(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2016 年 8 月 18 日 (18.08.2016)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2016/127790 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 47/48 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/072129

(22) 国际申请日: 2016 年 1 月 26 日 (26.01.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201510083765.0 2015 年 2 月 15 日 (15.02.2015) CN

(71) 申请人: **江苏恒瑞医药股份有限公司 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.)** [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。 **上海恒瑞医药有限公司 (SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)** [CN/CN]; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。

(72) 发明人: **许建烟 (XU, Jianyan)**; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。 **章瑛 (ZHANG, Ying)**; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。 **屈博磊 (QU, Bolei)**; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。 **张富尧 (ZHANG, Fuyao)**; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。 **于秀招 (YU, Xiuzhao)**; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。 **梁金栋 (LIANG, Jindong)**; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。 **蒋贵阳 (JIANG, Guiyang)**; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。 **张连山 (ZHANG, Lianshan)**; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。 **李昂 (LI, Ang)**; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。 **王亚里 (WANG, Yali)**; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。

(74) 代理人: **北京戈程知识产权代理有限公司 (GE CHENG & CO.,LTD.)**; 中国北京市东城区东长安街 1 号东方广场东三办公楼 19 层程伟, Beijing 100738 (CN)。

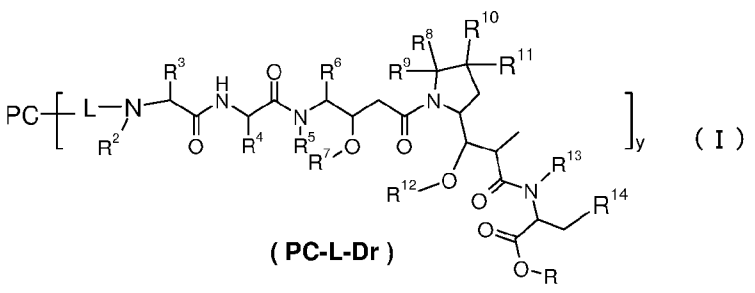
(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
— 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: LIGAND-CYTOTOXICITY DRUG CONJUGATE, PREPARING METHOD THEREFOR, AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称 : 配体-细胞毒性药物偶联物、其制备方法及其应用



(PC-L-Dr)

(I)

(57) Abstract: Provided are a ligand-cytotoxicity drug conjugate with a general formula of PC-L-Dr, a preparing method therefor, and applications of the ligand-cytotoxicity drug conjugate and pharmaceutical compositions comprising the same in preparing drugs for treating cancers by means of receptor regulation.

(57) 摘要: 提供了一种通式（I）为 PC-L-Dr 的配体-细胞毒性药物偶联物，其制备方法以及该配体-细胞毒性药物偶联物及含有其的药物组合物通过受体调节在制备治疗癌症的药物中的用途。

WO 2016/127790 A1

配体-细胞毒性药物偶联物、其制备方法及其应用

技术领域

本发明涉及一类全新结构的配体-细胞毒性药物偶联物。具体地说，本发明涉及抗体-细胞毒性药物偶联物，也涉及本发明偶联物的制备方法、包含所述偶联物的药物组合物以及所述偶联物或药物组合物的用途。

背景技术

化疗依然是包括手术、放疗、以及靶向治疗法在内的最重要的抗癌手段之一。尽管高效细胞毒素的种类很多，但是肿瘤细胞和正常细胞之间差别很小，限制了这些抗肿瘤化合物由于毒副作用在临床上的广泛应用。而抗肿瘤单克隆抗体对于肿瘤细胞表面抗原的特异性，抗体药物已成为抗肿瘤治疗的前线药物，但单独使用抗体作为抗肿瘤药物时，疗效经常不尽人意。

抗体药物偶联物（antibody drug conjugate，ADC）把单克隆抗体或者抗体片段通过稳定的化学接头化合物与具有生物活性的细胞毒素相连，充分利用了抗体对正常细胞和肿瘤细胞表面抗原结合的特异性和细胞毒素的高效性，同时又避免了前者疗效偏低和后者毒副作用过大等缺陷。这也就意味着，与以往传统的化疗药物相比，抗体药物偶联物能精准地结合肿瘤细胞并降低将对正常细胞的影响。

早期的 ADC 药物主要使用鼠源的单抗，因为人类的免疫反应造成一部分药物难以到达标靶。其次，早期使用的包括阿霉素（doxorubicin）在内的效应分子的生物活性较低，限制了第一代抗体药物偶联物的疗效。除此之外，抗体的来源、接头连接的方式和数目也未得到优化。

2013 年 2 月，Kadcyla®（ado-trastuzumab emtansine，T-DM1）获得美国 FDA 批准，用于治疗 HER2 阳性同时对曲妥珠单抗（Trastuzumab，商品名：Herceptin® 和紫杉醇有抗药性的晚期或转移性乳腺癌患者。Mylotarg®和 Adcetris®都是针对血液肿瘤进行靶向治疗，和固体肿瘤相比组织结构相对简单。Kadcyla®是美国 FDA 批准的治疗固体肿瘤的第一个 ADC 药物。

Kadcyla®采用 ImmunoGen 的技术将高活性的有丝分裂抑制剂 DM1 用一个稳定的硫醚健接头连到罗氏公司的曲妥珠单抗上，平均一个曲妥珠单抗结合大约 3.5 个 DM1，曲妥珠单抗在病人体内特异性结合乳腺癌细胞，被细胞内吞后在细胞内断裂释放出 DM1，DM1 在细胞内的聚集浓度足以导致细胞因有丝分裂障碍而死亡，肿瘤灶随之消退。T-DM1 既保留了 Herceptin®的抗体依赖性的细胞增殖抑制作用，同时又增加了潜在的细胞毒素药物的效应。而且因为其毒素靶向在肿瘤细胞内释放，药物毒副作用并没有随着疗效的增加而同步增大。

帕妥珠单抗（Pertuzumab，也被称作 2C4，商品名 Perjeta）是一种重组人源化单克隆抗体，它是第一个被称作“HER 二聚化抑制剂”的单克隆抗体。通过结合

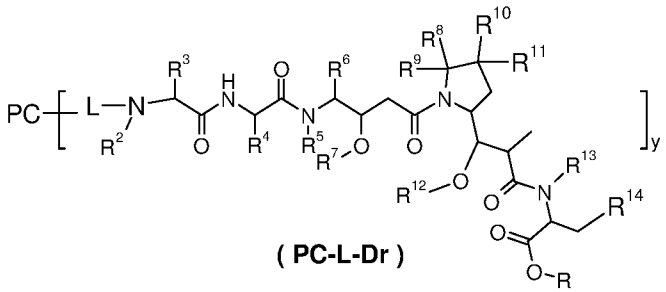
HER2 阻滞了 HER2 与其它 HER 受体的二聚化作用。帕妥珠单抗已经被证实在 HER2 高表达及低表达的前列腺癌等模型上均有抑制肿瘤生长的作用。

与曲妥珠单抗（Trastuzumab,商品名 Herceptin）结合位点位于 HER2 胞外区的近膜区 IV 亚域上抑制下游信号通路不同，帕妥珠单抗则是通过结合在 II 域（二聚化域）有效抑制 HER2 的异源二聚化反应。因此，曲妥珠单抗只能对 HER2 过表达的癌症患者尤其是乳腺癌患者有一定疗效，而帕妥珠单抗虽然和曲妥珠单抗作用同一靶点，且二者有同样的内吞特点，但因其作用机理不同，在抑制二聚化后可以切断由 ErbB 家族受体介导的信号通路，可能会有比单独阻断 HER2 信号通路更广泛的应用范围。

目前 ADC 药物的偶联技术主要有两种：T-DM1 采用的是将细胞毒性药物与抗体的自由氨基随机偶联；而 Adcetris®采用的是将细胞毒性药物和抗体铰链区还原后的自由巯基偶联。两种偶联方法都产出了载药量数不一致的混合物。如 T-DM1 虽然平均载药量是 3.5，但载药量的分布可从 0~8。过低的载药量影响了 ADC 的药效，而过高的载药量则更容易因对抗体的过分修饰而导致 ADC 药物被组织的巨噬细胞体系识别并破坏。这不仅减低了 ADC 的半衰期也因为毒素在非靶点组织的积累而增加毒性副作用；而 Adcetris®用还原剂将抗体铰链区的二硫键进行还原，对抗体本身的稳定性产生一定影响。相关的 ADC 药物专利有 WO2007008603 、 WO2013173393 、 WO2005081711 、 WO2013173391 、 WO2013173392、WO2013173393 和 WO2012010287。本发明提供一种有新型连接方式，新的毒素与抗体组合，从而有更有益效果的新的 ADC 化合物。

发明内容

为了改进配体，特别是抗体和药物的偶联效果，本发明提供了一种包含改进的连接单元的通式化合物(PC-L-Dr) 或其药学上可接受的盐或溶剂化合物：



(PC-L-Dr)

其中：

R，R^2-R^7 选自氢原子、卤素、羟基、氰基、烷基、烷氧基和环烷基；

R^8-R^{11} 中至少一个选自卤素、烯基、烷基和环烷基，其余为氢原子；

或者 R^8-R^{11} 之中的任意两个形成环烷基，余下的两个基团任选自氢原子、烷基和环烷基；

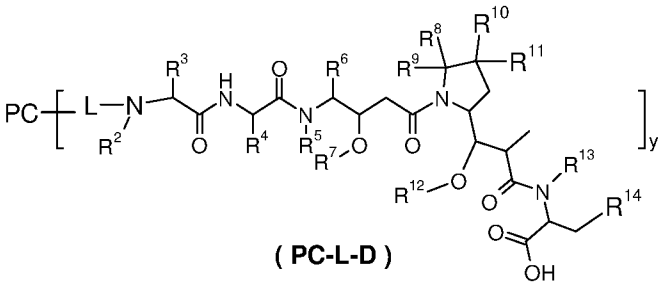
R^{12}-R^{13} 选自氢原子、烷基或卤素；

R^{14} 选自芳基或杂芳基，所述的芳基或杂芳基任选进一步被选自氢原子、卤素、羟基、烷基、烷氧基和环烷基的取代基所取代；

y 为 1-8，优选 2-5；y 为正实数，可以为整数或小数；

PC 为配体；L 为接头单元。

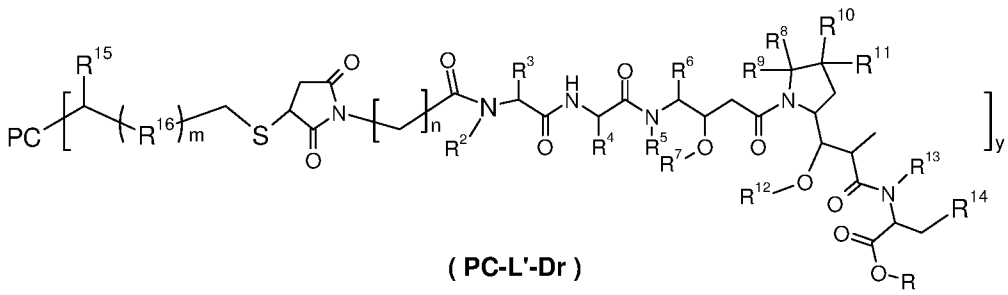
在本发明另一个优选方案中，一种通式(PC-L-Dr)所示的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，其为通式(PC-L-D)所示的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物：



(PC-L-D)

其中，R^2-R^{14} 定义如通式（PC-L-Dr）中所定义。

在本发明另一个优选方案中，一种通式(PC-L-Dr)所示的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，其为通式(PC-L'-Dr)所示的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物：



(PC-L'-Dr)

其中：

R^{15} 选自氢原子、卤素、羟基、氰基、烷基、烷氧基和环烷基；

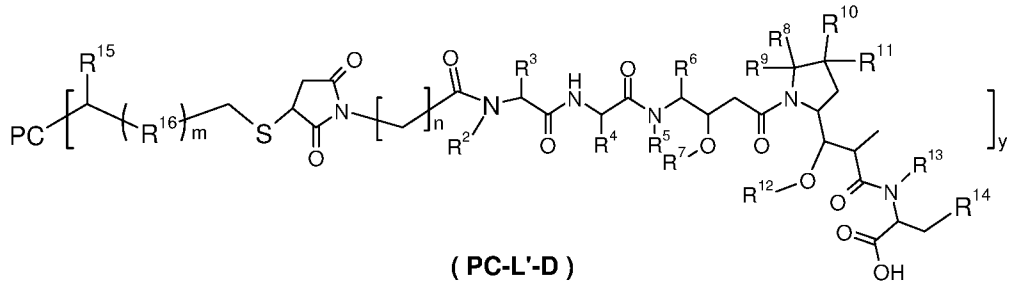
R^{16} 选自烷基、环烷基、烷氧基和杂环基；

n 为 2-6，优选 2-5；

m 为 0-5，优选 1-3；

PC，y，n，R，R^2-R^{14} 如通式(PC-L-Dr)中所定义。

在本发明另一个优选方案中，一种通式(PC-L-Dr)所示的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，其为通式(PC-L'-D)所示的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物：



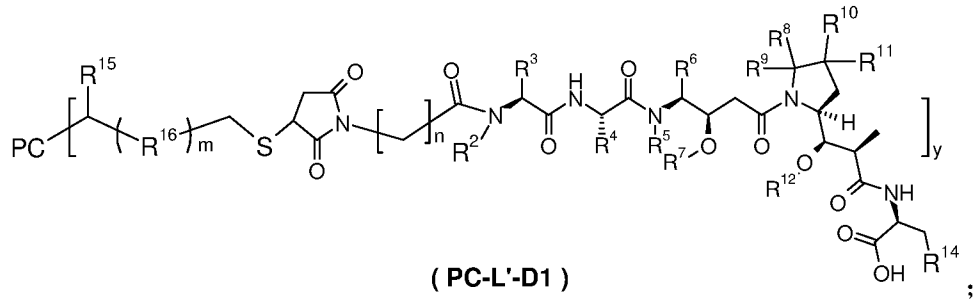
(PC-L'-D)

其中：

R^{15}，R^{16}，m 如通式(PC-L'-Dr)中所定义；

PC，y，n，R^2-R^{14} 如通式(PC-L-Dr)中所定义。

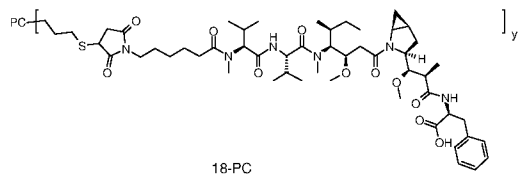
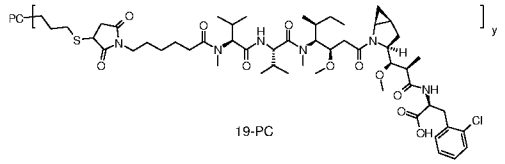
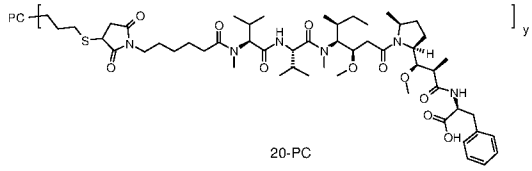
在本发明另一个优选方案中，一种通式(PC-L'-D)所示的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，其为通式(PC-L'-D1)所示的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物：

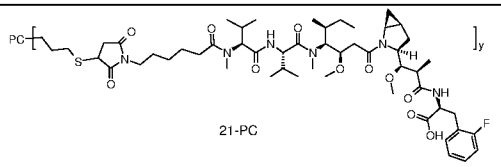
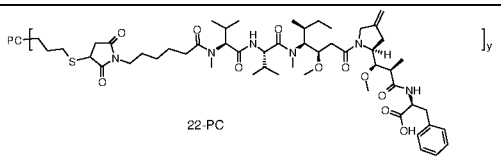
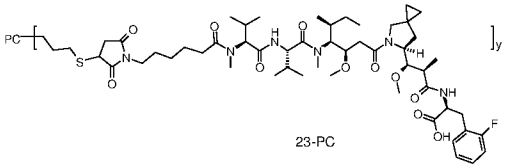
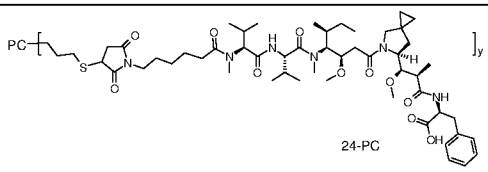
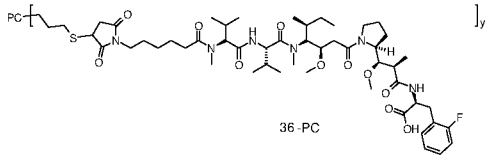
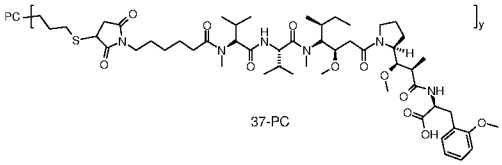
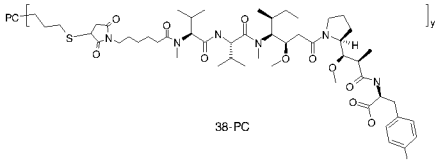
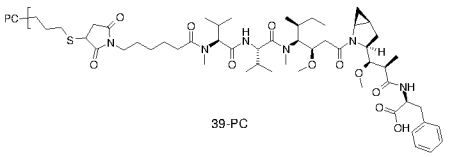
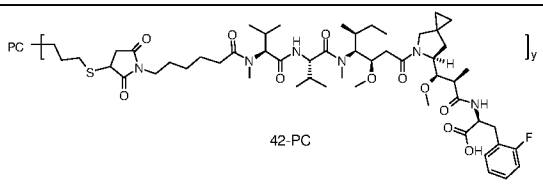
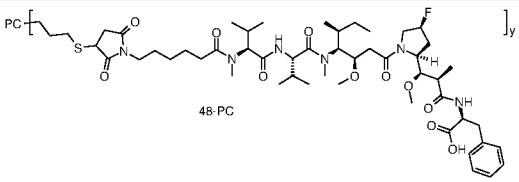


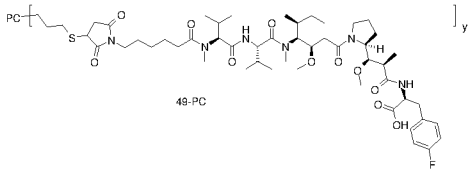
(PC-L'-D1)；

其中 PC，y，n，m，R^2-R^{16} 如通式(PC-L'-D)中所定义。

本发明的配体药物偶联物 ADC 化合物包括，但不限于：

结构	前体药物（D）/（L1-D）实施例
 18-PC	1/4
 19-PC	2/5
 20-PC	3/6

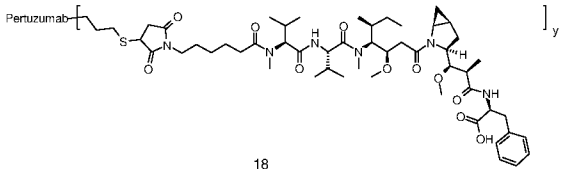
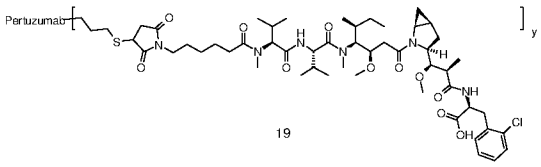
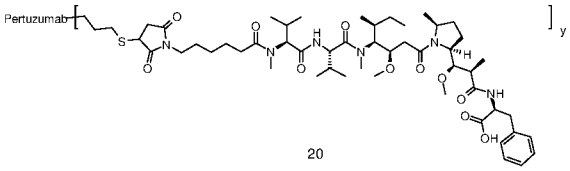
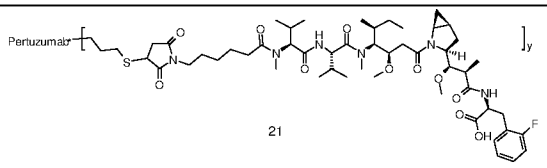
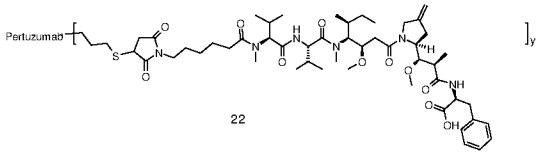
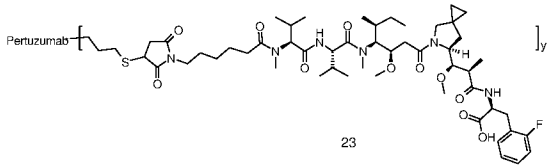
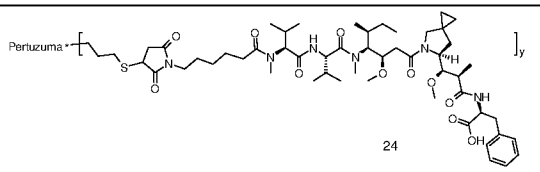
 21-PC	7/8
 22-PC	9/10
 23-PC	11/12
 24-PC	13/14
 36-PC	25/26
 37-PC	27/28
 38-PC	29/30
 39-PC	1/4
 42-PC	11/12
 48-PC	44/45

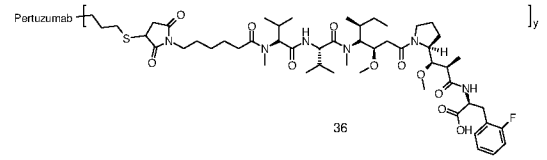
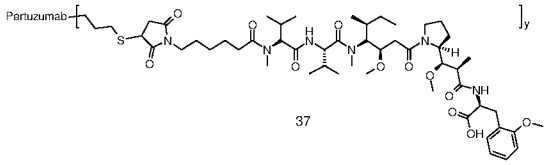
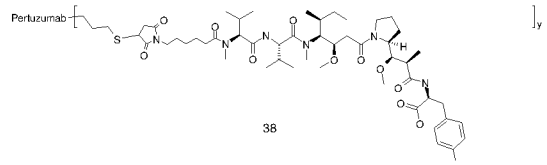
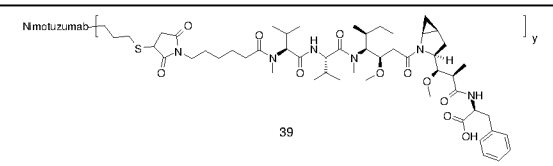
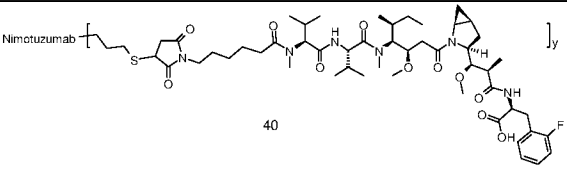
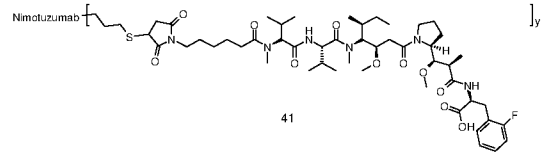
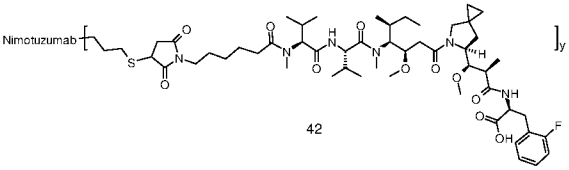
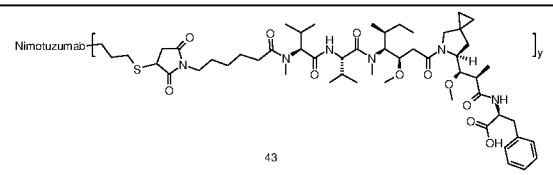
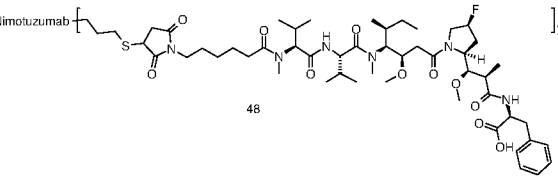
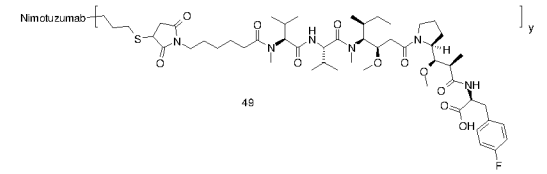
 49-PC	46/47

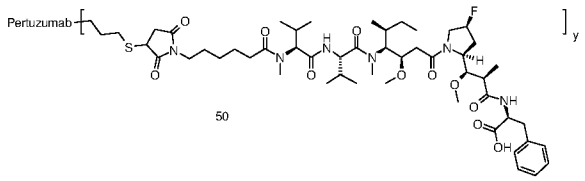
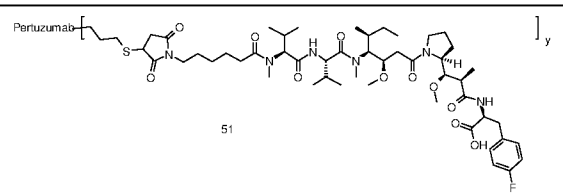
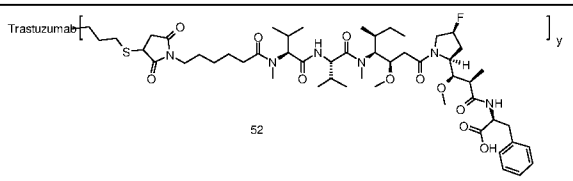
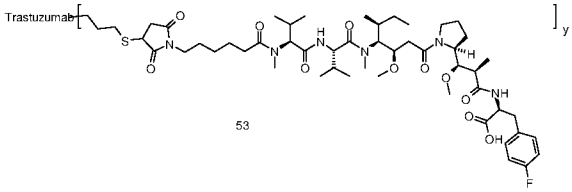
或其药学上可接受的盐或溶剂化合物。

在本发明另一个优选方案中，一种通式(PC-L-Dr)所示的化合物，其中 PC 为抗体，优选自帕妥珠单抗（Pertuzumab）、尼妥珠单抗（Nimotuzumab）和曲妥珠单抗（Trastuzumab）。

本发明的典型配体药物偶联物 ADC 化合物包括，但不限于：

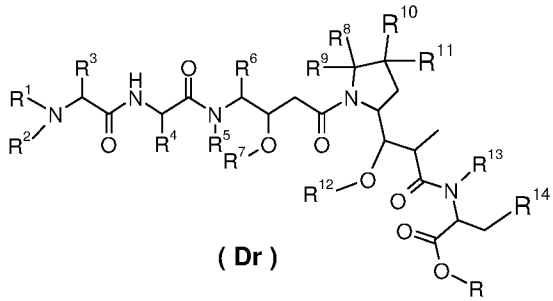
实施例	结构	前体药物（D）/（L1-D）实施例
18	 18	1/4
19	 19	2/5
20	 20	3/6
21	 21	7/8
22	 22	9/10
23	 23	11/12
24	 24	13/14

36		25/26
37		27/28
38		29/30
39		1/4
40		7/8
41		25/26
42		11/12
43		13/14
48		44/45
49		46/47

50		44/45
51		46/47
52		44/45
53		46/47

或其药学上可接受的盐或溶剂化合物。

本发明进一步提供一种通式(Dr)所示的化合物：



(Dr)

或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、或其混合物形式，或其可药用的盐，可用于作为制备通式(PC-L-Dr)所示化合物的前药；其中：

R，R^1-R^7选自氢原子、卤素、羟基、氰基、烷基、烷氧基和环烷基；

R^8-R^{11}中至少一个选自卤素、烯基、烷基和环烷基，其余为氢原子；

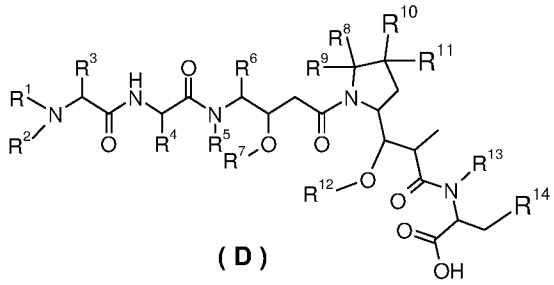
或者 R^8-R^{11}之中的任意两个形成环烷基，余下的两个基团任选自氢原子、烷基和环烷基；

R^{12}-R^{13}选自氢原子、烷基或卤素；

R^{14}选自芳基或杂芳基，所述的芳基或杂芳基任选进一步被且选自氢原子、卤素、羟基、烷基、烷氧基和环烷基的取代基所取代。

在本发明另一个优选方案中，一种通式(Dr)所示的化合物，其为通式(D)所示

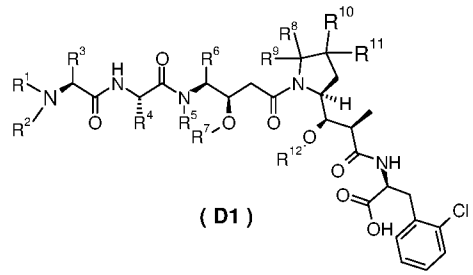
的化合物：



(D)

或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、或其混合物形式，或其可药用的盐，其中：R^1-R^{14} 如通式(Dr)中所定义。

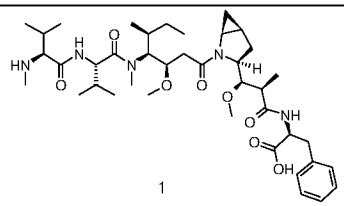
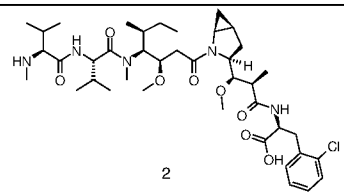
在本发明另一个优选方案中，一种通式(Dr)所示的化合物，其为通式(D1)所示的化合物：

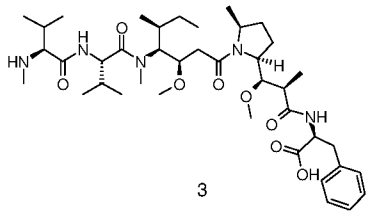
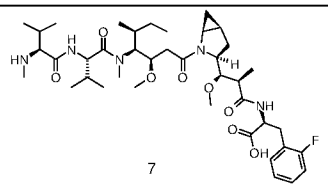
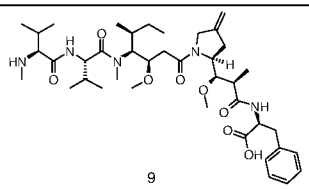
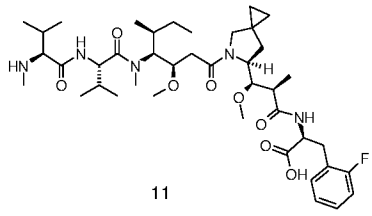
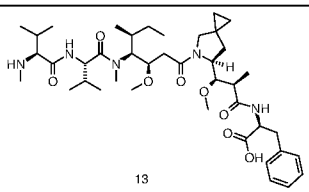


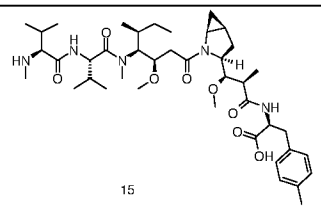
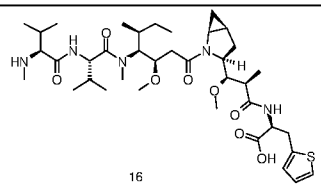
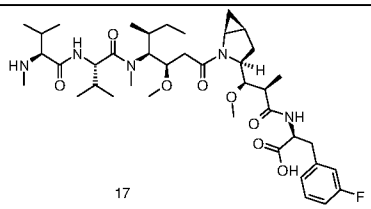
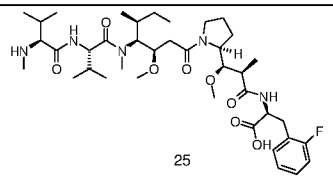
(D1)

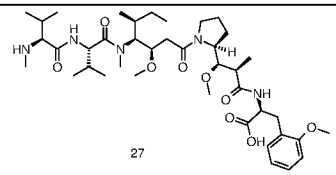
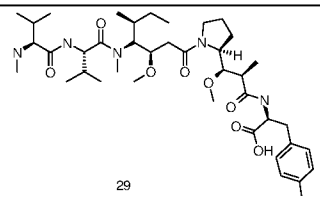
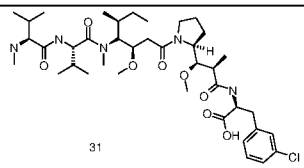
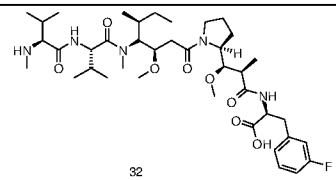
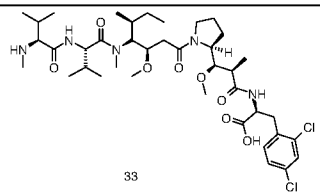
或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、或其混合物形式，或其可药用的盐，其中：R^1-R^{14} 如通式(D)中所定义。

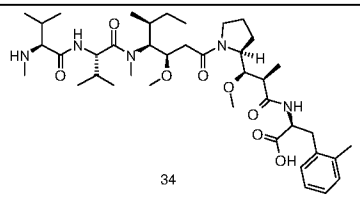
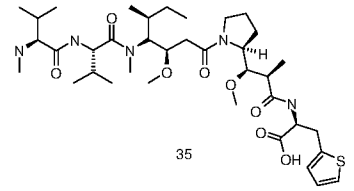
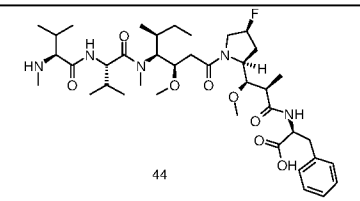
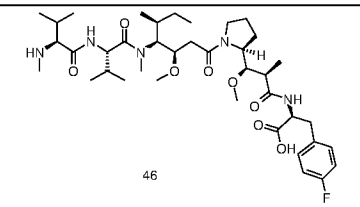
本发明的配体药物偶联物 ADC 的典型前药化合物包括，但不限于：

实施例编号	结构与命名
1	 1
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸
2	 2
	(*S*)-3-(2-氯苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲

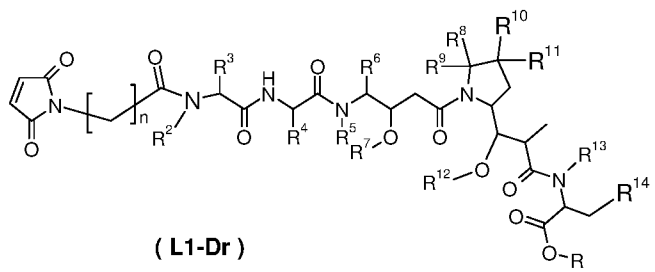
	基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)丙酸
3	 3
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,5*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸
7	 7
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸
9	 9
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰胺)-4-亚甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸
11	 11
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸
13	 13

	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸
15	 15
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(对-甲苯基)丙酸
16	 16
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(噻吩-2-基)丙酸
17	 17
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(3-氟苯基)丙酸
25	 25
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸

27	 27
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰基)-3-(2-甲氧基苯基)丙酸
29	 29
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*R*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(对甲苯基)丙酸
31	 31
	(*S*)-3-(3-氯苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*R*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)丙酸
32	 32
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*R*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(3-氟苯基)丙酸
33	 33
	(*S*)-3-(2,4-二氯苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*R*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)丙酸

34	 34
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(邻甲苯基)丙酸
35	 35
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*R*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰基)丁酰基)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(噻吩-2-基)丙酸
44	 44
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-4-氟吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸
46	 46
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(4-氟苯基)丙酸

本发明进一步提供一种通式(L_1-Dr)所示的化合物：



(L1-Dr)

可用于制备通式（PC-L'-D）的中间体，其中

n 为 2-6，优选 2-5；

R，R^1-R^7 选自氢原子、卤素、羟基、氰基、烷基、烷氧基和环烷基；

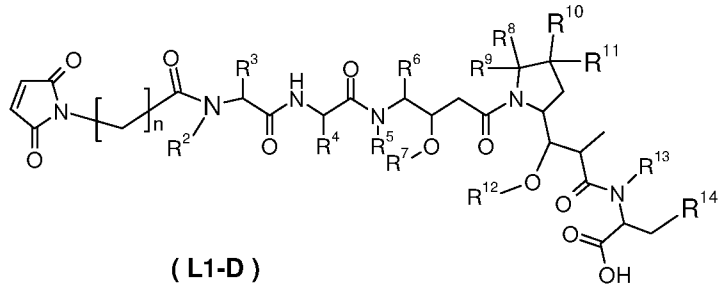
R^8-R^{11} 中至少一个选自卤素、烯基、烷基和环烷基，其余为氢原子；

或者 R^8-R^{11} 之中的任意两个形成环烷基，余下的两个基团任选自氢原子、烷基和环烷基；

R^{12}-R^{13} 选自氢原子、烷基或卤素；

R^{14} 选自芳基或杂芳基，所述的芳基或杂芳基任选进一步被且选自氢原子、卤素、羟基、烷基、烷氧基和环烷基的取代基所取代。

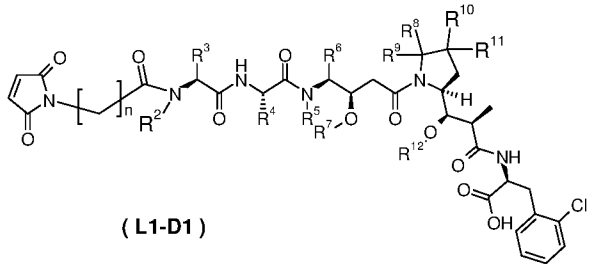
在本发明另一个优选方案中，一种通式(L1-Dr)所示的化合物，其为通式(L1-D)所示的化合物：



(L1-D)

其中 n，R^2-R^{14} 如通式(L1-Dr)中所定义。

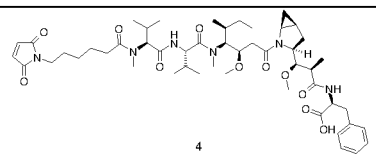
在本发明另一个优选方案中，一种通式(L_1-D)所示的化合物，其为一种通式(L_1-D1)所示的化合物：

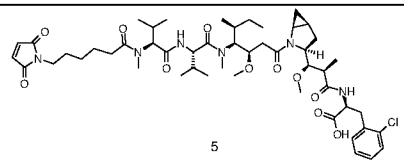
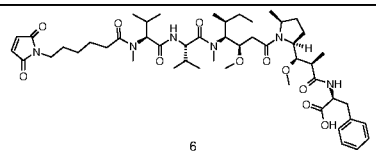
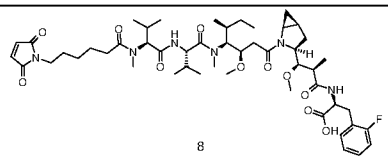
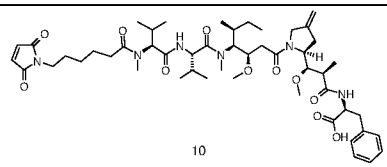
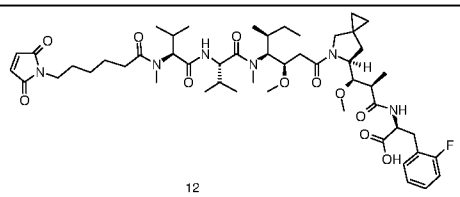


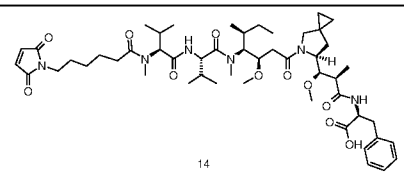
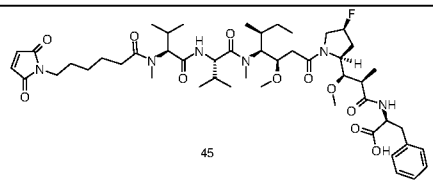
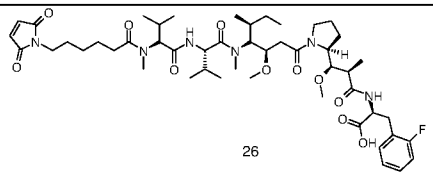
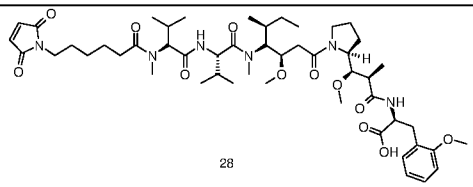
(L1-D1)

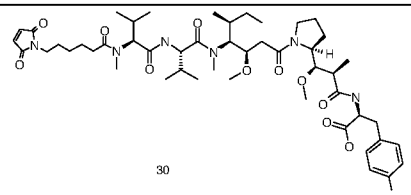
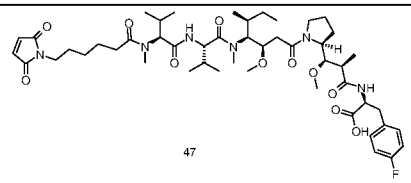
其中 n，R^1-R^{12} 如通式(L_1-D)中所定义。

本发明的配体药物偶联物 ADC 的典型前药化合物（带部分接头单元），可用于制备本发明配体药物偶联物的中间体，包括，但不限于下列化合物：

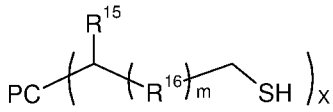
实施例编号	结构与命名
4	 4
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰

	胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸
5	 5
	(*S*)-3-(2-氯苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)丙酸
6	 6
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,5*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸
8	 8
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸
10	 10
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-4-亚甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸
12	 12

	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸
14	 14
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸
45	 45
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-4-氟吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸
26	 26
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*R*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*R*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸
28	 28
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*R*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*R*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-甲氧基苯基)丙酸

30	 30
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(对甲苯基)丙酸
47	 47
	(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(4-氟苯基)丙酸

本发明进一步提供一种通式(PC-L_2)所示的化合物：



(PC-L2)

其中

PC 配体，优选为抗体，更优选为帕妥珠单抗（Pertuzumab）、尼妥珠单抗（Nimotuzumab）或曲妥珠单抗（Trastuzumab）；

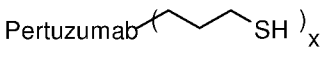
R^{15}选自氢原子、卤素、羟基、氰基、烷基、烷氧基和环烷基；

R^{16}选自烷基、环烷基、烷氧基和杂环基；

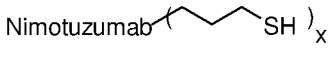
m 为 0-5，优选 1-3；

X 为 0-5，优选 1-3，x 为正实数，包括小数和整数。

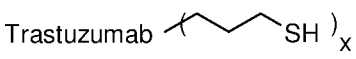
在本发明另一个优选方案中，一种通式(PC-L_2)所示的化合物，其选自：



18c



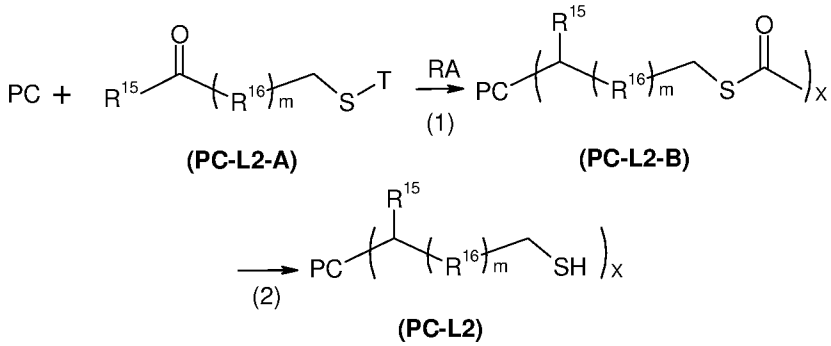
39c 和



52c 。

本发明进一步提供一种制备如通式（PC-L_2）所示的化合物的方法，其包括如

下步骤：



1) 向 PC 与通式（PC-L2-A）化合物中加入还原剂 RA，进行反应，得到通式（PC-L2-B）化合物；RA 优选为氰基硼氢化钠或三乙酰氧基硼氢化钠，更优选为氰基硼氢化钠；

