



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111065638 B

(45) 授权公告日 2021.04.09

(21) 申请号 201880053092.6

(22) 申请日 2018.08.17

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 111065638 A

(43) 申请公布日 2020.04.24

(30) 优先权数据  
62/547,303 2017.08.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2020.02.14

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/EP2018/072298 2018.08.17

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02019/034764 EN 2019.02.21

(73) 专利权人 麦迪穆有限责任公司  
地址 英国剑桥

(72) 发明人 纳扎雷诺·迪马西  
菲利普·威尔逊·霍华德  
卢克·马斯特森

阿诺·查尔斯·蒂贝尔吉恩  
巴拉库马尔·维贾雅克里希南  
贾森·怀特

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限  
责任公司 11240

代理人 李小爽

(51) Int.Cl.  
C07D 487/04 (2006.01)  
A61K 31/5517 (2006.01)  
C07K 16/30 (2006.01)  
A61K 47/68 (2006.01)

(56) 对比文件  
W0 2016166300 A1, 2016.10.20  
W0 2017137553 A1, 2017.08.17  
CN 105102004 A, 2015.11.25  
CN 104955485 A, 2015.09.30  
CN 105102003 A, 2015.11.25

审查员 赵贞贞

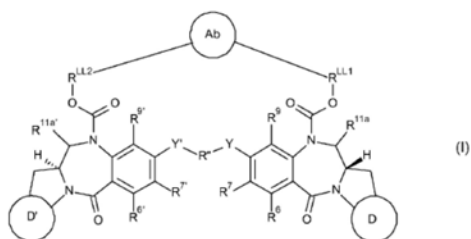
权利要求书13页 说明书69页 附图4页

### (54) 发明名称

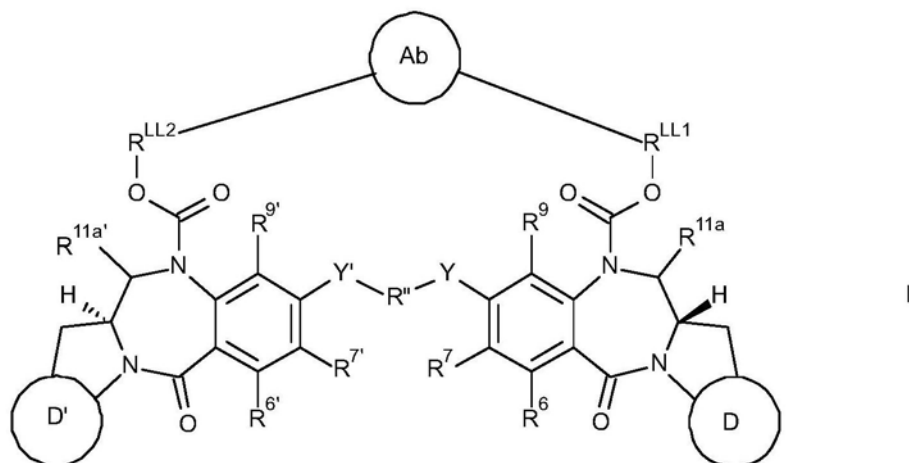
吡咯并苯并二氮杂萘缀合物

### (57) 摘要

一种式(I)的缀合物,其中Ab为在每条重链上具有至少一个自由缀合位点的经修饰抗体。



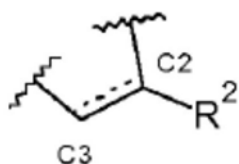
1. 一种式I的缀合物：



其中

Ab为在每条重链上具有至少一个自由缀合位点的经修饰抗体，其中所述经修饰抗体已被修饰使得其在每条重链中包括包含适用于与接头缀合的反应性基团的至少一个氨基酸残基；

D代表基团D1：



D1

；

虚线指示C2与C3之间任选存在双键；

当C2与C3之间存在双键时， $R^2$ 选自由以下组成的组：

(ia)  $C_{1-5}$ 饱和脂族烷基；

(ib) 环丙基；

(ic) 其中 $R^{11}$ 、 $R^{12}$ 和 $R^{13}$ 中的每一个独立地选自H、 $C_{1-3}$ 饱和烷基、 $C_{2-3}$ 烯基、 $C_{2-3}$ 炔基和环丙基，其中所述 $R^2$ 基团中碳原子的总数不超过5；以及

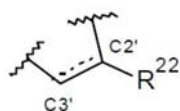
(id) 其中 $R^{14}$ 是H；

当C2与C3之间存在单键时，

$R^2$ 选自H、OH、F、diF和 其中 $R^{16a}$ 和 $R^{16b}$ 独立地选自H、F、 $C_{1-4}$ 饱和烷基、 $C_{2-3}$ 烯基、

基；

D' 代表基团D' 1：



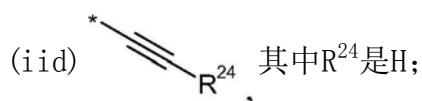
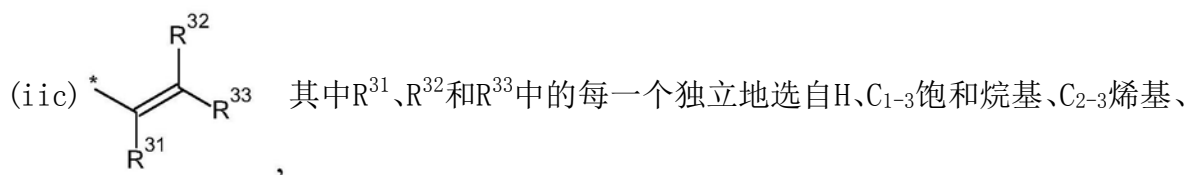
D'1

其中虚线指示C2' 与C3' 之间任选存在双键；

当C2' 与C3' 之间存在双键时，R<sup>22</sup>选自由以下组成的组：

(iia) C<sub>1-5</sub>饱和脂族烷基；

(iib) 环丙基；



当C2' 与C3' 之间存在单键时，



R<sup>6</sup>和R<sup>9</sup>是H；

R<sup>7</sup>是C<sub>1-4</sub>烷氧基；

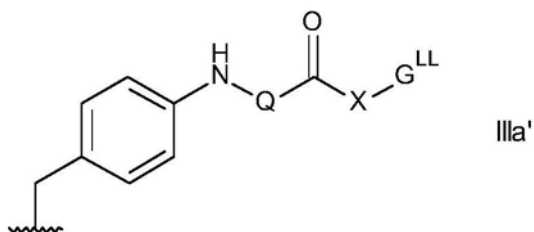
R''为C<sub>3-12</sub>亚烷基，链可被苯中断；

Y和Y'是O；

R<sup>11a</sup>是OH；

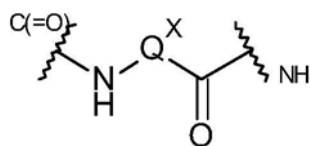
R<sup>6'</sup>、R<sup>7'</sup>、R<sup>9'</sup>和R<sup>11a'</sup> 分别选自与R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>9</sup>和R<sup>11a</sup>相同的基团；并且

R<sup>LL1</sup>和R<sup>LL2</sup>是在不同位点与所述抗体连接的接头，其独立地具有式IIIa'：



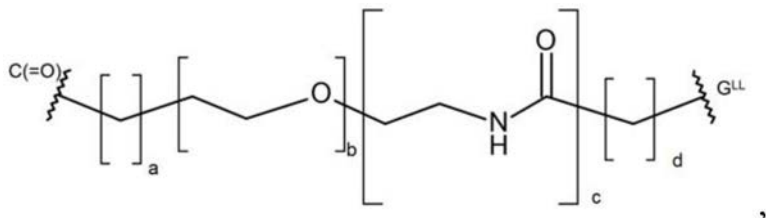
其中

Q为：



其中 $Q^X$ 是使得Q是氨基酸残基、二肽残基或三肽残基；

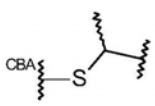
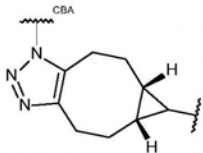
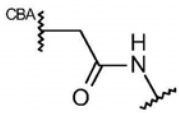
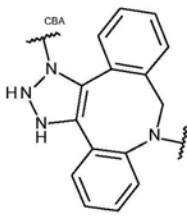
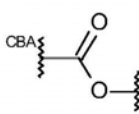
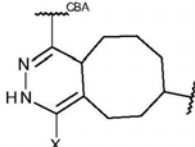
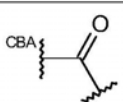
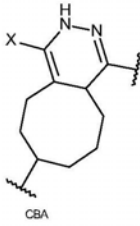
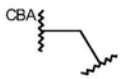
X为：



其中 $a=0$ 至 $5$ ,  $b=0$ 至 $16$ ,  $c=0$ 或 $1$ ,  $d=0$ 至 $5$ ；

$G^{LL}$ 选自：

$(G^{LL1-1})$		$(G^{LL8-1})$	
$(G^{LL1-2})$		$(G^{LL8-2})$	
$(G^{LL2})$		$(G^{LL9-1})$	
$(G^{LL3-1})$		$(G^{LL9-2})$	

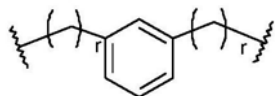
(G <sup>LL3-2</sup> )		G <sup>L10</sup>	
(G <sup>LL4</sup> )		G <sup>L11</sup>	
(G <sup>LL5</sup> )		G <sup>L12</sup>	
(G <sup>LL6</sup> )		G <sup>L13</sup>	
(G <sup>LL7</sup> )			

其中Ar代表C<sub>5-6</sub>亚芳基,选自亚苯基并且X代表C<sup>1-4</sup>烷基;

其中CBA代表细胞结合剂Ab,所述细胞结合剂Ab为在每条重链上具有至少一个自由缀合位点的经修饰抗体,其中所述经修饰抗体已被修饰使得其在每条重链中包括包含适用于与接头缀合的反应性基团的至少一个氨基酸残基。

2. 根据权利要求1所述的缀合物,其中R<sup>2</sup>为C<sub>3-7</sub>亚烷基。

3. 根据权利要求1所述的缀合物,其中R<sup>2</sup>为下式的基团:



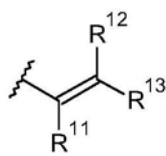
其中r为1或2。

4. 根据权利要求1所述的缀合物,其中D为D1,在C2与C3之间存在双键,并且R<sup>2</sup>为C<sub>1-5</sub>饱和脂族烷基。

5. 根据权利要求1所述的缀合物,其中R<sup>2</sup>为甲基、乙基或丙基。

6. 根据权利要求1所述的缀合物,其中R<sup>2</sup>为环丙基。

7. 根据权利要求1所述的缀合物,其中D为D1,在C2与C3之间存在双键,并且R<sup>2</sup>为下式的基团:



8. 根据权利要求7所述的缀合物, 其中所述 $R^2$ 基团中碳原子的总数不超过4。

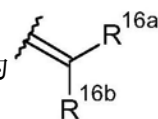
9. 根据权利要求8所述的缀合物, 其中所述 $R^2$ 基团中碳原子的总数不超过3。

10. 根据权利要求7所述的缀合物, 其中 $R^{11}$ 、 $R^{12}$ 和 $R^{13}$ 中的一个为H, 并且其他两个基团选自H、 $C_{1-3}$ 饱和烷基、 $C_{2-3}$ 烯基、 $C_{2-3}$ 炔基以及环丙基。

11. 根据权利要求7所述的缀合物, 其中 $R^{11}$ 、 $R^{12}$ 和 $R^{13}$ 中的两个为H, 并且另一个基团选自H、 $C_{1-3}$ 饱和烷基、 $C_{2-3}$ 烯基、 $C_{2-3}$ 炔基以及环丙基。

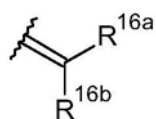
12. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中D为D1, 在C2与C3之间存在单键, 并且 $R^2$ 为H。

13. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中D为D1, 在C2与C3之间存在单键,  $R^2$ 为



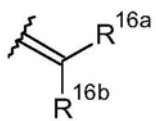
并且 $R^{16a}$ 和 $R^{16b}$ 均为H。

14. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中D为D1, 在C2与C3之间存在单键,  $R^2$ 为



并且 $R^{16a}$ 和 $R^{16b}$ 均为甲基。

15. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中D为D1, 在C2与C3之间存在单键,  $R^2$ 为



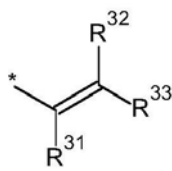
$R^{16a}$ 和 $R^{16b}$ 中的一个为H, 并且另一个选自 $C_{1-4}$ 饱和烷基、 $C_{2-3}$ 烯基。

16. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中D' 为D' 1, 在C2' 与C3' 之间存在双键, 并且 $R^{22}$ 为 $C_{1-5}$ 饱和脂族烷基。

17. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中 $R^{22}$ 为甲基、乙基或丙基。

18. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中D' 为D' 1, 在C2' 与C3' 之间存在双键, 并且 $R^{22}$ 为环丙基。

19. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中D' 为D' 1, 在C2' 与C3' 之间存在双键, 并且 $R^{22}$ 为下式的基团:



20. 根据权利要求19所述的缀合物, 其中所述 $R^{22}$ 基团中碳原子的总数不超过4。

21. 根据权利要求20所述的缀合物, 其中所述 $R^{22}$ 基团中碳原子的总数不超过3。

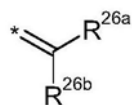
22. 根据权利要求19所述的缀合物, 其中 $R^{31}$ 、 $R^{32}$ 和 $R^{33}$ 中的一个为H, 并且其他两个基团选自H、 $C_{1-3}$ 饱和烷基、 $C_{2-3}$ 烯基、 $C_{2-3}$ 炔基以及环丙基。

23. 根据权利要求19所述的缀合物, 其中 $R^{31}$ 、 $R^{32}$ 和 $R^{33}$ 中的两个为H, 并且另一个基团选

自H、C<sub>1-3</sub>饱和烷基、C<sub>2-3</sub>烯基、C<sub>2-3</sub>炔基以及环丙基。

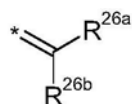
24. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中D' 为D' 1, 在C2' 与C3' 之间存在单键, 并且R<sup>22</sup>为H。

25. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中D' 为D' 1, 在C2' 与C3' 之间存在单键, R<sup>22</sup>为



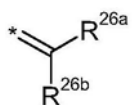
并且R<sup>26a</sup>和R<sup>26b</sup>均为H。

26. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中D' 为D' 1, 在C2' 与C3' 之间存在单键, R<sup>22</sup>为



并且R<sup>26a</sup>和R<sup>26b</sup>均为甲基。

27. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中D' 为D' 1, 在C2' 与C3' 之间存在单键, R<sup>22</sup>为



R<sup>26a</sup>和R<sup>26b</sup>中的一个为H, 并且另一个选自C<sub>1-4</sub>饱和烷基、C<sub>2-3</sub>烯基, 所述烷基和烯基

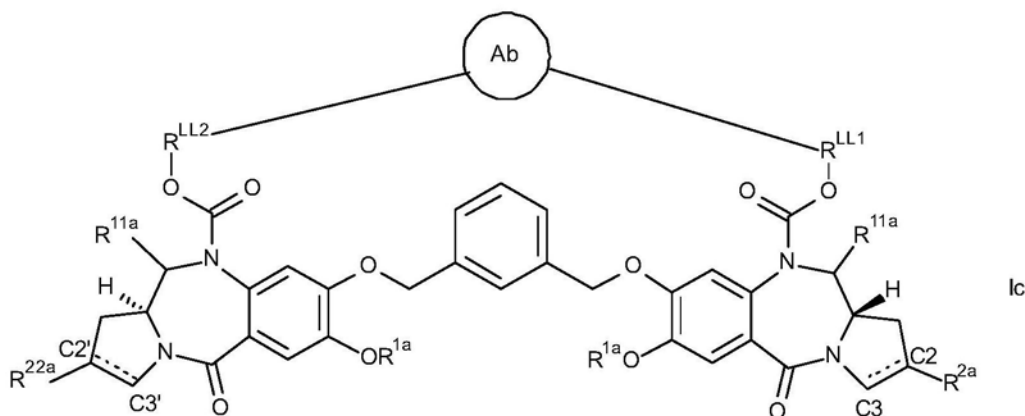
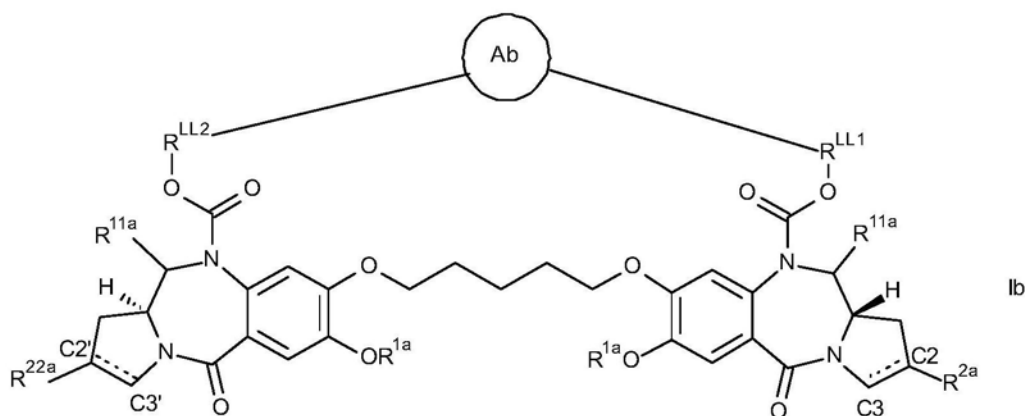
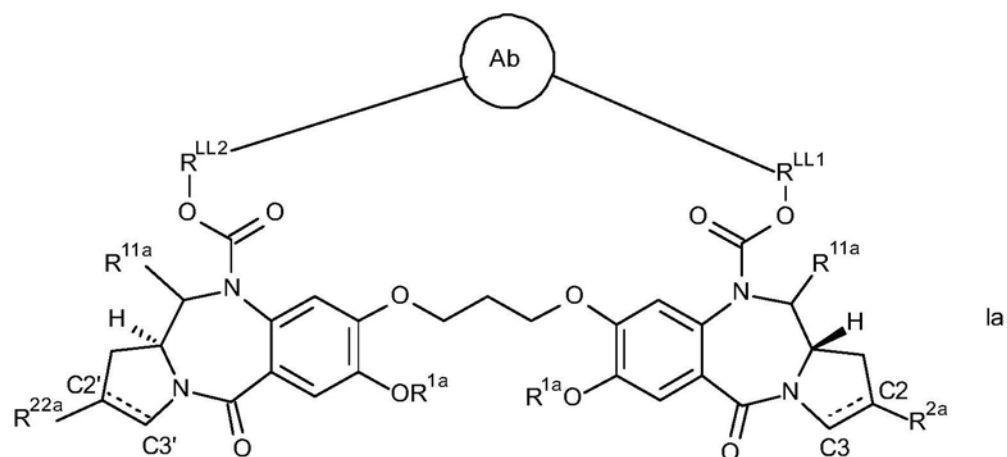
是任选取代的。

28. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中R<sup>6'</sup> 选自与R<sup>6</sup>相同的基团, R<sup>7'</sup> 选自与R<sup>7</sup>相同的基团, R<sup>9'</sup> 选自与R<sup>9</sup>相同的基团, R<sup>11a'</sup> 选自与R<sup>11a</sup>相同的基团, 并且Y' 选自与Y相同的基团。


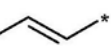


29. 根据权利要求28所述的缀合物, 其中R<sup>6'</sup> 是与R<sup>6</sup>相同的基团, R<sup>7'</sup> 是与R<sup>7</sup>相同的基团, R<sup>9'</sup> 是与R<sup>9</sup>相同的基团, R<sup>11a'</sup> 是与R<sup>11a</sup>相同的基团, 并且Y' 是与Y相同的基团。

30. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中R<sup>22</sup>是与R<sup>2</sup>相同的基团。

31. 根据权利要求1所述的缀合物, 其具有式Ia-1、Ia-2或Ia-3:



其中 $R^{2a}$ 和 $R^{22a}$ 相同并选自：

- (a)  ;
- (b)  ;
- (c)  ;
- (d)  ;

$R^{1a}$ 是甲基；

$R^{LL1}$ 、 $R^{LL2}$ 和 $R^{11a}$ 如权利要求1中所定义。

32. 根据权利要求1所述的缀合物，其中 $R^{LL1}$ 具有式IIIa'，并且 $Q^x$ 是选自Phe、Lys、Val、



Ala、Cit、Leu、Ile、Arg和Trp的氨基酸残基。

33. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中 $R^{LL1}$ 具有式IIIa', 并且 $Q^x$ 是选自以下的二肽残基:

$CO-Phe-Lys-NH$ 、  
 $CO-Val-Ala-NH$ 、  
 $CO-Val-Lys-NH$ 、  
 $CO-Ala-Lys-NH$ 、  
 $CO-Val-Cit-NH$ 、  
 $CO-Phe-Cit-NH$ 、  
 $CO-Leu-Cit-NH$ 、  
 $CO-Ile-Cit-NH$ 、  
 $CO-Phe-Arg-NH$ , 以及  
 $CO-Trp-Cit-NH$ 。

34. 根据权利要求33所述的缀合物, 其中 $Q^x$ 选自 $CO-Phe-Lys-NH$ 、 $CO-Val-Cit-NH$ 和 $CO-Val-Ala-NH$ 。

35. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中 $R^{LL1}$ 具有式IIIa', 并且 $Q^x$ 是三肽残基。

36. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中 $R^{LL1}$ 具有式IIIa' 并且a是0至3。

37. 根据权利要求36所述的缀合物, 其中a是0。

38. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中 $R^{LL1}$ 具有式IIIa' 并且b是0至12。

39. 根据权利要求38所述的缀合物, 其中b是0至8。

40. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中 $R^{LL1}$ 具有式IIIa' 并且d是0至3。

41. 根据权利要求40所述的缀合物, 其中d是2。

42. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中 $R^{LL1}$ 具有式IIIa', 并且a是0, c是1且d是2, 并且b是0至8。

43. 根据权利要求42所述的缀合物, 其中b是0、4或8。

44. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中 $G^{LL}$ 选自 $G^{LL1-1}$ 和 $G^{LL1-2}$ 。

45. 根据权利要求44所述的缀合物, 其中 $G^{LL}$ 是 $G^{LL1-1}$ 。

46. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中 $R^{LL2}$ 具有式IIIa', 并且 $Q^x$ 是选自Phe、Lys、Val、Ala、Cit、Leu、Ile、Arg和Trp的氨基酸残基。

47. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中 $R^{LL2}$ 具有式IIIa', 并且 $Q^x$ 是选自以下的二肽残基:

$CO-Phe-Lys-NH$ 、  
 $CO-Val-Ala-NH$ 、  
 $CO-Val-Lys-NH$ 、  
 $CO-Ala-Lys-NH$ 、  
 $CO-Val-Cit-NH$ 、  
 $CO-Phe-Cit-NH$ 、  
 $CO-Leu-Cit-NH$ 、  
 $CO-Ile-Cit-NH$ 、

$\text{C}^0\text{-Phe-Arg-NH}$ 以及

$\text{C}^0\text{-Trp-Cit-NH}$ 。

48. 根据权利要求47所述的缀合物, 其中 $\text{Q}^x$ 选自 $\text{C}^0\text{-Phe-Lys-NH}$ 、 $\text{C}^0\text{-Val-Cit-NH}$ 和 $\text{C}^0\text{-Val-Ala-NH}$ 。

49. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中 $\text{R}^{\text{LL}2}$ 具有式IIIa', 并且 $\text{Q}^x$ 是三肽残基。

50. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中 $\text{R}^{\text{LL}2}$ 具有式IIIa' 并且a是0至3。

51. 根据权利要求50所述的缀合物, 其中a是0。

52. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中 $\text{R}^{\text{LL}2}$ 具有式IIIa' 并且b是0至12。

53. 根据权利要求52所述的缀合物, 其中b是0至8。

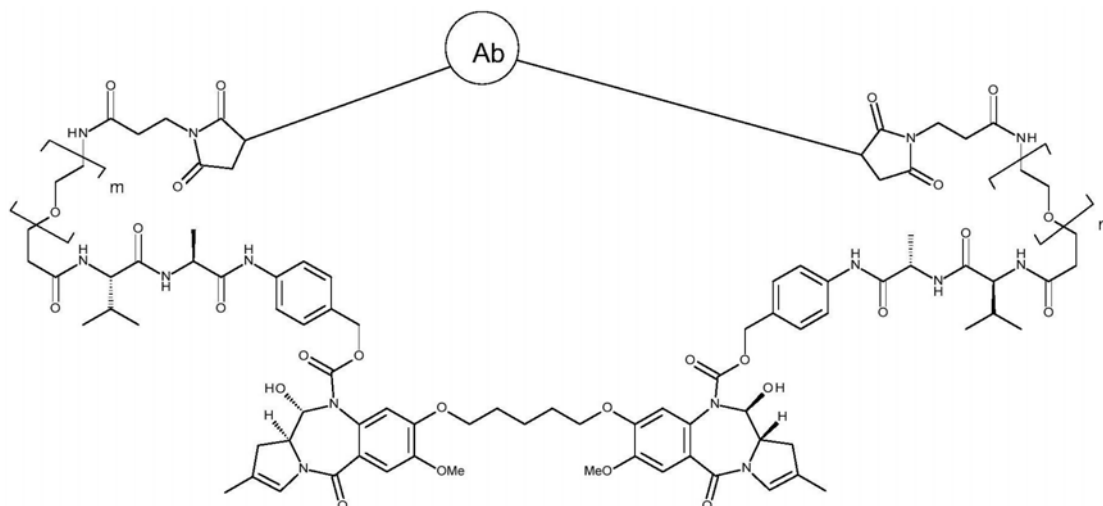
54. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中 $\text{R}^{\text{LL}2}$ 具有式IIIa' 并且d是0至3。

55. 根据权利要求54所述的缀合物, 其中d是2。

56. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中 $\text{R}^{\text{LL}2}$ 具有式IIIa', 并且a是0, c是1且d是2, 并且b是0至8。

57. 根据权利要求56所述的缀合物, 其中b是0、4或8。

58. 根据权利要求1所述的缀合物, 其具有式Id:



其中m是2至8的整数。

59. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中在每条重链上具有至少一个自由缀合位点的所述经修饰抗体为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。

60. 根据权利要求59所述的缀合物, 其中在每条重链上具有至少一个自由缀合位点的所述经修饰抗体为人抗体。

61. 根据权利要求59所述的缀合物, 其中在每条重链上具有至少一个自由缀合位点的所述经修饰抗体为人源化抗体。

62. 根据权利要求59所述的缀合物, 其中所述天然链间半胱氨酸残基被取代为缺乏硫醇基团的氨基酸残基。

63. 根据权利要求62所述的缀合物, 其中所述经修饰抗体在每条重链中包含包含适用于与接头缀合的反应性基团的氨基酸残基的至少一个另外的取代, 并且所述经修饰抗体中另外取代的氨基酸为半胱氨酸或非天然氨基酸。

64. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中在每条重链中包含适用于与接头缀合的反应性

基团的氨基酸残基的另外的取代的位置选自下文列出的那些:

抗体	同种型	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
位 置 (Kabat EU) 和 对 应 氨基酸	239	Ser	Ser	Ser	Ser
	282	Val	Val	Val	Val
	289	Thr	Thr	Thr	Thr
	297	Asn	Asn	Asn	Asn
	312	Asp	Asp	Asp	Asp
	324	Ser	Ser	Ser	Ser
	330	Ala	Ala	Ala	Ser
	335	Thr	Thr	Thr	Thr
	337	Ser	Ser	Ser	Ser
	339	Ala	Thr	Thr	Ala
	356	Glu	Glu	Glu	Glu
	359	Thr	Thr	Thr	Thr
	361	Asn	Asn	Asn	Asn
	383	Ser	Ser	Ser	Ser
	384	Asn	Asn	Ser	Asn
	398	Leu	Leu	Leu	Leu
	400	Ser	Ser	Ser	Ser
	422	Val	Val	Ile	Val
	440	Ser	Ser	Ser	Ser
	442	Ser	Ser	Ser	Ser
SEQ ID NO:		1	2	3	4

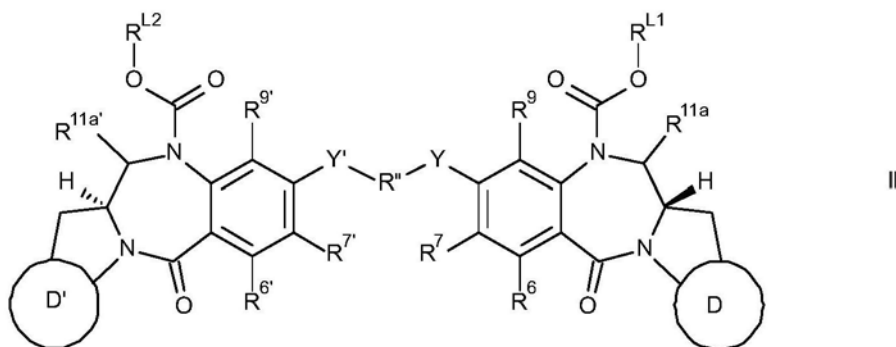
65. 一种药物组合物, 其包含根据权利要求1所述的缀合物以及药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂。

66. 根据权利要求1所述的缀合物,其在治疗受试者中的癌症中使用。

67. 根据权利要求65所述的药物组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

68. 根据权利要求1所述的缀合物在制造用于治疗癌症的药物的方法中的用途。

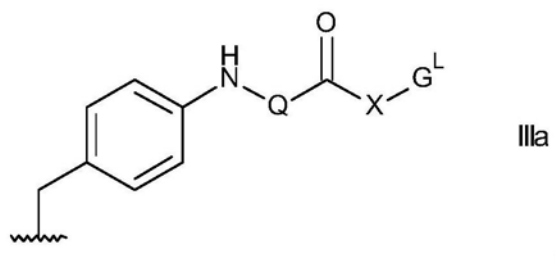
69. 一种式II的化合物:



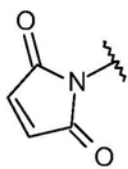
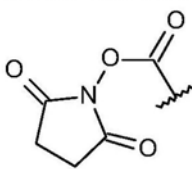
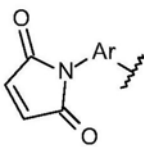
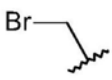
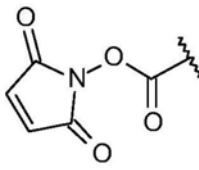

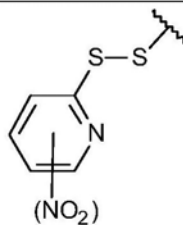

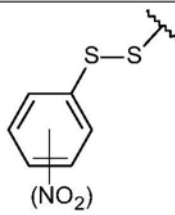
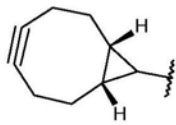
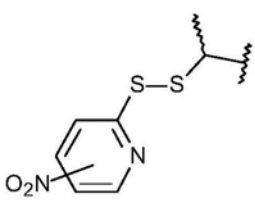
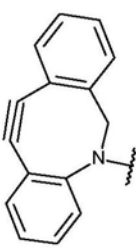
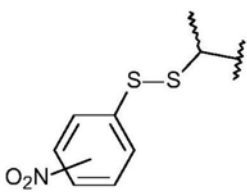
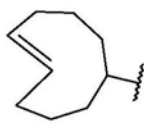
及其盐和溶剂合物，

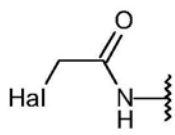
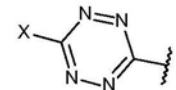
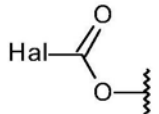
其中D、R<sup>2</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>9</sup>、R<sup>11a</sup>、Y、R''、Y'、D'、R<sup>6'</sup>、R<sup>7'</sup>、R<sup>9'</sup>、R<sup>11a'</sup>和R<sup>12</sup>如权利要求1所定义,包括相应地C2与C3之间以及C2'与C3'之间的双键的存在或不存在;

$R^{L1}$ 和 $R^{L2}$ 为用于连接至细胞结合剂的接头,其独立地具有式IIIa:



其中Q和X如权利要求1中任一项所定义,并且 $\text{G}^{\text{L}}$ 选自:

(G <sup>L1-1</sup> )		(G <sup>L6</sup> )	
(G <sup>L1-2</sup> )		(G <sup>L7</sup> )	
(G <sup>L2</sup> )		(G <sup>L8</sup> )	
(G <sup>L3-1</sup> )	 其中 NO <sub>2</sub> 基团是任选的	(G <sup>L9</sup> )	
(G <sup>L3-2</sup> )	 其中 NO <sub>2</sub> 基团是任选的	(G <sup>L10</sup> )	
(G <sup>L3-3</sup> )	 其中 NO <sub>2</sub> 基团是任选的	(G <sup>L11</sup> )	
(G <sup>L3-4</sup> )	 其中 NO <sub>2</sub> 基团是任选的	(G <sup>L12</sup> )	

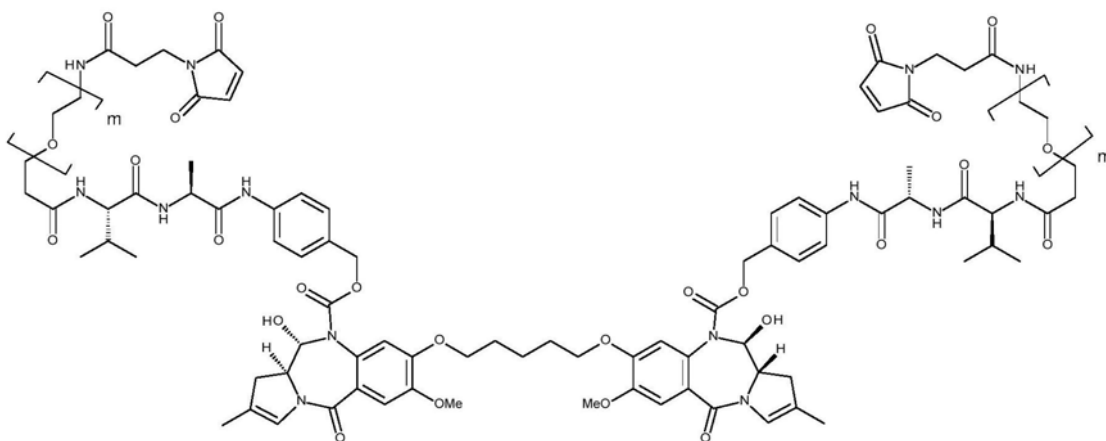
	的		
(G <sup>L4</sup> )	 其中 Hal = I、Br、Cl	(G <sup>L13</sup> )	
(G <sup>L5</sup> )			

其中Ar代表C<sub>5-6</sub>亚芳基,选自亚苯基,并且X代表C<sup>1-4</sup>烷基。

70. 根据权利要求69所述的化合物,其中G<sup>L</sup>选自G<sup>L1-1</sup>和G<sup>L1-2</sup>。

71. 根据权利要求70所述的化合物,其中G<sup>L</sup>是G<sup>L1-1</sup>。

72. 根据权利要求69所述的化合物,其中所述化合物具有式Id' :



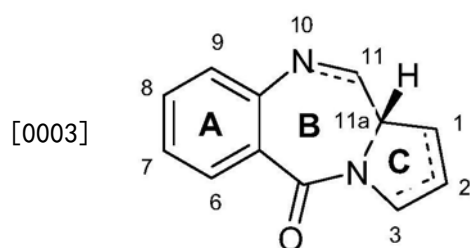
其中m是2至8的整数。

## 吡咯并苯并二氮杂萘缀合物

[0001] 本发明涉及包括吡咯并苯并二氮杂萘和相关二聚体 (PBD) 的缀合物, 以及用于制备所述缀合物的前体药物接头。

### 背景技术

[0002] 一些吡咯并苯并二氮杂萘 (PBD) 具有识别和结合特异性DNA序列的能力; 优选的序列是PuGpu。第一PBD抗肿瘤抗生素, 安曲霉素 (anthramycin), 发现于1965年 (Leimgruber等, J. Am. Chem. Soc., 87, 5793-5795 (1965); Leimgruber等, J. Am. Chem. Soc., 87, 5791-5793 (1965))。自那以后, 已报道了许多天然存在的PBD, 并且已开发了用于各种类似物的10种以上的合成路线 (Thurston等, Chem. Rev. 1994, 433-465 (1994))。家族成员包括修道院霉素 (abbeymycin) (Hochlowski 等, J. Antibiotics, 40, 145-148 (1987))、契卡霉素 (chicamycin) (Konishi 等, J. Antibiotics, 37, 200-206 (1984))、DC-81 (日本专利58-180 487; Thurston等, Chem. Brit., 26, 767-772 (1990); Bose等, Tetrahedron, 48, 751-758 (1992))、甲基氨基霉素 (Kuminoto等, J. Antibiotics, 33, 665-667 (1980))、新菌霉素A和B (Takeuchi等, J. Antibiotics, 29, 93-96 (1976))、porothramycin (Tsunakawa等, J. Antibiotics, 41, 1366-1373 (1988))、prothracarcin (Shimizu等, J. Antibiotics, 29, 2492-2503 (1982); Langley和Thurston, J. Org. Chem., 52, 91-97 (1987))、西班牙米星 (DC-102) (Hara等, J. Antibiotics, 41, 702-704 (1988); Itoh等, J. Antibiotics, 41, 1281-1284 (1988))、矛霉素 (sibiromycin) (Leber等, J. Am. Chem. Soc., 110, 2992-2993 (1988)) 以及托马霉素 (tomamycin) (Arima 等, J. Antibiotics, 25, 437-444 (1972))。PBD具有以下通式结构:

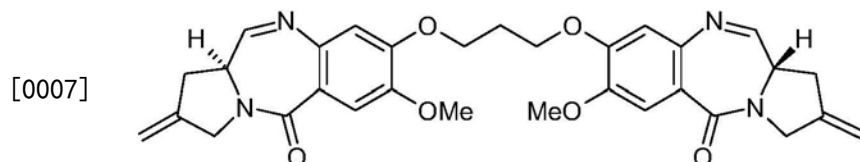


[0004] 它们的不同之处在于其芳香族A环和吡咯并C环两者中的取代基的数目、类型和位置以及C环的饱和度。在B环中, 在N10-C11 位置处存在亚胺 (N=C)、甲醇胺 (NH-CH (OH)) 或甲醇胺甲基醚 (NH-CH (OMe)), 所述N10-C11位置为负责烷基化DNA的亲电中心。所有已知的天然产物在手性C11a位置处具有 (S)-构型, 当从C环朝向A环观察时, 所述位置为其提供右手扭转。这给予它们适当的三维形状, 用于与B型DNA的小沟的同螺旋性 (isohelicity), 从而导致在结合位点处的滑动配合 (snug fit) (Kohn, 在Antibiotics III中. Springer-Verlag, New York, 第3-11页 (1975); Hurley和 Needham-VanDevanter, Acc. Chem. Res., 19, 230-237 (1986))。它们在小沟中形成加合物的能力使得它们能够干扰DNA加工, 因此使其具有作为抗肿瘤剂的用途。

[0005] 先前已经公开, 此分子的生物活性可通过将两个PBD单元通过它们的C8/C' -羟基

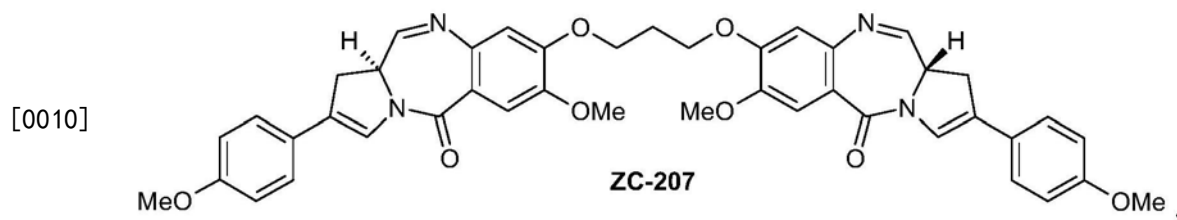
官能度经由柔性亚烷基接头接合在一起而加强 (Bose, D.S. 等, J. Am. Chem. Soc., 114, 4939-4941 (1992); Thurston, D.E. 等, J. Org. Chem., 61, 8141-8147 (1996))。PBD二聚体被认为形成序列选择性DNA损伤, 诸如回文结构5'-Pu-GATC-Py-3' 股间交联 (Smellie, M. 等, Biochemistry, 42, 8232-8239 (2003); Martin, C. 等, Biochemistry, 44, 4135-4147), 被认为主要负责其生物活性。

