



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101186613 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 17

(21) 申请号 200710194150. 0

(56) 对比文件

(22) 申请日 2004. 05. 20

US 6441163 B1, 2002. 08. 27, 说明书第 1-16 栏.

(30) 优先权数据

60/471, 739 2003. 05. 20 US

审查员 王健

(62) 分案原申请数据

200480013488. 6 2004. 05. 20

(73) 专利权人 伊缪诺金公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 W·C·威迪逊 R·V·J·沙利

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

(51) Int. Cl.

C07D 498/16 (2006. 01)

C07D 491/12 (2006. 01)

A61K 31/536 (2006. 01)

A61K 47/48 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

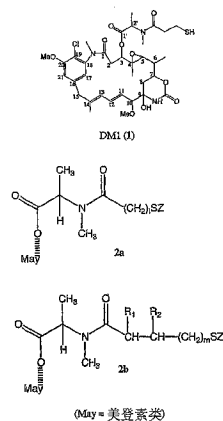
权利要求书6页 说明书49页 附图20页

(54) 发明名称

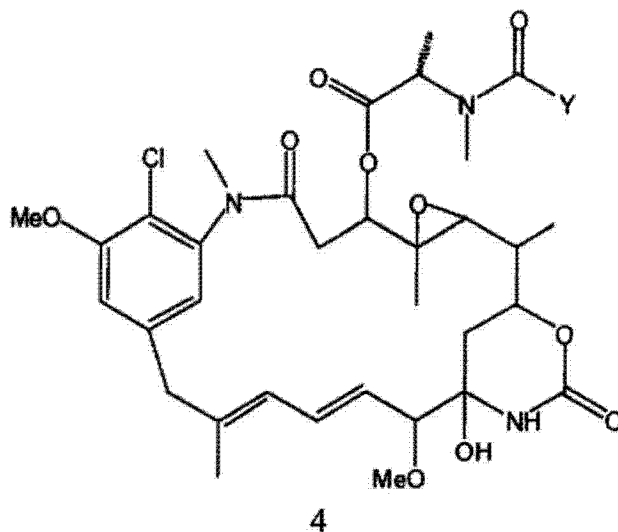
含有新的美登素类的改进的细胞毒剂

(57) 摘要

本发明公开了含硫醇和二硫化物的新的美登素类,其在带有硫原子的 α -碳原子上具有单烷基取代或双烷基取代。也公开了用于合成这些新的美登素类的方法以及用于将这些新的美登素类连接于细胞结合剂的方法。美登素类-细胞结合剂偶联物作为治疗剂是有用的,其被特异性地输送至靶细胞并且是细胞毒性的。与以前描述的药剂相比,这些偶联物在动物肿瘤模型中显示了大大改进的治疗效果。



1. 式 4 所表示的化合物：



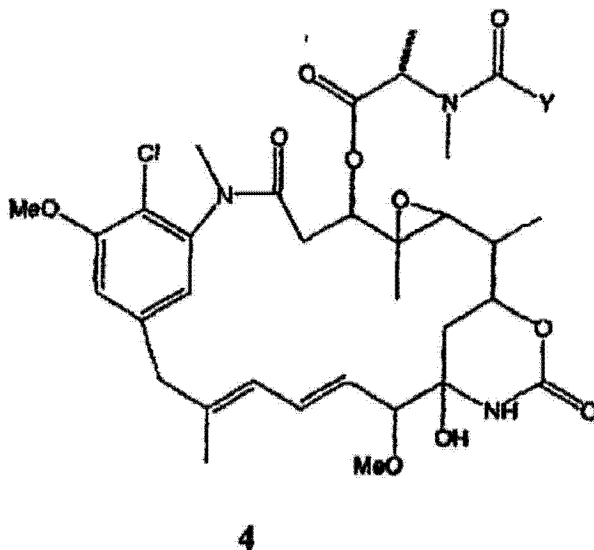
其中：

Y 代表

$(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_mCR_1R_2SZ$, 其中：

- a) R_1 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 是 H； R_2 为甲基， l 是 1， m 是 1，并且 Z 是 H；
- b) R_1 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 是 H； R_2 为甲基， l 是 1， m 是 1，并且 Z 是 SCH_3 ；
- c) R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 是 H； R_1 和 R_2 为甲基， l 是 1， m 是 1，并且 Z 是 H；或
- d) R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 是 H； R_1 和 R_2 为甲基， l 是 1， m 是 1，并且 Z 是 SCH_3 。

2. 由式 4 所表示的化合物：



其中：

Y 代表

$(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$, 其中：

R_1 和 R_2 的每一个独立地是具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基、具有 3 至 10 个碳原子的分支烷基，此外， R_2 可以是 H；

R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个独立地是 H、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、或

具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代有至少一个具有 1-4 个碳原子的烷基、烷氧基、卤素或硝基的取代的苯基、或具有一个或两个选自 N、O 或 S 的杂原子的 3 至 10 元杂环芳基或具有一个或两个选自 N、O 或 S 的杂原子的 3 至 10 元杂环烷基；

1、m 和 n 的每一个独立地是从 1 至 5 的整数，此外 n 可以是 0；和

Z 是 H、SR 或 -COR，其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、或单纯的芳基或用至少一个含有 1-4 个碳原子的烷基、或烷氧基、卤素或硝基取代的芳基、或具有一个或两个选自 N、O 或 S 的杂原子的 3 至 10 元杂环芳基或具有一个或两个选自 N、O 或 S 的杂原子的 3 至 10 元杂环烷基。

3. 权利要求 2 所述的化合物，其中：

R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个独立地是 H、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基、具有 3 至 10 个碳原子的分支烷基；并且，

R 是具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基、具有 3 至 10 个碳原子的分支烷基。

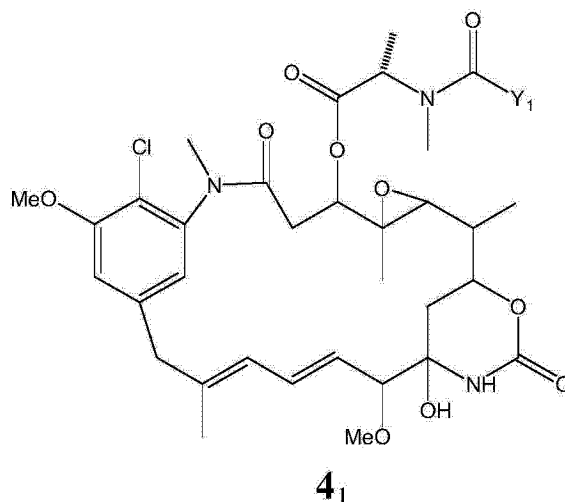
4. 权利要求 2 所述的化合物，其中 R_1 是甲基， R_2 是 H， R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是 H，1 和 m 的每一个是 1，n 是 0，Z 是 H。

5. 权利要求 2 所述的化合物，其中 R_1 和 R_2 是甲基， R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是 H，1 和 m 是 1，n 是 0，Z 是 H。

6. 权利要求 2 所述的化合物，其中 R_1 是甲基， R_2 是 H， R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是 H，1 和 m 的每一个是 1，n 是 0，Z 是 -SCH₃。

7. 权利要求 2 所述的化合物，其中 R_1 和 R_2 是甲基， R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是 H，1 和 m 是 1，n 是 0，Z 是 -SCH₃。

8. 美登素类-细胞结合剂偶联物，其中美登素由式 4₁ 所表示：



其中：

Y_1 表示 $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$ ，其中：

R_1 和 R_2 的每一个独立地是具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基、具有 3 至 10 个碳原子的分支烷基，此外， R_2 可以是 H；

R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个独立地是 H、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代有至少一个具有 1-4 个碳原子的烷基、烷氧基、卤素或硝基的取代的苯基、或具有一个或两个选自 N、O 或 S 的杂原子的

3 至 10 元杂环芳基或具有一个或两个选自 N、O 或 S 的杂原子的 3 至 10 元杂环烷基；

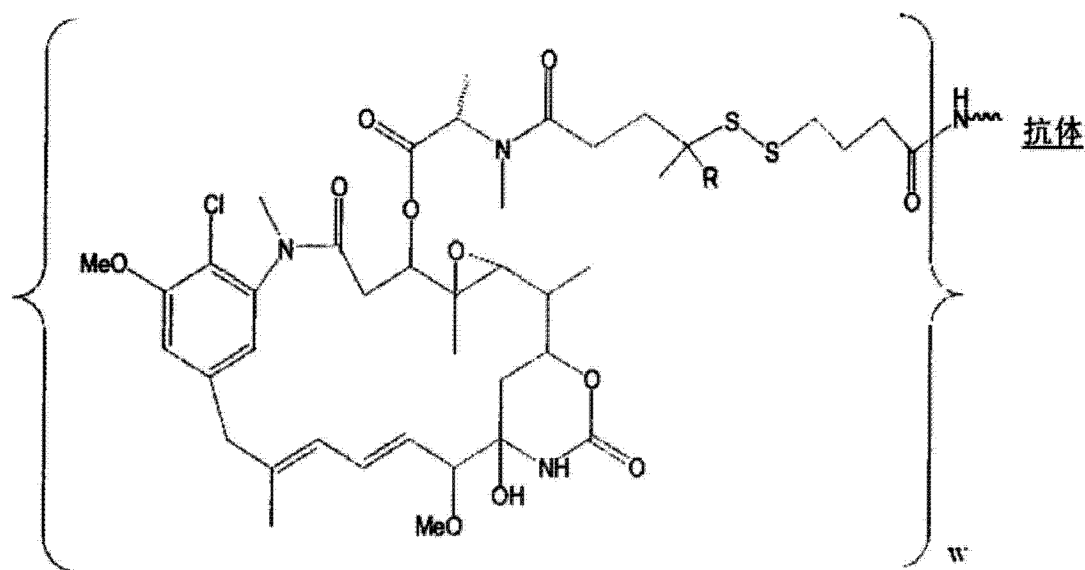
1、m 和 n 的每一个独立地是从 1 至 5 的整数，此外 n 可以是 0。

9. 权利要求 8 所述的美登素类-细胞结合剂偶联物，其中 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个独立地是 H、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基、具有 3 至 10 个碳原子的分支烷基。

10. 权利要求 8 或 9 所述的美登素类-细胞结合剂偶联物，其中所述的细胞结合剂包含至少一个抗体结合位点，并且其中所述抗体是与 CD19 抗原特异结合的鼠抗体 B4 的人源化的或表面重构抗体。

11. 权利要求 8 或 9 所述的美登素类-细胞结合剂偶联物，其中所述的细胞结合剂包含至少一个抗体结合位点，并且其中所述抗体是 MY9、抗-B4 或 C242。

12. 美登素类-细胞结合剂偶联物，其中细胞结合剂是抗体并且所述美登素类-细胞结合剂偶联物由下式表示：



其中 R 是 H 或甲基；所述抗体包括至少一个抗体结合位点；和 w 是 1-10。

13. 权利要求 12 所述的美登素类-细胞结合剂偶联物，其中所述 R 是甲基。

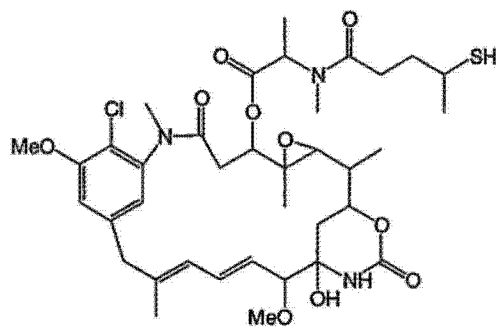
14. 权利要求 12 或 13 所述的美登素类-细胞结合剂偶联物，其中所述抗体是与 CD19 抗原特异结合的鼠抗体 B4 的人源化的或表面重构抗体。

15. 权利要求 12 或 13 所述的美登素类-细胞结合剂偶联物，其中所述抗体包括至少一个 MY9、抗-B4 或 C242 的结合位点。

16. 权利要求 15 所述的美登素类-细胞结合剂偶联物，其中所述抗体是 MY9、抗-B4 或 C242。

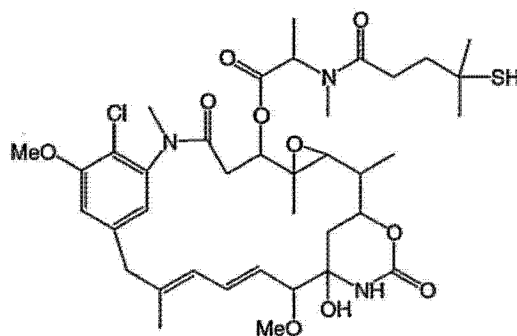
17. 权利要求 15 所述的美登素类-细胞结合剂偶联物，其中所述抗体是特异性结合于 CD33 抗原的人源化的或表面重构的 MY9、特异性结合于 CD19 抗原的人源化的或表面重构的抗-B4 抗体，或特异性结合于 CanAg 抗原的人源化的或表面重构的 C242 抗体。

18. 美登素类-细胞结合剂偶联物，其包括至少一个连接于细胞结合剂的美登素类，其中所述美登素类是



DM3

或



DM4

19. 权利要求 18 所述的美登素类-细胞结合剂偶联物,其中所述美登素类是 DM4。

20. 权利要求 18 或 19 所述的美登素类-细胞结合剂偶联物,其中所述的细胞结合剂包含至少一个抗体结合位点,并且其中所述抗体是与 CD19 抗原特异结合的鼠抗体 B4 的人源化的或表面重构抗体。

21. 权利要求 18 或 19 所述的美登素类-细胞结合剂偶联物,其中所述的细胞结合剂包含至少一个抗体结合位点,并且其中所述抗体是 MY9、抗-B4 或 C242。

22. 药物组合物,其包括有效量的权利要求 8 至 21 中的任一项所述的美登素类-细胞结合剂偶联物、其药学上可接受的盐,以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

23. 根据权利要求 8 至 21 中的任一项所述的偶联物、或其药学上可接受的盐在制造用于治疗肿瘤的药物中的应用。

24. N-甲基-N-(4-甲基-4-甲基二硫代-1-氧代戊基)-S-丙氨酸、N-甲基-N-(4-甲基-4-甲基二硫代-1-氧代戊基)-R-丙氨酸或外消旋的 N-甲基-N-(4-甲基-4-甲基二硫代-1-氧代戊基)-丙氨酸。

25. 制造 N-甲基-N-(4-甲基-4-甲基二硫代-1-氧代戊基)-S-丙氨酸、N-甲基-N-(4-甲基-4-甲基二硫代-1-氧代戊基)-R-丙氨酸或外消旋的 N-甲基-N-(4-甲基-4-甲基二硫代-1-氧代戊基)-丙氨酸的方法,包括:

- (1) 使异丁烯基硫醚 (5) 与乙腈的阴离子反应,得到 4-巯基-4-甲基-戊腈 (6);
- (2) 水解 4-巯基-4-甲基-戊腈 (6),得到 4-巯基-4-甲基戊酸 (7);
- (3) 通过与甲基甲硫醇磺酸酯反应,将 4-巯基-4-甲基戊酸 (7) 转变为 4-甲基-4-(甲基二硫代)戊酸 (8);
- (4) 将 4-甲基-4-(甲基二硫代)戊酸 (8) 转变为 4-甲基(甲基二硫代)戊酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯 (9);和
- (5) 使 4-甲基(甲基二硫代)戊酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯 (9) 与 N-甲基-L-丙氨酸、

N-甲基-D-丙氨酸或外消旋的N-甲基丙氨酸反应,得到所述的N-甲基-N-(4-甲基-4-甲基二硫代-1-氧代戊基)-S-丙氨酸、N-甲基-N-(4-甲基-4-甲基二硫代-1-氧代戊基)-R-丙氨酸或外消旋的N-甲基-N-(4-甲基-4-甲基二硫代-1-氧代戊基)-丙氨酸。

26. N-甲基-N-[4-(S)-甲基二硫代-1-氧代戊基]-S-丙氨酸和N-甲基-N-[4-(R)-甲基二硫代-1-氧代戊基]-S-丙氨酸的混合物。

27. 制造N-甲基-N-[4-(S)-甲基二硫代-1-氧代戊基]-S-丙氨酸和N-甲基-N-[4-(R)-甲基二硫代-1-氧代戊基]-S-丙氨酸的混合物的方法,包括:

(1) 使4-巯基戊酸(12)和甲基甲硫醇磺酸酯反应,得到4-甲基二硫代-戊酸(13);

(2) 将4-甲基二硫代-戊酸(13)转变为4-甲基二硫代-戊酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(14);和

(3) 使4-甲基二硫代-戊酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(14)与N-甲基-L-丙氨酸反应,得到所述的N-甲基-N-[4-(S)-甲基二硫代-1-氧代戊基]-S-丙氨酸和N-甲基-N-[4-(R)-甲基二硫代-1-氧代戊基]-S-丙氨酸的混合物。

28. N-甲基-N-[4-(R)-甲基二硫代-1-氧代戊基]-R-丙氨酸和N-甲基-N-[4-(S)-甲基二硫代-1-氧代戊基]-R-丙氨酸的混合物。

29. 制造N-甲基-N-[4-(R)-甲基二硫代-1-氧代戊基]-R-丙氨酸和N-甲基-N-[4-(S)-甲基二硫代-1-氧代戊基]-R-丙氨酸的混合物的方法,包括:

(1) 使4-巯基戊酸(12)和甲基甲硫醇磺酸酯反应,得到4-甲基二硫代-戊酸(13);

(2) 将4-甲基二硫代-戊酸(13)转变为4-甲基二硫代-戊酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(14);和

(3) 使4-甲基二硫代-戊酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(14)与N-甲基-D-丙氨酸反应,得到所述的N-甲基-N-[4-(R)-甲基二硫代-1-氧代戊基]-R-丙氨酸和N-甲基-N-[4-(S)-甲基二硫代-1-氧代戊基]-R-丙氨酸的混合物。

30. N-甲基-N-[4-甲基二硫代-1-氧代戊基]-丙氨酸、N-甲基-N-[4-(R)-甲基二硫代-1-氧代戊基]-丙氨酸或N-甲基-N-[4-(S)-甲基二硫代-1-氧代戊基]-丙氨酸。

31. 制造N-甲基-N-[4-甲基二硫代-1-氧代戊基]-丙氨酸、N-甲基-N-[4-(R)-甲基二硫代-1-氧代戊基]-丙氨酸或N-甲基-N-[4-(S)-甲基二硫代-1-氧代戊基]-丙氨酸的方法,该方法包括:

(1) 使4-巯基戊酸(12)和甲基甲硫醇磺酸酯反应,得到4-甲基二硫代-戊酸(13);

(2) 将4-甲基二硫代-戊酸(13)转变为4-甲基二硫代-戊酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(14);

(3) 使4-甲基二硫代-戊酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(14)与外消旋的N-甲基丙氨酸反应,得到所述的N-甲基-N-[4-甲基二硫代-1-氧代戊基]-丙氨酸。

32. N-甲基-N-[4-(S)-甲基二硫代-1-氧代戊基]-S-丙氨酸。

33. 制造N-甲基-N-[4-(S)-甲基二硫代-1-氧代戊基]-S-丙氨酸(15a)的方法,包括:

(1) 将(R)-1,3-丁二醇转变为(S)-4-(甲基二硫代)戊酸(19);

(2) 将(S)-4-(甲基二硫代)戊酸(19)转变为其(S)-4-(甲基二硫代)戊酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(20);和

(3) 使 (S)-4-(甲基二硫代) 戊酸 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 (20) 与 N- 甲基 -L- 丙氨酸反应, 得到所述的 N- 甲基 -N-[4-(S)- 甲基二硫代 -1- 氧代戊基]-S- 丙氨酸。

34. N- 甲基 -N-[4-(R)- 甲基二硫代 -1- 氧代戊基]-S- 丙氨酸。

35. 制造 N- 甲基 -N-[4-(R)- 甲基二硫代 -1- 氧代戊基]-S- 丙氨酸 (15b) 的方法, 包括:

(1) 将 (S)-1, 3- 丁二醇转变为 (R)-4-(甲基二硫代) 戊酸 (24);

(2) 将 (R)-4-(甲基二硫代) 戊酸 (24) 转变为其 (R)-4-(甲基二硫代) 戊酸羟基琥珀酰亚胺酯 (25); 和

(3) 使 (R)-4-(甲基二硫代) 戊酸羟基琥珀酰亚胺酯 (25) 与 N- 甲基 -L- 丙氨酸反应, 得到所述的 N- 甲基 -N-[4-(R)- 甲基二硫代 -1- 氧代戊基]-S- 丙氨酸。

36. 药物组合物, 其包括有效量的权利要求 1-7 和 24 中的任一项所述的化合物、其药学上可接受的盐, 以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

37. 权利要求 36 所述的药物组合物, 进一步包括抗体。

38. 根据权利要求 8 至 21 中的任一项所述的偶联物、或其药学上可接受的盐在制造用于在所选择的细胞群中诱导细胞死亡的药物中的应用。

39. 权利要求 38 所述的应用, 其中所述药物是用于治疗恶性肿瘤。

40. 权利要求 39 所述的应用, 其中所述恶性肿瘤是选自乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、结肠癌、肾癌、胰腺癌以及淋巴器官癌。

41. 权利要求 40 所述的应用, 其中所述淋巴器官癌是非霍奇金淋巴瘤或慢性成淋巴细胞白血病。

42. 权利要求 40 所述的应用, 其中所述淋巴器官癌是非霍奇金淋巴瘤。

含有新的美登素类的改进的细胞毒剂

[0001] 本申请要求 2003 年 5 月 20 日提交的临时申请 60/471,739 号的权益,其公开内容通过引用方式在此并入。

技术领域

[0002] 本发明涉及制备含有美登素类 (maytansinoids) 和细胞结合剂 (cell-binding agents) 的改良的细胞毒性偶联物 (conjugates) 的方法。这些偶联物在以靶向方式被传送至特定的细胞群时,具有治疗作用。本发明也涉及制备具有硫醇部分 (thiol moiety) 的美登素类的方法,其可以被用于制备细胞毒性偶联物。本发明进一步涉及新的美登素类,以及新的美登素类的合成中的新的中间产物。

背景技术

[0003] 有许多报道试图于用单克隆抗体-药物偶联物特异性地靶向于肿瘤细胞 (Sela et al., Immunoconjugates 189-216 (C. Vogel, ed. 1987); Ghose et al., Targeted Drugs 1-22 (E. Goldberg, ed. 1983); Diener et al., Antibody Mediated Delivery Systems 1-23 (J. Rodwell, ed. 1988); Pietersz et al., Antibody Mediated Delivery Systems 25-53 (J. Rodwell, ed. 1988); Bumol et al., Antibody Mediated Delivery Systems 55-79 (J. Rodwell, ed. 1988))。细胞毒性药物诸如甲氨蝶呤、柔红霉素、阿霉素、长春新碱、长春花碱、美法仑、丝裂霉素 C 和苯丁酸氮芥已被连接于各种鼠科单克隆抗体。在一些情形下,药物分子通过中间载体分子被连接于抗体分子,所述的中间载体分子如血清白蛋白 (Garnett et al. Cancer Res. 46 : 2407-2412 (1986); Ohkawa et al. Cancer Immunol. Immunother. 23 : 81-86 (1986); Endo et al. Cancer Res. 47 : 1076-1080 (1980))、右旋糖苷 (Hurwitz et al. Appl. Biochem. 2 : 25-35 (1980); Manabi et al. Biochem. Pharmacol. 34 : 289-291 (1985); Dillman et al. Cancer Res. 46 : 4886-4891 (1986); Shoval et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 85 : 8276-8280 (1988)), 或聚谷氨酸 (Tsukada et al. J. Natl. Canc. Inst. 73 : 721-729 (1984); Kato et al. J. Med. Chem. 27 : 1602-1607 (1984); Tsukada et al. Br. J. Cancer 52 : 111-116 (1985))。

[0004] 各种接头 (linker) 技术已被用于制备这样的免疫偶联物,并研究了可切割的接头和不可切割的接头。然而,在大多数情况下,仅在药物分子可以在靶位点以未被修饰的方式从偶联物上被释放时,才观察到药物的完整的细胞毒性潜能。

[0005] 已被用于制备抗体-药物偶联物的可切割接头中的一种是,基于顺乌头酸的酸不稳定性接头,其利用了不同的细胞内区室的酸性环境,例如在受体介导的胞吞作用期间遇到的内体和溶酶体。Shen 和 Ryser 将此方法引入以制备柔红霉素和大分子载体的偶联物 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 102 : 1048-1054 (1981))。Yang 和 Reisfeld 用同样的技术将柔红霉素连接于抗黑素瘤抗体 (J. Natl. Canc. Inst. 80 : 1154-1159 (1988))。最近, Dillman 等人也以相似的方式应用酸不稳定性接头来制备柔红霉素和抗 T 细胞抗体的偶联物 (Cancer Res. 48 : 6097-6102 (1988))。

[0006] 由 Trouet 等人开发的一种替代方法,涉及通过肽间隔臂 (peptide spacer arm) 将柔红霉素连接于抗体 (Proc. Natl. Acad. Sci. 79 :626-629(1982))。这是在游离药物可以经溶酶体肽酶的作用从这样的偶联物上被释放出来的前提下进行的。

[0007] 然而,体外细胞毒性实验揭示了,抗体-药物偶联物极少达到与游离的非连接药物相同的细胞毒性能力。这提示了,药物分子从抗体被释放的机制是非常低效率的。在免疫毒剂的领域中,已显示,通过单克隆抗体和有催化活性的蛋白毒素之间的二硫键形成的偶联物,比含其它接头的偶联物更具细胞毒性。参见, Lambert et al. J. Biol. Chem. 260 :12035-12041(1985); Lambert et al. Immunotoxins 175-209 (A. Frankel, ed. 1988); Ghetie et al. Cancer Res. 48 :2610-2617(1988)。这被归因于细胞内的高谷胱甘肽浓度,其可以有效切割抗体分子和毒素之间的二硫键。尽管如此,仅有少数的被报道的例子,是有关于将二硫键桥应用于制备药物和大分子之间的偶联物。Shen 等人描述了通过二硫键与聚-D-赖氨酸连接之后,甲氨蝶呤转化为巯基乙酰胺衍生物 (J. Biol. Chem. 260 :10905-10908(1985))。此外,一些报道描述了制备含三硫的毒性药物加里刹霉素 (calicheamicin) 与抗体的偶联物 (Hinman et al, 53Cancer Res. 3336-3342(1993), Hamann et al., Bioconjugate Chem., 13, 40-46(2002), Hamann et al., Bioconjugate Chem., 13, 47-58(2002))。

[0008] 造成二硫键连接的抗体-药物偶联物的缺乏的一个原因是,具有含硫原子的部分的细胞毒性药物并不总是可以获得的,而所述含硫原子部分是被需要以用来方便地将该药物经二硫键连接于抗体的。而且,对现存药物进行化学修饰而不减少它们的细胞毒性潜能,是困难的。

[0009] 美登素类是高度细胞毒性的药物。美登素 (maytansine) 首先由 Kupchan 等人从东非灌木 *Maytenus serrata* 中分离出来,它比传统的癌症化疗剂如甲氨蝶呤、柔红霉素和长春新碱的细胞毒性强 100 至 1000 倍 (美国专利 3,896,111 号)。随后,发现一些微生物也产生美登素类,如美登醇 (maytansinol) 和美登醇的 C-3 酯 (美国专利 4,151,042 号)。也报道了合成的美登醇 C-3 酯及美登醇的类似物 (Kupchan et al. J. Med. Chem. 21 : 31-37(1978); Higashide et al. Nature 270 :721-722(1977); Kawai et al. Chem. Pharm. Bull. 32 :3441-3451(1984))。C-3 酯由美登醇制备得来,这样的美登醇类似物的例子包括,在芳环上有修饰的美登醇 (例如,脱氯) 或在 C-9、C-14 有修饰的美登醇 (例如,羟化的甲基)、在 C-15、C-18、C-20 和 C-4,5 处带有修饰的美登醇。

[0010] 天然发生的美登醇 C-3 酯和合成的美登醇 C-3 酯可以被分为两组:

[0011] (a) 带有简单羧酸的 C-3 酯 (美国专利 4,248,870 ;4,265,814 ;4,308,268 ;4,308,269 ;4,309,428 ;4,317,821 ;4,322,348 和 4,331,598 号、) 和

[0012] (b) 带有 N-甲基-L-丙氨酸的衍生物的 C-3 酯 (美国专利 4,137,230 ;4,260,608 ;5,208,020 号和 Chem. Pharm. Bull. 12 :3441(1984))。

[0013] 发现组 (b) 的酯比组 (a) 的酯更有细胞毒性。

[0014] 美登素是有丝分裂抑制剂。已报道,用美登素在体处理 L1210 细胞,导致细胞的 67% 积累在有丝分裂期。据报道,未被处理的对照细胞显示了范围在 3.2% 至 5.8% 之间的有丝分裂指数 (Sieber et al. 43Comparative Leukemia Research 1975, Bibl. Haemat. 495-500(1976))。用海胆卵和蛤卵进行的实验提示,美登素通过抑制微管蛋白质

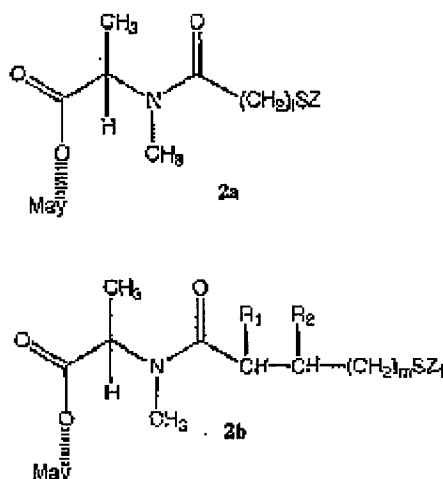
(microtubule)——微管蛋白 (tubulin) 的多聚化而干扰微管的形成,从而抑制有丝分裂 (Remillard et al. Science 189 :1002-1005 (1975))。

[0015] 在体外,已发现 P388、L1210 和 LY5178 鼠白血病细胞悬液被美登素抑制,美登素的剂量是 10^{-3} 至 $10^{-1} \mu\text{g}/\mu\text{l}$, 其中 P388 细胞系最为敏感。也已显示,美登素是人鼻咽癌细胞的体外生长的活性抑制剂,并且据报道,人急性成淋巴细胞性白血病系 CEM 被低至 $10^{-7} \mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度所抑制 (Wolpert-DeFillippes et al. Biochem. Pharmacol. 24 : 1735-1738 (1975))。

[0016] 在体内,也已显示,美登素是活性的。在 50 倍至 100 倍的剂量范围内, P388 淋巴细胞白血病系统中的肿瘤生长被抑制,这表明了高的治疗指数;对于 L1210 鼠白血病系统、人 Lewis 肺癌系统和人 B-16 黑素癌系统,也可以显示出显著的抑制活性 (Kupchan, Ped. Proc. 33 :2288-2295 (1974))。在美国专利 5,208,020 和 5,416,064 以及 Chari et al., Cancer Res., 52 :127-131 (1992) 和 Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 93 : 8618-8623 (1996) 中描述了,用来与细胞结合剂进行结合的美登素类。在这些偶联物中,细胞结合剂是通过二硫键被连接于美登素类 DM1 [$\text{N}^{2'}$ -脱乙酰- $\text{N}^{2'}$ -(3-巯基-1-氧丙基)-美登素, 1, CAS 号 :139504-50-0, 图 1]。

[0017] 在上述的专利中,具有酰化的 N-甲基-L-丙氨酸侧链的美登素类药物具有式 2a, b :

[0018]



