



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103269712 B

(45)授权公告日 2016.09.21

(21)申请号 201180062234.3

(22)申请日 2011.11.03

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103269712 A

(43)申请公布日 2013.08.28

(30)优先权数据
61/409,831 2010.11.03 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.06.21

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2011/059131 2011.11.03

(87)PCT国际申请的公布数据
W02012/061590 EN 2012.05.10

(73)专利权人 伊缪诺金公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 R·V·J·查理 W·C·威迪森
S·D·威廉

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256
代理人 陈文平

(51)Int.Cl.
A61K 39/00(2006.01)

(56)对比文件
WO 2004103272 A2, 2004.12.02,
WO 2004103272 A2, 2004.12.02,
US 4331598 A, 1982.05.25,
US 7754681 B2, 2010.07.13,
US 2010129314 A1, 2010.05.27,

审查员 王胜佳

权利要求书5页 说明书58页 附图28页

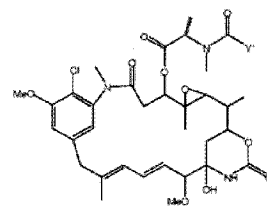
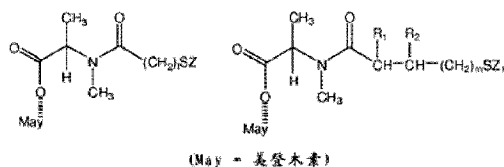
(54)发明名称

包含新型安丝菌素衍生物的细胞毒性剂

(57)摘要

本发明公开了携带连接基团的新型安丝菌素衍生物。还公开了用于合成这些新型安丝菌素衍生物的方法以及它们与细胞结合剂的键联的方法。安丝菌素衍生物-细胞结合剂偶联物可用作治疗剂,其经特异性递送以靶向细胞并且是细胞毒性的。这些偶联物与前述的试剂相比,在动物肿瘤模型中显示出大幅改善的疗效。

可连接的美登木素



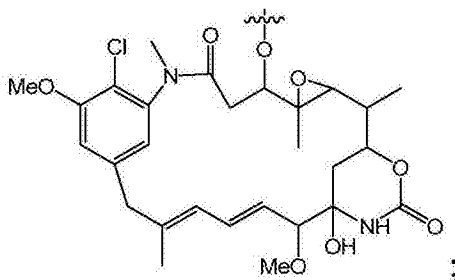
$Y^* = (CR_1R_2R_3)(CR_4R_5R_6R_7R_8R_9R_{10})(C\equiv C)_{10}A_d(CR_{11}R_{12}R_{13}R_{14}R_{15}R_{16}R_{17})(C\equiv C)_1B_f(CR_{18}R_{19}R_{20}R_{21}R_{22}R_{23}R_{24}R_{25}R_{26}R_{27}R_{28}R_{29}R_{30}R_{31}R_{32}R_{33}R_{34}R_{35}R_{36}R_{37}R_{38}R_{39}R_{40}R_{41}R_{42}R_{43}R_{44}R_{45}R_{46}R_{47}R_{48}R_{49}R_{50}R_{51}R_{52}R_{53}R_{54}R_{55}R_{56}R_{57}R_{58}R_{59}R_{60}R_{61}R_{62}R_{63}R_{64}R_{65}R_{66}R_{67}R_{68}R_{69}R_{70}R_{71}R_{72}R_{73}R_{74}R_{75}R_{76}R_{77}R_{78}R_{79}R_{80}R_{81}R_{82}R_{83}R_{84}R_{85}R_{86}R_{87}R_{88}R_{89}R_{90}R_{91}R_{92}R_{93}R_{94}R_{95}R_{96}R_{97}R_{98}R_{99}R_{100})$

1. 一种细胞结合剂偶联物,或其药学上可接受的盐,其中所述偶联物由下式表示:

$(\text{MayO}-\text{A}-\text{Y}-\text{M}'-\text{BFCG})_m-\text{CB}$;

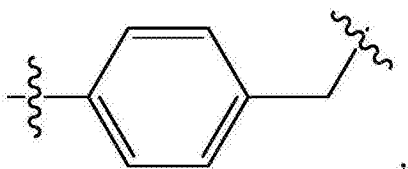
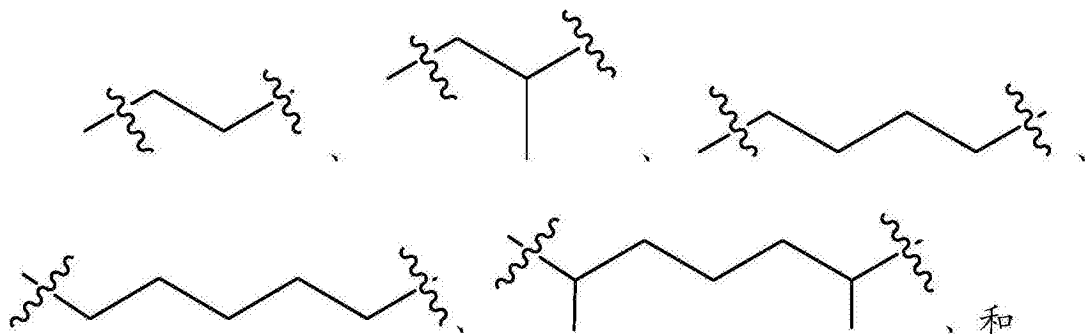
其中

MayO由下式表示;

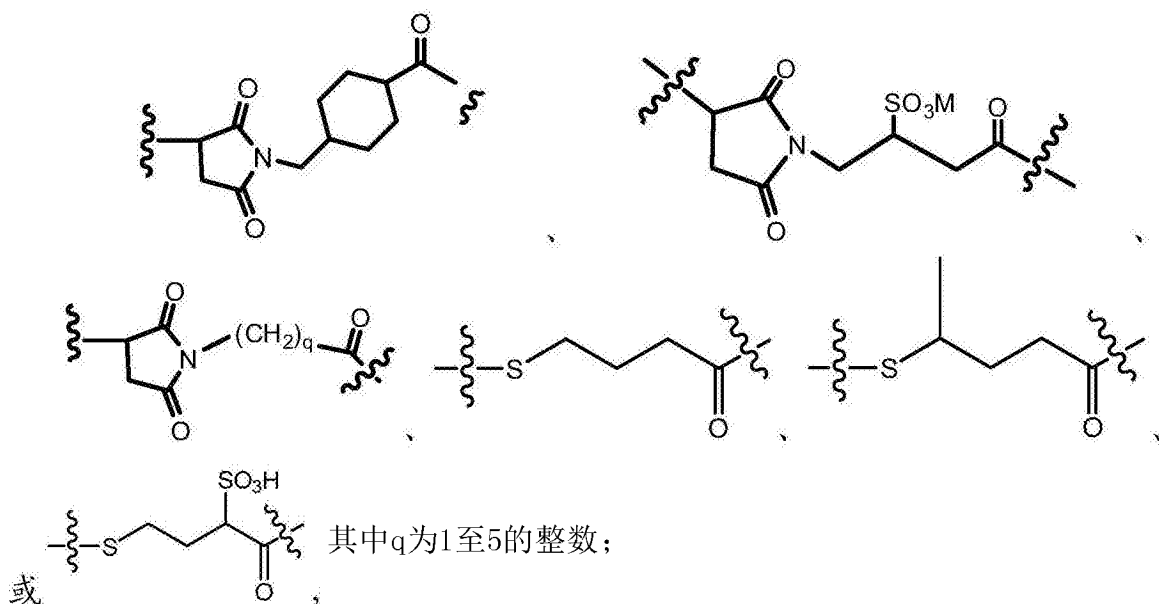


A是C=O;

Y是选自:



BFCG由以下表示:



M' 是-S-;

m为1至20的整数,并且;

CB是抗体或特异性结合靶细胞的抗体片段。

2.如权利要求1所述的细胞结合剂偶联物,其中所述细胞结合剂CB是表面重塑的抗体、或表面重塑的抗体片段。

3.如权利要求2所述的细胞结合剂偶联物,其中所述细胞结合剂CB是表面重塑的单链抗体。

4.如权利要求1所述的细胞结合剂偶联物,其中所述细胞结合剂CB是单克隆抗体、或单克隆抗体片段。

5.如权利要求4所述的细胞结合剂偶联物,其中所述细胞结合剂CB是单链单克隆抗体。

6.如权利要求1所述的细胞结合剂偶联物,所述细胞结合剂CB是人源化抗体、或人源化抗体片段。

7.如权利要求6所述的细胞结合剂偶联物,其中所述细胞结合剂CB是人源化单链抗体。

8.如权利要求1所述的细胞结合剂偶联物,其中所述细胞结合剂CB是嵌合抗体或特异性结合靶细胞的嵌合抗体片段。

9.如权利要求1所述的细胞结合剂偶联物,其中所述细胞结合剂CB是结构域抗体或特异性结合靶细胞的结构域抗体片段。

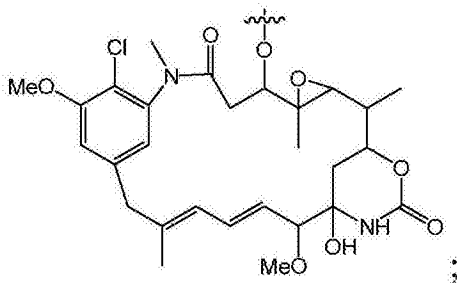
10.一种药物组合物,其包含权利要求1-9中任一项的偶联物和药学上可接受的载体。

11.一种化合物或其药学上可接受的盐,所述化合物由下式表示:

MayO-A-Y-M'-BFCG'-Z';

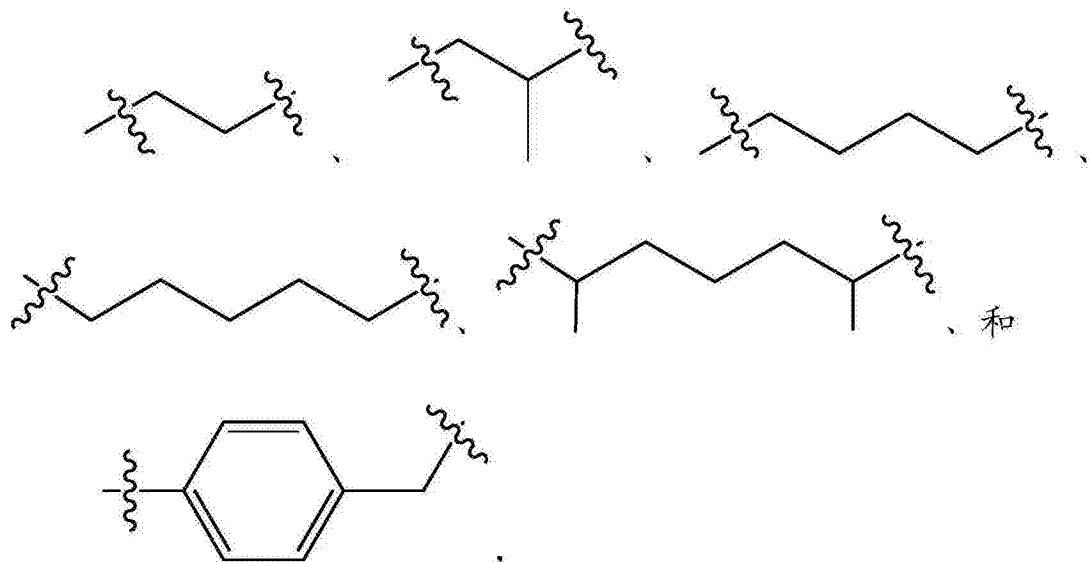
其中:

MayO由下式表示;

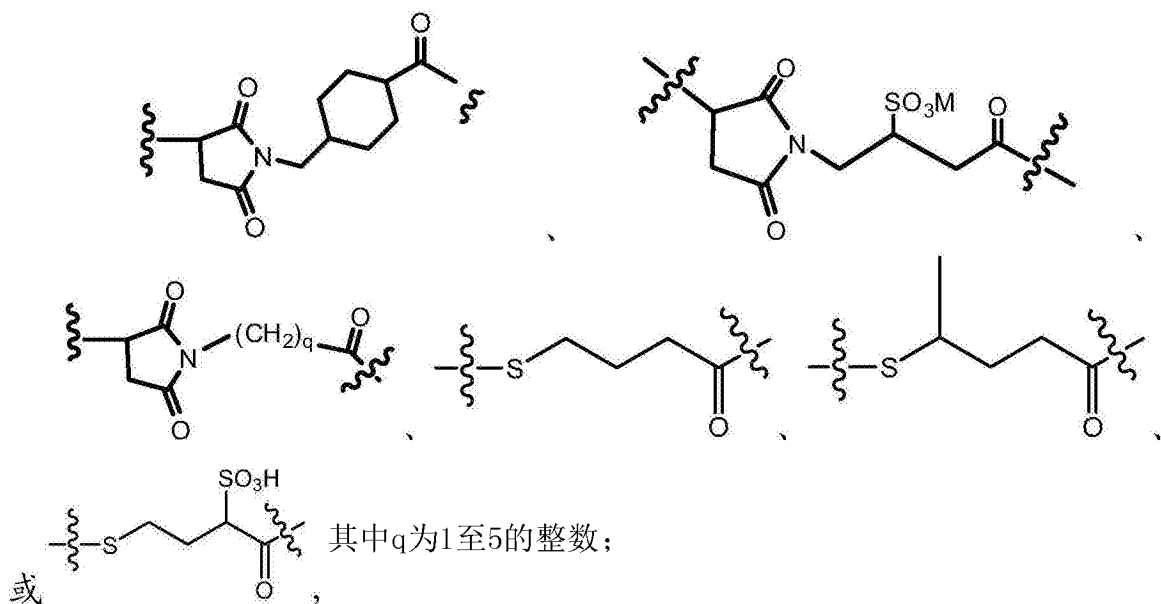


A是C=O;

Y是选自:



BFCG' 由下式表示:



Z' 与来自BFCG' 的-C(=O)-基团一起是-COOH或-COE, 其中-COE是选自N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、硝基苯基酯、二硝基苯基酯、磺基-四氟苯基酯、和五氟苯基酯的活性酯; 并且

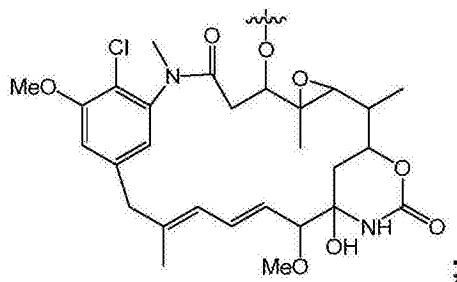
M' 是-S-。

12. 由下式表示的化合物或其药学上可接受的盐:

MayO-A-Y-L;

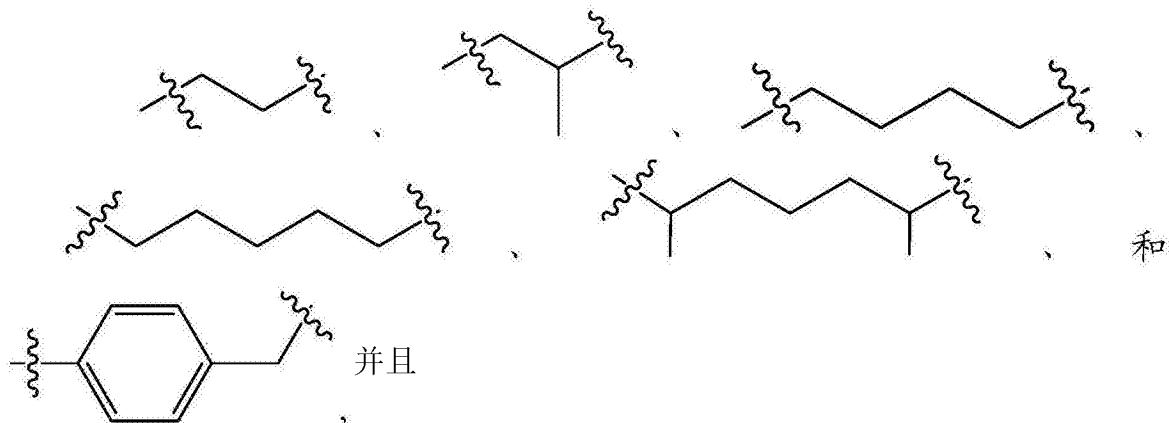
其中:

MayO由下式表示:



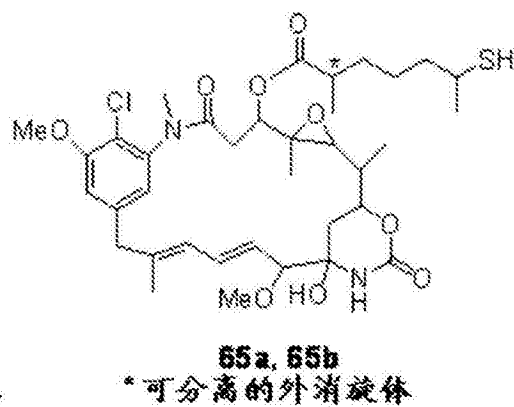
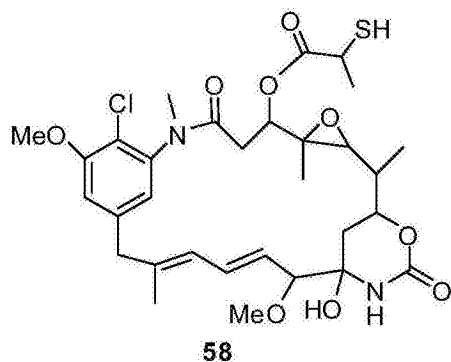
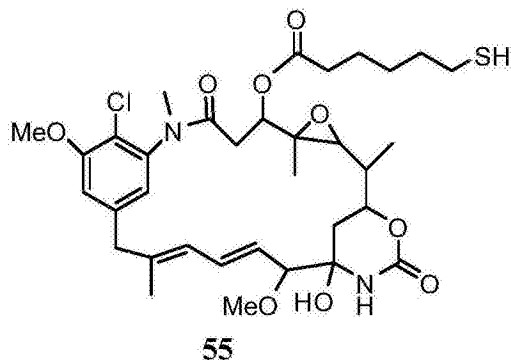
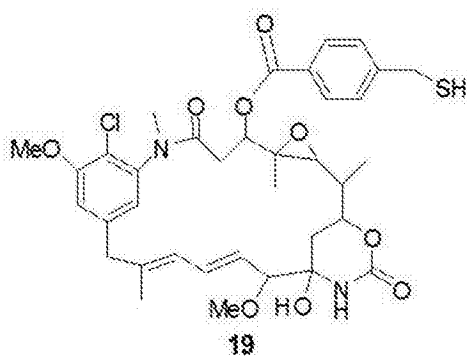
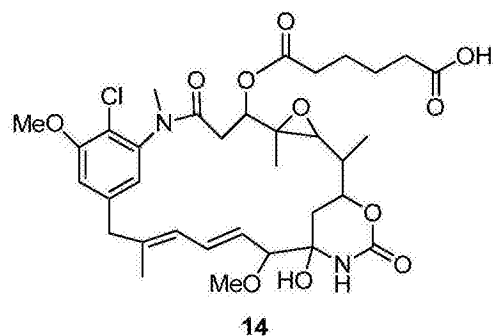
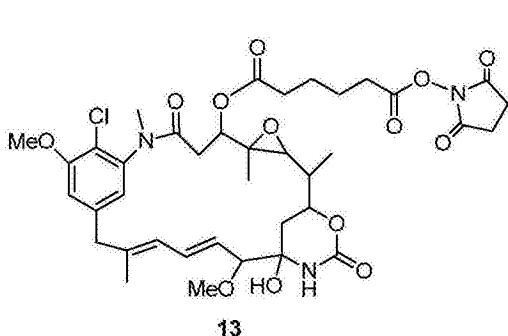
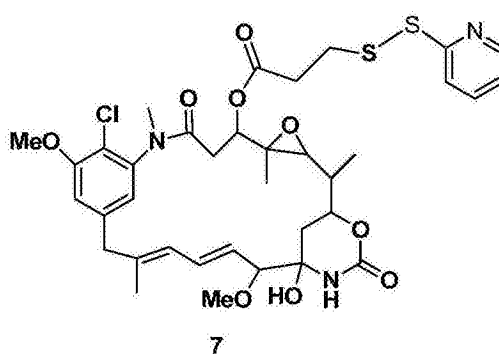
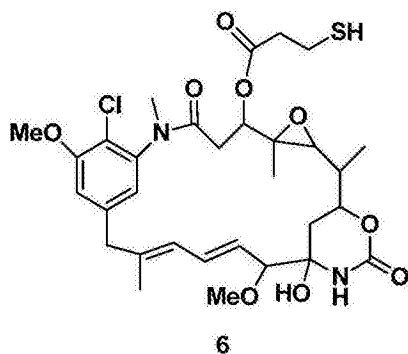
A是C(=O);

Y是选自:



L是-SH、-SSR^d、-COOH、或-COE, 其中R^d是任选被取代的苯基或任选被取代的吡啶基, 并且其中-COE是选自N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、硝基苯基酯、二硝基苯基酯、磺基-四氟苯基酯、和五氟苯基酯的活性酯。

13. 如权利要求12所述的化合物, 其中所述化合物由以下任一种化合物或其药学上可接受的盐表示:



14. 如权利要求1-9中任一项所述的偶联物和任选的第二化疗剂在制备用于在哺乳动物体内治疗癌症的药物中的用途。

15. 如权利要求14所述的用途,其中所述癌症选自乳腺癌、结肠癌、脑癌、前列腺癌、肾癌、胰腺癌、卵巢癌、头颈癌、黑素瘤、结直肠癌、胃癌、鳞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、睾丸癌、Merkel细胞癌、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤以及淋巴器官癌。

包含新型安丝菌素衍生物的细胞毒性剂

[0001] 相关申请

[0002] 本申请主张于2010年11月3日申请的美国临时申请系列号61/409,831的利益,其全部教导通过引用并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及用于制备包含安丝菌素衍生物和细胞结合剂的细胞毒性偶联物的方法。这些偶联物当以靶向方式被递送到特定细胞群体时具有治疗用途。本发明还涉及用于制备具有连接子半族的安丝菌素衍生物的方法,其可用于制备细胞毒性偶联物。本发明进一步涉及新型安丝菌素衍生物。

[0004] 发明背景

[0005] 正在将细胞毒性药物的抗体偶联物开发成靶特异性治疗剂。抗各种癌细胞-表面抗原的抗体已与不同细胞毒性剂偶联(参见Chari 1998, Adv. Drug Delivery Revs., 31, p 89-104; Chari, 2008, Acc. Chem. Res., 41, p 98-107; Ducry&Stump, 2010, Bioconjugate Chem., 21, p 5-13; Senter, 2009, Curr Opin in Chem. Biol., 13, p 235-244; Ojima. 等人, 2002, J Med. Chem. 45, 5620-5623; Hamann, P.R. 等人, 2002, Bioconjug Chem. 13, 47-58; Bross, P.F. 等人, 2001 Clin Cancer Res. 7, 1490-6; DiJoseph, J.F. 等人, 2004, Blood, 103:1807-1814; Doronina, S.O., 等人, 2003, Nat Biotechnol. 21, 778-784; Doronina, S.O., 等人, 2006, Bioconjug Chem. 17, 114-24)。

