



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107019804 A

(43)申请公布日 2017. 08. 08

(21)申请号 201611198713.9

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2011.04.15

A61K 47/68(2017.01)

(30)优先权数据

A61K 31/5517(2006.01)

61/324,623 2010.04.15 US

C07D 519/06(2006.01)

(62)分案原申请数据

A61P 35/00(2006.01)

201180029867.4 2011.04.15

A61P 37/02(2006.01)

(71)申请人 西雅图基因公司

地址 美国华盛顿州

申请人 麦迪穆有限责任公司

(72)发明人 菲利普·威尔逊·霍华德

斯科特·杰弗里 帕特里克·伯克

彼得·森特

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 张英 宫传芝

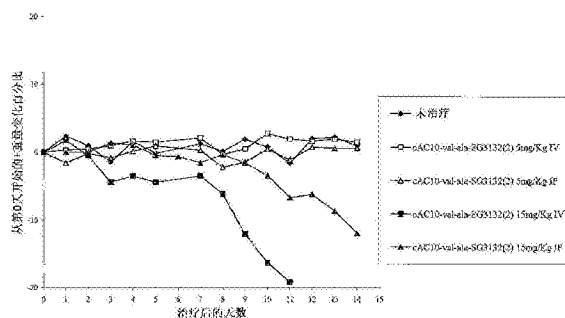
权利要求书3页 说明书90页 附图5页

(54)发明名称

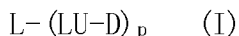
靶向吡咯并苯并二氮杂卓结合物

(57)摘要

本发明涉及靶向吡咯并苯并二氮杂卓结合物。具体而言,本发明提供了包含结合到靶向剂上的PBD的结合物以及使用这类PBD的方法。



1. 一种结合物, 具有式I:

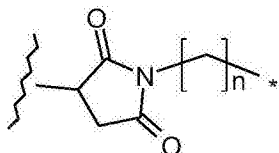


或其药学上可接受的盐或溶剂化物;

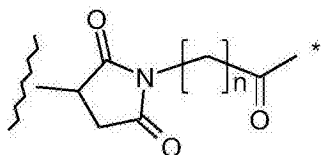
其中L是配体单元, 选自抗体或抗体的抗原结合片段,

LU是式-A¹-L¹-的接头单元,

其中, A¹选自:



其中星号表示与L¹的附着点, 波形线表示与所述配体单元的附着点, 并且n是0至6; 和

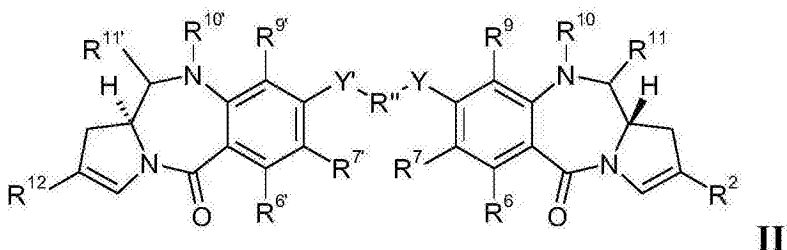


其中星号表示与L¹的附着点, 波形线表示与所述配体单元的附着点, 并且n是0至6;

L¹是二肽;

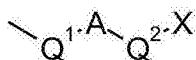
p是1至20; 以及

D是包含具有下面式II的PBD二聚体的药物单元:



其中:

R²具有式III:



其中A是C₅₋₇芳基, X是-N(R^N)-, 其中R^N选自包括H和C₁₋₄烷基的组中:

Q¹是单键, 并且Q²选自单键和-Z-(CH₂)_n-, 其中Z选自单键、O、S和NH并且是1至3;

R¹²是C₅₋₁₀芳基, 可选地被选自下组的一个或多个取代基取代, 所述组包括: 卤素、硝基、氰基、醚、C₁₋₇烷基、C₃₋₇杂环基、二甲基氨基丙氧基、哌嗪基以及双氧-C₁₋₃亚烷基;

R⁶、R^{6'}、R⁹和R^{9'}是H;

R⁷和R^{7'}独立地选自C₁₋₄烷氧基;

以下两者之一:

(a) R¹⁰是H, 并且R¹¹是OH或OR^A, 其中R^A是C₁₋₄烷基;

或者

(b) R¹⁰和R¹¹在它们结合到其上的氮原子与碳原子之间形成氮-碳双键;

R^{''}是C₃₋₁₂亚烷基;

Y和Y' 是相同的,并且选自O、S、或NH;

R^{10'} 和R^{11'} 与R¹⁰和R¹¹相同。

2. 根据权利要求1所述的结合物,其中Y和Y' 是O。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的结合物,其中R" 是C₃₋₇亚烷基。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的结合物,其中A是苯基。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的结合物,其中X是-NH-。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的结合物,其中Q²是单键。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的结合物,其中Q²是-Z-(CH₂)_n-,Z是O或S,并且n是1或2。

8. 根据权利要求7所述的结合物,其中R¹²是C₅₋₇芳基。

9. 根据权利要求8所述的结合物,其中R¹²是苯基。

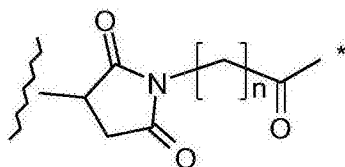
10. 根据权利要求1至7中任一项所述的结合物,其中R¹²是C₈₋₁₀芳基。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的结合物,其中R¹²具有一至三个取代基。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的结合物,其中,R¹⁰和R¹¹形成氮-碳双键。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的结合物,其中R^{7'} 与R⁷相同。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的结合物,其中,A¹是:

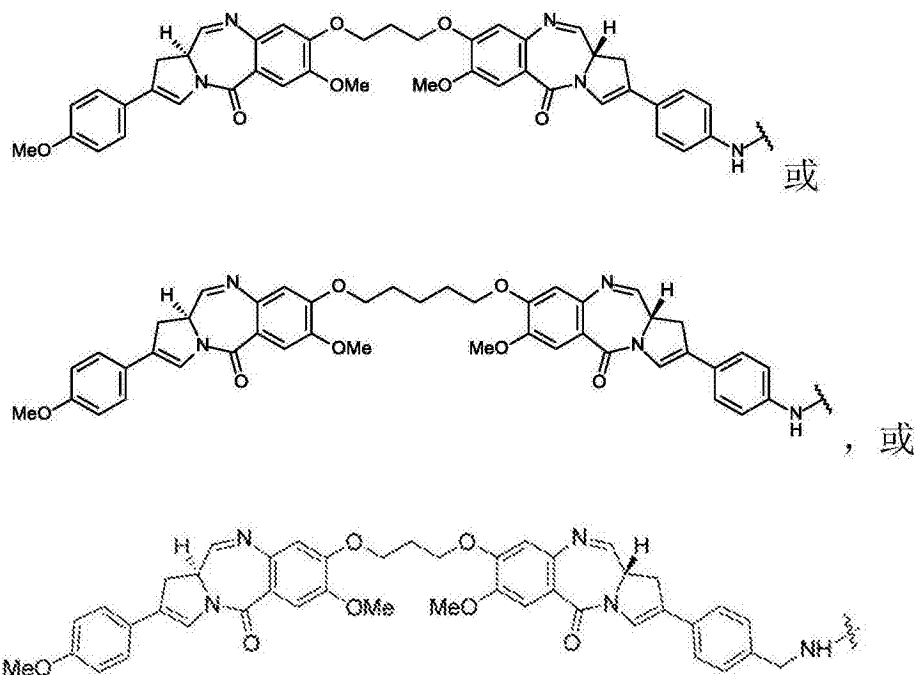


其中星号表示与L¹的附着点,波形线表示与所述配体单元的附着点,并且n是0至6。

15. 根据权利要求14所述的结合物,其中n是5。

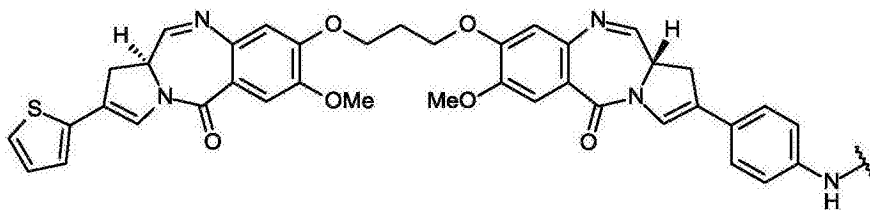
16. 根据前述权利要求中任一项所述的结合物,其中,L¹选自由缬氨酸-丙氨酸、缬氨酸-瓜氨酸以及苯丙氨酸-赖氨酸组成的组中。

17. 根据权利要求1所述的结合物,其中D选自:



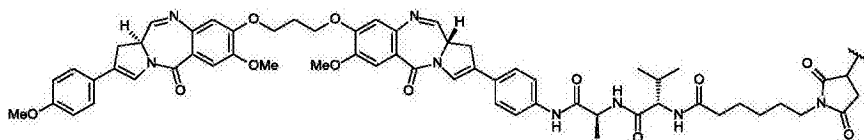
其中波形线指示与所述接头单元LU的附着点。

18. 根据权利要求1所述的结合物,其中D是:



其中波形线指示与所述接头单元LU的附着点。

19. 根据权利要求1所述的结合物,其中LU-D是:



其中波形线指示与细胞结合剂L的附着点。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的结合物、或其药学上可接受的盐或溶剂化物在制造用于治疗增生性疾病或自身免疫病的药物中的用途。

靶向吡咯并苯并二氮杂卓结合物

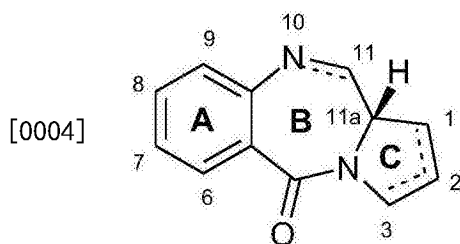
[0001] 本申请是申请日为2011年4月15日的题为“靶向吡咯并苯并二氮杂卓结合物”的中国专利申请号201180029867.4的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及靶向吡咯并苯并二氮杂卓(吡咯并苯并二氮杂卓, PBD) 结合物, 具体地通过单体之一的C2位置结合到靶向剂上的吡咯并苯并二氮杂卓二聚体。

背景技术

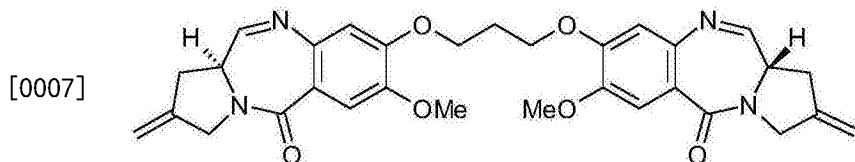
[0003] 一些吡咯并苯并二氮杂卓(PBD)能够识别并且结合到DNA的特定序列上; 优选的序列是PuGpu。第一种PBD抗肿瘤抗生素, 安曲霉素, 发现于1965年(Leimgruber, et al., J. Am. Chem. Soc., 87, 5793-5795 (1965); Leimgruber, et al., J. Am. Chem. Soc., 87, 5791-5793 (1965))。从那时起, 已经报道了许多天然发生的PBD, 并且针对各种各样的类似物已经开发了10种以上的合成路径(Thurston, et al., Chem. Rev. 1994, 433-465 (1994))。家族成员包括abbeymycin(Hochlowski, et al., J. Antibiotics, 40, 145-148 (1987)), 契卡霉素(chicamycin)(Konishi, et al., J. Antibiotics, 37, 200-206 (1984)), DC-81(日本专利58-180 487; Thurston, et al., Chem. Brit., 26, 767-772 (1990); Bose, et al., Tetrahedron, 48, 751-758 (1992)), 甲基氨基霉素(Kuminoto, et al., J. Antibiotics, 33, 665-667 (1980)), 新丝拉霉素A和B(Takeuchi, et al., J. Antibiotics, 29, 93-96 (1976)), porothramycin(Tsunakawa, et al., J. Antibiotics, 41, 1366-1373 (1988)), prothracarcin(Shimizu, et al., J. Antibiotics, 29, 2492-2503 (1982); Langley and Thurston, J. Org. Chem., 52, 91-97 (1987)), 西班牙米星(DC-102)(Hara, et al., J. Antibiotics, 41, 702-704 (1988); Itoh, et al., J. Antibiotics, 41, 1281-1284 (1988)), 西伯利亚霉素(Leber, et al., J. Am. Chem. Soc., 110, 2992-2993 (1988))以及托马霉素(Arima, et al., J. Antibiotics, 25, 437-444 (1972))。PBD具有通式结构:



[0005] 它们的差别在于在它们的芳族A环和吡咯并C环两者中取代基的数目、类型和位置, 以及在于C环的饱和度。在B环中, 在N10-C11位置处, 存在亚胺(N=C)、甲醇胺(NH-CH(OH))、或甲醇胺甲醚(NH-CH(OMe)), 它是负责烷基化DNA的亲电中心。所有已知的天然产物在手性C11a位置处具有(S)-构型, 当从C环朝向A环看时, 所述构型为它们提供了右手转动(right-handed twist)。这给予它们适当的三维形状以与B型DNA的小沟具有相同螺旋性(isohelicity), 这导致在结合位点处滑动配合(Kohn, In Antibiotics III. Springer-Verlag, New York, pp. 3-11 (1975); Hurley and Needham-VanDevanter, Acc. Chem. Res.,

19,230-237 (1986))。PBD在小沟中形成加合物的能力使它们能够干扰DNA加工,因此它们用作抗肿瘤剂。

[0006] 可以通过柔性亚烷基接头通过它们的C8/C' -羟基官能团将两个PBD单元连接在一起来增强这些分子的生物活性 (Bose, D.S., et al., J. Am. Chem. Soc., 114, 4939-4941 (1992); Thurston, D.E., et al., J. Org. Chem., 61, 8141-8147 (1996))。PBD二聚体被认为形成序列选择性DNA损伤例如回文的5' -Pu-GATC-Py-3' 链间交联 (Smellie, M., et al., Biochemistry, 42, 8232-8239 (2003); Martin, C., et al., Biochemistry, 44, 4135-4147), 它被认为主要负责它们的生物活性。PBD二聚体的一个实施是SG2000 (SJG-136):



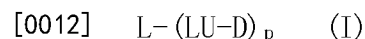
[0008] (Gregson, S., et al., J. Med. Chem., 44, 737-748 (2001); Alley, M.C., et al., Cancer Research, 64, 6700-6706 (2004); Hartley, J.A., et al., Cancer Research, 64, 6693-6699 (2004))。

[0009] 由于这些高度有效化合物在交联DNA中的作用方式,已经对称地制造PBD二聚体,即,二聚体的两个单体是相同的。通过构建同时具有已经形成的二聚体键的PBD二聚体部分,或者通过使已经构建的PBD单体部分与二聚体连接基团反应,这种合成路径提供了直接合成。这些合成方法已经限制了用于制备包含PBD的靶向结合物的选项。然而,由于PBD二聚体的观察到的效力,对于可结合到靶向剂上以用于靶向治疗的PBD二聚体存在需要。

发明内容

[0010] 本发明涉及包含连接到靶向剂上的PBD的二聚体的结合物,其中在为了将化合物连接于靶向剂上提供锚定物的C2位置处,PBD单体具有取代基。本发明还涉及包含结合到靶向剂上的PBD二聚体的结合物,其中二聚体的PBD单体是不同的。在为了将化合物连接到靶向剂上提供锚定物的C2位置处,PBD单体之一具有取代基。本文描述的结合物对于表达靶分子的细胞(如癌细胞或免疫细胞)具有强有力的细胞毒性和/或细胞抑制活性。与相应的不含PBD二聚体的药物化合物相比较,这些结合物显示出具有降低毒性的良好效力。

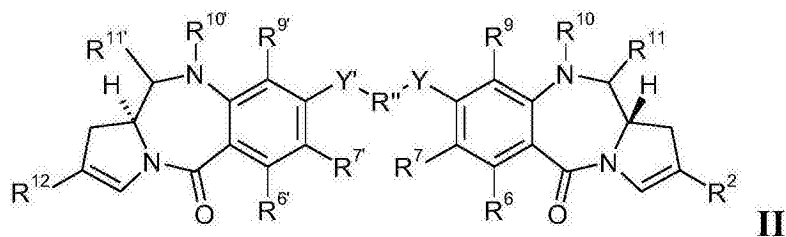
[0011] 在一些实施方式中,结合物具有下面式I:



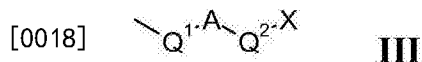
[0013] 其中L是配体单元(即,靶向剂),LU是接头单元,并且D是包含PBD二聚体的药物单元。下标p是1至20的整数。因此,结合物包含通过接头单元共价地连接到至少一个药物单元上的配体单元。下面更全面描述的配体单元是结合到靶部分上的靶向剂。配体单元可以,例如,特异性地结合到细胞成分(细胞结合剂)上或结合到感兴趣的其他靶分子上。因此,本发明还提供了例如用于治疗各种癌症和自身免疫病的方法。这些方法包括使用结合物,其中配体单元是特异性地结合到靶分子上的靶向剂。配体单元可以是,例如,蛋白质、多肽或肽,例如抗体,抗体的抗原结合片段,或其他结合剂,如Fc融合蛋白。

[0014] 在第一方面,所述结合物包括式I(同上)的结合物,其中药物单元包含下面式II的PBD二聚体:

[0015]



[0016] 其中:

[0017] R^2 具有式III:

[0019] 其中A是C₅₋₇芳基,X是用于结合到接头单元上的可活化基团,其中X选自包括-O-、-S-、-C(O)-O-、-C(O)-、-NHC(O)-、以及-N(R^N)-的组中,其中R^N选自包括H、C₁₋₄烷基以及(C₂H₄O)_mCH₃的组中,其中m是1至3,以及

[0020] (i) Q¹是单键,并且Q²选自单键和-Z-(CH₂)_n-,其中Z选自单键、O、S以及NH,并且n是1至3;或者

[0021] (ii) Q¹是-CH=CH-,并且Q²是单键;

[0022] R¹²是C₅₋₁₀芳基,被选自下组的一个或多个取代基可选地取代,该组包括:卤素、硝基、氰基、醚、C₁₋₇烷基、C₃₋₇杂环基和双氧-C₁₋₃亚烷基;

[0023] R⁶和R⁹独立地选自H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR'、硝基、Me₃Sn和卤素;

[0024] 其中R和R'独立地选自可选地取代的C₁₋₁₂烷基、可选地取代的C₃₋₂₀杂环基以及可选地取代的C₅₋₂₀芳基;

[0025] R⁷选自H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NHR'、硝基、Me₃Sn和卤素;

[0026] (a) R¹⁰是H,并且R¹¹是OH或OR^A,其中R^A是C₁₋₄烷基;

[0027] (b) 在它们结合到其上的氮原子与碳原子之间,R¹⁰和R¹¹形成氮-碳双键;或者

[0028] (c) R¹⁰是H并且R¹¹是SO_zM,其中z是2或3并且M是单价药学上可接受的阳离子;

[0029] R''是C₃₋₁₂亚烷基,它的链可以被一个或多个杂原子中断(例如,O、S、NR^{N2}(其中R^{N2}是H或C₁₋₄烷基)),和/或是芳环(例如,苯或吡啶);

[0030] Y和Y'选自O、S、或NH;

[0031] R^{6'}、R^{7'}、R^{9'}分别选自与R⁶、R⁷和R⁹相同的组中,并且R^{10'}和R^{11'}与R¹⁰和R¹¹相同,其中如果R¹¹和R^{11'}是SO_zM,则M可以表示二价药学上可接受的阳离子。

[0032] 在第二方面,提供了式I的结合物用于治疗增生性疾病或自身免疫病的药物的用途。在相关的第三方面,提供了式I的结合物用于治疗增生性疾病或自身免疫病的用途。

[0033] 在另一个方面,提供了式I的结合物用于在目标位置提供PBD二聚体、或它的盐或溶剂化物的用途。

[0034] 本领域普通技术人员能够容易地确定候选结合物是否治疗任何特定细胞类型的增生性疾病。例如,在以下实施例中描述了可以常规地用于评估由特定化合物提供的活性的测定法。

[0035] 术语“增生性疾病”是指不希望的过多或异常细胞的不想要的或不受控制的细胞增殖,如,新生性或增生性生长(无论在体外或在体内)。

[0036] 增生性病症的实例包括,但不限于,良性、恶性前期、以及恶性细胞增殖,包括但不限于,新生物和肿瘤(例如,组织细胞瘤、胶质瘤、星形细胞瘤、骨瘤)、癌症(例如,肺癌、小细胞肺癌、胃肠癌、肠癌、结肠癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、肝癌、肾癌、膀胱癌、胰腺癌、脑癌、肉瘤、骨肉瘤、卡波西肉瘤、黑素瘤)、白血病、牛皮癣、骨病、纤维增生性疾病(例如结缔组织的纤维增生性疾病)、以及动脉粥样硬化。感兴趣的其他癌症包括,但不限于,血液学恶性肿瘤如白血病和淋巴瘤,如非霍奇金淋巴瘤、以及亚型如DLBCL、边缘区、外套区(mantle zone)、和滤泡性霍奇金淋巴瘤、AML、以及B或T细胞起源的其他癌症。

[0037] 自身免疫病的实例包括下面各项:类风湿性关节炎、自身免疫性脱髓鞘疾病(例如,多发性硬化症、变应性脑脊髓炎)、银屑病关节炎、内分泌性眼病、葡萄膜视网膜炎(uveoretinitis)、系统性红斑狼疮、重症肌无力、格雷夫斯病、肾小球肾炎、自身免疫性肝脏疾病、炎症肠病(例如,克罗恩病)、过敏反应、变态反应、舍格伦综合征、I型糖尿病、原发性胆汁性肝硬化、韦格纳肉芽肿病、纤维肌痛、多肌炎、皮肌炎、多发性内分泌功能衰竭、施密特综合征、自身免疫性葡萄膜炎、艾迪生病、肾上腺炎、甲状腺炎、桥本甲状腺炎、自身免疫性甲状腺病、恶性贫血、胃萎缩、慢性肝炎、狼疮样肝炎、动脉粥样硬化、亚急性皮肤红斑狼疮、甲状旁腺功能减退、德雷斯勒综合征、自身免疫性血小板减少症、特发性血小板减少性紫癜、溶血性贫血、寻常性天疱疮、天疱疮、疱疹性皮炎、脱发(alopecia areata)、类天疱疮、硬皮病、进行性系统性硬化病、CREST综合征(钙质沉着症、雷诺现象、食道运动功能障碍、指端硬化、以及毛细血管扩张)、男性和女性自身免疫性不孕、强直性脊柱炎、溃疡性结肠炎、混合性结缔组织病、结节性多动脉炎、系统性坏死性血管炎、特应性皮炎、特应性鼻炎、古德帕斯丘综合征、查加斯病、结节病、风湿热、哮喘、复发性流产、抗磷脂综合征、农夫肺、多形性红斑、心脏切开后综合征、库欣综合征、自身免疫性慢性活动性肝炎、鸟爱好者肺(bird-fancier's lung)、中毒性表皮坏死溶解症、奥尔波特综合征、牙槽炎、变应性肺泡炎、纤维性肺泡炎、间质性肺病、结节性红斑、坏疽性脓皮症、输血反应、高安动脉炎、风湿性多肌痛、颞动脉炎、血吸虫病、巨细胞性动脉炎、蛔虫病、曲霉病、Sampter氏综合征、湿疹、淋巴瘤样肉芽肿病、白塞病、卡普兰综合征、川崎病、登革热、脑脊髓炎、心内膜炎、心肌心内膜纤维化、眼内炎、持久性隆起性红斑、牛皮癣、胎儿成红细胞增多、嗜酸性筋膜炎、舒尔曼综合征、费尔蒂综合征、丝虫病、睫状体炎、慢性睫状体炎、异时性睫状体炎、富克斯睫状体炎、IgA肾病、亨-舍紫癜、移植物抗宿主病、移植排斥、心肌病、伊-兰综合征、复发性多软骨炎、冷球蛋白血症、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、埃文斯综合征、以及自身免疫性性腺衰竭。

[0038] 在一些实施方式中,自身免疫病是B淋巴细胞的疾病(例如,系统性红斑狼疮、古德帕斯丘综合征、类风湿性关节炎、以及I型糖尿病)、Th1-淋巴细胞的疾病(例如,类风湿性关节炎、多发性硬化、牛皮癣、舍格伦综合征、桥本甲状腺炎、格雷夫斯病、原发性胆汁性肝硬化、韦格纳肉芽肿病、结核病、或移植物抗宿主病)、或Th2-淋巴细胞的疾病(例如,特应性皮炎、系统性红斑狼疮、特应性哮喘、鼻结膜炎、变应性鼻炎、澳门综合征、系统性硬化病、或慢性移植物抗宿主病)。通常,涉及树突状细胞的疾病涉及Th1-淋巴细胞或Th2-淋巴细胞的疾病。在一些实施方式中,自身免疫性疾病是T细胞介导的免疫紊乱。

[0039] 在第四方面,本发明包括制造式I的结合物的方法。

[0040] 通过与前面用于制造对称二聚体PBD化合物的策略同于的策略,来制造用于本发明的二聚体PBD化合物。具体地,本发明的发明人已经开发了涉及以分离方法步骤将每个C2

芳基取代基加入对称PBD二聚体核心的方法。因此,本发明的第六方面提供了制造式I结合物的方法,包括本文描述的方法步骤中至少一个。

附图说明

[0041] 图1至图6显示了本发明的结合物在肿瘤中的作用。

具体实施方式

[0042] 定义

[0043] 当本文中使用时,除非上下文另有说明,提及商品名还指商品名产品的产品配方、通用名药物、以及一种或多种活性药物成分。

[0044] 结合剂和靶向剂

[0045] 如在本文中使用的术语“结合剂”和“靶向剂”是指特异性地结合到靶分子上的分子,例如蛋白质、多肽或肽。实例可以包括全长抗体、全长抗体的抗原结合片段、包括特异性地结合到靶分子上的抗体重链和/或轻链可变区的其他试剂(蛋白质、多肽或肽),或包含结合到靶分子上以及连接到抗体的Fc区、结构域或其一部分上的蛋白质、肽、多肽的胞外域的Fc融合蛋白。

[0046] 特异性地结合

[0047] 术语“特异性地结合”和“特异性结合”是指抗体或其他蛋白、多肽或肽结合到预先确定的分子上(例如,抗原)。典型地,抗体或其他分子以至少约 $1 \times 10^7 M^{-1}$ 的亲合力结合,并且以比它结合到与预先确定的分子或紧密相关分子不同的非特异性分子(例如,BSA、酪蛋白)上的亲和力高至少两倍的亲合力结合到预先确定的分子上。

[0048] 药学上可接受的阳离子

[0049] 药学上可接受的单价和二价阳离子的实例在Berge, et al., J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977) 中进行讨论,通过引用将其结合在此。

[0050] 药学上可接受的阳离子可以是无机的或有机的。

[0051] 药学上可接受的单价无机阳离子的实例包括,但不限于,碱金属离子如 Na^+ 和 K^+ 。药学上可接受的二价无机阳离子的实例包括,但不限于,碱土金属阳离子如 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 。药学上可接受的有机阳离子的实例包括,但不限于,铵离子(即 NH_4^+)和取代的铵离子(例如 NH_3R^+ 、 $NH_2R_2^+$ 、 NHR_3^+ 、 NR_4^+)。一些适当取代的铵离子的实例是来自下面的那些:乙胺、二乙胺、二环己胺、三乙胺、丁胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪、苄胺、苯基苄胺、胆碱、葡甲胺、和氨丁三醇,以及氨基酸,如赖氨酸和精氨酸。常见的季铵离子的实例是 $N(CH_3)_4^+$ 。

[0052] 取代基

[0053] 如在本文中使用的短语“可选地取代”是指可以是未取代的或可以是取代的母体基团。

[0054] 除非另有说明,如在本文中使用的,术语“取代”是指具有一个或多个取代基的母体基团。术语“取代基”在本文中以常规含义使用并且是指共价连接到,或者如果适当的话,融合到母体基团上的化学部分。多种多样的取代基是熟知的,并且用于它们形成以及引入多种母体基团中的方法也是熟知的。

[0055] 下面更详细地说明取代基的实例。

[0056] C_{1-12} 烷基:如在本文中使用的,术语“ C_{1-12} 烷基”是指通过从具有1至12个碳原子的碳氢化合物的碳原子上去除氢原子而获得的单价部分,它可以是脂肪族或脂环族,并且它可以是饱和或不饱和的(例如部分不饱和、完全不饱和)。因此,术语“烷基”包括下面讨论的子类:链烯基、炔基、环烷基等。

[0057] 饱和烷基的实例包括,但不限于,甲基(C_1)、乙基(C_2)、丙基(C_3)、丁基(C_4)、戊基(C_5)、己基(C_6)和庚基(C_7)。

[0058] 饱和的线性烷基的实例包括,但不限于,甲基(C_1)、乙基(C_2)、正丙基(C_3)、正丁基(C_4)、正戊基(戊基)(C_5)、正己基(C_6)和正庚基(C_7)。

[0059] 饱和的支链烷基的实例包括异丙基(C_3)、异丁基(C_4)、仲丁基(C_4)、叔丁基(C_4)、异戊基(C_5)、和新戊基(C_5)。

[0060] C_{2-12} 链烯基:如在本文中使用的术语“ C_{2-12} 链烯基”是指具有一个或多个碳-碳双键的烷基。

[0061] 不饱和的链烯基的实例包括,但不限于乙烯基(ethenyl)(乙烯基,vinyl, $-\text{CH}=\text{CH}_2$)、1-丙烯基($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$)、2-丙烯基(烯丙基, $-\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$)、异丙烯基(1-甲基乙烯基, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$)、丁烯基(C_4)、戊烯基(C_5)、和己烯基(C_6)。

[0062] C_{2-12} 炔基:如在本文中使用的,术语“ C_{2-12} 炔基”是指具有一个或多个碳-碳三键的烷基。

[0063] 不饱和的炔基的实例包括,但不限于,乙炔基($-\text{C}\equiv\text{CH}$)和2-丙炔基(炔丙基, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$)。

[0064] C_{3-12} 环烷基:如在本文中使用的,术语“ C_{3-12} 环烷基”是指还是环基的烷基;即,通过从环烃(碳环)化合物的脂环原子上去除氢原子而获得的单价部分,所述部分具有3至7个碳原子(包括3至7个环原子)。

[0065] 环烷基的实例包括,但不限于,来自下面的那些:

[0066] 饱和的单环碳氢化合物:

[0067] 环丙烷(C_3)、环丁烷(C_4)、环戊烷(C_5)、环己烷(C_6)、环庚烷(C_7)、甲基环丙烷(C_4)、二甲基环丙烷(C_5)、甲基环丁烷(C_5)、二甲基环丁烷(C_6)、甲基环戊烷(C_6)、二甲基环戊烷(C_7)和甲基环己烷(C_7);

[0068] 不饱和的单环碳氢化合物:

[0069] 环丙烯(C_3)、环丁烯(C_4)、环戊烯(C_5)、环己烯(C_6)、甲基环丙烯(C_4)、二甲基环丙烯(C_5)、甲基环丁烯(C_5)、二甲基环丁烯(C_6)、甲基环戊烯(C_6)、二甲基环戊烯(C_7)和甲基环己烯(C_7);以及

[0070] 饱和的多环碳氢化合物:

[0071] 降萘烷(C_7)、降蒾烷(C_7)、降莰烷(C_7)。

[0072] C_{3-20} 杂环基:如在本文中使用的,术语“ C_{3-20} 杂环基”是指通过从杂环化合物的环原子上去除氢原子而获得的单价部分,所述单价部分具有3至20个环原子,其中1至10个是环杂原子。优选地,每个环具有3至7个环原子,其中1至4个是环杂原子。

[0073] 在本发明上下文中,前缀(例如 C_{3-20} 、 C_{3-7} 、 C_{5-6} 等)表示环原子的数目、或环原子(无论是碳原子还是杂原子)的数目范围。例如,如在本文中使用的,术语“ C_{5-6} 杂环基”是指具有5或6个环原子的杂环基。

[0074] 单环杂环基的实例包括,但不限于,来自下面的那些:

[0075] N₁:氮丙啶(C₃)、氮杂环丁烷(C₄)、吡咯烷(四氢吡咯)(C₅)、吡咯啉(例如,3-吡咯啉、2,5-二氢吡咯)(C₅)、2H-吡咯或3H-吡咯(异吡咯)(C₅)、哌啶(C₆)、二氢吡啶(C₆)、四氢吡啶(C₆)、氮杂卓(C₇);

[0076] O₁:氧杂环丙烷(oxirane)(C₃)、氧杂环丁烷(oxetane)(C₄)、氧杂环戊烷(oxolane)(四氢呋喃)(C₅)、氧杂环戊二烯(二氢呋喃)(C₅)、噁烷(四氢吡喃)(C₆)、二氢吡喃(C₆)、吡喃(C₆)、噁庚(C₇);

[0077] S₁:硫杂环丙烷(C₃)、硫杂环丁烷(C₄)、硫杂环戊烷(四氢噻吩)(C₅)、硫杂环己烷(四氢噻喃)(C₆)、硫杂环庚烷(thiepane)(C₇);

[0078] O₂:二氧杂环戊烷(C₅)、二氧杂环己烷(C₆)、和二氧杂环庚烷(C₇);

[0079] O₃:三氧杂环己烷(C₆);

[0080] N₂:咪唑烷(C₅)、吡唑烷(二氮杂环戊烷)(C₅)、咪唑啉(C₅)、吡唑啉(二氢吡唑)(C₅)、哌嗪(C₆);

[0081] N₁O₁:四氢噁唑(C₅)、二氢噁唑(C₅)、四氢异噁唑(C₅)、二氢异噁唑(C₅)、吗啉(C₆)、四氢噁嗪(C₆)、二氢噁嗪(C₆)、噁嗪(C₆);

[0082] N₁S₁:噻唑啉(C₅)、噻唑烷(C₅)、硫代吗啉(C₆);

[0083] N₂O₁:噁二嗪(C₆);

[0084] O₁S₁:氧硫杂环戊二烯(oxathiole)(C₅)和氧硫杂环己烷(噻噁烷)(C₆);以及

[0085] N₁O₁S₁:噁噻嗪(C₆)。

[0086] 取代的单环杂环基的实例包括来自环形式糖的那些:例如,呋喃糖(C₅),如阿拉伯呋喃糖、来苏呋喃糖(lyxofuranose)、呋喃核糖、和呋喃木糖(xylofuranse);以及吡喃糖(C₆),如吡喃阿洛糖(allopyranose)、吡喃阿卓糖(altropyranose)、吡喃葡萄糖、吡喃甘露糖、吡喃古洛糖(gulopyranose)、吡喃艾杜糖(idopyranose)、吡喃半乳糖、和吡喃塔罗糖(talopyranose)。

[0087] C₅₋₂₀芳基:如在本文中使用的,术语“C₅₋₂₀芳基”是指通过从芳香族化合物的芳环原子上去除氢原子而获得的单价部分,所述单价部分具有3至20个环原子。优选地,每个环具有5至7个环原子。

[0088] 在本发明上下文中,前缀(例如,C₃₋₂₀、C₅₋₇、C₅₋₆等)表示环原子的数目、或环原子(无论碳原子还是杂原子)的数目范围。例如,如在本文中使用的,术语“C₅₋₆芳基”是指具有5或6个环原子的芳基。

[0089] 环原子可以都是碳原子(如在“碳芳基”中)。

[0090] 碳芳基的实例包括,但不限于,来自下面的那些:苯(例如苯基)(C₆)、萘(C₁₀)、甘菊环(C₁₀)、蒽(C₁₄)、菲(C₁₄)、萘并萘(C₁₈)、和芘(C₁₆)。

[0091] 芳基(所述芳基包含稠环,其中至少一个是芳环)的实例包括,但不限于来自下面的基团:茛满(例如2,3-二氢-1H-茛)(C₉)、茛(C₉)、异茛(C₉)、四氢化萘(1,2,3,4-四氢化萘)(C₁₀)、茚(C₁₂)、茛(C₁₃)、菲烯(非那烯,phenalene)(C₁₃)、醋菲(C₁₅)、和醋蒽(C₁₆)。

[0092] 可替换地,环原子可以包括一个或多个杂原子(如在“杂芳基”中)。单环杂芳基的实施例包括,但不限于,来自下面的那些:

[0093] N₁:吡咯(Pyrrole)(吡咯,azole)(C₅)、吡啶(吡啶)(C₆);

- [0094] O₁:呋喃(氧杂环戊二烯)(C₅) ;
- [0095] S₁:噻吩(thiophene)(噻吩,thiole)(C₅) ;
- [0096] N₁O₁:噁唑(C₅)、异噁唑(C₅)、异噁嗪(C₆) ;
- [0097] N₂O₁:噁二唑(呋咱)(C₅) ;
- [0098] N₃O₁:噁三唑(C₅) ;
- [0099] N₁S₁:噻唑(C₅)、异噻唑(C₅) ;
- [0100] N₂:咪唑(1,3-二唑)(C₅)、吡唑(1,2-二唑)(C₅)、哒嗪(1,2-二嗪)(C₆)、嘧啶(1,3-二嗪)(C₆) (例如,胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶)、吡嗪(1,4-二嗪)(C₆) ;
- [0101] N₃:三唑(C₅)、三嗪(C₆) ;以及
- [0102] N₄:四唑(C₅) 。
- [0103] 包含稠环的杂芳基的实例包括,但不限于:
- [0104] C₉(具有2个稠环),来自苯并呋喃(O₁)、异苯并呋喃(O₁)、吲哚(N₁)、异吲哚(N₁)、中氮茚(N₁)、二氢吲哚(N₁)、异二氢吲哚(N₁)、嘌呤(N₄) (例如,腺嘌呤、鸟嘌呤)、苯并咪唑(N₂)、吲唑(N₂)、苯并噁唑(N₁O₁)、苯并异噁唑(N₁O₁)、苯并二氧杂环戊二烯(O₂)、苯并呋咱(N₂O₁)、苯并三唑(N₃)、苯并噻吩(S₁)、苯并噻唑(N₁S₁)、苯并噻二唑(N₂S₂) ;
- [0105] C₁₀(具有2个稠环),来自色烯(O₁)、异色烯(O₁)、色满(O₁)、异色满(O₁)、苯并二噁烷(O₂)、喹啉(N₁)、异喹啉(N₁)、喹嗪(N₁)、苯并噁嗪(N₁O₁)、苯并二嗪(N₂)、吡啶并吡啶(N₂)、喹啉(N₂)、喹唑啉(N₂)、噌啉(N₂)、酞嗪(N₂)、茶啉(N₂)、蝶啶(N₄) ;
- [0106] C₁₁(具有2个稠环),来自苯并二氮杂卓(N₂) ;
- [0107] C₁₃(具有3个稠环),来自咔唑(N₁)、二苯并呋喃(O₁)、二苯并噻吩(S₁)、咔啉(N₂)、茶嵌间二氮杂苯(N₂)、吡啶并吲哚(N₂) ;以及
- [0108] C₁₄(具有3个稠环),来自吖啶(N₁)、氧杂蒽(O₁)、噻吨(S₁)、噁蒽(oxanthrene)(O₂)、氧硫杂蒽(phenoxathiin)(O₁S₁)、吩嗪(N₂)、吩噁嗪(N₁O₁)、吩噻嗪(N₁S₁)、噻蒽(S₂)、菲啉(N₁)、菲咯啉(N₂)、吩嗪(N₂) 。
- [0109] 上述基团(无论单独地或其他取代基的一部分)本身可以可选地被选自它们本身和下面列出的另外取代基的一个或多个基团取代。
- [0110] 卤素:-F、-Cl、-Br、和-I。
- [0111] 羟基:-OH。
- [0112] 醚:-OR,其中R是醚取代基,例如,C₁₋₇烷基(也称为C₁₋₇烷氧基,在下面讨论)、C₃₋₂₀杂环基(也称为C₃₋₂₀杂环氧基)、或C₅₋₂₀芳基(也称为C₅₋₂₀芳氧基),优选C₁₋₇烷基。
- [0113] 烷氧基:-OR,其中R是烷基,例如,C₁₋₇烷基。C₁₋₇烷氧基的实例包括,但不限于,-OMe(甲氧基)、-OEt(乙氧基)、-O(nPr)(正丙氧基)、-O(iPr)(异丙氧基)、-O(nBu)(正丁氧基)、-O(sBu)(仲丁氧基)、-O(iBu)(异丁氧基)、和-O(tBu)(叔丁氧基)。
- [0114] 缩醛:-CH(OR¹)(OR²),其中R¹和R²独立地是缩醛取代基,例如,C₁₋₇烷基、C₃₋₂₀杂环基、或C₅₋₂₀芳基,优选C₁₋₇烷基,或者,在“环状”缩醛基团的情况下,R¹和R²,连同它们附连到其上的两个氧原子以及它们附连到其上的碳原子一起,形成具有4至8个环原子的杂环。缩醛基团的实例包括,但不限于,-CH(OMe)₂、-CH(OEt)₂、和-CH(OMe)(OEt)。
- [0115] 半缩醛:-CH(OH)(OR¹),其中R¹是半缩醛取代基,例如,C₁₋₇烷基、C₃₋₂₀杂环基、或C₅₋₂₀芳基,优选C₁₋₇烷基。半缩醛基团的实例包括,但不限于,-CH(OH)(OMe)和-CH(OH)

(OEt)。

[0116] 缩酮: $-\text{CR}(\text{OR}^1)(\text{OR}^2)$, 其中 R^1 和 R^2 如针对缩醛所定义, 并且 R 是不同于氢的缩酮取代基, 例如, C_{1-7} 烷基、 C_{3-20} 杂环基、或 C_{5-20} 芳基, 优选 C_{1-7} 烷基。缩酮基团的实例包括, 但不限于 $-\text{C}(\text{Me})(\text{OMe})_2$ 、 $-\text{C}(\text{Me})(\text{OEt})_2$ 、 $-\text{C}(\text{Me})(\text{OMe})(\text{OEt})$ 、 $-\text{C}(\text{Et})(\text{OMe})_2$ 、 $-\text{C}(\text{Et})(\text{OEt})_2$ 、和 $-\text{C}(\text{Et})(\text{OMe})(\text{OEt})$ 。

[0117] 半缩酮: $-\text{CR}(\text{OH})(\text{OR}^1)$, 其中 R^1 如针对半缩醛所定义, 并且 R 是不同于氢的半缩酮取代基, 例如, C_{1-7} 烷基、 C_{3-20} 杂环基、或 C_{5-20} 芳基, 优选 C_{1-7} 烷基。半缩醛基团的实例包括, 但不限于, $-\text{C}(\text{Me})(\text{OH})(\text{OMe})$ 、 $-\text{C}(\text{Et})(\text{OH})(\text{OMe})$ 、 $-\text{C}(\text{Me})(\text{OH})(\text{OEt})$ 、和 $-\text{C}(\text{Et})(\text{OH})(\text{OEt})$ 。

[0118] 氧代(酮基、-酮): $=\text{O}$ 。

[0119] 硫酮(thione)(硫酮, thioketone): $=\text{S}$ 。

[0120] 亚氨基(亚胺): $=\text{NR}$, 其中 R 是亚氨基取代基, 例如, 氢、 C_{1-7} 烷基、 C_{3-20} 杂环基、或 C_{5-20} 芳基, 优选氢或 C_{1-7} 烷基。酯基团的实例包括, 但不限于, $=\text{NH}$ 、 $=\text{NMe}$ 、 $=\text{NEt}$ 、和 $=\text{NPh}$ 。

[0121] 甲酰(甲醛, carbaldehyde, carboxaldehyde): $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$ 。

[0122] 酰基(酮基): $-\text{C}(=\text{O})\text{R}$, 其中 R 是酰基取代基, 例如, C_{1-7} 烷基(也称为 C_{1-7} 烷基酰基(alkylacyl)或 C_{1-7} 烷酰基(alkanoyl))、 C_{3-20} 杂环基(也称为 C_{3-20} 杂环基酰基)、或 C_{5-20} 芳基(也称为 C_{5-20} 芳酰基), 优选 C_{1-7} 烷基。酰基的实例包括, 但不限于 $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3$ (乙酰基)、 $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$ (丙酰基)、 $-\text{C}(=\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_3$ (叔丁酰基)、和 $-\text{C}(=\text{O})\text{Ph}$ (苯酰基, 苯酮)。

[0123] 羧基(羧酸): $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ 。

[0124] 硫代羧基(硫代羧酸): $-\text{C}(=\text{S})\text{SH}$ 。

[0125] 硫醇羧基(硫醇羧酸): $-\text{C}(=\text{O})\text{SH}$ 。

[0126] 硫羧基(硫羧酸): $-\text{C}(=\text{S})\text{OH}$ 。

[0127] 亚胺酸: $-\text{C}(=\text{NH})\text{OH}$ 。

[0128] 异羟肟酸: $-\text{C}(=\text{NOH})\text{OH}$ 。

[0129] 酯(羧酸酯, carboxylate, carboxylic acid ester, oxycarbonyl): $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}$, 其中 R 是酯取代基, 例如, C_{1-7} 烷基、 C_{3-20} 杂环基、或 C_{5-20} 芳基, 优选 C_{1-7} 烷基。酯基团的实例包括, 但不限于 $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_3$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ 、和 $-\text{C}(=\text{O})\text{Oph}$ 。

[0130] 酰氧基(反向酯): $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}$, 其中 R 是酰氧基取代基, 例如, C_{1-7} 烷基、 C_{3-20} 杂环基、或 C_{5-20} 芳基, 优选 C_{1-7} 烷基。酰氧基的实例包括, 但不限于, $-\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_3$ (乙酰氧基)、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{Ph}$ 、和 $-\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{Ph}$ 。

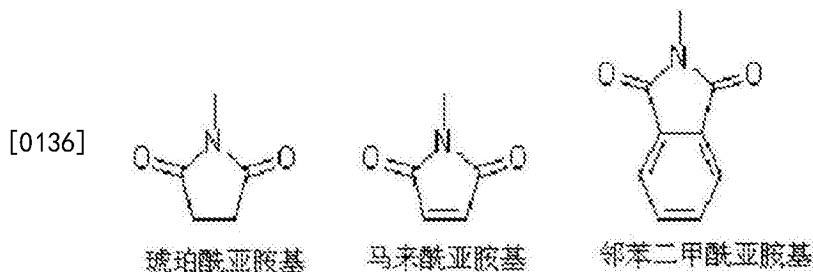
[0131] 氧羧酸酯(Oxycarboxyloxy): $-\text{OC}(=\text{O})\text{OR}$, 其中 R 是酯取代基, 例如, C_{1-7} 烷基、 C_{3-20} 杂环基、或 C_{5-20} 芳基, 优选 C_{1-7} 烷基。酯基团的实例包括, 但不限于, $-\text{OC}(=\text{O})\text{OCH}_3$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ 、和 $-\text{OC}(=\text{O})\text{Oph}$ 。