[0006] PBD二聚体的一个实例是SG2000 (SJG-136) :

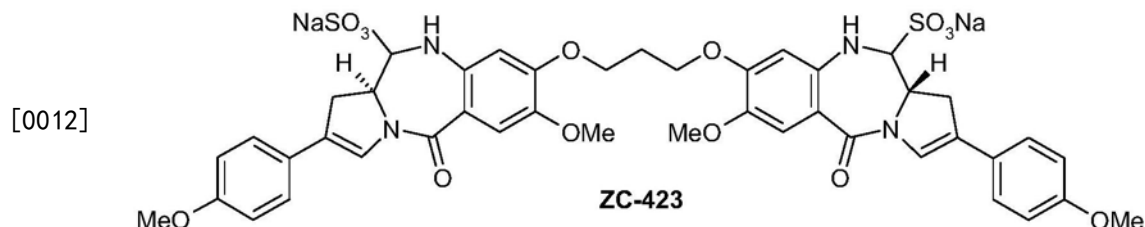


[0008] (Gregson, S. 等, J. Med. Chem., 44, 737-748 (2001); Alley, M. C. 等, Cancer Research, 64, 6700-6706 (2004); Hartley, J.A. 等, Cancer Research, 64, 6693-6699 (2004)), 其已经作为独立药剂参与临床试验, 例如, NCT02034227研究了其在治疗急性骨髓性白血病和慢性淋巴细胞性白血病中的用途 (参见: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02034227>)。

[0009] 携带C2芳基取代基的二聚PBD化合物, 诸如SG2202 (ZC-207), 公开于W0 2005/085251中:



[0011] 以及W02006/111759中, 所述PBD化合物的亚硫酸氢盐, 例如 SG2285 (ZC-423) :



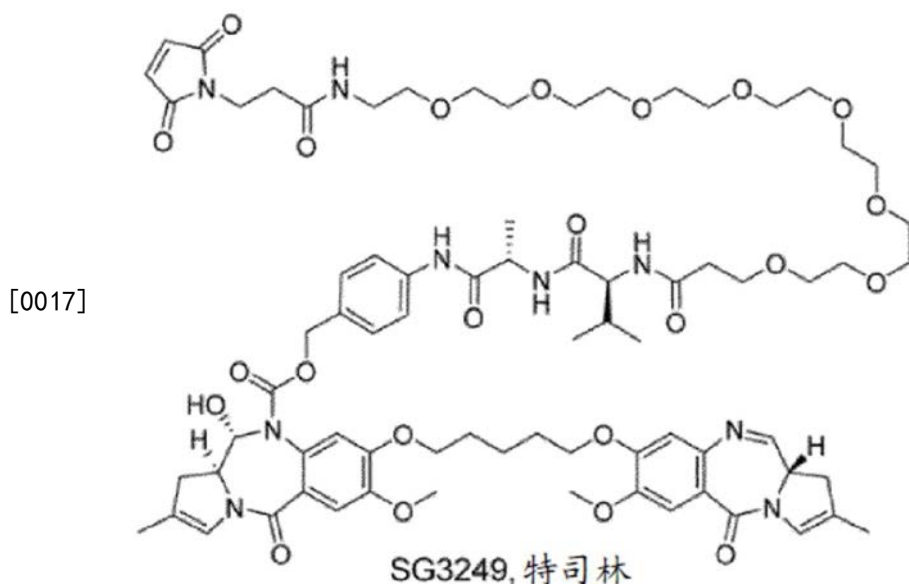
[0013] 这些化合物已经显示出为高度可用的细胞毒性药剂 (Howard, P.W. 等, Bioorg. Med. Chem. (2009), doi:10.1016/j.bmcl.2009.09.012)。

[0014] W0 2007/085930描述了具有用于连接至细胞结合剂 (如抗体) 的接头基团的二聚体PBD化合物的制备。接头存在于连接二聚体的单体PBD单元的桥中。

[0015] 具有用于连接至细胞结合剂 (如抗体) 的接头基团的二聚体PBD 化合物描述于W0 2011/130598中。这些化合物中的接头连接于可用的N10位置中的一个, 并且通常因酶对接头基团的作用而被切割。如果用封端基团保护未结合的N10位置, 那么所例示的封端基团具有与连接至抗体的接头相同的切割触发物。

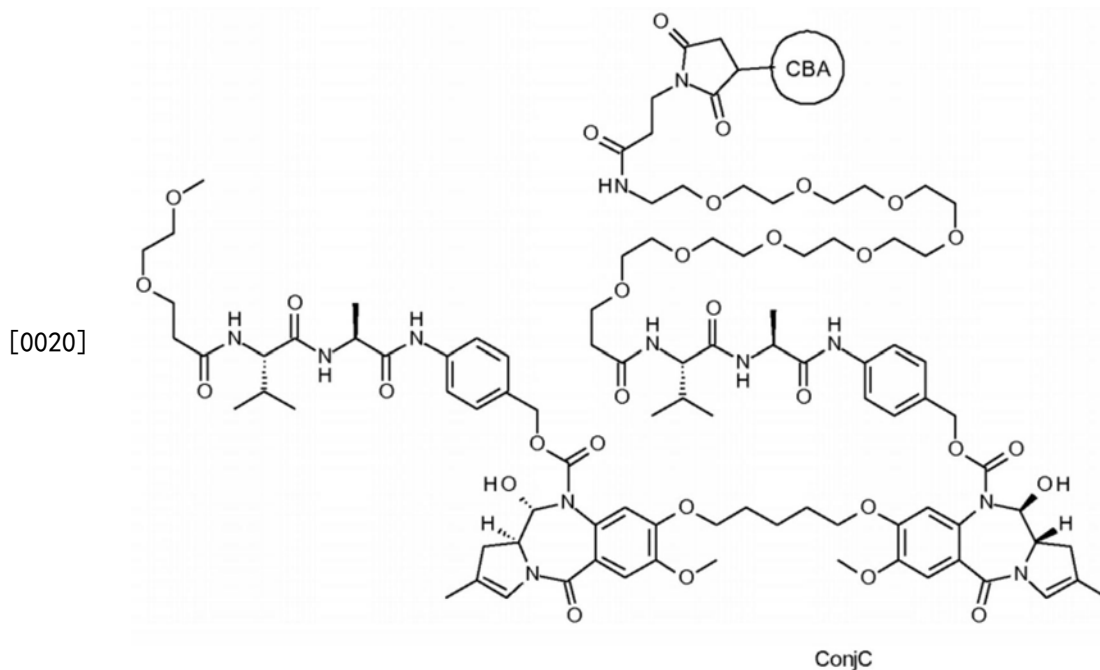
[0016] W0 2014/057074描述了两种特定的PBD二聚体缀合物, 其通过 N10位置结合在一个单体上, 另一个PBD单体呈亚胺形式。所公开的药物-接头之一是SG3249, 特司林 (Tesirine) :





[0018] 当与抗DLL3罗伐珠单抗 (rovalpituzumab) 缀合时,其被称为罗伐珠单抗-特司林 (Rova-T), 目前正在进行用于治疗小细胞肺癌的评估 (Tiberghien, A.C. 等, ACS Med. Chem. Lett., 2016, 7 (11), 983-987; DOI:10.1021/acsmedchemlett.6b00062)。此药物-接头与曲妥珠单抗的工程化型式和针对人CD19的人源化抗体的另外的缀合物也在2017年初由ADC Therapeutics SA开始了试验 (Proceedings of the American Association for Cancer Research, 第58卷, 2017年4月中的Abstracts #51和#52)。

[0019] WO 2015/052322描述了一种特定的PBD二聚体缀合物,其通过 N10位置结合在一个单体上,另一个PBD单体呈亚胺形式。它还描述了一种特定的PBD二聚体缀合物,其通过N10位置结合在一个单体上,另一个PBD单体具有封端基团,所述封端基团具有与连接至抗体的接头相同的切割触发物:



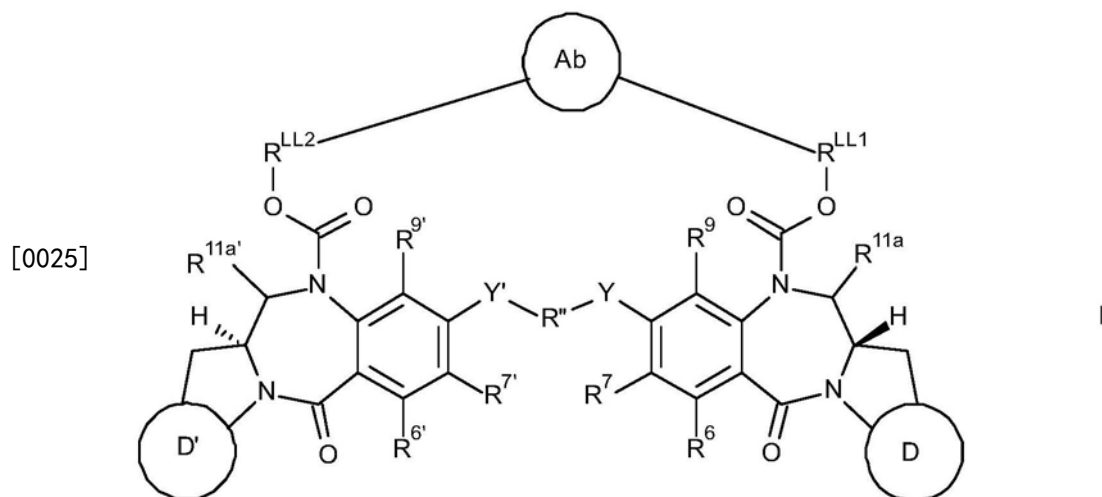
## 发明内容

[0021] 本发明提供了PBD,以及相关PBD二聚体缀合物,其中PBD与被修饰以便在每条重链上具有至少一个自由缀合位点的抗体缀合,并且其中缀合是经由接头经由PBD的每个N10基团实现的。

[0022] 本发明人已经发现此类缀合物惊人的有效,尽管预期不可通过两个接头将单个PBD或相关二聚体与单个抗体相连接。

[0023] 本发明还提供了适用于缀合于经修饰抗体的PBD和相关二聚体药物接头,其中两个N10基团均携带连接基团。

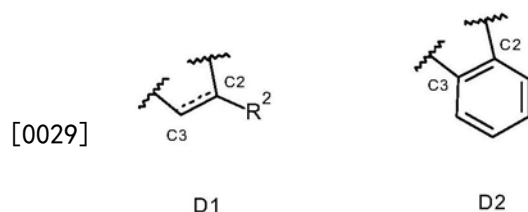
[0024] 本发明的第一方面提供了一种式I的缀合物:



[0026] 其中

[0027] Ab为在每条重链上具有至少一个自由缀合位点的经修饰抗体;

[0028] D代表基团D1或D2:



[0030] 虚线指示C2与C3之间任选存在双键;

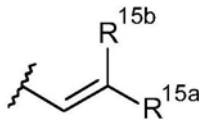
[0031] 当C2与C3之间存在双键时, R<sup>2</sup>选自自由以下组成的组:

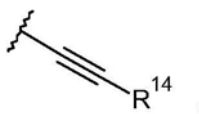
[0032] (ia) C<sub>5-10</sub>芳基,其任选地被选自包括以下的组的一个或多个取代基取代:卤素、硝基、氰基、醚、羧基、酯、C<sub>1-7</sub>烷基、C<sub>3-7</sub>杂环基以及双-氧基-C<sub>1-3</sub>亚烷基;

[0033] (ib) C<sub>1-5</sub>饱和的脂族烷基;

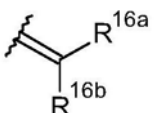
[0034] (ic) C<sub>3-6</sub>饱和的环烷基;

[0035] (id) 其中R<sup>11</sup>、R<sup>12</sup>和R<sup>13</sup>中的每一个独立地选自H、C<sub>1-3</sub>饱和烷基、C<sub>2-3</sub>烯基、C<sub>2-3</sub>炔基和环丙基,其中所述R<sup>2</sup>基团中碳原子的总数不超过5;

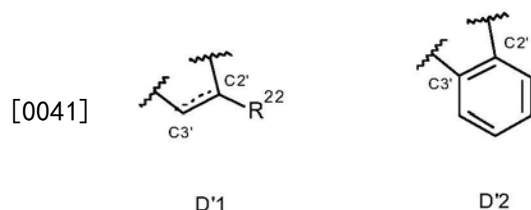
[0036] (ie)  其中 $R^{15a}$ 和 $R^{15b}$ 中的一个为H并且另一个选自：苯基，所述苯基任选地被选自卤素、甲基、甲氧基的基团取代；吡啶基；以及苯硫基；以及

[0037] (if)  其中 $R^{14}$ 选自：H； $C_{1-3}$ 饱和烷基； $C_{2-3}$ 烯基； $C_{2-3}$ 炔基；环丙基；苯基，所述苯基任选地被选自卤素、甲基、甲氧基的基团取代；吡啶基；以及苯硫基；

[0038] 当C2与C3之间存在单键时，

[0039]  $R^2$ 选自H、OH、F、diF和  其中 $R^{16a}$ 和 $R^{16b}$ 独立地选自H、F、 $C_{1-4}$ 饱和烷基、 $C_{2-3}$ 烯基，所述烷基和烯基任选地被选自  $C_{1-4}$ 烷基酰氨基和 $C_{1-4}$ 烷基酯的基团取代；或，当 $R^{16a}$ 和 $R^{16b}$ 中的一个为H时，另一个选自腈和 $C_{1-4}$ 烷基酯；

[0040]  $D'$ 代表基团 $D'1$ 或 $D'2$ ：



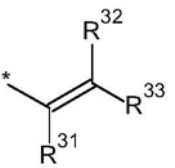
[0042] 其中虚线指示 $C2'$ 与 $C3'$ 之间任选存在双键；

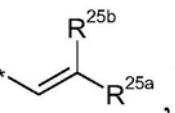
[0043] 当 $C2'$ 与 $C3'$ 之间存在双键时， $R^{12}$ 选自由以下组成的组：

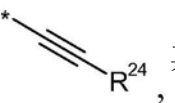
[0044] (iia)  $C_{5-10}$ 芳基，其任选地被选自包括以下的组的一个或多个取代基取代：卤素、硝基、氰基、醚、羧基、酯、 $C_{1-7}$ 烷基、 $C_{3-7}$ 杂环基以及双-氧基- $C_{1-3}$ 亚烷基；

[0045] (iib)  $C_{1-5}$ 饱和的脂族烷基；

[0046] (iic)  $C_{3-6}$ 饱和的环烷基；

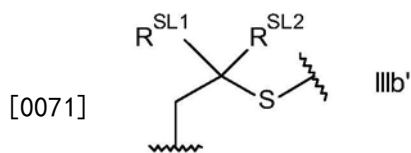
[0047] (iid)  其中 $R^{31}$ 、 $R^{32}$ 和 $R^{33}$ 中的每一个独立地选自H、 $C_{1-3}$ 饱和烷基、 $C_{2-3}$ 烯基、 $C_{2-3}$ 炔基和环丙基，其中 $R^{12}$ 基团中碳原子的总数不超过5；

[0048] (iie)  其中 $R^{25a}$ 和 $R^{25b}$ 中的一个为H并且另一个选自：苯基，所述苯基任选地被选自卤素、甲基、甲氧基的基团取代；吡啶基；以及苯硫基；以及

[0049] (iif)  其中 $R^{24}$ 选自：H； $C_{1-3}$ 饱和烷基； $C_{2-3}$ 烯基； $C_{2-3}$ 炔基；环丙基；苯基，所述苯基任选地被选自卤素、甲基、甲氧基的基团取代；吡啶基；以及苯硫基；

[0050] 当 $C2'$ 与 $C3'$ 之间存在单键时，

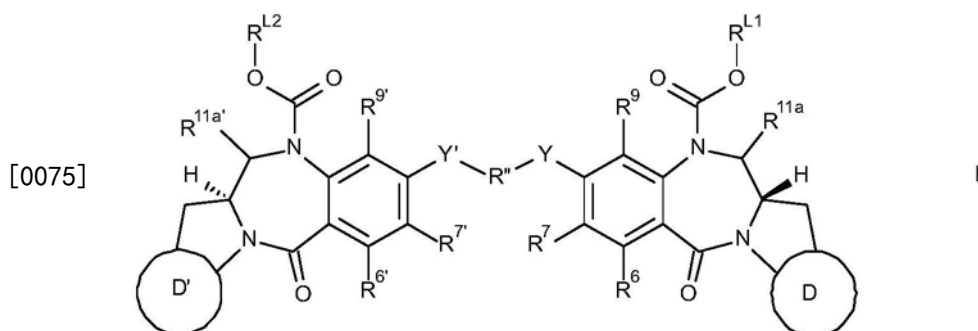




[0072] 其中 $R^{SL1}$ 和 $R^{SL2}$ 独立地选自H和甲基,或与它们所结合的碳原子一起形成亚环丙基或亚环丁基。

[0073] 据认为,相比于由异质混合物组成的具有较高DAR的ADC而言,通过降低最小有效剂量需要,有效地具有1的药物抗体比率(DAR)的此类ADC可提供显著的优点,包括降低的脱靶毒性和增强的治疗窗口。

[0074] 本发明的第二方面包括一种具有式II的化合物:

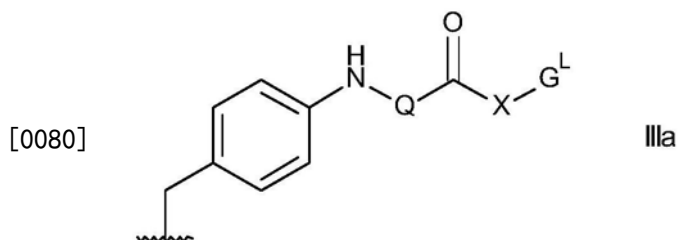


[0076] 及其盐和溶剂合物,

[0077] 其中D、 $R^2$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^9$ 、 $R^{11a}$ 、Y、 $R''$ 、Y'、D'、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^9$ 、 $R^{11a}$ 和 $R^{12}$ (包括相应地C2与C3之间以及C2'与C3'之间的双键的存在或不存在)如本发明的第一方面所定义;

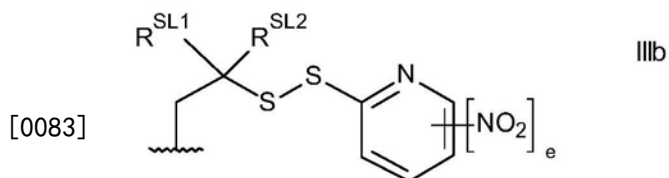
[0078]  $R^L$ 为用于连接至细胞结合剂的接头,其选自:

[0079] (iiia):



[0081] 其中Q和X如第一方面所定义并且 $G^L$ 是用于连接至抗体的接头;以及

[0082] (iiib):



[0084] 其中 $R^{SL1}$ 和 $R^{SL2}$ 如第一方面所定义

[0085] 并且e是0或1。

[0086] 本发明的第三方面提供了本发明的第一方面的缀合物在制造用于治疗增殖性疾

病的药物中的用途。第三方面还提供了用于治疗增殖性疾病的本发明的第一方面的缀合物。第三方面还提供了一种治疗增殖性疾病的方法,其包括向有需要的患者施用治疗有效量的本发明的第一方面的缀合物。

[0087] 本领域的普通技术人员能够容易地确定候选缀合物是否治疗任何特定细胞类型的增殖性病状。例如,可以方便地用来评估由特定化合物提供的活性的测定描述于以下实施例中。

[0088] 本发明的第四方面提供了本发明的第一方面的缀合物的合成,其包括将本发明的第二方面的化合物(药物接头)与如本发明的第一方面所定义的抗体缀合。

## 附图说明

[0089] 图1示出在NCI-N87异种移植模型中,相比于非治疗而言单剂量的本发明缀合物的效果;

[0090] 图2示出在NCI-N87异种移植模型中,相比于非治疗而言较低剂量的本发明的相同缀合物的效果。

[0091] 图3示出(A)适合在本发明中使用的经修饰抗体的示意图,(B)包含本发明的PBD的抗体药物缀合物的示意图。

[0092] 图4示出经修饰抗体与化合物10的缀合的示意图。

[0093] 图5示出赫塞汀-Flexmab的重链序列和轻链序列。

[0094] 图6示出相比于非本发明的缀合物而言,本发明的缀合物的活性。

[0095] 定义

[0096] 取代基

[0097] 如本文所用的短语“任选取代的”涉及可为未取代的或可为取代的亲本基团。

[0098] 除非另外指明,否则如本文所用的术语“取代的”涉及携带一个或多个取代基的亲本基团。术语“取代基”在本文中以常规意义使用并且是指共价连接至亲本基团或在适当时候与亲本基团融合的化学部分。熟知广泛多种取代基,并且还熟知其形成以及引入多种亲本基团中的方法。

[0099] 以下更详细地描述取代基的实例。

[0100] C<sub>1-12</sub>烷基:如本文所用的术语“C<sub>1-12</sub>烷基”涉及通过从具有1至12个碳原子的烃化合物的碳原子处移除氢原子获得的一价部分,其可以是脂族或脂环族的,并且可以是饱和或不饱和的(例如部分不饱和的、完全不饱和的)。如本文所用的术语“C<sub>1-4</sub>烷基”涉及通过从具有1至4个碳原子的烃化合物的碳原子处移除氢原子获得的一价部分,其可以是脂族或脂环族的,并且可以是饱和或不饱和的(例如部分不饱和的、完全不饱和的)。因此,术语“烷基”包括以下论述的亚类烯基、炔基、环烷基等。

[0101] 饱和烷基的实例包括但不限于甲基(C<sub>1</sub>)、乙基(C<sub>2</sub>)、丙基(C<sub>3</sub>)、丁基(C<sub>4</sub>)、戊基(C<sub>5</sub>)、己基(C<sub>6</sub>)以及庚基(C<sub>7</sub>)。

[0102] 饱和的直链烷基的实例包括但不限于甲基(C<sub>1</sub>)、乙基(C<sub>2</sub>)、正丙基(C<sub>3</sub>)、正丁基(C<sub>4</sub>)、正戊基(戊基)(C<sub>5</sub>)、正己基(C<sub>6</sub>)以及正庚基(C<sub>7</sub>)。

[0103] 饱和的支链烷基的实例包括异丙基(C<sub>3</sub>)、异丁基(C<sub>4</sub>)、仲丁基(C<sub>4</sub>)、叔丁基(C<sub>4</sub>)、异戊基(C<sub>5</sub>)以及新戊基(C<sub>5</sub>)。

[0104] C<sub>2-12</sub>烯基:如本文所用的术语“C<sub>2-12</sub>烯基”涉及具有一个或多个碳-碳双键的烷基。

[0105] 不饱和烯基的实例包括但不限于乙烯基(乙烯基,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ )、1-丙烯基( $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$ )、2-丙烯基(烯丙基,  $-\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$ )、异丙烯基(1-甲基乙烯基,  $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ )、丁烯基( $\text{C}_4$ )、戊烯基( $\text{C}_5$ )以及己烯基( $\text{C}_6$ )。

[0106] C<sub>2-12</sub>炔基:如本文所用的术语“C<sub>2-12</sub>炔基”涉及具有一个或多个碳-碳三键的烷基。

[0107] 不饱和炔基的实例包括但不限于乙炔基 ( $-\text{C}\equiv\text{CH}$ ) 和2-丙炔基 (炔丙基,  $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$ )。

[0108] C<sub>3-12</sub>环烷基:如本文所用的术语“C<sub>3-12</sub>环烷基”涉及也是环基的烷基;即,通过从环状烃(碳环)化合物的脂环环原子处移除氢原子获得的一价部分,所述部分具有3至7个碳原子,包括3至7个环原子。

[0109] 环烷基的实例包括但不限于衍生自以下的环烷基：

[0110] 饱和的单环烃化合物:

[0111] 环丙烷 (C<sub>3</sub>)、环丁烷 (C<sub>4</sub>)、环戊烷 (C<sub>5</sub>)、环己烷 (C<sub>6</sub>)、环庚烷 (C<sub>7</sub>)、甲基环丙烷 (C<sub>4</sub>)、二甲基环丙烷 (C<sub>5</sub>)、甲基环丁烷 (C<sub>5</sub>)、二甲基环丁烷 (C<sub>6</sub>)、甲基环戊烷 (C<sub>6</sub>)、二甲基环戊烷 (C<sub>7</sub>) 以及甲基环己烷 (C<sub>7</sub>)；

[0112] 不饱和的单环烃化合物:

[0113] 环丙烯(C<sub>3</sub>)、环丁烯(C<sub>4</sub>)、环戊烯(C<sub>5</sub>)、环己烯(C<sub>6</sub>)、甲基环丙烯(C<sub>4</sub>)、二甲基环丙烯(C<sub>5</sub>)、甲基环丁烯(C<sub>5</sub>)、二甲基环丁烯(C<sub>6</sub>)、甲基环戊烯(C<sub>6</sub>)、二甲基环戊烯(C<sub>7</sub>)以及甲基环己烯(C<sub>7</sub>)；以及

[0114] 饱和的多环烃化合物:

[0115] 降薅烷 (norcarane) ( $C_7$ )、降蒎烷 (norpinane) ( $C_7$ )、降莰烷 (norbornane) ( $C_7$ )。

[0116] C<sub>3-20</sub>杂环基:如本文所用的术语“C<sub>3-20</sub>杂环基”涉及通过从杂环化合物的环原子处移除氢原子获得的一价部分,所述部分具有3至20个环原子,其中1至10个为环杂原子。优选地,各环均具有3至7个环原子,其中1至4个环原子为环杂原子。

[0117] 在上下文中,前缀(例如C<sub>3-20</sub>、C<sub>3-7</sub>、C<sub>5-6</sub>等)表示环原子的数目或环原子的数目的范围,无论为碳原子或杂原子。例如,如本文所用的术语“C<sub>5-6</sub>杂环基”涉及具有5或6个环原子的杂环基。

[0118] 单环杂环基的实例包括但不限于衍生自以下的杂环基:

[0119] N<sub>1</sub>:氮丙啶(C<sub>3</sub>)、氮杂环丁烷(C<sub>4</sub>)、吡咯烷(四氢吡咯)(C<sub>5</sub>)、吡咯啉(例如,3-吡咯啉、2,5-二氢吡咯)(C<sub>5</sub>)、2H-吡咯或3H-吡咯(异吡咯、异唑)(C<sub>5</sub>)、哌啶(C<sub>6</sub>)、二氢吡啶(C<sub>6</sub>)、四氢吡啶(C<sub>6</sub>)、吡庚因(C<sub>7</sub>)；

[0120] O<sub>1</sub>: 环氧乙烷 (C<sub>3</sub>)、氧杂环丁烷 (C<sub>4</sub>)、氧杂环戊烷 (四氢呋喃) (C<sub>5</sub>)、氧杂环戊二烯 (oxole) (二氢呋喃) (C<sub>5</sub>)、噁烷 (四氢吡喃) (C<sub>6</sub>)、二氢吡喃 (C<sub>6</sub>)、吡喃 (C<sub>6</sub>)、氧杂环庚三烯 (C<sub>7</sub>) ;

[0121] S<sub>1</sub>: 硫杂丙环 (thiirane) (C<sub>3</sub>)、硫杂环丁烷 (thietane) (C<sub>4</sub>)、硫杂环戊烷 (thiolane) (四氢噻吩) (C<sub>5</sub>)、噻烷 (四氢噻喃) (C<sub>6</sub>)、硫杂环庚烷 (thiepane) (C<sub>7</sub>)；

[0122] O<sub>2</sub>: 二氧戊环 (C<sub>5</sub>)、二氧杂环己环 (C<sub>6</sub>) 和二氧杂环庚烷 (C<sub>7</sub>);

[0123] 0<sub>3</sub>:三噁烷(C<sub>6</sub>):

[0124] N<sub>2</sub>:咪唑烷(C<sub>5</sub>)、吡唑烷(二氮杂环戊烷(diazolidine))(C<sub>5</sub>)、咪唑啉(C<sub>5</sub>)、吡唑啉

(二氢吡唑) (C<sub>5</sub>)、哌嗪 (C<sub>6</sub>) ;

[0125] N<sub>1</sub>O<sub>1</sub>: 四氢噁唑 (C<sub>5</sub>)、二氢噁唑 (C<sub>5</sub>)、四氢异噁唑 (C<sub>5</sub>)、二氢异噁唑 (C<sub>5</sub>)、吗啉 (C<sub>6</sub>)、四氢噁嗪 (C<sub>6</sub>)、二氢噁嗪 (C<sub>6</sub>)、噁嗪 (C<sub>6</sub>) ;

[0126] N<sub>1</sub>S<sub>1</sub>: 噻唑啉 (C<sub>5</sub>)、噻唑烷 (C<sub>5</sub>)、硫代吗啉 (C<sub>6</sub>) ;

[0127] N<sub>2</sub>O<sub>1</sub>: 噁二嗪 (C<sub>6</sub>) ;

[0128] O<sub>1</sub>S<sub>1</sub>: 氧硫杂环戊二烯 (oxathiole) (C<sub>5</sub>) 和氧硫杂环己烷 (oxathiane) (噻噁烷) (C<sub>6</sub>) ; 以及,

[0129] N<sub>1</sub>O<sub>1</sub>S<sub>1</sub>: 噁噻嗪 (C<sub>6</sub>) 。

[0130] 取代的单环杂环基的实例包括衍生自呈环状形式的糖类的杂环基, 所述糖类例如呋喃糖 (C<sub>5</sub>) , 如阿拉伯呋喃糖、来苏呋喃糖、核呋喃糖和木呋喃糖; 以及吡喃糖 (C<sub>6</sub>) , 如阿洛吡喃糖 (allopyranose)、阿卓吡喃糖 (altropyranose)、葡萄吡喃糖、甘露吡喃糖、古洛吡喃糖 (gulopyranose)、艾杜吡喃糖 (idopyranose)、半乳吡喃糖以及太洛吡喃糖 (talopyranose) 。

[0131] C<sub>5-20</sub>芳基: 如本文所用的术语“C<sub>5-20</sub>芳基”涉及通过从芳族化合物的芳族环原子处移除氢原子获得的一价部分, 所述部分具有3至20个环原子。如本文所用的术语“C<sub>5-7</sub>芳基”涉及通过从芳族化合物的芳族环原子处移除氢原子获得的一价部分, 所述部分具有5至7个环原子并且如本文所用的术语“C<sub>5-10</sub>芳基”涉及通过从芳族化合物的芳族环原子处移除氢原子获得的一价部分, 所述部分具有5至10个环原子。优选地, 每个环具有5至7个环原子。

[0132] 在上下文中, 前缀 (例如C<sub>3-20</sub>、C<sub>5-7</sub>、C<sub>5-6</sub>、C<sub>5-10</sub>等) 表示环原子的数目或环原子的数目的范围, 无论为碳原子或杂原子。例如, 如本文所用的术语“C<sub>5-6</sub>芳基”涉及具有5或6个环原子的芳基。

[0133] 环原子可以是全部碳原子, 如在“碳芳基”中。

[0134] 碳芳基的实例包括但不限于衍生自苯 (即苯基) (C<sub>6</sub>)、萘 (C<sub>10</sub>)、薹 (azulene) (C<sub>10</sub>)、蒽 (C<sub>14</sub>)、菲 (C<sub>14</sub>)、蔡并蔡 (C<sub>18</sub>) 以及嵌二蔡 (C<sub>16</sub>) 的那些。

[0135] 包括其中至少一个为芳环的稠环的芳基的实例包括但不限于衍生自茛满 (例如2, 3-二氢-1H-茛) (C<sub>9</sub>)、茛 (C<sub>9</sub>)、异茛 (C<sub>9</sub>)、四氢化蔡 (1, 2, 3, 4-四氢蔡 (C<sub>10</sub>)、二氢茛 (C<sub>12</sub>)、茛 (C<sub>13</sub>)、非那烯 (phenalene) (C<sub>13</sub>)、醋菲 (acephenanthrene) (C<sub>15</sub>) 以及醋蒽 (aceanthrene) (C<sub>16</sub>) 的基团。

[0136] 另选地, 环原子可包括一个或多个杂原子, 如在“杂芳基”中。单环杂芳基的实例包括但不限于衍生自以下的那些:

[0137] N<sub>1</sub>: 吡咯 (唑) (C<sub>5</sub>)、吡啶 (吡嗪) (C<sub>6</sub>) ;

[0138] O<sub>1</sub>: 呋喃 (氧杂环戊二烯) (C<sub>5</sub>) ;

[0139] S<sub>1</sub>: 噻吩 (硫醇) (C<sub>5</sub>) ;

[0140] N<sub>1</sub>O<sub>1</sub>: 噁唑 (C<sub>5</sub>)、异噁唑 (C<sub>5</sub>)、异噁嗪 (C<sub>6</sub>) ;

[0141] N<sub>2</sub>O<sub>1</sub>: 噁二唑 (呋咱) (C<sub>5</sub>) ;

[0142] N<sub>3</sub>O<sub>1</sub>: 噁三唑 (C<sub>5</sub>) ;

[0143] N<sub>1</sub>S<sub>1</sub>: 噻唑 (C<sub>5</sub>)、异噻唑 (C<sub>5</sub>) ;

[0144] N<sub>2</sub>: 咪唑 (1, 3-二唑) (C<sub>5</sub>)、吡唑 (1, 2-二唑) (C<sub>5</sub>)、哒嗪 (1, 2-二嗪) (C<sub>6</sub>)、嘧啶 (1, 3-二嗪) (C<sub>6</sub>) (例如, 胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶)、吡嗪 (1, 4-二嗪) (C<sub>6</sub>) ;



[0145]  $N_3$ : 三唑 ( $C_5$ )、三嗪 ( $C_6$ ) ; 以及,

[0146]  $N_4$ : 四唑 ( $C_5$ ) 。

[0147] 包含稠环的杂芳基的实例包括但不限于:

[0148]  $C_9$  (具有2个稠环), 其衍生自苯并呋喃 ( $O_1$ )、异苯并呋喃 ( $O_1$ )、吡咯 ( $N_1$ )、异吡咯 ( $N_1$ )、中氮茚 ( $N_1$ )、吡咯啉 ( $N_1$ )、异吡咯啉 ( $N_1$ )、嘌呤 ( $N_4$ ) (例如, 腺嘌呤、鸟嘌呤)、苯并咪唑 ( $N_2$ )、吡唑 ( $N_2$ )、苯并噁唑 ( $N_1O_1$ )、苯并异噁唑 ( $N_1O_1$ )、苯并二噁茂 ( $O_2$ )、苯并呋喃 ( $N_2O_1$ )、苯并三唑 ( $N_3$ )、苯并硫代呋喃 ( $S_1$ )、苯并噻唑 ( $N_1S_1$ )、苯并噻二唑 ( $N_2S$ ) ;

[0149]  $C_{10}$  (具有2个稠环), 其衍生自苯并吡喃 ( $O_1$ )、异苯并吡喃 ( $O_1$ )、苯并二氢吡喃 ( $O_1$ )、异苯并二氢吡喃 ( $O_1$ )、苯并噁烷 ( $O_2$ )、喹啉 ( $N_1$ )、异喹啉 ( $N_1$ )、喹啉 ( $N_1$ )、苯并噁啉 ( $N_1O_1$ )、苯并二嗪 ( $N_2$ )、吡啶并吡啶 ( $N_2$ )、喹啉 ( $N_2$ )、喹啉 ( $N_2$ )、噌啉 ( $N_2$ )、酞嗪 ( $N_2$ )、二氮杂萘 ( $N_2$ )、蝶啶 ( $N_4$ ) ;

[0150]  $C_{11}$  (具有2个稠环), 其衍生自苯并二氮杂萘 ( $N_2$ ) ;

[0151]  $C_{13}$  (具有3个稠环), 其衍生自吡啶 ( $N_1$ )、二苯并呋喃 ( $O_1$ )、二苯并噻吩 ( $S_1$ )、吡啶 ( $N_2$ )、萘嵌间二氮杂萘 ( $N_2$ )、吡啶并吡啶 ( $N_2$ ) ; 以及,

[0152]  $C_{14}$  (具有3个稠环), 其衍生自吡啶 ( $N_1$ )、咕吨 ( $O_1$ )、噻吨 ( $S_1$ )、二苯并对二噁英 (oxanthrene) ( $O_2$ )、氧硫杂蒽 ( $O_1S_1$ )、吩嗪 ( $N_2$ )、吩噻嗪 ( $N_1O_1$ )、吩噻嗪 ( $N_1S_1$ )、噻蒽 ( $S_2$ )、菲啶 ( $N_1$ )、菲咯啉 ( $N_2$ )、吩嗪 ( $N_2$ ) 。

[0153] 无论单独或为另一取代基的一部分的以上基团均可自身任选被一个或多个选自自身及以下列出的其他取代基的基团取代。

[0154] 卤素: -F、-Cl、-Br 和 -I。

[0155] 羟基: -OH。

[0156] 醚: -OR, 其中R是醚取代基, 例如,  $C_{1-7}$ 烷基 (也称为 $C_{1-7}$ 烷氧基, 以下进行讨论)、 $C_{3-20}$ 杂环基 (也称为 $C_{3-20}$ 杂环氧基) 或 $C_{5-20}$ 芳基 (也称为 $C_{5-20}$ 芳基氧基), 优选 $C_{1-7}$ 烷基。

[0157] 烷氧基: -OR, 其中R为烷基, 例如,  $C_{1-7}$ 烷基。 $C_{1-7}$ 烷氧基的实例包括但不限于 -OMe (甲氧基)、-OEt (乙氧基)、-O (nPr) (正丙氧基)、-O (iPr) (异丙氧基)、-O (nBu) (正丁氧基)、-O (sBu) (仲丁氧基)、-O (iBu) (异丁氧基) 以及 -O (tBu) (叔丁氧基)。

[0158] 缩醛: -CH (OR<sup>1</sup>) (OR<sup>2</sup>), 其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>独立地为缩醛取代基, 例如,  $C_{1-7}$ 烷基、 $C_{3-20}$ 杂环基或 $C_{5-20}$ 芳基, 优选 $C_{1-7}$ 烷基, 或在“环状”缩醛基团的情况下, R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>, 与它们所连接的两个氧原子, 和它们所连接的碳原子一起, 形成具有4至8个环原子的杂环。缩醛基团的实例包括但不限于 -CH (OMe)<sub>2</sub>、-CH (OEt)<sub>2</sub> 和 -CH (OMe) (OEt) 。

[0159] 半缩醛: -CH (OH) (OR<sup>1</sup>), 其中R<sup>1</sup>为半缩醛取代基, 例如,  $C_{1-7}$ 烷基、 $C_{3-20}$ 杂环基或 $C_{5-20}$ 芳基, 优选 $C_{1-7}$ 烷基。半缩醛基团的实例包括但不限于 -CH (OH) (OMe) 和 -CH (OH) (OEt) 。

[0160] 缩酮: -CR (OR<sup>1</sup>) (OR<sup>2</sup>), 其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>如对于缩醛所定义, 并且R 是除氢之外的缩酮取代基, 例如,  $C_{1-7}$ 烷基、 $C_{3-20}$ 杂环基或 $C_{5-20}$ 芳基, 优选 $C_{1-7}$ 烷基。缩酮基团的实例包括但不限于 -C (Me) (OMe)<sub>2</sub>、-C (Me) (OEt)<sub>2</sub>、-C (Me) (OMe) (OEt)、-C (Et) (OMe)<sub>2</sub>、-C (Et) (OEt)<sub>2</sub> 以及 -C (Et) (OMe) (OEt) 。

[0161] 半缩酮: -CR (OH) (OR<sup>1</sup>), 其中R<sup>1</sup>如对于半缩醛所定义, 并且R 是除氢之外的半缩酮取代基, 例如,  $C_{1-7}$ 烷基、 $C_{3-20}$ 杂环基或 $C_{5-20}$ 芳基, 优选 $C_{1-7}$ 烷基。半缩酮基团的实例包括但不限于 -C (Me) (OH) (OMe)、-C (Et) (OH) (OMe)、-C (Me) (OH) (OEt) 以及 -C (Et) (OH) (OEt) 。

[0162] 氧代基(酮、-酮):  $=O$ 。

[0163] 硫酮(thione)(硫酮(thio ketone)):  $=S$ 。

[0164] 亚氨基(亚胺):  $=NR$ , 其中R为亚氨基取代基, 例如, 氢、 $C_{1-7}$ 烷基、 $C_{3-20}$ 杂环基或 $C_{5-20}$ 芳基, 优选氢或 $C_{1-7}$ 烷基。酯基的实例包括但不限于 $=NH$ 、 $=NMe$ 、 $=NEt$ 及 $=NPh$ 。

