



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113661172 A

(43) 申请公布日 2021.11.16

(21) 申请号 202080025926.X

(22) 申请日 2020.03.27

(30) 优先权数据

62/825,954 2019.03.29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.09.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/025341 2020.03.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/205564 EN 2020.10.08

(71) 申请人 伊缪诺金公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 R·V·J·查里 M·L·米勒

M·施祖卡 K·E·阿彻尔

E·E·里德

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 侯宝光

(51) Int.Cl.

C07K 5/062 (2006.01)

C07D 519/00 (2006.01)

A61K 31/5513 (2006.01)

A61K 31/5517 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

A61K 47/64 (2017.01)

A61K 47/55 (2017.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61P 1/18 (2006.01)

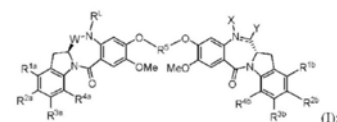
权利要求书17页 说明书171页 附图9页

(54) 发明名称

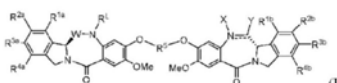
用于抑制异常细胞生长或治疗增生性疾病的细胞毒性双苯并二氮杂萆衍生物及其与细胞结合剂的缀合物

(57) 摘要

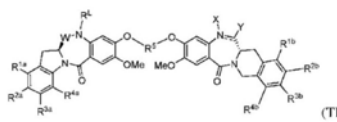
本发明涉及具有抗增生活性的苯并二氮杂萆衍生物且更具体地涉及式(I)、(II)、(T1)和(T2)的苯并二氮杂萆化合物。本发明还提供连接至细胞结合剂的所述苯并二氮杂萆化合物的缀合物。本发明进一步提供使用本发明的化合物或缀合物用于抑制哺乳动物的异常细胞生长或治疗其增生性病症的组合物及方法。



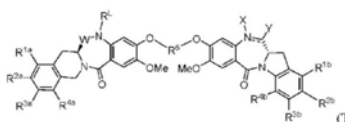
(I);



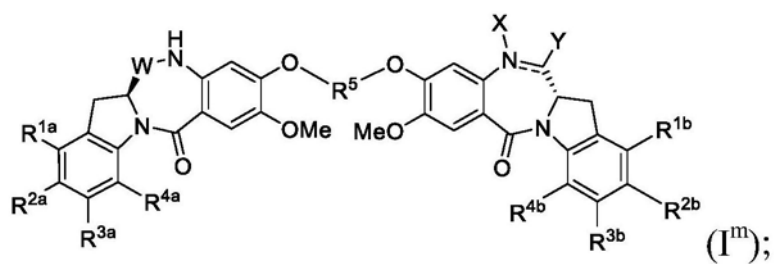
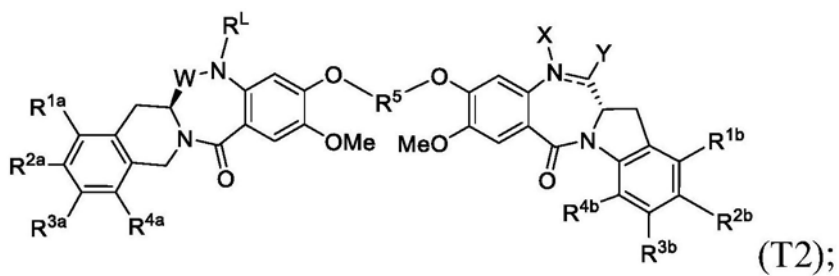
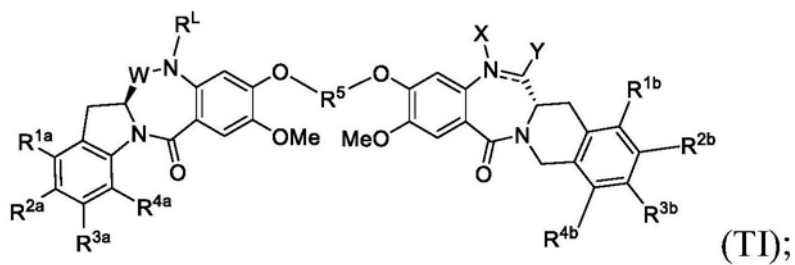
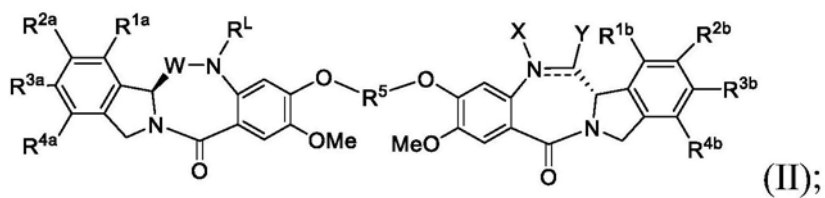
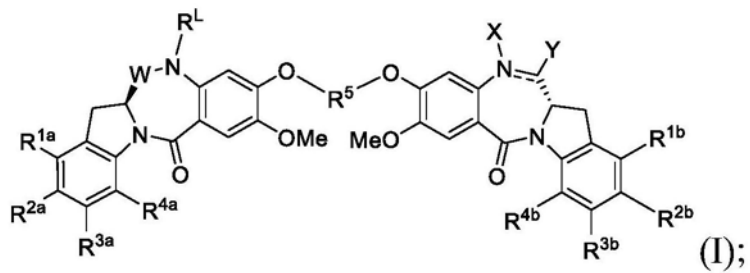
(II);

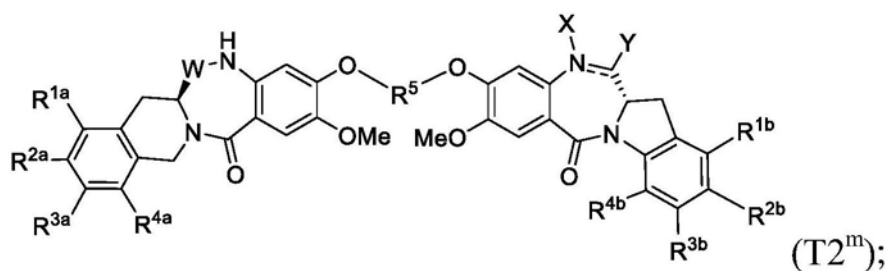
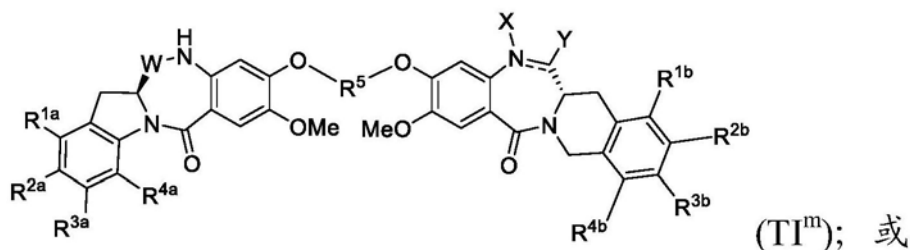
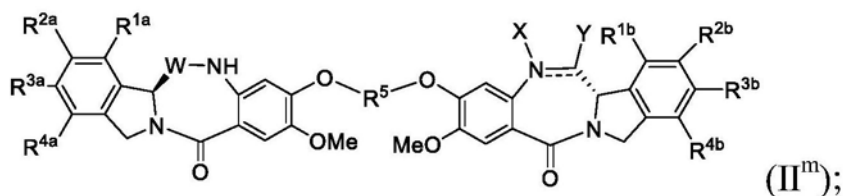


(T1);



1. 一种细胞毒性化合物,其由下式表示:





或其药学上可接受的盐,其中:

N与C之间的双线=表示单键或双键,限制条件在于当其为双键时,X不存在且Y为H或C₁₋₄烷基,且当其为单键时,X为H且Y为-OH或-SO₃H;

W为-C(=O)-或-C(Y')-;

Y' 为H或C₁₋₄烷基;

R^{1a}、R^{2a}、R^{3a}、R^{4a}、R^{1b}、R^{2b}、R^{3b}及R^{4b}各自独立地选自H、C₁₋₁₀烷基、-(OCH₂CH₂)_nOR^c、卤素、-NH(C=NH)NH₂、-OR、-NR'R''、-NO₂、-NR'COR''、-SR、-SOR'、-SO₂R'、-SO₃H、-OSO₃H、-SO₂NR'R''、-CN、-N₃、-COR'、-OCOR'及-OCONR'R''组成的组;

R^c为H或C₁₋₄烷基;

n为整数1至24;

R在每次出现时独立地选自H、-(CH₂CH₂O)_n-R^c、C₁₋₁₀烷基、C₃₋₈环烷基、6元至18元芳基、含有一个或多个独立地选自N、O及S的杂原子的5元至18元杂芳环或含有1至6个独立地选自O、S、N及P的杂原子的3元至18元杂环组成的组;

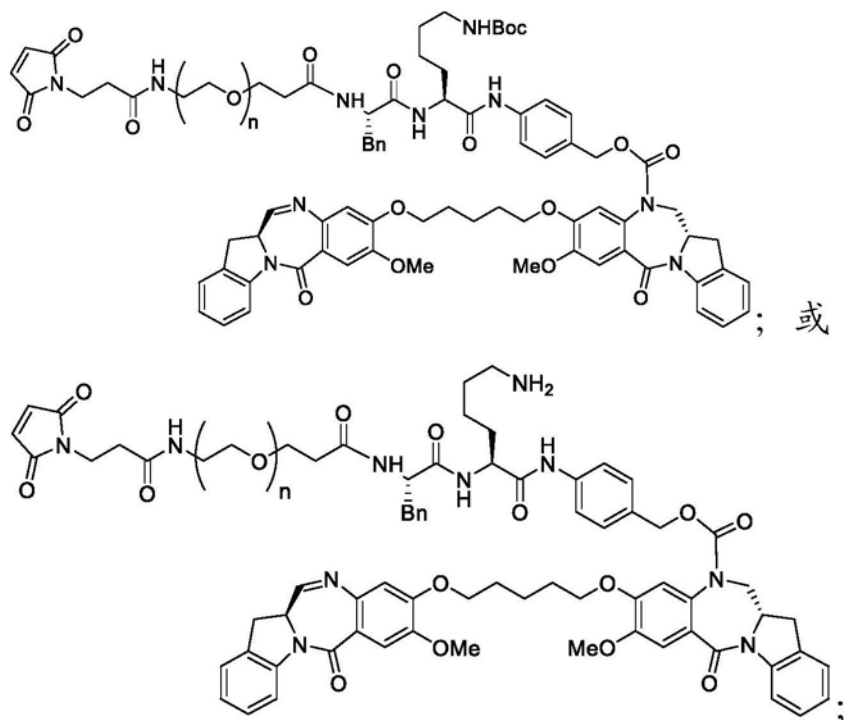
R'及R''各自独立地选自-H、-OH、-OR、-NHR、-NR₂、-COR、C₁₋₁₀烷基、-(CH₂CH₂O)_n-R^c及具有1至6个独立地选自O、S、N及P的杂原子的3元至18元杂环;

R⁵为C₃₋₁₂亚烷基,所述链可由一个或多个选自-O-、-S-、-NH-、-NMe-、苯环、4元至7元杂芳环及4元至7元杂环的基团中断,其中所述苯、所述4元至7元杂芳环及所述4元至7元杂环被1至4个R⁶取代;

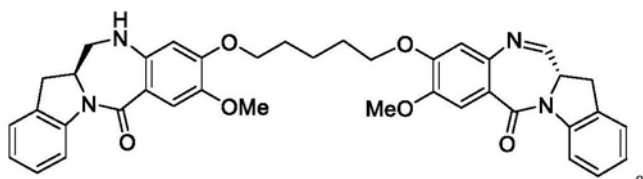
R⁶在每次出现时独立地选自H、C₁₋₁₀烷基、-(CH₂CH₂O)_n-R^c、卤素、-NH(C=NH)NH₂、-OR、-NR'R''、-NO₂、-NCO、-NR'COR''、-SR、-SOR'、-SO₂R'、-SO₃H、-OSO₃H、-SO₂NR'R''、-CN、-N₃、-COR'、-OCOR'及-OCONR'R'';并且

R^l为包含可与细胞结合剂形成共价键的反应性基团的自降解接头,限制条件在于所述

式(I)化合物不为:



且限制条件在于所述式(I^m)化合物不为:



2. 如权利要求1所述的化合物,其中所述细胞毒性化合物由描绘于表A中的各式之一或其药学上可接受的盐表示,其中:

AA¹及AA²各自独立地为氨基酸残基;

a1为整数1至19;

a2为整数1至5;

R^a为H或C₁₋₄烷基;

q为1、2或3;

R^{s1}及R^{s2}各自独立地为H或C₁₋₄烷基,或R^{s1}及R^{s2}与其所附接的碳原子合起来形成3元至5元环烷基环,限制条件在于当q为1时,R^{s1}及R^{s2}与其所附接的碳原子合起来无法形成3元环烷基环;

V为C(=O)或CH₂;

Z¹为-C(=O)-或-SO₂-NH-C(=O)-,其中-SO₂-NH-C(=O)-中的-SO₂-基团连接至P¹;

R^x为不存在、C₁₋₁₀亚烷基、C₃₋₈环烷基、-(CH₂CH₂O)_{m1}-C₁₋₁₀亚烷基-或C₁₋₁₀亚烷基-(OCH₂CH₂)_{m2}-;

m1及m2各自独立地为整数1至24;

Z²为不存在、-C(=O)NH-或-NH-C(=O)-;

R^y为不存在、C₁₋₁₀亚烷基、-(CH₂CH₂O)_{m3}-C₁₋₁₀亚烷基-或C₁₋₁₀亚烷基-(OCH₂CH₂)_{m4}-;

m3及m4各自独立地为整数1至24；

Z^s为具有经由二硫键或硫醚键共价连接至所述细胞毒性化合物的反应性基团的双官能交联剂；

J为包含能够与细胞结合剂形成共价键的反应性基团(优选地,胺反应性基团或硫醇反应性基团)的部分。

3.如权利要求1或2所述的化合物,其中R^{1a}、R^{2a}、R^{3a}、R^{4a}、R^{1b}、R^{2b}、R^{3b}及R^{4b}均为H。

4.如权利要求1至3中任一项所述的化合物,其中R⁵为C₃₋₇亚烷基。

5.如权利要求4所述的化合物,其中R⁵为-(CH₂)₃-、-(CH₂)₅-或-(CH₂)₇-。

6.如权利要求4所述的化合物,其中R⁵为-(CH₂)₅-。

7.如权利要求1至3中任一项所述的化合物,其中R⁵由下式表示:



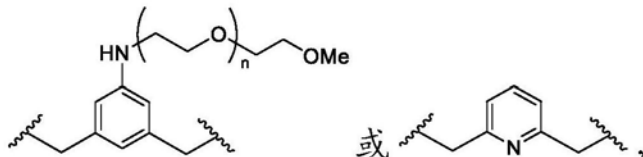
其中:

X₁、X₂、X₃及X₄各自独立地为N或CR⁶,限制条件在于X₁、X₂、X₃及X₄中的至少一者为CR⁶。

8.如权利要求7所述的化合物,其中R⁵为:



9.如权利要求8所述的化合物,其中R⁵为:



其中n为整数1至8。

10.如权利要求9所述的化合物,其中n为1、2、3或4。

11.如权利要求2所述的化合物,其中所述化合物由描绘于表B中的各式或其药学上可接受的盐表示。

12.如权利要求2至11中任一项所述的化合物,其中Z¹为-C(=O)-。

13.如权利要求2至12中任一项所述的化合物,其中R^x为C₁₋₆亚烷基,Z²及R^y均不存在。

14.如权利要求2至12中任一项所述的化合物,其中R^x为-(CH₂CH₂O)_{m1}-C₁₋₆亚烷基-;Z²为-NH-C(=O)-或-C(=O)-NH-;R^y为C₁₋₆亚烷基。

15.如权利要求2至12中任一项所述的化合物,其中R^x为C₁₋₆亚烷基;Z²为-NH-C(=O)-或-C(=O)-NH-;并且R^y为-(CH₂CH₂O)_{m2}-C₁₋₆亚烷基-。

16.如权利要求11所述的化合物,其中所述化合物由描绘于表C中的各式之一或其药学上可接受的盐表示,其中:

R⁶为-C(=O)OR^{6a}或NR^{6b}(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OR^{6c};

R^{6a}、R^{6b}及R^{6c}各自独立地为H或C₁₋₄烷基;

n为整数1至8;

R^a 及 R^b 在每次出现时独立地为H或 C_{1-4} 烷基；

r 、 r_1 及 r_2 各自独立地为整数2至6,且

s 为整数2至12。

17. 如权利要求16所述的化合物,其中:

R^{6a} 及 R^{6c} 均为Me;

R^{6b} 为H;

n 为1、2、3或4;

R^a 及 R^b 在每次出现时独立地为H或Me;

r 为4;

r_1 为4;

r_2 为2;

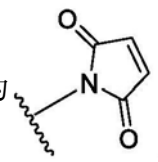
s 为1、2、3或4。

18. 如权利要求2至17中任一项所述的化合物,其中J为 $-COOR^d$ 或由COE表示的反应性酯,其中 R^d 为H或 C_{1-4} 烷基。

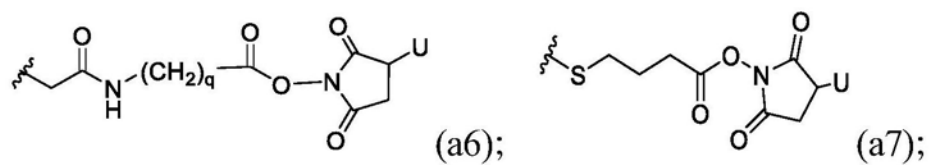
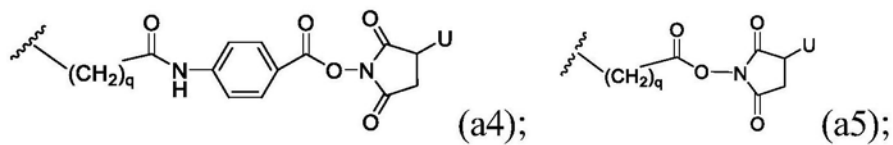
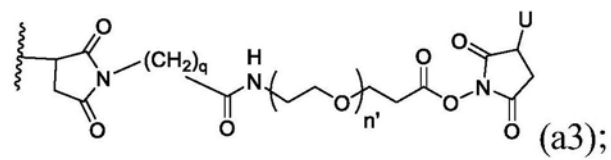
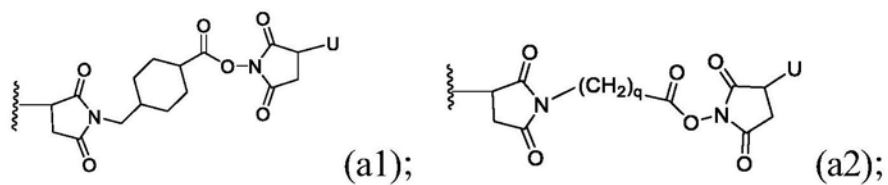
19. 如权利要求18所述的化合物,其中J为选自N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、硝基苯基(例如2-硝基苯基或4-硝基苯基)酯、二硝基苯基(例如2,4-二硝基苯基)酯、磺基-四氟苯基(例如4-磺基-2,3,5,6-四氟苯基)酯及五氟苯基酯的反应性酯。

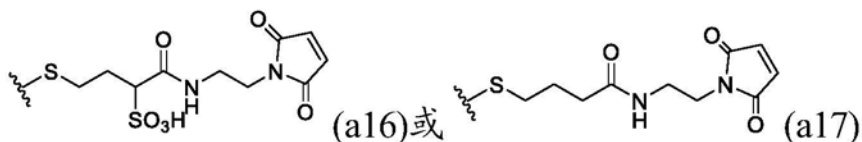
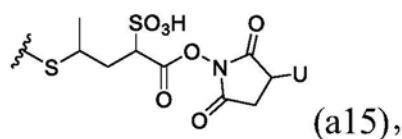
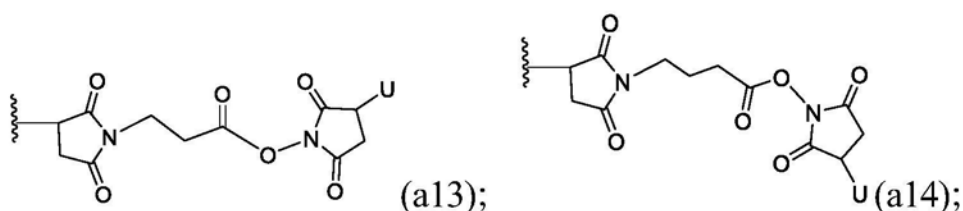
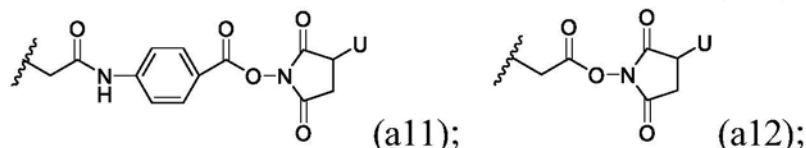
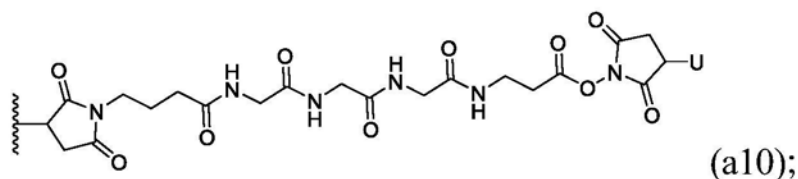
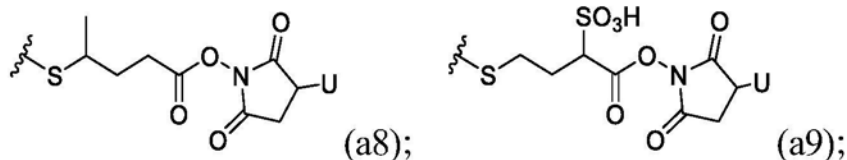
20. 如权利要求18所述的化合物,其中J为N-羟基琥珀酰亚胺酯。

21. 如权利要求2至17中任一项所述的化合物,其中J为



22. 如权利要求2至17中任一项所述的化合物,其中J为 $-SZ^s$,其中 Z^s 为H、 SR^e ,或选自以下各式:





其中:

q为整数1至5;

n' 为整数2至6;

U为-H或SO₃H;

R^e为具有1至6个碳原子的直链或支链烷基或选自苯基、硝基苯基(例如2-硝基苯基或4-硝基苯基)、二硝基苯基(例如2,4-二硝基苯基)、羧基硝基苯基(例如3-羧基-4-硝基苯基)、吡啶基或硝基吡啶基(例如4-硝基吡啶基)。

23. 如权利要求1至22中任一项所述的化合物,其中N与C之间的双线==表示双键,X不存在且Y为H。

24. 如权利要求1至22中任一项所述的化合物,其中N与C之间的双线==表示单键,X为H且Y为-SO₃H。

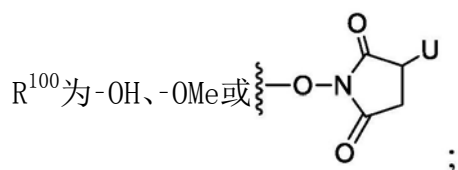
25. 如权利要求2至24中任一项所述的化合物,其中a1为整数1至7。

26. 如权利要求25所述的化合物,其中AA¹-(AA²)_{a1}选自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Lle-Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N⁹-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-

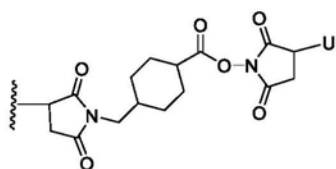
Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu、 β -Ala-Leu-Ala-Leu、Gly-Phe-Leu-Gly、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met、Met-Ala、Thr-Thr、Thr-Met、Met-Thr、Leu-Ala、Cit-Val、Gln-Val、Ser-Val、Leu-Gln、Gln-Leu、Phe-Arg、Arg-Phe、Tyr-Arg、Arg-Tyr、Phe-Gln、Gln-Phe、Val-Thr、Thr-Val、Met-Tyr及Tyr-Met。

27. 如权利要求26所述的化合物,其中 $AA^1-(AA^2)_{al}$ 为Ala-Ala、L-Ala-L-Ala、Ala-Val、L-Ala-L-Val、Gln-Val、L-Gln-L-Val、Gln-Leu、L-Gln-L-Leu、Ser-Val或L-Ser-L-Val。

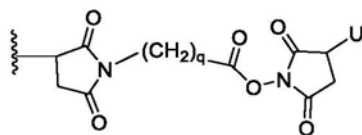
28. 如权利要求1所述的化合物,其中所述化合物选自描绘于表D中的各式之一或其药学上可接受的盐,其中:



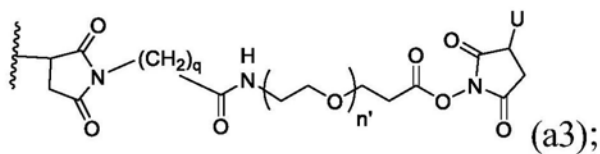
Z^s 为H、 SR^e ,或选自以下各式之一:



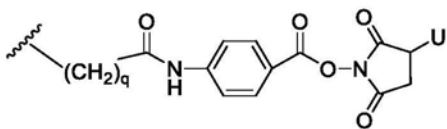
(a1);



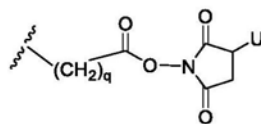
(a2);



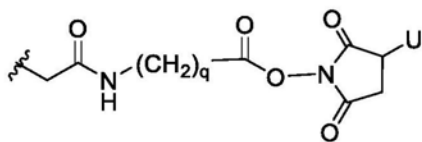
(a3);



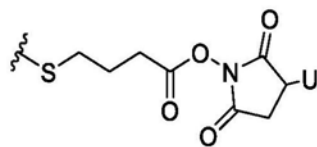
(a4);



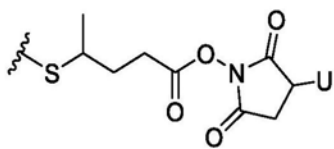
(a5);



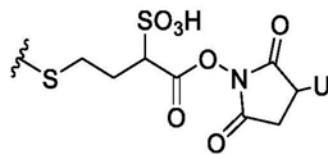
(a6);



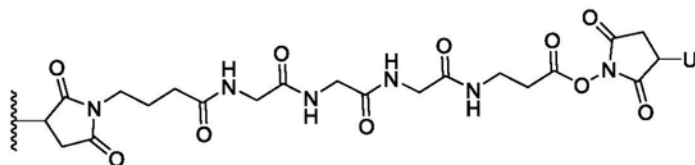
(a7);



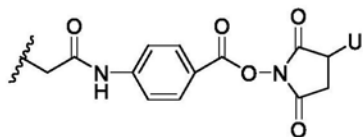
(a8);



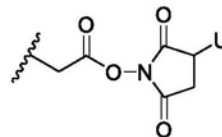
(a9);



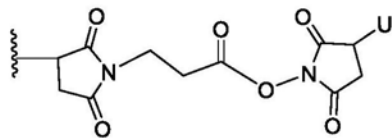
(a10);



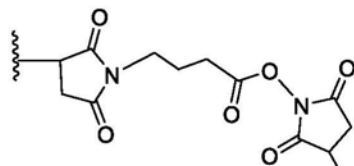
(a11);



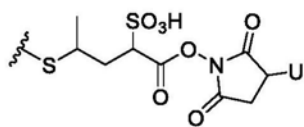
(a12);



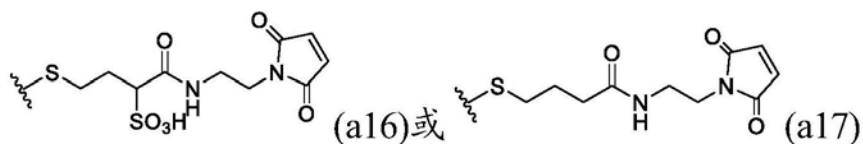
(a13);



(a14);



(a15),



其中：

q为整数1至5；

n' 为整数2至6；

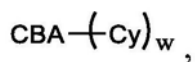
U为-H或SO₃H；

R^e为具有1至6个碳原子的直链或支链烷基或选自苯基、硝基苯基(例如2-硝基苯基或4-硝基苯基)、二硝基苯基(例如2,4-二硝基苯基)、羧基硝基苯基(例如3-羧基-4-硝基苯基)、吡啶基或硝基吡啶基(例如4-硝基吡啶基)。

29. 如权利要求1至28中任一项所述的化合物,其中所述药学上可接受的盐为钠盐或钾盐。

30. 如权利要求1至28中任一项所述的化合物,其中所述药学上可接受的盐为钠盐。

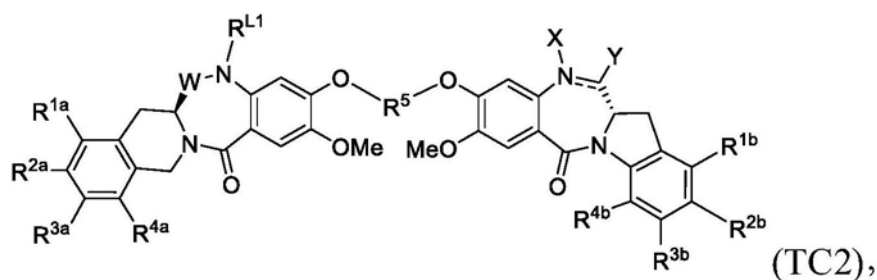
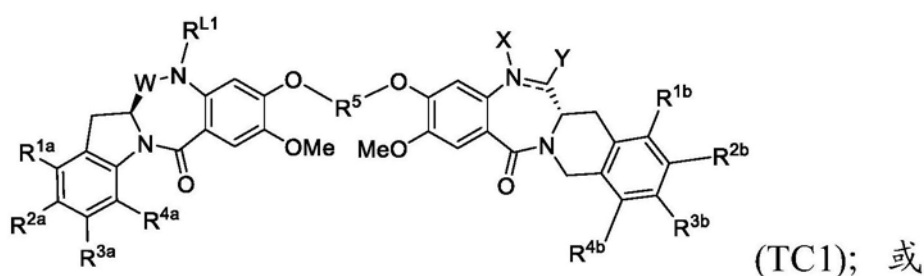
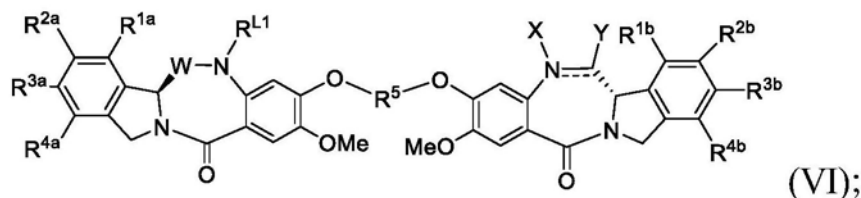
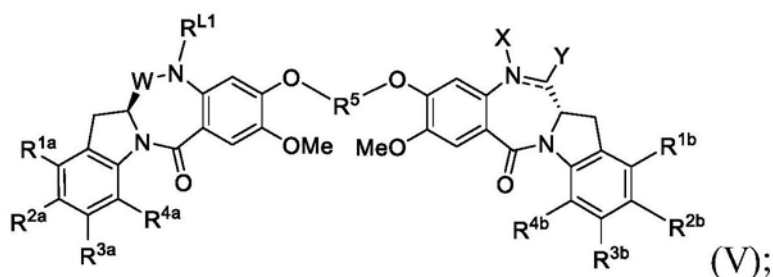
31. 一种细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物,其包含共价连接至细胞毒性剂的细胞结合剂(CBA),其中所述缀合物由下式表示:



或其药学上可接受的盐,其中:

CBA为细胞结合剂;

Cy为细胞毒性剂,其由下式表示:



或其药学上可接受的盐,其中:

N与C之间的双线 $\equiv$ 表示单键或双键,限制条件在于当其为双键时,X不存在且Y为H或 C_{1-4} 烷基,且当其为单键时,X为H且Y为-OH或-SO₃H;

W为-C(=O)-或-C(Y')-;

Y' 为H或 C_{1-4} 烷基;

R^{1a} 、 R^{2a} 、 R^{3a} 、 R^{4a} 、 R^{1b} 、 R^{2b} 、 R^{3b} 及 R^{4b} 各自独立地选自由H、 C_{1-10} 烷基、-(OCH₂CH₂)_n-OR^c、卤素、-NH(C=NH)NH₂、-OR、-NR'R''、-NO₂、-NR'COR''、-SR、-SOR'、-SO₂R'、-SO₃H、-OSO₃H、-SO₂NR'R''、-CN、-N₃、-COR'、-OCOR'及-CONR'R''组成的组;

R^c为H或 C_{1-4} 烷基;

n为整数1至24;

R在每次出现时独立地选自由H、-(CH₂CH₂O)_n-R^c、 C_{1-10} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、6元至18元芳基、含有一个或多个独立地选自N、O及S的杂原子的5元至18元杂芳环或含有1至6个独立地选自O、S、N及P的杂原子的3元至18元杂环组成的组;

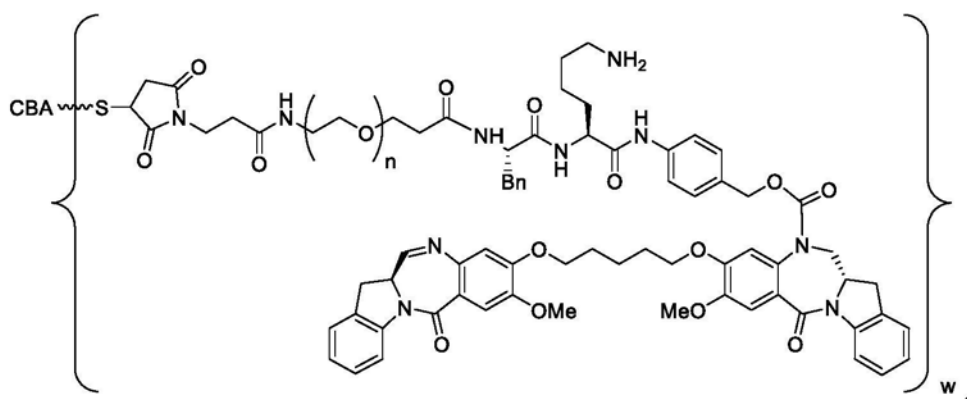
R'及R''各自独立地选自-H、-OH、-OR、-NHR、-NR₂、-COR、 C_{1-10} 烷基、-(CH₂CH₂O)_n-R^c及具有

1至6个独立地选自O、S、N及P的杂原子的3元至18元杂环；

R^5 为 C_{3-12} 亚烷基,所述链可由一个或多个选自-O-、-S-、-NH-、-NMe-、苯环、4元至7元杂芳环及4元至7元杂环的基团中断,其中所述苯、所述4元至7元杂芳环及所述4元至7元杂环被1至4个 R^6 取代;

R^6 在每次出现时独立地选自H、 C_{1-10} 烷基、 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ 、卤素、 $-NH(C=NH)NH_2$ 、 $-OR$ 、 $-NR'R''$ 、 $-NO_2$ 、 $-NCO$ 、 $-NR'COR''$ 、 $-SR$ 、 $-SOR'$ 、 $-SO_2R'$ 、 $-SO_3H$ 、 $-OSO_3H$ 、 $-SO_2NR'R''$ 、 $-CN$ 、 $-N_3$ 、 $-COR'$ 、 $-OCOR'$ 及 $-OCONR'R''$;并且

R^{L1} 为共价连接至所述CBA的自降解接头,限制条件在于所述式(V)缀合物不为:



32. 如权利要求31所述的缀合物,其中Cy由描绘于表E中的各式之一或其药学上可接受的盐表示,其中:

AA^1 及 AA^2 各自独立地为氨基酸残基;

a_1 为整数1至19;

a_2 为整数1至5;

R^a 为H或 C_{1-4} 烷基;

q 为1、2、3或4;

R^{s1} 及 R^{s2} 各自独立地为H或 C_{1-4} 烷基,或 R^{s1} 及 R^{s2} 与其所附接的碳原子合起来形成3元至5元环烷基环,限制条件在于当 q 为1时, R^{s1} 及 R^{s2} 与其所附接的碳原子合起来形成4元或5元环烷基环;

V 为 $C(=O)$ 或 CH_2 ;

Z^1 为 $-C(=O)-$ 或 $-SO_2-NH-C(=O)-$,其中 $-SO_2-NH-C(=O)-$ 中的 $-SO_2-$ 基团连接至 P^1 ;

R^x 为不存在、 C_{1-10} 亚烷基、 C_{3-8} 环烷基、 $-(CH_2CH_2O)_{m1}-C_{1-10}$ 亚烷基-或 C_{1-10} 亚烷基- $(OCH_2CH_2)_{m2}-$;

m_1 及 m_2 各自独立地为整数1至24;

Z^2 为不存在、 $-C(=O)NH-$ 或 $-NH-C(=O)-$;

R^y 为不存在、 C_{1-10} 亚烷基、 $-(CH_2CH_2O)_{m3}-C_{1-10}$ 亚烷基-或 C_{1-10} 亚烷基- $(OCH_2CH_2)_{m4}-$;

m_3 及 m_4 各自独立地为整数1至24;

Z^{s1} 为共价连接至所述CBA及所述细胞毒性化合物的双官能交联剂,其中所述交联剂经由二硫键或硫醚键共价连接至所述细胞毒性化合物;并且

J^1 为通过使所述细胞毒性剂的胺反应性基团或硫醇反应性基团与位于CBA上的胺基或硫醇基反应而形成的部分。

33. 如权利要求31或32所述的缀合物,其中 R^{1a} 、 R^{2a} 、 R^{3a} 、 R^{4a} 、 R^{1b} 、 R^{2b} 、 R^{3b} 及 R^{4b} 均为H。

34. 如权利要求31至33中任一项所述的缀合物,其中 R^5 为 C_{3-7} 亚烷基。

35. 如权利要求34所述的缀合物,其中 R^5 为 $-(CH_2)_3-$ 、 $-(CH_2)_5-$ 或 $-(CH_2)_7-$ 。

36. 如权利要求34所述的缀合物,其中 R^5 为 $-(CH_2)_5-$ 。

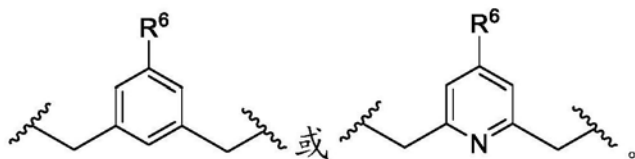
37. 如权利要求31至33中任一项所述的缀合物,其中 R^5 由下式表示:



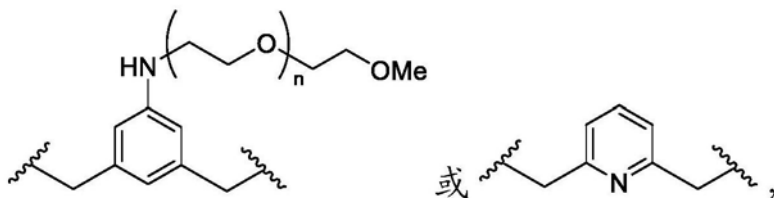
其中:

X_1 、 X_2 、 X_3 及 X_4 各自独立地为N或 CR^6 ,限制条件在于 X_1 、 X_2 、 X_3 及 X_4 中的至少一者为 CR^6 。

38. 如权利要求37所述的缀合物,其中 R^5 为:



39. 如权利要求38所述的缀合物,其中 R^5 为:



其中n为整数1至8。

40. 如权利要求39所述的缀合物,其中n为1、2、3或4。

41. 如权利要求32所述的缀合物,其中Cy由描绘于表F中的各式之一或其药学上可接受的盐表示。

42. 如权利要求32至41中任一项所述的缀合物,其中 Z^1 为 $-C(=O)-$ 。

43. 如权利要求32至42中任一项所述的缀合物,其中 R^x 为 C_{1-6} 亚烷基, Z^2 及 R^y 均不存在。

44. 如权利要求32至42中任一项所述的缀合物,其中 R^x 为 $-(CH_2CH_2O)_{m1}-C_{1-6}$ 亚烷基-; Z^2 为 $-NH-C(=O)-$ 或 $-C(=O)-NH-$; R^y 为 C_{1-6} 亚烷基。

45. 如权利要求32至42中任一项所述的缀合物,其中 R^x 为 C_{1-6} 亚烷基; Z^2 为 $-NH-C(=O)-$ 或 $-C(=O)-NH-$;并且 R^y 为 $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C_{1-6}$ 亚烷基-。

46. 如权利要求41所述的缀合物,其中Cy由描绘于表G中的各式之一或其药学上可接受的盐表示,其中:

R^6 为 $-C(=O)OR^{6a}$ 或 $-NR^{6b}(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR^{6c}$;

R^{6a} 、 R^{6b} 及 R^{6c} 各自独立地为H或 C_{1-4} 烷基;

n为整数1至8;

R^a 及 R^b 在每次出现时独立地为H或 C_{1-4} 烷基;

r、r1及r2各自独立地为整数2至6,且

s为整数2至12。

47. 如权利要求46所述的缀合物,其中:

R^{6a} 及 R^{6c} 均为Me;

R^{6b} 为H;

n为1、2、3或4;

R^a 及 R^b 在每次出现时独立地为H或Me;

r为4;

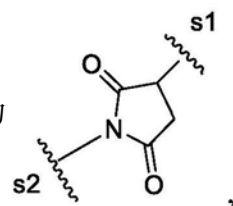
r1为4;

r2为2;

s为1、2、3或4。

48. 如权利要求32至47中任一项所述的缀合物, 其中 J^1 为 $-C(=O)-$ 。

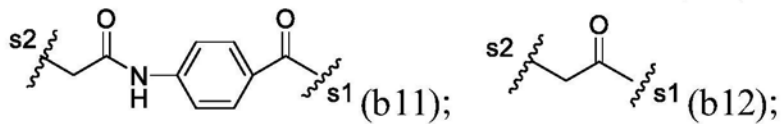
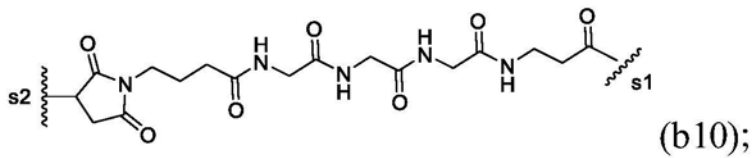
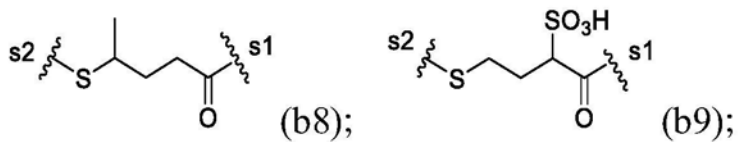
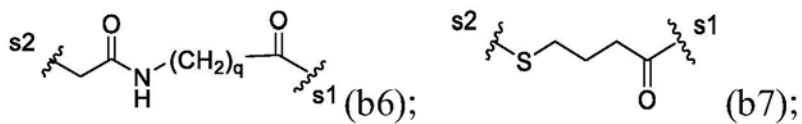
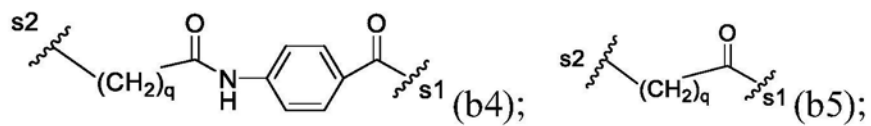
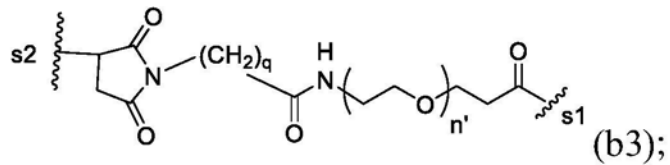
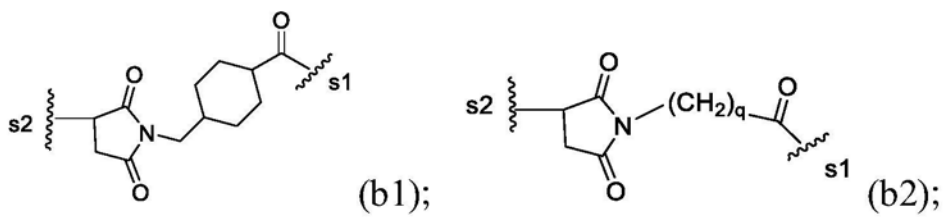
49. 如权利要求32至47中任一项所述的缀合物, 其中 J^1 为

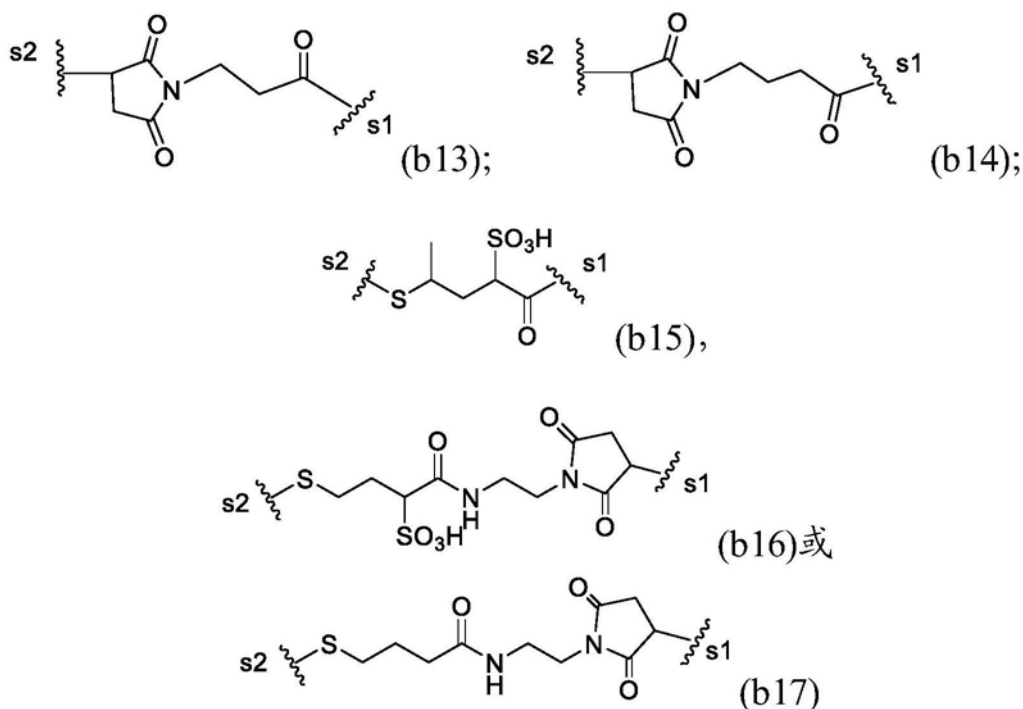


其中s1为连

接至CBA的位点且s2为连接至所述细胞毒性化合物的其余部分的位点。

50. 如权利要求32至47中任一项所述的缀合物, 其中 J^1 为 $-SZ^{s1}$, 其中 Z^{s1} 选自以下各式:





其中：

q为整数1至5；

n' 为整数2至6；

s1为连接至CBA的位点；并且

s2为连接至所述细胞毒性化合物的其余部分的位点。

51. 如权利要求31至50中任一项所述的缀合物，其中N与C之间的双线 $\equiv$ 表示双键，X不存在且Y为H。

52. 如权利要求31至50中任一项所述的缀合物，其中N与C之间的双线 $\equiv$ 表示单键，X为H且Y为 $-SO_3H$ 。

53. 如权利要求32至52中任一项所述的缀合物，其中a1为整数1至7。

54. 如权利要求53所述的缀合物，其中 $AA^1-(AA^2)_{a1}$ 选自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Lle-Cit、Phe-Ala、Phe- N^9 -甲苯磺酰基-Arg、Phe- N^9 -硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu、 β -Ala-Leu-Ala-Leu及Gly-Phe-Leu-Gly、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met、Met-Ala、Thr-Thr、Thr-Met、Met-Thr、Leu-Ala、Cit-Val、Gln-Val、Ser-Val、Val-Gln、Gln-Val、Leu-Gln、Gln-Leu、Phe-Arg、Arg-Phe、Tyr-Arg、Arg-Tyr、Phe-Gln、Gln-Phe、Val-Thr、Thr-Val、Val-Met、Met-Val、Leu-Met、Met-Leu、Met-Tyr、Tyr-Met、Ala-Asn、Asn-Ala、Phe-Met、Met-Phe、Gly-Gly-Arg及Arg-Gly-Gly。

55. 如权利要求54所述的缀合物，其中 $AA^1-(AA^2)_{a1}$ 为Ala-Ala、L-Ala-L-Ala、Ala-Val、L-Ala-L-Val、Gln-Val、L-Gln-L-Val、Gln-Leu、L-Gln-L-Leu、Ser-Val或L-Ser-L-Val。

56. 如权利要求31所述的缀合物，其中所述缀合物选自描绘于表H中的缀合物之一或其

药学上可接受的盐,其中 $\text{CBA} \sim \text{N} \text{---}$ 为经由位于所述CBA上的胺基共价连接至所述细胞毒性化合物的所述细胞结合剂; $\text{CBA} \sim \text{S} \text{---}$ 为经由位于所述CBA上的硫醇基共价连接至所述细胞毒性化合物的所述细胞结合剂; w_L 为整数1至20;并且 w_C 为整数1至4。

57. 如权利要求31至56中任一项所述的缀合物,其中所述药学上可接受的盐为钠盐或钾盐。

58. 如权利要求31至56中任一项所述的缀合物,其中所述药学上可接受的盐为钠盐。

59. 如权利要求31至58中任一项所述的缀合物,其中所述细胞结合剂(CBA)为抗体、单链抗体、特异性地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地结合于靶细胞的单克隆抗体片段、嵌合抗体、特异性地结合于靶细胞的嵌合抗体片段、结构域抗体、特异性地结合于靶细胞的结构域抗体片段、probody、纳米抗体、淋巴因子、激素、维生素、生长因子、集落刺激因子或营养物转运分子。

60. 如权利要求31至59中任一项所述的缀合物,其中所述细胞结合剂(CBA)结合于选自以下的靶细胞: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、髓系细胞、活化T细胞、B细胞或黑色素细胞;表达CA6、CAK1、CD4、CD5、CD6、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD44、CD56、CD123、CD138、EpCAM、CanAg、CALLA、CEACAM5、FGFR3、LAMP1、p-钙粘蛋白、Her-2或Her-3抗原的细胞;或表达胰岛素生长因子受体、表皮生长因子受体及叶酸盐受体的细胞。

61. 如权利要求31至58中任一项所述的缀合物,其中所述细胞结合剂为抗叶酸盐受体抗体或其抗体片段、抗EGFR抗体或其抗体片段、抗CD33抗体或其抗体片段、抗CD19抗体或其抗体片段、抗Muc1抗体或其抗体片段或抗CD37抗体或其抗体片段。

62. 一种药物组合物,其包含药学上可接受的载剂及如权利要求31至61中任一项所述的缀合物,或其药学上可接受的盐。

63. 一种抑制哺乳动物的异常细胞生长或治疗其增生性病症、自身免疫病症、破坏性骨病症、传染病、病毒性疾病、纤维化疾病、神经退行性病症、胰腺炎或肾病的方法,其包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的如权利要求1至30中任一项所述的化合物或如权利要求31至61中任一项所述的缀合物,及任选的化学治疗剂。

64. 如权利要求63所述的方法,其中所述方法用于治疗癌症。

65. 如权利要求64所述的方法,其中所述癌症为子宫内膜癌、肺癌(例如非小细胞肺癌)、结直肠癌、膀胱癌、胃癌、胰腺癌、肾细胞癌、前列腺癌、食道癌、乳腺癌、头颈癌、子宫癌、卵巢癌、肝癌、子宫颈癌、甲状腺癌、睾丸癌、髓系癌、黑色素瘤及淋巴瘤。

66. 如权利要求64所述的方法,其中所述癌症为急性髓系白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、急性B淋巴母细胞性白血病或B细胞急性淋巴母细胞性白血病(B-ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、急性早幼粒细胞白血病(APL)、B细胞慢性淋巴增生性疾病(B-CLPD)、非典型慢性淋巴细胞性白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、母细胞性浆细胞样树突状细胞赘瘤(BPDCN)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、套细胞白血病(MCL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、霍奇金氏淋巴瘤、全身性肥大细胞增多症及伯基特淋巴瘤。

用于抑制异常细胞生长或治疗增生性疾病的细胞毒性双苯并二氮杂萘衍生物及其与细胞结合剂的缀合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据35 U.S.C. §119(e) 要求2019年3月29日提交的美国临时申请第62/825,954号的申请日权益,所述申请的完整内容以引用的方式并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及新颖细胞毒性化合物,及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,本发明涉及新颖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,这些可用作药剂,具体地可用作抗增生剂。

背景技术

[0004] 苯并二氮杂萘衍生物为可用于治疗多种病症的化合物,且包括诸如抗癫痫药(咪唑并[2,1-b][1,3,5]苯并硫杂二氮杂萘,美国专利第4,444,688号;美国专利第4,062,852号)、抗菌药(嘧啶并[1,2-c][1,3,5]苯并硫杂二氮杂萘,GB 1476684)、利尿剂及降血压药(吡咯并(1,2-b)[1,2,5]苯并硫杂二氮杂萘5,5-二氧化物,美国专利第3,506,646号)、降血脂药(WO 03091232)、抗抑郁剂(美国专利第3,453,266号);骨质疏松症(JP 2138272)的药剂。

[0005] 动物肿瘤模型中已显示出,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-苯并硫杂二氮杂萘-1,1-二氧化物,美国专利第6,156,746号)、苯并-吡啶并或二吡啶并硫杂二氮杂萘(WO 2004/069843)、吡咯并[1,2-b][1,2,5]苯并硫杂二氮杂萘及吡咯并[1,2-b][1,2,5]苯并二氮杂萘衍生物(WO2007/015280)、茅层霉素(tomaymycin)衍生物(例如,吡咯并[1,4]苯并二氮杂萘),诸如WO 00/12508、WO2005/085260、WO2007/085930及EP 2019104中描述的那些。还已知苯并二氮杂萘影响细胞生长及分化(Kamal A.等人,Bioorg.Med.Chem.,2008年8月15日;16(16):7804-10(及其中引用的参考文献);Kumar R,Mini Rev Med Chem.2003年6月;3(4):323-39(及其中引用的参考文献);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.及Bose D.S.,Chem.Rev.,1994;94:433-465;及Tozuka,Z.等人,Journal of Antibiotics,(1983) 36:1699-1708。PBD的一般结构描述于美国公布第20070072846号中。PBD在取代基的数目、类型及位置方面,在其芳族A环及吡咯并C环方面,且在所述C环的饱和程度方面不同。其在小沟中形成加合物且使DNA交联的能力使其能够干扰DNA加工,因此其可能用作抗增生剂。

[0006] 首先进入临床的吡咯并苯并二氮杂萘 SJG-136 (NSC 694501) 是引起 DNA 链间交联的有效细胞毒性剂 (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)。来自 SJG-136 的 I 期临床评估的结果揭露了此药物在极低剂量下具毒性 ($45\mu\text{g}/\text{m}^2$ 的最大耐受剂量, 且注意到数种不良作用, 包括血管渗漏综合征、外周性水肿、肝脏毒性及疲劳。在所有剂量下均在循环淋巴细胞中注意到 DNA 损伤 (D. Hochhauser 等人, 2009, Clin. Cancer Res., 15:2140-2147)。

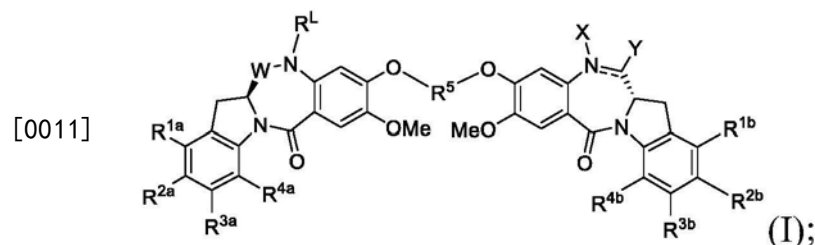
[0007] 因此, 需要具较少毒性且在治疗上仍有效用于治疗诸如癌症的多种增生性疾病的改善苯并二氮杂萘衍生物。

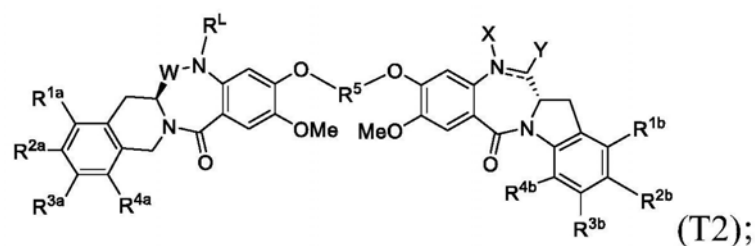
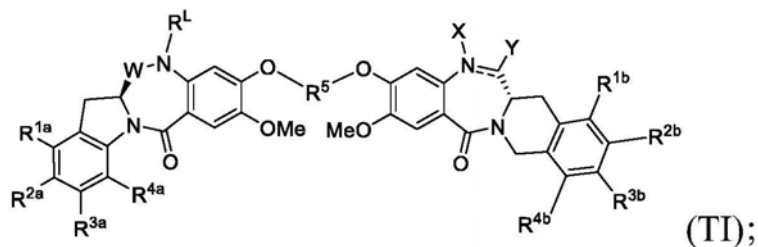
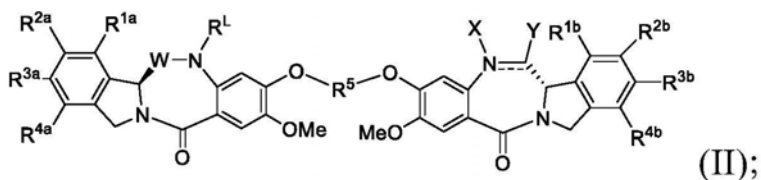
发明内容

[0008] 本发明提供新颖苯并二氮杂萘二聚体化合物及其细胞结合剂缀合物。在一些实施方案中, 所述苯并二氮杂萘二聚体化合物具有经亚胺还原 (即, N 与 C 原子之间的单键) 的苯并二氮杂萘作为单体之一。本发明的二聚体化合物经由在经还原苯并二氮杂萘单体的 N-10 胺处的自降解接头共价连接至细胞结合剂, 其可引起相应细胞结合剂缀合物的改善代谢、效能、耐受性和/或溶解度。

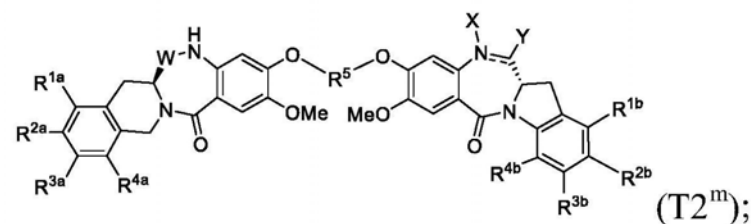
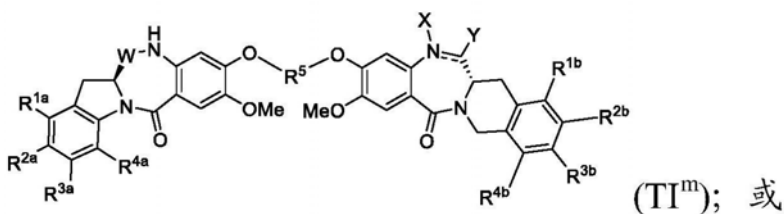
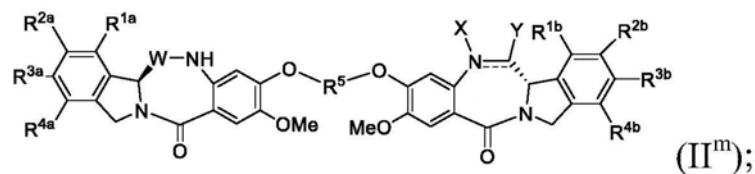
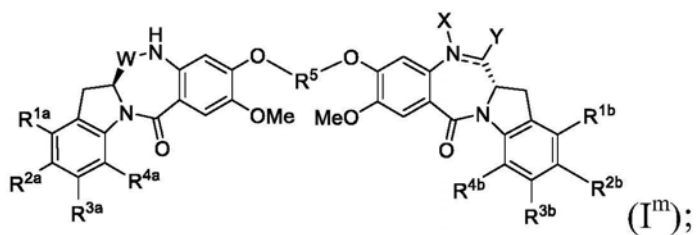
[0009] 具体地, 本发明的二聚体化合物具有亚胺苯并二氮杂萘作为另一单体, 其可经亚胺反应性试剂 (例如亚硫酸氢钠) 修饰以产生修饰 (例如磺化) 的二聚体化合物 (例如本文所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中 N 与 C 之间的双线 $\equiv$ 表示单键, X 为 H 且 Y 为 -OH 或 -SO₃H, 优选地 Y 为 -SO₃H), 其在水溶液中具有增加的溶解度。由于抗体缀合反应一般地在水溶液或水溶液与有机共溶剂的混合物中进行, 所述二聚体化合物的溶解度增加可改善缀合产率且引起所得缀合物的较高 DAR 和/或单体百分率。相比而言, 在亚胺苯并二氮杂萘单体的 N-10 位置处具有自降解接头的比较物苯并二氮杂萘二聚体化合物难以缀合于抗体, 这至少部分地归因于其在水溶液中的低溶解度。另外, 如与本发明缀合物相比, 所述比较物化合物的抗体缀合物具有较低 DAR 及单体百分率 (实施例 47)。

[0010] 在第一方面中, 本发明涉及细胞毒性化合物, 其由下式表示:





[0012]



[0013] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0014] N与C之间的双线=表示单键或双键,限制条件在于当其为双键时,X不存在且Y为H

或 C_{1-4} 烷基,且当其为单键时,X为H且Y为-OH或-SO₃H;

[0015] W为-C(=O)-或-C(Y)-;

[0016] Y'为H或 C_{1-4} 烷基;

[0017] R^{1a} 、 R^{2a} 、 R^{3a} 、 R^{4a} 、 R^{1b} 、 R^{2b} 、 R^{3b} 及 R^{4b} 各自独立地选自由H、 C_{1-10} 烷基、-(OCH₂CH₂)_nOR^c、卤素、-NH(C=NH)NH₂、-OR、-NR' R''、-NO₂、-NR' COR''、-SR、-SOR'、-SO₂R'、-SO₃H、-OSO₃H、-SO₂NR' R''、-CN、-N₃、-COR'、-OCOR'及-CONR' R''组成的组;

[0018] R^c为H或 C_{1-4} 烷基;

[0019] n为整数1至24;

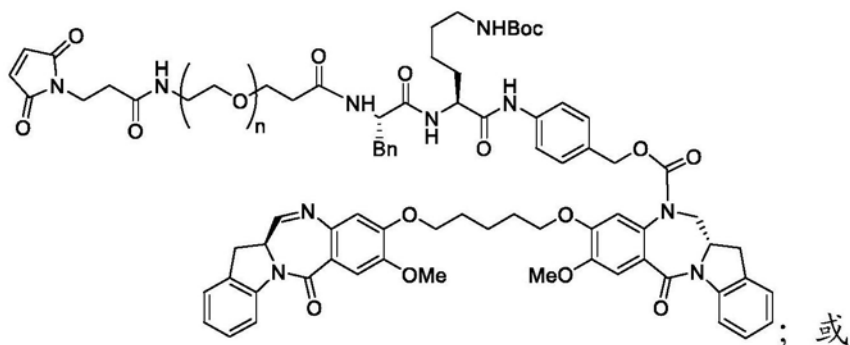
[0020] R在每次出现时独立地选自由H、-(CH₂CH₂O)_n-R^c、 C_{1-10} 烷基、C₃₋₈环烷基、6元至18元芳基、含有一个或多个独立地选自N、O及S的杂原子的5元至18元杂芳环或含有1至6个独立地选自O、S、N及P的杂原子的3元至18元杂环组成的组;

[0021] R'及R''各自独立地选自-H、-OH、-OR、-NHR、-NR₂、-COR、 C_{1-10} 烷基、-(CH₂CH₂O)_n-R^c及具有1至6个独立地选自O、S、N及P的杂原子的3元至18元杂环;

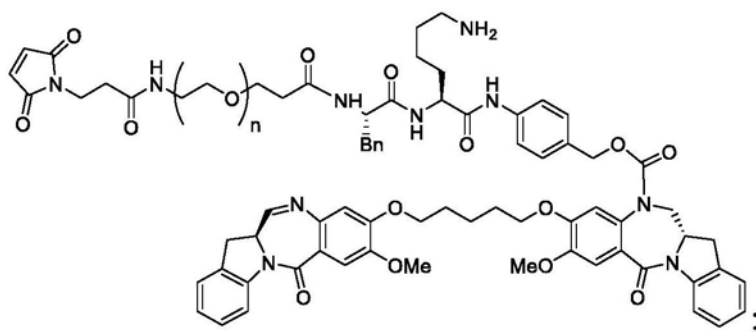
[0022] R⁵为 C_{3-12} 亚烷基,所述链可由一个或多个选自-O-、-S-、-NH-、-NMe-、苯环、4元至7元杂芳环及4元至7元杂环的基团中断,其中所述苯、所述4元至7元杂芳环及所述4元至7元杂环被1至4个R⁶取代;

[0023] R⁶在每次出现时独立地选自H、 C_{1-10} 烷基、-(CH₂CH₂O)_n-R^c、卤素、-NH(C=NH)NH₂、-OR、-NR' R''、-NO₂、-NCO、-NR' COR''、-SR、-SOR'、-SO₂R'、-SO₃H、-OSO₃H、-SO₂NR' R''、-CN、-N₃、-COR'、-OCOR'及-CONR' R'';并且

[0024] R^L为包含可与细胞结合剂形成共价键的反应性基团的自降解接头,限制条件在于式(I)化合物不为:

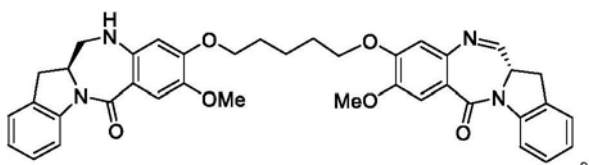


[0025]



[0026] 且限制条件在于式(I^m)化合物不为:

[0027]



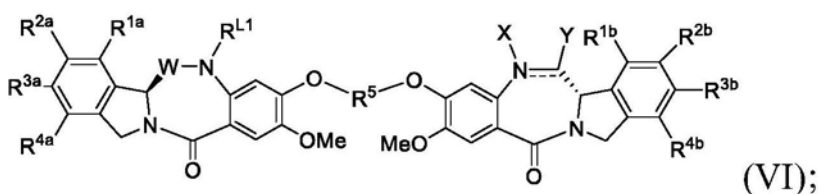
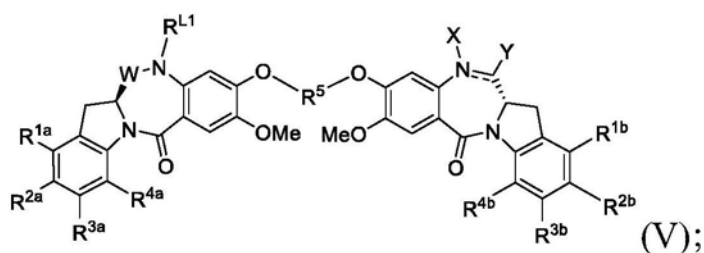
[0028] 在第二方面中,本发明涉及细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物,其由下式表示:

[0029] $CBA-(Cy)_w$,

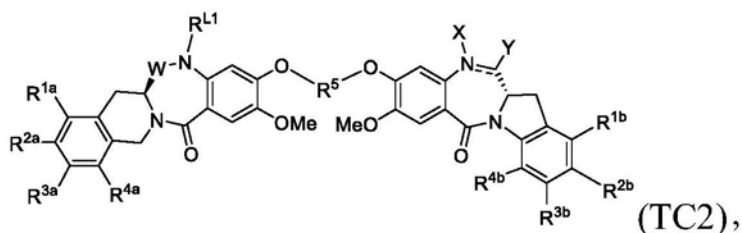
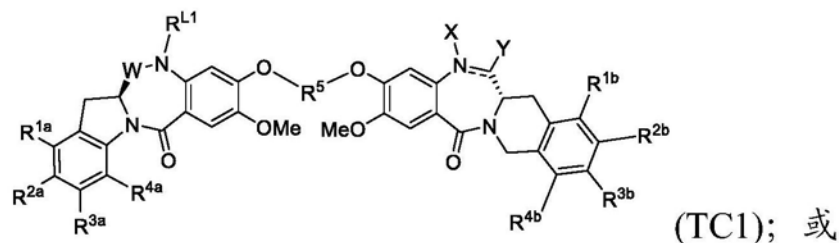
[0030] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0031] CBA为细胞结合剂;

[0032] Cy为细胞毒性剂,其由下式表示:



[0033]



[0034] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0035] N与C之间的双线 $\equiv$ 表示单键或双键,限制条件在于当其为双键时,X不存在且Y为H或 C_{1-4} 烷基,且当其为单键时,X为H且Y为-OH或-SO₃H;

[0036] W为-C(=O)-或-C(Y')-;

[0037] Y'为H或 C_{1-4} 烷基;[0038] R^{1a} 、 R^{2a} 、 R^{3a} 、 R^{4a} 、 R^{1b} 、 R^{2b} 、 R^{3b} 及 R^{4b} 各自独立地选自由H、 C_{1-10} 烷基、-(OCH₂CH₂)_n-OR^c、卤素、-NH(C=NH)NH₂、-OR、-NR'R''、-NO₂、-NR'COR''、-SR、-SOR'、-SO₂R'、-SO₃H、-OSO₃H、-

$\text{SO}_2\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{COR}'$ 、 $-\text{OCOR}'$ 及 $-\text{OCONR}'\text{R}''$ 组成的组；

[0039] R^c 为 H 或 C_{1-4} 烷基；

[0040] n 为整数 1 至 24；

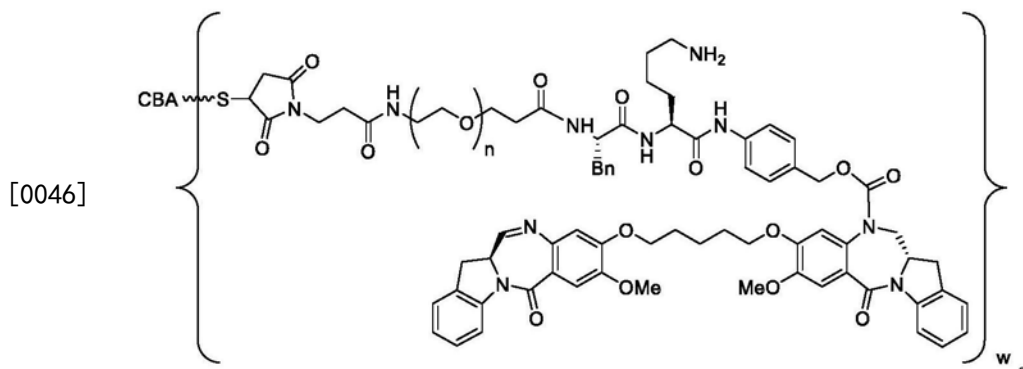
[0041] R 在每次出现时独立地选自 H、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ 、 C_{1-10} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、6 元至 18 元芳基、含有一个或多个独立地选自 N、O 及 S 的杂原子的 5 元至 18 元杂芳环或含有 1 至 6 个独立地选自 O、S、N 及 P 的杂原子的 3 元至 18 元杂环组成的组；

[0042] R' 及 R'' 各自独立地选自 $-\text{H}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{NHR}$ 、 $-\text{NR}_2$ 、 $-\text{COR}$ 、 C_{1-10} 烷基、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ 及具有 1 至 6 个独立地选自 O、S、N 及 P 的杂原子的 3 元至 18 元杂环；

[0043] R^5 为 C_{3-12} 亚烷基，所述链可由一个或多个选自 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NMe}-$ 、苯环、4 元至 7 元杂芳环及 4 元至 7 元杂环的基团中断，其中所述苯、所述 4 元至 7 元杂芳环及所述 4 元至 7 元杂环被 1 至 4 个 R^6 取代；

[0044] R^6 在每次出现时独立地选自 H、 C_{1-10} 烷基、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ 、卤素、 $-\text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{NCO}$ 、 $-\text{NR}'\text{COR}''$ 、 $-\text{SR}$ 、 $-\text{SOR}'$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}'$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{COR}'$ 、 $-\text{OCOR}'$ 及 $-\text{OCONR}'\text{R}''$ ；并且

[0045] R^{L1} 为共价连接至 CBA 的自降解接头，限制条件在于式 (V) 缀合物不为：



[0047] 本发明还包括一种组合物 (例如药物组合物)，其包含本文所述的本发明的细胞毒性化合物或缀合物及载剂 (药学上可接受的载剂)。本发明化合物、缀合物或组合物适用于抑制哺乳动物 (例如人) 的异常细胞生长或治疗其增生性病症 (例如癌症)、自身免疫病症、破坏性骨病症、传染病、病毒性疾病、纤维化疾病、神经退行性病症、胰腺炎或肾病。

[0048] 本发明还包括本发明的细胞毒性化合物、缀合物或组合物用于制造用于抑制哺乳动物 (例如人) 的异常细胞生长或治疗其增生性病症 (例如癌症)、自身免疫病症、破坏性骨病症、传染病、病毒性疾病、纤维化疾病、神经退行性病症、胰腺炎或肾病的药剂的用途。

附图说明

[0049] 图1显示携带OV90异种移植物的SCID小鼠中的抗FR α -55缀合物的抗肿瘤活性。

[0050] 图2显示携带NCI-H2110异种移植物的SCID小鼠中的抗FR α -18缀合物的抗肿瘤活性。

[0051] 图3显示携带FaDu异种移植物的SCID小鼠中的抗EGFR-79缀合物的抗肿瘤活性。

[0052] 图4显示携带Ishikawa异种移植物的SCID小鼠中的抗FR α -46缀合物的抗肿瘤活性。

[0053] 图5显示携带KB异种移植物的SCID小鼠中的抗FR α -18缀合物的抗肿瘤活性。

[0054] 图6显示携带KB异种移植物的SCID小鼠中的抗FR α -46缀合物的抗肿瘤活性。

[0055] 图7显示携带OCI-Ly18异种移植物的SCID小鼠中的huCD19-55缀合物的抗肿瘤活性。

[0056] 图8显示本发明的例示性化合物的DNA结合亲和力。

[0057] 图9是比较物化合物A的抗体缀合物的质谱分析(MS)数据,显示大量D0(未缀合抗体)物质存在。

具体实施方式

[0058] 现将详细地参考本发明的某些实施方案,其实施例在伴随结构及式子中说明。虽然本发明将联合所列举的实施方案来描述,但应理解其不意在将本发明局限于那些实施方案。相反,本发明意在涵盖所有替代物、润饰及等效物,其可包括于如权利要求所限定的本发明范围内。所属领域技术人员应认识到与本文所述的那些相似或等效的多种方法及材料,其可能用于本发明的实践。

[0059] 应理解,除非明确地否认或不适当,否则本文所述的任何实施方案,包括在本发明的不同方面及说明书的不同部分下描述的那些(包括仅在实施例中描述的实施方案)均可与本发明的一个或多个其他实施方案组合。实施方案的组合不限于经由多个从属权利要求要求保护的那些特定组合。

[0060] 定义

[0061] 如本文所用,术语“烷基”或“直链或支链烷基”是指饱和直链或支链单价烃基。在优选实施方案中,直链或支链烷基具有三十个或三十个以下碳原子(例如,关于直链烷基为C₁-C₃₀且关于支链烷基为C₃-C₃₀),且更优选地二十个或二十个以下碳原子。甚至更优选地,直链或支链烷基具有十个或十个以下碳原子(即,关于直链烷基为C₁-C₁₀且关于支链烷基为C₃-C₁₀)。在其他实施方案中,直链或支链烷基具有六个或六个以下碳原子(即,关于直链烷基为C₁-C₆且关于支链烷基为C₃-C₆)。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、-CH₂CH(CH₃)₂、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-辛基及其类似基团。此外,如本说明书、实施例及权利要求中所用的术语“烷基”意在包括“未取代的烷基”及“取代的烷基”,其中后者是指具有置换烃骨架的一个或多个碳上的氢的取代基的烷基部分。如本文所用,(C_x-C_{xx})烷基或C_{x-xx}烷基意指具有x-xx个碳原子的直链或支链烷基。

[0062] 如本文所用,术语“亚烷基”是指饱和直链或支链二价烃基。在优选实施方案中,直链或支链亚烷基具有三十个或三十个以下碳原子(例如,关于直链亚烷基为C₁-C₃₀且关于支链亚烷基为C₃-C₃₀),且更优选地二十个或二十个以下碳原子。甚至更优选地,直链或支链亚烷基具有十个或十个以下碳原子(即,关于直链亚烷基为C₁-C₁₀且关于支链亚烷基为C₃-C₁₀)。在其他实施方案中,直链或支链亚烷基具有六个或六个以下碳原子(即,关于直链亚烷基为C₁-C₆且关于支链亚烷基为C₃-C₆)。如本文所用,(C_x-C_{xx})亚烷基或C_{x-xx}亚烷基意指具有x-xx个碳原子的直链或支链亚烷基。

[0063] 术语“烯基”或“直链或支链烯基”是指具有两个至二十个碳原子且具有至少一个

不饱和位点(即,碳-碳双键)的直链或支链单价烃基,其中烯基包括具有“顺式”及“反式”取向或替代地“E”及“Z”取向的基团。实例包括但不限于乙烯基($-\text{CH}=\text{CH}_2$)、烯丙基($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$)及其类似基团。优选地,烯基具有两个至十个碳原子。更优选地,烷基具有两个至四个碳原子。

[0064] 术语“炔基”或“直链或支链炔基”是指具有两个至二十个碳原子且具有至少一个不饱和位点(即,碳-碳三键)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、己炔基及其类似基团。优选地,炔基具有两个至十个碳原子。更优选地,炔基具有两个至四个碳原子。

[0065] 术语“环状烷基”及“环烷基”可互换使用。如本文所用,所述术语是指饱和碳环的基团。在优选实施方案中,环烷基在其环结构中具有3至10个碳原子,且更优选地在环结构中具有5至7个碳原子。在一些实施方案中,所述两个环可共同具有两个或两个以上原子,例如所述环为“稠环”。合适环烷基包括但不限于环庚基、环己基、环戊基、环丁基及环丙基。在一些实施方案中,环烷基为单环基团。在一些实施方案中,环烷基为二环基团。在一些实施方案中,环烷基为三环基团。

[0066] 术语“环烷基烷基”是指经环烷基取代的上述烷基。

[0067] 术语“环状烯基”是指在环结构中具有至少一个双键的碳环基团。

[0068] 术语“环状炔基”是指在环结构中具有至少一个三键的碳环基团。

[0069] 如本文所用,术语“芳基”或“芳环”包括取代或未取代的单环芳族基团,其中所述环的每一个原子均为碳。优选地,所述环为5至7元环,更优选地6元环。芳基包括但不限于苯基、苯酚、苯胺及其类似基团。术语“芳基”还包括“多环基”、“多环”及“多环状”环系统,其具有两个或两个以上环,其中两个或两个以上原子为两个邻接环所共有,例如所述环为“稠环”,其中所述环中的至少一者为芳族,例如其他环可为环烷基、环烯基、环炔基或芳环。在一些优选实施方案中,多环具有2-3个环。在某些优选实施方案中,多环系统具有两个环,其中所述环均为芳族。多环的每一个环均可取代或未取代的。在某些实施方案中,多环的每一个环在环中含有3至10个碳原子,优选地5至7个。例如,芳基包括但不限于苯基、甲基苯基、萘基、茚基、茚基、萘基及蒽基,以及苯并稠合碳环部分,诸如5,6,7,8-四氢萘基及其类似基团。在一些实施方案中,芳基为单环芳族基团。在一些实施方案中,芳基为双环芳族基团。在一些实施方案中,芳基为三环芳族基团。

[0070] 如本文所用,术语“杂环(heterocycle)”、“杂环基”及“杂环(heterocyclic ring)”是指3元至18元环、优选地3元至10元环、更优选地3元至7元环的取代或未取代的非芳环结构,其环结构包括至少一个杂原子,优选地一个至四个杂原子,更优选地一个或两个杂原子。在某些实施方案中,所述环结构可具有两个环。在一些实施方案中,所述两个环可共同具有两个或两个以上原子,例如所述环为“稠环”。杂环基包括例如吡啶、哌啶、吡咯烷、吗啉、内酯、内酰胺及其类似基团。杂环描述于Paquette, Leo A.; “Principles of Modern Heterocyclic Chemistry”(W.A. Benjamin, New York, 1968), 尤其第1、3、4、6、7及9章; “The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs”(John Wiley & Sons, New York, 1950年至今), 尤其第13、14、16、19及28卷; 及J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566中。杂环的实例包括但不限于四氢呋喃、二氢呋喃、四氢噻吩、四氢吡喃、二氢吡喃、四氢噻喃、硫代吗啉、噻恶烷、高哌啶、氮杂环丁烷、氧杂环丁烷、硫杂环丁烷、高哌啶、哌啶、哌啶、吡咯

烷、吗啉、氧杂环庚烷、硫杂环庚烷、氧氮杂茛、二氮杂茛、硫氮杂茛、2-吡咯啉、3-吡咯啉、吡啶、2H-吡喃、4H-吡喃、二恶烷、1,3-二氧戊环、吡唑啉、二噻烷、二硫戊环、二氢吡喃、二氢噻吩、二氢呋喃、吡唑烷基咪唑啉、咪唑烷、3-氮杂双环[3.1.0]己烷、3-氮杂双环[4.1.0]庚烷及氮杂双环[2.2.2]己烷。螺部分也包括于此定义的范围。其中环原子被氧代(=O)部分取代的杂环基团的实例为嘧啶酮及1,1-二氧化-硫代吗啉。

[0071] 如本文所用,术语“杂芳基(heteroaryl)”或“杂芳环(heteroaromatic ring)”是指取代或未取代的芳族单环结构,优选地6元至18元环,优选地5元至7元环,更优选地5元至6元环,其环结构包括至少一个杂原子(例如,O、N或S),优选地一个至四个或一个至三个杂原子,更优选地一个或两个杂原子。当两个或两个以上杂原子存在于杂芳基环中时,其可为相同或不同的。术语“杂芳基”还包括“多环基”、“多环”及“多环状”环系统,其具有两个或两个以上环,其中两个或两个以上环原子为两个邻接环所共有,例如所述环为“稠环”,其中所述环中的至少一者为杂芳族,例如其他环可为环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳族和/或杂环基。在一些优选实施方案中,多环杂芳基具有2-3个环。在某些实施方案中,更佳多环杂芳基具有两个环,其中所述环均为芳族。在某些实施方案中,多环的每一个环在环中含有3至10个原子,优选地在环中含有5至7个原子。例如,杂芳基包括但不限于吡咯、呋喃、噻吩、咪唑、恶唑、噻唑、吡唑、吡啶、吡嗪、哒嗪、喹啉、嘧啶、吡啶、吡啶、吡啶、苯并咪唑、苯并噻唑、苯并呋喃、苯并噻吩、噌啉、酞嗪、喹啉、呋喃、吩恶嗪、喹啉、嘌呤及其类似物。在一些实施方案中,杂芳基为单环芳族基团。在一些实施方案中,杂芳基为双环芳族基团。在一些实施方案中,杂芳基为三环芳族基团。

[0072] 在可能的情况下,杂环或杂芳基可为碳(碳连接)或氮(氮连接)附接的。举例而言且非限制,碳键结的杂环或杂芳基键结于吡啶的2、3、4、5或6位、哒嗪的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、硫代呋喃、噻吩、吡咯或四氢吡咯的2、3、4或5位、恶唑、咪唑或噻唑的2、4或5位、异恶唑、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。

[0073] 举例而言且非限制,氮键结的杂环或杂芳基键结于氮丙啶、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、1H-吡啶的1位、异吡啶或异吡啶啉的2位、吗啉的4位及呋喃或0-呋喃的9位。

[0074] 存在于杂芳基或杂环基中的杂原子包括氧化的形式,诸如NO、SO及SO₂。

[0075] 在一些实施方案中,杂芳环为5至18元环。

[0076] 术语“卤基”或“卤素”是指氟(F)、氯(Cl)、溴(Br)或碘(I)。在一些实施方案中,所述卤素为氟。在一些实施方案中,所述卤素为氯。在一些实施方案中,所述卤素为溴。在一些实施方案中,所述卤素为碘。如本文所用,术语“卤烷基”是指如本文所定义的烷基,其由如本文所定义的一个或多个卤基取代。所述卤烷基可为单卤烷基、二卤烷基或聚卤烷基。单卤烷基可具有一个氟、氯、溴或碘取代基。二卤烷基或聚卤烷基可被两个或两个以上相同卤原子或不同卤基的组合取代。卤烷基的实例包括但不限于氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、氯甲基、二氯甲基、三氯甲基、五氟乙基、七氟丙基、二氟氯甲基、二氯氟甲基、二氟乙基、二氟丙基、二氯乙基及二氯丙基。

[0077] 本文所用的术语“烷氧基”是指烷基-O-,其中烷基定义于上文中。烷氧基的实例包

括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、2-丙氧基、丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、己氧基及其类似基团。

[0078] 上文所述的烷基、卤烷基、烷氧基、烯基、炔基、环状烷基、环状烯基、环状炔基、碳环基、芳基、杂环基及杂芳基可任选地被一个或多个(例如,2、3、4、5、6个或6个以上)取代基取代。

[0079] 除非特定地陈述为“未取代”,否则本文中对化学部分的提及应理解为也包括取代的变体。例如,对“烷基”基团或部分的提及暗含包括取代及未取代的变体。化学部分上的取代基的实例包括但不限于卤素、羟基、羰基(诸如羧基、烷氧羰基、甲酰基或酰基)、硫羰基(诸如硫酯、硫代乙酸酯或硫代甲酸酯)、烷氧基、烷硫基、酰氧基、磷酰基、磷酸酯、膦酸酯、氨基、酰氨基、脒、亚胺、氰基、硝基、叠氮基、巯基、烷硫基、硫酸酯、磺酸酯、氨磺酰基、磺酰氨基、磺酰基、杂环基、芳烷基或芳族或杂芳基部分。

[0080] “任选的”或“任选地”意指随后描述的情形可或可不发生,使得所述申请包括其中所述情形发生的情况及其中所述情形不发生的情况。例如,措辞“任选地取代”意指非氢取代基可或可不存在于给定原子上,且因此所述申请包括其中存在非氢取代基的结构及其中不存在非氢取代基的结构。

[0081] 术语“取代的”是指具有置换一个或多个碳、氮、氧或硫原子上的氢的取代基的部分。应理解,“进行取代”或“被取代”包括暗含限制条件,即所述取代与被取代的原子及取代基的允许价态一致,且所述取代产生稳定化合物,例如所述化合物不会自发地经历诸如通过重排、环化、消除等导致的转化。如本文所用,术语“取代的”预期包括有机化合物的所有可允许取代基。在一广泛方面中,所述可允许取代基包括有机化合物的无环及环状、分支及未分支、碳环及杂环、芳族及非芳族取代基。所述可允许取代基可为用于适当有机化合物的一者或多者且相同或不同。出于本发明的目的,诸如氮的杂原子可具有氢取代基和/或本文所述的有机化合物的满足杂原子价态的任何可允许取代基。取代基可包括本文所述的任何取代基,例如卤素、羟基、羰基(诸如羧基、烷氧羰基、甲酰基或酰基)、硫羰基(诸如硫酯、硫代乙酸酯或硫代甲酸酯)、烷氧基、烷硫基、酰氧基、磷酰基、磷酸酯、膦酸酯、氨基、酰氨基、脒、亚胺、氰基、硝基、叠氮基、巯基、烷硫基、硫酸酯、磺酸酯、氨磺酰基、磺酰氨基、磺酰基、杂环基、芳烷基或芳族或杂芳族部分。为了说明,单氟烷基是被一个氟取代基取代的烷基,且二氟烷基是被两个氟取代基取代的烷基。应认识到,若取代基上存在超过一个取代,则各非氢取代基可为一致或不同的(除非另外规定)。

[0082] 若取代基的碳被描述为任选地被取代基清单中的一者或多者取代,则所述碳上的一个或多个氢(就存在一些而言)可独立地和/或合起来被独立选择的任选的取代基置换。若取代基的氮被描述为任选地被取代基清单中的一者或多者取代,则所述氮上的一个或多个氢(就存在一些而言)可各自被独立选择的任选的取代基置换。一种例示性取代基可描绘为-NR' R'',其中R'及R''与其所附接的氮原子一起可形成杂环。由R'及R''与其所附接的氮原子一起形成的杂环可部分地或完全地饱和。在一些实施方案中,所述杂环由3至7个原子组成。在其他实施方案中,所述杂环选自吡咯基、咪唑基、吡唑基、三唑基、四唑基、异恶唑基、吡啶基及噻唑基。

[0083] 此说明书可互换地使用术语“取代基”、“基团(radical)”及“基团(group)”。

[0084] 若取代基的基团共同地描述为任选地由取代基清单中的一者或多者取代,则所述

基团可包括：(1) 无法取代的取代基，(2) 可取代的取代基，其未由任选的取代基取代，和/或 (3) 可取代的取代基，其由任选的取代基中的一者或多者取代。

[0085] 若取代基描述为任选地被多达特定数目的非氢取代基取代，则那个取代基可 (1) 为未取代的；或 (2) 由那个特定数目的非氢取代基或由所述取代基上的多达最大数目的可取代位置 (取较小者) 取代。因此，举例而言，若取代基描述为任选地被多达3个非氢取代基取代的杂芳基，则具有少于3个可取代位置的任何杂芳基均将任选地被多达仅与所述杂芳基具有的可取代位置同样多的非氢取代基取代。在非限制性实例中，所述取代基可选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基、芳基、杂芳基、杂环基、卤素、胍盐 $[-NH(C=NH)NH_2]$ 、 $-OR^{100}$ 、 $-NR^{101}R^{102}$ 、 $-NO_2$ 、 $-NR^{101}COR^{102}$ 、 $-SR^{100}$ 、由 $-SOR^{101}$ 表示的亚砷、由 $-SO_2R^{101}$ 表示的砷、磺酸酯基 $-SO_3M$ 、硫酸酯基 $-OSO_3M$ 、由 $-SO_2NR^{101}R^{102}$ 表示的磺酰胺、氰基、叠氮基、 $-COR^{101}$ 、 $-OCOR^{101}$ 、 $-OCONR^{101}R^{102}$ 及聚乙二醇单元 $(-OCH_2CH_2)_nR^{101}$ ，其中M为H或阳离子 (诸如 Na^+ 或 K^+)； R^{101} 、 R^{102} 及 R^{103} 各自独立地选自H、具有1至10个碳原子的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基、聚乙二醇单元 $(-OCH_2CH_2)_nR^{104}$ (其中n为整数1至24)、具有6至10个碳原子的芳基、具有3至10个碳原子的杂环及具有5至10个碳原子的杂芳基；并且 R^{104} 为H或具有1至4个碳原子的直链或支链烷基，其中所述基团中由 R^{100} 、 R^{101} 、 R^{102} 、 R^{103} 及 R^{104} 表示的烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基及杂环基任选地被独立地选自卤素、 $-OH$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 及具有1至4个碳原子的未取代直链或支链烷基的一个或多个 (例如，2、3、4、5、6个或6个以上) 取代基取代。优选地，用于上文所述的任选取代的烷基、烯基、炔基、环状烷基、环状烯基、环状炔基、碳环基、芳基、杂环基及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、 $-SR^{101}$ 、 $-SOR^{101}$ 、 $-SO_2R^{101}$ 及 $-SO_3M$ 。

[0086] 基团中的碳原子数目在本文中可由字首“ C_{x-xx} ”或“ C_x-C_{xx} ”规定，其中x及xx为整数。例如，“ C_{1-4} 烷基”或“C1-C4烷基”为具有1至4个碳原子的烷基。

[0087] 术语“化合物”或“细胞毒性化合物”、“细胞毒性二聚体”及“细胞毒性二聚体化合物”可互换使用。其意在包括如下化合物，其结构或式子或任何衍生物已公开于本发明中或其结构或式子或任何衍生物已以引用的方式并入。所述术语还包括本发明中公开的所有式子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 (例如，药学上可接受的盐) 及前药以及前药盐。所述术语还包括前述任一者的任何溶剂化物、水合物及多晶型物。在此申请中描述的本发明的某些方面中，特定陈述“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”不应解释为在其中使用术语“化合物”而未陈述这些其他形式的本发明的其他方面中意在省略这些形式。

[0088] 如本文所用，术语“缀合物”是指连接至细胞结合剂的本文所述化合物或其衍生物。

[0089] 术语“手性”是指具有镜像搭配物的不可重叠特性的分子，而术语“非手性”是指在其镜像搭配物上可重叠的分子。

[0090] 术语“立体异构体”是指如下化合物，其具有一致化学组成及连接性，但其原子在空间中的不同取向无法通过绕单键旋转而互变。

[0091] 术语“非对映异构体”是指具有两个或两个以上手性中心且分子彼此不为镜像的立体异构体。非对映异构体具有不同的物理特性，例如熔点、沸点、光谱特性及反应性。非对

映异构体的混合物可根据高分辨率分析程序,诸如结晶、电泳及色谱来分离。

[0092] 术语“对映异构体”是指化合物的两种立体异构体,其彼此为不可重叠镜像。

[0093] 本文所使用的立体化学定义及惯例一般地遵循S.P.Parker编,McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms(1984)McGraw-Hill Book Company,New York;及Eliel, E.及Wilens, S., “Stereochemistry of Organic Compounds,” John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994。本发明化合物可含有非对称或手性中心,且因此以不同立体异构体形式存在。预期本发明化合物的所有立体异构体形式形成本发明的一部分,包括但不限于非对映异构体、对映异构体及位阻异构体,以及其混合物,诸如外消旋混合物。多种有机化合物以光学活性形式存在,即,其具有使平面-偏振光的平面旋转的能力。在描述光学活性化合物时,字首D及L或R及S用于表示所述分子绕其手性中心的绝对构型。字首d及l或(+)及(-)用于指示所述化合物使平面-偏振光旋转的符号,其中(-)或l意指所述化合物为左旋的。字首为(+)或d的化合物为右旋的。关于给定化学结构,这些立体异构体为一致的,只是其彼此为镜像。特定立体异构体也可称作对映异构体,且所述异构体的混合物通常称作对映异构体混合物。对映异构体的50:50混合物称作外消旋混合物或外消旋体,其可在化学反应或过程中无立体选择或立体特异性的情况下出现。术语“外消旋混合物”及“外消旋体”是指两种对映异构体物质的等摩尔浓度混合物,其缺乏光学活性。

[0094] 术语“互变异构体”或“互变异构体形式”是指可经由低能屏障互变的具有不同能量的结构异构体。例如,质子互变异构体(也称作质子移变互变异构体)包括经由质子迁移实现的互变,诸如酮-烯醇及亚胺-烯胺异构化。价互变异构体包括通过一些键结电子的重组实现的互变。