[0132] 氨基: $-\text{NR}^1\text{R}^2$, 其中 R^1 和 R^2 独立地是氨基取代基, 例如, 氢、 C_{1-7} 烷基(也称为 C_{1-7} 烷基氨基或二 C_{1-7} 烷基氨基)、 C_{3-20} 杂环基、或 C_{5-20} 芳基, 优选 H 或 C_{1-7} 烷基, 或者, 在“环状”氨基的情况下, R^1 和 R^2 , 连同它们附连到其上的氮原子一起, 形成具有4至8个环原子的杂环。氨基可以是伯胺($-\text{NH}_2$)、仲胺($-\text{NHR}^1$)、或叔胺($-\text{NHR}^1\text{R}^2$), 以及阳离子形式, 可以是季胺($-\text{N}^+\text{R}^1\text{R}^2\text{R}^3$)。氨基的实例包括, 但不限于, $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHCH}_3$ 、 $-\text{NHC}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 、和 $-\text{NPh}$ 。环状氨基的实例包括, 但不限于, 氮杂环丙烷基(aziridino)、氮杂环丁烷基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉代、和硫代吗啉代。

[0133] 酰氨基(氨基甲酰基,氨基甲酰,氨基羰基,羧酰胺): $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^1\text{R}^2$,其中 R^1 和 R^2 独立地是氨基取代基,如针对氨基所定义的。酰氨基的实例包括,但不限于, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_3$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ 、和 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$,以及酰氨基,其中 R^1 和 R^2 ,连同它们附连到其上的氮原子一起,形成杂环结构,如在,例如,哌啶基羰基、吗啉代羰基、硫代吗啉代羰基、和哌嗪基羰基中。

[0134] 硫代酰氨基(硫代氨基甲酰): $-\text{C}(=\text{S})\text{NR}^1\text{R}^2$,其中 R^1 和 R^2 独立地是氨基取代基,如针对氨基所定义的。酰氨基的实例包括,但不限于, $-\text{C}(=\text{S})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{NHCH}_3$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、和 $-\text{C}(=\text{S})\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ 。

[0135] 酰基酰氨基(酰氨基): $-\text{NR}^1\text{C}(=\text{O})\text{R}^2$,其中 R^1 是酰胺取代基,例如,氢、 C_{1-7} 烷基、 C_{3-20} 杂环基、或 C_{5-20} 芳基,优选氢或 C_{1-7} 烷基,并且 R^2 是酰基取代基,例如, C_{1-7} 烷基、 C_{3-20} 杂环基、或 C_{5-20} 芳基,优选氢或 C_{1-7} 烷基。酰胺基团的实例包括,但不限于, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、和 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{Ph}$ 。 R^1 和 R^2 可以一起形成环状结构,如在,例如,琥珀酰亚胺基、马来酰亚胺基、和邻苯二甲酰亚胺基中:

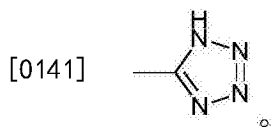


[0137] 氨基羰氧基: $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^1\text{R}^2$,其中 R^1 和 R^2 独立地是氨基取代基,如针对氨基所定义的。氨基羰氧基的实例包括,但不限于, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{NHMe}$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{NMe}_2$ 、和 $-\text{OC}(=\text{O})\text{NEt}_2$ 。

[0138] 脲基: $-\text{N}(\text{R}^1)\text{CONR}^2\text{R}^3$,其中 R^2 和 R^3 独立地是氨基取代基,如针对氨基所定义的,并且 R^1 是脲基取代基,例如,氢、 C_{1-7} 烷基、 C_{3-20} 杂环基、或 C_{5-20} 芳基,优选氢或 C_{1-7} 烷基。脲基的实例包括,但不限于, $-\text{NHCONH}_2$ 、 $-\text{NHCONHMe}$ 、 $-\text{NHCONHEt}$ 、 $-\text{NHCONMe}_2$ 、 $-\text{NHCONEt}_2$ 、 $-\text{NMeCONH}_2$ 、 $-\text{NMeCONHMe}$ 、 $-\text{NMeCONHEt}$ 、 $-\text{NMeCONMe}_2$ 、和 $-\text{NMeCONEt}_2$ 。

[0139] 胍基: $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 。

[0140] 四唑基:具有4个氮原子和1个碳原子的五元芳环,



[0142] 亚氨基: $=\text{NR}$,其中 R 是亚氨基取代基,例如,氢、 C_{1-7} 烷基、 C_{3-20} 杂环基、或 C_{5-20} 芳基,优选 H 或 C_{1-7} 烷基。亚氨基的实例包括,但不限于, $=\text{NH}$ 、 $=\text{NMe}$ 、和 $=\text{NEt}$ 。

[0143] 脒基(脒基): $-\text{C}(=\text{NR})\text{NR}_2$,其中每个 R 是脒取代基,例如,氢、 C_{1-7} 烷基、 C_{3-20} 杂环基、或 C_{5-20} 芳基,优选 H 或 C_{1-7} 烷基。脒基团的实例包括,但不限于, $-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(=\text{NH})\text{NMe}_2$ 、和 $-\text{C}(=\text{NMe})\text{NMe}_2$ 。

[0144] 硝基: $-\text{NO}_2$ 。

[0145] 亚硝基: $-\text{NO}$ 。

[0146] 叠氮基: $-\text{N}_3$ 。

- [0147] 氰基(腈,nitrile,carbonitrile):-CN。
- [0148] 异氰基:-NC。
- [0149] 氰氧基:-OCN。
- [0150] 异氰氧基(isocyanato):-NCO。
- [0151] 氰硫基(thiocyano)(氰硫基,thiocyanato):-SCN。
- [0152] 异氰硫基(isothiocyano)(异氰硫基,isothiocyanato):-NCS。
- [0153] 巯基(sulfhydryl)(巯基,thiol,mercapto):-SH。
- [0154] 硫醚(硫化物):-SR,其中R是硫醚取代基,例如,C₁₋₇烷基(也称为C₁₋₇烷硫基)、C₃₋₂₀杂环基、或C₅₋₂₀芳基,优选C₁₋₇烷基。C₁₋₇烷硫基的实例包括,但不限于,-SCH₃和-SCH₂CH₃。
- [0155] 二硫化物:-SS-R,其中R是二硫化物取代基,例如,C₁₋₇烷基、C₃₋₂₀杂环基、或C₅₋₂₀芳基,优选C₁₋₇烷基(在本文中也称为C₁₋₇烷基二硫化物)。C₁₋₇烷基二硫化物基团的实例包括,但不限于,-SSCH₃和-SSCH₂CH₃。
- [0156] 钼化物(亚硫酰基,亚碲):-S(=O)R,其中R是钼化物取代基,例如,C₁₋₇烷基、C₃₋₂₀杂环基、或C₅₋₂₀芳基,优选C₁₋₇烷基。钼化物基团的实例包括,但不限于,-S(=O)CH₃和-S(=O)CH₂CH₃。
- [0157] 碲(磺酰基):-S(=O)₂R,其中R是碲取代基,例如,C₁₋₇烷基、C₃₋₂₀杂环基、或C₅₋₂₀芳基,优选C₁₋₇烷基,包括,例如,氟化或全氟化C₁₋₇烷基。碲基团的实例包括,但不限于,-S(=O)₂CH₃(甲磺酰基,methanesulfoyl,mesyl)、-S(=O)₂CF₃(三氟甲磺酰基,triflyl)、-S(=O)₂CH₂CH₃(乙磺酰基,esyl)、-S(=O)₂C₄F₉(九氟甲磺酰基,nonaflyl)、-S(=O)₂CH₂CF₃(三氟乙磺酰基,tresyl)、-S(=O)₂CH₂CH₂NH₂(牛磺酰基)、-S(=O)₂Ph(苯磺酰基,phenylsulfonyl,besyl)、4-甲基苯磺酰基(甲苯磺酰基)、4-氯苯磺酰基(氯苯磺酰基,closyl)、4-溴苯磺酰基(溴苯磺酰基,brosyl)、4-硝基苯基(硝基苯磺酰基,nosyl)、2-萘磺酸酯(萘磺酰基,napsyl)、和5-二甲基氨基-萘-1-基磺酸酯(丹磺酰基)。
- [0158] 亚磺酸(亚磺基):-S(=O)OH、-SO₂H。
- [0159] 磺酸(磺基):-S(=O)₂OH、-SO₃H。
- [0160] 亚磺酸酯(sulfinate)(亚磺酸酯,sulfinic acid ester):-S(=O)OR;其中R是亚磺酸酯取代基,例如,C₁₋₇烷基、C₃₋₂₀杂环基、或C₅₋₂₀芳基,优选C₁₋₇烷基。亚磺酸酯基团的实例包括,但不限于,-S(=O)OCH₃(甲氧基亚硫酰基;亚磺酸甲酯)和-S(=O)OCH₂CH₃(乙氧基亚硫酰基;亚磺酸乙酯)。
- [0161] 磺酸酯(sulfonate)(磺酸酯,sulfonic acid ester):-S(=O)₂OR,其中R是磺酸酯取代基,例如,C₁₋₇烷基、C₃₋₂₀杂环基、或C₅₋₂₀芳基,优选C₁₋₇烷基。磺酸酯基团的实例包括,但不限于,-S(=O)₂OCH₃(甲氧基磺酰基;磺酸甲酯)和-S(=O)₂OCH₂CH₃(乙氧基磺酰基;磺酸乙酯)。
- [0162] 亚磺酰氧基:-OS(=O)R,其中R是亚磺酰氧基取代基,例如,C₁₋₇烷基、C₃₋₂₀杂环基、或C₅₋₂₀芳基,优选C₁₋₇烷基。亚磺酰氧基的实例包括,但不限于,-OS(=O)CH₃和-OS(=O)CH₂CH₃。
- [0163] 磺酰氧基:-OS(=O)₂R,其中R是磺酰氧基取代基,例如,C₁₋₇烷基、C₃₋₂₀杂环基、或C₅₋₂₀芳基,优选C₁₋₇烷基。磺酰氧基的实例包括,但不限于,-OS(=O)₂CH₃(磺酸甲酯)和-OS(=O)₂CH₂CH₃(磺酸乙酯)。

[0164] 硫酸酯： $-\text{OS}(=\text{O})_2\text{OR}$ ；其中R是硫酸酯取代基，例如， C_{1-7} 烷基、 C_{3-20} 杂环基、或 C_{5-20} 芳基，优选 C_{1-7} 烷基。硫酸酯基团的实例包括，但不限于， $-\text{OS}(=\text{O})_2\text{OCH}_3$ 和 $-\text{SO}(=\text{O})_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ 。

[0165] 氨磺酰基(sulfamyl)(氨磺酰基(sulfamoyl)；亚磺酸酰胺；亚磺酰胺)： $-\text{S}(=\text{O})\text{NR}^1\text{R}^2$ ，其中 R^1 和 R^2 独立地是氨基取代基，如针对氨基所定义的。氨磺酰基的实例包括，但不限于， $-\text{S}(=\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{S}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_3)$ 、 $-\text{S}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{S}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 、 $-\text{S}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 和 $-\text{S}(=\text{O})\text{NPh}$ 。

[0166] 磺酰胺(亚磺氨基；磺酸酰胺；磺酰胺)： $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NR}^1\text{R}^2$ ，其中 R^1 和 R^2 独立地是氨基取代基，如针对氨基所定义的。磺酰胺基的实例包括，但不限于， $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}(\text{CH}_3)$ 、 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 、 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 和 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NPh}$ 。

[0167] 磺氨基： $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})_2\text{OH}$ ，其中 R^1 是氨基取代基，如针对氨基所定义的。磺氨基的实例包括，但不限于， $-\text{NHS}(=\text{O})_2\text{OH}$ 和 $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})_2\text{OH}$ 。

[0168] 磺酰氨基： $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})_2\text{R}$ ，其中 R^1 是氨基取代基，如针对氨基所定义的，并且R是磺酰氨基取代基，例如， C_{1-7} 烷基、 C_{3-20} 杂环基、或 C_{5-20} 芳基，优选 C_{1-7} 烷基。磺酰氨基的实例包括，但不限于， $-\text{NHS}(=\text{O})_2\text{CH}_3$ 和 $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})_2\text{C}_6\text{H}_5$ 。

[0169] 亚磺氨基： $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})\text{R}$ ，其中 R^1 是氨基取代基，如针对氨基所定义的，并且R是亚磺氨基取代基，例如， C_{1-7} 烷基、 C_{3-20} 杂环基、或 C_{5-20} 芳基，优选 C_{1-7} 烷基。亚磺氨基的实例包括，但不限于， $-\text{NHS}(=\text{O})\text{CH}_3$ 和 $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})\text{C}_6\text{H}_5$ 。

[0170] 膦基(膦)： $-\text{PR}_2$ ，其中R是膦基取代基，例如， $-\text{H}$ 、 C_{1-7} 烷基、 C_{3-20} 杂环基、或 C_{5-20} 芳基，优选 $-\text{H}$ 、 C_{1-7} 烷基、或 C_{5-20} 芳基。膦基的实例包括，但不限于， $-\text{PH}_2$ 、 $-\text{P}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{P}(\text{t-Bu})_2$ 和 $-\text{P}(\text{Ph})_2$ 。

[0171] 磷酸基： $-\text{P}(=\text{O})_2$ 。

[0172] 磷酰基(氧化膦)： $-\text{P}(=\text{O})\text{R}_2$ ，其中R是磷酰基取代基，例如， C_{1-7} 烷基、 C_{3-20} 杂环基、或 C_{5-20} 芳基，优选 C_{1-7} 烷基或 C_{5-20} 芳基。磷酰基的实例包括，但不限于， $-\text{P}(=\text{O})(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{t-Bu})_2$ 和 $-\text{P}(=\text{O})(\text{Ph})_2$ 。

[0173] 膦酸(膦酰基)： $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})_2$ 。

[0174] 膦酸酯(膦酰酯)： $-\text{P}(=\text{O})(\text{OR})_2$ ，其中R是膦酸酯取代基，例如， $-\text{H}$ 、 C_{1-7} 烷基、 C_{3-20} 杂环基、或 C_{5-20} 芳基，优选 $-\text{H}$ 、 C_{1-7} 烷基、或 C_{5-20} 芳基。膦酸酯基团的实例包括，但不限于， $-\text{P}(=\text{O})(\text{OCH}_3)_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{O-t-Bu})_2$ 和 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OPh})_2$ 。

[0175] 膦酸(膦酰氧基)： $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OH})_2$ 。

[0176] 膦酸酯(膦酰氧基酯)： $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR})_2$ ，其中R是膦酸酯取代基，例如， $-\text{H}$ 、 C_{1-7} 烷基、 C_{3-20} 杂环基、或 C_{5-20} 芳基，优选 $-\text{H}$ 、 C_{1-7} 烷基、或 C_{5-20} 芳基。膦酸酯基团的实例包括，但不限于， $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_3)_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{O-t-Bu})_2$ 和 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OPh})_2$ 。

[0177] 亚磷酸： $-\text{OP}(\text{OH})_2$ 。

[0178] 亚磷酸酯： $-\text{OP}(\text{OR})_2$ ，其中R是亚磷酸酯取代基，例如， $-\text{H}$ 、 C_{1-7} 烷基、 C_{3-20} 杂环基、或 C_{5-20} 芳基，优选 $-\text{H}$ 、 C_{1-7} 烷基、或 C_{5-20} 芳基。亚磷酸酯基团的实例包括，但不限于， $-\text{OP}(\text{OCH}_3)_2$ 、 $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{OP}(\text{O-t-Bu})_2$ 和 $-\text{OP}(\text{OPh})_2$ 。

[0179] 亚磷酰胺： $-\text{OP}(\text{OR}^1)-\text{NR}^2_2$ ，其中 R^1 和 R^2 是亚磷酰胺取代基，例如， $-\text{H}$ 、(可选地取代的) C_{1-7} 烷基、 C_{3-20} 杂环基、或 C_{5-20} 芳基，优选 $-\text{H}$ 、 C_{1-7} 烷基、或 C_{5-20} 芳基。亚磷酰胺基团的实例包括，但不限于， $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{N}(\text{i-Pr})_2$ 和 $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})-\text{N}(\text{i-Pr})_2$ 。

Pr)₂。

[0180] 氨基磷酸酯： $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR}^1)-\text{NR}^2_2$ ，其中 R^1 和 R^2 是氨基磷酸酯取代基，例如， $-\text{H}$ 、(可选地取代的) C_{1-7} 烷基、 C_{3-20} 杂环基、或 C_{5-20} 芳基，优选 $-\text{H}$ 、 C_{1-7} 烷基、或 C_{5-20} 芳基。氨基磷酸酯基团的实例包括，但不限于， $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{N}(\text{i-Pr})_2$ 、和 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})-\text{N}(\text{i-Pr})_2$ 。

[0181] 亚烷基

[0182] C_{3-12} 亚烷基：如在本文中使用的，术语“ C_{3-12} 亚烷基”是指通过从具有3至12个碳原子(除非另有说明)的碳氢化合物的相同碳原子、或从两个不同碳原子的每一个上去除两个氢原子而获得的双配位基部分，它可以是脂肪族或脂环族的，并且它可以是饱和、部分不饱和、或完全不饱和的。因此，术语“亚烷基”包括下面讨论的子类：亚链烯基、亚炔基、环亚烷基等。

[0183] 线性饱和的 C_{3-12} 亚烷基的实例包括，但不限于， $-(\text{CH}_2)_n-$ ，其中 n 是3至12的整数，例如， $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (亚丙基)、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (亚丁基)、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (亚戊基)和 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (亚庚基)。

[0184] 支链饱和的 C_{3-12} 亚烷基的实例包括，但不限于， $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ 、和 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ 。

[0185] 线性部分不饱和的 C_{3-12} 亚烷基(C_{3-12} 亚链烯基、和亚炔基)的实例包括，但不限于， $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ 、和 $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-$ 。

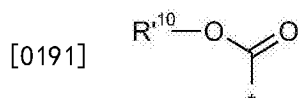
[0186] 支链的部分不饱和的 C_{3-12} 亚烷基(C_{3-12} 亚链烯基和亚炔基)的实例包括，但不限于， $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 和 $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 。

[0187] 脂环族的饱和 C_{3-12} 亚烷基(C_{3-12} 环亚烷基)的实例包括，但不限于，亚环戊基(例如，环戊-1,3-亚基)、和亚环己基(例如，环己-1,4-亚基)。

[0188] 脂环族的部分不饱和的 C_{3-12} 亚烷基(C_{3-12} 环亚烷基)的实例包括，但不限于，亚环戊烯基(例如，4-环戊烯-1,3-亚基)、亚环己烯基(例如，2-环己烯-1,4-亚基；3-环己烯-1,2-亚基；2,5-环己二烯-1,4-亚基)。

[0189] 氧保护基团：术语“氧保护基团”是指掩蔽羟基的部分，并且这些是本领域熟知的。大量适宜的基团描述于Greene, T.W. and Wuts, G.M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd Edition, John Wiley & Sons, Inc., 1999的第23至200页，通过引用将其结合在此。特别感兴趣的类型包括甲硅烷基醚(例如，TMS、TBDMS)、取代的甲醚(例如，THP)和酯(例如乙酸酯)。

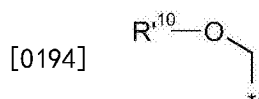
[0190] 氨基甲酸酯氮保护基团：术语“氨基甲酸酯氮保护基团”是指掩蔽亚胺键中的氮的部分，并且这些是本领域众所周知的。这些基团具有以下结构：



[0192] 其中 R'^{10} 是如上文所定义的 R 。大量适宜的基团描述于Greene, T.W. and Wuts, G.M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd Edition, John Wiley & Sons, Inc.,

1999的第503至549页,通过引用将其结合在此。

[0193] 半缩醛胺氮保护基团:术语“半缩醛胺氮保护基团”是指具有以下结构的基团:



[0195] 其中R'¹⁰是如上文所定义的R。大量适宜的基团描述于Greene, T.W. and Wuts, G.M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd Edition, John Wiley & Sons, Inc., 1999的第633至647页作为酰胺保护基团,通过引用将其结合在此。

[0196] 本发明的详细说明

[0197] 本发明提供了包含通过接头单元连接到配体单元上的PBD二聚体的结合物。在一种实施方式中,接头单元包括延伸物单元(A)、特异性单元(L¹)、和间隔物单元(L²)。接头单元一端连接到配体单元上而另一端连接到PBD二聚体化合物上。

[0198] 一方面,在下面式Ia中显示了这种结合物:

[0199] $L-(A^1-L^1-L^2-D)_p$ (Ia)

[0200] 其中:

[0201] L是配体单元;并且

[0202] $-A^1-L^1-L^2-$ 是接头单元(LU),其中:

[0203] $-A^1-$ 是延伸物单元(延伸单元),

[0204] a是1或2,

[0205] L¹-是特异性单元,

[0206] s是范围从1至12的整数,

[0207] $-L^2-$ 是间隔物单元(间隔单元),

[0208] y是0、1或2;

[0209] -D是PBD二聚体;并且

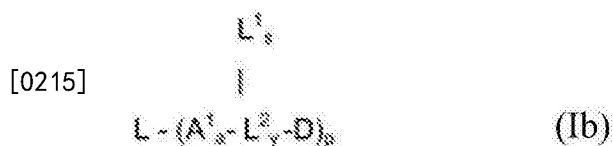
[0210] p是1至20。

[0211] 载药量由p表示(药物分子的数目/配体单元(例如,抗体))。载药量可以范围从1至20个药物单元(D)/配体单元(例如,Ab或mAb)。对于组合物,p表示在组合物中结合物的平均载药量,并且p范围从1至20。

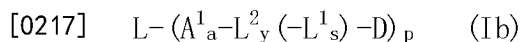
[0212] 在一些实施方式中,p是约1至约8个药物单元/配体单元。在一些实施方式中,p为1。在一些实施方式中,p为2。在一些实施方式中,p为约2至约8个药物单元/配体单元。在一些实施方式中,p为约2至约6、2至约5、或2至约4个药物单元/配体单元。在一些实施方式中,p为约2、约4、约6或约8个药物单元/配体单元。

[0213] 可以通过常规手段如质谱法、ELISA测定法、和HPLC,来表征在来自结合反应的制备中药物单元的平均数/配体单元。还可以确定就p而言的结合物的定量分布。在一些情况下,可以通过多种手段如反相HPLC或电泳,来实现从具有其他载药量的结合物中分离、纯化、以及表征均匀的结合物,其中p为某一数值。

[0214] 在另一方面,在下面式Ib中显示了这种结合物:



[0216] 还表示为:



[0218] 其中:

[0219] L是配体单元;并且

[0220] $-A^1_a-L^1_s(L^2_y)-$ 是接头单元(LU),其中:

[0221] $-A^1-$ 是连接到延伸物单元(L^2)上的延伸物单元,

[0222] a是1或2,

[0223] L^1- 是连接到延伸物单元(L^2)上的特异性单元,

[0224] s是范围从0至12的整数,

[0225] $-L^2-$ 是间隔物单元,

[0226] y是0、1或2;

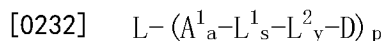
[0227] $-D$ 是PBD二聚体;并且

[0228] p是1至20。

[0229] 优选项

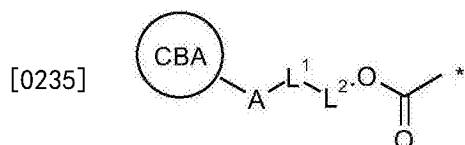
[0230] 以下优选项可以用于如上所述的本发明的所有方面,或可以涉及单个方面。这些优选项能够以任何组合方式结合在一起。

[0231] 在一种实施方式中,结合物具有下式:



[0233] 其中L、 A^1 、a、 L^1 、s、 L^2 、D和p如上所述。

[0234] 在一种实施方式中,配体单元(L)是特异性地结合到靶细胞表面上的靶分子上的细胞结合剂(CBA)。一个示例性分子式显示如下:



[0236] 其中星号表示与药物单元(D)的附着点,CBA是细胞结合剂, L^1 是特异性单元, A^1 是将 L^1 连接到细胞结合剂上的延伸物单元, L^2 是间隔物单元,它是共价键、自切除基团(self-immolative group)或连同 $-OC(=O)-$ 一起形成自切除基团,并且 L^2 是可选的。

[0237] 在另一种实施方式中,配体单元(L)是特异性地结合到靶细胞表面上的靶分子上的细胞结合剂(CBA)。一个示例性分子式显示如下:



[0239] 其中,星号表示与药物单元(D)的附着点,CBA是细胞结合剂, L^1 是特异性单元, A^1 是将 L^1 连接到细胞结合剂上的延伸物单元, L^2 是间隔物单元,它是共价键或自切除基团,并且a是1或2,s是0、1或2,并且y是0或1或2。

[0240] 在上述实施方式中, L^1 可以是可切割的特异性单元,并且可以称作,当一种或多种自切除基团存在时,当被切割时,激活一个自切除基团(或多个自切除基团) L^2 的“触发物”。

当特异性单元 L^1 被切割、或位于 L^1 与 L^2 之间的键(即,共价键)被切割时,自切除基团释放药物单元(D)。

[0241] 在另一种实施方式中,配体单元(L)是特异性地结合到靶细胞表面上的靶分子上的细胞结合剂(CBA)。一个示例性分子式显示如下:



[0243] 其中星号表示与药物(D)的附着点,CBA是细胞结合剂, L^1 是连接到 L^2 上的特异性单元, A^1 是将 L^2 连接到细胞结合剂上的延伸物单元, L^2 是自切除基团,并且是1或2,s是1或2,并且y是1或2。

[0244] 在本文讨论的多个实施方式中, L^1 和 L^2 的特性可以有很大的不同。这些基团是基于它们的特性选择的,它们可以部分地通过结合物递送到其上的位点处的条件来指示。当特异性单元 L^1 可切割时,选择 L^1 的结构和/或序列,从而通过存在于靶位点(例如,靶细胞)的酶的作用将其切割。还可以使用通过改变pH(例如,酸或碱可分解的)、温度或当照射(例如光可分解的)时可以切割的 L^1 单元。在还原或氧化条件下可切割的 L^1 单元还可以应用于结合物。

[0245] 在一些实施方式中, L^1 可以包含一个氨基酸或氨基酸的连续序列。氨基酸序列可以是酶的靶向底物。

[0246] 在一种实施方式中,通过酶的作用可以切割 L^1 。在一种实施方式中,酶是酯酶或肽酶。例如,可以通过溶酶体蛋白酶,如组织蛋白酶,来切割 L^1 。

[0247] 在一种实施方式中,存在 L^2 并且连同 $-C(=O)O-$ 一起形成一个或多个自切除基团。在一些实施方式中, $-C(=O)O-$ 也是自切除基团。

[0248] 在一种实施方式中,当通过酶的作用可以切割 L^1 并且存在 L^2 时,酶切割位于 L^1 与 L^2 之间的键,由此所述一个或多个自切除基团释放药物单元。

[0249] L^1 和 L^2 ,当存在时,可以通过选自下面的键来连接:

[0250] $-C(=O)NH-$,

[0251] $-C(=O)O-$,

[0252] $-NHC(=O)-$,

[0253] $-OC(=O)-$,

[0254] $-OC(=O)O-$,

[0255] $-NHC(=O)O-$,

[0256] $-OC(=O)NH-$,

[0257] $-NHC(=O)NH$,以及

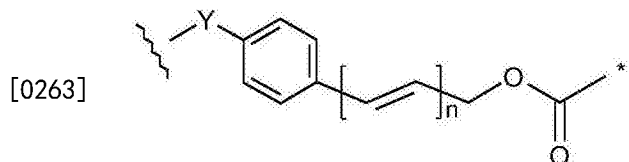
[0258] $-O-$ (糖苷键)。

[0259] 连接到 L^2 上的 L^1 的氨基可以是氨基酸的N端或可以来自氨基酸侧链的氨基,例如赖氨酸氨基酸侧链。

[0260] 连接到 L^2 上的 L^1 的羧基可以是氨基酸的C端或可以来自氨基酸侧链的羧基,例如,谷氨酸氨基酸侧链。

[0261] 连接到 L^2 上的 L^1 的羟基可以来自氨基酸侧链的羟基,例如丝氨酸氨基酸侧链。

[0262] 在一种实施方式中, $-C(=O)O-$ 和 L^2 一起形成以下基团:



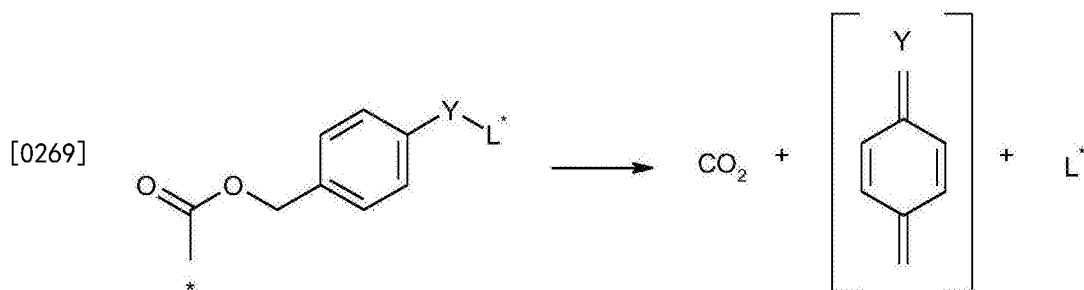
[0264] 其中星号表示与药物单元的附着点, 波形线表示与 L^1 的附着点, Y 是 $-N(H)-$ 、 $-O-$ 、 $-C(=O)N(H)-$ 或 $-C(=O)O-$, 并且 n 是 0 至 3。亚苯基环被如本文所述的一个、两个或三个取代基可选地取代。

[0265] 在一种实施方式中, Y 是 NH。

[0266] 在一种实施方式中, n 是 0 或 1。优选地, n 是 0。

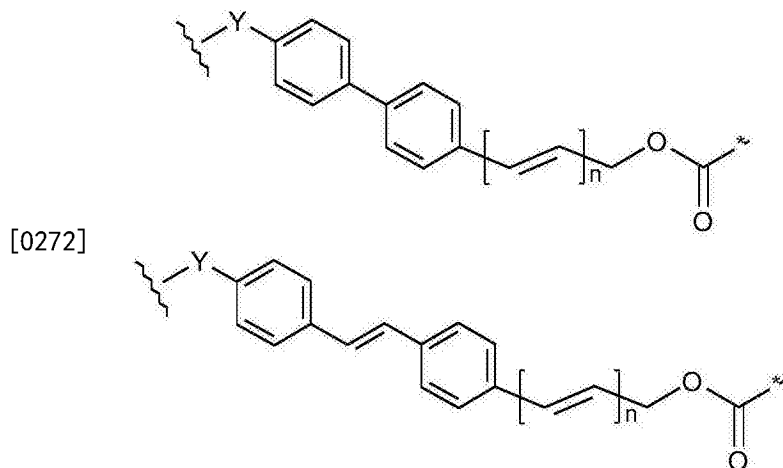
[0267] 当 Y 是 NH 并且 n 是 0 时, 自切除基团可以称作对氨基苄基羰基接头 (PABC)。

[0268] 当接头中的远侧位点被激活时 (沿着下面所示路线进行 (对于 n=0)), 自切除基团将允许释放药物单元 (即, 非对称 PBD):



[0270] 其中星号表示与药物的附着, L^* 是接头剩余部分的激活形式, 并且未示出释放的药物单元。这些基团具有使激活位点与药物分开的优点。

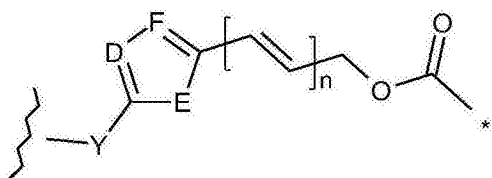
[0271] 在另一种实施方式中, $-C(=O)O-$ 和 L^2 一起形成选自下面的基团:



[0273] 其中星号、波形线、Y、和 n 如上定义。每个亚苯基环被如本文所述的一个、两个或三个取代基可选地取代。在一种实施方式中, 具有 Y 取代基的亚苯基环是可选地取代的并且不具有 Y 取代基的亚苯基环是未取代的。

[0274] 在另一种实施方式中, $-C(=O)O-$ 和 L^2 一起形成选自下面的基团:

[0275]



[0276] 其中星号、波形线、Y、和n如上定义，E是O、S或NR，D是N、CH、或CR，并且F是N、CH、或CR。

[0277] 在一种实施方式中，D是N。

[0278] 在一种实施方式中，D是CH。

[0279] 在一种实施方式中，E是O或S。

[0280] 在一种实施方式中，F是CH。

[0281] 在一种优选实施方式中，位于 L^1 与 L^2 之间的共价键是组织蛋白酶可分解（例如，可切割）的键。

[0282] 在一种实施方式中， L^1 包含二肽。在二肽中的氨基酸可以是天然氨基酸和非天然氨基酸的任何组合。在一些实施方式中，二肽包含天然氨基酸。当接头是组织蛋白酶可分解的接头时，二肽是组织蛋白酶介导切割的作用位点。因而二肽是组织蛋白酶的识别位点。

[0283] 在一种实施方式中，在二肽-NH-X₁-X₂-CO-中的基团-X₁-X₂-选自：

[0284] -Phe-Lys-

[0285] -Val-Ala-

[0286] -Val-Lys-

[0287] -Ala-Lys-

[0288] -Val-Cit-

[0289] -Phe-Cit-

[0290] -Leu-Cit-

[0291] -Ile-Cit-

[0292] -Phe-Arg-，以及

[0293] -Trp-Cit-；

[0294] 其中Cit是瓜氨酸。在这样的二肽中，-NH-是X₁的氨基，并且CO是X₂的羰基。

[0295] 优选地，在二肽-NH-X₁-X₂-CO-中的基团-X₁-X₂-选自：

[0296] -Phe-Lys-

[0297] -Val-Ala-

[0298] -Val-Lys-

[0299] -Ala-Lys-，以及

[0300] -Val-Cit-。

[0301] 最优选地，在二肽-NH-X₁-X₂-CO-中的基团-X₁-X₂-是-Phe-Lys-、Val-Cit或-Val-Ala-。

[0302] 其他感兴趣的二肽组合包括：

[0303] -Gly-Gly-

[0304] -Pro-Pro-，以及

[0305] -Val-Glu-。

[0306] 可以使用其他二肽组合,包括由Dubowchik等人描述的那些,通过引用将其结合在此。

[0307] 在一种实施方式中,当适当时,氨基酸侧链被化学保护。侧链保护基团可以是如下讨论的基团。可以通过酶来切割被保护的氨基酸序列。例如,可以通过组织蛋白酶来切割包含Boc侧链保护的Lys残基的二肽序列。

[0308] 氨基酸侧链的保护基团是本领域熟知的并且描述于Novabiochem Catalog中。在Protective groups in Organic Synthesis, Greene and Wuts中提出了另外的保护基团策略。

[0309] 下面针对具有反应性侧链功能的那些氨基酸显示了可能的侧链保护基团:

[0310] Arg: Z, Mtr, Tos;

[0311] Asn: Trt, Xan;

[0312] Asp: Bzl, t-Bu;

[0313] Cys: Ac, Bzl, Bzl-OMe, Bzl-Me, Trt;

[0314] Glu: Bzl, t-Bu;

[0315] Gln: Trt, Xan;

[0316] His: Boc, Dnp, Tos, Trt;

[0317] Lys: Boc, Z-Cl, Fmoc, Z;

[0318] Ser: Bzl, TBDMS, TBDPS;

[0319] Thr: Bz;

[0320] Trp: Boc;

[0321] Tyr: Bzl, Z, Z-Br。

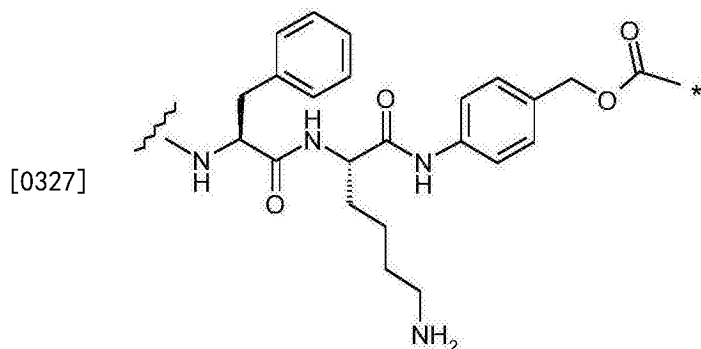
[0322] 在一种实施方式中,将-X₂-间接地连接到药物单元上。在这样的实施方式中,存在间隔物单元L²。

[0323] 在一种实施方式中,二肽与一个或多个自切除基团(间隔物单元)结合地使用。所述一个或多个自切除基团可以连接到-X₂-上。

[0324] 当存在自切除基团时,将-X₂-直接地连接到自切除基团上。在一种实施方式中,将-X₂-连接到自切除基团的基团Y上。优选地,将基团-X₂-CO-连接到Y上,其中Y是NH。

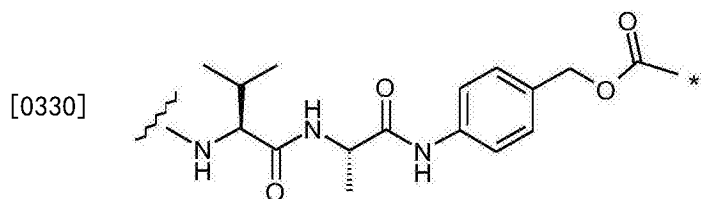
[0325] 将-X₁-直接地连接到A¹上。在一种实施方式中,将-X₁-直接地连接到A¹上。优选地,将基团NH-X₁- (X₁的氨基端)连接到A¹上。A¹可以包含官能团-CO-,从而与-X₁-一起形成酰胺键。

[0326] 在一种实施方式中,L¹和L²连同-OC(=O)-一起包含基团-X₁-X₂-PABC-。将PABC基团直接地连接到药物单元上。在一个实施例中,自切除基团和二肽一起形成基团-Phe-Lys-PABC-,它显示如下:



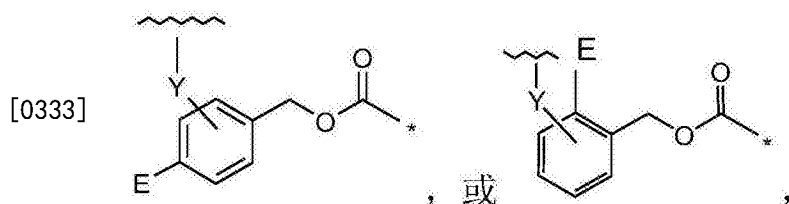
[0328] 其中星号表示与药物单元的附着点,而波形线则表示与L¹的剩余部分的附着点或与A¹的附着点。优选地,波形线表示与A¹的附着点。

[0329] 可替换地,自切除基团和二肽一起形成基团-Val-Ala-PABC-,它显示如下:



[0331] 其中星号和波形线如上定义。

[0332] 在另一种实施方式中,L¹和L²连同-OC(=O)-一起表示:



[0334] 其中星号表示与药物单元的附着点,波形线表示与A¹的附着点,Y是共价键或官能团,并且E是易于切割的基团,从而激活自切除基团。

[0335] 选择E,使得基团易于切割(例如,通常光或通过酶的作用)。E可以是-NO₂或葡萄糖醛酸(例如,β-葡萄糖醛酸)。前者可以对硝基还原酶的作用敏感,而后者对β-葡萄糖醛酸酶的作用敏感。

[0336] 基团Y可以是共价键。

[0337] 基团Y可以是选自下面的官能团:

[0338] -C(=O)-,

[0339] -NH-,

[0340] -O-,

[0341] -C(=O)NH-,

[0342] -C(=O)O-,

[0343] -NHC(=O)-,

[0344] -OC(=O)-,

[0345] -OC(=O)O-,

[0346] -NHC(=O)O-,

[0347] -OC(=O)NH-,

[0348] $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}-$,

[0349] $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}$,

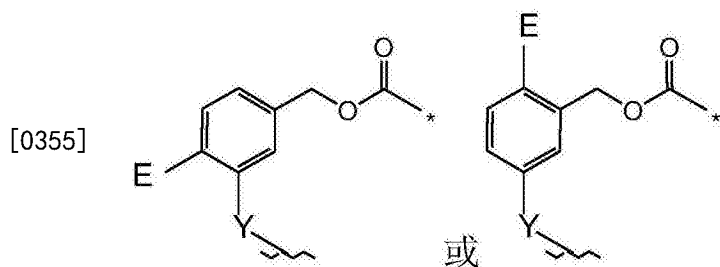
[0350] $-\text{C}(=\text{O})\text{NHC}(=\text{O})-$,

[0351] SO_2 , 以及

[0352] $-\text{S}-$ 。

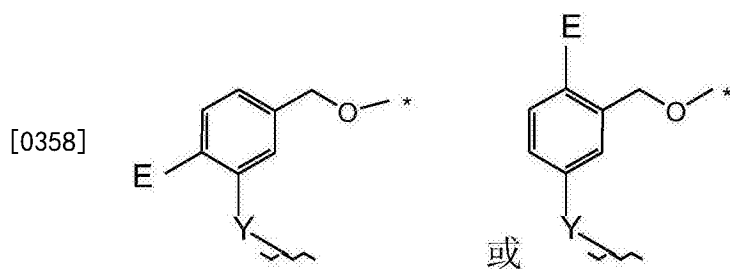
[0353] 基团Y优选为 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-$ 、和 $-\text{S}-$ 。

[0354] 在一些实施方式中, L^1 和 L^2 连同 $-\text{OC}(=\text{O})-$ 一起表示:



[0356] 其中星号表示与药物单元的附着点,波形线表示与A的附着点,Y是共价键或官能团,并且E是葡糖醛酸(例如, β -葡糖醛酸)。Y优选为选自 $-\text{NH}-$ 的官能团。

[0357] 在一些实施方式中, L^1 和 L^2 一起表示:



[0359] 其中星号表示与 L^2 的剩余部分或药物单元的附着点,波形线表示与 A^1 的附着点,Y是共价键或官能团,并且E是葡糖醛酸(例如, β -葡糖醛酸)。Y优选地为选自 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-$ 、和 $-\text{S}-$ 的官能团。

[0360] 在一些另外的实施方式中,Y是如上所述的官能团,将官能团连接到氨基酸上,并且将氨基酸连接到延伸物单元 A^1 上。在一些实施方式中,氨基酸是 β -丙氨酸。在这样的实施方式中,氨基酸被等效地认为是延伸物单元的一部分。

[0361] 通过延伸物单元间接地连接特异性单元 L^1 和配体单元。

[0362] 可以通过选自下面的键来连接 L^1 和 A^1 :

[0363] $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$,

[0364] $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$,

[0365] $-\text{NHC}(=\text{O})-$,

[0366] $-\text{OC}(=\text{O})-$,

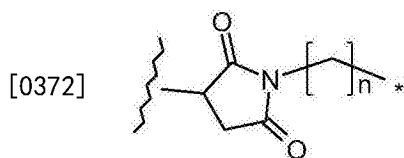
[0367] $-\text{OC}(=\text{O})\text{O}-$,

[0368] $-\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-$,

[0369] $-\text{OC}(=\text{O})\text{NH}-$, 以及

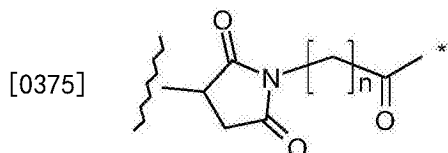
[0370] $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}-$ 。

[0371] 在一种实施方式中,基团 A^1 是:



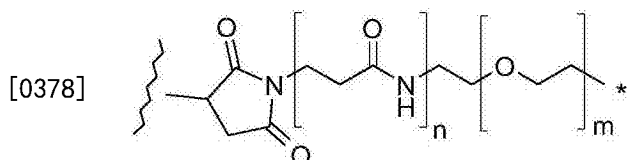
[0373] 其中星号表示与L¹的附着点,波形线表示与配体单元的附着点,并且n是0至6。在一种实施方式中,n是5。

[0374] 在一种实施方式中,基团A¹是:



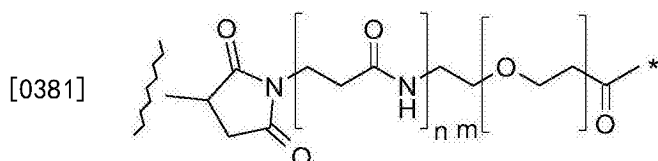
[0376] 其中星号表示与L¹的附着点,波形线表示与配体单元的附着点,并且n是0至6。在一种实施方式中,n是5。

[0377] 在一种实施方式中,基团A¹是:



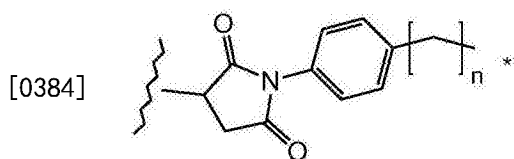
[0379] 其中星号表示与L¹的附着点,波形线表示与配体单元的附着点,n是0或1,并且m是0至30。在一种优选实施方式中,n是1并且m是0至10,1至8,优选4至8,最优选4或8。

[0380] 在一种实施方式中,基团A¹是:



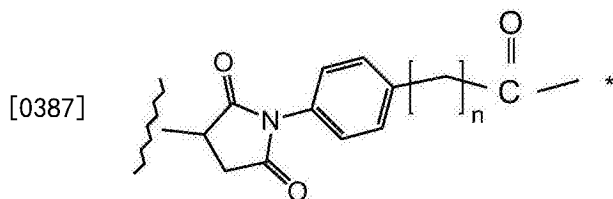
[0382] 其中星号表示与L¹的附着点,波形线表示配体单元与的附着点,n是0或1,并且m是0至30。在一种优选实施方式中,n是1并且m是0至10,1至8,优选4至8,最优选4或8。

[0383] 在一种实施方式中,基团A¹是:



[0385] 其中星号表示与L¹的附着点,波形线表示与配体单元的附着点,并且n是0至6。在一种实施方式中,n是5。

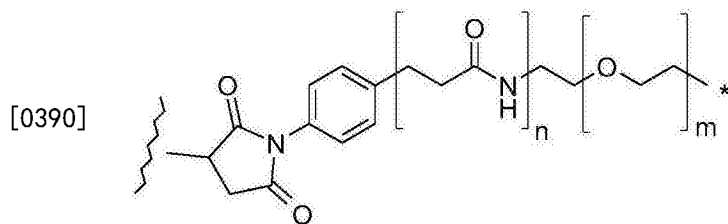
[0386] 在一种实施方式中,基团A¹是:



[0388] 其中星号表示与L¹的附着点,波形线表示与配体单元的附着点,并且n是0至6。在

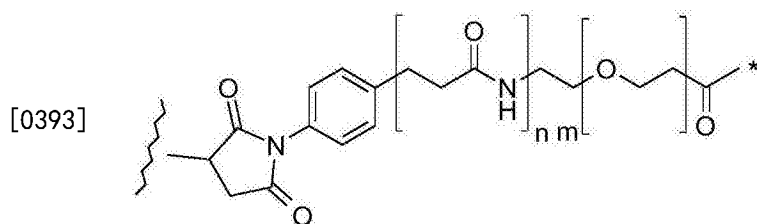
一种实施方式中, n 是 5。

[0389] 在一种实施方式中, 基团 A^1 是:



[0391] 其中星号表示与 L^1 的附着点, 波形线表示与配体单元的附着点, n 是 0 或 1, 并且 m 是 0 至 30。在一种优选实施方式中, n 是 1 并且 m 是 0 至 10, 1 至 8, 优选 4 至 8, 最优选 4 或 8。

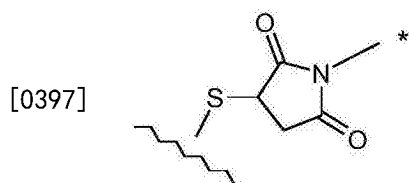
[0392] 在一种实施方式中, 基团 A^1 是:



[0394] 其中星号表示与 L^1 的附着点, 波形线表示与配体单元的附着点, n 是 0 或 1, 并且 m 是 0 至 30。在一种优选实施方式中, n 是 1 并且 m 是 0 至 10, 1 至 8, 优选 4 至 8, 最优选 4 或 8。

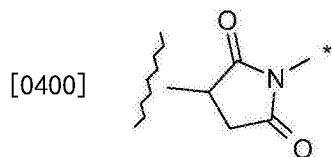
[0395] 在一种实施方式中, 配体单元与 A^1 之间的连接是通过配体单元的硫醇残基和 A^1 的马来酰亚胺基团。

[0396] 在一种实施方式中, 配体单元与 A^1 之间的连接是:



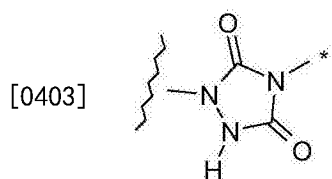
[0398] 其中星号表示与 A^1 、 L^1 、 L^2 或 D 的剩余部分的附着点, 以及波形线表示与配体单元的剩余部分的附着点。在此实施方式中, S 原子典型地来自配体单元。

[0399] 在上述每种实施方式中, 可以使用可替换的官能团来替代下面显示的马来酰亚胺类基团:



[0401] 其中波形线表示与配体单元的附着点 (如前所述), 并且星号表示与 A^1 基团的剩余部分、或者与 L^1 、 L^2 或 D 的键。

[0402] 在一种实施方式中, 用以下基团来替代马来酰亚胺类基团:

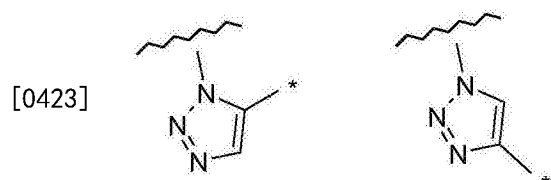


[0404] 其中波形线表示与配体单元的附着点,并且星号表示与A¹基团的剩余部分、或者与L¹、L²或D的键。

[0405] 在一种实施方式中,用可选地连同配体单元(例如,细胞结合剂)一起选自下面的基团来替代马来酰亚胺类基团:

- [0406] -C(=O)NH-,
- [0407] -C(=O)O-,
- [0408] -NHC(=O)-,
- [0409] -OC(=O)-,
- [0410] -OC(=O)O-,
- [0411] -NHC(=O)O-,
- [0412] -OC(=O)NH-,
- [0413] -NHC(=O)NH-,
- [0414] -NHC(=O)NH,
- [0415] -C(=O)NHC(=O)-,
- [0416] -S-,
- [0417] -S-S-,
- [0418] -CH₂C(=O)-,
- [0419] -C(=O)CH₂-,
- [0420] =N-NH-,以及
- [0421] -NH-N=。

[0422] 在一种实施方式中,用可选地连同配体单元一起选自下面的基团来替代马来酰亚胺类基团:



[0424] 其中波形线表示与配体单元的附着点或者与A¹基团的剩余部分的键,并且星号表示另一个与配体单元的附着点或者与A¹基团的剩余部分的键。

[0425] 在WO 2005/082023中描述了适合将L¹连接到细胞结合剂上的其他基团。

[0426] 在一种实施方式中,存在延伸物单元A¹,存在特异性单元L¹并且不存在间隔物单元L²。因此,通过键直接地连接L¹和药物单元。等效地,在此实施方式中,L²是键。

[0427] 可以通过选自下面的键来连接L¹和D:

- [0428] -C(=O)NH-,
- [0429] -C(=O)O-,
- [0430] -NHC(=O)-,
- [0431] -OC(=O)-,
- [0432] -OC(=O)O-,
- [0433] -NHC(=O)O-,
- [0434] -OC(=O)NH-,以及

[0435] -NHC(=O)NH- 。

[0436] 在一种实施方式中,优选地通过选自下面的键来连接 L^1 和D:

[0437] -C(=O)NH- ,以及

[0438] -NHC(=O)- 。

[0439] 在一种实施方式中, L^1 包含二肽并且所述二肽的一端连接到D上。如上所述,二肽中的氨基酸可以是天然氨基酸和非天然氨基酸的任何组合。在一些实施方式中,二肽包含天然氨基酸。当接头是组织蛋白酶可分解的接头时,二肽是用于组织蛋白酶介导切割的作用位点。于是二肽是组织蛋白酶的识别位点。

[0440] 在一种实施方式中,在二肽 $\text{-NH-X}_1\text{-X}_2\text{-CO-}$ 中的基团 $\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-}$ 选自:

[0441] -Phe-Lys- ,

[0442] -Val-Ala- ,

[0443] -Val-Lys- ,

[0444] -Ala-Lys- ,

[0445] -Val-Cit- ,

[0446] -Phe-Cit- ,

[0447] -Leu-Cit- ,

[0448] -Ile-Cit- ,

[0449] -Phe-Arg- ,以及

[0450] -Trp-Cit- ;

[0451] 其中Cit是瓜氨酸。在这样的二肽中, -NH- 是 X_1 的氨基,并且CO是 X_2 的羰基。

[0452] 优选地,在二肽 $\text{-NH-X}_1\text{-X}_2\text{-CO-}$ 中的基团 $\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-}$ 选自:

[0453] -Phe-Lys- ,

[0454] -Val-Ala- ,

[0455] -Val-Lys- ,

[0456] -Ala-Lys- ,以及

[0457] -Val-Cit- 。

[0458] 最优选地,在二肽 $\text{-NH-X}_1\text{-X}_2\text{-CO-}$ 中的基团 $\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-}$ 是 -Phe-Lys- 或 -Val-Ala- 。

[0459] 其他感兴趣的二肽组合包括:

[0460] -Gly-Gly- ,

[0461] -Pro-Pro- ,以及

[0462] -Val-Glu- 。

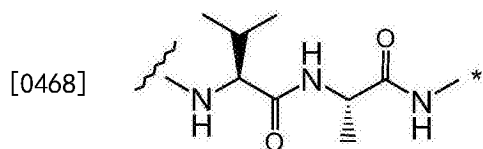
[0463] 可以使用其他二肽组合,包括上述的那些。

[0464] 在一种实施方式中, $L^1\text{-D}$ 是:

[0465]  $\text{-NH-X}_1\text{-X}_2\text{-CO-NH-}^*$

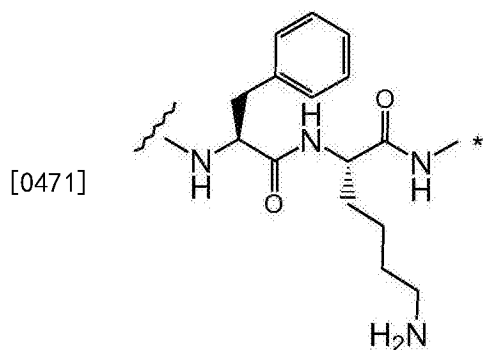
[0466] 其中 $\text{-NH-X}_1\text{-X}_2\text{-CO}$ 是二肽, -NH- 是药物单元的一部分,星号表示与药物单元的剩余部分的附着点,以及波形线表示与 L^1 的剩余部分的附着点或与 A^1 的附着点。优选地,波形线表示与 A^1 的附着点。

[0467] 在一种实施方式中,二肽是缬氨酸-丙氨酸并且 $L^1\text{-D}$ 是:



[0469] 其中星号、-NH-和波形线如上定义。

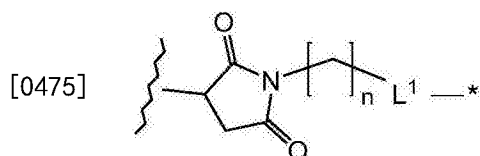
[0470] 在一种实施方式中,二肽是苯丙氨酸-赖氨酸并且 L^1 -D是:



[0472] 其中星号、-NH-和波形线如上定义。

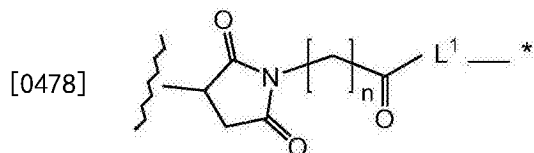
[0473] 在一种实施方式中,二肽是缬氨酸-瓜氨酸。

[0474] 在一种实施方式中,基团 A^1 - L^1 是:



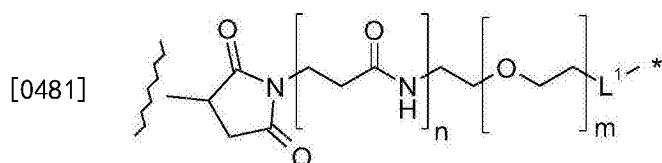
[0476] 其中星号表示与 L^2 或D的附着点,波形线表示与配体单元的附着点,并且n是0至6。在一种实施方式中,n是5。

[0477] 在一种实施方式中,基团 A^1 - L^1 是:



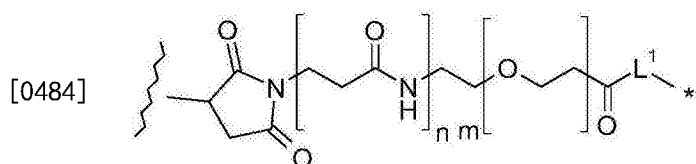
[0479] 其中星号表示与D的附着点,波形线表示与配体单元的附着点,并且n是0至6。在一种实施方式中,n是5。

[0480] 在一种实施方式中,基团 A^1 - L^1 是:



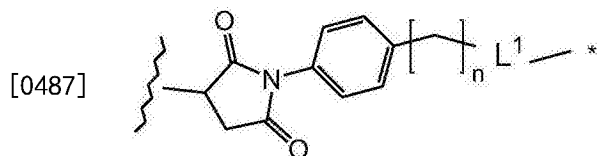
[0482] 其中星号表示与D的附着点,波形线表示与配体单元的附着点,n是0或1,并且m是0至30。在一种优选实施方式中,n是1并且m是0至10,1至8,优选4至8,最优选4或8。

[0483] 在一种实施方式中,基团 A^1 - L^1 是:



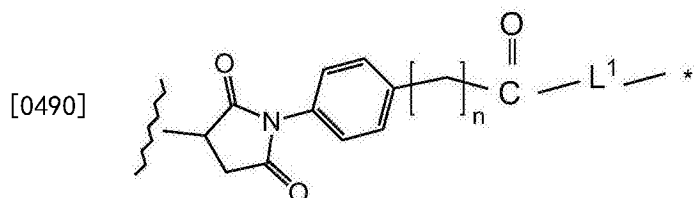
[0485] 其中星号表示与D的附着点,波形线表示与配体单元的附着点,n是0或1,并且m是0至30。在一种优选实施方式中,n是1并且m是0至10,1至7,优选3至7,最优选3或7。

[0486] 在一种实施方式中,基团A¹-L¹是:



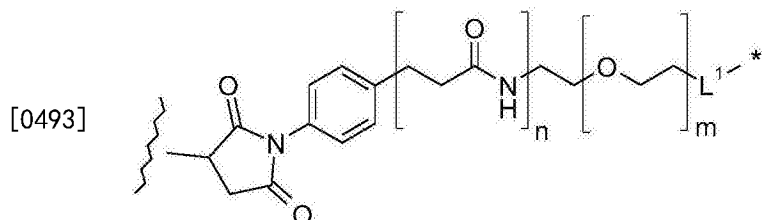
[0488] 其中星号表示与L²或D的附着点,波形线表示与配体单元的附着点,并且n是0至6。在一种实施方式中,n是5。

[0489] 在一种实施方式中,基团A¹-L¹是:



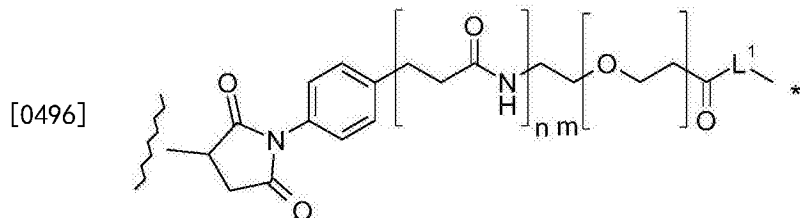
[0491] 其中星号表示与L²或D的附着点,波形线表示与配体单元的附着点,并且n是0至6。在一种实施方式中,n是5。

[0492] 在一种实施方式中,基团A¹-L¹是:



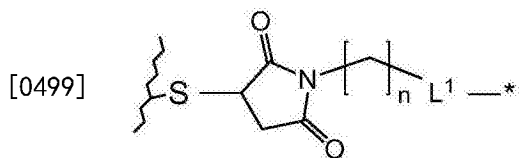
[0494] 其中星号表示与L²或D的附着点,波形线表示与配体单元的附着点,n是0或1,并且m是0至30。在一种优选实施方式中,n是1并且m是0至10,1至8,优选4至8,最优选4或8。

[0495] 在一种实施方式中,基团A¹-L¹是:



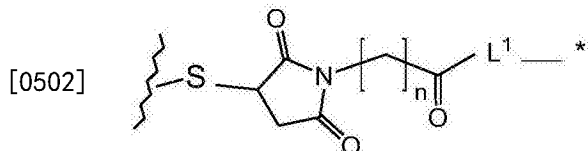
[0497] 其中星号表示与L²或D的附着点,波形线表示与配体单元的附着点,n是0或1,并且m是0至30。在一种优选实施方式中,n是1并且m是0至10,1至8,优选4至8,最优选4或8。

[0498] 在一种实施方式中,基团L-A¹-L¹是:



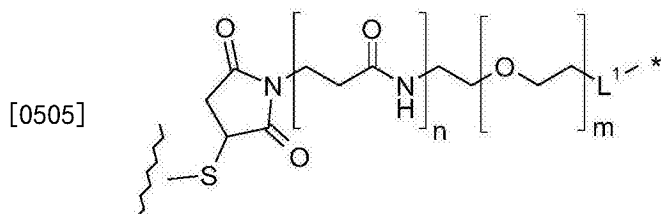
[0500] 其中星号表示与D的附着点，S是配体单元的硫基，波形线表示与配体单元的剩余部分的附着点，并且n是0至6。在一种实施方式中，n是5。

[0501] 在一种实施方式中，基团L-A¹-L¹是：



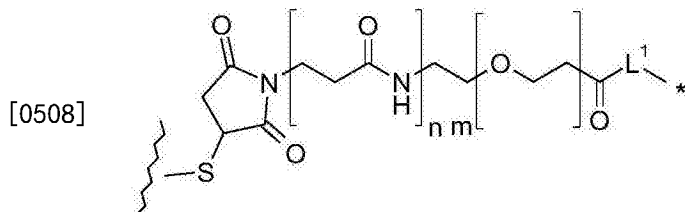
[0503] 其中星号表示与D的附着点，S是配体单元的硫基，波形线表示与配体单元的剩余部分的附着点，并且n是0至6。在一种实施方式中，n是5。

[0504] 在一种实施方式中，基团L-A¹-L¹是：



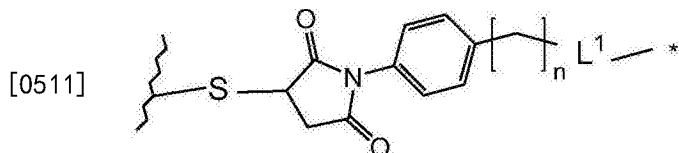
[0506] 其中星号表示与D的附着点，S是配体单元的硫基，波形线表示与配体单元的剩余部分的附着点，n是0或1，并且m是0至30。在一种优选实施方式中，n是1并且m是0至10，1至8，优选4至8，最优选4或8。

[0507] 在一种实施方式中，基团L-A¹-L¹是：



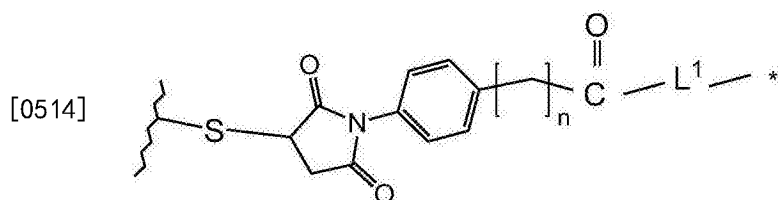
[0509] 其中星号表示与D的附着点，波形线表示与配体单元的附着点，n是0或1，并且m是0至30。在一种优选实施方式中，n是1并且m是0至10，1至7，优选4至8，最优选4或8。

[0510] 在一种实施方式中，基团L-A¹-L¹是：



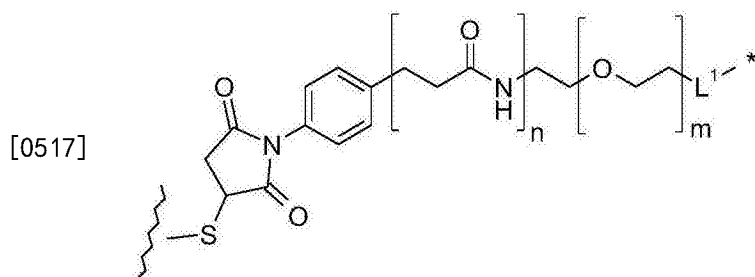
[0512] 其中星号表示与L²或D的附着点，波形线表示与配体单元的剩余部分的附着点，并且n是0至6。在一种实施方式中，n是5。

[0513] 在一种实施方式中，基团L-A¹-L¹是：



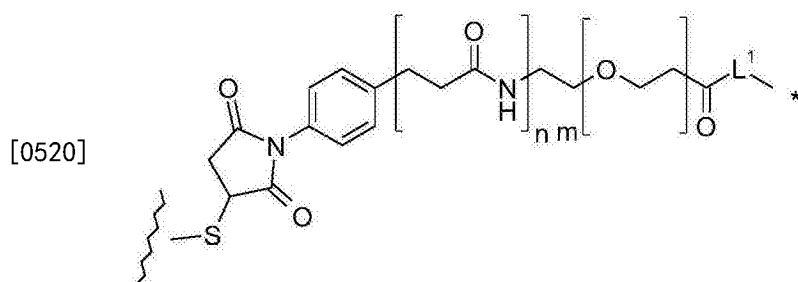
[0515] 其中星号表示与L²或D的附着点,波形线表示与配体单元的剩余部分的附着点,并且n是0至6。在一种实施方式中,n是5。

[0516] 在一种实施方式中,基团L-A¹-L¹是:



[0518] 其中星号表示与L²或D的附着点,波形线表示与配体单元的剩余部分的附着点,n是0或1,并且m是0至30。在一种优选实施方式中,n是1并且m是0至10,1至8,优选4至8,最优选4或8。

[0519] 在一种实施方式中,基团L-A¹-L¹是:



[0521] 其中星号表示与L²或D的附着点,波形线表示与配体单元的剩余部分的附着点,n是0或1,并且m是0至30。在一种优选实施方式中,n是1并且m是0至10,1至8,优选4至8,最优选4或8。

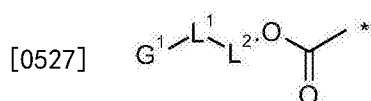
[0522] 在一种实施方式中,延伸物单元是乙酰胺单元,具有下式:



[0524] 其中星号表示与延伸物单元L¹或D的剩余部分的附着点,并且波形线表示与配体单元的附着点。

[0525] 在其他实施方式中,提供接头-药物化合物,用于结合到配体单元上。在一种实施方式中,接头-药物化合物设计成连接到细胞结合剂上。

[0526] 在一种实施方式中,药物接头化合物具有下式:



[0528] 其中星号表示与药物单元的附着点,G¹是用于形成与配体单元连接的延伸基团(A¹),L¹是特异性单元,L²(间隔物单元)是共价键或连同-OC(=O)-一起形成一个或多个自

切除基团。

[0529] 在另一种实施方式中,药物接头化合物具有下式:

[0530] $G^1-L^1-L^2-*$

[0531] 其中星号表示与药物单元的附着点, G^1 是用于形成与配体单元连接的延伸物单元(A^1), L^1 是特异性单元, L^2 (间隔物单元)是共价键或一个或多个自切除基团。

[0532] L^1 和 L^2 如上定义。在本文中提及连接到 A^1 上可以认为是指连接到 G^1 上。

[0533] 在一种实施方式中,当 L^1 包含氨基酸时,可以保护所述氨基酸的侧链。可以使用任何适当的保护基团。在一种实施方式中,可以用其他保护基团(当存在时)来去除化合物中的侧链保护基团。在其他实施方式中,在所述分子中保护基团可以与其他保护基团正交(当存在时)。

[0534] 用于氨基酸侧链的适当的保护基团包括在Novabiochem Catalog 2006/2007中说明的那些基团。在Dubowchik等人文章中还讨论了用于组织蛋白酶可分解的接头的保护基团。

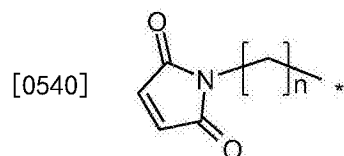
[0535] 在本发明的某些实施方式中,基团 L^1 包括Lys氨基酸残基。可以用Boc或Alloc保护基团来保护这种氨基酸的侧链。Boc保护基团是最优选的。

[0536] 当与配体单元(例如,细胞结合剂)反应时,官能团 G^1 形成连接基团。

[0537] 在一种实施方式中,官能团 G^1 是或包含氨基、羧酸、羟基、巯基、或马来酰亚胺基团,用来与配体单元上的适当基团反应。在一种优选实施方式中, G^1 包含马来酰亚胺基团。

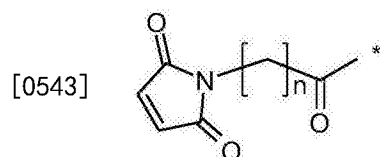
[0538] 在一种实施方式中,基团 G^1 是烷基马来酰亚胺基团。这个基团适合与细胞结合剂中存在的(例如抗体中存在的)巯基基团反应(尤其是半胱氨酸巯基基团)。

[0539] 在一种实施方式中,基团 G^1 是:



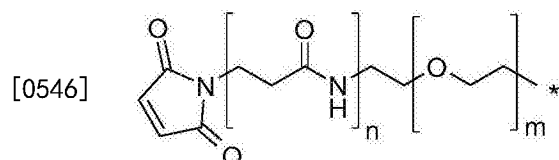
[0541] 其中星号表示与 L^1 、 L^2 或D的附着点,并且n是0至6。在一种实施方式中,n是5。

[0542] 在一种实施方式中,基团 G^1 是:



[0544] 其中星号表示与 L^1 、 L^2 或D的附着点,并且n是0至6。在一种实施方式中,n是5。

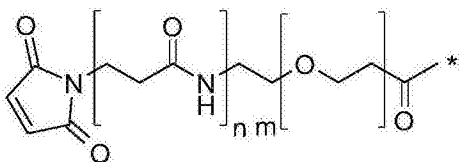
[0545] 在一种实施方式中,基团 G^1 是:



[0547] 其中星号表示与 L^1 的附着点,n是0或1,并且m是0至30。在一种优选实施方式中,n是1并且m是0至10,1至2,优选4至8,以及最优选4或8。

[0548] 在一种实施方式中,基团 G^1 是:

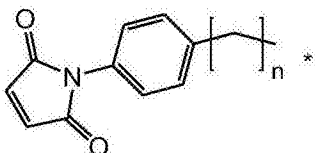
[0549]



[0550] 其中星号表示与 L^1 的附着点, n 是0或1, 并且 m 是0至30。在一种优选实施方式中, n 是1并且 m 是0至10, 1至8, 优选4至8, 以及最优选4或8。

[0551] 在一种实施方式中, 基团 G^1 是:

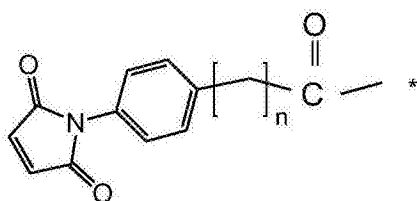
[0552]



[0553] 其中星号表示与 L^1 、 L^2 或 D 的附着点, 并且 n 是0至6。在一种实施方式中, n 是5。

[0554] 在一种实施方式中, 基团 G^1 是:

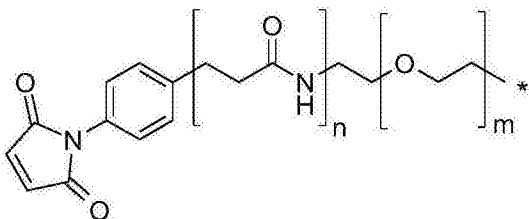
[0555]



[0556] 其中星号表示与 L^1 、 L^2 或 D 的附着点, 并且 n 是0至6。在一种实施方式中, n 是5。

[0557] 在一种实施方式中, 基团 G^1 是:

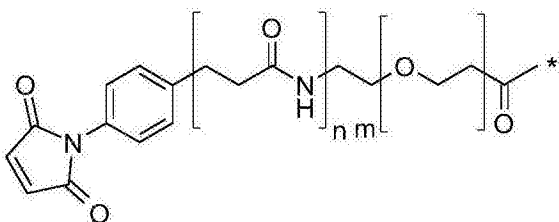
[0558]



[0559] 其中星号表示与 L^1 的附着点, n 是0或1, 并且 m 是0至30。在一种优选实施方式中, n 是1并且 m 是0至10, 1至2, 优选4至8, 以及最优选4或8。

[0560] 在一种实施方式中, 基团 G^1 是:

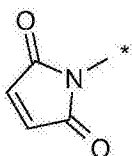
[0561]



[0562] 其中星号表示与 L^1 的附着点, n 是0或1, 并且 m 是0至30。在一种优选实施方式中, n 是1并且 m 是0至10, 1至8, 优选4至8, 以及最优选4或8。

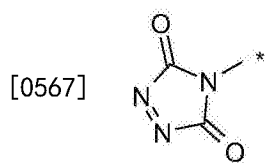
[0563] 在上述每种实施方式中, 可以使用可替换的官能团来替代下面显示的马来酰亚胺基团:

[0564]



[0565] 其中星号表示与G基团的剩余部分的键。

[0566] 在一种实施方式中,用以下基团来替代马来酰亚胺类基团:



[0568] 其中星号表示与G基团的剩余部分的键。

[0569] 在一种实施方式中,用选自下面的基团来替代马来酰亚胺基团:

[0570] $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$,

[0571] $-\text{OH}$,

[0572] $-\text{NH}_2$,

[0573] $-\text{SH}$,

[0574] $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{X}$,其中X是Cl、Br或I,

[0575] $-\text{CHO}$,

[0576] $-\text{NHNH}_2$,

[0577] $-\text{C}\equiv\text{CH}$,以及

[0578] $-\text{N}_3$ (叠氮化物)。

[0579] 在一种实施方式中,存在 L^1 ,并且 G^1 是 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHMe}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{OH}$ 或 $-\text{SH}$ 。

[0580] 在一种实施方式中,当存在 L^1 时, G^1 是 $-\text{NH}_2$ 或 $-\text{NHMe}$ 。任何一种基团可以是 L^1 氨基酸序列的N端。

[0581] 在一种实施方式中,存在 L^1 并且 G^1 是 $-\text{NH}_2$,并且 L^1 是氨基酸序列 $-\text{X}_1-\text{X}_2-$ (如上定义)。

[0582] 在一种实施方式中,存在 L^1 并且 G^1 是 COOH 。这个基团可以是 L^1 氨基酸序列的C端。

[0583] 在一种实施方式中,存在 L^1 并且 G^1 是 OH 。

[0584] 在一种实施方式中,存在 L^1 并且 G^1 是 SH 。

[0585] 可以将基团 G^1 从一种官能团转化成另一种官能团。在一种实施方式中,存在 L^1 并且 G^1 是 $-\text{NH}_2$ 。可以将这个基团转化成包含马来酰亚胺基团的另一种基团 G^1 。例如,基团 $-\text{NH}_2$ 可以与包含上面显示的马来酰亚胺的那些 G^1 基团的酸或活化的酸(例如,N-琥珀酰亚胺形式)进行反应。

[0586] 因此,可以将基团 G^1 转化成更适合与配体单元反应的官能团。

[0587] 如上所述,在一种实施方式中,存在 L^1 并且 G^1 是 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHMe}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{OH}$ 或 $-\text{SH}$ 。在其他实施方式中,以化学保护形式来提供这些基团。因此,化学保护形式是提供有官能团的接头的前体。

[0588] 在一种实施方式中, G^1 是化学保护形式的 $-\text{NH}_2$ 。可以用氨基甲酸酯保护基团来保护所述基团。氨基甲酸酯保护基团可以选自由以下组成的组中:

[0589] Alloc、Fmoc、Boc、Troc、Teoc、Cbz和PNZ。

[0590] 优选地,当 G^1 是 $-\text{NH}_2$ 时,用Alloc或Fmoc基团来保护它。

[0591] 在一种实施方式中,当 G^1 是 $-\text{NH}_2$ 时,用Fmoc基团来保护它。

[0592] 在一种实施方式中,保护基团与封端基团的氨基甲酸酯保护基团相同。

[0593] 在一种实施方式中,保护基团与封端基团的氨基甲酸酯保护基团不同。在此实施方式中,优选的是,在并不去除封端基团的氨基甲酸酯保护基团的条件下,可以去除保护基团。

[0594] 可以去除化学保护基团从而提供官能团来形成与配体单元的连接。可选地,然后将这种官能团转化成另一种官能团(如上所述)。

[0595] 在一种实施方式中,活性基团是胺。这种胺优选地是肽的N端胺,并且可以是本发明的优选二肽的N端胺。

[0596] 可以使活性基团反应从而产生用来形成与配体单元的连接官能团。

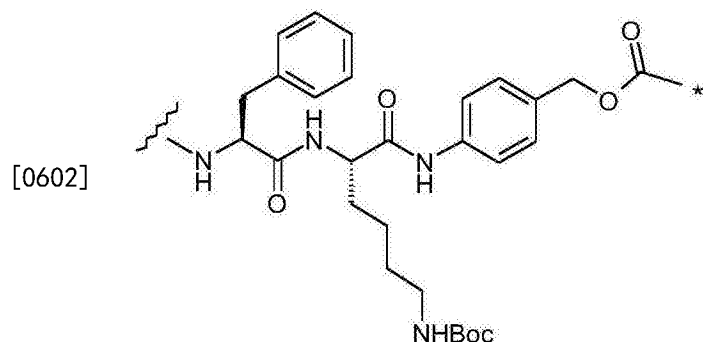
[0597] 在其他实施方式中,接头单元是具有活性基团的接头单元的前体。在此实施方式中,接头单元包含活性基团,所述活性基团通过保护基团进行提供。可以去除保护基团从而提供具有活性基团的接头单元。

[0598] 当活性基团是胺时,保护基团可以是胺保护基团,如在Green and Wuts中描述的那些。

[0599] 在接头单元中保护基团优选地与其他保护基团正交(当存在时)。

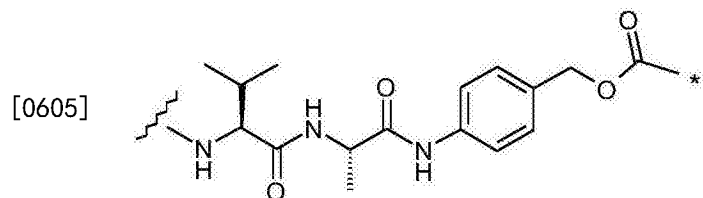
[0600] 在一种实施方式中,保护基团与封端基团正交。因此,可以去除活性基团保护基团,同时保留封端基团。在其他实施方式中,在与用于去除封端基团的那些相同的条件下,可以去除保护基团和封端基团。

[0601] 在一种实施方式中,接头单元是:



[0603] 其中星号表示与药物单元的附着点,并且波形线表示与接头单元的剩余部分的附着点、或者与G¹的附着点(当适用时)。优选地,波形线表示与G¹的附着点。

[0604] 在一种实施方式中,接头单元是:



[0606] 其中星号和波形线如上定义。

[0607] 在W0 2005/082023中描述了适合用于在L¹与细胞结合剂之间形成连接的其他官能团。

[0608] 配体单元

[0609] 配体单元可以是任何种类,并且包括特异性地结合到靶分子上的蛋白质、多肽、肽以及非肽试剂。在一些实施方式中,配体单元可以是蛋白质、多肽或肽。在一些实施方式中,

配体单元可以是环状多肽。这些配体单元可以包括抗体或包含至少一个靶分子结合位点的抗体片段,淋巴因子,激素,生长因子,或可以特异性地结合到靶上的任何其他细胞结合分子或物质。

[0610] 配体单元的实例包括针对WO 2007/085930中使用所描述的那些试剂,将其结合于本文中。

[0611] 在一些实施方式中,配体单元是结合到细胞上的胞外靶上的细胞结合剂。这样的细胞结合剂可以是蛋白质、多肽、肽或非肽试剂。在一些实施方式中,细胞结合剂可以是蛋白质、多肽或肽。在一些实施方式中,细胞结合剂可以是环状多肽。细胞结合剂还可以是抗体或抗体的抗原结合片段。因此,在一种实施方式中,本发明提供了抗体-药物结合物(ADC)。

[0612] 在一种实施方式中,抗体是单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体、或单链抗体。在一种实施方式中,抗体是具有生物活性的这些抗体之一的片段。这类片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段。

[0613] 抗体可以是双特异抗体、域抗体(DAB)或单链抗体。

[0614] 在一种实施方式中,抗体是单克隆抗体。

[0615] 用于本发明的抗体包括在WO 2005/082023中描述的那些抗体,将其结合于本文中。特别优选的是针对肿瘤相关抗原的那些抗体。本领域已知的那些抗原的实例包括,但不限于,在WO 2005/082023中提出的那些肿瘤相关抗原。参见,例如,第41-55页。

[0616] 在一些实施方式中,结合物设计成通过它们的细胞表面抗原靶向肿瘤细胞。抗原可以是过表达或在异常时间或细胞类型表达的细胞表面抗原。优选地,靶抗原仅表达在增殖细胞(优选肿瘤细胞)上;然而,在实践中,这很少被观测到。其结果是,通常基于增生组织与健康组织之间的差异表达来选择靶抗原。

[0617] 已经产生抗体用于靶向特定的肿瘤相关抗原,包括:

[0618] Cripto、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、糖蛋白NMB、CanAg、Her2 (ErbB2/Neu)、CD56 (NCAM)、CD70、CD79、CD138、PSCA、PSMA (前列腺特异性膜抗原)、BCMA、E-选择蛋白、EphB2、黑色素转铁蛋白(Melanotransferin)、Muc16和TMEFF2。

[0619] 将配体单元连接到接头单元上。在一种实施方式中,将配体单元连接到接头单元的A上(当存在时)。

[0620] 在一种实施方式中,配体单元与接头单元之间的连接是通过硫醚键。

[0621] 在一种实施方式中,配体单元与接头单元之间的连接是通过二硫键。

[0622] 在一种实施方式中,配体单元与接头单元之间的连接是通过酰胺键。

[0623] 在一种实施方式中,配体单元与接头单元之间的连接是通过酯键。

[0624] 在一种实施方式中,在配体单元的半胱氨酸残基的巯基基团与接头单元的马来酰亚胺基团之间形成配体单元与接头之间的连接。

[0625] 配体单元的半胱氨酸残基可以用于与接头单元的官能团进行反应以形成连接。在其他实施方式中,例如当配体单元是抗体时,抗体的巯基基团可以参与链间二硫键。在与接头单元的官能团进行反应之前,通过例如用DTT处理抗体,可以将这些链间键转化成游离的巯基基团。

[0626] 在一些实施方式中,将半胱氨酸残基引入到抗体的重或轻链中。在抗体重链或轻

链中通过取代用于半胱氨酸插入的位置包括在公开的美国申请号2007-0092940和国际专利公开W02008070593中描述的那些,将其结合于本文中。

[0627] 治疗方法

[0628] 本发明的结合物可以用于治疗方法中。还提供了一种治疗方法,包括将治疗有效量的式I的结合物给予需要治疗的受试者。术语“治疗有效量”是足以显示对患者有利的量。这种益处可以是至少改善至少一种症状。给予的结合物的实际量、以及给予的速率和时间进程将取决于所治疗的特性和严重性。治疗处方,例如剂量的决定,是在全科医生和其他医生的责任范围内。

[0629] 在一些实施方式中,给予的结合物的量范围从约0.01至约10mg/kg/剂量。在一些实施方式中,给予的结合物的量范围从约0.01至约5mg/kg/剂量。在一些实施方式中,给予的结合物的量范围从约0.05至约5mg/kg/剂量。在一些实施方式中,给予的结合物的量范围从约0.1至约5mg/kg/剂量。在一些实施方式中,给予的结合物的量范围从约0.1至约4mg/kg/剂量。在一些实施方式中,给予的结合物的量范围从约0.05至约3mg/kg/剂量。在一些实施方式中,给予的结合物的量范围从约0.1至约3mg/kg/剂量。在一些实施方式中,给予的结合物的量范围从约0.1至约2mg/kg/剂量。在一些实施方式中,给予的结合物的量范围从约0.01至约1mg/kg/剂量。

[0630] 结合物可以单独地或与其他治疗结合地,同时地或顺序地给予,这取决于有待治疗的病症。治疗和疗法的实例包括,但不限于,化疗(给予活性剂,包括,例如药物;外科手术;以及放射治疗)。

[0631] 根据本发明的药物组合物、以及根据本发明的用途,可以包括,除了活性组分(即式I的结合物)之外,本领域技术人员熟知的药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂或其他物质。这类物质应是无毒的并且不应干扰活性组分的功效。载体或其他物质的确切特性将取决于给药途径,所述给药途径可以是口服,或通过注射,例如皮肤注射、皮下注射、或静脉内注射。

[0632] 用于口服给药的药物组合物可以是片剂、胶囊剂、粉末或液体形式。片剂可以包含固体载体或佐剂。液体药物组合物通常包含液体载体,如水、石油、动物油或植物油、矿物油或合成油。可以包括生理盐水溶液、右旋糖或其他糖溶液或二醇类例如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。胶囊剂可以包含固体载体如明胶。

[0633] 对于静脉内、皮肤或皮下注射、或在痛苦部位的注射,活性组分可以是胃肠道外可接受的水溶液的形式,它是无热原的并且具有适当的pH值、等渗性和稳定性。本领域相关技术人员能够使用例如,等渗载体(如氯化钠注射液、Ringer注射液、乳酸盐林格注射液)来很好地制备适当的溶液。根据需要,可以包括防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其他添加剂。

[0634] 包括其他形式

[0635] 除非另有规定,在上述中包括的是这些取代基的熟知的离子形式、盐形式、溶剂化物形式、以及保护形式。例如,提及羧酸($-COOH$)还包括其阴离子(羧酸酯)形式($-COO^-$)、盐或溶剂化物,以及常规的保护形式。类似地,提及氨基包括氨基的质子化形式($-NH^+HR^{1/2}$)、盐或溶剂化物,例如,盐酸盐,以及氨基的常规保护形式。类似地,提及羟基还包括其阴离子形式($-O^-$)、盐或溶剂化物,以及常规的保护形式。

[0636] 盐

[0637] 可以方便地或令人希望地制备、纯化、和/或处理活性化合物(结合物)相应的盐,例如,药学上可接受的盐。在Berge, et al., J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977) 中讨论了药学上可接受的盐的实例。

[0638] 例如,如果化合物是阴离子的,或具有可以成为阴离子的官能团(例如, $-\text{COOH}$ 可以成为 $-\text{COO}^-$),那么可以与适当的阳离子形成盐。适当的无机阳离子的实例包括,但不限于,碱金属离子(如 Na^+ 和 K^+),碱土金属阳离子(如 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}),以及其他阳离子(如 Al^{3+})。适当的有机阳离子的实例包括,但不限于,铵离子(即 NH_4^+)以及取代的铵离子(例如 NH_3R^+ 、 NH_2R_2^+ 、 NHR_3^+ 、 NR_4^+)。一些适当的取代铵离子的实例是来自下面的那些:乙胺、二乙胺、二环己胺、三乙胺、丁胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪、苄胺、苯基苄胺、胆碱、葡甲胺、以及氨丁三醇,以及氨基酸,如赖氨酸和精氨酸。常见的季铵离子的实例是 $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ 。

[0639] 如果结合物是阳离子的、或具有可以成为阳离子的官能团(例如, $-\text{NH}_2$ 可以成为 $-\text{NH}_3^+$),那么可以与适当的阴离子形成盐。适当的无机阴离子的实例包括,但不限于,来自以下无机酸的那些:盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、亚硫酸、硝酸、亚硝酸、磷酸、和亚磷酸。

[0640] 适当的有机阴离子的实例包括,但不限于,来自以下有机酸的那些:2-乙酰氧基苯甲酸、乙酸、抗坏血酸、天冬氨酸、苯甲酸、樟脑磺酸、肉桂酸、柠檬酸、依地酸、乙二磺酸、乙磺酸、富马酸、葡庚糖酸、葡萄糖酸、谷氨酸、乙醇酸、羟基马来酸、羟基萘甲酸、羟乙磺酸、乳酸、乳糖酸、月桂酸、马来酸、苹果酸、甲磺酸、粘酸、油酸、草酸、棕榈酸、双羟萘酸、泛酸、苯乙酸、苯磺酸、丙酸、丙酮酸、水杨酸、硬脂酸、琥珀酸、对氨基苯磺酸、酒石酸、甲苯磺酸、和戊酸。适当的聚合物有机阴离子的实例包括,但不限于,来自以下聚合物酸的那些:鞣酸、羧甲基纤维素。

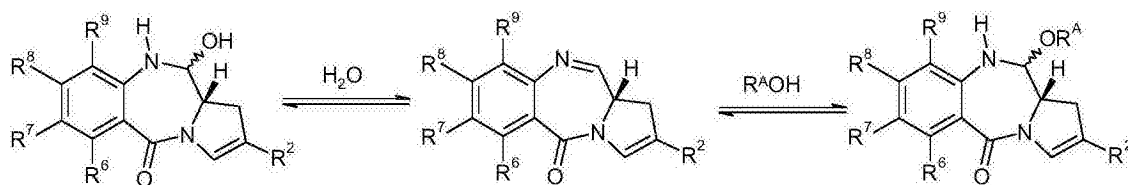
[0641] 溶剂化物

[0642] 可以方便地或令人希望地制备、纯化、和/或处理所述一种或多种结合物的相应的溶剂化物。术语“溶剂化物”在本文中以常规含义使用,是指溶质(例如,活性结合物、活性结合物的盐)和溶剂的复合物。如果溶剂是水,溶剂化物可以方便地称为水合物,例如,一水合物、二水合物、三水合物等。

[0643] 甲醇胺

[0644] 本发明包括结合物,其中横过PBD部分的亚胺键添加溶剂,针对PBD单体说明如下,其中溶剂是水或醇(R^AOH ,其中 R^A 是 C_{1-4} 烷基):

[0645]



[0646] 这些形式可以称为PBD的甲醇胺和甲醇胺醚形式。这些等式的平衡取决于其中发现化合物的条件、以及所述部分本身的特性。

[0647] 例如,可以通过冰冻干燥法以固体形式分离这些特定化合物。

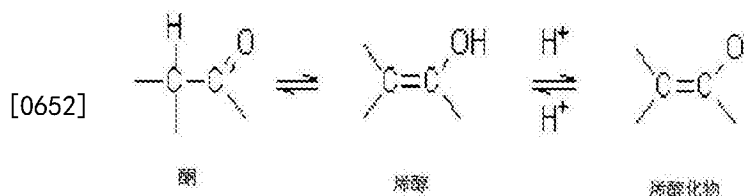
[0648] 异构体

[0649] 某些化合物能够以一种或多种特定的几何形式、光学形式、对映体形式、非对映体

形式、差向异构体形式、异位异构体形式、立体异构体形式、互变异构体形式、构象形式、或异头异构体形式存在,包括但不限于,顺-和反-(cis-and trans-forms)形式;E-和Z-形式;c-、t-、和r-形式;内-和外-形式;R-、S-、和内消旋形式;D-和L-形式;d-和l-形式;(+)型和(-)形式;酮-、烯醇-、和烯醇化物形式;顺-和反-形式(syn-and anti-forms);向斜-和背斜-形式; α -和 β -形式;轴向和平伏形式;船-、椅-、扭曲-、信封-、和半椅形式;以及它们的组合,在下文中统称为“异构体”(或“异构体形式”)。

[0650] 需要注意的是,除了下面针对互变异构形式所讨论的,如在本文中使用的,从术语“异构体”中明确排除在外的是结构(或构造)异构体(即,其差别在于原子之间的连接而不仅仅在于原子空间位置的异构体)。例如,提及甲氧基($-\text{OCH}_3$)不应认为提及它的结构异构体(羟甲基, $-\text{CH}_2\text{OH}$)。类似地,提及邻-氯苯基不应认为提及它的结构异构体(间-氯苯基)。然而,提及一类结构可以很好地包括落在所述类别内的结构异构体形式(例如, C_{1-7} 烷基包括正丙基和异丙基;丁基包括正丁基、异丁基、仲丁基、和叔丁基;甲氧基苯基包括邻-甲氧基苯基、间-甲氧基苯基、和对-甲氧基苯基)。

[0651] 上述排除并不涉及互变异构体形式,如在,例如,以下互变异构体对中:酮/烯醇(如下所示)、亚胺/烯胺、酰胺/亚氨基醇、脒/脒、亚硝基/肟、硫酮/烯硫醇、N-亚硝基/羟基偶氮、和硝基/异硝基中的例如,酮-、烯醇-、和烯醇化物形式。



[0653] 需要注意的是,明确地包括在术语“异构体”内的是具有一个或多个同位素取代的化合物。例如,H可以处于任何同位素形式,包括 ^1H 、 ^2H (D)、和 ^3H (T);C可以处于任何同位素形式,包括 ^{12}C 、 ^{13}C 、和 ^{14}C ;O可以处于任何同位素形式,包括 ^{16}O 和 ^{18}O ;等等。

[0654] 除非另有规定,提及特定的化合物或结合物包括所有这些异构体形式,(全部地或部分地)包括其外消旋混合物以及其他混合物。用于制备(例如不对称合成)和分离(例如,分级结晶和层析方式)这类异构体形式的方法是本领域熟知的或通过采用本文中教导的方法、或已知方法以已知方式容易获得的。

[0655] 一般性合成路径

[0656] 在以下参考文献中广泛地讨论了PBD二聚体化合物的合成,通过引用将所述讨论结合于本文中:

[0657] a) WO 00/12508 (第14至30页);

[0658] b) WO 2005/023814 (第3至10页);

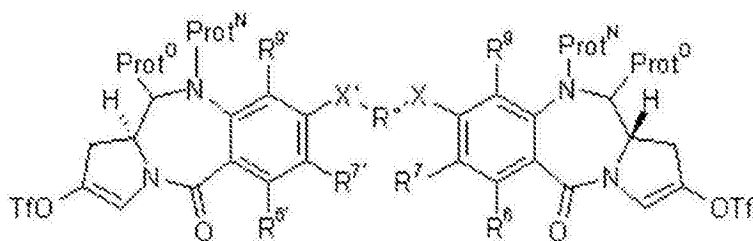
[0659] c) WO 2004/043963 (第28至29页);以及

[0660] d) WO 2005/085251 (第30至39页)。

[0661] 合成路径

[0662] 可以由化合物式2的化合物合成本发明的结合物,其中 R^{10} 和 R^{11} 在它们结合到其上的氮原子与碳原子之间形成氮-碳双键:

[0673]