[0165] 甲酰基(醛、甲醛):  $-C(=O)H$ 。

[0166] 酰基(酮基):  $-C(=O)R$ , 其中R是酰基取代基, 例如,  $C_{1-7}$ 烷基(也称为 $C_{1-7}$ 烷基酰基或 $C_{1-7}$ 烷酰基)、 $C_{3-20}$ 杂环基(也称为 $C_{3-20}$ 杂环酰基)或 $C_{5-20}$ 芳基(也称为 $C_{5-20}$ 芳基酰基), 优选 $C_{1-7}$ 烷基。酰基的实例包括但不限于 $-C(=O)CH_3$ (乙酰基)、 $-C(=O)CH_2CH_3$ (丙酰基)、 $-C(=O)C(CH_3)_3$ (叔丁酰基)和 $-C(=O)Ph$ (苯甲酰基、酰苯基(phenone))。

[0167] 羧基(羧酸):  $-C(=O)OH$ 。

[0168] 硫代羧基(硫代羧酸):  $-C(=S)SH$ 。

[0169] 硫醇羧基(硫醇羧酸):  $-C(=O)SH$ 。

[0170] 硫酮羧基(硫酮羧酸):  $-C(=S)OH$ 。

[0171] 亚胺酸:  $-C(=NH)OH$ 。

[0172] 异羟肟酸:  $-C(=NOH)OH$ 。

[0173] 酯(羧酸酯、羧酸的酯、氧羰基):  $-C(=O)OR$ , 其中R是酯取代基, 例如,  $C_{1-7}$ 烷基、 $C_{3-20}$ 杂环基或 $C_{5-20}$ 芳基, 优选 $C_{1-7}$ 烷基。酯基的实例包括但不限于 $-C(=O)OCH_3$ 、 $-C(=O)OCH_2CH_3$ 、 $-C(=O)OC(CH_3)_3$ 和 $-C(=O)OPh$ 。

[0174] 酰氧基(反酯):  $-OC(=O)R$ , 其中R是酰氧基取代基, 例如,  $C_{1-7}$ 烷基、 $C_{3-20}$ 杂环基或 $C_{5-20}$ 芳基, 优选 $C_{1-7}$ 烷基。酰氧基的实例包括但不限于 $-OC(=O)CH_3$ (乙酰氧基)、 $-OC(=O)CH_2CH_3$ 、 $-OC(=O)C(CH_3)_3$ 、 $-OC(=O)Ph$ 和 $-OC(=O)CH_2Ph$ 。

[0175] 氧基羰基氧基:  $-OC(=O)OR$ , 其中R是酯取代基, 例如,  $C_{1-7}$ 烷基、 $C_{3-20}$ 杂环基或 $C_{5-20}$ 芳基, 优选 $C_{1-7}$ 烷基。酯基的实例包括但不限于 $-OC(=O)OCH_3$ 、 $-OC(=O)OCH_2CH_3$ 、 $-OC(=O)OC(CH_3)_3$ 和 $-OC(=O)OPh$ 。

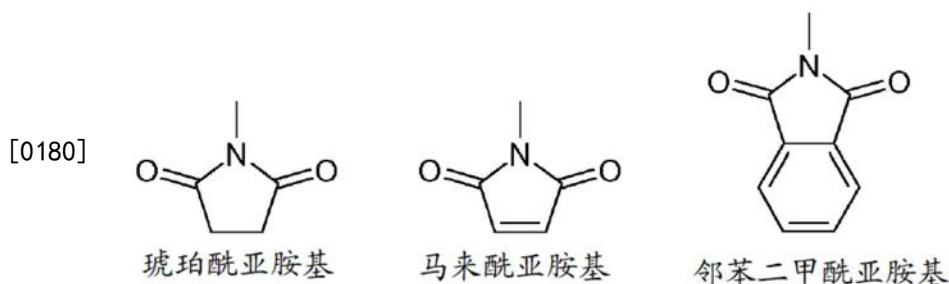
[0176] 氨基:  $-NR^1R^2$ , 其中 $R^1$ 和 $R^2$ 独立地为氨基取代基, 例如, 氢、 $C_{1-7}$ 烷基(也称为 $C_{1-7}$ 烷基氨基或二- $C_{1-7}$ 烷基氨基)、 $C_{3-20}$ 杂环基或 $C_{5-20}$ 芳基, 优选H或 $C_{1-7}$ 烷基, 或, 在“环状”氨基的情况下,  $R^1$ 和 $R^2$ 与它们所连接的氮原子一起形成具有4至8个环原子的杂环。氨基可以是伯( $-NH_2$ )、仲( $-NHR^1$ )或叔( $-NHR^1R^2$ ), 并且在阳离子形式中, 可以是季( $-^+NR^1R^2R^3$ )。氨基的实例包括但不限于 $-NH_2$ 、 $-NHCH_3$ 、 $-NHC(CH_3)_2$ 、 $-N(CH_3)_2$ 、 $-N(CH_2CH_3)_2$ 和 $-NPh$ 。环状氨基的实例包括但不限于氮杂环丙烷基、氮杂环丁烷基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉代以及硫吗啉代。

[0177] 酰氨基(氨基甲酰基、氨甲酰基、氨基羰基、羧基酰胺):  $-C(=O)NR^1R^2$ , 其中 $R^1$ 和 $R^2$ 独立地为氨基取代基, 如对于氨基所定义。酰氨基的实例包括但不限于 $-C(=O)NH_2$ 、 $-C(=O)NHCH_3$ 、 $-C(=O)N(CH_3)_2$ 、 $-C(=O)NHCH_2CH_3$ 和 $-C(=O)N(CH_2CH_3)_2$ , 以及其中 $R^1$ 和 $R^2$ 与它们所连接的氮原子一起形成杂环结构的酰氨基, 例如哌啶基羰基、吗啉代羰基、硫吗啉代羰基和哌嗪基羰基。

[0178] 硫代酰氨基(硫代氨甲酰基):  $-C(=S)NR^1R^2$ , 其中 $R^1$ 和 $R^2$ 独立地为氨基取代基, 如对于氨基所定义。酰氨基的实例包括但不限于 $-C(=S)NH_2$ 、 $-C(=S)NHCH_3$ 、 $-C(=S)N(CH_3)_2$ 和 $-C(=S)NHCH_2CH_3$ 。

[0179] 酰氨基(Acylamido)(酰基氨基(acylamino)):  $-NR^1C(=O)R^2$ , 其中 $R^1$ 是酰胺取代

基,例如,氢、 $C_{1-7}$ 烷基、 $C_{3-20}$ 杂环基或 $C_{5-20}$ 芳基,优选氢或 $C_{1-7}$ 烷基,并且 $R^2$ 是酰基取代基,例如, $C_{1-7}$ 烷基、 $C_{3-20}$ 杂环基或 $C_{5-20}$ 芳基,优选氢或 $C_{1-7}$ 烷基。酰基酰胺基团的实例包括但不限于 $-NHC(=O)CH_3$ 、 $-NHC(=O)CH_2CH_3$ 和 $-NHC(=O)Ph$ 。 $R^1$ 和 $R^2$ 可一起形成环状结构,如例如在琥珀酰亚胺基、马来酰亚胺基和邻苯二甲酰亚胺基中:

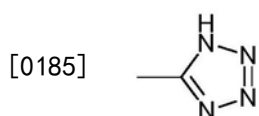


[0181] 氨基羰基氧基:  $-OC(=O)NR^1R^2$ , 其中 $R^1$ 和 $R^2$ 独立地为氨基取代基, 如对于氨基所定义。氨基羰基氧基的实例包括但不限于  $-OC(=O)NH_2$ 、 $-OC(=O)NHMe$ 、 $-OC(=O)NMe_2$  和  $-OC(=O)NEt_2$ 。

[0182] 脲基:  $-N(R^1)CONR^2R^3$ , 其中 $R^2$ 和 $R^3$ 独立地为氨基取代基, 如对于氨基所定义, 并且 $R^1$ 是脲基取代基, 例如, 氢、 $C_{1-7}$ 烷基、 $C_{3-20}$ 杂环基或 $C_{5-20}$ 芳基, 优选氢或 $C_{1-7}$ 烷基。脲基的实例包括但不限于  $-NHCONH_2$ 、 $-NHCONHMe$ 、 $-NHCONHEt$ 、 $-NHCONMe_2$ 、 $-NHCONEt_2$ 、 $-NMeCONH_2$ 、 $-NMeCONHMe$ 、 $-NMeCONHEt$ 、 $-NMeCONMe_2$  和  $-NMeCONEt_2$ 。

[0183] 胍基:  $-NH-C(=NH)NH_2$ 。

[0184] 四唑基: 具有四个氮原子和一个碳原子的五元芳环,



[0186] 亚氨基:  $=NR$ , 其中 $R$ 为亚氨基取代基, 例如, 氢、 $C_{1-7}$ 烷基、 $C_{3-20}$ 杂环基或 $C_{5-20}$ 芳基, 优选 $H$ 或 $C_{1-7}$ 烷基。亚氨基的实例包括但不限于  $=NH$ 、 $=NMe$  和  $=NEt$ 。

[0187] 脒(脒基):  $-C(=NR)NR_2$ , 其中每个 $R$ 为脒取代基, 例如, 氢、 $C_{1-7}$ 烷基、 $C_{3-20}$ 杂环基或 $C_{5-20}$ 芳基, 优选 $H$ 或 $C_{1-7}$ 烷基。脒基团的实例包括但不限于  $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(=NH)NMe_2$  和  $-C(=NMe)NMe_2$ 。

[0188] 硝基:  $-NO_2$ 。

[0189] 亚硝基:  $-NO$ 。

[0190] 叠氮基:  $-N_3$ 。

[0191] 氰基(腈、甲腈):  $-CN$ 。

[0192] 异氰基:  $-NC$ 。

[0193] 氰酰基:  $-OCN$ 。

[0194] 异氰酰基:  $-NCO$ 。

[0195] 氰硫基(硫氰酰基):  $-SCN$ 。

[0196] 异氰硫基(异硫氰酰基):  $-NCS$ 。

[0197] 巯氢基(Sulfhydryl)(巯基(thiol)、巯基(mercapto)):  $-SH$ 。

[0198] 硫醚(Thioether)(硫醚(sulfide)):  $-SR$ , 其中 $R$ 为硫醚取代基, 例如, $C_{1-7}$ 烷基(也称为 $C_{1-7}$ 烷硫基)、 $C_{3-20}$ 杂环基或 $C_{5-20}$ 芳基, 优选 $C_{1-7}$ 烷基。 $C_{1-7}$ 烷硫基的实例包括但不限于-

SCH<sub>3</sub>和-SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>。

[0199] 二硫醚:-SS-R,其中R为二硫醚取代基,例如,C<sub>1-7</sub>烷基、C<sub>3-20</sub>杂环基或C<sub>5-20</sub>芳基,优选C<sub>1-7</sub>烷基(本文也称为C<sub>1-7</sub>烷基二硫醚)。C<sub>1-7</sub>烷基二硫醚基团的实例包括但不限于-SSCH<sub>3</sub>和-SSCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>。

[0200] 钼化物(亚磺酰基、亚磺):-S(=O)R,其中R为钼化物取代基,例如,C<sub>1-7</sub>烷基、C<sub>3-20</sub>杂环基或C<sub>5-20</sub>芳基,优选C<sub>1-7</sub>烷基。钼化物基团的实例包括但不限于-S(=O)CH<sub>3</sub>和-S(=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>。

[0201] 砷(磺酰基):-S(=O)<sub>2</sub>R,其中R为砷取代基,例如,C<sub>1-7</sub>烷基、C<sub>3-20</sub>杂环基或C<sub>5-20</sub>芳基,优选C<sub>1-7</sub>烷基,包括例如氟化或全氟化的C<sub>1-7</sub>烷基。砷基团的实例包括但不限于-S(=O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>(甲基磺酰基、甲磺酰基)、-S(=O)<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>(三氟甲磺酰基)、-S(=O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>(乙磺酰基)、-S(=O)<sub>2</sub>C<sub>4</sub>F<sub>9</sub>(九氟丁磺酰基)、-S(=O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>(三氟乙磺酰基)、-S(=O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>(牛磺酰基)、-S(=O)<sub>2</sub>Ph(苯基磺酰基、苯磺酰基)、4-甲基苯基磺酰基(甲苯磺酰基)、4-氯苯基磺酰基(氯苯磺酰基)、4-溴苯基磺酰基(溴苯磺酰基)、4-硝基苯基磺酰基(硝苯磺酰基)、2-萘磺酸酯(萘磺酰基)以及5-二甲基氨基-萘-1-基磺酸酯(丹磺酰基)。

[0202] 亚磺酸(亚磺基):-S(=O)OH、-SO<sub>2</sub>H。

[0203] 磺酸(磺基):-S(=O)<sub>2</sub>OH、-SO<sub>3</sub>H。

[0204] 亚磺酸酯(亚磺酸的酯):-S(=O)OR,其中R为亚磺酸酯取代基,例如,C<sub>1-7</sub>烷基、C<sub>3-20</sub>杂环基或C<sub>5-20</sub>芳基,优选C<sub>1-7</sub>烷基。亚磺酸酯基团的实例包括但不限于-S(=O)OCH<sub>3</sub>(甲氧基亚磺酰基;甲基亚磺酸酯)和-S(=O)OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>(乙氧基亚磺酰基;乙基亚磺酸酯)。

[0205] 磺酸酯(磺酸的酯):-S(=O)<sub>2</sub>OR,其中R为磺酸酯取代基,例如,C<sub>1-7</sub>烷基、C<sub>3-20</sub>杂环基或C<sub>5-20</sub>芳基,优选C<sub>1-7</sub>烷基。磺酸酯基团的实例包括但不限于-S(=O)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>(甲氧基磺酰基;甲基磺酸酯)和-S(=O)<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>(乙氧基磺酰基;乙基磺酸酯)。

[0206] 亚磺酰氧基:-OS(=O)R,其中R为亚磺酰氧基取代基,例如,C<sub>1-7</sub>烷基、C<sub>3-20</sub>杂环基或C<sub>5-20</sub>芳基,优选C<sub>1-7</sub>烷基。亚磺酰氧基的实例包括但不限于-OS(=O)CH<sub>3</sub>和-OS(=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>。

[0207] 磺酰氧基:-OS(=O)<sub>2</sub>R,其中R为磺酰氧基取代基,例如,C<sub>1-7</sub>烷基、C<sub>3-20</sub>杂环基或C<sub>5-20</sub>芳基,优选C<sub>1-7</sub>烷基。磺酰氧基的实例包括但不限于-OS(=O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>(甲磺酸酯)和-OS(=O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>(乙磺酸酯)。

[0208] 硫酸酯:-OS(=O)<sub>2</sub>OR;其中R为硫酸酯取代基,例如,C<sub>1-7</sub>烷基、C<sub>3-20</sub>杂环基或C<sub>5-20</sub>芳基,优选C<sub>1-7</sub>烷基。硫酸酯基团的实例包括但不限于-OS(=O)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>和-SO(=O)<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>。

[0209] 氨磺酰基(氨磺酰;亚磺酰胺;亚磺酰胺):-S(=O)NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>,其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>独立地为氨基取代基,如对于氨基所定义。氨磺酰基的实例包括但不限于-S(=O)NH<sub>2</sub>、-S(=O)NH(CH<sub>3</sub>)、-S(=O)N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-S(=O)NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、-S(=O)N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>和-S(=O)NHPh。

[0210] 磺酰氨基(Sulfonamido)(氨亚磺酰基;磺酰胺;磺酰胺):-S(=O)<sub>2</sub>NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>,其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>独立地为氨基取代基,如对于氨基所定义。磺酰氨基的实例包括但不限于-S(=O)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-S(=O)<sub>2</sub>NH(CH<sub>3</sub>)、-S(=O)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-S(=O)<sub>2</sub>NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、-S(=O)<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>和-S(=O)<sub>2</sub>NHPh。

[0211] 磺氨基:-NR<sup>1</sup>S(=O)<sub>2</sub>OH,其中R<sup>1</sup>为氨基取代基,如对于氨基所定义。磺氨基的实例包括但不限于-NHS(=O)<sub>2</sub>OH和-N(CH<sub>3</sub>)S(=O)<sub>2</sub>OH。

[0212] 磺酰基氨基 (Sulfonamino) :  $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})_2\text{R}$ , 其中  $\text{R}^1$  为氨基取代基, 如对于氨基所定义, 并且  $\text{R}$  为磺酰基氨基取代基, 例如,  $\text{C}_{1-7}$  烷基、 $\text{C}_{3-20}$  杂环基或  $\text{C}_{5-20}$  芳基, 优选  $\text{C}_{1-7}$  烷基。磺酰基氨基的实例包括但不限于  $-\text{NHS}(=\text{O})_2\text{CH}_3$  和  $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})_2\text{C}_6\text{H}_5$ 。

[0213] 亚磺酰基氨基 (Sulfinamino) :  $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})\text{R}$ , 其中  $\text{R}^1$  为氨基取代基, 如对于氨基所定义, 并且  $\text{R}$  为亚磺酰基氨基取代基, 例如,  $\text{C}_{1-7}$  烷基、 $\text{C}_{3-20}$  杂环基或  $\text{C}_{5-20}$  芳基, 优选  $\text{C}_{1-7}$  烷基。亚磺酰基氨基的实例包括但不限于  $-\text{NHS}(=\text{O})\text{CH}_3$  和  $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})\text{C}_6\text{H}_5$ 。

[0214] 膦基 (膦) :  $-\text{PR}_2$ , 其中  $\text{R}$  为膦基取代基, 例如,  $-\text{H}$ 、 $\text{C}_{1-7}$  烷基、 $\text{C}_{3-20}$  杂环基或  $\text{C}_{5-20}$  芳基, 优选  $-\text{H}$ 、 $\text{C}_{1-7}$  烷基或  $\text{C}_{5-20}$  芳基。膦基的实例包括但不限于  $-\text{PH}_2$ 、 $-\text{P}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{P}(\text{t-Bu})_2$  和  $-\text{P}(\text{Ph})_2$ 。

[0215] 磷基 :  $-\text{P}(=\text{O})_2$ 。

[0216] 氧膦基 (氧化膦) :  $-\text{P}(=\text{O})\text{R}_2$ , 其中  $\text{R}$  为氧膦基取代基, 例如,  $\text{C}_{1-7}$  烷基、 $\text{C}_{3-20}$  杂环基或  $\text{C}_{5-20}$  芳基, 优选  $\text{C}_{1-7}$  烷基或  $\text{C}_{5-20}$  芳基。氧膦基的实例包括但不限于  $-\text{P}(=\text{O})(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{t-Bu})_2$  和  $-\text{P}(=\text{O})(\text{Ph})_2$ 。

[0217] 膦酸 (膦酰基) :  $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})_2$ 。

[0218] 膦酸酯 (膦酰基酯) :  $-\text{P}(=\text{O})(\text{OR})_2$ , 其中  $\text{R}$  为膦酸酯取代基, 例如,  $-\text{H}$ 、 $\text{C}_{1-7}$  烷基、 $\text{C}_{3-20}$  杂环基或  $\text{C}_{5-20}$  芳基, 优选  $-\text{H}$ 、 $\text{C}_{1-7}$  烷基或  $\text{C}_{5-20}$  芳基。膦酸酯基团的实例包括但不限于  $-\text{P}(=\text{O})(\text{OCH}_3)_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{O-t-Bu})_2$  和  $-\text{P}(=\text{O})(\text{OPh})_2$ 。

[0219] 磷酸 (膦酰基氧基) :  $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OH})_2$ 。

[0220] 磷酸酯 (膦酰基氧基酯) :  $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR})_2$ , 其中  $\text{R}$  为磷酸酯取代基, 例如,  $-\text{H}$ 、 $\text{C}_{1-7}$  烷基、 $\text{C}_{3-20}$  杂环基或  $\text{C}_{5-20}$  芳基, 优选  $-\text{H}$ 、 $\text{C}_{1-7}$  烷基或  $\text{C}_{5-20}$  芳基。磷酸酯基团的实例包括但不限于  $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_3)_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{O-t-Bu})_2$  和  $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OPh})_2$ 。

[0221] 亚磷酸 :  $-\text{OP}(\text{OH})_2$ 。

[0222] 亚磷酸酯 :  $-\text{OP}(\text{OR})_2$ , 其中  $\text{R}$  为亚磷酸酯取代基, 例如,  $-\text{H}$ 、 $\text{C}_{1-7}$  烷基、 $\text{C}_{3-20}$  杂环基或  $\text{C}_{5-20}$  芳基, 优选  $-\text{H}$ 、 $\text{C}_{1-7}$  烷基或  $\text{C}_{5-20}$  芳基。亚磷酸酯基团的实例包括但不限于  $-\text{OP}(\text{OCH}_3)_2$ 、 $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{OP}(\text{O-t-Bu})_2$  和  $-\text{OP}(\text{OPh})_2$ 。

[0223] 亚磷酰胺 :  $-\text{OP}(\text{OR}^1)-\text{NR}^2_2$ , 其中  $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  为亚磷酰胺取代基, 例如,  $-\text{H}$ 、(任选取代的)  $\text{C}_{1-7}$  烷基、 $\text{C}_{3-20}$  杂环基或  $\text{C}_{5-20}$  芳基, 优选  $-\text{H}$ 、 $\text{C}_{1-7}$  烷基或  $\text{C}_{5-20}$  芳基。亚磷酰胺基团的实例包括但不限于  $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{N}(\text{i-Pr})_2$  和  $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})-\text{N}(\text{i-Pr})_2$ 。

[0224] 磷酰胺 :  $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR}^1)-\text{NR}^2_2$ , 其中  $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  为磷酰胺取代基, 例如,  $-\text{H}$ 、(任选取代的)  $\text{C}_{1-7}$  烷基、 $\text{C}_{3-20}$  杂环基或  $\text{C}_{5-20}$  芳基, 优选  $-\text{H}$ 、 $\text{C}_{1-7}$  烷基或  $\text{C}_{5-20}$  芳基。磷酰胺基团的实例包括但不限于  $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{N}(\text{i-Pr})_2$  和  $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})-\text{N}(\text{i-Pr})_2$ 。

[0225] 亚烷基

[0226]  $\text{C}_{3-12}$  亚烷基 : 如本文所用的术语“ $\text{C}_{3-12}$  亚烷基”涉及通过从具有 3 至 12 个碳原子 (除非另外指出) 的烃化合物上移除 2 个氢原子 (从同一个碳原子处移除两个氢原子或从两个不同碳原子处各移除一个氢原子) 而获得的双齿物部分, 其可以是脂族的或脂环族的, 并且可以是饱和的、部分不饱和的或完全不饱和的。因此, 术语“亚烷基”包括以下论述的亚类亚烯基、亚炔基、亚环烷基等。

[0227] 直链饱和  $\text{C}_{3-12}$  亚烷基的实例包括但不限于  $-(\text{CH}_2)_n-$ , 其中  $n$  为 3 至 12 的整数, 例

如,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$  (亚丙基)、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$  (亚丁基)、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$  (亚戊基) 和  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$  (亚庚基)。

[0228] 支链饱和 $\text{C}_{3-12}$ 亚烷基的实例包括但不限于  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2-$  和  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ 。

[0229] 直链部分不饱和的 $\text{C}_{3-12}$ 亚烷基( $\text{C}_{3-12}$ 亚烯基和亚炔基)的实例包括但不限于  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$  和  $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-$ 。

[0230] 支链部分不饱和的 $\text{C}_{3-12}$ 亚烷基( $\text{C}_{3-12}$ 亚烯基和亚炔基)的实例包括但不限于  $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}(\text{CH}_3)-$  和  $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ 。

[0231] 脂环族饱和的 $\text{C}_{3-12}$ 亚烷基( $\text{C}_{3-12}$ 亚环烷基)的实例包括但不限于亚环戊基(例如亚环戊-1,3-基)和亚环己基(例如,亚环己-1,4-基)。

[0232] 脂环族部分不饱和的 $\text{C}_{3-12}$ 亚烷基( $\text{C}_{3-12}$ 亚环烷基)的实例包括但不限于亚环戊烯基(例如4-亚环戊烯-1,3-基)、亚环己烯基(例如2-亚环己烯-1,4-基;3-亚环己烯-1,2-基;2,5-亚环己二烯-1,4-基)。

[0233] 配体单元

[0234] 用于在本发明中使用的配体单元是细胞结合剂,更具体地为在每条重链上具有至少一个缀合位点的经修饰抗体、或其抗原结合片段。根据本发明适用的特定的经修饰抗体的实例公开于W0 2012/064733 (作为PCT/US2011/059775提交)中,其以引用方式并入本文。

[0235] 抗体

[0236] 术语“抗体”在本文中是在最广泛的意义上加以使用并且具体地涵盖单克隆抗体、多克隆抗体、二聚体、多聚体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、和抗体片段,只要它们显示所期望的生物活性(Miller等(2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861)。抗体可以是鼠、人、人源化、嵌合抗体,或源于其他物种。抗体是由免疫系统生成的蛋白质,其能够识别和结合于特异性抗原(Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 第5版, Garland Publishing, New York)。靶抗原通常具有由在多种抗体上的CDR所识别的许多结合位点,还被称为表位。特异性地结合于不同表位的每种抗体具有不同的结构。因此,一种抗原可以具有多于一种的相应的抗体。抗体包括全长免疫球蛋白分子或全长免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即,一种分子,其包含免疫特异性地结合感兴趣的靶的抗原或其部分的抗原结合位点,这样的靶包括但不限于癌细胞或产生与自身免疫疾病相关的自身免疫抗体的细胞。免疫球蛋白可以是任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、和IgA)、类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或免疫球蛋白分子的亚类。免疫球蛋白可以源自任何物种,包括人、鼠、或兔起源。

[0237] “抗体片段”包含全长抗体的一部分,通常为其抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 和scFv片段,以及以上任一者的免疫特异性地结合于癌细胞抗原、病毒抗原或微生物抗原的二聚体表位结合片段、单链抗体分子;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0238] 适于在本发明使用的经修饰抗体包括其中天然链间半胱氨酸残基被取代为缺乏硫醇基团的氨基酸残基的那些。抗体可在每条重链中包括包含适用于与接头缀合的反应性基团的氨基酸残基的至少一个另外的取代。另外取代的氨基酸可以是半胱氨酸或非天然氨基酸。被取代的位置可选自下文列出的那些：

抗体	同种型	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
[0239] 位置 (Kabat EU) 和 对应氨基酸	239	Ser	Ser	Ser	Ser
	282	Val	Val	Val	Val
	289	Thr	Thr	Thr	Thr
	297	Asn	Asn	Asn	Asn
	312	Asp	Asp	Asp	Asp
[0240]	324	Ser	Ser	Ser	Ser
	330	Ala	Ala	Ala	Ser
	335	Thr	Thr	Thr	Thr
	337	Ser	Ser	Ser	Ser
	339	Ala	Thr	Thr	Ala
	356	Glu	Glu	Glu	Glu
	359	Thr	Thr	Thr	Thr
	361	Asn	Asn	Asn	Asn
	383	Ser	Ser	Ser	Ser
	384	Asn	Asn	Ser	Asn
	398	Leu	Leu	Leu	Leu
	400	Ser	Ser	Ser	Ser
	422	Val	Val	Ile	Val
	440	Ser	Ser	Ser	Ser
	442	Ser	Ser	Ser	Ser

[0241] 适于在本发明使用的经修饰抗体的实例包括在被并入本文的 WO 2012/064733 中公开的 Flexmab 结构。此类 Flexmab 在抗体的铰链区中包括具有游离硫醇基团的半胱氨酸，其可用作用于通过本发明的 PBD 的 N10 基团连接的缀合位点。

[0242] 适用于本发明的经修饰抗体的其他实例包括其中半胱氨酸已经插入抗体中的选定位点中的那些。这些抗体描述于 Dimasi, N. 等, Molecular Pharmaceuticals, 2017, 14, 1501-1516 (DOI:10.1021/acs.molpharmaceut.6b00995) 和 WO2015/157595 中。具体地，已经通过在 S239 位之后 (即, 239 位与 240 位之间) 插入半胱氨酸进行修饰的抗体是有用的。

[0243] 参考被并入本文的 WO 2012/064733 的第 60 页和第 62 页中所列。在一些实施方案中，抗体可以是肿瘤相关抗原，例如：HER2 (ErbB2)；EPhA2 (EPH 受体 A2)；CD19；IL2RA (白介素 2 受体,  $\alpha$ )。

[0244] 用于本发明的实施方案的肿瘤相关抗原和同源抗体在下文列出，并且更详细地描述于被并入本文的 WO 2017/186894 的第 14 页至第 86 页。

[0245] (1) BMPR1B (骨形态发生蛋白受体型 IB)

[0246] (2) E16 (LAT1, SLC7A5)

[0247] (3) STEAP1 (前列腺的六跨膜上皮抗原)

[0248] (4) 0772P (CA125, MUC16)

- [0249] (5) MPF (MPF、MSLN、SMR、巨核细胞增效因子、间皮素)
- [0250] (6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, 溶质载体家族34 (磷酸钠), 成员2, II型钠依赖性磷酸转运蛋白3b)
- [0251] (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaphorin 5b Hlog, 25sema域, 7血小板反应蛋白重复 (1型和1型样), 跨膜域(TM) 和短胞质域(semaphorin 5B))
- [0252] (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008016Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12基因)
- [0253] (9) ETBR (内皮素B型受体)
- [0254] (10) MSG783 (RNF124, 假定蛋白FLJ20315)
- [0255] (11) STEAP2 (HGNC\_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, 前列腺癌相关基因1, 前列腺癌相关蛋白1, 前列腺的六跨膜上皮抗原2, 六跨膜前列腺蛋白)
- [0256] (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, 瞬时受体电位阳离子5通道, 亚家族M, 成员4)
- [0257] (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, 畸胎瘤源性生长因子)
- [0258] (14) CD21 (CR2 (补体受体2) 或C3DR (C3d/埃-巴二氏病毒受体 (Epstein Barr virus receptor)) 或Hs.73792)
- [0259] (15) CD79b (CD79B, CD79 $\beta$ , Ig $\beta$  (免疫球蛋白相关 $\beta$ ), B29)
- [0260] (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (SH2域, 包含磷酸酶锚定蛋白1a), SPAP1B, SPAP1C)
- [0261] (17) HER2 (ErbB2)
- [0262] (18) NCA (CEACAM6)
- [0263] (19) MDP (DPEP1)
- [0264] (20) IL20R- $\alpha$  (IL20Ra, ZCYTOR7)
- [0265] (21) 短蛋白聚糖 (Brevican) (BCAN, BEHAB)
- [0266] (22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5)
- [0267] (23) ASLG659 (B7h)
- [0268] (24) PSCA (前列腺干细胞抗原前体)
- [0269] (25) GEDA
- [0270] (26) BAFF-R (B细胞活化因子受体, BLyS受体3, BR3)
- [0271] (27) CD22 (B细胞受体CD22-B同种型, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814)
- [0272] (27a) CD22 (CD22分子)
- [0273] (28) CD79a (CD79A, CD79 $\alpha$ ), 免疫球蛋白相关的 $\alpha$ 、B细胞特异性蛋白, 其共价相互作用于Ig $\beta$  (CD79B) 并在表面上形成与Ig M分子的复合物, 转导涉及B细胞分化的信号, pI: 4.84, MW: 25028TM: 2[P] 基因染色体: 19q13.2)。
- [0274] (29) CXCR5 (伯基特淋巴瘤受体1, G蛋白偶联受体, 其被CXCL13趋化因子活化, 在淋巴细胞迁移和体液性防御中起作用, 在 HIV-2感染中以及也许在AIDS、淋巴瘤、骨髓瘤、和白血病的发展中起作用); 372aa, pI: 8.54MW: 41959TM: 7[P] 基因染色体: 11q23.3,
- [0275] (30) HLA-DOB (MHC II类分子的 $\beta$ 亚基 (Ia抗原), 其结合肽并20 将它们呈递到CD4+



T淋巴细胞);273aa,pI:6.56,MW:30820.TM:1 [P]基因染色体:6p21.3)

[0276] (31) P2X5(嘌呤能受体P2X配体门控离子通道5,由细胞外ATP 门控的离子通道,可能涉及突触传递和神经发生,缺乏可能有助于特发性逼尿肌不稳定的病理生理学);422aa),pI:7.63,MW:47206TM:1 [P]基因染色体:17p13.3)。

[0277] (32) CD72(B细胞分化抗原CD72, Lyb-2);359aa,pI:8.66,MW: 40225,TM:1 5[P]基因染色体:9p13.3)。

[0278] (33) LY64(淋巴细胞抗原64(RP105),富含亮氨酸重复(LRR)家族的I型膜蛋白,调节B细胞活化和细胞凋亡,在患有系统性红斑狼疮的患者中功能的丧失相关于增加的疾病活性);661aa,pI:6.20,MW: 74147TM:1[P]基因染色体:5q12)。

[0279] (34) FcRH1(Fc受体样蛋白1,假定受体,用于免疫球蛋白Fc域,其包含C2型Ig样和ITAM域,在B淋巴细胞分化中可以具有作用);429aa,pI:5.28,MW:46925TM:1[P]基因染色体:1q21-1q22)

[0280] (35) IRTA2(免疫球蛋白超家族受体易位相关的2,假定的免疫受体,其在B细胞的发育和淋巴瘤发生中具有可能的作用;在一些B 细胞恶性疾病中发生基因的去调节(通过易位));977aa,pI:6.88,MW: 106468,TM:1[P]基因染色体:1q21)

[0281] (36) TENB2(TMEFF2,tomoregulin,TPEF,HPP1,TR,推定的跨膜蛋白多糖,涉及到生长因子和卵泡抑素的EGF/调蛋白(heregulin) 家族);374aa)

[0282] (37) PSMA-FOLH1(叶酸水解酶(前列腺特异性膜抗原)1)

[0283] (38) SST(生长抑素受体;注意:存在5种亚型)

[0284] (38.1) SSTR2(生长抑素受体2)

[0285] (38.2) SSTR5(生长抑素受体5)

[0286] (38.3) SSTR1

[0287] (38.4) SSTR3

[0288] (38.5) SSTR4

[0289] AvB6-两种亚基(39+40)

[0290] (39) ITGAV(整联蛋白, $\alpha$ V)

[0291] (40) ITGB6(整联蛋白, $\beta$ 6)

[0292] (41) CEACAM5(癌胚抗原相关细胞粘附分子5)

[0293] (42) MET(met原癌基因;肝细胞生长因子受体)

[0294] (43) MUC1(粘蛋白1(Mucin 1),细胞表面相关的)

[0295] (44) CA9(碳酸酐酶IX)

[0296] (45) EGFRvIII(表皮生长因子受体(EGFR),转录变体3,

[0297] (46) CD33(CD33分子)

[0298] (47) CD19(CD19分子)

[0299] (48) IL2RA(白细胞介素2受体, $\alpha$ );NCBI参考序列:NM\_000417.2);

[0300] (49) AXL(AXL受体酪氨酸激酶)

[0301] (50) CD30-TNFRSF8(肿瘤坏死因子受体超家族,成员8)

[0302] (51) BCMA(B细胞成熟抗原)-TNFRSF17(肿瘤坏死因子受体超家族,成员17)

[0303] (52) CT Ags-CTA(睾丸癌抗原(Cancer Testis Antigen))

- [0304] (53) CD174 (Lewis Y)-FUT3 (岩藻糖基转移酶3 (半乳糖苷3 (4)-L- 岩藻糖基转移酶, 路易斯血型)
- [0305] (54) CLEC14A (C型凝集素域家族14, 成员A; Genbank 登录号 NM175060)
- [0306] (55) GRP78-HSPA5 (热休克70kDa蛋白5 (葡萄糖调节蛋白, 78kDa)
- [0307] (56) CD70 (CD70分子) L08096
- [0308] (57) 干细胞特异性抗原。例如:
- [0309] • 5T4 (见以下条目 (63))
- [0310] • CD25 (见以下条目 (48))
- [0311] • CD32
- [0312] • LGR5/GPR49
- [0313] • Prominin/CD133
- [0314] (58) ASG-5
- [0315] (59) ENPP3 (外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶3)
- [0316] (60) PRR4 (富含脯氨酸4 (泪腺的))
- [0317] (61) GCC-GUCY2C (鸟苷酸环化酶2C (热稳定肠毒素受体)
- [0318] (62) Liv-1-SLC39A6 (溶质载体家族39 (锌转运蛋白), 成员6)
- [0319] (63) 5T4, 滋养层糖蛋白, TPBG-TPBG (滋养层糖蛋白)
- [0320] (64) CD56-NCMA1 (神经细胞粘附分子1)
- [0321] (65) CanAg (肿瘤相关抗原CA242)
- [0322] (66) FOLR1 (叶酸盐受体1)
- [0323] (67) GPNMB (糖蛋白 (跨膜) nmb)
- [0324] (68) TIM-1-HAVCR1 (甲型肝炎病毒细胞受体1)
- [0325] (69) RG-1/前列腺肿瘤靶Mindin-Mindin/RG-1
- [0326] (70) B7-H4-VTCN1 (包含T细胞活化抑制剂的V-set域1
- [0327] (71) PTK7 (PTK7蛋白酪氨酸激酶7)
- [0328] (72) CD37 (CD37分子)
- [0329] (73) CD138-SDC1 (多配体聚糖1 (syndecan 1))
- [0330] (74) CD74 (CD74分子, 主要组织相容性复合物, II类不变链)
- [0331] (75) Claudins (整合膜连接蛋白) -CLs (Claudins)
- [0332] (76) EGFR (表皮生长因子受体)
- [0333] (77) Her3 (ErbB3) -ERBB3 (v-erb-b2成红细胞白血病病毒癌基因同系物3 (禽))
- [0334] (78) RON-MST1R (巨噬细胞刺激1受体 (c-met相关酪氨酸激酶))
- [0335] (79) EPHA2 (EPH受体A2)
- [0336] (80) CD20-MS4A1 (跨膜4域, 亚家族A, 成员1)
- [0337] (81) 腱生蛋白C (肌腱蛋白C, Tenascin C) -TNC (腱生蛋白C)
- [0338] (82) FAP (成纤维细胞活化蛋白,  $\alpha$ )
- [0339] (83) DKK-1 (Dickkopf 1同系物 (光滑爪蟾, *Xenopus laevis*))
- [0340] (84) CD52 (CD52分子)
- [0341] (85) CS1-SLAMF7 (SLAM家族成员7)

[0342] (86) Endoglin-ENG (内皮糖蛋白)

[0343] (87) 膜联蛋白A1-ANXA1 (膜联蛋白A1)

[0344] (88) V-CAM (CD106) -VCAM1 (血管细胞粘附分子1)

[0345] 接头单元与配体单元的连接

[0346] 配体单元可通过二硫键与接头单元相连接。

[0347] 在一个实施方案中,配体单元与药物接头之间的连接在配体单元的半胱氨酸残基的巯基与药物接头单元的马来酰亚胺基团之间形成。用于连接的其他可能的基团和所得的连接基团在下文示出。

[0348] 配体单元的半胱氨酸残基可用于与接头单元的官能团的反应以形成连接。在其他实施方案中,例如其中配体单元为抗体,抗体的巯基可参与链间二硫键。这些链间键可通过例如在与接头单元的官能团反应之前用DTT处理抗体而转化成游离巯基。

[0349] 在一些实施方案中,将半胱氨酸残基引入抗体的重链或轻链中。通过取代将半胱氨酸插入抗体重链或轻链中的位置包括并入本文的所公布的美国申请2007-0092940和国际专利公布WO 2008/070593中所描述的那些。

[0350] 治疗方法

[0351] 本发明的化合物可以用于治疗方法。还提供了一种治疗方法,其包括将治疗有效量的式I的缀合物施用给需要治疗的受试者。术语“治疗有效量”是足以对患者显示益处的量。这样的益处可以是至少改善至少一种症状。施用的实际量以及施用的速率和时程将取决于待治疗对象的特性和严重性。治疗处方,例如,对剂量的决定,是在全科医生和其他医生的责任范围内。

[0352] 可以单独地或与其他治疗组合施用缀合物(同时或相继地,其取决于待治疗的病状)。治疗和疗法的实例包括但不限于化疗(施用活性剂,包括,例如药物;手术;以及放射疗法)。

[0353] 根据本发明和根据本发明应用的药物组合物,除活性组分(即,式I的缀合物)之外,还可以包含药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂或其他材料(本领域技术人员众所周知的)。所述物质应为无毒的并且应不干扰活性成分的功效。载体或其他材料的确切性质将取决于施用途径,所述施用途径可以是口服、或通过注射,例如皮肤、皮下、或静脉内注射。