[0006] 用于抗体-药物偶联物的细胞毒性化合物抑制各种必要的细胞靶,例如微管(美登木素、阿里他汀类(auristatins)、紫杉烷类:美国专利No. 5,208,020; 5,416,064; 6,333,410; 6,441,163; 6,340,701; 6,372,738; 6,436,931; 6,596,757; 7,276,497; 7,301,019; 7,303,749; 7,368,565; 7,473,796; 7,585,857; 7,598,290; 7,495,114; 7,601,354、美国专利申请No. 20100092495、20100129314、20090274713、20090076263、20080171865)和DNA(加利刹霉素、阿霉素、CC-1065类似物:美国专利No. 5,475,092; 5,585,499; 5,846,545; 6,534,660; 6,756,397; 6,630,579; 7,388,026; 7,655,660; 7,655,661)。在这些偶联物中,细胞毒性半族和抗体经由可切割的连接子例如二硫键、酸不稳定键、肽酶不稳定性键、或酯酶不稳定键、或经由不可切割的连接子、例如硫醚键或酰胺键连接在一起。具有这些细胞毒性药物中的一些的抗体偶联物在临床中正在积极地研究用于癌症治疗(Richart, A.D., 和 Tolcher, A.W., 2007, Nature Clinical Practice, 4, 245-255; Krop 等人, 2010, J. Clin. Oncol., 28, p 2698-2704)。

[0007] 各种连接子技术已被用于制备此类免疫偶联物,并研究了可切割的连接子和不可切割的连接子。然而,在大多数情况下,仅在药物分子可以在靶位点以未被修饰的方式从偶联物上被释放时,才观察到药物的完整的细胞毒性效力。

[0008] 已被用于制备抗体-药物偶联物的可切割连接子中的一种是,基于顺乌头酸的酸不稳定性连接子,其利用了不同的细胞内区室的酸性环境,例如在受体介导的胞吞作用期间遇到的内体和溶酶体。Shen和Ryser将此方法引入以制备柔红霉素和大分子载体的偶联

物(Biochem.Biophys.Res.Comm.102:1048-1054(1981))。Yang和Reisfeld用同样的技术将柔红霉素偶联到抗黑素瘤抗体(J.Natl.Canc.Inst.80:1154-1159(1988))。Dillman等人也以相似的方式应用酸不稳定性连接子来制备柔红霉素和抗T细胞抗体的偶联物(Cancer Res.48:6097-6102(1988))。

[0009] 由Trouet等人开发的一种替代方法,涉及通过肽间隔臂将柔红霉素连接到抗体(Proc.Natl.Acad.Sci.79:626-629(1982))。这是在游离药物可以经溶酶体肽酶的作用从这样的偶联物上被释放出来的前提下进行的。

[0010] 美登素是高度细胞毒性的药物。美登素(maytansine)首先由Kupchan等人从东非灌木齿叶美登木(Maytenus serrata)中分离出来,并且显示它比传统的癌症化疗剂如甲氨蝶呤、柔红霉素和长春新碱的细胞毒性强100至1000倍(美国专利No.3,896,111)。随后,发现一些微生物也生成美登素,例如美登醇和美登醇的C-3酯(美国专利No.4,151,042)。也报道了合成的美登醇C-3酯及美登醇的类似物(Kupchan等人J.Med.Chem.21:31-37(1978);Higashide等人Nature270:721-722(1977);Kawai等人Chem.Pharm.Bull.32:3441-3451(1984))。用以制备C-3酯的美登醇的类似物的例子包括,在芳族环上有修饰(例如脱氯)的美登醇或在C-9、C-14(例如羟基化的甲基基团)、C-15、C-18、C-20和C-4,5处带有修饰的美登醇。

[0011] 天然存在的美登醇C-3酯和合成的美登醇C-3酯可以被分为两组:

[0012] (a)具有简单羧酸的C-3酯(美国专利No.4,248,870;4,265,814;4,308,268;4,308,269;4,309,428;4,317,821;4,322,348;以及4,331,598和Chem.Pharm.Bull.1984,12:3441),以及

[0013] (b)具有N-甲基-L-丙氨酸的衍生物的C-3酯(美国专利No.4,137,230;4,260,608;5,208,020;以及Chem.Pharm.Bull.1984,12:3441)。

[0014] 已发现,携带乙酰化N-甲基丙氨酸酯的组(b)的酯比组(a)的安丝菌素酯更具有细胞毒性。例如,Kupchan等人(J.Med.Chem.,21:31(1978)报道,安丝菌素类似物(美登醇的简单C3酯)例如丙酰基酯、溴乙酰基酯、巴豆酰基酯和三氟乙酰基酯($IC_{50}=0.00021-0.01$ 微克/mL)对癌细胞的效力比在C3携带乙酰化N-甲基-L-丙氨酸酯的酯例如美登素($IC_{50}=0.0000061$ 微克/mL)低34至1640倍。在该研究中测试的6种简单的安丝菌素酯中仅有2种具有与含有N-甲基丙氨酸的化合物美登素类似的效力。相比之下,不管酰基的性质如何,美登醇的N-酰基-N-甲基-L-丙氨酰基酯均高度有效。其他修饰的安丝菌素已由Kawai等人报道(Chem.Pharm.Bull.,32:3441,1984)。已报道,大部分这些化合物在1至4微克/mL下具有抗微生物活性。并未报道体内对癌细胞的细胞杀死活性。

[0015] 美登素是美登醇的N-乙酰基-N-甲基-L-丙氨酰基酯。其是高度有效的有丝分裂抑制剂。已报道,用美登素在体内处理L1210细胞,导致细胞的67%积累在有丝分裂期。据报道,未被处理的对照细胞显示了范围在3.2%至5.8%之间的有丝分裂指数(Sieber等人43Comparative Leukemia Research 1975,Bibl.Haemat.495-500(1976))。用海胆卵和蛤卵进行的实验提示,美登素通过抑制微管蛋白质(microtubule)——微管蛋白(tubulin)的聚合而干扰微管的形成,从而抑制有丝分裂(Remillard等人Science 189:1002-1005(1975))。

[0016] 在体外,已发现P388、L1210和LY5178鼠白血病细胞悬液被美登素抑制,美登素的

剂量是 10^{-3} 至 $10^{-1}\mu\text{g}/\mu\text{l}$,其中P388细胞系最为敏感。也已显示,美登素是人鼻咽癌细胞的体外生长的活性抑制剂,并且据报道,人急性成淋巴细胞性白血病系CEM被低至 $10^{-7}\text{mg}/\text{ml}$ 的浓度所抑制(Wolpert-DeFillippes等人Biochem.Pharmacol.24:1735-1738(1975))。

[0017] 在体内,也已显示,美登素是活性的。在50倍至100倍的剂量范围内,P388淋巴细胞白血病系统中的肿瘤生长被抑制,这表明了高的治疗指数;对于L1210鼠白血病系统、人Lewis肺癌系统和人B-16黑素癌系统,也可以显示出显著的抑制活性(Kupchan, Fed.Proc.33:2288-2295(1974))。

[0018] 基于其高效力,描述了在适用于连接到细胞结合剂的N-甲基丙氨酸酰基半族上携带各种酰基侧链的美登素类似物(参见例如美国专利No.5,208,020;5,416,064;7,473,796;7,368,565;7,301,019;7,276,497;6,716,821;6,441,163;美国专利申请No.20100129314;20100092495;20090274713;20090076263;20080171865;20080171856;20070270585;20070269447;20070264266;以及20060167245;Chari等人,Cancer Res.,52:127-131(1992);Liu等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,93:8618-8623(1996);以及Widdison等人,J.Med.Chem.,49:4392,2006)。在这些偶联物中,细胞结合剂经由二硫键连接到美登木素,例如DM1[N^{2'}-脱乙酰基-N^{2'}(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素,CAS号:139504-50-0,图1]或DM4[N^{2'}-脱乙酰基-N^{2'}(4-巯基-4-甲基-1-氧代戊基)-美登素,CAS号:796073-69-3]。

[0019] 在上述专利中,用于与细胞结合剂连接的美登木素药物携带含酰化的N-甲基丙氨酸或N-甲基半胱氨酸的酯侧链(参见图1)。含N-甲基丙氨酸或N-甲基半胱氨酸的侧链必须具有L构型以得到高效力,而D-异构体的效力地至多100倍(参见Widdison等人,J.Med.Chem.,49:4392,2006)。

[0020] 发明概述

[0021] 本发明基于下面的出乎意料的发现:与之前的报道相反,携带不同的简单C3酯(丙酰基、异丁基、异戊酰基、戊酰基)的安丝菌素高度有效并且其效力比含N-甲基丙氨酸的酯美登素更高(参见图2和图3)。例如,经报道,携带C3丙酰基酯的安丝菌素抵抗KB细胞的效力比美登素低约34.4倍(Kupchan等人J.Med.Chem.21:31-37,1978)。然而,在本文,已发现携带C3丙酰基酯的相同的安丝菌素抵抗KB细胞系的效力比美登素高1.3倍。用另一细胞系SK-Br-3观察到类似的结果,表明安丝菌素相比于美登素具有更高的效力(参见图3)。因此,使用细胞结合剂,安丝菌素具有足够的靶向递送的效力。

[0022] 因此,本发明描述了携带可用于与细胞结合剂连接的官能团的新型安丝菌素衍生物。

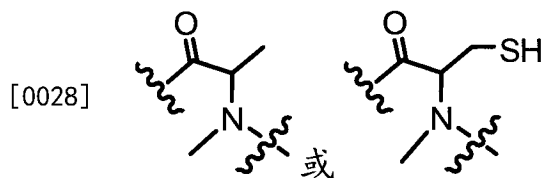
[0023] 在第一实施方案中,本发明涉及细胞结合剂偶联物,其包含以化学方式连接到由下式(I)表示的衍生化美登醇或美登醇类似物残基的细胞结合剂:

[0024] MayO-A-

[0025] (I);

[0026] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中:MayO是由MayOH表示的美登醇或美登醇类似物的残基;A是选自C=O、C(=O)NR'和C(=O)O的任选基团,R'选自H、被取代或未被取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基、以及被取代或未被取代的芳基,

[0027] 前提条件是所述偶联物不包含直接连接到MayO-的由下式表示的N-甲基丙氨酸或N-甲基半胱氨酸半族:



[0029] 在第二实施方案中,本发明涉及细胞结合剂偶联物,其包含由下式(II)表示的衍生化美登醇或美登醇类似物残基:

[0030] MayO-A-Y-

[0031] (II);

[0032] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中MayO与A如式(I)中所述并且Y是选自被取代或未被取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂环基团、被取代或未被取代的芳基烷基、被取代或未被取代的杂环基烷基基团、氮丙啶基团和环氧基团的任选基团,其中烷基、烯基、炔基、芳基烷基、杂环基烷基基团中的每一个任选地被一个或多个选自以下的基团间断:聚乙二醇单元(OCH_2CH_2)_n、氮丙啶基团、环氧基团、氨基基团、酰氨基基团、酯基团、芳基基团和杂环基团、氨基酸以及肽,其中:n为1至200的整数;

[0033] 在第三实施方案中,本发明涉及由式(III)表示的细胞结合剂偶联物:

[0034] (MayO-A-Y-L')_m-CB

[0035] (III);

[0036] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中:MayO、A和Y如在第一和第二实施方案中所述,L'是连接子;m为1至20的整数,并且CB表示细胞结合剂。

[0037] 在第四实施方案中,本发明涉及由式(IV)表示的细胞结合剂偶联物:

[0038] MayO-A-Y-L'-CB

[0039] (IV);

[0040] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中:MayO、A、L'和CB如在第一实施方案和第二实施方案中所述;Y是任选基团并且选自被取代或未被取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂环基团、每个基团携带任选的聚乙二醇单元(OCH_2CH_2)_n,其中:n为1至200的整数,以及肽。

[0041] 在第五实施方案中,本发明涉及由式(V)表示的细胞结合剂偶联物:

[0042] (MayO-A-Y-M'-BFCG)_m-CB

[0043] (V);

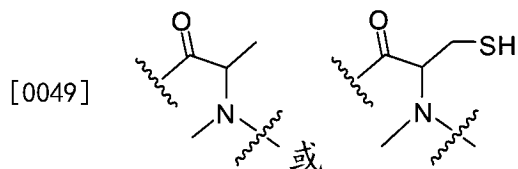
[0044] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中:MayO、A、Y、m和CB如在第一、第二、第三、第四实施方案中定义;BFCG不存在或包含两个连接基团的双官能交联剂的残基,其中连接基团之一已与M'反应并且另一个连接基团已与所述细胞结合剂反应;M'是连接基团的残基,所述连接基团与BFCG的经反应的连接基团之一一起形成硫醚、二硫化物、硫酯、酰胺、亚胺、-O-亚胺或脲半族;以及BFCG通过硫醚、二硫化物、硫酯、酰胺、亚胺、-O-亚胺或脲半族连接到CB。

[0045] 在第六实施方案中,本发明涉及包含衍生化美登醇或美登醇类似物残基和连接基团的化合物,所述连接基团可与细胞结合剂或双官能交联剂形成化学键,其中所述衍生化美登醇或美登醇类似物残基由式(VI)表示:

[0046] MayO-A-

[0047] (VI);

[0048] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中:MayO是由MayOH表示的美登醇或美登醇类似物的残基;A是选自C=O、C(=O)NR'和C(=O)O的任选基团;以及R'选自H、被取代或未被取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基、以及被取代或未被取代的芳基;前提条件是所述化合物不包含直接连接到MayO-的由下式表示的N-甲基丙氨酸或N-甲基半胱氨酸半族:



[0050] 在第七实施方案中,本发明涉及包含衍生化美登醇或美登醇类似物残基的化合物,其中所述衍生化美登醇或美登醇类似物由下式(VII)表示:

[0051] MayO-A-Y-

[0052] (VII);

[0053] 其中:MayO与A如在第六实施方案中所述;以及Y是选自被取代或未被取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂环基团、被取代或未被取代的芳基烷基、被取代或未被取代的杂环基烷基基团、氮丙啶基团和环氧基团的任选基团,其中烷基、烯基、炔基、芳基烷基和杂环基烷基基团中的每一个任选地被一个或多个选自以下的基团间断:聚乙二醇单元(OCH_2CH_2)_n、氮丙啶基团、环氧基团、氨基基团、酰氨基基团、酯基团、芳基基团和杂环基团氨基酸和肽,其中:n为1至200的整数。

[0054] 在第八实施方案中,本发明涉及式(VIII)的化合物:

[0055] MayO-A-Y-L

[0056] (VIII);

[0057] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中:MayO、A和Y如在第六和第七实施方案中所定义;以及L是可与细胞结合剂或双官能交联剂形成化学键的连接基团。

[0058] 在第九实施方案中,本发明涉及由式(IX)表示的化合物:

[0059] MayO-A-Y-L

[0060] (IX);

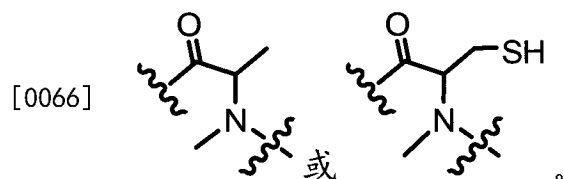
[0061] 或所述化合物的药学上可接受的盐或溶剂化物,其中:MayO、A和L如在第六、第七和第八实施方案中所定义;以及Y是选自被取代或未被取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂环基团的任选基团,每一个携带任选的聚乙二醇单元(OCH_2CH_2)_n,其中n为1至200的整数,以及肽;并且L是可经由二硫键、硫醚键、肽键、酰胺键、酯键或腙键与细胞结合剂形成化学键的官能团,前提条件是当A是C=O时,Y与A一起不是N-甲基丙氨酸或N-甲基半胱氨酸半族。

[0062] 在第十实施方案中,本发明涉及化合物,其包含连接到由式(X)表示的衍生化美登醇或美登醇类似物残基的双官能交联剂:

[0063] MayO-A-

[0064] (X);

[0065] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中:MayO是由MayOH表示的美登醇或美登醇类似物的残基;A是选自 $C=O$ 、 $C(=O)NR'$ 和 $C(=O)O$ 的任选基团; R' 选自H、被取代或未被取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基、以及被取代或未被取代的芳基;前提条件是所述化合物不包含直接连接到MayO-的由下式表示的N-甲基丙氨酸或N-甲基半胱氨酸半族:



[0067] 在第十一实施方案中,本发明涉及化合物,其包含连接到由式(XI)表示的衍生化美登醇或美登醇类似物残基的双官能交联剂:

[0068] MayO-A-Y-

[0069] (XI);

[0070] 其中:MayO和A如在第十实施方案中所定义;以及Y是选自被取代或未被取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂环基团、被取代或未被取代的芳基烷基、被取代或未被取代的杂环基烷基基团、氮丙啶基团和环氧基团的任选基团,其中烷基、烯基、炔基、芳基烷基和杂环基烷基基团中的每一个任选地被一个或多个选自以下的基团间断:聚乙二醇单元 $(OCH_2CH_2)_n$ 、氮丙啶基团、环氧基团、氨基基团、酰氨基基团、酯基团、芳基基团和杂环基团、氨基酸以及肽,其中:n为1至200的整数。

[0071] 在第十二实施方案中,本发明涉及化合物,其包含连接到衍生化美登醇或美登醇类似物残基的双官能交联剂,其中所述化合物由式(XII)表示:

[0072] MayO-A-Y-M'-BFCG'-Z'

[0073] (XII);

[0074] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中:MayO、A和Y如在第十和第十一实施方案中所定义;以及BFCG'-Z'是包含两个连接基团的双官能交联剂的残基,其中所述连接基团中的一个由Z'表示并且另一个连接基团已与M'反应;;Z'是可经由硫醚、二硫化物、硫酯、酰胺、硫酯、亚胺、-O-亚胺或脲半族连接到细胞结合剂的连接基团;M'是连接基团的残基,所述连接基团与BFCG'的经反应的基团之一一起形成硫醚、二硫化物、硫酯、酰胺、亚胺、-O-亚胺或脲半族。

[0075] 在第十三实施方案中,本发明涉及抑制哺乳动物体内的异常细胞生长或治疗增殖性病症、自身免疫性病症、破坏性骨病症、感染性疾病、病毒性疾病、纤维化疾病、神经变性疾病、胰腺炎或肾疾病的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的式I-V的偶联物和任选的化疗剂。

[0076] 在第十四实施方案中,本发明涉及式I-V的细胞结合剂偶联物及其药学上可接受的载体、添加剂或稀释剂的药物组合物。

[0077] 附图简述

[0078] 图1示出美登醇和先前所述的美登木素的结构。在Y'中,l、m、n、o、p、q、r、s、t和u各自独立地是0或1至5的整数,前提条件是l、m、n、o、p、q、r、s、t和u中的至少两个在任何时间均不为零;并且Z是H、SR或-COR,其中R是具有1至10个碳原子的直链烷基或烯基、具有3至10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、未被取代或被取代的芳基基团或被取代或未被取代的

杂环基团。在可连接的美登木素中,Z和Z₁具有与Y'的Z相同的定义。图1示出可连接的美登木素。

[0079] 图2示出安丝菌素和美登素的结构。

[0080] 图3示出与具有不同酯基团的安丝菌素相比,美登素对A)KB细胞和B)SK-Br-3细胞的体外细胞毒性。图3示出安丝菌素和美登素的体外效力。

[0081] 图4示出侧链的合成。

[0082] 图5示出含二硫化物和硫醇的安丝菌素衍生物的合成。

[0083] 图6示出携带芳族或杂环侧链的含硫醇的安丝菌素衍生物的合成。

[0084] 图7示出含二硫化物与硫醇的聚乙二醇化安丝菌素衍生物的合成。图7A示出含硫醇的聚乙二醇化安丝菌素衍生物的合成。图7B示出硫醇反应性的聚乙二醇化安丝菌素衍生物的合成。

[0085] 图8示出携带肽酶不稳定性连接子的安丝菌素衍生物的合成。

[0086] 图9示出携带羰基基团的安丝菌素衍生物的合成。

[0087] 图10示出携带氨基基团的安丝菌素衍生物的合成。图10A示出携带氨基集团的安丝菌素衍生物的合成。图10B携带二甲基氨基基团的安丝菌素衍生物的合成。

[0088] 图11示出携带N-羟基琥珀酰亚胺基酯基团的安丝菌素衍生物的合成。

[0089] 图12示出携带醚基团、氨基甲酸酯基团或碳酸酯基团的安丝菌素衍生物的合成。图12A示出携带醚基团的安丝菌素衍生物的合成。图12B示出携带氨基甲酸酯或碳酸酯基团的安丝菌素衍生物的合成。

[0090] 图13示出含硫醇的安丝菌素的合成。图13A-13C示出含硫醇的安丝菌素的合成。

[0091] 图14示出用本发明化合物制备的二硫化物-连接的偶联物的偶联过程。

[0092] 图15示出用本发明化合物制备的硫代琥珀酰亚胺基-连接的偶联物的偶联过程。

[0093] 图16示出用本发明化合物制备的硫代乙酰氨基-连接的偶联物的偶联过程。

[0094] 图17示出用本发明化合物制备的肽酶不稳定性偶联物的偶联过程。

[0095] 图18示出用本发明化合物制备的肽酶不稳定性硫代琥珀酰亚胺基-连接的偶联物的偶联过程。

[0096] 图19示出用本发明化合物制备的肽酶不稳定性硫代乙酰氨基-连接的偶联物的偶联过程。

[0097] 图20示出用本发明化合物制备的酰胺-连接的偶联物的偶联过程。

[0098] 图21示出用本发明化合物制备的脲-连接的偶联物的偶联过程。

[0099] 图22示出用本发明化合物制备的脲-连接的偶联物的偶联过程。

[0100] 图23示出用本发明化合物制备的脲-连接的偶联物的偶联过程。

[0101] 图24示出用本发明化合物制备的酰胺-连接的偶联物的偶联过程。

[0102] 图25示出用本发明化合物制备的二硫化物-连接的偶联物的偶联过程。

[0103] 图26示出用本发明化合物制备的硫醚-连接的偶联物的偶联过程。

[0104] 图27示出用本发明化合物制备的酰胺-连接的偶联物的偶联过程。

[0105] 图28示出所制备的安丝菌素衍生物抵抗KB细胞系的体外活性(96小时暴露)。

[0106] 图29示出所制备的安丝菌素衍生物抵抗COLO 205细胞系的体外活性(96小时暴露)。

[0107] 图30示出所制备的安丝菌素衍生物抵抗COLO 205-MDR细胞系的体外活性(96小时暴露)。

[0108] 图31示出用可连接的安丝菌素衍生物和携带硫醇的美登木素DM1制备的偶联物抵抗COLO 205细胞的体外活性。

[0109] 发明详述

[0110] 本发明公开了携带允许与细胞结合剂连接的官能团的新型安丝菌素衍生物。此外,本发明公开了这些新型安丝菌素衍生物与细胞结合剂的偶联物的制备。

[0111] 本发明的另一方面是包含有效量的任何上述的安丝菌素衍生物-细胞结合剂偶联物、其药学上可接受的盐或溶剂化物和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂的药物组合物。

[0112] 上述的包含安丝菌素衍生物的药物组合物可进一步包含抗体。

[0113] 本发明的进一步方面是一种诱导所选细胞群体中的细胞死亡的方法,其包括将靶细胞或含有靶细胞的组织与有效量的任何上述的安丝菌素衍生物-细胞结合剂、其盐或溶剂化物接触。

[0114] 本领域揭示了在不降低现有药物细胞毒性潜力的情况下极难对其进行修饰。公开的本发明克服了该问题,通过教导合成携带官能团的新型安丝菌素衍生物的方法。公开的新型安丝菌素衍生物保留并且在一些情况下甚至增强前述的安丝菌素的细胞毒性效力。

[0115] 安丝菌素衍生物-细胞结合剂偶联物允许待以靶向方法应用的安丝菌素衍生物仅对不需要的细胞发挥充分的细胞毒性作用,由此避免由于对非靶向健康细胞的损伤而引起的副作用。因此,本发明提供了有用试剂,以及用于制备该试剂的新型方法、用于消除待杀死或溶解的患病或异常细胞而同时展现最小程度的副作用的新方法,所述细胞例如肿瘤细胞(特别是实体肿瘤细胞)、病毒感染细胞、微生物感染细胞、寄生虫感染细胞、自身免疫细胞(生成自身抗体的细胞)、活化细胞(涉及移植物排斥或移植物宿主病的那些)、或任何其他类型的患病或异常细胞。

