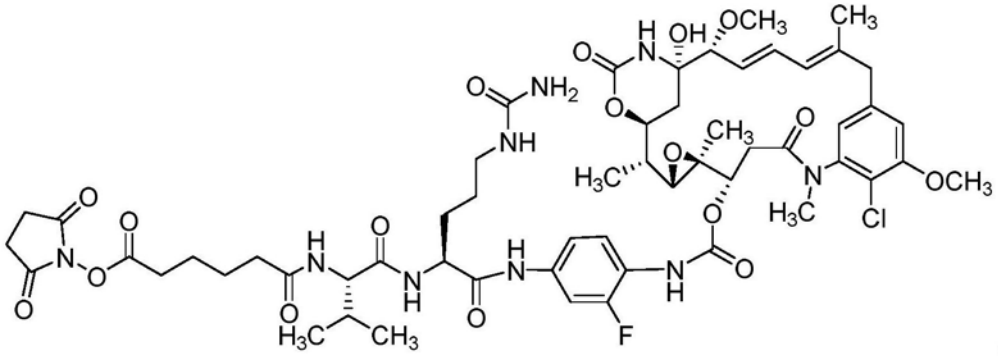
,



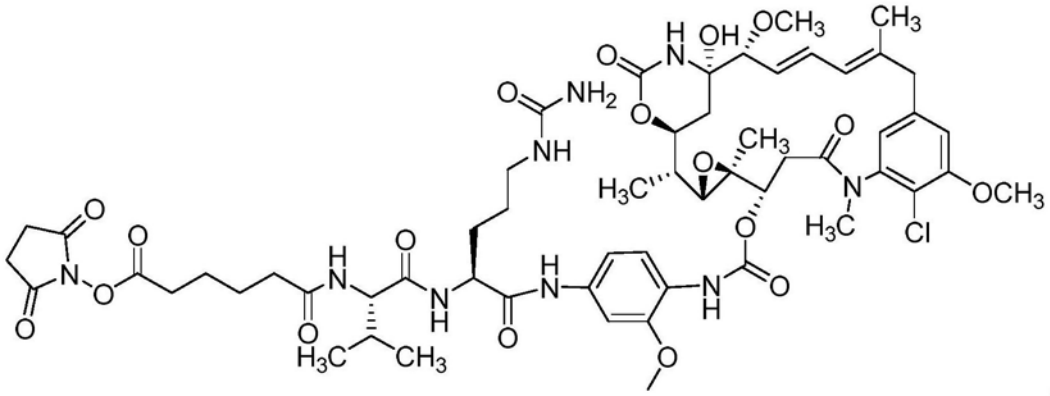
,



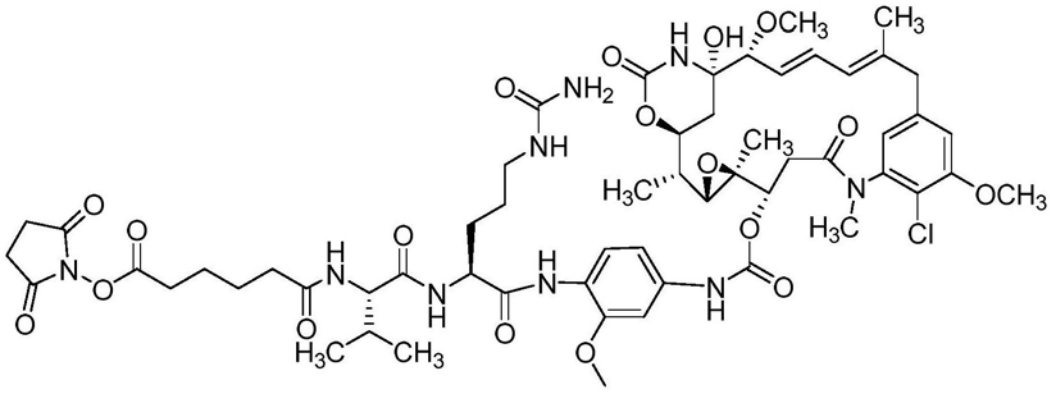
,



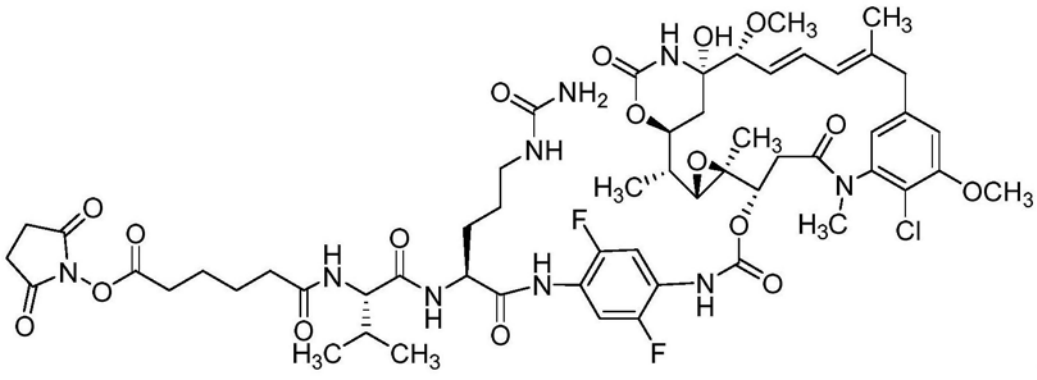
,



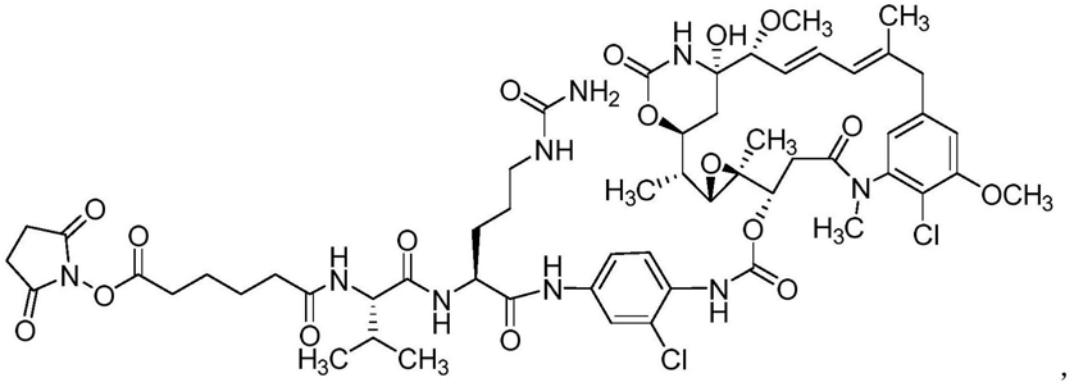
,



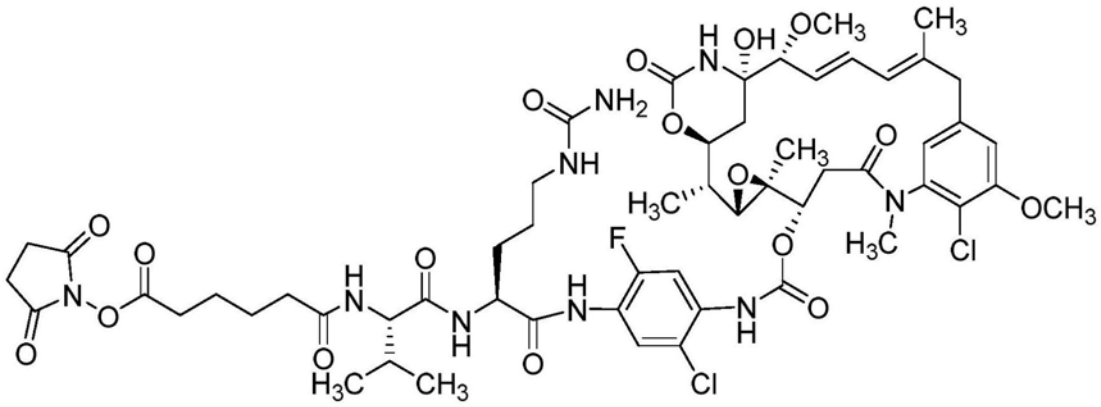
,



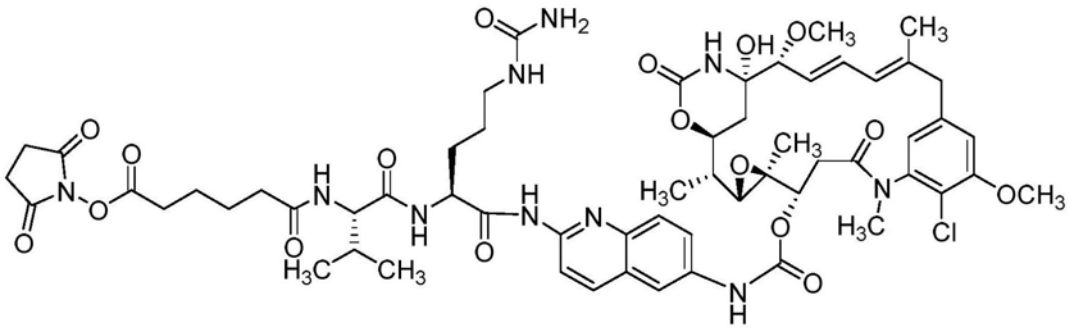
,



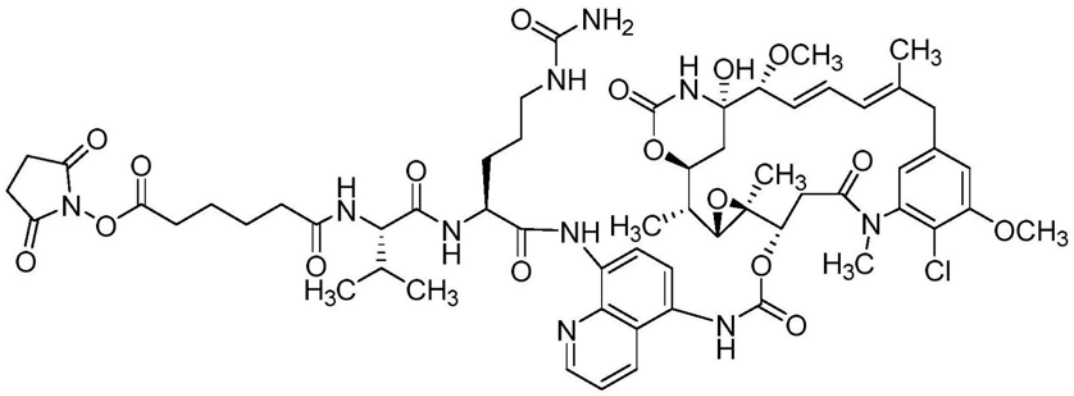
,



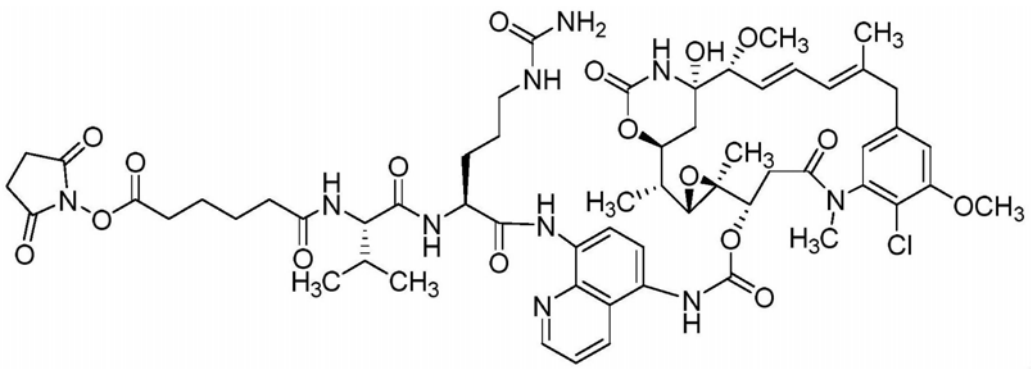
,



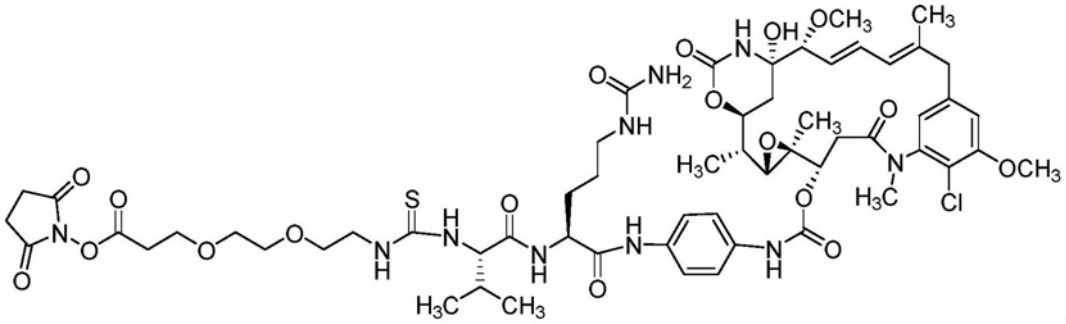
,



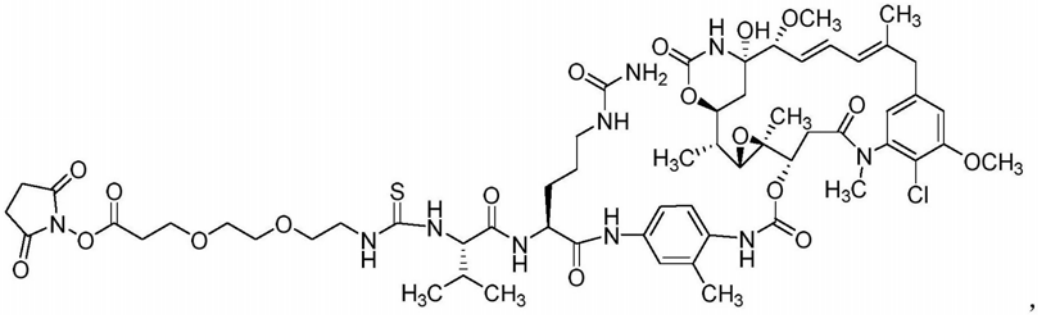
,



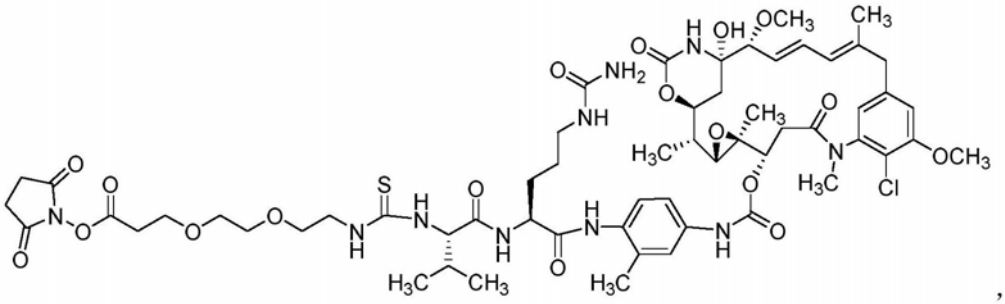
,



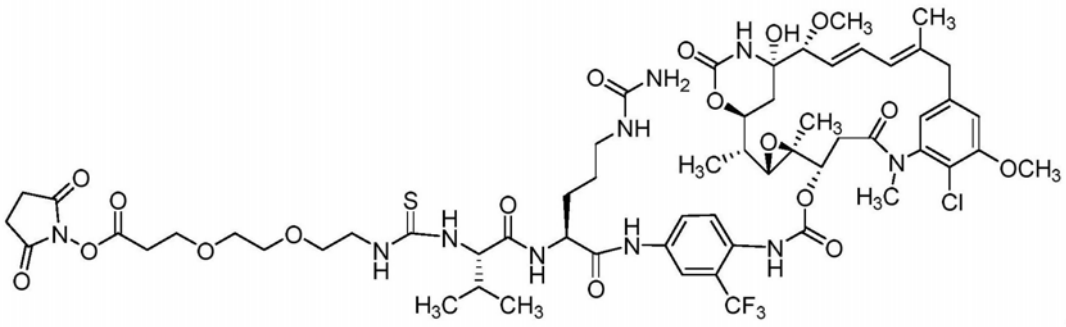
,



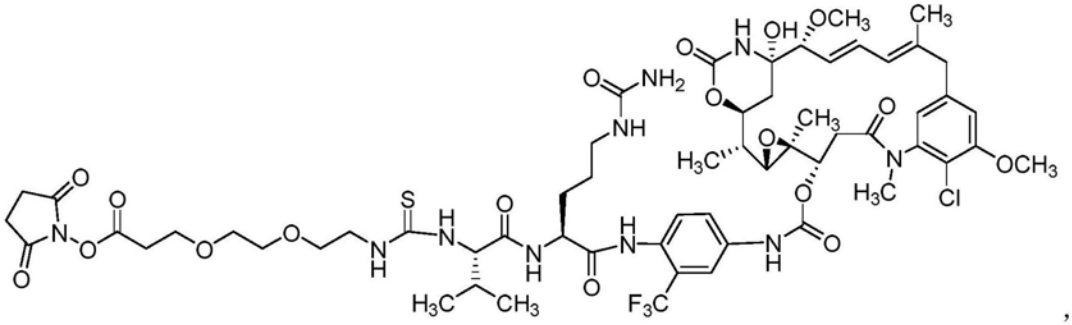
,



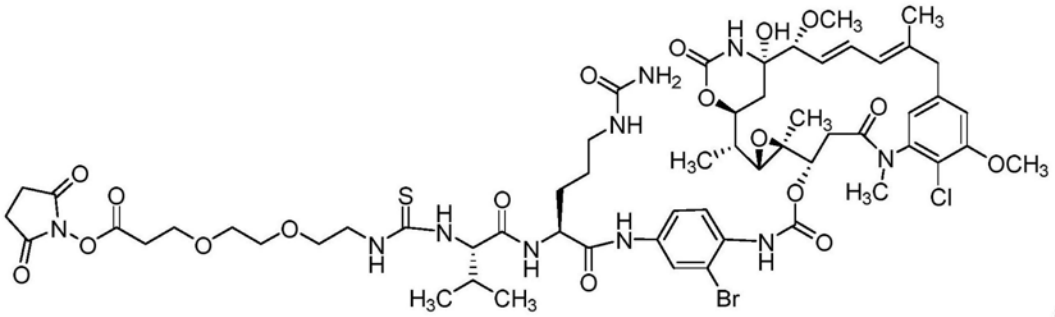
,



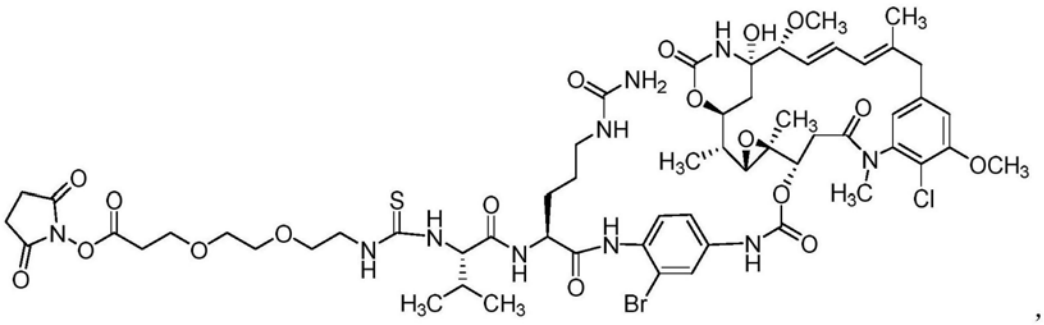
,



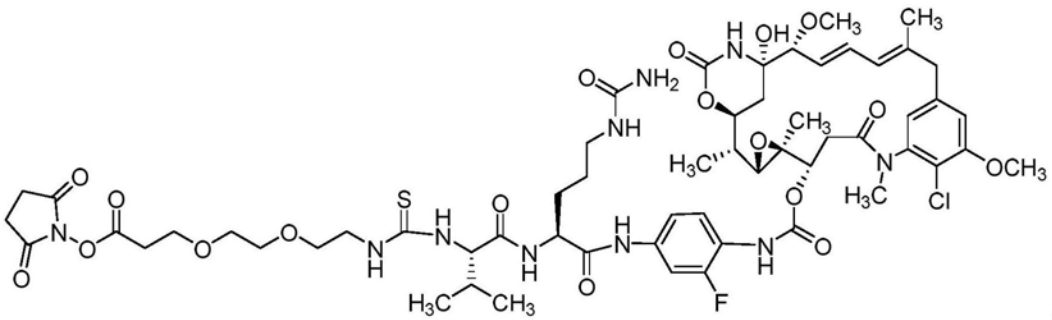
,



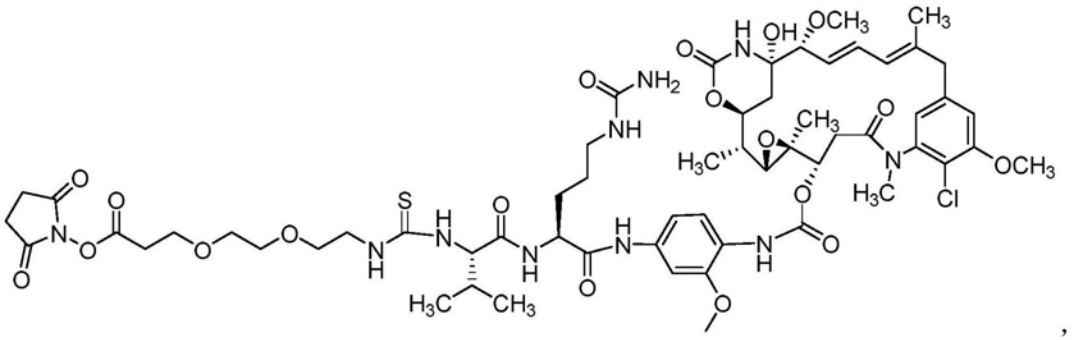
,



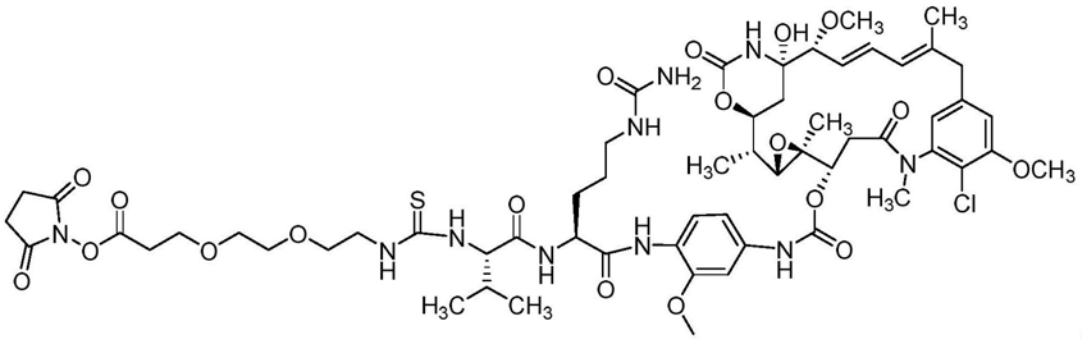
,



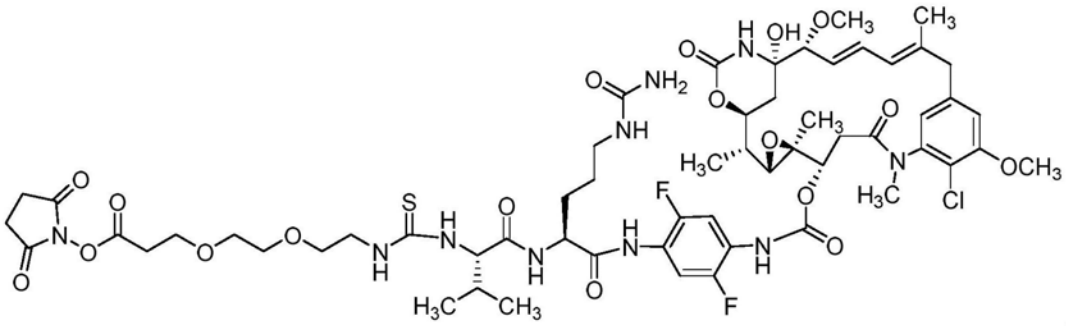
,



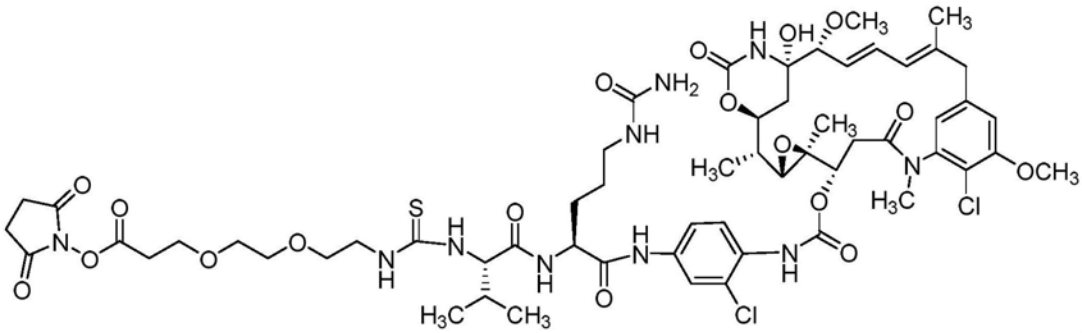
,



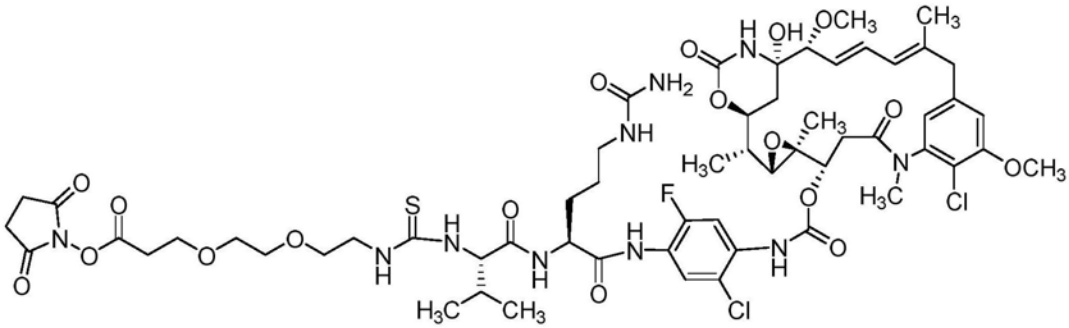
,



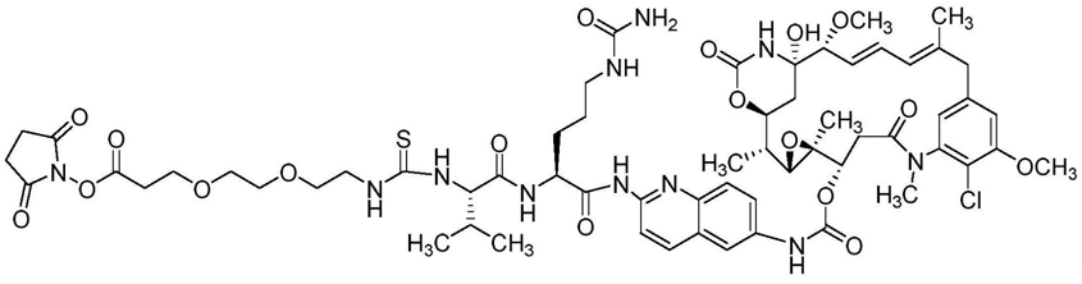
,



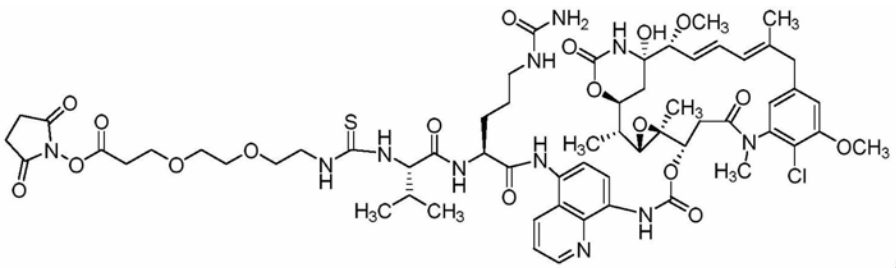
,



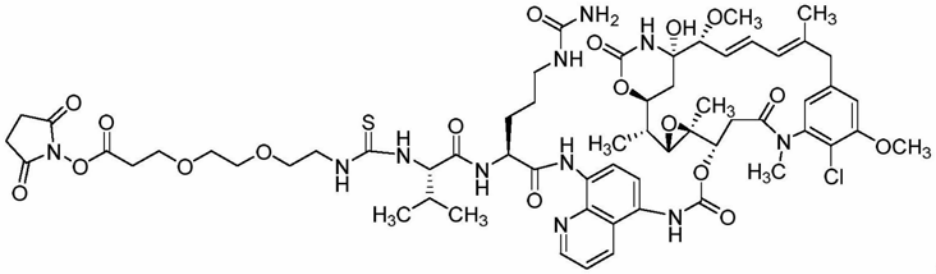
,



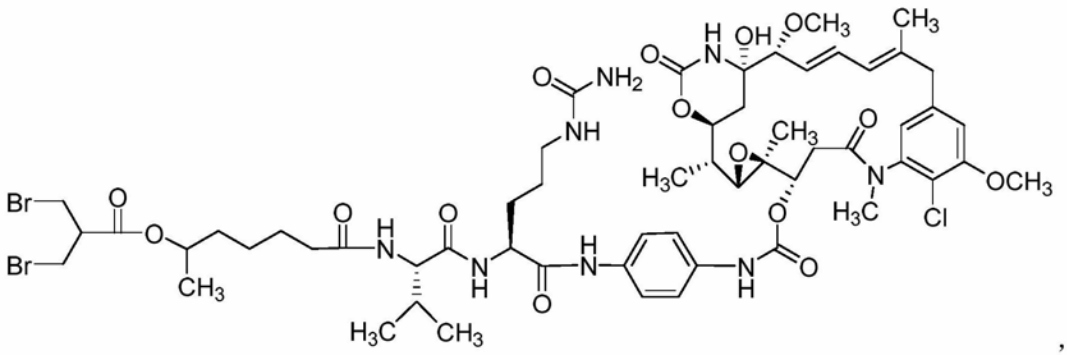
,



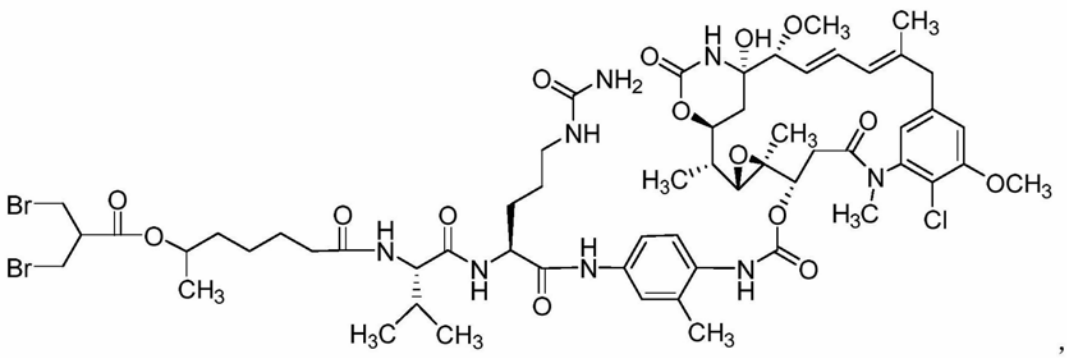
,



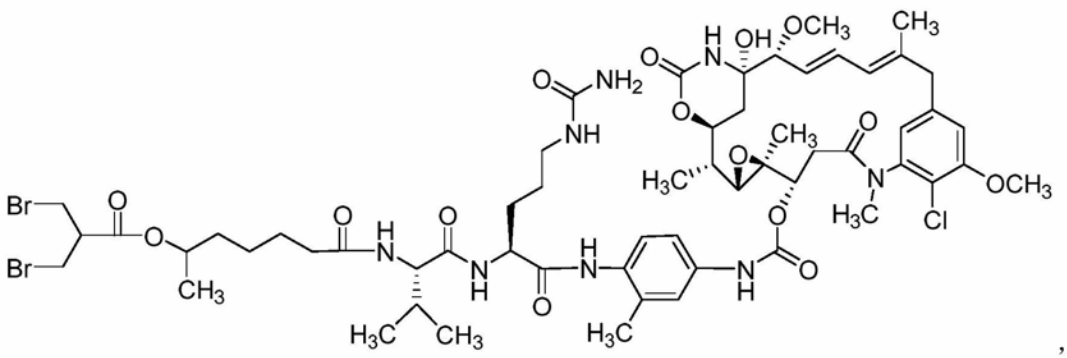
,



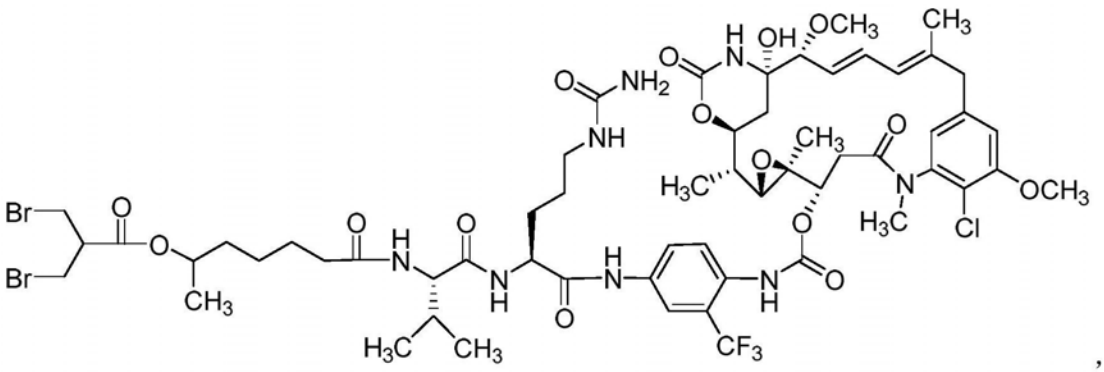
,



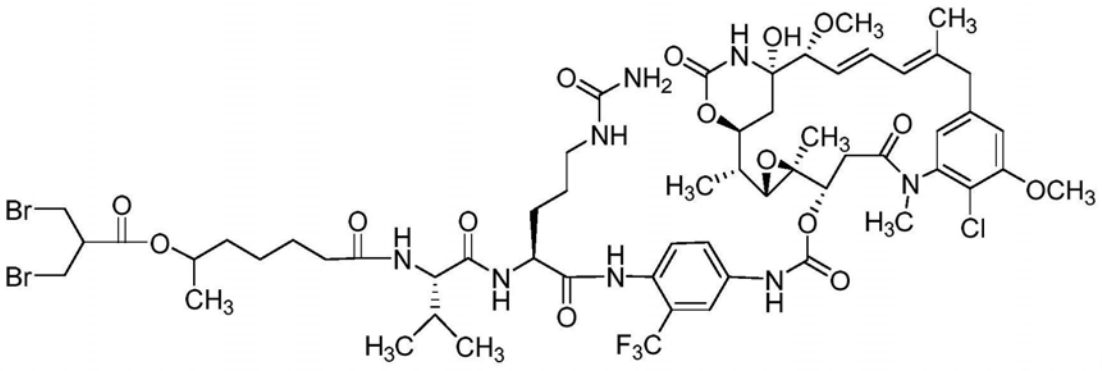
,



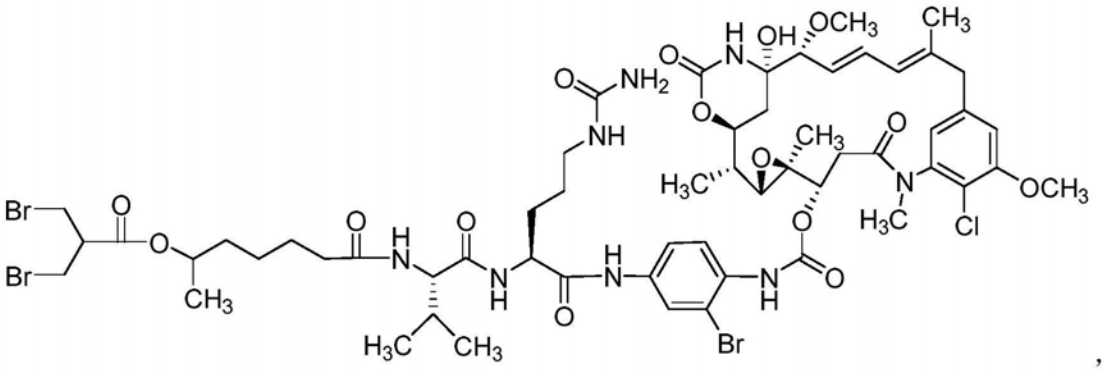
,



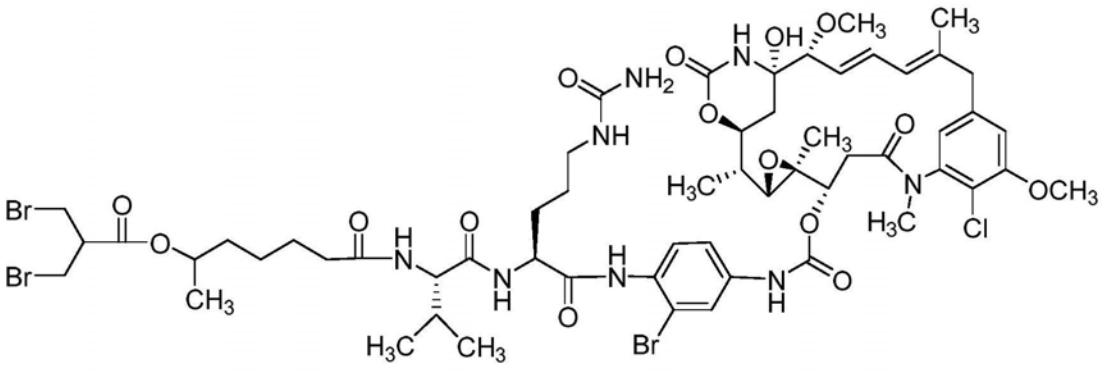
,



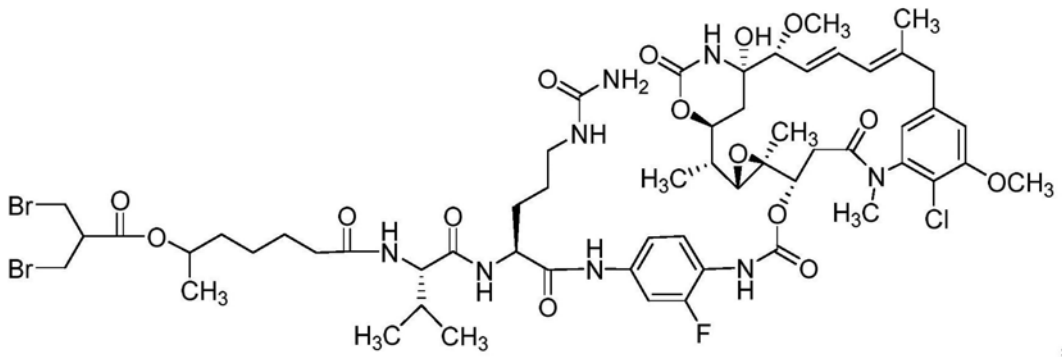
,



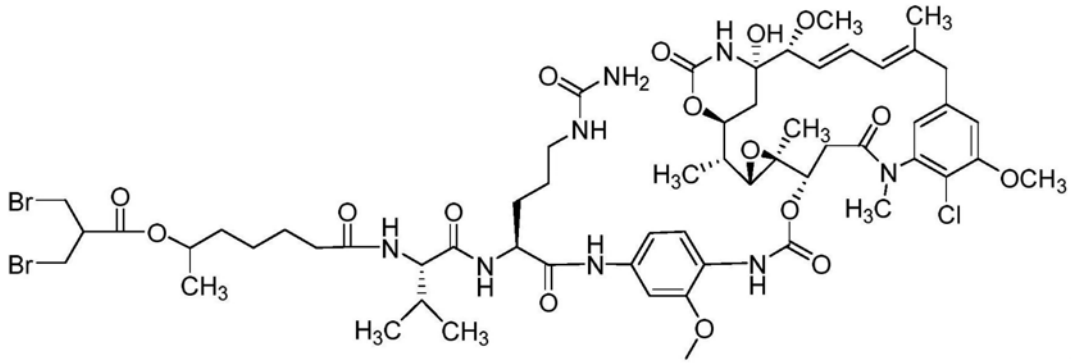
,



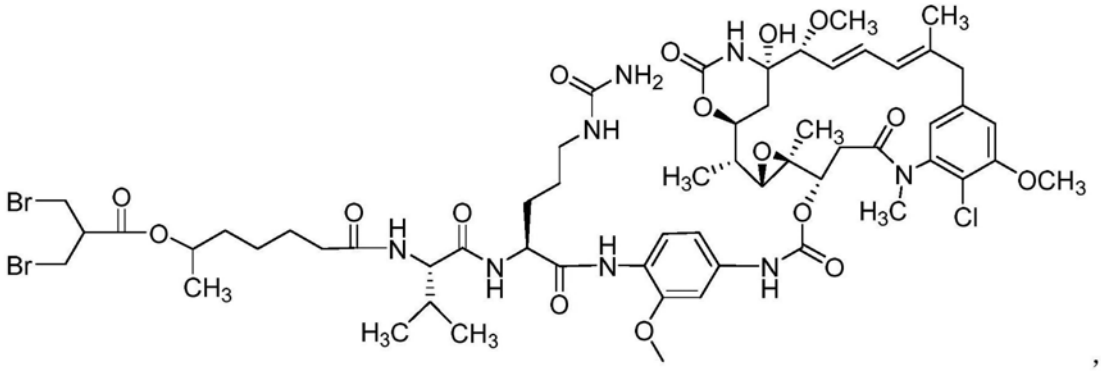
,



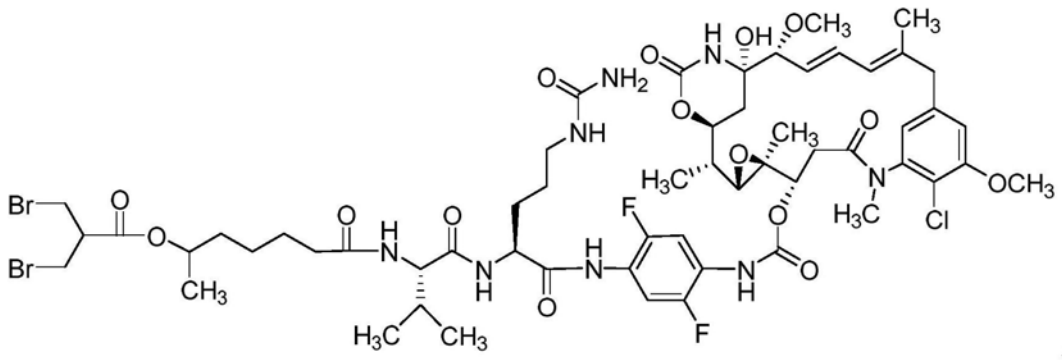
,



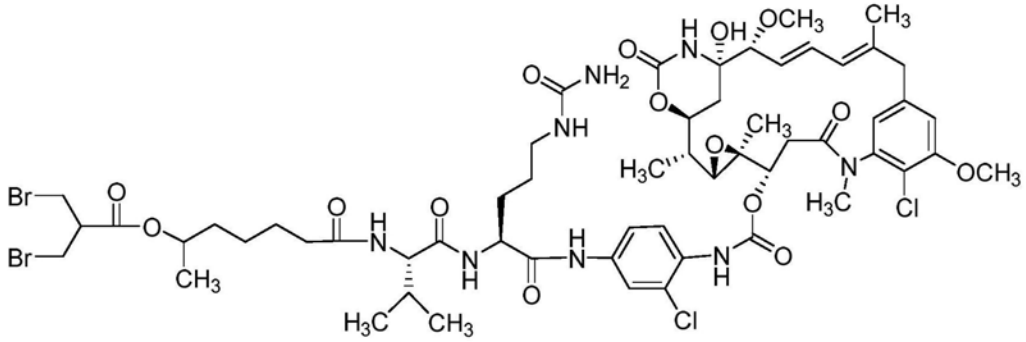
,



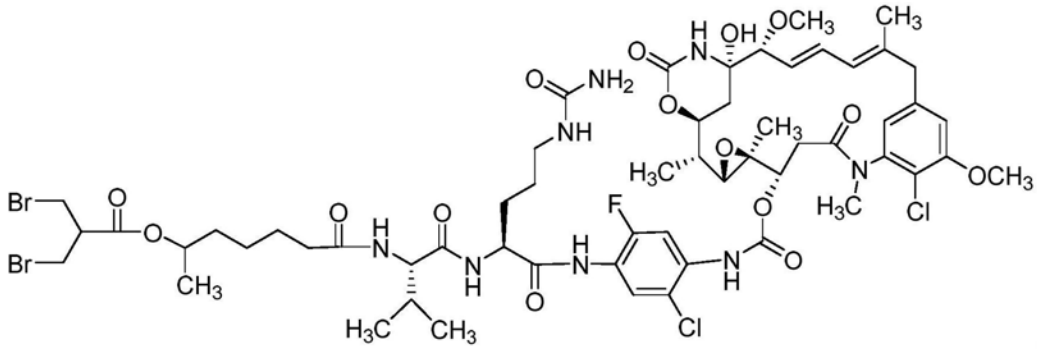
,



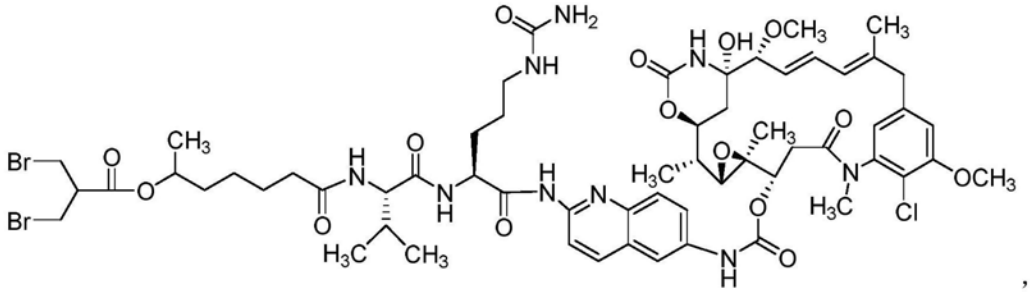
,



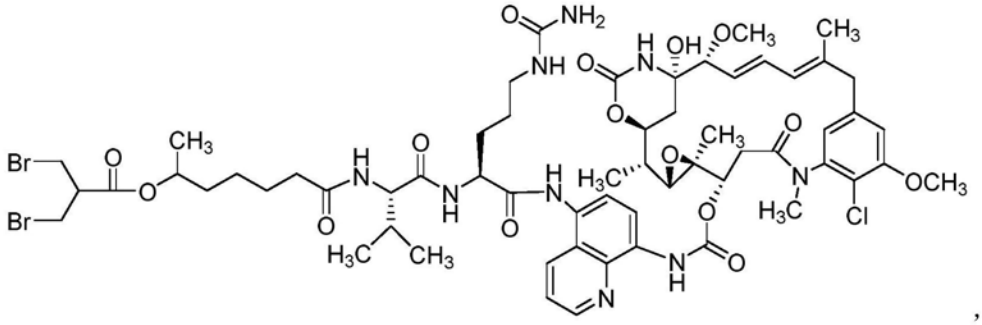