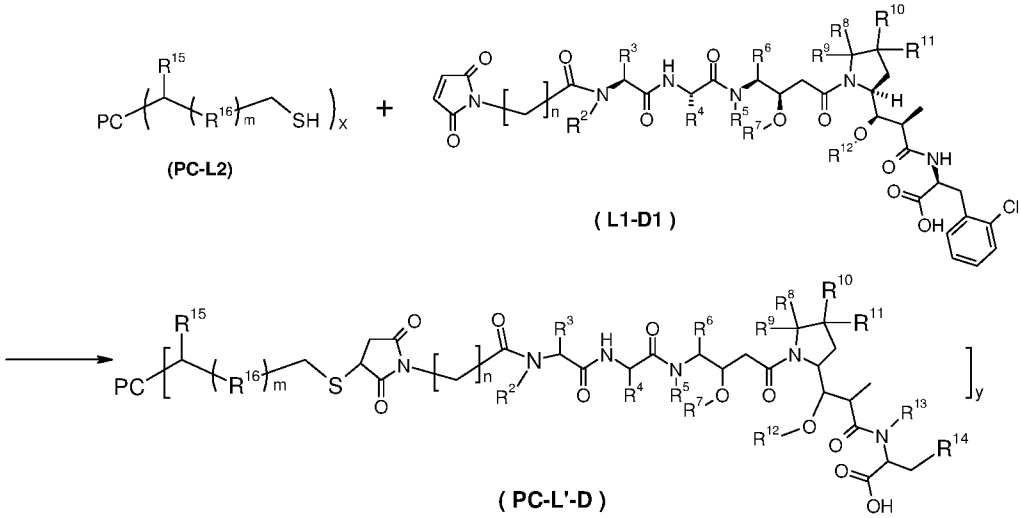
2)向通式（PC-L2-B）化合物中加入脱保护剂脱去巯基保护基，得到通式（PC-L2）化合物；

T 选自 H、叔丁基、乙酰基、正丙酰基、异丙酰基、三苯基甲基、甲氧基甲基、2-(三甲硅烷基)乙氧甲基，优选为 H 或乙酰基；

（PC-L2-A）化合物优选为硫代乙酸 S-（3-羰基丙基）酯；

其中 PC，R^{15}，R^{16}，m，x 如通式（PC-L2）中所定义。

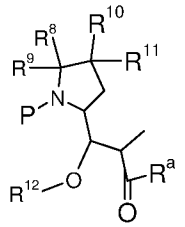
本发明进一步提供一种制备通式(PC-L'-D)所示的化合物的方法，该方法包括：



通式(PC-L2)化合物与通式(L1-D1)化合物反应，得到通式(PC-L'-D)化合物；

其中：PC，m，n，y，R^2～R^{16} 如通式(PC-L'-D)中所定义。

本发明进一步提供一种通式(D-A a)所示的化合物：



(D-Aa)

或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、或其混合物形式，或其可药用的盐，可作为合成本发明的配体药物偶联物 ADC 的典型前药化合物的中间体，其中：

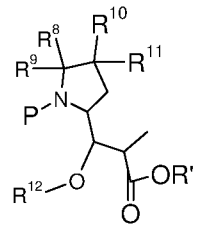
R^8-R^{11} 之中的任意两个形成环烷基，余下的两个基团任选自氢原子、烷基和环烷基；

R^{12} 选自氢原子、烷基或卤素；

P 为氢原子或保护基，所述的保护基优选 Boc，Bn，Cbz，最优选 Boc;

R^a 选自羟基，氨基，烷氧基，环烷氧基或烷氨基。

本发明进一步提供一种通式(D-Aa)所示的化合物，其为通式(D-A)所示的化合物：



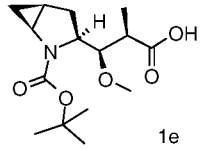
(D-A)

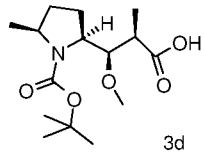
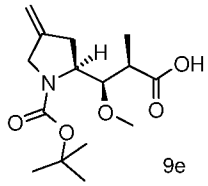
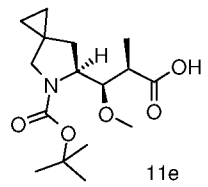
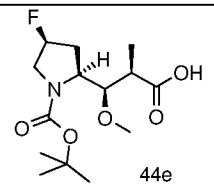
或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、或其混合物形式，或其可药用的盐，可作为合成本发明的配体药物偶联物 ADC 的典型前药化合物的中间体，其中：

R^8-R^{12}，P 之中的任意两个形成环烷基，余下的两个基团任选自氢原子、烷基和环烷基；

R’选自氢原子，烷基，环烷基。

本发明的配体药物偶联物 ADC 的典型前药化合物的中间体(D-Aa) 或(D-A) 包括，但不限于：

实施例编号	结构与命名
1e	 1e
	(2*R*,3*R*)-3- ((1*S*,3*S*,5*S*)-2-(叔丁氧羰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸

3d	 3d
	(2*R*,3*R*)-3-((2*S*,5*S*)-1-(叔丁氧羰基)-5-甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸
9e	 9e
	(2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-(叔丁氧羰基)-4-亚甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸
11e	 11e
	(2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-(叔丁氧羰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸
44e	 44e
	(2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*S*)-1-(叔丁氧羰基)-4-氟吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸

本发明进一步提供一种药物组合物，其含有治疗有效量的如通式(PC-L-Dr)、通式(PC-L'-D)及其它如上所述的配体-细胞毒性药物偶联物，或包含如通式（Dr)、通式（L1-Dr)、通式(D)、通式（L1-D）及其它如上所述药物、其可药用盐或溶剂合物，以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

本发明进一步提供将如通式(PC-L-Dr) 、通式(PC-L'-D)及其它如上所述的配体-细胞毒性药物偶联物，或如通式（Dr)、通式（L1-Dr)、通式（D)、通式（L1-D）及其它如上所述的药物或其可药用盐或溶剂合物，或如上所述的药物组合物在制备治疗哺乳动物癌症的药物的用途，所述的癌症为与 HER2，HER3，EGFR 表达相关的癌症。

本发明进一步涉及一种治疗哺乳动物癌症的方法，该方法包括对于哺乳动物施用有效剂量的如通式(PC-L-Dr) 、通式(PC-L'-D)及其它如上所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，或如通式（Dr)、通式（L1-Dr)、通式（D)、

通式（L1-D）及其它如上所述的药物或其可药用盐或溶剂合物，或包含其的药物组合物；其中所述的癌症为与 HER2，HER3，EGFR 表达相关的癌症。

本发明进一步提供将如通式(PC-L-Dr) 、通式(PC-L'-D)及其它如上所述的配体-细胞毒性药物偶联物，或如通式（Dr）、通式（L1-Dr）、通式（D）、通式（L1-D）及其它如上所述的药物或其可药用盐或溶剂合物，或如上所述的药物组合物在制备治疗哺乳动物癌症的药物的用途，其中所述哺乳动物为人，所述癌症选自乳腺癌、卵巢癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肺癌、结肠癌、肾癌、直肠癌、甲状腺癌、胰腺癌、前列腺癌、膀胱癌、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、慢性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤或复发性间变性大细胞淋巴瘤，优选乳腺癌症、霍奇金淋巴瘤或复发性间变性大细胞淋巴瘤；更优选为与 HER2 表达相关的乳腺癌。

本发明进一步涉及一种治疗哺乳动物癌症的方法，该方法包括对于哺乳动物施用有效剂量的如通式(PC-L-Dr) 、通式(PC-L'-D)及其它如上所述的配体-细胞毒性药物偶联物或其可药用盐或溶剂合物，或如通式（Dr）、通式（L1-Dr）、通式（D）、通式（L1-D）及其它如上所述的药物或其可药用盐或溶剂合物，或包含其的药物组合物；其中所述哺乳动物优选为人；所述癌症选自乳腺癌、卵巢癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肺癌、结肠癌、肾癌、直肠癌、甲状腺癌、胰腺癌、前列腺癌、膀胱癌、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、慢性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤或复发性间变性大细胞淋巴瘤，优选为乳腺癌、霍奇金淋巴瘤或复发性间变性大细胞淋巴瘤；更优选为 2+或更高水平过表达 HER2 的乳腺癌；最优选为与 HER2 表达相关的乳腺癌。

本发明在抗体的 N 端氨基和/或赖氨酸残基的氨基上连接本发明含有游离巯基的连接单元 L 后，可避免对抗体铰链区进行还原反应，从而减少对抗体自身结构的影响，并且引入的碳-氮键结构稳定，不易在体内循环中分解，进一步通过控制反应条件，可使载药量在 0~5 范围内分布。

发明详述

除非另有限定，本文所用的所有技术和科学术语均与本发明所属领域普通技术人员的通常理解一致。虽然也可采用与本文所述相似或等同的任何方法和材料实施或测试本发明，但本文描述了优选的方法和材料。描述和要求保护本发明时，依据以下定义使用下列术语。

当本发明中使用商品名时，申请人旨在包括该商品名产品的制剂、该商品名产品的非专利药和活性药物部分。

除非有相反陈述，在说明书和权利要求书中使用的术语具有下述含义。

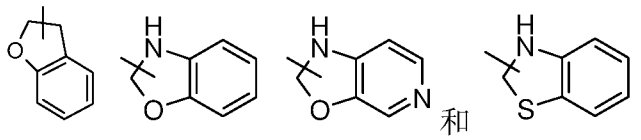
术语“烷基”指饱和脂肪族烃基团，其为包含 1 至 20 个碳原子的直链或支链基团，优选含有 1 至 12 个碳原子的烷基，更优选含有 1 至 10 个碳原子的烷基，最优选含有 1 至 6 个碳原子的烷基。非限制性实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基、正庚基、2-甲基己基、3-甲基己基、4-甲基己基、5-甲基己基、2,3-二甲基戊基、2,4-二甲基戊基、2,2-二甲基戊基、3,3-二甲基戊基、2-乙基戊基、3-乙基戊基、正辛基、2,3-二甲基己基、2,4-二甲基己基、2,5-二甲基己基、2,2-二甲基己基、3,3-二甲基己基、4,4-二甲基己基、2-乙基己基、3-乙基己基、4-乙基己基、2-甲基-2-乙基戊基、2-甲基-3-乙基戊基、正壬基、2-甲基-2-乙基己基、2-甲基-3-乙基己基、2,2-二乙基戊基、正癸基、3,3-二乙基己基、2,2-二乙基己基，及其各种支链异构体等。更优选的是含有 1 至 6 个碳原子的低级烷基，非限制性实施例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基等。烷基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基、氧代基。

术语“环烷基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基，环烷基环包含 3 至 20 个碳原子，优选包含 3 至 12 个碳原子，更优选包含 3 至 10 个碳原子，最优选包含 3 至 8 个碳原子。单环环烷基的非限制性实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环己二烯基、环庚基、环庚三烯基、环辛基等；多环环烷基包括螺环、稠环和桥环的环烷基。

术语“杂环基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基，其包含 3 至 20 个环原子，其中一个或多个环原子为选自氮、氧或 $S(O)_m$（其中 m 是整数 0 至 2）的杂原子，但不包括-O-O-、-O-S-或-S-S-的环部分，其余环原子为碳。优选包含 3 至 12 个环原子，其中 1～4 个是杂原子；更优选环烷基环包含 3 至 10 个环原子。单环杂环基的非限制性实例包括吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、高哌嗪基等。多环杂环基包括螺环、稠环和桥环的杂环基。

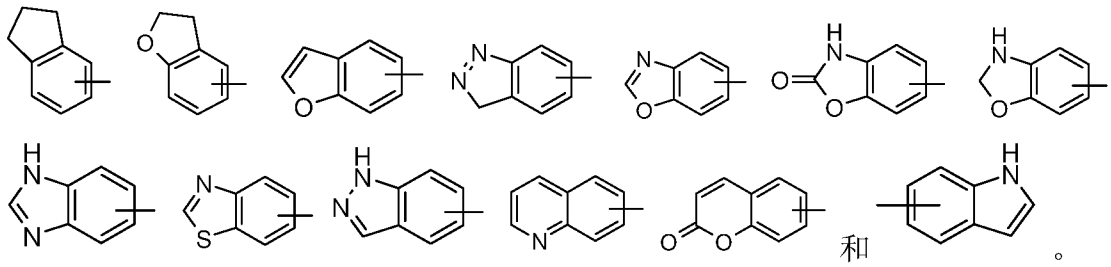
所述杂环基环可以稠合于芳基、杂芳基或环烷基环上，其中与母体结构连接

在一起的环为杂环基，其非限制性实例包括：


和 等。

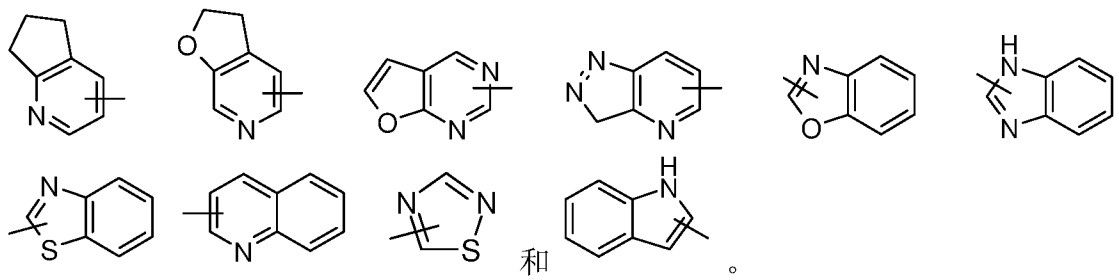
杂环基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基、氧代基。

术语“芳基”指具有共轭的π电子体系的6至14元全碳单环或稠合多环（也就是共享毗邻碳原子对的环）基团，优选为6至10元，例如苯基和萘基，优选苯基。所述芳基环可以稠合于杂芳基、杂环基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为芳基环，其非限制性实例包括：


和 。

芳基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基。

术语“杂芳基”指包含1至4个杂原子、5至14个环原子的杂芳族体系，其中杂原子选自氧、硫和氮。杂芳基优选为5至10元，更优选为5元或6元，例如呋喃基、噻吩基、吡啶基、吡咯基、N-烷基吡咯基、嘧啶基、吡嗪基、咪唑基、四唑基等。所述杂芳基环可以稠合于芳基、杂环基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为杂芳基环，其非限制性实例包括：


和 。

杂芳基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基。

术语“烷氧基”指-O-(烷基)和-O-(非取代的环烷基)，其中烷基或环烷基的定义如上所述。烷氧基的非限制性实例包括：甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、环丙氧基、环丁氧基、环戊氧基、环己氧基。烷氧基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基。

术语“烷氨基”指-N-(烷基)和-N-(非取代的环烷基)，其中烷基或环烷基的定义如上所述。烷氨基的非限制性实例包括：甲氨基、乙氨基、丙氨基、丁氨基、环丙氨基、环丁氨基、环戊氨基、环己氨基。烷氨基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基。

术语“键”指用“—”表示的共价键。

术语“羟基”指-OH 基团。

术语“卤素”指氟、氯、溴或碘。

术语“羧酸酯基”指-C(O)O(烷基)或(环烷基)，其中烷基、环烷基如上所定义。“任选”或“任选地”意味着随后所描述的事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生地场合。例如，“任选被烷基取代的杂环基团”意味着烷基可以但不必须存在，该说明包括杂环基团被烷基取代的情形和杂环基团不被烷基取代的情形。

“取代的”指基团中的一个或多个氢原子，优选为最多 5 个，更优选为 1～3 个氢原子彼此独立地被相应数目的取代基取代。不言而喻，取代基仅处在它们的可能的化学位置，本领域技术人员能够在不付出过多努力的情况下确定（通过实验或理论）可能或不可能的取代。例如，具有游离氢的氨基或羟基与具有不饱和（如烯属）键的碳原子结合时可能是不稳定的。

术语“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物，以及其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

术语“可药用盐”是指本发明配体-细胞毒性药物偶联物的盐，这类盐用于哺乳动物体内时具有安全性和有效性，且具有应有的生物活性，本发明抗体-抗体药物偶联化合物至少含有一个氨基，因此可以与酸形成盐，可药用盐的非限制性实例包括：盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、柠檬酸盐、乙酸盐、琥珀酸盐、抗坏血酸盐、草酸盐、硝酸盐、梨酸盐、磷酸氢盐、磷酸二氢盐、水杨酸盐、柠檬酸氢盐、酒石酸盐、马来酸盐、富马酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐。

术语“溶剂合物”指本发明的配体-药物偶联化合物与一种或多种溶剂分子形成可药用的溶剂合物，溶剂分子的非限制性实例包括水、乙醇、乙腈、异丙醇、DMSO、乙酸乙酯。

术语“配体”是能识别和结合目标细胞相关的抗原或受体的大分子化合物。配体的作用是将药物呈递给与配体结合的目标细胞群，这些配体包括但不限于蛋白类激素、凝集素、生长因子、抗体或其他能与细胞结合的分子。在本发明实施方式中，配体表示为 Pc，配体可通过配体上的杂原子与连接单元形成连接键，优选为抗体。

术语“配体-药物偶联化合物”，指配体通过稳定的化学接头化合物与具有生物活性的细胞毒素相连。本发明中配体优选为抗全，“配体-药物偶联化合物”优选为抗体药物偶联物（antibody drug conjugate，ADC），指把单克隆抗体或者抗体片段通过稳定的化学接头化合物与具有生物活性的细胞毒素相连。

术语“抗原或受体”可供配体识别和结合目标细胞。本发明中优选针对在增生性疾病，例如癌症的靶细胞和/或组织上表达的细胞表面抗原或受体的配体；非限制性细胞表面受体实施例选自 HER2，HER3，HER4，CD20，CD22，CD30，CD33，CD44，Lewis Y，CD56，CD105，VEGFR 或 GPNMB 的细胞表面受体；最优选为选自 HER2 或 EGFR 的细胞表面受体。具体的优选的非限制性实施例为曲妥珠单抗（Trastuzumab），可以和 HER2 靶标特异性结合；帕妥珠单抗（Pertuzumab），可以和 HER2 靶标特异性结合；尼妥珠单抗（Nimotuzumab），可以和 EGFR 靶标特异性结合。

本发明所述的“抗体”是指表现出所需生物学活性的任何形式的抗体。因此，它以最广义使用，具体地说，包括但不限于全长抗体，抗体结合片段或衍生物。抗体的来源包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、基因工程抗体（例如双特异性抗体）。

术语“全长抗体”是指包含 4 条多肽链即 2 条重链和 2 条轻链通过二硫键相互交联形成多聚体的免疫球蛋白分子（例如 IgM）。每条重链包含一段重链可变区（简称 VH）和一段重链恒定区，重链恒定区包含 3 个结构域：CH1、CH2 和 CH3。每条轻链包含一段轻链可变区（简称 VL）和一段轻链恒定区，轻链恒定区包含 1 个结构域（CL1）。VH 区和 VL 区可进一步分为高变区，术语为互补决定区（CDRs），各互补决定区之间穿插着更加保守的结构域，称为框架区（FR）。

术语“抗体结合片段或衍生物” 包括任何一种自然发生的，酶催化获得的，合成的，或是通过基因工程得到的可与抗原特异性结合形成复合物的多肽或糖蛋白；通常包括亲本抗体的至少部分抗原结合区或可变区（例如一个或多个 CDR），其保留亲本抗体的至少某些结合特异性。“抗体结合片段或衍生物”可能由抗体衍生而来，例如通过适宜的标准技术包括蛋白水解或重组基因工程技术（包括对表达抗体可变区和部分恒定区的 DNA 进行操作和表达）对抗体全长进行改造而得。“抗

体结合片段或衍生物”包括但不限于：(i) Fab 片段；(ii) $F(ab')_2$ 片段；(iii) Fd 片段；(iv) Fv 片段；(v) 单链 Fv (scFv)；(vi) dAb 片段；和(vii)模拟抗体高变区氨基酸残基的最小识别单元（如一个分离的互补决定区（CDR））。其它工程分子如双价抗体、三价抗体、四价抗体和微抗体也在“抗体结合片段或衍生物”范围内。

“Fab 片段”由一条完整的轻链和重链的 VH 和 CH1 功能区组成。Fab 分子的重链不能与另一个重链分子形成二硫键。

“Fc”区包含含有抗体的 CH1 与 CH2 结构域的两个重链片段。两个重链片段通过两个以上的二硫键和通过 CH3 结构域的疏水作用保持在一起。

“Fab’片段”包含一条轻链和重链的 VH 和 CH1 功能区，还包含在 CH1 与 CH2 结构域之间的区域，以致于可在两个 Fab’片段的两条重链之间形成链间二硫键，以形成 F(ab’)2 分子。

“F(ab’)2 片段”包含二条轻链和含有 CH1 与 CH2 结构域之间的部分恒定区的两条重链，以致于在两条重链之间形成链间二硫键。因此，F(ab’)2 片段由通过两条重链之间的二硫键保持在一起的两个 Fab’片段组成。

“Fv 片段”包含轻链或/和重链的可变区 VH 功能区。

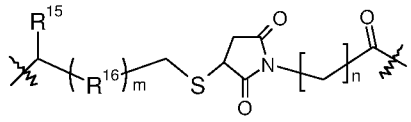
“Fc 区”相当于 IgG 的 CH2 和 CH3 功能区，无抗原结合活性，是抗体分子与效应分子和细胞相互作用的部位。

“铰链区”用于连接抗体的 Fab 段和 Fc 段。在本发明中可以将双特异性融合蛋白与 Fc 段连接。

本发明所述的抗体优选为针对靶细胞上细胞表面抗原的特异性抗体，非限制性实施例为以下抗体： 曲妥珠单抗，是用于治疗乳腺癌的人源化抗 HER2 抗体，适用于治疗 HER2 过度表达的转移性乳腺癌。帕妥珠单抗（Pertuzumab，也被称作 2C4，商品名 Perjeta），是一种重组人源化单克隆抗体。它是第一个被称作“HER 二聚化抑制剂”的单克隆抗体，通过结合 HER2 阻滞了 HER2 与其它 HER 受体的二聚化作用，从而减缓了肿瘤的生长。帕妥珠单抗已经被证实在 HER2 高表达及低表达的前列腺癌等模型上均有抑制肿瘤生长的作用。帕妥珠单抗已被美国 FDA 批准用于治疗 HER2 阳性的转移性乳腺癌。尼妥珠单抗（Nimotuzumab，商品名泰欣生），是一个以表皮生长因子受体（EGFR）为靶点的单抗药物，可用于治疗恶性肿瘤的人源化单克隆抗体。EGFR 在多种实体瘤中过度表达，如头颈癌、肺癌、结直肠癌中，都存在 EGFR 过度表达现象。

术语“细胞毒性药物”是指在肿瘤细胞内具有较强破坏其正常生长的化学分子。细胞毒性药物原则上在足够高的浓度下都可以杀死肿瘤细胞，但是由于缺乏特异性，在杀伤肿瘤细胞的同时，也会导致正常细胞的凋亡，导致严重的副作用。在本发明的实施方式中，细胞毒性药物表示为 D/D1。

术语“接头单元”在本发明中为 L，指一端与配体共价连接而另一端与细胞毒性药物相连的化学结构片段或键。本发明中 L 的结构单元如：



（PC-L'-D）；

其中 R15，R16，m，n 如通式（PC-L'-D）通式中所定义。

术语“载药量”是指式（I）分子中每个配体上加载的细胞毒性药物平均数量，也可以表示为药物量和抗体量的比值，药物载量的范围可以是每个配体（Pc）连接 1-8 个细胞毒性药物（D），在本发明的实施方式中，载药量表示为 y，可用常规方法如 UV/可见光光谱法，质谱，ELISA 试验和 HPLC 特征鉴定偶联反应后每个 ADC 分子的药物品均数量。

在本发明中，y 可能受连接位点数量的限制。本发明的一个实施方式中，细胞毒性药物通过连接单元偶联在配体的 N 端氨基和/或赖氨酸残基的ε-氨基上，一般地，偶联反应中能与抗体偶联的药物分子数将小于理论上的最大值。

可以用以下非限制性方法控制配体细胞毒性药物偶联物的载量，包括：

(1) 控制连接试剂和单抗的摩尔比，

(2) 控制反应时间和温度，

(3) 选择不同的反应试剂。

常规的药物组合物的制备见中国药典。

术语“载体”用于本发明的药物，是指能改变药物进入人体的方式和在体内的分布、控制药物的释放速度并将药物输送到靶向器官的体系。药物载体释放和靶向系统能够减少药物降解及损失，降低副作用，提高生物利用度。如可作为载体的高分子表面活性剂由于其独特的两亲性结构，可以进行自组装，形成各种形式的聚集体，优选的实例如胶束、微乳液、凝胶、液晶、囊泡等。这些聚集体具有包载药物分子的能力，同时又对膜有良好的渗透性，可以作为优良的药物载体。

术语“赋形剂”是在药物制剂中除主药以外的附加物，也可称为辅料。如片剂中的黏合剂、填充剂、崩解剂、润滑剂；半固体制剂软膏剂、霜剂中的基质部分；液体制剂中的防腐剂、抗氧剂、矫味剂、芳香剂、助溶剂、乳化剂、增溶剂、渗透压调节剂、着色剂等均可称为赋形剂。

术语“稀释剂”又称填充剂，其主要用途是增加片剂的重量和体积。稀释剂的加入不仅保证一定的体积大小，而且减少主要成分的剂量偏差，改善药物的压缩成型性等。当片剂的药物含有油性组分时，需加入吸收剂吸收油性物，使保持“干燥”状态，以利于制成片剂。如淀粉、乳糖、钙的无机盐、微晶纤维素等。

药物组合物可以是无菌注射水溶液形式。可在使用的可接受的溶媒和溶剂中有水、林格氏液和等渗氯化钠溶液。无菌注射制剂可以是其中活性成分溶于油相的无菌注射水包油微乳。例如将活性成分溶于大豆油和卵磷脂的混合物中。然后将油溶液加入水和甘油的混合物中处理形成微乳。可通过局部大量注射，将注射液或微乳注入患者的血流中。或者，最好按可保持本发明化合物恒定循环浓度的

方式给予溶液和微乳。为保持这种恒定浓度，可使用连续静脉内递药装置。这种装置的实例是 Deltec CADD-PLUS. TM. 5400 型静脉注射泵。

药物组合物可以是用于肌内和皮下给药的无菌注射水或油混悬液的形式。可按已知技术，用上述那些适宜的分散剂或湿润剂和悬浮剂配制该混悬液。无菌注射制剂也可以是在无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中制备的无菌注射溶液或混悬液，例如 1,3-丁二醇中制备的溶液。此外，可方便地用无菌固定油作为溶剂或悬浮介质。为此目的，可使用包括合成甘油单或二酯在内的任何调和固定油。此外，脂肪酸例如油酸也可以制备注射剂。

术语“还原剂”是在氧化还原反应里，失去电子或有电子偏离的物质。还原剂本身在广义上说也是抗氧化剂，具有还原性，被氧化，其产物叫氧化产物。在本发明的实施方式中，还原剂表示为 RA，还原剂的非限制性实例包括：H_2、碳(C)、一氧化碳(CO)、还原铁粉(Fe)、锌粉(Zn)、碱金属(常用的有 Li、Na、K)、其他活泼金属(如 Mg、Al、Ca、La 等)、氯化亚锡($SnCl_2$)、草酸、硼氢化钾(KBH_4)、硼氢化钠($NaBH_4$)、氰基硼氢化钠($NaCNBH_3$)、三乙酰氧基硼氢化钠($(CH3COO)_3BHNa$)、氢化铝锂($LiAlH_4$)、次磷酸、次磷酸钠、硫代硫酸钠($Na_2S_2O_3$)，本发明优选的还原剂为氰基硼氢化钠或三乙酰氧基硼氢化钠。

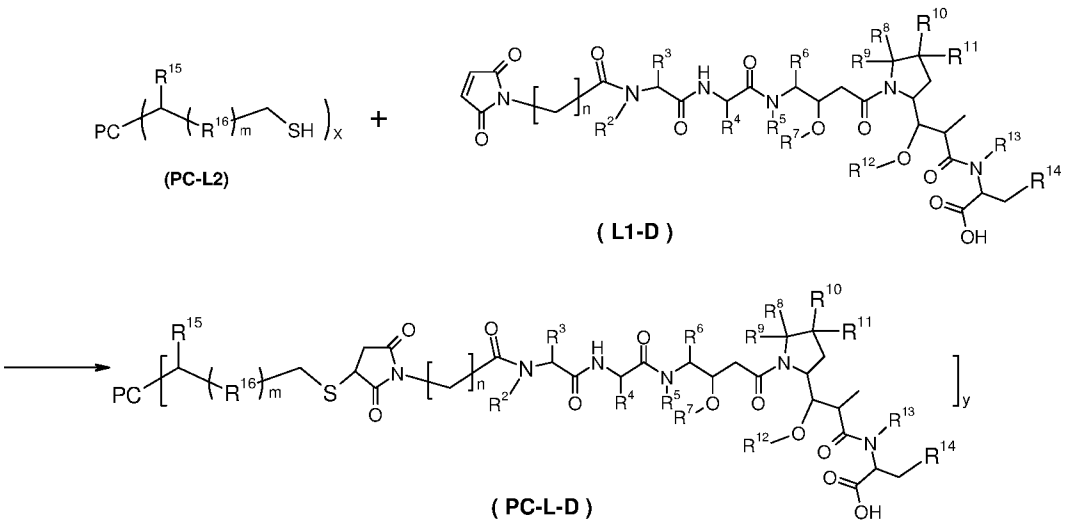
术语“巯基保护基”指当同时含有巯基和其他基团的化学分子参与反应的情况下，为使反应只发生在特定的基团处，而避免巯基遭受影响，将巯基加以保护，当反应完成后脱除的基团，在本发明的实施方式中，巯基保护基表示为 T，巯基保护基的非限制性实例包括：-叔丁基、-乙酰基、-正丙酰基、-异丙酰基、-三苯基甲基、-甲氧基甲基、-2-(三甲硅烷基)乙氧甲基，本发明优选的巯基保护基为乙酰基。

本发明的合成方法

为了完成本发明的合成目的，本发明采用如下的合成技术方案：

方案一：

本发明通式(PC-L-DR)所示的化合物的制备方法，该方法包括：

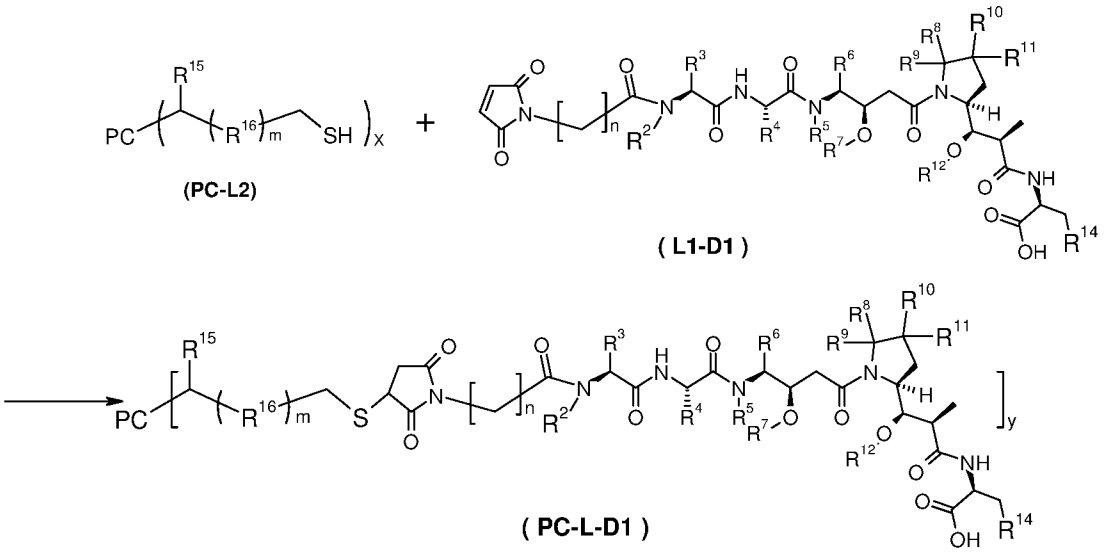


(PC-L2)　　(L1-D)

(PC-L-D)

方案二：

本发明通式(PC-L-DR1)所示的化合物的制备方法，该方法包括：



通式(PC-L2)化合物与通式(L1-D1)化合物在乙腈溶液中反应，经 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化后，得到通式(PC-L-DR)化合物；

其中：PC，m，n，y，R^2～R^{16} 如通式(PC-L-DR)中所定义。

具体实施方式

以下结合实施例进一步描述本发明，但这些实施例并非限制本发明的范围。

本发明实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

实施例

化合物的结构是通过核磁共振(NMR)或/和质谱(MS)来确定的。NMR 化学位移(δ)以 10^{-6} (ppm)的单位给出。NMR 的测定是用 Bruker AVANCE-400 核磁仪，测定溶剂为氘代二甲基亚砜(DMSO-d_6)，氘代氯仿($CDCl_3$)，氘代甲醇(CD_3OD)，内标为四甲基硅烷(TMS)。

MS 的测定用 FINNIGAN LCQAd (ESI)质谱仪(生产商：Thermo，型号：Finnigan LCQ advantage MAX)。

HPLC 的测定使用安捷伦 1200DAD 高压液相色谱仪(Sunfire C18 150×4.6mm 色谱柱)和 Waters 2695-2996 高压液相色谱仪(Gimini C18 150×4.6mm 色谱柱)。

激酶平均抑制率及 IC_{50} 值的测定用 NovoStar 酶标仪(德国 BMG 公司)。

薄层层析硅胶板使用烟台黄海 HSGF254 或青岛 GF254 硅胶板，薄层色谱法(TLC)使用的硅胶板采用的规格是 0.15 mm～0.2 mm，薄层层析分离纯化产品采用的规格是 0.4 mm～0.5 mm。

柱层析一般使用烟台黄海硅胶 200~300 目硅胶为载体。

本发明的已知的起始原料可以采用或按照本领域已知的方法来合成，或可购买自 ABCR GmbH & Co. KG，Acros Organics，Aldrich Chemical Company，韶远化学科技(Accela ChemBio Inc)，达瑞化学品等公司。

实施例中无特殊说明，反应均能够在氩气氛或氮气氛下进行。

氩气氛或氮气氛是指反应瓶连接一个约 1L 容积的氩气或氮气气球。

实施例中无特殊说明，溶液是指水溶液。

实施例中无特殊说明，反应的温度为室温，为 20℃～30℃。

实施例中 pH=6.5 的 PBS 缓冲液的配制：取 KH_2PO_4 8.5g，$K_2HPO_4.3H_2O$ 8.56g，NaCl 5.85g，EDTA 1.5g 置于瓶中，定容至 2L，超声波使其全部溶解，摇匀即得。

实施例中 pH=4.5 的乙酸/乙酸钠缓冲液的配制：取 9 g 无水乙酸钠置于瓶中，加入纯化水，定容至 2L，摇匀后，加入醋酸钠 4.9 mL，摇匀即得。

实施例中磷酸盐缓冲液(pH=7.0)的配制：0.2*M* 的 Na_2HPO_4 61mL 中加入 0.2*M* 的 NaH_2PO_4 39mL 摇匀得 0.2*M* pH=7 的缓冲液。

实施例中的反应进程的监测采用薄层色谱法(TLC)，反应所使用的展开剂的体系有：A：二氯甲烷和甲醇体系，B：正己烷和乙酸乙酯体系，C：石油醚和乙酸乙酯体系，D：丙酮，溶剂的体积比根据化合物的极性不同而进行调节。

纯化化合物采用的柱层析的洗脱剂的体系和薄层色谱法的展开剂体系包括：A：二氯甲烷和甲醇体系，B：正己烷和乙酸乙酯体系，C：二氯甲烷和丙酮体系，D：乙酸乙酯和二氯甲烷体系，E：乙酸乙酯和二氯甲烷和正己烷，F：乙酸乙酯和二氯甲烷和丙酮，溶剂的体积比根据化合物的极性不同而进行调节，也可以加入少量的三乙胺和醋酸等碱性或酸性试剂进行调节。

本发明部分化合物是通过 Q-TOF LC/MS 来表征的。Q-TOF LC/MS 使用安捷伦 6530 精确质量数四级杆-飞行时间质谱仪和安捷伦 1290-Infinity 超高效液相色谱仪(安捷伦 Poroshell 300SB-C8 5μm,2.1×75mm 色谱柱)。

本发明的已知的起始原料可以采用或按照本领域已知的方法来合成，实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

一、作为抗体的中间体的制备：

以下抗体按抗体常规方法进行制备：如可进行载体构建后，转染真核细胞如 HEK293 细胞（Life Technologies Cat. No. 11625019），纯化表达。

抗体序列

（1）帕妥珠单抗（Pertuzumab），可以和 HER2 靶标特异性结合：

轻链序列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY
TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE

QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.1

重链序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVN
PNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYF
DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.2

（2）尼妥珠单抗（Nimotuzumab），可以和 EGFR 靶标特异性结合：

轻链顺序：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQNIVHSNGNTYLDWYQQTPGKAPKLLIY
KVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCFQYSHVPWTFGQGTKL
QITRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

SEQ ID NO：3

重链顺序：

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYYIYWVRQAPGQGLEWIGGINP
TSGGSNFNEKFKTRVTITADESSTTAYMELSSLRSEDTAFYFCTRQGLWFDSDGR
GFDFWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：4

（3）曲妥珠单抗（Trastuzumab），可以和 HER2 靶标特异性结合：

轻链顺序:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFL
YSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO：5

重链顺序

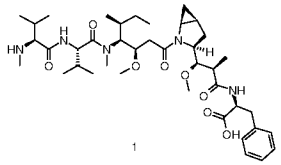
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP
TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY
AMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：6

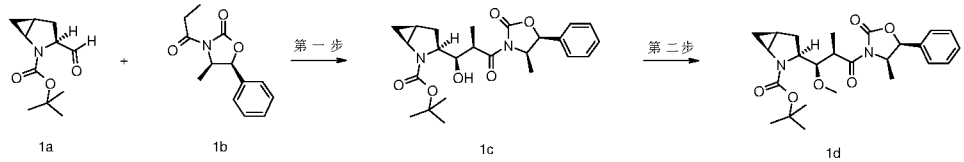
二、药物、药物连接体、配体药物偶联物（ADC）的制备

实施例 1

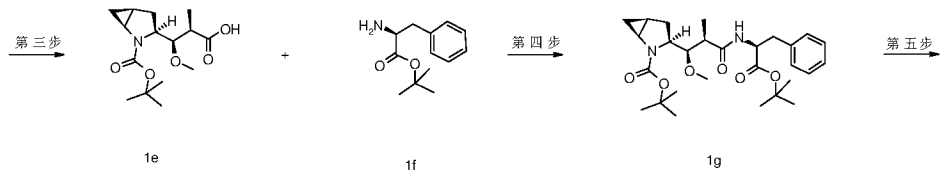
(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸



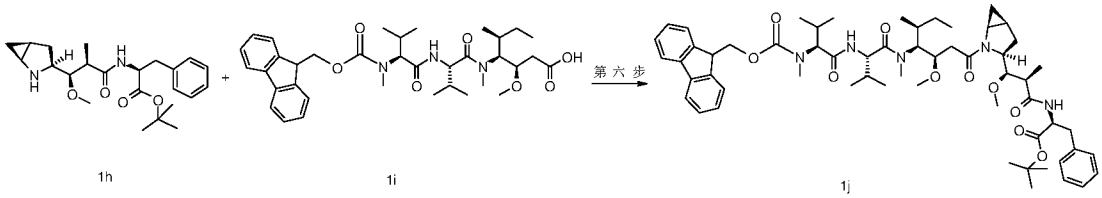
1



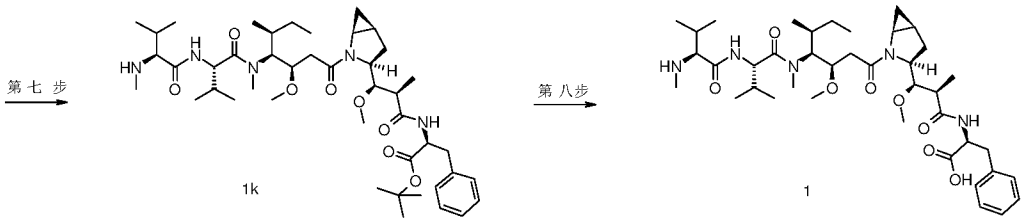
1a 1b 第一步 1c 第二步 1d



第三步 1e 1f 第四步 1g 第五步



1h 1i 第六步 1j



第一步

(1*S*,3*S*,5*S*)-叔丁酯 3-((1*R*,2*R*)-1-羟基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-2-羧酸

将原料(4*R*,5*S*)-4-甲基-5-苯基-3-丙酰基噁唑烷酮 **1b** (1.96 g，9.26 mmol，采用公知的方法“*Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(50), 15512-15520”制备而得)溶于 25 mL 二氯甲烷中，氩气氛下，降温至 0℃。反应液于 0℃下滴加三乙胺(1.49 mL，10.93 mmol)，再滴加三氟甲磺酸二丁硼(9.7 mL，9.72 mmol)，于 0℃下搅拌 50 分钟，干冰丙酮浴下将反应液降温至-75℃，加入(1*S*,3*S*,5*S*)-叔丁酯 3-甲酰基-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-2-羧酸 **1a** (2.16 g，9.26 mmol，采用专利申请“US20100249190”公开的方法制备而得)溶于 7 mL 二氯甲烷的溶液，于-75℃下搅拌 1.5 小时，于 0℃搅拌 2 小时，于室温搅拌 1 小时。反应结束后，加入 36 mL 磷酸盐缓冲液(pH=7.0)和甲醇(V/V=1:3)的混合液。于 0℃下加入 36 mL 甲醇和双氧水(30%) (V/V=2:1)的混合液，于室温搅拌 1 小时。减压浓缩除去有机相，加入少量水，用乙醚(50 mL×3)萃取，依次用 5%碳酸氢钠溶液，饱和氯化钠溶液(150 mL)洗涤，用无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化残留物，得标题产物(1*S*,3*S*,5*S*)-叔丁酯 3-((1*R*,2*R*)-1-羟基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-2-羧酸 **1c** (2.4 g，白色泡沫状固体)，产率 58.5%。

MS m/z (ESI): 345.1 [M-100+1]

第二步

(1*S*,3*S*,5*S*)-叔丁酯 3-((1*R*,2*R*)-1-甲氧基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-2-羧酸

将原料(1*S*,3*S*,5*S*)-叔丁酯 3-((1*R*,2*R*)-1-羟基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-2-羧酸 **1c** (1.4 g，3.15 mmol)溶于 20 mL 二氯甲烷，加入 1.4 g 碾碎的分子筛，氩气氛下，于 0℃下加入 1,8-双二甲氨基萘(1.75 g，8.19 mmol)，三甲基氧鎓四氟硼酸盐(1.16 g，7.87 mmol)，反应避光，于室温搅拌 40 小时。反应结束后，过滤，滤饼用二氯甲烷洗涤，滤液用饱和氯化铵溶液(50 mL×4)洗去过量 1,8-双二甲氨基萘，再用饱和氯化钠溶液(120 mL)洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化所得残余物，得到标题产物(1*S*,3*S*,5*S*)-叔丁酯 3-((1*R*,2*R*)-1-甲氧基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-2-羧酸 **1d** (400 mg，白色固体)，产率 27.8%。