[0116] 可用于本发明来生成能够与细胞结合剂连接的安丝菌素衍生物的安丝菌素前体在本领域是众所周知的并且可根据已知方法从天然来源分离或者根据已知方法(参见美国专利No.6,790,954;7,192,750;7,432,088)合成制备。

[0117] 适合的安丝菌素前体的实例包括美登醇和美登醇类似物。适合的美登醇类似物的实例包括具有经修饰芳族环的那些以及在其他位置具有修饰的那些。

[0118] 适合的具有经修饰芳族环的美登醇类似物的具体实例包括:

[0119] (1)C-19-脱氯(美国专利No.4,256,746)(通过对安丝菌素P2进行LAH还原而制备);

[0120] (2)C-20-羟基(或C-20-脱甲基)+/-C-19-脱氯(美国专利No.4,361,650和4,307,016)(通过使用链霉菌属(*Streptomyces*)或放线菌属(*Actinomyces*)进行脱甲基或使用LAH进行脱氯而制备);以及

[0121] (3)C-20-脱甲氧基、C-20-酰氧基(-OCOR)、+/-C-19-脱氯(美国专利No.4,294,757)(通过使用酰氯进行酰氯而制备)。

[0122] 适合的具有其他位置的修饰的美登醇类似物的具体实例包括:

[0123] (1)C9-SH(美国专利No.4,424,219)(通过美登醇与H₂S或P₂S₅的反应而制备);

[0124] (2)C14-烷氧基甲基(脱甲氧基/CH₂OR)(美国专利No.4,331,598);

[0125] (3)C14-羟基甲基或酰氧基甲基(CH₂OH或CH₂OAc)(美国专利No.4,450,254)(由诺卡氏菌属(*Nocardia*)制备);

[0126] (4)C15-羟基/酰氧基(美国专利No.4,364,866)(通过用链霉菌属转化美登醇而制备);

[0127] (5)C15-甲氧基(美国专利No.4,313,946和4,315,929)(由滑桃树(*Trewia nudiflora*)分离);

[0128] (6)C18-N-脱甲基(美国专利No.4,362,663和4,322,348)(通过用链霉菌属对美登醇进行脱甲基而制备);以及

[0129] (7)4,5-脱氧(美国专利No.4,371,533)(对美登醇进行三氯化钛/LAH还原而制备)。

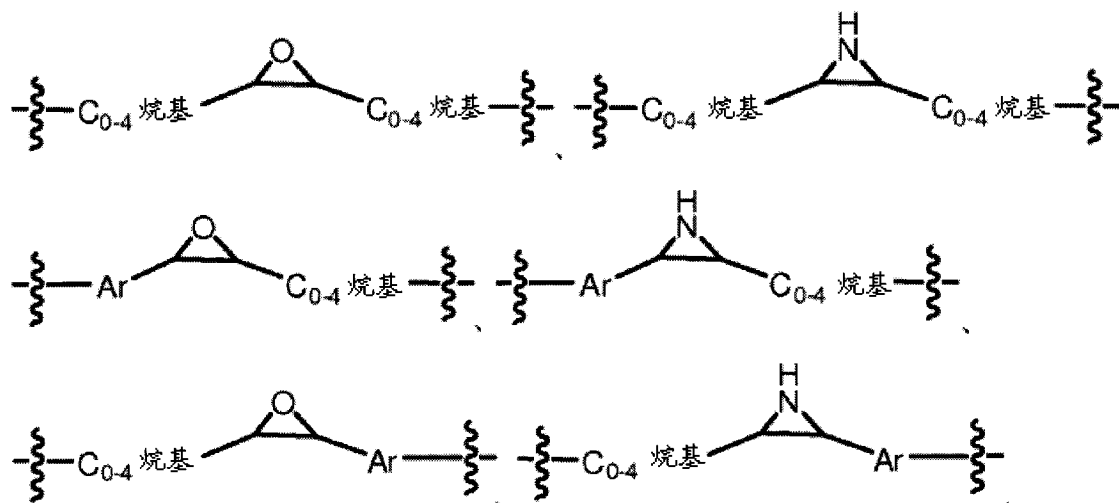
[0130] 美登醇上的很多位置可用作化学连接连接半族的位置。例如,具有羟基基团的C-3位置、用羟基甲基修饰的C-14位置、用羟基修饰的C-15位置和具有羟基基团的C-20位置均是有用的。然而,优选C-3和C-20位置并且尤其优选美登醇的C-3位置。

[0131] 下面根据C-3位置的一些示例性连接半族描述具有连接半族的美登醇的酯的合成,本领域技术人员应理解,具有如上所述的其他化学键的连接半族也可用于本发明,就像如上所述的其他安丝菌素和其他连接位置一样。

[0132] 在本文所述的结构式中(例如,在第一实施方案至第十二实施方案的式I-XII中),下面提供了变量的替代值。

[0133] 在第一(1)备选实施方案中,结构式II-V、VII-IX、XI和XII中的Y是任选基团,其选自C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、卤代C₁₋₆烷基、在两个相邻碳原子上具有卤素和羟基基团的C₁₋₆烷基、

[0134]



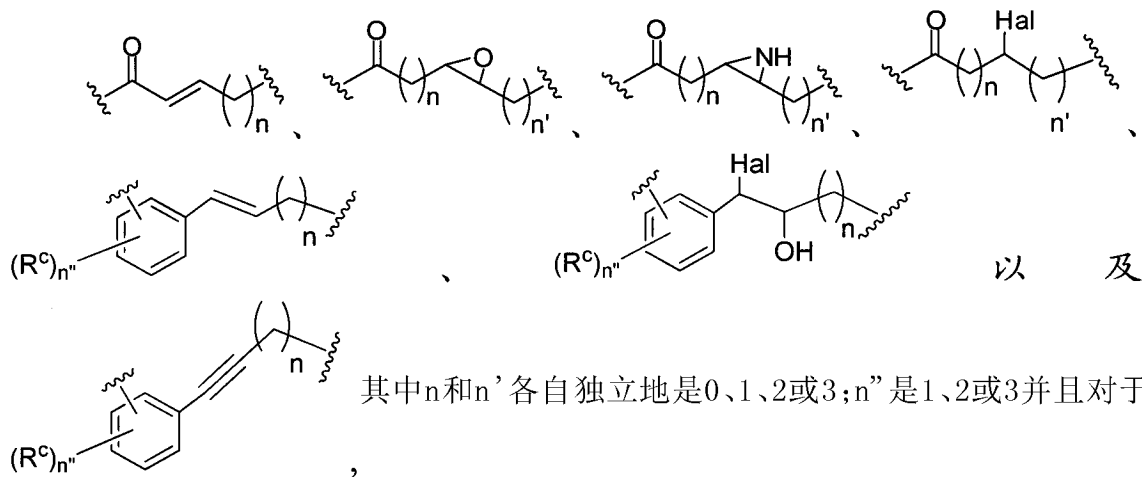
[0135] -C₂₋₆烯基-Ar-、-Ar-C₂₋₆烯基-、-C₂₋₆炔基-Ar-、-Ar-C₂₋₆炔基-、在C₁₋₆烷基的两个相邻碳原子上具有卤素和羟基基团的-C₁₋₆烷基-Ar-以及在两个相邻碳原子上具有卤素和羟基基团的-Ar-C₁₋₆烷基,其中Ar是任选被取代的芳基或任选被取代的杂环基并且由Y表示的基团中的烯基、炔基、烷基是任选被取代的。

[0136] 在第二(2)备选实施方案中,第一备选实施方案中的Ar是任选地被以下取代的苯

基基团： C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 烷氧基、羟基 C_{1-4} 烷基、卤代 C_{1-4} 烷基、 $-OH$ 、 $-OC(=O)-C_{1-4}$ 烷基、 $-OC(=O)-C_{1-4}$ 烷基- NR^aR^b 、 $-C_{1-4}$ 烷基- $COOH$ 、 $-NR^aR^b$ 、 $-C_{1-4}$ 烷基 NR^aR^b 、 $-NO_2$ 和卤素，其中 R^a 和 R^b 各自独立地是H、 C_{1-4} 烷基或氨基保护基团或 R^a 和 R^b 与氮原子一起形成具有一个或多个杂原子的杂环。

[0137] 在第三(3)备选实施方案中，结构式II-V、VII-IX、XI和XII中的-A-Y-由下式之一表示：

[0138]



[0139] 在第四(4)备选实施方案中，在第二和第三备选实施方案中的 R^a 和 R^b 与氮原子一起形成任选被取代的哌嗪基、任选被取代的保护的哌嗪基或任选被取代的4-哌啶子基哌啶基（例如，）。

[0140] 在第五(5)备选实施方案中， n'' 是1或2并且在备选实施方案2-4中 R^c 是H、甲基、乙基、卤素、 $-CF_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-OMe$ 、 $-CO_2Me$ 、 $-OH$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-CH_2OC(=O)CH_2NH_2$ 、 $-CH_2OC(=O)(C(CH_3)_2)CH_2NH_2$ 、 $-CH_2NH_2$ 、 $-CH_2N(CH_3)_2$ 、 $-CH_2COOH$ 和 $-CH_2$ -哌嗪基。

[0141] 在第六(6)备选实施方案中，结构式II-V、VII-IX、XI和XII中的Y由式(IA)表示：

[0142] $-[Ar']_j-(C_{1-10}烷基)-$

[0143] (IA)；

[0144] 其中： Ar' 是任选被取代的芳基、任选被取代的杂环基、任选被取代的 C_{1-4} 烷基芳基、或任选被取代的 C_{1-4} 烷基杂环基；以及 j 为0或1。

[0145] 在第七(7)备选实施方案中，结构式II-V、VII-IX、XI和XII中的Y由式(IIA)表示：

[0146] $-[Ar'']_{0-1}-(CR^1R^2)_x-B-W-D-(CR^1R^2)_w-$

[0147] (IIA)；

[0148] 其中： Ar'' 是苯基、 $-CH_2$ -苯基、杂环基、或 $-CH_2$ -杂环基，任选地被一个至四个选自以下的基团取代：烷基、烷氧基、卤代、卤代烷基、烷氧基-卤代烷基、腈和硝基；每个 R^1 和 R^2 独立地是氢或 C_{1-4} 烷基；B是 NR'' 、O或不存在；W是氨基酸或包含2至8个氨基酸的肽、 $(OCH_2CH_2)_n$ 或

不存在;D是CO、NR^{''}或不存在;R^{''}选自H、被取代或未被取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基、以及被取代或未被取代的芳基;x为1至10的整数;w为0或1至10的整数;以及n为1至200的整数。

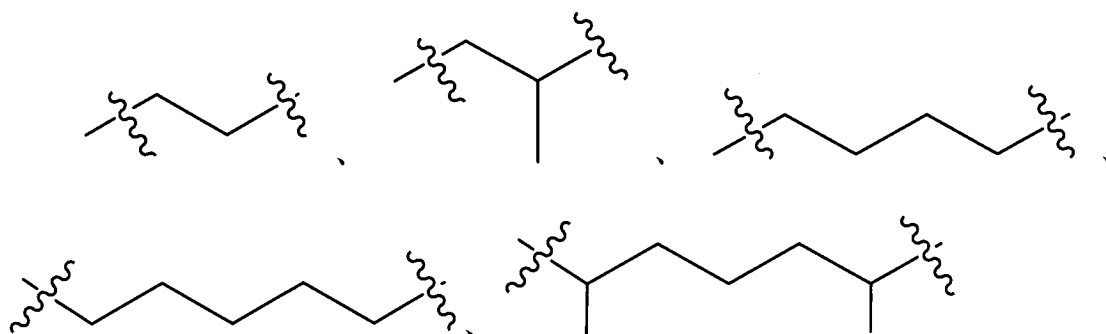
[0149] 在第八(8)备选实施方案中,结构式IIA中的R^{''}是H或C₁₋₄烷基。

[0150] 在第九(9)备选实施方案中,结构式II-V、VII-IX、XI和XII和备选实施方案1-8中的Y为-(CR¹R²)_x-,x是1至6的整数。

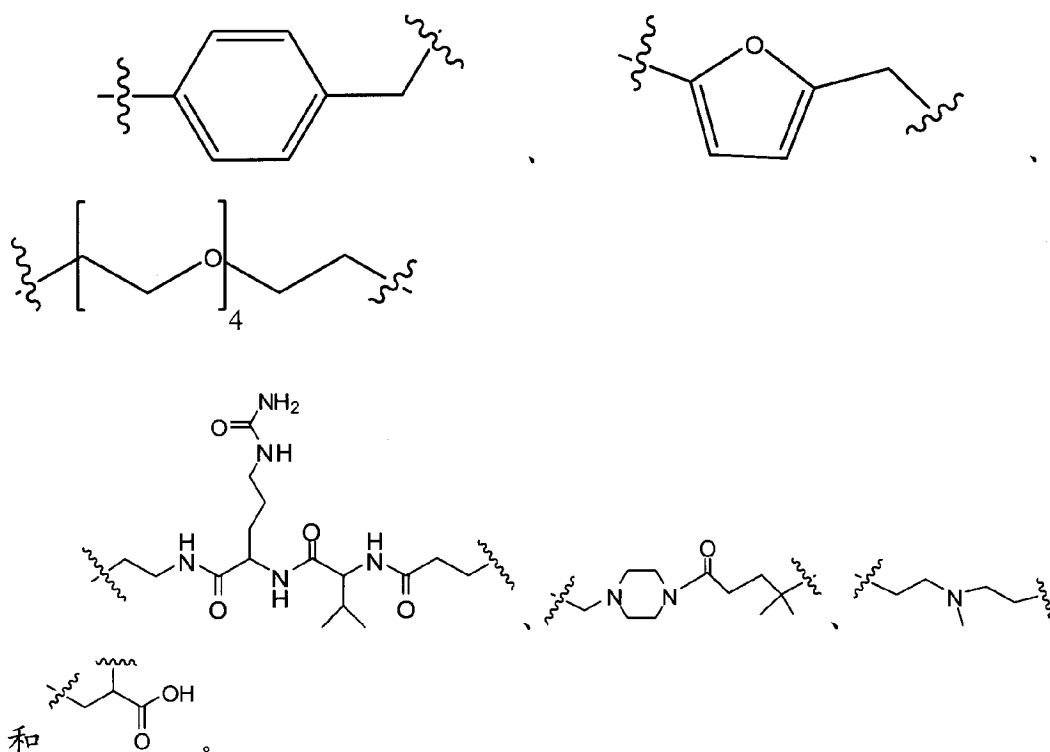
[0151] 在第十(10)备选实施方案中,结构式II-XII和备选实施方案1-9中的每个R¹和R²独立地是氢或甲基。

[0152] 在第十一(11)备选实施方案中,结构式II-V、VII-IX、XI和XII中的Y由下式之一表示:

[0153]



[0154]

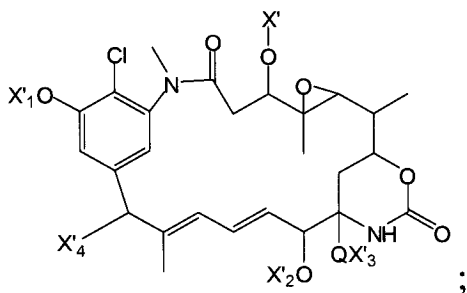


[0155] 在第十二(12)备选实施方案中,式I-XII和备选实施方案1-11中的R^{''}是H或C₁₋₄烷基。

[0156] 在第十三(13)备选实施方案中,式I-XII和备选实施方案1-12中的May0由下式表

示:

[0157]

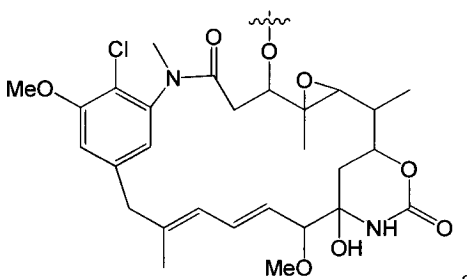


[0158] 其中: $X'_4 = X'_5$ 或 OX'_5 , 以及 X' 、 X'_1 、 X'_2 、 X'_3 和 X'_5 相同或不同并且选自 R 、 $C(=O)R$ 、 $C(=O)NR_2$ 或 $C(=O)OR$, 其中: 每个 R 独立地选自 H 、被取代或未被取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基、以及被取代或未被取代的芳基; Q 选自 O 或 S ; 前提条件是 X' 、 X'_1 、 X'_2 、 X'_3 、 X'_5 中的至少一个表示 $MayO$ 与 A 或 AY 之间的共价键。

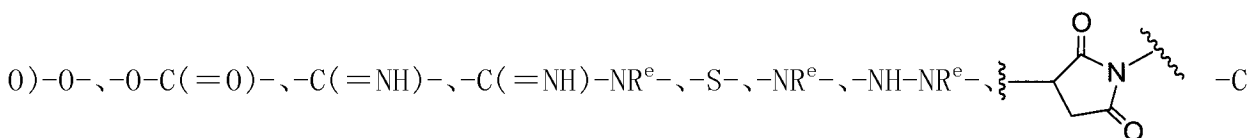
[0159] 在第十四(14)备选实施方案中, 在第十三备选实施方案中的 R 独立地是 H 或 C_{1-4} 烷基。

[0160] 在第十五(15)备选实施方案中, 式 I-XII 和备选实施方案 1-14 中的 $MayO$ 由下式表示:

[0161]

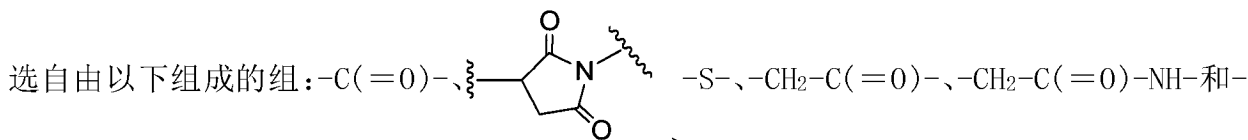


[0162] 在第十六(16)备选实施方案中, 式 V 中的 BFCG 包含连接到 M' 的半族 M'' 和连接到 CB 的半族 Z , 其中 M'' 和 Z 各自独立地是选自由以下组成的组: $-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-NR^e-$ 、 $-C(=$



$=NR^e)-$ 、 $=NNR^e-$ 、 $-CH_2-C(=O)-$ 和 $-CH_2-C(=O)-NR^e-$, 其中 R^e 是 H 、烷基、烯基或炔基并且其余变量如在备选实施方案 1-15 中所述。

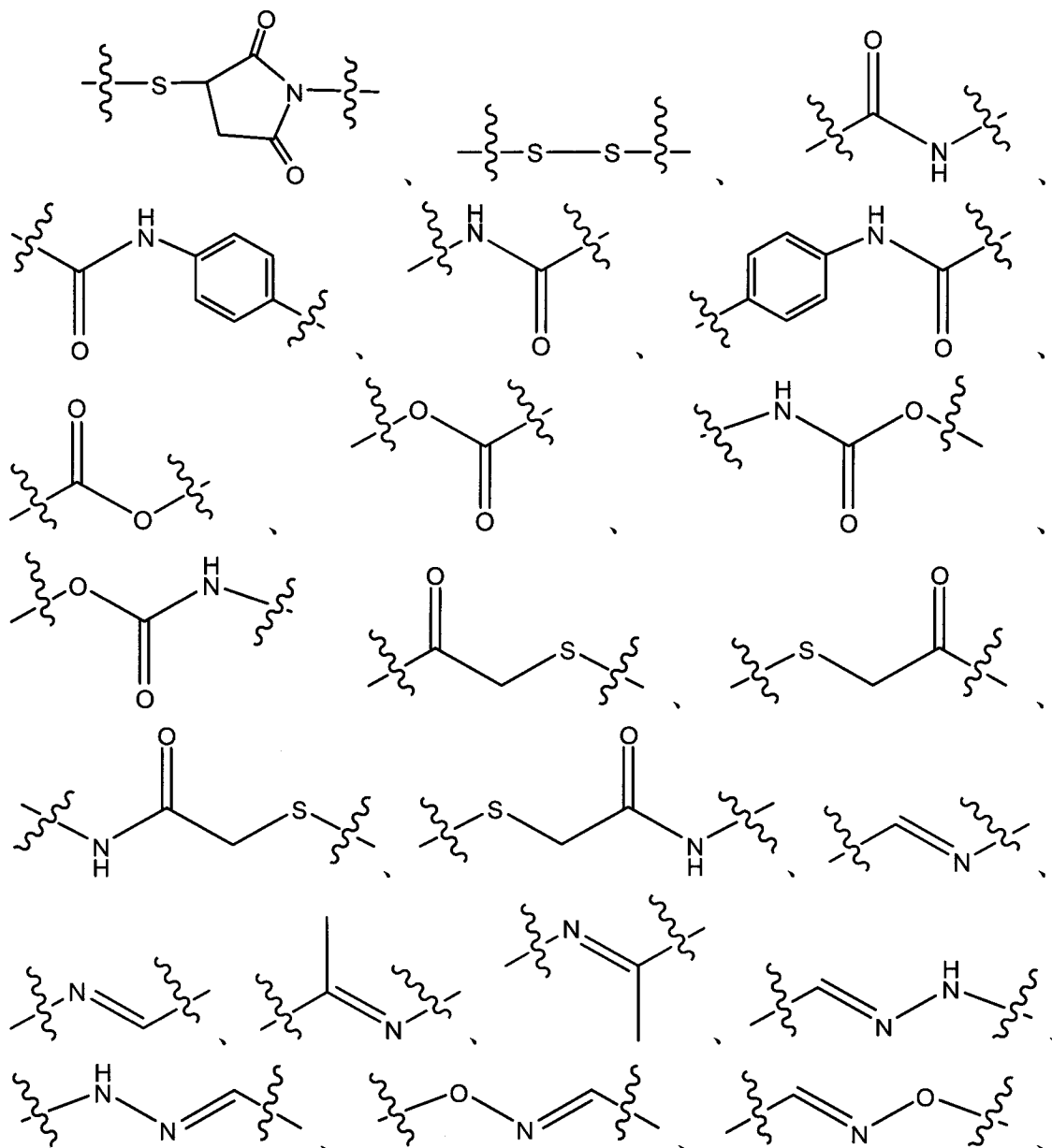
[0163] 在第十七(17)备选实施方案中, 在第十六备选实施方案中的 M'' 和 Z 各自独立地是



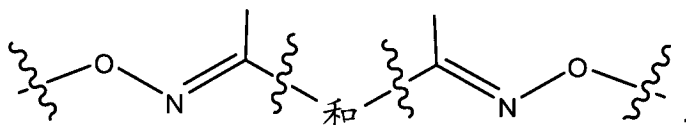
$-C(=O)-$ 并且其余变量如在备选实施方案 1-15 中所述。

[0164] 在第十八(18)备选实施方案中, 在第十六备选实施方案中的 $M'-M''$ 由选自以下的结构式表示:

[0165]



[0166]



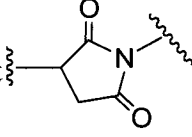
并且剩余变量如在备选实施方案

案1-17中所述。

[0167] 在第十九(19)备选实施方案中,式V中的-BFCG-由式(IIIA)表示:

[0168] $-M''-(CR^3R^4)_y-[Cy]_0 \text{ 或 } -C(O)-$

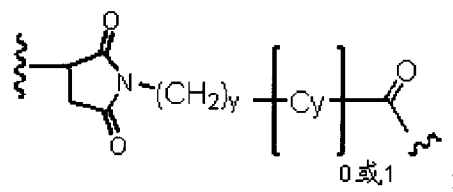
[0169] (IIIA);

[0170] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中: M'' 是  每个 R^3 和 R^4 独立地

是氢、甲基或 $-SO_3^-M^+$,其中: M^+ 是 H^+ 或药学上可接受的阳离子; Cy 是任选地被一个至四个选自以下的基团取代的环烷基或苯基:烷基、烷氧基、卤代、卤代烷基、烷氧基卤代烷基、腈和硝