[0019] 在式 2a 中, 1 代表从 1 至 10 的整数。因此, 式 2a 的美登素类具有连接于未取代的亚甲基的硫原子 ($-\text{CH}_2-\text{S}-$)。据称, 这种美登素类化合物中的巯基或者带有这样的美登素类的通过二硫键连接的细胞结合剂-美登素类偶联物中的二硫基团, 是“非位阻的 (non-hindered)”, 原因是, 在相邻于巯基或二硫基团的 α -碳上没有引起位阻现象的大体积的取代基。在式 2b 中, m 代表 0、1、2 或 3。因此, 式 2b 的美登素类也有连接于未取代的亚甲基基团的硫原子, m=0 并且 $\text{R}_2=\text{CH}_3$ 或 CH_2CH_3 的情况除外。如果 m=0, 那么美登素类在通过二硫键与细胞结合剂连接后, 在带有硫醇功能基 (thiol functionality) 或二硫功能基 (disulfide functionality) 的碳上具有一个取代基。然而, 由于在此情形下, 硫原子相对于羰基是处于 β 位, 发现这些美登素类以及这些美登素类与细胞结合剂经二硫键形成的偶联物是不稳定的, 这归因于它们有遭受 β -消除的倾向。

[0020] 发明概述

[0021] 本发明是基于下面的出乎意料的发现：带有空间上有位阻的硫醇基团的美登素类（在带有硫醇功能基的 α -碳上具有一个或两个取代基）与细胞结合剂的连接，获得了具有大大改进的体内抗肿瘤活性的偶联物，这是与用以前描述的美登素类制备的偶联物相比而言的，以前描述的美登素类在带有二硫键的 α -碳原子上不具有取代基。另一个出乎意料的发现是，要得到改善的生物学活性，空间位阻最佳地是发生在偶联物中的二硫键的美登素类一侧上。此外，带有巯基的美登素类的酰化的氨基酸侧链中的酰基，在酰胺的羰基和硫原子之间，必须具有至少 3 个碳原子的线性链长度。

[0022] 这些发现表明，可以构建二硫化物连接的 (disulfide-linked) 细胞结合剂-美登素类偶联物，这样，带有二硫键的两个 α -碳原子上的取代可以导致二硫键任一侧上的不同程度的空间位阻。

[0023] 因此，本发明描述了合成新的含空间位阻的硫醇和二硫化物的美登素类，其在带有硫原子的 α -碳上具有一个或两个烷基取代基。此外，酰化的氨基酸侧链的酰基，在酰胺的羰基和硫原子之间，具有至少 3 个碳原子的线性链长度。

[0024] 也描述了这些新的美登素类的细胞结合剂偶联物的制备和生物学评价。

[0025] 在本发明的一种实施方案中，描述了新的含硫醇和二硫化物的美登素类，其在带有硫原子的碳原子上具有单烷基取代或双烷基取代。

[0026] 在第二种实施方案中，本发明公开了用于合成这些新的美登素类的方法。

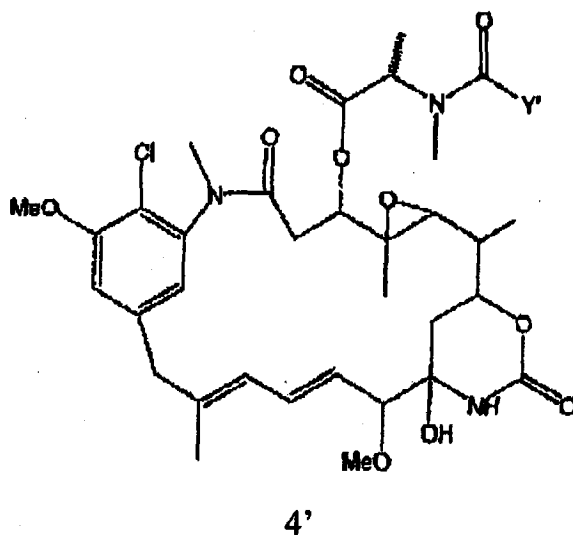
[0027] 在第三种实施方案中，描述了用于将这些新的美登素类与细胞结合剂相连接的方法。这些偶联物作为治疗剂是有用的，其被特异性地传送至靶细胞，并且是细胞毒性的。与以前描述的制剂相比，这些偶联物在动物肿瘤模型中显示出大大改进的治疗效应。

[0028] 更具体地，本发明提供了：

[0029] 美登素类，其在 C-3、C-14 羟甲基、C-15 羟基或 C-20 去甲基 (desmethyl) 处，具有酰化的氨基酸侧链，该侧链带有酰基，该酰基具有位阻的巯基，其中带有硫醇功能的酰基碳原子具有一个或两个取代基，所述取代基是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性或分支的烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的环烷基或环烯基、苯基、取代的苯基、或者杂环芳基或杂环基团，此外，取代基之一可以是 H，并且其中酰基在羰基功能基 (carbonyl functionality) 和硫原子之间，具有至少 3 个碳原子的线性链长度；

[0030] 表示为式 4' 的化合物：

[0031]



[0032] 其中：

[0033] Y' 代表

[0034] $(\text{CR}_7\text{CR}_8)_1(\text{CR}_9=\text{CR}_{10})_p(\text{C}\equiv\text{C})_q\text{A}_r(\text{CR}_5\text{CR}_6)_m\text{D}_u(\text{CR}_{11}=\text{CR}_{12})_r(\text{C}\equiv\text{C})_s\text{B}_t(\text{CR}_3\text{R}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}$,

[0035] 其中：

[0036] R_1 和 R_2 的每一个独立地是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或线性烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基团，此外， R_2 可以是 H；

[0037] A、B、D 是具有 3-10 个碳原子的环烷基或环烯基，单纯的芳基或取代的芳基或杂环芳基或杂环基团；

[0038] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{11} 和 R_{12} 的每一个独立地是 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基团；

[0039] l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 和 t 的每一个独立地是 0 或 1 至 5 的整数，只要 l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 和 t 中的至少 2 个不同时为 0。

[0040] Z 是 H、SR 或 $-\text{COR}$ ，其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、或单纯的芳基或取代的芳基或杂环芳基或杂环基团。

[0041] 表示为式 4' 的化合物，其中 R_1 是甲基， R_2 是 H 和 Z 是 H。

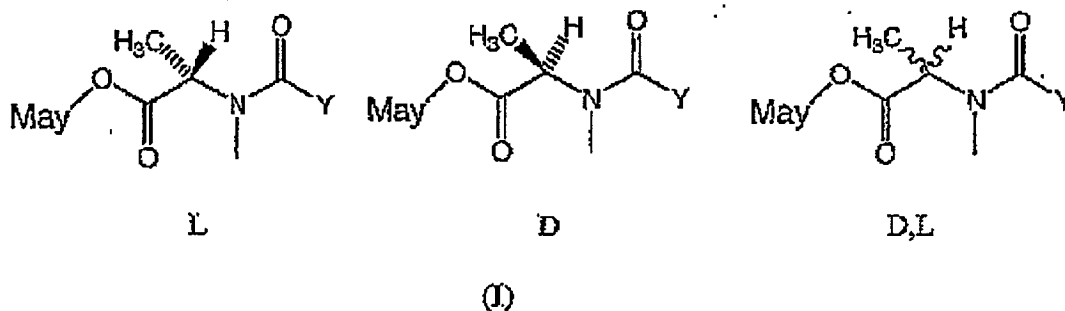
[0042] 表示为式 4' 的化合物，其中 R_1 和 R_2 是甲基和 Z 是 H。

[0043] 表示为式 4' 的化合物，其中 R_1 是甲基， R_2 是 H，Z 是 $-\text{SCH}_3$ 。

[0044] 表示为式 4' 的化合物，其中 R_1 和 R_2 是甲基，Z 是 $-\text{SCH}_3$ 。

[0045] 表示为式 (I-L)、(I-D) 或 (I-D, L) 的化合物：

[0046]



[0047] 其中：

[0048] Y 代表 $(\text{CR}_7\text{CR}_8)_1(\text{CR}_5\text{CR}_6)_m(\text{CR}_3\text{CR}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}$, 其中：

[0049] R_1 和 R_2 的每一个独立地是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基、或杂环芳基或杂环基团, 并且此外, R_2 可以是 H；

[0050] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个独立地是 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基、或杂环芳基或杂环基团；

[0051] 1、m 和 n 的每一个独立地是从 1 至 5 的整数, 并且此外 n 可以是 0；

[0052] Z 是 H、SR 或 $-\text{COR}$, 其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的线性或分支的烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的环烷基或环烯基、或单纯的芳基或取代的芳基或杂环芳基或杂环基团；和

[0053] May 代表在 C-3、C-14 羟甲基、C-15 羟基或 C-20 去甲基处带有侧链的美登素类；

[0054] 上述的化合物, 其中 R_1 是甲基, R_2 是 H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是 H, 1 和 m 的每一个是 1, n 是 0, Z 是 H；

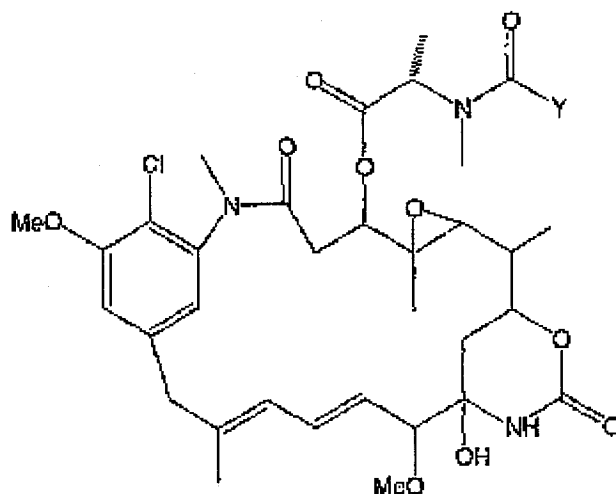
[0055] 上述的化合物, 其中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是 H, 1 和 m 是 1, n 是 0, Z 是 H；

[0056] 上述的化合物, 其中 R_1 是甲基, R_2 是 H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是 H, 1 和 m 的每一个是 1, n 是 0, Z 是 $-\text{SCH}_3$ ；

[0057] 上述的化合物, 其中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是 H, 1 和 m 是 1, n 是 0, Z 是 $-\text{SCH}_3$ ；

[0058] 表示为式 4 的化合物；

[0059]



4

[0060] 其中：

[0061] Y 代表 $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$ ，其中：

[0062] R_1 和 R_2 的每一个独立地是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基团，并且此外， R_2 可以是 H；

[0063] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个独立地是 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基，或杂环芳基或杂环基团；

[0064] 1、m 和 n 的每一个独立地是从 1 至 5 的整数，并且此外 n 可以是 0；和

[0065] Z 是 H、SR 或 $-COR$ ，其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、或单纯的芳基或取代的芳基或杂环芳基或杂环基团；

[0066] 式 4 的化合物，其中 R_1 是甲基， R_2 是 H， R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是 H；1 和 m 的每一个是 1；n 是 0；Z 是 H；

[0067] 式 4 的化合物，其中 R_1 和 R_2 是甲基； R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是 H；1 和 m 是 1；n 是 0；Z 是 H；

[0068] 式 4 的化合物，其中 R_1 是甲基， R_2 是 H， R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是 H，1 和 m 的每一个是 1，n 是 0，Z 是 $-SCH_3$ ；

[0069] 式 4 的化合物，其中 R_1 和 R_2 是甲基， R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是 H，1 和 m 是 1，n 是 0，Z 是 $-SCH_3$ ；

[0070] 美登素类-细胞结合剂偶联物，包括至少一种连接于细胞结合剂的美登素类，其中所述美登素类是上述化合物中的任意一种；

[0071] 上述的美登素类-细胞结合剂偶联物中的任意一种，其中所述的细胞结合剂包含至少一个抗体结合位点，其优选地是人源化的 (humanized) MY9 或表面重构的 (resurfaced) MY9、人源化的抗-B4 或表面重构的抗-B4，或人源化的 C242 或表面重构的 C242；

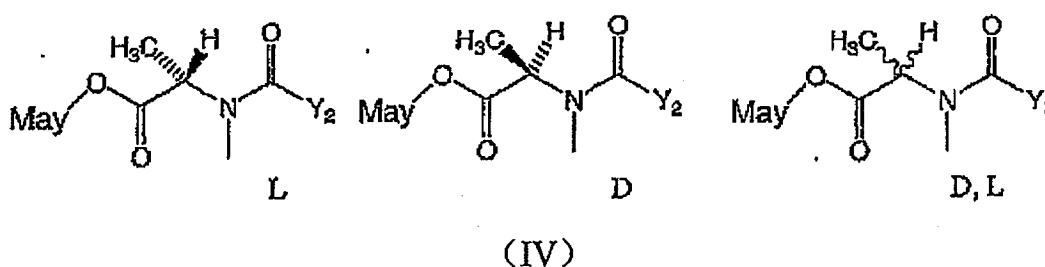
[0072] 药物组合物，包含有效量的任何上述的美登素类-细胞结合剂偶联物、其药学上

可接受的盐或溶剂化物 (solvate), 以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂;

[0073] 在 C-3、C-14 羟甲基、C-15 羟基或 C-20 去甲基处酯化美登素类的方法, 得到的美登素类带有酰化的氨基酸侧链, 在该处的酰基具有 被保护的巯基功能基, 其中带有被保护的硫醇功能基的酰基碳原子有一个或两个取代基, 所述取代基是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基团, 并且此外所述的取代基之一可以是 H, 并且其中该酰基在羰基功能基和硫原子之间有至少 3 个碳原子的线性链长度, 所述方法包括使美登素类在 C-3、C-14 羟甲基、C-15 羟基或 C-20 去甲基处与酰化的氨基酸发生反应, 所述酰化的氨基酸中的酰基带有被保护的巯基;

[0074] 酯化美登素类以生成美登素类酯 (maytansinoid ester) 的方法, 所述美登素类酯可以表示为式 (IV-L)、(IV-D) 或 (IV-D, L):

[0075]



[0076] 其中:

[0077] Y_2 代表 $(\text{CR}_7\text{CR}_8)_1(\text{CR}_5\text{CR}_6)_m(\text{CR}_3\text{CR}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}_2$, 其中:

[0078] R_1 和 R_2 的每一个独立地是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基团, 并且此外, R_2 可以是 H;

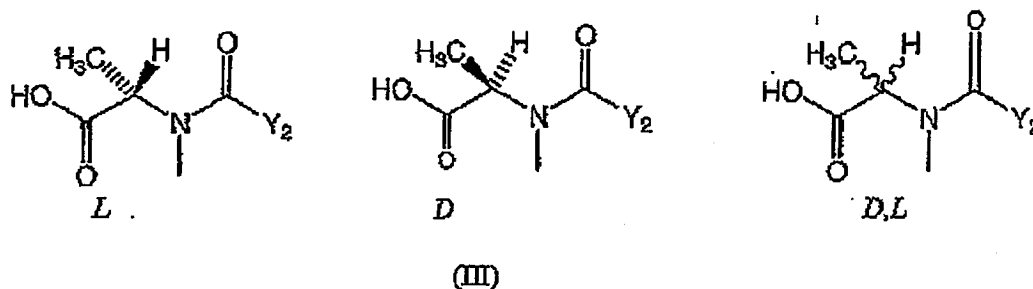
[0079] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个独立地是 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性环状烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基团;

[0080] 1、m 和 n 的每一个独立地是从 1 至 5 的整数, 并且此外 n 可以是 0;

[0081] Z_2 是 SR 或 $-\text{COR}$, 其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、或单纯的芳基或取代的芳基或杂环芳基或杂环基团; 和

[0082] May 是美登素类; 所述方法包括使所述 May 在 C-3、C-14 羟甲基、C-15 羟基或 C-20 去甲基处, 与式 (III-L)、(III-D) 或 (III-D, L) 的化合物反应;

[0083]



[0084] 其中：

[0085] Y_2 代表 $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$ ，其中：

[0086] R_1 和 R_2 的每一个独立地是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基团，并且此外， R_2 可以是 H；

[0087] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个独立地是 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性或分支的烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的环烷基或环烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基团；

[0088] 1、m 和 n 的每一个独立地是 1 至 5 的整数，此外 n 可以是 0；和

[0089] Z_2 是 SR 或 $-COR$ ，其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、或单纯的芳基或取代的芳基或杂环芳香基团或杂环基团；

[0090] 上述方法，其中 R_1 是甲基， R_2 是 H， R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是 H；1 和 m 的每一个是 1；n 是 0；

[0091] 上述方法，其中式 (III) 化合物是如 (III-L) 所表示；

[0092] 上述方法，其中式 (III-L) 化合物是化合物 15a(S, S)、15b(S, R) 或 15a(S, S) 和 15b(S, R) 的混合物；

[0093] 上述方法，其中式 (III-D) 化合物是化合物 15(R, S)、15(R, R) 或 15(R, S) 和 15(R, R) 的混合物；

[0094] 上述方法，其中式 (III-D, L) 化合物是用带有被保护的硫醇功能基的羧基基团酰化的外消旋 N-甲基丙氨酸，其中带有硫原子的碳中心或是外消旋的或是 R 手性或 S 手性的，从而得到结构 15 的化合物；

[0095] 上述的方法，其中 15a(S, S) 和 15b(S, R) 的混合物是经下列过程制成的，包括：

[0096] (1) 使 4-巯基戊酸 (12) 和甲基甲硫醇磺酸酯反应，得到化合物 13；

[0097] (2) 将化合物 13 转变为其 N-羟基琥珀酰亚胺酯 14；

[0098] (3) 使化合物 14 与 N-甲基-L-丙氨酸反应，得到所述的化合物 15a(S, S) 和 15b(S, R) 的混合物；

[0099] 上述的方法，其中化合物 15a(S, S) 是由下列方法制成的，包括：

[0100] (1) 转变 (R)-1,3-丁二醇为 (S)-4-(甲基二硫代)戊酸 19；

[0101] (2) 转变化合物 19 为其 N-羟基琥珀酰亚胺酯 (20)；和

[0102] (3) 使化合物 20 与 N-甲基-L-丙氨酸反应，得到所述的化合物 15a(S, S)。

[0103] 上述的方法，其中化合物 15b(S, R) 是由下列方法制成的，包括：

[0104] (1) 转变 (S)-1,3-丁二醇为 (R)-4-(甲基二硫代)戊酸；

[0105] (2) 转变化合物 24 为其 N-羟基琥珀酰亚胺酯 (25)；和

[0106] (3) 使化合物 25 与 N-甲基-L-丙氨酸反应，得到所述的化合物 15b(S, R)。

[0107] 上述的方法，其中 15(R, S) 和 15(R, R) 的混合物是经下列过程制成的，包括：

[0108] (1) 使 4-巯基戊酸 (12) 和甲基甲硫醇磺酸酯反应，得到化合物 13；

[0109] (2) 将化合物 13 转变为其 N-羟基琥珀酰亚胺酯 14；

[0110] (3) 使化合物 14 与 N-甲基-D-丙氨酸反应，得到所述的化合物 15(R, S) 和 15(R,

R) 的混合物。

[0111] 上述的方法,其中用带有被保护的硫醇功能基的羧基基团酰化外消旋的 N- 甲基丙氨酸,其中带有硫原子的碳中心或是外消旋的或是 R 或 S 手性的,从而得到结构 15 的化合物,其是经下列过程制成的,包括:

[0112] (1) 使 4- 巯基戊酸 (12) 和甲基甲硫醇磺酸酯反应,得到化合物 13;

[0113] (2) 将化合物 13 转变为其 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 14;

[0114] (3) 使化合物 14 与外消旋的 N- 甲基丙氨酸反应,得到用具有被保护的硫醇功能基的羧基基团酰化的外消旋的 N- 甲基丙氨酸,其中带有硫原子的碳中心或是外消旋的或是 R 手性或 S 手性的,从而得到结构 15 的化合物。

[0115] 上述方法,其中 R_1 和 R_2 是甲基; R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是 H; l 和 m 的每一个是 1; n 是 0;

[0116] 上述方法,其中式 (III-L) 化合物是含有 N- 甲基 -L- 丙氨酸的化合物 10(S);

[0117] 上述方法,其中式 (III-D) 化合物是含有 N- 甲基 -D- 丙氨酸的化合物 10(R);

[0118] 上述方法,其中式 (III-D, L) 化合物是含有外消旋的 N- 甲基丙氨酸的化合物 10(S, R);

[0119] 上述方法,其中含有 N- 甲基 -L- 丙氨酸、N- 甲基 -D- 丙氨酸或外消旋的 N- 甲基丙氨酸的化合物 10 是经下列过程制造的,包括:

[0120] (1) 使异丁烯基硫醚 (5) 与乙腈阴离子反应,得到化合物 6;

[0121] (2) 水解化合物 6,得到 4- 巯基 -4- 甲基戊酸 (7);

[0122] (3) 通过与甲基甲硫醇磺酸酯反应,转变化合物 7 为二硫化物 8;

[0123] (4) 转变化合物 8 为其 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 9;和

[0124] (5) 使化合物 9 与 N- 甲基 -L- 丙氨酸、N- 甲基 -D- 丙氨酸或外消旋的 N- 甲基丙氨酸反应,得到所述的含有 N- 甲基 -L- 丙氨酸、N- 甲基 -D- 丙氨酸或外消旋的 N- 甲基丙氨酸的化合物 10;

[0125] 通过上述任一方法来制造美登素类的方法,如果存在非对映异构体的话,还可包括分离非对映异构体,以及通过在氰键合的二氧化硅上的 HPLC 来进行纯化;

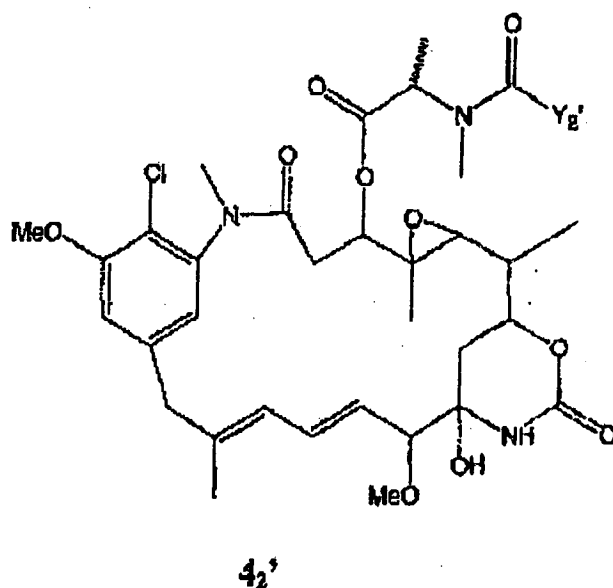
[0126] 制造美登素类 - 细胞结合剂偶联物的方法,包括通过上述的任意方法来制造纯化的美登素类,以及使纯化的美登素类与含有活性二巯基或巯基的细胞结合剂反应;

[0127] 上述的制造美登素类 - 细胞结合剂偶联物的方法,其中所述的活性二巯基是二硫代吡啶基团或取代的二硫代吡啶基团;

[0128] 制造美登素类 - 细胞结合剂偶联物的方法,包括通过上述的任意方法制造纯化的美登素类,以及使纯化的美登素类与含有马来酰亚胺基团 (maleimido group) 或卤代乙酰基团 (haloacetyl group) 的细胞结合剂反应;

[0129] 酯化美登醇以得到式 4₂' 的美登素类的方法:

[0130]



[0131] 其中：

[0132] Y_2' 代表

[0133] $(CR_7CR_8)_1(CR_9 = CR_{10})_p(C \equiv C)_qA_r(CR_5CR_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C \equiv C)_sB_t(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$,

[0134] 其中：

[0135] R_1 和 R_2 的每一个独立地是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性分支的或烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的环烷基或环烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基，此外， R_2 可以是 H；

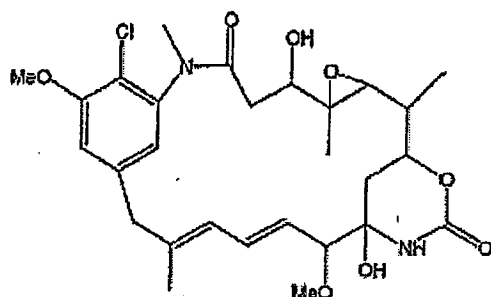
[0136] A、B 和 D 的每一个独立地是具有 3 至 10 个碳原子的环烷基或环烯基、单纯的芳基或取代的芳基，或杂环芳基或杂环基团；

[0137] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{11} 和 R_{12} 的每一个独立地是 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基；

[0138] l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 和 t 的每一个独立地是 0 或从 1 至 5 的整数，只要 l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 和 t 中的至少 2 个不同时为 0；和

[0139] Z_2 是 SR 或 $-COR$ ，其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、或单纯的芳基或取代的芳基或杂环芳基或杂环基，所述方法包括使结构 11 的美登醇在 C-3：

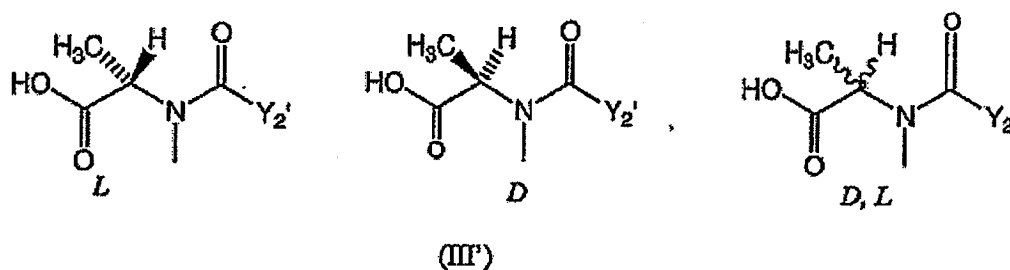
[0140]



11

[0141] 与式 (III' -L)、(III' -D)、或 (III' -D, L) 的化合物反应：

[0142]



[0143] 其中：

[0144] Y_2 代表

[0145] $(CR_7CR_8)_1(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_{qA_0}(CR_5CR_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C\equiv C)_{sB_t}(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$,

[0146] 其中：

[0147] R_1 和 R_2 的每一个独立地是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基，此外， R_2 可以是 H；

[0148] A、B 和 D 的每一个独立地是具有 3 至 10 个碳原子的环烷基或环烯基、单纯的芳基或取代的芳基，或杂环芳基或杂环烷基；

[0149] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 和 R_{12} 的每一个独立地是 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基；

[0150] l、m、n、o、p、q、r、s、t 和 u 的每一个独立地是 0 或从 1 至 5 的整数，只要 l、m、n、o、p、q、r、s、t 和 u 中的至少 2 个不同时为 0；和

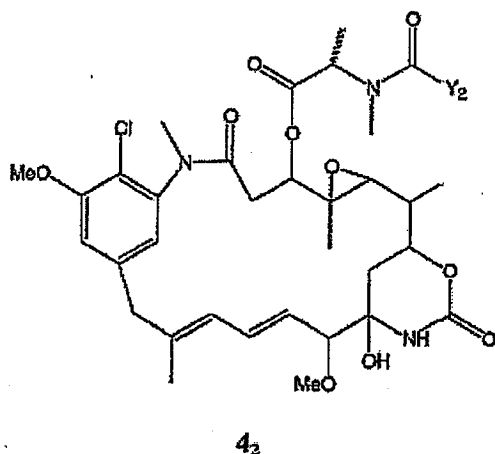
[0151] Z_2 是 SR 或 $-COR$ ，其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、或单纯的芳基或取代的芳基或杂环芳基或杂环烷基。

[0152] 酯化美登醇以得到式 4₂' 的美登素类的方法，其中式 (I) 的化合物表示为式 (I-L)。

[0153] 酯化美登醇以得到式 4₂' 的美登素类的方法，其中 R_1 是甲基， R_2 是 H。

[0154] 酯化美登醇以得到式 4₂ 的美登素类的方法：

[0155]



[0156] 其中：

[0157] Y_2 代表 $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$, 其中：

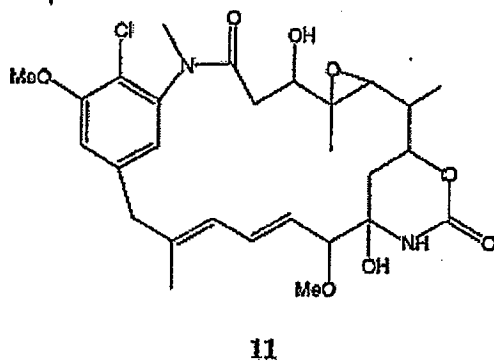
[0158] R_1 和 R_2 的每一个独立地是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的环烷基或烯基、苯基、取代的苯基,或杂环芳基或杂环基,此外, R_2 可以是 H；

[0159] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个独立地是 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基；

[0160] 1、m 和 n 的每一个独立地是从 1 至 5 的整数,另外 n 可以是 0；

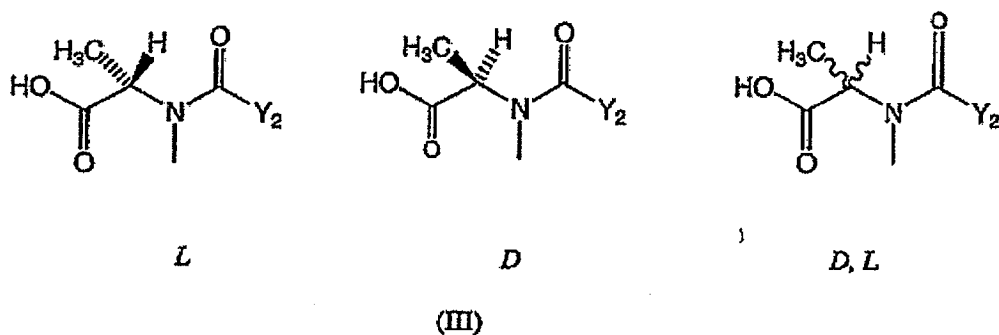
[0161] Z_2 是 SR 或 COR, 其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、或单纯的芳基或取代的芳基或杂环芳基或杂环基,其中所述方法包括使式 11 的美登醇：

[0162]



[0163] 在 C-3 位置上与式 (III-L)、(III-D) 或 (III-D, L) 的化合物反应：

[0164]



[0165] 其中：

[0166] Y_2 代表 $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$ ，其中：

[0167] R_1 和 R_2 的每一个独立地是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或线性烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基，此外， R_2 可以是 H；

[0168] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个独立地是 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基；

[0169] l 、 m 和 n 的每一个独立地是从 1 至 5 的整数，另外 n 可以是 0；

[0170] Z_2 是 SR 或 COR，其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或线性烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、或单纯的或取代的芳基或杂环芳基或杂环基；

[0171] 上述酯化美登醇以得到式 4a 的美登素类的方法，其中式 (III) 的化合物表示为式 (III-L)；

[0172] 上述酯化美登醇以得到式 4a 的美登素类的方法，其中所述式 (III-L) 化合物是 15a(S, S)、15b(S, R) 或 15a(S, S) 和 15b(S, R) 的混合物；

[0173] 上述酯化美登醇以得到式 4a 的美登素类的方法，其中所述式 (III-D) 化合物是 15(R, S)、15(R, R) 或 15(R, S) 和 15(R, R) 的混合物；

[0174] 上述酯化美登醇以得到式 4a 的美登素类的方法，其中所述式 (III-D, L) 化合物是用带有被保护的硫醇功能基的羧基基团酰化的外消旋 N-甲基丙氨酸，其中带有硫原子的碳中心或是外消旋的或是 R 手性或 S 手性的，从而得到结构 15 的化合物；