MS m/z (ESI): 459.4 [M+1]

第三步

(2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-(叔丁氧羰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸

将原料(1*S*,3*S*,5*S*)-叔丁酯 3-((1*R*,2*R*)-1-甲氧基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-2-羧酸 **1d** (400 mg， 0.87 mmol)溶于 24 mL 四氢呋喃，氩气氛下，降温至 0℃，缓慢滴加 30%的双氧水(0.34 mL/0.38 g，3.31 mmol)，再加入一水合氢氧化锂(62 mg,，1.48 mmol)，反应体系于室温反应 20 小时。反应结束后，向反应液中加入亚硫酸钠固体(440 mg，3.48 mmol)，于室温搅拌 1 小时，加入 10 mL 水，减压浓缩掉有机相，所得残余物用二氯甲烷萃取(40 mL×2)。水相在冰浴下滴加 2*N* 盐酸至反应液 pH 为 3～4，用乙酸乙酯萃取(25 mL×3)，乙酸乙酯层依次用水(50 mL)，饱和氯化钠溶液(50 mL)洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得标题产物(2*R*,3*R*)-3- ((1*S*,3*S*,5*S*)-2-(叔丁氧羰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸 **1e** (230 mg，无色液体)，收率 88.0%。

MS m/z (ESI): 200.1 [M-100+1]

第四步

(1*S*,3*S*,5*S*)-叔丁酯 3-((1*R*,2*R*)-3-((*S*)-1-叔丁氧基-1-羰基-3-苯丙基-2-基胺)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基丙基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-2-羧酸

将原料(2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-(叔丁氧羰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸 **1e** (100 mg，0.334 mmol)溶于 6 mL 二氯甲烷和二甲基甲酰胺(V/V=5:1)混合溶剂中，加入反应物(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-苯丙酸 **1f** (73.9 mg，0.334 mmol，采用公知的方法“*Tetrahedron: Asymmetry*, 2006, 17(4), 603-606”制备而得)，再加入*N*,*N*-二异丙基乙基胺(0.29 mL，67 mmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)- *N*,*N*,*N*′,*N*′-四甲基脲六氟磷酸酯(152.3 mg，0.40 mmol)。反应体系在氩气氛下，于室温下搅拌 1 小时。反应结束后，加 10 mL 水搅拌，分层，二氯甲烷层用饱和氯化钠溶液(10 mL)洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化所得残余物，得到标题产物(1*S*,3*S*,5*S*)-叔丁酯 3-((1*R*,2*R*)-3- ((*S*)-1-叔丁氧基-1-羰基-3-苯丙基-2-基胺)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基丙基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-2-羧酸 **1g** (140 mg，无色粘稠液体)，收率 83.7%。

MS m/z (ESI): 503.3 [M+1]

第五步

(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸

将原料(1*S*,3*S*,5*S*)-叔丁酯 3-((1*R*,2*R*)-3-((*S*)-1-叔丁氧基-1-羰基-3-苯丙基-2-基胺)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基丙基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-2-羧酸 **1g** (140 mg，0.28

mmol)溶于 2 mL 二氧六环中，加入 5.6*M* 的氯化氢二氧六环溶液(0.15 mL，0.835 mmol)后将反应体系密封。于室温搅拌 8 小时，置于 0℃冰箱内 12 小时。反应结束后，依次加入 3 mL 二氯甲烷，3 mL 水，3 mL 饱和碳酸氢钠溶液，搅拌 10 分钟。体系分层，二氯甲烷层用饱和氯化钠溶液(20 mL×2)洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，得到标题产品(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*) -2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **1h** (86 mg，黄色固体)，收率 76.7%。

MS m/z (ESI): 403.4 [M+1]

第六步

(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷基-14-酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸

将原料(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **1h** (86 mg，0.213 mmol)，(5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷-14-羧酸 **1i** (136 mg，0.213 mmol，采用专利申请“WO 2013072813”公开的方法制备而得)溶于 6 mL 二氯甲烷和二甲基甲酰胺(V/V=5:1)混合溶剂中，加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(0.19 mL，1.065 mmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-四甲基脲六氟磷酸酯(97.4 mg，0.256 mmol)。反应体系在氩气氛下，于室温下搅拌 1 小时。反应结束后，加入 20 mL 水搅拌，分层。二氯甲烷层用饱和氯化钠溶液(20 mL)洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化残留物，得到标题产品(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷基-14-酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **1j** (120 mg，白色泡沫状固体)，收率 54.9%。

MS m/z (ESI): 1023.1 [M+1]

第七步

(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸

将原料(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷基-14-酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **1j** (120 mg，0.117 mmol)溶于 2 mL 二氯甲烷中，加入 2 mL 二乙胺。反应体系在氩气氛下，于室温下搅拌 2 小时。反应结束后，将反应液减压浓缩，得到粗品标题产品(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)- 4-((*S*)-*N*,3-二

甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **1k** (124 mg，黄色液体)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

MS m/z (ESI): 801.5 [M+1]

第八步

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸

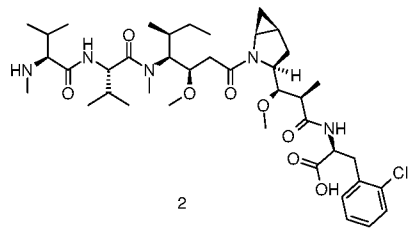
将粗品(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **1k** (90 mg，0.112 mmol)溶于 1 mL 二氧六环中，加入 5.6*M* 的氯化氢二氧六环溶液 3 mL，将反应体系密封，于室温下搅拌 12 小时。反应结束后，减压浓缩，用高效液相色谱法纯化所得残留物得标题产品(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **1** (19 mg，白色固体)，收率 22.7%。

MS m/z (ESI): 744.6 [M+1]

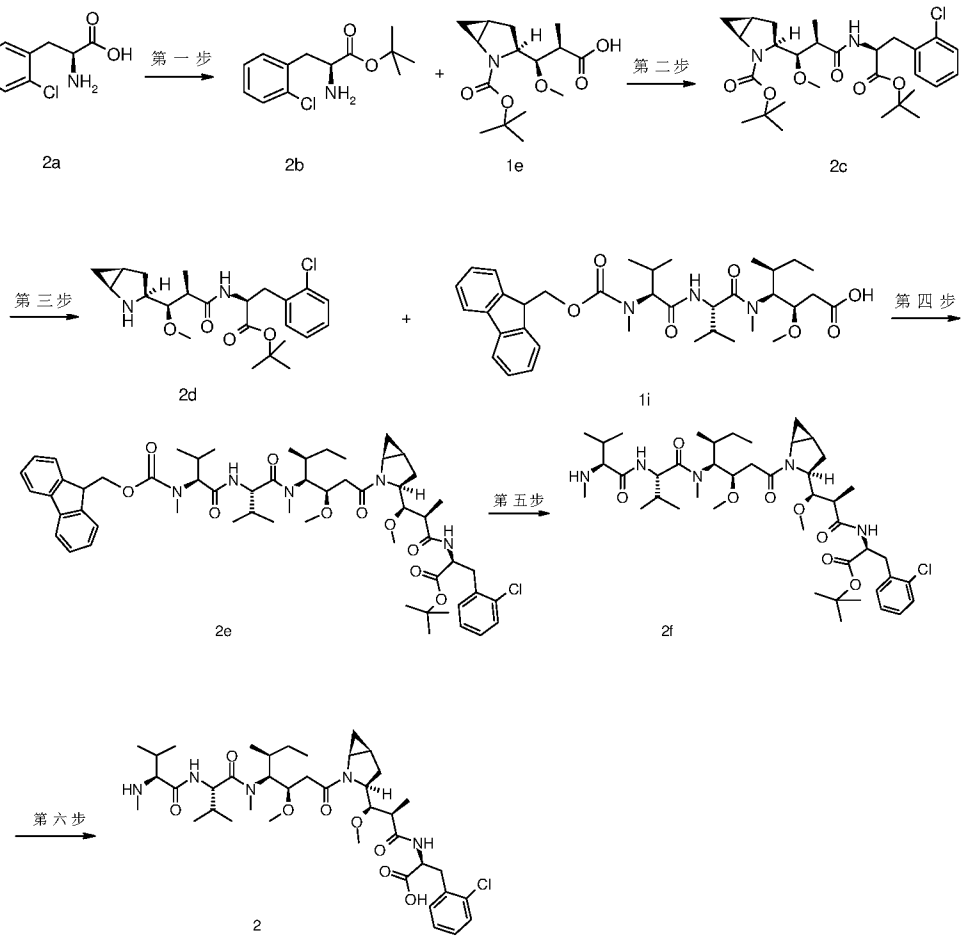
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.34-7.21(m, 5H), 4.76-4.70(m, 2H), 4.26-4.19 (m, 1H), 4.14-4.06(m, 1H), 3.91-3.86(m, 1H), 3.85-3.77(m, 1H), 3.75-3.56(m, 2H), 3.44-3.10(m, 9H), 2.98-2.83(m, 1H), 2.71-2.57(m, 4H), 2.26-1.99(m, 4H), 1.92-1.77 (m, 1H), 1.75-1.58(m, 2H), 1.49-1.27(m,4H),1.21-0.95(m, 18H), 0.93-0.79(m, 4H), 0.76-0.61(m, 1H).

实施例 2

(*S*)-3-(2-氯苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)丙酸



2



第一步

(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(2-氯苯基)丙酸

将原料(*S*)-2-氨基-3-(2-氯苯基)丙酸 **2a** (400 mg，2.0 mmol，采用公知的方法“*Journal of the American Chemical Society*, 1940, 62, 565-8”制备而得)溶于 10 mL 乙酸叔丁酯，加入高氯酸(428 mg(70%)，3.00 mmol)，于室温下搅拌 16 小时。反应结束后，加入 6 mL 水，分液，有机相用饱和碳酸氢钠溶液(3 mL)洗涤。水相用饱和碳酸氢钠溶液调节至 pH=8，二氯甲烷(5 mL×3)萃取，合并有机相，依次用水(3 mL)，饱和氯化钠溶液(5 mL)洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得粗品标题产物(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(2-氯苯基)丙酸 **2b** (400 mg，白色固体)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

第二步

(1*S*,3*S*,5*S*)-叔丁酯 3-((1*R*,2*R*)-3-((*S*)-1-叔丁氧基-3-(2-氯苯基)-1-羰基丙基-2-基胺)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基丙基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-2-羧酸

将原料(2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-(叔丁氧羰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸 **1e** (110 mg，0.367 mmol)溶于 6 mL 二氯甲烷和二甲基甲酰胺(V/V=5:1)混合溶剂中，加入粗品(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(2-氯苯基)丙酸 **2b** (94 mg，0.367 mmol)，再加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(0.32 mL，1.835 mmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N*,*N*,*N*',*N*'-四甲基脲六氟磷酸酯(168 mg，0.44 mmol)，反应体系在氩气氛下，

于室温下搅拌 1.5 小时。反应结束后，加 10 mL 水搅拌，分层，有机相用饱和氯化钠溶液(10 mL)洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化所得残余物，得到标题产物(1*S*,3*S*,5*S*)-叔丁酯 3-((1*R*,2*R*)-3-((*S*)-1-叔丁氧基-3-(2-氯苯基)-1-羰基丙基-2-基胺)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基丙基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-2-羧酸 **2c** (112 mg，白色泡沫状固体)，收率 56.8%。

MS m/z (ESI): 537.3 [M+1]

第三步

(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氯苯基)丙酸

将原料(1*S*,3*S*,5*S*)-叔丁酯 3-((1*R*,2*R*)-3-((*S*)-1-叔丁氧基-3-(2-氯苯基)-1-羰基丙基-2-基胺)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基丙基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-2-羧酸 **2c** (110 mg，0.205 mmol)溶于 2 mL 二氧六环中，加入 5.6*M* 的氯化氢二氧六环溶液(0.13 mL，0.717 mmol)，氩气氛下，于室温搅拌 1 小时，置于 0℃冰箱内 6 小时。反应结束后加入 5 mL 二氯甲烷稀释，加入 10 mL 饱和碳酸氢钠溶液，搅拌 10 分钟。体系分层，水层用 5 mL 二氯甲烷萃取。合并二氯甲烷层，用饱和氯化钠溶液(20 mL)洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，得到粗品标题产品(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氯苯基)丙酸 **2d** (99 mg，黄色液体)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

MS m/z (ESI): 437.2 [M+1]

第四步

(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-仲丁基-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氯苯基)丙酸

将粗品(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氯苯基)丙酸 **2d** (99 mg，0.226 mmol)，(5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷-14-羧酸 **1i** (144.4 mg，0.226 mmol)溶于 6 mL 二氯甲烷和二甲基甲酰胺(V/V =5:1)混合溶剂中，加入 *N,N*-二异丙基乙基胺(0.2 mL，1.13 mmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N′,N′*-四甲基脲六氟磷酸酯(103.3 mg，0.271 mmol)。反应体系在氩气氛下，于室温下搅拌 1 小时。反应结束后，加入 10 mL 水搅拌，分层。二氯甲烷层用饱和氯化钠溶液(10 mL)洗涤，无水硫酸钠干燥。过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化残留物，得到标题产品(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-仲丁基-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氯苯基)丙酸 **2e** (127mg，

白色泡沫状固体)，收率 53.1%。

MS m/z (ESI): 1056.4 [M+1]

第五步

(*S*)-叔丁酯 3-(2-氯苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)丙酸

将原料(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-仲丁基-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氯苯基)丙酸 **2e** (127 mg，0.12 mmol)溶于 2 mL 二氯甲烷中，加入 2 mL 二乙胺。反应体系在氩气氛下，于室温下搅拌 3 小时。反应结束后，将反应液减压浓缩，得到粗品标题产品(*S*)-叔丁酯 3-(2-氯苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)丙酸 **2f** (130 mg，黄色粘稠物)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

MS m/z (ESI): 834.5 [M+1]

第六步

(*S*)-3-(2-氯苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)丙酸

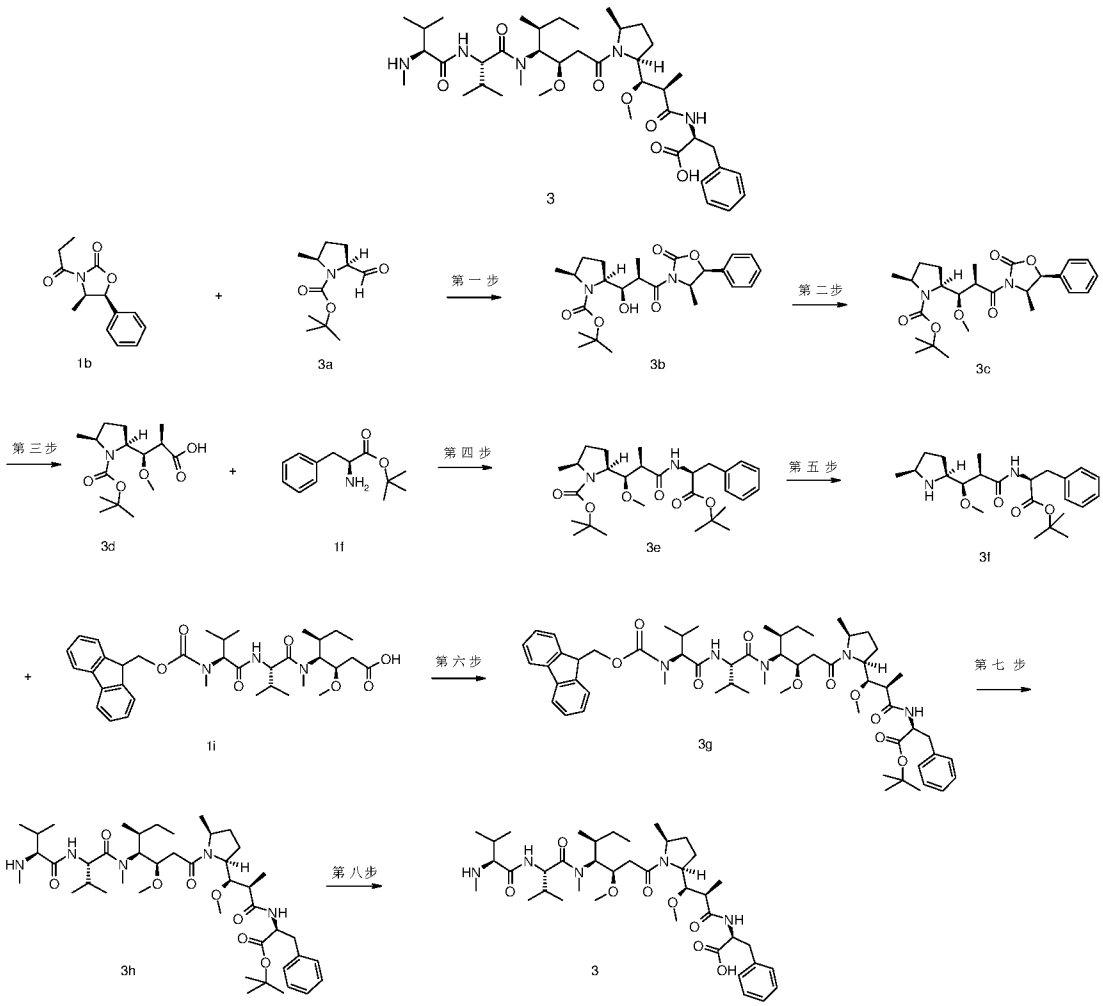
将粗品(*S*)-叔丁酯 3-(2-氯苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5S)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((S)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)丙酸 **2f** (100 mg，0.12 mmol)溶于 1 mL 二氧六环中，加入 5.6*M* 的氯化氢二氧六环溶液 3 mL，氩气氛下，于室温下搅拌 12 小时。反应结束后，减压浓缩反应液，用高效液相色谱法纯化所得残留物，得标题产品(*S*)-3-(2-氯苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)丙酸 **2** (35 mg，白色固体)，收率 35.7%。

MS m/z (ESI): 778.7 [M+1]

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.41-7.32(m, 2H), 7.31-7.16(m, 2H), 4.80-4.65(m, 2H), 4.22-4.13 (m, 1H), 4.10-4.03(m, 1H), 3.98-3.91(m, 1H), 3.87-3.82(m, 1H), 3.73-3.63(m, 2H), 3.47-3.12(m, 9H), 3.09-3.01(m, 1H), 2.67-2.57(m, 4H), 2.24-2.11 (m, 3H), 2.09-1.98(m, 1H), 1.89-1.67(m, 3H), 1.51-1.25 (m, 4H), 1.20-0.93(m, 18H), 0.92-0.79(m, 4H), 0.75-0.66(m, 1H).

实施例 3

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,5*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸



第一步

(2*S*,5*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-1-羟基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-5-甲基吡咯烷-1-羧酸

将原料(4*R*,5*S*)-4-甲基-5-苯基-3-丙酰基噁唑烷酮 **1b** (0.992 g，4.2 mmol)溶于 20 mL 二氯甲烷中，氩气氛下，降温至 0℃。反应液于 0℃下滴加三乙胺(0.69 mL，4.96 mmol)，再滴加三氟甲磺酸二正丁基化硼(4.4 mL，4.4 mmol)，于 0℃下搅拌 50 分钟，将反应液降温至-75℃，加入(2*S*,5*S*)-叔丁酯 2-甲酰基-5-甲基吡咯烷-1-羧酸 **3a** (900 mg，4.2 mmol，采用专利申请“US20120195857”公开的方法制备而得)溶于 5 mL 二氯甲烷的溶液，于-75℃下搅拌 1.5 小时，于 0℃搅拌 1.5 小时，于室温搅拌 1 小时。于室温下加入 36 mL 磷酸盐缓冲液(pH=7.0)和甲醇(V/V=1:3)的混合液。冷却至 0℃，于 0℃下加入 36 mL 甲醇和双氧水(30%) (V/V=2:1)的混合液，于室温搅拌 1 小时。反应结束后，减压浓缩除去有机相，加入 15 mL 水。水相用乙醚(30 mL×3)萃取，合并乙醚相，依次用 5%碳酸氢钠溶液，水，饱和氯化钠溶液(150 mL)洗涤，

用无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化残留物，得标题产物(2*S*,5*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-1-羟基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-5-甲基吡咯烷-1-羧酸 **3b** (600 mg，白色固体)，产率 33%。

第二步

(2*S*,5*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-1-甲氧基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-5-甲基吡咯烷-1-羧酸

将原料(2*S*,5*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-1-羟基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-5-甲基吡咯烷-1-羧酸 **3b** (600 mg，1.34 mmol)溶于 15 mL 二氯甲烷，加入 1 g 磨成粉末的分子筛，氩气氛下，于 0℃下加入 1,8-双二甲氨基萘(740 mg，3.45 mmol)，三甲基氧鎓四氟硼酸盐(500 mg，3.38 mmol)，反应用锡箔纸包裹，于室温下反应 38 小时。反应结束后，过滤，滤饼用二氯甲烷洗涤。合并滤液，有机相用饱和氯化铵溶液(20 mL×3)洗去过量 1,8-双二甲氨基萘，再用饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥。过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化所得残余物，得到标题产物(2*S*,5*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-1-甲氧基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-5-甲基吡咯烷-1-羧酸 **3c** (200 mg，白色固体)，产率 32%。

第三步

(2*R*,3*R*)-3-((2*S*,5*S*)-1-(叔丁氧羰基)-5-甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸

将原料(2*S*,5*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-1-甲氧基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-5-甲基吡咯烷-1-羧酸 **3c** (200 mg， 0.43 mmol)溶于 22 mL 四氢呋喃，氩气氛下，降温至 0℃，缓慢滴加 30%的双氧水(186 mg，1.6 mmol)，再加入一水合氢氧化锂(58 mg，1.37 mmol)，于 0℃下反应 10 分钟后，撤去冰浴，反应体系于室温反应 44 小时。反应结束后，向反应液中加入亚硫酸钠固体(220 mg，1.74 mmol)，于室温搅拌 1 小时，加入 15 mL 水。减压浓缩掉有机相，所得残余物用二氯甲烷萃取(20 mL×2)。水相在冰浴下滴加 2*N* 盐酸至反应液 pH 为 3～4，用乙酸乙酯萃取(20 mL×3)，乙酸乙酯层依次用水，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得粗品标题产物(2*R*,3*R*)-3-((2*S*,5*S*)-1-(叔丁氧羰基)-5-甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸 **3d** (120 mg，白色固体)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

第四步

(2*S*,5*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-3-((*S*)-1-叔丁氧基-1-羰基-3-苯丙基-2-基胺)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基丙基)-5-甲基吡咯烷-1-羧酸

将粗品(2*R*,3*R*)-3-((2*S*,5*S*)-1-(叔丁氧羰基)-5-甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸 **3d** (106 mg，0.35 mmol)溶于 4.8 mL 二氯甲烷和二甲基甲酰胺(V/V=5:1)混合溶剂中，加入(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-苯丙酸 **1f** (80 mg，0.36 mmol)，反应体系在氩气

氛下，加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(0.30 mL，1.74 mmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-四甲基脲六氟磷酸酯(160 mg，0.42 mmol)，于室温下搅拌 2 小时。反应结束后，加 10 mL 二氯甲烷，依次用水(5 mL×2)、饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化所得残余物，得到标题产物(2*S*,5*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-3-((*S*)-1-叔丁氧基-1-羰基-3-苯丙基-2-基胺)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基丙基)-5-甲基吡咯烷-1-羧酸 **3e** (138 mg，无色粘稠液体)，收率 78%。

第五步

(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-甲氧基-2-甲基-3-((2*S*,5*S*)-5-甲基吡咯烷-2-基)丙酰基)-3-苯丙酸

将原料(2*S*,5*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-3-((*S*)-1-叔丁氧基-1-羰基-3-苯丙基-2-基胺)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基丙基)-5-甲基吡咯烷-1-羧酸 **3e** (150 mg，0.267 mmol)溶于 2.2 mL 二氧六环中，加入 4*M* 的氯化氢二氧六环溶液(0.160 mL，0.896 mmol)后将反应体系密封。于室温搅拌 7 小时，置于 4℃冰箱内 16 小时。反应结束后，将反应液减压浓缩，加入 15 mL 二氯甲烷，冷却至 0℃，滴加饱和碳酸氢钠溶液调至 pH 为 8，分层，水相用二氯甲烷萃取(8 mL×2)，合并有机相。有机相用饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥。过滤，滤液减压浓缩，得到标题产品(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-甲氧基-2-甲基-3-((2*S*,5*S*)-5-甲基吡咯烷-2-基)丙酰基)-3-苯丙酸 **3f** (80 mg，无色粘稠固体)，收率 74%。

第六步

(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,5*S*)-1-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-仲丁基-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷基)-5-甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸

将原料(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-甲氧基-2-甲基-3-((2*S*,5*S*)-5-甲基吡咯烷-2-基)丙酰基)-3-苯丙酸 **3f** (80 mg，0.198 mmol)，(5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷-14-羧酸 **1i** (136 mg，0.213 mmol)溶于 4.8 mL 二氯甲烷和二甲基甲酰胺(V/V=5:1)混合溶剂中，加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(0.170 mL，0.98 mmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-四甲基脲六氟磷酸酯(100 mg，0.263 mmol)。反应体系在氩气氛下，于室温下搅拌反应 1 小时。反应结束后，加入 15 mL 二氯甲烷，用水(6mL×2）洗涤。水相用二氯甲烷萃取(5mL)，合并二氯甲烷相，用饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥。过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化残留物，得到标题产品(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,5*S*)-1-((5*S*,8*S*,11*S*, 12*R*)-11-仲丁基-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷基)-5-甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **3g** (168 mg，白色泡沫状固体)，收率 81%。

第七步

(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,5*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸

将原料(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,5*S*)-1-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-仲丁基-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷基)-5-甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **3g** (167 mg，0.16 mmol)溶于 2 mL 二氯甲烷中，加入 2 mL 二乙胺。反应体系在氩气氛下，于室温下搅拌 3 小时。反应结束后，将反应液减压浓缩，得到粗品标题产品(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,5*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **3h** (180 mg，黄色液体)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

MS m/z (ESI): 802.6 [M+1]

第八步

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,5*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸

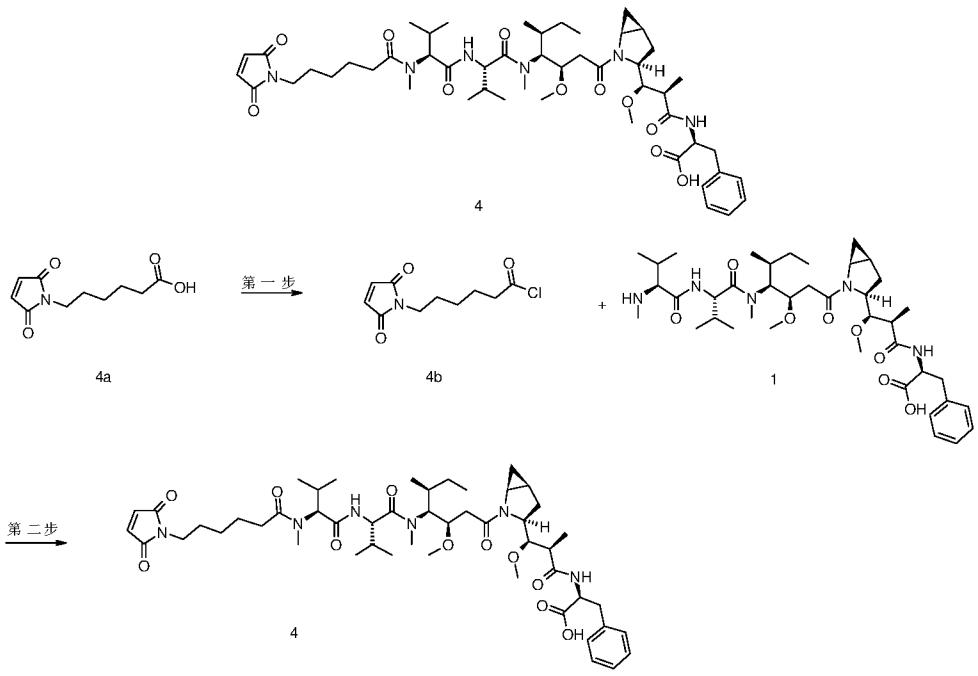
将粗品(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,5*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **3h** (130 mg，0.16 mmol)溶于 1 mL 二氧六环中，加入 3 mL 5.6*M* 的氯化氢二氧六环溶液，将反应体系密封，于室温下搅拌 12 小时。反应结束后，将反应液减压浓缩，用高效液相色谱法纯化所得残余物，得标题产品(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,5*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **3** (28 mg，白色固体)，收率 23%。

MS m/z (ESI): 746.7 [M+1]

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.31-7.14(m, 5H), 4.79-4.67(m, 2H), 4.25-4.13 (m, 1H), 4.10-3.97(m, 2H), 3.77-3.66(m, 1H), 3.60-3.52(m, 1H), 3.51-3.42(m, 1H), 3.41-3.12(m, 7H), 2.97-2.85(m, 1H), 2.67(d, 3H), 2.48-2.40(m, 2H), 2.30-2.02(m, 4H), 1.93-1.73(m, 2H), 1.70-1.55(m, 1H), 1.53-1.28(m, 5H),1.26-1.11(m, 7H), 1.10-0.99(m, 14H), 0.98-0.83(m, 4H).

实施例 4

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸



第一步

6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)已酰氯

在原料 6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)已酸 **4a** (1.5 g，7.10 mmol，采用公知的方法“*Journal of Medcinal Chemistry*, 2013, 56(24), 9955-9968”制备而得)中滴入一滴 *N*,*N*-二甲基甲酰胺，氩气氛下，干冰浴降温后，缓慢滴入 15 mL 草酰氯，滴加时剧烈搅拌，滴完于室温反应 1 小时。反应结束后，将反应液减压浓缩，用二氯甲烷溶解所得残留物，减压浓缩，得到粗品标题产物 6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)已酰氯 **4b**，产品不经纯化直接进行下一步反应。

第二步

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸

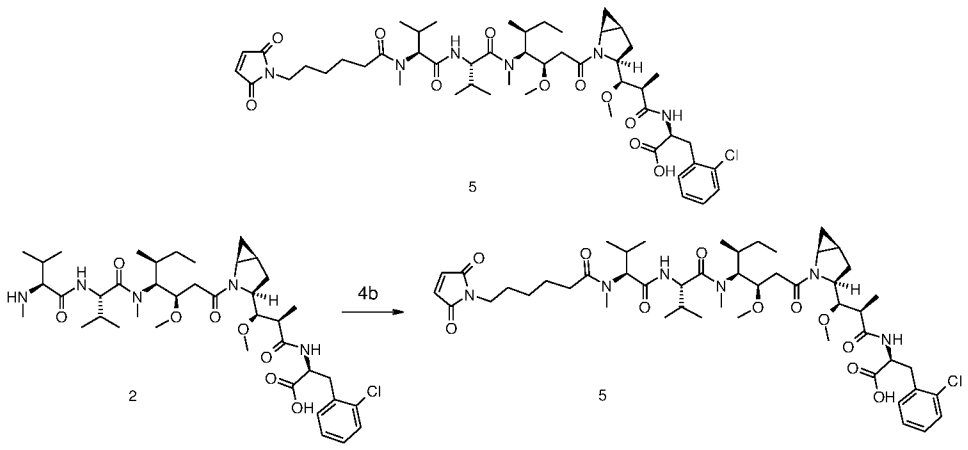
将原料(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **1** (17 mg，0.023 mmol)溶于 1 mL 二氯甲烷中，加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(20 μL，0.115 mmol)，反应体系在氩气氛下，冰浴下滴加预制的 6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)已酰氯 **4b** (7.9 mg, 0.034 mmol)的二氯甲烷溶液，滴加完毕后于室温反应 5 小时。反应结束后，加入 10 mL 甲醇淬灭，将反应液减压浓缩，用高效液相色谱法纯化所得残留物，得标题产物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **4** (9 mg，白色固体)，收率 42%。

MS m/z (ESI): 937.4 [M+1]

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.37-7.17(m, 5H), 6.84-6.79(m, 2H), 4.80-4.71(m, 2H), 4.69-4.56(m, 2H), 4.26-4.19(m, 1H), 4.14-4.07(m, 1H), 3.92-3.86(m, 1H), 3.84-3.78(m, 1H), 3.77-3.60(m, 1H), 3.55-3.47(m, 2H), 3.42-3.23(m, 5H), 3.18-3.12 (m, 2H), 3.07-3.03(m, 2H), 3.02-2.82(m, 2H), 2.66-2.58(m, 2H), 2.54-2.46(m, 1H), 2.46-2.38(m, 2H), 2.30-2.14(m, 2H), 2.09-1.99(m, 1H), 1.90-1.78(m, 1H), 1.75-1.56 (m, 6H),1.48-1.28(m, 6H), 1.20-0.79(m, 22H), 0.77-0.69(m,1H).

实施例 5

(*S*)-3-(2-氯苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*) -2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)丙酸



将原料(*S*)-3-(2-氯苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)丙酸 **2** (18 mg，0.023 mmol)溶于 1 mL 二氯甲烷中，加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(0.02 mL，0.115 mmol)，反应体系在氩气氛下，冰浴下滴加预制的 6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)己酰氯 **4b** (7.9 mg，0.034 mmol)的二氯甲烷溶液，滴加完毕后于室温反应 4 小时。反应结束后，加入 5 mL 甲醇淬灭，将反应液减压浓缩，用高效液相色谱法纯化所得残留物，得标题产物(*S*)-3-(2-氯苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2- ((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)丙酸 **5** (6 mg，白色固体)，收率 26.6%。

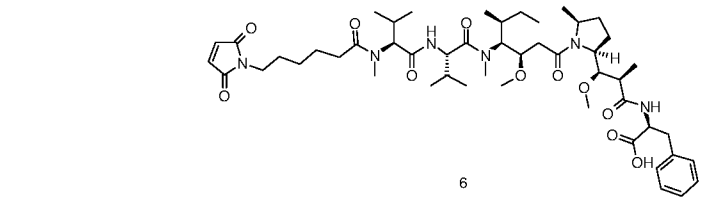
MS m/z (ESI): 971.5 [M+1]

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.42-7.34(m, 2H), 7.33-7.19(m, 2H), 6.83-6.78(m, 2H), 4.83-4.70(m, 2H), 4.68-4.56 (m, 2H), 4.24-4.16(m, 1H), 4.13-4.05(m, 1H), 4.03-3.95(m, 1H), 3.91-3.84(m, 1H), 3.76-3.65(m, 1H), 3.54-3.48(m, 2H), 3.47-3.18(m, 5H), 3.17-2.96(m, 6H), 2.67-2.58(m, 2H), 2.53-2.38(m, 3H), 2.28-2.18(m, 2H), 2.09-2.00(m,

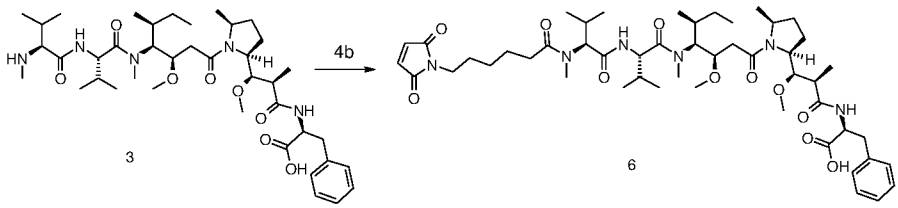
1H), 1.92-1.57(m, 7H), 1.51-1.28(m, 6H), 1.21-0.82(m, 22H), 0.78-0.69(m, 1H).

实施例 6

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,5*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸



6



3 6

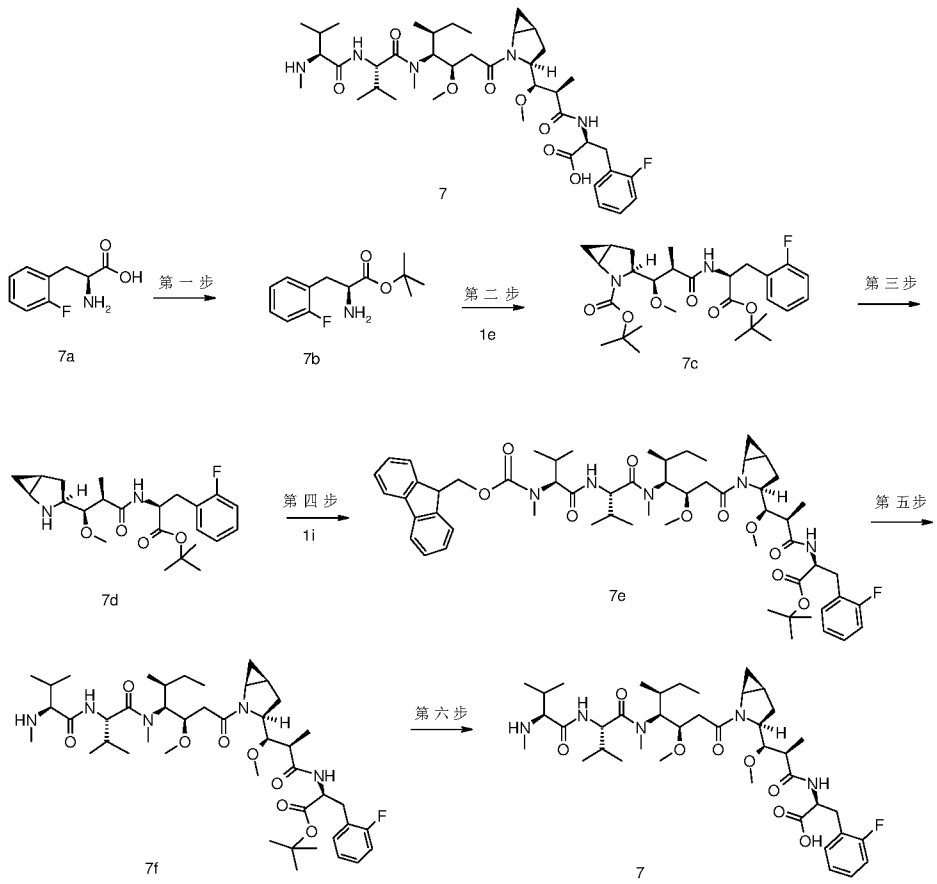
将原料(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,5*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **3** (18 mg，0.024 mmol)溶于 1 mL 二氯甲烷中，加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(0.02 mL，0.12 mmol)，反应体系在氩气氛下，冰浴下滴加预制的 6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)已酰氯 **4b** (8.3 mg, 0.036 mmol)的二氯甲烷溶液，于室温搅拌反应 4 小时。反应结束后，加入 5 mL 甲醇淬灭，将反应液减压浓缩，用高效液相色谱法纯化所得残留物，得标题产物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,5*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **6** (7 mg，白色固体)，收率 30.9%。

MS m/z (ESI): 939.5 [M+1]

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.30-7.15(m, 5H), 6.83-6.78(m, 2H), 4.78-4.69(m, 2H), 4.69-4.56 (m, 2H), 4.24-4.12(m, 1H), 4.10-3.96(m, 2H), 3.60-3.44(m, 3H), 3.41-3.22(m, 4H), 3.16-3.10(m, 2H), 3.07-3.02(m, 2H), 3.01-2.86(m, 2H), 2.52-2.38(m, 4H), 2.31-2.15(m, 3H), 2.09-1.99(m, 1H), 1.91-1.77(m, 2H), 1.71-1.56(m, 5H), 1.52-1.28(m, 9H), 1.26-1.14(m, 6H), 1.11-0.77(m,18H).

实施例 7

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸



第一步

(S)-叔丁酯 2-氨基-3-(2-氟苯基)丙酸

将原料((*S*)-2-氨基-3-(2-氟苯基)丙酸 **7a** (400 mg，2.18 mmol，采用公知的方法"*Advanced Synthesis & Catalysis*, 2012, 354(17), 3327-3332"制备而得)溶于 10 mL 乙酸叔丁酯，加入高氯酸(300 mg(70%)，3.3 mmol)，于室温下搅拌 16 小时。反应完毕后加入 6 mL 水，分液，有机相用饱和碳酸氢钠溶液(5 mL)洗涤。水相用饱和碳酸氢钠溶液调节至 pH=8，二氯甲烷(5 mL×3)萃取，合并有机相，依次用水(3 mL)，饱和氯化钠溶液(5 mL)洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得粗品标题产物(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(2-氟苯基)丙酸 **7b** (390 mg，黄色油状物)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

第二步

(1*S*,3*S*,5*S*)-叔丁酯 3-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-(叔丁氧基)-3-(2-氟苯基)-1-羰基丙基-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基丙基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-2-羧酸

将原料(2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-(叔丁氧羰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸 **1e** (100 mg，0.334 mmol)溶于 6 mL 二氯甲烷和二甲基甲酰胺(V/V=5:1)混合溶剂中，加入反应物粗品(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(2-氟苯基)丙酸 **7b** (80 mg，0.334 mmol)。再加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(0.29 mL，1.67 mmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N*,*N*,*N*',*N*'-四甲基脲六氟磷酸酯(152.3 mg，0.40 mmol)。反应体系在氩气氛下，于室温搅拌 1 小时。反应结束后，加 10 mL 水搅拌，分层，二氯甲烷层

用饱和氯化钠溶液(10 mL)洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩。用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化所得残余物，得到标题产物(1*S*,3*S*,5*S*)-叔丁酯 3-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-(叔丁氧基)-3-(2-氟苯基)-1-羰基丙基-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基丙基)-2-氮杂双环[3.1.0]已烷-2-羧酸 **7c** (173 mg，无色液体)，收率 99.5%。

MS m/z (ESI): 521.2 [M+1]

第三步

(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-氮杂双环[3.1.0]已烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸

将原料(1*S*,3*S*,5*S*)-叔丁酯 3-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-(叔丁氧基)-3-(2-氟苯基)-1-羰基丙基-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基丙基)-2-氮杂双环[3.1.0]已烷-2-羧酸 **7c** (173 mg，0.33 mmol)溶于 2 mL 二氧六环中，加入 5.6*M* 的氯化氢二氧六环溶液(0.21 mL，1.16 mmol)，氩气氛下，于室温搅拌 1 小时，置于 0℃冰箱内 12 小时。反应结束后，将反应液减压浓缩，加入 5 mL 二氯甲烷稀释，加入 10 mL 饱和碳酸氢钠溶液，搅拌 10 分钟。体系分层，水层用二氯甲烷萃取(5 mL×3)。合并二氯甲烷层，用饱和氯化钠溶液(10 mL)洗涤，无水硫酸钠干燥。过滤，滤液减压浓缩，得到粗品标题产品(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-氮杂双环[3.1.0]已烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **7d** (77 mg，黄色液体)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

MS m/z (ESI): 421.2 [M+1]

第四步

(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧-4,7,10-三氮杂十四烷基-14-酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]已烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸

将粗品(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-氮杂双环[3.1.0]已烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **7d** (77 mg，0.183 mmol)，(5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷-14-羧酸 **1i** (116.8 mg，0.183 mmol)溶于 6 mL 二氯甲烷和二甲基甲酰胺(V/V =5:1)混合溶剂中，加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(0.16 mL，0.915 mmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-四甲基脲六氟磷酸酯(84 mg，0.22 mmol)。反应体系在氩气氛下，于室温下搅拌 1 小时。反应结束后，加入 10 mL 水搅拌，分层。二氯甲烷层用饱和氯化钠溶液(10 mL)洗涤，无水硫酸钠干燥。过滤，滤液减压浓缩。用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化残留物，得到标题产品(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷基-14-酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]已烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙

酸 **7e** (190.5 mg，黄色粘稠物)，收率 100%。

MS m/z (ESI): 1040.6 [M+1]

第五步

(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸

将原料 (*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷基-14-酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **7e** (190.5 mg，0.183 mmol)溶于 1.5 mL 二氯甲烷中，加入 2 mL 二乙胺。反应体系在氩气氛下，于室温搅拌 3 小时。反应结束后，将反应液减压浓缩，得到粗品标题产品 (*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **7f** (150 mg，黄色粘稠物)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

MS m/z (ESI): 818.5 [M+1]

第六步

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸

将粗品 (*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **7f** (150 mg，0.183 mmol)溶于 1 mL 二氧六环中，加入 5.6*M* 的氯化氢二氧六环溶液 3 mL，氩气氛下，于室温搅拌 12 小时。反应结束后，将反应液减压浓缩，用乙醚带旋溶剂。所得残余物用高效液相色谱法纯化得标题产品 (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **7** (28 mg，白色粉末固体)，收率 20%。

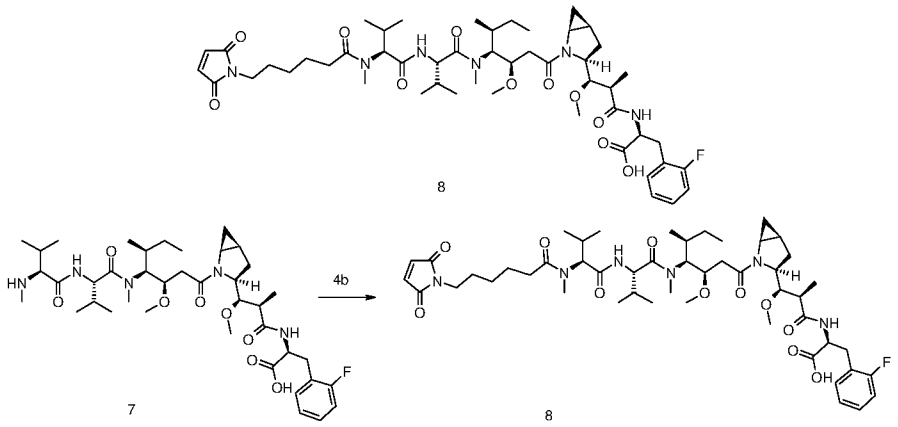
MS m/z (ESI): 762.7 [M+1]

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.38-7.18(m, 2H), 7.13-7.01(m, 2H), 4.80-4.67(m, 2H), 4.30-4.15(m, 1H), 4.13-4.01(m, 1H), 3.96-3.83(m, 2H), 3.75-3.60(m, 2H), 3.42-3.11(m, 9H), 3.06-2.95(m, 1H), 2.70-2.58(m, 4H), 2.28-2.01 (m, 4H), 1.88-1.70(m, 3H), 1.57-1.25 (m, 4H), 1.22-0.95(m, 18H), 0.92-0.80(m, 4H), 0.78-0.65(m, 1H).

