



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113896731 A

(43) 申请公布日 2022.01.07

(21) 申请号 202110553208.6

R·V·J·查里

(22) 申请日 2012.02.15

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

(30) 优先权数据

61/443,062 2011.02.15 US

61/443,092 2011.02.15 US

61/483,499 2011.05.06 US

代理人 陈文平 黄海波

(51) Int.Cl.

C07D 487/04 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201280014480.6 2012.02.15

(83) 生物保藏信息

PTA-10772 2010.04.07

PTA-10773 2010.04.07

PTA-10774 2010.04.07

(71) 申请人 伊缪诺金公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 李为 M·米勒 N·菲什金

权利要求书1页 说明书156页

序列表13页 附图61页

(54) 发明名称

细胞毒性苯并二氮杂萘衍生物

(57) 摘要

本发明涉及新型具有抗增殖活性的苯并二氮杂萘衍生物,并且更具体地涉及式(I)-(VII)的新型苯并二氮杂萘化合物。本发明也提供将所述苯并二氮杂萘化合物连接于细胞结合剂的缀合物。本发明还提供使用本发明的所述化合物或缀合物用于在哺乳动物中抑制异常细胞生长或治疗增殖性病症的组合物及方法。



## 细胞毒性苯并二氮杂萘衍生物

[0001] 本申请是申请日为2012年2月15日、申请号为201710188948.8、名称为“细胞毒性苯并二氮杂萘衍生物”的专利申请的分案申请。

[0002] 参考相关申请

[0003] 本申请要求提交于2011年2月15日的美国临时申请No.61/443,062、提交于2011年5月6日的美国临时申请No.61/483,499和提交于2011年2月15日的美国临时申请No.61/443,092在35U.S.C.§119(e)下的提交日期的权益,其全部内容(包括所有附图、化学式、说明书和权利要求)通过引用并入本文。

### 发明领域

[0004] 本发明涉及新型细胞毒性化合物和包含这些细胞毒性化合物和细胞结合剂的细胞毒性缀合物。更具体地说,本发明涉及新型苯并二氮杂萘化合物、其衍生物、其中间体、其缀合物及其药学上可接受的盐,它们可用作药物,尤其是用作抗增殖剂。

[0005] 发明背景

[0006] 苯并二氮杂萘衍生物是用于治疗多种病症的有用的化合物,且包括诸如以下的药物:抗癫痫剂(咪唑并[2,1-b][1,3,5]苯并硫二氮杂萘,美国专利No.4,444,688;美国专利No.4,062,852)、抗菌剂(嘧啶并[1,2-c][1,3,5]苯并硫二氮杂萘,GB 1476684)、利尿剂和降血压剂(吡咯并(1,2-b)[1,2,5]-苯并硫二氮杂萘5,5-二氧化物,美国专利No.3,506,646)、降血脂剂(WO 03091232)、抗抑郁剂(美国专利No.3,453,266);骨质疏松症(JP 2138272)。

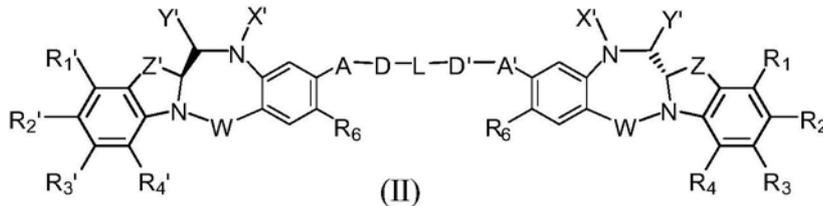
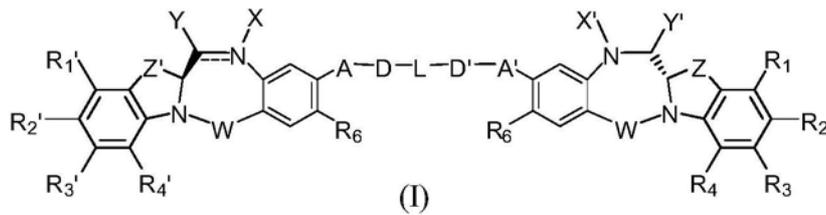
[0007] 最近,在动物肿瘤模型中已示出,诸如吡咯并苯并二氮杂萘(PBD)的苯并二氮杂萘衍生物用作抗肿瘤剂(N-2-咪唑基烷基取代的1,2,5-苯并硫二氮杂萘-1,1-二氧化物,美国专利No.6,156,746)、苯并-吡啶并或二吡啶并硫二氮杂萘(WO 2004/069843)、吡咯并[1,2-b][1,2,5]苯并硫二氮杂萘和吡咯并[1,2-b][1,2,5]苯并二氮杂萘衍生物(WO2007/015280)、托马霉素(tomaymycin)衍生物(如,吡咯并[1,4]苯并二氮杂萘),诸如描述于WO 00/12508、WO 2005/085260、WO2007/085930和EP 2019104中的那些。也已知苯并二氮杂萘影响细胞生长和分化(Kamal A.,等人,Bioorg Med Chem.2008年8月15日;16(16):7804-10(和其中引用的文献);Kumar R,Mini Rev Med Chem.2003年6月;3(4):323-39(和其中引用的文献);Bednarski J J,等人,2004;Sutter A.P,等人,2002;Blatt N B,等人,2002),Kamal A.等人,Current Med.Chem.,2002;2:215-254,Wang J-J.,J.Med.Chem.,2206;49:1442-1449,Alley M.C.等人,Cancer Res.2004;64:6700-6706,Pepper C.J.,Cancer Res 2004;74:6750-6755,Thurston D.E.和Bose D.S.,Chem Rev 1994;94:433-465;和Tozuka,Z.,等人,Journal of Antibiotics,(1983)36:1699-1708.PBD的一般结构描述于美国公开 No.20070072846.PBD在取代基的数量、类型和位置,在其芳族A环和吡咯并C环,以及在C环的饱和度上存在不同。它们在小沟和交联DNA中形成加合物的能力使它们干扰DNA处理,因此它们可能用作抗增殖剂。

[0008] 进入临床的第一种吡咯并苯并二氮杂 $\text{萘}$ , SJG-136 (NSC 694501) 是一种有效的引起DNA链间交联的细胞毒性剂 (S.G. Gregson等人, 2001, *J. Med. Chem.*, 44:737-748; M.C. Alley等人, 2004, *Cancer Res.*, 64:6700-6706; J.A. Hartley等人, 2004, *Cancer Res.*, 64:6693-6699; C. Martin等人, 2005, *Biochemistry.*, 44:4135-4147; S. Arnould等人, 2006, *Mol. Cancer Ther.*, 5:1602-1509)。SJG-136 的I期临床评价结果显示: 该药物在极低剂量时是有毒的 (最大耐受剂量是  $45\mu\text{g}/\text{m}^2$ , 且观察到几种副作用, 包括血管渗漏综合征、外周性水肿、肝脏毒性和疲劳。在所有剂量下在淋巴细胞循环中均观察到DNA损伤 (D. Hochhauser等人, 2009, *Clin. Cancer Res.*, 15:2140-2147)。因此, 需要改进的较低毒性且仍有治疗活性的苯并二氮杂 $\text{萘}$ 衍生物, 用于治疗各种增殖性疾病状况, 诸如癌症。

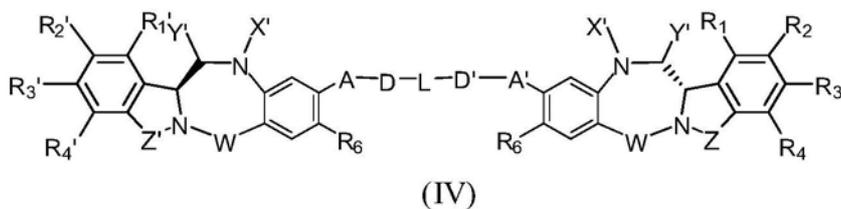
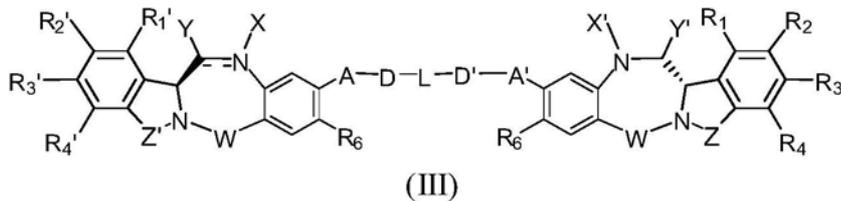
### 发明概要

[0009] 现有技术中公开的细胞毒性苯并二氮杂 $\text{萘}$ 二聚体具有两个亚胺官能团 (functionalities), 所述亚胺官能团以它们的游离形式或可逆保护形式存在, 诸如水合物、烷氧基化物或磺酸盐。这两个亚胺官能团的存在导致DNA的交联 (S.G. Gregson等人, 2001, *J. Med. Chem.*, 44:737-748)。本发明部分基于以下意外发现: 新细胞毒性苯并二氮杂 $\text{萘}$ 衍生物 (诸如没有两个亚胺官能团 (如, 一个亚胺官能团和一个胺官能团), 并因此不能交联DNA的二氢吡啶并苯并二氮杂 $\text{萘}$ 二聚体) 的细胞结合剂缀合物; 与先前技术公开的能交联DNA的苯并二氮杂 $\text{萘}$ 衍生物相比, 该细胞结合剂缀合物显示高得多的体内治疗指数 (最大耐受剂量与最低有效剂量的比率)。

[0010] 本发明的一个目标是提供包含具有键合至其的反应性基团的能够将该细胞毒性化合物共价连接于细胞结合剂 (CBA, 参见下文) 的连接基团的细胞毒性化合物, 其中该细胞毒性化合物由下式中的任一者:



[0011]



[0012] 或其药学上可接受的盐表示,其中:

[0013] N和C之间的双线=表示单键或双键,条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H,或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基,而当其是单键时,X是-H,具有键合至其的反应性基团的连接基团或氨基保护部分;

[0014] Y是-H或离去基团,其选自-OR、-OCOR'、-OCOOR'、-OCONR' R''、-NR' R''、-NR' COR''、-NR' NR' R''、任选取代的5或6元含氮杂环(如,哌啶、四氢吡咯、吡啶、吗啉等)、由-NR' (C=NH) NR' R''表示的胍基、氨基酸或由-NRCOP'表示的肽,其中P'是氨基酸或含有2至20个氨基酸单元的多肽、-SR、-SOR'、-SO<sub>2</sub>M、-SO<sub>3</sub>M、-OSO<sub>3</sub>M、卤素、氰基和叠氨基;或

[0015] Y为亚硫酸盐(HSO<sub>3</sub>、HSO<sub>2</sub>或与阳离子形成的HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>、SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>或HSO<sub>2</sub><sup>-</sup>的盐),偏亚硫酸氢盐(H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>或与阳离子形成的S<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>2-</sup>的盐),单、二、三和四硫代磷酸盐(PO<sub>3</sub>SH<sub>3</sub>、PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>H<sub>2</sub>、POS<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、PS<sub>4</sub>H<sub>2</sub>或与阳离子形成的PO<sub>3</sub>S<sup>3-</sup>、PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>3-</sup>、POS<sub>3</sub><sup>3-</sup>或PS<sub>4</sub><sup>3-</sup>的盐),硫代磷酸酯(R<sup>i</sup>O)<sub>2</sub>PS(OR<sup>i</sup>)、R<sup>i</sup>S-、R<sup>i</sup>SO、R<sup>i</sup>SO<sub>2</sub>、R<sup>i</sup>SO<sub>3</sub>,硫代硫酸盐(HS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>或与阳离子形成的S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>的盐),连二亚硫酸盐(HS<sub>2</sub>O<sub>4</sub>或与阳离子形成的S<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>的盐),二硫代磷酸盐(P(=S)(OR<sup>k</sup>)(S)(OH)或其与阳离子形成的盐),异羟肟酸(R<sup>k</sup>C(=O)NOH或与阳离子形成的盐),甲醛次硫酸氢盐(HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>或与阳离子形成的HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>Na<sup>+</sup>)或其混合物,其中R<sup>i</sup>是具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被选自-N(R<sup>j</sup>)<sub>2</sub>、-CO<sub>2</sub>H、-SO<sub>3</sub>H和-PO<sub>3</sub>H中的至少一个取代基取代;R<sup>j</sup>可进一步任选地被本文所述的烷基取代基取代;R<sup>j</sup>是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷

基;R<sup>k</sup>是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,芳基,杂环基或杂芳基;优选地,Y是亚硫酸氢盐、次硫酸盐、或偏亚硫酸氢盐或其盐(诸如钠盐)的加合物;

[0016] M是-H或阳离子;

[0017] 每次出现时,R独立地选自-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>,任选取代的具有6至18个碳原子的芳基,任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环,或任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环;

[0018] R'和R''各自独立地选自-H,-OH,-OR,-NHR,-NR<sub>2</sub>,-COR,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>,和任选取代的具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环;

[0019] R<sup>c</sup>是-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基,或具有键合至其的反应性基团的连接基团;

[0020] n是1至24的整数;

[0021] W选自C=O、C=S、CH<sub>2</sub>、BH、SO和SO<sub>2</sub>;

[0022] X'选自-H,氨基保护基,具有键合至其的反应性基团的连接基团,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>,任选取代的具有6至18个碳原子的芳基,任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环,和任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环;

[0023] Y'选自-H、氧代基团、具有键合至其的反应性基团的连接基团、任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,任选取代的6至18元芳基,任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环,任选取代的具有1至6个杂原子的3至18元杂环;

[0024] R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>1</sub>'、R<sub>2</sub>'、R<sub>3</sub>'和R<sub>4</sub>'各自独立地选自-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>,卤素,胍基[-NH(C=NH)NH<sub>2</sub>],-OR,-NR'R'',-NO<sub>2</sub>, -NCO,-NR'COR'',-SR,由-SOR'所表示的亚砷,由-SO<sub>2</sub>R'所表示的砷,磺酸盐-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>,硫酸盐-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>,由-SO<sub>2</sub>NR'R''所表示的磺酰胺,氰基,叠氮基,-COR',-OCOR',-OCONR'R''和具有键合至其的反应性基团的连接基团;

[0025] R<sub>6</sub>是-H、-R、-OR、-SR、-NR'R''、-NO<sub>2</sub>、卤素或具有键合至其的反应性基团的连接基团;

[0026] Z和Z'独立地选自-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>na'</sub>-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NR<sub>9</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>na'</sub>-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>na'</sub>-和-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>na'</sub>-;

[0027] n'和na'相同或不同,且选自0、1、2和3;

[0028] R<sub>7</sub>和R<sub>8</sub>相同或不同,且各自独立地选自-H,-OH,-SH,-COOH,-NHR',聚乙二醇单元-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-,氨基酸,具有2至6个氨基酸的肽单元,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基;

[0029] R<sub>9</sub>独立地选自-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基,聚乙二醇单元-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-;

[0030] A和A'相同或不同,且独立地选自-O-、氧代(-C(=O)-)、-CRR'O-、-CRR'-、-S-、-

CRR' S-、-NR<sub>5</sub>-和-CRR' N(R<sub>5</sub>)-;

[0031] 每次出现时, R<sub>5</sub>独立地为-H或任选取代的具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基;

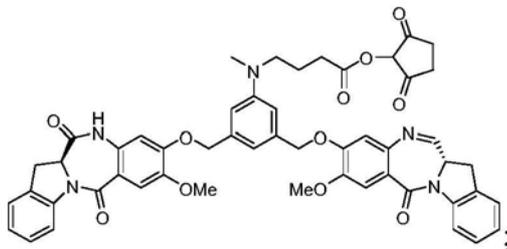
[0032] D和D' 相同或不同, 且独立地不存在或选自任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基, 氨基酸, 具有2至6个氨基酸的肽, 和聚乙二醇单元(-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-;

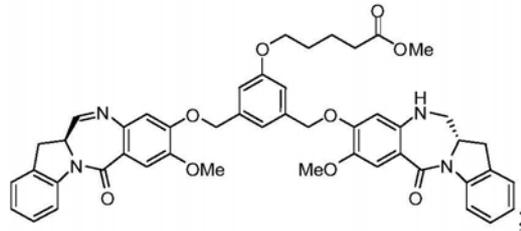
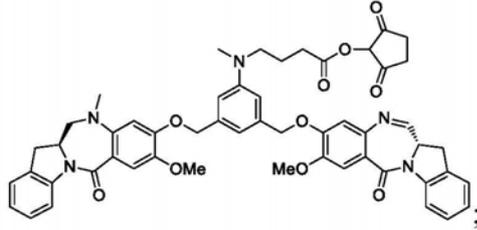
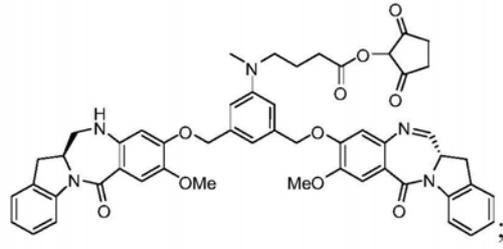
[0033] L不存在, 为具有键合至其的反应性基团的连接基团, 聚乙二醇单元(-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, 具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基或烯基, 苯基, 具有1至6个独立选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环或5至18元杂芳基环, 其中所述烷基、烯基任选地被具有键合至其的反应性基团的连接基团取代; 苯基或杂环或杂芳基环可任选被取代, 其中所述取代基可以是具有键合至其的反应性基团的连接基团。

[0034] 在某些实施方案中, X不是具有键合至其的反应性基团的连接基团。在某些实施方案中, N和C之间的双线==表示单键, Y不是-H。

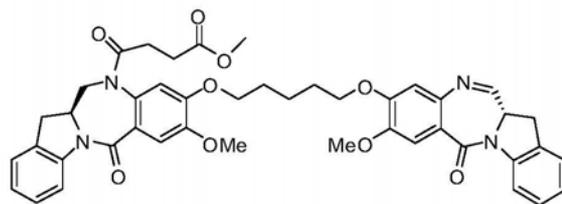
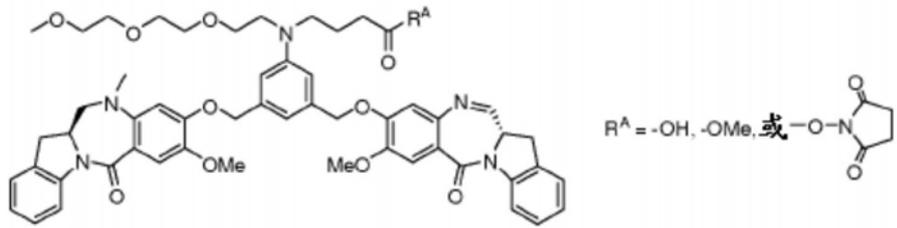
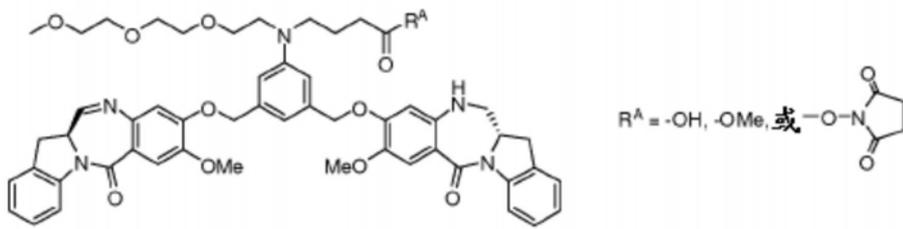
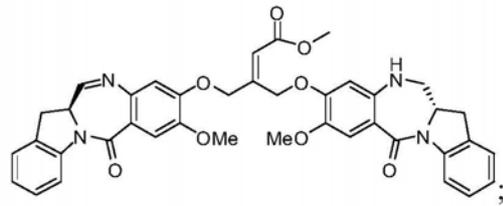
[0035] 在某些实施方案中, 化合物不是下述化合物中的任一者:

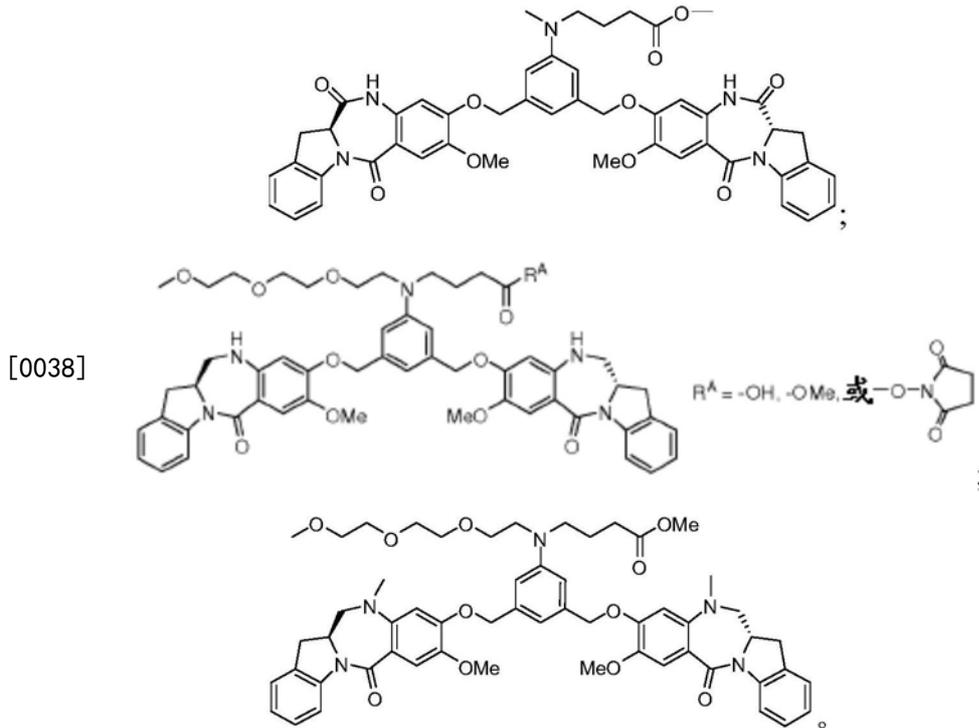
[0036]





[0037]

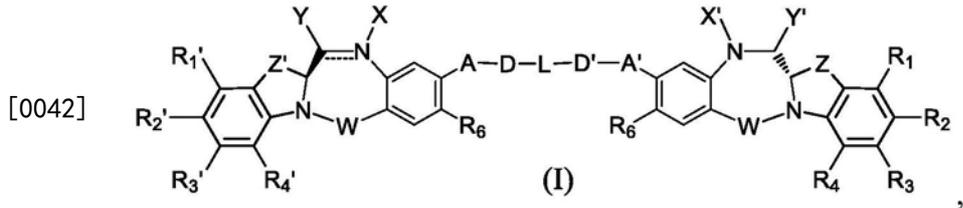


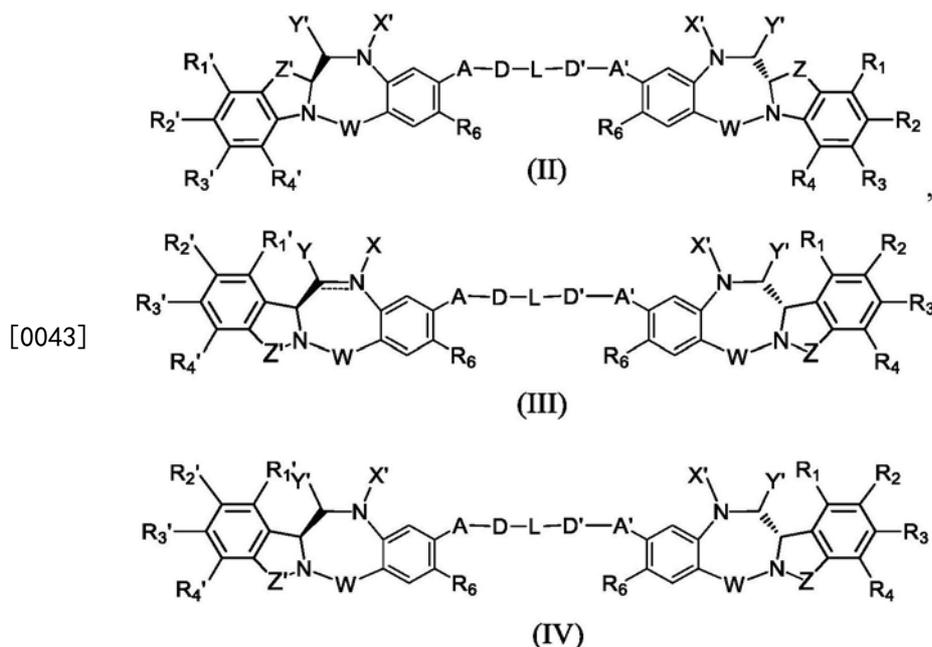


[0039] 在某些实施方案中, Y是离去基团, 其选自 -OR、-OCOR'、-OCOOR'、-OCONR' R''、-NR' R''、-NR' COR''、-NR' NR' R'' ,任选取代的5或6元含氮杂环(如, 哌啶、四氢吡咯、吡唑、吗啉等), 由 -NR' (C=NH) NR' R'' 表示的胍基, 氨基酸, 或由 -NRCOP' 表示的肽, 其中P' 是氨基酸或含有2至20个氨基酸单元的多肽、-SR、-SOR'、-SO<sub>2</sub>M、-SO<sub>3</sub>M、-OSO<sub>3</sub>M、卤素、氰基和叠氨基。

[0040] 本发明的第二目标是提供细胞结合剂与本发明的新型苯并二氮杂萘化合物或其衍生物的缀合物。这些缀合物可用作治疗剂, 它们被特异性地递送至靶细胞且有细胞毒性。

[0041] 具体地说, 本发明的缀合物可包含: 细胞毒性化合物和细胞结合剂 (CBA), 其中所述细胞毒性化合物包含将细胞毒性化合物共价连接于所述 CBA的连接基团, 且其中所述细胞毒性化合物由下式中的任一者:





[0044] 或其药学上可接受的盐表示,其中:

[0045] N和C之间的双线=表示单键或双键,条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H,或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基,而当其是单键时,X是-H、连接基团或氨基保护部分;

[0046] Y是-H或离去基团,其选自-OR、-OCOR'、-OCOOR'、-OCONR' R''、-NR' R''、-NR' COR''、-NR' NR' R'',任选取代的5或6元含氮杂环(如,吡啶、四氢吡咯、吡唑、吗啉)、由-NR' (C=NH) NR' R''表示的胍基、氨基酸或由-NRCOP'表示的肽,其中P'是氨基酸或含有2至20个氨基酸单元的多肽、-SR、-SOR'、-SO<sub>2</sub>M、-SO<sub>3</sub>M、-OSO<sub>3</sub>M、卤素、氰基和叠氨基;或

[0047] Y为亚硫酸盐(HSO<sub>3</sub>、HSO<sub>2</sub>或与阳离子形成的HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>、SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>或HSO<sub>2</sub><sup>-</sup>的盐),偏亚硫酸氢盐(H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>或与阳离子形成的S<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>2-</sup>的盐),单、二、三和四硫代磷酸盐(PO<sub>3</sub>SH<sub>3</sub>、PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>H<sub>2</sub>、POS<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、PS<sub>4</sub>H<sub>2</sub>或与阳离子形成的PO<sub>3</sub>S<sup>3-</sup>、PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>3-</sup>、POS<sub>3</sub><sup>3-</sup>或PS<sub>4</sub><sup>3-</sup>的盐),硫代磷酸酯(R<sup>i</sup>O)<sub>2</sub>PS(OR<sup>i</sup>)、R<sup>i</sup>S<sup>-</sup>、R<sup>i</sup>SO、R<sup>i</sup>SO<sub>2</sub>、R<sup>i</sup>SO<sub>3</sub>,硫代硫酸盐(HS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>或与阳离子形成的S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>的盐),连二亚硫酸盐(HS<sub>2</sub>O<sub>4</sub>或与阳离子形成的S<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>的盐),二硫代磷酸盐(P(=S)(OR<sup>k</sup>)(S)(OH)或其与阳离子形成的盐),异羟肟酸(R<sup>k</sup>C(=O)NOH或与阳离子形成的盐),甲醛次硫酸氢盐(HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>或与阳离子形成的HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>的盐,诸如HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>Na<sup>+</sup>)或其混合物,其中R<sup>i</sup>是具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被选自-N(R<sup>j</sup>)<sub>2</sub>、-CO<sub>2</sub>H、-SO<sub>3</sub>H和-PO<sub>3</sub>H中的至少一个取代基取代;R<sup>i</sup>可进一步任选地被本文所述的烷基取代基取代;R<sup>j</sup>是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基;R<sup>k</sup>是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,芳基,杂环基或杂芳基;优选地,Y是亚硫酸氢盐、次硫酸盐、或偏亚硫酸氢盐或其盐(诸如钠盐)的加合物;

[0048] M是-H或阳离子;

[0049] 每次出现时,R独立地选自-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>,任选取代的具有6至18个碳原子的芳基,任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环,或任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环;

[0050] R'和R''各自独立地选自-H、-OH、-OR、-NHR、-NR<sub>2</sub>、-COR,任选取代的具有1至10个碳

原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ ,和任选取代的具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环;

[0051]  $\text{R}^c$ 是-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基或连接基团;

[0052]  $n$ 是1至24的整数;

[0053]  $W$ 选自 $\text{C}=\text{O}$ 、 $\text{C}=\text{S}$ 、 $\text{CH}_2$ 、 $\text{BH}$ 、 $\text{SO}$ 和 $\text{SO}_2$ ;

[0054]  $X'$ 选自-H,氨基保护基,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ ,任选取代的具有6至18个碳原子的芳基,任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环,和任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环;

[0055]  $Y'$ 选自-H,氧代基团,连接基团,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,任选取代的6至18元芳基,任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环,任选取代的具有1至6个杂原子的3至18元杂环;

[0056]  $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$ 、 $\text{R}_4$ 、 $\text{R}_1'$ 、 $\text{R}_2'$ 、 $\text{R}_3'$ 和 $\text{R}_4'$ 各自独立地选自-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{R}^c$ ,卤素,胍基 $[-\text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2]$ , $-\text{OR}$ , $-\text{NR}'\text{R}''$ , $-\text{NO}_2$ , $-\text{NCO}$ , $-\text{NR}'\text{COR}''$ , $-\text{SR}$ ,由 $-\text{SOR}'$ 所表示的亚砷,由 $-\text{SO}_2\text{R}'$ 所表示的砷,磺酸盐 $-\text{SO}_3^-\text{M}^+$ ,硫酸盐 $-\text{OSO}_3^-\text{M}^+$ ,由 $-\text{SO}_2\text{NR}'\text{R}''$ 所表示的磺酰胺,氰基,叠氮基, $-\text{COR}'$ , $-\text{OCOR}'$ , $-\text{OCONR}'\text{R}''$ 和连接基团;

[0057]  $\text{R}_6$ 是-H、-R、-OR、-SR、 $-\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NO}_2$ 、卤素或连接基团;

[0058]  $Z$ 和 $Z'$ 独立地选自 $-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{CR}_7\text{R}_8$ 、 $-(\text{CH}_2)_{na}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{NR}_9$ 、 $-(\text{CH}_2)_{na}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_{na}-$ 和 $-(\text{CH}_2)_n-\text{S}-(\text{CH}_2)_{na}-$ ;

[0059]  $n'$ 和 $na'$ 相同或不同,且选自0、1、2和3;

[0060]  $\text{R}_7$ 和 $\text{R}_8$ 相同或不同,且各自独立地选自-H、-OH、-SH、-COOH、-NHR',聚乙二醇单元 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ ,氨基酸,具有2至6个氨基酸的肽单元,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基;

[0061]  $\text{R}_9$ 独立地选自-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基,聚乙二醇单元 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ ;

[0062]  $A$ 和 $A'$ 相同或不同,且独立地选自-O、氧代( $-\text{C}(=\text{O})-$ )、 $-\text{CRR}'\text{O}-$ 、 $-\text{CRR}'-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{CRR}'\text{S}-$ 、 $-\text{NR}_5$ 和 $-\text{CRR}'\text{N}(\text{R}_5)-$ ;

[0063] 每次出现时, $\text{R}_5$ 独立地为-H或任选取代的具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基;

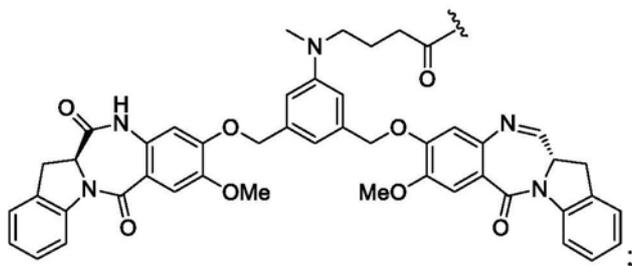
[0064]  $D$ 和 $D'$ 相同或不同,且独立地不存在或选自任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,氨基酸,具有2至6个氨基酸的肽,和聚乙二醇单元 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ ;

[0065]  $L$ 不存在,为连接基团,聚乙二醇单元 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ ,具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基或烯基,苯基,具有1至6个独立选自O、S、N和P的杂原子的3-18元杂环或5至18元杂芳基环,其中所述烷基或烯基任选被所述连接基团取代;苯基或杂环或杂芳基环可任选被取代,其中所述取代基可以是连接基团;

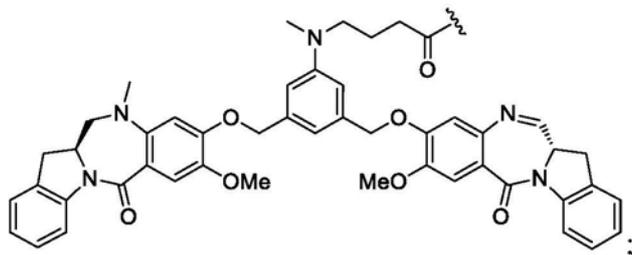
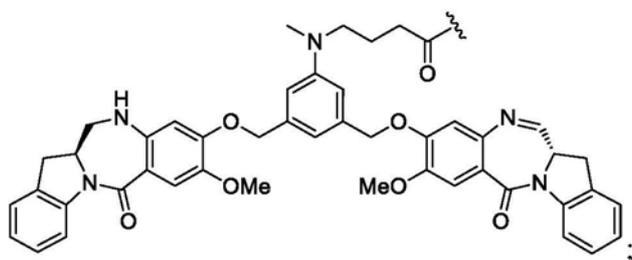
[0066] 在某些实施方案中, $X$ 不是连接基团。在某些实施方案中, $N$ 和 $C$ 之间的双线 $=$ 表示单键, $Y$ 不是-H。

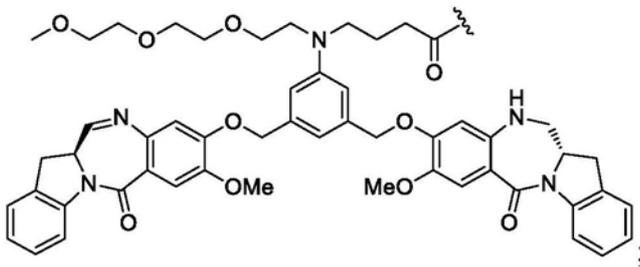
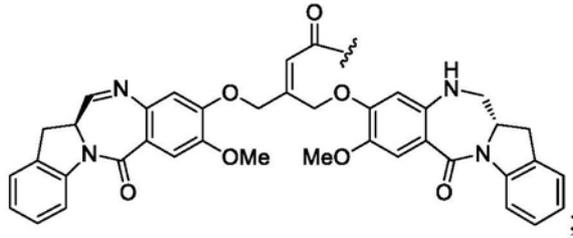
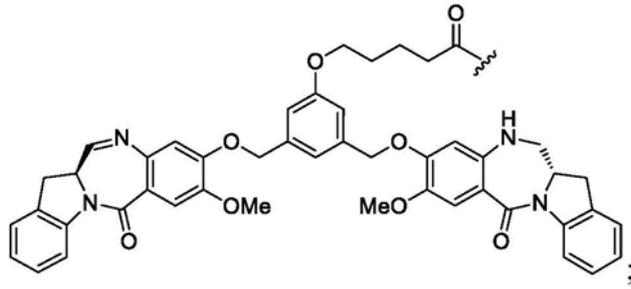
[0067] 在某些实施方案中, Y是-H或离去基团, 其选自-OR、-OCOR'、-OCOOR'、-OCONR' R''、-NR' R''、-NR' COR''、-NR' NR' R'', 任选取代的5或6元含氮杂环(如, 吡啶、四氢吡咯、吡唑、吗啉等), 由-NR' (C=NH) NR' R''表示的胍基, 氨基酸, 或由-NRCOP'表示的肽, 其中P'是氨基酸或含有2至20个氨基酸单元的多肽、-SR、-SOR'、-SO<sub>2</sub>M、-SO<sub>3</sub>M、-OSO<sub>3</sub>M、卤素、氰基和叠氮基。在某些实施方案中, Y不是-H。

[0068] 在某些实施方案中, 缀合物的化合物不是以下化合物中的任一者(波浪键表示化合物通过该键连接于CBA):

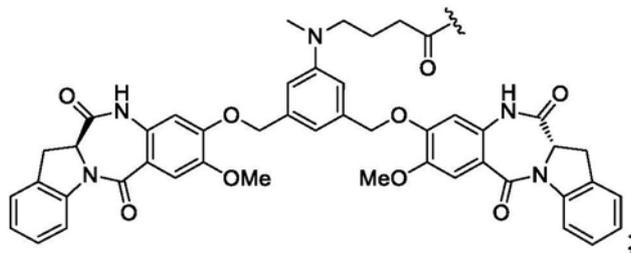
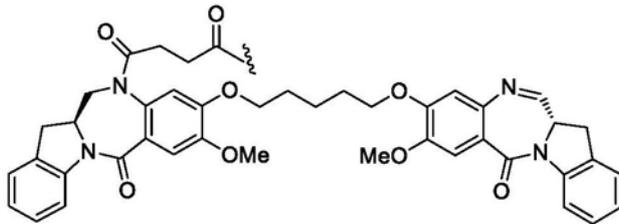
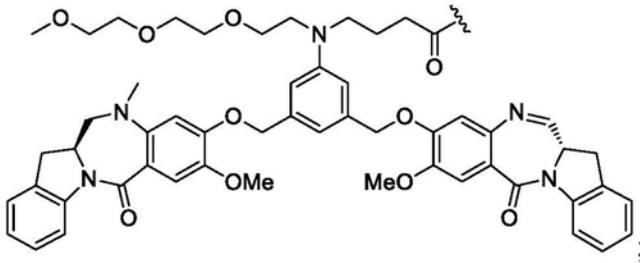


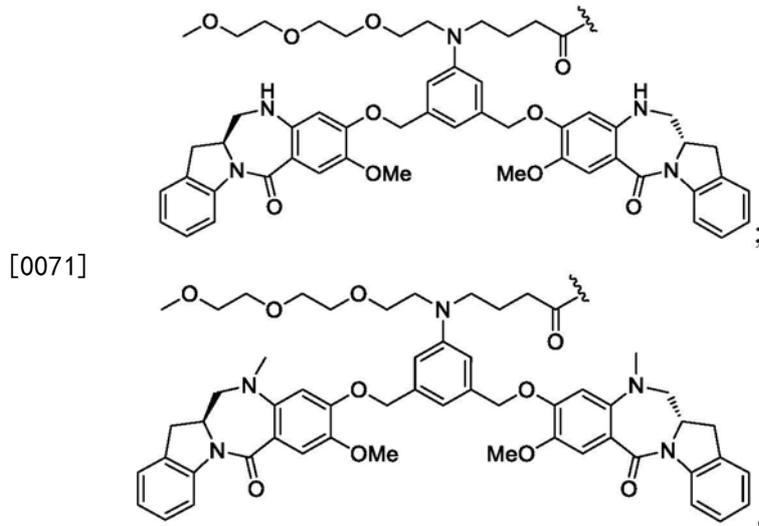
[0069]





[0070]





[0072] 本发明还包括包含新型苯并二氮杂 $\sigma$ 化合物、其衍生物或其缀合物(和/或其溶剂化物、水合物和/或盐)和载体(药学上可接受的载体)的组合物(如,药物组合物)。本发明另外包括包含新型苯并二氮杂 $\sigma$ 化合物、其衍生物或其缀合物(和/或其溶剂化物、水合物和/或盐)和载体(药学上可接受的载体),进一步包含第二治疗剂的组合物(如,药物组合物)。本发明组合物可用于在哺乳动物(如人类)中抑制异常细胞生长或治疗增殖性病症。本发明组合物可用于治疗哺乳动物(如,人类)中的疾病诸如癌症、类风湿性关节炎、多发性硬化、移植物抗宿主疾病(GVHD)、移植排斥、狼疮、肌炎、感染、诸如AIDS的免疫缺陷以及炎症性疾病。

[0073] 本发明包括在哺乳动物(如人类)中抑制异常细胞生长或治疗增殖性病症的方法,所述方法包括向所述哺乳动物单独或与第二治疗剂组合施用治疗有效量的新型苯并二氮杂 $\sigma$ 化合物、其衍生物,或其缀合物,(和/或其溶剂化物及盐)或其组合。本发明包括合成和使用新型苯并二氮杂 $\sigma$ 化合物、其衍生物及其缀合物,用于哺乳动物细胞、生物体或相关病理病患的体外、原位和体内诊断或治疗的方法。

[0074] 本发明的化合物、其衍生物或其缀合物,以及包含它们的组合物可用于治疗或减轻病症的严重性,诸如,特征是细胞的异常生长(如,癌症)。本发明化合物和缀合物的其它应用包括,但不限于治疗哺乳动物(如,人类)中的疾患,诸如癌症、类风湿性关节炎、多发性硬化、移植物抗宿主疾病(GVHD)、移植排斥、狼疮、肌炎、感染、诸如AIDS的免疫缺陷以及炎症性疾病。

[0075] 如本文所用,当提到基团(如, $R^c$ 、L、X'等)时,“是/为”(或“不是”)连接基团或具有键合至其的反应性基团的连接基团,意指该基团“包含”(或“不包含”)连接基团或具有键合至其的反应性基团的连接基团。

[0076] 附图简述

[0077] 图1-6示出适用于本发明的缀合的苯并二氮杂 $\sigma$ 化合物和相应的可连接化合物的合成方案。图1示出连接子1b和二聚体1d-g的合成方案。图2示出二聚体2a-b的合成方案。图3示出二聚体3e-g的合成方案。图4示出二聚体4b-e的合成方案。图5示出连接子5e和二聚体5g-j的合成方案。图6示出连接子6a和二聚体6c-d的合成方案。

[0078] 图7示出用本发明的PEG修饰的连接子合成代表性化合物的方案。图7示出PEG修

饰的连接子7b和二聚体7d-f的合成方案。

[0079] 图8示出用本发明的甲硫基连接子合成代表性化合物的方案。图8示出含硫醇二聚体8b-e的合成方案。

[0080] 图9-10示出合成含有本发明叔胺的代表性化合物的方案。图9示出含有叔胺二聚体17d-g的合成方案。图10示出含有叔胺二聚体18c-f的合成方案。

[0081] 图11示出用本发明的肽连接子合成代表性化合物的方案。图11示出含有肽连接子的二聚体21f-g的合成方案。

[0082] 图12-19示出适用于本发明的一步缀合方法的代表性化合物的合成方案。图12A示出可连接硫代乙酰的二聚体9a-b的一步合成方案。图12B示出可连接硫代乙酰的二聚体9a-b的一步可替代合成方案。图13示出可连接 BMPS的二聚体10的一步合成方案。图14示出可连接SMCC的二聚体11 的一步合成方案。图15示出可连接碘基-SPDB的二聚体12的一步合成方案。图16示出可连接SPP的二聚体13的一步合成方案。图17示出可连接硫代酰基的二聚体14a-b的一步合成方案。图18示出可连接BMPS的二聚体15 的一步合成方案。图19示出可连接SPP的二聚体16的一步合成方案。

[0083] 图20示出两步单亚胺二聚体的合成方案。

[0084] 图21示出两步两次还原的二聚体的合成方案。

[0085] 图22示出代表性抗体-药物缀合物的一步合成方案。

[0086] 图23示出代表性抗体-药物缀合物的两步合成方案。

[0087] 图24示出甲基二硫代二聚体1d对Namalwa、KB和HL60/QC细胞系的体外细胞毒性。特别地,图24示出甲基二硫代二聚体1d (A) Namalwa细胞、(B) HL60/QC细胞细胞、和(C) KB细胞的抗增殖活性。

[0088] 图25示出huMy9-6-SPDB-1f缀合物对各种细胞系的体外细胞毒性和特异性。注意,向缀合反应中加入亚硫酸氢钠用于制备缀合物。特别地,图25 示出huMy9-6-SPDB-1f对(A) 阻断或未阻断抗原结合位点的HL60/QC ( $Ag^+$ ) 细胞、(B) HL60/ATCC ( $Ag^+$ ) 细胞、和(C) NB-4 ( $Ag^+$ ) 细胞的抗增殖活性。

[0089] 图26示出huFOLR1-SPDB-1f缀合物的体外细胞毒性和特异性。特别地,图26示出huFOLR1-SPDB-1f对阻断或未阻断抗原结合位点的KB ( $Ag^+$ ) 细胞的抗增殖活性。

[0090] 图27示出二聚体的缀合不会降低抗体的结合亲和力。注意,向缀合反应中加入亚硫酸氢钠用于制备缀合物。图27示出huMy9-6-SPDB-1f的结合亲和力(FACS分析)。

[0091] 图28示出huMy9-6缀合物的体内抗肿瘤活性。注意,向缀合反应中加入亚硫酸氢钠用于制备缀合物。图28示出huMy9-6SPDB-1f在具有HL60/QC 肿瘤的裸鼠中的体内效力。

[0092] 图29示出huMy9-6-SPDB-1f缀合物对抗原阳性细胞的体外细胞毒性。注意,向缀合反应中加入亚硫酸氢钠用于制备缀合物。图29示出 huMy9-6-SPDB-1f对抗原阳性细胞系(A) HL60/QC细胞、(B) HL60/ATCC 细胞系、(C) NB-4细胞、和HEL92.1.7细胞(D)的抗增殖活性。

[0093] 图30示出用于制备含硫醚连接子二硫化物27e-h的合成方案。

[0094] 图31示出用于制备28c-f二聚体的合成方案。

[0095] 图32示出用于制备苯基连接的二聚体29b-c的合成方案。

[0096] 图33示出单亚胺二聚体的替代两步合成方案。

[0097] 图34示出huMy9-6-SPDB-1f (A)、huMy9-6-磺基SPDB-1f (B) 和 huMy9-6-BMPS-1f (C) 对阻断和未阻断抗原结合位点的HL60/QC ( $Ag^+$ ) 细胞的体外细胞毒性。注意,在所有三个试验(34A、34B和34C)中,向缀合反应中加入亚硫酸氢钠用于制备缀合物。特别地,图34示出比较(A) huMy9-6-SPDB-1f和(B) huMy9-6-磺基SPDB-1f、及(C) huMy9-6-BMPS-1f 对阻断和未阻断抗原结合位点的HL60/QC ( $Ag^+$ ) 细胞的抗增殖活性。

[0098] 图35示出chB38.1-SPDB-1f (A) 和chB38.1-磺基SPDB-1f (B) 对COL0205 ( $Ag^+$ ) 细胞的体外细胞毒性。注意,在两个试验中,向缀合反应中加入亚硫酸氢钠用于制备缀合物。特别地,图35示出比较(A) chB38.1-SPDB-1f和 (B) chB38.1-磺基SPDB-1f对COL0205 ( $Ag^+$ ) 细胞的抗增殖毒性。

[0099] 图36示出huMy9-6-SPDB-1f在具有HL60/QC小鼠的体内效力。注意,向缀合反应中加入亚硫酸氢钠。特别地,图36示出huMy9-6-SPDB-1f在具有HL60/QC肿瘤的小鼠中的体内效力。

[0100] 图37示出huFOLR1-SPDB-1f在具有KB肿瘤的小鼠体内效力。

[0101] 图38示出化合物1的合成方案。

[0102] 图39示出有5-乙基-2-甲基吡啶硼烷(PEMB)的化合物1d的合成方案。

[0103] 图40示出有三乙酰氧基硼氢化钠(STAB)的化合物1d的合成方案。

[0104] 图41示出化合物31a-c的合成方案。

[0105] 图42示出化合物32c,d的合成方案。

[0106] 图43示出化合物1i和12a的合成方案。

[0107] 图44示出通过比较(A) huMy9-6-SPDB-1f、(B) huMy9-6-磺基SPDB-1f和 (C) huMy9-6-BMPS-1f对阻断或未阻断抗原结合位点的OCI-AML3 ( $Ag^+$ ) 细胞的抗增殖活性。注意,在所有三个试验中,向缀合反应中加入亚硫酸氢钠用于制备缀合物。

[0108] 图45示出用于合成4-(苄氧基)-5-甲氧基-2-硝基苯甲酸(用于制备IBD单体)的一种替换方案。

[0109] 图46是(5-((2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)氨基)-1,3-亚苯基)二甲醇(1b)的替换合成方案。

[0110] 图47是(5-((2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)氨基)-1,3-亚苯基)二甲醇(1b)的替换合成方案。

[0111] 图48是用于两步单亚胺二聚物合成的替换合成方案。

[0112] 图49示出各种缀合物对各种细胞系的效力。 $IC_{50}$ 值以nM为单位列于表中。特别地,图49示出通过 $IC_{50}$ 值(nM)测量缀合物对各种细胞系的效能。

[0113] 图50示出huMy9-6-磺基-SPDB-1f在具有MOLM-13肿瘤的小鼠中的体内效力。

[0114] 图51示出huMy9-6-磺基-SPDB-1f在具有NB4肿瘤的小鼠中的体内效力。

[0115] 图52示出huMy9-6-BMPS-1f在具有HL60/QC肿瘤的小鼠中的体内效力。

[0116] 图53示出huMy9-6-BMPS-1f在具有MOLM-13肿瘤的小鼠中的体内效力。注意,向缀合反应中加入亚硫酸氢钠用于制备缀合物。

[0117] 图54示出磺化叶酸/细胞毒性化合物缀合物的代表性合成方案。

[0118] 图55示出具有不同连接子的几种代表性的磺化药物-抗体缀合物。

[0119] 图56示出huMy9-6-药物2在具有HL60/QC肿瘤的小鼠中的体内效力。注意,向缀合

反应中加入亚硫酸氢钠用于制备缀合物。

[0120] 图57示出huMy9-6-药物2在具有MOLM-13肿瘤的小鼠中的体内效力。注意,向缀合反应中加入亚硫酸氢钠用于制备缀合物。

[0121] 图58示出在不含和含有亚硫酸氢钠下制备的HuMy9-6-药物2缀合物对表达CD33-抗原的HL60细胞的类似的体外细胞毒性。

[0122] 图59示出在不含和含有亚硫酸氢钠下制备的抗-CD22 Ab-药物2缀合物对表达CD22-抗原的BJAB细胞的类似的体外细胞毒性。

[0123] 图60示出使用高反应性的4-硝基Py-磺基-SPDB连接子制备huMy9-6-磺基-SPDB-1d。

[0124] 发明详述

[0125] 现在将详细参考本发明的某些实施方案,在附随的结构和式中阐明本发明的实例。尽管将结合所列举的实施方案来描述本发明,但应理解,它们并非旨在将本发明限制于那些实施方案中。相反,本发明旨在涵盖所有的备选方案、修改和等效物,它们可如由权利要求所定义的那样包括在本发明的范围内。本领域技术人员将认识到许多方法和材料与本文描述的那些类似或等效,可将这些方法和材料用于本发明的实践。

[0126] 应当理解,包括在本发明的不同方面(如,化合物、化合物-连接分子、缀合物、组合物、制备和使用方法)和说明书的不同部分(包括仅在实施例中描述的实施方案)所描述的那些在内的本文所述的任何实施方案,可与本发明的一种或多种其它实施方案组合,除非明确地排除或不适当。实施方案的组合不限于经由多个从属权利要求所要求的那些特定的组合。

[0127] 定义

[0128] 本文使用的“直链或支链的烷基”是指1至20个碳原子的饱和直链或支链单价烃基。烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、1-丁基、2-甲基-1-丙基、-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、2-丁基、2-甲基-2-丙基、1-戊基、2-戊基、3-戊基、2-甲基-2-丁基、3-甲基-2-丁基、3-甲基-1-丁基、2-甲基-1-丁基、1-己基)、2-己基、3-己基、2-甲基-2-戊基、3-甲基-2-戊基、4-甲基-2-戊基、3-甲基-3-戊基、2-甲基-3-戊基、2,3-二甲基-2-丁基、3,3-二甲基-2-丁基、1-庚基、1-辛基等。优选地,烷基具有1至10个碳原子。更优选地,烷基具有1至4个碳原子。

[0129] “直链或支链烯基”是指具有至少一个不饱和位点(即,碳-碳双键)的2至20个碳原子的直链或支链单价烃基,其中该烯基包括具有“顺式”和“反式”取向,或者可选地,具有“E”和“Z”取向的基团。实例包括但不限于亚乙烷基(ethylenyl)或乙烯基(-CH=CH<sub>2</sub>)、烯丙基(-CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>)等。优选地,烯基具有2至10个碳原子。更优选地,烯基具有2至4个碳原子。

[0130] “直链或支链炔基”是指具有至少一个不饱和位点(即,碳-碳三键)的2至20个碳原子的直链或支链单价烃基。实例包括但不限于乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-戊炔基、己炔基等。优选地,炔基具有2至10个碳原子。更优选地,炔基具有2至4个碳原子。

[0131] 术语“碳环(carbocycle)”、“碳环基”和“碳环(carbocyclic ring)”是指具有3至12个碳原子作为单环或7至12个碳原子作为双环的单价非芳族、饱和或部分不饱和的环。具

有7至12个原子的双环碳环可排列为,例如,双环[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系统,而具有9或10个环原子的双环碳环可排列为双环[5,6]或[6,6]系统或排列为桥环系统诸如双环[2.2.1]庚烷、双环[2.2.2]辛烷和双环[3.2.2]壬烷。单环碳环的实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、1-环戊-1-烯基、1-环戊-2-烯基、1-环戊-3-烯基、环己基、1-环己-1-烯基、1-环己-2-烯基、1-环己-3-烯基、环己二烯基、环庚基、环辛基、环壬基、环癸基、环十一烷基、环十二烷基等。

[0132] 术语“环烷基(cyclic alkyl)”和“环烷基(cycloalkyl)”可互换使用。它们是指单价饱和碳环基团。优选地,环烷基是3至7元单环基团。更优选地,环烷基是环己基。

[0133] 术语“环烯基”是指在环结构中具有至少一个双键的碳环基团。

[0134] 术语“环炔基”是指在环结构中具有至少一个三键的碳环基团。

[0135] “芳基”意指从母体芳族环系的单个碳原子上去除一个氢原子而得到的6-18个碳原子的单价芳族烃基。一些芳基在示例性结构中表示为“Ar”。芳基包括含有稠合于饱和、部分不饱和环或芳族碳环或杂环的双环基团。典型的芳基包括但不限于来自于苯(苯基)、取代的苯、萘、蒽、茛基、二氢茛基、1,2-二氢萘、1,2,3,4-四氢萘基等的基团。优选地,芳基是苯基。

[0136] 术语“杂环(heterocycle)”、“杂环基”和“杂环(heterocyclic ring)”在本文中可互换使用且是指饱和或部分不饱和的(即,环内具有一个或多个双键和/或三键)3至18个环原子的碳环基团,其中至少一个环原子选自氮、氧、磷和硫的杂原子,其余的环原子是C,其中一个或多个环原子任选被下文所述的一个或多个取代基独立地取代。杂环可以是具有3至7个环成员的单环(2至6个碳原子和1至4个选自N、O、P和S的杂原子)或具有7至10个环成员的双环(4至9个碳原子和1至6个选自N、O、P和S的杂原子),例如:双环[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系统。杂环描述于Paquette,Leo A.;“Principles of Modern Heterocyclic Chemistry”(W.A.Benjamin,New York,1968),特别是第1、3、4、6、7和9章;The Chemistry of Heterocyclic Compounds,A series of Monographs”(John Wiley&Sons,New York,1950年至今),特别是第13、14、16、19和28卷;和J.Am.Chem.Soc.(1960)82:5566。“杂环基”还包括其中杂环基与饱和、部分不饱和环或芳族碳环或杂环稠合的基团。杂环的实例包括但不限于吡咯烷基、四氢呋喃基、二氢呋喃基、四氢噻吩基、四氢吡喃基、二氢吡喃基、四氢噻喃基、哌啶子基、吗啉代、硫代吗啉代、噻噁烷基、哌嗪基、高哌嗪基、氮杂环丁基、氧杂环丁基、硫杂环丁基、高哌啶基、氧杂环庚基、硫杂环庚基、氧氮杂茛基、二氮杂茛基、硫氮杂茛基、2-吡咯啉基、3-吡咯啉基、吲哚啉基、2H-吡喃基、4H-吡喃基、二噁烷基、1,3-二氧戊环基、吡唑啉基、二噻烷基、二硫戊环基、二氢吡喃基、二氢噻吩基、二氢呋喃基、吡唑烷基咪唑啉基、咪唑烷基、3-氮杂二环[3.1.0]己基、3-氮杂二环[4.1.0]庚基和氮杂二环[2.2.2]己基。螺环部分也包括在此定义的范围之内。其中环原子被氧代(=O)部分取代的杂环基团的实例是嘧啶酮基和1,1-二氧化-硫代吗啉基。

[0137] 术语“杂芳基”是指5或6元环的单价芳族基团,且包含含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-18个原子的稠环系统(其中至少一者是芳族)。杂芳基的实例是吡啶基(包括,例如2-羟基吡啶基)、咪唑基、咪唑并吡啶基、嘧啶基(包括,例如4-羟基嘧啶基)、吡唑基、三唑基、吡嗪基、四唑基、呋喃基、噻吩基、异噻唑基、噻唑基、噁唑基、异噻唑基、吡咯基、喹啉基、异喹啉基、吲哚基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、噌啉基、吲哚啉

基、酞嗪基、哒嗪基、三嗪基、异吡啶基、蝶啶基、嘌呤基、噁二唑基、三唑基、噻二唑基、呋咱基、苯并呋咱基、苯并苯硫基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、喹唑啉基、喹喔啉基、萘啶基和呋喃吡啶基。

[0138] 该杂环或杂芳基可连接有碳(碳连接的)或氮(氮连接的)(在此类连接可能的情况下)。通过实例而非限制的方式,碳键合的杂环或杂芳基键合于吡啶的2、3、4、5或6位,哒嗪3、4、5或6位,嘧啶的2、4、5或6位,吡嗪的2、3、5或6位,呋喃、四氢呋喃、噻吩(thiofuran)、噻吩(thiophene)、吡咯、四氢吡咯的2、3、4或5位,噁唑、咪唑或噻唑的2、4或5位,异噁唑、吡唑或异噻唑的3、4或5位,氮丙啶的2或3位,氮杂环丁烷的2、3或4位,喹啉的2、3、4、5、6、7或8位,或异喹啉的1、3、4、5、6、7或8位。

[0139] 通过实例而非限制的方式,氮键合的杂环或杂芳基连接于氮丙啶、氮杂环丁烷、吡咯、吡咯烷、2-吡咯啉、3-吡咯啉、咪唑、咪唑烷、2-咪唑啉、3-咪唑啉、吡唑、吡唑啉、2-吡唑啉、3-吡唑啉、哌啶、哌嗪、吡啶、吡啶啉、1H-吡啶的1位,异吡啶或异吡啶啉的2位,吗啉的4位和咪唑或O-咪唑的9位。

[0140] 存在于杂芳基或杂环基中的杂原子包括诸如NO、SO和SO<sub>2</sub>的氧化形式。

[0141] 术语“卤代”或“卤素”是指F、Cl、Br或I。

[0142] 上述的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、碳环基、芳基、杂环基和杂芳基环可任选被一个以上(如,2、3、4、5、6或更多个)取代基取代。

[0143] 如果取代基被描述为被“取代的”,那么非氢取代基代替取代基的碳、氧、硫或氮上的氢取代基。因此,例如,取代的烷基取代基是其中至少一个非氢取代基代替烷基取代基上的氢取代基的烷基取代基。举例而言,单氟烷基是被一个氟代取代基取代的烷基,而二氟烷基是被两个氟代取代基取代的烷基。应该认识到,如果在取代基上存在多于一个的取代基,那么每个非氢取代基可相同或不同(除非另有说明)。

[0144] 如果取代基被描述为“任选取代的”,那么该取代基可以是(1)未被取代的,或(2)被取代的。如果取代基的碳被描述为任选被一系列取代基的一个或多个取代时,那么碳上的一个或多个氢原子(在存在任何氢原子的程度上)可单独地和/或一起被独立选择的任选取代基替换。如果取代基的氮被描述为任选被一系列取代基的一个或多个取代时,那么氮上的一个或多个氢原子(在存在任何氢原子的程度上)可被独立选择的任选取代基替换。一个示例性取代基可表示为-NR'R”,其中R'和R”与它们连接的氮原子一起可形成杂环。由R'和R”与它们连接的氮原子一起形成的杂环可部分或完全饱和。在一个实施方案中,杂环由3至7个原子组成。在另一实施方案中,该杂环选自吡咯基、咪唑基、吡唑基、三唑基、四唑基、异噁唑基、吡啶基和噻唑基。

[0145] 本说明书中的术语“取代基”、“基团(radical)”和“基团(group)”可互换使用。

[0146] 如果一组取代基统称为任选地被一系列取代基的一个或多个取代时,所述基团可包括:(1)未被取代的取代基,(2)未被任选的取代基取代的可取代的取代基,和/或(3)被一个或多个任选的取代基取代的可取代的取代基。

[0147] 如果取代基被描述为任选地被多达特定数目的非氢取代基取代,那么该取代基可以是(1)未被取代的;或(2)被多达该特定数目的非氢取代基取代或者被多达取代基的可取代位置上的最大数目的取代基取代(以较小者为准)。因此,例如,如果取代基被描述为任选地被多达3个非氢取代基取代的杂芳基,那么具有小于3个可取代位置的任何杂芳基将任选地

被多达仅与杂芳基所具有的可取代位置一样多的非氢取代基取代。在非限制性实施例中, 此类取代基可选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基, 芳基, 杂芳基, 杂环基, 卤素、胍基 $[-NH(C=NH)NH_2]$ ,  $-OR^{100}$ ,  $NR^{101}R^{102}$ ,  $-NO_2$ ,  $-NR^{101}COR^{102}$ ,  $-SR^{100}$ , 由 $-SOR^{101}$ 表示的亚砷, 由 $-SO_2R^{101}$ 表示的砷, 磺酸盐 $-SO_3M$ , 硫酸盐 $-OSO_3M$ , 由 $-SO_2NR^{101}R^{102}$ 表示磺酰胺, 氰基, 叠氮基,  $-COR^{101}$ ,  $-OCOR^{101}$ ,  $-OCONR^{101}R^{102}$ 和聚乙二醇单元 $(-OCH_2CH_2)_nR^{101}$ , 其中M是H或药学上可接受的阳离子(诸如 $Na^+$ 或 $K^+$ );  $R^{101}$ 、 $R^{102}$ 和 $R^{103}$ 各自独立地选自H, 具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基, 聚乙二醇单元 $(-OCH_2CH_2)_nR^{104}$ , 其中n为1至24的整数, 具有6至10个碳原子的芳基, 具有3至10个碳原子的杂环和具有5至10个碳原子的杂芳基; 且 $R^{104}$ 是H或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基, 其中由 $R^{100}$ 、 $R^{101}$ 、 $R^{102}$ 、 $R^{103}$ 和 $R^{104}$ 表示的基团中的烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基和杂环基任选被一个或多个(如, 2、3、4、5、6或更多个)独立地选自卤素、 $-OH$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 的取代基和具有1至4个碳原子的未取代的直链或支链的烷基取代。优选地, 上文描述的任选取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、碳环基、芳基、杂环基和杂芳基的取代基包括卤素、 $-CN$ 、 $-NR^{102}R^{103}$ 、 $-CF_3$ 、 $-OR^{101}$ 、芳基、杂芳基、杂环基、 $-SR^{101}$ 、 $-SOR^{101}$ 、 $-SO_2R^{101}$ 和 $-SO_3M$ 。

[0148] 术语“化合物”或“细胞毒性化合物”、“细胞毒性二聚体”以及“细胞毒性二聚体化合物”可互换使用。它们旨在包括这样的化合物, 对于该化合物而言, 其结构式或化学式或任何衍生物已公开于通过引用方式并入本发明或其结构式或化学式或任何衍生物。该术语还包括本发明公开的所有式的化合物的立体异构体、几何异构体、互变异构体、溶剂化物、代谢物、盐(如, 药学上可接受的盐)和前药及前药盐。该术语还包括任何溶剂化物、水合物和前述的任何多晶型物。在本申请中描述的本发明某些方面中, “立体异构体”、“几何异构体”、“互变异构体”、“溶剂化物”、“代谢物”、“盐”、“前药”、“前药盐”“缀合物”、“缀合物盐”、“溶剂化物”、“水合物”或“多晶型物”的特定引用在使用术语“化合物”而未引用这些其它形式的情况下不应理解为在本发明其它方面的这些形式的有意省略。

[0149] 本文使用的术语“缀合物”是指本文所述的化合物或其连接于细胞结合剂的衍生物。

[0150] 本文使用的术语“可连接于细胞结合剂”是指本文所述的化合物或其衍生物, 其包含适于将这些化合物或其衍生物键合于细胞结合剂的至少一个连接基团或前体。

[0151] 给定基团的术语“前体”是指可通过任何脱保护、化学修饰或缀合反应而产生该基团的任何基团。

[0152] 术语“连接于细胞结合剂”是指包含至少一种本文所述化合物(如, 本文所述的式(I) - (IV) 和(VIII) - (XI) 的化合物和药物-连接子化合物), 或其经由合适的连接基团结合于细胞结合剂的衍生物或其前体的缀合物分子。

[0153] 术语“手性”是指具有镜像配偶体(mirror image partner)的不重叠性性质的分子, 而术语“非手性”是指其镜像配偶体可重叠的分子。

[0154] 术语“立体异构体”是指具有相同的化学组成和连接性, 但是其原子在空间具有不同取向的化合物, 该取向不能通过单键旋转互换。

[0155] “非对映异构体”是指具有两个或多个手性中心且其分子并非彼此镜像的立体异构体。非对映异构体具有不同的物理性质, 如熔点、沸点、光谱特性和反应性。非对映异构体混合物可在高分辨率分析程序(诸如结晶、电泳和色谱法)下进行分离。

[0156] “对映体”是指彼此为非重叠镜像化合物的两种立体异构体。

[0157] 本文使用的立体化学的定义和惯例通常遵循S.P.Parker,编辑, McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; 及ElieI, E.和Wilen, S., “Stereochemistry of Organic Compounds,” John Wiley&Sons, Inc., New York, 1994。本发明的化合物可含有不对称或手性中心, 并因此存在不同的立体异构形式。预期包括但不限于非对映体、对映体和阻转异构体以及其混合物例如外消旋混合物的本发明化合物的所有立体异构形式, 形成本发明的一部分。许多有机化合物以光学活性形式存在, 即, 它们具有旋转平面偏振光的平面的能力。在描述光学活性化合物时, 前缀D和L, 或R和S用于表示分子在其手性中心处的绝对构型。前缀d和l 或 (+) 和 (-) 用于表示化合物的平面偏振光旋转的标记, 其中 (-) 或 l 意指该化合物是左旋的。前缀为 (+) 或 d 的化合物是右旋的。对于给定的化学结构, 除了彼此互为镜像以外, 这些立体异构体是相同的。特定的立体异构体也可称为对映体, 且此类异构体的混合物经常被称为对映体混合物。50:50的对映体混合物被称为外消旋混合物或外消旋物, 它们可在化学反应或过程中没有立体选择性或立体特异性的情况下产生。术语“外消旋混合物”和“外消旋物”是指无光学活性的两种对映体种类的等摩尔混合物。

[0158] 术语“互变异构体”或“互变异构形式”是指经由低能量屏障可相互转化的不同能量的结构异构体。例如, 质子互变异构体 (也称为质子异变互变异构体) 包括经由质子迁移的互变, 如酮-烯醇和亚胺-烯胺异构化。价互变异构体包括通过一些成键电子的重组而相互转化。

[0159] 在本申请中所用的术语“前药”是指本发明化合物的前体或衍生形式, 其能够被酶或水解激活或转化为更具活性的母体形式。参见, 如, Wilman, “Prodrugs in Cancer Chemotherapy” Biochemical Society Transactions, 14, 第 375-382页, 615th Meeting Belfast (1986) 和Stella等人, “Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery”, Directed Drug Delivery, Borchardt等人, (编辑), 第247-267页, Humana Press (1985)。本发明的前药包括但不限于, 含酯的前药、含磷酸酯的前药、含有硫代磷酸酯的前药、含硫酸酯的前药、含肽的前药、D-氨基酸修饰的前药、糖基化的前药、含 $\beta$ -内酰胺类的前药、任选取代的含苯氧基乙酰胺的前药、任选取代的含苯乙酰胺的前药、5-氟胞嘧啶和可转化为更具活性的无细胞毒素药物的其它5-氟尿苷前药。可被衍生成用于本发明前药形式的细胞毒性药物的实例包括但不限于本发明的化合物和诸如上述的化疗剂。

[0160] 术语“前药”也意在包括在生物学条件下 (体外或体内) 可水解、氧化或发生其它反应的化合物的衍生物以提供本发明的化合物。前药可仅在生物学条件下在此类反应中活化, 或者它们可以其未反应的形式具有活性。本发明涵盖的前药的实例包括但不限于本文公开的包含可生物水解部分的任一式的化合物的类似物或衍生物, 诸如可生物水解的酰胺、可生物水解的酯、可生物水解的氨基甲酸酯、可生物水解的碳酸酯、可生物水解的酰胺和可生物水解的磷酸酯类似物。前药的其它实例包括本文公开的任一式的化合物的衍生物, 其包括-NO、-NO<sub>2</sub>、-ONO或-ONO<sub>2</sub>部分。前药通常可使用众所周知的方法制备, 如Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery (1995) 172-178, 949-982 (Manfred E. Wolff 编辑, 第5版); 还可参见Goodman and Gilman's, The Pharmacological basis of Therapeutics, 第8版, McGraw-Hill, Int. 编辑于 1992年, “Biotransformation of

Drugs”。

[0161] 本发明前药的一种优选形式包括本发明的化合物(含有或不含有任何连接子基团)和缀合物,其包括在化合物/缀合物的亚胺键和亚胺反应剂之间形成的加合物。另一优选形式的本发明的前药包括诸如式(I)-(IV)的那些化合物,其中当N和C之间的双线 $\equiv$ 表示单键时,X是H或氨基保护基,该化合物变为前药。本发明的前药可包含本文所述的一种或两种形式的前药(如,含有化合物/缀合物的亚胺键和亚胺反应剂之间形成的加合物,和/或当X是-H时含有Y离去基团)。

[0162] 术语“亚胺反应剂”是指能够与亚胺基团反应的试剂。亚胺反应剂的实例包括但不限于,亚硫酸盐( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_2$ , 与阳离子形成的 $\text{HSO}_3^-$ 、 $\text{SO}_3^{2-}$ 或 $\text{HSO}_2^-$ 的盐)、偏亚硫酸氢盐( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 或与阳离子形成的 $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ 的盐),单、二、三和四硫代磷酸盐( $\text{PO}_3\text{SH}_3$ 、 $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_3$ 、 $\text{POS}_3\text{H}_3$ 、 $\text{PS}_4\text{H}_3$ 或与阳离子形成的 $\text{PO}_3\text{S}^{3-}$ 、 $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$ 、 $\text{POS}_3^{3-}$ 或 $\text{PS}_4^{3-}$ 的盐),硫代磷酸酯( $(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$ 、 $\text{R}^i\text{SH}$ 、 $\text{R}^i\text{SOH}$ 、 $\text{R}^i\text{SO}_2\text{H}$ 、 $\text{R}^i\text{SO}_3\text{H}$ ),各种胺(羟胺(如, $\text{NH}_2\text{OH}$ ),肼(如, $\text{NH}_2\text{NH}_2$ )、 $\text{NH}_2\text{O}-\text{R}^i$ 、 $\text{R}^{i'}$   $\text{NH}-\text{R}^i$ 、 $\text{NH}_2-\text{R}^i$ ), $\text{NH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$ , $\text{NH}_2-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}_2$ ,硫代硫酸盐( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 或与阳离子形成的 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 的盐)、连二亚硫酸盐( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 或与阳离子形成的 $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ 的盐)、二硫代磷酸盐( $\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^k)(\text{SH})(\text{OH})$ 或其与阳离子形成的盐),异羟肟酸( $\text{R}^k\text{C}(=\text{O})\text{NHOH}$ 或与阳离子形成的盐),酰肼( $\text{R}^k\text{CONHNH}_2$ ),甲醛次硫酸氢盐氢钠( $\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{H}$ 或与阳离子形成的 $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ 的盐,诸如, $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-\text{Na}^+$ ),糖化的核苷酸(诸如GDP-甘露糖),氟达拉滨或其混合物,其中 $\text{R}^i$ 和 $\text{R}^{i'}$ 各自独立地为具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被至少一个选自 $-\text{N}(\text{R}^j)_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 和 $-\text{PO}_3\text{H}$ 的取代基取代; $\text{R}^i$ 和 $\text{R}^{i'}$ 可进一步任选地被本文所述的烷基取代基取代; $\text{R}^j$ 是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基; $\text{R}^k$ 是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,芳基,杂环基或杂芳基(优选地, $\text{R}^k$ 是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基;更优选地, $\text{R}^k$ 是甲基、乙基或丙基)。优选地,阳离子是单价阳离子,诸如 $\text{Na}^+$ 或 $\text{K}^+$ 。优选地,亚胺反应剂选自亚硫酸盐、羟胺、脲和肼。更优选地,亚胺反应剂是 $\text{NaHSO}_3$ 或 $\text{KHSO}_3$ 。

[0163] 除非另外指明,否则本文使用的术语“可生物水解的酰胺”、“可生物水解的酯”、“可生物水解的氨基甲酸酯”、“可生物水解的碳酸酯”、“可生物水解的酰脲”和“可生物水解的磷酸盐酯类似物”分别意指酰胺、酯、氨基甲酸酯、碳酸酯、酰脲或磷酸盐酯类似物,它们或者:1)不破坏化合物的生物活性并赋予该化合物在体内有利的特性,诸如吸收、作用持续时间或作用开始;或者2)其本身无生物活性但在体内转化为生物活性化合物。可生物水解的酰胺的实例包括但不限于低级烷基酰胺、 $\alpha$ -氨基酸酰胺、烷氧基酰基酰胺和烷基氨基烷基羰基酰胺。可生物水解的酯的实例包括但不限于低级烷基酯、烷氧基酰氧基酯、烷基酰氨基烷基酯和胆碱酯。可生物水解的氨基甲酸酯的实例包括但不限于低级烷基胺、取代的乙二胺、氨基酸、羟基烷基胺、杂环胺和杂芳香胺及聚醚胺。特别优选的前药和前药盐是将此类化合物施用于哺乳动物时提高本发明化合物生物利用度的那些。

[0164] 本文使用的短语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的药学上可接受的有机盐或无机盐。示例性的盐包括但不限于硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸式柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、单宁酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐(gentisinate)、富马酸盐、葡萄糖酸盐、葡萄糖醛酸盐、蔗糖盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲烷磺酸盐“甲磺酸盐”、乙烷磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、扑酸盐(即,1,1'-

亚甲基-双-(2-羟基-3-萘甲酸))盐、碱金属(如,钠和钾)盐、碱土金属(如,镁)盐和铵盐。药学上可接受的盐可涉及引入另一种分子如乙酸根离子、琥珀酸根离子或其他平衡离子。平衡离子可以是使母体化合物上的电荷稳定的任何有机或无机部分。此外,药学上可接受的盐在其结构中可具有一个以上的带电原子。多个带电原子为药学上可接受盐的一部分的情况可具有多个平衡离子。因此,药学上可接受的盐可具有一个或多个带电原子和/或一个或多个平衡离子。

[0165] 如果本发明的化合物是碱,那么所需的药学上可接受的盐可通过本领域可获得的任何合适的方法制备,例如,用以下酸来处理游离碱:用无机酸,如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、甲磺酸、磷酸等;或用有机酸,如乙酸、马来酸、琥珀酸、扁桃酸、富马酸、丙二酸、丙酮酸、草酸、乙醇酸、水杨酸、吡喃酮侧基酸(如葡萄糖醛酸或半乳糖醛酸)、 $\alpha$ -羟基酸(如柠檬酸或酒石酸)、氨基酸(如天冬氨酸或谷氨酸)、芳族酸(如苯甲酸或肉桂酸)、磺酸(如对甲苯磺酸或乙磺酸)等。

[0166] 如果本发明的化合物是酸,那么所需的药学上可接受的盐可通过任何合适的方法制备,例如,用无机或有机碱,如胺(伯胺、仲胺或叔胺)、碱金属氢氧化物或碱土金属氢氧化物等处理游离酸。合适盐的示例性实例包括但不限于衍生自氨基酸(如甘氨酸和精氨酸)的有机盐,氨,伯胺、仲胺、叔胺及环胺,如哌啶、吗啉和哌嗪以及衍生自钠、钙、钾、镁、锰、铁、铜、锌、铝和锂的无机盐。

[0167] 本文使用的术语“溶剂化物”意指进一步包括化学计量或非化学计量的溶剂,如水、异丙醇、丙酮、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸及乙醇胺二氯甲烷、2-丙醇等的化合物,其通过非共价分子间力结合。化合物的溶剂化物或水合物易于通过向化合物中加入至少一摩尔当量的羟基溶剂(如甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇或水)而导致亚胺部分的溶剂化或水合来制备。

[0168] 术语“异常细胞生长”和“增殖性疾病”在本申请中可互换使用。除非另有说明,本文所用的“异常细胞生长”是指独立于正常调节机制的细胞生长(如,接触抑制的丧失)。这包括,例如,以下的异常生长:(1)通过表达突变的酪氨酸激酶或过度表达受体酪氨酸激酶而增殖的肿瘤细胞(肿瘤);(2)其中发生异常酪氨酸激酶活化的其它增殖性疾病的良性和恶性细胞;(3)通过受体酪氨酸激酶增殖的任何肿瘤;(4)通过异常丝氨酸/苏氨酸激酶活化而增殖的任何肿瘤;和(5)其中发生异常丝氨酸/苏氨酸激酶活化的其它增殖性疾病的良性和恶性细胞。

[0169] 术语“癌症”和“癌性的”是指或描述哺乳动物中通常以失调的细胞生长为特征的生理状态。“肿瘤”包括一种或多种癌细胞和/或良性或癌前细胞。癌症的实例包括但不限于,癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病或淋巴恶性肿瘤。此类癌症的更具体的实例包括鳞状细胞癌(如,上皮鳞状细胞癌);肺癌,包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌(“NSCLC”)、肺腺癌和肺鳞状癌;腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(gastric cancer)或胃癌(stomach cancer),包括胃肠道癌;胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌(kidney cancer)或肾癌(renal cancer)、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、肛门癌、阴茎癌、急性白血病、头/脑和颈癌(head/brain and neck cancer)、淋巴器官的癌症和骨髓恶性肿瘤,包括白血病(急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓性白血病

(CML)、急性单核细胞白血病 (AMOL)、多毛细胞白血病 (HCL)、T-细胞幼淋巴细胞白血病 (T-PLL)、巨粒淋巴细胞白血病、成人T细胞白血病)、淋巴瘤 (小淋巴细胞淋巴瘤 (SLL)、霍奇金淋巴瘤 (Hodgkin's lymphomas) (结节硬化型、混合细胞型、富于淋巴细胞型、淋巴细胞削减型或未削减型和结节性淋巴细胞主导的霍奇金淋巴瘤)、非霍奇金淋巴瘤 (所有亚型)、慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤、B-细胞幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞性淋巴瘤 (诸如瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症)、脾边缘带淋巴瘤、浆细胞肿瘤 (浆细胞性骨髓瘤、浆细胞瘤、单克隆免疫球蛋白沉积物疾病、重链病)、结节外边缘区B细胞淋巴瘤 (MALT淋巴瘤)、结节边缘区B细胞淋巴瘤 (NMZL)、滤泡淋巴瘤、外套细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、纵隔 (胸腺) 大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤/白血病、T细胞幼淋巴细胞白血病、T细胞巨粒淋巴细胞白血病、攻击性NK细胞白血病、成人T细胞白血病/淋巴瘤、结节外NK/T细胞淋巴瘤 (鼻型)、肠病型T细胞淋巴瘤、肝脾T细胞淋巴瘤、亚顶级NK细胞淋巴瘤、蕈样真菌病/塞扎里综合征、原发性皮肤间CD30<sup>+</sup>阳性T细胞淋巴增生性病症、原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤、淋巴瘤样丘疹病、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤 (非特异性)、间变性大细胞淋巴瘤)、多发性骨髓瘤 (浆细胞性骨髓瘤或卡勒病 (Kahler's disease))。

[0170] “治疗剂”包括诸如抗体、肽、蛋白质、酶的生物制剂或化疗剂两者。

[0171] “化疗剂”是用于治疗癌症的化学物质。化疗治疗剂的实例包括厄洛替尼 (TARCEVA<sup>®</sup>, Genentech/OSI Pharm.), 硼替佐米 (VELCADE<sup>®</sup>, Millennium Pharm.), 氟维司群 (FASLODEX<sup>®</sup>, AstraZeneca), 舒尼替尼 (SU11248, Pfizer), 来曲唑 (FEMARA<sup>®</sup>, Novartis), 甲磺酸伊马替尼 (GLEEVEC<sup>®</sup>, Novartis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), 奥沙利铂 (Eloxatin<sup>®</sup>, Sanofi), 5-FU (5-氟尿嘧啶), 甲酰四氢叶酸, 雷帕霉素 (Sirolimus, RAPAMUNE<sup>®</sup>, Wyeth), 拉帕替尼 (TYKERB<sup>®</sup>, GSK572016, Glaxo Smith Kline), 洛那法尼 (Lonafarnib) (SCH 66336), 索拉非尼 (BAY 43-9006, Bayer Labs) 和吉非替尼 (IRESSA<sup>®</sup>, AstraZeneca), AG 1478、AG 1571 (SU 5271; Sugen), 烷化剂, 诸如塞替派和 CYTOXAN<sup>®</sup> 环磷酰胺; 烷基磺酸盐类诸如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡; 氮丙啶类诸如苯并多巴、卡波醌、美妥多巴和尿多巴; 氮丙啶和甲基三聚氰胺包括六甲蜜胺、三乙烯三聚氰胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基三聚氰胺; 己酸配质 (特别是泡番荔枝辛和泡番荔枝辛酮); 喜树碱 (包括合成类似物托泊替康); 苔藓抑素; callystatin; CC-1065 (包括它的阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物); 念珠藻素 (特别是念珠藻素1和念珠藻素8); 多拉司他汀; 多卡米星 (包括合成类似物, KW-2189和CB1-TM1); 艾榴塞洛素 (eleutherobin); 水鬼蕉碱; 葡枝珊瑚醇; 海绵抑制素; 氮芥诸如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯代磷酰胺、雌氮芥、异环磷酰胺、氮芥、氧化氮芥氢氯化物、美法仑、新氮芥、胆甾醇对苯乙酸氮芥、泼尼莫司汀、曲磷胺、乌拉莫司汀; 亚硝基脲类诸如卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀和雷尼司汀 (ranimustine); 抗生素诸如烯二炔抗生素 (如, 卡其霉素, 特别是卡其霉素  $\gamma$  11 和卡其霉素  $\omega$  11 (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); 达内霉素, 包括达内霉素A; 双磷酸盐类诸如氯膦酸; 埃斯波霉素; 以及新制癌菌素生色团和相关的色蛋白烯二炔抗生素生色团), 阿克拉霉素、放线菌素、安曲霉

素、偶氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素 C (cactinomycin)、卡柔比星 (carabycin), 洋红霉素 (caminomycin), 嗜癌素、色霉素 (chromomycinis)、更生霉素、柔红霉素、地托比星、6-重氨基-5-氧代-L-正亮氨酸、ADRIAMYCIN® (多柔比星)、吗啉代-多柔比星, 氰基吗啉代-多柔比星, 2-吡咯啉基-多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素诸如丝裂霉素C、霉酚酸、诺拉霉素、橄榄霉素类 (olivomycins)、培洛霉素、泊非霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑霉素、链佐星、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星; 抗代谢药诸如甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶 (5-FU); 叶酸类似物诸如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙; 嘌呤类似物诸如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、thiamiprine、硫鸟嘌呤; 嘧啶类似物诸如安西他滨、阿扎胞苷、6-阿扎尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷; 雄激素诸如卡普睾酮、屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯; 抗肾上腺素诸如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦; 叶酸补充剂诸如亚叶酸 (frolinic acid); 醋葡萄糖内酯; 醛磷酰胺糖苷; 氨基酮戊酸; 恩尿嘧啶; 安吡啶; 比生群; 依达曲沙 (edatraxate); 地磷酰胺; 秋水仙胺; 地吡醌; elformithine; 依利醋铵; 埃博霉素; 依托格鲁; 硝酸镓; 羟基豚; 香菇多糖; 氯尼达明 (lonidainine); 美登木素生物碱诸如美坦辛和美登木素 (ansamitocins); 米托胍脲; 米托蒽醌; 莫哌达醇 (mopidanmol); 二胺硝吡啶 (nitraerine); 喷司他丁; 蛋氨酸芥 (phenamet); 吡柔比星; 洛索蒽醌; 鬼臼酸; 2-乙基酰肼; 丙卡巴肼; **PSK®** - 多糖复合物 (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); 雷佐生; 根霉素; 施佐非兰 (sizofuran); 锗螺胺; 替奴佐酸、三亚胺醌、2,2',2''-三氯三乙胺; 单端孢霉烯类 (尤其是T-2毒素、疣孢菌素 (verracurin) A、杆孢菌素A和anguidine); 乌拉坦; 长春地辛; 达卡巴嗪; 甘露莫司汀; 二溴甘露醇; 二溴卫矛醇; 哌泊溴烷; 加胞嘧啶 (gacytosine); 阿糖胞苷 (“Ara-C”); 环磷酰胺; 塞替派; 紫杉烷, 如, **TAXOL®** (紫杉醇, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), **ABRAXANE®** (无克列莫佛), 紫杉醇白蛋白工程纳米粒子制剂 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.) 和 **TAXOTERE®** (多西紫杉醇 (doxetaxel); Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 苯丁酸氮芥 (chlorambucil); **GEMZAR®** (吉西他滨); 6-巯鸟嘌呤; 巯嘌呤; 氨甲蝶呤; 铂类似物诸如顺铂和卡铂; 长春碱; 依托泊苷 (VP-16); 异环磷酰胺; 米托蒽醌; 长春新碱; **NAVELBINE®** (长春瑞滨); 米托蒽醌; 替尼泊苷; 依达曲沙; 柔红霉素; 氨基蝶呤; 卡培他滨 (**XELODA®**); 伊班膦酸盐; CPT-11; 拓扑异构酶抑制剂RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸 (DMFO); 类维生素A诸如视黄酸; 以及上文中任一种药学上可接受的盐、酸和衍生物。

[0172] 也包括在“化疗剂”定义中的是: (i) 起到调节或抑制激素对肿瘤作用的抗激素剂诸如抗雌激素类和选择性雌激素受体调节剂 (SERM), 包括, 例如, 他莫昔芬 (包括 **NOLVADEX®**; 枸橼酸他莫昔芬)、雷洛昔芬、屈洛昔芬、4-羟泰米芬、曲沃昔芬、雷洛西芬、LY117018、奥那司酮和 **FARESTON®** 枸橼酸托瑞米芬 (toremifine citrate) (ii) 抑制芳香酶的芳香酶抑制剂, 其调节肾上腺中的雌激素产生, 诸如, 例如4(5)-咪唑、氨鲁米特、**MEGASE®** (醋酸甲地孕酮)、**AROMASIN®** (依西美坦; Pfizer)、formestanie、法倔唑、**RIVISOR®** (伏氯唑)、**FEMARA®** (来曲唑; Novartis) 和 **ARIMIDEX®** (阿那曲唑; AstraZeneca); (iii) 抗雄激素类诸如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞

林;以及曲沙他滨(1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物);(iv)蛋白激酶抑制剂;(v)脂质激酶抑制剂;(vi)反义寡核苷酸,特别地是抑制基因在异常细胞增殖中牵涉的信号传导途径中表达的那些,诸如,例如,PKC- $\alpha$ 、Ralf和H-Ras;(vii)核酶,诸如VEGF表达抑制剂(如,ANGIOZYME®)和HER2表达抑制剂;(viii)疫苗诸如基因治疗疫苗,例如,ALLOVECTIN®、LEUVECTIN®和VAXID®;PROLEUKIN® rIL-2;拓扑异构酶1抑制剂诸如LURTOTECAN®;ABARELIX® rmRH;(ix)抗血管生成剂诸如贝伐单抗(AVASTIN®, Genentech);和(x)上文任一药剂的药学上可接受的盐、酸和衍生物。其它抗血管生成剂包括MMP-2(基质-金属蛋白酶2)抑制剂、MMP-9(基质-金属蛋白酶9)抑制剂、COX-II(环氧合酶II)抑制剂和VEGF受体酪氨酸激酶抑制剂。可与本发明化合物/组合物组合使用的此类有用的基质金属蛋白酶抑制剂的实例描述于以下专利中:WO 96/33172、WO 96/27583、EP 818442、EP 1004578、WO 98/07697、WO 98/03516、WO 98/34918、WO 98/34915、WO 98/33768、WO 98/30566、EP 606,046、EP 931,788、WO 90/05719、WO 99/52910、WO 99/52889、WO 99/29667、WO 99/07675、EP 945864、美国专利No.5,863,949;美国专利No.5,861,510,和EP 780,386,所有这些专利均通过引用整体并入本文。VEGF受体酪氨酸激酶抑制剂的实例包括4-(4-溴代-2-氟代苯胺基)-6-甲氧基-7-(1-甲基哌啶-4-基甲氧基)喹唑啉(ZD6474;WO 01/32651中的实施例2)、4-(4-氟代-2-甲基吡啶-5-基氧基)-6-甲氧基-7-(3-吡咯烷-1-基丙氧基)-喹唑啉(AZD 2171;WO 00/47212中的实施例240)、瓦他拉尼碱(PTK 787;WO 98/35985)和SU 11248(舒尼替尼;WO 01/60814),以及诸如公开于PCT公开No.WO 97/22596、WO 97/30035、WO 97/32856和WO 98/13354的那些化合物)。

[0173] 可与本化合物组合使用的化疗剂的其它实例包括PI3K抑制剂(磷酸肌醇-3激酶),诸如以下文献中报告的那些:Yaguchi等人(2006) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 98 (8):545-556;美国专利No.7,173,029;美国专利No. 7,037,915;美国专利No.6,608,056;美国专利No.6,608,053;美国专利No. 6,838,457;美国专利No.6,770,641;美国专利No.6,653,320;美国专利No. 6,403,588;WO 2006/046031;WO 2006/046035;WO 2006/046040;WO 2007/042806;WO 2007/042810;WO 2004/017950;US 2004/092561;WO 2004/007491;WO 2004/006916;WO 2003/037886;US 2003/149074;WO 2003/035618;WO 2003/034997;US 2003/158212;EP 1417976;US 2004/053946;JP 2001247477;JP 08175990;JP 08176070;美国专利No. 6,703,414和WO 97/15658,所有这些文献均通过引入并入本文。此类PI3K抑制剂的具体实例包括SF-1126(PI3K抑制剂,Semafore Pharmaceuticals)、BEZ-235(PI3K抑制剂,Novartis)、XL-147(PI3K抑制剂,Exelixis,Inc.)。

[0174] 化疗剂还可包括本文引用的品牌药物的非专利药或生物仿制药或它们的改良药中的任一者,包括改良的制剂、前药、递送装置(缓释、生物粘附涂层、定向递送等)和剂型。

[0175] “代谢物”是特定的化合物、其衍生物或其缀合物或其盐通过体内代谢而产生的产物。化合物、其衍生物、或其缀合物的代谢物可使用本领域已知的常规技术进行鉴定并使用如本文所述的那些试验来测定其活性。此类产物可通过施用化合物的例如氧化、羟基化、还原、水解、酰胺化、脱酰胺、酯化、脱酯、酶裂解等而产生。因此,本发明包括本发明的化合物、其衍生物、或其缀合物的代谢物,其包括通过包括使本发明的化合物、其衍生物或其缀合物与哺乳动物接触足够的时间以产生其代谢产物的方法而产生的化合物、其衍生物或其缀合

物。

[0176] 短语“药学上可接受的”表示物质或组合物在化学上和/或毒理学上与构成制剂的其它成分和/或用其治疗的哺乳动物是可相容的。

[0177] 术语“保护基”或“保护部分”是指通常用于阻断或保护特定的官能团而使化合物、其衍生物或其缀合物上的其它官能团发生反应的取代基。例如，“氨基保护基”或“氨基保护部分”是连接于阻断或保护化合物中氨基官能团的氨基基团的取代基。此类基团是本领域熟知的(参见例如P.Wuts和T.Greene, 2007, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第7章, J.Wiley&Sons, NJ) 并通过氨基甲酸酯, 如甲基和氨基甲酸乙酯、FMOC、取代的氨基甲酸乙酯、通过1,6- $\beta$ -消除(也称为“自我切除”)断裂的氨基甲酸酯、脲、酰胺、肽、烷基和芳基衍生物例示。合适的氨基保护基包括乙酰基、三氟乙酰基、叔丁氧基羰基(BOC)、苄氧基羰基(CBZ)和9-芴基亚甲氧基羰基(Fmoc)。对于保护基及其用途的一般描述, 参见P.G.M.Wuts和T.W.Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley&Sons, New York, 2007.