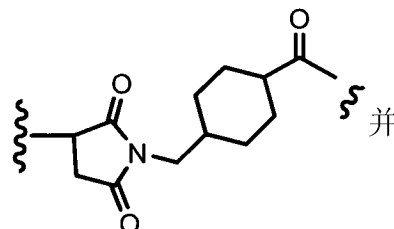
基;以及y为0或1至10的整数并且剩余变量如在备选实施方案1-18中所述。

[0171] 在第二十(20)备选实施方案中,式V中的BFCG是



以及M'是-S-并且剩余变量如在备选实施方案1-19中所述,以及剩余变量如在备选实施方案1-19中所述。

[0172] 在第二十一(21)备选实施方案中,式V中的BFCG是:



且剩余变量如在备选实施方案1-20中所述。

[0173] 在第二十二(22)备选实施方案中,式V的-BFCG-由式(IVA)表示:

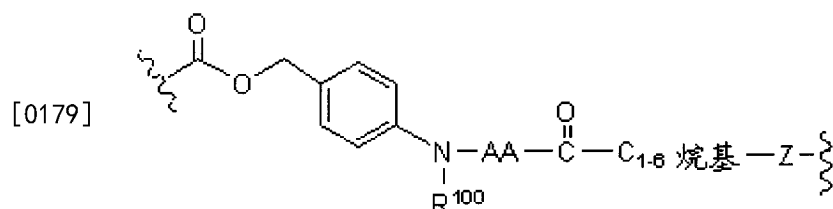
[0174] $-S-(CR^3R^4)_{y'}-C(O)-$

[0175] (IVA);

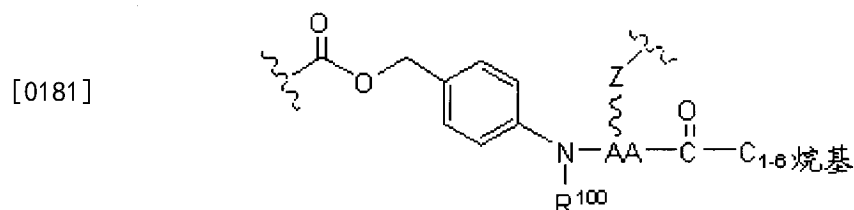
[0176] 其中:每个R³和R⁴独立地是氢、甲基或-SO₃⁻M⁺,其中:M⁺是H⁺或药学上可接受的阳离子,y'为1至10的整数并且剩余变量如在备选实施方案1-18中所述。

[0177] 在第二十三(23)备选实施方案中,本发明涉及其中BFCG包含自降解性半族的细胞结合剂偶联物并且其余变量如在备选实施方案1-22中所述。

[0178] 在第二十四(24)备选实施方案中,式V中的BFCG由下式表示:

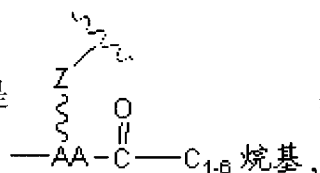


[0180] 其中AA是氨基酸或包含2至8个氨基酸的肽、R¹⁰⁰是H或烷基并且其余变量如在备选实施方案1-18中所述。可选地,式V中的BFCG由下式表示:



[0182] 其中AA是氨基酸或包含2至8个氨基酸的肽,其中具有本文所述的连接半族Z(例如、-NH-、-C(=O)-)的氨基酸侧链中的一个共价连接到细胞结合剂并且R¹⁰⁰是H或烷基。在另一备选,式V中的BFCG是-AA-(C=O)₀₋₁-C₀₋₆烷基-Z-,其中AA是氨基酸或包含2至8个氨

基酸的肽并且Z是连接基团;或式V中的BFCG是



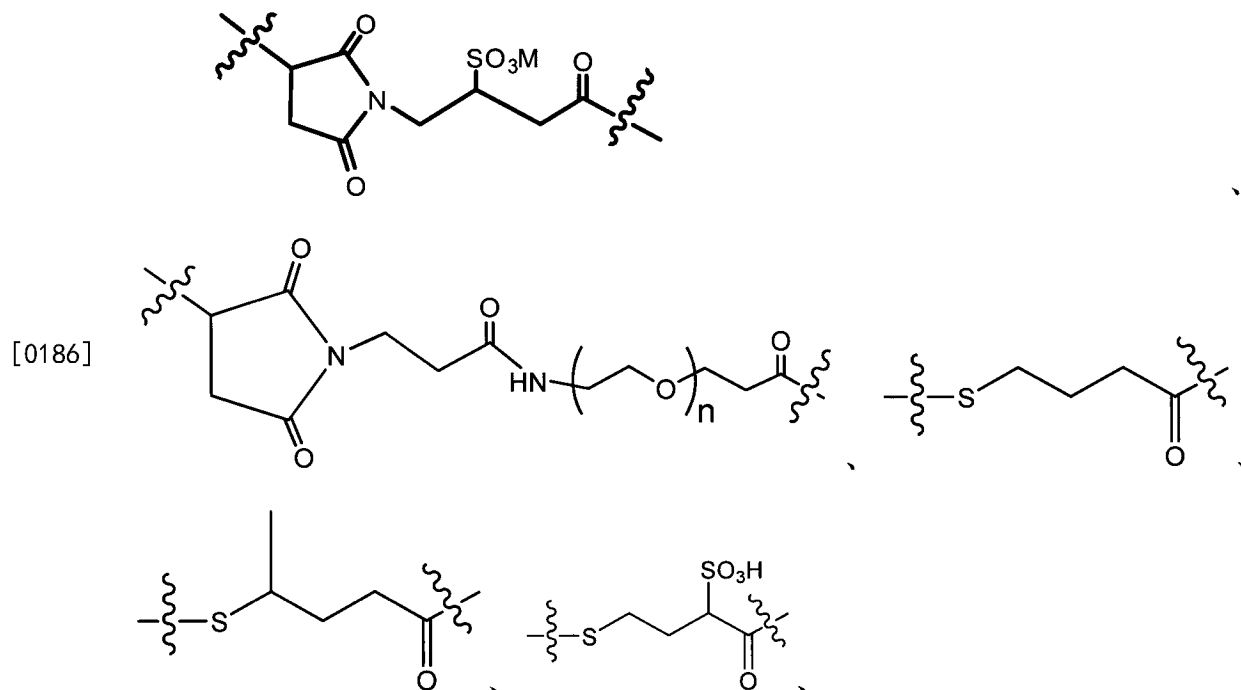
其中AA是氨基酸或包

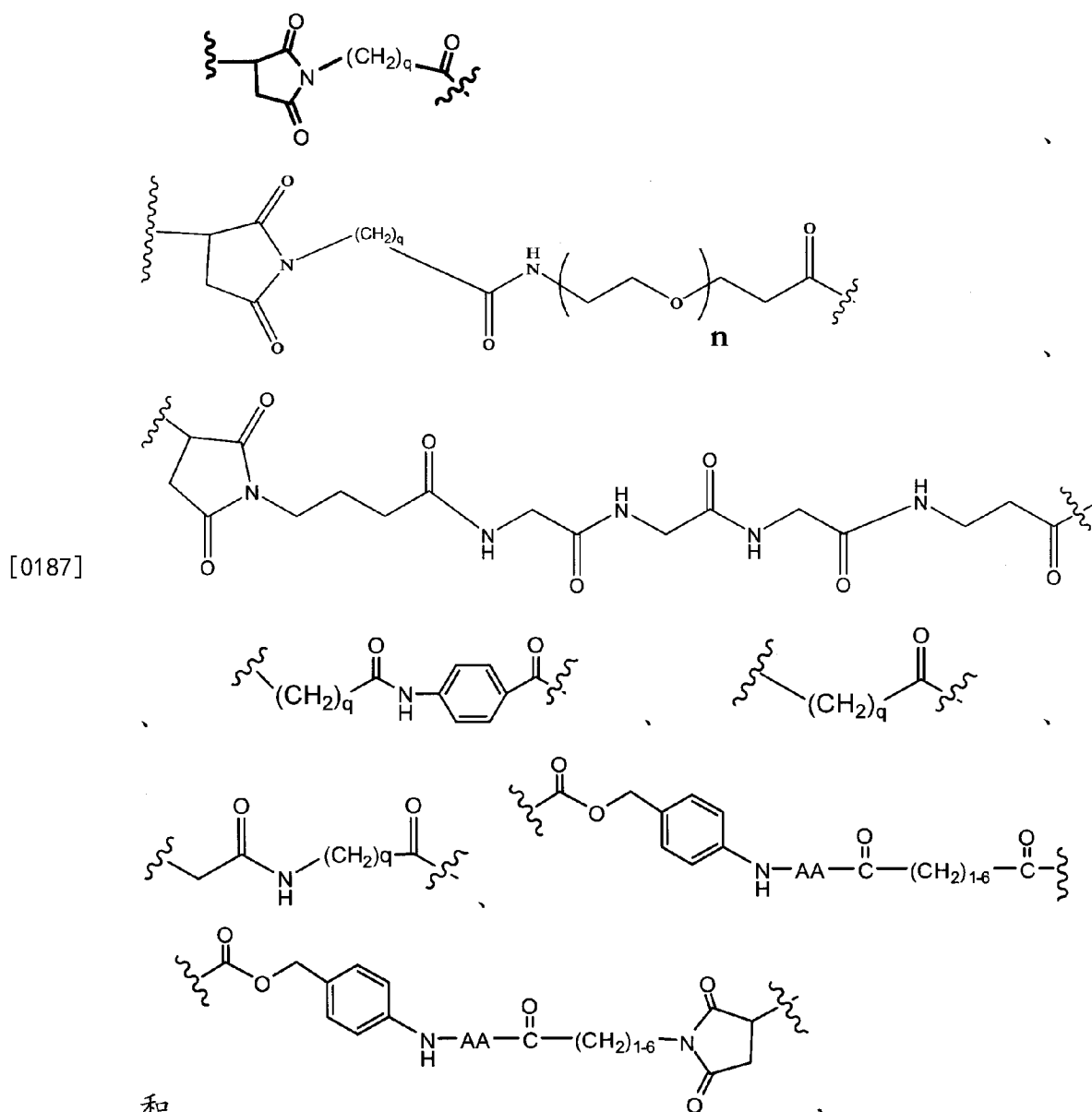
含2至8个氨基酸的肽,其中具有本文所述的连接半族Z(例如,-NH-、-C(=O)-)的氨基酸侧链中的一个共价连接到细胞结合剂。

[0183] 在第二十五备选(25)实施方案中,备选实施方案24中的AA选自由以下组成的组: Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Lle-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N⁹-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:1)、β-Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:2)和Gly-Phe-Leu-Gly(SEQ ID NO:3)、Gly-Gly-Gly(SEQ ID NO:4), Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg和D-Arg-D-Arg并且其余变量如在备选实施方案1-18中所述。

[0184] 在第二十六(26)备选实施方案中,备选实施方案24-25中的AA是Gly-Gly-Gly、Val-Cit、Phe-Lys或Val-Lys并且其余变量如在备选实施方案1-18中所述。

[0185] 在第二十七(27)备选实施方案中,式V中的BFCG选自:





[0188] 其中:AA是Val-Cit、Phe-Lys或Val-Lys,q为1至5的整数;n为1至20的整数;以及M是H⁺或药学上可接受的阳离子并且其余变量如在备选实施方案1-18中所述。

[0189] 在第二十八(28)备选实施方案中,式III-V中的细胞结合剂结合选自以下的靶细胞:肿瘤细胞、病毒感染细胞、微生物感染细胞、寄生虫感染细胞、自身免疫细胞、活化细胞、髓系细胞、活化T-细胞、B细胞或黑素细胞;表达CD4、CD6、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD44、CD56、EpCAM、CanAg、CALLA、STEAP、TENB2、MUC16、IRTA1、IRTA2、IRTA3、IRTA4、IRTA5、c-MET、5T4或Her-2抗原的细胞;Her-3抗原或表达胰岛素生长因子受体、表皮生长因子受体和叶酸受体的细胞并且其余变量如在备选实施方案1-27中所述。

[0190] 在第二十九(29)备选实施方案中,式III-V的细胞结合剂是抗体、单链抗体、特异性结合靶细胞的抗体片段、单克隆抗体、单链单克隆抗体、或特异性结合靶细胞的单克隆抗体片段、嵌合抗体、特异性结合靶细胞的嵌合抗体片段、结构域抗体、特异性结合靶细胞的结构域抗体片段、双链抗体、纳米抗体、前抗体(probody)、达尔潘(Darpin)、淋巴因子、激素、维生素、生长因子、集落刺激因子、或营养素转运分子并且其余变量如在备选实施方案

1-27中所述。

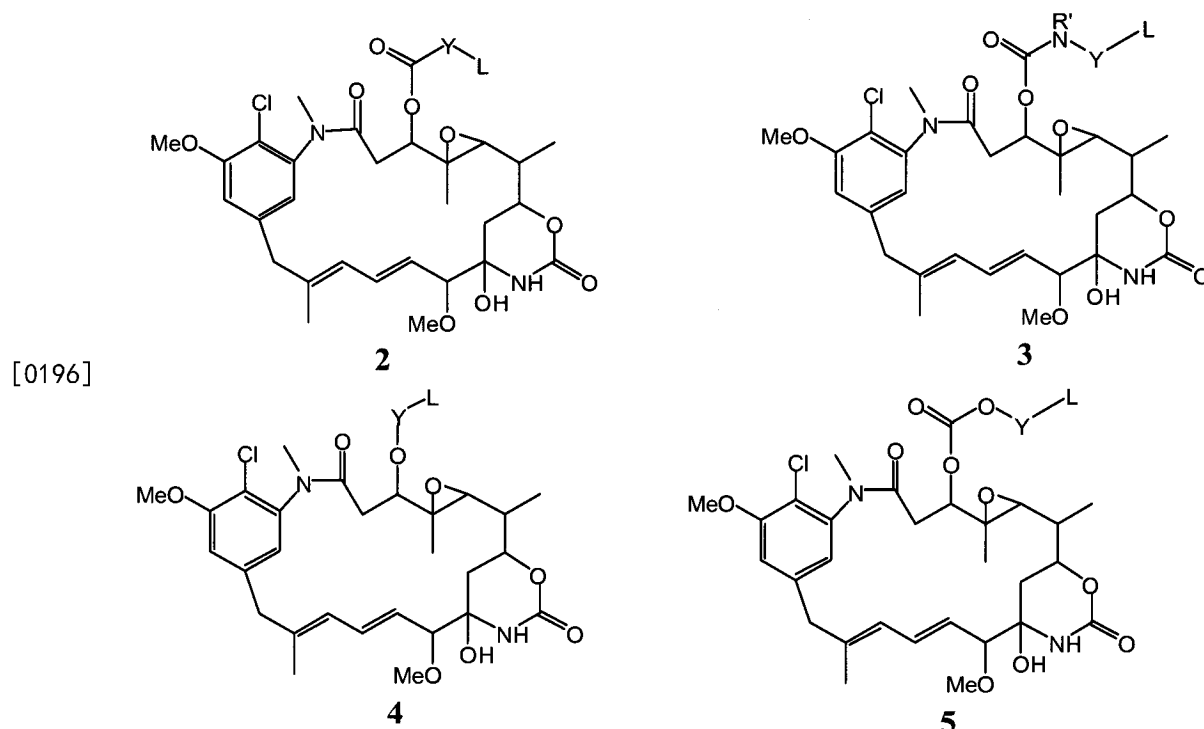
[0191] I在第三十(30)备选实施方案中,备选实施方案29中的抗体是表面重塑的抗体、表面重塑的单链抗体、或表面重塑的抗体片段并且其余变量如在备选实施方案1-27中所述。

[0192] 在第三十一(31)备选实施方案中,备选实施方案29中的抗体是单克隆抗体、单链单克隆抗体、或其单克隆抗体片段并且其余变量如在备选实施方案1-27中所述。

[0193] 在第三十二(32)备选实施方案中,备选实施方案29中的抗体是人源化抗体、人源化单链抗体、或人源化抗体片段并且其余变量如在备选实施方案1-27中所述。

[0194] 在第三十三(33)备选实施方案中,式I-V的细胞结合剂偶联物及示例性实施方案1-32与药学上可接受的载体一起被配制成药物组合物。

[0195] 在第三十四(34)备选实施方案中,化合物式VI-IX由结构式2-5 表示:



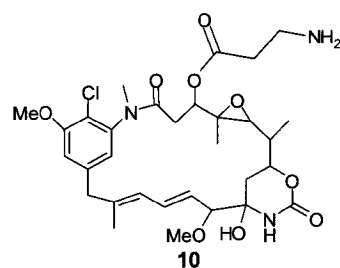
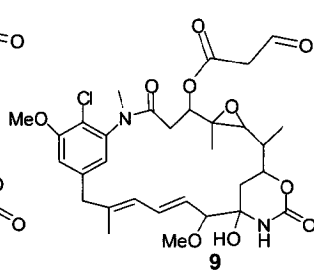
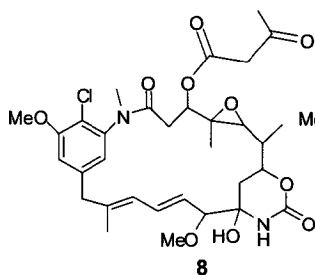
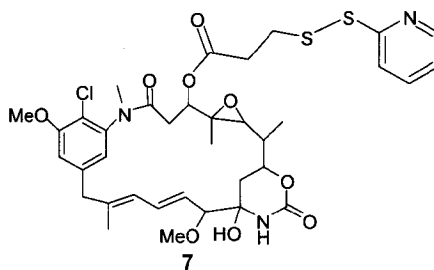
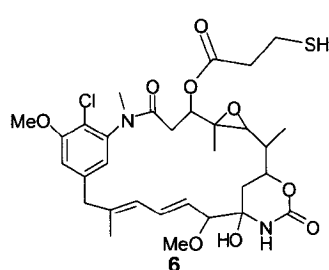
[0197] 其中, R' 选自H、被取代或未被取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基以及被取代或未被取代的芳基; Y 是选自被取代或未被取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂环基团的任选基团, 每一个携带任选的聚乙二醇单元 $(OCH_2CH_2)_n$, 其中 n 为1至200的整数, 以及肽; L 是经由二硫键、硫醚键、肽键、酰胺键、酯键或脲键形成与细胞结合剂的连接的官能团, 或安丝菌素衍生物的药学上可接受的盐或溶剂化物, 并且其余变量如在备选实施方案1-15中所定义。

[0198] 在第三十五(35)备选实施方案中, 式VIII-IX和备选实施方案34中的 L 由选自以下的结构式表示: 顺丁烯二酰亚胺、卤代乙酰氨基、 $-SH$ 、 $-SSR^d$ 、 $-CH_2SH$ 、 $-CH(Me)SH$ 、 $-C(Me)_2SH$ 、 $-NHR^f$ 、 $-CH_2NHR^f$ 、 $-NR^fNH_2$ 、 $-COOH$ 和 $-COE$, 其中 COE 表示活性酯, R^d 是任选被取代的苯基或任选被取代的吡啶基以及 R^f 是H或烷基并且其余变量如备选实施方案1-15中所定义。

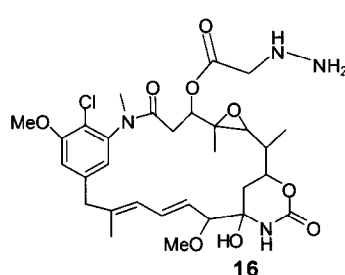
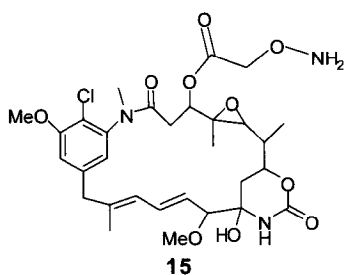
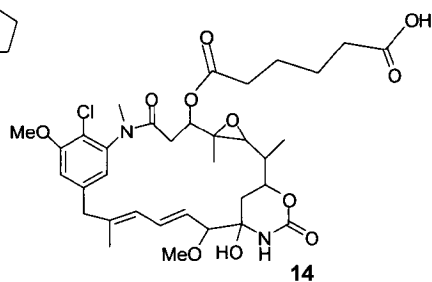
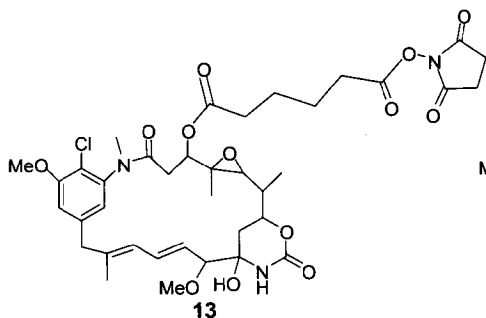
[0199] 在第三十六(36)备选实施方案中, 备选实施方案35中的由 $-COE$ 表示的活性酯选自N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、硝基苯基(例如, 2-硝基苯基或4-硝基苯基)酯、二硝基苯基(例如, 2,4-二硝基苯基)酯、磺基-四氟苯基(例如, 4-磺基-2,3,5,6-四

氟苯基)酯、和五氟苯基酯、和 R^d 选自苯基、硝基苯基(例如,2-硝基苯基或4-硝基苯基)、二硝基苯基(例如,2-硝基苯基或4-硝基苯基)、羧基硝基苯基(例如,3-羧基-4-硝基苯基)、吡啶基或硝基吡啶基(例如,4-硝基吡啶基)并且其余变量如在备选实施方案1-15中所定义。

[0200] 在第三十七(37)备选实施方案中,式VI-IX化合物和示例性实施方案34-36由化合物6至26或其药学上可接受的盐或溶剂化物中的任一种表示:



[0201]



17

[illegible]

19

20

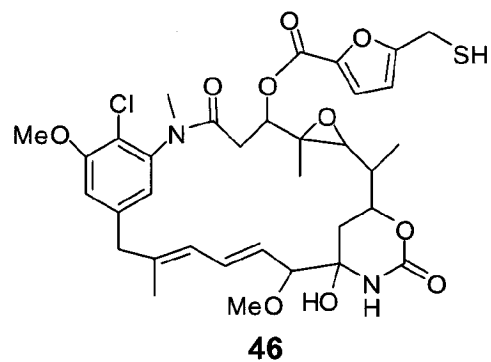
21

22

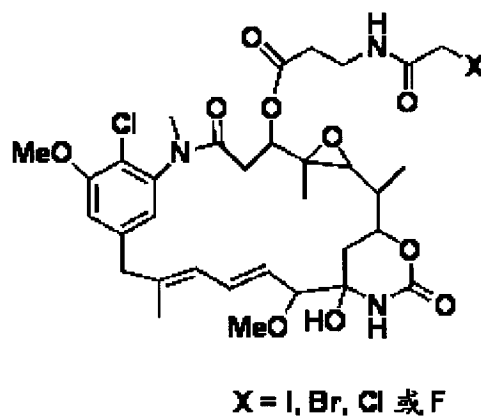
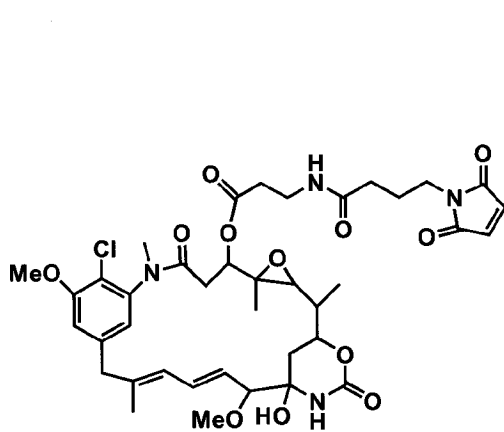
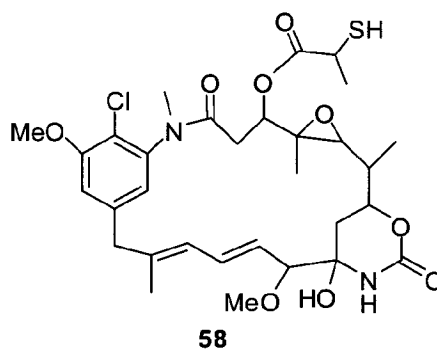
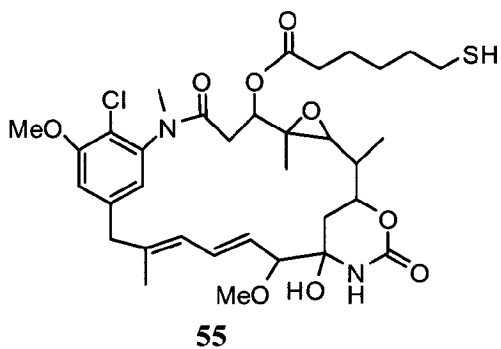
Chemical structure of compound 23, a macrocyclic peptide derivative. The structure shows a 14-membered ring with an amide bond, a methyl ester, a hydroxyl group, and a side chain containing a thiol group. The side chain also includes a piperazine ring and a thiol group.