实施例 8

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢

-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基已酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]已烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸



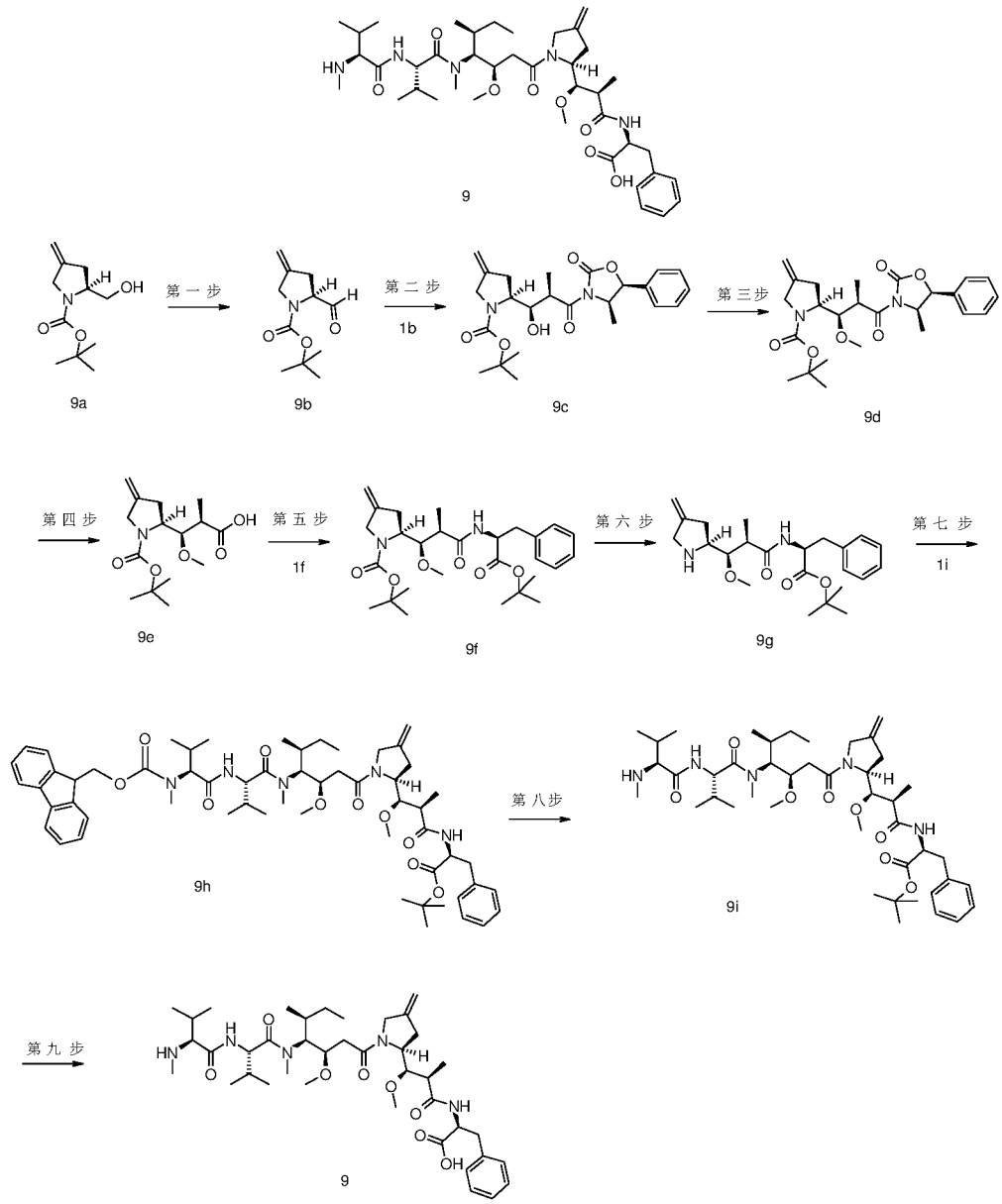
将原料(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]已烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **7** (25 mg，0.033 mmol)溶于 3 mL 二氯甲烷中，加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(0.029 mL，0.164 mmol)，反应体系在氩气氛下，冰浴下滴加预制的 6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)已酰氯 **4b** (11.3 mg，0.049 mmol)的二氯甲烷溶液，于室温反应 3 小时。反应结束后，加入 5 mL 水，搅拌 20 分钟，分液，有机层用无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，残留物用高效液相色谱法纯化得标题产物 (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基已酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]已烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **8** (7 mg，黄色粘稠物)，收率 22.4%。

MS m/z (ESI): 955.4 [M+1]

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.36-7.30(m, 1H), 7.29-7.21(m, 1H), 7.17-7.02(m, 2H), 6.83-6.79(m, 2H), 4.81-4.71(m, 2H), 4.69-4.55 (m, 2H), 4.25-4.15(m, 1H), 4.13-4.04(m, 1H), 3.96-3.85(m, 2H), 3.70-3.61(m, 1H), 3.55-3.46(m, 3H), 3.40-3.21 (m, 4H), 3.18-3.10(m, 2H), 3.07-2.96(m, 4H), 2.67-2.56(m, 2H), 2.54-2.34(m, 3H), 2.29-2.17(m, 2H), 2.10-1.99(m, 1H), 1.89-1.57(m, 7H), 1.52-1.28(m, 6H), 1.21-1.11 (m, 4H), 1.07-0.96(m, 6H), 0.95-0.81(m, 12H), 0.80-0.69(m, 1H).

实施例 9

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰胺)-4-亚甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸



第一步

(*S*)-叔丁酯 2-甲酰基-4-亚甲基吡咯烷-1-羧酸

将原料(*S*)-叔丁酯 2-(羟甲基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羧酸 **9a** (1.32 g，6.19 mmol，采用公知的方法“*From Journal of Organic Chemistry*, 2003, 68(10), 3923-3931”制备而得)溶于 15 mL 二氯甲烷中，降温至 0℃。反应体系于氩气氛下，加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(5.38 mL，30.9 mmol)，二甲基亚砜(7.26 g，92.9 mmol)，加入三氧化硫-吡啶络合物(7.26 g，92.9 mmol)，反应液于 0℃下反应 3 小时。反应结束后，加入磷酸盐缓冲液(pH=7)淬灭反应，依次用水，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化残留物，得标题产物(*S*)-叔丁酯 2-甲酰基-4-亚甲基吡咯烷-1-羧酸 **9b** (1.1 g，淡黄色液体)，产率 84.2%。

第二步

(*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-1-羟基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羧酸

将原料(4*R*,5*S*)-4-甲基-5-苯基-3-丙酰基噁唑烷酮 **1b** (1.43 g，6.15 mmol)溶于 30 mL 二氯甲烷中，氩气氛下，降温至 0℃，滴加三乙胺(0.98 mL，7.08 mmol)，再滴加三氟甲磺酸二正丁基化硼(6.65 mL，6.65 mmol)，于 0℃下搅拌 50 分钟，将反应液降温至-78℃，加入预制的(*S*)-叔丁酯 2-甲酰基-4-亚甲基吡咯烷-1-羧酸 **9b** (1.43 g，6.15 mmol)的二氯甲烷溶液，于-78℃下搅拌 2 小时，于 0℃搅拌 1 小时，于室温搅拌 1 小时。加入 36 mL 磷酸盐缓冲液(pH=7)和甲醇(V/V=3:1)的混合液淬灭反应。于 0℃下加入甲醇和双氧水(V/V=1:2)的混合液，于室温搅拌 1 小时。反应结束后，旋除甲醇和有机相，残留水相用二氯甲烷萃取，合并有机相，依次用水洗涤，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化残留物，得标题产物(*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-1-羟基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羧酸 **9c** (810 mg，白色泡沫状固体)，产率 30%。

MS m/z (ESI): 354.2 [M-100+1]

第三步

(*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-1-甲氧基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羧酸

将原料(*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-1-羟基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羧酸 **9c** (810 mg，1.82 mmol)溶于 15 mL 二氯甲烷，加入碾碎的分子筛，加入碳酸钾(1.25 g，9.11 mmol)，三氟甲磺酸甲酯(897.7 mg，5.47 mmol)，于室温搅拌反应 12 小时。反应结束后，将反应液过滤，滤饼用二氯甲烷洗涤，合并有机相，将有机相减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化所得残余物，得到标题产物(*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-1-甲氧基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羧酸 **9d** (280 mg，白色泡沫固体)，产率 33.5%。

MS m/z (ESI): 359.2 [M-100+1]

第四步

(2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-(叔丁氧羰基)-4-亚甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸

将原料(*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-1-甲氧基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羧酸 **9d** (400 mg，0.87 mmol)溶于 20 mL 四氢呋喃，加入一水合氢氧化锂(62.2 mg,，1.484 mmol)，反应体系在氩气氛下，降温至 0℃，缓慢滴加 30%的双氧水(112.7 mg，3.31 mmol)，反应体系于室温反应 12 小时。反应结束后，向反应液中加入亚硫酸钠(416 mg，3.3 mmol)，于室温搅拌 1 小时。将四氢呋喃旋干，残余物中加入水溶解，用二氯甲烷萃取。水相滴加稀盐酸调节反应液 pH 为 3～4，用二氯甲烷萃取(30 mL×3)，合并有机相，依次用水洗

涤，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得得粗品标题产物(2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-(叔丁氧羰基)-4-亚甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸 **9e** (230 mg，无色液体)，产品不经纯化直接进行下一步。

MS m/z (ESI): 298.2 [M-1]

第五步

(*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-(叔丁氧基)-1-羰基-3-苯丙基-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基丙基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羧酸

将粗品(2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-(叔丁氧羰基)-4-亚甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸 **9e** (220 mg，0.735 mmol)溶于 6 mL 二氯甲烷中，加入反应物(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-苯丙酸 **1f** (178.8 mg，0.809 mmol)。再加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(0.51 mL，2.94 mmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N*,*N*,*N*',*N*'-四甲基脲六氟磷酸酯(363 mg，0.956 mmol)。反应体系在氩气氛下，于室温下反应 3 小时。反应结束后，反应液用水洗涤，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化所得残余物，得到标题产物(*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-(叔丁氧基)-1-羰基-3-苯丙基-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基丙基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羧酸 **9f** (271 mg，白色固体)，收率 66%。

MS m/z (ESI): 503.3 [M+1]

第六步

(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-甲氧基-2-甲基-3-((*S*)-4-亚甲基吡咯烷-2-基)丙酰胺)-3-苯丙酸

将原料(*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-(叔丁氧基)-1-羰基-3-苯丙基-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基丙基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羧酸 **9f** (270 mg，0.537 mmol)溶于 4 mL 1,4-二氧六环中，加入 4*M* 的氯化氢二氧六环溶液(0.335 mL，1.881 mmol)，于室温下搅拌 1 小时，置于 0～4℃冰箱内 12 小时。将反应物减压浓缩，残留物用二氯甲烷溶解，滴加饱和碳酸氢钠溶液调节 pH 为 8～9，分液，水相用二氯甲烷萃取。合并有机相，依次用水洗涤，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得到粗品标题产品(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-甲氧基-2-甲基-3-((*S*)-4-亚甲基吡咯烷-2-基)丙酰胺)-3-苯丙酸 **9g** (210 mg，淡黄色油状物)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

MS m/z (ESI): 403.4 [M+1]

第七步

(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷基-14-酰基)-4-亚甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸

将粗品(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-甲氧基-2-甲基-3-((*S*)-4-亚甲基吡咯烷-2-基)丙酰胺)-3-苯丙酸 **9g** (210 mg，0.521 mmol)，(5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-1- (9*H*-

芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷-14-羧酸 **1i** (365.9 mg，0.547 mmol)溶于 6 mL 二氯甲烷中，加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(0.4537 mL，2.609 mmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-四甲基脲六氟磷酸酯(257.8 mg，0.678 mmol)。反应体系在氩气氛下，室温下搅拌 2 小时。反应结束后，反应液依次用水洗涤，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化残留物，得到标题产品(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷基-14-酰基)-4-亚甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **9h** (345 mg，白色泡沫状固体)，收率 64.7%。

MS m/z (ESI): 1022.5 [M+1]

第八步

(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-4-亚甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸

将原料(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-1- (9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷基-14-酰基)-4-亚甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **9h** (345 mg，0.337 mmol)溶于 2 mL 二氯甲烷中，加入 3 mL 二乙胺。反应体系在氩气氛下，于室温下搅拌 2 小时。反应结束后将反应液减压浓缩，得到粗品标题产品(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-4-亚甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **9i** (375 mg，黄色油状物)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

MS m/z (ESI): 800.5 [M+1]

第九步

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-4-亚甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸

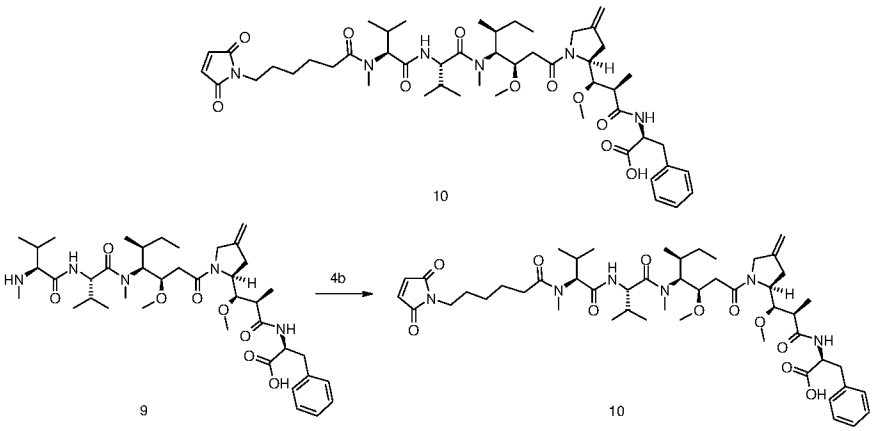
将粗品(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2- ((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-4-亚甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **9i** (370 mg，0.462mmol)加入反应瓶中，加入 4*M* 的氯化氢二氧六环溶液 7 mL，将反应体系密封，于室温下搅拌 12 小时。反应结束后，将反应液减压浓缩，残留物用高效液相色谱法纯化得标题产物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-4-亚甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **9** (30 mg，白色粉末)，收率 11.9%。

MS m/z (ESI): 744.7 [M+1]

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10.57(s, 1H), 10.00(s, 1H), 8.41-8.26(m, 2H), 7.52-6.99(m, 5H), 5.34(s, 1H)，5.02-4.95(m, 4H), 4.38-4.33(m, 2H), 4.16(m, 2H), 3.93-3.75(m, 3H), 3.49-3.07(m, 6H), 2.94-2.32(m, 16H), 2.30-2.01(m, 4H), 1.75-1.65(m, 2H), 1.32-0.83(m, 16H).

实施例 10

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-4-亚甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸

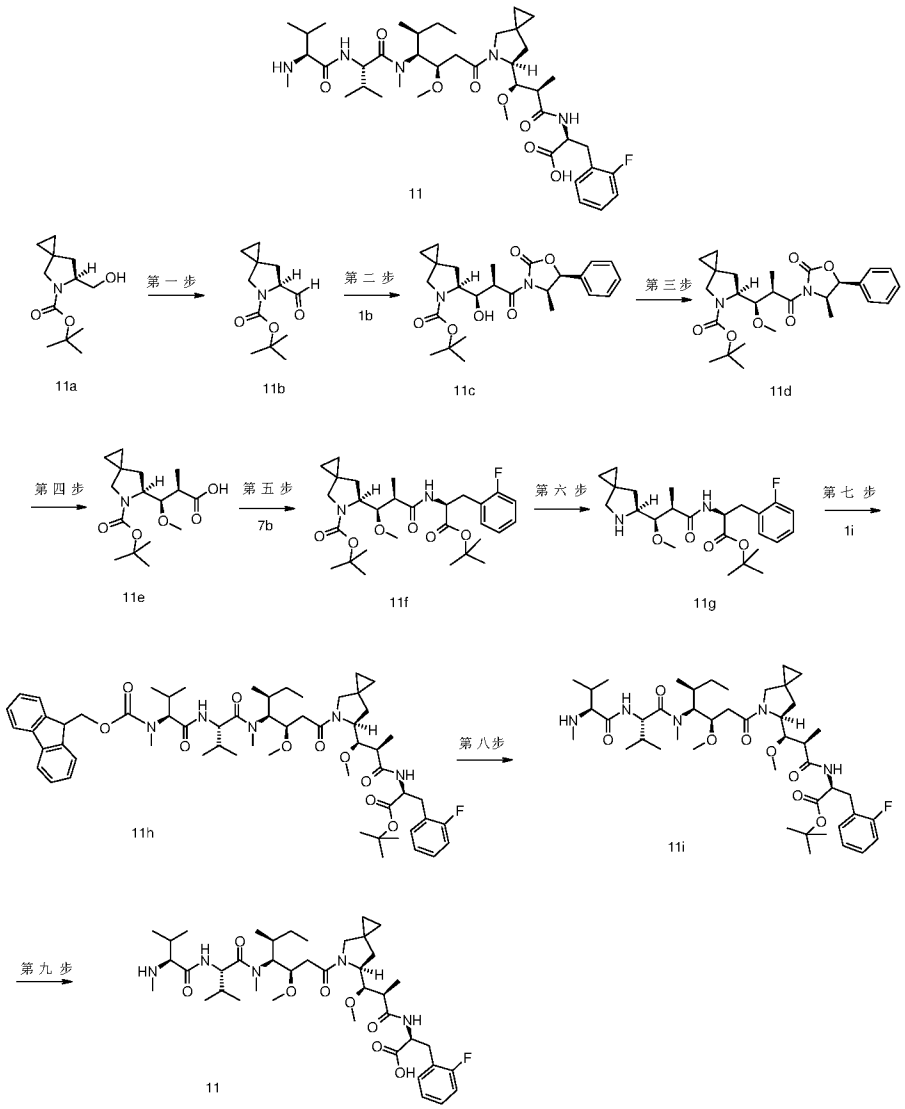


将原料(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-4-亚甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **9** (22 mg，0.0295 mmol)溶于 3 mL 二氯甲烷中，加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(19 mg，0.1479 mmol)，降温至 0℃，滴加预制的 6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)已酰氯 **4b** (10.1 mg，0.0443 mmol)的二氯甲烷溶液，反应体系在氩气氛下，于室温反应 2.5 小时。反应结束后，加入甲醇淬灭，将反应液减压浓缩，用高效液相色谱法纯化所得残留物，得标题产物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-4-亚甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **10** (1.3 mg，白色粘稠物)，收率 4.6%。

MS m/z (ESI): 937.9 [M+1]

实施例 11

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸



第一步

(*S*)-叔丁酯 6-甲酰基-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-5-羧酸

将原料(*S*)-叔丁酯 6-(羟甲基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-5-羧酸 **11a** (2.37 g，10.4 mmol, 采用公知的方法“*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 23(9), 2653-2658”制备而得)溶于 40 mL 二氯甲烷中，降温至 0℃。反应体系在氩气氛下，加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(10.8 mL，62.5 mmol)，二甲基亚砜(12.2 g，156.4 mmol)，加入三氧化硫-吡啶络合物(6.63 g，41.7 mmol)，反应液于 0℃反应 3 小时。反应结束后，加入磷酸盐缓冲液(pH=7)淬灭反应，依次用水，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化残留物，得标题产物(*S*)-叔丁酯 6-甲酰基-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-5-羧酸 **11b** (2 g，黄色液体)，产率 88%。

第二步

(*S*)-叔丁酯 6-((1*R*,2*R*)-1-羟基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-5-羧酸

将原料(4*R*,5*S*)-4-甲基-5-苯基-3-丙酰基噁唑烷酮 **1b** (2 g，8.88 mmol)溶于 35 mL 二氯甲烷中，氩气氛下，滴加三乙胺(1.42 mL，10.2 mmol)，降温至 0℃，滴加三氟甲磺酸二正丁基化硼(9.59 mL，9.59 mmol)，于 0℃搅拌 50 分钟，于 78℃加入预制的(*S*)-叔丁酯 6-甲酰基-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-5-羧酸 11**b** (2 g，8.88 mmol)的二氯甲烷溶液，于-78℃下搅拌 2 小时，于 0℃搅拌 1 小时，于室温搅拌 1 小时。反应结束后，加入磷酸盐缓冲液(pH=7.0)和甲醇(V/V=3:1)的混合液淬灭反应。于 0℃加入甲醇和双氧水(V/V=1:2)的混合液，于室温搅拌 1 小时。减压浓缩后，加水溶解残留物，用二氯甲烷萃取，合并有机相，依次用水洗涤，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化残留物，得标题产物(*S*)-叔丁酯 6-((1*R*,2*R*)-1-羟基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-5-羧酸 **11c** (1.8g，白色泡沫状固体)，产率 44.2%。

MS m/z (ESI): 459.4 [M+1]

第三步

(*S*)-叔丁酯 6-((1*R*,2*R*)-1-甲氧基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-5-羧酸

将原料(*S*)-叔丁酯 6-((1*R*,2*R*)-1-羟基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-5-羧酸 **11c** (1.8 g，3.92 mmol)溶于 30 mL 二氯甲烷，加入碾碎的分子筛，反应体系在氩气氛下，加入碳酸钾(3.78 g，27.48 mmol)，三氟甲磺酸甲酯(3.22 g，19.64 mmol)，于室温下搅拌反应 12 小时。反应结束后，将反应液过滤，滤饼用二氯甲烷洗涤，合并有机相，将有机相减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 A 纯化所得残余物，得到标题产物(*S*)-叔丁酯 6-((1*R*,2*R*)-1-甲氧基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-5-羧酸 **11d** (930 mg，无色油状物)，产率 50.2%。

MS m/z (ESI): 473.4 [M+1]

第四步

(2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-(叔丁氧羰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸

将原料(*S*)-叔丁酯 6-((1*R*,2*R*)-1-甲氧基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-5-羧酸 **11d** (1.03 g， 2.8 mmol)溶于 20 mL 四氢呋喃，加入一水合氢氧化锂(155 mg,，3.7 mmol)，反应体系在氩气氛下，滴加 30%的双氧水(939 mg，8.28 mmol)，反应体系于室温反应 12 小时。反应结束后，向反应液中加入亚硫酸钠(1.04 g，8.28 mmol)，于室温搅拌 1 小时。将四氢呋喃旋干，残余物中加入水溶解，用二氯甲烷萃取。水相滴加稀盐酸调节反应液 pH 为 3～4，用二氯甲烷萃取(30 mL×5)，合并有机相，依次用水洗涤，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得得粗品标题产物(2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-(叔丁氧羰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸 **11e**

(700 mg，无色粘稠液体)，产品不经纯化直接进行下一步。

MS m/z (ESI): 314.4 [M+1]

第五步

(*S*)-叔丁酯 6-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-(叔丁氧基)-3-(2-氟苯基)-1-羰基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基丙基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-5-羧酸

将粗品(2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-(叔丁氧羰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸 11**e** (350 mg，1.117 mmol)溶于 6 mL 二氯甲烷中，加入反应物(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(2-氟苯基)丙酸 **7b** (267 mg，1.117 mmol)。反应体系在氩气氛下，加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(720 mg，5.587 mmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-四甲基脲六氟磷酸酯(509.8 mg，1.341 mmol)，于室温下反应 2 小时。反应结束后，反应液用水洗涤，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化所得残余物，得到标题产物(*S*)-叔丁酯 6-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-(叔丁氧基)-3-(2-氟苯基)-1-羰基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基丙基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-5-羧酸 **11f** (570 mg，无色油状物)，收率 95.3%。

MS m/z (ESI): 535.3 [M+1]

第六步

(*S*)-叔丁酯 3-(2-氟苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-甲氧基-2-甲基-3-((*S*)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)丙酰胺)丙酸

将原料(*S*)-叔丁酯 6-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-(叔丁氧基)-3-(2-氟苯基)-1-羰基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基丙基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-5-羧酸 **11f** (570 mg，1.049 mmol)溶于 8 mL 1,4-二氧六环中，加入 4*M* 的氯化氢二氧六环溶液(0.749 mL，4.196 mmol)，于室温下搅拌 1 小时，置于 0～4℃冰箱内 12 小时。将反应物减压浓缩，残留物用二氯甲烷溶解，滴加饱和碳酸氢钠溶液调节 pH 为 8～9，分液，水相用二氯甲烷萃取。合并有机相，依次用水洗涤，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得到粗品标题产品(*S*)-叔丁酯 3-(2-氟苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-甲氧基-2-甲基-3-((*S*)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)丙酰胺)丙酸 11**g** (440 mg，淡黄色油状物)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

MS m/z (ESI): 435.4 [M+1]

第七步

(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷基-14-酰基-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸

将粗品(*S*)-叔丁酯 3-(2-氟苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-甲氧基-2-甲基-3-((*S*)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)丙酰胺)丙酸 11**g** (440 mg，1.013 mmol)，(5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷-14-羧酸 **1i** (645.8 mg，1.013 mmol)溶于 10 mL 二氯甲烷中，

加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(0.88 mL，5.06 mmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-四甲基脲六氟磷酸酯(500.5 mg，1.317 mmol)。反应体系在氩气氛下，于室温下搅拌 2 小时。反应结束后，反应液依次用水洗涤，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化残留物，得到标题产品(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷基-14-酰基-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **11h** (570 mg，白色粉末)，收率 53.4%。

MS m/z (ESI): 1054.9 [M+1]

第八步

(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸

将原料(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷基-14-酰基-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **11h** (560 mg，0.531 mmol)溶于 2 mL 二氯甲烷中，加入 6 mL 二乙胺，于室温下搅拌 2.5 小时。反应结束后将反应液减压浓缩，得到粗品标题产品(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **11i** (550 mg，白色粘稠物)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

MS m/z (ESI): 832.5 [M+1]

第九步

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸

将粗品(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2- ((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **11i** (450 mg，0.541 mmol)加入反应瓶中，加入 4*M* 的氯化氢二氧六环溶液 7 mL，将反应体系密封，于室温下搅拌反应 12 小时。反应结束后，将反应液减压浓缩，残留物用高效液相色谱法纯化得标题产物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **11** (403 mg，白色固体)，收率 96%。

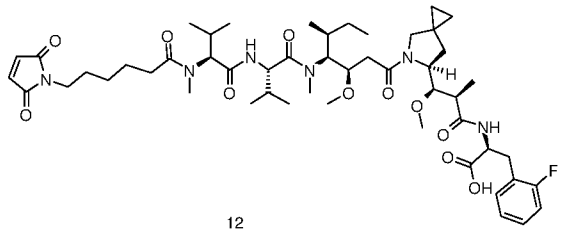
MS m/z (ESI): 776.7 [M+1]

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.30-7.22(m, 2H), 7.12-7.04(m, 2H), 4.72-4.68(m, 2H),

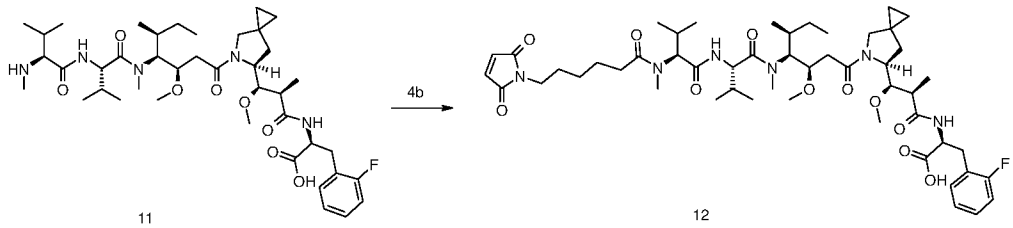
4.13-4.07(m, 2H), 3.96-3.94(m, 1H), 3.70-3.66(m, 2H), 3.50-3.47(m, 2H), 3.40-3.37(m, 3H), 3.34-3.28(m, 4H), 3.26-3.22(m, 2H), 3.11(s,1H), 3.05-2.91(m, 2H), 2.67-2.65(m, 3H), 2.57-2.43(m, 2H), 2.39-2.28(m, 2H), 2.25-2.16(m, 3H), 1.93-1.88 (m, 2H), 1.55-1.43(m, 2H), 1.23-1.21(d, 2H), 1.16-1.08(m, 3H), 1.08-0.97 (m, 10H), 0.89-0.83(m, 3H), 0.66-0.53(m, 3H), 0.46-0.43(m, 2H).

实施例 12

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸



12



11 12

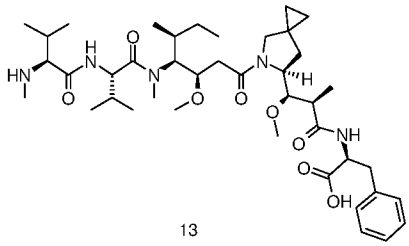
将原料(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **11** (150 mg，0.193 mmol)溶于 7 mL 二氯甲烷中，加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(87.3 mg，0.677 mmol)，反应体系在氩气氛下，降温至 0℃，滴加预制的 6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)已酰氯 **4b** (57.6 mg，0.251 mmol)的二氯甲烷溶液，于室温反应 2 小时。反应结束后，加入甲醇淬灭，将反应液减压浓缩，用高效液相色谱法纯化所得残留物，得标题产物 (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **12** (14.7 mg，白色粉末)，收率 7.8%。

MS m/z (ESI): 969.9 [M+1]

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.29-7.23(m, 2H), 7.10-7.04(m, 2H), 6.79-6.78(m, 2H), 4.69-4.54(m, 3H), 4.18-4.07(m, 3H), 3.98-3.92(m, 1H), 3.75-3.71(m, 2H), 3.50-3.47(m, 3H), 3.42-3.39(m, 2H), 3.34-3.32(m, 5H), 3.27-3.19(m, 4H), 3.09-2.95(m, 5H), 2.49-2.47(m, 2H), 2.41-2.36(m, 2H), 2.29-2.18(m, 3H), 2.09-2.02(m, 2H), 1.90-1.87(m, 2H), 1.63-1.59(m, 4H), 1.49(s, 2H), 1.32-1.28(m, 3H), 1.21-1.12(m, 3H), 1.00-0.81(m, 12H), 0.62-0.55(m, 3H), 0.46-0.40(m, 2H).

实施例 13

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸



13

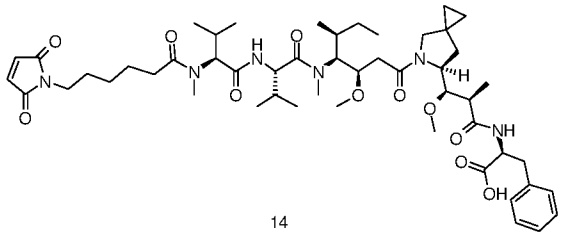
采用实施例 11 的合成路线，将第五步原料替换为(2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-(叔丁氧羰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸 **11e** 和(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-苯丙酯 **1f** 制得标题产物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸 **13** (219 mg，白色粉末)。

MS m/z (ESI): 758.7 [M+1]

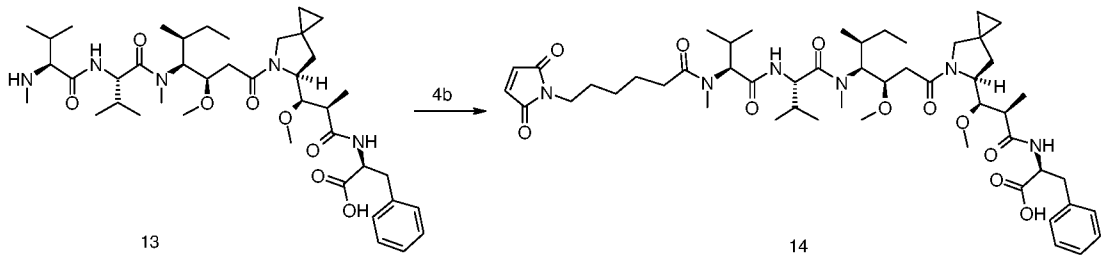
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.31-7.19(m, 5H), 4.70-4.68(m, 2H), 4.14-4.03(m, 2H), 3.95-3.93(m, 1H), 3.69-3.66(m, 2H), 3.48-3.45(m, 2H), 3.43-3.38(m, 3H), 3.34-3.29 (m, 4H), 3.23-3.21(m, 2H), 3.11(s, 1H), 2.97-2.89(m, 2H), 2.67-2.65(m, 3H), 2.51-2.43(m, 2H), 2.39-2.27(m, 2H), 2.21-2.06(m, 3H), 1.88-1.82(m, 2H), 1.41-1.39 (m, 2H), 1.23-1.21(d, 2H), 1.16-1.10(m, 3H), 1.08-0.98(m, 10H), 0.89-0.84(m, 3H), 0.63-0.52(m, 3H), 0.46-0.43(m, 2H).

实施例 14

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸



14



13 14

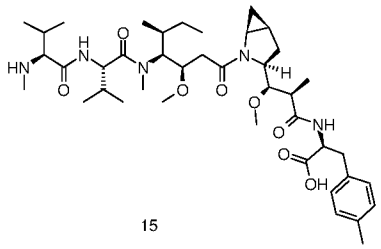
将原料(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸 **13** (120 mg，0.158 mmol)溶于 5 mL 二氯甲烷中，加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(71.5 mg，0.554 mmol)，反应体系在氩气氛下，于 0℃滴加预制的 6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)己酰氯 **4b** (47.1 mg，0.2059 mmol)的二氯甲烷溶液，于室温反应 2 小时。反应结束后，加入 1 mL 甲醇，搅拌 10 分钟，将反应液减压浓缩，用高效液相色谱法纯化所得残留物，得标题产物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **14** (5.1 mg，白色粉末)，收率 3.39%。

MS m/z (ESI): 951.9 [M+1]

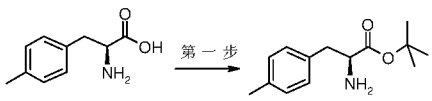
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.29-7.18(m, 5H), 6.80-6.79(m, 2H), 4.75-4.61(m, 3H), 4.21-3.99(m, 3H), 3.94-3.91(m, 1H), 3.74-3.70(m, 2H), 3.51-3.44(m, 3H), 3.42-3.37(m, 2H), 3.34-3.28(m, 5H), 3.23-3.21(m, 4H), 3.10-2.86(m, 5H), 2.49-2.36(m, 4H), 2.32-2.17(m, 3H), 2.12-2.03(m, 2H), 1.88-1.80(m, 2H), 1.67-1.58(m, 4H), 1.49(s, 2H), 1.37-1.26(m, 3H), 1.22-1.13(m, 3H), 1.00-0.83(m, 12H), 0.63-0.51(m, 3H), 0.43-0.40(m, 2H).

实施例 15

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(对-甲苯基)丙酸



15



15a 15b

(S)-tert-butyl 2-amino-3-(p-tolyl)propanoate

(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(对甲苯基)丙酸

将原料(*S*)-2-氨基-3-(对甲苯基)丙酸 **15a** (400 mg，2.23 mmol，采用公知的方法“*Organic & Biomolecular Chemistry*, 2004, 2(18), 2684-2691”制备而得)溶于 10 mL 乙酸叔丁酯，反应体系在氩气氛下，加入高氯酸(336.3 mg(70%)，3.34 mmol)，于室温下搅拌 16 小时。反应完毕后加入 10 mL 水，分液，水相用饱和碳酸氢钠溶液

调节 pH=8，二氯甲烷(5mL×3)萃取，合并有机相，用饱和氯化钠溶液(5 mL)洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得标题产物(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(*p*-甲苯基)丙酸 **15b** (370 mg，白色固体)，收率 70%。

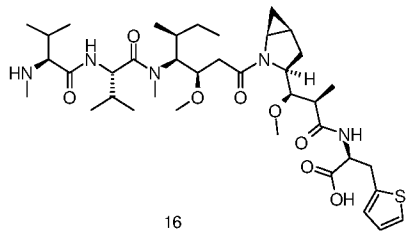
采用实施例 **1** 的合成路线，将第四步原料替换为(2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-(叔丁氧羰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-异丁酸 **1e** 和(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(*p*-甲苯基)丙酸 **15b**，制得标题产物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2- ((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(对-甲苯基)丙酸 **15** (30 mg，白色粉末)。

MS m/z (ESI): 758.8 [M+1]

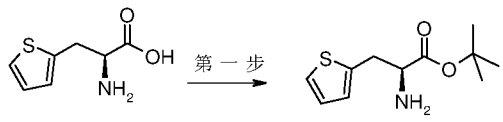
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.19-7.07(m, 4H), 4.82-4.68(m, 2H), 4.30-4.18 (m, 1H), 4.15-4.05(m, 1H), 3.89-3.84(m, 1H), 3.83-3.76(m, 1H), 3.74-3.62(m, 2H), 3.47-3.12(m, 9H), 2.89-2.79(m, 1H), 2.70-2.59(m, 4H), 2.34-2.03(m, 7H), 1.91-1.75 (m, 1H), 1.73-1.53(m, 2H), 1.50-1.24(m,4H),1.22-0.92(m, 18H), 0.90-0.79(m, 4H), 0.75-0.64(m,1H).

实施例 16

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(噻吩-2-基)丙酸



16



16a 16b

第一步

(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(噻吩-2-基)丙酸

将原料(*S*)-2-氨基-3-(噻吩-2-基)丙酸 **16a** (400 mg，2.33 mmol，采用公知的方法“*European Journal of Organic Chemistry*, 2006, (5), 1113-1116”制备而得)溶于 10 mL 乙酸叔丁酯，反应体系在氩气氛下，冷却至 0℃，滴加高氯酸(352 mg(70%)，3.5 mmol)，于室温搅拌反应 16 小时。反应结束后，加入水，加饱和碳酸氢钠溶液调节 pH 为 8～9，用二氯甲烷萃取，合并有机相，依次用水洗涤，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得粗品标题产物(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(噻吩-2-基)丙酸 **16b** (370 mg，淡黄油状物)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

MS m/z (ESI): 228.3 [M+1]

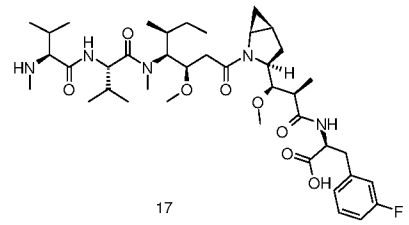
采用实施例 1 的合成路线，将第四步原料替换为(2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-(叔丁氧羰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-异丁酸 **1e** 和(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(噻吩-2-基)丙酸 **16b**，制得标题产物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(噻吩-2-基)丙酸 **16** (18 mg，白色粉末)。

MS m/z (ESI): 527.6 [M+1]

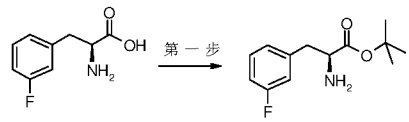
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 11.00(s, 1H), 8.44(s, 1H), 7.17-7.15(d, 1H), 6.94-6.88 (d, 2H), 4.97-4.95(m, 2H), 4.10-4.08(m, 1H), 3.85-3.83(m, 2H), 3.71-3.69(m, 2H), 3.52-3.50(m, 2H), 3.37-3.34(m, 12H), 3.06-3.04(m, 2H), 2.80-2.78(m, 2H), 2.3-2.26 (m, 4H), 1.64-1.59(m, 3H), 1.48-1.46(m, 2H), 1.31-1.259(m, 12H), 1.08-0.98(m, 8H), 0.89-0.82(m, 4H).