,



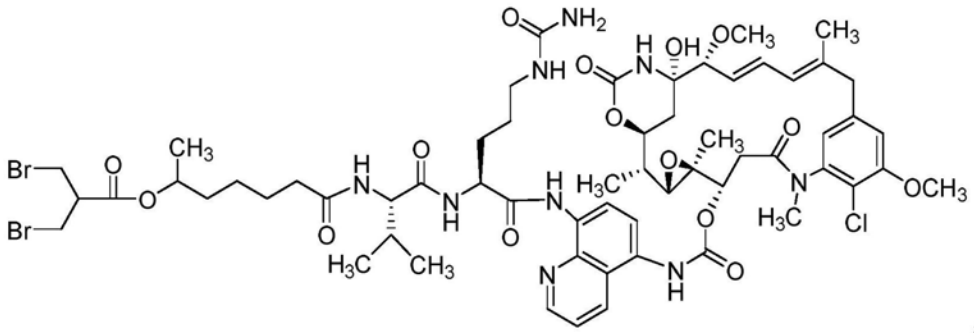
,



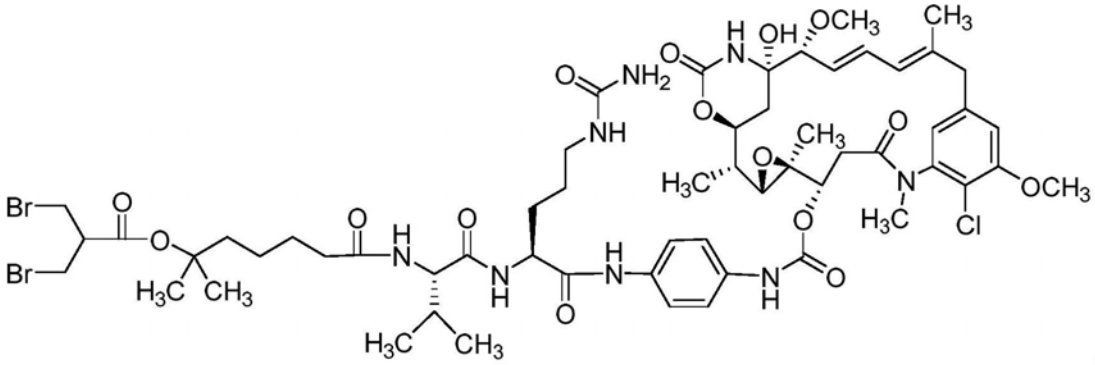
,



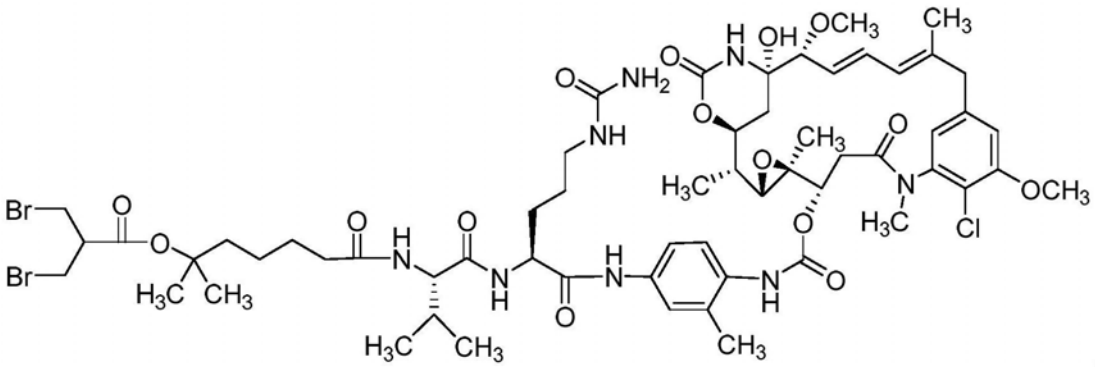
,



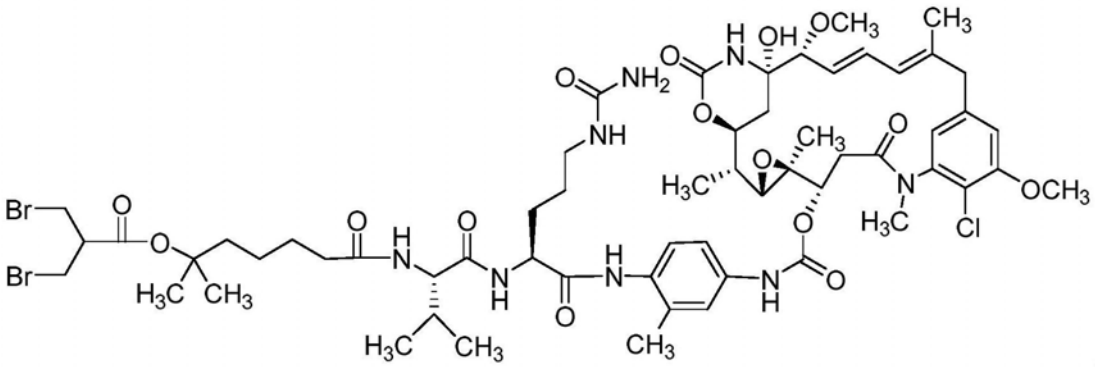
,



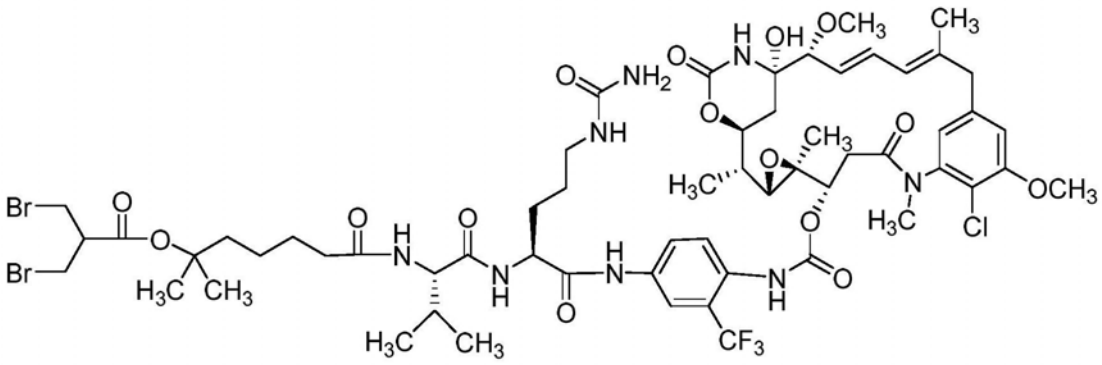
,



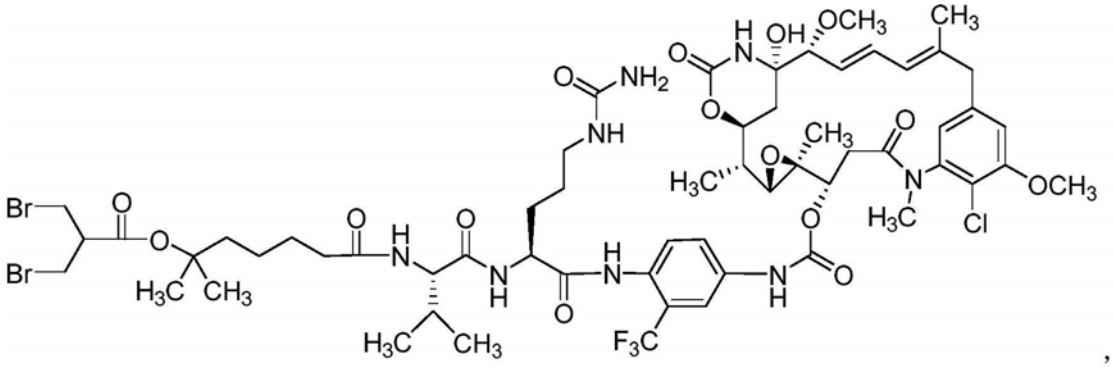
,



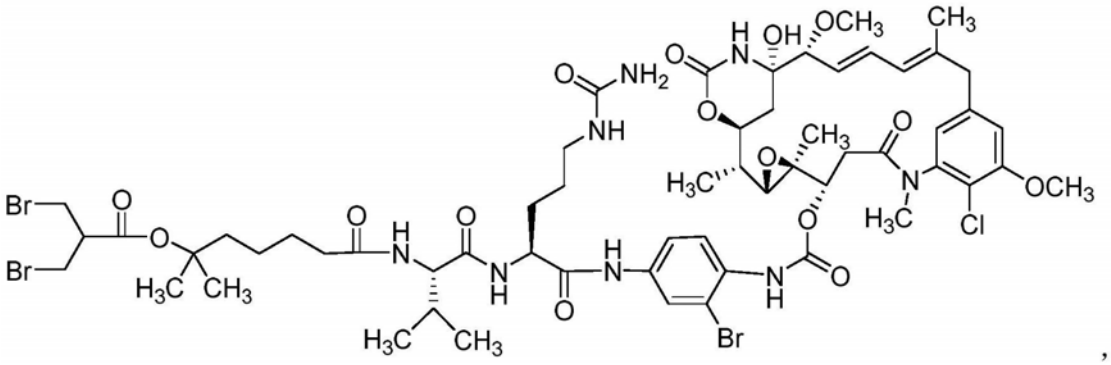
,



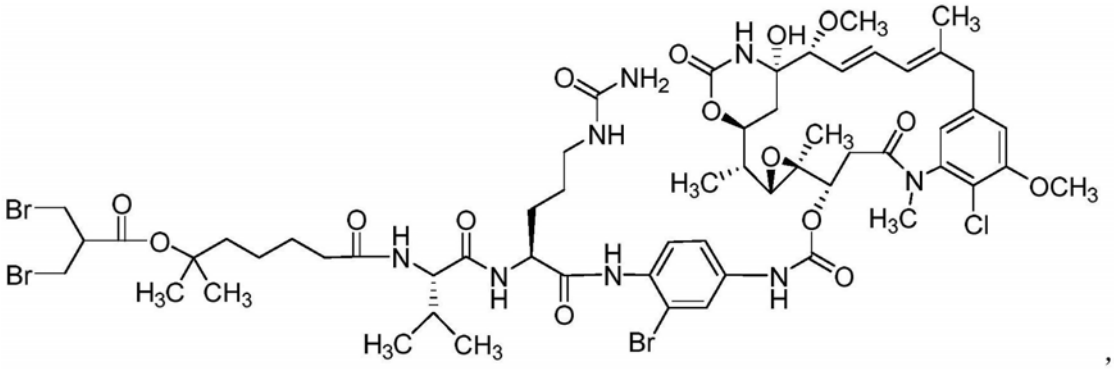
,



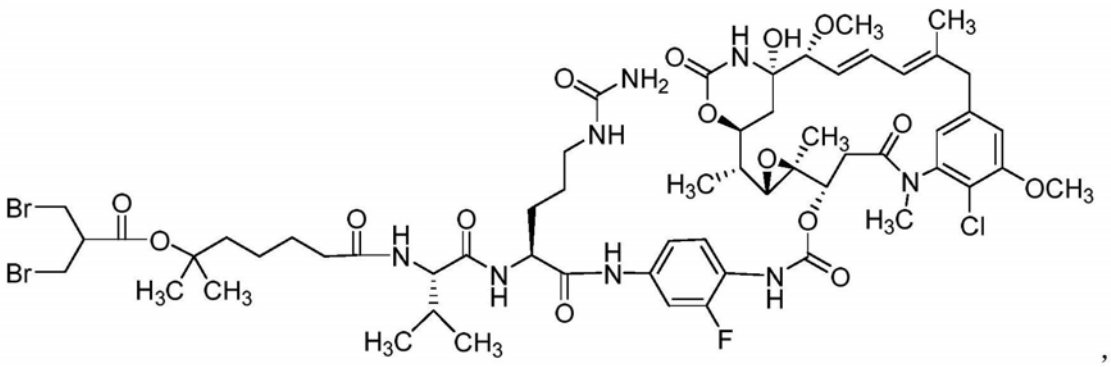
,



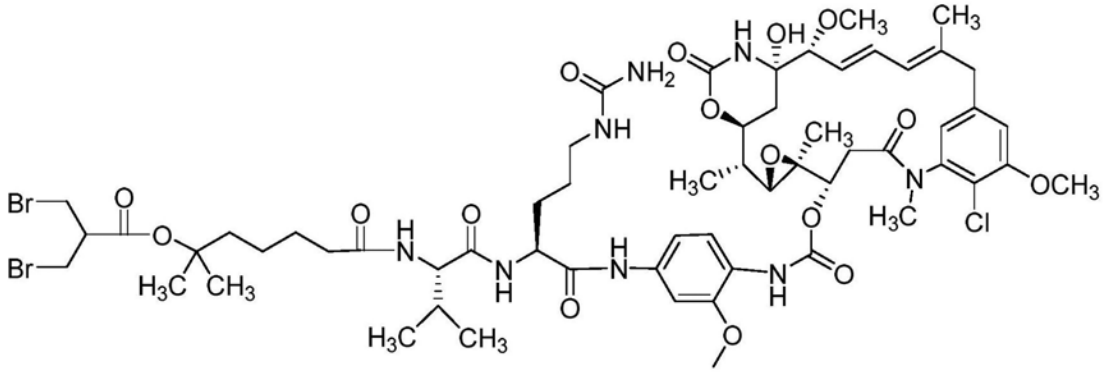
,



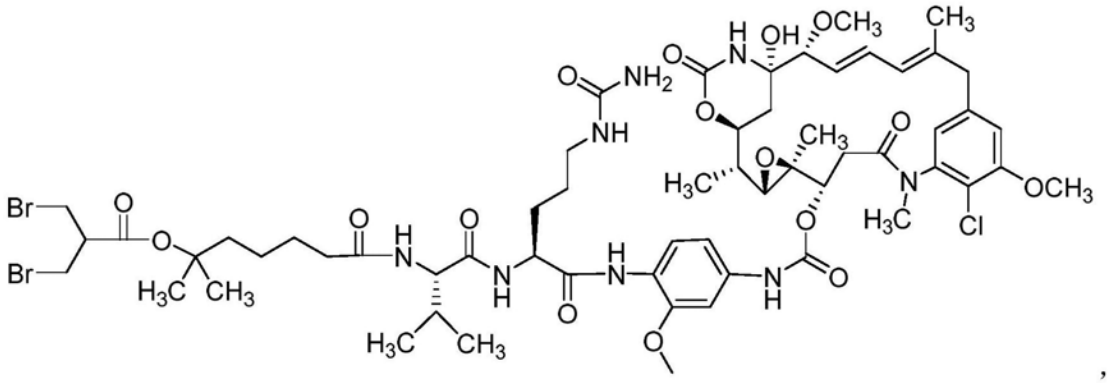
,



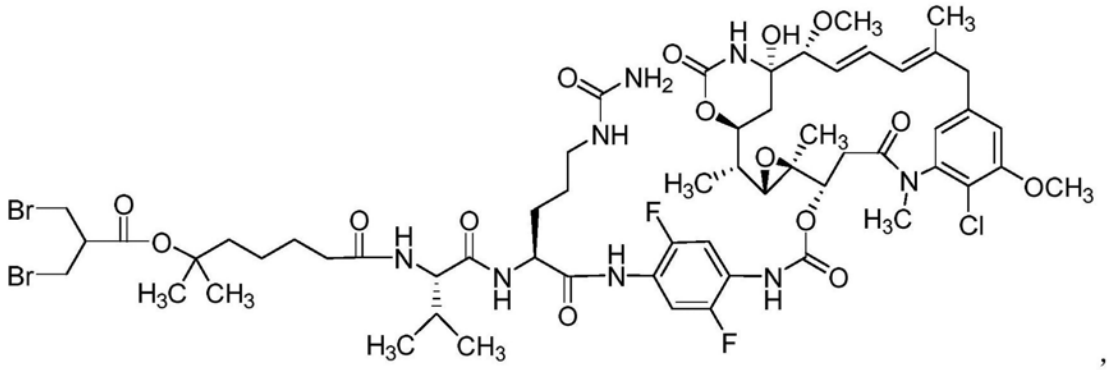
,



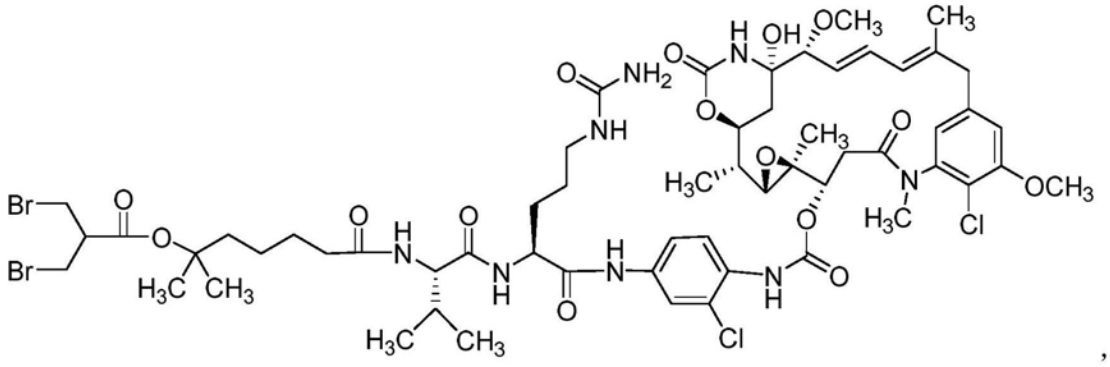
,



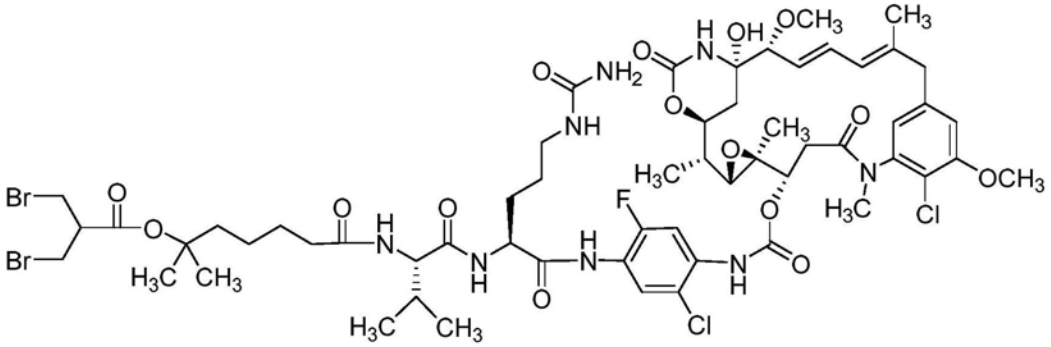
,



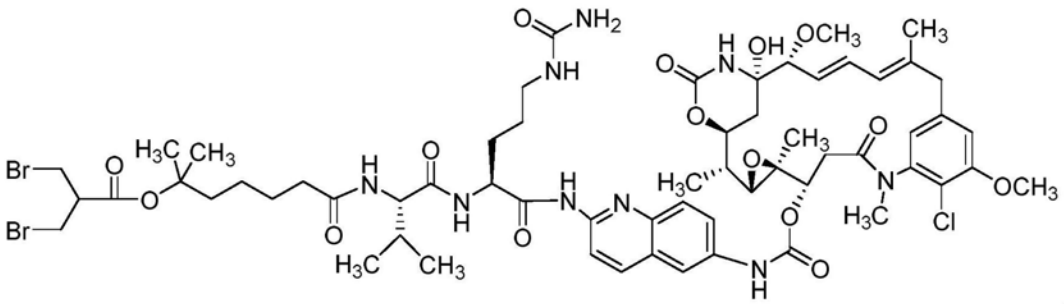
,



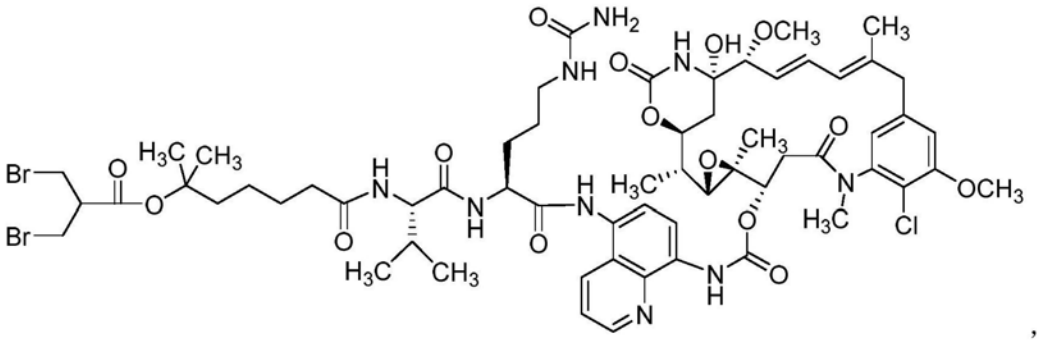
,



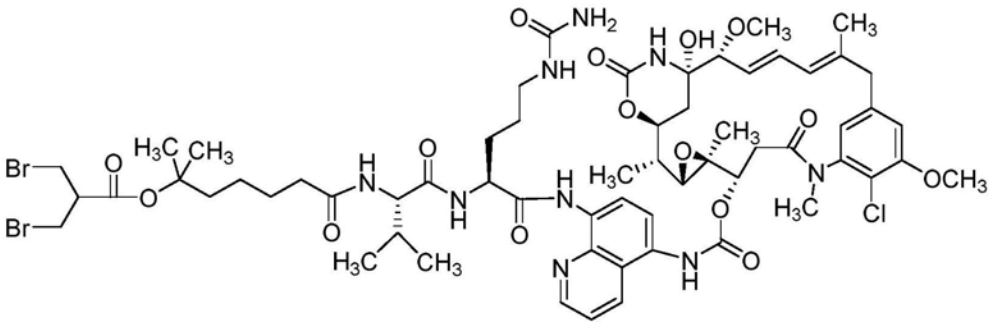
,



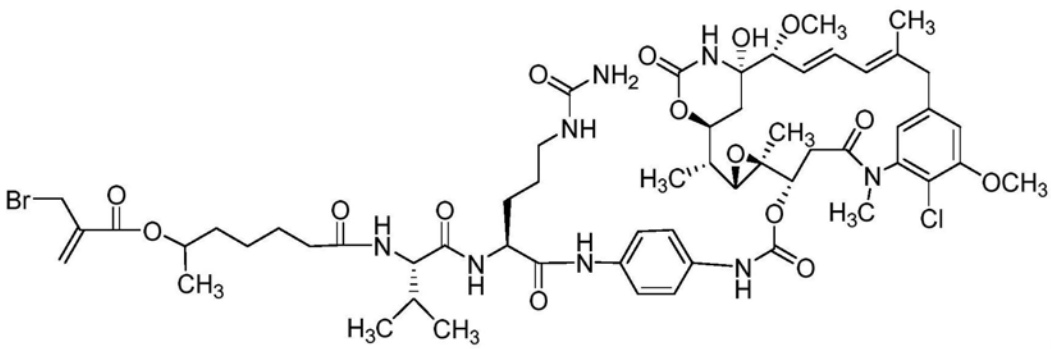
,



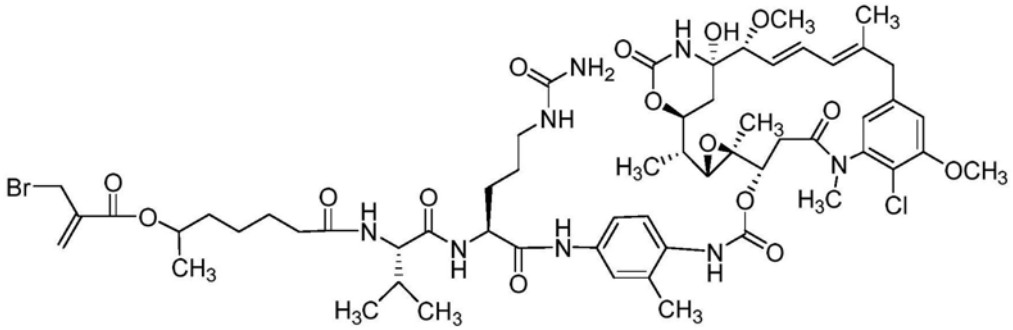
,



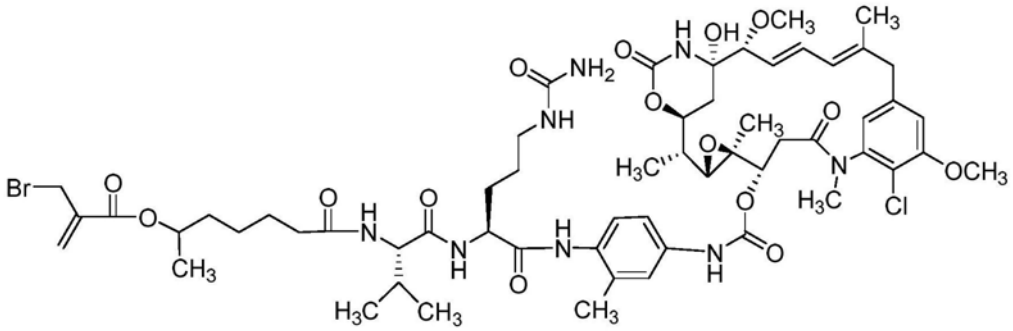
,



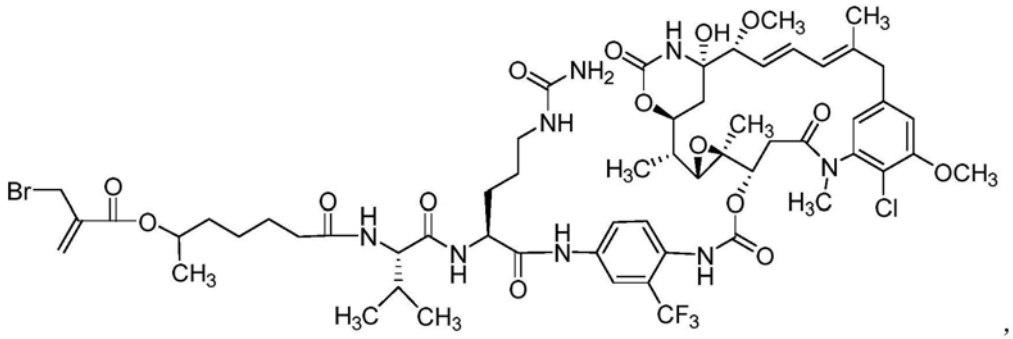
,



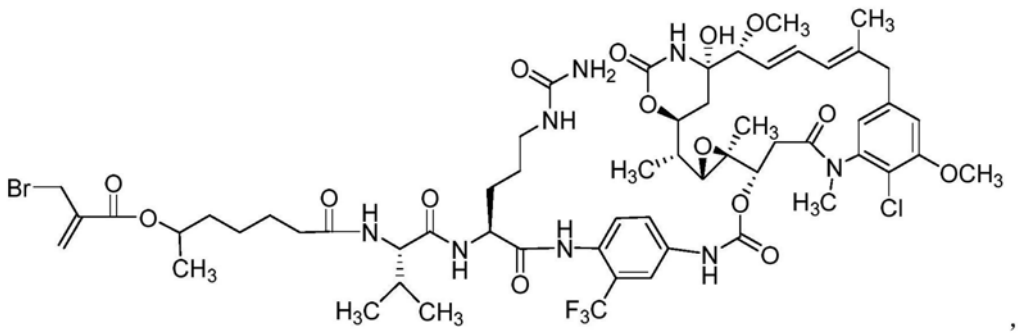
,



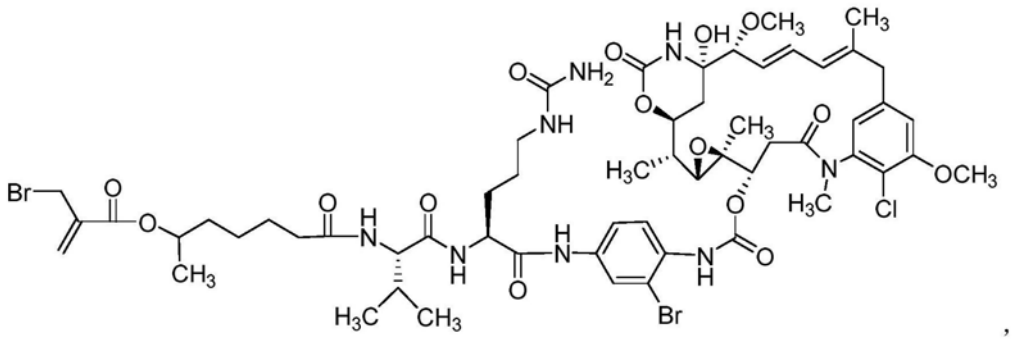
,



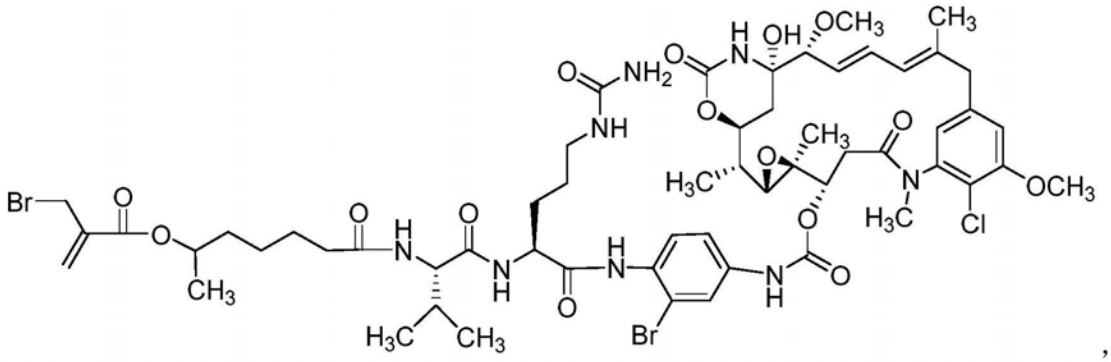
,



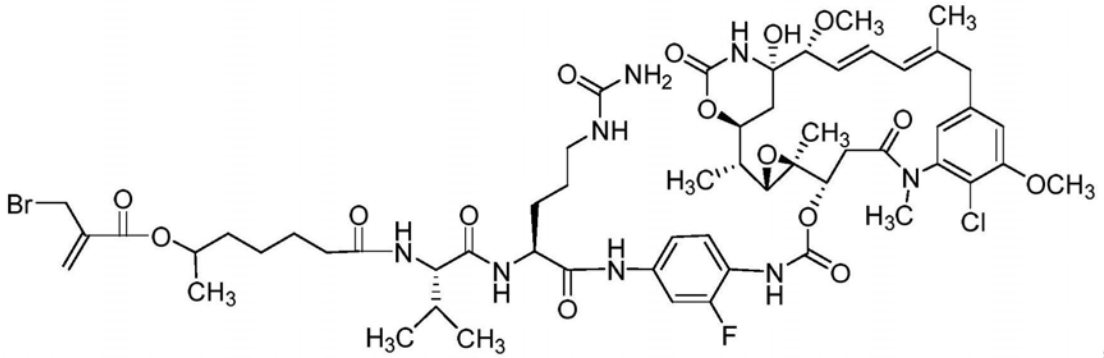
,



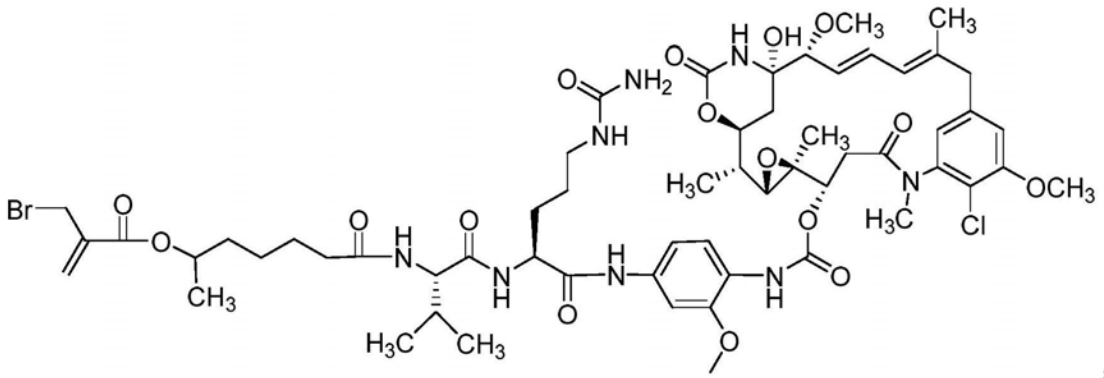
,



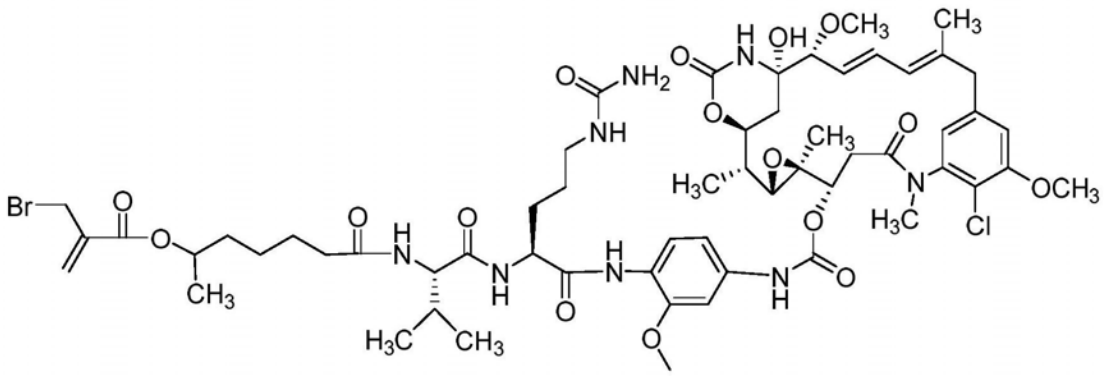
,



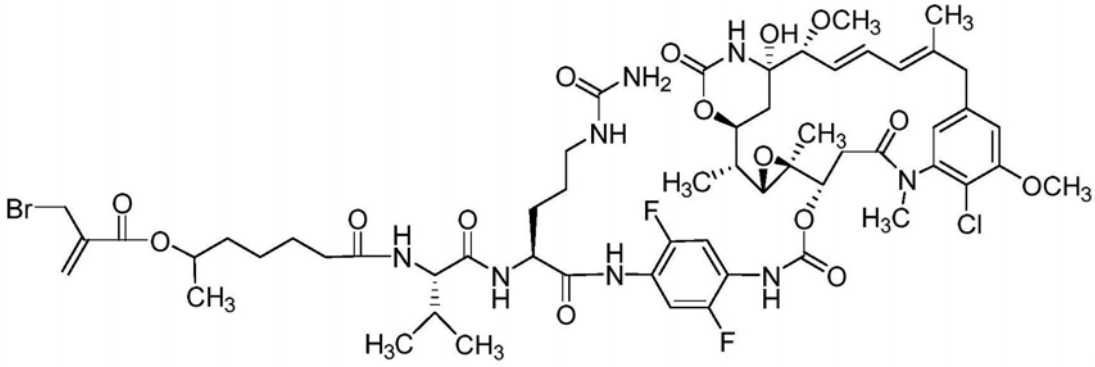
,



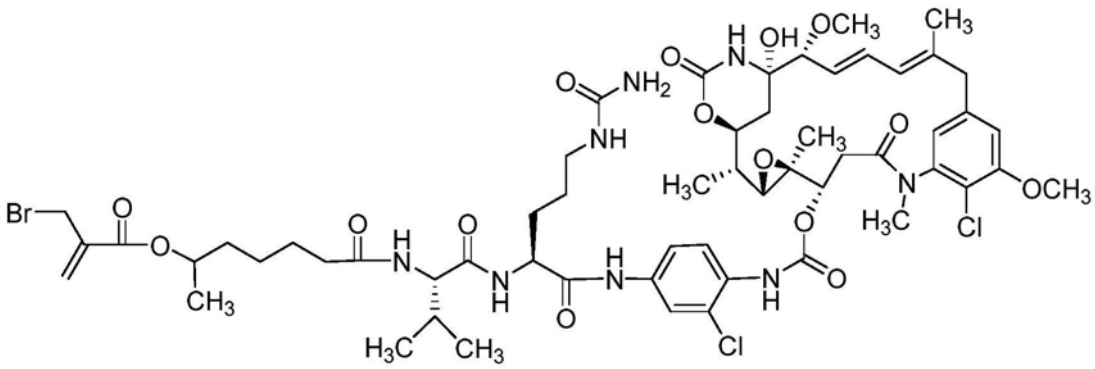
,



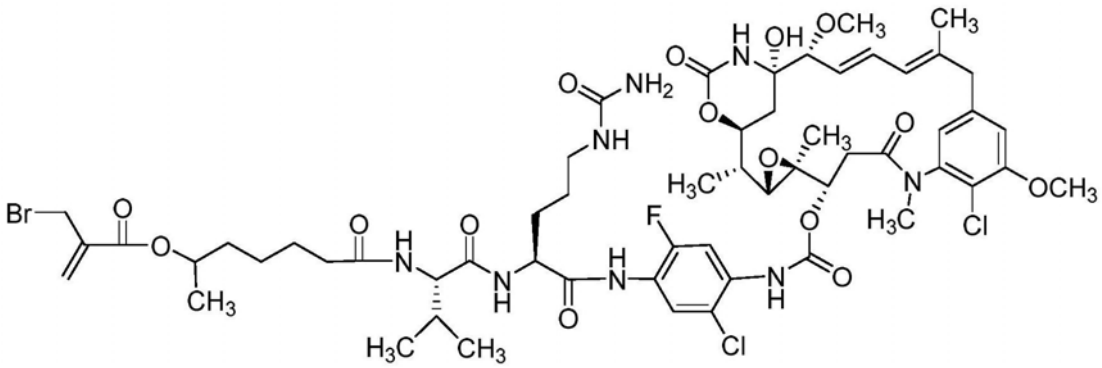
,



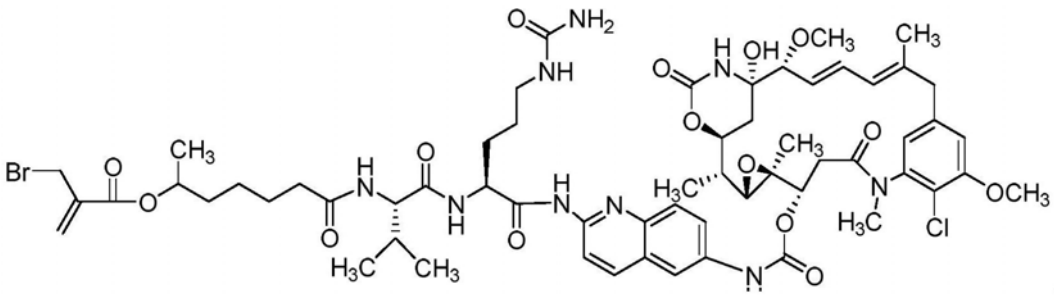
,



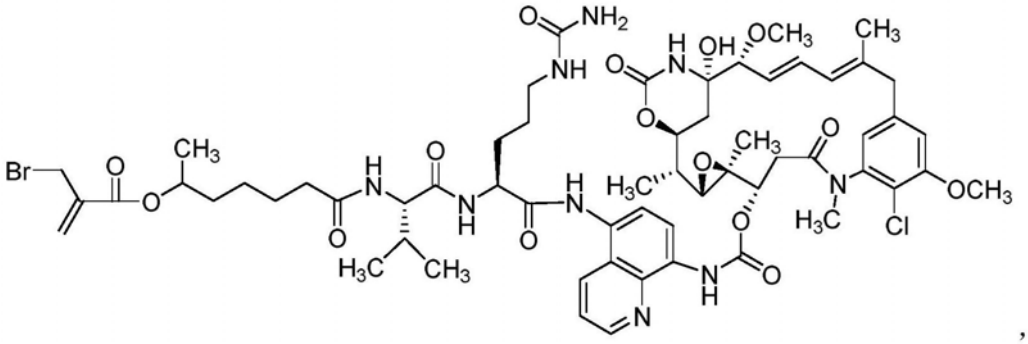
,



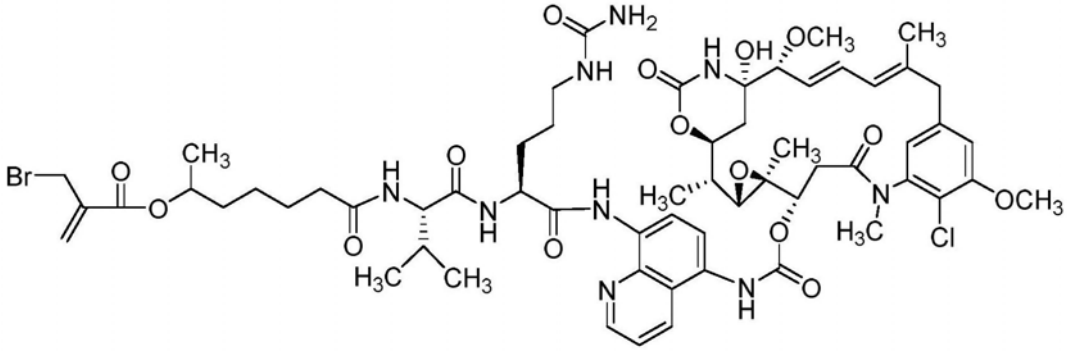
,



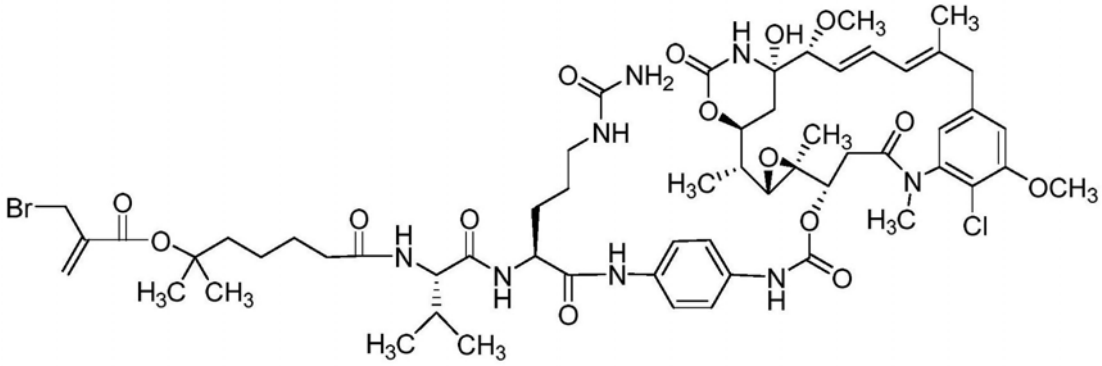
,



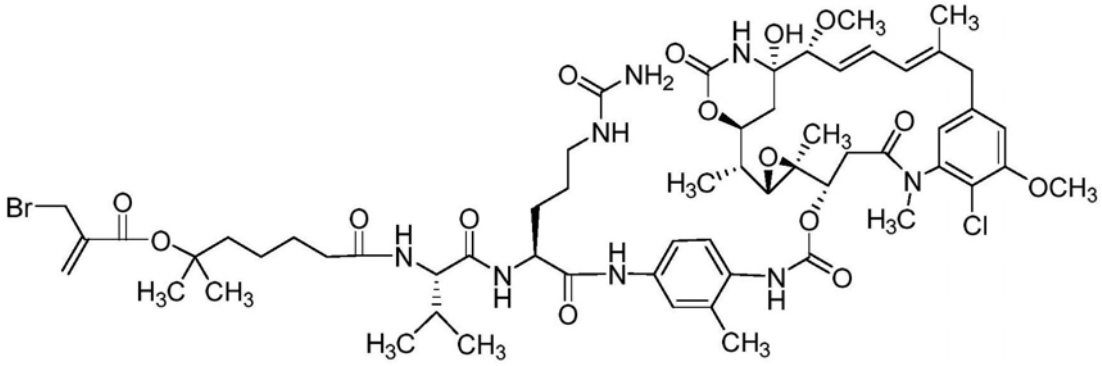
,



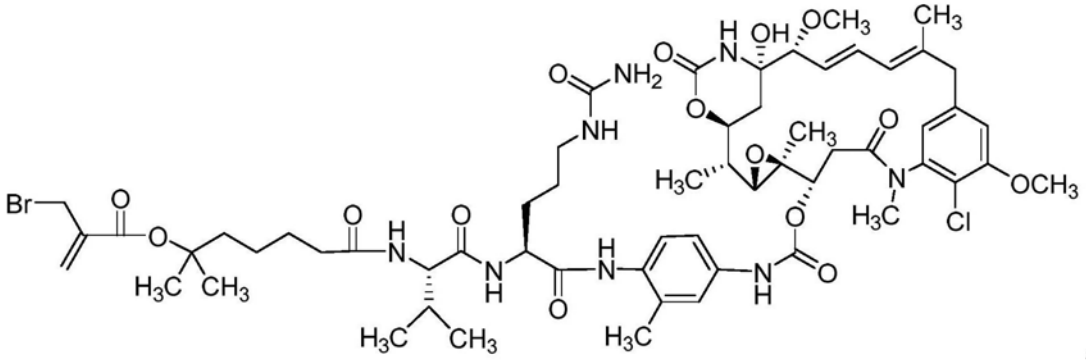
,



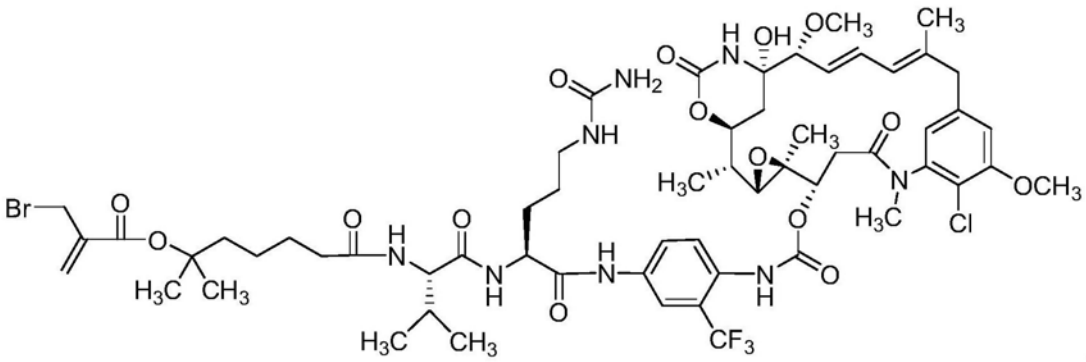
,



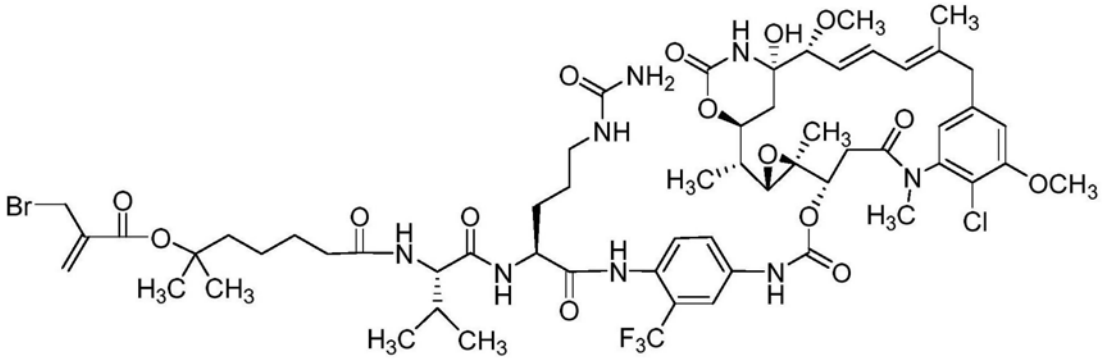
,



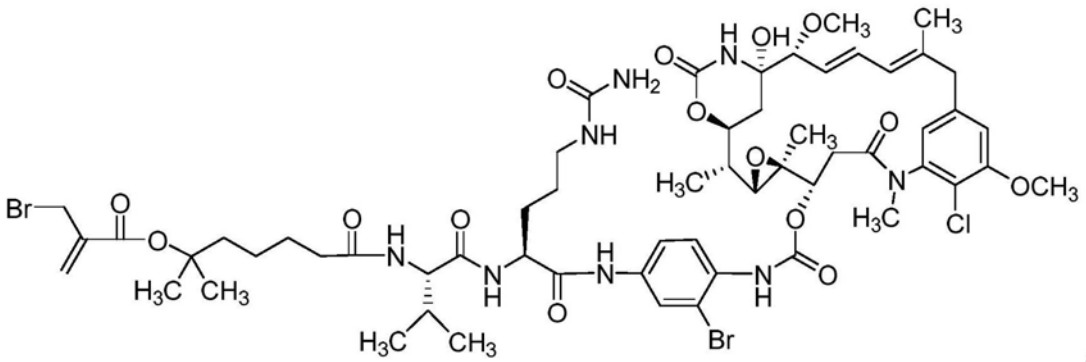
,