[0095] 如本文所用,术语“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或无机盐。例示性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、酸性磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸性柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、鞣酸盐、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、富马酸盐、葡糖酸盐、葡糖醛酸盐、糖质酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐“甲磺酸盐”、乙烷磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、双羟萘酸盐(即,1,1'-亚甲基-双-(2-羟基-3-萘甲酸盐))、碱金属(例如,钠及钾)盐、碱土金属(例如,镁)盐及铵盐。药学上可接受的盐可涉及包括另一分子,诸如乙酸盐离子、琥珀酸盐离子或其他相对离子。所述相对离子可为使母体化合物上的电荷稳定化的任何有机或无机部分。此外,药学上可接受的盐可在其结构中具有超过一个带电原子。其中多个带电原子为药学上可接受的盐的一部分的情况可具有多个相对离子。因此,药学上可接受的盐可具有一个或多个带电原子和/或一个或多个相对离子。

[0096] 若本发明化合物为碱,则所需药学上可接受的盐可通过本领域中可获得的任何合适方法制备,例如用诸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、甲磺酸、磷酸及其类似物的无机酸,或用诸如乙酸、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、吡喃糖酸(诸如葡糖醛酸或半乳糖醛酸)、 α 羟基酸(诸如柠檬酸或酒石酸)、氨基酸(诸如天冬氨酸或谷氨酸)、芳香酸(诸如苯甲酸或肉桂酸)、磺酸(诸如对甲苯磺酸或乙烷磺酸)或其类似物的有机酸处理游离碱。

[0097] 若本发明化合物为酸,则所需药学上可接受的盐可通过任何合适方法制备,例如

用诸如胺(伯、仲或叔)、碱金属氢氧化物或碱土金属氢氧化物或其类似物的无机或有机碱处理游离酸。合适盐的说明性实例包括但不限于源于诸如甘氨酸及精氨酸的氨基酸、氨水、伯、仲及叔胺及诸如吡啶、吗啉及哌嗪的环状胺的有机盐,及源于钠、钙、钾、镁、锰、铁、铜、锌、铝及锂的无机盐。

[0098] 如本文所用,术语“溶剂化物”意指如下化合物,其进一步包括通过非共价分子间力结合的化学计量或非化学计量的量的溶剂,诸如水、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-丙醇或其类似物。所述化合物的溶剂化物或水合物容易通过向所述化合物中添加至少一摩尔当量的羟基溶剂(诸如甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇或水)以产生亚胺部分的溶剂化或水合来制备。

[0099] 措辞“药学上可接受”指示所述物质或组合物必须可在化学上和/或在毒物学上与构成所述制剂的其他成分和/或用其治疗的哺乳动物相容。

[0100] 术语“离去基”是指在取代或置换期间离去的带电或不带电部分的基团。所述离去基为本领域中熟知的且包括但不限于卤素、酯、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、硫醚及重氮化合物。

[0101] 术语“反应性酯”是指具有可容易置换的离去基的酯,所述离去基可容易与氨基反应以形成酰胺键。反应性酯的实例包括但不限于N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、硝基苯基(例如,2-硝基苯基或4-硝基苯基)酯、二硝基苯基(例如,2,4-二硝基苯基)酯、磺基-四氟苯基(例如,4磺基-2,3,5,6-四氟苯基)酯或五氟苯基酯。

[0102] 术语“反应性基团”是指可与位于另一分子(诸如细胞结合剂或细胞毒性化合物)上的部分反应以形成共价键的基团。反应性基团包括但不限于胺反应性基团及硫醇反应性基团。

[0103] 术语“胺反应性基团”是指可与氨基反应以形成共价键的基团。例示性胺反应性基团包括但不限于反应性酯基团、酰基卤、磺酰基卤、酰亚胺酯或反应性硫酯基团。在某些实施方案中,所述胺反应性基团为反应性酯基团。在一个实施方案中,所述胺反应性基团为N-羟基琥珀酰亚胺酯或N-羟基磺基-琥珀酰亚胺酯。

[0104] 术语“硫醇反应性基团”是指可与硫醇(-SH)基团反应以形成共价键的基团。例示性硫醇反应性基团包括但不限于马来酰亚胺、卤基乙酰基、卤基乙酰胺、乙烯基砜、乙烯基磺酰胺或乙烯基吡啶。在一个实施方案中,所述硫醇反应性基团为马来酰亚胺。

[0105] 术语“双官能交联剂”、“双官能接头”或“交联剂”是指具有两个反应性基团的修饰剂;所述反应性基团之一能够与细胞结合剂反应,而另一者与细胞毒性化合物反应以使所述两个部分连接在一起。所述双官能交联剂为本领域中熟知的(参见例如Isalm及Dent Bioconjugation第5章,第218-363页,Groves Dictionaries Inc.New York,1999)。例如,使得能够经由硫醚键连接的双官能交联剂包括N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-甲酸酯(SMCC)以引入马来酰亚胺基,或N-琥珀酰亚胺基-4-(碘乙酰基)-氨基苯甲酸酯(SIAB)以引入碘乙酰基。在细胞结合剂上引入马来酰亚胺基或卤基乙酰基的其他双官能交联剂为本领域中熟知的(参见美国专利申请2008/0050310、20050169933,可获自Pierce Biotechnology Inc.P.O.Box 117,Rockland,IL 61105,USA)且包括但不限于双-马来酰亚胺基聚乙二醇(BMPEO)、BM(PEO)₂、BM(PEO)₃、N-(β-马来酰亚胺基丙氧基)琥珀酰亚胺酯(BMPS)、γ-马来酰亚胺基丁酸N-琥珀酰亚胺酯(GMBS)、ε-马来酰亚胺基己酸N-羟

基琥珀酰亚胺酯 (EMCS)、5-马来酰亚胺基戊酸NHS、HBVS、N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧基-(6-酰氨基己酸酯) (其为SMCC的“长链”类似物 (LC-SMCC))、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (MBS)、4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)-丁酸酐或HCl盐 (MPBH)、N-琥珀酰亚胺基-3-(溴乙酰氨基) 丙酸酯 (SBAP)、N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯 (SIA)、 κ -马来酰亚胺基十一酸N-琥珀酰亚胺酯 (KMUA)、N-琥珀酰亚胺基-4-(对马来酰亚胺基苯基)-丁酸酯 (SMPB)、琥珀酰亚胺基-6-(β -马来酰亚胺基丙酰氨基) 己酸酯 (SMPH)、琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基磺酰基) 苯甲酸酯 (SVSB)、二硫双-马来酰亚胺基乙烷 (DTME)、1,4-双-马来酰亚胺基丁烷 (BMB)、1,4双马来酰亚胺基-2,3-二羟基丁烷 (BMD)、双-马来酰亚胺基己烷 (BMH)、双-马来酰亚胺基乙烷 (BMOE)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基-甲基) 环己烷-1-甲酸酯 (磺基-SMCC)、磺基琥珀酰亚胺基(4-碘-乙酰基) 氨基苯甲酸酯 (磺基-SIAB)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯 (磺基-MBS)、N-(γ -马来酰亚胺基丁酰基氧基) 磺基琥珀酰亚胺酯 (磺基-GMBS)、N-(ϵ -马来酰亚胺基己酰基氧基) 磺基琥珀酰亚胺酯 (磺基-EMCS)、N-(κ -马来酰亚胺基十一酰基氧基) 磺基琥珀酰亚胺酯 (磺基-KMUS) 及磺基琥珀酰亚胺基-4-(对马来酰亚胺基苯基) 丁酸酯 (磺基-SMPB)。

[0106] 杂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-羟基琥珀酰亚胺基 (NHS基团) 及羰基反应性肼基两者的杂双官能交联剂也可用于使本文所述的细胞毒性化合物与细胞结合剂 (例如, 抗体) 连接。所述市售杂双官能交联剂的实例包括琥珀酰亚胺基-6-肼基烟酰胺丙酮腙 (succinimidyl 6-hydrazinonicotinamide acetone hydrazone, SANH)、琥珀酰亚胺基-4-肼基对苯二甲酸酯盐酸盐 (succinimidyl 4-hydrazidoterephthalate hydrochloride, SHTH) 及琥珀酰亚胺基肼烟酸酯盐酸盐 (succinimidyl hydrazinium nicotinate hydrochloride, SHNH)。具有酸不稳定键的缀合物也可使用本发明的具有肼的苯并二氮杂萘衍生物来制备。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) 及琥珀酰亚胺基-对甲酰基苯氧基乙酸酯 (SFPA)。

[0107] 使得能够经由二硫键使细胞结合剂与细胞毒性化合物连接的双官能交联剂为本领域中已知的且包括N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫基) 丙酸酯 (SPDP)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫基) 戊酸酯 (SPP)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫基) 丁酸酯 (SPDB)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫基)-2-磺基丁酸酯 (磺基-SPDB) 以引入二硫基吡啶基。可用于引入二硫基的其他双官能交联剂为本领域中已知的且公开于美国专利6,913,748、6,716,821及美国专利公布20090274713及20100129314中,其均以引用的方式并入本文。或者,也可使用引入硫醇基的交联剂,诸如2-亚氨基硫杂戊环、高半胱氨酸硫内酯或S-乙酰基琥珀酸酐。

[0108] 如本文所定义,术语“接头”、“接头部分”或“连接基团”是指使诸如细胞结合剂及细胞毒性化合物的两个基团连接在一起的部分。典型地,所述接头在连接其所连接的两个基团的条件下基本上呈惰性。双官能交联剂可包含两个反应性基团,在接头部分的各末端处一个基团,以致一个反应性基团可首先与细胞毒性化合物反应以提供具有所述接头部分及第二反应性基团的化合物,所述第二反应性基团可接着与细胞结合剂反应。或者,所述双官能交联剂的一个末端可首先与细胞结合剂反应以提供具有接头部分及第二反应性基团的细胞结合剂,其可接着与细胞毒性化合物反应。所述连接部分可含有允许在特定位置处

释放所述细胞毒性部分的化学键。合适化学键为本领域中熟知的且包括二硫键、硫醚键、酸不稳定键、光不稳定键、肽酶不稳定键及酯酶不稳定键(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及7,414,073)。优选的为二硫键、硫醚及肽酶不稳定键。可用于本发明的其他接头包括不可裂解接头,诸如详细描述于美国公布第20050169933号中的那些,或描述于US 2009/0274713、US 2010/01293140及WO 2009/134976中的带电接头或亲水性接头,所述公布中每一者均明确地以引用的方式并入本文,所述公布中每一者均明确地以引用的方式并入本文。

[0109] 术语“自降解接头”是指当远端位点被活化时将允许细胞毒性化合物的释放的接头。在某些实施方案中,所述接头包含对氨基苯甲基单元。在一些这样的实施方案中,对氨基苯甲基醇经由酰胺键附接至氨基酸单元,且在苯甲基醇与药物之间产生氨基甲酸酯、甲基氨基甲酸酯或碳酸酯(Hamann等人(2005)Expert Opin.Ther.Patents(2005)15:1087-1103)。在一些实施方案中,所述接头包含对氨基苯甲氧基羰基(PAB)。自降解接头的其他实例包括但不限于在电子上类似于PAB基团的芳族化合物,诸如2-氨基咪唑-5-甲醇衍生物(美国专利第7,375,078号;Hay等人(1999)Bioorg.Med.Chem.Lett.9:2237)及邻或对氨基苯甲基缩醛。在一些实施方案中,可使用在酰胺键水解时经受环化的间隔体,诸如取代及未取代的4-氨基丁酸酰胺(Rodrigues等人(1995)Chemistry Biology 2:223)、适当取代的双环[2.2.1]及双环[2.2.2]环系统(Storm等人(1972)J.Amer.Chem.Soc.94:5815)及2-氨基苯基丙酸酰胺(Amsberry等人(1990)J.Org.Chem.55:5867)。药物与甘氨酸残基的 α -碳的连接是可适用于ADC的自降解接头的另一实例(Kingsbury等人(1984)J.Med.Chem.27:1447)。

[0110] 术语“氨基酸”是指天然存在的氨基酸或非天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,氨基酸由 $\text{NH}_2\text{-C(R}^{\text{aa}}\text{R}^{\text{aa}}\text{)-C(=O)OH}$ 表示,其中 R^{aa} 及 R^{aa} 各自独立地为H、任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基、芳基、杂芳基或杂环基或 R^{aa} 及N端氮原子可合起来形成杂环(例如,如在脯氨酸中)。术语“氨基酸残基”是指当一个氢原子从氨基酸的胺和/或羧基末端移除时的相应残基,诸如 $\text{-NH-C(R}^{\text{aa}}\text{R}^{\text{aa}}\text{)-C(=O)-}$ 。

[0111] 术语“肽”是指通过肽(酰胺)键连接的氨基酸单体的短链。在一些实施方案中,所述肽含有2至20个氨基酸残基。在其他实施方案中,所述肽含有2至10个或2至8个氨基酸残基。在其他实施方案中,所述肽含有2至5个氨基酸残基。如本文所用,当肽为本文所述的细胞毒性剂或接头中由氨基酸的特定序列表示的一部分时,所述肽可沿两个方向连接至所述细胞毒性剂或所述接头的剩余部分。

[0112] 术语“阳离子”是指具有正电荷的离子。所述阳离子可为单价(例如, Na^+ 、 K^+ 等)、二价(例如, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等)或多价(例如, Al^{3+} 等)。优选地,所述阳离子为单价。

[0113] 除非另外指示,否则如本文中可互换使用的术语“(人)IL-3R α ”、“白细胞介素-3受体 α ”或“CD123”是指任何原生(人)IL-3R α 或CD123。CD123蛋白是杂二聚细胞因子受体(IL-3受体或IL-3R)的白细胞介素3特异性亚单元。IL-3R包含配体特异性 α 亚单元,及由白细胞介素3(IL3)、集落刺激因子2(CSF2/GM-CSF)及白细胞介素5(IL5)的受体共享的信号转导共用 β 亚单元(也称作CD131)。CD123/IL-3R α 与IL3的结合取决于所述 β 亚单元。所述 β 亚单元通过配体结合来活化,且是IL3的生物活性所需的。

[0114] 关于CD123的所有这些上述术语均可指如本文所指示的蛋白质或核酸序列。术语

“CD123/IL-3R α ”涵盖“全长”未加工CD123/IL-3R α ,以及由细胞内的加工产生的任何形式的CD123/IL-3R α 。所述术语还涵盖CD123/IL-3R α 蛋白或核酸的天然存在的变体,例如剪接变体、等位基因变体及同工型。本文所述的CD123/IL-3R α 多肽及聚核苷酸可从多种来源,诸如从人组织类型或从另一来源分离,或通过重组或合成方法制备。CD123/IL-3R α 序列的实例包括但不限于NCBI参考编号NP_002174及NM_002183(针对人CD123变体1的蛋白质及核酸序列),及NP_001254642及NM_001267713(针对人CD123变体2的蛋白质及核酸序列)。

[0115] 术语“ADAM9”是指含有去整合素及金属蛋白酶结构域的蛋白9,其为ADAM分子家族的成员。其被合成为无活性形式,所述无活性形式经蛋白水解裂解以产生活性酶。上游处的加工对于酶原的活化而言尤其重要。ADAM9表达于成纤维细胞(Zigrino,P.等人(2011)“The Disintegrin-Like And Cysteine-Rich Domains Of ADAM-9 Mediate Interactions Between Melanoma Cells And Fibroblasts,”J.Biol.Chem.286:6801-6807)、活化的血管平滑肌细胞(Sun,C.等人(2010)“ADAM15 Regulates Endothelial Permeability And Neutrophil Migration Via Src/ERK1/2 Signalling,”Cardiovasc.Res.87:348-355)、单核细胞(Namba,K.等人(2001)“Involvement Of ADAM9 In Multinucleated Giant Cell Formation Of Blood Monocytes,”Cell.Immunol.213:104-113)及活化的巨噬细胞(Oksala,N.等人(2009)“ADAM-9,ADAM-15,And ADAM-17 Are Upregulated In Macrophages In Advanced Human Atherosclerotic Plaques In Aorta And Carotid And Femoral Arteries-Tampere Vascular Study,”Ann.Med.41:279-290)中。代表性人ADAM9多肽为NCBI序列NP_003807。在ADAM9多肽的819个氨基酸残基中,残基1-28为信号序列,残基29-697为细胞外结构域,残基698-718为跨膜结构域,且残基719-819为细胞内结构域。三个结构域位于细胞外结构域内:Reprolysin(M12B)家族锌金属蛋白酶结构域(在大约残基212-406处);去整合素结构域(在大约残基423-497处);及EGF样结构域(在大约残基644-697处)。多种翻译后修饰及同工型已被鉴别且所述蛋白质在其到达质膜以产生成熟蛋白质之前在反面高尔基体网络中经蛋白水解裂解。前结构域的移除经由两个不同位点处的裂解而发生。加工最有可能在前结构域与催化结构域之间的边界处(Arg-205/Ala-206)通过诸如弗林的原蛋白转化酶而发生。额外上游裂解原蛋白转化酶位点(Arg-56/Glu-57)在ADAM9的活化中具有重要作用。代表性食蟹猕猴ADAM9多肽为NCBI序列XM_005563126.2,包括可能28个氨基酸残基的信号序列。所述蛋白质的Reprolysin(M12B)家族锌金属蛋白酶结构域在大约残基212-406处;所述蛋白质的去整合素结构域在大约残基423-497处。

[0116] 术语“抗体”意指免疫球蛋白分子,其经由所述免疫球蛋白分子的可变区内的至少一个抗原识别位点识别且特异性地结合于靶标,诸如蛋白质、多肽、肽、碳水化合物、聚核苷酸、脂质或前述各物的组合。如本文所用,术语“抗体”涵盖完整多克隆抗体、完整单克隆抗体、抗体片段(诸如Fab、Fab'、F(ab')₂及Fv片段)、单链Fv(scFv)突变体、多特异性抗体(诸如双特异性抗体)、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、包含抗体的抗原决定部分的融合蛋白及包含抗原识别位点的任何其他修饰免疫球蛋白分子,只要所述抗体展现所需生物活性即可。抗体基于其重链恒定结构域的身份(分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ)可为免疫球蛋白的五种主要类别中的任一者:IgA、IgD、IgE、IgG及IgM,或其亚类(同型)(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)。免疫球蛋白的不同类别具有不同且熟知的亚单元结构及三维构型。抗体可为裸的或缀合于其他分子,诸如毒素、放射性同位素等。

[0117] 在一些实施方案中,抗体为非天然存在的抗体。在一些实施方案中,抗体从天然组分纯化得到。在一些实施方案中,抗体是重组产生的。在一些实施方案中,抗体是由融合瘤产生的。

[0118] 术语“抗CD123抗体”、“抗IL-3R α 抗体”或“(特异性地)结合于CD123/IL-3R α 的抗体”是指能够以充足亲和力结合CD123/IL-3R α 的抗体,以致所述抗体适用作靶向于CD123/IL-3R α 的诊断和/或治疗剂。除非另外规定,否则抗CD123/IL-3R α 抗体与无关、非CD123/IL-3R α 蛋白的结合程度小于所述抗体与CD123/IL-3R α 的结合的约10%,如例如通过放射性免疫分析(RIA)所测量。在某些实施方案中,结合于CD123/IL-3R α 的抗体具有 $\leq 0.5\text{nM}$ 、 $\leq 0.3\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.05\text{nM}$ 或 $\leq 0.01\text{nM}$ 的解离常数(K_d)。在一个实施方案中,抗CD123/IL-3R α 抗体不结合共用 β 链CD131。在一个实施方案中,抗CD123/IL-3R α 抗体不结合CD123中由诸如7G3(小鼠IgG $_{2a}$)、6H6(小鼠IgG $_1$)及9F5(小鼠IgG $_1$)的已知且市售CD123抗体结合的相同表位(Sun等人,Blood 87(1):83-92,1996)。

[0119] 本文提供本发明的抗CD123/IL-3R α 抗体及其抗原结合片段的序列。

[0120] 术语“抗体片段”是指完整抗体的一部分且是指完整抗体的抗原决定可变区。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab') $_2$ 及F $_v$ 片段、线性抗体、单链抗体及由抗体片段形成的多特异性抗体。术语抗体的“抗原结合片段”包括抗体中保持特异性地结合于抗原的能力的一个或多个片段。已显示抗体的抗原结合功能可通过全长抗体的某些片段执行。涵盖于术语抗体的“抗原结合片段”内的结合片段的实例包括(但不限于): (i) Fab片段,即由V $_L$ 、V $_H$ 、C $_L$ 及C $_H1$ 结构域组成的单价片段(例如,通过木瓜蛋白酶消化的抗体产生三个片段:两个抗原结合Fab片段及一个不结合抗原的Fc片段); (ii) F(ab') $_2$ 片段,即包含由铰链区处的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段(例如,通过胃蛋白酶消化的抗体产生两个片段:二价抗原结合F(ab') $_2$ 片段及不结合抗原的pFc'片段)及其相关F(ab')单价单元; (iii) F $_d$ 片段,其由V $_H$ 及C $_H1$ 结构域组成(即,重链中包括于Fab中的那个部分); (iv) F $_v$ 片段,其由抗体单臂的V $_L$ 及V $_H$ 结构域组成,及相关二硫键连接的F $_v$; (v) dAb(结构域抗体)或sdAb(单结构域抗体)片段(Ward等人,Nature 341:544-546,1989),其由V $_H$ 结构域组成;及(vi)分离的互补决定区(CDR)。

[0121] 术语“单克隆抗体”是指牵涉于单一抗原决定簇或表位的高度特异性识别及结合中的均质抗体群体。此与多克隆抗体形成对照,多克隆抗体典型地包括针对不同抗原决定簇的不同抗体。术语“单克隆抗体”涵盖完整及全长单克隆抗体,以及抗体片段(诸如Fab、Fab'、F(ab') $_2$ 、F $_v$)、单链(scFv)突变体、包含抗体部分的融合蛋白及包含抗原识别位点的任何其他修饰免疫球蛋白分子。此外,“单克隆抗体”是指以多种方式制得的所述抗体,所述方式包括但不限于通过融合瘤、噬菌体选择、重组表达及转基因动物。

[0122] 术语“人源化抗体”是指非人(例如鼠科动物)抗体的形式,所述形式是含有最小非人(例如鼠科动物)序列的特异性免疫球蛋白链、嵌合免疫球蛋白或其片段。典型地,人源化抗体是其中来自互补决定区(CDR)的残基由来自具有所需特异性、亲和力及能力的非人物种(例如小鼠、大鼠、兔、仓鼠)的CDR的残基置换的人免疫球蛋白(Jones等人,Nature 321:522-525,1986;Riechmann等人Nature 332:323-327,1988;Verhoeyen等人,Science 239:1534-1536,1988)。

[0123] 在一些情况下,人免疫球蛋白的F $_v$ 构架区(FR)残基用来自具有所需特异性、亲和

力及能力的非人物种的抗体中的相应残基置换。所述人源化抗体可通过F_v构架区中和/或经置换的非人残基内额外残基的取代进一步被修饰以细化及最佳化抗体特异性、亲和力和/或能力。一般而言,人源化抗体将包含至少一个且典型地两个或三个可变结构域中的基本上全部,所述可变结构域含有全部或基本上全部的对应于非人免疫球蛋白的CDR区,而全部或基本上全部FR区为人免疫球蛋白共有序列的那些。人源化抗体也可包含免疫球蛋白恒定区或结构域(F_c) (典型地,人免疫球蛋白的恒定区或结构域)的至少一部分。用于产生人源化抗体的方法的实例描述于美国专利5,225,539及5,639,641,Roguska等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91(3):969-973,1994;及Roguska等人,Protein Eng.9(10):895-904,1996(均以引用的方式并入本文)中。在一些实施方案中,“人源化抗体”为表面重塑抗体。在一些实施方案中,“人源化抗体”为CDR移植抗体。

[0124] 术语抗体的“可变区”是指抗体轻链的可变区或抗体重链的可变区,单独或组合。重链及轻链的可变区各自由四个通过三个互补决定区(CDR)(也称作高变区)连接的构架区(FR)组成。各链中的CDR通过FR紧密地保持在一起且与来自另一链的CDR一起促进形成抗体的抗原结合位点。存在至少两种用于测定CDR的技术:(1)基于交叉物种序列变异性的方法(即,Kabat等人Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,1991,National Institutes of Health,Bethesda Md.);及(2)基于抗原-抗体复合物的结晶学研究的方法(Al-lazikani等人,J.Molec.Biol.273:927-948,1997)。此外,这两种方法的组合有时在本领域中用于测定CDR。

[0125] 当提及可变结构域中的残基(大致为轻链的残基1-107及重链的残基1-113)时,一般使用Kabat编号系统(例如Kabat等人,Sequences of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991))。

[0126] 如Kabat中的氨基酸位置编号是指在Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)(以引用的方式并入本文)中用于抗体的汇编的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用此编号系统,实际线性氨基酸序列可含有较少或额外氨基酸,其对应于可变结构域的FR或CDR的缩短或插入其中。例如,重链可变结构域可包括在H2的残基52后面的单一氨基酸插入(根据Kabat的残基52a)及在重链FR残基82后面插入的残基(例如,根据Kabat的残基82a、82b及82c等)。残基的Kabat编号可针对给定抗体通过在所述抗体的序列的同源区处与“标准”Kabat编号序列比对来测定。Chothia反而提及结构环的位置(Chothia及Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917,1987)。当使用Kabat编号惯例编号时,Chothia CDR-H1环的末端在H32与H34之间变化,取决于所述环的长度。这是因为Kabat编号方案将插入置于H35A及H35B处—若35A及35B均不存在,则所述环在32处结束;若仅35A存在,则所述环在33处结束;若35A及35B均存在,则所述环在34处结束。AbM高变区表示在Kabat CDR与Chothia结构环之间的折衷,且通过Oxford Molecular的AbM抗体建模软件使用。

环	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
[0127]	H1	H31-H35B	H26-H32..34
		(Kabat 编号)	
	H1	H31-H35	H26-H35
		(Chothia 编号)	H26-H32
	H2	H50-H65	H50-H58
	H3	H9S-H102	H95-H102
			H52-H56
			H95-H102

[0128] 如Kabat或EU编号方案中的EU索引或EU索引是指基于Edelman等人,1969,Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85(以引用的方式并入本文)的人IgG1 Eu抗体的编号系统。

[0129] 术语“人抗体”意指由人产生的抗体,或使用本领域中已知的任何技术制得的具有对应于由人产生的抗体的氨基酸序列的抗体。在某些实施方案中,所述人抗体不具有非人序列。人抗体的此定义包括完整或全长抗体,或其抗原结合片段。

[0130] 术语“嵌合抗体”是指其中免疫球蛋白分子的氨基酸序列系源于两种或两种以上物种的抗体。典型地,轻链及重链的可变区对应于源于具有所需特异性、亲和力及能力的一种哺乳动物物种(例如小鼠、大鼠、兔等)的抗体的可变区,而恒定区与源于另一物种(通常为人)的抗体中的序列同源以避免或减少在那个物种(例如人)中引发免疫反应的机会。在某些实施方案中,嵌合抗体可包括包含至少一种人重链和/或轻链多肽的抗体或其抗原结合片段,诸如包含鼠科动物轻链及人重链多肽的抗体。

[0131] 术语“表位”或“抗原决定簇”在本文中可互换使用且是指抗原中能够由特定抗体识别且特异性地结合的那个部分。当所述抗原为多肽时,表位可由连续氨基酸及通过蛋白质的三重折叠并置的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位在蛋白质变性时典型地被保持,而通过三重折叠形成的表位在蛋白质变性时典型地丧失。表位典型地包括呈独特空间构型的至少3个且更通常地至少5个或8-10个氨基酸。

[0132] “结合亲和力”一般是指在分子(例如抗体)的单一结合位点与其结合搭配物(例如抗原)之间的非共价相互作用的合计强度。除非另外指示,否则如本文所用,“结合亲和力”是指反映结合对的成员(例如,抗体及抗原)之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其搭配物Y的亲和力一般可由解离常数(K_d)或半最大有效浓度(EC_{50})表示。亲和力可通过本领域中已知的常见方法,包括本文所述的那些来测量。低亲和力抗体一般缓慢地结合抗原且倾向于快速地解离,而高亲和力抗体一般更快结合抗原且倾向于保持更久结合。本领域中已知多种测量结合亲和力的方法,其中任一者均可用于本发明的目的。本文描述特定说明性实施方案。

[0133] “特异性地结合”一般意指抗体经由其抗原结合结构域结合于表位,且所述结合使得所述抗原结合结构域与所述表位之间需要一些互补性。根据此定义,与抗体将结合于随机、无关表位相比,当抗体更快速地经由其抗原结合结构域结合于一表位时,据说所述抗体“特异性地结合”于那个表位。术语“特异性”在本文中用于限定特定抗体结合于特定表位时的相关亲和力。例如,抗体“A”可被认为与抗体“B”相比对给定表位具有较高特异性,或据说与抗体“A”对相关表位“D”的特异性相比,抗体“A”可以较高特异性结合于表位“C”。

[0134] 如本文所用,术语“免疫缀合物”、“缀合物”或“ADC”是指连接至细胞结合剂(例如抗体或其抗原结合片段)的化合物或其衍生物。

[0135] 术语“经半胱氨酸工程改造的抗体”包括具有通常未存在于抗体轻链或重链的给定残基处的至少一个Cys的抗体。所述Cys也可称作“经工程改造的Cys”,可使用任何常规分子生物学或重组DNA技术(例如,通过用Cys的编码序列置换在靶残基处的非Cys残基的编码序列)被工程改造。例如,若初始残基为具有编码序列5'-UCU-3'的Ser,则所述编码序列可突变(例如,通过定点突变诱发)为5'-UGU-3',其编码Cys。在某些实施方案中,经Cys工程改造的本发明抗体在重链中具有经工程改造的Cys。在某些实施方案中,经工程改造的Cys在重链的CH3结构域中或附近。在某些实施方案中,经工程改造的Cys在重链的残基442处(EU/OU编号)。C442残基可经由C442残基的游离硫醇基,诸如经由与细胞毒性药物的硫醇反应剂(例如,马来酰亚胺基)反应而与所述细胞毒性药物/剂缀合。

[0136] 术语“癌症”及“癌的”是指或描述哺乳动物中的生理学病状,其中细胞群体的特征在于未调节细胞生长。“肿瘤”及“赘瘤”是指由于过度细胞生长或增生而产生的一种或多种细胞,其为良性(非癌的)或恶性(癌的),包括癌前病变。

[0137] 癌症的实例包括子宫内膜癌、肺癌(例如非小细胞肺癌)、结直肠癌、膀胱癌、胃癌、胰腺癌、肾细胞癌、前列腺癌、食道癌、乳腺癌、头颈癌、子宫癌、卵巢癌、肝癌、子宫颈癌、甲状腺癌、睾丸癌、髓系癌、黑色素瘤及淋巴瘤。在某些实施方案中,所述癌症为非小细胞肺癌、结直肠癌、胃癌或胰腺癌。在某些实施方案中,所述癌症为非小细胞肺癌(鳞状细胞、非鳞状细胞、腺癌或大细胞未分化癌)、结直肠癌(腺癌、胃肠类癌肿瘤、胃肠基质肿瘤、原发性结直肠淋巴瘤、平滑肌肉瘤或鳞状细胞癌)或乳腺癌(例如三阴性乳腺癌(TNBC))。在某些实施方案中,癌症为淋巴瘤及白血病。在某些实施方案中,癌症的实例包括AML、CML、ALL(例如B-ALL)、CLL、骨髓增生异常综合征、母细胞性浆细胞样DC赘瘤(BPDCN)白血病、B细胞淋巴瘤(包括非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma,NHL))、前体B细胞淋巴瘤母细胞性白血病/淋巴瘤及成熟B细胞赘瘤(诸如B细胞慢性淋巴细胞性白血病(B-CLL)/小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL))、B细胞前淋巴细胞性白血病、淋巴浆细胞性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)(包括低级、中间级及高级FL)、皮肤滤泡中心淋巴瘤、边缘区B细胞淋巴瘤(MALT类型、淋巴结及脾类型)、毛细胞白血病(HCL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、浆细胞瘤、浆细胞骨髓瘤、移植后淋巴增生性病症、华氏巨球蛋白血症、退行性大细胞淋巴瘤(ALCL)及霍奇金氏白血病(HL)。在某些实施方案中,所述癌症为BPDCN白血病。在某些实施方案中,所述癌症为ALL。在其他实施方案中,所述癌症为AML。

[0138] 术语“受试者”是指将要为特定治疗的接受者的任何动物(例如哺乳动物),包括但不限于人、非人灵长类动物、啮齿动物及其类似动物。典型地,术语“受试者”及“患者”在本文中关于人受试者可互换使用。

[0139] 术语“药物组合物”是指呈允许活性成分的生物活性有效的形式,且不含对将施用所述组合物的受试者具有不可接受的毒性的额外组分的制剂。所述组合物可为无菌的。

[0140] 如本文所公开的免疫缀合物的“治疗有效量”为足以进行特定陈述的目的的量。“治疗有效量”可关于所陈述的目的凭经验且以常规方式测定。

[0141] 术语“亚胺反应性试剂”是指能够与亚胺基团反应的试剂。优选地,亚胺反应性试剂选自亚硫酸盐、羟胺、脒及胂。更优选地,亚胺反应性试剂为 NaHSO_3 或 KHSO_3 。

[0142] 本发明化合物

[0143] 在第一方面中,本发明涉及本文所述的细胞毒性化合物。在某些实施方案中,本发明的细胞毒性化合物为苯并二氮杂萘二聚体化合物,其在还原的苯并二氮杂萘单体的N-10胺处具有可连接至细胞结合剂(CBA)的自降解接头。

[0144] 在第一个实施方案中,本发明化合物由式(I)、(II)、(TI)、(T2)、(I^{III})、(II^{III})、(TI^{III})或(T2^{III})或其药学上可接受的盐表示,其中:

[0145] N与C之间的双线=表示单键或双键,限制条件在于当其为双键时,X不存在且Y为H或C₁₋₄烷基,且当其为单键时,X为H且Y为-OH或-SO₃H;

[0146] W为-C(=O)-或-C(Y')-;

[0147] Y'为H或C₁₋₄烷基;

[0148] R^{1a}、R^{2a}、R^{3a}、R^{4a}、R^{1b}、R^{2b}、R^{3b}及R^{4b}各自独立地选自由H、C₁₋₁₀烷基、-(OCH₂CH₂)_nOR^c、卤素、-NH(C=NH)NH₂、-OR、-NR'R''、-NO₂、-NR'COR''、-SR、-SOR'、-SO₂R'、-SO₃H、-OSO₃H、-SO₂NR'R''、-CN、-N₃、-COR'、-OCOR'及-OCONR'R''组成的组;

[0149] R^c为H或C₁₋₄烷基;

[0150] n为整数1至24;

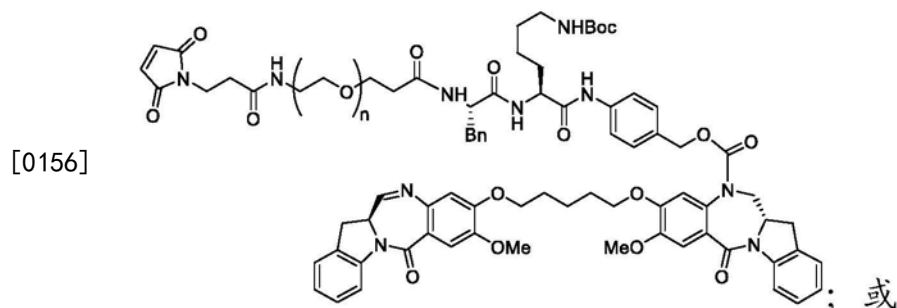
[0151] R在每次出现时独立地选自由H、-(CH₂CH₂O)_n-R^c、C₁₋₁₀烷基、C₃₋₈环烷基、6元至18元芳基、含有一个或多个独立地选自N、O及S的杂原子的5元至18元杂芳环或含有1至6个独立地选自O、S、N及P的杂原子的3元至18元杂环组成的组;

[0152] R'及R''各自独立地选自-H、-OH、-OR、-NHR、-NR₂、-COR、C₁₋₁₀烷基、-(CH₂CH₂O)_n-R^c及具有1至6个独立地选自O、S、N及P的杂原子的3元至18元杂环;

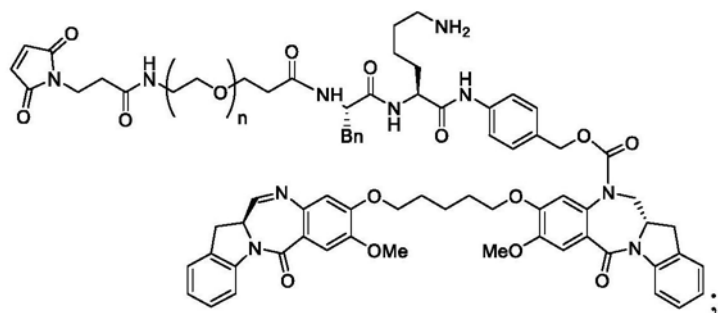
[0153] R⁵为C₃₋₁₂亚烷基,所述链可由一个或多个选自-O-、-S-、-NH-、-NMe-、苯环、4元至7元杂芳环及4元至7元杂环的基团中断,其中所述苯、所述4元至7元杂芳环及所述4元至7元杂环被1至4个R⁶取代;

[0154] R⁶在每次出现时独立地选自H、C₁₋₁₀烷基、-(CH₂CH₂O)_n-R^c、卤素、-NH(C=NH)NH₂、-OR、-NR'R''、-NO₂、-NCO、-NR'COR''、-SR、-SOR'、-SO₂R'、-SO₃H、-OSO₃H、-SO₂NR'R''、-CN、-N₃、-COR'、-OCOR'及-OCONR'R'';并且

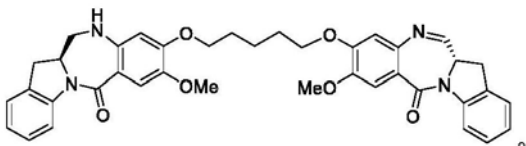
[0155] R^L为包含可与细胞结合剂形成共价键的反应性基团的自降解接头,限制条件在于式(I)化合物不为:



[0157]

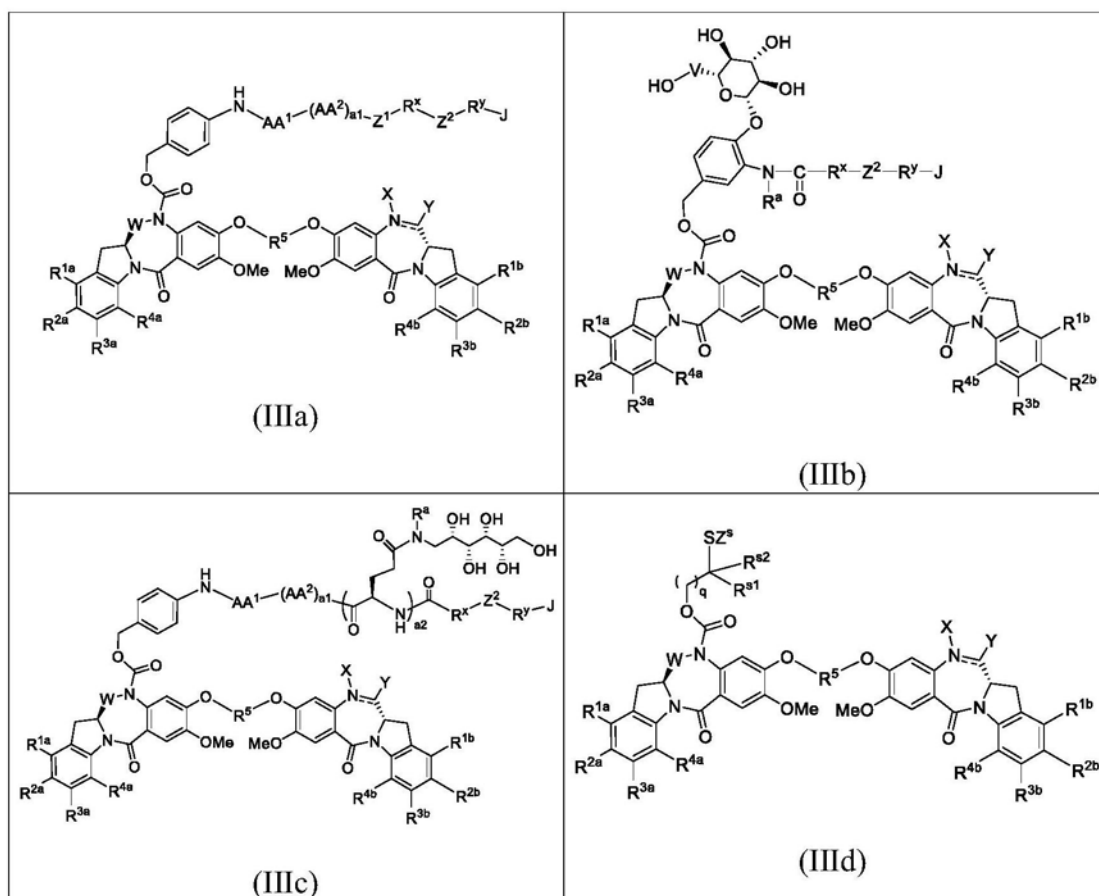
[0158] 且限制条件在于式 (I^{III}) 化合物不为:

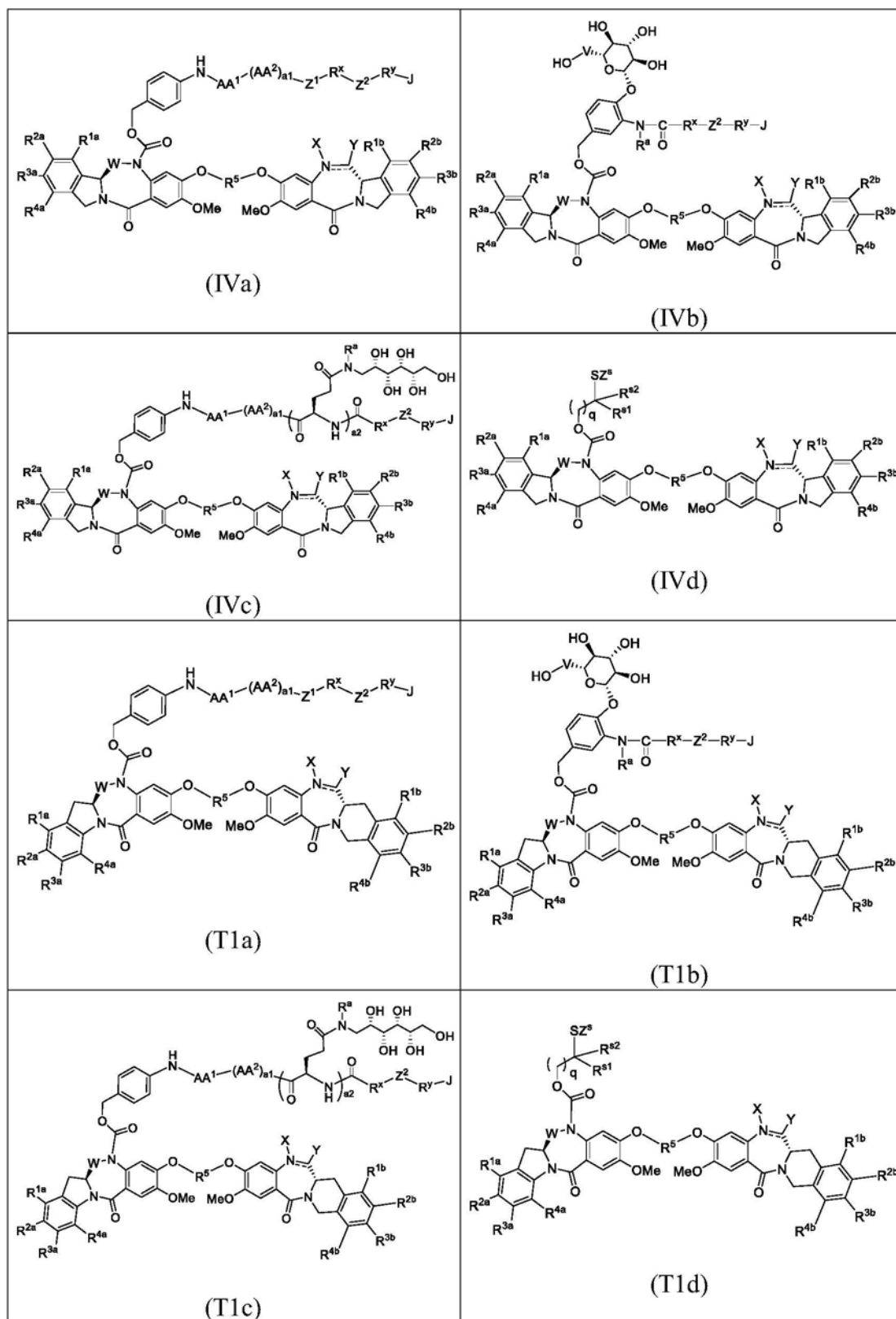
[0159]



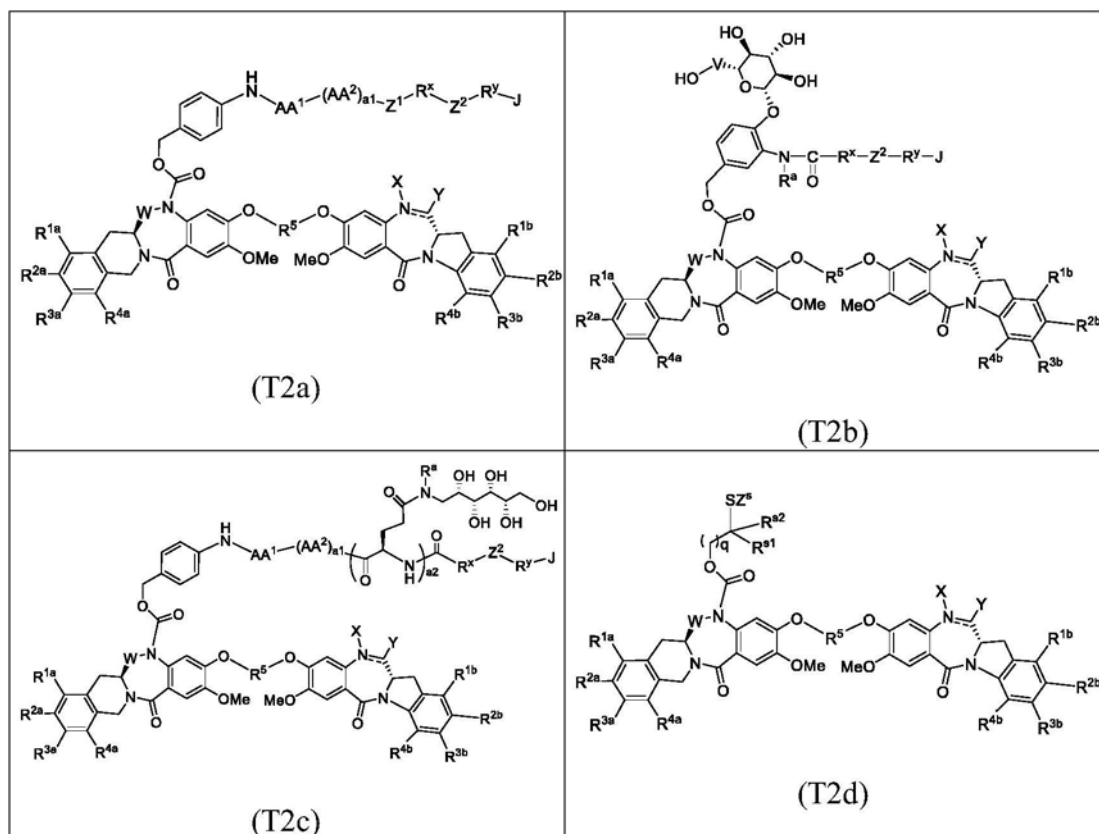
[0160] 在第二实施方案中,本发明化合物由表A中的以下各式之一表示:

[0161]





[0163]



[0164] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0165] AA^1 及 AA^2 各自独立地为氨基酸残基;[0166] a_1 为整数1至19;[0167] a_2 为整数1至5;[0168] R^a 为H或 C_{1-4} 烷基;[0169] q 为1、2或3;

[0170] R^{s1} 及 R^{s2} 各自独立地为H或 C_{1-4} 烷基,或 R^{s1} 及 R^{s2} 与其所附接的碳原子合起来形成3元至5元环烷基环,限制条件在于当 q 为1时, R^{s1} 及 R^{s2} 与其所附接的碳原子合起来无法形成3元环烷基环;

[0171] V 为 $C(=O)$ 或 CH_2 ;[0172] Z^1 为 $-C(=O)-$ 或 $-SO_2-NH-C(=O)-$,其中 $-SO_2-NH-C(=O)-$ 中的 $-SO_2-$ 基团连接至 P^1 ;

[0173] R^x 为 C_{1-10} 亚烷基、 C_{3-8} 环烷基、 $-(CH_2CH_2O)_{m1}-C_{1-10}$ 亚烷基-或 C_{1-10} 亚烷基- $(OCH_2CH_2)_{m2}-$;

[0174] m_1 及 m_2 各自独立地为整数1至24;[0175] Z^2 为不存在、 $-C(=O)NH-$ 或 $-NH-C(=O)-$;[0176] R^y 为不存在、 C_{1-10} 亚烷基、 $-(CH_2CH_2O)_{m3}-C_{1-10}$ 亚烷基-或 C_{1-10} 亚烷基- $(OCH_2CH_2)_{m4}-$;[0177] m_3 及 m_4 各自独立地为整数1至24;

[0178] Z^s 为具有经由二硫键或硫醚键共价连接至所述细胞毒性化合物的反应性基团的双官能交联剂;

[0179] J 为包含能够与细胞结合剂形成共价键的反应性基团(优选地,胺反应性基团或硫醇反应性基团)的部分;并且剩余变量如第一个实施方案中所定义。

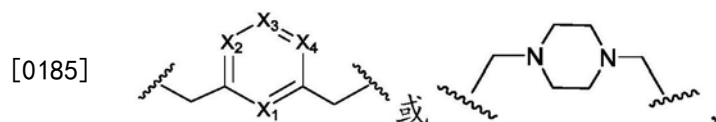
[0180] 在一个具体实施方案中,关于式(IIIId)、(IVd)、(T1d)或(T2d), q 为1。在一个更具体实施方案中,关于式(IIIId)、(IVd)、(T1d)或(T2d), q 为1;并且 R^{s1} 及 R^{s2} 均为甲基。

[0181] 在一个具体实施方案中,关于式(IIIb)、(IIIc)、(IVb)、(IVc)、(T1b)、(T1c)、(T2b)或(T2c), R^a 为H、甲基或乙基。在一个更具体实施方案中, R^a 为H。在一个更具体实施方案中, R^a 为甲基。

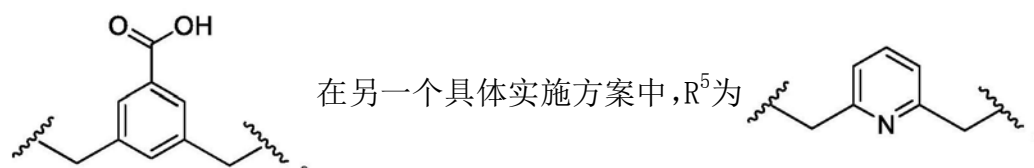
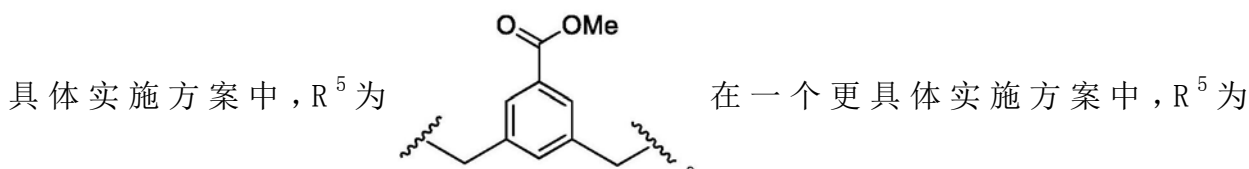
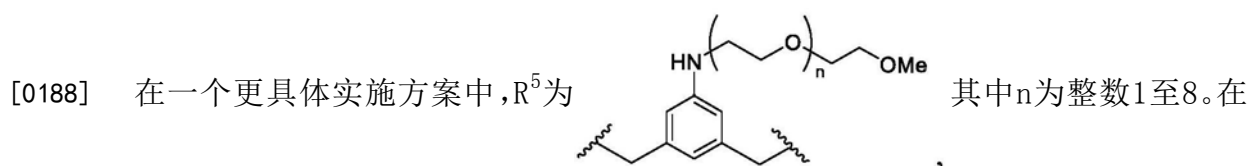
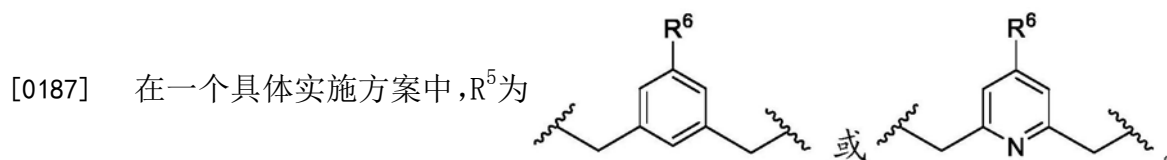
[0182] 在第三实施方案中,本发明化合物由第一或第二实施方案中所述的式子或其药学上可接受的盐表示,其中 R^{1a} 、 R^{2a} 、 R^{3a} 、 R^{4a} 、 R^{1b} 、 R^{2b} 、 R^{3b} 及 R^{4b} 均为H;并且剩余变量如第一或第二实施方案或其中所述的任何特定实施方案中所定义。

[0183] 在第四实施方案中,本发明化合物由第一或第二实施方案中所述的式子或其药学上可接受的盐表示,其中 R^5 为 C_{3-7} 亚烷基;并且剩余变量如第一、第二或第三实施方案或其中所述的任何特定实施方案中所定义。在一个具体实施方案中, R^5 为 $-(CH_2)_3-$ 、 $-(CH_2)_5-$ 或 $-(CH_2)_7-$ 。在一个更具体实施方案中, R^5 为 $-(CH_2)_7-$ 。在一个更具体实施方案中, R^5 为 $-(CH_2)_5-$ 。在一个更具体实施方案中, R^5 为 $-(CH_2)_3-$ 。

[0184] 在第五实施方案中,本发明化合物由第一或第二实施方案中所述的式子或其药学上可接受的盐表示,其中 R^5 由下式表示:

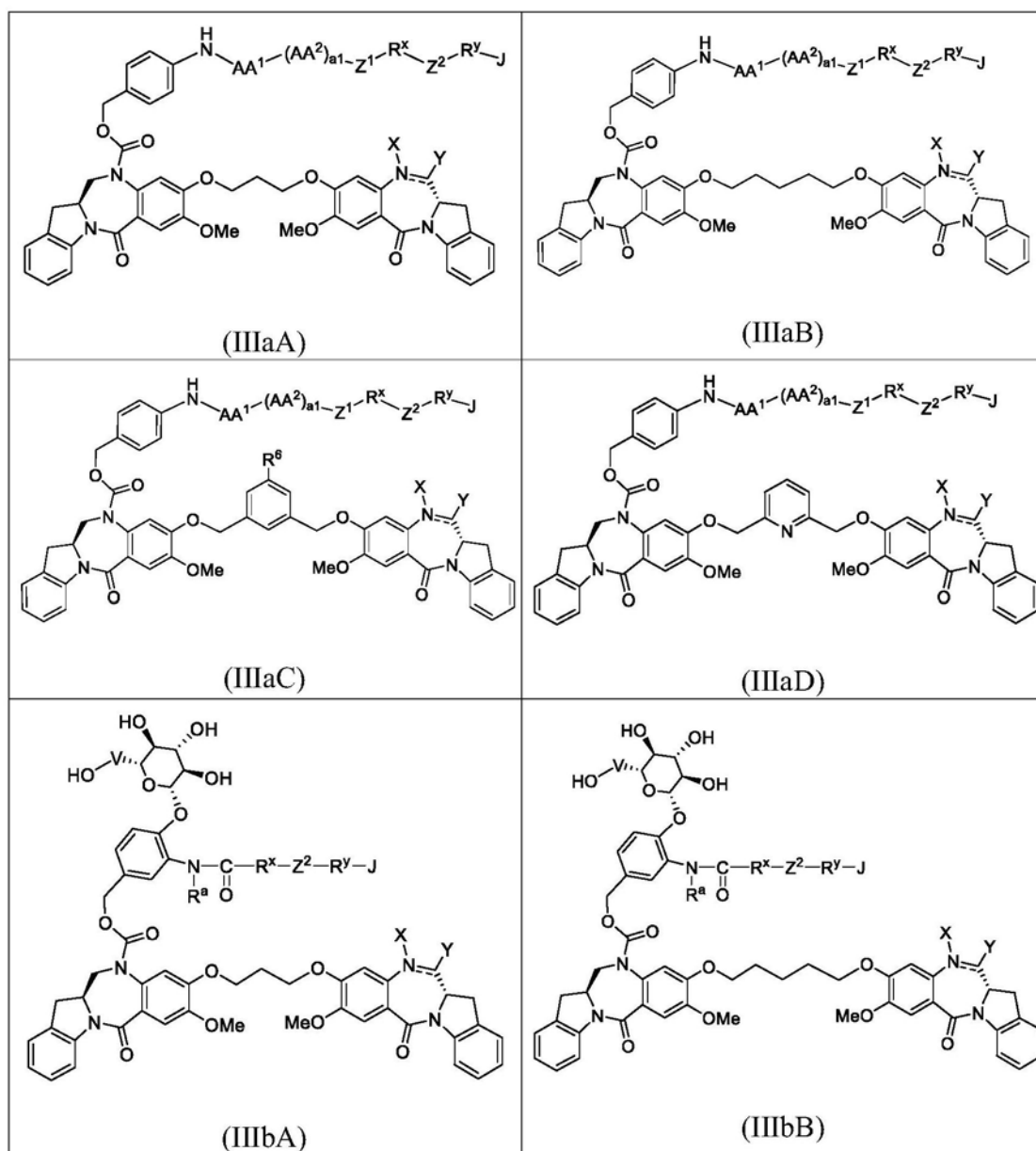


[0186] 其中 X_1 、 X_2 、 X_3 及 X_4 各自独立地为N或 CR^6 ,限制条件在于 X_1 、 X_2 、 X_3 及 X_4 中的至少一者为 CR^6 ;并且剩余变量如第一、第二或第三实施方案或其中所述的任何特定实施方案中所定义。

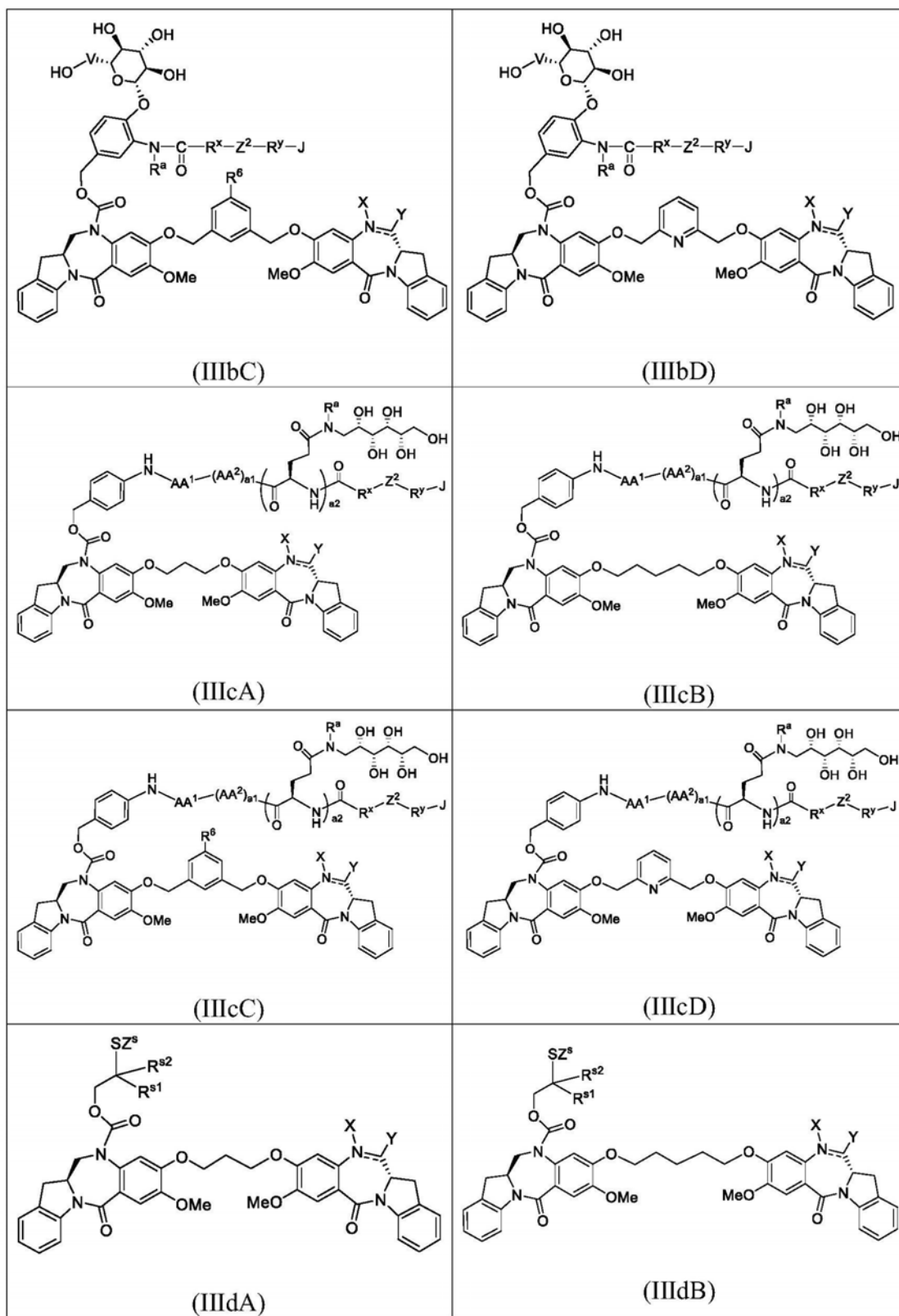


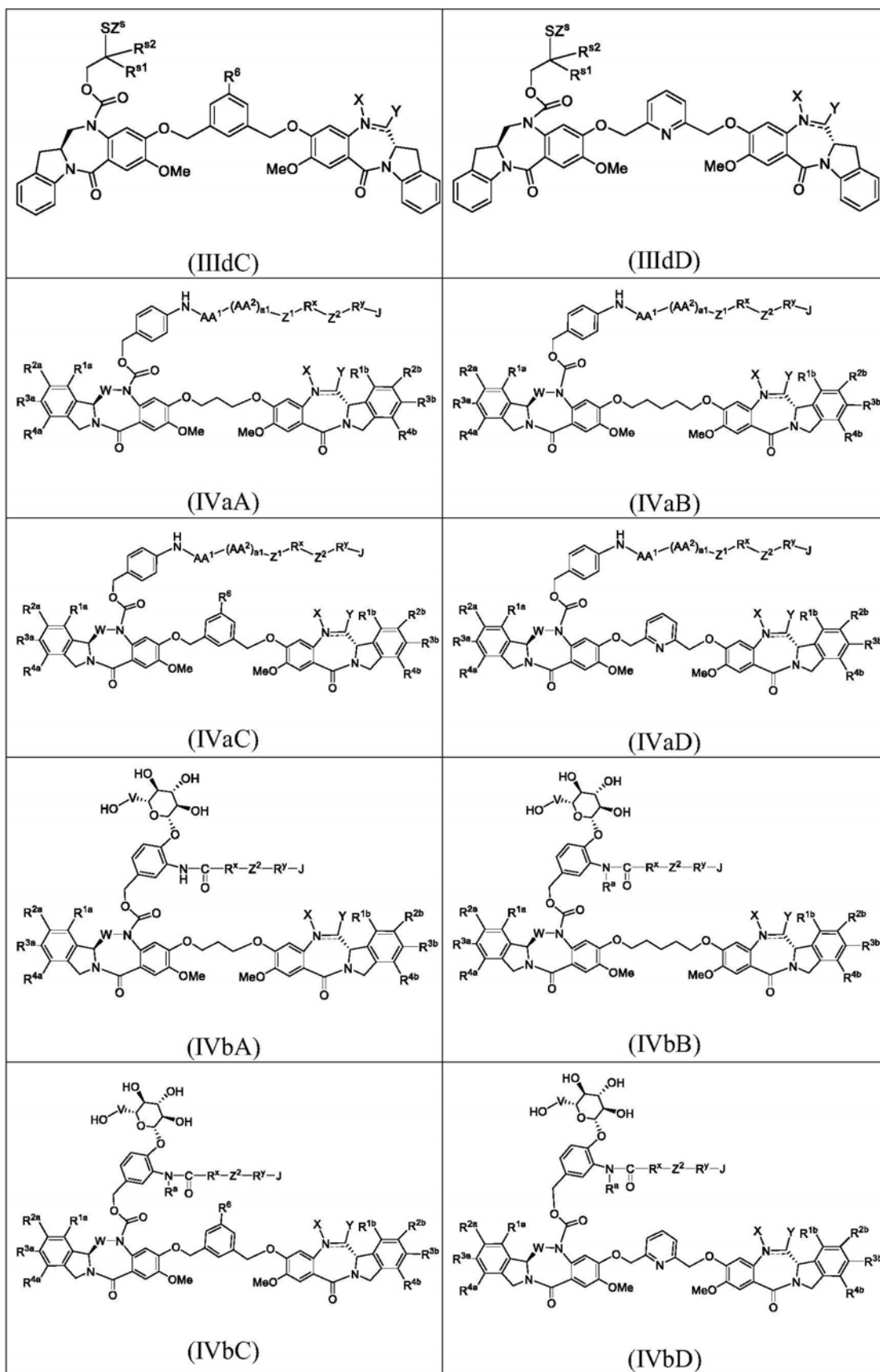
[0189] 在第六实施方案中,本发明化合物由表B中的以下各式之一表示:

[0190]



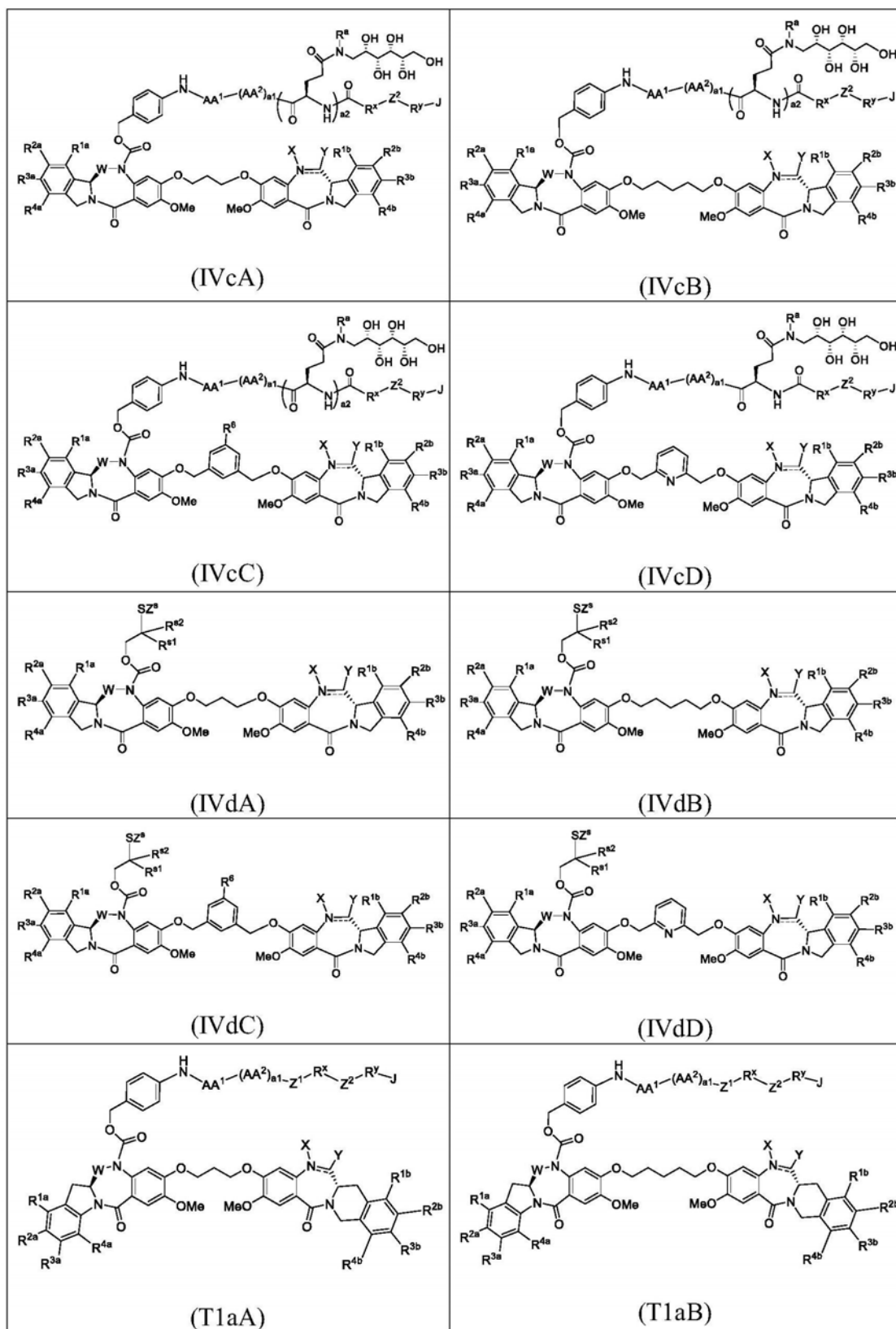
[0191]

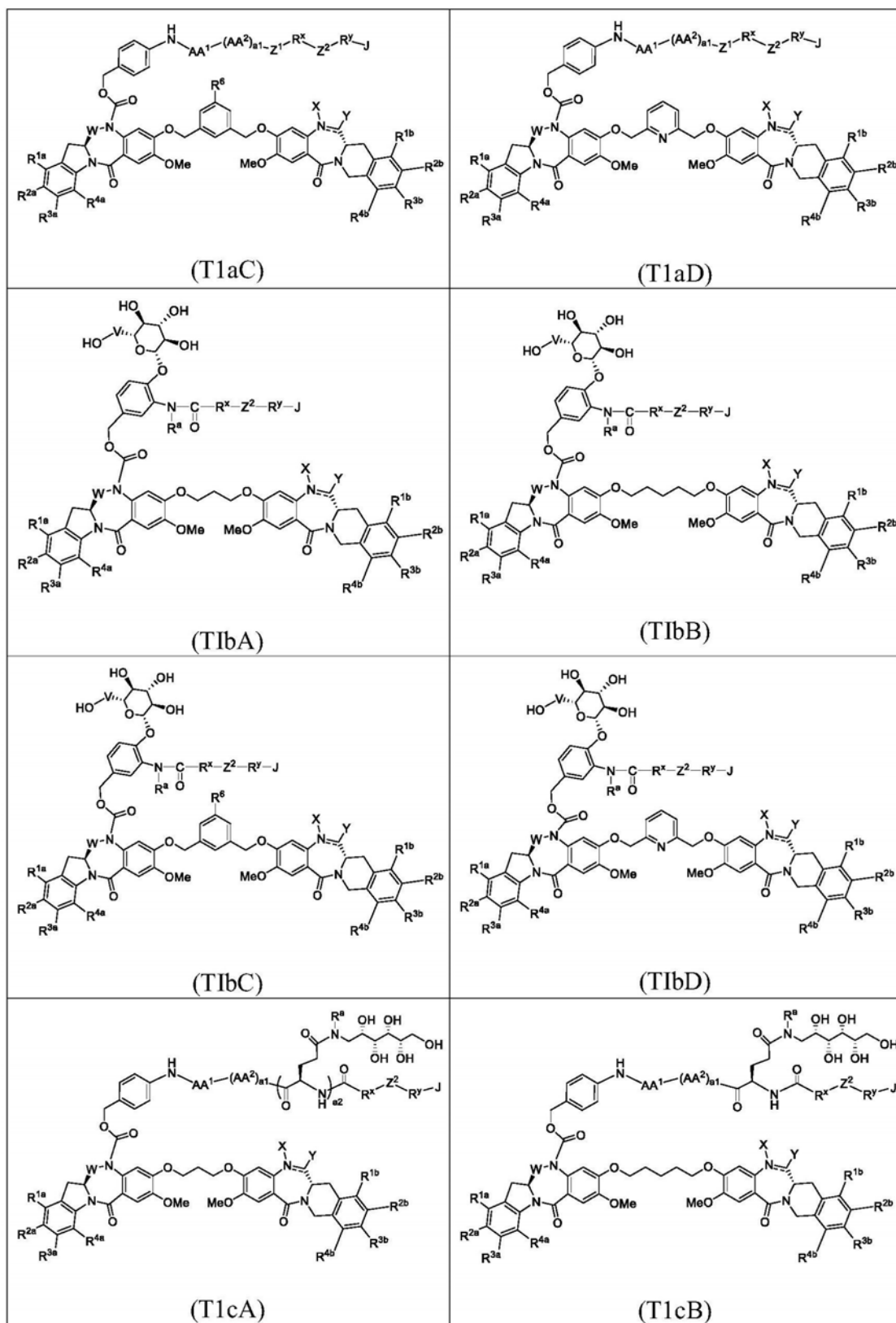




[0192]

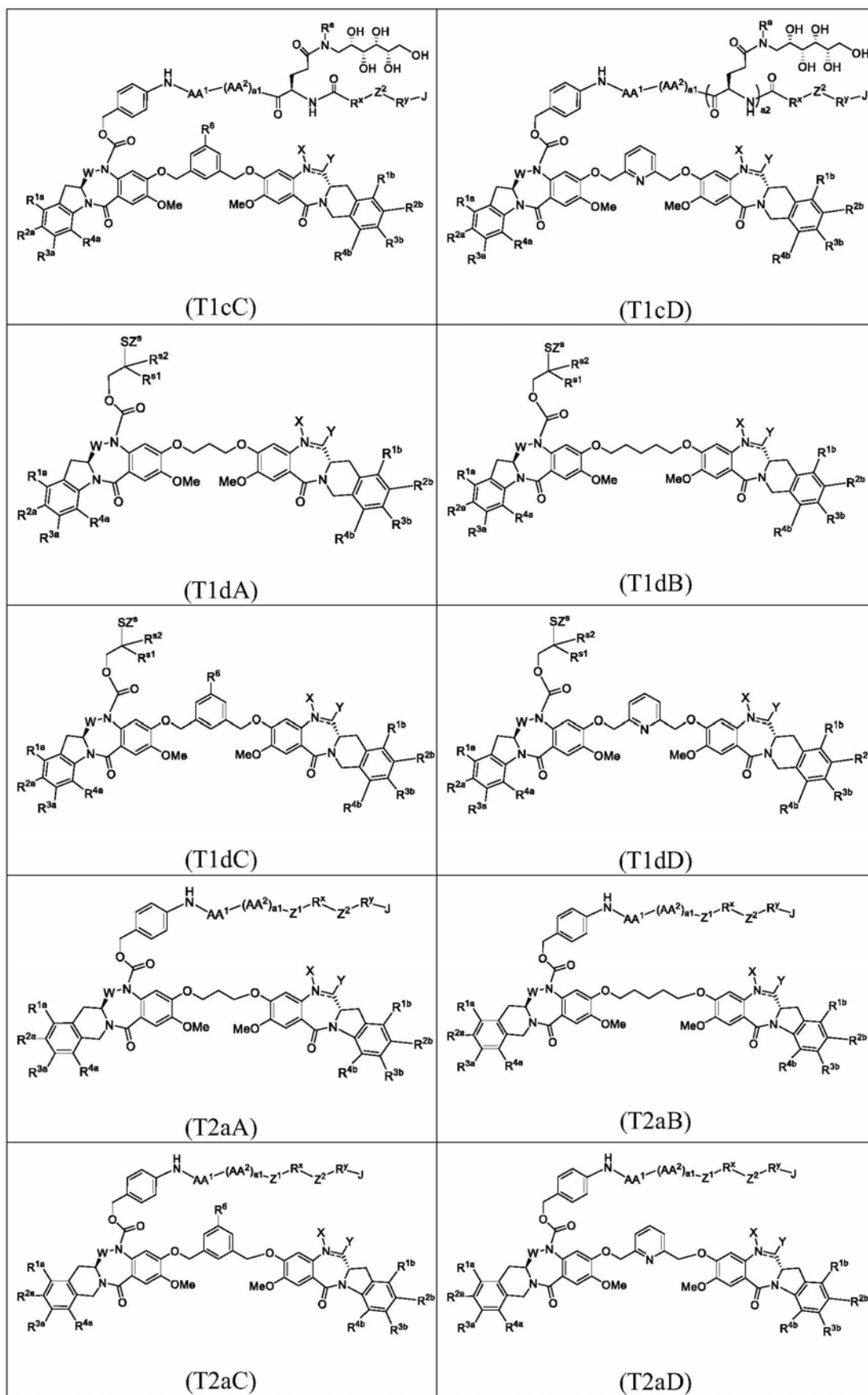
[0193]

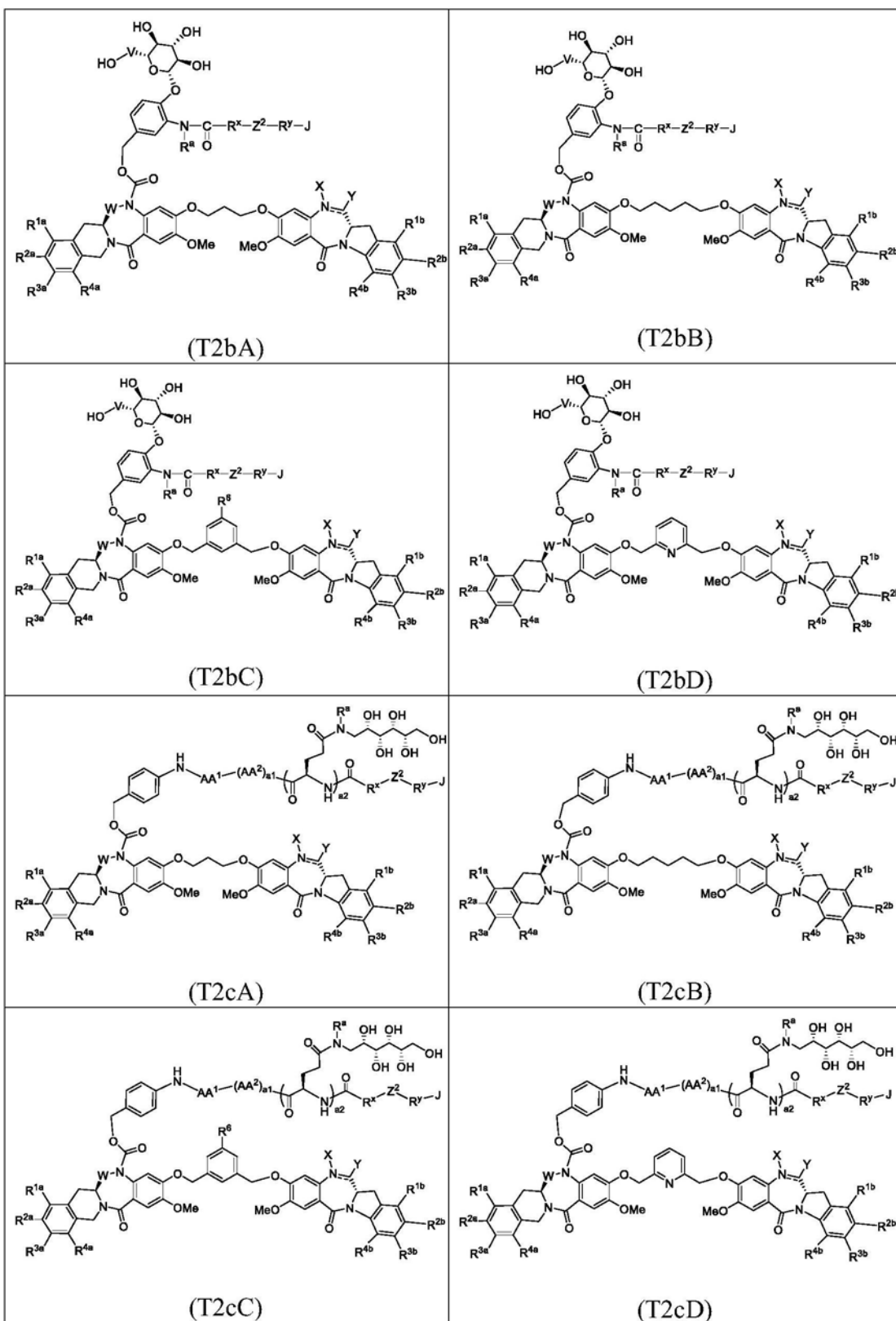




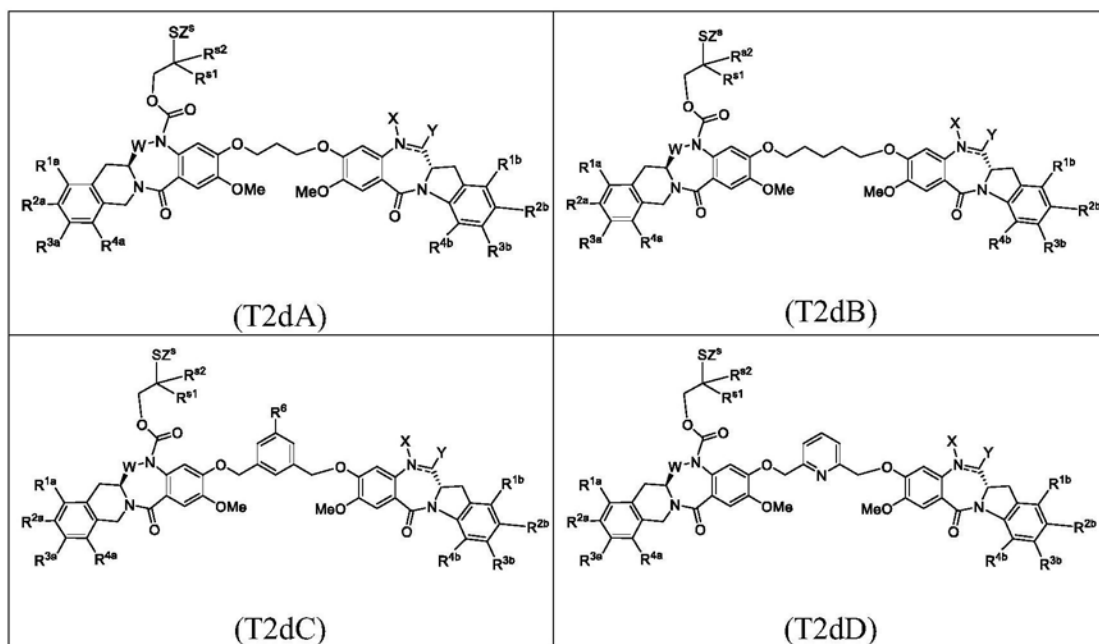
[0194]

[0195]





[0197]



[0198] 或其药学上可接受的盐,其中剩余变量如第二实施方案或其中所述的任何特定实施方案所定义。

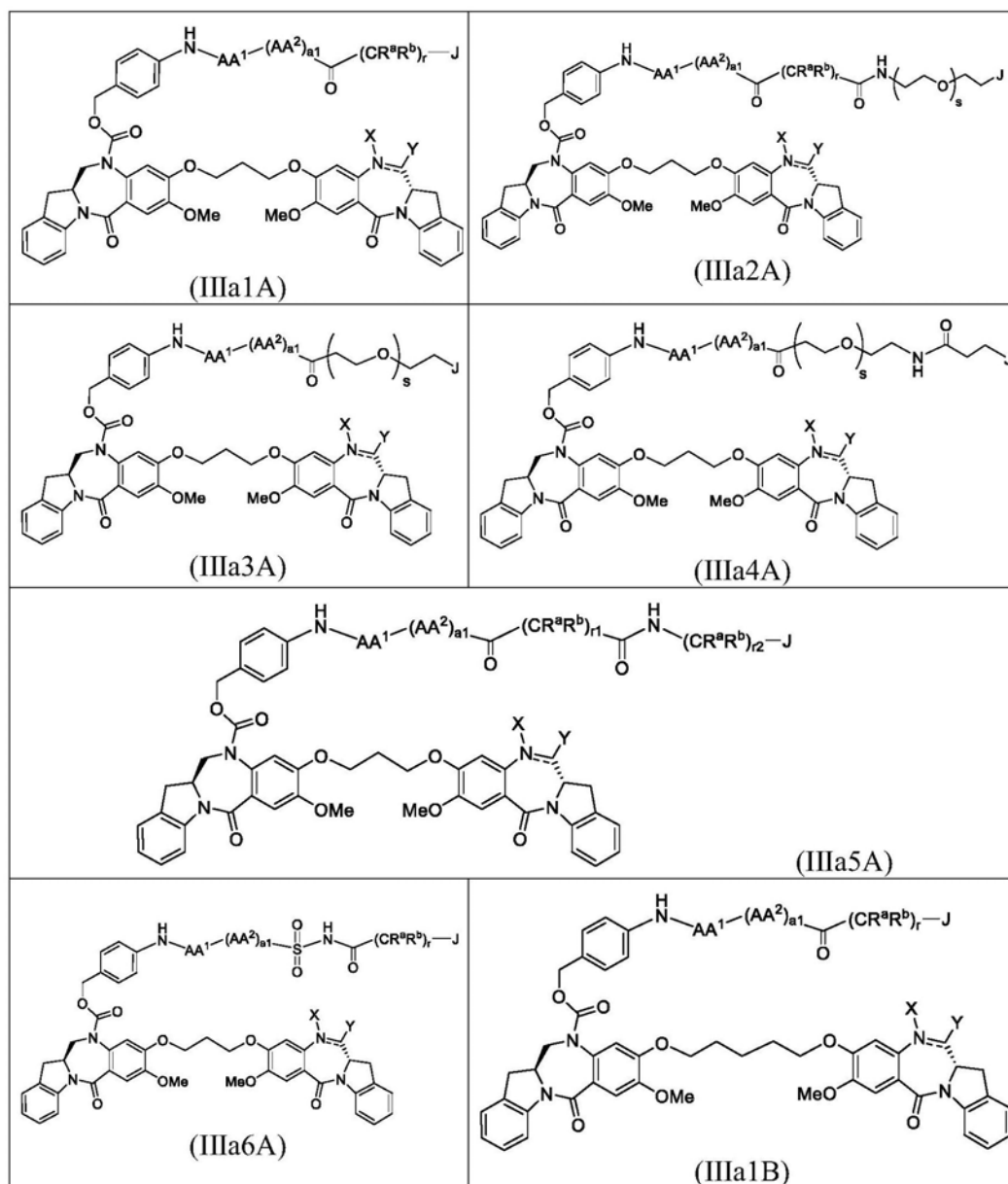
[0199] 在第七实施方案中,本发明化合物由第二或第六实施方案中所述的式子或其药学上可接受的盐表示,其中 Z^1 为 $-C(=O)-$;并且剩余变量如第二、第三、第四、第五或第六实施方案或其中所述的任何特定实施方案中所定义。

[0200] 在第八实施方案中,本发明化合物由第二或第六实施方案中所陈述的式子或其药学上可接受的盐表示,其中 R^x 为 C_{1-6} 亚烷基; Z^2 及 R^y 均不存在;并且剩余变量如第二、第三、第四、第五、第六或第七实施方案或其中所述的任何特定实施方案中所定义。在另一个实施方案中, R^x 、 Z^2 及 R^y 不存在;并且剩余变量如第二、第三、第四、第五、第六或第七实施方案或其中所述的任何特定实施方案中所定义。

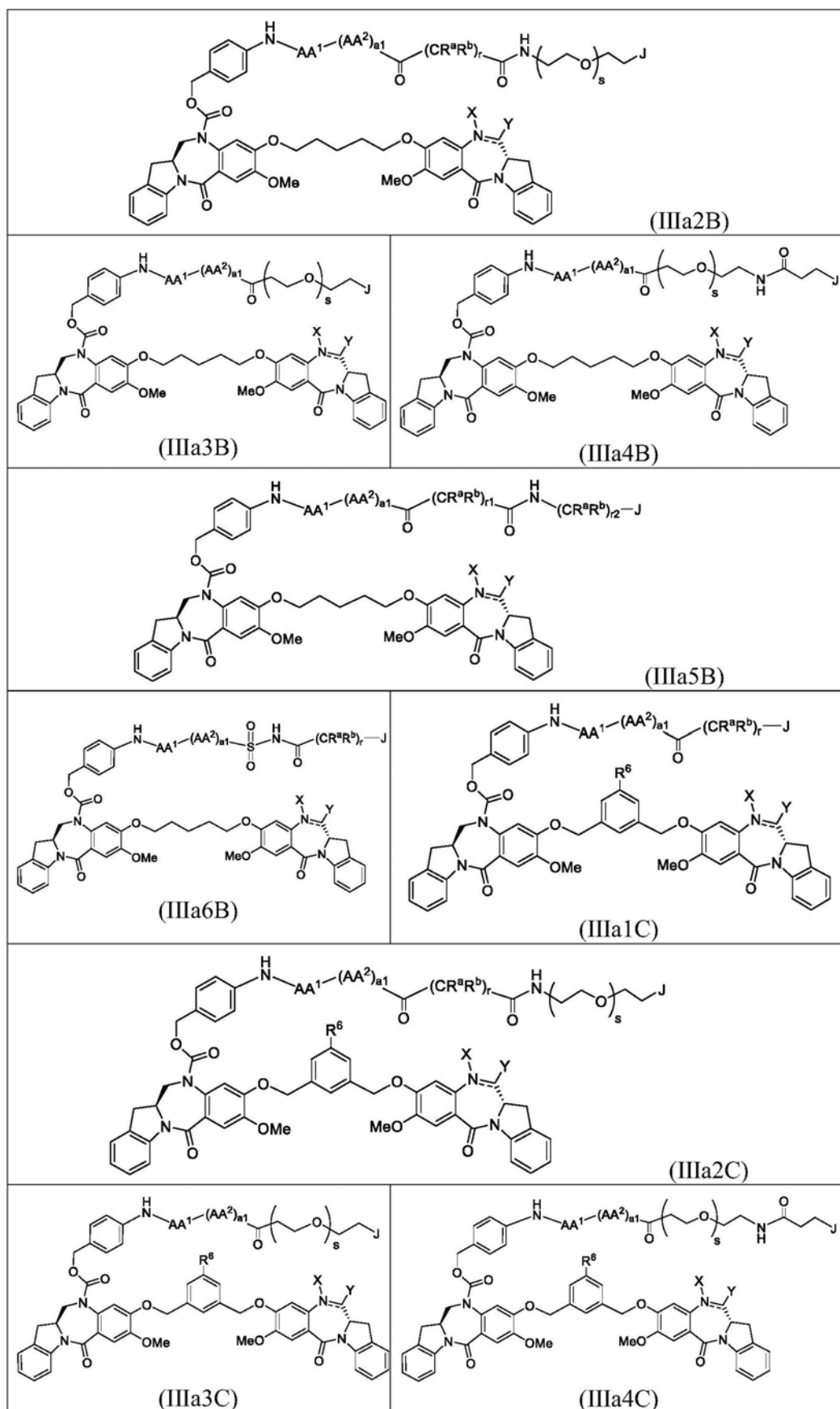
[0201] 在第九实施方案中,本发明化合物由第二或第六实施方案中所述的式子或其药学上可接受的盐表示,其中 R^x 为 $-(CH_2CH_2O)_{m1}-C_{1-6}$ 亚烷基-; Z^2 为 $-NH-C(=O)-$ 或 $-C(=O)-NH-$; R^y 为 C_{1-6} 亚烷基;并且剩余变量如第二、第三、第四、第五、第六或第七实施方案或其中所述的任何特定实施方案中所定义。

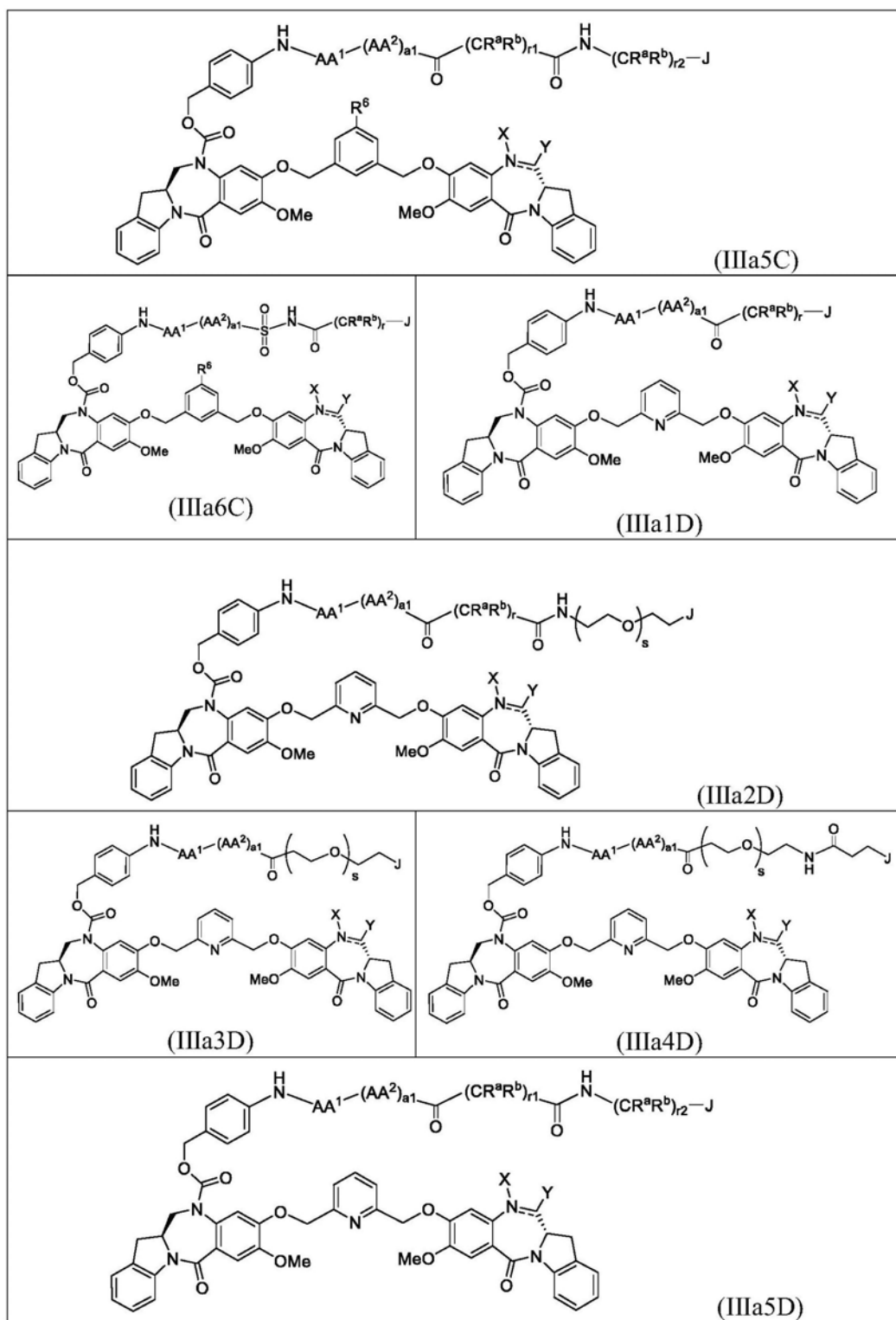
[0202] 在第十实施方案中,本发明化合物由第二或第六实施方案中所陈述的式子或其药学上可接受的盐表示,其中 R^x 为 C_{1-6} 亚烷基; Z^2 为 $-NH-C(=O)-$ 或 $-C(=O)-NH-$; R^y 为 $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C_{1-6}$ 亚烷基-;并且剩余变量如第二、第三、第四、第五、第六或第七实施方案或其中所述的任何特定实施方案中所定义。