[0354] 用于口服施用的药物组合物可以是片剂、胶囊剂、粉剂或液体形式。片剂可以包含固体载体或佐剂。液体药物组合物通常包含液体载体如水、石油、动物油或植物油、矿物油或合成油。可包含生理盐水溶液、葡萄糖或其他糖溶液或二醇类如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。胶囊剂可以包含固体载体如明胶。

[0355] 对于静脉内、皮肤或皮下注射、或在痛苦部位处的注射,活性成分将具有肠胃外可接受的水性溶液的形式,所述水性溶液是无热原的并具有适宜的pH、等渗性和稳定性。本领域的相关技术人员使用例如等渗媒介物如氯化钠注射液、林格氏注射液、乳酸林格氏注射液完全能够制备合适的溶液。根据需要,可以包含防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其他添加剂。

[0356] 缀合物可用于治疗增殖性疾病和自身免疫疾病。术语“增殖性疾病”涉及过度或异常细胞的不需要的或不受控制的细胞增殖,其不是所期望的,如,肿瘤或增生性生长(无论

是在体外或体内)。

[0357] 增殖性病状的实例包括但不限于良性、恶化前、和恶性细胞增殖,包括但不限于赘生物和肿瘤(例如组织细胞瘤、神经胶质瘤、星形细胞瘤、骨瘤)、癌症(例如肺癌、小细胞肺癌、胃肠癌、肠癌、结肠癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、肝癌、肾癌、膀胱癌、胰腺癌、脑癌、肉瘤、骨肉瘤、卡波西肉瘤、黑素瘤)、白血病、银屑病、骨疾病、纤维增殖性病状(例如结缔组织的纤维增殖性病状)、以及动脉粥样硬化。其他所关注的癌症包括但不限于血液学;恶性肿瘤,如白血病和淋巴瘤,如非霍奇金淋巴瘤、以及亚型如DLBCL、边缘区、外套层和滤泡、霍奇金淋巴瘤、AML、以及B或T细胞来源的其他癌症。

[0358] 自身免疫性疾病的实例包括以下:类风湿性关节炎、自身免疫性脱髓鞘疾病(例如,多发性硬化症、变态反应性脑脊髓炎)、银屑病性关节炎、内分泌眼病、葡萄膜视网膜炎、全身性红斑狼疮、重症肌无力、格雷夫斯病、肾小球肾炎、自身免疫性肝病、炎症性肠病(例如,克罗恩病)、过敏反应、变态反应、舍格伦综合症、I型糖尿病、原发性胆汁性肝硬化、韦氏肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)、纤维肌痛症、多肌炎、皮炎、多发性内分泌衰竭、施密特氏综合征(Schmidt's syndrome)、自身免疫性葡萄膜炎、爱迪生氏病(Addison's disease)、肾上腺炎、甲状腺炎、桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、自身免疫性甲状腺疾病、恶性贫血、胃萎缩、慢性肝炎、狼疮样肝炎、动脉粥样硬化、亚急性皮肤型红斑狼疮、甲状旁腺功能减退症、德雷斯勒综合征(Dressler's syndrome)、自身免疫性血小板减少症、特发性血小板减少性紫癜、溶血性贫血、寻常型天疱疮、天疱疮、疱疹样皮炎、斑秃、类天疱疮、硬皮病、进行性全身性硬化症、CREST综合征(钙质沉着、雷诺氏现象、食道运动功能障碍、指端硬化以及毛细血管扩张)、男性和女性自身免疫性不孕、强直性脊柱炎、溃疡性结肠炎、混合性结缔组织病、结节性多动脉炎、系统性坏死性血管炎、过敏性皮炎、特应性鼻炎、肺出血-肾炎综合征(Goodpasture's syndrome)、查加斯病(Chagas' disease)、结节病、风湿热、哮喘、复发性流产、抗磷脂综合征、农民肺、多形性红斑、心脏切开后综合征、库欣综合征(Cushing's syndrome)、自身免疫性慢性活动性肝炎、养鸟人肺(bird-fancier's lung)、中毒性表皮坏死松解症、Alport综合征、肺炎、过敏性肺炎、纤维性肺炎、间质性肺病、结节性红斑、坏疽性脓皮病、输血反应、大动脉炎、风湿性多肌痛、颞动脉炎、血吸虫病、巨细胞动脉炎、蛔虫病、曲霉病、阿司匹林三联症(Sampter's syndrome)、湿疹、淋巴瘤样肉芽肿病、贝切特氏病(Behcet's disease)、卡普兰综合征(Caplan's syndrome)、川崎氏病(Kawasaki's disease)、登革热、脑脊髓炎、心内膜炎、心内膜心肌纤维化、眼内炎、持久性隆起性红斑(erythema elevatum et diutinum)、银屑病、胎儿成红细胞增多症、嗜酸性细胞性筋膜炎、舒尔曼综合征(Shulman's syndrome)、费尔蒂氏综合征(Felty's syndrome)、丝虫病、睫状体炎、慢性睫状体炎、异时睫状体炎、富克斯氏睫状体炎、IgA肾病、亨-舍二氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)、移植物抗宿主病、移植排斥反应、心肌症、伊顿-兰伯特综合征(Eaton-Lambert syndrome)、复发性多软骨炎、冷球蛋白血症、华氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulemia)、埃文氏综合征(Evan's syndrome)以及自身免疫性腺衰竭。

[0359] 在一些实施方案中,自身免疫性疾病是B淋巴细胞的失调(例如,系统性红斑狼疮、肺出血-肾炎综合征、类风湿性关节炎以及I型糖尿病)、Th1淋巴细胞的失调(例如,类风湿性关节炎、多发性硬化症、银屑病、干燥综合征、桥本氏甲状腺炎、格雷夫斯病、原发性胆汁

性肝硬化、韦氏肉芽肿病、肺结核、或移植物抗宿主病)、或Th2淋巴细胞的失调(例如,特异性皮炎、系统性红斑狼疮、特应性哮喘、结膜炎、过敏性鼻炎、欧门氏综合征(Omenn's syndrome)、系统性硬化症、或慢性移植物抗宿主病)。一般而言,涉及树突状细胞的病症涉及Th1淋巴细胞或Th2淋巴细胞的失调。在一些实施方案中,自身免疫性病症是T细胞介导的免疫学病症。

[0360] 在一些实施方案中,所施用的缀合物的量在约0.01mg/kg/剂量至约10mg/kg/剂量的范围内。在一些实施方案中,所施用的缀合物的量在约0.01mg/kg/剂量至约5mg/kg/剂量的范围内。在一些实施方案中,所施用的缀合物的量在约0.05mg/kg/剂量至约5mg/kg/剂量的范围内。在一些实施方案中,所施用的缀合物的量在约0.1mg/kg/剂量至约5mg/kg/剂量的范围内。在一些实施方案中,所施用的缀合物的量在约0.1mg/kg/剂量至约4mg/kg/剂量的范围内。在一些实施方案中,所施用的缀合物的量在约0.05mg/kg/剂量至约3mg/kg/剂量的范围内。在一些实施方案中,所施用的缀合物的量在约0.1mg/kg/剂量至约3mg/kg/剂量的范围内。在一些实施方案中,所施用的缀合物的量在约0.1mg/kg/剂量至约2mg/kg/剂量的范围内。

[0361] 药物负载量

[0362] 药物负载量(p)是每个细胞结合剂(例如抗体)的PBD药物的平均数量。在本发明中,其通常为1。然而,任何组合物可包含其中PBD被缀合的抗体和其中PBD未被缀合的抗体。因此,对于组合物,药物负载量(或DAR)可小于1,例如0.75和更高、0.80和更高、0.85和更高、0.90和更高或0.95和更高。

[0363] 一般合成路线

[0364] PBD化合物的合成在以下参考文献中进行了广泛论述,论述内容以引用方式并入本文:

[0365] a) WO 00/12508 (第14至30页);

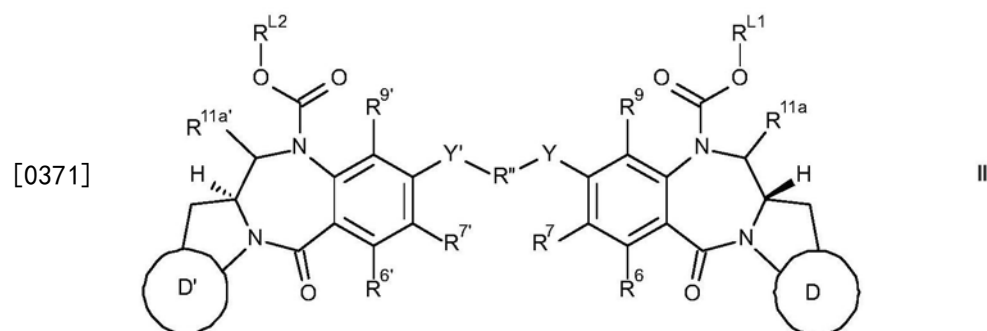
[0366] b) WO 2005/023814 (第3至10页);

[0367] c) WO 2004/043963 (第28至29页);以及

[0368] d) WO 2005/085251 (第30至39页)。

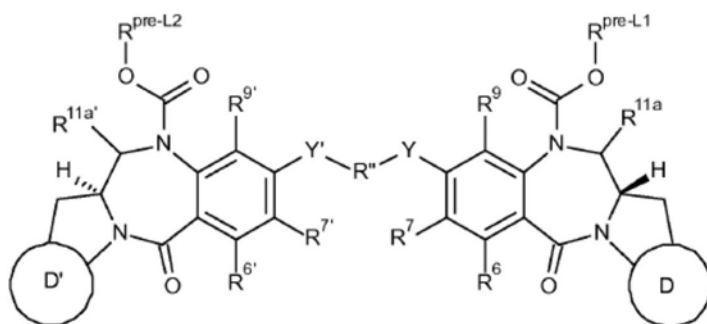
[0369] 合成路线

[0370] 式I的本发明的化合物:



[0372] 可以由式2的化合物合成:

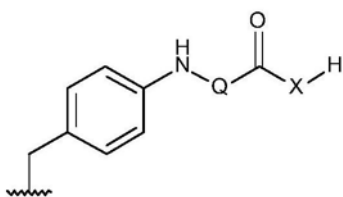
[0373]



式 2

[0374] 其中 $R^2$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^9$ 、 $R^{11a}$ 、 $R^{6'}$ 、 $R^{7'}$ 、 $R^{9'}$ 、 $R^{11a'}$ 、 $Y$ 、 $Y'$  和 $R''$ 如针对式I的化合物所定义, $R^{pre-L1}$ 是 $R^{L1}$ 的前体并且 $R^{pre-L2}$ 是 $R^{L2}$ 的前体-此方法尤其适用于其中 $R^{L1}$ 和 $R^{L2}$ 具有式IIIa的式I的化合物。对于这些化合物, $R^{pre-L1}$ 和 $R^{pre-L2}$ 将通常为 $R^{L1}$ 和 $R^{L2}$ 的部分,诸如式 IIIa' 的基团:

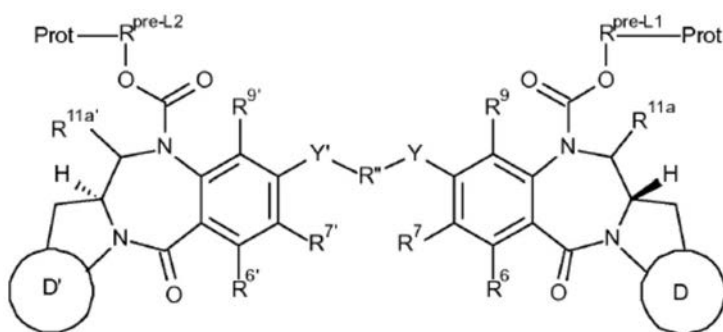
[0375]



IIIa' 在这种情况下,反应涉及添加基团  $G^L$ 。

[0376] 式2的化合物可通过对式3的化合物去保护来制备:

[0377]

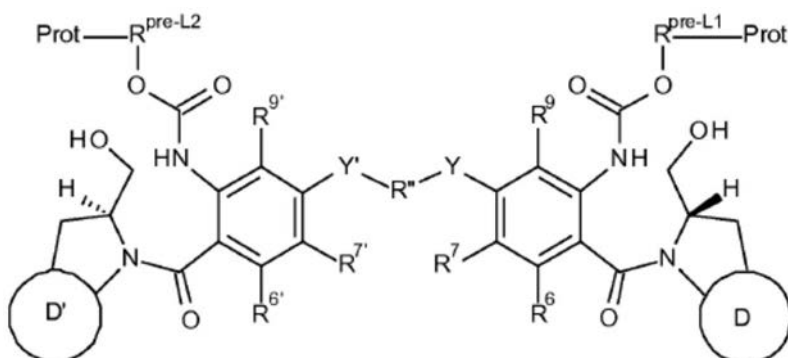


式3

[0378] 其中 $R^2$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^9$ 、 $R^{11a}$ 、 $R^{6'}$ 、 $R^{7'}$ 、 $R^{9'}$ 、 $R^{11a'}$ 、 $Y$ 、 $Y'$  和 $R''$ 如针对式I的化合物所定义, $R^{pre-L1}Prot$ 为 $R^{pre-L1}$ 的受保护型式,  $R^{pre-L2}Prot$ 为 $R^{pre-L2}$ 的受保护型式并且Prot代表适当的羧基/羟基保护基。

[0379] 式3的化合物可通过式4的化合物的环闭合制备:

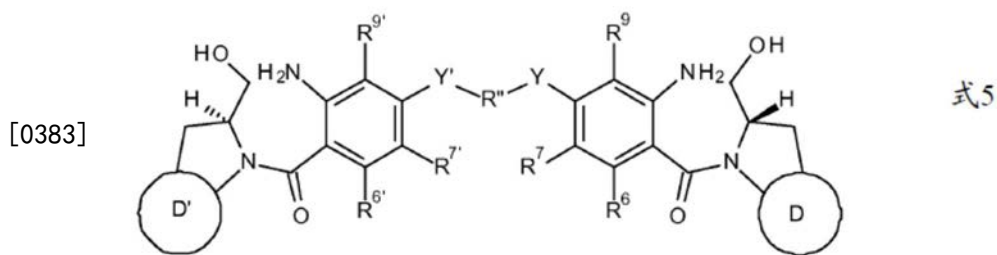
[0380]



式4

[0381] 其中环闭合通过氧化(例如Swern)进行。

[0382] 式4的化合物可由式5的化合物合成:



[0384] 通过添加两个氨基保护基实现。如果基团是不同的,那么逐步添加可以通过简单保护一个氨基(例如通过Fmoc),然后在另一个氨基上安装期望的保护基来实现。此后可以移除简单的保护基,并且接着安装其他期望的氨基保护基。

[0385] 其中 $R^{L1}$ 和 $R^{L2}$ 具有式IIIb的式I的化合物可以类似的方式合成,但是完整的 $R^{L1}$ 和/或 $R^{L2}$ 基团可以从式5的化合物开始安装,而不使用受保护的前体。

[0386] 式5的化合物可以通过已知方法合成,如W0 2011/130598中公开的那些。

#### [0387] 药物缀合物的合成

[0388] 可通常如Doronina等,Nature Biotechnology,2003,21,778-784)中所述将抗体缀合至药物接头化合物。简单地说,在37℃下用三(羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)还原在pH 7.4的含有50mM硼酸钠的PBS中的抗体(4-5mg/mL)。还原链间二硫化物的反应的进展通过与5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)的反应进行监测并且使其进行直到实现期望水平的巯基/mAb。然后将还原的抗体冷却至0℃并且每抗体用3当量的药物-接头进行烷基化。1小时后,通过添加5当量N-乙酰半胱氨酸将反应淬灭。通过在PD-10柱上进行凝胶过滤来移除淬灭的药物-接头。然后通过0.22μm注射过滤器将ADC无菌过滤。可分别在280nm和329nm处进行光谱分析来确定蛋白质浓度,其中针对在280nm处的药物吸光度的贡献进行校正。可使用尺寸排阻色谱确定抗体聚集的程度,并且可使用RP-HPLC确定剩余的NAC淬灭的药物-接头的水平。

#### [0389] 另外优选项

[0390] 以下优选项可应用于如上所述的本发明的所有方面,或者可以涉及单个方面。优选项可以任何组合被组合在一起。

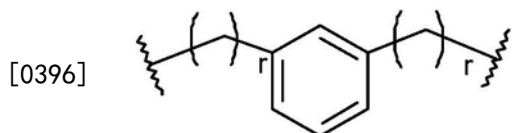
[0391]  $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^9$ 、 $R^{11a'}$ 和 $Y'$ 分别选自与 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^9$ 、 $R^{11a}$ 和 $Y$ 相同的基团。在一些实施方案中, $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^9$ 、 $R^{11a'}$ 和 $Y'$ 分别与 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^9$ 、 $R^{11a}$ 和 $Y$ 相同。在一些实施方案中, $R^{12}$ 与 $R^2$ 相同。

#### [0392] 二聚体连接

[0393] 在一些实施方案中, $Y$ 和 $Y'$ 均为0。

[0394] 在一些实施方案中, $R''$ 是不具有取代基的 $C_3$ -7亚烷基。在这些实施方案的一些中, $R''$ 是 $C_3$ 、 $C_5$ 或 $C_7$ 亚烷基。具体地讲, $R''$ 可以是 $C_3$ 或 $C_5$ 亚烷基。

[0395] 在其他实施方案中, $R''$ 是下式的基团:



[0397] 其中 $r$ 为1或2。

[0398]  $R^6$ 至 $R^9$

[0399] 在一些实施方案中, $R^9$ 是H。

[0400] 在一些实施方案中,  $R^6$  选自 H、OH、OR、SH、NH<sub>2</sub>、硝基和卤素, 并且可选自 H 或卤素。在这些实施方案的一些中,  $R^6$  是 H。

[0401] 在一些实施方案中,  $R^7$  选自 H、OH、OR、SH、SR、NH<sub>2</sub>、NHR、NRR' 以及卤素。在这些实施方案的一些中,  $R^7$  选自 H、OH 和 OR, 其中 R 选自任选取代的 C<sub>1-7</sub> 烷基、C<sub>3-10</sub> 杂环基以及 C<sub>5-10</sub> 芳基。R 可更优选地为 C<sub>1-4</sub> 烷基, 它可以是或可以不是被取代的。感兴趣的取代基为 C<sub>5-6</sub> 芳基 (例如苯基)。7 位特别优选的取代基为 OMe 和 OCH<sub>2</sub>Ph。其他特别感兴趣的取代基为二甲氨基 (即 -NMe<sub>2</sub>) ; -(OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>q</sub>OMe, 其中 q 为 0 至 2; 含氮 C<sub>6</sub> 杂环基, 包括吗啉代、哌啶基和 N-甲基-哌啶基。

[0402] 这些实施方案和优选项分别适用于  $R^9$ 、 $R^6$  和  $R^7$ 。

[0403] D 和 D'

[0404] 在一些实施方案中, D 和 D' 分别为 D1 和 D' 1。

[0405] 在一些实施方案中, D 和 D' 分别为 D2 和 D' 2。

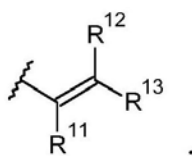
[0406]  $R^2$

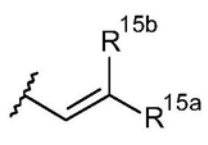
[0407] 当 C2 与 C3 之间存在双键时,  $R^2$  选自:

[0408] (a) C<sub>5-10</sub> 芳基, 其任选地被选自包括以下的组的一个或多个取代基取代: 卤素、硝基、氰基、醚、C<sub>1-7</sub> 烷基、C<sub>3-7</sub> 杂环基以及双-氧基 -C<sub>1-3</sub> 亚烷基;

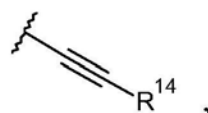
[0409] (b) C<sub>1-5</sub> 饱和的脂族烷基;

[0410] (c) C<sub>3-6</sub> 饱和的环烷基;

[0411] (d)  其中  $R^{11}$ 、 $R^{12}$  和  $R^{13}$  中的每一个独立地选自 H、C<sub>1-3</sub> 饱和烷基、C<sub>2-3</sub> 烯基、C<sub>2-3</sub> 炔基和环丙基, 其中  $R^2$  基团中碳原子的总数不超过 5;

[0412] (e)  其中  $R^{15a}$  和  $R^{15b}$  中的一个为 H 并且另一个选自: 苯基, 所述苯基

任选地被选自卤素甲基、甲氧基的基团取代; 吡啶基; 以及苯硫基; 以及

[0413] (f)  其中  $R^{14}$  选自: H; C<sub>1-3</sub> 饱和烷基; C<sub>2-3</sub> 烯基; C<sub>2-3</sub> 炔基; 环丙基; 苯基, 所述苯基任选地被选自卤素甲基、甲氧基的基团取代; 吡啶基; 以及苯硫基。

基, 所述苯基任选地被选自卤素甲基、甲氧基的基团取代; 吡啶基; 以及苯硫基。

[0414] 当  $R^2$  为 C<sub>5-10</sub> 芳基时, 它可以是 C<sub>5-7</sub> 芳基。C<sub>5-7</sub> 芳基可以是苯基或 C<sub>5-7</sub> 杂芳基, 例如呋喃基、苯硫基和吡啶基。在一些实施方案中,  $R^2$  优选为苯基。在其他实施方案中,  $R^2$  优选为苯硫基, 例如, 苯硫-2-基和苯硫-3-基。

[0415] 当  $R^2$  为 C<sub>5-10</sub> 芳基时, 它可以是 C<sub>8-10</sub> 芳基, 例如喹啉基或异喹啉基。喹啉基或异喹啉基可通过任何可用环位置结合 PBD 核心。例如, 喹啉基可为喹啉-2-基、喹啉-3-基、喹啉-4-基、喹啉-5-基、喹啉-6-基、喹啉-7-基以及喹啉-8-基。在这些喹啉基中, 喹啉-3-基和喹啉-6-基可为优选的。异喹啉基可为异喹啉-1-基、异喹啉-3-基、异喹啉-4-基、异喹啉-5-基、异喹啉-6-基、异喹啉-7-基以及异喹啉-8-基。在这些异喹啉基中, 异喹啉-3-基和异喹啉-6-基可为优选的。



[0416] 当 $R^2$ 是 $C_{5-10}$ 芳基时,它可携带任何数目的取代基。优选携带1至3个取代基,更优选1和2个取代基,并且最优选单取代基。取代基可以是任何位置。

[0417] 在 $R^2$ 为 $C_{5-7}$ 芳基的情况下,单个取代基优选地处于和连接化合物的其余部分的键不相邻的环原子上,即,它优选地在连接化合物的其余部分的键的 $\beta$ 或 $\gamma$ 位。因此,在 $C_{5-7}$ 芳基为苯基的情况下,取代基优选地处于间位或对位,并且更优选处于对位。

[0418] 在 $R^2$ 为 $C_{8-10}$ 芳基(例如喹啉基或异喹啉基)的情况下,它可在喹啉或异喹啉环的任何位置上携带任何数目的取代基。在一些实施方案中,它具有一个、两个或三个取代基,并且这些取代基可以在近侧环或远侧环或两者(如果多于一个取代基)上。

[0419]  $R^2$ 取代基,当 $R^2$ 为 $C_{5-10}$ 芳基时

[0420] 如果 $R^2$ 上的取代基在 $R^2$ 为 $C_{5-10}$ 芳基时为卤素,那么它优选为F或Cl,更优选Cl。

[0421] 如果 $R^2$ 上的取代基在 $R^2$ 为 $C_{5-10}$ 芳基时为醚,那么在一些实施方案中它可以是烷氧基,例如, $C_{1-7}$ 烷氧基(例如甲氧基、乙氧基)或在一些实施方案中它可以是 $C_{5-7}$ 芳氧基(例如苯氧基、吡啶氧基、呋喃氧基)。烷氧基本身可进一步被取代,例如被氨基(例如二甲氨基)取代。

[0422] 如果 $R^2$ 上的取代基在 $R^2$ 为 $C_{5-10}$ 芳基时为 $C_{1-7}$ 烷基,那么它可优选为 $C_{1-4}$ 烷基(例如甲基、乙基、丙基、丁基)。

[0423] 如果 $R^2$ 上的取代基在 $R^2$ 为 $C_{5-10}$ 芳基时为 $C_{3-7}$ 杂环基,那么它在一些实施方案中可以是 $C_6$ 含氮杂环基,例如吗啉代、硫吗啉代、哌啶基、哌嗪基。这些基团可以通过氮原子结合PBD部分的其余部分。这些基团可被例如 $C_{1-4}$ 烷基进一步取代。如果 $C_6$ 含氮杂环基是哌嗪基,则所述另外的取代基可在第二氮环原子上。

[0424] 如果 $R^2$ 上的取代基在 $R^2$ 为 $C_{5-10}$ 芳基时为双-氧基- $C_{1-3}$ 亚烷基,这优选为双-氧基-亚甲基或双-氧基-亚乙基。

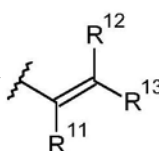
[0425] 如果 $R^2$ 上的取代基在 $R^2$ 为 $C_{5-10}$ 芳基时为酯,这优选为甲基酯或乙基酯。

[0426] 当 $R^2$ 为 $C_{5-10}$ 芳基时特别优选的取代基包括甲氧基、乙氧基、氟、氯、氰基、双-氧基-亚甲基、甲基-哌嗪基、吗啉代以及甲基-苯硫基。 $R^2$ 的其他特别优选的取代基是二甲基氨基丙氧基和羧基。

[0427] 当 $R^2$ 为 $C_{5-10}$ 芳基时特别优选的取代的 $R^2$ 基团包括但不限于4-甲氧基-苯基、3-甲氧基苯基、4-乙氧基-苯基、3-乙氧基-苯基、4-氟-苯基、4-氯-苯基、3,4-双氧基亚甲基-苯基、4-甲基苯硫基、4-氰基苯基、4-苯氧基苯基、喹啉-3-基和喹啉-6-基、异喹啉-3-基和异喹啉-6-基、2-噻吩基、2-呋喃基、甲氧基萘基以及萘基。另一种可能的取代的 $R^{12}$ 基团为4-硝基苯基。特别感兴趣的 $R^{12}$ 基团包括4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基和3,4-双氧基亚甲基-苯基。

[0428] 当 $R^2$ 是 $C_{1-5}$ 饱和的脂族烷基时,它可以是甲基、乙基、丙基、丁基或戊基。在一些实施方案中,它可以是甲基、乙基或丙基(正戊基或异丙基)。在这些实施方案的一些中,它可以是甲基。在其他实施方案中,它可以是丁基或戊基,其可以是直链或支链的。

[0429] 当 $R^2$ 是 $C_{3-6}$ 饱和的环烷基时,它可以是环丙基、环丁基、环戊基或环己基。在一些实施方案中,它可以是环丙基。

[0430] 当 $R^2$ 为  时,  $R^{11}$ 、 $R^{12}$ 和 $R^{13}$ 中的每一个独立地选自H、 $C_{1-3}$ 饱和烷基、 $C_{2-3}$ 烯基、 $C_{2-3}$ 炔基和环丙基,其中 $R^2$ 基团中碳原子的总数不超过5。在一些实施方案中, $R^2$ 基团中碳原子的总数不超过4或不超过3。

[0431] 在一些实施方案中, $R^{11}$ 、 $R^{12}$ 和 $R^{13}$ 中的一个为H,并且其他两个基团选自H、 $C_{1-3}$ 饱和烷基、 $C_{2-3}$ 烯基、 $C_{2-3}$ 炔基以及环丙基。

[0432] 在其他实施方案中, $R^{11}$ 、 $R^{12}$ 和 $R^{13}$ 中的两个为H,并且另一个基团选自H、 $C_{1-3}$ 饱和烷基、 $C_{2-3}$ 烯基、 $C_{2-3}$ 炔基以及环丙基。

[0433] 在一些实施方案中,不是H的基团选自甲基和乙基。在这些实施方案的一些中,不是H的基团是甲基。

[0434] 在一些实施方案中, $R^{11}$ 是H。

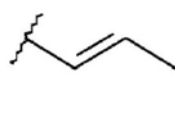
[0435] 在一些实施方案中, $R^{12}$ 是H。

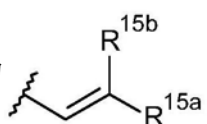
[0436] 在一些实施方案中, $R^{13}$ 是H。

[0437] 在一些实施方案中, $R^{11}$ 和 $R^{12}$ 是H。

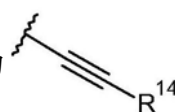
[0438] 在一些实施方案中, $R^{11}$ 和 $R^{13}$ 是H。

[0439] 在一些实施方案中, $R^{12}$ 和 $R^{13}$ 是H。

[0440] 特别感兴趣的 $R^2$ 基团为: 。


[0441] 当 $R^2$ 为  时,  $R^{15a}$ 和 $R^{15b}$ 中的一个为H并且另一个选自:苯基,所述苯基

任选地被选自卤素、甲基、甲氧基的基团取代;吡啶基;以及苯硫基。在一些实施方案中,不是H的基团是任选取代的苯基。如果苯基任选取代基为卤素,那么它优选是氟。在一些实施方案中,苯基是未取代的。

[0442] 当 $R^2$ 为  时,  $R^{14}$ 选自:H;  $C_{1-3}$ 饱和烷基;  $C_{2-3}$ 烯基;  $C_{2-3}$ 炔基;环丙基;苯基,所述苯基任选地被选自卤素、甲基、甲氧基的基团取代;吡啶基;以及苯硫基。如果苯基任选取代基为卤素,那么它优选是氟。在一些实施方案中,苯基是未取代的。

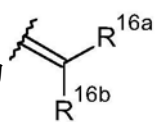
[0443] 在一些实施方案中, $R^{14}$ 选自H、甲基、乙基、乙烯基和乙炔基。在这些实施方案的一些中, $R^{14}$ 选自H和甲基。

[0444] 当C2与C3之间存在单键时,

[0445]  $R^2$ 为H或 , 其中 $R^{16a}$ 和 $R^{16b}$ 独立地选自H、F、 $C_{1-4}$ 饱和烷基、 $C_{2-3}$ 烯基,所述

烷基和烯基任选地被选自 $C_{1-4}$ 烷基酰氨基和 $C_{1-4}$ 烷基酯的基团取代;或,当 $R^{16a}$ 和 $R^{16b}$ 中的一个为H时,另一个选自腈和 $C_{1-4}$ 烷基酯。

[0446] 在一些实施方案中,  $R^2$  是 H。

[0447] 在一些实施方案中,  $R^2$  为 。

[0448] 在一些实施方案中, 优选的是  $R^{16a}$  和  $R^{16b}$  均为 H。

[0449] 在其他实施方案中, 优选的是  $R^{16a}$  和  $R^{16b}$  均为甲基。

[0450] 在另外的实施方案中, 优选的是  $R^{16a}$  和  $R^{16b}$  中的一个为 H, 并且另一个选自  $C_{1-4}$  饱和烷基、 $C_{2-3}$  烯基, 所述烷基和烯基是任选取代的。在这些另外的实施方案中, 可进一步优选的是, 不是 H 的基团选自甲基和乙基。

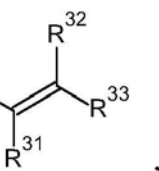
[0451]  $R^{22}$

[0452] 当  $C2'$  与  $C3'$  之间存在双键时,  $R^{22}$  选自:

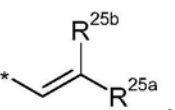
[0453] (a)  $C_{5-10}$  芳基, 其任选地被选自包括以下的组的一个或多个取代基取代: 卤素、硝基、氰基、醚、 $C_{1-7}$  烷基、 $C_{3-7}$  杂环基以及双-氧基 - $C_{1-3}$  亚烷基;

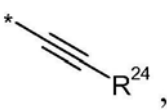
[0454] (b)  $C_{1-5}$  饱和的脂族烷基;

[0455] (c)  $C_{3-6}$  饱和的环烷基;

[0456] (d)  其中  $R^{31}$ 、 $R^{32}$  和  $R^{33}$  中的每一个独立地选自 H、 $C_{1-3}$  饱和烷基、 $C_{2-3}$

烯基、 $C_{2-3}$  炔基和环丙基, 其中  $R^{22}$  基团中碳原子的总数不超过 5;

[0457] (e)  其中  $R^{25a}$  和  $R^{25b}$  中的一个为 H 并且另一个选自: 苯基, 所述苯基任选地被选自卤素甲基、甲氧基的基团取代; 吡啶基; 以及苯硫基; 以及

[0458] (f)  其中  $R^{24}$  选自: H;  $C_{1-3}$  饱和烷基;  $C_{2-3}$  烯基;  $C_{2-3}$  炔基; 环丙基; 苯基, 所述苯基任选地被选自卤素甲基、甲氧基的基团取代; 吡啶基; 以及苯硫基。

[0459] 当  $R^{22}$  为  $C_{5-10}$  芳基时, 它可以是  $C_{5-7}$  芳基。 $C_{5-7}$  芳基可以是苯基或  $C_{5-7}$  杂芳基, 例如呋喃基、苯硫基和吡啶基。在一些实施方案中,  $R^{22}$  优选为苯基。在其他实施方案中,  $R^{22}$  优选为苯硫基, 例如, 苯硫 -2-基和苯硫 -3-基。

[0460] 当  $R^{22}$  为  $C_{5-10}$  芳基时, 它可以是  $C_{8-10}$  芳基, 例如喹啉基或异喹啉基。喹啉基或异喹啉基可通过任何可用环位置结合 PBD 核心。例如, 喹啉基可为喹啉 -2-基、喹啉 -3-基、喹啉 -4-基、喹啉 -5-基、喹啉 -6-基、喹啉 -7-基以及喹啉 -8-基。在这些喹啉基中, 喹啉 -3-基和喹啉 -6-基可为优选的。异喹啉基可为异喹啉 -1-基、异喹啉 -3-基、异喹啉 -4-基、异喹啉 -5-基、异喹啉 -6-基、异喹啉 -7-基以及异喹啉 -8-基。在这些异喹啉基中, 异喹啉 -3-基和异喹啉 -6-基可为优选的。

[0461] 当  $R^{22}$  是  $C_{5-10}$  芳基时, 它可携带任何数目的取代基。优选携带 1 至 3 个取代基, 更优选 1 和 2 个取代基, 并且最优选单取代基。取代基可以是任何位置。

[0462] 在  $R^{22}$  为  $C_{5-7}$  芳基的情况下, 单个取代基优选地处于和连接化合物的其余部分的键

不相邻的环原子上,即,它优选地在连接化合物的其余部分的键的 $\beta$ 或 $\gamma$ 位。因此,在 $C_{5-7}$ 芳基为苯基的情况下,取代基优选地处于间位或对位,并且更优选处于对位。

[0463] 在 $R^{22}$ 为 $C_{8-10}$ 芳基(例如喹啉基或异喹啉基)的情况下,它可在喹啉或异喹啉环的任何位置上携带任何数目的取代基。在一些实施方案中,它具有一个、两个或三个取代基,并且这些取代基可以在近侧环或远侧环或两者(如果多于一个取代基)上。

[0464]  $R^{22}$ 取代基,当 $R^{22}$ 为 $C_{5-10}$ 芳基时

[0465] 如果 $R^{22}$ 上的取代基在 $R^{22}$ 为 $C_{5-10}$ 芳基时为卤素,那么它优选为 F 或 Cl,更优选 Cl。

[0466] 如果 $R^{22}$ 上的取代基在 $R^{22}$ 为 $C_{5-10}$ 芳基时为醚,那么在一些实施方案中它可以是烷氧基,例如, $C_{1-7}$ 烷氧基(例如甲氧基、乙氧基)或在一些实施方案中它可以是 $C_{5-7}$ 芳氧基(例如苯氧基、吡啶氧基、呋喃氧基)。烷氧基本身可进一步被取代,例如被氨基(例如二甲氨基)取代。

[0467] 如果 $R^{22}$ 上的取代基在 $R^{22}$ 为 $C_{5-10}$ 芳基时为 $C_{1-7}$ 烷基,那么它可优选为 $C_{1-4}$ 烷基(例如甲基、乙基、丙基、丁基)。

[0468] 如果 $R^{22}$ 上的取代基在 $R^{22}$ 为 $C_{5-10}$ 芳基时为 $C_{3-7}$ 杂环基,那么它在一些实施方案中可以是 $C_6$ 含氮杂环基,例如吗啉代、硫吗啉代、哌啶基、哌嗪基。这些基团可以通过氮原子结合 PBD 部分的其余部分。这些基团可被例如 $C_{1-4}$ 烷基进一步取代。如果 $C_6$ 含氮杂环基是哌嗪基,则所述另外的取代基可在第二氮环原子上。

[0469] 如果 $R^{22}$ 上的取代基在 $R^{22}$ 为 $C_{5-10}$ 芳基时为双-氧基- $C_{1-3}$ 亚烷基,这优选为双-氧基-亚甲基或双-氧基-亚乙基。

[0470] 如果 $R^{22}$ 上的取代基在 $R^{22}$ 为 $C_{5-10}$ 芳基时为酯,这优选为甲基酯或乙基酯。

[0471] 当 $R^{22}$ 为 $C_{5-10}$ 芳基时特别优选的取代基包括甲氧基、乙氧基、氟、氯、氰基、双-氧基-亚甲基、甲基-哌嗪基、吗啉代以及甲基-苯硫基。 $R^{22}$ 的其他特别优选的取代基是二甲基氨基丙氧基和羧基。

[0472] 当 $R^{22}$ 为 $C_{5-10}$ 芳基时特别优选的取代的 $R^{22}$ 基团包括但不限于4-甲氧基-苯基、3-甲氧基苯基、4-乙氧基-苯基、3-乙氧基-苯基、4-氟-苯基、4-氯-苯基、3,4-双氧基亚甲基-苯基、4-甲基苯硫基、4-氰基苯基、4-苯氧基苯基、喹啉-3-基和喹啉-6-基、异喹啉-3-基和异喹啉-6-基、2-噻吩基、2-呋喃基、甲氧基萘基以及萘基。另一种可能的取代的 $R^{22}$ 基团为4-硝基苯基。特别感兴趣的 $R^{22}$ 基团包括4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基和3,4-双氧基亚甲基-苯基。

[0473] 当 $R^{22}$ 是 $C_{1-5}$ 饱和的脂族烷基时,它可以是甲基、乙基、丙基、丁基或戊基。在一些实施方案中,它可以是甲基、乙基或丙基(正戊基或异丙基)。在这些实施方案的一些中,它可以是甲基。在其他实施方案中,它可以是丁基或戊基,其可以是直链或支链的。

[0474] 当 $R^{22}$ 是 $C_{3-6}$ 饱和的环烷基时,它可以是环丙基、环丁基、环戊基或环己基。在一些实施方案中,它可以是环丙基。

[0475] 当 $R^{22}$ 为 $\begin{array}{c} R^{32} \\ | \\ * - C = C - R^{33} \\ | \\ R^{31} \end{array}$ 时, $R^{31}$ 、 $R^{32}$ 和 $R^{33}$ 中的每一个独立地选自 H、 $C_{1-3}$ 饱和烷基、 $C_{2-3}$

烯基、 $C_{2-3}$ 炔基和环丙基,其中 $R^{22}$ 基团中碳原子的总数不超过5。在一些实施方案中, $R^{22}$ 基团

中碳原子的总数不超过4或不超过3。

[0476] 在一些实施方案中,  $R^{31}$ 、 $R^{32}$ 和 $R^{33}$ 中的一个为H,并且其他两个基团选自H、 $C_{1-3}$ 饱和烷基、 $C_{2-3}$ 烯基、 $C_{2-3}$ 炔基以及环丙基。

[0477] 在其他实施方案中,  $R^{31}$ 、 $R^{32}$ 和 $R^{33}$ 中的两个为H,并且另一个基团选自H、 $C_{1-3}$ 饱和烷基、 $C_{2-3}$ 烯基、 $C_{2-3}$ 炔基以及环丙基。

[0478] 在一些实施方案中,不是H的基团选自甲基和乙基。在这些实施方案的一些中,不是H的基团是甲基。

[0479] 在一些实施方案中,  $R^{31}$ 是H。

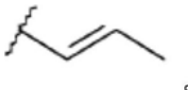
[0480] 在一些实施方案中,  $R^{32}$ 是H。

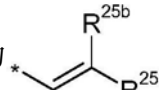
[0481] 在一些实施方案中,  $R^{33}$ 是H。

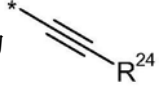
[0482] 在一些实施方案中,  $R^{31}$ 和 $R^{32}$ 是H。