式 4

[0674] 其中 R^2 、 R^6 、 R^7 、 R^9 、 $R^{6'}$ 、 $R^{7'}$ 、 $R^{9'}$ 、 X 、 X' 和 R'' 是如针对化合物式2的化合物所定义的。

[0675] 通常在钯催化剂(例如 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ 、 $\text{Pd}(\text{OCOCH}_3)_2$ 、 PdCl_2 、或 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$)存在下进行上述偶合。可以在标准条件下进行偶合,或者还可以在微波条件下进行偶合。

[0676] 通常顺序地进行两个偶合步骤。可以在两个步骤之间具有或不具有纯化的情况下来进行它们。如果未进行纯化,则可以在相同的反应容器中进行这两个步骤。在第二偶合步骤之后通常需要纯化。可以通过柱层析法或离子交换分离来从不希望的副产物中纯化所述化合物。

[0677] 在W0 00/12508(通过引用将其结合于本文中)中详细描述了化合物式4的化合物的合成,其中 Prot^0 是氧代基团并且 Prot^N 是SEM。具体地,参考第24页上的方案7,其中上述化合物被指定为中间体P。在W02004/043963中还描述了这种合成方法。

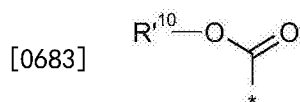
[0678] 在W0 2005/085251中描述了化合物式4的化合物的合成,其中 Prot^0 是用于合成的保护的氧基团,所述合成通过引用结合于本文中。

[0679] 可以通过添加适当的亚硫酸氢盐或亚磺酸盐,紧接着适当的纯化步骤,由式I的化合物(其中 R^{10} 和 R^{11} 在它们结合到其上的氮原子与碳原子之间形成氮-碳双键)合成式I的化合物(其中 R^{10} 和 $R^{10'}$ 是H并且 R^{11} 和 $R^{11'}$ 是 SO_2M)。另外的方法描述于GB 2 053 894,通过引用将其结合于本文中。

[0680] 用于合成的氮保护基团

[0681] 用于合成的氮保护基团是本领域熟知的。在本发明中,特别感兴趣的保护基团是氨基甲酸酯氮保护基团以及半缩醛胺氮保护基团。

[0682] 氨基甲酸酯氮保护基团具有以下结构:



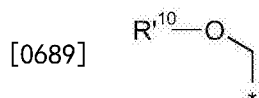
[0684] 其中 R^{10} 是如上定义的R。大量适当的基团描述于Greene, T.W. and Wuts, G.M., Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Edition, John Wiley & Sons, Inc., 1999的第503至549页上,通过引用将其结合于本文中。

[0685] 特别优选的保护基团包括Troc、Teoc、Fmoc、BOC、Doc、Hoc、TcBOC、1-Adoc和2-Adoc。

[0686] 其他可能的基团是硝基苄氧基羰基(例如4-硝基苄氧基羰基)和2-(苯基磺酰基)乙氧基羰基。

[0687] 用钯催化可以去除的那些保护基团不是优选的,例如,Alloc。

[0688] 半缩醛胺氮保护基团具有以下结构:



[0690] 其中, R'^{10} 是如上定义的R。大量适当的基团描述于Greene, T.W. and Wuts, G.M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd Edition, John Wiley&Sons, Inc., 1999的第633至647页上, 作为酰胺保护基团, 通过引用将其结合于本文中。本文公开的基团可以用于本发明中使用的化合物。这类基团包括, 但不限于, SEM、MOM、MTM、MEM、BOM、硝基或甲氧基取代的BOM、以及 $Cl_3CCH_2OCH_2-$ 。

[0691] 用于合成的保护的氧基团

[0692] 用于合成的保护的氧基团是本领域熟知的。大量适当的氧保护基团描述于Greene, T.W. and Wuts, G.M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd Edition, John Wiley&Sons, Inc., 1999中的第23至200页, 通过引用将其结合于本文中。

[0693] 特别感兴趣的类别包括甲硅烷基醚、甲醚、烷基醚、苄基醚、酯、乙酸酯、苯甲酸酯、碳酸酯、和磺酸酯。

[0694] 优选的氧保护基团包括乙酸酯、TBS和THP。

[0695] 进一步优选项

[0696] 下面优选项可以用于如上所述的本发明的所有方面, 或可以涉及单个方面。这些优选项能够以任何组合形式结合在一起。

[0697] 在一些实施方式中, R^6 、 $R^{7'}$ 、 $R^{9'}$ 、 $R^{10'}$ 、 $R^{11'}$ 和Y' 优选地分别与 R^6 、 R^7 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和Y相同。

[0698] 二聚体连接

[0699] Y和Y' 优选地是O。

[0700] R'' 优选地是不具有取代基的 C_{3-7} 亚烷基。更优选地, R'' 是 C_3 、 C_5 或 C_7 亚烷基。

[0701] R^6 至 R^9

[0702] R^9 优选地是H。

[0703] R^6 优选地选自H、OH、OR、SH、NH₂、硝基和卤素, 并且更优选地是H或卤素, 并且最优选地是H。

[0704] R^7 优选地选自H、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR'、和卤素, 并且更优选地独立选自H、OH和OR, 其中R优选地选自可选地取代的 C_{1-7} 烷基、 C_{3-10} 杂环基和 C_{5-10} 芳基。R可以更优选地是可以或不可以被取代的 C_{1-4} 烷基。感兴趣的取代基是 C_{5-6} 芳基(例如苯基)。在7位置处特别优选的取代基是OMe和OCH₂Ph。

[0705] 这些优选项分别应用于 $R^{9'}$ 、 $R^{6'}$ 和 $R^{7'}$ 。

[0706] R^2

[0707] R^2 中的A可以是苯基或 C_{5-7} 杂芳基, 例如呋喃基、苯硫基和吡啶基。在一些实施方式中, A优选地是苯基。在其他实施方式中, A优选地是苯硫基, 例如, 噻吩-2-基和噻吩-3-基。

[0708] X是选自包括-O-、-S-、-C(O)O-、-C(O)-、-NH(C=O)-和-N(R^N)-的列表中的基团, 其中 R^N 选自由H和 C_{1-4} 烷基组成的组中。X可以优选地是-O-、-S-、-C(O)O-、-NH(C=O)-或-NH-, 并且可以更优选地是-O-、-S-、或-NH-, 并且最优选地是-NH-。

[0709] Q^2-X 可以在 C_{5-7} 芳基的任何一个可供使用的环原子上, 但是优选在并不邻近化合物的剩余部分的键的环原子上, 即, 它优选相对于化合物的剩余部分的键的 β 或 γ 位。因而, 当 C_{5-7} 芳基(A)是苯基时, 取代基(Q^2-X)优选地在间位或对位, 并且更优选在对位。

[0710] 在一些实施方式中, Q^1 是单键。在这些实施方式中, Q^2 选自单键和 $-Z-(CH_2)_n-$, 其中

Z选自单键、O、S和NH并且为1至3。在这些实施方式的一些中， Q^2 是单键。在其他实施方式中， Q^2 是 $-Z-(CH_2)_n-$ 。在这些实施方式中，Z可以是O或S并且n可以是1或n可以是2。在这些实施方式的其他中，Z可以是单键并且n可以是1。

[0711] 在其他实施方式中， Q^1 是 $-CH=CH-$ 。

[0712] 在一些实施方式中， R^2 可以是 $-A-CH_2-X$ 和 $-A-X$ 。在这些实施方式中，X可以是 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-C(O)-$ 和 $-NH-$ 。在特别优选的实施方式中，X可以是 $-NH-$ 。

[0713] R^{12}

[0714] R^{12} 可以是 C_{5-7} 芳基。 C_{5-7} 芳基可以是苯基或 C_{5-7} 杂芳基，例如呋喃基、苯硫基和吡啶基。在一些实施方式中， R^{12} 优选为苯基。在其他实施方式中， R^{12} 优选为苯硫基，例如，噻吩-2-基和噻吩-3-基。

[0715] R^{12} 可以是 C_{8-10} 芳基，例如喹啉基或异喹啉基。可以通过任何可供使用的环位置，将喹啉基或异喹啉基结合到PBD核心上。例如，喹啉基可以是喹啉-2-基、喹啉-3-基、喹啉-4-基、喹啉-5-基、喹啉-6-基、喹啉-7-基和喹啉-8-基。其中喹啉-3-基和喹啉-6-基可以是优选的。异喹啉基可以是异喹啉-1-基、异喹啉-3-基、异喹啉-4-基、异喹啉-5-基、异喹啉-6-基、异喹啉-7-基和异喹啉-8-基。其中异喹啉-3-基和异喹啉-6-基可以是优选的。

[0716] R^{12} 可以具有任何数目的取代基。它优选具有1至3个取代基，其中1和2个取代基是更优选的，并且单取代的基团是最优选的。取代基可以处于任何位置。

[0717] 当 R^{12} 是 C_{5-7} 芳基时，单取代基优选在并不邻近化合物的剩余部分的键的环原子上，即，它优选相对于化合物的剩余部分的键的 β 或 γ 位。因此，当 C_{5-7} 芳基是苯基时，取代基优选在间位或对位，并且更优选在对位。

[0718] 当 R^{12} 是 C_{8-10} 芳基时，例如喹啉基或异喹啉基，它可以在喹啉或异喹啉环的任何位置具有任何数目的取代基。在一些实施方式中，它具有一个、两个或三个取代基，并且这些取代基可以在近侧环和远侧环上或在两者上(如果多于一个取代基)。

[0719] R^{12} 取代基

[0720] 如果 R^{12} 上的取代基是卤素，它优选为F或Cl，更优选Cl。

[0721] 如果 R^{12} 上的取代基是醚，在一些实施方式中它可以是烷氧基，例如， C_{1-7} 烷氧基(例如甲氧基、乙氧基)，或者在一些实施方式中它可以是 C_{5-7} 芳氧基(例如苯氧基、吡啶氧基、呋喃氧基)。烷氧基本身可以进一步被例如氨基(例如二甲基氨基)取代。

[0722] 如果 R^{12} 上的取代基是 C_{1-7} 烷基，它可以优选为 C_{1-4} 烷基(例如甲基、乙基、丙基、丁基)。

[0723] 如果 R^{12} 上的取代基是 C_{3-7} 杂环基，在一些实施方式中它可以是 C_6 含氮杂环基，例如吗啉代、硫代吗啉代、哌啶基、哌嗪基。通过氮原子，这些基团可以结合到PBD部分的剩余部分上。这些基团可以进一步被例如 C_{1-4} 烷基取代。如果 C_6 含氮杂环基是哌嗪基，所述进一步的取代基可以在第二氮环原子上。

[0724] 如果 R^{12} 上的取代基是双氧- C_{1-3} 亚烷基，它优选为双氧-亚甲基或双氧-亚乙基。

[0725] R^{12} 的特别优选的取代基包括甲氧基、乙氧基、氟基、氯基、氰基、双氧-亚甲基、甲基-哌嗪基、吗啉代和甲基-苯硫基。 R^{12} 的另一种特别优选的取代基是二甲基氨基丙氧基。

[0726] R^{12} 基团

[0727] 特别优选的取代的 R^{12} 基团包括，但不限于，4-甲氧基-苯基、3-甲氧基苯基、4-乙氧

基-苯基、3-乙氧基-苯基、4-氟-苯基、4-氯-苯基、3,4-双氧亚甲基-苯基、4-甲基苯硫基、4-氰基苯基、4-苯氧基苯基、喹啉-3-基和喹啉-6-基、异喹啉-3-基和异喹啉-6-基、2-噻吩基、2-呋喃基、甲氧基萘基、和萘基。另一种可能的取代的R¹²基团是4-硝基苯基。

[0728] M和z

[0729] 优选的是,M和M' 是单价药理学上可接受的阳离子,并且更优选为Na⁺。

[0730] z优选为3。

[0731] 实施例

[0732] 一般性实验方法

[0733] 在ADP 220旋光仪(Bellingham Stanley Ltd.)上测量旋光性并且以g/100mL给出浓度(c)。使用数字熔点仪器(Electrothermal)来测量熔点。在Perkin-Elmer Spectrum 1000 FT IR Spectrometer上记录红外光谱。在300K下,分别在400和100MHz下,使用Bruker Avance NMR分光计,来获得¹H和¹³C NMR谱。相对于TMS($\delta=0.0$ ppm)报告了化学位移,并且信号指示为s(单峰)、d(双峰)、t(三重峰)、dt(双三重峰)、dd(双峰的双峰)、ddd(双峰的双双峰)或m(多重峰),其中以Hertz(Hz)为单位给出偶合常数。使用连接到具有Waters 2996 PDA的Waters 2695 HPLC上的Waters Micromass ZQ仪器来收集质谱(MS)数据。使用的Waters Micromass ZQ参数是:毛细管(kV),3.38;锥体(V),35;提取器(V),3.0;源温度(°C),100;去溶剂化温度(°C),200;锥体流量(L/h),50;去溶剂化流量(L/h),250。使用金属涂覆的硼硅酸盐玻璃尖端将样品引入仪器中,以正W-模式在Waters Micromass QTOF Global上记录高分辨率质谱(HRMS)。在硅胶铝板(Merck 60,F₂₅₄)上进行薄层色谱法(TLC),并且快速色谱法使用硅胶(Merck 60,230-400目ASTM)。除了HOBt(NovaBiochem)和固体支持试剂(Argonaut)之外,所有其他化学品和溶剂均购自Sigma-Aldrich并且未进行进一步纯化以所提供的形式使用。在适当干燥剂存在下,在干燥氮气氛下,通过蒸馏来制备无水溶剂,并且储存在4Å分子筛或钠线(sodium wire)上。石油醚是指在40-60°C下沸腾的馏分。

[0734] 如在WO 00/012508(化合物210)(通过引用将其结合于本文中)中所述合成化合物1b。

[0735] 一般LC/MS条件:使用水(A)(甲酸0.1%)和乙腈(B)(甲酸0.1%)的流动相来运行HPLC(Waters Alliance 2695)。梯度:初始组成5%B,持续1.0分钟,然后5%B至95%B,3分钟内。在95%B下将组成保持0.5分钟,然后在0.3分钟内回到5%B。总梯度运行时间等于5分钟。通过进入质谱仪的零死容积T管来分开流量3.0mL/分钟,400μL。波长检测范围:220至400nm。功能类型:二极管阵列(535次扫描)。柱:Phenomenex[®] Onyx Monolithic C18 50x 4.60mm。

[0736] 专门用于被Troc和TBDM两个基团保护的化合物的LC/MS条件:使用来自Phenomenex Corp的Onyx Monolithic反相柱(3μm颗粒,50x 4.6mm)在Waters Alliance 2695HPLC系统上进行Troc和TBDMS保护的化合物的色谱分离。流动相A由5%乙腈-包含0.1%甲酸的95%水组成,并且流动相B由95%乙腈-包含0.1%甲酸的5%水组成。在5%B下1分钟之后,将B的比例升高至95%B,再持续2.5分钟,并且保持在95%B下再持续1分钟,然后在10s内返回到95%A,并且再平衡再持续50秒,从而产生5.0分钟的总运行时间。流量保持在3.0mL/分钟。

[0737] 专门用于化合物33的LC/MS条件:在与Waters 2996光电二极管阵列检测器和

Waters ZQ单四重质谱仪连接的Waters 2767样品Manager上运行LC。使用的柱是Luna Phenyl-Hexyl 150x 4.60mm, 5 μ m, 零件号00F-4257-E0 (Phenomenex)。采用的流动相是:

[0738] 流动相A: 100%的HPLC级水 (0.05%三乙胺), pH=7

[0739] 流动相B: 20%的HPLC级水和80%的HPLC级乙腈 (0.05%三乙胺), pH=7

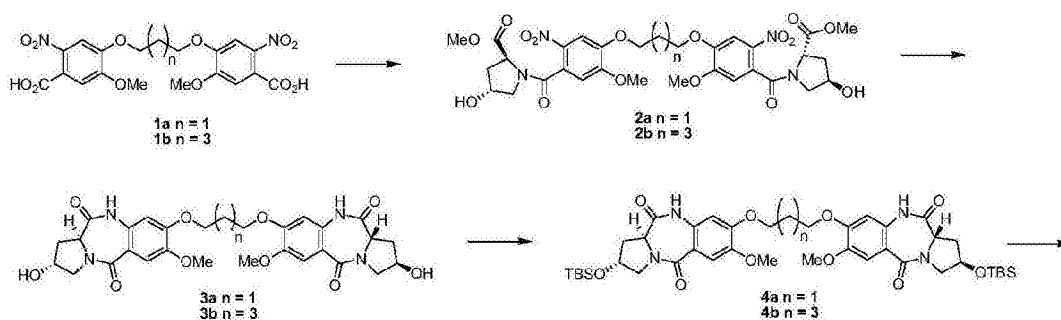
[0740] 使用的梯度是:

[0741]

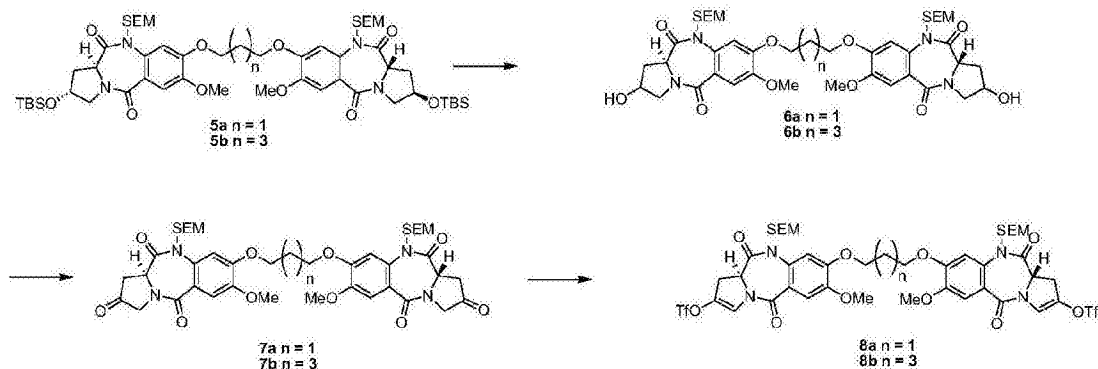
时间(分钟)	流量 (ml/分钟)	%A	%B
初始	1.50	90	10
1.0	1.50	90	10
16.0	1.50	64	36
30.0	1.50	5	95
31.0	1.50	90	10
32.0	1.50	90	10

[0742] 以正离子模式和SIR (选择性离子监视器) 进行质谱法并且监测的离子是m/z = 727.2。

[0743] 关键中间体的合成



[0744]



[0745] (a) 1,1'-[[[(丙烷-1,3-二基)二氧]二[(5-甲氧基-2-硝基-1,4-亚苯基)羰基]]二

[(2S,4R)-甲基-4-羟基吡咯烷-2-羧酸酯] (2a)

[0746] 方法A:将催化量的DMF (2滴) 加入处于无水THF (20mL) 中的硝基酸1a (1.0g, 2.15mmol) 和草酰氯 (0.95mL, 1.36g, 10.7mmol) 的搅拌溶液。在室温下搅拌反应混合物16小时,然后通过真空蒸发来去除溶剂。在-30℃ (干冰/乙二醇) 下在氮气氛围下,将得到的残余物再溶解于无水THF (20mL) 中,然后将酰基氯溶液逐滴加入处于THF (10mL) 中的 (2S,4R)-甲基-4-羟基吡咯烷-2-羧酸盐 (859mg, 4.73mmol) 和TEA (6.6mL, 4.79g, 47.3mmol) 的搅拌混合物。可以将反应混合物升温至室温并且搅拌另外3小时,此后,TLC (95:5v/v CHCl₃/MeOH) 和LC/MS (2.45分钟 (ES⁺) m/z (相对强度) 721 ([M+H]⁺, 20)) 显示产物形成。通过旋转蒸发来去除过量的THF,然后将得到的残余物溶解于DCM (50mL) 中。用1N HCl (2x 15mL)、饱和的NaHCO₃ (2x 15mL)、H₂O (20mL)、盐水 (30mL) 洗涤有机层,然后干燥 (MgSO₄)。过滤和蒸发溶剂产生粗产物,为深色油。通过快速色谱法 (梯度洗脱:100%CHCl₃至96:4v/v CHCl₃/MeOH) 纯化分离出纯酰胺2a,为橙色玻璃 (840mg, 54%)。

[0747] 方法B:将草酰氯 (9.75mL, 14.2g, 111mmol) 加入处于无水DCM (200mL) 中的硝基酸1a (17.3g, 37.1mmol) 和DMF (2mL) 的搅拌悬浮液。在初始泡腾之后,反应悬浮液变成溶液,然后在室温下搅拌混合物16小时。通过用MeOH处理反应混合物的样品证实转化成酰基氯并且通过LC/MS观测得到的二甲酯。通过真空蒸发来去除大部分溶剂,将得到的浓缩溶液再溶解于最小量的干燥DCM中并且用二乙醚研磨。通过过滤来收集得到的黄色沉淀物,用冷的二乙醚洗涤,然后在40℃的真空烘箱中干燥1小时。在-40℃ (干冰/CH₃CN) 下,在25分钟内,将固体酰基氯分批加入处于DCM (150mL) 中的 (2S,4R)-甲基-4-羟基吡咯烷-2-羧酸盐 (15.2g, 84.0mmol) 和TEA (25.7mL, 18.7g, 185mmol) 的搅拌悬浮液中。立即地,如通过LC/MS (2.47分钟 (ES⁺) m/z (相对强度) 721 ([M+H]⁺, 100)) 所判断的,反应完成。用DCM (150mL) 稀释混合物,并用1N HCl (300mL)、饱和的NaHCO₃ (300mL)、盐水 (300mL) 洗涤,过滤 (通过相分离器),然后真空蒸发溶剂,从而给出纯产物2a,为橙色固体 (21.8g, 82%)。

[0748] 分析数据: $[\alpha]_D^{25} = -46.1^\circ$ (c=0.47, CHCl₃); ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) (旋转异构体) δ 7.63 (s, 2H), 6.82 (s, 2H), 4.79-4.72 (m, 2H), 4.49-4.28 (m, 6H), 3.96 (s, 6H), 3.79 (s, 6H), 3.46-3.38 (m, 2H), 3.02 (d, 2H, J=11.1Hz), 2.48-2.30 (m, 4H), 2.29-2.04 (m, 4H); ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) (旋转异构体) δ 172.4, 166.7, 154.6, 148.4, 137.2, 127.0, 109.7, 108.2, 69.7, 65.1, 57.4, 57.0, 56.7, 52.4, 37.8, 29.0; IR (ATR, CHCl₃) 3410 (br), 3010, 2953, 1741, 1622, 1577, 1519, 1455, 1429, 1334, 1274, 1211, 1177, 1072, 1050, 1008, 871 cm⁻¹; MS (ES⁺) m/z (相对强度) 721 ([M+H]⁺, 47), 388 (80); HRMS [M+H]⁺ 理论值 C₃₁H₃₆N₄O₁₆ m/z 721.2199, 实测值 (ES⁺) m/z 721.2227。

[0749] (a) 1,1'-[[(戊烷-1,5-二基) 二氧] 二[(5-甲氧基-2-硝基-1,4-亚苯基) 羰基]] 二[(2S,4R)-甲基-4-羟基吡咯烷-2-羧酸酯] (2b)

[0750] 按照方法B由1b制备产生纯产物,为橙色泡沫 (75.5g, 82%)。

[0751] 分析数据: (ES⁺) m/z (相对强度) 749 ([M+H]⁺, 100)。

[0752] (b) 1,1'-[[(丙烷-1,3-二基) 二氧] 二(11aS,2R)-2-(羟基)-7-甲氧基-1,2,3,10,11,11a-六氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓-5,11-二酮] (3a)

[0753] 方法A:将处于DMF (40mL) 中的10%Pd/C (7.5g, 10%w/w) 的悬浮液加入处于DMF (360mL) 中的硝基酯2a (75g, 104mmol) 的溶液中。在Parr氢化器中氢化悬浮液持续8小时。在

氢摄取停止之后,通过LC/MS (2.12分钟 (ES+) m/z (相对强度) 597 ($[M+H]^+$, 100), (ES-) m/z (相对强度) 595 ($[M+H]^+$, 100) 来监测反应进展。通过过滤来去除固体Pd/C并在40℃下在真空(低于10毫巴)下通过旋转蒸发来浓缩滤液,从而提供包含痕量DMF和残余炭的深色油。在水浴(旋转蒸发器水浴)上在40℃ EtOH (500mL) 中消化残余物,通过C盐来过滤得到的悬浮液,然后用乙醇(500mL)洗涤,从而产生清澈的滤液。将水合肼(10mL, 321mmol)加入溶液中并且在回流下加热反应混合物。在20分钟之后,观测到形成白色沉淀物并继续回流另外30分钟。使混合物冷却至室温并通过过滤来回收沉淀物,用二乙醚(2*1容积的沉淀物)洗涤并在真空干燥器中干燥,从而提供3a (50g, 81%)。

[0754] 方法B:将处于MeOH (300mL) 中的硝基酯2a (6.80g, 9.44mmol) 的溶液加入处于三颈圆底烧瓶中的Raney™镍(4个大刮勺末端的处于H₂O中的~50%淤浆)和防暴沸颗粒中。在回流下加热混合物,然后用处于MeOH (50mL) 中的水合肼(5.88mL, 6.05g, 188mmol) 的溶液逐滴处理,这时观测到剧烈的泡腾。当添加完成时(~30分钟),小心地添加另外的Raney™镍,直到泡腾停止并且反应混合物的最初的黄色发生脱色。在回流下加热混合物持续另外30分钟,通过TLC (90:10v/v CHCl₃/MeOH) 和LC/MS (2.12分钟 (ES+) m/z (相对强度) 597 ($[M+H]^+$, 100)), 此时认为反应完成。使反应混合物冷却至约40℃,然后在没有真空抽吸的情况下通过烧结漏斗进行过滤以去除过量镍。通过真空蒸发来减小滤液的容积,这时形成无色沉淀物,通过过滤加以收集并在真空干燥器中干燥,从而提供3a (5.40g, 96%)。

[0755] 分析数据: $[\alpha]_D^{27} = +404^\circ$ ($c = 0.10$, DMF); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 10.2 (s, 2H, NH), 7.26 (s, 2H), 6.73 (s, 2H), 5.11 (d, 2H, $J = 3.98$ Hz, OH), 4.32-4.27 (m, 2H), 4.19-4.07 (m, 6H), 3.78 (s, 6H), 3.62 (dd, 2H, $J = 12.1, 3.60$ Hz), 3.43 (dd, 2H, $J = 12.0, 4.72$ Hz), 2.67-2.57 (m, 2H), 2.26 (p, 2H, $J = 5.90$ Hz), 1.99-1.89 (m, 2H); ¹³C NMR (100MHz, DMSO-d₆) δ 169.1, 164.0, 149.9, 144.5, 129.8, 117.1, 111.3, 104.5, 54.8, 54.4, 53.1, 33.5, 27.5; IR (ATR, neat) 3438, 1680, 1654, 1610, 1605, 1516, 1490, 1434, 1379, 1263, 1234, 1216, 1177, 1156, 1115, 1089, 1038, 1018, 952, 870cm⁻¹; MS (ES+) m/z (相对强度) 619 ($[M+Na]^+$, 10), 597 ($[M+H]^+$, 52), 445 (12), 326 (11); HRMS $[M+H]^+$ 理论值 C₂₉H₃₂N₄O₁₀ m/z 597.2191, 实测值 (ES+) m/z 597.2205。

[0756] (b) 1,1'-[[(戊烷-1,5-二基) 二氧] 二 (11aS, 2R) -2- (羟基) -7-甲氧基-1,2,3,10,11,11a-六氢-5H-吡咯并 [2,1-c] [1,4]-苯并二氮杂卓-5,11-二酮] (3b)

[0757] 按照方法A由2b制备产生产物,为白色固体 (22.1g, 86%)。

[0758] 分析数据: MS (ES-) m/z (相对强度) 623.3 ($[M-H]^-$, 100);

[0759] (c) 1,1'-[[(丙烷-1,3-二基) 二氧] 二 (11aS, 2R) -2- (叔丁基二甲基甲硅烷氧基) -7-甲氧基-1,2,3,10,11,11a-六氢-5H-吡咯并 [2,1-c] [1,4]-苯并二氮杂卓-5,11-二酮] (4a)

[0760] 将TBSCl (317mg, 2.1mmol) 和咪唑 (342mg, 5.03mmol) 加入处于无水DMF (6mL) 中的四内酰胺3a (250mg, 0.42mmol) 的混浊溶液中。在氮气氛下搅拌混合物3小时,此后,如通过LC/MS (3.90分钟 (ES+) m/z (相对强度) 825 ($[M+H]^+$, 100)) 所判断的,认为反应完成。将反应混合物倒在冰上(~25mL) 并在搅拌下升温至室温。通过真空过滤来收集得到的白色沉淀物,用H₂O、二乙醚洗涤,然后在真空干燥器中干燥,从而提供纯4a (252mg, 73%)。

[0761] 分析数据: $[\alpha]_D^{23} = +234^\circ$ ($c = 0.41$, CHCl₃); ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.65 (s, 2H,

NH), 7.44 (s, 2H), 6.54 (s, 2H), 4.50 (p, 2H, J=5.38Hz), 4.21-4.10 (m, 6H), 3.87 (s, 6H), 3.73-3.63 (m, 4H), 2.85-2.79 (m, 2H), 2.36-2.29 (m, 2H), 2.07-1.99 (m, 2H), 0.86 (s, 18H), 0.08 (s, 12H); ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 170.4, 165.7, 151.4, 146.6, 129.7, 118.9, 112.8, 105.3, 69.2, 65.4, 56.3, 55.7, 54.2, 35.2, 28.7, 25.7, 18.0, -4.82和-4.86; IR (ATR, CHCl_3) 3235, 2955, 2926, 2855, 1698, 1695, 1603, 1518, 1491, 1446, 1380, 1356, 1251, 1220, 1120, 1099, 1033 cm^{-1} ; MS (ES^+) m/z (相对强度) 825 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 62), 721 (14), 440 (38); HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 $\text{C}_{41}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{Si}_2$ m/z 825.3921, 实测值 (ES^+) m/z 825.3948。

[0762] (c) 1,1'-[[(戊烷-1,5-二基) 二氧] 二 (11aS,2R)-2-(叔丁基二甲基甲硅烷氧基)-7-甲氧基-1,2,3,10,11,11a-六氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓-5,11-二酮] (4b)

[0763] 按照上述方法由3b制备产生产物,为白色固体(27.3g,93%)。

[0764] 分析数据: MS (ES^+) m/z (相对强度) 853.8 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100), (ES^-) m/z (相对强度) 851.6 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 100)。

[0765] (d) 1,1'-[[(丙烷-1,3-二基) 二氧] 二 (11aS,2R)-2-(叔丁基二甲基甲硅烷氧基)-7-甲氧基-10-((2-(三甲基甲硅烷基) 乙氧基) 甲基)-1,2,3,10,11,11a-六氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓-5,11-二酮] (5a)

[0766] 在-30℃ (干冰/乙二醇) 下在氮气氛围下,将处于无水THF (10mL) 中的正丁基锂溶液 (在己烷中4.17mL 1.6M溶液,6.67mmol) 逐滴加入处于无水THF (30mL) 中的四内酰胺4a (2.20g,2.67mmol) 的搅拌悬浮液中。在此温度下搅拌反应混合物1小时 (现为淡红橙色),此时,逐滴添加处于无水THF (10mL) 中的SEMCl (1.18mL,1.11g,6.67mmol) 溶液。在氮气氛围下,缓慢升温反应混合物至室温并搅拌16小时。如通过TLC (EtOAc) 和LC/MS (4.77分钟 (ES^+) m/z (相对强度) 1085 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100)) 所判断的,认为反应完成。通过真空蒸发来去除THF,并且将得到的残余物溶解于EtOAc (60mL) 中,用 H_2O (20mL)、盐水 (20mL) 洗涤,干燥 (MgSO_4),过滤并真空蒸发,从而提供粗产物。通过快速色谱法 (80:20v/v己烷/EtOAc) 纯化产生纯N10-SEM保护的四内酰胺5a,为油 (2.37g,82%)。

[0767] 分析数据: $[\alpha]_D^{23} = +163^\circ$ (c=0.41, CHCl_3); ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.33 (s, 2H), 7.22 (s, 2H), 5.47 (d, 2H, J=9.98Hz), 4.68 (d, 2H, J=9.99Hz), 4.57 (p, 2H, J=5.77Hz), 4.29-4.19 (m, 6H), 3.89 (s, 6H), 3.79-3.51 (m, 8H), 2.87-2.81 (m, 2H), 2.41 (p, 2H, J=5.81Hz), 2.03-1.90 (m, 2H), 1.02-0.81 (m, 22H), 0.09 (s, 12H), 0.01 (s, 18H); ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 170.0, 165.7, 151.2, 147.5, 133.8, 121.8, 111.6, 106.9, 78.1, 69.6, 67.1, 65.5, 56.6, 56.3, 53.7, 35.6, 30.0, 25.8, 18.4, 18.1, -1.24, -4.73; IR (ATR, CHCl_3) 2951, 1685, 1640, 1606, 1517, 1462, 1433, 1360, 1247, 1127, 1065 cm^{-1} ; MS (ES^+) m/z (相对强度) 1113 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 48), 1085 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100), 1009 (5), 813 (6); HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 $\text{C}_{53}\text{H}_{88}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{Si}_4$ m/z 1085.5548, 实测值 (ES^+) m/z 1085.5542。

[0768] (d) 1,1'-[[(戊烷1,5-二基) 二氧] 二 (11aS,2R)-2-(叔丁基二甲基甲硅烷氧基)-7-甲氧基-10-((2-(三甲基甲硅烷基) 乙氧基) 甲基)-1,2,3,10,11,11a-六氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓-5,11-二酮] (5b)

[0769] 按照上述方法由4b制备产生产物,为浅橙色泡沫 (46.9g,100%),无需进一步纯化进行使用。

[0770] 分析数据:MS (ES⁺) m/z (相对强度) 1114 ([M+H]⁺, 90), (ES⁻) m/z (相对强度) 1158 ([M+2Na]⁻, 100)。

[0771] (e) 1,1'-[[[(丙烷-1,3-二基)二氧]二(11aS,2R)-2-羟基-7-甲氧基-10-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-1,2,3,10,11,11a-六氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓-5,11-二酮]] (6a)

[0772] 在室温下,将TBAF溶液(在THF中5.24mL 1.0M溶液,5.24mmol)加入处于THF(40mL)中的二甲硅烷基醚5a(2.58g,2.38mmol)的搅拌溶液中。在搅拌3.5小时之后,通过TLC(95:5v/v CHCl₃/MeOH)分析反应混合物显示反应完成。将反应混合物倒入饱和的NH₄Cl溶液(100mL)中并用EtOAc(3x 30mL)萃取。用盐水(60mL)洗涤合并的有机层,干燥(MgSO₄),过滤并真空蒸发,从而提供粗产物。通过快速色谱法(梯度洗脱:100%CHCl₃至96:4v/v CHCl₃/MeOH)纯化产生纯四内酰胺6a,为白色泡沫(1.78g,87%)。

[0773] 分析数据:[α]²³_D=+202°(c=0.34,CHCl₃);¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ7.28(s,2H), 7.20(s,2H), 5.44(d,2H,J=10.0Hz), 4.72(d,2H,J=10.0Hz), 4.61-4.58(m,2H), 4.25(t, 4H,J=5.83Hz), 4.20-4.16(m,2H), 3.91-3.85(m,8H), 3.77-3.54(m,6H), 3.01(br s,2H, OH), 2.96-2.90(m,2H), 2.38(p,2H,J=5.77Hz), 2.11-2.05(m,2H), 1.00-0.91(m,4H), 0.00(s,18H);¹³CNMR(100MHz,CDCl₃) δ169.5,165.9,151.3,147.4,133.7,121.5,111.6,106.9, 79.4,69.3,67.2,65.2,56.5,56.2,54.1,35.2,29.1,18.4,-1.23;IR(ATR,CHCl₃) 2956, 1684,1625,1604,1518,1464,1434,1361,1238,1058,1021cm⁻¹;MS(ES⁺) m/z (相对强度) 885 ([M+29]⁺,70), 857 ([M+H]⁺,100), 711(8), 448(17);HRMS[M+H]⁺理论值C₄₁H₆₀N₄O₁₂Si₂m/z 857.3819,实测值(ES⁺)m/z 857.3826。

[0774] (e) 1,1'-[[[(戊烷-1,5-二基)二氧]二(11aS,2R)-2-羟基-7-甲氧基-10-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-1,2,3,10,11,11a-六氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓-5,11-二酮]] (6b)

[0775] 按照上述方法由5b制备产生产物,为白色泡沫(15.02g)。

[0776] 分析数据:MS(ES⁺) m/z (相对强度) 886 ([M+H]⁺,10), 739.6(100), (ES⁻) m/z (相对强度) 884 ([M-H]⁻,40)。

[0777] (f) 1,1'-[[[(丙烷-1,3-二基)二氧]二[(11aS)-11-磺基-7-甲氧基-2-氧代-10-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)1,2,3,10,11,11a-六氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-5,11-二酮]] (7a)

[0778] 方法A:在0℃下,将0.37M次氯酸钠溶液(142.5mL,52.71mmol,2.4当量)逐滴加入处于DCM(115mL)中的二醇6a(18.8g,21.96mmol,1当量)、TEMPO(0.069g,0.44mmol,0.02当量)和0.5M溴化钾溶液(8.9mL,4.4mmol,0.2当量)的剧烈搅拌的混合物中。通过调节添加速率来将温度保持在0℃至5℃之间。在0℃至5℃下搅拌得到的黄色乳液1小时。TLC(EtOAc)和LC/MS[3.53分钟(ES⁺)m/z (相对强度) 875 ([M+Na]⁺,50), (ES⁻) m/z (相对强度) 852 ([M-H]⁻,100)]表明反应完成。

[0779] 过滤反应混合物,分离有机层,并用DCM(x 2)回洗水层。用盐水(x 1)洗涤合并的有机部分,干燥(MgSO₄)并蒸发,从而产生黄色泡沫。通过快速柱层析法(梯度洗脱35/65v/v 正己烷/EtOAc,30/70至25/75v/v正己烷/EtOAc)纯化提供了双酮7a,为白色泡沫(14.1g, 75%)。

[0780] 使用次氯酸钠溶液(试剂级,可供使用的氯为10-13%)。这被假定为10% (10g NaClO,在100g中)并计算为1.34M(在NaClO中)。通过用水将它稀释至0.37M,由其制备储备溶液。这产生大约pH 14的溶液。通过添加固体NaHCO₃,将pH调节为9.3至9.4。然后使用等分部分的这种储备溶液,来为反应提供2.4摩尔当量。

[0781] 当添加漂白溶液时,观测到温度的最初增加。控制添加速率,从而将温度保持在0℃至5℃之间。反应混合物形成稠密的柠檬黄色乳状液。

[0782] 氧化是在Thomas Fey et al, J.Org.Chem., 2001, 66, 8154-8159中描述步骤的适应型。

[0783] 方法B:在0℃(冰/丙酮)下,将固体TCCA(10.6g, 45.6mmol)分批加入处于无水DCM(700mL)中的醇6a(18.05g, 21.1mmol)和TEMPO(123mg, 0.78mmol)的搅拌溶液中。在0℃下在氮气氛下搅拌反应混合物15分钟,此后,TLC(EtOAc)和LC/MS[3.57分钟(ES+) m/z(相对强度) 875 ([M+Na]⁺, 50)]显示反应完成。通过C盐来过滤反应混合物并用饱和的NaHCO₃水溶液(400mL)、盐水(400mL)洗涤滤液,干燥(MgSO₄),过滤并真空蒸发,从而提供粗产物。通过快速柱层析法(80:20v/v EtOAc/己烷)纯化提供双酮7a,为泡沫(11.7g, 65%)。

[0784] 方法C:在-60℃(液氮/CHCl₃)下在氮气氛下,在25分钟内,将处于干燥DCM(18mL)中的无水DMSO(0.72mL, 0.84g, 10.5mmol)溶液逐滴加入草酰氯的搅拌溶液(在DCM中2.63mL 2.0M溶液, 5.26mmol)中。在-55℃下搅拌20分钟之后,在30分钟内,将处于干燥DCM(36mL)中的基质6a(1.5g, 1.75mmol)的淤浆逐滴加入反应混合物中。在-55℃下搅拌另外50分钟之后,在20分钟内,将处于干燥DCM(18mL)中的TEA(3.42mL, 2.49g, 24.6mmol)溶液逐滴加入反应混合物中。使搅拌的反应混合物升温至室温(~1.5h),然后用DCM(50mL)稀释。用1N HCl(2x 25mL)、H₂O(30mL)、盐水(30mL)洗涤有机溶液并干燥(MgSO₄)。真空过滤和蒸发溶剂产生粗产物,通过快速柱层析法(80:20v/v EtOAc/己烷)对其加以纯化,从而提供双酮7a,为泡沫(835mg, 56%)。

[0785] 分析数据:[α]_D²⁰=+291°(c=0.26, CHCl₃); ¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ7.32(s, 2H), 7.25(s, 2H), 5.50(d, 2H, J=10.1Hz), 4.75(d, 2H, J=10.1Hz), 4.60(dd, 2H, J=9.85, 3.07Hz), 4.31-4.18(m, 6H), 3.89-3.84(m, 8H), 3.78-3.62(m, 4H), 3.55(dd, 2H, J=19.2, 2.85Hz), 2.76(dd, 2H, J=19.2, 9.90Hz), 2.42(p, 2H, J=5.77Hz), 0.98-0.91(m, 4H), 0.00(s, 18H); ¹³C NMR(100MHz, CDCl₃) δ206.8, 168.8, 165.9, 151.8, 148.0, 133.9, 120.9, 111.6, 107.2, 78.2, 67.3, 65.6, 56.3, 54.9, 52.4, 37.4, 29.0, 18.4, -1.24; IR(ATR, CHCl₃) 2957, 1763, 1685, 1644, 1606, 1516, 1457, 1434, 1360, 1247, 1209, 1098, 1066, 1023cm⁻¹; MS(ES⁺) m/z(相对强度) 881 ([M+29]⁺, 38), 853 ([M+H]⁺, 100), 707(8), 542(12); HRMS[M+H]⁺理论值 C₄₁H₅₆N₄O₁₂Si₂m/z 853.3506, 实测值(ES⁺) m/z 853.3502。

[0786] (f) 1,1'-[[(戊烷-1,5-二基) 二氧] 二[(11aS)-11-磺基-7-甲氧基-2-氧代-10-(2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基) 1,2,3,10,11,11a-六氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-5,11-二酮]] (7b)

[0787] 按照方法C由6b制备产生产物,为白色泡沫(10.5g, 76%)。

[0788] 分析数据:MS(ES⁺) m/z(相对强度) 882 ([M+H]⁺, 30), 735(100), (ES⁻) m/z(相对强度) 925 ([M+45]⁻, 100), 880 ([M-H]⁻, 70)。

[0789] (g) 1,1'-[[(丙烷-1,3-二基) 二氧] 二[(11aS)-7-甲氧基-2-[[(三氟甲基) 磺酰基]

氧]-10-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-1,10,11,11a-四氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓-5,11-二酮] (8a)

[0790] 在-45℃(干冰/乙腈冷却浴)下在氮气氛围下,将无水2,6-二甲基吡啶(5.15mL, 4.74g, 44.2mmol)一次性注入处于干燥DCM(180mL)中的双酮7a(6.08g, 7.1mmol)的剧烈搅拌的溶液中。快速逐滴注射从刚刚打开的安瓿中取出的无水三氟甲磺酸酐(triflic anhydride)(7.2mL, 12.08g, 42.8mmol),同时保持温度为-40℃或以下。在-45℃下搅拌反应混合物1小时,此时,TLC(50/50v/v正己烷/EtOAc)显示起始原料完全消耗。在剧烈摇动下用DCM(200mL)立即稀释冷反应混合物,用水(1x 100mL)、5%柠檬酸溶液(1x 200mL)、饱和的NaHCO₃(200mL)、盐水(100mL)洗涤,并干燥(MgSO₄)。真空过滤和蒸发溶剂提供了粗产物,通过快速柱层析法(梯度洗脱:90:10v/v正己烷/EtOAc至70:30v/v正己烷/EtOAc)对其进行纯化,从而提供双烯醇三氟甲磺酸(bis-enol triflate)8a,为黄色泡沫(5.5g, 70%)。

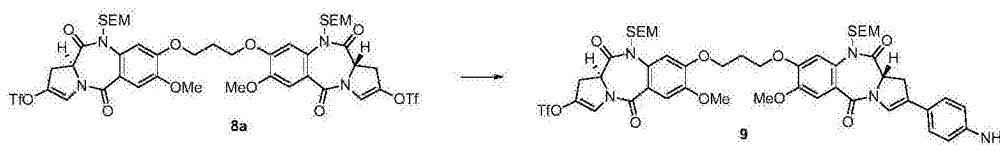
[0791] 分析数据:[α]_D²⁴=+271°(c=0.18, CHCl₃); ¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ 7.33(s, 2H), 7.26(s, 2H), 7.14(t, 2H, J=1.97Hz), 5.51(d, 2H, J=10.1Hz), 4.76(d, 2H, J=10.1Hz), 4.62(dd, 2H, J=11.0, 3.69Hz), 4.32-4.23(m, 4H), 3.94-3.90(m, 8H), 3.81-3.64(m, 4H), 3.16(ddd, 2H, J=16.3, 11.0, 2.36Hz), 2.43(p, 2H, J=5.85Hz), 1.23-0.92(m, 4H), 0.02(s, 18H); ¹³C NMR(100MHz, CDCl₃) δ 167.1, 162.7, 151.9, 148.0, 138.4, 133.6, 120.2, 118.8, 111.9, 107.4, 78.6, 67.5, 65.6, 56.7, 56.3, 30.8, 29.0, 18.4, -1.25; IR(ATR, CHCl₃) 2958, 1690, 1646, 1605, 1517, 1456, 1428, 1360, 1327, 1207, 1136, 1096, 1060, 1022, 938, 913cm⁻¹; MS(ES⁺) m/z(相对强度) 1144([M+28]⁺, 100), 1117([M+H]⁺, 48), 1041(40), 578(8); HRMS[M+H]⁺理论值C₄₃H₅₄N₄O₁₆Si₂S₂F₆m/z 1117.2491, 实测值(ES⁺) m/z 1117.2465。

[0792] (g) 1,1'-[[[(戊烷-1,5-二基)二氧]二(11aS)-7-甲氧基-2-[(三氟甲基)磺酰基]氧]-10-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-1,10,11,11a-四氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓-5,11-二酮] (8b)

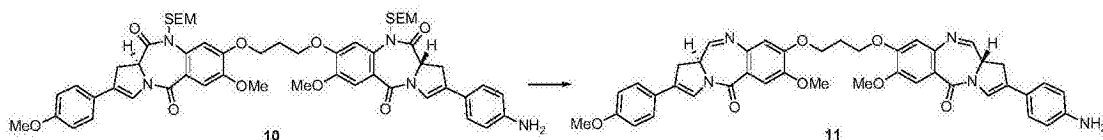
[0793] 按照上述方法由7b制备产生双烯醇三氟甲磺酸,为淡黄色泡沫(6.14g, 82%)。

[0794] 分析数据:(ES⁺) m/z(相对强度) 1146([M+H]⁺, 85)。

[0795] 实施例1



[0796]