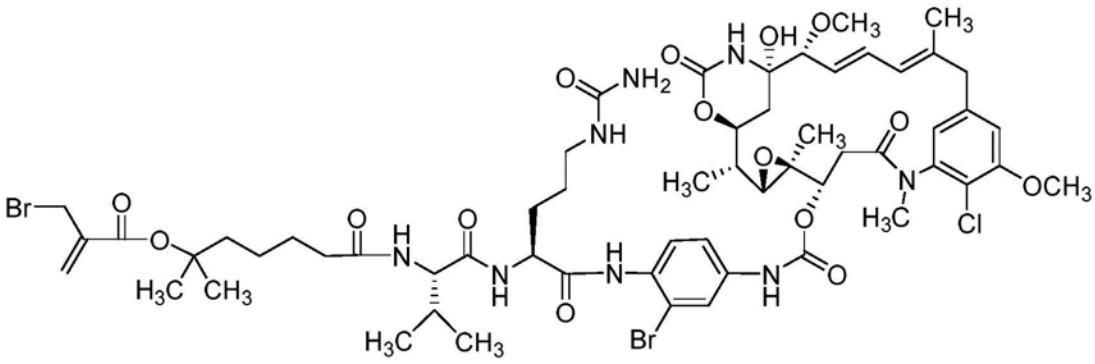
,



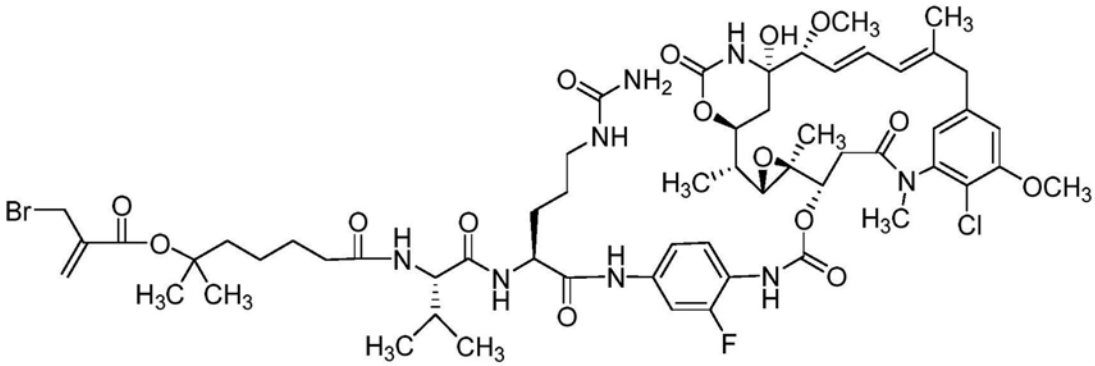
,



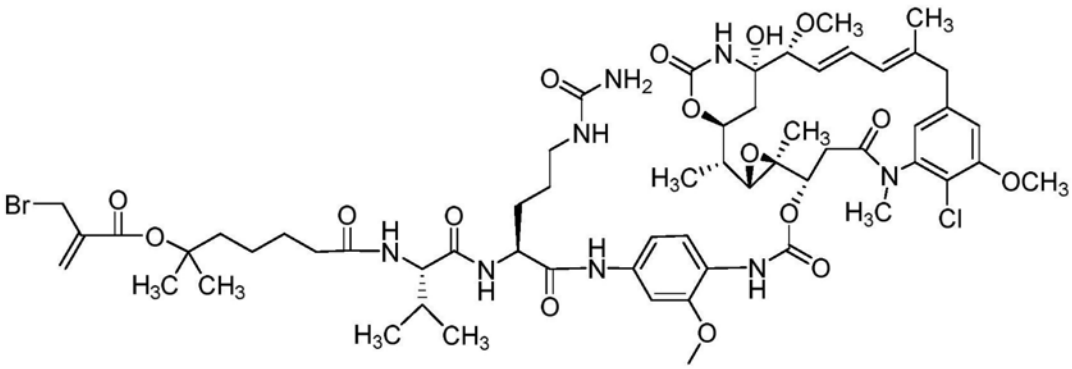
,



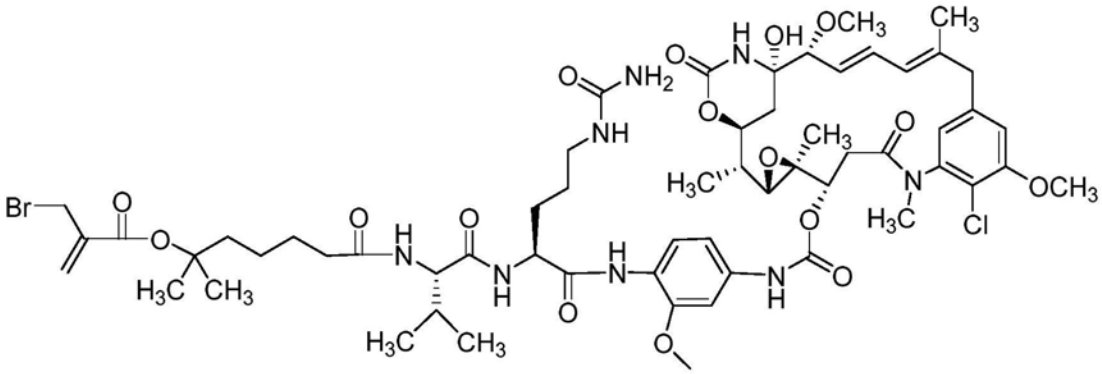
,



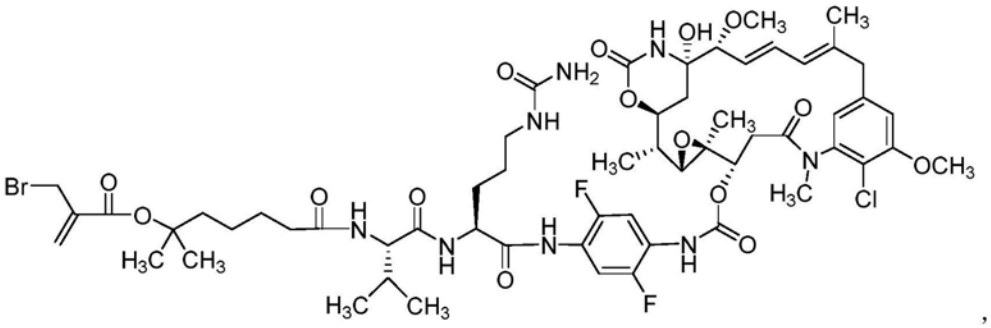
,



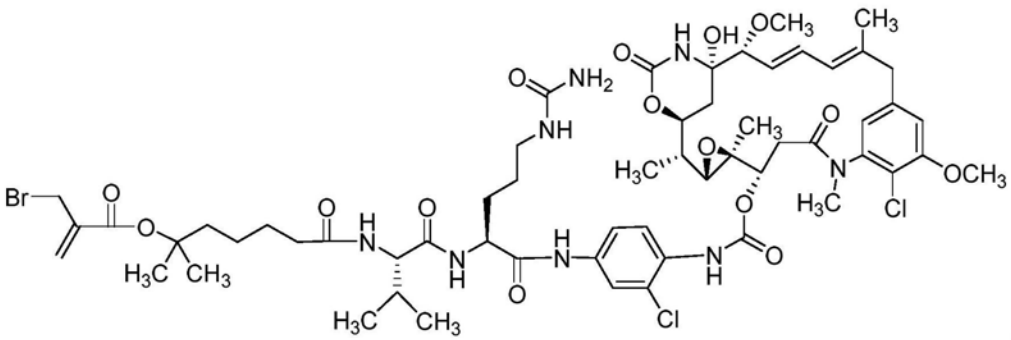
,



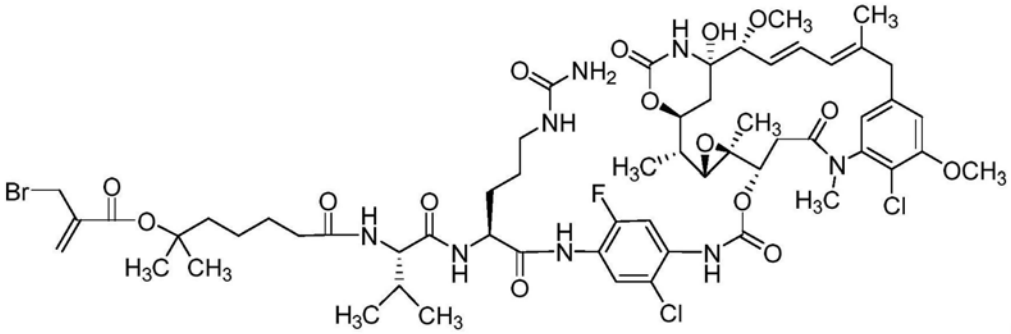
,



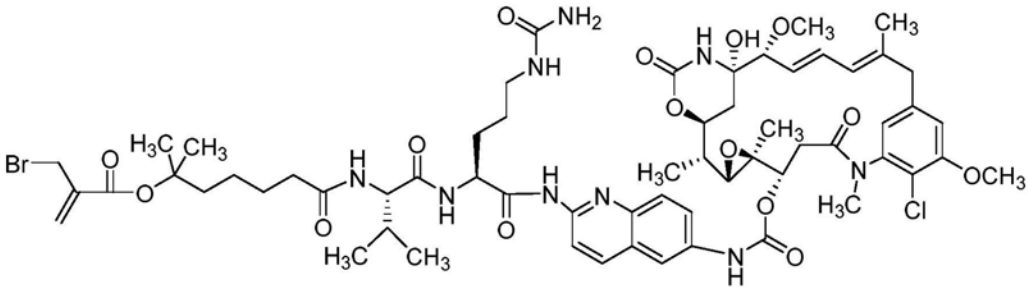
,



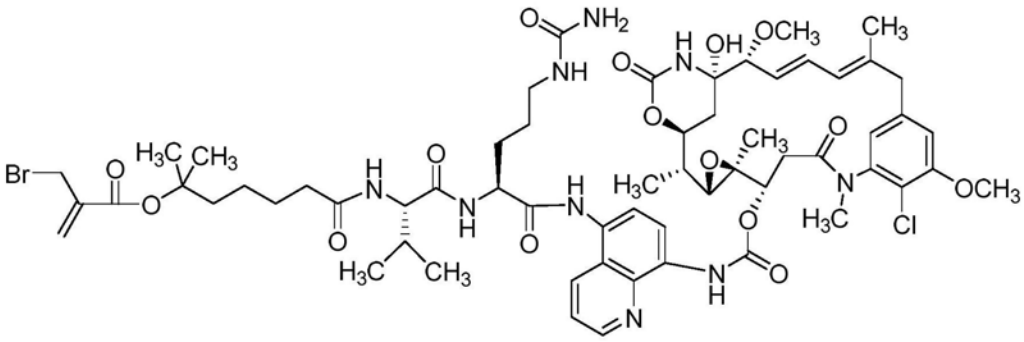
,



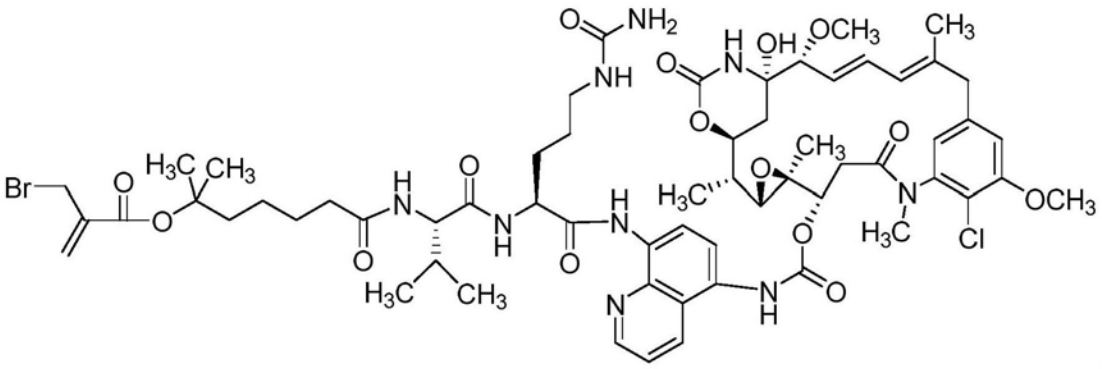
,



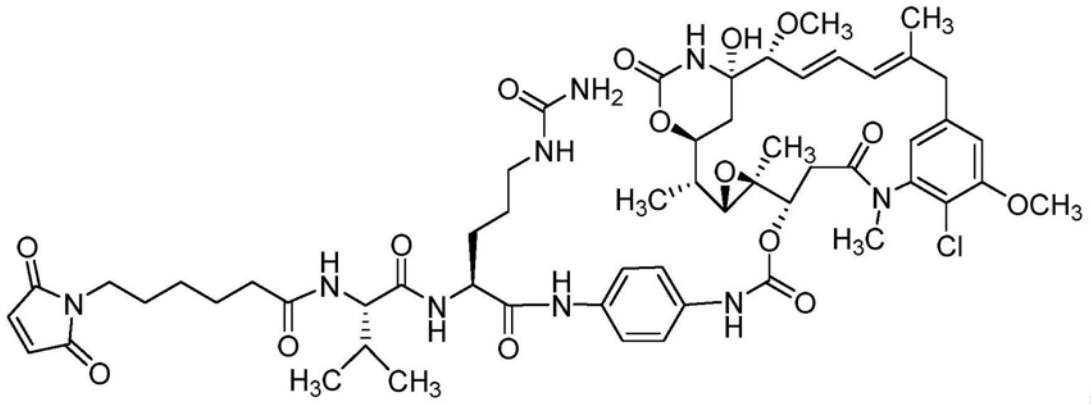
,

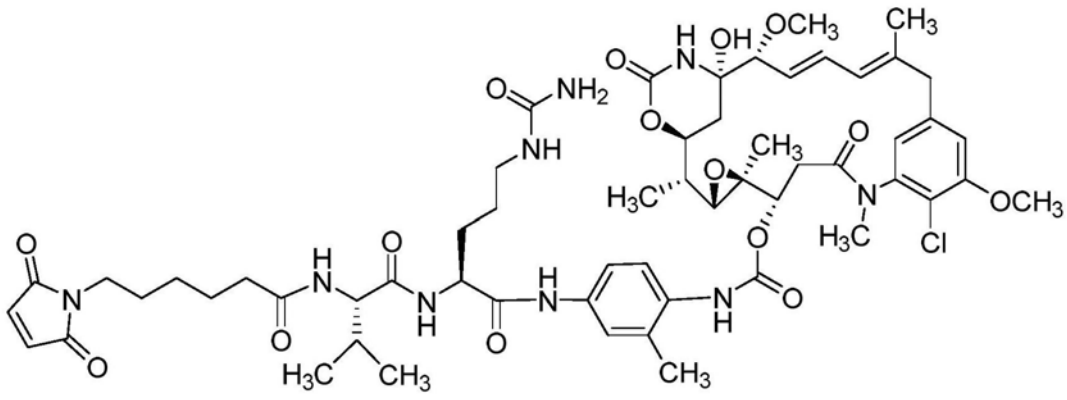


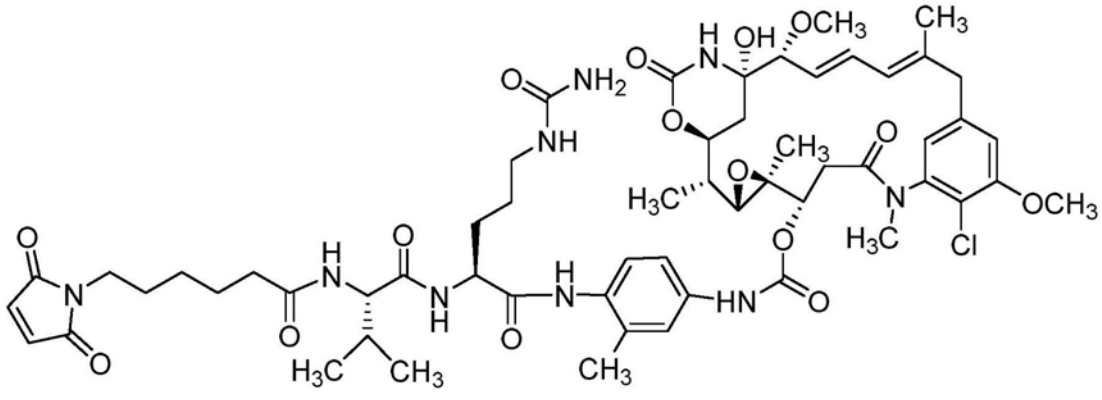
，或

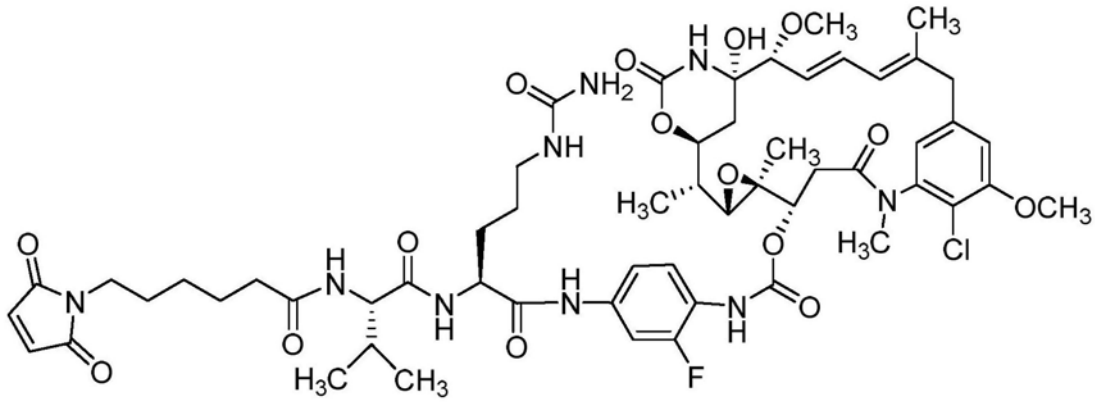


[0388] 在一些实施方案,式P1所示化合物是具有以下结构之一的化合物:

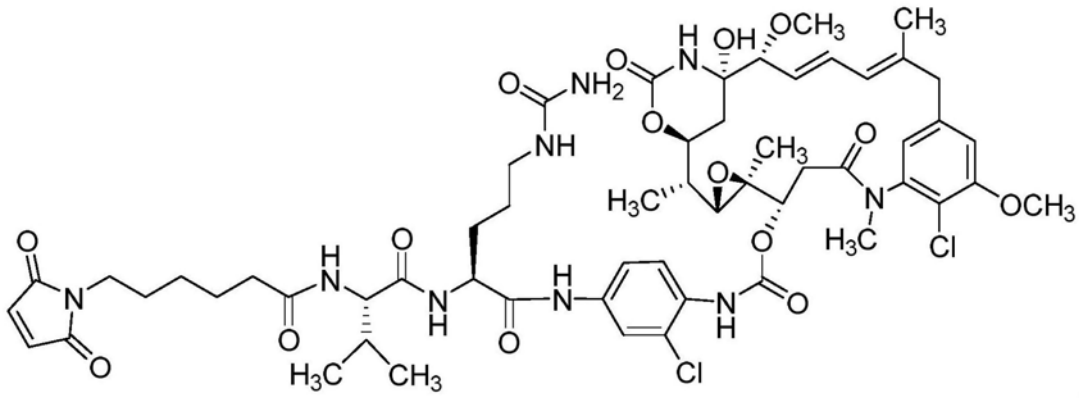




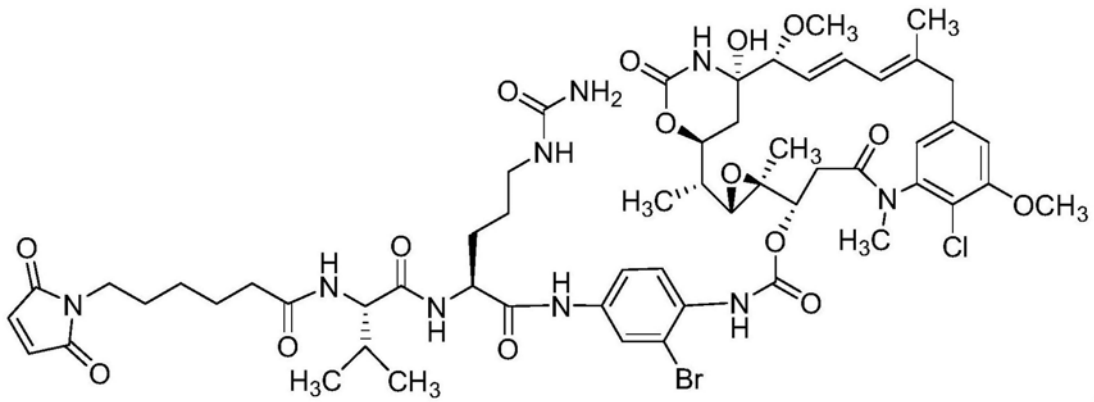




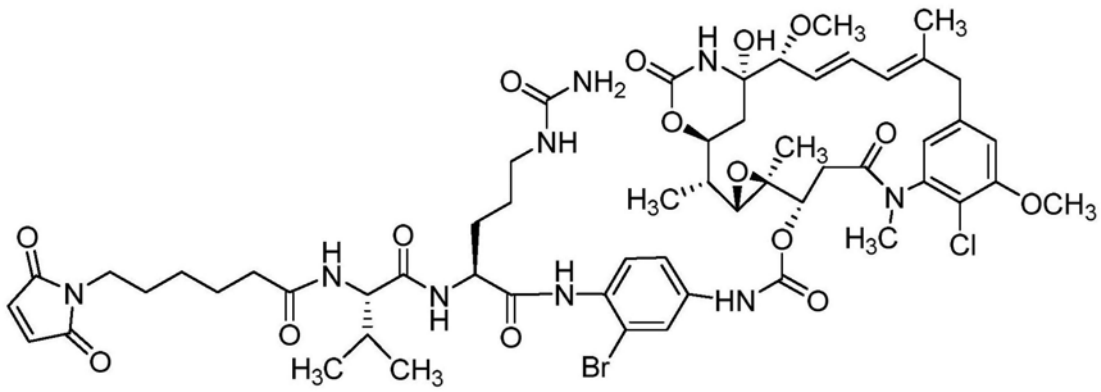
,



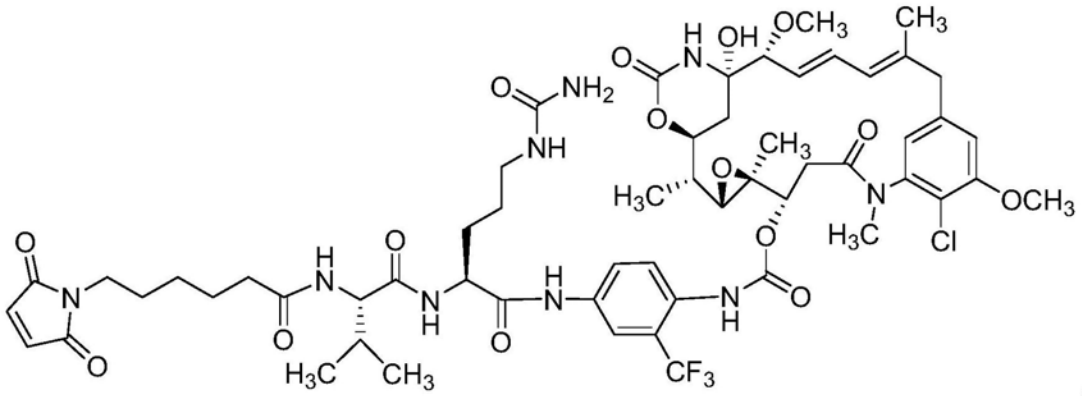
,



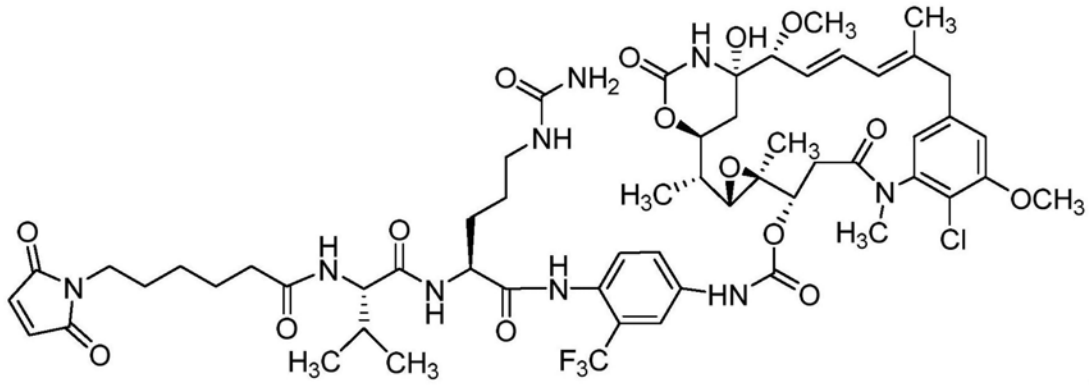
,



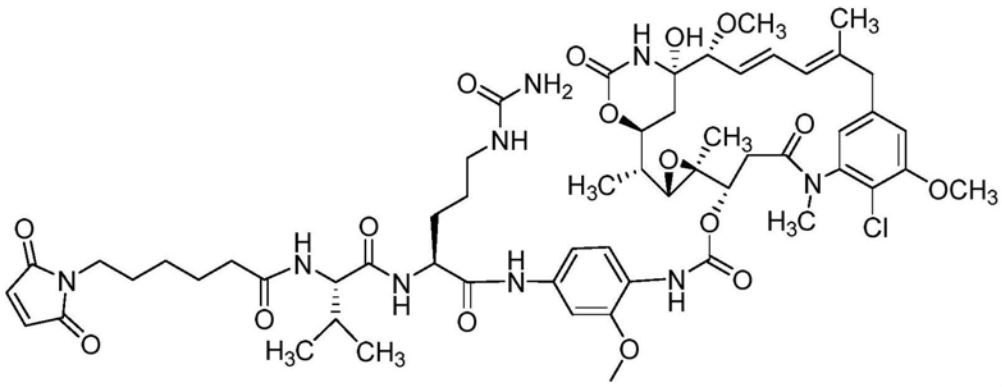
,



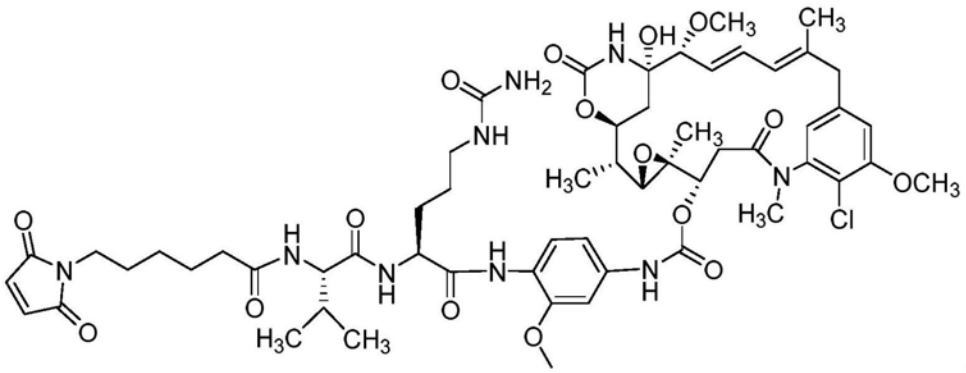
,



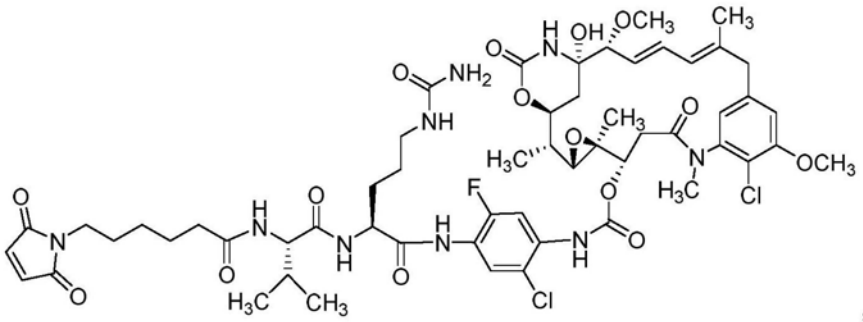
,



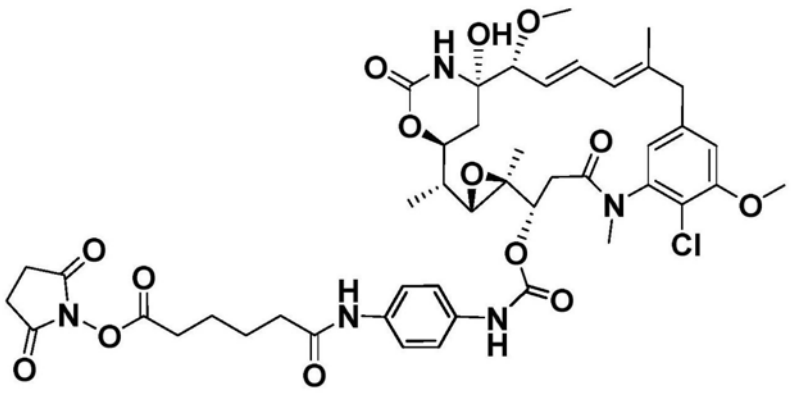
,



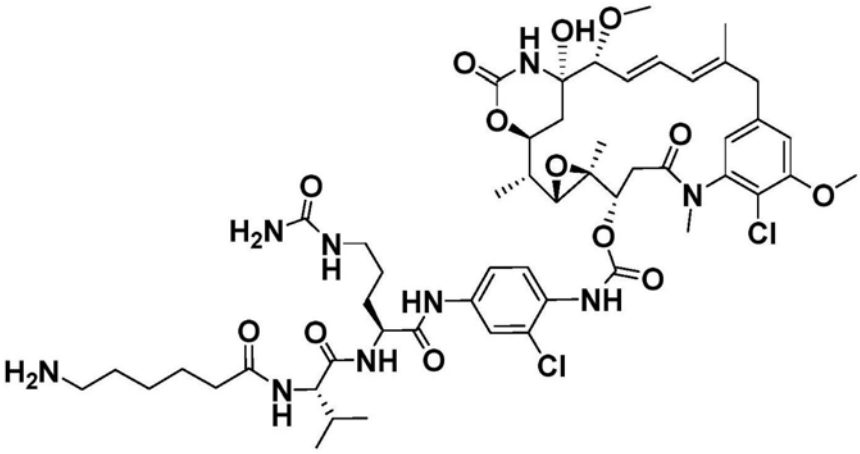
,



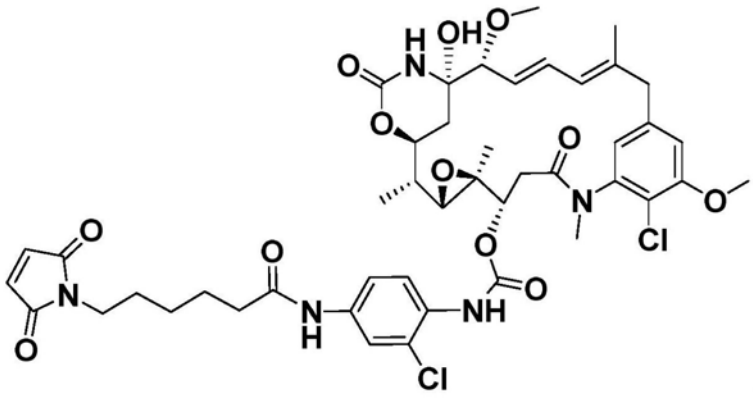
，



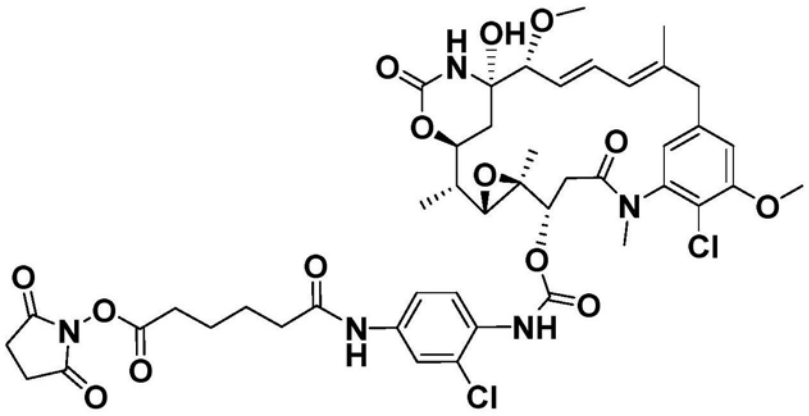
，



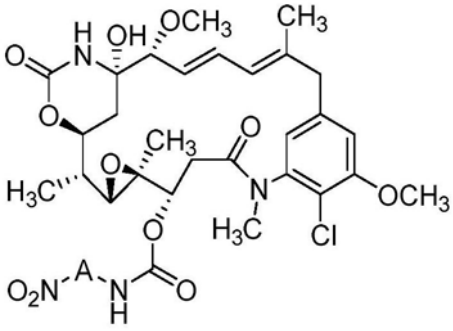
，



，或



[0389] 式(II)所示化合物可通过使式PP5所示化合物与合适的还原剂接触，合成得到：



PP5，

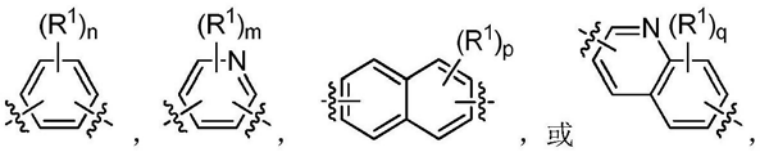
其中A是亚芳基或亚杂芳基。

[0390] 在一些实施方案，所述合适的还原剂包括金属、金属箔、金属粉、金属尘、金属汞合金、或金属屑。在一些实施方案，所述金属选自锌、铁、铝、钯、或雷尼镍。

[0391] 譬如，在一些实施方案，可采用下述还原剂条件。关于化合物PP5的量，譬如，在本发明的一些方法中，将约20当量的锌粉和40当量的乙酸进行组合。在一些实施例，还原反应是在室温下进行约1至24小时。在所述这些实施例中的一些，前述乙酸可被另一合适的弱酸或质子供体替换。合适的弱酸或质子供体的实例包括，但不限于甲酸、pTsOH、和NH_4Cl。在所述这些实施例中的一些，所述还原金属可被选自铁、铝、钯、或雷尼镍的合适的还原剂替换。在所述这些实施例中的一些，合适的溶剂包括在可混溶的有机溶剂中具有10-50％水(以体积计)的那些溶剂。可混溶的有机溶剂包括，但不限于THF、二氧六环、和乙醚。在一些实施例，本发明所述还原反应是在反应温度为0至50℃的范围进行的。在一些实施例，本发明所述还原反应是在反应时间为1至40小时的范围进行的。