24

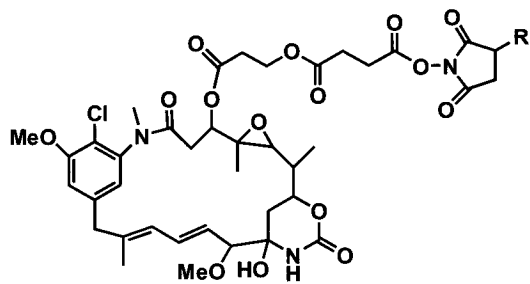
25



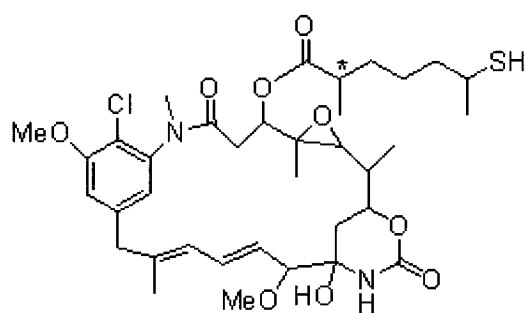
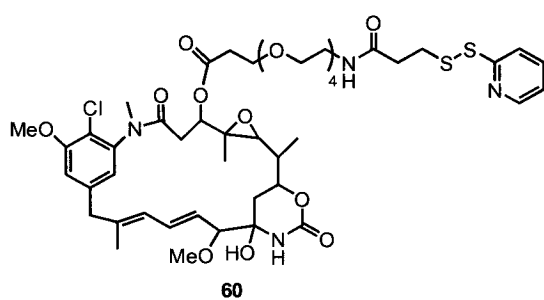
[0203]



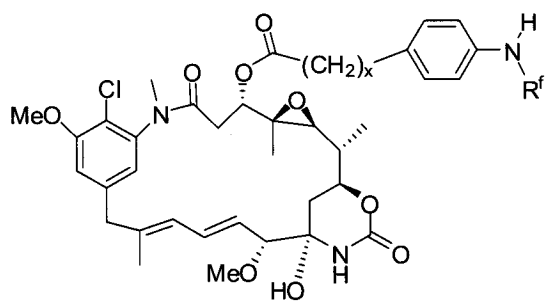
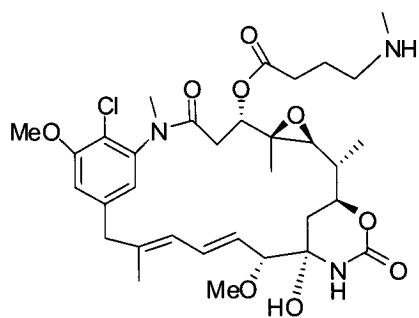
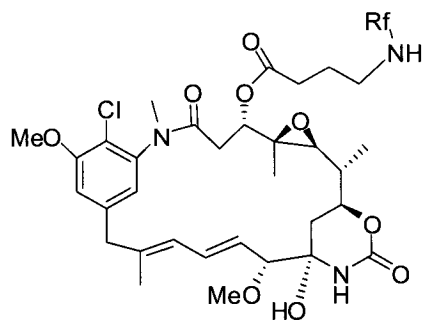
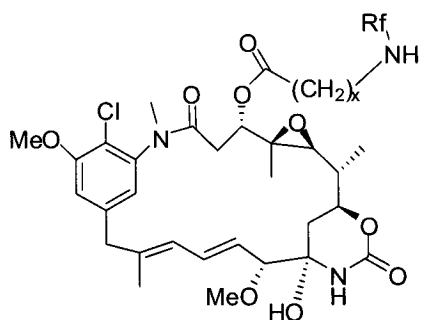
[0204]

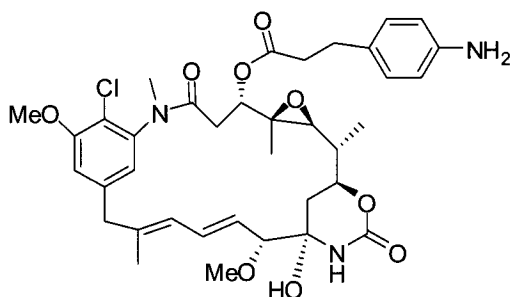


$R = H, SO_3H, SO_3Na$

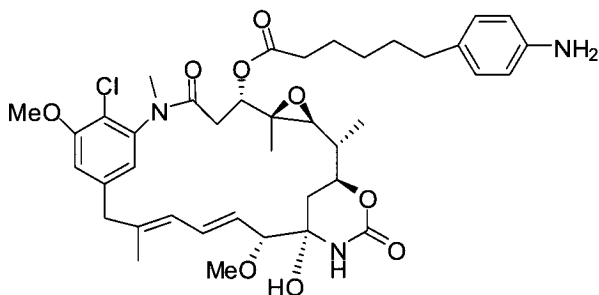


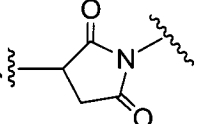
65a, 65b
*可分离的外消旋体





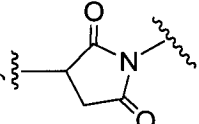
[0205]

[0206] 其中x是1至6的整数;以及R^f是H或烷基。[0207] 在八十五(38)备选实施方案中,式XII中的BFCG'包含连接到M'的连接基团M'',其中M''独立地选自由以下组成的组:-C(=O)-、-C(=O)-NR^e-、-C(=O)-O-、-O-C(=O)-、-C

(=NH)-、-C(=NH)-NR^e-、-S-、-NR^e-、-NH-NR^e-、 -C(=NR^e)-、=NNR^e-、-CH₂-

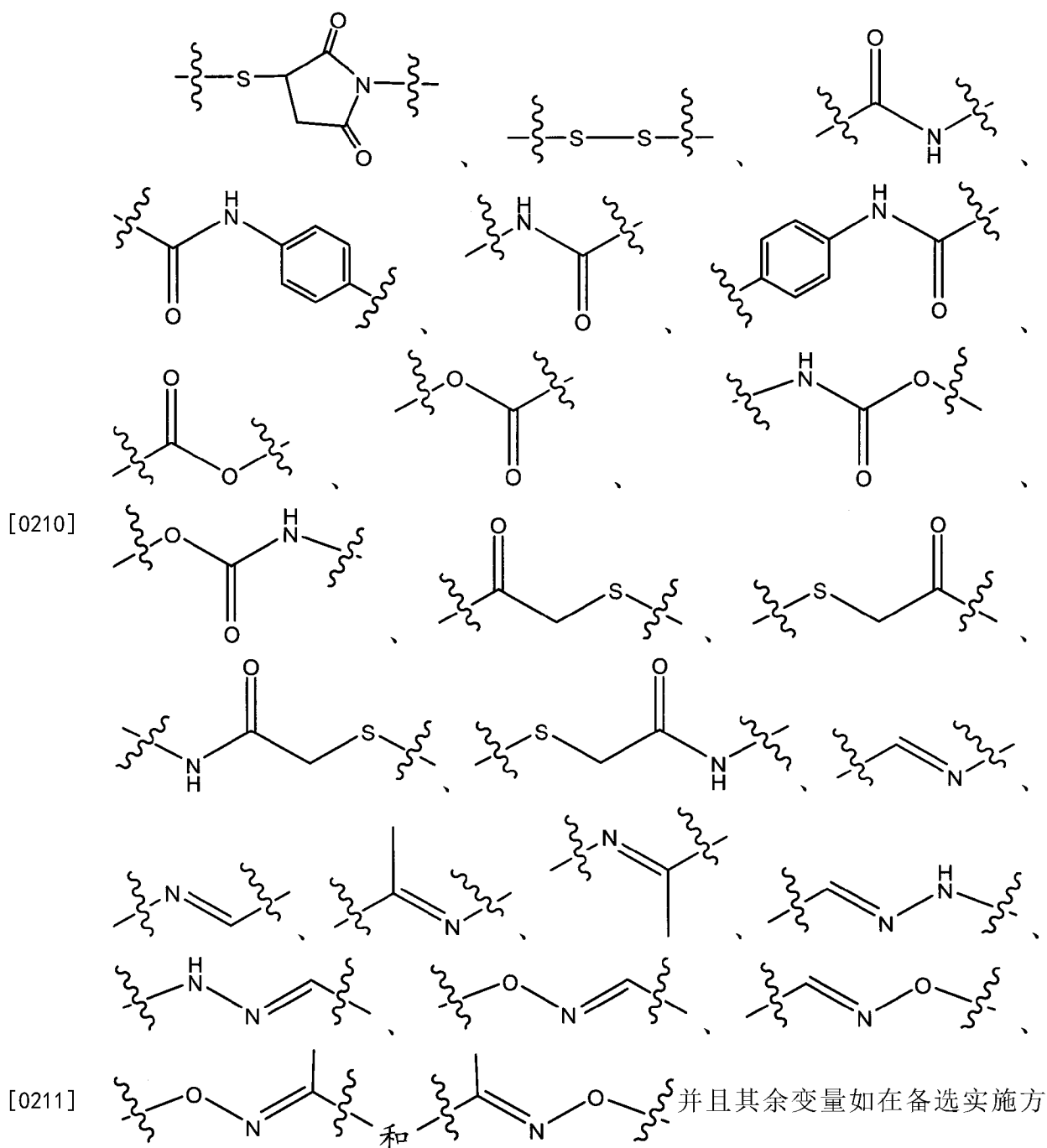
C(=O)-和-CH₂-C(=O)-NR^e-,其中R^e是H、烷基、烯基或炔基并且其余变量如在备选实施方案1-15中所定义。

[0208] 在第三十九(39)备选实施方案中,备选实施方案38中的M''选自由以下组成的组:-

C(=O)-、 -S-、-CH₂-C(=O)-、-CH₂-C(=O)-NH-和-O-C(=O)-并且其余变量

如在备选实施方案1-15中所定义。

[0209] 在第四十(40)备选实施方案中,备选实施方案38中的M'-M''由选自如下的结构式表示:



案1-15中所定义。

[0212] 在第四十一(41)备选实施方案中,式XII中的BFCG'由式(IIIC)表示:

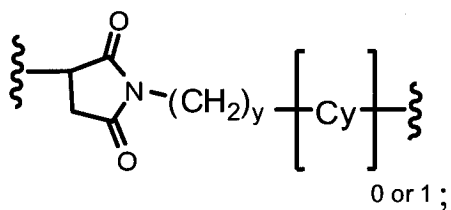
[0213] $-M''-(CR^3R^4)_y-[Cy]_{0或1}-$

[0214] (IIIC);

[0215] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中M³是  每个R³和R⁴独立地是 ;

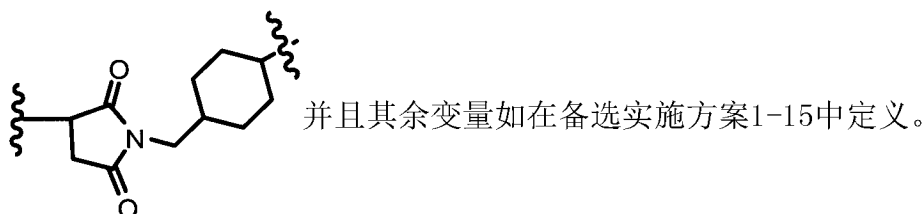
氢、甲基或 $\text{-SO}_3\text{M}^+$, 其中 M^+ 是 H^+ 或药理学上可接受的阳离子; Cy是任选地被一个至四个选自以下的基团取代的环烷基或苯基: 烷基、烷氧基、卤代、卤代烷基、烷氧基卤代烷基、腈和硝基; 以及 y 为0或1至10的整数并且其余变量如在备选实施方案1-15中所定义。

[0216] 在第四十二(42)备选实施方案中,式XII和备选实施方案38-41中的BFCG'是



义。

[0217] 在第四十三(43)备选实施方案中,式XIII和备选实施方案38-42中的BFCG'是



[0218] 在第四十四(44)备选实施方案中,式XII中的-BFCG'-由式(IVC)表示:

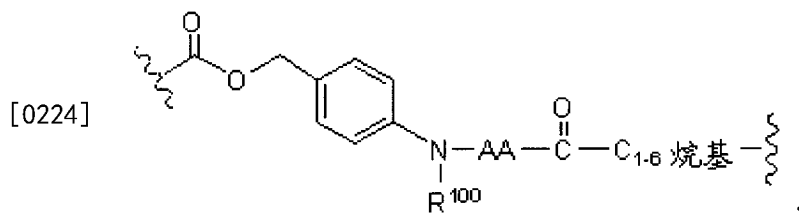
[0219] $-S''-(CR^3R^4)_y$

[0220] (IVC);

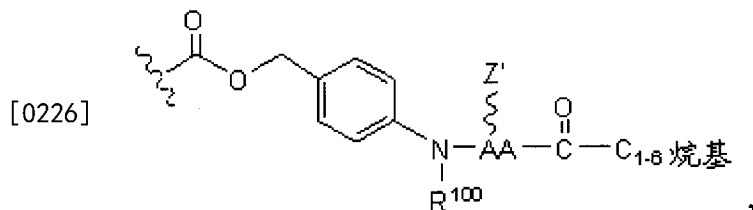
[0221] 其中:每个 R^3 和 R^4 独立地是氢、甲基或 $-SO_3^-M^+$,其中: M^+ 是 H^+ 或药学上可接受的阳离子, y' 为1至10的整数并且其余变量如在备选实施方案1-15中所定义。

[0222] 在第四十五(45)备选实施方案中,式XII中的BFCG'包含自降解性半族并且其余变量如在备选实施方案1-15中所定义。

[0223] 在第四十六(46)备选实施方案中,式XII中的BFCG'由下式表示:



[0225] 其中AA是氨基酸或包含2至8个氨基酸的肽, R^{100} 是H或烷基,并且其余变量如在备选实施方案1-15中所定义。可选地,式XII中的BFCG'-Z'由下式表示:



[0227] 其中AA是氨基酸或包含2至8个氨基酸的肽,其中具有上文所述的连接基团Z'(例如、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 或 $-COE$)的氨基酸侧链中的一个可共价连接到细胞结合剂并且 R^{100} 是H或烷基。在另一备选实施方案中,式V中的BFCG'是 $-AA-(C=O)_{0-1}-C_{0-6}$ 烷基-,其中AA是氨基酸或

包含2至8个氨基酸的肽;或式V中的BFCG'-Z'是 $\begin{matrix} Z' \\ | \\ -AA-C(=O)-C_{1-6} \text{烷基} \end{matrix}$ 其中AA是氨基酸或

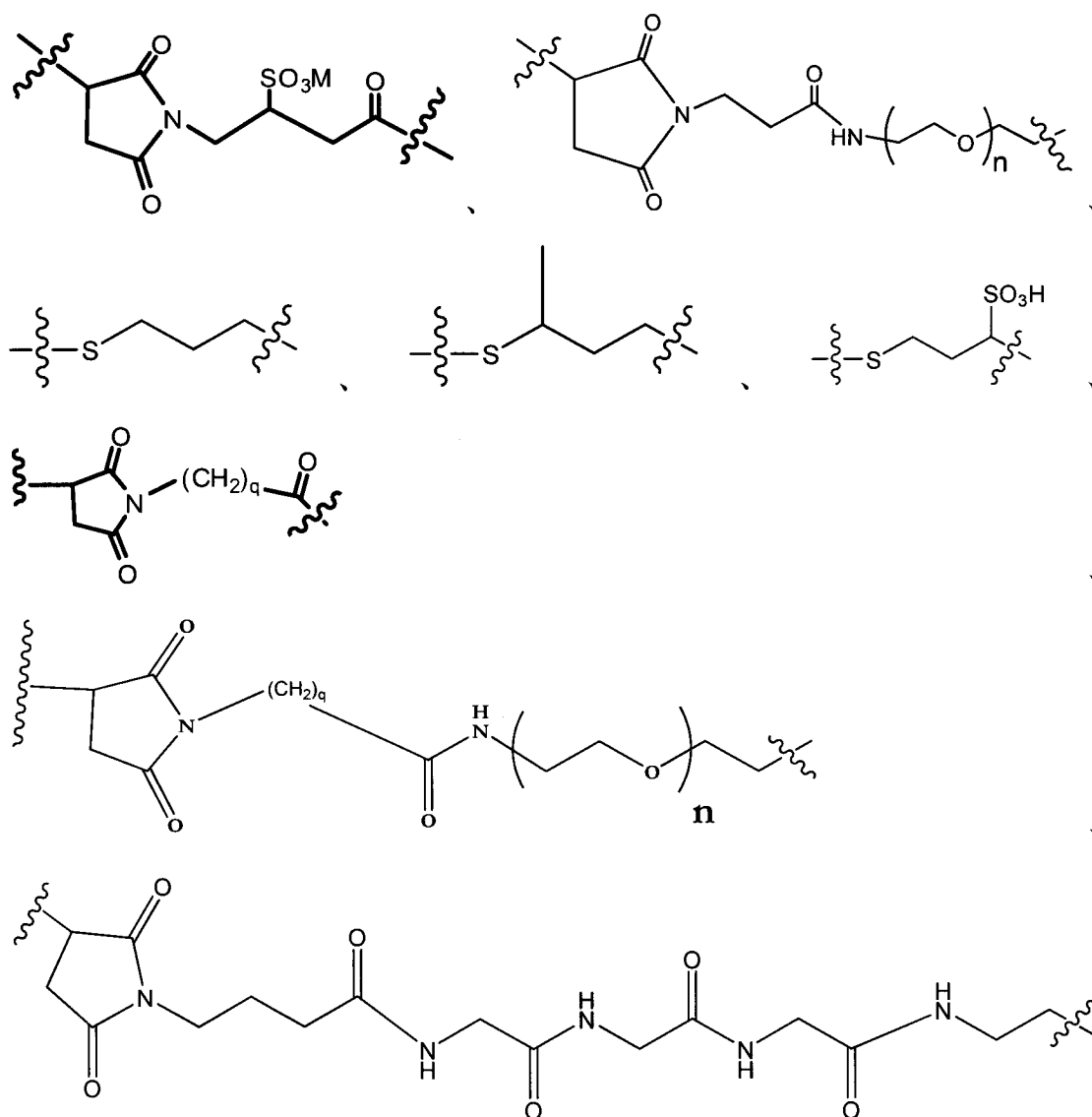
包含2至8个氨基酸的肽,其中具有上文所述的连接基团Z'(例如、 $-NH_2$ 或 $-COE$)的氨基酸侧链中的一个可共价连接到细胞结合剂。

[0228] 在第四十七(47)备选实施方案中,备选实施方案46中的AA选自由以下组成的组: Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Lle-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N⁹-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:1)、β-Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:2)和Gly-Phe-Leu-Gly(SEQ ID NO:3)、Gly-Gly-Gly(SEQ ID NO:4)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg和D-Arg-D-Arg并且其余变量如在备选实施方案1-15中所定义。

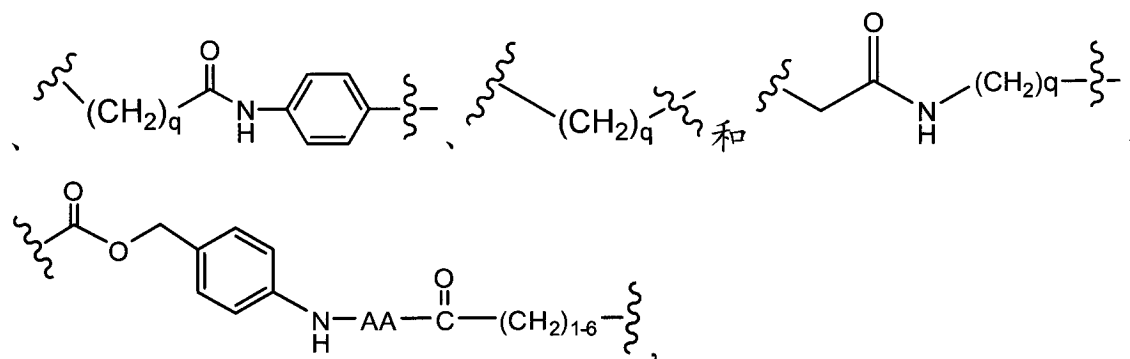
[0229] 在第四十八(48)备选实施方案中,备选实施方案46-47中的AA是Gly-Gly-Gly、Val-Cit、Phe-Lys或Val-Lys并且其余变量如在备选实施方案1-15中所定义。

[0230] 在第四十九(49)备选实施方案中,式XII中的BFCG'选自:

[0231]



[0232]



[0233] 其中:AA是Val-Cit、Phe-Lys或Val-Lys,q为1至5的整数;n为1至20的整数;以及M是H⁺或药理学上可接受的阳离子并且其余变量如在备选实施方案1-15中所定义。

[0234] 在第五十(50)备选实施方案中,式XII中的Z'选自由以下组成的组:顺丁烯二酰亚胺、卤代乙酰氨基、-SH、-SSR^d、-CH₂SH、-CH(Me)SH、-C(Me)₂SH、-NHR^c、-CH₂NHR^c、-NR^cNH₂、-COOH和-COE,其中COE表示活性酯,R^d是任选被取代的苯基或任选被取代的吡啶基以及R^f是H或烷基,并且其余变量如在备选实施方案1-49中所定义。

[0235] 在第五十一(51)备选实施方案中,备选实施方案50中的COE选自N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、硝基苯基(例如,2-硝基苯基或4-硝基苯基)酯、二硝基苯基(例如,2,4-二硝基苯基)酯、磺基-四氟苯基(例如,4-磺基-2,3,5,6-四氟苯基)酯、和五氟苯基酯、和R^d选自苯基、硝基苯基(例如,2-硝基苯基或4-硝基苯基)、二硝基苯基(例如,2-硝基苯基或4-硝基苯基)、羧基硝基苯基(例如,3-羧基-4-硝基苯基)、吡啶基或硝基吡啶基(例如,4-硝基吡啶基)并且其余变量如在备选实施方案1-49中所定义。

[0236] 在第五十二(52)备选实施方案中,向所述哺乳动物相继或连续施用第十三实施方案的化疗剂。

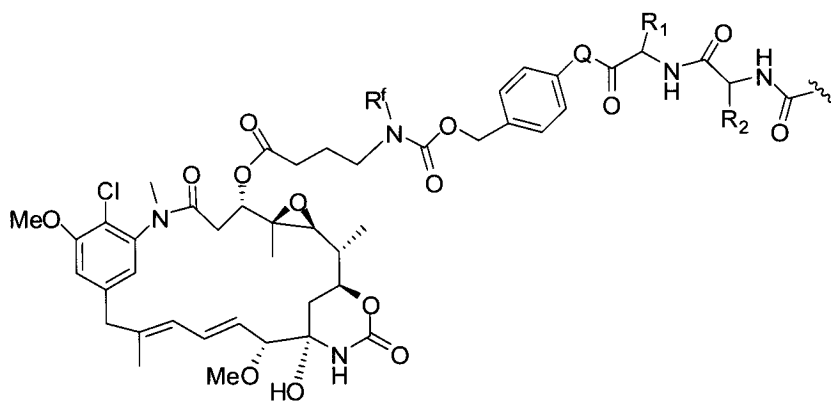
[0237] 在第五十三(53)备选实施方案中,第十三实施方案和备选实施方案52的方法是用于治疗选自以下的病状:癌症、类风湿性关节炎、多发性硬化、移植物抗宿主病(GVHD)、移植排斥、狼疮、肌炎、感染和免疫缺陷。