实施例 17

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(3-氟苯基)丙酸



17



17a 17b

第一步

(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(3-氟苯基)丙酸

将原料(*S*)-2-氨基-3-(3-氟苯基)丙酸 **17a** (549 mg，3 mmol，采用公知的方法“*Advanced Synthesis & Catalysis*, 2012, 354(17), 3327- 3332”制备而得)溶于 15 mL 乙酸叔丁酯，反应体系在氮气氛下，于 0℃滴加高氯酸(450 mg(70%)，4.5 mmol)，滴完于室温反应 12 小时。反应完毕后加入 30 mL 水，分液，有机相依次用 20 mL1*N* 的盐酸洗涤，饱和碳酸氢钠溶液洗涤，合并水相。水相用饱和碳酸氢钠溶液调节 pH 为 8～9，二氯甲烷(100 mL×2)萃取，合并有机相，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得粗品标题产物(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(3-氟苯基)丙酸 **17b** (600 mg，油状物)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

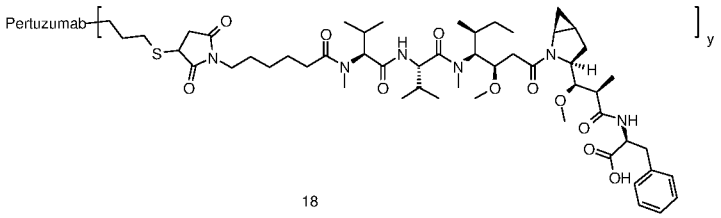
采用实施例 1 的合成路线，将第四步原料替换为((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-(叔丁

氧羰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-异丁酸 **1e** 和(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(3-氟苯基)丙酸 **17b**，制得标题产物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(3-氟苯基)丙酸 **17** (25 mg，白色粉末)。

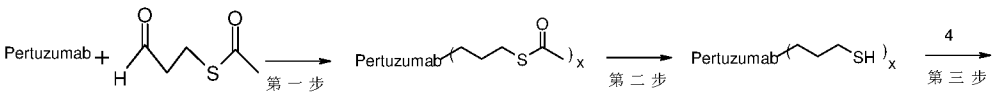
MS m/z (ESI): 762.8 [M+1]

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.29-7.21(m, 1H), 7.08-6.87(m, 3H), 4.81-4.73(m, 1H), 4.72-4.67(m, 1H), 4.61-4.53(m, 1H), 4.29-4.22(m, 1H), 4.15-4.06(m, 1H), 3.99-3.93(m, 1H), 3.75-3.58(m, 2H), 3.43-3.12(m, 9H), 2.99-2.90(m, 1H), 2.69-2.60 (m, 4H), 2.30-1.97(m, 4H), 1.87-1.77(m, 1H), 1.63-1.53(m, 1H), 1.49-1.36(m, 1H), 1.18-0.92(m, 22H), 0.91-0.82(m, 4H), 0.81-0.71(m,1H).

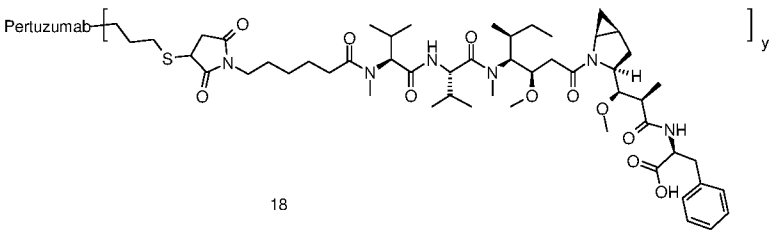
实施例 18



18



18a 18b 18c



18

第一步

将硫代乙酸 *S*-(3-羰基丙基)酯 **18a**(0.35 mg，2.65 μmol)，溶解于 0.45 mL 乙腈溶液，备用；向帕妥珠单抗（Pertuzumab）pH=4.5 的乙酸/乙酸钠缓冲液(10.85 mg/ml，4.5 mL，0.488 mmol)加入上述预制的硫代乙酸 *S*-(3-羰基丙基)酯 **18a** 的乙腈溶液，然后滴加 1.0 mL 的氰基硼氢化钠(7.06 mg, 112 μmol)的水溶液，于 25℃下振荡反应 2 小时。反应结束后用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05*M* 的 PBS 溶液)后得标题产物 **18b** 溶液，直接进行下一步反应。

第二步

向 **18b** 溶液(15.0 mL)中加入 0.45 mL 的 2.0*M* 盐酸羟胺溶液，于 25℃下振荡反应 30 分钟后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05*M*

的 PBS 溶液)后得标题产物帕妥珠单抗-丙硫醇 **18c** 溶液(浓度 1.65 mg/ml，22.6 mL)。

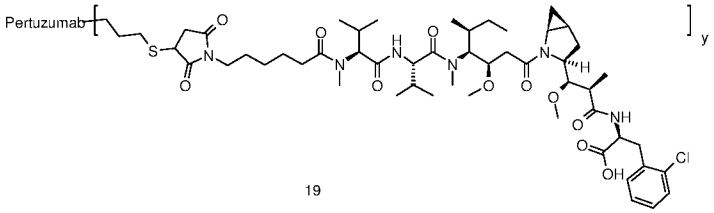
第三步

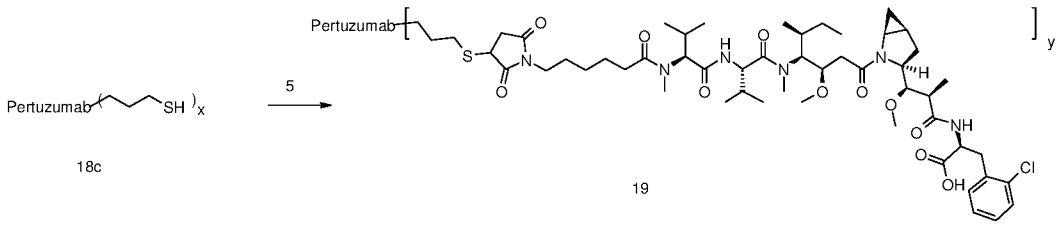
将化合物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **4** (1.09 mg，1.16 μmol)溶解于 1.1 mL 乙腈中，加入帕妥珠单抗-丙硫醇溶液 **18c** (1.65 mg/mL，11.3 mL)中，于 25℃下振荡反应 4 小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的含 0.05*M* 的 PBS 溶液)，在无菌条件下通过 0.2 μm 滤器过滤后得标题产物 **18** 的 PBS 缓冲液(0.75 mg/mL，19.5 mL)，于 4℃冷冻储存。

Q-TOF LC/MS: 特征峰：148119.54(M_{Ab}+0D)、149331.45(M_{Ab}+1D)、150407.02(M_{Ab}+2D)、151297.79(M_{Ab}+3D)、152448.85(M_{Ab}+4D)、153782.23(M_{Ab}+5D)。

平均值：y=2.0。

实施例 19



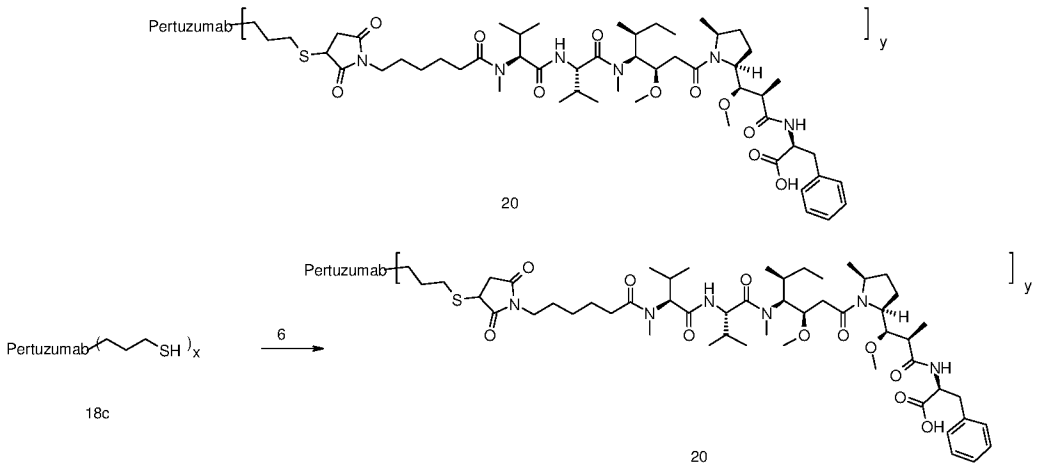


将化合物(*S*)-3-(2-氯苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)丙酸 **5** (1.39 mg，1.43 μmol)溶解于 1.1 mL 乙腈中，加入帕妥珠单抗-丙硫醇溶液 **18c** (1.65 mg/mL，11.3 mL)中，于 25℃下振荡反应 4 小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05*M* 的 PBS 溶液)，在无菌条件下通过 0.2 μm 滤器过滤后得标题产物 **19** 的 PBS 缓冲液(0.78 mg/mL，20.0 mL)，于 4℃冷冻储存。

Q-TOF LC/MS: 特征峰：148119.68(M_{Ab}+0D)、149308.79(M_{Ab}+1D)、150194.76(M_{Ab}+ 2D)、151354.52(M_{Ab}+3D)、152410.57(M_{Ab}+4D)、153375.31(M_{Ab}+5D)。

平均值：y=1.9。

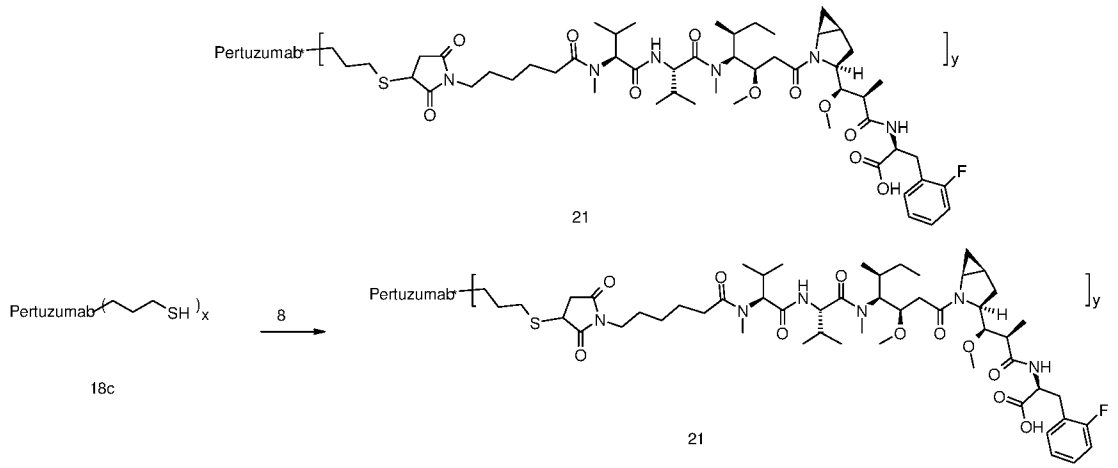
实施例 20



将化合物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,5*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*) -4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **6** (1.08 mg，1.15 μmol)溶解于 1.25 mL 乙腈中，加入帕妥珠单抗-丙硫醇溶液 **18c** (1.50 mg/mL，12.5 mL)中，于 25℃下振荡反应 4 小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05*M* 的 PBS 溶液)，在无菌条件下通过 0.2 μm 滤器过滤后得标题产物 **20** 的 PBS 缓冲液(0.74 mg/mL，19.0 mL)，于 4℃冷冻储存。Q-TOF LC/MS: 特征峰：Q-TOF LC/MS: 148253.27(M_{Ab}+0D)、149263.59(M_{Ab}+1D)、150315.25(M_{Ab}+2D)、151334.45(M_{Ab}+3D)、152383.92(M_{Ab}+4D)、153446.37 (M_{Ab}+5D)。

平均值：y=2.2。

实施例 21



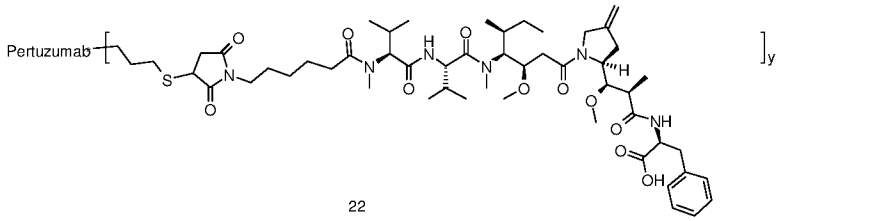
将化合物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)- 3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟

苯基)丙酸 **8** (3.0 mg，3.0 μmol)溶解于 1.0 mL 乙腈中，加入帕妥珠单抗-丙硫醇溶液 **18c** (2.11 mg/mL，10.0 mL)中，于 25℃下振荡反应 4 小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的.05*M* 的 PBS 溶液)，在无菌条件下通过 0.2 μm 滤器过滤后得标题产物 **21** 的 PBS 缓冲液(1.31 mg/mL，12.5 mL)，于 4℃冷冻储存。

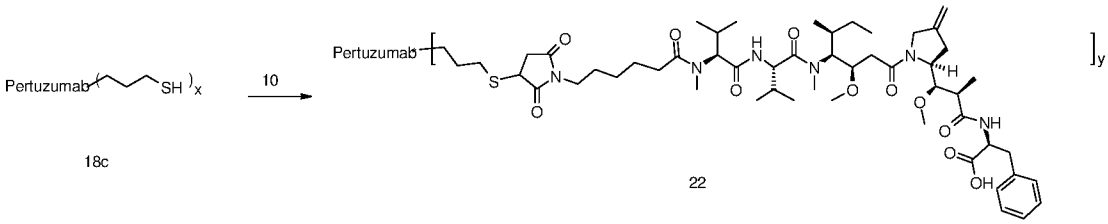
Q-TOF LC/MS: 特征峰：148312.73(M_{Ab}+0D)、149515.61(M_{Ab}+1D)、150459.55(M_{Ab}+ 2D)、151521.47(M_{Ab}+3D)、152580.02(M_{Ab}+4D)。

平均值：y=1.7。

实施例 22



22



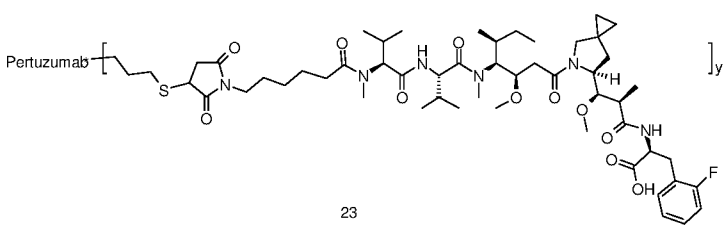
18c 22

将化合物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-4-亚甲基吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **10** (1.50 mg，1.60 μmol)溶解于 1.0 ml 乙腈中，加入帕妥珠单抗-丙硫醇溶液 **18c** (2.11 mg/mL，10.0 mL)中，于 25℃下振荡反应 4 小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05*M* 的 PBS 溶液)，在无菌条件下通过 0.2 μm 滤器过滤后得标题产物 **22** 的 PBS 缓冲液(1.28 mg/mL，13.0 mL)，于 4℃冷冻储存。

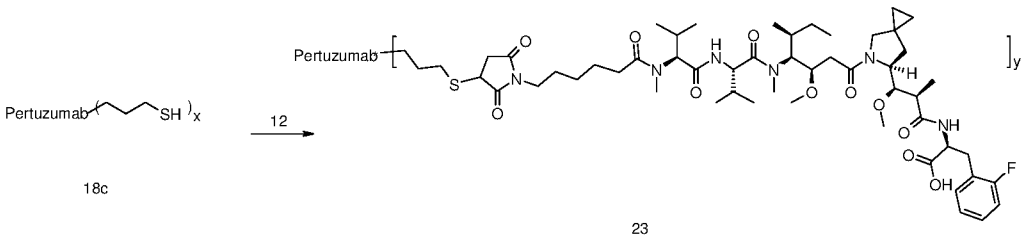
Q-TOF LC/MS: 特征峰：148411.82(M_{Ab}+0D)、149412.97(M_{Ab}+1D)、150468.08(M_{Ab}+ 2D)、151496.41(M_{Ab}+3D)、152580.37(M_{Ab}+4D)。

平均值：y=2.1。

实施例 23



23

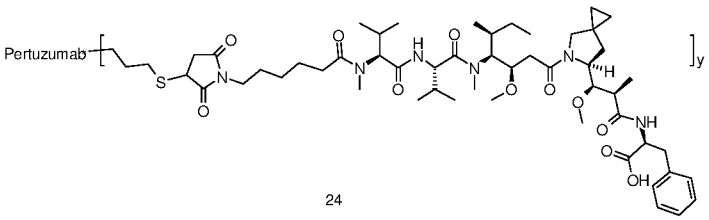


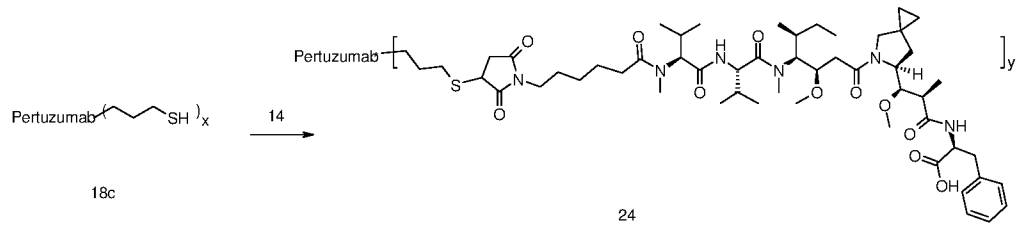
将化合物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **12** (0.86 mg，0.89 μmol)溶解于 0.6 mL 乙腈中，加入帕妥珠单抗-丙硫醇溶液 **18c** (2.06 mg/mL，6.0 mL)中，于 25℃下振荡反应 4 小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05*M* 的 PBS 溶液)，在无菌条件下通过 0.2 μm 滤器过滤后得标题产物 **23** 的 PBS 缓冲液(0.70 mg/mL，15 mL)，于 4℃冷冻储存。

Q-TOF LC/MS: 特征峰：148092.94(M_{Ab}+0D)、149296.82(M_{Ab}+1D)、150339.86(M_{Ab}+ 2D)、151416.51(M_{Ab}+3D)、152516.25(M_{Ab}+4D)、153422.64(M_{Ab}+5D)。

平均值：y=1.7。

实施例 24





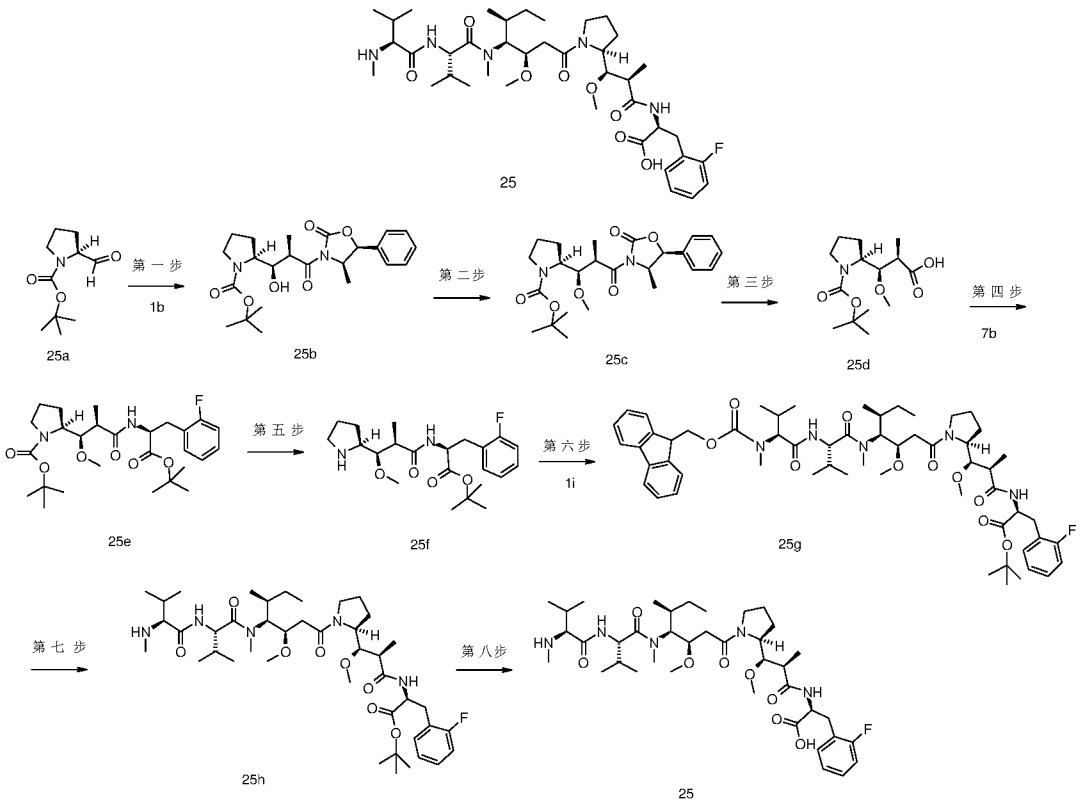
将化合物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **14** (0.73 mg，0.78 μmol)溶解于 0.6 mL 乙腈中，加入帕妥珠单抗-丙硫醇溶液 **18c** (2.06 mg/mL，6.0 mL)中，于 25℃下振荡反应 4 小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05*M* 的 PBS 溶液)，在无菌条件下通过 0.2 μm 滤器过滤后得标题产物 **24** 的 PBS 缓冲液(0.68 mg/mL，15.5 mL)，于 4℃冷冻储存。

Q-TOF LC/MS: 特征峰：148094.99(M_{Ab}+0D)、149277.83(M_{Ab}+1D)、150343.15(M_{Ab}+ 2D)、151359.29(M_{Ab}+3D)、152478.14(M_{Ab}+4D)、153449.92(M_{Ab}+5D)。

平均值：y=1.6。

实施例 25

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸



第一步

(*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-1-羟基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)吡咯烷-1-羧酸

将原料(4*R*,5*S*)-4-甲基-5-苯基-3-丙酰基噁唑烷酮 **1b** (4.6 g，20.1 mmol)溶于 80 mL 二氯甲烷中，在氩气氛下，降温至 0℃。反应液于 0℃下滴加三乙胺(3.2 mL，23.1 mmol)，再滴加三氟甲磺酸二正丁基化硼(20 mL，20.7 mmol)，于 0℃下搅拌 50 分钟，于-75℃滴加 5 mL 预制的(*S*)-叔丁酯 2-甲酰基吡咯烷-1-羧酸 **25a** (4 g，20.1 mmol，采用公知的方法“*Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(42), 16901-16910”制备而得)的二氯甲烷溶液，于-75℃下搅拌 1 小时，于 0℃搅拌 2 小时，于室温搅拌 1 小时。反应液中加入 60 mL 磷酸盐缓冲液(pH=7.0)和甲醇(V/V=1:3)的混合液。于 0℃加入 60 mL 甲醇和双氧水(30%) (V/V=2:1)的混合液，于室温搅拌 1 小时。反应结束后，减压浓缩除去有机相，加入 15 mL 水。水相用乙醚(30 mL×3)萃取，合并乙醚相，依次用 5%碳酸氢钠溶液，水，饱和氯化钠溶液洗涤，用无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化残留物，得标题产物(*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-1-羟基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基

噁唑-3-基)-3-羰基丙基)吡咯烷-1-羧酸 **25b** (2.26 g，白色泡沫固体)，产率 24.9%。
MS m/z (ESI): 333.3 [M-100+1]

第二步

(*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-1-甲氧基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)吡咯烷-1-羧酸

将原料(*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-1-羟基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)吡咯烷-1-羧酸 **25b** (2 g，4.62 mmol)溶于 20 mL 二氯甲烷，加入 2 g 磨成粉末的分子筛，在氩气氛下，于 0℃加入 1,8-双二甲氨基萘(2.57 g，12 mmol)，三甲基氧鎓四氟硼酸盐(1.71 g，11.5 mmol)，于室温搅拌 17 小时。反应结束后，过滤，滤饼用二氯甲烷洗涤，合并滤液，有机相用饱和氯化铵溶液(20 mL×3)洗涤，再用饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥。过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化所得残余物，得到标题产物(*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-1-甲氧基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)吡咯烷-1-羧酸 **25c** (1.3 g，白色泡沫固体)，产率 63%。
MS m/z (ESI): 447.3 [M+1]

第三步

(2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-(叔丁氧羰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸

将原料(*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-1-甲氧基-2-甲基-3-((4*R*,5*S*)-4-甲基-2-羰基-5-苯基噁唑-3-基)-3-羰基丙基)吡咯烷-1-羧酸 **25c** (1.3 g，2.9 mmol)溶于 80 mL 四氢呋喃，反应体系在氩气氛下，降温至 0℃，缓慢滴加 30%的双氧水(1.25 g，11 mmol)，再加入一水合氢氧化锂(207 mg，4.95 mmol)，于室温反应 12 小时。反应结束后，向反应液中加入亚硫酸钠固体(1.47 g，11.6 mmol)，于室温搅拌 1 小时，加入少量水，减压浓缩除去有机相，加入少量水溶解残留物，用二氯甲烷萃取(50 mL×2)。水相滴加盐酸至 pH 为 3，用二氯甲烷萃取(40 mL×3)，有机相用水洗涤，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得粗品标题产物(2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-(叔丁氧羰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸 **25d** (870 mg，无色油状)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

第四步

(*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-(叔丁氧基)-3-(2-氟苯基)-1-羰基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基丙基)吡咯烷-1-羧酸

将粗品(2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-(叔丁氧羰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸 **25d** (100 mg，0.368 mmol)溶于 6 mL 二氯甲烷与 1.8 mL 二甲基甲酰胺中，加入反应物(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(2-氟苯基)丙酸 **7b** (97 mg，0.405mmol)，反应体系在氩气氛下。再加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(237.8 mg，2.844 mmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-四甲基脲六氟磷酸酯(168.2 mg，0.442 mmol)，于室温搅拌 2 小时。反应结束后，加 10 mL 二氯甲烷，依次用水，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠

干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化所得残余物，得到标题产物(*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-(叔丁氧基)-3-(2-氟苯基)-1-羰基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基丙基)吡咯烷-1-羧酸 **25e** (157 mg，无色油状)，收率 83.9%。

MS m/z (ESI): 509.3 [M+1]

第五步

(*S*)-叔丁酯 3-(2-氟苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-甲氧基-2-甲基-3-((*S*)-吡咯烷-2-基)丙酰胺)丙酸

将原料(*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-(叔丁氧基)-3-(2-氟苯基)-1-羰基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基丙基)吡咯烷-1-羧酸 **25e** (157 mg，0.308 mmol)溶于 2 mL 二氧六环中，加入 4*M* 的氯化氢二氧六环溶液(0.193 mL，1.08 mmol)后将反应体系密封。于室温搅拌 1 小时，置于 4℃冰箱内 12 小时。反应结束后，将反应液减压浓缩，加入二氯甲烷溶解残留物，用饱和碳酸氢钠溶液洗涤，水相用二氯甲烷萃取，合并有机相，用饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，得到粗品标题产品(*S*)-叔丁酯 3-(2-氟苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-甲氧基-2-甲基-3-((*S*)-吡咯烷-2-基)丙酰胺)丙酸 **25f** (100 mg，淡黄色油状)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

MS m/z (ESI): 407.2 [M-1]

第六步

(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧-4,7,10-三氮杂十四烷基-14-酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸

将产品(*S*)-叔丁酯 3-(2-氟苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-甲氧基-2-甲基-3-((*S*)-吡咯烷-2-基)丙酰胺)丙酸 **25f** (100 mg，0.244 mmol)，(5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷-14-羧酸 **1i** (156.1 mg，0.244 mmol)溶于 7.5 mL 二氯甲烷和二甲基甲酰胺(V/V=4:1)混合溶剂中，加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(158 mg，1.224 mmol)，反应体系在氩气氛下，加入 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-四甲基脲六氟磷酸酯(121 mg，0.318 mmol)，于室温下搅拌 1 小时。反应结束后，加入二氯甲烷稀释，依次用水洗涤，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化残留物，得到标题产品(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷基-14-酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **25g** (242 mg，淡黄色油状)，收率 96.5%。

MS m/z (ESI): 1028.4 [M+1]

第七步

(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸

将原料(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基) -1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-2-氧-4,7,10-三氮杂十四烷基-14-酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **25g** (242 mg，0.235 mmol)溶于 3 mL 二氯甲烷中，加入 3 mL 二乙胺，于室温下搅拌 3 小时。反应结束后，将反应液减压浓缩，得到粗品标题产品(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **25h** (250 mg，黄色油状)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

MS m/z (ESI): 806.7[M+1]

第八步

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸

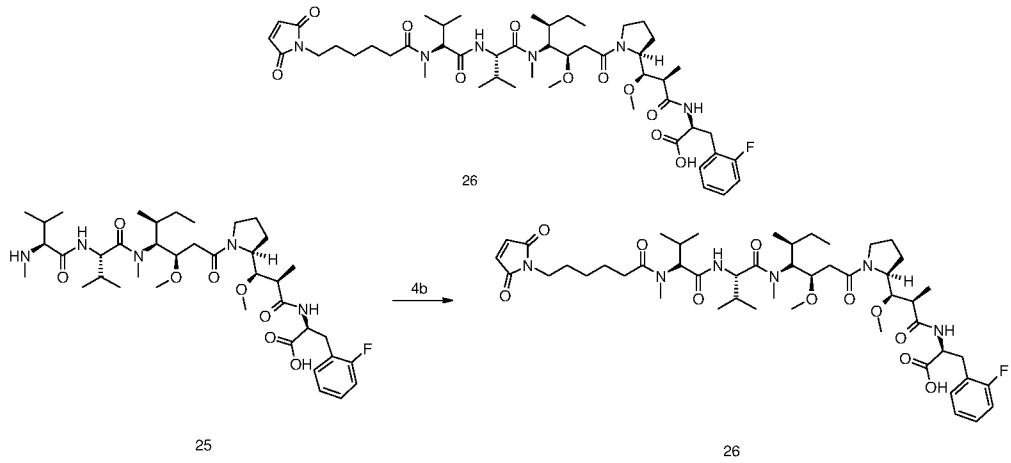
将粗品(*S*)-叔丁酯 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **25h** (262 mg，0.325mmol)置于反应瓶中，加入 4 *M* 的氯化氢二氧六环溶液 7 mL，将反应体系密封，于室温下搅拌 12 小时。反应结束后，将反应液减压浓缩，用高效液相色谱法纯化所得残余物，得标题产品(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **25** (50 mg，白色固体)，收率 28.4%。

MS m/z (ESI): 750.7 [M+1]

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.35-7.30(m, 1H), 7.20-7.15(m, 1H), 7.09-6.09(m, 2H), 4.81-4.75(m, 1H), 4.70-4.64(m, 1H), 4.15-4.13(m, 1H), 4.05-4.03(m, 1H), 3.84-3.81 (m, 1H), 3.69-3.64(m, 1H), 3.55-3.51(m, 1H), 3.48-3.13(m, 13H), 3.03-2.91(m, 2H), 2.66-2.53(m, 3H), 2.47-2.45(m, 1H), 2.40-2.33(m, 2H), 2.27-2.23 (m, 1H), 2.17-2.11 (m, 2H), 1.96-1.85(m, 3H), 1.63-1.40(m, 4H), 1.21-1.14(m, 3H), 1.09-0.94(m, 12H), 0.87-0.84(m, 3H).

实施例 26

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*R*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*R*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸



26

25 26

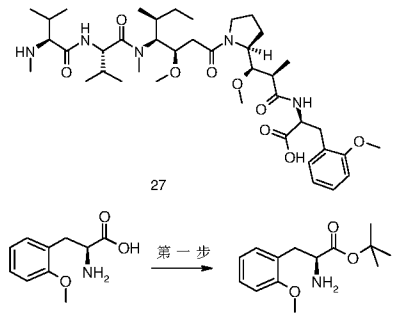
将原料(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **25** (20 mg，0.026 mmol)溶于 3 mL 二氯甲烷中，加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(13.7 mg，0.106mmol)，降温至 0℃，反应体系在氩气氛下，滴加预制的 6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)已酰氯 **4b** (9.1 mg，0.040 mmol)的二氯甲烷溶液，于室温反应 2 小时。反应结束后，加入甲醇淬灭，将反应液减压浓缩，残留物用高效液相色谱法纯化，得标题产物 (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*R*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*R*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基已酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **26** (7 mg，白色粉末)，收率 28.5%。

MS m/z (ESI): 941.6 [M-1]

^{1}HNMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.32-7.21(m, 2H), 7.10-7.00(m, 2H), 6.80-6.78(m, 2H), 4.75-4.55(m, 3H), 4.12-4.06(m, 2H), 3.93-3.89(m, 1H), 3.87-3.78(m, 2H), 3.69-3.63(m, 1H), 3.52-3.47(m, 3H), 3.44-3.28(m, 3H), 3.21-3.10(m, 4H), 3.04-2.96 (m, 4H), 2.53-2.40(m, 4H), 2.35-2.18(m, 2H), 2.13-2.00(m, 2H), 1.94-1.75(m, 4H), 1.68-1.56(m, 5H), 1.37-1.27(m, 4H), 1.20-1.13(m, 3H), 1.05-0.81(m, 18H).

实施例 27

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰基)-3-(2-甲氧基苯基)丙酸



27

27a 27b

第一步

(S)-tert-butyl 2-amino-3-(2-methoxyphenyl)propanoate

(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(2-甲氧基苯基)丙酸

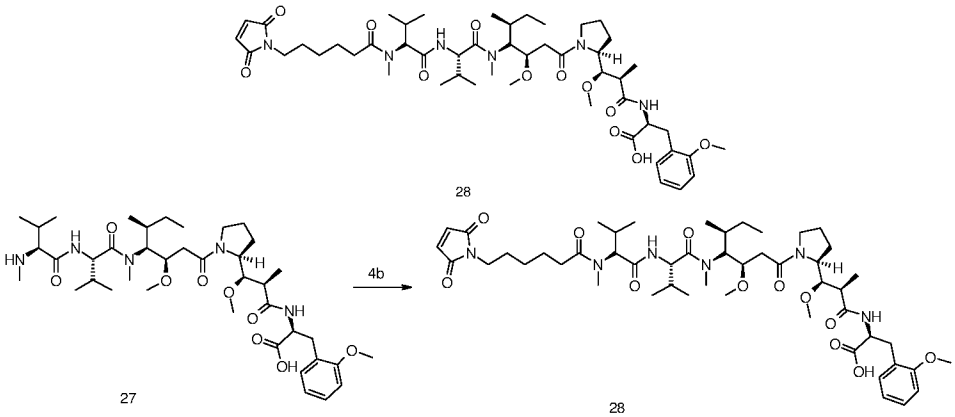
将原料(S)-2-氨基-3-(2-甲氧基苯基)丙酸 **27a** (250 mg，1.28 mmol，采用公知的方法“*Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)*, 2013, 49(70), 7744-766”制备而得)溶于 7 mL 乙酸叔丁酯，反应体系在氩气氛下，加入高氯酸(270 mg(70%)，1.88 mmol)，于室温下搅拌 16 小时。反应结束后，加入 10 mL 二氯甲烷，滴加饱和碳酸氢钠溶液调节 pH 为 8，分液，水相用二氯甲烷(10 mL×3)萃取，合并有机相。有机相用饱和氯化钠溶液(10 mL)洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得标题产物(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(2-甲氧基苯基)丙酸 **27b** (280 mg，浅黄色油状物)，收率 87%。

采用实施例 25 的合成路线，将第四步原料替换为(2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-(叔丁氧羰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸 **25d** 和(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(2-甲氧基苯基)丙酸 **27b**，制得标题产物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰基)-3-(2-甲氧基苯基)丙酸 **27** (22 mg，灰白色粉末)。

MS m/z (ESI): 760.7[M-1]

实施例 28

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*R*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*R*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-甲氧基苯基)丙酸



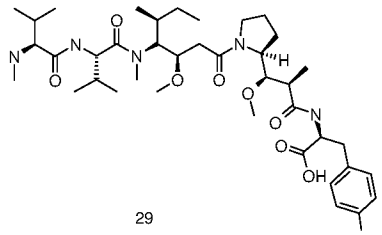
将原料(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰基)-3-(2-甲氧基苯基)丙酸 **27** (18 mg，0.023 mmol)溶于 5 mL 二氯甲烷中，反应体系在氩气氛下，加入 *N,N*-二异丙基乙基胺(12.19 mg，0.29 mmol)，于 0℃滴加预制的 6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)己酰氯 **4b** (6.5 mg，0.028 mmol)的二氯甲烷溶液，于室温反应 2 小时。反应结束后，加入甲醇淬灭，将反应液减压浓缩，

残留物用高效液相色谱法纯化，得标题产物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*R*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*R*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-甲氧基苯基)丙酸 **28** (4 mg，白色固体)，收率 18.2%。

MS m/z (ESI): 955.5 [M+1]

实施例 29

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*R*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(对甲苯基)丙酸



29

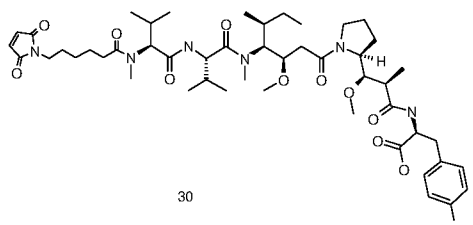
采用实施例 25 的合成路线，(2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-(叔丁氧羰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸 **25d** 和(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(对甲苯基)丙酸 **15b**，制得标题产物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*R*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(对甲苯基)丙酸 **29** (20 mg，白色粉末)。

MS m/z (ESI): 746.6 [M+1]

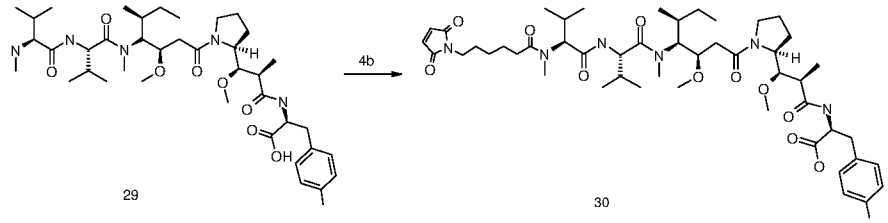
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.17-7.05(m, 4H), 4.84-4.67(m, 2H), 4.27-4.15 (m, 1H), 4.12-4.05(m, 1H), 3.89-3.82(m, 1H), 3.78-3.63(m, 2H), 3.57-3.47(m, 1H), 3.43-3.11(m, 7H), 2.92-2.79(m, 1H), 2.67(d, 3H), 2.52-2.44(m, 1H), 2.40-2.15(m, 7H), 2.12-2.01(m, 1H), 1.95-1.69(m, 3H), 1.67-1.49(m, 2H), 1.48-1.27(m,4H),1.23-1.12(m, 5H), 1.11-0.95(m, 14H), 0.94-0.84(m, 3H).

实施例 30

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(对甲苯基)丙酸



30



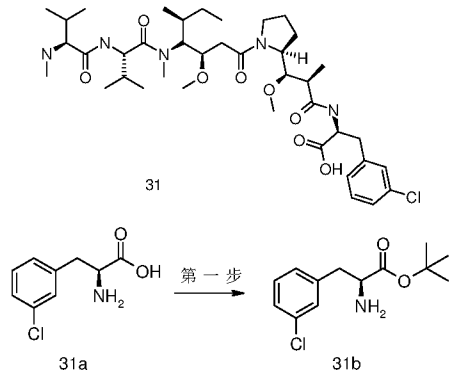
将原料(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*R*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(对甲苯基)丙酸 **29** (12 mg，0.016 mmol)溶于 1 mL 二氯甲烷中，反应体系在氩气氛下，加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(0.014 mL，0.08 mmol)，于 0℃滴加预制的 6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)己酰氯 **4b** (5.54 mg，0.024 mmol)的二氯甲烷溶液，于室温反应 4 小时。反应结束后，加入甲醇淬灭，将反应液减压浓缩，残留物用高效液相色谱法纯化，得标题产物 (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(对甲苯基)丙酸 **30** (4 mg，白色固体)，收率 26.5%。

MS m/z (ESI): 939.4 [M+1]

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.22-7.03(m, 4H), 6.85-6.78(m, 2H), 4.83-4.55(m, 3H), 4.27-3.97(m, 3H), 3.90-3.62(m, 3H), 3.59-2.95(m, 14H), 2.94-2.79(m, 1H), 2.54-2.35(m, 3H), 2.34-2.12(m, 5H), 2.08-1.99(m, 1H), 1.93-1.72(m, 3H), 1.71-1.51(m,5H),1.48-1.24(m, 8H), 1.23-1.12(m, 3H), 1.11-0.78(m, 17H).

实施例 31

(*S*)-3-(3-氯苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*R*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)丙酸



第一步

(S)-tert-butyl 2-amino-3-(3-chlorophenyl)propanoate

(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(3-氯苯基)丙酸

将原料(*S*)-2-氨基-3-(3-氯苯基)丙酸 **31a** (600 mg，3 mmol)溶于 15 mL 乙酸叔丁酯，在氩气氛下，于 0℃滴加高氯酸(450 mg(70%)，4.5 mmol)，滴完于室温反应

12 小时。反应完毕后加入 10 mL 水，分液，有机相依次用 20 mL 1*N* 的盐酸洗涤，饱和碳酸氢钠溶液洗涤，合并水相。水相滴加饱和碳酸氢钠溶液调节 pH 为 8～9，二氯甲烷(100 mL×2)萃取，合并有机相，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得粗品标题产物(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(3-氯苯基)丙酸 **31b** (500 mg，油状物)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

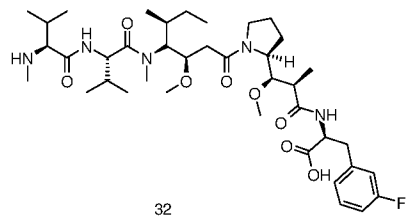
采用实施例 25 的合成路线，将第四步原料替换为(2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-(叔丁氧羰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸 **25d** 和(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(3-氯苯基)丙酸 **31b**，制得标题产物(*S*)-3-(3-氯苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*R*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)丙酸 **31** (4 mg，白色粉末)。

MS m/z (ESI): 766.6 [M+1]

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.31-7.12(m, 4H), 4.73-4.51(m, 2H), 4.22-4.05(m, 1H), 3.92-3.83(m, 1H), 3.76-3.65(m, 1H), 3.62-3.51(m, 1H), 3.50-3.12(m, 9H), 3.09-2.98(m, 1H), 2.59-2.39(m, 4H), 2.38-2.24(m, 1H), 2.23-2.17(m, 1H), 2.16-2.01 (m, 3H), 2.00-1.85(m, 2H), 1.84-1.76(m, 1H), 1.73-1.57(m, 2H), 1.43-1.27(m, 5H), 1.25-1.14(m, 3H), 1.10-0.95(m, 13H), 0.94-0.83(m, 5H).

实施例 32

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*R*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(3-氟苯基)丙酸



32

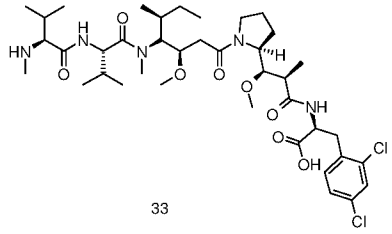
采用实施例 25 的合成路线，将第四步原料替换为(2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-(叔丁氧羰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸 **25d** 和(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(3-氟苯基)丙酸 **17b**，制得标题产物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*R*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(3-氟苯基)丙酸 **32** (33.5 mg，白色粉末)。

MS m/z (ESI): 750.7 [M+1]

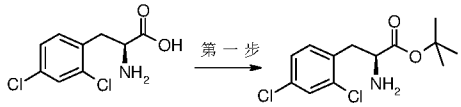
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.31-7.28(m, 1H), 7.08-6.95(m, 3H),4.77-4.69(m, 2H), 4.09-3.94(m,3H), 3.69-3.66(m,2H),3.48-3.44(m, 2H), 3.38-3.36(m, 3H), 3.34-3.28(m, 6H), 3.26-3.19(m, 2H), 3.13(m,1H), 3.01-2.91(m, 2H), 2.67-2.65(m, 2H),2.54-2.47(m, 2H), 2.34-2.28(m, 2H), 2.18-2.00(m, 2H),1.98-1.77(m, 2H), 1.55-1.42(m, 2H), 1.08-0.98(m, 18H),0.88-0.83 (m, 3H).