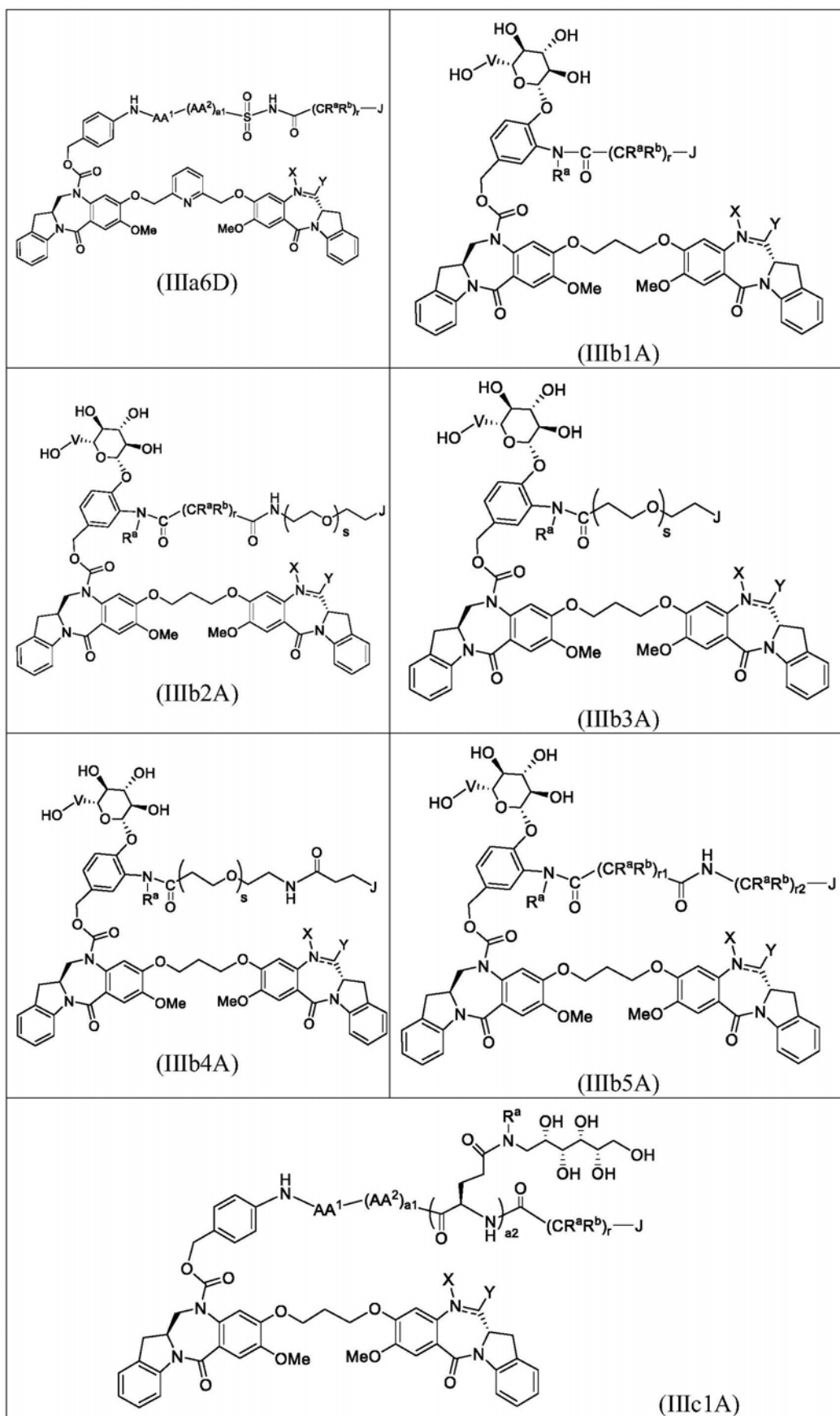
[0203] 在第十一个实施方案中,本发明化合物由表C中的以下各式之一表示:



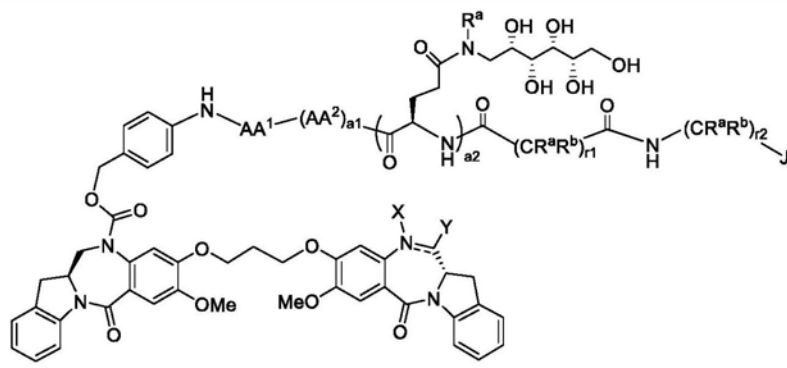
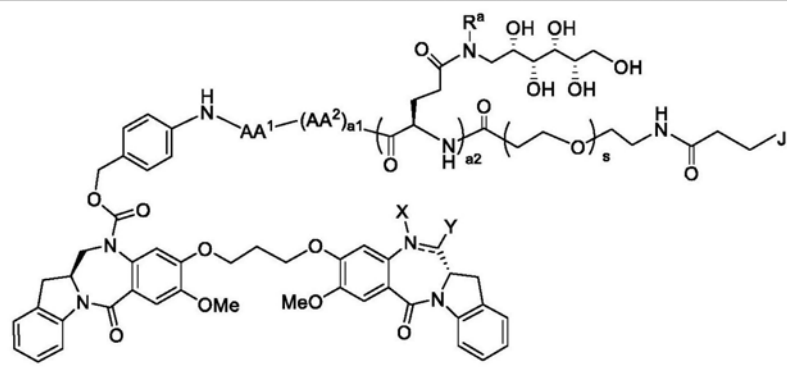
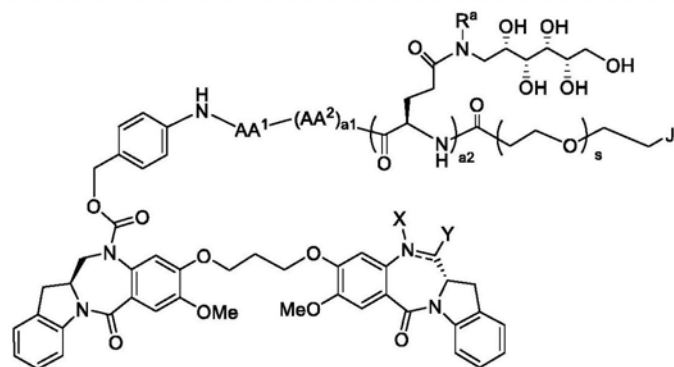
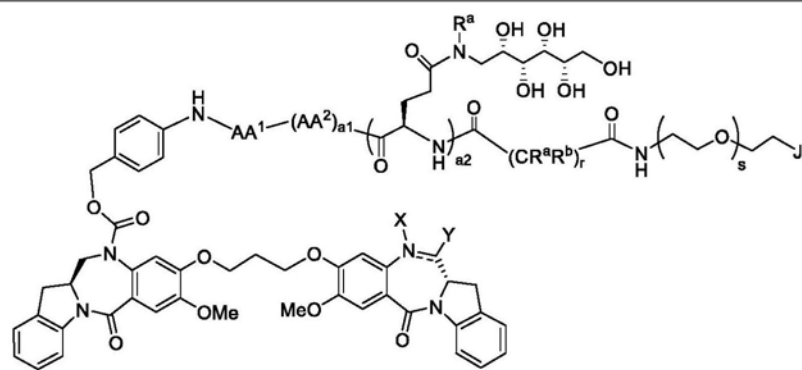
[0204]



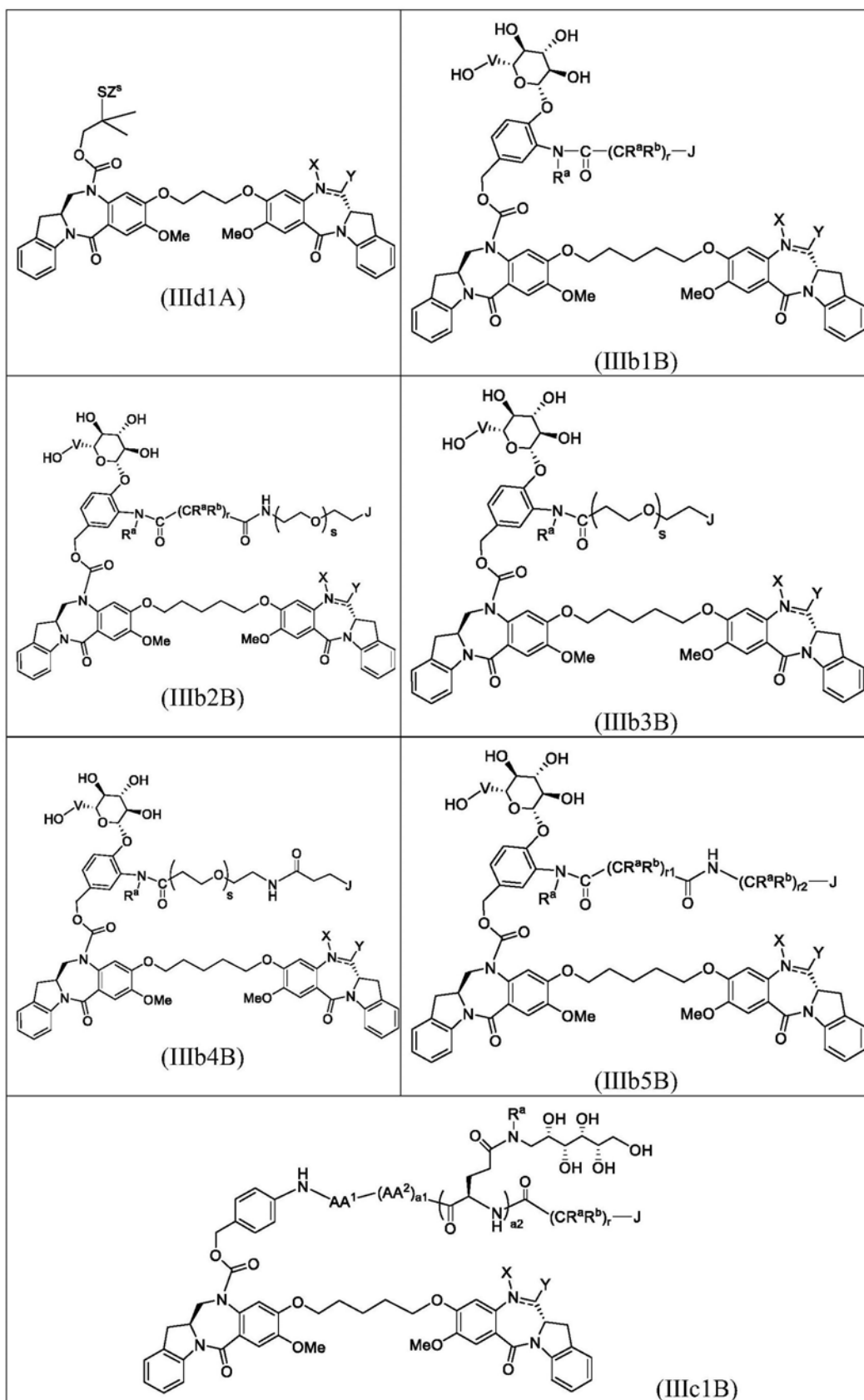




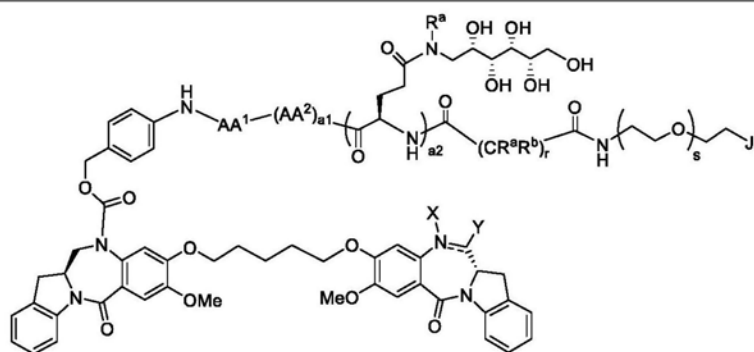
[0207]



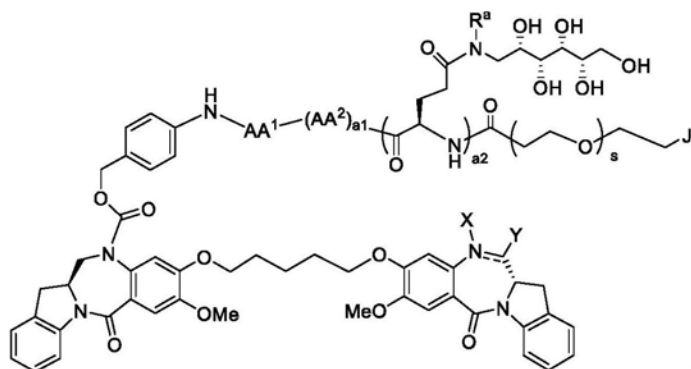
[0208]



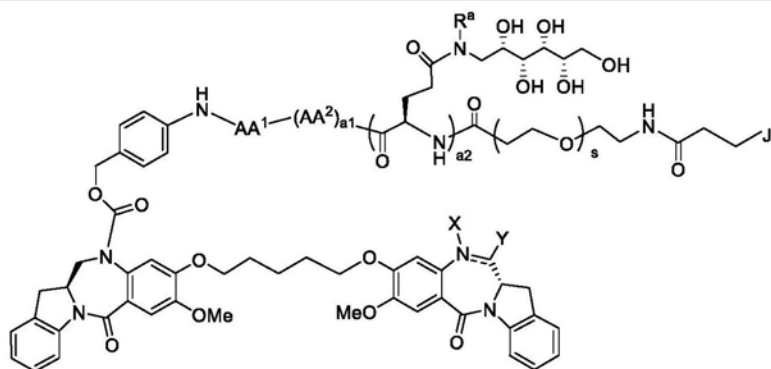
[0209]



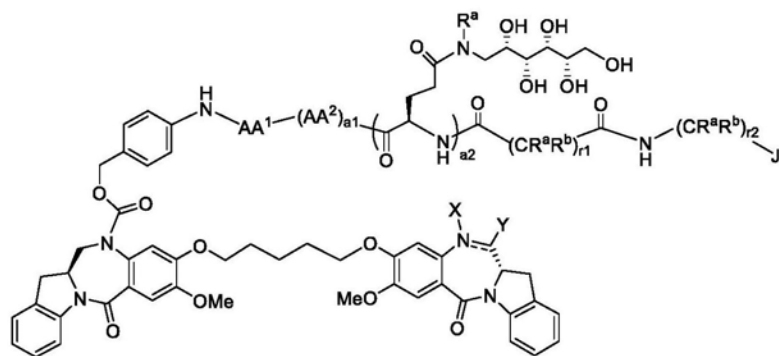
(IIIc2B)



(IIIc3B)

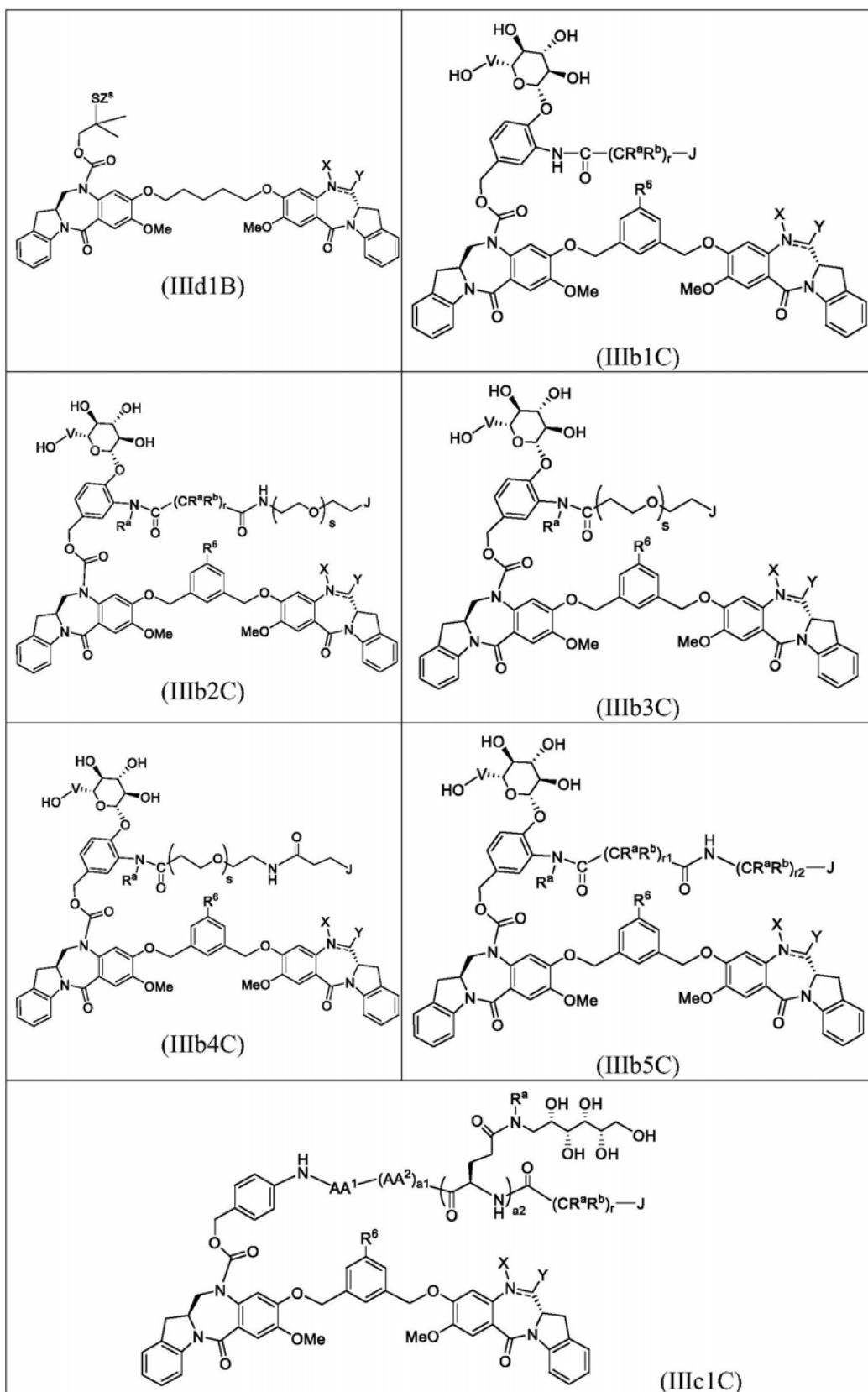


(IIIc4B)

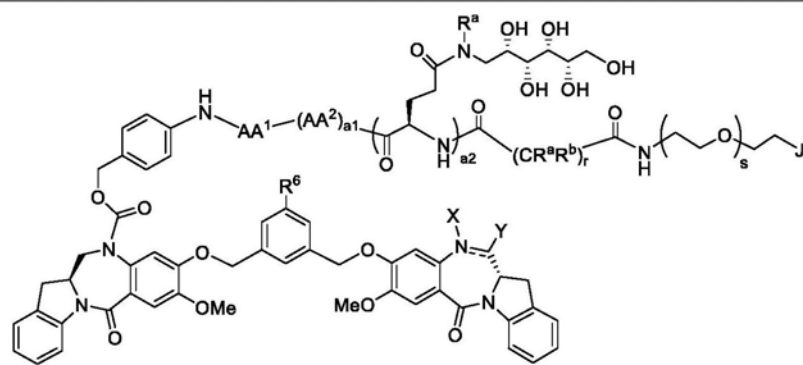


(IIIc5B)

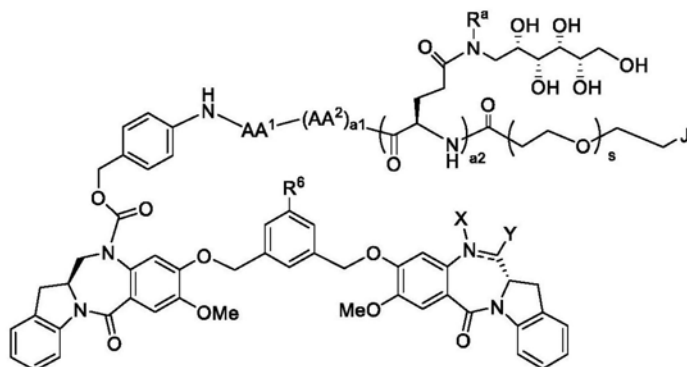
[0210]



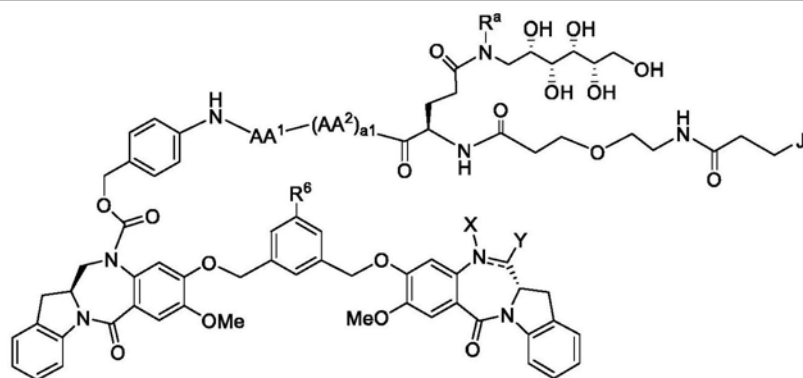
[0211]



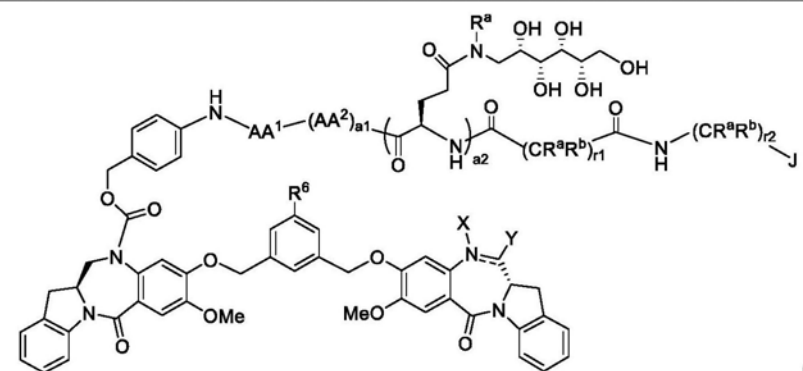
(IIIc2C)



(IIIc3C)

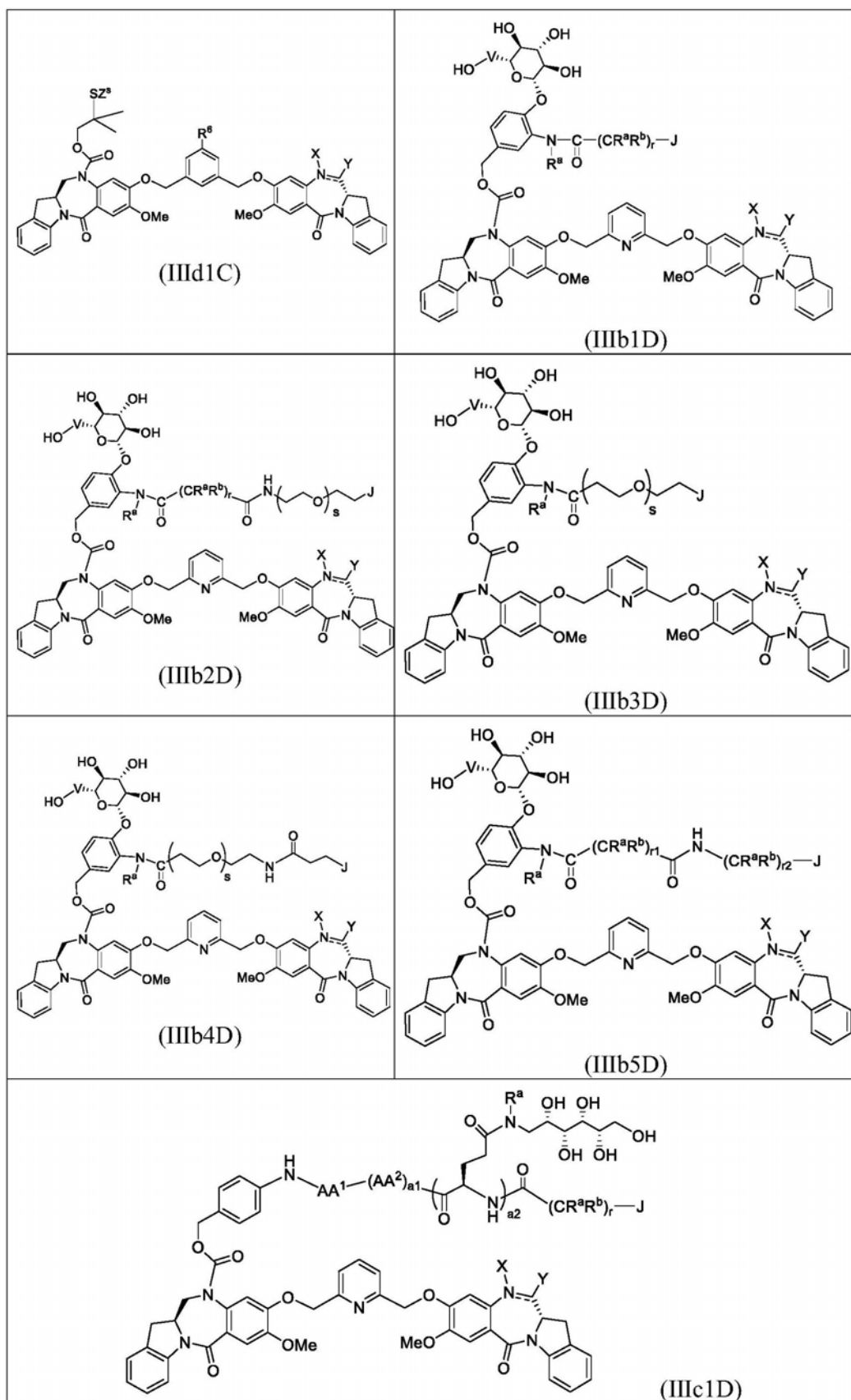


(IIIc4C)

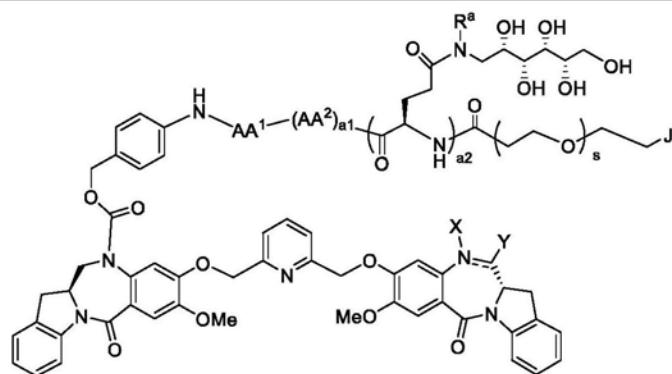
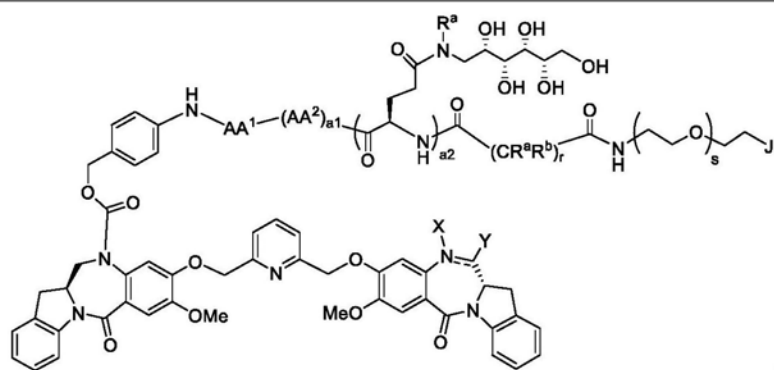


(IIIc5C)

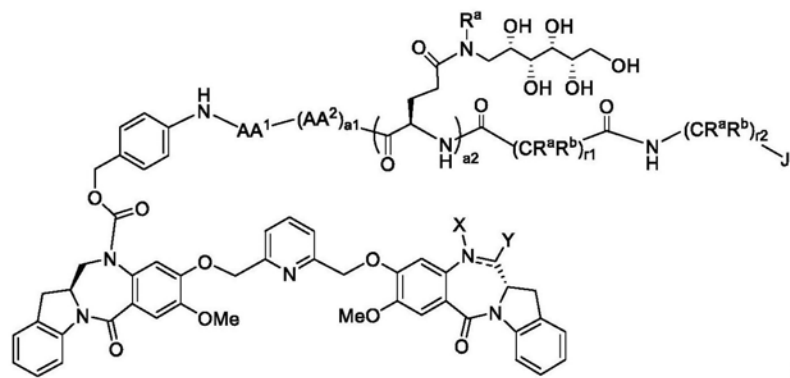
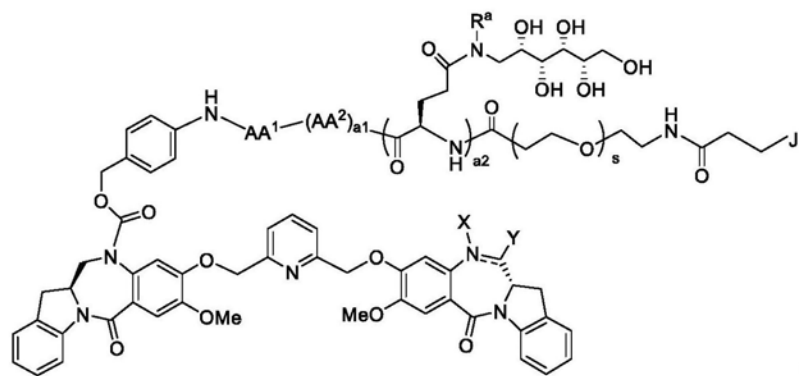
[0212]



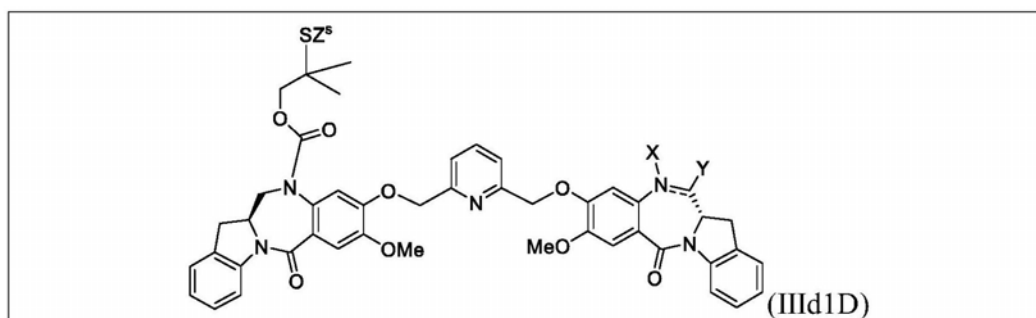
[0213]



[0214]



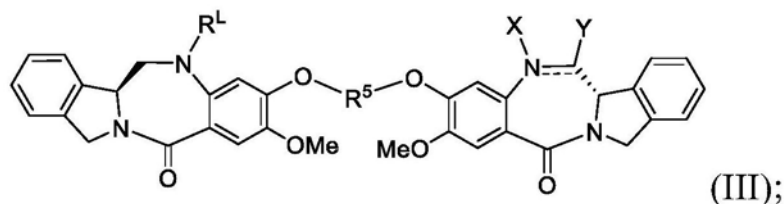
[0215]



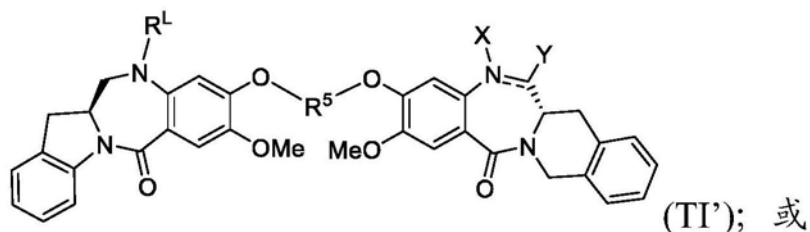
[0216] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0217] R^6 为 $-C(=O)OR^{6a}$ 或 $NR^{6b}(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR^{6c}$;[0218] R^{6a} 、 R^{6b} 及 R^{6c} 各自独立地为H或 C_{1-4} 烷基;[0219] n 为整数1至8;[0220] R^a 及 R^b 在每次出现时独立地为H或 C_{1-4} 烷基;[0221] r 、 r_1 及 r_2 各自独立地为整数2至6;[0222] s 为整数2至12;并且剩余变量如第六实施方案中所定义。

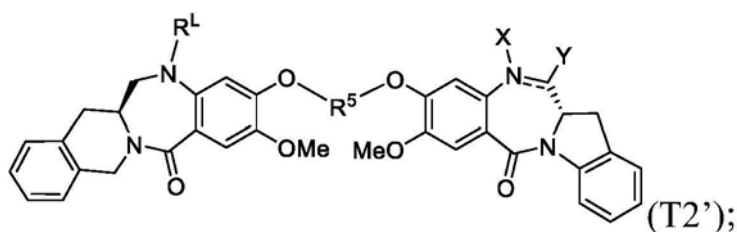
[0223] 第十一个实施方案中还包括以下化合物,其由下式表示:



[0224]



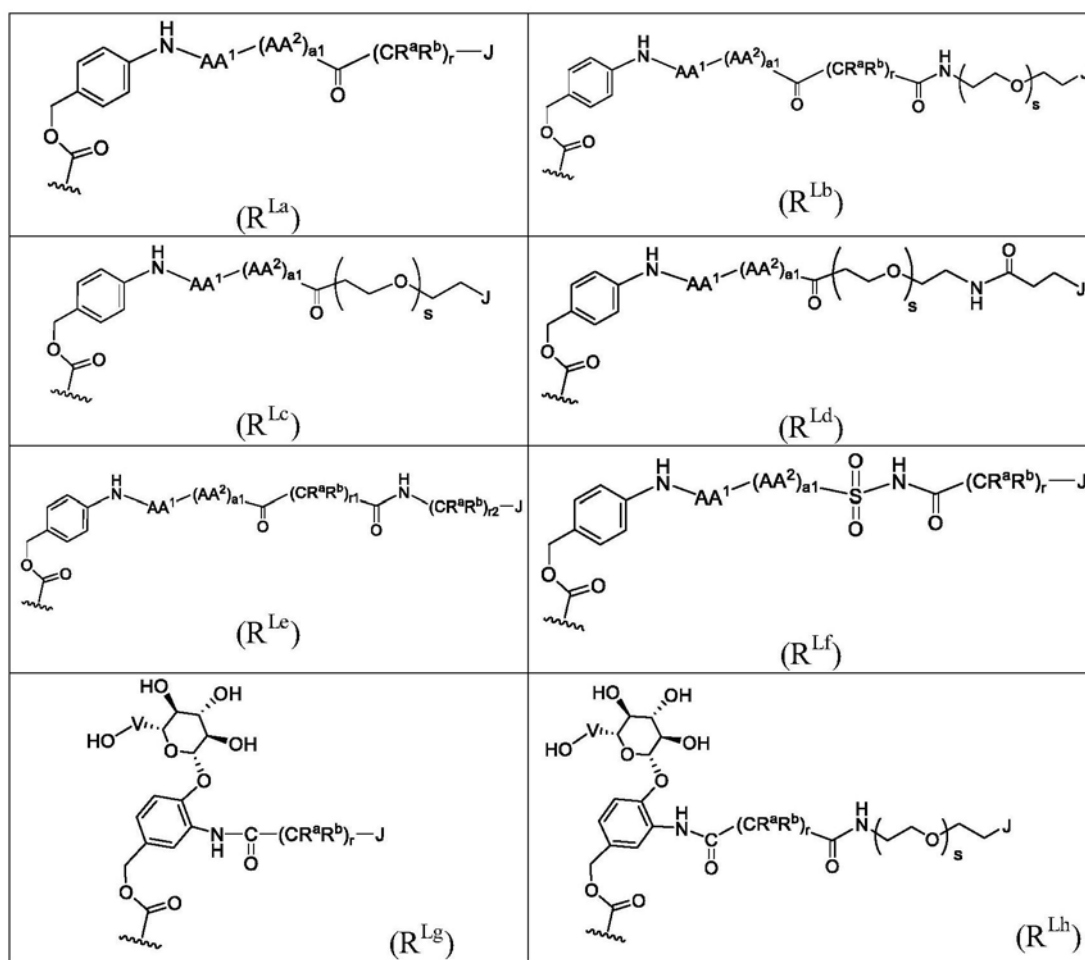
[0225]



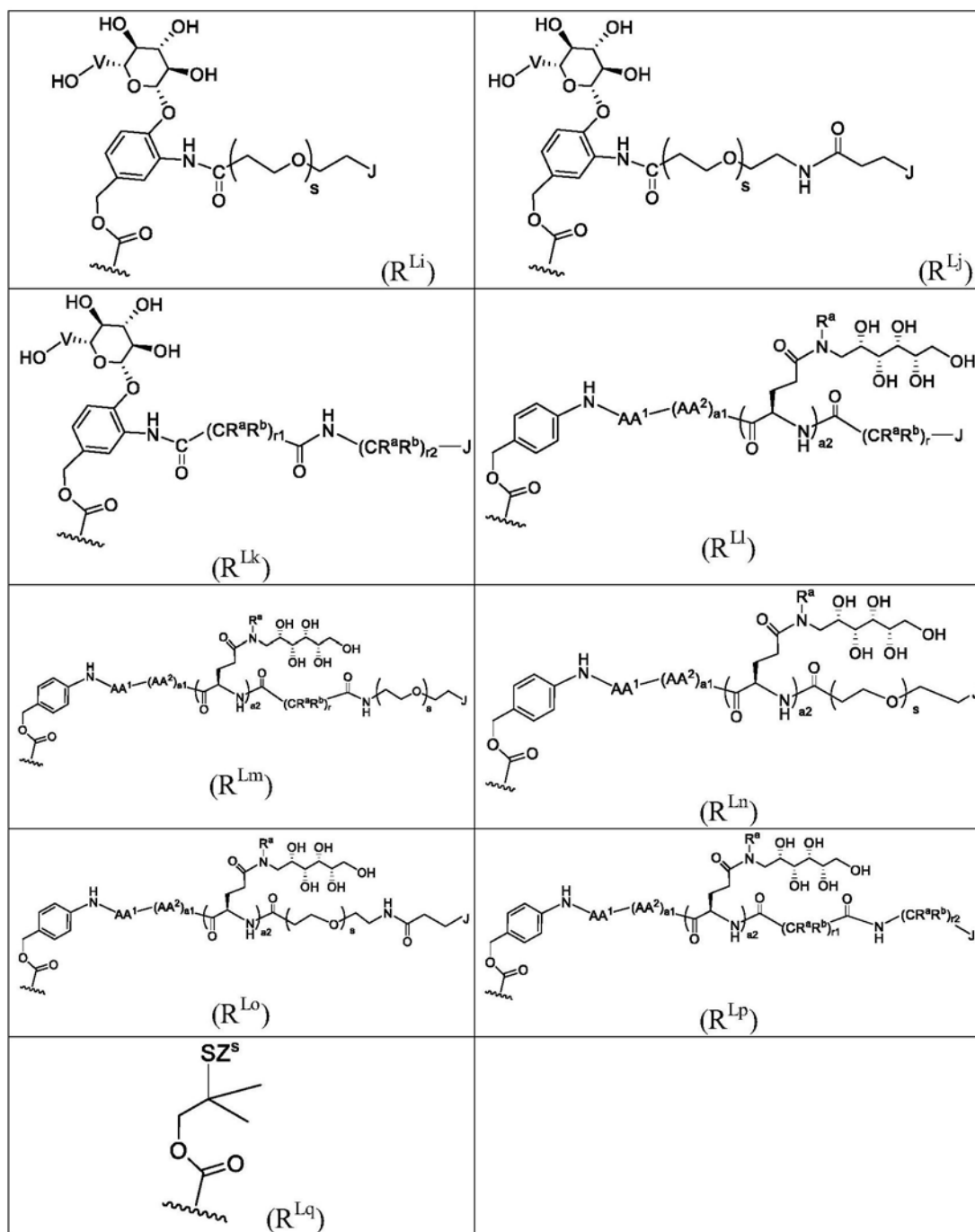
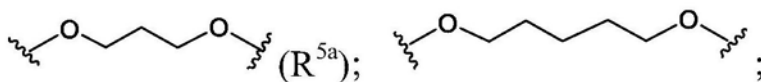
[0226] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0227] N与C之间的双线 $\equiv$ 表示单键或双键,限制条件在于当其为双键时,X不存在且Y为H或 C_{1-4} 烷基,且当其为单键时,X为H且Y为 $-SO_3H$;[0228] R^L 由下式中的任一者表示:

[0229]



[0230]

[0231] R⁵由以下各式之一表示:

[0232]

[0233] R^L及R⁵的任何组合均包括于本发明中。

[0234] 在第十二实施方案中,关于第十一个实施方案中所述的化合物或其药学上可接受的盐,变量被定义为:

[0235] R^{6a} 及 R^{6c} 均为Me;

[0236] R^{6b} 为H;

[0237] n为1、2、3或4;

[0238] R^a 及 R^b 在每次出现时独立地为H或Me;

[0239] r为4;

[0240] r_1 为4;

[0241] r_2 为2;

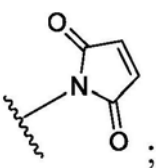
[0242] s为1、2、3或4;并且剩余变量如第十一个实施方案中所定义。

[0243] 在第十三实施方案中,关于第二至第十二实施方案中所述的化合物或其药学上可接受的盐,J为 $-COOR^d$ 或由COE表示的反应性酯,其中 R^d 为H或 C_{1-4} 烷基;并且剩余变量如第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一或第十二实施方案或其中所述的任何特定实施方案中所定义。

[0244] 在一个具体实施方案中,J为选自N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、硝基苯基(例如2-硝基苯基或4-硝基苯基)酯、二硝基苯基(例如2,4-二硝基苯基)酯、磺基-四氟苯基(例如4-磺基-2,3,5,6-四氟苯基)酯及五氟苯基酯的反应性酯。

[0245] 在一个更具体实施方案中,J为N-羟基琥珀酰亚胺酯。

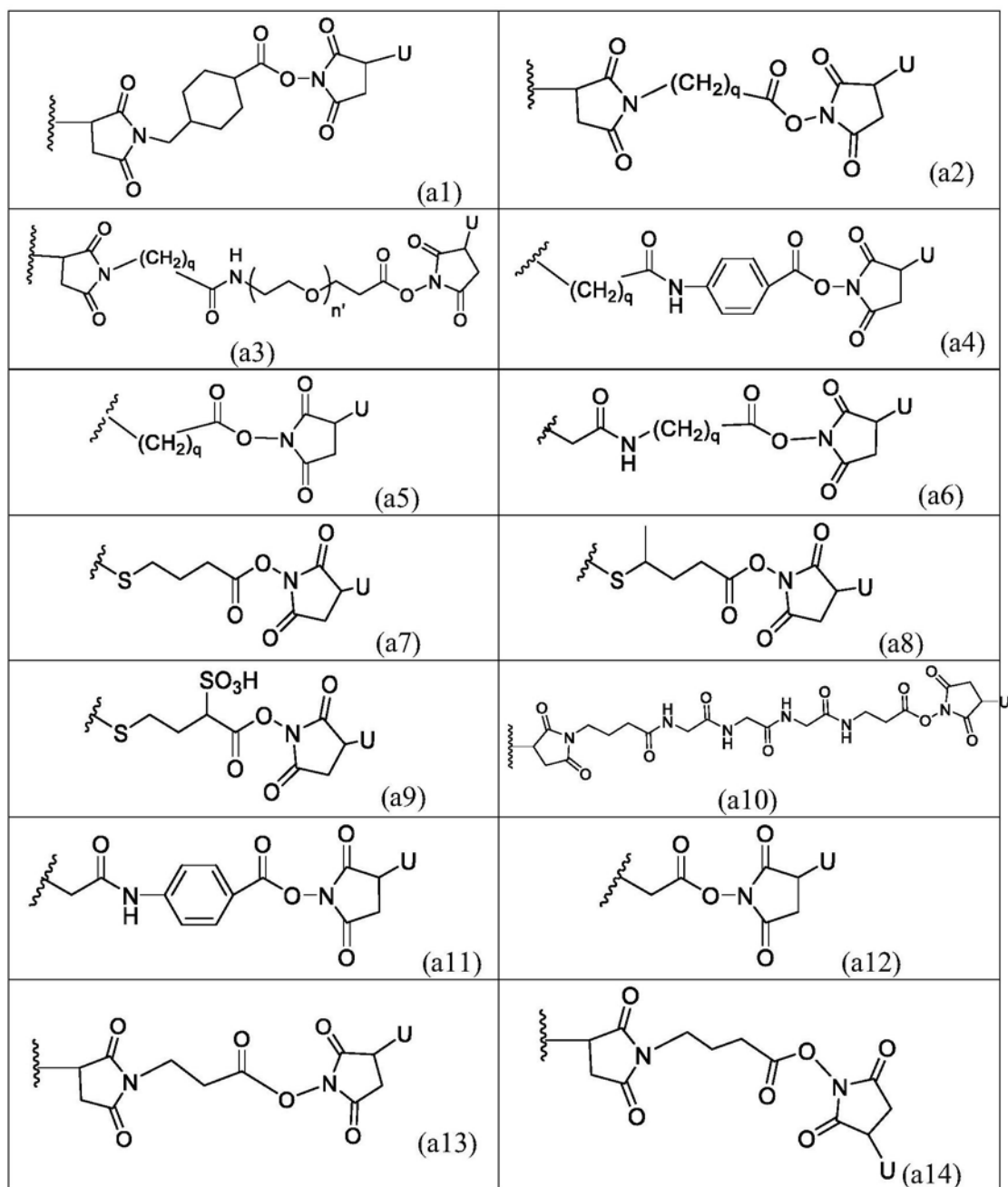
[0246] 在第十四实施方案中,关于第二至第十二实施方案中的任一者中所述的化合物或

其药学上可接受的盐,J为  并且剩余变量如第二、第三、第四、第五、第六、第七、

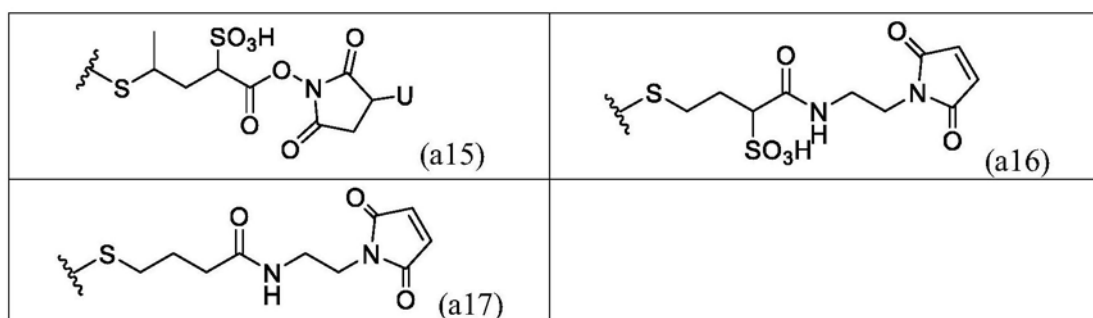
第八、第九、第十、第十一或第十二实施方案或其中所述的任何特定实施方案中所定义。

[0247] 在第十五实施方案中,关于第二至第十二实施方案中的任一者中所述的化合物或其药学上可接受的盐,J为 $-SZ^s$; Z^s 为H、 SR^e ,或选自以下各式:

[0248]



[0249]



[0250] 其中：

[0251] q为整数1至5；

[0252] n' 为整数2至6；

[0253] U为-H或SO₃H；

[0254] R^e 为具有1至6个碳原子的直链或支链烷基或选自苯基、硝基苯基(例如2-硝基苯基或4-硝基苯基)、二硝基苯基(例如2,4-二硝基苯基)、羧基硝基苯基(例如3-羧基-4-硝基苯基)、吡啶基或硝基吡啶基(例如4-硝基吡啶基);并且

[0255] 剩余变量如第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一或第十二实施方案或其中所述的任何特定实施方案中所定义。

[0256] 在一个具体实施方案中, Z^s 为H。在另一个具体实施方案中, Z^s 为 $-SR^e$,其中 R^e 为甲基。在另一个具体实施方案中, Z^s 由式(a7)或(a9)表示。在另一个具体实施方案中, Z^s 由式(a16)或(a17)表示。

[0257] 在第十六实施方案中,关于第一至第十五实施方案中的任一者中所述的化合物或其药学上可接受的盐,N与C之间的双线 $\equiv$ 表示双键,X不存在且Y为H;并且剩余变量如第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四或第十五实施方案或其中所述的任何特定实施方案中所定义。

[0258] 在第十七实施方案中,关于第一至第十五实施方案中的任一者中所述的化合物或其药学上可接受的盐,N与C之间的双线 $\equiv$ 表示单键,X为H且Y为 $-SO_3H$;并且剩余变量如第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四或第十五实施方案或其中所述的任何特定实施方案中所定义。在一个具体实施方案中,所述药学上可接受的盐为钠盐或钾盐。在另一个具体实施方案中,所述药学上可接受的盐为钠盐。

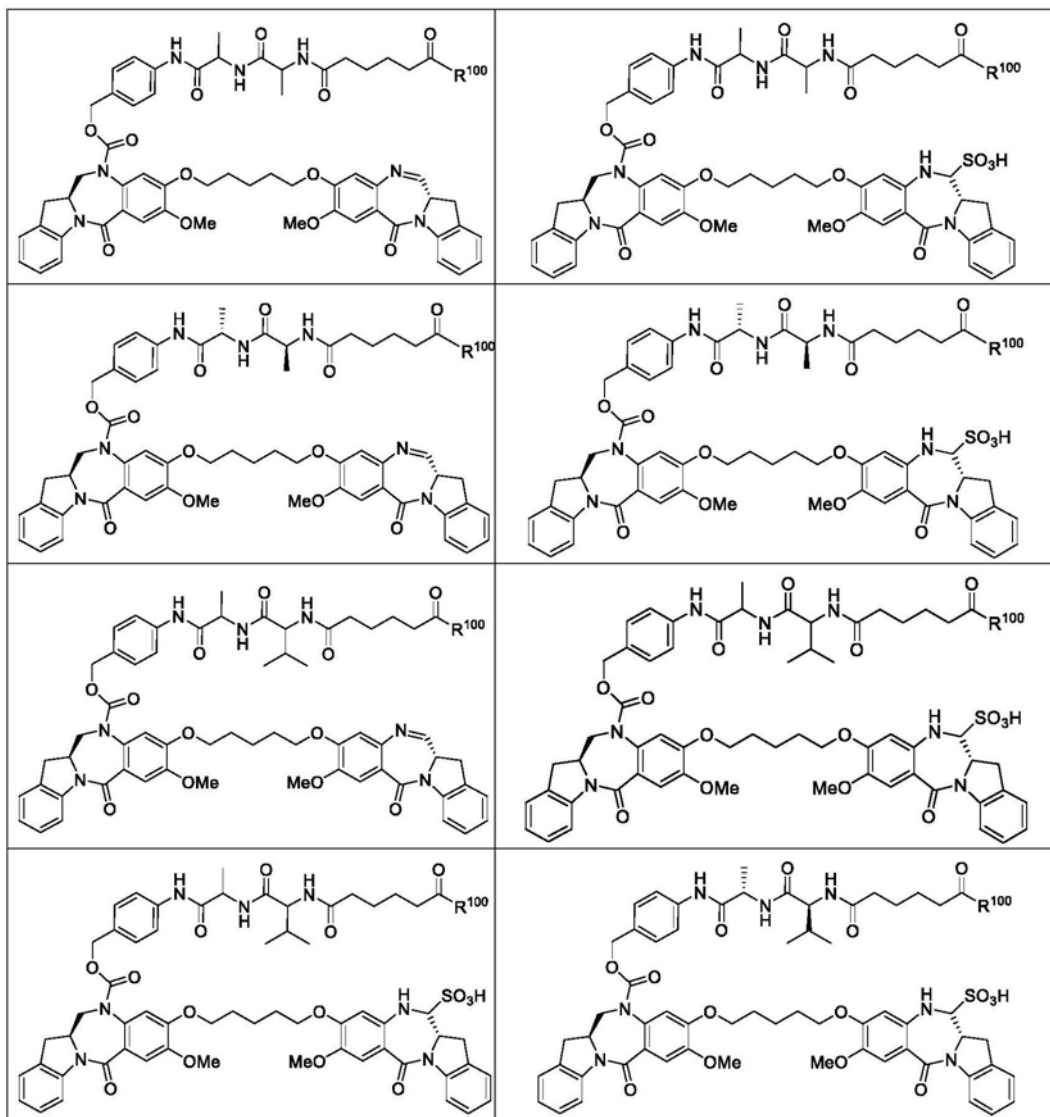
[0259] 在第十八实施方案中,关于第二至第十七实施方案中的任一者中所述的化合物或其药学上可接受的盐, a_1 为整数1至7;并且剩余变量如第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、第十六或第十七实施方案或其中所述的任何特定实施方案中所定义。

[0260] 在一个具体实施方案中, AA^1 及 AA^2 各自独立地选自精氨酸(Arg)、组氨酸(His)、赖氨酸(Lys)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、天冬酰胺(Asn)、谷氨酰胺(Gln)、半胱氨酸(Cys)、硒代半胱氨酸(Sec)、甘氨酸(Gly)、脯氨酸(Pro)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、甲硫氨酸(Met)、苯丙氨酸(Phe)、酪氨酸(Tyr)及色氨酸(Trp)。

[0261] 在第十九实施方案中,关于第十八实施方案中所述的化合物或其药学上可接受的盐, $AA^1-(AA^2)_{a_1}$ 选自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Lle-Cit、Phe-Ala、Phe- N^9 -甲苯磺酰基-Arg、Phe- N^9 -硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu、 β -Ala-Leu-Ala-Leu、Gly-Phe-Leu-Gly、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met、Met-Ala、Thr-Thr、Thr-Met、Met-Thr、Leu-Ala、Cit-Val、Gln-Val、Ser-Val、Leu-Gln、Gln-Leu、Phe-Arg、Arg-Phe、Tyr-Arg、Arg-Tyr、Phe-Gln、Gln-Phe、Val-Thr、Thr-Val、Met-Tyr及Tyr-Met;并且剩余变量如第十八实施方案中所定义。

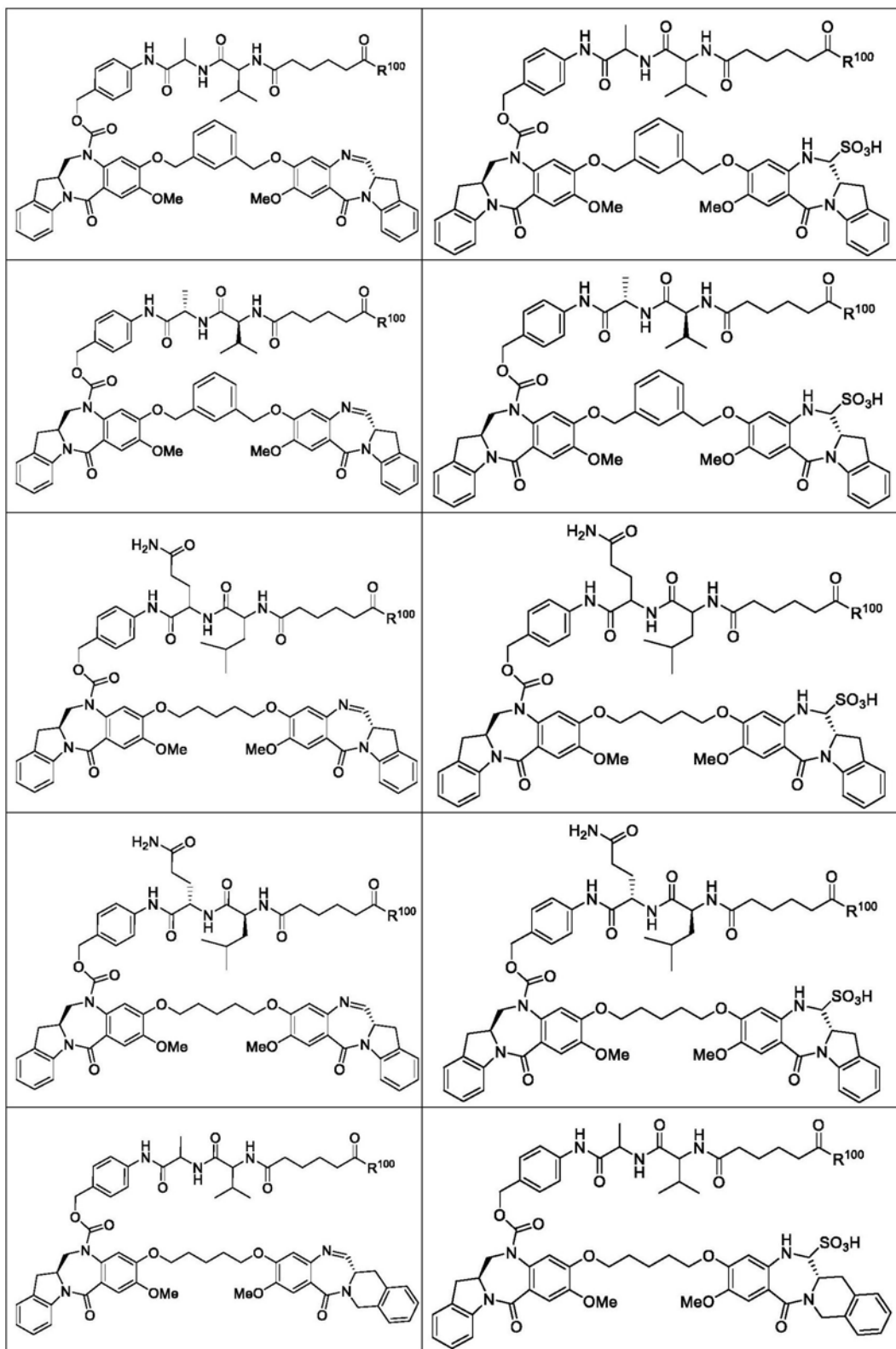
[0262] 在一个具体实施方案中, $AA^1-(AA^2)_{a_1}$ 为Ala-Ala、L-Ala-L-Ala、Ala-Val、L-Ala-L-Val、Gln-Val、L-Gln-L-Val、Gln-Leu、L-Gln-L-Leu、Ser-Val或L-Ser-L-Val。

[0263] 在第二十实施方案中,本发明化合物由表D中的下式:

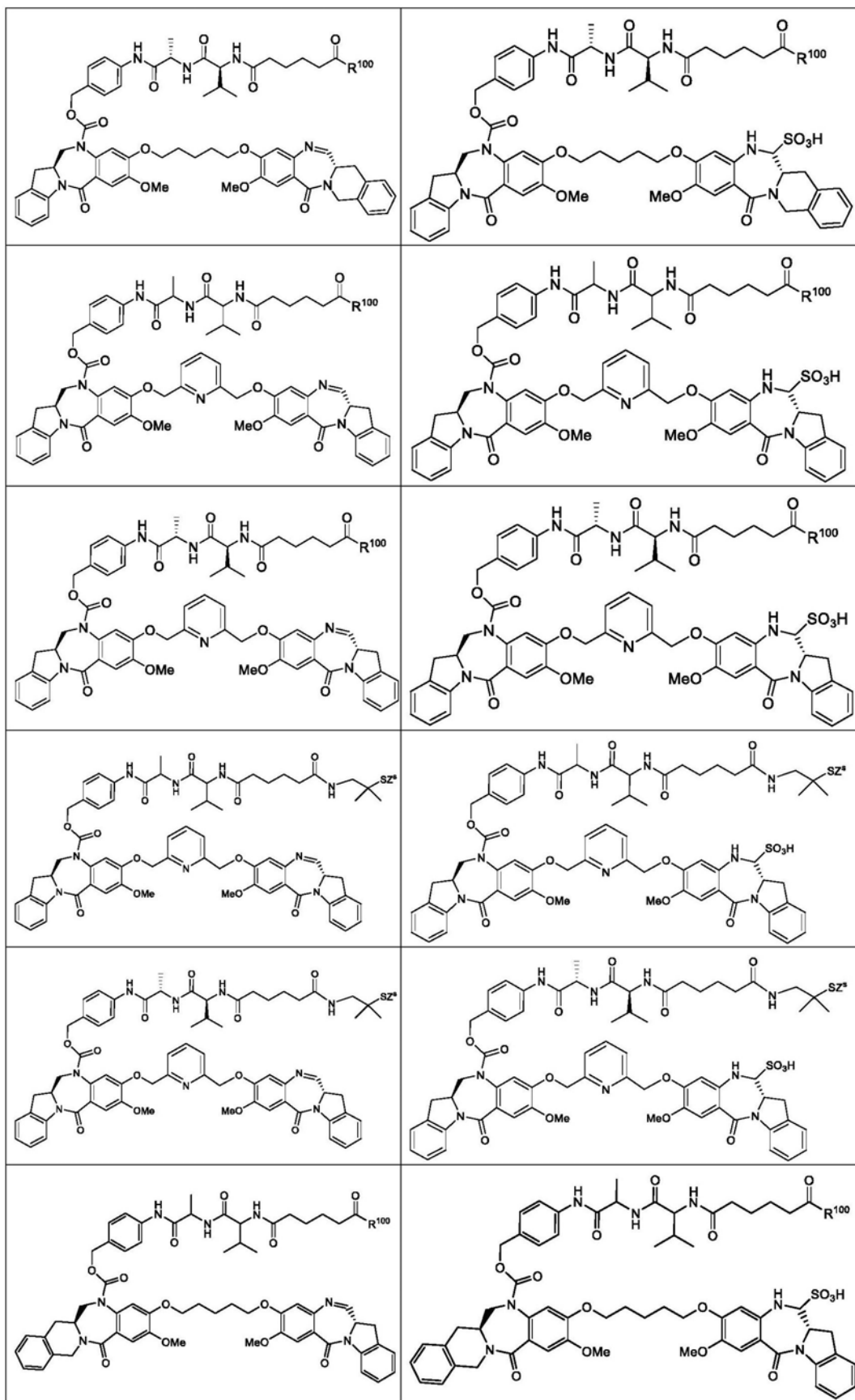


[0264]

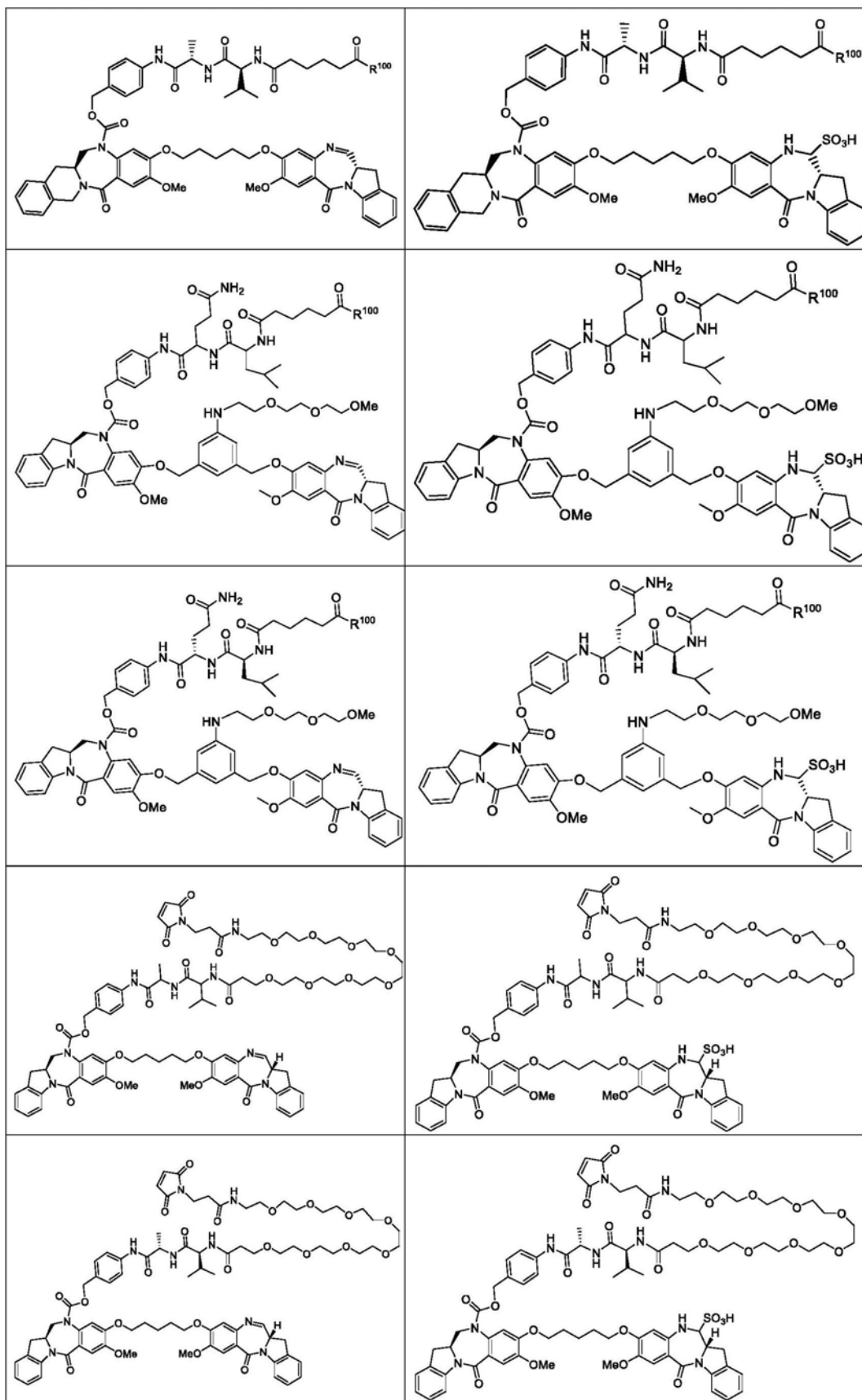
[0266]



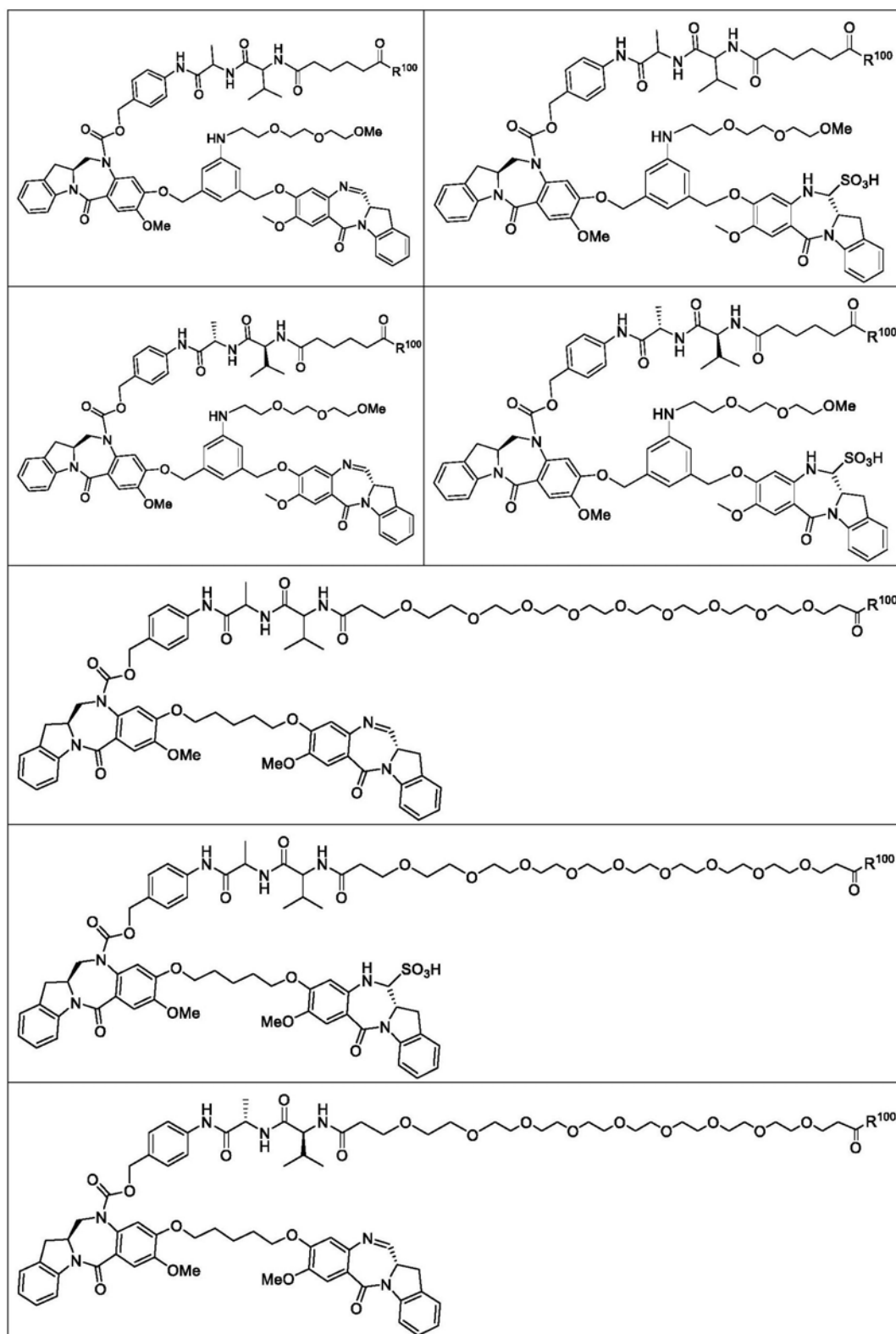
[0267]



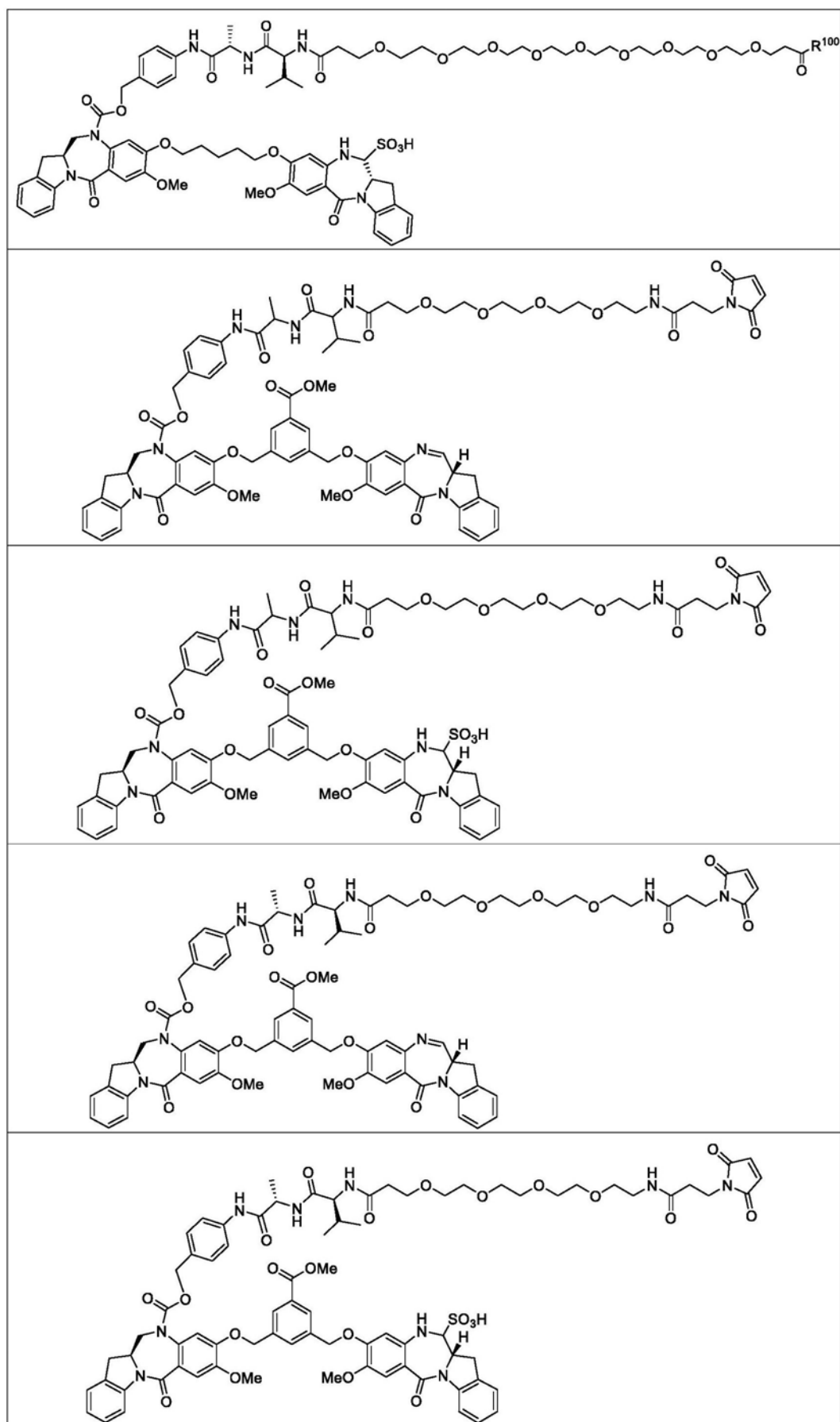
[0268]



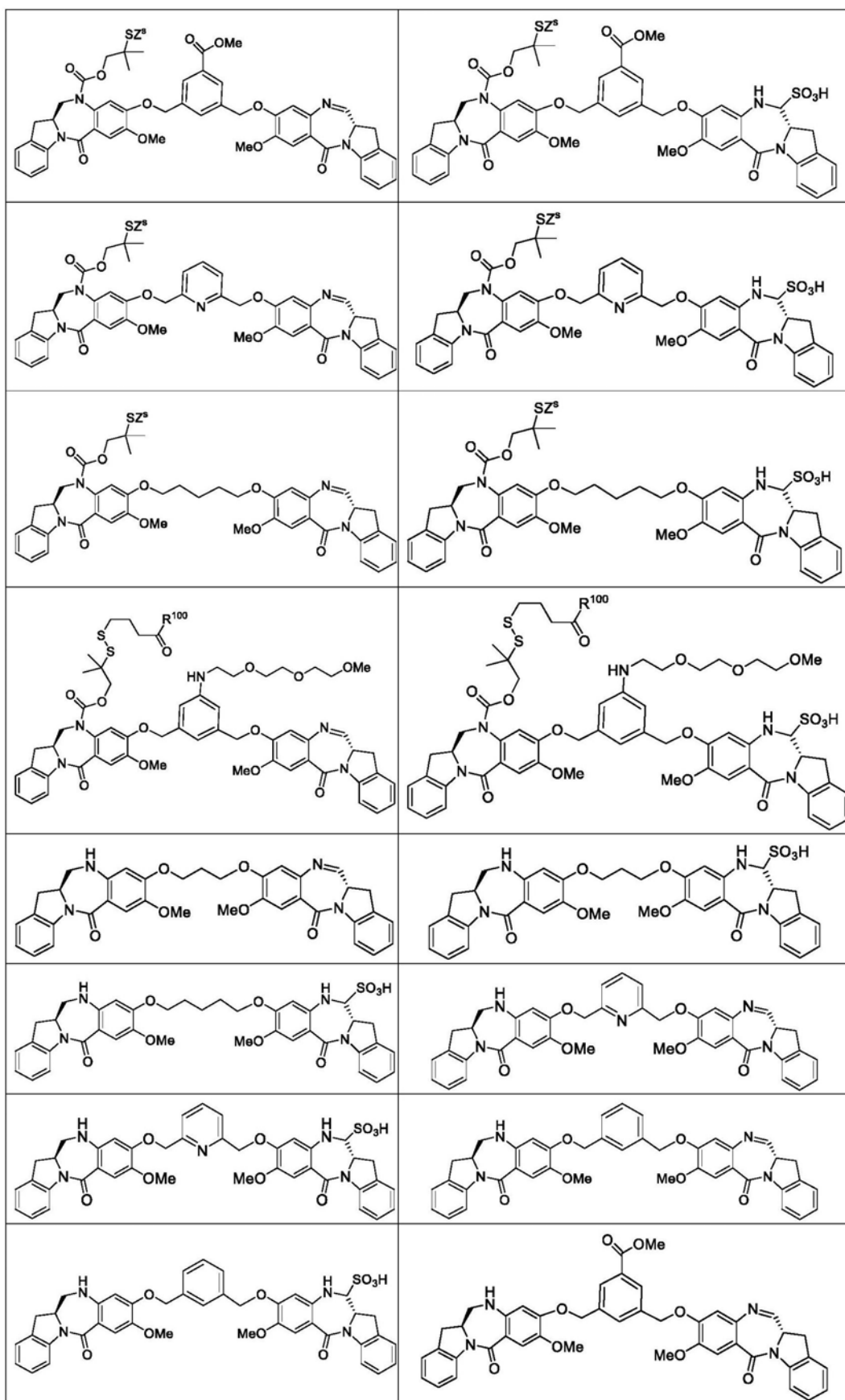
[0269]



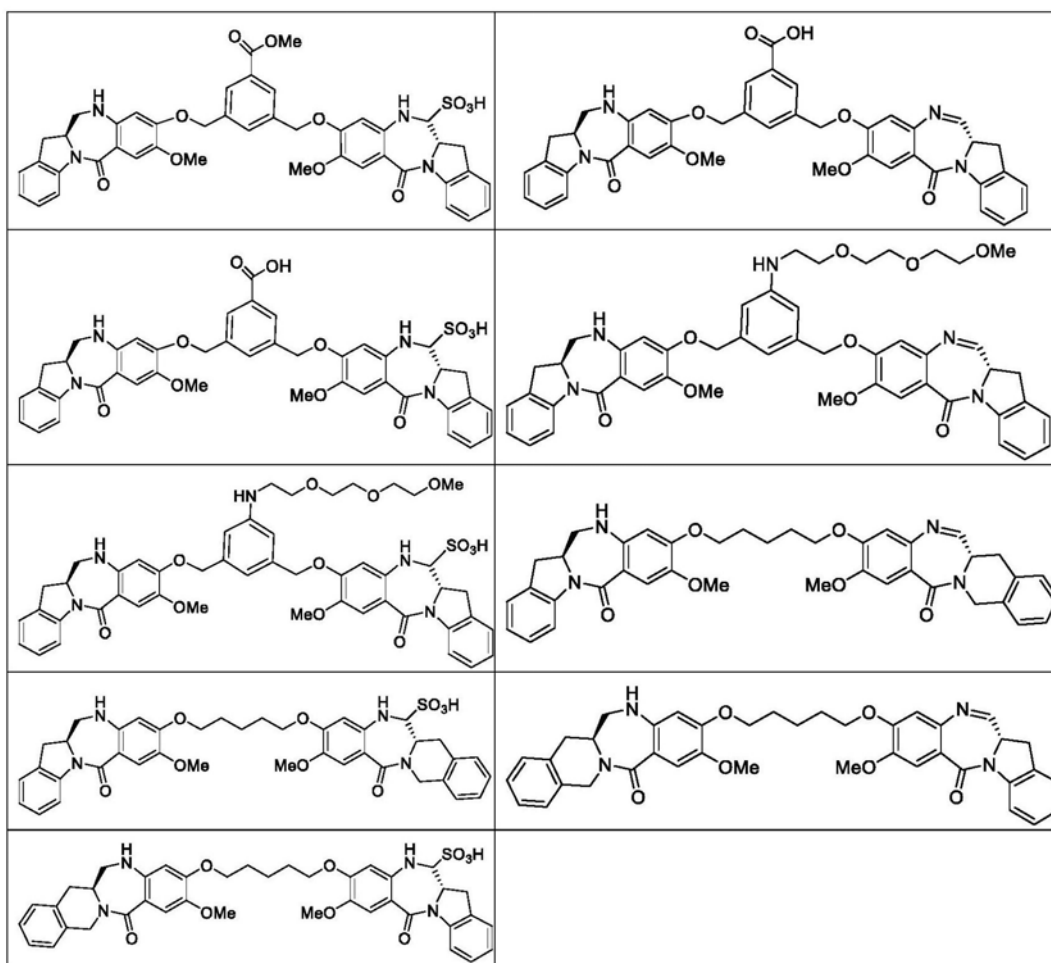
[0270]



[0272]



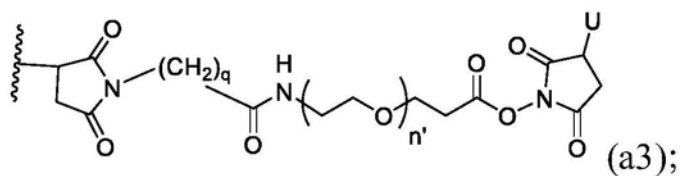
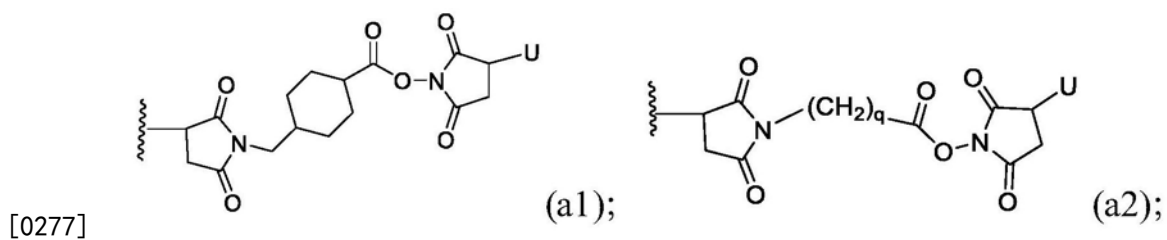
[0273]

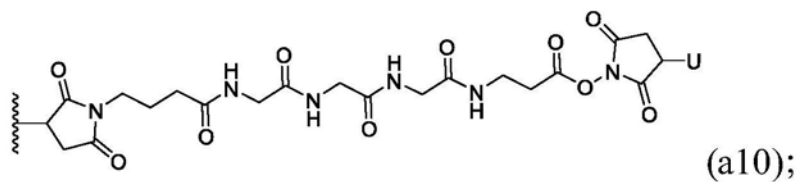
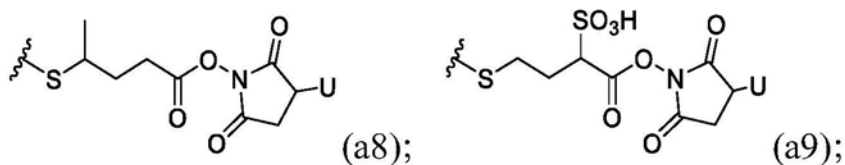
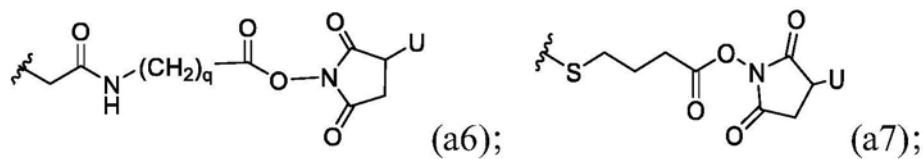
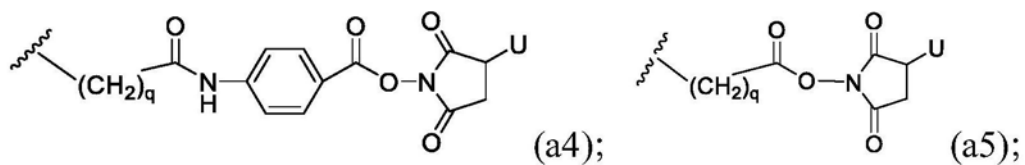


[0274] 或其药学上可接受的盐表示,其中:

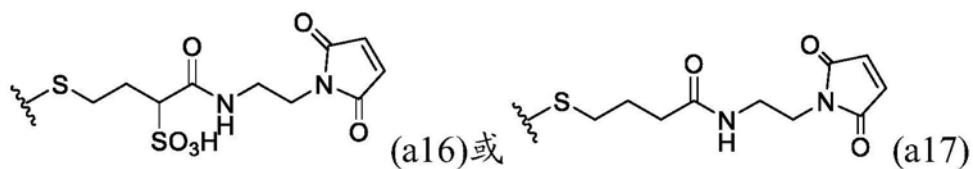
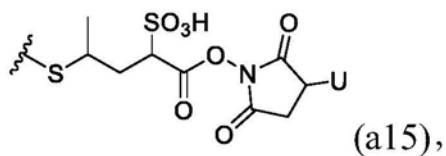
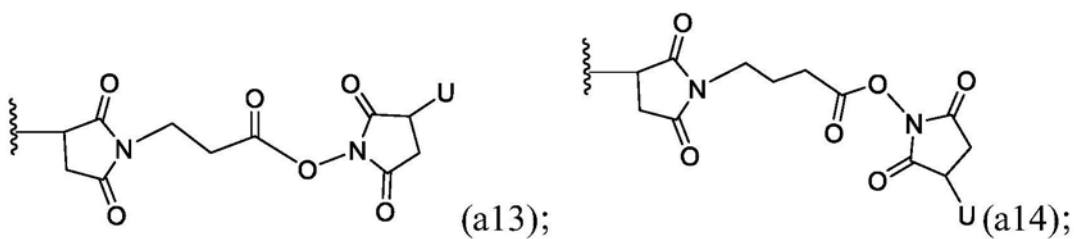
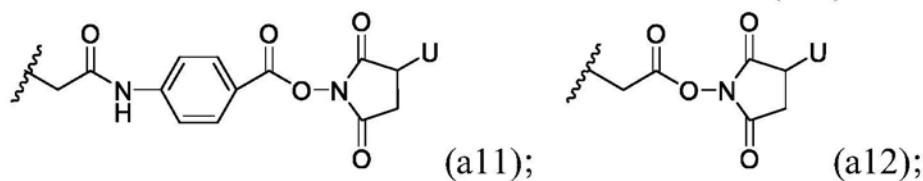
[0275] R^{100} 为 $-OH$ 、 $-OMe$ 或 ;

[0276] Z^S 为 H 、 SR^e , 或系选自以下各式:





[0278]



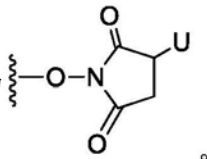
[0279] 其中:

[0280] q为整数1至5;

[0281] n' 为整数2至6;

[0282] U为-H或SO₃H;

[0283] R^e 为具有1至6个碳原子的直链或支链烷基或选自苯基、硝基苯基(例如2-硝基苯基或4-硝基苯基)、二硝基苯基(例如2,4-二硝基苯基)、羧基硝基苯基(例如3-羧基-4-硝基苯基)、吡啶基或硝基吡啶基(例如4-硝基吡啶基);并且剩余变量如第一个实施方案中所定义。

[0284] 在一个具体实施方案中, R^{100} 为  在一个更具体实施方案中, U为H。

[0285] 在第二十个实施方案中,关于上文所述的化合物(例如,第一方面或其中所述的任何实施方案或第一至第二十实施方案或其中所述的任何实施方案或特定实施方案中所述的化合物),其药学上可接受的盐为钠盐或钾盐。在一个实施方案中,所述药学上可接受的盐为钠盐。在一个实施方案中,所述药学上可接受的盐为钾盐。

[0286] 本发明缀合物

[0287] 在第二方面中,本发明提供细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物,其包含共价连接至本文所述的细胞毒性化合物的本文所述的细胞结合剂。

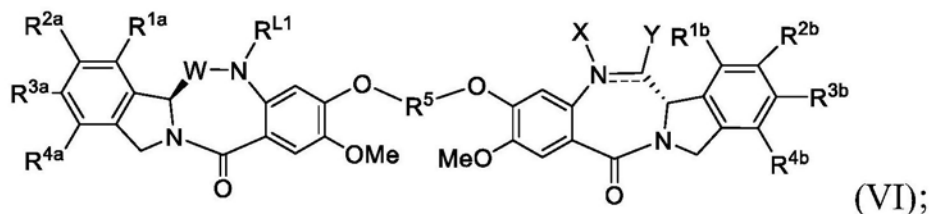
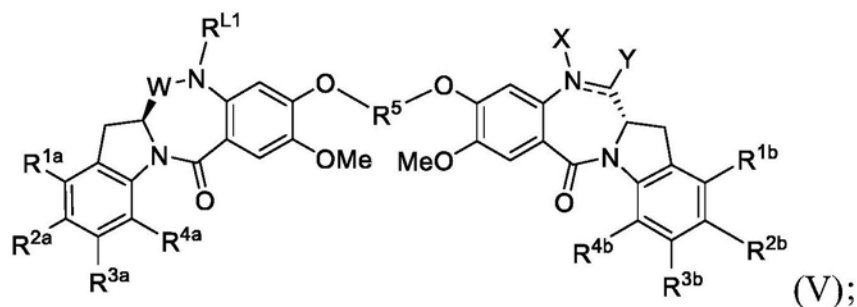
[0288] 在第二十二实施方案中,本发明缀合物由下式表示:

[0289] $CBA-(Cy)_w$,

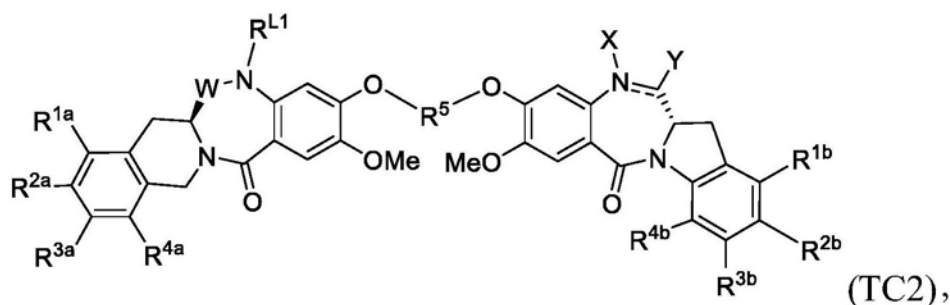
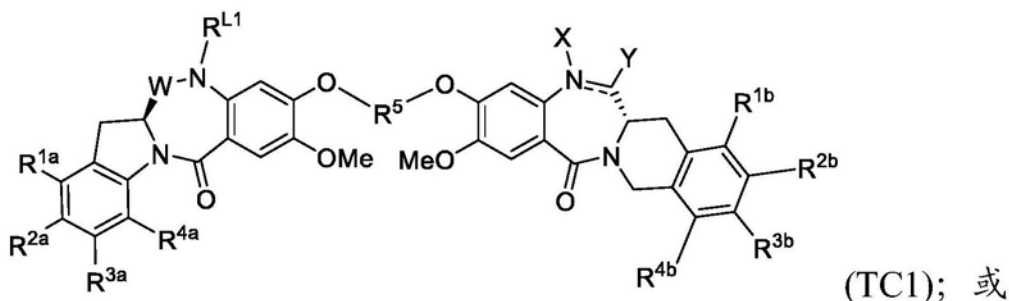
[0290] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0291] CBA为细胞结合剂;

[0292] Cy为细胞毒性剂,其由下式表示:



[0293]



[0294] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0295] N与C之间的双线 $\equiv$ 表示单键或双键,限制条件在于当其为双键时,X不存在且Y为H或 C_{1-4} 烷基,且当其为单键时,X为H且Y为-OH或-SO₃H;

[0296] W为-C(=O)-或-C(Y')-;

[0297] Y'为H或 C_{1-4} 烷基;[0298] R^{1a} 、 R^{2a} 、 R^{3a} 、 R^{4a} 、 R^{1b} 、 R^{2b} 、 R^{3b} 及 R^{4b} 各自独立地选自由H、 C_{1-10} 烷基、 $-(OCH_2CH_2)_n-OR^c$ 、卤素、 $-NH(C=NH)NH_2$ 、 $-OR$ 、 $-NR'R''$ 、 $-NO_2$ 、 $-NR'COR''$ 、 $-SR$ 、 $-SOR'$ 、 $-SO_2R'$ 、 $-SO_3H$ 、 $-OSO_3H$ 、 $-SO_2NR'R''$ 、 $-CN$ 、 $-N_3$ 、 $-COR'$ 、 $-OCOR'$ 及 $-OCONR'R''$ 组成的组;[0299] R^c 为H或 C_{1-4} 烷基;

[0300] n为整数1至24;

[0301] R在每次出现时独立地选自由H、 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ 、 C_{1-10} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、6元至18元芳基、含有一个或多个独立地选自N、O及S的杂原子的5元至18元杂芳环或含有1至6个独立

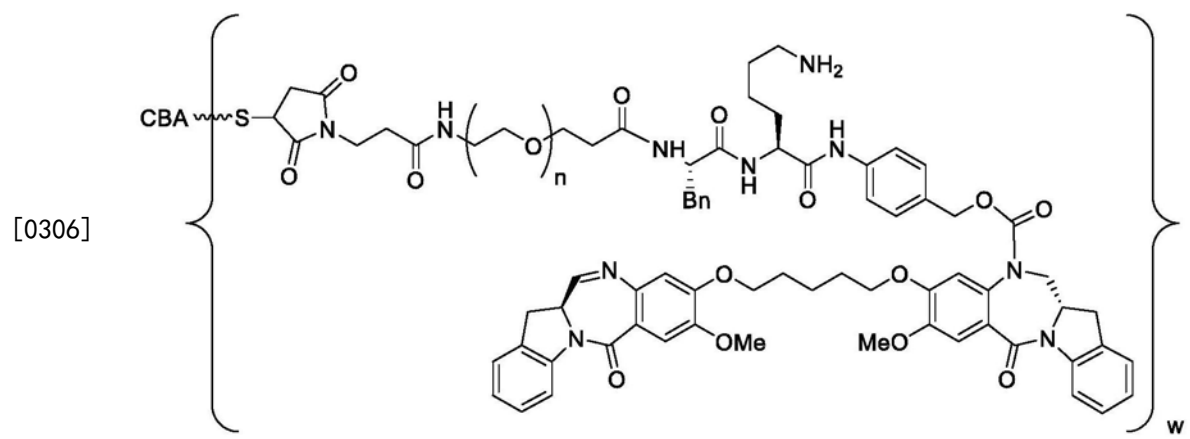
地选自O、S、N及P的杂原子的3元至18元杂环组成的组；

[0302] R' 及R'' 各自独立地选自 -H、-OH、-OR、-NHR、-NR₂、-COR、C₁₋₁₀烷基、-(CH₂CH₂O)_n-R^c及具有1至6个独立地选自O、S、N及P的杂原子的3元至18元杂环；