[0797] (a) (S)-2-(4-氨基苯基)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(三氟甲基磺酰基)-5,11-二氧代-10-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-5,10,11,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基氧基)丙氧基)-10-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-5,11(10H,11aH)-二酮(9)

[0798] 将固体Pd(PPh₃)₄(20.18mg, 17.46mmol)加入处于甲苯(13mL)、EtOH(6.5mL)和H₂O

(6.5mL) 中的三氟甲磺酸盐 8a (975mg, 0.87mmol)、4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼烷(dioxaboralane)-2-基) 苯胺 (172mg, 0.79mmol) 和 Na₂CO₃ (138mg, 3.98mmol) 的搅拌溶液中。在氮气氛围下搅拌深色溶液 24 小时, 此后, 通过 TLC (EtOAc) 和 LC/MS 分析显示形成希望的单耦合产物以及存在未反应的起始原料。在减压下通过旋转蒸发来去除溶剂并且得到的残余物分配在 H₂O (100mL) 与 EtOAc (100mL) 之间, 在最终分离层之后, 再次用 EtOAc (2x 25mL) 萃取水相。用 H₂O (50mL)、盐水 (60mL) 洗涤合并的有机层, 干燥 (MgSO₄), 过滤并真空蒸发, 从而提供粗 Suzuki 产物。对粗 Suzuki 产物进行快速色谱法 (40% EtOAc/60% 己烷→70% EtOAc, 30% 己烷)。在减压下, 通过旋转蒸发去除过量的洗脱液, 从而提供希望的产物 9 (399mg), 产率 43%。

[0799] ¹H-NMR: (CDCl₃, 400MHz) δ 7.40 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.27 (bs, 3H), 7.24 (d, 2H, J=8.5Hz), 7.15 (t, 1H, J=2.0Hz), 6.66 (d, 2H, J=8.5Hz), 5.52 (d, 2H, J=10.0Hz), 4.77 (d, 1H, J=10.0Hz), 4.76 (d, 1H, J=10.0Hz), 4.62 (dd, 1H, J=3.7, 11.0Hz), 4.58 (dd, 1H, J=3.4, 10.6Hz), 4.29 (t, 4H, J=5.6Hz), 4.00-3.85 (m, 8H), 3.80-3.60 (m, 4H), 3.16 (ddd, 1H, J=2.4, 11.0, 16.3Hz), 3.11 (ddd, 1H, J=2.2, 10.5, 16.1Hz), 2.43 (p, 2H, J=5.9Hz), 1.1-0.9 (m, 4H), 0.2 (s, 18H)。¹³C-NMR: (CDCl₃, 100MHz) δ 169.8, 168.3, 164.0, 162.7, 153.3, 152.6, 149.28, 149.0, 147.6, 139.6, 134.8, 134.5, 127.9 (次甲基), 127.5, 125.1, 123.21, 121.5, 120.5 (次甲基), 120.1 (次甲基), 116.4 (次甲基), 113.2 (次甲基), 108.7 (次甲基), 79.8 (亚甲基), 79.6 (亚甲基), 68.7 (亚甲基), 68.5 (亚甲基), 67.0 (亚甲基), 66.8 (亚甲基), 58.8 (次甲基), 58.0 (次甲基), 57.6 (甲氧基), 32.8 (亚甲基), 32.0 (亚甲基), 30.3 (亚甲基), 19.7 (亚甲基), 0.25 (甲基)。

[0800] (b) (S)-2-(4-氨基苯基)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5,11-二氧代-10-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-5,10,11,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基氧基)丙氧基)-10-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-5,11 (10H, 11aH)-二酮 (10)

[0801] 在室温下, 将固体 Pd(PPh₃)₄ (10mg, 8.69μmol) 加入处于甲苯 (3mL)、EtOH (10mL) 中的单三氟甲磺酸盐 9 (230mg, 0.22mmol)、以及处于 H₂O (1.5mL) 中的 4-甲氧基苯基硼酸 (43mg, 0.28mmol)、Na₂CO₃ (37mg, 0.35mmol) 的搅拌溶液中。在氮气氛围下搅拌反应混合物 20h, 此时如通过 LC/MS 和 TLC (EtOAc) 所判断的, 认为反应完成。在真空下在减压下通过旋转蒸发去除溶剂并且得到的残余物分配在 EtOAc (75mL) 与 H₂O (75mL) 之间。用 EtOAc (3x 30mL) 萃取水相并用 H₂O (30mL)、盐水 (40mL) 洗涤合并的有机层, 干燥 (MgSO₄), 过滤并蒸发, 从而提供粗产物。通过快速色谱法 (60% 己烷:40% EtOAc→80% EtOAc:20% 己烷) 对粗产物进行纯化从而提供纯二聚体, 为橙色泡沫。在减压下去除过量的洗脱液从而提供希望的产物 10 (434mg), 产率 74%。

[0802] ¹H-NMR: (CDCl₃, 400MHz) δ 7.38 (s, 2H), 7.34 (d, 2H, J=8.8Hz), 7.30 (bs, 1H), 7.26-7.24 (m, 3H), 7.22 (d, 2H, J=8.5Hz), 6.86 (d, 2H, J=8.8Hz), 6.63 (d, 2H, J=8.5Hz), 5.50 (d, 2H, J=10.0Hz), 4.75 (d, 1H, J=10.0Hz), 4.74 (d, 1H, J=10.0Hz), 4.56 (td, 2H, J=3.3, 10.1Hz), 4.27 (t, 2H, J=5.7Hz), 4.00-3.85 (m, 8H), 3.80 (s, 3H), 3.77-3.60 (m, 4H), 3.20-3.00 (m, 2H), 2.42 (p, 2H, J=5.7Hz), 0.96 (t, 4H, J=8.3Hz), 0.00 (s, 18H)。¹³C-NMR: (CDCl₃, 100MHz) δ 169.8, 169.7, 162.9, 162.7, 160.6, 152.7, 152.6, 149.0, 147.5, 134.8, 127.8 (次

甲基), 127.4, 126.8, 125.1, 123.1, 123.0, 121.5 (次甲基), 120.4 (次甲基), 116.4 (次甲基), 115.5 (次甲基), 113.1 (次甲基), 108.6 (次甲基), 79.6 (亚甲基), 68.5 (亚甲基), 66.9 (亚甲基), 58.8 (次甲基), 57.6 (甲氧基), 56.7 (甲氧基), 32.8 (亚甲基), 30.3 (亚甲基), 19.7 (亚甲基), 0.0 (甲基)。

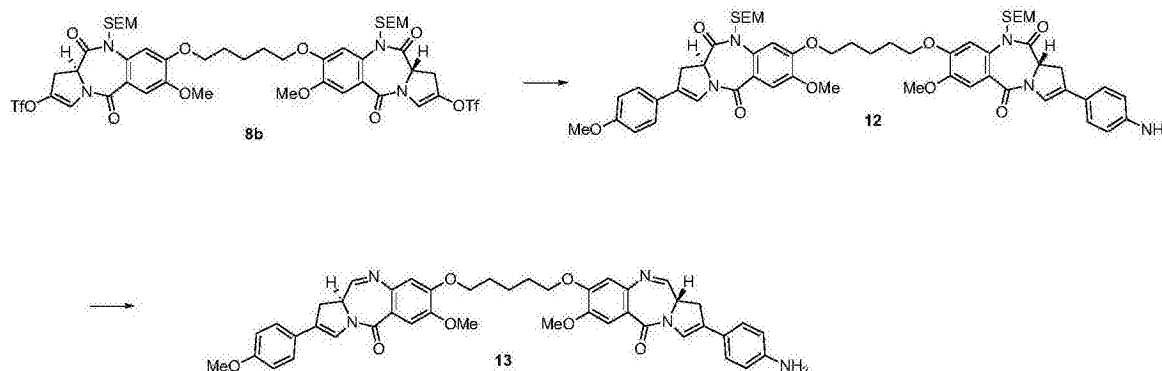
[0803] (c) (S)-2-(4-氨基苯基)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基氧基)丙氧基)-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-5(11aH)-酮(11)

[0804] 在室温下,将新鲜LiBH₄ (183mg, 8.42mmol) 加入处于THF (5mL) 和EtOH (5mL) 中的SEM-双内酰胺10 (428mg, 0.42mmol) 的搅拌溶液中。在10分钟之后,观测到延迟的剧烈泡腾,这需要将反应容器放置在冰浴中。在去除冰浴之后,在室温下搅拌混合物1小时。此时LC/MS分析显示起始原料完全消耗,带有非常少的单还原产物。将反应混合物倒在冰上 (100mL) 并在搅拌下升温至室温。用DCM (3x30mL) 萃取混合物水溶液并用H₂O (20mL)、盐水 (30mL) 洗涤合并的有机层,然后真空浓缩。用DCM (5mL)、EtOH (14mL)、H₂O (7mL) 和硅胶 (10g) 处理得到的残余物。在室温下搅拌粘性混合物3天。通过烧结漏斗缓慢过滤混合物并用90%CHCl₃:10%MeOH (~250mL) 洗涤硅石残余物,直至UV活性从洗脱液中完全消失。用H₂O (50mL)、盐水 (60mL) 洗涤有机相,干燥 (MgSO₄),过滤并真空蒸发,从而提供粗物质。通过快速色谱法 (97%CHCl₃:3%MeOH) 对粗产物进行纯化,从而提供纯C2/C2' 芳基PBD二聚体11 (185mg), 产率61%。

[0805] ¹H-NMR: (CDCl₃, 400MHz) δ7.88 (d, 1H, J=4.0Hz), 7.87 (d, 1H, J=4.0Hz), 7.52 (s, 2H), 7.39 (bs, 1H), 7.37-7.28 (m, 3H), 7.20 (d, 2H, J=8.5Hz), 6.89 (d, 2H, J=8.8Hz), 6.87 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.67 (d, 2H, J=8.5Hz), 4.40-4.20 (m, 6H), 3.94 (s, 6H), 3.82 (s, 3H), 3.61-3.50 (m, 2H), 3.40-3.30 (m, 2H), 2.47-2.40 (m, 2H)。 ¹³C-NMR: (CDCl₃, 100MHz) δ162.5 (亚胺次甲基), 161.3, 161.1, 159.3, 156.0, 151.1, 148.1, 146.2, 140.3, 126.2 (次甲基), 123.2, 122.0, 120.5 (次甲基), 119.4, 115.2 (次甲基), 114.3 (次甲基), 111.9 (次甲基), 111.2 (次甲基), 65.5 (亚甲基), 56.2 (甲氧基), 55.4 (甲氧基), 53.9 (次甲基), 35.6 (亚甲基), 28.9 (亚甲基)。

[0806] 实施例2

[0807]



[0808] (a) (S)-2-(4-氨基苯基)-7-甲氧基-8-(5-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5,11-二氧代-10-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-5,10,11,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基氧基)戊氧基)-10-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-1H-

吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-5,11(10H,11aH)-二酮(12)

[0809] 在30℃下,将固体Pd(PPh₃)₄(32mg,27.7μmol)加入处于甲苯(10mL)、EtOH(5mL)中的双三氟甲磺酸盐8b(1.04g,0.91mmol)、以及处于H₂O(5mL)中的4-甲氧基苯基硼酸(0.202g,1.32mmol)、Na₂CO₃(0.169g,1.6mmol)的搅拌溶液中。在氮气氛下搅拌反应混合物20小时。添加另外的固体4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼烷-2-基)苯胺(0.203g,0.93mmol)和Na₂CO₃(0.056g,0.53mmol),接着添加固体Pd(PPh₃)₄(10mg,8.6μmol)。在氮气氛下搅拌反应混合物另外20小时。LC/MS表明形成希望的产物。添加EtOAc(100mL)和H₂O(100mL),分离水层并用EtOAc(3x 30mL)萃取。用H₂O(100mL)、盐水(100mL)洗涤合并的有机层,干燥(MgSO₄),过滤并蒸发,从而提供深棕色油。将油溶解于DCM中并加载到10g用DCM(1体积)预平衡的SCX-2套筒上。用DCM(3体积)、MeOH(3体积)洗涤套筒,并用处于MeOH中的2M NH₃(2体积)洗脱粗产物。快速色谱法(50%正己烷:50%EtOAc→20%正己烷:80%EtOAc)提供了纯二聚体12,为黄色泡沫(0.16g,34%)。

[0810] 分析数据:[α]²³_D=+388°(c=0.22,CHCl₃);¹H-NMR:(CDCl₃,400MHz) δ7.39(s,2H),7.35(d,2H,J=12.8Hz),7.32(bs,1H),7.26-7.23(m,5H),6.89(d,2H,J=8.8Hz),6.66(d,2H,J=8.5Hz),5.55(d,2H,J=10.0Hz),4.73(d,1H,J=10.0Hz),4.72(d,1H,J=10.0Hz),4.62(td,2H,J=3.2,10.4Hz),4.15-4.05(m,4H),4.00-3.85(m,8H),3.82(s,3H),3.77-3.63(m,4H),3.20-3.05(m,2H),2.05-1.95(m,4H),1.75-1.67(m,2H),1.01-0.95(m,4H),0.03(s,18H);MS(ES⁺)m/z(相对强度)1047([M+H]⁺,45)。

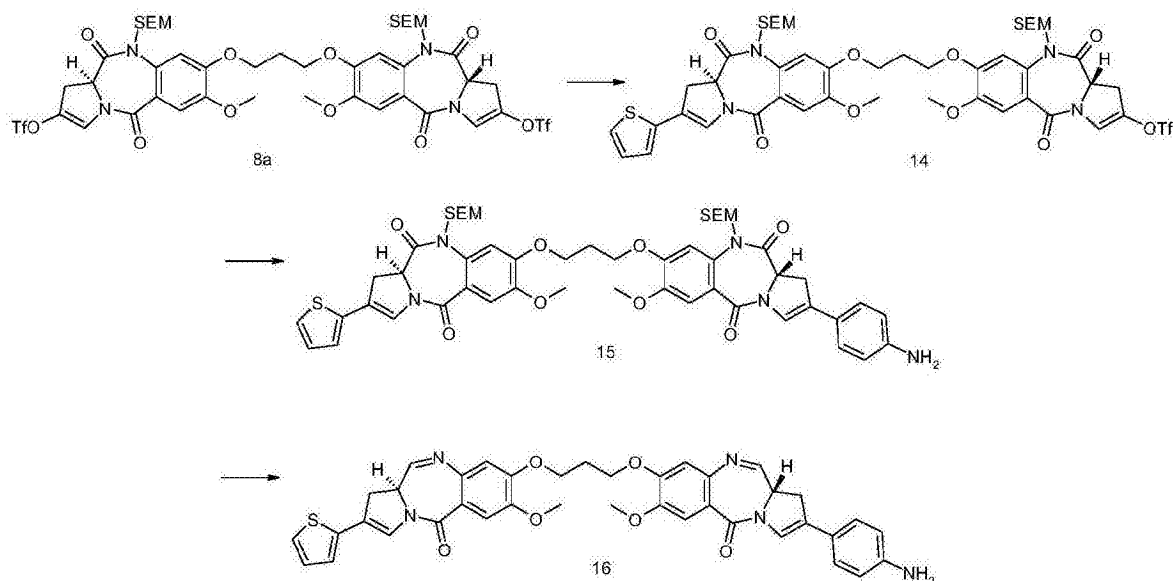
[0811] (b) (S)-2-(4-氨基苯基)-7-甲氧基-8-(5-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基氧基)戊氧基)-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-5(11aH)-酮(13)

[0812] 在0℃(冰浴)下,将新鲜LiBH₄(66mg,3.04mmol)加入处于THF(3mL)和EtOH(3mL)中的SEM-双内酰胺12(428mg,0.42mmol)的搅拌溶液中。移开冰浴并使反应混合物达到室温(剧烈泡腾)。在2小时之后,LC/MS分析表明起始原料完全消耗。将反应混合物倒在冰上(50mL)并在搅拌下升温至室温。用DCM(3x50mL)萃取混合物水溶液并用H₂O(50mL)、盐水(50mL)洗涤合并的有机层,干燥(MgSO₄)并真空浓缩。用DCM(2mL)、EtOH(5mL)、H₂O(2.5mL)和硅胶(3.7g)处理得到的残余物。在室温下搅拌粘性混合物3天。通过烧结漏斗过滤混合物并用90%CHCl₃:10%MeOH(~250mL)洗涤硅石残余物,直至UV活性从洗脱液中完全消失。对有机相进行干燥(MgSO₄),过滤和真空蒸发,从而提供粗物质。通过快速色谱法(99.5%CHCl₃:0.5%MeOH至97.5%CHCl₃:2.5%MeOH,0.5%增量)来纯化粗产物,从而提供纯C2/C2'芳基PBD二聚体13(59mg,52%)。

[0813] 分析数据:[α]²⁸_D=+760°(c=0.14,CHCl₃);¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ7.89(d,1H,J=4.0Hz),7.87(d,1H,J=4.0Hz),7.52(s,2H),7.39(bs,1H),7.37-7.28(m,3H),7.22(d,2H,J=8.4Hz),6.91(d,2H,J=8.8Hz),6.815(s,1H),6.81(s,1H),6.68(d,2H,J=8.4Hz),4.45-4.35(m,2H),4.2-4.0(m,4H),3.94(s,6H),3.85-3.7(s,3H),3.65-3.50(m,2H),3.45-3.3(m,2H),2.05-1.9(m,4H),1.75-1.65(m,2H);MS(ES⁺)(相对强度)754.6([M+H]⁺,100),(ES⁻)(相对强度)752.5([M-H]⁻,100)。

[0814] 实施例3

[0815]



[0816] (a) (S)-2-(噻吩-2-基)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(三氟甲磺酰氧基)-5,11-二氧代-10-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-5,10,11,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基氧基)丙氧基)-10-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-5,11(10H,11aH)-二酮(14)

[0817] 将固体Pd(PPh₃)₄ (41mg, 0.036mmol) 加入处于甲苯(10mL)、EtOH(5mL)中的双三氟甲磺酸盐8a (1g, 0.9mmol)、以及处于H₂O(5mL)中的噻吩-2-基硼酸(149mg, 1.16mmol)、Na₂CO₃ (152mg, 1.43mmol) 的搅拌溶液中。在室温下在氮气氛围下, 搅拌反应混合物过夜。通过真空蒸发来去除溶剂并且得到的残余物分配在H₂O(100mL)与EtOAc(100mL)之间。用EtOAc(2x 30mL)萃取水层, 并用H₂O(50mL)、盐水(50mL)洗涤合并的有机层, 干燥(MgSO₄), 过滤并真空蒸发, 从而提供粗产物, 通过快速色谱法(80己烷:20EtOAc→50己烷:50EtOAc)对其进行纯化, 从而提供二聚体14(188mg, 产率20%)。

[0818] 分析数据: LC-MS RT 4.27分钟, 1051 (M+H)⁺; ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.36 (s, 1H), 7.31 (bs, 1H), 7.27 (bs, 1H), 7.26-7.23 (m, 2H), 7.22-7.17 (m, 1H), 7.12 (bs, 1H), 7.02-6.96 (m, 2H), 5.50 (d, J=10.0Hz, 2H), 7.75 (d, J=10.0Hz, 2H), 4.65-4.55 (m, 2H), 4.37-4.13 (m, 4H), 4.00-3.85 (m, 8H), 3.8-3.6 (m, 4H), 3.20-3.10 (m, 2H), 2.50-2.35 (m, 2H), 1.0-0.9 (m, 4H), 0 (s, 18H)。

[0819] (b) (S)-2-(噻吩-2-基)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(三氟甲磺酰氧基)-5,11-二氧代-10-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-5,10,11,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基氧基)戊氧基)-10-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-5,11(10H,11aH)-二酮(15)

[0820] 在室温下, 将固体Pd(PPh₃)₄ (7.66mg, 6.63μmol) 加入处于甲苯(2-5mL)、EtOH(1.25mL)和H₂O(125mL)中的14 (174mg, 0.17mmol)、Na₂CO₃ (28mg, 0.22mmol) 和4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼烷-2-基)苯胺(47mg, 0.22mmol) 的搅拌的混浊溶液中。在氮气氛围下, 搅拌反应混合物24小时, 此时通过LC/MS主峰(@3.97分钟, FW=1016, M+Na) 和TLC(EtOAc), 认为反应完成。通过真空蒸发来去除溶剂并且得到的残余物分配在EtOAc(60mL)与H₂O(30mL)之间。对层加以分离并用H₂O(20mL)、盐水(30mL)洗涤有机相, 干燥(MgSO₄), 过

滤并真空蒸发,从而提供粗产物(123mg,产率75%)。

[0821] 分析数据:LC-MS RT 3.98分钟,100%面积,994 (M+H)⁺; ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.40 (d, J=5.3Hz, 2H), 7.30 (t, J=1.70Hz, 1H), 7.29-7.27 (m, 3H), 7.25 (d, J=8.5Hz, 2H), 7.21 (dd, J=1.4, 4.73Hz, 1H), 7.03-6.97 (m, 2H), 6.66 (d, J=8.5Hz, 2H), 5.52 (d, J=10.0Hz, 2H), 4.78 (d, J=10.0Hz, 1H), 4.77 (d, J=10.0Hz, 1H), 4.62 (dd, J=3.4, 10.5Hz, 1H), 4.59 (dd, J=3.40, 10.6Hz, 1H), 4.30 (t, J=5.85Hz, 4H), 3.85-4.03 (m, 8H), 3.84-3.64 (m, 6H), 3.18 (ddd, J=2.2, 10.5, 16.0Hz, 1H), 3.11 (ddd, J=2.2, 10.5, 16.0Hz, 1H), 2.44 (p, J=5.85Hz, 2H), 0.98 (t, J=1.5Hz, 4H), 0 (s, 18H)。

[0822] (c) (S)-2-(噻吩-2-基)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(4-氨基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基氧基)丙氧基)-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-5(11aH)-酮(16)

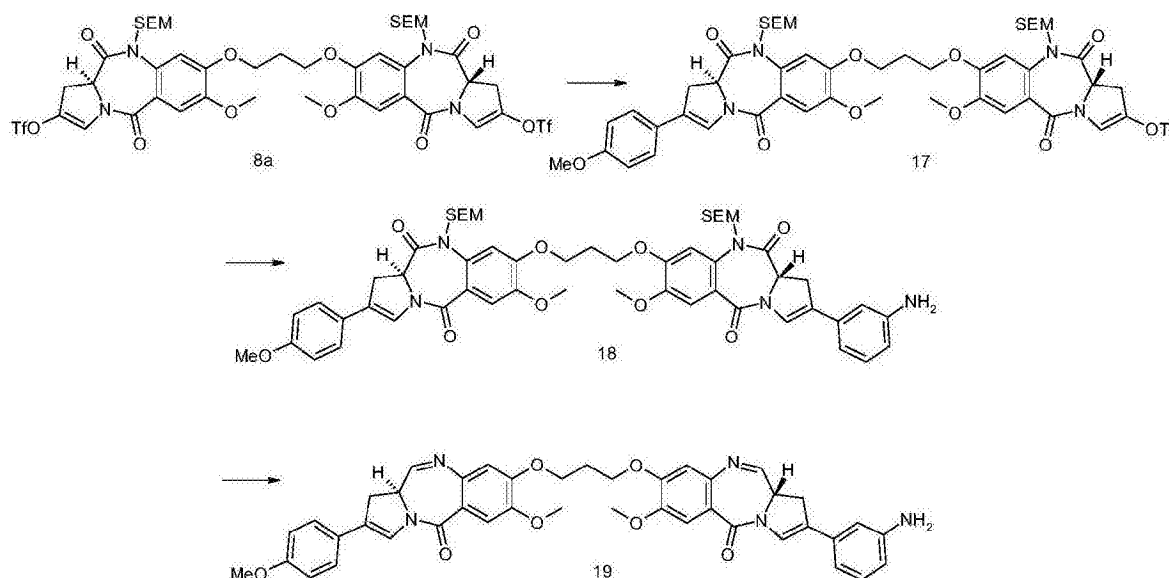
[0823] 在0℃(冰浴)下,将新鲜LiBH₄(47mg, 2.22mmol)加入处于无水THF(3mL)和EtOH(3mL)中的SEM-双内酰胺15(110mg, 0.11mmol)的搅拌溶液中。移开冰浴并在氮气氛围下搅拌反应混合物1小时。通过LC/MS分析进行的反应分析显示显著地形成希望的产物(Pk@2.57分钟)(I=69.32)、FW=702, M+H)和半亚胺。搅拌反应混合物持续另外1小时,此后,通过LC/MS未观测到进一步的反应进展。将反应混合物倒在冰上,搅拌并允许升温至室温。在DCM(50mL)与水(50mL)之间分配之后,用DCM(3x 20mL)萃取水相。用H₂O(50mL)、盐水(50mL)洗涤合并的有机层并在减压下通过真空蒸发来去除溶剂。

[0824] 将得到的残余物溶解于DCM(5mL)、EtOH(15mL)和H₂O(7mL)中,然后用硅胶(5g)处理。在室温下搅拌反应48h。通过烧结漏斗通过过滤来去除硅石,并用90:10 CHCl₃:MeOH(100mL)冲洗残余物。将H₂O(50mL)加入滤液中并对层进行分离(在摇动之后)。用CHCl₃(2x30mL)和H₂O(50mL)、盐水(50mL)萃取水层,干燥(MgSO₄),过滤并真空蒸发,从而提供粗产物。快速色谱法(CHCl₃→98%CHCl₃:2%MeOH)提供了产物(41mg, 53%)。

[0825] 分析数据:LC-MS RT 2.55分钟,702 (M+H)

[0826] 实施例4

[0827]



[0828] (a) (S)-2-(4-甲氧基苯基)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(三氟甲基磺酰

基)-5,11-二氧代-10-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-5,10,11,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基氧基)丙氧基)-10-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-5,11(10H,11aH)-二酮(17)

[0829] 将固体4-甲氧基苯硼酸(0.388g,2.55mmol)加入处于甲苯(54.8mL)、乙醇(27mL)和水(27mL)中的SEM保护的双三氟甲磺酸盐(8a)(3.0g,2.69mmol)、碳酸钠(426mg,4.02mmol)和四(三苯基)膦钨(0.08mmol)的溶液中。在室温下搅拌反应混合物3小时。然后在乙酸乙酯与水之间分配反应混合物。用水和盐水洗涤有机层并在硫酸镁上干燥。在减压下通过旋转蒸发来去除过量溶剂并对得到的残余物进行快速柱层析法(硅胶;梯度洗脱EtOAc/己烷30/70→35/65→40/60→45/55)从而去除未反应的双三氟甲磺酸盐(0.6g)。从选择的馏分中去除过量的洗脱液提供了4-甲氧基苯基耦合产物(1.27g,1.18mmol,41%)。

[0830] LC-MS RT 4.30分钟,1076(M+H);¹H-NMR(400MHZ,CDC1₃) δ7.41(s,1H),7.39(d,J=8.8Hz,2H),7.35(s,1H),7.34(bs,1H),7.29(s,1H),7.16(t,J=1.9Hz,1H),6.90(d,J=8.8Hz,2H),5.53(d,J=10.0Hz,2H),4.79(d,J=10.0Hz,1H),4.78(d,J=10.0Hz,1H),4.66-4.60(m,2H),4.30(t,J=5.7Hz,4H),4.0-3.94(m,2H),3.93(s,3H),3.92(s,3H),3.84(s,3H),3.83-3.60(m,4H),3.22-3.10(m,2H),2.45(t,J=5.9Hz,2H),1.05-0.94(m,4H),0(s,18H)。

[0831] (b) (S)-2-(3-氨基苯基)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5,11-二氧代-10-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-5,10,11,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基氧基)丙氧基)-10-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-5,11(10H,11aH)-二酮(18)

[0832] 将固体3-氨基苯硼酸(0.143g,0.92mmol)加入处于甲苯(10mL)、乙醇(5mL)和水(5mL)中的单三氟甲磺酸盐(17)(0.619g,0.58mmol)、碳酸钠(195mg,1.84mmol)和四(三苯基)膦钨(26.6mg,0.023mmol)的溶液中。在30℃下在室温下搅拌反应混合物过夜。然后在乙酸乙酯与水之间分配反应混合物。用水和盐水洗涤有机层并在硫酸镁上干燥。在减压下通过旋转蒸发来去除过量溶剂并对得到的残余物进行快速柱层析法(硅胶;梯度洗脱EtOAc/己烷70/30→85/15)。从选择的馏分中去除过量的洗脱液提供了希望的产物(0.502g,0.49mmol,85%)。

[0833] LC-MS RT 4.02分钟,1019(M+H);¹H-NMR(400MHZ,CDC1₃) δ7.38-7.35(m,4H),7.33(bs,1H),7.30(bs,1H),7.25(s,2H),7.10(t,J=7.8Hz,1H),6.88-6.80(m,3H),6.72(bs,1H),6.57(dd,J=7.9,1.8Hz,1H),5.50(d,J=10.0Hz,2H),4.75(d,10.0Hz,2H),4.58(dd,J=10.6,3.3Hz,2H),4.27(t,J=5.8Hz,4H),3.95-3.91(m,2H),3.90(s,6H),3.80(s,3H),3.77-3.60(m,6H),3.15-3.05(m,2H),2.41(p,J=5.8Hz,2H),0.95(t,=8.25Hz,4H),0(s,18H)。

[0834] (c) (S)-2-(3-氨基苯基)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基氧基)丙氧基)-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-5(11aH)-酮(19)

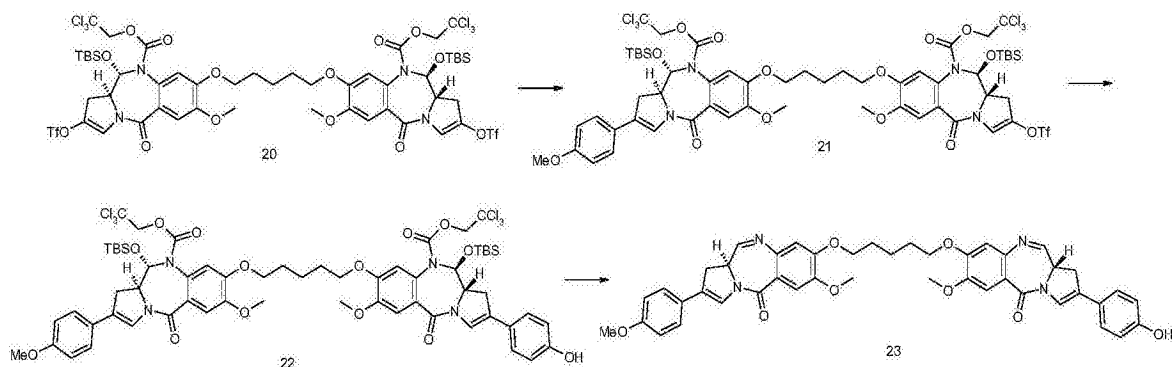
[0835] 在-78℃下在氮气氛下,将超氢化物溶液(0.56mL,0.56mmol,1.0M,在THF中)逐滴加入处于无水THF(10mL)中的SEM双内酰胺(18)(0.271g,0.27mmol)的溶液中。在1小时之后,添加另外等分部分的超氢化物溶液(0.13mL,0.13mmol)并搅拌反应混合物持续另外0.5

小时,此时,LC-MS表明还原完成。用水稀释反应混合物并允许升温至室温。在氯仿与水之间分配反应混合物,对层进行分离,并用另外的氯仿(乳状液)萃取水层。最后,用盐水洗涤合并的有机相并在硫酸镁上干燥。将还原产物溶解于甲醇、氯仿和水中,并在硅胶存在下搅拌72小时。在从选择的馏分中去除过量的洗脱液之后,对粗产物进行快速柱层析法(甲醇/氯仿梯度)从而提供希望的亚胺产物(150mg,0.21mmol,77%)。

[0836] LC-MS RT 2.63分钟,97%面积,726 (M+H)⁺; ¹H-NMR (400MHZ,CDCl₃) δ7.85 (d, J=3.9Hz, 1H), 7.84 (d, J=3.9Hz, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.32 (d, J=7.3Hz, 2H), 7.11 (t, (d, J=7.8Hz, 1H), 6.90-6.80 (m, 4H), 6.77 (d, J=7.9Hz, 1H), 4.40-4.20 (m, 6H), 3.92 (s, 6H), 3.80 (s, 3H), 3.60-3.27 (m, 6H), 2.48-2.29 (m, 2H)

[0837] 实施例5

[0838]



[0839] (a) 11-(叔丁基二甲基甲硅烷氧基)-8-(5-((11S,11aS)-11-(叔丁基二甲基甲硅烷氧基)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-10-((2,2,2-三氯乙氧基)羰基)-5,10,11,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基氧基)戊氧基)-7-甲氧基-5-氧代-2-(三氟甲基磺酰氧基)-11,11a-二氢-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-10(5H)-羧酸(11S,11aS)-2,2,2-三氯乙基酯21

[0840] 将固体4-甲氧基苯硼酸(59mg,0.39mmol)加入处于甲苯(10.8mL)、乙醇(5.4mL)和水(5.4mL)中的Troc保护的双三氟甲磺酸盐(化合物44,W0 2006/111759)(600mg,0.41mmol)、碳酸钠(65mg,0.61mmol)和四(三苯基)膦钯(0.012mmol)的溶液中。在室温下搅拌反应混合物过夜。然后在乙酸乙酯与水之间分配反应混合物。用水和盐水洗涤有机层并在硫酸镁上干燥。在减压下通过旋转蒸发来去除过量溶剂并对得到的残余物进行快速柱层析法(硅胶;梯度洗脱EtOAc/己烷20/80→30/70→40/60→60/40)从而去除未反应的双三氟甲磺酸盐。从选择的馏分中去除过量的洗脱液提供了4-甲氧基苯基耦合产物(261mg,0.18mmol,46%)。

[0841] LC-MS RT 4.17分钟,1427 (M+H)⁺; ¹H-NMR (400MHZ,CDCl₃) δ7.38 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.20 (bs, 1H), 6.92 (d, J=8.6Hz, 2H), 6.77 (d, J=8.7Hz, 2H), 6.0-5.90 (m, 2H), 5.25 (d, J=12.0Hz, 1H), 5.24 (d, J=12.0Hz, 1H), 4.24 (d, J=12.0Hz, 1H), 4.22 (d, J=12.0Hz, 1H), 4.18-4.08 (m, 2H), 4.07-3.89 (m, 10H), 3.81 (s, 3H), 3.44-3.25 (m, 2H), 2.85 (d, J=16.6Hz, 2H), 2.05-1.90 (m, 4H), 1.76-1.64 (m, 2H), 0.93 (s, 9H), 0.90 (s, 9H), 0.30 (s, 6H), 0.26 (s, 6H)。

[0842] (b) 11-(叔丁基二甲基甲硅烷氧基)-8-(5-((11S,11aS)-11-(叔丁基二甲基甲硅

烷氧基)-2-(4-羟基苯基)-7-甲氧基-5-氧代-10-((2,2,2-三氯乙氧基)羰基)-5,10,11,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基氧基)戊氧基)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-11,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-10(5H)-羧酸(11S,11aS)-2,2,2-三氯乙基酯22

[0843] 将在步骤(a)中描述的Suzuki偶合步骤应用于化合物21的合成。在30℃下用1当量的4-羟基苯硼酸(10mg)处理化合物20(62.5mg,0.044mmol)过夜从而在通过硅胶垫过滤之后提供所希望的化合物(40mg,0.029mmol,66%产率)。该化合物直接用于随后的步骤中。

[0844] LC-MS RT 4.27分钟,1371(M+H)

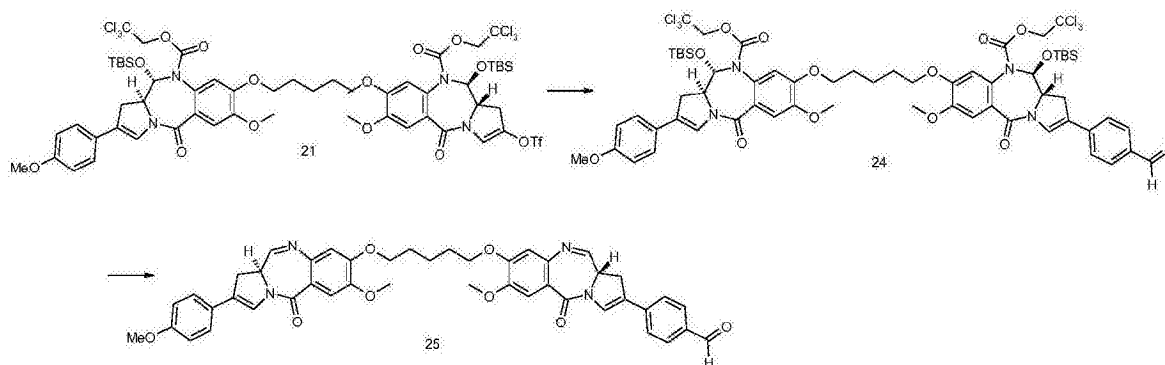
[0845] (c) (S)-2-(4-羟基苯基)-7-甲氧基-8-(5-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基氧基)戊氧基)-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-5(11aH)-酮23

[0846] 将镉/铅对(100mg,Q Dong et al.Tetrahedron Letters vol 36,issue 32,5681-5682,1995)加入处于THF(1mL)和乙酸铵(1N,1mL)中的21(40mg,0.029mmol)的溶液中并搅拌反应混合物1小时。在氯仿与水之间分配反应混合物,对相进行分离并用氯仿萃取水相。用盐水洗涤合并的有机层并在硫酸镁上干燥。在减压下旋转蒸发产生粗产物,对其进行柱层析法(硅胶,0→4%MeOH/CHCl₃)。在减压下通过旋转蒸发来去除过量的洗脱液提供了希望的亚胺产物(17mg,0.023mmol,79%)。

[0847] LC-MS RT 2.20分钟,755(M+H);¹H-NMR(400MHZ,CDCl₃) δ7.89(d,J=3.94Hz,1H),7.89(d,J=4.00Hz,1H),7.53(s,1H),7.52(s,1H),7.38(d,J=8.7Hz,2H),7.33(d,J=8.6Hz,2H),7.28(s,1H),6.90(d,J=8.7Hz,2H),6.84(d,J=8.6Hz,2H),6.82(s,1H),6.81(s,1H),5.68(bs,1H),4.50-4.30(m,2H),4.22-4.00(m,4H),3.93(s,6H),3.82(s,3H),3.69-3.45(m,2H),3.44-3.28(m,2H),2.64-1.88(m,4H),1.77-1.62(m,2H)。

[0848] 实施例6

[0849]



[0850] (a) 11-(叔丁基二甲基甲硅烷氧基)-8-(5-((11S,11aS)-11-(叔丁基二甲基甲硅烷氧基)-2-(4-甲酰苯基)-7-甲氧基-5-氧代-10-((2,2,2-三氯乙氧基)羰基)-5,10,11,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基氧基)戊氧基)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-11,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-10(5H)-羧酸(11S,11aS)-2,2,2-三氯乙基酯24

[0851] 将在实施例5步骤(a)中描述的Suzuki偶合步骤应用于化合物24的合成。在室温下用1当量的4-甲酰苯硼酸(10.5mg)处理化合物21(62.5mg,0.044mmol)过夜从而在通过硅胶

垫过滤之后提供所希望的化合物 (45mg, 0.033mmol, 75% 产率)。该化合物直接用于随后的步骤中。

[0852] LC-MS RT 4.42分钟, 1383 (M+H)

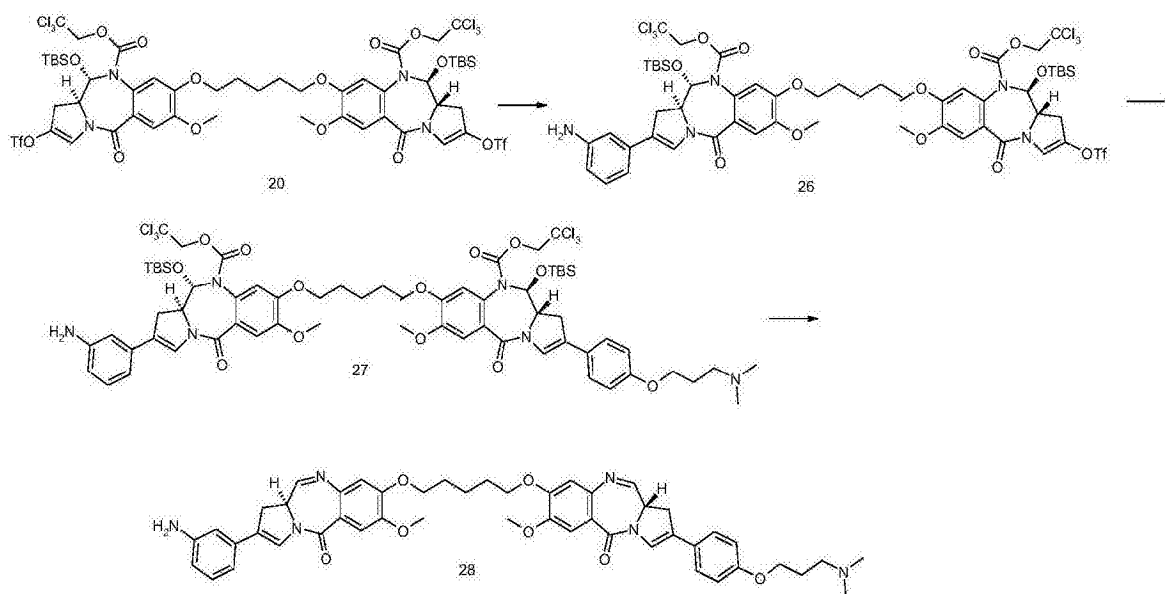
[0853] (b) 4-((S)-7-甲氧基-8-(5-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基氧基)戊氧基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-2-基)苯甲醛25

[0854] 通过在实施例5步骤(c)中描述的方法,对化合物24进行脱保护,从而产生希望的化合物 (18mg, 0.023mmol, 79%)。

[0855] LC-MS RT 3.18分钟, 768 (M+H); $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 9.98 (s, 1H), 7.91 (d, $J=3.90\text{Hz}$, 1H), 7.90–7.80 (m, 3H), 7.68 (s, 1H), 7.60–7.45 (m, 4H), 7.39 (s, 1H), 7.33 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 1H), 6.90 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H), 6.83 (s, 1H), 6.82 (s, 1H), 4.55–4.44 (m, 1H), 4.43–4.36 (m, 1H), 4.23–4.00 (m, 4H), 3.95 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.66–3.51 (m, 2H), 3.50–3.34 (m, 2H), 2.05–1.87 (m, 4H), 1.76–1.64 (m, 2H)。

[0856] 实施例7

[0857]



[0858] (a) 2-(3-氨基苯基)-11-(叔丁基二甲基甲硅烷氧基)-8-(5-((11S,11aS)-11-(叔丁基二甲基甲硅烷氧基)-7-甲氧基-5-氧代-10-((2,2,2-三氯乙氧基)羰基)-2-(三氟甲基磺酰氧基)-5,10,11,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基氧基)戊氧基)-7-甲氧基-5-氧代-11,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-10(5H)-羧酸(11S,11aS)-2,2,2-三氯乙基酯26

[0859] 使用3-氨基苯硼酸将在实施例5步骤(a)中描述的Suzuki偶合步骤应用于化合物26的合成,从而提供所希望的化合物 (230mg, 0.163mmol), 产率为41%。

[0860] LC-MS RT 4.28分钟, 1411 (M+H); $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 7.44 (bs, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.16 (t, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 6.84–6.73 (m, 3H), 6.70 (bs, 1H), 6.62 (dd, $J=7.9, 1.7\text{Hz}$, 1H), 6.66–6.58 (m, 2H), 5.25 (d, $J=12.0\text{Hz}$, 1H), 5.24 (d, $J=12.0\text{Hz}$, 1H), 4.24 (d, $J=12.0\text{Hz}$, 1H), 4.22 (d, $J=12.0\text{Hz}$, 1H), 4.17–4.07 (m, 2H), 4.08–

3.89 (m, 10H), 3.43-3.28 (m, 2H), 2.85 (d, $J=1.65\text{Hz}$, 2H), 2.07-1.90 (m, 4H), 1.78-1.63 (m, 2H), 0.94 (s, 9H), 0.90 (s, 9H), 0.30 (s, 6H), 0.27 (s, 6H)。

[0861] (b) 2-(3-氨基苯基)-11-(叔丁基二甲基甲硅烷氧基)-8-(5-((11S,11aS)-11-(叔丁基二甲基甲硅烷氧基)-2-(4-(3-(二甲基氨基)丙氧基)苯基)-7-甲氧基-5-氧代-10-((2,2,2-三氯乙氧基)羰基)-5,10,11,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基氧基)戊氧基)-7-甲氧基-5-氧代-11,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-10(5H)-羧酸(11S,11aS)-2,2,2-三氯乙基酯27

[0862] 将固体4-[3-(二甲基氨基)丙氧基苯硼酸频哪醇酯(25mg, 0.082mmol)加入处于甲苯(1mL)、乙醇(0.5mL)和水(0.5mL)中的26(73mg, 0.052mmol)、碳酸钠(18mg, 0.17mmol)和四(三苯基)磷钯(3mg)的溶液中。在室温下搅拌反应混合物过夜。然后在乙酸乙酯与水之间分配反应混合物。用水和盐水洗涤有机层并在硫酸镁上干燥。在减压下通过旋转蒸发来去除过量溶剂并用氯仿/甲醇通过硅胶塞来洗脱得到的残余物。从选择的馏分中去除过量的洗脱液提供了4-甲氧基苯基耦合产物(50mg, 0.035mmol, 67%)。

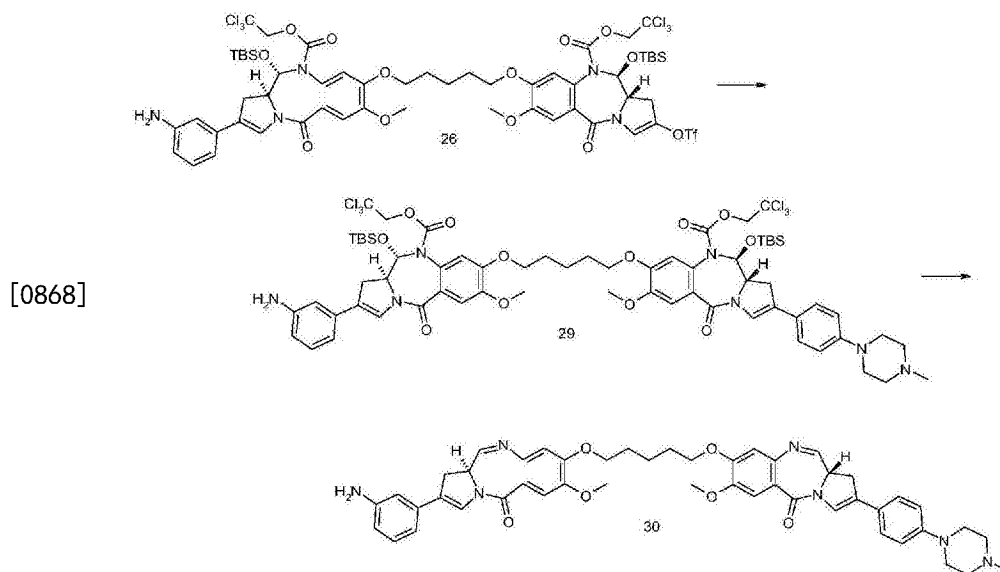
[0863] LC-MS RT 4.12分钟, 1440 (M+H)