[0175] 上述酯化美登醇以得到式 4a 的美登素类的方法，其中 15a(S, S) 和 15b(S, R) 的混合物是经下列过程被产生的，包括：

[0176] (1) 使 4-巯基戊酸 (12) 和甲基甲硫醇磺酸酯反应，得到化合物 13；

[0177] (2) 将化合物 13 转变为其 N-羟基琥珀酰亚胺酯 14；

[0178] (3) 使化合物 14 与 N-甲基-L-丙氨酸反应，得到所述的化合物 15a(S, S) 和 15b(S, R) 的混合物；

[0179] 上述酯化美登醇的方法，其中所述化合物 15a(S, S) 是由下列方法产生的，包括：

[0180] (1) 转变 (R)-1,3-丁二醇为 (S)-4-(甲基二硫代)戊酸 19；

[0181] (2) 转变化合物 19 为其 N-羟基琥珀酰亚胺酯 (20)；和

[0182] (3) 使化合物 20 与 N-甲基-L-丙氨酸反应，得到化合物 15a(S, S)。

[0183] 上述酯化美登醇的方法，其中所述化合物 15b(S, R) 是由下列方法产生的，包括：

[0184] (1) 转变 (S)-1,3-丁二醇为 (R)-4-(甲基二硫代)戊酸 24；

[0185] (4) 转变化合物 24 为其 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 (25) ;和

[0186] (5) 使化合物 25 与 N- 甲基 -L- 丙氨酸反应,得到所述的化合物 15b(S, R) ;

[0187] 上述酯化美登醇以得到式 4a 的美登素类的方法,其中化合物 15(R, S) 和 15(R, R) 的混合物是经下列过程被产生的,包括:

[0188] (1) 使 4- 巯基戊酸 (12) 和甲基甲硫醇磺酸酯反应,得到化合物 13 ;

[0189] (2) 将化合物 13 转变为其 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 14 ;

[0190] (3) 使化合物 14 与 N- 甲基 -D- 丙氨酸反应,得到所述的化合物 15(R, S) 和 15(R, R) 的混合物。

[0191] 上述酯化美登醇以得到式 4a 的美登素类的方法,其中用带有被保护的硫醇功能基的羧基基团酰化外消旋的 N- 甲基丙氨酸,其中带有硫原子的碳中心或是外消旋的或是 R 手性或 S 手性的,从而得到结构 15 的化合物,其是经下列过程产生的,包括:

[0192] (1) 使 4- 巯基戊酸 (12) 和甲基甲硫醇磺酸酯反应,得到化合物 13 ;

[0193] (2) 将化合物 13 转变为其 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 14 ;

[0194] (3) 使化合物 14 与外消旋的 N- 甲基丙氨酸反应,得到用具有被保护的硫醇功能基的羧基基团酰化的外消旋 N- 甲基丙氨酸,其中带有硫原子的碳中心或是外消旋的或是 R 手性或 S 手性的,从而得到结构 15 的化合物。

[0195] 上述酯化美登醇以得到式 4b 的美登素类的方法,其中 R_1 和 R_2 是甲基 ; R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是 H ;l 和 m 是 1 ;和 n 是 0 ;

[0196] 上述酯化美登醇以得到式 4b 的美登素类的方法,其中所述式 (III-L) 化合物是含有 N- 甲基 -L- 丙氨酸的化合物 10 ;

[0197] 上述酯化美登醇以得到式 4b 的美登素类的方法,其中所述式 (III-D) 化合物是含有 N- 甲基 -D- 丙氨酸的化合物 10 ;

[0198] 上述酯化美登醇以得到式 4b 的美登素类的方法,其中所述式 (III-D, L) 化合物是含有外消旋的 N- 甲基丙氨酸的化合物 10 ;

[0199] 上述酯化美登醇以得到式 4b 的美登素类的方法,其中含有 N- 甲基 -L- 丙氨酸、N- 甲基 -D- 丙氨酸或外消旋的 N- 甲基丙氨酸的化合物 10 是通过下列过程产生的,包括:

[0200] (1) 使异丁烯基硫醚 (5) 与乙腈阴离子反应,得到化合物 6 ;

[0201] (2) 水解化合物 6,得到 4- 巯基 -4- 甲基戊酸 (7) ;

[0202] (3) 通过与甲基甲硫醇磺酸酯反应,转变化合物 7 为二硫化物 8 ;

[0203] (4) 转变化合物 8 为其 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 9 ;和

[0204] (5) 使化合物 9 与 N- 甲基 -L- 丙氨酸、N- 甲基 -D- 丙氨酸或外消旋的 N- 甲基丙氨酸反应,得到含有 N- 甲基 -L- 丙氨酸、N- 甲基 -D- 丙氨酸或外消旋的 N- 甲基丙氨酸的化合物 10 ;

[0205] 上述用 10 酯化美登醇——如果存在非对映异构体,则随后分离非对映异构体,并在在氰键合的二氧化硅上的 HPLC 纯化美登素类——的方法,进一步包括还原二硫键,以得到式 4b 的美登素类 ;

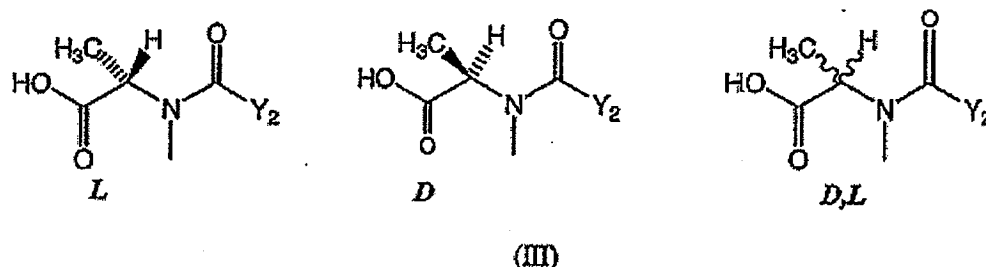
[0206] 制造美登素类 - 细胞结合剂偶联物的方法,包括通过上述任意的酯化美登醇以得到式 4b 的美登素类的方法,来制造纯化的美登素类,并使该美登素类与含有巯基或活性二硫基团——优选地是二硫代吡啶基或取代的二硫代吡啶基——的细胞结合剂反应 ;

[0207] 制造美登素类-细胞结合剂偶联物的方法,包括通过上述任意的酯化美登醇以得到式 4b 的美登素类的方法,来制造纯化的美登素类,并使该美登素类与含有马来酰亚胺基或卤代乙酰基的细胞结合剂反应。

[0208] 应用上述偶联物的治疗方法。

[0209] 式 (III) 的化合物:

[0210]



[0211] 其中:

[0212] Y_2 代表 $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$, 其中:

[0213] R_1 和 R_2 的每一个独立地是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基、或杂环芳基或杂环基,此外, R_2 可以是 H;

[0214] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个独立地是 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基;

[0215] 1、m 和 n 的每一个独立地是从 1 至 5 的整数,另外 n 可以是 0;和

[0216] Z_2 是 SR 或 -COR, 其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、或单纯的芳基或取代的芳基或杂环芳基或杂环基。

[0217] 化合物 10(S)、10(R) 或外消旋的 10;

[0218] 制造含有 N-甲基-L-丙氨酸、N-甲基-D-丙氨酸或外消旋的 N-甲基丙氨酸的化合物 10 的方法,包括:

[0219] (1) 使异丁烯基硫醚 (5) 与乙腈的阴离子反应,得到化合物 6;

[0220] (2) 水解化合物 6,得到 4-巯基-4-甲基戊酸 (7);

[0221] (3) 通过与甲基甲硫醇磺酸酯反应,转变化合物 7 为二硫化物 8;

[0222] (4) 转变化合物 8 为其 N-羟基琥珀酰亚胺酯 9;和

[0223] (5) 使化合物 9 与 N-甲基-L-丙氨酸、N-甲基-D-丙氨酸或外消旋的 N-甲基丙氨酸反应,得到所述的含有 N-甲基-L-丙氨酸、N-甲基-D-丙氨酸或外消旋的 N-甲基丙氨酸的化合物 10。

[0224] 化合物 15a(S, S) 和 15b(S, R) 的混合物;

[0225] 制造化合物 15a(S, S) 和 15b(S, R) 的混合物的方法,包括:

[0226] (1) 使 4-巯基戊酸 (12) 和甲基甲硫醇磺酸酯反应,得到化合物 13;

[0227] (2) 将化合物 13 转变为其 N-羟基琥珀酰亚胺酯 14;和

[0228] (3) 使化合物 14 与 N-甲基-L-丙氨酸反应,得到所述的化合物 15a(S, S) 和 15b(S, R) 的混合物;

- [0229] 化合物 15(R, S) 和 15(R, R) 的混合物。
- [0230] 制造化合物 15(R, S) 和 15(R, R) 的混合物的方法, 包括:
- [0231] (1) 使 4- 巯基戊酸 (12) 和甲基甲硫醇磺酸酯反应, 得到化合物 13;
- [0232] (2) 将化合物 13 转变为其 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 14;
- [0233] (3) 使化合物 14 与 N- 甲基 -D- 丙氨酸反应, 得到所述的化合物 15(R, S) 和 15(R, R) 的混合物;
- [0234] 用带有被保护的硫醇功能基的羧基基团酰化的外消旋的 N- 甲基丙氨酸, 其中带有硫原子的碳中心或是外消旋的或是 R 手性或 S 手性的, 以得到结构 15 的化合物。
- [0235] 制造用具有被保护的硫醇功能基的羧基基团酰化的外消旋的 N- 甲基丙氨酸的方法, 其中带有硫原子的碳中心或是外消旋的或是 R 手性或 S 手性的, 从而得到结构 15 的化合物, 该方法包括:
- [0236] (1) 使 4- 巯基戊酸 (12) 和甲基甲硫醇磺酸酯反应, 得到化合物 13;
- [0237] (2) 将化合物 13 转变为其 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 14;
- [0238] (3) 使化合物 14 与外消旋的 N- 甲基丙氨酸反应, 得到用具有被保护的硫醇功能基的羧基基团酰化的外消旋的 N- 甲基丙氨酸, 其中带有硫原子的碳中心或是外消旋的或是 R 手性或 S 手性的, 以得到结构 15 的化合物。
- [0239] 化合物 15a(S, S);
- [0240] 化合物 15b(S, R);
- [0241] 制造化合物 15a(S, S) 的方法, 包括:
- [0242] (1) 转变 (R)-1,3- 丁二醇为 (S)-4-(甲基二硫代) 戊酸 19;
- [0243] (2) 转变化合物 19 为其 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 (20); 和
- [0244] (3) 使化合物 20 与 N- 甲基 -L- 丙氨酸反应, 得到所述化合物 15a(S, S);
- [0245] 制造化合物 15b(S, R) 的方法, 包括:
- [0246] (1) 转变 (S)-1,3- 丁二醇为 (R)-4-(甲基二硫代) 戊酸 24;
- [0247] (2) 转变化合物 24 为其 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 (25); 和
- [0248] (3) 使化合物 25 与 N- 甲基 -L- 丙氨酸反应, 得到所述化合物 15b(S, R)。
- [0249] 药物组合物, 包含有效量的上述任意的美登素类化合物、其药学上可接受的盐或溶剂化物, 和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂;
- [0250] 上述的包含美登素类化合物的药物组合物, 进一步包含抗体。
- [0251] 在所选择的细胞群中诱导细胞死亡的方法, 包括用有效量的上述任意的美登素类 - 细胞结合剂、其盐或其溶剂化物接触靶细胞或含靶细胞的组织。
- [0252] 附图简述
- [0253] 图 1 显示了以前描述的美登素类的结构。
- [0254] 图 2 显示了本发明的一些美登素类的结构。
- [0255] 图 3a-3d 显示了合成本发明的代表性的美登素类的流程。
- [0256] 图 4a、4b 是显示本发明的新的美登素类的体外效力 (potency) 的曲线图。
- [0257] 图 4c、4d 是比较本发明的新的美登素类和那些以前描述的美登素类的体外效力的绘图。
- [0258] 图 5a-5d 显示了制备细胞结合剂和本发明美登素类的偶联物的流程。

[0259] 图 6 是显示本发明的细胞结合剂-美登素类偶联物的体外效应的绘图。

[0260] 图 7 是比较本发明的 huC242-美登素类与以前描述的美登素类的 huC242 偶联物的对抗 HT-29 人结肠肿瘤异种移植物的体内抗肿瘤效应的绘图。

[0261] 图 8 是比较本发明的 huC242-美登素类与以前描述的美登素类的 huC242 偶联物的对抗 COLO205 人结肠肿瘤异种移植物的体内抗肿瘤效应的绘图。

[0262] 图 9 是比较本发明的 MY9-6-美登素类与以前被描述的美登素类的 MY9-6 偶联物的对抗 HL60 前髓细胞性髓样白血病异种移植物的体内抗肿瘤效应的绘图。

[0263] 图 10 显示了偶联物 huMy9-6-DM4 对靶细胞 HL-60 和非靶细胞 Namalwa 细胞的体外细胞毒性的评价结果。

[0264] 图 11 显示了在 SCID 鼠中,偶联物 huMy9-6-DM4 抵抗人 HL-60 异种移植肿瘤的体内效应评价,并将其与以前描述的美登素类的 huMy9-6 偶联物(huMy9-6-DM1)的效应相比较。

[0265] 图 12 显示了偶联物 huB4-DM4 对 Ramos 靶细胞和 Colo205 非靶细胞的体外细胞毒性评价的结果。

[0266] 图 13a 显示了在 SCID 鼠中,偶联物 huB4-DM4 对抗人 Ramos 异种移植肿瘤的体内效应评价,图 13b 显示了该实验期间,动物体重的变化。

[0267] 发明详述

[0268] 本发明公开了新的、含有受空间位阻的硫醇(thiol)和二硫化物(disulfide)的美登素类,其中带有硫原子的 α -碳带有一个或两个烷基取代基。本发明也公开了用于合成这些新的美登素类的方法。进一步公开了在这些新的美登素类的合成中作为中间产物的有用的新的化合物。此外,本发明公开了制备这些新的美登素类和细胞结合剂的偶联物(conjugates)。

[0269] 本领域揭示了,修饰现有药物而不减少它们的细胞毒性潜能,是极其困难的。本公开的发明通过教导用于合成新的美登素类分子的方法,克服了此难题,所述分子含有具空间位阻的硫醇或二硫化物部分(moiety)。本公开的发明保留了——在一些情况下甚至增强了——以前描述的美登素类的细胞毒性潜力。

[0270] 美登素类-细胞结合剂偶联物允许欲以靶向方式应用的美登素类仅对不需要的细胞发挥充分的细胞毒作用,因此,避免了由于损害非靶向的健康细胞所带来的副作用。因此,本发明提供了有用的药剂,和用于制备这些药剂的新方法,以用于消除欲被杀死或裂解的疾病细胞或异常细胞,而显示最小的副作用,这些细胞例如肿瘤细胞(特别是实体瘤细胞)、病毒感染细胞、微生物感染细胞、寄生虫感染细胞、自身免疫细胞(产生自身抗体的细胞)、活化的细胞(参与移植排斥或移植抗宿主病的那些细胞)、或任意其它类型的疾病细胞或异常细胞。

[0271] 因此,本发明教导了用于产生改良的细胞毒性偶联物的方法,所述偶联物包括新的美登素类和细胞结合剂,这与以前描述的美登素类和细胞结合剂相比,生物学活性大大改善。本发明进一步教导了用于合成美登素类衍生物的方法,所述衍生物具有受空间位阻的硫醇或二硫化物部分,该部分允许和细胞结合剂进行化学连接,所述衍生物在结合形式或在释放形式或在两种状态下,显示出高的细胞毒性。本发明的细胞毒性偶联物包含一个或多个连接于细胞结合剂的美登素类。为了将美登素类连接于细胞结合剂,美登素类必须

先被修饰。

[0272] 可以被用于本发明以产生能够被连接于细胞结合剂的美登素类的美登素类,是本领域中已知的,并且可以根据已知方法从天然来源分离出来或根据已知方法合成制备出来。

[0273] 合适的美登素类的例子包括美登醇和美登醇类似物 (analogues)。合适的美登醇类似物的例子包括那些具有修饰的芳环和那些在其它位置带有修饰的化合物。

[0274] 具有修饰的芳环的合适的美登素类类似物的具体例子包括:

[0275] (1) C-19- 脱氯 (美国专利 4, 256, 746 号) (经安丝菌素 P2 的 LAH 还原而制备);

[0276] (2) C-20- 羟基 (或 C-20- 去甲基) + / - C-19- 脱氯 (美国专利 4, 361, 650 和 4, 307, 016 号) (用链霉菌 (*Streptomyces*) 或放线菌 (*Actinomyces*) 经去甲基化, 或用 LAH 经脱氯化而制备); 和

[0277] (3) C-20- 脱甲氧基, C-20- 酰氧基 ($-OCOR$), + / - 脱氯 (美国专利 4, 294, 757 号) (用酰基氯经酰化作用而制备)。

[0278] 在其它位置有修饰的合适的美登醇类似物的具体例子包括:

[0279] (1) C-9-SH (美国专利 4, 424, 219 号) (通过美登醇与 H_2S 或 P_2S_5 反应而制备);

[0280] (2) C-14- 烷氧甲基 (去甲氧 / CH_2OR) (美国专利 4, 331, 598 号);

[0281] (3) C-14- 羟甲基或酰氧基甲基 (CH_2OH 或 CH_2OAc) (美国专利 4, 450, 254 号) (从诺卡氏菌属 (*Nocardia*) 制备);

[0282] (4) C-15- 羟基 / 酰氧基 (美国专利 4, 364, 866 号) (由链霉菌经美登醇的转化而制备);

[0283] (5) C-15- 甲氧基 (美国专利 4, 313, 946 和 4, 315, 929 号) (从 *Trewia nudiflora* 分离);

[0284] (6) C-18-N- 去甲基 (美国专利 4, 362, 663 和 4, 322, 348 号) (由链霉菌进行美登醇去甲基化而制备); 和

[0285] (7) 4, 5- 脱氧 (美国专利 4, 371, 533 号) (经美登醇的三氯化肽 / LAH 还原而制备)。

[0286] 为了将美登素类连接于细胞结合剂, 美登素类包含连接部分 (linking moiety)。连接部分含有化学键, 其允许完整活性的美登素类在特定位点被释放出来。合适的化学键在本领域中是已知的, 包括二硫键、酸不稳定键、光不稳定键、肽酶不稳定键和酯酶不稳定键。优选的是二硫键。

[0287] 美国专利 5, 208, 020 的公开内容教导了产生带有这些键的美登素类, 其在此并入, 作为参考。

[0288] 根据本发明, 连接部分包括具空间位阻的硫醇或二硫化物部分。

[0289] 特别优选的包含含活性化学基团的连接部分的美登素类, 是美登醇的 C-3 酯及其类似物, 其中所述连接部分包含具空间位阻的硫醇或二硫键。

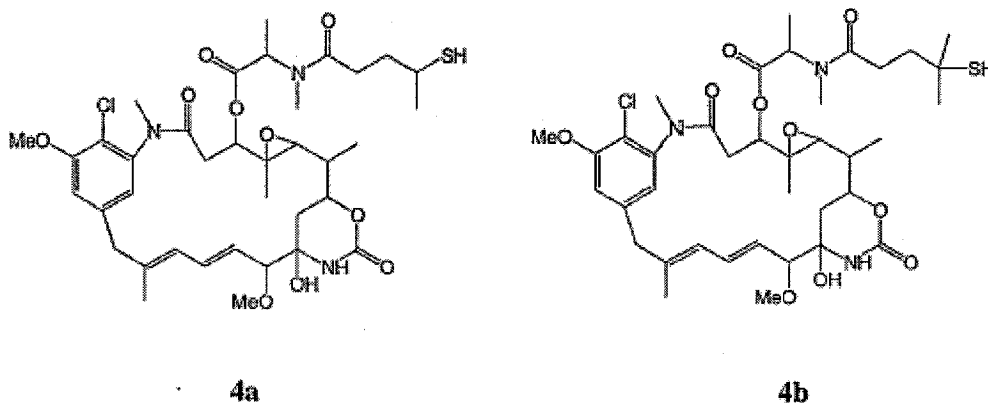
[0290] 美登素类上的许多位置可以用作化学地连接所述连接部分的位置。例如, 具有羟基的 C-3 位、用羟甲基修饰的 C-14 位、用羟基修饰的 C-15 位和具有羟基的 C-20 位, 都被预期是有用的。然而, C-3 位是优选的, 并且美登醇的 C-3 位是特别优选的。

[0291] 进一步地, 尽管在下面是基于在 C-3 位的含二硫键的连接部分, 描述了具有连接

部分的美登醇的酯的合成,但本领域的技术人员将理解,带有其它化学键的连接部分,如上面所描述的,也可以被用于本发明,同样地,其它美登素类和其它连接位置,如上面所描述的,也可以被用于本发明。

[0292] 图 2 显示了本发明的各种美登素类的结构。具有空间位阻的硫醇或二硫化物部分的美登素类的合成,参考图 3 的描述。下列代表性方法中的许多是应用了含硫醇的美登素类 N' -脱乙酰- N' -(4-巯基-1-氧戊基)-美登素(被称为 DM3)和 N' -脱乙酰- N' -(4-甲基-4-巯基-1-氧戊基)-美登素(被称为 DM4)。DM3(4a)和 DM4(4b)被表示为下列结构式:

[0293]



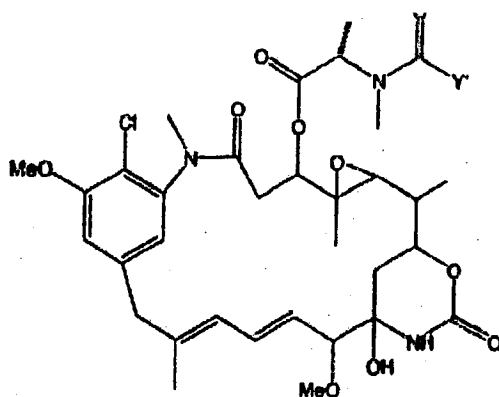
[0294] 本发明的含空间位阻的硫醇和二硫化物的新的美登素类的体外细胞毒性,可以用它们在体外抑制各种不需要的细胞系的增殖的能力来评价(图 4)。例如,可以用细胞系如人乳腺癌细胞系 SK-Br-3,或人表皮样癌细胞系 KB,来评价这些新的美登素类的细胞毒性。可以将欲被评价的细胞暴露于化合物 72 小时,并用已知方法用直接测定法来测定细胞的存活部分。然后,从分析结果可以计算出 IC_{50} 值。

[0295] 具有受空间位阻的硫醇或二硫化物部分的美登素类的生成

[0296] 本发明的新的美登素类是那些在 C-3、C-14 羟甲基、C-15 羟基或 C-20 去甲基处具有酰化的氨基酸侧链的物质,所述侧链带有酰基,该酰基具有位阻的巯基,其中具有硫醇功能基的酰基碳原子具有一个或两个取代基,所述取代基是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基,此外,取代基之一可以是 H,并且其中该酰基在羰基功能基和硫原子之间具有至少三个碳原子的线性链长度。

[0297] 优选地,美登素类化合物被表示为式 4' :

[0298]



4'

[0299] 其中：

[0300] Y' 代表

[0301] $(\text{CR}_7\text{CR}_8)_1(\text{CR}_9=\text{CR}_{10})_p(\text{C}\equiv\text{C})_q\text{A}_r(\text{CR}_5\text{CR}_6)_m\text{D}_u(\text{CR}_{11}=\text{CR}_{12})_r(\text{C}\equiv\text{C})_s\text{B}_t(\text{CR}_3\text{CR}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}$,

[0302] 其中：

[0303] R_1 和 R_2 的每一个独立地是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基，此外， R_2 可以是 H；A、B、D 是具有 3-10 个碳原子的环烷基或环烯基、单纯的或取代的芳基或杂环芳基或杂环基；

[0304] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{11} 和 R_{12} 的每一个独立地是 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基；

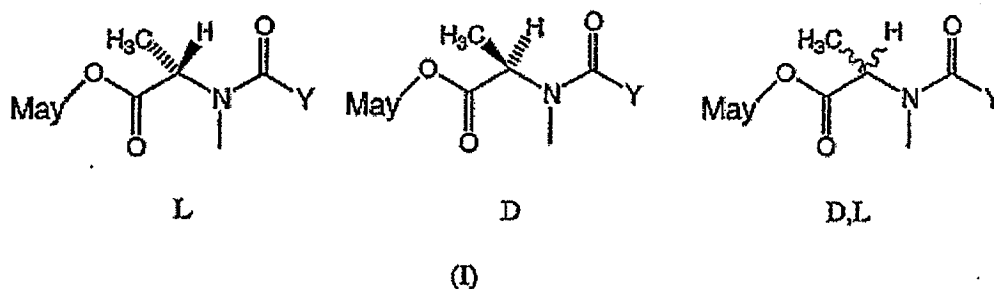
[0305] l、m、n、o、p、q、r、s 和 t 的每一个独立地是 0 或从 1 至 5 的整数，只要 l、m、n、o、p、q、r、s 和 t 中的至少 2 个不同时为 0；

[0306] Z 是 H、SR 或 -COR，其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、或单纯的或取代的芳基或杂环芳基或杂环基。

[0307] 在表示为 4' 的化合物的优选实施方案中， R_1 是甲基， R_2 是 H 和 Z 是 H； R_1 和 R_2 是甲基和 Z 是 H； R_1 是甲基， R_2 是 H 和 Z 是 $-\text{SCH}_3$ ；或 R_1 和 R_2 是甲基和 Z 是 $-\text{SCH}_3$ 。

[0308] 更优选地，美登素类是表示为式 (I-L)、(I-D) 或 (I-D, L) 的化合物：

[0309]



[0310] 其中：

[0311] Y 代表 $(\text{CR}_7\text{CR}_8)_1(\text{CR}_5\text{CR}_6)_m(\text{CR}_3\text{CR}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}$ ，其中：

[0312] R_1 和 R_2 的每一个独立地是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或线性烯

基、具有 3 至 10 个碳原子的环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基、或杂环芳基或杂环基,此外, R_2 可以是 H;

[0313] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个独立地是 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或线性烯基、具有从 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基;

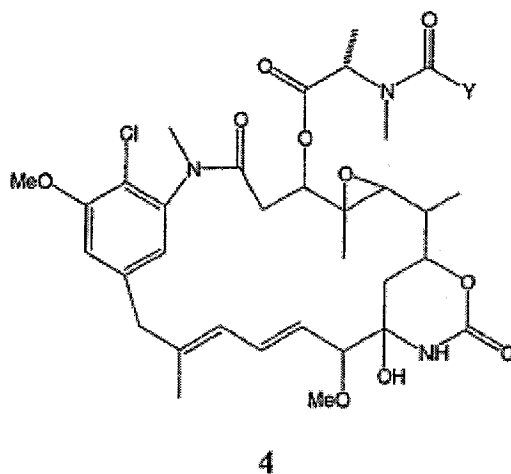
[0314] 1、m 和 n 的每一个独立地是从 1 至 5 的整数,此外, n 可以是 0;

[0315] Z 是 H、SR 或 $-COR$, 其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、或单纯的或取代的芳基或杂环芳基或杂环基;和

[0316] May 代表在 C-3、C-14 羟甲基、C-15 羟基或 C-20 去甲基处有侧链的美登素类。

[0317] 更优选的是 C-3 酯,它是被表示为式 4 的化合物:

[0318]



[0319] 其中的取代基如上面所定义。

[0320] 特别优选的是任意的上述化合物,其中 R_1 是甲基, R_2 是 H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是 H, 1 和 m 的每一个是 1, n 是 0, 和 Z 是 H; 上述那些化合物, 其中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是 H, 1 和 m 是 1, n 是 0, 和 Z 是 H; 那些化合物, 其中 R_1 是甲基, R_2 是 H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是 H, 1 和 m 的每一个是 1, n 是 0, 和 Z 是 $-SCH_3$; 那些化合物, R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是 H, 1 和 m 是 1, n 是 0, 和 Z 是 $-SCH_3$ 。进一步地, L- 丙氨酰立体异构体是优选的, 原因是, 对本发明的偶联物来说, 它是最有用的。

[0321] 式 4 的优选实施方案包括 DM3 和 DM4, 即, 式 4 的美登素类, 其中 Z 是 H, R_1 是甲基, R_2 是 H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是 H, 1 和 m 是 1, 和 n 是 0 (DM3, 化合物 4a); 式 4 的美登素类, 其中 Z 是 H, R_1 和 R_2 都是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是 H, 1 和 m 是 1, 和 n 是 0 (DM4, 化合物 4b); 式 4 的美登素类, 其中 R_1 是甲基, R_2 是 H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是 H, 1 和 m 的每一个是 1, n 是 0, 和 Z 是 $-SCH_3$; 和式 4 的美登素类, 其中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是 H, 1 和 m 是 1, n 是 0, 和 Z 是 $-SCH_3$ 。

[0322] 具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基的例子包括但不限于, 甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、丙烯基、丁烯基和己烯基。

[0323] 具有 3 至 10 个碳原子的分支烷基或烯基的例子包括但不限于, 异丙基、异丁基、仲丁基、叔丁基、异戊基、1- 乙基丙基、异丁烯基和异戊烯基。

[0324] 具有 3 至 10 个碳原子的环状烷基或烯基的例子包括但不限于, 环丙基、环丁基、环

戊基、环戊烯基和环己烯基。

[0325] 单纯的芳基包括具有 6 至 10 个碳原子的芳基,取代的芳基包括具有 6 至 10 个碳原子的芳基,其带有至少一个含 1 至 4 个碳原子的烷基取代基,或烷氧基取代基如甲氧基、乙氧基,或卤素取代基或硝基取代基。

[0326] 含有 6 至 10 个碳原子的单纯的芳基的例子包括苯基和萘基。

[0327] 取代的芳基的例子包括硝基苯基、二硝基苯基。

[0328] 杂环芳基包括具有 3 至 10 元环的基团,其含有一个或两个选自 N、O 或 S 的杂原子。

[0329] 杂环烷基包括环状化合物,其包括 3 至 10 元环体系,其中包含一个或两个选自 N、O 或 S 的杂原子。

[0330] 杂环芳基的例子包括吡啶基、硝基吡啶基、pyrrolyl、唑基、噻吩基、噻唑基和呋喃基。

[0331] 杂环烷基的例子包括二氢呋喃、四氢呋喃、tetrahydropyrrolyl、哌啶基、哌嗪基和吗啉基(morpholino)。

[0332] 具有受空间位阻的硫醇或二硫化物部分的新的美登素类,可以通过下列新公开的方法来制备:

[0333] 美登素类的合成

[0334] 图 3a 显示了合成美登素类 DM4(4b) 中的步骤。将异丁烯基硫醚(5)与乙腈的阴离子反应,得到巯基化合物 6。用碱水解 6 得到 4-巯基-4-甲基戊酸(7)。通过与甲基甲硫醇磺酸酯(MeSSO₂Me)反应,完成 7 向二硫化物 8 的转变。8 转变为 N-羟基琥珀酰亚胺酯 9,随后与 N-甲基-L-丙氨酸反应,得到羧酸 10,其通过硅胶柱层析被纯化。在 N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)和氯化锌存在的条件下,10 和美登醇(11)反应,得到 N-酰基-N-甲基-L-丙氨酰美登素类 L-DM4Sme, (4e) 和 N-酰基-N-甲基-D-丙氨酰美登素类 D-DM4Sme (4f) 的混合物。用氰键合的柱,通过 HPLC 分离非对映异构体的混合物。收集所需的含 L-氨基酸的异构体 4e 并用二硫苏糖醇还原,得到含硫醇的 L-氨酰基美登素类 DM4(4b),再次用氰键合的柱,通过 HPLC 纯化它。

[0335] 图 3b 显示了合成美登素类 DM3(4a) 中的步骤。

[0336] 通过与甲基甲硫醇磺酸酯反应,4-巯基戊酸(12)转变为甲基二硫化物,得到 13。化合物 13 转变为 N-羟基琥珀酰亚胺酯 14,随后与 N-甲基-L-丙氨酸反应,得到羧酸 15,其通过硅胶柱层析被纯化。在 N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)和氯化锌存在的条件下,15 和美登醇(11)反应,得到 N-酰基-N-甲基-L-丙氨酰美登素类 L-DM3SSMe, (4c) 和 N-酰基-N-甲基-D-丙氨酰美登素类 D-DM3SSMe (4d) 的混合物。用氰键合的柱,通过 HPLC 分离非对映异构体的混合物。收集所需的含 L-氨基酸的异构体并用二硫苏糖醇还原,得到含巯基-L-氨基酸的美登素类 DM3(4a),再次用氰键合的柱,通过 HPLC 纯化它。