[0178] 术语“离去基团”是指在置换或取代期间脱离的带电基团或不带电的部分。此类离去基团是本领域熟知的, 包括但不限于卤素、酯类、烷氧基、羟基、甲苯磺酸酯、三氟甲磺酸酯、甲磺酸酯、腈、叠氮化物、氨基甲酸酯、二硫化物、硫酯、硫醚和重氮化合物。

[0179] 术语“双官能交联剂”, “双官能连接器”或“交联剂”是指具有两个反应性基团的修饰剂, 其中一者能与细胞结合剂反应, 而另一者与细胞毒性化合物反应以将两部分连接在一起。此类双官能交联剂是本领域熟知的(参见, 例如, Isalm and Dent in *Bioconjugation* 第5章, 第218-363页, Groves Dictionaries Inc. New York, 1999)。例如, 能够通过硫醚键连接的双官能交联剂包括N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)引入马来酰亚胺基, 或用N-琥珀酰亚胺基-4-(碘代乙酰基)-氨基苯甲酸酯(SIAB)引入碘乙酰基。将马来酰亚胺基或碘代乙酰基引入于细胞结合剂的其它双官能交联剂是本领域熟知的(参见美国专利申请2008/0050310, 20050169933, 获自Pierce Biotechnology Inc., P.O.Box 117, Rockland, IL 61105, USA)且包括但不限于双-马来酰亚胺聚乙二醇(BMPEO)、BM(PEO)<sub>2</sub>、BM(PEO)<sub>3</sub>、N-( $\beta$ -马来酰亚胺丙基氧基)琥珀酰亚胺酯(BMPS)、 $\gamma$ -马来酰亚胺丁酸N-琥珀酰亚胺酯(GMBS)、 $\epsilon$ -马来酰亚胺己酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(EMCS)、5-马来酰亚胺戊酸NHS、HBVS、N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧基-(6-酰氨基己酸酯)(其是SMCC的“长链”类似物(LC-SMCC))、间马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、4-(4-N-马来酰亚胺苯基)-丁酸酰肼或HCl盐(MPBH)、3-(溴代乙酰基)丙酸-N-琥珀酰亚胺酯(SBAP)、碘乙酸N-琥珀酰亚胺酯(SIA)、 $\kappa$ -马来酰胺基十一烷酸N-琥珀酰亚胺酯(KMUA)、4-(对马来酰亚胺基苯基)丁酸N-琥珀酰亚胺酯(SMPB)、琥珀酰亚胺基-6-( $\beta$ -马来酰亚胺基丙酰胺基)己酸酯(SMPH)、琥珀酰亚胺基-(4-烯基磺酰基)苯甲酸酯(SVSB)、二硫代双-马来酰亚胺乙烷(DTME)、1,4-双-马来酰亚胺丁烷(BMB)、1,4双马来酰亚胺基-2,3-二羟基丁烷(BMDB)、双-马来酰亚胺基己烷(BMH)、双-马来酰亚胺乙烷(BMOE)、4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SMCC)、(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SIAB)、间-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-MBS)、N-( $\gamma$ -马来酰亚胺丁基氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-GMBS)、N-( $\epsilon$ -马来酰亚胺乙酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-EMCS)、N-( $\kappa$ -马来酰亚胺

十一酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-KMUS)和4-(对马来酰亚胺基苯基)丁酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SMPB)。

[0180] 异双官能交联剂是具有两个不同反应性基团的双官能交联剂。含有胺反应性N-羧基琥珀酰亚胺基团(NHS基团)和羰基反应性酰肼基团的异双官能交联剂也可用于将本文描述的细胞毒性化合物与细胞结合剂(如,抗体)反应。此类商业上可获得的杂双官能交联剂的实例包括6-丙酮脒基烟酸琥珀酰亚胺酯(SANH)、4-酰肼对苯二酸琥珀酰亚胺酯盐酸盐(SHTH)和肼基烟酸琥珀酰亚胺酯盐酸盐(SHNH)。具有对酸敏感连接的缀合物还可通过使用本发明的含肼的苯二氮䓬类衍生物来制备。可使用的双官能交联剂的实例包括琥珀酰亚胺基-对甲酰基苯甲酸酯(SFB)和琥珀酰亚胺基-对甲酰苯氧乙酸酯(SFPA)。

[0181] 能够使细胞结合剂与细胞毒性化合物通过二硫键连接的双官能交联剂在本领域是已知的且包括N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯(SPDB)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)2-硫代丁酸酯(磺基-SPDB)以引入二硫代吡啶基。其它可用于引入二硫基的双官能交联剂是本领域已知的且公开于美国专利6,913,748、6,716,821和美国专利公布20090274713和20100129314中,其全部通过引用并入本文。可选地,也可使用引入硫醇基的交联剂,诸如2-亚氨基硫杂环戊烷、高半胱氨酸硫内酯或S-乙酰琥珀酸酐。

[0182] 本文所定义的“连接子”、“连接子部分”或“连接基团”是指将诸如细胞结合剂和细胞毒性化合物的两部分连接在一起的部分。通常,连接子在连接两个连接基团的条件下基本上是惰性的。双官能交联剂可包含两个反应性基团,在连接子部分的每个末端各一个,使得一个反应性基团可首先与细胞毒素化合物反应以提供具有连接部分和第二反应性基团的化合物,该化合物随后可与细胞结合剂反应。可选地,双官能交联剂的一端可首先与细胞结合剂反应以提供具有连接子部分和第二反应性基团的细胞结合剂,其随后可与细胞毒性化合物反应。该连接部分可含有使细胞毒性部分在特定位点释放的化学键。适合的化学键在本领域是众所周知的且包括二硫键、硫醚键、对酸不稳定的键、对光不稳定的键、对肽酶不稳定的键、以及对酯酶不稳定的键(参见例如美国专利5,208,020、5,475,092、6,441,163、6,716,821、6,913,748、7,276,497、7,276,499、7,368,565、7,388,026和7,414,073)。优选二硫键、硫醚、对肽酶不稳定的键。可用于本发明的其它连接子包括非裂解性连接子,例如美国公开第20050169933号中详细描述中描述的那些,或带电荷的连接子或亲水性连接子并且描述于US 2009/0274713、US 2010/0129314和WO 2009/134976,其各自通过引用明确地并入本文,其各自通过引用明确地并入本文。

[0183] 在一个实施方案中,在一端连接有反应性基团的连接基团(诸如反应性酯)选自下述:

[0184]  $-O(CR_{20}R_{21})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ 、

[0185]  $-O(CR_{20}R_{21})_m(CR_{26}=CR_{27})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ 、

[0186]  $-O(CR_{20}R_{21})_m(\text{炔基})_n(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ 、

[0187]  $-O(CR_{20}R_{21})_m(\text{哌嗪子基})_t(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ 、

[0188]  $-O(CR_{20}R_{21})_m(\text{吡咯并})_t(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ 、

[0189]  $-O(CR_{20}R_{21})_mA''_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ 、

- [0190]  $-S(CR_{20}R_{21})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ 、
- [0191]  $-S(CR_{20}R_{21})_m(CR_{26}=CR_{27})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ 、
- [0192]  $-S(CR_{20}R_{21})_m(\text{炔基})_n(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ 、
- [0193]  $-S(CR_{20}R_{21})_m(\text{哌嗪子基})_t(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ 、
- [0194]  $-S(CR_{20}R_{21})_m(\text{吡咯并})_t(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ 、
- [0195]  $-S(CR_{20}R_{21})_mA''_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ 、
- [0196]  $-NR_{33}(C=O)_p(CR_{20}R_{21})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ 、
- [0197]  $-NR_{33}(C=O)_p(CR_{20}R_{21})_m(CR_{26}=CR_{27})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''$
- [0198]  $(CR_{24}R_{25})_q$
- [0199]  $(CO)_tX''$ 、
- [0200]  $-NR_{33}(C=O)_p(CR_{20}R_{21})_m(\text{炔基})_n(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ 、
- [0201]  $-NR_{33}(C=O)_p(CR_{20}R_{21})_m(\text{哌嗪子基})_t(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q$
- [0202]  $(CO)_tX''$ 、
- [0203]  $-NR_{33}(C=O)_p(CR_{20}R_{21})_m(\text{吡咯并})_t(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ 、
- [0204]  $-NR_{33}(C=O)_p(CR_{20}R_{21})_mA''_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q$
- [0205]  $(CO)_tX''$ 、
- [0206]  $-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ 、
- [0207]  $-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{26}=CR_{27})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ 、
- [0208]  $-(CR_{20}R_{21})_m(\text{炔基})_n(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ 、
- [0209]  $-(CR_{20}R_{21})_m(\text{哌嗪子基})_t(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ 、
- [0210]  $-(CR_{20}R_{21})_mA''_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ 、
- [0211]  $-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N-NR_{30})_n(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ 、
- [0212]  $-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N-NR_{30})_n(CR_{26}=CR_{27})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ 、
- [0213]  $-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N-NR_{30})_n(\text{炔基})_n(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$ 、
- [0214]  $-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N-NR_{30})_nA''_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q$
- [0215]  $(CO)_tX''$ 、
- [0216] 其中：
- [0217]  $m, n, p, q, m', n', t'$  是1至10的整数,或任选地是0；
- [0218]  $t, m'', n''$  和  $p''$  是0或1；
- [0219]  $X''$  选自  $OR_{36}, SR_{37}, NR_{38}, R_{39}$ , 其中  $R_{36}, R_{37}, R_{38}, R_{39}$  是H,或具有1至20个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基和,或聚乙二醇单元  $-(OCH_2CH_2)_n$ ,  $R_{37}$  任选地是硫醇基保护基。当  $t=1$  时,  $COX''$  形成选自以下的反应性酯： $N$ -羟基琥珀酰亚胺酯、 $N$ -羟基邻苯二甲酰亚胺酯、 $N$ -羟基磺基琥珀酰亚胺酯、对硝基苯基酯、二硝基苯基酯、五氟苯基酯及其衍生物,其中所述衍生物促进酰胺键的形成；
- [0220]  $Y''$  不存在或选自  $O, S, S-S$  或  $NR_{32}$ , 其中  $R_{32}$  具有上述  $R$  给出的相同的定义,或

[0221] 当Y”不是S-S”且t=0时,X”选自马来酰亚胺基或卤代乙酰基或SR<sub>37</sub>,其中R<sub>37</sub>具有上述相同的定义;

[0222] A”是选自甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸和谷氨酸的氨基酸或含有2至20个氨基酸单元的多肽。

[0223] R<sub>20</sub>、R<sub>21</sub>、R<sub>22</sub>、R<sub>23</sub>、R<sub>24</sub>、R<sub>25</sub>、R<sub>26</sub>和R<sub>27</sub>相同或不同且是-H或具有1至5个碳原子的直链或支链的烷基。

[0224] R<sub>29</sub>和R<sub>30</sub>相同或不同且是-H或1至5个碳原子的烷基。

[0225] R<sub>33</sub>是-H或具有1至12个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元R-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-,或R<sub>33</sub>是-COR<sub>34</sub>、-CSR<sub>34</sub>、-SOR<sub>34</sub>,或-SO<sub>2</sub>R<sub>34</sub>,其中R<sub>34</sub>是H或具有1至20个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基、或聚乙二醇单元-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;且

[0226] R<sub>40</sub>和R<sub>41</sub>中的一者任选地是带负或正电荷的官能团而另一者是H或具有1至4个碳原子的烷基、烯基、炔基。

[0227] 上述连接基团中的任一者可存在于本发明化合物、药物-连接子化合物或缀合物中的任一者,包括取代本文所述式中任一者的连接基团。

[0228] 术语“氨基酸”是指天然存在的氨基酸或由NH<sub>2</sub>-C(R<sup>aa</sup> R<sup>aa</sup>)-C(=O)OH表示的非天然存在的氨基酸,其中R<sup>aa</sup>和R<sup>aa</sup>各自独立为H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,芳基,杂芳基或杂环基。术语“氨基酸”还指当从胺和/或氨基酸的羧基末端去除一个氢原子时相应的残基,诸如-NH-C(R<sup>aa</sup> R<sup>aa</sup>)-C(=O)O-。

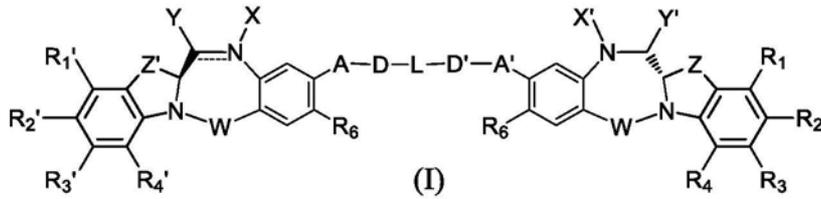
[0229] 术语“阳离子”是指带正电荷的离子。阳离子可以是单价的(如,Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、等),二价的(如,Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、等)或多价的(如,Al<sup>3+</sup>等)。优选地,阳离子是单价的。

[0230] 术语“治疗上的有效量”意指引发受试者中所需的生物反应的活性化合物或缀合物的量。与没有治疗或预防、抑制或延缓疾病病症或疾病本身的进展相比,此类反应包括缓解正在治疗的疾病或病症的症状,预防、抑制或延缓疾病的病症的复发或疾病本身,增加受试者的寿命。特别地根据本文提供的详细公开内容,有效量的确定完全在本领域技术人员的能力范围内。化合物I的毒性和治疗效应可通过细胞培养物和实验动物中的标准药理学方法来确定。本发明的化合物或缀合物或待施用于受试者的其它治疗剂的有效量将取决于受试者多发性骨髓瘤的阶段、种类和状态及受试者的特征,诸如一般健康、年龄、性别、体重和药物耐受性。本发明的化合物或缀合物或待施用的其它治疗剂的有效量也将取决于施用于途径和剂型。可单独调整剂量和间隔以提供足以维持所需的治疗效应的血浆水平的活性化合物。

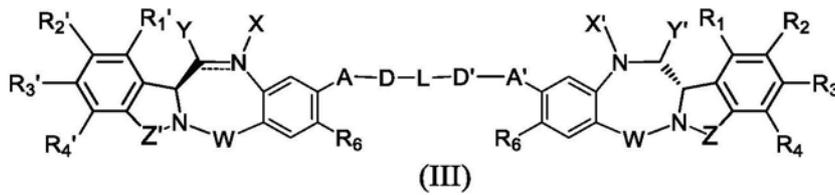
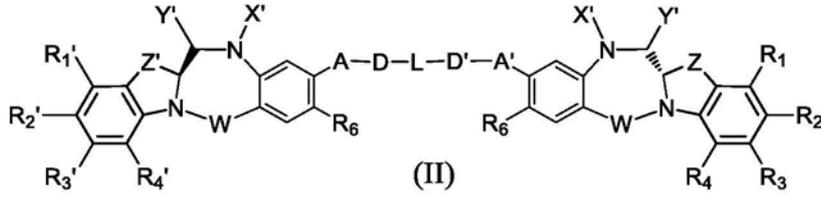
[0231] 细胞毒性化合物

[0232] 本发明涉及本文描述的细胞毒性化合物(如,式(I)、(II)、(III)和(IV)的化合物)。在一个实施方案中,本发明的细胞毒性化合物不包括描述于美国2010/0203007中的任何化合物(其全部教导通过引用并入本文),诸如在下文附带条件中明确放弃的那些。

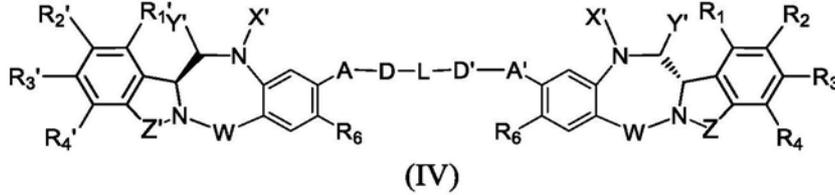
[0233] 在第一具体实施方案中,本发明提供包含具有键合至其的反应性基团的能够将所述细胞毒性化合物共价连接于细胞结合剂(CBA)的连接基团的细胞毒性化合物,其中所述细胞毒性化合物由下式(I)、(II)、(III)或(IV)中的任一者:



[0234]



[0235]



[0236] 或其药学上可接受的盐表示,其中:

[0237] N和C之间的双线 $\equiv$ 表示单键或双键,条件当它是双键时,X不存在且 Y是-H、或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基,而当其是单键时,X 是-H,具有键合至其的反应性基团的连接基团或氨基保护部分;优选地,N 和C之间的双线 $\equiv$ 表示双键;

[0238] Y是-H或离去基团,其选自-OR、-OCOR'、-OCOR'、-OCONR' R''、-NR' R''、-NR' COR''、-NR' NR' R''、任选取代的5或6元含氮杂环(如,哌啶、四氢吡咯、吡啶、吗啉等),由-NR' (C=NH) NR' R''表示的胍基,氨基酸,或由-NRCOP'表示的肽,其中P' 是氨基酸或含有2至20个氨基酸单元的多肽、-SR、-SOR'、-SO<sub>2</sub>M、-SO<sub>3</sub>M、-OSO<sub>3</sub>M、卤素、氰基和叠氨基,其中M是 -H或阳离子;诸如Na<sup>+</sup>或K<sup>+</sup>。优选地,M是-H或Na<sup>+</sup>。优选地,Y选自-SO<sub>3</sub>M、-OH、-OMe、-OEt或-NHOH。更优选地,Y是-SO<sub>3</sub>M或-OH;或,

[0239] Y为亚硫酸盐(HSO<sub>3</sub>、HSO<sub>2</sub>或与阳离子形成的HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>、SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>或HSO<sub>2</sub><sup>-</sup>的盐),偏亚硫酸氢盐(H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>或与阳离子形成的S<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>2-</sup>的盐),单、二、三和四硫代磷酸盐(PO<sub>3</sub>SH<sub>3</sub>、PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>H<sub>2</sub>、POS<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、PS<sub>4</sub>H<sub>2</sub>或与阳离子形成的PO<sub>3</sub>S<sup>3-</sup>、PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>3-</sup>、POS<sub>3</sub><sup>3-</sup>或PS<sub>4</sub><sup>3-</sup>的盐),硫代磷酸酯(R<sup>i</sup>O)<sub>2</sub>PS(OR<sup>i</sup>)、R<sup>i</sup>S<sup>-</sup>、R<sup>i</sup>SO、R<sup>i</sup>SO<sub>2</sub>、R<sup>i</sup>SO<sub>3</sub>,硫代硫酸盐(HS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>或与阳离子形成的S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>的盐),连二亚硫酸盐(HS<sub>2</sub>O<sub>4</sub>或与阳离子形成的S<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>的盐),二硫代磷酸盐(P(=S)(OR<sup>k</sup>)(S)(OH)或其与阳离子形成的盐),异羟肟酸(R<sup>k</sup>C(=O)NOH或与阳离子形成的盐),甲醛次硫酸氢盐(HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>或与阳离子形成的HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>的盐,诸如 HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>Na<sup>+</sup>)或其混合物,其中R<sup>i</sup>是具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被选自-N(R<sup>j</sup>)<sub>2</sub>、-CO<sub>2</sub>H、-SO<sub>3</sub>H和-PO<sub>3</sub>H中的至少一个取代基取代;R<sup>i</sup>可进一步任选地被本文所述的烷基取代基取代;R<sup>j</sup>是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基;R<sup>k</sup>是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,芳基,杂环基或杂芳

基;优选地,Y是亚硫酸氢盐、次硫酸盐、或偏亚硫酸氢盐或其盐(诸如钠盐)的加合物;

[0240] 每次出现时,R独立地选自-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ ,任选取代的具有6至18个碳原子的芳基,任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环,或任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环;

[0241]  $\text{R}'$ 和 $\text{R}''$ 相同或不同,且独立地选自-H,-OH,-OR,-NHR,- $\text{NR}_2$ ,-COR,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ ,和任选取代的具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环;

[0242]  $\text{R}^c$ 是-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基,或具有键合至其的反应性基团的连接基团;

[0243] n是1至24的整数;

[0244] W选自C=O、C=S、 $\text{CH}_2$ 、BH、SO和 $\text{SO}_2$ ;

[0245]  $\text{X}'$ 选自-H,-OH,氨基保护基,具有键合至其的反应性基团的连接基团,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ ,任选取代的具有6至18个碳原子(如,苯基)的芳基,任选取代的含有一个或多个杂原子独立地选自氮、氧和硫杂原子的5至18元杂芳环和任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环。优选地, $\text{X}'$ 是-H,-OH,-Me或具有键合至其的反应性基团的连接基团。更优选地, $\text{X}'$ 是-H;

[0246]  $\text{Y}'$ 选自-H、氧代基团、具有键合至其的反应性基团的连接基团、任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,任选取代的6至18元芳基,任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环,任选取代的具有1至6个杂原子的3至18元杂环;优选地, $\text{Y}'$ 选自-H或氧代。更优选地, $\text{Y}'$ 是-H;

[0247]  $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$ 、 $\text{R}_4$ 、 $\text{R}_1'$ 、 $\text{R}_2'$ 、 $\text{R}_3'$ 和 $\text{R}_4'$ 各自独立地选自-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{R}^c$ ,卤素,胍基 $[-\text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2]$ ,-OR,- $\text{NR}'\text{R}''$ ,- $\text{NO}_2$ ,-NCO,- $\text{NR}'\text{COR}''$ ,-SR,由-SOR'所表示的亚砷,由- $\text{SO}_2\text{R}'$ 所表示的砷,磺酸盐- $\text{SO}_3^-\text{M}^+$ ,硫酸盐- $\text{OSO}_3^-\text{M}^+$ ,由- $\text{SO}_2\text{NR}'\text{R}''$ 所表示的磺酰胺,氰基,叠氮基,-COR',-OCOR',-CONR'R''和具有键合至其的反应性基团的连接基团。优选地, $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$ 、 $\text{R}_2'$ 和 $\text{R}_3'$ 中的一者是具有键合至其的反应性基团的连接基团且其余的是-H;

[0248]  $\text{R}_6$ 是-H,-R,-OR,-SR,- $\text{NR}'\text{R}''$ ,- $\text{NO}_2$ 、卤素、具有键合至其的反应性基团的连接基团、-OR<sup>c</sup>或-SR<sup>c</sup>,其中 $\text{R}^c$ 是-H、具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基。优选地, $\text{R}_6$ 是-OMe或-SMe。甚至更优选地, $\text{R}_6$ 是-OMe;

[0249] Z和Z'独立地选自 $-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-\text{CR}_7\text{R}_8-(\text{CH}_2)_{n_a}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-\text{NR}_9-(\text{CH}_2)_{n_a}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_{n_a}-$ 和 $-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-\text{S}-(\text{CH}_2)_{n_a}-$ ;

[0250]  $n'$ 和 $n_a'$ 相同或不同,且选自0、1、2和3;

[0251]  $\text{R}_7$ 和 $\text{R}_8$ 相同或不同,且各自独立地选自-H,-OH,-SH,-COOH,-NHR',聚乙二醇单元 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ ,氨基酸,具有2至6个氨基酸的肽单元,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基;

[0252]  $\text{R}_9$ 独立地选自-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基,聚乙二醇单元 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ ;

[0253] A和A' 相同或不同,且独立地选自-O-、氧代(-C(=O)-)、-CRR' O-、-CRR' -、-S-、-CRR' S-、-N(R<sub>5</sub>)-和-CRR' N(R<sub>5</sub>)-。优选地,A和A' 相同或不同,且选自-O-和-S-。更优选地,A和A' 是-O-;

[0254] 每次出现时,R<sub>5</sub>独立地为-H或任选取代的具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基;

[0255] D和D' 相同或不同,且独立地不存在或选自氨基酸、具有2至6个氨基酸的肽,和聚乙二醇单元(-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,其中烷基、烯基和炔基被一个或更多(如,2、3、4、5、6或更多个)独立地选自卤素、-OR、-NR' COR''、-SR 和-COR' 的取代基取代;

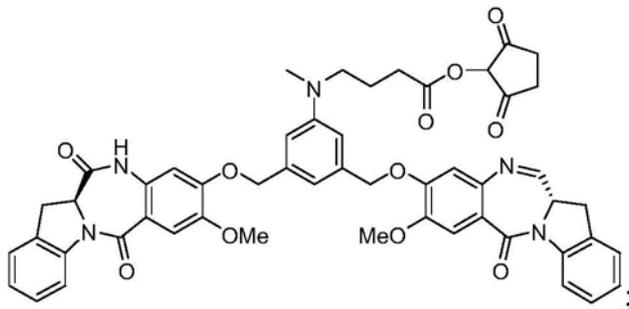
[0256] 优选地,D和D' 相同或不同,且独立地选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基。更优选地,D和D' 是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基。更优选地,D和D' 相同或不同,且选自具有1 至4个碳原子的直链烷基。

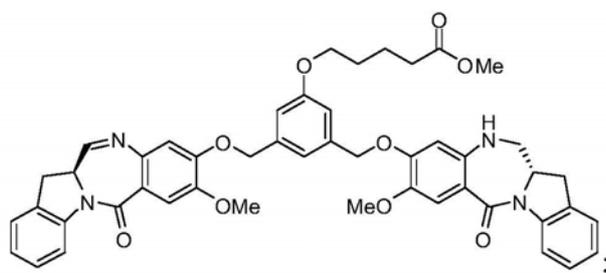
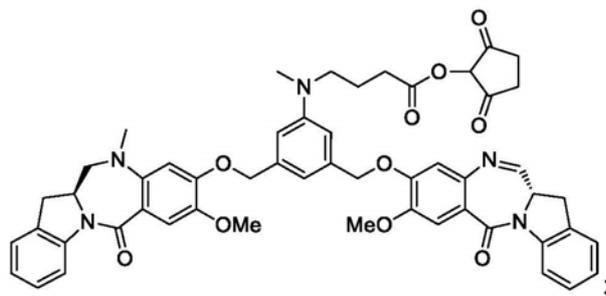
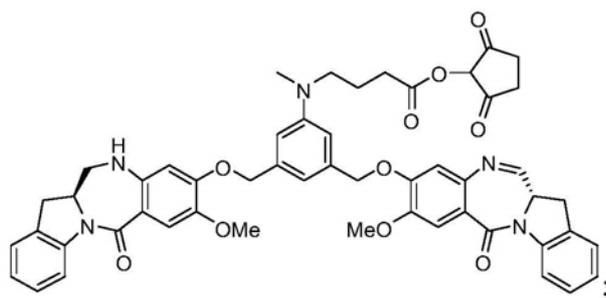
[0257] L不存在,为具有键合至其的反应性基团的连接基团,聚乙二醇单元(-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-,具有1至10个碳原子(如,1-6个碳原子)的直链、支链或环状的烷基或烯基,苯基,具有1至6个独立选自O、S、N和P的杂原子的3 至18元杂环或5至18元杂芳基环,其中所述烷基、烯基任选被具有键合至其的反应性基团的连接基团取代;苯基或杂环或杂芳基环可任选被取代,其中所述取代基可以是具有键合至其的反应性基团的连接基团。

[0258] 在某些实施方案中,X不是具有键合至其的反应性基团的连接基团。在某些实施方案中,N和C之间的双线==表示单键,Y不是-H。

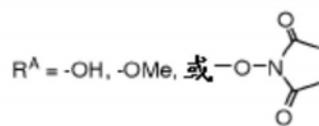
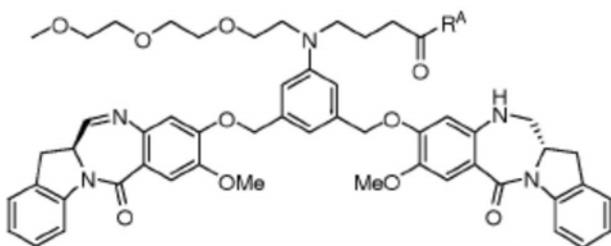
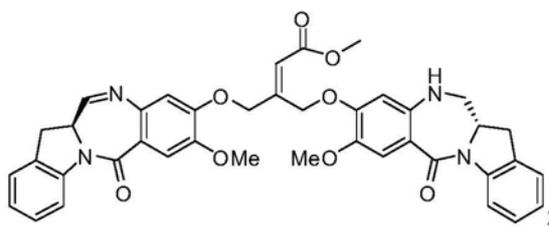
[0259] 在某些实施方案中,本发明的细胞毒性化合物不是下列化合物中的任一者:

[0260]

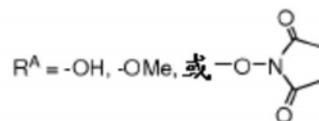
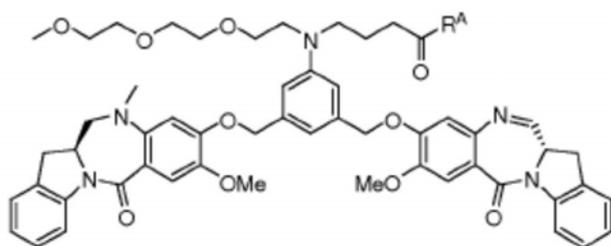




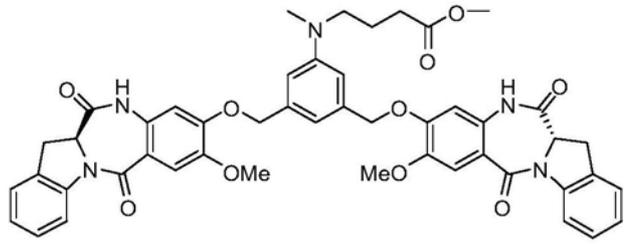
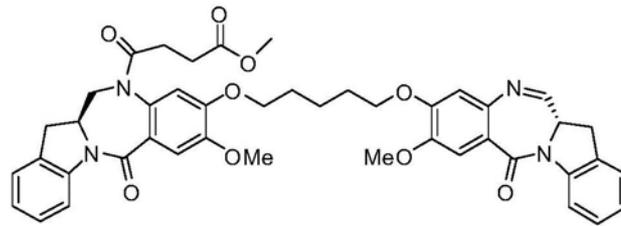
[0261]



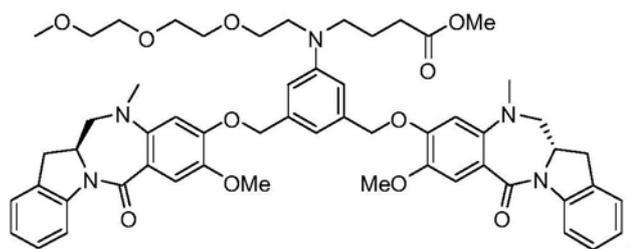
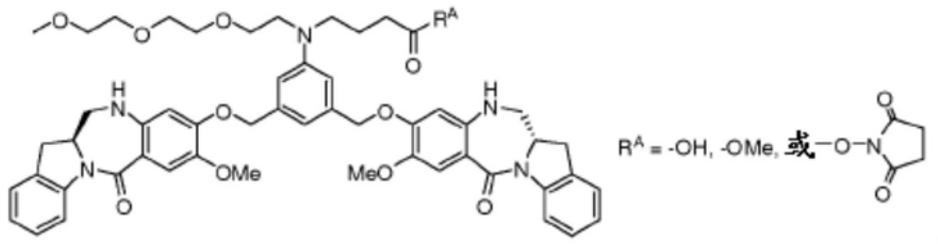
;



;



[0262]



[0263] 在某些实施方案中, Y是-H或离去基团, 其选自-OR、-OCOR'、-OCOR'、-OCONR'、-NR'R''、-NR'COR''、-NR'NR'R''、任选取代的5或6元含氮杂环(如, 吡啶、四氢吡咯、吡唑、吗啉等), 由-NR'(C=NH)NR'R''表示的胍基, 氨基酸, 或由-NRCOP'表示的肽, 其中P'是氨基酸或含有2至20个氨基酸单元的多肽、-SR、-SOR'、-SO<sub>2</sub>M、-SO<sub>3</sub>M、-OSO<sub>3</sub>M、卤素、氰基和叠氮基。优选地, Y是亚硫酸氢钠加合物、连二亚硫酸钠加合物, 或焦亚硫酸钠加合物。在某些实施方案中, Y不是-H。

[0264] 在某些实施方案中, L不存在或选自任选取代的苯基和任选取代的吡啶基, 其中苯基和吡啶基任选具有键合至其的反应性基团的连接基团, 或L是具有连接基团的氨基(即, -N(连接基)-), 所述连接基团具有键合至其的反应性基团, 或L是具有1至6个碳原子且具有连接基团的直链、支链或环状的烷基或烯基, 所述连接基团具有键合至其的反应性基团。

[0265] 在第二具体实施方案中, 对于细胞毒性二聚体(I)、(II)、(III)和(IV), 变量如下所述:

[0266] N和C之间的双线==表示双键;

[0267] Y是-H;

[0268] W是C=O;

[0269] R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>1</sub>'、R<sub>2</sub>'、R<sub>4</sub>和R<sub>4</sub>'是-H;

[0270] R<sub>3</sub>或R<sub>3</sub>'中的一者任选为连接基团, 而另一者是-H;

[0271]  $R_6$ 是-OMe;

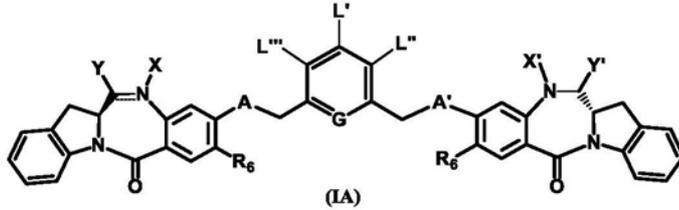
[0272] Z和Z' 是-CH<sub>2</sub>-;

[0273] X' 是-H;

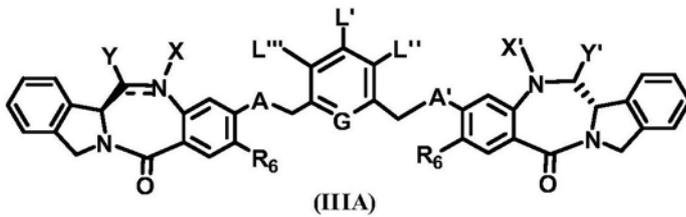
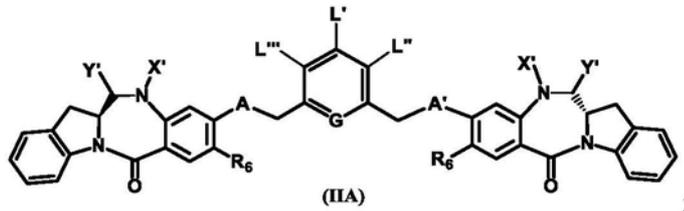
[0274] Y' 是-H;

[0275] A和A' 是-O-;且剩余的变量如第一具体实施方案所述。

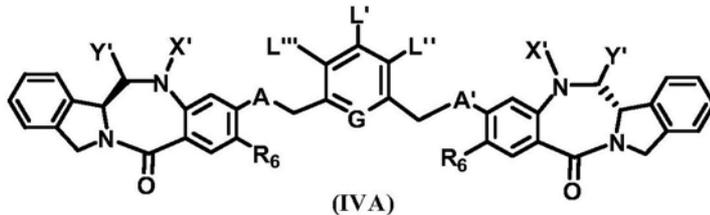
[0276] 在第三具体实施方案中,式(I)、(II)、(III)和(IV)的细胞毒性二聚体由下式表示:



[0277]



[0278]



[0279] 其中:

[0280] N和C之间的双线==表示单键或双键,条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H,而当其是单键时,X选自-H或具有键合至其的反应性基团的连接基团或氨基保护基(优选地X是-H);

[0281] Y选自-H、-OR、-OCOR'、-SR、-NR' R''、-SO<sub>3</sub>M、-SO<sub>2</sub>M或-OSO<sub>3</sub>M,其中M是-H或阳离子,诸如Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>。优选地,Y选自-OH、-OMe、-OEt、-NHOH或-SO<sub>3</sub>M。甚至更优选地,Y是-OH或-SO<sub>3</sub>M,优选地M是-H或Na<sup>+</sup>;

[0282] R是-H、任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,或PEG基团-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>,其中n是1至24的整数,且R<sup>c</sup>是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基;

[0283] R' 和R'' 相同或不同,且选自-H、-OH、-OR、-NRR<sup>g</sup>、-COR,任选取代的具有1至10个碳

原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,具有6至18个碳原子的任选取代的芳基,选自O、S、N和P具有1至6个杂原子的3至18元任选取代的杂环,PEG基团 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ ,其中n是1至24的整数,优选地n是2、4或8;且 $\text{R}^c$ 是-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或PEG基团 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ ;

[0284]  $\text{X}'$  选自-H, -OH, 具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基, 苯基, 以及氨基保护基。优选地,  $\text{X}'$  是-H、-OH 或-Me。更优选地,  $\text{X}'$  是-H;

[0285]  $\text{Y}'$  选自-H, 氧代基团, 具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基。优选地,  $\text{Y}'$  选自-H或-Me。更优选地,  $\text{Y}'$  是-H;

[0286]  $\text{R}_6$  是 $-\text{OR}^c$ 或 $-\text{SR}^c$ , 其中 $\text{R}^c$ 是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基。优选地,  $\text{R}_6$ 是-OMe或-SMe。甚至更优选地,  $\text{R}_6$ 是-OMe;

[0287] A和 $\text{A}'$  选自-O-和-S-。优选地, A和 $\text{A}'$  是-O-;

[0288]  $\text{L}'$ 、 $\text{L}''$ 和 $\text{L}'''$  相同或不同, 且独立地选自-H、具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基, 聚乙二醇单元 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{R}^c$ , 卤素, 胍基 $[-\text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2]$ ,  $-\text{OR}$ ,  $-\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{NR}'\text{COR}''$ ,  $-\text{SR}$ , 由 $-\text{SOR}'$ 表示的亚砷, 由 $-\text{SO}_2\text{R}'$ 表示的砷, 磺酸盐 $-\text{SO}_3^-\text{M}^+$ , 硫酸盐 $-\text{OSO}_3^+\text{M}^-$ , 由 $\text{SO}_2\text{NR}'\text{R}''$ 表示的磺酰胺, 氰基, 叠氮基,  $-\text{COR}'$ ,  $-\text{OCOR}'$ ,  $-\text{OCONR}'\text{R}''$ 和具有键合至其的反应性基团的连接基团, 条件是 $\text{L}'$ 、 $\text{L}''$ 和 $\text{L}'''$ 中仅一者是具有键合至其的反应性基团的连接基团; 优选地,  $\text{L}'$ 是具有键合至其的反应性基团的连接基团。可选地,  $\text{L}'$ 、 $\text{L}''$ 或 $\text{L}'''$ 中的一者为具有键合至其的反应性基团, 而其它为-H的连接基团。更优选地,  $\text{L}'$ 是具有键合至其的反应性基团的连接基团, 而 $\text{L}''$ 和 $\text{L}'''$ 均是-H;

[0289] G选自-CH-或-N-; 而其余的变量如第一具体实施方案所述。

[0290] 在某些实施方案中, X不是具有键合至其的反应性基团的连接基团。在某些实施方案中, N和C之间的双线 $\equiv$ 表示单键, Y不是-H。

[0291] 在某些实施方案中, A和 $\text{A}'$ 均是-O-;  $\text{R}_6$ 是-OMe, 且G是-CH-。

[0292] 在第四具体实施方案中, 对于式(IA)、(IIA)、(IIIA)或(IVA)的细胞毒性二聚体,  $\text{L}'$ 由下式表示:

[0293]  $-\text{W}'-\text{R}^x-\text{V}-\text{R}^y-\text{J}$ ,

[0294] 其中:

[0295]  $\text{W}'$ 和V相同或不同, 且各自独立地不存在或选自 $-\text{CR}^e\text{R}^e-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{SO}-$ 、 $-\text{SO}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{NR}^e-$ 、 $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^e)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^e)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^e)-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}^e)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^e)-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{N}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^e)\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{N}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^e)-$ 、 $-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-$ 、 $-\text{SS}-$ 或 $-\text{C}(=\text{O})-$ 或氨基酸, 或具有2至8个氨基酸的肽;

[0296]  $\text{R}^x$ 和 $\text{R}^y$ 相同或不同, 且各自独立地不存在或者是具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基, 具有6至10个碳原子的芳基或具有1至3个选自O、N或S的杂原子的3至8元杂环;

[0297]  $\text{R}^e$ 和 $\text{R}^e$ 相同或不同, 且选自-H, 具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{R}^k$ , 其中 $\text{R}^k$ 是-H, 具有1至6个碳原子的直链、支链的环状的烷基, 任选地具有仲氨基(如,  $-\text{NHR}^{101}$ )或叔氨基( $-\text{NR}^{101}\text{R}^{102}$ )基团或5或6元含氮杂环, 如哌啶或吗啉, 其中 $\text{R}^{101}$ 和 $\text{R}^{102}$ 各自独立地为具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基。优选地,  $\text{R}^{101}$ 和 $\text{R}^{102}$ 各自独立地为具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基;

[0298] n是1至24的整数;且

[0299] J包含键合至其的反应性基团,且选自马来酰亚胺、卤代乙酰氨基、-SH、-SSR<sup>d</sup>、-CH<sub>2</sub>SH、-CH(Me)SH、-C(Me)<sub>2</sub>SH、-NHR<sup>c1</sup>、-CH<sub>2</sub>NHR<sup>c1</sup>、-NR<sup>c1</sup>NH<sub>2</sub>、-COOH和-COE,其中-COE表示反应性酯,其选自但不限于N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、硝基苯基(如,2或4-硝基苯基)酯、二硝基苯基(如,2,4-二硝基苯基)酯、磺基-四氟苯基(如,4-磺基-2,3,5,6-四氟苯基)酯和五氟苯基酯,且其中R<sup>c1</sup>是-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基,且,

[0300] R<sup>d</sup>选自苯基、硝基苯基(如,2或4-硝基苯基)、二硝基苯基(如,2或4-硝基苯基)、羧基硝基苯基(如,3-羧基-4-硝基苯基)、吡啶基或硝基吡啶基(如,4-硝基吡啶基)。

[0301] 在某些实施方案中,J是-SH、-SSR<sup>d</sup>、马来酰亚胺或N-羟基琥珀酰亚胺酯。

[0302] 在某些实施方案中,R<sup>e</sup>是-H或-Me;R<sup>e</sup>是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基或-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>;n是2至8的整数,且R<sup>k</sup>是-H、-Me或-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NMe<sub>2</sub>,而其余的变量如在上文第四具体实施方案中所述。

[0303] 在某些实施方案中,V是氨基酸或具有2至8个氨基酸的肽。在某些实施方案中,V是缬氨酸-瓜氨酸-gly-gly-gly或ala-leu-ala-leu。

[0304] 在某些实施方案中,

[0305] W<sup>o</sup>是-O-、-N(R<sup>e</sup>)-或-N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-;

[0306] R<sup>e</sup>是H、具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基或-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>;

[0307] R<sup>x</sup>是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基;

[0308] V不存在、-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-、-C(=O)-NH-、-S-、-NH-C(=O)-;

[0309] R<sup>y</sup>不存在或者是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基;且

[0310] J是-SH、-SSR<sup>d</sup>或-COE(优选地,N-羟基琥珀酰亚胺酯)。剩余的变量如第四具体实施方案所述。

[0311] 在某些实施方案中,

[0312] W<sup>o</sup>是-O-、-N(R<sup>e</sup>)-或-N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-;

[0313] R<sup>e</sup>是H、Me或-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-Me;

[0314] n是2至6的整数;

[0315] R<sup>x</sup>是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基;

[0316] V和R<sup>y</sup>不存在;且

[0317] J为-COE,优选N-羟基琥珀酰亚胺酯。剩余的变量如第四具体实施方案所述。

[0318] 在第五具体实施方案中,L'由下式表示:

[0319] -W<sup>o</sup>-[CR<sub>1</sub><sup>a</sup>,R<sub>2</sub><sup>a</sup>]<sub>a</sub>-V-[Cy]<sub>0-1</sub>-[CR<sub>3</sub><sup>b</sup>,R<sub>4</sub><sup>b</sup>]<sub>b</sub>-COE,

[0320] 其中:

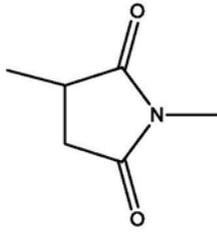
[0321] R<sub>1</sub><sup>a</sup>、R<sub>2</sub><sup>a</sup>和R<sub>3</sub><sup>b</sup>各自独立地为-H或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基,优选为-Me;

[0322] R<sub>4</sub><sup>b</sup>是-H、具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基(优选-Me)、-SO<sub>3</sub>H或-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>,其中M<sup>+</sup>是药学上可接受的阳离子;

[0323] a是0-5(如,从0至2、3、4或5)的整数,且b是0-6(如,从0至3、4、5或6)的整数;且

[0324] Cy是具有N杂原子的任选取代的5元杂环,优选地Cy是

[0325]

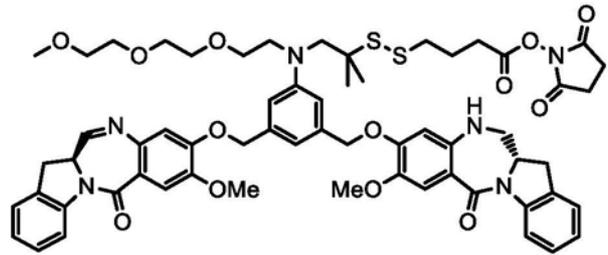
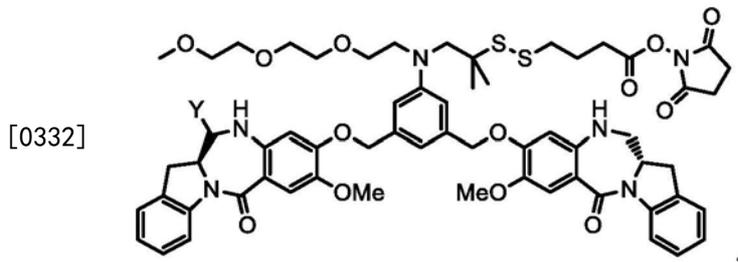
[0326] 在某些实施方案中, W' 是 -N(R<sup>e</sup>) -。[0327] 在某些实施方案中, 诸如在第四或第五具体实施方案中, R<sup>e</sup> 是 -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>2-6</sub>-R<sup>k</sup>, 其中 R<sup>k</sup> 是 -H, 具有 1 至 6 个碳原子的直链、支链环状的烷基。

[0328] 在某些实施方案中, 诸如在第四和/或第五具体实施方案中, V 是 -S- 或 -SS-。

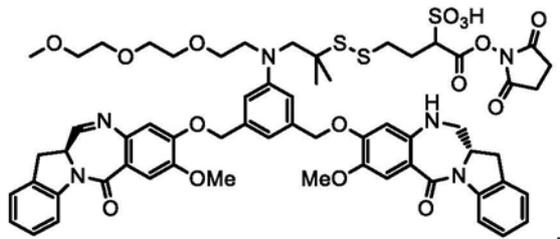
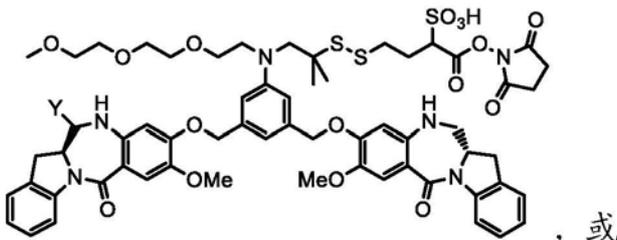
[0329] 在第六具体实施方案中, 诸如在第四和第五具体实施方案中, L' 由下式表示:

[0330] -NR<sup>e</sup>-[CR<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>]<sub>a</sub>-S-[CR<sub>3</sub>,R<sub>4</sub>]<sub>b</sub>-COE。

[0331] 在某些实施方案中, 化合物是下式的任一个:

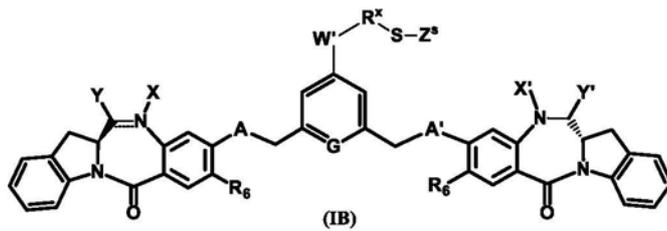


[0333]

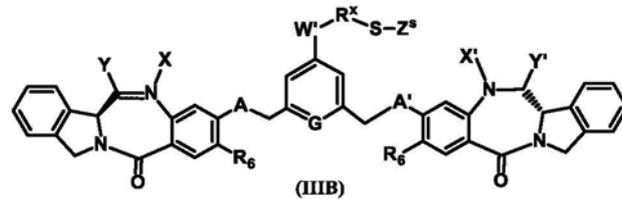
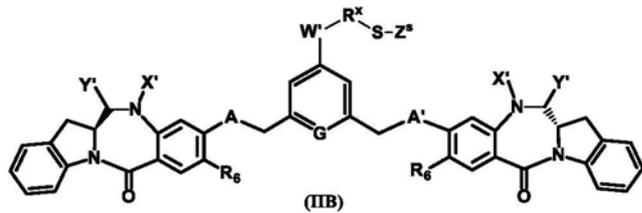
[0334] 其中 Y 是 -H 或 -SO<sub>3</sub>M; 且 M 是 -H 或药学上可接受的阳离子。在某些实施方案中, Y' 是 -SO<sub>3</sub>M。

[0335] 在第七具体实施方案中, 诸如在第四和/或第五具体实施方案中, L' 由下式表示:

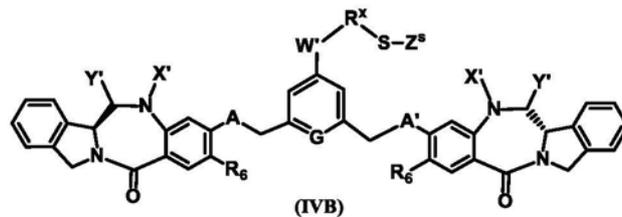




[0342]



[0343]



[0344] 其中:

[0345]  $W'$  不存在或选自  $-O-$ 、 $-N(R^e)-$ 、 $-N(R^e)-C(=O)-$ 、 $-N(C(=O)R^e)-$ 、 $-S-$  或  $-CH_2-S-$ 、 $-CH_2NR^e-$ ;

[0346]  $R^x$  不存在或选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基;

[0347]  $R^e$  是  $-H$ ，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或  $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ，其中  $R^k$  是  $-H$ ，具有1至6个碳原子的直链、支链环状的烷基，任选地具有仲氨基(如， $-NHR^{101}$ )或叔氨基( $-NR^{101}R^{102}$ )基团或5或6元含氮杂环，如哌啶或吗啉，其中  $R^{101}$  和  $R^{102}$  各自独立地为具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基。优选地， $R^{101}$  和  $R^{102}$  各自独立地为具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基;

[0348]  $Z^s$  是  $-H$ 、 $-SR^m$ ;

[0349]  $R^m$  是  $R^d$  或具有1至4个碳原子的取代或未取代的具有反应性酯的直链或支链的烷基，所述反应性酯选自  $N$ -羟基琥珀酰亚胺酯、 $N$ -羟基邻苯二甲酰亚胺酯、 $N$ -羟基磺基琥珀酰亚胺酯、对硝基苯基酯、二硝基苯基酯、五氟苯基酯;

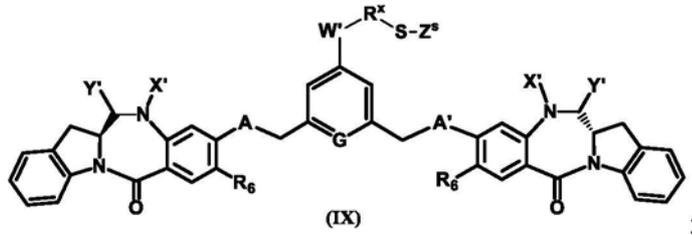
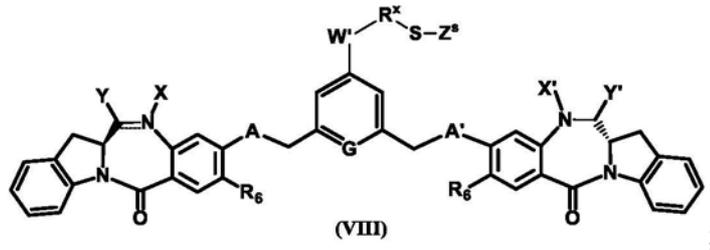
[0350]  $R^d$  选自苯基、硝基苯基、二硝基苯基、羧基硝基苯基、吡啶基或硝基吡啶基;且

[0351]  $n$  是1至24的整数，且剩余的变量如上文第三具体实施方案所述。

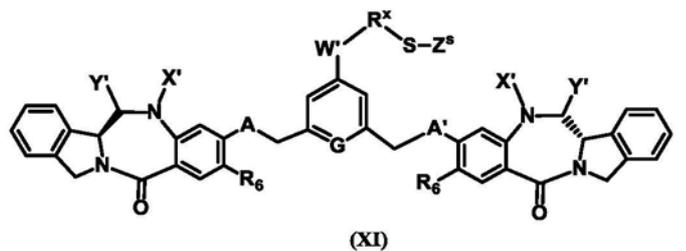
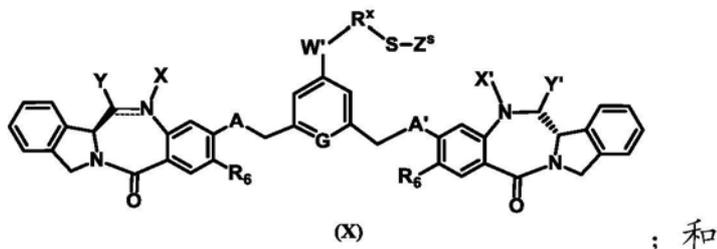
[0352] 优选地， $R^k$  是  $-H$  或  $-Me$  且  $n$  是2至8的整数。优选地， $R^x$  是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基;且剩余的变量如上文第三、第四和/或第五具体实施方案所述。

[0353] 在第九具体实施方案中，式(I)、(II)、(III)和(IV)的细胞毒性二聚体由下式表

示:



[0354]



[0355] 其中:

[0356] N和C之间的双线 $\equiv$ 表示单键或双键,条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H,而当其是单键时,X选自-H或具有键合至其的反应性基团的连接基团或氨基保护基(优选地X是-H或氨基保护基;更优选地,X是-H);

[0357] Y选自-H、-OR、-OCOR'、-SR、-NR' R''、-SO<sub>3</sub>M、-SO<sub>2</sub>M或-OSO<sub>3</sub>M(如,Y是-OR、-OCOR'、-SR、-NR' R''、-SO<sub>3</sub>M、-SO<sub>2</sub>M或-OSO<sub>3</sub>M),其中M是-H或阳离子,诸如Na<sup>+</sup>或K<sup>+</sup>;

[0358] R是-H、任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,或PEG基团-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>,其中n是1至24的整数,且R<sup>c</sup>是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基;

[0359] R'和R''相同或不同,且选自-H、-OH、-OR、-NRR<sup>g</sup>、-COR,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,具有6至18个碳原子的任选取代的芳基,选自O、S、N和P具有1至6个杂原子的3至18元任选取代的杂环,PEG基团-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>,其中n是1至24的整数,优选地n是2、4或8;且R<sup>g</sup>是-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或PEG基团-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>;

[0360] X'选自-H、-OH,具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、

烯基或炔基,苯基,以及氨基保护基;

[0361] Y' 选自 -H, 氧代基团, 具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基;

[0362] A和A' 选自 -O- 和 -S-;

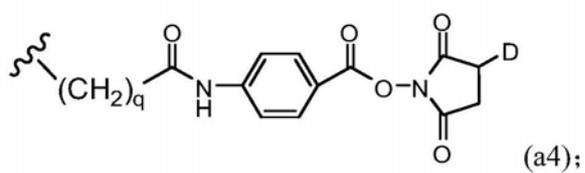
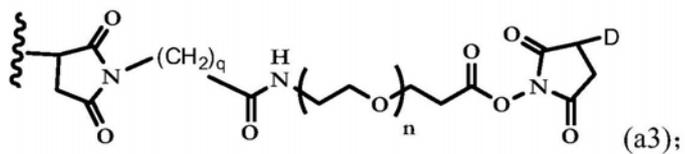
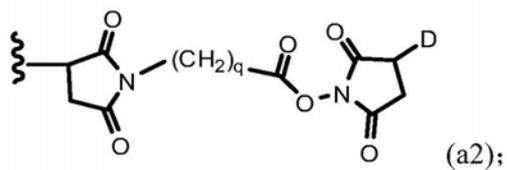
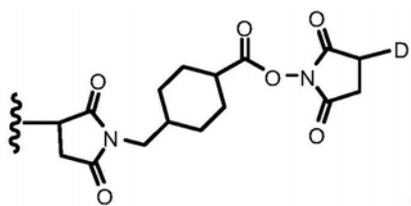
[0363] W' 不存在或选自 -O-、-N(R<sup>e</sup>)-、-N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-、-N(C(=O)R<sup>e</sup>)-、-S- 或 -CH<sub>2</sub>-S-、-CH<sub>2</sub>NR<sup>e</sup>-;

[0364] R<sup>x</sup> 不存在或选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基;

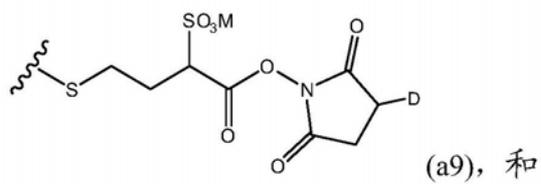
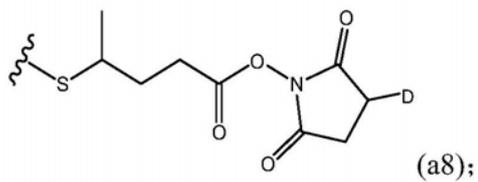
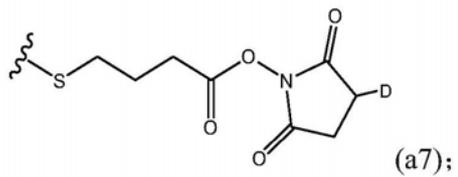
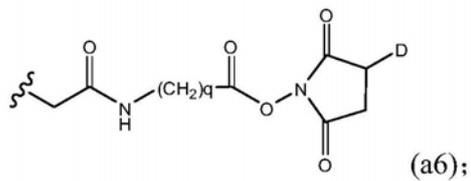
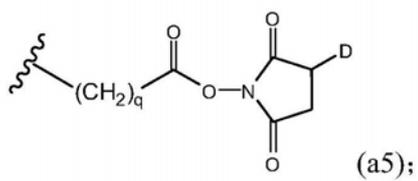
[0365] R<sup>e</sup> 是 -H, 具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或 -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>, 其中R<sup>k</sup> 是 -H, 具有1至6个碳原子的直链、支链环状的烷基, 任选地具有仲氨基(如, -NHR<sup>101</sup>) 或叔氨基(-NR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>) 基团或5或6元含氮杂环, 如哌啶或吗啉, 其中R<sup>101</sup> 和R<sup>102</sup> 各自独立地为具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基;

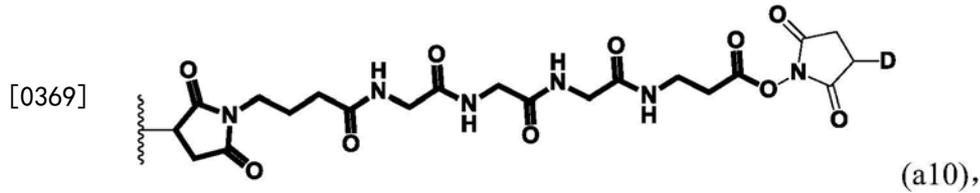
[0366] G 选自 -CH- 或 -N-;

[0367] Z<sup>s</sup> 是 -H, 或选自下式中的任一者:



[0368]





[0370] 其中:

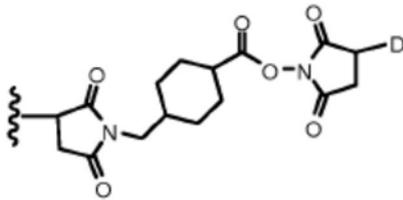
[0371] q是1至5的整数;

[0372] n是2至6的整数;

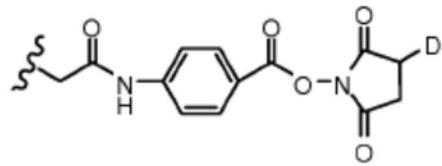
[0373] D是-H或-SO<sub>3</sub>M;

[0374] M是-H或阳离子,诸如Na<sup>+</sup>或K<sup>+</sup>。

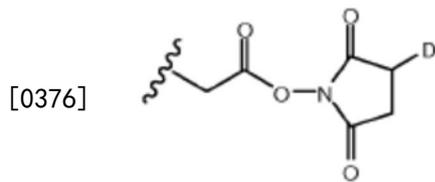
[0375] 在某些实施方案中,Z<sup>s</sup>由下式中的任一者表示:



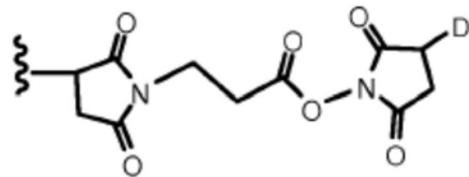
(a1);



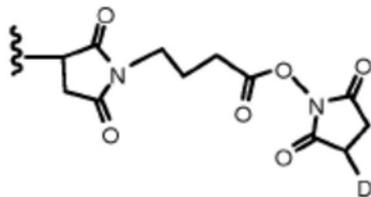
(a4');



(a5');



(a12);



(a13)。

[0377] 在某些实施方案中,W<sup>r</sup>是-N(R<sup>e</sup>)-。

[0378] 在某些实施方案中,R<sup>e</sup>是-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>,其中R<sup>k</sup>是-H、具有1至6个碳原子的直链、支链环状的烷基。

[0379] 在某些实施方案中,R<sup>k</sup>是-H或-Me,n是4,且q是2。

[0380] 在某些实施方案中,R<sup>x</sup>是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基。

[0381] 在某些实施方案中,R<sup>x</sup>是-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-(CR<sup>f</sup>R<sup>g</sup>)-,其中R<sup>f</sup>和R<sup>g</sup>各自独立地选自H或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基;且p是0、1、2或3。

[0382] 在某些实施方案中,R<sup>f</sup>和R<sup>g</sup>相同或不同,且选自-H和-Me;且p是1。

[0383] 在第十具体实施方案中,在第九具体实施方案中所述的式(VIII)、(IX)、(X)和(XI)的化合物,变量如下所述:

[0384] N和C之间的双线==表示单键或双键,条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H,当其是单键时,X是-H;Y是-H、-OH或-SO<sub>3</sub>M;

[0385] M是-H或药学上可接受的阳离子(如,Na<sup>+</sup>);

- [0386] X' 和Y' 均是-H;
- [0387] A和A' 均是-O-;
- [0388] R<sub>6</sub>是-OMe;且
- [0389] R<sup>x</sup>是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基。
- [0390] 在相关实施方案中,Y是-OH或-SO<sub>3</sub>M。
- [0391] 在另一实施方案中,在第九具体实施方案中所述的式(VIII)、(IX)、(X) 和(XI) 的化合物,变量如下所述:
- [0392] W' 是-O-, -N(R<sup>e</sup>) -, -N(R<sup>e</sup>) -C(=O) -, -N(COR<sup>e</sup>) -, -S- 或-CH<sub>2</sub>-S-;
- [0393] R<sup>x</sup>不存在或选自具有1至6个碳原子的直链、支链或环状的烷基;
- [0394] R<sup>e</sup>是-H,具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>,其中R<sup>k</sup>是-H,具有1至6个碳原子直链、支链环状的烷基,任选地具有伯、仲或叔氨基或5或6元含氮杂环,诸如哌啶或吗啉;
- [0395] n是1至24的整数,且剩余的变量如上文第九具体实施方案所述。
- [0396] 优选地,R<sup>k</sup>是-H或-Me且n是2至8的整数。优选地,R<sup>x</sup>是具有1至6 个碳原子的直链或支链的烷基。
- [0397] 优选地,R<sup>x</sup>是-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-(CR<sup>f</sup>R<sup>g</sup>)-,其中R<sup>f</sup>和R<sup>g</sup>各自独立地选自H或具有 1至4个碳原子的直链或支链的烷基;p是0、1、2或3。更优选地,R<sup>f</sup>和 R<sup>g</sup>相同或不同,且选自-H和-Me;且p是1。
- [0398] 在另一优选的实施方案中,连接子由选自上文所示的式(a1)、(a4)、(a5)、(a10) 和(a11)的任一者表示;且剩余的变量如上文第十具体实施方案所述。
- [0399] 在第十一具体实施方案中,在第八具体实施方案中所述的式(IB)、(IIB)、(IIIB) 和(IVB)的化合物,变量如下所述:
- [0400] N和C之间的双线==表示单键或双键,条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H,而当其是单键时,X是-H;Y是-H、-OH或-SO<sub>3</sub>M(如,Y是-OH 或-SO<sub>3</sub>M);
- [0401] M是-H或Na<sup>+</sup>;
- [0402] X' 和Y' 均是-H;
- [0403] A和A' 均是-O-;
- [0404] R<sub>6</sub>是-OMe;
- [0405] R<sup>x</sup>是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基;且剩余的变量如上文第三、第四、或第五具体实施方案所述。
- [0406] 优选地,R<sup>x</sup>是-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-(CR<sup>f</sup>R<sup>g</sup>)-,其中R<sup>f</sup>和R<sup>g</sup>各自独立地选自H或具有 1至4个碳原子的直链或支链的烷基;p是0、1、2或3。更优选地,R<sup>f</sup>和 R<sup>g</sup>相同或不同,且选自-H和-Me;且p是1。
- [0407] 在上文任一具体实施方案中(如,第1至第11具体实施方案中),N和C 之间的双线==可表示双键。
- [0408] 在上文任一具体实施方案中(如,第1至第11具体实施方案中),N和C 之间的双线==可表示单键,X是-H,具有键合至其的反应性基团的连接基团,或氨基保护基(如,X是-H或氨基保护基);且Y选自-H、-OR、-OCOR'、-SR、-NR' R''、任选取代的5或6元含氮杂环、-SO<sub>3</sub>M、-SO<sub>2</sub>M和-OSO<sub>3</sub>M 硫酸盐(如,Y是-OR、-OCOR'、-SR、-NR' R''、任选取代的5或6元含氮杂环、-

SO<sub>3</sub>M、-SO<sub>2</sub>M和硫酸盐(-OSO<sub>3</sub>M)。

[0409] 在某些实施方案中,Y选自-H、-SO<sub>3</sub>M、-OH、-OMe、-OEt或-NHOH(如,Y是-SO<sub>3</sub>M、-OH、-OMe、-OEt或-NHOH)。

[0410] 在某些实施方案中,Y是-H、-SO<sub>3</sub>M或-OH(如,Y是-SO<sub>3</sub>M或-OH)。

[0411] 在某些实施方案中,M是-H、Na<sup>+</sup>或K<sup>+</sup>。

[0412] 在上文任一具体实施方案中(如,第1至第11具体实施方案中),W当存在时是C=O。

[0413] 在上文任一具体实施方案中(如,第1至到第11具体实施方案中),Z和 Z'当存在时是-CH<sub>2</sub>。

[0414] 在上文任一具体实施方案中(如,第1至到第11具体实施方案中),X' 选自-H,-OH,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,苯基,具有键合至其的反应性基团的连接基团和氨基保护基。

[0415] 在某些实施方案中,X' 是-H,-OH,-Me或具有键合至其的反应性基团的连接基团。

[0416] 在某些实施方案中,X' 是-H。

[0417] 在上文任一具体实施方案中(如,第1至第11具体实施方案中),Y' 选自 -H,氧代基团,具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基。

[0418] 在某些实施方案中,Y' 是-H或氧代。

[0419] 在某些实施方案中,Y' 是-H。

[0420] 在上文任一具体实施方案中(如,第1至第11具体实施方案中),A和A' 相同或不同,且选自O、S、NR<sub>5</sub>和氧代(C=O)。A和A' 相同或不同,且选自 -O-和-S-。优选地,A和A' 两者是-O-。

[0421] 在上文任一具体实施方案中(如,第1至第11具体实施方案中),D和D' 当存在时相同或不同,且独立地选自聚乙二醇单元(-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>,其中n是1 至24的整数,氨基酸,具有2至6个氨基酸的肽,具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,其中所述烷基、烯基和炔基任选被一个或多个独立地选自卤素、-OR、-NR' COR''、-SR和-COR' 的取代基取代。优选地,D和D' 是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基。

[0422] 在第十二实施方案中,本发明的第一、第三和第九实施方案中所述的细胞毒化合物由下式表示:

[0423] N和C之间的双线==表示双键;

[0424] Y是-H;

[0425] W是C=O;

[0426] R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>1</sub>'、R<sub>2</sub>'、R<sub>4</sub>和R<sub>4</sub>' 是-H;

[0427] R<sub>3</sub>或R<sub>3</sub>' 中的一者任选为具有键合至其的反应性基团的连接基团且另一者是-H;

[0428] R<sub>6</sub>是-OMe;

[0429] Z和Z' 是-CH<sub>2</sub>;

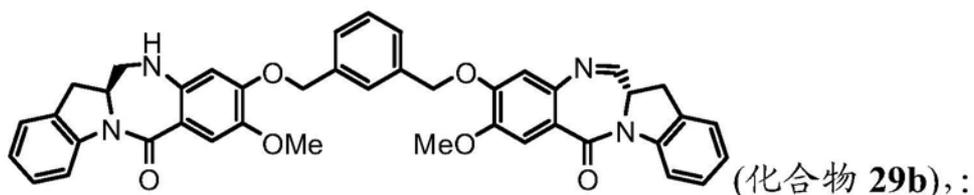
[0430] X' 是-H;

[0431] Y' 是-H;且

[0432] A和A' 是-O-。

[0433] 在第十三实施方案中,本发明的细胞毒化合物是:

[0434]



[0435] 或其药学上可接受的盐。

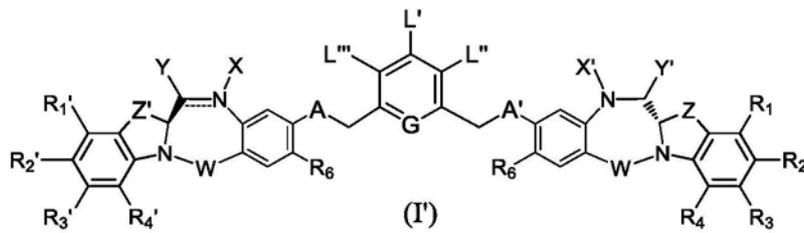
[0436] 在一个实施方案中,化合物29b可用于本文所述的本发明的方法。在优选的实施方案中,化合物29b可用于治疗增殖性病症,诸如癌症。

[0437] 在另一实施方案中,化合物29b可用于筛选细胞系以鉴定对苯并二氮杂萘化合物,诸如本文所述的苯并二氮杂萘衍生物,敏感的细胞系。

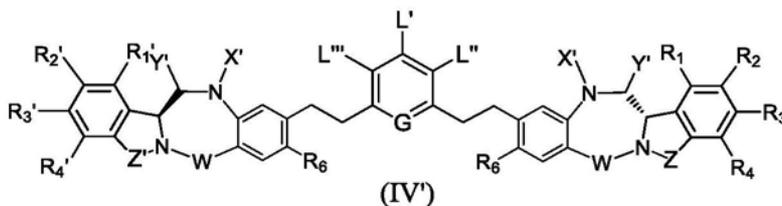
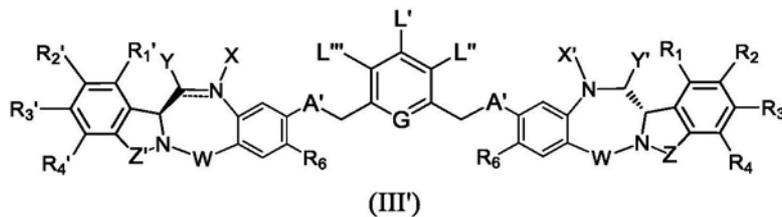
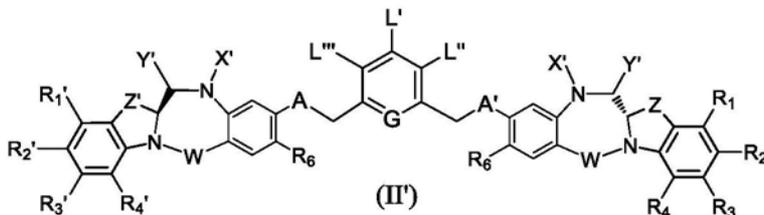
[0438] 药物化合物&药物-连接子化合物。

[0439] 上文所述的细胞毒化合物包含具有键合至其的反应性基团的连接基团,该化合物可引起双官能交联剂与“无连接子”的化合物反应以形成所谓的药物-连接子化合物。或者,在其它方面与药物-连接子化合物相同,但没有连接子部分的药物化合物也包含在本发明内。

[0440] 因此,在某些实施方案中,本发明提供没有连接基团但能够与双官能交联剂反应的细胞毒性化合物以形成本发明的化合物(诸如上述第1至第12具体实施方案中的任一者);或以形成本发明的细胞结合剂缀合物(诸如下文所述的那些)。本发明示例性的无连接子细胞毒性化合物包括上文第13具体实施方案的化合物29b。本发明的无连接子细胞毒性化合物由下式(I')、(II')、(III')或(IV')中的任一者:



[0441]



[0442] 或其药学上可接受的盐表示,其中:

[0443] N和C之间的双线 $\equiv$ 表示单键或双键,条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H、或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基,而当其是单键,X是-H,或氨基保护部分;优选地,N和C之间的双线 $\equiv$ 表示双键;

[0444] Y是-H或离去基团,其选自-OR、-OCOR'、-OCOOR'、-OCONR'R''、-NR'R''、-NR'COR''、-NR'NR'R''、任选取代的5或6元含氮杂环(如,吡啶、四氢吡咯、吡唑、吗啉等),由-NR'(C=NH)NR'R''表示的胍基,氨基酸,或由-NRCOP'表示的肽,其中P'是氨基酸或含有2至20个氨基酸单元的多肽、-SR、-SOR'、-SO<sub>2</sub>M、-SO<sub>3</sub>M、-OSO<sub>3</sub>M、卤素、氰基和叠氮基,其中M是-H或阳离子;诸如Na<sup>+</sup>或K<sup>+</sup>。优选地,M是-H或Na<sup>+</sup>。优选地,Y选自-SO<sub>3</sub>M、-OH、-OMe、-OEt或-NHOH。更优选地,Y是-SO<sub>3</sub>M或-OH;或,

[0445] Y为亚硫酸盐(HSO<sub>3</sub>、HSO<sub>2</sub>或与阳离子形成的HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>、SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>或HSO<sub>2</sub><sup>-</sup>的盐),偏亚硫酸氢盐(H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>或与阳离子形成的S<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>2-</sup>的盐),单、二、三和四硫代磷酸盐(PO<sub>3</sub>SH<sub>3</sub>、PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>H<sub>2</sub>、POS<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、PS<sub>4</sub>H<sub>2</sub>或与阳离子形成的PO<sub>3</sub>S<sup>3-</sup>、PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>3-</sup>、POS<sub>3</sub><sup>3-</sup>或PS<sub>4</sub><sup>3-</sup>的盐),硫代磷酸酯(R<sup>i</sup>O)<sub>2</sub>PS(OR<sup>i</sup>)、R<sup>i</sup>S<sup>-</sup>、R<sup>i</sup>SO、R<sup>i</sup>SO<sub>2</sub>、R<sup>i</sup>SO<sub>3</sub>,硫代硫酸盐(HS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>或与阳离子形成的S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>的盐),连二亚硫酸盐(HS<sub>2</sub>O<sub>4</sub>或与阳离子形成的S<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>的盐),二硫代磷酸盐(P(=S)(OR<sup>k</sup>)(S)(OH)或其与阳离子形成的盐),异羟肟酸(R<sup>k</sup>C(=O)NOH或与阳离子形成的盐),甲醛次硫酸氢盐(HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>或与阳离子形成的HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>的盐,诸如HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>Na<sup>+</sup>)或其混合物,其中R<sup>i</sup>是具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被选自-N(R<sup>j</sup>)<sub>2</sub>、-CO<sub>2</sub>H、-SO<sub>3</sub>H和-PO<sub>3</sub>H中的至少一个取代基取代;R<sup>i</sup>可进一步任选地被本文所述的烷基取代基取代;R<sup>j</sup>是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷

基;R<sup>k</sup>是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,芳基,杂环基或杂芳基;优选地,Y是亚硫酸氢盐、次硫酸盐、或偏亚硫酸氢盐或其盐(诸如钠盐)的加合物;

[0446] 每次出现时,R独立地选自-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>,任选取代的具有6至18个碳原子的芳基,任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环,或任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环;

[0447] R'和R''相同或不同,且独立地选自-H,-OH,-OR,-NHR,-NR<sub>2</sub>,-COR,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>,和任选取代的具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环;

[0448] R<sup>c</sup>是-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基;

[0449] n是1至24的整数;

[0450] W选自C=O、C=S、CH<sub>2</sub>、BH、SO和SO<sub>2</sub>;

[0451] X'选自-H,-OH,氨基保护基,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>,任选取代的具有6至18个碳原子(如,苯基)的芳基,任选取代的含有一个或多个杂原子独立地选自氮、氧和硫杂原子的5至18元杂芳环和任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环。优选地,X'是-H、-OH或-Me。更优选地,X'是-H;

[0452] Y'选自-H,氧代基团,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,任选取代的6至18元芳基,任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环,任选取代的具有1至6个杂原子的3至18元杂环。优选地,Y'选自-H或氧代。更优选地,Y'是-H;

[0453] R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>1</sub>'、R<sub>2</sub>'、R<sub>3</sub>'和R<sub>4</sub>'各自独立地选自-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>,卤素,胍基[-NH(C=NH)NH<sub>2</sub>],-OR,-NR'R'',-NO<sub>2</sub>, -NCO,-NR'COR'',-SR,由-SOR'所表示的亚砷,由-SO<sub>2</sub>R'所表示的砷,磺酸盐-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>,硫酸盐-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>,由-SO<sub>2</sub>NR'R''所表示的磺酰胺,氰基,叠氮基,-COR',-OCOR'和-OCONR'R''。优选地,1、2、3,或所有的R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>2</sub>'和R<sub>3</sub>'是-H;

[0454] R<sub>6</sub>是-H、-R、-OR、-SR、-NR'R''、-NO<sub>2</sub>、卤素、-OR<sup>c</sup>或-SR<sup>c</sup>,其中R<sup>c</sup>是-H、具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基。优选地,R<sub>6</sub>是-OMe或-SMe。甚至更优选地,R<sub>6</sub>是-OMe;

[0455] Z和Z'独立地选自-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>、-CR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>na</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>、-NR<sub>9</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>na</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>、-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>na</sub>、-和-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>na</sub>、-;

[0456] n'和na'相同或不同,且选自0、1、2和3;

[0457] R<sub>7</sub>和R<sub>8</sub>相同或不同,且各自独立地选自-H,-OH,-SH,-COOH,-NHR',聚乙二醇单元-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-,氨基酸,具有2至6个氨基酸的肽单元,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基;

[0458] R<sub>9</sub>独立地选自-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基,聚乙二醇单元-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-;

[0459] A和A'相同或不同,且独立地选自-O-、氧代(-C(=O)-)、-CRR'O-、-CRR'-、-S-、-CRR'S-、-N(R<sub>5</sub>)-和-CRR'N(R<sub>5</sub>)-。优选地,A和A'相同或不同,且选自-O-和-S-。更优选地,A和A'是-O-;

[0460] 每次出现时,  $R_5$  独立地为 -H 或任选取代的具有 1 至 10 个碳原子的直链或支链的烷基;

[0461]  $L'$ 、 $L''$  和  $L'''$  相同或不同, 且独立选自 -H、卤素、任选取代的直链、支链或环状的烷基、卤代烷基、烷氧基、卤代烷氧基、 $-NO_2$  或  $-CN$ ;

[0462] G 选自  $-CH-$  或  $-N-$ 。

[0463] 在某些实施方案中, N 和 C 之间的双线  $=$  表示单键, Y 不是 -H。

[0464] 在某些实施方案中, N 和 C 之间的双线  $=$  表示单键或双键, 条件是当其是双键时, X 不存在且 Y 是 -H, 且当其为单键时, X 选自 -H、或氨基保护基 (优选 X 是 -H); W 是  $C=O$ ;  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_1'$ 、 $R_2'$ 、 $R_3'$  和  $R_4'$  是 -H; Z 和  $Z'$  是  $-CH_2-$ ; A 和  $A'$  均是 -O-; W 是  $-(C=O)-$ ; G 是  $-CH-$ ;  $R_6$  是 -H 或任选取代的 C1-C10 直链、C1-C10 支链或 C3-C7 环烷基、-O-烷基或 -O-卤代-烷基, 诸如 -OMe;  $X'$  选自 -H, -OH, 具有 1 至 10 个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基, 苯基, 和氨基保护基;  $Y'$  选自 -H, 氧代基团, 具有 1 至 10 个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基。

[0465] 优选地, 当 Y 不是 -H 时, Y 选自 -OR、-OCOR'、-SR、-NR'  $R''$ 、 $-SO_3M$ 、 $-SO_2M$  或  $-OSO_3M$ , 其中 M 是 -H 或阳离子, 诸如  $Na^+$ 、 $K^+$ 。优选地, Y 选自 -H、-OH、-OMe、-OEt、-NHOH 或  $-SO_3M$  (如, Y 是 -OH、-OMe、-OEt、-NHOH 或  $-SO_3M$ )。甚至更优选地, Y 是 -H、-OH 或  $-SO_3M$  (如, Y 是 -OH 或  $-SO_3M$ ), 优选地 M 是 -H 或  $Na^+$ 。

[0466] 在某些实施方案中, N 和 C 之间的双线  $=$  表示单键或双键, 条件当它是双键时, X 不存在且 Y 是 -H, 而当其为单键时, X 选自 -H、或氨基保护基 (优选 X 是 -H); W 是  $C=O$ ;  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_1'$ 、 $R_2'$ 、 $R_3'$ 、 $R_4'$ 、 $X'$  和  $Y'$  是 -H; Z 和  $Z'$  是  $-CH_2-$ ; A 和  $A'$  均是 -O-; W 是  $-(C=O)-$ ; G 是  $-CH-$ ;  $R_6$  是 -H 或任选取代的 C1-C10 直链、C1-C10 支链、或 C3-C7 环烷基、-O-烷基、或 -O-卤代-烷基, 诸如 -OMe。

[0467] 该双官能交联剂可以是本领域已知的任何双官能连接子。例如, 可用于制备药物-连接子化合物的双官能连接子是与细胞毒性化合物形成二硫键、硫醚键、对酸不稳定的键、对光不稳定的键、对肽酶不稳定的键、以及对酯酶不稳定的键的那些 (参见例如美国专利 5,208,020; 5,475,092; 6,441,163; 6,716,821; 6,913,748; 7,276,497; 7,276,499; 7,368,565; 7,388,026 和 7,414,073, 所有这些文献均通过引用并入本文)。优选地, 双官能交联剂是与细胞毒性化合物形成二硫键, 硫醚和对肽酶不稳定的键的那些。可用于本发明的其它双官能交联剂包括不可裂解的连接子, 诸如描述于美国公开 No. US 2005/0169933 的那些, 或带电荷的连接子或亲水性连接子以及描述于 US 2009/0274713、US 2010/0129314 和 WO 2009/134976, 其各自通过引用明确地并入本文。可用于制备本发明的药物-连接子化合物的双官能交联剂还包括描述于 Thermo Scientific Pierce Crosslinking Technical Handbook 的那些, 其全部教导通过引用并入本文。

[0468] 细胞毒性化合物的合成

[0469] 制备本发明的细胞毒性二聚体化合物的代表性方法示于图 1-11。该二聚体通过使单体与具有两个离去基团的连接子化合物反应来制备, 所述离去基团诸如卤素、三氟甲磺酸酯、甲磺酸酯或甲苯磺酸酯 (诸如描述用于图 1 中 1c 的合成的甲苯磺酸酯)。具有硫醇或二硫化物部分以使得能经还原或非还原键连接于细胞结合剂的代表性二聚体的合成示于图 1-5、7、8 和 10。在图 1 中通过 1a 的还原胺化来制备包含短的聚乙二醇部分和烷基二硫化

物的连接子。将1b转化为其相应的甲磺酸酯并与IBD(二氢吡啶并苯并二氮杂<sub>5</sub>)单体单元偶联得到二聚体1c,将该二聚体还原成单亚胺、转化为游离硫醇,并与2偶联以得到本发明的化合物1g。在图3中,制备IBD单体的修饰形式并偶联以得到本发明的二聚体,其中将还原的亚胺转化为连接子。图4描述具有短的聚乙二醇部分和酰胺二硫化物的二聚体,将该二聚体还原成硫醇4c并转化为反应性酯。图5描述含有吡啶基二硫化物的连接子5e的合成,将该二硫化物转化为本发明的单亚胺硫醇5i然后转化为反应性酯。图6、9和11示出代表性二聚体的合成,所述代表性二聚体具有可与细胞结合剂(将甲酯转化为相应的离去基团的反应性酯而制备)反应的连接子,诸如但不限于N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基邻苯二甲酰亚胺酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、对硝基苯基酯、五氟苯基酯。

[0470] 用于制备本发明的适于与细胞结合剂一步缀合的细胞毒性二聚体化合物的代表性方法示于图1和12-19。在所有这些实施例中,含有硫醇部分的二聚体与双官能交联剂反应,所述双官能交联剂在一侧具有反应性基团,诸如但不限于硫代吡啶基、马来酰亚胺、碘化物、溴化物或甲苯磺酸酯;以及适于与细胞结合剂反应的反应性取代基,诸如但不限于N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基邻苯二甲酰亚胺基酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯类、对硝基苯基酯、五氟苯基酯。

[0471] 用于制备本发明的代表性细胞毒性二聚体化合物的替代合成方法示于图20-21。在图20中,单还原的二聚体(即,具有一个亚胺基团)的合成通过两步偶联方法实现,其中单体的还原形式最初偶联于连接子然后与IBD单体偶联,或者使用还原单体和IBD单体两者的混合物与反应性连接子偶联来制备二聚体。二次还原二聚体可能是先前所述的第二种合成途径的副产物,而一种更直接的途径示于图21,其中还原的单体直接与连接子偶联。

[0472] 细胞结合剂

[0473] 本发明的缀合物作为治疗剂的有效性取决于对合适细胞结合剂的谨慎选择。细胞结合剂可以是目前已知的或众所周知的任一种,且包括肽和非肽。通常,这些细胞结合剂可以是抗体(特别是单克隆抗体)、淋巴因子、激素、生长因子、维生素(诸如叶酸等,它们可结合于其细胞表面受体,如,叶酸受体)、营养运输分子(诸如转铁蛋白)或任何其它细胞结合分子或物质。

[0474] 在某些实施方案中,细胞结合剂是蛋白或多肽,或包含蛋白或多肽的化合物。优选地,蛋白或多肽包含一个或多个具有侧链-NH<sub>2</sub>基团的Lys残基。可选地或另外,所述蛋白或多肽包含一个或多个Cys残基。Cys残基的侧链-SH基团可以是完整的,或可以是在可被还原的二硫键中。优选地,二硫键的还原对蛋白或多肽的细胞结合功能的不利影响不显著(如,就抗体或其抗原结合片段而言,二硫键的还原基本上不会增加轻链/重链的解离)。

[0475] Lys侧链-NH<sub>2</sub>基和/或Cys侧链-SH基可共价连接于连接子,该连接子进而连接于本发明的二聚体化合物,从而将细胞结合剂缀合于本发明的二聚体化合物。每种基于蛋白的细胞结合剂可包含用于通过双官能交联剂连接本发明化合物的多个Lys侧链NH<sub>2</sub>基和/或Cys侧链-SH基。

[0476] 可使用的细胞结合剂的更具体的实施例包括:

[0477] 多克隆抗体;

[0478] 单克隆抗体;

[0479] 抗体片段诸如Fab、Fab' 和F(ab')<sub>2</sub>、Fv、微型抗体、二聚体、三聚体、四聚体

(Parham, J. Immunol. 131:2895-2902 (1983); Spring等人. J. Immunol. 113:470-478 (1974); Nisonoff等人. Arch. Biochem. Biophys. 89:230-244 (1960), Kim等人, Mol. Cancer Ther., 7:2486-2497 (2008), Carter, Nature Revs., 6:343-357 (2006));

[0480] 干扰素(如 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ );

[0481] 淋巴因子诸如IL-2、IL-3、IL-4、IL-6;

[0482] 激素诸如胰岛素、TRH(促甲状腺素释放激素)、MSH(促黑素细胞激素)、类固醇激素,诸如雄激素和雌激素;

[0483] 生长因子和集落刺激因子,诸如EGF、TGF- $\alpha$ 、FGF、VEGF、G-CSF, M-CSF和GM-CSF (Burgess, Immunology Today 5:155-158 (1984));

[0484] 转铁蛋白(O'Keefe等人. J. Biol. Chem. 260:932-937 (1985));

[0485] 维生素,诸如叶酸;

[0486] 基于纤连蛋白III型(FN3)重复序列的共有序列的蛋白支架(也称为 Centyrins; 参见美国专利公布2010/0255056,其通过引用并入本文);

[0487] 设计者锚蛋白重复蛋白(DARPin; 美国专利申请No. 20040132028; 20090082274; 20110118146; 20110224100,其通过引用并入本文), C. Zahnd 等人. 2010, Cancer Res., 70: 1595-1605,其通过引用并入本文); 和,

[0488] 纤连蛋白结构域支架蛋白(Adnectins; 美国专利申请No. 20070082365; 20080139791,其通过引用并入本文)。

[0489] 单克隆抗体技术允许以特异性的单克隆抗体形式制备非常特异的细胞结合剂。本领域特别熟知的是用于制备单克隆抗体的技术,所述单克隆抗体通过免疫小鼠、大鼠、仓鼠或任何其它具有关注抗原(诸如完整的靶细胞、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外壳蛋白)的哺乳动物而产生。也可使用致敏的人体细胞。制备单克隆抗体的另一种方法是使用scFv(单链可变区)的噬菌体文库,尤其是人类scFv(参见如Griffiths等人,美国专利No. 5,885,793和5,969,108; McCafferty等, WO 92/01047; Liming等人, WO 99/06587)。此外,也可使用公开于美国专利No. 5,639,641的表面重构抗体,如嵌合抗体和人源化抗体。选择合适的细胞结合剂是选择的问题,这取决于待靶向的特定细胞群,但是如果可得到合适的细胞群,一般而言人类单克隆抗体是优选的。

[0490] 例如,单克隆抗体MY9是鼠IgG1抗体,其特异结合于CD33抗原{J.D. Griffin等人 8Leukemia Res., 521 (1984)},如果在急性骨髓性白血病(AML)疾病中,靶细胞表达CD33,那么可使用该抗体。细胞结合剂可以是以特异性或非特异性方式结合细胞的任何化合物。通常,这些可以是抗体(特别是单克隆抗体和抗体片段)、干扰素、淋巴因子、激素、生长因子、维生素、营养转运分子(诸如转铁蛋白)或任何其它细胞结合分子或物质。

[0491] 在细胞结合剂是抗体的情况下,该抗体结合于抗原,该抗原是多肽并且可以是跨膜分子(如受体)或配体诸如生长因子。示例性的抗原包括以下分子,诸如肾素;生长激素,包括人体生长激素和牛生长激素;生长激素释放因子;甲状旁腺素;促甲状腺激素;脂蛋白; $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶;胰岛素A链;胰岛素B链;胰岛素原;促卵泡激素;降钙素;促黄体激素;胰高血糖素;凝血因子诸如因子vmc、因子IX、组织因子(TF),和血管性血友病(von Willebrands)因子;抗凝血因子,诸如蛋白C;心房利钠因子;肺表面活性物质;纤溶酶原激活物,诸如尿激酶或人尿液或组织型纤溶酶原激活物(t-PA);铃蟾肽;凝血酶;造血生长因

子;肿瘤坏死因子- $\alpha$ 和- $\beta$ ;脑啡肽酶;RANTES(调节激活正常T-细胞表达和分泌);人体巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1- $\alpha$ );血清白蛋白,诸如人血清白蛋白;抑制穆氏管(Muellerian)物质;松弛素A链;松弛素B链;松弛素原;小鼠促性腺素相关肽;微生物蛋白,诸如 $\beta$ -内酰胺酶;DNA酶;IgE;细胞毒性T淋巴细胞相关抗原(CTLA),诸如CTLA-4;抑制素;激活素;血管内皮生长因子(VEGF);激素或生长因子的受体;蛋白A或D;类风湿因子;神经营养因子,诸如骨源性神经营养因子(BDNF)、神经营养因子-3、-4、-5、或-6(NT-3、NT4、NT-5或NT-6),或神经生长因子,诸如NGF- $\beta$ ;血小板衍生生长因子(PDGF);成纤维细胞生长因子诸如aFGF和bFGF;成纤维细胞生长因子受体2(FGFR2),表皮生长因子(EGF);转化生长因子(TGF)诸如TGF- $\alpha$ 和TGF- $\beta$ ,包括TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3、TGF- $\beta$ 4或TGF- $\beta$ 5;胰岛素样生长因子-I和-II(IGF-I和IGF-II),des(1-3)-IGF-I(脑IGF-I)、胰岛素样生长因子结合蛋白、黑素转铁蛋白、EpCAM、GD3、FLT3、PSMA、PSCA、MUC1、MUC16、STEAP、CEA、TENB2、EphA受体、EphB受体、叶酸受体、FOLR1、间皮素、cripto、 $\alpha_v\beta_6$ 、结合素类、VEGF、VEGFR、EGFR、转铁蛋白(transferrin)受体、IRTA1、IRTA2、IRTA3、IRTA4、IRTA5;CD蛋白诸如CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD8、CD11、CD14、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CD26、CD28、CD30、CD33、CD36、CD37、CD38、CD40、CD44、CD52、CD55、CD56、CD59、CD70、CD79、CD80、CD81、CD103、CD105、CD134、CD137、CD138、CD152或公开在美国公开No. 20080171040或美国公布No. 20080305044中结合于一个或多个肿瘤相关抗原或细胞表面受体的抗体,且该公开通过引用整体并入;促红细胞生成素;骨诱导因子;免疫毒素类;骨形态生成蛋白(BMP);干扰素,如干扰素- $\alpha$ 、- $\beta$ 和- $\gamma$ ;集落刺激因子(CSF),如,M-CSF、GM-CSF和G-CSF;白细胞介素类(IL),如,IL-1至IL-10;超氧化物歧化酶;T细胞受体;表面膜蛋白;衰变加速因子;病毒抗原诸如,例如HIV包膜部分;运输蛋白;归巢受体;地址素;调节蛋白;结合素类,诸如CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4和VCAM;肿瘤相关抗原,诸如HER2、HER3或HER4受体;内皮因子、c-Met、c-kit、IGF1R、PSGR、NGEP、PSMA、PSCA、LGR5、B7H4和上面列出的多肽的任一片段。

[0492] 另外,结合于骨髓细胞的GM-CSF可用作急性髓性白血病患细胞细胞的细胞结合剂。结合于活化T细胞的IL-2可用于预防移植排斥、用于治疗 and 预防移植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可用于治疗黑素瘤,可以是针对黑素瘤的抗体。叶酸可用于靶向在卵巢和其它肿瘤中表达的叶酸受体。表皮生长因子可用于靶向鳞癌,诸如肺癌和头颈癌。生长抑素可用于靶向神经母细胞瘤和其它肿瘤类型。

[0493] 可分别成功地用雌激素(或雌激素类似物)或雄激素(或雄激素类似物)作为细胞结合剂来靶向乳腺癌和睾丸癌。

[0494] 在一个实施方案中,细胞结合剂是人源化单克隆抗体。在另一实施方案中,细胞结合剂是huMy9-6或其它相关的抗体,该抗体描述于美国专利No. 7,342,110和7,557,189(通过引用并入本文)中。在另一实施方案中,细胞结合剂是抗叶酸受体抗体,该抗体描述于美国临时申请No. 61/307,797、61/346,595、61/413,172和美国申请No. 13/033,723(公开为US 2012-0009181 A1中)。所有这些申请的教义均通过引用全文并入本文。

[0495] 在某些实施方案中,细胞结合剂可以是单克隆抗体或其抗原结合部分,它们共享对于抗原与本文公开的抗体结合来说关键的序列,诸如huMy9-6或其相关抗体,其描述于美国专利No. 7,342,110和7,557,189(通过引用并入本文)中。这些衍生的抗体与本文所述的抗体相比可基本上具有相同或同一的(1)轻链和/或重链CDR3区域;(2)轻链和/或重链

CDR1、CDR2和CDR3区域；或(3)轻链和/或重链区域。这些区域中的序列可含有保守氨基酸置换，包括 CDR区域内的置换。优选地，存在不超过1、2、3、4或5个保守性置换。在某些实施方案中，衍生抗体具有至少约90%、95%、99%或100%同一于本文所述抗体的轻链区域和/或重链区域。与本文所述的抗体相比，这些衍生抗体与靶抗原可具有基本相同的结合特异性和/或亲和力。优选地，衍生抗体的 $K_d$ 和/或 $k_{off}$ 值是本文所述抗体的10倍(更高或更低)、5倍(更高或更低)、3倍(更高或更低)或2倍(更高或更低)。这些衍生抗体可以是完全人体抗体或人源化抗体或嵌合抗体。衍生抗体可根据任何本领域公认的方法制备。

[0496] 在一个实施方案中，抗叶酸受体抗体是人源化抗体或其特异结合于人叶酸受体1的抗原结合片段，其中所述抗体包含：(a)包含GYFMN (SEQ ID NO: 1)的重链CDR1；包含RIHPYDGDTFYNQXaa<sub>1</sub>FXaa<sub>2</sub>Xaa<sub>3</sub> (SEQ ID NO:2)的重链CDR2；和包含YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3)的重链CDR3；和(b)包含 KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO:4)的轻链CDR1；包含RASNLEA (SEQ ID NO:5)的轻链CDR2；和包含QQSREYPYT (SEQ ID NO:6)的轻链CDR3；其中Xaa<sub>1</sub>选自K、Q、H和R；Xaa<sub>2</sub>选自Q、H、N和R；且Xaa<sub>3</sub>选自G、E、T、S、A和V。优选地，重链CDR2序列包含RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO:7)。

[0497] 在另一实施方案中，抗叶酸受体抗体是人源化抗体或其特异结合于人叶酸受体1的抗原结合片段，该抗体包含具有下述氨基酸序列的重链 QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASG YFTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIG RIHPYDGDTFYNQKFQKATLTVDKSSNTAHMELLSTSEDFAVYYCTRYD GSRAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKD TLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDG SFFLYSKLTVDKSRWQGGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:8)。

[0498] 在另一实施方案中，抗叶酸抗体是人源化抗体或由质粒DNA编码的其抗原结合片段，该DNA于2010年4月7日保藏于ATCC及具有的ATCC保藏号是PTA-10772和PTA-10773或10774。

[0499] 在另一实施方案中，抗叶酸受体抗体是人源化抗体或其特异结合于人叶酸受体1的抗原结合片段，该抗体包含具有下述氨基酸序列的轻链 DIVLTSPLSLAVSLGQPAAIISCKAS QSVSFAGTSLMHWHQKPGQQPRLLI YRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYT FG GGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:9)；或 DIVLTSPLSLAVSL GQPAAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHQKPGQQPRLLI YRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAAT YCQQSREYPYTFG GGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:10)。

[0500] 在另一实施方案中，抗叶酸受体抗体是人源化抗体或其特异结合于人叶酸受体1的抗原结合片段，该抗体包含具有SEQ ID NO:8氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10。优选地，抗体包含具有SEQ ID NO:8 氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO: 10 (hu FOLR1)氨基酸序列的轻链。

[0501] 在另一实施方案中，抗叶酸受体抗体是人源化抗体或由质粒DNA编码的其抗原结合片段，该质粒DNA于2010年4月7日保藏于ATCC及具有的 ATCC保藏号是PTA-10772和PTA-

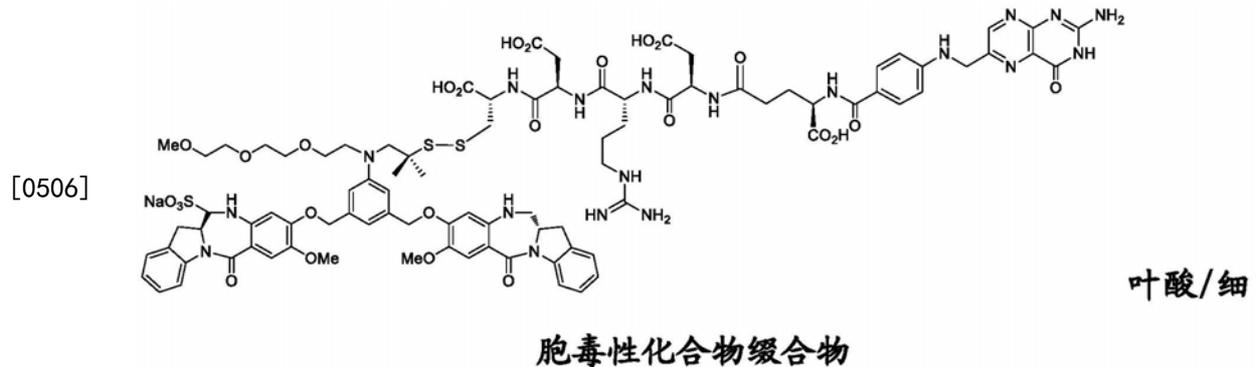
10773或10774。

[0502] 在另一实施方案中,抗叶酸受体抗体是人源化抗体或其抗原结合片段,该抗体包含与 QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWKQSPGQSLEWIG RIHPYDGDTFYNQKFQGKATL TVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYD GSRAMDYWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:11) 至少约90%、95%、99%或100%相同的重链可变区和与 DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHW YHQKPGQQPRLLI YRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFG GGTKLEIKR (SEQ ID NO:12);或 DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLI YRASN LEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFG GGTKLEIKR (SEQ ID NO:13)。

[0503] 细胞结合剂-药物缀合物

[0504] 本发明还提供细胞结合剂-药物缀合物,其包括通过各种连接子连接于一种或多种本发明的细胞毒性化合物的细胞结合剂,该连接子包括但不限于二硫化物连接子、硫醚连接子、酰胺键合的连接子、肽酶不稳定性连接子、酸不稳定性连接子、酯酶不稳定性连接子。

[0505] 本发明的代表性缀合物是抗体/细胞毒性化合物、抗体片段/细胞毒性化合物、表皮生长因子(EGF)/细胞毒性化合物、促黑素细胞激素(MSH)/细胞毒性化合物、促甲状腺激素(TSH)/细胞毒性化合物、生长抑素/细胞毒性化合物、叶酸/细胞毒性化合物、雌激素/细胞毒性化合物、雌性激素类似物/细胞毒性化合物、雄激素/细胞毒性化合物和雄激素类似物/细胞毒性化合物。代表性的叶酸/细胞毒性化合物的缀合物如下所述,在两种药物单体中的一者的亚胺键上具有任意的 $-SO_3^-Na^+$ 加合物。该缀合物的代表性合成方案示于图54。

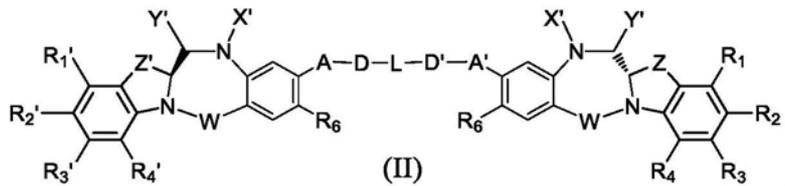
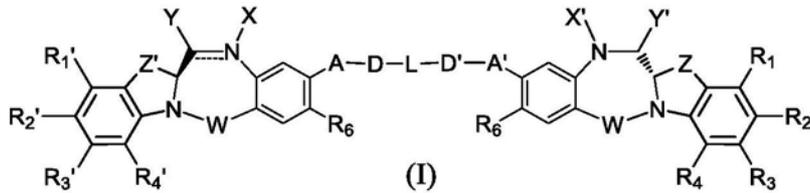


[0507] 在优选的实施方案中,本发明提供包含二氢吡啶并苯并二氮杂 $\sigma$ 二聚体化合物(如,式(I)-(IV)、(IA)-(IVA)和(IB)-(IVB)的化合物)和通过共价键连接的细胞结合剂的缀合物。该连接子可在肿瘤/不希望的增殖细胞位点裂解以许多方式将细胞毒性剂传送到其靶标。该连接子可,例如,通过低pH(胺)、还原环境(二硫化物)、蛋白裂解(酰胺/肽键)或通过酶促反应(酯酶/糖苷酶)裂解。

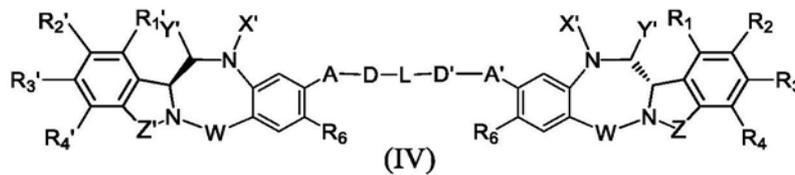
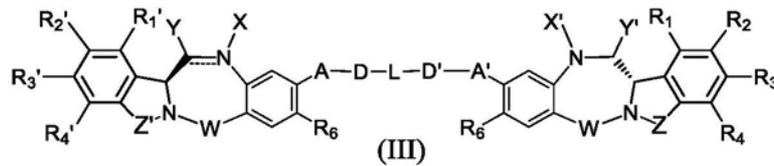
[0508] 在优选的方面,本发明的代表性细胞毒性缀合物是抗体/二氢吡啶并苯并二氮杂 $\sigma$ 二聚体化合物、抗体片段/二氢吡啶并苯并二氮杂 $\sigma$ 二聚体化合物、表皮生长因子(EGF)/二氢吡啶并苯并二氮杂 $\sigma$ 二聚体化合物、促黑素细胞激素(MSH)/二氢吡啶并苯并二氮杂 $\sigma$ 二聚体化合物、促甲状腺激素(TSH)/二氢吡啶并苯并二氮杂 $\sigma$ 二聚体化合物、生长抑素/二氢吡啶并苯并二氮杂 $\sigma$ 二聚体化合物、叶酸/二氢吡啶并苯并二氮杂 $\sigma$ 二聚体化合物、雌激素/二氢吡啶并苯并二氮杂 $\sigma$ 二聚体化合物、雌性激素类似物/二氢吡啶并苯并二氮杂 $\sigma$ 二聚

体化合物、前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 抑制剂/二氢吡啶并苯并二氮杂䓬二聚体化合物、蛋白裂解酶抑制剂/二氢吡啶并苯并二氮杂䓬二聚体化合物、设计的锚蛋白重复蛋白 (DARPin)/二氢吡啶并苯并二氮杂䓬二聚体化合物、雄激素/二氢吡啶并苯并二氮杂䓬二聚体化合物及雄激素类似物/二氢吡啶并苯并二氮杂䓬二聚体化合物。

[0509] 因此在第十四具体实施方案中,本发明提供缀合物,其包含:细胞毒性化合物和细胞结合剂(CBA),其中所述细胞毒性化合物包含将细胞毒性化合物共价连接于所述CBA的连接基团,且其中所述细胞毒性化合物由下式中的任一者:



[0510]



[0511] 或其药学上可接受的盐表示,其中:

[0512] N和C之间的双线 $\equiv$ 表示单键或双键,条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H,或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基,而当其是单键时,X是-H、连接基团或氨基保护部分;

[0513] Y是-H或离去基团,其选自-OR、-OCOR'、-OCOR'、-OCONR' R''、-NR' R''、-NR' COR''、-NR' NR' R'',任选取代的5或6元含氮杂环(如,吡啶、四氢吡咯、吡唑、吗啉)、由-NR(C=NH)NR' R''表示的胍基、氨基酸或由-NRCOP'表示的肽,其中P'是氨基酸或含有2至20个氨基酸单元的多肽、-SR、-SOR'、-SO<sub>2</sub>M、-SO<sub>3</sub>M、-OSO<sub>3</sub>M、卤素、氰基和叠氨基;或

[0514] Y为亚硫酸盐(HSO<sub>3</sub>、HSO<sub>2</sub>或与阳离子形成的HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>、SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>或HSO<sub>2</sub><sup>-</sup>的盐),偏亚硫酸氢盐(H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>或与阳离子形成的S<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>2-</sup>的盐),单、二、三和四硫代磷酸盐(PO<sub>3</sub>SH<sub>3</sub>、PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>H<sub>2</sub>、POS<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、PS<sub>4</sub>H<sub>2</sub>或与阳离子形成的PO<sub>3</sub>S<sup>3-</sup>、PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>3-</sup>、POS<sub>3</sub><sup>3-</sup>或PS<sub>4</sub><sup>3-</sup>的盐),硫代磷酸酯(R<sup>i</sup>O)<sub>2</sub>PS(OR<sup>i</sup>)、R<sup>i</sup>S<sup>-</sup>、R<sup>i</sup>SO、R<sup>i</sup>SO<sub>2</sub>、R<sup>i</sup>SO<sub>3</sub>,硫代硫酸盐(HS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>或与阳离子形成的S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>的盐),连二亚硫酸盐(HS<sub>2</sub>O<sub>4</sub>或与阳离子形成的S<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>的盐),二硫代磷酸盐(P(=S)(OR<sup>k</sup>)(S)(OH)或其与阳离子形成的盐),异羟肟酸(R<sup>k</sup>C(=O)NOH或与阳离子形成的盐),甲醛次硫酸氢盐(HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>或与

阳离子形成的 $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ 的盐,诸如 $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-\text{Na}^+$ 或其混合物,其中 $\text{R}^i$ 是具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被选自 $-\text{N}(\text{R}^j)_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 和 $-\text{PO}_3\text{H}$ 中的至少一个取代基取代; $\text{R}^i$ 可进一步任选地被本文所述的烷基取代基取代; $\text{R}^j$ 是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基; $\text{R}^k$ 是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,芳基,杂环基或杂芳基;优选地, $\text{Y}$ 是亚硫酸氢盐、次硫酸盐、或偏亚硫酸氢盐或其盐(诸如钠盐)的加合物;

[0515]  $\text{M}$ 是 $-\text{H}$ 或阳离子;

[0516] 每次出现时, $\text{R}$ 独立地选自 $-\text{H}$ ,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ ,任选取代的具有6至18个碳原子的芳基,任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环,或任选取代的含有1至6个独立地选自 $\text{O}$ 、 $\text{S}$ 、 $\text{N}$ 和 $\text{P}$ 的杂原子的3至18元杂环;

[0517]  $\text{R}'$ 和 $\text{R}''$ 各自独立地选自 $-\text{H}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{NHR}$ 、 $-\text{NR}_2$ 、 $-\text{COR}$ ,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ ,和任选取代的具有1至6个独立地选自 $\text{O}$ 、 $\text{S}$ 、 $\text{N}$ 和 $\text{P}$ 的杂原子的3至18元杂环;

[0518]  $\text{R}^c$ 是 $-\text{H}$ 或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基或连接基团;

[0519]  $n$ 是1至24的整数;

[0520]  $\text{W}$ 选自 $\text{C}=\text{O}$ 、 $\text{C}=\text{S}$ 、 $\text{CH}_2$ 、 $\text{BH}$ 、 $\text{SO}$ 和 $\text{SO}_2$ ;

[0521]  $\text{X}'$ 选自 $-\text{H}$ ,氨基保护基,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ ,任选取代的具有6至18个碳原子的芳基,任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环,和任选取代的含有1至6个独立地选自 $\text{O}$ 、 $\text{S}$ 、 $\text{N}$ 和 $\text{P}$ 的杂原子的3至18元杂环;

[0522]  $\text{Y}'$ 选自 $-\text{H}$ ,氧代基团,连接基团,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,任选取代的6至18元芳基,任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环,任选取代的具有1至6个杂原子的3至18元杂环;

[0523]  $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$ 、 $\text{R}_4$ 、 $\text{R}_1'$ 、 $\text{R}_2'$ 、 $\text{R}_3'$ 和 $\text{R}_4'$ 各自独立地选自 $-\text{H}$ ,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{R}^c$ ,卤素,胍基 $[-\text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2]$ , $-\text{OR}$ 、 $-\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{NCO}$ 、 $-\text{NR}'\text{COR}''$ 、 $-\text{SR}$ ,由 $-\text{SOR}'$ 所表示的亚砷,由 $-\text{SO}_2\text{R}'$ 所表示的砷,磺酸盐 $-\text{SO}_3^-\text{M}^+$ ,硫酸盐 $-\text{OSO}_3^-\text{M}^+$ ,由 $-\text{SO}_2\text{NR}'\text{R}''$ 所表示的磺酰胺,氰基,叠氮基, $-\text{COR}'$ 、 $-\text{OCOR}'$ 、 $-\text{OCONR}'\text{R}''$ 和连接基团;

[0524]  $\text{R}_6$ 是 $-\text{H}$ 、 $-\text{R}$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{SR}$ 、 $-\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NO}_2$ 、卤素或连接基团;

[0525]  $\text{Z}$ 和 $\text{Z}'$ 独立地选自 $-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-\text{CR}_7\text{R}_8-(\text{CH}_2)_{na}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-\text{NR}_9-(\text{CH}_2)_{na}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_{na}-$ 和 $-(\text{CH}_2)_n-\text{S}-(\text{CH}_2)_{na}-$ ;

[0526]  $n'$ 和 $na'$ 相同或不同,且选自0、1、2和3;

[0527]  $\text{R}_7$ 和 $\text{R}_8$ 相同或不同,且各自独立地选自 $-\text{H}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{NHR}'$ ,聚乙二醇单元 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ ,氨基酸,具有2至6个氨基酸的肽单元,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基;

[0528]  $\text{R}_9$ 独立地选自 $-\text{H}$ ,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基,聚乙二醇单元 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ ;

[0529]  $\text{A}$ 和 $\text{A}'$ 相同或不同,且独立地选自 $-\text{O}-$ 、氧代 $(-\text{C}(=\text{O})-)$ 、 $-\text{CRR}'\text{O}-$ 、 $-\text{CRR}'-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{CRR}'\text{S}-$ 、 $-\text{NR}_5$ 和 $-\text{CRR}'\text{N}(\text{R}_3)-$ ;

[0530] 每次出现时,  $R_5$  独立地为 -H 或任选取代的具有 1 至 10 个碳原子的直链或支链的烷基;

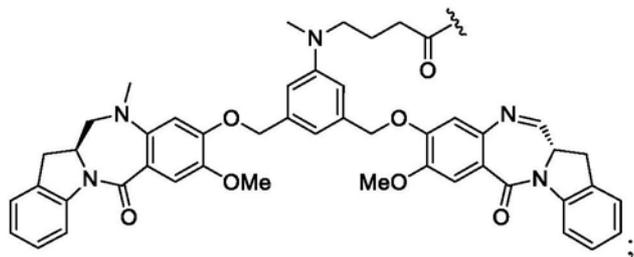
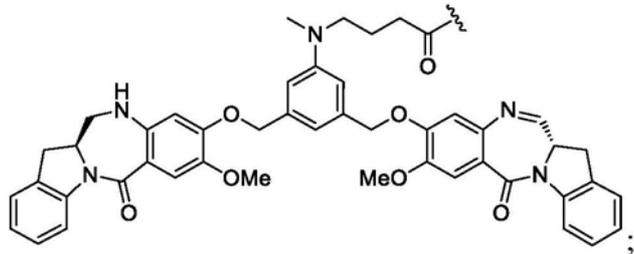
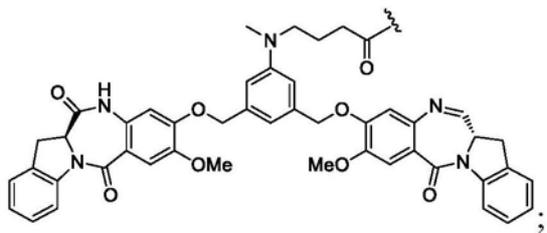
[0531] D 和 D' 相同或不同, 且独立地不存在或选自任选取代的具有 1 至 10 个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基, 氨基酸, 具有 2 至 6 个氨基酸的肽, 和聚乙二醇单元  $(-OCH_2CH_2)_n^-$ ;

[0532] L 不存在, 为连接基团, 聚乙二醇单元  $(-OCH_2CH_2)_n^-$ , 具有 1 至 10 个碳原子的直链、支链或环状的烷基或烯基, 苯基, 具有 1 至 6 个独立选自 O、S、N 和 P 的杂原子的 3-18 元杂环或 5 至 18 元杂芳基环, 其中所述烷基或烯基任选被所述连接基团取代; 苯基或杂环或杂芳基环可任选被取代, 其中所述取代基可以是连接基团;

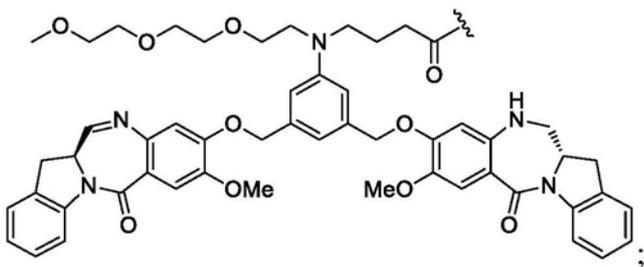
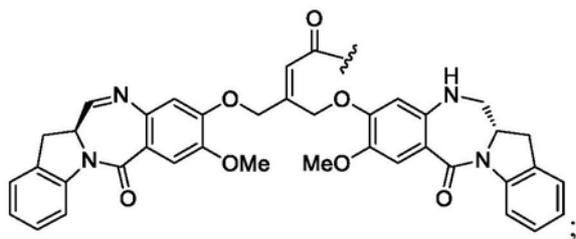
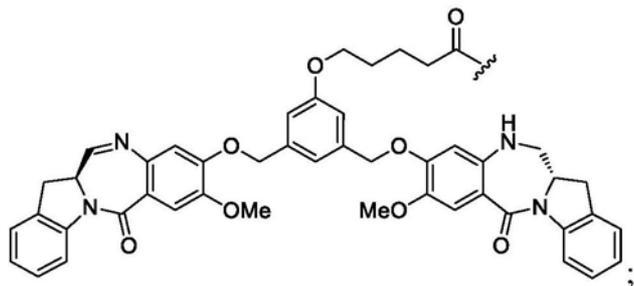
[0533] 在某些实施方案中, X 不是连接基团。在某些实施方案中, N 和 C 之间的双线  $=$  表示单键, Y 不是 -H。

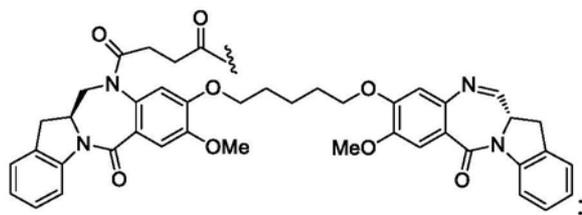
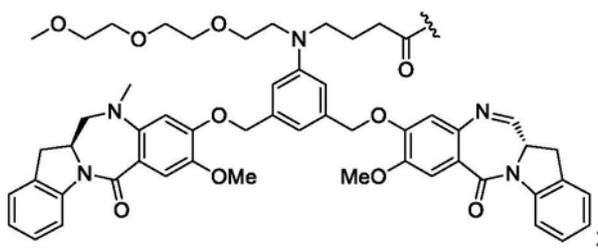
[0534] 在某些实施方案中, Y 是离去基团, 其选自 -OR、-OCOR'、-OCOR'、-OCONR' R''、-NR' R''、-NR' COR''、-NR' NR' R''、任选取代的 5 或 6 元含氮杂环 (如, 哌啶、四氢吡咯、吡啶、吗啉等), 由 -NR' (C=NH) NR' R'' 表示的胍基, 氨基酸, 或由 -NRCOP' 表示的肽, 其中 P' 是氨基酸或含有 2 至 20 个氨基酸单元的多肽、-SR、-SOR'、-SO<sub>2</sub>M、-SO<sub>3</sub>M、-OSO<sub>3</sub>M、卤素、氰基和叠氮基。

[0535] 在某些实施方案中, 化合物不是下述化合物中的任一者:

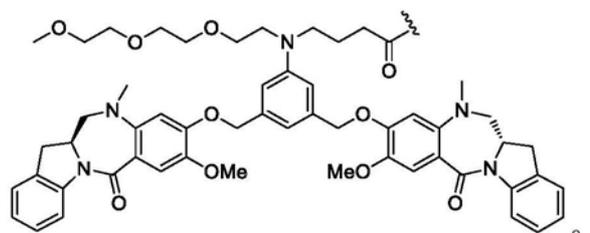
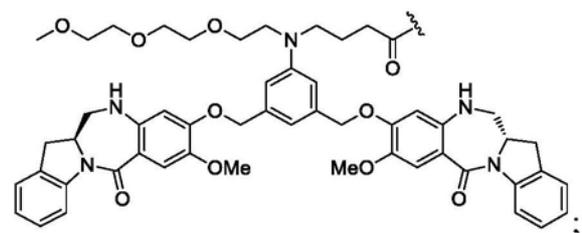
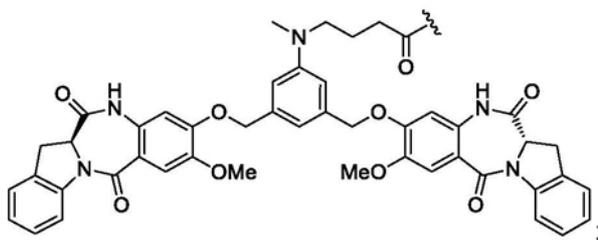


[0536]



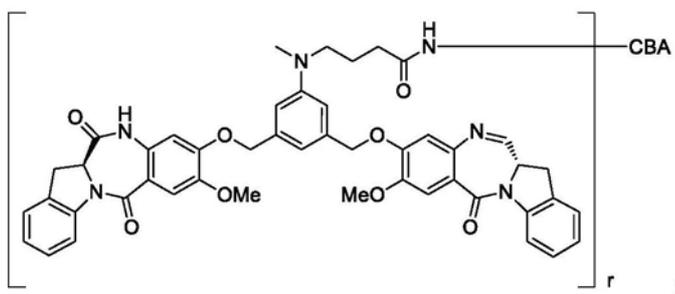


[0537]

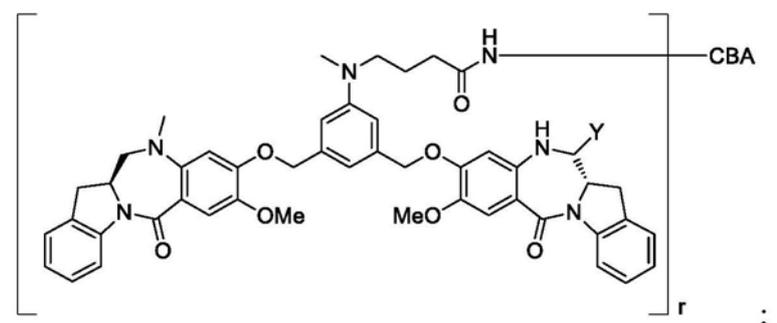
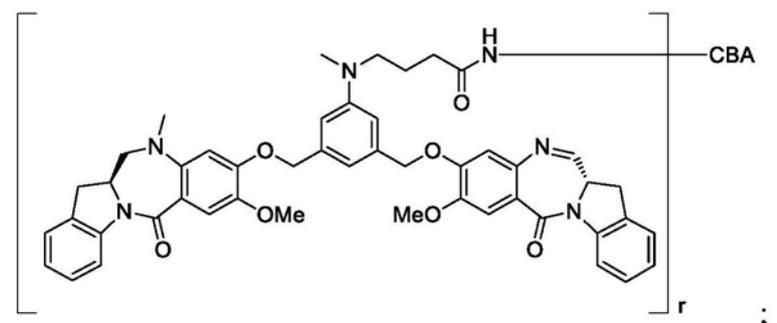
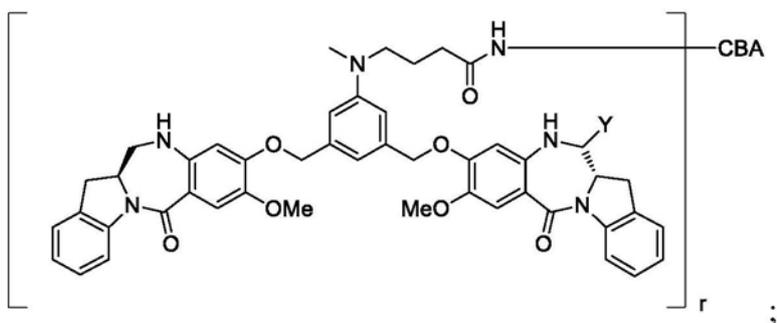
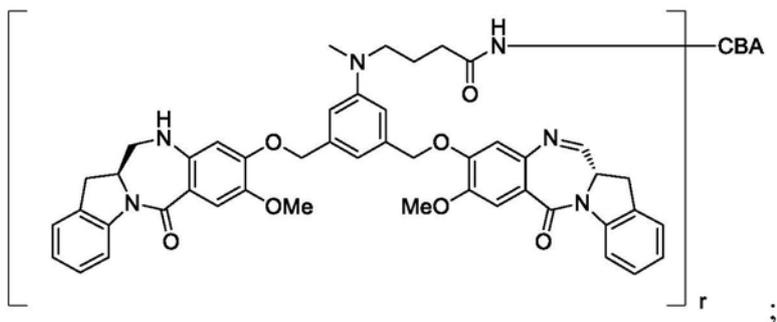
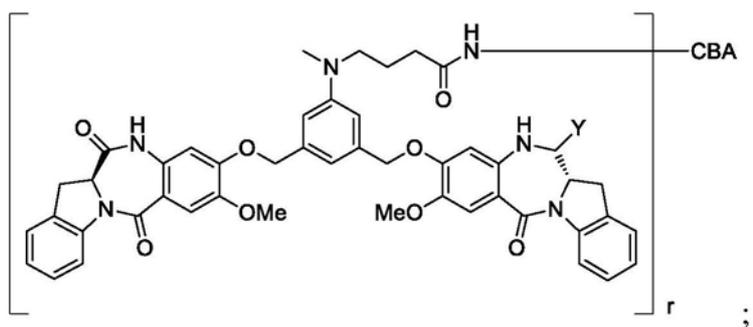


[0538] 在某些实施方案中,本发明的缀合物包括下述:

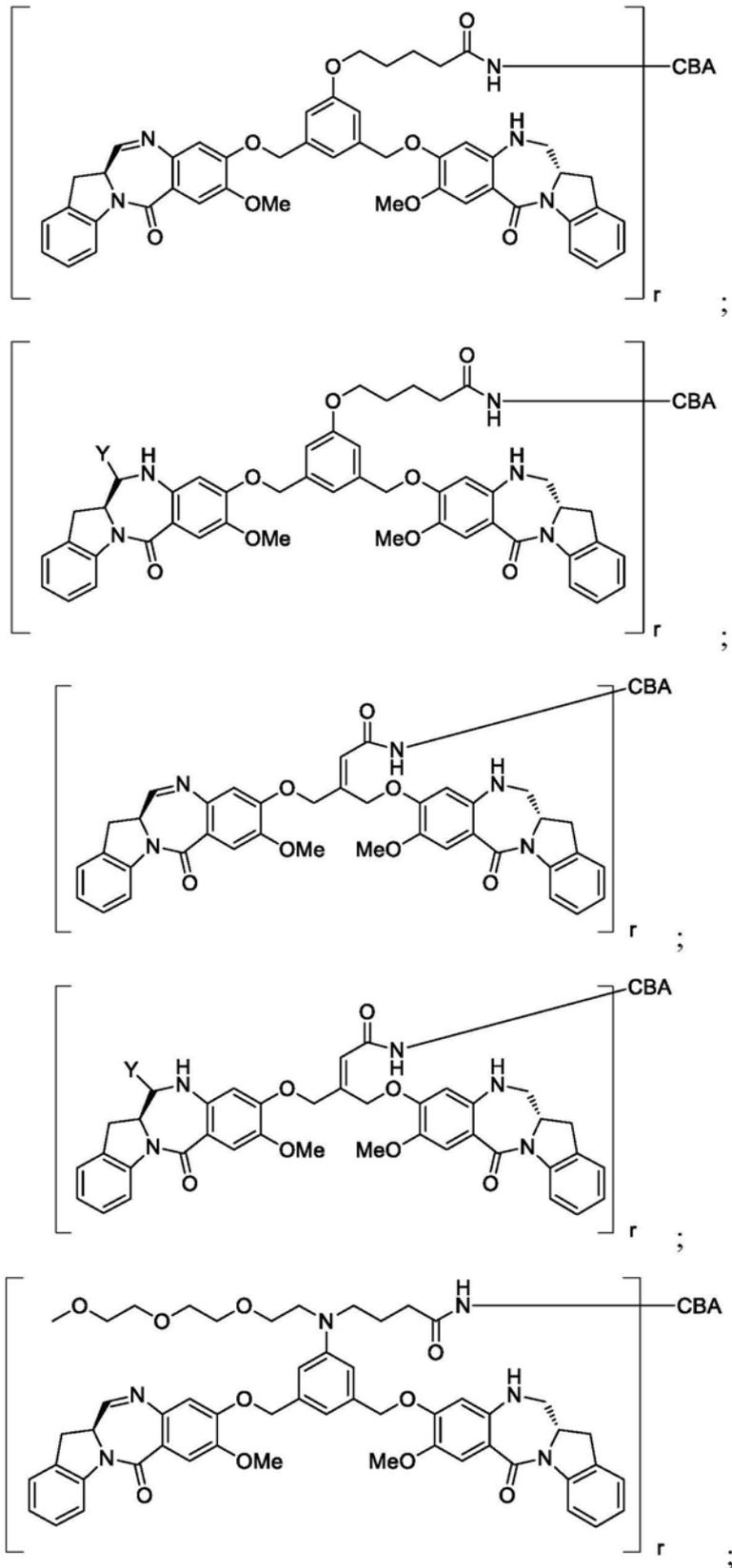
[0539]



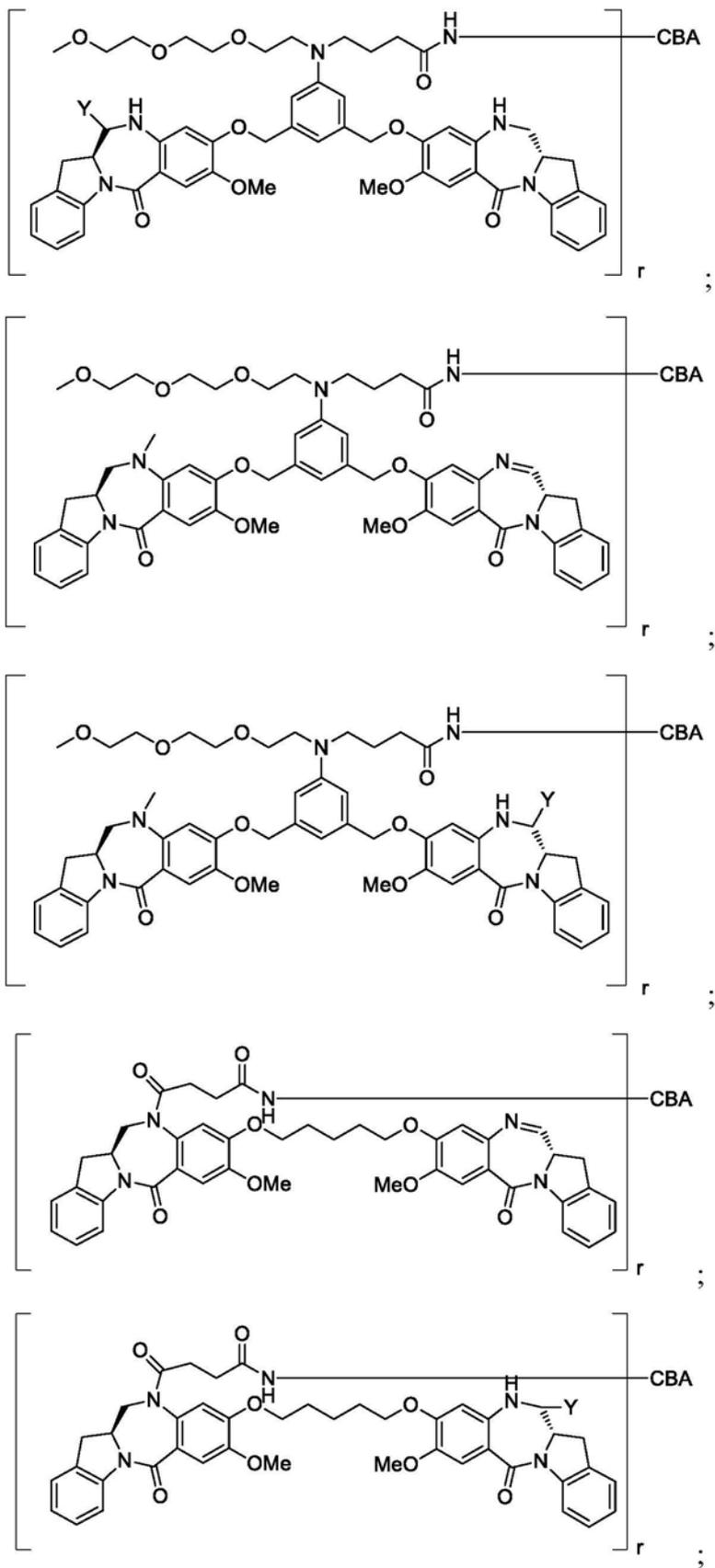
[0540]

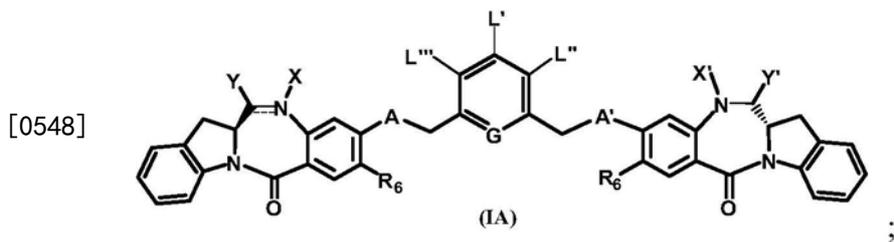
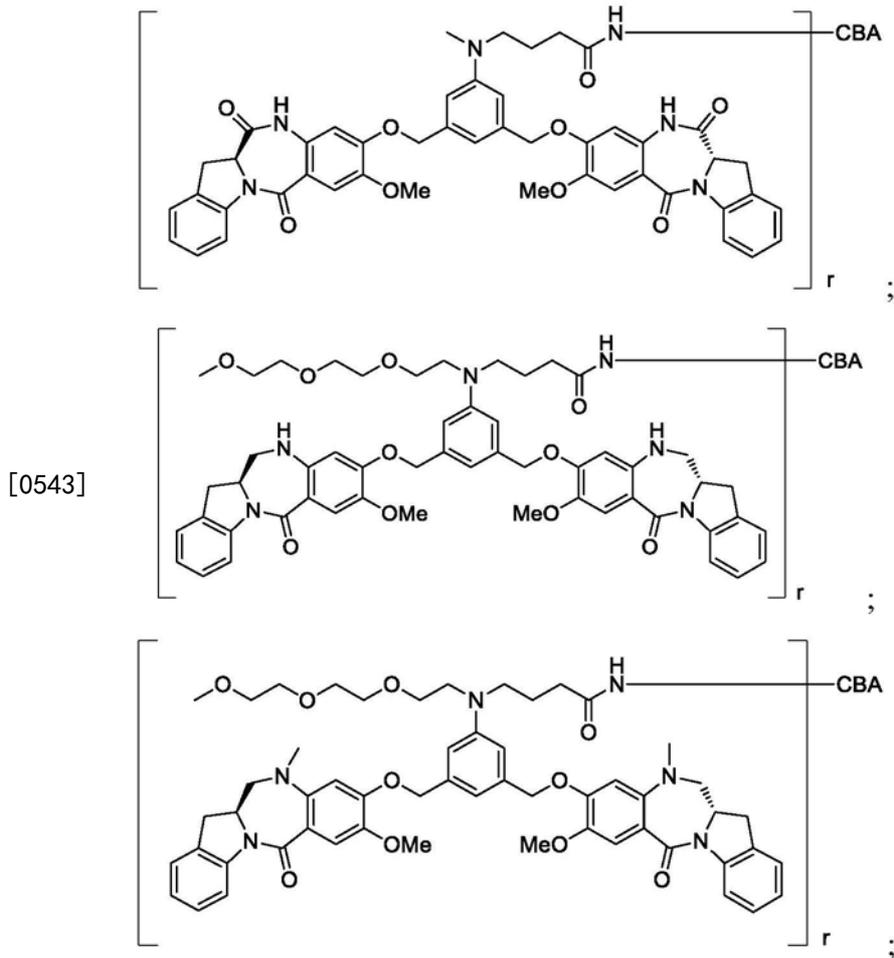


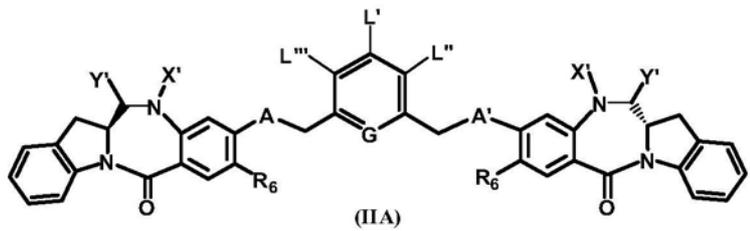
[0541]



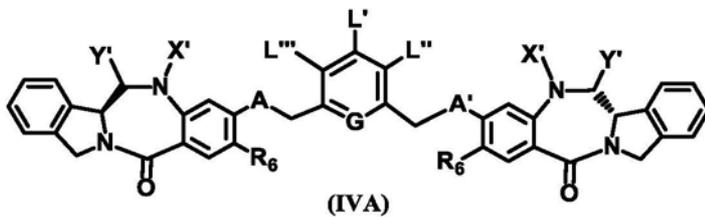
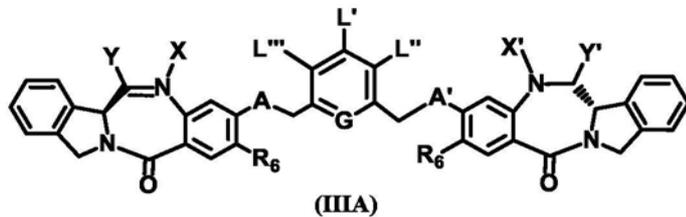
[0542]







[0549]



[0550] 其中:

[0551] L'、L''和L'''相同或不同,且独立地选自-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{R}^c$ ,卤素,胍基 $[-\text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2]$ , $-\text{OR}$ , $-\text{NR}'\text{R}''$ , $-\text{NO}_2$ , $-\text{NR}'\text{COR}''$ , $-\text{SR}$ ,由 $-\text{SOR}'$ 表示的亚砷,由 $-\text{SO}_2\text{R}'$ 表示的砷,磺酸盐 $-\text{SO}_3\text{M}$ ,硫酸盐 $-\text{OSO}_3\text{M}$ ,由 $-\text{SO}_2\text{NR}'\text{R}''$ 表示的磺酰胺,氰基,叠氮基, $-\text{COR}'$ , $-\text{OCOR}'$ , $-\text{OCONR}'\text{R}''$ 和连接基团,条件是L'、L''和L'''中仅一者是连接基团;且

[0552] G选自-CH-或-N-。其余的基团如上文第十四具体实施方案中所述。

[0553] 在某些实施方案中,L'、L''或L'''中的一者是连接基团,而其它的是-H。优选地,L'是连接基团,而L''和L'''是-H。

[0554] 在某些实施方案中,A和A'均是-O-;R<sub>6</sub>是-OMe,且G是-CH-。

[0555] 在第十六具体实施方案中,L'由下式表示:

[0556]  $-\text{W}'-\text{R}^x-\text{V}-\text{R}^y-\text{J}$ ,

[0557] 其中:

[0558] W'和V相同或不同,且各自独立地不存在或选自 $-\text{CR}^e\text{R}^e-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{SO}-$ 、 $-\text{SO}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{NR}^e-$ 、 $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^e)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^e)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^e)-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}^e)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^e)-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{N}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^e)\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{N}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^e)-$ 、 $-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-$ 、 $-\text{SS}-$ 或 $-\text{C}(=\text{O})-$ 或氨基酸,或具有2至8个氨基酸的肽;

[0559] R<sup>x</sup>和R<sup>y</sup>相同或不同,且各自独立地不存在或为任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,具有6至10个碳原子的芳基或具有1至3个选自O、N或S的杂原子的3至8元杂环;

[0560] R<sup>e</sup>和R<sup>e'</sup>相同或不同,且选自-H,具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{R}^k$ ,其中R<sup>k</sup>是-H,具有1至6个碳原子的直链、支链的环状的烷基,任选地具有仲氨基(如, $-\text{NHR}^{101}$ )或叔氨基( $-\text{NR}^{101}\text{R}^{102}$ )或5或6元含氮杂环,诸如哌啶或吗啉,

其中 $R^{101}$ 和 $R^{102}$ 是各自独立地具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基；优选地， $R^{101}$ 和 $R^{102}$ 是各自独立地具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；

[0561]  $n$ 是1至24的整数；且

[0562]  $J$ 共价连接于CBA，且选自琥珀酰亚胺、乙酰氨基、 $-S-$ 、 $-SS-$ 、 $-CH_2S-$ 、 $-CH(Me)S-$ 、 $-C(Me)_2S-$ 、 $-NR^{c1}-$ 、 $-CH_2NR^{c1}-$ 、 $-NR^{c1}N-$ 和 $-C(=O)-$ ，其中 $R^{c1}$ 是 $-H$ 或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基。

[0563] 在某些实施方案中， $J$ 是 $-S-$ 、 $-SS-$ ，琥珀酰亚胺，或 $-C(=O)-$ 。

[0564] 在某些实施方案中， $R^e$ 是 $-H$ 或 $-Me$ ； $R^e$ 是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ； $n$ 是2至8的整数，且 $R^k$ 是 $-H$ 、 $-Me$ 或 $-CH_2CH_2-NMe_2$ ，而其余的变量如在上文第十五具体实施方案中所述。

[0565] 在某些实施方案中， $V$ 是氨基酸或具有2至8个氨基酸的肽。

[0566] 在某些实施方案中， $V$ 是缬氨酸-瓜氨酸、gly-gly-gly或ala-leu-ala-leu。

[0567] 在某些实施方案中，

[0568]  $W'$ 是 $-O-$ 、 $-N(R^e)-$ 或 $-N(R^e)-C(=O)-$ ；

[0569]  $R^e$ 是 $H$ 、具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ；

[0570]  $R^x$ 是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；

[0571]  $V$ 不存在、为 $-(O-CH_2-CH_2)_n-$ 、 $-C(=O)-NH-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-C(=O)-$ ；

[0572]  $R^y$ 不存在或者是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基；且

[0573]  $J$ 是 $-S-$ 、 $-SS-$ 或 $-C(=O)-$ ，而其余的基团如第十六具体实施方案所定义。

[0574] 在某些实施方案中，

[0575]  $W'$ 是 $-O-$ 、 $-N(R^e)-$ 或 $-N(R^e)-C(=O)-$ ；

[0576]  $R^e$ 是 $-H$ 、 $-Me$ 或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-Me$ ；

[0577]  $n$ 是2至6的整数；

[0578]  $R^x$ 是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；

[0579]  $V$ 和 $R^y$ 不存在；且

[0580]  $J$ 是 $-C(=O)-$ 。其余的基团如第十六具体实施方案所定义。

[0581] 在第十七具体实施方案中，第十六具体实施方案中的 $L'$ 由下式表示：

[0582]  $-W' - [CR_1, R_2]_a - V - [Cy]_{0-1} - [CR_3, R_4]_b - C(=O) -$ ，

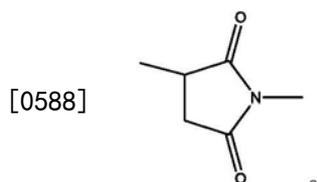
[0583] 其中：

[0584]  $R_1$ 、 $R_2$ 和 $R_3$ 各自独立地为 $-H$ 或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基，优选为 $-Me$ ；

[0585]  $R_4$ 是 $-H$ 、具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基（优选 $-Me$ ）、 $-SO_3H$ 或 $-SO_3^-M^+$ ，其中 $M^+$ 是药理学上可接受的阳离子；

[0586]  $a$ 是0-5（如，从0至2、3、4或5）的整数，且 $b$ 是0-6（如，从0至3、4、5或6）的整数；且

[0587]  $Cy$ 是具有 $N$ 杂原子的任选取代的5元杂环，优选地 $Cy$ 是

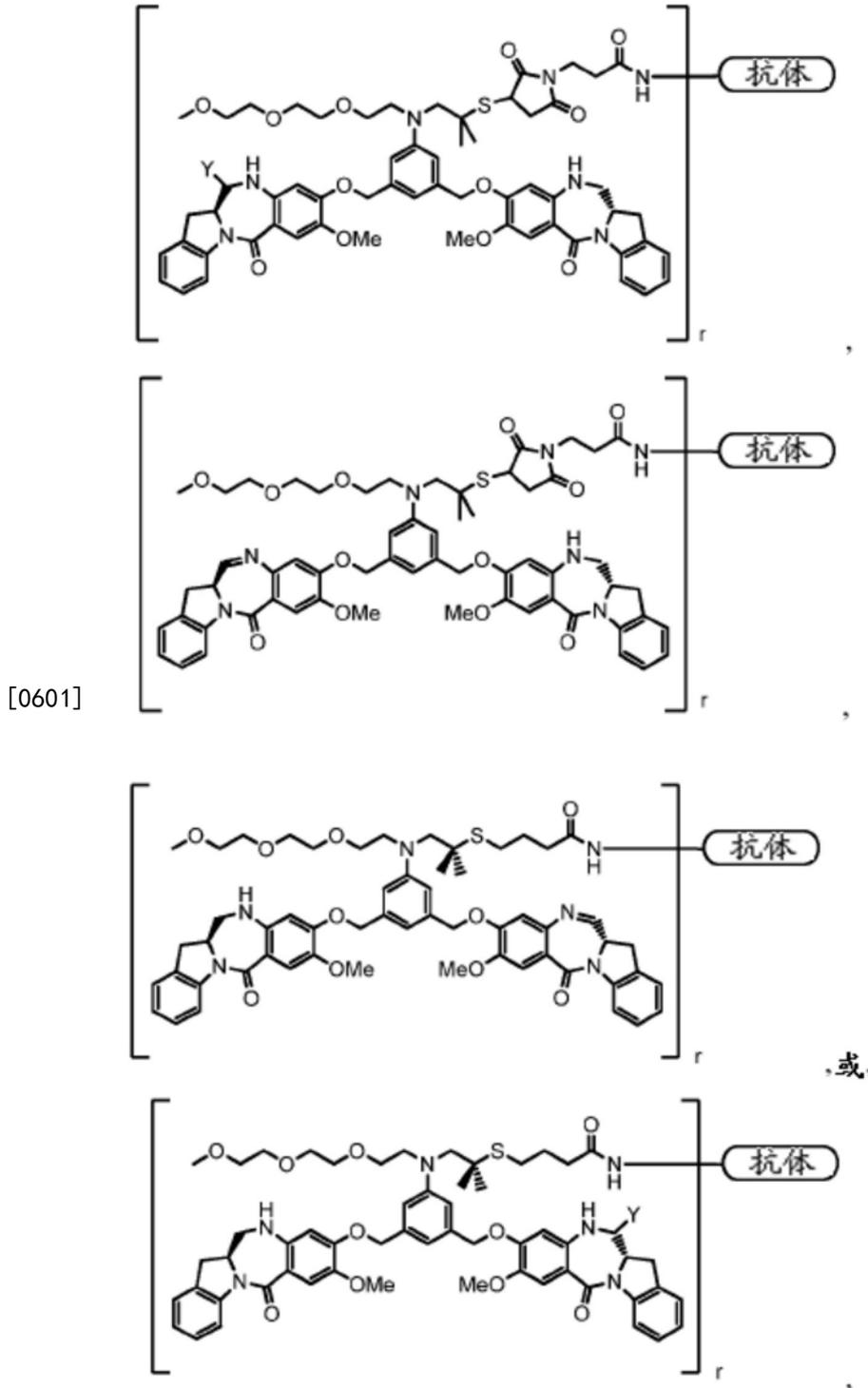




[0598] 在第十九具体实施方案中,在第十六或第十七具体实施方案中的L' 由下式表示:

[0599]  $-NR^e - [CR_1^a, R_2^a]_a - S - Cy - [CR_3^b, R_4^b]_b - C(=O) -$

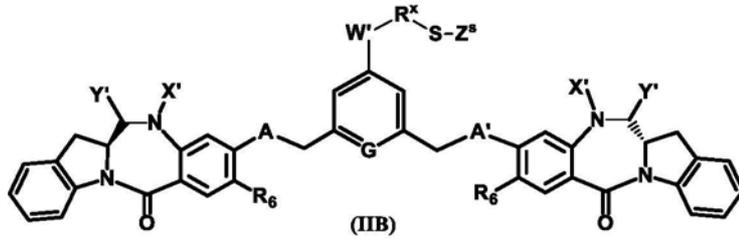
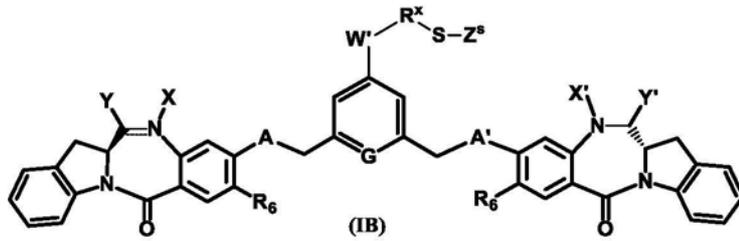
[0600] 在某些实施方案中,诸如在第十六、第十七和第十九具体实施方案中,缀合物是:



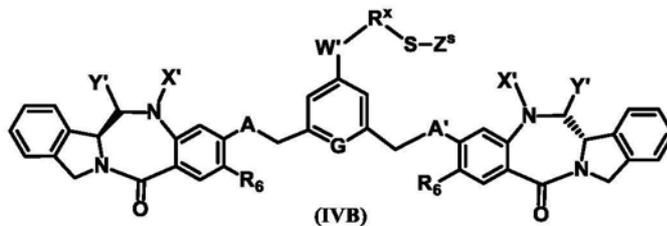
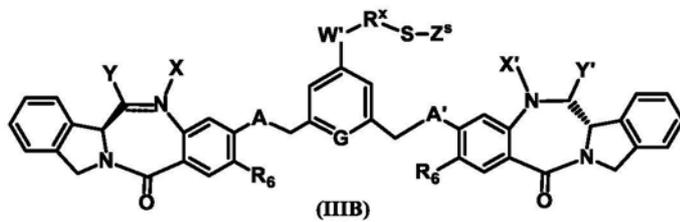
[0602] 其中r是1至10的整数,Y是-H或-SO<sub>3</sub>M(如,Y是-SO<sub>3</sub>M),且M是-H 或药学上可接受的阳离子。

[0603] 在某些实施方案中,诸如在第十六、第十七和第十九具体实施方案中,抗体是huMy9-6。

[0604] 在第二十具体实施方案中,化合物由下式表示:



[0605]



[0606] 其中:

[0607]  $W'$  不存在或选自  $-O-$ 、 $-N(R^e)-$ 、 $-N(R^e)-C(=O)-$ 、 $-N(C(=O)R^e)-$ 、 $-S-$ 、 $-CH_2-S-$  或  $-CH_2NR^e-$ ;

[0608]  $R^x$  不存在或选自具有 1 至 10 个碳原子的直链、支链或环状的烷基;

[0609]  $R^e$  是  $-H$ 、具有 1 至 10 个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或  $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ，其中  $R^k$  是  $-H$ 、具有 1 至 6 个碳原子的直链、支链环状的烷基，任选地具有仲氨基(如， $-NHR^{101}$ )或叔氨基( $-NR^{101}R^{102}$ )基团或 5 或 6 元含氮杂环，如哌啶或吗啉，其中  $R^{101}$  和  $R^{102}$  各自独立地为具有 1 至 10 个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基;

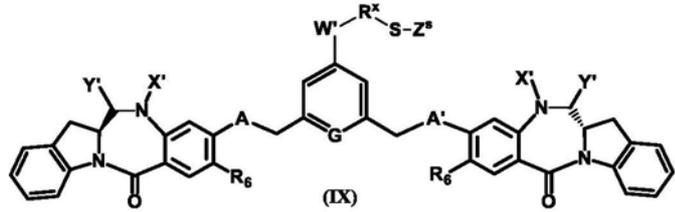
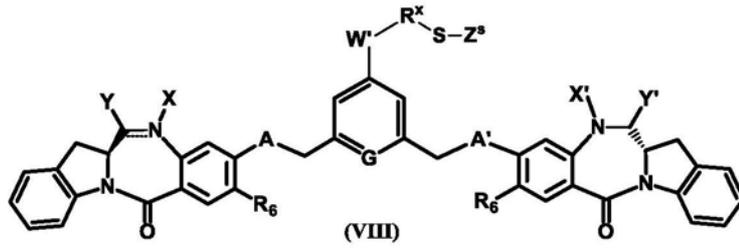
[0610]  $Z^s$  连接于 CBA，且为键或  $-SR^m-$ ;

[0611]  $R^m$  是  $R^d$  或是具有 1 至 4 个碳原子的取代的具有反应性酯的直链或支链的烷基，其选自 N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基邻苯二甲酰亚胺酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、对硝基苯基酯、二硝基苯基酯和五氟苯基酯;

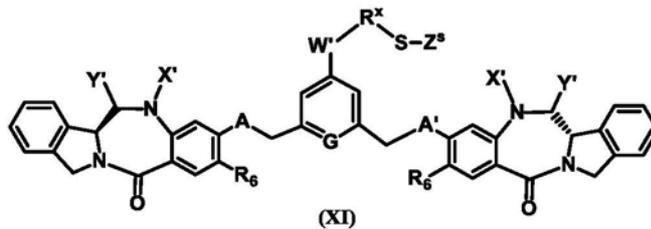
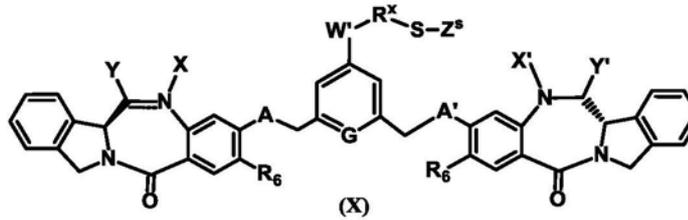
[0612]  $R^d$  选自苯基、硝基苯基、二硝基苯基、羧基硝基苯基、吡啶基或硝基吡啶基;且

[0613]  $n$  是 1 至 24 的整数，且剩余的变量如上文第八或第十五具体实施方案所述。

[0614] 在第二十一具体实施方案中，化合物由下式表示:



[0615]



[0616] 其中：

[0617]  $W'$  不存在或选自  $-O-$ 、 $-N(R^e)-$ 、 $-N(R^e)-C(=O)-$ 、 $-N(C(=O)R^e)-$ 、 $-S-$ 、 $-CH_2-S-$  或  $-CH_2NR^e-$ ；

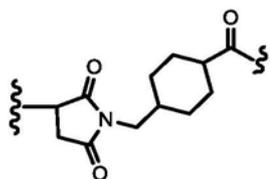
[0618]  $R^x$  不存在或选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基；

[0619]  $R^e$  是  $-H$ ，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或  $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ，其中  $R^k$  是  $-H$ ，具有1至6个碳原子的直链、支链环状的烷基，任选地具有仲氨基（如， $-NHR^{101}$ ）或叔氨基（ $-NR^{101}R^{102}$ ）基团或5或6元含氮杂环，如哌啶或吗啉，其中  $R^{101}$  和  $R^{102}$  各自独立地为具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基；

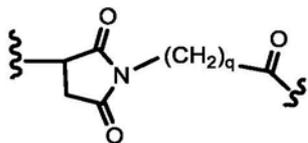
[0620]  $n$  是2至6的整数；

[0621]  $Z^s$  连接至所述CBA，且选自：

[0622] 键；

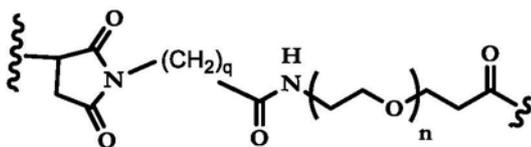


(b1);

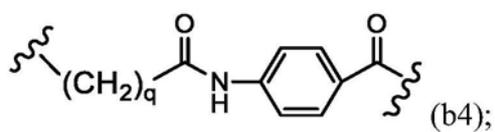


(b2);

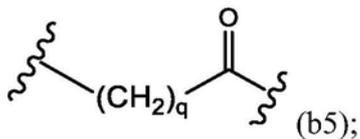
[0623]



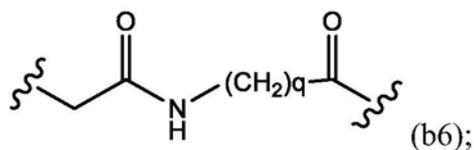
(b3);



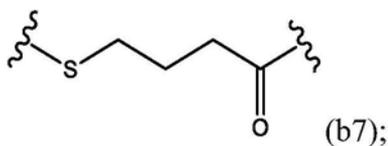
(b4);



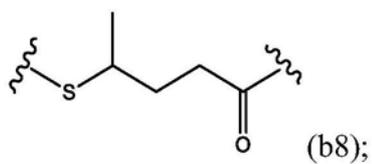
(b5);



(b6);

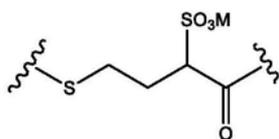


(b7);

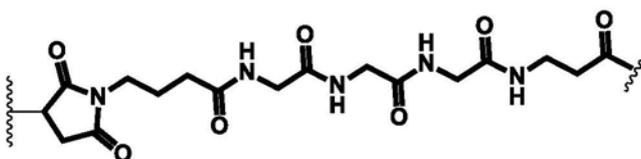


(b8);

[0624]



(a9)和



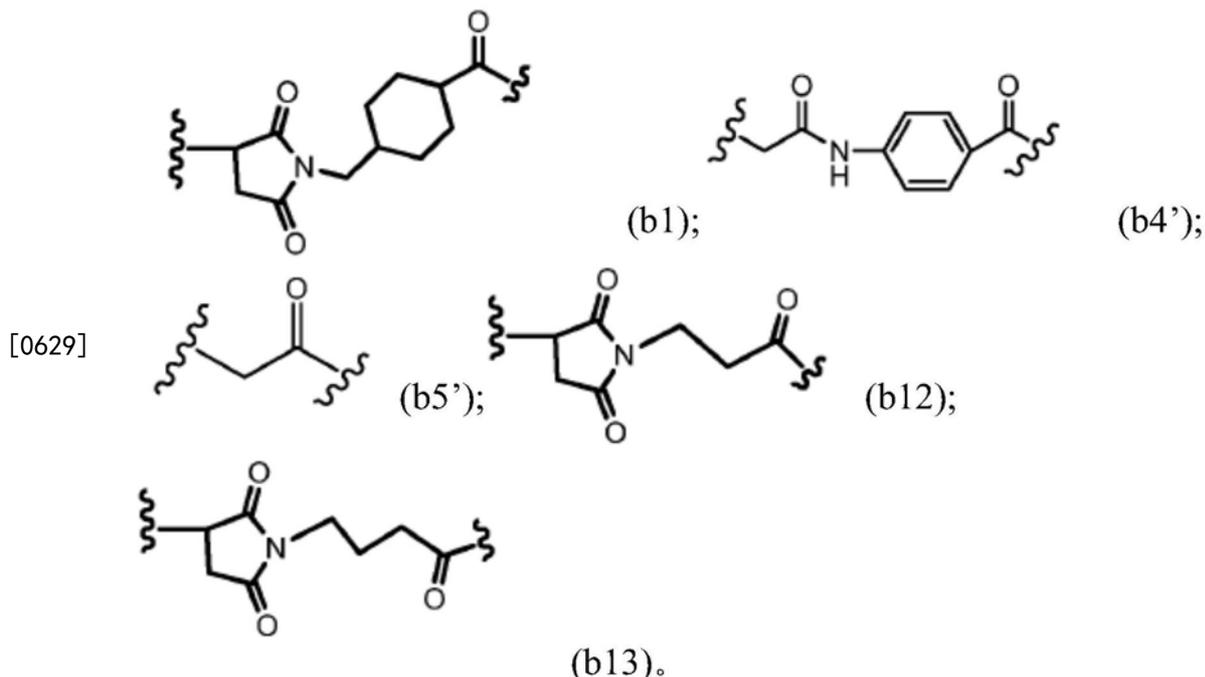
(b10),

[0625] 其中:

[0626] q是1至5的整数;且

[0627] M是-H或阳离子,诸如Na<sup>+</sup>或K<sup>+</sup>。

[0628] 在某些实施方案中,Z<sup>s</sup>由下式中的任一者表示:



[0630] 在某些实施方案中,W' 是-N(R<sup>e</sup>)-。

[0631] 在某些实施方案中,R<sup>e</sup>是-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>,其中R<sup>k</sup>是-H、具有1至6个碳原子的直链、支链环状的烷基。

[0632] 在某些实施方案中,R<sup>k</sup>是-H或-Me,n是4,且q是2。

[0633] 在某些实施方案中,R<sup>x</sup>是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基。

[0634] 在某些实施方案中,R<sup>x</sup>是-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-(CR<sup>f</sup>R<sup>g</sup>)-,其中R<sup>f</sup>和R<sup>g</sup>各自独立地选自H或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基;且p是0、1、2或3。

[0635] 在某些实施方案中,R<sup>f</sup>和R<sup>g</sup>相同或不同,且选自-H和-Me;且p是1。

[0636] 在第二十二具体实施方案中,在第二十一具体实施方案中所述的式(VIII)、(IX)、(X)和(XI)的缀合物,变量如下所述:

[0637] N和C之间的双线==表示单键或双键,条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H,而当其是单键时,X是-H;Y是-H、-OH或-SO<sub>3</sub>M(如,Y是-OH或-SO<sub>3</sub>M);

[0638] M是-H或药学上可接受的阳离子(如,Na<sup>+</sup>);

[0639] X'和Y'均是-H;

[0640] A和A'均是-O-;

[0641] R<sub>6</sub>是-OMe;且

[0642] R<sup>x</sup>是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基。

[0643] 在第二十三具体实施方案中,对于第二十具体实施方案中所述的式(IB)、(IIB)、(IIIB)和(IVB)的化合物,变量如下所述:

[0644] N和C之间的双线==表示单键或双键,条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H,而当其是单键时,X是-H;Y是-H、-OH或-SO<sub>3</sub>M(如,Y是-OH或-SO<sub>3</sub>M);

- [0645] M是-H或 $\text{Na}^+$ ;
- [0646]  $X'$ 和 $Y'$ 均是-H;
- [0647] A和 $A'$ 均是-O-;
- [0648]  $R_6$ 是-OMe;
- [0649]  $R^x$ 是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基。
- [0650] 优选地, $R^x$ 是 $(\text{CH}_2)_p - (\text{CR}^f\text{R}^g) -$ ,其中 $R^f$ 和 $R^g$ 各自独立地选自-H或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基;p是0、1、2或3。更优选地, $R^f$ 和 $R^g$ 相同或不同,且选自-H和-Me;且p是1。
- [0651] 在本发明上文所述缀合物的任一具体实施方案,诸如第十四到第二十三具体实施方案中,N和C之间的双线 $\equiv$ 可表示双键。
- [0652] 在本发明上文所述缀合物的任一具体实施方案,诸如第十四到第二十三具体实施方案中,N和C之间的双线 $\equiv$ 可表示单键,X是-H,连接基团,或氨基保护基(如,X是-H);且Y是-H或选自-OR、-OCOR'、-SR、-NR'R''、任选取代的5或6元含氮杂环、-SO<sub>3</sub>M、-SO<sub>2</sub>M和硫酸盐-OSO<sub>3</sub>M。在某些实施方案中,Y不是-H。
- [0653] 在某些实施方案中,Y选自-H、-SO<sub>3</sub>M、-OH、-OMe、-OEt或-NHOH(如,Y是-SO<sub>3</sub>M、-OH、-OMe、-OEt或-NHOH)。
- [0654] 在某些实施方案中,Y是-H、-SO<sub>3</sub>M或-OH(如,Y是-SO<sub>3</sub>M或-OH)。
- [0655] 在某些实施方案中,M是-H、 $\text{Na}^+$ 或 $\text{K}^+$ 。
- [0656] 在本发明上文所述缀合物的任一具体实施方案,诸如第14至第23具体实施方案中,W当存在时是C=O。
- [0657] 在本发明上文所述缀合物的任一具体实施方案,诸如第14至第23具体实施方案中,Z和Z'当存在时是-CH<sub>2</sub>-。
- [0658] 在本发明上文所述缀合物的任一具体实施方案,诸如第14至第23具体实施方案中, $X'$ 选自-H,-OH,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,苯基,连接基团和氨基保护基。
- [0659] 在某些实施方案中, $X'$ 是-H,-OH,-Me或连接基团。
- [0660] 在某些实施方案中, $X'$ 是-H。
- [0661] 在本发明上文所述缀合物的任一具体实施方案,诸如第14至第23具体实施方案中, $Y'$ 选自-H,氧代基团,具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基。
- [0662] 在某些实施方案中, $Y'$ 是-H或氧代。
- [0663] 在某些实施方案中, $Y'$ 是-H。
- [0664] 在本发明上文所述缀合物的任一具体实施方案,诸如第14至第23具体实施方案中,A和 $A'$ 相同或不同,且选自-O-、-S-、-N(R<sub>5</sub>)-和氧代(C=O)。
- [0665] 在某些实施方案中,A和 $A'$ 相同或不同,且选自-O-和-S-。
- [0666] 在某些实施方案中,A和 $A'$ 是-O-。
- [0667] 在本发明上文的缀合物的任一具体实施方案,诸如第14至第23具体实施方案中,D和D'当存在时相同或不同,且独立地选自聚乙二醇单元 $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ ,其中n是1至24的整数,氨基酸,具有2至6个氨基酸的肽,具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基

或炔基,其中所述烷基、烯基和炔基任选被一个或多个独立地选自卤素、-OR、-NR' COR''、-SR和-COR'的取代基取代。

[0668] 在某些实施方案中,D和D'是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基。

[0669] 在第二十四具体实施方案中,如第十四、第十五、或第二十一具体实施方案中所述的本发明的缀合物由下述表示:

[0670] N和C之间的双线==表示双键;

[0671] Y是-H;

[0672] W是C=O;

[0673] R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>1</sub>'、R<sub>2</sub>'、R<sub>4</sub>和R<sub>4</sub>'是-H;

[0674] R<sub>3</sub>或R<sub>3</sub>'中的一者任选为连接基团,而另一者是-H;

[0675] R<sub>6</sub>是-OMe;

[0676] Z和Z'是-CH<sub>2</sub>;

[0677] X'是-H;

[0678] Y'是-H;且

[0679] A和A'是-O-。

[0680] 在某些实施方案中,诸如第14至24具体实施方案的任一所述实施方案的缀合物均可包含1-10种细胞毒性化合物、2-9种细胞毒性化合物、3-8种细胞毒性化合物、4-7种细胞毒性化合物或5-6种细胞毒性化合物,包含将细胞毒性化合物连接于CBA的连接基团的每种细胞毒性化合物和缀合物上的各种细胞毒性化合物是相同的。

[0681] 在任一缀合物实施方案,诸如第14至第24具体实施方案中,细胞结合剂可结合至选自肿瘤细胞、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、活化细胞、骨髓细胞、活化的T细胞、B细胞或黑素细胞的靶细胞;结合至表达的CD4、CD6、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD44、CD56、EpCAM、CanAg、CALLA、或Her-2 抗原;Her-3抗原的细胞;或表达胰岛素生长因子受体、表皮生长因子受体和叶酸受体的细胞。

[0682] 在任一缀合物实施方案,诸如第14至第24具体实施方案中,细胞结合剂可以是抗体、单链抗体、特异性结合于靶细胞的抗体片段、单克隆抗体、单链单克隆抗体或特异性结合于靶细胞的单克隆抗体片段、嵌合抗体、特异性结合于靶细胞的嵌合抗体片段、结构域抗体、特异性结合于靶细胞结构域抗体片段、淋巴因子、激素、维生素、生长因子、集落刺激因子或营养转运分子。

[0683] 抗体可以是表面重构抗体、表面重构单链抗体或表面重构抗体片段。

[0684] 该抗体可以是单克隆抗体、单链单克隆抗体或其单克隆抗体片段。

[0685] 抗体可以是人源化抗体、人源化单链抗体或人源化抗体片段。

[0686] 本发明还提供包含本文所述的任一缀合物的药物组合物和药学上可接受的载体。

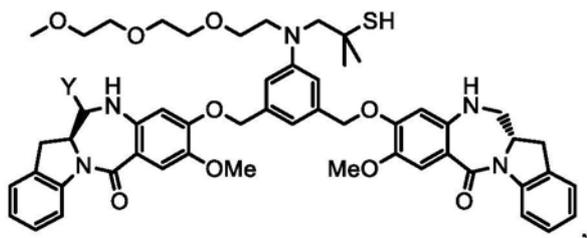
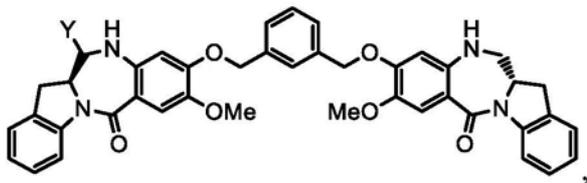
[0687] 本发明还提供包含共价连接于双官能连接子的任一主题化合物的药物-连接子化合物。

[0688] 本发明另外提供包含连接于细胞结合剂的任一种主题化合物或主题药物-连接子化合物的缀合物。

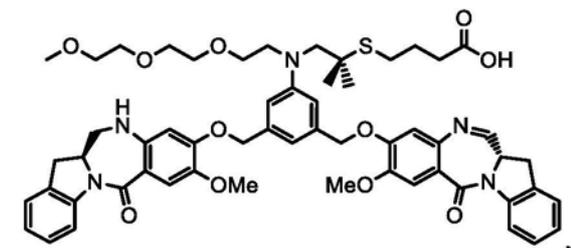
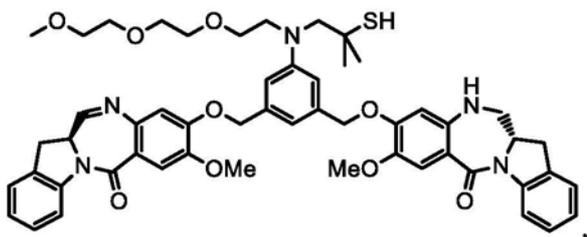
[0689] 本发明还提供抑制哺乳动物中异常细胞生长或治疗增殖性病症、自身免疫性病症、破坏性骨病症、传染性疾病、病毒性疾病、纤维化疾病、神经变性病症,胰腺炎或肾脏疾

病的方法,其包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的本发明的任一种化合物(含有或不含有任何连接子基团)或缀合物,及任选地,第二化疗剂。

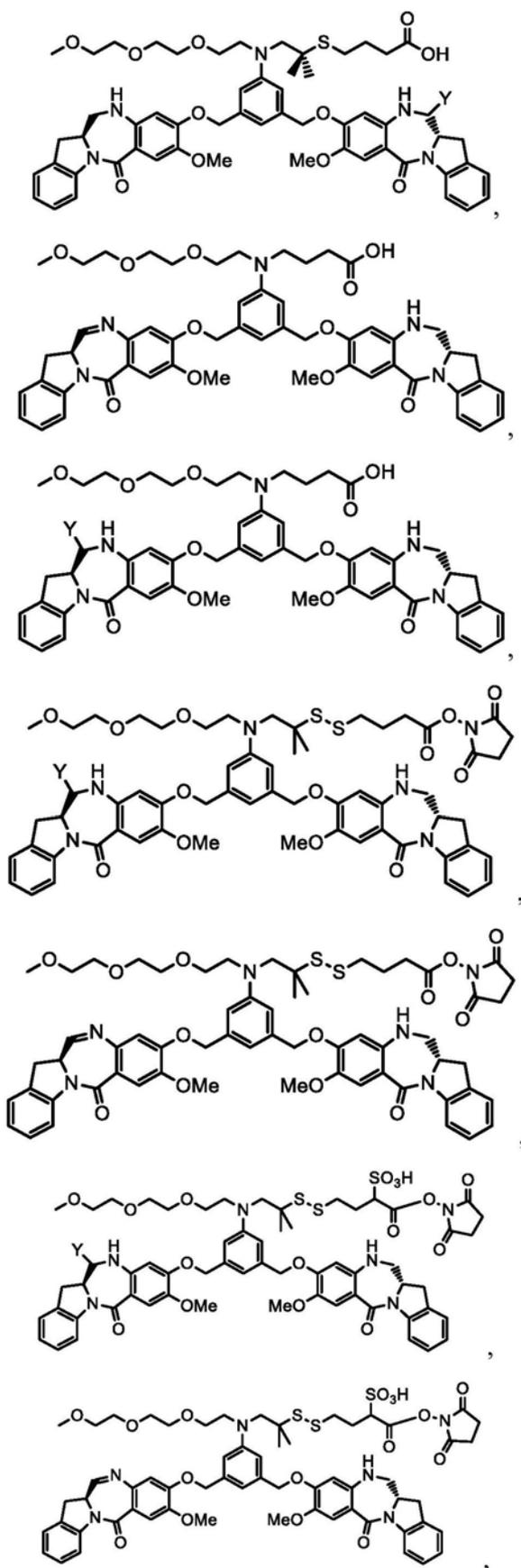
[0690] 在某些实施方案中,化合物或缀合物是:

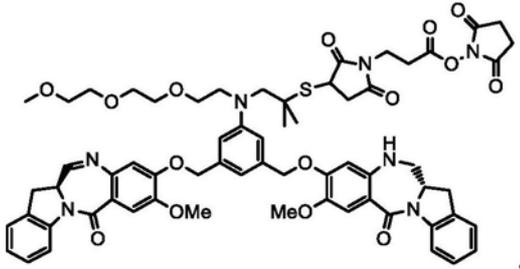
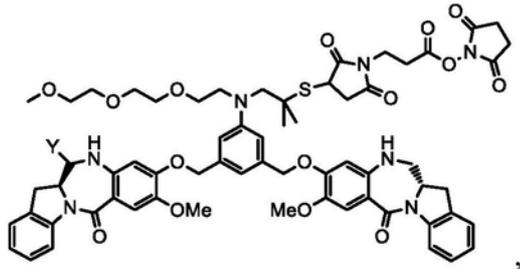


[0691]

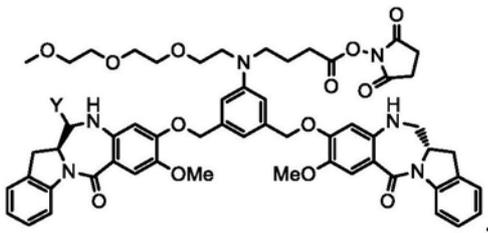
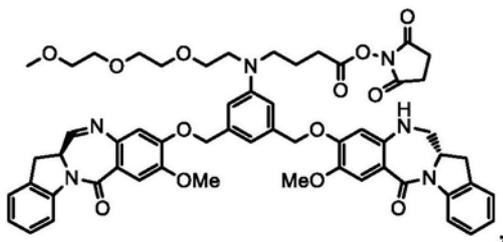
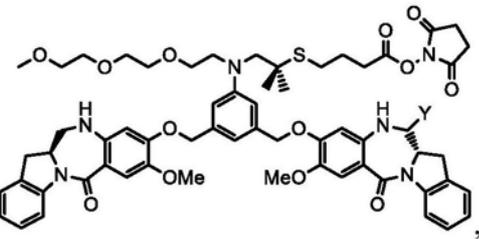
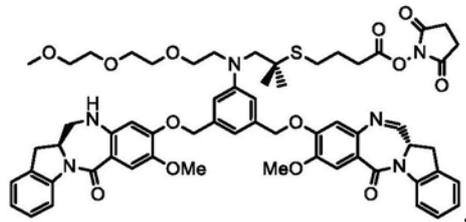


[0692]

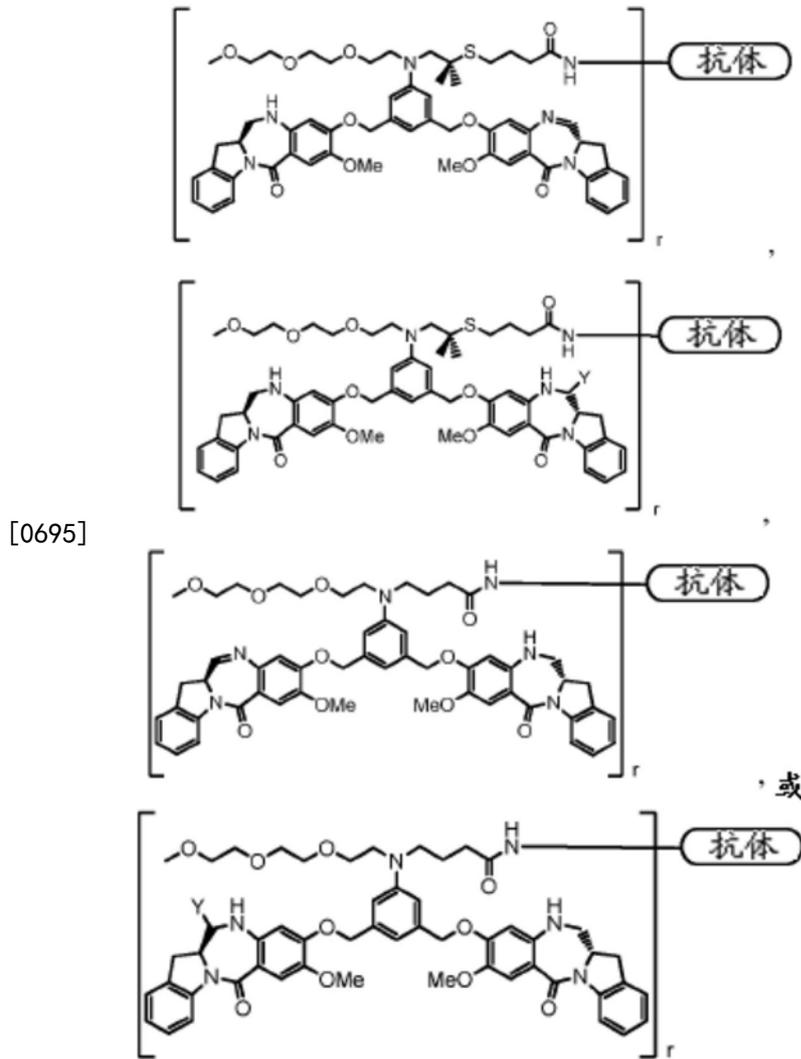




[0693]







[0696] 其中 $r$ 是1至10的整数, $Y$ 是-H或 $-SO_3M$ (如, $Y$ 是 $-SO_3M$ ),且 $M$ 是-H 或药学上可接受的阳离子。