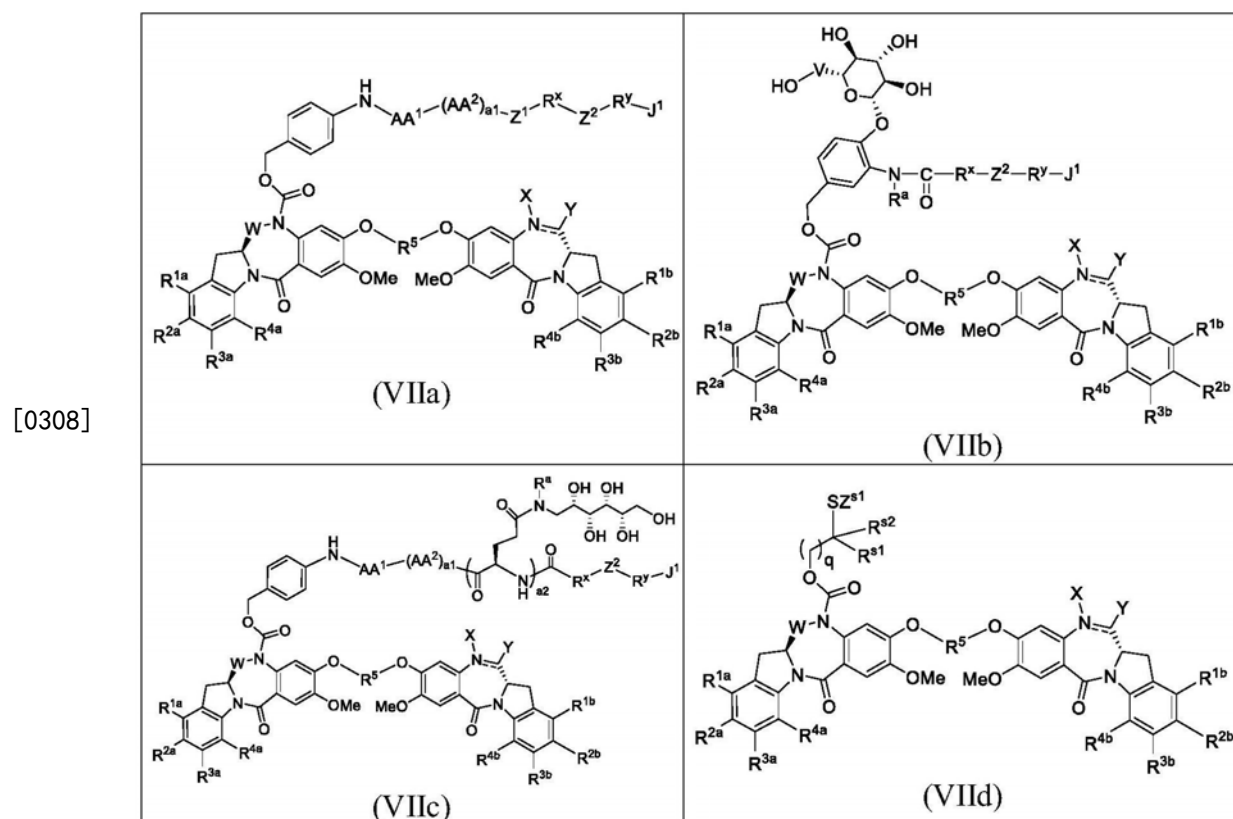
[0303] R⁵为C₃₋₁₂亚烷基，所述链可由一个或多个选自-O-、-S-、-NH-、-NMe-、苯环、4元至7元杂芳环及4元至7元杂环的基团中断，其中所述苯、所述4元至7元杂芳环及所述4元至7元杂环被1至4个R⁶取代；

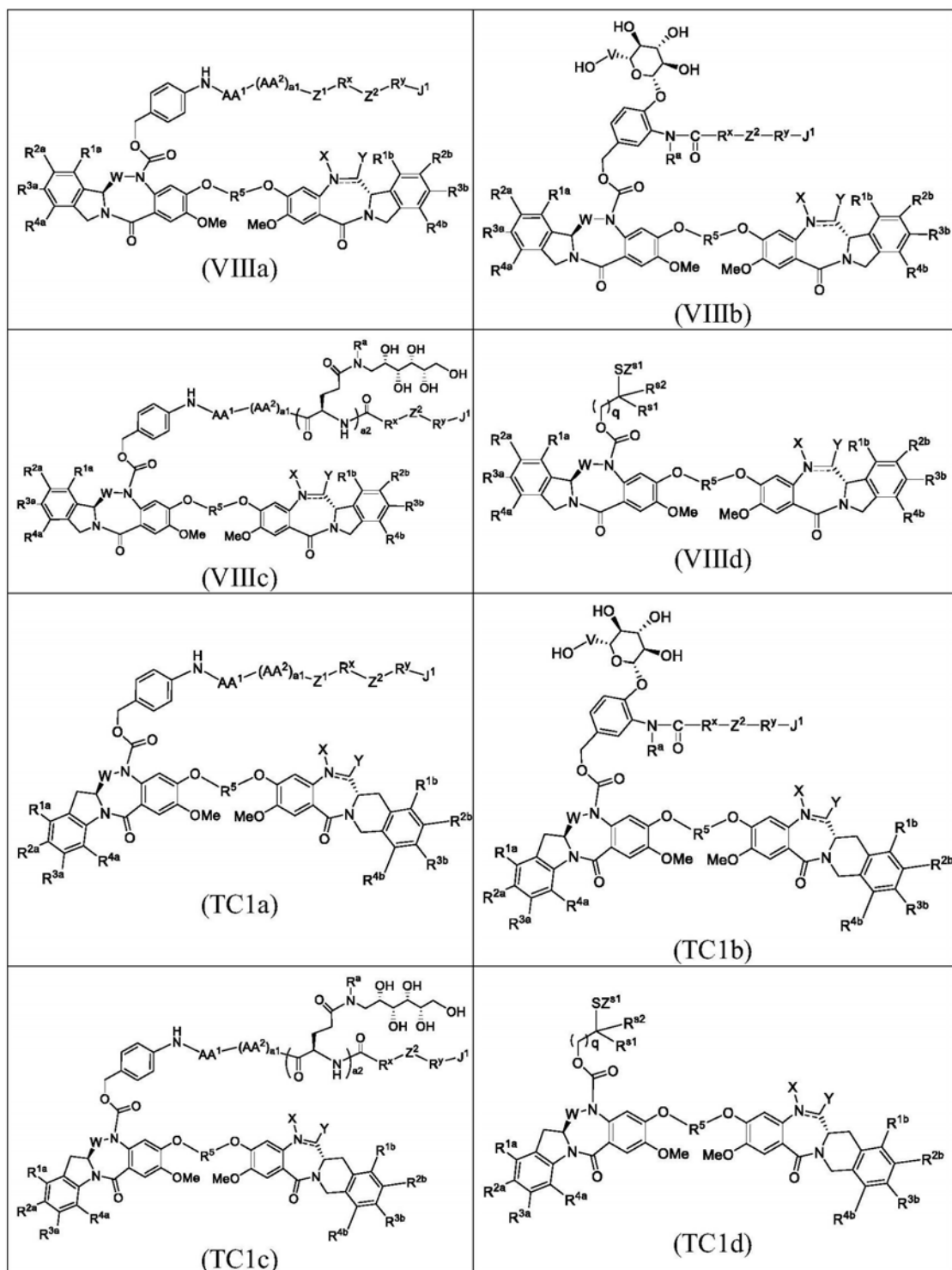
[0304] R⁶在每次出现时独立地选自H、C₁₋₁₀烷基、-(CH₂CH₂O)_n-R^c、卤素、-NH(C=NH)NH₂、-OR、-NR' R''、-NO₂、-NCO、-NR' COR''、-SR、-SOR'、-SO₂R'、-SO₃H、-OSO₃H、-SO₂NR' R''、-CN、-N₃、-COR'、-OCOR' 及-OCONR' R''；并且

[0305] R^{L1}为共价连接至CBA的自降解接头，限制条件在于式(V)缀合物不为：

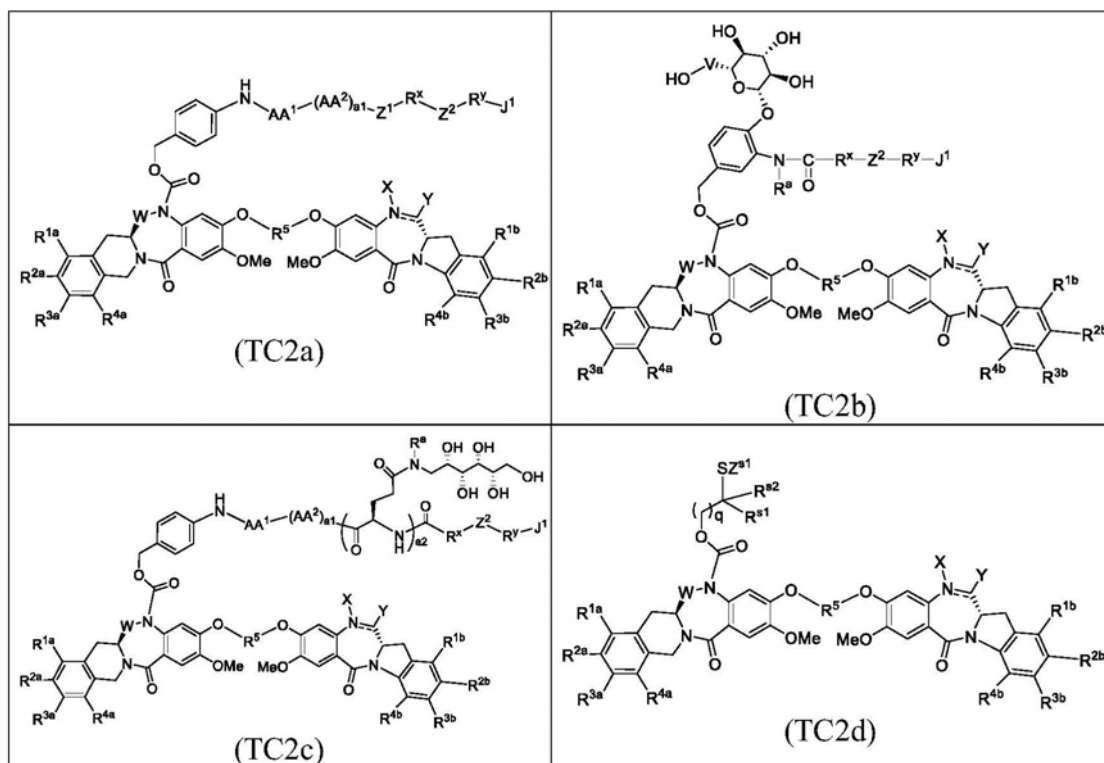


[0307] 在第二十三实施方案中，关于第二十二实施方案中所述之式(V)、(VI)、(TC1)或(TC2)缀合物或其药学上可接受的盐，其中Cy由表E中的以下各式之一表示：





[0310]



[0311] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0312] AA^1 及 AA^2 各自独立地为氨基酸残基;[0313] a_1 为整数1至19;[0314] a_2 为整数1至5;[0315] R^a 为H或 C_{1-4} 烷基;[0316] q 为1、2、3或4;[0317] R^{s1} 及 R^{s2} 各自独立地为H或 C_{1-4} 烷基,或 R^{s1} 及 R^{s2} 与其所附接的碳原子合起来形成3元至5元环烷基环,限制条件在于当 q 为1时, R^{s1} 及 R^{s2} 与其所附接的碳原子合起来形成4元或5元环烷基环;[0318] V 为 $C(=O)$ 或 CH_2 ;[0319] Z^1 为 $-C(=O)-$ 或 $-SO_2-NH-C(=O)-$,其中 $-SO_2-NH-C(=O)-$ 中的 $-SO_2-$ 基团连接至 P^1 ;[0320] R^x 为不存在、 C_{1-10} 亚烷基、 C_{3-8} 环烷基、 $-(CH_2CH_2O)_{m1}-C_{1-10}$ 亚烷基-或 C_{1-10} 亚烷基- $(OCH_2CH_2)_{m2}-$;[0321] m_1 及 m_2 各自独立地为整数1至24;[0322] Z^2 为不存在、 $-C(=O)NH-$ 或 $-NH-C(=O)-$;[0323] R^y 为不存在、 C_{1-10} 亚烷基、 $-(CH_2CH_2O)_{m3}-C_{1-10}$ 亚烷基-或 C_{1-10} 亚烷基- $(OCH_2CH_2)_{m4}-$;[0324] m_3 及 m_4 各自独立地为整数1至24;[0325] Z^{s1} 为共价连接至所述CBA及所述细胞毒性化合物的双官能交联剂,其中所述交联剂经由二硫键或硫醚键共价连接至所述细胞毒性化合物;[0326] J^1 为通过使所述细胞毒性剂的胺反应性基团或硫醇反应性基团与位于CBA上的胺基或硫醇基反应而形成的部分;并且

[0327] 剩余变量如第二方面或第二十二实施方案中所定义。

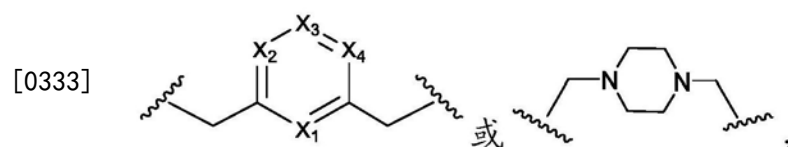
[0328] 在一个具体实施方案中,关于式(VIIId)、(VIIId)、(TC1d)或(TC2d),q为1。在一个更具体实施方案中,关于式(VIIId)、(VIIId)、(TC1d)或(TC2d),q为1;并且 R^{s1} 及 R^{s2} 均为甲基。

[0329] 在另一个具体实施方案中,关于式(VIIb)、(VIIc)、(VIIIb)、(VIIIc)、(TC1b)、(TC1c)、(TC2b)或(TC2c), R^a 为H、甲基或乙基。在一个更具体实施方案中, R^a 为H。在一个更具体实施方案中, R^a 为甲基。

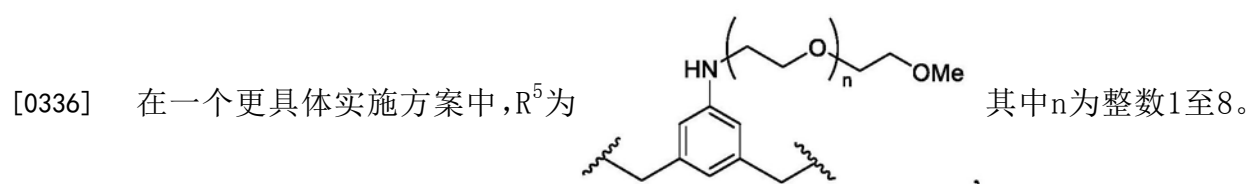
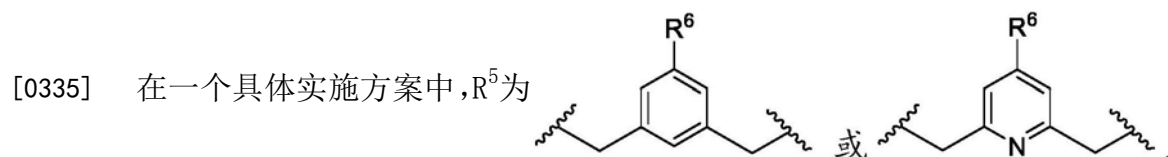
[0330] 在第二十四实施方案中,关于第二十二实施方案中所述的缀合物或其药学上可接受的盐,其中 R^{1a} 、 R^{2a} 、 R^{3a} 、 R^{4a} 、 R^{1b} 、 R^{2b} 、 R^{3b} 及 R^{4b} 均为H;并且剩余变量如第二方面或第二十二或第二十三实施方案或其中所述的任何特定实施方案中所定义。

[0331] 在第二十五实施方案中,关于第二十二或第二十三实施方案的缀合物或其药学上可接受的盐,其中 R^5 为 C_{3-7} 亚烷基;并且剩余变量如第二方面或第二十二、第二十三或第二十四实施方案或其中所述的任何特定实施方案中所定义。在一个具体实施方案中, R^5 为 $-(CH_2)_3-$ 、 $-(CH_2)_5-$ 或 $-(CH_2)_7-$ 。在一个更具体实施方案中, R^5 为 $-(CH_2)_7-$ 。在一个更具体实施方案中, R^5 为 $-(CH_2)_5-$ 。在一个更具体实施方案中, R^5 为 $-(CH_2)_3-$ 。

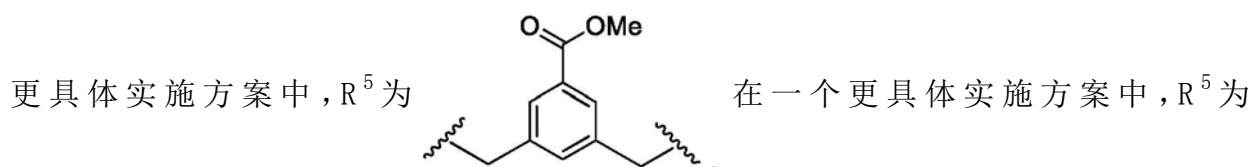
[0332] 在第二十六实施方案中,关于第二十二或第二十三实施方案的缀合物或其药学上可接受的盐,其中 R^5 由下式表示:

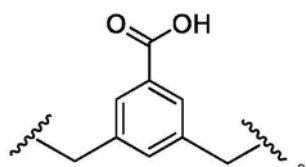


[0334] 其中 X_1 、 X_2 、 X_3 及 X_4 各自独立地为N或 CR^6 ,限制条件在于 X_1 、 X_2 、 X_3 及 X_4 中的至少一者为 CR^6 ;并且剩余变量如第二方面或第二十二、第二十三或第二十四实施方案或其中所述的任何特定实施方案中所定义。

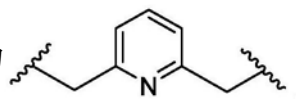


在一个更具体实施方案中,n为1、2、3或4。在一个更具体实施方案中,n为1。在一个更具体实施方案中,n为2。在一个更具体实施方案中,n为3。在一个更具体实施方案中,n为4。在一个



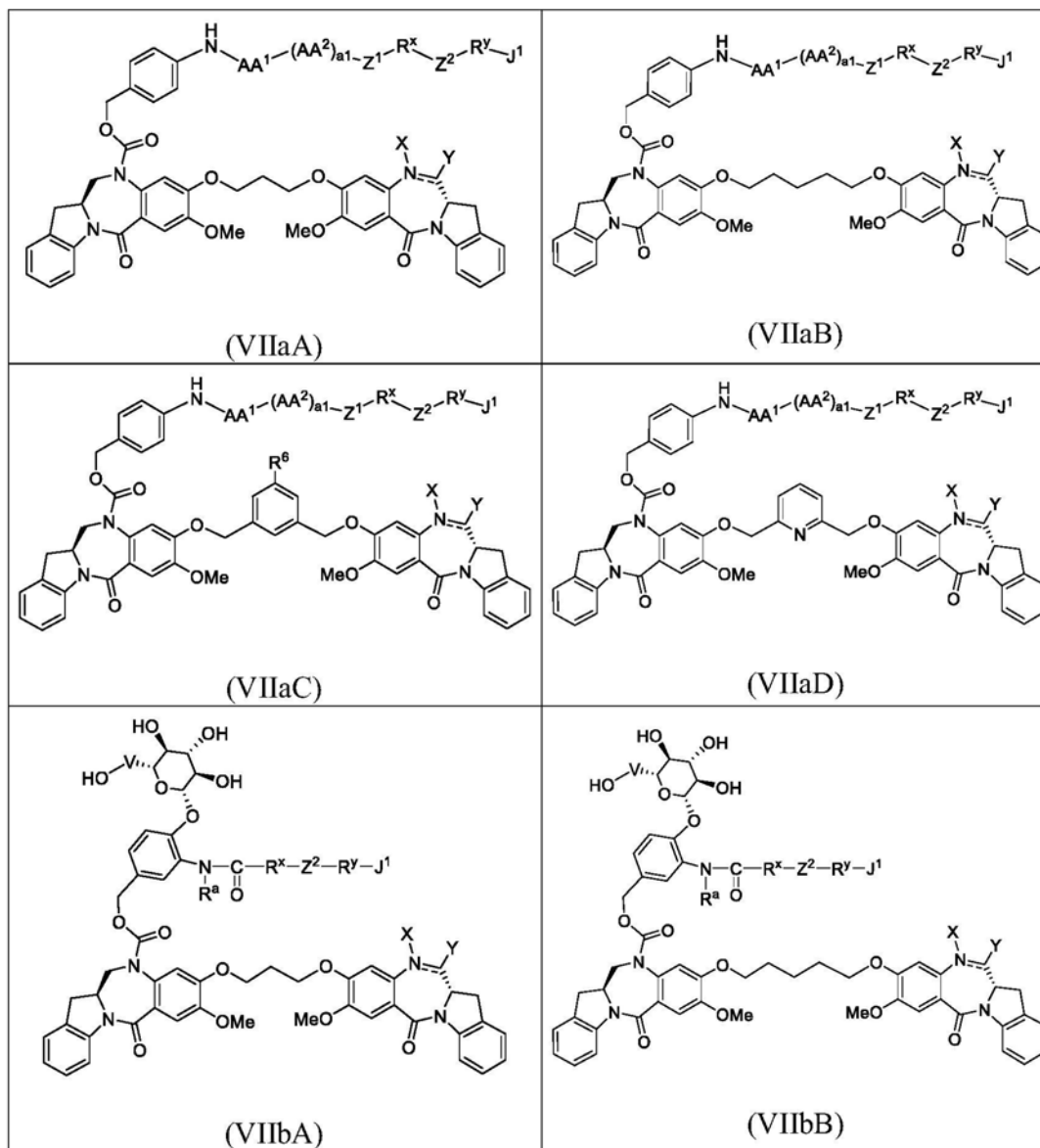


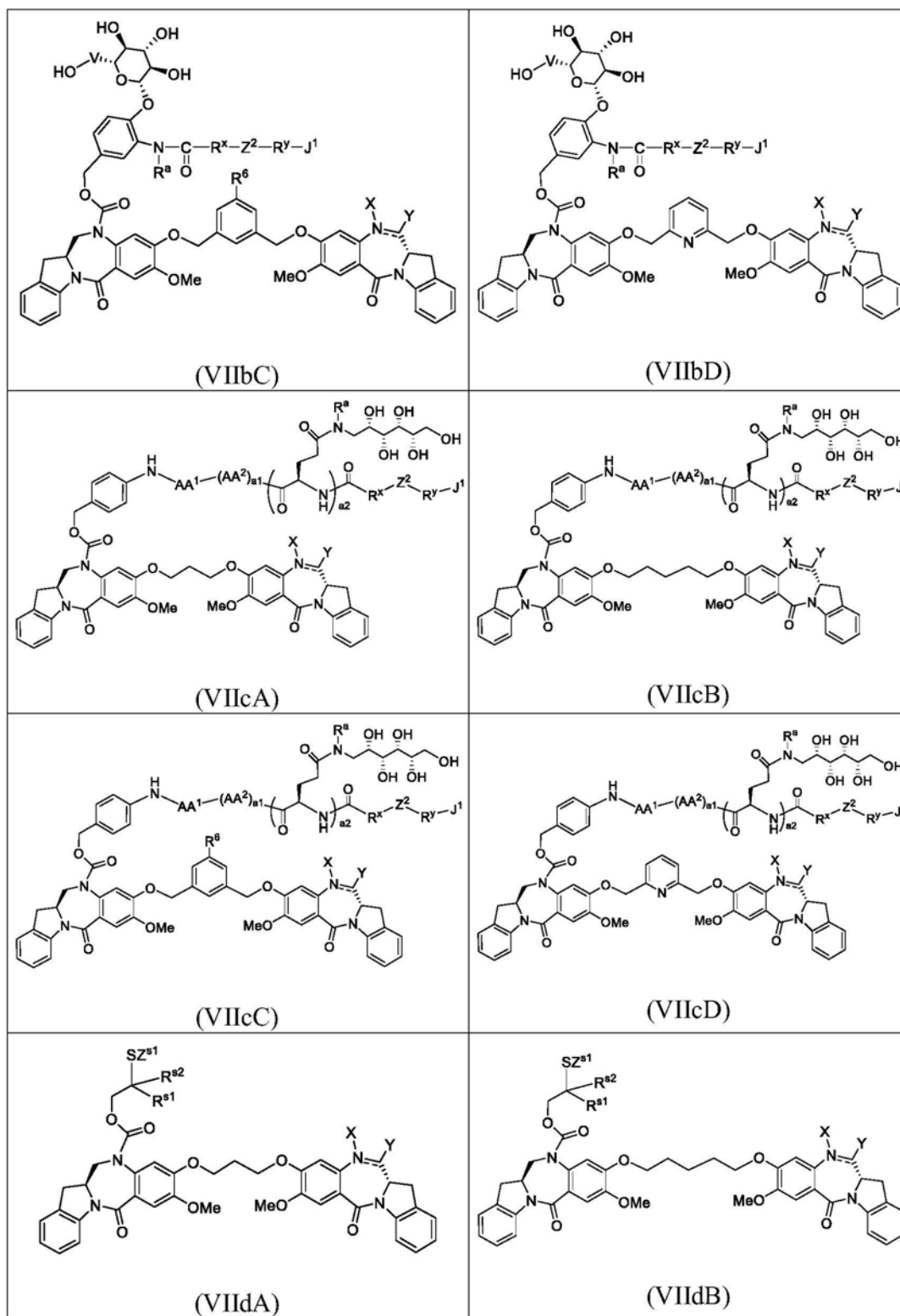
在另一个更具具体实施方案中, R^5 为



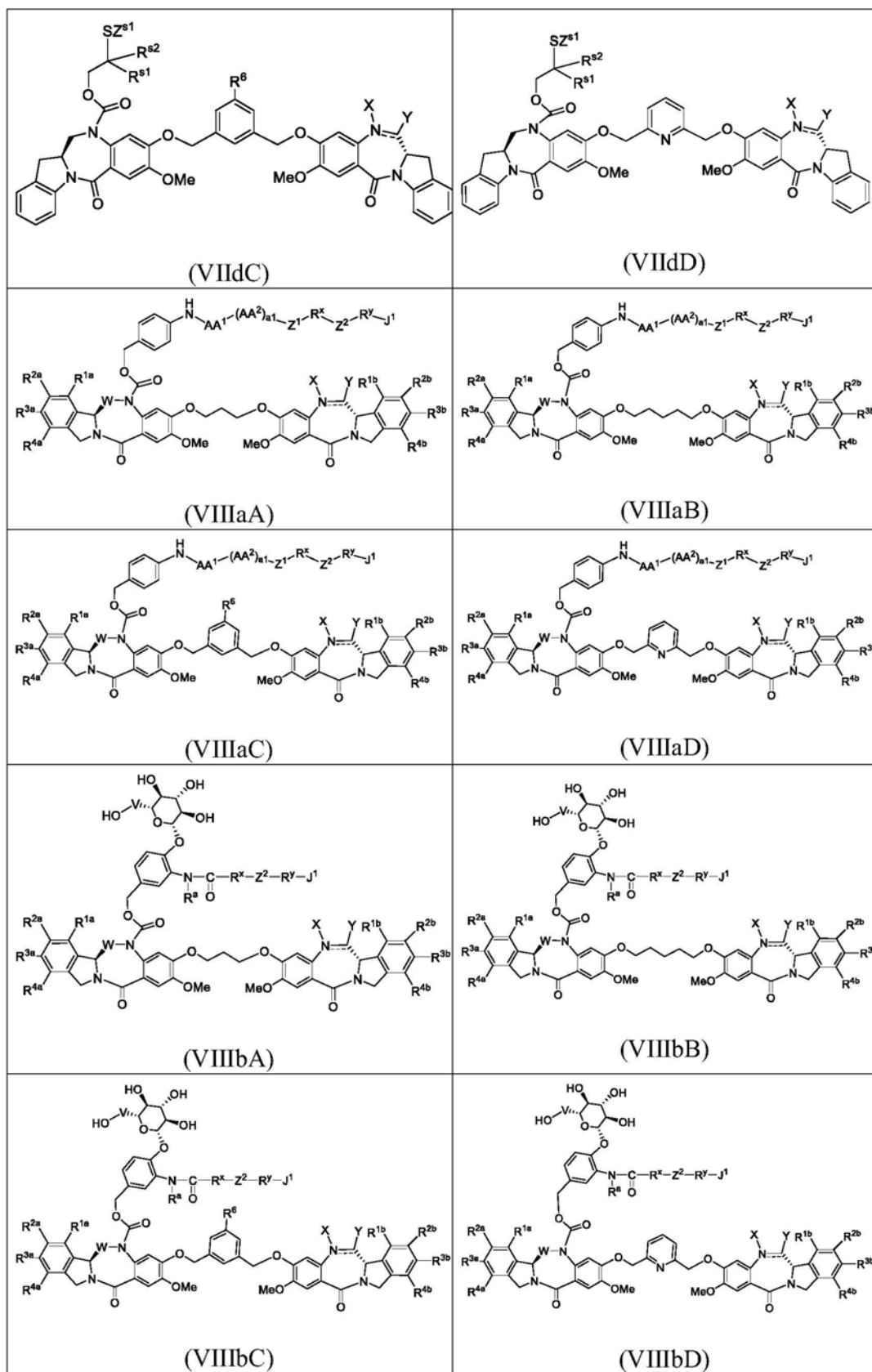
[0337] 在第二十七实施方案中, 关于第二十三实施方案的缀合物或其药学上可接受的盐, Cy由表F中的以下各式之一表示:

[0338]



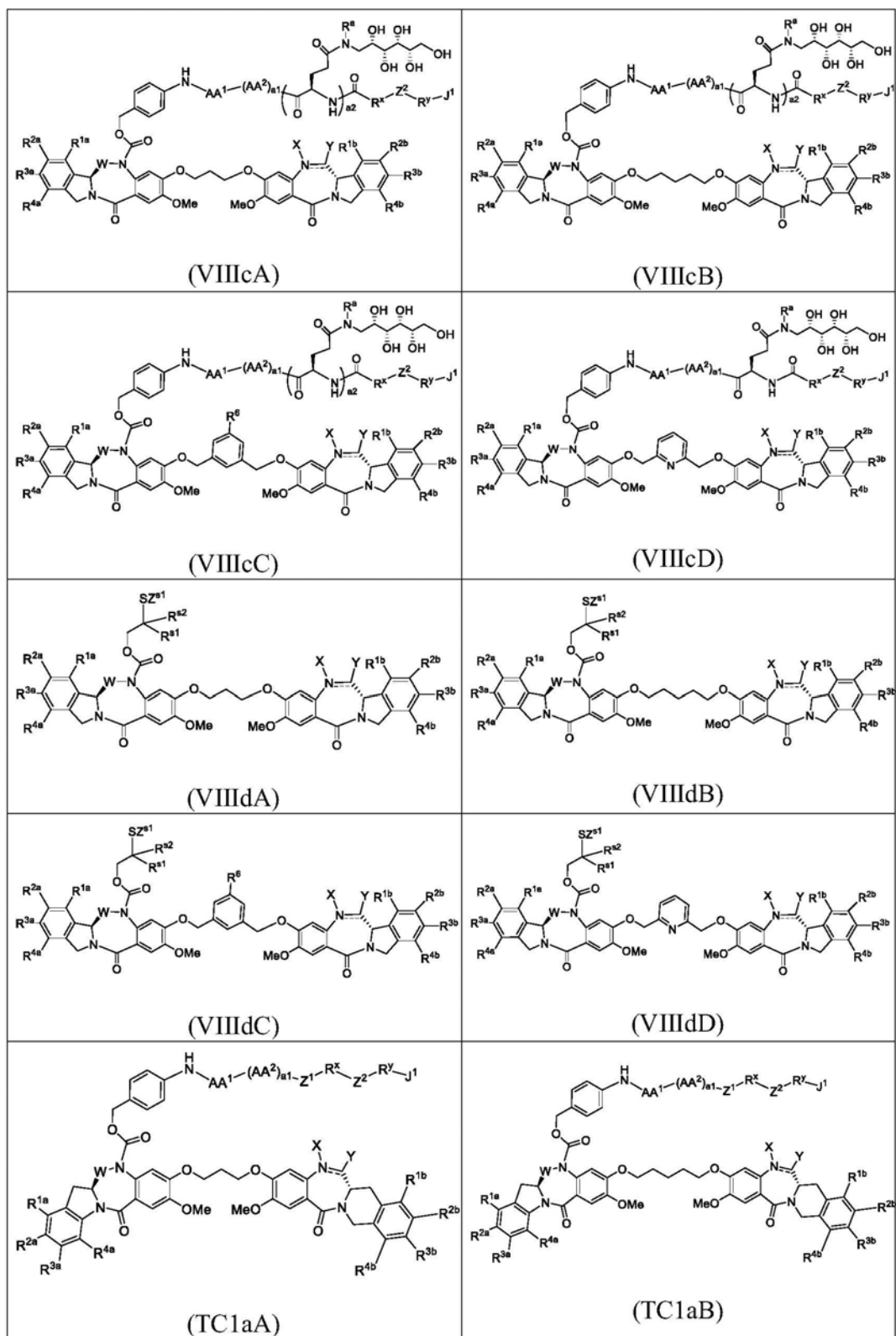


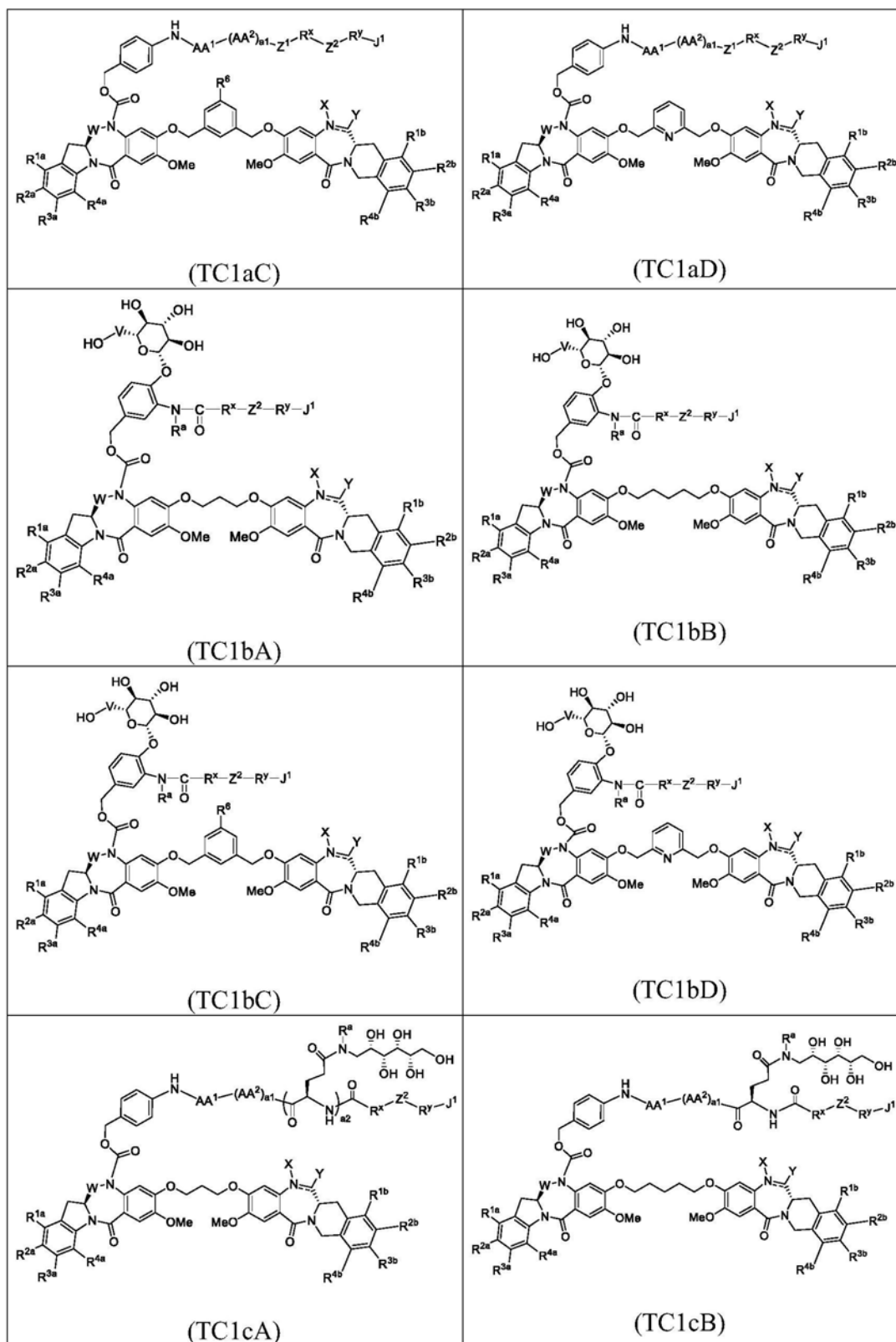
[0339]



[0340]

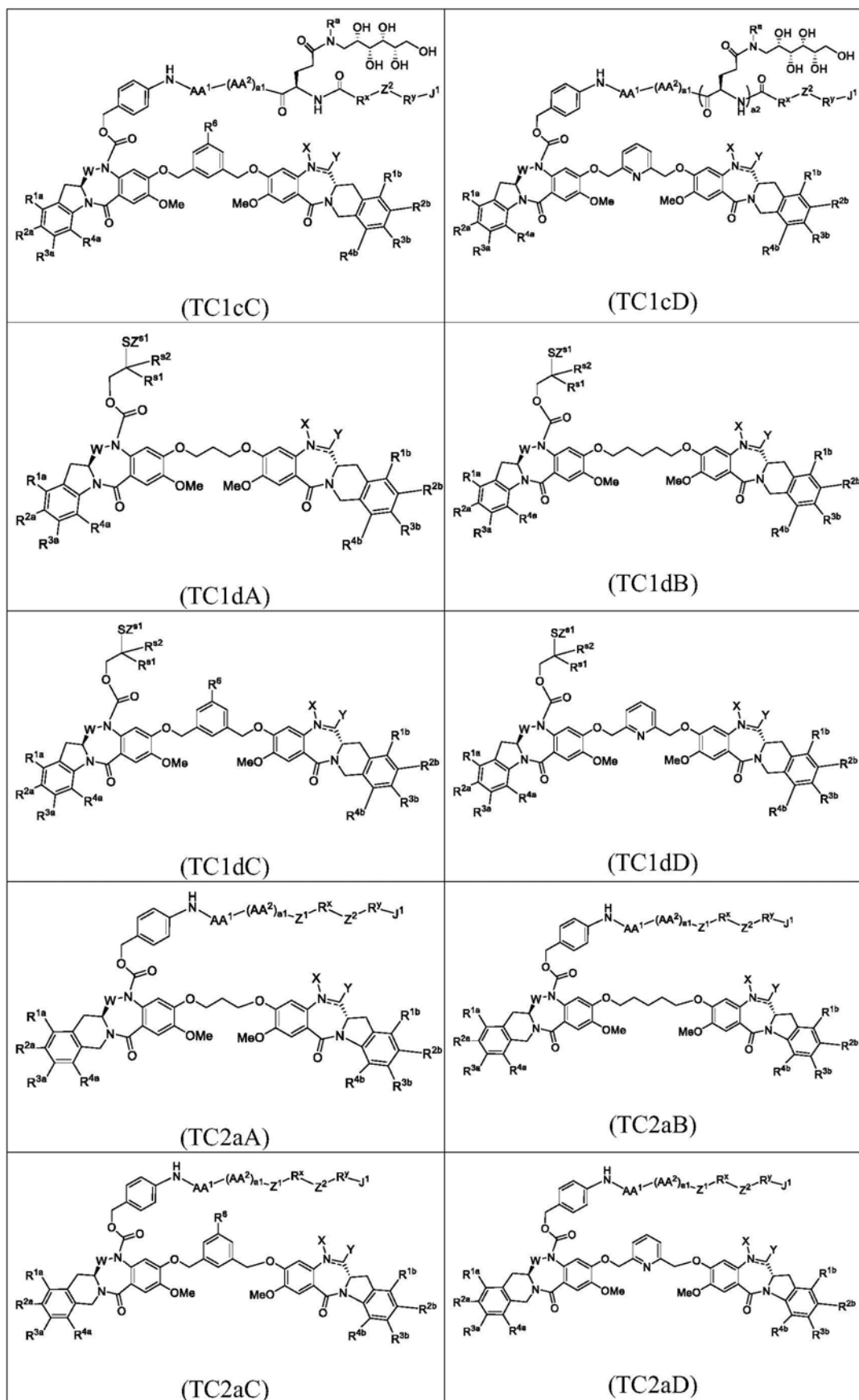
[0341]



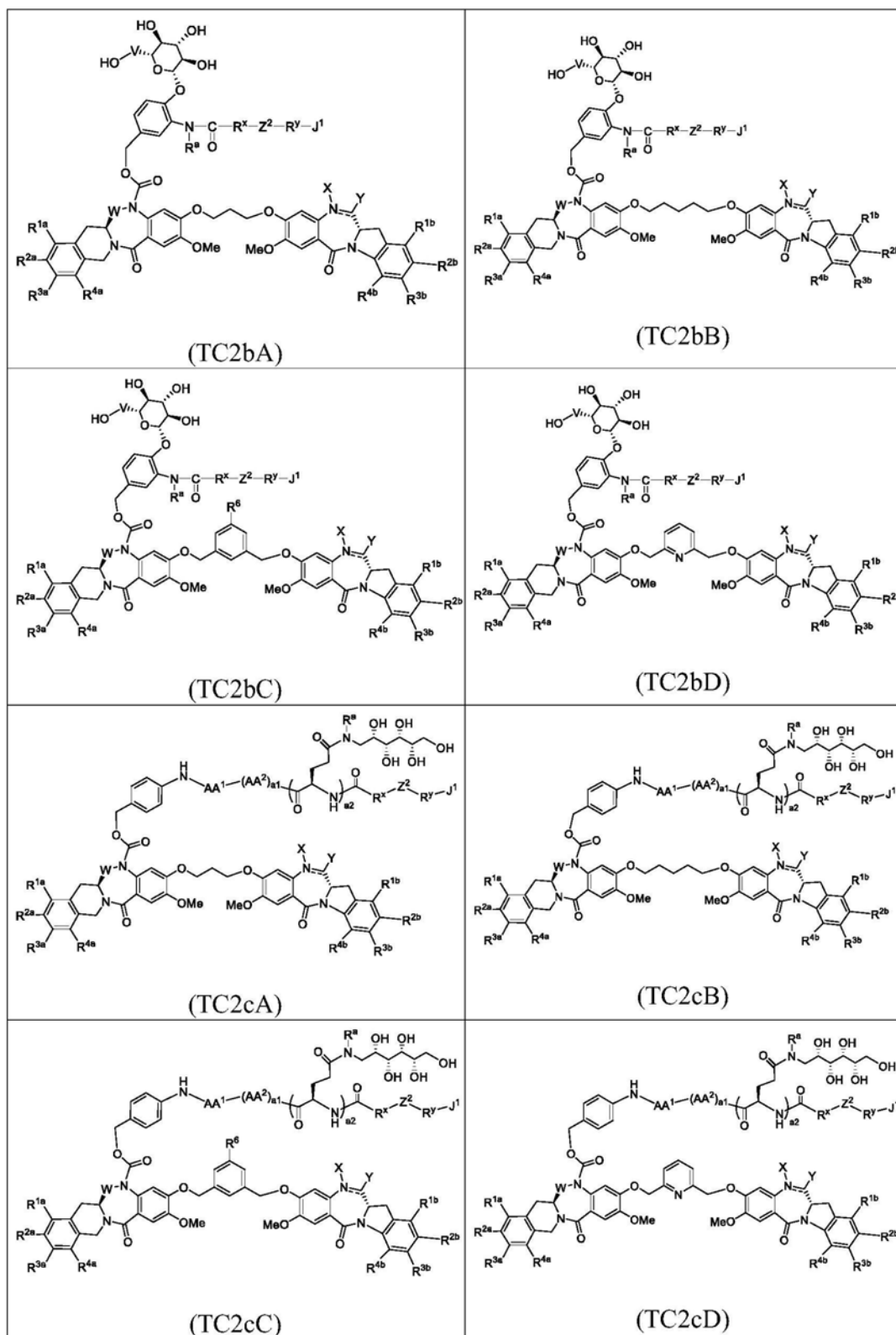


[0342]

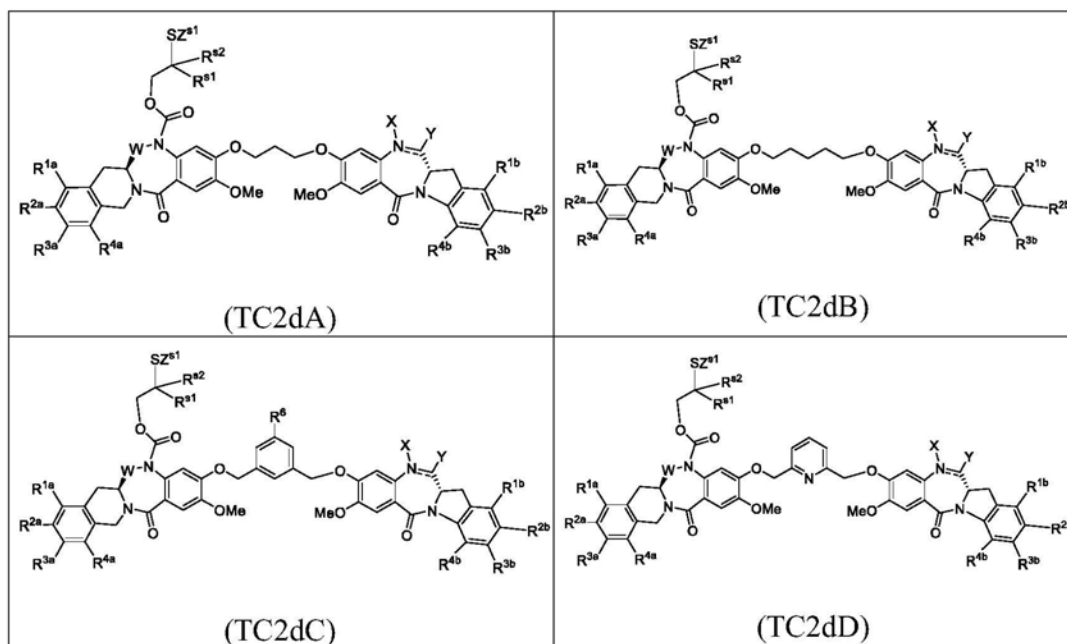
[0343]



[0344]



[0345]



[0346] 或其药学上可接受的盐,其中剩余变量如第二方面或第二十三实施方案或其中所述的任何特定实施方案中所定义。

[0347] 在第二十八实施方案中,关于第二十三至第二十七实施方案中所述的缀合物或其药学上可接受的盐, Z^1 为 $-C(=O)-$;并且剩余变量如第二方面或第二十三、第二十四、第二十五、第二十六或第二十七实施方案或其中所述的任何特定实施方案中所定义。

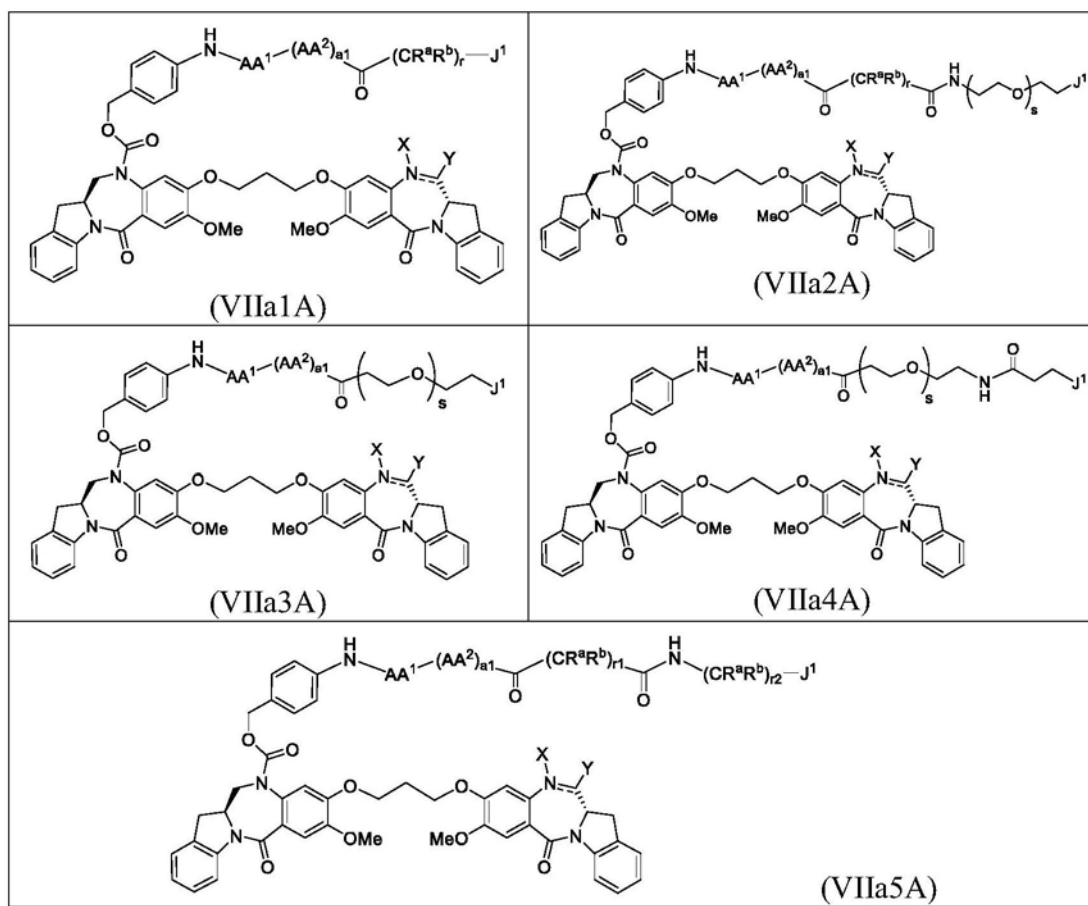
[0348] 在第二十九实施方案中,关于第二十三至第二十八实施方案中所述的缀合物或其药学上可接受的盐, R^x 为 C_{1-6} 亚烷基; Z^2 及 R^y 均不存在;并且剩余变量如第二方面或第二十三、第二十四、第二十五、第二十六、第二十七或第二十八实施方案或其中所述的任何特定实施方案中所定义。在另一个实施方案中, R^x 、 Z^2 及 R^y 不存在;并且剩余变量如第二十三、第二十四、第二十五、第二十六、第二十七或第二十八实施方案或其中所述的任何特定实施方案中所定义。

[0349] 在第三十实施方案中,关于第二十三至第二十八实施方案中所述的缀合物或其药学上可接受的盐, R^x 为 $-(CH_2CH_2O)_{m1}-C_{1-6}$ 亚烷基-; Z^2 为 $-NH-C(=O)-$ 或 $-C(=O)-NH-$; R^y 为 C_{1-6} 亚烷基;并且剩余变量如第二方面或第二十三、第二十四、第二十五、第二十六、第二十七或第二十八实施方案或其中所述的任何特定实施方案中所定义。

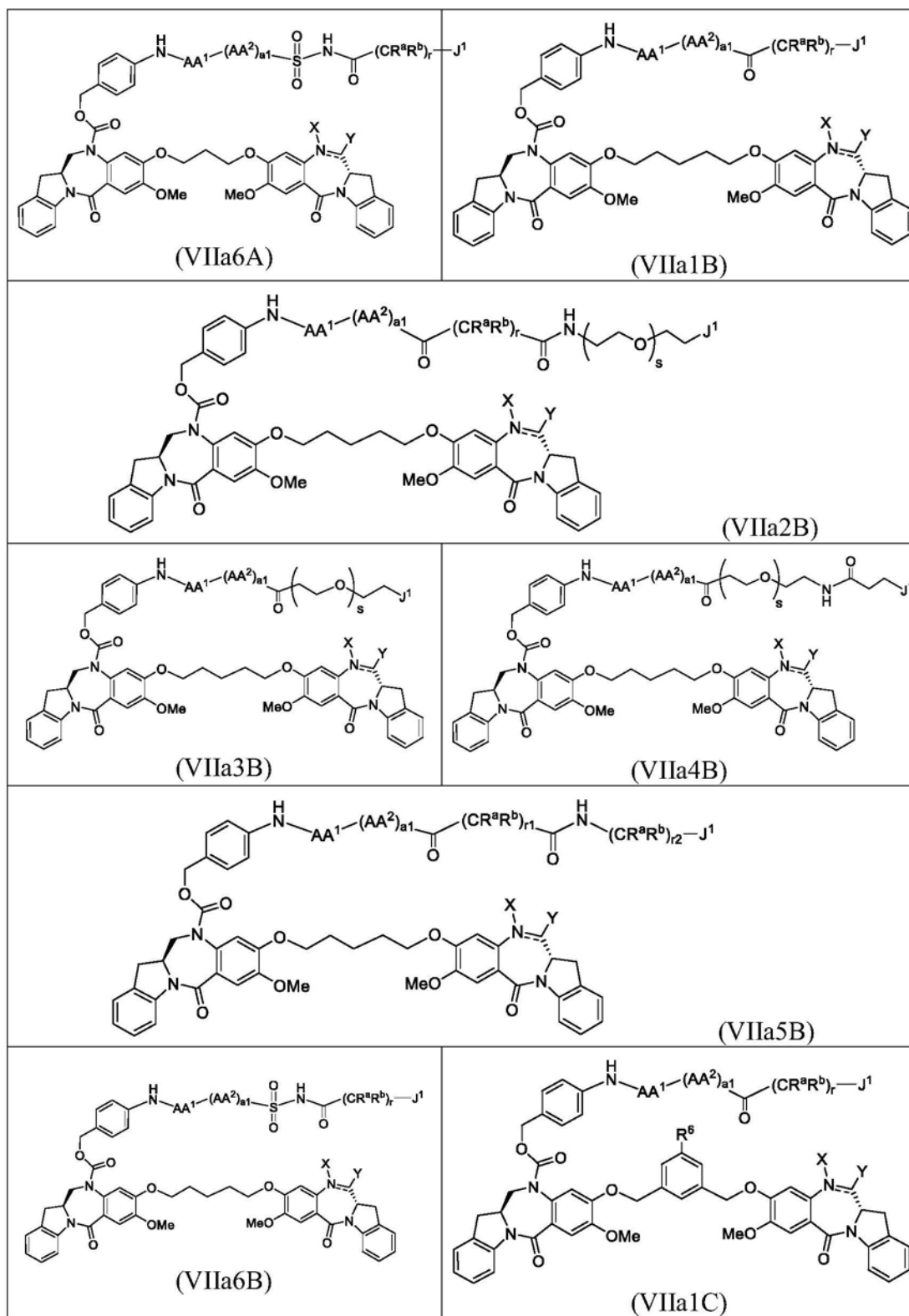
[0350] 在第三十一个实施方案中,关于第二十三至第二十八实施方案中所述的缀合物或其药学上可接受的盐, R^x 为 C_{1-6} 亚烷基; Z^2 为 $-NH-C(=O)-$ 或 $-C(=O)-NH-$; R^y 为 $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C_{1-6}$ 亚烷基-;并且剩余变量如第二方面或第二十三、第二十四、第二十五、第二十六、第二十七或第二十八实施方案或其中所述的任何特定实施方案中所定义。

[0351] 在第三十二实施方案中,关于第二十七实施方案的缀合物或其药学上可接受的盐,Cy由表G中的以下各式之一表示:

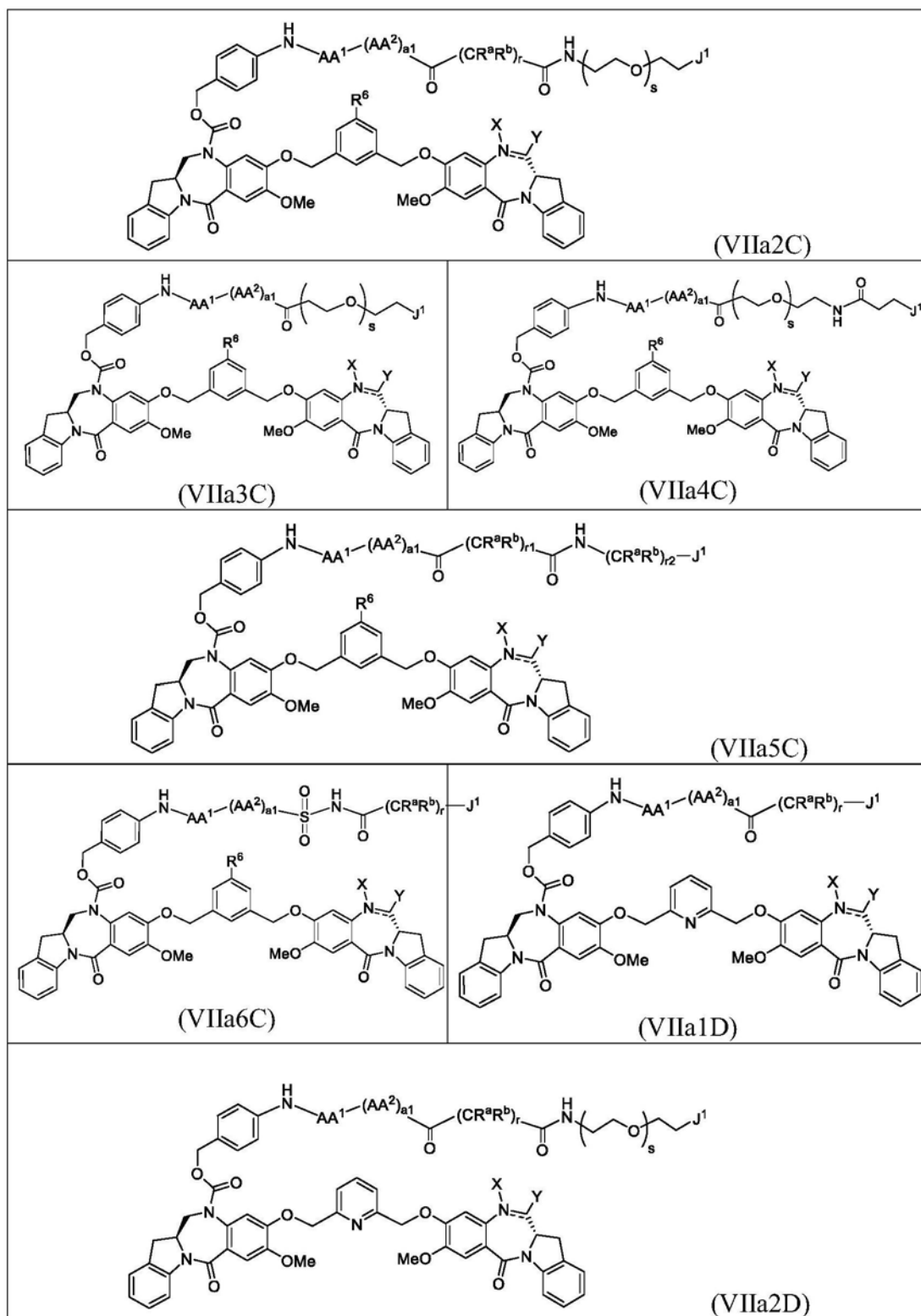
[0352]

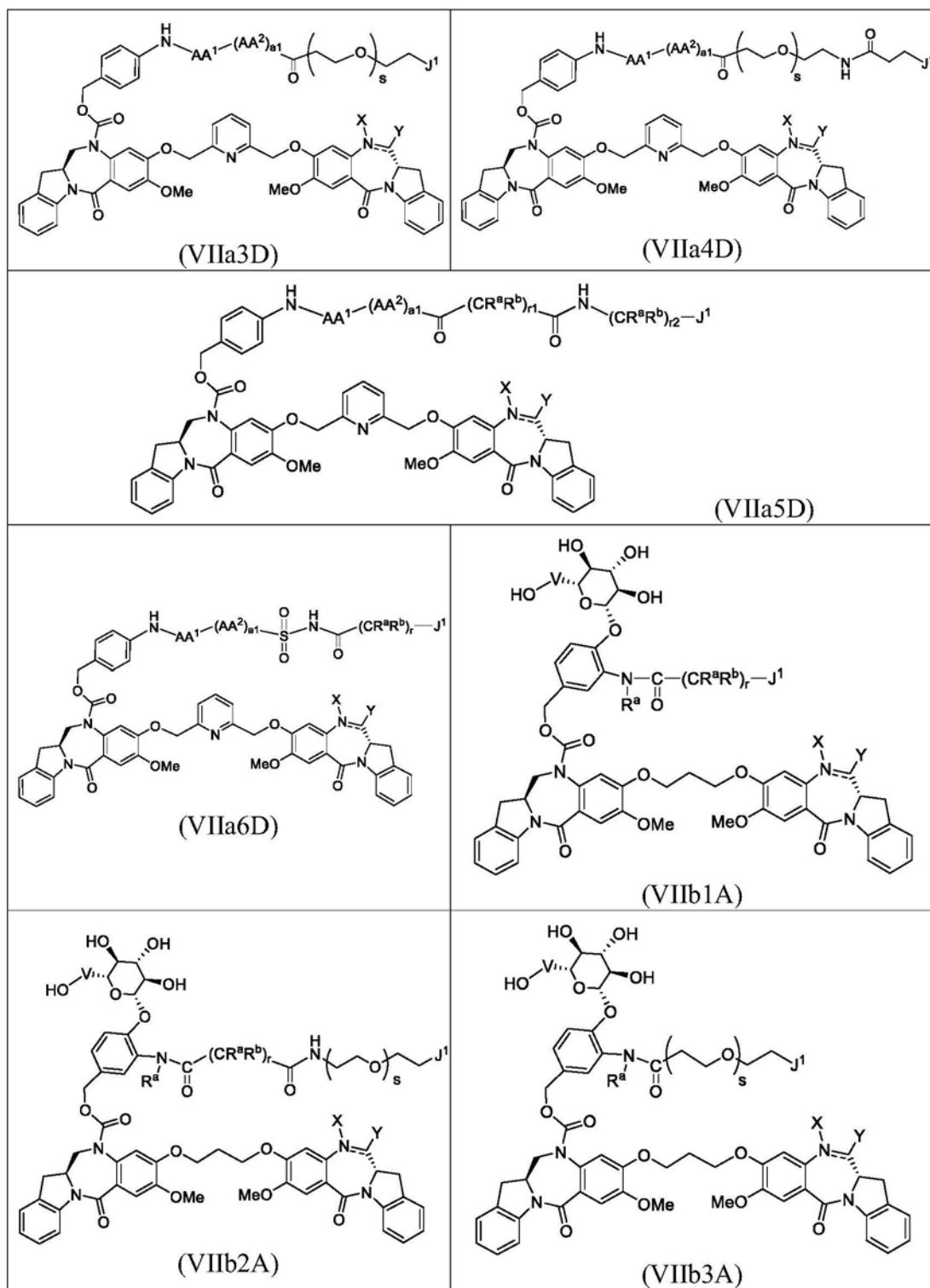


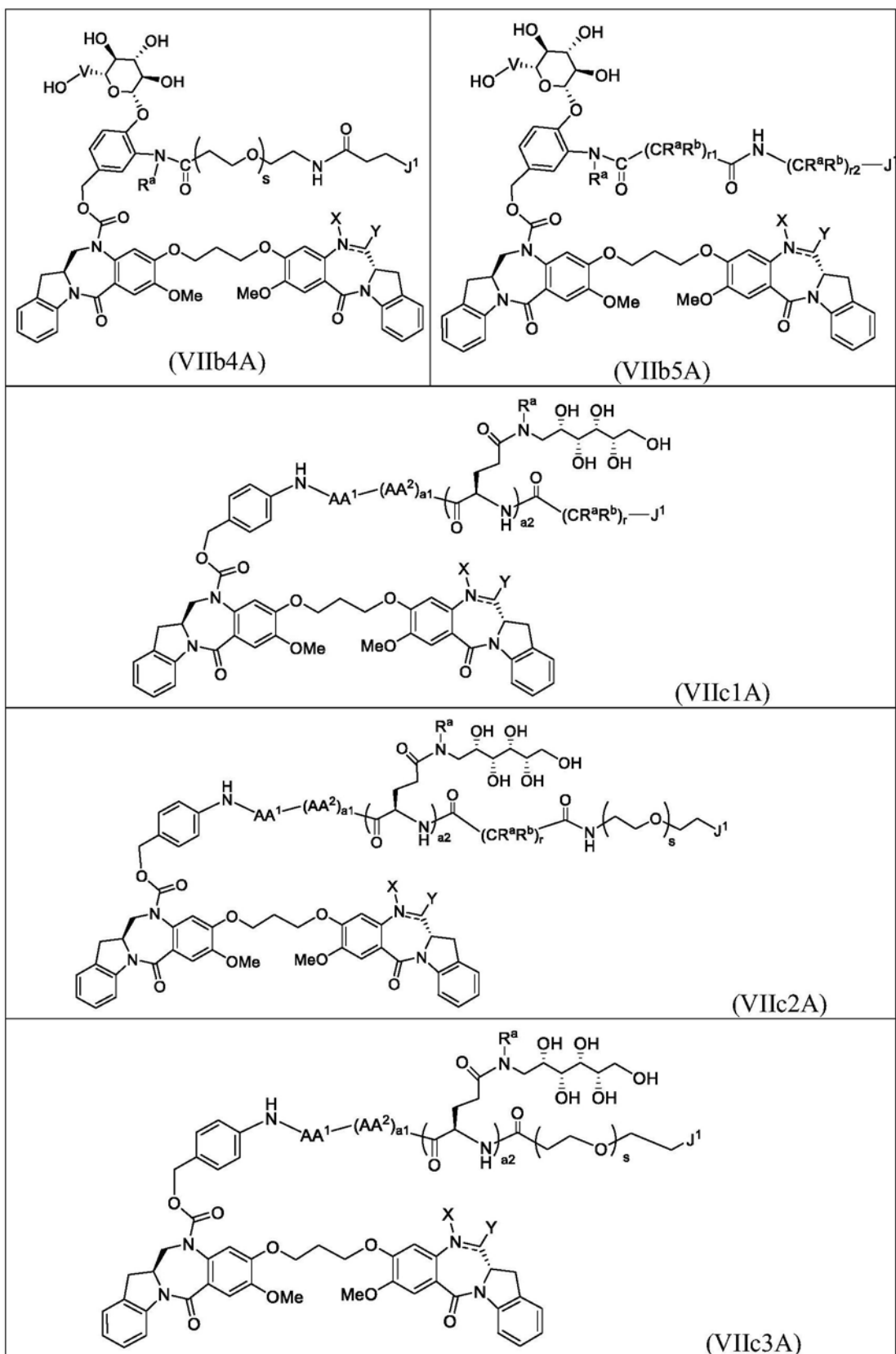
[0353]



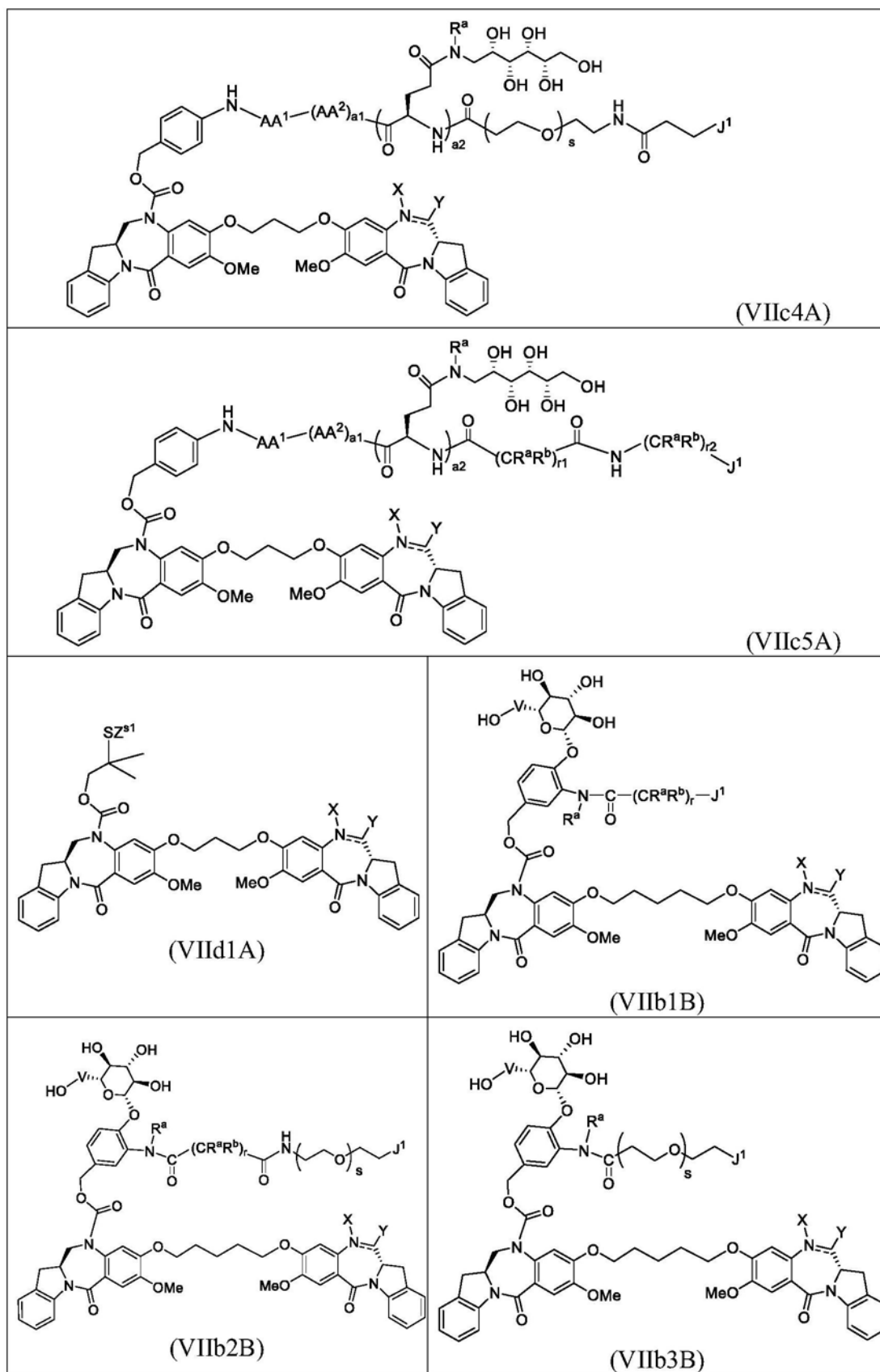
[0354]



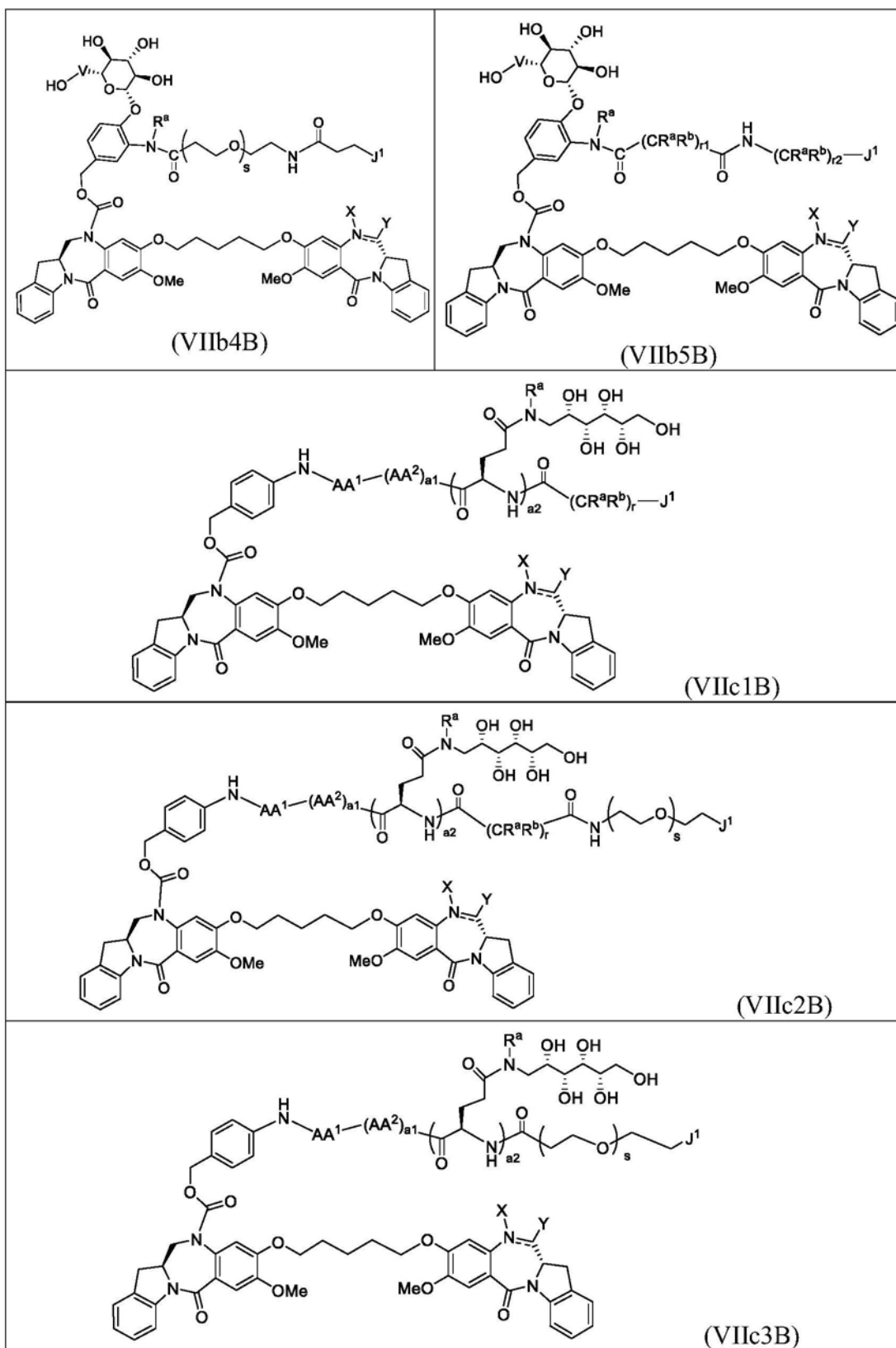


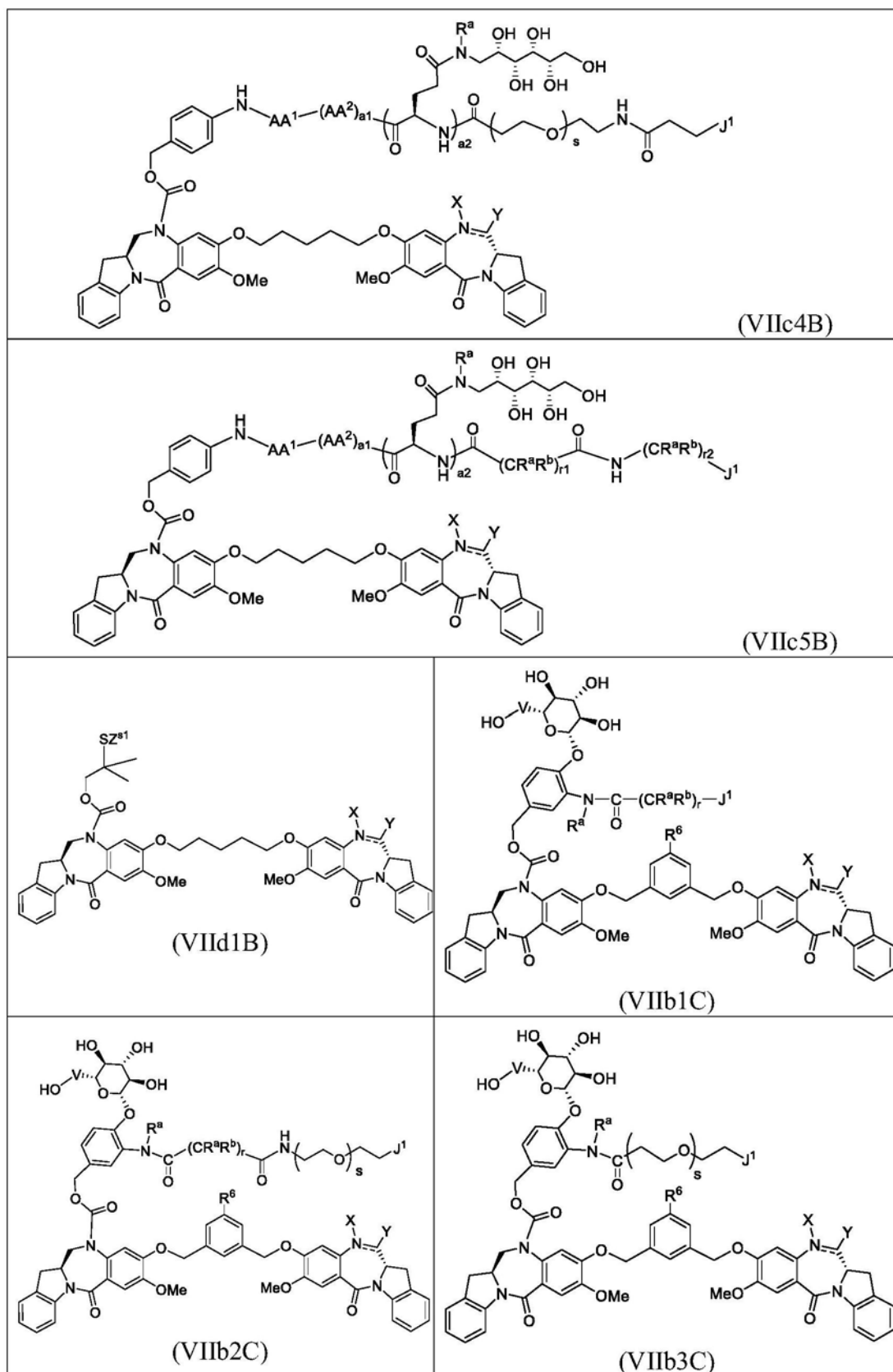


[0356]

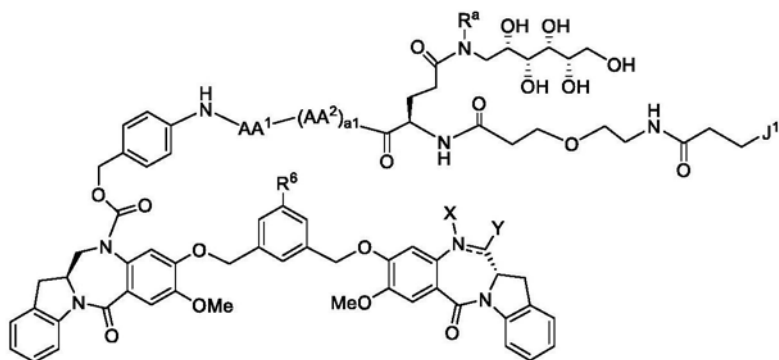


[0357]

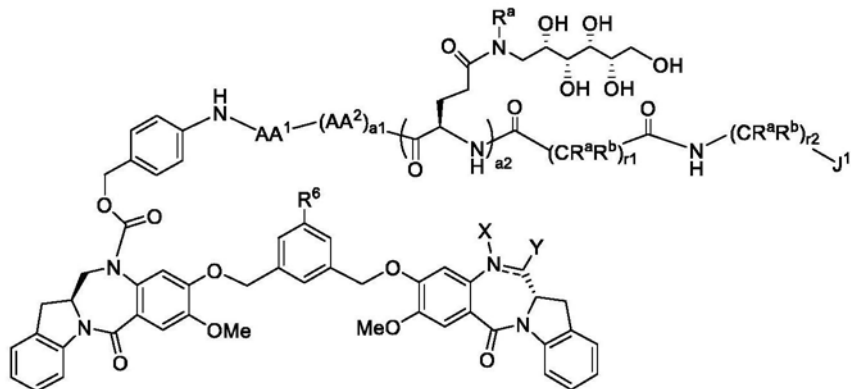




[0359]

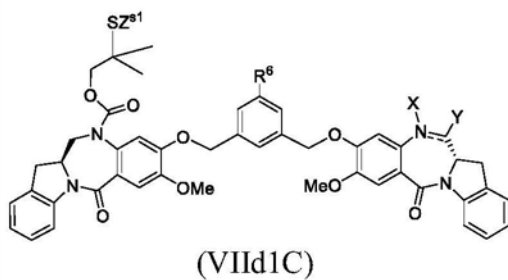


(VIIc4C)

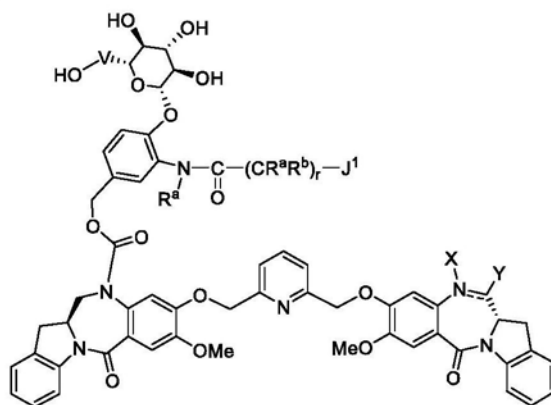


(VIIc5C)

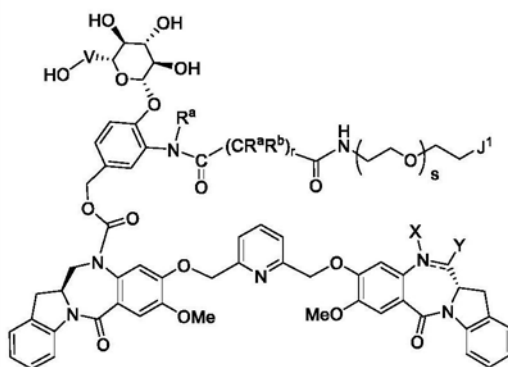
[0361]



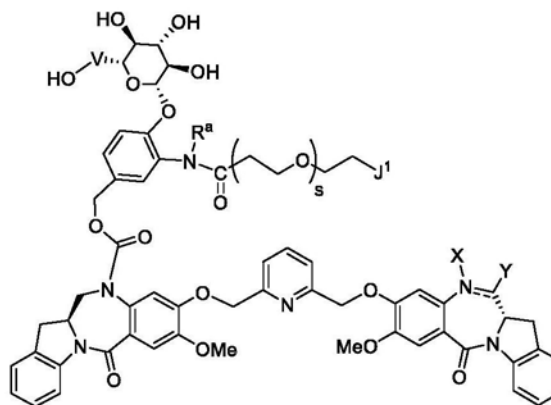
(VIIId1C)



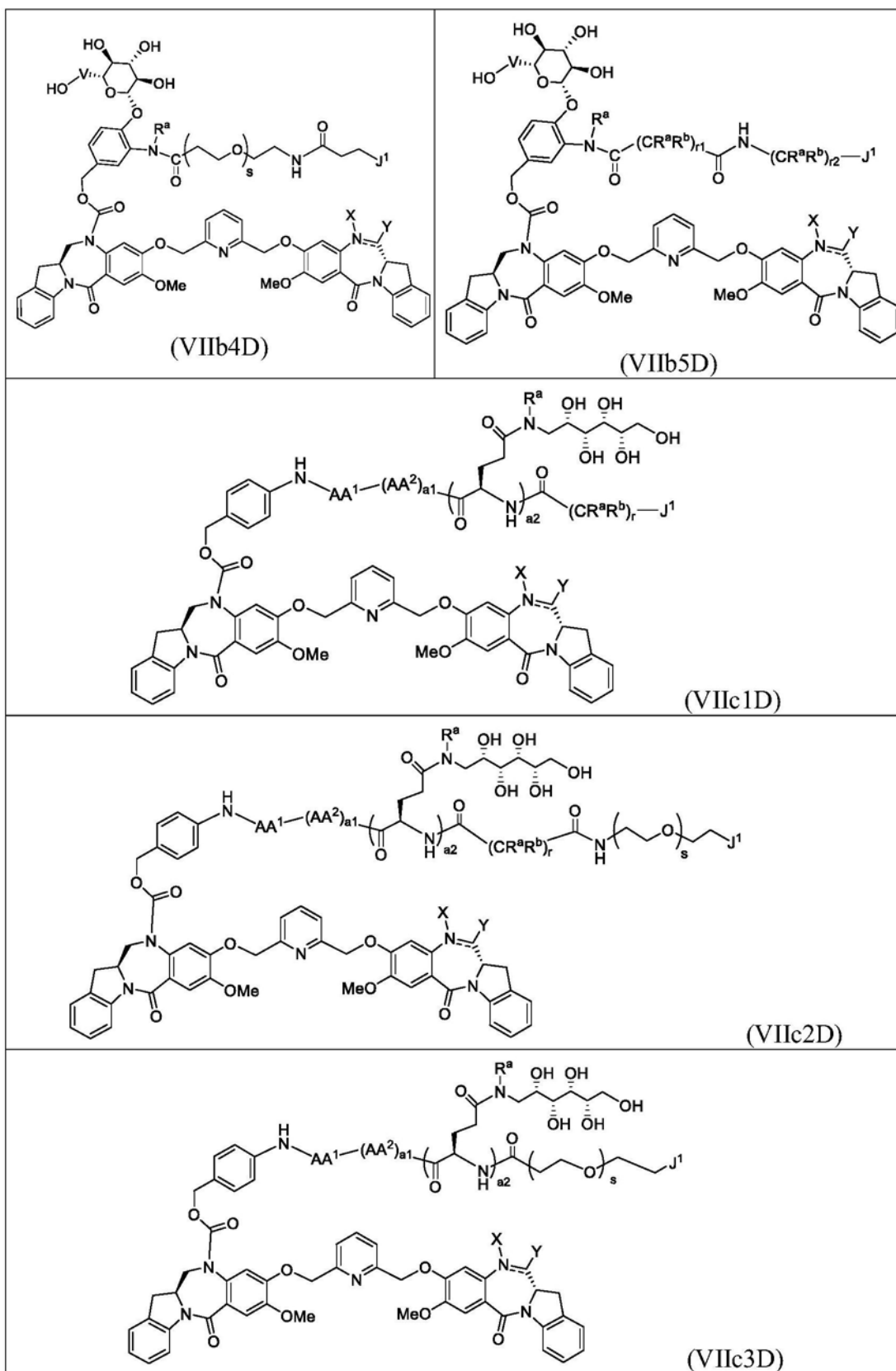
(VIIb1D)



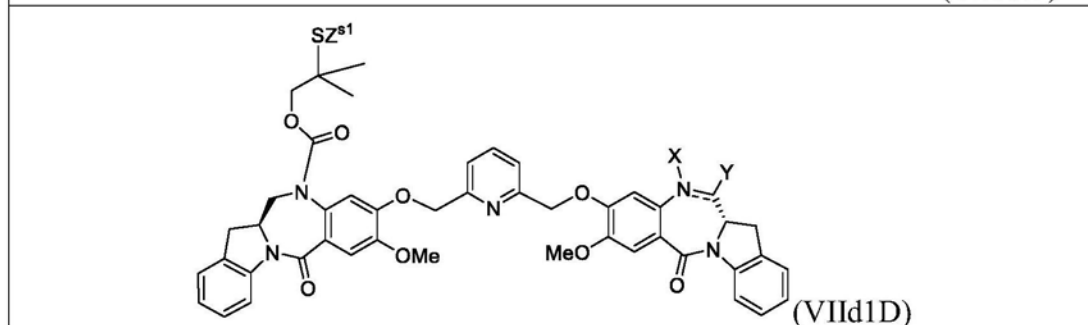
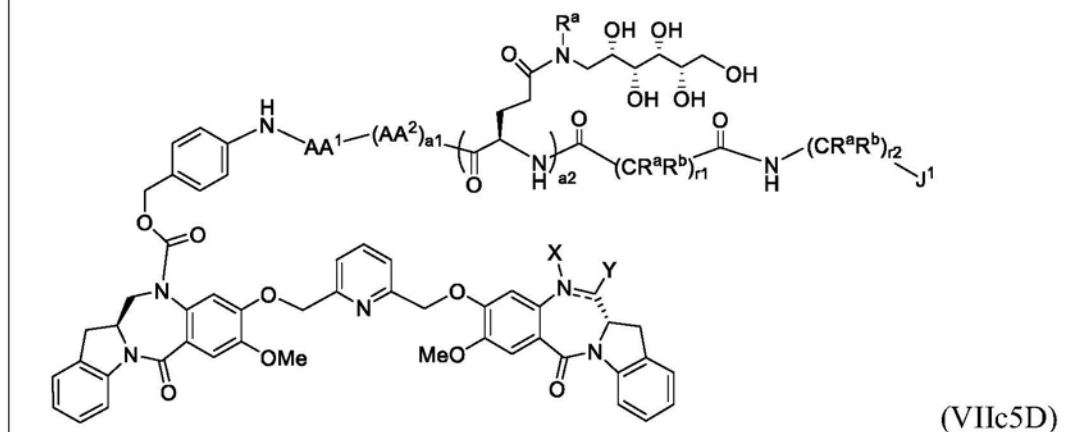
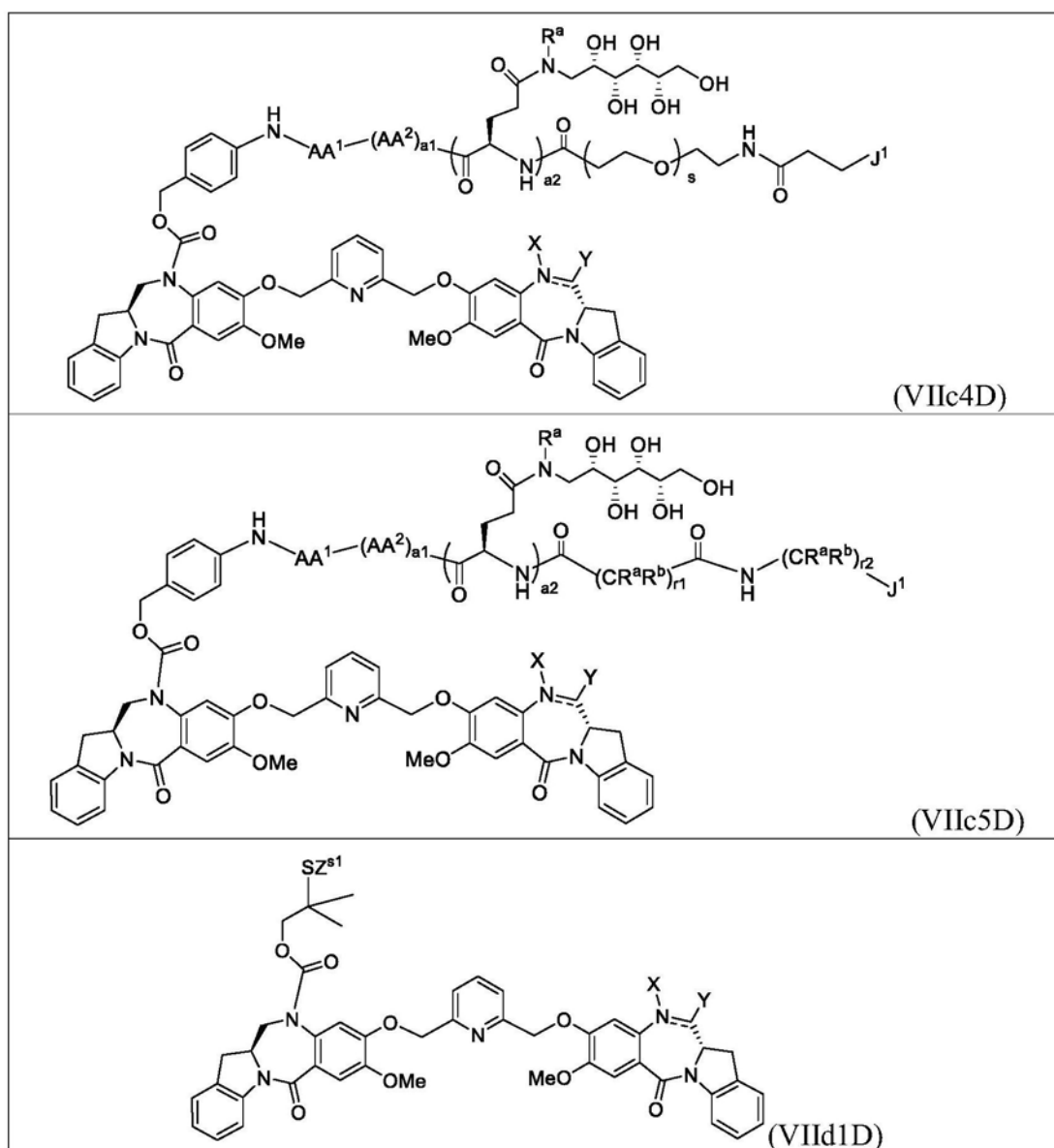
(VIIb2D)



(VIIb3D)



[0363]

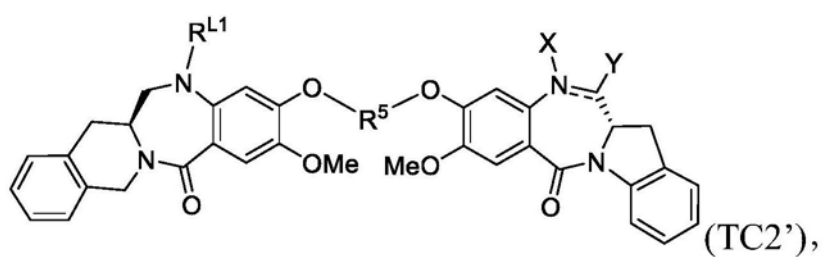
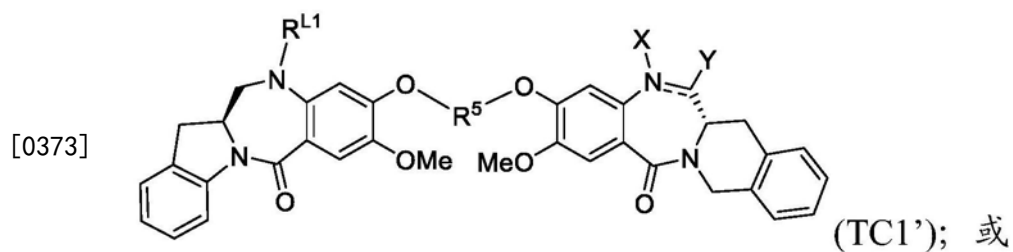
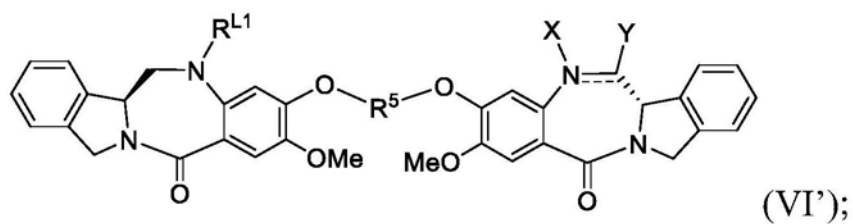