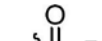
[0392] 合适的酸包括，但不限于乙酸。

[0393] 在一些实施方案，A是：



其中：

R^1在每次出现时独立地为烷基、烯基、炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、卤素、卤代烷氧

基、卤代烷基、杂烷基、杂芳基、杂环烷基、氰基、硝基、、、  或叠氮基，

其中R^A是烷基；

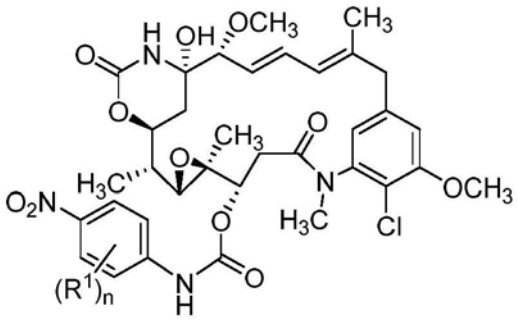
n是从0至4的整数；

m是从0至3的整数；

p是从0至6的整数；和

q是从0至5的整数。

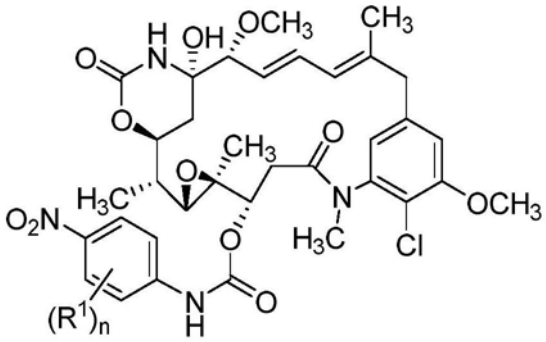
[0394] 在一些实施方案，式PP5所示化合物是式PP5A的化合物：



PP5A，

其中R^1和n具有本发明所述定义。

在一些实施方案，式PP5所示化合物是式PP5A1的化合物：



(PP5A1)，

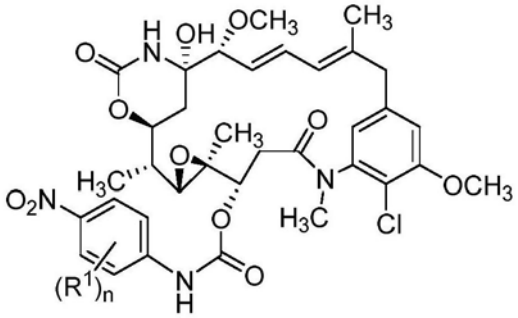
其中：

R^1在每次出现时独立地选自烷基、烷氧基、卤素、卤代烷基、和杂环烷基；和

n是从0至4的整数。

[0395] 在一些实施方案，各R^1独立地为烷基、烷氧基、杂烷基、卤素、卤代烷基、或卤代烷氧基。在一些实施方案，各R^1独立地为C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}卤代烷氧基、或卤素。在一些实施方案，各R^1独立地为C_{1-6}烷基、或C_{1-6}烷氧基。在一些实施方案，各R^1独立地为卤素。在一些实施方案，各R^1独立地为烷氧基。在一些实施方案，各R^1独立地为甲氧基、乙氧基、或丙氧基。在一些实施方案，R^1是甲基。在一些实施方案，R^1是甲氧基。在一些实施方案，R^1是三氟甲基。在一些实施方案，R^1是氟。在一些实施方案，R^1是氯。在一些实施方案，R^1是溴。在一些实施方案，n、m、p、或q是0、1或2。在一些实施方案，n、m、p、或q是0或1。在一些实施方案，n、m、p、或q是0。

[0396] 在一些实施方案,式PP5所示化合物是式PP5A的化合物:



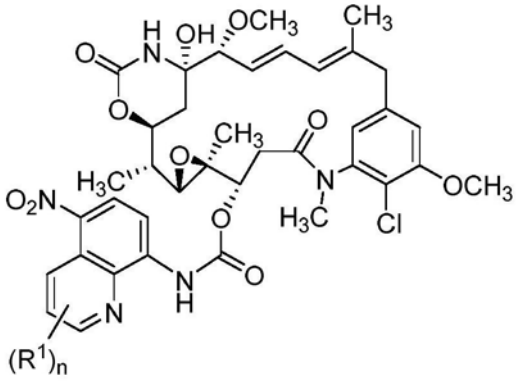
PP5A,

其中:

R^1在每次出现时独立地为卤素或三氟甲基;和

n是0、1、或2。

[0397] 在一些实施方案,式PP5所示化合物是式PP5A2的化合物:



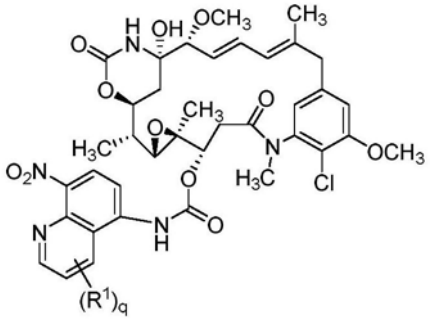
PP5A2,

其中:

R^1在每次出现时独立地为卤素或三氟甲基;和

q是从0至5的整数。

[0398] 在一些实施方案,式PP5所示化合物是式PP5A3的化合物:



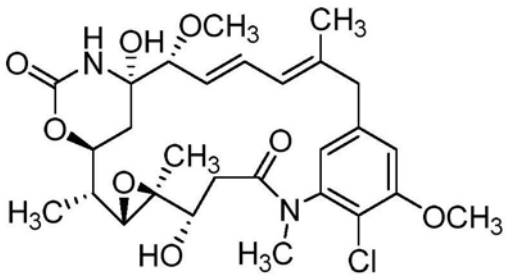
PP5A3,

其中:

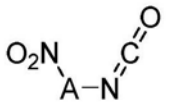
R^1在每次出现时独立地为卤素或三氟甲基;和q是从0至5的整数。在一些实施方案,R^1是1-甲基乙基-巯基、苯基、2-氟苯基、吡啶基、4-吡啶基、吡咯烷基、或1-吡咯烷基。在一些实施方案,R^1是三氟甲基。在一些实施方案,R^1是甲氧基。在一些实施方案,R^1是氟。在一

些实施方案，R^1是氢。

[0399] 式PP5所示化合物可通过在路易斯酸条件下，使式P2所示化合物与式PP6所示化合物接触，合成得到：



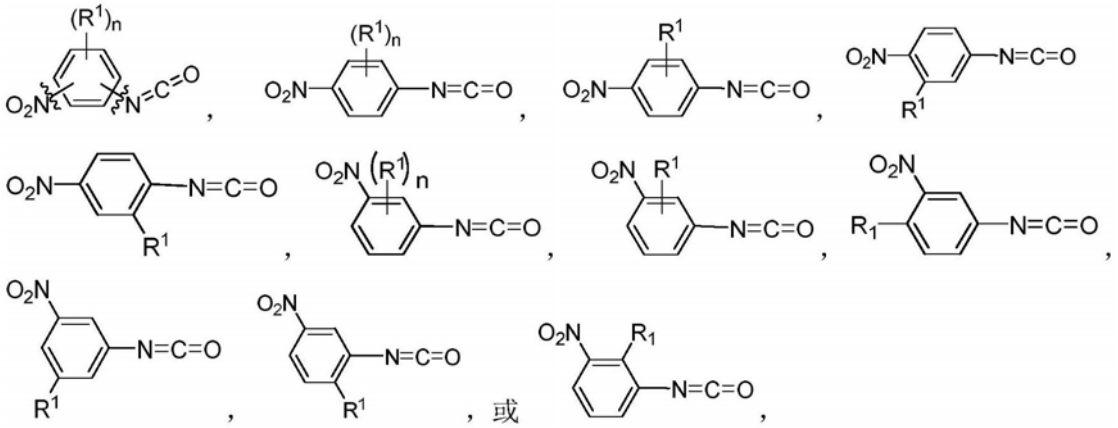
P2，



PP6。

[0400] 合适的式PP6的化合物包括，但不限于，4-异氰酸基-2-甲基-1-硝基-苯，1-异氰酸基-2-甲基-4-硝基-苯、2-溴-4-异氰酸基-1-硝基-苯、2-氯-1-异氰酸基-4-硝基-苯、3-氯-1-异氰酸基-4-硝基-苯、2-氟-1-异氰酸基-4-硝基-苯、2-溴-1-异氰酸基-4-硝基-苯、4-异氰酸基-2-甲氧基-1-硝基-苯、1-异氰酸基-2-甲氧基-4-硝基-苯、4-异氰酸基-1-硝基-2-三氟甲基-苯、或1-异氰酸基-4-硝基-2-三氟甲基-苯。

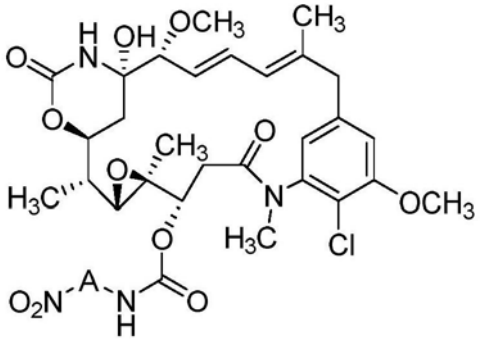
[0401] 合适的式PP6的化合物包括具有任一以下结构通式的化合物：



其中，R^1在每次出现时独立地为C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、卤素、C_{1-6}卤代烷基、或C_{1-6}卤代烷氧基，其中n是0、1、2、3、或4。在所述这些实施方案中的一些，R^1是甲氧基或甲基。在一些具体实施方案，R^1是甲氧基、甲基、氟、氯、溴、或三氟甲基。在一些实施方案，n是1或2。在所述这些实施方案中的一些，n是1。在一些实施方案，R^1是氟、氯、溴、或碘。在一些实施方案，R^1是甲基。在一些实施方案，R^1是甲氧基。在一些实施方案，R^1是三氟甲基。在一些实施方案，R^1是氟。在一些实施方案，R^1是氯。在一些实施方案，R^1是溴。

[0402] 在一些实施方案，R^1是1-甲基乙基-巯基、苯基、2-氟苯基、吡啶基、4-吡啶基、吡咯烷基、或1-吡咯烷基。在一些实施方案，R^1是三氟甲基。在一些实施方案，R^1是甲氧基。在一些实施方案，R^1是氟。在一些实施方案，R^1是氢。

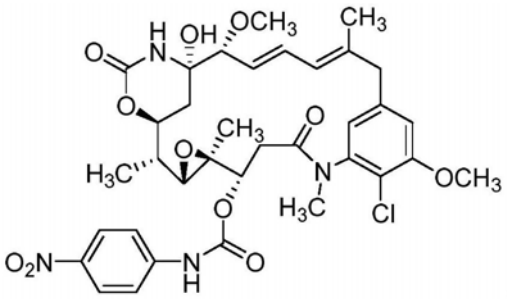
[0403] 在一些实施方案,本发明提供了式PP5所示化合物:



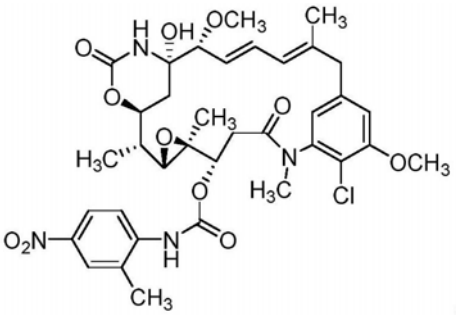
PP5,

其中A是亚芳基或亚杂芳基。

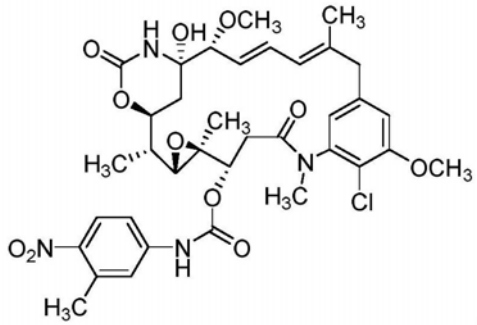
[0404] 在一些实施方案,式PP5所示化合物是选自下述化合物:



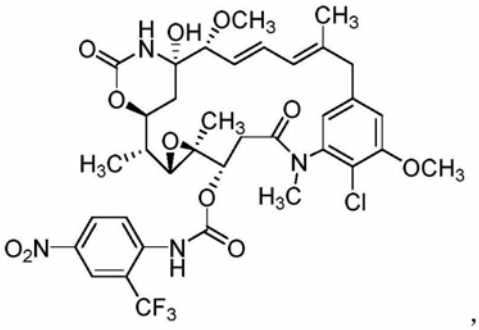
,



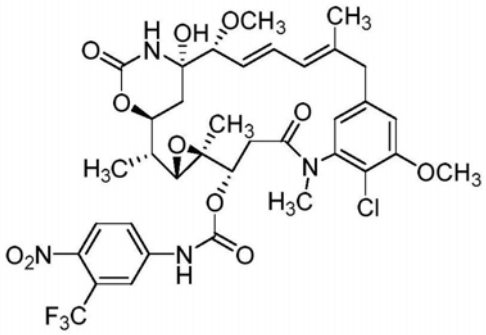
,



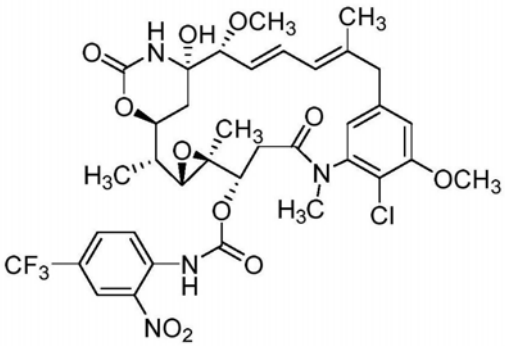
,



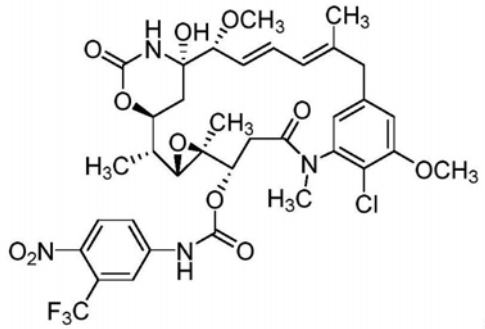
,



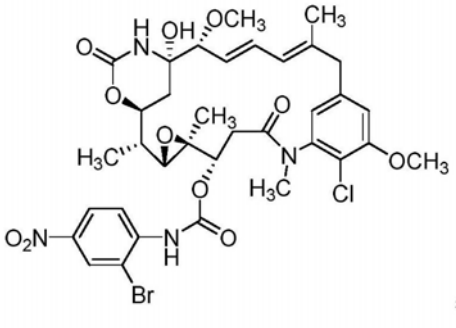
,



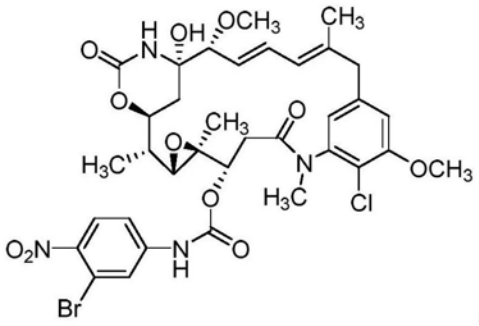
,



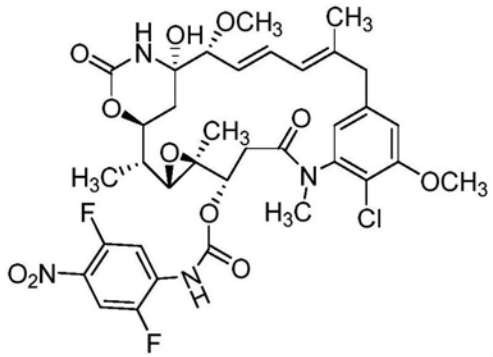
,



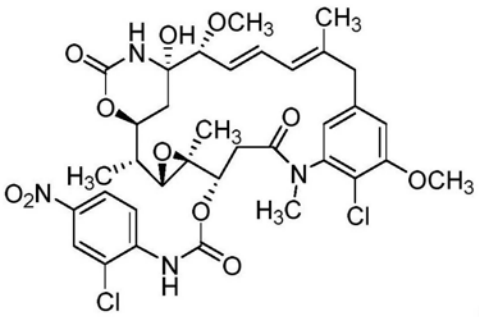
,



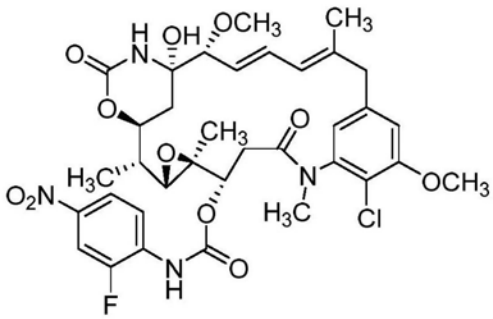
,



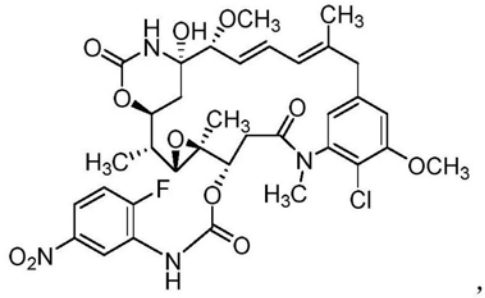
,



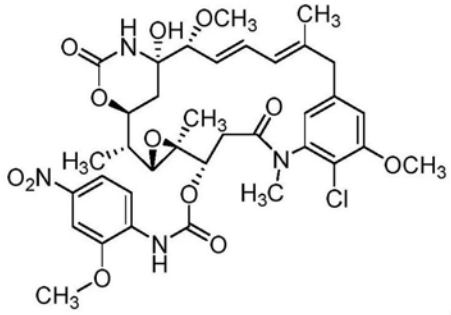
,



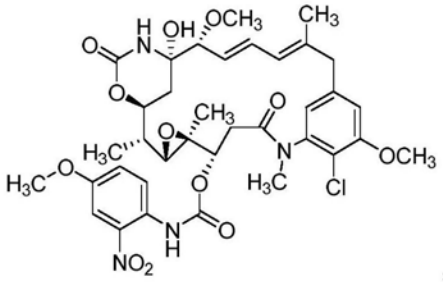
,



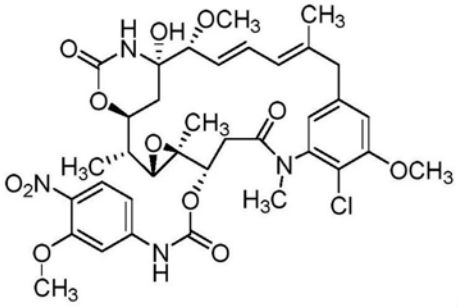
,



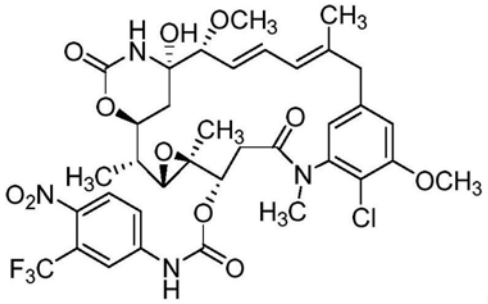
,



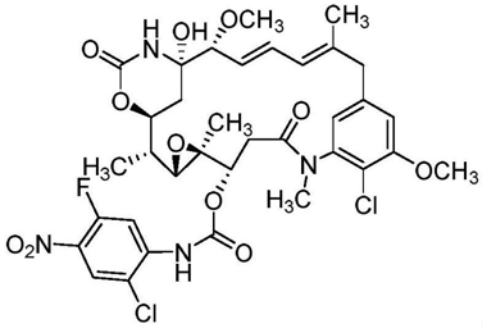
,



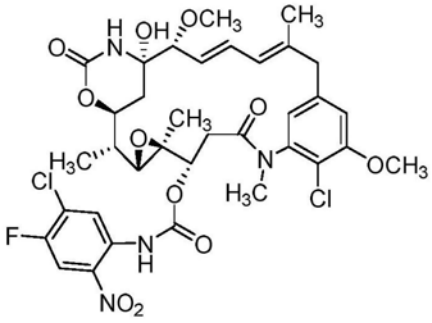
,



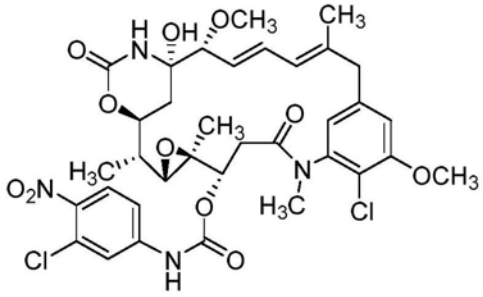
,



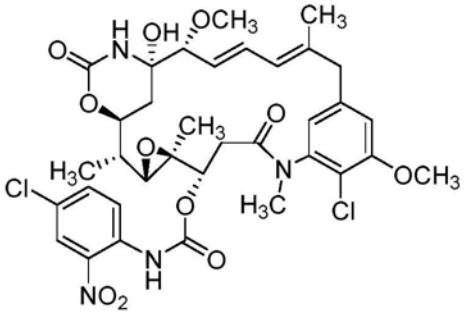
,



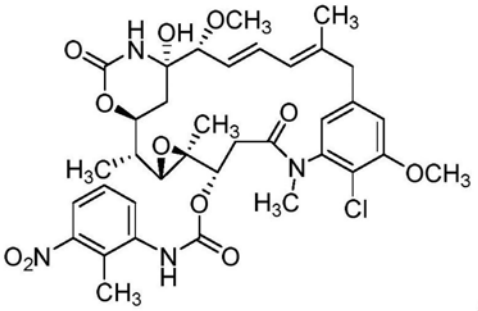
,



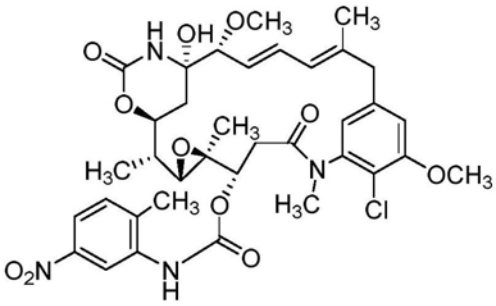
,



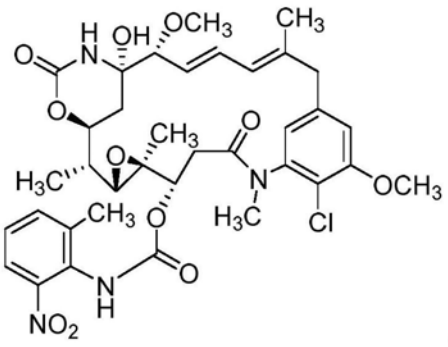
,



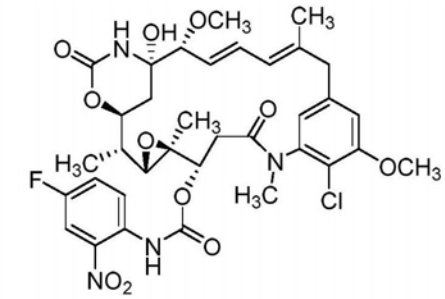
,

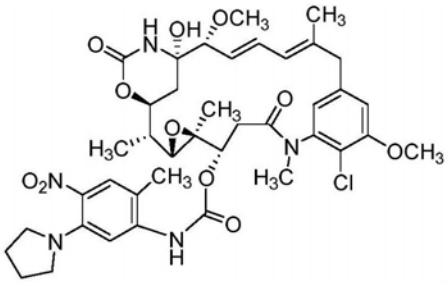


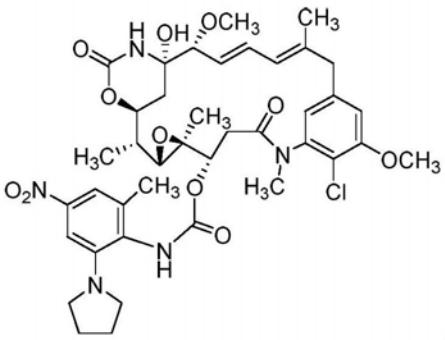
,

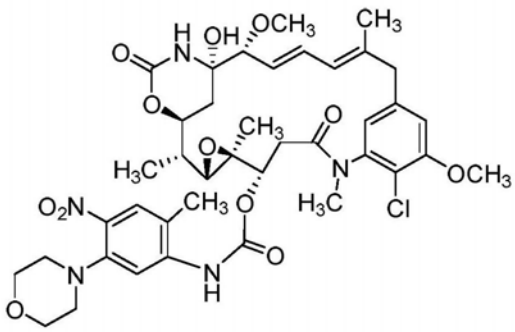


,

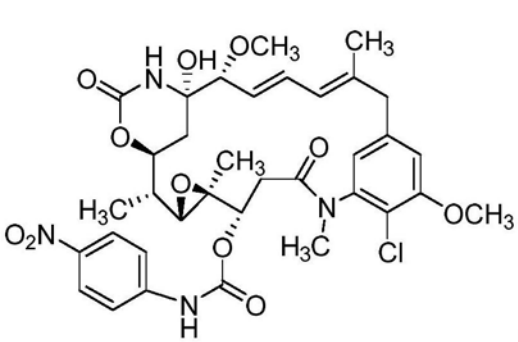

，

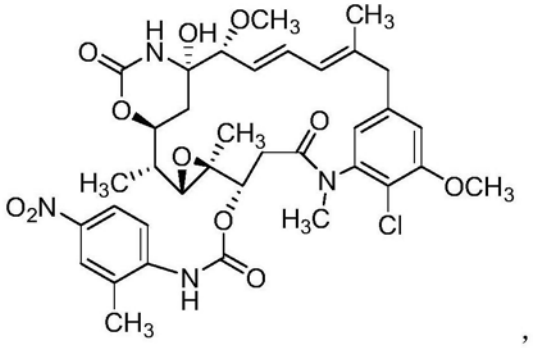

，

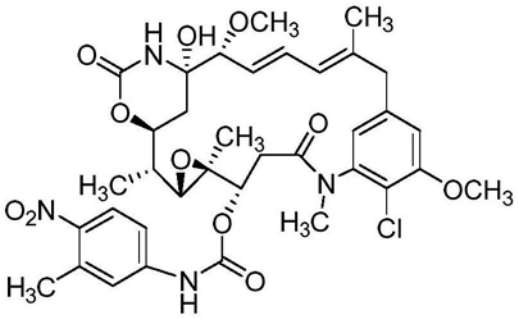

，和

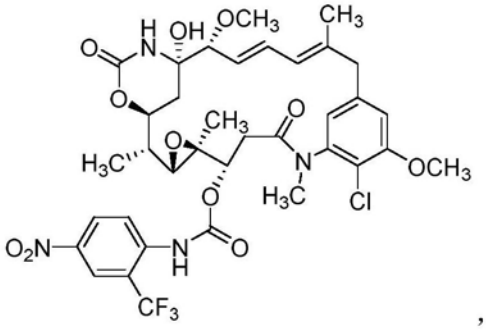

。

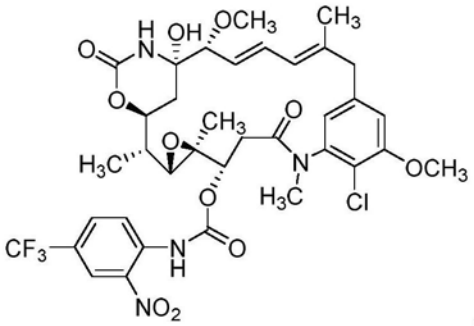
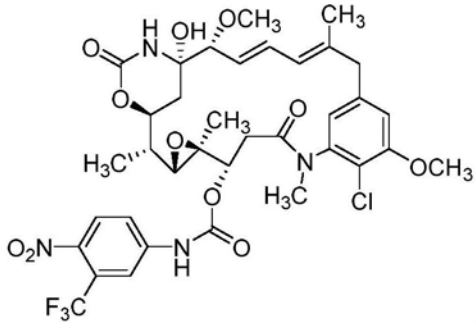
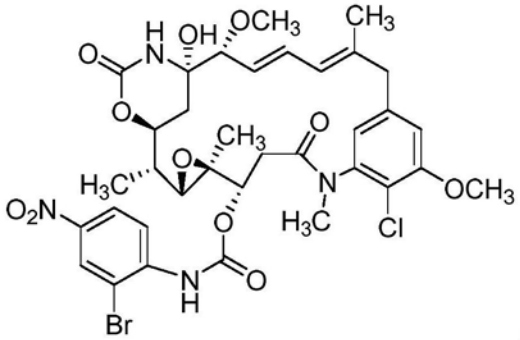
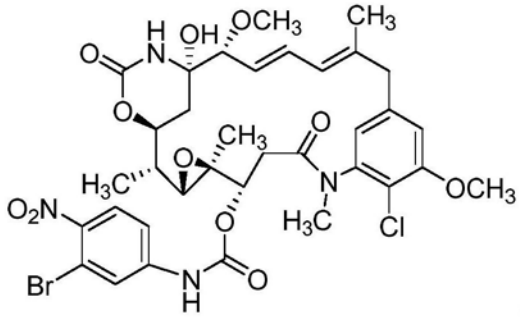
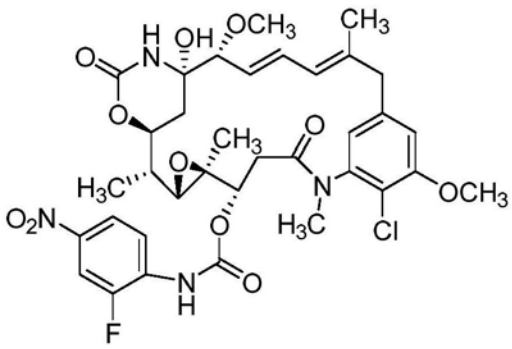
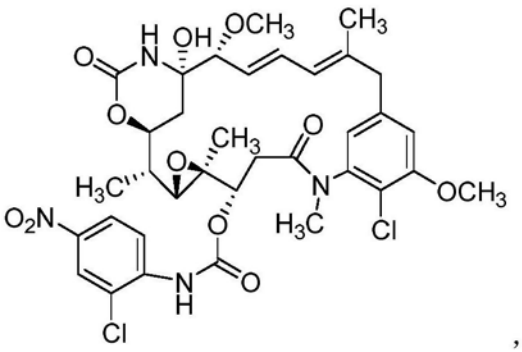
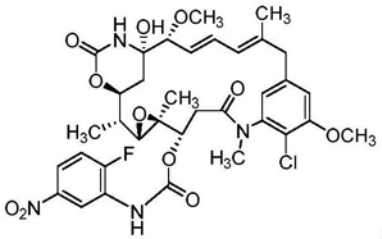
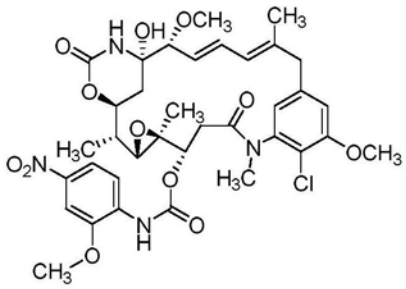
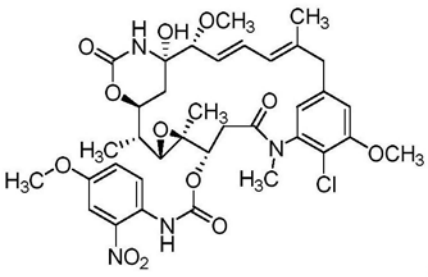
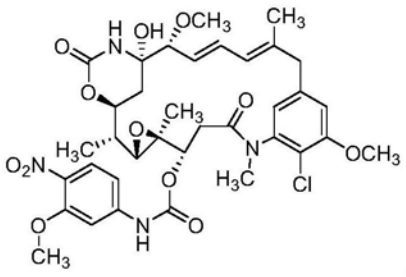
[0405] 在一些实施方案，式PP5所示化合物是选自下述化合物：

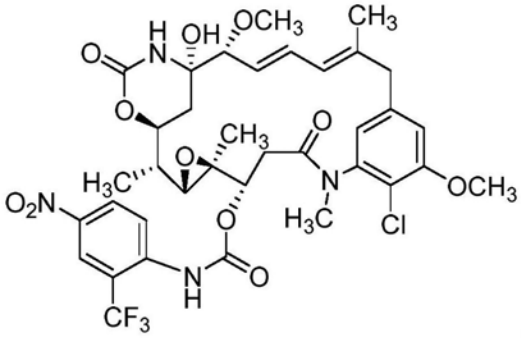
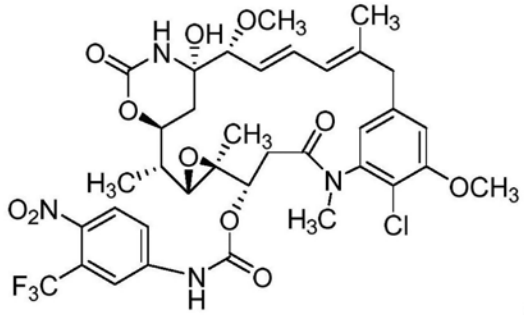
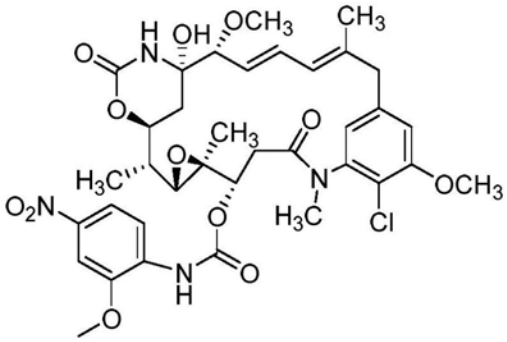
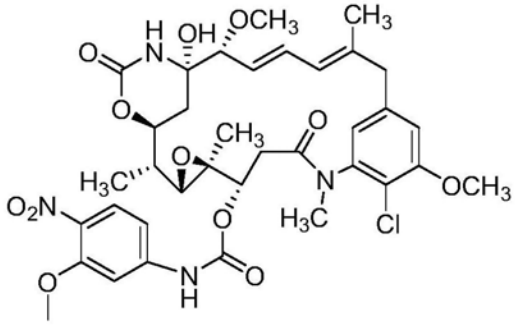
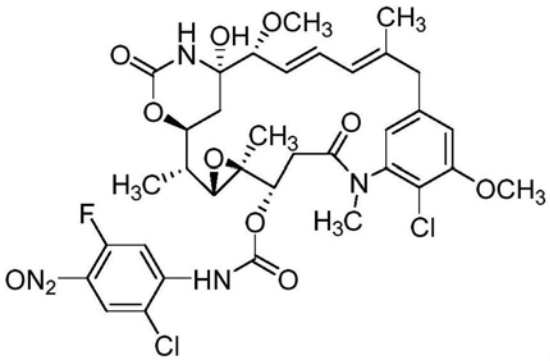
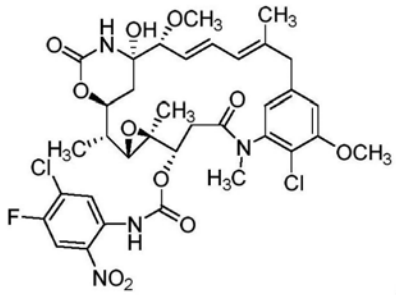
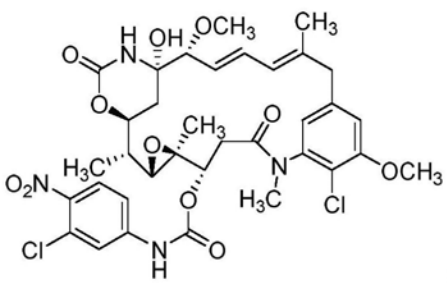
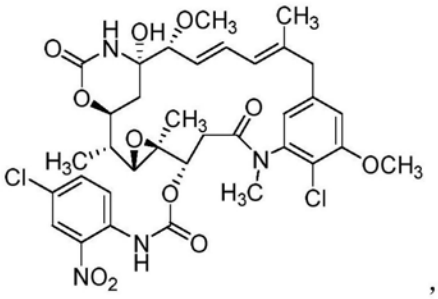
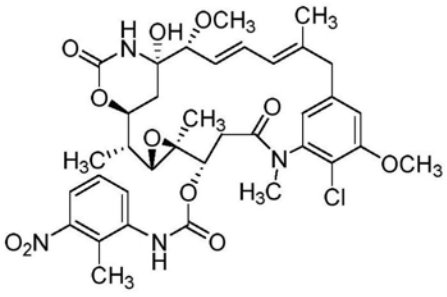
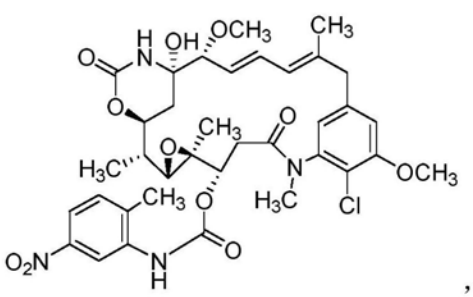