[0483] 在一些实施方案中,  $R^{31}$ 和 $R^{33}$ 是H。

[0484] 在一些实施方案中,  $R^{32}$ 和 $R^{33}$ 是H。

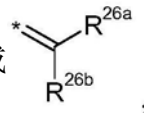
[0485] 特别感兴趣的 $R^{22}$ 基团为: 。

[0486] 当 $R^{22}$ 为  时,  $R^{25a}$ 和 $R^{25b}$ 中的一个为H并且另一个选自:苯基,所述苯基任选地被选自卤素、甲基、甲氧基的基团取代;吡啶基;以及苯硫基。在一些实施方案中,不是H的基团是任选取代的苯基。如果苯基任选取代基为卤素,那么它优选是氟。在一些实施方案中,苯基是未取代的。

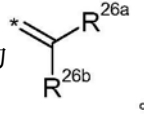
[0487] 当 $R^{22}$ 为  时,  $R^{24}$ 选自:H;  $C_{1-3}$ 饱和烷基;  $C_{2-3}$ 烯基;  $C_{2-3}$ 炔基;环丙基;苯基,所述苯基任选地被选自卤素甲基、甲氧基的基团取代;吡啶基;以及苯硫基。如果苯基任选取代基为卤素,那么它优选是氟。在一些实施方案中,苯基是未取代的。

[0488] 在一些实施方案中,  $R^{24}$ 选自H、甲基、乙基、乙烯基和乙炔基。在这些实施方案的一些中,  $R^{24}$ 选自H和甲基。

[0489] 当 $C2'$ 与 $C3'$ 之间存在单键时,

[0490]  $R^{22}$ 为H或 , 其中 $R^{26a}$ 和 $R^{26b}$ 独立地选自H、F、 $C_{1-4}$ 饱和烷基、 $C_{2-3}$ 烯基,所述烷基和烯基任选地被选自 $C_{1-4}$ 烷基酰氨基和  $C_{1-4}$ 烷基酯的基团取代;或,当 $R^{26a}$ 和 $R^{26b}$ 中的一个为H时,另一个选自腈和 $C_{1-4}$ 烷基酯。

[0491] 在一些实施方案中,  $R^{22}$ 是H。

[0492] 在一些实施方案中,  $R^{22}$ 为 。

[0493] 在一些实施方案中,优选的是 $R^{26a}$ 和 $R^{26b}$ 均为H。

[0494] 在其他实施方案中,优选的是 $R^{26a}$ 和 $R^{26b}$ 均为甲基。

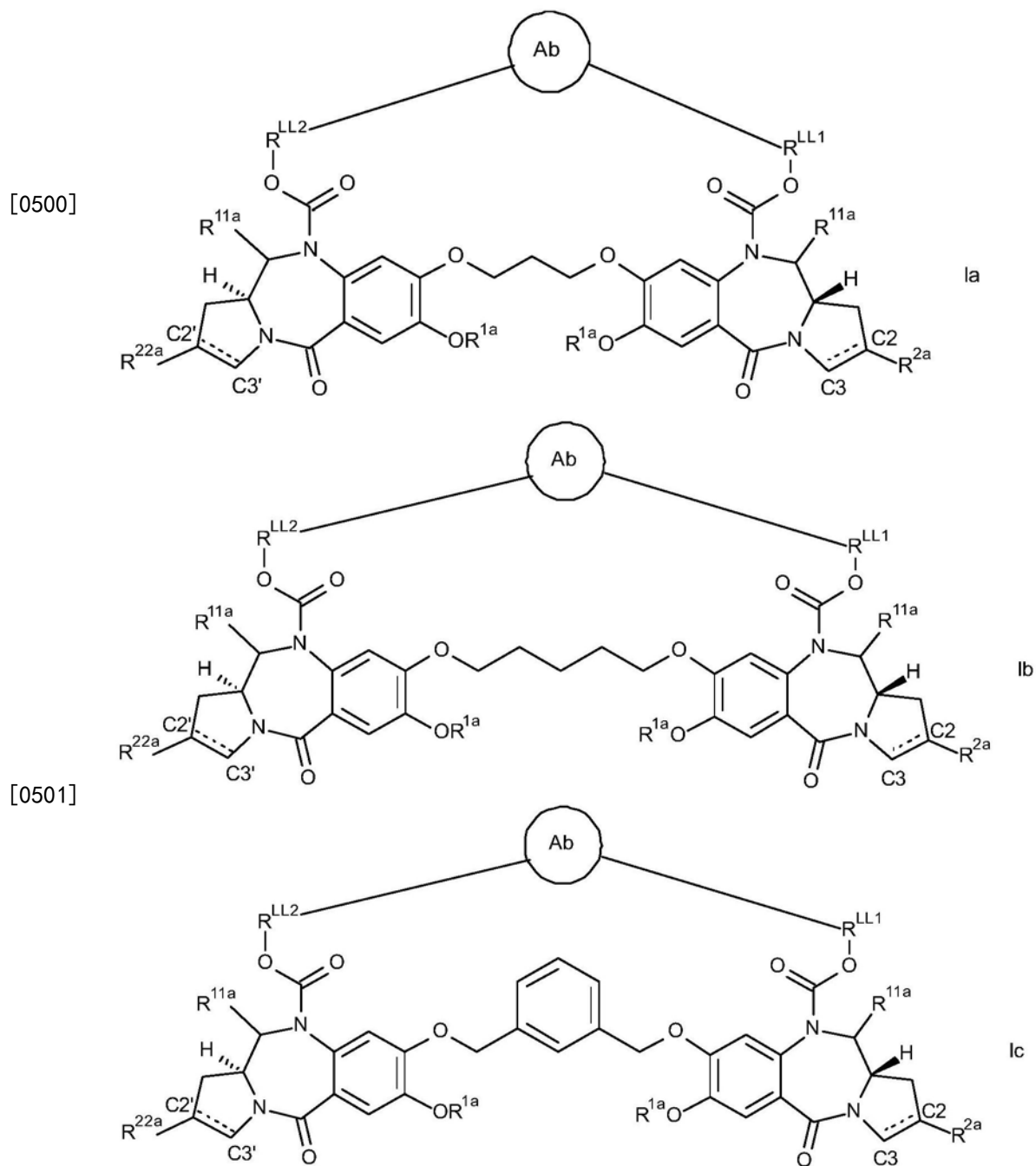
[0495] 在另外的实施方案中,优选的是 $R^{26a}$ 和 $R^{26b}$ 中的一个H,并且另一个选自 $C_{1-4}$ 饱和烷基、 $C_{2-3}$ 烯基,所述烷基和烯基是任选取代的。在这些另外的实施方案中,可进一步优选的是,不是H的基团选自甲基和乙基。

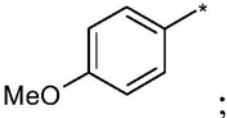
[0496]  $R^{11}$


[0497] 在一些实施方案中, $R^{11a}$ 是OH。

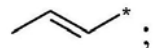
[0498] 在一些实施方案中, $R^{11a}$ 是 $OR^A$ ,其中 $R^A$ 是 $C_{1-4}$ 烷基。在这些实施方案的一些中, $R^A$ 是甲基。

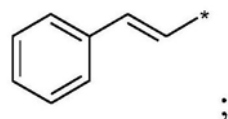
[0499] 在本发明的第一方面的一些实施方案中,具有式Ia-1、Ia-2或 Ia-3:

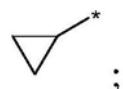



[0502] 其中 $R^{2a}$ 和 $R^{22a}$ 相同并选自：(a)  ;

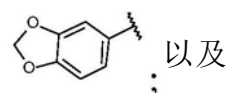
[0503] (b)  ;

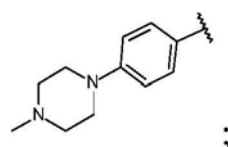
[0504] (c)  ;

[0505] (d)  ;

[0506] (e)  ;

[0507] (f)  ;

[0508] (g)  ; 以及

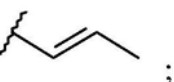
[0509] (h)  ;

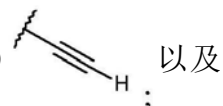
[0510]  $R^{1a}$ 选自甲基和苄基；

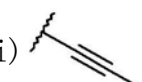
[0511]  $R^{LL1}$ 、 $R^{LL2}$ 和 $R^{11a}$ 如上文所定义。

[0512] 在本发明的一些实施方案中， $R^2$ 和 $R^{22}$ 均包括不超过3个碳原子。

[0513] 因此，在C2与C3之间存在双键的这些实施方案中， $R^2$ 可选自：

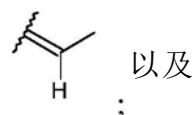
[0514] (i) 甲基；(v)  ;

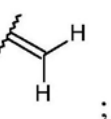
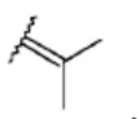
[0515] (ii) 乙基；(vi)  ； 以及

[0516] (iii) 丙基；(vi)  ;

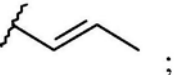
[0517] (iv) 环丙基；

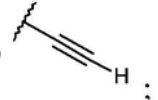
[0518] 因此，在C2与C3之间不存在双键的这些实施方案中， $R^2$ 可选自：


[0519] (i) H；(iii)  ； 以及

[0520] (ii)  (iv)  。

[0521] 因此，在C2'与C3'之间存在双键的这些实施方案中， $R^{22}$ 可选自：

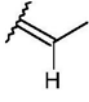
[0522] (i) 甲基; (v)  ;

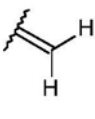
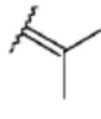
[0523] (ii) 乙基; (vi)  以及

[0524] (iii) 丙基; (vi)  ;

[0525] (iv) 环丙基;

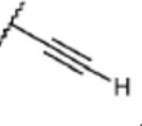
[0526] 因此, 在C2' 与C3' 之间不存在双键的这些实施方案中, R<sup>22</sup>可选自:

[0527] (i) H; (iii)  以及

[0528] (ii)  ; (iv)  。

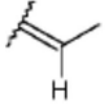
[0529] 在这些实施方案的一些中, R<sup>2</sup>和R<sup>22</sup>均包括不超过2个碳原子。

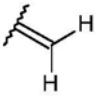
[0530] 因此, 在C2与C3之间存在双键的这些实施方案中, R<sup>2</sup>可选自:

[0531] (i) 甲基; (vi)  。

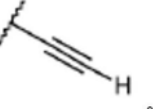
[0532] (ii) 乙基; 以及

[0533] 因此, 在C2与C3之间不存在双键的这些实施方案中, R<sup>2</sup>可选自:

[0534] (i) H; (iii)  。

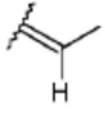
[0535] (ii)  以及

[0536] 因此, 在C2' 与C3' 之间存在双键的这些实施方案中, R<sup>22</sup>可选自:

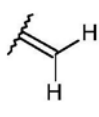
[0537] (i) 甲基; (vi)  。

[0538] (ii) 乙基; 以及

[0539] 因此, 在C2' 与C3' 之间不存在双键的这些实施方案中, R<sup>22</sup>可选自:

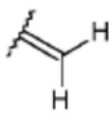
[0540] (i) H; (iii)  。



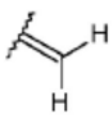
[0541] (ii)  以及 ;

[0542] 在另外的这些实施方案中,  $R^2$  和  $R^{22}$  均包括不超过1个碳原子。

[0543] 因此, 在C2与C3之间存在双键的这些实施方案中,  $R^2$  可以是甲基。因此, 在C2与C3之间不存在双键的这些实施方案中,  $R^2$  可选自:

[0544] (i) H; 以及 (ii)  。

[0545] 因此, 在C2' 与C3' 之间存在双键的这些实施方案中,  $R^{22}$  可以是甲基。因此, 在C2' 与C3' 之间不存在双键的这些实施方案中,  $R^{22}$  可选自:

[0546] (i) H; 以及 (ii)  。

[0547] 不受理论的束缚, 在PBD二聚体的C2位置上的取代基小的情况下, 据信在这些药物接头中使用葡糖醛酸苷封端单元是特别有利的, 因为它显著增加了药物接头的亲水性, 从而使药物接头更易缀合至配体单元。

[0548] 这些实施方案和优选项也适用于本发明的第二方面。

[0549] 接头 ( $R^L/R^{LL}$ )

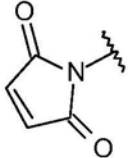
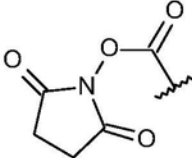
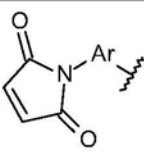
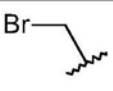
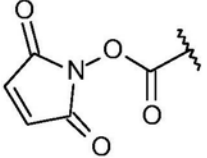

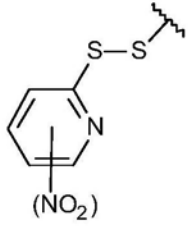

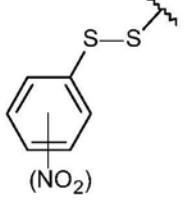
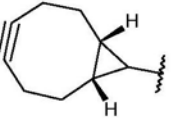
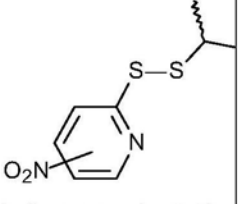
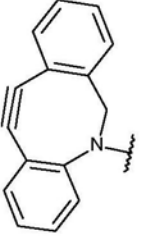
[0550] 在一些实施方案中,  $R^{LL1}$  和  $R^{LL2}$  具有式IIIa'。

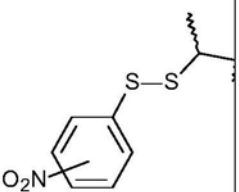
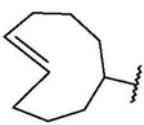
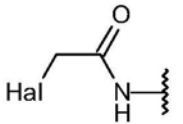
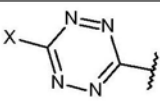
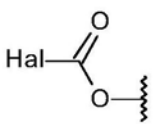
[0551] 在一些实施方案中,  $R^{L1}$  和  $R^{L2}$  具有式IIIa。

[0552]  $G^L$

[0553]  $G^L$  可选自

[0554]

(G <sup>L1-1</sup> )		(G <sup>L6</sup> )	
(G <sup>L1-2</sup> )		(G <sup>L7</sup> )	
(G <sup>L2</sup> )		(G <sup>L8</sup> )	
(G <sup>L3-1</sup> )	 其中 NO <sub>2</sub> 基团是任选的	(G <sup>L9</sup> )	
(G <sup>L3-2</sup> )	 其中 NO <sub>2</sub> 基团是任选的	(G <sup>L10</sup> )	
(G <sup>L3-3</sup> )	 其中 NO <sub>2</sub> 基团是	(G <sup>L11</sup> )	

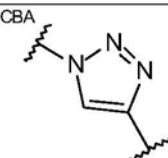
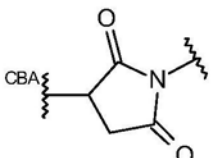
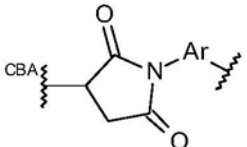
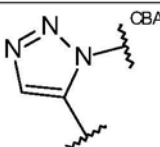
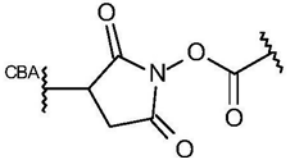
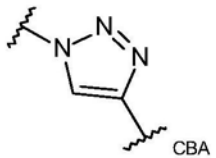
	任选的		
(G <sup>L3-4</sup> )	 <p>其中 NO<sub>2</sub> 基团是任选的</p>	(G <sup>LI2</sup> )	
[0555]	<p>(G<sup>L4</sup>)</p>  <p>其中 Hal = I、Br、Cl</p>	(G <sup>LI3</sup> )	
	<p>(G<sup>L5</sup>)</p> 		

[0556] 其中Ar代表C<sub>5-6</sub>亚芳基,例如亚苯基,并且X代表C<sup>1-4</sup>烷基。

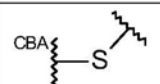
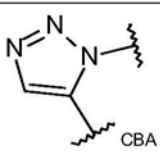
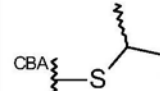
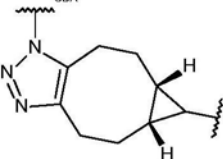
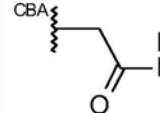
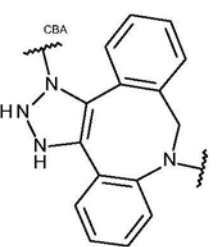
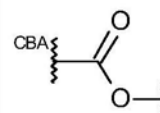
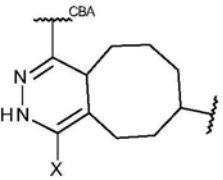
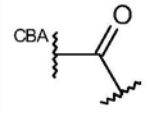
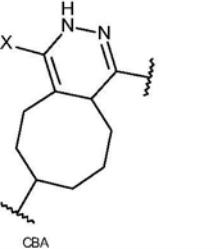
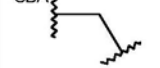
[0557] 在一些实施方案中,G<sup>L</sup>选自G<sup>L1-1</sup>和G<sup>L1-2</sup>。在这些实施方案的一些中,G<sup>L</sup>是G<sup>L1-1</sup>。

[0558] G<sup>LL</sup>

[0559] G<sup>LL</sup>可选自:

	(G <sup>LL1-1</sup> )	(G <sup>LL8-1</sup> )	
			
[0560]	<p>(G<sup>LL1-2</sup>)</p> 	(G <sup>LL8-2</sup> )	
	<p>(G<sup>LL2</sup>)</p> 	(G <sup>LL9-1</sup> )	

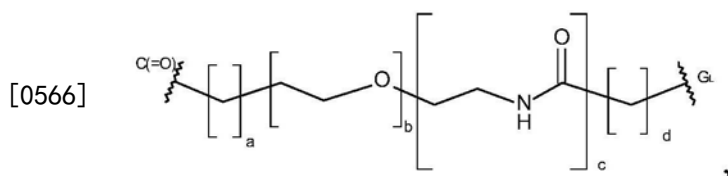
[0561]

$(G^{LL3-1})$		$(G^{LL9-2})$	
$(G^{LL3-2})$		$G^{LI10}$	
$(G^{LL4})$		$G^{LI11}$	
$(G^{LL5})$		$G^{LI12}$	
$(G^{LL6})$		$G^{LI13}$	
$(G^{LL7})$			

[0562] 其中Ar代表C<sub>5-6</sub>亚芳基,例如亚苯基并且X代表C<sup>1-4</sup>烷基。[0563] 在一些实施方案中,G<sup>LL</sup>选自G<sup>LL1-1</sup>和G<sup>LL1-2</sup>。在这些实施方案的一些中,G<sup>LL</sup>是G<sup>LL1-1</sup>。

[0564] X

[0565] X是:



[0567] 其中a=0至5,b=0至16,c=0或1,d=0至5。

[0568] a可以是0、1、2、3、4或5。在一些实施方案中,a是0至3。在这些实施方案的一些中,a是0或1。在另外的实施方案中,a是0。

[0569] b可以是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。在一些实施方案中,b是0至12。在这些实施方案的一些中,b是0至8,并且可以是0、2、4或8。

[0570] c可以是0或1。

[0571] d可以是0、1、2、3、4或5。在一些实施方案中,d是0至3。在这些实施方案的一些中,d是1或2。在另外的实施方案中,d是2。

[0572] 在X的一些实施方案中,a是0,c是1且d是2,并且b可以是0至8。在这些实施方案的一些中,b是0、4或8。

[0573]  $Q^X$

[0574] 在一个实施方案中, $Q^X$ 是氨基酸残基。氨基酸可以是天然氨基酸或非天然氨基酸。

[0575] 在一个实施方案中, $Q^X$ 选自:Phe、Lys、Val、Ala、Cit、Leu、Ile、Arg和Trp,其中Cit是瓜氨酸。

[0576] 在一个实施方案中, $Q^X$ 包括二肽残基。二肽中的氨基酸可以是天然氨基酸和非天然氨基酸的任何组合。在一些实施方案中,二肽包含天然氨基酸。在接头是组织蛋白酶不稳定接头的情况下,二肽是组织蛋白酶介导的切割的作用位点。则二肽是组织蛋白酶的识别位点。

[0577] 在一个实施方案中, $Q^X$ 选自:

[0578]  $^{CO}\text{-Phe-Lys-NH}$ 、

[0579]  $^{CO}\text{-Val-Ala-NH}$ 、

[0580]  $^{CO}\text{-Val-Lys-NH}$ 、

[0581]  $^{CO}\text{-Ala-Lys-NH}$ 、

[0582]  $^{CO}\text{-Val-Cit-NH}$ 、

[0583]  $^{CO}\text{-Phe-Cit-NH}$ 、

[0584]  $^{CO}\text{-Leu-Cit-NH}$ 、

[0585]  $^{CO}\text{-Ile-Cit-NH}$ 、

[0586]  $^{CO}\text{-Phe-Arg-NH}$ 以及

[0587]  $^{CO}\text{-Trp-Cit-NH}$ ;

[0588] 其中Cit是瓜氨酸。

[0589] 优选地, $Q^X$ 选自:

[0590]  $^{CO}\text{-Phe-Lys-NH}$ 、

[0591]  $^{CO}\text{-Val-Ala-NH}$ 、

[0592]  $^{CO}\text{-Val-Lys-NH}$ 、

[0593]  $^{CO}\text{-Ala-Lys-NH}$ 、

[0594]  $^{CO}\text{-Val-Cit-NH}$ 。

[0595] 最优选地, $Q^X$ 选自 $^{CO}\text{-Phe-Lys-NH}$ 、 $^{CO}\text{-Val-Cit-NH}$ 和 $^{CO}\text{-Val-Ala-NH}$ 。

[0596] 感兴趣的其他二肽组合包括:

[0597]  $^{CO}\text{-Gly-Gly-NH}$ 、

[0598]  $^{CO}\text{-Pro-Pro-NH}$ 以及

[0599]  $^{CO}\text{-Val-Glu-NH}$ 。

[0600] 可使用其他二肽组合,包括Dubowchik等,Bioconjugate Chemistry, 2002,13, 855-869 (其通过引用并入本文)所述的那些。

[0601] 在一些实施方案中, $Q^X$ 是三肽残基。三肽中的氨基酸可以是天然氨基酸和非天然氨基酸的任何组合。在一些实施方案中,三肽包含天然氨基酸。当接头是组织蛋白酶不稳定

接头时,三肽是组织蛋白酶介导的切割的作用位点。则三肽是组织蛋白酶的识别位点。

[0602] 在一个实施方案中,在适当时,氨基酸侧链被化学保护。侧链保护基可以是如下文所论述的基团。受保护的氨基酸序列可被酶切割。例如,包含Boc侧链保护的Lys残基的二肽序列可被组织蛋白切割。

[0603] 氨基酸侧链的保护基团是本领域熟知的,并且描述于 Novabiochem目录中并且如上所述。

[0604] 在一些实施方案中, $R^{LL1}$ 和 $R^{LL2}$ 具有式IIIb'。

[0605] 在一些实施方案中, $R^{L1}$ 和 $R^{L2}$ 具有式IIIb。

[0606]  $R^{SL1}$ 和 $R^{SL2}$ 独立地选自H和甲基,或与它们所结合的碳原子一起形成亚环丙基或亚环丁基。

[0607] 在一些实施方案中, $R^{SL1}$ 和 $R^{SL2}$ 均为H。

[0608] 在一些实施方案中, $R^{SL1}$ 是H并且 $R^{SL2}$ 是甲基。

[0609] 在一些实施方案中, $R^{SL1}$ 和 $R^{SL2}$ 均为甲基。

[0610] 在一些实施方案中, $R^{SL1}$ 和 $R^{L2}$ 与它们所结合的碳原子一起形成亚环丙基。

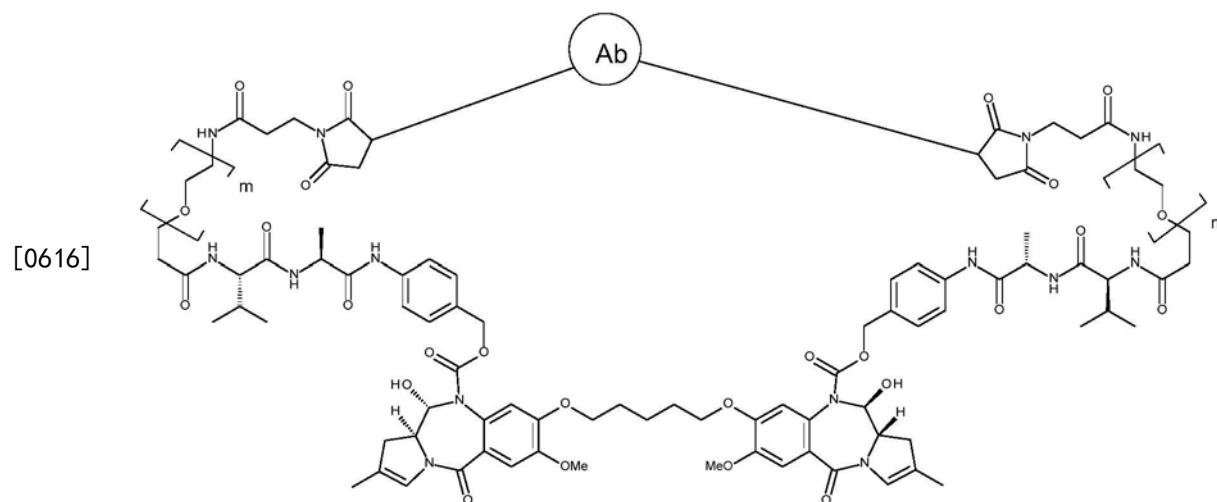
[0611] 在一些实施方案中, $R^{SL1}$ 和 $R^{SL2}$ 与它们所结合的碳原子一起形成亚环丁基。

[0612] 在基团IIIb中,在一些实施方案中,e是0。在其他实施方案中,e是1且硝基可处于环的任何可用位置。在这些实施方案的一些中,它处于邻位。在这些实施方案的其他者中,它处于对位。

[0613] 在一些实施方案中, $R^{L1}$ 和 $R^{L2}$ 是相同的。

[0614] 在一些实施方案中, $R^{LL1}$ 和 $R^{LL2}$ 是相同的。

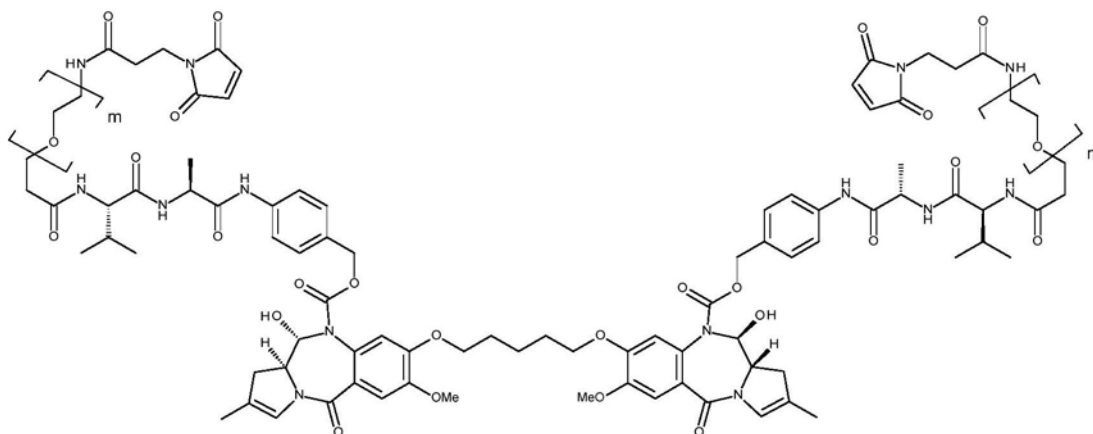
[0615] 在一个特定实施方案中,本发明的第一方面包括式Id的缀合物:



[0617] 其中m是2至8的整数。

[0618] 在一个特定实施方案中,本发明的第二方面,药物接头( $D^L$ )具有式(Id'):

[0619]



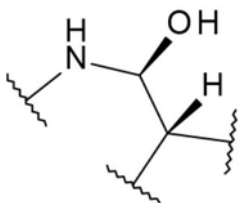
[0620] 其中m是2至8的整数。

[0621] 在一些实施方案中, $R^{L1}$ 和 $R^{L2}$ 是不同的。[0622] 在一些实施方案中, $R^{LL1}$ 和 $R^{LL2}$ 是不同的。

[0623] 具体地,在其中连接基团不同的实施方案中,差异可仅在G基团中,使得连接基团的其余部分是相同的(以使切割触发物是相同的)。

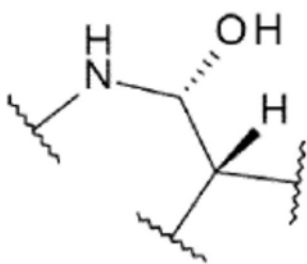
[0624] 在本发明的一些实施方案中,C11取代基可相对于相邻基团处于以下立体化学布置:

[0625]



[0626] 在其他实施方案中,C11取代基可相对于相邻基团处于以下立体化学布置:

[0627]



[0628] 特别感兴趣的化合物包括实施例的那些化合物。

## 实施例

[0629] 在压力下使用硅胶进行快速色谱。在铝板上利用荧光指示剂,使用Merck Kieselgel 60F254硅胶,用薄层色谱(TLC)检查级分的纯度。除非另有说明,借助于UV光或碘蒸气来实现TLC的可视化。从VWR U.K.购买萃取和色谱溶剂且不经进一步纯化即使用。所有精细化学品购自Sigma-Aldrich,除非另行指出。聚乙二醇化试剂通过Stratech UK 从Quanta biodesign US获得或通过Thermo Fische从Pierce Scientific 获得。

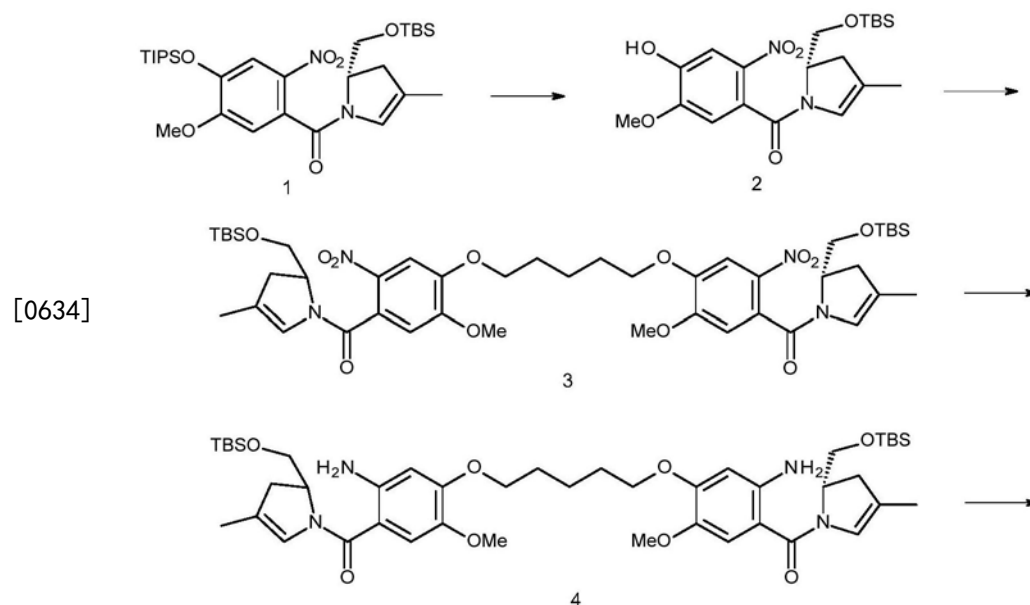
[0630]  $^1H$ 和 $^{13}C$  NMR光谱在Bruker Avance®400光谱仪上获得。耦合常数以赫兹(Hz)给

出。化学位移是以从四甲基硅烷往低磁场的每百万分数(ppm)报道。自旋多重态描述为s(单峰)、bs(宽单峰)、d(双重峰)、t(三重峰)和m(多重峰)。

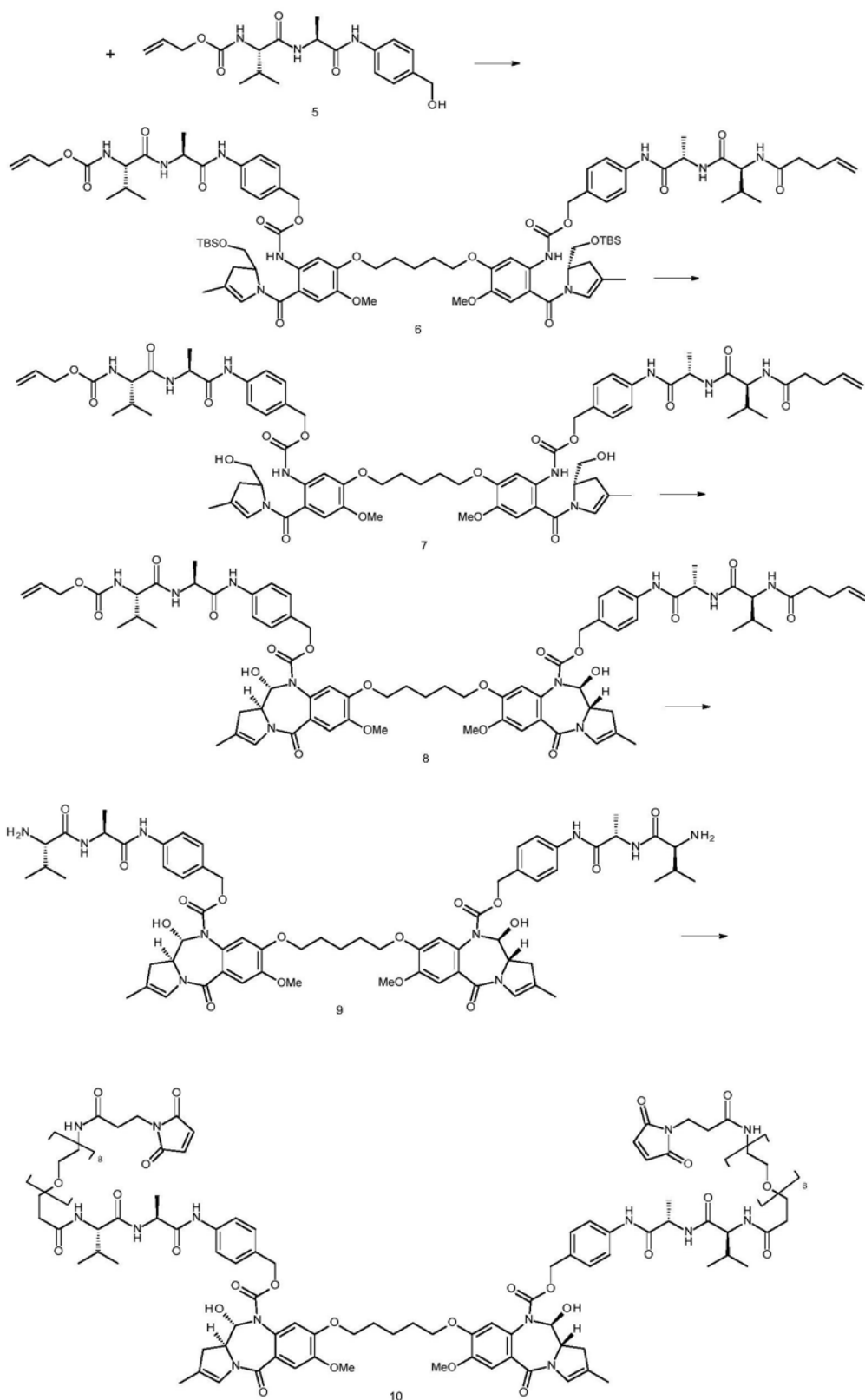
[0631] 分析型LC/MS条件(用于反应监测和纯度确定)如下:使用 Shimadzu Nexera®/Prominence®LCMS-2020进行阳性模式电喷雾质谱。使用的流动相是溶剂A(具有0.1%甲酸的H<sub>2</sub>O)和溶剂B(具有0.1%甲酸的CH<sub>3</sub>CN)。常规3分钟运行的梯度:初始组成5%B保持25秒,然后经1分钟35秒的时段从5%B增加至100%B。组成在100%B处保持50秒,然后在5秒内回到5%B且在此处保持5秒。梯度运行的总持续时间为3.0分钟。15分钟运行的梯度:初始组成5%B保持1.25分钟,然后经8.75分钟的时段从5%B增加至100%B。组成在100%B处保持2.5分钟,然后在30秒内回到5%B且在此处保持2分钟。梯度运行的总持续时间为15.0分钟。流速为0.8毫升/分钟(运行3分钟)和0.5毫升/分钟(运行15分钟)。在254nm下检测。柱:Waters Acquity UPLC®BEH Shield RP18 1.7μm 2.1x 50mm,在50℃下,配备有Waters Acquity UPLC®BEH Shield RP18 VanGuard 前置柱,130A,1.7μm,2.1mm x 5mm(常规3分钟运行);以Waters Acquity UPLC CSH C18,1.7μm,2.1x 100mm,配备有Waters Acquity UPLC®BEH Shield RP18 VanGuard前置柱,130A,1.7μm,2.1mm x 5mm(15分钟运行)。

[0632] 制备型HPLC条件如下:反相超快速高效液相色谱(UFLC)在 Shimadzu Prominence®机器上使用Phenomenex®Gemini NX 5μC18 柱(在50℃下)150x 21.2mm进行。使用的洗脱液是溶剂A(具有0.05%甲酸的H<sub>2</sub>O)和溶剂B(具有0.05%甲酸的CH<sub>3</sub>CN)。所有UFLC实验均使用梯度条件进行:初始组成13%B,然后以适于实现期望分离的梯度经总共17分钟将组成增加至100%B,接着在100%B下保持1分钟,然后在0.1分钟内回到13%B并且在此处保持1.9分钟。梯度运行的总持续时间为20.0分钟。流速为20.0毫升/分钟并且在254nm和280nm下进行检测。

[0633] 实施例1







[0635]

[0636] (a) (S)-2-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-4-甲基-2,3-二氢-1H-吡咯-1-基)(4-羟基-5-甲氧基-2-硝基苯基)甲酮(2)

[0637] 将乙酸锂二水合物(3.52g, 34.5mmol, 1.0当量)添加到TIPS醚(1)(19.96g, 34.5mmol, 1.0当量)在DMF/H<sub>2</sub>O(300mL/4mL)中的经搅拌溶液中。在室温下搅拌所得红色溶液3.5h。将反应混合物用EtOAc(600mL)稀释并且用1M柠檬酸溶液(2x 250mL)、H<sub>2</sub>O(2x

250mL)、饱和盐水(300mL)洗涤并干燥(MgSO<sub>4</sub>)。在减压下蒸发溶剂,以得到为黄色固体的产物(14.57g,100%)。产物不经进一步纯化即使用。分析数据:LC/MS,RT 1.74min;MS(ES<sup>+</sup>)m/z(相对强度)423([M+H]<sup>+</sup>,100);445([M+Na]<sup>+</sup>,75)。

[0638] (b) ((戊烷-1,5-二基双(氧基))双(5-甲氧基-2-硝基-4,1-亚苯基))双(((S)-2-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-4-甲基-2,3-二氢-1H-吡咯-1-基)甲酮)(3)

[0639] 将碳酸钾(5.03g,36.44mmol,1.1当量)添加到苯酚(2)(14g,33.13 mmol,1.0当量)和1,5-二碘戊烷(21.46g,9.86mL,66.26mmol,2.0 当量)在DMF(250mL)中的经搅拌溶液中。将溶液在70℃下加热3.5 h。将溶液倒入冰/水的混合物(800mL)中并且用EtOAc(4x 500mL)萃取。合并的萃取物用H<sub>2</sub>O(2x 250mL)、饱和盐水(400mL)洗涤,干燥(MgSO<sub>4</sub>)并且在减压下蒸发以得到褐色油状物。通过快速柱色谱[正庚烷/EtOAc 40%至80%,增量为10%]进行纯化,得到为黄色泡沫的产物(12.7g,85%)。分析数据:LC/MS,RT 2.16min;MS(ES<sup>+</sup>)m/z(相对强度)913([M+H]<sup>+</sup>,100);935([M+Na]<sup>+</sup>,100)。

[0640] (c) ((戊烷-1,5-二基双(氧基))双(2-氨基-5-甲氧基-4,1-亚苯基))双(((S)-2-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-4-甲基-2,3-二氢-1H-吡咯-1-基)甲酮)(4)