[0864] (c) (S)-2-(3-氨基苯基)-8-(5-((S)-2-(4-(3-(二甲基氨基)丙氧基)苯基)-7-甲氧基-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基氧基)戊氧基)-7-甲氧基-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-5(11aH)-酮28

[0865] 通过在实施例5步骤(c)中描述的方法对化合物27进行脱保护,从而产生希望的化合物。在DCM与碳酸氢钠水溶液(乳状液)之间分配反应混合物并在硅胶上通过梯度柱层析法(5%甲醇/氯仿→35%甲醇/氯仿)来纯化粗产物,从而提供希望的非对称PBD亚胺(50mg, 0.018mmol, 58%)。

[0866] LC-MS RT 2.55分钟, 826 (M+H); $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 7.92-7.82 (m, 2H), 7.52 (bs, 2H), 7.45 (bs, 1H), 7.39 (bs, 1H), 7.31 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H), 7.14 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 6.89 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H), 6.85-6.75 (m, 3H), 6.72 (bs, 1H), 6.60 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 4.46-4.33 (m, 2H), 4.21-3.98 (m, 6H), 3.94 (s, 6H), 3.63-3.50 (m, 2H), 3.43-3.29 (m, 2H), 2.64-2.48 (m, 2H), 2.34 (s, 6H), 2.10-1.89 (m, 6H), 1.57 (m, 2H)。

[0867] 实施例8



[0869] (a) 2-(3-氨基苯基)-11-(叔丁基二甲基甲硅烷氧基)-8-(5-((11S,11aS)-11-(叔丁基二甲基甲硅烷氧基)-7-甲氧基-2-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)-5-氧代-10-((2,2,2-三氯乙氧基)羰基)-5,10,11,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基氧基)戊氧基)-7-甲氧基-5-氧代-11,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-10(5H)-羧酸(11S,11aS)-2,2,2-三氯乙基酯29

[0870] 实施实施例7步骤(b)的方法,从而在通过硅胶塞过滤(使用1/3甲醇/氯仿)并且在减压下通过旋转蒸发来去除过量溶剂之后提供希望的产物(58mg,.0.040mmol,78%)。

[0871] LC-MS RT 4.08分钟,1439(M+H)

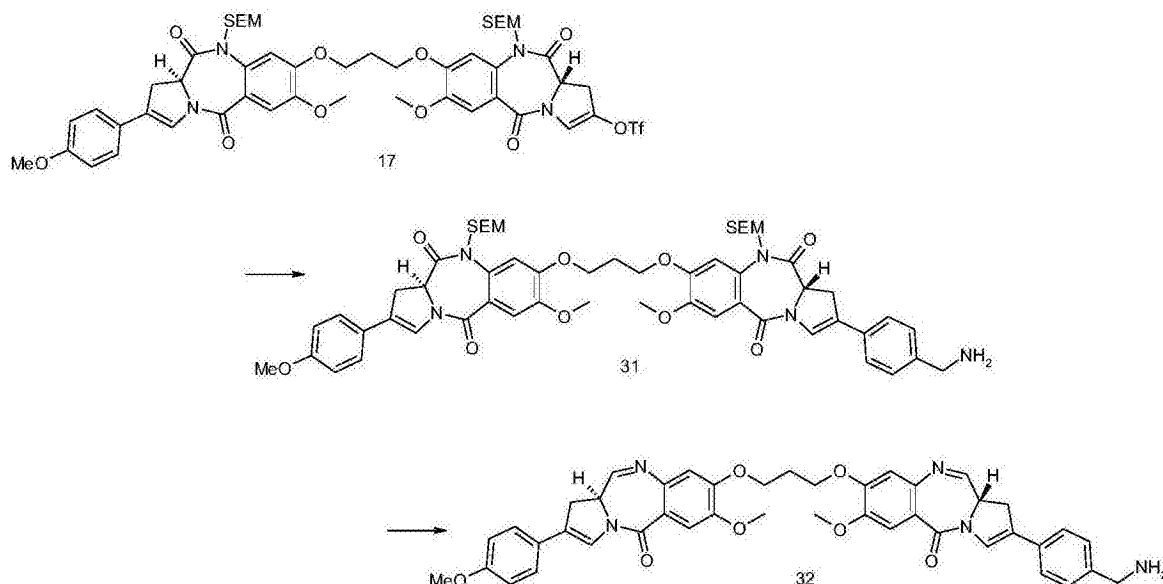
[0872] (b) (S)-2-(3-氨基苯基)-7-甲氧基-8-(5-((S)-7-甲氧基-2-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基氧基)戊氧基)-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-5(11aH)-酮30

[0873] 使用实施例7步骤(c)的方法来脱保护化合物29。通过硅胶梯度层析法(2%甲醇/氯仿→35%甲醇/氯仿)来纯化粗产物从而提供希望的非对称PBD亚胺(18mg,0.022mmol,59%)。

[0874] LC-MS RT 2.52分钟,823(M+H); $^1\text{H-NMR}$ (400MHZ, CDCl_3) δ 7.80 (d, $J=3.8\text{Hz}$, 2H), 7.45 (s, 2H), 7.38 (s, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.23 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H), 7.07 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 6.83 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H), 6.79-6.89 (m, 3H), 6.65 (s, 1H), 6.54 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 4.40-4.24 (m, 2H), 4.15-3.93 (m, 4H), 3.87 (s, 6H), 3.56-3.42 (m, 2H), 3.37-3.23 (m, 2H), 3.22-3.08 (m, 4H), 2.61-2.41 (m, 4H), 2.29 (s, 3H), 1.98-1.80 (m, 4H), 1.67-1.54 (m, 2H)。

[0875] 实施例9

[0876]



[0877] (a) (S)-2-(4-(氨基甲基)苯基)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5,11-二氧代-10-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-5,10,11,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基氧基)丙氧基)-10-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-5,11(10H,11aH)-二酮31

[0878] 将固体4-氨基甲基苯硼酸盐(0.111g,0.59mmol)加入处于甲苯(10mL)、乙醇

(5mL) 和水 (5mL) 中的 17 (0.394g, 0.37mmol)、碳酸钠 (175mg, 1.654mmol) 和四 (三苯基) 磷钨 (28.0mg, 0.024mmol) 的溶液中。在 30℃ 下搅拌反应混合物过夜。第二天, 在 70℃ 下加热反应混合物持续另外 3 小时。然后在乙酸乙酯与水之间分配反应混合物。用水和盐水洗涤有机层并在硫酸镁上干燥。在减压下通过旋转蒸发来去除过量溶剂并对得到的残余物进行快速柱层析法 (硅胶; 梯度洗脱 EtOAc/己烷 2/98 → 15/85)。从选择的馏分中去除过量的洗脱液提供了所希望的产物 (0.230mg, 0.22mmol, 61%)。

[0879] LC-MS RT 3.63 分钟, 1034 (M+2H); ¹H-NMR (400MHz, DMSO d₆) δ 11.7 (s, 2H), 7.52 (d, J=8.2Hz, 2H), 7.48 (d, J=8.7Hz, 2H), 7.40 (s, 1H), 7.50 (d, J=8.1Hz, 2H), 7.38-7.19 (m, 5H), 6.93 (d, J=8.7Hz, 2H), 5.40 (d, J=2.13Hz, 1H), 5.38 (d, J=2.12Hz, 1H), 5.32 (d, J=10.6Hz, 2H), 5.25 (d, J=10.6Hz, 2H), 4.87-4.72 (m, 2H), 4.35-4.15 (m, 4H), 3.85 (s, 6H), 3.79 (s, 3H), 3.73-3.56 (m, 2H), 3.55-3.39 (m, 4H), 3.22-3.02 (m, 2H), 2.39-2.23 (m, 2H), 0.94-0.67 (m, 4H), -0.06 (s, 18H)。

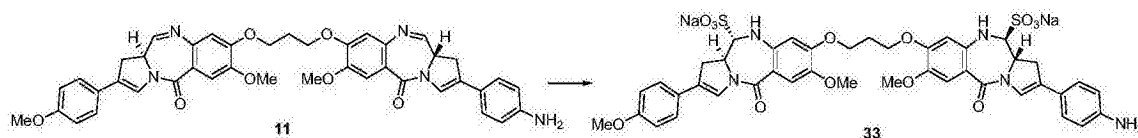
[0880] (b) (S)-2-(4-(氨基甲基)苯基)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基氧基)丙氧基)-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-5(11aH)-酮 32

[0881] 按照实施例 1 步骤 (c) 的方法对化合物 31 进行脱保护。通过梯度柱层析法 (5/95 → 30/70 MeOH/CHCl₃) 来纯化粗产物从而提供产物, 为亚胺和甲醇胺甲醚的混合物。

[0882] LC-MS RT 2.58 分钟, 740 (M+H)。

[0883] 实施例 10

[0884]



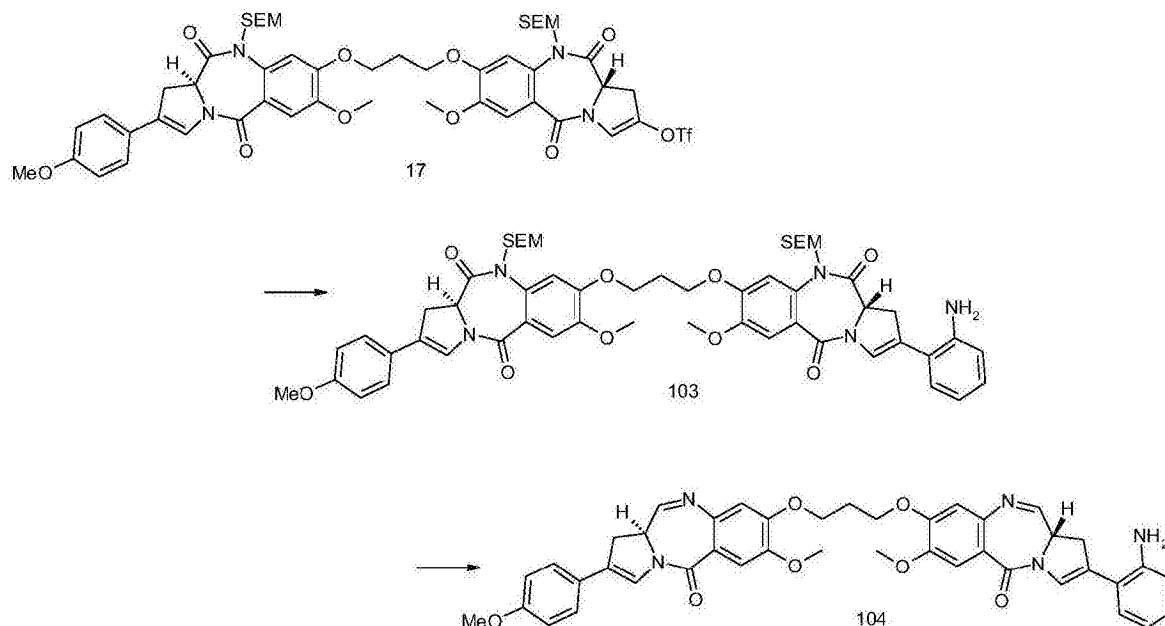
[0885] (S)-2-(4-氨基苯基)-7-甲氧基-11(S)-磺基-8-(3-((S)-7-甲氧基-11(S)-磺基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,10,11,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基氧基)丙氧基)-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-5(11aH)-酮二钠盐 33

[0886] 将亚硫酸氢钠 (8.5mg, 3.1 当量) 加入处于异丙醇 (4mL) 和水 (2mL) 中的二亚胺 11 (20mg, 0.036mmol) 的搅拌悬浮液中。剧烈搅拌反应混合物并最终变得清澈 (约 1 小时)。将反应混合物转移到漏斗中并通过棉壁 (cotton wall) 进行过滤 (然后用 2mL 水洗涤)。快速冷冻滤液 (液体并且至水浴) 并冷冻干燥, 从而以定量产率提供希望的产物 33。

[0887] LC-MS RT 11.77 分钟, 727.2 (M+H) (母体化合物的质量, 亚硫酸氢盐加合物, 在质谱仪中不稳定); ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.66-7.55 (m, 5H), 7.43 (s, 1H), 7.39 (d, J=8.66Hz, 2H), 7.06 (m, 2H), 6.93 (d, J=8.84Hz, 2H), 6.54 (m, 2H), 5.29-5.21 (m, 2H), 4.32-4.28 (m, 2H), 4.14-4.20 (m, 4H), 3.96-3.83 (m, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.73 (m, 6H), 3.52-3.43 (m, 2H), 3.30-3.08 (m, 2H), 2.24-2.21 (m, 2H)。

[0888] 实施例 11

[0889]



[0890] (a) (S)-2-(2-氨基苯基)-7-甲氧基-8-(3-(((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5,11-二氧代-10-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-5,10,11,11a-四氢-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基)氧基)丙氧基)-10-((2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)甲基)-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-5,11(10H,11aH)-二酮(103)

[0891] 将催化量的四(三苯基)磷钨(0)(11.2mg)加入处于乙醇(5mL)、甲苯(5mL)和水(5mL)中的单三氟甲磺酸盐17(380mg)、2-氨基苯基硼酸的频哪醇酯(124mg)和碳酸钠(120mg)的混合物中。在室温下以及在40℃下搅拌反应混合物过夜,直至反应完成(约2小时)。用乙酸乙酯稀释反应混合物并用水和盐水洗涤有机层。在硫酸镁上干燥乙酸乙酯溶液并在真空下过滤。在减压下通过旋转蒸发来去除乙酸乙酯提供了粗产物,对其进行快速色谱法(硅胶,乙酸乙酯/己烷)。收集并且合并纯馏分。在减压下通过旋转蒸发来去除过量的洗脱液提供了纯产物103(330mg,产率86%)。LC/MS RT:4.17分钟,ES⁺1018.48。

[0892] (b) (S)-2-(2-氨基苯基)-7-甲氧基-8-(3-(((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基)氧基)丙氧基)-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-5(11aH)-酮(104)

[0893] 在-78℃下在惰性气氛下,将处于干燥四氢呋喃中的超氢化物的溶液(1.0M,4.4当量)加入处于干燥四氢呋喃(5mL)中的2-苯胺化合物103(300mg)的溶液中。当缓慢地进行还原时,将添加等分部分的硼氢化锂(20当量)并允许反应混合物返回到室温。将水/冰加入反应混合物中用来淬灭未反应的氢化物并用二氯甲烷稀释反应。用水(两次)、柠檬酸和盐水顺序地洗涤有机层。在减压下通过旋转蒸发来去除过量的二氯甲烷并将残余物再溶解于乙醇和水中,然后用硅胶处理96小时。真空过滤反应混合物并蒸发滤液至干燥。对残余物进行快速柱层析法(硅胶,梯度氯仿/甲醇)。收集并合并纯馏分并在减压下通过旋转蒸发来去除过量的洗脱液,从而提供纯产物104(30mg,14%产率)。LC/MS RT:2.90分钟,ES⁺726.09。

[0894] 实施例12:代表性的PBD化合物的体外细胞毒性的确定

[0895] K562测定

[0896] 在37℃下在包含5%CO₂的加湿气氛中将K562人慢性骨髓性白血病细胞保持在补

充有10%胎牛血清和2mM谷氨酰胺的RPMI1640培养基中,并在37℃下在黑暗中用特定剂量的药物孵化1小时或96小时。通过离心法(5分钟,300g)来终止孵化并用不含药物的培养基洗涤细胞一次。在适当药物处理之后,将细胞转移到96孔微量滴定板中(10^4 个细胞/孔,8孔/样品)。然后在37℃下在黑暗中将这板保持在包含5%CO₂的加湿气氛中。该测定法是基于活细胞将黄色可溶性四唑盐,3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基-2H-四唑溴化物(MTT,Aldrich-Sigma),还原成不溶性紫色甲臢沉淀物的能力。在将这些板孵化4天(从而允许对照细胞的数目增加大约10倍)之后,将20μL的MTT溶液(5mg/mL,在磷酸盐缓冲盐水中)加入每个孔中并将这些板进一步孵化5小时。然后在300g下将这些板离心5分钟并从细胞球粒中移出大量的培养基,从而留下10-20μL/孔。将DMSO(200μL)加入每个孔中并搅拌样品以确保完全混合。然后在Titertek Multiscan ELISA酶标仪上在550nm的波长下读取光密度,并构建剂量-反应曲线。对于每条曲线,将IC₅₀值读作将最终光密度降低至对照值的50%所需要的剂量。

[0897] 在此测定中,化合物13具有30pM的IC₅₀。

[0898] A2780测定

[0899] A2780亲代细胞系生长在包含~10%胎牛血清(FCS)和~1%200mM L-谷氨酰胺溶液的Dulbecco改良型Eagle培养基(DMEM)中,并且生长在Corning Cellbind 75cm²烧瓶中。

[0900] 将190μL细胞悬液(以 1×10^4)加入96孔板(Nunc 96F平底TC板)的第2列至第11列的每个孔中。将190μL培养基加入第1列和第12列的每个孔中。培养基是Dulbecco改良型Eagle培养基(DMEM)(它包括~10%胎牛血清(FCS)和~1%200mM L-谷氨酰胺溶液)。

[0901] 如果细胞是附着的,在添加药物之前,在37℃下将这些板孵化过夜。横过96孔板,连续稀释200μM测试化合物溶液(在100%DMSO中)。然后将每个得到的点进一步稀释1/10到无菌蒸馏水(SDW)中。

[0902] 以5%v/v向细胞阴性空白和化合物阴性对照孔,添加10%DMSO。在37℃下在5%CO₂中在加湿培养箱中孵化测定板持续以下时间:持续72小时。在孵化之后,将终浓度1.5μM的MTT溶液加入每个孔。然后在37℃下在5%CO₂中在加湿培养箱中孵化这些板持续另外4小时。然后去除培养基,并将染料溶解于200μL DMSO(99.99%)中。

[0903] 使用Envision酶标仪在540nm下读取平板的吸光度。使用Microsoft Excel和GraphPad Prism来分析数据并获得IC₅值。

[0904] 在此测定中,化合物11具有11.7pM的IC₅₀。

[0905] 肾细胞和AML细胞系测定

[0906] 在肾细胞癌细胞系、786-0、霍奇金淋巴瘤细胞系、L428和两种AML细胞系、HL60和HEL上测试各种自由药物化合物的细胞毒性。对于96小时测定,在包含补充有20%FBS的150μL RPMI 1640的96孔板中接种在对数期生长中培养的培养细胞持续24小时。以4x工作浓度制备在细胞培养基中测试物品(即,自由药物)的连续稀释;将50μL的每种稀释物加入96孔板中。在添加测试物品之后,在37℃下,将细胞与测试物品一起孵化4天。然后将刃天青加入每个孔中以实现50μM终浓度,并在37℃下将这些板孵化另外4小时。然后在Fusion HT酶标仪(Packard Instruments,Meridien,CT,USA)上,分别地用530nm和590nm的激发波长和发射波长,针对染料还原程度读取平板。重复三次确定的IC₅₀值在本文中定义为相对于未处理的对照导致细胞生长50%减少的浓度。

[0907] 参考下面表1,在此测定中,与间-苯胺化合物19相比较,在这些细胞系上对-苯胺化合物11显示显著增加的活性。

[0908] 表1:自由药物的IC₅₀总结[nM]

[0909]

自由药物	L428	786-0	HL60	HEL
化合物11	<0.00001	<0.00001	<0.00001	<0.00001
化合物19	1	0.5	0.6	0.2

[0910] 参考下面表2,显示了在L428、786-0、HEL、HL-60和MCF-7细胞上化合物28、30和32的活性,以及在MCF-7细胞上化合物19的活性。

[0911] 表2:自由药物的IC₅₀总结[nM]

[0912]

自由药物	L428	786-0	HEL	HL-60	MCF-7
化合物28	<0.00001	<0.00001	<0.00001	<0.00001	<0.00001
化合物30	<0.00001	<0.00001	<0.00001	<0.00001	0.01
化合物32	<0.00001	<0.00001	<0.00001	<0.00001	1.0
化合物19					5

[0913] 参考下面表3,在786-0、Caki-1、MCF-7、HL-60、THP-1、HEL、和TF1细胞上,将化合物23、25的活性与化合物11的活性进行比较。以150μL生长培养基/孔将细胞平板接种到黑色侧面透明底96孔板中(Costar, Corning),并允许在生物学工作橱中沉降1小时,然后放入37℃、5%CO₂的培养箱中。第二天,制备4X浓度的药物储备溶液,然后滴定为10倍连续稀释物,从而产生8点剂量曲线并以50μl/孔加入(重复两次)。然后在37℃、5%CO₂下,将细胞孵化48小时。通过用100μL Cell Titer Glo (Promega) 溶液孵化1小时来测量细胞毒性,然后在Fusion HT酶标仪上(Perkin Elmer) 测量发光。用Excel (Microsoft) 和GraphPad (Prism) 处理数据从而产生剂量-反应曲线,然后产生IC₅₀值并收集数据。

[0914] 表3:自由药物的IC₅₀总结[nM]

[0915]

自由药物	786-0	Caki-1	MCF-7	HL-60	THP-1	HEL	TF1a
化合物11	0.4	0.2	1	0.01	1	0.03	1
化合物23	0.06	0.02	0.7	0.005	0.4	0.009	0.2
化合物25	0.09	0.06	0.8	0.01	0.9	0.02	0.9

[0916] 在实施例13至16中,如下所示通过化合物编号来指示以下化合物:

[0917]

化合物	替代指定
11	37
13	57
19	42
25	95
28	50
30	49

104

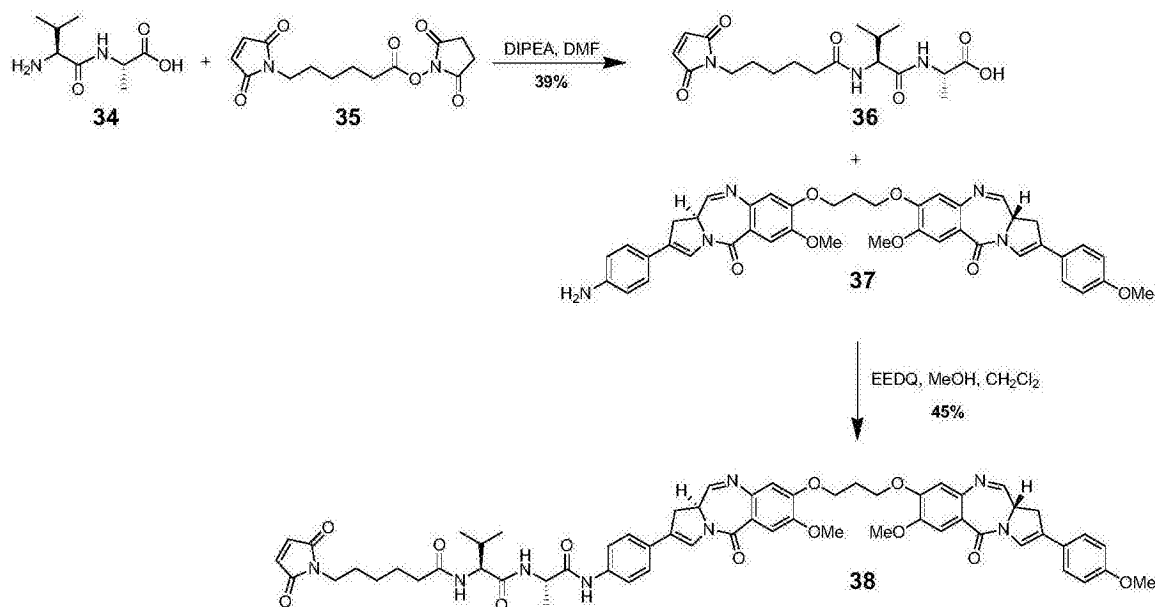
66

[0918] 实施例13:PBD药物接头化合物的合成

[0919] 一般信息。在以下实施例中,所有可商购的无水溶剂无需进一步纯化即可使用。在硅胶60F254铝板(EMD Chemicals,Gibbstown,NJ)上进行分析型薄层色谱法。在Chromatotron仪器(Harris Research,Palo Alto,CA)上进行径向色谱法。在配置有Varian ProStar 330PDA检测器的Varian ProStar 210溶剂递送系统上进行分析型HPLC。在C12Phenomenex Synergi 2.0x 150mm,4 μ m,80Å反相柱上洗脱样品。酸性流动相由乙腈和水组成,两者均包含0.05%三氟乙酸或0.1%甲酸(表示每种化合物)。用线性梯度的酸性乙腈(从5%(在注射后1分钟)至95%(在11分钟)),接着用等浓度95%乙腈至15分钟(流量=1.0mL/分钟),来洗脱化合物。在联接到装备有C12Phenomenex Synergi 2.0x 150mm,4 μ m,80Å反相柱的HP Agilent 1100HPLC仪器上的ZMD Micromass质谱仪上进行LC-MS。酸性洗脱液由线性梯度的乙腈组成,从5%至95%(处于0.1%甲酸水溶液中),持续10分钟,接着等浓度95%乙腈持续5分钟(流量=0.4mL/分钟)。在配置有Varian ProStar 330PDA检测器的Varian ProStar 210溶剂递送系统上进行制备型HPLC。在C12Phenomenex Synergi 10.0x 250mm,4 μ m,80Å反相柱上,用处于水中的0.1%甲酸(溶剂A)和处于乙腈中的0.1%甲酸(溶剂B)进行洗脱,来纯化产物。纯化方法由以下梯度的溶剂A相对于溶剂B组成:90:10,从0至5分钟;90:10至10:90,从5分钟至80分钟;接着等浓度10:90,持续5分钟。流量为4.6mL/分钟,在254nm下监测。在Varian Mercury 400MHz分光计上收集NMR谱数据。以hertz为单位报告偶合常数(J)。

[0920] 方案1

[0921]

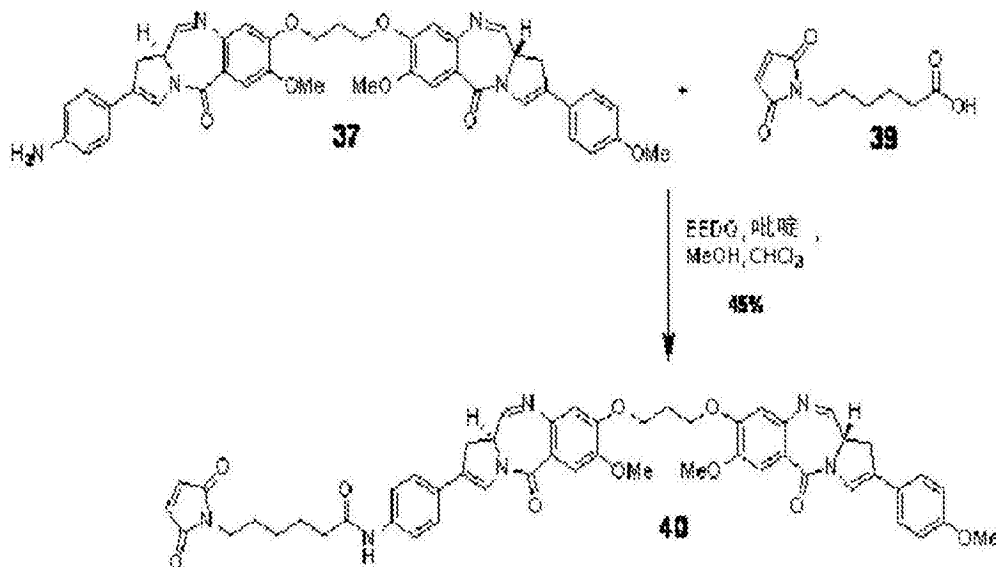


[0922] (S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酸(36):向溶解于10.6mL无水DMF中的Val-Ala二肽34(200mg,1.06mmol)的溶液中添加马来酰亚氨基己酰基NHS酯35(327mg,1.06mmol)。然后添加二异丙基乙胺(0.92mL,5.3mmol),并在氮气下在环境温度下搅拌反应18小时,此时,TLC和分析型HPLC显示起始原料消耗。用0.1M HCl(100mL)稀释反应,并用乙酸乙酯(100mL,3x)萃取水层。用水和盐水洗

涤合并的有机层,然后在硫酸钠上干燥,过滤并且浓缩。将粗产物溶解于最少的二氯甲烷中并在2mm chromatotron板上通过径向色谱法来纯化,用CH₂Cl₂/MeOH混合物(95:5至90:10CH₂Cl₂/MeOH)进行洗脱,从而提供36(158mg,39%),为油状残余物。TLC:R_f=0.26,处于CH₂Cl₂中的10%MeOH。¹H NMR(CDCl₃) δ(ppm) 0.95(d,J=17Hz,3H),0.98(d,J=17Hz,3H),1.30(m,2H),1.40(d,J=17Hz,3H),1.61(m,4H),2.06(m,1H),2.25(dt,J=4,19Hz,2H),3.35(s,1H),3.49(t,J=17Hz,2H),4.20(d,J=18Hz,1H),4.38(m,1H),6.80(s,2H)。分析型HPLC(0.1%甲酸):t_R 9.05分钟。LC-MS:t_R 11.17分钟,m/z(ES⁺)实测值381.9(M+H)⁺,m/z(ES⁻)实测值379.9(M-H)⁻。

[0923] 6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-7-甲氧基-8-(3-(((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基)氧基)丙氧基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-2-基)苯基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)己酰胺(38):在火焰干燥的10mL烧瓶中加入酸36(3.6mg,9.5μmol)、EEDQ(2.8mg,11.4μmol)和0.33mL无水CH₂Cl₂。添加甲醇(4滴,~80μL)以促进溶解,然后在氮气下搅拌混合物1小时。然后添加PBD二聚体37(5.7mg,7.9μmol),并在室温下搅拌反应6小时,此时,LC-MS显示转化成产物。对反应进行浓缩,溶解于最少的CH₂Cl₂中,然后在1mm chromatotron板上通过径向色谱法进行纯化,用CH₂Cl₂/MeOH混合物(100:0至90:10 CH₂Cl₂/MeOH)进行洗脱,从而提供药物接头38(3.9mg,45%)。TLC:R_f=0.06,处于CH₂Cl₂中的5%MeOH。分析型HPLC(0.1%甲酸):t_R 11.51分钟。LC-MS:t_R 12.73分钟,m/z(ES⁺)实测值1089.6(M+H)⁺,m/z(ES⁻)实测值1087.3(M-H)⁻。

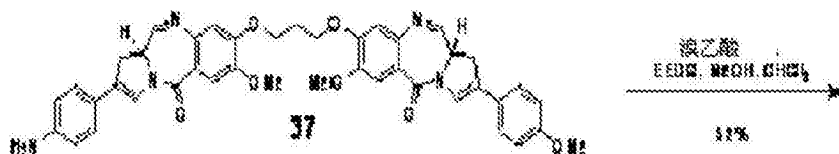
[0924] 方案2



[0926] 6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-(4-((S)-7-甲氧基-8-(3-(((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基)氧基)丙氧基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-2-基)苯基)己酰胺(40):向火焰干燥的10mL烧瓶添加PBD二聚体37(25mg,34.4μmol),将其溶解于1.4mL处于CHCl₃溶剂混合物中的10%MeOH中。添加马来酰亚氨基己酸(39)(7.3mg,34.4μmol),接着添加EEDQ(10.2mg,41.3μmol)和吡啶(6μL,68.8μmol)。在室温下在氮气氛下搅拌

反应14小时,此时,LC-MS显示转化成产物。对反应进行浓缩,溶解于最少的CH₂Cl₂中,并在1mm chromatotron板上通过径向色谱法进行纯化,用CH₂Cl₂/MeOH混合物(100:0至90:10CH₂Cl₂/MeOH)进行洗脱,从而提供药物接头40(14.1mg,45%)。LC-MS: t_R 12.81分钟, m/z (ES⁺) 实测值918.9 (M+H)⁺, m/z (ES⁻) 实测值917.0 (M-H)⁻。

[0927] 方案3



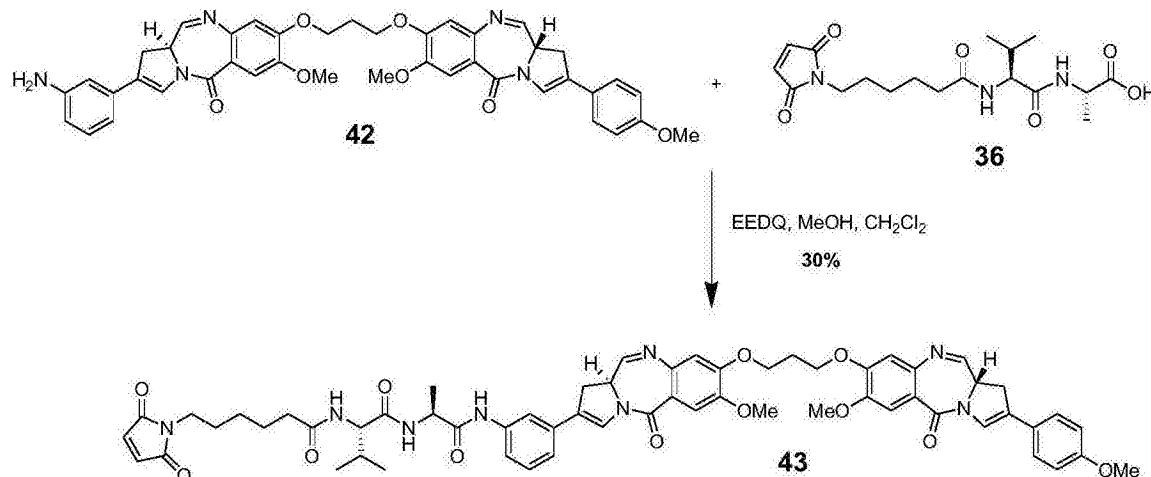
[0928]



[0929] 2-溴-N-(4-((S)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基)氧基)丙氧基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-2-基)苯基)乙酰胺(41):向火焰干燥的10mL烧瓶中加入PBD二聚体37(16.5mg,22.7μmol),将其溶解于0.9mL处于CHCl₃溶剂混合物中的10%MeOH中。添加溴乙酸(3.2mg,22.7μmol),接着添加EEDQ(6.8mg,27.2μmol)。在室温下在氮气氛围下搅拌反应4小时,此时,LC-MS显示转化成产物。对反应进行浓缩,溶解于最少的CH₂Cl₂中,并在1mm chromatotron板上通过径向色谱法进行纯化,用CH₂Cl₂/MeOH混合物(100:0至95:5 CH₂Cl₂/MeOH)进行洗脱,从而提供药物接头41(9.9mg,52%)。TLC: R_f=0.09, 处于CH₂Cl₂中的5%MeOH。LC-MS: t_R 12.44分钟, m/z (ES⁺) 实测值848.1 (M+H)⁺, m/z (ES⁻) 实测值845.7 (M-H)⁻。

[0930] 方案4

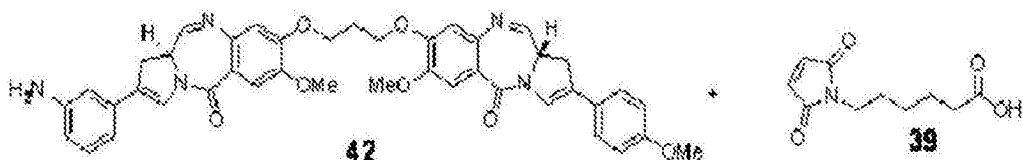
[0931]



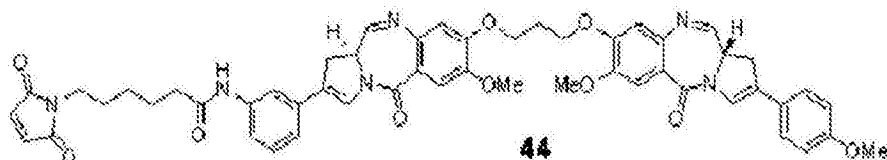
[0932] 6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-((S)-1-((S)-1-((3-((S)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基)氧基)丙氧基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-2-基)苯基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)己酰胺(43):

在火焰干燥的10mL烧瓶中加入酸36 (3.6mg, 9.4 μ mol)、EEDQ (2.8mg, 11.3 μ mol)、和0.38mL包含1%甲醇的无水CH₂Cl₂。在氮气下搅拌反应1小时;然后添加PBD二聚体42 (6.8mg, 9.4 μ mol),并在室温下搅拌反应2小时,此时,LC-MS显示转化成产物。对反应进行浓缩,溶解于最少的CH₂Cl₂中,并在1mm chromatotron板上通过径向色谱法进行纯化,用CH₂Cl₂/MeOH混合物(100:0至90:10 CH₂Cl₂/MeOH)进行洗脱,从而提供药物接头43 (3.1mg, 30%)。TLC:R_f=0.31,处于CH₂Cl₂中的10%MeOH。分析型HPLC (0.1%甲酸):t_R 11.49分钟。LC-MS:t_R 12.28分钟,m/z (ES⁺) 实测值1089.5 (M+H)⁺,m/z (ES⁻) 实测值1087.3 (M-H)⁻。

[0933] 方案5

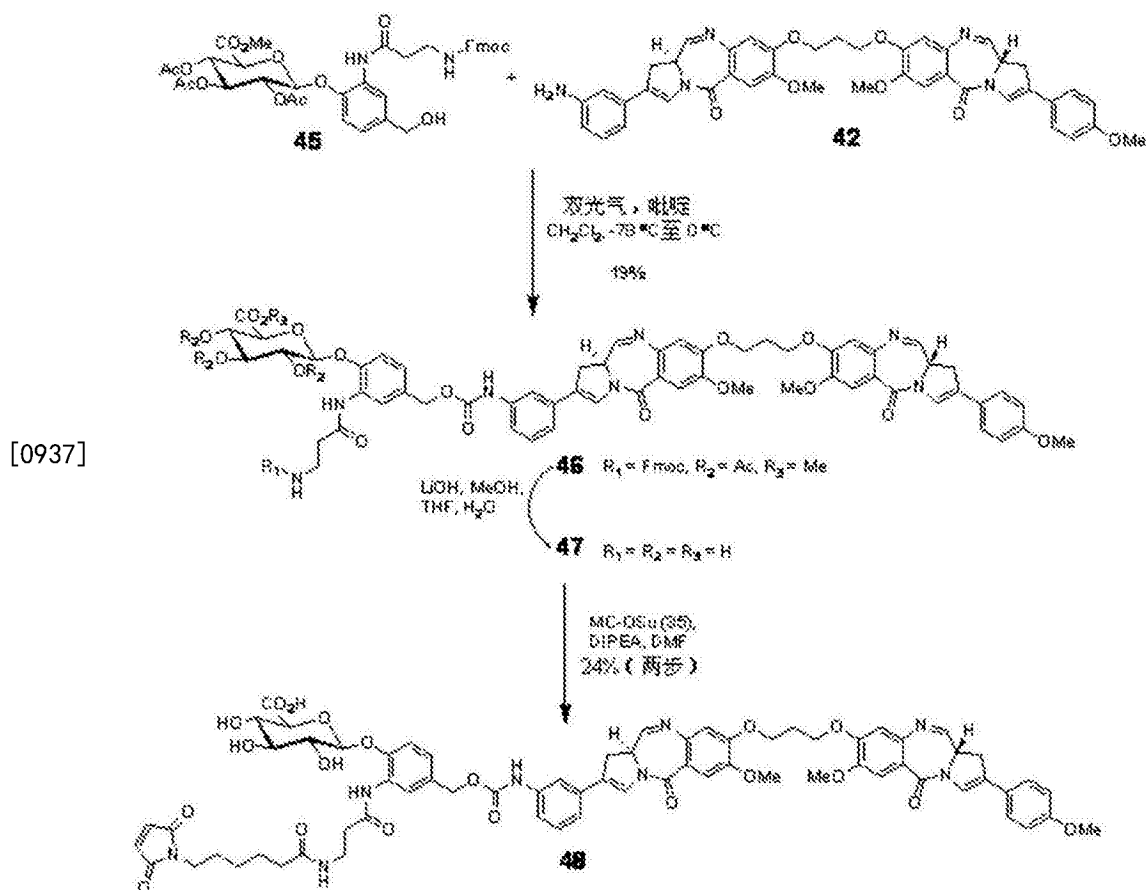


[0934]



[0935] 6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-(3-((S)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基)氧基)丙氧基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-2-基)苯基)己酰胺 (44):在火焰干燥的10mL烧瓶中添加PBD二聚体42 (8.0mg, 11 μ mol),将其溶解于0.44mL处于CH₂Cl₂溶剂混合物中的10%MeOH中。添加马来酰亚氨基己酸 (39) (2.3mg, 11 μ mol),接着添加EEDQ (3.3mg, 13.2 μ mol) 和吡啶 (1.8 μ L, 22 μ mol)。在室温下在氮气氛下搅拌反应3小时,此时,LC-MS显示转化成产物。在1mm chromatotron板上通过径向色谱法来纯化反应,用CH₂Cl₂/MeOH混合物(100:0至90:10 CH₂Cl₂/MeOH)进行洗脱,从而提供药物接头化合物44 (1.2mg, 12%)。TLC:R_f=0.45,处于CH₂Cl₂中的10%MeOH。分析型HPLC (0.05%三氟乙酸):t_R 11.71分钟。LC-MS:t_R 12.63分钟,m/z (ES⁺) 实测值919.1 (M+H)⁺,m/z (ES⁻) 实测值917.1 (M-H)⁻。

[0936] 方案6



[0938] (2S,3R,4S,5R,6R)-2-(2-(3-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)丙酰氨基)-4-(((3-((S)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基)氧基)丙氧基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-2-基)苯基)氨基甲酰基)氧基)甲基)苯氧基)-6-甲基四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯(46):在火焰干燥的烧瓶中加入葡萄糖苷酸接头中间体45(参考文献:Jeffrey et al.,Bioconjugate Chemistry,2006,17,831-840)(15mg,20 μ mol)、1.4mL无水CH₂Cl₂、吡啶(20 μ L,240 μ mol),然后在氮气下冷却至-78°C。然后添加双光气(3.0 μ L,24 μ mol)并在-78°C下搅拌反应2小时,此后,用甲醇淬灭较小的等分部分并通过LC-MS来分析碳酸甲酯的形成,这证实了葡萄糖苷酸氯甲酸酯的形成。然后将PBD二聚体42(15mg,20 μ mol)溶解于0.7mL无水CH₂Cl₂中并逐滴加入反应容器中。在2小时内,加热反应至0°C,然后用50mL CH₂Cl₂稀释。用水(50mL)、盐水(50mL)洗涤有机层,在硫酸钠上干燥,过滤并浓缩。在1mm chromatotron板上通过径向色谱法来纯化粗反应产物,用处于CH₂Cl₂中的10%MeOH进行洗脱,从而提供46(5.7mg,19%)。TLC: R_f =0.47,处于CH₂Cl₂中的10%MeOH。分析型HPLC(0.1%甲酸): t_R 12.09分钟。LC-MS: t_R 14.05分钟, m/z (ES⁺)实测值1500.3(M+H)⁺。

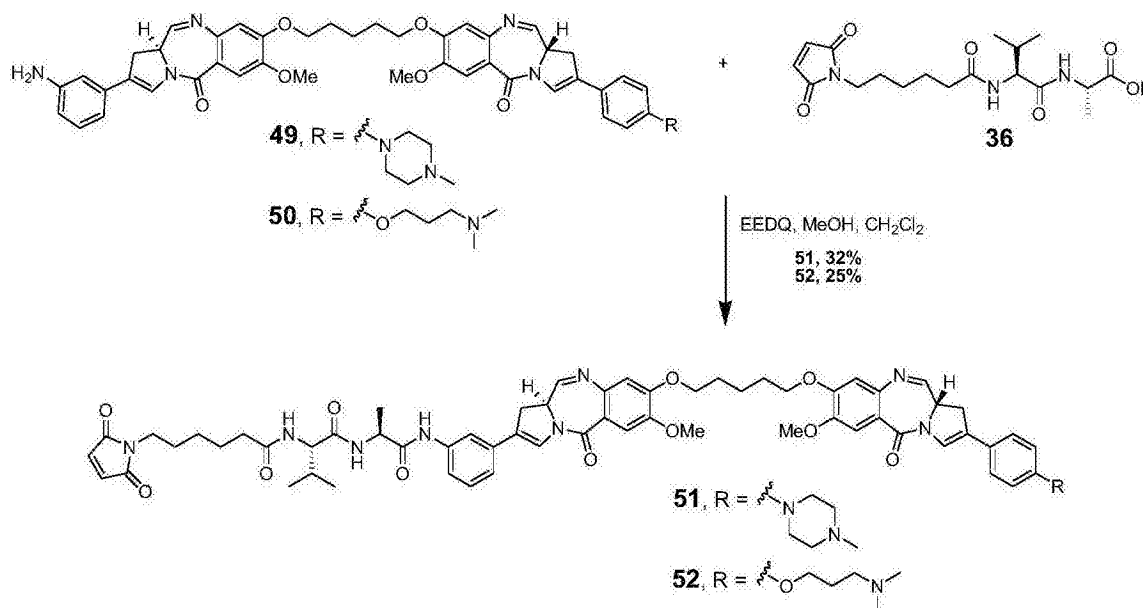
[0939] (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-(3-氨基丙酰氨基)-4-(((3-((S)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基)氧基)丙氧基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-2-基)苯基)氨基甲酰基)氧基)甲基)苯氧基)-3,4,5-三羟基四氢-2H-吡喃-2-羧酸(47):将包含溶解于各自0.2mL的MeOH、四氢呋喃、和水的溶剂混合物中的46(5.7mg,3.8 μ mol)的烧瓶冷却至0°C。向搅拌溶液中添加氢氧化锂单水合物(0.8mg,19 μ mol)并在室温下搅拌反应4

小时,此时,LC-MS指示转化成产物。添加冰醋酸(1.1 μ L,19 μ mol)并浓缩反应从而提供47,无需进一步纯化即可使用。LC-MS: t_R 11.59分钟, m/z (ES^+) 实测值1138.4 ($M+H$)⁺。

[0940] (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-(3-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰氨基)丙酰氨基)-4-((((3-((S)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基)氧基)丙氧基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-2-基)苯基)氨基甲酰基)氧基)甲基)苯氧基)-3,4,5-三羟基四氢-2H-吡喃-2-羧酸(48):向溶解于0.38mL无水DMF中的47(4.3mg,3.8 μ mol)的溶液中添加马来酰亚氨基己酰基NHS酯35(1.2mg,3.8 μ mol),接着添加二异丙基乙胺(4.0 μ L,22.8 μ mol)。在室温下在氮气下搅拌反应2小时,此时,LC-MS显示转化成产物。用乙腈(0.5mL)、DMSO(1mL)、水(0.5mL)的混合物稀释反应,然后通过制备型HPLC加以纯化。流动相由A=水和B=乙腈组成,两者均包含0.1%甲酸。使用90:10A:B至10:90A:B的线性洗脱梯度持续75分钟并冷冻干燥包含希望的产物的馏分,从而提供药物接头化合物48(1.2mg,24%,经两个步骤)。分析型HPLC(0.1%甲酸): t_R 10.85分钟。LC-MS: t_R 12.12分钟。 m/z (ES^+) 实测值1331.4 ($M+H$)⁺, m/z (ES^-) 实测值1329.5 ($M-H$)⁻。