，

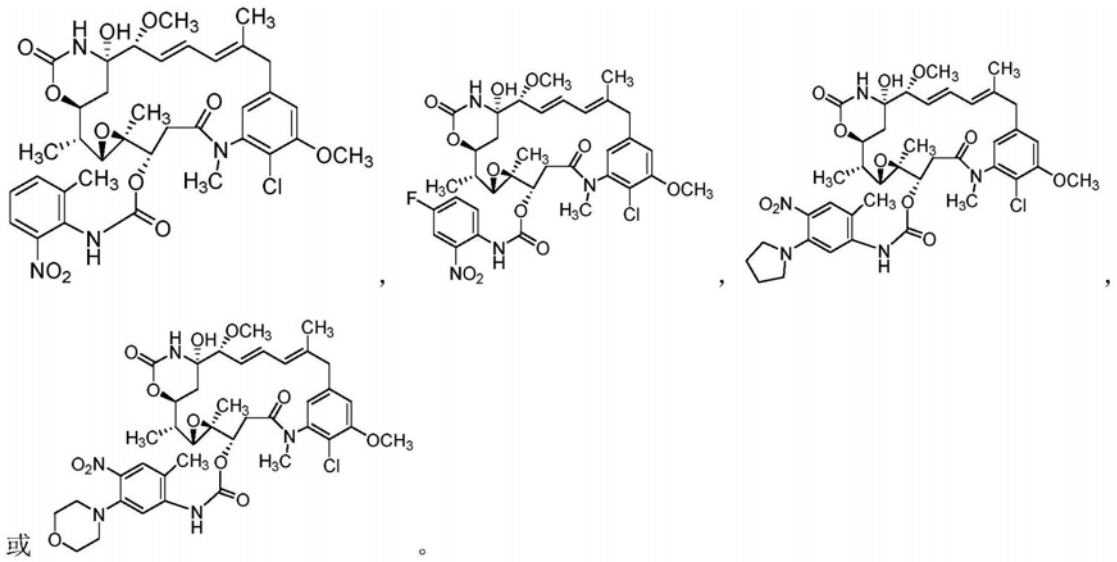

，


，

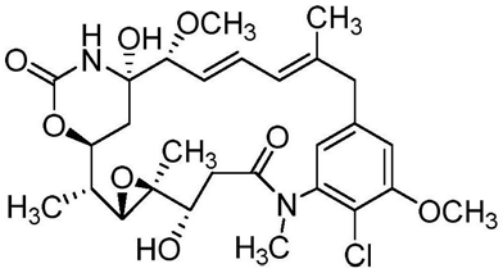

，


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

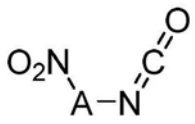

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,



[0406] 在一些实施例，本发明涉及制备式PP5所示化合物的方法。在一些实施例，所述这些方法包括在路易斯酸条件下，使式P2所示化合物与式PP6所示化合物接触：



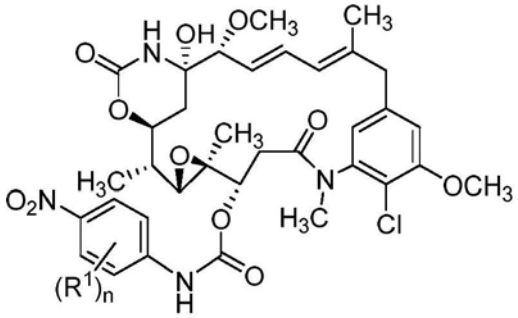
P2，



PP6。

[0407] 在一些本发明所述方法中，使式P2所示化合物与式PP6所示化合物的接触是在所述接触步骤中具有路易斯酸和非质子溶剂。在一些实施例，所述路易斯酸选自$AlBr_3$、$AlCl_3$、BCl_3、三氯化硼甲基硫化物、BF_3、三氟化硼甲基醚合物、三氟化硼甲基硫化物、三氟化硼四氢呋喃、二环己基硼三氟甲磺酸盐、溴化铁(III)、氯化铁(III)、氯化锡(IV)、氯化钛(IV)、异丙醇钛(IV)、$Cu(OTf)_2$、$CuCl_2$、$CuBr_2$、氯化锌、烷基铝卤化物类(R_nAlX_{3-n}，其中R是烃基)、$Zn(OTf)_2$、$Yb(OTf)_3$、$Sc(OTf)_3$、$MgBr_2$、$NiCl_2$、$Sn(OTf)_2$、$Ni(OTf)_2$、或$Mg(OTf)_2$。在一些实施例，所述路易斯酸是$ZnCl_2$。在一些实施例，所述非质子溶剂选自全氟己烷($CF_3(CF_2)_4CF_3$)、α，α，α-三氟甲苯、戊烷、己烷、环己烷、甲基环己烷、二噁烷、四氯化碳、氟利昂-11($CFCl_3$)、苯、甲苯、三乙胺、二硫化碳、二异丙醚、乙醚、叔丁基甲基醚、氯仿、乙酸乙酯、1，2-二甲氧基乙烷(甘醇二甲醚)、2-甲氧基乙基醚(二甘醇二甲醚)、四氢呋喃、二氯甲烷(亚甲基氯)、吡啶、2-丁酮(MEK)、丙酮、六甲基磷酰胺、N-甲基吡咯烷酮、硝基甲烷、二甲基甲酰胺、乙腈、环丁砜、二甲基亚砜、或碳酸丙烯酯。在一些实施例，所述非质子溶剂是二氯甲烷。在本发明的一些方法中，式P2所示化合物与式PP6所示化合物的接触包括使氯化锌和二氯甲烷与式P2的化合物和式PP6的化合物接触。

[0408] 在一些实施方案，式PP5所示化合物具有式PP5A所示结构：

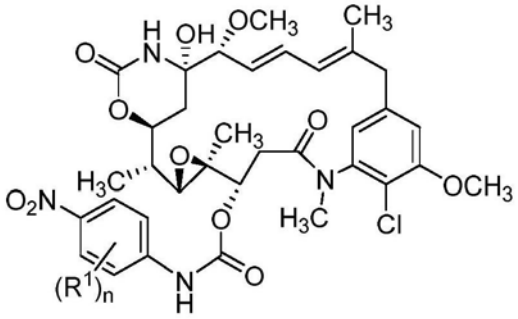


PP5A，

其中R^1和n均具有本发明所述定义。

[0409] 在所述这些方法中的一些，各R^1独立地为烷基、烷氧基、杂烷基、卤素、卤代烷基、或卤代烷氧基。在一些实施方案，各R^1独立地为C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}卤代烷氧基、或卤素。在一些实施方案，各R^1独立地为C_{1-6}烷基、或C_{1-6}烷氧基。在一些实施方案，各R^1独立地为卤素。在一些实施方案，各R^1独立地为烷氧基。在一些实施方案，各R^1独立地为甲氧基、乙氧基、或丙氧基。在一些实施方案，R^1是甲基。在一些实施方案，R^1是甲氧基。在一些实施方案，R^1是三氟甲基。在一些实施方案，R^1是氟。在一些实施方案，R^1是氯。在一些实施方案，R^1是溴。在一些实施方案，n、m、p、或q是0、1或2。在一些实施方案，n、m、p、或q是0或1。在一些实施方案，n、m、p、或q是0。

[0410] 在所述这些方法中的一些，式PP5所示化合物具有式PP5A所示结构：



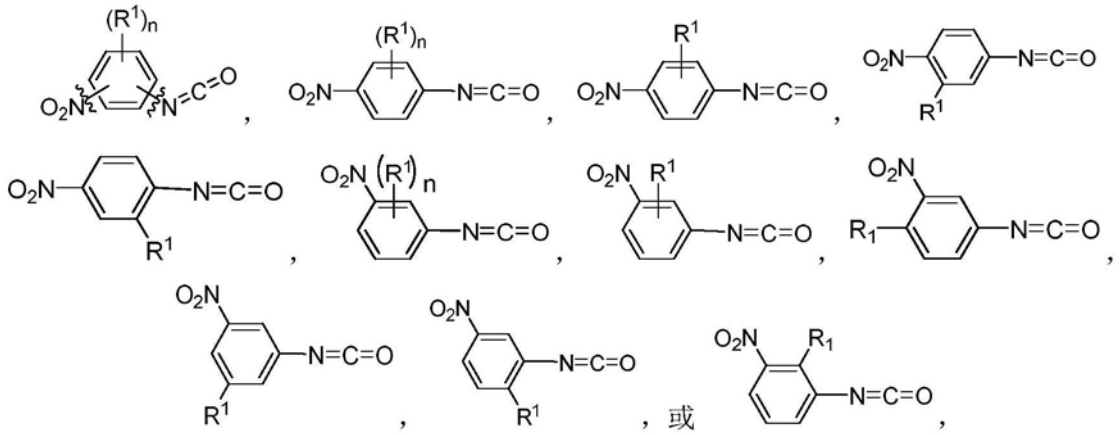
PP5A，

其中：

各R^1独立地为烷基、烷氧基、杂烷基、卤素、卤代烷基、或卤代烷氧基；和n是0、1、或2。

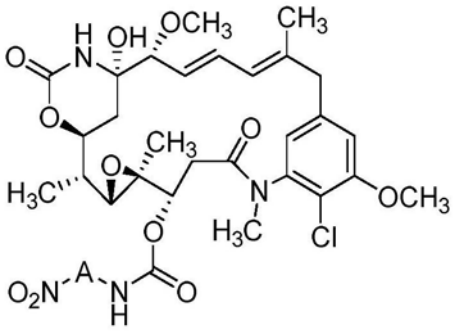
[0411] 在一些实施方案，本发明所述方法包括式PP6所示化合物，所述PP6所示化合物选自4-异氰酸基-2-甲基-1-硝基-苯，1-异氰酸基-2-甲基-4-硝基-苯、2-溴-4-异氰酸基-1-硝基-苯、2-氯-1-异氰酸基-4-硝基-苯、3-氯-1-异氰酸基-4-硝基-苯、2-氟-1-异氰酸基-4-硝基-苯、2-溴-1-异氰酸基-4-硝基-苯、4-异氰酸基-2-甲氧基-1-硝基-苯、1-异氰酸基-2-甲氧基-4-硝基-苯、4-异氰酸基-1-硝基-2-三氟甲基-苯、或1-异氰酸基-4-硝基-2-三氟甲基-苯。

[0412] 在一些实施方案，本发明所述方法包括式PP6所示化合物，所述式PP6所示化合物具有任一以下结构式：



其中，R^1在每次出现时独立地为C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、卤素、C_{1-6}卤代烷基、或C_{1-6}卤代烷氧基，其中n是0、1、2、3或4。在所述这些实施方案中某些，R^1是甲氧基、或甲基。在一些具体实施方案，R^1是甲氧基、甲基、氟、氯、溴或三氟甲基。在某些实施方案，n是1或2。在所述这些实施方案中的一些，n是1。在一些实施方案，R^1是氟、氯、溴、或碘。在一些实施方案，R^1是甲基。在一些实施方案，R^1是甲氧基。在一些实施方案，R^1是三氟甲基。在一些实施方案，R^1是氟。在一些实施方案，R^1是氯。在一些实施方案，R^1是溴。

[0413] 在一些实施方案，本发明公开的方法还包括通过使式PP5的化合物与合适的还原剂接触来还原式PP5的化合物：



PP5，

其中A是亚芳基或亚杂芳基。

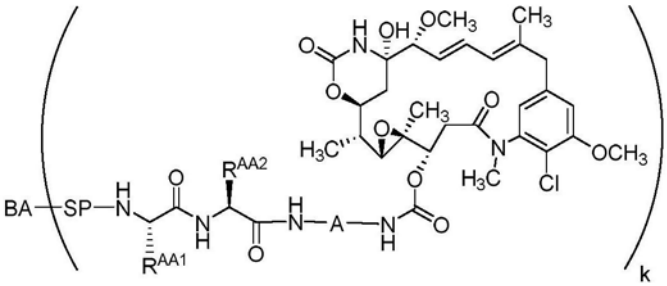
[0414] 在所述这些方法中一些中，所述合适的还原剂包括金属、金属箔、金属粉、金属尘、金属汞齐或金属屑。在某些实施方案，所述金属选自锌、铁、铝、钯或雷尼镍。在所述这些方法中的一些中，所述合适的还原剂是Zn。在所述这些方法中的一些中，所述合适的还原剂是Zn的乙酸溶液。在所述这些方法的一些中，所述合适的还原剂是Zn尘的乙酸溶液。

[0415] 在一些实施方案，本发明公开的方法还包括通过在特定还原剂条件下使式PP5的化合物与合适的还原剂接触来还原式PP5的化合物。在一些实施例，所述方法包括用选自锌尘、铁、铝、钯或雷尼镍的还原剂来还原式PP5的化合物。在一些实施例，所述方法包括用锌尘还原式PP5的化合物。在一些实施例，所述方法包括用锌尘和选自乙酸、甲酸、pTsOH、或NH_4Cl的溶剂还原式PP5的化合物。在一些实施例，所述方法包括用锌尘和乙酸还原式PP5的化合物。在一些实施例，所述方法包括用约二十(20)当量的锌尘和四十(40)当量的乙酸来还原式PP5的化合物。在一些实施例，所述还原是在0和70℃之间的温度下进行。在一些实施例，所述还原是在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、

24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、或70℃的温度下进行。在一些实施例，所述还原进行1至40小时。在一些实施例，所述还原进行1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、或40小时。在一些实施例，所述还原进行24小时。在一些实施例，所述还原是在室温下进行约1至24小时。

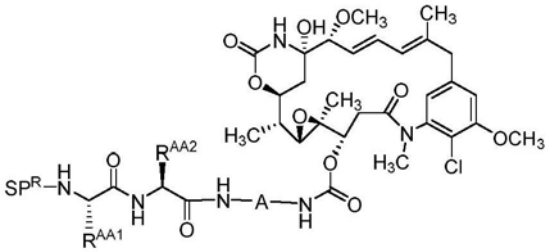
[0416] 在一些实施例，上述方法步骤均是在具有10-50％水(以体积计)的溶剂中在可混溶的有机溶剂中进行或完成。在一些实施例，所述可混溶的有机溶剂是THF、二噁烷、或二乙醚。

[0417] 式III所示化合物：



III

可通过在偶联条件下，使式PP1所示化合物：



PP1

与结合剂接触，从而合成得到，

其中：

BA是结合剂；

SP是间隔基团；

SP^R是活性间隔基团；

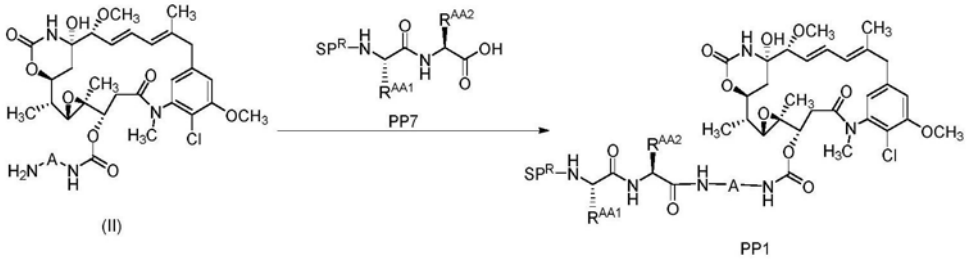
R^{AA1}是氨基酸侧链；

R^{AA2}是氨基酸侧链；

A是亚芳基或亚杂芳基；和

k是从1至30的整数。

[0418] 式PP1所示化合物可通过使式(II)所示化合物与式PP7所示化合物接触制备得到：



其中：

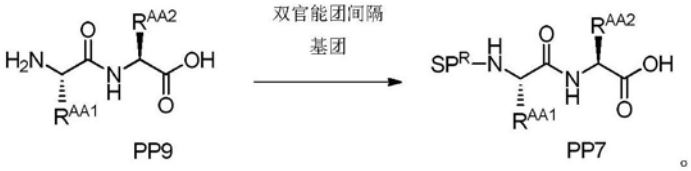
SP^R是活性间隔基团；

R^{AA1}是氨基酸侧链；

R^{AA2}是氨基酸侧链；和

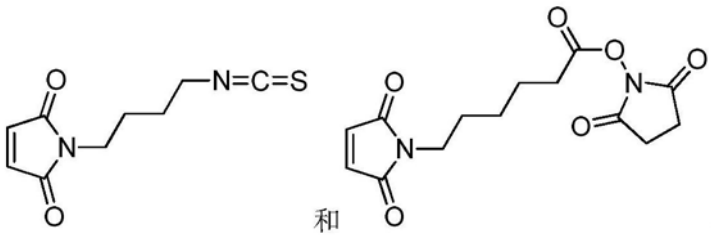
A是亚芳基或亚杂芳基。

[0419] 式PP7所示化合物可通过使式PP9所示化合物与双官能团间隔基团接触制备得到：



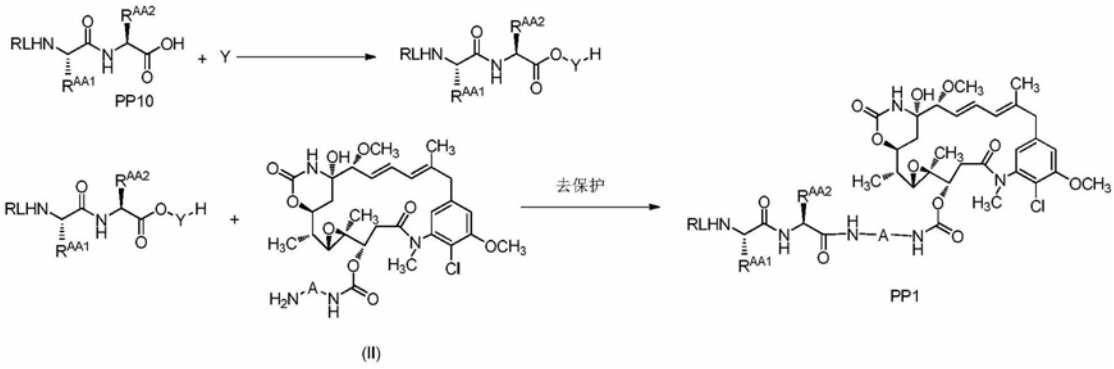
。

[0420] 示例性双官能团间隔基团包括，但不限于：



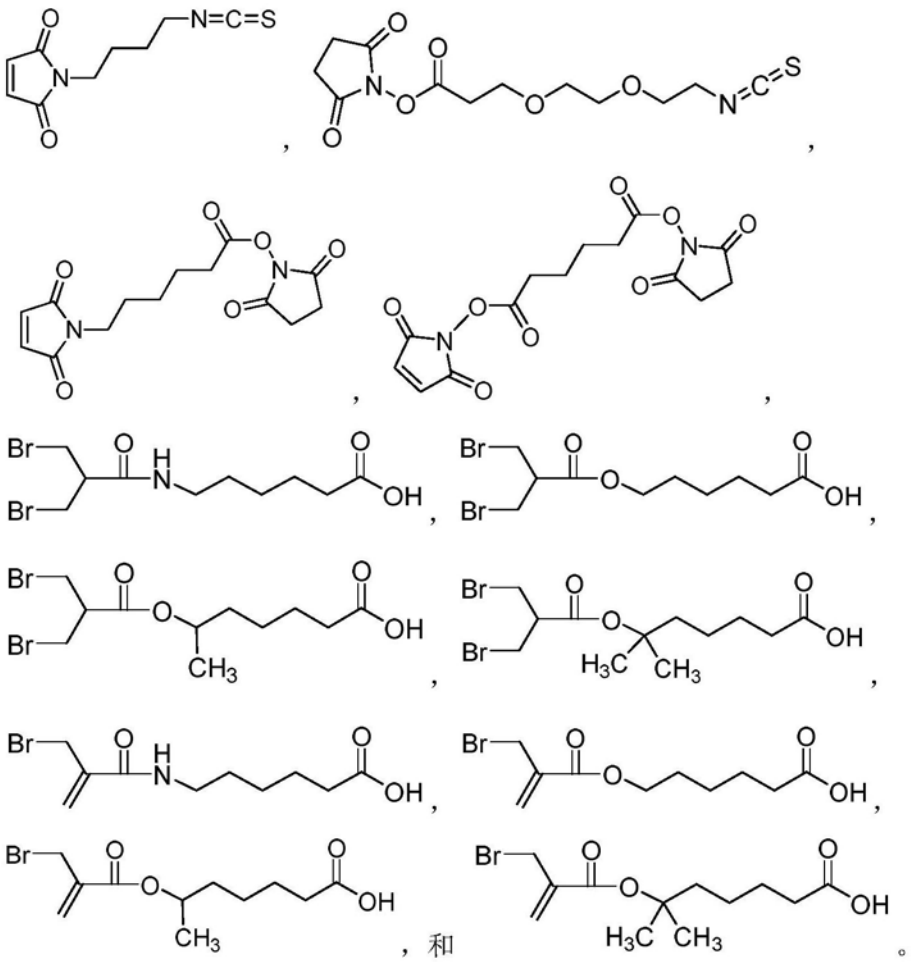
。

[0421] 式PP1所示化合物可通过使活化形式的式PP10所示化合物与式(II)所示化合物接触制备得到：



其中Y是使其连接至羧基基团亲电的基团部分。式PP10所示化合物可通过使用标准氨基酸偶联技术，包括譬如，在DIEA、DBU、EEDG、或三丁胺存在下，使用HATU、BOP/HOBt、或EDC/N-羟基琥珀酰胺形成活性酯，首先偶联其相应氨基酸制备得到。然后，式PP10所示化合物可通过使用标准氨基酸偶联技术，包括譬如，在DIEA、DBU、EEDG、或三丁胺存在下，使用HATU、BOP/HOBt、或EDC/N-羟基琥珀酰胺形成活性酯，随后连接所述RL制备得到。

[0422] 双官能团间隔基团是与式PP9所示化合物反应，从而附加存在于式PP7所示化合物中的SP^R基团部分的化合物。示例性双官能团间隔基团包括，但不限于：



E.使用方法和药物组合物

[0423] 本发明包括治疗或预防疾病、病情、或病症，譬如，增殖性疾病如癌症的方法，其包含施用治疗有效量的一种或多种本发明化合物，譬如，一种或多种式(I)或(II)所示化合物。疾病、病症、和/或病情包括，但不限于与本发明所列抗原相关的那些。在一些实施方案，所述抗原是PSMA、MUC16、STEAP2、或EGFRvIII。

[0424] 本发明公开化合物可用于治疗脑和脑膜，口咽，肺和支气管树，胃肠道，男性和女性生殖道，肌肉，骨骼，皮肤及附属物，结缔组织，脾脏，免疫系统，造血细胞和骨髓，肝脏和尿道，以及特殊的感觉器官如眼部产生的原发性和/或转移性肿瘤。在一些实施方案，本发明所述化合物用于治疗一种或多种下述癌症：肾细胞癌，胰腺癌，头颈癌，前列腺癌，恶性胶质瘤，骨肉瘤，结直肠癌，胃癌(例如，具有MET扩增的胃癌)，恶性间皮瘤，多发性骨髓瘤，卵巢癌，小细胞肺癌，非小细胞肺癌，滑膜肉瘤，甲状腺癌，乳腺癌，或黑素瘤。在一些实施方案，所述癌症是乳腺癌。

[0425] 本发明所述化合物可单独给药或与一种或多种附加治疗剂一同给药。所述一种或多种附加治疗剂可在本发明所述化合物给药之前、同时给药，或给药不久之后进行给药。本发明还包括药物组合物，其包含本发明所述的任一化合物与一种或多种附加治疗剂组合使用/联用，以及治疗方法，其包含将此类组合施用于有需要的患者。

[0426] 合适的附加治疗剂包括，但不限于：EGFR拮抗剂(例如，抗EGFR抗体[如西妥昔单抗或帕尼单抗]或EGFR的小分子抑制剂[例如，吉非替尼或厄洛替尼])，另一EGFR家族成员如

Her2/ErbB2、ErbB3或ErbB4的拮抗剂(例如,抗ErbB2[如曲妥单抗或T-DM1{KADCYLA®}],抗ErbB3或抗ErbB4抗体或ErbB2、ErbB3或ErbB4活性的小分子抑制剂),EGFRvIII的拮抗剂(例如,特异性结合EGFRvIII的抗体),cMET拮抗剂(例如,抗cMET抗体),IGF1R拮抗剂(例如,抗IGF1R抗体),B-raf抑制剂(例如,威罗菲尼,索拉菲尼,GDC-0879,PLX-4720),PDGFR-α抑制剂(例如,抗PDGFR-α抗体),PDGFR-β抑制剂(例如,抗PDGFR-β抗体,或小分子激酶抑制剂如甲磺酸伊马替尼或苹果酸舒尼替尼),PDGF配体抑制剂(例如,抗PDGF-A、-B、-C、或-D抗体,适体,siRNA等),VEGF拮抗剂(例如,VEGF-Trap如阿柏西普,参见如US 7,087,411(本发明也被称为"VEGF-抑制融合蛋白"),抗-VEGF抗体(例如,贝伐单抗),VEGF受体的小分子激酶抑制剂(例如,舒尼替尼,索拉菲尼,或帕唑帕尼),DLL4拮抗剂(例如,US 2009/0142354中公开的抗DLL4抗体如REGN421),Ang2拮抗剂(US 2011/0027286中公开的抗Ang2抗体如H1H685P),FOLH1拮抗剂(例如,抗FOLH1抗体),STEAP1或STEAP2拮抗剂(例如,抗STEAP1抗体或抗STEAP2抗体),TMPRSS2拮抗剂(例如,抗TMPRSS2抗体),MSLN拮抗剂(例如,抗MSLN抗体),CA9拮抗剂(例如,抗CA9抗体),尿路上皮特异蛋白(uroplakin)拮抗剂(例如,抗尿路上皮特异蛋白[例如,抗UPK3A]抗体),MUC16拮抗剂(例如,抗MUC16抗体),Tn抗原拮抗剂(例如,抗Tn抗体),CLEC12A拮抗剂(例如,抗CLEC12A抗体),TNFRSF17拮抗剂(例如,抗TNFRSF17抗体),LGR5拮抗剂(例如,抗LGR5抗体),一价CD20拮抗剂(例如,一价抗CD20抗体如利妥昔单抗)等。可与本发明化合物组合受益施用的其他治疗剂包括,譬如,它莫西芬,芳香化酶抑制剂类,和细胞因子抑制剂类,包括与细胞因子如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18、或其各自受体结合的小分子细胞因子抑制剂类和抗体类。

[0427] 合适的治疗剂还包括,但不限于化学治疗剂类,包括烷化剂如噻替派和环磷酰胺(Cytoxan™);烷基磺酸酯类,如白消安,英丙舒凡和嗪消安;氮丙啶类,如苯并多巴(benzodopa),卡泊醌,麦曲多巴(meturedopa),和尤利多巴(uredopa);乙撑亚胺类(ethylenimines)和甲基密胺类(methylamelamines),包括六甲蜜胺(altretamine),曲他胺(triethylenemelamine),三亚乙基磷酰胺(trietylenephosphoramide)、三亚乙基硫代磷酰胺(triethiylenethiophosphoramide)和三羟甲基密胺(trimethylolomelamine);氮芥类,如苯丁酸氮芥(chlorambucil),萘氮芥(chlornaphazine),胆磷酰胺(cholophosphamide),雌氮芥(estramustine),异环磷酰胺(ifosfamide),氮芥(mechlorethamine),盐酸甲氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride),美法仑(melphalan),新恩比兴(novembichin),苯芥胆甾醇(phenesterine),泼尼莫司汀(prednimustine),曲磷胺(trofosfamide),尿嘧啶氮芥(uracil mustard);亚硝基脲类,如卡莫司汀(carmustine),氯脲霉素(chlorozotocin),福莫司汀(fotemustine),洛莫司汀(lomustine),尼莫司汀(nimustine),和雷莫司汀(ranimustine);抗生素类,如阿克拉霉素(aclacinomysins),放线菌素,氨茴霉素(authramycin),重氮丝氨酸(azaserine),博莱霉素,放线菌素,卡里奇毒素(calicheamicin),卡柔比星(carabicin),洋红霉素,嗜癌菌素(carzinophilin),色霉素类(chromomycins),放线菌素D,道诺霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin),6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸,多柔比星,表柔比星,依索比星(esorubicin),伊达比星(idarubicin),麻西罗霉素(marcellomycin),丝裂霉素类(mitomycins),霉酚酸,诺加霉素(nogalamycin),橄榄霉素类(olivomycins),培洛霉素

(peplomycin),泊非霉素(potfiromycin),嘌呤霉素,三铁阿霉素(quelamycin),罗多比星(rodorubicin),链黑菌素(streptonigrin),链脲菌素(streptozocin),杀结核菌素(tubercidin),乌苯美司(ubenimex),新制癌菌素(zinostatin),佐柔比星;抗代谢物类,如甲氨喋呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物类,如二甲叶酸,甲氨蝶呤,蝶罗呤,和三甲曲沙(trimetrexate);嘌呤类似物类,如氟达拉滨(fludarabine),6-巯基嘌呤,硫咪嘌呤,和硫鸟嘌呤;嘧啶类似物类,如环胞苷,阿扎胞苷,6-氮杂尿苷,卡莫氟(carmofur),阿糖胞苷,二脱氧尿苷,去氧氟尿苷,依诺他滨(enocitabine),氟尿苷;雄激素类,如卡普睾酮(calusterone),屈他雄酮丙酸酯,环硫雄醇,美雄烷,睾内酯;抗肾上腺类,如氨鲁米特,米托坦,曲洛司坦;叶酸补充剂,如亚叶酸;醋葡醛内酯;醒磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside);氨基乙酰丙酸;安吖啶(amsacrine);贝曲布辛(bestrabucil);比生群(bisantrene);伊达曲沙(edatraxate);德弗法明(defofamine);秋水仙胺;地吖醌(diaziquone);伊弗鸟氨酸(elfornithine);依利醋铵;依托格鲁(etoglucid);硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明(lonidamine);丙脒腙(mitoguazone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫哌达醇(mopidamol);二胺硝吖啶(nitracrine);喷司他丁(pentostatin);苯来美特(phenamet);吡柔比星;鬼臼酸;2-乙基酰肼;甲苄肼;PSK™;雷佐生(razoxane);西佐喃(sizofiran);锗螺胺(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziquone);2,2',2"-三氯三乙胺;氨基甲酸乙酯(urethan);长春地辛;达卡巴嗪;甘露醇氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;胍血生(pipobroman);瓜西托辛(gacytosine);阿拉伯糖苷("Ara-C");环磷酰胺;噻替哌;紫杉烷类,譬如,紫杉醇(Taxol™,Bristol-Myers Squibb Oncology,Princeton,N.J.)和多西他赛(Taxotere™;Aventis Antony,France);苯丁酸氮芥;吉西他滨;6-硫鸟嘌呤;巯嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物类,如顺铂和卡铂;长春花碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;丝裂霉素C;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;去甲长春碱;诺消灵(novantrone);替尼泊苷;柔红霉素;氨喋呤;卡培他滨;伊班膦酸盐;CPT-11;拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);视黄酸;埃斯波霉素类(esperamicins);卡培他滨;和上述任何治疗剂的药学上可接受的盐、酸或衍生物类。此定义中还包括用于调节或抑制激素作用于肿瘤例如抗雌激素类和抗雄激素类的抗激素药物,所述抗雌激素包括,例如,他莫昔芬、雷洛昔芬、芳香化酶抑制4(5)-咪唑类、4-羟基他莫西芬、曲沃昔芬(trioxifene)、keoxifene、LY 117018、奥那司酮(onapristone)、和托瑞米芬(法乐通);和抗雄激素类,包括如氟他胺、尼鲁米特(nilutamide)、比卡鲁胺(bicalutamide)、亮丙瑞林、和戈舍瑞林;和上述任何药物的药学上可接受的盐、酸或衍生物类。

[0428] 本发明所述化合物还可与抗病毒剂类、抗生素类、镇痛剂类、皮质类固醇类、类固醇类、氧分子、抗氧化剂类、COX抑制剂类、心脏保护剂类、金属螯合剂类、IFN-γ、和/或NSAID类组合/联合施用和/或共同配制。

[0429] 在本发明所述方法的一些实施方案中,多剂量的本发明化合物(或包含本发明所述化合物与本发明提及的任何附加治疗剂的组合的药物组合物)可在规定时间内对受试者进行给药。本发明此方面的方法包括向受试者顺序施用多剂量的本发明所述化合物。本发明使用的"依次施用/给药"是指每种剂量的所述化合物在不同的时间点,例如在以预定间隔(如几小时、几天、几周、或几个月)分开的不同天数,对受试者进行给药。本发明包括方

法，其包含对患者依次施用单个初始剂量的本发明所述化合物，随后施用一个或多个二次剂量的所述化合物，以及任选地后续一个或多个三次剂量的化合物。

[0430] 术语“初始剂量”，“二次剂量”，和“三次剂量”是指本发明所述化合物的给药时间顺序。因此，“初始剂量”是在治疗方案开始时给药的剂量(也称为“基线剂量”)；“二次剂量”是在所述初始剂量给药后施用的剂量；和“三次剂量”是在所述二次剂量给药后施用的剂量。所述初始、二次和三次剂量均可含有相同量的本发明化合物，但通常可在给药频率方面彼此不同。在一些实施方案，在治疗过程中，所述初始、二次和/或三次剂量中所含的化合物的量彼此变化(例如，酌情向上或向下调整)。在一些实施方案，在治疗方案开始时，将两种或更多种(例如，2、3、4或5种)剂量施用为“负荷剂量”，随后以较不频繁的基础施用后续剂量(例如“维持剂量”)。

[0431] 在本发明所述的一些示例性实施方案中，每个二次和/或三次剂量在紧随前述剂量之后进行给药1至26周(例如，1、$1^1/_2$、2、$2^1/_2$、3、$3^1/_2$、4、$4^1/_2$、5、$5^1/_2$、6、$6^1/_2$、7、$7^1/_2$、8、$8^1/_2$、9、$9^1/_2$、10、$10^1/_2$、11、$11^1/_2$、12、$12^1/_2$、13、$13^1/_2$、14、$14^1/_2$、15、$15^1/_2$、16、$16^1/_2$、17、$17^1/_2$、18、$18^1/_2$、19、$19^1/_2$、20、$20^1/_2$、21、$21^1/_2$、22、$22^1/_2$、23、$23^1/_2$、24、$24^1/_2$、25、$25^1/_2$、26、$26^1/_2$、或更多)。本发明使用的短语“紧随前述剂量”是指在多次给药的序列中，在施用紧邻下一个剂量之前，对患者施用本发明化合物的剂量，在所述给药序列中不存在干预剂量。

[0432] 本发明此方面的方法可包含向患者施用任何数量的二次和/或三次剂量的本发明化合物。譬如，在一些实施方案，仅向患者施用单次二次剂量。在其他实施方案，向患者施用两次或更多次(例如，2、3、4、5、6、7、8或更多次)二次剂量。同理，在一些实施方案，仅向患者施用单次的三次剂量。在其他实施方案，向患者施用两次或更多次(例如，2、3、4、5、6、7、8或更多次)三次剂量。给药方案可在特定受试者的寿命期内无限期地进行，或者直至此种治疗不再是治疗需要或有利的。

[0433] 在涉及多个二次剂量的实施方案中，每个二次剂量可以与其他二次剂量相同的频率施用/给药。譬如，每个二次剂量可在紧随前述剂量之后，对患者进行给药1至2周或1至2个月。同理，在涉及多个三次剂量的实施方案中，每个三次剂量可以与其他三次剂量相同的频率施用/给药。譬如，每个三次剂量可在紧随前述剂量之后，对患者进行给药2至12周。在本发明的一些实施方案中，向患者施用二次和/或三次剂量的频率可在治疗方案的过程中变化。也可根据临床检查后的个体患者的需要，由医师在治疗过程中调整给药频率。

[0434] 本发明包括其中以第一频率(例如，每周一次，每两周一次，每三周一次，每月一次，每两个月一次等)向患者施用2至6次负荷剂量，然后以较不频繁的方式向患者施用两次或更多次维持剂量的给药方案。例如，根据本发明的此方面，如果以每月一次的频率施用负荷剂量，那么维持剂量可以每6周施用一次，每两个月一次，每三个月一次等。

[0435] 本发明包括本发明所述化合物和/或偶联物如式(I)和(II)所示化合物的药物组合物，譬如，组合物包含本发明所述化合物、其盐、立体异构体、多晶型物，和药学上可接受的载体、稀释剂、和/或辅料。合适的载体、稀释剂和辅料的实例包括，但不限于：用于维持适当组合物pH值的缓冲剂类(例如，柠檬酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、乳酸盐缓冲液、草酸盐缓冲液等)，载体蛋白类(如人血清白蛋白)，盐水，多元醇类(例如，海藻糖、蔗糖、木糖醇、山梨糖醇等)，表面活性剂类(例如，聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80、聚氧乙烯酸酯(polyoxolate)等)，抗微生物剂类，和抗氧化剂类。

F.实施例

[0436] 在Varian(瓦里安)300MHz仪器上获得连接体的质子NMR谱,而在Varian 500MHz仪器上获得有效负载和有效负载-连接体的光谱。使用电喷雾电离和离子阱质量分析仪或单四极杆分析仪在AgilentLCMS仪器上收集质谱。对于所有实施例,仅报道了通过质谱法获得的最大丰度的同位素。除非另有说明,否则所有原料均是通过商业购得并无需纯化即可使用,而溶剂是商业购得的并且必要时通过本领域熟知的方法进行干燥处理。以下是实施例中使用的缩写列表,其全部化学名称附在括号中:Ahx(6-氨基己酸),Boc(N-叔丁氧基羰基),Cap(己酰基),$CDCl_3$(氯仿-d),CD_3OD(甲醇-d_4),Cit(L-瓜氨酸),DCM(二氯甲烷),DIEA(N,N-二异丙基乙胺),DMF(N,N-二甲基甲酰胺),EDC(N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐),EEDQ(2-乙氧基-1-乙氧基羰基-1,2-二氢喹啉),EtOAc(乙酸乙酯),Fmoc(9-芴基甲氧基羰基),HATU(1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶-3-氧化六氟磷酸盐),HCl(盐酸水溶液),HOAc(冰醋酸),HOAT(1-羟基-7-氮杂苯并三唑),HPLC(高效液相色谱),LCMS(串联HPLC和质谱),Mal(马来酰亚胺),MeCN(乙腈),MeOH(甲醇),MS(低分辨率质谱),$NaHCO_3$(碳酸氢钠),Na_2SO_4(无水硫酸钠),NH_4Cl(氯化铵),NHS(N-羟基琥珀酰亚胺),NMR(核磁共振光谱),OSu(琥珀酸酯),TEA(三乙胺),TFA(三氟乙酸),THF(四氢呋喃),TLC(薄层色谱),Val(L-缬氨酸),$ZnCl_2$(氯化锌)。

实施例1

[0437] 实施例1涉及图.9中所示的化合物

美登素-3-O-氨基甲酰基-N-苯基-p-(氨基-L-瓜氨酸-L-缬氨酸-己酰基-马来酰亚胺)(Maytan-3-O-carbamoyl-N-phenyl-p-(amino-Cit-Val-Cap-Mal))(9)

步骤A:L-缬氨酸-L-瓜氨酸(2):

[0438] 向配备有磁力搅拌器和氮气入口的50mL圆底烧瓶中加入Boc-L-缬氨酸-L-瓜氨酸(1,0.5g;1.3mmol)、乙腈(10mL)和水(10mL)。加入1M HCl水溶液(13mL;13mmol),将所得溶液在环境温度下搅拌18小时(h)。将溶液冷冻并冻干成白色固体。所得固体用10%MeOH的DCM溶液萃取,有机层用Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩,得到标题化合物为无色透明油状物(0.4g,98%收率)。MS(ESI,pos.&neg.):计算值$C_{11}H_{22}N_4O_4$,274.2;实测值275.2(M+H),273.2(M-H)。

步骤B:6-马来酰亚胺基-己酰胺基((caproamidyl))-L-缬氨酸-L-瓜氨酸(4):

[0439] 向配备有磁力搅拌器和氮气入口的25mL圆底烧瓶中加入L-缬氨酸-L-瓜氨酸(2,0.4g;1.3mmol)、6-马来酰亚胺基-己酸琥珀酸酯(3,0.6g;2.0mmol)的DMF(3mL)溶液,然后加入DIEA(0.4mL;2.0mmol)。将所得溶液在环境温度下搅拌18小时,用水(2mL)稀释并上样到C18柱上,用5-95%MeCN的水溶液(含有0.05%HOAc)洗脱。合并含有产物的级分,冷冻并冻干,得到标题化合物为白色固体(0.3g,47%收率)。MS(ESI,pos.&neg.):计算值$C_{21}H_{33}N_5O_7$,467.2;实测值468.4(M+H),466.4(M-H)。

步骤C:美登素(Maytan)-3-O-氨基甲酰基-N-(4-硝基苯)(7):

[0440] 向干燥的圆底烧瓶中称取美登醇(6)(如本领域先前所述制备得到,114mg,0.202mmol)和对硝基苯基异氰酸酯(5,73mg,0.445mmol)。将混合物溶于无水DCM(10mL)中,并用1.0M氯化锌的乙醚溶液(0.50mL,0.50mmol)逐滴处理。用橡胶隔膜密封烧瓶,通过针注入氩气排气,并将反应在环境温度下搅拌18小时。LCMS显示美登醇完全转化。将反应物用水稀释并用EtOAc萃取三次。将合并的有机层用饱和的($NaHCO_3$)水溶液和盐水洗,然后用

Na_2SO_4干燥并过滤。蒸发的产物不太溶于MeCN/水，因此将其再次真空浓缩至干，溶于EtOAc/DCM中，并用Na_2SO_4过滤。然后将滤液通过硅胶快速柱层析纯化(梯度洗脱:50-100％EtOAc的己烷溶液)，合并含有产物的级分，浓缩，真空干燥，得到标题化合物为黄色固体(50mg，34％)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{35}H_{41}N_4O_{11}Cl$,728.3;实测值729.2(M+H)。