[0364] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0365] R^6 为 $-C(=O)OR^{6a}$ 或 $-NR^{6b}(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR^{6c}$;[0366] R^{6a} 、 R^{6b} 及 R^{6c} 各自独立地为 H 或 C_{1-4} 烷基;[0367] n 为整数 1 至 8;[0368] R^a 及 R^b 在每次出现时独立地为 H 或 C_{1-4} 烷基;[0369] r 、 r_1 及 r_2 各自独立地为整数 2 至 6;[0370] s 为整数 2 至 12; 并且

[0371] 剩余变量如第二方面或第二十七实施方案中所定义。

[0372] 第三十二实施方案中还包括第二方面的缀合物,其中 Cy 由下式表示:

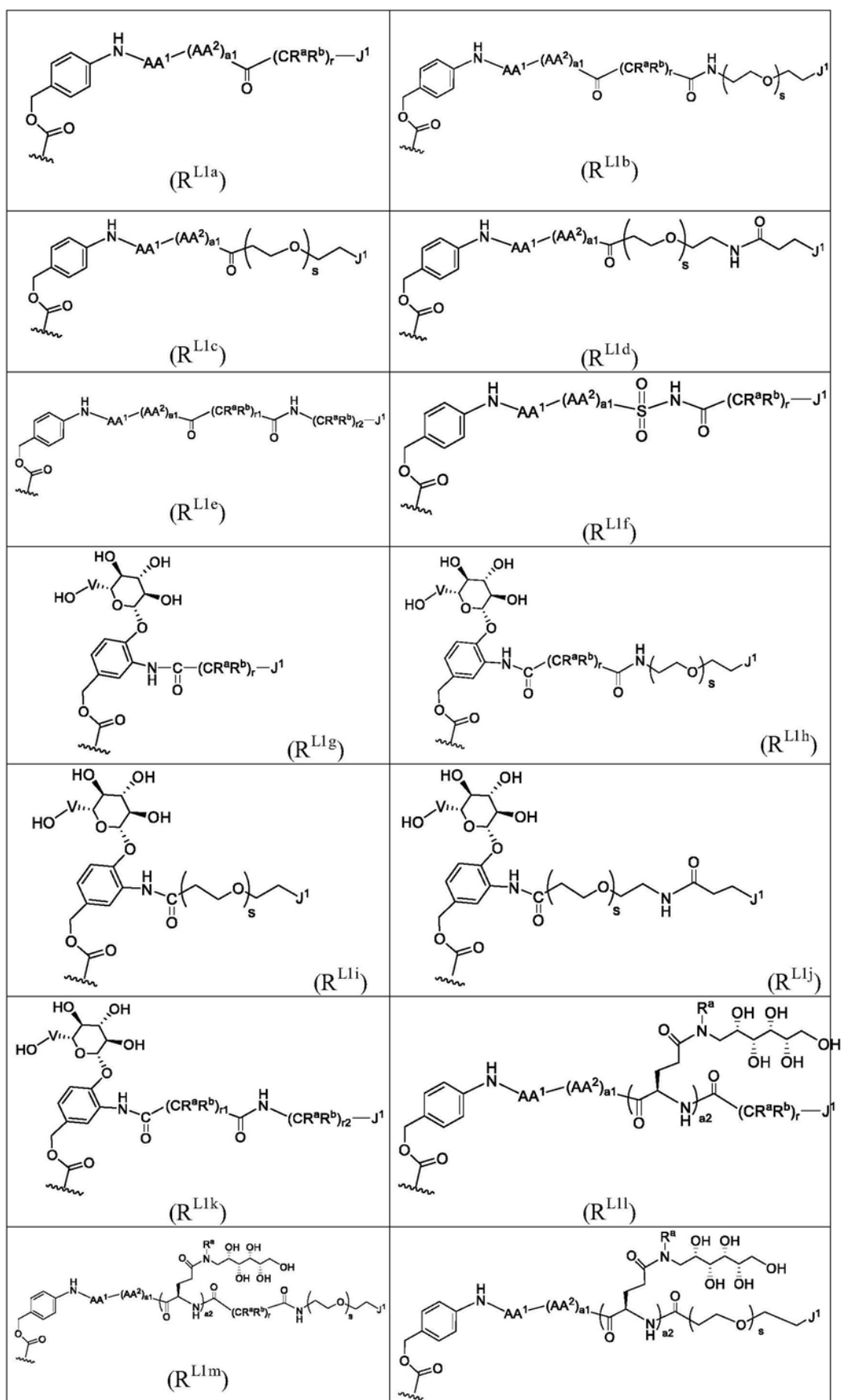


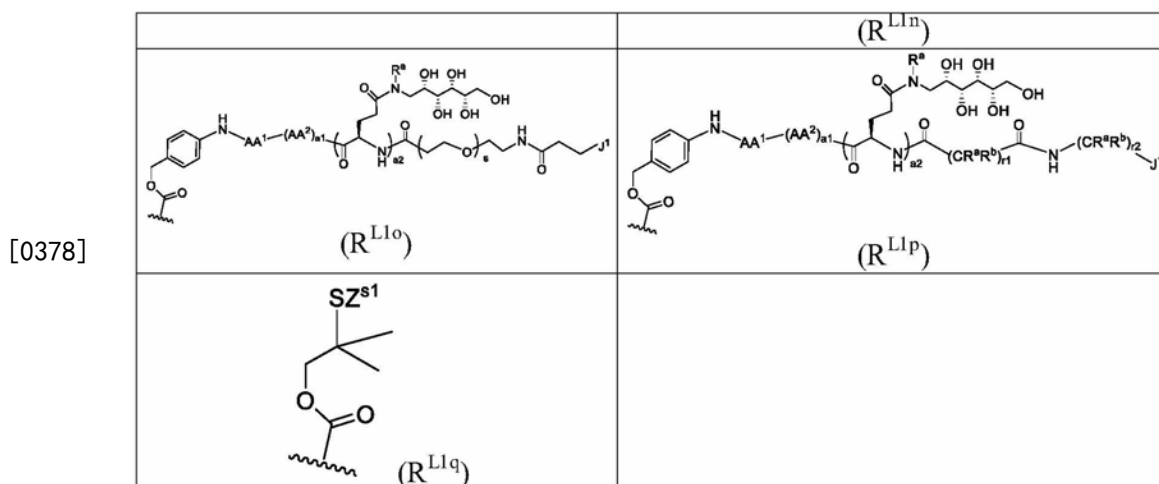
[0374] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0375] N与C之间的双线 $\equiv$ 表示单键或双键,限制条件在于当其为双键时,X不存在且Y为H或C₁₋₄烷基,且当其为单键时,X为H且Y为-SO₃H;

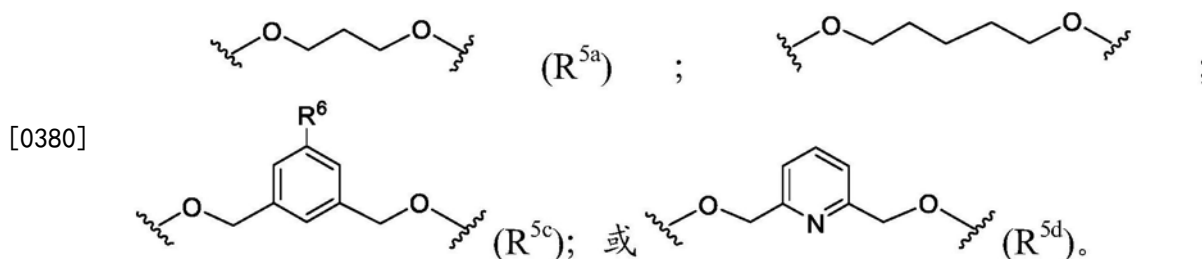
[0376] R^{L1}由下式中的任一者表示:

[0377]





[0379] R⁵由以下各式之一表示：



[0381] R^{L1}及R⁵的任何组合均包括于本发明中。

[0382] 在第三十三实施方案中,关于第三十二实施方案的缀合物或其药学上可接受的盐,其中:

[0383] R^{6a}及R^{6c}均为Me;

[0384] R^{6b}为H;

[0385] n为1、2、3或4;

[0386] R^a及R^b在每次出现时独立地为H或Me;

[0387] r为4;

[0388] r1为4;

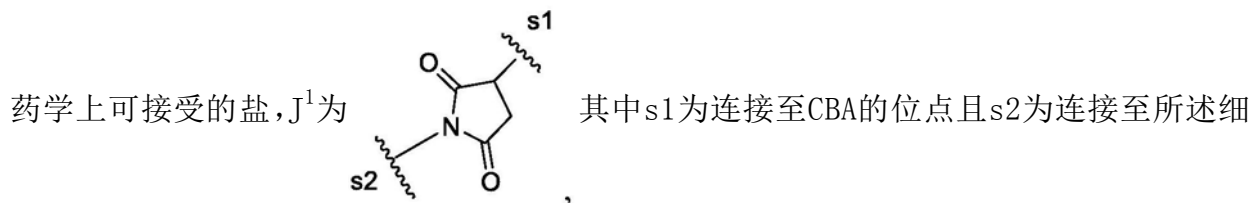
[0389] r2为2;

[0390] s为1、2、3或4;并且

[0391] 剩余变量如第二方面或第三十二实施方案中所定义。

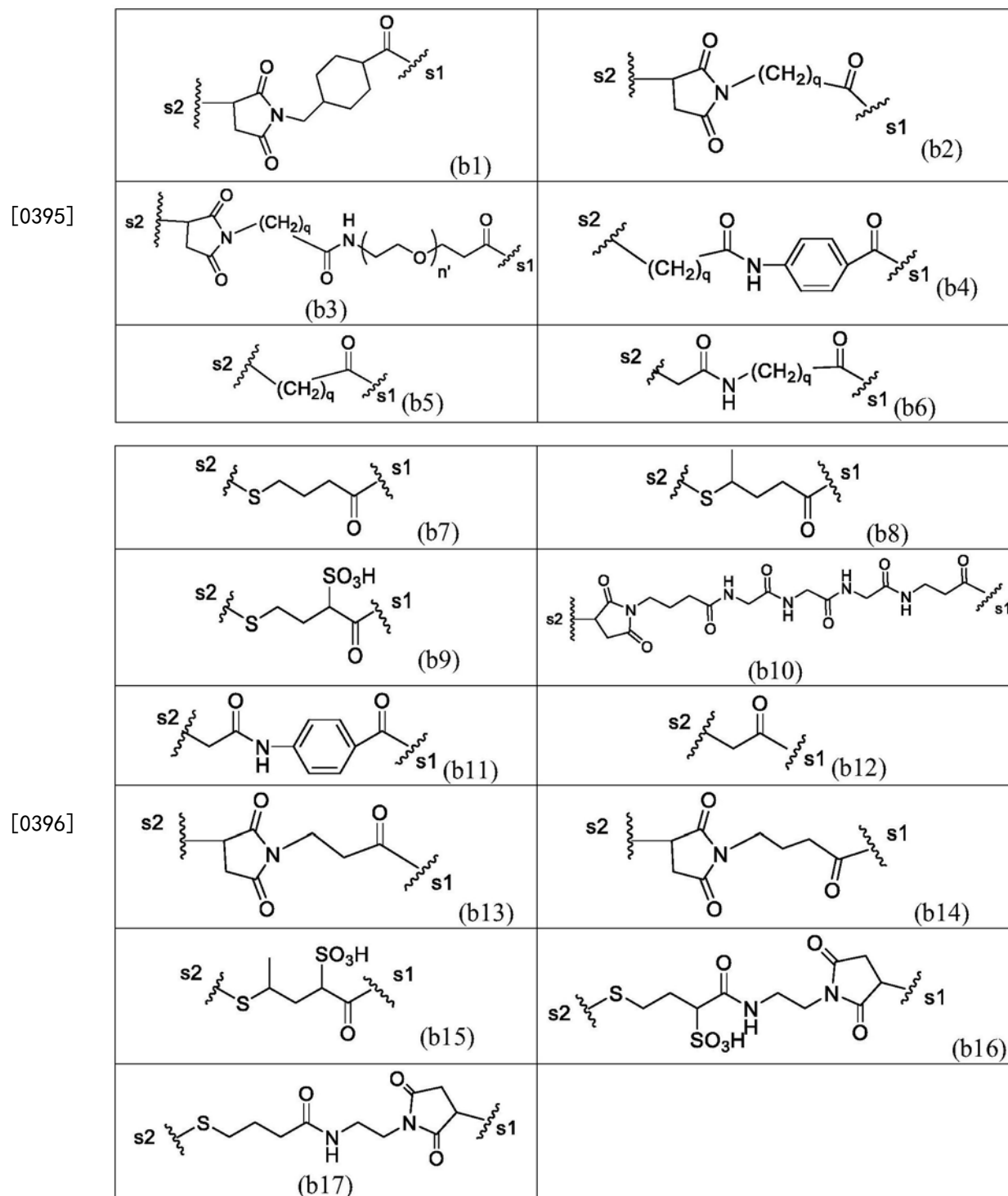
[0392] 在第三十四实施方案中,关于第二十三至第三十三实施方案中所述的缀合物或其药学上可接受的盐,J¹为-C(=O)-;并且剩余变量如第二方面或第二十三、第二十四、第二十五、第二十六、第二十七、第二十八、第二十九、第三十、第三十一、第三十二或第三十三实施方案或此中所述的任何特定实施方案中所定义。

[0393] 在第三十五实施方案中,关于第二十三至第三十三实施方案中所述的缀合物或其



胞毒性化合物的其余部分的位点；并且剩余变量如第二方面或第二十三、第二十四、第二十五、第二十六、第二十七、第二十八、第二十九、第三十、第三十一、第三十二或第三十三实施方案或此中所述的任何特定实施方案中所定义。

[0394] 在第三十六实施方案中，关于第二十三至第三十三实施方案中所述的缀合物或其药学上可接受的盐，其中 J^1 为 $-SZ^{s1}$ ，其中 Z^{s1} 选自以下各式：



[0397] 其中：

[0398] q为整数1至5；

[0399] n' 为整数2至6；

[0400] s1为连接至CBA的位点；

[0401] s2为连接至所述细胞毒性化合物的其余部分的位点；并且

[0402] 剩余变量如第二方面或第二十三、第二十四、第二十五、第二十六、第二十七、第二十八、第二十九、第三十、第三十一、第三十二或第三十三实施方案或此中所述的任何特定实施方案中所定义。

[0403] 在一个具体实施方案中， Z^{s1} 由式 (b7) 或 (b9) 表示。在另一个具体实施方案中， Z^{s1} 由式 (b16) 或 (b17) 表示。

[0404] 在第三十七实施方案中，关于第二十二至第三十六实施方案的缀合物或其药学上可接受的盐，其中N与C之间的双线 $\equiv$ 表示双键，X不存在且Y为H；并且剩余变量如第二方面或第二十二、第二十三、第二十四、第二十五、第二十六、第二十七、第二十八、第二十九、第三十、第三十一、第三十二、第三十三、第三十四、第三十五或第三十六实施方案或此中所述的任何特定实施方案中所定义。

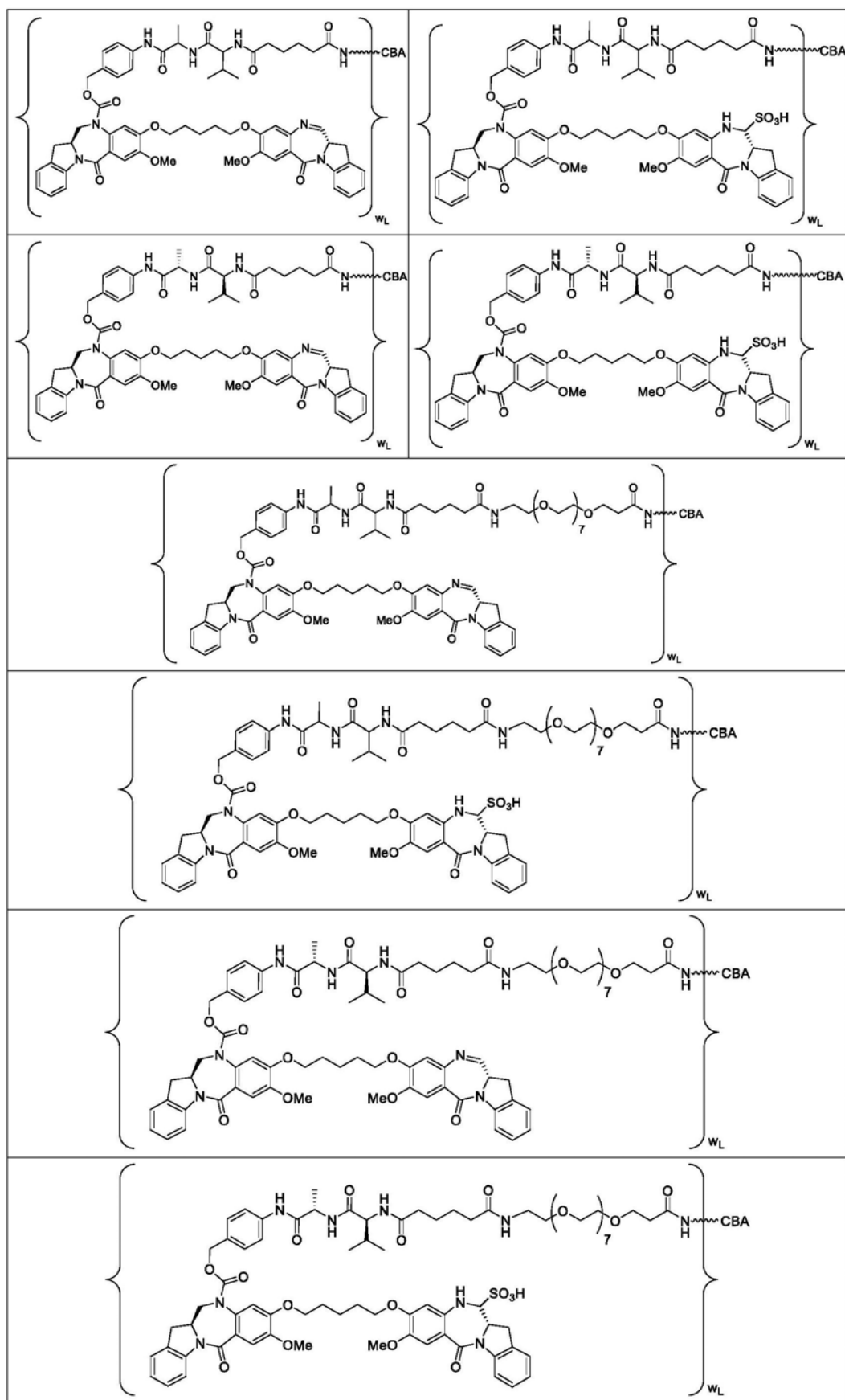
[0405] 在第三十八实施方案中，关于第二十二至第三十六实施方案的缀合物或其药学上可接受的盐，N与C之间的双线 $\equiv$ 表示单键，X为H且Y为 $-SO_3H$ ；并且剩余变量如第二方面或第二十二、第二十三、第二十四、第二十五、第二十六、第二十七、第二十八、第二十九、第三十、第三十一、第三十二、第三十三、第三十四、第三十五或第三十六实施方案或此中所述的任何特定实施方案中所定义。在一个具体实施方案中，所述药学上可接受的盐为钠盐或钾盐。在另一个具体实施方案中，所述药学上可接受的盐为钠盐。

[0406] 在第三十九实施方案中，关于第二十三至第三十八实施方案中所述的缀合物或其药学上可接受的盐，其中a1为整数1至7；并且剩余变量如第二方面或第二十三、第二十四、第二十五、第二十六、第二十七、第二十八、第二十九、第三十、第三十一、第三十二、第三十三、第三十四、第三十五、第三十六、第三十七或第三十八实施方案或此中所述的任何特定实施方案中所定义。

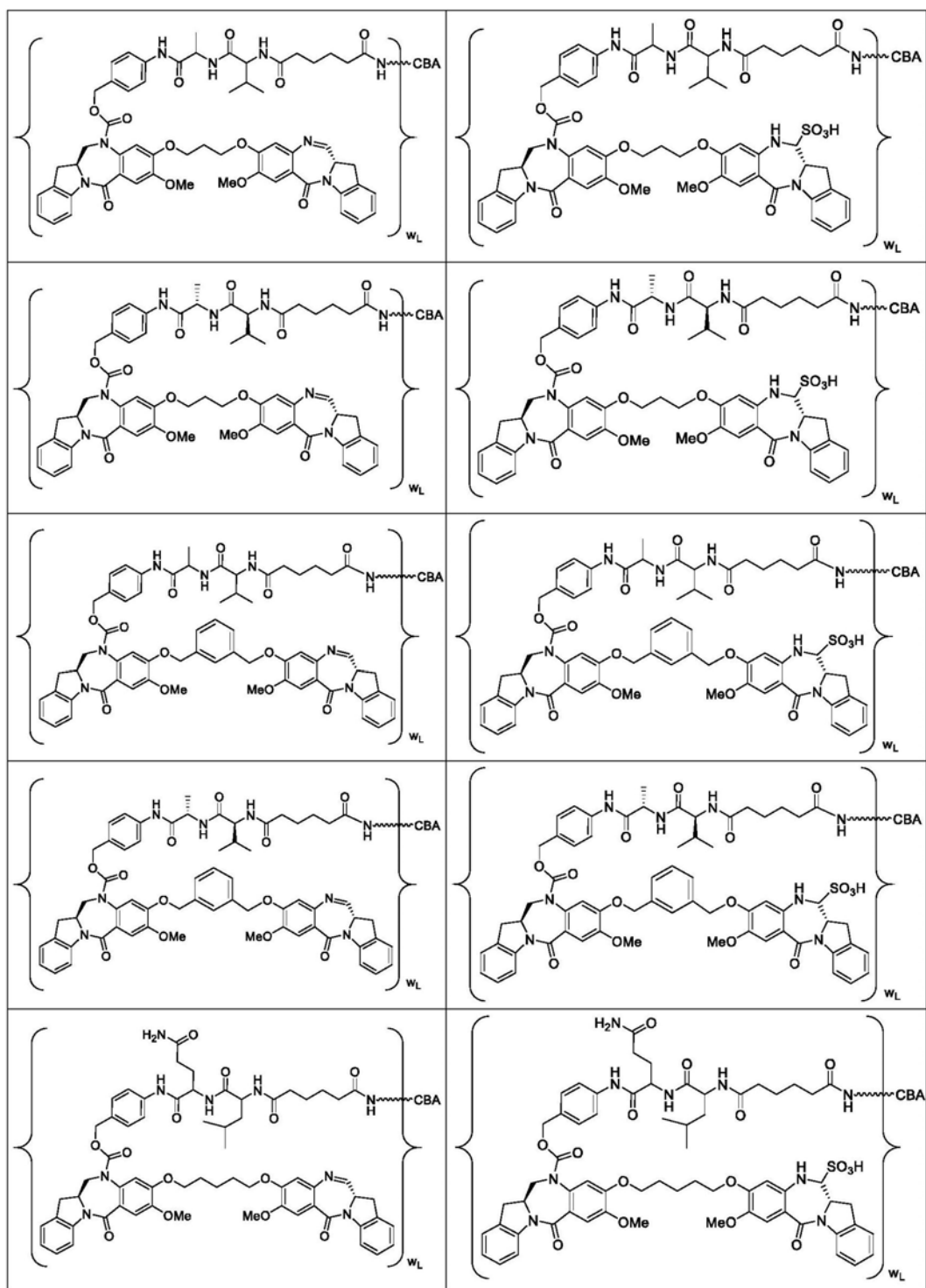
[0407] 在一个具体实施方案中， AA^1 及 AA^2 各自独立地选自在一个具体实施方案中， AA^1 及 AA^2 各自独立地选自精氨酸(Arg)、组氨酸(His)、赖氨酸(Lys)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、天冬酰胺(Asn)、谷氨酰胺(Gln)、半胱氨酸(Cys)、硒代半胱氨酸(Sec)、甘氨酸(Gly)、脯氨酸(Pro)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、甲硫氨酸(Met)、苯丙氨酸(Phe)、酪氨酸(Tyr)及色氨酸(Trp)。

[0408] 在第四十实施方案中，关于第三十九实施方案的缀合物或其药学上可接受的盐，其中 $AA^1-(AA^2)_{a1}$ 选自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Phe-Ala、Phe- N^9 -甲苯磺酰基-Arg、Phe- N^9 -硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu、 β -Ala-Leu-Ala-Leu、Gly-Phe-Leu-Gly、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met、Met-Ala、Thr-Thr、Thr-Met、Met-Thr、Leu-Ala、Cit-Val、Gln-Val、Ser-Val、Leu-Gln、Gln-Leu、Phe-Arg、Arg-Phe、Tyr-Arg、Arg-Tyr、Phe-Gln、Gln-Phe、Val-Thr、Thr-Val、Met-Tyr及Tyr-Met；并且剩余变量如第二方面或第三十九实施方案中所定义。

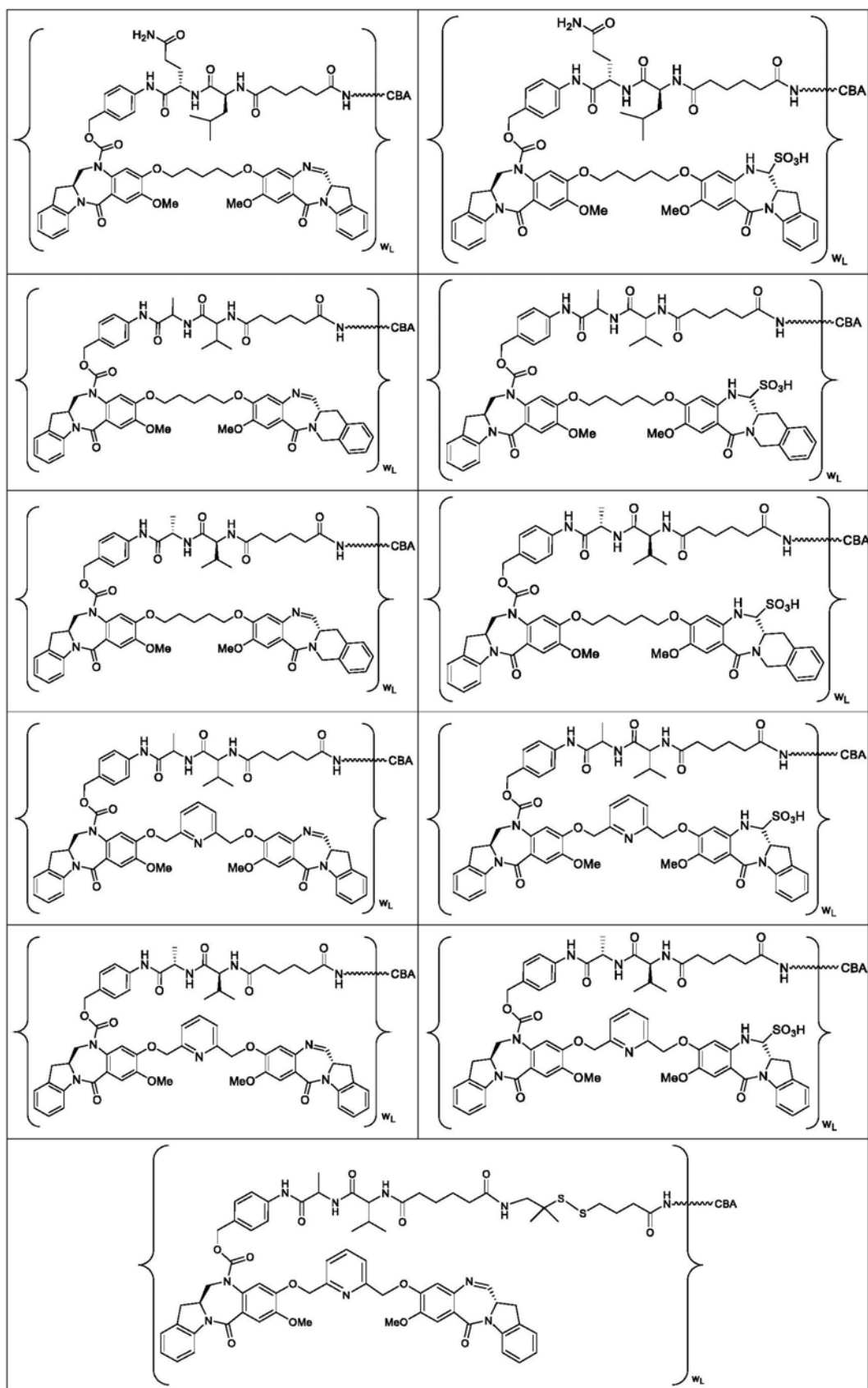
[0409] 在一个具体实施方案中， $AA^1-(AA^2)_{a1}$ 为Ala-Ala、L-Ala-L-Ala、Ala-Val、L-Ala-L-



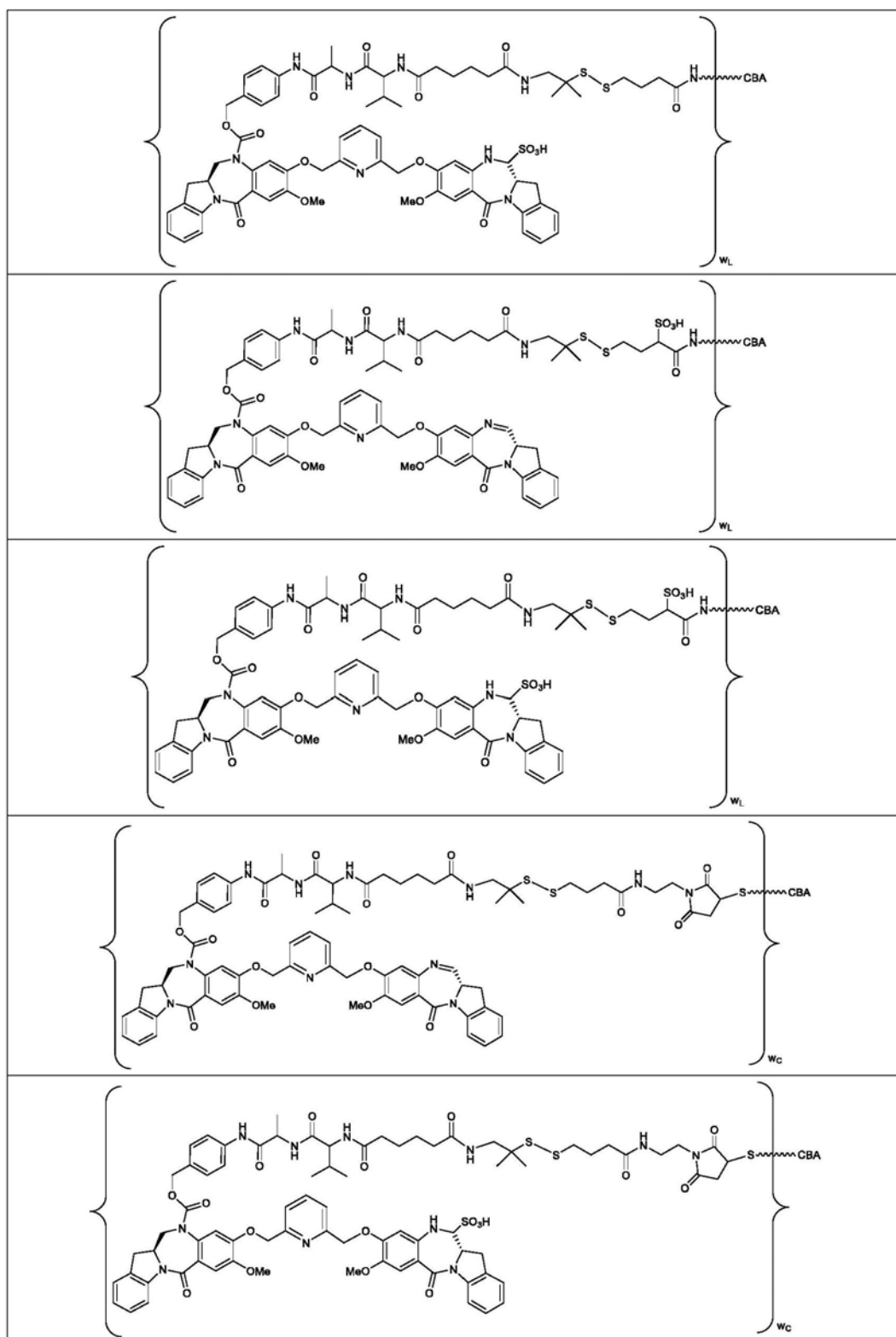
[0413]



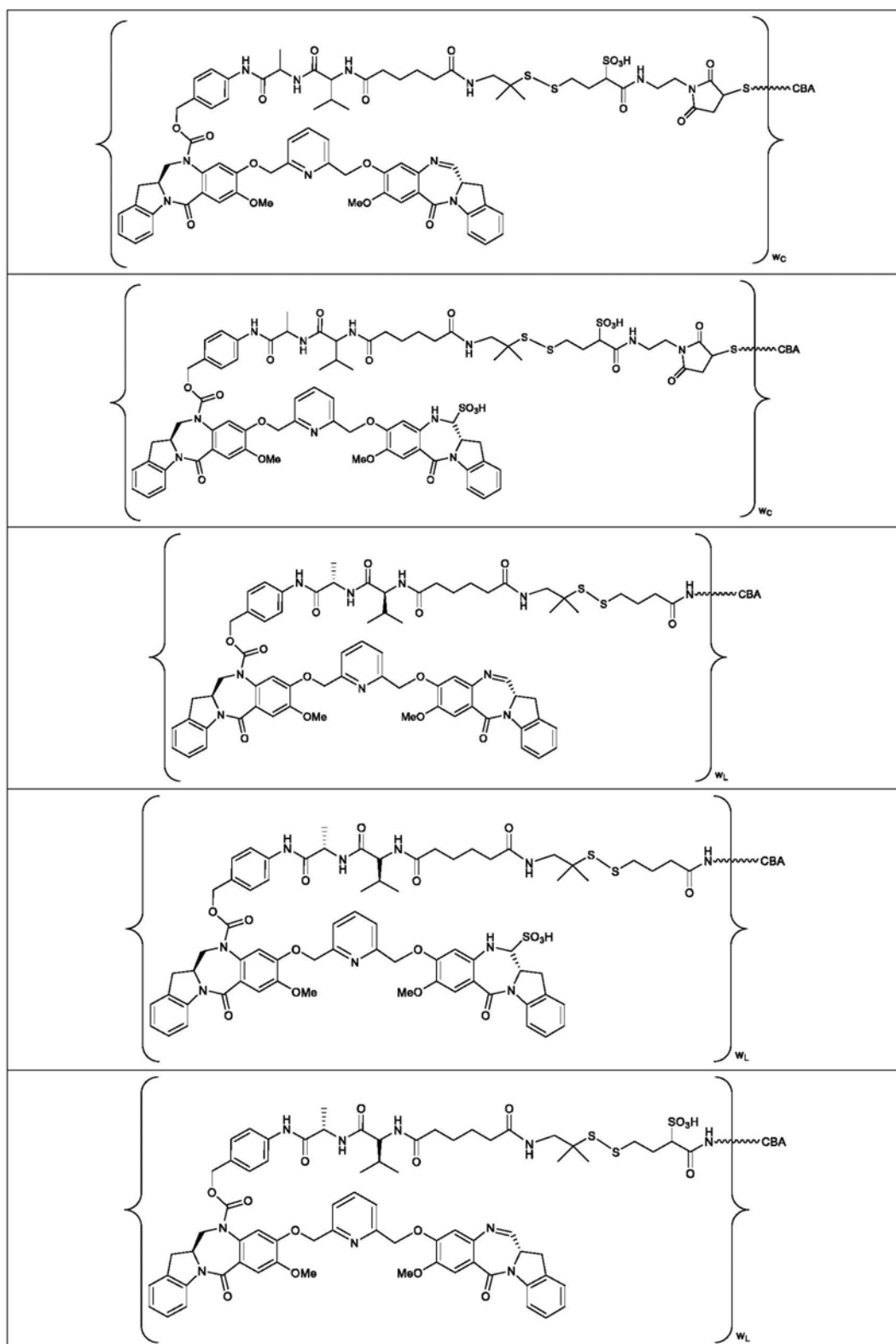
[0414]

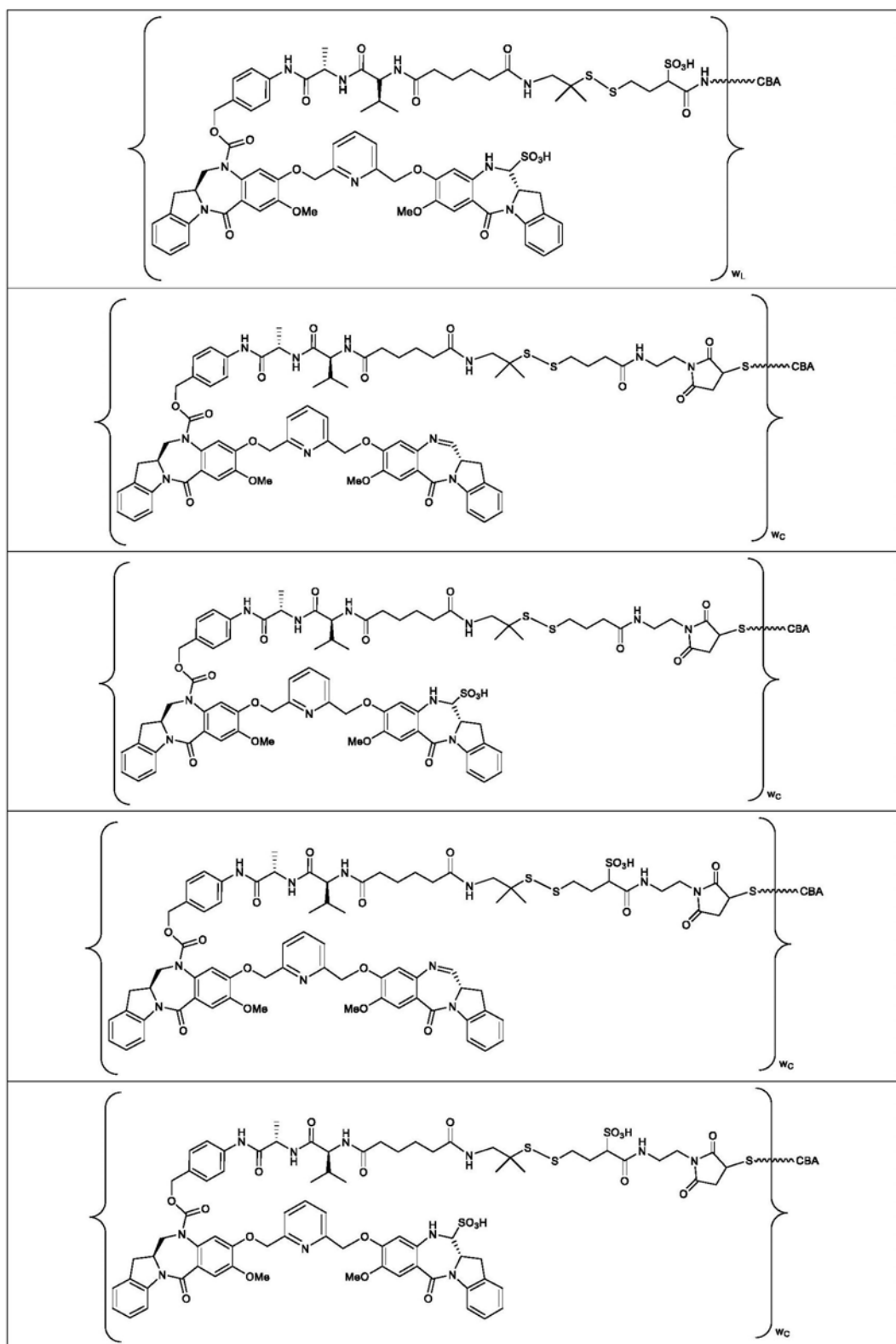


[0415]

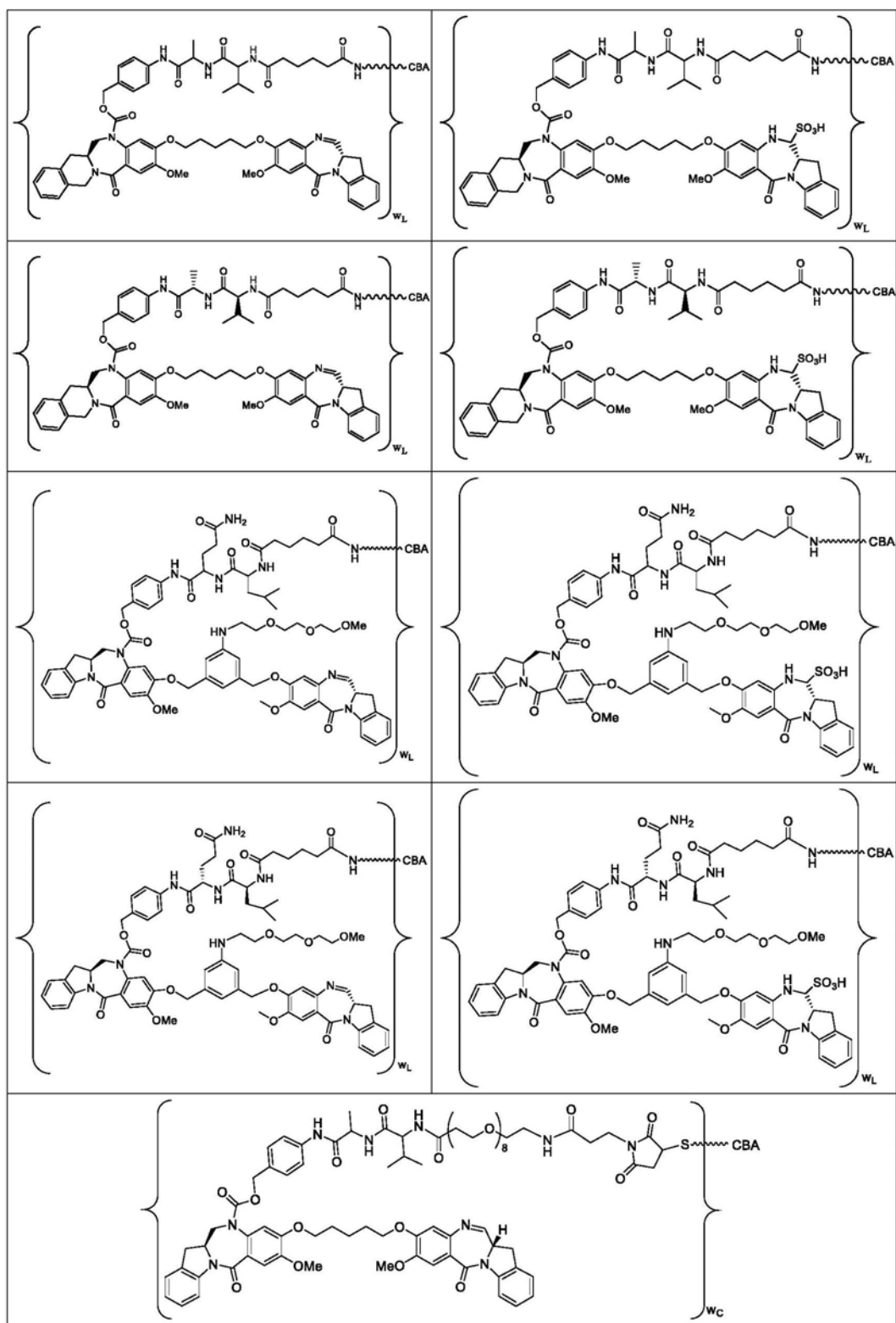


[0416]

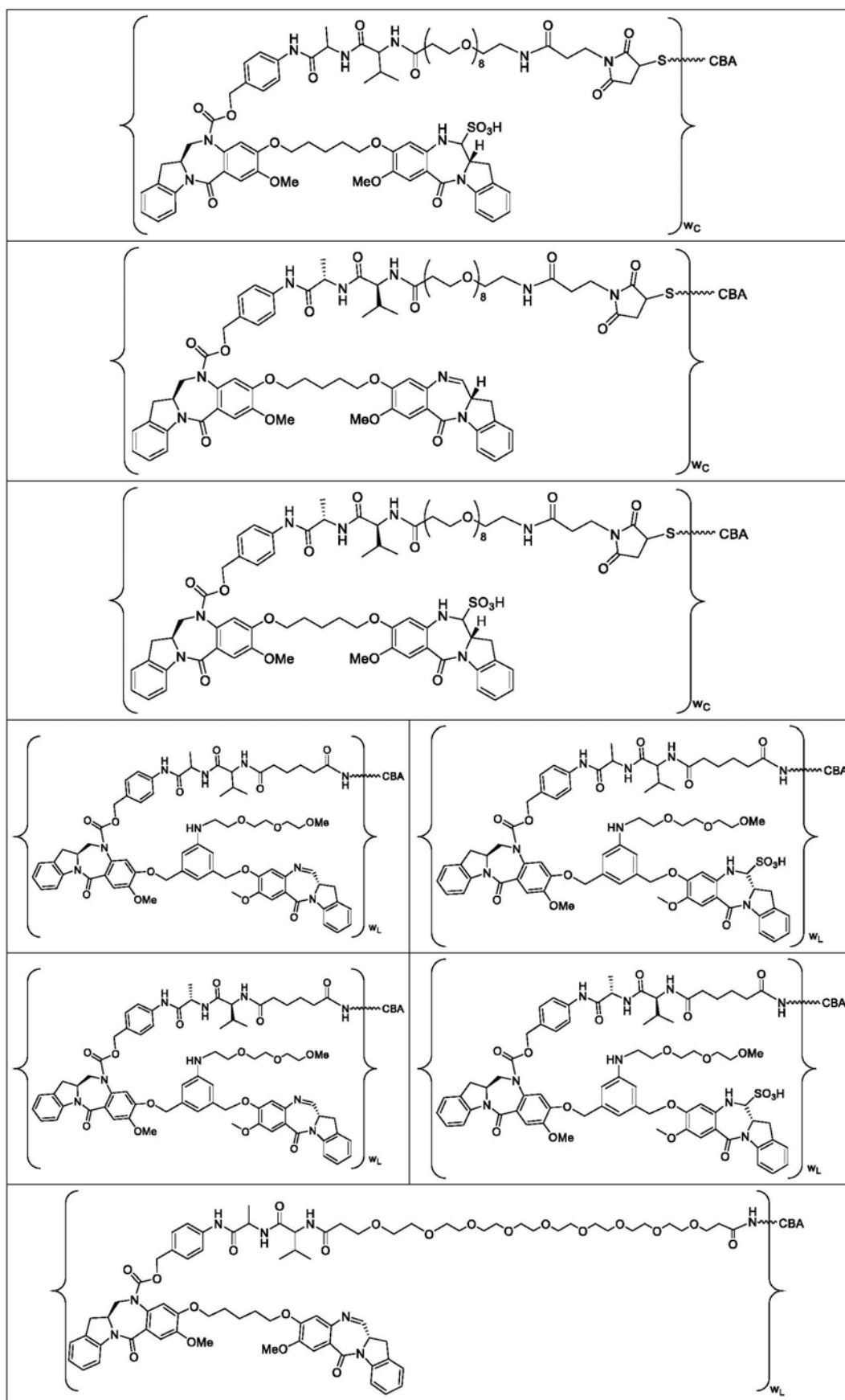




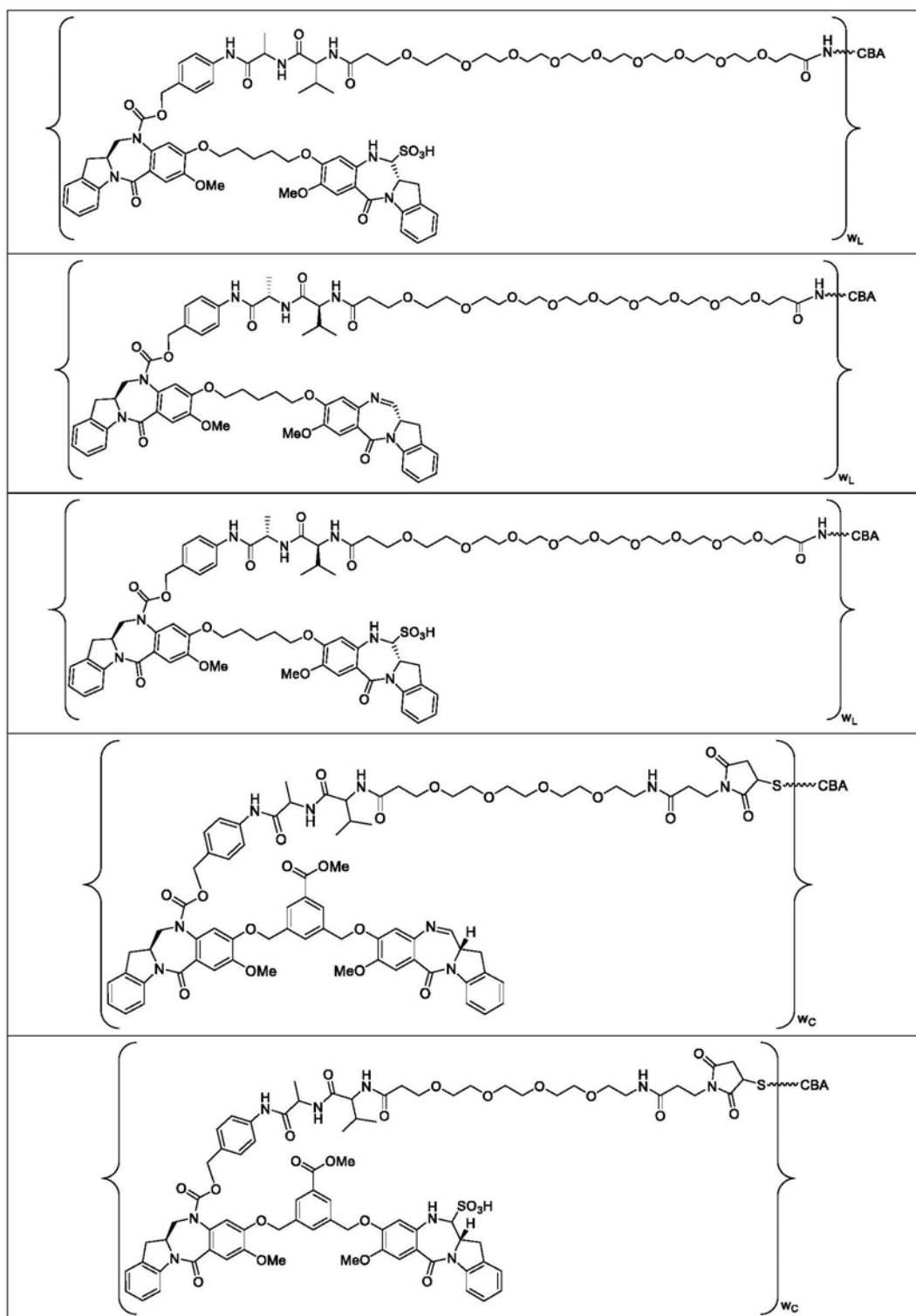
[0418]



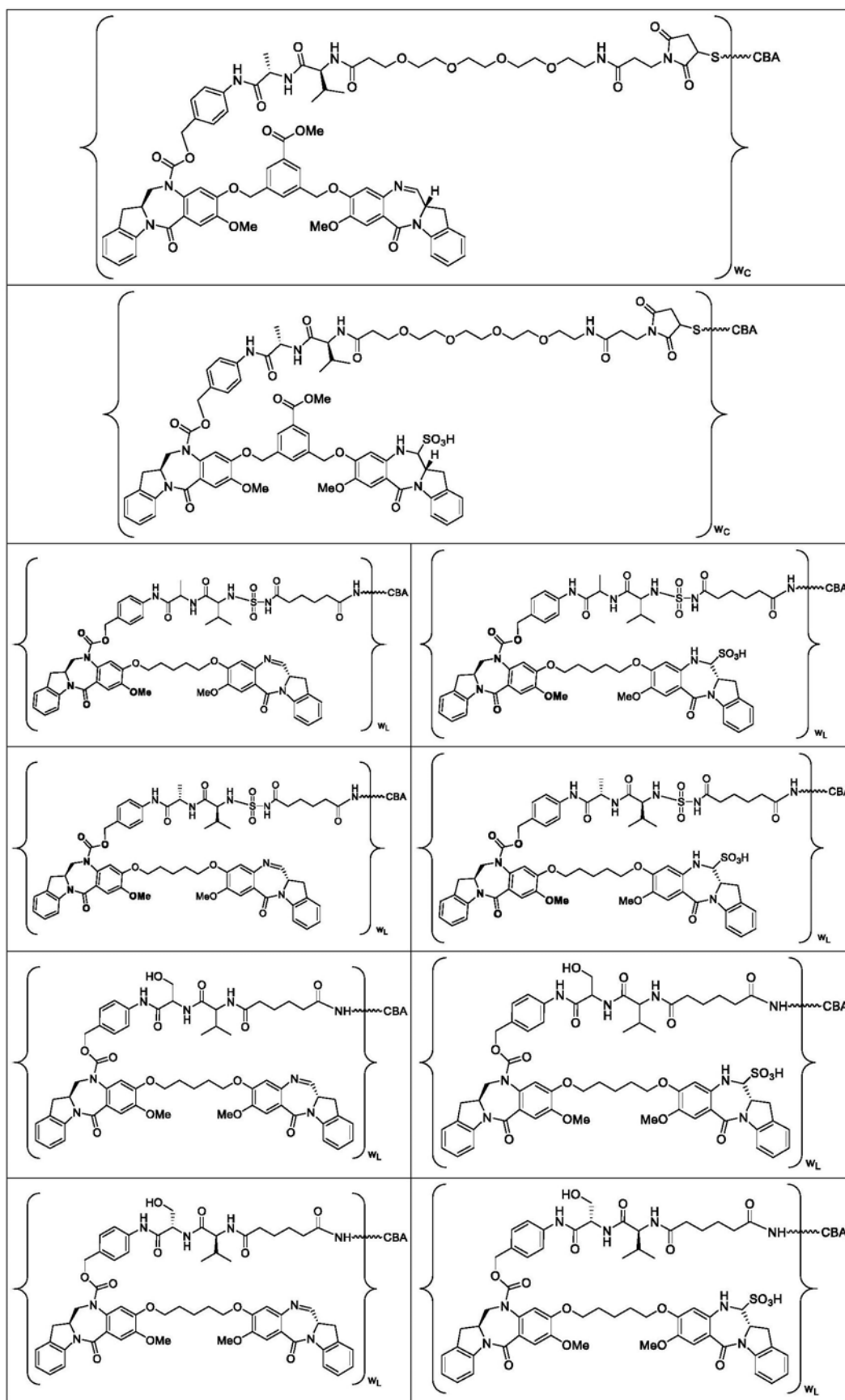
[0419]



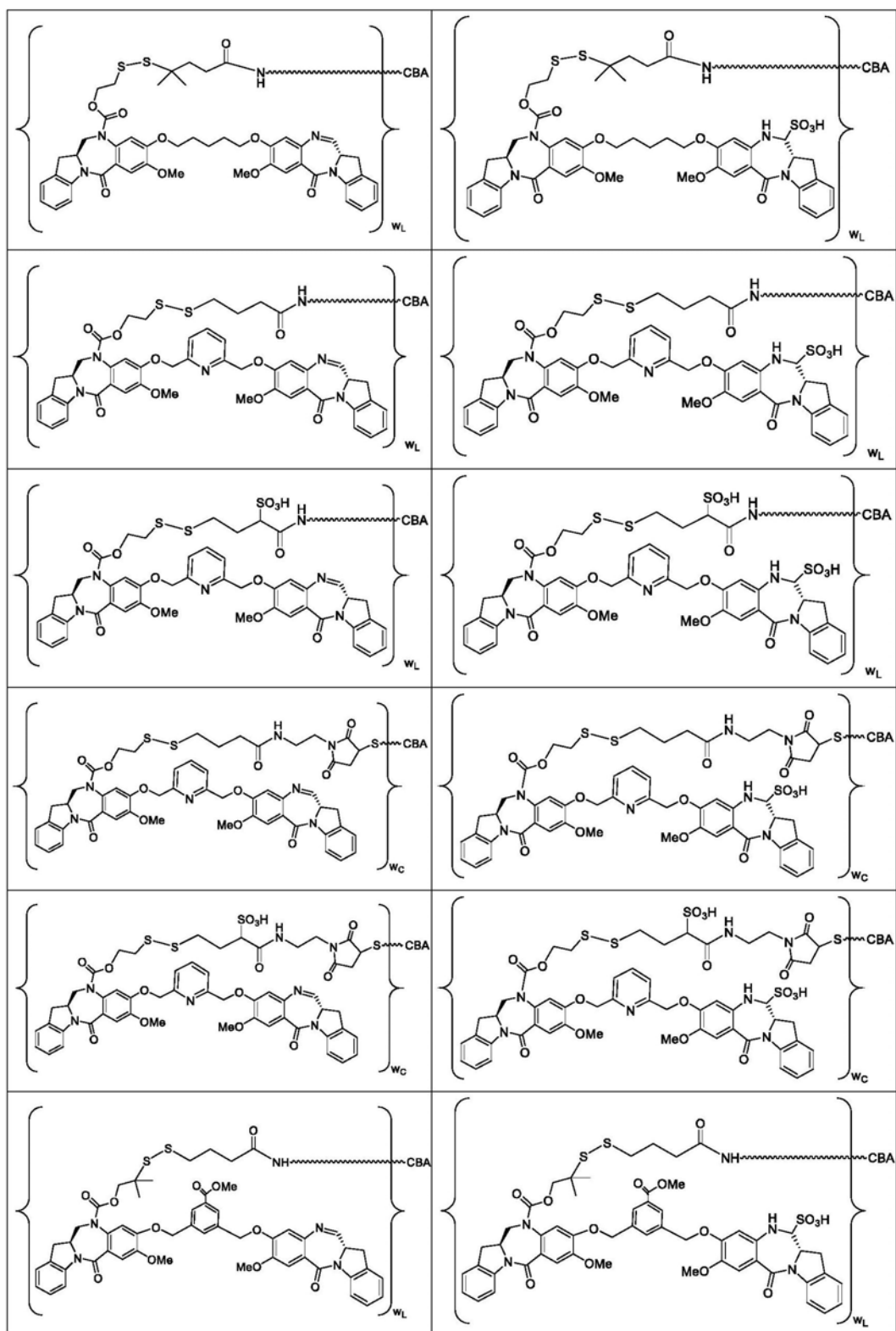
[0420]



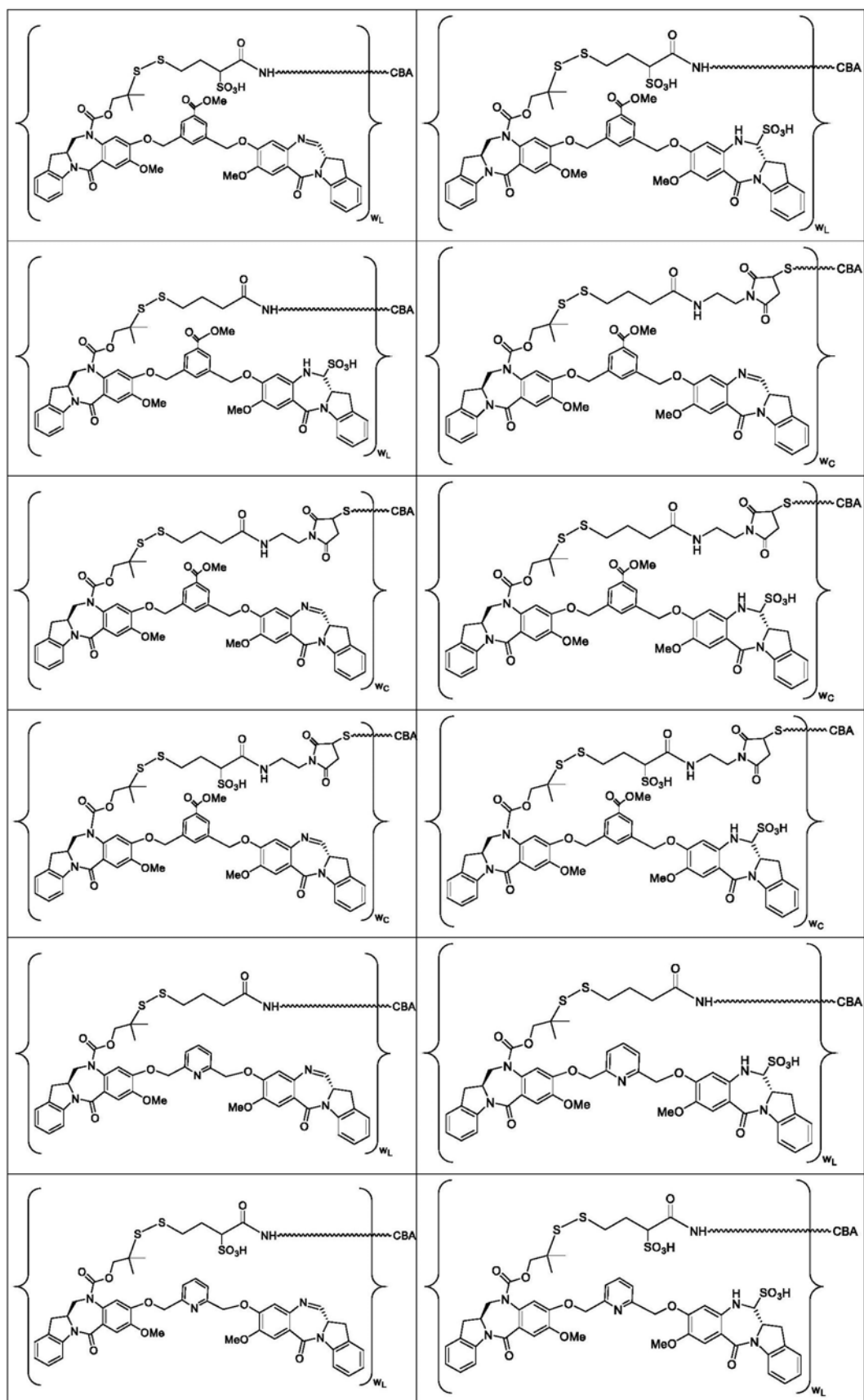
[0421]



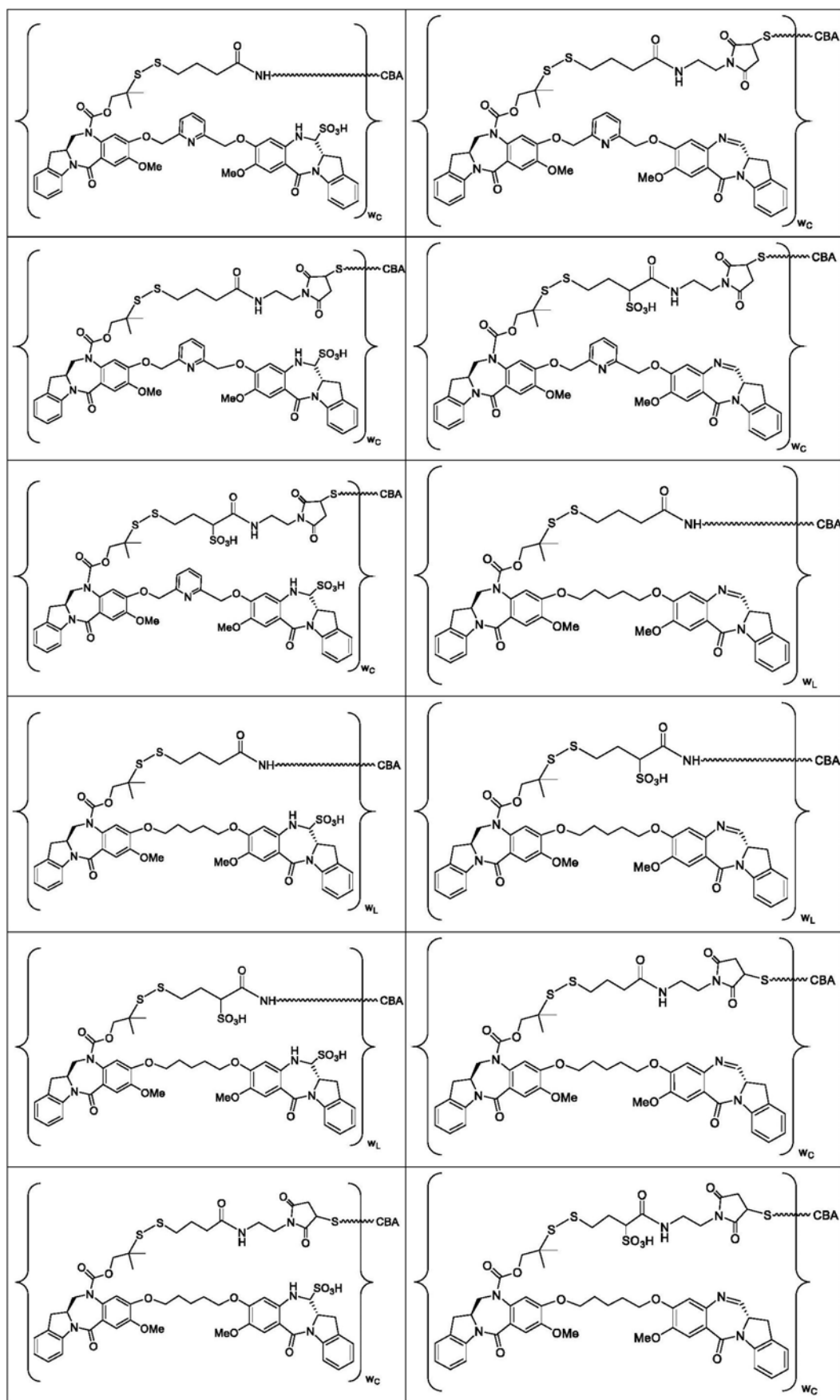
[0422]



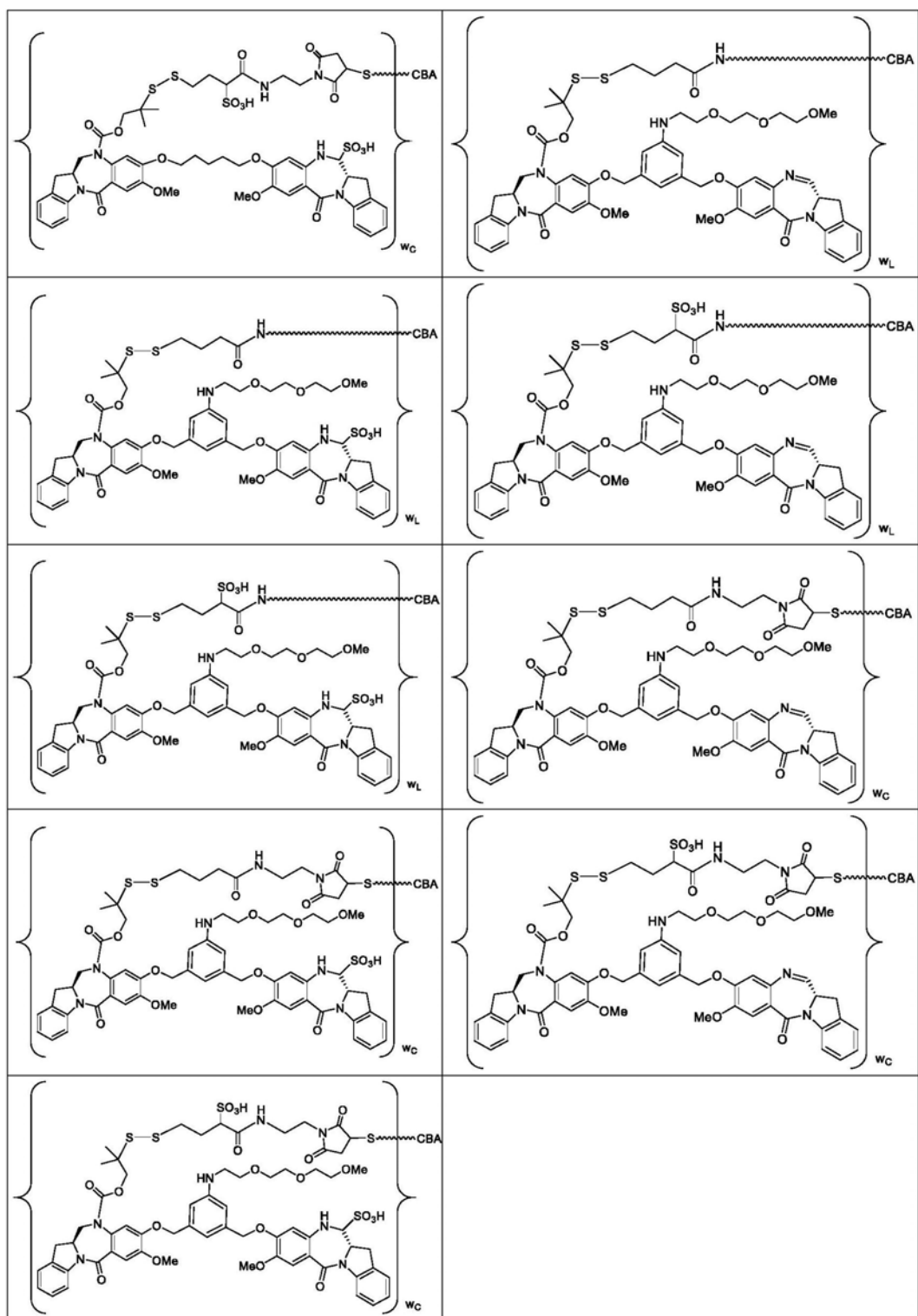
[0423]



[0424]



[0425]



[0426] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0427] $\text{CBA}-\text{NH}-$ 为经由位于所述CBA上的胺基共价连接至所述细胞毒性化合物的细胞结合剂;[0428] $\text{CBA}-\text{S}-$ 为经由位于所述CBA上的硫醇基共价连接至所述细胞毒性化合物的细胞结合剂;[0429] w_L 为整数1至20;

[0430] w_c 为整数1至4;并且

[0431] 剩余变量如第二方面或第二十二实施方案中所定义。

[0432] 在第四十二实施方案中,关于上文所述的缀合物(例如,第二方面或其中所述的任何实施方案或第二十二至第四十一个实施方案或其中所述的任何实施方案或特定实施方案中所述的缀合物),其药学上可接受的盐为钠盐或钾盐。在一个实施方案中,所述药学上可接受的盐为钠盐。在一个实施方案中,所述药学上可接受的盐为钾盐。

[0433] 细胞结合剂

[0434] 本发明的免疫缀合物中的细胞结合剂可为目前已知或变成已知的任何种类,包括肽及非肽。一般而言,这些细胞结合剂可为抗体(诸如多克隆抗体及单克隆抗体,尤其单克隆抗体)、淋巴因子、激素、生长因子、维生素(诸如叶酸盐等,其可结合于其细胞表面受体,例如叶酸受体)、营养物转运分子(诸如转铁蛋白)或任何其他细胞结合分子或物质。

[0435] 在某些实施方案中,细胞结合剂为抗体、单链抗体、特异性地结合于靶细胞的抗体片段、单克隆抗体、单链单克隆抗体、特异性地结合于靶细胞的单克隆抗体片段(或“抗原结合部分”或“抗原结合片段”)、嵌合抗体、特异性地结合于靶细胞的嵌合抗体片段(或“抗原结合部分”或“抗原结合片段”)、结构域抗体(例如,sdAb)或特异性地结合于靶细胞的结构域抗体片段。

[0436] 在某些实施方案中,细胞结合剂为人源化抗体、人源化单链抗体或人源化抗体片段(或“抗原结合部分”或“抗原结合片段”)。

[0437] 在某些实施方案中,细胞结合剂为表面重塑抗体、表面重塑单链抗体或表面重塑抗体片段(或“抗原结合部分”或“抗原结合片段”)。

[0438] 在某些实施方案中,细胞结合剂为抗体或其抗原结合部分(包括抗体衍生物),CBA可结合于靶细胞上的配体,诸如细胞表面配体,包括细胞表面受体。

[0439] 在某些实施方案中,细胞结合剂(CBA)结合于选自以下的靶细胞: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、髓系细胞、活化T细胞、B细胞或黑色素细胞;表达CA6、CAK1、CD4、CD5、CD6、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD44、CD56、CD123、CD138、EpCAM、CanAg、CALLA、CEACAM5、FGFR3、LAMP1、p-钙粘蛋白、Her-2或Her-3抗原的细胞;或表达胰岛素生长因子受体、表皮生长因子受体及叶酸盐受体的细胞。

[0440] 在某些实施方案中,细胞结合剂为经半胱氨酸工程改造的抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,经半胱氨酸工程改造的抗体或其抗原结合片段为抗叶酸盐受体抗体或其抗原结合片段、抗EGFR抗体或其抗原结合片段、抗CD33抗体或其抗原结合片段、抗CD19抗体或其抗原结合片段、抗Muc1抗体或其抗原结合片段、抗CD37抗体或其抗原结合片段、抗cMet抗体或其抗原结合片段或抗EpCAM抗体或其抗原结合片段。

[0441] 在某些实施方案中,细胞结合剂为如下抗体或其抗原结合片段,其:(a)结合人CD123/IL3-R α 抗原的氨基酸101-346内的表位,及(b)抑制抗原阳性TF-1细胞中的IL3依赖性增生(参见W02017/004026,以引用的方式整体并入本文)。

[0442] 在某些实施方案中,细胞结合剂为如W02017/004026(其以引用的方式并入本文)中所述的抗CD123抗体或其抗原结合片段。

[0443] 在某些实施方案中,抗CD123抗体或其抗原结合片段可包含:a)至少一个轻链可变

区或其片段,其分别包含三个连续互补决定区(CDR)CDR_L1、CDR_L2及CDR_L3,其中CDR_L1具有氨基酸序列RASQDINSYLS (SEQ ID NO:1),CDR_L2具有氨基酸序列RVNRLVD (SEQ ID NO:2),且CDR_L3具有氨基酸序列LQYDAFPYT (SEQ ID NO:3);及b)至少一个重链可变区或其片段,其分别包含三个连续互补决定区(CDR)CDR_H1、CDR_H2及CDR_H3,其中CDR_H1具有氨基酸序列SSIMH (SEQ ID NO:4),CDR_H2具有氨基酸序列YIKPYNDGTTYNEKFKG (SEQ ID NO:5),且CDR_H3具有氨基酸序列EGGNDYYDTMDY (SEQ ID NO:6)。

[0444] 在某些实施方案中,抗CD123抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(V_H),其具有氨基酸序列

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSSIMHWVRQAP
[0445] GQGLEWIGYIKPYNDGTTYNEKFKGRATLTSDRSTSTAYMELSS
LRSEDVAVYYCAREEGGNDYYDTMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID
NO:7)

[0446] 及轻链可变区(V_L),其具有氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQQKPGK
[0447] APKTLIYRVNRLVDGVPSRFSGSGSGNDYTLTISSLQPEDFATYYC
LQYDAFPYTFFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:9)。

[0448] 在某些实施方案中,抗CD123抗体具有重链全长序列

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSSIMHWVRQAP
GQGLEWIGYIKPYNDGTTYNEKFKGRATLTSDRSTSTAYMELSS
[0449] LRSEDVAVYYCAREEGGNDYYDTMDYWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
[0450] PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
CLSPG (SEQ ID NO:8)

[0451] 及轻链全长序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDINSYLSWFQQKPGK
APKTLIYRVNRLVDGVPSRFSGSGSGNDYTLTISSLQPEDFATYYC
[0452] LQYDAFPYTFGGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
LTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID N
O:10)

[0453] 在某些实施方案中,细胞结合剂为如美国专利第7,342,110号及第7,557,189号(其以引用的方式并入本文)中所述的抗CD3抗体或其抗原结合片段。

[0454] 在某些实施方案中,抗CD33抗体或其抗原结合片段可包含:a)至少一个轻链可变区或其片段,其分别包含三个连续互补决定区(CDR) CDR_L1 、 CDR_L2 及 CDR_L3 ,其中 CDR_L1 具有氨基酸序列KSSQSVFFSSSQKNYLA (SEQ ID NO:11), CDR_L2 具有氨基酸序列WASTRES (SEQ ID NO:12),且 CDR_L3 具有氨基酸序列HQYLSSRT (SEQ ID NO:13);及b)至少一个重链可变区或其片段,其分别包含三个连续互补决定区(CDR) CDR_H1 、 CDR_H2 及 CDR_H3 ,其中 CDR_H1 具有氨基酸序列SYIIH (SEQ ID NO:14), CDR_H2 具有氨基酸序列VIYPGNDDISYNQKFQG (SEQ ID NO:15),且 CDR_H3 具有氨基酸序列EVRLRYFDV (SEQ ID NO:16)。

[0455] 在某些实施方案中,抗CD33抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(V_H),其具有氨基酸序列

QVQLQQPGAIEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIIHWIKQTP
GQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQGKATLTADKSSTTAYMQLS
[0456] SLTSEDSAVYYCAREEVRLRYFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:
17)

[0457] 及轻链可变区(V_L),其具有氨基酸序列

EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWY
[0458] QQIPGQSPRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDL
AIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO:19)。

[0459] 在某些实施方案中,抗CD33抗体具有重链全长序列

QVQLQQPGAIEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSY_YIHWIKQTP
GQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQGKATLTADKSSTTAYMQLS
SLTSEDSAVYYCAREEVRLRYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
[0460] KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPG (SEQ ID NO:18)

[0461] 及轻链全长序列

EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSQKNYLAWY
QQIPGQSPRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDL
[0462] AIYYCHQYLSRTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ
ID NO:20)。

[0463] 在某些实施方案中,所述抗CD33抗体为huMy9-6抗体。

[0464] 在某些实施方案中,细胞结合剂为如W02018/119196及美国临时申请第62/690052号及第62/691342号(其各自以引用的方式并入本文)中所述的抗ADAM9抗体或其抗原结合片段。

[0465] 在某些实施方案中,抗ADAM9抗体或其抗原结合片段为特异性地结合于人ADAM9及cyno ADAM9的人源化抗ADAM9抗体或其抗原结合片段。

[0466] 在某些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段被最佳化以具有对cyno ADAM9的结合亲和力的至少100倍增强且如与嵌合或鼠科动物亲本抗体相比,保持对人ADAM9的高亲和力结合。

[0467] 在某些实施方案中,抗ADAM9抗体或其抗原结合片段(例如,人源化抗ADAM9抗体或其抗原结合片段)包含:a)至少一个轻链可变区或其片段,其分别包含三个连续互补决定区(CDR)CDR_L1、CDR_L2及CDR_L3,其中CDR_L1具有氨基酸序列KASQSVDYSGDSYMN (SEQ ID NO:21), CDR_L2具有氨基酸序列AASDLES (SEQ ID NO:22),且CDR_L3具有氨基酸序列QQSHEDPFT (SEQ ID NO:23);及b)至少一个重链可变区或其片段,其分别包含三个连续互补决定区(CDR)CDR_H1、CDR_H2及CDR_H3,其中CDR_H1具有氨基酸序列SYWMH (SEQ ID NO:24),CDR_H2具有氨基酸序列EIIPIFGHTNYNEKFKS (SEQ ID NO:25),且CDR_H3具有氨基酸序列GGYYYYPRQGFLDY (SEQ ID

NO:26)。

[0468] 在某些实施方案中,抗ADAM9抗体或其抗原结合片段(例如,人源化抗ADAM9抗体或其抗原结合片段)包含重链可变区(V_H),其具有氨基酸序列

EVQLVESGGG LVKPGGSLRLSCAASGFTFS SYWMHWVRQ
A PGKGLEWVGE IPIFGHTNY NEKFSRFTI SLDNSKNTLY
[0469] LQMGSRLAED TAVYYCARGG YYYYPRQGFL DYWGQGTTVT
VSS (SEQ ID NO:27)

[0470] 及轻链可变区(V_L),其具有氨基酸序列

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKASQSVDYSGDSYMNWYQ
[0471] QKPGQPPKLLIY AASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPED
FATYYCQQSHEDPFTFGQGTKLEI K (SEQ ID NO:28)。

[0472] 在某些实施方案中,抗ADAM9抗体具有重链全长序列

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVR
QA PGKGLEWVGE IPIFGHTNY NEKFSRFTI SLDNSKNTLY
LQMGSRLAED TAVYYCARGG YYYYPRQGFL DYWGQGTTV
T VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYPPEPV T
VSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQT
YICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPS
[0473] VFLFP PKPKDTLYIT REPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDG
VEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKC
KVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS
LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT PPVLDSDGSF FL
YSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLCLS PG
(SEQ ID NO:29)

[0474] 及轻链全长序列

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKASQSVDYSGDSYMNWYQ
[0475] QKPGQPPKLLIY AASDLES GIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFA
TYYCQQSHEDPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ
ID NO:30)。

[0476] 在某些实施方案中,细胞结合剂为如美国临时申请第62/751,530号(其以引用的

方式并入本文)中所述的抗EpCAM抗体或其抗原结合片段。

[0477] 在某些实施方案中,抗EpCAM抗体或其抗原结合片段可包含:a)至少一个轻链可变区或其片段,其分别包含三个连续互补决定区(CDR) CDR_L1 、 CDR_L2 及 CDR_L3 ,其中 CDR_L1 具有氨基酸序列RSSRSLHSDGFTYLY (SEQ ID NO:31), CDR_L2 具有氨基酸序列QTSNLAS (SEQ ID NO:32),且 CDR_L3 具有氨基酸序列AQNLELPNT (SEQ ID NO:33);及b)至少一个重链可变区或其片段,其分别包含三个连续互补决定区(CDR) CDR_H1 、 CDR_H2 及 CDR_H3 ,其中 CDR_H1 具有氨基酸序列NYYIH (SEQ ID NO:34), CDR_H2 具有氨基酸序列WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO:35),且 CDR_H3 具有氨基酸序列DGPWFAY (SEQ ID NO:36)。

[0478] 在某些实施方案中,抗EpCAM抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(V_H),其具有氨基酸序列

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQA

[0479] PGQRLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELS
SLRSEDVAVYYCARDDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:37)

[0480] 及轻链可变区(V_L),其具有氨基酸序列

DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLHSDGFTYLYWFLQ

[0481] KPGQSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCAAQNLELPNTFGQGTKLEIK (SEQ ID N:38)。

[0482] 在某些实施方案中,抗EpCAM抗体具有重链全长序列

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQA

PGQRLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELS

SLRSEDVAVYYCARDDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA

PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL

QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

[0483] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV

SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL

HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS

RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD

SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL

SPG (SEQ ID NO:39)

[0484] 及轻链全长序列

DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLHSDGFTYLYWFLQ
KPGQSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCAQNLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
[0485] ASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ
ID NO:40)。

[0486] 在某些实施方案中,所述细胞结合剂为抗叶酸受体抗体。在某些实施方案中,细胞结合剂为如美国专利8,709,432、美国专利第8,557,966号及W02011106528(其均以引用的方式并入本文)中所述的抗人叶酸受体1(FOLR1)抗体或其抗原结合片段。

[0487] 在某些实施方案中,抗FOLR1抗体或其抗原结合片段可包含:a)至少一个轻链可变区或其片段,其分别包含三个连续互补决定区(CDR)CDR_L1、CDR_L2及CDR_L3,其中CDR_L1具有氨基酸序列KASQSVSFAGTSLMH(SEQ ID NO:41),CDR_L2具有氨基酸序列RASNLEA(SEQ ID NO:42),且CDR_L3具有氨基酸序列QQSREYPYT(SEQ ID NO:43);及b)至少一个重链可变区或其片段,其分别包含三个连续互补决定区(CDR)CDR_H1、CDR_H2及CDR_H3,其中CDR_H1具有氨基酸序列GYFMN(SEQ ID NO:44)或GYTFTGYFMN(SEQ ID NO:47),CDR_H2具有氨基酸序列RIHPYDGDFTFYNQKFQG(SEQ ID NO:45)或RIHPYDGDTF(SEQ ID NO:48),且CDR_H3具有氨基酸序列YDGSRAMDY(SEQ ID NO:46)。在某些实施方案中,抗FOLR1抗体或其抗原结合片段包含a)轻链可变区,其包含具有以SEQ ID NO:41陈述的氨基酸序列的CDR_L1、具有以SEQ ID NO:42陈述的氨基酸序列的CDR_L2及具有以SEQ ID NO:43陈述的氨基酸序列的CDR_L3;及b)重链可变区,其包含具有以SEQ ID NO:44陈述的氨基酸序列的CDR_H1、具有以SEQ ID NO:45陈述的氨基酸序列的CDR_H2及具有以SEQ ID NO:46陈述的氨基酸序列的CDR_H3。在某些实施方案中,抗FOLR1抗体或其抗原结合片段包含a)轻链可变区,其包含具有以SEQ ID NO:41陈述的氨基酸序列的CDR_L1、具有以SEQ ID NO:42陈述的氨基酸序列的CDR_L2及具有以SEQ ID NO:43陈述的氨基酸序列的CDR_L3;及b)重链可变区,其包含具有以SEQ ID NO:47陈述的氨基酸序列的CDR_H1、具有以SEQ ID NO:48陈述的氨基酸序列的CDR_H2及具有以SEQ ID NO:46陈述的氨基酸序列的CDR_H3。

[0488] 在某些实施方案中,抗FOLR1抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(V_H),其具有氨基酸序列

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQS
PGQSLEWIGRIHPYDGDFTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMEL
[0489] LSLTSEDFAVYYCTRYYDGSRAMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID N
O:49)

[0490] 及轻链可变区(V_L),其具有氨基酸序列

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQ
[0491] KPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAA

TYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:50),或

[0492] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQ
KPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAA
TYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:51)。

[0493] 在某些实施方案中,抗F0LR1抗体具有重链全长序列

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQS
PGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMEL
LSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
[0494] PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (SEQ ID NO:52)

[0495] 及轻链全长序列

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQ
KPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAA
[0496] TYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ
ID NO:53),或

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQ
[0497] KPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAA
TYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ
ID NO:54)。

[0498] 在某些实施方案中,所述抗F0LR1抗体为huMov19或M9346A抗体。

[0499] 在某些实施方案中,本文所述的抗体为鼠科动物、非人哺乳动物、嵌合、人源化或

人抗体。例如,所述人源化抗体可为CDR移植抗体或表面重塑抗体。在某些实施方案中,所述抗体为全长抗体。在某些实施方案中,其抗原结合片段为Fab、Fab'、F(ab')₂、F_d、单链Fv或scFv、二硫键连接的F_v-V-NAR域、IgNar、内体、IgG Δ CH₂、微型抗体、F(ab')₃、四功能抗体、三功能抗体、双功能抗体、单结构域抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb₂、(scFv)₂或scFv-Fc。

[0500] 在某些实施方案中,所述细胞结合剂为替代蛋白质骨架,诸如Centyrin(基于纤维连接蛋白III型(FN3)重复序列的共有序列的蛋白质骨架;参见美国专利公布2010/0255056、2010/0216708及2011/0274623,以引用的方式并入本文)、锚蛋白重复蛋白(例如经设计的锚蛋白重复蛋白,称作DARPin;参见美国专利公布第2004/0132028号、第2009/0082274号、第2011/0118146号及第2011/0224100号,以引用的方式并入本文,且还参见C.Zahnd等人,Cancer Res. (2010) 70:1595-1605;Zahnd等人,J.Biol.Chem. (2006) 281(46):35167-35175;及Binz,H.K.,Amstutz,P.及Pluckthun,A.,Nature Biotechnology (2005) 23:1257-1268,以引用的方式并入本文)、锚蛋白样重复蛋白或合成肽(参见例如美国专利公布第2007/0238667号;美国专利第7,101,675号;WO 2007/147213;及WO 2007/062466,以引用的方式并入本文)、纤连蛋白(纤维连接蛋白域骨架蛋白;参见美国专利公布第2007/0082365号;第2008/0139791号,以引用的方式并入本文)、Avibody(包括双功能抗体、三功能抗体及四功能抗体;参见美国公布第2008/0152586号及第2012/0171115号)、双重受体再靶向(DART)分子(P.A.Moore等人,Blood,2011;117(17):4542-4551;Veri MC等人,Arthritis Rheum,2010年3月30日;62(7):1933-43;Johnson S等人J Mol Biol,2010年4月9日;399(3):436-49)及细胞渗透超电荷蛋白(Methods in Enzymol.502,293-319 (2012))。

[0501] 细胞结合剂-药物缀合物的产生

[0502] 为了使本发明的细胞毒性化合物或其衍生物连接至细胞结合剂,所述细胞毒性化合物可包含具有键结至其的反应性基团的连接部分。这些化合物可直接连接至细胞结合剂。用于使具有键结至其的反应性基团的细胞毒性化合物与细胞结合剂连接以产生细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物的代表性方法描述于实施例s32-36中。

[0503] 在一些实施方案中,双官能交联剂可首先与所述细胞毒性化合物反应以提供含有具有键结至其的一个反应性基团的连接部分的化合物(即,药物-接头化合物),其可接着与细胞结合剂反应。或者,所述双官能交联试剂的一个末端可首先与细胞结合剂反应以提供含有具有键结至其的一个反应性基团的连接部分的细胞结合剂,其可接着与细胞毒性化合物反应。所述连接部分可含有允许在特定位点处释放所述细胞毒性部分的化学键。合适化学键为本领域中熟知的且包括二硫键、硫醚键、酸不稳定键、光不稳定键、肽酶不稳定键及酯酶不稳定键(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及7,414,073)。优选的为二硫键、硫醚及肽酶不稳定键。可用于本发明的其他接头包括不可裂解接头,诸如详细描述于美国公布第2005/0169933号中的那些,或描述于US 2009/0274713、US 2010/01293140及WO 2009/134976中的带电接头或亲水性接头,所述公布中每一者均明确地以引用的方式并入本文,所述公布中每一者均明确地以引用的方式并入本文。

[0504] 在一些实施方案中,细胞结合剂(例如,抗体)于水性缓冲液中的溶液可用摩尔过量的双官能交联剂,诸如N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫基)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酰亚

胺基-4-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯(SPDB)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫基)2-磺基丁酸酯(磺基-SPDB)温育以引入二硫基吡啶基。修饰的细胞结合剂(例如,修饰的抗体)接着与本文所述的含硫醇细胞毒性化合物反应,以产生本发明的二硫键连接的细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物。

[0505] 在另一个实施方案中,本文所述的含硫醇细胞毒性化合物可与双官能交联剂,诸如N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫基)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯(SPDB)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫基)2-磺基丁酸酯(磺基-SPDB)反应以形成细胞毒性剂-接头化合物,其可接着与细胞结合剂反应以产生本发明的二硫键连接的细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物。所述细胞毒性剂-接头化合物可当场制备而无需纯化,接着与细胞结合剂反应。或者,所述细胞毒性剂-接头化合物可在与细胞结合剂反应之前经纯化。

[0506] 所述细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物可使用本领域中已知的任何纯化方法,诸如描述于美国专利第7,811,572号及美国公布第2006/0182750号(均以引用的方式并入本文)中的那些来纯化。例如,所述细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物可使用切向流过滤、吸附色谱、吸附过滤、选择性沉淀、非吸收过滤或其组合来纯化。优选地,切向流过滤(TFF,也称作交叉流过滤、超滤及透滤)和/或吸附色谱树脂用于所述缀合物的纯化。

[0507] 每个抗体分子结合的细胞毒性分子的数目可以分光光度法通过测量在280nm及330nm下的吸光度的比率来测定。在一些实施方案中,平均1-10个细胞毒性化合物/抗体分子可通过上述方法连接。在一些实施方案中,每个抗体分子连接的细胞毒性化合物的平均数目(DAR)为2-5,且更具体地为2.5-4.0。在一些实施方案中,包含本发明缀合物的组合物(例如药物组合物)具有在2与8之间、在2与5之间、更具体地在2.5与4.0之间的DAR值。

[0508] 在一些实施方案中,当所述抗体经由半胱氨酸硫醇基连接至细胞毒性剂时,所述缀合物具有每个抗体分子1至4个细胞毒性化合物。在一些实施方案中,所述缀合物具有每个抗体分子1或2个细胞毒性化合物。在一些实施方案中,所述缀合物具有每个抗体分子2个细胞毒性化合物。在一些实施方案中,每个抗体分子连接的细胞毒性化合物的平均数目(DAR)为1.5-2.5,更具体地为1.8-2.2。在一些实施方案中,包含本发明缀合物的组合物(例如药物组合物)具有在1.0与2.5之间、在1.5与2.5之间、更具体地在1.8与2.2之间或在1.9与2.1之间的DAR值。

[0509] 用于制备本发明的细胞结合剂-药物缀合物的代表性方法描述于8,765,740及美国申请公布第2012/0238731号中。这些参考文献的完整教示以引用的方式并入本文。

[0510] 组合物及使用方法

[0511] 本发明包括包含本文所述的细胞毒性化合物、其衍生物或其缀合物(和/或其溶剂化物、水合物和/或盐)及载剂(药学上可接受的载剂)的组合物(例如,药物组合物)。

[0512] 本文所述的药物组合物可以多种方式被施用以用于局部或全身性治疗。施用可为表面(诸如至粘膜,包括阴道及直肠递送),诸如经皮贴片、软膏、洗剂、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体及散剂;肺(例如通过散剂或气雾剂的吸入或吹入,包括通过喷雾器;气管内、鼻内、表皮及经皮);口服;或肠道外,包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌肉内注射或输注;或颅内(例如鞘内或室内)施用。在一些特定实施方案中,所述施用为静脉内。本文所述的药物组合物亦可体外或离体使用。

[0513] 本发明组合物适用于抑制哺乳动物(例如,人)的异常细胞生长或治疗其增生性病症。

[0514] 本发明包括一种抑制哺乳动物(例如,人)的异常细胞生长或治疗其增生性病症、自身免疫病症、破坏性骨病症、传染病、病毒性疾病、纤维化疾病、神经退行性病症、胰腺炎或肾病的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的本文所述的细胞毒性化合物、其衍生物或其缀合物(和/或其溶剂化物及盐)或其组合物。

[0515] 在某些实施方案中,哺乳动物的增生性病症为癌症,包括血液科癌症、白血病或淋巴瘤。在某些实施方案中,所述增生性病症为淋巴器的癌症,或血液学恶性肿瘤。

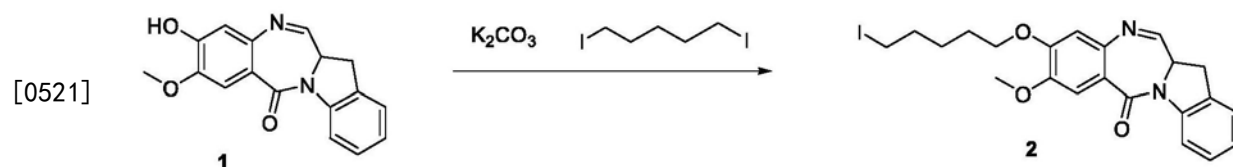
[0516] 例如,所述癌症可选自由以下组成的组:急性髓系白血病(AML,包括CD33低AML、P-糖蛋白阳性AML、复发性AML或难治性AML)、慢性骨髓性白血病(CML)(包括CML的原始细胞危象及与CML相关的Abelson致癌基因(Bcr-ABL易位))、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)(包括但不限于急性B淋巴细胞性白血病或B细胞急性淋巴细胞性白血病(B-ALL))、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)(包括Richter氏综合征或Richter氏CLL转化)、毛细胞白血病(HCL)、急性早幼粒细胞白血病(APL)、B细胞慢性淋巴增生性疾病(B-CLPD)、非典型慢性淋巴细胞性白血病(优选地具有经标记CD11c表达)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、母细胞性浆细胞样树突状细胞赘瘤(BPDCN)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)(包括套细胞白血病(MCL)及小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、霍奇金氏淋巴瘤、全身性肥大细胞增多症及伯基特淋巴瘤)。