实施例 33

(*S*)-3-(2,4-二氯苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*R*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)丙酸



33



33a 33b

第一步

(S)-tert-butyl 2-amino-3-(2,4-dichlorophenyl)propanoate

(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(2,4-二氯苯基)丙酸

将原料(*S*)-2-氨基-3-(2,4-二氯苯基)丙酸 **33a** (1.3 g，5.57 mmol，采用公知的方法“*International Journal of Peptide & Protein Research*, 1987, 30(1), 13-21”制备而得)溶于 10 mL 乙酸叔丁酯，反应体系在氩气氛下，于 0℃滴加高氯酸(1.2 g(70%)，8.36 mmol)，滴完于室温反应 12 小时。反应结束后，加入二氯甲烷稀释，滴加饱和碳酸氢钠溶液至 pH 为 8～9，分液，水相用二氯甲烷萃取，合并有机相，依次用水洗涤，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得粗品标题产物(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(2,4-二氯苯基)丙酸 **33b** (3.4 g，淡黄油状物)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

采用实施例 25 的合成路线，将第四步原料替换为(2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-(叔丁氧羰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸 **25d** 和(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(2,4-二氯苯基)丙酸 **33b**，制得标题产物(*S*)-3-(2,4-二氯苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*R*,5*S*)-4- ((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)丙酸 **33** (23 mg，白色粉末)。

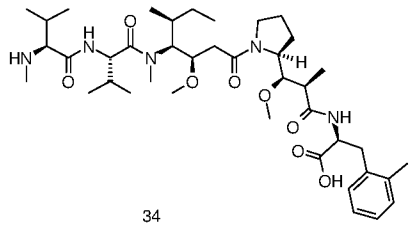
MS m/z (ESI): 800.6 [M+1]

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.43-7.42(m, 1H), 7.26-7.23(m,2H), 4.75-4.67(m, 2H), 4.14-4.04(m, 2H), 4.00-3.98(m, 1H), 3.91-3.89(m, 1H), 3.68-3.67(m, 3H), 3.39-3.26(m, 12H), 3.21-3.12(m, 3H), 2.67-2.64(m, 3H), 2.50-2.46(m, 3H), 2.31-2.28 (m, 2H), 2.17-2.15(m, 2H), 2.02-2.00(m, 4H), 1.90-1.88(m, 2H), 1.74-1.72(m, 2H), 1.39-1.37(m, 2H), 1.06-0.98(m, 12H).

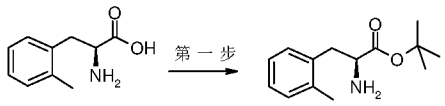
实施例 34

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁

酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(邻甲苯基)丙酸



34



34a 34b

第一步

(S)-tert-butyl 2-amino-3-(o-tolyl)propanoate

(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(邻甲苯基)丙酸

将原料(*S*)-2-氨基-3-(*o*-甲苯基)丙酸 **34a** (100 mg，0.55 mmol，采用公知的方法"*International Journal of Peptide & Protein Research*, 1987, 30(1), 13-21"制备而得)溶于 2.5 mL 乙酸叔丁酯，在氩气氛下，滴加高氯酸(107 mg(70%)，0.83 mmol)，于室温反应 16 小时。反应结束后，加入 5 mL 二氯甲烷稀释，滴加饱和碳酸氢钠溶液调节 pH 为 8。分液，水相用二氯甲烷(5 mL×3)萃取，合并有机相，依次用水洗涤，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得粗品标题产物(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(邻甲苯基)丙酸 **34b** (140 mg，无色油状物)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

采用实施例 25 的合成路线，将第四步原料替换为(2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-(叔丁氧羰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸 **25d** 和(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(邻甲苯基)丙酸 **34b**，制得标题产物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(邻甲苯基)丙酸 **34** (40 mg，白色粉末)。

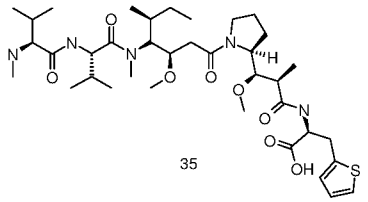
MS m/z (ESI): 746.8 [M+1]

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.41-8.39(d, 1H), 8.19-8.17(d, 1H), 7.18-7.05(m, 4H), 4.80-4.78(d, 1H), 4.71-4.69(d, 1H), 3.86-3.84(m, 1H), 3.76-3.72(m, 1H), 3.69-3.63 (m, 2H), 3.48-3.42(d, 2H), 3.38-3.23(m, 5H), 3.20-3.12(m, 4H), 2.98-2.87 (m, 2H), 2.66-2.65(d, 3H), 2.53-2.50(d, 1H), 2.46-2.44(d, 1H), 2.41-2.26(m, 4H), 2.21-2.14(m, 2H), 2.10-2.04(m, 1H), 1.87-1.85(m, 2H), 1.77-1.74(m, 1H), 1.62-1.53 (m, 2H), 1.33-1.28(m, 3H), 1.23-1.21(d, 2H), 1.16-1.14(d, 2H), 1.08-0.96(m, 14H), 0.90-0.84(m, 3H).

实施例 35

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*R*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰基)丁酰基)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(噻

吩-2-基)丙酸

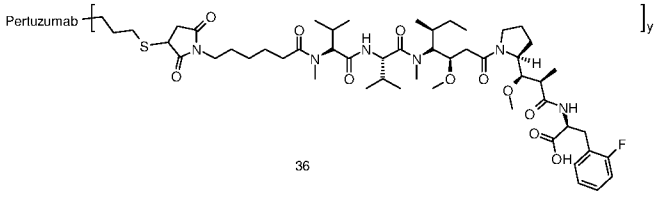


35

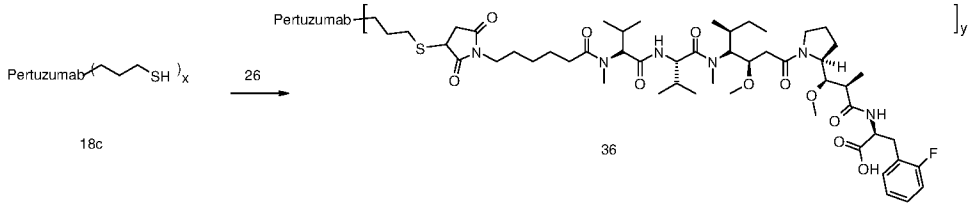
采用实施例25的合成路线，将第四步原料替换为(2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-(叔丁氧羰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸 **25d** 和(*S*)-叔丁酯 2-氨基-3-(噻吩-2-基)丙酸 **16b**，制得标题产物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*R*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)- 3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰基)丁酰基)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(噻吩-2-基)丙酸 **35** (2.6 mg，白色粉末)。

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.21-7.19(m, 1H), 6.91-6.90(m, 2H), 4.80-4.65(m, 2H), 4.16-4.08(m, 2H), 3.93-3.90(m, 1H), 3.70-3.66(m, 2H), 3.55-3.52(m, 1H), 3.48-3.45(m, 2H), 3.40-3.26(m, 6H), 3.25-3.13(m, 4H), 2.96-2.82(t, 1H), 2.69-2.65(d, 3H), 2.52-2.47(m, 2H), 2.39-2.29(m, 1H), 2.21-2.14(m, 2H), 1.92-(s, 3H), 1.63-1.61(m, 2H), 1.40-1.29(m, 3H), 1.23-1.14(m, 3H), 1.10-0.98(m, 13H), 0.88-0.85 (t, 3H).

实施例 36



36



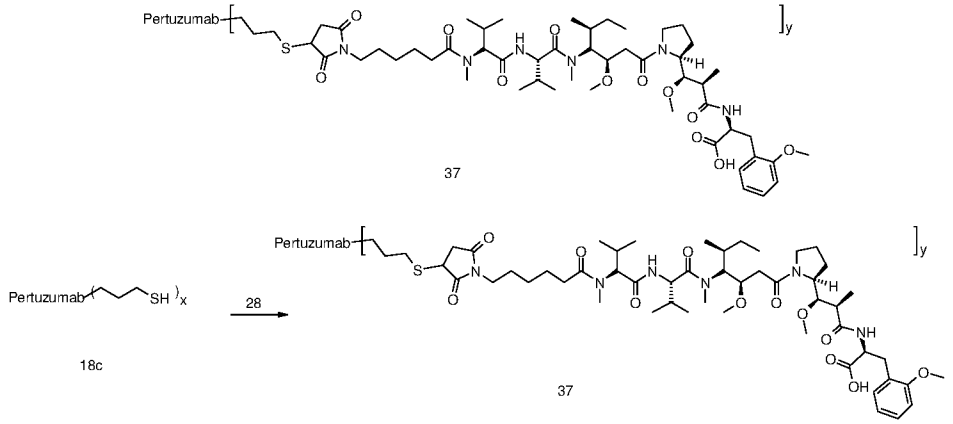
18c 36

将化合物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*R*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*R*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **26** (5.45 mg，5.78 μmol)溶解于 1.2 mL 乙腈中，加入帕妥珠单抗-丙硫醇溶液 **18c** (7.56 mg/mL，12 mL)中，于25℃下振荡反应4小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05*M* 的 PBS 溶液)，在无菌条件下通过 0.2 μm 滤器过滤后得标题产物 **36** 的 PBS 缓冲液(3.51 mg/mL，27.5 mL)，于4℃冷冻储存。

Q-TOF LC/MS: 特征峰：148094.39(M_{Ab}+0D)、149111.06(M_{Ab}+1D)、150167.12(M_{Ab}+ 2D)、151188.93(M_{Ab}+3D)、152243.46(M_{Ab}+4D)、153272.96(M_{Ab}+5D)。

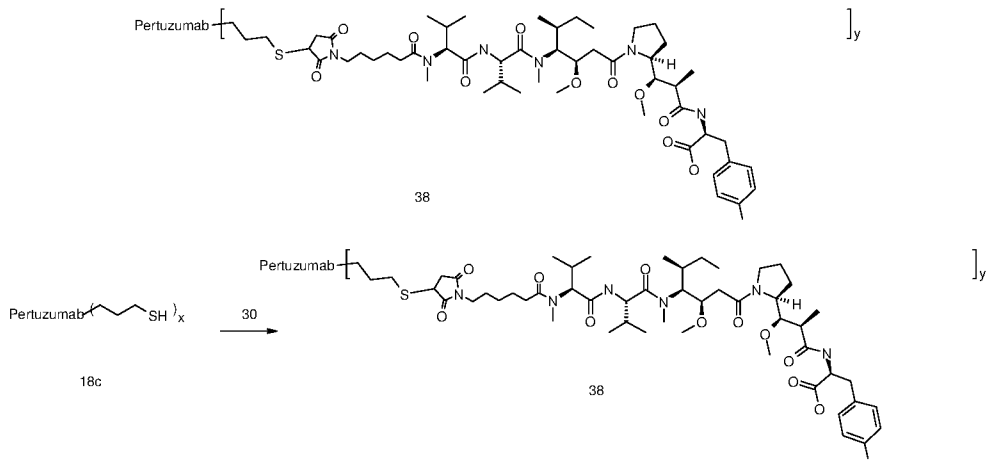
平均值：y=1.9

实施例 37



将化合物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*R*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*R*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-甲氧基苯基)丙酸 **28** (1.75 mg，1.83 μmol)溶解于 0.9 mL 乙腈中，加入帕妥珠单抗-丙硫醇溶液 **18c** (2.31 mg/mL，9.0 mL)中，于 25℃下振荡反应 6 小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05*M* 的 PBS 溶液)，在无菌条件下通过 0.2 μm 滤器过滤后得标题产物 **37** 的 PBS 缓冲液(1.35 mg/mL，13.0 mL)，于 4℃冷冻储存。Q-TOF LC/MS: 特征峰：148093.25(M_{Ab}+0D)、149281.78(M_{Ab}+1D)、150474.33(M_{Ab}+ 2D)、151372.72(M_{Ab}+3D)、152373.24(M_{Ab}+4D)、153469.40(M_{Ab}+5D)。平均值：y=2.3。

实施例 38



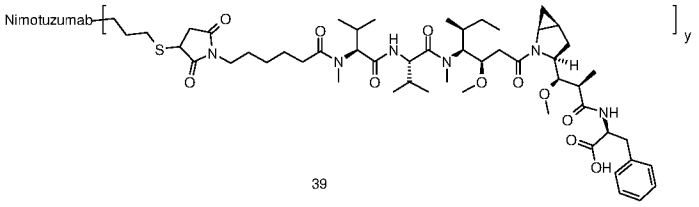
将化合物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(对甲苯基)丙酸 **30** (1.07 mg，1.14 μmol)溶解于 1.25 mL 乙腈中，加入帕妥珠单抗-丙硫醇溶液 **18c** (1.5 mg/mL，12.5 mL)中，于 25℃下振荡反应 4.5 小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐

纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05*M* 的 PBS 溶液)，在无菌条件下通过 0.2 μm 滤器过滤后得标题产物 **38** 的 PBS 缓冲液(0.74 mg/mL，17.5 mL)，于 4℃冷冻储存。

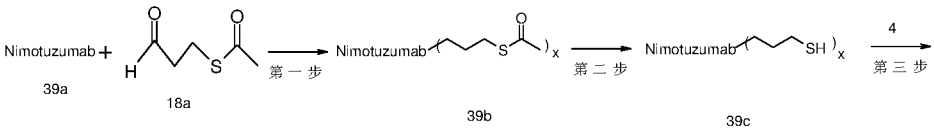
Q-TOF LC/MS: 特征峰：148247.08(M_{Ab}+0D)、149265.32(M_{Ab}+1D)、150276.10(M_{Ab}+ 2D)、151334.50(M_{Ab}+3D)、152392.21(M_{Ab}+4D)、153388.72(M_{Ab}+5D)。

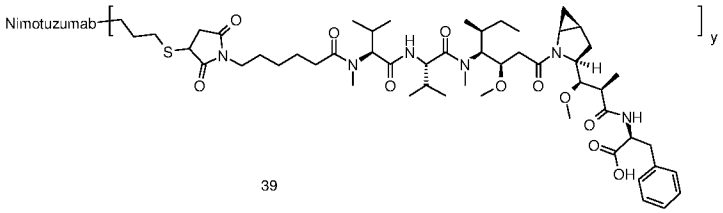
平均值：y=2.4。

实施例 39



39





39

第一步

将硫代乙酸 *S*-(3-羰基丙基)酯 **18a**(2.44 mg，18.5 μmol)，溶解于 3.0 mL 乙腈溶液，备用；向尼妥珠单抗 pH=4.3 的乙酸/乙酸钠缓冲液(10.22 mg/ml，30 mL，0.204 mmol)加入上述预制的硫代乙酸 *S*-(3-羰基丙基)酯 **18a** 的乙腈溶液，然后滴加 1.2 mL 的氰基硼氢化钠(49.86 mg, 793 μmol)的水溶液，于 25℃下振荡反应 2 小时。将反应液先用含 10%乙腈的 PBS 缓冲液(250 mL)通过 30 KDa 超滤包进行纯化，再改用 pH=6.5 的 PBS 缓冲液(200 mL)通过 30 KDa 超滤包进行纯化，除去未反应的硫代乙酸 *S*-(3-羰基丙基)酯 **18a** 以及氰基硼氢化钠，得到标题产物 **39b** 的 PBS 缓冲溶液(约 75 mL)，直接进行下一步反应。

第二步

向 **39b** 的 PBS 缓冲溶液(75.0 mL)中加入 2.0 mL 的 2.0*M* 盐酸羟胺溶液，加毕，置于水浴振荡器，于 25℃下振荡反应 30 分钟，停止反应。将反应液用 pH=6.5 的 PBS 缓冲液通过 30 KDa 超滤包进行纯化，得到标题产物尼妥珠*单抗*-丙硫醇 **39c** 的 PBS 缓冲溶液(浓度 5.38 mg/ml，55 mL)。

第三步

将化合物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲

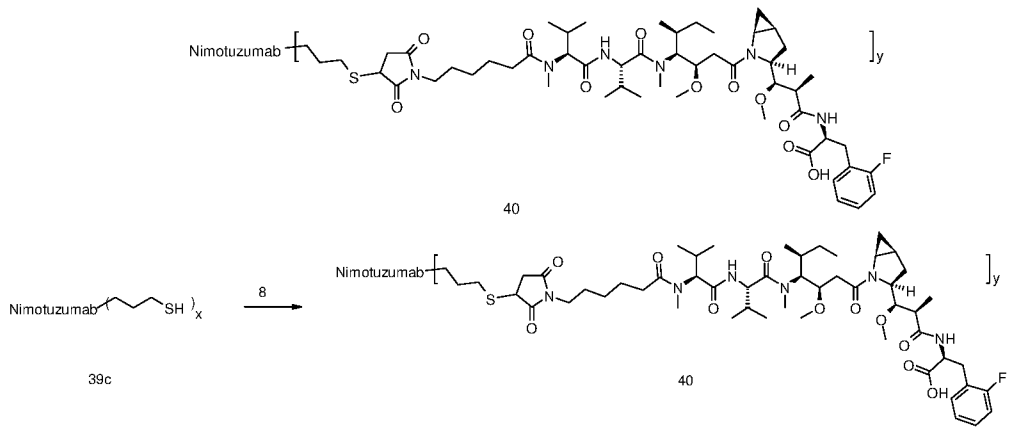
氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **4** (4.48 mg，4.78 μmol)溶解于 1.1 mL 乙腈中，加入尼妥珠*单抗*-丙硫醇 PBS 缓冲溶液 **39c** (5.38 mg/mL，11 mL)中，置于水浴振荡器中，于 25℃下振荡反应 4 小时后停止反应。

将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05*M* 的 PBS 溶液)，得到粗品标题产物 **39** 的 PBS 缓冲液(2.96 mg/mL，20.5 mL)，进一步离心浓缩至 6 mL 左右，再用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05*M* 的 PBS 溶液)，得到标题产物 **39** 的 PBS 缓冲液(4.25 mg/mL，11.8 mL)，于 4℃冷冻储存。

Q-TOF LC/MS: 特征峰：150188.68(M_{Ab}+0D)、151234.76(M_{Ab}+1D)、152248.46(M_{Ab}+ 2D)、153419.10(M_{Ab}+3D)、154312.17(M_{Ab}+4D)、155358.48 (M_{Ab}+5D)。

平均值：y=2.2。

实施例 40



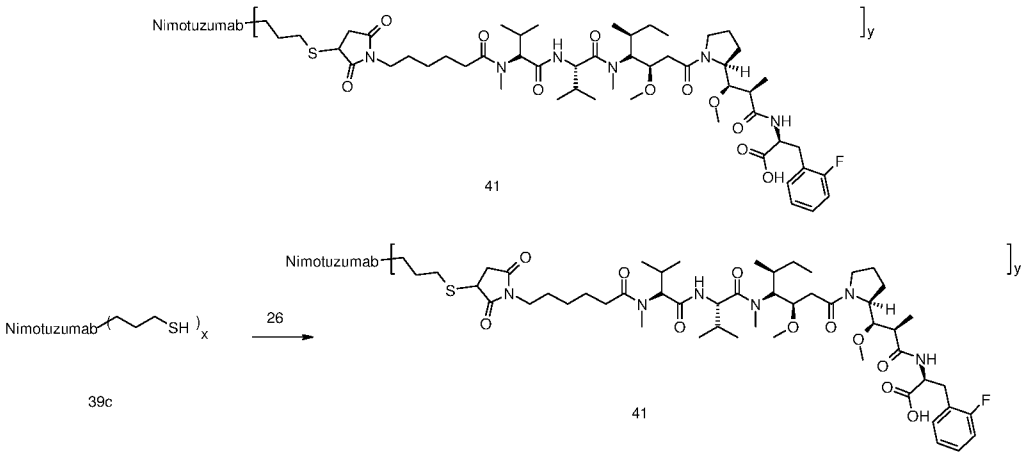
将化合物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)- 3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **8** (4.32 mg，4.52 μmol)溶解于 1.1 mL 乙腈中，加入尼妥珠*单抗*-丙硫醇 PBS 缓冲溶液 **39c** (5.38 mg/mL，11 mL)中，置于水浴振荡器中，于 25℃下振荡反应 4 小时后停止反应。

将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05*M* 的 PBS 溶液)，得到粗品标题产物 **40** 的 PBS 缓冲液(2.92 mg/mL，20 mL)，进一步离心浓缩至 5.5 mL 左右，再用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05*M* 的 PBS 溶液)，得到标题产物 **40** 的 PBS 缓冲液(4.25 mg/mL，11.6 mL)，于 4℃冷冻储存。

Q-TOF LC/MS: 特征峰：150186.98(M_{Ab}+0D)、151374.09(M_{Ab}+1D)、152287.22(M_{Ab}+ 2D)、153353.26(M_{Ab}+3D)、154501.80(M_{Ab}+4D)、155575.57(M_{Ab}+5D)。

平均值：y=2.2。

实施例 41

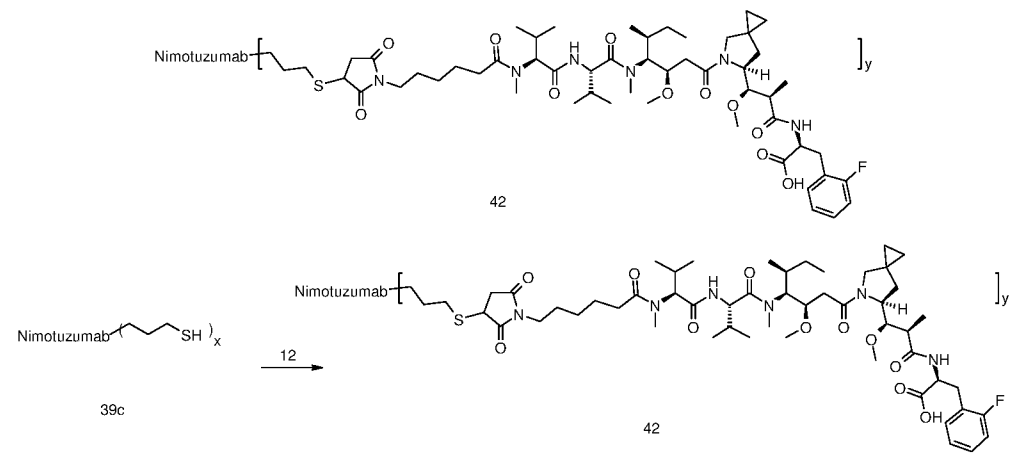


将化合物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*R*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*R*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **26** (4.45 mg，4.72 μmol)溶解于 1.1 mL 乙腈中，加入尼妥珠*单抗*-丙硫醇 PBS 缓冲溶液 **39c** (5.38 mg/mL，11 mL)中，置于水浴振荡器中，于 25℃振荡反应 4 小时后停止反应。

将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的.05*M* 的 PBS 溶液)，得到粗品标题产物 **41** 的 PBS 缓冲液(2.96 mg/mL，20 mL)，进一步离心浓缩至 6 mL 左右，再用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05*M* 的 PBS 溶液)，得到标题产物 **41** 的 PBS 缓冲液(4.33 mg/mL，11 mL)，于 4℃冷冻储存。

Q-TOF LC/MS: 特征峰：150186.05(M_{Ab}+0D)、151362.44(M_{Ab}+1D)、152261.90(M_{Ab}+ 2D)、153438.29(M_{Ab}+3D)、154339.30(M_{Ab}+4D)、155511.23(M_{Ab}+5D)。
平均值：y=2.3。

实施例 42



将化合物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢

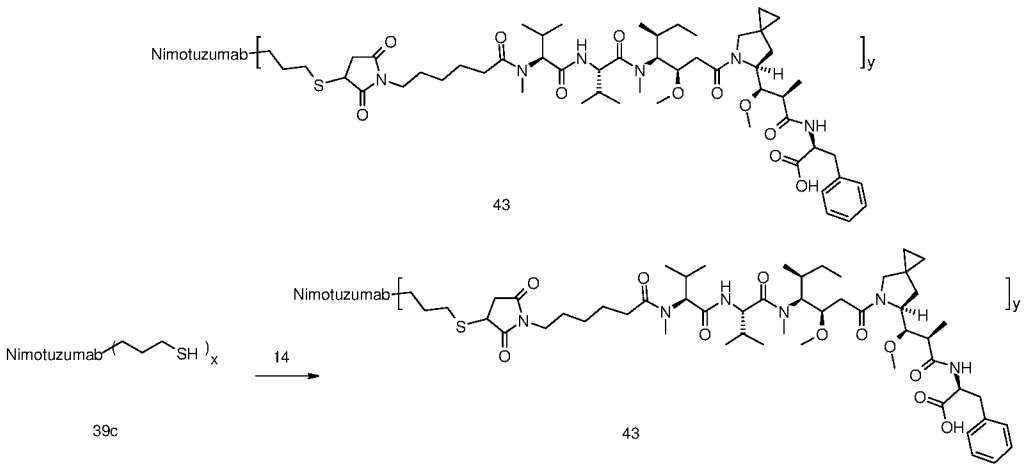
-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 **12** (0.56 mg，0.58 μmol)溶解于 0.42 mL 乙腈中，加入尼妥珠*单抗*-丙硫醇溶液 **39c** (2.06 mg/mL，4.2 mL)中，置于水浴振荡器中，于 25℃振荡反应 5 小时后停止反应。

将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05*M* 的 PBS 溶液)，得到粗品标题产物 **42** 的 PBS 缓冲液(0.74 mg/mL，10 mL)，进一步离心浓缩，再用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05*M* 的 PBS 溶液)，得到标题产物 **42** 的 PBS 缓冲液(1.15 mg/mL，6 mL)，于 4℃冷冻储存。

Q-TOF LC/MS: 特征峰：150188.42(M_{Ab}+0D)、151387.82(M_{Ab}+1D)、152472.27(M_{Ab}+ 2D)、153528.33(M_{Ab}+3D)。

平均值：y=1.0。

实施例 43



将化合物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-5-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-5-氮杂螺环[2.4]庚烷-6-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 **14** (0.60 mg，0.63 μmol)溶解于 0.42 mL 乙腈中，加入尼妥珠*单抗*-丙硫醇溶液 **39c** (2.06 mg/mL，4.2 mL)中，置于水浴振荡器中，于 25℃下振荡反应 5 小时后停止反应。

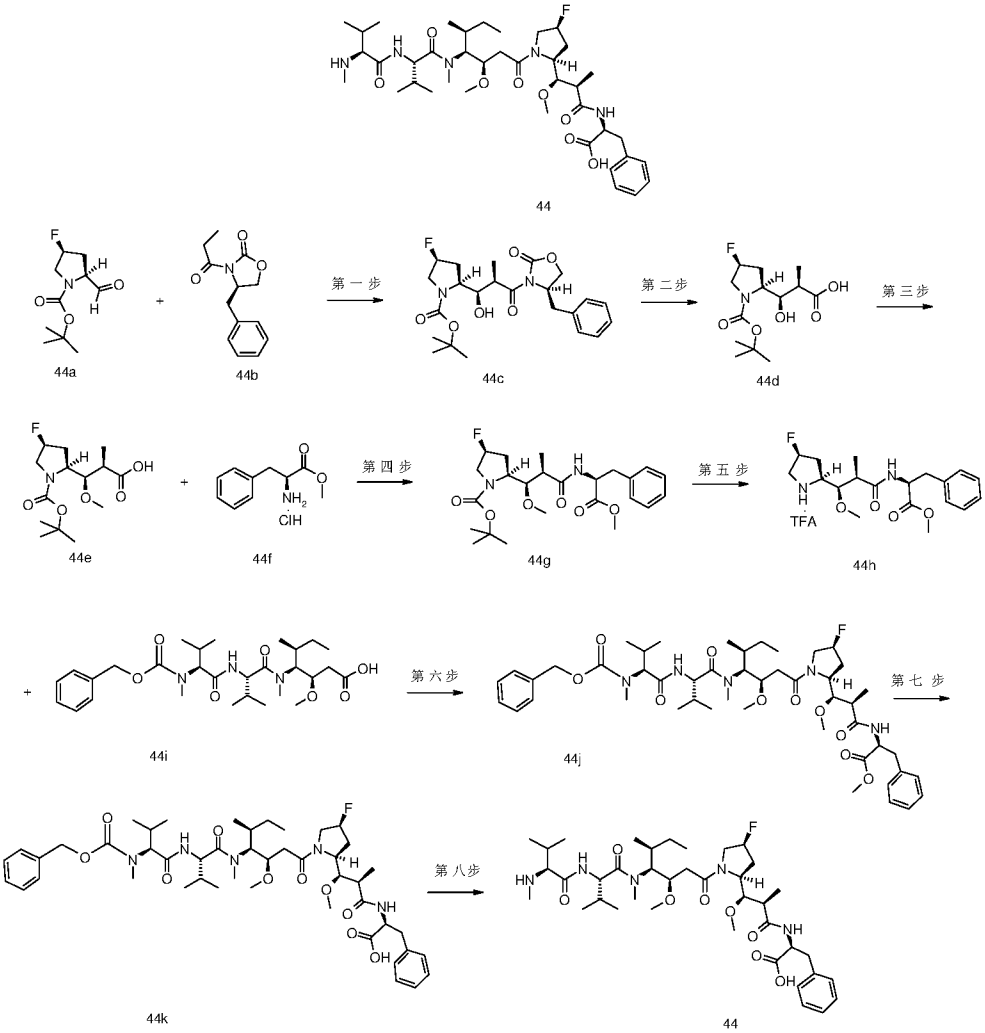
将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05*M* 的 PBS 溶液)，得到粗品标题产物 **43** 的 PBS 缓冲液(0.78 mg/mL，9.5 mL)，进一步离心浓缩，再用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05*M* 的 PBS 溶液)，得到标题产物 **43** 的 PBS 缓冲液(1.16 mg/mL，6 mL)，于 4℃冷冻储存。

Q-TOF LC/MS: 特征峰：150188.39(M_{Ab}+0D)、151251.46(M_{Ab}+1D)、152442.90(M_{Ab}+ 2D)、153507.73(M_{Ab}+3D)。

平均值：y=1.0。

实施例 44

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-4-氟吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸



第一步

(2*S*,4*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-3-((*R*)-4-苄基-2-羰基噁唑-3-基)-1-羟基-2-甲基-3-羰基丙基)-4-氟吡咯烷-1-羧酸

将原料(*R*)-4-苄基-3-丙酰基噁唑-2-酮 **44b** (21 g，90 mmol，采用公知的方法"*Tetrahedron Letters*, 1999, 40(36), 6545-6547"制备而得)溶于 300 mL 二氯甲烷中，氮气氛下，降温至 0℃。反应液于 0℃下滴加四氯化钛(9.8 mL，1.1 mmol)，溶液由无色逐渐变为黄色，并且有黄色固体出现。再缓慢滴加 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(40 mL，225 mmol)，有白烟生成，溶液由黄色变为红棕色，于 0℃下搅拌 1 小时，将反应液降温至-78℃，加入 50 mL (2*S*,4*S*)-叔丁酯 4-氟-2-甲酰基吡咯烷-1-羧酸 **44a** (21.27 g，98 mmol，采用公知的方法"*Tetrahedron: Asymmetry*, 2014, 25(3), 212-218"制备而得)的二氯甲烷溶液，-78℃下搅拌 1.5 小时。TLC 监测反应的完成情况。反应完毕后，加入 200 mL 碳酸氢钠溶液(5%)，分液，水相用二氯甲烷萃取(300 mL ×2)，合并有机相，依次用水(200 mL)、饱和氯化钠溶液(200 mL)洗涤，无水硫酸

镁干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化所得残余物，得标题产物(2*S*,4*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-3-((*R*)-4-苄基-2-羰基噁唑-3-基)-1-羟基-2-甲基-3-羰基丙基)-4-氟吡咯烷-1-羧酸 **44c** (19 g，淡黄色固体)，收率 43.2%。

MS m/z (ESI): 351.06 [M-100+1]

第二步

(2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*S*)-1-(叔丁氧羰基)-4-氟吡咯烷-2-基)-3-羟基-2-甲基丙酸

将原料(2*S*,4*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-3-((*R*)-4-苄基-2-羰基噁唑-3-基)-1-羟基-2-甲基-3-羰基丙基)-4-氟吡咯烷-1-羧酸 **44c** (19 g，42 mmol)溶于 200 mL 四氢呋喃与 50 mL 水中，氮气氛下，降温至 0℃，缓慢滴加 30%的双氧水(17.2 mL，147 mmol)，再加入 80 mL 一水合氢氧化锂(2.86 g，68 mmol)溶液，反应体系于 0℃反应 5 小时。向反应液中加入 100 mL 亚硫酸钠(21.2 g，168 mmol)溶液，于 25℃反应 16 小时。反应结束后，减压浓缩除去有机相，所得残留物用二氯甲烷洗涤(200 mL×3)；水相用 1*N* 盐酸调节 pH 为 3 左右，用乙酸乙酯萃取(200 mL×4)。合并有机相，减压浓缩，所得残留物用 350 mL 碳酸氢钠溶液(5%)溶解，用二氯甲烷洗涤(200 mL×2)，水相用 2*N* 盐酸调节 pH 为 3 左右，用乙酸乙酯萃取(200 mL×5)，合并有机相，用无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，得粗品标题产物(2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*S*)-1-(叔丁氧羰基)-4-氟吡咯烷-2-基)-3-羟基-2-甲基丙酸 **44d** (11.6 g，淡黄色粘稠液体)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

MS m/z (ESI): 191.47 [M-100+1]

第三步

(2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*S*)-1-(叔丁氧羰基)-4-氟吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸

将原料(2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*S*)-1-(叔丁氧羰基)-4-氟吡咯烷-2-基)-3-羟基-2-甲基丙酸 **44d** (11.6 g，39.8 mmol)溶于 200 mL 四氢呋喃中，氮气氛下，在 0℃下加入碘甲烷(91 g，640 mmol)，分批加入氢化钠(7.32 g(60%)，183 mmol)，于 0℃下反应 48 小时。反应结束后，加入 500 mL 冰水淬灭反应，加入乙酸乙酯萃取(150 mL)。水相用乙醚(150 mL×2)洗涤，用 2*N* 盐酸调节 pH 为 3，再用乙酸乙酯萃取(250 mL×3)。合并有机相，用无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化所得残余物，得到标题产物(2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*S*)-1-(叔丁氧羰基)-4-氟吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸 **44e** (8.0 g，淡黄色粘稠液体)，产率 65.6%。

MS m/z (ESI): 205.68 [M-100+1]

第四步

(2*S*,4*S*)-叔丁酯 4-氟-2-((1*R*,2*R*)-1-甲氧基-3-(((*S*)-1-甲氧基-1-羰基-3-苯基丙烷-2-基)氨基)-2-甲基-3-羰基丙基)吡咯烷-1-羧酸

将原料(2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*S*)-1-(叔丁氧羰基)-4-氟吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸 **44e** (580 mg，1.9 mmol)溶于 15 mL 乙腈中，加入(*S*)-2-氨基-3-苯基丙酸甲酯 盐酸盐 **44f** (480 mg，2.2 mmol，采用公知的方法“*Journal of Heterocyclic Chemistry*,

2013, 50(2), 320-325”制备而得)，再加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(1.42 mL，8 mmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-四甲基脲六氟磷酸酯(1.07 g，2.8 mmol)，反应体系于室温下反应 12 小时。TLC 显示反应完全，停止反应，加入 40 mL 乙酸乙酯稀释，依次用饱和氯化铵溶液(20 mL)、饱和氯化钠溶液(20 mL)洗涤，用无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化所得残余物，得到标题产物(2*S*,4*S*)-叔丁酯 4-氟-2-((1*R*,2*R*)-1-甲氧基-3-(((*S*)-1-甲氧基-1-羰基-3-苯基丙烷-2-基)氨基)-2-甲基-3-羰基丙基)吡咯烷-1-羧酸 **44g** (750 mg，白色固体)，收率 83.2%。

MS m/z (ESI): 222.62 [M-100+1]

第五步

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*S*)-4-氟吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸甲酯 三氟乙酸盐

将原料(2*S*,4*S*)-叔丁酯 4-氟-2-((1*R*,2*R*)-1-甲氧基-3-(((*S*)-1-甲氧基-1-羰基-3-苯基丙烷-2-基)氨基)-2-甲基-3-羰基丙基)吡咯烷-1-羧酸 **44g** (738 mg，1.58 mmol)溶于 15 mL 二氯甲烷中，逐滴加入三氟乙酸(3 mL，30 mmol)，于室温反应 12 小时。TLC 检测反应完全后，将反应液减压浓缩得粗品标题产物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*S*)-4-氟吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸甲酯 三氟乙酸盐 **44h** (1.24 g，黄色粘稠液体)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

MS m/z (ESI): 236.39 [M+1]

第六步

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*S*)-1-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-1-苯基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷-14-酰基-4-氟吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸甲酯

将原料(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*S*)-4-氟吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸甲酯 三氟乙酸盐 **44h** (572 mg，1.56 mmol)，(5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)- 11-((*S*)-仲丁基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-1-苯基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷-14-羧酸 **44i** (868 mg，1.56 mmol，采用专利申请“WO2007008848”公开的方法制备而得)溶于 15 mL 乙腈中，加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(2.0 mL，12 mmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-四甲基脲六氟磷酸酯(890 mg，2.34 mmol)，反应体系于室温下反应 12 小时。TLC 显示反应完全，停止反应，加入 50 mL 乙酸乙酯稀释，依次用饱和氯化铵溶液(30 mL)、饱和氯化钠溶液(30 mL)洗涤，用无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 和 A 纯化所得残余物，得到标题产品(*S*)-2-((2*R*,3*R*)- 3-((2*S*,4*S*)-1-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-1-苯基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷-14-酰基-4-氟吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸甲酯 **44j** (1.4 g，白色泡沫状固体)，收率 99.9%。

MS m/z (ESI): 898.99 [M+1]

第七步

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*S*)-1-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-1-苯基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷-14-酰基)-4-氟吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸

将原料(*S*)-2-((2*R*,3*R*)- 3-((2*S*,4*S*)-1-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-1-苯基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷-14-酰基-4-氟吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸甲酯 **44j** (180 mg，0.2 mmol)溶于 0.5 mL 甲醇、0.5 mL 四氢呋喃与 0.5 mL 水中，冷却至 0℃，加入一水合氢氧化锂(34 mg，0.8 mmol)，于 23℃下反应 2 小时。TLC 及 Ms 显示反应完毕，加入 2 mL 水稀释，用 1*N* 盐酸调节 pH 为 4.5 左右，用乙酸乙酯萃取(5 mL×3)，合并有机相，用无水硫酸镁干燥，过滤，滤液减压浓缩得粗品标题产品(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*S*)-1-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-1-苯基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷-14-酰基)-4-氟吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸 **44k** (160 mg，淡黄色泡沫状固体)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

MS m/z (ESI): 883.73 [M-1]

第八步

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-4-氟吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸

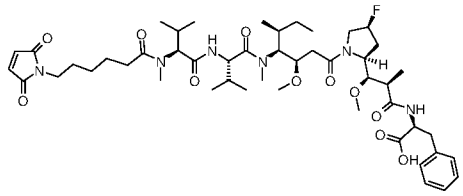
将粗品(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*S*)-1-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-1-苯基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷-14-酰基)-4-氟吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸 **44k** (160 mg，0.2 mmol)溶于 10 mL 无水乙醇中，加入 30 mg 钯碳(10%)，将反应体系用氢气置换三次，于 23℃反应 15 小时。TLC 显示反应完全，通过硅藻土过滤除去钯碳，滤液减压浓缩得残留物 120 mg，用高效液相色谱法纯化所得残留物得标题产品(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-4-氟吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸 **44** (29 mg，白色固体)，收率 21.5%。

MS m/z (ESI): 749.94 [M+1]

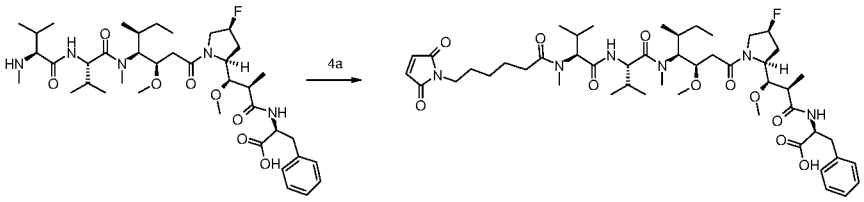
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.29-7.14(m, 5H), 4.81-4.71(m, 2H), 4.18-4.13(m, 2H), 4.05-4.03(m, 2H), 3.84-3.81(m, 1H), 3.63-3.60(m, 1H), 3.58-3.52(m, 1H), 3.48-3.13(m, 14H), 3.00-2.91(m, 1H), 2.66-1.81(m, 11H), 1.63-1.38(m, 2H), 1.21-1.10(m, 5H), 1.09-0.94(m, 14H), 0.91-0.82(m, 3H).

实施例 45

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-4-氟吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸



45



44 45

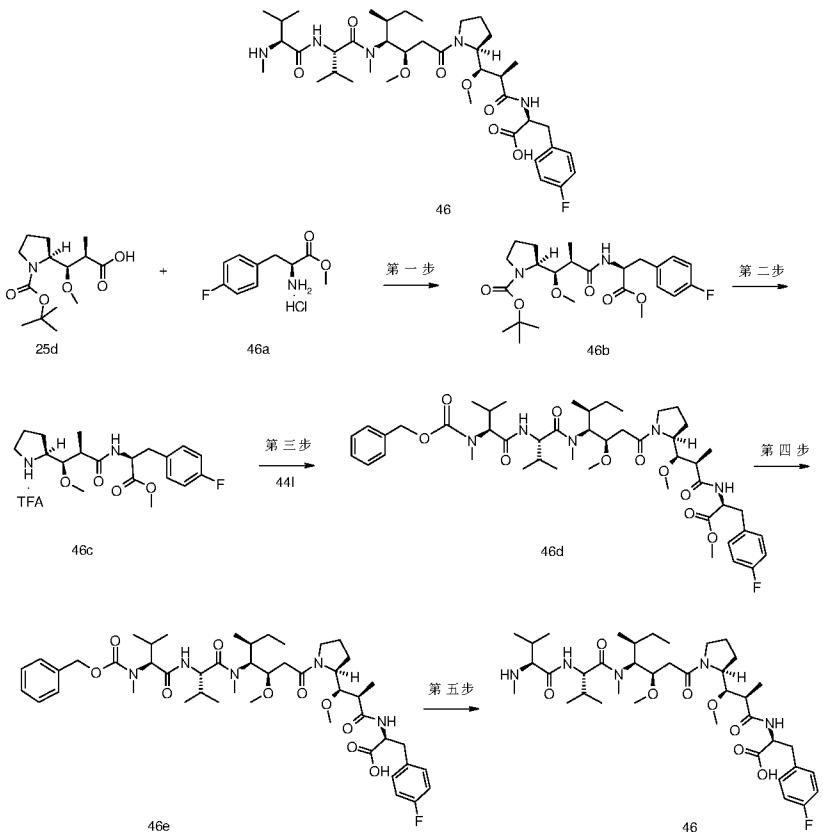
将原料(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-4-氟吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸 **44** (1.0 g，1.34 mmol)溶于 20 mL 乙腈中，加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(0.53 mL，3.0 mmol)，2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-四甲基脲六氟磷酸酯(560 mg，1.48 mmol)，反应体系于 23℃反应 30 分钟，加入 6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)己酸 **4a** (300 mg，1.41 mmol)。待 TLC 显示反应完全后，停止反应，加入 50 mL 乙酸乙酯，减压浓缩，用硅胶柱色谱法先后以洗脱剂体系 B 和 A 纯化所得残余物，得粗品标题产物 1.0 g，然后用高效液相色谱法纯化所得残留物，得标题产物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-4-氟吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸 **45** (140 mg，白色固体)，收率 11%。

MS m/z (ESI): 942.67 [M+1]

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.34-7.14(m, 5H), 6.83-6.80(m, 2H), 5.20-5.10(m, 1H), 5.01-4.96(m, 1H), 4.78-4.57(m, 2H), 4.18-4.01(m, 2H), 4.00-3.80(m, 1H), 3.56-3.41(m, 5H), 3.35-3.24(m, 10H), 3.19-2.90(m, 4H), 2.60-2.40(m, 4H), 2.39-2.00(m, 4H), 1.93-1.58(m, 6H), 1.50-1.10(m, 7H), 1.09-0.82(m, 21H).