[0238] 在第五十四(54)备选实施方案中,第十三实施方案和备选实施方案52的方法是用于治疗癌症。

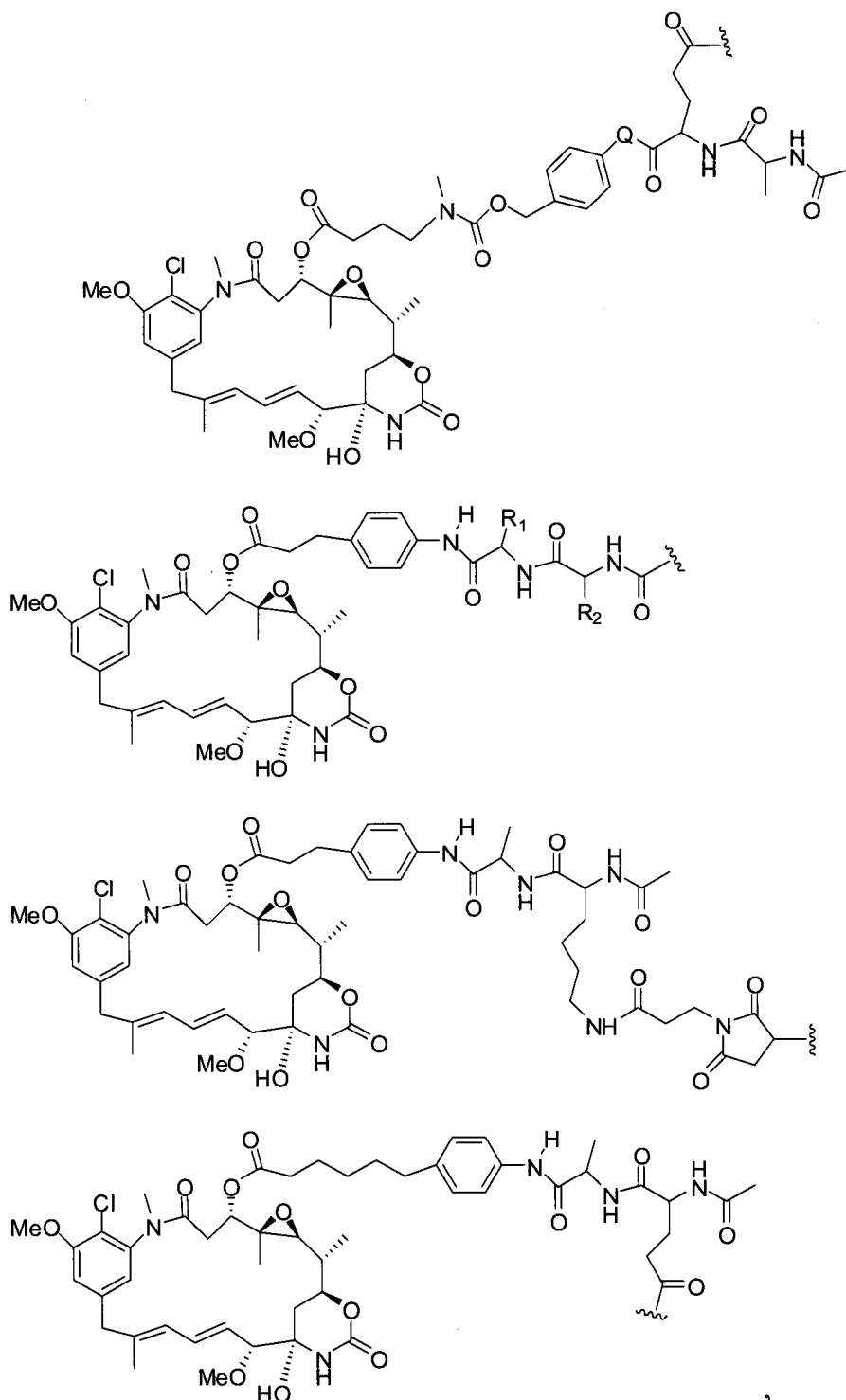
[0239] 在第五十五(55)备选实施方案中,第十三实施方案和备选实施方案52与54的方法是治疗癌症的方法,其中所述癌症选自乳腺癌、结肠癌、脑癌、前列腺癌、肾癌、胰腺癌、卵巢癌、头颈癌、黑色素瘤、结直肠癌、胃癌、鳞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、睾丸癌、Merkel细胞癌、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤以及淋巴器官癌。

[0240] 在另一个实施方案中,式V中的MayO-A-Y-M'-BFCG由下式表示:

[0241]



[0242]



[0243] 其中R^f是H或烷基；Q是-O-或-NR¹⁰⁰；R¹⁰⁰是H或烷基；以及R₁和R₂各自独立地是氨基酸侧链。

[0244] 如本文所用的，“双官能交联剂”是指具有两个活性基团的试剂；所述活性基团中的一个能够与细胞结合剂反应，而另一个活性基团能够与细胞毒性剂反应以连接细胞结合剂与细胞毒性剂（例如，式(VI)-(IX)的化合物），由此形成偶联物。

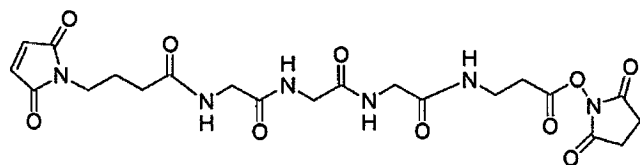
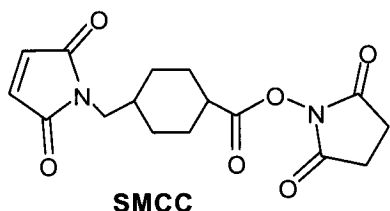
[0245] 任何适合的双官能交联剂可结合本发明使用，只要该连接子试剂分别提供细胞毒性剂和细胞结合剂的治疗性例如细胞毒性以及靶向特性的保留，而无异常毒性。优选地，连接子分子通过化学键（如上所述）联结细胞毒性剂与细胞结合剂，以使细胞毒性剂与细胞结

合剂彼此化学偶联(例如,共价键合)。可用于制备本发明的药物-连接子化合物的双官能交联剂还包括描述于Thermo Scientific Pierce Crosslinking Technical Handbook(其全部教导通过引用并入本文)中的那些。

[0246] 在一个实施方案中,双官能交联剂包含不可切割的连接子。不可切割的连接子是能够以稳定且共价的方式连接细胞毒性剂(例如,式(VI)-(IX)的化合物)与细胞结合剂的任何化学半族。因此,在细胞毒性剂或细胞结合剂保持活性的条件下,不可切割的连接子实质上可抵抗酸诱导的切割、光诱导的切割、肽酶诱导的切割、脂酶诱导的切割和二硫键切割。

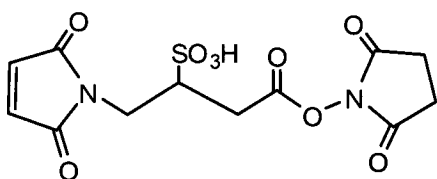
[0247] 在细胞毒性剂与细胞结合剂之间形成不可切割的连接子的适合的交联剂在本领域中是众所周知的。在一个实施方案中,细胞毒性剂通过硫醚键连接到细胞结合剂。不可切割的连接子的实例包括具有与细胞毒性剂反应的基于顺丁烯酰二亚胺基的半族的或基于卤代乙酰基的半族的连接子。此类双官能交联剂在本领域中是众所周知的(参见美国专利申请公布No.2010/0129314、2009/0274713、2008/0050310、20050169933、2009/0274713、2010/0129314,以及可由Pierce Biotechnology Inc.P.O.Box 117,Rockland,IL 61105,USA得到的那些)并且包括但不限于4-(顺丁烯酰二亚胺基甲基)环己烷羧酸N-琥珀酰亚胺基酯(SMCC)、为SMCC“长链”类似物的N-琥珀酰亚胺基-4-(N-顺丁烯酰二亚胺基甲基)-环己烷-1-羧基-(6-酰胺基己酸酯)(LC-SMCC)、 κ -顺丁烯酰二亚胺基十一酸N-琥珀酰亚胺基酯(KMUA)、 γ -顺丁烯酰二亚胺基丁酸N-琥珀酰亚胺基酯(GMBS)、 ϵ -顺丁烯酰二亚胺基己酸N-羟基琥珀酰亚胺(EMCS)、间顺丁烯酰二亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺(MBS)、N-(α -顺丁烯酰二亚胺基乙酰氧基)-琥珀酰亚胺(AMAS)、琥珀酰亚胺基-6-(β -顺丁烯酰二亚胺基丙酰胺基)己酸酯(SMPH)、4-(对顺丁烯酰二亚胺基苯基)-丁酸N-琥珀酰亚胺基酯(SMPB)和N-(对顺丁烯酰二亚胺基苯基)异氰酸酯(PMPI)。包含基于卤代乙酰基的半族的交联试剂包括N-琥珀酰亚胺基-4-(碘乙酰基)-氨基苯甲酸酯(SIAB)、N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯(SIA)、N-琥珀酰亚胺基溴乙酸酯(SBA)和3-(溴乙酰氨基)丙酸N-琥珀酰亚胺基酯(SBAP)、二-顺丁烯酰二亚胺基聚乙二醇(BMPEO)、BM(PEO)₂、BM(PEO)₃、N-(β -顺丁烯酰二亚胺基丙基氧基)琥珀酰亚胺酯(BMPS)、5-顺丁烯酰二亚胺基戊酸NHS、HBVS、4-(4-N-顺丁烯酰二亚胺基苯基)-丁酸肼·HCl(MPBH)、琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基磺基萘-1-基)苯甲酸酯(SVSB)、二硫代二-顺丁烯酰二亚胺基乙烷(DTME)、1,4-二-顺丁烯酰二亚胺基丁烷(BMB)、1,4-二-顺丁烯酰二亚胺基-2,3-二羟基丁烷(BMDB)、二-顺丁烯酰二亚胺基己烷(BMH)、二-顺丁烯酰二亚胺基乙烷(BMOE)、4-(N-顺丁烯酰二亚胺基-甲基)环己烷-1-羧酸磺基琥珀酰亚胺基酯(磺基-SMCC)、磺基琥珀酰亚胺基(4-碘代-乙酰基)氨基苯甲酸酯(磺基-SIAB)、间顺丁烯酰二亚胺基苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-MBS)、N-(γ -顺丁烯酰二亚胺基丁酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-GMBS)、N-(ϵ -顺丁烯酰二亚胺基己酰氧基)磺基琥珀酰亚胺基酯(磺基-EMCS)、N-(κ -顺丁烯酰二亚胺基十一酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-KMUS)、4-(对顺丁烯酰二亚胺基苯基)丁酸磺基琥珀酰亚胺基酯(磺基-SMPB)、CX1-1、磺基-Ma1和PEG_n-Ma1。优选地,该双官能交联剂是SMCC。

[0248]

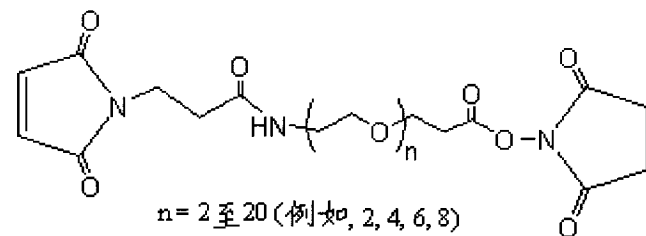


(CX1-1);

[0249]



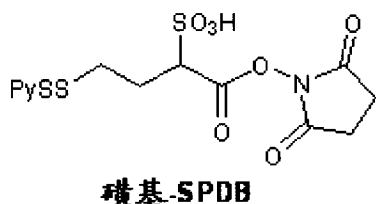
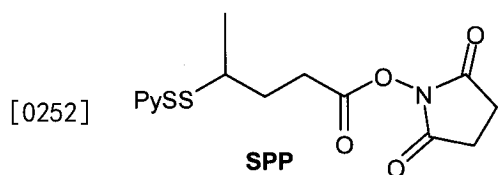
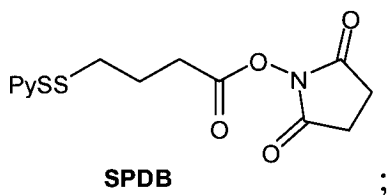
(磺基-Mal);

(PEG_n-Mal)。

[0250] 在一个实施方案中,该连接试剂是可切割的连接子。适合的可切割的连接子的实例包括二硫化物连接子、酸不稳定性连接子、光不稳定性连接子、肽酶不稳定性连接子和脂酶不稳定性连接子。含有连接子的二硫化物是通过在生理条件下可发生的二硫化物交换可切割的连接子。酸不稳定性连接子是在酸性pH下可切割的连接子。例如,某些细胞内的小室例如核内体和溶酶体具有酸性的pH(pH 4-5),并且提供了适合切割酸不稳定性连接子的条件。光不稳定性连接子在体表上和在和可接触光的很多体腔中是有用的。而且,红外线可深入组织。肽酶不稳定性连接子可用于切割在细胞内或细胞外的某些肽(参见例如,Trouet等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,79:626-629(1982),和Umemoto等人,Int.J.Cancer,43:677-684(1989))。在一个实施方案中,可切割的连接子在温和条件下,即不影响细胞毒性剂活性的细胞内的条件下是可切割的。

[0251] 在另一个实施方案中,细胞毒性剂通过二硫键连接到细胞结合剂。该连接子分子包含可与细胞结合剂反应的反应性化学基团。优选的用于与细胞结合剂反应的反应性化学基团是N-琥珀酰亚胺基酯和 N-磺基琥珀酰亚胺基酯。此外,该连接子分子包含可与细胞毒性剂反应以形成二硫键的反应性化学基团,优选二硫代吡啶基基团。经由二硫键实现细胞结合剂与细胞毒性剂的连接的双官能交联剂在本领域中是已知的并且包括例如,3-(2-吡啶基二硫代)丙酸N-琥珀酰亚胺基酯(SPDP)(参见,例如,Carlsson等人,Biochem.J.,173:723-737(1978))、4-(2-吡啶基二硫代)丁酸N-琥珀酰亚胺基酯(SPDB)(参见,例如,美国专利4,563,304)、4-(2-吡啶基二硫代)戊酸N-琥珀酰亚胺基酯(SPP)(参见例如,CAS登记号

341498-08-6)和N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)2-磺基丁酸酯(磺基-SPDB)(参见例如,美国申请公布No.2009/0274713)。可用于引入二硫化物基团的其他双官能交联剂在本领域中是众所周知的并且描述于美国专利6,913,748、6,716,821和美国专利公布2009/0274713和2010/0129314(其所有均通过引用整体并入本文)中。



[0253] 缺少硫原子的可形成不可切割的连接子的其他交联剂也可用于本发明方法中。此类连接子可衍生自基于二羧酸的半族。适合的基于二羧酸的半族包括但不限于通式(IX)的 α, ω -二羧酸。

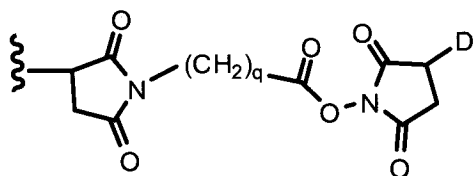
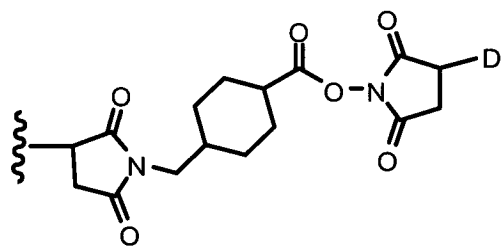
[0254] $\text{HOOC-X}_1\text{-Y}_n\text{-Z}_m\text{-COOH}$

[0255] (IX),

[0256] 其中X是具有2至20个碳原子的直链或支链烷基、烯基或炔基基团,Y是携带3至10个碳原子的环烷基或环烯基基团,Z是携带6至10个碳原子的被取代或未被取代的芳族基团、或被取代或未被取代的杂环基团,其中杂原子选自N、O或S,并且其中l、m和n各自为0或1,前提条件是l、m和n不同时为零。

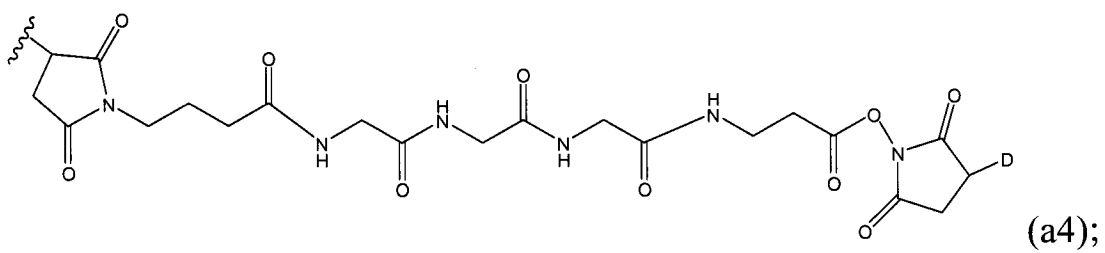
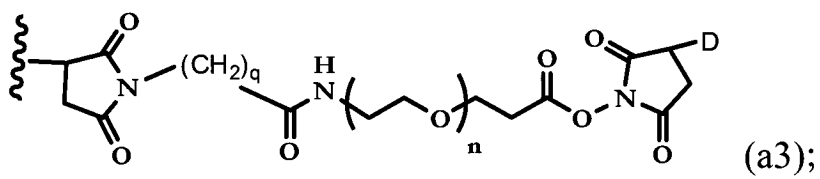
[0257] 本文公开的很多不可切割的连接子详细描述于美国专利申请公布No.2005/0169933A1中。

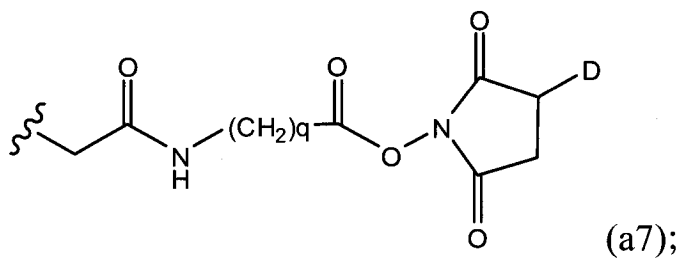
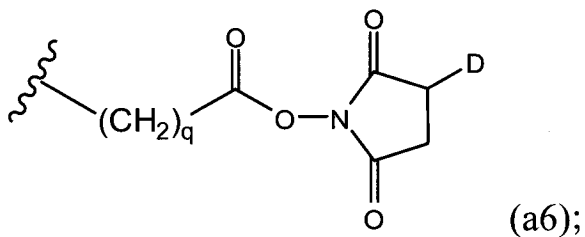
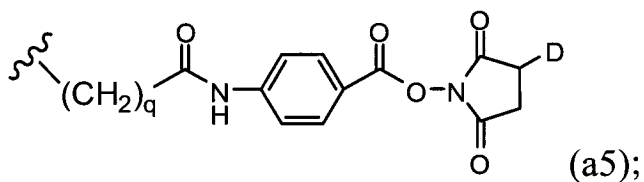
[0258] 在一个实施方案中,式VII中的BFCG'-Z'由以下结构式表示:



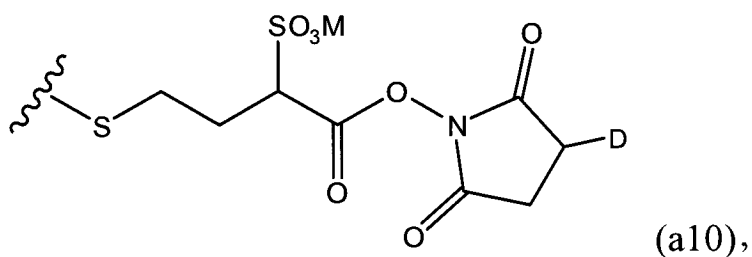
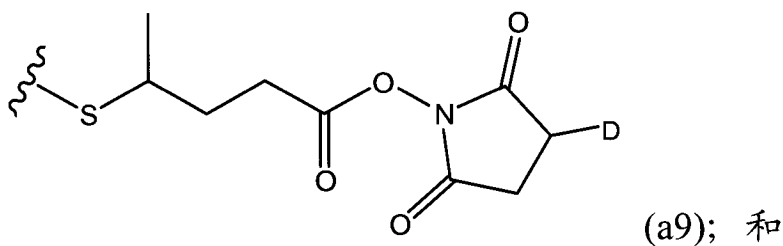
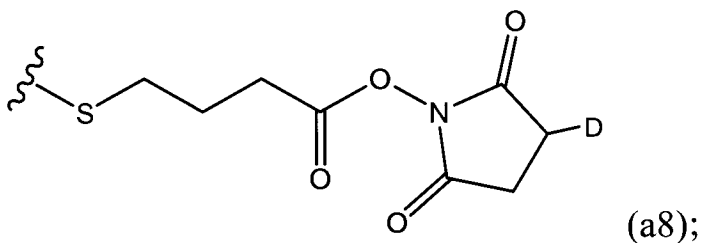
[0259]

;





[0260]



[0261] 其中:q为1至5的整数;n为2至6的整数;D是H或SO₃M; M是H或阳离子,例如Na⁺或K⁺。
更优选地,BFCG'-Z'由式(a1)、(a4)、(a8)、(a9)和(a10)表示。

[0262] “连接基团”是化合物上可与双官能交联剂——包含衍生化美登醇或美登醇类似

物的化合物(例如,式VI-IX化合物)或细胞结合剂反应以形成化学键的官能团。

[0263] 两个半族,例如生物活性半族例如细胞结合剂或包含衍生化美登醇或美登醇类似物的化合物(例如,式VI-IX化合物)、或反应性半族例如连接基团,当通过化学键或其他基团连接时被“连接”以使基本上保持生物活性和/或反应性。例如,May0-A-和细胞结合剂通过结构式(III)中的Y-M'-BFCG连接。连接两个此类半族的基团在本文被称为“连接子”,其为结构式V中的Y-M'BFCG。

[0264] “残基”是化合物中的活性官能团与第二化合物经历反应并且结合第二化合物后在该化合物中剩余的原子。类似地,在反应后剩余的第二化合物中的原子是第二化合物的残基。

[0265] 术语“自降解性半族”是指能够使两个化学半族共价连接到通常稳定的三重分子的双官能化学半族。如果与第一半族的键被切割,那么自降解性半族能够自发地与第二半族分离。自降解性半族包括但不限于描述于美国专利No.7,750,116和7,705,045以及US 2010/0062008中的那些半族。在一个实施方案中,自降解性半族是对氨基苄氧基羰基基团(PABC)。可选地,自降解性半族是对氨基-双(羟基甲基)苯乙烯(BHMS),具有结构 $p\text{-NH-Ph-CH=C(CH}_2\text{O-)}_2$,包括羰基基团,结构为 $p\text{-NH-Ph-CH=C(CH}_2\text{OCO-)}_2$ 。

[0266] 术语“间断”和“携带”在本文可互换使用。这些术语表示烷基、烯基、炔基、芳基烷基和杂环基烷基基团中的一个或多个亚甲基基团被指定的基团,例如聚乙烯单元、氮丙啶基团、环氧基团、氨基基团、酰氨基基团、酯基团、芳基基团和杂环基基团替换。