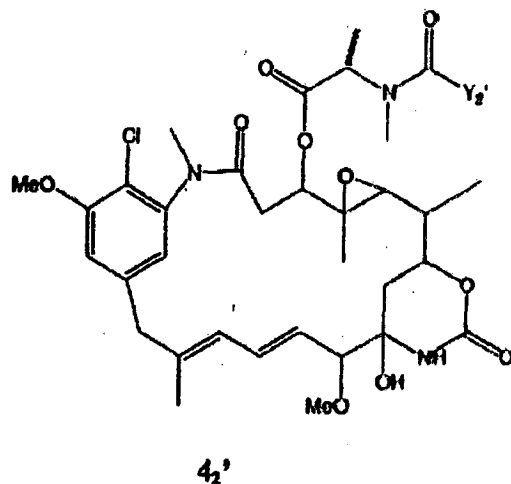
[0337] 图 3c 和 3d 显示了具有或者(S)-4-甲基二硫代-1-氧代戊基部分或者(R)-4-甲基二硫代-1-氧代戊基部分的 DM3 的合成。转变(R)-1,3-丁二醇(16)为其二甲苯磺酸酯(ditosylate)17,随后与氰化钠和黄原酸乙酯钾(potassium ethyl xanthate)连续反应,得到腈 18(图 3c)。碱水解,随后经二硫化物交换,得到(S)-4-甲基二硫代-戊酸 19。19 转变为琥珀酰亚胺酯 20,随后与 N-甲基-L-丙氨酸反应,得到 N-甲基-N-[4-(S)-甲基二

硫代-1-氧代-戊基]-S-丙氨酸(15a)。如上面对化合物 15 的描述,与美登醇反应,得到 L-DM3SMe 的两种非对映异构体 4g 和 4h。类似地,(S)-1,3-丁二醇(21)被转变为(R)-4-甲基二硫代-戊酸 24,然后转变为 15b。如上面所描述,与美登醇反应,得到 DM3SMe 的两种非对映异构体,4k 和 4l。

[0338] 因此,本发明提供了在 C-3、C-14 羟甲基、C-15 羟基或 C-20 去甲基处用酰化的氨基酸侧链酯化美登素类的方法,其中的酰基基团具有被保护的巯基功能基,其中带有被保护的巯醇功能基的酰基碳原子具有一个或两个取代基,所述取代基是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基,此外取代基之一可以是 H,其中酰基基团在羰基功能基和硫原子之间有至少 3 个碳原子的线性链长度,所述方法包括使美登素类在 C-3、C-14 羟甲基、C-15 羟基或 C-20 去甲基处与酰化的氨基酸反应,所述酰化的氨基酸中的酰基带有被保护的巯基。

[0339] 在一种优选的实施方案中,本发明提供了酯化美登醇以得到式 4₂' 的美登素类的方法:

[0340]



[0341] 其中:

[0342] Y₂' 代表

[0343] $(\text{CR}_7\text{CR}_8)_1(\text{CR}_9 = \text{CR}_{10})_p(\text{C} \equiv \text{C})_q\text{A}_r(\text{CR}_5\text{CR}_6)_m\text{D}_u(\text{CR}_{11} = \text{CR}_{12})_r(\text{C} \equiv \text{C})_s\text{B}_t(\text{CR}_3\text{CR}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}_2$,

[0344] 其中:

[0345] R₁ 和 R₂ 的每一个独立地是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性分支的或烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的环烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基,此外, R₂ 可以是 H;

[0346] A、B 和 D 的每一个独立地是具有 3 至 10 个碳原子的环烷基或环烯基、单纯的芳基或取代的芳基,或杂环芳基或杂环基;

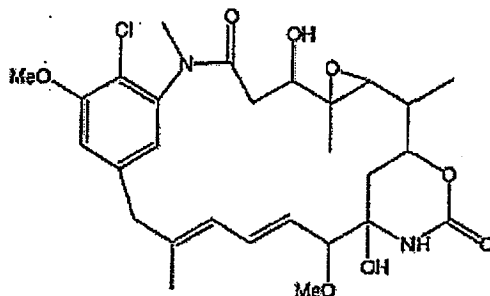
[0347] R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、R₉、R₁₁ 和 R₁₂ 的每一个独立地是 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基;

[0348] l、m、n、o、p、q、r、s 和 t 的每一个独立地是 0 或从 1 至 5 的整数,只要 l、m、n、o、

p、q、r、s 和 t 中的至少 2 个不同时为 0；和

[0349] Z_2 是 SR 或 -COR，其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、或单纯的或取代的芳基或杂环芳基或杂环基，所述方法包括使结构 11 的美登醇在 C-3 位

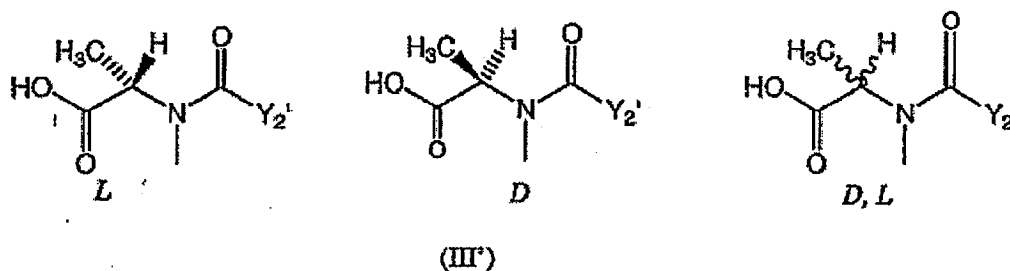
[0350]



11

[0351] 与式 (III' -L)、(III' -D) 或 (III' -D, L) 的化合物反应：

[0352]



(III')

[0353] 其中：

[0354] Y_2 代表

[0355] $(CR_7CR_8)_1(CR_9 = CR_{10})_p(C \equiv C)_{qA_0}(CR_5CR_6)_mD_u(CR_{11} = CR_{12})_r(C \equiv C)_sB_t(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$,

[0356] 其中：

[0357] R_1 和 R_2 的每一个独立地是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或线性烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基，此外， R_2 可以是 H；

[0358] A、B 和 D 的每一个独立地是具有 3 至 10 个碳原子的环烷基或环烯基、单纯的芳基或取代的芳基，或杂环芳基或杂环烷基；

[0359] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 和 R_{12} 的每一个独立地是 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基；

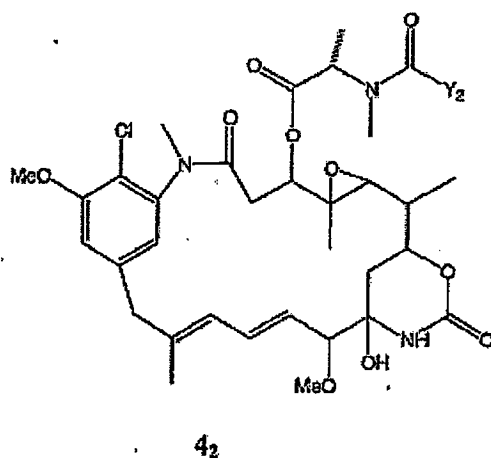
[0360] l、m、n、o、p、q、r、s、t 和 u 的每一个独立地是 0 或从 1 至 5 的整数，只要 l、m、n、o、p、q、r、s、t 和 u 中的至少 2 个不同时为 0；和

[0361] Z_2 是 SR 或 -COR，其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或线性烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、或单纯的或取代的芳基或杂环芳基或杂环基。

[0362] 优选地，式 (I) 的化合物被表示为式 (I-L)，并且，还优选地， R_1 是甲基和 R_2 是 H。

[0363] 在一种更优选的实施方案中,本发明提供了酯化美登醇以得到式 4₂ 的美登素类的方法:

[0364]



[0365] 其中:

[0366] Y₂ 代表 (CR₇CR₈)₁(CR₅CR₆)_m(CR₃CR₄)_nCR₁R₂SZ₂, 其中:

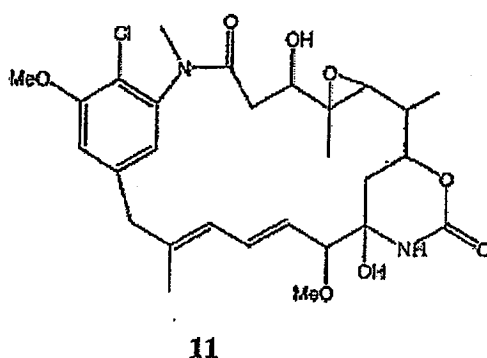
[0367] R₁ 和 R₂ 的每一个独立地是 CH₃、C₂H₅、具有 1 至 10 碳原子的线性分支的或烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的环烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基,此外,R₂ 可以是 H;

[0368] R₃、R₄、R₅、R₆、R₇ 和 R₈ 的每一个独立地是 H、CH₃、C₂H₅、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基;

[0369] 1、m 和 n 的每一个独立地是 1 至 5 的整数,另外 n 可以是 0;

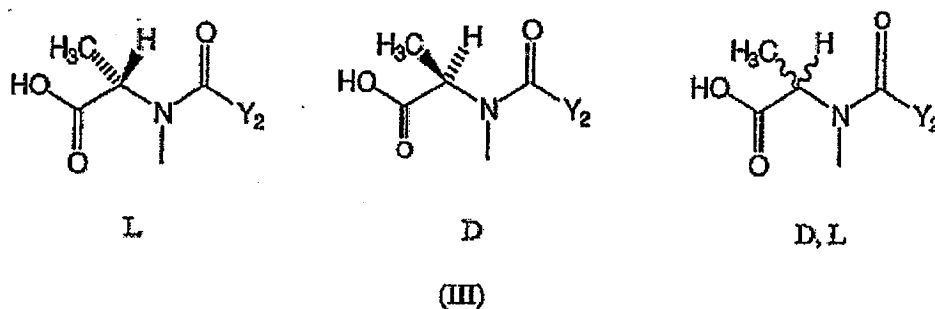
[0370] Z₂ 是 SR 或 -COR,其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、或单纯的或取代的芳基或杂环芳基或杂环基,所述方法包括使式 11 的美登醇在 C-3 位:

[0371]



[0372] 与式 (III-L)、(III-D) 或 (III-D, L) 的化合物反应:

[0373]



[0374] 其中：

[0375] Y_2 代表 $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$ ，其中：

[0376] R_1 和 R_2 的每一个独立地是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或线性烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基，此外， R_2 可以是 H；

[0377] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个独立地是 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或线性烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基；

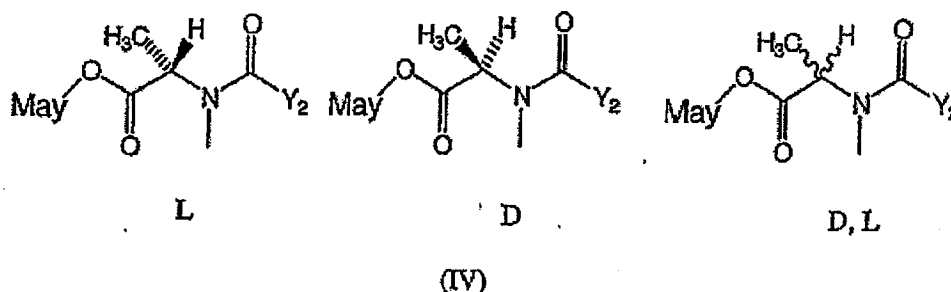
[0378] l 、 m 和 n 的每一个独立地是从 1 至 5 的整数，另外 n 可以是 0；和

[0379] Z_2 是 SR 或 $-COR$ ，其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或线性烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、或单纯的或取代的芳基或杂环芳基或杂环基。

[0380] 可以在氰键合的二氧化硅上，通过 HPLC 分离非对映异构体。

[0381] 在一种更优选的实施方案中，本发明提供了酯化美登素类以产生式 (IV-L)、(IV-D) 或 (IV-D, L) 所表示的美登素类酯的方法：

[0382]



[0383] 其中：

[0384] Y_2 代表 $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$ ，其中：

[0385] R_1 和 R_2 的每一个独立地是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基、或杂环芳基或杂环基，此外， R_2 可以是 H；

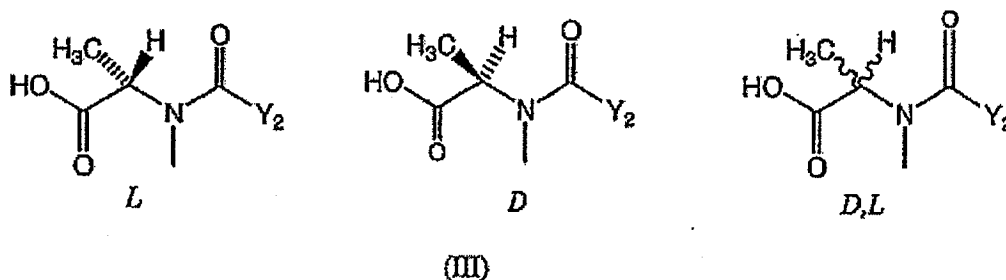
[0386] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个独立地是 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基；

[0387] l 、 m 和 n 的每一个独立地是从 1 至 5 的整数，另外 n 可以是 0；

[0388] Z_2 是 SR 或 COR ，其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、或单纯的或取代的芳基或杂环芳基或杂环基；和

[0389] May 是美登素类,所述方法包括使所述 may 在 C-3、C-14 羟甲基、C-15 羟基或 C-20 去甲基,与式 (III-L)、(III-D) 或 (III-D, L) 的化合物反应:

[0390]



[0391] 其中:

[0392] Y_2 代表 $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$, 其中:

[0393] R_1 和 R_2 的每一个独立地是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基,此外, R_2 可以是 H;

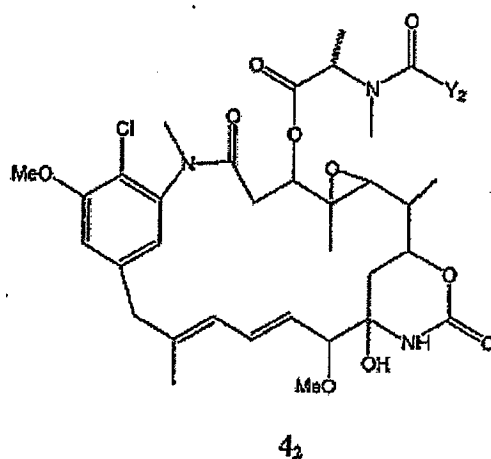
[0394] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个独立地是 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基;

[0395] 1、m 和 n 的每一个独立地是从 1 至 5 的整数,另外 n 可以是 0;和

[0396] Z_2 是 SR 或 $-COR$, 其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、或单纯的或取代的芳基或杂环芳基或杂环基。

[0397] 在一种甚至更优选的实施方案中,本发明提供了酯化美登醇以得到式 4₂ 的美登素类的方法:

[0398]



[0399] 其中:

[0400] Y_2 代表 $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$, 其中:

[0401] R_1 和 R_2 的每一个独立地是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基,此外, R_2 可以是 H;

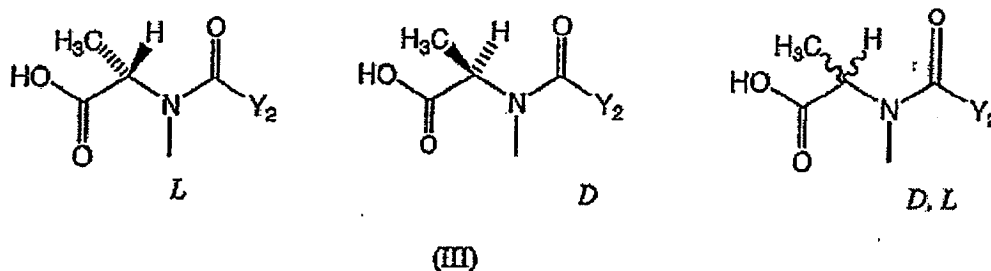
[0402] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个独立地是 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性

烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基；

[0403] 1、m 和 n 的每一个独立地是从 1 至 5 的整数，另外 n 可以是 0；

[0404] Z_2 是 SR 或 -COR，其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、或单纯的或取代的芳基或杂环芳基或杂环基，所述方法包括使美登醇在 C-3 位上与式 (III-L)、(III-D) 或 (III-D, L) 的化合物反应：

[0405]



[0406] 其中：

[0407] Y_2 代表 $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$ ，其中：

[0408] R_1 和 R_2 的每一个独立地是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基，此外， R_2 可以是 H；

[0409] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个独立地是 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基；

[0410] 1、m 和 n 的每一个独立地是从 1 至 5 的整数，另外 n 可以是 0；

[0411] Z_2 是 SR 或 -COR，其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、或单纯的或取代的芳基或杂环芳基或杂环基。

[0412] 优选地，表示为式 (I) 的化合物是 L 立体异构体。

[0413] 对于上述的方法，优选的是， R_1 是甲基， R_2 是 H， R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是 H，1 和 m 的每一个是 1，和 n 是 0；或 R_1 和 R_2 是甲基， R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是 H，1 和 m 是 1，和 n 是 0。

[0414] 制备 DM3 时，式 (III-L) 的化合物是 15a(S, S)、15b(S, R) 或 15a(S, S) 和 15b(S, R) 的混合物；式 (III-D) 的化合物是被外消旋的酰基基团或具有 R 或 S 手性的酰基基团酰化的 N-甲基-D-丙氨酸，从而得到化合物 15；式 (III-D, L) 的化合物是用带有被保护的硫醇功能基的羧基基团酰化的外消旋的 N-甲基丙氨酸，其中带有硫原子的碳中心或是外消旋的或是 R 手性或 S 手性的，从而得到结构 15 的化合物。

[0415] 15a(S, S) 和 15b(S, R) 的混合物可以通过下面的过程产生，包括：

[0416] (1) 使 4-巯基戊酸 (12) 和甲基甲硫醇磺酸酯反应，得到化合物 13；

[0417] (2) 将化合物 13 转变为其 N-羟基琥珀酰亚胺酯 14；

[0418] (3) 使化合物 14 与 N-甲基-L-丙氨酸反应，得到所述的化合物 15a(S, S) 和 15b(S, R) 的混合物。

[0419] 相似地，15(R, S) 和 15(R, R) 的混合物可以通过下列过程产生，包括：

[0420] (1) 使 4- 巯基戊酸 (12) 和甲基甲硫醇磺酸酯反应, 得到化合物 13 ;

[0421] (2) 将化合物 13 转变为其 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 14 ;

[0422] (3) 使化合物 14 与 N- 甲基 -D- 丙氨酸反应, 得到所述的化合物 15 (R, S) 和 15 (R, R) 的混合物。

[0423] 用带有被保护的硫醇功能基的羧基基团酰化的外消旋的 N- 甲基丙氨酸, 其中带有硫原子的碳中心或是外消旋的或是 R 手性或 S 手性的, 以得到结构 15 的化合物, 其可以经下列过程产生, 包括 :

[0424] (1) 使 4- 巯基戊酸 (12) 和甲基甲硫醇磺酸酯反应, 得到化合物 13 ;

[0425] (2) 将化合物 13 转变为其 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 14 ;

[0426] (3) 使化合物 14 与外消旋的 N- 甲基丙氨酸反应, 得到所述的用带有被保护的硫醇功能基的羧基基团酰化的外消旋的 N- 甲基丙氨酸, 其中带有硫原子的碳中心或是外消旋的或是 R 手性或 S 手性的, 从而得到结构 15 的化合物。

[0427] 化合物 15a (S, S) 可以经下列方法制成, 包括 :

[0428] (1) 转变 (R)-1,3- 丁二醇为 (S)-4-(甲基二硫代) 戊酸 19 ;

[0429] (2) 转变化合物 19 为其 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 (20) ; 和

[0430] (3) 使化合物 20 与 N- 甲基 -L- 丙氨酸反应, 得到所述化合物 15a (S, S)。

[0431] 化合物 15b (S, R) 可以经下列方法制成, 包括 :

[0432] (1) 转变 (S)-1,3- 丁二醇为 (R)-4-(甲基二硫代) 戊酸 24 ;

[0433] (2) 转变化合物 24 为其 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 (25) ; 和

[0434] (3) 使化合物 25 与 N- 甲基 -L- 丙氨酸反应, 得到所述的化合物 15b (S, R) ;

[0435] 制造 DM4 时, 式 (III-L) 的化合物是含有 N- 甲基 -L- 丙氨酸的化合物 10 ; 式 (III-D) 的化合物是含有 N- 甲基 -D- 丙氨酸的化合物 10, 式 (III-D, L) 的化合物是含有外消旋的 N- 甲基丙氨酸的化合物 10。

[0436] 含有 N- 甲基 -L- 丙氨酸、N- 甲基 -D- 丙氨酸或外消旋的 N- 甲基丙氨酸的化合物 10 是通过下列过程被制造的, 包括 :

[0437] (1) 使异丁烯基硫醚 (5) 与乙腈阴离子反应, 得到化合物 6 ;

[0438] (2) 水解化合物 6, 得到 4- 巯基 -4- 甲基戊酸 (7) ;

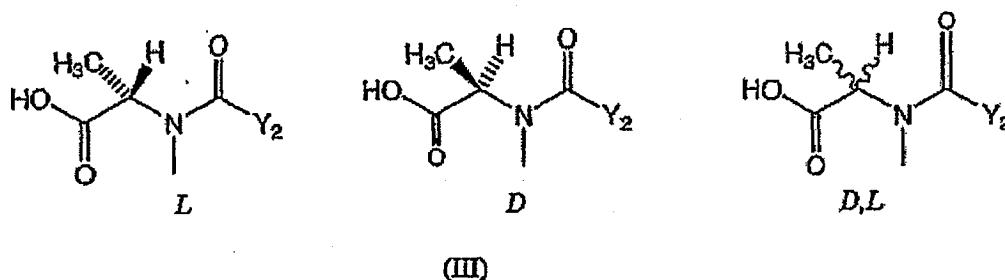
[0439] (3) 通过与甲基甲硫醇磺酸酯反应, 转变化合物 7 为二硫化物 8 ;

[0440] (4) 转变化合物 8 为其 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 9 ; 和

[0441] (5) 使化合物 9 与 N- 甲基 -L- 丙氨酸、N- 甲基 -D- 丙氨酸或外消旋的 N- 甲基丙氨酸反应, 得到含有 N- 甲基 -L- 丙氨酸、N- 甲基 -D- 丙氨酸或外消旋的 N- 甲基丙氨酸的化合物 10。

[0442] 根据本发明, 式 III 的化合物也是新的 :

[0443]



[0444] 其中：

[0445] Y_2 代表 $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$ ，其中：

[0446] R_1 和 R_2 的每一个独立地是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基，此外， R_2 可以是 H；

[0447] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个独立地是 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基；

[0448] 1、m 和 n 的每一个独立地是从 1 至 5 的整数，另外 n 可以是 0；

[0449] Z_2 是 SR 或 $-COR$ ，其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基、分支烷基或环烷基、或单纯的或取代的芳基或杂环芳基或杂环基。

[0450] 用类似于本文所公开的那些用于制造化合物 10 和 15 的方法，本领域的技术人员可以容易地制造出式 III 的化合物。

[0451] 美登素类的体外细胞毒性

[0452] 图 4 显示了本发明的美登素类的体外细胞毒性。具有受位阻的二硫键的新的美登素类 (4c, 4e) 对被测试的细胞系是高度有效的。因此，4c 杀死 A-375 细胞和 SK-Br-3 细胞， IC_{50} 值分别是 $1.5 \times 10^{-11}M$ 和 $7.0 \times 10^{-12}M$ 。相似地，美登素类 4e 也是高度有效的，它对 A-375 细胞和 SK-Br-3 细胞的 IC_{50} 值分别是 $3.2 \times 10^{-11}M$ 和 $9.0 \times 10^{-12}M$ 。比较本发明的含位阻硫醇的美登素类 4a 和以前描述的美登素类 1 的体外效力（图 4c、d），结果表明，新的美登素类比以前描述的美登素类的效力大 20 至 50 倍。

[0453] 细胞结合剂的制备

[0454] 本发明的化合物作为治疗剂的有效性取决于对合适的细胞结合剂的仔细选择。细胞结合剂可以是目前已知的，或是正在成为已知的任意种类，包括肽和非肽物质。通常地，它们可以是抗体（特别是单克隆抗体）、淋巴因子、激素、生长因子、维生素、营养输送分子（如转铁蛋白）、或任意其它的细胞结合分子或物质。

[0455] 可以被应用的细胞结合剂的更具体的例子包括：

[0456] 多克隆抗体；

[0457] 单克隆抗体；

[0458] 抗体片段如 Fab、Fab' 和 $F(ab')_2$ 、Fv (Parham, J. Immunol. 131: 2895-2902(1983); Spring et al. J. Immunol. 113: 470-478(1974); Nisonoff et al. Arch. Biochem. Biophys. 89: 230-244(1960))；

[0459] 干扰素（例如， α 、 β 、 γ ）；

[0460] 淋巴因子如 IL-2、IL-3、IL-4、IL-6；

[0461] 激素如胰岛素、TRH(促甲状腺激素释放激素)、MSH(黑素细胞刺激素)、类固醇激素如雄激素和雌激素;

[0462] 生长因子和集落刺激因子如 EGF、TGF- α 、FGF、VEGF、G-CSF、M-CSF 和 GM-CSF(Burgess, Immunology Today 5:155-158(1984));

[0463] 转铁蛋白(O' Keefe et al. J. Biol. Chem. 260:932-937(1985));和

[0464] 维生素,如叶酸。

[0465] 单克隆抗体技术允许极度特异的细胞结合剂以特异的单克隆抗体的形式产生。在本领域中,用于制备单克隆抗体的技术是公知的,所述抗体是通过用感兴趣的抗原免疫小鼠、大鼠、仓鼠或任意其它的哺乳动物而产生的,所述抗原例如完整的靶细胞、从靶细胞分离的抗原、全病毒、减毒的全病毒和病毒蛋白如病毒衣壳蛋白。也可以应用致敏的人细胞。制备单克隆抗体的另一种方法是应用 scFv(单链可变区)噬菌体文库,特别是人 scFv 噬菌体文库(参见,Griffiths 等,美国专利 5,885,793 和 5,969,108 号;McCafferty 等,WO92/01047;Liming 等,WO99/06587)。此外,也可以应用美国专利 5,639,641 号中公开的表面重构抗体,也可以应用人源化的抗体。

[0466] 对合适的细胞结合剂的选择,取决于欲靶向的特定细胞群,但通常地,如果可以得到合适的人单克隆抗体,则优选人单克隆抗体。

[0467] 例如,单克隆抗体 MY9 是鼠 IgG₁ 抗体,其特异性结合于 CD33 抗原{J. D. Griffin et al. Leukemia Res., 521(1984)},如果靶细胞表达 CD33,例如在急性骨髓性白血病(AML)中,可以应用该抗体。类似地,单克隆抗体抗 B4 是鼠 IgG₁,其结合于 B 细胞上的 CD19 抗原{Nadler et al., 131 J. Immunol. 244-250(1983)},如果靶细胞是表达此抗原的 B 细胞或患病细胞,例如在非霍奇金淋巴瘤或慢性淋巴细胞白血病中,可以应用该抗体。类似地,单克隆抗体 C242,结合于 CanAg 抗原(美国专利 5,552,293 号),它可以被用于治疗表达 CanAg 的肿瘤,如直肠癌、胰腺癌和胃癌。

[0468] 另外,结合于骨髓细胞的 GM-CSF,可以被用作细胞结合剂,针对来自急性骨髓性白血病的患病细胞。结合于活化的 T 细胞的 IL-2,可以被用于预防移植排斥、用于治疗和预防移植物抗宿主病,和用于治疗急性 T 细胞白血病。结合于黑素细胞的 MSH,可以被用于治疗黑素瘤。叶酸可以被用于靶向表达在卵巢肿瘤和其它肿瘤的上叶酸受体。表皮生长因子可以被用于靶向鳞状癌如肺部鳞状癌和头部鳞状癌和颈部状鳞癌。生长激素释放抑制因子可以被用于靶向神经母细胞瘤和其它肿瘤类型。

[0469] 可以分别用雌激素(或雌激素类似物)或雄激素(或雄激素类似物)作为细胞结合剂,成功地靶向乳腺癌和睾丸癌。

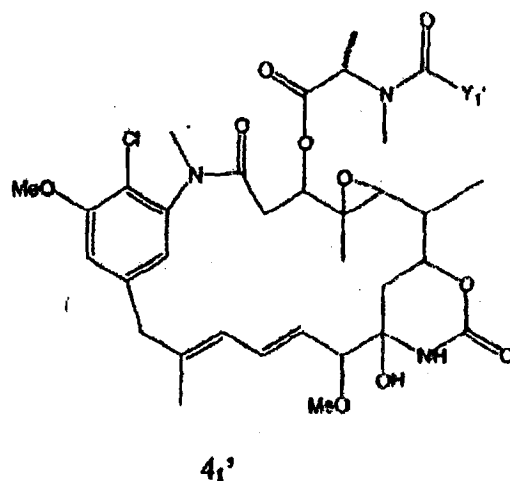
[0470] 细胞毒性偶联物的生成

[0471] 本发明也提供了美登素类-细胞结合剂偶联物,其包括至少一种连接于细胞结合剂的美登素类,其中所述细胞结合剂是用硫醇或二硫功能基被连接于美登素类的,硫醇或二硫功能基存在于酰化的氨基酸侧链的酰基基团上,酰化的氨基酸侧链存在于美登素类的 C-3、C-14 羟甲基、C-15 羟基或 C-20 去甲基处,其中,酰化的氨基酸侧链的酰基基团具有其硫醇或二硫功能基,它们位于带有一个或两个取代基的碳原子上,所述取代基是 CH₃、C₂H₅、具有 1 至 10 个碳原子的线性或烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基,此外,取代基之一可以是 H,和其中酰基

基团在羰基功能基和硫原子之间具有至少 3 个碳原子的线性链长度。

[0472] 优选的细胞结合剂偶联物包括至少一种连接于细胞结合剂的美登素类,其中美登素类由式 4₁' 表示:

[0473]



[0474] 其中:

[0475] Y₁' 代表

[0476] (CR₇CR₈)₁(CR₉=CR₁₀)_p(C≡C)_qA_r(CR₅CR₆)_mD_u(CR₁₁=CR₁₂)_r(C≡C)_sB_t(CR₃CR₄)_nCR₁R₂S-,

[0477] 其中:

[0478] R₁ 和 R₂ 的每一个独立地是 CH₃、C₂H₅、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基,此外, R₂ 可以是 H:

[0479] A、B 和 D 的每一个独立地是具有 3 至 10 个碳原子的环烷基或环烯基、单纯的芳基或取代的芳基、或杂环芳基或杂环基;

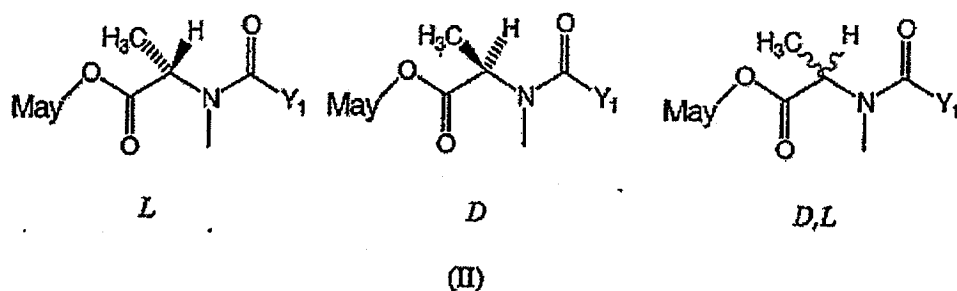
[0480] R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、R₉、R₁₁ 和 R₁₂ 的每一个独立地是 H、CH₃、C₂H₅、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基;和