[0641] 用1M HCl(100mL)处理锌粉(19.9g,304mmol,40当量)并在室温下搅拌10分钟。然后将混合物超声波处理10分钟并且通过真空过滤收集活化的锌,然后用1M HCl(50mL)、H<sub>2</sub>O(至pH 6至7)、MeOH 洗涤并在过滤垫上真空干燥。在室温下将活化的锌添加到双硝基化合物(3)(6.94g,7.6mmol,1.0当量)在EtOH/H<sub>2</sub>O/EtOAc(60mL/4mL/60 mL)中的经剧烈搅拌的溶液中。将反应混合物用5%v/v(体积/体积)HCO<sub>2</sub>H在MeOH(76mL)中的溶液逐滴处理。观察到从绿色到银灰色的颜色变化且放热至42℃。一旦放热已经减弱至30℃,LC/MS指示反应不完全。再添加一部分在MeOH(20mL)中的5%v/v HCO<sub>2</sub>H并且观察到另外的放热(34℃)。使反应混合物冷却至室温,此时LC/MS 的分析显示完全转化为期望产物。将混合物通过**硅藻土®**过滤并将垫用EtOAc洗涤。将滤液用饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液(2x 300mL)、水(300 mL)、饱和盐水(300mL)洗涤,干燥(MgSO<sub>4</sub>),过滤并真空蒸发以提供为黄色泡沫的双苯胺(6.22g,96%)。产物不经进一步纯化即使用。分析数据:LC/MS,RT 2.12min;MS(ES<sup>+</sup>)m/z(相对强度)853([M+H]<sup>+</sup>,15)。

[0642] (d) 双(4-((S)-2-((S)-2-((烯丙氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苄基)((戊烷-1,5-二基双(氧基))双(6-((S)-2-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-4-甲基-2,3-二氢-1H-吡咯-1-羰基)-4-甲氧基-3,1-亚苯基))二氨基甲酸酯(6)

[0643] 在氩气气氛下,通过注射器将三乙胺(0.171g,235μL,1.69mmol,4.4当量)添加到双苯胺(4)(0.33g,0.38mmol,1.0当量)和三光气(0.082 g,0.28mmol,0.72当量)在无水THF中的经搅拌溶液中。将所得悬浮液加热至40℃并且在5min后,在MeOH中取样,以作为双(氨基甲酸甲酯)(bis methyl carbamate)用于LC/MS(MS(ES<sup>+</sup>)m/z(相对强度)969([M+H]<sup>+</sup>,80);992([M+Na]<sup>+</sup>,100)。添加二月桂酸二丁基锡(0.024g,23μL,38μmol,0.1当量),接着添加固体接头(5)(0.319g,0.85mmol,2.2当量)和三甲胺(0.085g,118μL,0.85mmol,2.2当量)并且将混合物在40℃下,在搅拌、氩气气氛下加热5h。将反应混合物冷却,过滤并且将THF减压蒸发。通过快速柱色谱[CHCl<sub>3</sub>/MeOH 0%、1%、1.5%、2%,梯度洗脱]纯化残余物,以得到为黄色泡沫的产物(0.42g,66%)。分析数据:LC/MS,RT 2.16min;MS(ES<sup>+</sup>)m/z(相对强度)1660([M+H]<sup>+</sup>,60);1682([M+Na]<sup>+</sup>,65)。

[0644] (e) 双(4-((S)-2-((S)-2-(((烯丙氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苄基)((戊烷-1,5-二基双(氧基))双(6-((S)-2-(羟甲基)-4-甲基-2,3-二氢-1H-吡咯-1-羰基)-4-甲氧基-3,1-亚苯基))二氨基甲酸酯(7)

[0645] 将对甲苯磺酸(0.296g, 1.7mmol, 2.2当量)添加到双叔丁基二甲基甲硅烷基醚(6)(1.26g, 0.76mmol, 1.0当量)处于在THF中的10% v/v H<sub>2</sub>O中的经搅拌溶液中。将溶液在室温下搅拌18h。将反应混合物用EtOAc(100mL)稀释并且用饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液(2x 100mL)、H<sub>2</sub>O(100mL)、饱和盐水(100mL)洗涤、干燥(MgSO<sub>4</sub>)并减压蒸发。通过快速柱色谱[CHCl<sub>3</sub>/MeOH 0%至5%, 增量为1%]纯化残余物,以得到为黄色泡沫的产物(0.896g, 92%)。分析数据:LC/MS, RT 1.61min; MS(ES<sup>+</sup>)m/z(相对强度)1432([M+H]<sup>+</sup>, 5); 1454([M+Na]<sup>+</sup>, 5)。

[0646] (f) 双(4-((S)-2-((S)-2-(((烯丙氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苄基)8,8'-(戊烷-1,5-二基双(氧基))(11S, 11aS, 11'S, 11a'S)-双(11-羟基-7-甲氧基-2-甲基-5-氧代-11,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~草~~-10(5H)-羧酸酯)(8)

[0647] 将Dess-Martin过碘烷(0.24g, 0.57mmol, 2.0当量)添加到双-醇(7)在无水DCM(20mL)中的经搅拌溶液中。将所得白色悬浮液在室温下搅拌24h。将反应混合物用DCM(100mL)稀释并且用饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液(2x 100mL)、水(100mL)、饱和盐水(100mL)萃取、干燥(MgSO<sub>4</sub>)并减压蒸发。通过快速柱色谱[CHCl<sub>3</sub>/MeOH 0%至3%, 增量为0.5%]进行纯化,得到为白色泡沫的产物(0.28g, 69%)。分析数据:LC/MS, RT 1.58min; MS(ES<sup>+</sup>)m/z(相对强度)1428([M+H]<sup>+</sup>, 20); 1450([M+Na]<sup>+</sup>, 30)。

[0648] (g) 双(4-((S)-2-((S)-2-氨基-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苄基)8,8'-(戊烷-1,5-二基双(氧基))(11S, 11aS, 11'S, 11a'S)-双(11-羟基-7-甲氧基-2-甲基-5-氧代-11,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~草~~-10(5H)-羧酸酯)(9)

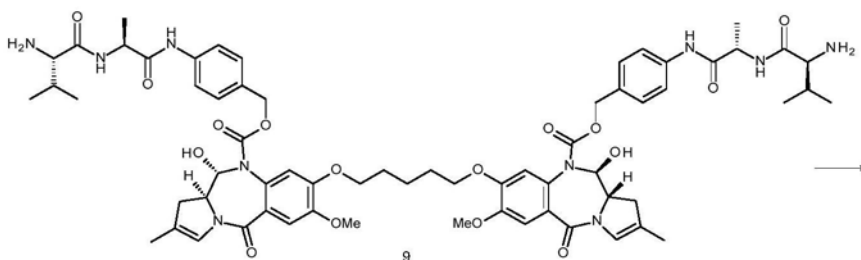
[0649] 将Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(8mg, 7μmol, 0.04当量)添加到双alloc衍生物(8)(0.25g, 0.176mmol, 1.0当量)和吡咯烷(31mg, 36μL, 0.44mmol, 2.5当量)在无水DCM(10mL)中的经搅拌溶液中。将溶液在室温下搅拌2h。将反应混合物在NH<sub>4</sub>Cl饱和溶液(50mL)与DCM(50mL)之间分配。将DCM分离并用饱和盐水(100mL)洗涤、干燥(MgSO<sub>4</sub>)并减压蒸发。将固体残余物用Et<sub>2</sub>O(3x 15mL)研磨/超声波处理并且真空干燥,以得到为白色固体的产物(0.207g, 93%)。产物不经进一步纯化即使用。分析数据:LC/MS, RT 1.06min; MS(ES<sup>+</sup>)m/z(相对强度)630([M+2H]<sup>+</sup>, 100)。

[0650] (h) 双(4-((2S,5S)-37-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-5-异丙基-2-甲基-4,7,35-三氧代-10,13,16,19,22,25,28,31-八氧杂-3,6,34-三氮杂三十七烷酰氨基)苄基)8,8'-(戊烷-1,5-二基双(氧基))(11S, 11aS, 11'S, 11a'S)-双(11-羟基-7-甲氧基-2-甲基-5-氧代-11,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~草~~-10(5H)-羧酸酯)(10)

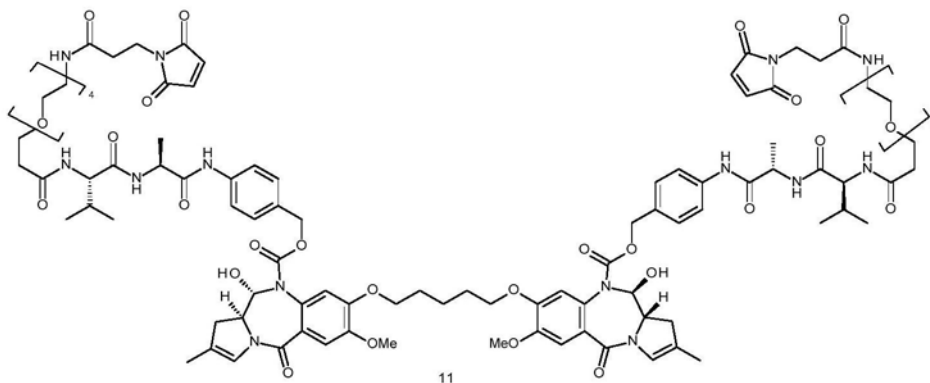
[0651] 将EDCI·HCl(56mg, 0.29mmol, 3当量)添加到双-胺(9)(0.123g, 98μmol, 1.0当量)和MaldPEG®OH(0.128g, 0.22mmol, 2.2当量)在CHCl<sub>3</sub>(15mL)中的经搅拌溶液中。将反应混合物在室温下搅拌30 min,接着用CHCl<sub>3</sub>(50mL)稀释,用H<sub>2</sub>O(100mL)、饱和盐水(100mL)洗涤、干燥(MgSO<sub>4</sub>)并减压蒸发。通过制备型HPLC纯化,接着冻干得到为白色泡沫的产物(0.047g, 20%)。分析数据:LC/MS, RT 6.61 min; MS(ES<sup>+</sup>)m/z(相对强度)1205([M+2H]<sup>+</sup>,

55)。

[0652] 实施例2



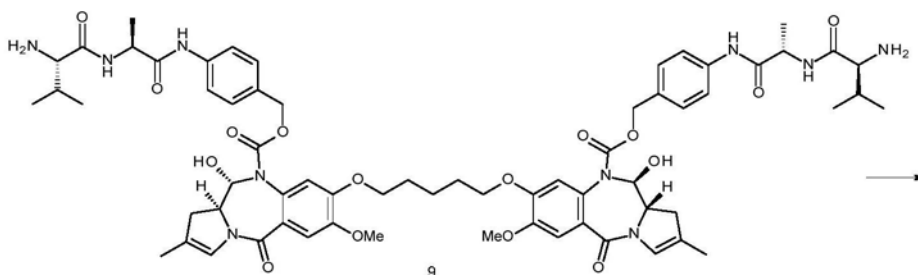
[0653]



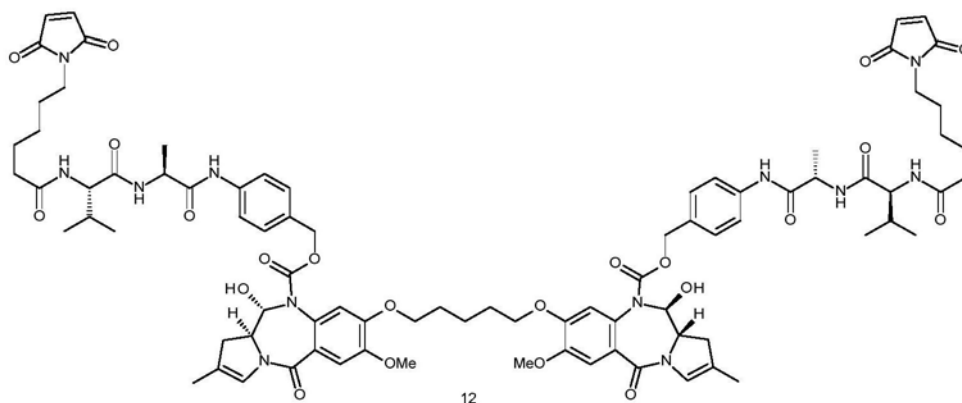
[0654] 双(4-((2S,5S)-25-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-5-异丙基-2-甲基-4,7,23-三氧代-10,13,16,19-四氧杂-3,6,22-三氮杂二十五烷酰氨基)苄基)8,8'-(戊烷-1,5-二基双(氧基)) (11S,11aS,11'S,11a'S)-双(11-羟基-7-甲氧基-2-甲基-5-氧代-11,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~草~~-10(5H)-羧酸酯) (11)

[0655] 将DIPEA (30mg, 42μL, 0.23mmol, 3当量) 添加到双-胺 (9) (98 mg, 78μmol, 1.0当量) 和Ma1PEG<sub>4</sub>OSu (88mg, 0.17mmol, 2.2当量) 在CHCl<sub>3</sub> (10mL) 中的经搅拌溶液中。将反应混合物在室温下搅拌 72h, 接着用CHCl<sub>3</sub> (50mL) 稀释, 用H<sub>2</sub>O (100mL)、饱和盐水 (100mL) 洗涤、干燥 (MgSO<sub>4</sub>) 并减压蒸发。通过制备型HPLC纯化, 接着冻干得到为白色泡沫的产物 (0.043g, 25%)。分析数据: LC/MS, RT 6.11 min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 1028 ([M+2H]<sup>+</sup>, 80)。

[0656] 实施例3



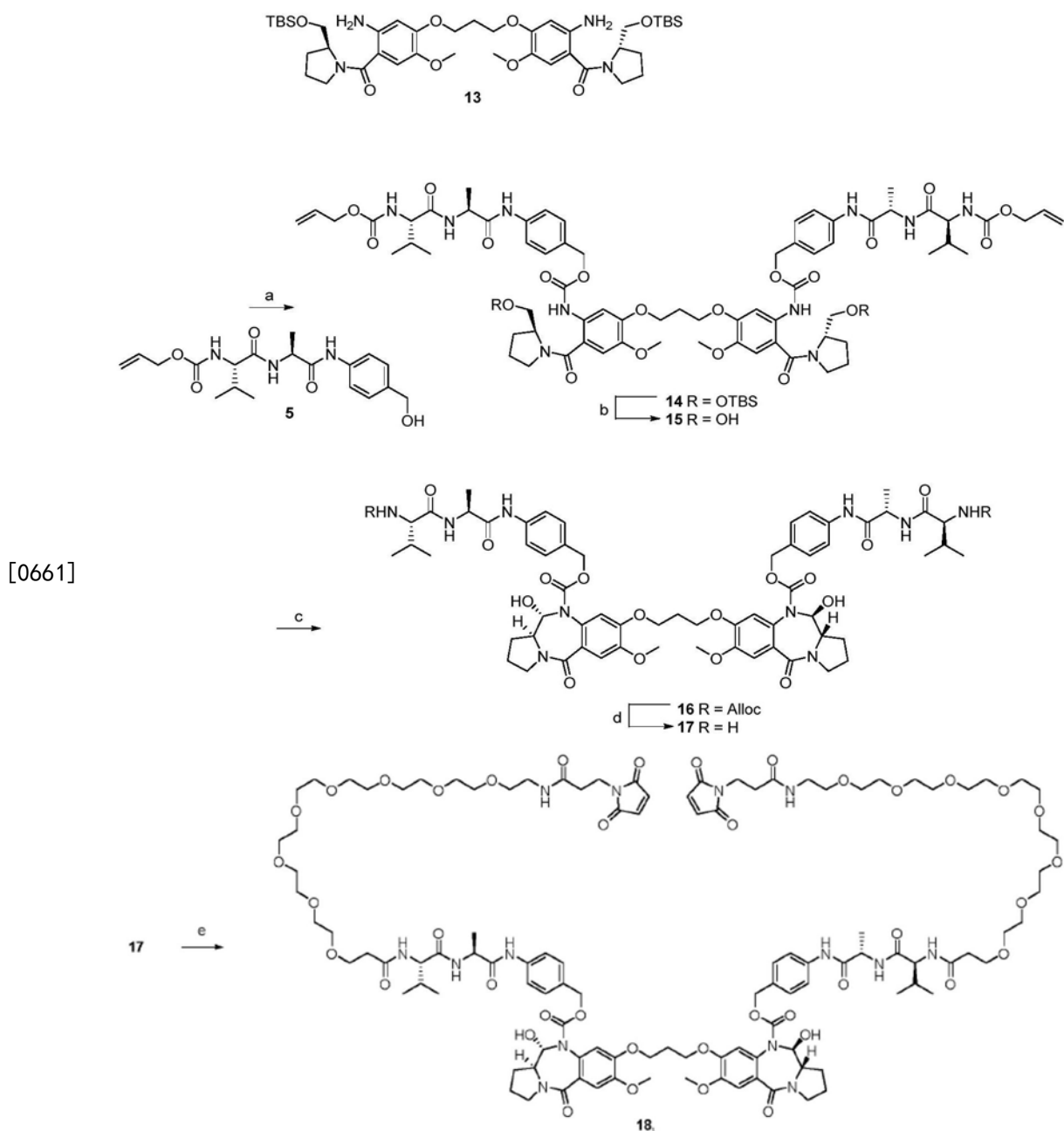
[0657]



[0658] 双(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苄基)8,8'-(戊烷-1,5-二基双(氧基))(11S,11aS,11'S,11a'S)-双(11-羟基-7-甲氧基-2-甲基-5-氧代-11,11a-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~草~~-10(5H)-羧酸酯)(12)

[0659] 将EDCI.HCl (50mg, 0.26mmol, 3当量)添加到双-胺(9) (0.109g, 86.5 $\mu$ mol, 1.0当量)和MCOSu (40mg, 0.19mmol, 2.2当量)在CHCl<sub>3</sub> (10mL)中的经搅拌溶液中。将反应混合物在室温下搅拌30min,接着用CHCl<sub>3</sub> (50mL)稀释,用H<sub>2</sub>O (100mL)、饱和盐水(100mL)洗涤、干燥(MgSO<sub>4</sub>)并减压蒸发。通过制备型HPLC纯化,接着冻干得到为白色泡沫的产物(0.045g, 32%)。分析数据:LC/MS, RT 6.82min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 1646 ([M+H]<sup>+</sup>, 20); 1667 ([M+Na]<sup>+</sup>, 30)。

[0660] 实施例4



[0662] (a) 双(4-((S)-2-((S)-2-((烯丙氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苄基)((丙烷-1,3-二基双(氧基))双(6-((S)-2-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)吡咯烷-1-羰基)-4-甲氧基-3,1-亚苯基))二氨基甲酸酯(14)

[0663] 将三光气(472mg, 1.59mmol, 0.72当量)一次性添加到13(1.77g, 2.21mmol)和三乙胺(1.35mL, 9.69mmol, 4.38当量)在二氯甲烷(3.6 mL)中的混合物中。10min后, 一次性添加为细粉的5(1.83g, 4.85 mmol, 2.19当量), 然后添加三乙胺(0.68mL, 4.9mmol, 2.2当量)和二月桂酸二丁基锡(132μL, 0.221mmol, 0.1当量)。将反应混合物在37℃下搅拌4h, 然后在室温下搅拌过夜。将有机相用水洗涤并且在滤筒中滗析。通过蒸发去除DCM, 并且将残余物干燥加载在硅胶上, 之后用50g ultra biotage筒进行色谱(梯度DCM/DCM:MeOH 90:10, 从5%至最高32%, 在32%下洗脱)。合并纯级分以得到产物 14(2.35g, 1.46mmol, 66.2%收率)。

[0664] 分析数据:LC/MS,3min亲脂性方法,RT 2.24min;MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 1608.9 ([M+H]<sup>+</sup>,100);

[0665] (b) 双(4-((S)-2-((S)-2-((烯丙氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苄基)((丙烷-1,3-二基双(氧基))双(6-((S)-2-(羟甲基)吡咯烷-1-羰基)-4-甲氧基-3,1-亚苯基))二氨基甲酸酯(15)

[0666] 在0℃(冰/水浴)下,将对甲苯磺酸水合物(277mg,1.46mmol,1当量)一次性添加到14(2.34g,1.46mmol)在四氢呋喃(53.0mL)和水(5.00mL)中的混合物中。将反应混合物在20℃下搅拌7h,直到通过LCMS监测到反应完全。将反应混合物在乙酸乙酯与水之间分配,并且用NaHCO<sub>3</sub>洗涤,接着用盐水洗涤。将有机物经硫酸镁干燥并真空浓缩。残余物通过色谱纯化(50g ultra,干燥加载在samplet上,DCM对DCM:MeOH 90:10,梯度从20%至64%,在64%左右洗脱。将纯级分合并,并且真空浓缩以得到为白色固体的产物15(1.60g,1.16mmol,79.7%收率)。

[0667] 分析数据:LC/MS,3min亲脂性方法,RT 1.50min;MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 1380.9 ([M+H]<sup>+</sup>,100);

[0668] (c) 双(4-((S)-2-((S)-2-((烯丙氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苄基)8,8'-((丙烷-1,3-二基双(氧基))(11S,11aS,11'S,11a'S)-双(11-羟基-7-甲氧基-5-氧代-2,3,11,11a-四氢-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂~~草~~-10(5H)-羧酸酯)(16)

[0669] 在500mL烧瓶中将Stahl Tempo 0.2M溶液(2.10mL,0.420 mmol,0.44当量),以及随后的四乙腈三氟甲磺酸铜(I)(160mg,0.425 mmol,0.44当量)添加到15(1.32g,0.957mmol)在DMF(4.00mL)中的溶液中。将反应混合物快速搅拌并且在40℃下搅拌5h,然后在气球下在35℃下搅拌18h,此时通过LCMS观察到反应完全。通过蒸发去除溶剂。通过在丁酮以及随后的高真空下二次蒸发去除痕量DMF。将残余物干燥加载在具有丙酮的samplet(10g)上,然后用50g ultra柱在biotage isolera系统上进行色谱。梯度使用在DCM中的10% MeOH/DCM,从20%至最高63%,在8CV中。在60%左右洗脱并保持。在25g柱上使用相同的系统重新纯化不纯的前级分。将所有纯级分汇集。将残余物溶解于丙酮中。添加庚烷导致白色产物沉淀。将挥发性物质蒸发以在高真空后留下为白色粉末的产物16。(892mg,0.648mmol,67.8%收率)分析数据:LC/MS,3min亲脂性方法,RT 1.42min;MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 1376.6 ([M+H]<sup>+</sup>,100);

[0670] (d) 双(4-((S)-2-((S)-2-氨基-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苄基)8,8'-((丙烷-1,3-二基双(氧基))(11S,11aS,11'S,11a'S)-双(11-羟基-7-甲氧基-5-氧代-2,3,11,11a-四氢-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂~~草~~-10(5H)-羧酸酯)(17)

[0671] 将四(三苯基膦)钯(0)(10.0mg,0.00865mmol,0.034当量)添加到16(350mg,0.254mmol)和吡咯烷(65.0μL,0.780mmol,3.07当量)在二氯甲烷(7.50mL)和甲醇(0.5mL)中的混合物中。将反应混合物在氩气、室温下搅拌1h 30分钟并且通过LCMS发现反应完全。

[0672] 添加氯化铵水溶液(30mL,34.3mmol,6质量%)并且剧烈搅拌混合物。然后在biotage相分离筒中淬析混合物。在真空下将DCM层蒸发至干燥。将残余物溶解于氯仿(20mL)中并且在真空、35℃下通过蒸发去除溶剂。再次重复此循环,然后在高真空(3mbar)下干燥以得到为白色固体的粗产物17(307mg,0.254mmol,100%),其无需进一步纯化即直

接用于下一步骤。分析数据:LC/MS,3min亲脂性方法,2个峰,RT 0.22min;MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 604.9 ([M+2H]<sup>2+</sup>, 100); 1208.2 ([M+H]<sup>+</sup>, 10);

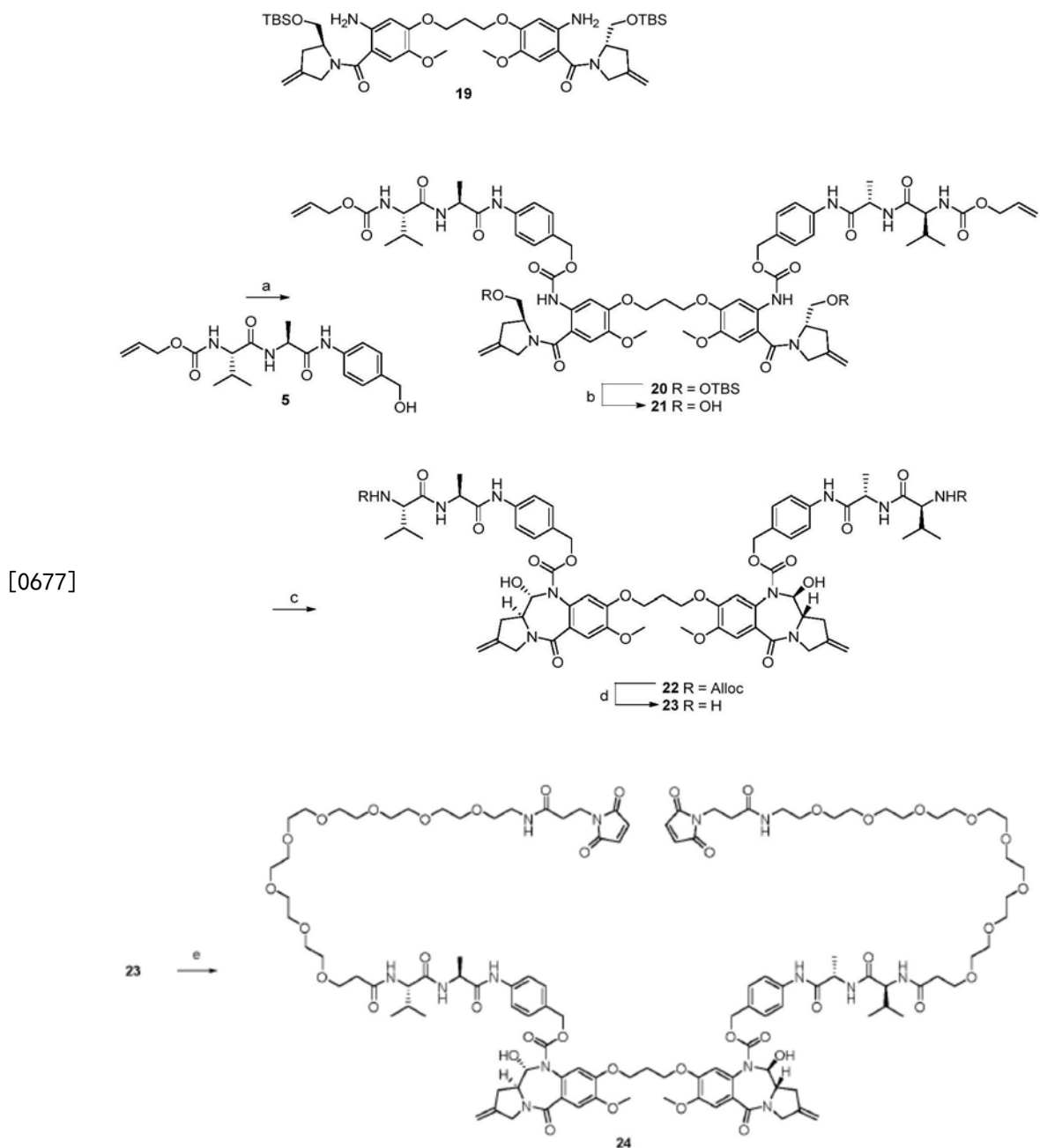
[0673] (e) 双(4-((2S,5S)-37-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-5-异丙基-2-甲基-4,7,35-三氧代-10,13,16,19,22,25,28,31-八氧杂-3,6,34-三氮杂三十七烷酰氨基)苄基)8,8'-(丙烷-1,3-二基双(氧基))(11S,11aS,11'S,11a'S)-双(11-羟基-7-甲氧基-5-氧代-2,3,11,11a-四氢-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂~~草~~-10(5H)-羧酸酯)(18)

[0674] 将氯仿(10.00mL)和甲醇(0.4mL)添加到粗17(307mg,0.254 mmol)中,然后添加mal-amido-peg8-acid(339mg,0.561mmol,2.2 当量)和EDCI(107mg,0.558mmol,2.19当量)。使反应在室温下进行45min,此时通过LCMS观察到反应完全。添加氯化铵水溶液(30 mL,6质量%)并且剧烈搅拌混合物。在biotage相分离筒中淬析混合物。在真空下将DCM层蒸发至干燥。

[0675] 通过旋转蒸发去除挥发性物质并且通过色谱纯化粗残余物(50g Ultra,Biotage,梯度30/70至100/0的在DCM中的16%MeOH/DCM,在10CV中;在多于10%的MeOH下洗脱)。通过TLC(在DCM中的 10%MeOH)分析所有级分。将纯级分汇集。通过蒸发去除溶剂以得到18(200mg)。LCMS分析显示出痕量mal-peg8-acid,并且将材料通过制备型HPLC进一步纯化、冷冻-干燥、在二氯甲烷中等分,并且在高真空下干燥,以得到为白色固体的18。纯度为99.45%。(B,110 mg,0.0467mmol,18.3%收率)。分析数据:LC/MS,15min方法,RT 5.90min;MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 1179.5 ([M+2H]<sup>2+</sup>, 100); <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.92 (s, 2H), 8.16 (d, J=6.9Hz, 2H), 7.99 (t, J = 5.7Hz, 2H), 7.86 (d, J=8.7Hz, 2H), 7.55 (s, 4H), 7.18 (s, 4H), 7.07 (s, 2H), 7.00 (s, 4H), 6.79 (s, 2H), 6.50 (s, 2H), 5.48 (s, 2H), 5.23-4.77 (m, 4H), 4.39 (t, J=7.0Hz, 2H), 4.22 (dd, J=8.7, 6.6Hz, 2H), 4.10 (s, 4H), 3.77 (s, 6H), 3.64-3.55 (m, 8H), 3.55-3.42 (m, 56H), 3.37 (t, J=5.9 Hz, 6H), 3.28 (t, J=8.3Hz, 2H), 3.15 (q, J=5.8Hz, 4H), 2.49-2.37 (m, 4H), 2.37-2.30 (m, 4H), 2.17 (s, 2H), 2.09-1.73 (m, 10H), 1.30 (d, J= 7.0Hz, 6H), 0.85 (dd, J=15.3, 6.7Hz, 12H)。

[0676] 实施例5





[0678] (a) 双(4-((S)-2-((S)-2-(((烯丙氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苄基)((丙烷-1,3-二基双(氧基))双(6-((S)-2-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羰基)-4-甲氧基-3,1-亚苯基))二氨基甲酸酯(20)

[0679] 在0℃下将三光气(816mg, 2.75mmol, 0.72当量)一次性添加到 19(3.15g, 3.82mmol)和三乙胺(2.34mL, 16.8mmol, 4.4当量)在二氯甲烷(75mL)中的混合物中。去除冰浴,并且在15min后,作为细粉一次性添加醇5(3.17g, 8.40mmol, 2.2当量),然后添加三乙胺(1.17 mL, 8.39mmol, 2.2当量)和二月桂酸二丁基锡(229μL, 0.383mmol, 0.1当量)。将反应混合物在37℃下搅拌1h,然后在室温下搅拌过夜。将有机相用DCM(100mL)稀释并且用水(200mL)、饱和氯化铵(100 mL)和盐水(50mL)洗涤,接着经硫酸镁干燥。通过减压蒸发去除挥发性物质。将粗产物干燥加载在硅胶上并且在340g Ultra上,利用在7CV 中的20%至最高100%的乙酸乙酯-丙酮梯度洗脱。在30%丙酮左右在 2CV中快速洗脱得到纯级分,将其

真空干燥以得到20 (4.00g, 2.45 mmol, 100质量%, 64.2%收率)。分析数据: LC/MS, 3min亲脂性方法, RT 2.34min; MS ( $ES^+$ )  $m/z$  (相对强度) 1661.1 ( $[M+H]^+$ , 100);

[0680] (b) 双(4-((S)-2-((S)-2-((烯丙氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苄基)((丙烷-1,3-二基双(氧基))双(6-((S)-2-(羟甲基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羰基)-4-甲氧基-3,1-亚苯基))二氨基甲酸酯(21)

[0681] 将双-TBS醚20 (4.00g, 2.45mmol) 和对甲苯磺酸水合物 (300mg, 1.58mmol) 溶解于2-甲基四氢呋喃 (25.0mL, 249mmol, 100质量%)、乙酸 (4.00mL, 69.8mmol, 100质量%) 和水 (4.00mL, 222mmol, 100 质量%) 的混合物中。在40℃下加热混合物。2h后, 通过LCMS观察到反应完全。将反应混合物在乙酸乙酯 (150mL) 与水 (200mL) 之间分配, 然后用饱和 $NaHCO_3$  (150mL) 和盐水 (100mL) 洗涤。将有机物经硫酸镁干燥并真空浓缩。残余物通过色谱纯化 (100g ultra, 干燥加载在10g samplet上, 乙酸乙酯/丙酮, 梯度从85/15至0/100, 在80%丙酮左右洗脱。将纯级分合并, 并且真空浓缩以得到为白色固体的纯产物21 (960mg, 0.684mmol, 27.9%收率)。分析数据: LC/MS, 3min 亲脂性方法, RT 1.54min; MS ( $ES^+$ )  $m/z$  (相对强度) 1402.3 ( $[M+H]^+$ , 100);

[0682] (c) 双(4-((S)-2-((S)-2-((烯丙氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苄基) 8,8'-((丙烷-1,3-二基双(氧基)) (11S,11aS,11'S,11a'S)-双 (11-羟基-7-甲氧基-2-亚甲基-5-氧代-2,3,11,11a-四氢-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂~~草~~-10(5H)-羧酸酯) (22)

[0683] 在500mL烧瓶中将Stahl Tempo 0.2M溶液 (1.34mL, 0.268 mmol, 0.4当量), 以及随后的四乙腈三氟甲磺酸铜(I) (190mg, 0.504 mmol, 0.75当量) 添加到醇21 (940mg, 0.670mmol) 在DMF (3.00mL) 和DCM (13.0mL) 中的溶液中。将反应混合物快速搅拌并且在37℃下加热5h (几乎反应完全), 然后在-20℃下96h, 此时用二氯甲烷 (60mL) 和水 (60mL) 稀释反应混合物并搅拌5min。将反应混合物在相分离器中滗析并且将DCM相减压干燥。添加MEK (60mL) 并且通过在减压下与MEK共沸去除DMF (2次), 以得到为固体的粗产物。将其重新溶解于DCM/异丙醇80/20 (5至10mL) 中并且加载到Biotage samplet (10g) 上, 干燥并加载在100g Ultra柱上。梯度从88/12DCM/在DCM 中的20%MeOH, 至最高70/30, 在10CV中。将纯级分合并以得到为白色产物的纯22 (602mg, 0.430mmol, 64.2%收率)。分析数据: LC/MS, 3min 亲脂性方法, RT 1.51min; MS ( $ES^+$ )  $m/z$  (相对强度) 1401.5 ( $[M+H]^+$ , 100);

[0684] (d) 双(4-((S)-2-((S)-2-氨基-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苄基) 8,8'-((丙烷-1,3-二基双(氧基)) (11S,11aS,11'S,11a'S)-双 (11-羟基-7-甲氧基-2-亚甲基-5-氧代-2,3,11,11a-四氢-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂~~草~~-10(5H)-羧酸酯) (23)

[0685] 将四(三苯基膦)钯(0) (8.2mg, 0.0071mmol, 100质量%) 添加到 22 (250mg, 0.179mmol) 和吡咯烷 (37.0μL, 0.444mmol, 2.49当量) 在DCM (7.50mL) 和甲醇 (0.5mL) 中的混合物中。将反应混合物在氩气、室温下搅拌1h 30分钟并且通过LCMS发现反应完全。

[0686] 添加氯化铵水溶液 (30mL, 6质量%) 并且剧烈搅拌混合物。然后在biotage相分离筒中滗析混合物。在真空下将DCM层蒸发至干燥。将残余物溶解于氯仿 (20mL) 中并且在真空、35℃下通过旋转蒸发去除溶剂。再次重复此循环, 然后在高真空 (3mbar, 在旋转蒸发器上) 下干燥以得到为白色固体的粗产物23 (220mg, 0.179mmol, 100%), 其无需进一步纯化即直接用于下一步骤。分析数据: LC/MS, 3min 方法, 2个峰, RT 1.15min; MS ( $ES^+$ )  $m/z$  (相对

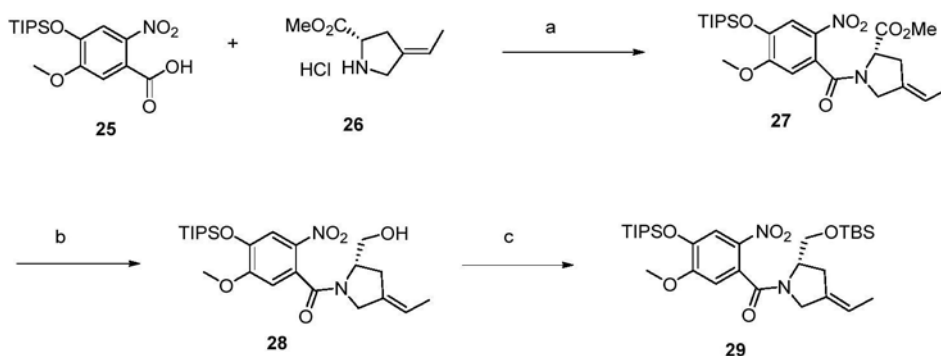
强度) 616.9 ( $[M+2H]^{2+}$ , 100); 1232.1 ( $[M+H]^+$ , 10)。

[0687] (e) 双(4-((2S,5S)-37-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-5-异丙基-2-甲基-4,7,35-三氧代-10,13,16,19,22,25,28,31-八氧杂-3,6,34-三氮杂三十七烷酰氨基)苄基)8,8'-(丙烷-1,3-二基双(氧基)) (11S,11aS,11'S,11a'S)-双(11-羟基-7-甲氧基-2-亚甲基-5-氧代-2,3,11,11a-四氢-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂~~草~~-10(5H)-羧酸酯) (24)

[0688] 将氯仿(4.1mL)和甲醇(0.2mL)添加到23中,然后添加 mal-amido-peg8-acid (238mg, 0.394mmol, 2.2当量)和EDCI (85.0mg, 0.443mmol, 2.48当量)。使反应在室温下进行45min,此时通过LCMS 观察到反应完全。将反应混合物浓缩(2mL),加载在3g biotage二氧化硅samplet上并真空干燥。将samplet加载在25g Ultra Biotage柱上并洗脱(梯度10/90至58/42的在DCM中的20%MeOH/DCM,在 12CV中;在55%的20%MeOH左右洗脱)。通过TLC(在DCM中的 10%MeOH)分析所有级分。将纯级分汇集。通过蒸发去除溶剂以得到24 (250mg, 0.105mmol, 58.8%收率)。分析数据:LC/MS, 15min 方法, RT 6.20min; MS ( $ES^+$ ) m/z (相对强度) 1191.5 ( $[M+2H]^{2+}$ , 100);  $^1H$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.92 (s, 2H), 8.16 (d, J=6.9Hz, 2H), 7.99 (t, J=5.5Hz, 2H), 7.86 (d, J=8.6Hz, 2H), 7.68-7.42 (m, 4H), 7.39-7.11 (m, 4H), 7.07 (s, 2H), 7.00 (s, 4H), 6.81 (s, 2H), 6.60 (s, 2H), 5.46-5.30 (m, 2H), 5.21-4.79 (m, 8H), 4.39 (t, J=7.0Hz, 2H), 4.22 (dd, J=8.7, 6.7Hz, 2H), 4.15-3.88 (m, 8H), 3.77 (s, 6H), 3.65-3.55 (m, 8H), 3.54-3.40 (m, 58H), 3.37 (t, J=5.9Hz, 4H), 3.15 (q, J=5.8 Hz, 4H), 2.95-2.79 (m, 2H), 2.57-2.52 (m, 2H), 2.49-2.37 (m, 4H), 2.37-2.29 (m, 4H), 2.22-2.10 (m, 2H), 2.03-1.88 (m, 2H), 1.30 (d, J = 7.0Hz, 6H), 0.85 (dd, J=15.3, 6.7Hz, 12H)。

[0689] 实施例6

[0690] (i) (S,E)-2-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-4-亚乙基吡咯烷-1-基)(5-甲氧基-2-硝基-4-((三异丙基甲硅烷基)氧基)苯基)甲酮(29)的合成



[0691]