步骤D:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(4-氨基苯)(8):

[0441] 向圆底烧瓶中称取前一步骤的产物(7，49mg，0.067mmol)和锌尘(85mg，1.30mmol)，并用THF(4mL)、水(1mL)、和HOAc(0.100mL,1.75mmol)处理。用橡胶隔膜密封烧瓶，并用氩气排气，将反应在环境温度下搅拌18小时。反应物通过硅藻土过滤，用乙腈(MeCN,3×5mL)冲洗固体，滤液真空浓缩，得到琥珀色油状物。将其直接在C18 Aq RediSep金色(Gold)柱上通过ISCO纯化(梯度洗脱:20-80％MeCN的水溶液，0.05％乙酸的乙腈溶液和0.05％乙酸的水溶液，洗脱12分钟)。合并含有产物的级分，部分真空浓缩，在干冰上冷冻，冻干3天，得到标题化合物为奶油色固体(32mg，63％)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{35}H_{43}N_4O_9Cl$,698.3;实测值699.2(M+H)。

步骤E:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-苯基-p-(氨基-L-瓜氨酸-L-缬氨酸-己酰基-马来酰亚胺)(9):

[0442] 向圆底烧瓶中称取前一步骤的产物(8,16mg,0.021mmol)、6-马来酰亚胺基-己酰胺基-L-缬氨酸-L-瓜氨酸(4,16mg,0.034mmol)和EEDQ(15mg,0.061mmol)，并溶于干燥DCM(2mL)和无水甲醇(1mL)中。用橡胶隔膜密封烧瓶，并用氩气排气，将反应在环境温度下搅拌18小时。反应物减压浓缩，然后溶于MeCN/水，并直接在C18 Aq RediSep金色柱上通过ISCO(梯度洗脱:20-80％MeCN的水溶液，0.05％乙酸的乙腈溶液和0.05％乙酸的水溶液，洗脱12分钟)纯化。产物并不能很好地分离，因此将不纯的产物级分冻干并通过制备型HPLC在Phenomenex Gemini 5u,30x150mm C18柱(首先40-80％然后20-80％MeCN的水溶液，0.1％HOAc，洗脱20分钟，30mL/min)上再次纯化两次。合并含有产物的级分，部分真空浓缩，在干冰上冷冻，冻干过夜，得到标题化合物为白色固体(5mg，21％)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{56}H_{74}N_9O_{15}Cl$,1147.5;实测值1148.5(M+H)，1130.4(M-H_2O+H)，1170.5(M+Na)。^1H NMR(500MHz,甲醇-d_4)δ:7.48-7.42(m,2H)，7.40(t,J＝8.3Hz,2H)，7.07(s,1H)，7.02(d,J＝1.8Hz,1H)，6.69(d,J＝4.7Hz,1H)，6.49(dd,J＝15.4,11.1Hz,1H)，6.14(d,J＝8.9Hz,1H)，5.33(dd,J＝15.4,8.7Hz,1H)，4.47(dd,J＝11.9,2.9Hz,1H)，4.40(dd,J＝8.9,5.2Hz,1H)，4.25-4.14(m,1H)，4.07(dd,J＝12.0,7.6Hz,1H)，3.88(s,3H)，3.50(d,J＝12.7Hz,1H)，3.43(d,J＝8.9Hz,1H)，3.38(t,J＝7.1Hz,2H)，3.18-3.13(m,2H)，3.11(s,4H)，3.09-2.97(m,2H)，2.90(dd,J＝9.8,3.7Hz,1H)，2.58-2.47(m,1H)，2.18(t,J＝7.5Hz,2H)，2.14-2.04(m,2H)，2.00-1.92(m,1H)，1.87(d,J＝4.9Hz,1H)，1.80(dd,J＝10.0,4.8Hz,1H)，1.67(dd,J＝13.7,2.1Hz,2H)，1.63(s,4H)，1.59-1.41(m,8H)，1.41-1.33(m,2H)，1.25-1.17(m,4H)，1.17-1.09(m,4H)，1.04(d,J＝6.5Hz,1H)，0.94(dd,J＝11.7,6.7Hz,1H)，0.87(dt,J＝7.9,4.0Hz,6H)，0.77(s,3H)。

实施例2

[0443] 实施例2涉及图.10中所示的化合物

美登素-3-O-氨基甲酰基-N-苯基-p-氨基-己二酸琥珀酸酯(10)

步骤A:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-苯基-p-氨基-己二酸:

[0444] 向圆底烧瓶中称取实施例1步骤D的产物(8,20mg,0.0263mmol)和己二酸酐(a.k.a-氧杂环庚烷-2,7-二酮,20mg,0.156mmol),溶解于THF(2.0mL)中,然后用三乙胺(0.010mL,0.0717mmol)处理。固体不溶解,因此加入DMF(1.0mL),用橡胶隔膜密封烧瓶,并用氩气排气,在环境温度下搅拌反应。18小时后,LCMS显示化合物2已完全转化,因此将反应物真空浓缩成油状物,所得油状物溶于MeCN/水中,并在C18 Aq RediSep金色柱上通过ISCO(梯度洗脱:20-80%MeCN的水溶液,0.05%乙酸的乙腈溶液和0.05%乙酸的水溶液)纯化。合并含有产物的级分,部分真空浓缩,在干冰上冷冻,并冻干18小时,得到标题化合物为白色固体(19mg,86%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{41}H_{51}ClN_4O_{12}$,826.3;实测值827.3(M+H),849.3(M+Na)。

步骤B:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-苯基-p-氨基-己二酸琥珀酸酯(10):

[0445] 向圆底烧瓶中称取前一步骤的产物(18mg,0.0218mmol)、N-羟基琥珀酰亚胺(19mg,0.165mmol)和EDC盐酸盐(34mg,0.177mmol),并溶解在DCM(3mL)中,用橡胶隔膜密封烧瓶,并用氩气排气,在环境温度下搅拌反应。20小时后,将反应物真空浓缩,所得残余物溶于MeCN中,用几滴10%乙酸水溶液处理,并在C18 Aq RediSep金色柱上通过ISCO(梯度洗脱:30-90%MeCN的水溶液,0.05%乙酸的乙腈溶液和0.05%乙酸的水溶液)进行纯化。合并含有产物的级分,部分真空浓缩,在干冰上冷冻,并冻干18小时,得到标题化合物为白色固体(10mg,50%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{45}H_{54}N_5O_{14}Cl$,923.3;实测值924.3(M+H),946.3(M+Na)。^1H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ:7.62(s,1H),7.54(d,2H,J=9Hz),7.39(d,2H,J=9Hz),6.84(d,1H,J=2Hz),6.69(d,1H,J=2Hz),6.58(s,1H),6.47(dd,1H,J=16Hz,11Hz),6.18(s,1H),6.10(d,1H,J=11Hz),5.37(dd,1H,J=16Hz,9Hz),4.81(dd,1H,J=12Hz,2Hz),4.32(t,1H,J=10Hz),4.00(s,3H),3.50(d,1H,J=14Hz),3.47(d,1H,J=9Hz),3.31(s,3H),3.27(d,1H,J=13Hz),3.20(s,3H),2.89(m,6H),2.68(m,2H),2.51(dd,1H,J=14Hz,12Hz),2.43(m,2H),2.26(dd,1H,J=14Hz,2Hz),1.89(m,5H),1.71(s,3H),1.29(m,5H),0.91(s,3H)。

实施例3

实施例3涉及图.11中所示的化合物

美登素-3-O-氨基甲酰基-N-苯基-p-氨基-L-瓜氨酸-L-缬氨酸-己二酸琥珀酸酯(14):

步骤A:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-苯基-p-氨基-L-瓜氨酸-L-缬氨酸-Fmoc(12):

[0446] 通过实施例1、步骤E的方法偶联实施例1、步骤D的产物(8,54mg,0.071mmol)和Fmoc-L-缬氨酸-L-瓜氨酸(11,151mg,0.304mmol),得到标题化合物为白色固体(51mg,61%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{61}H_{73}ClN_8O_{14}$,1176.5;实测值1178.1(M+H),1200.1(M+Na)。

步骤B:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-苯基-p-氨基-L-瓜氨酸-L-缬氨酸(13):

[0447] 将前一步骤的产物(12,49mg,0.042mmol)溶于5%v/v的哌啶的DMF(2.0mL)溶液中,所得混合物在环境温度下搅拌反应。20小时后,反应物用几滴10%乙酸水溶液酸化,用MeCN和水(各约1mL)稀释,并在C18 Aq RediSep金色(Gold)柱上通过ISCO(梯度洗脱:20-80%MeCN的水溶液,0.05%乙酸的乙腈溶液和0.05%乙酸的水溶液)纯化。合并含有产物的级分,部分真空浓缩,并在干冰上冷冻,冻干18小时,得到标题化合物为奶油色固体(34mg,81%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{46}H_{63}ClN_8O_{12}$,954.5;实测值955.9(M+H),977.9(M+Na)。

步骤C:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-苯基-p-氨基-L-瓜氨酸-L-缬氨酸-己二酸:

[0448] 向圆底烧瓶中称取前一步骤的产物(13,49mg,0.042mmol)和己二酸酐(a.k.a-氧杂环庚烷-2,7-二酮,20mg,0.156mmol),并溶解在吡啶(2mL)中,用橡胶隔膜密封烧瓶,并用氩气排气,在环境温度下搅拌反应。18小时后,将反应混合物在高真空下浓缩至干,用几滴10%乙酸水溶液酸化,并溶于MeCN中,后在C18 Aq RediSep金色柱上通过ISCO(梯度洗脱:20-80%MeCN的水溶液,0.05%乙酸的乙腈溶液和0.05%乙酸的水溶液)进行纯化。合并含有产物的级分,部分真空浓缩,并在干冰上冷冻,冻干3天,得到标题化合物为白色固体(14mg,40%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{52}H_{71}ClN_8O_{15}$,1082.5;实测值1084.0(M+H),1106.1(M+Na)。

步骤D:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-苯基-p-氨基-L-瓜氨酸-L-缬氨酸-己二酸琥珀酸酯(14):

[0449] 使用实施例2、步骤B的方法,由前一步骤的产物(13mg,0.012mmol)制备得到标题化合物为白色固体(7mg,50%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{56}H_{74}ClN_9O_{17}$,1179.5;实测值1182.1(M+H),1203.2(M+Na)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ:9.91(s,1H),8.48(s,1H),8.08(d,J=7.6Hz,1H),7.84(d,J=8.6Hz,1H),7.54(d,J=8.8Hz,2H),7.44(d,J=8.5Hz,2H),7.26(s,1H),7.19(s,1H),6.77(s,1H),6.59-6.46(m,1H),6.36(s,1H),5.98(s,1H),5.53(s,1H),5.40(s,2H),5.30(dd,J=15.1,9.1Hz,1H),4.44-4.31(m,2H),4.27-4.18(m,1H),4.14(t,J=11.2Hz,1H),3.94(s,3H),3.63(d,J=12.0Hz,1H),3.42(d,J=9.1Hz,1H),3.18(s,4H),3.10(s,3H),3.06-2.98(m,1H),2.98-2.91(m,1H),2.89(d,J=9.7Hz,1H),2.81(s,4H),2.73-2.65(m,2H),2.30-2.22(m,1H),2.21-2.14(m,1H),2.06(d,J=13.2Hz,1H),1.97(dd,J=12.5,5.6Hz,1H),1.66(s,3H),1.60(d,J=5.5Hz,5H),1.53-1.30(m,6H),1.23(s,1H),1.11(d,J=6.3Hz,3H),0.85(dd,J=15.2,6.7Hz,6H),0.75(s,3H)。

实施例4

[0450] 实施例4涉及图.12中所示的化合物。

美登素-3-O-氨基甲酰基-N-苯基-2-氯-4-(氨基-L-瓜氨酸-L-缬氨酸-己酰基-马来酰亚胺)(19)

步骤A:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(2-氯-4-硝基)苯(16):

[0451] 向干燥的圆底烧瓶中称取2-氯-4-硝基苯基异氰酸酯(15,525mg,2.64mmol)和美登醇(6,503mg,0.890mmol)。将混合物溶于干燥DCM(10mL)中,并用1.0M氯化锌的乙醚溶液(1.20mL,1.20mmol)逐滴处理。用橡胶隔膜密封烧瓶,并通过针通入氩气排气,在环境温度下搅拌反应。18小时后,通过LCMS检测反应不完全,因此将烧瓶用水冷凝器加盖,并将反应加热至50℃。6小时后,通过LCMS检测已消耗大部分美登醇,因此将反应冷却至环境温度并搅拌过夜。再过18小时后,将反应物真空浓缩,所得残余物溶于MeCN/DCM中,并通过硅胶快速柱层析纯化(梯度洗脱:10-50%MeCN的DCM溶液)。将缓慢运行的产物级分合并,浓缩,真空干燥3天,得到标题化合物为橙色固体(396mg,58%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{35}H_{40}Cl_2N_4O_{11}$,762.2;实测值763.1(M+H)。

步骤B:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(2-氯-4-氨基)苯(17):

[0452] 采用实施例1、步骤D的方法,不同之处在于使用MeCN代替THF,并将反应物搅拌仅2小时,由前一步骤的产物(16,388mg,0.509mmol)制备得到标题化合物为白色固体(301mg,

75%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{35}H_{42}Cl_2N_4O_9$,732.2;实测值733.1(M+H)。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ:7.83(d,J=8.8Hz,1H),6.85(s,2H),6.79(s,1H),6.74(d,J=2.6Hz,1H),6.60(dd,J=8.8,2.6Hz,1H),6.42(dd,J=15.4,11.0Hz,1H),6.30(d,J=10.8Hz,1H),6.20-6.13(m,1H),5.23(dd,J=15.3,9.0Hz,1H),4.80(dd,J=11.8,2.5Hz,1H),4.37(ddd,J=12.4,10.5,2.0Hz,1H),4.00(s,3H),3.56(d,J=13.0Hz,1H),3.43(d,J=9.0Hz,1H),3.26(s,4H),3.20(s,3H),3.04(d,J=9.8Hz,1H),2.85-2.73(m,1H),2.49(dd,J=13.7,11.8Hz,1H),2.23(dd,J=13.7,2.5Hz,1H),1.78(d,J=13.5Hz,1H),1.69(s,3H),1.54-1.43(m,2H),1.31(d,J=6.4Hz,3H),1.23(t,J=12.6Hz,1H),0.88(s,3H)。

步骤C:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-2-氯-4-(氨基苯基-L-瓜氨酸-L-缬氨酸-Fmoc):

[0453] 采用实施例3、步骤A的方法,由前一步骤的产物(17,150mg,0.189mmol)制备得到标题化合物为白色固体(174mg,76%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{61}H_{72}Cl_2N_8O_{14}$,1210.5;实测值1213.2(M+H),1235.3(M+Na)。

步骤D:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-2-氯-4-(氨基苯基-L-瓜氨酸-L-缬氨酸)(18):

[0454] 使用实施例3、步骤B的方法,由前一步骤的产物(172mg,0.142mmol)制备得到标题化合物为白色固体(51mg,34%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{46}H_{62}Cl_2N_8O_{12}$,988.4;实测值989.3(M+H),1011.3(M+Na)。

步骤E:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-苯基-2-氯-4-(氨基-L-瓜氨酸-L-缬氨酸-己酰基-马来酰亚胺)(19):

[0455] 将前一步骤的产物(18,14mg,0.013mmol)和6-马来酰亚胺基-己酸琥珀酸酯(3,20mg,0.065mmol)溶于MeCN(2.0mL)和水(0.5mL)中。用一滴饱和$NaHCO_3$水溶液处理,并用橡胶隔膜密封烧瓶,用氩气排气,然后在环境温度下搅拌反应。20小时后,将反应物用几滴10%乙酸水溶液酸化,溶于MeCN(约2mL)中,并在C18 Aq RediSep金色柱上通过ISCO(梯度洗脱:30-90%MeCN的水溶液,0.05%乙酸的乙腈溶液和0.05%乙酸的水溶液)进行纯化。合并含有产物的级分,部分真空浓缩,并在干冰上冷冻,冻干4天,得到标题化合物为白色固体(10mg,63%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{56}H_{73}Cl_2N_9O_{15}$,1181.5;实测值1183.1(M+H),1204.1(M+Na)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ:10.16(s,1H),8.14(d,J=7.3Hz,1H),7.93(dd,J=15.2,2.3Hz,1H),7.81(d,J=9.1Hz,2H),7.71-7.59(m,1H),7.46(dd,J=8.8,2.4Hz,1H),7.21(d,J=1.7Hz,1H),7.07(s,1H),6.99(d,J=11.8Hz,2H),6.90(d,J=8.2Hz,1H),6.57(dd,J=15.1,11.2Hz,1H),6.45(d,J=10.6Hz,1H),5.98(d,J=6.2Hz,1H),5.91-5.84(m,1H),5.47-5.34(m,3H),4.45(dd,J=12.0,2.6Hz,1H),4.40-4.29(m,1H),4.19(dd,J=8.6,6.8Hz,1H),4.13(t,J=11.1Hz,1H),3.94(s,3H),3.57(d,J=12.4Hz,1H),3.48(d,J=9.1Hz,1H),3.21(d,J=3.7Hz,4H),3.07(s,3H),3.05-2.98(m,1H),2.98-2.88(m,1H),2.78(d,J=9.8Hz,1H),2.43(t,J=13.1Hz,1H),2.24-2.05(m,2H),2.01(d,J=13.8Hz,1H),1.98-1.91(m,1H),1.69(d,J=7.9Hz,1H),1.65(s,3H),1.61(dd,J=9.2,4.9Hz,1H),1.54-1.40(m,8H),1.40-1.30(m,1H),1.19(td,J=15.8,14.8,8.2Hz,3H),1.11(d,J=6.4Hz,3H),0.88(d,J=6.7Hz,1H),0.84(dd,J=17.0,6.8Hz,6H),0.81(s,2H)。

实施例5

[0456] 实施例5涉及图.13中所示的化合物。

美登素-3-O-氨基甲酰基-N-苯基-2-氯-4-(氨基-L-瓜氨酸-L-缬氨酸-己二酸琥珀酸酯)(20):

步骤A:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-苯基-2-氯-4-(氨基-L-瓜氨酸-L-缬氨酸-己二酸):

[0457] 使用实施例3、步骤C的方法,由实施例4、步骤D的产物(18,19mg,0.018mmol)制备得到标题化合物为白色固体(11mg,55%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{52}H_{70}Cl_2N_8O_{15}$,1116.4;实测值1119.2(M+H),1139.2(M+Na)。

步骤B:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-苯基-2-氯-4-(氨基-L-瓜氨酸-L-缬氨酸-己二酸琥珀酸酯)(20):

[0458] 使用实施例2、步骤B的方法,由前一步骤的产物(11mg,0.010mmol)制备得到标题化合物为白色固体(4mg,33%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{56}H_{73}Cl_2N_9O_{17}$,1213.5;实测值1216.2(M+H),1236.3(M+Na)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ:10.16(s,1H),8.16(d,J=7.3Hz,1H),7.91(d,J=2.4Hz,1H),7.84(d,J=8.7Hz,1H),7.78(s,1H),7.65(d,J=8.7Hz,1H),7.45(dd,J=8.7,2.4Hz,1H),7.21(d,J=1.8Hz,1H),7.06(s,1H),6.88(s,1H),6.64-6.50(m,1H),6.44(d,J=11.0Hz,1H),5.97(d,J=6.2Hz,1H),5.87(d,J=1.3Hz,1H),5.41(q,J=7.6,6.4Hz,3H),4.50-4.39(m,1H),4.34(d,J=7.0Hz,1H),4.28-4.17(m,1H),4.13(t,J=11.6Hz,1H),3.94(s,3H),3.56(d,J=13.9Hz,1H),3.52-3.42(m,1H),3.21(s,3H),3.07(s,3H),3.03(dt,J=13.1,6.7Hz,2H),2.98-2.90(m,2H),2.82-2.74(m,5H),2.69-2.64(m,2H),2.24(d,J=9.9Hz,1H),2.21-2.13(m,1H),2.00(d,J=13.3Hz,1H),1.98-1.93(m,1H),1.64(s,3H),1.60(d,J=6.5Hz,5H),1.51(d,J=13.1Hz,1H),1.47-1.40(m,3H),1.39(d,J=6.5Hz,1H),1.11(d,J=6.4Hz,3H),0.85(dd,J=16.2,6.8Hz,6H),0.80(s,3H)。

实施例6

[0459] 实施例6涉及图.14中所示的化合物。

美登素-3-O-氨基甲酰基-N-苯基-2-氯-4-(氨基-L-瓜氨酸-L-缬氨酸-6-氨基己酸)(22):

步骤A:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-苯基-2-氯-4-(氨基-L-瓜氨酸-L-缬氨酸-6-氨基己酸-Fmoc):

[0460] 通过实施例4、步骤E的方法,使实施例4、步骤D的产物(18,40mg,0.040mmol)和Fmoc-6-氨基己酸琥珀酸酯(21,92mg,0.204mmol)进行偶联,得到标题化合物为白色固体(31mg,57%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{67}H_{83}Cl_2N_9O_{15}$,1323.5;实测值1326.5(M+H),1346.6(M+Na)。

步骤B:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-2-氯-4-(氨基苯基-L-瓜氨酸-L-缬氨酸-6-氨基己酸)(22):

[0461] 使用实施例3、步骤B的方法,由前一步骤的产物(30mg,0.023mmol)制备得到标题化合物,由制备型HPLC在Phenomenex Gemini 5u,30x150mm C18柱(10-90%MeCN的水溶液,0.05%HOAc,22分钟,40mL/min)上再纯化后,为白色固体(9mg,35%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{52}H_{73}Cl_2N_9O_{13}$,1101.5;实测值1102.8(M+H)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ:7.93-7.85(m,1H),7.65(d,J=8.7Hz,1H),7.49(d,J=10.2Hz,1H),7.21(d,J=1.8Hz,1H),7.06(s,1H),

6.57(dd,J＝15.1,11.1Hz,1H),6.44(d,J＝11.2Hz,1H),6.05(s,1H),5.50-5.32(m,2H),4.49-4.39(m,1H),4.34(s,1H),4.23-4.06(m,1H),3.94(s,2H),3.21(s,3H),3.07(s,3H),3.03-2.92(m,3H),2.78(d,J＝9.8Hz,1H),2.41(d,J＝12.7Hz,1H),2.30-2.23(m,1H),2.18(q,J＝6.7Hz,2H),2.05-1.93(m,3H),1.81(s,2H),1.75-1.67(m,1H),1.65(s,3H),1.54-1.41(m,7H),1.41-1.32(m,4H),1.30-1.17(m,5H),1.11(d,J＝6.3Hz,3H),0.85(dd,J＝11.5,6.7Hz,6H),0.80(s,2H)。

实施例7

[0462] 实施例7涉及图.15中所示的化合物。

美登素-3-O-氨基甲酰基-N-苯基-2-氯-4-(氨基-己酰基-马来酰亚胺)(24):

[0463] 通过实施例1、步骤E的方法,使实施例4、步骤B的产物(17,20mg,0.025mmol)和6-马来酰亚胺基-己酸(23,28mg,0.133mmol)进行偶联,所得产物在第二次ISCO纯化后,得到标题化合物为白色固体(21mg,91%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{45}H_{53}Cl_2N_5O_{12}$,925.3;实测值926.2(M+H),948.2(M+Na)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ:9.96(s,1H),7.90(d,J＝2.4Hz,1H),7.65(d,J＝8.8Hz,1H),7.60(s,1H),7.43(dd,J＝8.8,2.4Hz,1H),7.21(d,J＝1.8Hz,1H),7.04(d,J＝1.8Hz,1H),6.98(s,2H),6.72(s,1H),6.58(dd,J＝15.2,11.1Hz,1H),6.42(d,J＝11.0Hz,1H),5.75(s,1H),5.43(dd,J＝15.3,9.1Hz,1H),4.51(dd,J＝11.9,2.6Hz,1H),4.18(ddd,J＝12.4,10.4,2.3Hz,1H),3.96(s,3H),3.57(d,J＝12.4Hz,1H),3.50(d,J＝9.1Hz,1H),3.42(t,J＝7.0Hz,2H),3.09(s,4H),2.79(d,J＝9.8Hz,1H),2.45(dd,J＝13.8,11.9Hz,1H),2.31(t,J＝7.4Hz,2H),2.09-1.98(m,1H),1.88(s,1H),1.67(s,3H),1.65-1.57(m,2H),1.55(q,J＝7.2Hz,3H),1.46(d,J＝12.7Hz,2H),1.34-1.21(m,2H),1.14(d,J＝6.3Hz,3H),0.83(s,3H)。

实施例8

[0464] 实施例8涉及图.16中所示的化合物。

美登素-3-O-氨基甲酰基-N-苯基-2-氯-4-(氨基-己二酸琥珀酸酯)(26):

步骤A:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-苯基-2-氯-4-(氨基-己二酸):

[0465] 通过实施例1、步骤E的方法,使实施例4、步骤B的产物(17,17mg,0.021mmol)和己二酸(25,18mg,0.123mmol)进行偶联,得到标题化合物为白色固体(11mg,59%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{41}H_{50}Cl_2N_4O_{12}$,860.3;实测值861(M+H),883(M+Na)。

步骤B:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-苯基-2-氯-4-(氨基-己二酸琥珀酸酯)(26):

[0466] 使用实施例2、步骤B的方法,由前一步骤的产物(10mg,0.012mmol)制备得到标题化合物为白色固体(11mg,100%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{45}H_{53}Cl_2N_5O_{14}$,957.3;实测值958.0(M+H),980.0(M+Na)。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ:8.18(d,J＝2.4Hz,1H),8.06(d,J＝8.9Hz,1H),7.78(s,1H),7.08-6.93(m,2H),6.85(d,J＝1.8Hz,1H),6.81(d,J＝1.8Hz,1H),6.40(dd,J＝15.0,10.9Hz,1H),6.33(d,J＝11.0Hz,1H),6.14(d,J＝1.4Hz,1H),6.04(s,1H),5.19(dd,J＝15.1,9.0Hz,1H),4.81(dd,J＝11.8,2.6Hz,1H),4.39-4.28(m,1H),4.00(s,3H),3.74-3.65(m,3H),3.55(d,J＝13.0Hz,1H),3.41(d,J＝8.8Hz,1H),3.28-3.21(m,4H),3.19(s,3H),3.05(d,J＝9.8Hz,1H),2.93-2.87(m,6H),2.86(s,6H),2.82(d,J＝5.4Hz,8H),2.68(d,J＝6.9Hz,2H),2.51(dd,J＝13.9,11.9Hz,1H),2.42(t,J＝7.2Hz,2H),2.23(dd,J＝13.8,2.6Hz,1H),1.88(d,J＝5.4Hz,5H),1.74(d,J＝13.7Hz,1H),1.69(s,3H),

1.52(s,1H),1.30(d,J＝6.4Hz,3H),1.25-1.18(m,1H),0.87(s,3H)。

实施例9

[0467] 实施例9-25涉及图.17中所示的化合物,其是制备有效负载30a-q的一般合成方案。

美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(3-氯-4-氨基)苯(30a)

步骤A:1-异氰酸基-3-氯-4-硝基苯(28a):

[0468] 按照Cai等人的方法(Org.Lett.2012,14,3332-35),将三光气(301mg,1.01mmol)溶解在2mL无水EtOAc中,并在Ar气氛下将反应冷却至0℃。在20分钟内逐滴加入Et_3N(15μL,0.11mmol)和3-氯-4-硝基苯胺(27a,173mg,1.00mmol)的3mL干燥EtOA溶液。将反应烧瓶温热至环境温度并搅拌1小时,然后用水冷凝器加盖并加热至80℃保持18小时。真空蒸发溶剂,所得残余物用Et_2O/己烷1:1(3×10mL)在烧结过滤器上清洗。蒸发滤液并真空干燥,得到标题化合物为黄色固体(177mg,89%)。^1H NMR(300MHz,$CDCl_3$)δ:7.29(d,J＝2.3Hz,1H),7.14(d,J＝2.3Hz,1H),7.11(d,J＝2.3Hz,1H)。

步骤B:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(3-氯-4-硝基)苯(29a):

[0469] 使用实施例1、步骤C的方法,由前一步骤的产物(28a,87mg,0.438mmol)和美登醇(6,103mg,0.182mmol)制备得到标题化合物为淡黄色固体(78mg,56%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{35}H_{40}Cl_2N_4O_{11}$,762.2;实测值763.1(M+H)。

步骤C:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(3-氯-4-氨基)苯(30a):

[0470] 使用实施例4、步骤B的方法,由前一步骤的产物(29a,77mg,0.101mmol)制备得到标题化合物为白色固体(59mg,74%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{35}H_{42}Cl_2N_4O_9$,732.2;实测值733.1(M+H)。^1H NMR(500MHz,氯仿-d)δ:7.43(s,1H),7.13(d,J＝8.4Hz,1H),6.83(d,J＝1.8Hz,1H),6.76(s,1H),6.70(s,1H),6.46(dd,J＝15.4,11.1Hz,2H),6.22(s,1H),6.07(d,J＝10.9Hz,1H),5.38(dd,J＝15.4,8.7Hz,1H),4.78(d,J＝11.5Hz,1H),4.34(t,J＝11.5Hz,1H),3.99(s,3H),3.98(s,1H),3.53-3.44(m,2H),3.32(s,3H),3.26(d,J＝14.5Hz,1H),3.21(s,3H),2.98(s,1H),2.90(d,J＝9.1Hz,1H),2.50(t,J＝12.8Hz,1H),2.26(d,J＝13.9Hz,1H),1.87(d,J＝13.6Hz,1H),1.70(s,3H),1.50(dd,J＝10.8,4.4Hz,2H),1.30(d,J＝6.3Hz,3H),1.24(t,J＝12.7Hz,1H),0.90(s,3H)。

实施例10

美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(4-氯-2-氨基)苯(30b)

步骤A:1-异氰酸基-4-氯-2-硝基苯(28b):

[0471] 使用实施例9、步骤A的方法,由4-氯-2-硝基苯胺(27b,172mg,0.997mmol)制备得到标题化合物为黄色固体(198mg,100%)。^1H NMR(300MHz,氯仿-d)δ:8.14(d,J＝2.5Hz,1H),7.57(dd,J＝8.6,2.5Hz,1H),7.21(d,J＝8.6Hz,1H)。

步骤B:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(4-氯-2-硝基)苯(29b):

[0472] 使用实施例4、步骤A的方法,由前一步骤所得产物(28b,98mg,0.493mmol)和美登醇(6,54mg,0.096mmol)制备得到标题化合物为橙色固体(46mg,63%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{35}H_{40}Cl_2N_4O_{11}$,762.2;实测值763.5(M+H)。

步骤C:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(4-氯-2-氨基)苯(30b):

[0473] 使用实施例4、步骤B的方法,由前一步骤的产物(29b,44mg,0.058mmol)制备得到

标题化合物为白色固体(34mg,74%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{35}H_{42}Cl_2N_4O_9$,732.2;实测值733.5(M+H)。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ:7.43(s,1H),7.13(d,J=8.4Hz,1H),6.83(d,J=1.8Hz,1H),6.76(s,1H),6.70(s,1H),6.46(dd,J=15.4,11.1Hz,2H),6.22(s,1H),6.07(d,J=10.9Hz,1H),5.38(dd,J=15.4,8.7Hz,1H),4.78(d,J=11.5Hz,1H),4.34(t,J=11.5Hz,1H),3.99(s,3H),3.98(s,1H),3.54-3.44(m,2H),3.32(s,3H),3.26(d,J=14.5Hz,1H),3.21(s,3H),2.98(s,1H),2.90(d,J=9.1Hz,1H),2.50(t,J=12.8Hz,1H),2.26(d,J=13.9Hz,1H),1.87(d,J=13.6Hz,1H),1.70(s,3H),1.50(dd,J=10.8,4.4Hz,2H),1.30(d,J=6.3Hz,3H),1.24(t,J=12.7Hz,1H),0.90(s,3H)。

实施例11

美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(2-甲基-4-氨基)苯(30c)

步骤A:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(2-甲基-4-硝基)苯(29c):

[0474] 使用实施例4、步骤A的方法,由2-甲基-4-硝基苯基异氰酸酯(28c,41mg,0.230mmol)和美登醇(6,53mg,0.094mmol)制备得到标题化合物为黄色固体(10mg,14%),不同的是通过Teledyne ISCO纯化系统(梯度洗脱:20-80%MeCN的水溶液,0.05%乙酸的乙腈溶液和0.05%乙酸的水溶液)在C18 Aq RediSep金色柱上进行纯化。MS(ESI,pos.):计算值$C_{36}H_{43}ClN_4O_{11}$,742.3;实测值743.2(M+H)。

步骤B:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(2-甲基-4-氨基)苯(30c):

[0475] 使用实施例4、步骤B的方法,由前一步骤的产物(29c,10mg,0.014mmol)制备得到标题化合物为奶油色固体(6mg,60%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{35}H_{42}Cl_2N_4O_9$,712.3;实测值713.2(M+H)。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ:7.33-7.30(m,1H),6.84(d,J=1.8Hz,1H),6.79(s,1H),6.55(d,J=2.6Hz,1H),6.52(dd,J=8.4,2.7Hz,1H),6.47(dd,J=15.5,10.9Hz,1H),6.24(s,1H),6.22-6.15(m,1H),6.10(d,J=10.9Hz,1H),5.46(dd,J=15.5,8.9Hz,1H),4.80(dd,J=11.7,2.4Hz,1H),4.42-4.29(m,1H),4.00(s,3H),3.53-3.41(m,2H),3.32(s,3H),3.24(d,J=13.0Hz,1H),3.19(s,3H),3.14(s,1H),2.89(d,J=9.8Hz,1H),2.49(dd,J=13.7,11.7Hz,1H),2.25(s,3H),2.22(d,J=2.4Hz,1H),1.94(d,J=13.6Hz,1H),1.70(s,3H),1.51-1.45(m,1H),1.34-1.21(m,5H),0.91(s,3H)。

实施例12

美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(2-甲基-3-氨基)苯(30d)

步骤A:1-异氰酸基-2-甲基-3-硝基苯(28d):

[0476] 使用实施例9、步骤A的方法,由2-甲基-3-硝基苯胺(27d,153mg,1.01mmol)制备得到标题化合物为淡黄色固体(178mg,99%)。^{1}H NMR(300MHz,氯仿-d)δ:7.68(dd,J=7.5,1.8Hz,1H),7.43-7.26(m,2H),2.49(s,3H)。

步骤B:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(2-甲基-3-硝基)苯(29d):

[0477] 使用实施例4、步骤A的方法,由前一步骤的产物(28d,70mg,0.393mmol)和美登醇(6,73mg,0.129mmol)制备得到标题化合物为黄色固体(41mg,43%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{36}H_{43}ClN_4O_{11}$,742.3;实测值743.5(M+H)。

步骤C:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(2-甲基-3-氨基)苯(30d):

[0478] 使用实施例4、步骤B的方法,由前一步骤的产物(29d,44mg,0.058mmol)制备得到标题化合物为白色固体(12mg,29%),不同之处在于所得产物必须通过制备型HPLC在

Phenomenex Gemini 5u,30×150mm C18柱(20-80%MeCN的水溶液,0.05%HOAc,洗脱15分钟,50mL/min)上再纯化。MS(ESI,pos.):计算值$C_{36}H_{45}ClN_4O_9$,712.3;实测值713.5(M+H)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ:7.92(s,1H),7.19(d,J=1.9Hz,1H),7.15(s,1H),7.00(s,1H),6.90(s,2H),6.63-6.53(m,1H),6.49(d,J=11.1Hz,1H),5.54(dd,J=15.0,9.1Hz,1H),4.48(dd,J=12.1,2.7Hz,1H),4.13(t,J=11.3Hz,1H),3.94(s,3H),3.58(d,J=12.2Hz,1H),3.25(s,3H),3.16(d,J=12.1Hz,2H),3.09(s,3H),2.73(d,J=9.7Hz,1H),2.45-2.38(m,1H),2.06-1.94(m,5H),1.66(s,3H),1.56(d,J=13.3Hz,1H),1.44(d,J=12.2Hz,2H),1.10(d,J=6.3Hz,3H),0.79(s,3H)。

实施例13

美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(6-甲基-3-氨基)苯(30e)

步骤A:1-异氰酸基-6-甲基-3-硝基苯(28e):

[0479] 使用实施例9、步骤A的方法,由6-甲基-3-硝基苯胺(27e,1.00mmol)制备得到标题化合物为黄色固体(100mg,56%收率)。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ:7.98(d,1H,J=2.5Hz),7.95(dd,1H,J=2.5,8.5Hz),7.36(d,1H,J=8.5Hz)。

步骤B:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(6-甲基-3-硝基)苯(29e):

[0480] 使用实施例1、步骤C的方法,由前一步骤的产物(28e,0.422mmol)和美登醇(6,100mg,0.176mmol)制备得到标题化合物为黄色固体(21mg,16%收率),不同之处在于所得产物通过ISCO(梯度洗脱:20-80%MeCN的水溶液,0.05%乙酸的乙腈溶液和0.05%乙酸的水溶液)在C18 Aq RediSep金色柱上纯化。MS(ESI,pos.):计算值$C_{36}H_{43}ClN_4O_{11}$,742.3;实测值725.2(M+H-H2O),765.2(M+Na)。

步骤C:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(6-甲基-3-氨基)苯(30e):

[0481] 使用实施例4、步骤B的方法,由前一步骤的产物(29e,21mg,0.028mmol)制备得到标题化合物为白色固体(6.0mg,29%收率)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{36}H_{45}ClN_4O_9$,712.3,实测值713.3(M+H),695.3(M+H-H_2O)。^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$):δ7.25-7.22(m,1H),6.96(d,1H,J=7.5Hz),6.84(s,1H),6.77(s,1H),6.45-6.40(m,1H),6.26(s,1H),6.10(d,1H,J=11.0Hz),5.35(dd,1H,J=8.5,11.7Hz),4.77(dd,1H,J=2.5,11.7Hz),4.37(dd,1H,J=10.5,10.5Hz),3.99(s,3H),3.48(d,1H,J=13.5Hz),3.45(d,1H,J=9.0Hz),3.28(s,3H),3.24(d,1H,J=13.5Hz),3.19(s,3H),2.97(d,1H,J=10.0Hz),2.50(dd,1H,J=11.5,11.5Hz),2.28-2.22(m,4H),1.86(d,1H,J=13.5Hz),1.70(s,3H),1.53-1.49(m,1H),1.31(s,3H),1.27-1.22(m,1H),0.89(s,3H)。

实施例14

美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(6-甲基-2-氨基)苯(30f)

步骤A:1-异氰酸基-6-甲基-2-硝基苯(28f):

[0482] 使用实施例9、步骤A的方法,由6-甲基-2-硝基苯胺(27f,1.00mmol)制备得到标题化合物为黄色固体(135mg,76%收率)。^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$):δ7.92(d,1H,J=8.5Hz),7.49(d,1H,J=8.5Hz),7.22(dd,1H,J=8.5,8.5Hz),2.43(s,3H)。

步骤B:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(6-甲基-2-硝基)苯(29f):

[0483] 使用实施例13、步骤B的方法,由前一步骤的产物(28f,0.422mmol)和美登醇(6,100mg,0.176mmol)制备得到标题化合物为黄色固体(33mg,25%收率)。MS(ESI,pos.):计算

值$C_{36}H_{43}ClN_4O_{11}$,742.3;实测值743.2(M+H)。

步骤C:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(6-甲基-2-氨基)苯(30f):

[0484] 使用实施例4、步骤B的方法,由前一步骤的产物(29f,33mg,0.044mmol)制备得到标题化合物为黄色固体(15.0mg,53%收率)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{36}H_{45}ClN_4O_9$,712.3,实测值713.30(M+H)。^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$):δ7.01-6.98(m,1H),6.83(s,1H),6.78(s,1H),6.67-6.62(m,2H),6.50-6.45(m,1H),6.35(bs,1H),6.16(d,1H,J=11.0Hz),5.98(s,1H),5.63(dd,1H,J=8.5,14.7Hz),4.96(d,1H,J=11.5Hz),4.28(dd,1H,J=10.5,10.5Hz),3.98(s,3H),3.50-3.45(m,2H),3.32(s,3H),3.21(d,1H,J=13.5Hz),3.18(s,3H),2.81(d,1H,J=10.0Hz),2.54(dd,1H,J=13.5,13.5Hz),2.25-2.23(m,4H),1.90(d,1H,J=12.5Hz),1.70(s,3H),1.52-1.48(m,1H),1.35-1.27(m,4H),0.92(s,3H)。

实施例15

美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(4-氟-2-氨基)苯(30g)

步骤A:1-异氰酸基-4-氟-2-硝基苯(28g):

[0485] 使用实施例9、步骤A的方法,由4-氟-2-硝基苯胺(27g,1.00mmol)制备得到标题化合物为橙色固体(223mg,81%收率)。^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):δ7.88(dd,1H,J=3.0,7.5Hz),7.33(dd,1H,J=3.0,7.5Hz),7.25(dd,1H,J=4.0,9.0Hz)。

步骤B:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(4-氟-2-硝基)苯(29g):

[0486] 使用实施例13、步骤B的方法,由前一步骤的产物(28g,0.422mmol)和美登醇(6,10mg,0.176mmol)制备得到标题化合物为黄色固体(16mg,12%收率)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{35}H_{40}ClFN_4O_{11}$,746.2;实测值747.2(M+H)。

步骤C:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(4-氟-2-氨基)苯(30g):