[0517] 在某些实施方案中,所述癌症可选自由肺癌(例如非小细胞肺癌)、结直肠癌、膀胱癌、胃癌、胰腺癌、肾细胞癌、前列腺癌、食道癌、乳腺癌、头颈癌、子宫癌、卵巢癌、肝癌、子宫颈癌、甲状腺癌、睾丸癌、髓系癌、黑色素瘤及淋巴癌组成的组。在某些实施方案中,所述癌症为非小细胞肺癌、结直肠癌、胃癌、乳腺癌(例如三阴性乳腺癌(TNBC))或胰腺癌。在进一步实施方案中,本发明的免疫缀合物可适用于治疗非小细胞肺癌(鳞状细胞、非鳞状细胞、腺癌或大细胞未分化癌)、结直肠癌(腺癌、胃肠类癌肿瘤、胃肠基质肿瘤、原发性结直肠淋巴瘤、平滑肌肉瘤或鳞状细胞癌)或乳腺癌(例如三阴性乳腺癌(TNBC))

[0518] 合适的药学上可接受的载剂、稀释剂及赋形剂为熟知的且可作为临床表现凭证由所属领域技术人员确定。合适载剂、稀释剂和/或赋形剂的实例包括:(1)杜氏磷酸盐缓冲生理盐水,约pH 7.4,含有或不含约1mg/mL-25mg/mL人血清白蛋白,(2)0.9%生理盐水(0.9% w/vNaCl),及(3)5%(w/v)右旋糖;并且还可含有诸如色胺的抗氧化剂及诸如Tween 20的稳定剂。

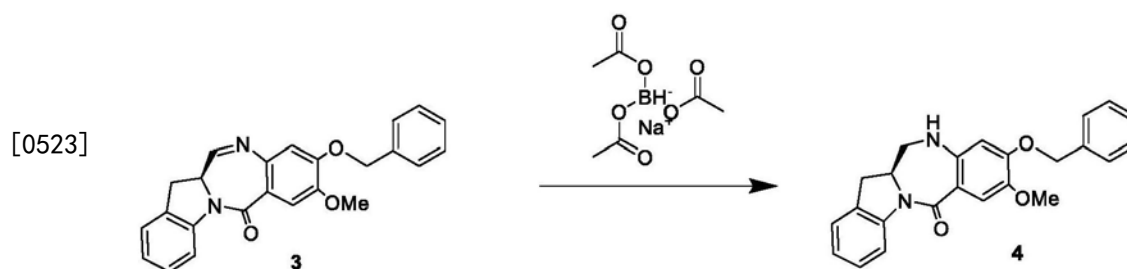
[0519] 例证

[0520] 实施例1.合成化合物18及化合物19



[0522] 化合物1(1g,3.40mmol)溶解于二甲基甲酰胺(22.65ml)中。添加1,5-二碘戊烷(3.66ml,23.78mmol)及碳酸钾(1.174g,8.49mmol)。所述反应避光且在室温下搅拌过夜。所述反应用二氯甲烷稀释且用氯化铵水溶液及盐水洗涤。有机层经无水硫酸钠干燥,过滤,且

在真空中浓缩。粗材料通过乙酸乙酯/二氯甲烷中的硅胶色谱纯化以生成化合物2 (1.05g, $y=63\%$) MS (m/z) : 491.1 (M+1)⁺。UPLC=4.93min (10min方法)。



[0524] (S)-9-(苯甲氧基)-8-甲氧基-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-6-酮 (4.3g, 11.19mmol) 在氮气下溶解于无水1,2-二氯乙烷 (102ml) 中且添加三乙酰氧基硼氢化钠 (7.11g, 33.6mmol)。所述反应在室温下搅拌持续4小时。所述混合物冷却至0℃且用饱和氯化铵淬灭且接着用二氯甲烷萃取。合并的有机物用盐水洗涤,经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩。粗化合物4无需进一步纯化继续使用,假定100%产率。MS (m/z) : 387.2 (M+1)⁺。UPLC=1.65min (2.5min方法)。

[0525] (UPLC 2.5min方法) 分析型BEH Phenyl HPLC方法:

[0526] 柱:Acquity UPLC BEH-C18 2.1×50 mm, 1.7μm粒径, P/N 186002350, SN 02743604615173

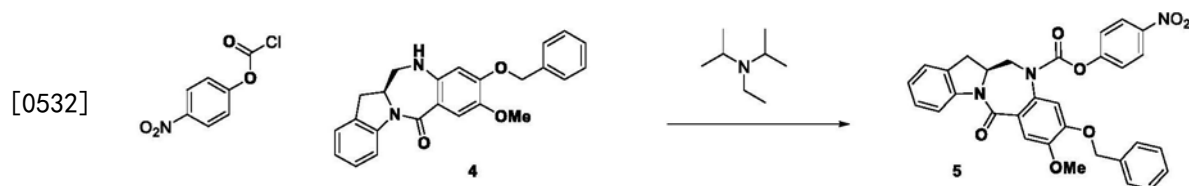
[0527] 流速:0.8mL/min

[0528] 温度:环境

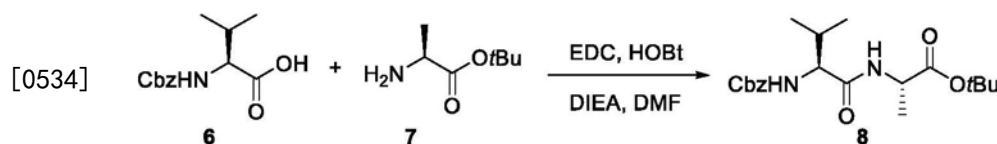
[0529] 流动相A:去离子水+0.1%甲酸

[0530] 流动相B:乙腈

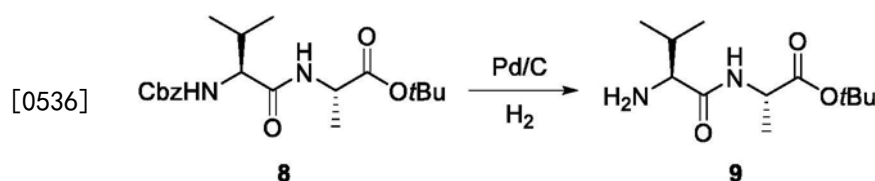
梯度:	时间	% B
	0	5
	1.8	98
	2	98
	2.1	5
	2.5	5



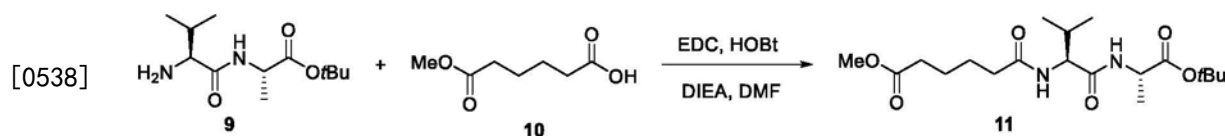
[0533] 在室温下向化合物4 (4.32g, 11.19mmol) 的溶液中添加胡尼碱 (Hunig's base) (2.339ml, 13.43mmol), 随后添加氯甲酸4-硝基苯酯 (2.58g, 12.31mmol) 于二氯甲烷中的溶液。4小时之后,所述反应用水淬灭,且分离各层。有机层用水、饱和碳酸氢钠及盐水洗涤。其经硫酸镁干燥,过滤并汽提。粗固体通过乙酸乙酯/己烷中的硅胶色谱纯化以生成呈淡黄色蓬松固体状的化合物5 (4.4g, $y=71\%$) MS (m/z) : 552.5 (M+1)⁺。UPLC=1.87min (2.5min方法)。



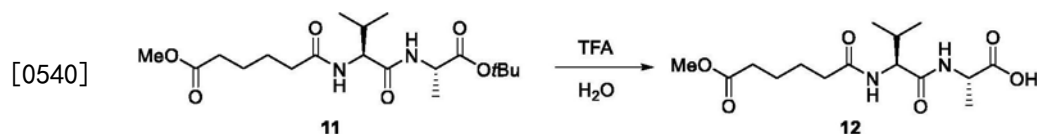
[0535] 化合物6 (3.0g, 11.94mmol) 及化合物7 (1.907g, 13.13mmol) 溶解于二甲基甲酰胺 (23.88mL) 中。EDC·HCl (2.52g, 13.13mmol) 及HOBT (2.011g, 13.13mmol) 添加至反应混合物中, 随后添加DIEA (4.59mL, 26.3mmol)。所述反应在室温下在Ar下搅拌过夜。反应混合物用二氯甲烷稀释且用饱和碳酸氢钠、饱和氯化铵、水及盐水洗涤。有机层经硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。粗残余物通过硅胶闪蒸色谱 (乙酸乙酯/己烷) 纯化以获得呈白色固体状的化合物8 (3.68g, 81% 产率)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ7.39-7.29 (m, 5H), 6.29 (bd, 1H, J=6.9Hz), 5.34 (bd, 1H, J=8.4Hz), 5.11 (s, 2H), 4.45 (p, 1H, J=7.2Hz), 4.02-3.98 (m, 1H), 2.18-2.09 (m, 1H), 1.56 (s, 9H), 1.37 (d, 3H, J=7.0Hz), 0.98 (d, 3H, J=6.8Hz), 0.93 (d, 3H, J=6.8Hz)。LCMS=5.571min (8min方法)。所观察到的质量 (ESI⁺): 323.25 (M-tBu+H)。



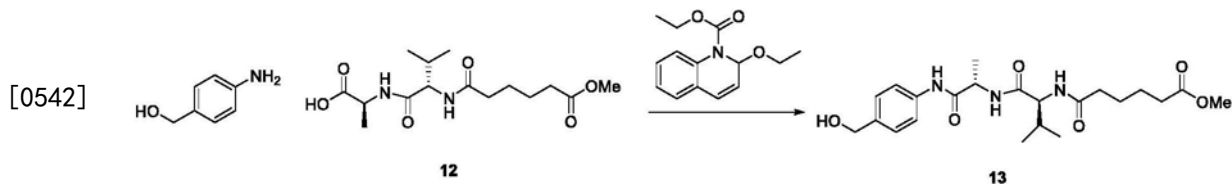
[0537] 化合物8 (3.68g, 9.72mmol) 溶解于甲醇 (30.9mL) 及水 (1.543mL) 中。所述溶液用Ar吹扫且脱气持续5分钟。Pd/C (10%, 湿, 0.517g) 缓慢地添加至反应混合物中。H₂接着鼓泡持续一分钟。停止鼓泡且所述反应接着在H₂气球下搅拌过夜。反应混合物经由硅藻土过滤且滤饼用甲醇 (30mL) 洗涤并浓缩以获得呈白色固体状的化合物9 (2.35g, 99% 产率)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ7.79-7.77 (m, 1H), 4.50 (p, 1H, J=7.3Hz), 3.27 (d, 1H, J=3.9Hz), 2.34-2.26 (m, 1H), 1.49 (s, 9H), 1.40 (d, 3H, J=7.1Hz), 1.01 (d, 3H, J=7.0Hz), 0.86 (d, 3H, J=6.9Hz)。



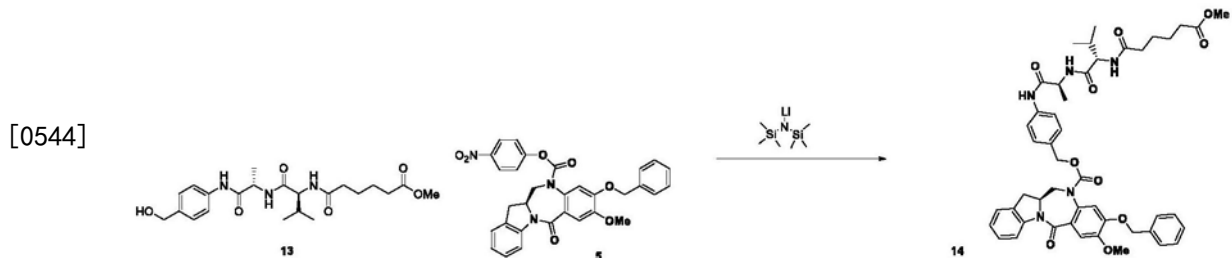
[0539] 化合物9 (2.35g, 9.62mmol) 及己二酸单甲酯 (1.69g, 10.58mmol) 溶解于二甲基甲酰胺 (32.1mL) 中。EDC·HCl (1.94g, 10.10mmol) 及HOBT (1.47g, 9.62mmol) 添加至反应混合物中, 随后添加DIEA (3.36mL, 19.24mmol)。所述反应在室温下搅拌过夜。反应混合物用二氯甲烷/甲醇 (20mL, 5:1) 稀释且用饱和氯化铵、饱和碳酸氢钠、水及盐水洗涤。有机层经硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。粗产物通过硅胶闪蒸色谱 (乙酸乙酯/己烷, 梯度0%至50%) 纯化以获得呈白色固体状的化合物11 (2.77g, 75% 产率)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ6.29 (d, 1H, J=7.2Hz), 6.12 (d, 1H, J=8.6Hz), 4.43 (p, 1H, J=7.2Hz), 4.27 (dd, 1H, J=6.4, 8.6Hz), 3.66 (s, 3H), 2.35-2.31 (m, 2H), 2.26-2.23 (m, 2H), 2.12-2.03 (m, 1H), 1.70-1.63 (m, 4H), 1.46 (s, 9H), 1.36 (d, 3H, J=7.1Hz), 0.95 (表观t, 6H, J=6.6Hz)。



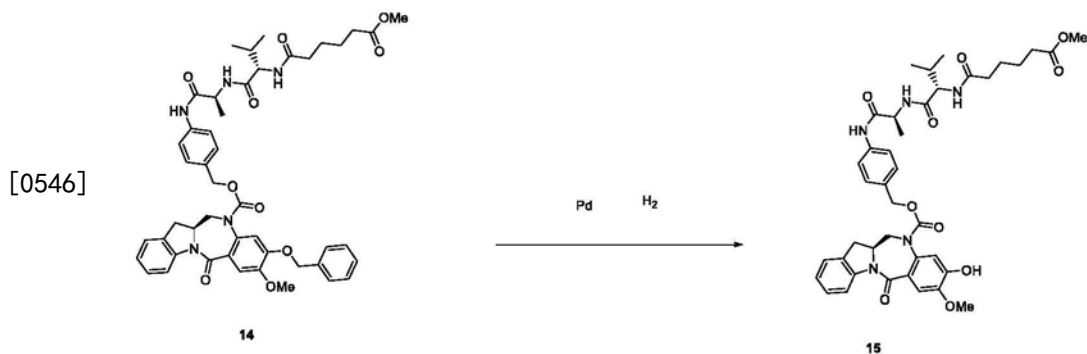
[0541] TFA (8.28ml, 108.0mmol) 及水 (0.56mL) 在室温下添加至纯化合物11 (2.77g, 7.17mmol) 中且搅拌持续2.5h。乙腈 (30mL) 添加至反应混合物中并浓缩。将此再重复2次以获得呈淡黄色固体状的化合物12 (2.0g, 84% 产率)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 8.11 (bs, 1H), 7.29 (d, 1H, J=8.9Hz), 7.14 (d, 1H, 6.8Hz), 4.58 (p, 1H, J=7.1Hz), 4.37 (t, 1H, J=8.7Hz), 3.68 (s, 3H), 2.37-2.32 (m, 4H), 2.03-1.99 (m, 2H), 1.69-1.63 (m, 4H), 1.49 (d, 3H, J=7.2Hz), 0.97 (d, 3H, J=4.8Hz), 0.96 (d, 3H, J=4.8Hz)。



[0543] (6-甲氧基-6-氧代己酰基)-L-缬氨酰基-L-丙氨酸 (4.93g, 14.92mmol) 悬浮于无水二氯甲烷 (49.7ml) 及无水甲醇 (24.87ml) 中。相继添加EEDQ (6.64g, 26.9mmol) 及(4-氨基苯基) 甲醇 (2.205g, 17.91mmol) 且所述反应在室温下搅拌过夜。反应混合物经浓缩并用二氯甲烷共蒸发。粗材料通过二氯甲烷/甲醇中的硅胶色谱纯化以生成化合物13 (2.04g, y=31%) MS (m/z): 434.3 (M-1)⁻。UPLC=1.23min (2.5min方法)。



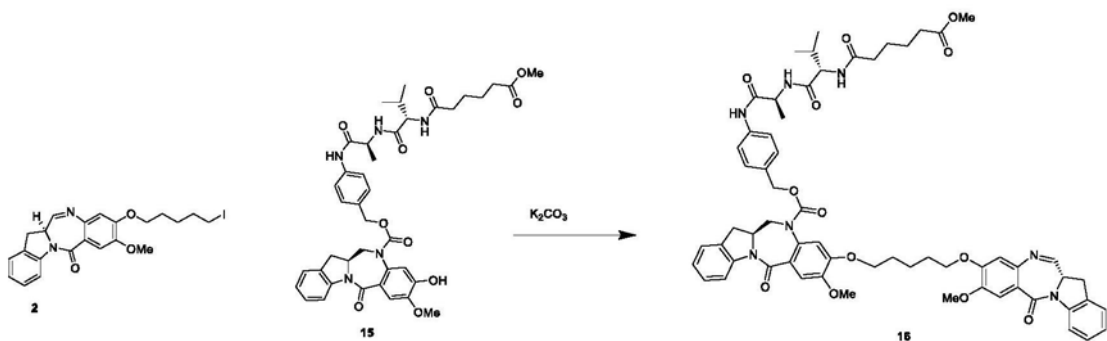
[0545] 在0℃下向化合物13 (805mg, 1.848mmol) 于无水THF (3501μl) 及无水二甲基乙酰胺 (7001μl) 中的溶液中添加双(三甲基甲硅烷基) 氨基锂 (1M于THF中) (1848μl, 1.848mmol)。所述反应搅拌持续15分钟, 接着添加含化合物5 (850mg, 1.540mmol) 的无水THF (3501μl)。反应混合物在0℃下搅拌且使其温至室温过夜。所述反应在0℃下用饱和氯化铵淬灭, 使得形成沉淀物。所述溶液用二氯甲烷萃取。合并的有机物用水洗涤 (2次)。有机物经硫酸镁干燥, 过滤并浓缩。其通过硅胶色谱 (二氯甲烷/甲醇) 纯化以生成化合物14 (430mg, y=33%)。MS (m/z): 848.7 (M+1)⁺。UPLC=1.74min (2.5min方法)。



[0547] 向经氩气脱气的化合物14 (0.38g, 0.448mmol) 于无水甲醇 (6.40ml) 中的溶液中添加钯/碳10% (0.048g)。所述溶液再次脱气且接着在氢气气氛下在室温下搅拌且通过UPLC监测直至完全。1小时30分钟之后, 反应混合物经由硅藻土过滤, 用二氯甲烷/甲醇冲洗。粗

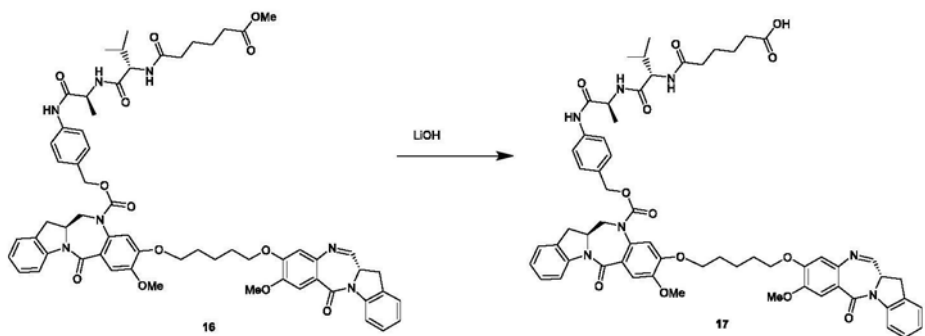
固体通过二氯甲烷/甲醇中的硅胶色谱纯化并收集纯部分以生成化合物15 (263mg, $y=77\%$)。MS (m/z): 758.6 ($M+1$)⁺。UPLC=1.52min (2.5min方法)。

[0548]



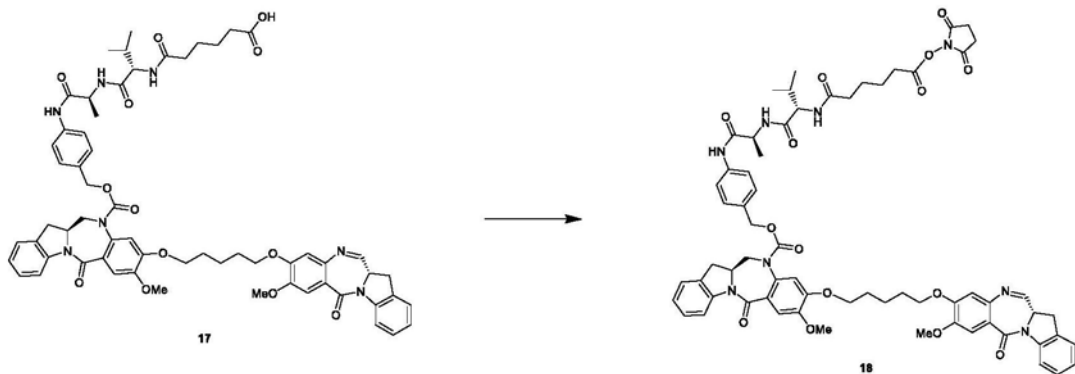
[0549] 化合物15 (414mg, 0.0546mmol) 及化合物2 (321mg, 0.656mmol) 溶解于无水二甲基乙酰胺 (5463 μ l) 中。添加碳酸钾 (151mg, 1.093mmol) 且所述反应在室温下在氮气下搅拌过夜。所述反应用水沉淀, 搅拌持续五分钟且过滤。所得固体溶解于20%甲醇/二氯甲烷中, 转移至分液漏斗, 用水洗涤, 经无水硫酸镁干燥且在真空中浓缩并经由二氯甲烷/甲醇中的硅胶色谱纯化。纯部分的蒸发生成化合物16 (329mg, $y=54\%$)。MS (m/z): 1121.3 ($M+1$)⁺。UPLC=1.88min (2.5min方法)。

[0550]



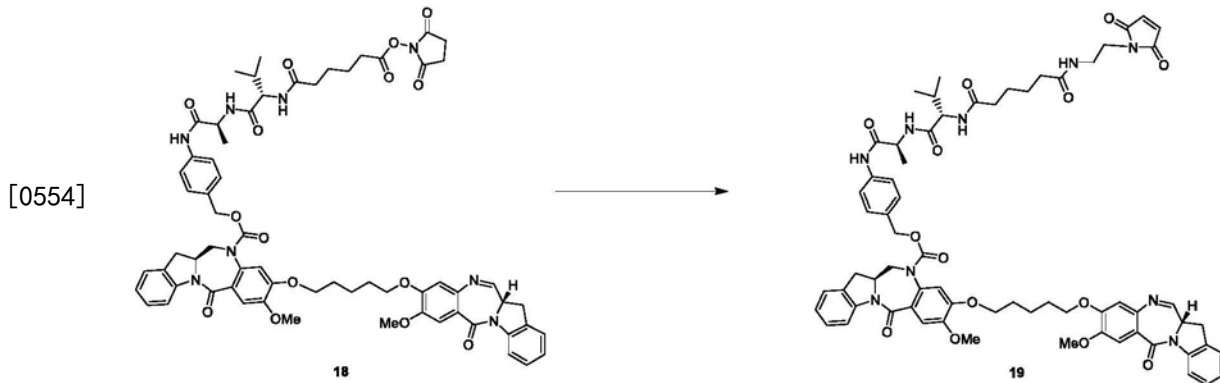
[0551] 化合物16 (0.329g, 0.294mmol) 溶解于无水四氢呋喃 (11.01ml) 及去离子水 (3.67ml) 中。添加氢氧化锂 (0.021g, 0.881mmol) 且所述反应通过UPLC监测直至完全转化为所需产物。在室温下搅拌持续1小时30分钟之后, 其用30%甲醇/二氯甲烷及去离子水稀释, 接着用0.5M HCl缓慢地酸化至pH约为3。经酸化水层用30%甲醇/二氯甲烷萃取两次。合并的有机物用水洗涤至pH=5, 经硫酸镁干燥, 经硅藻土过滤, 浓缩并用二氯甲烷共蒸发以生成呈黄色固体状的化合物17, 其无需进一步纯化即使用。(290mg, $y=89\%$)。MS (m/z): 1107.2 ($M+1$)⁺。UPLC=1.78min (2.5min方法)。

[0552]



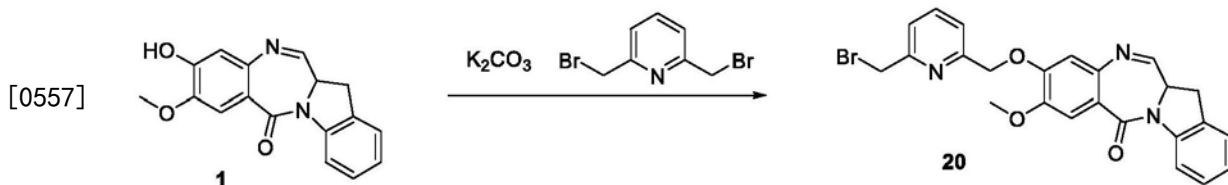
[0553] 化合物17 (0.29g, 0.262mmol) 悬浮于无水二氯甲烷 (6.55ml) 中。添加N-羟基琥珀

酰亚胺 (0.091g, 0.786mmol) 及 EDC.HCl (0.251g, 1.311mmol) 且起始材料变得可溶。所述反应在室温下搅拌持续1小时且完成。所述反应用二氯甲烷稀释且用水洗涤。有机物经硫酸镁干燥, 过滤并汽提以生成310mg粗材料, 所述粗材料通过RP-HPLC (C18Kromasil, 去离子水/乙腈) 纯化。含有所需材料的部分经冷冻并冻干以生成纯的最终化合物18 (140mg, $y=56\%$ * 基于经纯化的量的回收)。MS (m/z): 1204.4 ($M+1$)⁺。UPLC=1.86min (2.5min方法)。

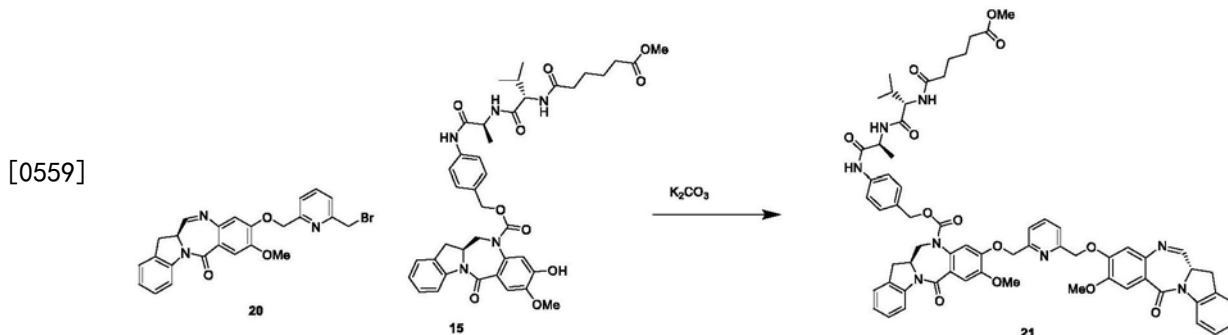


[0555] 化合物18 (96.6mg, 0.080mmol) 溶解于无水二氯甲烷 (3211 μ l) 中。添加1-(2-氨基乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮盐酸盐 (18.29mg, 0.096mmol), 随后添加无水DIPEA (28.0 μ l, 0.161mmol)。所述反应通过UPLC监测且在1小时30分钟之后浓缩至干。粗固体再溶解于乙腈/去离子水及数滴甲酸中且通过RP-HPLC (C18 Kromasil, 去离子水/乙腈) 纯化。含有所需材料的部分经冷冻并冻干以生成纯的最终化合物19 (54mg, $y=55\%$)。MS (m/z): 1229.4 ($M+1$)⁺。UPLC=1.78min (2.5min方法)。

[0556] 实施例2. 合成化合物23

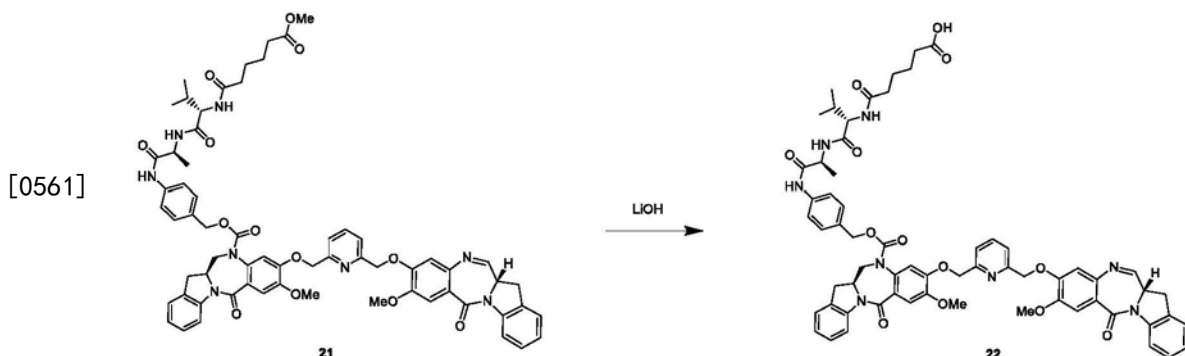


[0558] 化合物1 (0.173g, 0.588mmol) 溶解于二甲基甲酰胺 (3.92ml) 中且添加2,6-双(溴甲基)吡啶 (1.090g, 4.11mmol) 及碳酸钾 (0.203g, 1.470mmol)。所述反应搅拌持续4小时30分钟, 此时化合物1被消耗。所述反应用乙酸乙酯稀释且用饱和氯化铵、水及盐水洗涤。粗材料溶解于二氯甲烷中并通过硅胶色谱 (二氯甲烷/乙酸乙酯) 纯化。纯部分合并以生成化合物20 (193mg, $y=68\%$)。MS (m/z): 478.3 ($M+1$)⁺。UPLC=1.6min (2.5min方法)。

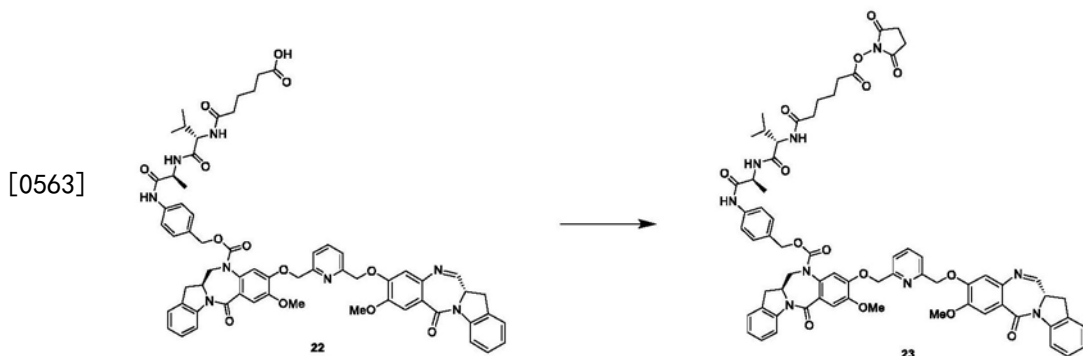


[0560] 化合物15 (86mg, 0.113mmol) 及化合物20 (65.1mg, 0.136mmol) 溶解于无水二甲基

乙酰胺 (1135 μ l) 中。添加碳酸钾 (31.4mg, 0.227mmol) 且所述反应在室温下搅拌过夜。所述反应用水沉淀, 搅拌持续5分钟, 且过滤。所得固体溶解于20%甲醇/二氯甲烷中, 转移至分液漏斗, 用水洗涤, 经无水硫酸镁干燥并浓缩。粗材料经由硅胶柱色谱 (二氯甲烷/甲醇) 纯化以生成化合物21 (96mg, $y=73\%$)。MS (m/z): 1156.2 ($M+1$)⁺。UPLC=1.84 (2.5min方法)。

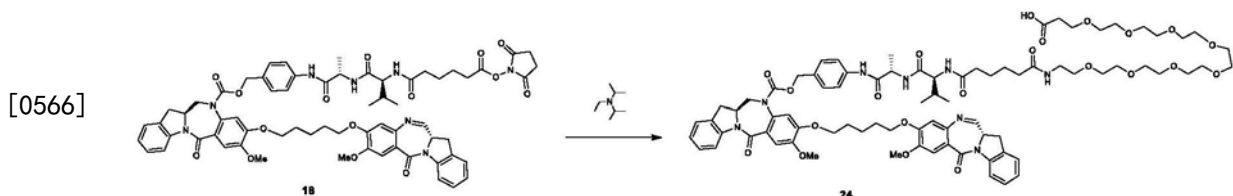


[0562] 化合物22与化合物17相似地制备。粗材料无需进一步纯化即使用以生成 (94mg, $y=99\%$)。MS (m/z): 1142.2 ($M+1$)⁺。UPLC=1.76 (2.5min方法)。

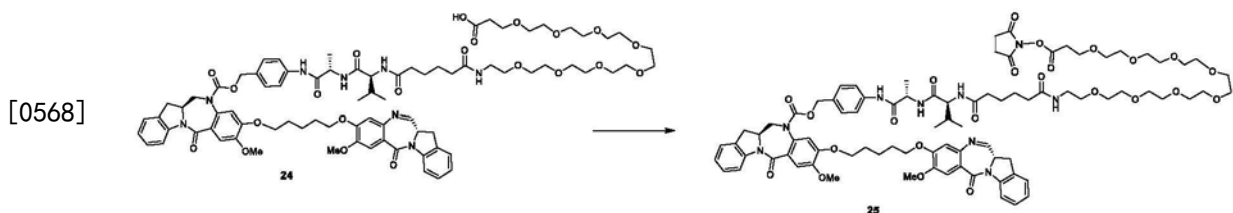


[0564] 化合物23与化合物18相似地制备。粗材料经由RPHPLC (C18柱, 乙腈/水) 纯化以生成最终化合物23 (41mg, $y=40\%$)。MS (m/z): 1239.3 ($M+1$)⁺。UPLC=1.82min (2.5min方法)。

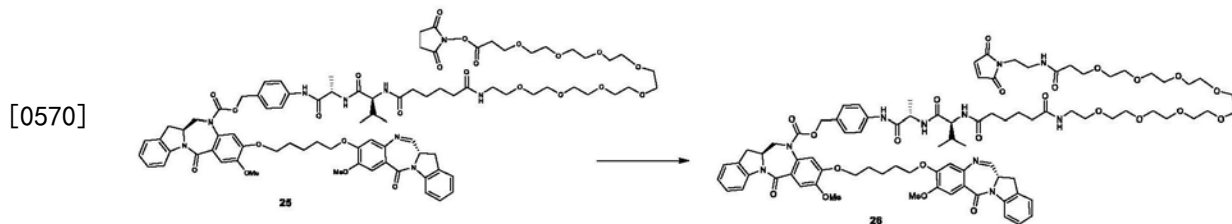
[0565] 实施例3. 合成化合物25及26



[0567] 化合物18 (49mg, 0.041mmol) 溶解于无水二氯甲烷 (1629 μ l) 中。在室温下添加1-氨基-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂二十七烷-27-酸 (19.78mg, 0.045mmol) 及DIPEA (10.64 μ l, 0.061mmol)。所述反应搅拌持续1小时30分钟并接着浓缩至干。粗残余物通过二氯甲烷/甲醇中的硅胶色谱纯化。收集纯部分且用二氯甲烷共蒸发以生成呈蓬松白色固体状的化合物24 (39mg, $y=63\%$)。UPLC=1.60min (2.5min方法)。

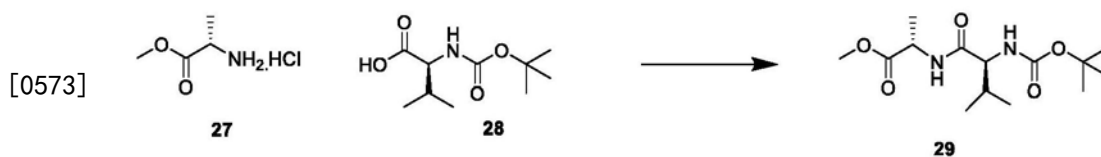


[0569] 化合物25与化合物18相似地制备。粗材料直接地用于下一反应或经由RPHPLC (C18柱, 乙腈/水) 纯化以生成最终纯化合物25 (10mg, $y=49\%$)。MS (m/z): 1627.2 ($M+1$)⁺。UPLC=1.66min (2.5min方法)。

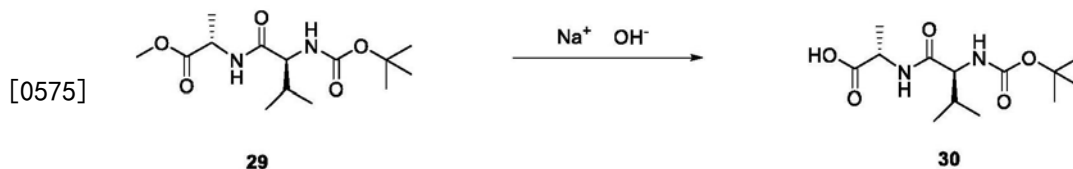


[0571] 化合物26与化合物19相似地制备。粗材料经由RPHPLC (C18柱, 乙腈/水) 纯化以生成最终纯化合物26 (12mg, $y=48\%$)。MS (m/z): 1652.2 ($M+1$)⁺。UPLC=1.60min (2.5min方法)。

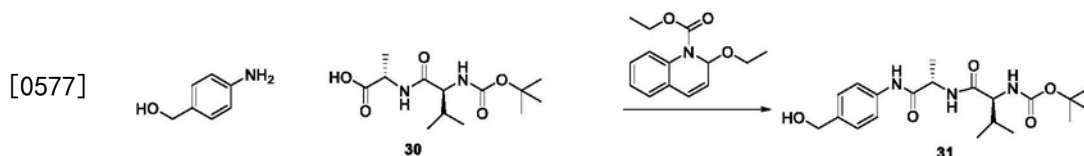
[0572] 实施例4. 合成化合物36及化合物37



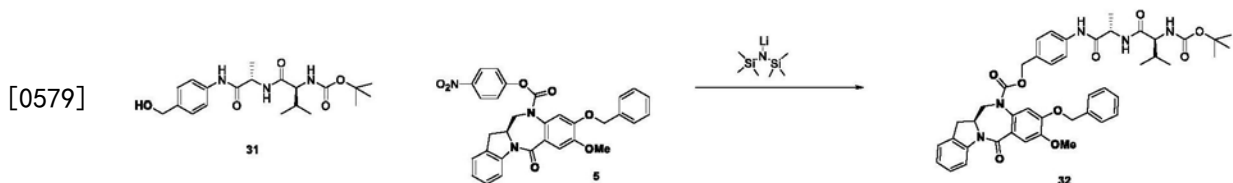
[0574] (叔丁氧羰基)-L-缬氨酸 (10.58g, 48.7mmol) 溶解于二氯甲烷 (97ml) 中。在室温下分成数份添加CDI (9.48g, 58.4mmol)。所述混合物在室温下在氩气下搅拌持续2.5小时且所述反应已变成黄色。添加L-丙氨酸甲酯盐酸盐 (7.00g, 50.2mmol) 且所述混合物变成淡黄色。其继续在氩气下搅拌过夜。所述混合物用二氯甲烷稀释, 用1M HCl水溶液 (2次)、饱和碳酸氢钠水溶液及盐水洗涤。有机物经无水硫酸镁干燥, 过滤并浓缩以生成呈白色固体状的化合物29, 其无需进一步纯化作为粗物质使用 (12.85g, $y=87\%$)。



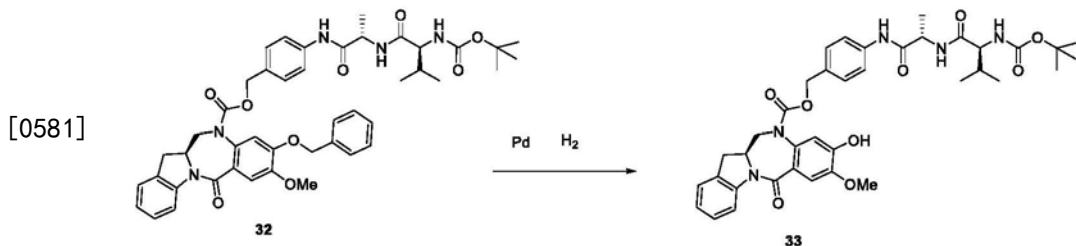
[0576] 化合物29 (12.85g, 42.5mmol) 溶解于甲醇 (42.5ml) 中并冷却至0℃。1M氢氧化钠 (47.8ml, 47.8mmol) 添加至反应中且所述反应通过使用溴甲酚绿染色的TLC监测。2.5小时之后, 添加水以使浑浊溶液澄清。所述溶液接着在冰浴中用1M HCl酸化至pH约为3-4, 使得形成沉淀物。将其从冰浴中移出且用乙酸乙酯萃取三次, 用盐水洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤并汽提以生成白色粘性固体。粗材料置于高真空下且无需进一步纯化即使用以生成化合物30 (12.05g, $y=98\%$)。



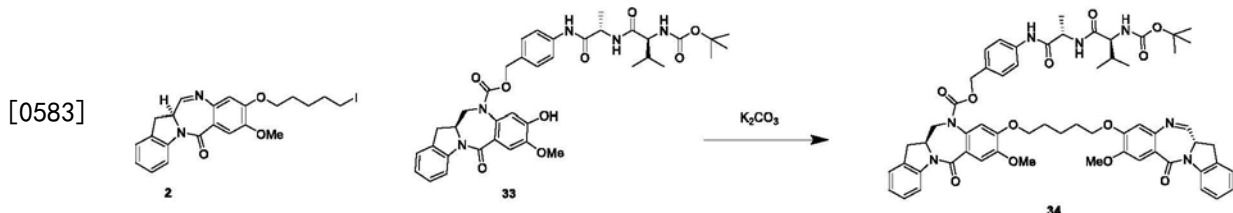
[0578] 化合物30 (12.05g, 41.8mmol) 悬浮于无水二氯甲烷 (139ml) 及甲醇 (69.7ml) 中。相继添加EEDQ (18.60g, 75mmol) 及 (4-氨基苯基) 甲醇 (6.18g, 50.1mmol) 且所述反应在室温下在氩气下搅拌过夜。反应混合物经浓缩并用二氯甲烷共蒸发。固体用乙酸乙酯湿磨并接着通过硅胶色谱 (二氯甲烷/甲醇) 纯化以生成化合物31 (5.45g, $y=33\%$)。



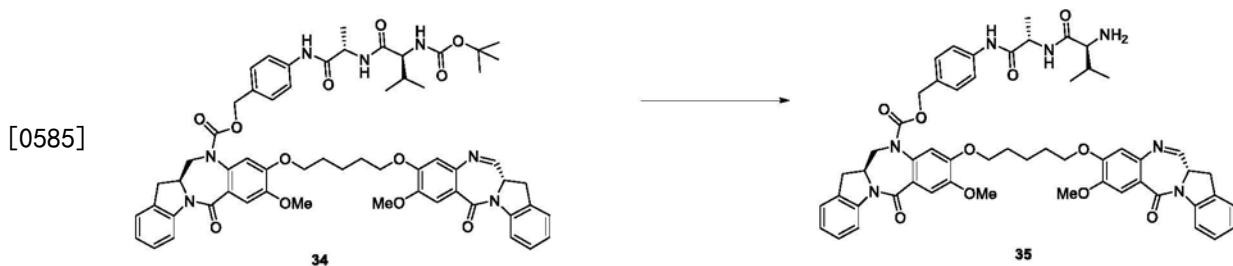
[0580] 化合物31及化合物5与化合物14的形成相似地发生反应。材料通过硅胶色谱(二氯甲烷/甲醇)纯化以生成化合物32 (507mg, $y=54\%$)。MS (m/z): 806.5 ($M+1$)⁺及804.5 ($M-1$)⁻。UPLC=1.86min (2.5min方法)。



[0582] 化合物33与化合物15相似地制备。粗材料通过硅胶色谱纯化以生成 (213mg, $y=47\%$)。MS (m/z): 716.6 ($M+1$)⁺及714.5 ($M-1$)⁻。UPLC=1.61min (2.5min方法)。

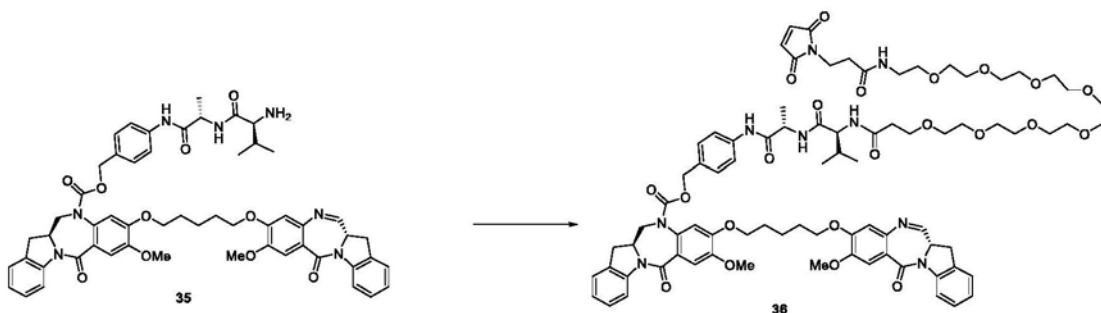


[0584] 化合物2及化合物33与化合物16的制备相似地发生反应。粗材料通过硅胶色谱(二氯甲烷/甲醇)纯化以生成化合物34 (140mg, $y=94\%$)。MS (m/z): 1078.7 ($M+1$)⁺。UPLC=1.84min (2.5min方法)。



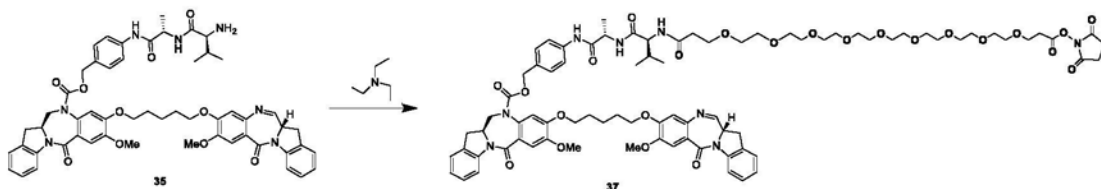
[0586] 化合物34 (70mg, 0.065mmol) 溶解于无水二氯甲烷 (600 μ l) 中且在冰浴中冷却至 0C。添加无水二氯甲烷 (600 μ l) 及TFA (601 μ l) 的新鲜混合溶液且所述溶液变成亮黄色。所述反应通过UPLC监测且在氩气下在0C下搅拌持续50分钟,直至起始材料的完全消耗。其用二氯甲烷稀释且倾入冰/饱和碳酸氢钠溶液中。分离的有机物用盐水洗涤,经硫酸镁干燥,过滤并汽提以生成呈淡黄色固体状的化合物35 (55mg, $y=87\%$),所述化合物无需进一步纯化直接地加以使用。MS (m/z): 978.7 ($M+1$)⁺。UPLC=1.44min (2.5min方法)。

[0587]



[0588] 化合物35 (55mg, 0.056mmol) 及1-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-3-氧代-7,10,13,16,19,22,25,28-八氧杂-4-氮杂三十一烷-31-酸 (33.3mg, 0.056mmol) 溶解于无水二氯甲烷 (3514 μ l) 中。添加EDC (10.78mg, 0.056mmol) 且所述反应脱气三次且在室温下在氩气下搅拌。其通过UPLC监测并且1小时之后, 所述反应用二氯甲烷稀释且用水及盐水洗涤。有机物经硫酸镁干燥, 过滤并汽提以生成65mg粗物质。粗材料经由RPHPLC (C18柱, 乙腈/水) 纯化以生成最终纯化合物36 (48mg, $y=55\%$)。MS (m/z): 1553.7 ($M+1$)⁺。UPLC=1.63min (2.5min方法)。

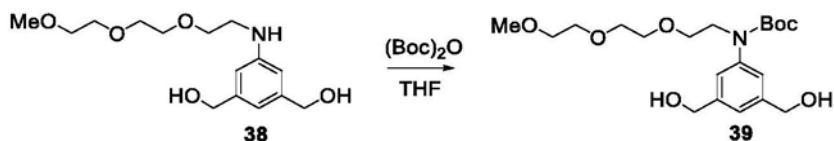
[0589]



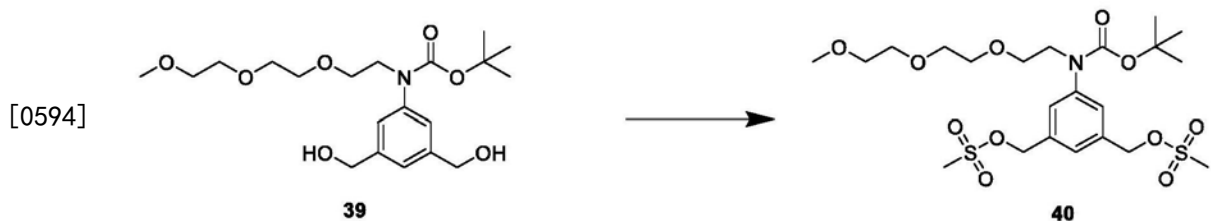
[0590] 4,7,10,13,16,19,22,25,28-九氧杂三十一烷二酸双(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)酯 (34.8mg, 0.049mmol) 溶解于无水二甲基甲酰胺 (981 μ l) 中且直接地添加至化合物35 (48mg, 0.049mmol) 中。添加三乙胺 (10.26 μ l, 0.074mmol) 且接着使所述反应脱气并在室温下在氩气下搅拌。再添加40 μ l三乙胺且所述反应加热至35C持续2.5小时且接着在室温下搅拌过夜。所述反应用水及二氯甲烷稀释。水溶液含有所有所需产物。添加乙腈至分离的水溶液中, 冷冻并冻干。将粗冻干材料溶解于二甲基乙酰胺中且经由RPHPLC (水/乙腈) 纯化。冷冻并冻干纯部分以生成化合物37 (8mg, $y=10\%$)。MS (m/z): 1572.4 ($M+1$)⁺。UPLC=1.70min (2.5min方法)。

[0591] 实施例5. 合成化合物46及化合物47

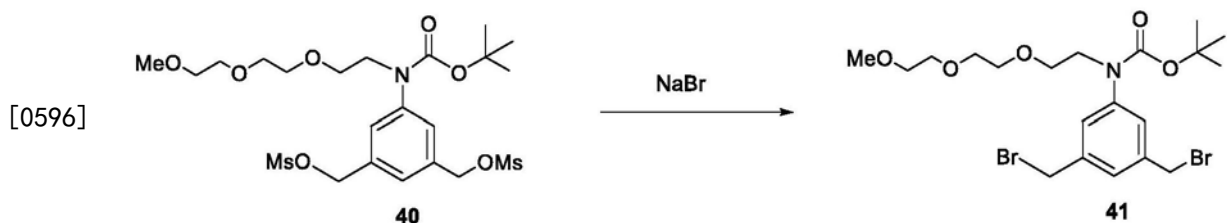
[0592]



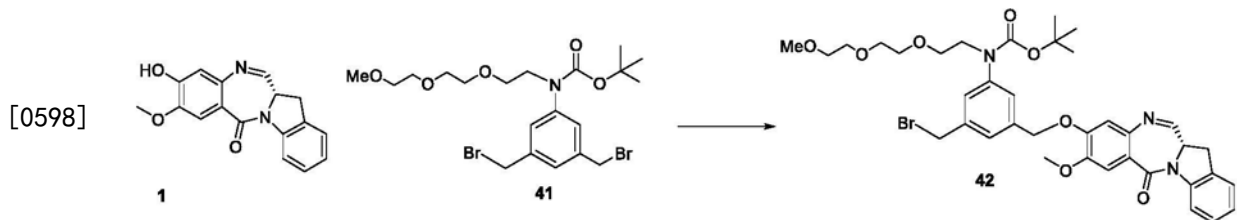
[0593] 向苯胺38 (339mg, 1.1mmol) 于无水四氢呋喃 (4.0mL) 中的搅拌溶液中添加Boc酐 (272mg, 1.2mmol)。所述混合物继续在室温下搅拌持续三天。反应混合物在减压下浓缩并且残余物通过硅胶色谱 (二氯甲烷/甲醇) 纯化以生成呈无色油状物的化合物39 (405mg, $y=90\%$)。¹H NMR (400Hz, CDCl₃): δ 7.00 (s, 2H), 6.97 (s, 1H), 4.38 (s, 4H), 4.12 (s, 2H), 3.64 (t, $J=5.6$ Hz, 2H), 3.48-3.44 (m, 8H), 3.40-3.38 (m, 2H), 3.21 (s, 3H), 1.31 (s, 9H); ¹³C NMR (400Hz, CDCl₃): δ 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。



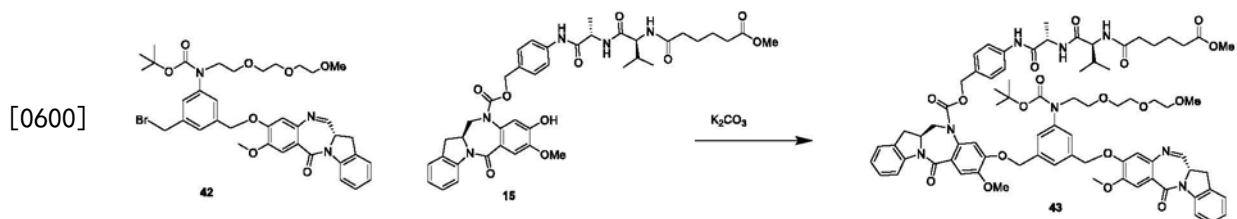
[0595] 化合物39 (3g, 7.51mmol) 溶解于无水二氯甲烷 (75ml) 中且在丙酮/干冰浴中冷却至 -5°C 。添加三乙胺 (5.23ml, 37.5mmol), 随后添加甲烷磺酐 (3.27g, 18.77mmol) 且所得混合物在 -5°C 下搅拌持续两小时。所述反应用冷乙酸乙酯稀释且用冰水洗涤两次。滤液经无水硫酸镁干燥, 过滤且在真空中浓缩以生成化合物40 (3.58g, $y=86\%$ 产率)。粗材料置于高真空下且接着无需进一步纯化直接地加以使用。MS (m/z): 556.2 ($M+1$)⁺。UPLC=1.48min (2.5min方法)。



[0597] 化合物40 (3.58g, 6.44mmol) 溶解于二甲基甲酰胺 (32.2ml) 中。添加溴化钠 (3.31g, 32.2mmol) 且所述反应在室温下搅拌过夜以通过UPLC发现生成一个新的峰。用水稀释反应混合物且用乙酸乙酯萃取。用水洗涤有机物且经无水硫酸镁干燥, 过滤并汽提以生成化合物41 (3.01g, $y=89\%$), 其无需进一步纯化继续使用。UPLC=1.79min (2.5min方法)。

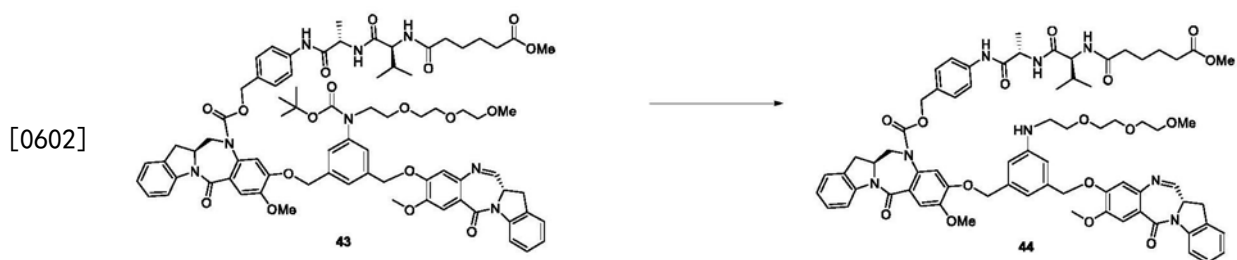


[0599] 化合物1 (0.241g, 0.819mmol) 及化合物41 (3.01g, 5.73mmol) 溶解于二甲基甲酰胺 (5.46ml) 中。添加碳酸钾 (0.283g, 2.047mmol) 且所述反应在室温下搅拌持续2.5小时, 直至化合物1的完全消耗。所述反应用乙酸乙酯稀释且用饱和氯化铵、水及盐水洗涤。粗材料溶解于二氯甲烷中并通过硅胶色谱 (二氯甲烷/乙酸乙酯) 纯化。收集纯的单偶合材料以生成化合物42 (322mg, $y=53\%$)。MS (m/z): 738.3 ($M+1$)⁺。UPLC=1.80min (2.5min方法)。

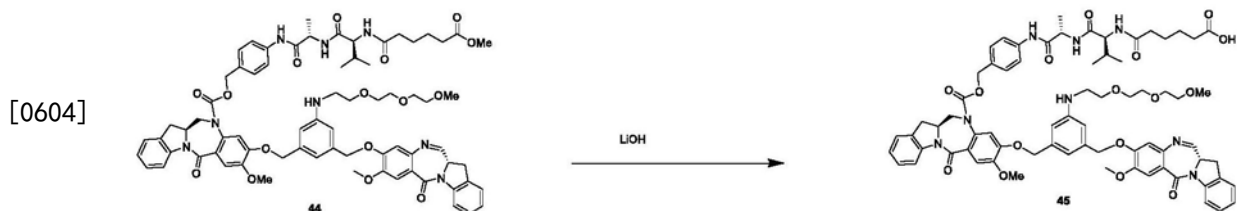


[0601] 化合物42 (94mg, 0.127mmol) 及化合物15 (88mg, 0.116mmol) 溶解于无水二甲基乙酰胺 (1157 μ l) 中。添加碳酸钾 (32.0mg, 0.231mmol) 且所述反应在室温下搅拌过夜。所述反应用水沉淀, 搅拌持续5分钟且过滤。所得固体溶解于具有少量甲醇的二氯甲烷中, 经无水硫酸镁干燥, 过滤, 且在真空中浓缩。粗材料经由硅胶柱 (二氯甲烷/甲醇) 纯化以生成呈蓬

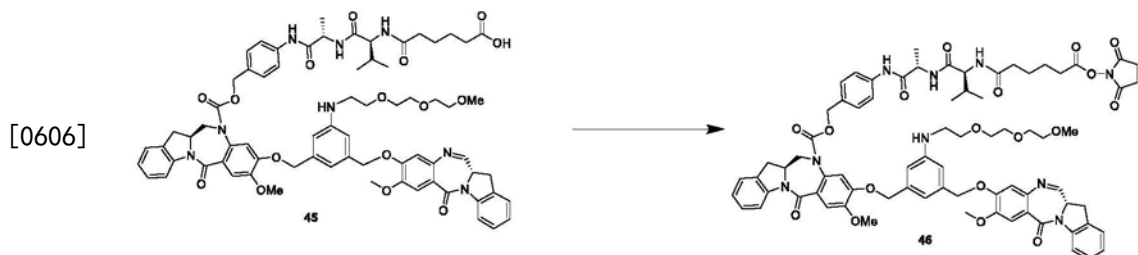
松固体状的化合物43 (110mg, $y=67\%$)。MS (m/z): 1416.2 ($M+1$)⁺。UPLC=1.84min (2.5min方法)。



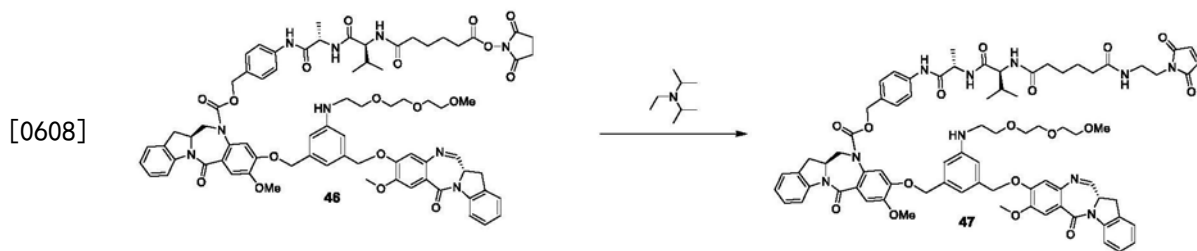
[0603] 化合物43 (110mg, 0.078mmol) 溶解于无水二氯甲烷 (700 μ l) 中且在冰浴中冷却至 0C。添加无水二氯甲烷 (700 μ l) 及TFA (719 μ l) 的新鲜混合溶液。所述反应在0C下搅拌持续45分钟。其用二氯甲烷稀释反应, 倾入冰/饱和碳酸氢钠溶液中, 且接着分离的有机物用盐水洗涤, 经硫酸镁干燥, 过滤并汽提。粗物质通过二氯甲烷/甲醇中的硅胶色谱纯化以生成化合物44 (84mg, $y=82\%$)。MS (m/z): 1316.2 ($M+1$)⁺。UPLC=1.72min (2.5min方法)。



[0605] 化合物44 (84mg, 0.064mmol) 溶解于无水四氢呋喃 (2395 μ l) 及去离子水 (798 μ l) 中。添加氢氧化锂 (4.59mg, 0.192mmol) 且所述反应在室温下搅拌持续1小时。其用30%甲醇/二氯甲烷及去离子水稀释, 接着用0.5M HCl缓慢地酸化至pH约为3。水溶液用30%甲醇/二氯甲烷再萃取两次。合并的有机物用水洗涤至pH=5, 经硫酸镁干燥, 经硅藻土过滤, 浓缩并用二氯甲烷共蒸发以获得89mg粗化合物45。假定100%用于下一反应质量。MS (m/z): 1302.4 ($M+1$)⁺。UPLC=1.64min (2.5min方法)。

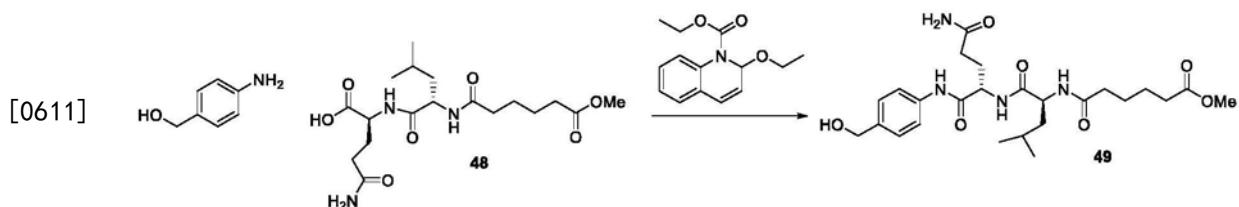


[0607] 化合物45 (83mg, 0.064mmol) 溶解于无水二氯甲烷 (1594 μ l) 中。添加N-羟基琥珀酰亚胺 (22.02mg, 0.191mmol) 及EDC.HCl (61.1mg, 0.319mmol) 且所述反应在氩气下搅拌持续50分钟。其用二氯甲烷稀释且用水洗涤。有机物经硫酸镁干燥, 过滤并汽提。粗固体直接地用于下一反应或通过RP-HPLC (C18 Kromasil, 乙腈/去离子水) 纯化。纯部分经冷冻并冻干以生成化合物46 (51mg, $y=57\%$)。MS (m/z): 1399.3 ($M+1$)⁺。UPLC=1.70min (2.5min方法)。

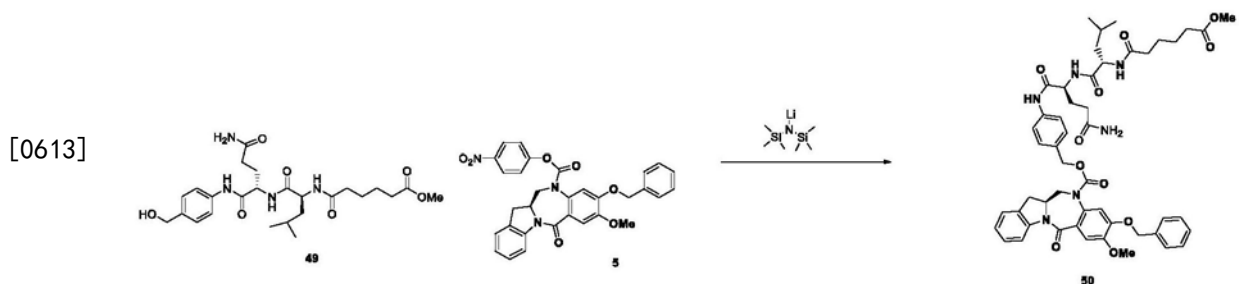


[0609] 化合物46 (53.7mg, 0.038mmol) 溶解于无水二氯甲烷 (1536 μ l) 中。添加1-(2-氨基乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮盐酸盐 (8.02mg, 0.042mmol), 随后添加无水N-乙基-N-异丙基丙-2-胺 (13.38 μ l, 0.077mmol)。所述反应通过UPLC监测并且1.5小时之后浓缩至干。粗固体溶解于乙腈/去离子水/四氢呋喃及数滴甲酸中且通过RP-HPLC (C18, 水/乙腈) 纯化。纯部分合并并且经冷冻并冻干以生成纯化合物47 (20.4mg, 37%)。MS (m/z): 1424.7 (M+1)⁺。UPLC = 1.65min (2.5min方法)。

[0610] 实施例6. 合成化合物55及化合物56

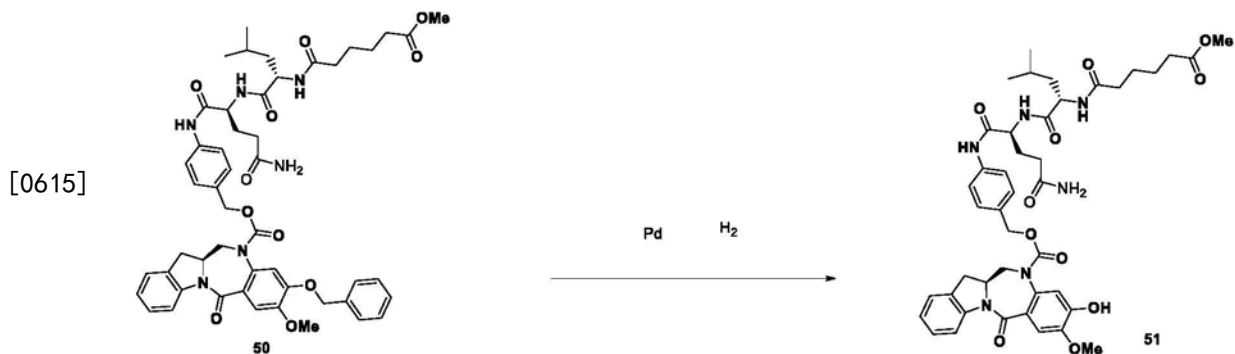


[0612] 向(6-甲氧基-6-氧代己酰基)-L-亮氨酸-L-谷氨酰胺 (0.83g, 2.067mmol) 及(4-氨基苯基) 甲醇 (0.306g, 2.481mmol) 于无水二氯甲烷 (9.19ml) 及无水甲醇 (4.59ml) 中的溶液 (亮黄色溶液) 中添加EEDQ (1.023g, 4.13mmol) 且反应混合物在环境温度下在氮气下搅拌持续18小时。反应混合物经浓缩并且所得残余物用乙酸乙酯湿磨。将灰白色固体过滤, 用乙酸乙酯洗涤且干燥以生成呈白色固体状的6-(((S)-1-(((S)-5-氨基-1-((4-(羟基甲基) 苯基) 氨基)-1,5-二氧代戊-2-基) 氨基)-4-甲基-1-氧代戊-2-基) 氨基)-6-氧代己酸甲酯 (0.5g, y=48%)。MS (m/z): 508.05 (M+1)⁺。LC=3.72min

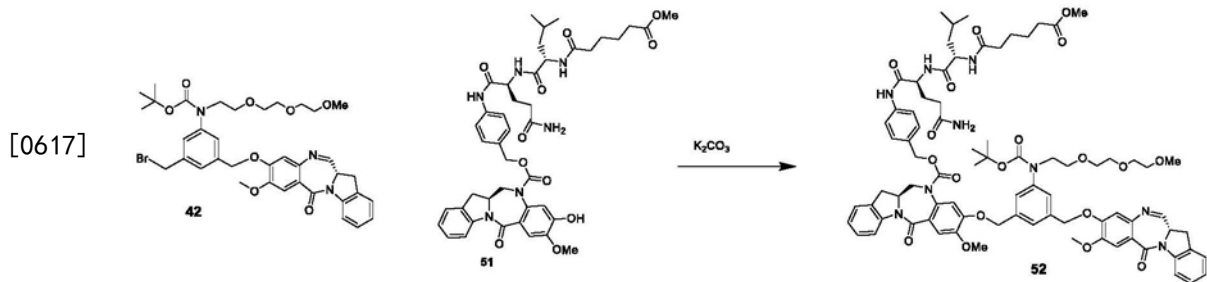


[0614] 在0℃下向6-(((S)-1-(((S)-5-氨基-1-((4-(羟基甲基) 苯基) 氨基)-1,5-二氧代戊-2-基) 氨基)-4-甲基-1-氧代戊-2-基) 氨基)-6-氧代己酸甲酯 (450mg, 0.888mmol) 于无水四氢呋喃 (1.68ml) 及无水N,N-二甲基乙酰胺 (3.36ml) 中的溶液中添加双(三甲基甲硅烷基) 氨基锂 (1M于四氢呋喃中, 0.888ml, 0.888mmol)。澄清黄色反应搅拌持续15分钟, 接着添加含化合物5 (408mg, 0.740mmol) 的无水四氢呋喃 (1.68ml)。反应混合物在0℃下搅拌且经18小时使其温至室温。所述混合物在0℃下用饱和氯化铵水溶液淬灭反应且用二氯甲烷 (3 $\times$ 50mL) 萃取。合并的有机层用水 (2 $\times$ 50mL) 洗涤且接着经无水硫酸镁干燥, 过滤并浓缩。粗材料通过ISCO (24g 硅石柱, 甲醇/二氯甲烷) 纯化以生成呈白色固体状的化合物50 (95mg,

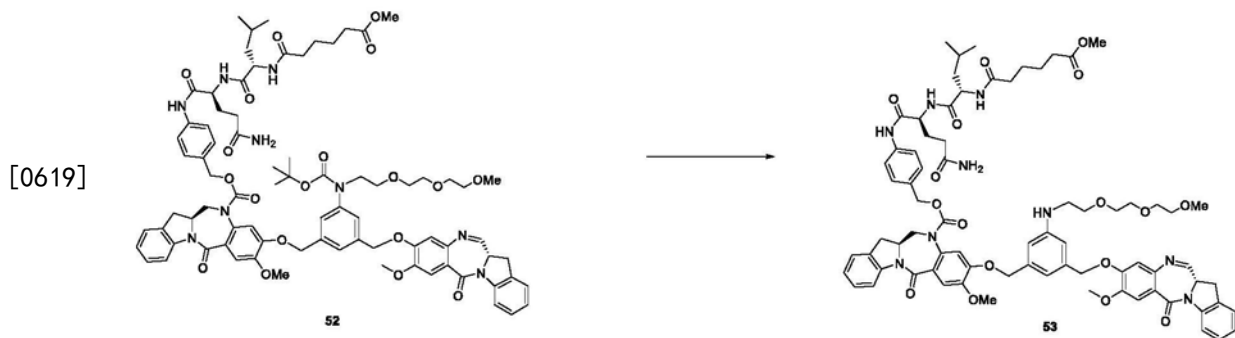
14%产率)。MS (m/z) : 919.8 (M+1)⁺。UPLC=5.54min (10min方法)。



[0616] 使(S)-9-(苯甲氧基)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂草并[1,2-a]吡啶-11(12H)-甲酸4-((S)-5-氨基-2-((S)-2-(6-甲氧基-6-氧代己酰氨基)-4-甲基戊酰氨基)-5-氧代戊酰氨基)苯甲酯(91mg,0.099mmol)于无水甲醇(1.5ml)中的溶液脱气且添加钯/碳10%(10.54mg,0.099mmol)。所述混合物在氢气球(1atm)下在室温下搅拌持续四小时,之后其经由硅藻土过滤,用甲醇冲洗。蒸发滤液以获得呈白色固体状的DP(83mg,100%)。MS (m/z) : 829.6 (M+1)⁺827.5 (M-1)⁻UPLC=4.25min (10min方法)。

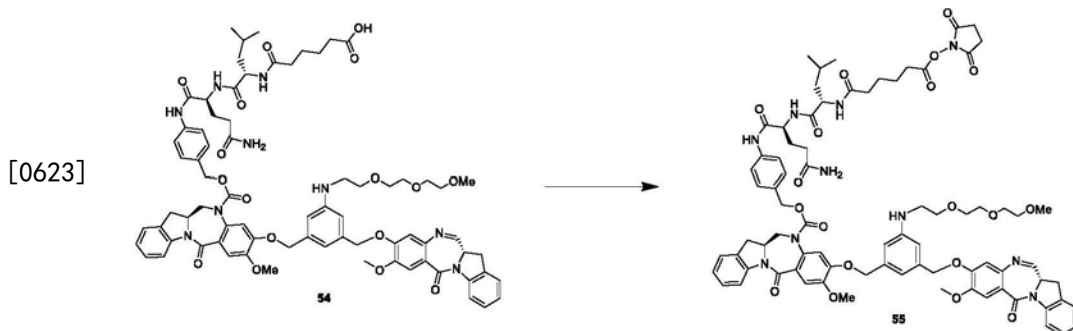


[0618] 化合物42(215mg,0.291mmol)及化合物51(201mg,0.242mmol)溶解于无水二甲基乙酰胺(2425μl)中。添加碳酸钾(67.0mg,0.485mmol)且所述反应在室温下搅拌过夜。所述反应用水沉淀,搅拌持续5分钟且过滤。所得黄色固体溶解于二氯甲烷/5%甲醇中且用水洗涤。有机物经无水硫酸镁干燥,过滤并汽提。材料通过硅胶色谱(二氯甲烷/甲醇)纯化以生成所需产物化合物52(323mg,y=64%)。MS (m/z) : 1487.6 (M+1)⁺。UPLC=1.77min (2.5min方法)。

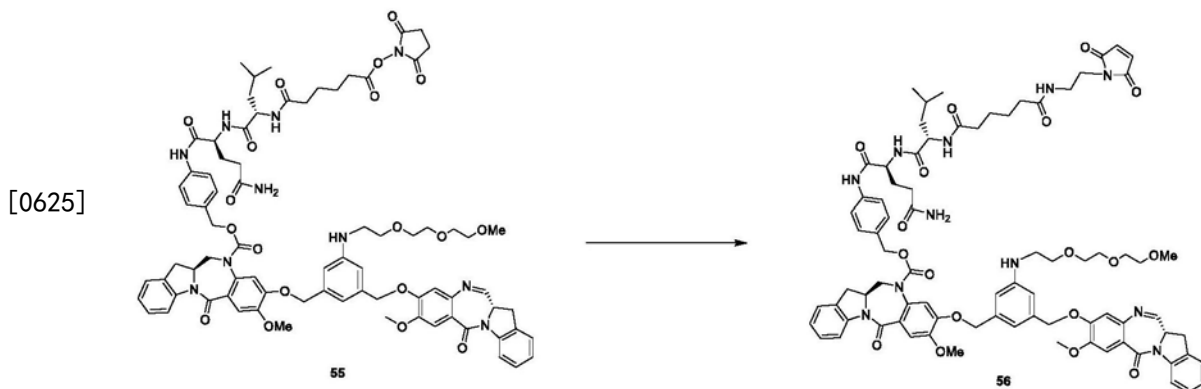


[0620] 化合物53与化合物44相似地制备。粗产物通过硅胶色谱(二氯甲烷/甲醇)纯化。MS (m/z) : 1387.7 (M+1)⁺。UPLC=1.8 (2.5min方法)。

[0622] 化合物54与化合物45相似地制备。粗产物通过硅胶色谱(二氯甲烷/甲醇)纯化(117mg, y=45.5%)。MS (m/z): 1373.9 (M+1)⁺。UPLC=1.71 (2.5min方法)。

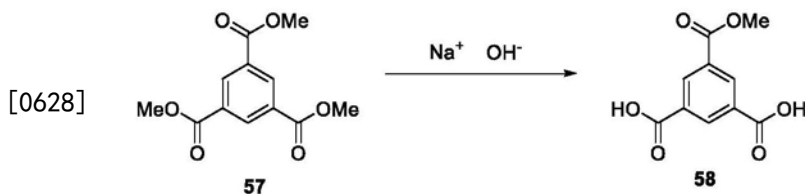


[0624] 化合物55与化合物46相似地制备。粗产物直接地用于下一反应或通过RPHPLC(水/乙腈)纯化(34.5mg, $y=49\%$)。MS (m/z): 1470.8 ($M+1$)⁺。UPLC=1.74 (2.5min方法)。



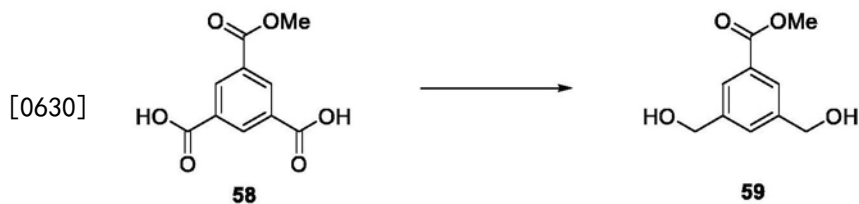
[0626] 化合物56与化合物47相似地制备。粗产物通过RPHPLC (水/乙腈) 纯化 (26mg, y=47%)。MS (m/z): 1495.9 (M+1)⁺。UPLC=1.71 (2.5min方法)。

[0627] 实施例7.合成化合物65

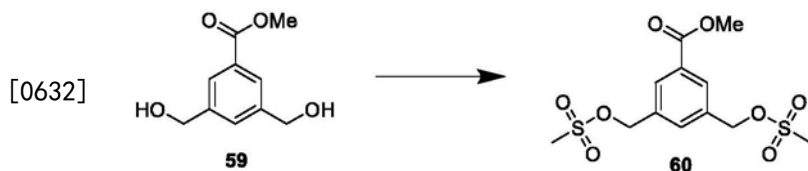


[0629] 氢氧化钠 (2.065g, 51.6mmol) 添加至苯-1,3,5-三甲酸三甲酯 (6.2g, 24.58mmol) 于甲醇 (82ml) 及水 (16.39ml) 中的搅拌溶液中。反应混合物在氩气下回流 (85℃ 油浴) 持续3小时且形成白色沉淀物。所述反应冷却至室温且用水稀释, 直至所有固体均溶解。所述溶液用5N HCl水溶液酸化至pH约为2-3。在真空中移除甲醇且所得水溶液用乙酸乙酯萃取三次。合并的有机物经硫酸钠干燥, 过滤并汽提。白色产物溶解于热乙酸乙酯中且接着使其冷却。

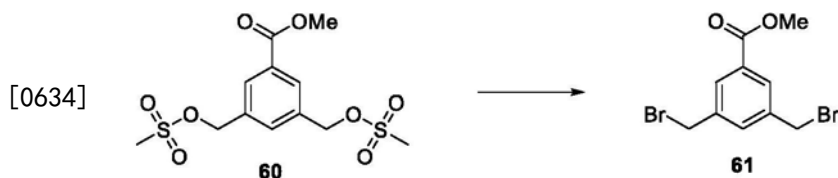
将所述溶液过滤(沉淀物为副产物)且蒸发滤液以生成所需化合物58(4.34g, $y=79\%$)。MS (m/z): 225.0 ($M+1$)⁺及224.0 ($M-1$)⁻。UPLC=1.07min(2.5min方法)。¹H NMR(400MHz, DMSO- d_6): δ 13.62(bs, 2H), 8.65(s, 3H), 3.93(s, 3H)。



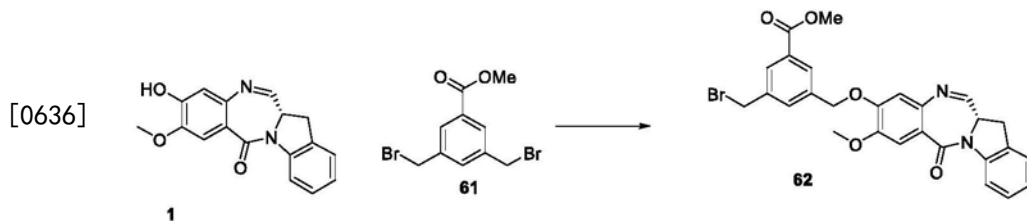
[0631] 化合物58(1.94g, 8.65mmol)溶解于THF(34.6ml)中并冷却至0℃。在氩气下缓慢地添加BH₃·DMS(2M于THF中, 17.31ml, 34.6mmol), 引起剧烈鼓泡。所述反应温至室温且搅拌过夜。其用甲醇缓慢地淬灭直至气泡形成的强度减轻且接着添加水, 直至气体逸出停止且所有固体均已溶解。所述溶液用乙酸乙酯萃取两次。合并的有机物依序用75ml约3% H₂O₂溶液、150ml 0.5M柠檬酸水溶液及盐水洗涤。有机物经干燥, 浓缩并通过硅胶色谱(己烷/乙酸乙酯)纯化以生成化合物59(0.82g, $y=32\%$)。¹H NMR(400MHz, DMSO- d_6): δ 7.81(s, 2H), 7.52(s, 1H), 5.33(bs, 2H), 4.56(s, 4H), 3.86(s, 3H)。



[0633] 化合物59(0.82g, 4.18mmol)溶解于无水二氯甲烷(41.8ml)中且在丙酮/冰浴中冷却至-5℃。添加三乙胺(2.91ml, 20.90mmol), 随后添加甲烷磺酸酐(1.820g, 10.45mmol)且所得混合物在-5℃下搅拌持续1.5小时。其用冷乙酸乙酯及水稀释且再用乙酸乙酯萃取两次。合并的有机物用水洗涤, 经无水硫酸镁干燥, 过滤且在真空中浓缩(<25℃)以生成化合物60(1.12g, $y=76\%$), 其直接地用于下一反应中。

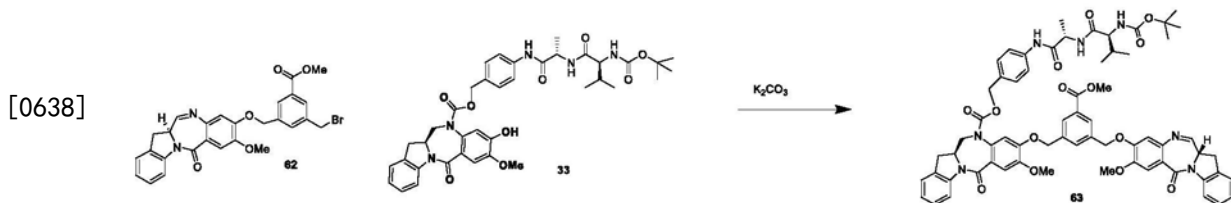


[0635] 化合物60(1.12g, 3.18mmol)溶解于无水二甲基甲酰胺(15.89ml)中且添加溴化钠(1.635g, 15.89mmol)。所述反应在室温下搅拌过夜。其用水稀释且用乙酸乙酯萃取。有机物用水洗涤且经无水硫酸镁干燥, 过滤并汽提。粗材料置于高真空下直至干燥以生成化合物61(0.97g, $y=94\%$), 其无需进一步纯化即使用。UPLC=1.66min(2.5min方法)。

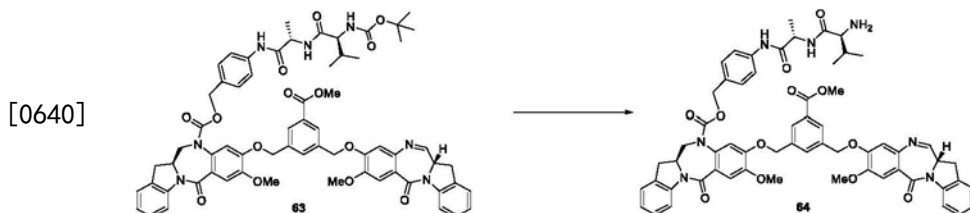


[0637] 化合物1(0.126g, 0.429mmol)及化合物61(0.967g, 3.00mmol)溶解于无水二甲基甲酰胺(4.29ml)中且添加碳酸钾(0.148g, 1.073mmol)。1小时20分钟之后, 所有化合物1均

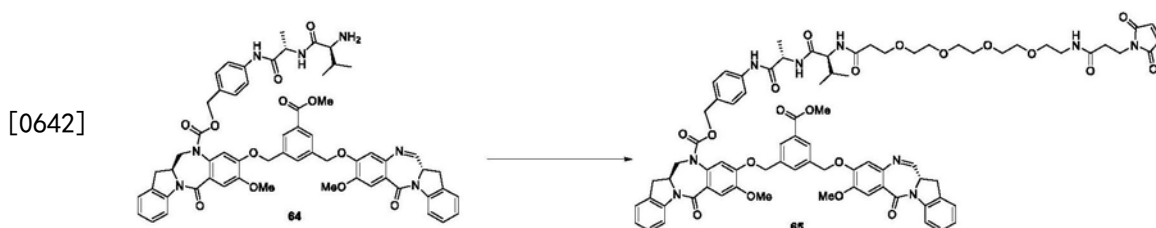
已被消耗且所述反应用乙酸乙酯稀释且用饱和氯化铵、水及盐水洗涤。有机物经硫酸镁干燥,过滤,且经汽提。纯化合物62通过硅胶色谱经分离(133mg, $y=58\%$)。UPLC=1.71min (2.5min方法)。



[0639] 化合物33 (63.6mg, 0.089mmol) 及化合物62 (63mg, 0.098mmol) 溶解于无水二甲基乙酰胺 (888 μ l) 中。添加碳酸钾 (24.54mg, 0.178mmol) 且所述反应在氩气下搅拌过夜。所述反应用水沉淀,搅拌持续5分钟且过滤。所得白色固体溶解于二氯甲烷中,转移至分液漏斗,用水洗涤,经无水硫酸镁干燥,过滤并汽提。粗物质经由柱纯化以生成化合物63 (79mg, $y=76\%$)。MS (m/z): 1171.0 (M+1)⁺。UPLC=1.89min (2.5min方法)。

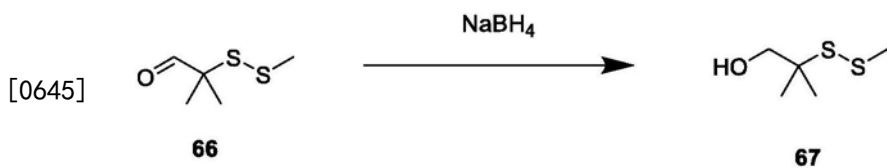


[0641] 化合物64与化合物35相似地制备。粗材料无需纯化直接地加以使用 (54mg, $y=75\%$)。MS (m/z): 1171.1 (M+1)⁺。UPLC=1.51min (2.5min方法)。



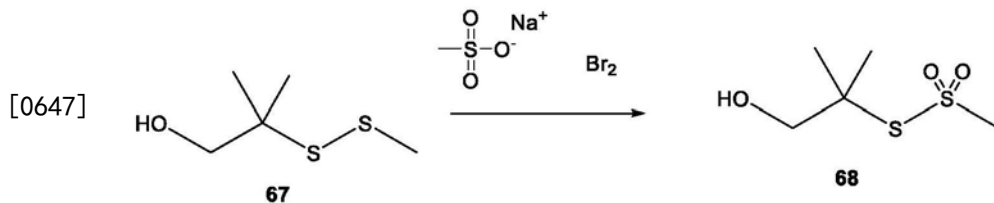
[0643] 化合物64 (54mg, 0.050mmol) 及1-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-3-氧代-7,10,13,16-四氧杂-4-氮杂十九烷-19-酸 (21.01mg, 0.050mmol) 溶解于无水二氯甲烷 (3154 μ l) 中。添加EDC (9.67mg, 0.050mmol) 且所述反应脱气且在室温下在氩气下搅拌。在1小时之时,所述反应用二氯甲烷稀释且用水及盐水洗涤。有机物经硫酸镁干燥,过滤并汽提。粗材料溶解于乙腈及四氢呋喃加上数滴甲酸中且通过半制备型RP-HPLC (C18, 水/乙腈) 纯化。纯部分经冷冻并冻干以提供化合物65 (29.5mg, $y=40\%$)。MS (m/z): 1469.6 (M+1)⁺。UPLC=1.68min (2.5min方法)。

[0644] 实施例8. 合成化合物73

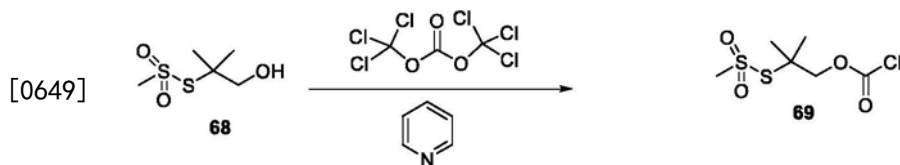


[0646] 向2-甲基-2-(甲基二硫基)丙醛 (1g, 6.66mmol) 于无水甲醇 (44.4ml) 中的溶液中添加硼氢化钠 (0.252g, 6.66mmol)。所述反应在室温下搅拌90分钟,此时其用盐酸水溶液

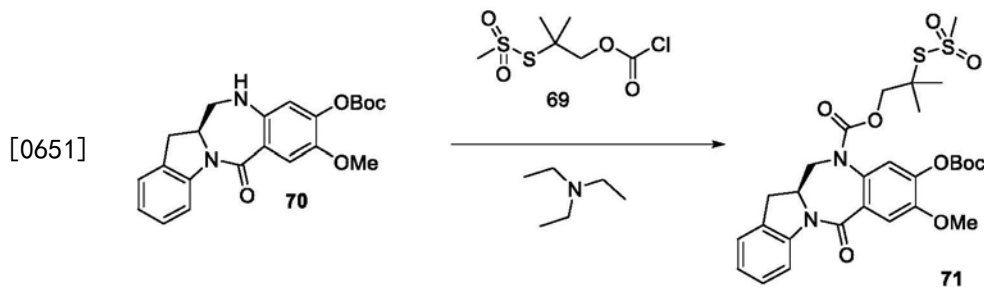
(0.5M) 淬灭且用乙酸乙酯(100ml) 稀释。添加饱和碳酸氢钠水溶液直至pH约为10且接着用乙酸乙酯(2×50ml) 萃取。将有机萃取物合并,用盐水洗涤,经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩。粗物质无需进一步纯化继续使用,假定100%产率。



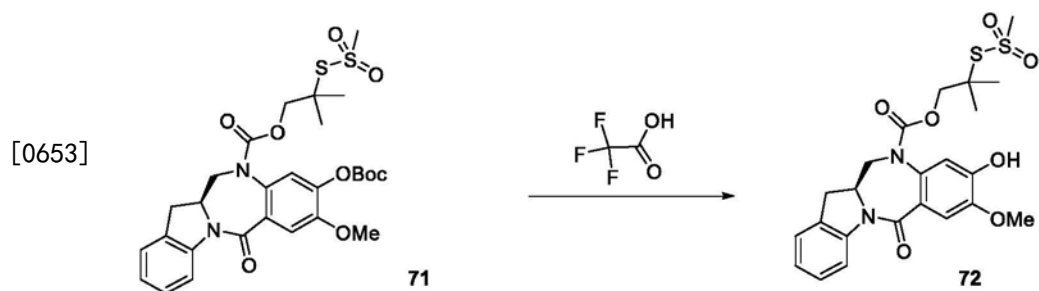
[0648] 在0℃下向2-甲基-2-(甲基二硫基)丙-1-醇(1.2g,7.88mmol)于无水二氯甲烷(52.5ml)中的冷却溶液中添加甲烷磺酸钠(4.65g,39.4mmol)及二溴(1.009ml,19.70mmol)。在环境温度下搅拌持续90分钟之后,反应混合物经由硅藻土过滤且用二氯甲烷冲洗。滤液经浓缩并通过ISCO(40g硅石柱,乙酸乙酯/己烷)纯化以生成甲烷硫代磺酸S-(1-羟基-2-甲基丙-2-基)酯(1.1g,y=76%)。¹H NMR(400Hz,d₆-DMSO):δ5.39(t,J=5.6Hz,1H),3.54(d,J=5.6Hz,2H),3.50(s,3H),1.44(s,6H)



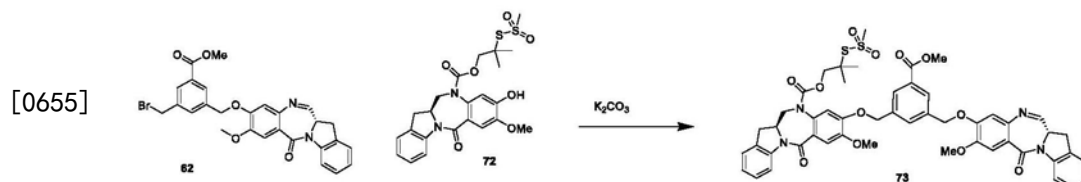
[0650] 向甲烷硫代磺酸S-(1-羟基-2-甲基丙-2-基)酯(47mg,0.255mmol)及三光气(26.5mg,0.089mmol)于无水二氯甲烷(1.27ml)中的溶液中添加吡啶(19.60μl,0.242mmol)。所述反应在环境温度下搅拌持续四小时,之后其用二氯甲烷稀释且用水洗涤。有机层经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩以获得澄清无色油状物。粗化合物69无需进一步纯化继续使用,假定100%产率。



[0652] 向(S)-叔丁基(8-甲氧基-6-氧代-11,12,12a,13-四氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂茛并[1,2-a]吡啉-9-基)碳酸酯(40mg,0.101mmol)及甲烷硫代磺酸S-(1-((氯羰基)氧基)-2-甲基丙-2-基)酯(62.2mg,0.252mmol)于无水1,2-二氯乙烷(1.00ml)中的溶液中添加三乙胺(56.3μl,0.404mmol)。所述混合物在环境温度下搅拌持续30分钟并接着用二氯甲烷稀释。有机层用盐水洗涤,干燥并浓缩。粗材料通过乙酸乙酯/己烷中的硅胶色谱纯化以获得呈白色固体状的化合物71(50mg,y=82%)。MS(m/z):607.6(M+1)⁺。UPLC=1.81min(2.5min方法)。

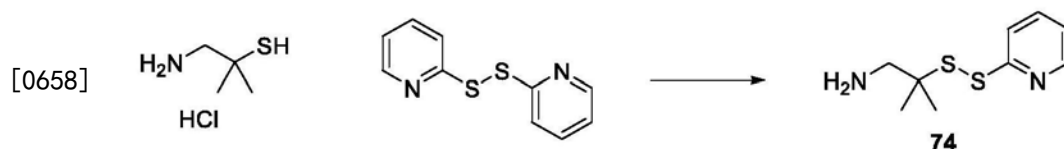


[0654] 向(S)-9-((叔丁氧羰基)氧基)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂革并[1,2-a]吡啶-11(12H)-甲酸2-甲基-2-((甲基磺酰基)硫基)丙酯(0.910g,1.5mmol)于无水二氯甲烷(15.00ml)中的溶液中缓慢地添加三氟乙酸(1.733ml,22.50mmol)。使所述混合物在环境温度下搅拌持续五小时,之后其用二氯甲烷稀释且用饱和碳酸氢钠水溶液及盐水洗涤。有机层经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩。粗材料通过乙酸乙酯/二氯甲烷中的硅胶色谱纯化以获得呈白色结晶固体状的化合物72(0.68g,y=89%)。MS(m/z):507.1(M+1)⁺505.1(M-1)⁻UPLC=1.51min(2.5min方法)。