[0481] l、m、n、o、p、q、r、s、t 和 u 的每一个独立地是 0 或从 1 至 5 的整数,只要 l、m、n、o、p、q、r、s、t 和 u 中的至少 2 个不同时为 0。

[0482] 优选地, R₁ 是甲基和 R₂ 是 H, 或 R₁ 和 R₂ 是甲基。

[0483] 一种更优选的细胞结合剂偶联物包括至少一种连接于细胞结合剂的美登素类,其中美登素类由式 (II-L)、(II-D) 或 (II-D, L) 表示:

[0484]



[0485] 其中:

[0486] Y_1 代表 $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2S-$, 其中:

[0487] R_1 和 R_2 的每一个独立地是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基、杂环芳基或杂环基, 此外, R_2 可以是 H;

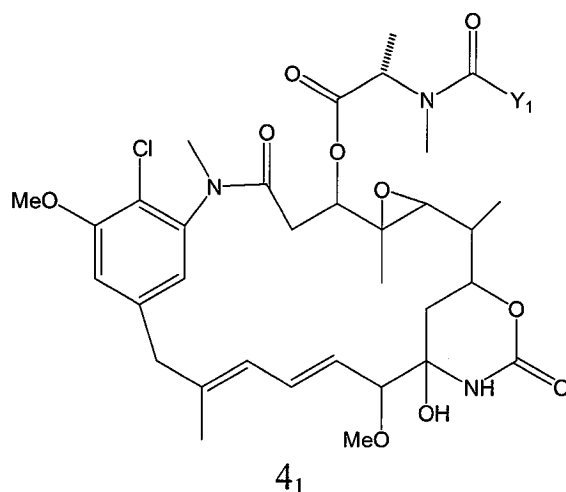
[0488] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个独立地是 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的线性烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基;

[0489] l 、 m 和 n 的每一个独立地是从 1 至 5 的整数, 此外 n 可以是 0; 和

[0490] May 代表在 C-3、C-14 羟甲基、C-15 羟基或 C-20 去甲基处带有侧链的美登醇;

[0491] 更优选的是这样的美登素类-细胞结合剂偶联物, 其中美登素类由式 4_1 表示:

[0492]



[0493] 其中取代基如对上面的式 (II) 所定义。

[0494] 特别优选的是任意的上述化合物, 其中 R_1 是甲基, R_2 是 H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是 H, l 和 m 的每一个是 1, 和 n 是 0; 和那些任意的上述化合物, 其中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是 H, l 和 m 是 1, 和 n 是 0。

[0495] 进一步地, 优选 L- 氨基酰立体异构体。

[0496] 本发明的代表性的细胞毒性偶联物是抗体/美登素类, 抗体片段/美登素类, 表皮生长因子 (EGF)/美登素类, 黑素细胞刺激素 (MSH)/美登素类, 促甲状腺素 (TSH)/美登素类, 生长激素释放抑制因子/美登素类, 叶酸/美登素类, 雌激素/美登素类, 雌激素类似物/美登素类, 雄激素/美登素类, 和雄激素类似物/美登素类。

[0497] 使含巯醇的美登素类与合适地被修饰的细胞结合剂反应, 产生细胞毒性偶联物。通过凝胶过滤、离子交换层析或通过 HPLC, 可以纯化这些偶联物。

[0498] 图 5 中显示了用于从含巯基的美登素类制备偶联物的方案。更具体地 (图 5a, b), 可以将抗体在含水缓冲液中的溶液与过量摩尔数的抗体修饰剂如 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)-丙酸酯 (SPDP, 3a) 温育, 以导入二硫吡啶基 (图 5a), 或与 N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)-丁酸酯 (SPDB, 3b) 温育, 以导入二硫吡啶基 (图 5b)。然后, 将修饰的抗体和含巯醇的美登素类 (如 4a 或 4b) 反应, 生成二硫化物连接的抗体-美登素类偶联物。然后, 通过凝胶过滤, 美登素类-抗体偶联物可以被纯化出来。

[0499] 可选择地, 可以将抗体与过量摩尔数的抗体修饰剂例如 2- iminothiolane 温育,

以导入巯基。然后,将修饰的抗体与合适的含二硫化物的美登素类反应,生成二硫化物连接的抗体-美登素类偶联物。然后,通过凝胶过滤,美登素类-抗体偶联物可以被纯化出来。

[0500] 通过分光光度法测定 252nm 和 280nm 处的吸光度的比值,可以确定每个抗体分子结合的美登素类分子的数目(在图 5a 至 5d 中,用 w 表示)。通过本方法,可以连接平均 1-10 个美登素类分子/抗体分子。每个抗体连接的美登素类的优选平均数是 2-5,最优选的是 3-4.5。

[0501] 可选择地,可以将抗体在含水缓冲液中的溶液与过量摩尔数的抗体修饰剂如 N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧酸酯(SMCC, 26)温育,以导入马来酰亚胺基(图 5c),或与 N-琥珀酰亚胺基-4-(碘乙酰基)-氨基苯甲酸酯(SIAB, 27)温育,以导入碘乙酰基(图 5d)。然后,将修饰的抗体和含硫醇的美登素类(如 4a 或 4b)反应,生成硫醚-连接的抗体-美登素类偶联物。然后,通过凝胶过滤,美登素类-抗体偶联物可以被纯化出来。

[0502] 通过如上描述的分光光度分析,可以测定每个抗体分子结合的美登素类分子的数目。

[0503] 因此,本发明提供了制造美登素类-细胞结合剂偶联物的方法,包括经上述方法之一制造纯化的美登素类,和使纯化的美登素类与细胞结合剂反应,所述细胞结合剂含有活性的二巯基或巯基。优选地,活性的二巯基是二硫吡啶基或取代的二硫吡啶基。特别优选地,活性的二巯基包括硝基吡啶二巯基或二硝基吡啶二巯基。

[0504] 在另一种方法中,将纯化的美登素类与含有马来酰亚胺基或卤代乙酰基的细胞结合剂反应。

[0505] 可以评价本发明的细胞结合剂与美登素类药物的偶联物,评价它们在体外抑制各种不需要的细胞系的增殖的能力(图 6)。例如,可以用细胞系如人结肠癌细胞系 COLO205、人黑素瘤细胞系 A-375、人骨髓白血病细胞系 HL60,评价这些偶联物的细胞毒性。可以将欲被评价的细胞暴露于化合物 24 小时,并通过已知方法用直接测定法来测定细胞的存活部分。然后,从分析结果可以计算出 IC_{50} 值。

[0506] 图 6、10 和 12 显示了本发明的抗体-美登素类偶联物的体外效力和靶特异性。因此,图 6 显示,huC242-DM3 和 huC242-DM4 在杀死抗原阳性的 COLO205 细胞中,均是高度有效的, IC_{50} 值分别是 $1.3 \times 10^{-11}M$ 和 $1.1 \times 10^{-11}M$ 。与之对照,抗原阴性的 A-375 细胞的敏感度低于大约 500 倍,这说明本发明的美登素类偶联物是高度有效的和高度特异的。类似地,图 10 和 12 分别说明,本发明的美登素类与抗体 MY9-6 和抗 -B4 的偶联物的高效力和靶特异性。

[0507] 在几种不同的人肿瘤小鼠模型中,将本发明的含位阻硫醇的美登素类与抗体的偶联物在体内的抗肿瘤效应和以前描述的美登素类偶联物在体内的抗肿瘤效应进行比较。在第一个模型中(图 7),用以前描述的美登素类 DM1 的抗体偶联物(huC242-DM1)或用两种新的美登素类偶联物(huC242-DM3, huC242-DM4),处理带有已建立的人结肠肿瘤 HT-29 的皮下异种移植物的 SCID 鼠。用 huC242-DM1 进行处理,导致肿瘤生长延迟 18 天。与之相比,新药剂显著地更加有效,对于 huC242-DM3,肿瘤生长延迟 28 天,对于 huC242-DM4,肿瘤生长延迟 36 天。

[0508] 在第二个模型中(图 8),用以前描述的美登素类 DM1 的抗体偶联物(huC242-DM1)

或用两种新的美登素类偶联物 (huC242-DM3, huC242-DM4), 处理带有已建立的人结肠肿瘤 COLO205 的皮下异种移植物的老鼠。用 huC242-DM1 处理, 没有导致肿瘤消退, 使肿瘤生长延迟 20 天。与之对照, 新药剂显著地更加有效。在 huC242-DM3 处理组中, 肿瘤完全消退, 持续了 45 天。huC242-DM4 更加有效, 导致所有被处理的老鼠痊愈。

[0509] 在第三个模型中 (图 9), 用以前描述的美登素类 DM1 的抗体偶联物 (MY-9-6-DM1) 或用两种新的美登素类偶联物 (MY-9-6-DM3, MY-9-6-DM4), 处理带有已建立的人骨髓性白血病 HL60 的皮下异种移植物的老鼠。用 MY-9-6-DM1 处理没有导致肿瘤消退, 使肿瘤生长延迟 5 天。与之对照, 新药剂显著地更加有效。导致肿瘤消退。MY-9-6-DM3 和 MY-9-6-DM4 均使肿瘤生长延迟大于 20 天。

[0510] 在第四个模型中 (图 11), 在用 HL-60 细胞建立的皮下异种移植模型中, 直接比较了本发明的美登素类 (huMY9-6-DM4) 和以前描述的美登素类的偶联物 (huMY9-6-DM1) 的效应。按照等同的剂量, 用本发明的偶联物 MY9-6-DM4 处理, 导致完全的肿瘤消退, 持续 85 天。与之相比, 以前描述的美登素类的偶联物的活性小得多, 肿瘤生长延迟仅为大约 48 天。

[0511] 在第五个模型中 (图 13a), 在皮下 Ramos 肿瘤模型中, 本发明的美登素类与 huB4 抗体的偶联物以剂量依赖的方式, 显示出了高的抗肿瘤活性。在非毒性的剂量下, 获得了完全的肿瘤消退和痊愈 (图 13a, b)。

[0512] 上面五个效应实验的结果说明, 用本发明的含受到空间位阻的硫醇的美登素类得到的细胞结合剂偶联物, 与以前描述的美登素类-细胞结合剂偶联物相比, 抗肿瘤活性大大改进。

[0513] 组合物及应用方法

[0514] 本发明提供了药物组合物, 其包括有效量的本发明的任何美登素类-细胞结合剂、其药学上可接受的盐或溶剂化物, 和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0515] 本发明也提供了治疗方法, 其包括向需要治疗的对象给予有效量的上述的任意偶联物。

[0516] 类似地, 本发明提供了用于在所选择的细胞群中诱导细胞死亡的方法, 所述方法包括, 用有效量的细胞毒性药剂接触靶细胞或含靶细胞的组织, 所述细胞毒性药剂含有本发明的任何美登素类-细胞结合剂、其盐或溶剂化物。靶细胞是细胞结合剂可以与之结合的细胞。

[0517] 如果需要, 可以随所述偶联物给予其它的活性药剂, 如其它的抗肿瘤剂。

[0518] 合适的药学上可接受的载体、稀释剂和赋形剂是已知的, 并且本领域的普通技术人员可以确定其临床可用性。

[0519] 合适的载体、稀释剂和 / 或赋形剂的例子包括: (1) Dulbecco's 磷酸盐缓冲盐水, pH 大约是 7.4, 包含或不包含大约 1mg/ml 至 25mg/ml 的人血清白蛋白, (2) 0.9% 生理盐水 (0.9% w/v NaCl), 和 (3) 5% (w/v) 葡萄糖; 并且也可以包括抗氧化剂如色胺和稳定剂如吐温 20。

[0520] 用于在所选择的细胞群中诱导细胞死亡的方法, 可以在体外 (in vitro)、体内 (in vivo) 或离体 (ex vivo) 实施。

[0521] 体外应用的例子包括, 为了杀死的病态或恶性的细胞, 在向同一患者移植自体骨髓之前, 处理自体骨髓; 为了杀死感受性 T 细胞和预防移植抗宿主病 (GVHD), 在移植骨髓

之前,处理骨髓;为了杀死除了不表达靶抗原的所需变异体之外的所有细胞,或为了杀死表达不期望的抗原的变异体,处理细胞培养物。

[0522] 非临床的体外应用的条件,可以容易地由本领域的普通技术人员确定。

[0523] 临床离体应用的例子是,在癌症治疗或自身免疫病治疗中,在自体移植前,从骨髓中去除肿瘤细胞或淋巴细胞,或为了预防 GvHD,在移植前从自体或同种异体的骨髓或组织中去除 T 细胞和其它淋巴细胞。处理可以如下地进行。从患者或其它个体采集骨髓,然后在含血清的培养基中温育,培养基中加入本发明的细胞毒剂,浓度范围是大约 $10\ \mu\text{M}$ 至 1pM ,在大约 37°C ,温育大约 30 分钟至大约 48 小时。本领域的普通技术人员可以容易地确定确切的浓度条件和温育时间,即剂量。温育之后,用含血清的培养基洗涤骨髓细胞,并按照已知的方法经静脉输回患者体内。在采集骨髓和再输入处理细胞的时期之间,如果患者接受其它治疗如消融化疗 (ablative chemotherapy) 或全身放疗,则标准的医疗设备,在液氮中冷冻保存处理的骨髓细胞。

[0524] 对于临床的体内用途,本发明的细胞毒剂将以溶液或冻干粉末被提供,它们经过无菌性和内毒素水平的检测。给予偶联物的合适的方案的例子如下。每周以静脉弹丸的形式给予偶联物,每周一次,持续 4 周。弹丸剂量是以 50 至 1000ml 的正常生理盐水被给予的,其中可以加入 5 至 10ml 的人血清白蛋白。每次给予的剂量是 $10\ \mu\text{g}$ 至 2000mg,静脉给予 (每日剂量范围是 100ng 至 20mg/kg)。治疗 4 周后,患者可以以周为单位继续接受治疗。本领域的技术人员可以确定临床上允许的关于给予途径、赋形剂、稀释剂、剂量、时间等的具体临床方案。

[0525] 根据在所选择的细胞群中诱导细胞死亡的体内或离体方法,可以被治疗的医学状态的例子包括任何类型的恶性肿瘤,这包括,例如,肺癌、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、肾癌、胰腺癌、卵巢癌和淋巴器官癌;自身免疫病,如系统性红斑狼疮、风湿性关节炎和多发性硬化;移植排斥,如肾移植排斥、肝移植排斥、肺移植排斥、心脏移植排斥和骨髓移植排斥;移植抗宿主病 (graft versus host disease);病毒感染,如 CMV 感染、HIV 感染、AIDS 等;和寄生虫感染,如贾第鞭毛虫病、阿米巴病、血吸虫病,和本领域的普通技术人员所确定的其它疾病。

实施例

[0526] 现在,将参考非限制性的实施例来阐释本发明。除非另有指明,所有的百分数、比率、部分 (parts) 等等,都是按重量计。下面描述的实施例是针对 R_1 是 CH_3 , R_2 是 H, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是 H, l 和 m 的每一个是 1 和 n 是 0 的化合物而言的。对于本发明的其它化合物,可以进行类似的合成,在所述其它化合物中, R_1 和 R_2 的每一个独立地是 H、 CH_3 、 C_2H_5 、或具有 1 至 10 个碳原子的更高级的烷基、烯基、或者苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环基;其中 l 、 m 和 n 的每一个是从 1 至 5 的整数,此外 n 也可以是 0。

[0527] 所有的试剂购自新泽西州的 Aldrich Chemical Co.,或来自其它商业来源。美登醇 (11) 是如以前所描述地制备的 (美国专利 6,333,410)。核磁共振 (^1H NMR) 谱是在 Bruker 400MHz 设备上获得的,质谱是在 Bruker Daltonics Esquire 3000 设备上用电喷雾离子化获得的。

[0528] 实施例 1

[0529] 美登素类 4b 的合成

[0530] 4- 巯基 -4- 甲基戊酸 (7) : 将搅拌棒和 150ml 的添加漏斗装配于 500ml 的烧瓶。将该体系放置在氮气氛下。经导管加入 150ml 无水四氢呋喃 (THF) 和 75ml 含 2.5M n-BuLi 的己烷 (18.7mmol), 并在 -78℃ 的干冰 / 丙酮浴中将溶液冷却。在大约 5 分钟的时间内, 经注射器滴加乙腈 (7.3g, 9.4ml, 18mmol)。当白色的乙腈锂沉淀形成时, 搅拌反应液 30 分钟。将异丁烯基硫醚 (15g, 17mmol) 溶于 100ml 无水 THF 中, 并在大约 30 分钟内, 经添加漏斗滴加。移走冷却浴, 搅拌反应液 3 小时。滴加 38ml 0.5M HCl, 同时在冰 / 水浴中冷却烧瓶。保留 THF 层, 用 75ml 乙酸乙酯洗涤水层两次。合并 THF 层和乙酸乙酯层, 用大约 20g 无水硫酸钠进行干燥, 并转移至 250ml 的烧瓶中。在真空下经旋转蒸发去除溶剂, 得到粗产物 6。加入乙醇 (30ml) 和搅拌棒。当缓慢加入含 8.0g NaOH 的 30ml 去离子水溶液时, 搅拌内容物。将回流冷凝器装配于烧瓶并置于氩气氛中。使反应回流过夜, 然后冷却至室温。加入去离子水 (60ml), 用 25mL 的乙酸乙酯和己烷的 2 : 1 混合物萃取混合物两次。用浓 HCl 酸化水层至 pH 为 2, 之后用 75ml 的乙酸乙酯萃取三次。用无水 Na₂SO₄ 干燥有机层, 并在真空下经旋转蒸发去除溶剂, 得到 10g 产物 7 (产率为 39%)。应用得到的物质而无需进一步纯化。¹H NMR (CDCl₃) : δ 1.38 (6H, s), 1.87-1.93 (2H, m), 2.08 (1H, s), 2.51-2.57 (2H, m)。

[0531] 4- 甲基 -4- (甲基二硫代) 戊酸 (8) : 在 250ml 烧瓶中, 将巯基戊酸 7 的溶液 (6.0ml, 40mmol) 溶于 50ml 去离子水中。以不引起过度起泡的速度向酸中加入碳酸钠 (6.4g, 60mmol), 并磁力搅拌。将 100ml 的添加漏斗装配于烧瓶, 漏斗中装有甲基甲硫醇磺酸酯 (7.5g, 60mmol) 的溶液, 甲基甲硫醇磺酸酯溶于 30ml 的玻璃蒸馏 (glass-distilled) 的 100% 乙醇中。在冰 / 水浴中冷却烧瓶, 并在氩气氛中维持该体系。尽可能快地将甲基甲硫醇磺酸酯溶液滴加至烧瓶中, 但不引起过度的起泡。移除冷却浴, 再搅拌反应混合物 3 小时。在真空下经旋转蒸发去除溶剂, 直至保留大约 20ml。随后, 加入 10ml 的饱和碳酸氢钠和 30ml 的去离子水。在分液漏斗中, 用 25ml 的乙酸乙酯洗涤混合物三次。用 5M HCl 调节水层至 pH 大约为 2, 并用 120ml 的乙酸乙酯萃取两次。合并有机层并用 20ml 的溶液洗涤两次, 所述溶液由饱和 NaCl 和 1M HCl 以 4 : 1 的比率组成。然后, 用 14g 无水硫酸钠干燥有机层, 在真空下经旋转蒸发去除溶剂, 得到 5.4g 产物 8 (产率是 70%)。可以将该物质带入下一步反应, 而无需进一步纯化。¹H NMR (CDCl₃) : δ 1.54 (6H, s), 2.5-2.21 (2H, m), 2.64 (3H, s), 2.69-2.72 (2H, m)。MS (M+Na⁺) 计算值 : 217.0, 实测值 : 217.1。

[0532] N- 羟基琥珀酰亚胺基 4- 甲基 -4- (甲基二硫代) 戊酸 (9) :

[0533] 将甲基二硫代戊酸 8 (3g, 15mmol) 溶于 20ml 的二氯甲烷中, 并在加入 N- 羟基琥珀酰亚胺 (2.65g, 23mmol) 时磁力搅拌, 随后加入盐酸 1-[3- (二甲基氨基) 丙基]-3- 乙基碳亚二胺 (EDC, 4.4g, 23mmol)。在氩气氛下搅拌混合物 2 小时。将反应混合物倒入 125ml 的分液漏斗中, 加入 40ml 乙酸乙酯, 用 20ml 的 pH6.0 的 50mM 磷酸钾缓冲液洗涤溶液两次, 用 12ml 饱和氯化钠洗涤溶液一次。用 14g 无水 Na₂SO₄ 干燥有机层, 并在真空下经旋转蒸发去除溶剂, 得到 4.0g 产物 9 (产率为 90%), 应用产物 9 而无需进一步纯化。¹H NMR (CDCl₃) : δ 1.30 (6H, s), 2.00-2.05 (2H, m), 2.39 (3H, s), 2.68-2.72 (2H, m), 2.73-2.83 (4H, m)。MS (M+Na⁺) 计算值 : 314.0, 实测值 : 314.1。

[0534] N- 甲基 -N- (4- 甲基 -4- 甲基二硫代 -1- 氧代戊基) -L- 丙氨酸 (10) :

[0535] 在配备有磁力搅拌棒的 125ml 烧瓶中, 将 N- 甲基 -L- 丙氨酸 (2.85g, 18.0mmol) 溶

于二甲氧基乙烷和去离子水的 1 : 1 溶液 50ml 中。加入三乙胺 (6.9g, 36mmol), 并滴加溶于 40ml 相同溶剂混合物的 9 (5.44g, 18mmol), 同时剧烈搅拌该溶液, 此过程为大约 5 分钟。2 小时之后, 在真空下经旋转蒸发, 浓缩反应混合物至大约 40ml, 然后加入 10ml 去离子水和 1M HCl, 得到大约 2 的 pH 值。将混合物倒入分液漏斗中, 用 50ml 的乙酸乙酯萃取两次。合并有机层, 随后用 7ml 饱和氯化钠溶液洗涤。用 8.0g 无水 Na₂SO₄ 干燥有机层, 并在真空下经旋转蒸发去除溶剂。使残余物保留在最小体积的乙酸乙酯中, 并通过二氧化硅上的层析纯化 (二氧化硅 : 40 微米规格 (flash grade), 二氧化硅床 : 24x3.0cm, 流动相 : 己烷 : 乙酸乙酯 : 乙酸为 50 : 48 : 2)。合并含有所需产物的部分, 在真空下去除溶剂。通过将残余物溶解在最小体积的乙酸乙酯中并通过快速滴加己烷并同时搅拌来沉淀产物, 去除残留的乙酸。加入己烷, 直至经 TLC 分析, 上清液中检测不到产物。真空干燥沉淀物 4 小时, 得到 2.2g 产物 10 (产率是 51%)。¹H NMR(CDCl₃) : δ 1.32(6H, s), 1.42(3H, d, J = 7Hz), 1.90-1.97(2H, m), 2.40(3H, s), 2.42-2.49(2H, m), 2.9(3H, s), 5.15(1H, q, J = 7Hz)。MS(M+Na⁺) 计算值 : 302.1, 实测值 : 302.0。

[0536] N^{2'}-脱乙酰-N^{2'}-(4-甲基-4-甲基二硫代-1-氧代戊基)-美登素 (L-DM4-SMe, 4e)。在氩气氛下, 磁力搅拌含有美登醇 (11, 25mg, 0.44mmol) 和 N-甲基-N-(4-甲基-4-甲基二硫代-1-氧代戊基)-L-丙氨酸 (10, 42.0mg, 0.177mmol) 的 3mL 二氯甲烷溶液, 同时加入含有二环己基碳二亚胺 (DCC, 57.1g, 0.277mmol) 的 0.67mL 二氯甲烷溶液。1 分钟之后, 加入含有 1M ZnCl₂ 的二乙醚 (0.03mL, 0.03mmol) 溶液。在室温下搅拌混合物 2 小时, 随后加入 5mL 乙酸乙酯, 经 course 滤纸真空过滤混合物。用 2mL 饱和碳酸氢钠溶液洗涤滤过物, 随后用 1mL 饱和氯化钠溶液洗涤。用 2g 无水硫酸钠干燥有机层。在真空下去除溶剂, 并用二氯甲烷和乙醇的混合物经二氧化硅层析纯化残余物, 以去除未反应的美登醇。合并含有所需产物的部分, 并在真空下去除溶剂, 以得到非对映异构体 4e 和 4f 的混合物。将残余物吸收到最小体积的乙酸乙酯中, 并用比率为 68 : 8 : 24 的己烷、2-丙醇和乙酸乙酯的混合物作为流动相, 在 50cm 乘 250cm、10 微米 DiazemTM CN 柱上纯化。流速是 118mL / min。在这些条件下, 所需产物 4e 在保留时间 11 分钟时被洗脱出来, 不需要的对映异构体 4f 的保留时间是 19 分钟。合并含有所需产物的部分, 在真空下去除溶剂, 得到 12.0mg 产物 4e (产率是 36%)。 ¹H NMR(CDCl₃) : δ 0.80(3H, s), 1.28-1.36(13H, m), 1.42-1.46(2H, m), 1.53-1.63(2H, m), 1.64(3H, s), 1.75-1.85(1H, m), 1.90-2.10(1H, m), 2.18(1H, dd, J = 3Hz 和 14Hz), 2.31(3H, s), 2.40-2.49(1H, m), 2.50-2.65(1H, m), 2.85(3H, s), 3.04(1H, d, J = 9Hz), 3.11(1H, d, J = 11Hz), 3.23(3H, s), 3.35(3H, s), 3.49(1H, d, J = 9Hz), 3.63(1H, d, J = 12Hz), 3.98(3H, s), 4.27(1H, t, J = 10Hz), 4.79(1H, dd, J = 3Hz 和 12Hz), 5.41(1H, q, J = 7Hz), 5.66(1H, dd J = 9Hz 和 15Hz), 6.21(1H, s), 6.42(1H, dd, J = 11Hz 和 15Hz), 6.65(1H, d, J = 1.5Hz), 6.73(1H, d, J = 11Hz), 6.81(1H, d, J = 1.5Hz)。高分辨率 MS(M+H⁺) 计算值 : 826.3174, 实测值 : 826.3150。

[0537] N^{2'}-脱乙酰-N^{2'}-(4-巯基-4-甲基-1-氧代戊基)-美登素 (L-DM4, 4b) : 将上面得到的二硫化物 4e (12mg, 0.015mmol) 溶解在 1.0mL 的 1 : 1 乙酸乙酯 : 甲醇中。然后, 加入溶于 0.50mL 50mM 磷酸缓冲液 pH7.5 的二硫苏糖醇 (18mg, 0.117mmol) 溶液。在氩气氛下磁力搅拌溶液 3 小时, 然后加入 1mL 200mM 磷酸缓冲液, pH6.0, 用 2mL 的乙酸乙酯萃取该混合物三次。合并有机层并用 1mL 饱和氯化钠溶液洗涤, 随后用 1g 无水硫酸钠干燥。在真空下去除

溶剂,将残余物吸收到最小体积的乙酸乙酯中,并用比率为 70 : 8 : 22 的己烷、2- 丙醇和乙酸乙酯混合物作为流动相,在 50cm x250cm、10 微米 Diazem™CN 柱上纯化。流速是 22mL / min。所需产物 4b 在保留时间 10 分钟时被洗脱出来。合并含有纯化的 4b 的部分,在真空下去除溶剂,得到 11mg4b (产率是 97%)。¹H NMR(CDCl₃) : δ 0.80 (3H, s), 1.19-1.23 (1H, m), 1.28-1.36 (12H, m), 1.42-1.46 (2H, m), 1.53-1.63 (2H, m), 1.64 (3H, s), 1.75-1.85 (1H, m), 1.90-2.10 (1H, m), 2.18 (1H, dd, J = 3Hz 和 14Hz), 2.40-2.49 (1H, m), 2.50-2.65 (2H, m), 2.88 (3H, s), 3.04 (1H, d, J = 9Hz), 3.11 (1H, d, J = 11Hz), 3.23 (3H, s), 3.35 (3H, s), 3.49 (1H, d, J = 9Hz), 3.63 (1H, d, J = 12Hz), 3.98 (3H, s), 4.27 (1H, t, J = 10Hz), 4.79 (1H, dd, J = 3Hz 和 12Hz), 5.41 (1H, q, J = 7Hz), 5.66 (1H, dd J = 9Hz 和 15Hz), 6.21 (1H, s), 6.42 (1H, dd, J = 11Hz 和 15Hz), 6.65 (1H, d, J = 1.5Hz), 6.73 (1H, d, J = 11Hz), 6.81 (1H, d, J = 1.5Hz)。高分辨率 MS(M+Na⁺) 计算值 :802.3101,实测值 :802.3116。

[0538] 实施例 2

[0539] 美登素类 4a 的合成

[0540] 4- 甲基二硫代 - 戊酸 (13) :在 500mL 的烧瓶中,将 4- 巯基戊酸 (12,16.6mg, 124mmol) 溶液溶于 350mL 去离子水中。磁力搅拌该溶液,同时向该酸中加入碳酸钠 (19.7g, 186mmol),碳酸钠加入的速度不引起过度起泡。将 250ml 的添加漏斗装配于烧瓶,漏斗中装有甲基甲硫醇磺酸酯 (23.4g,186mmol) 溶液,其溶于 220ml 玻璃蒸馏的 100% 乙醇中。在冰 / 水浴中冷却烧瓶,并在氩气氛中维持该体系。尽可能快地将甲基甲硫醇磺酸酯溶液滴加至烧瓶中,但滴加速度不致于引起过度的起泡。移走冷却浴,再搅拌反应混合物 2 小时。在真空下经旋转蒸发去除溶剂,直至留下大约 250ml。随后,加入 30ml 饱和碳酸氢钠溶液和 50ml 去离子水。在分液漏斗中,用 200ml 的乙酸乙酯洗涤该混合物三次。用 5M HCl 调节水层至 pH 大约为 2,并用 400ml 的乙酸乙酯萃取两次。合并有机层,再用 60ml 的饱和 NaCl 溶液和 1M HCl 的 4 : 1 混合物洗涤,然后,用 50g 无水硫酸钠干燥,最后,在真空下旋转蒸发去除溶剂,得到 10.2g 的产物 13 (产率是 45%)。在下一反应中应用该物质,而不需进一步纯化。¹H NMR(CDCl₃) : δ 1.36 (3H, d, J = 7Hz), 1.84-1.95 (H, m), 1.85-2.56 (1H, m), 2.42 (3H, s), 2.53 (2H, t, J = 7Hz), 2.85-2.95 (1H, m), MS(M+Na⁺) 计算值 :203.3,实测值 :203.2。

[0541] N- 羟基琥珀酰亚胺基 4- 甲基二硫代 - 戊酸酯 (14) :将甲基二硫代 - 戊酸 (13,0.75g,4.16mmol) 溶于 7.0ml 二氯甲烷中,磁力搅拌,同时加入 N- 羟基琥珀酰亚胺 (0.526g,4.57mmol),随后加入盐酸 1-[3-(二甲基氨基) 丙基]-3- 乙基碳亚二胺氢氯化物 (0.877g,4.57mmol)。在氩气氛下搅拌混合物 2.5 小时,然后将混合物倒入 60ml 的分液漏斗中,分液漏斗中含有 20mL 的乙酸乙酯。用 15ml 的 pH6.0 的 50mM 磷酸钾缓冲液洗涤得到的溶液两次,用 5ml 饱和氯化钠洗涤一次。用 8g 无水 Na₂SO₄ 干燥有机层,在真空下旋转蒸发去除溶剂,得到 1.15g 产物 14 (产率为 87%),其可以被用于下一反应而无需进一步纯化。¹H NMR δ 1.48 (3H, d, J = 7), 2.06 (1H, m), 2.17 (1H, m), 2.55 (3H, s), 2.93 (2H, t, J = 7), 2.98 (4H, s), 3.15 (1H, m)。MS(M+Na⁺) 计算值 :304.1,实测值 :304.0。