实施例 46

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(4-氟苯基)丙酸



第一步

(*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-3-(4-氟苯基)-1-甲氧基-1-羰基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基丙基)吡咯烷-1-羧酸

将(2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-(叔丁氧羰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸 **25d** (1.0 g，3.5 mmol)溶于 15 mL 乙腈中，加入(*S*)-2-氨基-3-(4-氟苯基)丙酸甲酯 盐酸盐 **46a** (820 mg，4 mmol，采用公知的方法“*Tetrahedron*, 2003, 59(21), 3719-3727”制备而得)，再加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(2.7 mL，15 mmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-四甲基脲六氟磷酸酯(1.9 g，5.0 mmol)，反应体系于 23℃反应 12 小时。TLC 显示反应完全，停止反应，加入 50 mL 乙酸乙酯稀释，依次用饱和氯化铵溶液(30 mL)、饱和氯化钠溶液(30 mL)洗涤，用无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系 B 纯化所得残余物，得到标题产物(*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-3-(4-氟苯基)-1-甲氧基-1-羰基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基丙基)吡咯烷-1-羧酸 **46b** (1.35 g，白色固体)，收率 82.6%。

MS m/z (ESI): 366.46 [M-100-1]

第二步

(*S*)-3-(4-氟苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-甲氧基-2-甲基-3-((*S*)-吡咯烷-2-基)丙酰胺)丙酸甲酯 三氟乙酸盐

将原料(*S*)-叔丁酯 2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-3-(4-氟苯基)-1-甲氧基-1-羰基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基丙基)吡咯烷-1-羧酸 **46b** (1.34 g，2.87 mmol)溶于 20 mL 二氯甲烷中，逐滴加入三氟乙酸(3 mL，30 mmol)，于 23℃反应 12 小时。TLC

检测反应完全后，将反应液减压浓缩得粗品标题产物(*S*)-3-(4-氟苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-甲氧基-2-甲基-3-((*S*)-吡咯烷-2-基)丙酰胺)丙酸甲酯 三氟乙酸盐 **46c** (1.92 g，黄色粘稠液体)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

MS m/z (ESI): 366.85 [M+1]

第三步

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-1-苯基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷基-14-酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(4-氟苯基)丙酸甲酯

将原料(*S*)-3-(4-氟苯基)-2-((2*R*,3*R*)-3-甲氧基-2-甲基-3-((*S*)-吡咯烷-2-基)丙酰胺)丙酸甲酯 三氟乙酸盐 **46c** (367 mg，1.0 mmol)，(5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-1-苯基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷-14-羧酸 **44i** (549 mg，1.0 mmol)溶于 10 mL 乙腈中，加入 *N,N*-二异丙基乙基胺(1.24 mL，7 mmol)和 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(570 mg，1.5 mmol)，反应体系于 23℃下反应 12 小时。TLC 显示反应完全，停止反应，加入 30 mL 乙酸乙酯稀释，依次用饱和氯化铵溶液(20 mL)、饱和氯化钠溶液(20 mL)洗涤，用无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法先后以洗脱剂体系 B 和 A 纯化所得残留物，得到标题产品 (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-1-苯基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷基-14-酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(4-氟苯基)丙酸甲酯 **46d** (760 mg，白色泡沫状固体)，收率 84.6%。

MS m/z (ESI): 898.10 [M+1]

第四步

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-1-苯基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷基-14-酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(4-氟苯基)丙酸

将原料(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-1-苯基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷基-14-酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(4-氟苯基)丙酸甲酯 **46d** (180 mg，0.2 mmol)溶于 0.5 mL 甲醇、0.5 mL 四氢呋喃与 0.5 mL 水中，冷却至 0℃，加入一水合氢氧化锂(34 mg，0.8 mmol)，于 23℃下反应 2 小时。TLC 及 Ms 显示反应完毕，加入 2 mL 水稀释，用 1*N* 盐酸调节 pH 为 4.5 左右，用乙酸乙酯萃取(5 mL×3)，合并有机相，用无水硫酸镁干燥，过滤，滤液减压浓缩得粗品标题产品(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-1-苯基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷基-14-酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(4-氟苯基)丙酸 **46e** (160 mg，白色固体)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

MS m/z (ESI): 883.78 [M-1]

第五步

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(4-氟苯基)丙酸

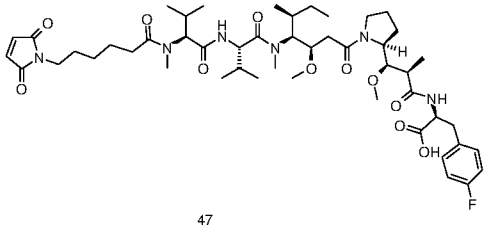
将粗品(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-仲丁基)-5,8-二异丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三羰基-1-苯基-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷基-14-酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(4-氟苯基)丙酸 **46e** (160 mg，0.2 mmol)溶于 10 mL 无水乙醇中，加入 30 mg 钯碳(10%)，将反应体系用氢气置换三次，于室温反应 15 小时。TLC 显示反应完全，通过硅藻土过滤除去钯碳，滤液减压浓缩得残留物 130 mg，用高效液相色谱法纯化所得残留物得标题产品(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(4-氟苯基)丙酸 **46** (34 mg，白色粉末)，收率 25.2%。

MS m/z (ESI): 749.94 [M+1]

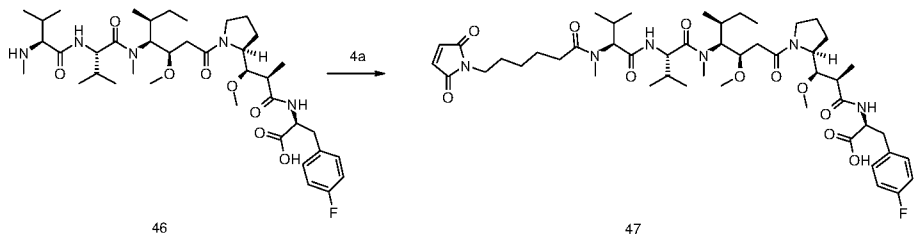
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.31-7.24(m, 2H), 7.02-6.92(m, 2H), 4.48-4.58(m, 2H), 4.22-4.11(m, 1H), 3.85-3.40(m, 4H), 3.39-3.04(m, 14H), 3.00-2.90(m, 1H), 2.66-2.40(m, 5H), 2.39-2.02(m, 4H), 1.99-1.75(m, 3H), 1.73-1.24(m, 3H), 1.20-1.10(m, 4H), 1.09-0.95(m, 16H), 0.94-0.80(m, 3H).

实施例 47

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(4-氟苯基)丙酸



47



46 47

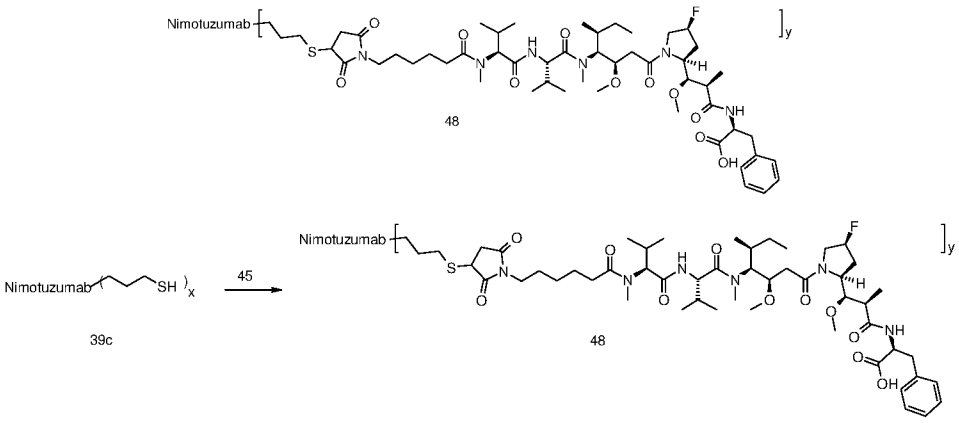
将 6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)已酸 **4a** (434 mg，2.06 mmol)溶于 20 mL 乙腈中，加入 *N*,*N*-二异丙基乙基胺(844 mL，6.55 mmol)，2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-四甲基脲六氟磷酸酯(781 mg，1.87 mmol)，反应体系于 23℃反应 30 分钟，加入(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲

基氨基)丁酰胺)丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(4-氟苯基)丙酸 **46** (1.4 g，1.87 mmol)。待 TLC 显示完全后，停止反应，加入 50 mL 乙酸乙酯稀释，减压浓缩，用硅胶柱色谱法先后以洗脱剂体系 B 和 A 纯化所得残余物，得标题产物粗品 1.2 g，然后用高效液相色谱法纯化所得残留物，得标题产物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(4-氟苯基)丙酸 **47** (670 mg，白色固体)，收率 37.9%。

MS m/z (ESI): 944.54 [M+1]

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 12.80(br.s, 1H), 8.56-8.52(m, 1H), 8.42-8.20(m, 1H), 8.18-8.10(m, 1H), 7.30-7.18(m, 2H), 7.07-6.75(m, 4H), 4.64-4.34(m, 3H), 4.08-3.94(m, 1H), 3.80-3.50(m, 2H), 3.46-2.70(m, 15H), 2.50-1.80(m, 6H), 1.73-1.38(m,7H), 1.30-1.10(m, 12H), 1.09-0.62(m, 20H).

实施例 48

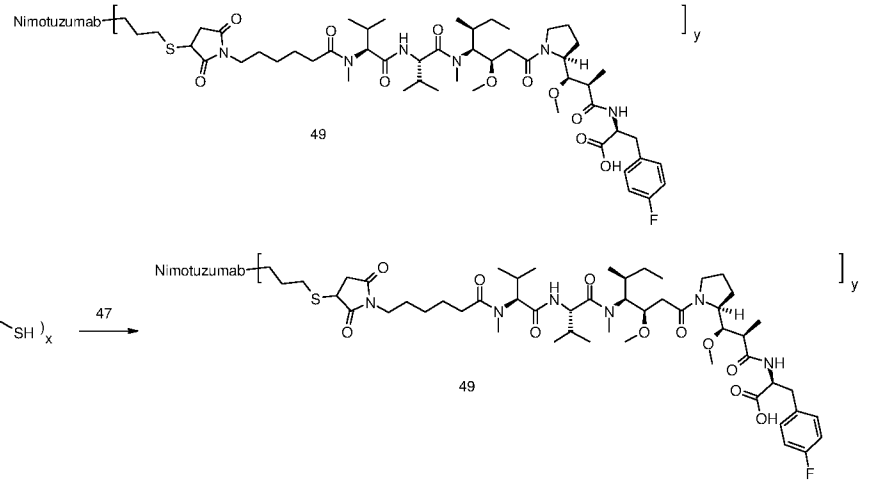


将化合物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-4-氟吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸 **45** (1.1 mg，1.16 μmol)溶解于 1.1 mL 乙腈中，加入尼妥珠单抗-丙硫醇 PBS 缓冲液 **39c** (1.63 mg/mL，11.4 mL)中，于 25℃下振荡反应 4 小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的含 0.05*M* 的 PBS 溶液)，在无菌条件下通过 0.2 μm 滤器过滤后得标题产物 **48** 的 PBS 缓冲液(0.75 mg/mL，19.8 mL)，于 4℃冷冻储存。

Q-TOF LC/MS: 特征峰：150186.5(M_{Ab}+0D)、151364.1(M_{Ab}+1D)、152262.3(M_{Ab}+2D)、153435.7(M_{Ab}+3D)、154499.6(M_{Ab}+4D)、155427.5(M_{Ab}+5D)。

平均值：y=2.0。

实施例 49

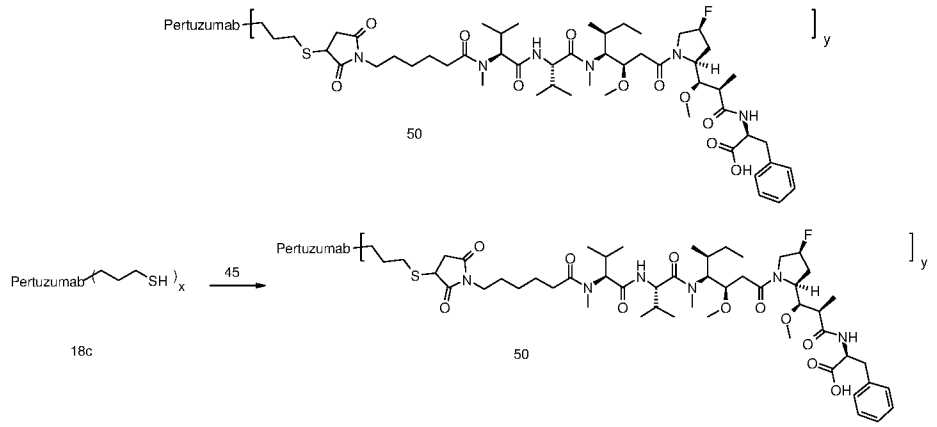


将化合物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(4-氟苯基)丙酸 **47** (1.1 mg，1.16 μmol)溶解于 1.1 mL 乙腈中，加入尼妥珠单抗-丙硫醇 PBS 缓冲液 **39c** (1.63 mg/mL，11.4 mL)中，于 25℃下振荡反应 4 小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH为6.5的含0.05*M*的PBS溶液)，在无菌条件下通过0.2 μm滤器过滤后得标题产物 **49** 的 PBS 缓冲液(0.75 mg/mL，19.8 mL)，于 4℃冷冻储存。

Q-TOF LC/MS: 特征峰：150185.5(M_{Ab}+0D)、151364.7(M_{Ab}+1D)、152261.2(M_{Ab}+2D)、153436.2(M_{Ab}+3D)、154499.9(M_{Ab}+4D)、155428.6(M_{Ab}+5D)。。

平均值：y=2.0。

实施例 50



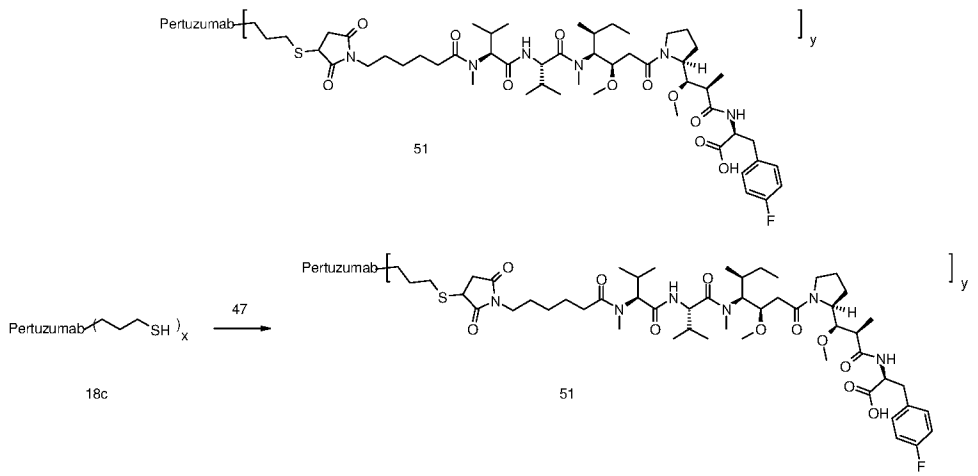
将化合物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4- ((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-4-氟吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸 **45** (1.09 mg，1.16 μmol)溶解于 1.1 mL 乙腈中，加入帕妥珠单抗-丙硫醇溶液 **18c** (1.65 mg/mL，11.3 mL)中，于 25℃下振荡反应 4 小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶

柱脱盐纯化(洗脱相：pH为6.5的含0.05*M*的PBS溶液)，在无菌条件下通过0.2 μm滤器过滤后得标题产物 **50** 的 PBS 缓冲液(0.75 mg/mL，19.5 mL)，于 4℃冷冻储存。

Q-TOF LC/MS: 特征峰：148095.6(M_{Ab}+0D)、149111.5(M_{Ab}+1D)、150165.3(M_{Ab}+2D)、151184.7(M_{Ab}+3D)、152255.2M_{Ab}+4D)、153297.5(M_{Ab}+5D)。

平均值：y=2.0。

实施例 51

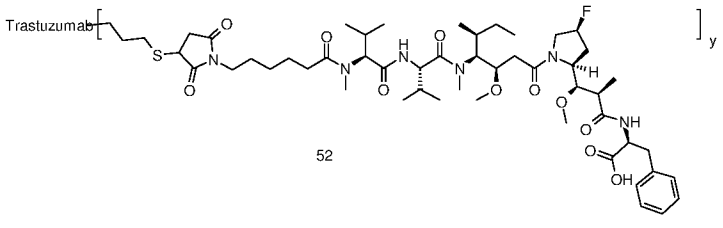


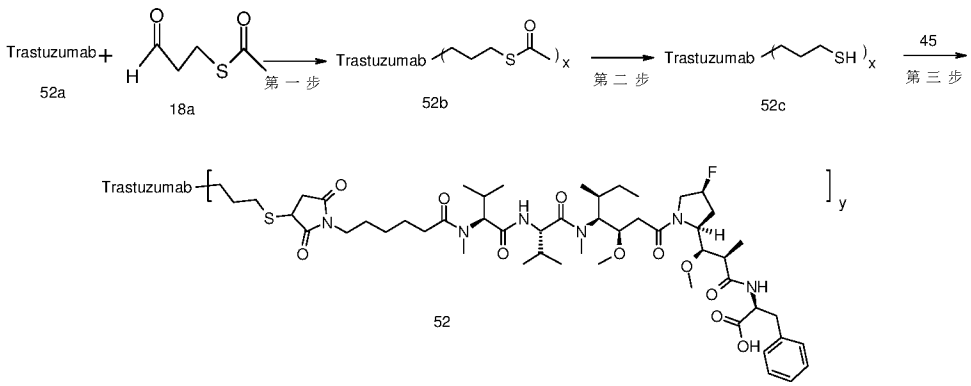
将化合物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(4-氟苯基)丙酸 **47** (1.09 mg，1.16 μmol)溶解于 1.1 mL 乙腈中，加入帕妥珠单抗-丙硫醇溶液 **47c** (1.65 mg/mL，11.3 mL)中，于 25℃下振荡反应 4 小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的含 0.05*M* 的 PBS 溶液)，在无菌条件下通过 0.2 μm 滤器过滤后得标题产物 **51** 的 PBS 缓冲液(0.75 mg/mL，19.5 mL)，于 4℃冷冻储存。

Q-TOF LC/MS: 特征峰：148096.2(M_{Ab}+0D)、149112.2(M_{Ab}+1D)、150165.4(M_{Ab}+2D)、151184.8(M_{Ab}+3D)、152255.1(M_{Ab}+4D)、153297.6(M_{Ab}+5D)。

平均值：y=2.0。

实施例 52





第一步

将硫代乙酸 *S*-(3-羰基丙基)酯 **18a**(0.35 mg，2.65 μmol)，溶解于 0.45 mL 乙腈溶液，备用；向曲妥珠单抗 pH=4.5 的乙酸/乙酸钠缓冲液(10.0 mg/ml，4.5 mL，0.304 μmol)加入上述预制的硫代乙酸 *S*-(3-羰基丙基)酯 **18a** 的乙腈溶液，然后滴加 1.0 mL 的氰基硼氢化钠(7.06 mg, 112 μmol)溶液，于 25℃下振荡反应 2 小时。反应结束后用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05*M* 的 PBS 溶液)后得标题产物 **52b** 溶液，直接进行下一步反应。

第二步

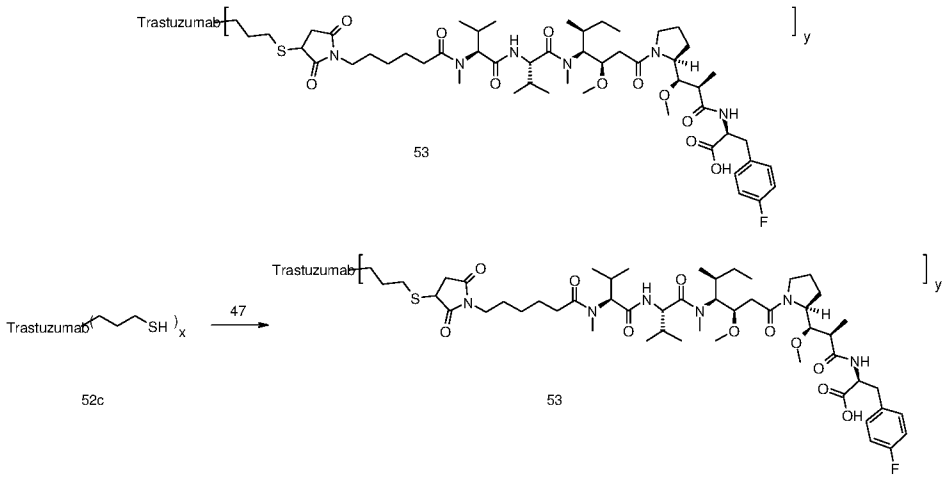
向 **52b** 溶液(约 15.0 mL)中加入 0.45 mL 的 2.0*M* 盐酸羟胺溶液，于 25℃下振荡反应 30 分钟后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05*M* 的 PBS 溶液)后得标题产物曲妥珠单抗-丙硫醇 **52c** 溶液(浓度 1.65 mg/ml，22.6 mL)。

第三步

将化合物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((2*S*,4*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4- ((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-4-氟吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸 **45** (1.1 mg，1.2 μmol)溶解于 1.1 mL 乙腈中，加入曲妥珠单抗-丙硫醇溶液 **52c** (1.65 mg/mL，11.3 mL)中，于 25℃下振荡反应 4 小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH为6.5的含0.05*M*的PBS溶液)，在无菌条件下通过0.2 μm滤器过滤后得标题产物 **52** 的PBS缓冲液(0.72 mg/mL，20 mL)，于4℃冷冻储存。Q-TOF LC/MS: 特征峰：148062.9(M_{Ab}+0D)、149235.2(M_{Ab}+1D)、150259.8(M_{Ab}+2D)、151268.2(M_{Ab}+3D)、152341.9(M_{Ab}+4D)、153356.4(M_{Ab}+5D)。

平均值：y=2.0。

实施例 53



将化合物(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(4-氟苯基)丙酸 **47** (1.12 mg，1.2 μmol)溶解于 1.1 mL 乙腈中，加入曲妥珠单抗-丙硫醇溶液 **52c** (1.65 mg/mL，11.3 mL)中，于 25℃下振荡反应 4 小时后将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的含 0.05*M* 的 PBS 溶液)，在无菌条件下通过 0.2 μm 滤器过滤后得标题产物 **53** 的 PBS 缓冲液(0.70 mg/mL，20.5 mL)，于 4℃冷冻储存。

Q-TOF LC/MS: 特征峰：148065.2(M_{Ab}+0D)、149244.6(M_{Ab}+1D)、150254.9(M_{Ab}+2D)、151280.9(M_{Ab}+3D)、152301.6(M_{Ab}+4D)、153457.9(M_{Ab}+5D)。

平均值：y=2.0。

生物学评价

测试例 1：细胞毒素通式（D）化合物对肿瘤细胞体外增殖抑制测试

一、测试目的

本实验的目的是为了检测本发明通式（D）药物化合物，对 HepG2 肿瘤细胞（人肝癌细胞，中科院细胞库，货号#TCHu 72）和 A549 肿瘤细胞（人肺腺癌细胞中科院细胞库，货号#TCHu150）体外增殖的抑制活性。以不同浓度的化合物体外处理细胞，经 76 小时培养后，采用 CCK-8(Cell Counting Kit-8，Dojindo，货号：CK04)试剂对细胞的增值进行检测，根据 IC50 值评价该化合物的体外活性。

二、实验方法

下面以对 HepG2 细胞体外增殖抑制测试方法为例，用于举例说明本发明中测试本发明化合物对肿瘤细胞进行体外增殖抑制活性测试的方法。本方法同样适用于，但不限于对其它肿瘤细胞进行体外增殖抑制活性测试。

1、细胞准备。取对数生长期的 HepG2 细胞，用 PBS（磷酸缓冲液，ThermoFisher）洗涤 1 次之后，加入 2-3ml 胰蛋白酶（0.25% Trypsin-EDTA (1x)，Gibico, Life Technologies 公司）消化 2-3min，待细胞消化完全后，加入 10-15ml

细胞培养液（DMEM/F12 培养基，Invitrogen；10% (v/v)灭活的胎牛血清），将经过消化的 HepG2 细胞洗脱下来，1000rpm 离心 3min，弃上清，接着加入 10-20ml 细胞培养液将细胞重悬，制成单细胞悬液。

2、细胞铺板。将 HepG2 单细胞悬液混匀，用细胞培养液调整活细胞密度至 6×10^4 cells/ml，将密度调整过后的细胞悬液混匀，以 100μl/孔加入 96 孔细胞培养板。将培养板置于 37℃，5% CO_2 恒温培养箱内培养 18-20 小时。

3、化合物准备

用 DMSO（二甲基亚砜，上海泰坦科技股份有限公司）溶解化合物，配制成初始浓度为 10mM 的存储液。

加入 10μl 10mM 的化合物样品至 U 型底 96 孔板（样品板 1）第一列各孔。，在第一列各化合物样品孔内加入 90μl DMSO，即对原液稀释 10 倍，作为起始浓度点，接下来进行 3 倍梯度稀释，每种化合物稀释 10 个浓度点。稀释液为 DMSO 溶液。第 12 列加入 60μl 100% DMSO。第 11 列加入 20μl 1mM 的阳性药物参考品。

取一新的 U 型底 96 孔板（样品板 2），用完全培养基对样品板 1 内的各孔样品进行 20 倍稀释。接着再取一新的 U 型底 96 孔板（样品板 3），将样品板 2 内的各孔样品进行最终的 10 倍稀释。

4、加样操作。细胞预培养完成后，取出 96 孔细胞培养板，弃上清。以 100μl/孔，将 96 孔样品板 3 中的各样品稀释液依次加入到 96 孔细胞培养板内。各化合物样品每种浓度点作 2 复孔检测。加样操作不应超过 30min。完成加样操作后，将 96 孔细胞培养板置于 37℃，5% CO_2 二氧化碳恒温培养箱中培养 76 小时左右。

5、显色操作。取出 96 孔细胞培养板，向各孔中以 10μl/孔加入 CCK-8 显色液。轻轻拍板混匀 10 次以上，将细胞培养板置于 37℃，5%CO_2 二氧化碳恒温培养箱继续孵育 2.0 小时。

6、读板操作。取出 96 孔细胞培养板，置于酶标仪（PerkinElmer ，VICTOR 3）中，用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度。

按照以上步骤，测试本发明药物化合物对 A549 肿瘤细胞体外增殖的抑制活性。细胞培养液同样为 DMEM/F12 培养基。

三、数据分析

用 Microsoft Excel，Graphpad Prism 5 对数据进行处理分析。实施例结果参见表 1。

表 1

化合物编号	IC_{50}/nM	
	HepG2	A549
1	8.60	12.75

2	4.12	2.33
3	9.33	16.17
7	283	776.4
9	55	114.4
11	6.6	27.23
13	11.7	30.24
15	47.45	75.45
16	13.92	52.99
44		179
25	174.7	200.5
29	58.64	1.8
31	100.5	130.1
32	17.40	13.51
33	4.66	5.00
34	18.33	32.32
35	30.56	17.98
46		106

测试例 2：针对 HER2 靶标的本发明抗体药物偶联物对肿瘤细胞的体外增殖抑制测试

本实验的目的是为了检测本发明针对 HER2 靶标的抗体药物偶联物，对 SK-BR-3 肿瘤细胞（人乳腺癌细胞，ATCC，货号 HTB-30）体外增殖的抑制活性。以不同浓度的化合物体外处理细胞，经 76 小时培养后，采用 CCK-8(Cell Counting Kit-8，Dojindo，货号：CK04)试剂对细胞的增值进行检测，根据 IC50 值评价该化合物的体外活性。

按照测试例 1 的测试方法，测试细胞为 SK-BR-3，细胞培养液为含 10%FBS 的 McCoy's 5A 培养基（Gibco，货号 16600-108）。对相关化合物进行测试，得到结果见表 2:

表 2

化合物编号	IC_{50}/nM
	SK-BR-3
18	0.026
19	0.147
20	0.466
21	0.031
22	0.28
23	0.201
24	0.174

36	0.052
37	0.215
38	0.101
50	0.1
51	0.373

结论：本发明针对 HER2 靶标的抗体药物偶联物对 SK-BR-3 细胞具有明显的增殖抑制活性。

测试例 3：针对 EGFR 靶标的本发明抗体药物偶联物对肿瘤细胞的体外增殖抑制测试

本实验的目的是为了检测本发明针对 EGFR 靶标的抗体药物偶联物，对 HCC827 肿瘤细胞（非小细胞肺癌细胞，中科院细胞库，货号#TCHu153）体外增殖的抑制活性。以不同浓度的化合物体外处理细胞，经 76 小时培养后，采用 CCK-8(Cell Counting Kit-8，Dojindo，货号：CK04)试剂对细胞的增值进行检测，根据 IC50 值评价该化合物的体外活性。

按照测试例 1 的测试方法，测试细胞为 HCC827，细胞培养液为 RPMI1640 培养基（Invitrogen），10% (v/v)灭活的胎牛血清。对相关化合物进行测试，得到结果见表 3:

表 3

化合物编号	IC_{50}/nM
	HCC827
39	0.353
40	0.255
41	0.451
48	0.993

结论：本发明针对 EGFR 靶标的抗体药物偶联物对 HCC827 细胞具有明显的增殖抑制活性。

测试例 4：NCI-N87 抑瘤率实验

一、试验目的

评价并比较本发明抗体细胞毒素偶联物对 NCI-N87 细胞（HER2 过表达的人胃癌细胞，ATCC，CRL-5822）裸小鼠移植瘤的疗效。

二、受试药物

本发明样品：化合物 18，化合物 21，化合物 36。

阳性对照：Pertuzumab 帕妥珠单抗，Trastuzumab 曲妥珠单抗。

配制方法：均用生理盐水配制。

三．试验动物

BALB/cA-nude 裸小鼠，6-7 周，雌性，购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。合格证号：SCXK（沪）2012-0002。饲养环境：SPF 级。

四、试验步骤

裸小鼠皮下接种人胃癌 NCI-N87 细胞，待肿瘤生长至 100-200mm^3 后，将动物随机分组(D0)。给药剂量和给药方案见表 4。每周测 2-3 次瘤体积，称鼠重，记录数据。肿瘤体积（V）计算公式为：

$V=1/2\times a\times b^2$

其中：a、b 分别表示长、宽。

T/C(%)=(T-T_0)/(C-C_0)×100% 其中 T、C 为实验结束时的肿瘤体积；T_0、C_0 为实验开始时的肿瘤体积。

表 4. 化合物(18、21、36)对人胃癌 NCI-N87 裸小鼠移植瘤的疗效

化合物 分组	给药	途径	平均肿瘤体积（mm^3） D0	SEM	平均肿瘤体积（mm^3） D21	SEM	%T/C D21	%抑瘤率 D21	P 值 D21	每组动物数
溶剂	D0,7	IV	107.8	±3.0	742.8	±92.6	-	-	-	12
Pertuzumab 60mg/kg	D0,7	IV	115.5	±2.9	380.1	±76.3	42	58	0.018	6
Trastuzumab 7.5mg/kg	D0,7	IV	109.7	±4.4	366.5	±90.9	40	60	0.019	6
18（3mg/kg）	D0,7	IV	113.1	±2.4	87.6	±6.7	-22	122	0.000	6
21 (3mg/kg)	D0,7	IV	122.1	±4.0	20.0	±20.0	-84	184	0.000	6
36 (3mg/kg)	D0,7	IV	119.1	±6.1	95.8	±22.3	-20	120	0.000	6

D0: 第一次给药时间; Pertuzumab 和 Trastuzumab :首剂加倍；P 值指与溶剂对照组相比；采用 Student's t 检验。实验开始时小鼠数目：对照组 n=12，治疗组 n=6。

五、试验结果

本发明典型化合物显著抑制 HER2 高表达胃癌 NCI-N87 裸小鼠皮下移植瘤的生长，并且荷瘤小鼠对以上药物均能较好耐受。

测试例 5：EGFRV3 抗体及包含其的 ADC 对 HCC827 移植瘤裸小鼠疗效测试

一、试验目的

本实验以Nude-nude裸小鼠为受试动物，评价本发明ADC化合物39、40多剂量腹腔注射给药后，对人非小细胞肺癌HCC827移植瘤裸小鼠的疗效。

本次实验结果显示，发明ADC化合物39、40多剂腹腔注射给药一次后观察抑瘤效果，并给药后第38天时结束实验， ADC化合物39（0.05 mg/mouse）的抑瘤率为62.78%，与空白组相比差异有统计学意义（p<0.05）；ADC化合物40（0.025 mg/mouse）的抑瘤率为49.20%，与空白组相比差异不显著；ADC化合物40（0.05 mg/mouse）的抑瘤率为86.8%，与空白组相比有显著差异（p<0.01）；ADC化合物40（0.1 mg/ mouse）的抑瘤率为93.41%；与空白组相比差异有统计学意义（p<0.05）

二、受试药物及材料

1、受试药物

本发明ADC化合物：ADC化合物39，ADC化合物40，

2、配制方法：均用 PBS 稀释配制。

3、试验动物

Nude-nude裸小鼠，SPF，16-20 g，♀，购自上海西普尔·必凯实验动物有限责任公司。合格证号：SCXK（沪）2008－0016。

三、试验方法

裸小鼠实验室环境适应三天后，进行肿瘤细胞移植。在裸小鼠右肋部皮下接种 HCC827 细胞（4×10^6+50% matrigel/mouse），接种后第 21 天，肿瘤长至 209.41±25.93 mm3（d1）开始给药。给药剂量及方法具体见表 5。

每周测定2次移植瘤体积，称量裸小鼠体重并记录数据。

使用 Excel 统计软件：平均值以 avg 计算；SD 值以 STDEV 计算；SEM 值以 STDEV/SQRT 计算；组间差异 P 值以 TTEST 计算。

肿瘤体积（V）计算公式为：$V=1/2\times L_{长}\times L_{短}^2$

相对体积（RTV）=V_T/V_0

抑瘤率(%)=(C_{RTV}-T_{RTV})/ C_{RTV}(%)

其中 V_0、V_T 分别为实验开始时及实验结束时的肿瘤体积。C_{RTV} 、T_{RTV} 分别为实验结束时的空白对照组(Blank)及实验组的相对肿瘤体积。

表5. 受试抗体对HCC827裸小鼠移植瘤的疗效

化合物 分组	给药	途径	平均肿瘤体积（mm^3） D0	SEM	平均肿瘤体积（mm^3） D38	SEM	%抑瘤率 D38	P 值 (vs blank)	每组动物数
溶剂	d1-14/一次	ip	210.6	23.1	1710.5	281.7	-	-	5
39 (0.05 mg/kg)	d1-14/一次	ip	208.6	26.5	598.4	115.1	62.78	0.020266	5
40（0.025mg/kg）	d1-14/一次	ip	209.6	25.5	868.8	167.4	49.20	0.058313	5
40 (0.05mg/kg)	d1-14/一次	ip	209.6	28.1	273.6	129.6	86.8	0.003073	5
40 (0.1mg/kg)	d1-14/一次	ip	210.5	30.1	130.4	53.5	93.41	0.001662	5

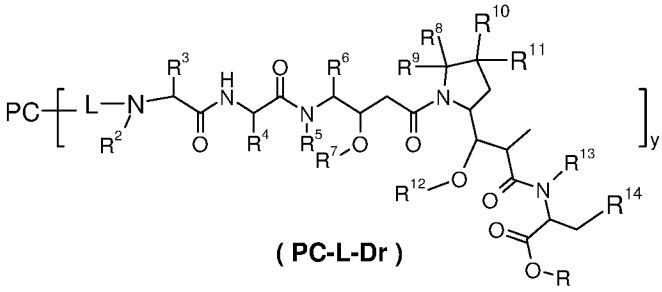
四、试验结果

本次实验结果显示抑瘤效果至第38天，ADC化合物39（0.05 mg/mouse）的抑瘤率为62.78%，与空白组相比差异有统计学意义（$p<0.05$）；ADC化合物40（0.025 mg/ mouse）的抑瘤率为49.20%，与空白组相比差异无统计学意义（$p>0.05$）；ADC化合物40（0.05 mg/ mouse）的抑瘤率为86.8%， ADC化合物40（0.1 mg/ mouse）

的抑瘤率为93.41%，与空白组相比均有显著差异（$p<0.01$）；此外， ADC化合物40三个不同剂量组的抑瘤效果具剂量依赖关系。

权利要求书

1、一种通式(PC-L-Dr)所示的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物：



(PC-L-Dr)

其中：

R，R^2-R^7 选自氢原子、卤素、羟基、氰基、烷基、烷氧基和环烷基；

R^8-R^{11} 中至少一个选自卤素、烯基、烷基和环烷基，其余为氢原子；

或者 R^8-R^{11} 之中的任意两个形成环烷基，余下的两个基团任选自氢原子、烷基和环烷基；

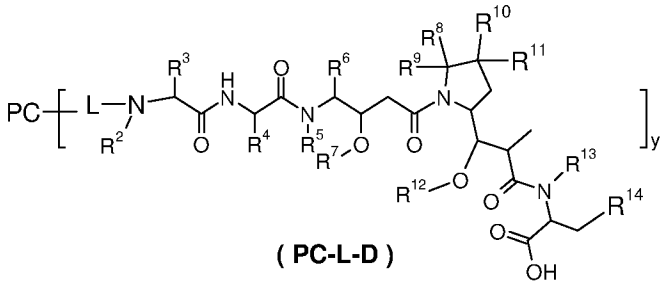
R^{12}-R^{13} 选自氢原子、烷基或卤素；

R^{14} 选自芳基或杂芳基，所述的芳基或杂芳基任选进一步被选自氢原子、卤素、羟基、烷基、烷氧基和环烷基的取代基所取代；

y 为 1-8，优选 2-5；

PC 为配体；L 为接头单元。

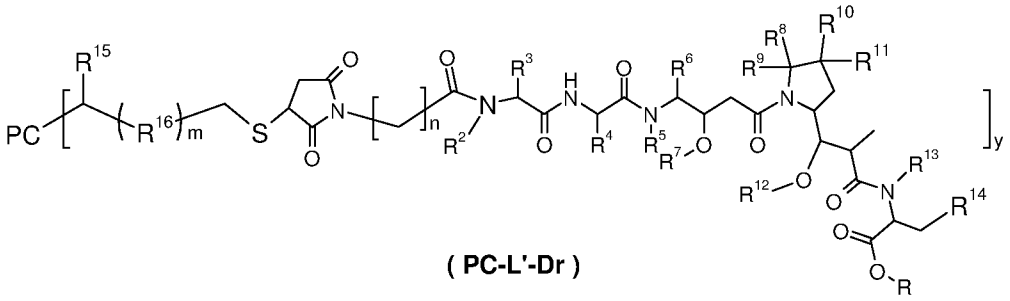
2、根据权利要求 1 所述的通式(PC-L-Dr)所示的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，其为通式(PC-L-D)所示的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物：



(PC-L-D)

其中，R^2-R^{14} 定义如权利要求 1 中所述。

3、根据权利要求 1 所述的通式(PC-L-Dr)所示的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，其为通式(PC-L'-Dr)所示的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物：



(PC-L'-Dr)

其中：

R^{15}选自氢原子、卤素、羟基、氰基、烷基、烷氧基和环烷基；

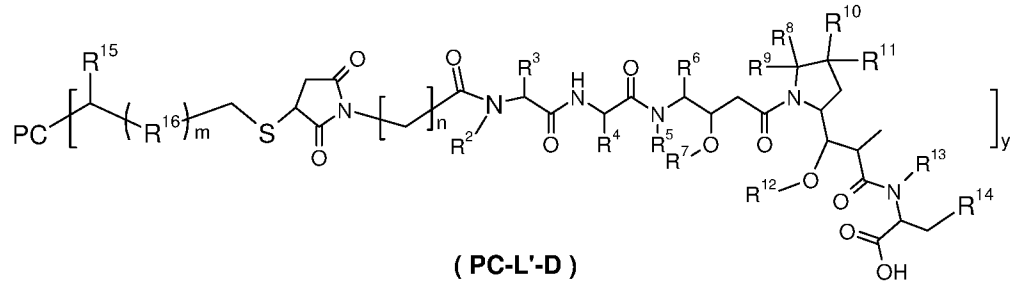
R^{16}选自烷基、环烷基、烷氧基和杂环基；

n 为 2-6，优选 2-5；

m 为 0-5，优选 1-3；

PC，y，n，R，R^2-R^{14}如权利要求 1 中所定义。

4、根据权利要求 1 所述的通式(PC-L-Dr)所示的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，其为通式(PC-L'-D)所示的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物：



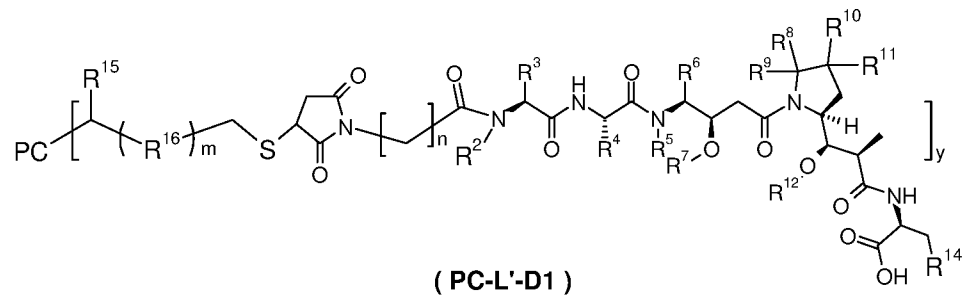
(PC-L'-D)

其中：

R^{15}，R^{16}，m 如权利要求 3 中所定义；

PC，y，n，R^2-R^{14}如权利要求 1 中所定义。

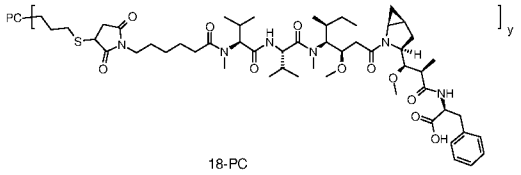
5、根据权利要求 2 所述的通式(PC-L'-D)所示的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，其为通式(PC-L'-D1)所示的化合物：