[0692] 化合物25描述于Tiberghien等, ACS Med.Chem.Lett., 2016, 7 (11), 第983-987页中。化合物26描述于Smits和Zemribo, Org.Lett., 2013, 15 (17), 第4406-4409页中。

[0693] (a) (S,E)-4-亚乙基-1-(5-甲氧基-2-硝基-4-((三异丙基甲硅烷基)氧基)苯基)吡咯烷-2-羧酸甲酯(27)

[0694] 将25 (325g, 1.2当量)和26 (1.0当量)溶解于DCM (3.25L)中并冷却至-40℃。在-40℃下分批添加T3P (2当量),然后添加DIEA (6.0 当量)。将混合物在-40℃下搅拌1h。通过LCMS观察到反应完全。在0℃下添加乙酸水溶液(10%, 3.25L)。将有机相分离并用乙酸水溶液(10%, 3.25L)再次洗涤,然后用盐水(3.25L)洗涤。将挥发性物质在真空下去除,以留下

为褐色油状物的粗产物27,其通过硅胶色谱纯化(石油醚/EtOAc,梯度从100/1至10/1,从20/1开始收集。(591g,纯度87.6%,通过LC得到,70%,通过NMR得到,收率=60%)。室温:6.374min。

[0695] 用于化合物27的分析方法

[0696] 柱:Agilent Poroshell 120 EC-C18 4.6\*100mm,2.7um

[0697] 流动相A:0.05%TFA水溶液

[0698] 流动相B:含0.05%TFA的ACN

[0699] 稀释剂:ACN

[0700] 流速:1.0mL/min

[0701] 注入体积:1μL

[0702] 柱温:40℃

[0703] 检测器:220nm

[0704] 运行时间:8.1分钟

[0705] 后运行时间(Post time):2分钟

[0706] 梯度表

[0707]

时间(min)	0.0	4.0	8.0	8.1
%流动相A	80	0	0	95
%流动相B	20	100	100	5

[0708] (b) (S,E)-(4-亚乙基-2-(羟甲基)吡咯烷-1-基)(5-甲氧基-2-硝基-4-((三异丙基甲硅烷基)氧基)苯基)甲酮(28)

[0709] 将27(591g,1当量)溶解于DCM中并冷却至0℃。分批添加硼氢化锂(2.0当量)。将反应混合物在0℃下搅拌6h。通过LCMS观察到反应完全。在0℃下添加乙酸水溶液(10%,5.9L)。将有机相分离并用乙酸水溶液(10%,5.9L)再次洗涤,然后用盐水(5.9L)洗涤。将挥发性物质在真空下去除以留下残余物,其通过快速色谱纯化(石油醚/EtOAc,梯度从50/1至1/1,从5/1开始收集,以得到为灰白色固体的28(250g,64%收率)。室温:7.922min。

[0710] (c) (S,E)-(2-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-4-亚乙基吡咯烷-1-基)(5-甲氧基-2-硝基-4-((三异丙基甲硅烷基)氧基)苯基)甲酮(29)

[0711] 在室温下将28(250g,1当量)和咪唑(2当量)溶解于DCM(1.5L,6V)中。分批添加TBSCl(1.5当量),同时保持温度低于30℃。将反应混合物在25℃下搅拌1小时,此时通过HPLC观察到起始材料消失。通过脱脂棉过滤混合物。用DCM(500mL)洗涤滤饼。在10℃下用乙酸水溶液(10%,2.5L)洗涤滤液,然后用盐水(2.5L)洗涤。将有机相用无水硫酸钠干燥并真空浓缩,以得到为黄色油状物的产物29,发现其纯度足够用于下一步骤(285g,92.2%收率)。室温:11.002min。MS(ES<sup>+</sup>)m/z(相对强度)663.4([M+H]<sup>+</sup>,100);

[0712] 用于化合物28和29的分析方法

[0713] 柱:Agilent Poroshell 120EC-C18 4.6\*100mm,2.7um

[0714] 流动相A:0.05%TFA水溶液

[0715] 流动相B:含0.05%TFA的ACN

[0716] 稀释剂:ACN

[0717] 流速:1.0mL/min

[0718] 注入体积:2 $\mu$ L[0719] 柱温:40 $^{\circ}$ C

[0720] 检测器:220nm

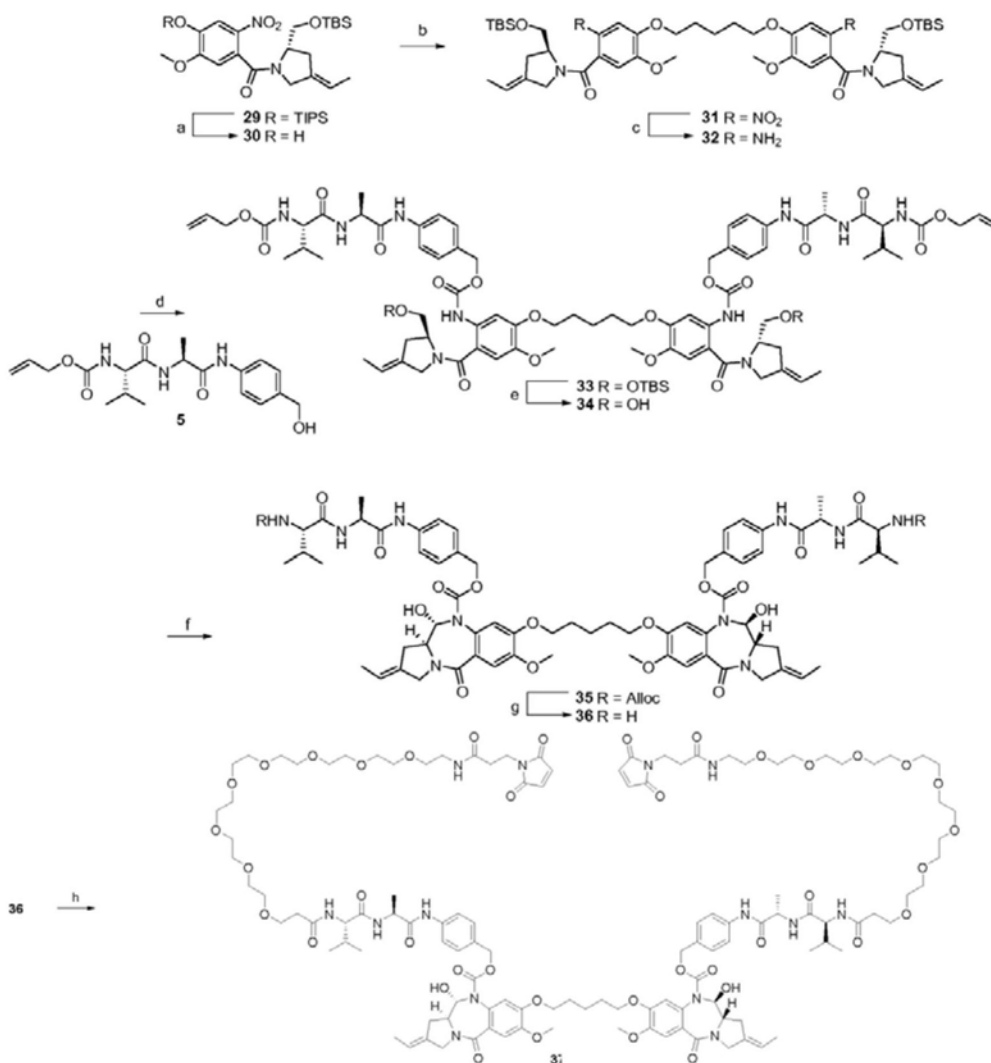
[0721] 运行时间:12.1分钟

[0722] 后运行时间:2分钟

[0723] 梯度表

[0724]	时间 (min)	0.0	6.0	12.0	12.1
	%流动相A	80	0	0	80
	%流动相B	20	100	100	20

[0725] (ii) 双(4-((2S,5S)-37-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-5-异丙基-2-甲基-4,7,35-三氧代-10,13,16,19,22,25,28,31-八氧杂-3,6,34-三氮杂三十七烷酰氨基)苄基)8,8'-(戊烷-1,5-二基双(氧基))(2E,2'E,11S,11aS,11'S,11a'S)-双(2-亚乙基-11-羟基-7-甲氧基-5-氧代-2,3,11,11a-四氢-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂~~草~~-10(5H)-羧酸酯)(37)的合成



[0727] (a) (S,E)-2-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-4-亚乙基吡咯烷-1-基)(4-羟基-5-甲氧基-2-硝基苯基)甲酮(30)

[0728] 在40℃下将TIPS保护的苯酚29 (10.0g, 16.9mmol) 溶解于乙酸乙酯 (20.0mL) 和DMF (20.0mL) 的混合物中。添加乙酸锂 (0.668g, 10.1mmol, 0.6当量) 在水 (3.0mL) 中的溶液。使反应在40℃下进行4 h, 此时通过LCMS观察到反应完全。将反应混合物分配于2-MeTHF (200mL) 与2%柠檬酸水溶液 (200mL) 之间。将有机相用盐水 (70mL) 洗涤并且经硫酸镁干燥。在真空下去除所有挥发性物质。通过添加二乙醚 (50mL) 和己烷 (200mL) 使固体残余物沉淀。产物通过过滤收集, 用少量二乙醚洗涤并在真空下干燥过夜, 以得到为浅黄色固体的30 (5.8g, 13mmol, 79%收率)。分析数据: LC/MS, 3min亲脂性方法, RT 1.82min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 437.8 ([M+H]<sup>+</sup>, 100);

[0729] (b) ((戊烷-1,5-二基双(氧基))双(5-甲氧基-2-硝基-4,1-亚苯基))双(((S,E)-2-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-4-亚乙基吡咯烷-1-基)甲酮) (31)

[0730] 在100mL圆底烧瓶中, 将1,5-二溴戊烷 (0.986g, 4.29mmol, 0.5 当量) 以及随后的碳酸钾 (1.30g, 9.41mmol, 1.1当量) 添加到30 (3.74 g, 8.57mmol) 和四丁基碘化铵 (0.63g, 1.7mmol, 0.2当量) 在丙酮 (20.0 mL) 中的溶液中。将反应混合物快速搅拌并且在60℃下加热2h, 接着将其在45℃下搅拌过夜。通过LCMS发现反应完全。将混合物在乙酸乙酯 (150mL) 与水 (200mL) 之间分配, 然后用盐水 (100mL) 洗涤, 经硫酸镁干燥。将挥发性物质在真空下去除以得到产物31 (4.04g, 4.29mmol, 100%收率), 其无需进一步纯化即用于下一步骤。分析数据: LC/MS, 3min亲脂性方法, RT 2.39min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 942.3 ([M+H]<sup>+</sup>, 100);

[0731] (c) ((戊烷-1,5-二基双(氧基))双(2-氨基-5-甲氧基-4,1-亚苯基))双(((S,E)-2-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-4-亚乙基吡咯烷-1-基)甲酮) (32)

[0732] 在10℃ (冰浴) 下, 将锌 (20.6g, 315mmol, 74当量) 添加到乙醇 (64.0mL)、水 (4.00mL) 和甲酸 (4.00mL, 106mmol, 25当量) 的混合物中并剧烈搅拌。向此混合物中用移液管分批添加31 (4.00g, 4.25 mmol) 在乙醇 (16.0mL) 中的溶液, 同时保持温度低于35℃。间或手动搅拌锌团块。使反应在室温下再进行30min, 此时达到反应完全。将混合物用乙酸乙酯 (200mL) 稀释。通过在硅藻土上过滤去除固体。将结块(sinter)用乙酸乙酯 (200mL) 冲洗。滤液用水 (300mL)、饱和碳酸氢钠 (150mL)、盐水 (100mL) 洗涤并经硫酸镁干燥。通过蒸发去除挥发性物质并且通过自动快速色谱 (100g ultra, biotage, 乙酸乙酯/己烷梯度从30%至最高80%, 在8CV中, 从10CV, 58%开始洗脱) 纯化残余物, 以得到为浅黄色泡沫的32 (1.94g, 2.20mmol, 51.8%收率)。分析数据: LC/MS, 3min亲脂性方法, RT 2.29min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 882.4 ([M+H]<sup>+</sup>, 100);

[0733] (d) 双(4-((S)-2-((S)-2-((烯丙氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苄基)((戊烷-1,5-二基双(氧基))双(6-((S,E)-2-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-4-亚乙基吡咯烷-1-羰基)-4-甲氧基-3,1-亚苯基))二氨基甲酸酯 (33)

[0734] 在0℃下将三光气 (0.461g, 1.55mmol, 0.72当量) 一次性添加到 32 (1.90g, 2.16mmol) 和三乙胺 (1.32g, 13.0mmol, 6当量) 在DCM (45 mL) 中的混合物中。去除冰浴, 并且在15min后, 作为细粉一次性添加5 (1.79g, 4.74mmol, 2.2当量), 然后添加三乙胺 (0.661g, 6.53 mmol, 3当量) 和二月桂酸二丁基锡 (0.129mL, 0.215mmol, 0.1当量)。将反应混合物在37℃下搅拌4h, 然后在室温下搅拌过夜。将有机相用DCM (100mL) 稀释并且用水 (200mL)、饱和氯化铵 (100mL) 和盐水 (50mL) 洗涤, 接着经硫酸镁干燥。通过减压蒸发去除挥发性物质以得到3 (3.00g, 1.78mmol, 82%收率)。使粗产物直接在下一步骤中反应。

[0735] 分析数据:LC/MS,3min亲脂性方法,RT 2.31min;MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 1689.6 ([M+H]<sup>+</sup>,100);

[0736] (e) 双(4-((S)-2-((S)-2-((烯丙氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苄基)((戊烷-1,5-二基双(氧基))双(6-((S,E)-4-亚乙基-2-(羟甲基)吡咯烷-1-羰基)-4-甲氧基-3,1-亚苯基))二氨基甲酸酯(34)

[0737] 将双TBS醚33(3.00g,1.78mmol)溶解在2-甲基四氢呋喃(9 mL)、乙酸(9mL)和水(1.5mL)的混合物中。将混合物在40℃下加热2 h。LCMS监测指示出令人不满意的反应完成率(40%)。添加对甲苯磺酸水合物(203mg,1.07mmol,0.6当量),其使反应加快。在30min 观察到反应完全。

[0738] 将反应混合物在乙酸乙酯(150mL)与水(200mL)之间分配,然后用饱和NaHCO<sub>3</sub>(150mL)和盐水(100mL)洗涤。将有机物经硫酸镁干燥并真空浓缩。残余物通过色谱纯化(50g ultra,干燥加载在松散的硅胶上,乙酸乙酯/丙酮,梯度从85/15至0/100,在55%丙酮左右洗脱。将纯级分合并,并且真空浓缩以得到为白色固体的纯产物34(2.20 g,1.51mmol,84.8%收率)。分析数据:LC/MS,3min亲脂性方法,RT 1.67min;MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 1461.6 ([M+H]<sup>+</sup>,100);

[0739] (f) 双(4-((S)-2-((S)-2-((烯丙氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苄基)8,8'-((戊烷-1,5-二基双(氧基))(2E,2'E,11S,11aS,11'S,11a'S)-双(2-亚乙基-11-羟基-7-甲氧基-5-氧代-2,3,11,11a-四氢-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂~~草~~10(5H)-羧酸酯)(35)

[0740] 在500mL烧瓶中将Stahl Tempo 0.2M溶液(3.50mL,0.700 mmol,0.47当量),以及随后的四乙腈三氟甲磺酸铜(I)(290mg,0.770 mmol,0.52当量)添加到34(2.17g,1.49mmol)在DMF(3.00mL)中的溶液中。将反应混合物快速搅拌并且在40℃下加热5h(反应完全),然后在气球下在30℃下18h,此时用二氯甲烷(60mL)和水(60mL)稀释反应混合物并搅拌5min。将反应混合物在相分离器中淬析并且将DCM相减压干燥。添加MEK(60mL)并且通过在减压下共沸去除 DMF(2次),以得到为固体的粗产物。将其重新溶解于DCM(5至10 mL)中并加载在100g Ultra柱上。梯度从75/25DCM/在DCM中的10% MeOH至最高40/60(在50/50左右洗脱)。将纯级分合并以得到为白色产物的35(1.35g,0.927mmol,62.4%收率)。分析数据:LC/MS,3 min亲脂性方法,RT 1.63min;MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 1457.3 ([M+ H]<sup>+</sup>,100); 15min方法,RT 7.52min;MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 1456.6 ([M+H]<sup>+</sup>,100);

[0741] (g) 双(4-((S)-2-((S)-2-氨基-3-甲基丁酰氨基)丙酰氨基)苄基)8,8'-((戊烷-1,5-二基双(氧基))(2E,2'E,11S,11aS,11'S,11a'S)-双(2-亚乙基-11-羟基-7-甲氧基-5-氧代-2,3,11,11a-四氢-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂~~草~~10(5H)-羧酸酯)(36)

[0742] 将四(三苯基膦)钯(0)(10.0mg,0.0086mmol,0.01当量)添加到 35(1.33g,0.914mmol)和吡咯烷(190μL,2.28mmol,2.5当量)在DCM(7.50mL)和甲醇(0.5mL)中的混合物中。将反应混合物在氩气、室温下搅拌1h 30分钟并且通过LCMS发现反应完全。添加氯化铵水溶液(30mL,6质量%)并且剧烈搅拌混合物。然后在biotage相分离筒中淬析混合物。在真空下将DCM层蒸发至干燥。将残余物溶解于氯仿(20mL)中并且在真空、35℃下通过蒸发去除溶剂。再次重复此循环,然后在高真空(3mbar)下干燥以得到为白色固体的粗36(1.17g,0.914 mmol,100%收率)。分析数据:LC/MS,3min方法,RT 1.23min,2个峰;MS (ES<sup>+</sup>)

m/z (相对强度) 645.0 ( $[M+2H]^{2+}$ , 100); 1288.8 ( $[M+H]^+$ , 10)。

[0743] (h) 双(4-((2S,5S)-37-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-5-异丙基-2-甲基-4,7,35-三氧代-10,13,16,19,22,25,28,31-八氧杂-3,6,34-三氮杂三十七烷酰氨基)苄基)8,8'-(戊烷-1,5-二基双(氧基))(2E,2'E,11S,11aS,11'S,11a'S)-双(2-亚乙基-11-羟基-7-甲氧基-5-氧代-2,3,11,11a-四氢-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮杂~~草~~-10(5H)-羧酸酯)(37)

[0744] 将DCM(10.00mL)和甲醇(0.4mL)添加到36(393mg,0.305 mmol)中,然后添加mal-amido-peg8-acid(380mg,0.628mmol,2.06 当量)和EDCI(128mg,0.668mmol,2.2当量)。使反应在室温下进行4h,此时通过LCMS观察到反应完全。添加氯化铵水溶液(30mL,6质量%)并且剧烈搅拌混合物。在biotage相分离筒中淬析混合物。将DCM层在真空下蒸发至干燥并且通过色谱纯化粗残余物(25g Ultra,梯度15/85至100/0的在DCM中的20%MeOH/DCM,在12CV 中;保持在48%左右洗脱)。通过TLC(在DCM中的10%MeOH)分析级分。将纯级分汇集。通过蒸发去除溶剂。通过反相制备型HPLC(梯度15至75%水/乙腈+0.01%甲酸)纯化残余物,然后进行冷冻-干燥并且从DCM中等分以得到为白色泡沫的37(516mg,0.212mmol,69.4%收率)。纯度为97.65%。分析数据:LC/MS,15min方法,RT 6.61 min;MS( $ES^+$ )m/z(相对强度)1219.7 ( $[M+2H]^{2+}$ ,100); $^1H$  NMR(400 MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) $\delta$ 9.92(s,2H),8.17(d,J=6.9Hz,2H),8.01(t,J=5.6 Hz,2H),7.87(d,J=8.7Hz,2H),7.72-7.44(m,4H),7.39-7.10(m,4H),7.05(s,2H),7.00(s,4H),6.76(s,2H),6.66-6.46(m,2H),5.56(d,J=7.1Hz,2H),5.34(dd,J=9.7,5.9Hz,2H),5.21-4.70(m,4H),4.39(t,J=7.0Hz,2H),4.22(dd,J=8.7,6.7Hz,2H),4.15-4.01(m,2H),3.94(d,J=15.3Hz,4H),3.86-3.72(m,8H),3.60(t,J=7.3Hz,8H),3.55-3.42(m,58H),3.37(t,J=5.9Hz,4H),3.15(q,J=5.8Hz,4H),2.76-2.56(m,4H),2.46(t,J=6.8Hz,2H),2.40(t,J=6.5Hz,2H),2.36-2.29(m,4H),1.96(q,J=6.7Hz,2H),1.78(s,4H),1.66(d,J=6.6Hz,6H),1.57(d,J=8.6Hz,2H),1.30(d,J=7.0Hz,6H),0.85(dd,J=15.2,6.7Hz,12H)。

[0745] 赫塞汀-Flexmab和NIP228-Flexmab抗体的产生

[0746] 概要

[0747] 细胞系SKBR-3( $HER2^+$ , $1.5 \times 10^6$ 个受体/细胞)、MDA-MB-453( $HER2^+$ , $7.7 \times 10^4$ 个受体/细胞)和MCF-7( $HER2^-$ )获自ATCC并且使用制造商推荐的培养基(SKBR-3:McCoy's 5A+10%FBS,MDA-MB-453:DMEM+10%FBS,以及MCF-7:DMEM+10%FBS)维持在T175组织培养烧瓶(Corning)中。将用于转染的293F细胞(Invitrogen)维持在293F Freestyle培养基(Invitrogen)中。将SKBR-3、MDA-MB-453和MCF-7细胞在具有5%CO<sub>2</sub>的37℃培养箱中培养。将293F细胞在具有8%CO<sub>2</sub>且在120rpm下旋转的摇瓶(2L,Corning)中,在37℃下培养。所有试剂购自Sigma Aldrich、VWR或JT Baker,除非另外指明,并且不经另外的纯化即使用。

[0748] 赫塞汀-Flexmab和NIP228-Flexmab抗体的设计和构建

[0749] 使用赫塞汀野生型抗体作为模板来工程化赫塞汀-Flexmab。赫塞汀-Flexmab的轻链包括两个突变F118C和C214V,而重链含有三个突变L124C、C216V和C225V(参见图3和图5-在图5中,C代表工程化的半胱氨酸,V代表半胱氨酸至缬氨酸突变,并且C代表用于缀合/重新桥接的半胱氨酸)。轻链中的F118C突变与重链中的L124C 突变形成二硫键。此工程化二硫化物不是溶剂暴露的,而是用于保留重链与轻链之间的共价键。C222铰链半胱氨酸保持



不被修饰并且用作与基于pBD的药物接头的位点特异性缀合的位置。赫塞汀-Flexmab 的轻链和重链序列针对哺乳动物表达进行了密码子优化并且购自 GeneArt (Life Technologies)。利用标准分子生物学技术,使用 BssHII/NheI位点(轻链)和SalI/NotI位点(重链)将经优化的赫塞汀 -Flexmab构建体亚克隆到MedImmune专有的哺乳动物表达载体中,所述表达载体含有用于分泌的IgG轻链信号肽和用于重组表达的巨细胞病毒启动子。完整的哺乳动物表达质粒pOE-赫塞汀-Flexmab通过DNA测序进行确认。阴性对照NIP228-Flexmab抗体如针对赫塞汀 -Flexmab所述的那样,同时使用野生型NIP228抗体 (MedImmune 专有)作为模板生成。

[0750] 赫塞汀-Flexmab和NIP228-Flexmab抗体的表达和纯化

[0751] 赫塞汀-Flexmab和NIP228-Flexmab抗体的表达和纯化根据先前公开的方法 (Dimasi, N.等, Journal of Molecular Biology, 2009, 393, 672-692; DOI:10.1016/j.jmb.2009.08.032) 进行。在瞬时293F表达和蛋白A纯化之后,在4℃下使用Slide-A-Lyzer 渗析盒 (10kDa MWCO, Thermo) 将抗体配制到缀合缓冲液 (1X PBS, 0.1mM EDTA, pH 7.2) 中并且使用Vivaspin浓缩器 (10kDa MWCO, GE Healthcare) 浓缩至 8.0mg/mL (赫塞汀-Flexmab) 和5.52mg/mL (NIP228-Flexmab)。最终浓度使用Nanodrop分光光度计 (A<sub>280</sub>, Thermo) 确定。6天后的瞬时表达收率分别为赫塞汀-Flexmab的500mg/L和NIP228-Flexmab的150 mg/L。

[0752] 实施例7-赫塞汀-Flexmab和NIP228-Flexmab ADC的构建

[0753] 将在缀合缓冲液 (1X PBS, 1mM EDTA, pH 7.2, 3mL) 中的赫塞汀-Flexmab (15mg, 100nmol) 在室温下使用TCEP (3当量, 300nmol, Thermo) 还原2h。还原后,将DMSO (10% v/v, 300μL) 添加到经还原抗体中,然后添加化合物10 (3当量, 300nmol)。使缀合反应在室温下进行3h。使用N-乙酰半胱氨酸 (5当量, 相对化合物10, 1.5μmol, Sigma Aldrich) 淬灭过量的化合物10并且在4℃下使用Slide-A-Lyzer 渗析盒 (10kDa MWCO, Thermo) 对ADC进行渗析以进行缀合缓冲液的三次缓冲液交换。用DI-H<sub>2</sub>O 1:5稀释ADC并且使用AKTA Pure FPLC (GE Healthcare) 以5mL/min将其加载到II型陶瓷羟磷灰石柱 (Bio-Rad) 上并且用20柱体积的CHT缓冲液A (10mM NaPO<sub>3</sub>, pH 7) 洗涤柱。使用线性梯度的CHT缓冲液B (在10mM NaPO<sub>3</sub>中的0-2M NaCl, pH 7) 经20min进行ADC的洗脱。将洗脱的ADC在4℃下使用Slide-A-Lyzer渗析盒 (10kDa MWCO) 过夜渗析到缀合缓冲液中并且用HIC缓冲液A (25mM Tris-HCl, 1.5M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8) 进行1:5 稀释。使用AKTA Pure FPLC将ADC以1mL/min加载到半制备型疏水相互作用色谱 (HIC) 柱 (HiTrap Butyl-S FF, GE Healthcare) 上并且使用20柱体积的HIC缓冲液A进行洗涤。使用线性梯度的HIC缓冲液B (25mM Tris-HCl, 5% 异丙醇) 以1mL/min经45min洗脱ADC。将纯化的赫塞汀-Flexmab-10在4℃下过夜渗析到缀合缓冲液中,使用Vivaspin浓缩器 (10kDa MWCO) 浓缩至2mg/mL, 并且通过0.2μm 注射过滤器 (Pall Corporation) 无菌过滤。所述过程在图4中示意性地示出。突出显示的V代表缬氨酸突变。

[0754] 化合物10与NIP228-Flexmab的位点特异性缀合和随后的纯化如针对赫塞汀-Flexmab-10所描述的那样进行。

[0755] 实施例8-ADC的分析性表征

[0756] SDS-PAGE

[0757] 使用SDS-PAGE确认赫塞汀-Flexmab、赫塞汀-Flexmab-10、NIP228-Flexmab和

NIP228-Flexmab-10构建体的分子量。将样品 (2 μg, 亲本或缀合) 与LDS Bolt样品缓冲液 (Invitrogen) 1:4混合、与 NuPAGE还原缓冲液 (Invitrogen) 1:10混合, 并且加热至70℃, 持续 10分钟, 然后加载到10%Bis-tris Bolt凝胶 (Invitrogen) 上。将凝胶在 150V下电泳并且使用Simply Blue染色试剂 (Invitrogen) 染色并使用 DI-H<sub>2</sub>O脱色。使用Gel Doc EZ成像系统 (Bio-RAD) 对凝胶成像。

[0758] 使用还原SDS-PAGE确认纯化的赫塞汀-Flexmab和 NIP228-Flexmab抗体以及ADC的分子量。结果证明了分别具有~25 kDa和50kDa分子量的赫塞汀-Flexmab的轻链 (LC) 和重链 (HC) 的分离。双马来酰亚胺化合物10有效负载与赫塞汀-Flexmab的缀合导致重链非常有效的桥接, 并且存在100kDa的条带。利用 NIP228-Flexmab观察到类似结果, 其中在还原条件下清楚地鉴定了轻链和重链。观察到NIP228-Flexmab重链与化合物10的高度有效的二硫化物桥接。对于抗体或ADC均未观察到聚集。

[0759] 疏水性相互作用色谱

[0760] 使用分析性疏水性相互作用色谱评估化合物10与赫塞汀-Flexmab和NIP228-Flexmab抗体的缀合效率并且评价每个ADC的药物与抗体比率 (DAR)。使用HIC缓冲液A (25mM Tris-HCl, 1.5M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8) 将ADC (500μg, 50μL) 单独加载到Proteomix HIC Butyl-NP5柱 (4.6mm I.D. × 3.5cm × 5μm, Sepax) 上并且使用线性梯度的HIC缓冲液B (25mM Tris-HCl, 5% 异丙醇, pH 7, 5-100%) 以 0.8mL/min经13min洗脱ADC。测量在280nm和330nm下的吸光度并且将洗脱峰手动积分以确定各ADC的缀合效率。缀合效率和DAR 分别基于公式1和公式2计算。

[0761] 公式1: 缀合效率

$$[0762] = \left[ \frac{\text{面积}_{\text{缀合}}}{(\text{面积}_{\text{未缀合}} + \text{面积}_{\text{缀合}})} \right] \times 100$$

$$[0763] \text{ 公式2: } DAR = \left[ \frac{\text{面积}_{DAR1} + 2(\text{面积}_{DAR2}) + n(\text{面积}_{DAR...n})}{(\text{面积}_{DAR0} + \text{面积}_{DAR1} + \text{面积}_{DAR2} + \text{面积}_{DAR...n})} \right]$$

[0764]

ADC	面积 <sub>DAR0</sub>	面积 <sub>DAR1</sub>	面积 <sub>DAR2</sub>	效率 <sub>缀合</sub>	DAR
赫塞汀-Flexmab3-10	138.4	1285.9	不适用	90.3	0.90
NIP228-Flexmab3-10	118.1	1191.4	不适用	90.1	0.90

[0765] 尺寸排阻色谱

[0766] 使用Agilent 1200系列HPLC在亲本抗体和ADC上进行尺寸排阻色谱HPLC (SEC-HPLC), 以分析纯度和聚集。使用0.1M NaPO<sub>4</sub>、0.1M NaSO<sub>4</sub>、10% 异丙醇, pH 6.8作为流动相, 以1mL/min的流速将样品 (100μg, 在100μL缀合缓冲液中) 注入到TSK Gel柱 (G3000SW, 8mm I.D. × 30cm × 5μm, Tosoh Bioscience) 上。洗脱峰的吸光度在280nm下测量, 然后手动积分以确定每个样品的纯度和聚集百分比。

[0767] 在蛋白A纯化之后, 各抗体产生98%的过量的单体含量, 并且这些特征在化合物10有效负载缀合之后保持, 以产生DAR=1 ADC。赫塞汀-Flexmab和赫塞汀-Flexmab-10分别以8.65min和8.66 min、以及9.01min的保留时间 (T<sub>R</sub>) 洗脱。NIP228-Flexmab和 NIP228-Flexmab-10分别以T<sub>R</sub>=8.52min和8.54min洗脱。

#### [0768] 还原反相HPLC

[0769] 为了确认化合物10与抗体重链的位点特异性缀合,利用了还原反相HPLC(rRP-HPLC)。将ADC在室温下用二硫苏糖醇(DTT,50mM)处理30分钟。还原之后,将ADC注入到PLRP-S柱(1000Å,2.1mm × 50mm,Agilent)上并且使用RP-HPLC溶剂A(0.1%三氟乙酸的水溶液)和RP-HPLC溶剂B(0.1%三氟乙酸的乙腈溶液)的梯度流动相(其由5%溶剂B-100%溶剂B组成)经25min洗脱。使用1mL/min的流速在80℃下进行梯度洗脱。在280nm下测量吸光度。

[0770] 赫塞汀-Flexmab和赫塞汀-Flexmab-10ADC的色谱图重叠。两种物类的轻链共洗脱(赫塞汀-Flexmab-10 $T_R$ =17.57min;赫塞汀-Flexmab  $T_R$ =17.54min),然而,当与未缀合的赫塞汀-Flexmab抗体( $T_R$ =19.75min)相比时,在赫塞汀-Flexmab-10的重链的保留时间( $T_R$ =21.31min)中存在明显的偏移。在赫塞汀-Flexmab-10色谱图( $T_R$ =19.97min)上也可见少量未缀合重链。

[0771] 阴性对照NIP228-Flexmab和NIP228-Flexmab-10的色谱图也重叠以用于比较分析。当与NIP228-Flexmab的重链( $T_R$ =20.09min)相比时,NIP228-Flexmab-10ADC的重链显示出保留时间( $T_R$ =21.57min)的偏移。对于NIP228-Flexmab-10( $T_R$ =20.35min),可见少量未缀合重链。

#### [0772] 质谱

[0773] 利用完整和折合(reduced)的反相液相色谱-质谱(LCMS)确认赫塞汀-Flexmab和NIP228-Flexmab抗体以及ADC的分子量。将大约2μg(4μL)的抗体或ADC注入到与Agilent 6520Accurate-Mass Time-of-Flight(TOF)LC-MS串联连接的Agilent 1200系列HPLC上。将抗体或ADC加载到Zorbax 300Diphenyl Rapid Resolution HD柱(2.1mm×50mm×1.8μm)上并且在2min后,使用由1-80%溶剂B(0.1%甲酸的乙腈溶液)的不连续梯度组成的0.5mL/min的流速洗脱(溶剂A:0.1甲酸的水溶液)。获取数据并使用MassHunter软件(Agilent)分析。

[0774] 纯化的赫塞汀-Flexmab在147,985.36Da(G0f计算值:147,980.8 Da)处产生峰。在化合物10有效负载(MW:2408.67Da)缀合之后,LCMS显示出为150,396.71Da(G0f计算值:150,394.03Da)的赫塞汀-Flexmab3-10的分子量。通过LCMS进行的NIP228-Flexmab的分析显示出在146,770.36Da(G0f计算值:146743.98Da)处的峰。化合物10有效负载的缀合产生具有149,199.75Da(G0f计算值:149,152.65 Da)的MW的峰。

#### [0775] 差示扫描量热法(DSC)

[0776] 将抗体和ADC在4℃下充分渗析到25mM组氨酸pH 6中并配制为0.5mg/mL。使用MicroCal VP-DSC仪器(Malvern)进行DSC实验。对浓度和扫描速率(1℃/min)的原始数据进行归一化。使用Origin 7软件(Malvern)进行数据分析和解卷积。使用非双态模型进行解卷积分析并且使用10-15个迭代周期获得最佳拟合。确定每个构建体的变性温度 $T_m$ ,其对应于转变峰的最大值。

[0777] DSC实验的结果揭示了赫塞汀(CH2  $T_m$ 1=68.95℃,Fab  $T_m$ 2=81.43℃)和NIP228(CH2  $T_m$ 1=69.09℃,Fab  $T_m$ 2=74.22℃)野生型抗体的CH2和Fab结构域的 $T_m$ 转变温度(Wakankar,A.A.等,Bioconjugate Chemistry,2010,21,1588-1595;DOI:10.1021/bc900434c)。NIP228抗体表现出为81.92℃的CH3结构域的第三 $T_m$ 转变温度。将Flexmab技

术引入这些抗体中导致这些 $T_m$ 转变温度逆转,其中与CH2结构域相比,Fab结构域具有较低的 $T_m$ 转变温度(赫塞汀-Flexmab Fab  $T_{m1}=68.21^{\circ}\text{C}$ ,CH2  $T_{m1}=81.05^{\circ}\text{C}$ ;NIP228-Flexmab Fab  $T_{m1}=66.58^{\circ}\text{C}$ ,CH2  $T_{m3}=81.85^{\circ}\text{C}$ )。如在NIP228野生型抗体的情况下所见的,我们在NIP228-Flexmab上观察到CH3结构域的第三 $T_m$ 转变温度( $T_{m2}=76.28^{\circ}\text{C}$ )。如所预期,在化合物10与赫塞汀-Flexmab和 NIP228-Flexmab抗体缀合之后,在 $T_m$ 转变温度中观察到非常小的变化。(赫塞汀-Flexmab-10Fab  $T_{m1}=67.83^{\circ}\text{C}$ ,CH2  $T_{m1}=81.11^{\circ}\text{C}$ ; NIP228-Flexmab-10Fab  $T_{m1}=66.11^{\circ}\text{C}$ ,CH2  $T_{m3}=82.19^{\circ}\text{C}$ )。相比于NIP228-Flexmab,NIP228-Flexmab-10的CH3结构域的第三 $T_m$ 转变温度( $T_{m2}=78.78^{\circ}\text{C}$ )在最小程度上变化。

[0778] 实施例9-赫塞汀-Flexmab和NIP228-Flexmab抗体以及ADC 的体外表征

[0779] 通过流式细胞术获得的细胞结合

[0780] 使用流式细胞术确认赫塞汀-Flexmab和NIP228-Flexmab ADC的结合亲和力和特异性。在研究当天,利用TrypLE (Life Technologies) 胰蛋白酶将SKBR-3 (HER2<sup>+</sup>) 和MCF-7 (HER2<sup>-</sup>) 细胞从其烧瓶中解离,并且重悬于其相应的生长培养基中。细胞在ViCell细胞计数器 (Beckman Coulter) 上计数并且使其浓度达到 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL。将细胞一式二份转染到96孔板 (Falcon) 的孔中 ( $5 \times 10^4$ 个细胞/孔) 并且在 $4^{\circ}\text{C}$ 下以1200rpm离心。将沉淀的细胞重悬于180 $\mu\text{L}$ 的流式细胞术缓冲液 (PBS pH 7.2, 2%FBS, 在冰上) 中并且将抗体或ADC单独添加至细胞 (20 $\mu\text{L}$ 系列稀释液:200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;最终浓度20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。将抗体和细胞在 $4^{\circ}\text{C}$ 下温育1小时,然后将其用流式细胞术缓冲液洗涤并通过离心 (2x, 1200rpm) 沉淀。最终自旋后,将细胞沉淀物重悬于AlexaFluor 647缀合的抗人二抗 (150 $\mu\text{L}$ , 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 在PBS pH 7.2中, 2%FBS) 中并且在 $4^{\circ}\text{C}$ 下温育1小时。将细胞用流式细胞术缓冲液洗涤并离心 (2x, 1200rpm), 然后重悬于135  $\mu\text{L}$ 流式细胞术缓冲液中。将DAPI (来自10X储液的15 $\mu\text{L}$ , 最终1  $\mu\text{M}$ , Sigma Aldrich) 添加到每个细胞悬浮液中,以用于活/死染色。使用LSRII流式细胞仪 (Beckton Dickson) 收集细胞的荧光数据并且使用 FlowJo分析软件 (版本9, FlowJo, LLC) 分析数据。使用GraphPad Prism (版本6, GraphPad Software, Inc.) 生成结合曲线。

[0781] 赫塞汀-Flexmab-10ADC显示出对SKBR-3细胞系的高亲和力 ( $\text{EC}_{50}=0.24\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和选择性,而未观察到对MCF-7细胞系的结合。

[0782] 血清稳定性研究

[0783] 将小鼠血清 (Jackson ImmunoResearch Labs) 通过0.2 $\mu\text{m}$ 注射过滤器 (Pall Corporation) 过滤到无菌聚丙烯管中并保持在冰上。将ADC (200 $\mu\text{g}$ ) 添加到小鼠血清中,至200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的最终浓度并且将样品在 $37^{\circ}\text{C}$ 下温育。使用PBS作为阴性对照。在温育的 $T=0$ 、24、72和148 小时,从每个样品中获取200 $\mu\text{L}$ 的等分试样。在将ADC添加到血清中之后的第一分钟内的 $T=0$ 时间点放置在干冰上。将样品储存在 $-80^{\circ}\text{C}$ ,直到进行亲和捕获和通过LCMS进行分析。使用抗人IgG (Fc 特异性) 琼脂糖 (Sigma Aldrich) 亲和捕获来自小鼠血清的ADC。从每个时间点,将50 $\mu\text{L}$ 的抗人Fc琼脂糖珠粒与300 $\mu\text{L}$ 的PBS和100 $\mu\text{L}$  的血清样品在室温下在连续旋转下混合30min。珠粒用1 $\times$ PBS洗涤三次以去除任何未结合的血清蛋白并且使用100 $\mu\text{L}$  IgG洗脱缓冲液 (Thermo Scientific) 将ADC洗脱并用20 $\mu\text{L}$  1M Tris pH 8中和。如上所述通过LCMS分析各个样品 (20 $\mu\text{L}$ ) 并使用Masshunter软件分析原始数据。