[0542] N- 甲基 -N-(4- 甲基二硫代 -1- 氧代戊基) -L- 丙氨酸 (15) :在配备有磁力搅拌棒的 125ml 烧瓶中,将 N- 甲基 -L- 丙氨酸 (0.64g,6.2mmol) 溶于二甲氧基乙烷和去离子水的 1 : 1 混合液 8ml 中。加入三乙胺 (0.841g,8.3mmol),剧烈搅拌该烧瓶,同时滴加溶于 8ml 相同溶剂混合物的 14(1.0g,3.6mmol) 的溶液,此过程大约 5 分钟。2 小时之后,在真空下旋

转蒸发,浓缩反应混合物至大约 3ml,然后加入 15ml 去离子水和 1M HCl,得到大约 2 的 pH 值。将混合物倒入 60mL 的分液漏斗中,用 15ml 的乙酸乙酯萃取两次。合并有机层,用 3ml 饱和氯化钠溶液洗涤,随后用 8.0g 无水 Na_2SO_4 干燥,最后,在真空下旋转蒸发去除溶剂。将残余物吸收到最小体积的乙酸乙酯中,并经二氧化硅层析纯化(二氧化硅:40 微米 flash grade,二氧化硅床:24x3.0cm,流动相己烷:乙酸乙酯:乙酸为 50 : 48 : 2)。合并含所需产物 15 的部分,在真空下去除溶剂。通过将残余物溶解在最小体积的乙酸乙酯中并沉淀产物,去除残留乙酸,沉淀产物是通过快速滴加己烷并同时搅拌而实施的。加入己烷,直至经 TLC 分析上清液中检测不到产物。真空干燥沉淀物,得到 0.60g 产物 15(产率是 62%)。 ^1H NMR(CDCl_3): δ 1.35(3H, d, $J = 7$), 1.41(3H, d, $J = 7$), 1.94-2.03(2H, m), 2.43(3H, s), 2.50-2.55(2H, m), 2.83-2.93(1H, m), 2.98(3H, s), 5.14(1H, q, $J = 7$)。MS($\text{M}+\text{Na}^+$) 计算值: 288.1, 实测值: 288.1。

[0543] $\text{N}^{2'}$ -脱乙酰- $\text{N}^{2'}$ -(4-甲基二硫代-1-氧代戊基)-美登素(L-DM3-SMe, 4c): 在氩气氛下,磁力搅拌含有美登醇(25mg, 0.44mmol) 和 15(42.0mg, 0.177mmol) 的 3mL 二氯甲烷溶液,同时加入二环己基碳二亚胺(DCC, 57.1g, 0.277mmol) 在 0.67ml 二氯甲烷中的溶液。1 分钟之后,加入含有 1M ZnCl_2 的二乙醚(0.03ml, 0.03mmol) 溶液。在室温下搅拌混合物 2 小时,随后加入 5ml 乙酸乙酯,经 course 滤纸真空过滤混合物。用 2ml 饱和碳酸氢钠溶液洗涤滤过物,随后用 1ml 饱和氯化钠溶液洗涤。用 2g 无水硫酸钠干燥有机层,然后在真空下去除溶剂。用二氯甲烷和甲醇的混合物经二氧化硅层析纯化残余物,以去除未反应的美登醇。合并含有所需产物的部分,并在真空下去除溶剂,得到非对映异构体 4c 和 4d 的混合物。将残余物吸收到最小体积的乙酸乙酯中,并用比率为 68:8:24 的己烷、2-丙醇和乙酸乙酯混合物作为流动相,在 50cm 乘 250cm、10 微米 DiazemTMCN 柱上纯化。流速是 118mL / min。所需产物 4c 在保留时间 11 分钟时被洗脱出来,不需要的对映异构体 4d 的保留时间是 19 分钟。合并含有所需产物的部分,在真空下去除溶剂,得到 12.0mg 产物 4c(产率是 36%)。 ^1H NMR(CDCl_3): δ 0.80(3H, s), 1.19-1.23(1H, m), 1.28-1.36(9H, m), 1.42-1.46(1H, m), 1.53-1.63(2H, m), 1.64(3H, s), 1.80-1.89(1H, m), 1.90-2.09(1H, m), 2.18(1H, dd, $J = 3\text{Hz}$ 和 14Hz), 2.32(3H, s), 2.33-2.42(1H, m), 2.49-2.62(2H, m), 2.88(3H, s), 3.04(1H, d, $J = 9\text{Hz}$), 3.11(1H, d, $J = 11\text{Hz}$), 3.23(3H, s), 3.35(3H, s), 3.49(1H, d, $J = 9\text{Hz}$), 3.63(1H, d, $J = 12\text{Hz}$), 3.98(3H, s), 4.27(1H, t, $J = 10\text{Hz}$), 4.79(1H, dd, $J = 3\text{Hz}$ 和 12Hz), 5.41(1H, q, $J = 7\text{Hz}$), 5.66(1H, dd $J = 9\text{Hz}$ 和 15Hz), 6.21(1H, s), 6.42(1H, dd, $J = 11\text{Hz}$ 和 15Hz), 6.65(1H, d, $J = 1.5\text{Hz}$), 6.73(1H, d, $J = 11\text{Hz}$), 6.81(1H, d, $J = 1.5\text{Hz}$)。MS($\text{M}+\text{Na}^+$) 计算值: 834.3, 实测值: 834.3。

[0544] $\text{N}^{2'}$ -脱乙酰- $\text{N}^{2'}$ -(4-巯基-1-氧代戊基)-美登素(L-DM3, 4a): 将 L-DM3-SMe(4c, 12mg, 0.015mmol) 溶解在 1.0ml 的 1 : 1 乙酸乙酯: 甲醇混合物中。加入溶于 pH7.5 的 0.50ml 50mM 磷酸缓冲液的二硫苏糖醇(18mg, 0.117mmol) 溶液。在氩气氛下磁力搅拌反应液 3 小时,然后加入 1mL 200mM 磷酸缓冲液, pH6.0, 用 2mL 的乙酸乙酯萃取混合物三次。合并有机层并用 1mL 饱和氯化钠溶液洗涤,随后用 1g 无水硫酸钠干燥。在真空下去除溶剂,将残余物吸收到最小体积的乙酸乙酯中,并用比率为 70 : 8 : 22 的己烷、2-丙醇和乙酸乙酯混合物作为流动相,在 50cm x 250cm、10 微米 DiazemTMCN 柱上纯化。流速是 22mL/min。所需产物在保留时间 10 分钟时被洗脱出来。合并含有纯化产物的部分,在真空下去除溶

剂,得到 11mg 的产物 4a(产率是 97%)。¹H NMR(CDCl₃): δ 0.80(3H, s), 1.19-1.23(1H, m), 1.28-1.36(9H, m), 1.42-1.46(1H, m), 1.53-1.63(2H, m), 1.64(3H, s), 1.80-1.89(1H, m), 1.90-2.09(1H, m), 2.18(1H, dd, J = 3Hz 和 14Hz), 2.33-2.42(1H, m), 2.49-2.62(2H, m), 2.88(3H, s), 3.04(1H, d, J = 9Hz), 3.11(1H, d, J = 11Hz), 3.23(3H, s), 3.35(3H, s), 3.49(1H, d, J = 9Hz), 3.63(1H, d, J = 12Hz), 3.98(3H, s), 4.27(1H, t, J = 10Hz), 4.79(1H, dd, J = 3Hz 和 12Hz), 5.41(1H, q, J = 7Hz), 5.66(1H, dd J = 9Hz 和 15Hz), 6.21(1H, s), 6.42(1H, dd, J = 11Hz 和 15Hz), 6.65(1H, d, J = 1.5Hz), 6.73(1H, d, J = 11Hz), 6.81(1H, d, J = 1.5Hz)。MS:(M+Na⁺) 计算值:788.3,实测值:788.3。

[0545] 实施例 3

[0546] 美登素类 4g、4h 的合成(图 3c)

[0547] R-1,3-二-O-对甲苯磺酰-丁烷(17):在 0℃,在氩气氛下,用对甲苯磺酰氯(12.70g,66.84mmol)处理溶于无水吡啶(40mL)和无水甲苯(60mL)的混合物的 R-(-)-1,3-丁二醇(16,2.00g,22.22mmol)溶液。在 0℃搅拌 5 分钟后,室温搅拌 2 小时,在真空下蒸发混合物,再溶解在乙酸乙酯中,并用 0.1M 含水 NaHCO₃ 洗涤,随后用饱和 NaCl 洗涤。用 MgSO₄ 干燥有机层,过滤,蒸发溶剂。在硅胶上经层析纯化,用 1:2(v/v) 乙酸乙酯/己烷洗脱,得到 6.51g(74%)的标题产物 17。R_f = 0.40(1:1EtOAc/己烷);¹H NMR(CDCl₃) 7.76(dd,4H, J = 1.0,8.0Hz), 7.35(dt,4H, J = 0.4,8.0+8.0Hz), 4.70(m,1H), 4.03(m,1H), 3.94(m,1H), 2.46(s,6H), 1.92(m,2H), 1.26(d,3H, J = 6.3Hz);¹³C NMR 145.17, 133.00, 130.11, 128.12, 127.91, 76.28, 66.21, 36.08, 21.86, 21.06;MS: 420.99(M+Na)⁺, 421.93(M+1+Na)⁺。

[0548] S-4-O-乙基黄原酸-戊腈(S-4-O-Ethylxanthic-pentanenitrile)(18):用 NaCN(0.65)处理溶于无水 DMSO(50mL)中的 R-1,3-二-O-对甲苯磺酰-丁烷(17,4.80g, 12.06mmol)的溶液。在氩气氛下,室温搅拌 18 小时后,用乙酸乙酯稀释反应混合物,连续用冷的 pH7.5 的 1.0M NaH₂PO₄、水和 pH4.0 的 1.0M NaH₂PO₄ 洗涤。分离有机层并用 MgSO₄ 干燥,过滤,然后蒸发,得到 2.63g 粗产物 R-3-O-对甲苯磺酰-戊腈。MS 275.80(M+Na)⁺, 276.75(M+1+Na)⁺。直接应用产物而不需进一步纯化。

[0549] 向粗产物 R-3-O-对甲苯磺酰-戊腈(2.63g)的乙醇(15ml)溶液中,加入含有 O-黄原酸乙酯钾(potassium O-ethylxanthate)(4.55g)的乙醇(50ml)。在氩气氛下搅拌过夜之后,浓缩该混合物,用乙酸乙酯稀释,通过短的二氧化硅柱进行过滤。浓缩洗脱物并经硅胶层析而纯化,用 1:4(v/v) 的 EtOAc/己烷洗脱,得到 1.54g 标题产物 18(63%, 2 步)。R_f = 0.40(1:4EtOAc/己烷)。¹H NMR(CDCl₃) 4.67(dd,2H, J = 7.1,14.2Hz), 3.86(ddd,1H, J = 7.0,14.0,21.9Hz), 2.50(t,2H J = 7.3+7.6Hz), 2.06(m,2H), 1.44(m, 6H);¹³C NMR 213.04, 119.16, 70.28, 44.57, 32.10, 20.20, 15.21, 13.93;MS: 226.51(M+Na)⁺, 242.51(M+K)⁺。

[0550] S-(+)-4-甲基二硫代-戊酸(19):向含有 S-4-O-乙基黄原酸-戊腈(18, 1.95g(9.61mmol))的乙醇(10ml)和水(150ml)的混合物的溶液中,加入 5.0g NaOH。在氩气氛下,回流反应混合物过夜。冷却混合物至室温,用水(150ml)稀释,用 1:1 的 EtOAc/己烷(2x100ml)萃取。用 H₃PO₄ 酸化水层至 pH2.5-3.0,并用 EtOAc(6x75ml)萃取。合并有机层,用 MgSO₄ 干燥,过滤和蒸发至干燥,得到粗产物 S-4-巯基戊酸。将粗产物直接用于下

一步骤而不需进一步纯化。

[0551] 在 0℃, 在 45 分钟的时间内, 向粗提的 S-4- 巯基戊酸 (1.2g) 溶于乙醇 (50ml) 和 0.5M NaH₂PO₄pH7.0 (75mL) 的混合物的溶液中, 滴加含有甲基甲硫醇磺酸酯 (1.47g, 11.65mmol) 的 5 无水 TNF (5ml)。在 0℃, 在氩气氛下搅拌 30 分钟之后, 浓缩混合物并用二氯甲烷 (2x50ml) 萃取。用 H₃PO₄ 酸化水层至 pH2.5-3.0, 并用 EtOAc (4x100ml) 萃取。合并有机层, 用 MgSO₄ 干燥, 过滤和蒸发。经硅胶层析纯化残留物, 用 (1 : 100 : 400 的 HOAc / EtOAc / 己烷) 洗脱, 得到 1.43g (83%) 的标题产物 19。R_f = 0.32 (1 : 100 : 400 的 HOAc / EtOAc / 己烷); ¹H NMR (CDCl₃) 2.91 (ddd, 1H, J = 6.8, 13.7, 20.5Hz), 2.53 (t, 2H, J = 7.7+7.4Hz), 2.42 (s, 3H), 1.94 (m, 2H), 1.36 (d, 3H, J = 6.8Hz); ¹³C NMR 179.18, 45.35, 31.58, 30.73, 24.70, 21.05; MS : 202.92 (M+Na)⁺, 203.91 (M+1+Na)⁺; [α] = 41.35 (c = 2, CH₃OH)。

[0552] N- 甲基 -N-[4-(S)- 甲基二硫代 -L- 氧代戊基]-S- 丙氨酸 (15a): 用上面针对化合物 14 而描述的方法, 将 S-(+)-4-(甲基二硫代)- 戊酸 (19) 转变为 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 20。通过上面针对化合物 15 而描述的方法, 与 N- 甲基 -L- 丙氨酸反应, 得到 15a, (产率是 62%)。H¹NMR δ 1.36 (3H, d, J = 7), 1.42 (3H, d, J = 7), 1.93-1.98 (2H, m), 2.40 (3H, s), 2.50-2.53 (2H, m), 2.90-2.95 (1H, m), 2.99 (3H, s), 5.14 (1H, q, J = 7), MS : (M+Na) 计算值 : 288.1, 实测值 : 288.1。

[0553] N^{2'}- 脱乙酰 -N^{2'}-(4-(S)- 甲基二硫代 -L- 氧代戊基)- 美登素 (DM3-SMe, 4g, h): 如上述的 4c 的合成, 应用含有 DCC 和氯化锌的二氯甲烷, 连接美登醇 (11) 和 15a。获得带有 N- 甲基 -S- 丙氨酰部分 (4g, S, S) 和 N- 甲基 -R- 丙氨酰部分 (4h, R, S) 的 2 种非对映异构体的混合物。用己烷 : 乙酸乙酯 : 2- 丙醇 (68 : 24 : 8, v / v / v) 进行等强度洗脱, 流速是 1mL / min, 通过 Kromasil 氰柱 (4.6mm x 250mm) 上的 HPLC 分离非对映异构体。在这些条件下, 异构体 4g(S, S) 在 24.5 分钟时被洗脱出来。质谱 : m / z 834.2 (M+Na)⁺。在 34.6 分钟时, 另一异构体 4h(R, S) 的峰被很好地分离和洗脱出来。MS : m / z 834.2 (M+Na)⁺。

[0554] 实施例 4

[0555] 美登素类 4k, 1 的合成 (图 3d)

[0556] S-1,3- 二 -O- 对甲苯磺酰 - 丁烷 22 : 在 0℃, 在氩气氛下, 用对甲苯磺酰氯 (12.70g, 66.84mmol) 处理 S-(-)-1,3- 丁二醇 (21, 2.00g (22.22mmol)) 溶于无水吡啶 (40ml) 和无水甲苯 (60ml) 混合物的溶液。在 0℃ 下搅拌 5 分钟后, 室温搅拌 2 小时, 在真空下蒸发混合物。将残留物在乙酸乙酯中再溶解, 用 0.1M 含水 NaHCO₃ 和饱和 NaCl 洗涤。分离有机层, 用 MgSO₄ 干燥, 过滤并蒸发。通过硅胶层析纯化残余物, 用 1 : 2 乙酸乙酯 / 己烷洗脱, 得到 6.25g (71%) 的标题产物 22。R_f = 0.40 (1 : 1EtOAc / 己烷); ¹H NMR (CDCl₃) 7.76 (dd, 4H, J = 1.0, 8.0Hz), 7.35 (dt, 4H, J = 0.4, 8.0+8.0Hz), 4.70 (m, 1H), 4.03 (m, 1H), 3.94 (m, 1H), 2.46 (s, 6H), 1.92 (m, 2H), 1.26 (d, 3H, J = 6.3Hz); ¹³C NMR 145.17, 133.00, 130.11, 128.12, 127.91, 76.28, 66.21, 36.08, 21.86, 21.06; MS : 420.99 (M+Na)⁺。

[0557] R-4-O- 乙基黄原酸 - 戊腈 (23): 用 NaCN (0.85g) 处理 S-1,3- 二 -O- 对甲苯磺酰 - 丁烷 (22, 6.25g (15.70mmol)) 在 60 无水 DMSO (50mL) 中的溶液。在氩气氛下, 室温搅拌反应混合物 18 小时。然后, 用乙酸乙酯稀释反应混合物, 连续用冷的 pH7.5 的 1.0M

NaH_2PO_4 、水和 pH4.0 的 1.0M NaH_2PO_4 洗涤。用 MgSO_4 干燥有机层,过滤,蒸发,得到 3.62g 粗产物 S-3-O- 对甲苯磺酰 - 戊腈。直接应用产物而不需进一步纯化。

[0558] 向含有粗产物 S-3-O- 对甲苯磺酰 - 戊腈 (3.62g) 的乙醇 (50ml) 溶液中,加入含有 O- 黄原酸乙酯钾 (5.72g) 的乙醇 (100ml)。在氩气氛下搅拌过夜之后,浓缩混合物,用乙酸乙酯稀释,并经过短的硅胶柱过滤。浓缩洗脱物并经硅胶层析纯化残余物,用 1 : 4 的 EtOAc / 己烷洗脱,得到 2.0g 的标题产物 23 (62%, 2 步)。 $R_f = 0.40$ (1 : 4EtOAc / 己烷)。 ^1H NMR(CDCl_3) 4.67 (dd, 2H, $J = 7.1, 14.2\text{Hz}$), 3.86 (ddd, 1H, $J = 7.0, 14.0, 21.9\text{Hz}$), 2.50 (t, 2H $J = 7.3+7.6\text{Hz}$), 2.06 (m, 2H), 1.44 (m, 6H); ^{13}C NMR 213.04, 119.16, 70.28, 44.57, 32.10, 20.20, 15.21, 13.93; MS : 226.51 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺, 242.51 ($\text{M}+\text{K}$)⁺。

[0559] R-(-)-4- 甲基二硫代 - 戊酸 (24) : 用 NaOH (6.0g) 处理含有 R-4-O- 乙基黄原酸 - 戊腈 (23, 2.0g (9.85mmol)) 的乙醇 (10ml) 和水 200ml 的混合物的溶液。在氩气氛下,回流反应混合物过夜。用水 (150ml) 稀释混合物并用 1 : 1 的 EtOAc / 己烷 (2x100ml) 萃取。用 H_3PO_4 酸化水层至 pH2.5-3.0, 并用 EtOAc (6x75ml) 萃取。合并有机层,经 MgSO_4 干燥,过滤和蒸发至干燥,得到粗产物 R-4- 巯基戊酸。将粗产物直接用于下一步骤而不需进一步纯化。

[0560] 在 0°C, 在 45 分钟的时间内,向含有 1.60g 粗提的 R-4- 巯基戊酸的乙醇 (50ml) 和 0.5M NaH_2PO_4 pH7.0 (75mL) 的混合物的溶液中,滴加含有甲基甲硫醇磺酸酯 (1.96g, 15.53mmol) 的无水 TNF (7ml)。在 0°C, 在氩气氛下搅拌反应混合物 30 分钟,然后在室温下搅拌反应混合物 2 小时。浓缩混合物并用二氯甲烷 (2x50ml) 萃取。用 H_3PO_4 酸化水层至 pH2.5-3.0, 用 EtOAc (4x100ml) 萃取。合并有机层,经 MgSO_4 干燥,过滤和蒸发。经硅胶层析纯化残留物,用 (1 : 100 : 400 的 HOAc / EtOAc / 己烷) 洗脱,得到 1.65g (93%) 的标题产物 24。 $R_f = 0.32$ (1 : 100 : 400 的 HOAc / EtOAc / 己烷); ^1H NMR(CDCl_3) 2.91 (ddd, 1H, $J = 6.8, 13.7, 20.4\text{Hz}$), 2.53 (t, 2H, $J = 7.7+7.4\text{Hz}$), 2.42 (s, 3H), 1.96 (m, 2H), 1.36 (d, 3H, $J = 6.8\text{Hz}$); ^{13}C NMR 179.46, 45.67, 31.91, 31.07, 25.02, 21.36; MS : 202.9 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺, 203.9 ($\text{M}+1+\text{Na}$)⁺; $[\alpha] = -39.16$ (c = 2, CH_3OH)。

[0561] N- 甲基 -N-[4-(R)- 甲基二硫代 -1- 氧代戊基] -S- 丙氨酸 (15b) : 用上述的针对化合物 14 的方法,将 R-(+)-4-(甲基二硫代) - 戊酸 (24) 转变为 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 25。通过上述针对化合物 15 的方法,与 N- 甲基 -L- 丙氨酸反应,得到 15b。 MS : m/z ($\text{M}+\text{Na}$) : 计算值 : 288.1, 实测值 : 288.1。

[0562] N^2 - 脱乙酰 - $\text{N}^{2'}$ - (4-(R)- 甲基二硫代 -1- 氧代戊基) - 美登素 (DM3-SMe, 4k, 1) : 如上述的 4c 的合成,应用溶于二氯甲烷中的 DCC 和氯化锌,连接美登醇 (11) 和 15b。获得带有 N- 甲基 -S- 丙氨酸部分 (4k, S, R) 和 N- 甲基 -R- 丙氨酸部分 (41, R, R) 的 2 种非对映异构体的混合物。用己烷 : 乙酸乙酯 : 2- 丙醇 (68 : 24 : 8, v/v/v) 等强度洗脱,在 Kromasil 氰柱 (4.6mm x 250mm) 上经 HPLC 分离非对映异构体,流速是 1mL/min。在这些条件下,异构体 4k (S, R) 在 23.9 分钟时被洗脱出来。质谱 : m/z 834.2 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺。在 33.7 分钟时,另一异构体 41 (R, R) 的峰被很好地分离和洗脱出来。 MS : m/z 834.2 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺。

[0563] 实施例 5a

[0564] 美登素类和抗体 - 美登素类偶联物的体外细胞毒性

[0565] KB (ATCC CCL-17) 细胞系是人上皮来源。 SK-BR-3 (ATCC HTB-30) 细胞系是由人

乳腺癌建立的。人结肠肿瘤细胞系 COLO205(ATCC CCL-222) 和 HT-29(ATCC HTB38)、人黑素瘤细胞系 A-375(ATCC CRL1619)、人伯基特淋巴瘤细胞系 Ramos(ATCC CRL-1596) 和人骨髓性白血病细胞系 HL60(ATCC CCL-240) 均是从马里兰州的 ATCC 获得的。细胞系是在带有 L- 谷氨酰胺的 Dulbecco' s modified Eagles Medium(DMEM, Biowhittaker, Walkersville, MD) 中生长的, 培养基中补充有 10% 的胎牛血清 (Hyclone, Logan, Utah) 和 $50 \mu\text{g/ml}$ 的硫酸庆大霉素 (LifeTechnologies, Rockville, MD)。在含有 6% CO_2 的潮湿气氛中, 于 $36-37.5^\circ\text{C}$ 保持细胞。

[0566] 进行的细胞毒性研究应用的是克隆形成试验 (clonogenic assay)。以每孔 1000 个细胞的固定数值, 将测试细胞系铺在 6 孔培养皿中。用各种美登素类 (游离的或者偶联于抗体的) 的各种浓度 (0 至 3nm) 温育细胞 72 小时。然后, 从板中吸出培养基并放置新鲜的培养基。让培养物生长并形成集落, 铺板后, 维持 7-10 天。然后, 用溶于 10% 福尔马林/PBS 的 0.2% 结晶紫固定并染色培养物, 计集落数。用数出的集落数目除以被铺的细胞数目, 确定出非处理细胞 (单独的培养基) 的铺板效率。用暴露于药物的孔中的集落数除以对照孔中的集落数, 确定出暴露于药物的细胞的存活分数。

[0567] 图 4 显示了本发明的新的美登素类的体外细胞毒性测定结果。对于被测试的细胞系, SK-BR-3 和 A-375, 带有具有位阻的二硫键的新的美登素类 4c, e 均是高度细胞毒性的, IC_{50} 值的范围是从 $7 \times 10^{-12}\text{M}$ 至 $2.5 \times 10^{-11}\text{M}$ 。因此, 在带有二硫化物部分的碳上引入烷基取代基, 保持了高的细胞毒力。本发明的含具有空间位阻的硫醇的美登素类 4a, 比以前描述的相应的非位阻美登素类 1 的效力大 30 至 50 倍。因此, 在带有硫醇部分的碳上引入烷基取代基大大增加了效力。

[0568] 图 4c 和 4d 中显示了本发明的美登素类的抗体偶联物的体外测试结果。在针对人结肠肿瘤的 huC242 抗体上连接两种新的美登素类, 4a 或 4b, 导致对靶细胞的抗原特异性杀伤。因此, 这些偶联物对于抗原阳性 COLO205 细胞是高度有效的, IC_{50} 值的范围是从 $1.1 \times 10^{-11}\text{M}$ 至 $1.3 \times 10^{-11}\text{M}$ 。与之对照, 这些偶联物对抗原阴性的 A-375 细胞的细胞毒性要小 100 至 250 倍, 这说明, 本发明的新的美登素类产生拥有具有空间位阻的二硫键的偶联物, 它们显示出高度的靶向特异性的细胞毒性。

[0569] 实施例 5b

[0570] 用美登素类 4a 或 4b 制备 huC242 抗体的细胞毒性偶联物 (方法 A, 图 5a, b)

[0571] 将 huC242 抗体 (8mg/ml) 在 pH6.5 的含水缓冲液 (50mM 磷酸钾、 50mM 氯化钠、 2mM 乙二胺四乙酸二钠盐) 中的溶液, 与 7 至 10 倍的过量摩尔数的 SPDP[琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫)-丙酸酯, 3a], 或与 N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫)-丁酸酯 (SPDB, 3b) 温育。反应混合物通过 Sephadex G25 凝胶过滤柱而被纯化。应用抗体的已知的消光系数 $\epsilon_{280\text{nm}} = 217,560\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 用分光光度法测定抗体浓度。

[0572] 用 pH6.5 的含水缓冲液 (50mM 磷酸钾、 50mM 氯化钠、 2mM 乙二胺四乙酸二钠盐) 稀释修饰的抗体至 2.5mg/ml , 然后用二甲基乙胺中的 1.5 至 2.5 倍过量摩尔数的 DM3 或 DM4 处理 (DMA 的终浓度是 3% v/v)。在室温下温育反应混合物 18 小时。经过 Sephadex G25 凝胶过滤柱纯化反应混合物。应用抗体的已知消光系数 $\epsilon_{280\text{nm}} = 217,560\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 和 $\epsilon_{252\text{nm}} = 80,062\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; DM3 或 DM4 的已知消光系数 $\epsilon_{280\text{nm}} = 5,700\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 和 $\epsilon_{252\text{nm}} = 26,790\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 用分光光度法测定偶联物的浓度。得到的偶联物是单体的, 并且, 平均每个抗体分子连接有

3. 2-3. 5 个 DM3 或 DM4。

[0573] 实施例 5c

[0574] 用美登素类 4a 或 4b 制备 huC242 抗体的细胞毒性偶联物（方法 B, 图 5c）

[0575] 将 huC242 抗体 (8mg/ml) 在 pH6.5 的含水缓冲液 (50mM 磷酸钾、50mM 氯化钠、2mM 乙二胺四乙酸二钠盐) 中的溶液, 与 7 至 10 倍的过量摩尔数的 SMCC[琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸酯, 26] 温育 2 小时。经过 Sephadex G25 凝胶过滤柱纯化反应混合物。用抗体的已知消光系数 $\epsilon_{280\text{nm}} = 217,560\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 用分光光度法测定抗体浓度。

[0576] 用 pH6.5 的含水缓冲液 (50mM 磷酸钾、50mM 氯化钠、2mM 乙二胺四乙酸二钠盐) 稀释修饰的抗体至 2.5mg/ml, 然后用二甲基乙胺中的 1.5 至 2.5 倍过量摩尔数的 DM3 或 DM4 处理 (DMA 的终浓度是 3% v/v)。在室温下温育反应混合物 18 小时。经过 Sephadex G25 凝胶过滤柱纯化反应混合物。应用已知的消光系数 (对于抗体, $\epsilon_{280\text{nm}} = 217,560\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 和 $\epsilon_{252\text{nm}} = 80,062\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; 对于 DM3 或 DM4, $\epsilon_{280\text{nm}} = 5,700\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 和 $\epsilon_{252\text{nm}} = 26,790\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 用分光光度法测定偶联物的浓度。得到的偶联物是单体的, 并且, 平均每个抗体分子连接有 3. 2-3. 5 个 DM3 或 DM4。

[0577] 实施例 5d

[0578] 用美登素类 4a 或 4b 制备 huC242 抗体的细胞毒性偶联物（方法 C, 图 5d）

[0579] 将 huC242 抗体 (8mg/ml) 在 pH6.5 的含水缓冲液 (50mM 磷酸钾、50mM 氯化钠、2mM 乙二胺四乙酸二钠盐) 中的溶液, 与 7 至 10 倍的过量摩尔数的 SIAB[N-琥珀酰亚胺基 4-(碘乙酰)-氨基苯甲酸酯, 27] 温育 2 小时。经过 Sephadex G25 凝胶过滤柱纯化反应混合物。用抗体的已知消光系数 $\epsilon_{280\text{nm}} = 217,560\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 用分光光度法测定抗体浓度。

[0580] 实施例 6

[0581] huC242-美登素类偶联物在体内抵抗 HT-29 异种移植物的效率

[0582] 五周龄的雌性 SCID 鼠 (20 只动物) 右侧皮下接种 HT-29 人结肠癌细胞 (1.5×10^6 细胞 / 鼠), 所述细胞溶于 0.1ml 的无血清培养液中。让肿瘤生长 11 天至平均体积为 100mm^3 。然后, 将动物随机分为四组 (每组五只动物)。第一组接受静脉给予的 huC242-DM1 偶联物 (DM1 的剂量是 $75 \mu\text{g/kg}$, qd x5)。第二组接受静脉给予的 huC242-DM3 偶联物 (DM3 的剂量是 $75 \mu\text{g/kg}$, qd x5)。第三组接受静脉给予的 huC242-DM4 偶联物 (DM4 的剂量是 $75 \mu\text{g/kg}$, qd x5), 第四组动物作为对照组并接受 PBS, 处理方案与组 1-3 中的方案相同。

[0583] 每周两次测定肿瘤的体积, 用公式: 肿瘤体积 = $1/2 \times (\text{长} \times \text{宽} \times \text{高})$ 计算肿瘤体积。动物的体重也是每周测定两次。结果显示在图 7 中。小鼠对照组的肿瘤在 35 天时生长至接近 1000mm^3 的体积。用 huC242-DM1 处理, 导致肿瘤生长延迟 18 天, 而用本发明的美登素类 4a 和 4b 制成的偶联物显著地更有效, 分别延迟肿瘤生长至 28 天和 36 天。