[0697] 在某些实施方案中,将第二化疗剂相继或连续地施用于所述哺乳动物。

[0698] 在某些实施方案中,所述方法用于治疗选自以下的病症:癌症、风湿性关节炎、多发性硬化、移植物抗宿主病(GVHD)、移植排斥、狼疮、肌炎、感染和免疫缺陷。

[0699] 在某些实施方案中,该方法或缀合物用于治疗癌症。

[0700] 在某些实施方案中,癌症选自乳腺癌、结肠癌、脑癌、前列腺癌、肾癌、胰腺癌、卵巢癌、头颈癌、黑素瘤、结直肠癌、胃癌、鳞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、睾丸癌、梅克尔细胞癌(Merkel cell carcinoma)、胶质母细胞瘤、神经细胞瘤、淋巴器官癌和骨髓恶性肿瘤包括白血病(急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓性白血病(CML)、急性单核细胞白血病(AMOL)、多毛细胞白血病(HCL)、T-细胞幼淋巴细胞白血病(T-PLL)、巨粒淋巴细胞白血病、成人T细胞白血病)、淋巴瘤(小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphomas)(结节硬化型、混合细胞型、富于淋巴细胞型、淋巴细胞削减型或未削减型和结节性淋巴细胞主导的霍奇金淋巴瘤)、非霍奇金淋巴瘤(所有亚型)、慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤、B-细胞前淋巴细胞白血病、淋巴质浆细胞白血病(诸如瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症)、脾边缘带淋巴瘤、浆细胞肿瘤

(浆细胞性骨髓瘤、浆细胞瘤、单克隆免疫球蛋白沉积物疾病、重链病)、结节外边缘区B细胞淋巴瘤(MALT淋巴瘤)、结节边缘区B细胞淋巴瘤(NMZL)、滤泡淋巴瘤、外套细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤/白血病、T细胞幼淋巴细胞白血病、T细胞巨粒淋巴细胞白血病、攻击性NK细胞白血病、成人T细胞白血病/淋巴瘤、结节外NK/T细胞淋巴瘤(鼻型)、肠病型T细胞淋巴瘤、肝脾T细胞淋巴瘤、亚顶级NK细胞淋巴瘤、蕈样真菌病/塞扎里综合征、原发性皮肤间CD30-阳性T细胞淋巴增生性病症、原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤、淋巴瘤样丘疹病、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤(非特异性)、间变性大细胞淋巴瘤)、多发性骨髓瘤(浆细胞性骨髓瘤或卡勒病(Kahler's disease))。

[0701] 细胞结合剂-药物缀合物的制备

[0702] 为了将本发明的细胞毒性化合物或其衍生物连接于细胞结合剂,细胞毒性化合物可包含具有键合至其的反应性基团的连接部分。在一个实施方案中,双官能交联剂可首先与细胞毒性化合物反应以提供具有连接部分的化合物(即药物-连接子化合物),所述连接部分具有一个键合至其的反应性基团,其然后能与细胞结合剂反应。可选地,双官能交联剂的一端可首先与细胞结合剂反应以提供具有连接部分的细胞结合剂,所述连接部分具有一个键合至其的反应性基团,其然后可与细胞毒性化合物反应。该连接部分可含有使细胞毒性部分在特定位点释放的化学键。适合的化学键在本领域是众所周知的且包括二硫键、硫醚键、对酸不稳定的键、对光不稳定的键、对肽酶不稳定的键、以及对酯酶不稳定的键(参见例如美国专利5,208,020、5,475,092、6,441,163、6,716,821、6,913,748、7,276,497、7,276,499、7,368,565、7,388,026 和7,414,073)。优选二硫键、硫醚、对肽酶不稳定的键。可用于本发明的其它连接子包括非裂解性连接子,例如美国公开第2005/0169933号中详细描述中描述的那些,或带电荷的连接子或亲水性连接子并且描述于US 2009/0274713、US 2010/01293140和WO 2009/134976,其各自通过引用明确地并入本文,其各自通过引用明确地并入本文。

[0703] 式(I)-(IV)、(IA)-(IVA)和(IB)-(IVB)的化合物可通过 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_1'$ 、 $R_2'$ 、 $R_3'$ 、 $R_4'$ 、 $L'$ 、 $L''$ 、 $L'''$ 或X(当存在时)连接。其中,优选的可交联基团是 $R_2'$ 、 $R_3'$ 、 $R_4'$ 、 $L'$ 、 $L''$ 、 $L'''$ ,且最优选的可交联基团是 $R_2'$ 、 $R_3'$ 和 $L'$ 。式(I)-(IV)、(IA)-(IVA)和(IB)-(IVB)化合物的连接基团的实例如上所述。

[0704] 在一个实施方案中,将含水缓冲液中的抗体溶液与摩尔过量的抗体修饰剂诸如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)或与N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)丁酸甲酯(SPDB)一起孵育以引入二硫代吡啶基。然后使修饰的抗体与含硫醇基的细胞毒性化合物(诸如化合物2a)反应,以产生二硫键连接的抗体-二氢吡啶并苯并二氮杂革二聚体缀合物。然后可使用本领域已知的任何纯化方法对细胞结合剂-药物缀合物进行纯化,所述纯化方法诸如描述于美国专利号7,811,572和美国公开No.2006/0182750的那些,二者均通过引用并入本文。例如,可使用正切流动过滤、吸附色谱法、吸附过滤、选择性沉淀、非吸附性过滤或其组合对细胞结合剂-药物缀合物进行纯化。优选地,将正切流动过滤(TFF,也称为交叉流动过滤、超滤和渗滤)和/或吸附色谱树脂用于纯化缀合物。

[0705] 或者,可将抗体与摩尔过量的抗体修饰剂诸如2-亚氨基四氢噻吩-L-高半胱氨酸硫代内酯(或衍生物),或N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫代乙酸酯(SATA)一起孵育以引入硫醇

基。然后将修饰的抗体与合适的含二硫键的细胞毒性剂反应以制备二硫键连接的抗体-细胞毒性剂缀合物。然后抗体-细胞毒性剂缀合物可通过上述方法进行纯化。也可对细胞结合进行设计以引入硫醇部分,诸如公开于美国专利号7,772,485和7,855,275的半胱氨酸-设计的抗体。

[0706] 在另一实施方案中,可将抗体在含水缓冲液中的溶液与摩尔过量的抗体修饰剂诸如N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯一起孵育以引入马来酰亚胺基,或用N-琥珀酰亚胺基4-(碘代乙酰基)-氨基苯甲酸酯(SIAB)以引入碘乙酰基。然后将修饰的抗体与含硫醇的细胞毒性剂反应,以制备硫醚连接的抗体-细胞毒性缀合物。然后可通过上述方法来纯化抗体-细胞毒性缀合物。

[0707] 可通过测量在280nm和330nm下的吸光度比率用分光光度法来测定每个抗体分子结合的细胞毒性分子的数目。平均1-10个细胞毒性化合物/抗体分子可通过本文所述的方法连接。连接的细胞毒性化合物/抗体分子优选的平均数目是2-5,且最优选2.5-4.0。

[0708] 含有末端是N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯的连接子的细胞毒性剂,诸如化合物1g和10,可与抗体反应以制备直接酰胺连接的缀合物,诸如 huMy9-6-SPDB-1f或huMy9-6-BMPS-1f。然后抗体-细胞毒性剂缀合物可通过上述任何方法经凝胶过滤进行纯化。

[0709] 用于制备本发明细胞结合剂-药物缀合物的代表性方法示于图22和23。本发明的细胞毒性二聚体化合物可通过一步或两步缀合方法与细胞结合剂缀合。在图22a和22b中,对代表性的实施例进行了描述,其中具有连接子的二聚体化合物(诸如N-羟基琥珀酰亚胺酯)直接与细胞结合剂(诸如抗体)反应,产生所需的缀合物。在图22c中,将可连接的二聚体1g首先用亚硫酸氢钠处理以提供修饰的二聚体化合物26,然后添加抗体以形成本发明的缀合物huMy9-6-SBDP-1f。

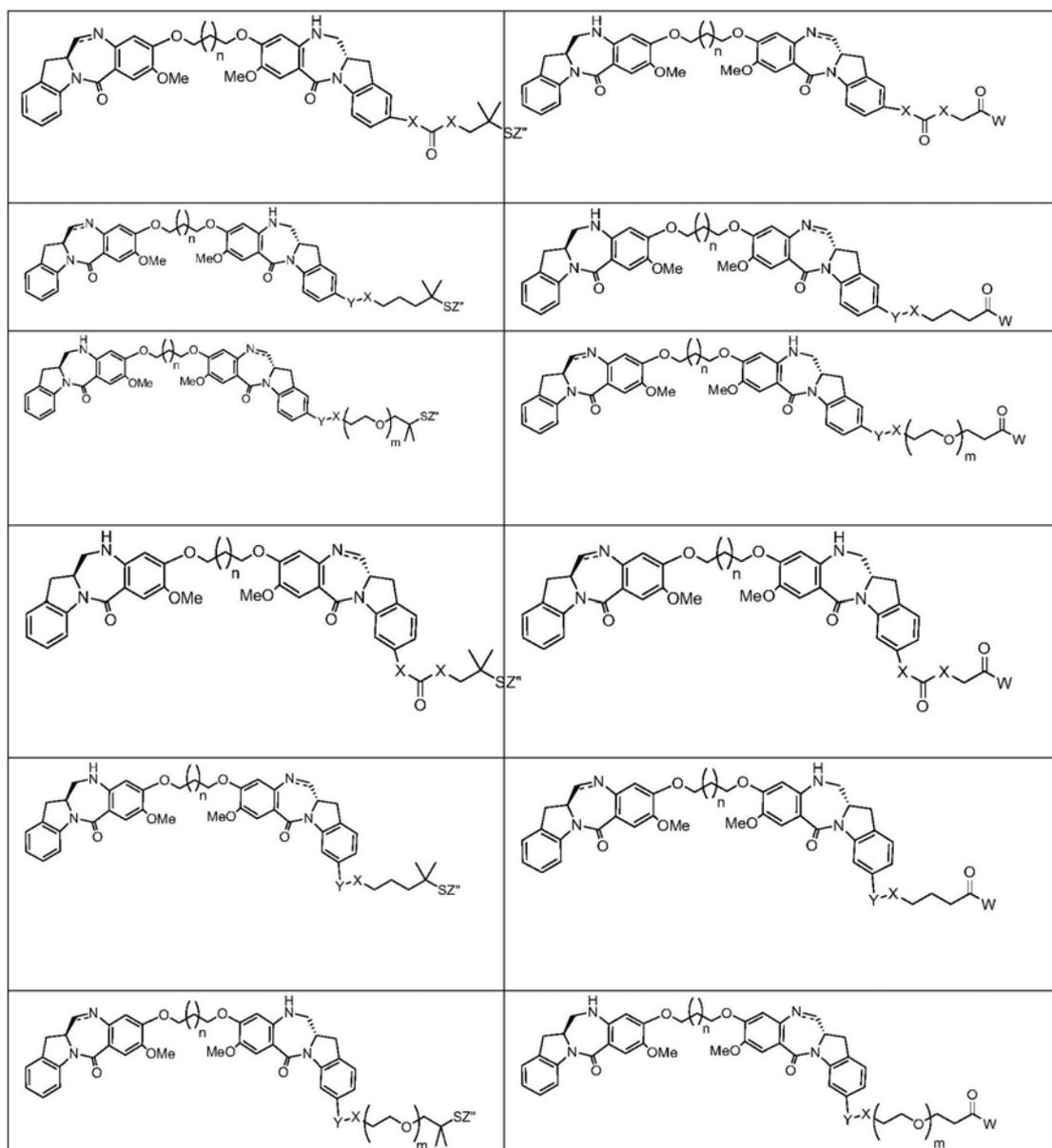
[0710] 两步缀合法的示范性实例描述于图23中,其中首先用双官能交联剂修饰抗体,产生具有所需数目连接子的抗体,该抗体适于与具有游离硫醇部分的二聚体化合物反应。在该实例中,首先用SPDB修饰抗体huMy9-6以得到具有含有二硫代吡啶基部分的连接子的抗体。然后将修饰的抗体暴露于游离的硫醇,诸如2a,产生所需的缀合物huMy9-6-SPDB-2a。

[0711] 用于合成本发明的药物-连接子化合物和缀合物的方法也描述于提交于2011年2月15日的美国临时专利申请No.61/443,092,以及要求其申请日期的权益及与本申请同一天提交的题为“METHODS OF PREPARATION OF CONJUGATES”的美国实用新型申请中,所述申请的全部内容(包括所有附图、化学式、合成方案、说明书和权利要求)以引入方式并入本文。

[0712] 本发明的代表性化合物和缀合物的结构示于表1-8。这些化合物和缀合物可根据本文所述的方法制备。

[0713] 表1. 本发明中代表性化合物的结构。

[0714]

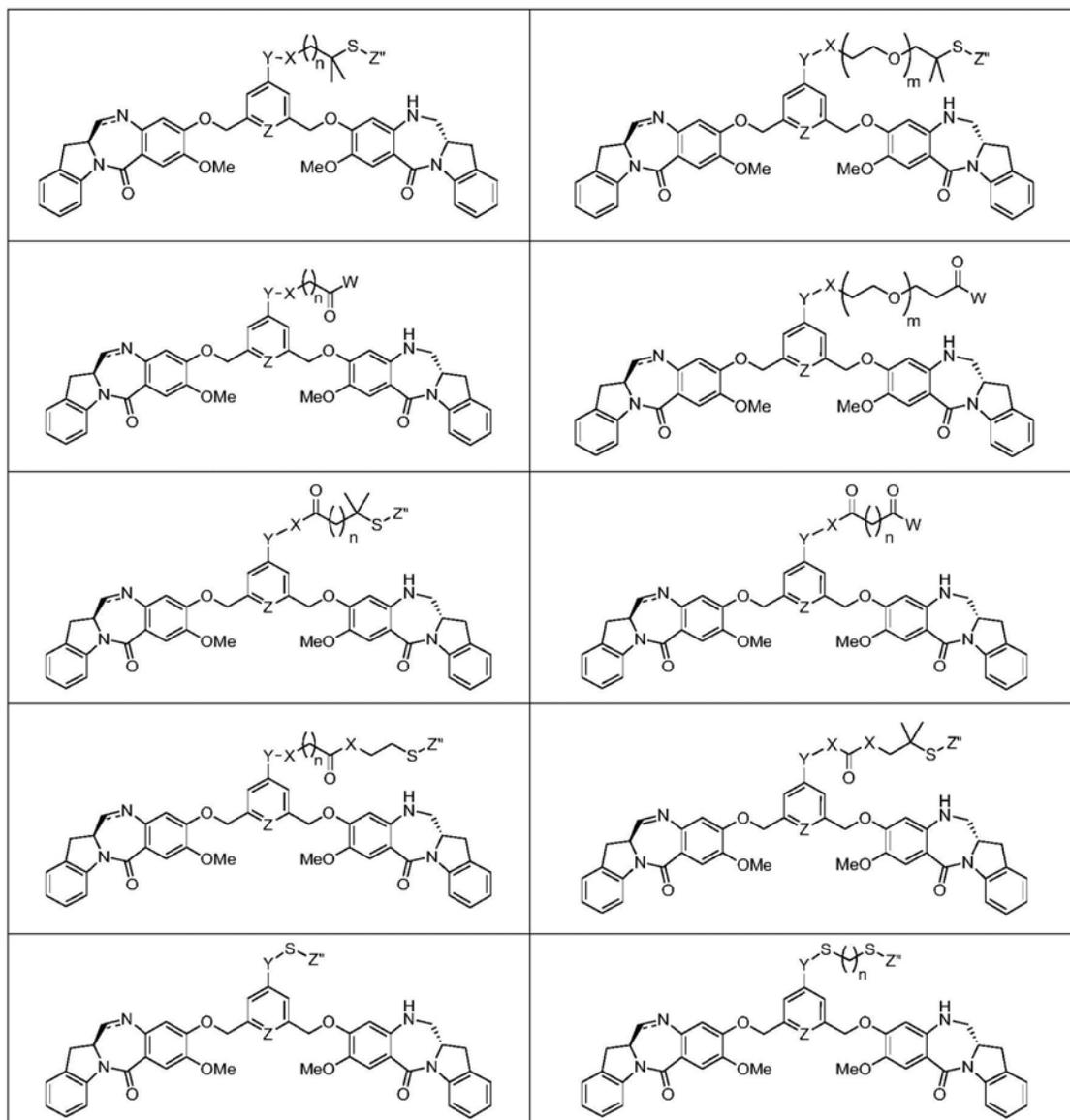


注释:

 $n = 1$  或  $3$ ;  $m = 3$  或  $4$  $W = \text{OH}$ 、 $\text{OMe}$ 、 $\text{ONHS}$ 、 $\text{NHNH}_2$ 、 $\text{H}$ 、 $\text{Me}$ 、 $\text{Ph}$ 、肽 $X = \text{CH}_2$ 、 $\text{O}$ 、 $\text{S}$ 、 $\text{NH}$  或  $\text{NMe}$  $Y = \text{CH}_2$  或不存在 $Z'' = \text{H}$ 、 $\text{Me}$ 、 $\text{SMe}$ 、 $\text{S}(\text{CH}_2)_3\text{C}(\text{O})\text{NHS}$  或  $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NHS}$  或  $\text{BMPS}$  或  $\text{SMCC}$  或  $\text{SPy}$  或  $\text{SPy-NO}_2$ 

[0715]

[0716] 表2. 本发明代表性化合物的结构(续)。



[0717]

注释:

$n=1, 2$  或  $3$

$m=3$  或  $4$

$W = \text{OH}, \text{OMe}, \text{ONHS}, \text{NHNH}_2, \text{H}, \text{Me}, \text{Ph}, \text{肽}$

[0718]

$X = \text{CH}_2, \text{O}, \text{S}, \text{NH}$  或  $\text{NMe}$

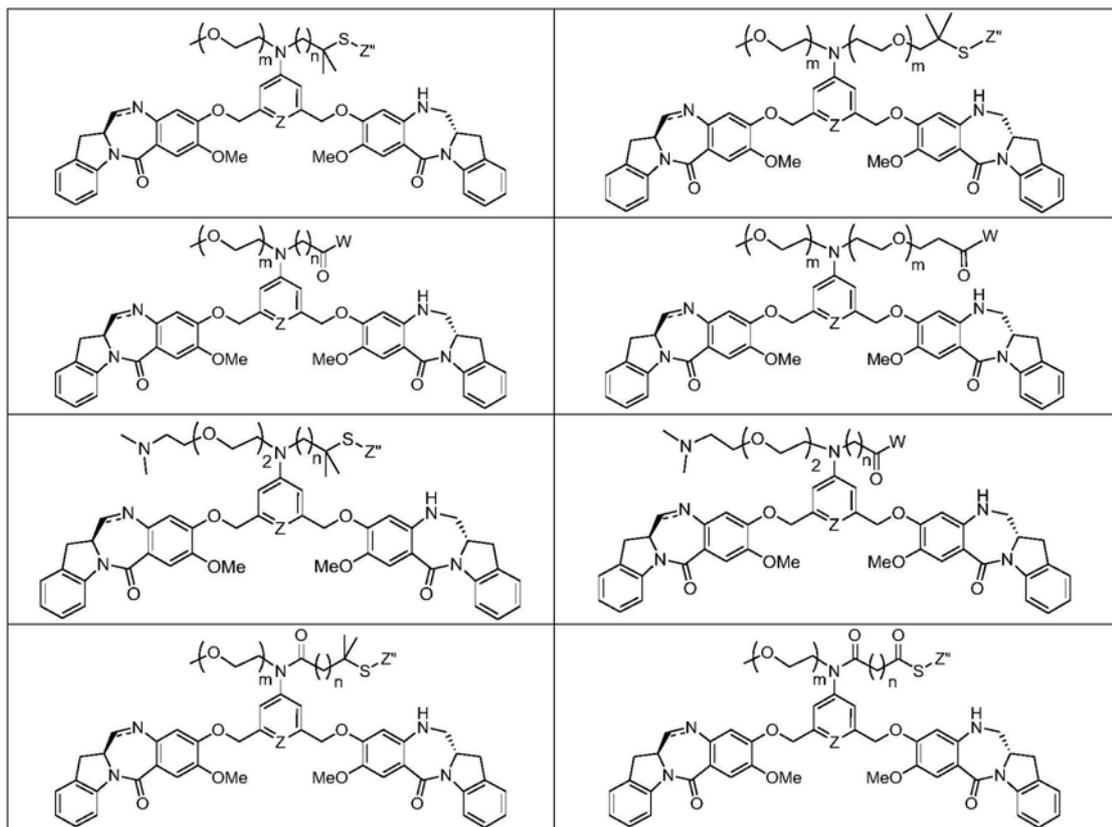
$Y =$  不存在或  $\text{CH}_2$

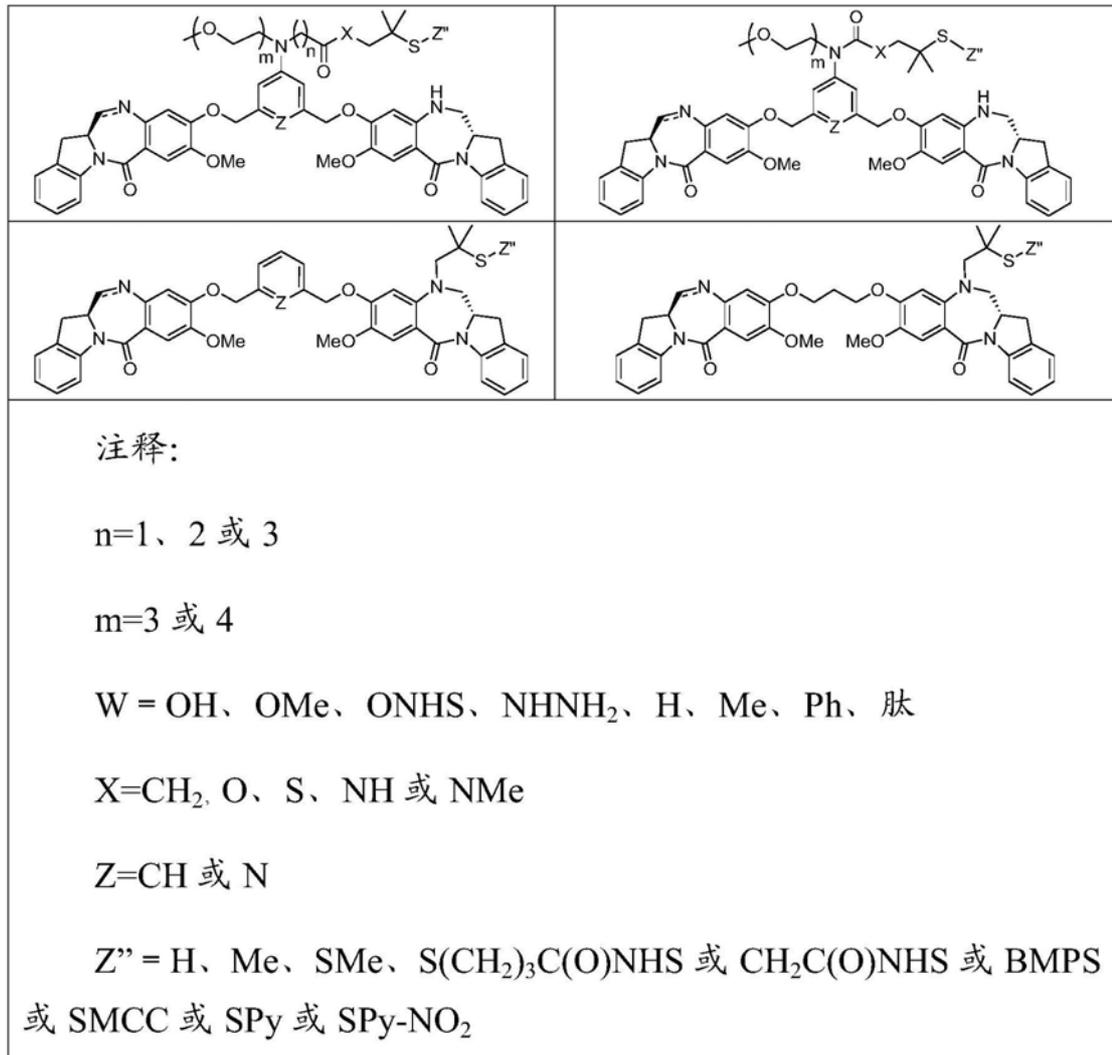
$Z = \text{CH}$  或  $\text{N}$

$Z'' = \text{H}, \text{Me}, \text{SMe}, \text{S}(\text{CH}_2)_3\text{C}(\text{O})\text{NHS}$  或  $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NHS}$  或  $\text{BMPS}$  或  $\text{SMCC}$  或  $\text{SPy}$  或  $\text{SPy-NO}_2$

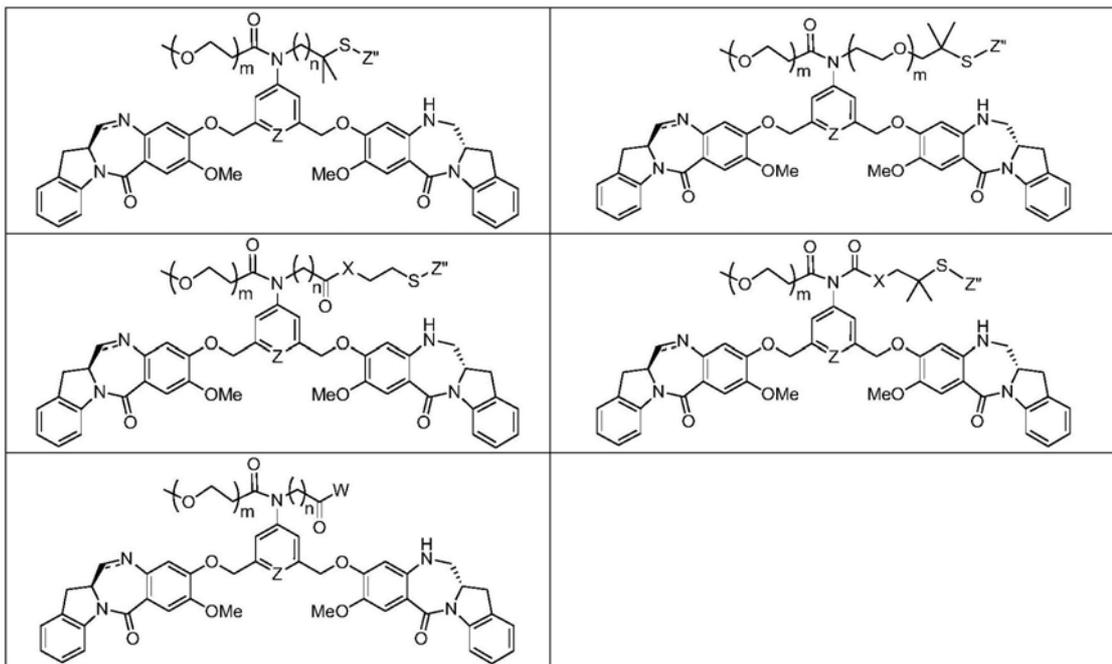
[0719] 表3. 本发明代表性化合物的结构(续)。

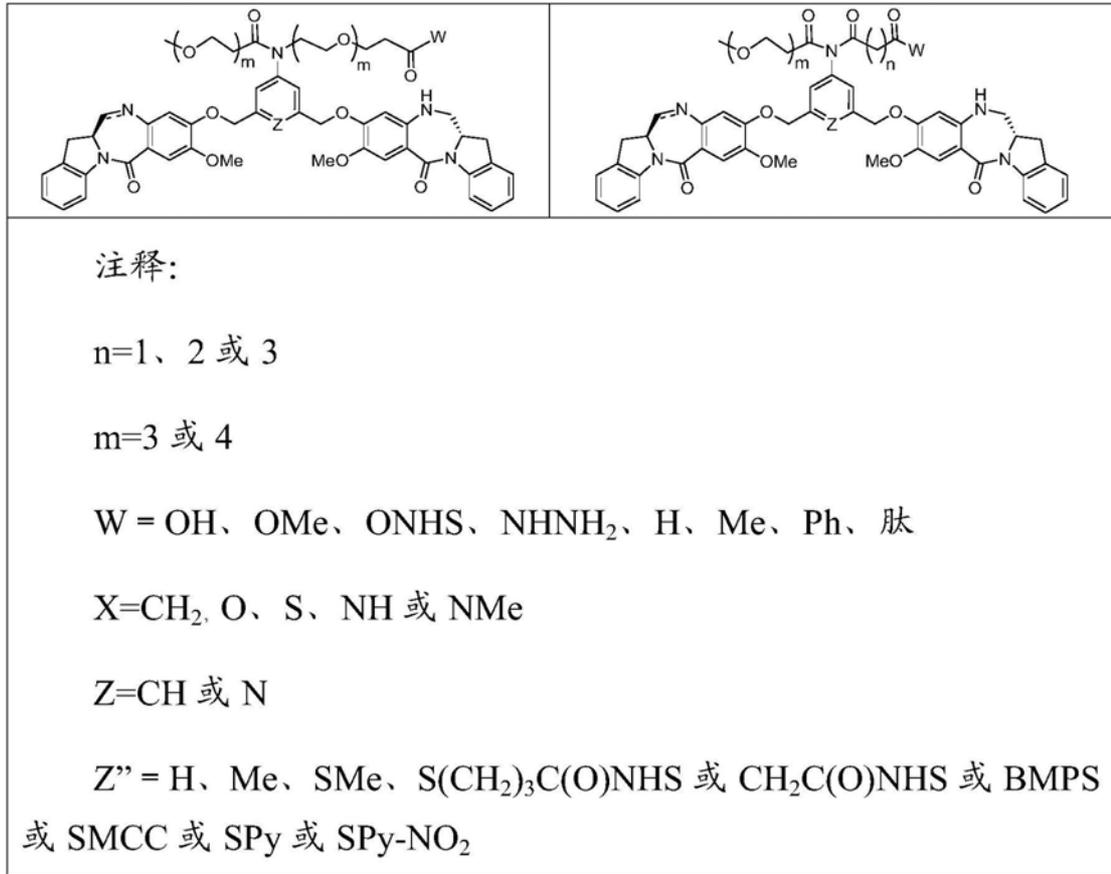
[0720]





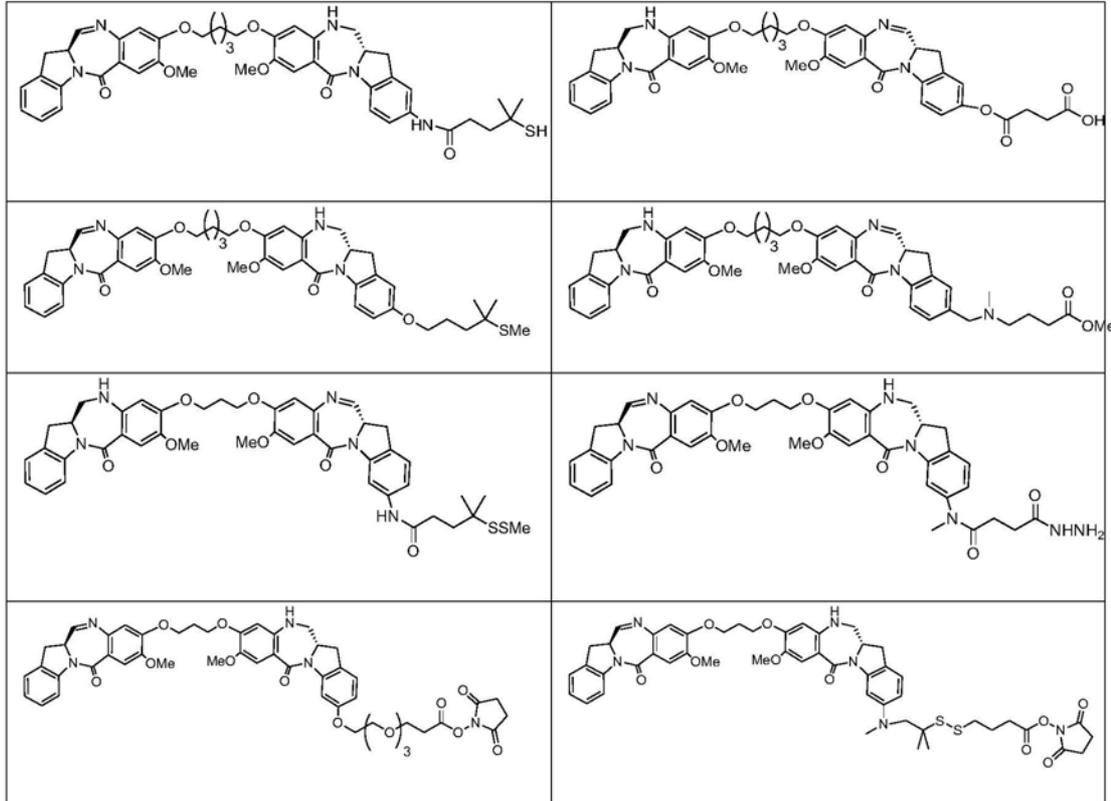
[0722] 表4. 本发明代表性化合物的结构(续)。



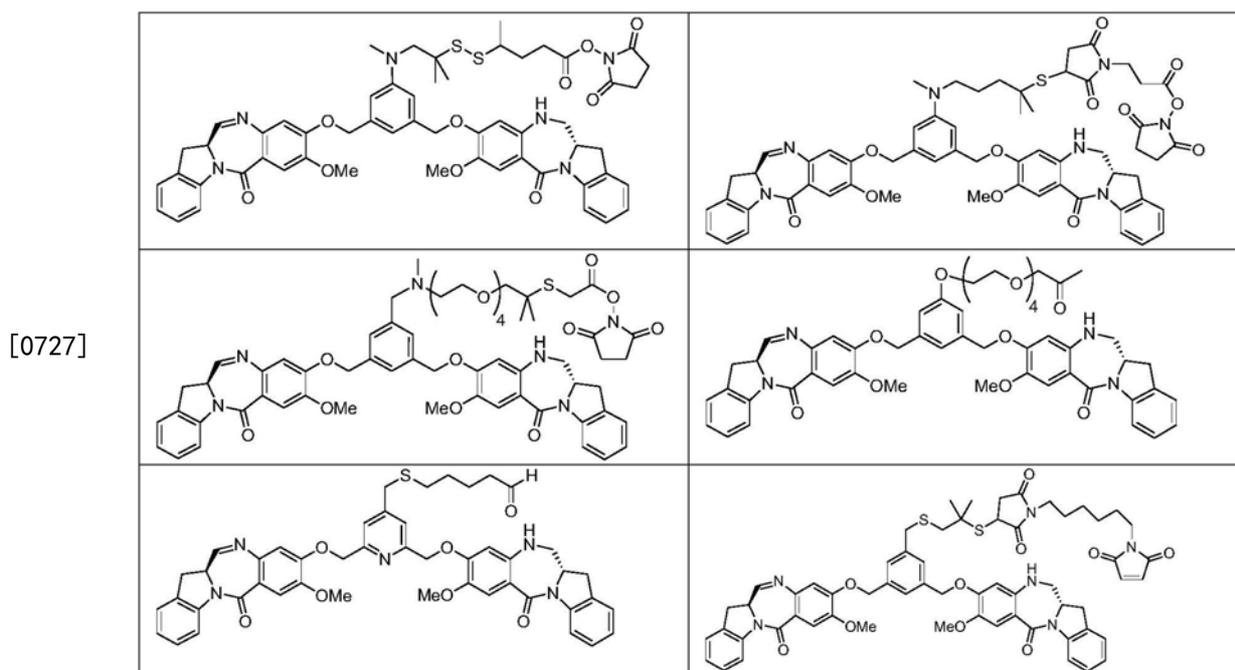


[0724]

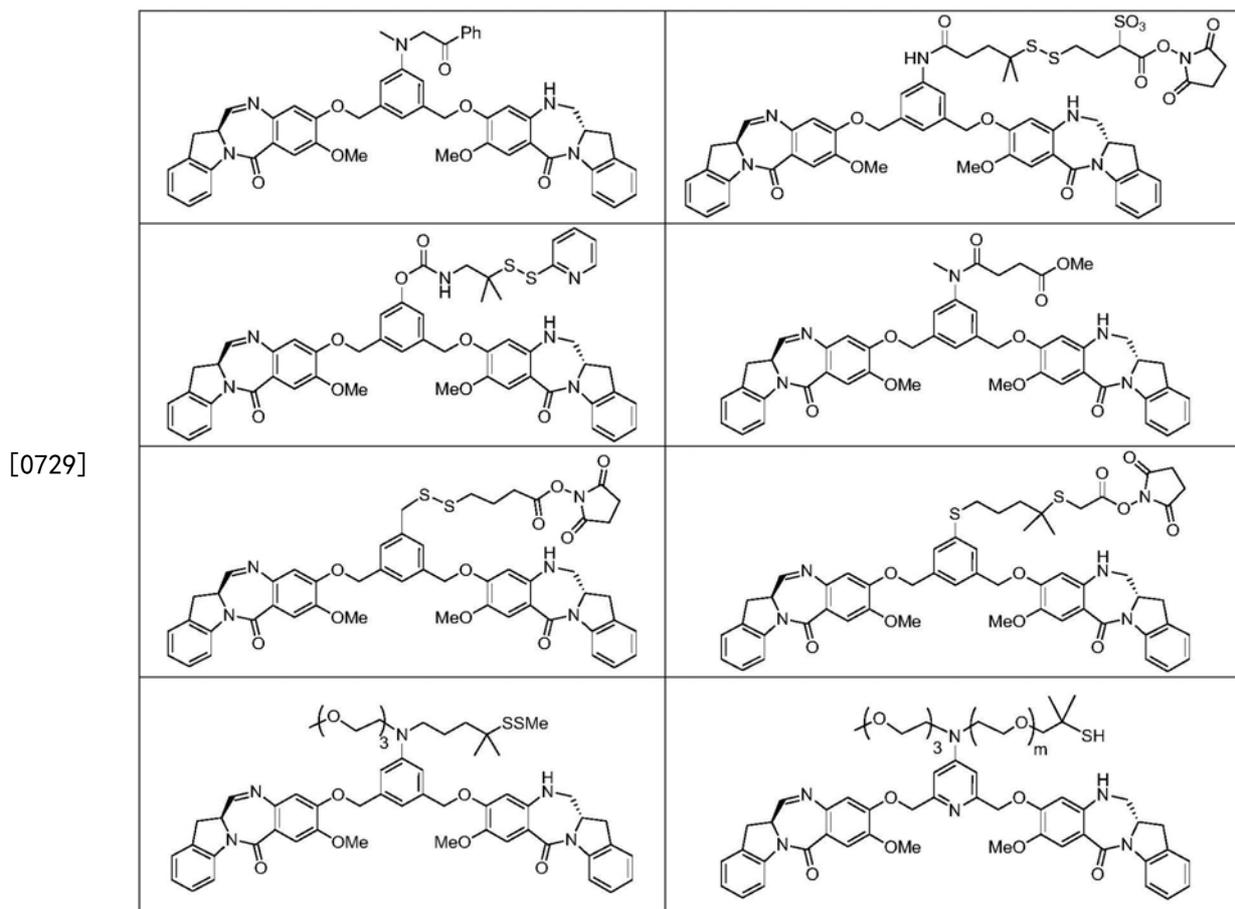
[0725] 表5. 本发明中代表性化合物的结构。



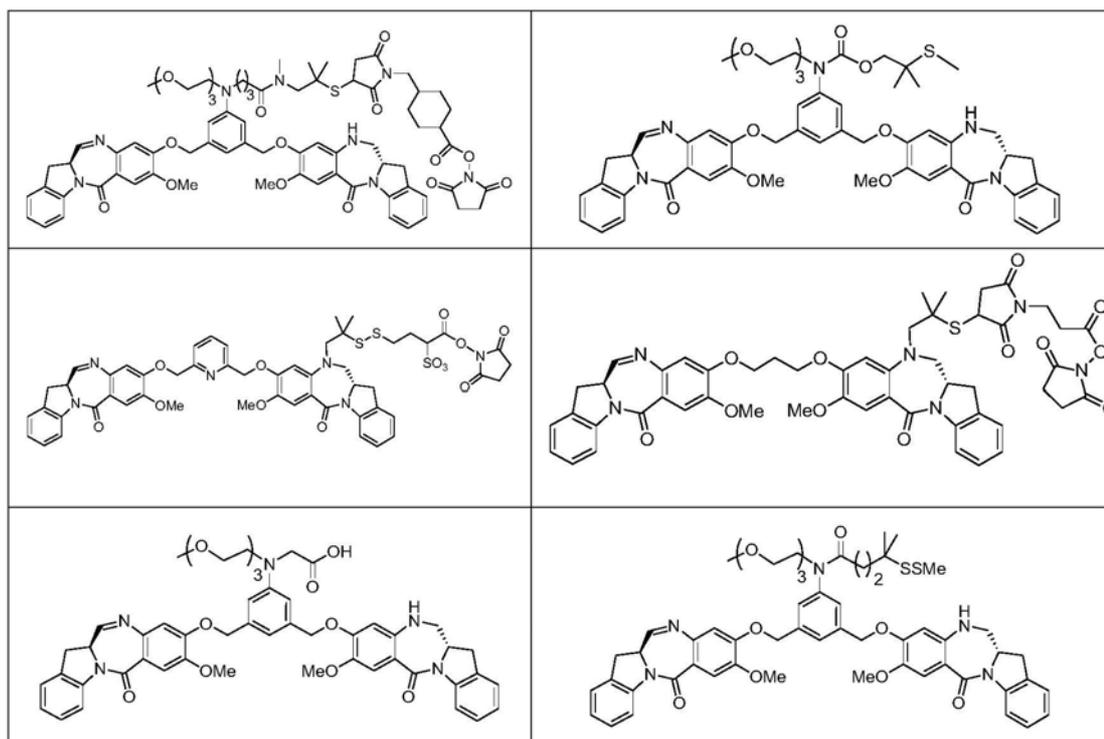
[0726]



[0728] 表6. 本发明代表性化合物的结构(续)。

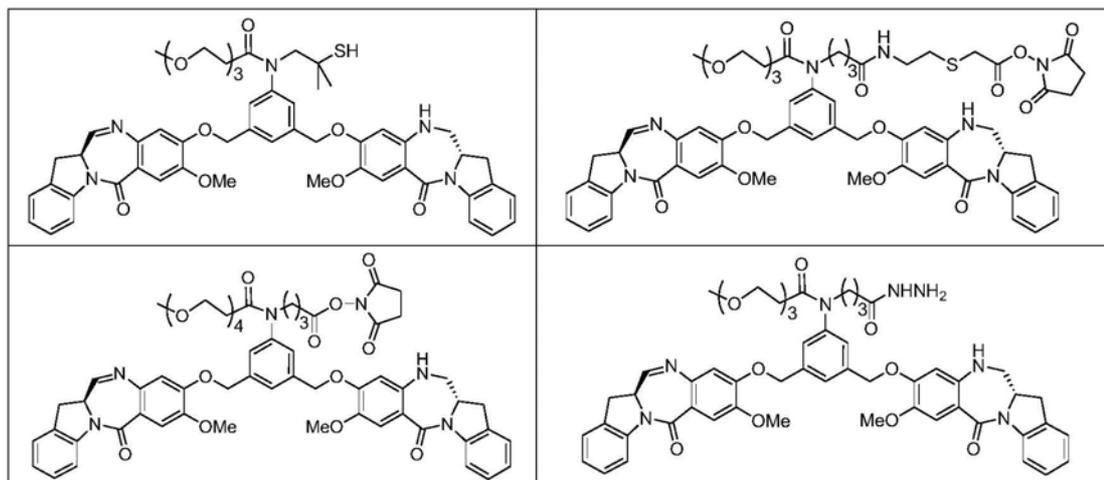


[0730]



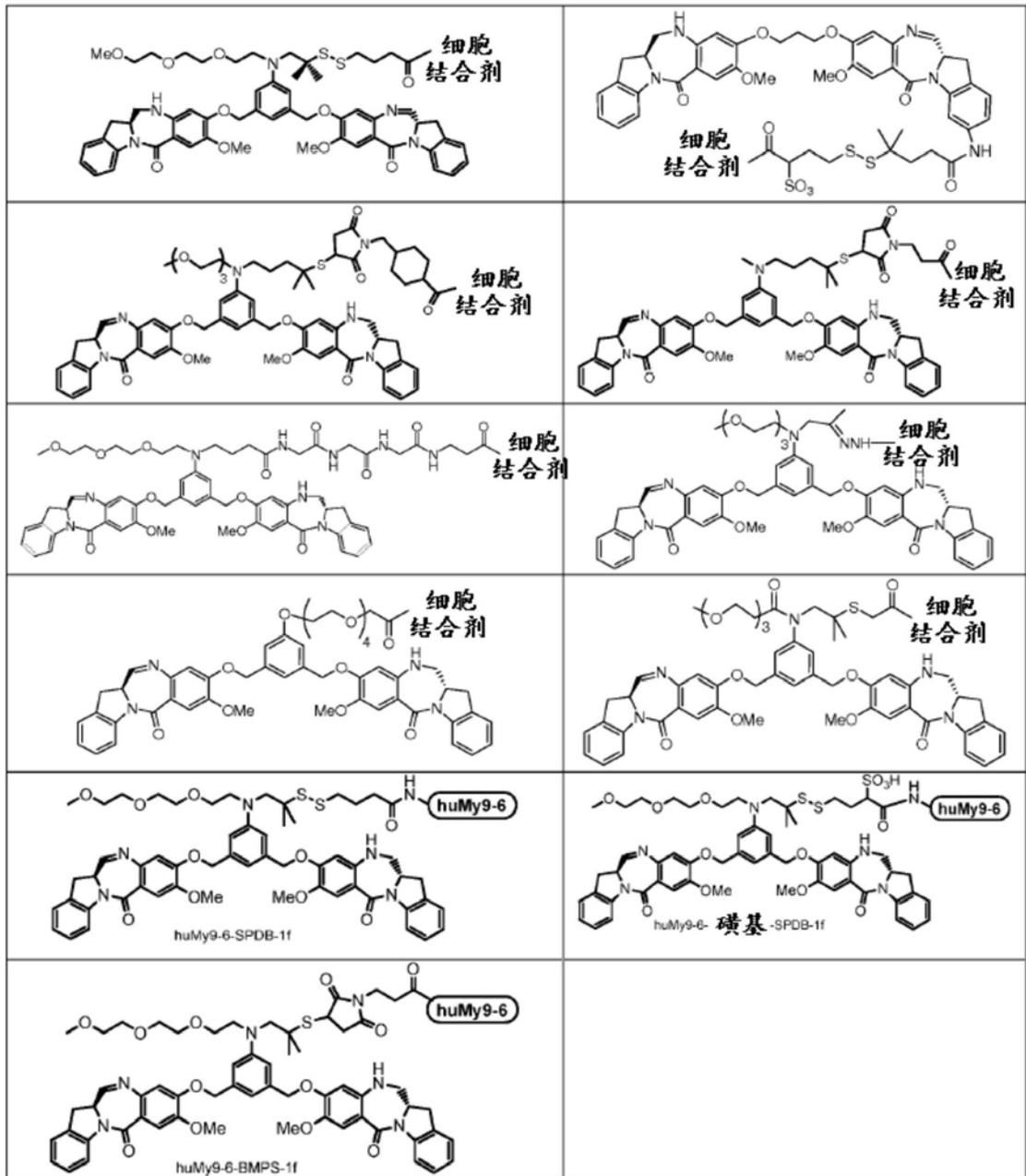
[0731] 表7. 本发明代表性化合物的结构(续)。

[0732]



[0733] 表8. 本发明代表性缀合物的结构。

[0734]



[0735] 化合物和缀合物的体外细胞毒性

[0736] 可对本发明的细胞毒性化合物和细胞结合剂-药物缀合物抑制各种癌细胞系体外增殖的能力进行评价。例如,可将细胞系诸如人结肠癌细胞系COLO 205、横纹肌肉瘤细胞系RH-30和多发性骨髓瘤细胞系MOLP-8用于评价这些化合物和缀合物的细胞毒性。待评价的细胞可被暴露于化合物或缀合物 1-5天且细胞的存活部分通过已知的方法以直接测定进行测量。然后可由测定的结果来计算IC<sub>50</sub>值。可选地或另外,体外细胞系敏感度筛选,诸如由美国国家癌症研究所(参见Voskoglou-Nomikos等人,2003,Clinical Cancer Res. 9: 42227-4239,通过引用并入本文)描述的一类可用作指南之一,以确定可对由本发明的化合物或缀合物敏感的癌症的类型。

[0737] 本发明的抗体-细胞毒性剂缀合物的体外效能和靶特异性的实例示于图 25-26 中。所有缀合物对在低皮摩尔范围内的IC<sub>50</sub>抗原阳性癌细胞有极强的细胞毒性。当暴露于相同的缀合物时,抗原阴性细胞系保持活力。当用未缀合的抗体huMy9-6(抗-CD33)阻断时,该

吡啶并苯并二氮杂䓬二聚体示出小于 160 倍效能的靶特异性效能及当用未缀合的抗体 FOLR1 (抗叶酸受体抗体) 阻断时, 该吡啶并苯并二氮杂䓬二聚体示出小于 40 倍效能的靶特异性效能。例如, 用 huMy9-6-SPDB-1f 缀合物杀死  $IC_{50}$  值为 10.5 pM 的抗原阳性 HL60/QC 细胞, 而加入过量未缀合的 huMy9-6 抗体减少该细胞毒性效应 ( $IC_{50} = 1.69$  nM), 这证明了抗原特异性 (图 25A)。此外, huMy9-6-SPDB-1f 缀合物对  $IC_{50}$  值为 21 pM 的 HL 60/ATCC 细胞系和  $IC_{50}$  为 190 pM 的 NB-4 细胞系 (图 25B 和 25C) 也是高度有效的。

[0738] 类似地, huFOLR1-SPDB-1f 缀合物对  $IC_{50}$  值为 55 pM 的抗原阳性 KB 细胞是高度有效的 (图 26)。加入过量的未缀合的 huFOLR1 抗体使该细胞毒性效果减少 >40 倍, 这证明了抗原特异性。

[0739] 通过比较未缀合的 huMy9-6 抗体和 huMy9-6-SPDB-1f 缀合物两者对 HL60/QC 细胞系的结合来测量缀合物对抗体结合的效应 (图 27)。FACS 分析表明缀合物与裸露抗体的结合能力没有变化, 这表明没有因为细胞毒性剂缀合于抗体而削弱结合。

[0740] 在一个实例中, 测量了细胞结合剂/细胞毒性剂缀合物的体内功效。用 huMy9-6-SPDB-1f 缀合物来处理具有人类 HL60/QC 肿瘤的裸鼠, 在多剂量下观察到显著的肿瘤消退, 而未处理的小鼠肿瘤生长迅速 (图 28)。在低至 20  $\mu$ g/kg 的剂量时, 观察到比最大耐受剂量低至少 35 倍的反应性。

[0741] 亚胺饱和对耐受性的影响示于表 9。在多剂量下对二亚胺 huFOLR1-药物 1 进行测试, 发现所有这些是高度有毒的仅留在 50  $\mu$ g/kg 下测试的最低测试组的幸存者。相比之下, 发现部分还原的单亚胺 huFOLR1-药物 2 和 huFOLR1-SPDB-IGN (huFOLR1-SPDB-1f) 缀合物具有显著改善的耐受性, 而 huFOLR1-SPDB-IGN (huFOLR1-SPDB-1f) 缀合物在最高测试剂量 560  $\mu$ g/kg 时, 这表明 100% 的动物存活。

[0742] 组合物及使用方法

[0743] 本发明包括包含本文所述的新型苯并二氮杂䓬化合物 (如, 二氢吡啶并苯并二氮杂䓬或噁唑烷并苯并二氮杂䓬), 其衍生物或其缀合物 (和/或其溶剂化物、水合物和/或盐) 和载体 (药学上可接受的载体) 的组合物 (如, 药物组合物)。本发明还包括包含本文所述的新型苯并二氮杂䓬化合物、其衍生物或其缀合物 (和/或其溶剂化物、水合物和/或盐) 和载体 (药学上可接受的载体), 进一步包含第二治疗剂的组合物 (如, 药物组合物)。本发明组合物可用于在哺乳动物 (如人类) 中抑制异常细胞生长或治疗增殖性病症。本发明组合物还可用于治疗哺乳动物 (如人类) 的抑郁、焦虑、紧张、恐惧、恐慌、烦躁、精神疾患、疼痛和炎性病症。

[0744] 本发明包括在哺乳动物 (如人类) 中抑制异常细胞生长或治疗增殖性病症的方法, 包括向所述哺乳动物单独或与第二治疗剂组合施用治疗有效量的本文所述的新型苯并二氮杂䓬化合物 (如, 二氢吡啶并苯并二氮杂䓬或噁唑烷并苯并二氮杂䓬), 其衍生物或其缀合物, (和/或其溶剂化物和盐) 或其组合。

[0745] 本发明还提供治疗方法, 包括向需要治疗的受试者施用有效量的上文所述的任一种缀合物。

[0746] 类似地, 本发明提供用于诱导所选择的细胞群体中细胞死亡的方法, 包括使靶细胞或含有靶细胞的组织与有效量的包含本发明的细胞毒性化合物-细胞结合剂中的任一

者细胞毒性剂(如,连接于细胞结合剂的二氢吡啶并苯并二氮杂萘或噁唑烷并苯并二氮杂萘二聚体),其盐或溶剂化物接触。靶细胞是细胞结合剂可结合于其的细胞。

[0747] 如果需要,其它活性剂,诸如其它抗肿瘤剂,可与缀合物一起施用。

[0748] 合适的药学上可接受的载体、稀释剂和赋形剂是熟知的且可在临床情况许可时由本领域的普通技术人员确定。

[0749] 合适的载体、稀释剂和/或赋形剂的实例包括:(1)杜氏磷酸盐缓冲盐水(Dulbecco's phosphate buffered saline),pH约7.4,含有或不含约1mg/mL至25mg/mL人血清白蛋白,(2)0.9%盐水(0.9%w/v NaCl),和(3)5%(w/v)葡萄糖;及也可含有抗氧化剂诸如色胺和稳定剂诸如Tween 20。

[0750] 用于诱导所选择的细胞群体中细胞死亡的方法可在体外、体内、或离体下进行。

[0751] 体外应用的实例包括在将自体骨髓移植至同一患者之前处理自体骨髓以杀死患病的或恶性细胞:骨髓移植之前的处理以杀死感受性T细胞和预防移植物抗宿主病(GVHD);对细胞培养物的处理以杀死除了不表达靶抗原的所需变体以外的所有细胞;或杀死表达不期望的抗原的变体。

[0752] 非临床的体外应用条件易于由本领域的普通技术人员来确定。

[0753] 临床离体应用的实例是在癌症治疗或自身免疫疾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,或在移植前从自体或同种异体骨髓或组织中去除T细胞和其它淋巴细胞以防止GVHD。处理可如下进行。从患者或其它个体采集骨髓,然后在添加有本发明细胞毒性剂的含有血清(浓度范围约10 $\mu$ M至1pM)的培养基中在约37 $^{\circ}$ C下孵育约30分钟至约48小时。浓度和孵育时间的精确条件,即,剂量,易于由本领域的普通技术人员来确定。孵育后,将骨髓细胞用含有血清的培养基洗涤并根据已知方法通过静脉返回至患者。在患者接受其它治疗的情况下,诸如在采集骨髓和再输注细胞的时间内烧蚀化疗或全身辐射的过程,使用标准的医疗设备在液氮中冷冻储存经处理骨髓细胞。

[0754] 对于临床体内应用,本发明的细胞毒性剂将以溶液或冻干粉剂的形式提供,测试该溶液或冻干粉剂的无菌性和内毒素水平。缀合物施用的合适方案的实例如下。缀合物以每周静脉推注给予,每周一次持续4周。单次剂量(Bolus doses)以50至1000mL的生理盐水给予,可向其中加入5至10mL人血清白蛋白。剂量将是10 $\mu$ g至2000mg/静脉内施用(每天100ng至20mg/kg的范围)。在治疗四周之后,患者可每周一次继续接受治疗。关于施用途径、赋形剂、稀释剂、剂量、时间等的具体临床方案,可在临床情况许可时由本领域的普通技术人员确定。

[0755] 可根据在所选择的细胞群体中诱导细胞死亡的体内或体外方法治疗的医学疾患的实例包括任何类型的恶性肿瘤,包括,例如肺癌(小细胞和非小细胞)、乳腺癌、结肠癌、脑癌、前列腺癌、肾癌、胰腺癌、卵巢癌、头颈癌、皮肤癌(黑色素瘤)、梅克尔细胞癌(Merkel cell carcinoma)、胶质母细胞瘤、神经细胞瘤和淋巴器官的癌症;自身免疫性疾病诸如全身性红斑狼疮、风湿性关节炎和多发性硬化;移植排斥,例如肾移植排斥、肝移植排斥、肺移植排斥、心脏移植排斥和骨髓移植排斥;移植物抗宿主病;病毒感染,诸如CMV感染、HIV感染、AIDS等;和寄生虫感染,诸如贾第鞭毛虫病、阿米巴病、血吸虫病,和本领域的技术人员确定的其它病症。

[0756] 癌症治疗及其剂量、施用途径和推荐用途是本领域已知的且已描述于诸如

Physician's Desk Reference (PDR) 的文献中。PDR公开已用于治疗各种癌症的试剂的剂量。治疗上有效的这些上述化学治疗药物的给药方案和剂量将取决于正治疗的具体癌症、疾病程度和本领域的技术医师所熟悉的其它因素并且可由医师确定。PDR的内容通过引用明确地整体并入本文。本领域的技术人员可查阅PDR,使用下述参数中的一者或多者来确定可根据本发明的教导使用的化疗剂和缀合物的给药方案和剂量。这些参数包括:

[0757] 综合索引

[0758] 按制造商

[0759] 产品(按公司或商标药物名称)

[0760] 类别索引

[0761] 通用/化学索引(无商标常见药物名称)

[0762] 药物的彩色图像

[0763] 产品信息,与FDA标签一致

[0764] 化学信息

[0765] 功能/作用

[0766] 适应症和禁忌症

[0767] 试验研究、副作用、注意事项

[0768] 类似物和衍生物

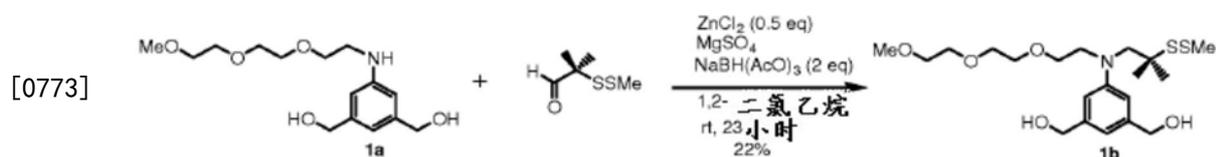
[0769] 细胞毒性剂领域的技术人员将容易理解,可以这样的方式对本文所述的每种细胞毒性剂进行修饰,该方式使得所产生的化合物仍保持起始化合物的特异性和/或活性。本领域技术人员也将理解许多这些化合物可用于代替本文所述的细胞毒性剂。因此,本发明的细胞毒性剂包括本文所述化合物的类似物和衍生物。

[0770] 本文所引用的和下述实施例中的所有参考均通过引用明确地整体并入。

## 实施例

[0771] 现将通过参考非限制性实施例来阐明本发明。除非另有说明,否则所有百分比、比例、份等均按重量计。所有试剂均购自Aldrich Chemical Co., New Jersey,或其它商业来源。在Bruker 400MHz仪器上获得核磁共振( $^1\text{H}$  NMR)光谱,并在Bruker Daltonics Esquire 3000仪器上获得质谱(使用电喷雾电离)。

[0772] 实施例1



[0774] 化合物1b:

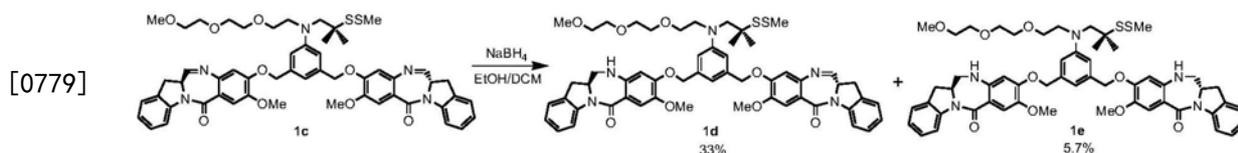
[0775] 向搅拌的苯胺1a (1.55g, 5.18mmol) 和2-(甲基二硫代)-异丁醛 (0.7mL, 5.18mmol) 在无水1,2-二氯甲烷 (20mL) 的溶液中加入三乙酰氧基硼氢化钠 (1.1g, 5.18mmol) 和氯化锌粉末 (353mg, 2.59mmol), 然后加入无水硫酸镁 (800mg)。将混合物在室温 (rt) 下搅拌6小时, 然后加入第二份2-(甲基二硫代)-异丁醛 (0.7mL, 5.18mmol) 和三乙酰氧基硼氢化钠 (1.1g, 5.18mmol)。将其在rt下搅拌过夜。将反应混合物通过硅藻土过滤,

并用二氯甲烷洗涤。浓缩滤液,并将残余物经凝胶色谱法(Combiflash,40g柱,二氯甲烷/MeOH)纯化,得到无色油状的化合物1b(487mg  $y=22\%$ )。未反应的起始材料苯胺1a(1.02g)也以65%的产率回收。 $^1\text{H}$  NMR(400Hz, $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$ 6.76(s,2H),6.63(s,1H),4.55(s,4H),3.65-3.51(m,14H),3.35(s,3H),2.44(s,3H),1.33(s,6H); $^{13}\text{C}$  NMR(400Hz, $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$ 149.0,142.35,114.0,111.1,71.98,70.7,70.6,70.5,67.6,65.5,59.75,59.1,53.9,51.9,26.6,25.7,20.75;MS(m/z):实测值456.2(M+Na) $^+$ 。参见图1。



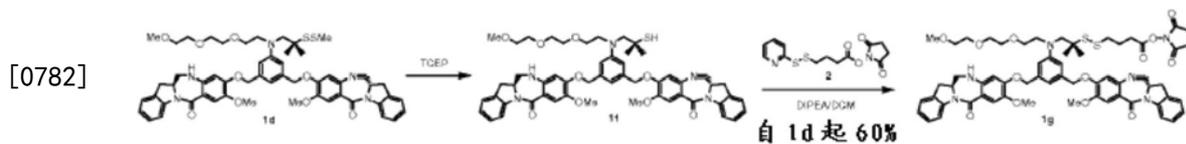
[0777] 化合物1c:

[0778] 向搅拌的1b(243mg,0.56mmol)在无水二氯甲烷(3.5mL)的溶液中加入三乙胺(234 $\mu\text{l}$ ,1.68mmol)。将混合物冷却至 $-10^\circ\text{C}$ ,并通过注射器经15分钟缓慢加入甲磺酰氯(113 $\mu\text{l}$ ,1.46mmol)。将该溶液在 $-10\sim-7^\circ\text{C}$ 下继续搅拌60分钟,并通过加入冰/水来淬灭。用乙酸乙酯稀释,并用冷水洗涤。将有机层经无水硫酸钠干燥、过滤、浓缩并抽高真空,得到浅黄色油状的甲磺酸酯(340mg)。将甲磺酸酯转移至装有乙酸乙酯/二氯甲烷的10mL圆底烧瓶中,浓缩并抽高真空。加入IBD单体(412mg,1.4mmol),然后加入无水二甲基甲酰胺(3mL)和无水碳酸钾(232mg,1.68mmol)。将所得浅黄色混合物在室温下搅拌过夜。用二氯甲烷稀释,并用盐水洗涤。将有机层经无水硫酸钠干燥、过滤并浓缩。将残余物溶于二氯甲烷,加载于硅胶柱上,并用二氯甲烷/甲醇(15:1然后10:1)洗脱。合并含有化合物1c的级分并浓缩,得到705mg粗品,其进一步经制备反相HPLC纯化(C18柱,用乙腈/水洗脱),得到浅黄色蓬松固体状的化合物1c(181mg, $y=33\%$ )。 $^1\text{H}$  NMR(400Hz, $\text{CDCl}_3$ ): $\delta$ 8.28(d, $J=8.0\text{Hz}$ ,2H),7.86(d, $J=3.6\text{Hz}$ ,2H),7.59(s,2H),7.31-7.26(m,4H),7.12(t, $J=7.6\text{Hz}$ ,2H),6.87-6.80(m,5H),5.18(dd, $J_1=20.8\text{Hz}$ , $J_2=12.4\text{Hz}$ ,4H),4.50-4.47(m,2H),3.99(s,6H),3.75-3.48(m,18H),3.37(s,3H),2.44(s,3H),1.32(s,6H);MS(m/z):实测值1025.9(M+H<sub>2</sub>O+Na) $^+$ ,1043.9(M+2H<sub>2</sub>O+Na) $^+$ ,983.8(M-H) $^-$ ,1055.8(M+4H<sub>2</sub>O-H) $^-$ 。参见图1。



[0780] 化合物1d:

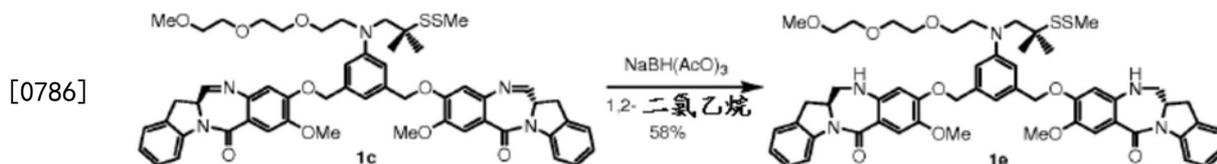
[0781] 在 $0^\circ\text{C}$ 下,向搅拌的化合物1c(112mg,0.114mmol)在无水二氯甲烷(0.3mL)和无水乙醇(0.6mL)的溶液中加入硼氢化钠(0.9mg,0.023mmol)。5分钟后,除去冰浴,并将混合物在室温下搅拌3小时,然后冷却至 $0^\circ\text{C}$ ,用饱和氯化铵淬灭、用二氯甲烷稀释,分离并将有机层用盐水洗涤,经无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,通过硅藻土过滤,并浓缩。将残余物通过反相HPLC纯化(C18柱,乙腈/水)。相应的级分用二氯甲烷萃取并浓缩以得到产物1d、1e和未反应的起始材料1c。化合物1d:37.1mg( $y=33\%$ ),MS(m/z):实测值1010.4(M+Na) $^+$ ,1028.4(M+H<sub>2</sub>O+Na) $^+$ ,1040.3(M+3H<sub>2</sub>O-H) $^-$ ;化合物1e:6.4mg( $y=5.7\%$ ),MS(m/z):实测值1012.4(M+Na) $^+$ ;化合物1c:44.1mg( $y=39\%$ )。参见图1。



[0783] 化合物1g:

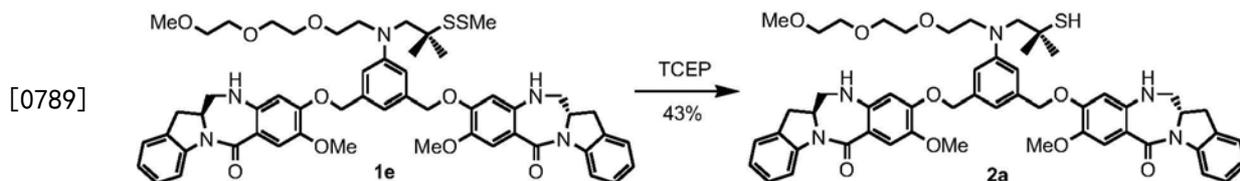
[0784] 向搅拌的1d (23.6mg, 0.024mmol) 在乙腈 (3mL) 和甲醇 (3mL) 的溶液中加入新制备的TCEP溶液 (将17mg的TCEP的盐酸盐用饱和碳酸氢钠溶液中和至pH6-6.5, 然后用0.5mL pH 6.5的磷酸盐缓冲液稀释)。将混合物在室温搅拌3小时, 然后用二氯甲烷和去离子水稀释, 分离并将有机层用盐水洗涤, 经无水硫酸钠干燥并过滤。将滤液高真空浓缩得到浅黄色泡沫状 22mg1f。由19mg1d按照相同的方法制备另一18mg1f。将合并的40mg (0.042mmol) 1f溶于无水二氯甲烷 (0.5mL) 并搅拌。向该搅拌的溶液中加入SPDB NHS酯2 (34.6mg, 80%纯度, 0.085mmol) 和二异丙基乙胺 (15μl, 0.085mmol)。继续在室温搅拌过夜, 用饱和氯化铵淬灭及用二氯甲烷稀释, 分离并用盐水洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。将残余物通过制备反相HPLC纯化 (C18 柱, 乙腈/水)。将含有产物的级分合并, 用二氯甲烷萃取并浓缩得到白色固体化合物1g (29.7mg, y=60%)。<sup>1</sup>H NMR (400Hz, CD<sub>3</sub>CN) : δ8.28-8.25 (m, 1H), 8.20-8.17 (m, 1H), 7.87-7.84 (m, 1H), 7.49 (d, J=4.4Hz, 1H), 7.39 (d, J=4.4Hz, 1H), 7.31-7.19 (m, 4H), 7.13-7.01 (m, 2H), 6.92-6.87 (m, 3H), 6.77 (bs, 1H), 6.31-6.29 (m, 1H), 5.16-5.09 (m, 2H), 5.00 (d, J=4.4Hz, 2H), 4.94 (bs, -NH), 4.48-4.43 (m, 1H), 4.40-4.34 (m, 1H), 3.90 (d, J=4.4Hz, 3H), 3.77 (d, J=4.4Hz, 3H), 3.64-3.39 (m, 18H), 3.26 (d, J=4.4Hz, 3H), 2.82-2.70 (m, 8H), 2.17 (d, J= 4.4Hz, 1H), 2.08-2.01 (m, 3H), 1.30 (d, J=4.4Hz, 6H); MS (m/z): 实测值1025.9 (M+H<sub>2</sub>O+Na)<sup>+</sup>, 1043.9 (M+2H<sub>2</sub>O+Na)<sup>+</sup>, 983.8 (M-H)<sup>-</sup>, 1055.8 (M+4H<sub>2</sub>O -H)<sup>-</sup>; MS (m/z), 实测值1179.5 (M+Na)<sup>+</sup>。参见图1。

[0785] 实施例2



[0787] 化合物1e:

[0788] 向搅拌的1c (8mg, 0.0081mmol) 在无水1,2-二氯甲烷 (0.2mL) 的溶液中加入三乙酰氧基硼氢化钠 (3.8mg, 0.018mmol)。将混合物在室温下搅拌1.5 小时, 然后将混合物用二氯甲烷稀释并用饱和碳酸氢钠淬灭, 分离并将有机层用盐水洗涤, 经硫酸钠干燥并过滤。将滤液浓缩并将残余物经反相HPLC 纯化 (C18柱, 乙腈/水) 得到白色固体状化合物1e (4.7mg, y=58%)。MS (m/z), 实测值1012.4 (M+Na)<sup>+</sup>, 1024.2 (M+2H<sub>2</sub>O-H)<sup>-</sup>。参见图2。

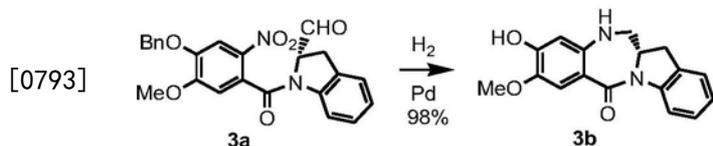


[0790] 化合物2a:

[0791] 向搅拌的1e (12mg, 0.012mmol) 在乙腈 (1mL) 和甲醇 (3mL) 的溶液中加入新制备的TCEP溶液 (将11mg的TCEP的盐酸盐用饱和碳酸氢钠溶液中和至pH~6.5, 然后用

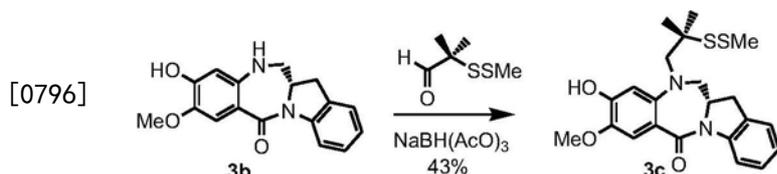
0.4mL pH 6.5的磷酸盐缓冲液稀释)。将混合物在室温搅拌3.5小时,然后用二氯甲烷和去离子水稀释,分离并将有机层用盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥并过滤。将滤液浓缩并将残余物经反相HPLC 纯化(C18柱,乙腈/水)得到白色固体状化合物2a (4.9mg,  $y=43\%$ )。MS ( $m/z$ ), 实测值966.4 ( $M+Na$ )<sup>+</sup>, 978.2 ( $M+2H_2O-H$ )<sup>-</sup>。参见图2。

[0792] 实施例3



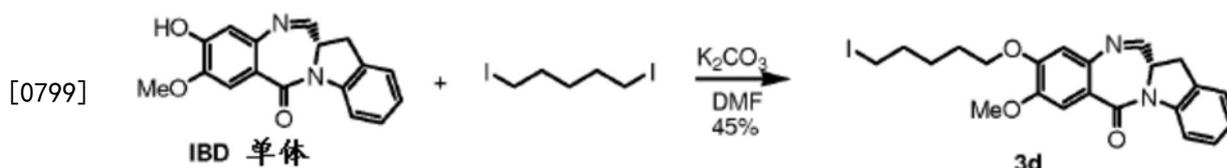
[0794] 化合物3b:

[0795] 向化合物3a (830mg, 1.9mmol) 在甲醇 (15mL) 的溶液中加入Pd/C (10%, 204mg, 0.19mmol)。将烧瓶中的空气通过真空除去,然后用气囊中的氢气置换。将混合物在室温下搅拌过夜。将混合物通过硅藻土过滤,及用二氯甲烷和甲醇洗涤硅藻土/Pd/C。浓缩滤液,残余物用二氯甲烷稀释并蒸发几次,然后通过硅胶色谱法纯化(二氯甲烷/甲醇)得到浅黄色固体状化合物3b (558 mg,  $y=98\%$ )。<sup>1</sup>H NMR (400Hz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ 8.34 (d,  $J=8.0$ Hz, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.22 (dd,  $J_1=8.0$ Hz,  $J_2=7.6$ Hz, 1H), 7.17 (d,  $J=7.2$ Hz, 1H), 7.02 (dd,  $J_1=7.2$ Hz,  $J_2=7.6$ Hz, 1H), 6.16 (s, 1H), 4.37 (tt,  $J_1=10.4$ Hz,  $J_2=7.2$ Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.49-3.36 (m, 3H), 2.73 (dd,  $J_1=16.8$ Hz,  $J_2=3.6$ Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ 167.0, 150.4, 142.6, 141.2, 140.8, 129.9, 127.7, 124.8, 123.96, 117.4, 113.7, 112.5, 104.7, 57.3, 56.3, 54.7, 33.0; MS ( $m/z$ ), 实测值295.1 ( $M-H$ )<sup>-</sup>。参见图3。



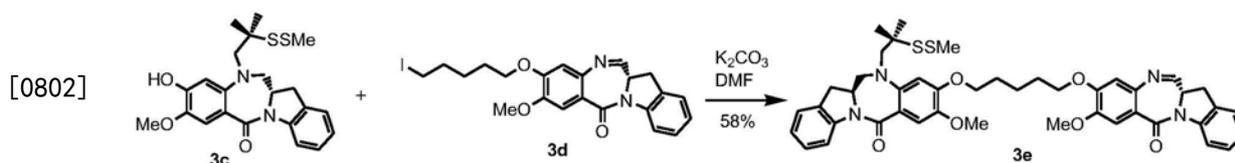
[0797] 化合物3c:

[0798] 向2-(甲基二硫代)-异丁醛 (113mg, 0.75mmol) 和化合物3b (148mg, 0.5mmol) 在无水1,2-二氯乙烷 (2mL) 溶液中加入三乙酰氧基硼氢化钠 (212 mg, 1.0mmol)。将混合物在室温下搅拌2天。在该时间内,加入另两份 (0.05 mL, 0.5mmol/份) 2-(甲基二硫代)-异丁醛以及一份三乙酰氧基硼氢化钠 (106 mg, 0.5mmol)。将反应用饱和碳酸氢钠淬灭,用二氯甲烷和水稀释。将有机层用盐水洗涤,经硫酸钠干燥并过滤。将滤液减压浓缩,残余物经硅胶色谱法 (Combiflash, 24g柱, 己烷/乙酸乙酯) 纯化得到白色蓬松固体状化合物 3c (92.5mg,  $y=43\%$ )。也回收未反应的起始材料3b (49.3mg,  $y=33\%$ )。<sup>1</sup>H NMR (400Hz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ 8.30 (d,  $J=8.0$ Hz, 1H), 7.28 (dd,  $J_1=6.8$ Hz,  $J_2=7.6$ Hz, 1H), 7.25-7.20 (m, 2H), 7.07 (t,  $J=7.6$ Hz, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.17 (s, 1H), 4.36-4.28 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.78 (d,  $J=14.4$ Hz, 1H), 3.46-3.34 (m, 3H), 2.90 (d,  $J=14.4$ Hz, 1H), 2.73 (dd,  $J_1=16.4$ Hz,  $J_2=2.8$ Hz, 1H), 2.34 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.05 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (400Hz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ 167.2, 149.0, 142.5, 142.2, 141.9, 129.9, 128.0, 125.3, 124.5, 124.1, 117.1, 112.0, 108.5, 64.8, 61.4, 58.1, 56.3, 53.4, 32.0, 26.3, 25.7, 25.4; MS ( $m/z$ ), 实测值453.3 ( $M+Na$ )<sup>+</sup>, 429.2 ( $M-H$ )<sup>-</sup>。参见图3。



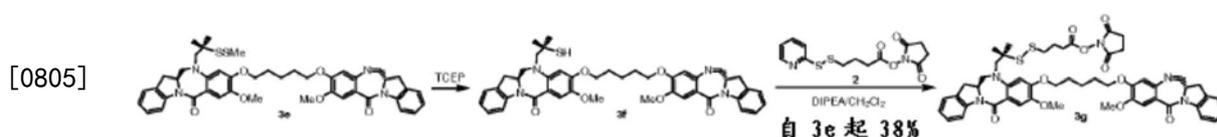
[0800] 化合物3d:

[0801] 向搅拌的IBD单体 (125mg, 0.425mmol) 和1,5-二碘戊烷 (0.63mL, 4.25 mmol) 在无水二甲基甲酰胺 (3mL) 的溶液中加入碳酸钾 (59mg, 0.425mmol) 并将混合物室温搅拌过夜。将反应溶液用二氯甲烷稀释, 用盐水洗涤并经无水硫酸钠干燥。将其过滤并浓缩。将残余物通过硅胶色谱纯化 (己烷/乙酸乙酯) 得到浅黄色泡沫状化合物3d (94mg,  $y=45\%$ )。 $^1\text{H}$  NMR (400Hz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.27 (d,  $J=8.0\text{Hz}$ , 1H), 7.86 (d,  $J=4.8\text{Hz}$ , 1H), 7.56 (s, 1H), 7.27 (dd,  $J_1=8.4\text{Hz}$ ,  $J_2=7.6\text{Hz}$ , 2H), 7.10 (dd,  $J_1=7.6\text{Hz}$ ,  $J_2=7.2\text{Hz}$ , 1H), 6.82 (s, 1H), 4.48 (dt,  $J_1=10.8\text{Hz}$ ,  $J_2=4.4\text{Hz}$ , 1H), 4.15-4.07 (m, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.70 (dd,  $J_1=16.8\text{Hz}$ ,  $J_2=10.8\text{Hz}$ , 1H), 3.49 (dd,  $J_1=16.8\text{Hz}$ ,  $J_2=4.0\text{Hz}$ , 1H), 3.22 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H), 1.96-1.87 (m, 4H), 1.64-1.57 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (400Hz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  164.0, 163.2, 151.4, 148.3, 142.2, 140.3, 129.6, 128.3, 124.9, 120.5, 117.0, 112.0, 110.6, 68.8, 56.4, 55.1, 33.3, 32.7, 28.0, 27.2, 6.6; MS ( $m/z$ ), 实测值513.3 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ , 543.2 ( $\text{M}+3\text{H}_2\text{O}-\text{H}$ ) $^-$ 。参见图3。



[0803] 化合物3e:

[0804] 向搅拌的起始材料3c (91mg, 0.21mmol) 和3d (94mg, 0.19mmol) 在无水二甲基甲酰胺 (1mL) 溶液中加入碳酸钾 (29mg, 0.21mmol), 将混合物在室温搅拌过夜。将反应溶液用二氯甲烷稀释, 用盐水洗涤并经无水硫酸钠干燥。过滤、浓缩并将残余物通过硅胶色谱纯化 (己烷/乙酸乙酯) 得到浅黄色泡沫状化合物3e (89.1mg,  $y=58\%$ )。 $^1\text{H}$  NMR (400Hz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.32-8.28 (m, 2H), 7.91 (bs, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.36-7.21 (m, 5H), 7.15-7.05 (m, 2H), 6.85 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 4.53-4.48 (m, 1H), 4.37-4.31 (m, 1H), 4.21-4.03 (m, 4H), 3.98 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.86-3.70 (m, 2H), 3.55-3.35 (m, 4H), 2.93 (d,  $J=4.0\text{Hz}$ , 1H), 2.73 (dd,  $J_1=16.4\text{Hz}$ ,  $J_2=2.4\text{Hz}$ , 1H), 2.36 (s, 3H), 2.03-1.96 (m, 3H), 1.77-1.67 (m, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.06 (s, 3H); MS ( $m/z$ ), 实测值815.3 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ 。参见图3。

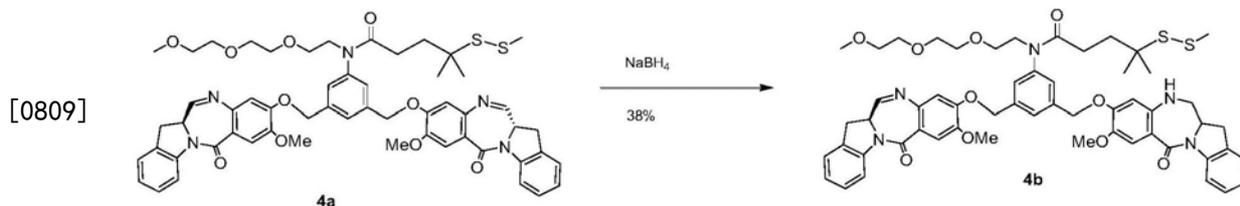


[0806] 化合物3g:

[0807] 向搅拌的化合物3e (33.1mg, 0.042mmol) 在乙腈 (2mL) 和甲醇 (4mL) 的溶液中加入新制备的TCEP溶液 (将36mg的TCEP的盐酸盐用饱和碳酸氢钠溶液中和至pH~6.5, 然后用0.4mL pH 6.5的磷酸盐缓冲液稀释)。将混合物在室温搅拌3小时, 然后用二氯甲烷和去离子水稀释, 分离并将有机层用盐水洗涤, 经无水硫酸钠干燥并过滤。将滤液高真空浓缩得到浅黄色固体状31mg化合物3f。将其溶于无水二氯甲烷中 (0.5mL)。将SPDB NHS酯 2

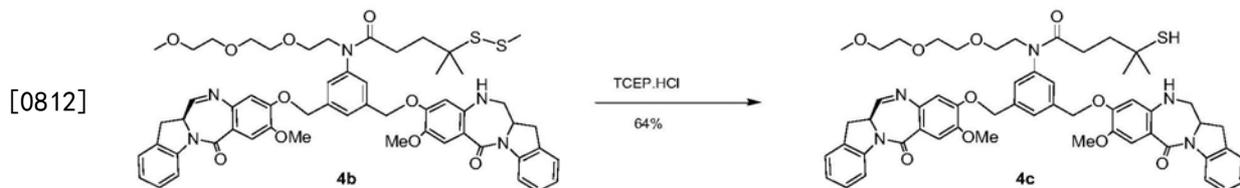
(26mg, 80%纯度, 0.063mmol) 和二异丙基乙胺 (11 $\mu$ l, 0.063mmol) 依次加入。将混合物继续在室温搅拌过夜, 用饱和氯化铵淬灭及用二氯甲烷稀释, 分离并用盐水洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。将残余物通过制备反相HPLC纯化 (C18柱, 乙腈/水)。将含有产物的级分合并, 用二氯甲烷萃取并浓缩得到黄色固体状化合物3g (15.2mg,  $y=38\%$ )。MS (m/z), 实测值 984.3 (M+Na)<sup>+</sup>, 1014.2 (M+3H<sub>2</sub>O-H)<sup>-</sup>。参见图3。

[0808] 实施例4



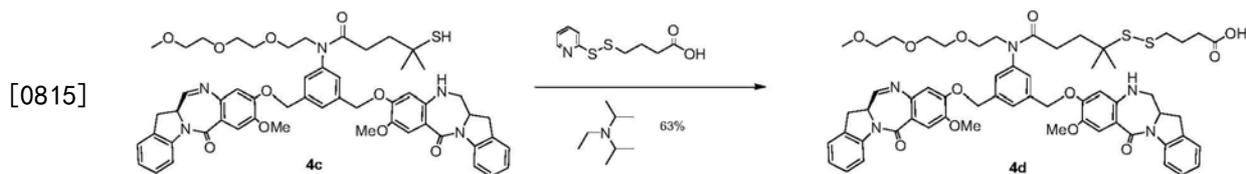
[0810] 化合物4b:

[0811] 将搅拌的化合物4a (111mg, 0.108mmol) 在无水乙醇 (720 $\mu$ L) 和无水二氯甲烷 (360 $\mu$ L) 的溶液在冰浴中冷却至0 $^{\circ}$ C。在0 $^{\circ}$ C下加入硼氢化钠 (0.817mg, 0.022mmol) 的50 $\mu$ L无水乙醇。将反应物在环境温度下搅拌两小时。将混合物在冰浴中冷却至0 $^{\circ}$ C, 用饱和氯化铵淬灭及用二氯甲烷萃取。将有机萃取物用盐水洗涤, 经无水硫酸钠干燥并通过硅藻土过滤。将滤液减压浓缩, 并将粗品经由RP-HPLC纯化 (C18去离子水/乙腈) 得到化合物4b (43mg, 38%)。<sup>1</sup>H NMR (400Hz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.26 (d, 1H, J=8.0Hz), 8.18 (d, 1H, J=8.0Hz), 7.77 (d, 1H, J=4.4Hz), 7.51 (s, 1H), 7.41 (s, 2H), 7.17 (m, 6H), 7.03 (t, 1H, J=7.2Hz), 6.96 (t, 1H, J=7.2Hz), 6.76 (s, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.13 (m, 4H), 4.38 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.79 (m, 2H), 3.63 (m, 1H), 3.51 (m, 8H), 3.43 (m, 6H), 3.25 (s, 3H), 2.73 (dd, 1H, J=3.6, 16.4Hz), 2.22 (s, 3H), 2.04 (m, 2H), 1.81 (m, 2H), 1.18 (s, 6H); MS (m/z) 实测值, 1051.9 (M+Na), 1069.9 (M+Na+H<sub>2</sub>O)。参见图4。



[0813] 化合物4c:

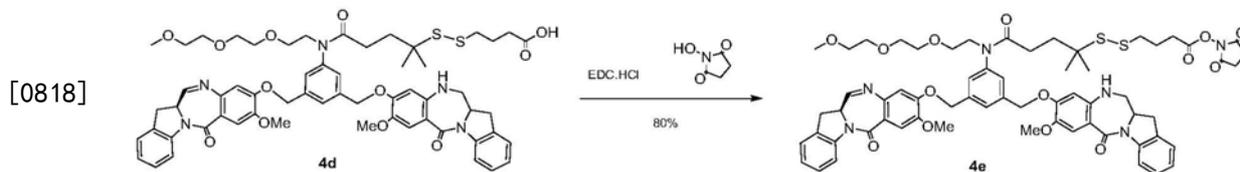
[0814] 向搅拌的化合物4b (40mg, 0.039mmol) 在甲醇 (4.45mL) 和乙腈 (2.225mL) 的溶液中加入TCEP.HCl (39.0mg, 0.136mmol) 的磷酸钠缓冲液 (0.89mL, pH 6.5)。将混合物在环境温度下搅拌18小时。将混合物用二氯甲烷稀释及用水和盐水洗涤。将有机萃取物经无水硫酸钠干燥、过滤并浓缩。用 RP-hPLC (C18、去离子水/乙腈) 纯化并用二氯甲烷提取得到化合物 4c (26.5mg, 64%); MS (m/z) 实测值, 1006.0 (M+Na)。参见图4。



[0816] 化合物4d:

[0817] 向搅拌的化合物4c (24mg, 0.024mmol) 在无水二氯甲烷 (800 $\mu$ L) 的溶液中加入PBA

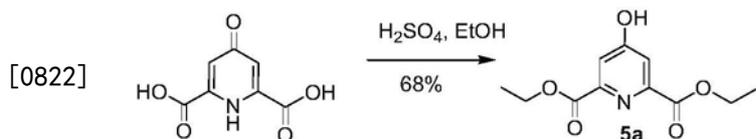
(11.18mg, 0.049mmol) 和二异丙基乙胺 (20.18 $\mu$ L, 0.116mmol)。在环境温度下搅拌保持18小时之后, 将反应物用二氯甲烷稀释及用饱和氯化铵淬灭。分层及有机层用盐水洗涤, 经无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩。用PTLC (5% 甲醇/二氯甲烷) 纯化得到化合物4d (17mg, 63%); MS (m/z) 实测值, 1123.9 (M+Na) 1139.9 (M+K); 1099.8 (M-H) 117.9 (M-H+H<sub>2</sub>O)。参见图4。



[0819] 化合物4e:

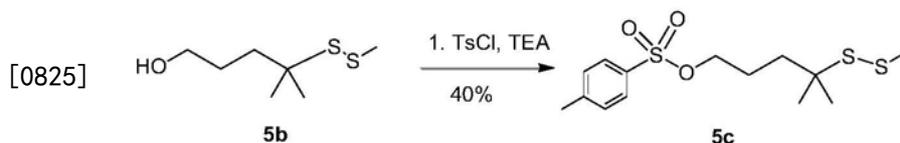
[0820] 向化合物4d (15mg, 0.014mmol) 和N-羟基琥珀酰亚胺 (4.70mg, 0.041 mmol) 在无水二氯甲烷 (1.0mL) 的混合物中加入EDC.HCl (7.83mg, 0.041 mmol)。在环境温度下搅拌18小时之后, 将反应物用二氯甲烷稀释及用饱和氯化铵淬灭。将混合物用盐水洗涤, 经无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩。将粗品通过RP-HPLC (C18, 去离子水/乙腈) 纯化。将含有产物的级分混合并用二氯甲烷萃取, 经无水硫酸镁干燥, 过滤并浓缩得到化合物4e (13mg, 80%); MS (m/z) 实测值, 1220.8 (M+Na) 1238.8 (M+Na+H<sub>2</sub>O)、1254.8 (M+K+H<sub>2</sub>O)。参见图4。