[0941] 方案7

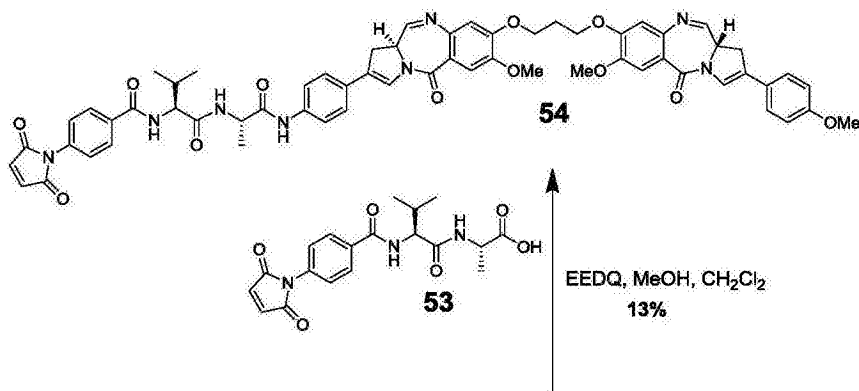
[0942]



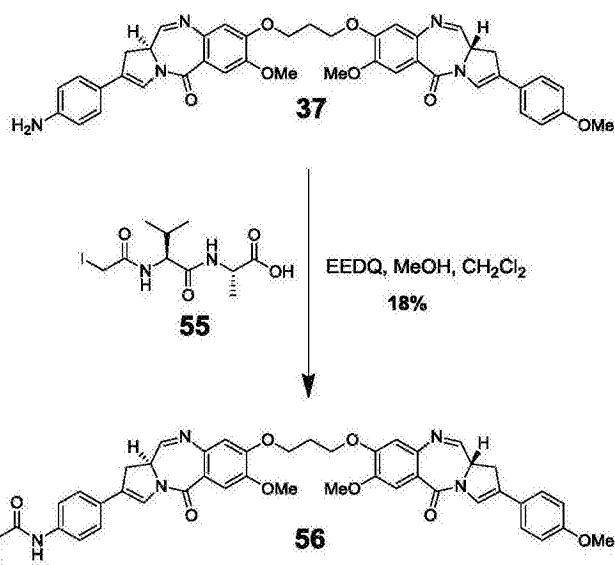
[0943] 6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-((S)-1-(((S)-1-((3-((S)-7-甲氧基-8-((5-((S)-7-甲氧基-2-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基)氧基)戊基)氧基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-2-基)苯基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)己酰胺(51):在火焰干燥的10mL烧瓶中加入酸36(2.7mg,7.1 μ mol)、EEDQ(2.1mg,8.5 μ mol)、和0.28mL包含1%甲醇的无水CH₂Cl₂。在氮气下搅拌反应1小时;然后添加PBD二聚体49(5.8mg,7.1 μ mol)并在室温下搅拌反应20小时,此时,LC-MS显示转化成产物。浓缩反应,然后通过制备型HPLC进行纯化并冷冻干燥包含希望的产物的馏分,从而提供药物接头化合物51(2.7mg,32%)。分析型HPLC(0.1%甲酸): t_R 9.17分钟。LC-MS: t_R 11.25分钟, m/z (ES^+) 实测值1185.3 ($M+H$)⁺, m/z (ES^-) 实测值1182.9 ($M-H$)⁻。

[0944] N-((S)-1-(((S)-1-(3-((S)-8-((5-((S)-2-(4-(3-(二甲基氨基)丙氧基)苯基)-7-甲氧基-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基)氧基)戊基)氧基)-7-甲氧基-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-2-基)苯基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺(52):在火焰干燥的10mL烧瓶中加入酸36(3.7mg,9.7 μ mol)、EEDQ(2.9mg,11.6 μ mol)、和0.4mL包含1%甲醇的无水CH₂Cl₂。在氮气下搅拌反应1小时;然后添加PBD二聚体50(8.0mg,9.7 μ mol)并在室温下搅拌反应6小时,此时,LC-MS显示出现产物。浓缩反应,然后通过制备型HPLC加以纯化并冷冻干燥包含希望的产物的馏分,从而提供药物接头化合物52(3.1mg,25%)。分析型HPLC(0.1%甲酸):t_R 9.45分钟。LC-MS:t_R 11.75分钟,m/z (ES⁺)实测值1188.4 (M+H)⁺,m/z (ES⁻)实测值1186.0 (M-H)⁻。

[0945] 方案8



[0946]



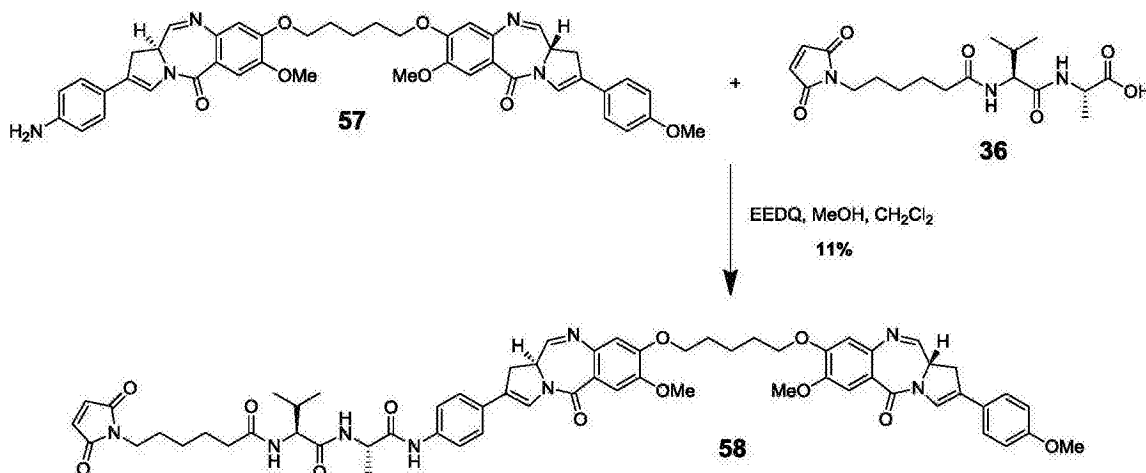
[0947] 4-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-((S)-1-(((S)-1-(4-((S)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基)氧基)丙氧基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-2-基)苯基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)苯甲酰胺(54):在火焰干燥的10mL烧瓶中加入接头片段53(7.7mg,20 μ mol),将其溶解于0.33mL处于CH₂Cl₂溶剂混合物中的5%MeOH中。添加EEDQ(6.1mg,25 μ mol)并在室温下在氮气下搅拌反应15分钟,此时,添加PBD二聚体37(12mg,16.5 μ mol)。在室温下在氮气氛下搅拌反应持续另外

3小时,此时,LC-MS显示转化成产物。在1mm chromatotron板上通过径向色谱法来纯化反应,用CH₂Cl₂/MeOH混合物(100:0至90:10 CH₂Cl₂/MeOH)进行洗脱,从而提供54(2.4mg,13%)。TLC:R_f=0.44,处于CH₂Cl₂中的10%MeOH。分析型HPLC(0.05%三氟乙酸):t_R 11.53分钟。LC-MS:t_R 12.61分钟,m/z (ES⁺) 实测值1095.4 (M+H)⁺,m/z (ES⁻) 实测值1093.9 (M-H)⁻。

[0948] (S)-2-(2-碘乙酰氨基)-N-((S)-1-((4-((S)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基)氧基)丙氧基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-2-基)苯基)氨基)-1-氧代丙-2-基)-3-甲基丁酰胺(56):在火焰干燥的烧瓶中加入接头55(7.8mg,22μmol),将其溶解于0.37mL处于CH₂Cl₂溶剂混合物中的5%MeOH中。添加EEDQ(6.8mg,27.5μmol)并在室温下在氮气下搅拌反应15分钟,此时添加PBD二聚体37(13mg,18μmol)。在室温下在氮气氛下搅拌反应持续另外4小时,此时,LC-MS显示转化成产物。在1mm chromatotron板上通过径向色谱法来纯化反应,用CH₂Cl₂/MeOH混合物(100:0至80:20 CH₂Cl₂/MeOH)进行洗脱,从而提供56(3.5mg,18%)。分析型HPLC(0.1%甲酸):t_R 11.43分钟。LC-MS:t_R 12.49分钟,m/z (ES⁺) 实测值1064.6 (M+H)⁺,m/z (ES⁻) 实测值1098.9 (M+2H₂O-H)⁻。

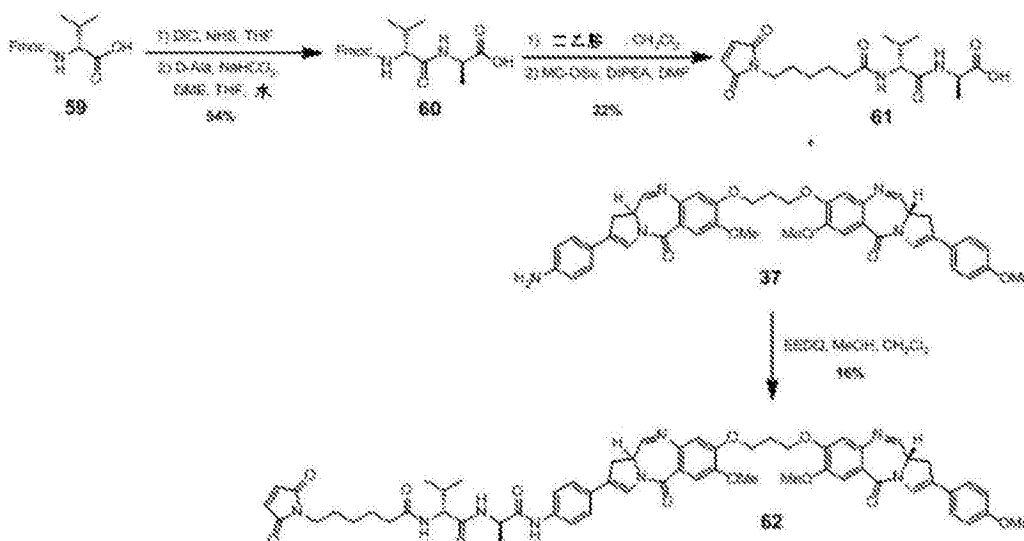
[0949] 方案9

[0950]



[0951] 6-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-((S)-1-((S)-1-((4-((S)-7-甲氧基-8-((5-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基)氧基)戊基)氧基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-2-基)苯基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)己酰胺(58):在火焰干燥的10mL烧瓶中加入接头片段36(19mg,50μmol),将其溶解于0.33mL处于CH₂Cl₂溶剂混合物中的5%MeOH中。添加EEDQ(12.4mg,50μmol)并在室温下在氮气下搅拌反应15分钟,此时添加PBD二聚体57(12.5mg,16.6μmol)。在室温下在氮气氛下搅拌反应持续另外5小时,此时,LC-MS显示转化成产物。在1mm chromatotron板上通过径向色谱法来纯化反应,用CH₂Cl₂/MeOH混合物(100:0至80:20 CH₂Cl₂/MeOH)进行洗脱,从而提供58(2.1mg,11%)。分析型HPLC(0.1%甲酸):t_R 12.19分钟。LC-MS:t_R 12.58分钟,m/z (ES⁺) 实测值1117.8 (M+H)⁺,m/z (ES⁻) 实测值1133.7 (M+H₂O-H)⁻。

[0952] 方案10



[0953]

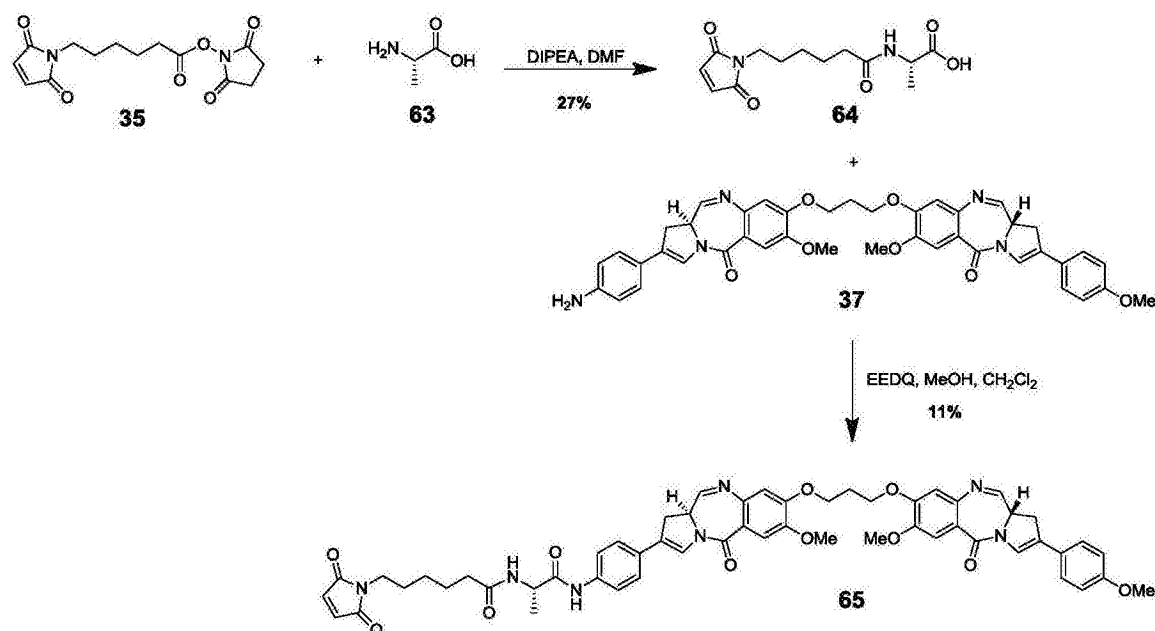
[0954] (R)-2-((R)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酸(60):在火焰干燥的烧瓶中加入Fmoc-D-缬氨酸(200mg,0.59mmol)和5.9mL无水THF。添加N-羟基琥珀酰亚胺(75mg,0.65mmol),接着添加二异丙基碳二亚胺(0.1mL,0.65mmol),并在环境温度下搅拌反应过夜,此时,LC-MS显示转化成产物。用 CH_2Cl_2 稀释反应混合物并用水(50mL)、盐水(50mL)洗涤,在硫酸钠上干燥并浓缩至干燥。该物质无需进一步纯化即可使用。LC-MS: t_{R} 13.89分钟, m/z (ES^+) 实测值437.0 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 。将粗Fmoc-D-Val-OSu(0.59mmol)溶解于二甲氧基乙烷(1.5mL)和THF(0.8mL)中。将D-丙氨酸(73mg,0.89mmol)溶解于2.3mL水中并加入反应混合物中,紧接着加入碳酸氢钠(99mg,1.2mmol)。在室温下搅拌产生的淤浆过夜,此时,反应澄清并且LC-MS显示完成。将反应倒入50mL CH_2Cl_2 中并用50mL 0.1M HCl、然后用盐水洗涤有机层,在硫酸钠上干燥,然后浓缩至干燥。在1mm chromatotron板上通过径向色谱法来纯化粗产物,用 CH_2Cl_2 进行洗脱,从而提供60(128mg,54%)。TLC: R_{f} =0.18,处于 CH_2Cl_2 中的10% MeOH。分析型HPLC(0.1%甲酸): t_{R} 9.47分钟。LC-MS: t_{R} 13.09分钟, m/z (ES^+) 实测值411.1 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, m/z (ES^-) 实测值409.2 ($\text{M}-\text{H}$) $^-$ 。

[0955] (R)-2-((R)-2-(6-(2,5-二氧化代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酸(61):将保护的二肽60(70mg,0.37mmol)悬浮于6mL无水 CH_2Cl_2 中,在氮气下在冰上冷却,然后逐滴添加2mL二乙胺。将反应升温至室温并在氮气下搅拌2小时,此时,HPLC显示起始原料消耗。用6mL氯仿稀释反应并浓缩。将粗反应残余物再溶解于6mL氯仿中并浓缩两次,接着在真空管线上干燥2小时。然后将脱保护的二肽溶解于3.7mL无水DMF中。然后添加MC-OSu(138mg,0.44mmol),接着添加二异丙基乙胺(0.32mL,1.9mmol)。在室温下在氮气氛下搅拌反应过夜。通过将反应倒入50mL 0.1M HCl中并用乙酸乙酯(50mL,3x)萃取来完成成后处理(workup)。用水(50mL)和盐水(50mL)洗涤合并的有机层,在硫酸钠上干燥,并浓缩。在1mm chromatotron板上通过径向色谱法来纯化粗产物,用 CH_2Cl_2 /MeOH混合物(99:1至95:5 CH_2Cl_2 /MeOH)进行洗脱,从而提供61(14mg,22%)。 ^1H NMR(CD_3OD) δ (ppm) 0.94(d, $J=14\text{Hz}$, 3H), 0.98(d, $J=14\text{Hz}$, 3H), 1.29(m, 2H), 1.39(d, $J=7.4\text{Hz}$, 3H), 1.61(m, 4H), 2.05(m, 1H), 2.25(dt, $J=1.2, 7.4\text{Hz}$, 2H), 3.48(t, $J=7\text{Hz}$, 2H), 4.19(m, 1H), 4.37(m, 1H), 6.78(s, 2H)。分析型HPLC(0.1%甲酸): t_{R} 10.04分钟。LC-MS: t_{R} 11.22分钟, m/z (ES^+) 实测值382.1 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, m/z (ES^-) 实测值380.0 ($\text{M}-\text{H}$) $^-$ 。

[0956] 6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-((R)-1-(((R)-1-((4-((S)-7-甲氧基-8-(3-(((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基)氧基)丙氧基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-2-基)苯基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)己酰胺(62): 在火焰干燥的10mL烧瓶中加入接头61(9.5mg, 25 μ mol), 将其溶解于0.33mL处于CH₂Cl₂溶剂混合物中的5%MeOH中。添加EEDQ(7.3mg, 30 μ mol)并在室温下在氮气下搅拌反应15分钟, 此时, 添加PBD二聚体37(12mg, 16.5 μ mol)。在室温下在氮气氛下, 搅拌反应持续另外3小时, 此时, LC-MS显示转化成产物。在1mmchromatotron板上通过径向色谱法来纯化反应, 用CH₂Cl₂/MeOH混合物(100:0至80:20 CH₂Cl₂/MeOH)进行洗脱, 从而提供62(2.8mg, 16%)。TLC: R_f=0.39, 处于CH₂Cl₂中的10%MeOH。分析型HPLC(0.1%甲酸): t_R 11.50分钟。LC-MS: t_R 12.50分钟, m/z (ES⁺) 实测值1089.7 (M+H)⁺, m/z (ES⁻) 实测值1088.0 (M-H)⁻。

[0957] 方案11

[0958]



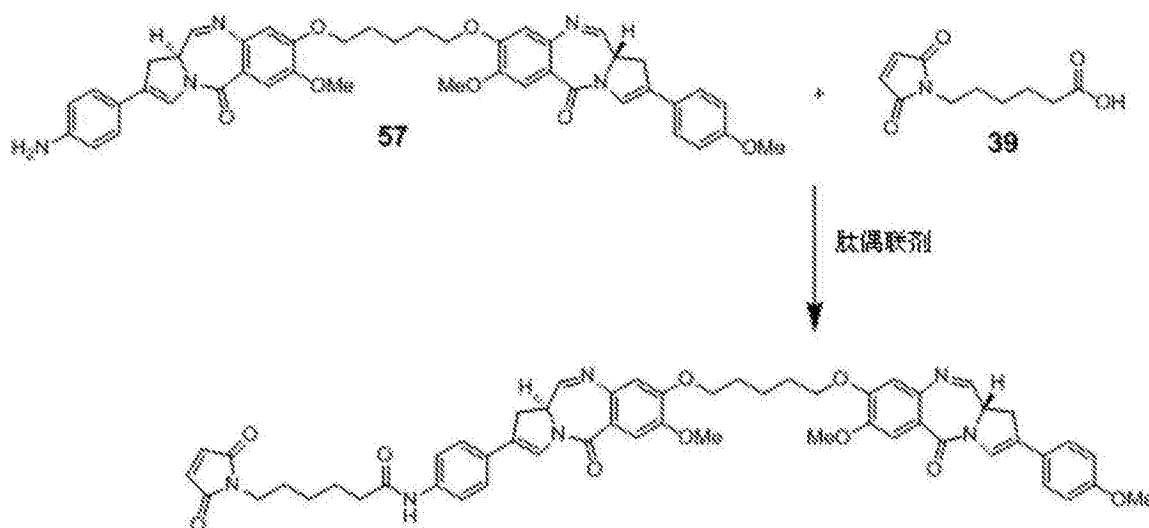
[0959] (S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰氨基)丙酸(64): 将L-丙氨酸(58mg, 0.65mmol)悬浮于6.5mL无水DMF中, 然后添加MC-OSu 35(100mg, 0.324mmol)。添加二异丙基乙胺(0.28mL, 1.6mmol)并在室温下在氮气下搅拌反应过夜。然后用50mL 0.1M HCl稀释反应, 然后用水(50mL)和盐水(50mL)洗涤合并的有机层, 在硫酸钠上干燥, 然后浓缩至干燥。在1mmchromatotron板上通过径向色谱法来纯化反应, 用CH₂Cl₂/MeOH混合物(97.5:2.5至90:10 CH₂Cl₂/MeOH)进行洗脱, 从而提供64(25mg, 27%)。TLC: R_f=0.25, 处于CH₂Cl₂中的10%MeOH。¹H NMR(CD₃OD) δ (ppm) 1.30 (m, 2H), 1.37 (d, J=7.4Hz, 3H), 1.60 (m, 4H), 2.21 (t, J=7.4Hz, 2H), 3.48 (t, J=7Hz, 2H), 4.35 (q, J=7.4Hz, 1H), 6.78 (s, 2H)。分析型HPLC(0.1%甲酸): t_R 9.06分钟。

[0960] 6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-((S)-1-((4-((S)-7-甲氧基-8-(3-(((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基)氧基)丙氧基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-2-基)苯基)氨基)-1-氧代丙-2-基)己酰胺(65): 在火焰干燥的10mL烧瓶中加入接头64

(14mg, 50 μ mol), 将其溶解于0.66mL处于CH₂Cl₂溶剂混合物中的5%MeOH中。添加EEDQ (15mg, 60 μ mol) 并在室温下在氮气下搅拌反应15分钟, 此时, 添加PBD二聚体37 (24mg, 33 μ mol)。在室温下在氮气下搅拌反应持续另外4小时。在1mmchromatotron板上通过径向色谱法来纯化反应, 用CH₂Cl₂/MeOH混合物 (100:0至90:10 CH₂Cl₂/MeOH) 进行洗脱, 从而提供65 (3.5mg, 11%)。分析型HPLC (0.1% 甲酸): t_R 11.40分钟。LC-MS: t_R 12.39分钟, m/z (ES⁺) 实测值 990.6 (M+H)⁺, m/z (ES⁻) 实测值989.0 (M-H)⁻。

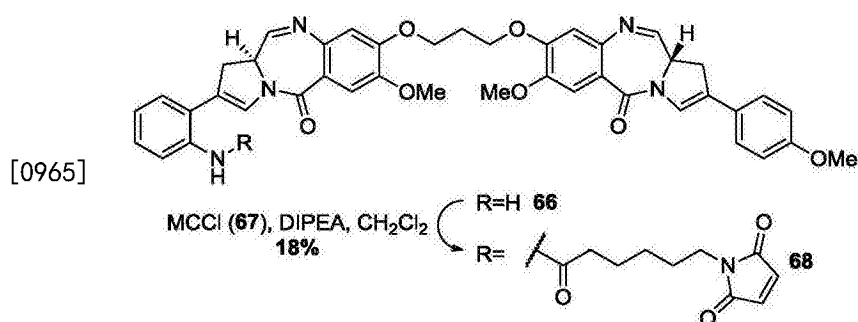
[0961] 方案12

[0962]



[0963] 直接通过马来酰亚氨基己酰基间隔物连接的PBD二聚体57 (方案14): 使用方案2中所述的化学作用, 将PBD二聚体57偶联到马来酰亚氨基己酸39上。

[0964] 方案13

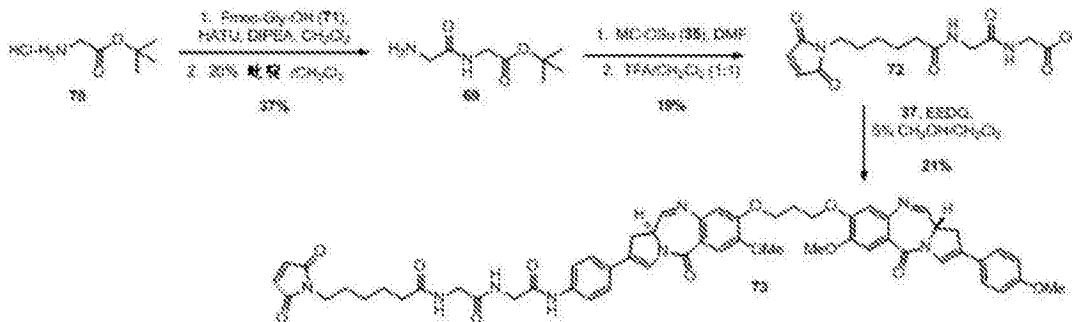


[0966] 6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-(2-((S)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基)氧基)丙氧基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-2-基)苯基)己酰胺 (68): 在处于CH₂Cl₂ (300 μ L) 中的66 (10mg, 0.013mmol) 的混合物中加入DIPEA和MC-Cl (67) (3mg, 0.013mmol)。在1小时之后, 添加另外3当量的DIPEA (7 μ L) 和2当量的酰基氯 (6mg, 0.026mmol)。在1小时之后, 添加另外量的DIPEA (7 μ L) 和酰基氯 (6mg, 0.026mmol)。在另外3小时之后, 将反应混合物直接抽吸到1mm径向chromatotron板上, 并用二氯甲烷, 紧接着处于二氯甲烷中的甲醇梯度 (1%至5%) 进行洗脱。将包含馏分的产物 (作为与起始苯胺的混合物), 浓缩至残余物, 并溶解于0.5mL DMSO、0.5mL乙腈和0.5mL去离子水的混合物中, 然后通过制备型HPLC进一步纯化。收集主峰并合并馏分, 冷冻并且冷冻干燥, 从而产生

2.1mg (18%) : MS (ES^+) m/z 919.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0967] 注意:通过将100mg 39溶解于草酰氯(5mL)中来制备酰基氯67。在减压浓缩之前,添加一滴DMF并在环境温度下搅拌混合物数小时。添加二氯甲烷并第二次浓缩混合物,从而提供直接使用的灰白色固体: $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 6.70 (s, 2H), 3.46 (t, $J=7\text{Hz}$, 2H), 2.82 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 1.72 (五重峰, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 1.61 (五重峰, $J=7.4\text{Hz}$, 2H), 1.35 (五重峰, $J=7.6\text{Hz}$, 2H)。

[0968] 方案14



[0969]

[0970] 2-(2-氨基乙酰氨基) 乙酸叔丁基酯 (69): 在处于二氯甲烷 (25mL) 中的甘氨酸叔丁酯盐酸盐 (70) (484mg, 2.9mmol) 的混合物中加入Fmoc-Gly-OH (71) (0.861mg, 2.99mmol)、DIPEA (756mg, 4.35mmol) 和HATU (1.3g, 3.5mmol)。在环境温度下搅拌反应混合物16小时,然后倒入乙酸乙酯中并用水 (3X) 和盐水 (1X) 洗涤。在 MgSO_4 上干燥有机相,过滤并在减压下浓缩。在2mm平板上通过径向色谱法来纯化得到的残余物,用5%甲醇/二氯甲烷洗脱。在减压下浓缩包含馏分的产物并用20%哌啶/二氯甲烷 (10mL) 处理1小时,然后在减压下浓缩,然后在2mm平板上通过径向色谱法纯化两次,用5%至10%甲醇/二氯甲烷的梯度进行洗脱,从而提供 (200mg, 37%) : $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 7.62 (s, 1H), 4.00 (s, 2H), 3.39 (s, 2H), 1.47 (s, 9H)。

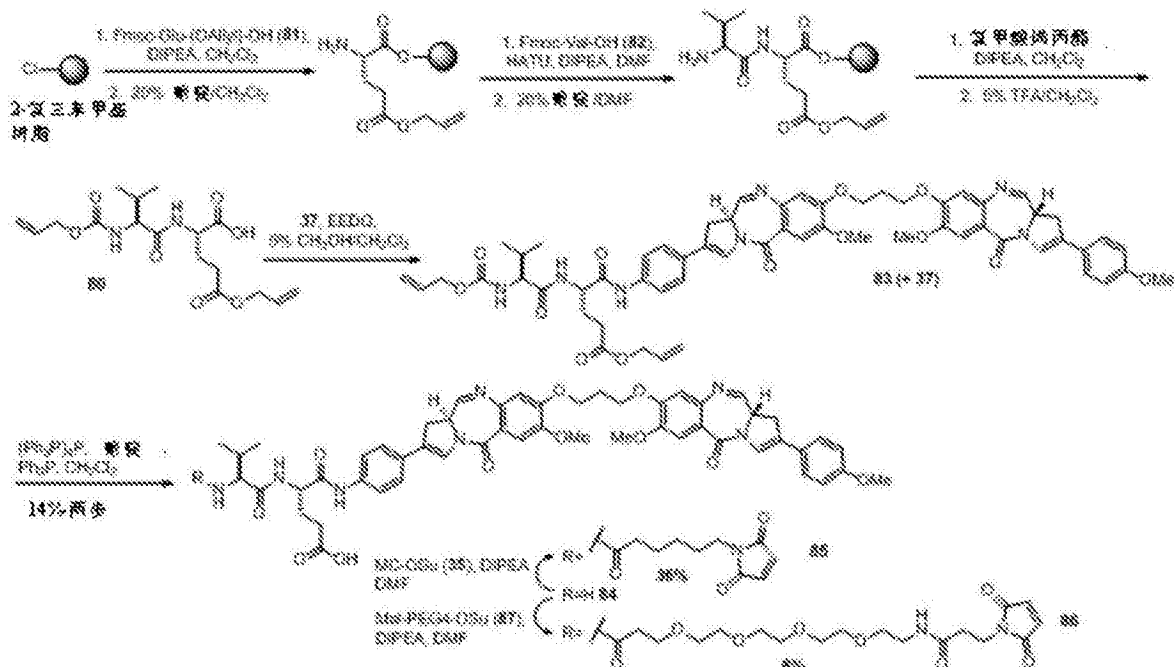
[0971] 2-(2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基) 己酰氨基) 乙酰氨基) 乙酸 (72): 在处于DMF (1mL) 中的胺69 (200mg, 0.11mmol) 的溶液中加入35 (350mg, 0.11mmol), 并在环境温度下搅拌反应混合物2小时。在减压下浓缩混合物并在1mm平板上通过径向色谱法进行纯化,用二氯甲烷以及处于二氯甲烷中的甲醇梯度 (1%至5%) 进行洗脱。在减压下浓缩包含馏分的产物,溶解于二氯甲烷 (4mL) 中并用三氟乙酸 (4mL) 处理。在40分钟之后,在减压下浓缩混合物并将得到的残余物溶解于二氯甲烷中,然后浓缩,从而产生22.5mg (19%) 的72,为白色固体: $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CD_3OD) δ 6.79 (s, 2H), 3.93 (s, 2H), 3.89 (s, 2H), 3.49 (t, $J=6.8\text{Hz}$, 2H), 2.26 (t, $J=6.8\text{Hz}$, 2H), 1.61 (m, 4H), 1.34 (m, 2H); MS (ES^+) m/z 326.21 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0972] 6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-(2-((2-((4-((S)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基) 氧基) 丙氧基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-2-基) 苯基) 氨基)-2-氧代乙基) 氨基)-2-氧代乙基) 己酰胺 (73): 在处于5%甲醇/二氯甲烷 (0.5mL) 中的72 (15mg, 0.046mmol) 的混合物中加入EEDQ (11mg, 0.046mmol), 并在环境温度下搅拌混合物30分钟,此时,添加37 (16mg, 0.023mmol)。搅拌反应混合物3小时并在1mm径向 chromatotron板上直接进行纯化,用1%至4%甲醇/二氯甲烷梯度进行洗脱,从而产生6.8mg (29%) 的73,为黄色固体: MS (ES^+) m/z 1033.57 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

(0.4mL) 中的78 (9.3mg, 0.023mmol) 的混合物中加入EEDQ (7mg, 0.027mmol)。在环境温度下搅拌混合物15分钟, 然后添加37 (15mg, 0.021mmol)。搅拌混合物4小时, 用二氯甲烷 (2mL) 稀释反应混合物, 并直接抽吸到1mm径向chromatotron板上。用处于二氯甲烷中的1%至5%甲醇梯度洗脱产物, 从而提供6.8mg (29%) 的79, 为黄色固体; MS (ES⁺) m/z 1113.51 [M+H]⁺。

[0979] 方案16

[0980]



[0981] (S)-5-(烯丙氧基)-2-((S)-2-(((烯丙氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)-5-氧代戊酸(80):在2-氯三苯甲基树脂(1.0g,1.01mmol)悬浮在二氯甲烷(10ml)中的混合物中加入Fmoc-Glu-(OAllyl)-OH(81)(409mg,1.0mmol)和DIPEA(173μL,1.0mmol)。摇动反应混合物5分钟,并添加另外部分的DIPEA(260μL,1.5mmol),然后摇动混合物1小时。添加甲醇(0.8mL)并摇动混合物5分钟,然后过滤并用DMF(6X)、二氯甲烷(6X)、二乙醚(6X)洗涤,并且在减压下干燥。使产生的树脂经受处于二氯甲烷(10mL)中的20%哌啶持续1小时,然后过滤并用DMF(6X)、二氯甲烷(6X)、二乙醚(6X)洗涤,并且在减压下干燥。

[0982] 向处于DMF (7mL) 中的Fmoc-Val-OH (82) (1.03g, 3.30mmol) 混合物中加入DIPEA (1.0mL) 和HATU (1.1g, 3.03mmol)。在充分混合之后, 将溶液抽吸到包含前面制备的树脂的10mL注射器中。将混合物盖上盖子并摇动16小时。用DMF (6X)、二氯甲烷 (6X) 和醚 (6X) 洗涤树脂。分离小部分 (10mg) 并用20% TFA/二氯甲烷处理, 通过LC-MS分析得到的溶液, 显示一个高纯度峰, 该峰显示正确的质量 ($MS(E^+) m/z 509.28 [M+H]^+$)。然后, 用20% 哌啶/DMF (8mL) 处理剩余树脂持续2小时, 然后用DMF (6X)、二氯甲烷 (6X)、二乙醚 (6X) 洗涤并在减压下干燥。

[0983] 制备处于二氯甲烷(10mL)中的氯甲酸烯丙酯(529μL, 5.05mmol)、DIPEA(1.7mL, 10mmol)的混合物,并抽吸到包含上述树脂的注射器中。将混合物盖上盖子并且摇动。在大约2小时之后,排出反应混合物,并用二氯甲烷(6X)洗涤。用20%TFA/二氯甲烷切割小部分的树脂(~10mg)并通过LC-MS分析起始原料和产物的质量。主要成分仍然是未反应的胺,所以使树脂再次经受上述条件。在4小时之后,用二氯甲烷(6X)洗涤树脂,然后用处于二氯甲

烷中的5%TFA(4X 7mL)重复处理。在减压下浓缩得到的溶液。在2mm径向chromatotron板上纯化混合物,用5%甲醇/二氯甲烷进行洗脱,从而产生107mg的80:¹H-NMR(400MHz,CDCl₃) δ 7.05(s,1H),5.90(m,2H),5.57(d,1H),5.29(d,J=14.7Hz,2H),5.22(t,J=10.9Hz,2H),4.59(m,5H),4.02(m,1H),2.60-2.40(m,2H),2.37-2.18(m,1H),2.17-2.02(m,2H),0.96(d,J=6.4Hz,3H),0.93(d,J=6.6Hz,3H);MS(ES⁺)m/z 371.12[M+H]⁺。

[0984] 4-((S)-2-((烯丙氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)-5-((4-((S)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基)氧基)丙氧基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-2-基)苯基)氨基)-5-氧代戊酸(S)-烯丙基酯(83):在处于5%甲醇/二氯甲烷(1mL)中的酸80(30,0.04mmol)的混合物中加入EEDQ(20mg,0.082mmol)。在环境温度下搅拌混合物30分钟,然后添加37(30mg,0.04mmol),并搅拌混合物大约5小时。通过直接抽吸到1mm径向chromatotron板上进行部分纯化并用1%至5%甲醇/二氯甲烷梯度进行洗脱,从而提供所希望的产物和37的混合物(26mg;分别~3:1),它无需进一步纯化即可使用。

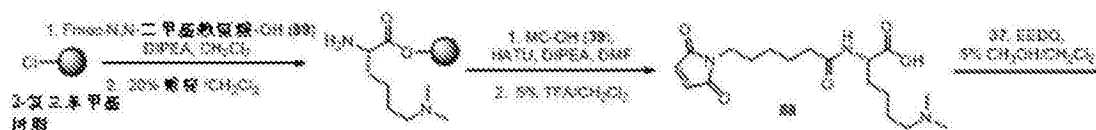
[0985] (S)-4-((S)-2-氨基-3-甲基丁酰氨基)-5-((4-((S)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基)氧基)丙氧基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-2-基)苯基)氨基)-5-氧代戊酸(84):在处于无水二氯甲烷(3mL)中的83和37(26mg)的混合物中加入Ph₃P(0.3mg,0.0012mmol)、吡咯烷(4μL,0.048mmol)和四钯(tetrakis palladium)(0.7mg,0.6μmol)。在2小时之后,添加另外量(0.7mg,0.6μmol)的四钯,并搅拌反应持续另外1小时,然后在减压下浓缩。将残余物溶解于DMSO(1mL)、含有0.05%甲酸的乙腈(1mL)和含有0.05%甲酸的水(1mL)中,并通过制备型反相HPLC进行纯化。收集产物的单个馏分并冷冻干燥,从而产生6mg(14%,两个步骤)的84:MS(ES⁺)m/z 1078.6[M+H]⁺。

[0986] (S)-4-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰氨基)-3-甲基丁酰氨基)-5-((4-((S)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基)氧基)丙氧基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-2-基)苯基)氨基)-5-氧代戊酸(85):在处于DMF(200μL)中的84(6mg,6μmol)和35(2mg,6μmol)的混合物中加入DIPEA(3μL,18μmol)并在环境温度下搅拌反应混合物。在1小时之后,添加另外当量的35(2mg,6μmol)并在环境温度下继续搅拌反应3小时。添加第三当量的35(2mg,6μmol)并搅拌混合物大约1小时,在减压下浓缩,溶解于二氯甲烷中,直接抽吸到1mm径向chromatotron板上,然后用处于二氯甲烷中的5%甲醇进行洗脱。这产生2.5mg(36%)高纯度85:MS(ES⁺)m/z 1147.49[M+H]⁺。

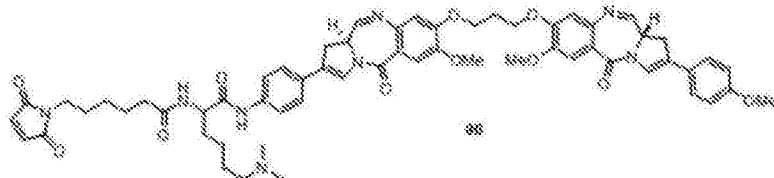
[0987] (21S,24S)-1-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-21-异丙基-24-((4-((S)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基)氧基)丙氧基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-2-基)苯基)氨基甲酰基)-3,19,22-三氧代-7,10,13,16-四氧杂-4,20,23-三氮杂二十七-27-酸(86):在处于DMF(200μL)中的84(8mg,8.4μmol)和Mal-PEG4-NHS(87)(6.5mg,12.6μmol)的混合物中添加DIPEA(4.3μL,25μmol)。在环境温度下搅拌反应混合物2小时,并在减压下浓缩。将得到的残余物溶解于二氯甲烷中并抽吸到1mm径向chromatotron板上。该物质是极性的并且在硅胶基chromatotron板上并不进行层析。用甲

醇洗脱平板用来回收在减压下分离的混合物。通过制备型反相HPLC来纯化残余物质。洗脱单主峰并合并馏分,冷冻并且冷冻干燥成残余0.9mg (8%)的86:MS (ES⁺) m/z 1353.04 [M+H]⁺。

[0988] 方案17



[0989]



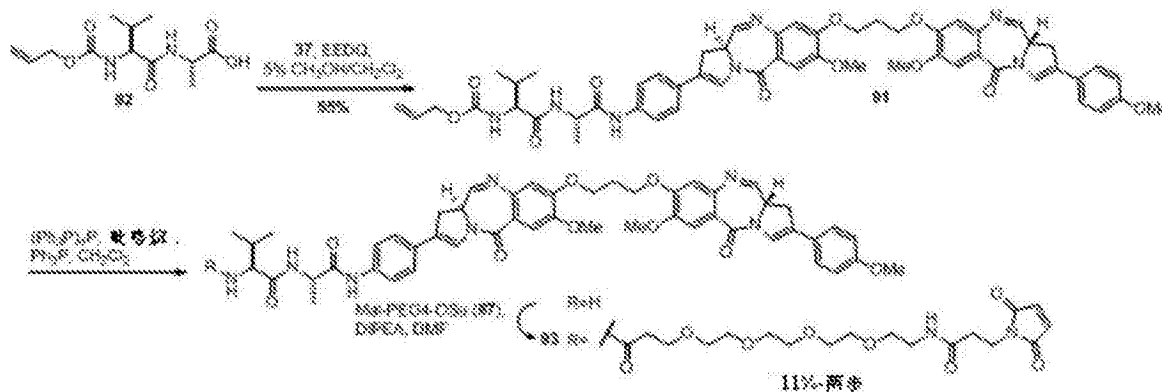
[0990] (S)-6-(二甲基氨基)-2-(6-(2,5-二氧化代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰氨基)己酸 (88): 在处于CH₂Cl₂ (10mL) 中的2-氯三苯甲基树脂 (1g, 1.01mmol) 的混合物中添加Fmoc-Lys (Me) 2-OH (89) (432mg, 1.0mmol) 和DIPEA (433μL, 2.5mmol)。摇动反应混合物1小时。添加甲醇 (0.8mL) 并摇动混合物持续另外5分钟,然后过滤并用DMF (6x)、二氯甲烷 (6x)、二乙醚 (6x) 洗涤,并且在减压下干燥。使干燥的树脂经受处于DMF (10mL) 中的20%哌啶持续1小时,然后过滤并用DMF (6X)、二氯甲烷 (6X)、二乙醚 (6X) 洗涤。

[0991] 在处于DMF (7mL) 中的39 (3.0mmol, 633mg) 的混合物中添加DIPEA (1.0mL) 和HATU (1.1g, 3.03mmol)。在充分混合之后,将溶液抽吸到包含上述树脂的10mL注射器中。将混合物盖上盖子,摇动16小时,过滤并用DMF (6X)、二氯甲烷 (6X)、和乙醚 (6X) 洗涤树脂。用5% TFA/二氯甲烷 (6mLX5) 重复处理树脂,摇动1分钟,然后过滤。在减压下并且在高真空中浓缩得到的溶液。通过制备型反相HPLC来纯化物质从而产生208mg的88:¹H-NMR (400MHz, CD₃OH/CDCl₃ 1:1混合物) δ6.73 (s, 2H), 4.41 (m, 1H), 3.48 (t, 2H), 3.31 (s, 1H), 3.03 (m, 2H), 2.84 (s, 6H), 2.22 (m, 2H), 1.87 (m, 2H), 1.78-1.52 (m, 6H), 1.43 (m, 2H), 1.31 (五重峰, 2H); MS (ES⁺) m/z 386.28 [M+H]⁺。

[0992] (S)-6-(二甲基氨基)-2-(6-(2,5-二氧化代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰氨基)-N-(4-((S)-7-甲氧基-8-(3-((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基)氧基)丙氧基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-2-基)苯基)己酰胺 (90): 在处于5%甲醇/二氯甲烷 (400μL) 中的88 (9.3mg, 0.023mmol) 的混合物中加入EEDQ (7mg, 0.027mmol)。在环境温度下搅拌混合物30分钟然后添加37 (15mg, 0.021mmol)。在4小时之后,在减压下浓缩混合物,溶解于DMSO (1mL)、乙腈 (2mL, 包含0.05%甲酸) 和水 (1mL, 包含0.05%甲酸) 的混合物中,然后通过反相HPLC (方法A) 加以纯化。包含产物的馏分被37污染,所以冷冻干燥这些馏分成为残余物并如上所述再纯化,从而产生0.5mg (2%) 纯90:MS (ES⁺) m/z 537.46 [M+H]⁺/2⁺。

[0993] 方案18

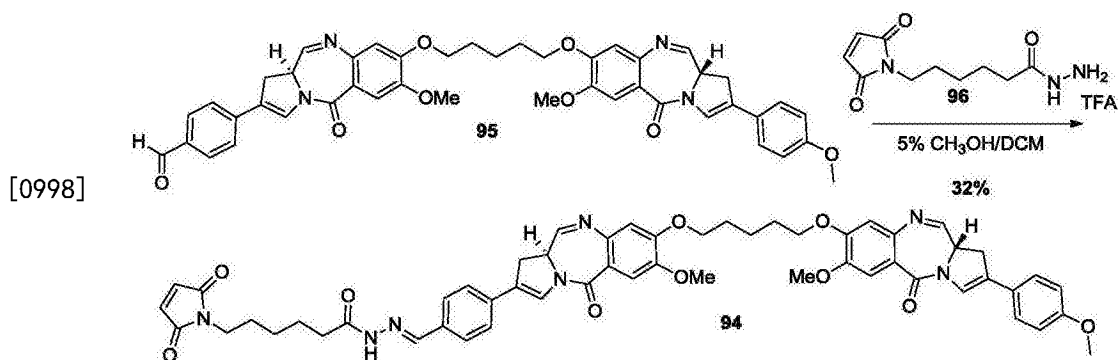
[0994]



[0995] ((S)-1-(((S)-1-(4-((S)-7-甲氧基-8-(3-(((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基)氧基)丙氧基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-2-基)苯基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)氨基甲酸烯丙基酯 (91): 在处于5%甲醇/二氯甲烷(1mL)中的92(45mg, 0.123mmol)的混合物中加入EEDQ(30.4mg, 0.123mmol)。在环境温度下搅拌混合物30分钟, 然后添加37(30mg, 0.041mmol)。搅拌反应混合物大约5小时, 然后在1mm径向chromatotron板上进行纯化, 用5%甲醇/二氯甲烷进行洗脱, 从而产生22mg(55%)的91, 它未进行表征而直接地使用。

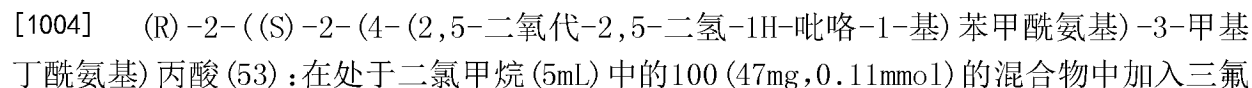
[0996] 1-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丙酰氨基)-N-(((S)-1-(((S)-1-(4-((S)-7-甲氧基-8-(3-(((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-8-基)氧基)丙氧基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-2-基)苯基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺 (93): 在处于无水二氯甲烷(3mL)中的91(22mg, 0.022mmol)的溶液中加入 Ph_3P (0.3mg, 0.0012mmol)、吡咯烷(4 μL , 0.048mmol)和四钨(0.7mg, 6 μmol)。在大约2小时之后, 在1mm径向chromatotron板上纯化反应混合物, 用5%至10%甲醇/二氯甲烷进行洗脱。收集主带并浓缩成残余物, 将其溶解于DMF(0.2mL)中并与NHS酯87(10mg, 0.19mmol)反应。搅拌反应30分钟, 浓缩并在1mm平板上通过径向色谱法进行纯化, 用5%甲醇/二氯甲烷进行洗脱, 从而产生3.2mg(11%)的93: MS(ES^+) m/z 1294.7 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 。