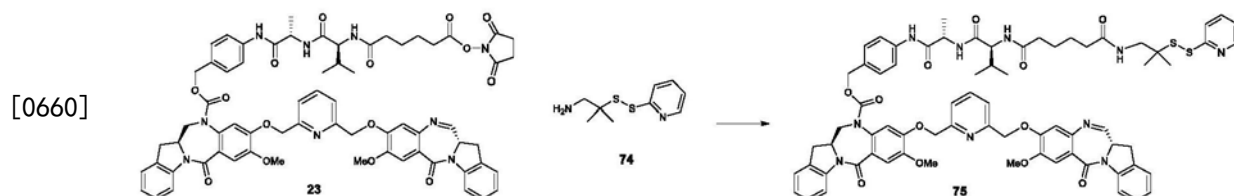


[0656] 化合物62(69.6mg,0.130mmol)及化合物72(59mg,0.108mmol)溶解于无水二甲基乙酰胺(1083μl)中。添加碳酸钾(29.9mg,0.217mmol)且所述反应在室温下搅拌过夜。所述反应用水成浆且过滤。所得固体溶解于具有少量甲醇的二氯甲烷中,经无水硫酸镁干燥并浓缩以获得0.114mg呈粗黄色固体状的化合物73(70%纯,y=76%)。通过RP-HPLC(C18,去离子水/乙腈)获得纯材料。MS(m/z):961.7(M+1)⁺。UPLC=1.85min(2.5min方法)。

[0657] 实施例9.合成化合物75



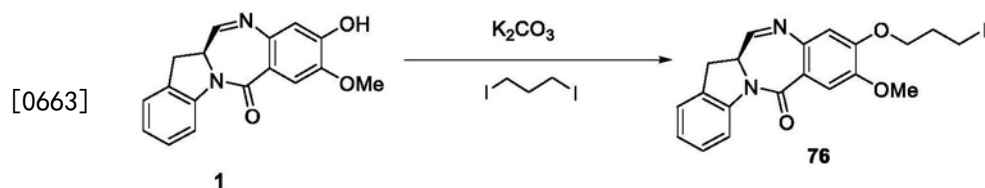
[0659] 二甲基半胱胺HCl(500mg,3.53mmol)溶解于甲醇(11.765mL)中。添加Aldrithiol(1166mg,5.29mmol)且搅拌黄色溶液过夜。LCMS指示在0.394分钟时形成产物。添加三乙胺(0.492ml,3.53mmol)且搅拌持续5分钟并接着浓缩反应混合物。粗残余物通过硅胶色谱(二氯甲烷/甲醇)纯化以生成呈灰白色粘性固体状的化合物74(700mg,93%)。



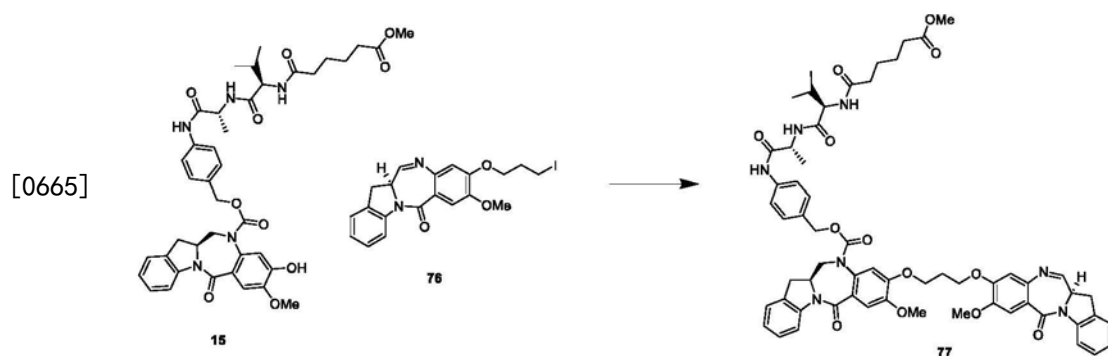
[0661] 化合物23(10mg,8.08μmol)溶解于无水二氯甲烷(0.25ml)中。相继添加化合物74(2.077mg,9.69μmol)及DIPEA(2.81μl,0.016mmol)。所述反应搅拌持续1小时并浓缩至干。粗材料溶解于具有2滴甲酸的乙腈/H₂O中且通过RP-HPLC(C18,去离子水/乙腈)纯化。所需

部分经冷冻并冻干以生成化合物75 (8mg, $y=74\%$)。MS (m/z): 1338.5 ($M+1$)⁺。UPLC = 1.88min (2.5min方法)。

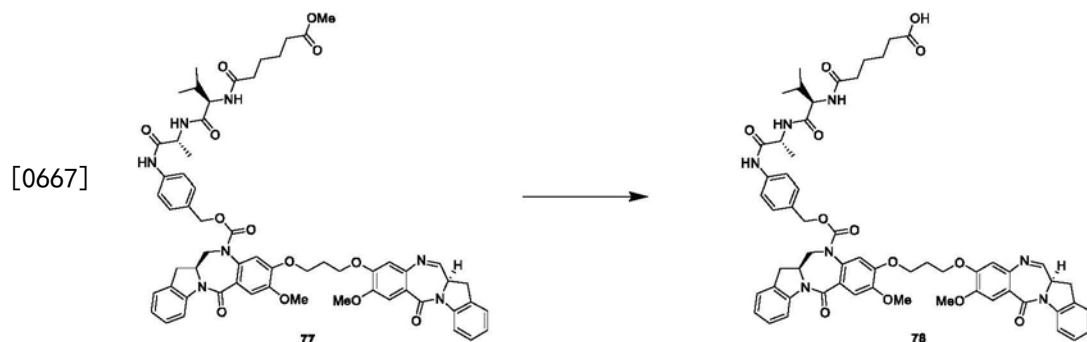
[0662] 实施例10. 合成化合物79



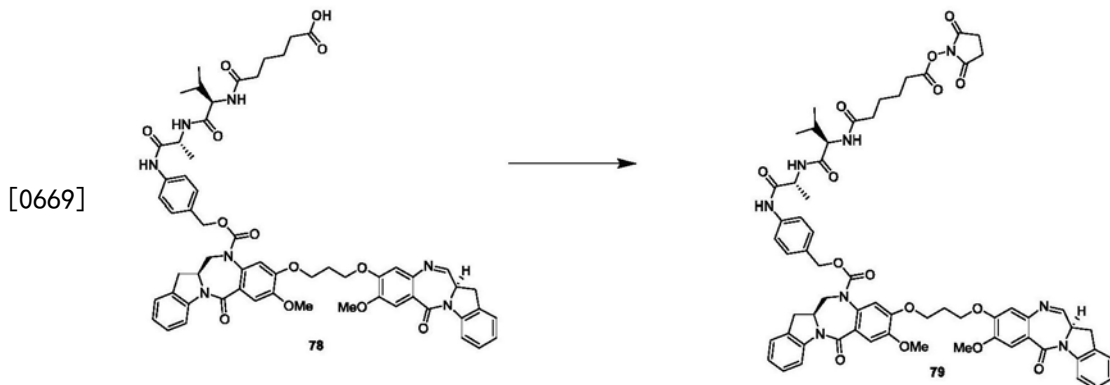
[0664] 化合物1 (250mg, 0.807mmol) 溶解于无水二甲基甲酰胺 (4035 μ l) 中。添加1,3-二碘丙烷 (1399 μ l, 12.10mmol) 及碳酸钾 (335mg, 2.421mmol)。所述反应在室温下搅拌过夜。其用乙酸乙酯及水稀释。有机物经分离且用水洗涤三次。其经干燥, 浓缩, 并通过硅胶色谱 (己烷/乙酸乙酯) 纯化以提供化合物76 (215mg, 57%)。



[0666] 化合物15及76与化合物16相似地发生反应。粗材料通过硅胶色谱 (二氯甲烷/甲醇) 纯化以生成化合物77 (54.3mg, 85% 纯, $y=30\%$)。MS (m/z): 1093.0 ($M+1$)⁺。UPLC = 1.83min (2.5min方法)。

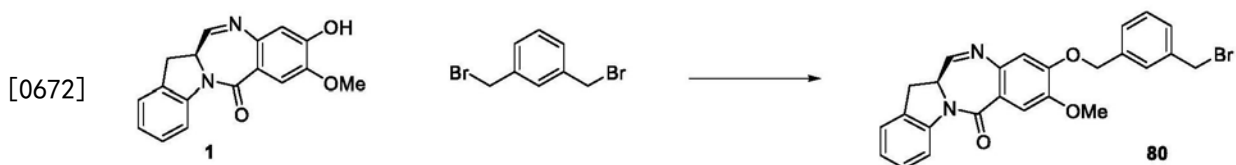


[0668] 化合物78与化合物17相似地制备。粗材料直接地用于下一反应中, 假定100% 产率。MS (m/z): 1078.8 ($M+1$)⁺。UPLC = 1.74 (2.5min方法)。

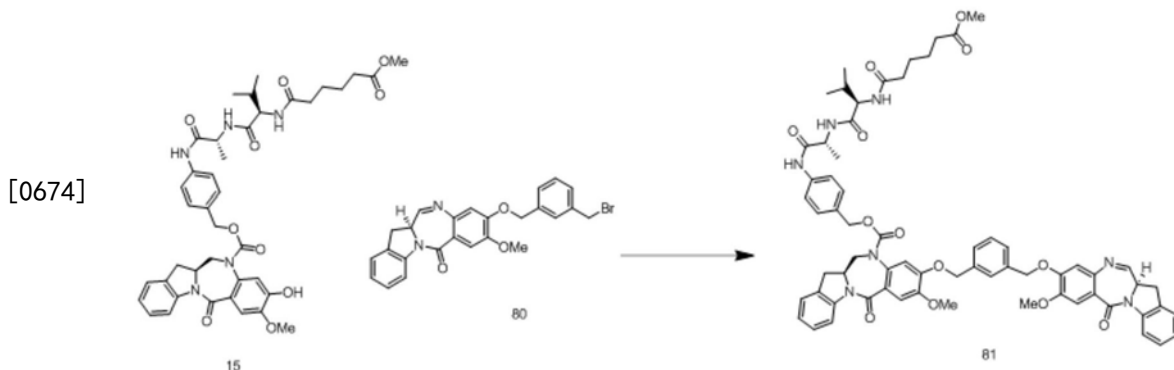


[0670] 化合物79与化合物18相似地制备。粗材料经由RPHPLC (C18柱, 水/乙腈) 纯化以生成最终化合物79 (38mg, $y=65\%$)。MS (m/z): 1175.8 ($M+1$)⁺。UPLC=1.80min (2.5min方法)。

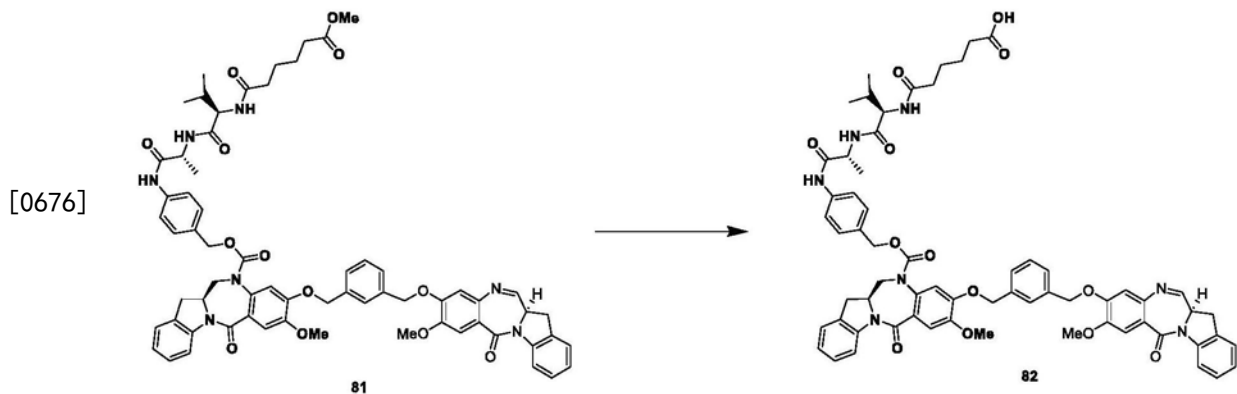
[0671] 实施例11. 合成化合物83



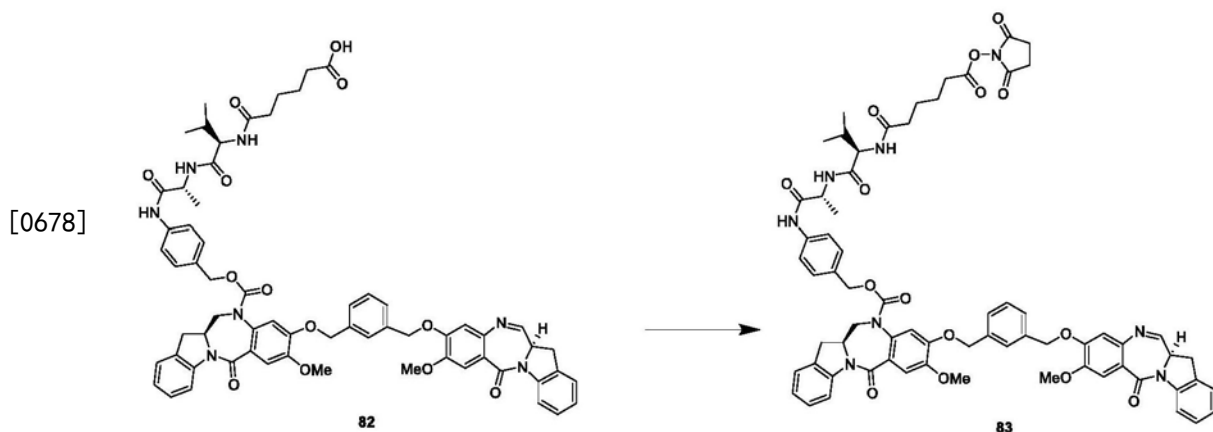
[0673] 化合物1 (250mg, 0.807mmol) 溶解于无水二甲基甲酰胺 (4035 μ l) 中。添加1,3-双(溴甲基)苯 (1704mg, 6.46mmol) 及碳酸钾 (335mg, 2.421mmol)。所述反应在室温下搅拌过夜。其用水崩解且过滤。固体通过硅胶色谱纯化以移除过量起始材料且化合物80立即用于下一反应中。MS (m/z): 477.4 ($M+1$)⁺。UPLC=1.77 (2.5min方法)。



[0675] 化合物80 (64.6mg, 0.135mmol) 溶解于无水二甲基乙酰胺 (3260 μ l) 中。依序添加碳酸钾 (45.1mg, 0.326mmol) 及化合物15 (124mg, 0.163mmol) 且所述反应在室温下在氩气下继续进行至完成 (12-15h)。所述反应用水沉淀且过滤。所收集的固体溶解于二氯甲烷中, 转移至分液漏斗, 用水、盐水洗涤, 经无水硫酸钠干燥且在真空中浓缩。其经由硅胶色谱 (二氯甲烷/甲醇) 纯化以生成化合物81 (93.7mg, $y=50\%$)。MS (m/z): 1154.8 ($M+1$)⁺。UPLC=1.92 (2.5min方法)。

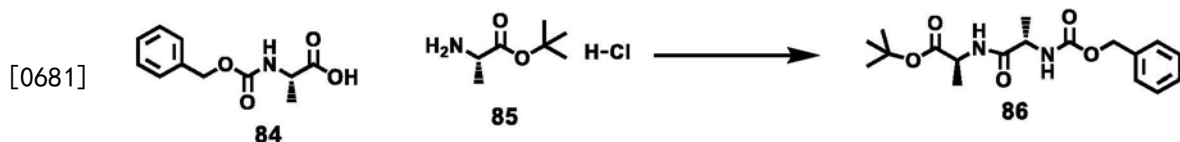


[0677] 化合物82与化合物17相似地制备。粗材料无需进一步纯化即使用。假定100%产率。MS (m/z) : 1140.9 (M+1)⁺。UPLC=1.85 (2.5min方法)。

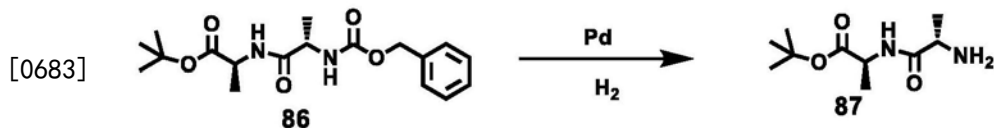


[0679] 化合物83与化合物18相似地制备。粗材料经由RPHPLC (C18柱, 水/乙腈) 纯化以生成最终化合物83 (13.8mg, y=14%)。MS (m/z) : 1237.7 (M+1)⁺。UPLC=1.92min (2.5min方法)。

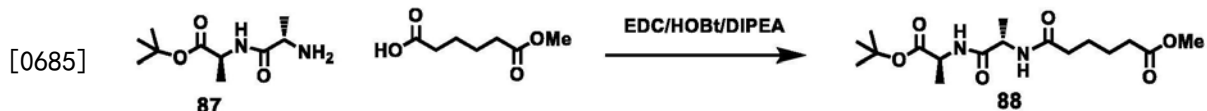
[0680] 实施例12. 合成化合物95



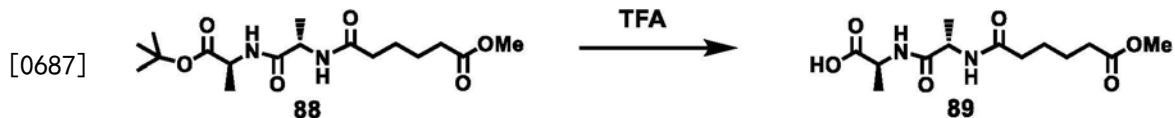
[0682] (S)-2-(((苯甲氧基)羰基)氨基)丙酸 (5g, 22.40mmol) 及2-氨基丙酸(S)-叔丁酯盐酸盐 (4.48g, 24.64mmol) 溶解于无水N,N-二甲基甲酰胺 (44.8ml) 中。添加3-(3-二甲基氨基丙基)-1-乙基-碳化二亚胺盐酸盐 (4.72g, 24.64mmol)、1-羟基苯并三唑水合物 (3.43g, 22.40mmol) 及二异丙基乙胺 (9.75ml, 56.0mmol)。所述反应在氩气下在室温下搅拌过夜。反应混合物用二氯甲烷稀释且接着用饱和氯化铵、饱和碳酸氢钠、水及盐水洗涤。有机物经硫酸钠干燥并浓缩。粗油状物经由硅胶色谱 (己烷/乙酸乙酯) 纯化以生成化合物86 (6.7g, y=85%) ¹H NMR (400Hz, CDCl₃) : δ 7.38-7.31 (m, 5H), 6.53-6.42 (m, 1H), 5.42-5.33 (m, 1H), 5.14 (s, 2H), 4.48-4.41 (m, 1H), 4.32-4.20 (m, 1H), 1.49 (s, 9H), 11.42 (d, J=6.8Hz, 3H), 1.38 (d, J=7.2Hz, 3H)。



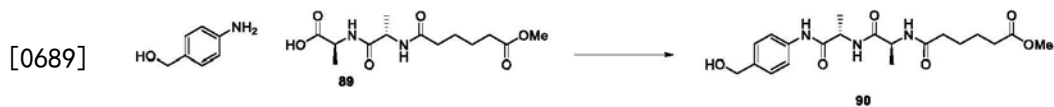
[0684] 化合物86 (6.7g, 19.12mmol) 溶解于甲醇 (60.7ml) 及水 (3.03ml) 中。所述溶液用氩气吹扫持续五分钟。缓慢地添加钯/碳(湿, 10%) (1.017g, 0.956mmol)。所述反应在氢气气氛下搅拌过夜。所述溶液经由硅藻土过滤, 用甲醇冲洗并浓缩。其与甲醇及乙腈共沸且所得油状物直接地置于高真空下以生成化合物87 (4.02g, y=97%), 其直接地用于下一步骤中。¹H NMR (400Hz, CDCl₃): δ7.78-7.63 (m, 1H), 4.49-4.42 (m, 1H), 3.55-3.50 (m, 1H), 1.73 (s, 2H), 1.48 (s, 9H), 1.39 (d, J=7.2Hz, 3H), 1.36 (d, J=6.8Hz, 3H)。



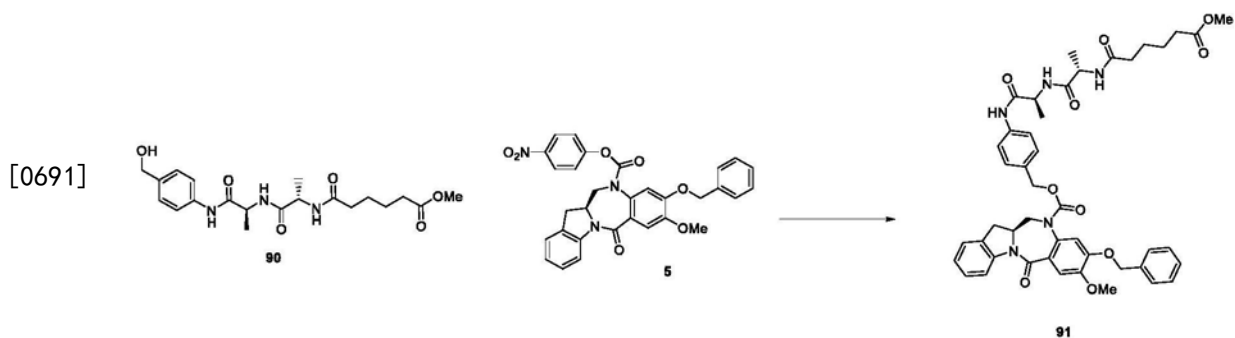
[0686] 化合物87 (4.02g, 18.59mmol) 及己二酸单甲酯 (3.03ml, 20.45mmol) 溶解于无水N,N-二甲基甲酰胺 (62.0ml) 中。添加3-(3-二甲基氨基丙基)-1-乙基-碳化二亚胺盐酸盐 (3.92g, 20.45mmol) 及1-羟基苯并三唑水合物 ((2.85g, 18.59mmol) 及二异丙基乙胺 (6.49ml, 37.2mmol)。所述混合物在室温下搅拌过夜。所述反应用二氯甲烷/甲醇 (150mL, 5:1) 稀释且用饱和氯化铵、饱和碳酸氢钠及盐水洗涤。其经硫酸钠干燥, 过滤并汽提。所述化合物与乙腈共沸 (5次), 接着在35°C下在高真空下泵送以生成化合物88 (6.66g, y=100%)。粗材料无需纯化即带入下一步骤。¹H NMR (400Hz, CDCl₃): δ6.75 (d, J=6.8Hz, 1H), 6.44 (d, J=6.8Hz, 1H), 4.52-4.44 (m, 1H), 4.43-4.36 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 2.35-2.29 (m, 2H), 2.25-2.18 (m, 2H), 1.71-1.60 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 1.36 (t, J=6Hz, 12.8Hz, 6H)



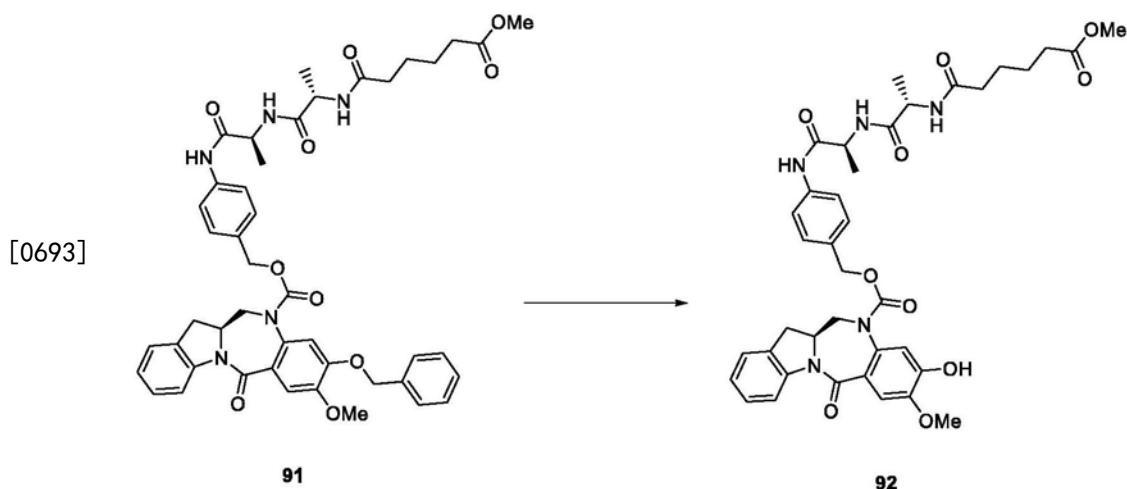
[0688] 化合物88 (5.91g, 16.5mmol) 在室温下在三氟乙酸 (28.6ml, 372mmol) 及去离子水 (1.5ml) 中搅拌持续三小时。其与乙腈一起旋转蒸发且置于高真空下直至溶剂被移除以生成呈粘性固体状的粗化合物89 (5.88g y=105%)。¹H NMR (400Hz, CDCl₃): δ7.21 (d, J=6.8Hz, 1H), 6.81 (d, J=7.6Hz, 1H), 4.69-4.60 (m, 1H), 4.59-4.51 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 2.40-2.33 (m, 2H), 2.31-2.24 (m, 2H), 1.72-1.63 (m, 4H), 1.51-1.45 (m, 3H), 1.42-1.37 (m, 3H)



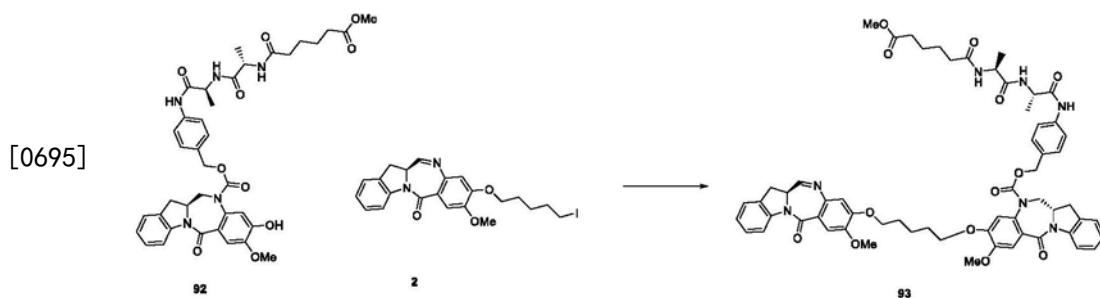
[0690] 化合物90与化合物13相似地制备。粗材料用乙酸乙酯成浆且过滤。(800mg, y=81%)。LCMS=3.1min (8min方法)。



[0692] 化合物91与化合物14相似地制备。粗材料通过硅胶色谱(二氯甲烷/甲醇)纯化(52mg, $y=17.5\%$)。MS (m/z): 820.6 ($M+1$)⁺。MS (m/z): 818.7 ($M-1$)⁻。UPLC=5.5min(10min方法)。

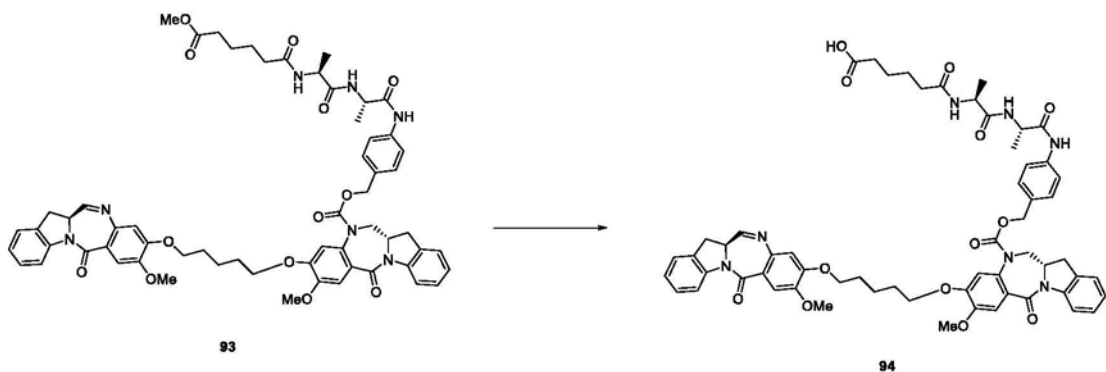


[0694] 向化合物91(10mg, 0.012mmol)于乙醇(47.7 μ l, 0.817mmol)中的溶液中添加环己-1,4-二烯(1.745 μ l, 0.018mmol)、(二甲基-13-硫基)-11-氧烷(0.077 μ l, 1.085 μ mol),随后添加钯(1.953mg, 0.018mmol)。所述反应在45C下搅拌过夜,此时存在约50%转化。使用与前例相似的比率及量添加额外Pd/Al₂O₃、DMSO、环己二烯。所述反应在4h之后完成。Pd接着在硅藻土上过滤且粗溶液经蒸发。经过滤的产物无需进一步纯化即用于下一步骤中。



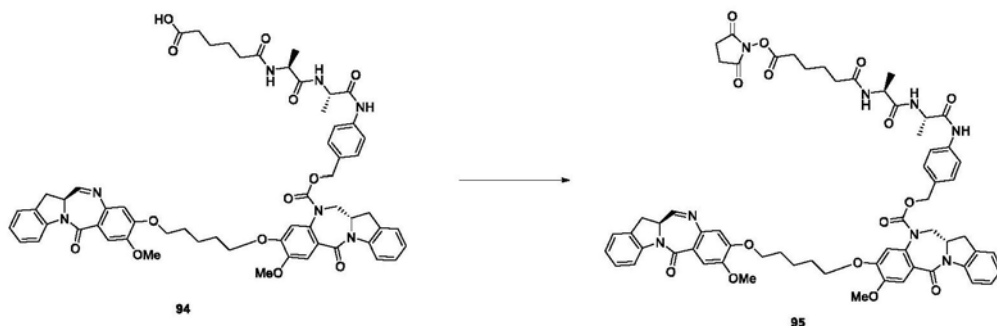
[0696] 化合物92及化合物2与化合物16的合成相似地发生反应。化合物93无需纯化即用于下一反应中。(52mg, $y=67\%$)。MS (m/z): 1093.2 ($M+1$)⁺。UPLC=5.78min(10min方法)。

[0697]



[0698] 化合物94与化合物17相似地制备。粗材料无需进一步纯化即使用 (33mg, $y = 96\%$)。MS (m/z): 1079.2 ($M+1$)⁺. UPLC=1.76 (2.5min方法)。

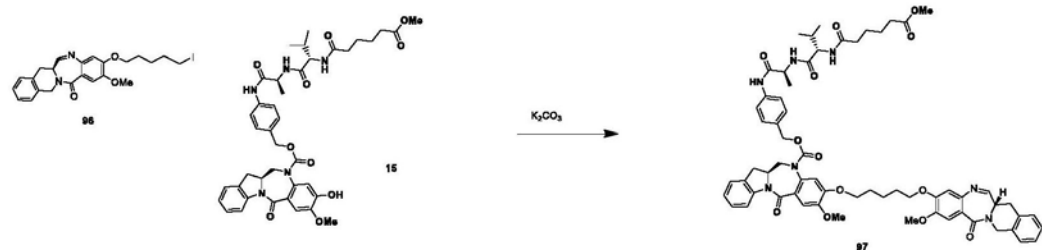
[0699]



[0700] 在室温下向化合物94 (33mg, 0.031mmol) 于无水二氯甲烷 (1ml) 中的溶液中添加N-乙基-N-异丙基丙-2-胺 (8.23μl, 0.046mmol), 随后添加碳酸双 (2,5-二氧代吡咯烷-1-基) 酯 (10.19mg, 0.040mmol)。将所述反应搅拌, 直至起始材料被消耗。其接着用水淬灭, 分离各层, 且水层用二氯甲烷萃取一次。合并的有机层用盐水洗涤, 经硫酸镁干燥且过滤。移除溶剂且粗材料通过RPHPLC (水/乙腈) 纯化以生成最终化合物95 (12mg, $y = 33\%$)。MS (m/z): 1176.4 ($M+1$)⁺. UPLC=1.84 (2.5min方法)。

[0701] 实施例13. 合成化合物99

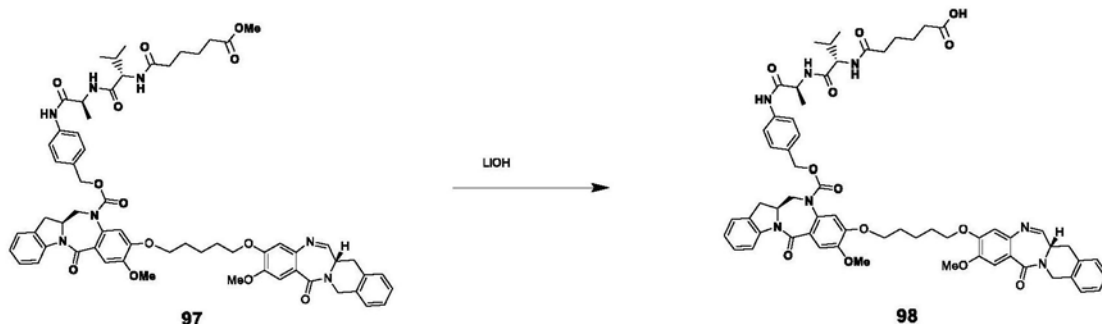
[0702]



[0703] 向 (S)-3-((5-碘戊基)氧基)-2-甲氧基-7,12-二氢苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-b]异喹啉-14 (6aH)-酮 (51.1mg, 0.101mmol) 及 (S)-9-羟基-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-11 (12H)-甲酸4-((S)-2-((S)-2-(6-甲氧基-6-氧代己酰氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苯甲酯 (64mg, 0.084mmol) 于无水N,N-二甲基乙酰胺 (845μl) 中的溶液中添加碳酸钾 (23.34mg, 0.169mmol) 且所述反应在氩气下在环境温度下搅拌持续18小时。去离子水 (10mL) 添加至所述反应中且将所得白色固体过滤, 接着再溶解于二氯甲烷中, 转移至分液漏斗, 且用水洗涤。有机层经无水硫酸镁干燥, 过滤, 且在真空中浓缩。粗固体经由甲醇/二氯甲烷中的硅胶色谱纯化以获得呈白色固

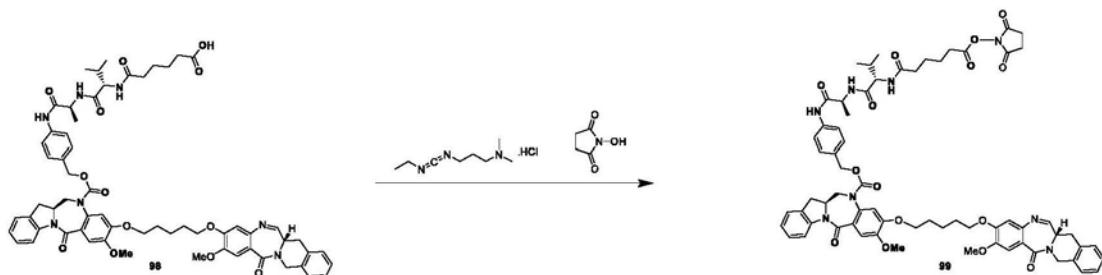
体状的化合物97 (80mg, $y=84\%$)。MS (m/z): 1135.1 ($M+1$)⁺。UPLC=5.91min (10min方法)。

[0704]



[0705] 向(S)-8-甲氧基-9-((5-((S)-2-甲氧基-14-氧代-6a,7,12,14-四氢苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-b]异喹啉-3-基)氧基)戊基)氧基)-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-11(12H)-甲酸4-((S)-2-((S)-2-(6-甲氧基-6-氧代己酰氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苯甲酯 (62mg, 0.055mmol) 于无水四氢呋喃 (2.0ml) 及去离子水 (683 μ l) 中的冷却溶液 (0 $^{\circ}$ C) 中添加氢氧化锂 (3.93mg, 0.164mmol)。所述反应在环境温度下在氩气下搅拌持续90min, 之后所述混合物用20%甲醇/二氯甲烷 (10ml) 及去离子水 (5ml) 稀释。所述混合物用盐酸水溶液 (0.5M, 1mL) 酸化至pH=3且用20%甲醇/二氯甲烷 (2 $\times$ 20mL) 萃取。有机层用去离子水洗涤, 经无水硫酸镁干燥, 经由硅藻土过滤并浓缩。粗材料通过甲醇/二氯甲烷中的硅胶色谱纯化以生成DP (36mg, $y=58\%$)。MS (m/z): 1121.3 ($M+1$)⁺。UPLC=1.66min (2.5min方法)。

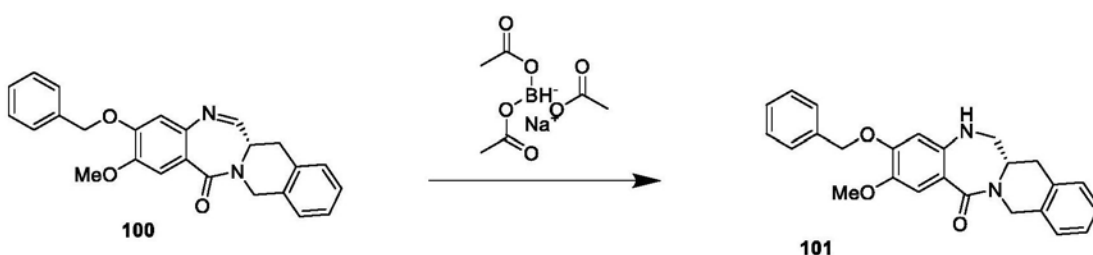
[0706]



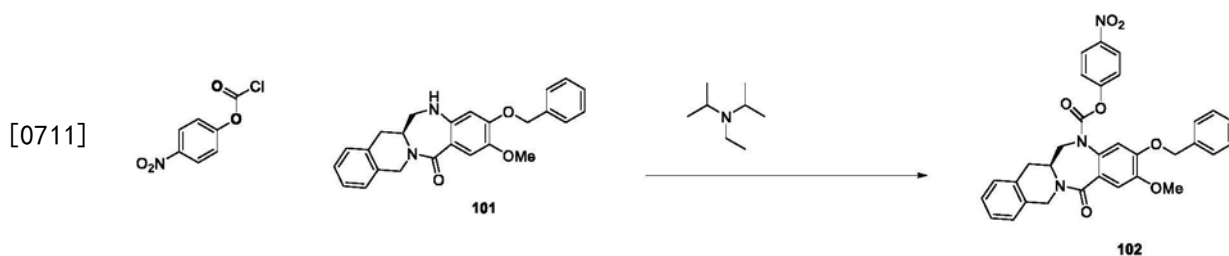
[0707] 向化合物98 (36mg, 0.032mmol) 及N-羟基琥珀酰亚胺 (11.10mg, 0.096mmol) 于无水二氯甲烷 (321 μ l) 中的溶液中添加1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐 (30.8mg, 0.161mmol)。所述反应在氮气下在环境温度下搅拌持续两小时, 此时其用二氯甲烷稀释且用水洗涤。有机层经无水硫酸镁干燥, 过滤且在真空中浓缩。粗产物通过RP-HPLC (Kromasil C18, 乙腈/去离子水, 经30min 50-65%) 纯化且含有产物的部分经冷冻并冻干以生成呈白色固体状的化合物99 (18mg, $y=46\%$)。MS (m/z): 1218.1 ($M+1$)⁺。UPLC=1.75min (2.5min方法)。

[0708] 实施例14. 合成化合物106

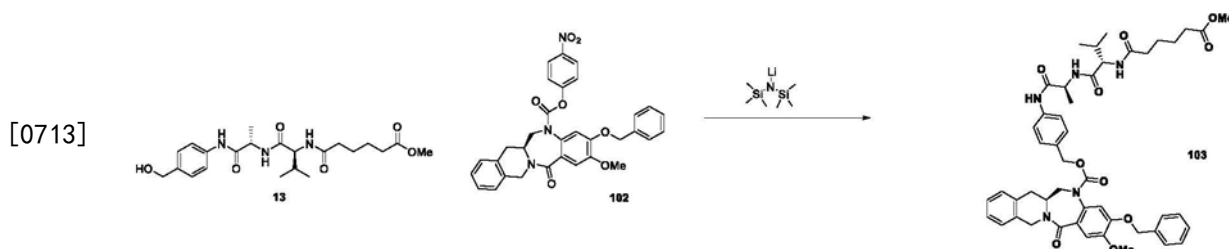
[0709]



[0710] 向(S)-3-(苯甲氧基)-2-甲氧基-7,12-二氢苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-b]异喹啉-14(6aH)-酮(1.1g,2.76mmol)于无水1,2-二氯乙烷(18.40ml)中的悬浮液中添加三乙酰氧基硼氢化钠(1.755g,8.28mmol)且所述混合物在环境温度下搅拌持续20小时。所述混合物用饱和氯化铵水溶液淬灭且用二氯甲烷萃取。有机萃取物用盐水溶液洗涤,经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩以获得呈淡黄色固体状的粗物质(S)-3-羟基-2-甲氧基-6,6a,7,12-四氢苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-b]异喹啉-14(5H)-酮,其无需纯化即用于下一反应(1.1g,y=99%)。MS(m/z):401.6(M+1)⁺。UPLC=1.69min(2.5min方法)。



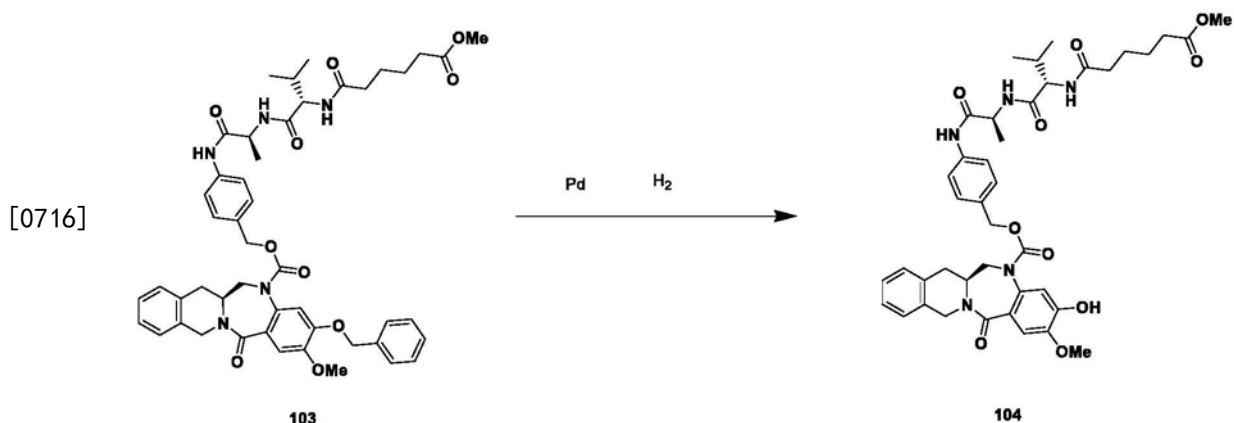
[0712] 向(S)-3-(苯甲氧基)-2-甲氧基-6,6a,7,12-四氢苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-b]异喹啉-14(5H)-酮(1.1g,2.75mmol)于无水二氯甲烷(12.21ml)中的悬浮液中添加N-乙基-N-异丙基丙-2-胺(0.591ml,3.30mmol)。接着添加氯甲酸4-硝基苯酯(0.634g,3.02mmol)于无水二氯甲烷(6.10ml)中的溶液。白色浆液变成澄清黄色且在环境温度下继续搅拌持续20小时。所述反应用二氯甲烷及水稀释且分离各层。有机层用水(50ml)、饱和碳酸氢钠水溶液(50ml)、盐水溶液(50mL)洗涤,经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩。所得固体在ISC0(乙酸乙酯/己烷,40g硅石柱)上纯化以生成化合物102(1.2g,77%产率)。MS(m/z):566.5(M+1)⁺。UPLC=1.94min(2.5min方法)。



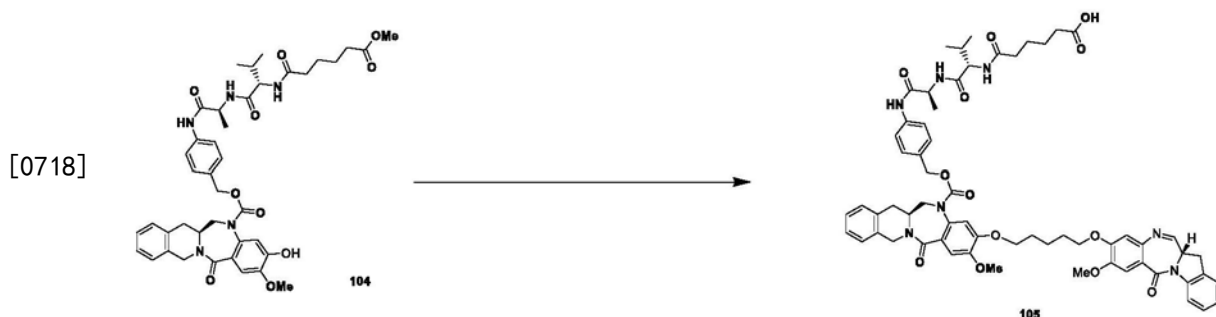
[0714] 在0℃下向6-(((S)-1-(((S)-1-((4-(羟基甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)氨基)-6-氧代己酸甲酯(410mg,0.941mmol)于无水四氢呋喃(1.78ml)及无水N,N-二甲基乙酰胺(3.56ml)中的溶液中添加双(三甲基甲硅烷基)氨基锂(1M于四氢呋喃中,0.94ml,0.941mmol)。所述澄清黄色反应搅拌持续15min,接着添加含(S)-3-(苯甲氧基)-2-甲氧基-14-氧代-6,6a,7,12-四氢苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-b]异喹啉-5(14H)-甲酸4-硝基苯酯(444mg,0.785mmol)的无水四氢呋喃(1.78ml)。

[0715] 反应混合物在氮气下从0℃至环境温度搅拌持续18小时,此时其在冰浴中冷却且用饱和氯化铵水溶液淬灭。所述混合物用二氯甲烷萃取且合并的有机层用水及盐水洗涤,接着经无水硫酸镁干燥,过滤且在高真空下干燥以移除N,N-二甲基乙酰胺。粗黄色油状物通过甲醇/二氯甲烷中的硅胶色谱纯化以生成(S)-3-(苯甲氧基)-2-甲氧基-14-氧代-6,6a,7,12-四氢苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-b]异喹啉-5(14H)-甲酸4-((S)-2-((S)-2-(6-甲氧基-6-氧代己酰氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苯甲酯(81mg,y=27%)。MS(m/

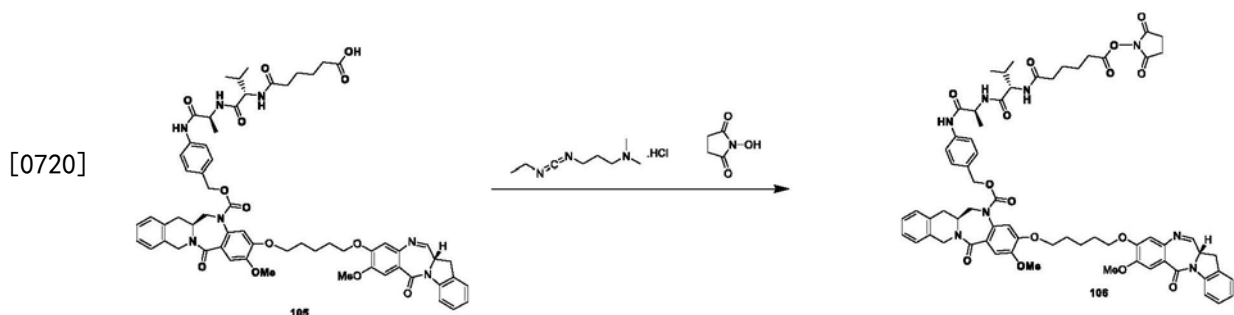
z): 862.8 (M+1)⁺, 860.5 (M-1)⁻。UPLC=1.82min (2.5min方法)。



[0717] 用氮气使(S)-3-(苯甲氧基)-2-甲氧基-14-氧代-6,6a,7,12-四氢苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-b]异喹啉-5(14H)-甲酸4-((S)-2-((S)-2-(6-甲氧基-6-氧代己酰氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苯甲酯(197mg, 0.229mmol)于无水甲醇(2.28ml)中的溶液脱气且添加钯/碳(10%, 24.32mg, 0.229mmol)。所述混合物抽真空且在环境温度下在氢气球(1atm)下搅拌持续两小时。将反应混合物过滤,用20%甲醇/二氯甲烷冲洗。滤液经浓缩并通过甲醇/二氯甲烷中的硅胶色谱纯化以获得呈亮白色固体状的化合物104(111mg, y=63%)。MS(m/z): 772.8 (M+1)⁺, 770.7 (M-1)⁻。UPLC=1.52min (2.5min方法)。



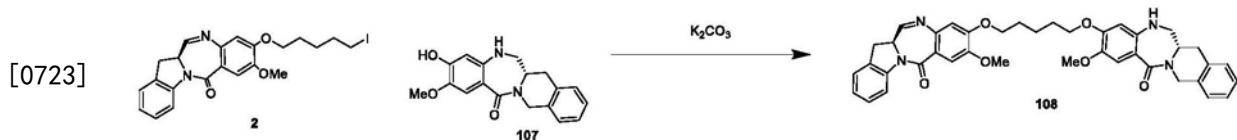
[0719] 化合物105以与化合物15经两个步骤转化为化合物17相似的方法从化合物104制备。



[0721] 向6-(((S)-1-(((S)-1-((4-(((S)-2-甲氧基-3-((5-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)戊基)氧基)-14-氧代-5,6,6a,7,12,14-六氢苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-b]异喹啉-5-羰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)氨基)-6-氧代己酸(70mg, 0.062mmol)及N-羟基琥珀酰亚胺(21.57mg, 0.187mmol)于无水二氯甲烷(1.25ml)中的溶液

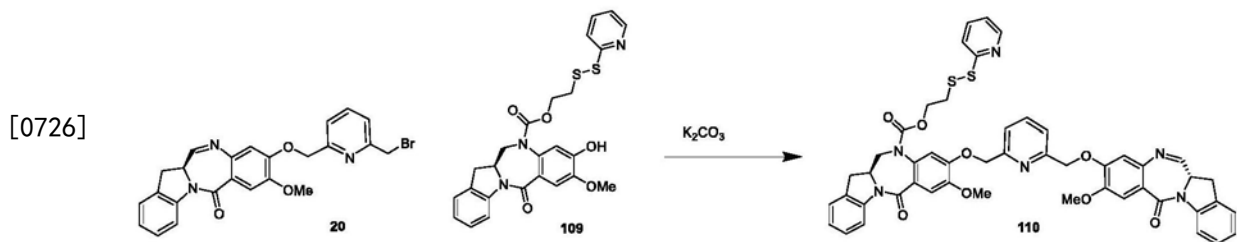
中添加1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(59.9mg,0.312mmol)。所述反应在环境温度下在氮气下搅拌持续90分钟,此时其用二氯甲烷稀释且用水洗涤。有机层经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩。粗白色固体通过RP-HPLC(C18 Kromasil,乙腈/去离子水,经30min50-65%)纯化。含有产物的部分经冷冻并冻干以生成呈亮白色固体状的纯化合物106(48mg,y=63%产率)。MS(m/z):1121.2(M+1)⁺。UPLC=1.94min(2.5min方法)。

[0722] 实施例15.合成化合物108



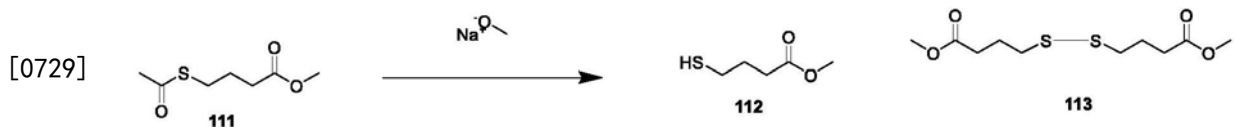
[0724] 向化合物2(48.7mg,0.099mmol)及(S)-3-羟基-2-甲氧基-6,6a,7,12-四氢苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-b]异喹啉-14(5H)-酮(28mg,0.090mmol)于无水N,N-二甲基乙酰胺(601μl)中的溶液中添加无水碳酸钾(18.70mg,0.135mmol)。所述混合物在室温下搅拌持续18小时。在反应完成时添加水且将所得固体过滤,再溶解于二氯甲烷中,且用水洗涤。有机层经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩。粗材料通过甲醇/二氯甲烷中的硅胶色谱纯化以获得化合物108(31mg,y=50%)。MS(m/z):673.4(M+1)⁺。UPLC=1.63min(2.5min方法)。

[0725] 实施例16.合成化合物110



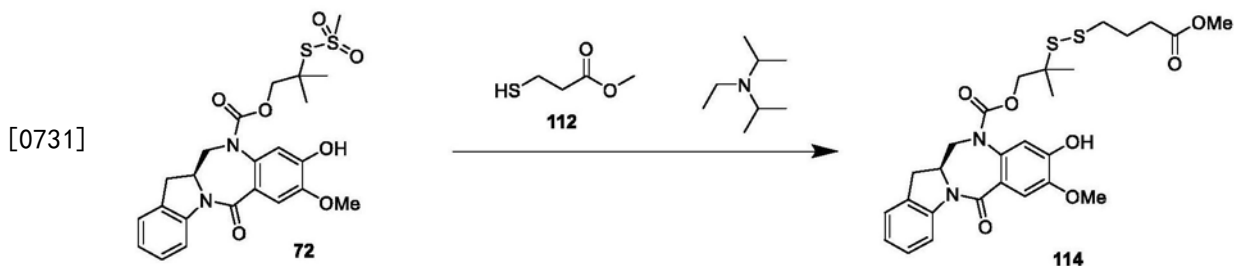
[0727] 向化合物20(101mg,0.212mmol)及(S)-9-羟基-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吲哚-11(12H)-甲酸2-(吡啶-2-基二硫基)乙酯(90mg,0.177mmol)于无水N,N-二甲基乙酰胺(1.76ml)中的溶液中添加碳酸钾(48.8mg,0.353mmol)且所述反应在环境温度下在氮气下搅拌持续18小时。反应混合物用水稀释且将所得白色固体过滤。接着所述固体溶解于二氯甲烷中,转移至分液漏斗且用水洗涤。有机层经无水硫酸镁干燥且在真空中浓缩。粗材料的三分之一经由RP-HPLC(C18 Kromasil,乙腈/去离子水,经30min50-65%)纯化。含有产物的部分经冷冻并冻干以获得呈白色固体状的化合物110(18mg,y=33%)。MS(m/z):907.9(M+1)⁺。UPLC=1.91min(2.5min方法)。

[0728] 实施例17.合成化合物117

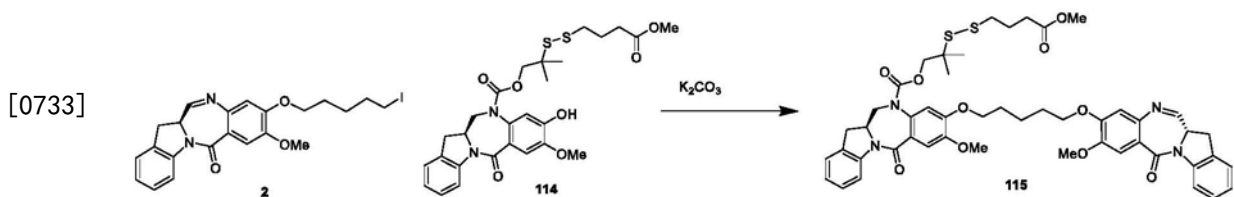


[0730] 向4-(乙酰基硫基)丁酸甲酯(2.6g,14.75mmol)于甲醇(369ml)中的溶液中添加甲醇钠(0.895g,16.23mmol)且所得澄清橙色溶液在室温下搅拌持续3.5小时。所述混合物浓缩至干,接着再溶解于二氯甲烷中。有机层用水洗涤三次且接着经无水硫酸钠干燥,过滤并浓缩以获得呈黄色油状物的2:1硫醇/二硫化物混合物(0.82g,40%),其无需进一步纯化即

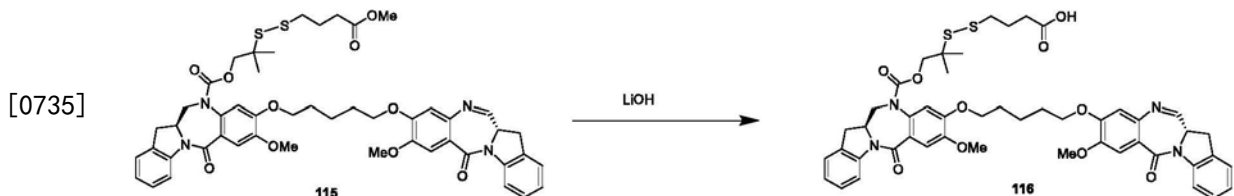
使用。¹H NMR (400Hz, CDCl₃) : δ 33.67 (s, 6H), 2.71 (t, J=7.2Hz, 2H), 2.61-54 (m, 2H), 2.48-2.42 (m, 4H), 2.05-1.99 (m, 2H), 1.98-1.91 (m, 2H), 1.33 (t, J=8.0Hz, 1H)。



[0732] 向(S)-9-羟基-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂革并[1,2-a]吡啶-11(12H)-甲酸2-甲基-2-((甲基磺酰基)硫基)丙酯(670mg, 1.323mmol)于无水二氯甲烷(13mL)中的溶液中添加二异丙基乙胺(0.461mL, 2.65mmol)及3-巯基丙酸甲酯(477mg, 1.984mmol)。所述混合物在室温下在氮气下经18小时搅拌且接着用二氯甲烷稀释且用水洗涤。有机层经无水硫酸镁干燥, 过滤并浓缩。粗材料通过乙酸乙酯/己烷)中的硅胶色谱纯化以生成呈白色结晶固体状的化合物114(0.54g, y=73%)。MS (m/z) : 561.3 (M+1)⁺ 559.3 (M-1)⁻ UPLC=1.67min (2.5min方法)。¹H NMR (400Hz, d₆-DMSO) : δ 9.85 (s, 1H), 8.02 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.28 (d, J=7.2Hz, 1H), 7.22 (t, J=7.6Hz, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.06 (t, J=7.2Hz, 1H), 6.77 (bs, 1H), 4.38-4.29 (m, 1H), 4.02 (t, J=12.4Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.57 (s, 3H), 3.39-3.33 (m, 1H), 2.89 (d, J=16.0Hz, 1H), 2.59 (t, J=6.8Hz, 2H), 2.35 (t, J=7.2Hz, 2H), 1.81-1.76 (m, 2H), 1.17-1.05 (m, 6H)。

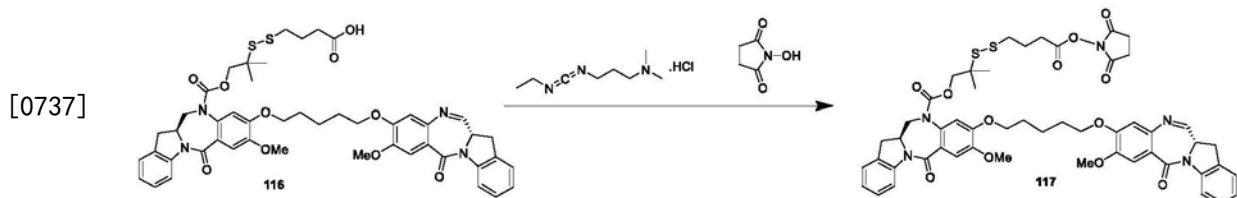


[0734] 在室温下在氮气下向化合物2(105mg, 0.193mmol)及(S)-9-羟基-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂革并[1,2-a]吡啶-11(12H)-甲酸2-((4-甲氧基-4-氧代丁基)二硫基)-2-甲基丙酯(90mg, 0.161mmol)于无水N,N-二甲基乙酰胺(1.60mL)中的悬浮液中添加碳酸钾(44.4mg, 0.321mmol)。所述混合物搅拌持续18小时, 之后其用水淬灭。将所得白色固体过滤且接着再溶解于二氯甲烷中, 转移至分液漏斗且用水洗涤。有机层经无水硫酸镁干燥, 过滤, 且在真空中浓缩。粗材料通过甲醇/二氯甲烷中的硅胶色谱纯化以获得化合物115(0.15g, y=100%)。MS (m/z) : 941.7 (M+1)⁺ UPLC=1.95min (2.5min方法)。



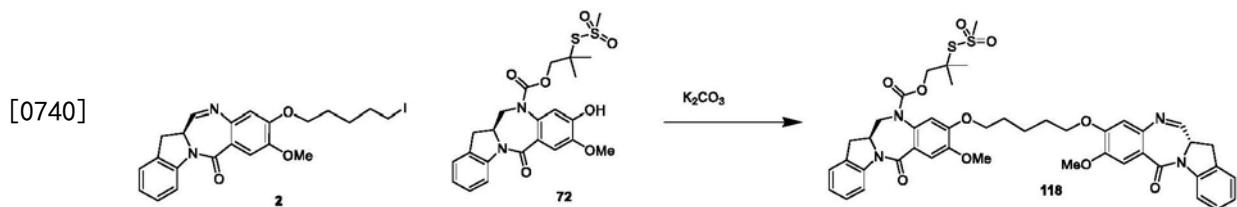
[0736] 在0℃下向(S)-8-甲氧基-9-((5-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂革并[1,2-a]吡啶-9-基)氧基)戊基)氧基)-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯

并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-11(12H)-甲酸2-((4-甲氧基-4-氧代丁基)二硫基)-2-甲基丙酯--甲烷(180mg,0.167mmol)于无水四氢呋喃(6.25ml)及去离子水(2.08ml)中的冷却溶液中添加氢氧化锂(19.97mg,0.834mmol)。所述反应经三小时从0℃至室温搅拌,此时其用二氯甲烷及去离子水稀释。所述混合物用盐酸(0.5M水溶液,1mL)酸化至pH=3且用二氯甲烷(2×20ml)萃取。有机层用水洗涤,经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩。粗物质无需进一步纯化继续使用,假定100%产率。MS(m/z):927.6(M+1)⁺925.6(M-1)⁻。UPLC=1.76min(2.5min方法)。



[0738] 向4-((1-((S)-8-甲氧基-9-((5-((S)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-9-基)氧基)戊基)氧基)-6-氧代-11,12,12a,13-四氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-11-羰基)氧基)-2-甲基丙-2-基)二硫基)丁酸(150mg,0.165mmol)及N-羟基琥珀酰亚胺(57.0mg,0.495mmol)于无水二氯甲烷(3.30ml)中的溶液中添加1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(158mg,0.825mmol)且所述混合物在室温下在氮气下搅拌持续三小时。所述反应用二氯甲烷稀释且用水洗涤。有机层经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩。粗材料的一半通过RP-HPLC(C18,乙腈/去离子水)纯化。含有DP的部分经冷冻并冻干以获得呈白色固体状的化合物117(38mg,y=46%)。MS(m/z):1006.7(M+1)⁺。UPLC=1.89min(2.5min方法)。

[0739] 实施例18.合成化合物118

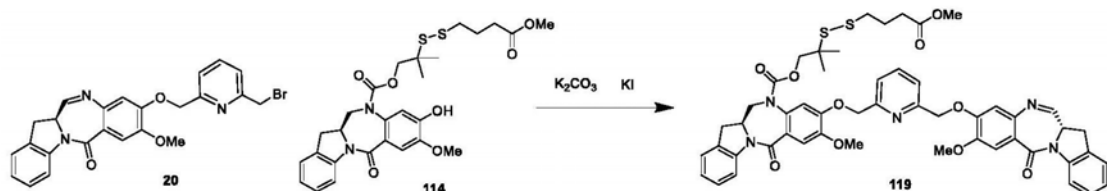


[0741] 向化合物2(116mg,0.213mmol)及(S)-9-羟基-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-11(12H)-甲酸2-甲基-2-((甲基磺酰基)硫基)丙酯(90mg,0.178mmol)于无水N,N-二甲基乙酰胺(1.77ml)中的悬浮液中添加无水碳酸钾(49.1mg,0.355mmol)且所述反应在室温下在氮气下搅拌持续18小时。水添加至反应混合物中且将所得白色固体过滤,再溶解于二氯甲烷中,转移至分液漏斗,且用水洗涤。有机层经无水硫酸镁干燥且在真空中浓缩。粗材料的一半经由RP-HPLC(C18 Kromasil,乙腈/去离子水,经30min55-65%)纯化。纯部分用二氯甲烷萃取,经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩以获得呈白色固体状的化合物118(45mg,y=58%)。

[0742] MS(m/z):869.6(M+1)⁺。UPLC=1.85min(2.5min方法)。

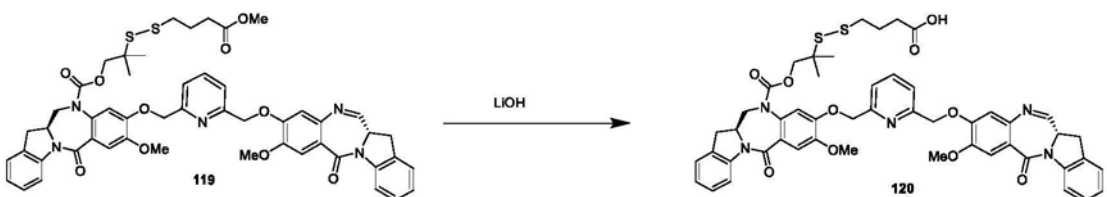
[0743] 实施例19.合成化合物121

[0744]



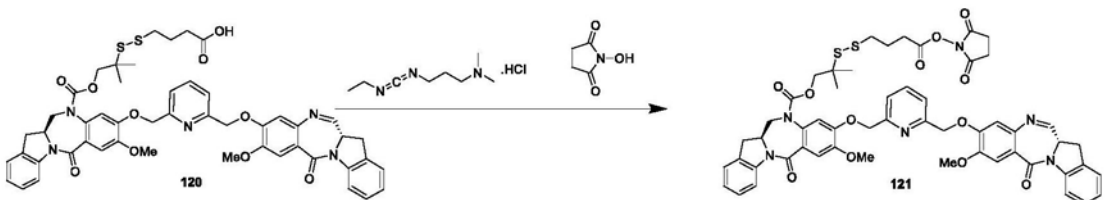
[0745] 向化合物20 (132mg, 0.235mmol) 及 (S)-9-羟基-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-11(12H)-甲酸2-((4-甲氧基-4-氧代丁基)二硫基)-2-甲基丙酯 (110mg, 0.196mmol) 于无水N,N-二甲基乙酰胺 (1.96ml) 中的悬浮液中添加无水碳酸钾 (54.2mg, 0.392mmol) 且所述反应在室温下在氮气下搅拌持续18小时。水添加至反应混合物中且将所得白色固体过滤,再溶解于二氯甲烷中且用水洗涤。有机层经无水硫酸镁干燥且在真空中浓缩。粗材料通过闪蒸色谱(甲醇/二氯甲烷)纯化以生成化合物119 (172mg, $y=90\%$)。MS (m/z): 976.7 ($M+1$)⁺。UPLC=1.91min (2.5min方法)。

[0746]



[0747] 无水四氢呋喃 (6.62ml) 及水 (2.20ml) 中的化合物119 (200mg, 0.177mmol) 在冰浴中冷却至0℃且添加氢氧化锂 (21.14mg, 0.883mmol)。所述反应从0℃至室温搅拌持续三小时,之后其用二氯甲烷及去离子水稀释。所述混合物用盐酸 (0.5M水溶液, 1ml) 酸化至pH=3且接着用二氯甲烷 (2×20ml) 萃取。有机层用水洗涤,经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩以获得粗化合物120,其无需纯化即用于下一步骤中。MS (m/z): 962.6 ($M+1$)⁺ 960.7 ($M-1$)⁻。UPLC=1.73min (2.5min方法)。

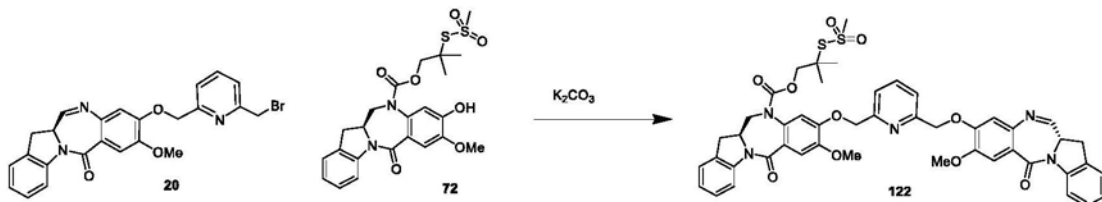
[0748]



[0749] 向4-((1-((S)-8-甲氧基-9-((6-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-9-基)氧基)甲基)吡啶-2-基)甲氧基)-6-氧代-11,12,12a,13-四氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-11-羰基)氧基)-2-甲基丙-2-基)二硫基)丁酸 (155mg, 0.164mmol) 及N-羟基琥珀酰亚胺 (56.7mg, 0.493mmol) 于无水二氯甲烷 (3284μl) 中的溶液中添加1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐 (157mg, 0.821mmol)。所述反应在室温下搅拌持续三小时且接着用二氯甲烷稀释且用水洗涤。有机层经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩。所得粗材料的一半通过RP-HPLC (Kromasil C18, 乙腈/去离子水) 纯化。含有产物的部分经冷冻并冻干以获得呈白色固体状的化合物121 (43.5mg, $y=50\%$)。MS (m/z): 1041.7 ($M+1$)⁺。UPLC=1.85min (2.5min方法)。

[0750] 实施例20.合成化合物122

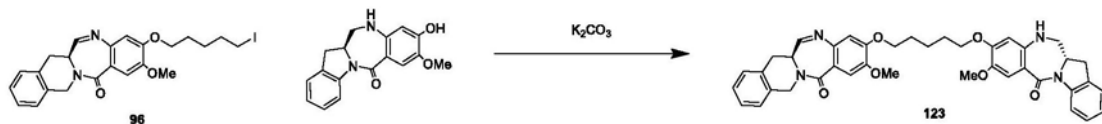
[0751]



[0752] 向化合物20 (71.4mg, 0.149mmol) 及 (S)-9-羟基-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂革并[1,2-a]吡啶-11(12H)-甲酸2-甲基-2-((甲基磺酰基)硫基)丙酯 (63mg, 0.124mmol) 于无水N,N-二甲基乙酰胺 (1.24ml) 中的悬浮液中添加无水碳酸钾 (34.4mg, 0.249mmol) 且所述反应在室温下在氮气下搅拌持续18小时。水添加至反应混合物中且将所得白色固体过滤,再溶解于二氯甲烷中,转移至分液漏斗,且用水洗涤。有机层经无水硫酸镁干燥,过滤且在真空中浓缩。粗物质经由RP-HPLC (C18 Kromasil, 乙腈/去离子水, 经30min 50-70%) 纯化。含有DP的部分经冷冻并冻干以获得呈白色固体状的化合物122 (64mg, $y=57\%$)。MS (m/z): 904.6 ($M+1$)⁺。UPLC=1.85min (2.5min方法)。

[0753] 实施例21. 合成化合物123

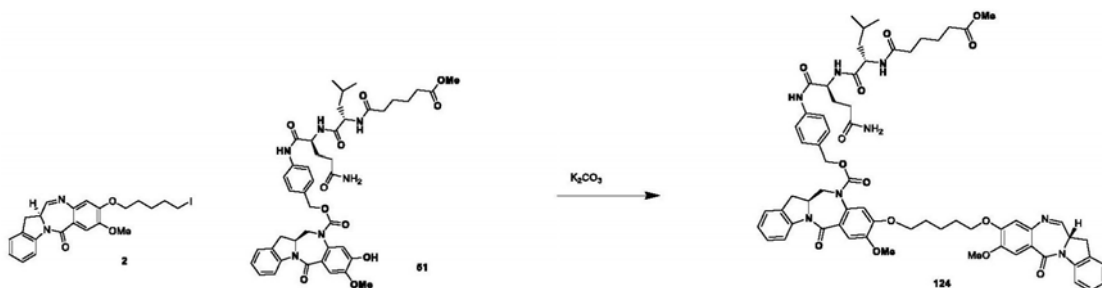
[0754]



[0755] 向化合物96及 (S)-9-羟基-8-甲氧基-11,12,12a,13-四氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂革并[1,2-a]吡啶-6-酮 (78mg, 0.262mmol) 于无水N,N-二甲基乙酰胺 (1.58ml) 中的溶液中添加碳酸钾 (49.3mg, 0.357mmol)。所述反应在室温下搅拌持续18小时,之后其用水稀释。将所得固体过滤且接着再溶解于二氯甲烷中且用水洗涤。有机层经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩。粗材料通过RP-HPLC (乙腈/去离子水, 经30min 55-75%) 纯化含有产物的部分经组合且用二氯甲烷萃取。有机层经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩以生成化合物123 (75mg, $y=46\%$)。MS (m/z): 673.6 ($M+1$)⁺。UPLC=1.66min (2.5min方法)。

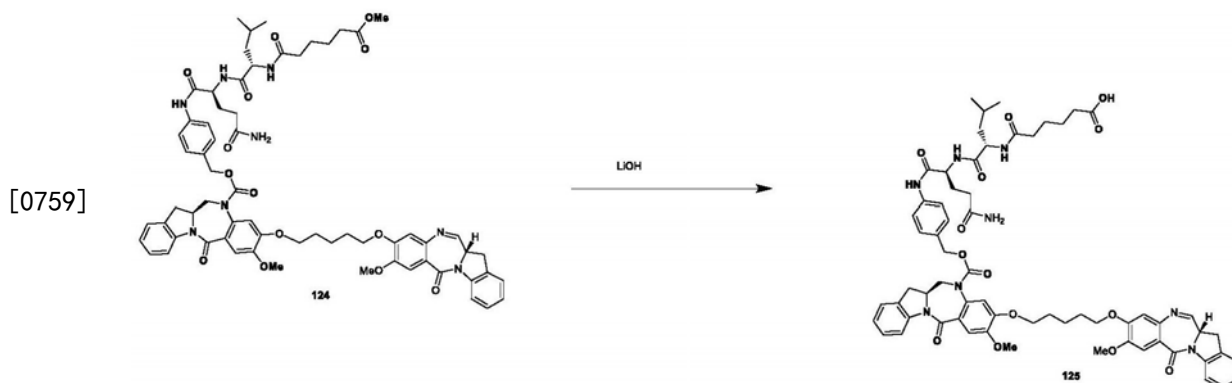
[0756] 实施例22. 合成化合物126

[0757]

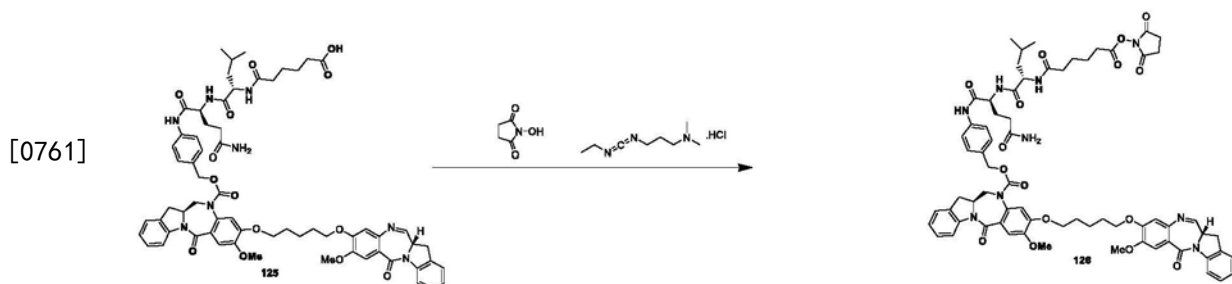


[0758] 向 (S)-9-羟基-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂革并[1,2-a]吡啶-11(12H)-甲酸4-((S)-5-氨基-2-((S)-2-(6-甲氧基-6-氧代己酰氨基)-4-甲基戊酰氨基)-5-氧代戊酰氨基)苯甲酯 (80mg, 0.097mmol) 及化合物2 (56.8mg, 0.116mmol) 于无水N,N-二甲基乙酰胺 (965 μ l) 中的溶液中添加碳酸钾 (26.7mg, 0.193mmol) 且所述反应在室温下在氮气下搅拌持续18小时。水添加至反应混合物中且将所得固体过滤,接着再溶解于20%甲醇/二氯甲烷中,转移至分液漏斗,且用水洗涤。有机层经无水硫酸镁干燥且在真空中浓缩。粗材料经由硅胶色谱 (12g 硅石柱, 甲醇/二氯甲烷) 纯化以获得化合物124

(70mg, $y=61\%$)。MS (m/z): 1192.0 ($M+1$)⁺。UPLC=5.55min (10min方法)。

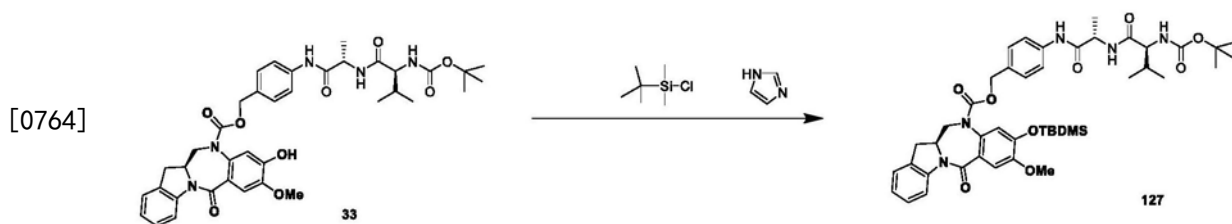


[0760] 向(S)-8-甲氧基-9-((5-((S)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)戊基)氧基)-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啉-11(12H)-甲酸4-((S)-5-氨基-2-((S)-2-(6-甲氧基-6-氧代己酰氨基)-4-甲基戊酰氨基)-5-氧代戊酰氨基)苯甲酯(60mg, 0.050mmol)于无水四氢呋喃(1.88ml)及去离子水(630 μ l)中的溶液中添加氢氧化锂(3.62mg, 0.151mmol)。在室温下搅拌持续90分钟之后,所述混合物用30%甲醇/二氯甲烷及去离子水稀释且用盐酸(0.5M水溶液)酸化至pH=3。所述混合物用30%甲醇/二氯甲烷(3 $\times$ 50mL)萃取。有机层用水洗涤,经无水硫酸镁干燥,经由硅藻土过滤且蒸发。粗产物125无需进一步纯化继续使用,假定100%产率。MS (m/z): 1178.0 ($M+1$)⁺。UPLC=5.53min (10min方法)。

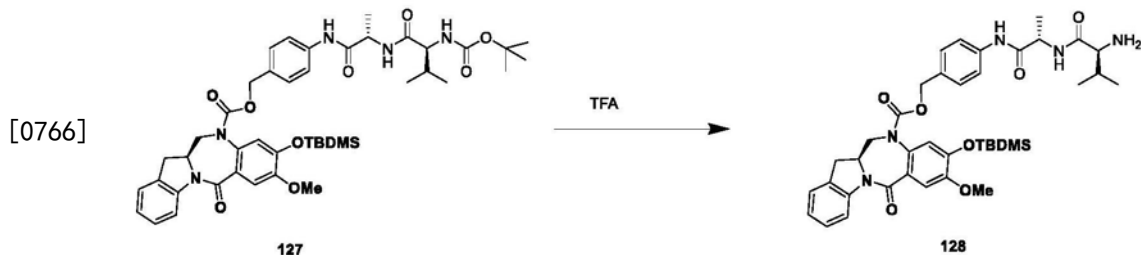


[0762] 向化合物125(58.9mg, 0.05mmol)及N-羟基琥珀酰亚胺(17.26mg, 0.150mmol)于无水二氯甲烷(750 μ l)及无水N,N-二甲基甲酰胺(250 μ l)中的溶液中添加1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(47.9mg, 0.250mmol)。使所述反应在室温下在氮气下搅拌持续三小时,此时所述混合物经浓缩以移除二氯甲烷。添加乙腈及去离子水且所述混合物经冷冻并冻干。粗材料通过RP-HPLC(C18 Kromasil, 乙腈/去离子水)纯化。含有DP的部分经冷冻并冻干为纯化化合物126(32mg, $y=51\%$, 经2个步骤)。MS (m/z): 1275.0 ($M+1$)⁺。UPLC=5.77min (10min方法)。

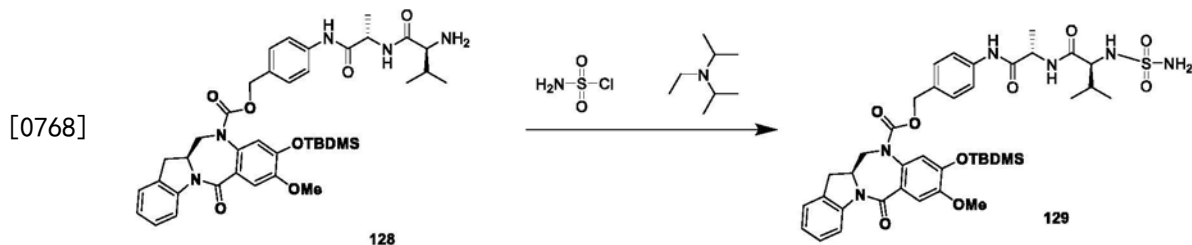
[0763] 实施例23. 合成化合物134



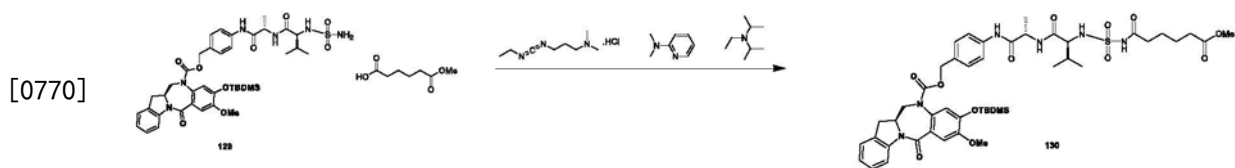
[0765] 向(S)-9-羟基-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-11(12H)-甲酸4-((S)-2-((S)-2-((叔丁氧羰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苯甲酯(0.28g,0.391mmol)及叔丁基二甲基甲硅烷氯(0.077g,0.509mmol)于无水二甲基甲酰胺(2.61ml)中的溶液中添加咪唑(0.067g,0.978mmol)。反应混合物在环境温度下搅拌持续20小时,此时其用乙酸乙酯萃取。有机层用水及盐水溶液洗涤,接着经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩。粗材料通过乙酸乙酯/己烷中的硅胶色谱纯化以生成呈白色结晶固体状的化合物127(0.30g,y=92%)。MS(m/z):830.8(M+1)⁺。UPLC=2.04min(2.5min方法)。



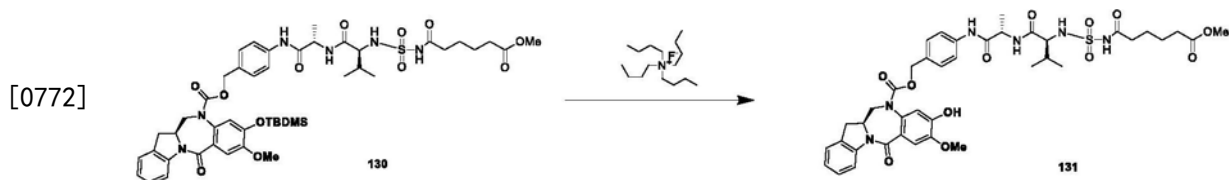
[0767] (S)-9-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-11(12H)-甲酸4-((S)-2-((S)-2-((叔丁氧羰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苯甲酯(0.30g,0.361mmol)于无水二氯甲烷(2.5ml)中的溶液在冰浴中冷却至0℃。添加三氟乙酸(1.807ml)于二氯甲烷(2.5ml)中的新鲜混合物。在0℃下在氮气下搅拌持续30分钟之后,所述反应倾入冰/碳酸氢钠混合物中且接着用二氯甲烷萃取。萃取物用盐水洗涤,经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩。粗化合物128无需进一步纯化继续使用,假定100%产率。MS(m/z):730.6(M+1)⁺。UPLC=1.53min(2.5min方法)。



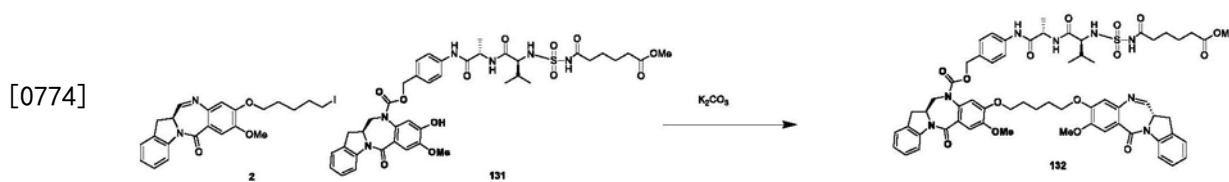
[0769] 向(S)-9-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-11(12H)-甲酸4-((S)-2-((S)-2-氨基-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苯甲酯(0.23g,0.315mmol)于无水N,N-二甲基乙酰胺(1.050ml)中的溶液中添加二异丙基乙胺(0.137ml,0.788mmol)。所述反应在冰浴中冷却至0℃,接着添加含氨磺酰氯(0.073g,0.630mmol)的无水N,N-二甲基乙酰胺(0.25ml)。所述混合物在0℃下搅拌持续20min,接着在室温下搅拌持续20小时,之后其用饱和碳酸氢钠水溶液淬灭。所述混合物用乙酸乙酯萃取且萃取物用水及盐水洗涤。有机层经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩。粗物质无需进一步纯化继续使用,假定100%产率。MS(m/z):809.8(M+1)⁺807.8(M-1)⁻。UPLC=1.84min(2.5min方法)。



[0771] 向(S)-9-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-11(12H)-甲酸4-((S)-2-((S)-3-甲基-2-(氨磺酰基氨基)丁酰氨基)丙酰氨基)苯甲酯(0.23g,0.284mmol)及己二酸单甲酯(0.063ml,0.426mmol)于无水二氯甲烷(1.895ml)中的溶液中添加添加1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(0.082g,0.426mmol)、4-二甲基氨基吡啶(0.017g,0.142mmol)及二异丙基乙胺(0.059ml,0.341mmol)。反应混合物在环境温度下搅拌持续20小时,此时其用二氯甲烷稀释且用水及盐水洗涤。有机层经无水硫酸钠干燥且在减压下浓缩。粗材料通过甲醇/二氯甲烷)中的硅胶色谱纯化以生成(S)-9-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-11(12H)-甲酸4-((S)-2-((S)-2-((N-(6-甲氧基-6-氧代己酰氨基)氨磺酰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苯甲酯(86mg,y=29%,经4个步骤)。MS(m/z):952.0(M+1)⁺949.9(M-1)⁻。UPLC=1.92min(2.5min方法)。



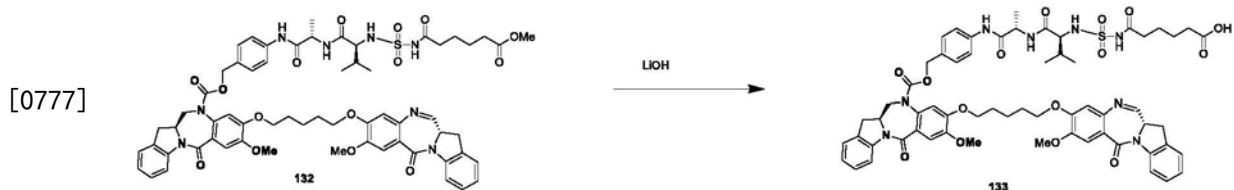
[0773] (S)-9-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-11(12H)-甲酸4-((S)-2-((S)-2-((N-(6-甲氧基-6-氧代己酰氨基)氨磺酰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苯甲酯(86mg,0.090mmol)于无水四氢呋喃(904μl)中的溶液在冰浴(0℃)中冷却且添加四丁基氟化铵溶液(1M于四氢呋喃中,181μl,0.181mmol)。所述混合物在0℃下在氮气下搅拌持续两小时。反应混合物用饱和氯化铵水溶液淬灭且用乙酸乙酯萃取。有机萃取物用盐水洗涤,经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩。粗材料通过甲醇/二氯甲烷)中的硅胶色谱纯化以生成(S)-9-羟基-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-11(12H)-甲酸4-((S)-2-((S)-2-((N-(6-甲氧基-6-氧代己酰氨基)氨磺酰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苯甲酯(59mg,y=78%)。MS(m/z):837.8(M+1)⁺835.7(M-1)⁻。UPLC=1.54min(2.5min方法)。



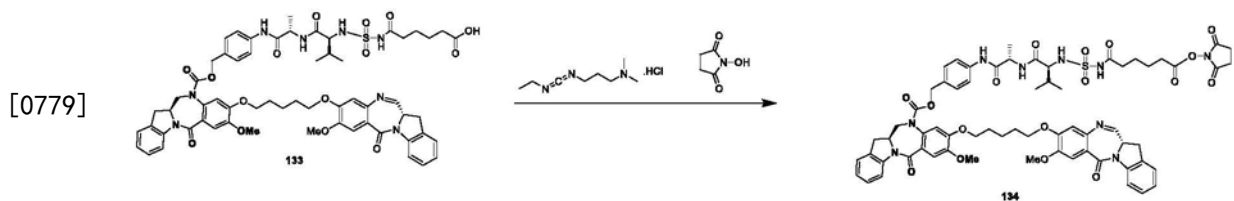
[0775] 向(S)-9-((5-碘戊基)氧基)-8-甲氧基-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-6-酮(44.9mg,0.092mmol)E003650-18及(S)-9-羟基-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-11(12H)-甲酸4-((S)-2-((S)-2-((N-(6-甲氧基-6-氧代己酰氨基)氨磺酰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苯甲酯(59mg,0.070mmol)于无水N,N-二甲基乙酰胺(705μl)中的溶液中添加无水碳酸钾(19.49mg,0.141mmol)且所述反应在室温下搅拌持续18小时。

[0776] 反应混合物用水稀释且用二氯甲烷萃取。萃取物用水洗涤,经无水硫酸镁干燥且

在真空中浓缩。粗材料通过甲醇/二氯甲烷中的硅胶色谱纯化以获得呈白色固体状的化合物132 (42mg, $y=50\%$)。MS (m/z): 1200.2 ($M+1$)⁺ UPLC=1.74min (2.5min方法)。

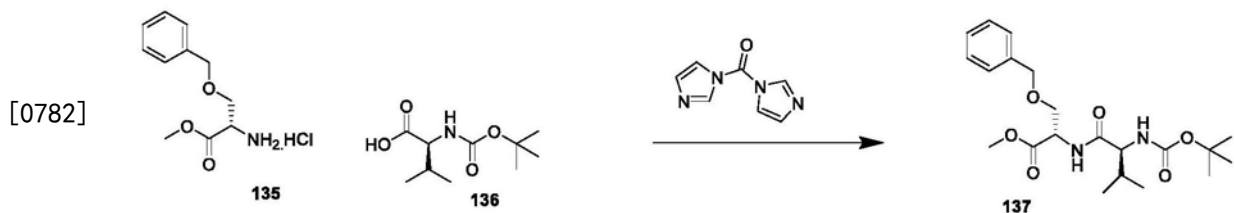


[0778] (S)-8-甲氧基-9-((5-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)戊基)氧基)-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啉-11(12H)-甲酸4-((S)-2-((S)-2-(N-(6-甲氧基-6-氧代己酰氨基)氨磺酰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苯甲酯 (28mg, 0.023mmol) 于无水四氢呋喃 (875 μ l) 及去离子水 (292 μ l) 中的溶液在冰浴中冷却且添加氢氧化锂 (1.677mg, 0.070mmol)。所述反应从0℃至室温搅拌持续三小时,之后其用二氯甲烷及去离子水稀释。所述混合物用盐酸 (0.5M水溶液, 1mL) 酸化至pH=3且用20%甲醇/二氯甲烷 (2 $\times$ 约20ml) 萃取。有机层用水洗涤,经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩以获得化合物133 (17.6mg, $y=63\%$) ,所述化合物无需进一步纯化即使用。MS (m/z): 1186.3 ($M+1$)⁺ UPLC=1.67min (2.5min方法)。



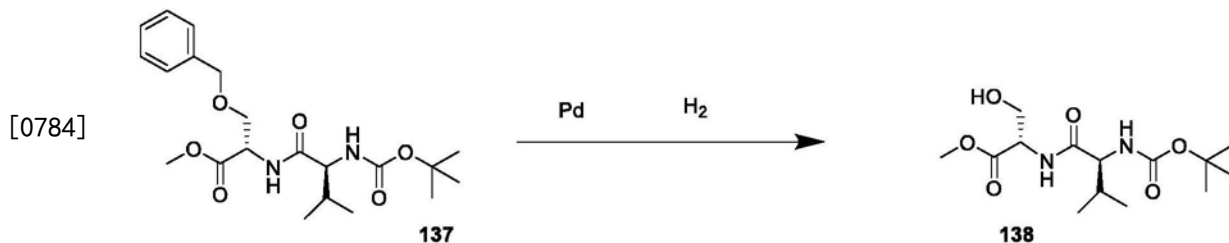
[0780] 向6-(N-((S)-1-(((S)-1-(4-(((S)-8-甲氧基-9-((5-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)戊基)氧基)-6-氧代-11,12,12a,13-四氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啉-11-羰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)氨磺酰基)氨基)-6-氧代己酸 (18mg, 0.015mmol) 于无水二氯甲烷 (607 μ l) 中的溶液中添加N-羟基琥珀酰亚胺 (5.24mg, 0.046mmol) 及1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐 (14.56mg, 0.076mmol)。反应混合物在室温下在氮气下搅拌持续90分钟并接着用二氯甲烷稀释且用水洗涤。有机层经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩。粗材料通过RP-HPLC (乙腈/水中的C18, 经30min 50-70%) 纯化。将含有产物的部分合并,经冷冻并冻干以获得化合物134 (5.3mg, $y=27\%$)。MS (m/z): 1283.3 ($M+1$)⁺ UPLC=1.75min (2.5min方法)。