[0821] 实施例5



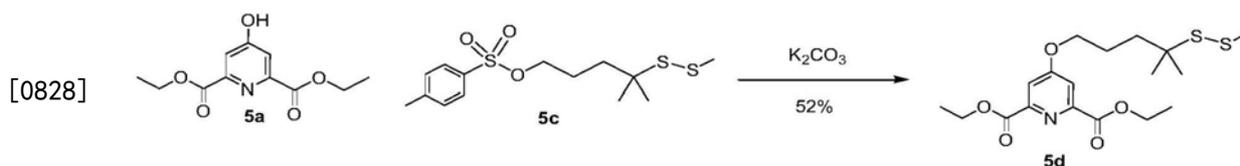
[0823] 化合物5a:

[0824] 将白屈氨酸水合物 (3.0g, 15.56mmol) 和硫酸 (0.6mL, 11.26mmol) 在无水乙醇 (40mL) 的混合物回流20小时。将反应物冷却至室温, 用含水碳酸钠中和, 然后用浓HCl酸化。加入水及用二氯甲烷萃取。将萃取物用无水硫酸镁干燥、过滤并浓缩。将粗品通过硅胶色谱 (5% 甲醇/二氯甲烷) 纯化得到白色固体状二乙基4-羟基吡啶-2,6-二羧酸酯 (5a) (2.5g, 68%)。参见图5。



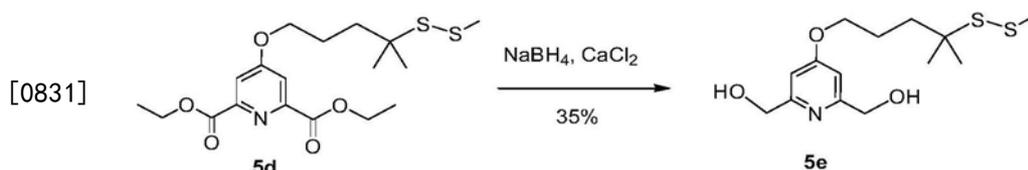
[0826] 化合物5c:

[0827] 将4-甲基-4-(甲基二硫烷基) 戊-1-醇 (5b) (2.0g, 11.09mmol) 在无水二氯甲烷 (55.5mL) 的溶液在冰浴中冷却至0 $^{\circ}$ C。在0 $^{\circ}$ C下加入三乙胺 (5.41mL, 38.8 mmol) 和甲苯磺酰氯 (3.17g, 16.64mmol)。将反应在环境温度下搅拌三小时。将混合物用乙酸乙酯萃取及用盐水洗涤。将有机萃取物用无水硫酸钠干燥、过滤并浓缩。通过硅胶色谱纯化 (5% 乙酸乙酯/己烷) 得到4-甲基-4-(甲基二硫烷基) 戊基4-苯磺酸甲酯 (5c) (1.5g, 40%)。5b: <sup>1</sup>H NMR (400Hz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ 3.42 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 1.77 (bs, 1H), 1.43 (m, 4H), 1.09 (s, 6H)。5c: <sup>1</sup>H NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ 7.66 (d, 2H, J=7.6Hz), 7.22 (d, 2H, J=8.0Hz), 3.90 (t, 2H, J=6.4Hz), 2.32 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 1.60 (m, 2H), 1.44 (m, 2H), 1.11 (s, 6H)。参见图5。



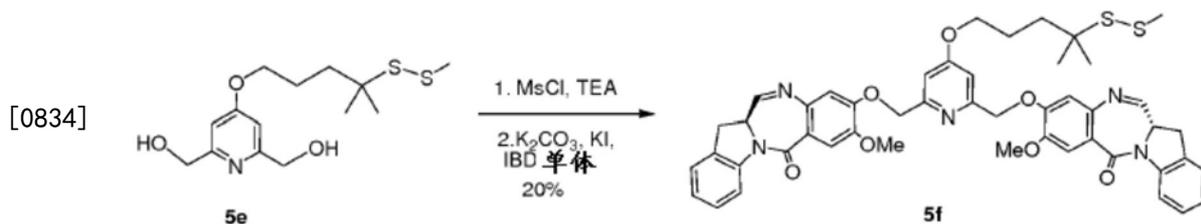
[0829] 化合物5d:

[0830] 向搅拌的4-甲基-4-(甲基二硫烷基)戊基4-苯磺酸甲酯(5c) (0.48g, 1.435 mmol) 和二乙基4-羟基吡啶-2,6-二羧酸酯(5a) (0.343g, 1.435mmol) 在无水二甲基甲酰胺(6.5mL)的溶液中加入碳酸钾(0.297g, 2.152mmol)。将反应物在 90℃下搅拌18小时。然后冷却至环境温度并用饱和氯化铵淬灭。将混合物用乙酸乙酯萃取三次。将萃取物用无水硫酸钠干燥、过滤并减压浓缩。通过硅胶色谱纯化(30%己烷/乙酸乙酯)得到二乙基4-(4-甲基-4-(甲基二硫烷基)戊氧基)吡啶-2,6-二羧酸酯(5d) (300mg, 52%) ;  $^1\text{H NMR}$  (400Hz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$ 7.70 (s, 2H), 4.40 (q, 4H,  $J=7.2, 14.4\text{Hz}$ ), 4.07 (t, 2H,  $J=6.4\text{Hz}$ ), 2.35 (s, 3H), 1.86 (m, 2H), 1.70 (m, 2H), 1.38 (t, 6H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 1.27 (s, 6H); MS (m/z), 实测值424.1 (M+Na), 440.1 (M+K)。参见图5。



[0832] 化合物5e:

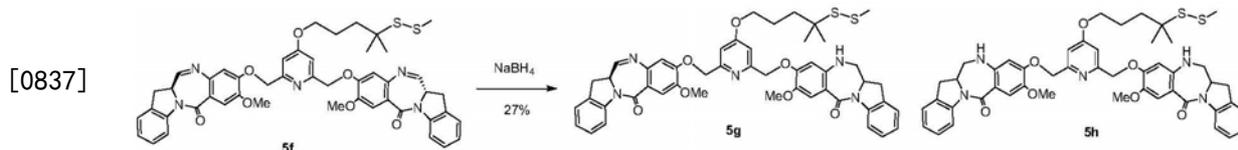
[0833] 向搅拌的二乙基4-(4-甲基-4-(甲基二硫烷基)戊氧基)吡啶-2,6-二羧酸酯(5d) (270mg, 0.672mmol) 在无水乙醇(7.0mL)的溶液中加入氯化钙(224mg, 2.017mmol) 和硼氢化钠(76mg, 2.017mmol)。将反应物在环境温度下搅拌90分钟,之后用水淬灭及真空浓缩以除去乙醇。然后将混合物用二氯甲烷萃取两次。将有机萃取物合并,用水洗涤,用无水硫酸镁干燥并通过硅藻土过滤。将滤液减压浓缩,及将粗品通过硅胶色谱(用10%甲醇/二氯甲烷洗脱)纯化,获得4-(4-甲基-4-(甲基二硫烷基)戊氧基)吡啶-2,6-二基)二甲醇(5e) (75mg, 35%) ;  $^1\text{H NMR}$  (400Hz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$ 6.63 (s, 2H), 4.60 (s, 4H), 3.95 (t, 2H,  $J=6.2\text{Hz}$ ), 3.54 (bs, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.82 (m, 2H), 1.66 (m, 2H), 1.26 (s, 6H); MS (m/z), 实测值340.1 (M+Na)。参见图5。



[0835] 化合物5f:

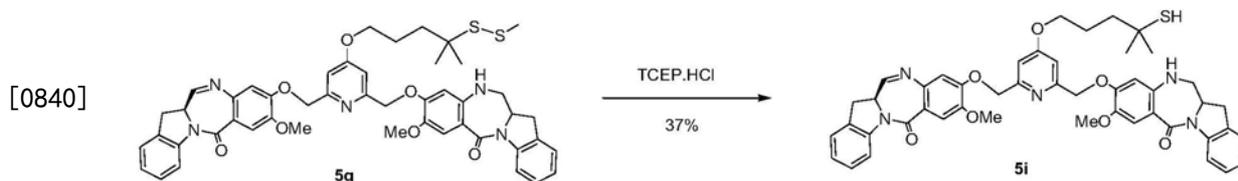
[0836] 将搅拌的(4-(4-甲基-4-(甲基二硫烷基)戊氧基)吡啶-2,6-二基)二甲醇(5e) (51mg, 0.161mmol) 在无水二氯甲烷(1.6mL)的溶液在丙酮/冰浴中冷却至 -5℃。加入三乙胺(0.112mL, 0.803mmol) 和甲磺酰氯(0.031mL, 0.402mmol)。将混合物在 -5℃下搅拌60分钟。将反应用冰水淬灭并用冷乙酸乙酯萃取。将有机萃取物用冰水洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩,得到二甲磺酸酯。向搅拌的二甲磺酸酯中间体(179mg, 0.378mmol) 和

IBD单体 (256mg, 0.869mmol) 在无水二甲基甲酰胺 (3.8mL) 的溶液中加入碳酸钾 (261mg, 1.890 mmol) 和碘化钾 (31.4mg, 0.189mmol)。将反应物在环境温度下搅拌18小时。将混合物用水淬灭并用二氯甲烷萃取三次。将有机萃取物用硫酸钠干燥、过滤并浓缩。将粗品再溶于乙腈中, 并通过RP-HPLC (C18, 去离子水/乙腈) 纯化。将含有含有产物的级分合并并用二氯甲烷萃取, 用无水硫酸镁干燥, 过滤并减压浓缩, 得到化合物5f (65mg, 20%);  $^1\text{H NMR}$  (400Hz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ 8.20 (d, 2H,  $J=8.0\text{Hz}$ ), 7.78 (m, 2H), 7.53 (s, 2H), 7.20 (m, 4H), 7.04 (t, 2H,  $J=7.4\text{Hz}$ ), 6.91 (m, 2H), 6.80 (s, 2H), 5.22 (s, 4H), 4.40 (m, 2H), 3.94 (s, 6H), 3.93 (m, 2H), 3.63 (m, 2H), 3.42 (dd, 2H,  $J=\text{Hz}$ ), 2.32 (s, 3H), 1.80 (m, 2H), 1.64 (m, 2H), 1.24 (s, 6H); MS (m/z), 实测值892.3 (M+Na) 910.3 (M+Na+ $\text{H}_2\text{O}$ ) 928.3 (M+Na+2 $\text{H}_2\text{O}$ )。参见图5。



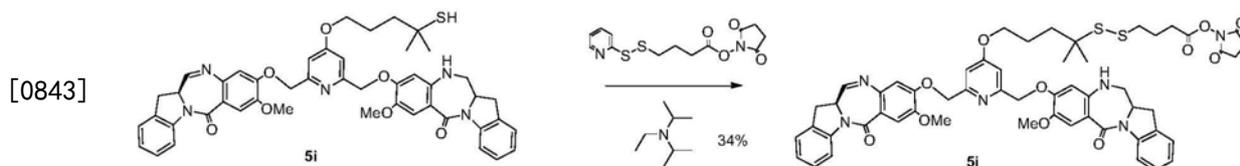
[0838] 化合物5g和5h:

[0839] 将化合物5f (74mg, 0.085mmol) 在无水乙醇 (600 $\mu\text{L}$ ) 和无水二氯甲烷 (300  $\mu\text{L}$ ) 的溶液在冰浴中冷却至0 $^\circ\text{C}$ 。在0 $^\circ\text{C}$ 下加入硼氢化钠 (0.644mg, 0.017mmol) 的50 $\mu\text{L}$ 无水乙醇。将混合物在环境温度下搅拌两小时然后冷却至0 $^\circ\text{C}$ 。用饱和氯化铵溶液淬灭反应并用二氯甲烷萃取。将有机萃取物用盐水洗涤, 经无水硫酸钠干燥, 通过硅藻土过滤并减压浓缩。将粗品再溶于二甲基甲酰胺中, 并通过RP-HPLC (C18, 去离子水/乙腈) 纯化。将含由化合物5g和5h的级分分别合并, 并用二氯甲烷萃取, 用无水硫酸镁干燥, 过滤并浓缩, 得到化合物5g (20mg, 27%) 和化合物5h。 $^1\text{H NMR}$  (400Hz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ 8.25 (m, 1H)、8.18 (m, 1H)、7.77 (m, 1H)、7.51 (ss, 1H)、7.40 (ss, 1H)、7.18 (m, 4H)、7.08 (m, 1H)、7.03 (m, 1H)、6.92 (m, 2H)、6.86 (ss, 1H) 5.98/6.06 (ss, 1H)、5.24 (m, 4H)、4.40 (m, 1H)、4.30 (m, 1H)、3.94 (s, 3H)、3.92 (m, 2H)、3.84 (s, 3H)、3.62 (m, 1H)、3.37 (m, 4H)、2.65 (m或dd, 1H)、2.32 (ss, 3H)、1.77 (m, 2H)、1.64 (m, 2H)、1.24 (s, 6H)。5h:  $^1\text{H NMR}$  (400Hz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ 8.24 (d, 2H,  $J=8.0\text{Hz}$ ), 7.39 (s, 2H), 7.14 (m, 4H), 6.97 (m, 2H), 6.93 (m, 2H), 6.15 (ss, 2H), 5.25 (s, 4H), 4.37 (m或t, 2H,  $J=9.8\text{Hz}$ ), 4.2 (bs, 2H), 3.94 (m, 2H), 3.83 (s, 6H), 3.40 (m, 6H), 2.72 (dd, 2H,  $J=\text{Hz}$ ), 2.32 (s, 3H), 1.79 (m, 2H), 1.64 (m, 2H), 1.24 (s, 6H)。参见图5。



[0841] 化合物5i:

[0842] 向搅拌的化合物5g (20mg, 0.023mmol) 在甲醇 (5.25mL) 和乙腈 (1.750mL) 的溶液中加入TCEP.HCl (19.72mg, 0.069mmol) 的磷酸钠缓冲液 (0.7mL, pH 6.5)。将混合物在环境温度下搅拌3小时, 然后用二氯甲烷和水稀释。分层并将有机层用盐水洗涤。将粗制品通过RP-HPLC (C18, 去离子水/乙腈) 纯化。将含有产物的级分合并, 用二氯甲烷萃取及蒸发, 得到化合物5i (7mg, 37%)。MS (m/z), 实测值848.3 (M+Na) 866.3 (M+Na+ $\text{H}_2\text{O}$ ) 880.3 (M+Na+MeOH)。参见图5。



[0844] 化合物5j:

[0845] 向搅拌的化合物5i (7mg, 8.47 $\mu$ mol) 和2,5-二氧吡咯烷-1-基4-(吡啶-2-基二硫烷基)丁酸甲酯 (8.64mg, 0.021mmol) 在无水二氯甲烷 (113 $\mu$ L) 的溶液中加入二异丙基乙胺 (3.69 $\mu$ L, 0.021mmol)。在环境温度下搅拌保持18小时之后,将反应物用饱和氯化铵溶液淬灭并用二氯甲烷萃取。将有机萃取物用盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩。将粗品通过制备 RP-HPLC (C18, 去离子水/乙腈) 纯化。将含有产物的级分用二氯甲烷萃取、过滤及蒸发,得到化合物5j (3mg, 34%)。MS (m/z), 实测值1063.3 (M+Na) 1081.3 (M+Na+H<sub>2</sub>O)。参见图5。

[0846] 实施例6

[0847] 抗体-SPDB-药物缀合物的制备:

[0848] 将化合物1g用3摩尔当量的亚硫酸氢钠(使用新鲜制备的NaHSO<sub>3</sub>水溶液)在96-98% DMA水溶液中在25 $^{\circ}$ C下保持4-5小时进行预处理。对于缀合,将2mg/mL的人源化抗体与5-7摩尔当量的化合1g(用NaHSO<sub>3</sub>预处理)在25 $^{\circ}$ C下,在85-90% PBS, pH 7.4, 水性缓冲液(含有10-15% N,N-二甲基乙酰胺(DMA))或50mM HEPES, pH 8.5, 水性缓冲液中反应6小时,然后在PBS中(pH 7.4)经G25凝胶过滤柱纯化以除去未反应或水解的药物化合物。将人源化的抗体-SPDB-药物缀合物在10mM组氨酸、250mM甘氨酸、1%蔗糖, pH 6.5缓冲液中透析。通过在280至320nm下的紫外吸光测量及药物和使用抗体在280nm (215,000M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)和320nm (9137M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)下的消光系数测得缀合物的药物抗体比率(DAR)是2.2-2.9。缀合物中单体的百分比使用TSK-Ge1 G300SWXL柱(7.8mm $\times$ 300mm, 5 $\mu$ m粒度)通过SEC(尺寸排阻色谱)测定为>90%。基于SEC中单体峰的紫外吸收也表明了单体缀合物峰具有连接的药物分子。对于游离(未缀合)的药物测定,以丙酮萃取缀合物以除去蛋白质,干燥并重新溶解在流动相中,并注射至VYDAC 208TP C8反相HPLC柱(4.6 $\times$ 250mm, 7 $\mu$ m粒度),并与标准相比较。缀合物中游离药物化合物的百分比测定为<0.5%的缀合药物化合物。参见图22。

[0849] 制备人源化Ab-SPDB-2a缀合物:

[0850] 将8mg/mL人源化的Ab与4-6摩尔当量的SPDB异双官能连接子在25 $^{\circ}$ C下在95% PBS, PH 7.4, 含有5% DMA (v/v), 中衍化1.5h, 然后经G25脱盐柱纯化至柠檬酸盐缓冲液(35mM柠檬酸盐缓冲液, pH 5.5, 含2mM EDTA, 150mM NaCl)以除去未反应的连接子。在没有和有50mM二硫苏糖醇(以测量总抗体和二硫苏糖醇释放的SPy)下使用280和343nm下的紫外吸收测量 LAR(连接子抗体比率)且测定为2.7-4.1LAR。将2mg/mL的SPDB-修饰的抗体与2摩尔当量的化合物2a(HCl盐)/连接的SPDB在环境温度下在85%柠檬酸盐缓冲液、15% DMA (v/v)中反应20h, 然后经G25脱盐柱纯化至PBS中, pH 7.4, 以除去未缀合的药物化合物。最终人源化的Ab-SPDB-2a缀合物的 DAR通过紫外分光光度计在280至350nm下进行测量及计算为~1.7-2.1 DAR。缀合物中单体和单体上连接药物化合物的百分比通过HPLC使用 SEC(尺寸排阻色谱)柱进行测定。参见图23。

[0851] 实施例7

[0852] 游离药物和缀合物的体外效能：

[0853] 使用的通用方法：将未缀合的游离药物化合物或药物缀合物样本加入至 96-孔平底组织培养板中并使用连续稀释滴定以覆盖所需摩尔范围。将抗原阳性 ( $Ag^+$ ) 或抗原阴性 ( $Ag^-$ ) 细胞加入特定细胞密度的孔中从而对每个相应的细胞系针对每种药物浓度有三份样品。然后将板在  $37^\circ C$  下在  $5\% CO_2$  的氛围中孵育保持 4-5 天，这取决于细胞系。COLO 205 (1,000 个细胞/孔)、Namalwa (3,000 个细胞/孔)、HEL 92.1.7 (3,000 个细胞/孔) -4 天；RH30 (1,000 个细胞/孔)、HL60/QC (5,000 个细胞/孔)、Ramos (10,000 个细胞/孔)、KB (2,000 个细胞/孔)、BJAB (2,000 个细胞/孔)、NB4 (3,000 个细胞/孔) -5 天，RPMI 8226 (8,000 个细胞/孔) -6 天。

[0854] 然后在培养末期细胞毒性效能使用 WST-8 基于细胞活力的试验评估及存活细胞通过与 WST-8 显影 (2-7 小时) 测量。测量每个孔中的吸光度及对在每个浓度下细胞存活分数作图以显示细胞毒性和/或抗原特异性 (缀合物)。

[0855] 使用上述通用方法，测量未缀合的游离药物化合物对七种细胞系的细胞毒性：KB, HeLa 细胞污染物, HL60/QC, 急性髓样白血病细胞系, Namalwa, 伯基特淋巴瘤细胞系细胞系, NB4, 急性早幼粒细胞白血病细胞系, HEL92.1.7, 红白血病细胞系, RPMI8226, 多发性骨髓瘤细胞系和 BJAB, B-细胞白血病细胞系。示于图 24 和表 10 的结果表明这些化合物对所有宽范围的细胞类型具有高效能。针对表达抗原的细胞, 在有和没有加入过量未缀合的阻断抗体以示出杀伤效果特异性下测量抗体-药物缀合物的效能和特异性。MY9-6-药物缀合物对三种不同的表达抗原的细胞 HL60/ATCC、HL60/QC 和 NB-4 非常有效, 尽管 NB4 细胞中抗原表达是很低的。特定的效能可通过加入过量的未缀合抗体而阻断, 证明细胞杀伤作用是抗原特异性的。类似地, huFOLR1-药物缀合物可以特定的方式有效杀死表达抗原的 KB 细胞。图 25 和 26 阐明了结果。

[0856] 表 10. 游离药物对不同细胞系的效力。IC<sub>50</sub> 值以 nM 为单位列于表中。

	Namalwa	KB	HL60/QC	NB4	HEL92.1.7	RPMI8226	BJAB
<b>1c</b>	0.056	0.16	0.023				
<b>1d</b>	0.069	0.18	0.032				
<b>1e</b>	2.4	>3.0	0.67				
<b>27d</b>		0.23	0.05	0.039	0.14	0.07	0.04
<b>27e</b>		0.39	0.09	0.13	0.2	0.24	0.12
<b>27f</b>		4.4	1.7	1.1	1.8	>3.0	1
<b>29a</b>	0.002	0.004	0.001	0.0023	0.0031	0.011	0.001
<b>29b</b>	0.003	0.007	0.006	0.007	0.007	0.005	0.003
<b>29c</b>	0.013	0.057	0.03	0.023	0.027	0.16	0.015

使用不同细胞系和本发明的不同缀合物也获得了类似的结果, 所述细胞系和缀合物包括: huMY9-6-SPDB-1f 对 HL60/QC ( $Ag^+$ ) 细胞、HL60/ATCC ( $Ag^+$ ) 细胞和 NB-4 ( $Ag^+$ ) 细胞 (图 25); huFOLR1-SPDB-1f 对 KB ( $Ag^+$ ) 细胞 (图 26); huMY9-6-SPDB-1f 对抗原阳性 HL60/QC 细胞、HL60/ATCC 细胞、NB-4 细胞和 HEL 92.1.7 细胞 (图 29); huMy9-6-SPDB-1f、huMy9-6-磺基 SPDB-1f 和 huMy9-6-BMPS-1f 对 HL60/QC ( $Ag^+$ ) 细胞 (图 34); chB38.1-SPDB-1f 和 chB38.1-磺

基SPDB-1f对COL0205 ( $\text{Ag}^+$ ) 细胞(图35); huMy9-6-SPDB-1f、huMy9-6-磺基SPDB-1f和huMy9-6-BMPS-1f对 OCI-AML3 ( $\text{Ag}^+$ ) 细胞(图44)。对于各种缀合物对各种细胞系的效能(表示为  $\text{IC}_{50}$ 值(nM))也可参见图49。注意,在图25、29、34、35和44中,缀合物在存在亚硫酸氢钠下制备。

[0858] 为了比较用和不用亚胺反应剂(诸如亚硫酸氢钠)制备的主题缀合物的体外效能测量结果,在有和没有亚硫酸氢钠下使用原位磺化法制备 huMy9-6-BMPS-1f、huMy9-6-磺基-SPDB-1f和huMy9-6-药物2(其中相应的本发明化合物首先与亚硫酸氢钠和具有反应性基团的双官能交联剂混合,然后将反应混合物(无需进一步纯化)与作为细胞结合剂的huMy9-6单克隆抗体反应)。HL60-QC细胞上缀合物的 $\text{IC}_{50}$ 如下所示。数据表明缀合物制备步骤中包含亚胺反应性基团(诸如亚硫酸氢钠)不会负面影响主题缀合物的体外效能。

缀合物	NaHSO <sub>3</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub> (pM) huMy9-6
	处理	(pM)	阻断
huMy9-BMPS-1f	-	2	130
	+	1.5	55
huMy9-6-磺基-SPDB-1f	-	5.6	1200
	+	7.1	610
huMy9-6-药物 2	-	16	> 3000
	+	6.8	> 3000

[0860] 很明显,在与huMy9-6缀合之前将药物化合物用亚硫酸氢钠(5摩尔当量,22h,4°C,90:10DMA:pH 5.5水)预处理没有显著影响缀合物体外效能的抗原依赖性或非依赖性(用1 $\mu\text{M}$ 未缀合huMy9-6阻断的抗原)。

[0861] 实施例8

[0862] 抗体-药物缀合物的结合类似于未修饰抗体的结合:

[0863] 对于表达抗原的HL60/QC细胞,将huMY9-6-药物缀合物的结合与未修饰的huMY9-6抗体的结合使用流式细胞仪进行比较。简单地说,将抗原-阳性细胞在4°C下与缀合物或未修饰的抗体孵育,然后在4°C下用二抗-FITC缀合物孵育,用甲醛固定(1%在PBS中)并用流式细胞仪分析。在缀合物的结合与未修饰抗体的结合之间没有观察到显著差异。一个实施例示于图27,其中 huMY9-6-药物缀合物以类似于未修饰抗体的高亲和力结合于抗原-阳性细胞。

[0864] 实施例9

[0865] huMY9-6-SPDB-1f缀合物在具有HL60/QC肿瘤裸鼠中的体内效能:

[0866] 在本研究中,在具有HL60/QC肿瘤裸鼠(人急性髓性白血病模型)中研究 huMY9-6-SPDB-1f的抗肿瘤活性。将HL60/QC肿瘤细胞( $2 \times 10^6$ 细胞/小鼠)以0.1mL/小鼠的体积皮下接种至5周龄的雌性无胸腺裸鼠的右肩区中。肿瘤细胞接种后八天将小鼠通过肿瘤体积随机分组(n=6只/组)。随机化那天开始进行处理,且组包括以PBS(200 $\mu\text{L}$ /注射)给药的对照

组,或将 huMY9-6-SPDB-1f (50 $\mu$ g/kg 1f剂量相当于2.5mg/kg抗体剂量)以不同剂量(5 至 100 $\mu$ g/kg)的单次处理。与PBS对照小鼠中观察到的损失相比,所有的处理都良好耐受平均体重损失。平均肿瘤体积与时间的关系(图28和36)以数据示出,表明huMY9-6-SPDB-1f缀合物的剂量依赖性抗肿瘤活性。最低有效剂量估计为20 $\mu$ g/kg,其比最大耐受剂量低约35倍。

[0867] 实施例10

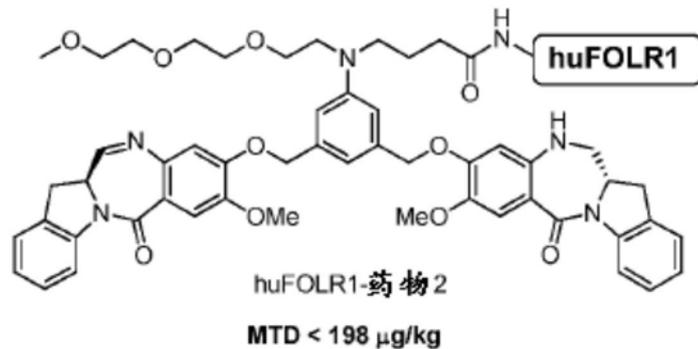
[0868] 在雌性CD-1小鼠中研究huFOLR-1缀合物的耐受性。在研究开始前观察动物七天且发现没有疾病或病症。给小鼠施用单次静脉内注射该缀合物且每天监测动物的体重减轻、发病率或死亡率。表9示出对于huFOLR1-药物1,缀合物仅在50 $\mu$ g/kg的最低测试剂量具有耐受性。相比之下,发现单亚胺缀合物huFOLR1-药物2和huFOLR1-SPDB-1f两者具有更好的耐受性,它们的最大耐受剂量分别是<198 $\mu$ g/kg和>560 $\mu$ g/kg。

[0869] 表9. (A) huFOLR1-药物1, (B) huFOLR1-药物2, 和 (C) huFOLR1-SPDB-1f 缀合物的耐受性比较数据。

[0870] A)

剂量 ( $\mu$ g/kg)	存活%
50	100
100	0
200	0
300	0
400	0

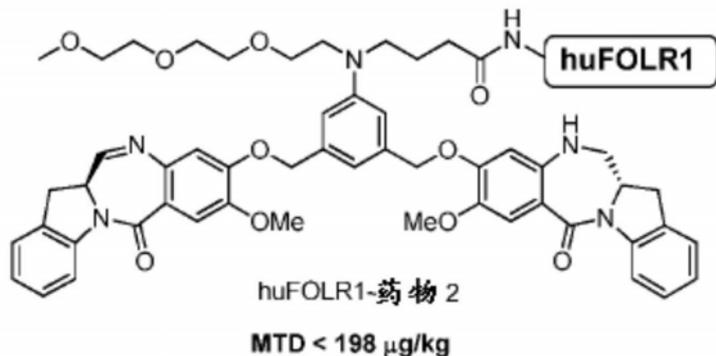
[0871]



[0872] B)

剂量 ( $\mu$ g/kg)	存活%
66	100
132	100
198	50
264	25

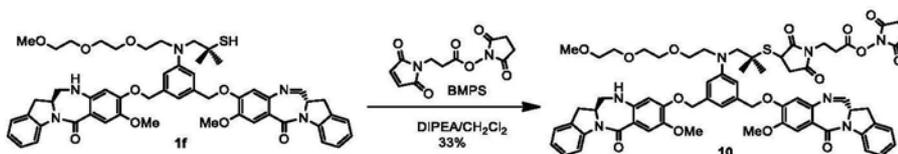
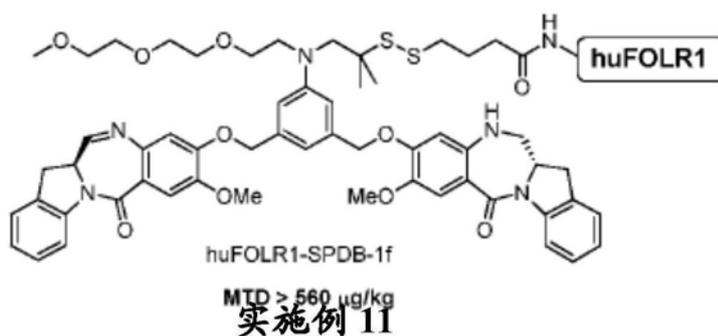
[0873]



[0874] C)

[0875]

剂量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	存活%
120	100
160	100
200	100
320	100
560	100

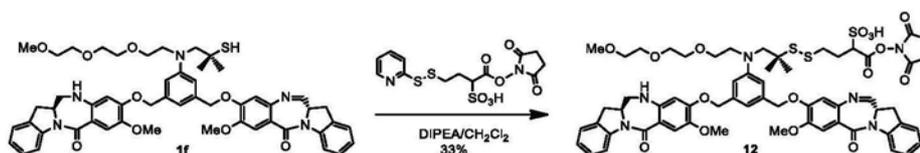


[0876] 化合物10:

[0877] 向搅拌的1f (18mg, 0.019mmol) 和N-( $\beta$ -马来酰亚胺丙基氧基) 琥珀酰亚胺 (BMPS) 酯 (9.2mg, 0.034mmol) 在无水二氯甲烷 (0.3mL) 的溶液中加入无水二异丙基乙胺 (5 $\mu\text{L}$ , 0.029mmol)。将混合物在室温下搅拌27小时, 用饱和氯化铵淬灭及用二氯甲烷稀释。将有机层用盐水洗涤, 经无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩。残余物通过制备反相HPLC (C18柱,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ) 纯化。将含有产物的级分合并, 用二氯甲烷萃取并蒸发得到白色固体状化合物10 (7.6mg,  $y=33\%$ )。MS ( $m/z$ ): 实测值1208.3 ( $\text{M}+\text{H}^+$ )。参见图13。

[0878] 实施例12

[0879]



[0880] 化合物12:

[0881] 向搅拌的1f (16.5mg, 0.018mmol) 和磺基-SPDB (14.2mg, 0.036mmol) 在无水二氯甲烷 (0.3mL) 的溶液中加入无水二异丙基乙胺 (9 $\mu\text{L}$ , 0.054mmol)。将混合物在室温过夜搅拌并减压浓缩。残余物通过制备反相HPLC (C18柱,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ) 纯化。将含有产物的级分合并, 用二氯甲烷萃取并蒸发得到6.6 mg淡黄色泡沫状的化合物12。将水层冻干得到另外白色固体状0.5mg的化合物12。MS ( $m/z$ ): 实测值1235.0 ( $\text{M}-\text{H}^-$ )。参见图15。

[0882] 实施例13

[0883] 人源化抗体-磺基SPDB-1f缀合物的制备

[0884] 将含有2.5mg/mL的huMy9-6抗体和10摩尔当量的10 (用5倍过量的亚硫酸氢钠于90:10DMA:水中预处理) 在50mM HEPES (4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸) pH 8.5的缓冲液和15%v/v DMA (N,N-二甲基乙酰胺) 助溶剂的反应中在25 $^{\circ}\text{C}$ 下缀合6小时。反应后, 将缀合物纯化且用NAP脱盐柱 (Illustra Sephadex G-25DNA Grade, GE Healthcare) 将缓冲液更换为250mM甘氨酸、10mM组氨酸、1%蔗糖、0.01%Tween、50 $\mu\text{M}$ 亚硫酸氢钠的制剂缓冲液中。在相同缓冲液中在室温下利用Slide-a-Lyzer透析盒 (ThermoScientific 20,000 MWC0) 进行

4小时的透析。发现纯化的缀合物具有的DAR为2.4(通过紫外-可见,对1f使用摩尔消光系数 $\epsilon_{330\text{nm}} = 15,484\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 和 $\epsilon_{280\text{nm}} = 30,115\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 及对My9-6抗体, $\epsilon_{280\text{nm}} = 146,000\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ )、96.7%单体(通过尺寸排阻色谱法), <1%未缀合的游离药物化合物(用丙酮萃取/反相HPLC)和最终1.4 mg/mL的蛋白浓度。

[0885] 根据描述于实施例7的通用方法,测量抗体-磺基SPDB-1f缀合物的体外效能且数据示于图34和35。与抗体-SPDB-1f缀合物相比,抗体-磺基 SPDB-1f具有相当或更高的效能。

[0886] 使用的共价亚胺反应物,诸如亚硫酸氢钠,提高Ab-化合物缀合规范规格(如,单体%和药物负荷)。在一个实验中,用5摩尔当量的亚胺反应物在25°C下经NHS-BMPS-1在90%DMSO/10%PBS pH 7.4下反应4小时以形成加合物。然后将反应混合物加入至huMy9-6抗体中(4摩尔当量IGN,2mg/ml, 10%v/v DMSO,50mM HEPES缓冲液,pH 8.5,5h,25°C)。使用连二亚硫酸钠、亚硫酸氢钠或焦亚硫酸钠制备的缀合物具有类似的IGN/Ab比率和单体%,而不用添加剂处理制得的缀合物导致非常低的药物结合。参见下述表。

反应物	IGN/Ab (UV)	单体% (SEC)	单体上% 1f
连二亚硫酸钠	2.6	88	82
亚硫酸氢钠	2.6	88	83
焦亚硫酸钠	2.7	88	82
无添加剂	0.1	98	94

[0888] 实施例14

[0889] 人源化抗体-BMPS-1f缀合物的制备

[0890] 将含有2.0mg/mL的huMy9-6抗体和5摩尔当量的12(用5倍过量的亚硫酸氢钠于90:10DMA:水中预处理)在50mM HEPES(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)pH 8.5的缓冲液和15%v/v DMA(N,N-二甲基乙酰胺)助溶剂的反应中在25°C下反应6小时。反应后,将缀合物纯化且用NAP脱盐柱(Illustra Sephadex G-25DNA Grade,GE Healthcare)将缓冲液更换为250mM甘氨酸、10mM组氨酸、1%蔗糖、0.01%Tween、50 $\mu$ M亚硫酸氢钠的制剂缓冲液中。在相同缓冲液中在室温下利用Slide-a-Lyzer透析盒(ThermoScientific 20,000 MWCO)进行4小时的透析。发现纯化的缀合物具有的DAR为2.8(通过紫外-可见,对1f使用摩尔消光系数 $\epsilon_{330\text{nm}} = 15,484\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 和 $\epsilon_{280\text{nm}} = 30,115\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 对My9-6抗体, $\epsilon_{280\text{nm}} = 146,000\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ )、91.7%单体(通过尺寸排阻色谱法), <1%未缀合的游离药物化合物(用丙酮萃取/反相HPLC)和最终1.2 mg/mL的蛋白浓度。

[0891] 根据描述于实施例7的通用方法,测量抗体-BMPS-1f缀合物的体外效能且数据示于图34和35。抗体-BMPS-1f缀合物具有与抗体-SPDB-1f缀合物相当的效能。

[0892] 实施例15

[0893] hu FOLR1-SPDB-1f缀合物在具有KB肿瘤裸鼠中的体内效力:

[0894] 在本研究中,hu FOLR1-SPDB-1f的抗肿瘤活性在具有KB肿瘤的雌性裸鼠(人类宫颈癌模型)中进行了研究。将KB( $1 \times 10^7$ 细胞/小鼠)以0.1mL/小鼠的体积皮下接种至6周龄的雌性无胸腺裸鼠的右肩区中。在肿瘤细胞接种六天后将小鼠通过肿瘤体积随机分组(n=6只/组)。随机化那天开始进行处理,且组包括以PBS(200 $\mu$ L/注射)给药的对照组,或将hu

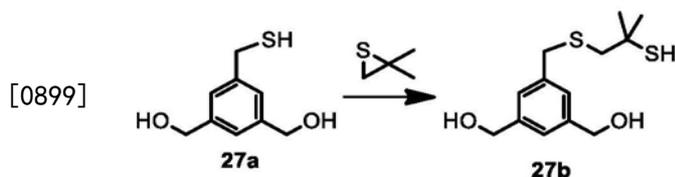
FOLR1-SPDB-1f (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 连接的剂量相当于2.8mg/kg抗体剂量)以不同剂量(20至200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )的单次处理。所有的处理都是良好耐受的,在任一测试组中没有体重减轻。平均肿瘤体积与时间的关系(图37)以数据示出,表明hu FOLR1-SPDB-1f缀合物的剂量依赖性抗肿瘤活性。最低有效剂量估计为<50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,其比最大耐受剂量低约14倍。

[0895] 类似的体内结果也通过使用本发明的其它缀合物针对各种其它癌症模型获得,包括具有MOLM-13肿瘤小鼠中的huMy9-6-磺基-SPDB-1f(图50);具有NB4肿瘤小鼠中的huMy9-6-磺基-SPDB-1f(图51);具有HL60/QC肿瘤小鼠的huMy9-6-BMPS-1f(图52);具有MOLM-13肿瘤小鼠的 huMy9-6-BMPS-1f(图53);具有HL60/QC肿瘤小鼠的huMy9-6-药物2(图56);和具有MOLM-13肿瘤小鼠的huMy9-6-药物2(图57)。注意,在图53、54、56和57中,缀合物在存在亚硫酸氢钠下制备。

[0896] 为了比较有或没有亚胺反应性基团制备的主题缀合物的体内效力,有或没有50 $\mu\text{M}$ 亚硫酸氢钠配制huMy9-6-药物2,且缀合物用于治疗具有 HL60-QC肿瘤异种移植物的鼠。下列数据示出有或没有50 $\mu\text{M}$ 亚硫酸氢钠配制的缀合物在~20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 药物剂量时示出可比的T/C%,表明在缀合物的制备步骤中包含亚硫酸氢钠不会负面地影响主题缀合物的体内效能。

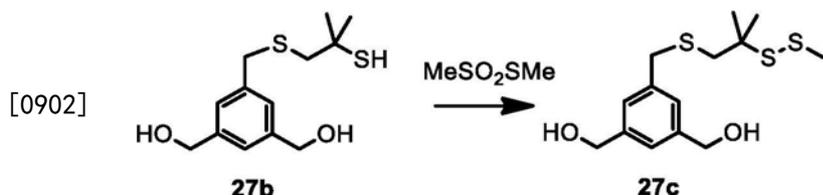
	NaHSO <sub>3</sub>	最低有效剂量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ 药物)	T/C %
[0897]	-	18	20
	+	19	16

[0898] 实施例16



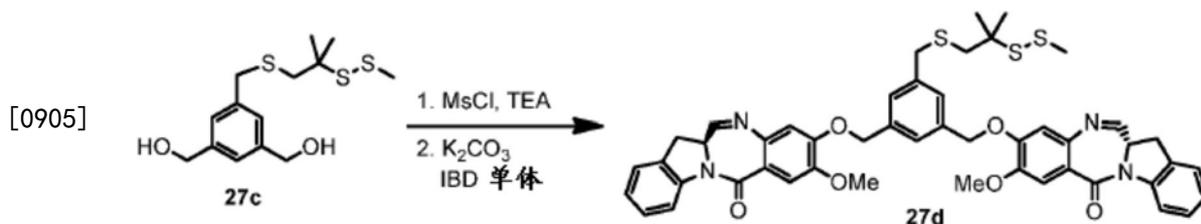
[0900] 化合物27b:

[0901] (5-((2-巯基-2-甲基丙基硫)甲基)-1,3-亚苯基)二甲醇:将(5-(巯基甲基)-1,3-亚苯基)二甲醇(0.163g,0.885mmol)溶于小瓶甲醇(3mL)中并加入搅拌棒。向该溶液加入三乙胺(0.016mL,0.118mmol),然后加入2,2-二甲基环硫乙烷(0.058mL,0.590mmol)并将所得混合物密封,在室温下搅拌过夜(16小时)。然后将反应物浓缩,重新溶于二氯甲烷,载入二氧化硅ptlc板(1000微米)并将板用10%甲醇的二氯甲烷溶液显色。刮下相应于产物的条带,用纯乙酸乙酯过滤并浓缩得到(5-((2-巯基-2-甲基丙基硫)甲基)-1,3-亚苯基)二甲醇(0.095g,0.349mmol,59.1%收率)。<sup>1</sup>H NMR(400Hz,CDCl<sub>3</sub>): $\delta$ 7.26(s,3H)、4.69(s,4H)、3.82(s,2H)、2.74(s,2H)、2.17(s,1H)、2.12(br s,2H)、1.43(s,6H);<sup>13</sup>C NMR(400Hz,CDCl<sub>3</sub>): $\delta$ 141.6、138.9、126.7、124.3、65.0、49.0、45.4、38.4、31.5;MS(m/z),预期值:272.4,实测值295.0(M+Na)。参见图30。



[0903] 化合物27c:

[0904] (5-((2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基硫基)甲基)-1,3-亚苯基)二甲醇:将(5-((2-巯基-2-甲基丙基硫)甲基)-1,3-亚苯基)二甲醇(0.120g,0.440mmol)溶于乙醇(5mL)和1.0M磷酸钾缓冲液(pH 7)(5.00mL)中并在冰浴中冷却(形成沉淀,但是它被忽略)。加入S-甲基甲磺硫酯(0.083mL,0.881mmol)及将混合物搅拌过夜,同时缓慢(经30分钟)升至室温。将反应物用二氯甲烷稀释,及除去有机层,用水洗涤,经无水硫酸钠干燥并真空浓缩。将残余物溶于二氯甲烷并载入至500微米ptlc及用66%乙酸乙酯的己烷中显色。刮下相应于产物的条带,用乙酸乙酯过滤并浓缩得到(5-((2-巯基-2-甲基二硫烷基)丙基硫基)甲基)-1,3-亚苯基)二甲醇(0.091g,0.286mmol,64.9%收率)。<sup>1</sup>H NMR(400 Hz,CDCl<sub>3</sub>): $\delta$ 7.27(s,3H),4.71(s,4H),3.78(s,2H),2.77(s,2H),2.41(s,3H),1.94(br s,2H),1.38(s,6H);<sup>13</sup>C NMR(400Hz,CDCl<sub>3</sub>): $\delta$ 141.6,139.0,126.7,124.2,65.0,51.8,44.0,38.2,26.7,25.3;MS(m/z),预期值:341.5,实测值341.1(M+Na)。参见图30。

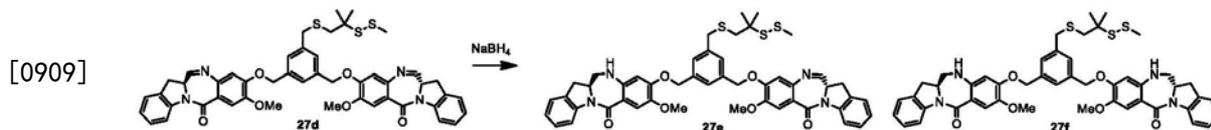


[0906] 化合物27d:

[0907] 将(5-((2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基硫基)甲基)-1,3-亚苯基)二甲醇(80 mg,0.251mmol)的无水二氯甲烷(1.75mL)在盐水/冰浴中冷却至-5℃。在-5℃下加入三乙胺(105 $\mu$ L,0.753mmol),随后加入甲磺酰氯(50.7 $\mu$ L,0.653 mmol)。将反应物在-5℃下搅拌1小时,之后用冷乙酸乙酯将其稀释并加入冰。将混合物转移至分液漏斗中并用冷乙酸乙酯萃取。将有机萃取物用冰水洗涤,并用无水硫酸镁和硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩。所得的(5-((2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基硫基)甲基)-1,3-亚苯基)双(亚甲基)二甲磺酸酯可直接使用而无需进一步纯化。

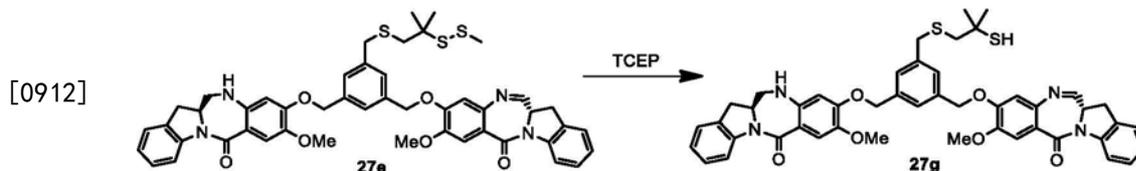
[0908] 将IBD单体(177mg,0.602mmol)的无水N,N-二甲基甲酰胺(1.75mL)在环境温度下加入至(5-((2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基硫基)甲基)-1,3-亚苯基)双(亚甲基)二甲磺酸酯(119mg,0.251mmol)。加入碳酸钾(173mg,1.253 mmol)并将反应物在环境温度下搅拌20小时。将反应混合物用水淬灭并用二氯甲烷萃取。将萃取液用盐水洗涤然后用无水硫酸钠干燥,过滤并在高真空下浓缩。将粗制品通过快速硅胶色谱(纯DCM $\rightarrow$ 2%MeOH/DCM)纯化。将含有产物的级分合并,浓缩并通过半制备RP-HPLC(C18,A=去离子水B=ACN,20mL/min)纯化。将含有所需产物的级分合并,用二氯甲烷萃取,用无水硫酸镁干燥,过滤并减压浓缩,得到所需产物(46mg,21%)。<sup>1</sup>H NMR(400Hz,CDCl<sub>3</sub>): $\delta$ 8.19(d,J=8.0Hz,2H)、7.77(m,d,J=4.4Hz,2H)、7.50(s,2H)、7.34(s,1H)、7.31(s,2H)、7.19(m,4H)、7.03(t,J=7.2,7.6Hz,

2H)、6.77 (s, 2H)、5.14 (m, 4H)、4.40 (m, 2H)、3.91 (s, 6H)、3.70 (m, 2H)、3.63 (m, 2H)、3.41 (m, 2H)、2.65 (s, 2H)、2.29 (s, 3H)、1.26 (s, 6H)。MS (m/z), 计算值893.2 (M+Na)<sup>+</sup>; 实测值893.2 (M+Na)<sup>+</sup>、911.2 (M+H<sub>2</sub>O+Na)<sup>+</sup>、929.2 (M+2H<sub>2</sub>O+Na)<sup>+</sup>、945.1 (M+2H<sub>2</sub>O+K)<sup>+</sup>。参见图30。



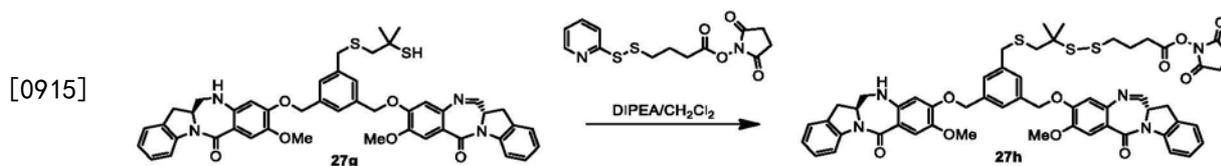
[0910] 化合物27e和27f:

[0911] 向冷却的(0°C)的27d (50mg, 0.057mmol) 无水二氯甲烷 (225μL) 和乙醇 (450μL) 溶液中加入硼氢化钠 (0.651mg, 0.017mmol)。将反应物在0°C下搅拌五分钟然后在环境温度下保持2.5小时。将反应混合物冷却至0°C, 用饱和氯化铵淬灭反应并用二氯甲烷萃取。将有机萃取物用盐水洗涤, 经无水硫酸钠干燥, 通过硅藻土过滤并浓缩。将粗品通过产物半制备 RP-HPLC (C18, A=去离子水B=ACN, 20mL/min) 纯化。将含有所需产物的级分合并, 用二氯甲烷萃取, 用无水硫酸镁干燥, 过滤并浓缩, 得到单还原胺27e (11mg, 22%) MS (m/z), 计算值895.3 (M+Na)<sup>+</sup> 实测值895.2 (M+Na)<sup>+</sup>、913.2 (M+H<sub>2</sub>O+Na)<sup>+</sup>、929.2 (M+H<sub>2</sub>O+K)<sup>+</sup> 和二次还原的胺27f (5mg, 10%) MS (m/z), 计算值 897.3 (M+Na)<sup>+</sup>, 实测值897.3 (M+Na)<sup>+</sup>。参见图30。



[0913] 化合物27g:

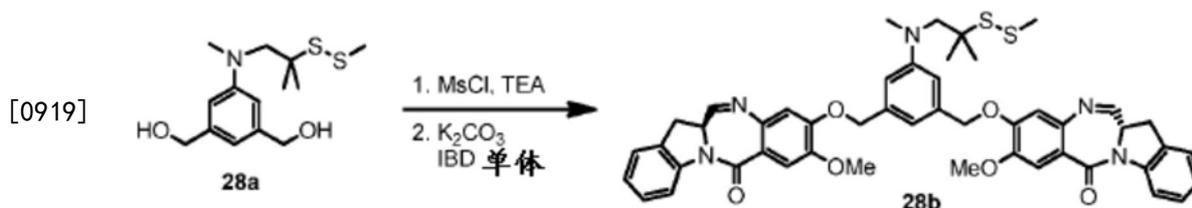
[0914] 向搅拌的27e (10mg, 0.011mmol) 在甲醇 (733μL) 和乙腈 (880μL) 的溶液中加入三(2-羧乙基)膦酸盐 (9.85mg, 0.034mmol) 的缓冲液6.5 (147μL) 中。将混合物在环境温度下搅拌3小时。将反应物用二氯甲烷稀释。加入水并分层。用盐水洗涤有机层, 用无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩, 得到化合物 27g (9mg, 95%)。MS (m/z), 计算值849.3 (M+Na)<sup>+</sup>; 实测值849.2 (M+Na)<sup>+</sup>、867.2 (M+K)<sup>+</sup>。参见图30。



[0916] 化合物27h:

[0917] 向搅拌的27g (9mg, 10.88μmol) 和2,5-二氧吡咯烷-1-基4-(吡啶-2-基二硫烷基)丁酸甲酯 (9.3mg, 0.023mmol) 在无水二氯甲烷 (0.4mL) 的溶液中加入无水二异丙基乙胺 (9μL, 0.054mmol) 并将反应在室温搅拌过夜。用饱和氯化铵溶液淬灭混合物并用二氯甲烷萃取。用盐水洗涤萃取液, 用无水硫酸钠干燥并减压浓缩。残余物经制备反相HPLC纯化 (C18柱, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O)。将含有产物的级分合并, 用二氯甲烷萃取及蒸发得到化合物27h (5mg, 44%)。MS (m/z), 计算值1064.3 (M+Na)<sup>+</sup>; 实测值1064.1 (M+Na)<sup>+</sup>、1082.1 (M+H<sub>2</sub>O+Na)<sup>+</sup>、1098.1 (M+H<sub>2</sub>O+K)<sup>+</sup>。参见图30。

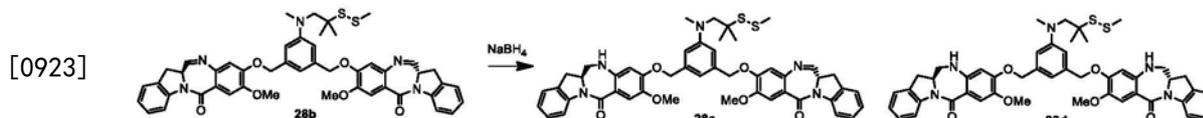
[0918] 实施例17



[0920] 化合物28b:

[0921] 将(5-(甲基(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)氨基)-1,3-亚苯基)二甲醇(52 mg, 0.172mmol)溶于无水二氯甲烷(1.7mL)中并在丙酮/冰浴中冷却至-5。首先,加入三乙胺(0.120mL,0.862mmol),随后加入甲磺酰氯(0.040mL,0.517 mmol)。将混合物在水浴中搅拌1小时。然后用冷乙酸乙酯稀释反应物并用冷水洗涤三次,然后经无水硫酸镁干燥。过滤二甲磺酸酯,真空浓缩并置于高真空下直至完全干燥。将产物直接用于下一步骤。

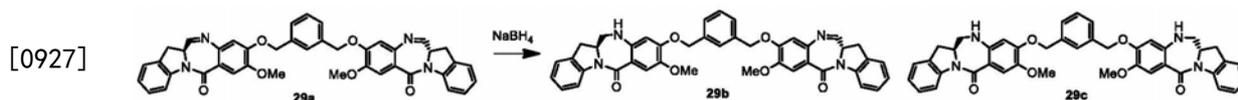
[0922] 将IBD单体(115mg,0.39mmol)的无水N,N-二甲基甲酰胺(1.5mL)在环境温度下加入至(5-(甲基(2-(甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)氨基)-1,3-亚苯基)双(亚甲基)二甲磺酸酯(72mg,0.156mmol)。加入碳酸钾(108mg,0.780mmol)并将反应物在环境温度下搅拌20小时。在搅拌下将水(10mL)直接加入至混合物中,导致形成白色沉淀。过滤混合物并将固体用另外部分的水洗涤。然后将固体溶于二氯甲烷,用水萃取,然后将有机层经无水硫酸钠干燥,过滤并真空浓缩得到化合物28b(104mg,78%),其直接用于下一步骤无需进一步处理。MS(m/z),实测值912.1(M+2H<sub>2</sub>O+Na)。参见图31。



[0924] 化合物28c和28d:

[0925] 将化合物28b(55mg,0.064mmol)溶解于二氯甲烷(0.4mL)和乙醇(0.8mL)的无水混合物中并在冰浴中冷却至0℃。然后加入溶解于乙醇(100μl)的硼氢化钠(0.731mg,0.019mmol)溶液,并将混合物搅拌5分钟及除去冰浴。将反应物搅拌2小时,在低温下通过加入饱和氯化铵和二氯甲烷淬灭,分离并用盐水洗涤有机层,经无水硫酸钠干燥,过滤并真空浓缩。将残余物通过半制备RP-HPLC(C18,A=去离子水B=ACN,20mL/min)纯化。将含有所需产物的级分用二氯甲烷萃取并浓缩,得到单亚胺28c(19mg,32%)MS(m/z),预期值:855.1,实测值:896.2(M+H<sub>2</sub>O+Na)和二次还原胺28d(22mg,38%)MS(m/z),预期值:857.1,实测值:880.2(M+Na)<sup>+</sup>。参见图31。

[0926] 实施例18

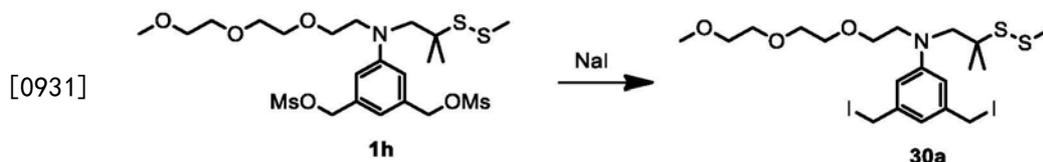


[0928] 化合物29b和29c:

[0929] 将化合物29a(60mg,0.043mmol)溶解于二氯甲烷(0.25mL)和乙醇(0.5 mL)的无水混合物中并在冰浴中冷却至0℃。然后加入溶解于乙醇(50μL)的硼氢化钠(0.493mg,0.013mmol)溶液,并将混合物搅拌5分钟及除去冰浴。将反应物搅拌3小时,在低温下通过加入饱和氯化铵和二氯甲烷淬灭,分离并用盐水洗涤有机层,经无水硫酸钠干燥,过滤并真空浓缩。将残余物通过半制备RP-HPLC(C18,A=去离子水B=ACN,20mL/min)纯化。将含有所需

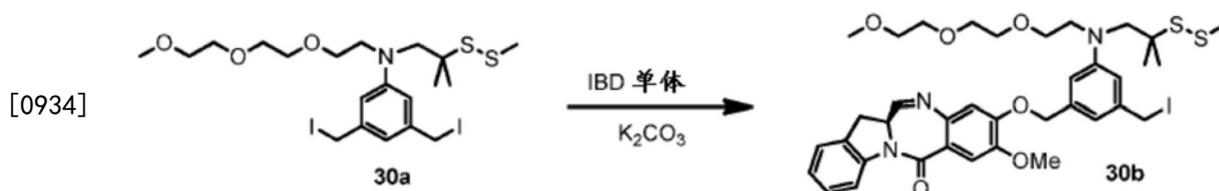
产物的级分用二氯甲烷萃取并浓缩得到单亚胺29b (20mg, 33%) MS (m/z), 预期值: 715.7, 实测值: 715.2 (M+Na)<sup>+</sup>, 733.2 (M+H<sub>2</sub>O+Na)<sup>+</sup>, 749.2 (M+H<sub>2</sub>O +K)<sup>+</sup>和二次还原胺29c (12mg, 20%) MS (m/z), 预期值: 694.7, 实测值: 717.2 (M+Na)<sup>+</sup>。参见图32。

[0930] 实施例19



[0932] 化合物30a:

[0933] 将(5-((2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)氨基)-1,3-亚苯基)双(亚甲基)二甲磺酸酯(0.566g, 0.960mmol)溶于丙酮(30 mL)并在剧烈搅拌下加入溶于丙酮(2毫升)的碘化钠(0.544g, 3.63mmol)。通过tlc(50%乙酸乙酯的己烷溶液)监测反应并在2小时后过滤反应物,真空浓缩并向残余物中加入二氯甲烷。将留下的固体盐过滤,浓缩滤液,并将所得残余物在硅胶上用3:5:2乙酸乙酯:己烷:二氯甲烷的混合物纯化得到黄色油状物3,5-二(碘甲基)-N-(2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)-N-(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)苯胺(0.505g, 0.773mmol, 74.5%收率)。<sup>1</sup>H NMR(400Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ6.75(s, 2H), 6.73(s, 1H), 4.38(s, 4H), 3.63(m, 14H), 3.40(s, 3H), 2.50(s, 3H), 1.38(s, 6H); <sup>13</sup>C NMR(400Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ148.7, 140.3, 117.3, 113.4, 71.9, 70.7, 70.6, 67.2, 59.8, 59.1, 53.5, 53.4, 51.8, 26.5, 25.6, 6.11; MS (m/z), 计算值676.0 (M+Na)<sup>+</sup>; 实测值675.8 (M+Na)<sup>+</sup>。参见图33。



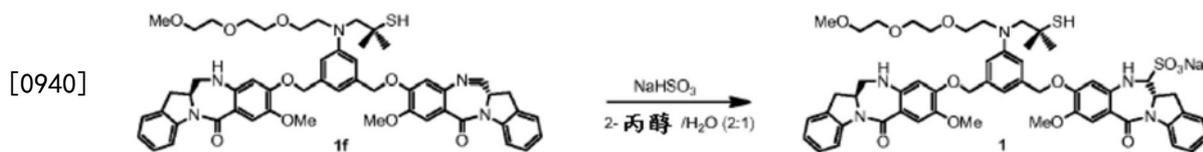
[0935] 化合物30b:

[0936] 将IBD单体(0.060g, 0.204mmol)溶于小瓶的丙酮(4ml)中,加入搅拌棒,然后加入3,5-二(碘甲基)-N-(2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)-N-(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)苯胺(0.167g, 0.255mmol)和碳酸钾(0.070g, 0.510 mmol)。将小瓶密封并在室温下搅拌过夜。滤出固体并浓缩滤液。将残余物溶于二氯甲烷,用水萃取,及将有机层经无水硫酸钠干燥,过滤并真空浓缩得到108mg粗品。将粗品在硅胶上纯化,使用30%乙酸乙酯以除去二碘代原料随后10%甲醇的二氯甲烷洗脱,得到所需产物30b(21mg, 0.026mmol, 13%)。MS (m/z), 预期值: 819.1, 实测值: 858.0 (M+K)<sup>+</sup>, 890.0 (M+CH<sub>3</sub>OH +K)<sup>+</sup>。参见图33。

[0937] 化合物1d:

[0938] 将还原的单体3b(4.16mg, 0.014mmol)溶于小瓶丙酮(2ml)中,加入搅拌棒,然后加入30b(10mg, 0.012mmol)和碳酸钾(4.21mg, 0.030mmol)。将小瓶密封并在室温下搅拌过夜。将反应物浓缩以除去丙酮及然后再溶于二氯甲烷,用水萃取,经无水硫酸钠干燥,过滤,并真空浓缩。将残余物通过反相C18 HPLC纯化得到1d(2.1mg, 2.125μmol, 17.42%收率)。MS (m/z): 实测值1010.4 (M+Na)<sup>+</sup>, 1028.4 (M+H<sub>2</sub>O+Na)<sup>+</sup>。参见图33。

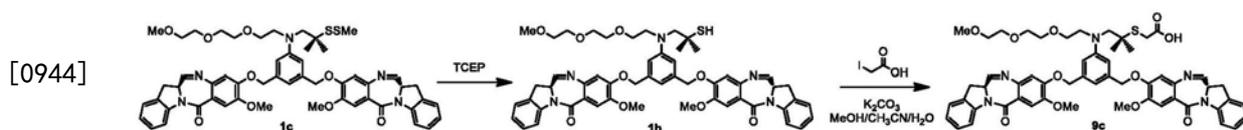
[0939] 实施例20化合物1的合成



[0941] 化合物1:

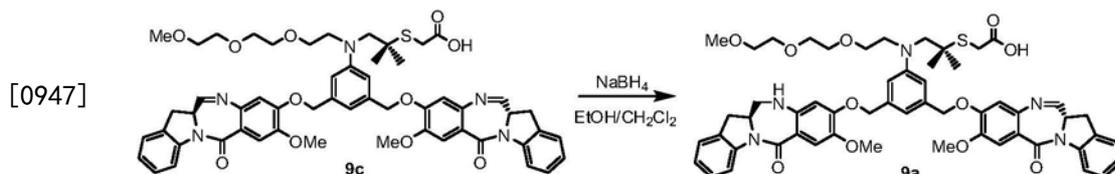
[0942] 向搅拌的1f (226mg, 0.24mmol) 在IPA (20mL) 和去离子水 (10mL) 的悬浮液中加入亚硫酸氢钠 (50mg, 0.48mmol)。将混合物在rt下剧烈搅拌2小时。用干冰/丙酮将其冷冻并冻干。将所得白色蓬松固体溶解于CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 中, 并通过反相HPLC纯化 (C18柱, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O)。将含有所需产物的级分合并并用干冰/丙酮浴冷冻并冻干得到白色蓬松固体状所需化合物1 (179.6 mg, 5=71.6%)。MS (m/z): 实测值1022.0 (M-H)<sup>-</sup>。参见图38。

[0943] 实施例21化合物9c的合成



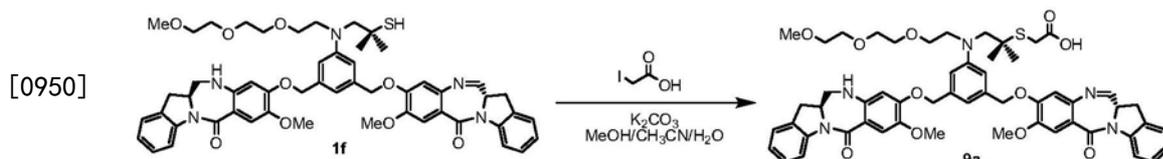
[0945] 化合物9c:

[0946] 向搅拌的1c (60mg, 0.061mmol) 在CH<sub>3</sub>CN (3mL) 的溶液中加入新制备的TCEP溶液 (将49mg, 0.17mmol TCEP的盐酸盐用饱和碳酸氢钠中和至pH~6.5, 然后用0.5mL pH 6.5的磷酸盐缓冲液稀释)。加入MeOH (2.5mL) 并将混合物在室温下搅拌3小时。用二氯甲烷和去离子水稀释反应混合物, 分离并用盐水洗涤有机层, 经无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并过滤。将滤液脱溶剂 (stripped) 并抽高真空, 得到60mg浅黄色泡沫状的1h。MS (m/z): 实测值940.1 (M+H)<sup>+</sup>。将其溶于甲醇 (1.0mL) 和CH<sub>3</sub>CN (1.4mL), 然后加入碘乙酸 (24mg, 0.13 mmol)、去离子水 (0.1mL) 和碳酸钾 (27mg, 0.19mmol)。将混合物在rt下搅拌过夜 (通过LCMS监测)。将其用饱和氯化铵淬灭以使溶液为酸性, 然后用二氯甲烷稀释, 分离并用盐水洗涤, 经无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并脱溶剂, 得到化合物9c (57.8mg, y=91%) , 其无需纯化而直接用于下一步骤。MS (m/z): 实测值998.1 (M+H)<sup>+</sup>。参见图12A。



[0948] 化合物9a:

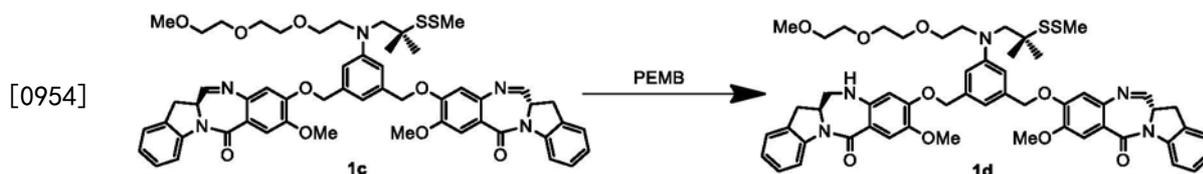
[0949] 在0℃下, 向搅拌的化合物9c (57.8mg, 0.058mmol) 在无水二氯甲烷 (0.2 mL) 和无水乙醇 (0.6mL) 的溶液中加入NaBH<sub>4</sub> (2.5mg, 0.066mmol)。除去冰浴, 并将混合物在室温下搅拌3小时, 然后用饱和氯化铵淬灭, 用二氯甲烷稀释, 分离并将有机层用盐水洗涤, 经无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 通过硅藻土过滤并脱溶剂。将残余物通过反相HPLC纯化 (C18柱, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O)。将产物级分用二氯甲烷萃取并脱溶剂, 得到化合物9a (13.0mg, y=22%)。MS (m/z): 实测值1000.0 (M+H)<sup>+</sup>, 1015.9 (M+H<sub>2</sub>O-H)<sup>-</sup>。参见图12A。



[0951] 化合物9a:

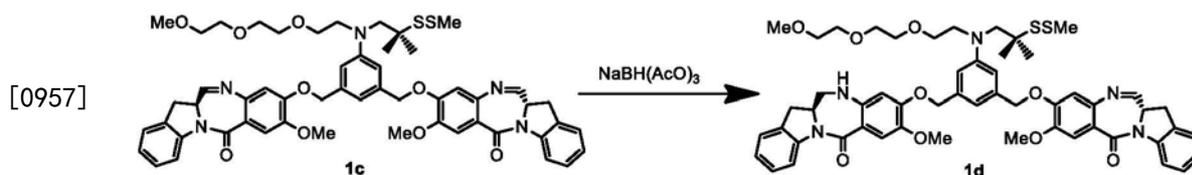
[0952] 向游离的硫醇1f (45mg, 0.048mmol) 和碘乙酸 (18mg, 0.096mmol) 在甲醇 (1.0mL) 和  $\text{CH}_3\text{CN}$  (1.4mL) 的溶液加入去离子水 (0.1mL) 和碳酸钾 (20mg, 0.14mmol)。将混合物在rt下搅拌过夜 (通过LCMS监测)。将其用饱和氯化铵淬灭以使溶液为酸性, 然后用二氯甲烷稀释, 分离并用盐水洗涤, 经无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥, 过滤并脱溶剂。将残余物通过制备反相HPLC纯化 (C18柱,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ )。将纯产物级分 (基于MS) 用二氯甲烷萃取, 脱溶剂得到所需酸 9a (18mg,  $y=38\%$ )。MS (m/z): 实测值1000.1 (M+H)<sup>+</sup>。参见图12B。

[0953] 实施例22化合物1d的合成



[0955] 化合物1d:

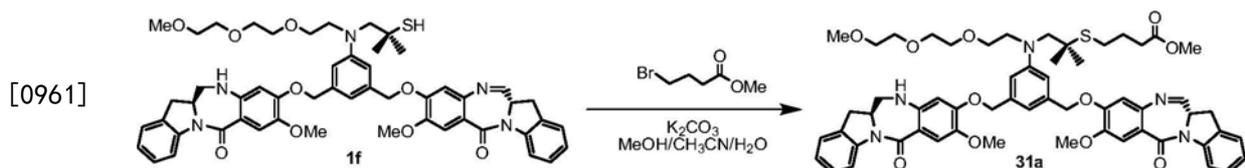
[0956] 向搅拌的化合物1c (178mg, 0.18mmol) 在无水二氯甲烷 (1.2mL) 和无水乙醇或无水甲醇 (0.1mL) 的溶液中逐滴加入5-乙基-2-甲基吡啶硼烷 (PEMB, 0.017mL, 0.11mmol)。将混合物在rt下搅拌1小时并用88%甲酸淬灭。用饱和  $\text{NaHCO}_3$  碱化并用二氯甲烷稀释, 分离并将有机层用盐水洗涤, 经无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥, 通过硅藻土过滤并脱溶剂。将残余物溶于  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/88\% \text{HCOOH}$  (5:1:0.05) 并通过反相HPLC纯化 (C18,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ )。将含有纯产物的级分用二氯甲烷萃取并脱溶剂, 得到化合物1d (56mg,  $y=31\%$ )。MS (m/z): 实测值988.1 (M+H)<sup>+</sup>。参见图39。



[0958] 化合物1d:

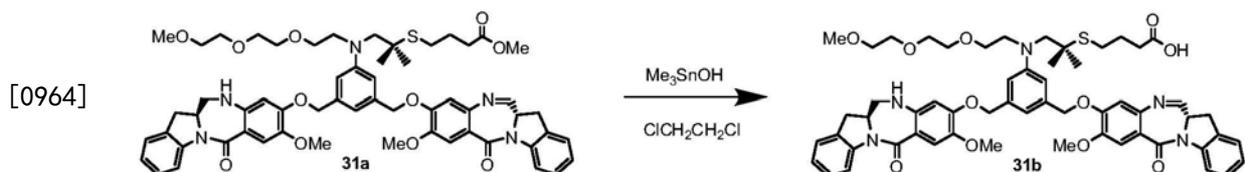
[0959] 向搅拌的化合物1c (71mg, 0.072mmol) 在无水1,2-二氯乙烷 (0.8mL) 的溶液中加入三乙酰氧基硼氢化钠 (14mg, 0.65mmol)。将混合物在rt下搅拌2小时, 用饱和  $\text{NaHCO}_3$  淬灭并用二氯甲烷稀释, 分离并将有机层用盐水洗涤, 经无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥并通过硅藻土过滤并脱溶剂。将残余物溶于  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/88\% \text{HCOOH}$  (5:1:0.05) 并通过反相HPLC纯化 (C18,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ )。将含有纯产物的级分用二氯甲烷萃取并脱溶剂得到化合物 1d (17mg,  $y=24\%$ )。MS (m/z): 实测值988.1 (M+H)<sup>+</sup>。未反应的起始材料1c 也得到了回收 (24mg,  $y=34\%$ )。参见图40。

[0960] 实施例23化合物31c的合成



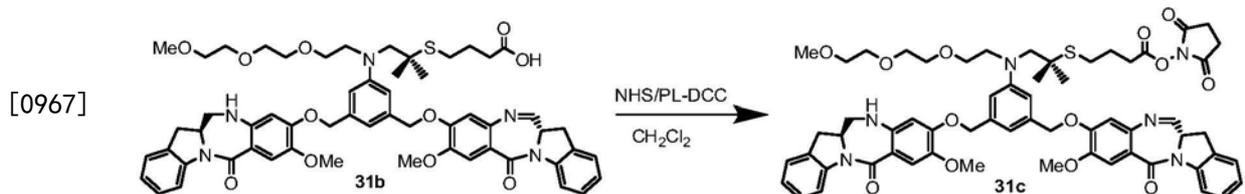
[0962] 化合物31a:

[0963] 向化合物1f (57.8mg, 0.061mmol) 和甲基4-溴丁酸酯 (22mg, 0.12mmol) 在甲醇 (1.0mL) 和CH<sub>3</sub>CN (1.0mL) 的溶液中加入去离子水 (0.1mL) 和碳酸钾 (17mg, 0.12mmol)。将混合物在rt下搅拌过夜, 然后用饱和氯化铵淬灭并用二氯甲烷稀释, 分离并用盐水洗涤, 经无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并脱溶剂。将残余物通过制备反相HPLC (C18, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) 纯化, 得到淡黄色泡沫状的所需产物31a (14mg, y=22%)。MS (m/z): 实测值1042.1 (M+H)<sup>+</sup>。参见图41。



[0965] 化合物31b:

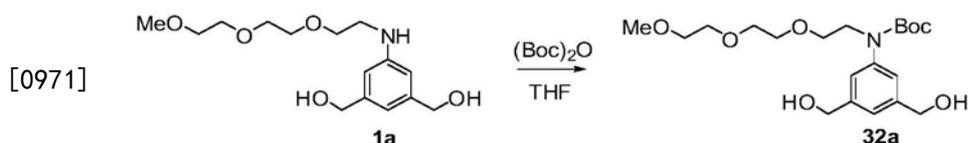
[0966] 向该甲酯31a (14mg, 0.013mmol) 在无水1,2-二氯乙烷 (1.5mL) 的溶液中加入三甲基氢氧化锡 (36mg, 0.2mmol)。将混合物在80℃油浴中搅拌过夜直至起始材料完全消耗。将其冷却至室温, 用二氯甲烷稀释, 用盐水/数滴5% HCl和盐水洗涤, 干燥并过滤。将滤液脱溶剂, 并用硅胶色谱 (二氯甲烷/MeOH) 纯化, 得到浅黄色固体状酸31b (10.2mg, y=74%)。MS (m/z): 实测值1028.2 (M+H)<sup>+</sup>, 1044.1 (M+H<sub>2</sub>O-H)<sup>-</sup>。参见图41。



[0968] 化合物31c:

[0969] 向酸31b (10.2mg, 0.0099mmol) 在无水二氯甲烷 (0.5mL) 的溶液中加入 N-羟基丁二酰亚胺 (3.4mg, 0.03mmol) 和PL-DCC (26mg, 0.04mmol, 1.55 mmol/g)。将混合物在室温下搅拌过夜并过滤以除去树脂。将树脂用二氯甲烷洗涤, 然后用乙酸乙酯洗涤。将滤液脱溶剂并将残余物通过反相HPLC纯化 (C18, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O)。将含有产物的级分合并并冻干, 得到白色固体状的 NHS酯31c (3.6mg, y=32%)。MS (m/z): 实测值1125.1 (M+H)<sup>+</sup>。参见图 41。

[0970] 实施例24化合物32c的合成



[0972] 化合物32a:

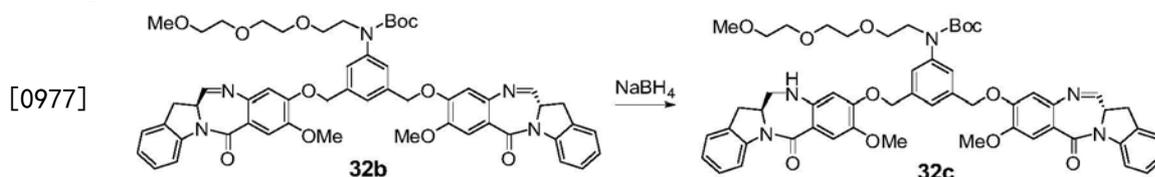
[0973] 向搅拌的苯胺1a (339mg, 1.1mmol) 在无水四氢呋喃 (4.0mL) 的溶液中加入Boc酸酐 (272mg, 1.2mmol)。将该混合物在室温下继续搅拌三天。将反应混合物减压浓缩并将残余物通过硅胶色谱纯化 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH), 得到无色油状的化合物32a (405mg, y=90%)。<sup>1</sup>H NMR

(400Hz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.00 (s, 2H), 6.97 (s, 1H), 4.38 (s, 4H), 4.12 (s, 2H), 3.64 (t,  $J=5.6\text{Hz}$ , 2H), 3.48-3.44 (m, 8H), 3.40-3.38 (m, 2H), 3.21 (s, 3H), 1.31 (s, 9H);  $^{13}\text{C}$  NMR (400Hz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  154.65, 142.3, 142.1, 124.1, 122.7, 80.2, 71.6, 70.3, 70.1, 69.9, 68.5, 63.9, 58.65, 49.4, 28.1. 参见图42。



[0975] 化合物32b:

[0976] 在 $-5\sim-10^\circ\text{C}$ 下,向搅拌的化合物32a (51mg, 0.128mmol) 在无水二氯甲烷的溶液中加入三乙胺 (0.053mL, 0.383mmol)。然后在15分钟内用注射器缓慢加入甲磺酰氯 (0.026mL, 0.332mmol)。将混合物在 $-5-10^\circ\text{C}$ 下搅拌1小时 (TLC, DCM/MeOH 10:1)。将反应物用冰/水淬灭,用冷AcOEt稀释,分离并将有机层用冷水洗涤,经无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{MgSO}_4$ 干燥,过滤并脱溶剂。将残余物用二氯甲烷转移至小反应烧瓶中,脱溶剂并抽高真空。将其溶于无水DMF (0.8 mL),然后加入IBD单体 (90mg, 0.31mmol) 和钾 (53mg, 0.38mmol)。将混合物在rt下搅拌过夜。将其用二氯甲烷稀释,用盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并脱溶剂。将残余物通过反相HPLC纯化 ( $\text{C}18, \text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ),得到淡黄色固体状的化合物32b (56mg, 46%)。%。 $^1\text{H}$  NMR (400Hz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.29 (d,  $J=8.0\text{Hz}$ , 2H), 7.87 (d,  $J=4.8\text{Hz}$ , 2H), 7.60 (s, 2H), 7.38-7.36 (m, 3H), 7.33-7.27 (m, 4H), 7.13 (t,  $J=7.6\text{Hz}$ , 2H), 6.88 (s, 2H), 5.21 (dd,  $J_1=20.0\text{Hz}, J_2=12.4\text{Hz}$ , 4H), 4.49 (dt,  $J_1=11.2\text{Hz}, J_2=4.0\text{Hz}$ , 2H), 3.99 (s, 6H), 3.83 (t,  $J=6.0\text{Hz}$ , 2H), 3.76-3.48 (m, 14H), 3.35 (s, 3H), 1.43 (s, 9H); MS ( $m/z$ ): 实测值 992.2 ( $\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{Na}$ ) $^+$ , 1010.2 ( $\text{M}+2\text{H}_2\text{O}+\text{Na}$ ) $^+$ 。参见图42。



[0978] 化合物32c:

[0979] 在 $0^\circ\text{C}$ 下,向搅拌的化合物32b (56mg, 0.059mmol) 在无水二氯甲烷 (0.3 mL) 和无水乙醇 (0.9mL) 的溶液中加入 $\text{NaBH}_4$  (2.7mg, 0.07mmol)。除去冰浴,并将混合物在室温下搅拌3小时,然后用饱和氯化铵淬灭,用二氯甲烷稀释,分离并将有机层用盐水洗涤,经无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,通过硅藻土过滤并脱溶剂。将残余物通过反相HPLC纯化 ( $\text{C}18$ 柱,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ )。回收的起始材料 32b重量为12mg,使其再经受还原条件并通过反相HPLC纯化。将含有纯产物的所有级分用二氯甲烷萃取并脱溶剂,得到浅黄色固体状的化合物 32c (20.7mg,  $y=37\%$ )。MS ( $m/z$ ): 实测值954.2 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ 。参见图42。

[0980] 实施例25

[0981] 在雌性CD-1小鼠中研究huMy9-6缀合物的耐受性。在研究开始前观察动物七天,发现没有疾病或病症。给小鼠施用单次静脉注射缀合物,并且每天监测动物的体重降低、发病率或死亡率。表10示出huMy9-6-SPDB-1c含有二亚胺二硫化物的缀合物在剂量低于 $300\mu\text{g}/\text{kg}$ 时是耐受的。相比之下,发现单亚胺二硫化物缀合物huMy9-6-SPDB-1f和huMy9-6-磺基-

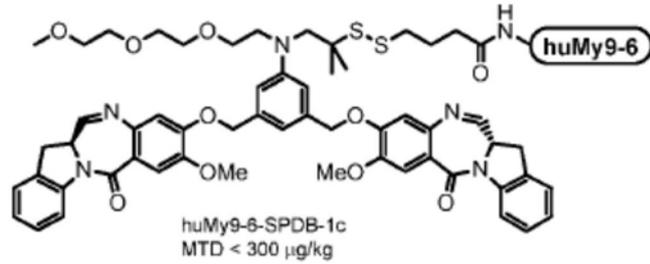
SPDB-1f具有更好的耐受性,它们的最大耐受剂量分别 $>729\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $<750\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0982] 表10. (A) huMy9-6-SPDB-1c, (B) huMy9-6-SPDB-1f, (C) huMy9-6-磺基-SPDB-1f, 和 (D) huMy9-6-BMPS-1f缀合物的耐受性比较数据。

[0983] A)

剂量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	存活%
100	100
300	50
500	0
700	0

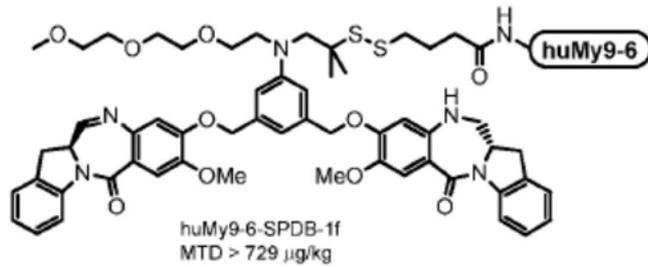
[0984]



[0985] B)

剂量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	存活%
405	100
567	100
729	100

[0986]



[0987] C)

剂量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	存活%
450	100
600	100
750	88
900	50

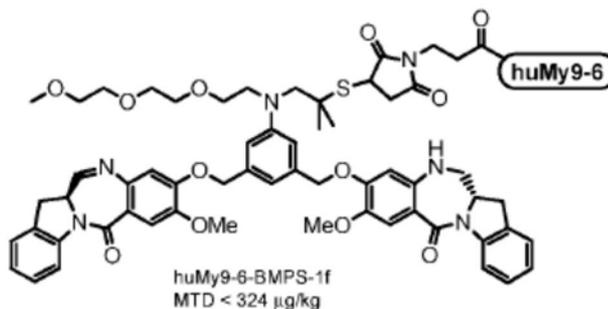
[0988]



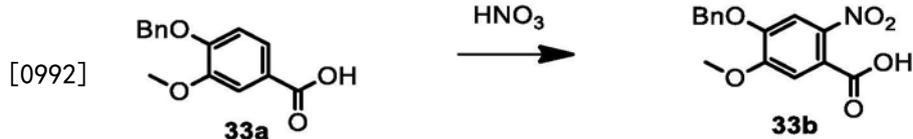
[0989] D)

剂量 (ug/kg)	存活%
100	100
200	100
284	100
324	83
405	50

[0990]



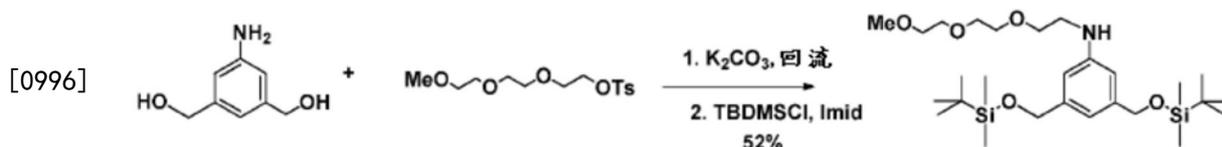
[0991] 实施例26



[0993] 化合物33b:

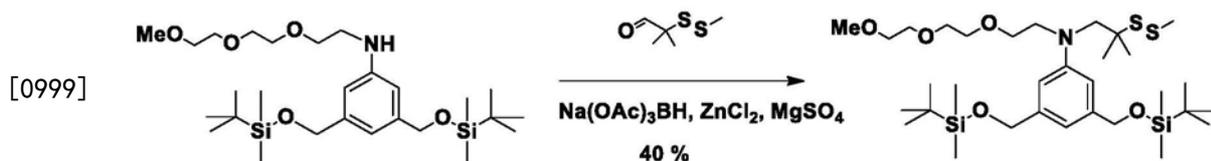
[0994] 加入化合物33a (20g, 77mmol) 在无水二氯甲烷 (100mL) 中的浓稠悬浮液并冷却至0℃。加入乙酸 (191mL), 得到澄清的溶液, 将该溶液在0℃下搅拌直至冷却。通过加料漏斗逐滴缓慢加入硝酸 (26mL, 581mmol)。除去冰浴并将溶液在室温下继续搅拌。3小时后, 将反应物用去离子水稀释并用二氯甲烷萃取。将有机层用盐水洗涤, 经无水硫酸镁干燥并将滤液真空浓缩。将粗残余物用乙酸乙酯和己烷重结晶。将固体过滤并用己烷洗涤得到黄色蓬松固体状的化合物33b (13.8g,  $y=59\%$ )。 $^1\text{H NMR}$  (400Hz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ 7.48-7.43 (m, 6H), 7.25 (s, 1H), 5.25 (s, 2H), 4.02 (s, 3H), MS (m/z): 326.1 (M+Na) $^+$ 。参见图45。

[0995] 实施例27



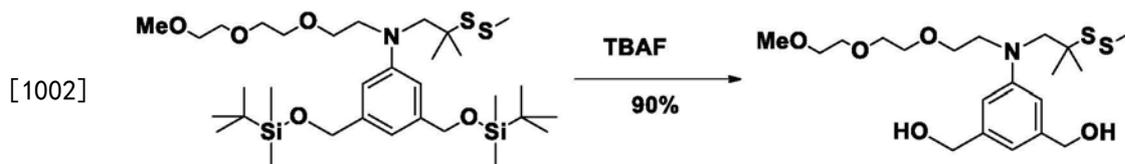
[0997] 3,5-双(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-N-(2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)苯胺:

[0998] 将(5-氨基-1,3-亚苯基)二甲醇 (11.78g, 77mmol)、4-甲基苯磺酸2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基酯 (15.3g, 48.1mmol) 和碳酸钾 (13.28g, 96mmol) 在DMF (96ml) 中的溶液的混合物回流20小时。将反应物冷却至环境温度并用二氯甲烷稀释。将混合物通过硅藻土过滤并真空浓缩。将所得橙色油状物溶于二氯甲烷 (240ml) 并加入叔丁基二甲基氯硅烷 (18.09g, 120mmol) 和咪唑 (9.80g, 144mmol)。将反应物在环境温度下搅拌20小时, 此时, 用二氯甲烷稀释并通过硅藻土过滤。通过硅胶色谱 (EtOAc/Hex) 纯化得到3,5-双(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-N-(2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)苯胺 (13g, 52%)。 $^1\text{H NMR}$  (400Hz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ 6.52 (s, 1H), 6.40 (s, 2H), 4.56 (s, 4H), 3.60 (t, 2H,  $J=5.2\text{Hz}$ ), 3.56 (m, 6H), 3.46 (m, 2H), 3.29 (s, 3H), 3.20 (t, 2H,  $J=5.2\text{Hz}$ ), 0.84 (s, 18H), 0.00 (s, 12H)。MS (m/z): 实测值550.1 (M+Na) $^+$ 。参见图46。



[1000] 3,5-双(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-N-(2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)-N-(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)苯胺:

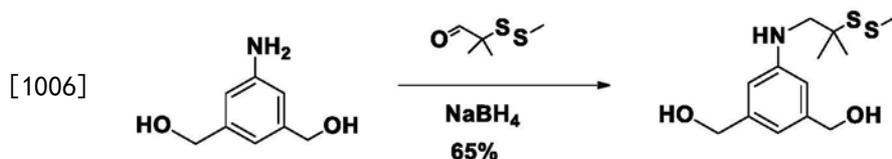
[1001] 向3,5-双(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-N-(2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)苯胺(6.7g,12.69mmol)在无水1,2-二氯乙烷(50ml)的溶液中加入2-(甲基二硫代)异丁醛(2.74ml,19.04mmol)、三乙酰氧基硼氢化钠(2.8g,1当量)、锌(II)氯化物(0.865g,6.35mmol)和硫酸镁(2.292g,19.04mmol)。将混合物在环境温度下搅拌5小时。加入三乙酰氧基硼氢化钠(2.8g,1当量)。将反应物在环境温度下继续搅拌20小时。将混合物通过硅藻土过滤,用二氯甲烷冲洗,并减压浓缩,然后用乙酸乙酯和水萃取。将有机萃取物用盐水洗涤,经硫酸镁干燥,过滤,浓缩并通过combiflash(EtOAc/Hex)纯化得到3,5-双(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-N-(2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)-N-(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)苯胺(3.5g,40%)。<sup>1</sup>H NMR(400Hz, CDC13): $\delta$ 6.73(s,2H),6.59(s,1H),4.56(s,4H),3.65-3.51(m,14H),3.30(s,3H),2.38(s,3H),1.28(s,6H),0.84(s,18H),0.00(s,12H)。MS(m/z):实测值684.2(M+Na)<sup>+</sup>。参见图46。



[1003] (5-((2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)氨基)-1,3-亚苯基)二甲醇(1b):