[0267] 直链或支链烷基是饱和的直链或支链单价烃自由基,优选具有1至10个碳原子。适合的直链烷基的实例包括甲基、乙基、丙基、丁基、戊基和己基。适合的支链烷基的实例包括异丙基、异丁基、仲丁基、叔丁基、异戊基和1-乙基-丙基。直链和支链烷基基团可被一个或多个如上所述的取代基取代。

[0268] 直链或支链烯基是直链或支链单价烃自由基,优选具有2至10个碳原子并且具有至少一个不饱和位点,即碳-碳双键,其中所述烯基自由基包括具有“顺式”和“反式”取向、或可选地,“E”和“Z”取向的自由基。适合的直链烯基的实例包括乙烯基或乙炔基($-\text{CH}=\text{CH}_2$)、烯丙基($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$)、丙烯基、丁烯基、戊烯基、己烯基、戊二烯基和己二烯基。适合的支链烯基的实例包括异丁烯基、异戊烯基和异己烯基。优选的烯基基团为乙烯基、烯丙基和异丁烯基基团。直链和支链烯基基团可被一个或多个如上所述的取代基取代。

[0269] 直链或支链炔基是直链或支链单价烃自由基,优选具有2至10个碳原子并且具有至少一个不饱和位点,即碳-碳三键。适合的炔基的实例包括乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-戊炔基、己炔基等。直链和支链炔基基团可被一个或多个如上所述的取代基取代。

[0270] 环状烷基、环状烯基和环状炔基是单价非-芳族、饱和或部分不饱和环,优选具有3至12个碳原子(作为单环)或7至12个碳原子(作为双环)。环状烷基、烯基和炔基的实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环丁烯基、环戊烯基、环己烯基、环己二烯基、环丁炔基、环戊炔基和环己炔基。优选的环状烷基、烯基和炔基基团包括环丙基、环戊基、环己基、环戊烯基、环己烯基、环己二烯基和环己炔基以及环辛炔基。环状烷基、烯基和炔基基团可被一个或多个如上所述的取代基取代。

[0271] 由R和R'表示的烷基、烯基和炔基的优选取代基包括一个或多个选自磺酸基团、

磷酸、羧基基团、羧基酯例如甲基或乙基酯、以及伯胺、仲胺、叔胺或季胺。优选为甲基、乙基、丙基和异丙基基团。由Y和Y'表示的烷基、烯基和炔基的优选取代基包括一个或多个选自卤素、烷氧基或芳基氧基基团(例如甲氧基、乙氧基或苯氧基)、硫化物(例如S-甲基、S-乙基和S-苯基)、硫酯(例如S-乙酰基)、亚砷例如(甲基或苯基亚砷)、砷(例如甲基或苯基砷)、磺酰胺、醛、酮、(例如乙酰基或苯甲酰基)、环氧化物(例如环氧乙烷)、环硫化物、酰胺半族(例如乙酰氨基或苯甲酰氨基)、伯、仲、叔或季氨基或烷基氨基或芳基氨基基团(例如甲基氨基、二甲基氨基、二乙基氨基或三乙基氨基)、胍基、磺酸、羧基基团、羧基酯例如甲基或乙基酯、羧酰胺、脒基、磷酸基、硝基基团、叠氮基、氰基基团和氰酸酯。

[0272] 芳基或芳族基团是单价芳族烃自由基,优选具有6-18个碳原子。芳基或芳族基团包括包含与饱和、部分不饱和环稠合的芳族环、或芳族碳环或杂环的二环自由基。未取代芳基的实例包括苯基、萘基和蒽基。

[0273] 芳基或芳族基团可被取代。由R和R'表示的芳基或芳族基团优选被至少一个含有1至4个碳原子的烷基或烯基基团、烷氧基基团例如甲氧基或乙氧基、卤素、硝基基团、磺酸基团、磷酸、羧基、羧基酯例如甲基或乙基酯、伯胺、仲胺、叔胺或季胺或烷氧基例如甲氧基或乙氧基取代。由Y和Y'表示的芳基或芳族基团优选被以下取代:至少一个卤素、烷氧基或芳基氧基基团(例如甲氧基、乙氧基或苯氧基基团)、硫化物(例如S-甲基、S-乙基和S-苯基)、硫酯(例如S-乙酰基)、亚砷(例如甲基或苯基亚砷)、砷(例如甲基或苯基砷)、磺酰胺、醛和酮(例如乙酰基或苯甲酰基)、环氧化物(例如环氧乙烷)、环硫化物、酰胺半族(例如乙酰氨基或苯甲酰氨基)、伯、仲、叔或季氨基或烷基氨基或芳基氨基基团(例如甲基氨基、二甲基氨基、二乙基氨基或三乙基氨基)、胍基、磺酸、羧基基团、羧基酯例如甲基或乙基酯、羧酰胺、脒基、磷酸基、硝基基团、叠氮基、氰基基团和氰酸酯。取代的芳基或芳族基团的优选实例包括硝基苯基、二硝基苯基、氯苯基 和甲氧基苯基、甲苯酰基和苯胺。

[0274] 杂环基团或杂环基是指饱和、部分不饱和或芳族碳环自由基,优选具有3至18个环原子,其中至少一个环原子是选自氮、氧、磷和硫的杂原子,其中一个或多个环原子任选地被一个或多个如上所述的取代基取代。杂环基团可以是单环基团,优选具有3至7个环成员(2至6个碳原子和1至4个选自N、O、P和S的杂原子)或二环基团,优选具有7至10个环成员(4至9个碳原子和1至6个选自N、O、P和S的杂原子)。杂环基团描述于Paquette,Leo A.;"Principles of Modern Heterocyclic Chemistry"(W.A.Benjamin,New York,1968),特别是第1、3、4、6、7和9章;"The Chemistry of Heterocyclic Compounds,A series of Monographs"(John Wiley&Sons,New York,1950至今),特别是第13、14、16、19和28卷;以及J.Am.Chem.Soc.(1960)82:5566。杂环基团最优选为具有含有一个或两个选自N、O或S的杂原子的3元至10元环系统的环状化合物。杂环基团的实例包括吡咯烷基、四氢呋喃基、二氢呋喃基、四氢噻吩基、四氢吡喃基、二氢吡喃基、哌啶子基、吗啉代、哌嗪基、环氧丙烷基(oxetanyl)、硫杂环丁烷基、吡咯啉基、吲哚基、2H-吡喃基、4H-吡喃基、二噁烷基、吡唑啉基、二噻烷基、哌啶子基哌啶基、杂环芳族基团例如吡啶基、咪唑基、噻啶基、吡唑基、三唑基、吡嗪基、四唑基、呋喃基、噻吩基、异噻唑基、噻唑基、噻唑基、异噻唑基、吡咯基、喹啉基、异喹啉基、吲哚基、苯并咪唑基和苯并呋喃基。在一个实施方案中,杂环基基团是任选被取代的哌嗪基基团或任选被取代的哌啶子基哌啶基(例如,4-哌啶子基哌啶基)基团。

[0275] 杂环基团可任选地被一个或多个选自以下的取代基取代:含有1至4个碳原子的烷

基或烯基、或烷氧基(例如甲氧基或乙氧基)、或卤素、硫化物(例如S-甲基、S-乙基和S-苯基)、硫酸酯(例如S-乙酰基)、亚砷(例如甲基或苯基亚砷)、砷(例如甲基或苯基砷)、磺酰胺、醛、酮(例如乙酰基或苯甲酰基)、环氧化物(例如环氧乙烷)、环硫化物、酰胺半族(例如乙酰氨基或苯甲酰氨基)、伯、仲、叔或季氨基或烷基 氨基或芳基氨基基团(例如甲基氨基、二甲基氨基、二乙基氨基或三乙基氨基)、胍基、磺酸、羧基基团、羧基酯例如甲基或乙基酯、羧酰胺、脲基、磷酸基、硝基基团、叠氮基、氰基基团和氰酸酯。

[0276] 本发明中有用的肽(短氨基酸单元、优选2至10个氨基酸单元)由天然或非天然氨基酸(包括N-烷基氨基酸、实例N-甲基氨基酸、以及还包括其L-异构体、D-异构体或外消旋氨基酸)构成。适合的肽的实例包括二肽、三肽、四肽和五肽。优选的肽包括缬氨酸-瓜氨酸、ala-phe、gly-gly-gly、ala-leu-ala-leu、ala-leu-ala-leu-β-ala。

[0277] 适合的卤素包括F、Cl、Br或I。

[0278] 药学上可接受的盐是本发明化合物的药学上可接受的有机或无机盐。示例性盐包括但不限于硫酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、顺丁烯二酸盐、龙胆酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、葡萄糖醛酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲烷磺酸盐“甲磺酸盐”、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、盐、碱金属(例如,钠和钾)盐、碱土金属(例如,镁)盐和铵盐。药学上可接受的盐可涉及包含另一分子例如乙酸根离子、琥珀酸根离子或其他抗衡离子。抗衡离子可以是稳定母体化合物上的电荷的任何有机或无机半族。而且,药学上可接受的盐可在其结构中具有多于一个的荷电原子。多个荷电原子是药学上可接受的盐的一部分的例子可具有多个抗衡离子。因此,药学上可接受的盐可具有一个或多个荷电原子和/或者一个或多个抗衡离子。

[0279] 如果本发明化合物是碱,那么所需药学上可接受的盐可通过本领域可用的任何适合方法来制备,例如用无机酸或有机酸处理游离碱,所述无机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、甲磺酸、磷酸等,所述有机酸如乙酸、顺丁烯二酸、琥珀酸、扁桃酸、富马酸、丙二酸、丙酮酸、草酸、羟乙酸、水杨酸、吡喃糖苷酸例如葡萄糖醛酸或半乳糖醛酸、α羟基酸例如柠檬酸或酒石酸、氨基酸例如门冬氨酸或谷氨酸、芳族 酸例如苯甲酸或肉桂酸、磺酸例如对甲苯磺酸或乙磺酸等。

[0280] 如果本发明化合物是酸,那么所需药学上可接受的盐可通过任何适合方法来制备,例如用无机或有机碱处理游离酸,例如胺(伯胺、仲胺或叔胺)、碱金属氢氧化物或碱土金属氢氧化物等。适合的盐的说明性实例包括但不限于源自氨基酸例如甘氨酸和精氨酸、氨、伯胺、仲胺和叔胺、以及环胺例如哌啶、吗啉和哌嗪的有机盐、以及源自钠、钙、钾、镁、锰、铁、铜、锌、铝和锂的无机盐。

[0281] 溶剂化物是进一步包括化学计量的或非化学计量的量的溶剂例如水、异丙醇、丙酮、乙醇、甲醇、己烷、庚烷、二甲基乙酰胺、乙酸乙酯、乙酸、乙醇胺、二氯甲烷、2-丙醇等的化合物,其受非共价分子间力限制。化合物的溶剂化物或水合物通过添加至少一个摩尔当量的羟基溶剂例如甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇或水添加至化合物来容易地制备。

[0282] 安丝菌素衍生物的合成

[0283] 本发明提供了生成安丝菌素衍生物的方法,其中将C3羟基、C-14羟基甲基、C-15羟基、或C-20脱甲基转化成携带能够与细胞结合剂反应以提供偶联物的官能团的酯、氨基甲酸酯、碳酸酯或醚。适合官能团是二硫化物、硫醇、醇、羧基、羧基基团、胺、胍、顺丁烯二酰亚

胺、叠氮化物、卤素、磺酸酯例如甲磺酸酯、三氟甲磺酸酯和对甲苯磺酸酯、乙烯基吡啶、乙烯砜、乙烯基磺酰胺、磺酸、磺酰氯、活性羧基酯例如N-羟基琥珀酰亚胺基、硝基或二硝基苯基、五氟苯基、磺基四氟苯基、邻苯二甲酰亚胺基。这些官能团经由二硫键、硫醚键、肽键、酰胺键、酯键或腙键形成与细胞结合剂的连接。

[0284] 安丝菌素酯衍生物通过用还携带适合于连接细胞结合剂的官能团的羧酸化合物酯化美登醇来制备。此侧链的合成示于图4中。酯化反应在催化剂例如1-羟基苯并三唑(HOBt)、4,4-二甲基氨基吡啶(DMAP)或ZnCl₂的存在下利用本领域已知的偶联剂例如二环己基碳二亚胺(DCC)或1-[(3-二甲基氨基)丙基]-3-乙基碳二亚胺(EDC)。携带不同的连接基团的安丝菌素酯的合成示于图5-13中。

[0285] 如下合成携带各种链长的酯的含硫醇的安丝菌素衍生物6(图5)、55(图13a)和58(图13b)。制备具有不同碳链长度和支化度的巯基-羧酸并且将其转化成相应的甲基二硫化物。用这些羧酸酯化美登醇在DCC/DMAP存在下顺利地进行,从而提供甲基二硫代安丝菌素。用二硫苏糖醇(DTT)还原二硫化物提供了含硫醇的安丝菌素6、55和58。

[0286] 如图11所示制备携带用于连接细胞结合剂的N-羟基琥珀酸基酯或N-羟基琥珀酰亚胺基酯的安丝菌素衍生物13a,b。用TEOC在两个羧基基团中的一个上部分保护己烷-1,6-二酸。酯化美登醇提供了携带受保护的羧基基团的安丝菌素酯衍生物。用四丁基氟化铵对TEOC基团脱保护提供了羧基安丝菌素衍生物14b。用N-羟基琥珀酰亚胺或N-羟基磺基琥珀酰亚胺缩合,提供了携带用于与细胞结合剂连接的活性酯的安丝菌素衍生物13a,b。

[0287] 安丝菌素氨基甲酸酯衍生物通过使美登醇与氯甲酸酯例如氯甲酸4-硝基苯基酯反应、然后与还携带用于与细胞结合剂反应的官能团(例如二硫化物半族)的氨基化合物反应来制备。备选方法示于图12b中。

[0288] 安丝菌素碳酸酯衍生物通过使美登醇与光气反应、然后与还携带用于与细胞结合剂反应的官能团(例如二硫化物半族)的羟基化合物反应来制备。备选方法示于图12b中。

[0289] 如图12a所示制备安丝菌素醚衍生物。美登醇用碱(对于适合的碱,参见美国专利No.7,598,375和7,301,019,通过引用明确并入本文)例如氢化钠、正丁基锂、三氟甲磺酸锌/二异丙基乙胺或六甲基二硅胺化锂处理,然后与含有卤素或磺酸酯(例如甲磺酸酯、三氟甲磺酸酯或对甲苯磺酸酯)的还携带用于与细胞结合剂反应的官能团的化合物反应。

[0290] 制备酯、氨基甲酸酯、碳酸酯和醚的额外通用方法在本领域中是已知的(参见例如March's Advanced Organic Chemistry, Jerry March & Michael B. Smith, Wiley 2007, 通过引用明确并入本文)。

[0291] 安丝菌素衍生物的体外细胞毒性

[0292] 本发明的安丝菌素衍生物的体外细胞毒性可通过先前公开的方法(美国专利7,276,497和Widdison等人, J. Med. Chem., 49:4392, 2006, 均通过引用明确并入本文)来测量。例如, 细胞系例如人乳腺癌系SK-Br-3、或人表皮样癌细胞系KB可用于评估这些新型安丝菌素衍生物的细胞毒性。将待评价的细胞暴露于化合物下达72小时并且通过已知方法在直接测定中测量细胞的存活分率。由测定结果计算IC₅₀值。

[0293] 细胞结合剂

[0294] 本发明的其安丝菌素衍生物或其偶联物作为治疗剂的有效性取决于对合适细胞结合剂的仔细选择。细胞结合剂可以是目前已知的、或是正在成为已知的任意种类, 包括肽

和非肽。通常地,这些可以是抗体(尤其是单克隆抗体)、淋巴因子、激素、生长因子、维生素、营养素转运分子(例如转铁蛋白)、或任意其他细胞结合剂或物质。

[0295] 可以使用的细胞结合剂的更具体实例包括:

[0296] 多克隆抗体;

[0297] 单克隆抗体;

[0298] 抗体片段例如Fab、Fab' 和F(ab')₂、Fv(Parham, J. Immunol. 131:2895-2902 (1983); Spring 等人 J. Immunol. 113:470-478 (1974); Nisonoff 等人 Arch. Biochem. Biophys. 89:230-244 (1960)); 微型抗体、双链抗体、三链抗体、四链抗体、纳米抗体、前抗体(probody)、结构域抗体、单抗体、微型抗体等(参见Kim等人, Mol. Cancer Ther., 7:2486-2497 (2008), Carter, Nature Revs., 6:343-357 (2006), R. Kontermann & S. Dubel, 2001 Antibody Engineering, Springer-Verlag, Heidelberg-New York;

[0299] 双特异性抗体(Morrison, SL Nature biotechnology 25(11):1233-4 (2007));

[0300] 锚蛋白重复蛋白(DARPin; Zahnd 等人, J. Biol. Chem., 281, 46, 35167-35175, (2006); Binz, H. K., Amstutz, P. & Pluckthun, A. (2005) Nature Biotechnology, 23, 1257-1268)或锚蛋白样重复蛋白或合成肽,例如描述于美国专利公布号20070238667; 美国专利 No. 7,101,675; 以及WO/2007/147213; WO/2007/062466中)

[0301] 干扰素(例如.α...β...γ.);

[0302] 淋巴因子例如IL-2、IL-3、IL-4、IL-6;

[0303] 激素例如胰岛素、TRH(促甲状腺激素释放激素)、MSH(黑素细胞刺激激素)、类固醇激素例如雄激素和雌激素;

[0304] 生长因子和集落刺激因子例如EGF、TGF-α、FGF、VEGF、G-CSF、M-CSF和GM-CSF (Burgess, Immunology Today 5:155-158 (1984));

[0305] 转铁蛋白(O'Keefe 等人 J. Biol. Chem. 260:932-937 (1985)); 和

[0306] 维生素,例如叶酸。

[0307] 单克隆抗体技术允许以特异性单克隆抗体的形式制备特异性很高的细胞结合剂。本领域中特别众所周知的是通过采用所关注的抗原如完整的靶细胞、从靶细胞分离出的抗原、全病毒、减毒的全病毒、以及病毒蛋白如病毒外壳蛋白来免疫小鼠、大鼠、仓鼠或任何其它哺乳动物,从而生成单克隆抗体的技术。致敏人细胞也可使用。生成单克隆抗体的其它方法是采用scFv(单链可变区),尤其是人类scFv的噬菌体库(参见例如,Griffiths 等人,美国专利No. 5,885,793和5,969,108; McCafferty 等人, WO 92/01047; Liming 等人, WO 99/06587)。此外,也可以使用在美国专利No. 5,639,641中公开的表面重塑的抗体,如可嵌合抗体和人源化抗体一样。合适细胞结合剂的选择是取决于待靶向的特定细胞群体的一个选择问题,但是一般而言优选人单克隆抗体,如果可得到合适的话。

[0308] 例如,单克隆抗体MY9是特异性结合到CD33抗原的鼠IgG1抗体{J. D. Griffin 等人 8 Leukemia Res., 521 (1984)}并且其可在靶细胞表达CD33的情况下,如在急性骨髓性白血病(AML)的疾病下使用。类似地,单克隆抗体抗-B4是结合到B细胞上CD19抗原的鼠IgG1 {Nadler 等人, 131 J. Immunol. 244-250 (1983)}并且其可在靶细胞是B细胞或表达该抗原的患病细胞的情况下,例如在非-何杰金氏淋巴瘤或淋巴性白血病的情况下使用。Hu-B4是源自鼠抗-B4抗体的表面重塑的抗体(Roguska 等人, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci., 91, pg969-

973)。HuN901是结合到在小细胞肺癌、多发性骨髓瘤、卵巢癌和其他实体肿瘤(包括神经内分泌癌)上表达的CD56抗原上的人源化抗体(Roguska等人,1994,Proc.Natl.Acad.Sci.,91,第969-973页)。B38.1是靶向EpCAM的嵌合抗体。也可使用靶向在数种实体肿瘤上表达的EGF受体的全人抗体例如帕尼单抗(Van Cutsem等人,J Clin Oncol.2007;25(13):1658-1664)。也可使用抗-erbB抗体例如曲妥单抗和帕妥珠单抗(Nahta等人,2004,Cancer Research 64:2343-2346)。

[0309] 当细胞结合剂为抗体时,其结合至为多肽并且可以是跨膜分子(例如受体)或配体如生长因子的抗原。示例性的抗原包括例如肾素的分子;生长激素,包括人生长激素和胎牛生长激素;生长激素释放因子;甲状旁腺激素;甲状腺刺激激素;脂蛋白; α -1-抗胰蛋白酶;胰岛素A-链;胰岛素B-链;胰岛素原;促卵泡激素;降钙素;黄体生成素;胰高血糖素;凝血因子如因子vmc、因子IX、组织因子(TF)和von Willebrands因子;抗凝血因子如蛋白C;心房钠尿肽;肺表面活性剂;纤溶酶原激活物例如尿激酶或人尿或组织型纤溶酶原激活物(t-PA);铃蟾肽;凝血酶;造血生长因子;肿瘤坏死因子- α 和- β ;脑啡肽酶;RANTES(对通常T-细胞表达和分泌的活化的调节);人巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1- α);血清白蛋白,例如人血清白蛋白;苗勒(Muellerian)抑制物质;松弛素A-链;松弛素B-链;前松弛素;鼠促性腺激素相关肽;微生物蛋白,例如 β -内酰胺酶;DNA酶;IgE;细胞毒性T-淋巴细胞相关抗原(CTLA),例如CTLA-4;抑制素;激活蛋白;血管内皮生长因子(VEGF);激素或生长因子的受体;蛋白A或D;类风湿因子;神经营养因子,例如骨源性神经营养因子(BDNF)、神经营养蛋白-3、-4、-5或-6(NT-3、NT4、NT-5或NT-6)或神经生长因子例如NGF- β ;血小板源性生长因子(PDGF);成纤维细胞生长因子例如aFGF和bFGF;成纤维细胞生长因子受体2(FGFR2)、表皮生长因子(EGF);转化生长因子(TGF),例如TGF- α 和TGF- β ,包括TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4或TGF- β 5;胰岛素样生长因子-I和-II(IGF-I和IGF-II);des(1-3)-IGF-I(脑IGF-I)、胰岛素样生长因子结合蛋白、EpCAM、GD3、FLT3、PSMA、PSCA、MUC1、MUC16、STEAP、CEA、TENB2、EphA受体、EphB受体、叶酸受体、FOLR1、间皮素(mesothelin)、cripto、 α _v β ₆、整联蛋白、VEGF、VEGFR、EGFR、运铁蛋白受体、IRTA1、IRTA2、IRTA3、IRTA4、IRTA5;CD蛋白,例如CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD8、CD11、CD14、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CD26、CD28、CD30、CD33、CD36、CD37、CD38、CD40、CD44、CD52、CD55、CD56、CD59、CD70、CD79、CD80、CD81、CD103、CD105、CD134、CD137、CD138、CD152或在美国公布No.20080171040或美国公布No.20080305044中公开的结合一种或多种肿瘤相关的抗原或细胞表面受体的抗体,并且它们通过引用整体并入;红细胞生成素;骨诱导因子;免疫毒素;骨形态发生蛋白(BMP);干扰素,例如干扰素- α 、- β 和- γ ;集落刺激因子(CSFs),例如M-CSF、GM-CSF和G-CSF;白细胞介素(ILs),例如,IL-1到IL-10;超氧化物歧化酶;T-细胞受体;表面膜蛋白;衰变加速因子;病毒抗原,例如,例如HIV包膜蛋白的一部分;转运蛋白;归巢受体;地址素;调节蛋白;整联蛋白,例如CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4和VCAM;肿瘤相关抗原例如HER2、HER3或HER4受体;内皮因子(endoglin)、c-Met、c-kit、1GF1R、PSGR、NGEP、PSMA、PSCA、LGR5、B7H4、TAG72(肿瘤相关糖蛋白72)、5T4(Bogharert等人,International J.of Oncology 32:221-234,2008)以及以上列出任一多肽的片段。