[0781] 实施例24. 合成化合物147

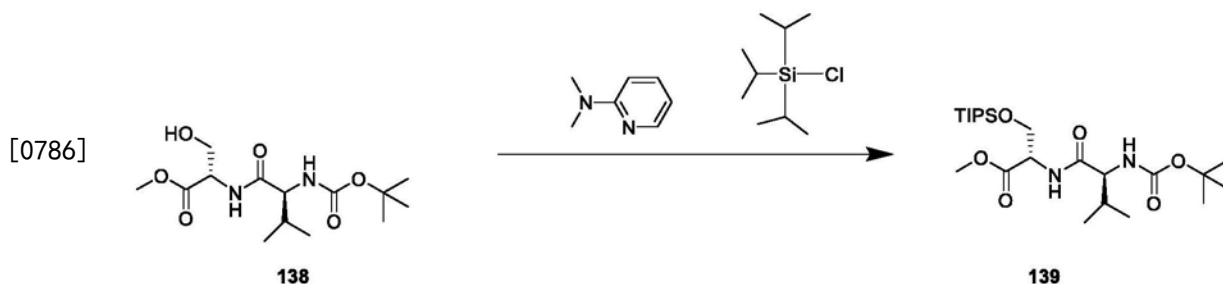


[0783] 在室温下向(叔丁氧羰基)-L-缬氨酸 (8.5g, 39.1mmol) (Boc-Val-OH) 于二氯甲烷

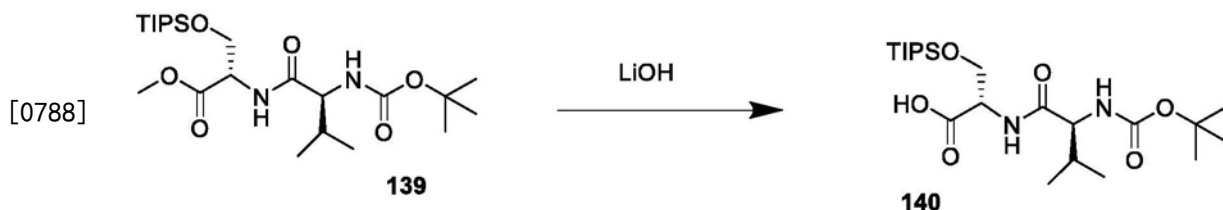
(78ml)中的溶液中分成数份添加添加1,1'-羰基二咪唑(7.61g,46.9mmol)。所述反应在室温下在氮气下搅拌持续30分钟。添加含O-苯甲基-L-丝氨酸甲酯(9.90g,40.3mmol) ChemImpex的二氯甲烷(19.56ml)且所述混合物在室温下在氮气下再搅拌持续18小时。所述反应用二氯甲烷稀释,用盐酸(1M水溶液)、饱和碳酸氢钠水溶液及盐水洗涤。有机层经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩以生成呈白色固体状的O-苯甲基-N-((叔丁氧羰基)-L-缬氨酰基)-L-丝氨酸甲酯17.8g。粗物质无需进一步纯化继续使用,假定100%产率。MS (m/z): 409.6 (M+1)⁺ UPLC=1.60min(2.5min方法)。



[0785] 向O-苯甲基-N-((叔丁氧羰基)-L-缬氨酰基)-L-丝氨酸甲酯(12.7g,31.1mmol)于无水甲醇(120ml)中的溶液中添加干燥钯/碳(10%,1.654g,1.554mmol)。使黑色悬浮液脱气且用氢气吹扫三次。所述混合物在室温下在氢气球(1atm)下搅拌持续18小时,之后其经由硅藻土过滤且用甲醇冲洗以获得呈粘性白色固体状的(叔丁氧羰基)-L-缬氨酰基-L-丝氨酸甲酯(10.6g)。粗物质无需进一步纯化继续使用,假定100%产率。

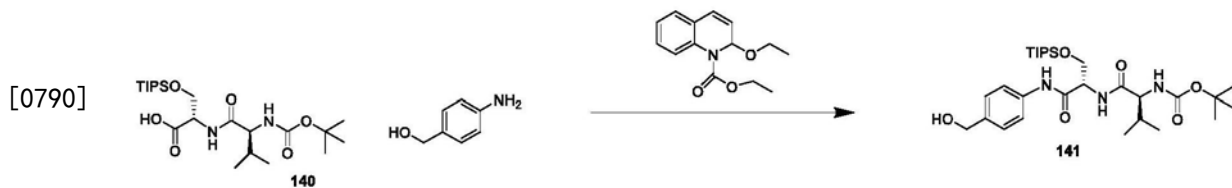


[0787] 向(叔丁氧羰基)-L-缬氨酰基-L-丝氨酸甲酯(4g,12.56mmol)于无水二甲基甲酰胺(100ml)中的溶液中添加三异丙基硅烷氯(4.16ml,18.85mmol)及4-二甲基氨基吡啶(4.60g,37.7mmol)。所述混合物在室温下在氩气下搅拌持续18小时。接着用乙酸乙酯稀释且用水及盐水洗涤。有机层经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩。粗物质通过乙酸乙酯/己烷中的硅胶色谱纯化以获得呈白色固体状的N-((叔丁氧羰基)-L-缬氨酰基)-O-(三异丙基甲硅烷基)-L-丝氨酸甲酯(5.9g,y=99%)。

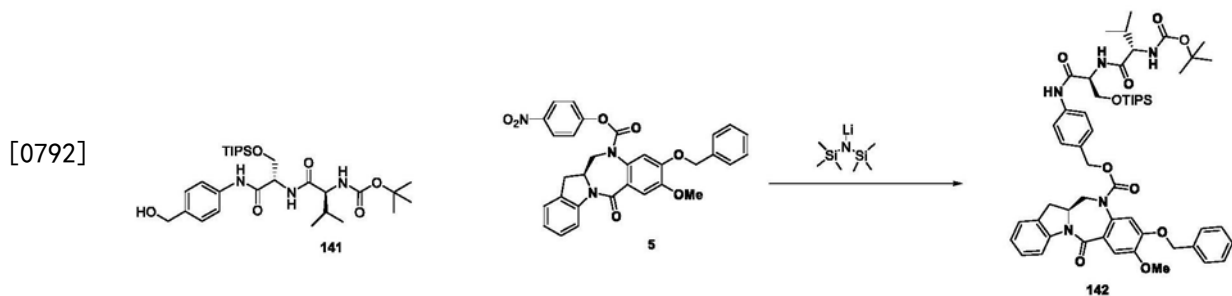


[0789] N-((叔丁氧羰基)-L-缬氨酰基)-O-(三异丙基甲硅烷基)-L-丝氨酸甲酯(5.9g,12.43mmol)于四氢呋喃(237ml)及去离子水(118ml)中的溶液在冰浴中冷却至0℃。添加氢氧化锂(0.893g,37.3mmol)且所述反应在0℃下搅拌持续2.5小时。所述混合物用水稀释且用盐酸(1M水溶液)酸化。接着其用乙酸乙酯萃取。萃取物用盐水洗涤,经无水硫酸镁干燥,

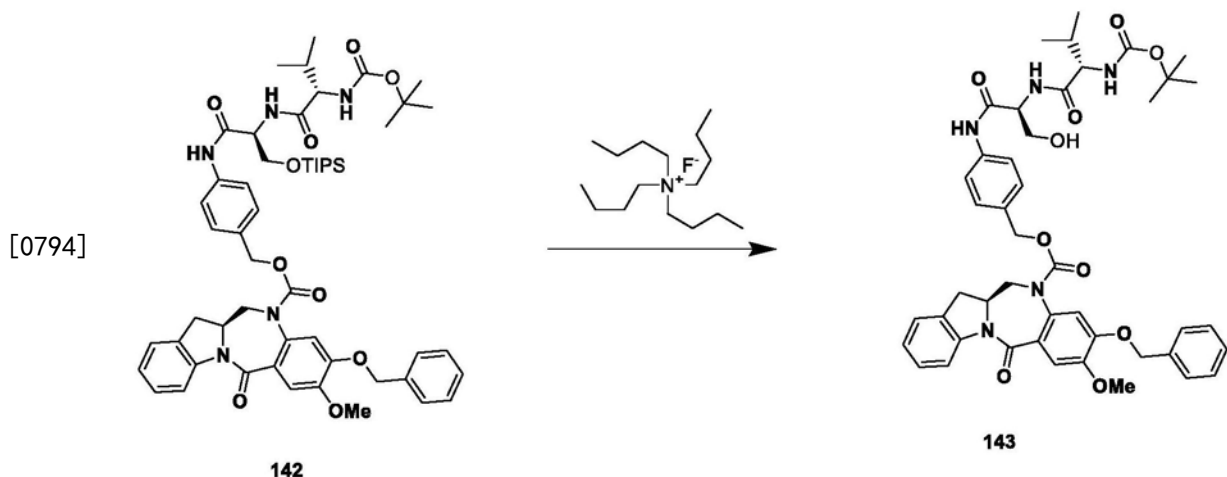
过滤并浓缩以获得呈白色结晶固体状的((S)-1-(((S)-1-((4-(羟基甲基)苯基)氨基)-1-氧代-3-((三异丙基甲硅烷基)氧基)丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)氨基甲酸叔丁酯(5.5g,96%),其无需进一步纯化即使用。



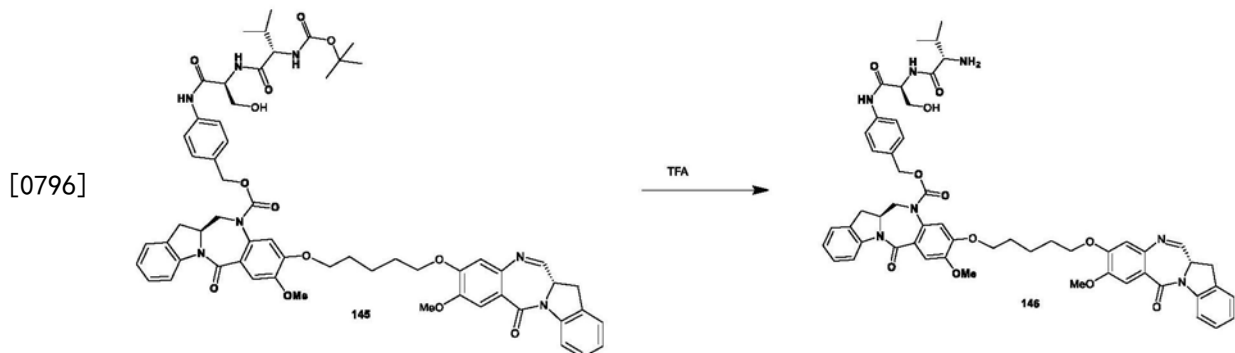
[0791] ((S)-1-(((S)-1-((4-(羟基甲基)苯基)氨基)-1-氧代-3-((三异丙基甲硅烷基)氧基)丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)氨基甲酸叔丁酯及EEDQ(5.62g,22.74mmol)于无水二氯甲烷(196ml)中的溶液在室温下搅拌持续一小时。接着添加(4-氨基苯基)甲醇(1.4g,11.37mmol)且所述混合物在室温下再搅拌持续18小时。所述反应浓缩至干,接着再溶解于二氯甲烷中且经由硅藻土过滤。滤液经蒸发且通过乙酸乙酯/己烷中的硅胶色谱纯化以获得呈结晶白色固体状的((S)-1-(((S)-1-((4-(羟基甲基)苯基)氨基)-1-氧代-3-((三异丙基甲硅烷基)氧基)丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)氨基甲酸叔丁酯(1.47g,y=23%)。MS(m/z):566.7(M+1)⁺564.7(M-1)⁻UPLC=1.92min(2.5min方法)。



[0793] ((S)-1-(((S)-1-((4-(羟基甲基)苯基)氨基)-1-氧代-3-((三异丙基甲硅烷基)氧基)丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)氨基甲酸叔丁酯(1.436g,2.54mmol)于无水四氢呋喃(5.77ml)及无水N,N-二甲基乙酰胺(11.54ml)中的溶液在冰浴中冷却至0℃。添加双(三甲基甲硅烷基)氨基锂(1M于四氢呋喃中,3.05ml,3.05mmol)且所述混合物在氩气下搅拌持续20分钟,接着添加含(S)-9-(苯甲氧基)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-11(12H)-甲酸4-硝基苯酯(1.4g,2.54mmol)的无水四氢呋喃(5.77ml)。反应混合物在氩气下从0℃至室温搅拌持续18小时,接着用饱和氯化铵溶液淬灭。所述混合物用乙酸乙酯萃取且有机层用水及盐水洗涤。有机层经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩。粗材料通过乙酸乙酯/二氯甲烷中的硅胶色谱纯化以获得呈白色固体状的(S)-9-(苯甲氧基)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-11(12H)-甲酸4-((S)-2-((S)-2-((叔丁氧羰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)-3-((三异丙基甲硅烷基)氧基)丙酰氨基)苯甲酯(0.91g,y=36%)。MS(m/z):979.2(M+1)⁺UPLC=2.24min(2.5min方法)。

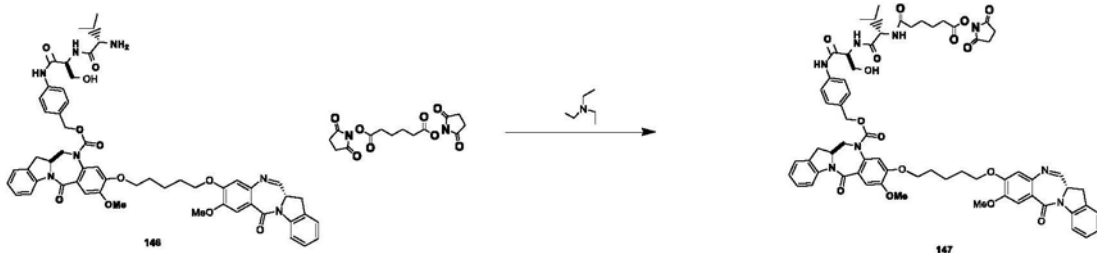


[0795] (S)-9-(苯甲氧基)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-11(12H)-甲酸4-((S)-2-((S)-2-((叔丁氧羰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)-3-((三异丙基甲硅烷基)氧基)丙酰氨基)苯甲酯(0.5g,0.511mmol)于无水四氢呋喃(5.11ml)中的溶液在冰浴中冷却至0℃且添加四丁基氟化铵溶液(1M于四氢呋喃中,1.022ml,1.022mmol)。反应混合物在0℃下在氩气下搅拌持续两小时且在完成时用饱和氯化铵溶液淬灭。所述混合物用乙酸乙酯萃取。萃取物用盐水洗涤,经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩。粗材料通过乙酸乙酯/二氯甲烷中的硅胶色谱纯化以获得呈白色固体状的化合物143(356mg,y=85%)。MS(m/z):822.9(M+1)⁺ UPLC=1.82min(2.5min方法)。



[0797] (S)-8-甲氧基-9-((5-((S)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-9-基)氧基)戊基)氧基)-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-11(12H)-甲酸4-((S)-2-((S)-2-((叔丁氧羰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)-3-羟基丙酰氨基)苯甲酯(90mg,0.082mmol)于无水二氯甲烷(0.8ml)中的溶液在冰浴中冷却至0℃。添加三氟乙酸(411μl)于无水二氯甲烷(0.4ml)中的新鲜混合物。所述反应在0℃下在氩气下搅拌持续一小时且在完成时,所述混合物倾入冰/饱和碳酸氢钠混合物中。此混合物用二氯甲烷萃取,用盐水洗涤且经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩以获得呈黄色固体状的化合物146(63mg,y=77%)。MS(m/z):995.2(M+1)⁺ UPLC=1.51min(2.5min方法)。

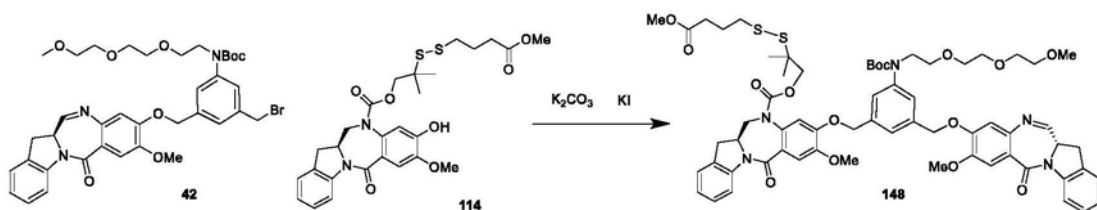
[0798]



[0799] 向(S)-8-甲氧基-9-((5-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)戊基)氧基)-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啉-11(12H)-甲酸4-((S)-2-((S)-2-氨基-3-甲基丁酰氨基)-3-羟基丙酰氨基)苯甲酯(36mg,0.036mmol)于无水N,N-二甲基甲酰胺(724μl)中的溶液中添加己二酸双(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)酯(24.65mg,0.072mmol)及三乙胺(15.14μl,0.109mmol)。所述反应在室温下在氩气下搅拌持续一小时且接着用二氯甲烷稀释且用水洗涤。有机层经干燥,过滤且用乙腈共蒸发。粗材料通过RP-HPLC(乙腈/水中的C18,经30min 50-70%)纯化以生成化合物147。MS(m/z):1220.4(M+1)⁺ UPLC=1.75min(2.5min方法)。

[0800] 实施例25.合成化合物148

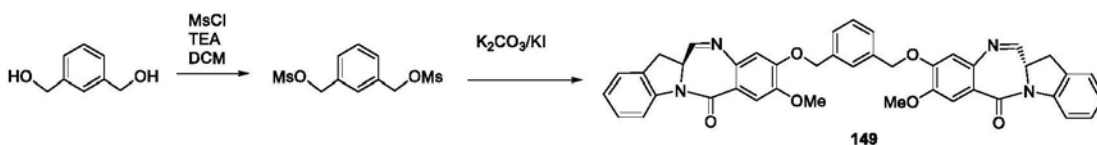
[0801]



[0802] 向(S)-(3-(溴甲基)-5-(((8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)(2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯(119mg,0.161mmol)及(S)-9-羟基-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啉-11(12H)-甲酸2-((4-甲氧基-4-氧代丁基)二硫基)-2-甲基丙酯(75mg,0.134mmol)于无水N,N-二甲基乙酰胺(1.34ml)中的悬浮液中添加碳酸钾(37.0mg,0.268mmol)且所述反应在室温下在氮气下搅拌持续18小时。水添加至所述反应中且将所得白色固体过滤,接着再溶解于二氯甲烷中,转移至分液漏斗,用水洗涤,经无水硫酸镁干燥且在真空中浓缩。粗材料经由RP-HPLC(C18 Kromasil,乙腈/水)纯化。纯部分用二氯甲烷萃取。经硫酸镁干燥,过滤并浓缩以生成化合物148。

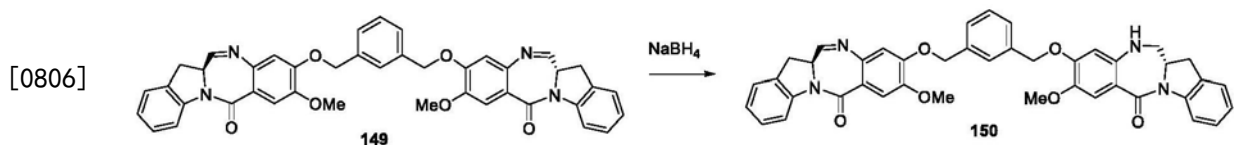
[0803] 实施例26.合成化合物150

[0804]



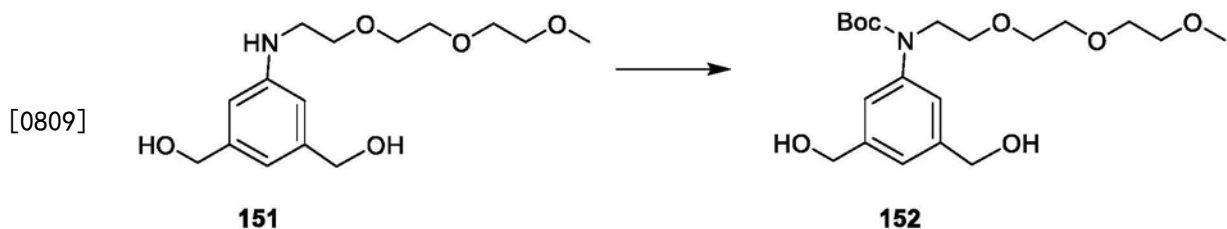
[0805] 在-5至-10℃下在15分钟内向1,3-苯二甲醇(11mg,0.08mmol)于无水二氯甲烷(0.8mL)中的搅拌溶液中逐滴添加三乙胺(33μl,0.24mmol),接着添加甲烷磺酰氯(16μl,0.21mmol)。所述溶液在-5至-10℃下再搅拌持续60分钟且用冰/水淬灭,用冷乙酸乙酯稀释。分离所述混合物且有机层用冷水洗涤,经无水硫酸钠干燥。将其过滤且滤液通过在真空

中旋转蒸发而经蒸发(温度<35℃)。所获得的二甲磺酸酯经抽高真空持续数小时,接着溶解于无水二甲基甲酰胺(1.5mL)中。随后添加化合物1(94mg,0.32mmol)、无水碳酸钾(50mg,0.36mmol)及碘化钾(27mg,0.16mmol)。所述混合物在室温下搅拌持续17小时(通过质谱检查)且用二氯甲烷稀释。其用盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥且过滤。滤液在减压下蒸发且残余物通过反相HPLC(C18柱,乙腈/H₂O,用乙腈/H₂O装载柱,3:1,搅拌持续30min且离心,接着注射)纯化以提供呈白色固体状的二聚体化合物149(6.6mg)。¹H NMR(400Hz,CDCl₃):δ8.21(d,J=8.0Hz,2H),7.79(d,J=4.4Hz,2H),7.51(s,2H),7.46(s,1H),7.36(bs,3H),7.23-7.18(m,4H),7.06-7.03(m,2H),6.79(s,2H),5.20(d,J=12.4Hz,2H),5.14(d,J=12.4Hz,2H),4.41(ddd,J1=10.8Hz,J2=4.4Hz,J3=4.0Hz,2H),3.92(s,6H),3.64(dd,J1=17.2Hz,J2=11.2Hz,2H),3.42(dd,J1=16.8Hz,J2=4.0Hz,2H);HRMS(ESI,m/z):计算值691.2557(M+H)⁺,实验值691.2570。

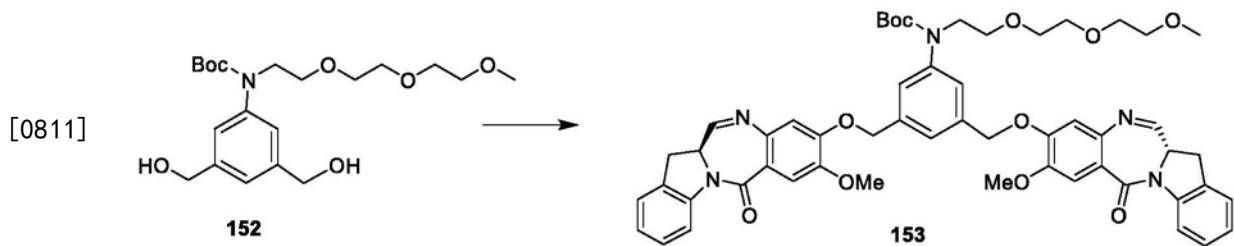


[0807] 化合物149(60mg,0.043mmol)溶解于二氯甲烷(0.25ml)及乙醇(0.5ml)的无水混合物中且在冰浴中冷却至0℃。接着添加溶解于乙醇(50μl)中的硼氢化钠(0.493mg,0.013mmol)溶液且所述混合物搅拌持续5分钟且移出冰浴。使所述反应搅拌持续3小时,在低温下通过添加饱和氯化铵及二氯甲烷淬灭,分离且有机层用盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤,且在真空中浓缩。残余物通过半制备型RP-HPLC(C18柱,乙腈/H₂O)纯化且含有所需产物的部分用二氯甲烷萃取并浓缩以生成单-亚胺化合物150(20mg,33%)。MS(m/z),预期值:692.7,实验值:715.2(M+Na)⁺,733.2(M+H₂O+Na)⁺,749.2(M+H₂O+K)⁺。

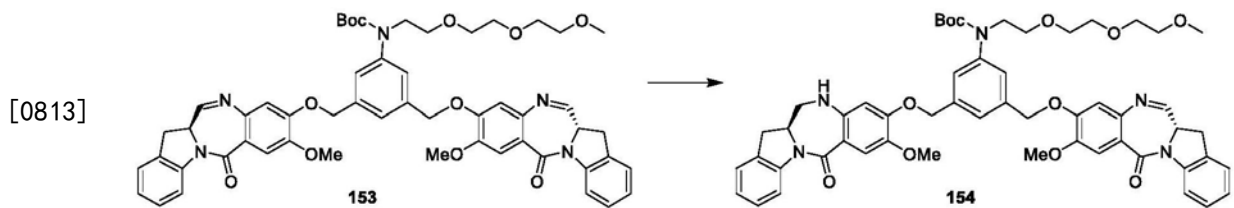
[0808] 实施例27.合成化合物155



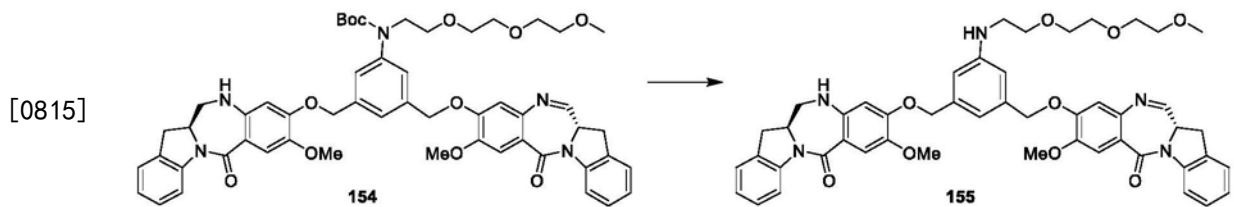
[0810] 向化合物151(339mg,1.1mmol)于无水四氢呋喃(4.0mL)中的搅拌溶液中添加Boc酐(272mg,1.2mmol)。所述混合物继续在室温下搅拌持续三天。反应混合物在减压下浓缩并且残余物通过硅胶色谱(二氯甲烷/甲醇)纯化以生成呈无色油状物的化合物152(405mg,y=90%)。¹H NMR(400Hz,CDCl₃):δ7.00(s,2H),6.97(s,1H),4.38(s,4H),4.12(s,2H),3.64(t,J=5.6Hz,2H),3.48-3.44(m,8H),3.40-3.38(m,2H),3.21(s,3H),1.31(s,9H);¹³C NMR(400Hz,CDCl₃):δ154.65,142.3,142.1,124.1,122.7,80.2,71.6,70.3,70.1,69.9,68.5,63.9,58.65,49.4,28.1。



[0812] 在 $-5-10^{\circ}\text{C}$ 下向化合物152 (51mg, 0.128mmol) 于无水二氯甲烷中的搅拌溶液中添加三乙胺 (0.053ml, 0.383mmol)。接着在15分钟内用注射器缓慢地添加甲烷磺酰氯 (0.026ml, 0.332mmol)。所述混合物在 $-5-10^{\circ}\text{C}$ 下搅拌持续1小时 (TLC, 二氯甲烷/甲醇10:1)。所述反应用冰/水淬灭, 用冷AcOEt稀释, 分离且有机层用冷水洗涤, 经无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{MgSO}_4$ 干燥, 过滤并汽提。残余物转移至具有二氯甲烷的小反应烧瓶中, 经汽提且抽高真空。其溶解于无水二甲基甲酰胺 (0.8mL) 中, 随后添加化合物1 (90mg, 0.31mmol) 及钾 (53mg, 0.38mmol)。所述混合物在室温下搅拌过夜。其用二氯甲烷稀释, 用盐水洗涤, 经无水硫酸钠干燥, 过滤并汽提。残余物通过反相HPLC (CI 8, 乙腈/水) 纯化以生成呈微黄色固体状的化合物32b (56mg, 46%)。 ^1H NMR (400Hz, CDCl_3): δ 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): 实验值 992.2 ($\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{Na}$) $^+$, 101 $^+$ 。



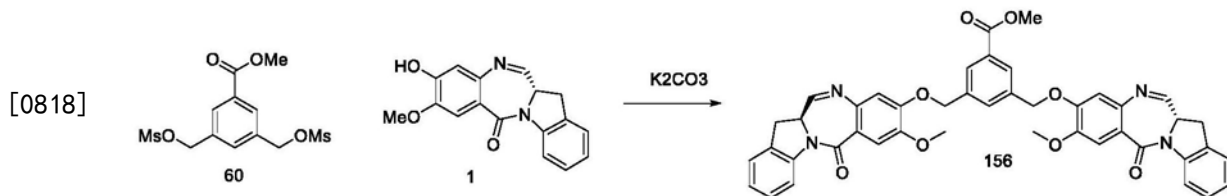
[0814] 在 0°C 下向化合物153 (56mg, 0.059mmol) 于无水二氯甲烷 (0.3mL) 及无水乙醇 (0.9mL) 中的搅拌溶液中添加 NaBH_4 (2.7mg, 0.07mmol)。移出冰浴且所述混合物在室温下搅拌持续3小时且接着用饱和氯化铵淬灭, 用二氯甲烷稀释, 分离且有机层用盐水洗涤, 经无水 Na_2SO_4 干燥且经由硅藻土过滤并汽提。所有含有纯产物的部分均用二氯甲烷萃取且经汽提以生成呈浅黄色固体状的化合物154 (20.7mg, $y=37\%$)。MS (m/z): 实验值 954.2 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 。



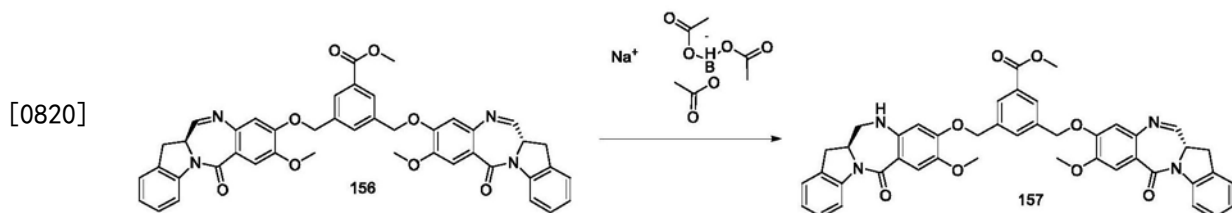
[0816] (3-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-11,12,12a,13-四氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基 (2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯 (273mg, 0.286mmol) 溶解于2.65mL无水二氯甲烷中且在冰浴中冷却至 0°C 。添加2.65mL无水二氯甲烷及三氟乙酸 (2649 μL) 的新鲜混合溶液。所述反应在 0°C 下

在氩气下搅拌持续55分钟。其用二氯甲烷稀释,倾入冰/饱和碳酸氢钠中。分离的有机物用盐水洗涤且经硫酸镁干燥,过滤并汽提以生成210mg淡黄色固体。移出46mg且通过RPHPLC(水/乙腈)纯化。含有所需化合物的部分经冷冻并冻干以生成最终化合物155(32mg, $y=60\%$)。MS(m/z):854.8($M+1$)⁺。UPLC=1.65(2.5min方法)。

[0817] 实施例28.合成化合物157

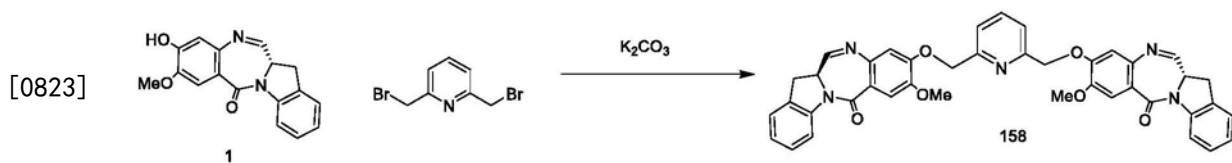


[0819] 化合物60(180mg,0.511mmol)及化合物1(336mg,1.073mmol)溶解于二甲基甲酰胺(2554 μ l)中。在室温下添加碳酸钾(176mg,1.277mmol),使颜色变化为亮橙色。所述反应在Ar下搅拌过夜。所述反应用二氯甲烷稀释且用水洗涤(2次)。有机物经干燥,浓缩,并通过硅胶色谱(乙酸乙酯/己烷且接着5%甲醇/二氯甲烷)纯化。收集纯产物以生成化合物156(300mg, $y=78\%$)。MS(m/z):849.5($M+1$)⁺。LCMS=8.2(15min方法)。

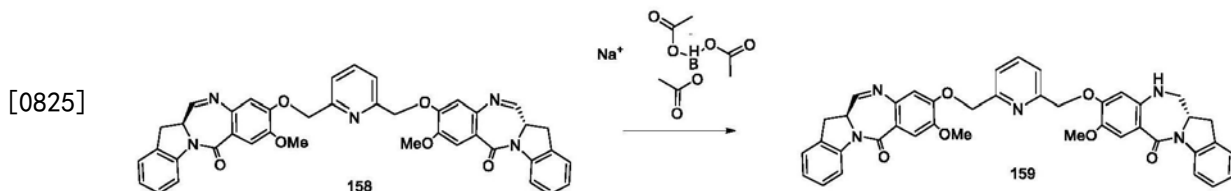


[0821] 化合物156(45mg,0.060mmol)溶解于1,2-二氯乙烷(601 μ l)中。在室温下添加三乙酰氧基硼氢化钠(11.46mg,0.054mmol)且搅拌持续1小时。再添加约2mg STAB且搅拌持续15分钟。所述反应用乙酸乙酯及数滴甲醇稀释且用柠檬酸水溶液淬灭。分离各层且有机物用盐水洗涤,干燥并浓缩。粗固体稀释于二甲基甲酰胺/乙腈/水/甲酸中且通过反相C18 HPLC纯化。含有单还原产物的纯部分经冷冻并冻干以生成作为所需产物的化合物157(10mg, $y=21\%$)。MS(m/z):751.7($M+1$)⁺。LCMS=5.8(8min方法)。

[0822] 实施例29.合成化合物159

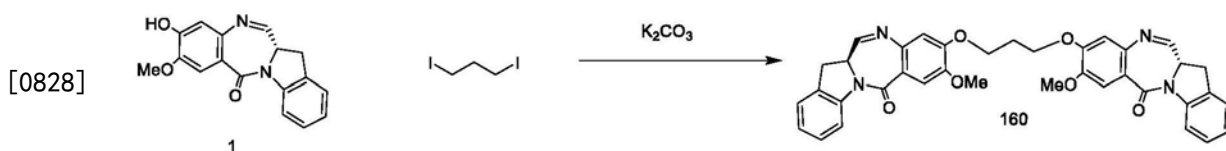


[0824] 化合物1(120mg,0.407mmol)及2,6-双(溴甲基)吡啶(50mg,0.185mmol)溶解于无水二甲基甲酰胺(1233 μ l)中且添加碳酸钾(77mg,0.555mmol)。所述反应在室温下搅拌持续5小时且完成。添加水以使产物沉淀。过滤所得固体且用水洗涤。所述固体再溶解于二氯甲烷/甲醇中。有机物经硫酸镁干燥,过滤,并浓缩以生成163mg粗化合物158。粗材料无需进一步纯化继续使用,假定100%产率。MS(m/z):692.5($M+1$)⁺。UPLC=1.68(2.5min方法)。

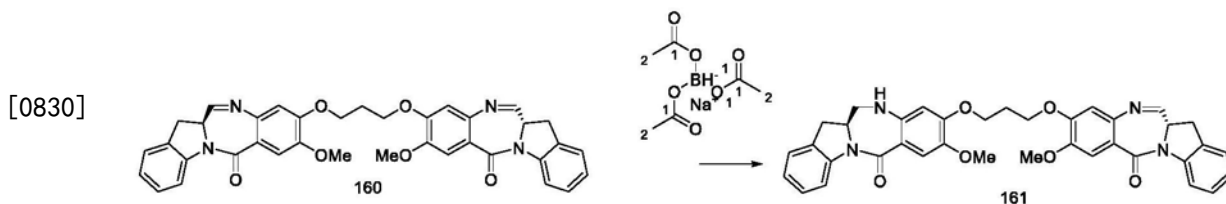


[0826] (12aS,12a'S)-9,9'-((吡啶-2,6-二基双(亚甲基))双(氧基))双(8-甲氧基-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-6-酮) (128mg,0.185mmol) 溶解于1,2-二氯乙烷(1850 μ l)中且在室温下添加三乙酰氧基硼氢化钠(39.2mg,0.185mmol)。所述反应在45分钟时经检查。再添加15mg STAB且使其搅拌30分钟。所述反应用二氯甲烷稀释且用饱和氯化铵淬灭。有机物用盐水洗涤且经硫酸镁干燥,过滤并汽提以生成165mg粗材料。粗材料的约一半溶解于四氢呋喃/乙腈/水中且通过RPHPLC(水/乙腈)纯化。含有单还原产物的部分经冷冻并冻干以生成所需化合物159(19.5mg,y=30%)。MS(m/z):694.6(M+1)⁺。UPLC=1.77(2.5min方法)。

[0827] 实施例30.合成化合物161

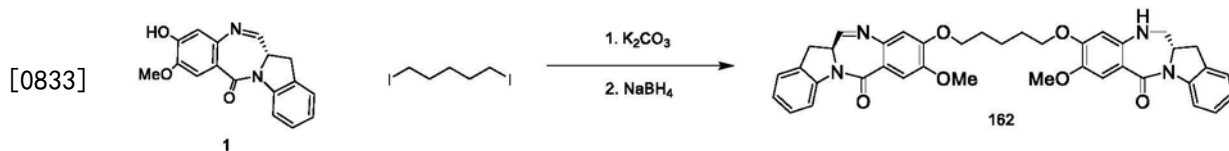


[0829] 向化合物1(147mg,0.5mmol)及1,3-二碘丙烷(23 μ l,0.2mmol)于无水二甲基甲酰胺(1.0mL)中的溶液中添加碳酸钾(111mg,0.8mmol)。所述混合物在室温下搅拌过夜(16小时)且用二氯甲烷稀释。其用饱和氯化铵及盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥且过滤。滤液在减压下蒸发且残余物经由制备型反相HPLC(C18柱,乙腈/水)纯化以生成呈白色固体状的化合物160(18.9mg,15%)。¹H NMR(400Hz,CDCl₃): δ 8.26(d,J=8.0Hz,2H),7.87(d,J=4.4Hz,2H),7.55(s,2H),7.26(s,4H),7.12-7.08(m,2H),6.88(s,2H),4.45(ddd,J₁=10.8Hz,J₂=4.4Hz,J₃=4.0Hz,2H),4.36-4.26(m,4H),3.94(s,6H),3.70(dd,J₁=16.8Hz,J₂=10.8Hz,2H),3.50(dd,J₁=16.8Hz,J₂=4.0Hz,2H),2.45(p,J=6.0Hz,2H);HRMS(ESI,m/z):计算值629.2400(M+H)⁺,实验值629.2400。



[0831] 程序:向化合物160(331mg,0.527mmol)于无水1,2-二氯乙烷(3.5ml)中的搅拌溶液中添加三乙酰氧基硼氢化钠(117mg,0.527mmol)且所述混合物在室温下再氮气下搅拌持续90分钟。用甲醇(约1mL)及饱和碳酸氢钠淬灭所述反应且用DCM稀释,分离且有机层用盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并汽提。粗物质通过半制备型HPLC(C18柱,乙腈/去离子水)纯化以获得呈白色固体状的化合物161(4.2mg y=12%)。MS(m/z):630.9(M+1)⁺。UPLC=2.5min(7min方法,30-98%)Agilent。

[0832] 实施例31.合成化合物162



[0834] 化合物162以与实施例30中所述的两步骤程序相似的方式制备以获得化合物62 (0.055g, 0.083mmol, 34.3%产率)。MS (m/z): 659.1 (M+1)⁺。

[0835] 实施例32. 制备化合物18的抗FR α 缀合物(抗FR α -18)

[0836] 含有在50mM HEPES (4- (2-羟基乙基) -1-哌嗪乙烷磺酸) pH 8.5缓冲液及10% v/v 二甲基乙酰胺 (N,N-二甲基乙酰胺) 共溶剂中的2.0mg/mL抗FR α 抗体及3.4摩尔当量化合物18 (在25℃下用5%二甲基乙酰胺水溶液中5倍过量的亚硫酸氢钠预处理持续6小时) 的反应在25℃下温育持续8小时。反应后, 所述缀合物使用NAP去盐柱 (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare) 纯化且经缓冲液交换至10mM组氨酸、250mM甘氨酸、1.0% w/v蔗糖、0.01% Tween-20、50 μ M亚硫酸氢钠pH 5.5配制缓冲液中。在室温下在相同缓冲液中执行透析持续4小时且接着在4℃下使用Slide-a-Lyzer透析盒 (ThermoScientific 30,000 MWC0) 执行透析过夜。

[0837] 发现纯化的缀合物具有1.2mg/ml的最终蛋白质浓度及每个抗体所连接的平均2.6个化合物18分子 (通过UV-Vis, 关于化合物18使用摩尔消光系数 $\epsilon_{330\text{nm}} = 11,971\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 及 $\epsilon_{280\text{nm}} = 30,188\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, 且关于抗FR α 抗体使用 $\epsilon_{280\text{nm}} = 201,400\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$); 97.5%单体 (通过尺寸排阻色谱); 及<1.1%未缀合化合物18 (通过双重柱、反相HPLC分析)。

[0838] 实施例33. 制备化合物79的抗EGFR缀合物(抗EGFR-79)

[0839] 含有在50mM HEPES (4- (2-羟基乙基) -1-哌嗪乙烷磺酸) pH 8.5缓冲液及10% v/v 二甲基乙酰胺 (N,N-二甲基乙酰胺) 共溶剂中的2.0mg/mL抗EGFR抗体及4.5摩尔当量化合物79 (在25℃下用5%二甲基乙酰胺水溶液中5倍过量的亚硫酸氢钠预处理持续6小时) 的反应在25℃下温育持续8小时。反应后, 所述缀合物使用NAP去盐柱 (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare) 纯化且经缓冲液交换至10mM组氨酸、250mM甘氨酸、1.0% w/v蔗糖、0.01% Tween-20、50 μ M亚硫酸氢钠pH 5.5配制缓冲液中。在室温下在相同缓冲液中执行透析持续4小时且接着在4℃下使用Slide-a-Lyzer透析盒 (ThermoScientific 30,000 MWC0) 执行透析过夜。

[0840] 发现纯化的缀合物具有1.2mg/ml的最终蛋白质浓度及每个抗体所连接的平均3.4个化合物79分子 (通过UV-Vis, 关于化合物79使用摩尔消光系数 $\epsilon_{330\text{nm}} = 11,971\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 及 $\epsilon_{280\text{nm}} = 30,188\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, 且关于抗EGFR抗体使用 $\epsilon_{280\text{nm}} = 201,400\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$); 96.3%单体 (通过尺寸排阻色谱); 及<1.0%未缀合化合物79 (通过双重柱、反相HPLC分析)。

[0841] 实施例34. 制备化合物46的抗FR α 缀合物(抗FR α -46)

[0842] 含有在50mM HEPES (4- (2-羟基乙基) -1-哌嗪乙烷磺酸) pH 8.5缓冲液及10% v/v 二甲基乙酰胺 (N,N-二甲基乙酰胺) 共溶剂中的2.0mg/mL抗FR α 抗体及5摩尔当量化合物46 (在25℃下用5%二甲基乙酰胺水溶液中5倍过量的亚硫酸氢钠预处理持续6小时) 的反应在25℃下温育持续8小时。反应后, 所述缀合物使用NAP去盐柱 (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare) 纯化且经缓冲液交换至10mM组氨酸、250mM甘氨酸、1.0% w/v蔗糖、0.01% Tween-20、50 μ M亚硫酸氢钠pH 5.5配制缓冲液中。在室温下在相同缓冲液中执行透

析持续4小时且接着在4℃下使用Slide-a-Lyzer透析盒(ThermoScientific 30,000 MWCO)执行透析过夜。

[0843] 发现纯化的缀合物具有1.2mg/ml的最终蛋白质浓度及每个抗体所连接的平均3.3个化合物46分子(通过UV-Vis,关于化合物46使用摩尔消光系数 $\epsilon_{330\text{nm}}=15,280\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 及 $\epsilon_{280\text{nm}}=30,115\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$,且关于抗FR α 抗体使用 $\epsilon_{280\text{nm}}=201,400\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$);95.1%单体(通过尺寸排阻色谱);及<0.8%未缀合化合物46(通过双重柱、反相HPLC分析)。

[0844] 实施例35.制备化合物55的抗FR α 缀合物(抗FR α -55)

[0845] 含有在50mM HEPES (4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸) pH 8.5缓冲液及10% v/v 二甲基乙酰胺(N,N-二甲基乙酰胺)共溶剂中的2.0mg/mL抗FR α 抗体及5摩尔当量化合物55(在25℃下用5%二甲基乙酰胺水溶液中5倍过量的亚硫酸氢钠预处理持续6小时)的反应在25℃下温育持续8小时。反应后,所述缀合物使用NAP去盐柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade,GE Healthcare)纯化且经缓冲液交换至10mM组氨酸、250mM甘氨酸、1.0% w/v蔗糖、0.01% Tween-20、50 μ M亚硫酸氢钠pH 5.5配制缓冲液中。在室温下在相同缓冲液中执行透析持续4小时且接着在4℃下使用Slide-a-Lyzer透析盒(ThermoScientific 30,000 MWCO)执行透析过夜。

[0846] 发现纯化的缀合物具有2.5mg/ml的最终蛋白质浓度及每个抗体所连接的平均2.4个化合物55分子(通过UV-Vis,关于化合物55使用摩尔消光系数 $\epsilon_{330\text{nm}}=15,280\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 及 $\epsilon_{280\text{nm}}=30,115\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$,且关于抗FR α 抗体使用 $\epsilon_{280\text{nm}}=201,400\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$);95.1%单体(通过尺寸排阻色谱);及<0.8%未缀合化合物55(通过双重柱、反相HPLC分析)。

[0847] 实施例36.化合物19(抗FR α -19、抗EGFR-19)及化合物47(抗FR α -47、抗EGFR-47)的抗FR α -C442或抗EGFR-C442缀合物的一般制备

[0848] 根据标准程序制备携带两个未配对半胱氨酸残基的抗体。

[0849] 向此中间体于15mM磷酸钾、5mM N,N,N',N'-乙二胺四乙酸(EDTA) pH 6.0中的溶液中添加丙二醇及作为N,N-二甲基乙酰胺(二甲基乙酰胺)中的储备溶液的5-10eq马来酰亚胺(化合物19或化合物47)以生成反应混合物,其最终溶剂组成为15mM磷酸钾、5mM EDTA pH 6.0中的约48%丙二醇及约2%二甲基乙酰胺。使所述反应在25℃下继续进行过夜。所述缀合物使用Sephadex G-25去盐柱纯化至20mM组氨酸、8.5%蔗糖、0.01% Tween-20、50M亚硫酸氢钠pH 4.2中。需要时重复纯化以移除残余未缀合药物。

[0850] 发现纯化的缀合物具有约2.5mg/ml的最终蛋白质浓度及一般每个抗体所连接的平均约1.8个IGN分子(通过UV-Vis,使用如上文的摩尔消光系数;约94%单体(通过尺寸排阻色谱);及<1%未缀合IGN(通过双重柱、反相HPLC分析)。

[0851] 实施例37.细胞毒性分析

[0852] 以下细胞系用于所述研究:KB(子宫颈癌,ATCC)、NCI-H2110(非小细胞肺癌,ATCC)、Namalwa(伯基特淋巴瘤,ATCC)及T47D(乳房上皮癌,ATCC)。所述细胞维持于由制造商推荐的培养基中且经涂板用于细胞毒性实验。细胞以1,000个细胞/孔(KB、Namalwa)或2,000个细胞/孔(NCI H2110、T47D)的接种密度经涂板于96孔平底培养板中。缀合物或游离药物化合物稀释于补充有热灭活10%FBS(Life Technologies)及0.1mg/ml庆大霉素(Life Technologies)的RPMI-1640(Life Technologies)中,且添加至经涂板细胞中。为了测定所述缀合物的细胞毒性活性的特异性,将过量未缀合抗体添加至经稀释缀合物的独立集合中

(+阻断样品, IC_{50} 表)。所述培养板在37℃、5%CO₂下温育持续4天(T47D细胞)或5天(KB、NCI H2110细胞)。使用阿尔玛蓝分析(Invitrogen)来测定T47D细胞的变异性,且将WST-8分析(Donjindo Molecular Technologies, Inc.)应用于KB、NCI H2110、Namalwa细胞的变异性。所述分析根据制造商的方案来执行。使用S型剂量-反应非线性回归曲线拟合(GraphPad Software Inc.)来产生杀死曲线及 IC_{50} 。如表1-3中所示,本发明的细胞毒性化合物及缀合物在体外细胞毒性分析中高度有效抵抗多种癌细胞。

[0853] 表1. 通过体外细胞毒性分析测定的游离细胞毒性化合物的 IC_{50} 值(摩尔浓度, M)

IGN 分解代谢物	KB	Namalwa
150	8.00E-12	1.00E-12
162	2.00E-11	3.00E-12
157	3.00E-12	1.00E-12
155	2.00E-11	2.00E-12
161	2.50E-10	3.00E-11
159	3.00E-12	1.00E-12
123	3.00E-12	1.00E-12
108	5.00E-11	1.00E-11

[0855] 表2. 通过体外细胞毒性分析测定的抗FR α -缀合物的 IC_{50} 值(摩尔浓度, M)

肽接头	化合物#	KB -阻断	KB +阻断	T47D -阻断	T47D +阻断
Ala-Ala	95	2.00E-11	2.00E-9	3.00E-10	4.00E-9
Ala-Val	18	3.00E-11	3.00E-9	1.00E-10	1.00E-8
Ala-Val	79	1.00E-10	>3.00E-8		
Ala-Val	83	7.00E-12	2.00E-9	7.00E-11	1.00E-8
Gln-Leu	126	1.00E-11	>3.50E-9	5.00E-11	1.00E-8
Ala-Val	23	2.00E-12	4.00E-10	6.00E-12	2.00E-9
Gln-Leu	55	1.00E-11	2.00E-9	2.00E-10	7.00E-9
Ala-Val	26	2.00E-11	>3.50E-9	3.00E-11	9.00E-9
Ala-Val	46	2.00E-11	3.50E-9	3.00E-10	2.00E-8
Ala-Val	65	1.00E-12	7.00E-10	8.00E-12	7.00E-9
--	110	2.00E-11	6.00E-11	2.00E-10	8.00E-10
--	121	1.00E-11	1.00E-10	5.00E-10	2.00E-9
--	117	1.00E-10	9.00E-10	3.00E-9	3.00E-9
--	148	3.00E-11	4.00E-10	5.00E-9	5.00E-9
Ala-Val	99	2.00E-12	6.00E-10	1.00E-11	3.00E-9
Ala-Val	106	7.00E-11	>3.50E-9	2.00E-10	3.00E-8

[0857] 表3. 通过体外细胞毒性分析测定的抗EGFR-缀合物的 IC_{50} 值(摩尔浓度, M)

肽接头	化合物#	HSC2 -阻断	HSC2 +阻断	KB -阻断	KB +阻断	H2110 -阻断	H2110 +阻断
-----	------	-------------	-------------	-----------	-----------	--------------	--------------

[0859]	Ala-Val	18	6.00E-12	1.00E-9	4.00E-11	3.50E-9	4.00E-10	8.00E-9
	Ala-Val	79	3.00E-10	>3.50E-9	3.00E-9	>3.50E-9	>1.00E-8	>3.50E-8
	Gln-Leu	55	4.00E-12	9.00E-10	3.00E-11	2.00E-9	1.00E-10	6.00E-9
	Ala-Val	46	6.00E-12	1.00E-9	4.00E-11	2.00E-9	1.00E-10	1.00E-8
	Ala-Val	65	1.50E-12	1.20E-9	4.80E-12	1.50E-9		
	Ala-Val	134	9.00E-11	8.00E-9	6.00E-10	1.00E-8		
	Ser-Val	147	5.00E-11	5.00E-9	2.50E-10	7.00E-9		

[0860] 实施例38.携带OV90异种移植物的SCID小鼠中的抗FR α -55的抗肿瘤活性(中值肿瘤体积,mm³)。

[0861] 从Charles River Laboratories接受6周龄雌性CB.17 SCID小鼠。小鼠通过在右侧腹中进行皮下注射而接种悬浮于0.1ml 50%matrigel/无血清培养基中的 1×10^7 个OV-90肿瘤细胞。当肿瘤体积达到大约100mm³时(接种后第7天),动物基于肿瘤体积被随机化至每组六只小鼠的4个组中。小鼠在第0天(接种后第7天)接受媒介物对照(0.15ml/小鼠)或0.7、1.4或2.7mg/kg的抗FR α -55的单一IV施用。

[0862] 每周两次至三次使用测径规测量三维中的肿瘤尺寸。肿瘤体积使用式子 $V = \text{长度} \times \text{宽度} \times \text{高度} \times 1/2$ 以mm³表述。当肿瘤体积降低50%或更高时,小鼠被视为具有部分衰退(PR),当无法检测到可触知肿瘤时,小鼠被视为具有完全肿瘤衰退(CR)。肿瘤体积通过StudyLog软件来测定。

[0863] 肿瘤生长抑制(T/C值)使用下式来测定:

[0864] $T/C(\%) = \text{经治疗的中值肿瘤体积} / \text{对照的中值肿瘤体积} \times 100$ 。

[0865] 当媒介物对照的肿瘤体积达到1000mm³的预定尺寸时,同时针对经治疗(T)及媒介物对照(C)组测定肿瘤体积。测定各经治疗组的每日中值肿瘤体积,包括无肿瘤小鼠(0mm³)。根据NCI标准,T/C $\leq 42\%$ 是抗肿瘤活性的最低水平。T/C $< 10\%$ 被视为高抗肿瘤活性水平。

[0866] 如图1所示,抗FR α -55缀合物在所测试的所有剂量下均具高度活性。

[0867] 实施例39.携带NCI-H2110异种移植物的SCID小鼠中的抗FR α -18的抗肿瘤活性(中值肿瘤体积,mm³)。

[0868] 从Charles River Laboratories接受6周龄雌性CB.17 SCID小鼠。小鼠通过在右侧腹中进行皮下注射而接种悬浮于0.1ml 50%matrigel/无血清培养基中的 1×10^7 个NCI-H2110肿瘤细胞。当肿瘤体积达到大约100mm³时(接种后第6天),动物基于肿瘤体积被随机化至每组六只小鼠的3个组中。小鼠在第0天(接种后第6天)接受媒介物对照(0.15ml/小鼠)或1.1或2.2mg/kg的抗FR α -18的单一IV施用。

[0869] 每周两次至三次使用测径规测量三维中的肿瘤尺寸。肿瘤体积使用式子 $V = \text{长度} \times \text{宽度} \times \text{高度} \times 1/2$ 以mm³表述。当肿瘤体积降低50%或更高时,小鼠被视为具有部分衰退

(PR), 当无法检测到可触知肿瘤时, 小鼠被视为具有完全肿瘤衰退 (CR)。肿瘤体积通过 StudyLog 软件来测定。

[0870] 肿瘤生长抑制 (T/C 值) 使用下式来测定:

[0871] $T/C(\%) = \text{经治疗的中值肿瘤体积} / \text{对照的中值肿瘤体积} \times 100$ 。

[0872] 当媒介物对照的肿瘤体积达到 1000mm^3 的预定尺寸时, 同时针对经治疗 (T) 及媒介物对照 (C) 组测定肿瘤体积。测定各经治疗组的每日中值肿瘤体积, 包括无肿瘤小鼠 (0mm^3)。根据 NCI 标准, $T/C \leq 42\%$ 是抗肿瘤活性的最低水平。 $T/C < 10\%$ 被视为高抗肿瘤活性水平。

[0873] 如图 2 所示, 抗 FR α -18 缀合物在所测试的所有剂量下均具高度活性。

[0874] 实施例 40. 携带 FaDu 异种移植物的 SCID 小鼠中的抗 EGFR-79 的抗肿瘤活性 (中值肿瘤体积, mm^3)。

[0875] 从 Charles River Laboratories 接受 6 周龄雌性 CB.17 SCID 小鼠。小鼠通过在右侧腹中进行皮下注射而接种悬浮于 0.1ml 50% matrigel/无血清培养基中的 1×10^7 个 FaDu 肿瘤细胞。当肿瘤体积达到大约 100mm^3 时 (接种后第 6 天), 动物基于肿瘤体积被随机化至每组六只小鼠的 4 个组中。小鼠在第 0 天 (接种后第 6 天) 接受媒介物对照 (0.15ml /小鼠) 或 3.7、7.4 或 14.9mg/kg 的抗 EGFR-79 的单一 IV 施用。

[0876] 每周两次至三次使用测径规测量三维中的肿瘤尺寸。肿瘤体积使用式子 $V = \text{长度} \times \text{宽度} \times \text{高度} \times 1/2$ 以 mm^3 表述。当肿瘤体积降低 50% 或更高时, 小鼠被视为具有部分衰退 (PR), 当无法检测到可触知肿瘤时, 小鼠被视为具有完全肿瘤衰退 (CR)。肿瘤体积通过 StudyLog 软件来测定。

[0877] 肿瘤生长抑制 (T/C 值) 使用下式来测定:

[0878] $T/C(\%) = \text{经治疗的中值肿瘤体积} / \text{对照的中值肿瘤体积} \times 100$ 。

[0879] 当媒介物对照的肿瘤体积达到 1000mm^3 的预定尺寸时, 同时针对经治疗 (T) 及媒介物对照 (C) 组测定肿瘤体积。测定各经治疗组的每日中值肿瘤体积, 包括无肿瘤小鼠 (0mm^3)。根据 NCI 标准, $T/C \leq 42\%$ 是抗肿瘤活性的最低水平。 $T/C < 10\%$ 被视为高抗肿瘤活性水平。

[0880] 如图 3 所示, 抗 EGFR-79 缀合物在所测试的所有剂量下均具高度活性。

[0881] 实施例 41. 携带 Ishikawa 异种移植物的 SCID 小鼠中的抗 FR α -46 的抗肿瘤活性 (中值肿瘤体积, mm^3)。

[0882] 从 Charles River Laboratories 接受 6 周龄雌性 CB.17 SCID 小鼠。小鼠通过在右侧腹中进行皮下注射而接种悬浮于 0.1ml 50% matrigel/无血清培养基中的 1×10^7 个 Ishikawa 肿瘤细胞。当肿瘤体积达到大约 100mm^3 时 (接种后第 23 天), 动物基于肿瘤体积被随机化至每组六只小鼠的 4 个组中。小鼠在第 0 天 (接种后第 23 天) 接受媒介物对照 (0.15ml /小鼠) 或 0.5、0.9 及 1.9mg/kg 的抗 FR α -46 的单一 IV 施用。

[0883] 每周两次至三次使用测径规测量三维中的肿瘤尺寸。肿瘤体积使用式子 $V = \text{长度} \times \text{宽度} \times \text{高度} \times 1/2$ 以 mm^3 表述。当肿瘤体积降低 50% 或更高时, 小鼠被视为具有部分衰退 (PR), 当无法检测到可触知肿瘤时, 小鼠被视为具有完全肿瘤衰退 (CR)。肿瘤体积通过 StudyLog 软件来测定。

[0884] 肿瘤生长抑制 (T/C 值) 使用下式来测定:

[0885] $T/C(\%) = \text{经治疗的中值肿瘤体积} / \text{对照物的中值肿瘤体积} \times 100$ 。

[0886] 当媒介物对照的肿瘤体积达到 1000mm^3 的预定尺寸时,同时针对经治疗(T)及媒介物对照(C)组测定肿瘤体积。测定各经治疗组的每日中值肿瘤体积,包括无肿瘤小鼠(0mm^3)。根据NCI标准, $T/C \leq 42\%$ 是抗肿瘤活性的最低水平。 $T/C < 10\%$ 被视为高抗肿瘤活性水平。

[0887] 如图4所示,抗FR α -46缀合物在所测试的所有剂量下均具活性。

[0888] 实施例42.携带KB异种移植物的SCID小鼠中的抗FR α -18的抗肿瘤活性(中值肿瘤体积, mm^3)。

[0889] 从Charles River Laboratories接受6周龄雌性CB.17 SCID小鼠。小鼠通过在右侧腹中进行皮下注射而接种悬浮于 0.1ml 50%matrigel/无血清培养基中的 1×10^7 个Ishikawa肿瘤细胞。当肿瘤体积达到大约 100mm^3 时(接种后第6天),动物基于肿瘤体积被随机化至每组六只小鼠的3个组中。小鼠在第0天(接种后第6天)接受媒介物对照(0.15ml /小鼠)或 1.3 及 2.7mg/kg 的抗FR α -18的单一IV施用。

[0890] 每周两次至三次使用测径规测量三维中的肿瘤尺寸。肿瘤体积使用式子 $V = \text{长度} \times \text{宽度} \times \text{高度} \times 1/2$ 以 mm^3 表述。当肿瘤体积降低50%或更高时,小鼠被视为具有部分衰退(PR),当无法检测到可触知肿瘤时,小鼠被视为具有完全肿瘤衰退(CR)。肿瘤体积通过StudyLog软件来测定。

[0891] 肿瘤生长抑制(T/C值)使用下式来测定:

[0892] $T/C(\%) = \text{经治疗的中值肿瘤体积} / \text{对照物的中值肿瘤体积} \times 100$ 。

[0893] 当媒介物对照的肿瘤体积达到 1000mm^3 的预定尺寸时,同时针对经治疗(T)及媒介物对照(C)组测定肿瘤体积。测定各经治疗组的每日中值肿瘤体积,包括无肿瘤小鼠(0mm^3)。根据NCI标准, $T/C \leq 42\%$ 是抗肿瘤活性的最低水平。 $T/C < 10\%$ 被视为高抗肿瘤活性水平。

[0894] 如图5所示,抗FR α -18缀合物在所测试的所有剂量下均具高度活性。

[0895] 实施例43.携带KB异种移植物的SCID小鼠中的抗FR α -46的抗肿瘤活性(中值肿瘤体积, mm^3)。

[0896] 从Charles River Laboratories接受6周龄雌性CB.17 SCID小鼠。小鼠通过在右侧腹中进行皮下注射而接种悬浮于 0.1ml 50%matrigel/无血清培养基中的 1×10^7 个KB肿瘤细胞。当肿瘤体积达到大约 100mm^3 时(接种后第6天),动物基于肿瘤体积被随机化至每组六只小鼠的4个组中。小鼠在第0天(接种后第6天)接受媒介物对照(0.15ml /小鼠)或 0.5 、 0.9 及 1.9mg/kg 的抗FR α -46的单一IV施用。

[0897] 每周两次至三次使用测径规测量三维中的肿瘤尺寸。肿瘤体积使用式子 $V = \text{长度} \times \text{宽度} \times \text{高度} \times 1/2$ 以 mm^3 表述。当肿瘤体积降低50%或更高时,小鼠被视为具有部分衰退(PR),当无法检测到可触知肿瘤时,小鼠被视为具有完全肿瘤衰退(CR)。肿瘤体积通过StudyLog软件来测定。

[0898] 肿瘤生长抑制(T/C值)使用下式来测定:

[0899] $T/C(\%) = \text{经治疗的中值肿瘤体积} / \text{对照物的中值肿瘤体积} \times 100$ 。

[0900] 当媒介物对照的肿瘤体积达到 1000mm^3 的预定尺寸时,同时针对经治疗(T)及媒介物对照(C)组测定肿瘤体积。测定各经治疗组的每日中值肿瘤体积,包括无肿瘤小鼠

(0mm³)。根据NCI标准, T/C ≤ 42% 是抗肿瘤活性的最低水平。T/C < 10% 被视为高抗肿瘤活性水平。

[0901] 如图6所示, 抗FRα-46缀合物在所测试的所有剂量下均具高度活性。

[0902] 实施例44. 携带OCI-Ly18异种移植物的SCID小鼠中的huCD19-55的抗肿瘤活性(中值肿瘤体积, mm³)。

[0903] 从Charles River Laboratories接受6周龄雌性CB.17 SCID小鼠。小鼠通过在右侧腹中进行皮下注射而接种悬浮于0.1ml 50%matrigel/无血清培养基中的1 × 10⁷个OCI-Ly18肿瘤细胞。当肿瘤体积达到大约100mm³时(接种后第14天), 动物基于肿瘤体积被随机化至每组六只小鼠的4个组中。小鼠在第0天(接种后第14天)接受媒介物对照(0.15ml/小鼠)或1.1及2.1mg/kg的huCD19-55的单一IV施用。

[0904] 每周两次至三次使用测径规测量三维中的肿瘤尺寸。肿瘤体积使用式子V = 长度 × 宽度 × 高度 × 1/2以mm³表述。当肿瘤体积降低50%或更高时, 小鼠被视为具有部分衰退(PR), 当无法检测到可触知肿瘤时, 小鼠被视为具有完全肿瘤衰退(CR)。肿瘤体积通过StudyLog软件来测定。

[0905] 肿瘤生长抑制(T/C值)使用下式来测定:

[0906] $T/C(\%) = \text{经治疗的中值肿瘤体积} / \text{对照物的中值肿瘤体积} \times 100$ 。

[0907] 当媒介物对照的肿瘤体积达到1000mm³的预定尺寸时, 同时针对经治疗(T)及媒介物对照(C)组测定肿瘤体积。测定各经治疗组的每日中值肿瘤体积, 包括无肿瘤小鼠(0mm³)。根据NCI标准, T/C ≤ 42% 是抗肿瘤活性的最低水平。T/C < 10% 被视为高抗肿瘤活性水平。

[0908] 如图7所示, huCD19-55缀合物在所测试的所有剂量下均具高度活性。

[0909] 实施例45. 所选择的抗EGFR-IGN缀合物的旁观者活性

[0910] 细胞在补充有热灭活10%FBS(Thermo Fisher)及0.1mg/ml庆大霉素(Thermo Fisher)的RPMI-1640(Thermo Fisher)中以1000个MDA-MB-468细胞/孔或500个Namalwa细胞/孔的接种密度涂板于96孔U型底、低丛集培养板(Costar)中。抗原阳性MDA-MB-468细胞及抗原阴性Namalwa细胞的混合培养物(或分别培养的各细胞)暴露于相同培养基中的连续稀释缀合物且添加至经涂板细胞中。细胞温育持续5天, 且通过Cell Titer Glo(Promega)根据制造商的方案测定总细胞活力的抑制作用。如表4所示, 结果指示所有缀合物均证明对抗原阴性细胞的旁观者活性。

[0911] 表4. 通过体外总细胞活力分析测定的抗EGFR-缀合物的IC₅₀值(摩尔浓度, M)

化合物 #	对照, IC ₅₀ , M		旁观者
	Namalwa	MDA-MB-468	(MDA-MB-468 + Namalwa)
[0912] 18	2.00E-9	2.30E-11	3.00E-11
79	6.00E-9	1.70E-10	2.70E-10
46	3.00E-9	1.00E-11	1.00E-11

[0913] 实施例46. 本发明化合物的分解代谢物与DNA的结合

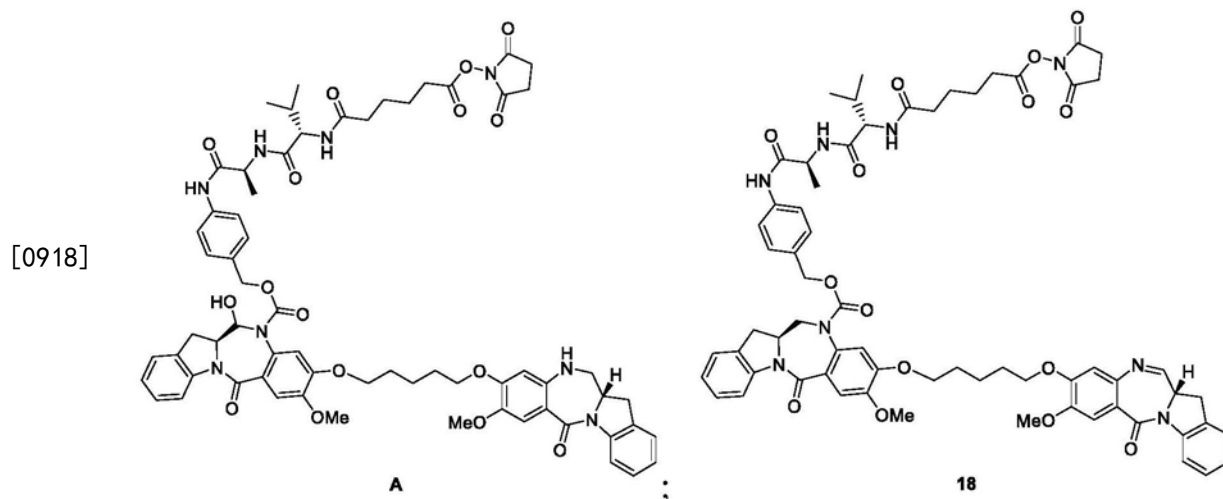
[0914] 使用竞争ELISA来测量本发明化合物的分解代谢物与经地高辛(digoxigenin)标记的发夹寡核苷酸的结合, 其中在数种浓度下的分解代谢物与经生物素标记的参考分子预混合, 随后用经地高辛标记的发夹寡核苷酸温育。通过ELISA来评估在本发明的竞争性分解

代谢物存在下经生物素标记的参考化合物与经地高辛标记的发夹寡核苷酸的结合。所述ELISA方法使用涂布的抗生蛋白链菌素用于捕获且使用抗地高辛抗体-辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合物用于检测。结果如图8所示。

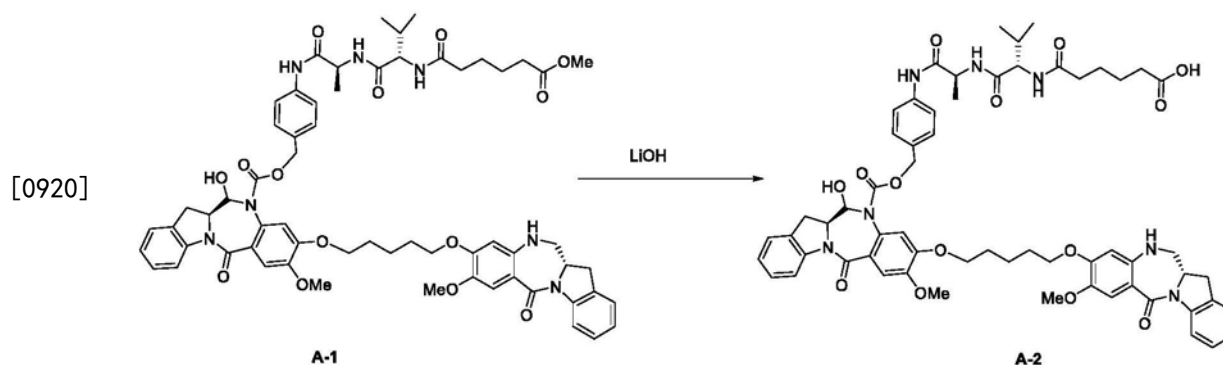
[0915] 实施例47. 关于缀合效率的比较数据

[0916] 比较物吡啶并苯并二氮杂萘化合物 (化合物A) 使用与W02013/177481中所述的那些相似的程序来合成。

[0917] 化合物A在经遮蔽亚胺苯并二氮杂萘单体的N-10位置处具有自降解接头 (即, 所述自降解接头的裂解导致在N10-C11位置处形成亚胺键)。相比之下, 本发明化合物 (诸如化合物18) 在还原的亚胺苯并二氮杂萘单体的N-10位置处具有自降解接头。本发明化合物在未携带自降解接头的苯并二氮杂萘单体中具有亚胺官能团。亚胺官能团可通过用亚硫酸氢钠处理所述化合物以形成具有增加的溶解度的磺化化合物, 接着用抗体进行缀合反应而加以修饰。

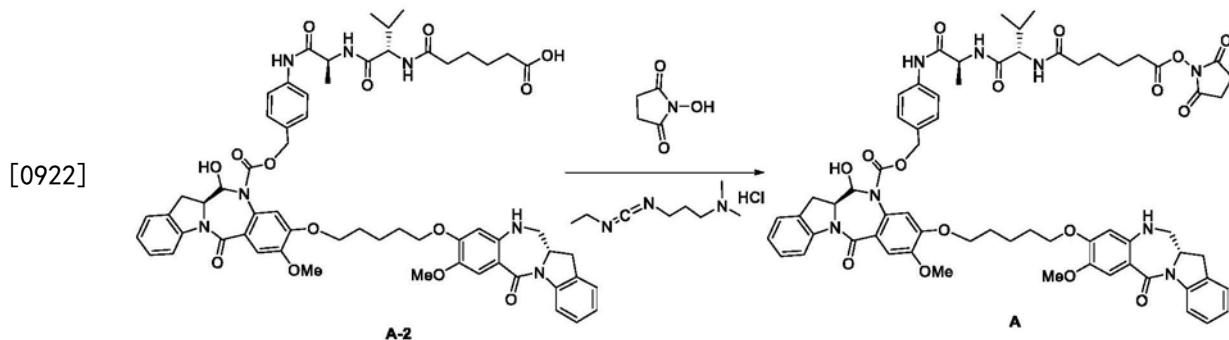


[0919] 合成化合物A



[0921] (12S,12aS) -12-羟基-8-甲氧基-9-((5-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-11,12,12a,13-四氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-9-基)氧基)戊基)氧基)-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啶-11(12H)-甲酸4-((S)-2-((S)-2-(6-甲氧基-6-氧代己酰氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苯甲酯 (30mg, 0.026mmol) (化合物A-1) 使用与W02013/177481中所述的那些相似的程序来制备。化合物A-1溶解于无水四氢呋喃 (988μl) 及DI水 (329μl) 中。添加氢氧化锂 (3.16mg, 0.132mmol)。反应混合物通过LCMS

监测。在室温下搅拌持续90min之后,其用30%MeOH/DCM及DI水稀释,接着用0.5M HCl (约1mL) 酸化至pH约为3。形成白色沉淀物。所述溶液用30%MeOH/DCM萃取2次。有机层用水洗涤,经硫酸镁干燥,经由硅藻土过滤并浓缩以获得20mg呈灰白色固体状的粗产物化合物A-2。



[0923] 6-(((S)-1-(((S)-1-((4-(((12S,12aS)-12-羟基-8-甲氧基-9-((5-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-11,12,12a,13-四氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)戊基)氧基)-6-氧代-11,12,12a,13-四氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮杂萘并[1,2-a]吡啉-11-羰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)氨基)-6-氧代己酸化合物A-2 (20mg, 0.018mmol) 及N-羟基琥珀酰亚胺 (6.14mg, 0.053mmol) 溶解于无水二氯甲烷 (356μl) 中。添加EDC·HCl (17.05mg, 0.089mmol) 且反应混合物在室温下搅拌持续90min。在反应完成时,所述混合物用DCM稀释且用水洗涤。有机层经无水硫酸镁干燥,过滤并浓缩。粗产物通过RP-HPLC (C18 Kromasil, ACN/DI水, 经30min 50-65%) 纯化。将含有产物的部分合并,经冷冻并冻干以生成化合物A。

[0924] 制备化合物A的抗体缀合物

[0925] 化合物A的抗体缀合物通过在室温下在含有50mM HEPES pH 8.5及共溶剂(15%或30%v/v二甲基乙酰胺(DMA)或40%丙二醇(PG))的缓冲溶液中使所述抗体与过量化合物A反应持续24小时或更久来制备。下表5显示缀合产率、单体百分率及DAR值。

[0926] 表5.

[0927]

条件	单体	DAR	产率
50mM HEPES, pH 8.5, 15%DMA, RT, 24h	61%	1.3	45%
50mM HEPES, pH 8.5, 30%DMA, RT, 24-72h	87%	约1.0	NA
50mM HEPES, pH 8.5, 40%PG, RT, 24-72h	79%	约1.1	NA

[0928] 部分地由于化合物A的低溶解度,发现所述缀合物中化合物A的并入程度比本发明缀合物低得多,如通过显著较低DAR值所指示。相比而言,化合物18的抗体缀合物的DAR值为约2.6(参见上文实施例32)。另外,图9显示有大量未缀合抗体(D0)存在于所得缀合物中。还观察到化合物A的缀合物的单体百分率比本发明缀合物低得多。相比而言,化合物18的抗体缀合物具有97.5%单体百分率;而化合物A的缀合物具有61%至87%之间的单体百分率,取决于所用的反应条件。增加用于缀合反应中以溶解化合物A的共溶剂的量不会引起DAR值增加。

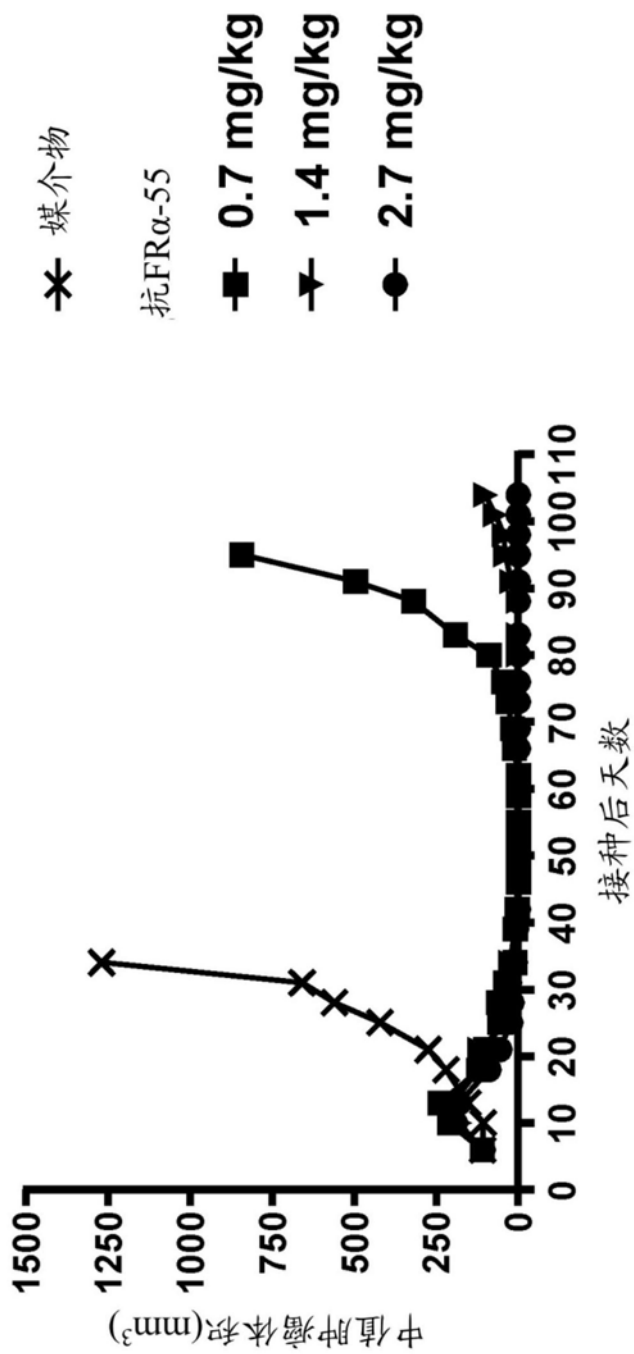


图1

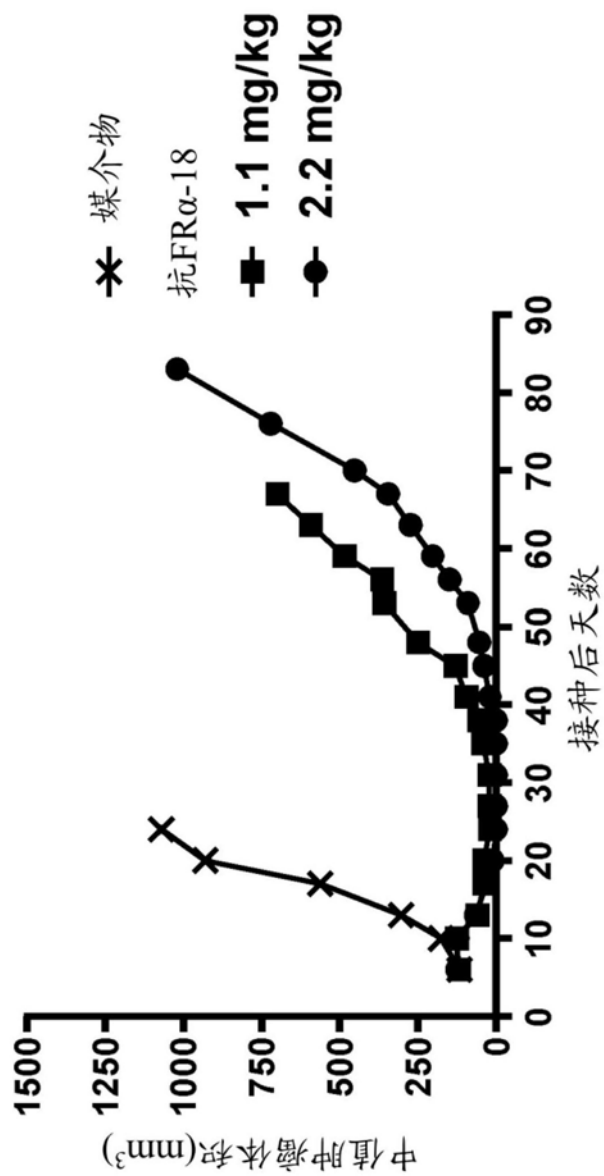


图2

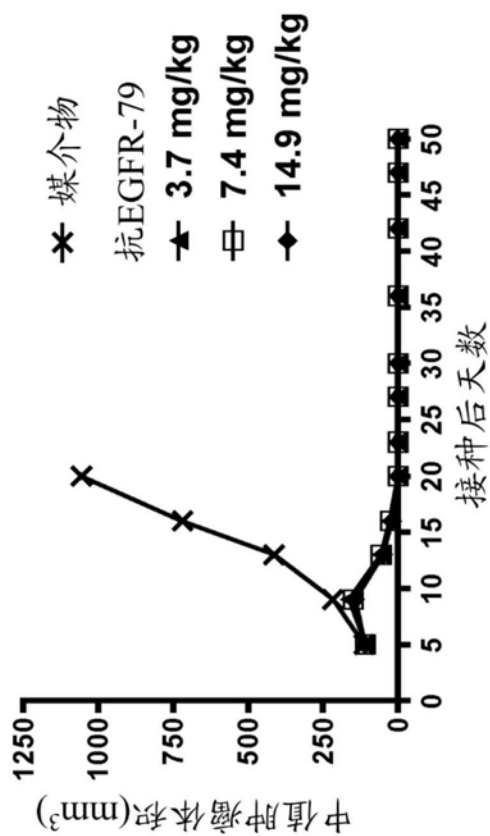


图3

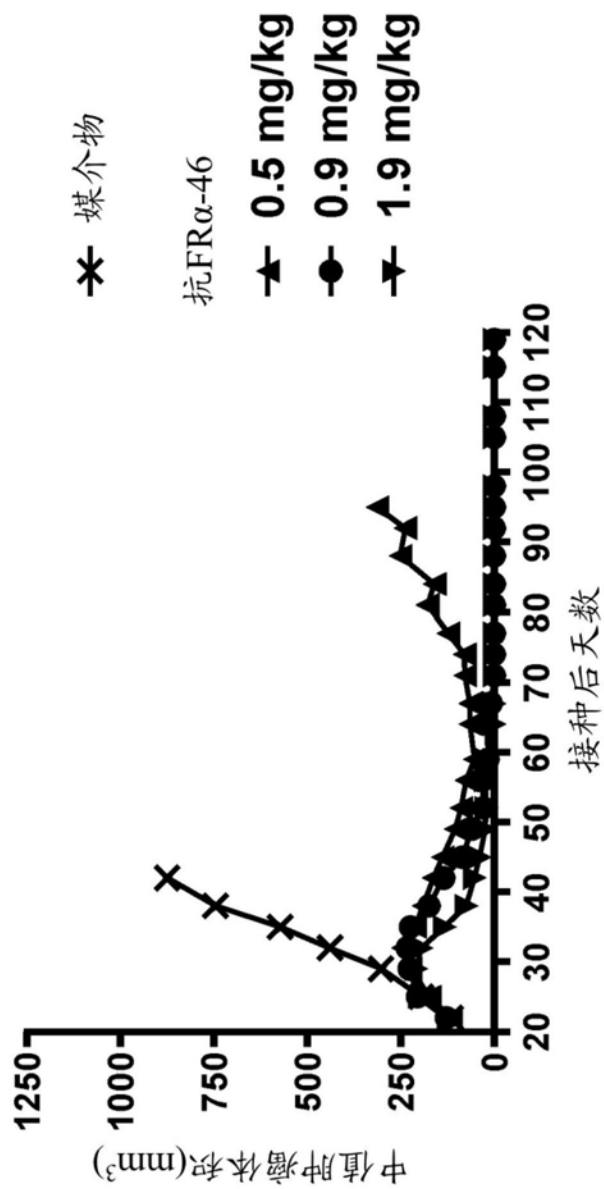


图4

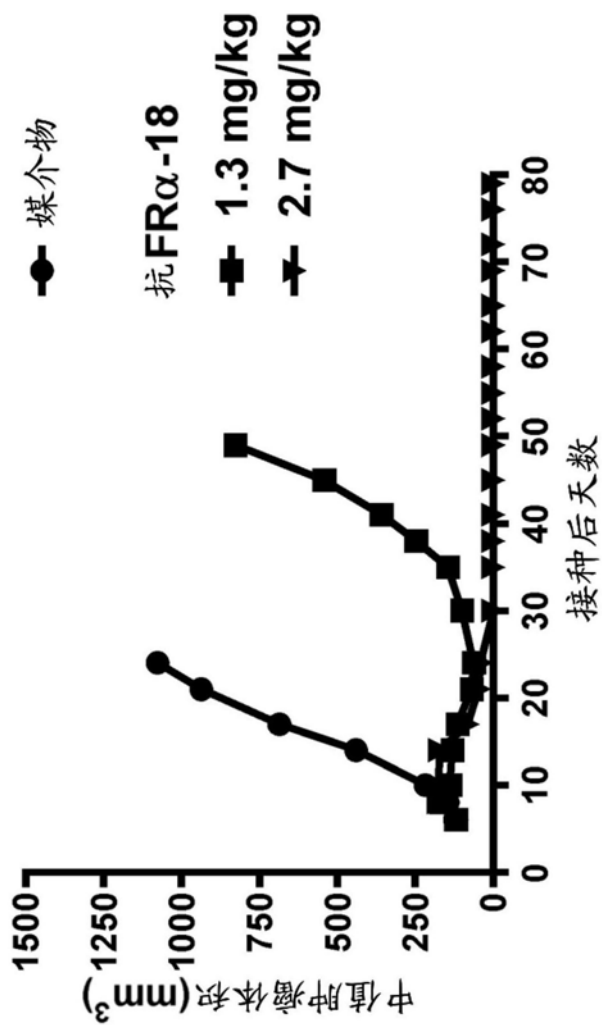


图5

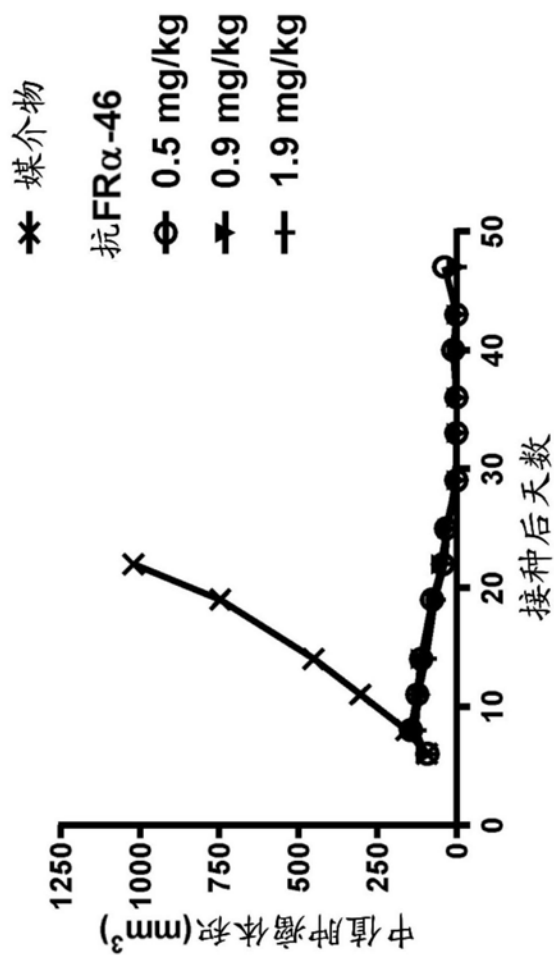


图6

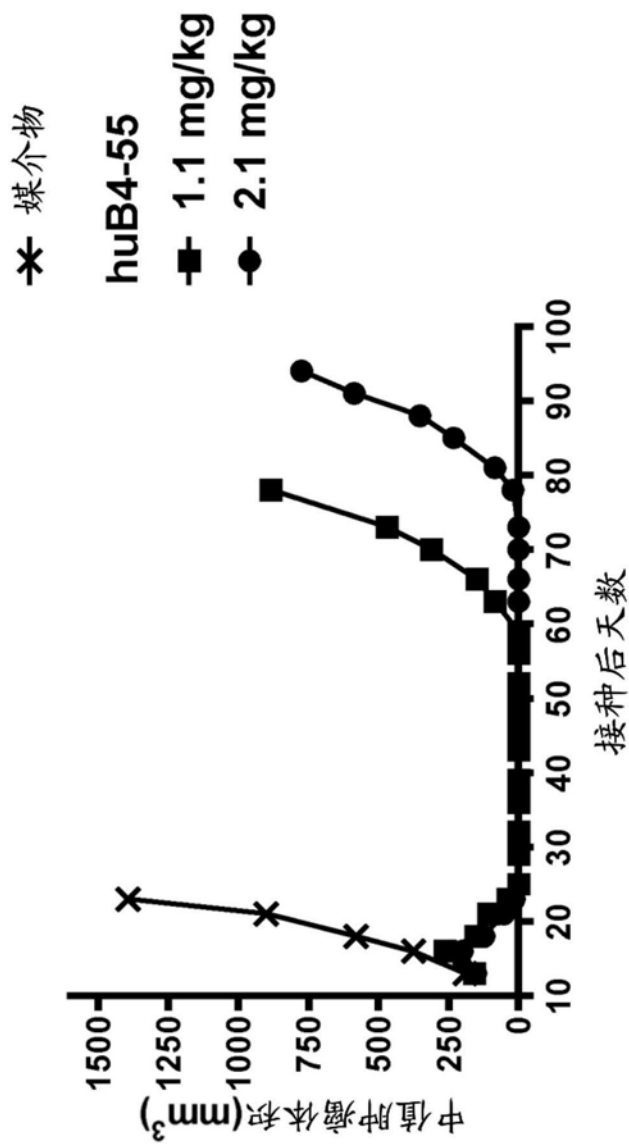


图7

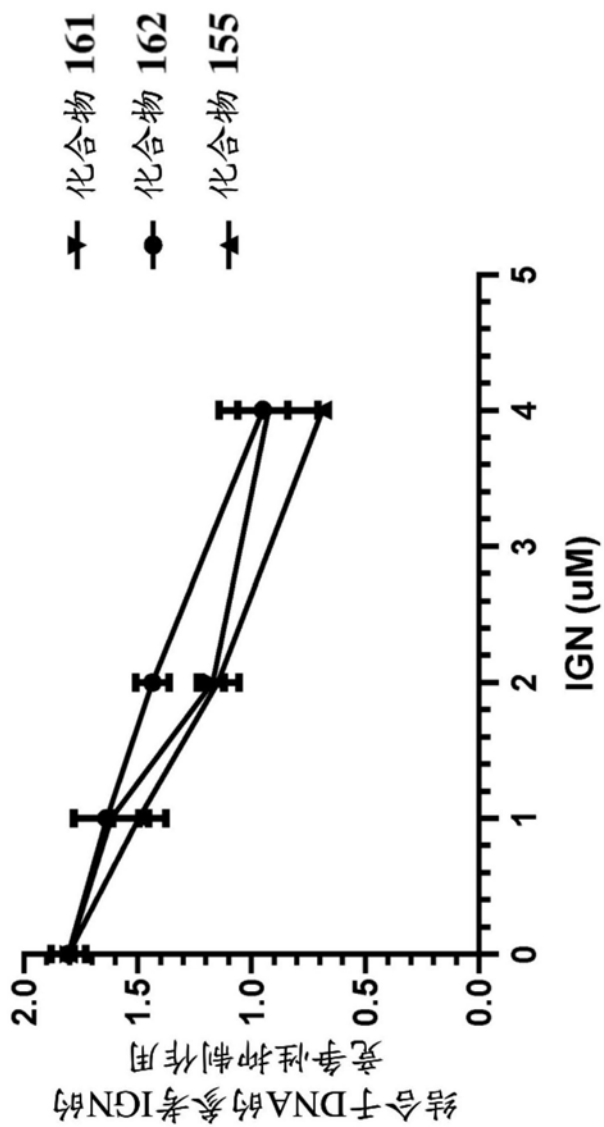


图8

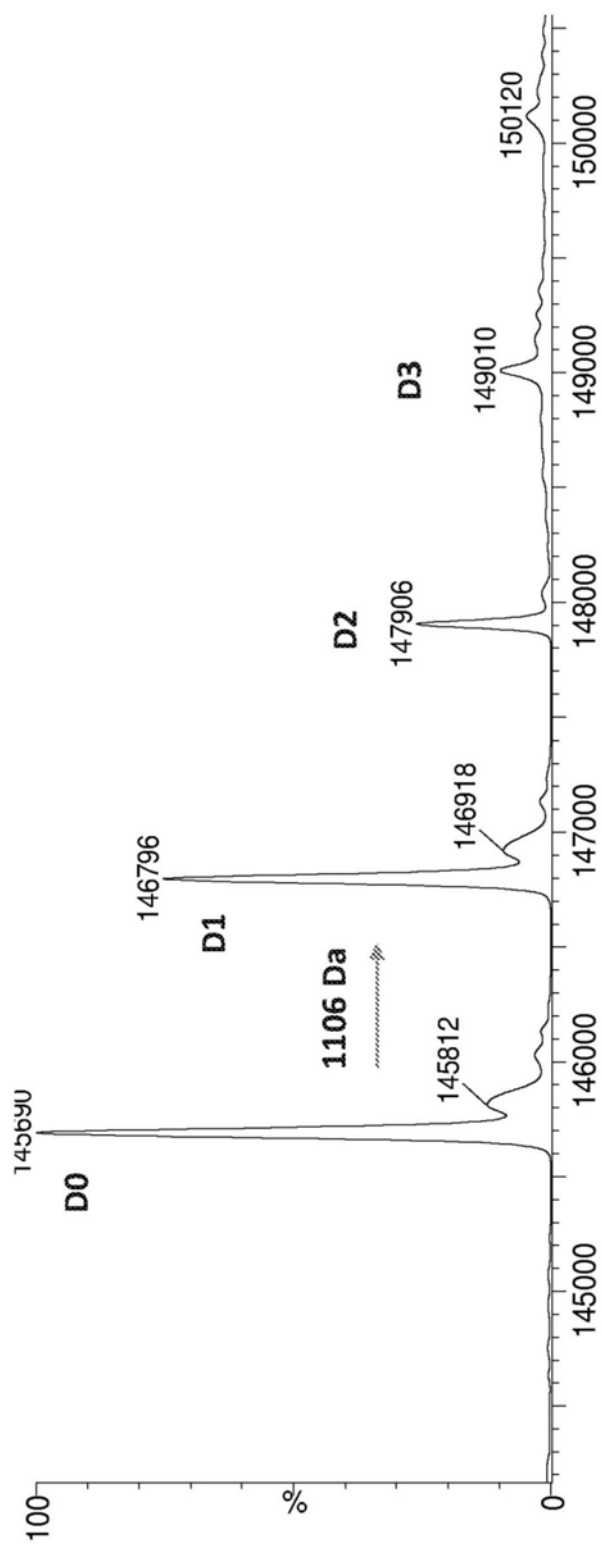


图9