[1004] 将氟化四丁铵(1M在THF中)(10.57ml,10.57mmol)逐滴加入至0℃冰浴中搅拌的3,5-双(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-N-(2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)-N-(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)苯胺(3.5g,5.29mmol)在无水THF(65ml)的溶液中。添加之后,将混合物在环境温度下搅拌两小时。用饱和氯化铵溶液淬灭混合物并用乙酸乙酯萃取。将萃取物用水和盐水洗涤,用硫酸镁干燥,过滤并减压浓缩。通过硅胶色谱(MeOH/DCM)纯化得到(5-((2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)氨基)-1,3-亚苯基)二甲醇(2g,87%)。<sup>1</sup>H NMR(400Hz,CDC13): $\delta$ 6.76(s,2H),6.63(s,1H),4.55(s,4H),3.65-3.51(m,14H),3.35(s,3H),2.44(s,3H),1.33(s,6H);<sup>13</sup>C NMR(400Hz,CDC13): $\delta$ 149.0,142.35,114.0,111.1,71.98,70.7,70.6,70.5,67.6,65.5,59.75,59.1,53.9,51.9,26.6,25.7,20.75;MS(m/z):实测值456.2(M+Na)<sup>+</sup>。参见图46。

[1005] 实施例28

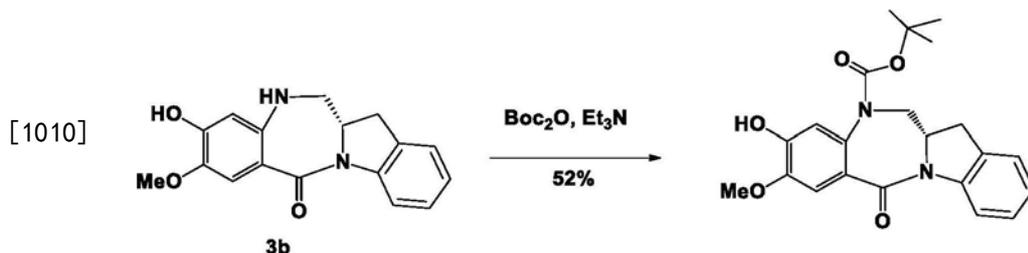


[1007] (5-(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙胺基)-1,3-亚苯基)二甲醇:

[1008] 在环境温度下将(5-氨基-1,3-亚苯基)二甲醇(2.5g,16.32mmol)和2-(甲基二硫

代) 异丁醛 (2.347ml, 16.32mmol) 在无水乙醇 (82ml) 中搅拌直至完全溶解 (3小时)。将混合物在冰浴中冷却至0℃并加入硼氢化钠 (0.741g, 19.59mmol)。将该反应在0℃下搅拌1小时, 然后缓慢地用冷5% HCl溶液淬灭。将混合物用二氯甲烷稀释并用饱和碳酸氢钠溶液将pH调节至pH=8然后用二氯甲烷萃取及用盐水洗滌。将有机萃取物经无水硫酸钠干燥、过滤并减压浓缩。通过硅胶色谱 (MeOH/DCM) 纯化得到白色固体状的 (5-(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基氨基)-1,3-亚苯基) 二甲醇 (3g, 65%)。<sup>1</sup>H NMR (400Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ6.62 (s, 1H), 6.54 (s, 2H), 4.53 (s, 4H), 3.13 (s, 2H), 2.30 (s, 3H), 1.32 (s, 6H)。参见图 47。

[1009] 实施例29

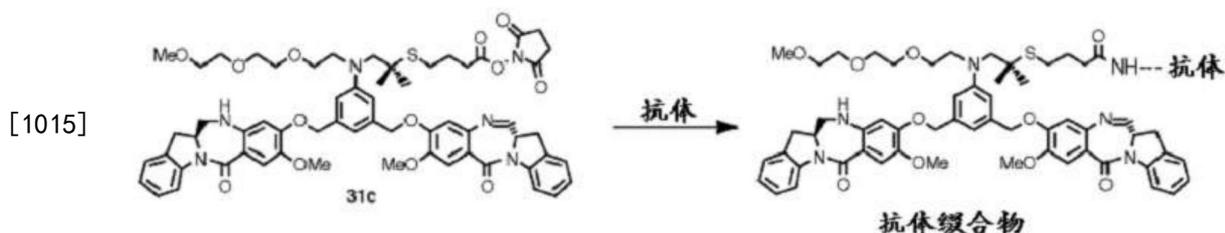


[1011] 9-羟基-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘[1,2-a]吡啶-11(12H)-羧酸叔丁酯:

[1012] 向9-羟基-8-甲氧基-11,12,12a,13-四氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘[1,2-a]吡啶-6-酮3b (0.3g, 1.012mmol) 在甲醇 (5.06ml) 的溶液中加入二碳酸二叔丁酯 (0.265g, 1.215mmol)、三乙胺 (0.212ml, 1.519mmol) 和DMAP (6.18mg, 0.051mmol)。在环境温度下搅拌5小时后, 将反应混合物真空浓缩。将残余物再溶于二氯甲烷并通过硅藻土过滤。通过硅胶色谱 (20% EtOAc/DCM) 纯化得到白色固体状的9-羟基-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘[1,2-a]吡啶-11(12H)-羧酸叔丁酯 (0.21g, 52%)。<sup>1</sup>H NMR (400Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ8.25 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.18 (t, J=7.2Hz, 1H), 7.11 (d, J=7.2Hz, 1H), 6.98 (t, J=7.2Hz, 1H), 6.39 (s, 1H), 4.37 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.42 (m, 3H), 2.74 (dd, J=3.6, 16.4Hz, 1H), 1.47 (s, 9H)。参见图48。

[1013] 实施例30

[1014] huMy9-6-31c的制备和测试



[1016] 将含有2.0mg/mL的huMy9-6抗体和5摩尔当量的化合物31c (用5倍过量的亚硫酸氢钠于90:10DMA:水中预处理) 在50mM HEPES (4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸) pH 8.5缓冲液和10% v/v DMA (N,N-二甲基乙酰胺) 助溶剂的反应物在25℃下缀合6小时。反应后, 使用NAP脱盐柱 (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare) 来纯化缀合物, 并将缓冲液更换为250mM甘氨酸、10mM组氨酸、1%蔗糖、0.01% Tween-20、50μM亚硫酸氢钠制剂缓冲液, pH 6.2。在相同缓冲液中在室温下利用Slide-a-Lyzer透析盒 (ThermoScientific 20, 000MWC0) 进行4小时的透析。

[1017] 发现纯化的缀合物具有平均3.1个IGN分子连接于每个抗体(通过紫外-可见,对1使用摩尔消光系数 $\epsilon_{330\text{nm}}=15,484\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 和 $\epsilon_{280\text{nm}}=30,115\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ,及对My9-6抗体, $\epsilon_{280\text{nm}}=207,000\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ )、98%单体(通过尺寸排阻色谱法), <0.2%未缀合药物(通过双柱反相HPLC分析)和最终0.4mg/ml的蛋白浓度。

[1018] 带有31c的huMy9-6缀合物在两种不同的药物负荷下的体外效能测量示于下文。两种缀合物对抗原阳性HL60-QC细胞具有高效能,它们的 $\text{IC}_{50}$ 值在1.3-1.8pM之间。用1 $\mu\text{M}$ 未缀合的huMy9-6阻断的抗原显著降低效能,这表明细胞毒性作用的抗原特异性。

[1019]	缀合物	$\text{IC}_{50}$ (pM)	$\text{IC}_{50}$ (pM) huMy9-6 阻断	特异性窗 口
	huMy9-6-31c			
	3.1 IGN/Ab	1.8	940	522
[1020]	3.9 IGN/Ab	1.3	790	608

[1021] 实施例31

[1022] 各种缀合物在具有肿瘤的裸鼠中的体内效力

[1023] 在本研究中,本发明若干缀合物的抗肿瘤活性在免疫缺陷小鼠(裸鼠或 SCID),优选具有各种肿瘤的雌性裸鼠中进行研究。在一些情况下,除此之外或作为替代,可以使用裸大鼠。待测试的缀合物包括本文所述的任一种或多种缀合物。可用于接种裸鼠的各种肿瘤细胞系包括HL60/QC、MOLM-13、NB4、HEL92.1.7、OCI-AML3、KB,和/或本领域认为用于疾病指示的任何其它癌细胞系(如,癌症)。可用于选择适于体内评估的肿瘤细胞系的一些标准包括:a)肿瘤细胞上靶抗原的表达,和,b)肿瘤细胞对未缀合药物的体外的敏感性。例如,体外细胞系敏感性筛选,诸如60-细胞系筛选描述于美国国家癌症研究所(参见Voskoglou-Nomikos等人,2003,Clinical Cancer Res.9; 42227-4239,其通过引入并入本文)可被用作指南之一,以确定可适合于用本发明的化合物进行治疗的癌症类型。对各种缀合物对各种肿瘤细胞系的效能(由 $\text{IC}_{50}$ 值(nM)表示)进行了相应的测量。

[1024] 使用与实施例15概述的基本相同的方案,将各种肿瘤细胞系接种于裸鼠或SCID小鼠。例如,将约 $1 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$ 个肿瘤细胞(通常 $1 \times 10^7$ 个细胞/小鼠)以0.1-0.2mL/小鼠的体积皮下接种至6周龄的雌性无胸腺裸鼠的右肩区中。当肿瘤达到 $\sim 100\text{mm}^3$ 的平均大小时(通常在肿瘤细胞接种后6-8天),将小鼠根据肿瘤体积随机分组(如, $n=5-8$ 只/组)。随机化后第二天开始进行处理,且组包括以合适媒介物(200 $\mu\text{L}$ /注射)给药的对照组,或将上述参考的药物缀合物(50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 连接的剂量相当于约2mg/kg抗体剂量)以不同剂量(5至700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )的单次处理。也可使用多个给药方案(例如在第1、3、5天或1、4、7天进行处理)。

[1025] 测量中值和平均肿瘤体积对比时间,数据表明主题缀合物的剂量依赖性抗肿瘤活性。然后计算最低有效剂量并与最大耐受剂量相比较。

[1026] 实施例32

[1027] 使用4-硝基-磺基-SPDB连接子制备huMy9-6-磺基-SPDB-1d

[1028] 将含有6mg/mL的huMy9-6抗体和5摩尔当量的高反应性的N-琥珀酰亚胺基-4-(4-硝基吡啶基-2-二硫代)丁酸酯连接子(20mM在乙醇中的储备液)的反应在25 $^{\circ}\text{C}$ 下于50mM EPPS缓冲液(pH 8)中孵育3h。使用NAP脱盐柱(Illustra Sephadex G-25DNA级,GE Healthcare)除去未反应的连接子。基于抗体浓度和通过紫外-可见(对于2-硫代-4-硝基吡

啉酮,  $\epsilon_{394\text{nm}} = 14205\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) 的DTT-释放的硝基吡啶基-2-硫酮浓度, 连接子抗体比率 (LAR) 测定为约2.3。

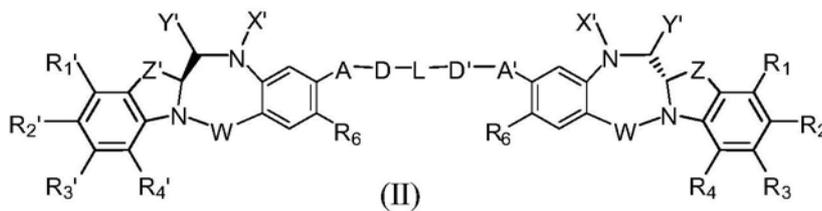
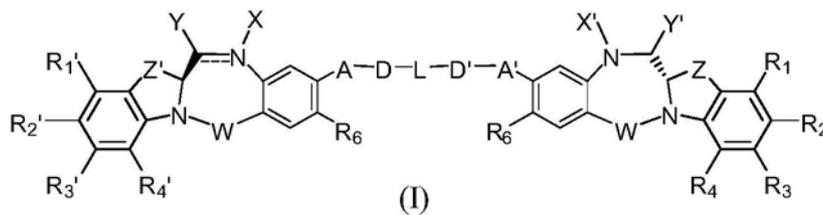
[1029] 将连接子修饰的huMy9-6在50mM HEPES缓冲液 (pH 8.5, 10% v/v DMA) 中稀释至2mg/mL, 并与2摩尔当量的化合物1d/连接子 (5mM在DMA中的储备液; 4.6当量/抗体) 在25°C下反应30分钟。通过监测在394nm下的紫外吸收的增加来确定二硫化物交换反应的完成。

[1030] 反应后, 使用脱盐柱 (G-25Sephadex, 细粒级, GE Healthcare) 来纯化缀合物, 将缓冲液更换为pH 6.2下的250mM甘氨酸、10mM组氨酸、1%蔗糖、0.01% Tween-20、50 $\mu\text{M}$ 亚硫酸氢钠。

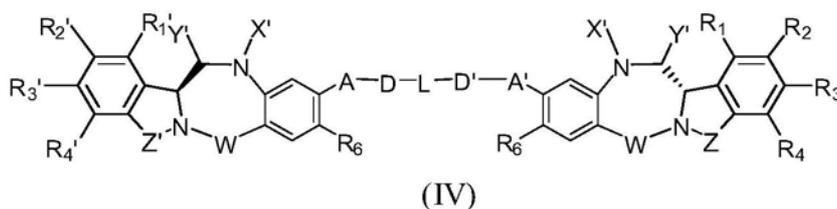
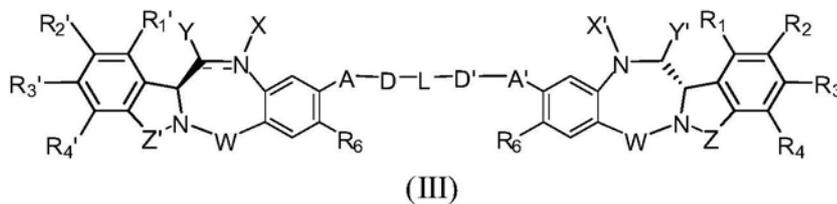
[1031] 发现纯化的缀合物具有平均每个抗体连接有2.1分子的1d (通过紫外-可见, 对1d使用摩尔消光系数  $\epsilon_{330\text{nm}} = 15,484\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  和  $\epsilon_{280\text{nm}} = 30,115\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ , 对huMy9-6,  $\epsilon_{280\text{nm}} = 207,000\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ )、98%单体 (通过尺寸排阻色谱法)、<1%未缀合的1d (用丙酮萃取/反相HPLC)、70%蛋白质产量和32%的1d的总收率。参见图60。

[1032] 本申请还涉及以下项目。

[1033] 1. 一种细胞毒性化合物, 其包含具有键合至其的反应性基团的能够将所述细胞毒性化合物共价连接于细胞结合剂 (CBA) 的连接基团, 其中所述细胞毒性化合物由下式中的任一者:



[1034]



[1035] 或其药学上可接受的盐表示,其中:

[1036] N和C之间的双线 $\equiv$ 表示单键或双键,条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H,或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基,而当其是单键时,X是-H,具有键合至其的反应性基团的连接基团或氨基保护部分;

[1037] Y是-H或离去基团,其选自-OR、-OCOR'、-OCOOR'、-OCONR'R''、-NR'R''、-NR'COR''、-NR'NR'R''、任选取代的5或6元含氮杂环(如,吡啶、四氢吡咯、吡唑、吗啉等)、由-NR'(C=NH)NR'R''表示的胍基、氨基酸或由-NRCOP'表示的肽,其中P'是氨基酸或含有2至20个氨基酸单元的多肽、-SR、-SOR'、-SO<sub>2</sub>M、-SO<sub>3</sub>M、-OSO<sub>3</sub>M、卤素、氰基和叠氮基;或

[1038] Y是亚硫酸盐(HSO<sub>3</sub>、HSO<sub>2</sub>或与阳离子形成的HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>、SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>或HSO<sub>2</sub><sup>-</sup>的盐),偏亚硫酸氢盐(H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>或与阳离子形成的S<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>2-</sup>的盐),单、二、三和四硫代磷酸盐(PO<sub>3</sub>SH<sub>3</sub>、PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>H<sub>2</sub>、POS<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、PS<sub>4</sub>H<sub>2</sub>或与阳离子形成的PO<sub>3</sub>S<sup>3-</sup>、PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>3-</sup>、POS<sub>3</sub><sup>3-</sup>或PS<sub>4</sub><sup>3-</sup>的盐),硫代磷酸酯(R<sup>i</sup>O)<sub>2</sub>PS(OR<sup>i</sup>)、R<sup>i</sup>S<sup>-</sup>、R<sup>i</sup>SO、R<sup>i</sup>SO<sub>2</sub>、R<sup>i</sup>SO<sub>3</sub>,硫代硫酸盐(HS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>或与阳离子形成的S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>的盐),连二亚硫酸盐(HS<sub>2</sub>O<sub>4</sub>或与阳离子形成的S<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>的盐),二硫代磷酸盐(P(=S)(OR<sup>k</sup>)(S)(OH)或其与阳离子形成的盐),异羟肟酸(R<sup>k</sup>C(=O)NOH或与阳离子形成的盐),甲醛次硫酸氢盐(HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>或与阳离子形成的HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>的盐,诸如HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>Na<sup>+</sup>)或其混合物,其中R<sup>i</sup>是具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被选自-N(R<sup>j</sup>)<sub>2</sub>、-CO<sub>2</sub>H、-SO<sub>3</sub>H和-PO<sub>3</sub>H中的至少一个取代基取代;R<sup>i</sup>可进一步被本文所述的烷基取代基任选取代;R<sup>j</sup>是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基;R<sup>k</sup>是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,芳基,杂环基或杂芳基;

[1039] M是-H或阳离子;

[1040] 每次出现时,R独立地选自-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>,任选取代的具有6至18个碳原子的芳基,任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环,或任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环;

[1041] R'和R''各自独立地选自-H、-OH、-OR、-NHR、-NR<sub>2</sub>、-COR,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>,和任选取代的具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环;

[1042] R<sup>c</sup>是-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基,或具有键合至其的反应性基团的连接基团;

[1043] n是1至24的整数;

[1044] W选自C=O、C=S、CH<sub>2</sub>、BH、SO和SO<sub>2</sub>;

[1045] X'选自-H,氨基保护基,具有键合至其的反应性基团的连接基团,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>,任选取代的具有6至18个碳原子的芳基,任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环,和任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环;

[1046] Y'选自-H、氧代基团、具有键合至其的反应性基团的连接基团、任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,任选取代的6至18元芳基,任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环,任选取代的具有1至6个杂原子的3至18元杂环;

[1047]  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_1'$ 、 $R_2'$ 、 $R_3'$  和  $R_4'$  各自独立地选自 -H, 任选取代的具有 1 至 10 个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基, 聚乙二醇单元  $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$ , 卤素, 胍基  $[-NH(C=NH)NH_2]$ ,  $-OR$ ,  $-NR'R''$ ,  $-NO_2$ ,  $-NCO$ ,  $-NR'COR''$ ,  $-SR$ , 由  $-SOR'$  所表示的亚砷, 由  $-SO_2R'$  所表示的砷, 磺酸盐  $-SO_3^-M^+$ , 硫酸盐  $-OSO_3^-M^+$ , 由  $-SO_2NR'R''$  所表示的磺酰胺, 氰基, 叠氮基,  $-COR'$ ,  $-OCOR'$ ,  $-OCONR'R''$  和具有键合至其的反应性基团的连接基团;

[1048]  $R_6$  是 -H、-R、-OR、-SR、 $-NR'R''$ 、 $-NO_2$ 、卤素或具有键合至其的反应性基团的连接基团;

[1049] Z 和 Z' 独立地选自  $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-CR_7R_8-(CH_2)_{na}-$ 、 $-(CH_2)_n-NR_9-(CH_2)_{na}-$ 、 $-(CH_2)_n-O-(CH_2)_{na}-$  和  $-(CH_2)_n-S-(CH_2)_{na}-$ ;

[1050]  $n'$  和  $na'$  相同或不同, 且选自 0、1、2 和 3;

[1051]  $R_7$  和  $R_8$  相同或不同, 且各自独立地选自 -H, -OH, -SH, -COOH,  $-NHR'$ , 聚乙二醇单元  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , 氨基酸, 具有 2 至 6 个氨基酸的肽单元, 任选取代的具有 1 至 10 个碳原子的直链、支链或环状的烷基;

[1052]  $R_9$  独立地选自 -H, 任选取代的具有 1 至 10 个碳原子的直链、支链或环状的烷基, 聚乙二醇单元  $-(OCH_2CH_2)_n-$ ;

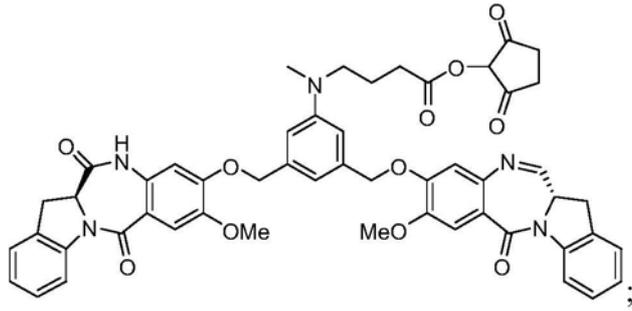
[1053] A 和 A' 相同或不同, 且独立地选自 -O-、氧代 ( $-C(=O)-$ )、 $-CRR'O-$ 、 $-CRR'-$ 、 $-S-$ 、 $-CRR'S-$ 、 $-NR_5$  和  $-CRR'N(R_5)-$ ;

[1054] 每次出现时,  $R_5$  独立地为 -H 或任选取代的具有 1 至 10 个碳原子的直链或支链的烷基;

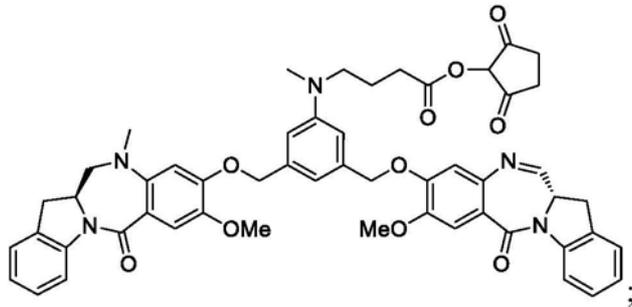
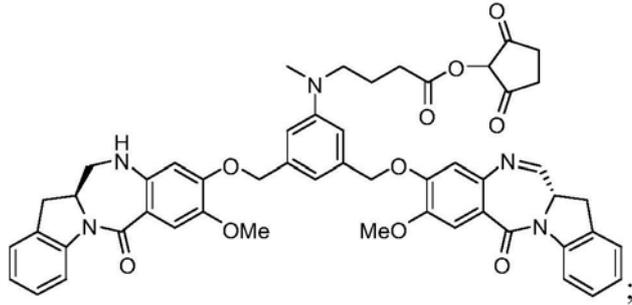
[1055] D 和 D' 相同或不同, 且独立地不存在或选自任选取代的具有 1 至 10 个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基, 氨基酸, 具有 2 至 6 个氨基酸的肽, 和聚乙二醇单元  $-(OCH_2CH_2)_n-$ ;

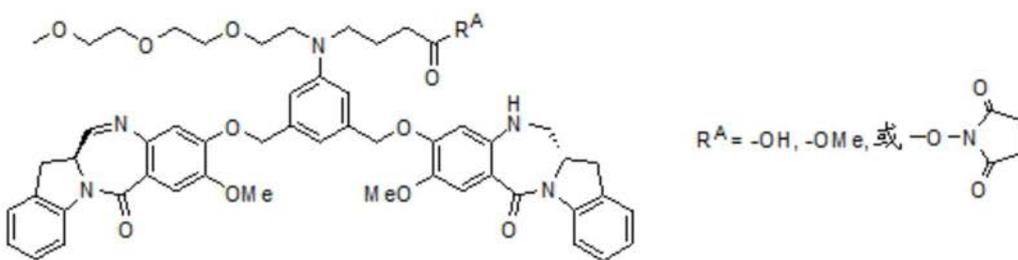
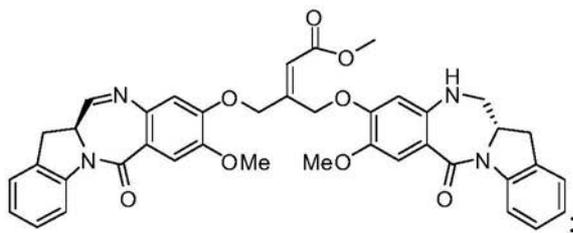
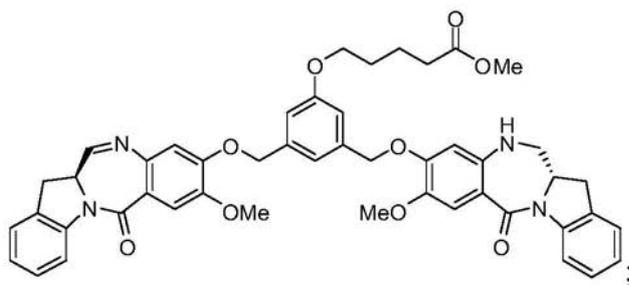
[1056] L 不存在, 为具有键合至其的反应性基团的连接基团, 聚乙二醇单元  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , 具有 1 至 10 个碳原子的直链、支链或环状的烷基或烯基, 苯基, 具有 1 至 6 个独立选自 O、S、N 和 P 的杂原子的 3 至 18 元杂环或 5 至 18 元杂芳基环, 其中所述烷基、烯基任选地被具有键合至其的反应性基团的连接基团取代; 苯基或杂环或杂芳基环可任选被取代, 其中所述取代基可以是具有键合至其的反应性基团的连接基团;

[1057] 条件是所述化合物不是下述化合物中的任一者:

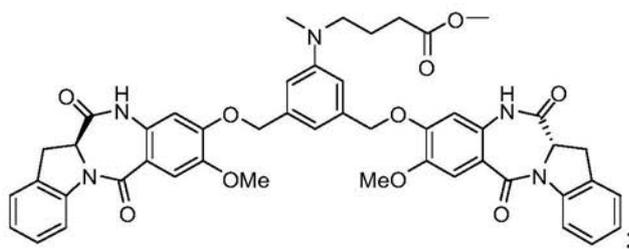
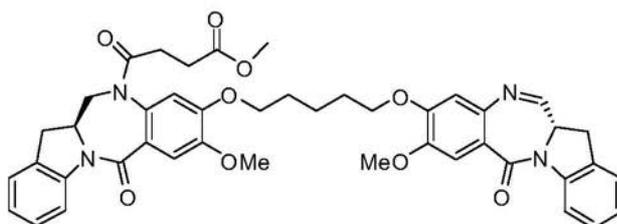
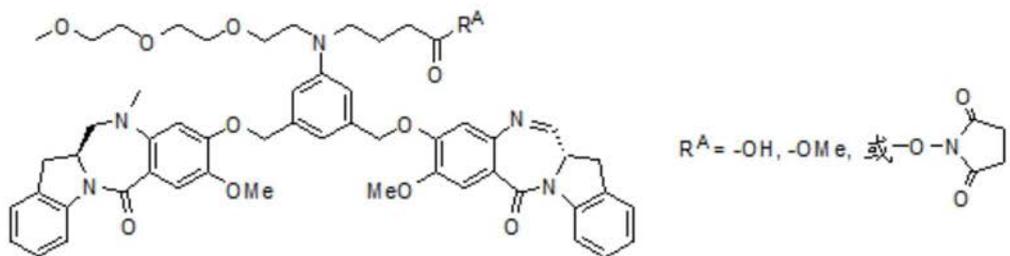


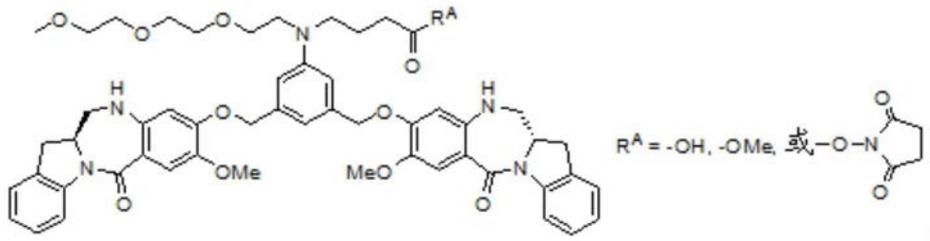
[1058]



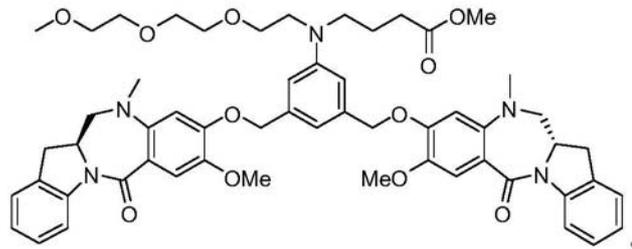


[1059]





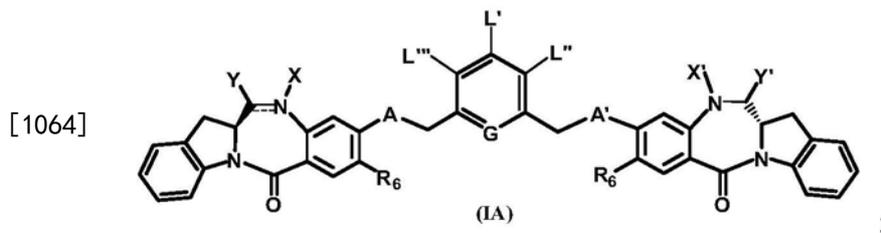
[1060]



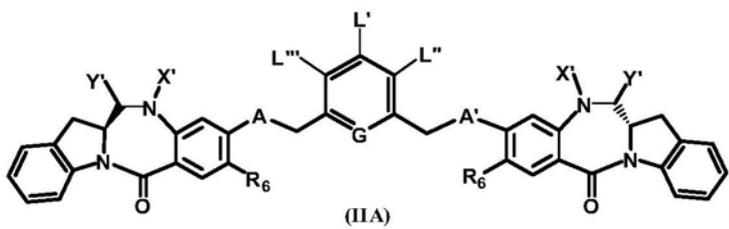
[1061] 2. 根据项目1所述的化合物,其中Y是离去基团,其选自 $-OR$ 、 $-OCOR'$ 、 $-OCOOR'$ 、 $-OCONR'R''$ 、 $-NR'R''$ 、 $-NR'COR''$ 、 $-NR'NR'R''$ 、任选取代的5或6元含氮杂环(如,哌啶、四氢吡咯、吡唑、吗啉等),由 $-NR'(C=NH)NR'R''$ 表示的胍基,氨基酸,或由 $-NRCOP'$ 表示的肽,其中 $P'$ 是氨基酸或含有2至20个氨基酸单元的多肽、 $-SR$ 、 $-SOR'$ 、 $-SO_2M$ 、 $-SO_3M$ 、 $-OSO_3M$ 、卤素、氰基和叠氮基。

[1062] 3. 根据项目1或2所述的化合物,其中L不存在,或选自任选取代的苯基和任选取代的吡啶基,其中所述苯基和所述吡啶基具有连接基团,所述连接基团具有键合至其的反应性基团,或L是具有连接基团的胺基(即, $-N(\text{连接基})-$ ),所述连接基团具有键合至其的反应性基团,或L是具有1至6个碳原子且具有连接基团的直链、支链或环状的烷基或烯基,所述连接基团具有键合至其的反应性基团。

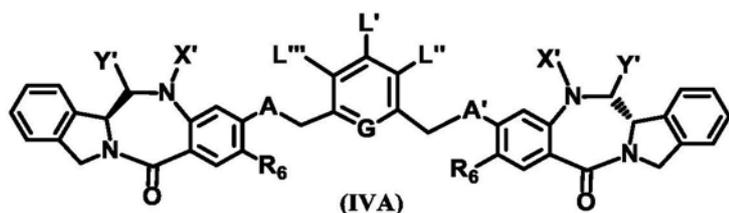
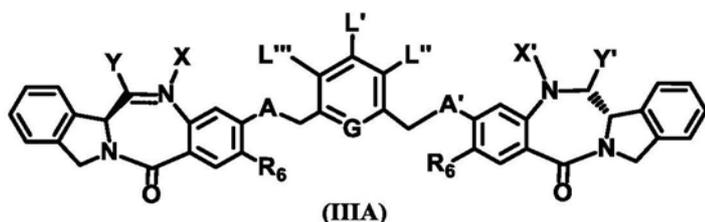
[1063] 4. 根据项目1或2所述的化合物,其中所述化合物由下式中的任一者表示:



[1064]



[1065]



[1066] 其中:

[1067] L'、L''和L'''相同或不同,且独立地选自-H、具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元 $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$ ,卤素,胍基 $[-NH(C=NH)NH_2]$ , $-OR$ , $-NR'R''$ , $-NO_2$ , $-NR'COR''$ , $-SR$ ,由 $-SOR'$ 表示的亚砷,由 $-SO_2R'$ 表示的砷,磺酸盐 $-SO_3M$ ,硫酸盐 $-OSO_3M$ ,由 $-SO_2NR'R''$ 表示的氯苯磺胺,氰基,叠氮基, $-COR'$ , $-OCOR'$ , $-OCONR'R''$ 和具有键合至其的反应性基团的连接基团,条件是L'、L''和L'''中仅一者是具有键合至其的反应性基团的连接基团;且

[1068] G选自-CH-或-N-。

[1069] 5. 根据项目4所述的化合物,其中L'、L''或L'''中的一者是具有键合至其的反应性基团的连接基团,而其它是-H。

[1070] 6. 根据项目5所述的化合物,其中L'是具有键合至其的反应性基团的连接基团,而L''和L'''是-H。

[1071] 7. 根据项目5或6所述的化合物,其中A和A'均是-O-, $R_6$ 是-OMe,且G是-CH-。

[1072] 8. 根据项目5、6或7所述的化合物,其中L'由下式表示:

[1073]  $-W^x-R^x-V-R^y-J$ ,

[1074] 其中:

[1075]  $W^x$ 和 $V$ 相同或不同,且各自独立地不存在或选自 $-CR^eR^e$ 、 $-O-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-O-$ 、 $-S-$ 、 $-SO-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-CH_2-S-$ 、 $-CH_2O-$ 、 $-CH_2NR^e-$ 、 $-O-(C=O)O-$ 、 $-O-(C=O)N(R^e)-$ 、 $-N(R^e)-$ 、 $-N(R^e)-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-N(R^e)-$ 、 $-N(R^e)-C(=O)O-$ 、 $-N(C(=O)R^e)C(=O)-$ 、 $-N(C(=O)R^e)-$ 、 $(O-CH_2-CH_2)_n-$ 、 $-SS-$ 或 $-C(=O)-$ 或氨基酸,或具有2至8个氨基酸的肽;

[1076]  $R^x$ 和 $R^y$ 相同或不同,且各自独立地不存在或者是具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,具有6至10个碳原子的芳基或具有1至3个选自O、N或S的杂原子的3至8元杂环;

[1077]  $R^e$ 和 $R^f$ 相同或不同,且选自-H,具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ,其中 $R^k$ 是-H,具有1至6个碳原子的直链、支链的环状的烷基,任选地具有仲氨基(如, $-NHR^{101}$ )或叔氨基( $-NR^{101}R^{102}$ )或5或6元含氮杂环,诸如哌啶或吗啉,其中 $R^{101}$ 和 $R^{102}$ 是各自独立地具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基;优选地, $R^{101}$ 和 $R^{102}$ 是各自独立地具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基;

[1078]  $n$ 是1至24的整数;

[1079]  $J$ 包含键合至其的反应性基团,且选自马来酰亚胺、卤代乙酰氨基、 $-SH$ 、 $-SSR^d$ 、 $-CH_2SH$ 、 $-CH(Me)SH$ 、 $-C(Me)_2SH$ 、 $-NHR^{c1}$ 、 $-CH_2NHR^{c1}$ 、 $-NR^{c1}NH_2$ 、 $-COOH$ 和 $-COE$ ,其中 $-COE$ 表示反应性酯,其选自但不限于 $N$ -羟基琥珀酰亚胺酯、 $N$ -羟基磺基琥珀酰亚胺酯、硝基苯基(如,2或4-硝基苯基)酯、二硝基苯基(如,2,4-二硝基苯基)酯、磺基-四氟苯基(如,4-磺基-2,3,5,6-四氟苯基)酯和五氟苯基酯,且其中 $R^{c1}$ 是-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基,且,

[1080]  $R^d$ 选自苯基、硝基苯基(如,2或4-硝基苯基)、二硝基苯基(如,2或4-硝基苯基)、羧基硝基苯基(如,3-羧基-4-硝基苯基)、吡啶基或硝基吡啶基(如,4-硝基吡啶基)。

[1081] 9. 根据项目8所述的化合物,其中 $J$ 是 $-SH$ 、 $-SSR^d$ 、马来酰亚胺或 $N$ -羟基琥珀酰亚胺酯。

[1082] 10. 根据项目8或9所述的化合物,其中:

[1083]  $R^e$ 是-H或-Me;

[1084]  $R^e$ 是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ;

[1085]  $n$ 是2至8的整数;且

[1086]  $R^k$ 是-H、-Me或 $-CH_2CH_2-NMe_2$ 。

[1087] 11. 根据项目8-10中任一项所述的化合物,其中 $V$ 是氨基酸或具有2至8个氨基酸的肽。

[1088] 12. 根据项目11所述的化合物,其中, $V$ 是缬氨酸-瓜氨酸、gly-gly-gly 或ala-leu-ala-leu。

[1089] 13. 根据项目8所述的化合物,其中:

[1090]  $W^p$ 是 $-O-$ 、 $-N(R^e)-$ 或 $-N(R^e)-C(=O)-$ ;

[1091]  $R^e$ 是-H、具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ;

[1092]  $R^x$ 是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基;

[1093]  $V$ 不存在、为 $-(O-CH_2-CH_2)_n-$ 、 $-C(=O)-NH-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-C(=O)-$ ;

[1094]  $R^y$ 不存在或者是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基;且

[1095]  $J$ 是 $-SH$ 、 $-SSR^d$ 或 $-COE$ 。

[1096] 14. 根据项目8所述的化合物,其中:

[1097]  $W^p$ 是 $-O-$ 、 $-N(R^e)-$ 或 $-N(R^e)-C(=O)-$ ;

[1098]  $R^e$ 是-H、-Me或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-Me$ ;

[1099]  $n$ 是2至6的整数;

[1100]  $R^x$ 是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基;

[1101]  $V$ 和 $R^y$ 不存在;且

[1102]  $J$ 是 $-COE$ 。

[1103] 15. 根据项目13或14所述的化合物,其中-COE是N-羟基琥珀酰亚胺酯。

[1104] 16. 根据项目8所述的化合物,其中L'由下式表示:

[1105]  $-W' - [CR_1R_2]_a - V - [Cy]_{0-1} - [CR_3R_4]_b - COE,$

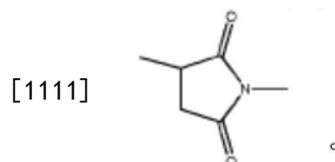
[1106] 其中:

[1107]  $R_1, R_2$ 和 $R_3$ 各自独立地为-H或-Me;

[1108]  $R_4$ 是-H、-Me、-SO<sub>3</sub>H或-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>,其中M<sup>+</sup>是药学上可接受的阳离子;

[1109] a是0-2的整数,b是0-3的整数;且

[1110] Cy是具有N杂原子的任选取代的5元杂环,优选地Cy是



[1112] 17. 根据项目8或16所述的化合物,其中W'是-N(R<sup>e</sup>)-。

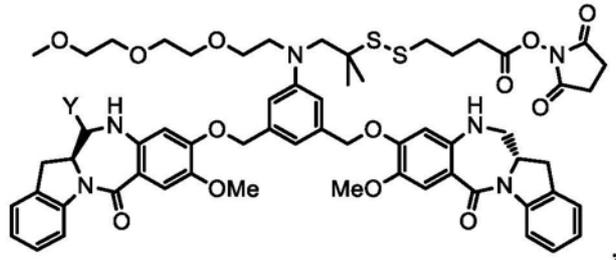
[1113] 18. 根据项目8、16或17所述的化合物,其中R<sup>e</sup>是-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>2-6</sub>-R<sup>k</sup>,其中R<sup>k</sup>是-H,具有1至6个碳原子的直链、支链环状的烷基。

[1114] 19. 根据项目8、16、17或18所述的化合物,其中V是-S-或-SS-。

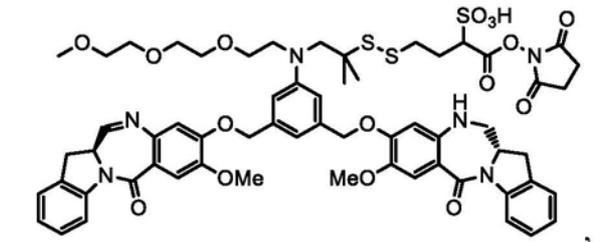
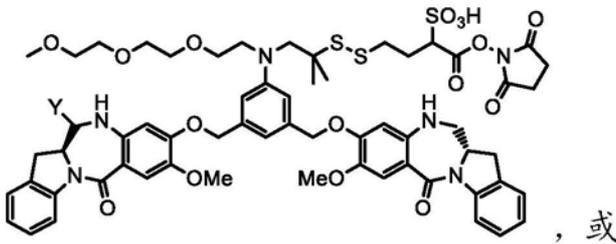
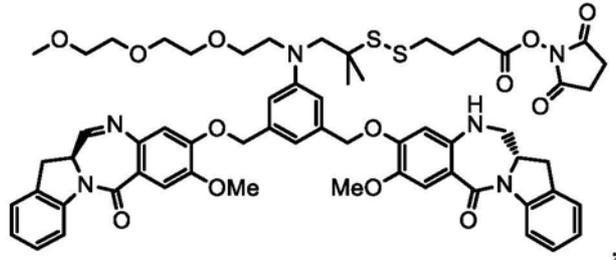
[1115] 20. 根据项目8、16、17、18或19所述的化合物,其中L'由下式表示:

[1116]  $-NR^e - [CR_1R_2]_a - S - [CR_3R_4]_b - COE.$

[1117] 21. 根据项目8、16、17、18或19所述的化合物,其是:



[1118]



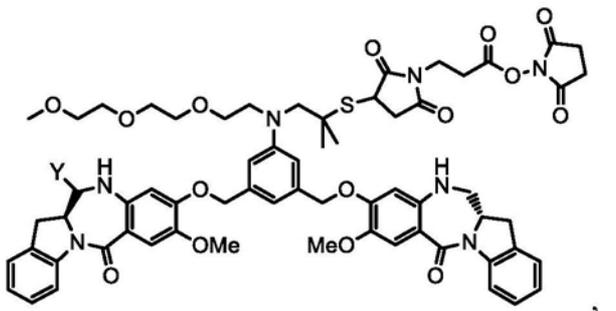
[1119] 其中Y是-H或-SO<sub>3</sub>M(如,Y是-SO<sub>3</sub>M),且M是-H或药学上可接受的阳离子。

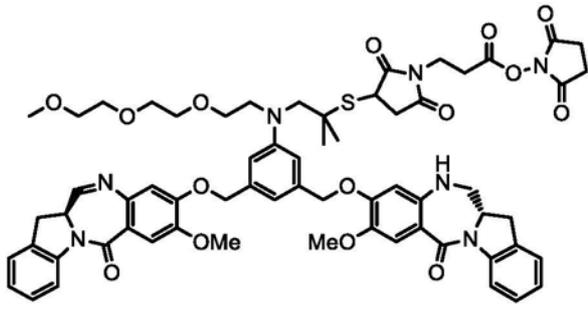
[1120] 22. 根据项目8、16、17、18或19所述的化合物,其中L'由下式表示:

[1121] -NR<sup>e</sup>-[CR<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>]<sub>a</sub>-S-Cy-[CR<sub>3</sub>,R<sub>4</sub>]<sub>b</sub>-COE。

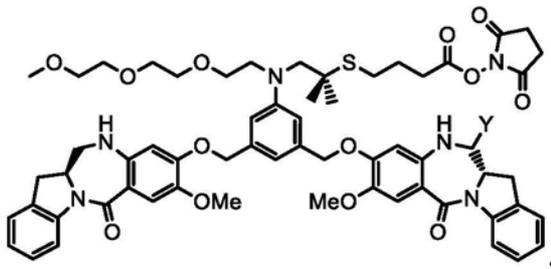
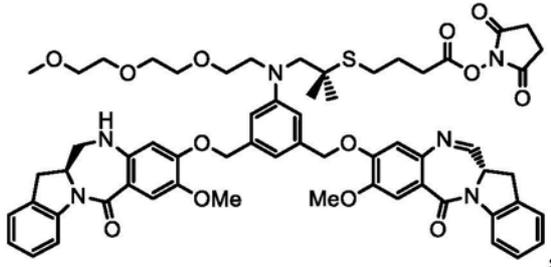
[1122] 23. 根据项目8、16、17、18、19或22所述的化合物,其是:

[1123]



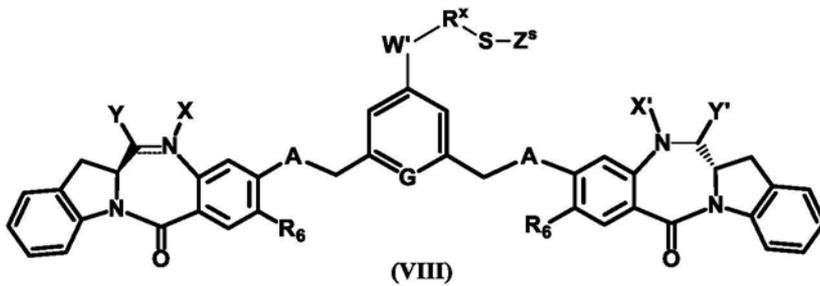


[1124]

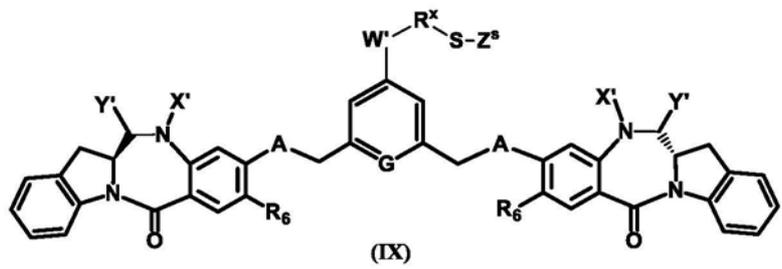


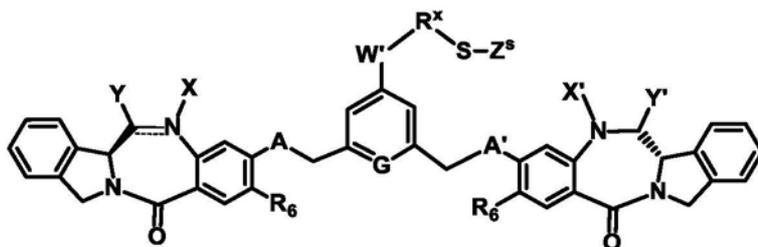
[1125] 其中Y是-H或-SO<sub>3</sub>M(如,Y是-SO<sub>3</sub>M),且M是-H或药学上可接受的阳离子。

[1126] 24. 根据项目1、2、4或8所述的化合物,其中所述化合物由下式中的任一者表示:



[1127]

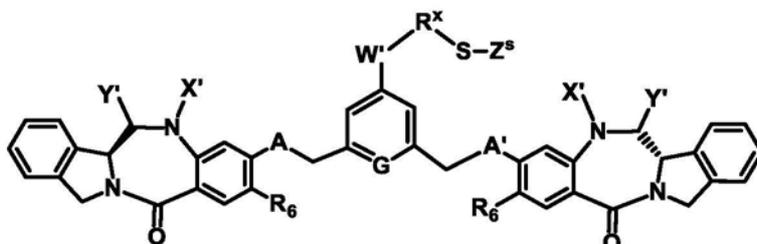




(X)

; 和

[1128]



(XI)

[1129] 其中:

[1130] N和C之间的双线 $\equiv$ 表示单键或双键,条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H,而当其是单键时,X选自-H或具有键合至其的反应性基团的连接基团或氨基保护基(优选地X是-H);

[1131] Y选自-H、-OR、-OCOR'、-SR、-NR'R''、-SO<sub>3</sub>M、-SO<sub>2</sub>M或-OSO<sub>3</sub>M,其中M是-H或阳离子,诸如Na<sup>+</sup>或K<sup>+</sup>;

[1132] R是-H、任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,或PEG基团-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>,其中n是1至24的整数,且R<sup>c</sup>是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基;

[1133] R'和R''相同或不同,且选自-H、-OH、-OR、-NRR<sup>g</sup>、-COR,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,具有6至18个碳原子的任选取代的芳基,选自O、S、N和P具有1至6个杂原子的3至18元任选取代的杂环,PEG基团-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>,其中n是1至24的整数,优选地n是2、4或8;且R<sup>g</sup>是-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或PEG基团-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>;

[1134] X'选自-H、-OH,具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,苯基,以及氨基保护基;

[1135] Y'选自-H,氧代基团,具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基;

[1136] A和A'选自-O-和-S-;

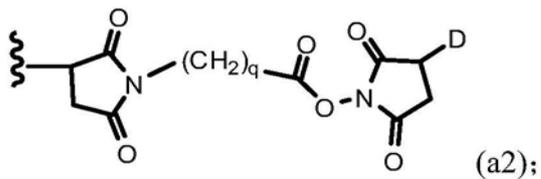
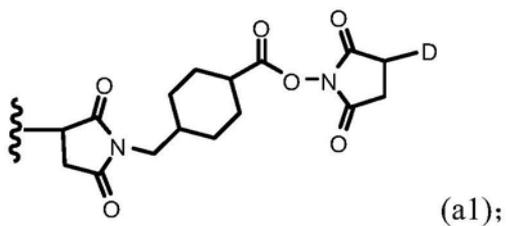
[1137] W'不存在或选自-O-、-N(R<sup>e</sup>)-、-N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-、-N(C(=O)R<sup>e</sup>)-、-S-或-CH<sub>2</sub>-S-、-CH<sub>2</sub>NR<sup>e</sup>-;

[1138] R<sup>x</sup>不存在或选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基;

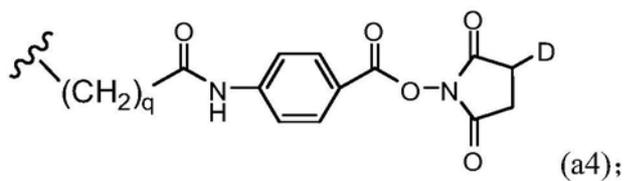
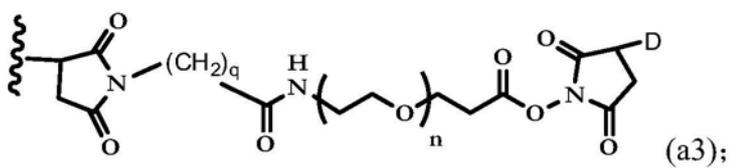
[1139] R<sup>e</sup>是-H,具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>,其中R<sup>k</sup>是-H,具有1至6个碳原子的直链、支链环状的烷基,任选地具有仲氨基(如,-NHR<sup>101</sup>)或叔氨基(-NR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>)基团或5或6元含氮杂环,如哌啶或吗啉,其中R<sup>101</sup>和R<sup>102</sup>各自独立地为具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基;

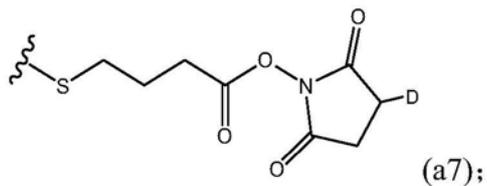
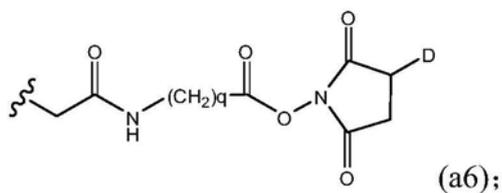
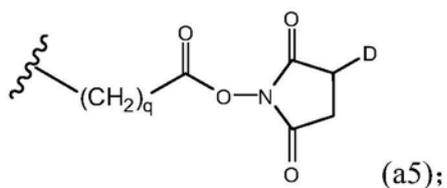
[1140] G选自-CH-或-N-;

[1141] Z<sup>s</sup>是-H,或选自下式中的任一者:

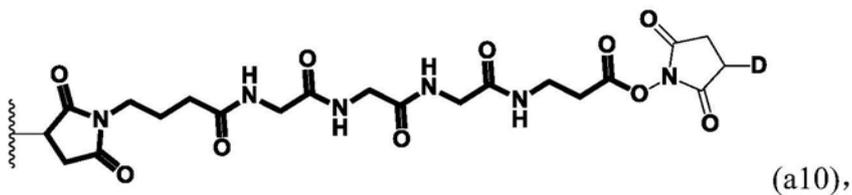
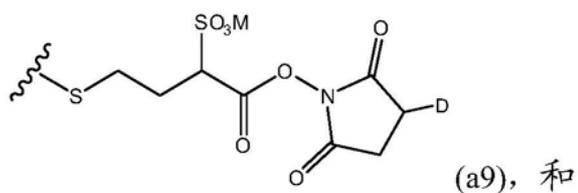
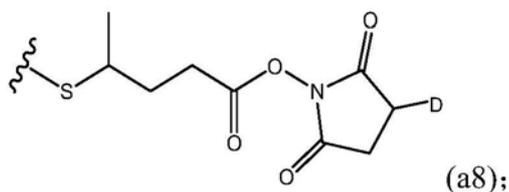


[1142]





[1143]

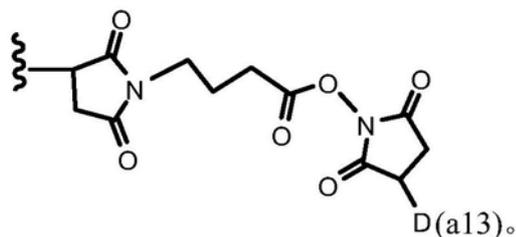
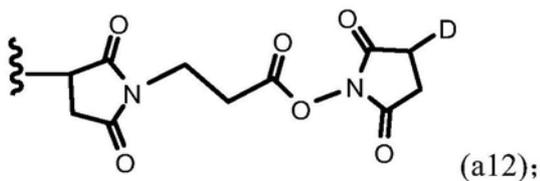
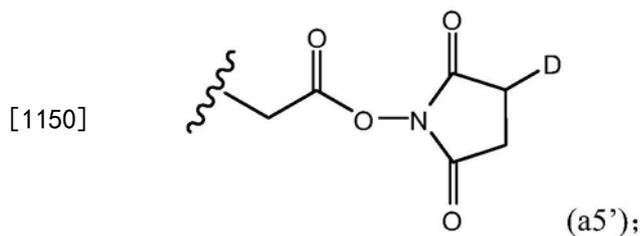
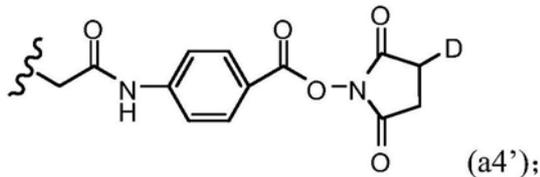
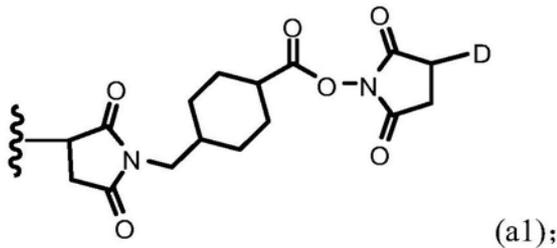


[1144] 其中:

[1145] q是1至5的整数;

[1146] n是2至6的整数;

[1147] D是-H或-SO<sub>3</sub>M;[1148] M是-H或阳离子, 诸如Na<sup>+</sup>或K<sup>+</sup>。[1149] 25. 根据项目24所述的化合物, 其中Z<sup>s</sup>由下式中的任一者表示:



[1151] 26. 根据项目24或25所述的化合物,其中W' 是-N(R<sup>e</sup>)-。

[1152] 27. 根据项目26所述的化合物,其中R<sup>e</sup>是-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>,其中R<sup>k</sup>是 -H、具有1至6个碳原子的直链、支链环状的烷基。

[1153] 28. 根据项目27所述的化合物,其中R<sup>k</sup>是-H或-Me,n是4,且q是2。

[1154] 29. 根据项目28所述的化合物,其中R<sup>x</sup>是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基。

[1155] 30. 根据项目28所述的化合物,其中R<sup>x</sup>是-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-(CR<sup>f</sup>R<sup>g</sup>)-,其中R<sup>f</sup>和 R<sup>g</sup>为各自独立地选自-H或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基;且p 是0、1、2或3。

[1156] 31. 根据项目30所述的化合物,其中R<sup>f</sup>和R<sup>g</sup>相同或不同,且选自-H和 -Me;且p是1。

[1157] 32. 根据项目24-31中任一项所述的化合物,其中:

[1158] N和C之间的双线==表示单键或双键,条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H,而当其是单键时,X是-H;Y是-OH或-SO<sub>3</sub>M;

[1159] M是-H或药学上可接受的阳离子(如,Na<sup>+</sup>);

[1160] X' 和Y' 均是-H;

[1161] A和A' 均是-O-;

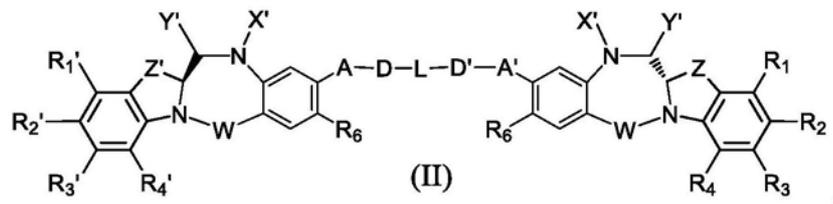
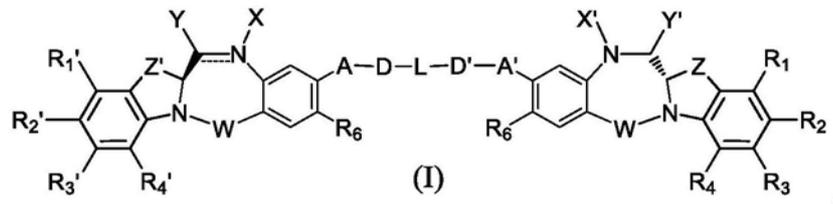
- [1162]  $R_6$ 是-OMe;且
- [1163]  $R^x$ 是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基。
- [1164] 33.根据项目1-32中任一项所述的化合物,其中所述N和C之间的双线 $\equiv$ 表示双键。
- [1165] 34.根据项目1-31中任一项所述的化合物,其中所述N和C之间的双线 $\equiv$ 表示单键, $X$ 是-H,具有键合至其的反应性基团的连接基团,或氨基保护基;且 $Y$ 选自-H、-OR、-OCOR'、-SR、-NR'R''、任选取代的5或6元含氮杂环、-SO<sub>3</sub>M、-SO<sub>2</sub>M和硫酸盐-OSO<sub>3</sub>M。
- [1166] 35.根据项目34所述的化合物,其中 $Y$ 选自-H、-SO<sub>3</sub>M、-OH、-OMe、-OEt或-NHOH。
- [1167] 36.根据项目35所述的化合物,其中 $Y$ 是-H、-SO<sub>3</sub>M或-OH。
- [1168] 37.根据项目34-36中任一项所述的化合物,其中 $M$ 是-H、Na<sup>+</sup>或K<sup>+</sup>。
- [1169] 38.根据项目1-37中任一项所述的化合物,其中 $W$ 当存在时是C=O。
- [1170] 39.根据项目1-38中任一项所述的化合物,其中 $Z$ 和 $Z'$ 当存在时是-CH<sub>2</sub>-。
- [1171] 40.根据项目1-39中任一项所述的化合物,其中 $X'$ 选自-H、-OH、任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,苯基,具有键合至其的反应性基团的连接基团和氨基保护基。
- [1172] 41.根据项目40所述的化合物,其中 $X'$ 是-H、-OH、-Me或具有键合至其的反应性基团的连接基团。
- [1173] 42.根据项目41所述的化合物,其中 $X'$ 是-H。
- [1174] 43.根据项目1-42中任一项所述的化合物,其中 $Y'$ 选自-H,氧代基团,具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基。
- [1175] 44.根据项目43所述的化合物,其中 $Y'$ 是-H或氧代。
- [1176] 45.根据项目44所述的化合物,其中 $Y'$ 是-H。
- [1177] 46.根据项目1-45中任一项所述的化合物,其中 $A$ 和 $A'$ 相同或不同,且选自-O-、-S-、-NR<sub>5</sub>-和氧代-(C=O)-。
- [1178] 47.根据项目46所述的化合物,其中 $A$ 和 $A'$ 相同或不同,且选自-O-和-S-。
- [1179] 48.根据项目47所述的化合物,其中 $A$ 和 $A'$ 是-O-。
- [1180] 49.根据项目1-48中任一项所述的化合物,其中 $D$ 和 $D'$ 当存在时相同或不同,且独立地选自聚乙二醇单元(-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>,其中 $n$ 是1-24的整数,氨基酸,具有2至6个氨基酸的肽,或具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,其中所述烷基、烯基和炔基任选被一个或多个独立地选自卤素、-OR、-NR'COR''、-SR和-COR'的取代基取代。
- [1181] 50.根据项目49所述的化合物,其中 $D$ 和 $D'$ 是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基。
- [1182] 51.根据项目1、2、4或24所述的化合物,其中:
- [1183] N和C之间的双线 $\equiv$ 表示双键;
- [1184]  $Y$ 是-H;
- [1185]  $W$ 是C=O;
- [1186]  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_1'$ 、 $R_2'$ 、 $R_4$ 和 $R_4'$ 是-H;
- [1187]  $R_3$ 或 $R_3'$ 中的一者任选为具有键合至其的反应性基团的连接基团且另一者是-H;
- [1188]  $R_6$ 是-Ome;
- [1189]  $Z$ 和 $Z'$ 是-CH<sub>2</sub>;

[1190] X' 是-H;

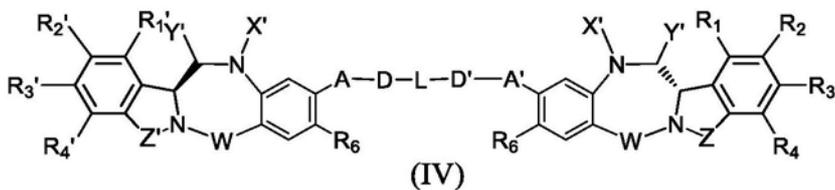
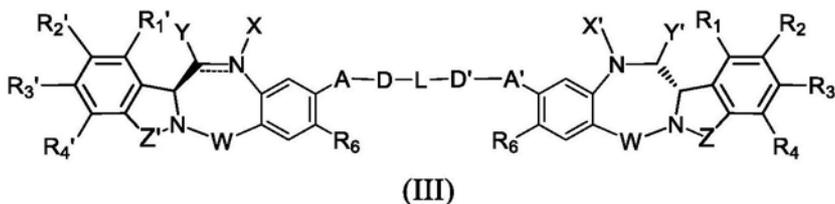
[1191] Y' 是-H;且

[1192] A和A' 是-O-。

[1193] 52. 一种缀合物,其包含:细胞毒性化合物和细胞结合剂(CBA),其中所述细胞毒性化合物包含将细胞毒性化合物共价连接于所述CBA的连接基团,且其中所述细胞毒性化合物由下式中的任一者:



[1194]



[1195] 或其药学上可接受的盐表示,其中:

[1196] N和C之间的双线 $\equiv$ 表示单键或双键,条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H,或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基,而当其是单键时,X是-H、连接基团或氨基保护部分;

[1197] Y是-H或离去基团,其选自-OR、-OCOR'、-OCOR'、-OCONR' R''、-NR' R''、-NR' COR''、-NR' NR' R'',任选取代的5或6元含氮杂环(如,吡啶、四氢吡咯、吡唑、吗啉)、由-NR' (C=NH) NR' R''表示的胍基、氨基酸或由-NRCOP'表示的肽,其中P'是氨基酸或含有2至20个氨基酸单元的多肽、-SR、-SOR'、-SO<sub>2</sub>M、-SO<sub>3</sub>M、-OSO<sub>3</sub>M、卤素、氰基和叠氨基;或

[1198] Y是亚硫酸盐(HSO<sub>3</sub>、HSO<sub>2</sub>或与阳离子形成的HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>、SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>或HSO<sub>2</sub><sup>-</sup>的盐),偏亚硫酸氢盐(H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>或与阳离子形成的S<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>2-</sup>的盐),单、二、三和四硫代磷酸盐(PO<sub>3</sub>SH<sub>3</sub>、PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>H<sub>2</sub>、PO<sub>3</sub>S<sub>2</sub>H<sub>2</sub>、PS<sub>4</sub>H<sub>2</sub>或与阳离子形成的PO<sub>3</sub>S<sup>3-</sup>、PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>3-</sup>、POS<sub>3</sub><sup>3-</sup>或PS<sub>4</sub><sup>3-</sup>的盐),硫代磷酸酯(R<sup>1</sup>O)<sub>2</sub>PS(OR<sup>1</sup>)、R<sup>1</sup>S<sup>-</sup>、R<sup>1</sup>SO、R<sup>1</sup>SO<sub>2</sub>、R<sup>1</sup>SO<sub>3</sub>,硫代硫酸盐(HS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>或与阳离子形成的S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>的盐),连二亚硫酸盐(HS<sub>2</sub>O<sub>4</sub>或与阳离子形成的S<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>的盐),二硫代磷酸盐(P(=S)(OR<sup>k</sup>)(S)(OH)或其与阳离子形成的盐),异羟肟酸(R<sup>k</sup>C(=O)NOH或与阳离子形成的盐),甲醛次硫酸氢盐(HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>或与阳

离子形成的 $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ 的盐,诸如 $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-\text{Na}^+$ 或其混合物,其中 $\text{R}^i$ 是具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被选自 $-\text{N}(\text{R}^j)_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 和 $-\text{PO}_3\text{H}$ 中的至少一个取代基取代; $\text{R}^i$ 可进一步被本文所述的烷基取代基任选取代; $\text{R}^j$ 是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基; $\text{R}^k$ 是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,芳基,杂环基或杂芳基;

[1199] M是-H或阳离子;

[1200] 每次出现时,R独立地选自-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ ,任选取代的具有6至18个碳原子的芳基,任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环,或任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环;

[1201]  $\text{R}'$ 和 $\text{R}''$ 各自独立地选自-H, -OH, -OR, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -COR,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ ,和任选取代的具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3-18元杂环;

[1202]  $\text{R}^c$ 是-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基或连接基团;

[1203] n是1至24的整数;

[1204] W选自C=O、C=S、CH<sub>2</sub>、BH、SO和SO<sub>2</sub>;

[1205]  $\text{X}'$ 选自-H,氨基保护基,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ ,任选取代的具有6至18个碳原子的芳基,任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环,和任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环;

[1206]  $\text{Y}'$ 选自-H,氧代基团,连接基团,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,任选取代的6至18元芳基,任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环,任选取代的具有1至6个杂原子的3至18元杂环;

[1207]  $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$ 、 $\text{R}_4$ 、 $\text{R}_1'$ 、 $\text{R}_2'$ 、 $\text{R}_3'$ 和 $\text{R}_4'$ 各自独立地选自-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{R}^c$ ,卤素,胍基 $[-\text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2]$ , -OR, -NR' R'', -NO<sub>2</sub>, -NCO, -NR' COR'', -SR,由-SOR'所表示的亚砷,由-SO<sub>2</sub>R'所表示的砷,磺酸盐-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>,硫酸盐-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>,由-SO<sub>2</sub>NR' R''所表示的磺酰胺,氰基,叠氮基, -COR', -OCOR', -OCONR' R''和连接基团;

[1208]  $\text{R}_6$ 是-H、-R、-OR、-SR、-NR' R''、-NO<sub>2</sub>、卤素或连接基团;

[1209] Z和Z'独立地选自 $-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{CR}_7\text{R}_8-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{na}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{NR}_9-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{na}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{na}-$ 和 $-(\text{CH}_2)_n-\text{S}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{na}-$ ;

[1210] n'和na'相同或不同,且选自0、1、2和3;

[1211]  $\text{R}_7$ 和 $\text{R}_8$ 相同或不同,且各自独立地选自-H, -OH, -SH, -COOH, -NHR',聚乙二醇单元 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ ,氨基酸,具有2至6个氨基酸的肽单元,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基;

[1212]  $\text{R}_9$ 独立地选自-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基,聚乙二醇单元 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ ;

[1213] A和A'相同或不同,且独立地选自-O-、氧代(-C(=O)-)、-CRR' O-、-CRR' -、-S-、-CRR' S-、-N(R<sub>5</sub>)-和-CRR' N(R<sub>5</sub>)-;

[1214] 每次出现时, $\text{R}_5$ 独立地为-H或任选取代的具有1至10个碳原子的直链或支链的烷

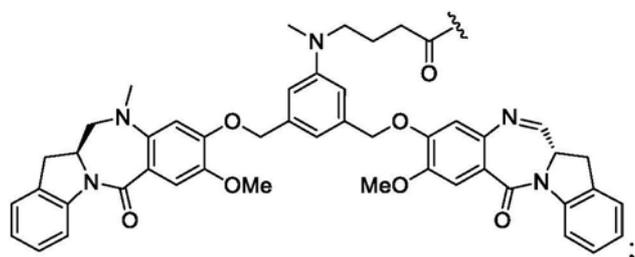
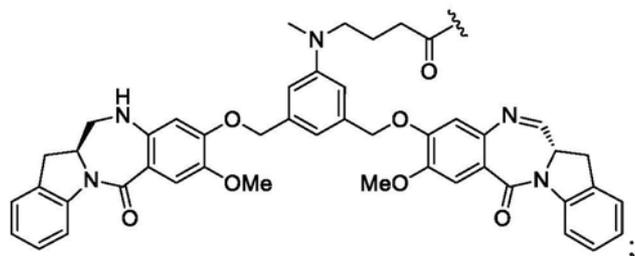
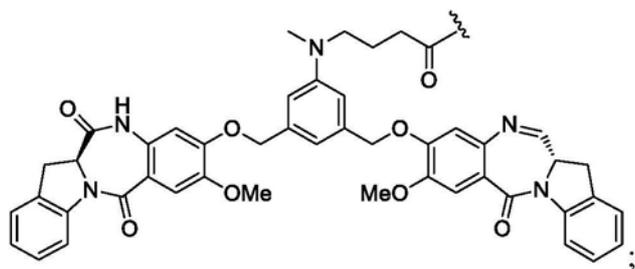
基;

[1215] D和D' 相同或不同,且独立地不存在或选自任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,氨基酸,具有2至6个氨基酸的肽,和聚乙二醇单元(-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-;

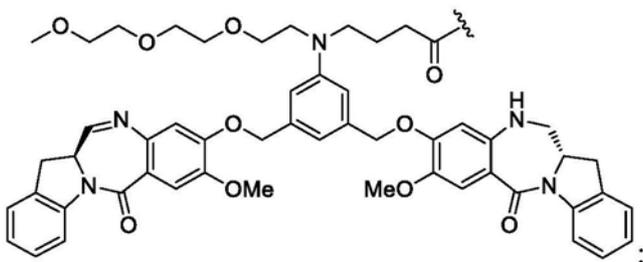
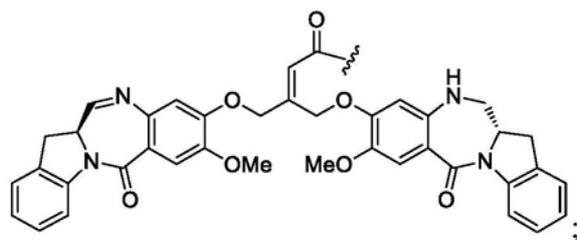
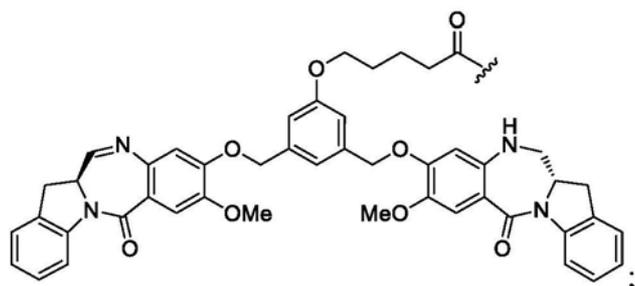
[1216] L不存在,为连接基团,聚乙二醇单元(-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-,具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基或烯基,苯基,具有1至6个独立选自O、S、N和P的杂原子的3-18元杂环或5至18元杂芳基环,其中所述烷基或烯基任选被所述连接基团取代;苯基或杂环或杂芳基环可任选被取代,其中所述取代基可以是连接基团。

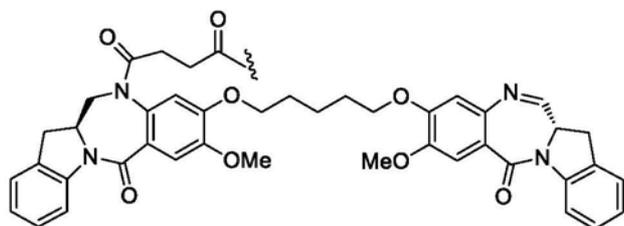
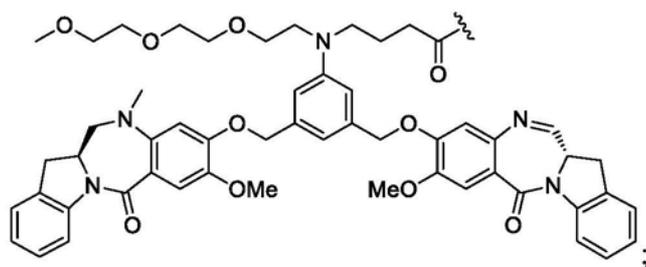
[1217] 53. 根据项目52所述的缀合物,其中Y是离去基团,其选自-OR、-OCOR'、-OCOR'、-OCOR' R''、-NR' R''、-NR' COR''、-NR' NR' R''、任选取代的5 或6元含氮杂环(如,哌啶、四氢吡咯、吡唑、吗啉等),由-NR' (C=NH) NR' R''表示的胍基,氨基酸,或由-NRCOP'表示的肽,其中P' 是氨基酸或含有2至 20个氨基酸单元的多肽、-SR、-SOR'、-SO<sub>2</sub>M、-SO<sub>3</sub>M、-OSO<sub>3</sub>M、卤素、氰基和叠氨基。

[1218] 54. 根据项目52或53所述的缀合物,其中所述化合物不是下式化合物中的任一者:

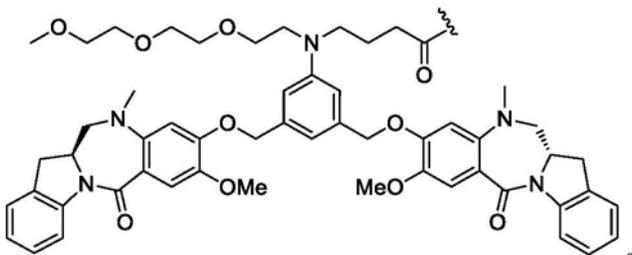
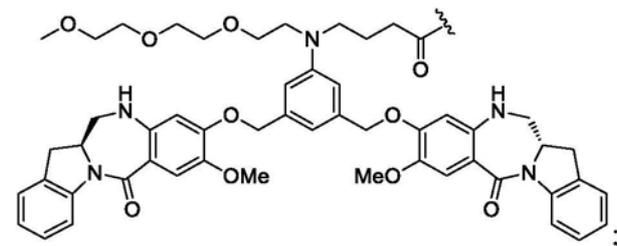
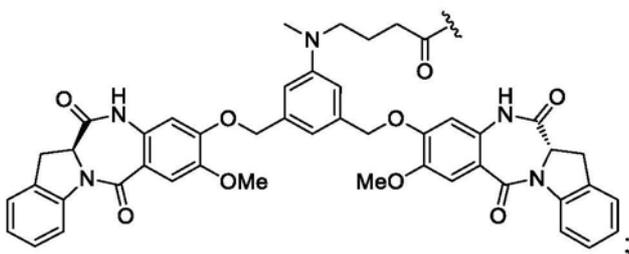


[1219]



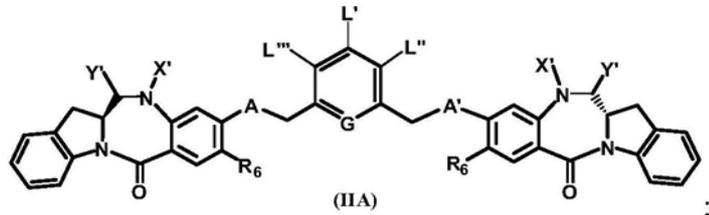
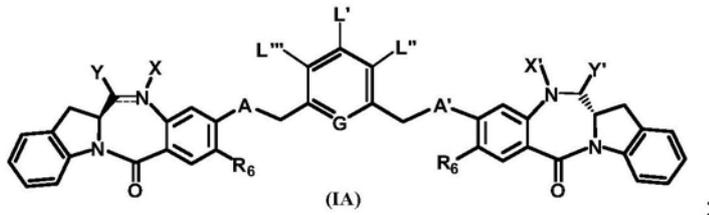


[1220]

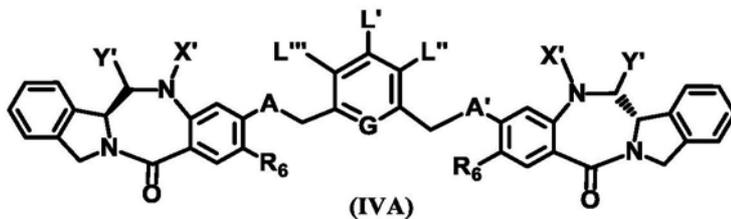
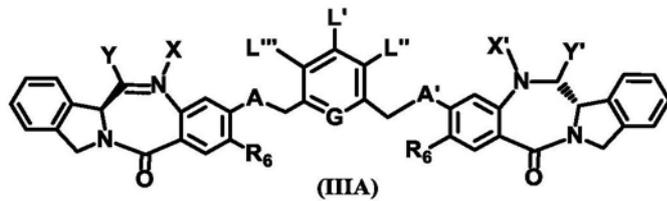


[1221] 55. 根据项目52或53所述的缀合物,其中L不存在,或选自任选取代的苯基和任选取代的吡啶基,其中所述苯基和所述吡啶基具有连接基团,或 L是具有连接基团的胺基(即, -N(连接基团) -),或L是具有1至6个碳原子且具有连接基团的直链、支链或环状的烷基或烯基。

[1222] 56. 根据项目52或53所述的缀合物,其中所述化合物由下式中的任一者表示:



[1223]



[1224] 其中:

[1225] L'、L''和L'''相同或不同,且独立地选自-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元 $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$ ,卤素,胍基 $[-NH(C=NH)NH_2]$ , $-OR$ , $-NR'R''$ , $-NO_2$ , $-NR'COR''$ , $-SR$ ,由 $-SOR'$ 表示的亚砷,由 $-SO_2R'$ 表示的砷,磺酸盐 $-SO_3M$ ,硫酸盐 $-OSO_3M$ ,由 $-SO_2NR'R''$ 表示的磺酰胺,氰基,叠氨基, $-COR'$ , $-OCOR'$ , $-OCONR'R''$ 和连接基团,条件是L'、L''和L'''中仅一者是连接基团;且

[1226] G选自-CH-或-N-。

[1227] 57. 根据项目56所述的缀合物,其中L'、L''或L'''中的一者是连接基团,而其它是-H。

[1228] 58. 根据项目57所述的缀合物,其中L'是连接基团,而L''和L'''是-H。

[1229] 59. 根据项目57或58所述的缀合物,其中A和A'均是-O-, $R_6$ 是-OMe,且G是-CH-。

[1230] 60. 根据项目57、58或59所述的缀合物,其中L'由下式表示:

[1231]  $-W^x-R^x-V-R^y-J$ ,

[1232] 其中:

[1233]  $W^x$ 和 $V$ 相同或不同,且各自独立地不存在或选自 $-CR^eR^{e'}$ 、 $-O-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-O-$ 、 $-S-$ 、 $-SO-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-CH_2-S-$ 、 $-CH_2O-$ 、 $-CH_2NR^e-$ 、 $-O-C(=O)O-$ 、 $-O-C(=O)N(R^e)-$ 、 $-N(R^e)-$ 、 $-N(R^e)-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-N(R^e)-$ 、 $-N(R^e)-C(=O)O-$ 、 $-N(C(=O)R^e)C(=O)-$ 、 $-N(C(=O)R^e)-$ 、 $(O-CH_2-CH_2)_n-$ 、 $-SS-$ 或 $-C(=O)-$ 或氨基酸,或具有2至8个氨基酸的肽;

[1234]  $R^x$ 和 $R^y$ 相同或不同,且各自独立地不存在或为任选取代的具有1至10个碳原子的

直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,具有6至10个碳原子的芳基或具有1至3个选自O、N或S的杂原子的3至8元杂环;

[1235]  $R^e$ 和 $R^f$ 相同或不同,且选自-H,具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ,其中 $R^k$ 是-H,具有1至6个碳原子的直链、支链的环状的烷基,任选地具有仲氨基(如, $-NHR^{101}$ )或叔氨基( $-NR^{101}R^{102}$ )或5或6元含氮杂环,诸如哌啶或吗啉,其中 $R^{101}$ 和 $R^{102}$ 是各自独立地具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基;优选地, $R^{101}$ 和 $R^{102}$ 是各自独立地具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基;

[1236]  $n$ 是1至24的整数;且

[1237]  $J$ 共价连接于CBA,且选自琥珀酰亚胺、乙酰氨基、-S-、-SS-、 $-CH_2S-$ 、 $-CH(Me)S-$ 、 $-C(Me)_2S-$ 、 $-NR^{c1}-$ 、 $-CH_2NR^{c1}-$ 、 $-NR^{c1}N-$ 和 $-C(=O)-$ ,其中 $R^{c1}$ 是-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基。

[1238] 61. 根据项目60所述的缀合物,其中 $J$ 是-S-、-SS-、琥珀酰亚胺或 $-C(=O)-$ 。

[1239] 62. 根据项目60或61所述的缀合物,其中:

[1240]  $R^e$ 是-H或-Me;

[1241]  $R^e$ 是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ;

[1242]  $n$ 是2至8的整数;且

[1243]  $R^k$ 是-H、-Me或 $-CH_2CH_2-NMe_2$ 。

[1244] 63. 根据项目60-62中任一项所述的缀合物,其中 $V$ 是氨基酸或具有2至8个氨基酸的肽。

[1245] 64. 根据项目63所述的缀合物,其中, $V$ 是缬氨酸-瓜氨酸、gly-gly-gly 或ala-leu-ala-leu。

[1246] 65. 根据项目60所述的缀合物,其中:

[1247]  $W^f$ 是-O-、-N( $R^e$ )-或 $-N(R^e)-C(=O)-$ ;

[1248]  $R^e$ 是-H、具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ;

[1249]  $R^x$ 是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基;

[1250]  $V$ 不存在、为 $-(O-CH_2-CH_2)_n-$ 、 $-C(=O)-NH-$ 、-S-、 $-NH-C(=O)-$ ;

[1251]  $R^y$ 不存在或者是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基;且

[1252]  $J$ 是-S-、-SS-或 $-C(=O)-$ 。

[1253] 66. 根据项目60所述的缀合物,其中:

[1254]  $W^g$ 是-O-、-N( $R^e$ )-或 $-N(R^e)-C(=O)-$ ;

[1255]  $R^e$ 是-H、-Me或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-Me$ ;

[1256]  $n$ 是2至6的整数;

[1257]  $R^x$ 是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基;

[1258]  $V$ 和 $R^y$ 不存在;且

[1259]  $J$ 是 $-C(=O)-$ 。

[1260] 67. 根据项目60所述的缀合物,其中 $L'$ 由下式表示:

[1261]  $-W^g-[CR_1^a, R_2^a]_a-V-[Cy]_{0-1}-[CR_3^b, R_4^b]_b-C(=O)-$ ,

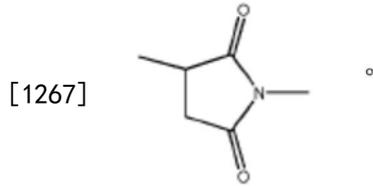
[1262] 其中:

[1263]  $R_1^a$ 、 $R_2^a$ 和 $R_3^b$ 各自独立地为-H或-Me;

[1264]  $R_4$  是 -H、-Me、-SO<sub>3</sub>H 或 -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>, 其中 M<sup>+</sup> 是药学上可接受的阳离子;

[1265] a 是 0-2 的整数, b 是 0-3 的整数; 且

[1266] Cy 是具有 N 杂原子的任选取代的 5 元杂环, 优选地 Cy 是



[1268] 68. 根据项目 60 或 67 所述的缀合物, 其中 W' 是 -N(R<sup>e</sup>)-。

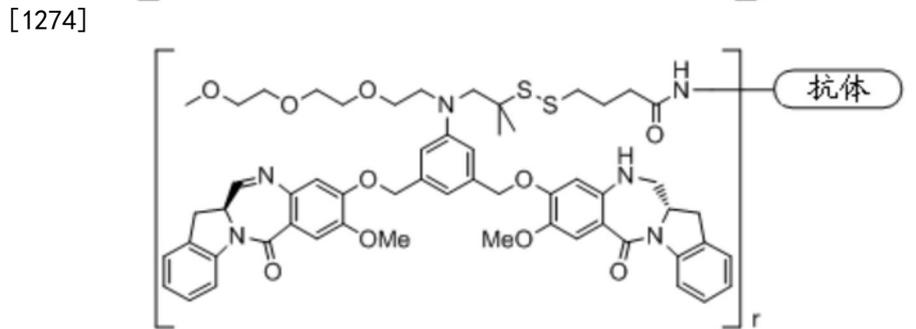
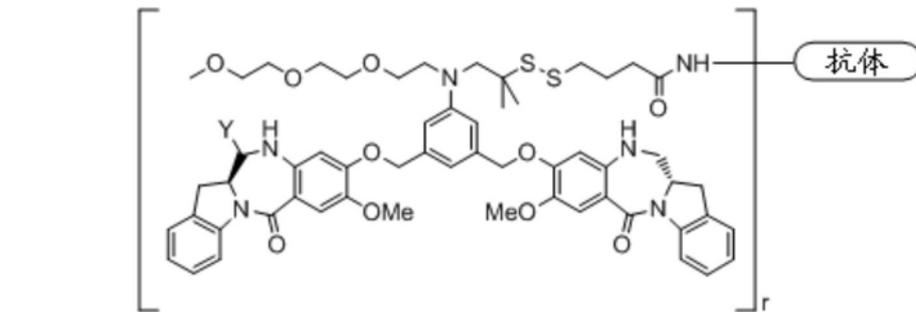
[1269] 69. 根据项目 60、67 或 68 所述的缀合物, 其中 R<sup>e</sup> 是 -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>2-6</sub>-R<sup>k</sup>, 其中 R<sup>k</sup> 是具有 1 至 6 个碳原子的直链或支链的烷基。

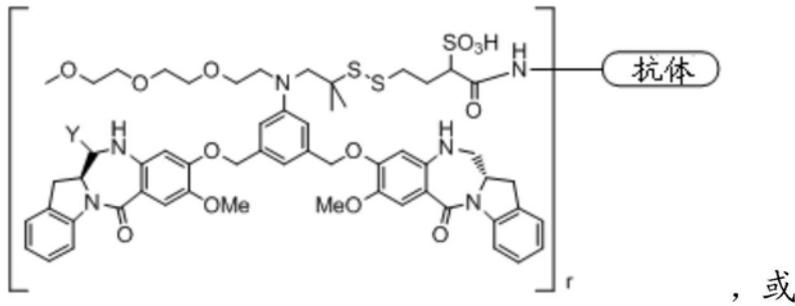
[1270] 70. 根据项目 60、67、68 或 69 所述的方法, 其中 V 是 -S- 或 -SS-。

[1271] 71. 根据项目 60、67、68、69 或 70 所述的缀合物, 其中 L' 由下式表示:

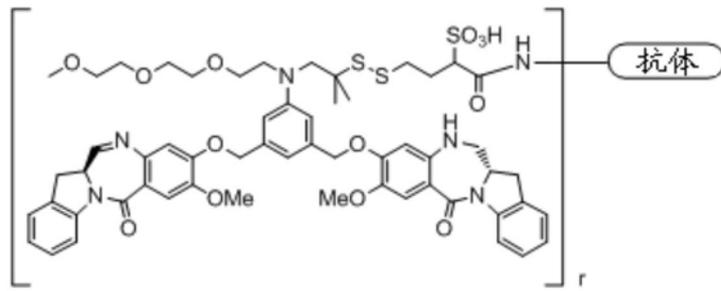
[1272] -NR<sup>e</sup>-[CR<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>]<sub>a</sub>-S-[CR<sub>3</sub>,R<sub>4</sub>]<sub>b</sub>-C(=O)-。

[1273] 72. 根据项目 60、67、68、69、70 或 71 所述的缀合物, 其是:





[1275]



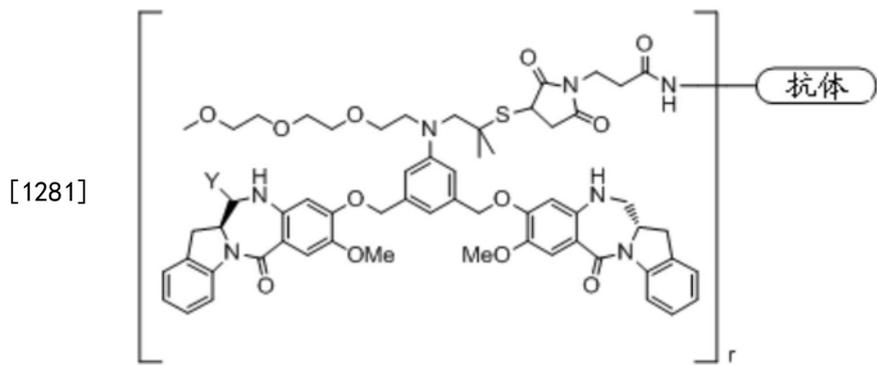
[1276] 其中r是1至10的整数,Y是-H或-SO<sub>3</sub>M(如,Y是-SO<sub>3</sub>M),且M是-H 或药学上可接受的阳离子。