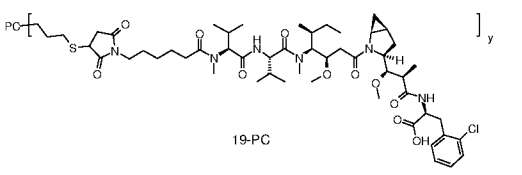


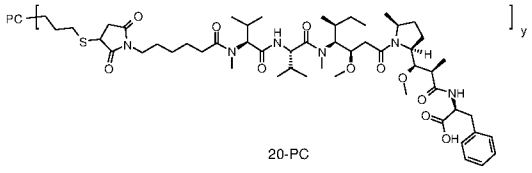
(PC-L'-D1)；

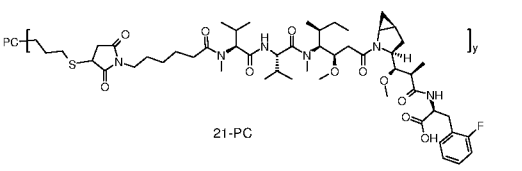
其中 PC，y，n，m，R^2-R^{16}如权利要求 2 中所定义。

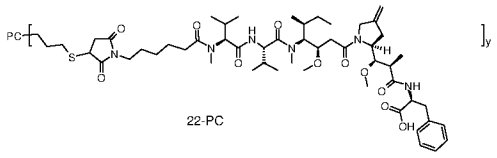
6、根据权利要求 1 至 5 任一项所述的通式(PC-L-Dr)所示的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，其选自：

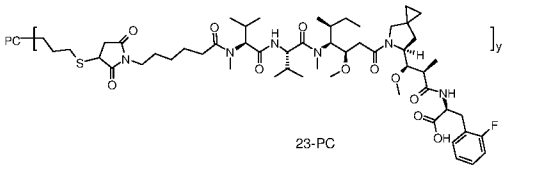

18-PC

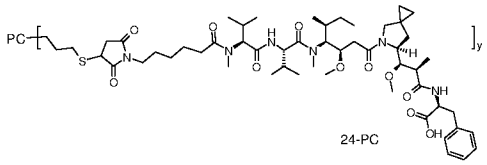

19-PC

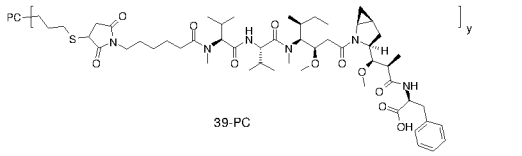

20-PC

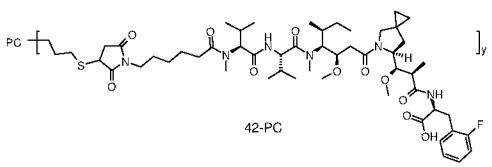

21-PC


22-PC

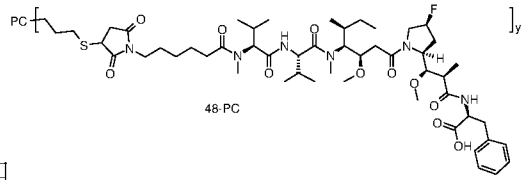

23-PC


24-PC


39-PC


42-PC

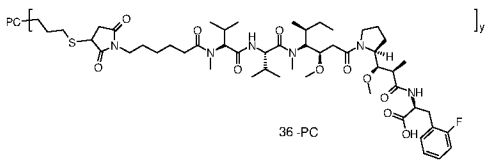
和

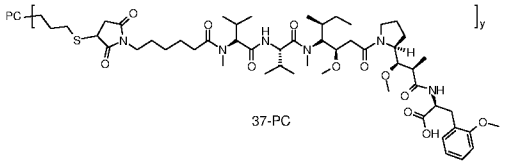

48-PC

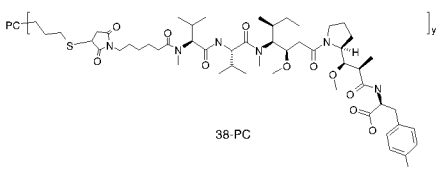
；

其中 PC， y 如权利要求 1 所定义。

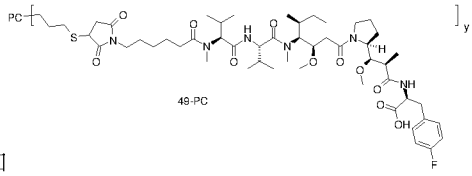
7、如下所述的配体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，其选自：


36-PC


37-PC


38-PC

和

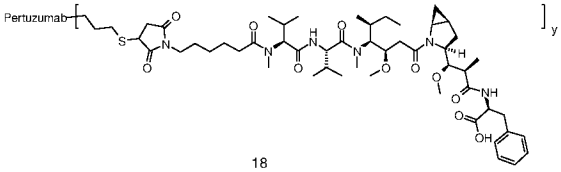

49-PC

；

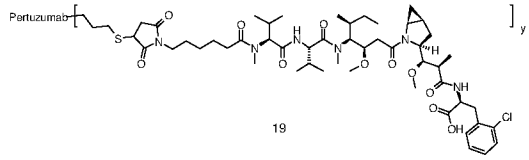
其中 PC、y 如权利要求 1 所述。

8、根据权利要求 1 至 7 中任一所述的通式(PC-L-Dr)所示的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，其中 PC 为抗体，优选自帕妥珠单抗（Pertuzumab）、尼妥珠单抗（Nimotuzumab）和曲妥珠单抗（Trastuzumab）。

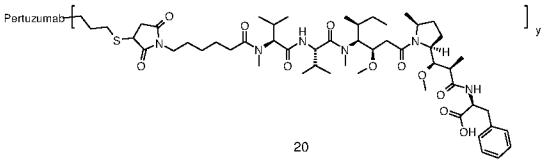
9、根据权利要求 1 至 8 任一项所述的通式(PC-L-Dr)所示的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，其选自：



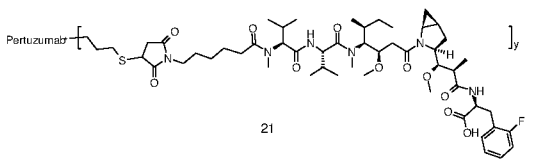
18



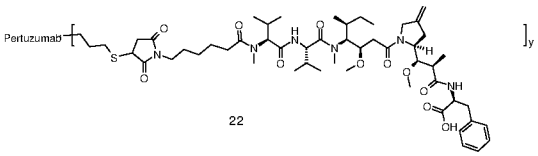
19



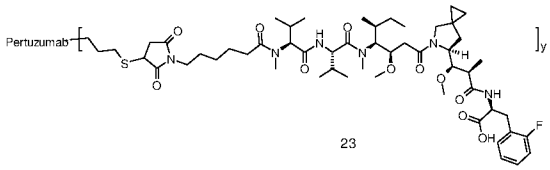
20



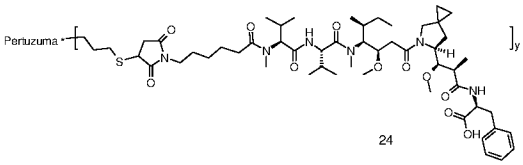
21



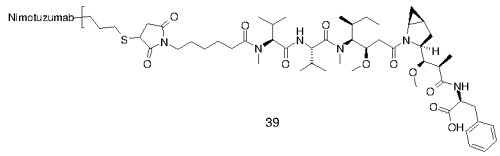
22



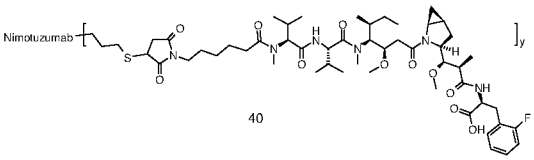
23



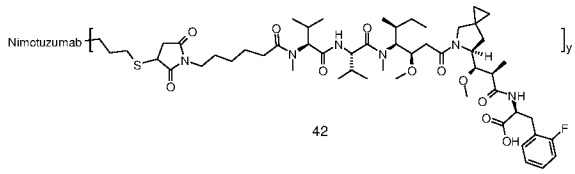
24



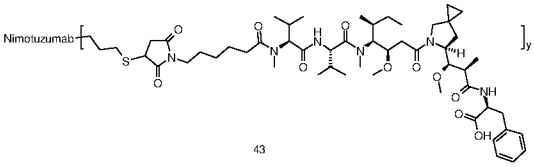
39



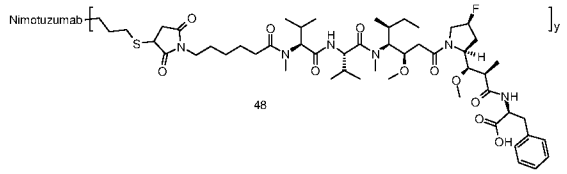
40



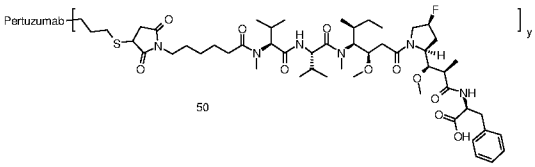
42



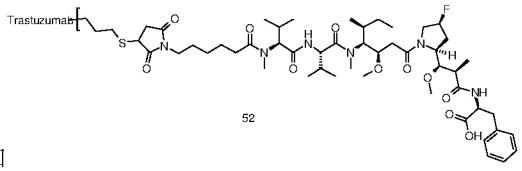
43



48



50

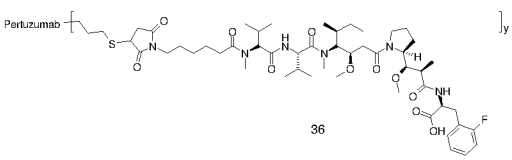


52

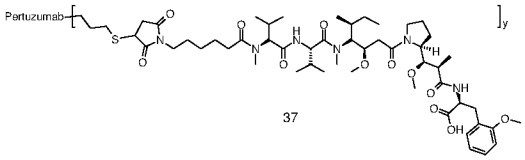
和 ；

其中 y 如权利要求 1 所述。

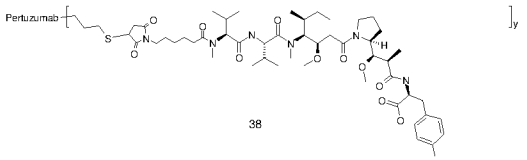
10、如下所述的配体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，其选自：

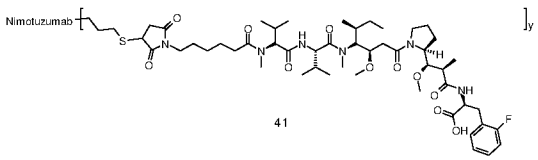


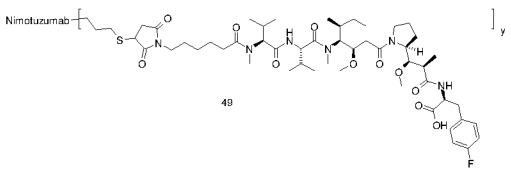
36

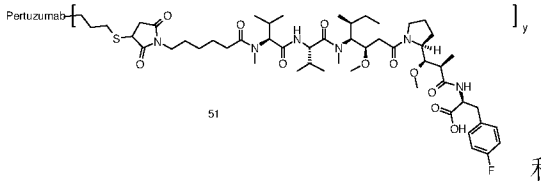


37

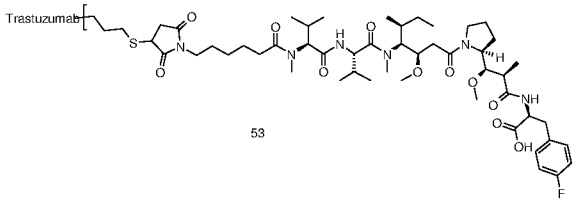






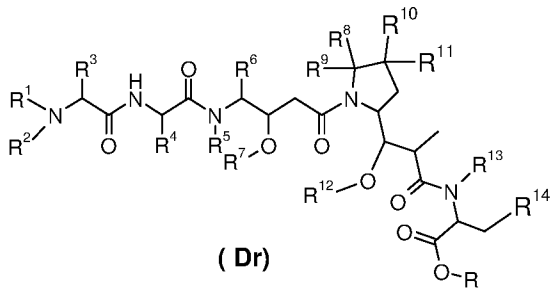


和



；其中 y 如权利要求 1 所述。

11、一种通式(D r)所示的化合物：



(Dr)

或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、或其混合物形式，或其可药用的盐，其中：

R，R^1-R^7 选自氢原子、卤素、羟基、氰基、烷基、烷氧基和环烷基；

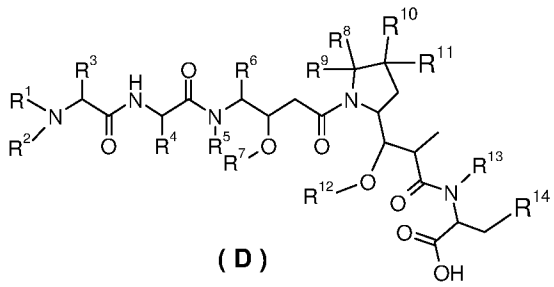
R^8-R^{11} 中至少一个选自卤素、烯基、烷基和环烷基，其余为氢原子；

或者 R^8-R^{11} 之中的任意两个形成环烷基，余下的两个基团任选自氢原子、烷基和环烷基；

R^{14} 选自芳基或杂芳基，所述的芳基或杂芳基任选进一步被选自氢原子、卤素、羟基、烷基、烷氧基和环烷基的取代基所取代；

R^{12}-R^{13} 选自氢原子、烷基或卤素。

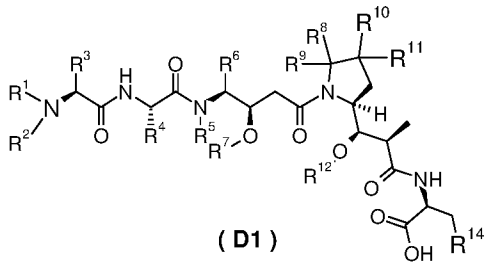
12 根据权利要求 11 所述的通式(Dr)所示的化合物，其为通式(D1)所示的化合物：



(D)

或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、或其混合物形式，或其可药用的盐，其中：R^1-R^{14} 如权利要求 11 中所定义。

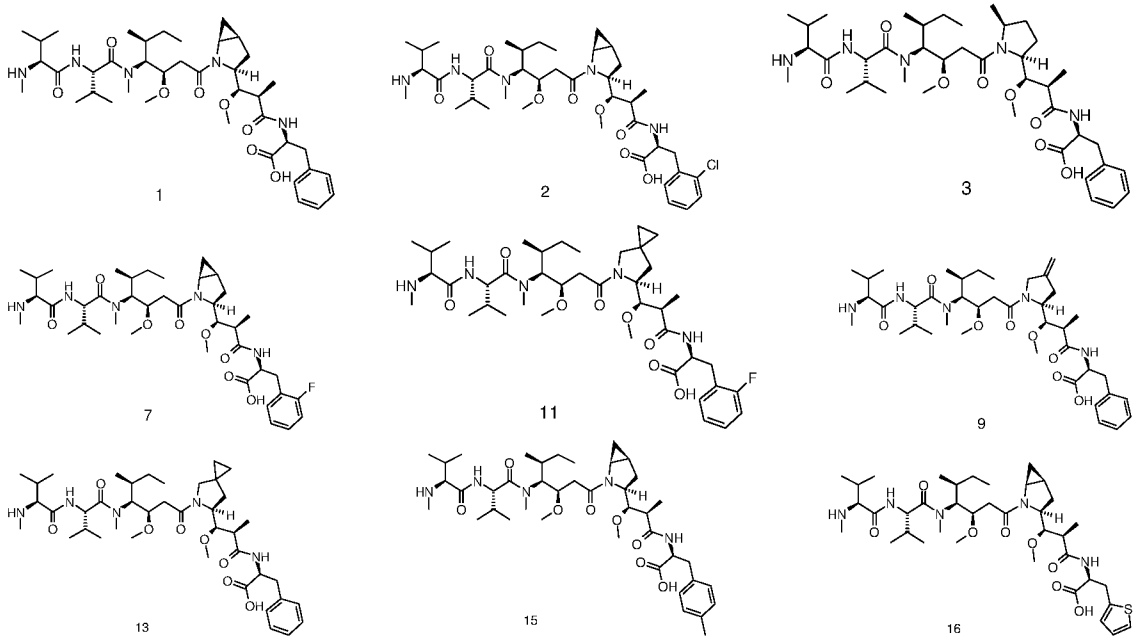
13、根据权利要求 11 所述的通式(Dr)所示的化合物，其为通式(D1)所示的化合物：

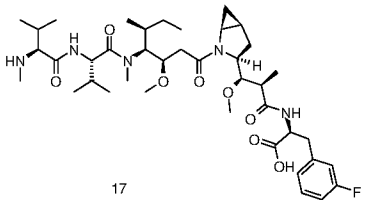


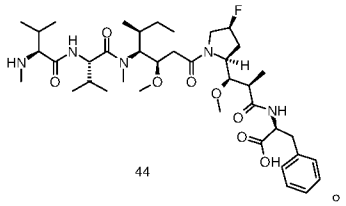
(D1)

或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、或其混合物形式，或其可药用的盐，其中：R^1-R^{14} 如权利要求 11 中所定义。

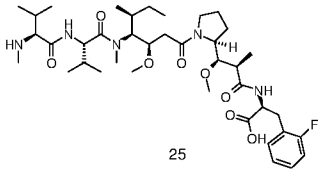
14、根据权利要求 11 至 13 任一项所述的通式(Dr)所示的化合物，其选自：

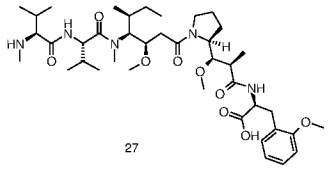


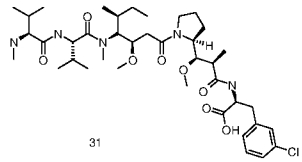

17

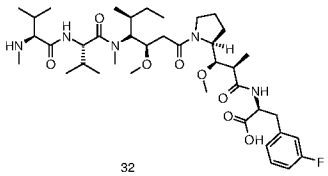

44

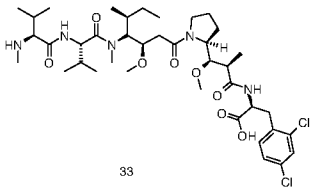
15、如下所示的化合物，其选自：

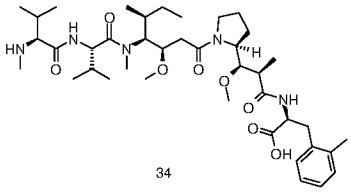

25

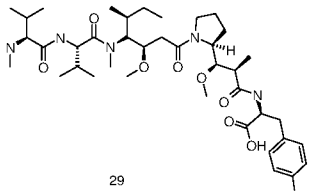

27

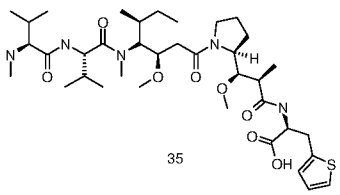

31


32

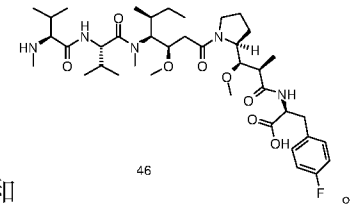

33


34

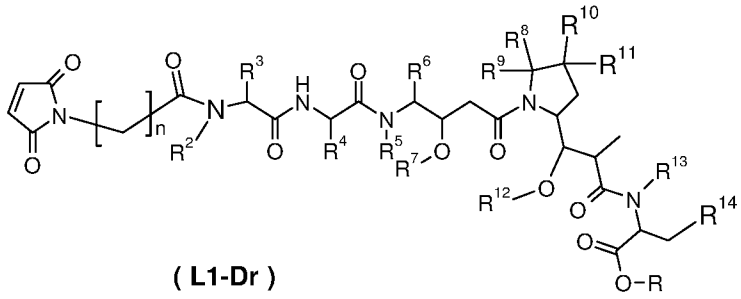

29


35

和


46

16、一种通式(L_1-Dr)所示的化合物：


(L1-Dr)

其中

n 为 2-6，优选 2-5；

R，R^2-R^7 选自氢原子、卤素、羟基、氰基、烷基、烷氧基和环烷基；

R^8-R^{11} 中至少一个选自卤素、烯基、烷基和环烷基，其余为氢原子；

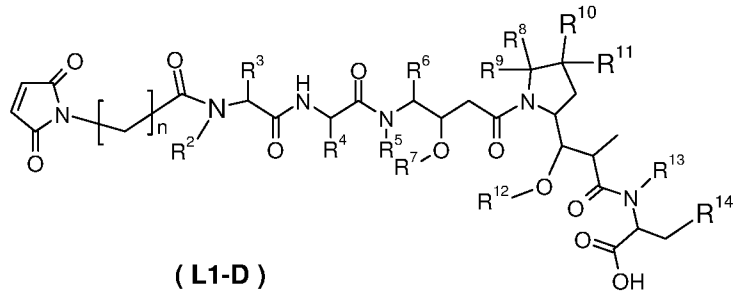
或者 R^8-R^{11} 之中的任意两个形成环烷基，余下的两个基团任选自氢原子、烷基和环烷基；

R^{12}-R^{13} 选自氢原子、烷基或卤素；

R^{14} 选自芳基或杂芳基，所述的芳基或杂芳基任选进一步被选自氢原子、卤素、羟基、烷基、烷氧基和环烷基的取代基所取代。

17、根据权利要求 16 所述的通式(L1-Dr)所示的化合物，其为通式(L1-D)所示

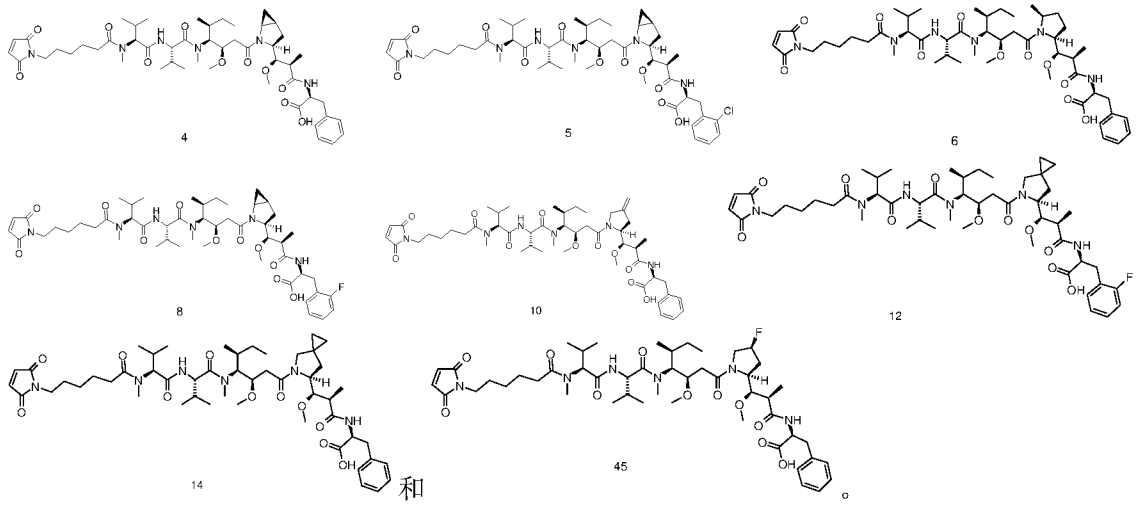
的化合物：



（L1-D）

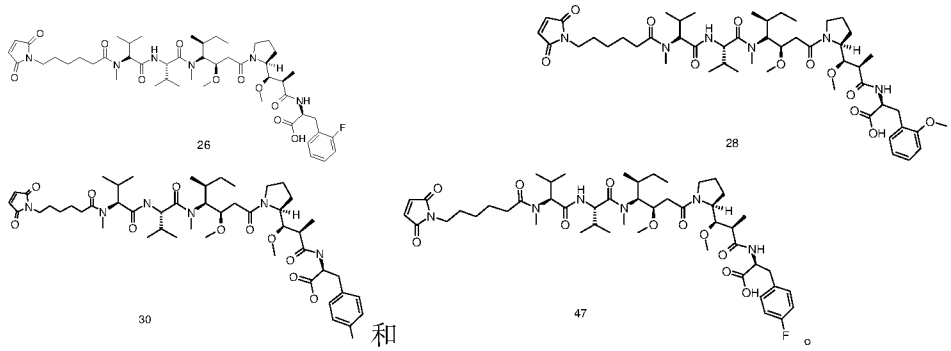
其中 n，R^2-R^{14} 如权利要求 16 中所定义。

18、根据权利要求 16 或 17 所述的通式(L_1-D)所示的化合物，其选自：



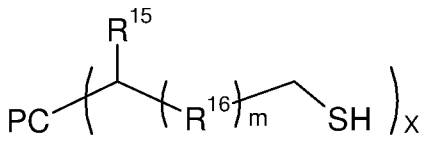
和。

19、制备如权利要求 10 所述的配体药物偶联物的中间体化合物，其选自：



和。

20、一种通式(PC-L_2)所示的化合物：



(PC-L2)

其中

PC 配体，优选为抗体，更优选为帕妥珠单抗（Pertuzumab）、尼妥珠单抗（Nimotuzumab）或曲妥珠单抗（Trastuzumab）；

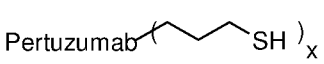
R^{15}选自氢原子、卤素、羟基、氰基、烷基、烷氧基和环烷基；

R^{16}选自烷基、环烷基和杂环基；

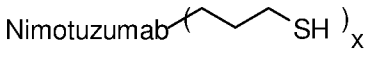
m 为 0-5，优选 1-3；

X 为 0-5，优选 1-3。

21、根据权利要求 20 所述的通式(PC-L_2)所示的化合物，其选自：

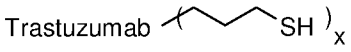


18c



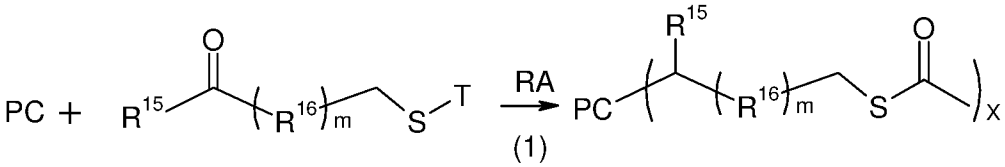
39c

和

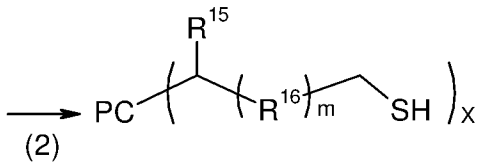


52c 。

22、一种制备如通式（PC-L_2）所示的化合物的方法，其包括如下步骤：



(PC-L2-A) **(PC-L2-B)**



(PC-L2)

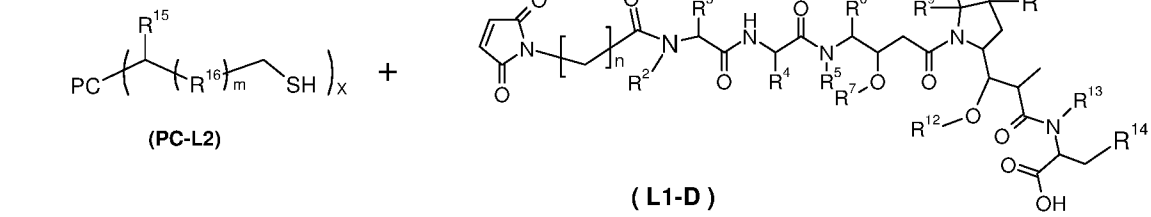
1) 向 PC 与通式（PC-L2-A）化合物中加入还原剂 RA，进行反应，得到通式（PC-L2-B）化合物；RA 优选为氰基硼氢化钠或三乙酰氧基硼氢化钠；

2)向通式（PC-L2-B）化合物中加入脱保护剂脱去巯基保护基，得到通式（PC-L2）化合物；

T 选自 H、叔丁基、乙酰基、正丙酰基、异丙酰基、三苯基甲基、甲氧基甲基、2-(三甲硅烷基)乙氧甲基，优选为 H 或乙酰基；

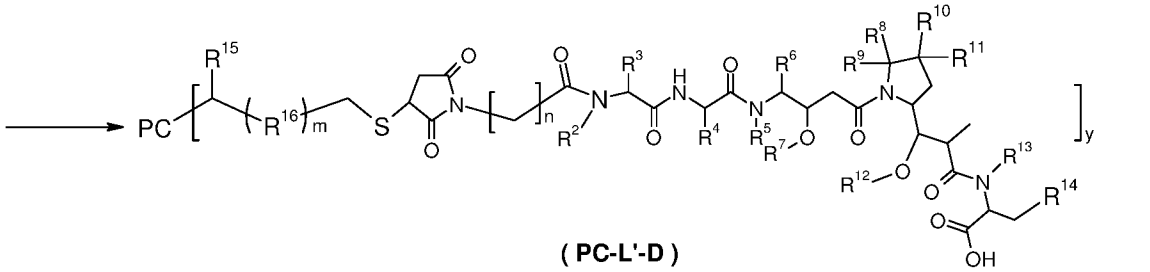
其中 PC，R^{15}，R^{16}，m，x 如权利要求 20 中所定义。

23、一种制备根据权利要求 4 所述的通式(PC-L'-D)所示的化合物的方法，该方法包括：



(PC-L2)

(L1-D)

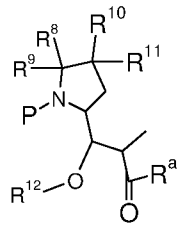


(PC-L'-D)

通式(PC-L2)化合物与通式(L1-D1)化合物在反应，得到通式(PC-L'-D)化合物；

其中：PC，m，n，y，R^2～R^{16}如权利要求 3 中所定义。

24、一种通式(D-Aa)所示的化合物：



(D-Aa)

或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、或其混合物形式，或其可药用的盐，其中：

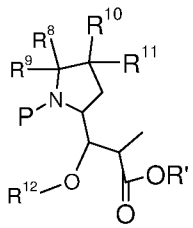
R^8-R^{11} 之中的任意两个形成环烷基，余下的两个基团任选自氢原子、烷基和环烷基；

R^{12} 选自氢原子、烷基或卤素；

P 为氢原子或保护基，所述的保护基优选 Boc，Bn，Cbz，最优选 Boc；

R^a 选自羟基，氨基，烷氧基，环烷氧基或烷氨基。

25、根据权利要求 24 所述的通式(D-Aa)所示的化合物，其为通式(D-A)所示的化合物：



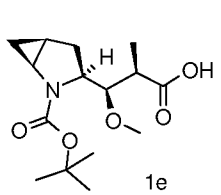
(D-A)

或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、或其混合物形式，或其可药用的盐，其中：

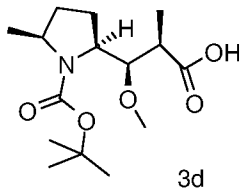
P，R^8-R^{12}，如权利要求 24 中所定义；

R’选自氢原子，烷基，环烷基。

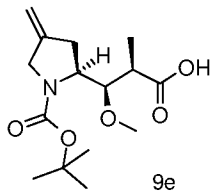
26、根据权利要求 24 所述的通式(D-A)所示的化合物，为如下所示的化合物：



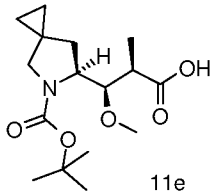
1e



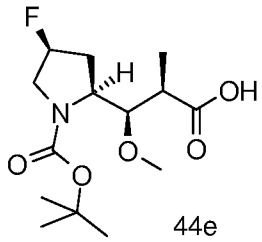
3d



9e



11e 或



44e 。

27、一种药物组合物，其含有治疗有效量的根据权利要求 1-10 任意一项所述的配体-细胞毒性药物偶联物，或根据权利要求 11-19 中所述药物、其可药用盐或溶剂合物，以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

28、根据权利要求 1-10 中任意一项所述的配体-细胞毒性药物偶联物，或根据权利要求 11-19 中任意一项所述的药物或其可药用盐或溶剂合物，或根据权利要求 27 所述的药物组合物在制备治疗哺乳动物癌症的药物的用途，所述的癌症为与 HER2，HER3，EGFR 表达相关的癌症。

29、根据权利要求 1-10 中任意一项所述的配体-细胞毒性药物偶联物，或根据权利要求 11-19 中任意一项所述的药物或其可药用盐或溶剂合物，或根据权利要求 27 所述的药物组合物在制备治疗哺乳动物癌症的药物的用途，其中所述哺乳动物为人，所述癌症选自乳腺癌、卵巢癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肺癌、结肠癌、肾癌、直肠癌、甲状腺癌、胰腺癌、前列腺癌、膀胱癌、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、慢性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤或复发性间变性大细胞淋巴瘤，优选乳腺癌症、霍奇金淋巴瘤或复发性间变性大细胞淋巴瘤；更优选为乳腺癌。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/072129

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/48 (2006.01) i; C07K 16/30 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, C07K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; CNKI; DWPI; ISI Web of knowledge and Keywords: 3.1.0, azabicyclo, pyrrolidine, cytotoxic, auristatine, etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 104254342 A (SEATTLE GENETICS INC.) 31 December 2014 (31.12.2014) see the entire document, especially claims 1-41 and description, paragraphs [0031] and [0138]	1-15, 23, 27-29
X	CN 103826661 A (SEATTLE GENETICS INC.) 28 May 2014 (28.05.2014) see the entire document, especially claims 1-52 and description, paragraphs [0015] and [0112]	1-15, 23, 27-29
A	CN 104245675 A (MERCK PATENT GMBH) 24 December 2014 (24.12.2014) see the entire document	1-15, 23, 27-29

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 April 2014	19 April 2014
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer JIA, Tao Telephone No. (86-10) 62411993

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/072129

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
Claims 1-15 (entirely), 23 (entirely), 27-29 (partially)

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/072129

Continuation of: Box No. III

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Invention 1, claims 1-10 (entirely), 23 (entirely) and 27-29 (partially), directed to compound presented by Formula (PC-L-Dr) or pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof, and preparation method, pharmaceutical composition and medicament preparation use thereof;

Invention 2, claims 11-15 (entirely) and 27-29 (partially), directed to compound presented by Formula (Dr) and pharmaceutical composition and medicament preparation use thereof;

Invention 3, claims 16-18 (entirely) and 27-29 (partially), directed to compound presented by Formula (L1-Dr) and pharmaceutical composition and medicament preparation use thereof;

Invention 4, claims 19 (entirely) and 27-29 (partially), directed to preparation of intermediate for the ligand pharmaceutical conjugate of claim 10 and pharmaceutical composition and medicament preparation use thereof;

Invention 5, claims 20-22 (entirely), directed to compound presented by Formula (PC-L2) and preparation method thereof; and

Invention 6, claims 24-26 (entirely), directed to compound presented by Formula (D-Aa).

The compounds of claims 2-6 are different intermediates relating to different part of the compound of claim 1, which is the final product. Those intermediates do not meet the requirements of unity. Furthermore, with respect to the compound of claim 1, the basic structure (parent nucleus) of the formula has been disclosed by prior art (e.g., CN 104254342 A, publication date: 31 December 2014, see claims 1, 7 and 9-12). Therefore, among invention 1 and the intermediate inventions 2-6, there are no special technical feature that make a contribution over the prior art. The inventions can not be considered to form a single general inventive concept, hence does not meet the requirements of unity of invention as defined in Rules 13.1 PCT.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/072129

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104254342 A	31 December 2014	AU 2012351685 A1	03 July 2014
		HK 1200714 A1	14 August 2015
		CA 2859255 A1	20 June 2013
		KR 20140114826 A	29 September 2014
		IL 233050 D0	31 July 2014
		JP 2015505850 A	26 February 2015
		RU 2014128467 A	10 February 2016
		EP 2790731 A2	22 October 2014
		AR 089252 A1	06 August 2014
		MX 2014007121 A	04 September 2014
		WO 2013087716 A3	22 August 2013
		US 2015023989 A1	22 January 2015
		WO 2013087716 A2	20 June 2013
		SG 11201403085 PA	30 October 2014
CN 103826661 A	28 May 2014	WO 2012143495 A2	26 October 2012
		CA 2833477 A1	26 October 2012
		KR 20140122167 A	17 October 2014
		WO 2012143495 A3	13 December 2012
		WO 2012143496 A2	26 October 2012
		MX 2013012253 A	17 February 2014
		RU 2013151600 A	27 May 2015
		KR 20140122649 A	20 October 2014
		US 2013122024 A1	16 May 2013
		WO 2012143497 A2	26 October 2012
		WO 2012143496 A3	21 March 2013
		WO 2012143497 A3	21 March 2013
		CA 2833690 A1	26 October 2012
		JP 2014512375 A	22 May 2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/072129

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		WO 2012143499 A2	26 October 2012
		IL 228841 D0	31 December 2013
		AR 086364 A1	11 December 2013
		WO 2012143499 A3	13 December 2012
		AR 086363 A1	11 December 2013
		SG 194567 A1	30 December 2013
		RU 2013151599 A	27 May 2015
		JP 2014515753 A	03 July 2014
		CN 103764170 A	30 April 2014
		AU 2012244673 A1	28 November 2013
		US 2015030618 A1	29 January 2015
		US 2015246136 A1	03 September 2015
		US 8992932 B2	31 March 2015
		US 2013095123 A1	18 April 2013
		AU 2012244675 A1	28 November 2013
		EP 2699268 A2	26 February 2014
		US 2013066055 A1	14 March 2013
		US 2014127240 A1	08 May 2014
CN 104245675 A	24 December 2014	WO 2013149704 A1	10 October 2013
		EP 2834221 A1	11 February 2015
		US 2015031670 A1	29 January 2015
		PH 12014501964 A1	17 November 2014
		DE 102012006884 A1	10 October 2013
		CA 2869337 A1	10 October 2013
		SG 11201406059 PA	27 November 2014
		CL 2014002640 A1	16 January 2015
		JP 2015512426 A	27 April 2015
		KR 20150004820 A	13 January 2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/072129

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		EA 201401081 A1	27 February 2015
		MX 2014011906 A	12 November 2014
		AR 090602 A1	26 November 2014
		PE 24522014 A1	28 January 2015
		AU 2013243020 A1	20 November 2014

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2016/072129

A. 主题的分类

A61K 47/48(2006.01)i; C07K 16/30(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K; C07K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNABS;CNKI;DWPI;ISI Web of knowledge和关键词：氮杂双环，3.1.0，吡咯烷，细胞毒，耳他汀，azabicyclo，pyrrolidine，cytotoxic，auristatine，等

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 104254342 A (西雅图基因公司) 2014年 12月 31日 (2014-12-31) 见全文，特别是权利要求1-41，说明书第[0031]、[0138]段	1-15，23，27-29
X	CN 103826661 A (西雅图基因公司) 2014年 5月 28日 (2014-05-28) 见全文，特别是权利要求1-52，说明书第[0015]、[0112]段	1-15，23，27-29
A	CN 104245675 A (默克专利股份公司) 2014年 12月 24日 (2014-12-24) 见全文	1-15，23，27-29

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2016年 4月 10日	2016年 4月 19日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 贾涛 电话号码 (86-10)62411993

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2016/072129

第III栏　缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

[1] 发明1：权利要求1-10（完整）、23（完整）、27-29（部分），涉及通式(PC-L-Dr)所示的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物以及其制备方法、药物组合物和制药用途；

[2] 发明2：权利要求11-15（完整）、27-29（部分），涉及通式(Dr)所示的化合物、其药物组合物和制药用途；

[3] 发明3：权利要求16-18（完整）、27-29（部分），涉及通式(L_1-Dr)所示的化合物、其药物组合物和制药用途；

[4] 发明4：权利要求19（完整）、27-29（部分），涉及制备如权利要求10所述的配体药物偶联物的中间体化合物、其药物组合物和制药用途；

[5] 发明5：权利要求20-22（完整），涉及通式(PC-L_2)所示的化合物及其制备方法；和

[6] 发明6：权利要求24-26（完整），涉及通式(D-Aa)所示的化合物。

[7] 发明2-6的化合物为不同的中间体，其分别涉及发明1化合物（最终产品）的不同构成部分，这些中间体之间不存在单一性。此外，就发明1的化合物而言，其通式的基本结构（母核）已经被现有技术公开（例如，CN104254342A，公开日2014年12月31日，参见权利要求1、7和9-12）。因此，发明1与涉及其中间体化合物的发明2-6之间不具有相同或相应的体现发明对现有技术作出贡献的特定技术特征，不属于一个总的发明构思，因而不满足发明单一性的要求，不符合PCT实施细则 13.1的规定。

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。

3. ☑ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求： 权利要求1-15（完整）、23（完整）、27-29（部分）

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

对异议的意见

☑ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。

☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2016/072129

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	104254342	A	2014年 12月 31日	AU	2012351685	A1	2014年 7月 3日
				HK	1200714	A1	2015年 8月 14日
				CA	2859255	A1	2013年 6月 20日
				KR	20140114826	A	2014年 9月 29日
				IL	233050	D0	2014年 7月 31日
				JP	2015505850	A	2015年 2月 26日
				RU	2014128467	A	2016年 2月 10日
				EP	2790731	A2	2014年 10月 22日
				AR	089252	A1	2014年 8月 6日
				MX	2014007121	A	2014年 9月 4日
				WO	2013087716	A3	2013年 8月 22日
				US	2015023989	A1	2015年 1月 22日
				WO	2013087716	A2	2013年 6月 20日
				SG	11201403085P	A	2014年 10月 30日
CN	103826661	A	2014年 5月 28日	WO	2012143495	A2	2012年 10月 26日
				CA	2833477	A1	2012年 10月 26日
				KR	20140122167	A	2014年 10月 17日
				WO	2012143495	A3	2012年 12月 13日
				WO	2012143496	A2	2012年 10月 26日
				MX	2013012253	A	2014年 2月 17日
				RU	2013151600	A	2015年 5月 27日
				KR	20140122649	A	2014年 10月 20日
				US	2013122024	A1	2013年 5月 16日
				WO	2012143497	A2	2012年 10月 26日
				WO	2012143496	A3	2013年 3月 21日
				WO	2012143497	A3	2013年 3月 21日
				CA	2833690	A1	2012年 10月 26日
				JP	2014512375	A	2014年 5月 22日
				WO	2012143499	A2	2012年 10月 26日
				IL	228841	D0	2013年 12月 31日
				AR	086364	A1	2013年 12月 11日
				WO	2012143499	A3	2012年 12月 13日
				AR	086363	A1	2013年 12月 11日
				SG	194567	A1	2013年 12月 30日
				RU	2013151599	A	2015年 5月 27日
				JP	2014515753	A	2014年 7月 3日
				CN	103764170	A	2014年 4月 30日
				AU	2012244673	A1	2013年 11月 28日
				US	2015030618	A1	2015年 1月 29日
				US	2015246136	A1	2015年 9月 3日
				US	8992932	B2	2015年 3月 31日
				US	2013095123	A1	2013年 4月 18日
				AU	2012244675	A1	2013年 11月 28日
				EP	2699268	A2	2014年 2月 26日
				US	2013066055	A1	2013年 3月 14日
				US	2014127240	A1	2014年 5月 8日
CN	104245675	A	2014年 12月 24日	WO	2013149704	A1	2013年 10月 10日
				EP	2834221	A1	2015年 2月 11日
				US	2015031670	A1	2015年 1月 29日
				PH	12014501964	A1	2014年 11月 17日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2016/072129

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
		DE	102012006884	A1	2013年 10月 10日
		CA	2869337	A1	2013年 10月 10日
		SG	11201406059P	A	2014年 11月 27日
		CL	2014002640	A1	2015年 1月 16日
		JP	2015512426	A	2015年 4月 27日
		KR	20150004820	A	2015年 1月 13日
		EA	201401081	A1	2015年 2月 27日
		MX	2014011906	A	2014年 11月 12日
		AR	090602	A1	2014年 11月 26日
		PE	24522014	A1	2015年 1月 28日
		AU	2013243020	A1	2014年 11月 20日