[0487] 使用实施例4、步骤B的方法,由前一步骤的产物(29g,16mg,0.021mmol)制备得到标题化合物为黄色固体(4.0mg,26%收率)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{35}H_{42}ClFN_4O_9$,716.3;实测值717.2(M+H)。^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$):δ7.25-7.21(m,1H),6.83(s,1H),6.73(bs,1H),6.52(dd,1H,J=2.5,8.5Hz),6.50-6.48(2H,m),6.39(s,1H),6.27(s,1H),6.11(1H,bs),5.52(dd,1H,J=8.5,15.7Hz),4.87(dd,1H,J=2.5,11.5Hz),4.27(dd,1H,J=11.5,11.5Hz),3.99(s,3H),3.49(d,1H,J=8.5Hz),3.45(bs,1H),3.34(s,3H),3.21(s,3H),3.18(bs,1H),2.84-2.83(m,1H),2.52(dd,1H,J=11.5,13.5Hz),2.28(d,1H,J=13.5Hz),1.86(d,1H,J=13.5Hz),1.68(s,3H),1.51-1.45(m,1H),1.27(d,3H,J=6.5Hz),1.27-1.23(m,1H),0.89(s,3H)。

实施例16

美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(2-氟-5-氨基)苯(30h)

步骤A:1-异氰酸基-2-氟-5-硝基苯(28h):

[0488] 使用实施例9、步骤A的方法,由2-氟-5-硝基苯胺(27h,155mg,0.99mmol)制备得到标题化合物为橙色固体(168mg,93%收率)。^{1}H NMR(300MHz,氯仿-d)δ:8.10(dd,J=8.7,4.1Hz,1H),8.01(dd,J=6.7,2.8Hz,1H),7.31(t,J=8.8Hz,1H)。

步骤B:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(2-氟-5-硝基)苯(29h):

[0489] 使用实施例13、步骤B的方法,由前一步骤的产物(28h,61mg,0.335mmol)和美登醇(6,67mg,0.119mmol)制备得到标题化合物为橙色固体(21mg,24%收率)。MS(ESI,pos.):计

算值$C_{35}H_{40}ClFN_4O_{11}$,746.2;实测值747.5(M+H)。

步骤C:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(2-氟-5-氨基)苯(30h):

[0490] 使用实施例4、步骤B的方法,由前一步骤的产物(29h,20mg,0.027mmol)制备得到标题化合物,在二次反相ISCO纯化(梯度洗脱:30-90%MeCN的水溶液,0.05%乙酸的乙腈溶液和0.05%乙酸的水溶液)后,为白色固体(6mg,29%收率)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{35}H_{42}ClFN_4O_9$,716.3;实测值717.5(M+H)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ:7.70(s,1H),7.19(d,J=1.9Hz,1H),7.07(s,1H),7.03(dd,J=7.0,2.8Hz,1H),6.90(dd,J=10.6,8.7Hz,1H),6.81(s,1H),6.56(dd,J=15.3,11.1Hz,1H),6.38(d,J=11.1Hz,1H),6.32(dt,J=8.7,3.3Hz,1H),5.59(s,1H),5.49(dd,J=15.2,9.1Hz,1H),4.90(s,2H),4.50(dd,J=11.7,2.5Hz,1H),4.14(t,J=11.2Hz,1H),3.94(s,3H),3.56(d,J=12.4Hz,1H),3.48(d,J=9.1Hz,1H),3.23(s,3H),3.07(s,3H),2.79(d,J=9.7Hz,1H),2.44(dd,J=14.0,11.9Hz,2H),2.03(d,J=13.7Hz,1H),1.66(s,3H),1.52(d,J=13.5Hz,1H),1.44(dd,J=18.3,10.2Hz,2H),1.12(d,J=6.3Hz,3H),0.80(s,3H)。

实施例17

美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(4-甲氧基-2-氨基)苯(30i)

步骤A:1-异氰酸基-4-甲氧基-2-硝基苯(28i):

[0491] 使用实施例9、步骤A的方法,由4-甲氧基-2-硝基苯胺(27i,1.00mmol)制备得到标题化合物为黄色固体(100mg,51%收率)。^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):δ8.10(dd,1H,J=3.0,8.7Hz),7.90(d,1H,J=3.0Hz),6.96(d,1H,J=8.7Hz),4.06(s,3H)。

步骤B:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(4-甲氧基-2-硝基)苯(29i):

[0492] 使用实施例13、步骤B的方法,由前一步骤的产物(28i,0.422mmol)和美登醇(6,100mg,0.176mmol)制备得到标题化合物为黄色固体(25mg,19%收率)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{36}H_{43}ClN_4O_{12}$,758.3;实测值759.2(M+H)。

步骤C:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(4-甲氧基-2-氨基)苯(30i):

[0493] 使用实施例4、步骤B的方法,由前一步骤的产物(29i,25mg,0.033mmol)制备得到标题化合物为黄色固体(2.0mg,9%收率)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{36}H_{45}ClN_4O_{10}$,728.3;实测值729.2(M+H)。^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$):δ7.14(d,1H,J=8.5Hz),6.83(s,1H),6.49-6.38(m,2H),6.30(s,1H),6.20(bs,1H),5.55-5.51(m,1H),4.89(d,1H,J=11Hz),4.30(dd,1H,J=11.0,11.0Hz),3.99(s,3H),3.76(s,3H),3.49-3.48(m,1H),3.33(s,3H),3.20-3.17(m,1H),3.21(s,3H),2.84(m,1H),2.54-2.49(m,1H),2.25(d,1H,J=13.5Hz),1.90(d,1H,J=13.5Hz),1.69(s,3H),1.69-1.57(m,2H),1.29(s,3H),0.91(s,3H)。

实施例18

美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(3-甲氧基-4-氨基)苯(30j)

步骤A:1-异氰酸基-3-甲氧基-4-硝基苯(28j):

[0494] 使用实施例9、步骤A的方法,由3-甲氧基-4-硝基苯胺(27j,169mg,1.00mmol)制备得到标题化合物为黄色固体(102mg,52%收率)。^{1}H NMR(300MHz,氯仿-d)δ:8.01-7.81(m,1H),6.85-6.65(m,2H),3.96(s,4H)。

步骤B:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(3-甲氧基-4-硝基)苯(29j):

[0495] 使用实施例4、步骤A的方法,由前一步骤的产物(28j,100mg,0.515mmol)和美登醇

(6,71mg,0.126mmol)制备得到标题化合物为黄色固体(64mg,67%),不同之处在于反应在环境温度下进行18小时。MS(ESI,pos.):计算值$C_{36}H_{43}ClN_4O_{12}$,758.3;实测值759.5(M+H)。

步骤C:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(3-甲氧基-4-氨基)苯(30j):

[0496] 使用实施例4、步骤B的方法,由前一步骤的产物(29j,63mg,0.083mmol)制备得到标题化合物为白色固体(37mg,57%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{36}H_{45}ClN_4O_{10}$,728.3;实测值729.5(M+H)。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ:6.84(d,J=1.8Hz,1H),6.71(s,1H),6.66(d,J=8.2Hz,1H),6.56(dd,J=8.2,2.3Hz,1H),6.52-6.38(m,2H),6.22(s,1H),6.13(d,J=10.9Hz,1H),5.41(dd,J=15.5,8.6Hz,1H),4.78(d,J=11.3Hz,1H),4.33(t,J=11.2Hz,1H),3.99(s,3H),3.87(s,3H),3.55-3.39(m,2H),3.31(s,3H),3.27(d,J=13.3Hz,1H),3.19(s,3H),2.90(d,J=9.8Hz,1H),2.49(dd,J=13.9,11.6Hz,1H),2.25(d,J=14.0Hz,1H),2.11(s,2H),1.87(d,J=13.4Hz,1H),1.70(s,3H),1.30(d,J=6.2Hz,3H),1.25(dd,J=15.1,10.5Hz,1H),0.90(s,3H)。

实施例19

美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(2-甲氧基-4-氨基)苯(30k)

步骤A:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(2-甲氧基-4-硝基)苯(29k):

[0497] 使用实施例4、步骤A的方法,由1-异氰酸基-2-甲氧基-4-硝基苯(28k,62mg,0.319mmol)和美登醇(6,53mg,0.094mmol)制备标题化合物为淡黄色固体(25mg,35%),不同之处在于反应物是在C18 Aq RediSep金色柱上通过ISCO纯化(梯度洗脱:20-80%MeCN的水溶液,0.05%乙酸的乙腈溶液和0.05%乙酸的水溶液)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{36}H_{43}ClN_4O_{12}$,758.3;实测值759.5(M+H)。

步骤B:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(2-甲氧基-4-氨基)苯(30k):

[0498] 使用实施例4、步骤B的方法,由前一步骤的产物(29k,24mg,0.032mmol)制备得到标题化合物为白色固体(9mg,36%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{36}H_{45}ClN_4O_{10}$,728.3;实测值729.5(M+H),751.5(M+Na)。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ:7.83(d,J=8.3Hz,1H),6.90(s,1H),6.86(d,J=1.9Hz,1H),6.82(d,J=1.8Hz,1H),6.42(dd,J=15.1,10.9Hz,1H),6.36-6.24(m,2H),6.15(s,1H),5.31(dd,J=15.1,9.1Hz,1H),4.79(dd,J=11.8,2.4Hz,1H),4.41-4.29(m,1H),4.00(s,3H),3.94(s,3H),3.52(d,J=12.9Hz,1H),3.41(d,J=9.1Hz,1H),3.29(d,J=12.7Hz,1H),3.25(s,3H),3.19(s,3H),3.02(d,J=9.9Hz,1H),2.73(s,1H),2.47(dd,J=13.8,11.8Hz,1H),2.22(dd,J=13.7,2.4Hz,1H),2.13(s,2H),1.78(d,J=13.6Hz,1H),1.70(s,3H),1.50(dd,J=10.2,6.4Hz,1H),1.30(d,J=6.4Hz,3H),1.20(t,J=12.9Hz,1H),0.86(s,3H)。

实施例20

美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(3-三氟甲基-4-氨基)苯(30l)

步骤A:1-异氰酸基-3-三氟甲基-4-硝基苯(28l):

[0499] 使用实施例9、步骤A的方法,由3-三氟甲基-4-硝基苯胺(27l,103mg,0.500mmol)制备得到标题化合物为黄色油状固体(63mg,54%收率)。^{1}H NMR(300MHz,氯仿-d)δ:7.95(d,J=8.7Hz,1H),7.53(dt,J=2.4,0.5Hz,1H),7.41(ddd,J=8.7,2.3,0.5Hz,1H)。

步骤B:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(3-三氟甲基-4-硝基)苯(29l):

[0500] 使用实施例19、步骤A的方法,由前一步骤的产物(28l,59mg,0.254mmol)和美登醇

(6,57mg,0.101mmol)制备得到标题化合物为黄色固体(27mg,34%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{36}H_{40}ClF_3N_4O_{11}$,796.2;实测值797.4(M+H)。

步骤C:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(3-三氟甲基-4-氨基)苯(30l):

[0501] 使用实施例4、步骤B的方法,由前一步骤的产物(29l,25mg,0.031mmol)制备得到标题化合物,在二次反相ISCO纯化后,为白色固体(16mg,62%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{36}H_{42}ClF_3N_4O_9$,766.3;实测值767.5(M+H)。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ:7.47(dd,J=8.7,2.6Hz,1H),7.40(d,J=2.5Hz,1H),6.84(d,J=1.9Hz,1H),6.73(d,J=8.7Hz,1H),6.71-6.61(m,1H),6.50(d,J=2.3Hz,1H),6.49-6.42(m,1H),6.22(s,1H),6.06(d,J=10.9Hz,1H),5.37(dd,J=15.5,8.5Hz,1H),4.79(dd,J=11.5,2.2Hz,1H),4.32(ddd,J=12.2,10.5,1.9Hz,1H),4.11(s,2H),3.99(s,3H),3.54-3.44(m,2H),3.32(s,3H),3.26(d,J=13.5Hz,1H),3.20(s,3H),2.97(s,1H),2.88(d,J=9.8Hz,1H),2.50(dd,J=14.0,11.6Hz,1H),2.27(dd,J=14.0,2.3Hz,1H),1.86(d,J=13.5Hz,1H),1.71(s,3H),1.50(td,J=10.2,6.3Hz,1H),1.29(d,J=6.4Hz,3H),1.25(t,J=12.6Hz,1H),0.90(s,3H)。

实施例21

美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(2-溴-4-氨基)苯(30m)

步骤A:1-异氰酸基-2-溴-4-硝基苯(28m):

[0502] 使用实施例9、步骤A的方法,由2-溴-4-硝基苯胺(27m,108mg,0.498mmol)制备得到标题化合物为黄色固体(109mg,90%收率)。^{1}H NMR(300MHz,氯仿-d)δ:8.49(d,J=2.5Hz,1H),8.16(dd,J=8.8,2.6Hz,1H),7.28(dd,J=8.8,0.3Hz,1H)。

步骤B:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(2-溴-4-硝基)苯(29m):

[0503] 使用实施例19、步骤A的方法,由前一步骤的产物(28m,55mg,0.226mmol)和美登醇(6,46mg,0.081mmol)制备得到标题化合物为黄色固体(30mg,45%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{35}H_{40}BrClN_4O_{11}$,806.2;实测值809.0(M+H)。

步骤C:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(2-溴-4-氨基)苯(30m):

[0504] 使用实施例4、步骤B的方法,由前一步骤的产物(29m,28mg,0.035mmol)制备得到标题化合物为白色固体(10mg,34%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{35}H_{42}BrClN_4O_9$,776.2;实测值779.0(M+H)。^{1}H NMR(300MHz,氯仿-d)δ:7.79(d,J=8.7Hz,1H),6.94(d,J=1.8Hz,1H),6.90(d,J=2.5Hz,1H),6.85(d,J=1.8Hz,1H),6.77(s,1H),6.64(dd,J=8.8,2.6Hz,1H),6.50-6.29(m,2H),6.19(s,1H),5.22(dd,J=14.6,9.0Hz,1H),4.79(dd,J=11.8,2.6Hz,1H),4.38(t,J=11.1Hz,1H),4.00(s,3H),3.69(s,1H),3.60(d,J=12.9Hz,1H),3.43(d,J=9.0Hz,1H),3.26(s,4H),3.20(s,4H),3.05(d,J=9.8Hz,1H),2.89(s,1H),2.49(dd,J=13.7,11.9Hz,1H),2.22(dd,J=13.7,2.6Hz,1H),1.79(d,J=13.5Hz,1H),1.69(s,4H),1.49(dd,J=10.3,6.2Hz,1H),1.31(d,J=6.3Hz,3H),1.28-1.16(m,2H),0.87(s,3H)。

实施例22

美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(4-三氟甲氧基-2-氨基)苯(30n)

步骤A:1-异氰酸基-4-三氟甲氧基-2-硝基苯(28n):

[0505] 使用实施例9、步骤A的方法,由4-三氟甲氧基-2-硝基苯胺(27n,223mg,1.00mmol)制备得到标题化合物为橙色油状固体(228mg,92%收率)。^{1}H NMR(300MHz,氯仿-d)δ:8.03(d,J=2.8Hz,1H),7.52-7.44(m,1H),7.32(dt,J=9.0,0.6Hz,1H)。

步骤B:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(4-三氟甲氧基-2-硝基)苯(29n):

[0506] 使用实施例4、步骤A的方法,由前一步骤的产物(28n,215mg,0.867mmol)和美登醇(6,84mg,0.149mmol)制备得到标题化合物为黄色固体(87mg,72%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{36}H_{40}ClF_3N_4O_{12}$,812.2;实测值813.5(M+H),835.4(M+Na)。

步骤C:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(4-三氟甲氧基-2-氨基)苯(30n):

[0507] 使用实施例4、步骤B的方法,由前一步骤的产物(29n,85mg,0.105mmol)制备得到标题化合物,在二次反相ISCO纯化后,为白色固体(59mg,67%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{36}H_{42}ClF_3N_4O_{10}$,782.3;实测值783.5(M+H),805.5(M+Na)。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ:7.31(d,J=8.8Hz,1H),6.81(s,1H),6.70(s,1H),6.63(m,2H),6.43(dd,J=15.4,10.9Hz,1H),6.09(s,1H),5.58(dd,J=15.4,8.8Hz,1H),4.88-4.77(m,1H),4.28(t,J=11.2Hz,1H),3.96(s,3H),3.44(d,J=8.7Hz,2H),3.39(p,J=1.7Hz,2H),3.33(s,3H),3.19(s,3H),3.15(d,J=13.1Hz,1H),2.84(d,J=9.6Hz,1H),2.57-2.47(m,1H),2.28-2.22(m,1H),1.84(d,J=13.7Hz,1H),1.65(s,3H),1.54-1.43(m,1H),1.30(d,J=12.6Hz,1H),1.26(d,J=6.2Hz,3H),0.87(s,3H)。

实施例23

美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(4-氟-5-氯-2-氨基)苯(30o)

步骤A:1-异氰酸基-4-氟-5-氯-2-硝基苯(28o):

[0508] 使用实施例9、步骤A的方法,由4-氟-5-氯-2-硝基苯胺(27o,70mg,0.367mmol)制备得到标题化合物为黄色油状物(72mg,91%收率)。^{1}H NMR(300MHz,氯仿-d)δ:8.01(d,J=8.3Hz,1H),7.35(d,J=6.5Hz,1H)。

步骤B:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(4-氟-5-氯-2-硝基)苯(29o):

[0509] 使用实施例4、步骤B的方法,由前一步骤的产物(28o,70mg,0.323mmol)和美登醇(6,48mg,0.085mmol)制备得到标题化合物为黄色固体(35mg,53%收率)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{35}H_{39}Cl_2FN_4O_{11}$,780.2;实测值781.4(M+H)。

步骤C:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(4-氟-5-氯-2-氨基)苯(30o):

[0510] 使用实施例4、步骤B的方法,由前一步骤的产物(29o,34mg,0.044mmol)制备得到标题化合物为白色固体(21mg,60%收率)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{35}H_{41}Cl_2FN_4O_9$,750.2;实测值751.5(M+H)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ:7.97(s,1H),7.19(s,1H),6.91(s,1H),6.73(d,J=11.4Hz,1H),6.66-6.30(m,2H),5.84(s,1H),5.52(dd,J=14.9,9.3Hz,1H),5.17(s,2H),4.52(d,J=11.8Hz,1H),4.15(t,J=11.1Hz,1H),3.94(s,3H),3.47(d,J=9.2Hz,1H),3.24(s,3H),3.17(d,J=12.2Hz,1H),3.10(s,3H),2.75(d,J=9.9Hz,1H),2.43(d,J=13.4Hz,1H),2.08(d,J=13.7Hz,1H),1.81(s,1H),1.66(s,3H),1.52(d,J=13.5Hz,1H),1.45(t,J=12.9Hz,2H),1.11(d,J=6.3Hz,3H),0.77(s,3H)。

实施例24

美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(4-氨基-2-甲基-5-吗啉-4-基)苯(30p)

步骤A:(4-硝基-2-甲基-5-吗啉-4-基)苯基异氰酸酯(28p):

[0511] 采用实施例9、步骤A的方法,由2-甲基-5-吗啉-4-基-4-硝基苯胺(237mg,1.00mmol)制备得到标题化合物为亮橙色固体(230mg,87%收率)。^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$):δ7.72(s,1H),6.79(s,1H),3.84(t,4H,J=5Hz),3.01(t,4H,J=5Hz),2.31(s,3H)。

步骤B:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(4-硝基-2-甲基-5-吗啉-4-基)苯(29p):

[0512] 采用实施例19、步骤A的方法,由前一步骤的产物(28p,56mg,0.21mmol)和美登醇(6,50mg,0.09mmol)制备得到标题化合物为类白色固体(8mg,11%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{40}H_{50}ClN_5O_{12}$,827.3;实测值828.2(M+H)。

步骤C:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(4-氨基-2-甲基-5-吗啉-4-基)苯(30p):

[0513] 使用实施例4、步骤B的方法,由前一步骤的产物(29p,8mg,0.01mmol)制备得到标题化合物为白色固体(3.2mg,42%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{40}H_{52}ClN_5O_{10}$,797.3;实测值798.2(M+H),820.2(M+Na)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ:7.54(s,1H),7.17(s,2H),6.88(s,1H),6.84(s,1H),6.62-6.52(m,2H),6.51(s,1H),5.69-5.51(m,2H),4.69(s,2H),4.45(dd,J=12.0,2.7Hz,1H),4.16(t,J=10.9Hz,1H),3.93(s,3H),3.73(t,J=4.8Hz,4H),3.64(d,J=12.3Hz,1H),3.53-3.44(m,1H),3.25(s,3H),3.14(d,J=12.2Hz,1H),3.05(s,3H),2.77(q,J=4.2,3.2Hz,4H),2.69(d,J=9.6Hz,1H),2.40(d,J=12.7Hz,1H),2.01(s,3H),1.97(d,J=13.4Hz,1H),1.65(s,3H),1.56(d,J=13.6Hz,1H),1.42(t,J=12.9Hz,2H),1.09(d,J=6.4Hz,3H),0.78(s,3H)。

实施例25

美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(4-氨基-2-甲基-5-吡咯烷-1-基)苯(30q)

步骤A:(4-硝基-2-甲基-5-吡咯烷-1-基)苯基异氰酸酯(28q):

[0514] 采用实施例9、步骤A的方法,由2-甲基-4-硝基-5-吡咯烷-1-基-苯胺(221mg,1.00mmol)制备得到标题化合物为亮橙色固体(210mg,85%收率)。^{1}H-NMR(300MHz,$CDCl_3$):δ7.65(s,1H),6.59(s,1H),3.25-3.14(m,4H),2.00-1.94(m,4H)。

步骤B:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(4-硝基-2-甲基-5-吡咯烷-1-基)苯基(29q):

[0515] 使用实施例19、步骤A的方法,由前一步骤的产物(28q,53mg,0.21mmol)和美登醇(6,50mg,0.09mmol)制备得到标题化合物为类白色固体(28mg,39%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{40}H_{50}ClN_5O_{11}$,811.3;实测值812.2(M+H)。

步骤C:美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(4-氨基-2-甲基-5-吡咯烷-1-基)苯(30q):

[0516] 使用实施例4、步骤B的方法,由前一步骤的产物(29q,28mg,0.03mmol)制备得到标题化合物为白色固体(8.6mg,32%)。MS(ESI,pos.):计算值$C_{40}H_{52}ClN_5O_9$,781.3;实测值782.2(M+H),804.2(M+Na)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ:7.53(s,1H),7.19(s,2H),6.93-6.86(m,1H),6.83(s,1H),6.66-6.50(m,2H),6.49(s,1H),5.62(dd,J=14.6,9.2Hz,1H),5.56(s,1H),4.54(s,2H),4.47(dd,J=12.0,2.7Hz,1H),4.17(t,J=11.1Hz,1H),3.94(s,3H),3.65(d,J=12.2Hz,1H),3.55-3.45(m,1H),3.25(s,3H),3.15(d,J=12.2Hz,1H),3.07(s,3H),2.93(d,J=6.7Hz,4H),2.70(d,J=9.7Hz,1H),2.41(d,J=12.9Hz,1H),2.02(s,3H),1.98(d,J=13.2Hz,1H),1.89-1.76(m,4H),1.66(s,3H),1.58(d,J=13.5Hz,1H),1.43(t,J=12.9Hz,2H),1.10(d,J=6.4Hz,3H),0.79(s,3H)。

实施例26

偶联物的制备与表征

[0517] 五种抗体采用下述方法与本发明所述连接体-有效负载化合物进行偶联。在所述这些实验中使用的四种靶向抗体是:(1)国际专利申请号WO2007002222A2,发明名称为"PSMAANTIBODY-DRUG CONJUGATES"中所述的具有克隆AB-PG1-XG1-006的重链和轻链可变

结构域的PSMA抗体，(2)国际专利申请号WO2007001851，发明名称为“COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE DIAGNOSISAND TREATMENT OF TUMOR”中所述的具有衍生自克隆3A5的可变区的抗MUC16抗体，和(3)具有衍生自Carter等人(Carter et al,PNAS 1992 89 4285)的humAb4D5-8的可变区的抗HER2抗体，和4)抗STEAP2抗体。出于所有目的，所述这些专利申请出版物和期刊引文均通过引用其整体并入本文。所有单克隆抗体在CHO细胞中表达并通过蛋白A进行纯化。还使用衍生自与肿瘤学无关的免疫原性的非结合同种型对照(5)。

[0518] 方法A:将50mM HEPES、150mM NaCl、pH值为7.5中的抗体(10mg/ml)用1mM二硫苏糖醇在37℃下处理30分钟。在凝胶过滤(G-25，pH值为4.5的乙酸钠)后，将DMSO(10mg/ml)中的马来酰亚胺连接体有效负载衍生物(连接体-有效负载9、19或24;1.2当量/SH组)加至还原的抗体中，并用1M HEPES(pH 7.4)将混合物调节至pH值为7.0。任选用N-乙基马来酰亚胺(NEM)淬灭偶联反应。通过体积排阻色谱法纯化偶联物并进行无菌过滤。根据Hamblett等(American Association for Cancer Research.2004 Oct 15:10(20):7063-70)的UV光谱分析或天然相对于偶联的质量差异来确定蛋白质浓度以及有效负载与抗体比率。体积排阻HPLC确定所用的所有偶联物均大于95％单体，并且RP-HPLC确定存在小于0.5％未偶联的连接体有效负载。表1中报告了产率及有效负载与抗体比率。

[0519] 方法B:将50mM HEPES、150mM NaCl、pH 8.0和10-15％(v/v)DMA中的抗体(10-20mg/ml)与5-6倍过量的化合物10、14、20、22或26，在环境温度下进行偶联反应2小时。通过体积排阻色谱法或大量超滤法来纯化偶联物并进行无菌过滤。通过UV光谱分析测定蛋白质浓度。体积排阻HPLC确定所用的所有偶联物均大于95％单体，并且RP-HPLC确定存在小于1％未偶联的连接体有效负载。所有偶联的抗体均通过天然相对于偶联的质量差异进行分析。表1中报告了有效负载与抗体的比率。

[0520] 方法C-细菌转谷氨酰胺酶偶联:非糖基化、去糖基化或谷氨酰胺标记的抗体可在PBS pH 7.4中以1-10mg/mL进行偶联。连接体有效负载22可比抗体多10至25倍摩尔过量进行添加，并且可通过每mg抗体添加1-5单位细菌转谷氨酰胺酶(Zedira,T1001)并在37℃下振荡温育来引发酶促反应，并持续4-16个小时。可通过体积排阻色谱法纯化所述偶联物并进行无菌过滤。蛋白和连接体有效负载浓度可通过UV光谱分析确定。体积排阻HPLC可确定所述偶联物可以大于95％单体。根据Hamblett等，Cancer Res 2004 10 7063，可通过UV来分析所有偶联的抗体的连接体有效负载载量。此外，可使用Waters Synapt G2-Si QTOF质谱联用Acquity UPLC，通过ESI-MS来分析所述偶联物的连接体有效负载载量。色谱分离可在C4柱(Waters蛋白BEH C4,50mm×1mm,1.7μm)上以25分钟梯度(分钟:流动相B的百分比;0:20％,1:20％,18:40％,18.1:90,20:95％,20.8:95％,20.9:20％,25:20％)进行。流动相A可以是0.1％甲酸水溶液，流动相B可以是0.1％甲酸乙腈溶液。流速可设定为100μl/min。探测器TOF扫描可在m/z 700-5000设置25分钟，主要参数如下所示(毛细管电压3.2kV;采样锥150;源偏移80;源温度120℃;去溶剂化温度500℃:陷阱碰撞能量30;传输碰撞能量关闭;气体控制关闭;解析四极杆:LM分辨率为4.7)。可使用MassLynx软件中的MaxEnt函数对组合光谱进行去卷积。

方法A DAR测定的偶联物

[0521] 为了确定抗体(半胱氨酸偶联物)上的连接体-有效负载的载量，将所述偶联物去糖基化、还原、并通过LC-MS进行分析。

[0522] 对于所述测定，将50μg偶联物用mili-Q水稀释至终浓度为1mg/mL。将10μL PNGaseF溶液[通过添加150μL PNGase F原液(New England Biolabs，Cat#P0704L)和850μL mili-Q水并混合均匀来制备PNGase F溶液]，加至稀释的偶联物溶液中，然后在37℃下孵育过夜。向样品中加入2.4μL的0.5M TCEP，使得所得物料的最终TCEP浓度为20mM，然后将其在50℃下温育30分钟。在LC-MS(Waters Synat G2-Si)上注射10μL各样品，用0.1mL/分钟的梯度流动相20-40％流动相B洗脱25分钟(流动相A:0.1％v/v FA的H_2O溶液;流动相B:0.1％v/v FA的乙腈溶液)。在Waters Acquity BEH C18柱(1.0×50mM，1.7μM)上实现LC分离。

[0523] 将质谱光谱进行去卷积，所述鉴定的轻链和重链峰表示具有连接体-有效负载值＝0和1的轻链(L)，具有连接体-有效负载值＝0、1、2和3的重链(H)。根据每个物种的强度值，使用以下等式1计算药物与抗体的比率(DAR)，用于同源二聚体抗体偶联物。

等式1：

$$DAR = 2*\left(\frac{L1}{L0+L1} + \frac{H1+2*H2+3*H3}{H0+H1+H2+H3}\right)$$

方法B DAR测定的偶联物

[0524] 为了确定抗体(赖氨酸偶联物)上的连接体-有效负载的载量，将所述偶联物去糖基化，并通过LC-MS进行分析。

[0525] 对于所述测定，将50μg偶联物用mili-Q水稀释至终浓度为1mg/mL。将10μL PNGaseF溶液[PNGase F溶液是通过添加150μL PNGase F原液(New England Biolabs，Cat#P0704L)和850μL mili-Q水并混合均匀制备得到]，加至稀释的偶联物溶液中，然后在37℃下孵育过夜。在LC-MS(Waters Synat G2-Si)上注射5μL各样品，用0.1mL/分钟的梯度流动相20-50％流动相B洗脱25分钟(流动相A:0.1％v/v FA的H_2O溶液;流动相B:0.1％v/v FA的乙腈溶液)。在Waters Acquity BEH C4柱(1.0×50mM，1.7μM)上在80℃下实现LC分离。

[0526] 使用Masslynx软件对质谱光谱进行去卷积，并使用以下等式计算药物与抗体的比率(DAR)。参见图.18。

1.由分布峰值强度(PI)确定的药物(Dn)相对百分比(％)：

a.Dn％＝PIn/Σ(PI0+PI1+PI2……+PIi)×100

b.(n＝0,1,2,3,…,i)

2.平均DAR计算：

a.DAR＝Σ(1×D1％+2×D2％+3×D3％+……+i×Di％)

表1

抗体	ε252 nm (cm^{-1} M^{-1})	ε280 nm (cm^{-1} M^{-1})
PSMA	77652	224320
MUC16	85888	247360
HER2	81847	215388
STEAP2	-	-
同种型对照	75113	218360

抗体偶联物	有效负载：抗体 (UV)	产率%
PSMA-9	1.3	80
MUC16-9	1.4	70
HER2	1.5	75
同种型对照-9	1.5	80

抗体偶联物	有效负载：抗体 (ESI-MS)	产率%
STEAP2-14	2.7	50
STEAP2-20	1.2	45
STEAP2-24	3.0	40
HER2-10	2.3	60
HER2-20	0.7	50
HER2-24	3.3	40
同种型对照-10	2.4	75
同种型对照-14	1.3	70
同种型对照-20	1.0	50
同种型对照-24	3.6	40

实施例27

体外连接体-有效负载无细胞酶学分析

组织蛋白酶B孵育

[0527] 采用来自Dubowchik等人(Dubowchik et al,Bioconjugate Chem.2002 13 855)中体外无细胞酶测定方法,其全部内容通过引用其整体并入本文,用于所有目。在25mM乙酸钠缓冲液、1mM EDTA、pH值为5.0中将连接体有效负载9最终设定为100μg/mL,并在37℃下预温育。组织蛋白酶B(Sigma#C8571)在室温下用1当量的30mM DTT、15mM EDTA至2当量的组织蛋白酶B原液活化15分钟。将活化的组织蛋白酶B溶液以1:20的摩尔比(纯化的H_2O,而非活化的组织蛋白酶B加入对照样品中)加入至底物溶液中。将样品在37℃下温育过夜,并采用LC-MS通过Q1扫描来检测所得样品。

LC-MS检测

[0528] 将样品以12,000g离心5分钟。回收上清液,并通过液相色谱-质谱(Waters Xevo TQ-S)经联合灌注0.3ml/min的30:70流动相B:A(流动相A:0.1%FA的H_2O溶液;流动相B:

0.1%FA的乙腈溶液)以20μl/min由上清液进行分析。MS1设定在适当范围内,用于检测连接体有效负载或有效负载的分子离子。所述上清液含有预计的有效负载,美登素-3-O-氨基甲酰基-N-(4-氨基苯)(8),质量为720.9(M+Na)(单同位素质量计算值为$C_{35}H_{43}N_4O_9Cl$,698.3)和不含组织蛋白酶B的对照样品,所述对照样品含有质量为1170.4(M+Na)的化合物9(单同位素质量计算值为$C_{60}H_{80}ClN_9O_{16}$,1147.50)。在对照样品中未检测出预计的有效负载分子离子。

[0529] 本实施例的结果是显着的,部分原因是化合物9的组织蛋白酶B蛋白水解应仅在所述酶存在的细胞中的ADC内化之后发生。由于抗体将细胞毒性有效负载直接递送至靶细胞,因此应减少脱靶效应。

实施例28

体外细胞毒性试验

[0530] 在本实施例中,评估了各种抗体-药物偶联物和裸有效负载在体外杀伤表达抗原的肿瘤细胞的能力。

[0531] 将Ovcar3(Muc16+)细胞在完全生长培养基中以每孔3000个细胞接种于96孔板中并生长过夜。对于细胞活力曲线,将连续稀释的偶联物或裸有效负载以100nM至5pM的终浓度添加至所述细胞,并孵育3天。为了测定细胞活力,将细胞与CCK8(Dojindo)一起温育最后2小时,并在Victor(Perkin Elmer)上测定450nm处的吸光度(OD_{450})。从所有孔中减去由洋地黄皂苷(40nM)处理的细胞测定的背景OD_{450}水平,并且活力以未处理对照的百分比表示。在10点响应曲线(GraphPad Prism)上由四参数逻辑斯谛(logistic)方程来确定IC_{50}值。MUC16-9 ADC的IC_{50}值为+++,表明IC_{50}(nM)大于或等于0.1且小于1.0。校正所有偶联物曲线和IC_{50}值以获得有效负载当量值。细胞活力%与Log10[M]药物的关系曲线如图.1所示。裸有效负载IC_{50}值和细胞杀伤百分比列于表2中。

[0532] 将SKBR3(Her2+)细胞在完全生长培养基中以8000个细胞/孔接种于96孔板中并生长过夜。对于细胞活力曲线,将连续稀释的偶联物或裸有效负载以100nM至5pM的终浓度添加至细胞,并孵育3天。为了测定细胞活力,将细胞与CCK8(Dojindo)一起温育最后2小时,并在Victor(Perkin Elmer)上测定450nm处的吸光度(OD_{450})。从所有孔中减去由洋地黄皂苷(40nM)处理的细胞测定的背景OD_{450}水平,并且活力以未处理对照的百分比表示。在10点响应曲线(GraphPad Prism)上由四参数逻辑斯谛(logistic)方程来确定IC_{50}值。所述HER2-9、10、20、和24ADC的IC_{50}值分别为+++,+++,+++,和+++,其中+++表示IC_{50}(nM)大于或等于0.1且小于1.0。校正所有偶联物曲线和IC_{50}值以获得有效负载当量值。细胞活力%与Log10[M]药物的关系曲线如图.2-5所示。裸有效负载IC_{50}值和细胞杀伤百分比列于表2中。

[0533] 将C4-2(STEAP2+)细胞在完全生长培养基中以4000个细胞/孔接种于96孔板中并生长过夜。对于细胞活力曲线,将连续稀释的偶联物或裸有效负载以100nM至5pM的终浓度添加至细胞,并孵育5天。为了测定细胞活力,将细胞与CellTiter-Glo试剂一起温育5分钟,并在Victor平板读数器(Perkin Elmer)上测定发光。在10点响应曲线(GraphPad Prism)上由四参数逻辑斯谛(logistic)方程来确定IC_{50}值。所述STEAP2-14、20、和24ADC的IC_{50}值分别为++,+++,+nM。+++表示IC_{50}(nM)大于或等于0.1且小于1.0;++表示IC_{50}(nM)大于或等于1.0且小于10;和+表示IC_{50}(nM)大于或等于10。

[0534] 所有IC_{50}均以nM浓度表示,并且报告了最高剂量的杀伤率%。校正所有曲线和IC_{50}

值以获得有效负载当量值。细胞活力%与Log10[M]药物的关系曲线如图.6-8所示。表2列出了裸有效负载的IC_{50}值和细胞杀伤百分比。

[0535] 上述实施方案和实施例旨在仅仅是示例性的而非限制性的。本领域技术人员将认识到或将能够使用不超过常规的实验，来确定具体化合物、材料/物料和程序/方法的许多等同物。所有此类等同物均被认为是在所附权利要求范围之内，并被所附权利要求所涵盖。

表2

	Ovcar3		C4-2		SKBr-3	
化合物 #	IC50 (nM)	杀伤率%	IC50 (nM)	杀伤率%	IC50 (nM)	杀伤率%
8	++	**	+	****	++	****
17	+++++	***	+++	****	++++	*****
30a	+++	***	++	*****	+++	****
30b			+	*	+++	****
30c	++	**	+	**	++	***
30d			++	****	++	****
30e			++	****	++	***
30f			++	****	+++	*****
30g			++	*****	+++	*****
30h			++	*	+++	****
30i			+	*****	++	*****
30j	++	**	+	***	+++	****
30k	+++	***	+		++	*****
30l	+++	***	+		+++	*****
30m	+++++	**	++++	*****	++++	*****
30n			+	*****	++	*****
30o			+	*	+++	*****
30p			+		+	*
30q			+	***	++	*****

+++++表示IC_{50}(nM)大于或等于0.001且小于0.01；

++++表示IC_{50}(nM)大于或等于0.01且小于0.1；

+++表示IC_{50}(nM)大于或等于0.1且小于1.0；

++表示IC_{50}(nM)大于或等于1.0且小于10;和

+表示IC_{50}(nM)大于或等于10。

*****表示杀伤率%大于或等于99；

****表示杀伤率%大于或等于95且小于99；

***表示杀伤率％大于或等于90且小于95；

**表示杀伤率％大于或等于85且小于90；和

*表示杀伤率％小于85。

[0536] 上述实施方案和实施例旨在仅仅是示例性的而非限制性的。本领域技术人员将认识到或将能够使用不超过常规的实验，来确定具体化合物、材料/物料和程序/方法的许多等同物。所有此类等同物均被认为是在所附权利要求范围之内，并被所附权利要求所涵盖。

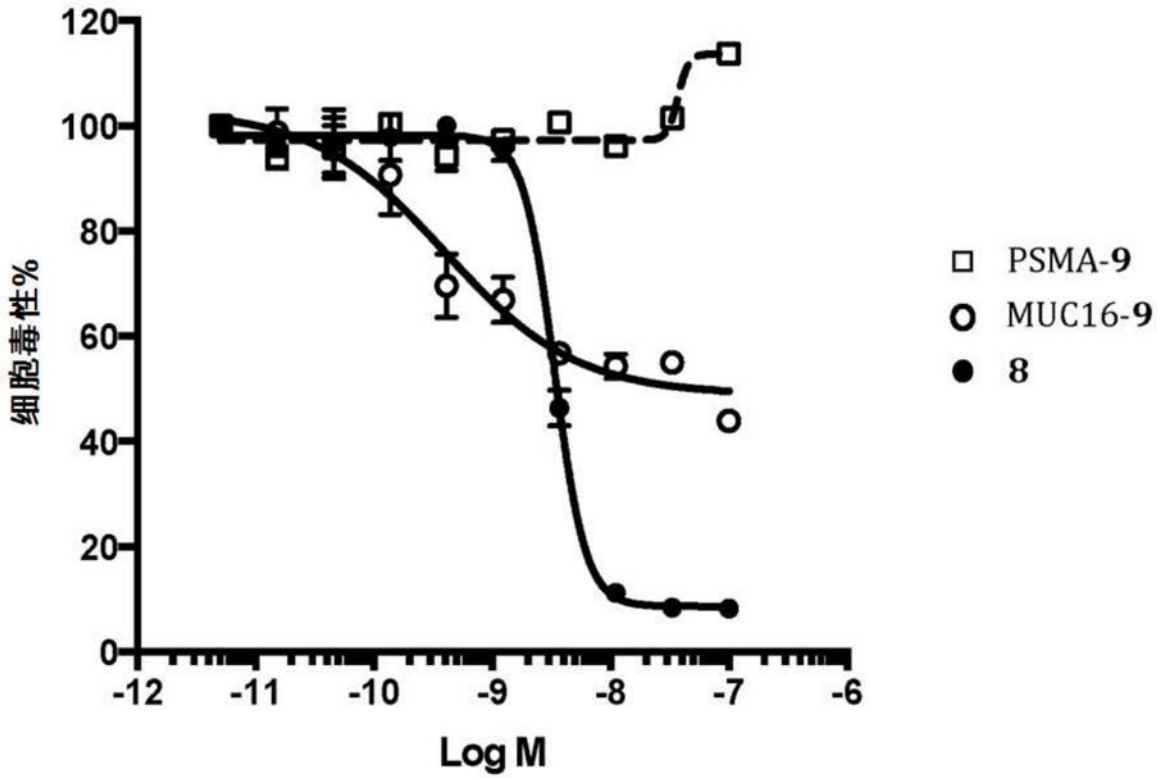

120
100
80
60
40
20
0
细胞毒性%
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
Log M
PSMA-9
MUC16-9
8