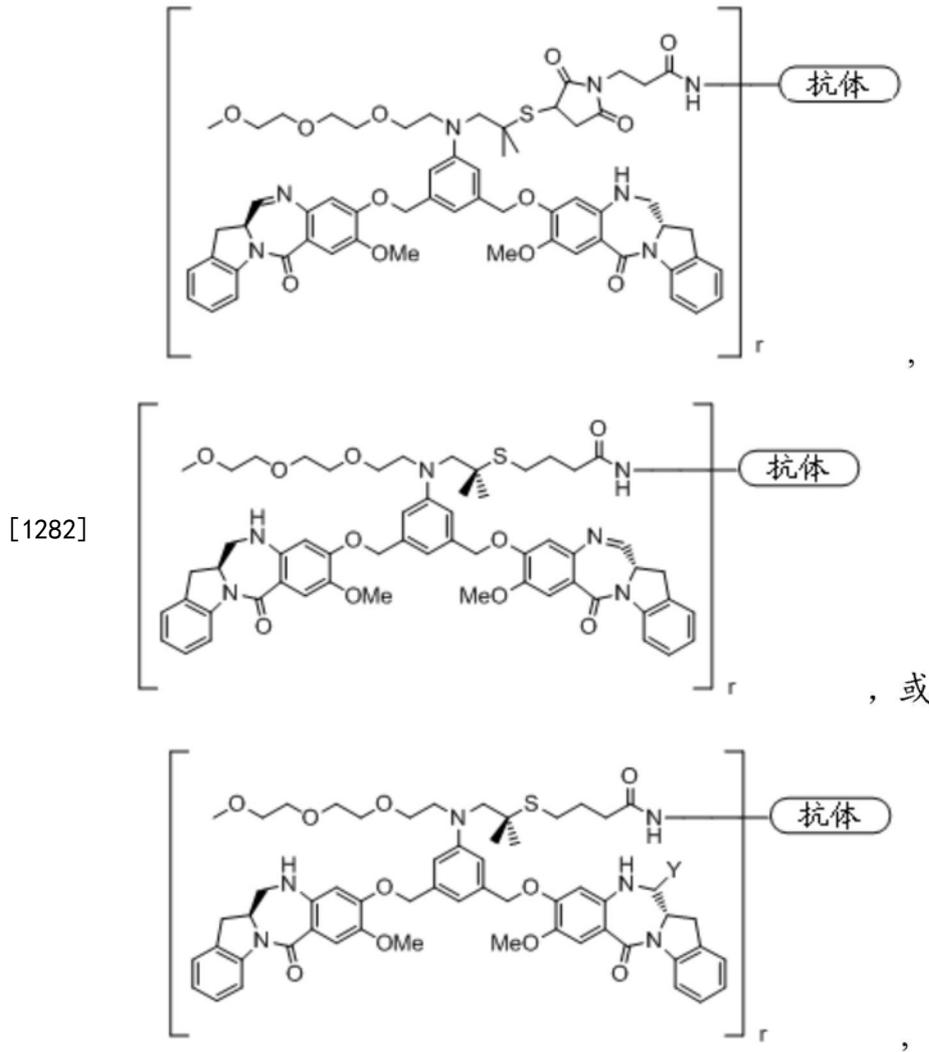
[1277] 73. 根据项目60、67、68、69、70、71或72所述的缀合物,其中所述抗体是huMy9-6。

[1278] 74. 根据项目60、67、68、69或70所述的缀合物,其中L' 由下式表示:

[1279] -NR<sup>e</sup>-[CR<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>]<sub>a</sub>-S-Cy-[CR<sub>3</sub>,R<sub>4</sub>]<sub>b</sub>-C(=O)-。

[1280] 75. 根据项目60、67、68、69、70或74所述的缀合物,其是:

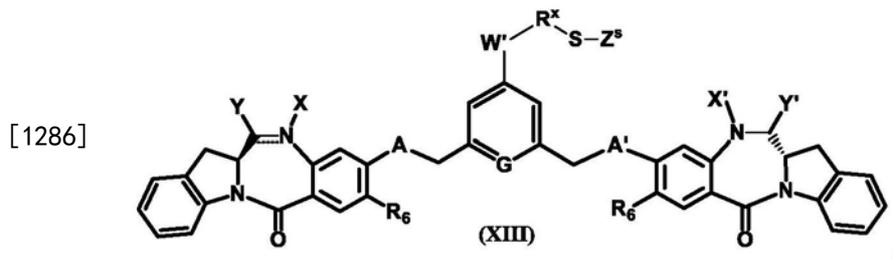


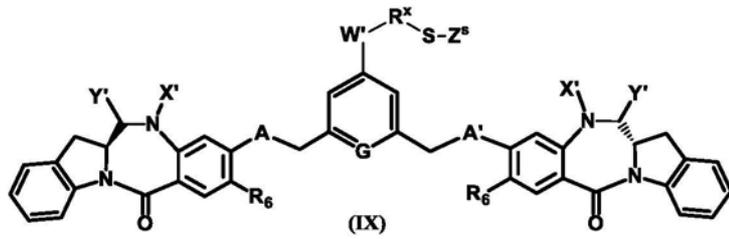


[1283] 其中r是1至10的整数,Y是-H或-SO<sub>3</sub>M(如,Y是-SO<sub>3</sub>M),且M是-H 或药学上可接受的阳离子。

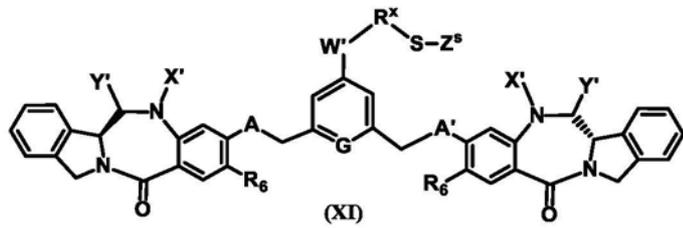
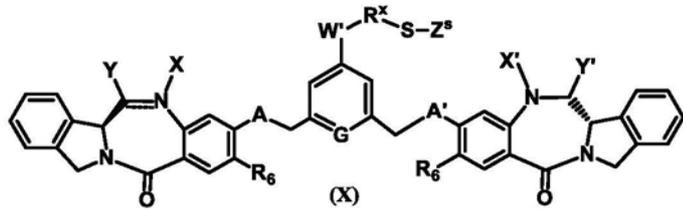
[1284] 76. 根据项目60、67、68、69、70、74或75所述的缀合物,其中所述抗体是huMy9-6。

[1285] 77. 根据项目56所述的缀合物,其中所述化合物由下式表示:





[1287]



[1288] 其中：

[1289]  $W'$  不存在或选自  $-O-$ 、 $-N(R^e)-$ 、 $-N(R^e)-C(=O)-$ 、 $-N(C(=O)R^e)-$ 、 $-S-$ 、 $-CH_2-S-$  或  $-CH_2NR^e-$ ；

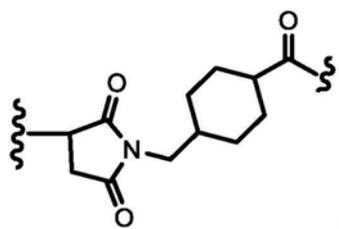
[1290]  $R^x$  不存在或选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基；

[1291]  $R^e$  是  $-H$ ，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或  $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ，其中  $R^k$  是  $-H$ ，具有1至6个碳原子的直链、支链环状的烷基，任选地具有仲氨基（如， $-NHR^{101}$ ）或叔氨基（ $-NR^{101}R^{102}$ ）基团或5或6元含氮杂环，如哌啶或吗啉，其中  $R^{101}$  和  $R^{102}$  各自独立地为具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基；

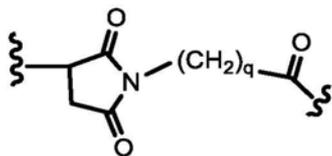
[1292]  $n$  是2至6的整数；

[1293]  $Z^s$  连接至所述CBA，且选自：

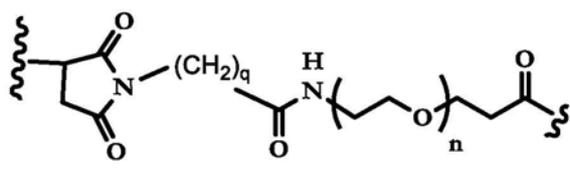
[1294] 键；



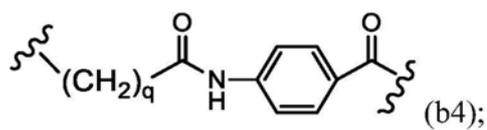
(b1);



(b2);

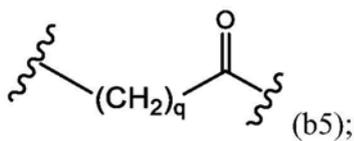


(b3);

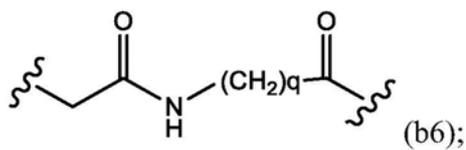


(b4);

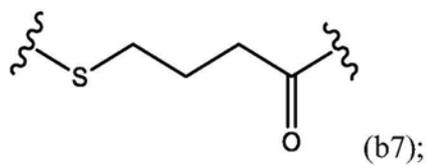
[1295]



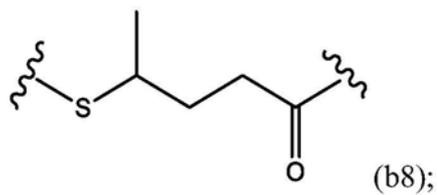
(b5);



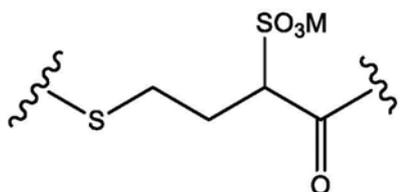
(b6);



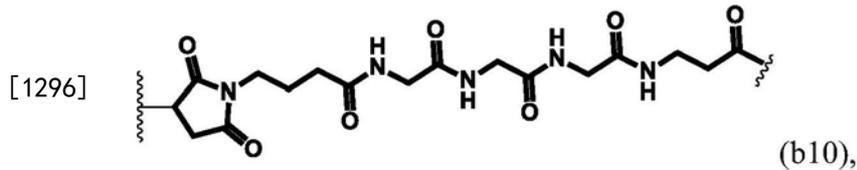
(b7);



(b8);



(b9), 和

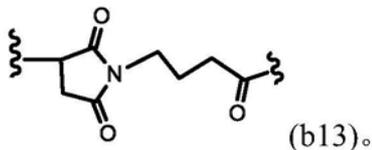
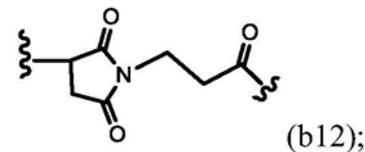
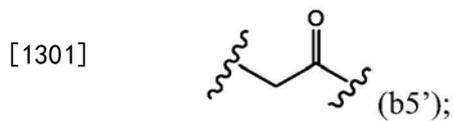
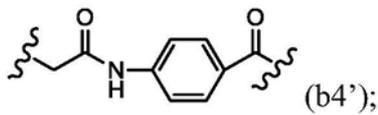
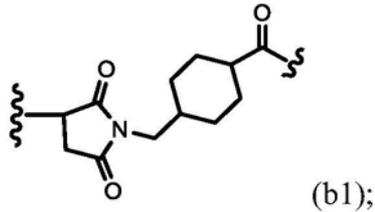


[1297] 其中:

[1298] q是1至5的整数;且

[1299] M是-H或阳离子,诸如Na<sup>+</sup>或K<sup>+</sup>。

[1300] 78. 根据项目77所述的缀合物,其中Z<sup>s</sup>是:



[1302] 79. 根据项目77或78所述的缀合物,其中W' 是-N(R<sup>e</sup>)-。

[1303] 80. 根据项目79所述的缀合物,其中R<sup>e</sup>是-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>,其中R<sup>k</sup>是 -H、具有1至6个碳原子的直链、支链环状的烷基。

[1304] 81. 根据项目80所述的缀合物,其中R<sup>k</sup>是-H或-Me, n是4, 且q是2。

[1305] 82. 根据项目81所述的缀合物,其中R<sup>x</sup>是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基。

[1306] 83. 根据项目81所述的缀合物,其中R<sup>x</sup>是-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-(CR<sup>f</sup>R<sup>g</sup>)-, 其中R<sup>f</sup>和 R<sup>g</sup>各自独立地选自H或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基;且p是0、1、2或3。

[1307] 84. 根据项目83所述的缀合物,其中R<sup>f</sup>和R<sup>g</sup>相同或不同,且选自H和 Me且p是1。

[1308] 85. 根据项目77-84中任一项所述的缀合物,其中:

[1309] N和C之间的双线=表示单键或双键,条件是当其是双键时,X不存在且Y是-H,而当其是单键时,X是-H;Y是-OH或-SO<sub>3</sub>M;

[1310] M是-H或药学上可接受的阳离子(如,Na<sup>+</sup>);

[1311] X' 和Y' 均是-H;

- [1312] A和A' 均是-O-;
- [1313]  $R_6$ 是-OMe;且
- [1314]  $R^x$ 是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基。
- [1315] 86.根据项目52-85中任一项所述的缀合物,其中N和C之间的双线==表示双键。
- [1316] 87.根据项目52-84中任一项所述的缀合物,其中N和C之间的双线==表示单键,X是-H,连接基团或氨基保护基;且Y选自-H、-OR、-OCOR'、-SR、-NR'R''、任选取代的5或6元含氮杂环、-SO<sub>3</sub>M、-SO<sub>2</sub>M和硫酸盐-OSO<sub>3</sub>M。
- [1317] 88.根据项目87所述的缀合物,其中Y选自-H、-SO<sub>3</sub>M、-OH、-OMe、-OEt或-NHOH。
- [1318] 89.根据项目88所述的缀合物,其中Y是-H、-SO<sub>3</sub>M或-OH。
- [1319] 90.根据项目87-89中任一项所述的缀合物,其中M是-H、Na<sup>+</sup>或K<sup>+</sup>。
- [1320] 91.根据项目52-90中任一项所述的缀合物,其中W当存在时是C=O。
- [1321] 92.根据项目52-91中任一项所述的缀合物,其中Z和Z' 当存在时是-CH<sub>2</sub>-。
- [1322] 93.根据项目52-92中任一项所述的缀合物,其中X' 选自-H、-OH,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,苯基,连接基团和氨基保护基。
- [1323] 94.根据项目93所述的缀合物,其中X' 是-H、-OH、-Me或连接基团。
- [1324] 95.根据项目94所述的缀合物,其中X' 是-H。
- [1325] 96.根据项目52-95中任一项所述的缀合物,其中Y' 选自-H,氧代基团,具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基。
- [1326] 97.根据项目96所述的缀合物,其中Y' 是-H或氧代。
- [1327] 98.根据项目97所述的缀合物,其中Y' 是-H。
- [1328] 99.根据项目52-98中任一项所述的缀合物,其中A和A' 相同或不同,且选自-O-、-S-、-N(R<sub>5</sub>)-、和氧代(C=O)。
- [1329] 100.根据项目99所述的缀合物,其中A和A' 相同或不同,且选自-O- 和-S-。
- [1330] 101.根据项目100所述的缀合物,其中A和A' 是-O-。
- [1331] 102.根据项目52-101中任一项所述的缀合物,其中D和D' 当存在时相同或不同,且独立地选自聚乙二醇单元(-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>,其中n是1-24的整数,氨基酸,具有2至6个氨基酸的肽,具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,其中所述烷基、烯基和炔基任选被一个或多个独立地选自卤素、-OR、-NR'COR''、-SR和-COR' 的取代基取代。
- [1332] 103.根据项目102所述的缀合物,其中D和D' 是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基。
- [1333] 104.根据项目52、53、56或77所述的缀合物,其中:
- [1334] N和C之间的双线==表示双键;
- [1335] Y是-H;
- [1336] W是C=O;
- [1337]  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_1'$ 、 $R_2'$ 、 $R_4$ 和 $R_4'$  是-H;
- [1338]  $R_3$ 或 $R_3'$  中的一者任选为连接基团,而另一者是-H;
- [1339]  $R_6$ 是-OMe;
- [1340] Z和Z' 是-CH<sub>2</sub>-;
- [1341] X' 是-H;

[1342] Y' 是-H;且

[1343] A和A' 是-O-。

[1344] 105. 根据项目52-104中任一项所述的缀合物,其中所述缀合物包含 1-10种细胞毒性化合物,每种细胞毒性化合物包括将所述细胞毒性化合物连接于所述CBA的连接基团,且在所述缀合物上的每种细胞毒性化合物是相同的。

[1345] 106. 根据项目52-105中任一项所述的缀合物,其中所述细胞结合剂结合至选自肿瘤细胞、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、活化细胞、骨髓细胞、活化的T细胞、B细胞或黑素细胞的靶细胞;结合至表达CD4、CD6、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD44、CD56、EpCAM、CanAg、CALLA,或Her-2抗原; Her-3抗原的细胞;或表达胰岛素生长因子受体、表皮生长因子受体和叶酸受体的细胞。

[1346] 107. 根据项目106所述的方法,其中所述细胞结合剂是抗体、单链抗体、特异性结合于靶细胞的抗体片段,单克隆抗体,单链单克隆抗体或特异性结合于靶细胞的单克隆抗体片段、嵌合抗体、特异性结合于靶细胞的嵌合抗体片段、结构域抗体、特异性结合于靶细胞结构域抗体片段、淋巴因子、激素、维生素、生长因子、集落刺激因子或营养转运分子。

[1347] 108. 根据项目107所述的缀合物,其中所述抗体是表面重构抗体、表面重构单链抗体或表面重构的抗体片段。

[1348] 109. 根据项目107所述的方法,其中所述抗体是单克隆抗体、单链单克隆抗体或它们的单克隆抗体片段。

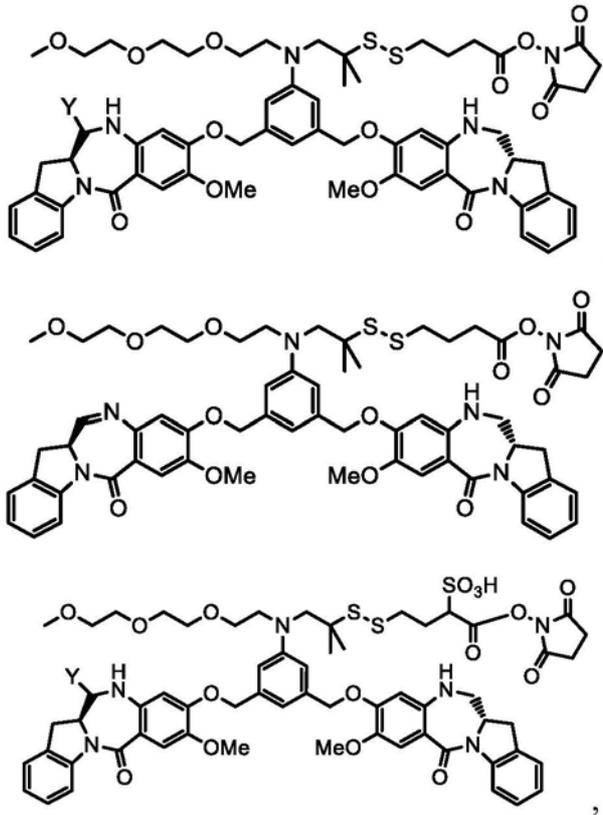
[1349] 110. 根据项目107所述的缀合物,其中所述抗体是人源化抗体、人源化单链抗体或人源化抗体片段。

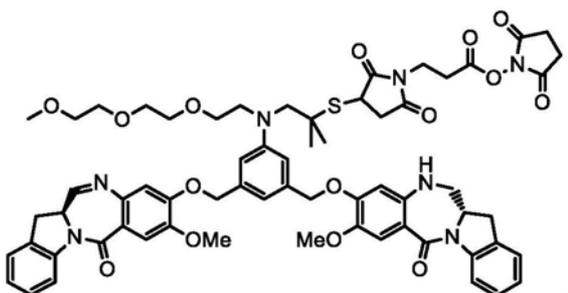
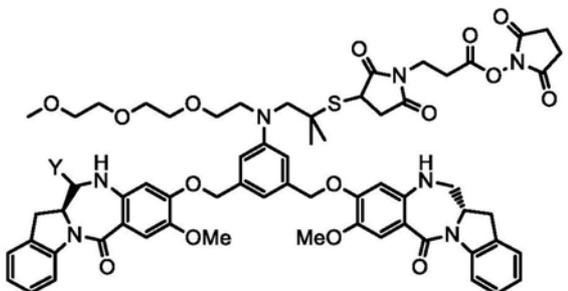
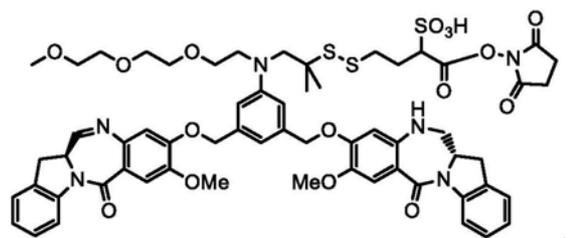
[1350] 111. 一种药物组合物,其包含根据项目52-110中任一项所述的缀合物和药学上可接受的载体。

[1351] 112. 一种抑制哺乳动物中异常细胞生长或治疗增殖性病症、自身免疫性病症、破坏性骨病症、传染性疾病、病毒性疾病、纤维化疾病、神经变性疾病,胰腺炎或肾脏疾病的方法,包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的项目1-51中任一项所述的化合物或项目52-110中任一项所述的缀合物及任选地,施用化疗剂。

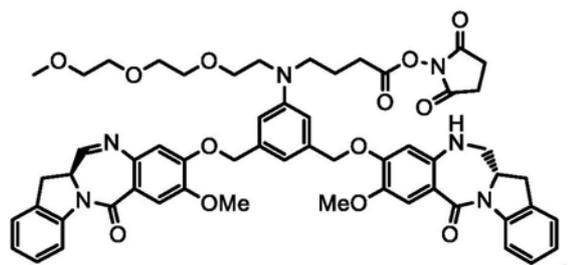
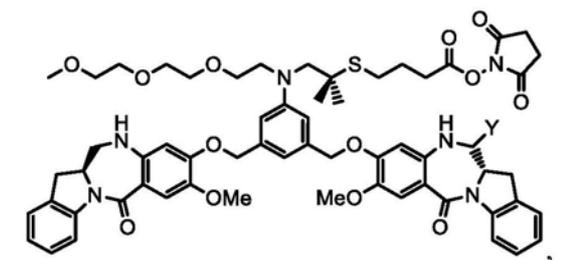
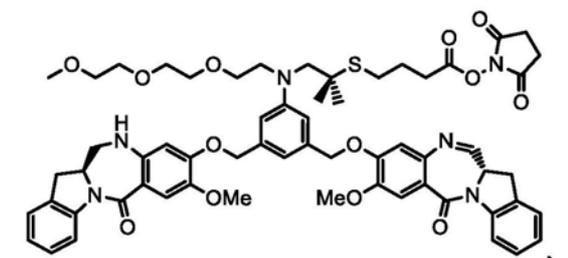
[1352] 113. 根据项目112中任一项所述的方法,其中所述化合物或缀合物是:

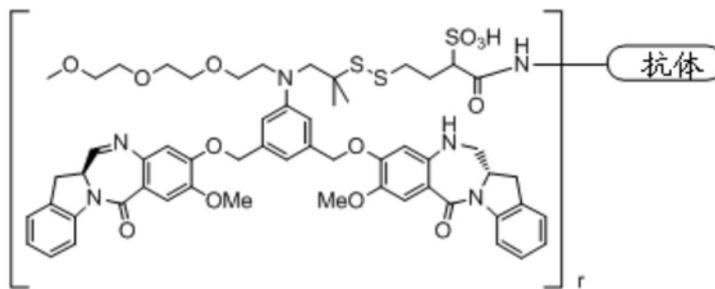
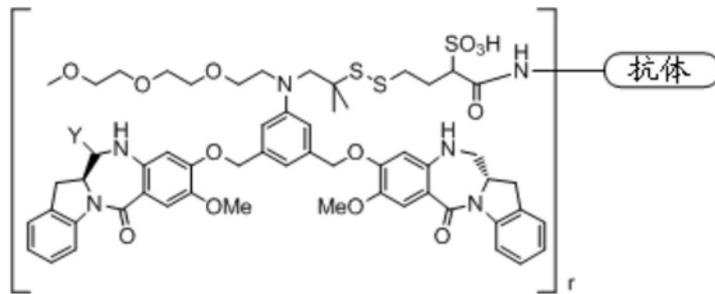
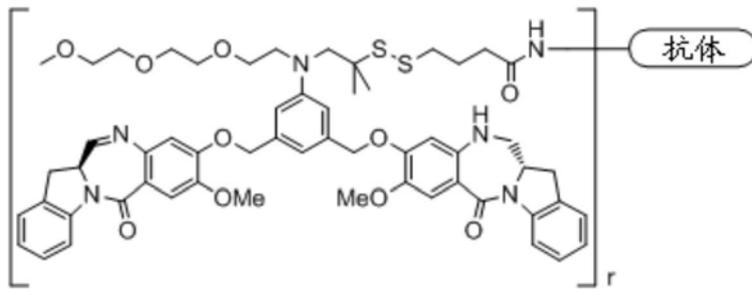
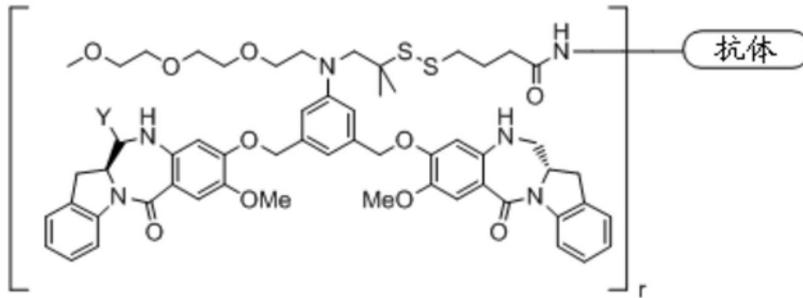
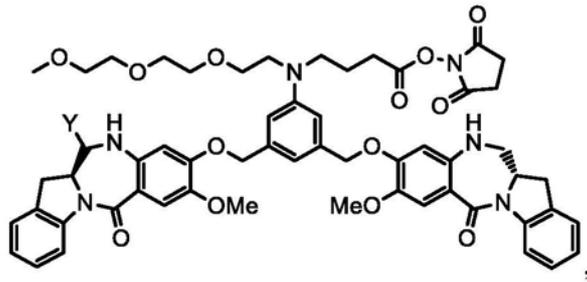
[1353]



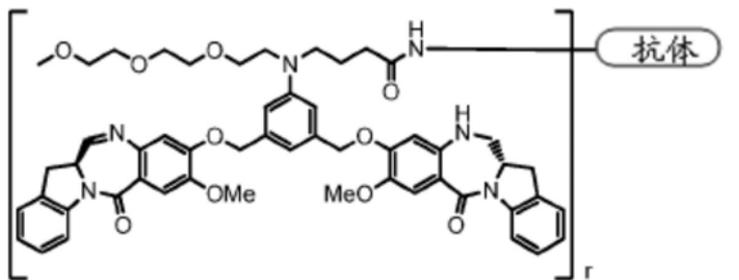
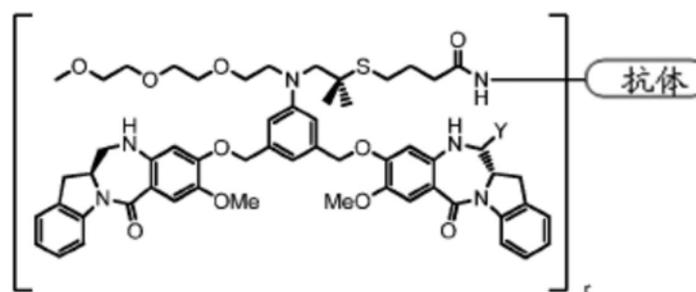
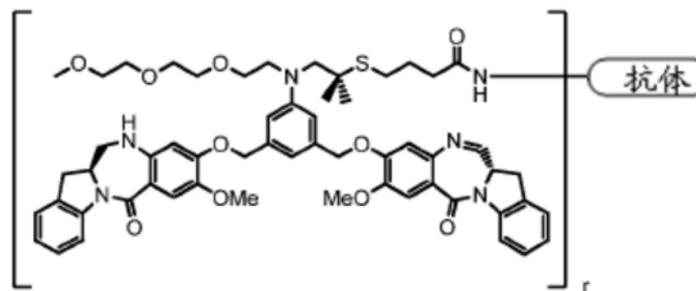
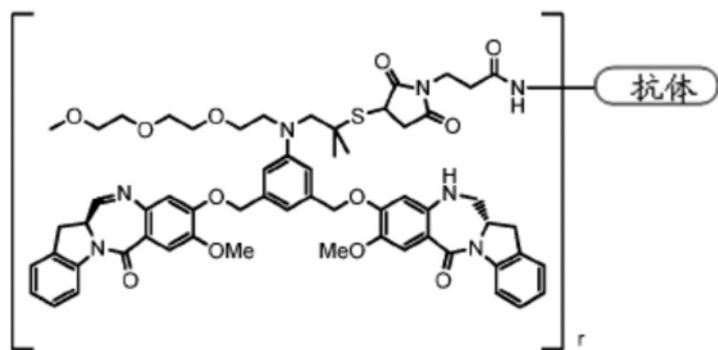
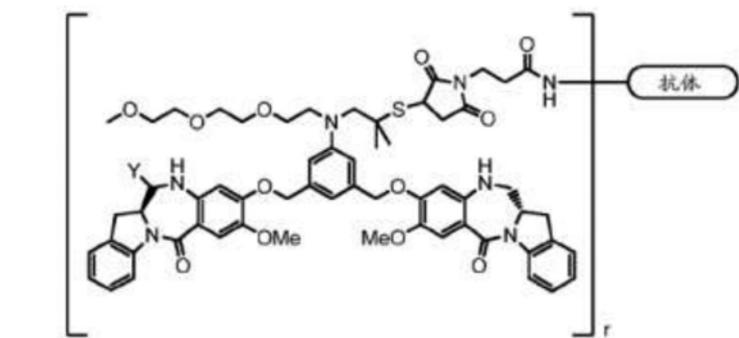


[1354]

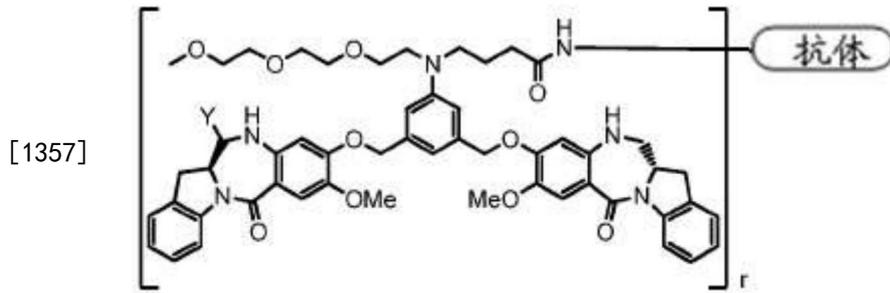




[1356]

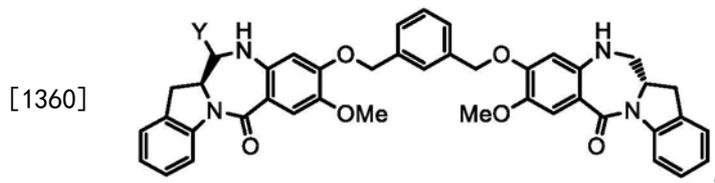


, 或



[1358] 其中 $r$ 是1至10的整数, $Y$ 是-H或 $-SO_3M$ (如, $Y$ 是 $-SO_3M$ ),且 $M$ 是-H或药学上可接受的阳离子。

[1359] 114.一种抑制哺乳动物中异常细胞生长或治疗增殖性病征、自身免疫性病征、破坏性骨病征、传染性疾病、病毒性疾病、纤维化疾病、神经变性病征,胰腺炎或肾脏疾病的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的下式化合物及任选地,化疗剂:



[1361] 其中 $Y$ 是-H或 $-SO_3M$ (如, $Y$ 是 $-SO_3M$ ),且 $M$ 是-H或药学上可接受的阳离子。

[1362] 115.根据项目112-114中任一项所述的方法,其中将所述第二化疗剂相继或连续地施用于所述哺乳动物。

[1363] 116.根据项目112-115中任一项所述的方法,其中所述方法用于治疗下述病征,其选自癌症、风湿性关节炎、多发性硬化、移植物抗宿主病(GVHD)、移植排斥、狼疮、肌炎、感染和免疫缺陷。

[1364] 117.根据项目112-116中任一项所述的方法,其中所述方法用于治疗癌症。

[1365] 118.根据项目116或117所述的方法,其中所述癌症选自乳腺癌、结肠癌、脑癌、前列腺癌、肾癌、胰腺癌、卵巢癌、头颈癌、黑素瘤、结直肠癌、胃癌、鳞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、睾丸癌、梅克尔细胞癌、胶质母细胞瘤、神经细胞瘤、淋巴器官的癌症和骨髓恶性肿瘤包括白血病(急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓性白血病(CML)、急性单核细胞白血病(AMOL)、多毛细胞白血病(HCL)、T-细胞幼淋巴细胞白血病(T-PLL)、巨粒淋巴细胞白血病、成人T细胞白血病)、淋巴瘤(小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、霍奇金淋巴瘤(结节硬化型、混合细胞型、富于淋巴细胞型、淋巴细胞削减型或未削减型和结节性淋巴细胞主导的霍奇金淋巴瘤)、非霍奇金淋巴瘤(所有亚型)、慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤、B-细胞前淋巴细胞白血病、淋巴质浆细胞白血病(诸如瓦尔登斯特伦病巨球蛋白血症)、脾边缘带淋巴瘤、浆细胞肿瘤(浆细胞性骨髓瘤、浆细胞瘤、单克隆免疫球蛋白沉积物疾病、重链病)、结节外边缘区B细胞淋巴瘤(MALT淋巴瘤)、结节边缘区B细胞淋巴瘤(NMZL)、滤泡淋巴瘤、外套细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤/白血病、T细胞幼淋巴细胞白血病、T细胞巨粒淋巴细胞白血病、攻击性NK细胞白血病、成人T细胞白血病/淋巴瘤、结节外NK/T细胞淋巴瘤(鼻型)、肠病型T细胞淋巴瘤、肝脾T细胞淋巴瘤、亚顶级NK细胞淋巴瘤、蕈样真菌病/塞扎里综合征、原发性皮肤间CD30-阳性T细胞淋巴增生性

病症、原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤、淋巴瘤样丘疹病、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤、外周T 细胞淋巴瘤(非特异性)、间变性大细胞淋巴瘤)、多发性骨髓瘤(浆细胞性骨髓瘤或卡勒病)。

## 序列表

<110> 伊缪诺金公司

<120> 细胞毒性苯并二氮杂卓衍生物

<130> 121162-00220

<140>

<141>

<150> 61/483,499

<151> 2011-05-06

<150> 61/443,062

<151> 2011-02-15

<150> 61/443,092

<151> 2011-02-15

<160> 14

[0001]

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 1

Gly Tyr Phe Met Asn

1                    5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (14)..(14)  
 <223> /替代="Gln" 或"His" 或"Arg"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (14)..(14)  
 <223> /注释="序列中给定的残基对于所述位置的注释无偏好性"

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (16)..(16)  
 <223> /替代="His"或"Asn"或"Arg"

[0002]

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (17)..(17)  
 <223> /替代="Glu"或"Thr"或"Ser"或"Ala"或"Val"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(17)  
 <223> /注释="序列中给定的残基对于在所述位置注释中的那些无偏好性"

<400> 2  
 Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln  
 1                    5                    10                    15

Gly

<210> 3  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 3

Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr

1                    5

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 4

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala Gly Thr Ser Leu Met His

1                    5                    10                    15

[0003]

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 5

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala

1                    5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 6

Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 7

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln  
 1 5 10 15

Gly

[0004]

<210> 8

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125

[0005] Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220

	His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser			
	225	230	235	240
	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
		245	250	255
	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro			
		260	265	270
	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
		275	280	285
	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val			
		290	295	300
[0006]	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr			
	305	310	315	320
	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr			
		325	330	335
	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
		340	345	350
	Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys			
		355	360	365
	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			
		370	375	380
	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp			
	385	390	395	400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 9

<211> 218

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

[0007]

<400> 9

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala  
 20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro  
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp  
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Ser  
 65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg  
 85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 165 170 175

[0008] Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

<210> 10

<211> 218

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<400> 10



Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

<210> 11

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

[0010]

<400> 11

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<400> 12

[0011] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala  
 20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro  
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp  
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Ser  
 65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg  
 85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105 110

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<400> 13

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala  
 20 25 30

[0012]

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro  
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp  
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg  
 85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105 110

<210> 14

<211> 4

<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
[0013] <221> 来源  
<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 14  
Ala Leu Ala Leu  
1

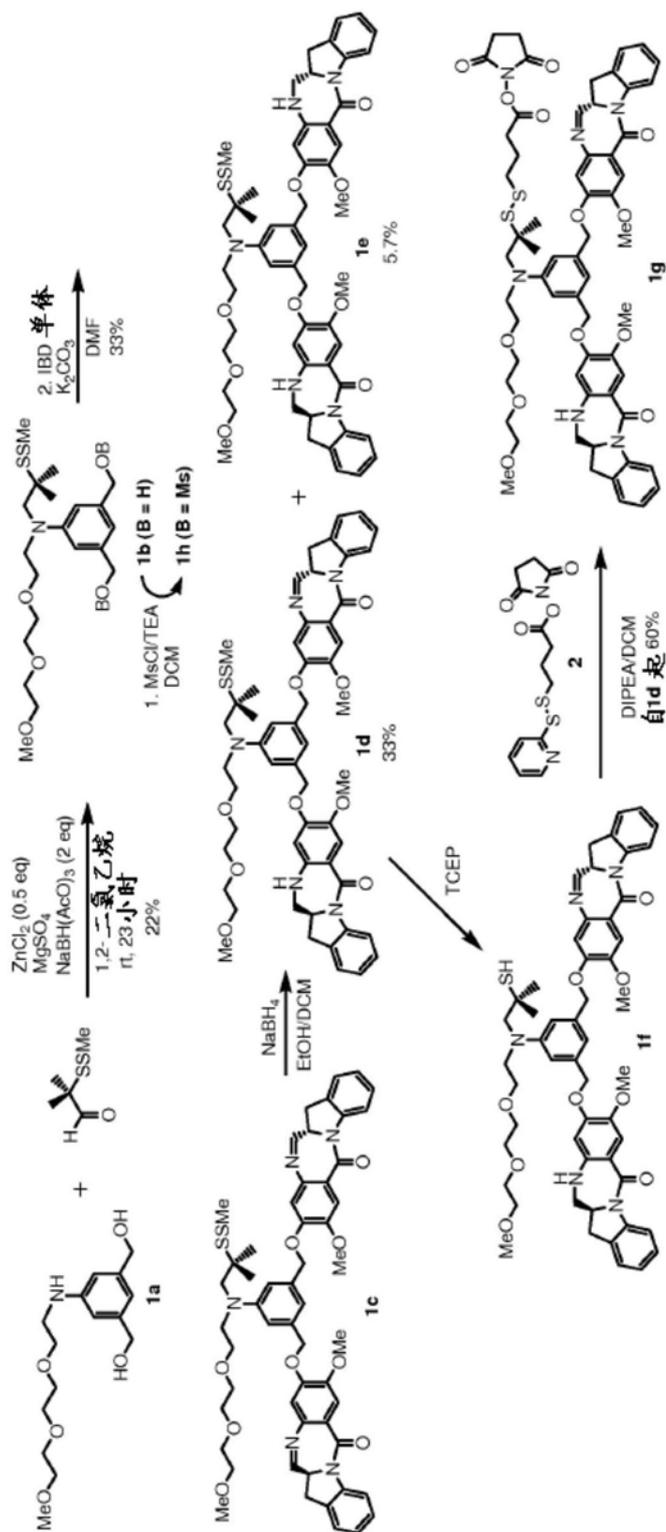


图1

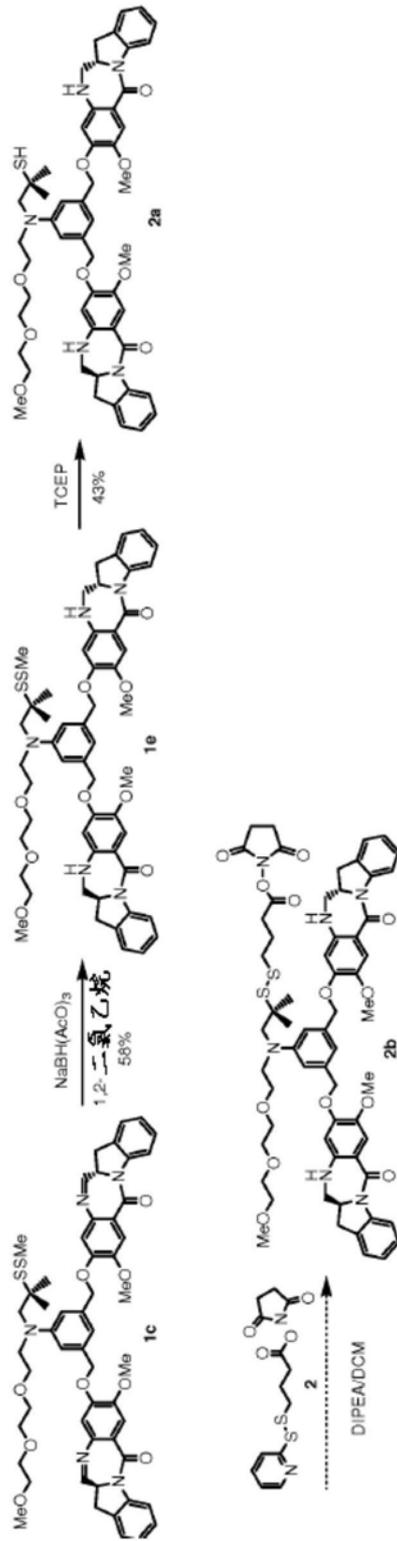
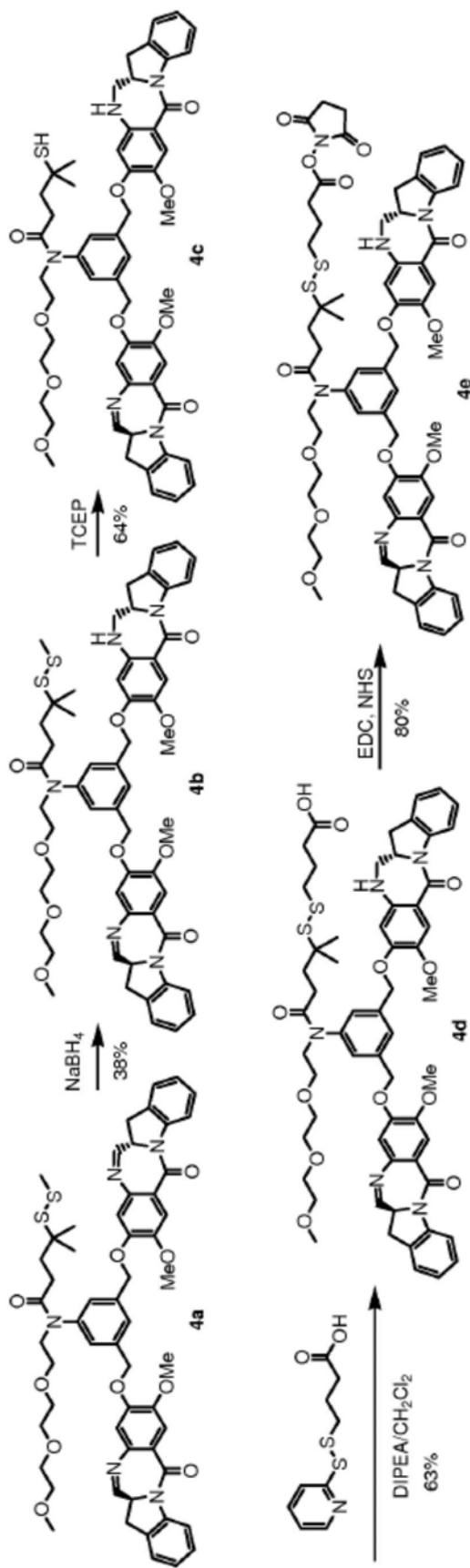


图2





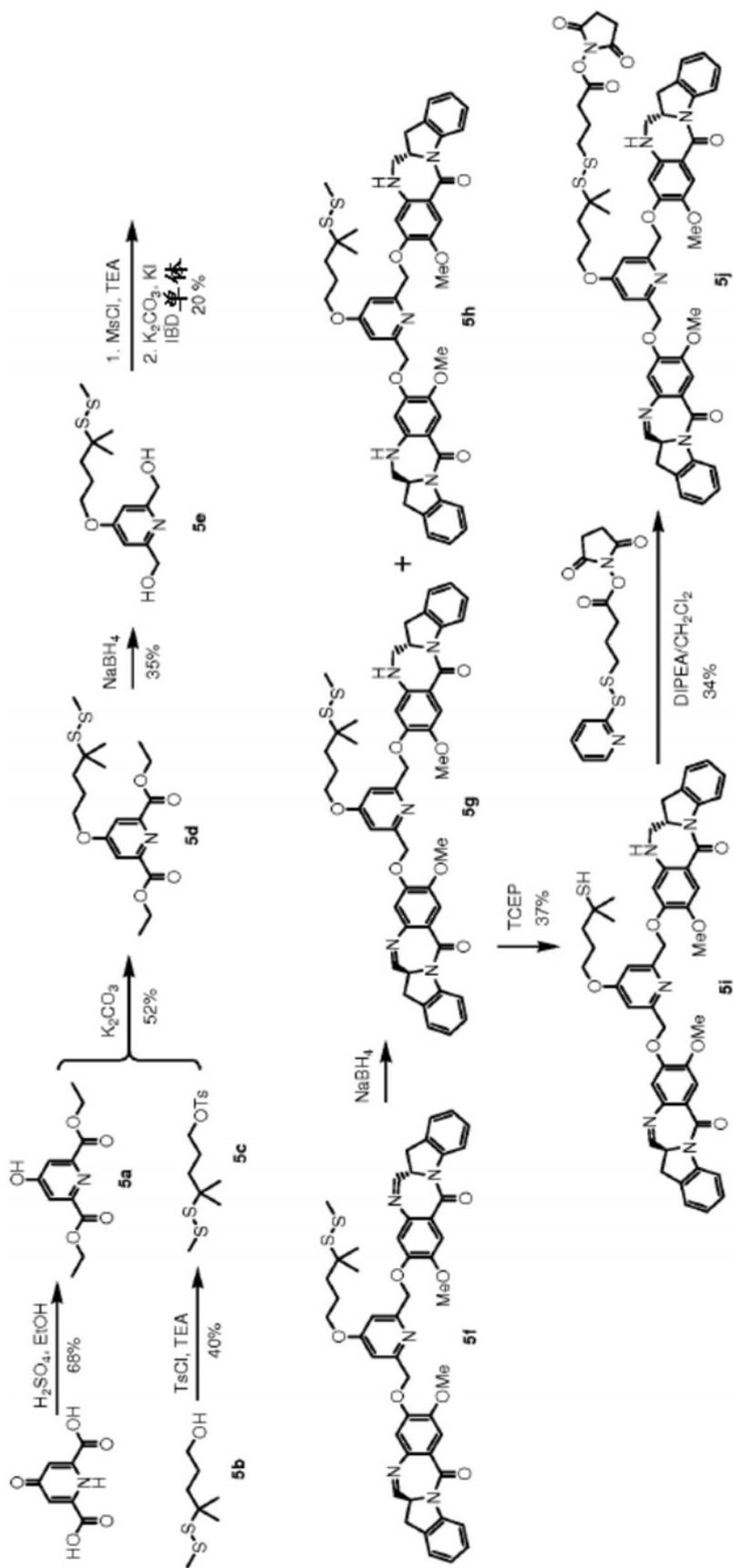


图5

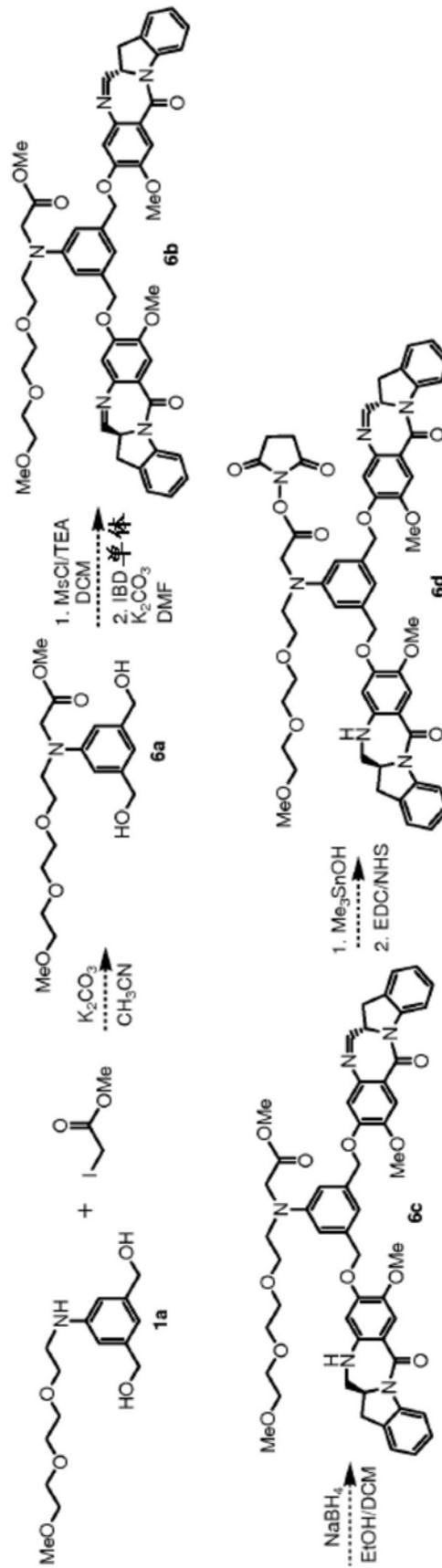


图6



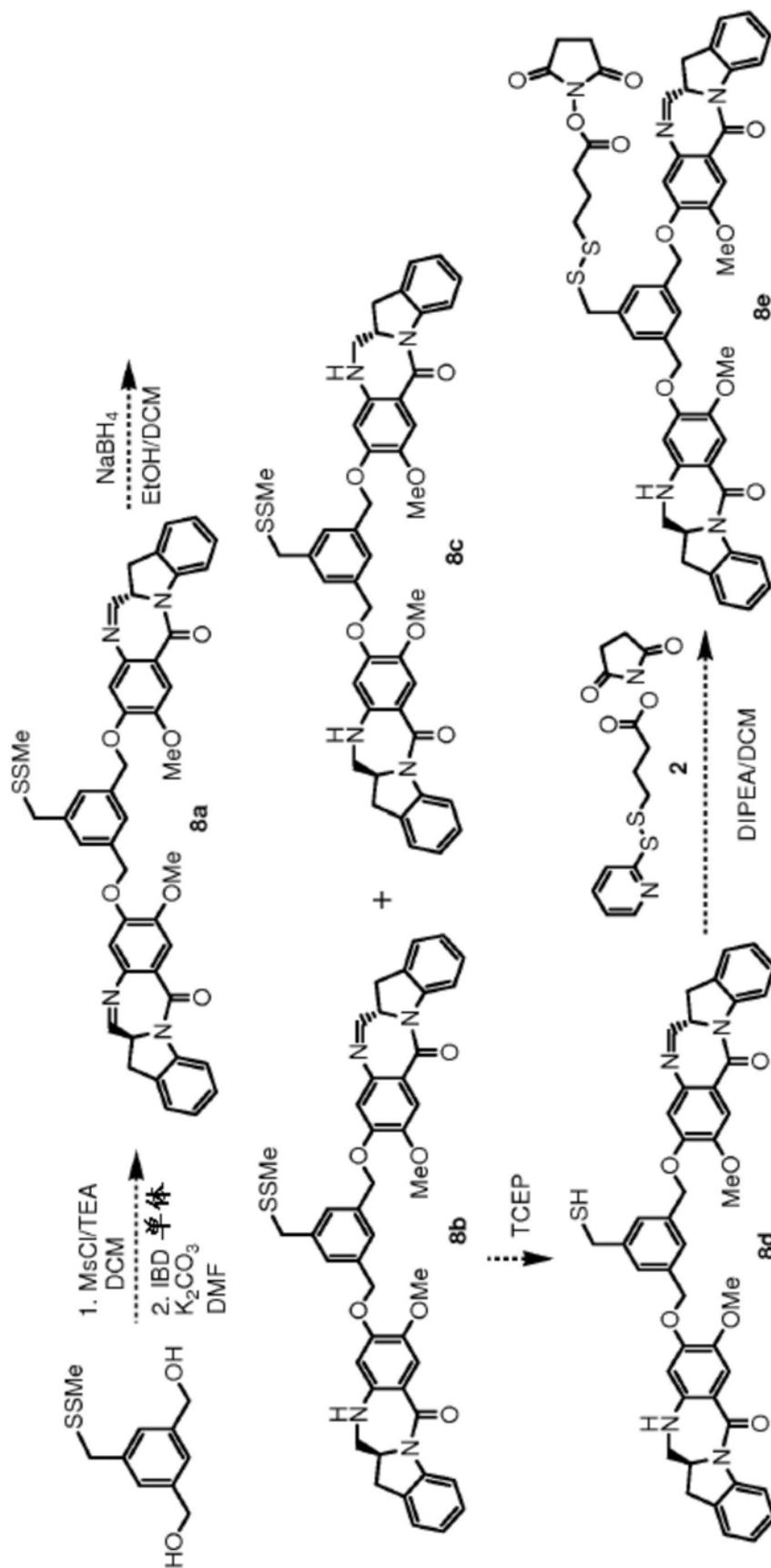


图8

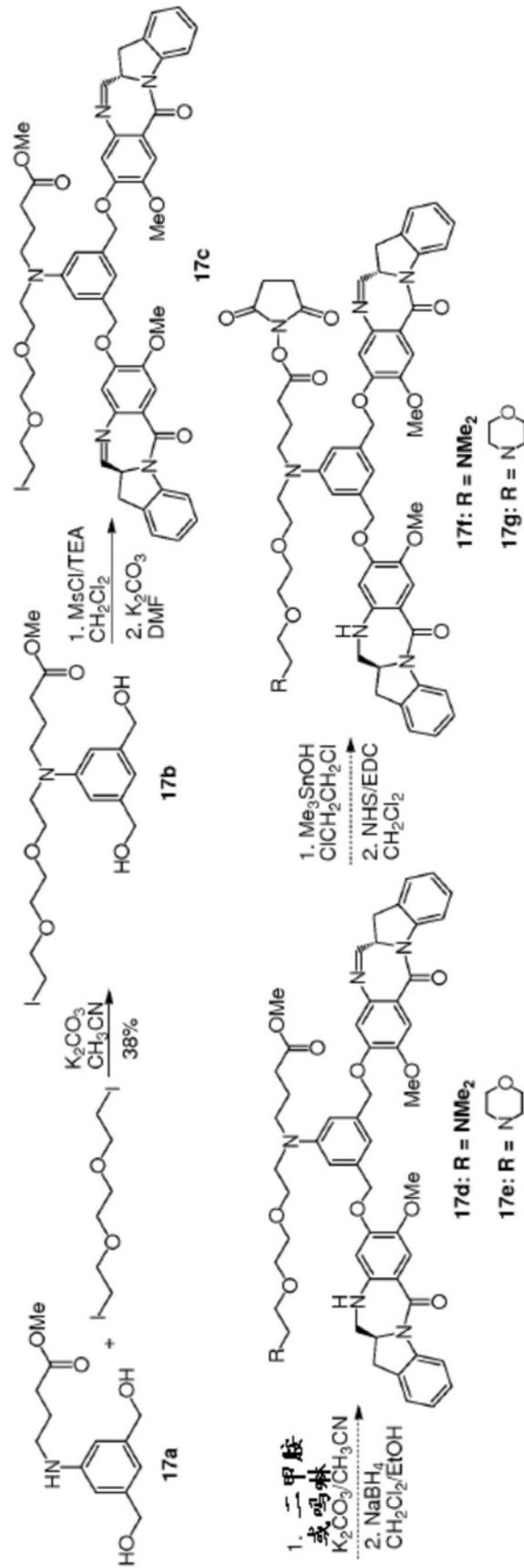


图9

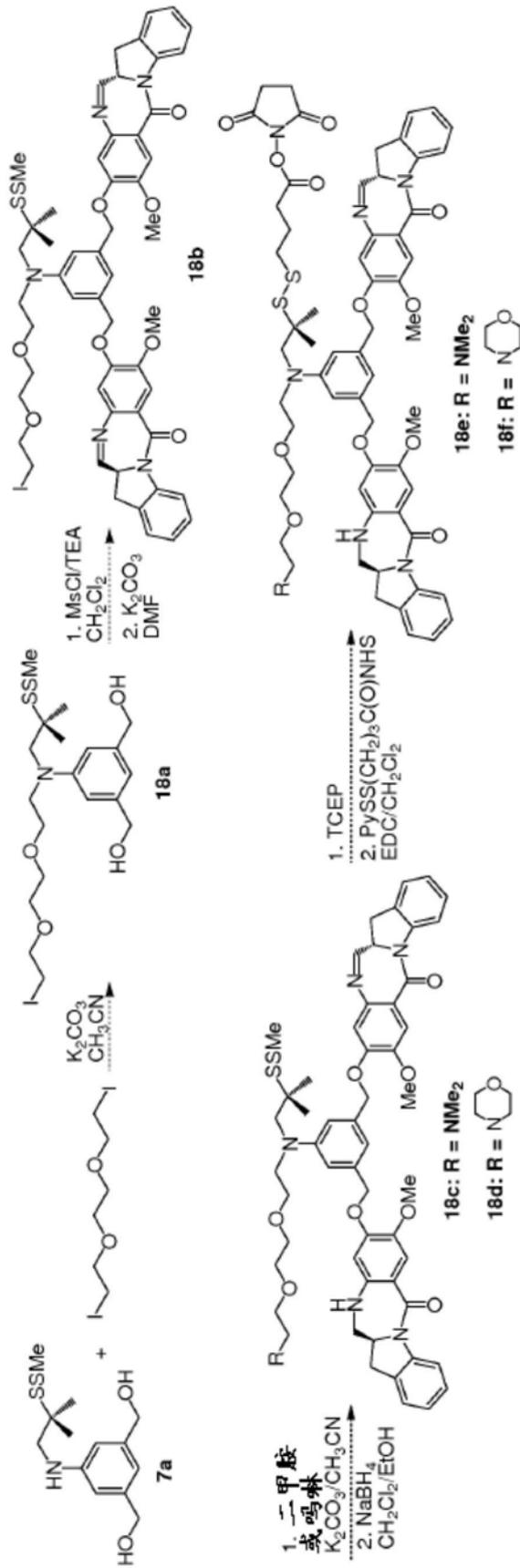


图10

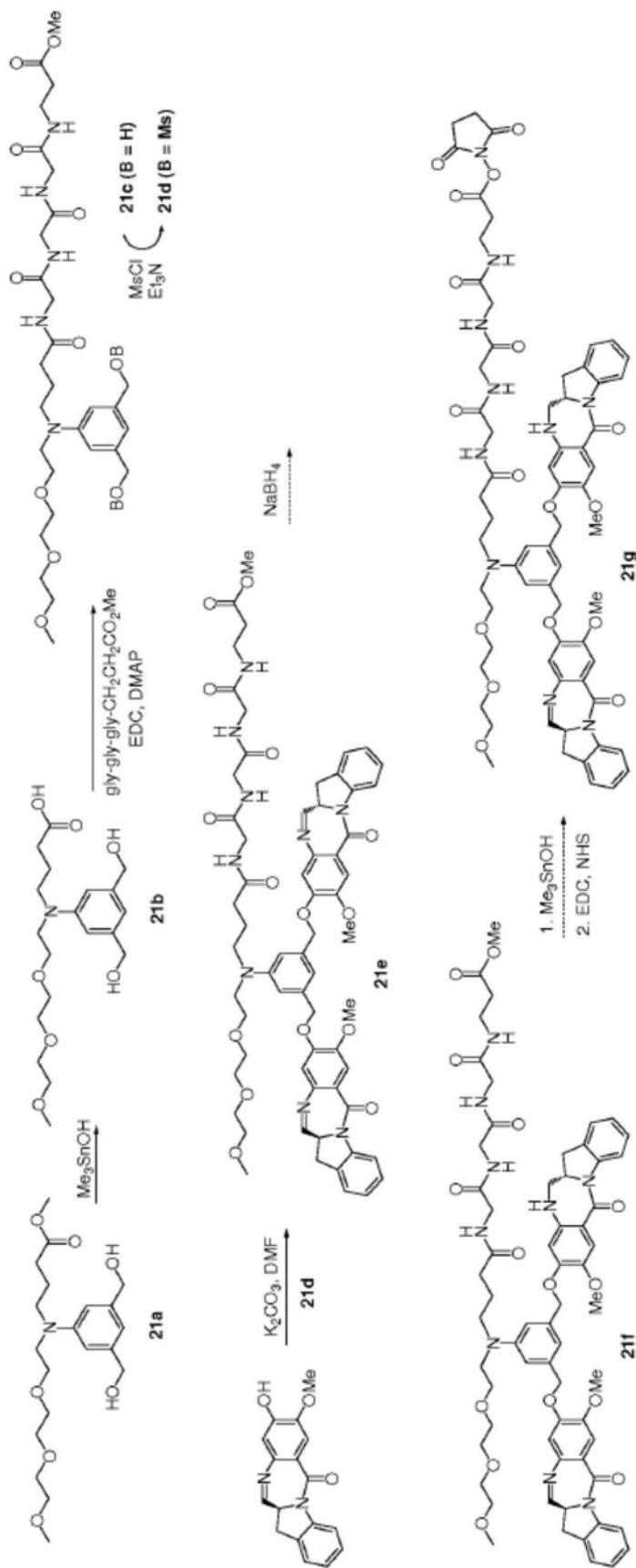


图11



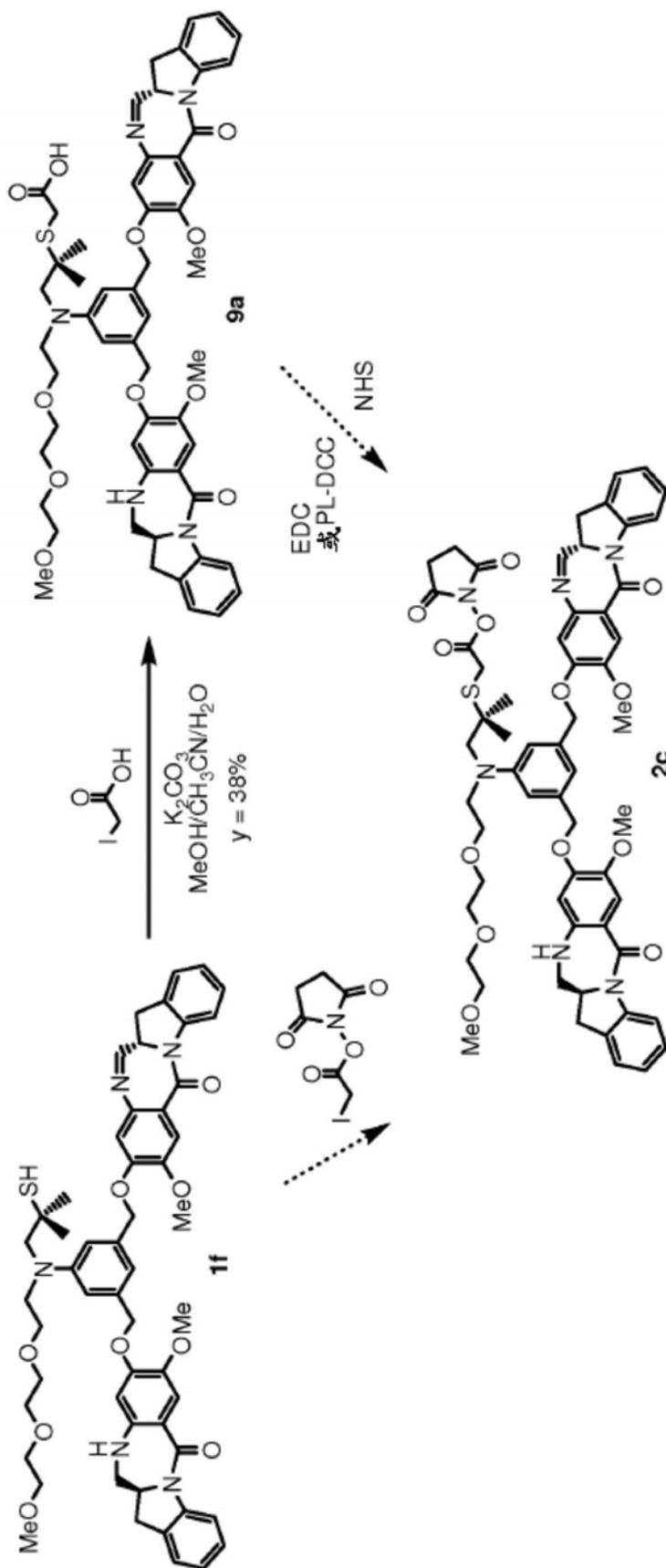


图12B

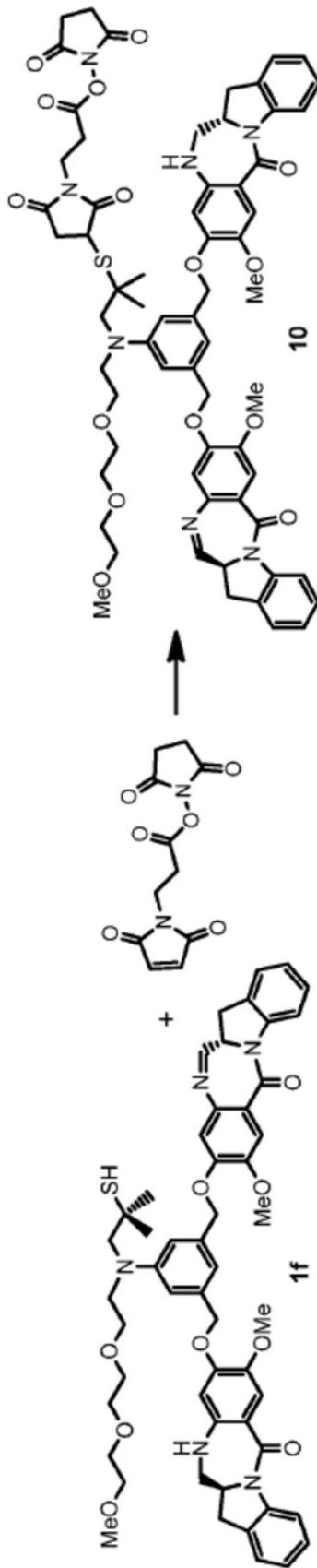


图13

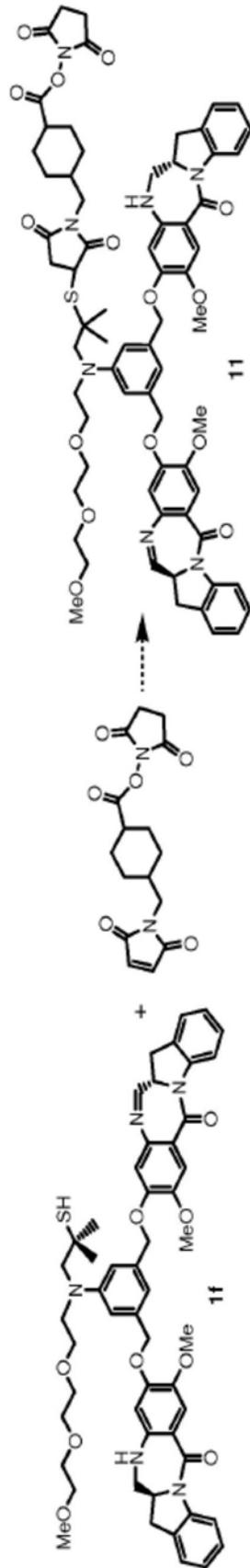


图14

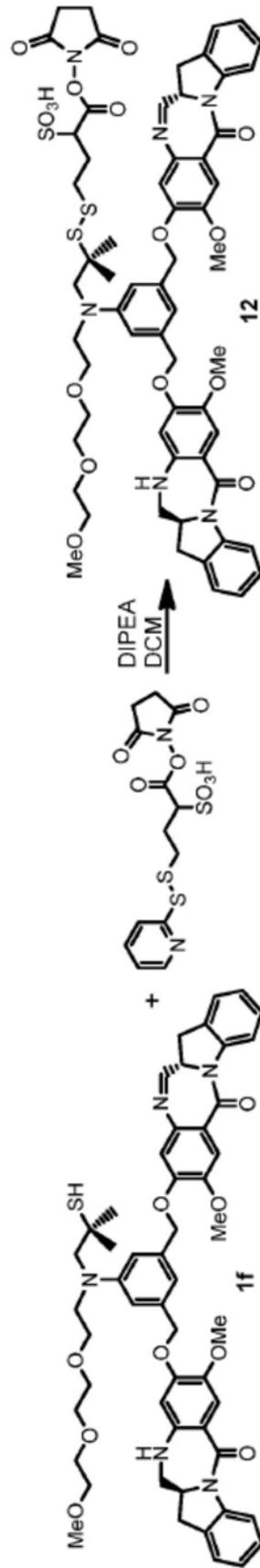


图15

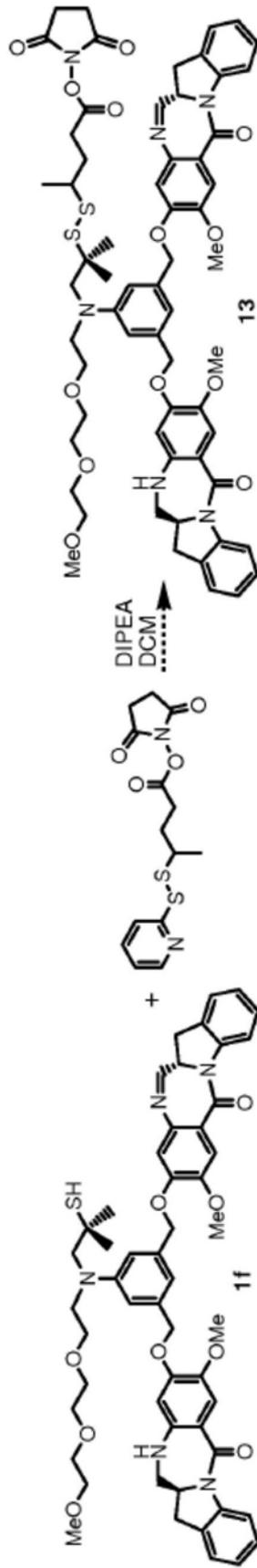


图16

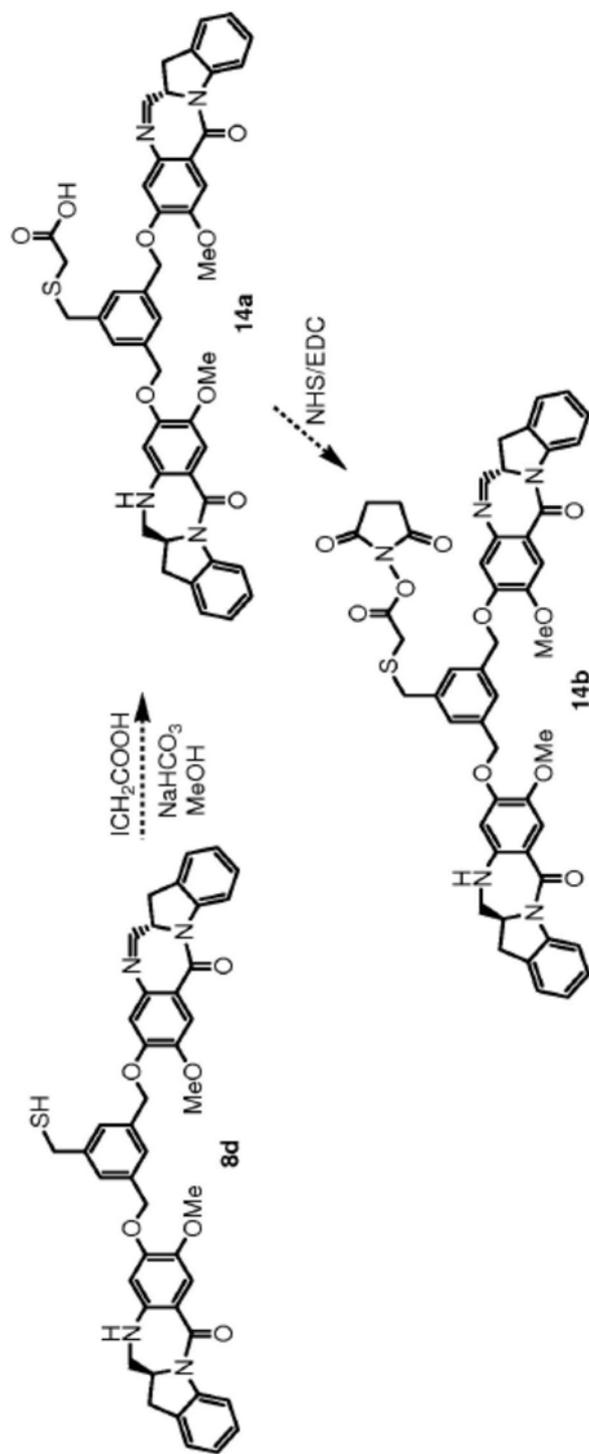


图17

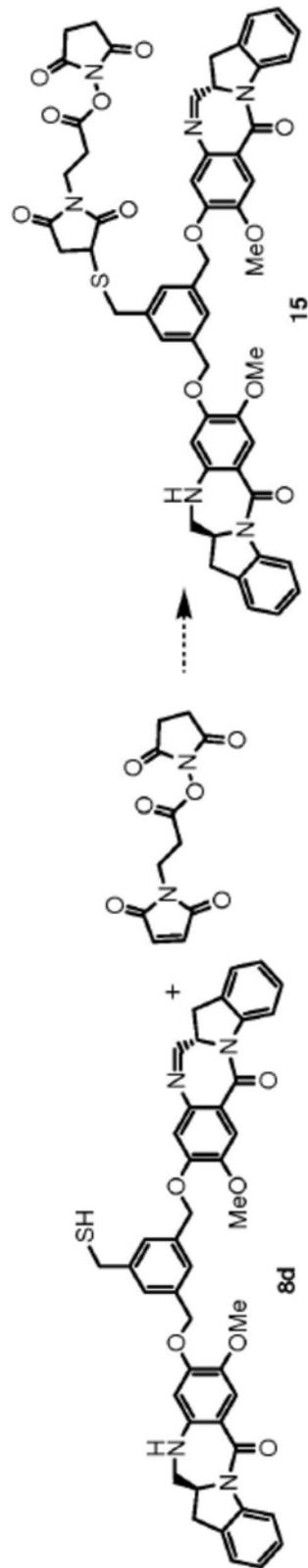


图18

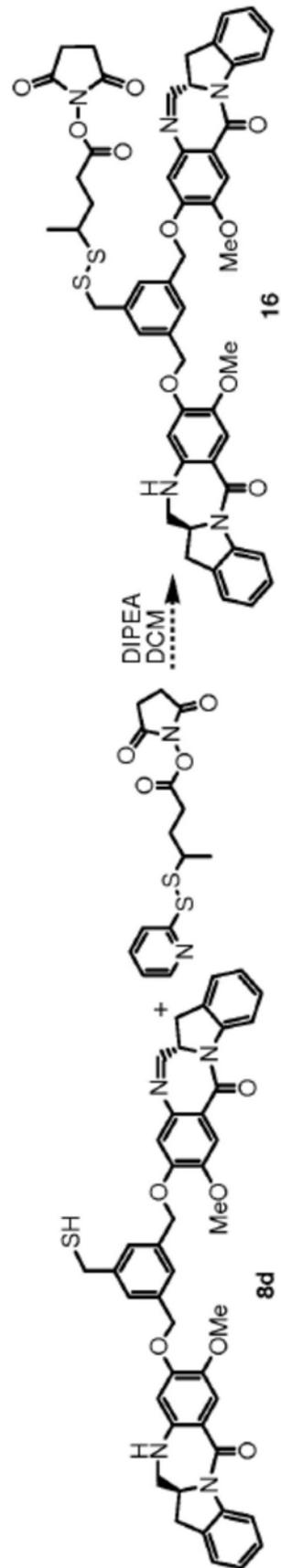


图19

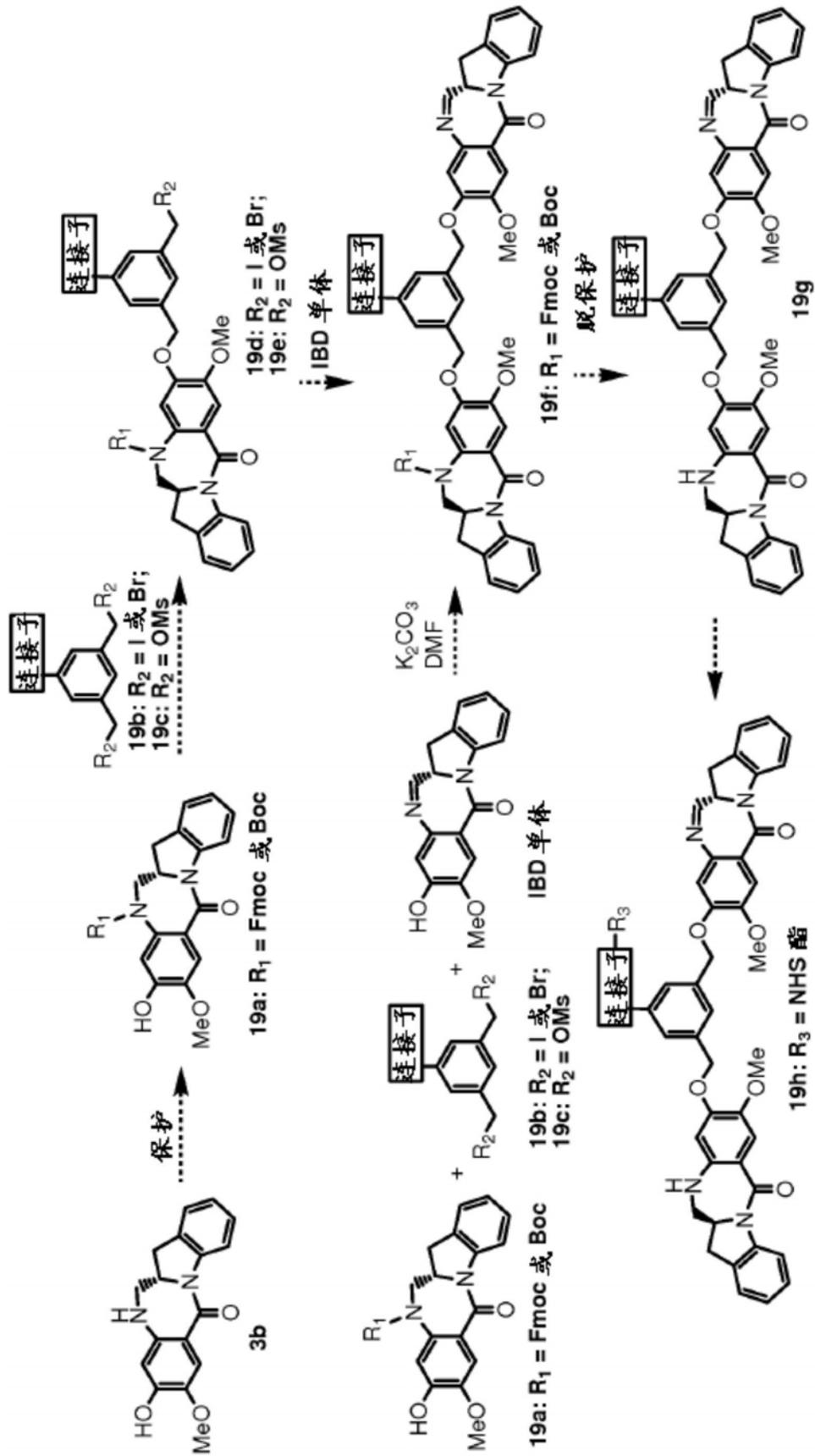


图20

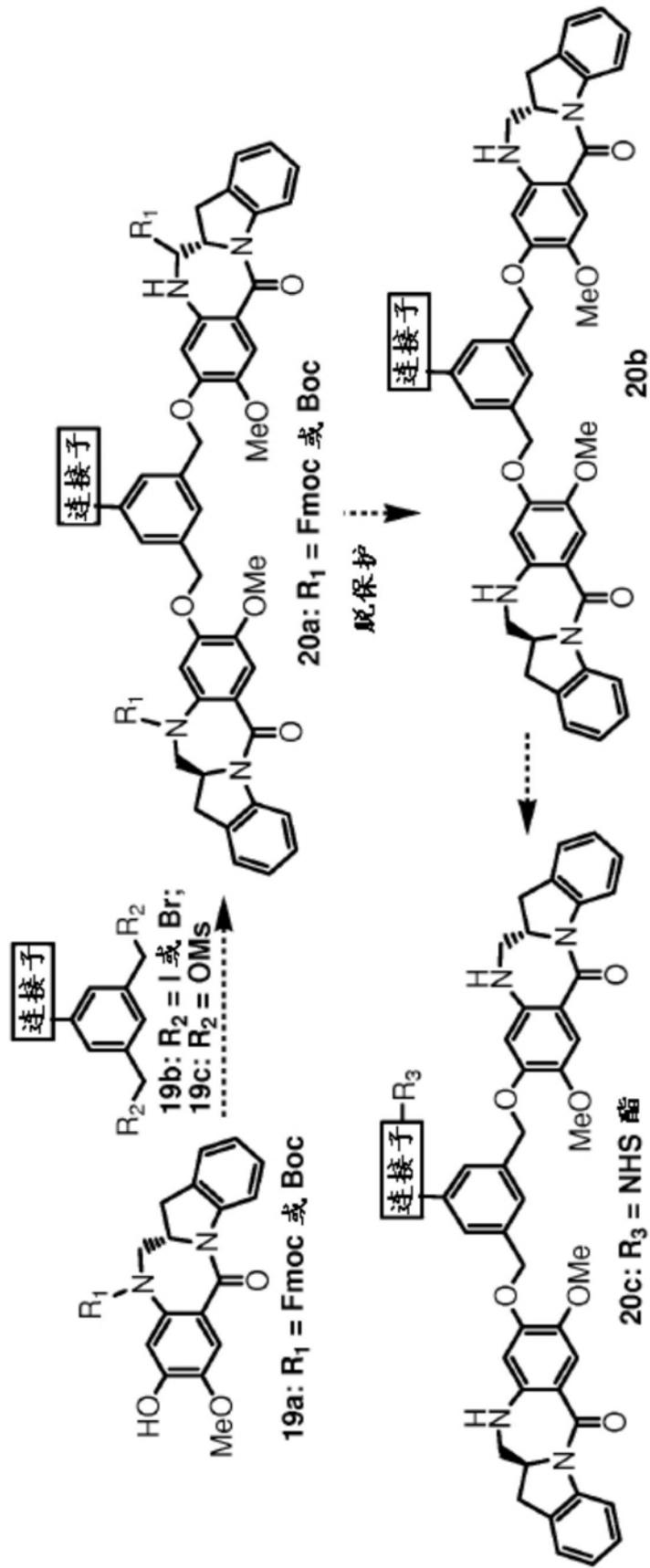


图21

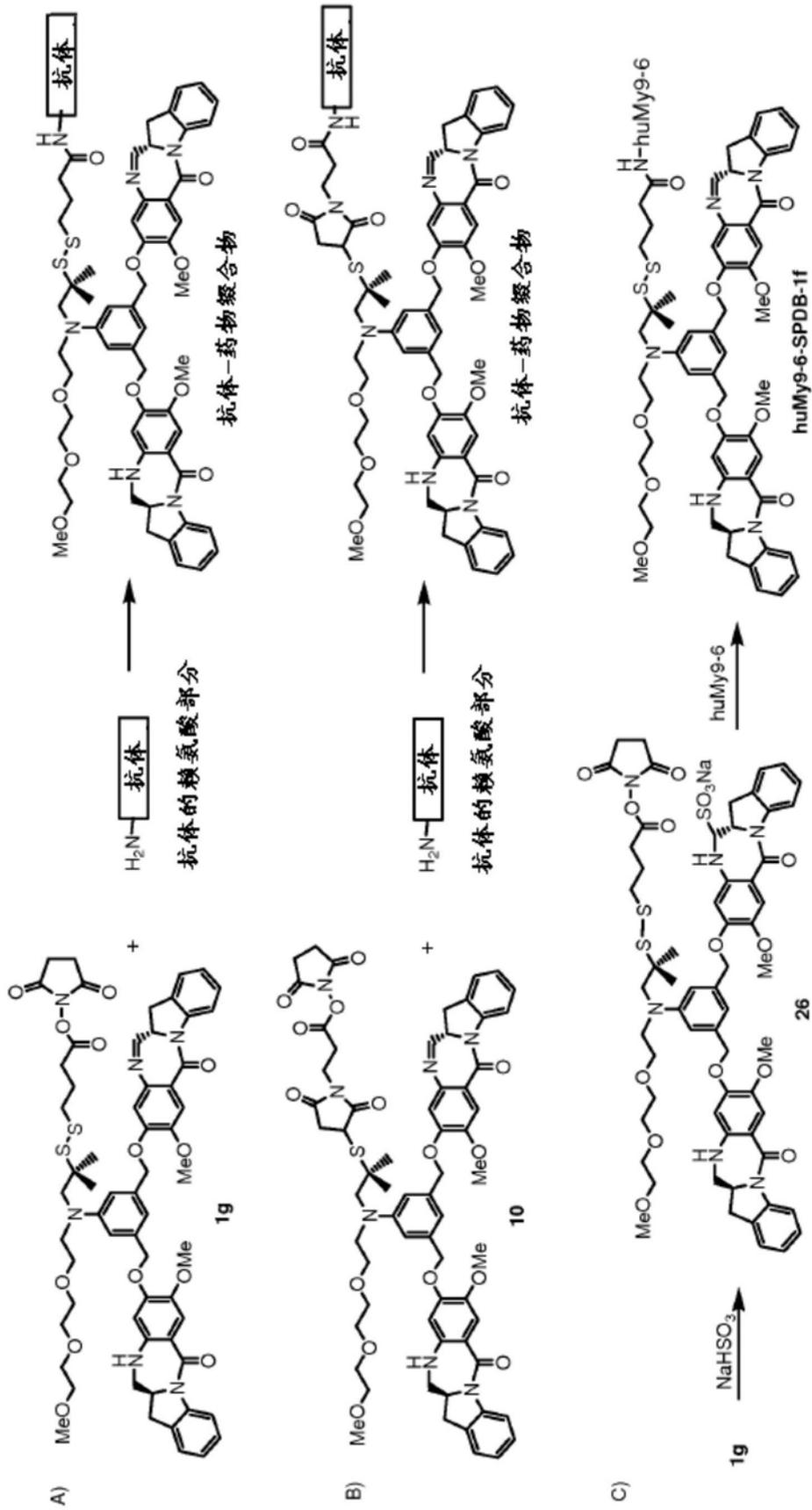


图22

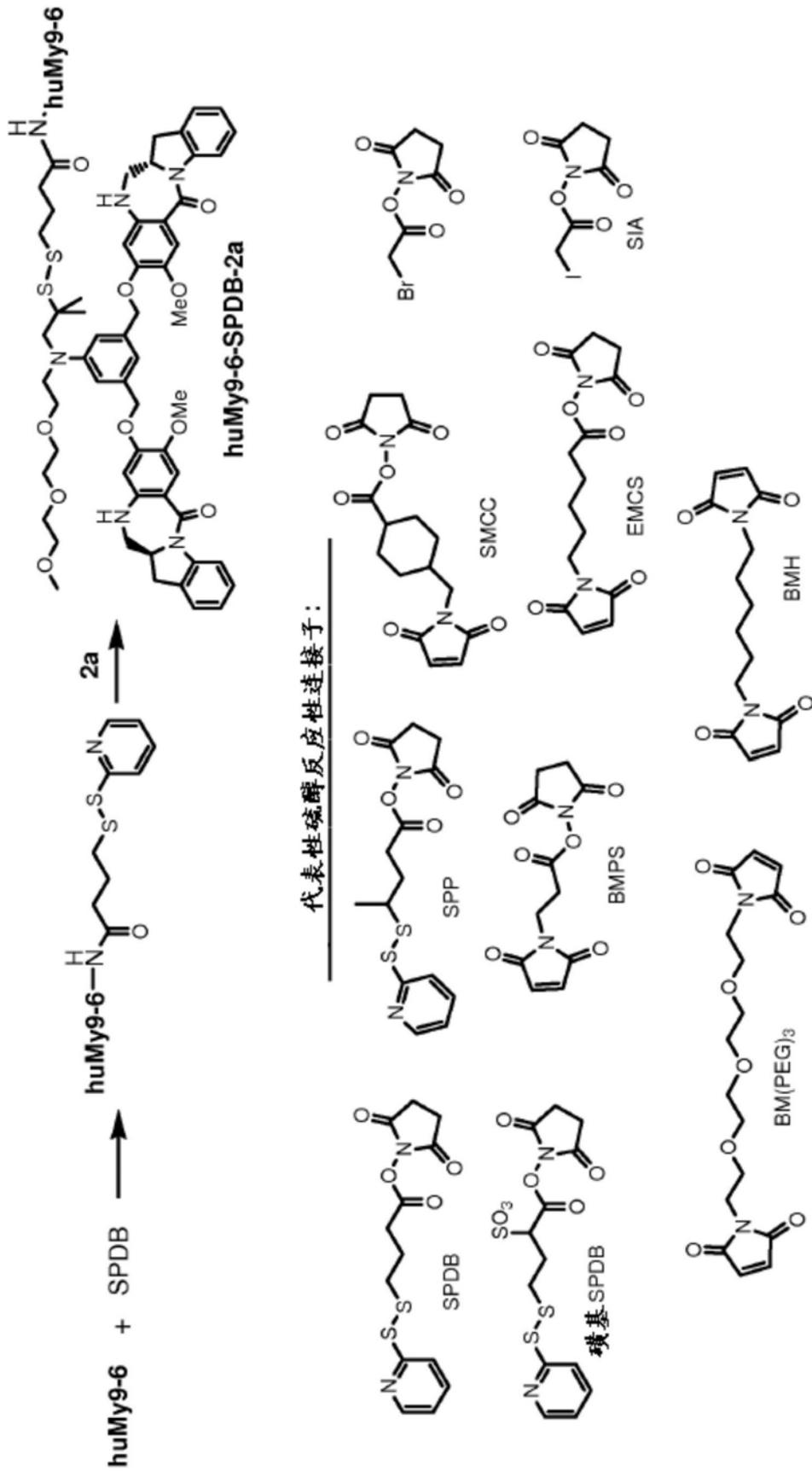


图23



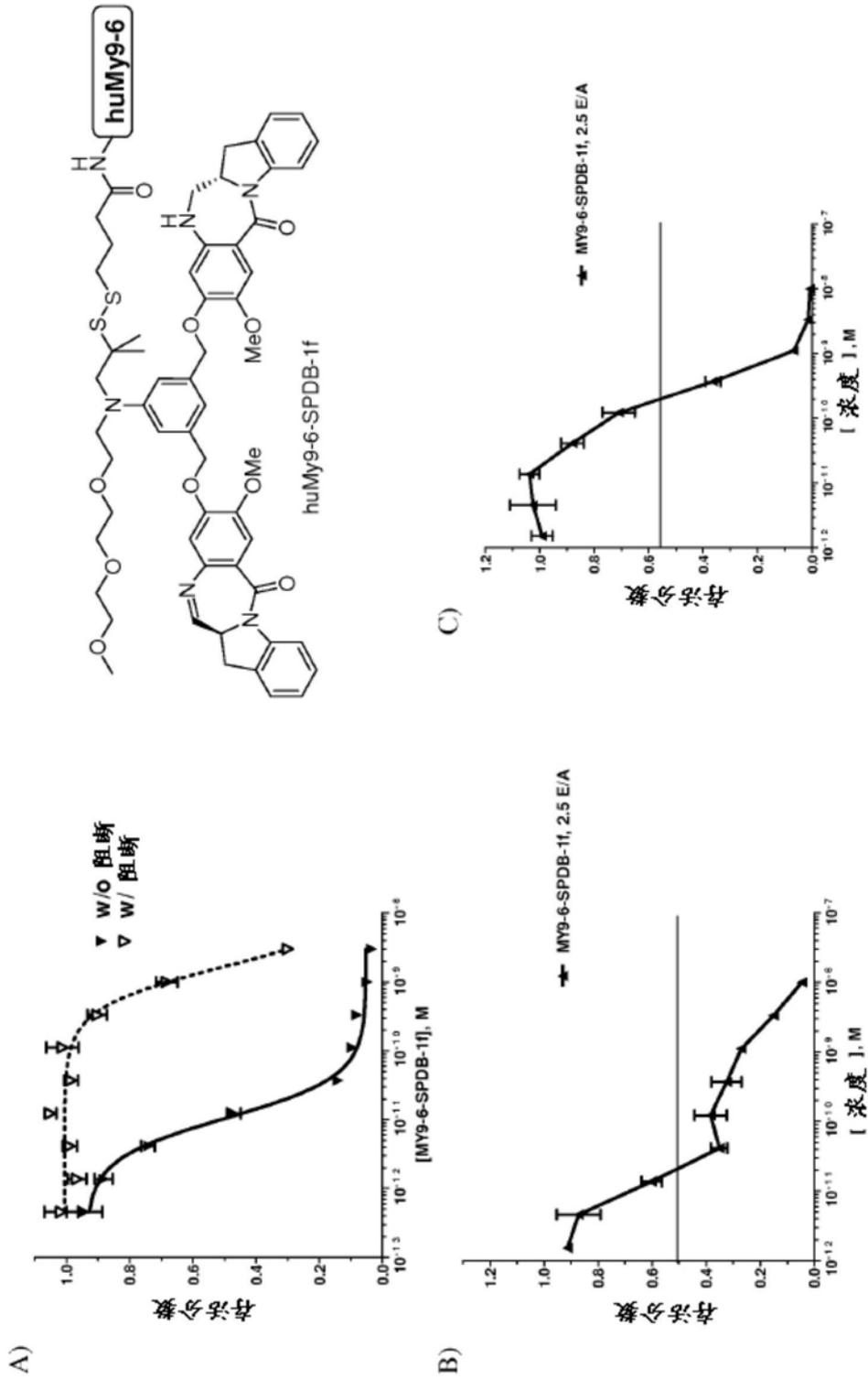


图25

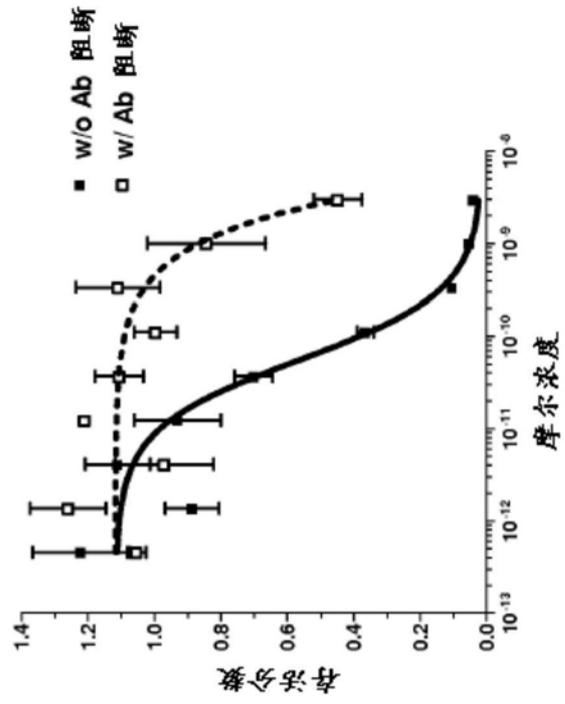
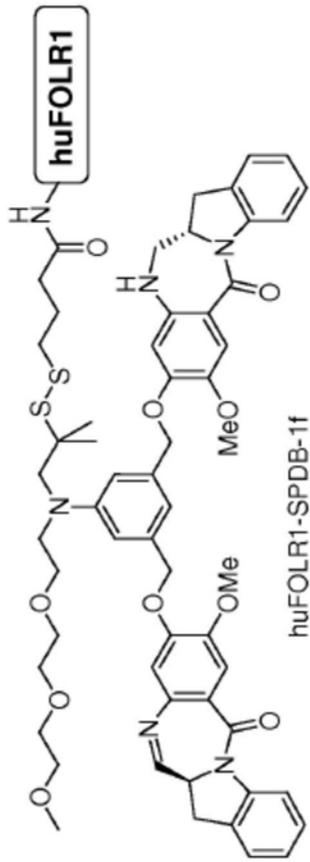