[0584] 实施例 7

[0585] huC242-美登素类偶联物在体内抵抗 COLO205 异种移植物的效率

[0586] 五周龄的雌性 SCID 鼠 (20 只动物) 右侧皮下接种 COLO205 人结肠癌细胞 (1.5×10^6 细胞 / 鼠), 所述细胞溶于 0.1ml 的无血清培养基中。让肿瘤生长 11 天至平均体积为 100mm^3 。然后, 将动物随机分为四组 (每组五只动物)。第一组接受静脉给予的 huC242-DM1 偶联物 (DM1 的剂量是 $75 \mu\text{g/kg}$, qd x5)。第二组接受静脉给予的 huC242-DM3

偶联物 (DM3 的剂量是 $75 \mu\text{g/kg}$, qd x5)。第三组接受静脉给予的 huC242-DM4 偶联物 (DM4 的剂量是 $75 \mu\text{g/kg}$, qd x5), 而第四组动物作为对照组接受 PBS, 处理方案与组 1-3 中的方案相同。

[0587] 每周两次测定肿瘤的体积, 用公式: 肿瘤体积 = $1/2(\text{长} \times \text{宽} \times \text{高})$ 计算肿瘤体积。动物的体重也是每周测定两次。结果显示在图 8 中。小鼠对照组的肿瘤在 24 天时生长至接近 900mm^3 的体积。用 huC242-DM1 处理, 导致肿瘤生长延迟 20 天, 而用本发明的美登素类 4a 制成的偶联物显著地更有效, 引起持续 45 天的完全肿瘤消退。用本发明的美登素类 4b 制成的偶联物甚至更有效, 导致所有被治疗动物痊愈。

[0588] 实施例 8

[0589] MY9-6- 美登素类偶联物在体内抵抗 HL-60 异种移植物的效率

[0590] 五周龄的雌性 SCID 鼠 (20 只动物) 右侧皮下接种 HL-60 人骨髓性白血病细胞 (1.5×10^6 细胞 / 小鼠), 所述细胞溶于 0.1ml 的无血清培养基中。让肿瘤生长 12 天至平均体积为 100mm^3 。然后, 将动物随机分为四组 (每组五只动物)。第一组接受静脉给予的 MY9-6-DM1 偶联物 (DM1 的剂量是 $200 \mu\text{g/kg}$, qd x5)。第二组接受静脉给予的 MY9-6-DM3 偶联物 (DM3 的剂量是 $200 \mu\text{g/kg}$, qd x5)。第三组接受静脉给予的 MY9-6-DM4 偶联物 (DM4 的剂量是 $200 \mu\text{g/kg}$, qd x5), 而第四组动物作为对照组接受 PBS, 处理方案与组 1-3 中的方案相同。

[0591] 每周两次测定肿瘤的体积, 用公式: 肿瘤体积 = $1/2(\text{长} \times \text{宽} \times \text{高})$ 计算肿瘤体积。动物的体重也是每周测定两次。结果显示在图 9 中。小鼠对照组的肿瘤在 21 天快速生长至接近 1600mm^3 的体积。用 MY9-6-DM1 处理, 导致肿瘤生长延迟大约 5 天, 而用本发明的美登素类 4a 和 4b 制成的偶联物显著地更有效, 延迟肿瘤生长大于 20 天。

[0592] 实施例 9

[0593] 用美登素类 DM4 (4b) 制备 huMy9-6 抗体的细胞毒性偶联物

[0594] 在含有 2mM 乙二醇四乙酸 (缓冲液 A) 和 5% 乙醇的 pH6.5 550mM 磷酸钾溶液中, 将浓度为 8mg/ml 的 huMy9-6 抗体溶液与 6.5 倍过量摩尔数的 SSNPB [硫代琥珀酰亚胺 4-(5' - 硝基 -2' - 吡啶基二硫代) 丁酸酯] 温育。修饰的抗体通过用缓冲液 A 平衡的 Sephadex G25 凝胶过滤柱而被纯化, 纯化抗体的浓度利用抗体在 280nm 处的消光系数, 用分光光度法测定。用缓冲液 A 将修饰的抗体稀释至 4.9mg/ml, 并用 1.7 倍过量摩尔数的 DM4 室温温育 18 小时, DM4 是以二甲基乙胺中的储存液形式被加入反应混合物中的 (二甲基乙胺的终浓度是 3% v/v)。经过用 pH6.5 的 PBS 平衡的 Sephadex G25 柱, 纯化抗体 - 药物偶联物。用抗体和 DM4 的已知消光系数 (对于抗体, $\epsilon_{280\text{nm}} = 206,460\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{252\text{nm}} = 72,261\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; 对于 DM4, $\epsilon_{280\text{nm}} = 5,700\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{252\text{nm}} = 26,790\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 用分光光度法测定偶联物的浓度。得到的抗体 - 药物偶联物中, 每个抗体分子平均有 3.6 个 DM4 分子。生物化学分析证明, 抗体在偶联后维持有大于 94% 的单体并具有结合亲和性, 这是与未被修饰的抗体相比较而言的, 这可以利用流式细胞仪来测定。通过 HPLC 分析来测定没有共价地连接于抗体的药物 (游离药物) 的量, 发现其不到所有连接药物的 1%。

[0595] 实施例 10

[0596] huMy9-6-DM4 偶联物的体外选择性和效应

[0597] 用集落形成分析来检测 huMy9-6-DM4 对 CD33 表达细胞 (HL-60) 和 CD33 阴性

Namalwa 细胞的细胞毒性,其中细胞杀伤活性是通过处理后可以生长的集落数目进行定量而确定的。对于 CD-33 阳性 HL-60 人肿瘤细胞, huMy9-6-DM4 显示了体外有效的细胞杀伤活性(图 10)。对于 CD33 阴性人 Namalwa 细胞,没有观察到明显的细胞毒性,这提示, CD33- 依赖性细胞毒性归因于偶联物的抗 -CD33 抗体 huMy9-6 的特异性靶向作用。

[0598] 实施例 11

[0599] SCID 鼠中, huMy9-6-DM4 偶联物对抗 HL60 人肿瘤异种移植物的体内效应

[0600] 在带有人 HL-60 肿瘤异种移植物的 SCID 鼠中,测定了 huMy9-6-DM4 的体内效应。皮下注射 HL-60 细胞,让肿瘤生长至平均体积为 100mm^3 。经静脉输送 huMy9-6-DM4,每日一次,持续 5 天,剂量是图 11 中指出的剂量。剂量是用偶联物中的 DM4 的微克数来表示的,对应地,每 μg DM4 有大约 $67\mu\text{g}$ 的抗体剂量。测量肿瘤体积,将其作为治疗效果的指示物,并监测鼠的体重,以表示治疗造成的毒性。在几乎不引起毒性的剂量下, huMy9-6-DM4 诱导人 HL-60 细胞异种移植物的肿瘤生长延迟时间延长(图 11)。也比较了 huMy9-6-DM4 的效应和 huMy9-6-DM1 的效应。出乎意料的是,发现 huMy9-6-DM4 比 huMy9-6-DM1 更有效。 huMy9-6-DM4 维持动物的完全缓解(CR)几乎达 60 天,而用 huMy9-6-DM1 处理的动物在大约 20 天的 CR 之后复发。

[0601] 实施例 12

[0602] 用美登素类 DM4(4b) 制备 huB4 抗体的细胞毒性偶联物

[0603] 在含有 2mM 乙二醇四乙酸(缓冲液 A)和 5%的二甲基乙酰胺的 pH6.5 的 50mM 磷酸钾缓冲液中,将浓度为 20mg/ml 的 huB4 抗体溶液与 8 倍过量摩尔数的 SSNPB[磺基琥珀酰亚胺 4-(5'-硝基-2'-吡啶基二硫代)丁酸酯]温育。经过用缓冲液 A 平衡的 Sephadex G25 凝胶过滤柱,纯化修饰的抗体,并利用抗体在 280nm 处的消光系数 ($\epsilon_{280\text{nm}} = 199,560\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$),用分光光度法测定纯化的抗体的浓度。用缓冲液 A 将修饰的抗体稀释至 8mg/ml,并用 1.7 倍过量摩尔数的 DM4 室温温育 3 小时,DM4 是以二甲基乙酰胺中的储存液形式被加入反应混合物中的(二甲基乙酰胺的终浓度是 3% v/v)。经过用 pH6.5 的 PBS 缓冲液平衡的 Sephadex G25 柱和 Sephadex S300 柱,纯化抗体-药物偶联物。用抗体 ($\epsilon_{280\text{nm}} = 199,560\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{252\text{nm}} = 67,850\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 和 DM4 ($\epsilon_{280\text{nm}} = 5,700\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{252\text{nm}} = 26,790\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 的已知消光系数,用分光光度法测定偶联物的浓度。在得到的抗体-药物偶联物中,每个抗体分子平均有 4.0 个 DM4 分子。生物化学分析证明,抗体在偶联之后多于 98% 的维持为单体并具有结合亲和性,这是与未被修饰的抗体相比较而言的,这可以利用流式细胞仪来测定。通过 HPLC 分析来测定没有共价连接于抗体的药物(游离药物)的量,其为总连接药物的大约 2%。

[0604] 实施例 13

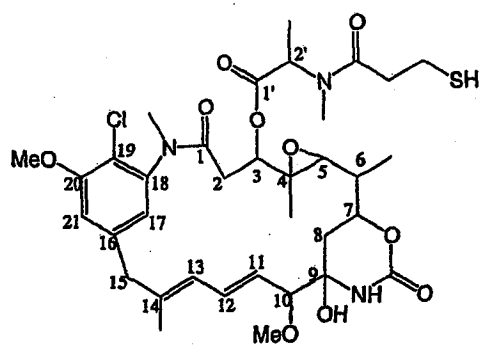
[0605] huB4-DM4 偶联物的体外选择性和效应

[0606] 应用基于 MTT 的分析,检测 huB4-DM4 对 CD-19 表达细胞(Ramos)和 CD-19 阴性细胞系(Colo205)的细胞毒性,其中细胞杀伤活性是通过用偶联物处理后残留的存活细胞数目进行定量而确定的。存活细胞数目是用活体染料 MTT 温育细胞后,经分光光度法定量测定的。在体外 HuB4-DM4 显示了对 CD-19 阳性 Ramos 人肿瘤细胞的有效细胞杀伤活性(图 12)。对于 CD-19 阴性细胞,没有观察到明显的毒性,这提示,CD-19 依赖性细胞毒性归因于抗 CD-19 抗体 huB4 的特异性靶向作用。

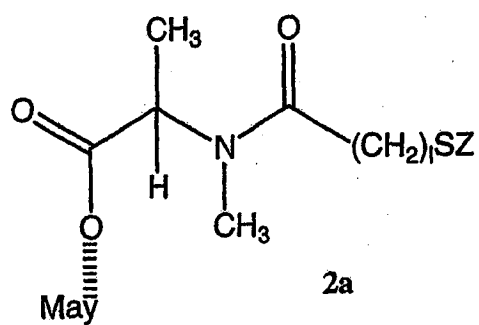
[0607] 实施例 14

[0608] SCID 鼠中, huB4-DM4 偶联物对抗 Ramos 人肿瘤异种移植物的体内效应

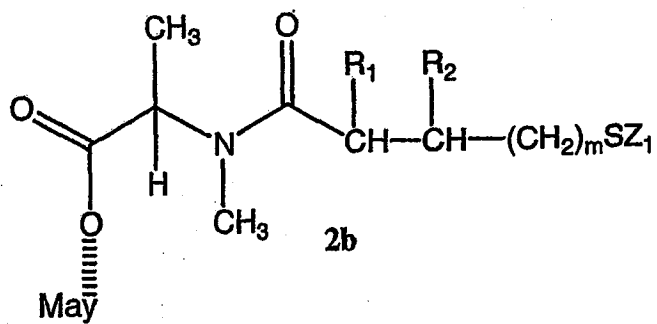
[0609] 使用带有已建立的人 Ramos 肿瘤异种移植物的 SCID 鼠, 测定 huB4-DM4 的体内效应。皮下注射 Ramos 细胞, 让肿瘤生长至平均体积为 100mm^3 。经静脉输送 huB4-DM4 偶联物, 单次注射, 剂量是图 13a 中指出的剂量。剂量被表示为偶联物中的 DM4 微克数, 其对应于每 μg DM4 大约 $44\mu\text{g}$ 抗体的抗体剂量。测量肿瘤体积, 将其作为治疗效果的指示物, 并监测小鼠的体重, 以提示治疗造成的毒性。在高于 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 的剂量, huB4-DM4 引起所有动物中肿瘤的完全消退。在 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 处理组中, 动物的没有可测到的疾病的状态维持了大约 35 天, 在两个最高剂量组中, 此状态维持了超过 55 天。如果是按照被处理的动物的体重变化来判定毒性的话, 则这些处理几乎不造成这样的变化 (图 13b)。



DM1 (1)



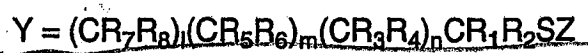
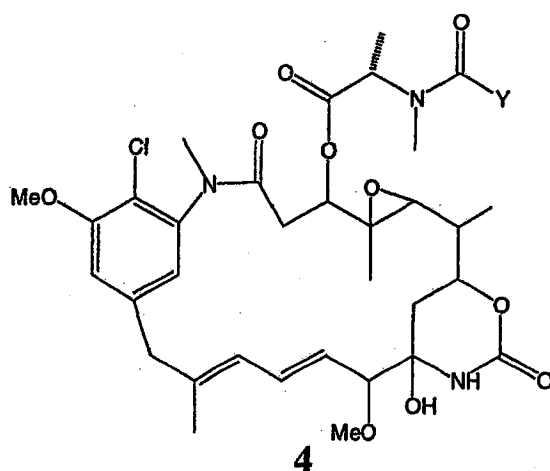
2a



2b

(May = 美登素类)

图 1



- DM3 (4a): $R_1, R_5, R_6, R_7, R_8 = H; R_2 = CH_3$
 $l = 1, m = 1, n = 0$
 $Z = H$
- DM3-SMe (4c): $R_1, R_5, R_6, R_7, R_8 = H; R_2 = CH_3$
 $l = 1, m = 1, n = 0$
 $Z = SCH_3$
- DM4 (4b): $R_5, R_6, R_7, R_8 = H; R_1, R_2 = CH_3$
 $l = 1, m = 1, n = 0$
 $Z = H$
- DM4-SMe (4e): $R_5, R_6, R_7, R_8 = H; R_1, R_2 = CH_3$
 $l = 1, m = 1, n = 0$
 $Z = SCH_3$

图 2

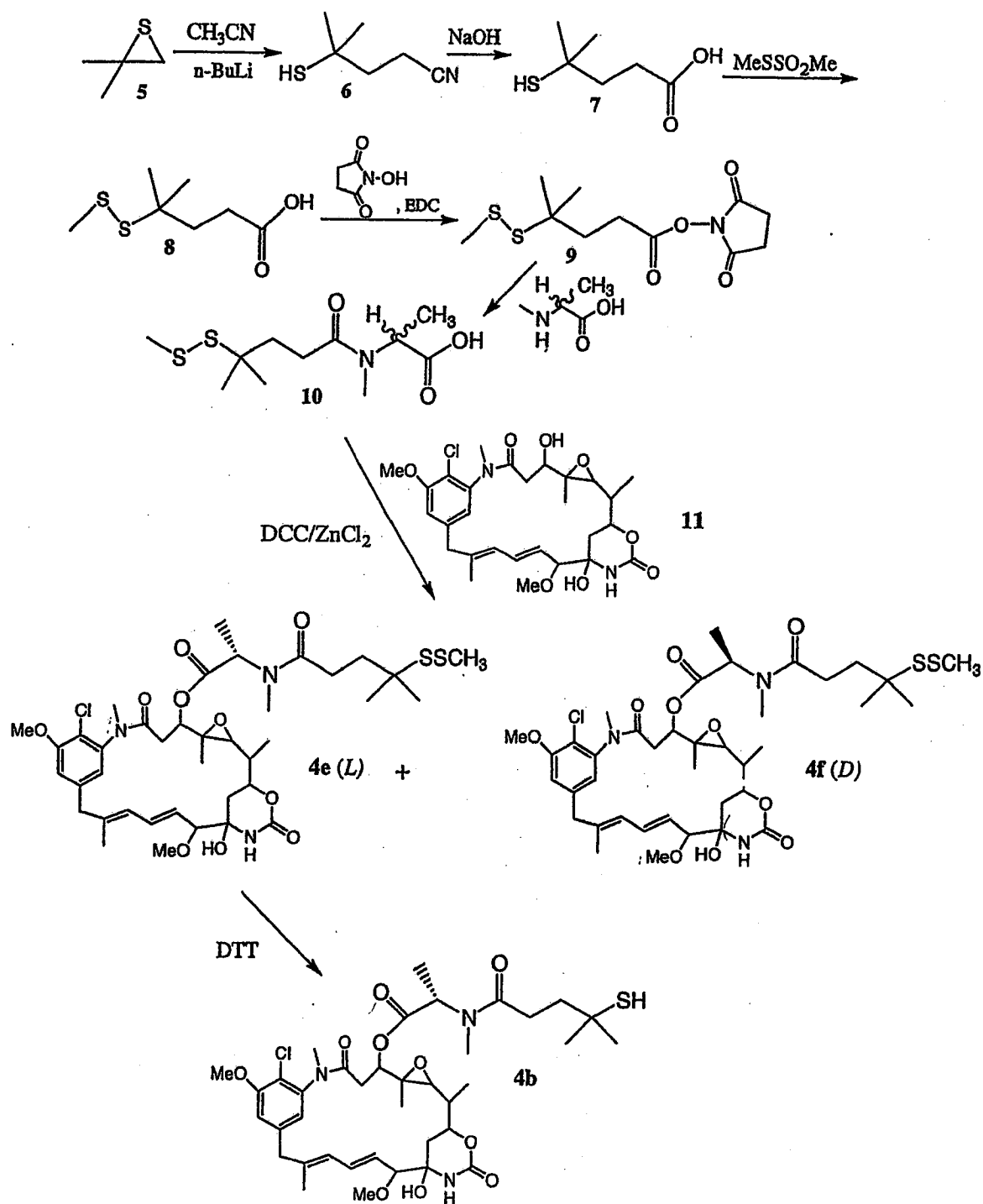


图 3a

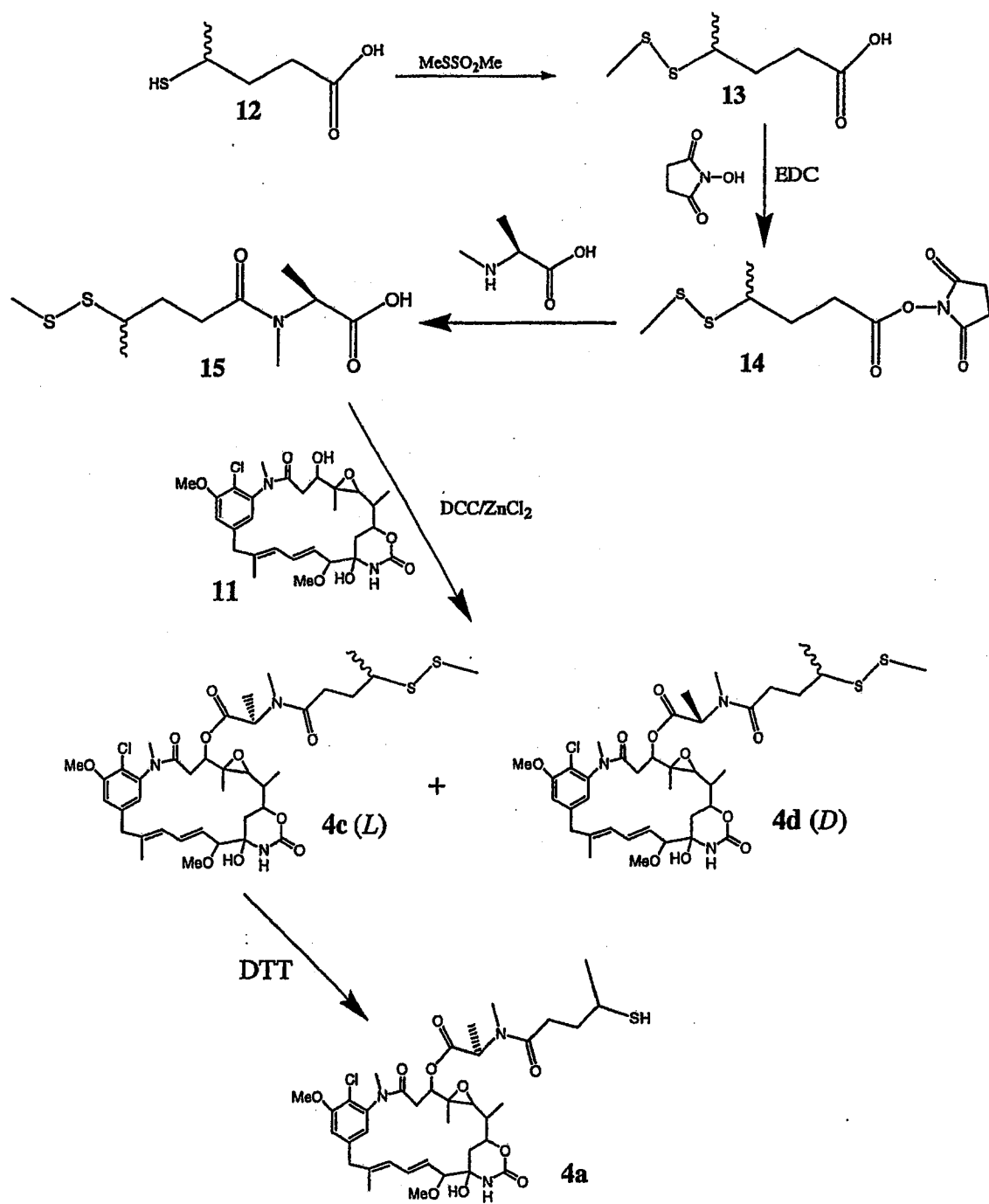


图 3b

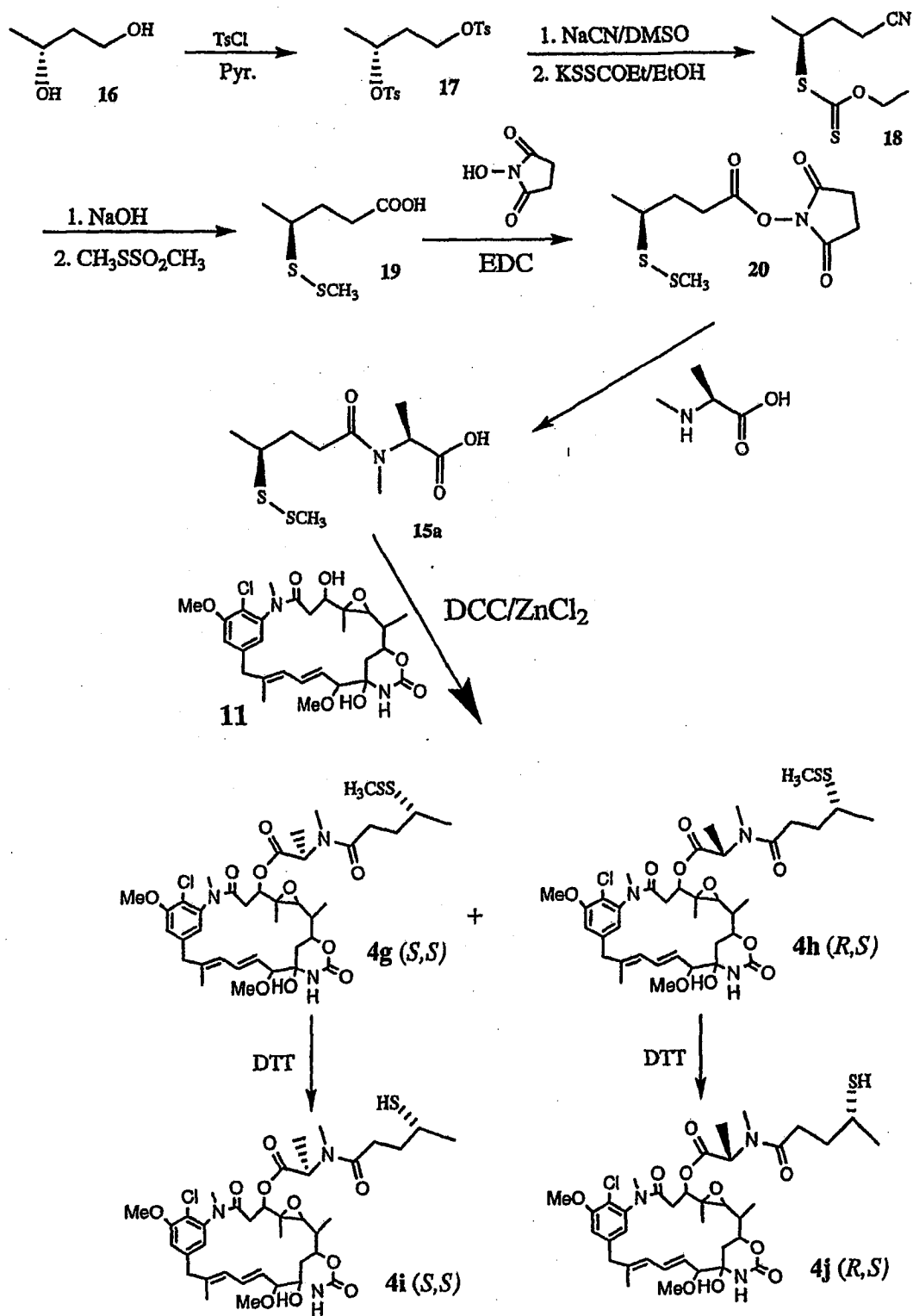


图 3c

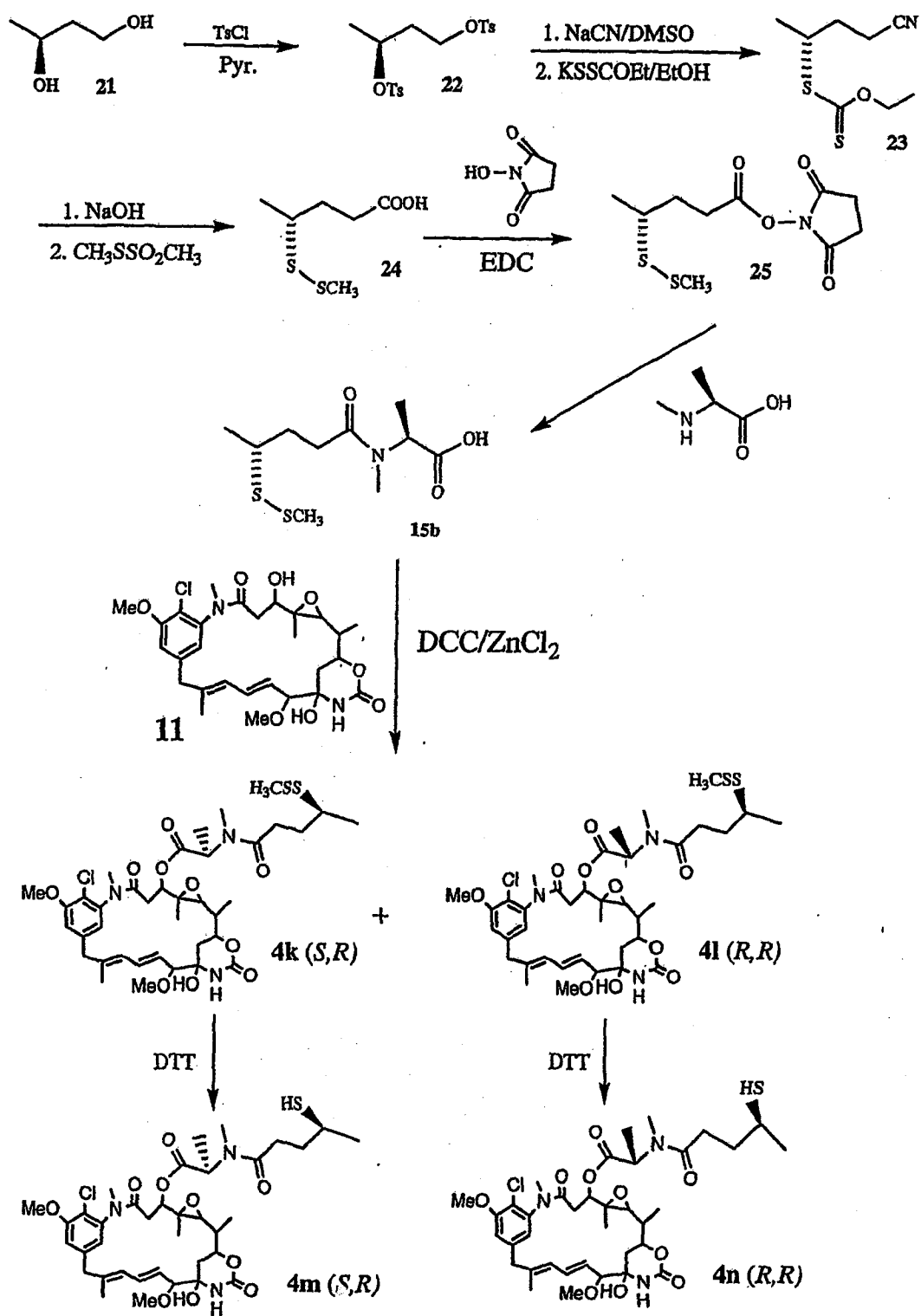
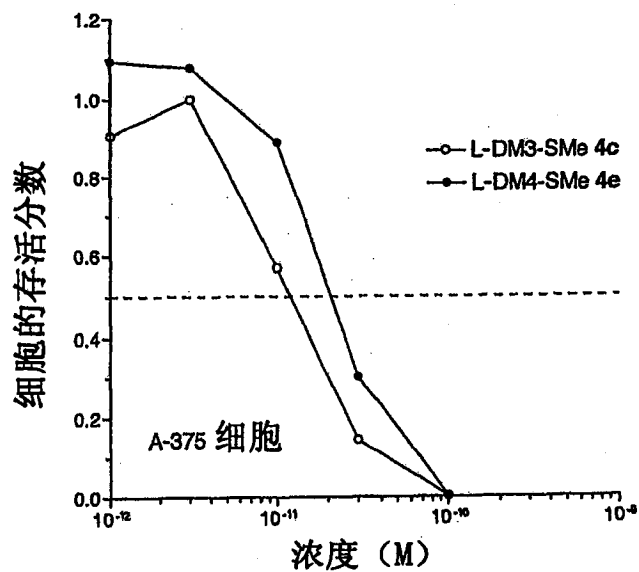