[0997] 方案19



[0999] (E)-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N'-(4-((S)-7-甲氧基-8-((5-(((S)-7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-5-氧代-5,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二

[1001]



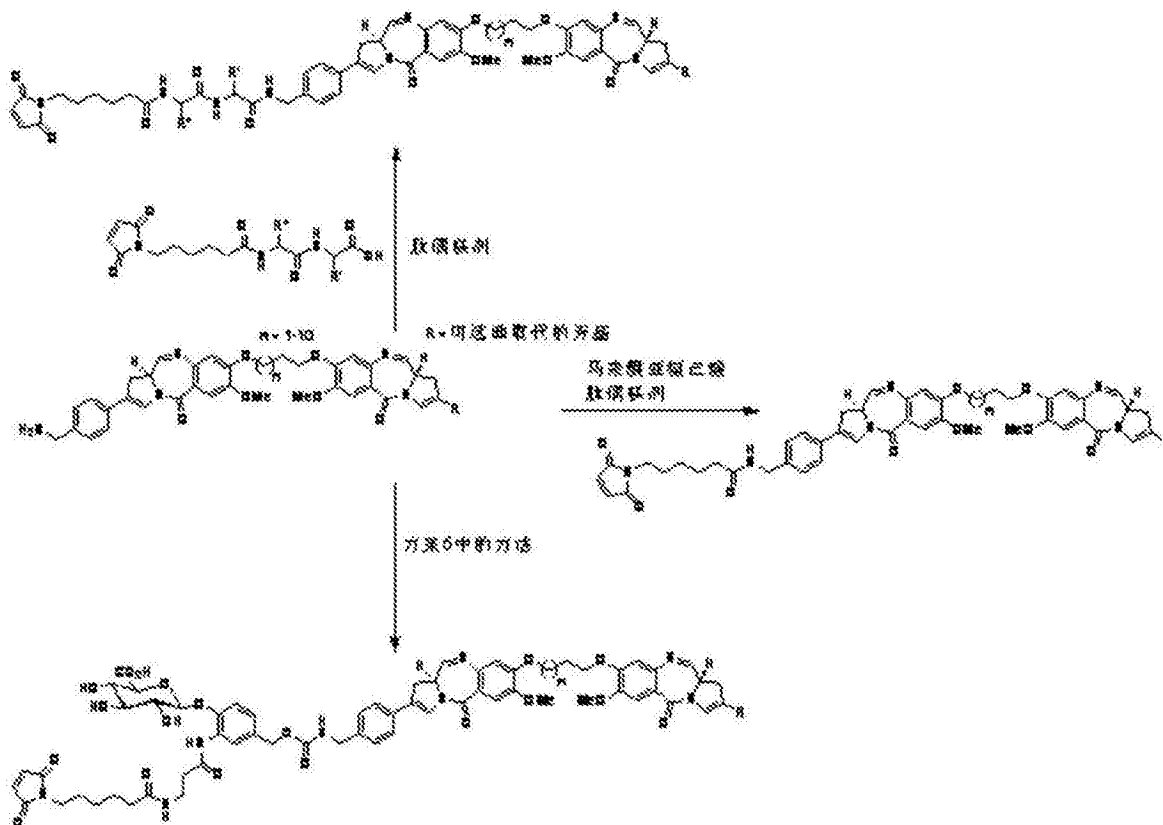
乙酸(5mL)并通过TLC(处于己烷中的50%乙酸乙酯,在高真空下在向下泵送TLC平板持续5分钟之后)来监测反应混合物。在75分钟之后,通过TLC不能检测出起始物质。使用相同条件第二次进行反应并合并来自两个反应的物质,然后在2mm径向chromatotron板上纯化,用处于二氯甲烷中5-10%甲醇的梯度进行洗脱。产率是42mg(49%)的53:¹H-NMR(400MHz,CDCl₃) δ7.92(d,J=6.6Hz,2H),7.51(d,J=6.6Hz,2H),7.0(m,1H),6.89(s,2H),6.70(s,1H),4.60(m,1H),2.22(m,1H),1.18(d,J=6.6Hz,3H),1.04(m,6H);MS(ES⁺)m/z 388.02[M+H]⁺。

[1005] (S)-2-((S)-2-(2-碘乙酰氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酸(102):在处于二氯甲烷中的97(100mg,0.41mmol)的混合物中加入碘乙酰胺-NHS酯(103)(115mg,0.41mmol),并在环境温度下搅拌混合物。在30分钟之后,将混合物抽吸到1mm chromatotron平板上,并用处于己烷中的乙酸乙酯(1:1)进行洗脱。收集单带并证实结构:¹H-NMR(400MHz,CDCl₃) δ6.70(d,J=7.8Hz,1H),6.27(d,J=7.0Hz,1H),4.45(m,1H),4.26(dd,J=8.6,6.3Hz,1H),3.72(四重峰,J=11.3Hz,2H),2.13(七重峰,J=6.5Hz,1H),1.47(s,9H),1.38(d,J=7.1Hz,3H),0.99(m,6H);MS(ES⁺)m/z 412.87[M+H]⁺。

[1006] (S)-2-((S)-2-(2-碘乙酰氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酸(55):参见用于合成(R)-2-((S)-2-(4-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)苯甲酰氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酸(53)的步骤。这产生22mg(15%,两个步骤):¹H-NMR(400MHz,D₆-DMSO) δ8.27(d,J=9.4Hz,1H),4.24(m,2H),3.97(bs,2H),3.83(d,J=9.4Hz,1H),3.71(d,J=9.6Hz,1H),2.07(m,1H),1.33(d,J=7.3Hz,3H),0.93(d,J=6.7Hz,3H),0.89(d,J=6.9Hz,3H);MS(ES⁻)m/z 354.84[M-H]⁻。

[1007] 方案21

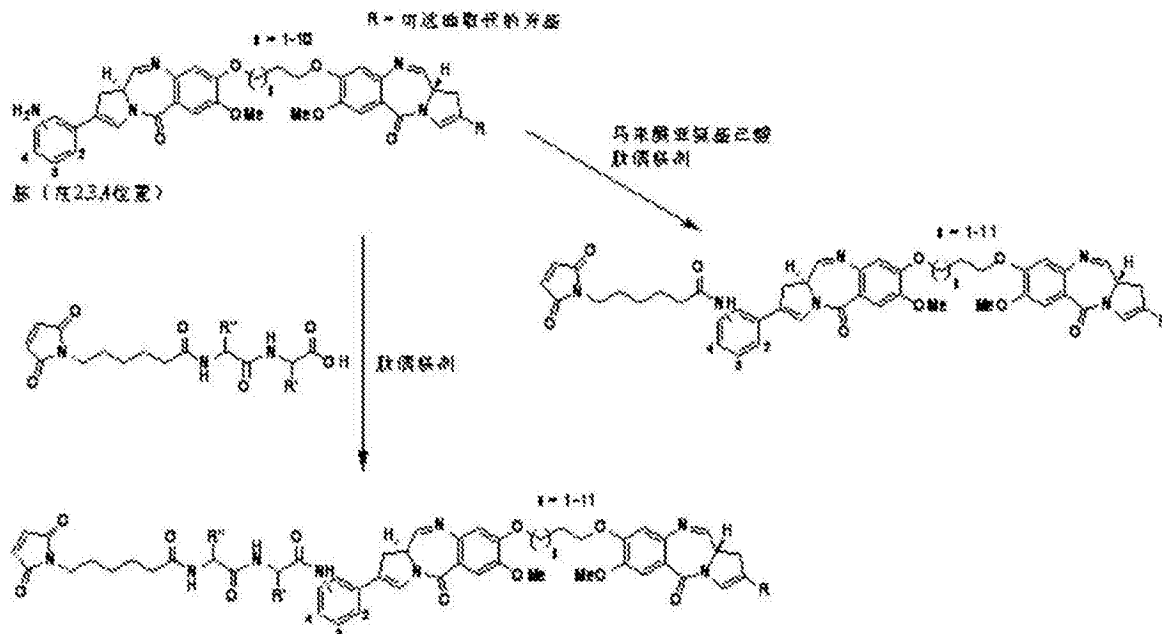
[1008]



[1009] 通过脂肪族胺连接的PBD二聚体(方案21)。用肽接头、葡糖苷酸接头、和/或取决于mAb降解释放的接头(即,不可切割接头),来合成包含脂肪族胺(如苄胺(实施例9))的PBD二聚体。通过苄胺结合的药物接头可以包括:(1)使用类似于方案1的化学作用可切割的肽;(2)与马来酰亚胺基己酰基直接附着(不可切割的接头)(方案2);(3)葡糖苷酸接头,如在方案6中所述制备。

[1010] 方案22

[1011]



[1012] 通用肽连接的2-、3-、和4-苯胺PBD二聚体(方案22)。使用在方案1中所述的化学作用,或如在方案2中举例说明的,直接与马来酰亚胺基己酸附连,将在2-、3-、和4-位置处具有苯胺的PBD二聚体结合到肽类接头上。

[1013] 实施例14:PBD二聚体结合物的制备

[1014] 如前所述(参见Doronina et al., Nature Biotechnology, 21, 778-784 (2003))或如下所述,制备抗体-药物结合物。简言之,对于马来酰亚胺药物-接头,在37°C下,用三(羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)还原处于包含50mM硼酸钠(pH 7.4)的PBS中的mAb(4-5mg/mL)。通过与5,5'-二硫代二(2-硝基苯甲酸)反应来监测反应进展(该反应还原链间二硫化物),并允许进行直至实现希望水平的巯基/mAb。然后将还原的抗体冷却至0°C并用1.5当量的马来酰亚胺药物-接头/抗体巯基进行烷基化。在1小时之后,通过添加5当量的N-乙酰基半胱氨酸来淬灭反应。在PD-10柱上通过凝胶过滤来去除淬灭的药物-接头。然后通过0.22μm注射器过滤器来无菌过滤ADC。分别在280nm和329nm下通过光谱分析来确定蛋白浓度,在280nm下校正药物吸光度的贡献。使用尺寸排阻层析法来确定抗体聚集的程度并且RP-HPLC证实了不存在剩余的NAC淬灭的药物-接头。

[1015] 对于卤素乙酰胺类药物接头,通常地如下进行结合:在处于10mM Tris(pH 7.4)、50mM NaCl、和2mM DTPA中的还原和再氧化的抗体(已经通过S239C取代在重链中引入半胱氨酸,见下文)的10mg/mL溶液中加入0.5体积的丙二醇。立即地在结合之前制备处于二甲基乙酰胺中的乙酰胺类药物接头的10mM溶液。将与加入抗体溶液中等量的丙二醇加入6倍

摩尔过量的药物接头中。将稀释的药物-接头溶液加入抗体溶液中并使用1M Tris (pH 9) 将pH值调节至8.0-8.5。在37℃进行结合反应持续45分钟。通过还原和变性反相PLRP-S层析法来证实结合。用Quadrasil MP树脂 (Sigma Aldrich; Product#679526) 去除过量的药物接头并利用PD-10脱盐柱 (GE Healthcare; Product#17-0851-01) 将缓冲液交换为10mM Tris (pH 7.4)、50mM NaCl和5%丙二醇。

[1016] 具有引入的半胱氨酸的工程化hIgG1抗体:通过添加10当量的TCEP和1mM EDTA并用1M Tris缓冲液 (pH 9.0) 将pH值调节至7.4来完全还原在重链(h1F6d)的位置239处包含半胱氨酸残基的CD70抗体。在37℃下1小时孵化之后,将反应冷却至22℃并添加30当量的脱氢抗坏血酸,用来选择性地再氧化天然二硫化物,同时留下处于还原状态的半胱氨酸239。用1M Tris缓冲液 (pH 3.7) 将pH值调节至6.5并且在22℃下允许反应进行1小时。然后,通过添加1M Tris缓冲液 (pH 9.0),将溶液的pH值再次提高至7.4。将3.5当量的处于DMSO中的PBD药物接头放置在适当的容器中,以便在加入反应之前用丙二醇稀释。为了保持PBD药物接头的可溶性,用丙二醇首先稀释抗体本身至33%的终浓度(例如,如果抗体溶液是在60mL反应体积中,则添加30mL丙二醇)。然后将相同体积的丙二醇(在这个实例中为30mL)加入PBD药物接头中,作为稀释剂。在混合之后,将处于丙二醇中的PBD药物接头溶液加入抗体溶液中进行结合;丙二醇的终浓度为50%。允许反应进行30分钟,然后通过添加5当量N-乙酰基半胱氨酸来淬灭。然后通过30kD膜通过超滤来纯化ADC。(需要注意的是,对于任何特定的PBD,可以减小在反应中使用的丙二醇的浓度,因为它的唯一目的是保持药物接头在水性介质中的溶解度)。

[1017] 实施例15:确定选择的结合物的体外活性

[1018] 使用刃天青 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 还原测定法 (参考文献: Doronina et al., Nature Biotechnology, 2003, 21, 778-784) 来评估选择的抗体药物结合物的体外细胞毒性活性。如前面实施例13中所述,制备抗体药物结合物。

[1019] 对于96小时测定,在包含补充有20%FBS的150μL RPMI 1640的96孔板中接种在对数期生长下培养的细胞持续24小时。以4x工作浓度制备ADC在细胞培养基中的连续稀释物;将50μL每种稀释物加入96孔板中。在添加ADC之后,在37℃下,将细胞与测试物品一起孵化4天。然后将刃天青加入每个孔中以实现50μM的终浓度,并且在37℃下将平板孵化另外4小时。然后在Fusion HT酶标仪上 (Packard Instruments, Meriden, CT, USA), 使用分别地530nm和590nm的激发波长和发射波长,针对染料还原程度读取平板。IC₅₀值(重复三次确定)在本文中定义为相对于未处理的对照,导致细胞生长减少50%的浓度。

[1020] 参考表4(下文),显示了使用96小时测定法得到的具有对-苯胺PBD二聚体的ADC的体外细胞毒性。针对CD70⁺CD30⁻细胞系和对照CD70⁻CD30⁻细胞系测试了ADC。所使用的抗体是CD70抗体、人源化1F6 (参见公开的美国申请号2009-148942)、CD30抗体、嵌合AC10 (参见公开的美国申请号2008-0213289) 和在氨基酸重链位置239 (按照EU编号系统) 处具有引入的半胱氨酸残基的CD70抗体 (人源化1F6) (表示为h1F6d)。与具有马来酰亚胺基或乙酰胺类接头的结合物 (分别为化合物40和41) 相比较,具有马来酰亚胺基-肽接头的结合物 (药物接头化合物38) 具有更低的IC₅₀。

[1021] 具有来自对-苯胺PBD二聚体37的药物接头的ADC的体外细胞毒性活性:

[1022] 表4. 在CD70⁺细胞系上的体外细胞毒性活性 (ng/mL), 所有ADC 2药物/mAb

[1023]

	肾细胞癌			AML	
	CD70+/30-			CD70-/30-	
	786-O	Caki-1	769-P	ACHN	HEL9217
h1F6d-38	30	5			1378
h1F6-38	4		118	26	
[1024]					
cAC10-38	1052		4005	508	
h1F6-40	7113			1764	
cAC10-40	2644			1264	
h1F6-41	580			1243	
cAC10-41	1153			1121	

[1025] 参考表5,显示了使用96小时测定得到的在CD30⁺细胞系上与PBD二聚体的ADC结合物的体外细胞毒性。针对CD30⁺CD70⁺细胞系和CD70⁻CD30⁺细胞系测试了ADC。所使用的抗体是CD70抗体、人源化1F6(参见公开的美国申请号2009-148942)和CD30抗体、嵌合AC10(参见公开的美国申请号2008-0213289)。与具有马来酰亚胺基或乙酰胺类接头的结合物(分别为化合物40和41)相比较,具有马来酰亚胺基-肽接头的结合物(药物接头化合物38)通常具有更低的IC₅₀。

[1026] 表5.在CD30⁺细胞系上的体外细胞毒性活性 (ng/mL),所有ADC 2药物/mAb

[1027]

	ALCL		霍奇金淋巴瘤		
	CD70-/30+		CD70+/30+		
	Karpas 299	L428	L540cy	L1236	Hs445
h1F6-38	1165	59	4	>10,000	5
cAC10-38	0.8	7	3	2012	0.2
h1F6-40	2195	7867	2557		
cAC10-40	621	3172	134		
h1F6-41	1330	3549	755		
cAC10-41	340	957	13		

[1028] 具有来自间-苯胺PBD二聚体42的药物接头的ADC的体外细胞毒性活性:

[1029] 参考表6,显示了使用96小时测定获得在CD30⁺细胞系上包含PBD二聚体的ADC的体外细胞毒性。针对CD30⁺CD70⁺细胞系和CD70⁻CD30⁺细胞系测试了活性。所使用的抗体是CD70

抗体、人源化1F6 (参见公开的美国申请号2009-148942) 和在氨基酸重链位置239 (按照EU编号系统) 处具有引入的半胱氨酸残基的CD70抗体 (人源化1F6) (表示为h1F6d)。与具有马来酰亚胺基类接头的结合物 (化合物44) 相比较, 具有马来酰亚胺基-肽接头 (药物接头化合物43) 和葡萄糖苷酸接头 (48) 的结合物通常具有更低的IC₅₀。

[1030] 表6. 在CD70⁺细胞系上体外细胞毒性活性 (ng/mL)

[1031]

	肾细胞癌		霍奇金淋巴瘤
	Caki-1	786-O	L428
h1F6d-43 (2dr/mAb)	7	39	>10,000
IgG-43 (2dr/mAb)		>10,000	>10,000
h1F6-44 (3.5dr/mAb)		1124	2142
IgG-44 (3.5dr/mAb)		1491	1242
h1F6d-48 (2dr/mAb)		89	4093
IgG-48 (2dr/mAb)		2939	6376

[1032] 具有来自对-和间-苯胺PBD二聚体38和42 (分别地) 的药物接头的ADC的体外细胞毒性活性:

[1033] 参考表7, 显示了使用96小时测定获得的在CD70⁺细胞系上包含PBD二聚体的ADC的体外细胞毒性。针对CD70⁺细胞系L428和786O以及CD70⁺ AML细胞系测试了活性。所使用的抗体是CD70抗体、人源化1F6 (参见公开的美国申请号2009-148942) 和在氨基酸重链位置239 (按照EU编号系统) 处具有引入的半胱氨酸残基的CD70抗体 (人源化1F6) (表示为h1F6d)。与具有带有对-苯胺的马来酰亚胺基-肽接头的那些结合物 (药物接头化合物38) 并相比较, 具有带有间-苯胺的马来酰亚胺基-肽接头的结合物 (药物接头化合物43) 具有稍低的活性。将间-苯胺化合物的载药量降低至2/抗体会降低活性。与具有马来酰亚胺基类接头的结合物 (化合物39) 相比较, 具有对-苯胺化合物 (48) 的葡萄糖苷酸接头的结合物通常具有更低的IC₅₀。另外, 对-苯胺化合物 (54) 的芳基马来酰亚胺在这些细胞系上没有活性。另外, 与结合物h1F6-43相比较, 具有直接结合到化合物42上的马来酰亚胺基接头的结合物具有降低的活性 (数据未示出)。

[1034] 表7. 在CD70⁺细胞系上的体外细胞毒性活性 (ng/mL)

[1035]

	霍奇金淋巴瘤	肾细胞癌	对照
	L428	786O	
h1F6- 43 (4dr/mAb)	404	11	1205
h1F6d- 43 (2dr/mAb)	最大抑制=40%	200	1625
h1F6d- 48 (2dr/mAb)	4093	89	1964
h1F6- 54 (4dr/mAb)	无影响	无影响	无影响
h1F6- 38 (2dr/mAb)	230 (n=2)	25 (n=3)	503

[1036] 具有来自苯胺连接的PBD二聚体的药物接头的ADC的体外细胞毒性活性。

[1037] 参考表8,显示了使用96小时测定获得的在CD70⁺细胞系上包含PBD二聚体的ADC的体外细胞毒性。针对CD70⁺细胞系Caki-1和L428以及CD70⁻细胞系测试了活性。所使用的抗体是在氨基酸重链位置239(按照EU编号系统)处具有引入的半胱氨酸残基的CD70抗体(人源化1F6)(表示为h1F6d)。与通过对-苯胺连接的可切割接头连接的ADC(化合物54)相比较,通过在邻位的胺通过不可切割接头连接PBD(化合物68)会显著降低活性。具有可切割接头的化合物73和85显示与化合物54可比较的活性;这两种化合物均通过对-苯胺连接。与化合物54相比较,具有需要更严格切割的可切割接头的化合物,化合物79和90,显示稍降低的活性。

[1038] 表8.在CD70⁺细胞系上体外细胞毒性活性 (ng/mL)

[1039]

	肾细胞癌	对照
	Caki-1	786-O
h1F6d- 68 (2dr/mAb)	3236	3486
h1F6d- 73 (2dr/mAb)	2	7
		482

[1040]

h1F6d- 79 (2dr/mAb)	24	348	5385
h1F6d- 54 (2dr/mAb)	6	17	4665
h1F6d- 85 (2dr/mAb)	3	5	4700
h1F6d- 90 (1.4dr/mAb)	...12	47	678

[1041] 具有来自苯胺连接的PBD二聚体的药物接头的ADC的体外细胞毒性活性。

[1042] 参考表9,显示了使用96小时测定获得的在CD70⁺细胞系上包含PBD二聚体的ADC的体外细胞毒性。针对CD70⁺细胞系Caki-1和L428以及两种CD70⁻白血病细胞系测试了活性。所使用的抗体是CD70抗体、人源化1F6(参见公开的美国申请号2009-148942)和在氨基酸重链位置239(按照EU编号系统)处具有引入的半胱氨酸残基的CD70抗体(人源化1F6)(表示为

h1F6d)。具有通过乙酰胺连接到抗体上的可切割接头的化合物56,显示与化合物38可比较的活性。在此测定中,间-苯胺连接的PBD二聚体的葡萄糖苷酸连接形式,化合物48,显示很少的活性。在PBD桥中具有5个亚甲基的化合物58,显示出与在PBD桥中具有3个亚甲基的化合物38可比较的活性。

[1043] 表9:在CD70⁺细胞系上的体外细胞毒性活性 (ng/mL)

[1044]

ADCs	肾细胞		白血病	
	Caki-1	786-O	CD70 ⁺ 系 1	CD70 ⁺ 系 2
	(CD70 #135,000)	(CD70 #190,000)		
h1F6d-56 (1.8dr/Ab)	3	6	1672	最大抑制=50%
h1F6d-48 (0.6dr/Ab)	最大抑制=45%	最大抑制=35%	无影响	无影响
h1F6d-58 (1.9dr/Ab)	0.5	2	1750	4847
	5	15		
h1F6d-38 (2dr/Ab)	(3-5, n=4)	(5-30, n=4)	2082	7188

[1045] 实施例16:确定选择的结合物的体内细胞毒性

[1046] 按照动物管理和使用委员会规定在由实验动物评估和认可管理协会完全授权的设施中进行所有研究。首先评估体内耐受性以确保在临床相关剂量下结合物是耐受的。用在含有0.01% Tween 20的PBS中配制的不断提高剂量的ADC来治疗BALB/c小鼠。在药物治疗之后,针对重量减轻监测小鼠;将体重减轻20%或患病的其他迹象的那些小鼠安乐处死。所使用的抗体是CD70抗体、人源化1F6 (参见公开的美国申请号2009-148942) 和CD30抗体、嵌合AC10 (参见公开的美国申请号2008-0213289)。

[1047] 参考图1,显示了使用cAC10-val-ala-SG3132 (2) (cAC10-化合物38) 体重减轻研究的结果 (在IV或IP交错开始之后的给药方案)。以5mg IP或IV给药给予单剂量结合物导致很少的体重减轻。更高剂量的结合物 (15mg/kg) 在小鼠体内引起体重减轻。

[1048] 参考图2,显示了使用h1F6-val-ala-SG3132 (2) (h1F6-化合物38) 体重减轻研究的结果 (在IP交错开始之后的给药方案)。以5mg IP给药给予单剂量结合物导致一定程度体重减轻。更高剂量的结合物 (10mg/kg) 在小鼠体内引起显著体重减轻。

[1049] 在两个CD70⁺肾细胞癌异种移植模型中进行治疗研究。将肿瘤 (786-O和Caki-1) 片段植入裸鼠的右侧腹。在第8天 (786-O) 或第9天 (Caki-1) 将小鼠随机分配到研究组 (n=5) 中,每组平均约100mm³。按照q4dx4时间表,ip给予ADC或对照。使用公式 $(L \times W^2) / 2$ 来确定肿瘤体积 (为时间的函数)。当肿瘤体积达到1000mm³时,将动物安乐处死。在植入后约100天终止显示持久消退的小鼠。

[1050] 参考图3,显示了使用h1F6-val-ala-SG3132 (2) (h1F6-化合物38) 结合物获得的治疗研究结果 (h1F6-val-ala-SG3132 (2) 对裸鼠体内786O肾细胞癌肿瘤的效力)。还使用对照结合物,cAC10-val-ala-SG3132 (2) (cAC10-化合物38)。以0.1mg/kg给予h1F6结合物的小鼠显示一定程度的肿瘤减小,而以0.3mg/kg和1mg/kg更高剂量给药看起来显示完全地肿瘤减

小。与h1F6结合物相比较,对照结合物(未结合)具有较小活性。

[1051] 参见图4,显示了使用h1F6-mc-val-ala-SG3132 (2) (h1F6-化合物38) 结合物获得的治疗研究结果(h1F6-1902 (2) 对雌性裸鼠体内Caki1 (RCC) 肿瘤的效力)。还使用对照结合物,cAC10-mc-val-ala-SG3132 (2) (cAC10-化合物38)。以1mg/kg给予h1F6结合物的小鼠看起来显示完全地肿瘤减小。分别地以0.3mg/kg和0.1mg/kg给予更低剂量的小鼠显示较小的肿瘤减小。与以类似剂量给予h1F6结合物相比较,对照结合物(未结合)具有较少活性,虽然与以更低剂量给予h1F6结合物相比较,它显示更高的活性。与以更高剂量给予h1F6-vc-MMAE结合物(公开的美国申请号2009-0148942) 相比较,h1F6结合物也具有更高的活性。

[1052] 参考图5,显示了与双加载的未结合对照,结合到相同化合物上(h00d-38)的H00d相比较,使用连接到化合物38上的双加载抗体h1F6d (h1F6d-38) 获得的治疗研究结果(在患有皮下Caki1肿瘤的裸鼠体内h1F6d-38ADC的活性)。模型是裸鼠体内的Caki皮下模型。剂量是0.1、0.3和1mg/kg q7dX2。h1F6结合物的最高的两个剂量显示完全消退(为1mg/kg),并且在0.3mg/kg下显示显著的肿瘤延迟。在1mg/kg剂量下,未结合的对照显示肿瘤延迟。

[1053] 参考图6,显示了与双加载的未结合对照,结合到相同化合物上的H00d (h00d-38) 相比较,使用连接到化合物38上的双加载抗体h1F6d (h1F6d-38) 的治疗研究结果(在患有皮下786-0肿瘤的裸鼠体内h1F6d-38 ADC的活性)。模型是裸鼠体内的786-0皮下模型。剂量是0.1、0.3和1mg/kg q7dX2。h1F6结合物的所有三种剂量都显示完全消退或肿瘤延迟,而未结合的对照显示肿瘤延迟。

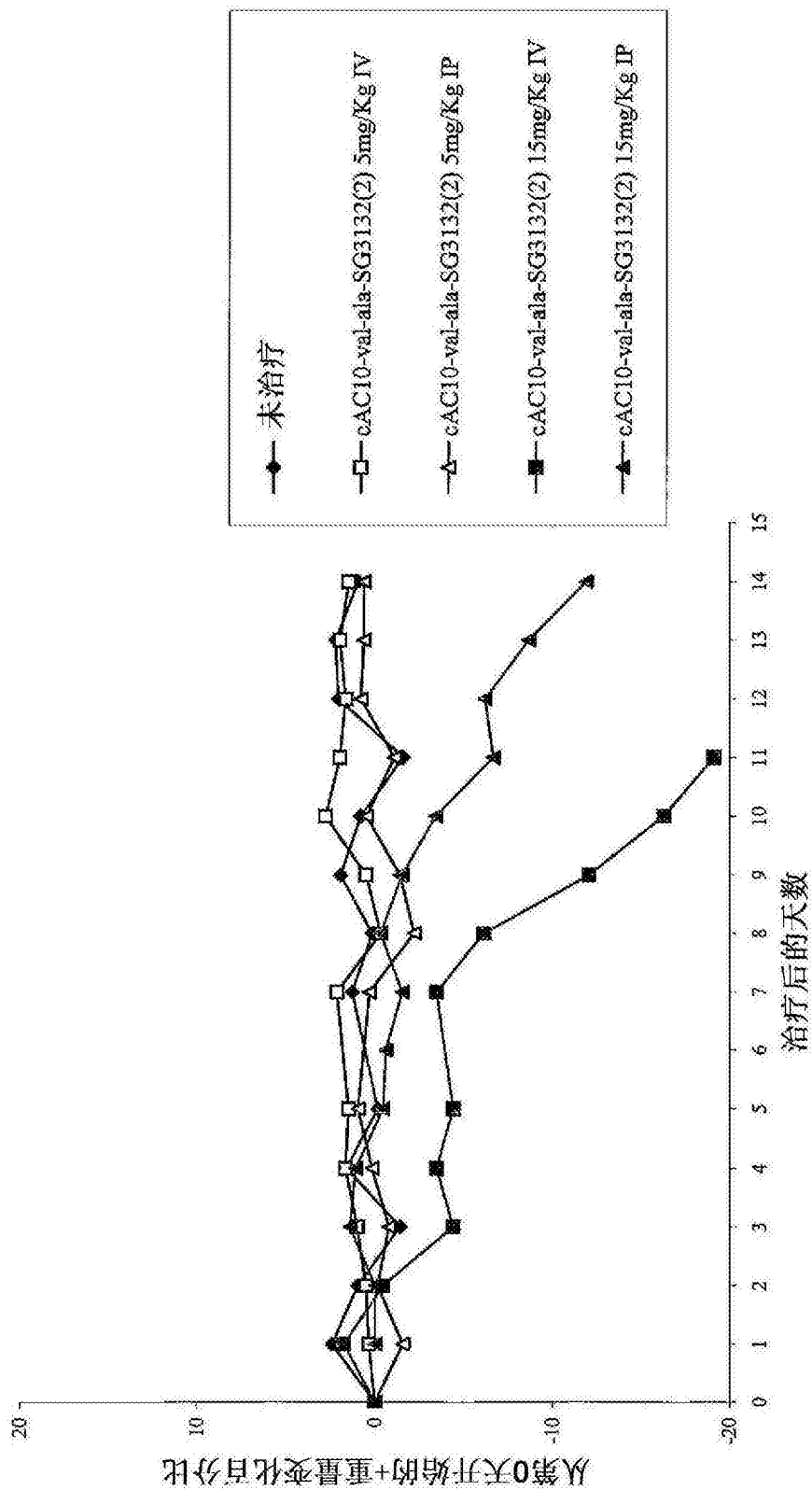


图1

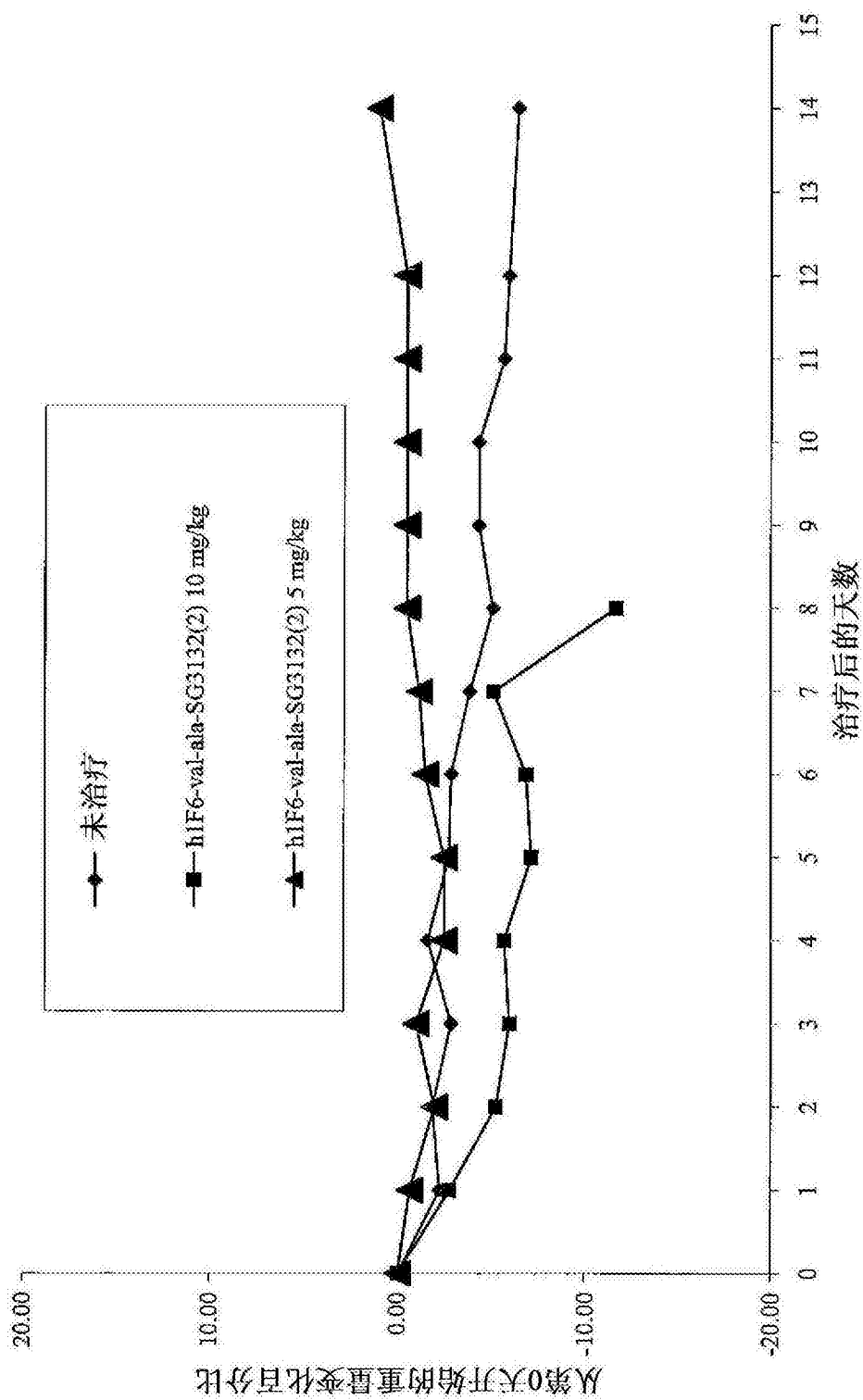


图2

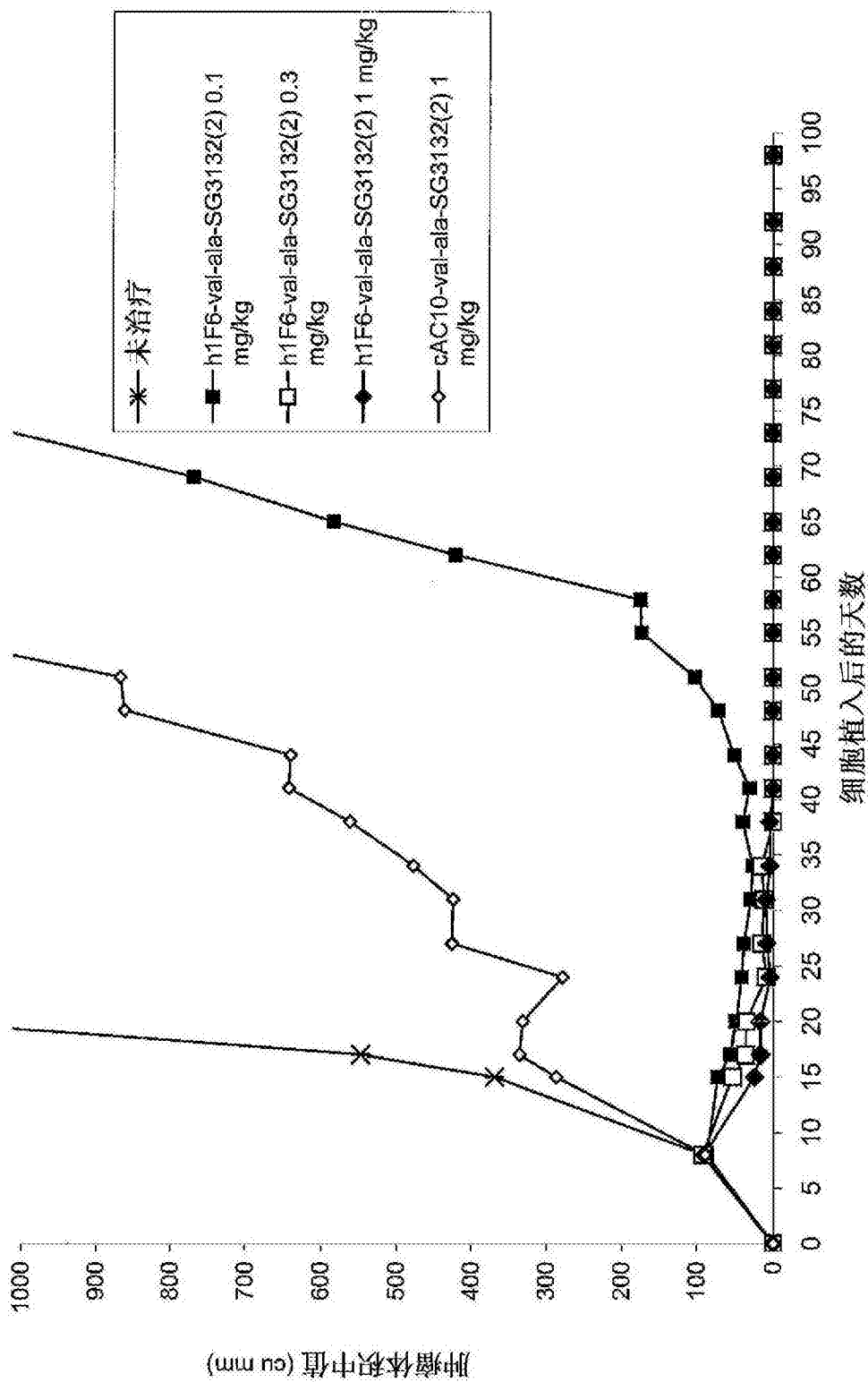


图3

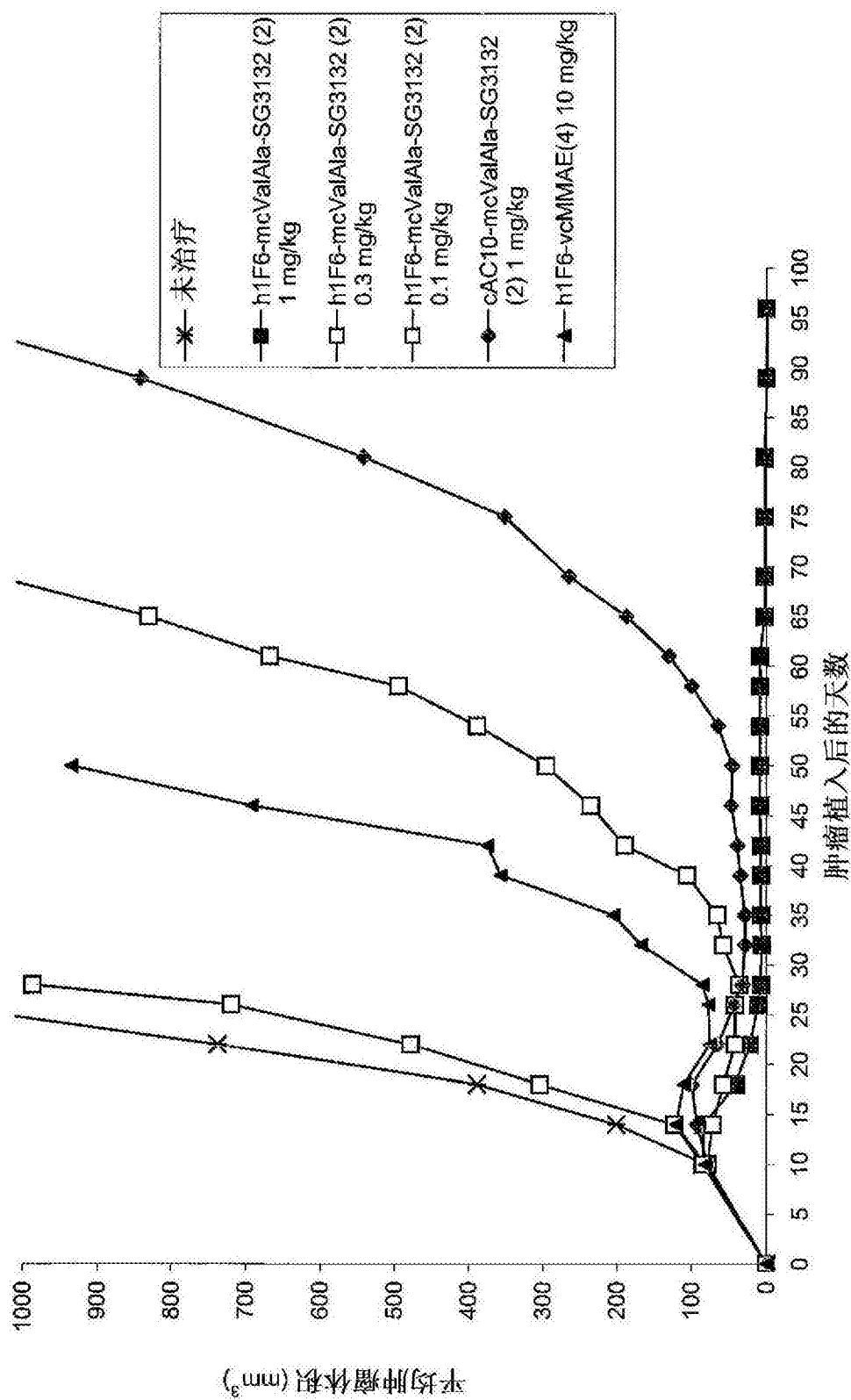


图4

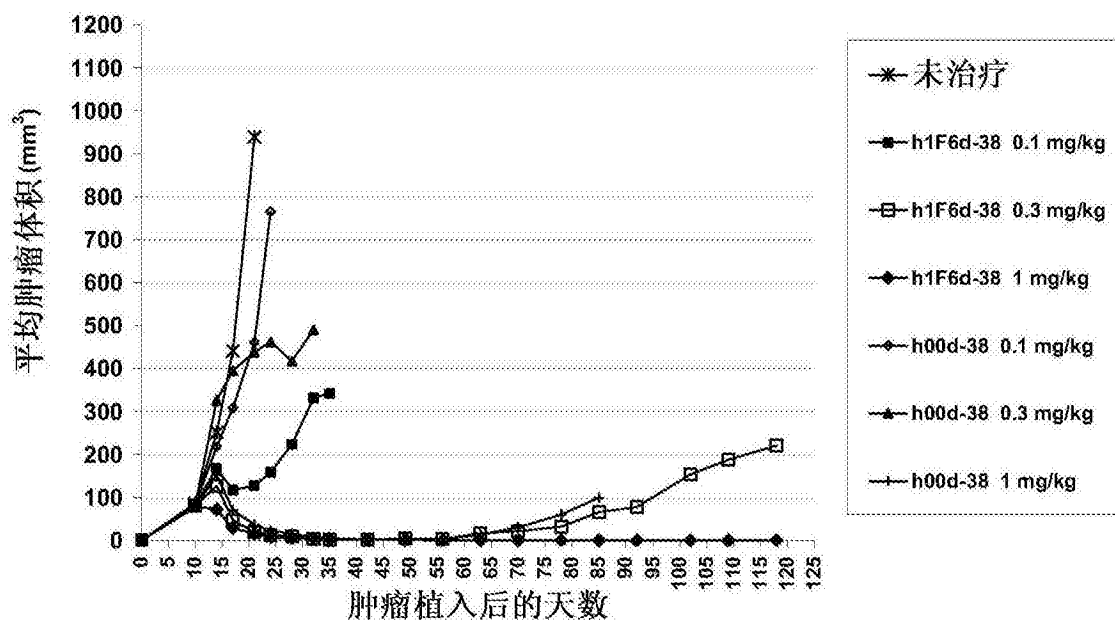


图5

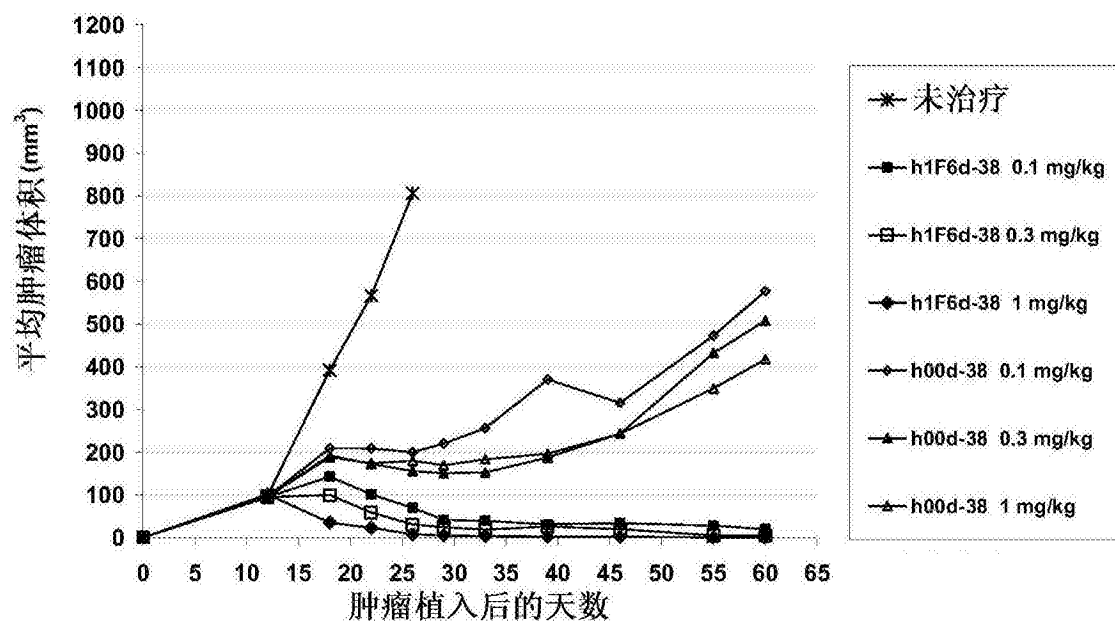


图6