图1

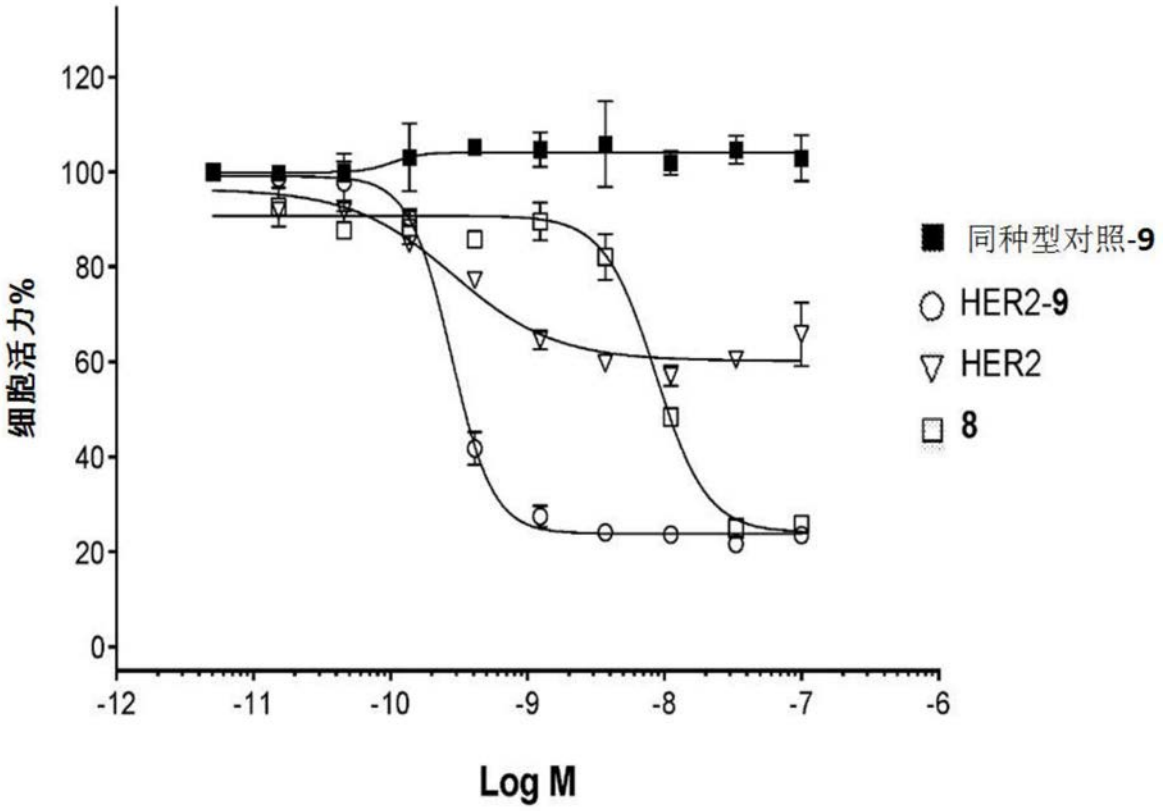

120
100
80
60
40
20
0
细胞活力%
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
Log M
同种型对照-9
HER2-9
HER2
8

图2

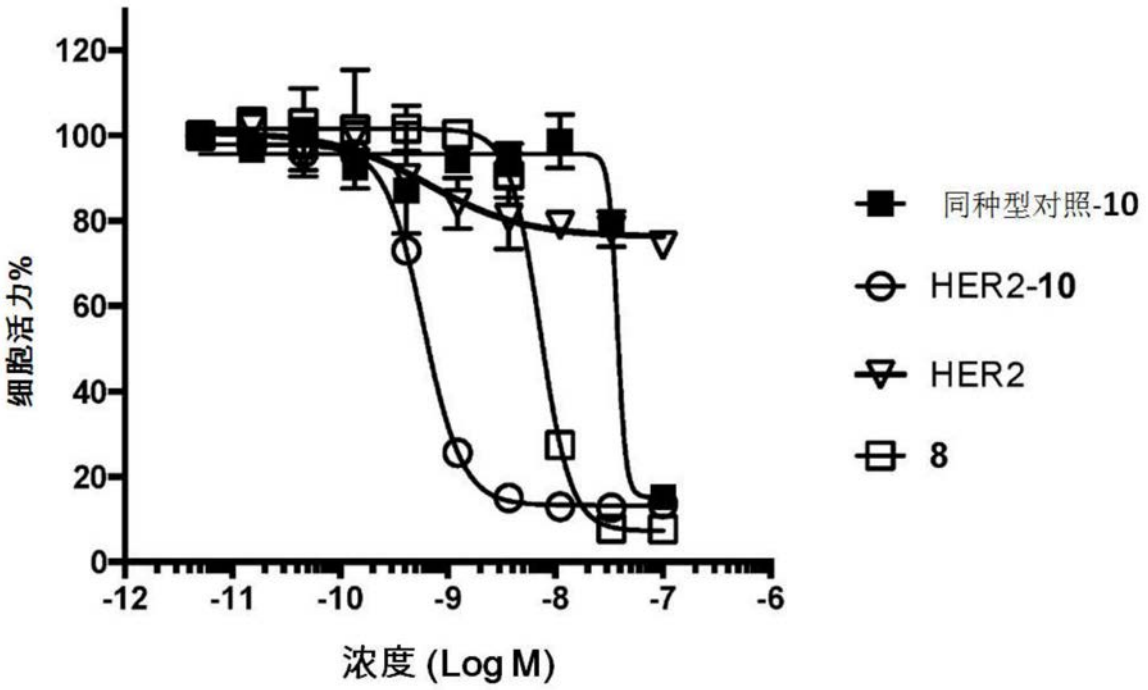

120
100
80
60
40
20
0
细胞活力%
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
浓度 (Log M)
同种型对照-10
HER2-10
HER2
8

图3

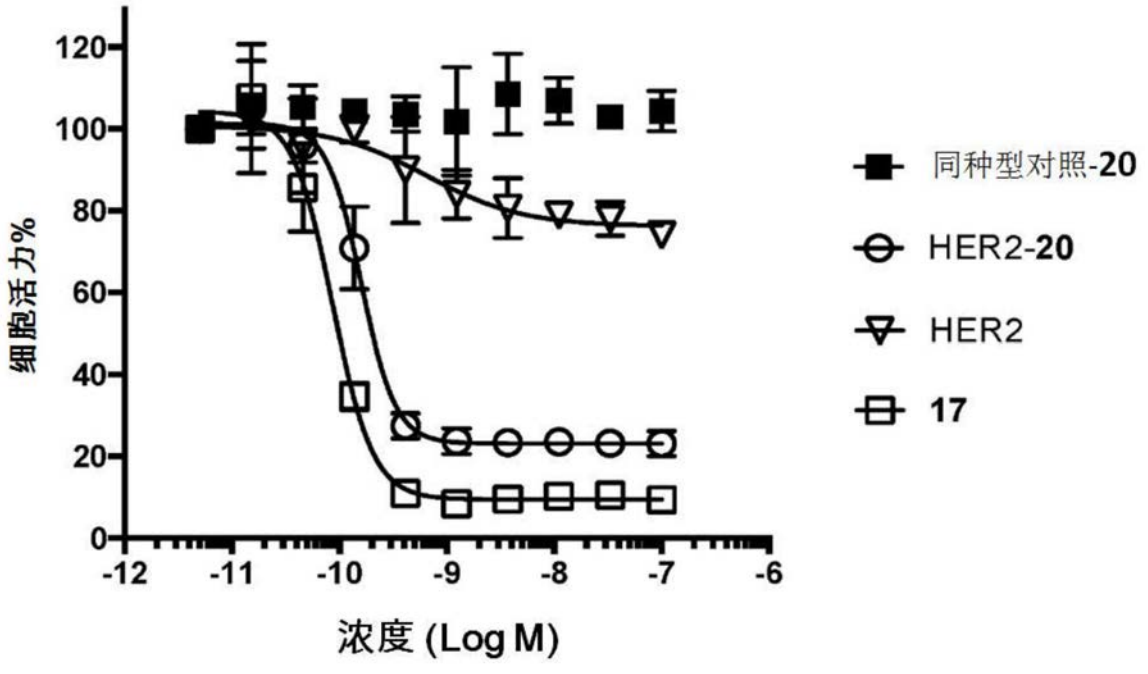

120
100
80
60
40
20
0
细胞活力%
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
浓度 (Log M)
同种型对照-20
HER2-20
HER2
17

图4

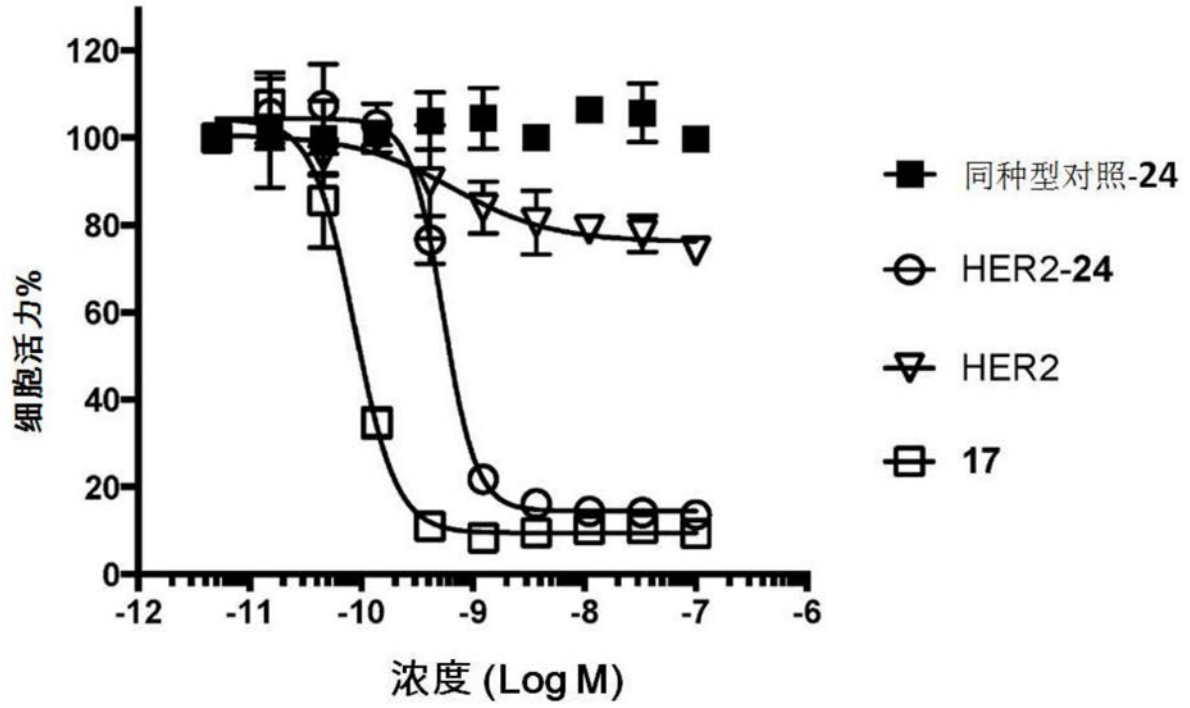

120
100
80
60
40
20
0
细胞活力%
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
浓度 (Log M)
同种型对照-24
HER2-24
HER2
17

图5

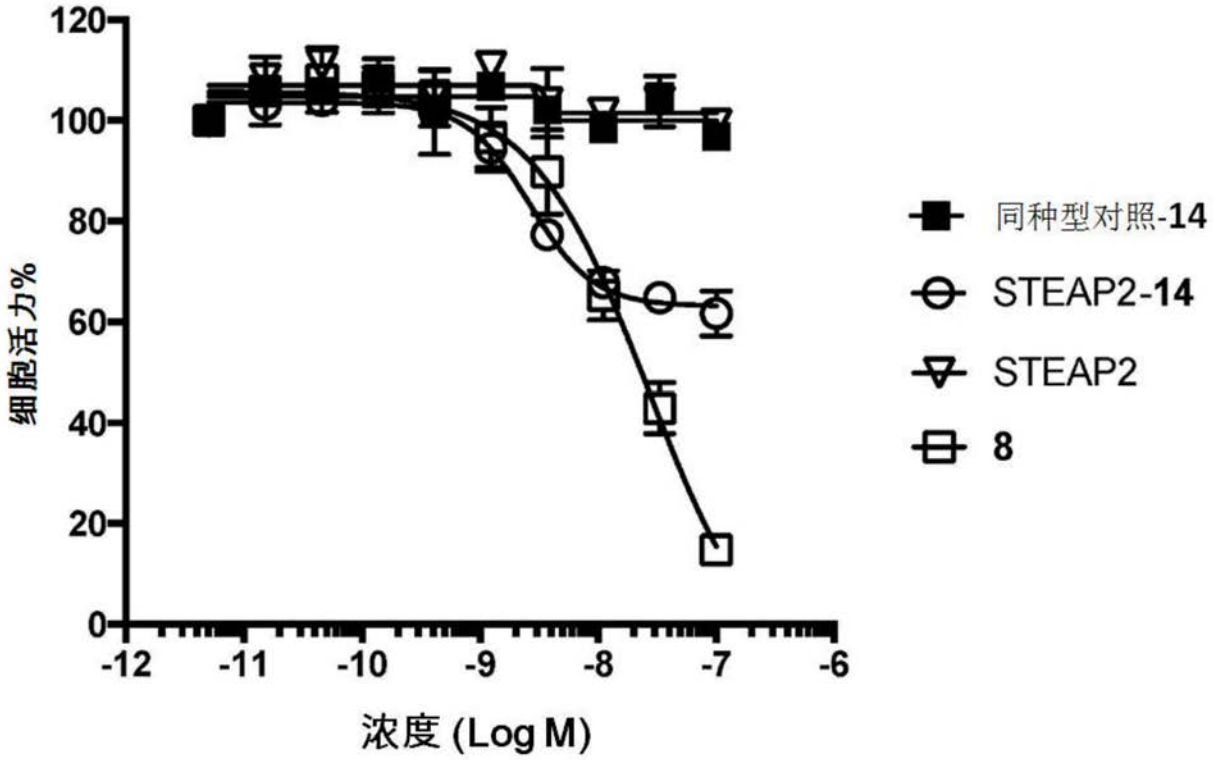

120
100
80
60
40
20
0
细胞活力%
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
浓度 (Log M)
同种型对照-14
STEAP2-14
STEAP2
8

图6

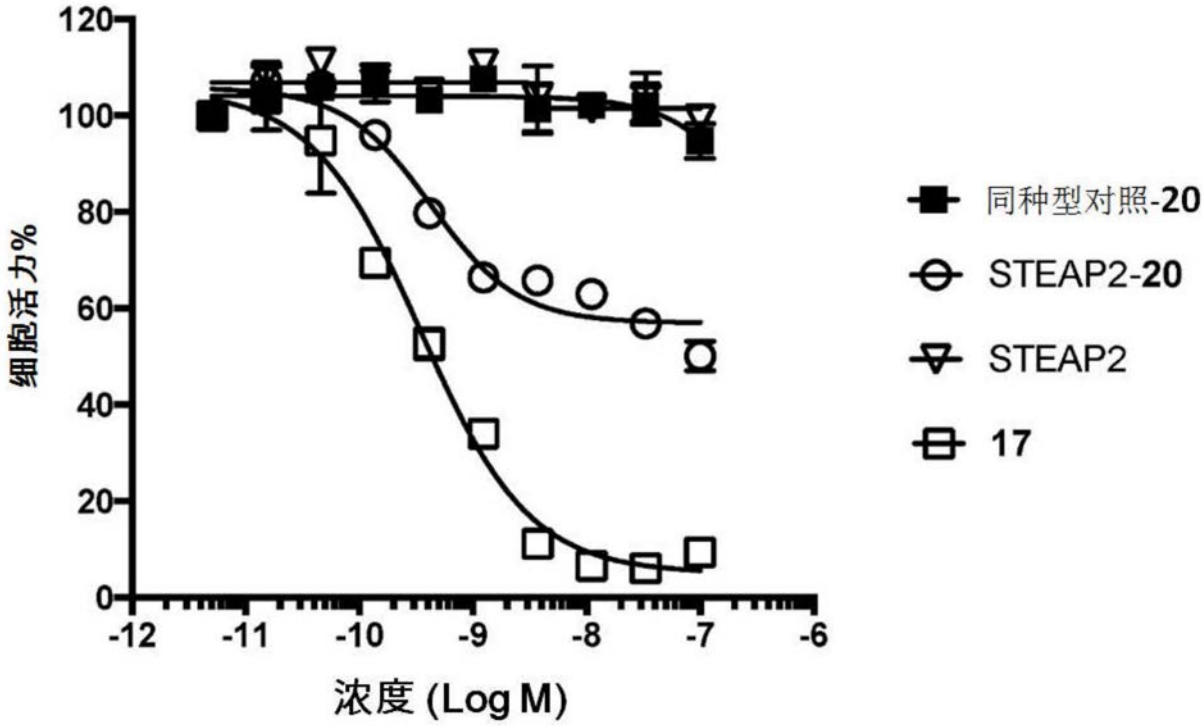

120
100
80
60
40
20
0
细胞活力%
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
浓度 (Log M)
同种型对照-20
STEAP2-20
STEAP2
17

图7

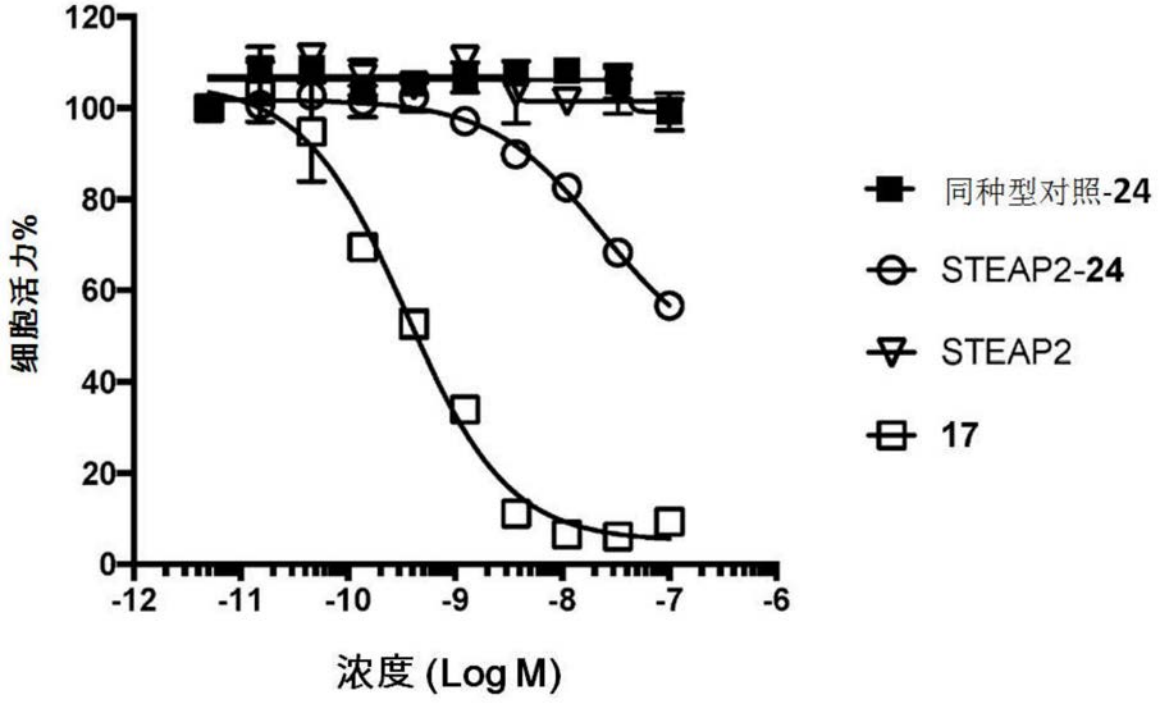

120
100
80
60
40
20
0
细胞活力%
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
浓度 (Log M)
同种型对照-24
STEAP2-24
STEAP2
17

图8

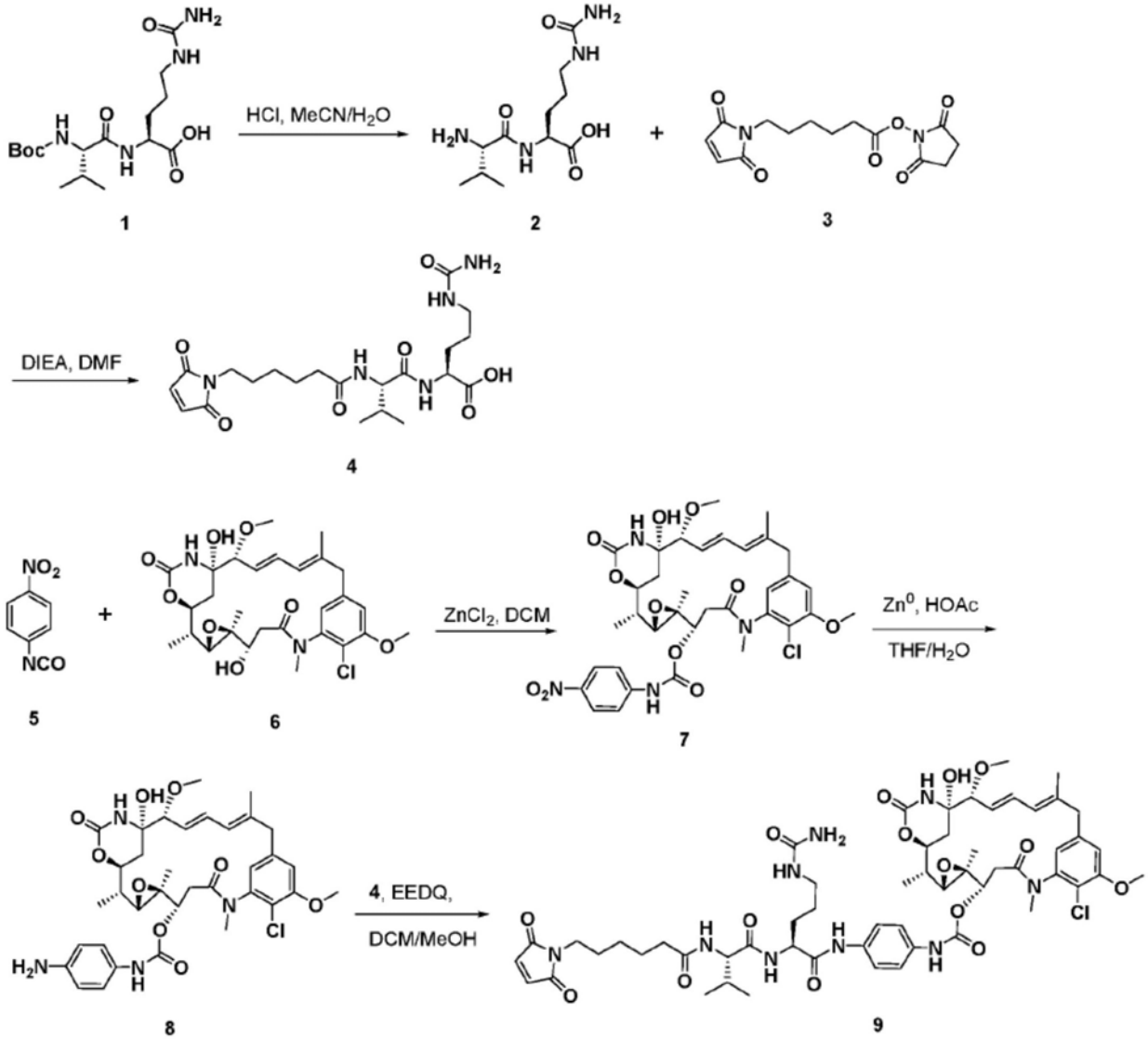

HCl, MeCN/H2O
DIEA, DMF
ZnCl2, DCM
Zn0, HOAc
THF/H2O
4, EEDQ,
DCM/MeOH
1
2
3
4
5
6
7
8
9

图9

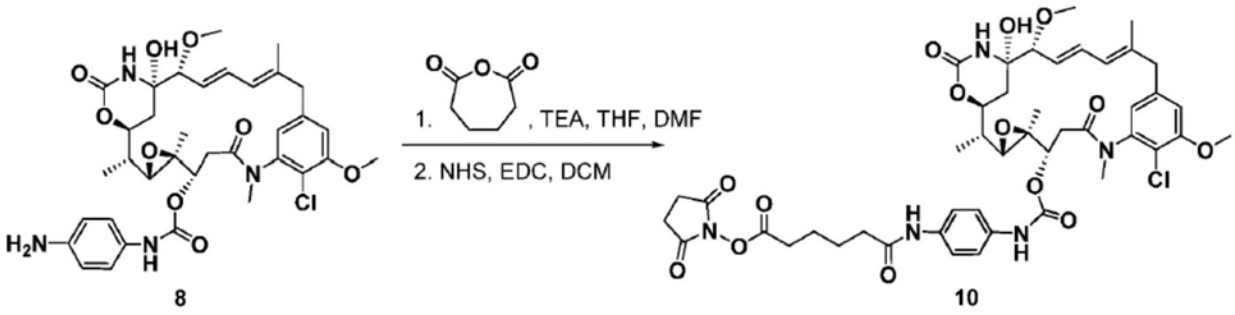

1.
, TEA, THF, DMF
2. NHS, EDC, DCM
8
10

图10

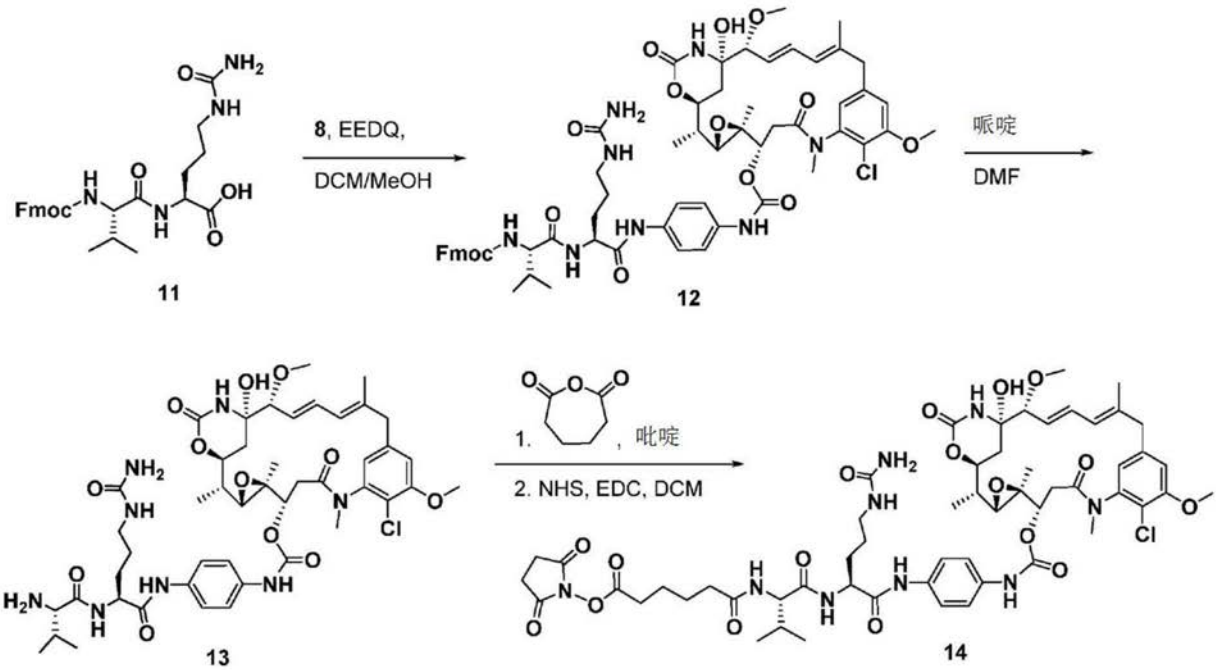

8, EEDQ,
DCM/MeOH
哌啶
DMF
1.
, 吡啶
2. NHS, EDC, DCM
11
12
13
14

图11

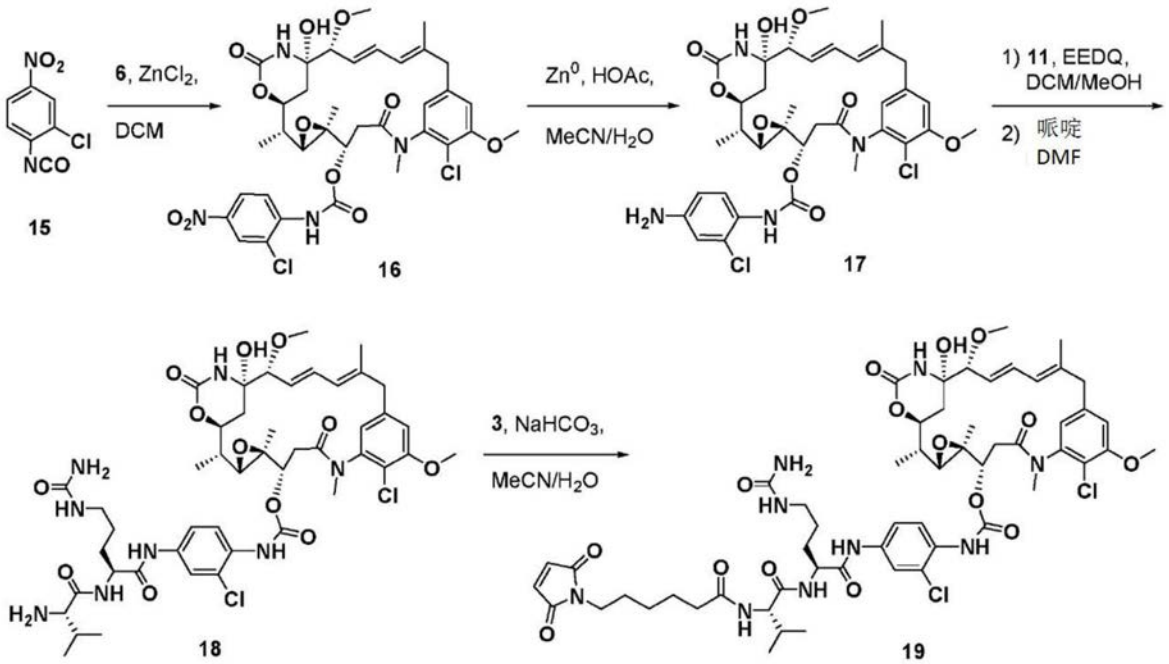

6, ZnCl2,
DCM
Zn0, HOAc,
MeCN/H2O
1) 11, EEDQ,
DCM/MeOH
2) 哌啶
DMF
3, NaHCO3,
MeCN/H2O
15
16
17
18
19

图12

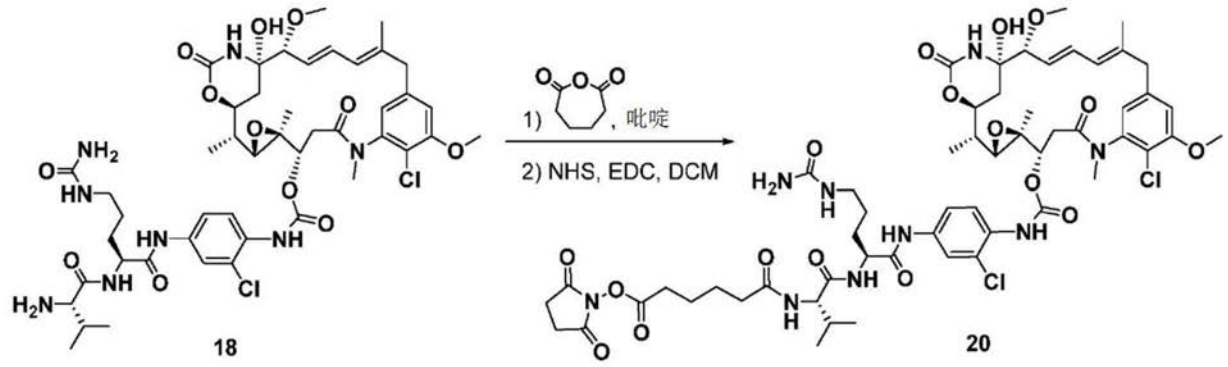

1) , 吡啶
2) NHS, EDC, DCM
18
20

图13

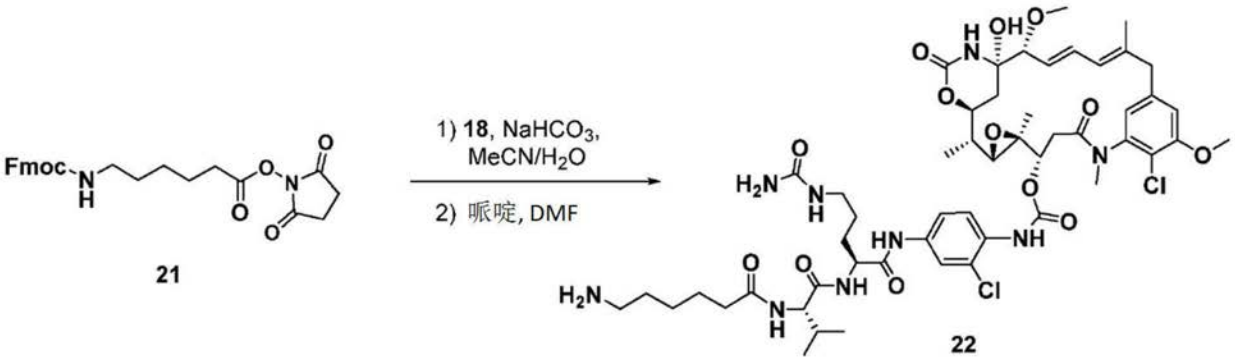

1) 18, NaHCO3, MeCN/H2O
2) 哌啶, DMF
21
22

图14

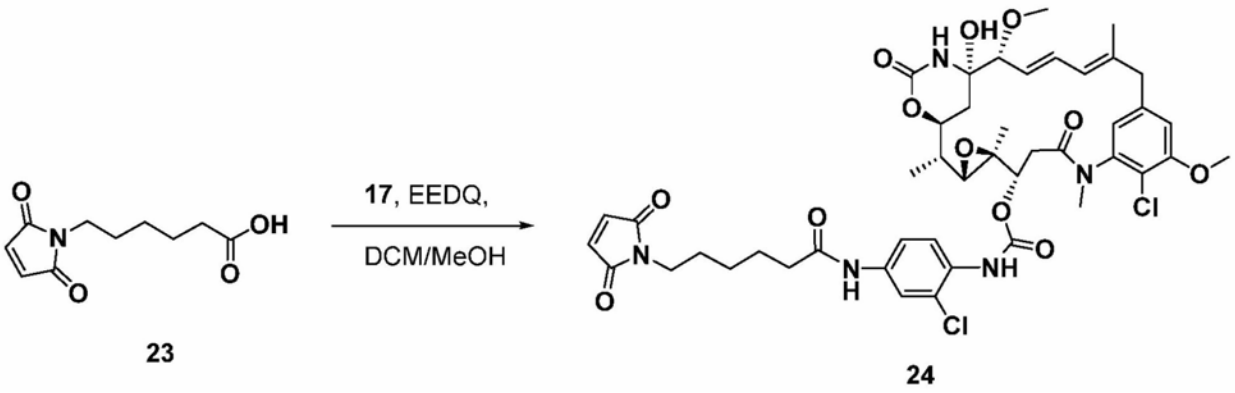

17, EEDQ,
DCM/MeOH
23
24

图15

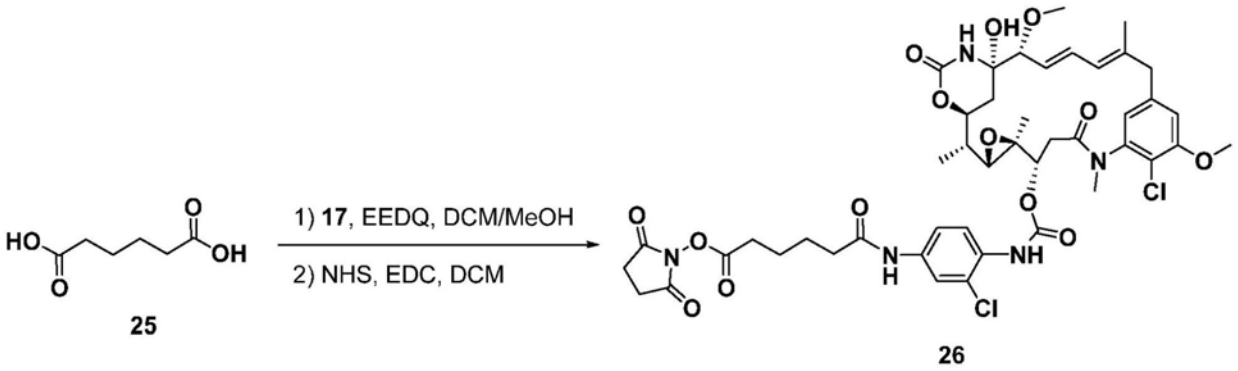

1) 17, EEDQ, DCM/MeOH
2) NHS, EDC, DCM
25
26

图16

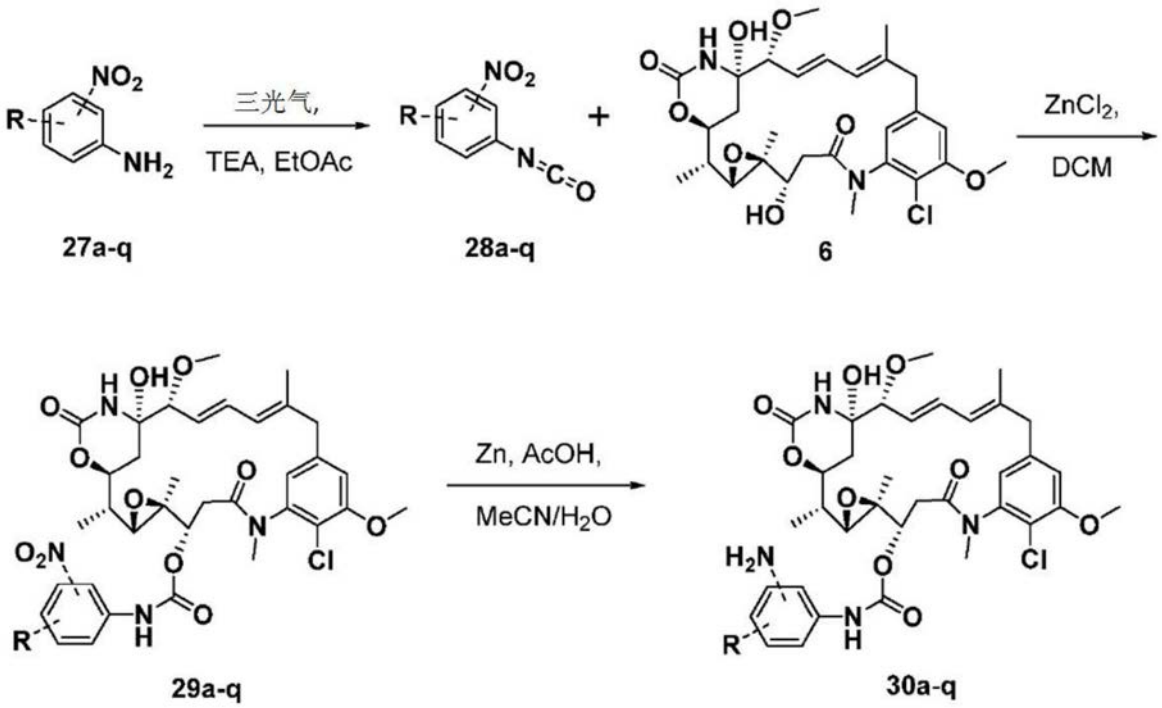

三光气,
TEA, EtOAc
ZnCl2,
DCM
27a-q
28a-q
6
Zn, AcOH,
MeCN/H2O
29a-q
30a-q

图17

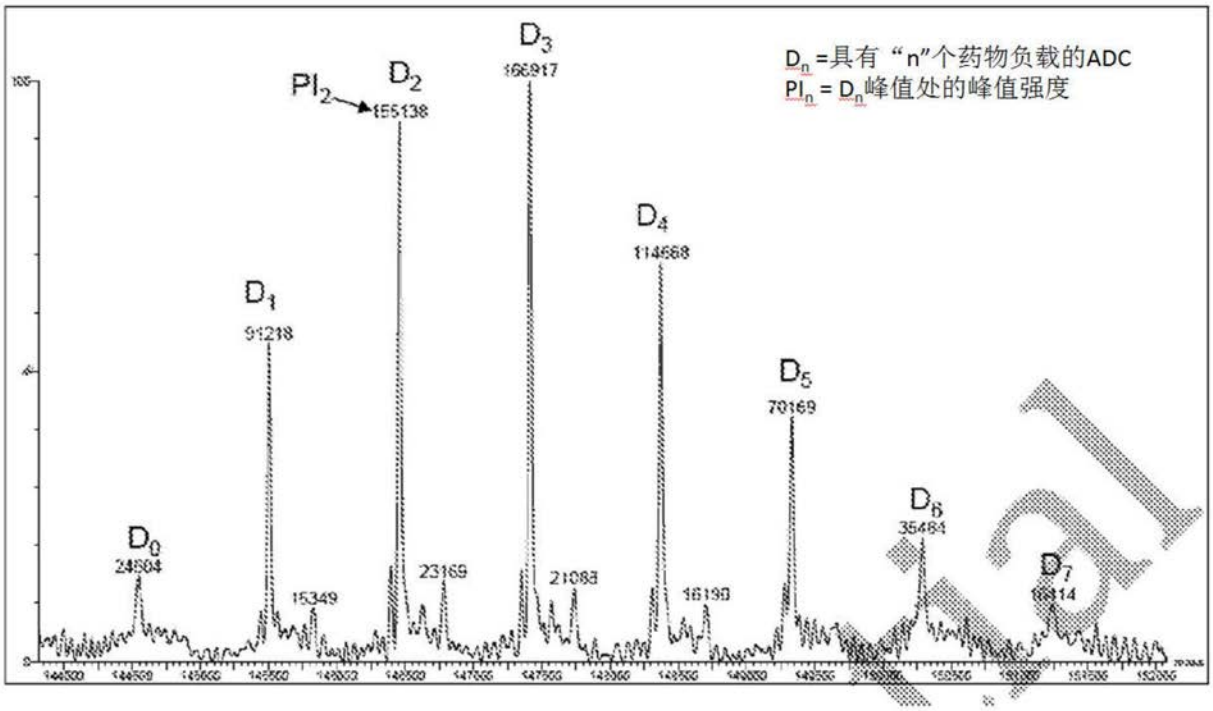

Dn =具有“n”个药物负载的ADC
PIn = Dn峰值处的峰值强度
D0
24604
D1
91218
PI2
D2
155138
15349
23169
D3
166917
21083
D4
114668
16190
D5
70169
D6
35484
D7
16414

图18