图26

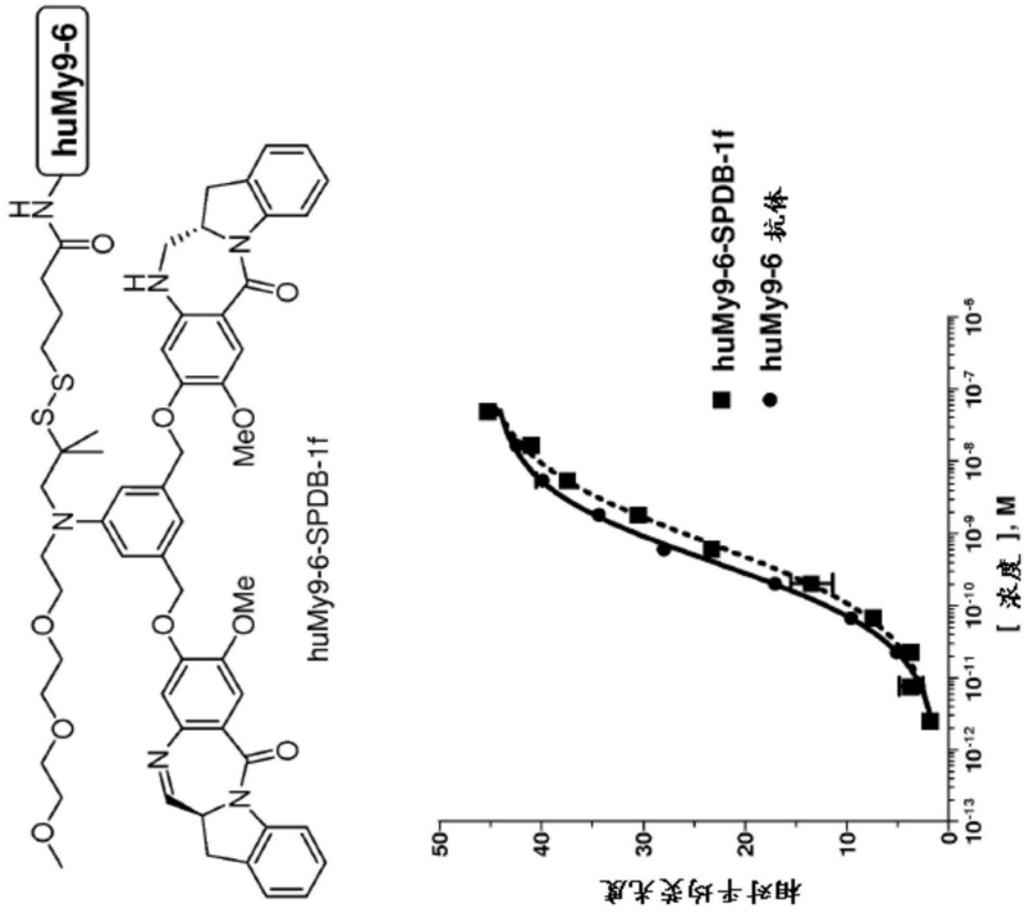


图27

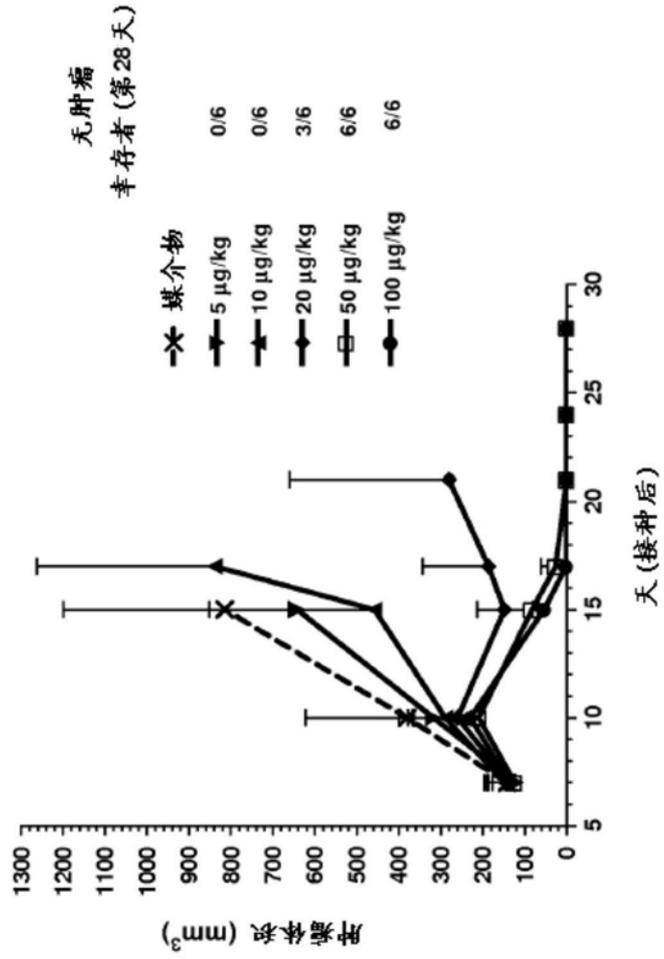
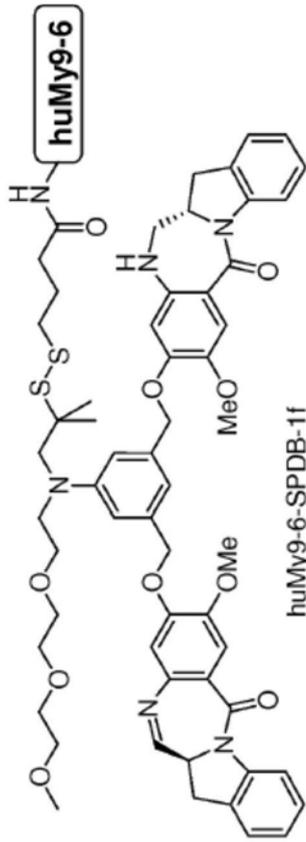


图28

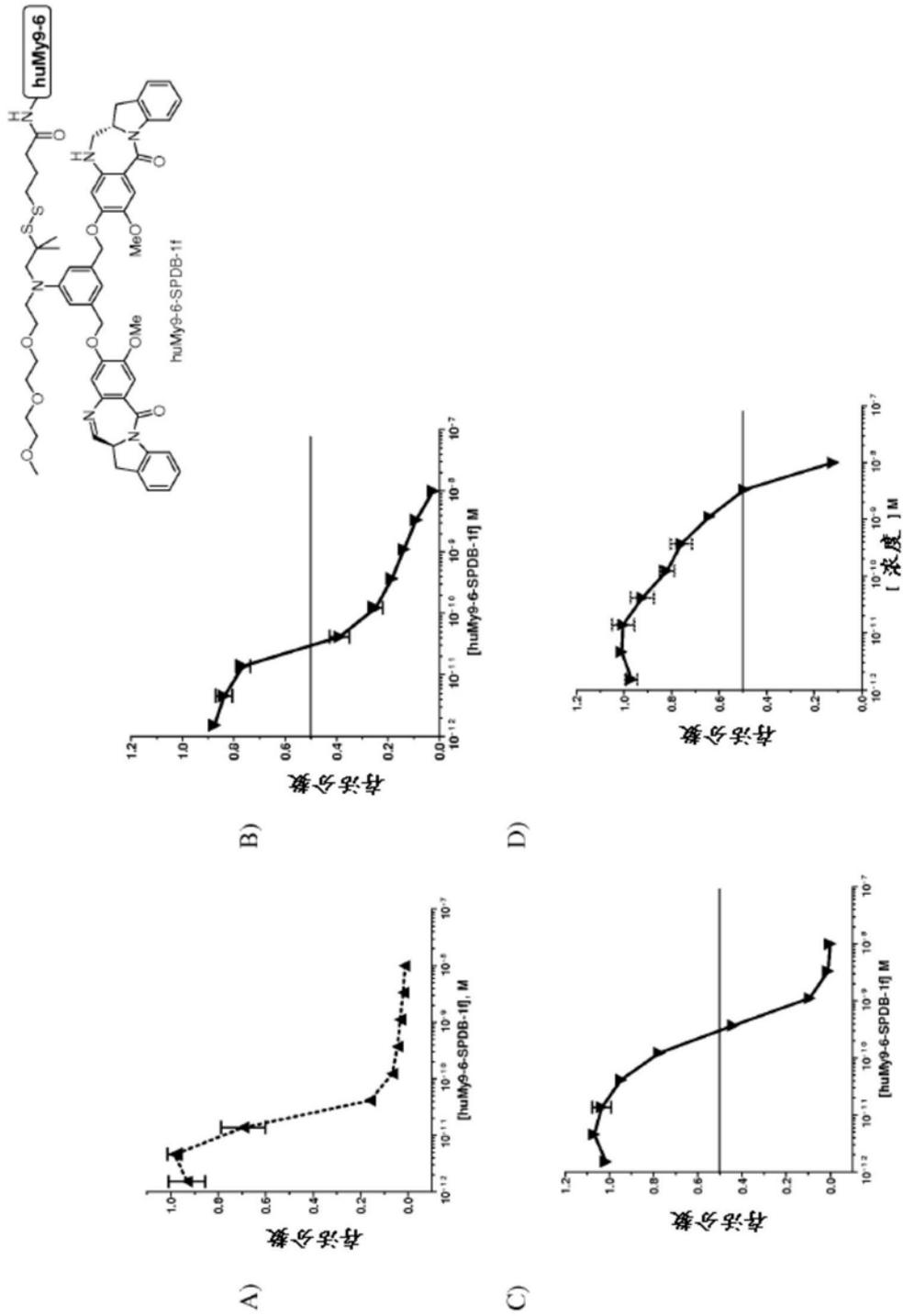


图29

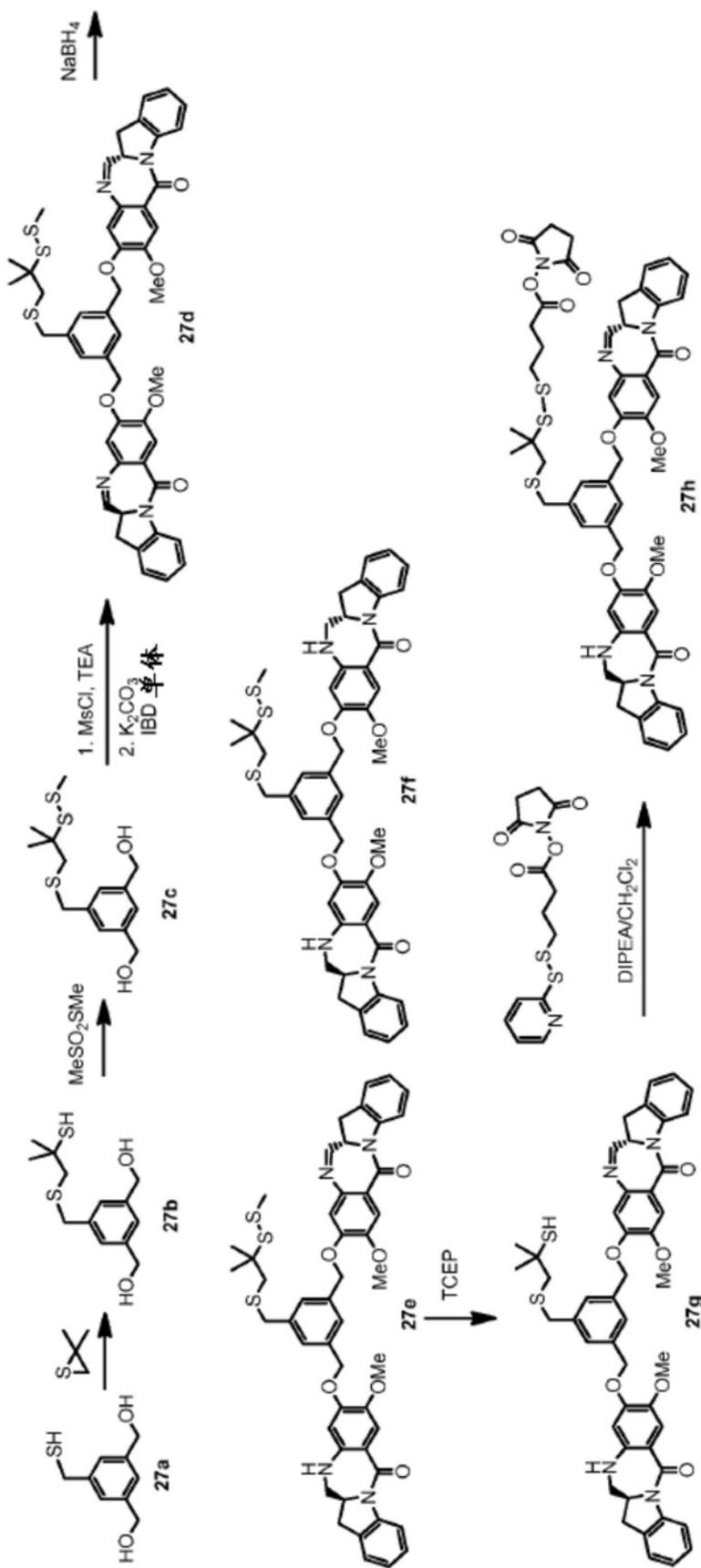


图30

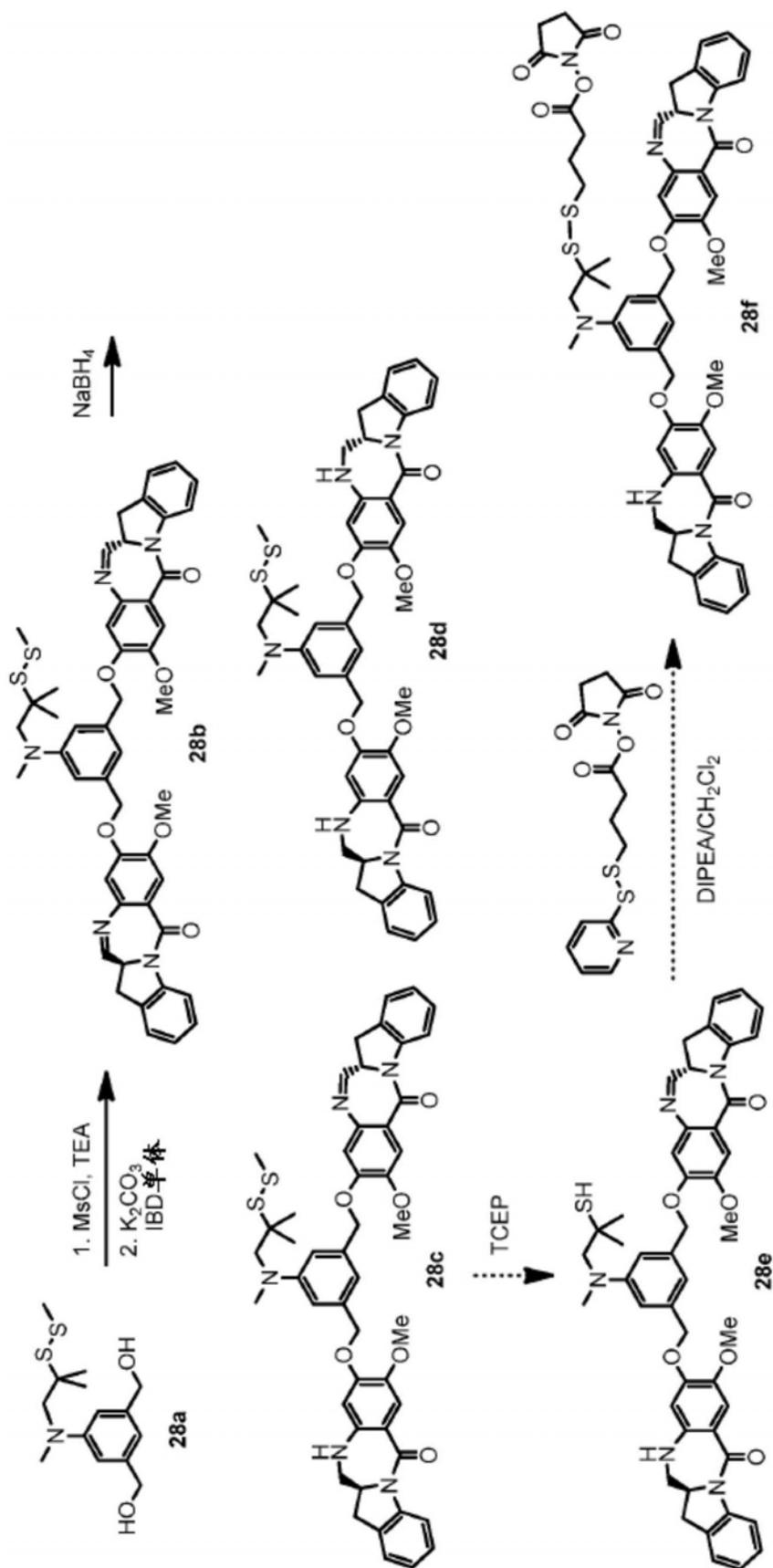


图31

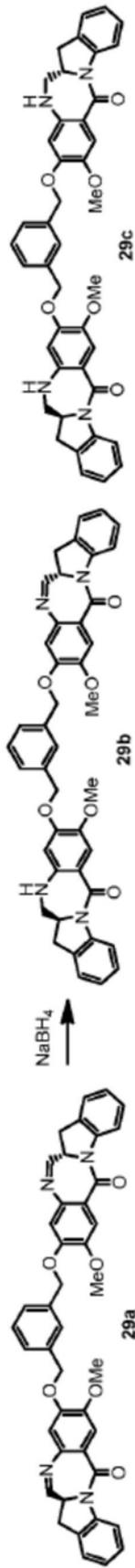


图32



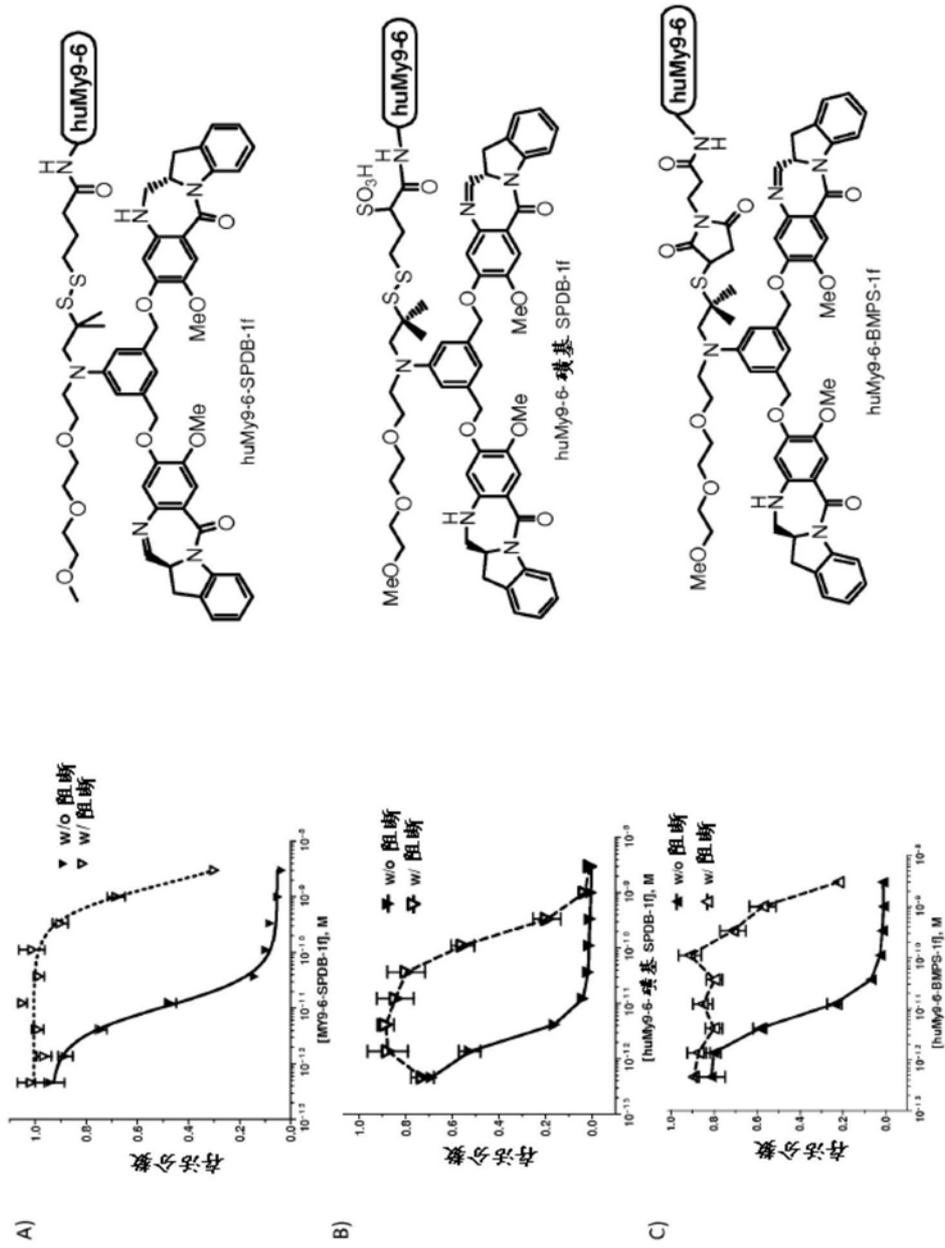


图34

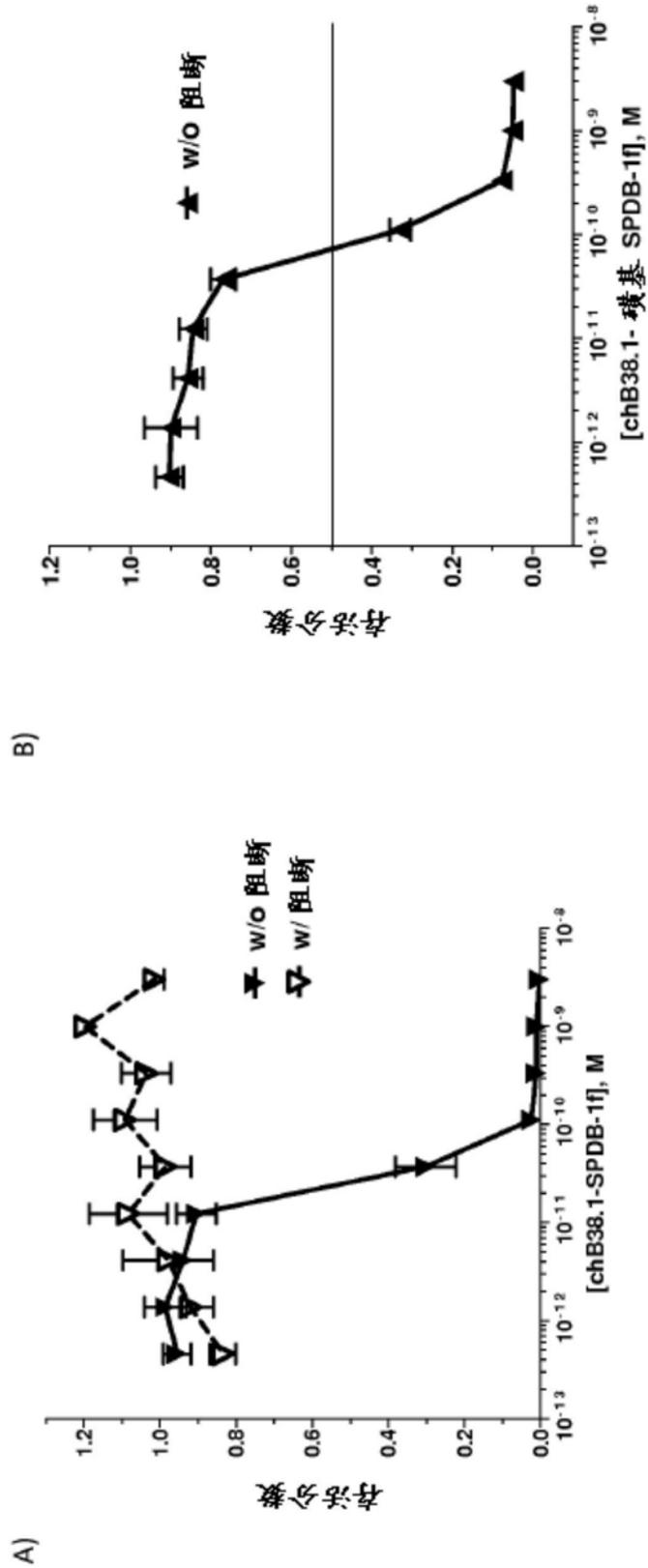


图35

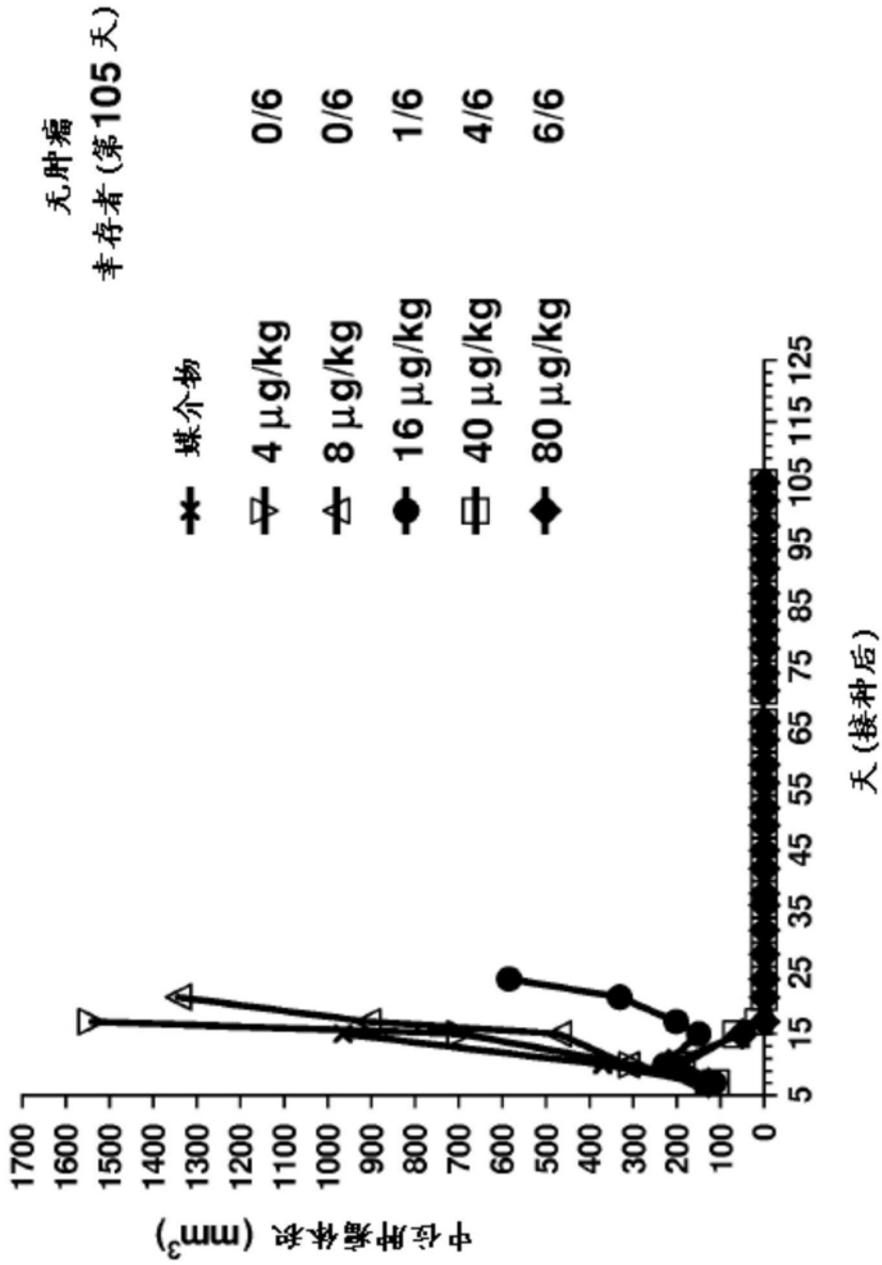


图36

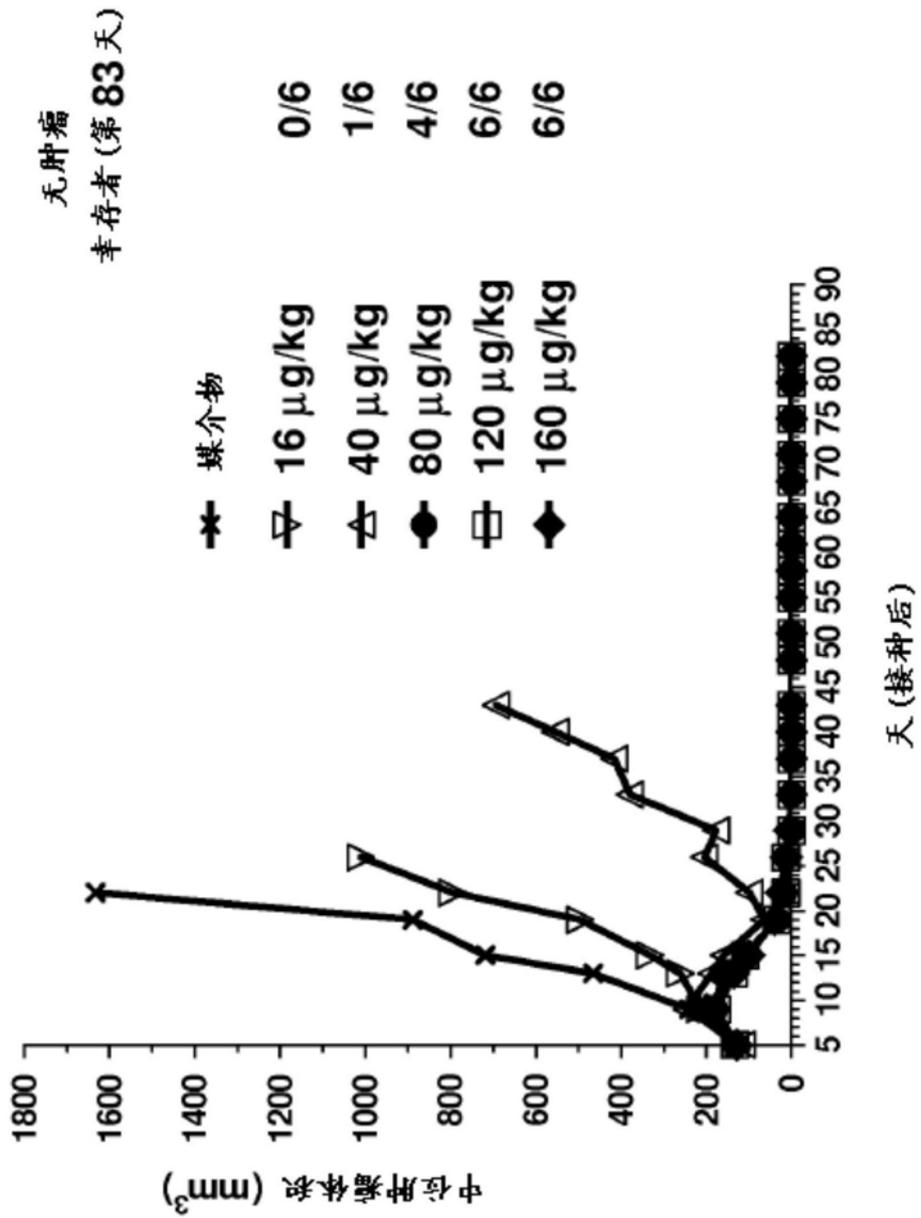


图37

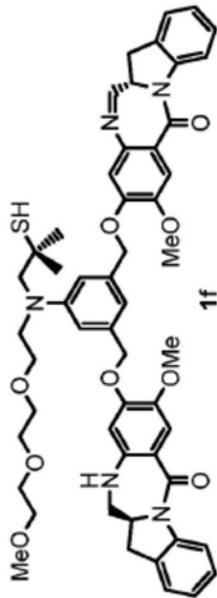
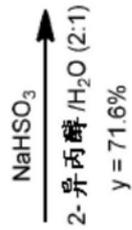
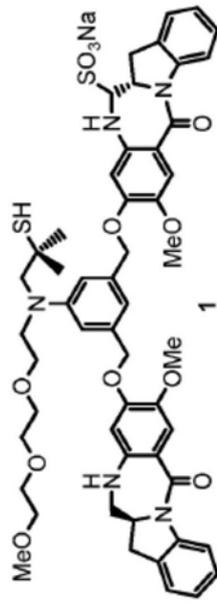


图38

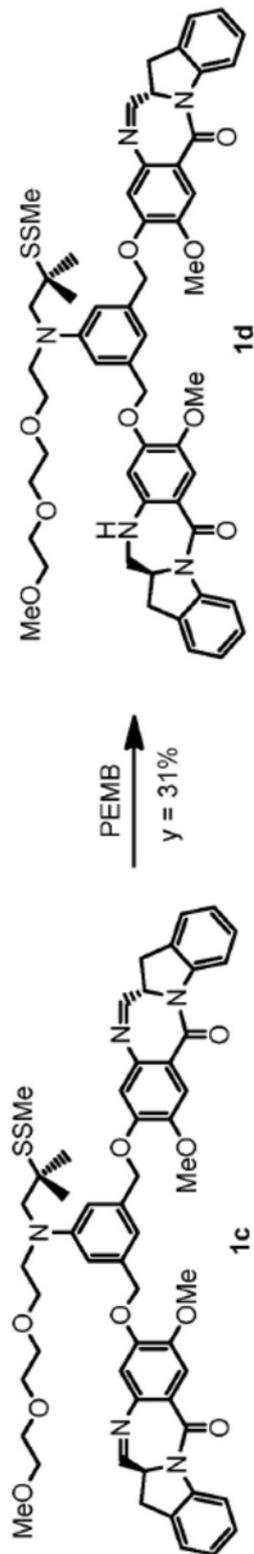


图39



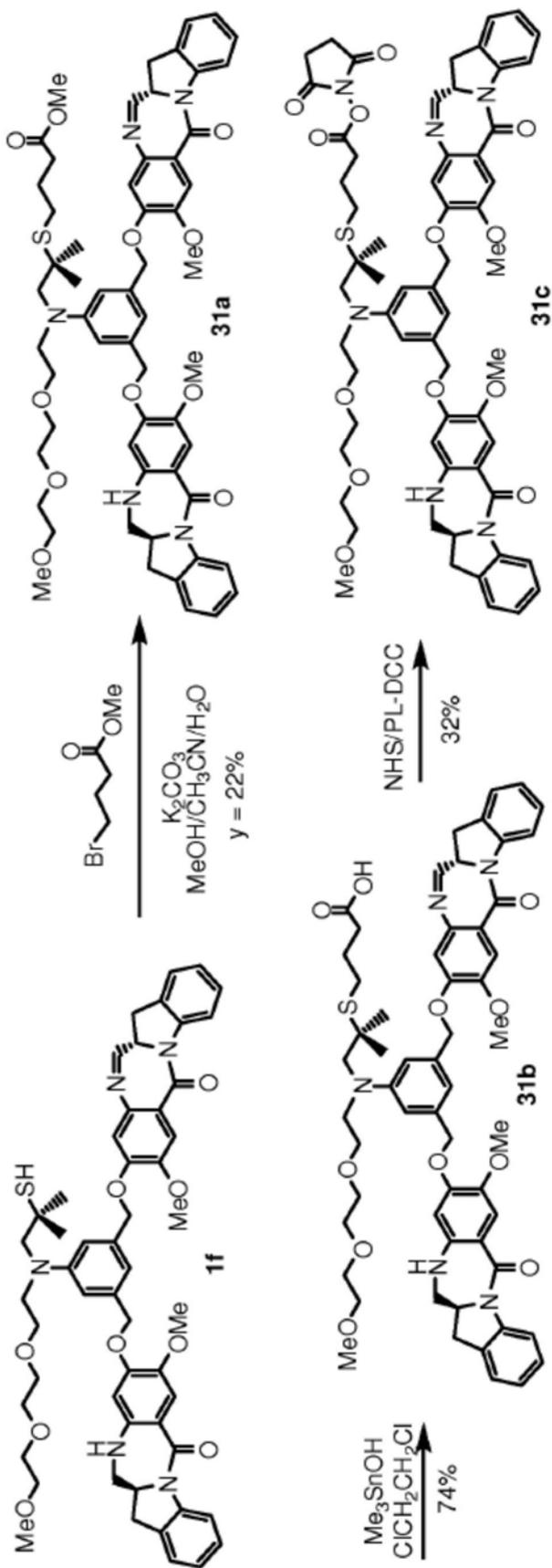


图41

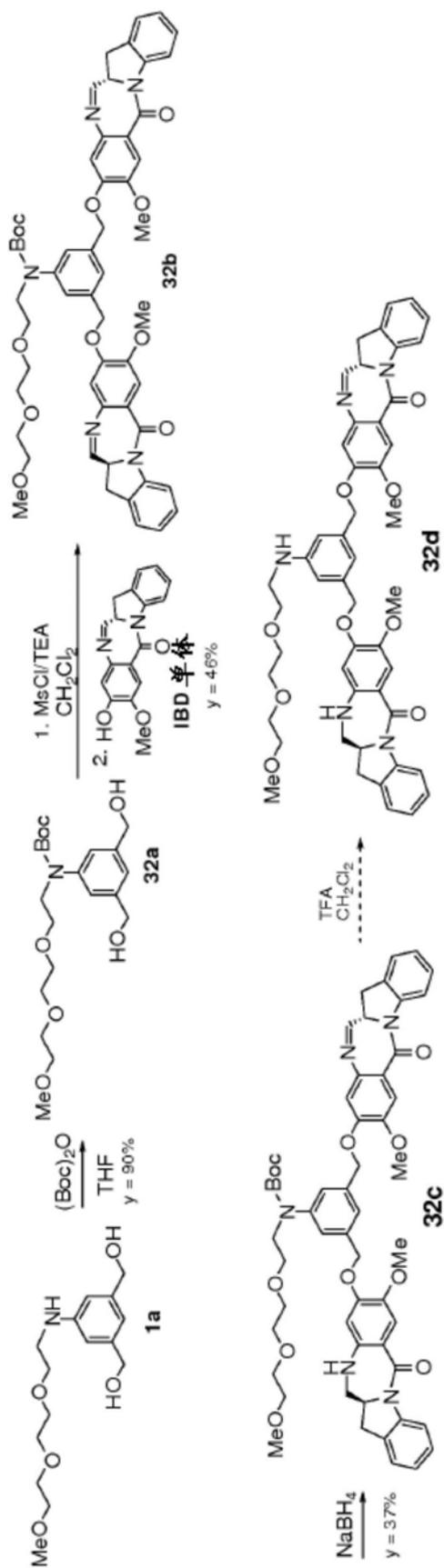


图42

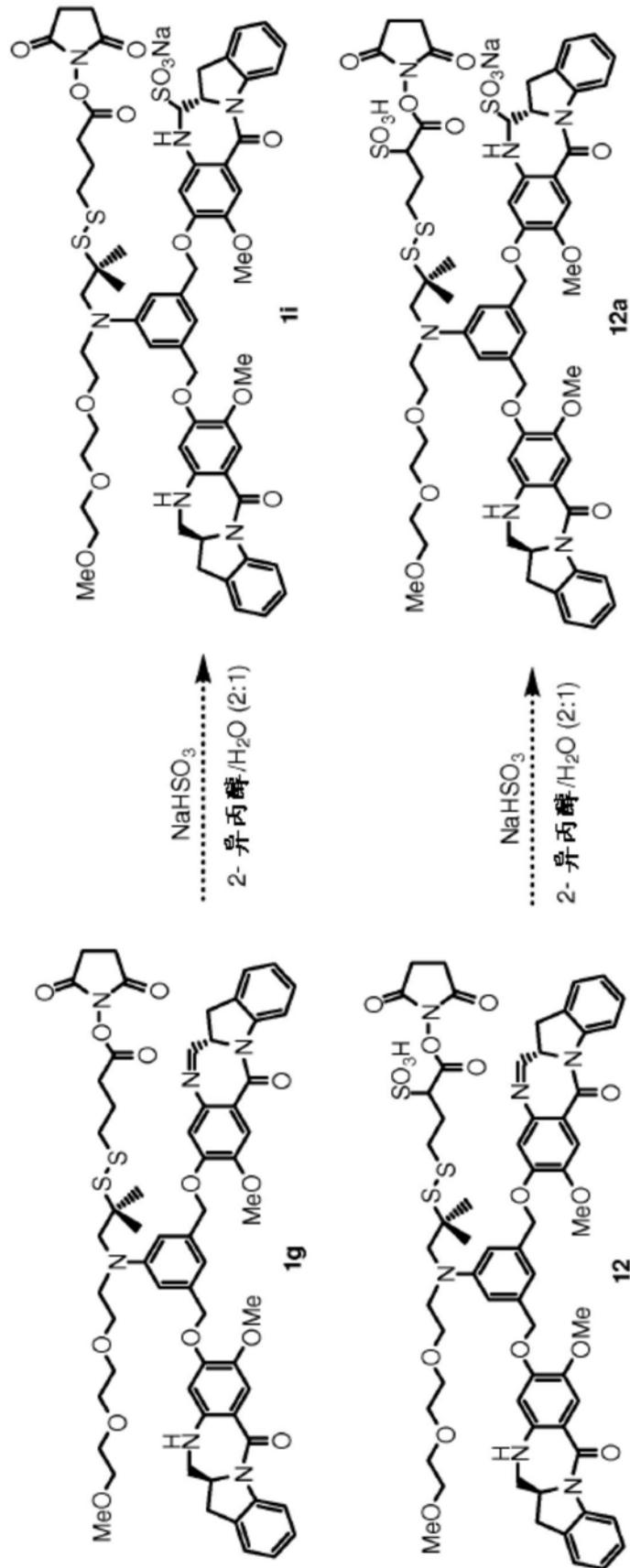


图43

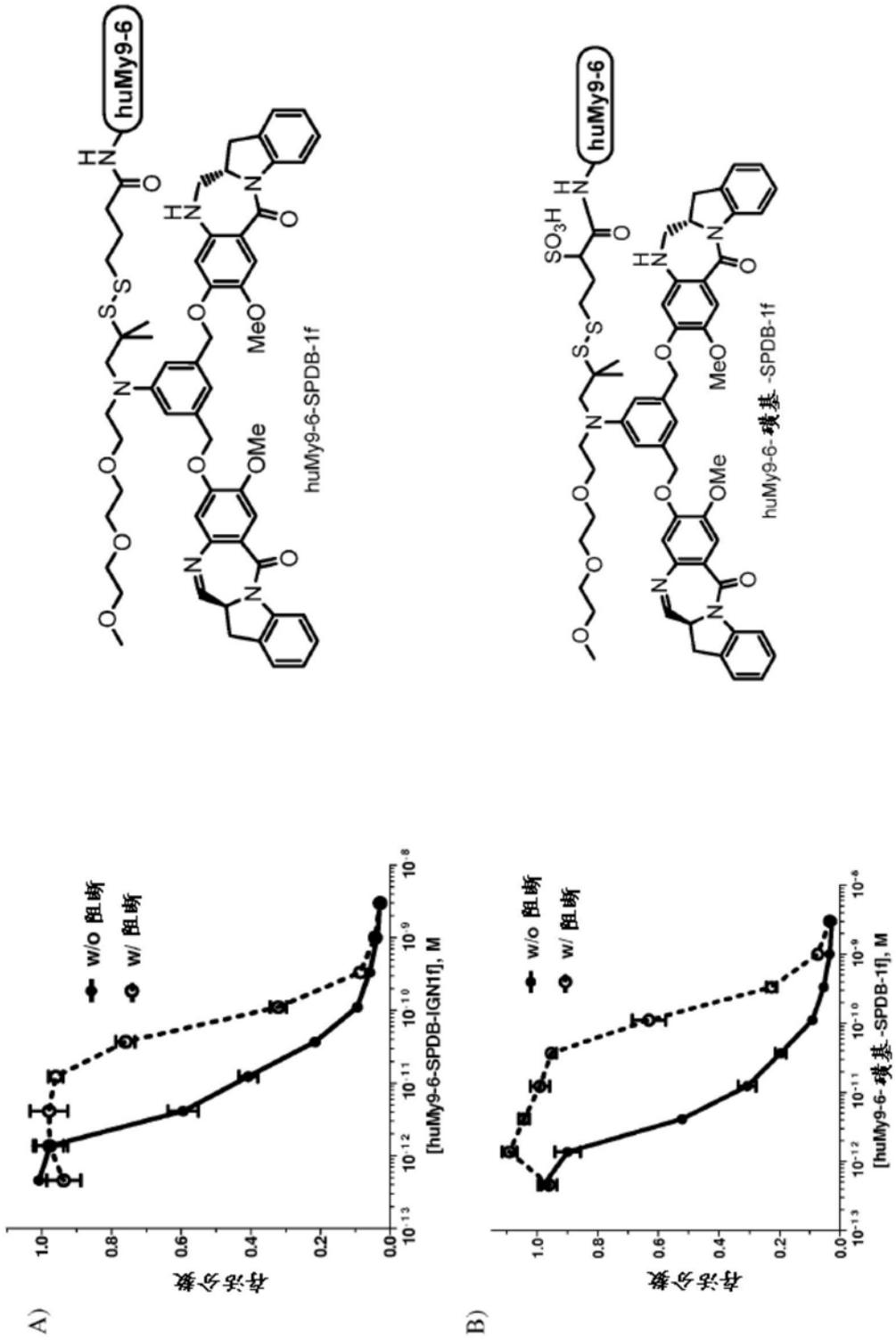


图44

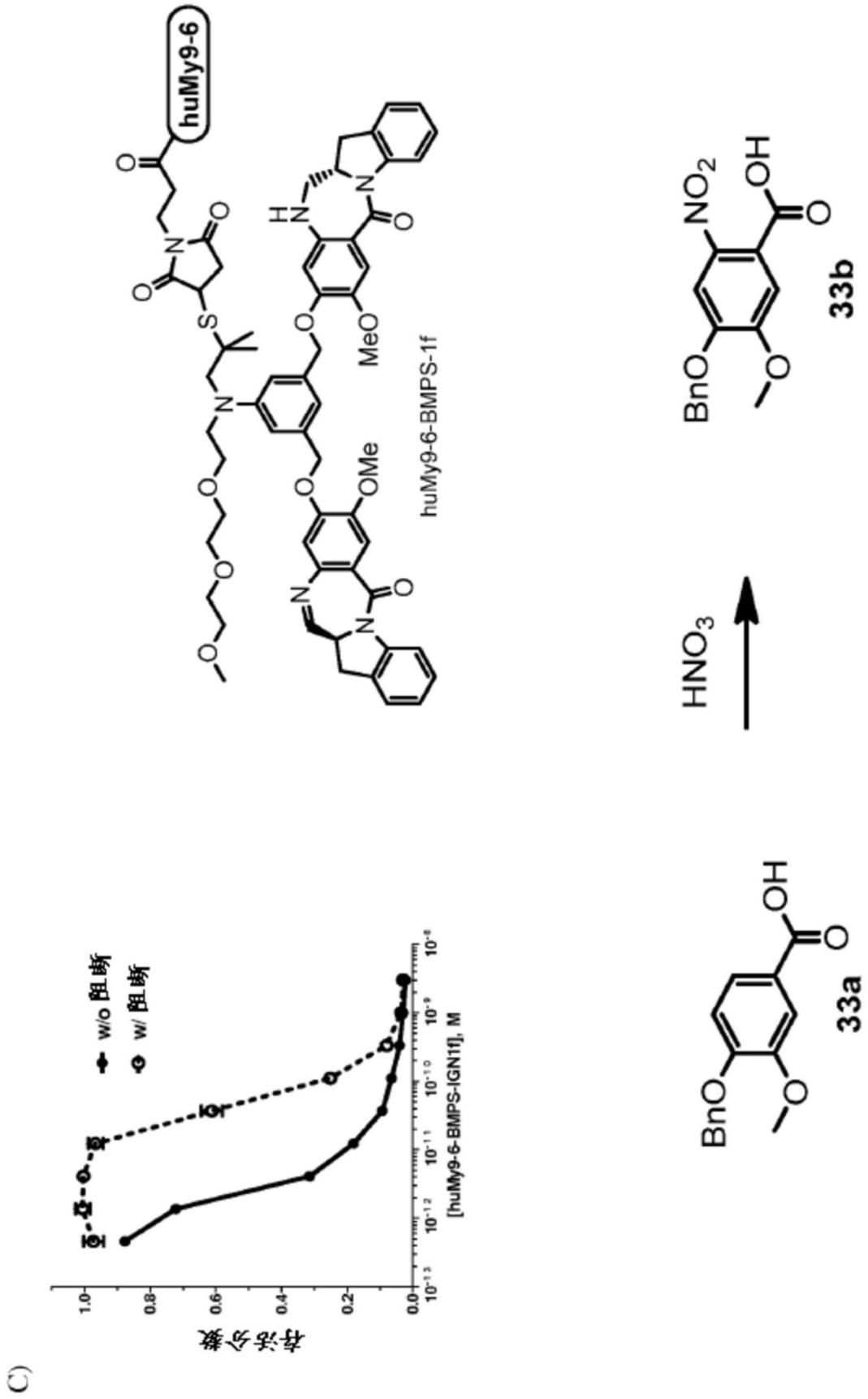


图45

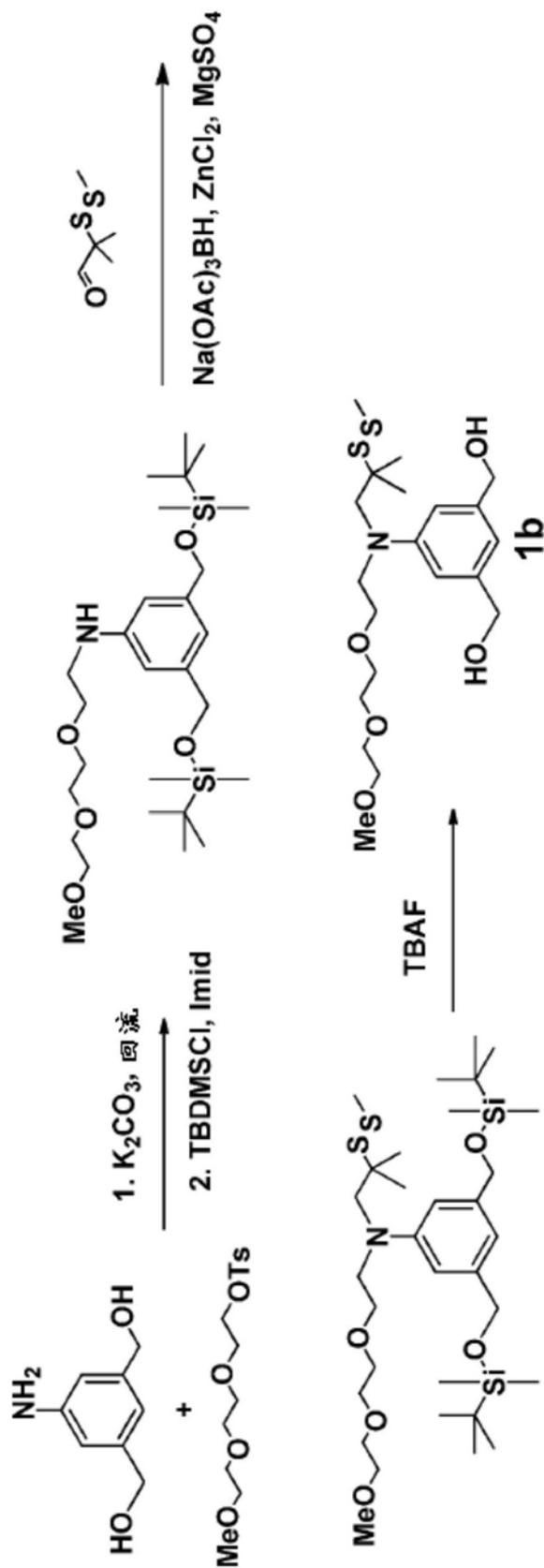


图46

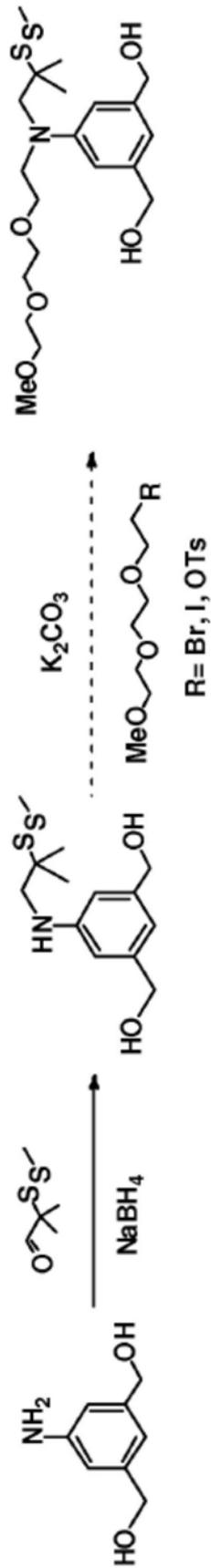


图47

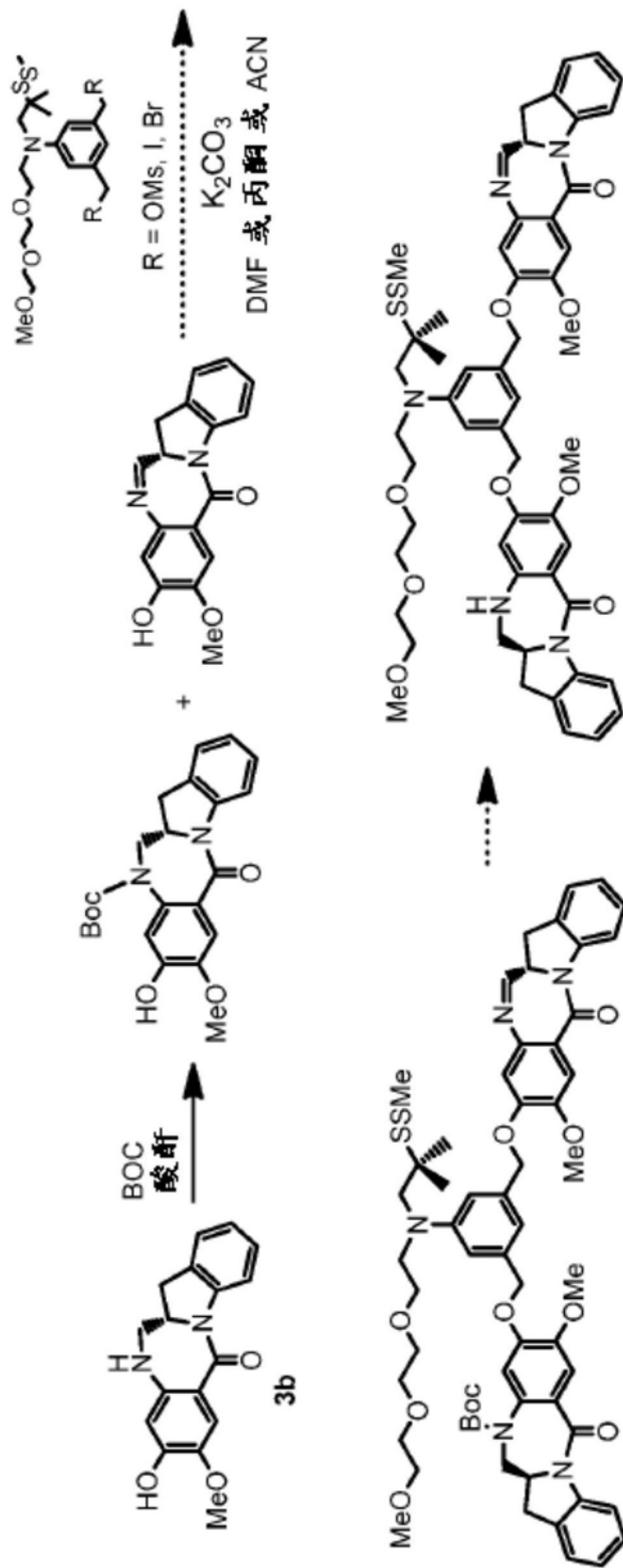


图48

緩合物	HL60/QC	MOLM-13	NB4	HEL92.1.7	OCI-AML3
huMy9-6-SPDB-1f	0.005	0.003	0.3	0.5	0.01
huMy9-6-磷基-SPDB-1f	0.006	0.002	0.4	0.05	0.008
huMy9-6-BMPS-1f	0.003	0.001	0.04	0.04	0.003

图49

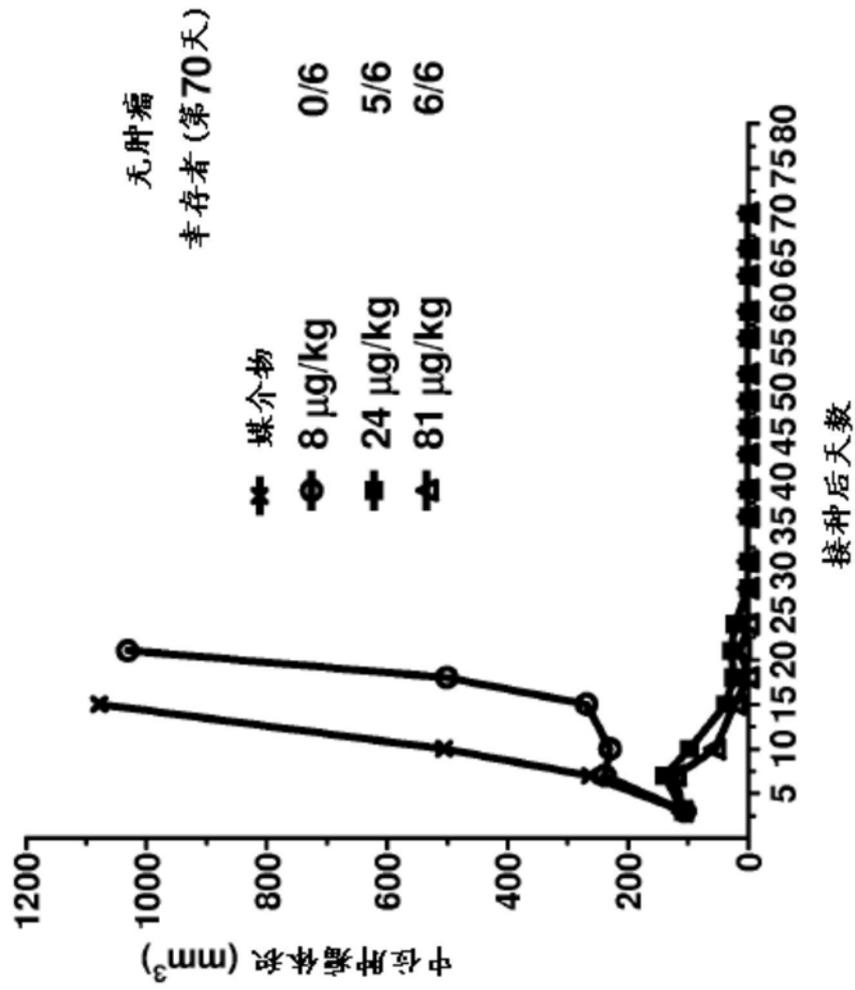


图50

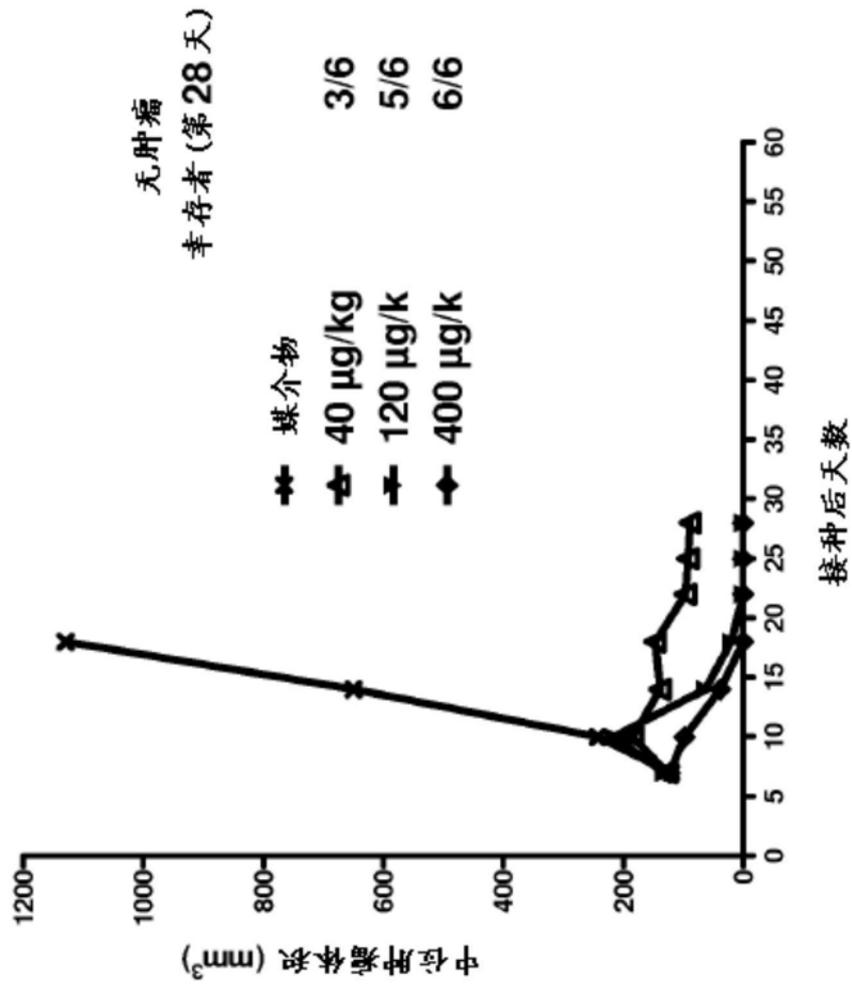


图51

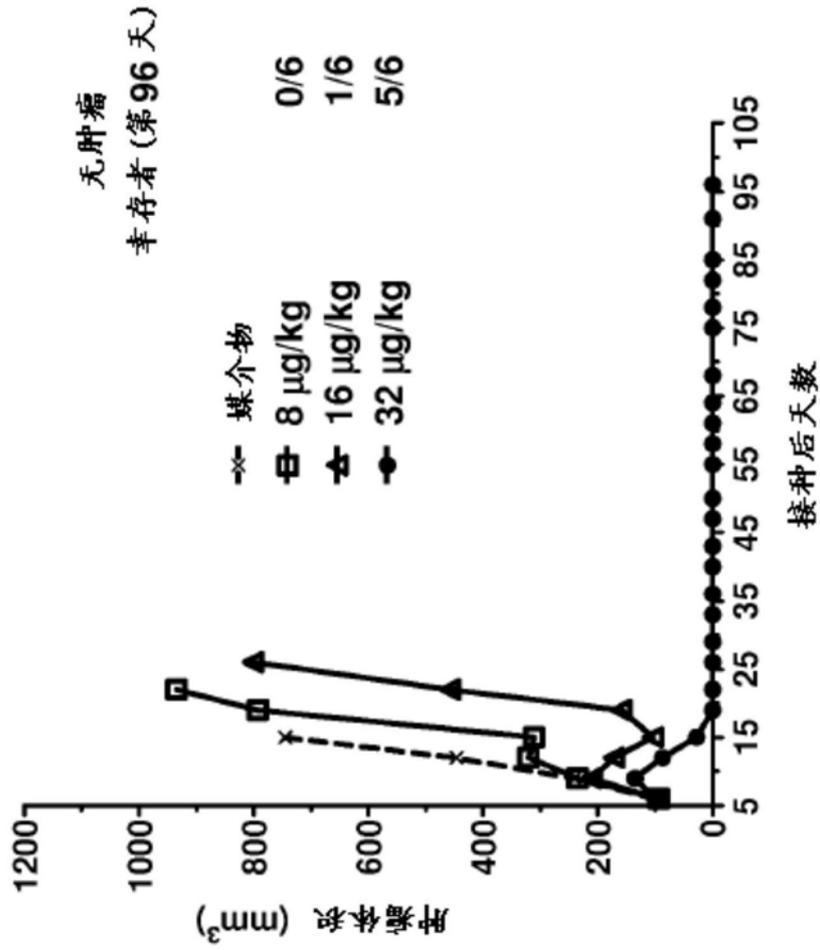


图52

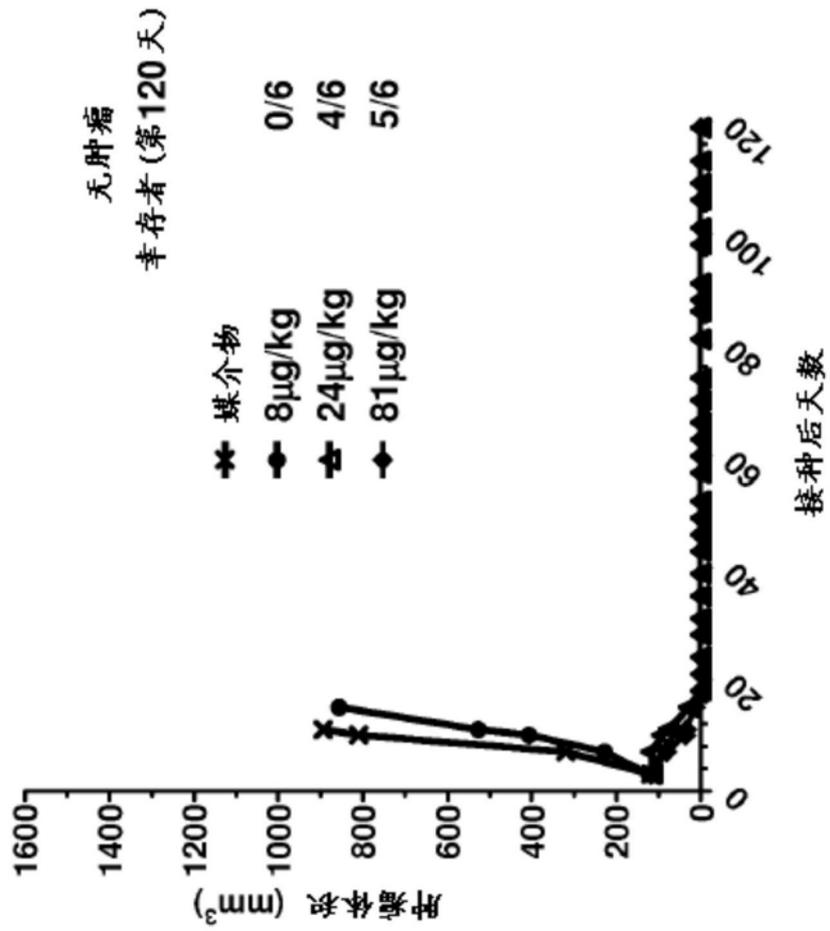


图53

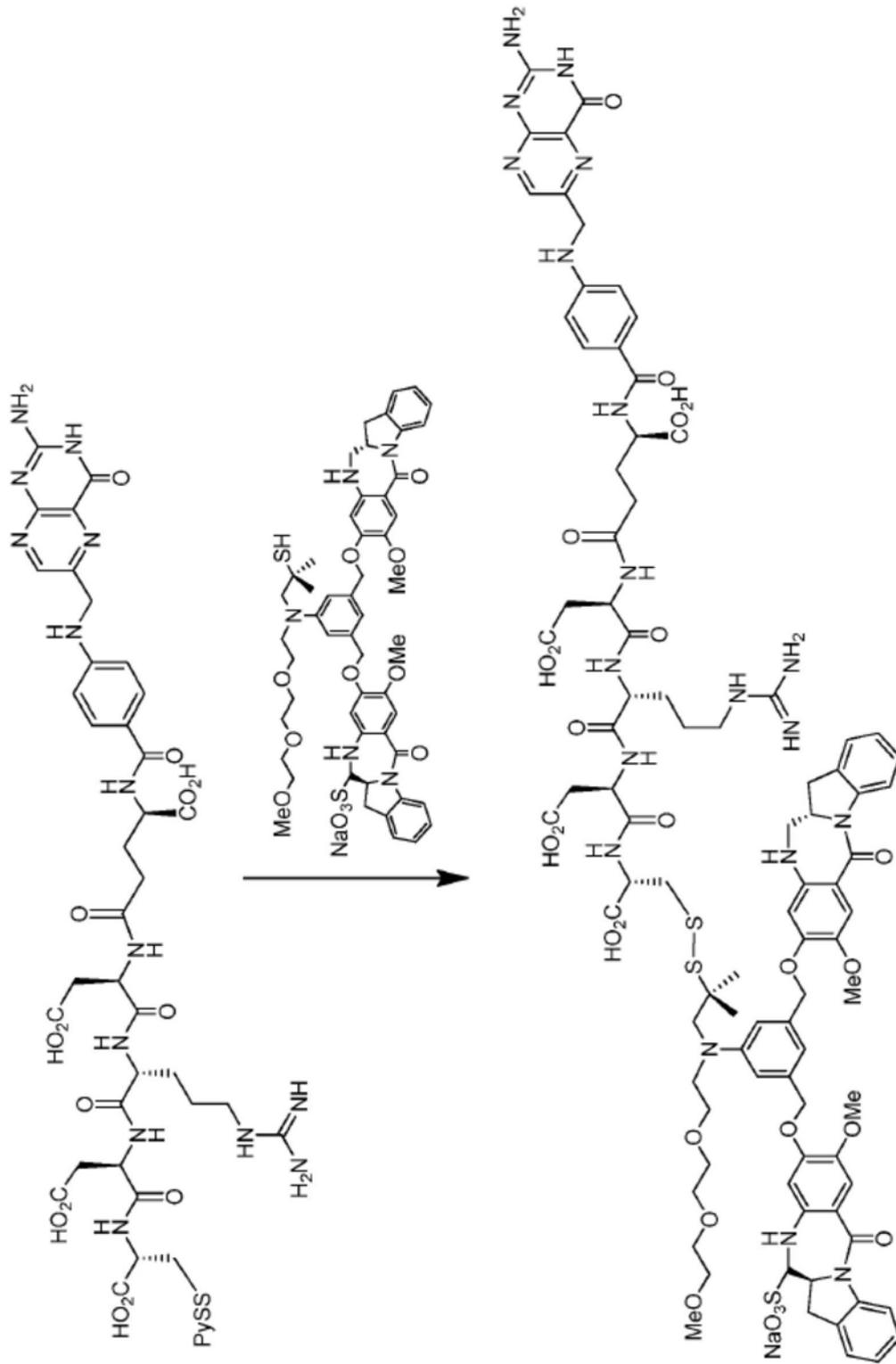


图54

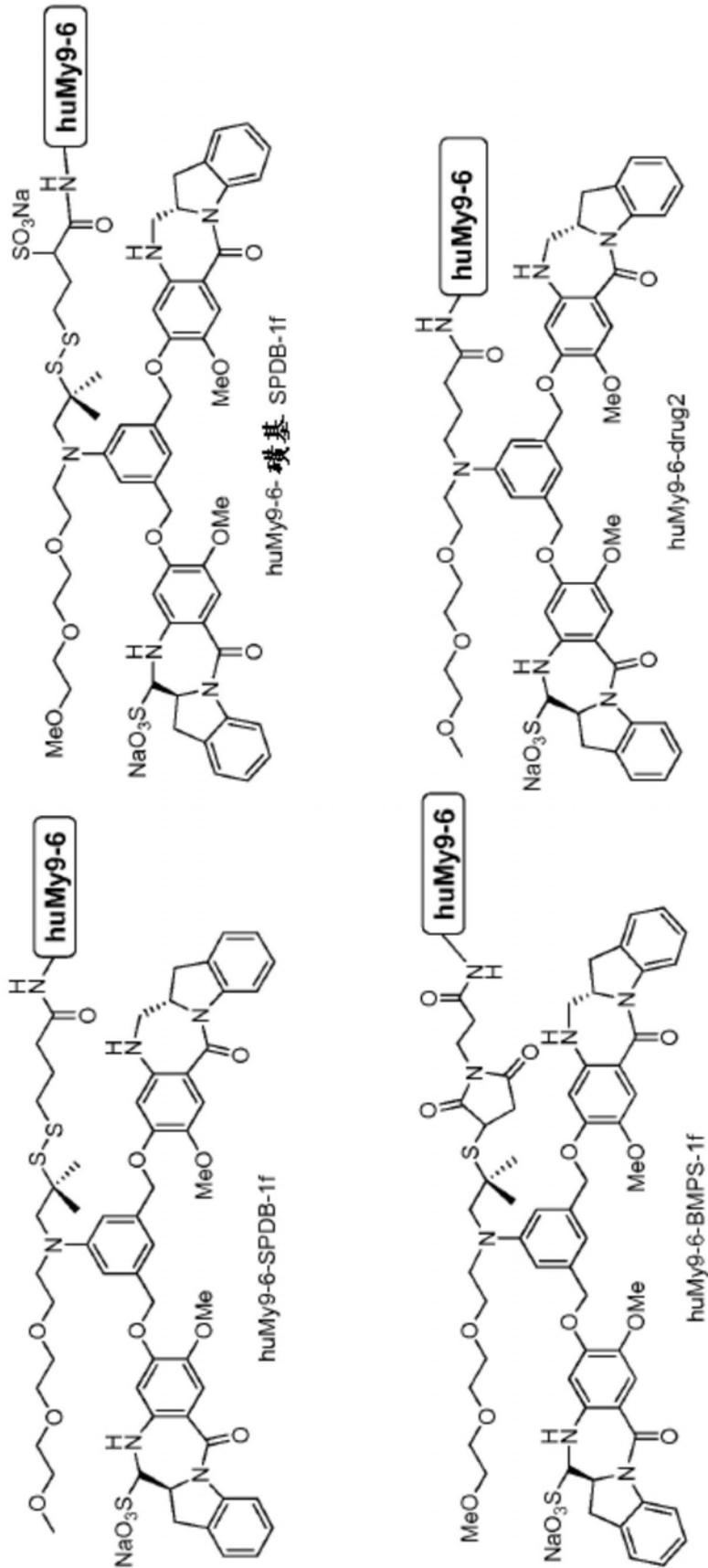


图55

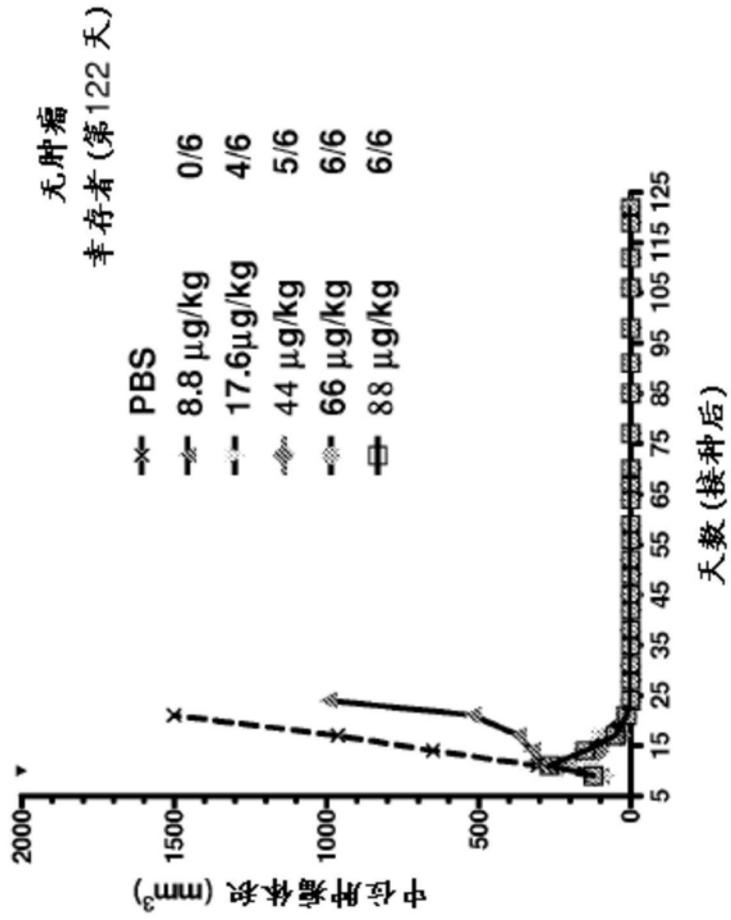


图56

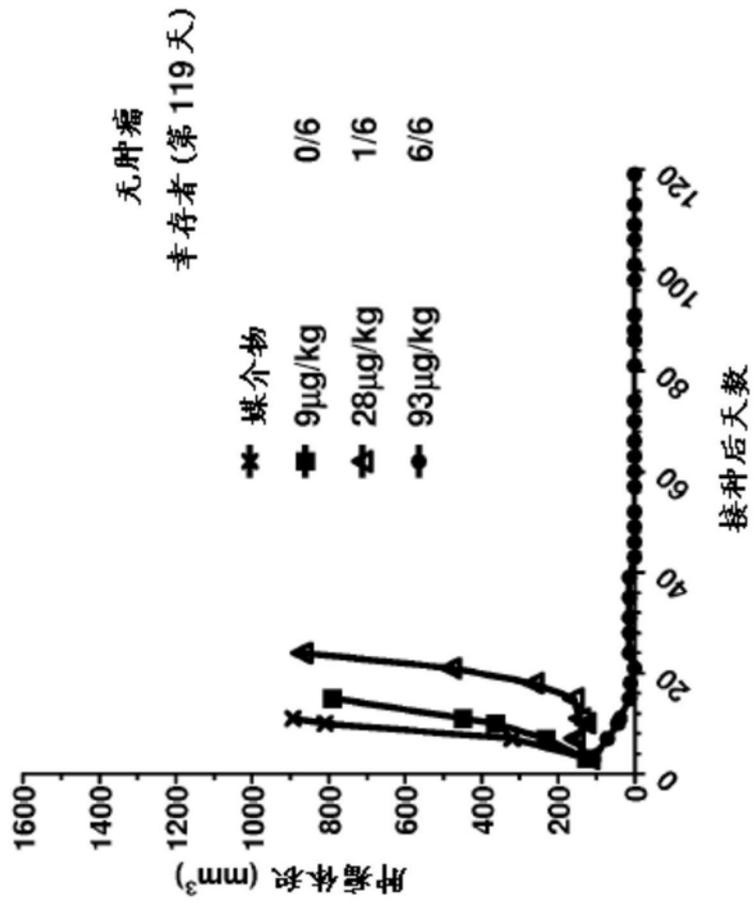


图57

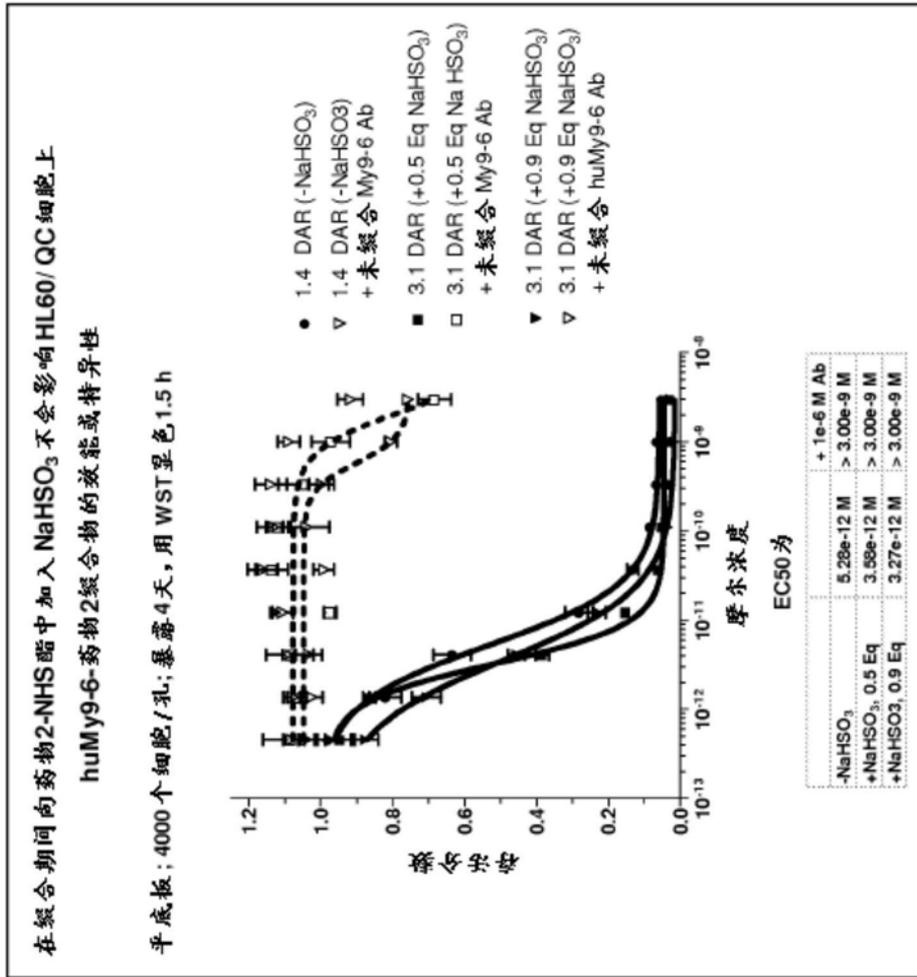


图58

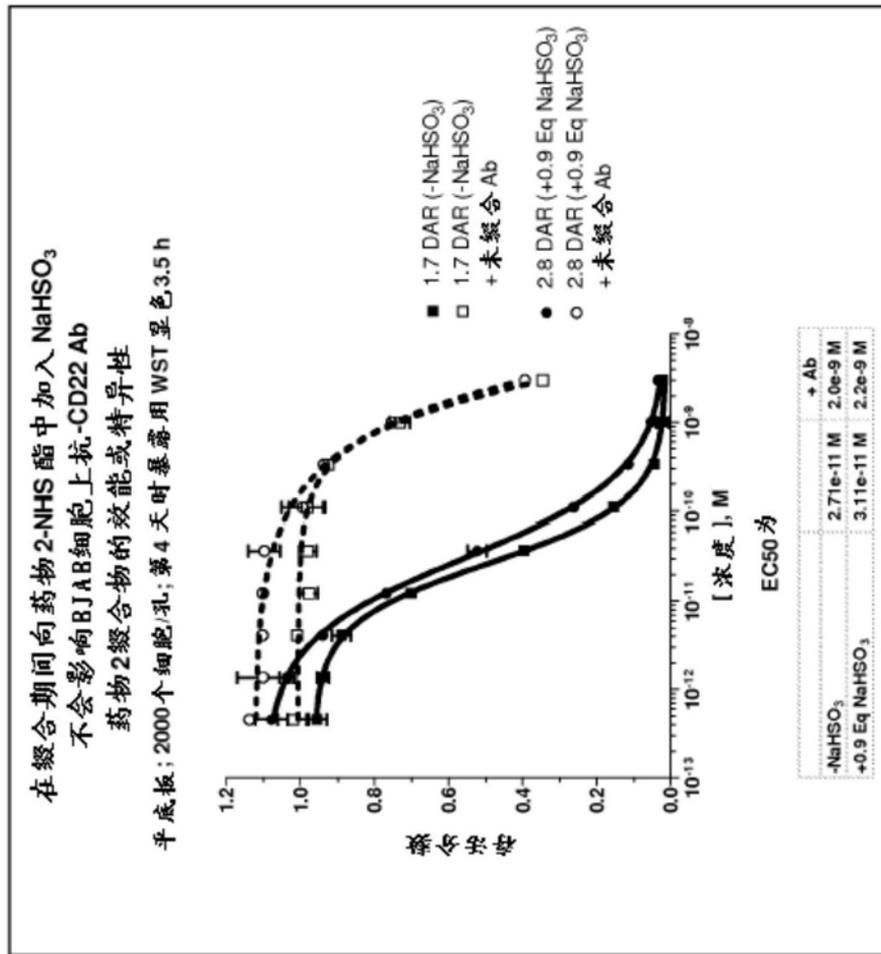


图59

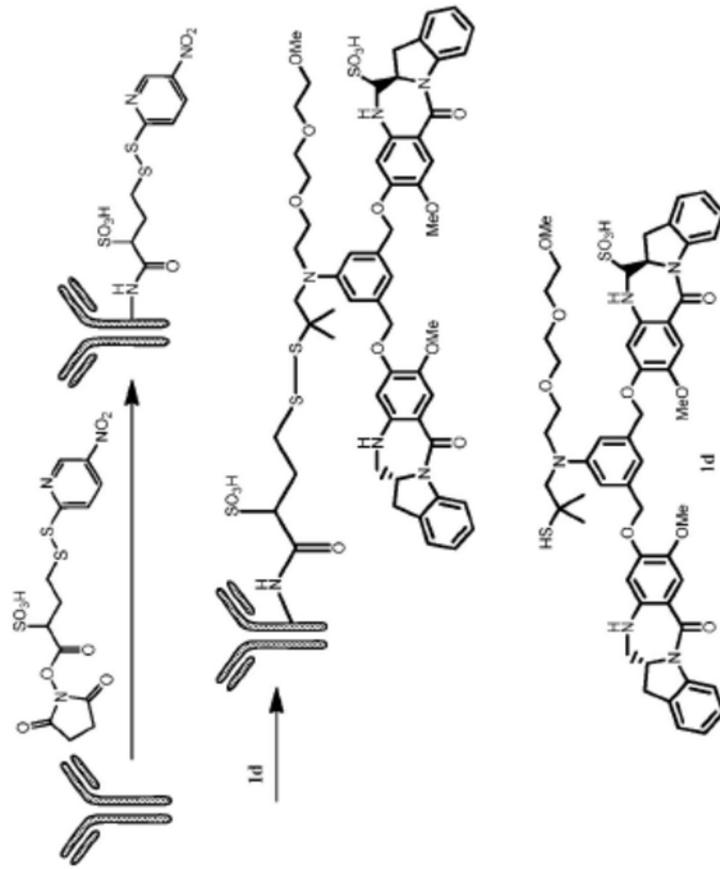


图60