图 3d

a) 对A-375细胞的体外细胞毒性



b) 对SK-Br-3细胞的体外细胞毒性

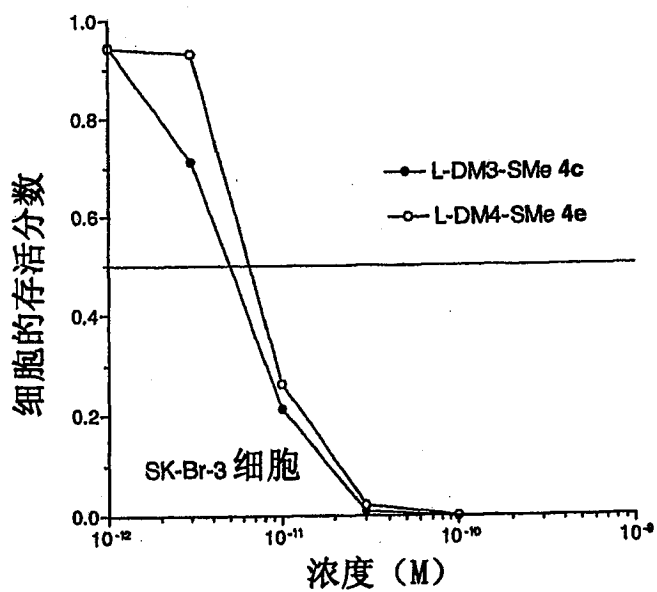
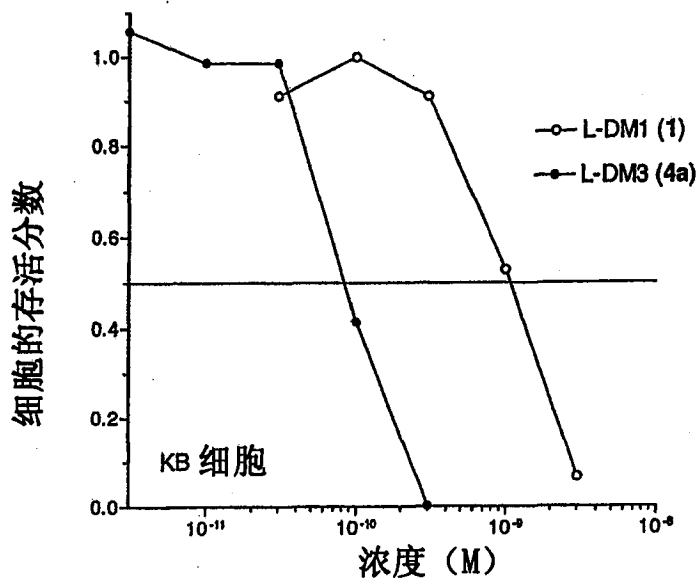


图 4

c) 对KB细胞的体外细胞毒性



d) 对SK-Br-3细胞的体外细胞毒性

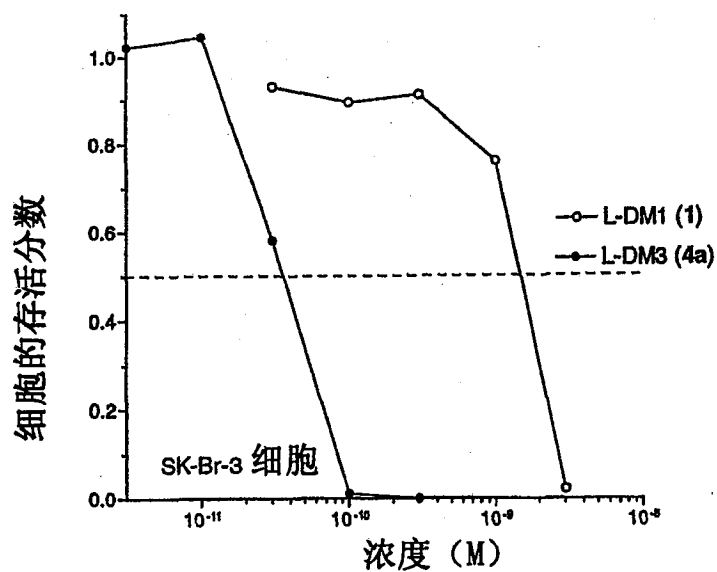


图 4

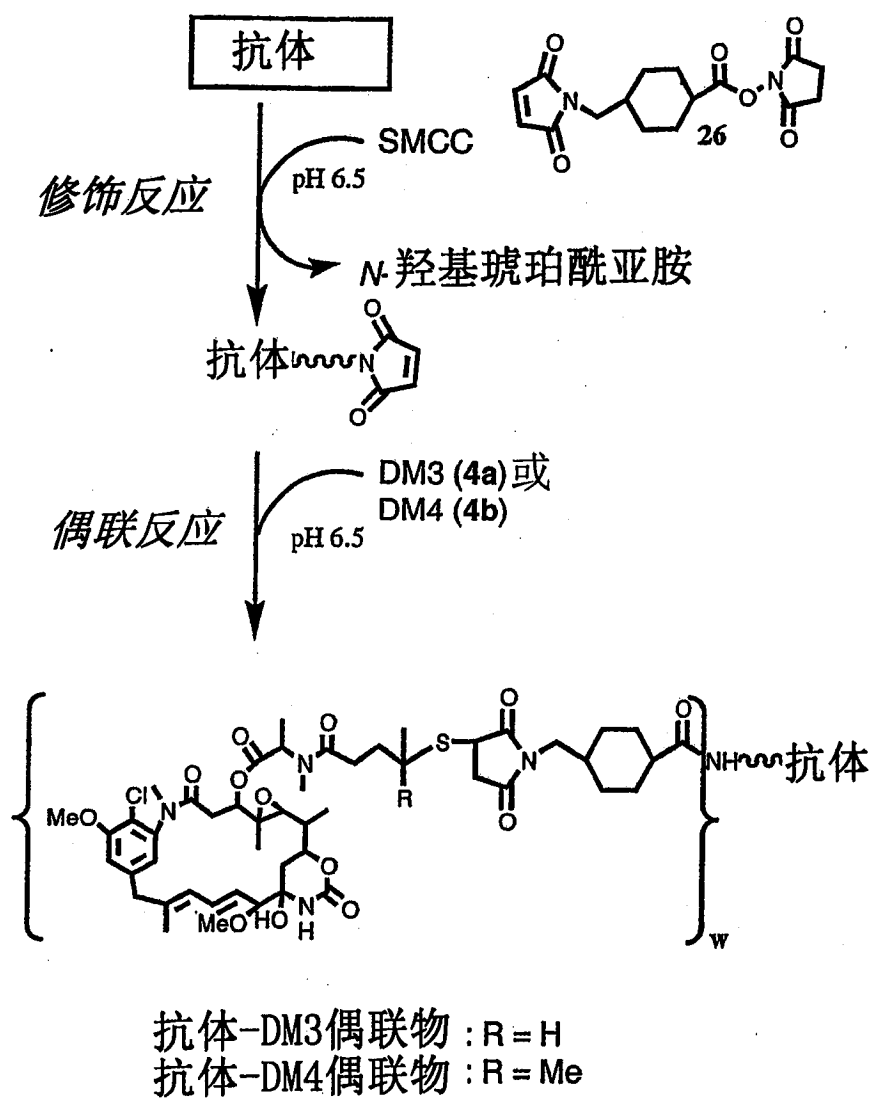


图 5c

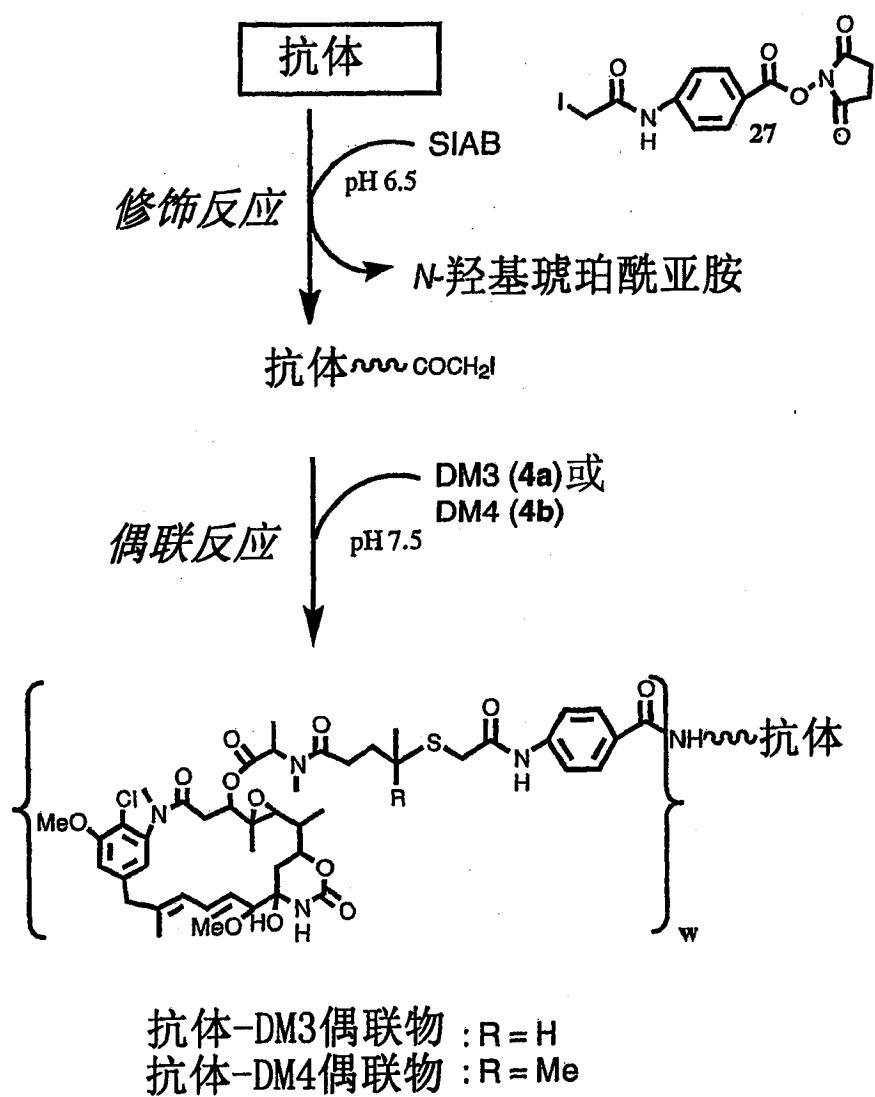


图 5d

a) huC242-DM3和huC242-DM4偶联物的体外细胞毒性和特异性

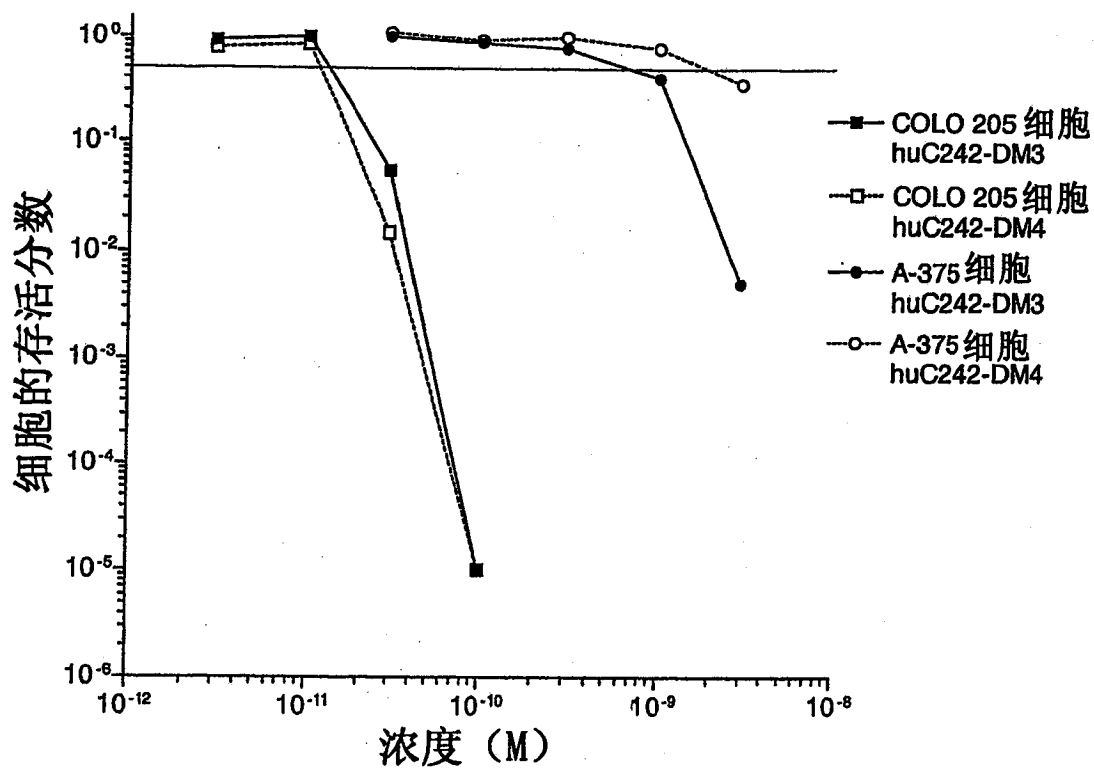


图 6

huC242-美登素类偶联物的体内效应 (HT-29异种移植)

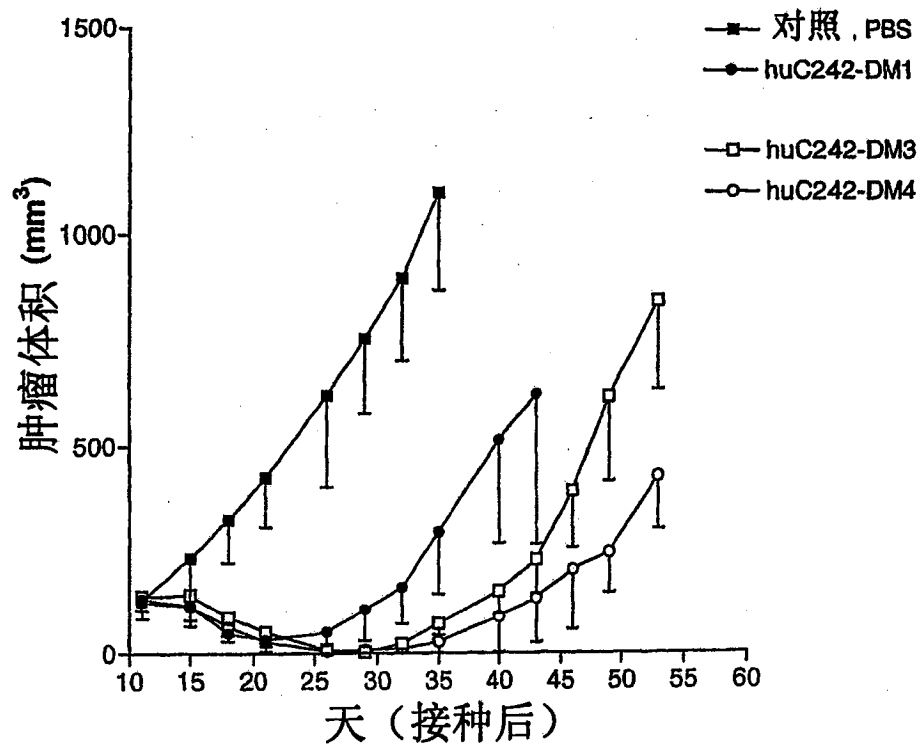


图 7

huC242-美登素类偶联物的体内效应
(COL0-205异种移植)

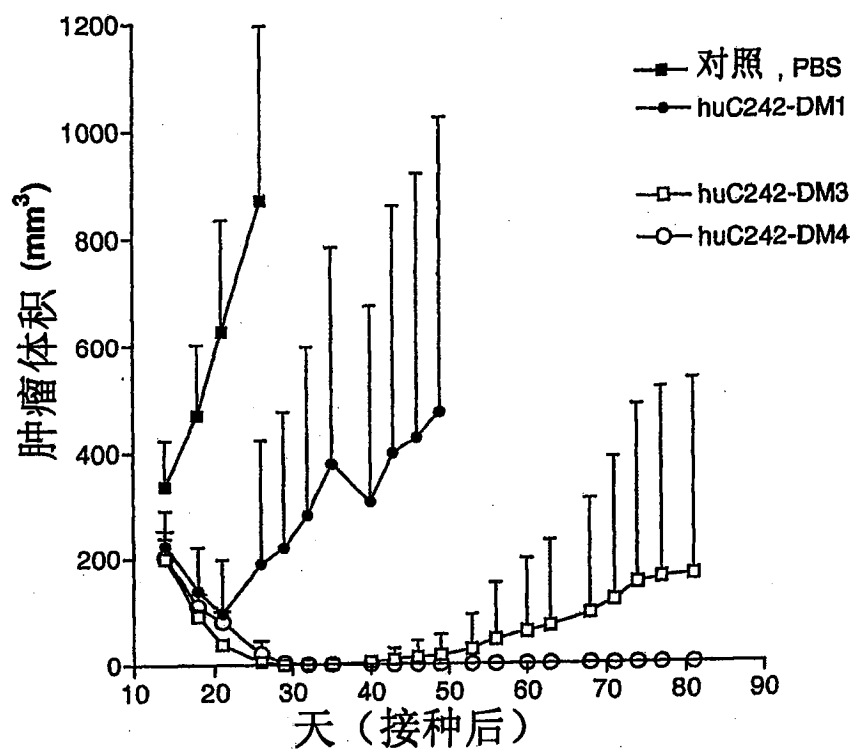


图 8

MY-9-6-美登素类偶联物的效应 (HL60异种移植)

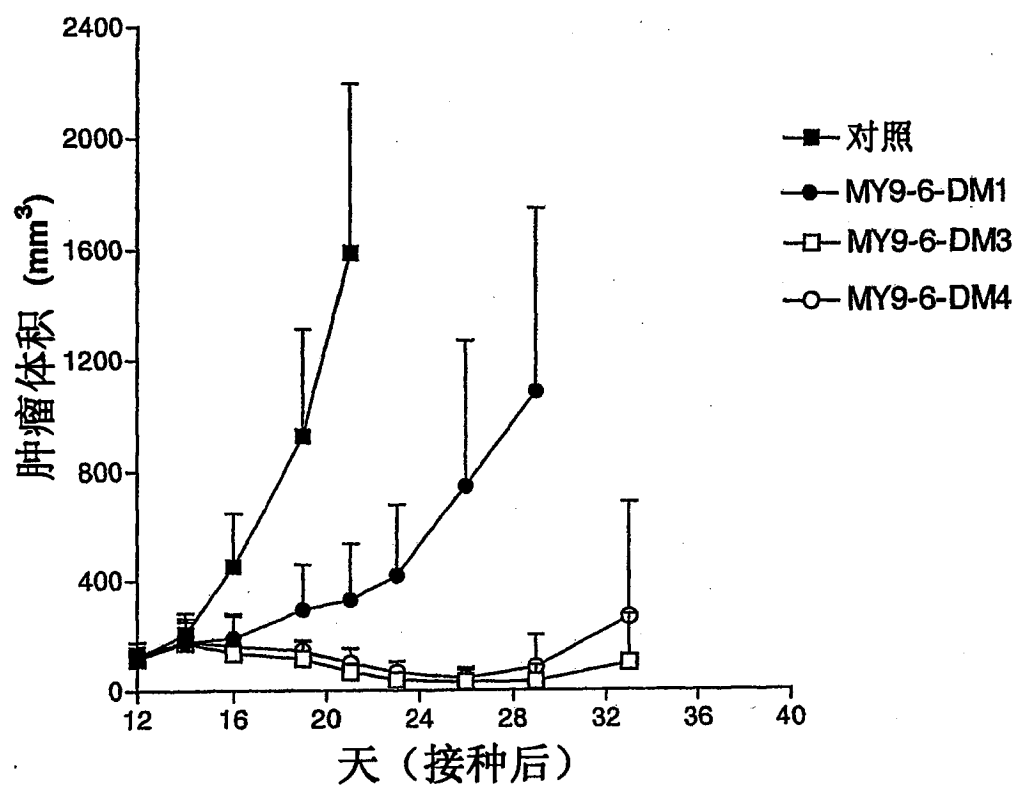


图 9

体外细胞毒性分析：HuMy9-6-DM4对抗原阳性HL-60和
抗原阴性Namalwa细胞的活性

huMy9-6-DM4

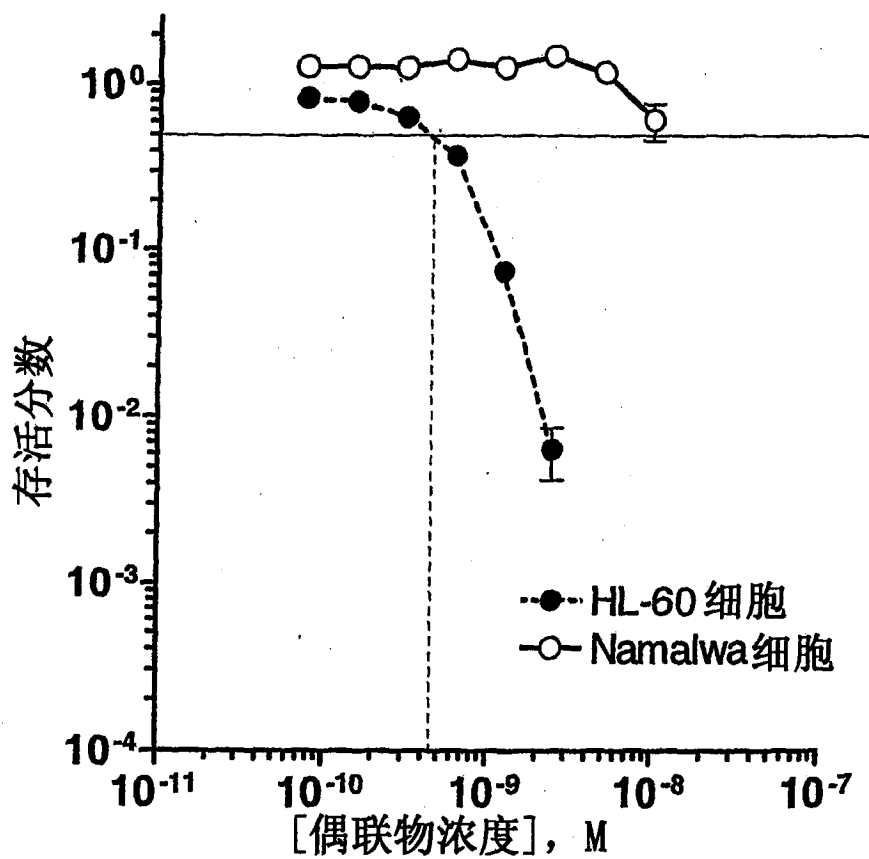


图 10

在SCID鼠中，huMy9-6-DM4和huMy9-6-DM1偶联物
对抗HL-60人肿瘤异种移植物的体内效应的比较

HL-60异种移植

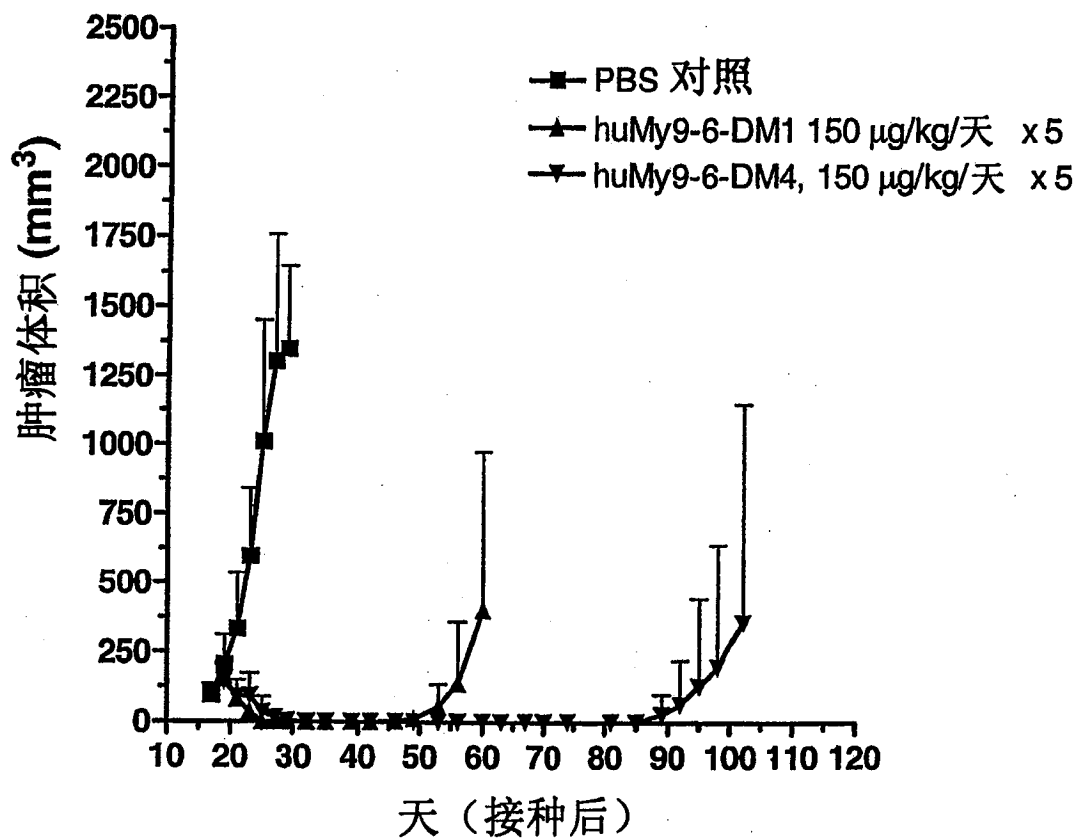


图 11

huB4-DM4的体外细胞毒性分析

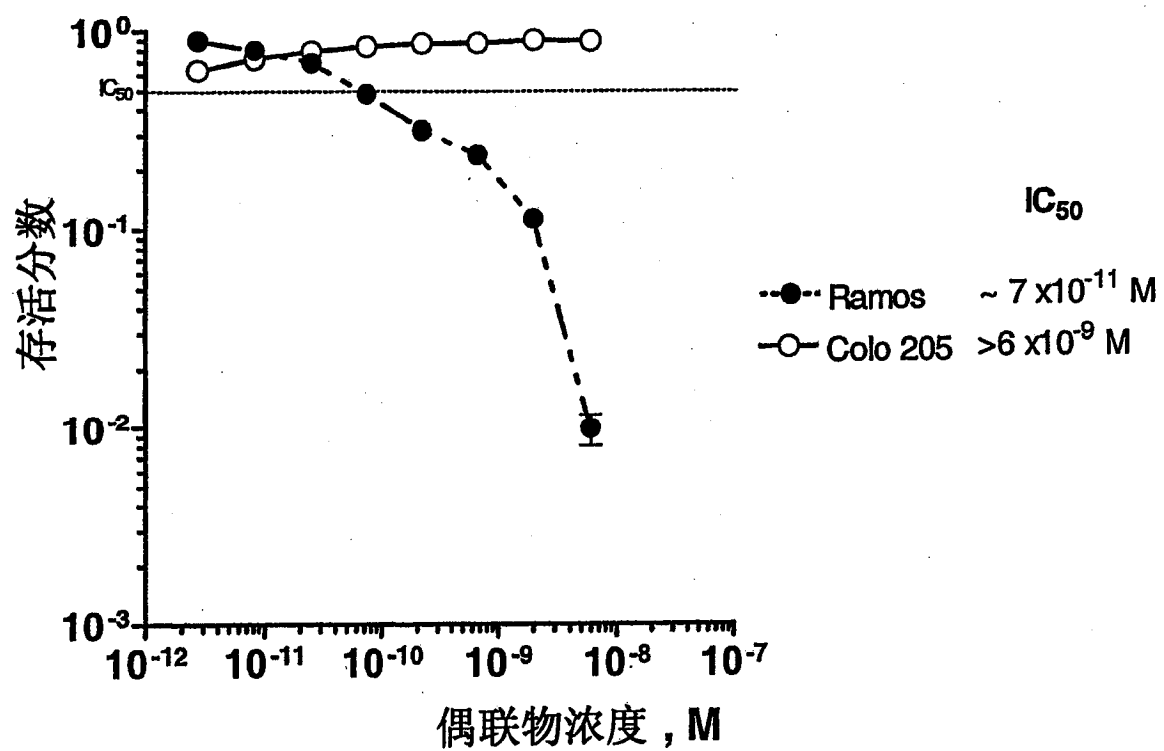


图 12

在SCID鼠中，偶联物huB4-DM4对抗Ramos异种植物的体内效应

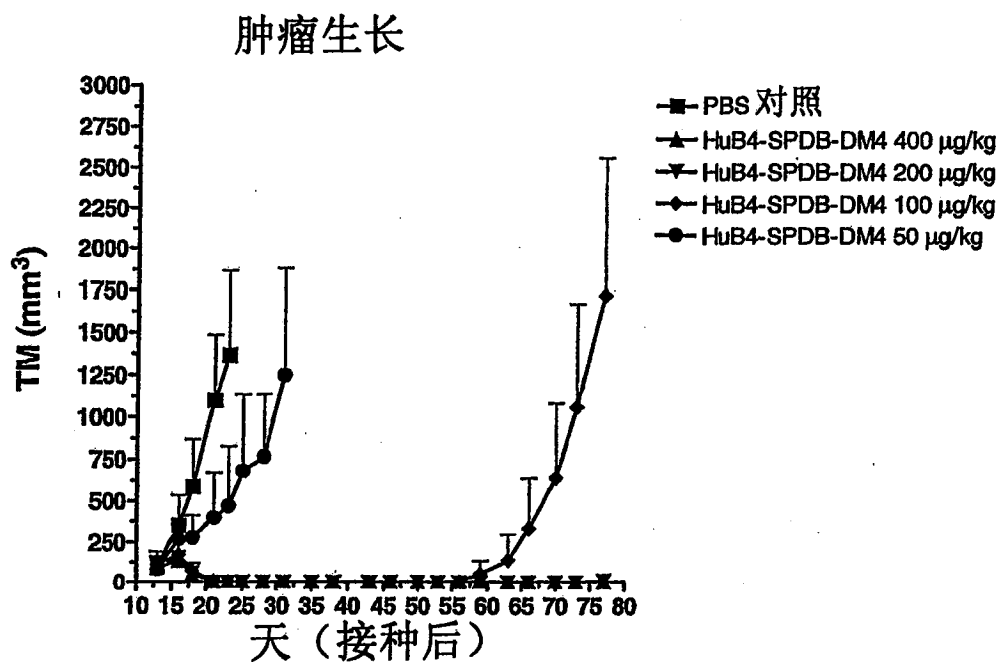


图 13a

在SCID鼠中，偶联物huB4-DM4对抗Ramos异种植物的体内效应:被处理的动物的体重变化

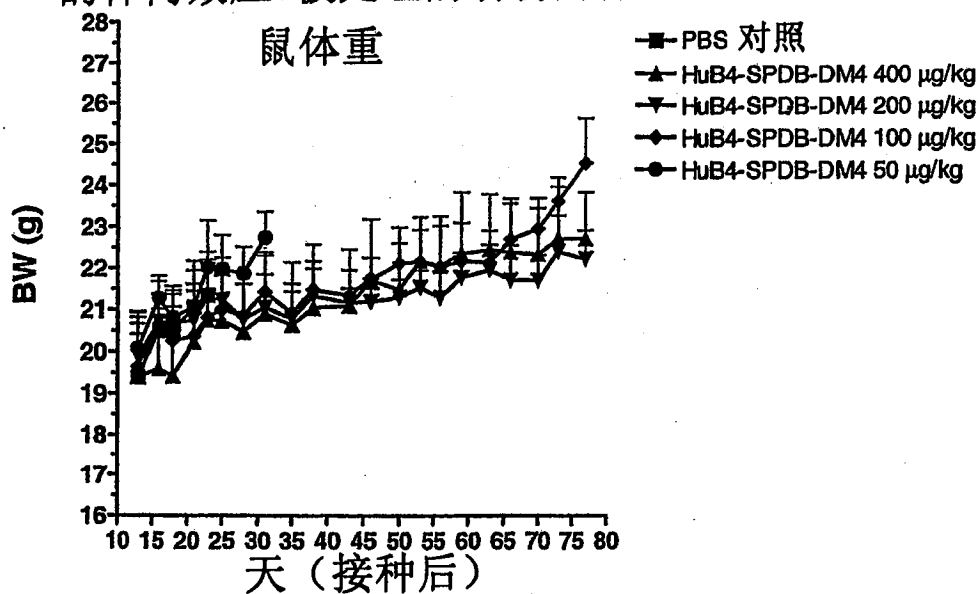


图 13b