[0784] 在温育七天后,LCMS显示,赫塞汀-Flexmab-10中损失了少于 1%的化合物10有效负载。这种良好的体外稳定性表明,可在体内减少脱靶毒性。

#### [0785] 细胞毒性测定

[0786] 如上所述维持SKBR-3、MDA-MD-453和MCF-7细胞。在处理前一天,用TrypLE胰蛋白酶将细胞从其烧瓶中解离,并且重悬于生长培养基中。细胞在ViCell细胞计数器上计数并且使其在相应生长培养基中的浓度达到 $1.0 \times 10^5$ 个细胞/mL。将细胞悬浮液(100 $\mu$ L,  $1.0 \times 10^4$ 个细胞/孔)转移到白壁透明底部的96孔板(Corning)的孔中。使细胞在具有5%CO<sub>2</sub>的37℃培养箱中粘附过夜。在处理当天,以30 $\mu$ g/mL-1.5ng/mL的范围制备ADC的系列稀释液并且将50 $\mu$ L的各稀释液一式三份添加到孔中(10 $\mu$ g/mL-0.5ng/mL最终ADC浓度,150 $\mu$ L总体积/孔)。另外向每个板添加适当的未经处理的孔以用作对照。在第5天,将板从培养箱中取出并且使其平衡至室温。将板离心(1300rpm,5min)并抽走上清液。将不具有酚红或FBS的培养基(SKBR-3:McCoy's 5A,MDA-MB-453和MCF-7:DMEM)添加到每个孔(50 $\mu$ L)中,然后添加CellTiter-Glo®试剂(50 $\mu$ L)。将板在黑暗中、室温下振荡1小时并且使用Envision™读板机(PerkinElmer)测量发光。活力百分比计算为(未知/平均对照)\*100。使用GraphPad Prism对实验数据作图,以生成IC<sub>50</sub>曲线。

[0787] 在MDA-MB-453细胞(低HER2表达; $7.7 \times 10^4$ 个HER2受体/细胞)上温育3天后,赫塞汀-Flexmab-10显示出IC<sub>50</sub>=1.08nM,具有~90%的细胞活力。5天后,赫塞汀-Flexmab-10具有IC<sub>50</sub>=0.0375nM,具有~35%的细胞活力。

[0788] 在SKBR-3细胞(高HER2表达; $1.5 \times 10^6$ 个HER2受体/细胞)上温育3天后,赫塞汀-Flexmab-10显示出IC<sub>50</sub>=0.229nM,具有~30%的细胞活力。5天后,赫塞汀-Flexmab-10具有IC<sub>50</sub>=0.0355nM,具有~5%的细胞活力。

#### [0789] 实施例10-赫塞汀-Flexmab和NIP228-Flexmab抗体以及ADC的体内表征

[0790] 所有涉及动物使用的研究根据经医学免疫研究所动物护理和使用委员会(MedImmune Institutional Animal Care and Use Committee)批准的方案在AAALAC国际认可的设施中人道地进行。

#### [0791] 异种移植

[0792] 将在50%Matrigel中的NCI-N87细胞( $5 \times 10^6$ )皮下接种到4-6周龄的雌性无胸腺裸小鼠(Harlan)中。当肿瘤达到200mm<sup>3</sup>时,将小鼠随机分配成组,每组5只小鼠。以指示剂量IV施用ADC并且在细胞接种后第5天给药。肿瘤体积用卡尺每周测量两次。使用式 $\frac{1}{2} \times L \times W^2$ (L=长度;W=宽度)计算肿瘤体积。测量体重以评估治疗的耐受性。使用Prism5软件(GraphPad,La Jolla,CA)绘制肿瘤生长和体重曲线。肿瘤体积表示为平均值 $\pm$ SEM。

[0793] 图1示出1.0mg/kg的单剂量的效果(◆),相比于未治疗(●)-该剂量在持续55天的肿瘤停滞产生肿瘤消退。

[0794] 图2示出0.3mg/kg的单剂量的效果(◆),相比于未治疗(●)-该剂量也在55天的肿瘤停滞产生肿瘤消退。

#### [0795] 毒性

[0796] 对雄性Sprague Dawley大鼠(8-12周龄,每组5只)施用0.75、1.5、3或4mg/kg的赫塞汀-Flexmab-10的单次IV注射(第1天),并且持续21天对大鼠进行评价。毒代动力学(TK)卫星动物(每组3只)包括在每个治疗组(treatment arm)中以测量总抗体和ADC的血浆浓度。对照大鼠(每组5只)在第1天施用媒介物对照的单次IV注射。评价所有主研究动物的临床体征、体重变化、临床病理、大体病理和器官重量,以及显微观察。评价所有TK卫星动物的

临床体征、体重变化和药代动力学分析。在第8天和第15天收集血液学和血清化学样品并进行分析。仅在第22天收集用于凝血分析的另外的样品并进行分析。在给药之前且在第1天、第8天、第15天、第22天的多个时间点,将用于药代动力学分析的血液样品收集在K<sub>2</sub> EDTA管中。在所有主研究动物上进行肉眼尸检并且将器官的标准列表,包括脑、肺、肝、肾、脾、胸腺、睾丸、心脏和骨,包埋在石蜡中、切片、用苏木精和伊红染色,并且由专业认证的兽医病理学家进行镜检。

[0797] 高达4mg/kg赫塞汀-Flexmab-10的剂量被良好的耐受。

[0798] 治疗指数

[0799] 可通过非靶向ADC在大鼠中的最大耐受单剂量(MTD)除以靶向ADC的最小有效单剂量(MED)计算治疗指数。MED是在28天(对于NCI-N87异种移植)在体内模型中实现肿瘤停滞所需的单剂量。因此,对于赫塞汀-Flexmab-10,计算得到的治疗指数为至少13.3。

[0800] 实施例11

[0801] 按照Dimasi,N.等,Molecular Pharmaceutics,2017,14,1501-1516 (DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00995)中所述的方法产生被工程化为具有插入在239位与240位之间的半胱氨酸的赫塞汀和R347抗体。

[0802] HerC239i-10ADC

[0803] 将DTT(100摩尔当量/抗体,26.7微摩尔)添加到赫塞汀-C239i 抗体(40mg,266.7纳摩尔)在PBS、1mM EDTA,pH 7.4中的溶液中并且使得最终体积为最多8mL。在轻柔振荡下在室温下持续4hr进行还原,然后使用Amicon Ultracell 30kDa MWCO自旋过滤器通过自旋过滤去除DTT。将(L)-脱氢抗坏血酸(DHAA,20摩尔当量/抗体,5.3微摩尔,106.7μL,50mM,在DMSO中)添加到在PBS、1mM EDTA,pH 7.4中的经还原抗体(5mg/mL,8mL)中,并且在轻柔搅拌下在室温下进行再氧化过夜。通过经由0.22μm膜过滤器过滤去除DHAA,并且将化合物10作为DMSO溶液(3摩尔当量/抗体,0.8微摩尔,在0.9mL DMSO中)添加到8.1mL的在PBS、1mM EDTA, pH 7.4中的再氧化抗体(40mg,266.7纳摩尔)中,以获得10% (v/v) 最终DMSO浓度。在轻柔振荡下,使溶液在室温下反应4hr。通过添加N-乙酰半胱氨酸(4微摩尔,40μL,100mM)淬灭缀合,并且使用FPLC和HP-丁基柱(5mL),利用1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、25mM磷酸钾pH 6.0和25mM磷酸钾pH 6.0梯度运行,通过疏水性相互作用色谱进行纯化。将包含超过95% DAR1的级分汇集、浓缩、使用15mL Amicon Ultracell 50kDa MWCO自旋过滤器通过自旋过滤缓冲液交换至PBS (pH 7.4)、无菌过滤并分析。

[0804] 在Shimadzu Prominence系统上,使用Proteomix HIC Butyl-NP5, 5μm,无孔,4.6x35 mm (Sepax) 柱,利用1.5M硫酸铵、25mM乙酸钠pH 7.4和25mM乙酸钠pH 7.4以及20% 乙腈(v/v)的梯度洗脱,在214nm处对HerC239i-10ADC的纯净样品进行的UHPLC分析显示出只有单缀合的化合物10,这与每分子抗体1.00分子的化合物10的药物/抗体比率(DAR)相一致。

[0805] 在Shimadzu Prominence系统上,使用Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4μm 4.6x 150mm柱(具有4μm 3.0x 20mm保护柱),用含有200mM磷酸钾pH 6.95、250mM氯化钾和10% 异丙醇 (v/v)的0.3毫升/分钟无菌过滤的SEC缓冲液洗脱,在280nm处对HerC239i-10ADC的纯净样品的UHPLC分析显示出99%的单体纯度。UHPLC SEC分析给出最终HerC239i-10ADC的浓度为在11.1mL 中的1.71mg/mL,并且获得的HerC239i-10ADC质量为

18.9mg (47% 收率)。

[0806] R347C239i-10ADC

[0807] 将DTT (100摩尔当量/抗体, 133.3微摩尔) 添加到R347-Maia抗体 (200mg, 1.33微摩尔) 在PBS、1mM EDTA, pH 7.4中的溶液中并且使得最终体积为最多40mL。在轻柔振荡下在室温下持续4hr进行还原, 然后通过切向流过滤 (30kDa纤维过滤器) 去除DTT。将(L)-脱氢抗坏血酸 (DHAA, 20摩尔当量/抗体, 26.7微摩尔, 533.3 $\mu$ L, 50mM, 在DMSO中) 添加到在PBS、1mM EDTA, pH 7.4中的经还原抗体 (4 mg/mL, 50mL) 中, 并且在轻柔搅拌下在室温下进行再氧化过夜。通过经由0.22 $\mu$ m膜过滤器过滤去除DHAA, 并且将化合物10作为 DMSO溶液 (2摩尔当量/抗体, 2.67微摩尔, 在5.6mL DMSO中) 添加到50.5mL的在PBS、1mM EDTA, pH 7.4中的再氧化抗体 (200mg, 1.33微摩尔) 中, 以获得10% (v/v) 最终DMSO浓度。在轻柔振荡下, 使溶液在室温下反应4hr。通过添加N-乙酰半胱氨酸 (6.7微摩尔, 66.7  $\mu$ L, 100mM) 淬灭缀合, 并且使用FPLC和HP-丁基柱 (5mL), 利用1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、25mM磷酸钾pH 6.0和25mM磷酸钾pH 6.0梯度运行, 通过疏水性相互作用色谱进行纯化。将包含超过95% DAR1的级分汇集、浓缩、使用15mL Amicon Ultracell 50kDa MWC0自旋过滤器通过自旋过滤缓冲液交换至25mM组氨酸、200mM蔗糖 (pH 6.0)、无菌过滤并分析。

[0808] 在Shimadzu Prominence系统上, 使用Proteomix HIC Butyl-NP5, 5 $\mu$ m, 无孔, 4.6x35 mm (Sepax) 柱, 利用1.5M硫酸铵、25mM乙酸钠pH 7.4和25mM乙酸钠pH 7.4以及20% 乙腈 (v/v) 的梯度洗脱, 在 214nm处对R347C239i-10ADC的纯净样品进行的UHPLC分析显示出只有单缀合的化合物10, 这与每分子抗体1.00分子的化合物10的药物/抗体比率 (DAR) 相一致。

[0809] 在Shimadzu Prominence系统上, 使用Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 $\mu$ m 4.6x 150mm柱 (具有4 $\mu$ m 3.0x 20mm保护柱), 用含有200mM磷酸钾pH 6.95、250mM氯化钾和10% 异丙醇 (v/v) 的0.3毫升/分钟无菌过滤的SEC缓冲液洗脱, 在280nm处对R347C239i-10ADC的纯净样品的UHPLC分析显示出99%的单体纯度。UHPLC SEC分析给出最终R347C239i-10ADC的浓度为在55mL 中的1.72mg/mL, 并且获得的R347C239i-10ADC质量为94.5 mg (47% 收率)。

[0810] 1C1C239i-10ADC

[0811] 将DTT (100摩尔当量/抗体, 3.3微摩尔) 添加到1C1-Maia抗体 (5 mg, 33.3纳摩尔) 在PBS、1mM EDTA, pH 7.4中的溶液中并且使得最终体积为最多2.5mL。在轻柔振荡下在室温下持续5hr进行还原, 然后使用Amicon Ultracell 30kDa MWC0自旋过滤器通过自旋过滤去除DTT。将(L)-脱氢抗坏血酸 (DHAA, 20摩尔当量/抗体, 0.67微摩尔, 13.3 $\mu$ L, 50mM, 在DMSO中) 添加到在PBS、1mM EDTA, pH 7.4中的经还原抗体 (2mg/mL, 2.5mL) 中, 并且在轻柔搅拌下在室温下进行再氧化过夜。通过经由0.22 $\mu$ m膜过滤器过滤去除DHAA, 并且将化合物10作为DMSO溶液 (3摩尔当量/抗体, 0.1微摩尔, 在 0.27mL DMSO中) 添加到2.5mL的在PBS、1mM EDTA, pH 7.4中的再氧化抗体 (5mg, 33.3纳摩尔) 中, 以获得10% (v/v) 最终DMSO 浓度。在轻柔振荡下, 使溶液在室温下反应5hr。通过添加N-乙酰半胱氨酸 (2微摩尔, 39.6 $\mu$ L, 100mM) 淬灭缀合, 并且使用FPLC和 Superdex 200 26/600柱, 利用PBS pH 7.4作为洗脱缓冲液, 通过制备型尺寸排阻色谱进行纯化。将包含超过95%单体的级分汇集、浓缩、使用15mL Amicon Ultracell 50kDa MWC0自旋过滤器通过自旋过滤缓冲液交换至25mM组氨酸、200mM蔗糖 (pH

6.0)、无菌过滤并分析。

[0812] 在Shimadzu Prominence系统上,使用Proteomix HIC Butyl-NP5, 5 $\mu$ m,无孔, 4.6x35 mm (Sepax) 柱,利用1.5M硫酸铵、25mM乙酸钠pH 7.4和25mM乙酸钠pH 7.4以及20% 乙腈(v/v)的梯度洗脱,在 214nm处对1C1C239i-10ADC的纯净样品进行的UHPLC分析显示出未缀合抗体以及单缀合和双缀合的化合物10的混合物,这与每分子抗体1.04分子的化合物10的药物/抗体比率(DAR)相一致。

[0813] 在Shimadzu Prominence系统上,使用Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 $\mu$ m 4.6x 150mm柱(具有4 $\mu$ m 3.0x 20mm保护柱),用含有200mM磷酸钾pH 6.95、250mM 氯化钾和10% 异丙醇 (v/v)的0.3毫升/分钟无菌过滤的SEC缓冲液洗脱,在280nm处对1C1C239i-10ADC的纯净样品的UHPLC分析显示出100%的单体纯度。UHPLC SEC分析给出最终1C1C239i-10ADC的浓度为在2.3mL 中的1.45mg/mL,并且获得的1C1C239i-10ADC质量为3.34mg (67%收率)。

[0814] HerC239i-11ADC

[0815] 将DTT (100摩尔当量/抗体,3.3微摩尔)添加到赫塞汀-Maia抗体 (5mg,33.3纳摩尔)在PBS、1mM EDTA,pH 7.4中的溶液中并且使得最终体积为最多2.5mL。在轻柔振荡下在室温下持续5hr进行还原,然后使用Amicon Ultracell 30kDa MWC0自旋过滤器通过自旋过滤去除DTT。将(L)-脱氢抗坏血酸(DHAA,20摩尔当量/抗体,0.67 微摩尔,13.3 $\mu$ L,50mM,在DMSO中)添加到在PBS、1mM EDTA, pH 7.4中的经还原抗体(2mg/mL,2.5mL)中,并且在轻柔搅拌下在室温下进行再氧化过夜。通过经由0.22 $\mu$ m膜过滤器过滤去除DHAA,并且将化合物11作为DMSO溶液(1.5摩尔当量/抗体,0.05微摩尔,在0.27mL DMSO中)添加到2.5mL的在PBS、1mM EDTA,pH 7.4 中的再氧化抗体(5mg,33.3纳摩尔)中,以获得10% (v/v) 最终DMSO浓度。在轻柔振荡下,使溶液在室温下反应过夜。通过添加N-乙酰半胱氨酸(2微摩尔,39.6 $\mu$ L,100mM)淬灭缀合,并且使用FPLC和 Superdex 200 26/600柱,利用PBS pH 7.4作为洗脱缓冲液,通过制备型尺寸排阻色谱进行纯化。将包含超过95%单体的级分汇集、浓缩、使用15mL Amicon Ultracell 50kDa MWC0自旋过滤器通过自旋过滤缓冲液交换至25mM组氨酸、200mM蔗糖(pH 6.0)、无菌过滤并分析。

[0816] 在Shimadzu Prominence系统上,使用Proteomix HIC Butyl-NP5, 5 $\mu$ m,无孔, 4.6x35 mm (Sepax) 柱,利用1.5M硫酸铵、25mM乙酸钠pH 7.4和25mM乙酸钠pH 7.4以及20% 乙腈(v/v)的梯度洗脱,在 214nm处对HerC239i-11ADC的纯净样品进行的UHPLC分析显示出未缀合抗体以及单缀合和双缀合的化合物11的混合物,这与每分子抗体1.10分子的化合物11的药物/抗体比率(DAR)相一致。

[0817] 在Shimadzu Prominence系统上,使用Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 $\mu$ m 4.6x 150mm柱(具有4 $\mu$ m 3.0x 20mm保护柱),用含有200mM磷酸钾pH 6.95、250mM 氯化钾和10% 异丙醇 (v/v)的0.3毫升/分钟无菌过滤的SEC缓冲液洗脱,在280nm处对HerC239i-11ADC样品的UHPLC分析显示出99%的单体纯度。UHPLC SEC分析给出最终HerC239i-11ADC的浓度为在4.0mL中的 1.29mg/mL,并且获得的HerC239i-11ADC质量为3.23mg (65%收率)。

[0818] 1C1C239i-11ADC

[0819] 将DTT (100摩尔当量/抗体,3.3微摩尔)添加到1C1-Maia抗体 (5 mg,33.3纳摩尔)



在PBS、1mM EDTA, pH 7.4中的溶液中并且使得最终体积为最多2.5mL。在轻柔振荡下在室温下持续5hr进行还原,然后使用Amicon Ultracell 30kDa MWC0自旋过滤器通过自旋过滤去除DTT。将(L)-脱氢抗坏血酸(DHAA, 20摩尔当量/抗体, 0.67微摩尔, 13.3 $\mu$ L, 50mM, 在DMSO中)添加到在PBS、1mM EDTA, pH 7.4中的经还原抗体(2mg/mL, 2.5mL)中,并且在轻柔搅拌下在室温下进行再氧化过夜。通过经由0.22 $\mu$ m膜过滤器过滤去除DHAA,并且将化合物11作为DMSO溶液(1.5摩尔当量/抗体, 0.05微摩尔, 在0.27mL DMSO中)添加到2.5mL的在PBS、1mM EDTA, pH 7.4中的再氧化抗体(5mg, 33.3纳摩尔)中,以获得10% (v/v) 最终DMSO 浓度。在轻柔振荡下,使溶液在室温下反应过夜。通过添加N-乙酰半胱氨酸(2微摩尔, 39.6 $\mu$ L, 100mM)淬灭缀合,并且使用FPLC和 Superdex 200 26/600柱,利用PBS pH 7.4作为洗脱缓冲液,通过制备型尺寸排阻色谱进行纯化。将包含超过95%单体的级分汇集、浓缩、使用15mL Amicon Ultracell 50kDa MWC0自旋过滤器通过自旋过滤缓冲液交换至25mM组氨酸、200mM蔗糖(pH 6.0)、无菌过滤并分析。

[0820] 在Shimadzu Prominence系统上,使用Proteomix HIC Butyl-NP5, 5 $\mu$ m, 无孔, 4.6x35 mm (Sepax) 柱,利用1.5M硫酸铵、25mM乙酸钠pH 7.4和25mM乙酸钠pH 7.4以及20% 乙腈(v/v)的梯度洗脱,在 214nm处对1C1C239i-11ADC的纯净样品进行的UHPLC分析显示出未缀合抗体以及单缀合和双缀合的化合物11的混合物,这与每分子抗体1.05分子的化合物11的药物/抗体比率(DAR)相一致。

[0821] 在Shimadzu Prominence系统上,使用Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 $\mu$ m 4.6x 150mm柱(具有4 $\mu$ m 3.0x 20mm保护柱),用含有200mM磷酸钾pH 6.95、250mM氯化钾和10% 异丙醇 (v/v)的0.3毫升/分钟无菌过滤的SEC缓冲液洗脱,在280nm处对1C1C239i-11ADC样品的UHPLC分析显示出99%的单体纯度。UHPLC SEC分析给出最终1C1C239i-11ADC的浓度为在2.2mL中的1.50mg/mL,并且获得的1C1C239i-11ADC质量为3.3mg (66%收率)。

[0822] 进行以下抗体与化合物10的另外缀合:RSV-C239i; B7H4-E02-C239i;PSMA-C239i;以及CDH6-50B-C239i。

[0823] 实施例12

[0824] 体外PC3 1C1测定

[0825] 从T75烧瓶中的亚汇合(80-90%汇合)PC3细胞中抽走培养基并且用PBS(约20ml)冲洗烧瓶并排空。添加胰蛋白酶-EDTA(5ml),将烧瓶放回到37 $^{\circ}$ C充气培养箱,持续至多约5分钟,然后剧烈振打以将细胞从塑料上移去并解离。将细胞悬浮液转移到无菌的50ml螺旋盖离心管中,用生长培养基稀释至15ml的最终体积,然后离心(400 g, 5min)。抽走上清液并将沉淀物重悬于10ml培养基中。可能需要重复吸吹以产生单分散性的细胞悬浮液。使用LUNA II测量台盼蓝细胞染色细胞的细胞浓度和活力。将细胞稀释至1500个细胞/孔,分配(50 $\mu$ l/孔)到白色96孔平底板中并且在使用之前温育过夜。

[0826] 通过将过滤灭菌的ADC稀释到细胞培养基中来制备抗体药物缀合物(ADC) (20 $\mu$ g/ml)的储备溶液(1ml)。通过连续转移100 $\mu$ l到900  $\mu$ l的细胞培养基上,在24孔板中进行储备ADC的一组8x 10倍稀释。将ADC稀释液分配(50 $\mu$ l/孔)到96孔板的4个重复孔中,其含有前一天接种的50 $\mu$ l细胞悬浮液。对照孔接收50 $\mu$ l细胞培养基。在 37 $^{\circ}$ C下在CO<sub>2</sub>-充气培养箱中温育含有细胞和ADC的96孔板,持续6 天。在温育期结束时,将板平衡至室温,持续30min,然后

将 CellTiter-Glo (Promega) 分配 (100 $\mu$ l/孔) 到每个孔中。将板在轨道振荡器上放置2min, 之后在室温下稳定化10min。测量孔发光并且细胞存活百分比计算自在4个ADC处理孔中的平均发光, 相比于在4个对照未处理孔中的平均发光 (100%)。使用GraphPad Prism, 使用非线性曲线拟合算法由剂量-反应数据确定IC<sub>50</sub>: 西格摩德 (sigmoidal) 剂量反应, X为log (浓度)。用于PC3的细胞生长培养基为: 具有谷氨酰胺、10% (v/v) HyClone™胎牛血清的F12K。

[0827]	ADC	EC50 ( $\mu$ g/ml)
	1C1C239i-10ADC	0.002247
	1C1C239i-11ADC	0.003987

[0828] 体外MTS测定

[0829] ADC的体外活性在表达Her2的细胞系NCI-N87和Her2阴性细胞系MDA-MB-468中测量。

[0830] 来自亚汇合 (80-90%汇合) T75烧瓶的细胞的浓度和活力通过台盼蓝染色进行测量并且使用LUNA-II™自动细胞计算器进行计数。将细胞稀释至2x10<sup>5</sup>/ml, 分配 (50 $\mu$ l/孔) 到96孔平底板中。

[0831] 通过将过滤灭菌的ADC稀释到细胞培养基中来制备抗体药物缀合物 (ADC) (20 $\mu$ g/ml) 的储备溶液 (1ml)。通过连续转移100 $\mu$ l至900 $\mu$ l 的细胞培养基中, 在24孔板中进行储备ADC的一组8x 10倍稀释。将ADC稀释液分配 (50 $\mu$ l/孔) 到96孔板的4个重复孔中, 其含有先前接种的50 $\mu$ l细胞悬浮液。对照孔接收50 $\mu$ l细胞培养基。将含有细胞和ADC的96孔板在37℃下在CO<sub>2</sub>充气的培养箱中温育, 持续暴露时间。

[0832] 在温育期结束时, 通过MTS测定来测量细胞活力。将MTS (Promega) 分配 (20 $\mu$ l/孔) 到每个孔中并且在CO<sub>2</sub>充气的培养箱中在 37℃下温育4小时。测量在490nm处的孔吸光度。细胞存活百分比计算自在4个ADC处理孔中的平均吸光度, 相比于在4个对照未处理孔中的平均吸光度 (100%)。使用GraphPad Prism, 使用非线性曲线拟合算法由剂量-反应数据确定IC<sub>50</sub>: 具有可变斜率的西格摩德剂量-反应曲线。

[0833] ADC温育时间为MDA-MB-468的4天和NCI-N87的7天。在具有Glutamax+10% (v/v) HyClone™胎牛血清的RPMI 1640中培养 MDA-MB-468和NCI-N87。

[0834]	EC50 ( $\mu$ g/ml)	NCI-N87	MDA-MB-468
	HerC239i-10ADC	0.0002893	14.9
	HerC239i-11ADC	0.0005823	11.4

[0835] 实施例13

[0836] 小鼠

[0837] 在研究的第1天, 雌性严重联合免疫缺陷小鼠 (Fox Chase **SCID**®, C.B-17/Icr-Prkdcscid, Charles River) 为十周龄, 具有16.2克至21.9克的体重 (BW) 范围。给动物不限量喂饲水 (反渗透, 1ppm Cl), 以及由 18.0%粗蛋白、5.0%粗脂肪以及5.0%粗纤维组成的 NIH 31Modified and Irradiated Lab **Diet**®。采用12小时光照循环, 在20-22℃ (68-72°F) 和40-60%湿度下, 将小鼠饲养在静态微型隔离器中的经照射的 Enricho' cobs™Laboratory Animal Bedding上。CR Discovery Services 特别按照实验室动物护理和使用指南 (Guide for Care and Use of Laboratory Animals) 中有关约束、饲养、手术

步骤、饲料和流体规章以及兽医护理的建议进行。CR Discovery Services上的动物护理和使用程序为国际实验动物护理评估和认可管理委员会 (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International) (AAALAC) 所认可,这确保符合实验动物的护理和使用的公认标准。

[0838] JIMT-1异种移植物

[0839] 肿瘤细胞培养

[0840] JIMT-1人乳腺癌细胞在含有10%胎牛血清、2mM谷氨酰胺、100 单位/mL青霉素G钠、100μg/mL硫酸链霉素以及25μg/mL庆大霉素的杜氏改良伊格尔培养基 (DMEM) 中培养。将细胞在37℃下,在 5%CO<sub>2</sub>和95%空气的气氛中在湿润培养箱中的组织培养烧瓶中培养。

[0841] 体内移植和肿瘤生长

[0842] 在移植当天,将JIMT-1细胞在对数生长期期间收获并且重悬于磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中,浓度为在50%Matrigel™ (BD Biosciences) 中的 $1 \times 10^8$ 个细胞/ml。通过将 $1 \times 10^7$ 个JIMT-1细胞 (0.1ml悬浮液) 皮下移植到每只测试动物的右侧腹部来始发异种移植物。当肿瘤体积达到100至150mm<sup>3</sup>的目标范围时对其进行监测并且使用卡尺在两个维度上进行测量。使用下式计算肿瘤体积:

$$[0843] \quad \text{肿瘤体积(mm}^3\text{)} = \frac{w^2 \times l}{2}$$

[0844] 其中w=肿瘤的宽度并且l=肿瘤的长度,单位为mm。假设1mg 等于1mm<sup>3</sup>的肿瘤体积,可估计肿瘤重量。

[0845] 治疗

[0846] 肿瘤移植后十四天,指定为研究的第1天,将动物分选成组 (n=10),其具有75至162mm<sup>3</sup>的个体肿瘤体积且组平均肿瘤体积为 115至117mm<sup>3</sup>。

[0847] 在第1天静脉内施用单剂量0.3mg/kg的HerC239i-10ADC和 HerC239i-SG3249 ADC。媒介物治疗组用作肿瘤生长对照。每周两次测量肿瘤。

[0848] HerC239i-SG3249是由SG32349制备的缀合物,如例如Dimasi, N. 等, Molecular Pharmaceutics, 2017, 14, 1501-1516 (DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00995) 中所述并且具有???的DAR。

[0849] 对肿瘤体积的影响在图6中示出,其中:

[0850]

媒介物	●
HerC239i-SG3249	◆
HerC239i-10ADC	▲

[0851] HerC239i-10ADC展示出与HerC239i-SG3249 ADC相等的活性,尽管仅具有PBD二聚体弹头的一半。

[0852] 上文提及的所有文献和其他参考文献均以引用方式结合于本文。

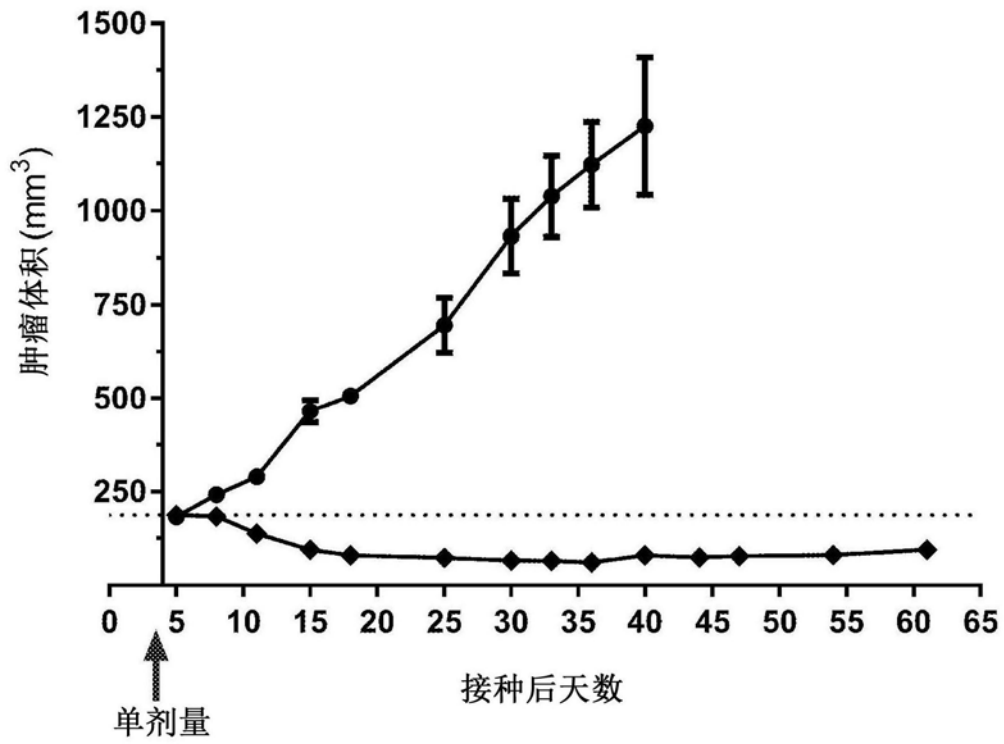


图1

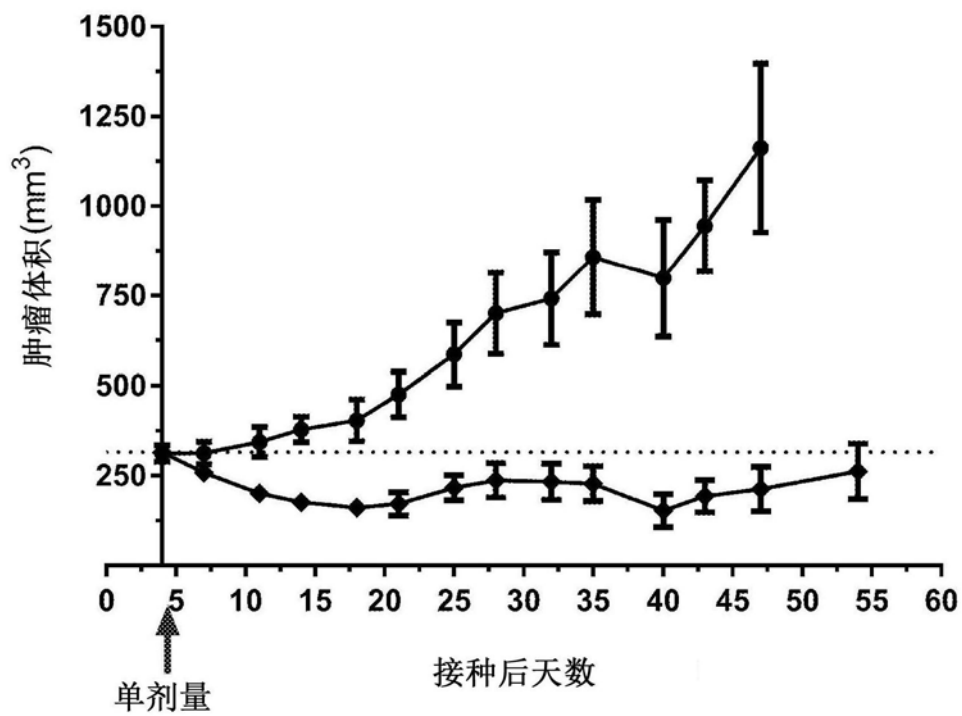


图2

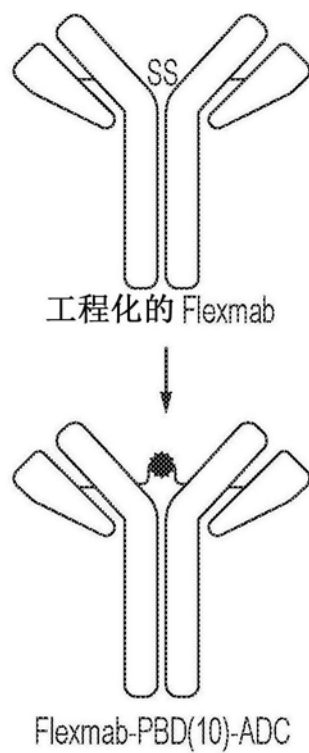


图3

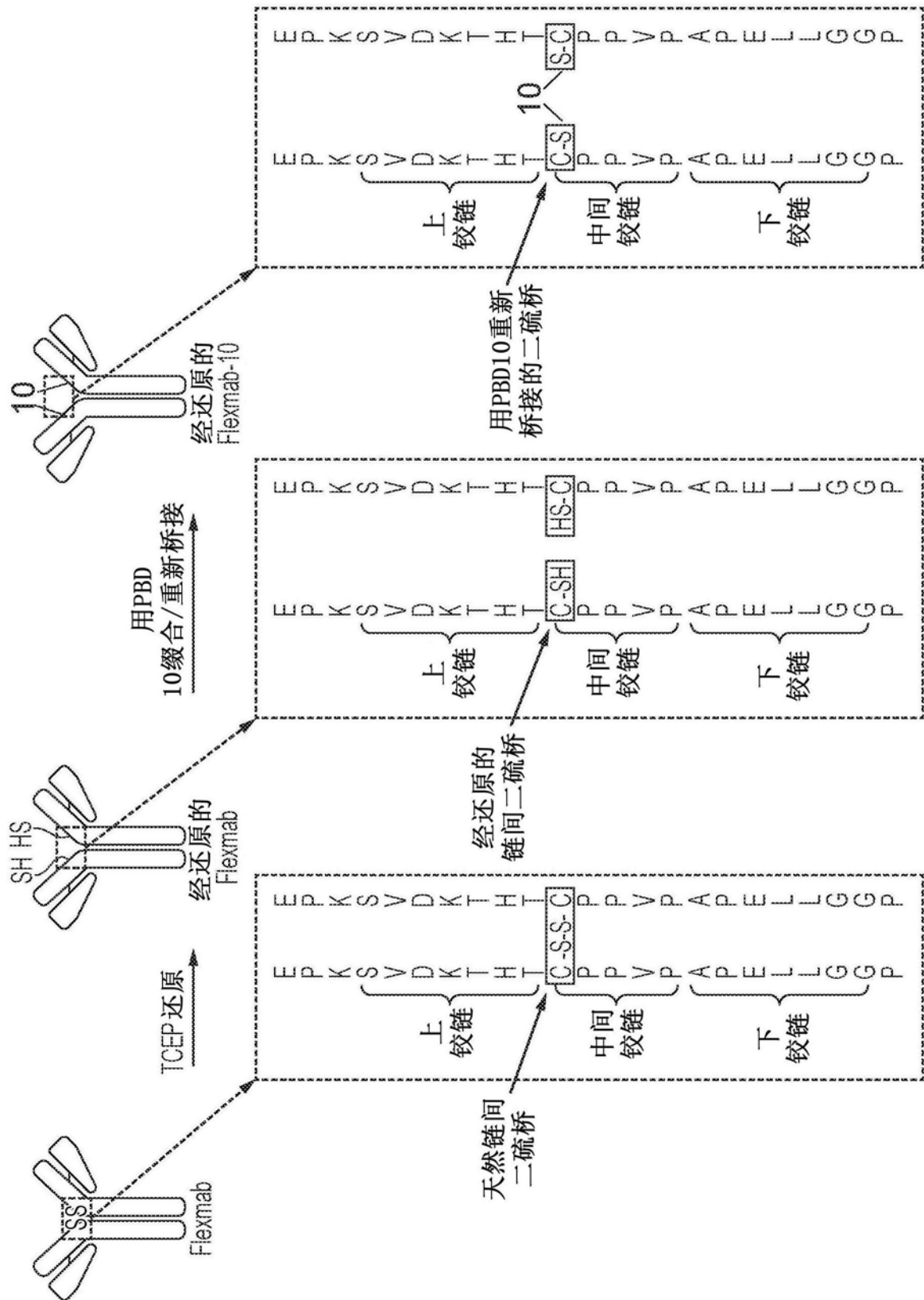


图4

## 赫塞汀-Flexmab: 轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIY  
 SASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTF  
 GGGTKVEIKRTVAAPSVFICPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ  
 WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE  
 VTHQGLSSPVTKSFNRGEV

## 赫塞汀-Flexmab: 重链

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW  
 VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC  
 SRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPCAPSSKSTSGGT  
 AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT  
 VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSVDKTHTCPPVPAPPELLG  
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV  
 HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
 SNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  
 EALHNHYTQKSLSLSPGK

图5

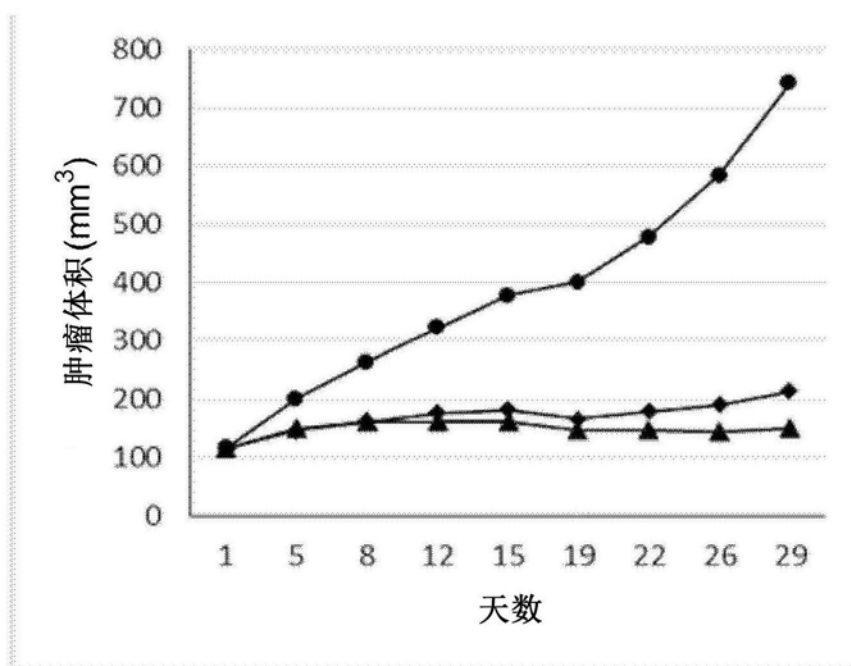


图6