[0310] 另外,GM-CSF(其与髓系细胞结合)可用作急性骨髓白血病的患病细胞的细胞结合剂。IL-2(其与活化T细胞结合)可用于防止移植体移植排斥,用于治疗 and 预防移植抗宿主疾病,以及用于治疗急性T细胞白血病。与黑素细胞结合的MSH可被用于治疗黑素瘤。叶酸可

用于靶向在卵巢癌和其它肿瘤上表达的叶酸受体。表皮生长因子可用于靶向鳞状细胞癌,如肺以及头和颈。促生长素抑制素可用于靶向成神经细胞瘤和其它肿瘤类型。

[0311] 乳腺癌和睾丸癌可以用作为细胞结合剂的雌激素(或雌激素类似物)或雄激素(或雄激素类似物)分别成功地靶向。

[0312] 在另一个实施方案中,细胞结合剂是huN901、huMy9-6、huB4、huC242、曲妥单抗、比伐单抗、西罗珠单抗、利妥昔单抗、CNT095、huDS6、描述于W0 2010/124797中的抗-间皮瘤抗体(例如MF-T)、描述于美国专利申请公布2010/0093980中的抗-cripto抗体(例如huB3F6)、描述于美国专利申请公布2007/0183971中的抗-CD138抗体(例如huB-B4)、描述于美国专利No.7,736,644和7,628,986以及美国申请公布No.2010/0111979、2009/0240038、2009/0175887、2009/0156790和2009/0155282中的抗-EGFRvIII抗体、描述于PCT/IB2010/054417和PCT/IB2010/054422中的人源化EphA2抗体(例如2H11R35R74);描述于W02008/047242中的抗-CD38抗体(例如hu38SB19)、描述于美国临时申请No.61/307,797、61/346,595和61/413,172和美国申请No.13/033,723中的抗-叶酸受体抗体。所有这些申请的教导通过引用整体并入本文。

[0313] 细胞结合剂偶联物的生成

[0314] 本发明还提供了安丝菌素衍生物-细胞结合剂偶联物,其包含经由各种连接子连接到一个或多个细胞毒性安丝菌素衍生物的细胞结合剂,所述连接子包括但不限于二硫化物连接子、硫醚连接子、酰胺键合的连接子、肽酶-不稳定性连接子、酸不稳定性连接子、脂酶不稳定性连接子。

[0315] 可用许多方法在肿瘤/不需要的增殖细胞的位点上切割连接子以将细胞毒性剂递送至其靶。连接子可(例如)通过低pH(脲)、还原环境(二硫化物)、蛋白质水解(酰胺/肽连接)、或通过酶促反应(脂酶/糖苷酶)切割。

[0316] 本发明的代表性细胞毒性偶联物是抗体/安丝菌素衍生物、抗体片段-安丝菌素衍生物、表皮生长因子(EGF)/安丝菌素衍生物、黑素细胞刺激激素(MSH)/安丝菌素衍生物、甲状腺刺激激素(TSH)/安丝菌素衍生物、生长抑素/安丝菌素衍生物、叶酸/安丝菌素衍生物、雌激素/安丝菌素衍生物、雌激素类似物/安丝菌素衍生物、前列腺特异性膜抗原(PSMA)抑制剂/安丝菌素衍生物、蛋白裂解酶抑制剂/安丝菌素衍生物、设计的锚蛋白重复蛋白(DARPs)/安丝菌素衍生物、雄激素/安丝菌素衍生物以及雄激素类似物/安丝菌素衍生物。

[0317] 本发明的偶联物可根据本领域中的任何已知方法来制备。参见例如,W0 2009/134977、美国专利No.7,811,572、6,441,163、U.S2006/0182750和Widdison,W.C.等人Semisynthetic maytansine analogues for the targeted treatment of cancer.J Med Chem 2006,49(14),4392-4408。在一个实施方案中,本发明的偶联物可通过如下来制备:a)使细胞结合剂与双官能交联剂反应以形成经修饰的具有与其共价结合的连接子的细胞结合剂;b)任选地纯化经修饰的细胞结合剂;c)将细胞毒性剂(即,本文所述的安丝菌素衍生物,例如式VI-IX化合物)与经修饰的细胞结合剂偶联以形成细胞结合剂-细胞毒性剂偶联物;以及d)纯化细胞结合剂-细胞毒性剂偶联物。

[0318] 在另一个实施方案中,本发明的偶联物可通过使细胞结合剂与具有能够与细胞结合剂形成共价键的连接基团的药物-连接子化合物(例如,式X-XII化合物)反应以形成细胞

结合剂-细胞毒性剂偶联物来制备。然后可纯化偶联物。可原位产生药物-连接子化合物并且在不经纯化下将其用于与抗体反应。

[0319] 可在首先使细胞结合剂与双官能连接子例如商购可得的SMCC反应后使携带硫醇半族的安丝菌素衍生物与细胞结合剂例如抗体的Fab单元偶联。例如Fab片段的数种赖氨酸残基可与SMCC反应以得到携带顺丁烯二酰亚胺基团的经修饰的Fab,然后可使含硫醇的安丝菌素与经修饰的Fab反应以得到偶联物。

[0320] 携带顺丁烯二酰亚胺基团的安丝菌素衍生物可与含有一个或多个硫醇半族的细胞结合剂反应。例如抗体可与二硫苏糖醇反应以还原数个抗体内部二硫键。二硫苏糖醇可通过分子排阻色谱除去,然后可使携带顺丁烯二酰亚胺的安丝菌素衍生物与游离硫醇基团偶联以得到偶联物。

[0321] 携带活化酯例如N-羟基琥珀酰亚胺酯的安丝菌素衍生物可与携带一个或多个胺半族的细胞结合剂反应。例如含有一个或多个赖氨酸残基的双链抗体可与携带五氟苯基酯的安丝菌素衍生物反应以得到偶联物。

[0322] 通过上文所述的方法制备的细胞结合剂偶联物可通过本文所述的任何方法来纯化。

[0323] 含有二硫化物的细胞毒性偶联物通过使含硫醇的安丝菌素衍生物与合适修饰的细胞结合剂反应来制备(参见图14,25)。通过使用凝胶过滤、离子交换色谱、陶瓷羟磷灰石(CHT)色谱、疏水相互作用色谱(CHT)、切向流过滤(TFF)、或通过HPLC纯化这些偶联物以除去非连接的细胞毒性剂。

[0324] 将含水缓冲液中的抗体溶液用摩尔过量的抗体修饰剂例如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)或用N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯(SPDB)孵育来引入二硫代吡啶基基团。经修饰的抗体然后与含硫醇的细胞毒性剂例如化合物17、18、19或46反应,以生成二硫化物-连接的抗体-安丝菌素衍生物偶联物。细胞毒性-细胞结合偶联物然后使用任何上文提及的方法来纯化。可用于引入二硫化物基团的其他交联剂在本领域中是已知的并且公开于美国专利6,913,748、6,716,821和美国专利公布20090274713和20100129314中。

[0325] 可选地,抗体用摩尔过量的抗体修饰剂例如2-亚胺基硫杂环戊烷、L-同型半胱氨酸硫代内酯(或衍生物)、或N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基硫代乙酸酯(SATA)孵育以引入巯基基团。经修饰的抗体然后与合适的含二硫化物的安丝菌素衍生物反应以生成二硫化物-连接的抗体-细胞毒性剂偶联物。抗体-细胞毒性剂偶联物然后通过凝胶过滤或其他上文提及的方法来纯化。

[0326] 每抗体分子结合的细胞毒性分子的数量通过测量280nm和252nm下的吸光度的比率用分光光度法测定。每抗体分子平均1-10个细胞毒性分子通过该方法连接。优选的每抗体分子连接的细胞毒性分子的平均数为2-5,并且最优选为3-4.5。

[0327] 可选地,可制备偶联物,其中安丝菌素衍生物经由不可切割的连接子连接到细胞结合剂(参见图15、16、26)。抗体在含水缓冲剂中的溶液用摩尔过量的抗体-修饰剂例如N-琥珀酰亚胺基-4-(N-顺丁烯二酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧酸酯(SMCC)孵育以引入顺丁烯二酰亚胺基基团、或用N-琥珀酰亚胺基-4-(碘乙酰基)-氨基苯甲酸酯(SIAB)孵育以引入碘乙酰基基团。经修饰的抗体然后与含硫醇的安丝菌素衍生物反应以生成硫醚-连接的抗

体-细胞毒性偶联物。抗体-细胞毒性偶联物然后通过凝胶过滤或其他上文提及的方法通过本领域技术人员已知的方法来纯化。向细胞结合剂引入顺丁烯酰二亚胺基基团或卤代乙酰基的其他交联剂在本领域中是众所周知的(参见美国专利申请2008/0050310、20050169933,可由Pierce Biotechnology Inc.P.O.Box117,Rockland,IL 61105,USA得到)并且包括但不限于BMPEO、BMPS、GMBS、EMCS、5-顺丁烯酰二亚胺基戊酸NHS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、KMUA、SMPB、SMPH、SVSB、DTME、BMB、BMDB、BMH、BMOE、BM(PEO)₃、BM(PEO)₃、磺基-SMCC、磺基-SIAB、磺基-MBS、磺基-GMBS、磺基-EMCS、磺基-KMUS和磺基-SMPB。

[0328] 携带胺反应性基团例如N-羟基琥珀酰亚胺基(NHS)酯的安丝菌素衍生物与细胞结合剂反应以生成直接酰胺连接的偶联物(参见图20、24、27)。抗体-细胞毒性剂偶联物通过凝胶过滤或其他上文提及的方法来纯化。

[0329] 包含肽可切割的连接子的细胞结合剂-安丝菌素衍生物偶联物由相应的含有肽的安丝菌素衍生物制备(参见图17、18、19)。

[0330] 携带末端N-羟基琥珀酰亚胺的含有肽的安丝菌素衍生物直接与细胞结合剂反应以提供肽可切割的偶联物。偶联物通过凝胶过滤、透析或其他本领域已知的方法来纯化。示例性肽包括二肽,例如缬氨酸-瓜氨酸(val-cit)、丙氨酸-苯基丙氨酸;三肽,例如,gly-gly-gly、gly-val-cit、ala-val-cit;四肽,例如leu-leu-leu-leu、ala-lys-ala-lys、ala-leu-ala-leu;五肽或六肽。其他可使用的肽在本领域公开(参见美国专利公布2008/0050310、20090047296、20080280937、20090203889)。

[0331] 如图21、22所示制备包含酸不稳定性连接的安丝菌素衍生物的细胞结合剂偶联物。具有酸不稳定性连接例如脲的偶联物通过含有烷基、芳基酮的安丝菌素衍生物与脲修饰的细胞结合剂的缩合而制备。可选地,修饰细胞结合剂以引入本领域所述的羰基基团半族(参见美国专利5,773,001;5,767,285;5,877,296),然后与携带脲基半族安丝菌素衍生物反应。

[0332] 评价细胞结合剂与本发明安丝菌素衍生物的偶联物抑制各种不需要细胞系的体外增殖的能力。例如,细胞系例如人结肠癌系COLO205、人黑素瘤细胞系A-375和人髓样白血病细胞系HL60可用于评估这些偶联物的细胞毒性。待评价的细胞可暴露于化合物下达24小时、72小时或更长并且细胞的存活分率通过已知方法在直接测定中测量。然后可由测定结果计算IC₅₀值。

[0333] 细胞结合剂与安丝菌素衍生物的偶联物的体内抗肿瘤效力通过先前公开的方法(美国专利No.7,473,796,通过引用并入本文)来评价。

[0334] 组合物及使用方法

[0335] 本发明提供了药物组合物,其包含有效量的本发明的任何安丝菌素衍生物-细胞结合剂偶联物、其药学上可接受的盐或溶剂化物、以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0336] 本发明还提供了治疗方法,其包括向需要治疗的受试者施用有效量的任何上述的偶联物。

[0337] 类似地,本发明提供了用于诱导所选细胞群体中的细胞死亡的方法,其包括将靶细胞或含有靶细胞的组织与有效量的细胞毒性剂(包含本发明的任何安丝菌素衍生物-细胞结合剂偶联物、其盐或溶剂化物)接触。靶细胞为细胞结合剂可与其结合的细胞。

[0338] 如有需要,其他活性剂例如其他抗肿瘤剂可与偶联物一起施用。

[0339] 适合的药学上可接受的载体、稀释剂和赋形剂是众所周知的并且可由本领域普通技术人员以临床情况为据而确定。

[0340] 适合的载体、稀释剂和/或赋形剂的实例包括:(1)杜尔贝科氏磷酸缓冲盐水(pH约7.4),含有或不含有约1mg/ml至25mg/ml人血清白蛋白,(2)0.9%盐水(0.9%w/v NaCl),和(3)5%(w/v)葡萄糖;并且也可含有抗氧化剂例如色胺和稳定剂例如Tween 20。

[0341] 诱导所选细胞群体中的细胞死亡的方法可在体外、体内或离体进行。

[0342] 体外应用的实例包括在移植到同一患者之前,对自体骨髓进行处理以杀死患病细胞或恶性细胞:移植之前处理骨髓以便杀死感受态T细胞并且防止移植物抗宿主病(GVHD);处理细胞培养物以杀死除未表达靶抗原的所需变体之外的所有细胞;或杀死表达不希望的抗原的变体。

[0343] 本领域的普通技术人员容易确定体外应用的非临床条件。

[0344] 临床离体应用的例子是在癌症治疗或自身免疫疾病治疗中,进行自体移植之前将肿瘤细胞或淋巴样细胞从骨髓中去除,或在进行移植之前从自体的或异体(allogenic)的骨髓中去除T细胞或其它淋巴样细胞,以防止GVHD。治疗按如下进行。从患者或其它个体收集骨髓,然后在约37℃下于加入了浓度为10 μ M到1pM的本发明细胞毒性剂的含血清培养基中孵育约30分钟至48小时。本领域的普通技术人员易于确定孵育的浓度和时间(即剂量)的确切条件。在孵育之后,用含有血清的培养基洗涤骨髓细胞,并采用已知的方法使骨髓细胞由静脉内返回到患者。在患者接受其它治疗,如在收集骨髓和重新灌注处理过的细胞之间的期间内接受烧蚀化疗(ablative chemotherapy)或全身放疗(total-body irradiation)的情况下,采用标准的医疗器械在液氮中储存处理过的骨髓细胞。

[0345] 对于临床体内应用,本发明的细胞毒性剂以作为测定无菌度和内毒素水平的溶液或冻干粉末而提供。偶联物施用的合适方法的例子如下。偶联物作为静脉内推注剂施用,每周一次,为期4周。施用的推注剂量为,在50到1000ml标准盐水中可加入5到10ml人类血清白蛋白。每次静脉内施用的剂量将为10 μ g到2000mg(每天施用的剂量范围为100ng到20mg/kg)。治疗4周之后,患者可继续接受每周一次的治疗。本领域的普通技术人员以临床情况为据,可确定关于施用途径、赋形剂、稀释剂、剂量、时间等的具体临床方案。

[0346] 根据诱导所选细胞集落中的细胞死亡的体内或离体方法可治疗的医学病状的例子包括任何种类的恶性情况,包括(例如)肺癌、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、肾癌、胰腺癌、卵巢癌和淋巴器官癌;自身免疫性疾病,如系统性狼疮、类风湿性关节炎和多发性硬化;移植排斥,如肾移植排斥、肝移植排斥、肺移植排斥、心脏移植排斥和骨髓移植排斥;移植物抗宿主病;病毒感染,如CMV感染、HIV感染、AIDS等;以及寄生虫感染,如贾第鞭毛虫病、阿米巴病、血吸虫病,以及其它本领域普通技术人员可确定的疾病。

[0347] 本文提及的所有出版物、专利和非专利参考文献的全部内容通过引用明确并入本文。

实施例

[0348] 现在通过参照非限制性的实施例对本发明进行举例说明。除非另有指明,否则所有的百分比、比率、份数等均以重量计。

[0349] 所有试剂均购自Aldrich Chemical Co., New Jersey或来自其他商业来源。如前所述制备美登醇(11)(美国专利6,333,410)。核磁共振(¹H NMR)光谱是在Bruker 400MHz设备上获得的,且质谱在Bruker Daltonics Esquire 3000仪器上使用电喷雾离子化获得的。体外细胞毒性测定如前所述地进行(参见美国专利7,276,497和W.C.Widdison等人, J. Med. Chem., 2006, 49, 4392-4408)。

[0350] KB(ATCC CCL-17)细胞系是人上皮细胞来源。由人乳腺癌细胞建立SK-BR-3(ATCC HTB-30)细胞系。人结肠肿瘤细胞系COLO 205 (ATCC CCL-222)和HT-29(ATCC HTB 38)、人黑素瘤细胞系A-375(ATCC CRL 1619)、人伯基特淋巴瘤细胞系Ramos(ATCC CRL-1596)和人髓系白血病细胞系HL-60(ATCC CCL-240)所有均获自ATCC, Maryland。使细胞系在具有L-谷氨酰胺的杜尔贝科氏改性伊格尔培养基(DMEM, Biowhittaker, Walkersville, MD)中生长, 所述培养基补充有10%胎牛血清(Hyclone, Logan, Utah)和50μg/mL硫酸庆大霉素(Life Technologies, Rockville, MD)。将细胞维持在36-37.5℃下于含有6%CO₂的增湿大气中。

[0351] 实施例1. 体外细胞毒性

[0352] 细胞毒性研究使用克隆原测定来进行。将测试细胞系(KB和SK-Br-3)以每孔1000个细胞的恒定数量接种于6孔培养皿中。将细胞用不同浓度(0至3nM)的各种安丝菌素或美登素孵育72小时。然后从平板吸取培养基并且替换为新鲜培养基。使培养基生长, 并且在接种后总计7-10天后形成集落。然后固定培养基并且用10%福尔马林/PBS中的0.2%结晶紫染色, 并对集落进行计数。通过将所计数的集落数目除以所接种的细胞数目确定未处理细胞(仅培养基)的接种效率。通过将孔中暴露于药物下的集落数目除以对照孔中的集落数目来测定暴露于药物下的细胞的存活分率。

[0353] 各种安丝菌素与美登素相比的体外细胞毒性测量的结果示于图3中。结果显示, 测试的所有三种安丝菌素酯对测试的两种细胞系(KB和SK-Br-3)的效力比美登素高。例如, 携带C3戊酰基的安丝菌素P4'和携带异丁酰基酯的安丝菌素P3对SK-Br-3细胞的效力比C3N-乙酰基-N-甲基丙氨酰基酯—美登素(IC₅₀=3.4x10⁻¹¹M)高17倍(IC₅₀=2x10⁻¹²M)。类似地, 安丝菌素P3、P4和P4'酯对KB细胞的效力比美登素高3.7至6倍。

[0354] 实施例2. 衍生化羧酸的制备

[0355] 化合物28: 如前所述, 3-巯基丙酸与S-甲基硫代磺酸甲酯在乙醇中反应以得到28。(Widdison, W.C., 等人, J Med Chem, 2006. 4, 4392-408)。

[0356] 化合物30: 化合物30通过使S-甲基硫代磺酸甲酯与4-巯基-1-丁醇反应而制备。

[0357] 化合物32: 化合物32通过使S-甲基硫代磺酸甲酯与1-氨基-丁-4-硫醇反应而制备(Reineke, T.M. 等人 Bioconjugate Chem., 2003 14, 247-254)。

[0358] 化合物34: 如下制备携带呋喃的羧酸34. 5-羟基甲基-2-糠酸甲酯(33)(Moore, J.A 等人, Journal of Polymer Science, Polymer Chemistry Edition(1984), 22(3), 863-4)与甲磺酰氯反应, 然后与硫脲反应并水解以得到33。之后33与甲基硫代磺酸酯反应。

[0359] 化合物37: 化合物37通过使2,2'-二硫代二吡啶与4-(巯基甲基)苯甲酸36反应而制备。

[0360] 化合物39: 化合物39通过使2,2'-二硫代二吡啶与硫代PEG4羧酸38反应而制备。

[0361] 化合物42: 如下制备携带肽的羧酸42。使用N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基苯并三唑(HOBT)使二肽FMoc-Val-Cit-OH 40(Dubowchik G.M.

等人Bioconjugate Chem.2002,13,855-869)与 β 丙氨酸的叔丁酯偶联,然后用哌啶进行FMoc脱保护以得到41。化合物41然后与3-[2-吡啶基二硫代]-丙酸N-琥珀酰亚胺基酯(SPDP)反应,然后用三氟乙酸进行叔丁酯脱保护。

[0362] 实施例3.碳酸4-硝基-苯酚酯或氨基甲酸4-硝基-苯酚酯的制备

[0363] 使氯甲酸4-硝基苯酯与化合物30反应以得到携带二硫化物的碳酸酯43。

[0364] 使氯甲酸4-硝基苯酯与化合物32反应以得到携带二硫化物的氨基甲酸酯44。

[0365] 安丝菌素衍生物的制备

[0366] 实施例4:

[0367] 携带硫醇的安丝菌素衍生物6通过美登醇与28的4,4-二甲基吡啶(DMAP)催化的二环己基碳二亚胺(DCC)偶联、然后使用二硫苏糖醇进行二硫化物还原而制备。

[0368] 实施例5:

[0369] 携带硫醇的安丝菌素衍生物19通过美登醇与37的4,4-二甲基吡啶(DMAP)催化的二环己基碳二亚胺(DCC)偶联、然后使用二硫苏糖醇进行二硫化物还原而制备。

[0370] 实施例6:

[0371] 携带硫醇的安丝菌素衍生物23通过美登醇与34的4,4-二甲基吡啶(DMAP)催化的二环己基碳二亚胺(DCC)偶联、然后使用二硫苏糖醇进行二硫化物还原而制备。

[0372] 实施例7:

[0373] 携带硫醇的安丝菌素衍生物18通过美登醇与39的4,4-二甲基吡啶(DMAP)催化的二环己基碳二亚胺(DCC)偶联、然后使用二硫苏糖醇进行二硫化物还原而制备。

[0374] 实施例8:

[0375] 携带硫醇的安丝菌素衍生物17通过美登醇与42的4,4-二甲基吡啶(DMAP)催化的二环己基碳二亚胺(DCC)偶联、然后使用二硫苏糖醇进行二硫化物还原而制备。

[0376] 实施例9:

[0377] 携带硫醇的安丝菌素衍生物20通过美登醇与44的DMAP催化的偶联、然后使用二硫苏糖醇进行二硫化物还原而制备。

[0378] 实施例10:

[0379] 携带硫醇的安丝菌素衍生物21通过美登醇与43的DMAP催化的偶联、然后使用二硫苏糖醇进行二硫化物还原而制备。

[0380] 实施例11:

[0381] 安丝菌素衍生物9通过美登醇与3-氧代丙酸48的DMAP催化的DCC偶联而制备(Yamada,E.M.等人J.Biol.Chem.1959 234,941-945)。

[0382] 实施例12:

[0383] 安丝菌素衍生物8通过美登醇与3-氧代丁酸49的DMAP催化的DCC偶联而制备。

[0384] 实施例13:

[0385] 安丝菌素衍生物15通过美登醇与50的DMAP催化的DCC偶联、然后用吗啉进行FMoc脱保护而制备。

[0386] 实施例14:

[0387] 安丝菌素衍生物16通过美登醇与51Fmoc- β -丙氨酸的DMAP催化的DCC偶联、然后用吗啉进行FMoc脱保护而制备。

[0388] 实施例15:

[0389] 安丝菌素衍生物13a,b如下制备(参见图11)。

[0390] 美登醇的己二酸-1-[2-三甲基甲硅烷基]乙基]酯(14a)。

[0391] 在室温下向己二酸-1-[2-三甲基甲硅烷基]乙基]酯(523.0mg, 2.12mmol)、CH₂Cl₂ (2mL)的溶液加入二环己基碳二亚胺(438mg, 2.124mmol)、4-二甲基氨基吡啶(86.0mg, 0.708mmol)和美登醇(200.00mg, 0.354mmol)。2h后, 过滤反应物并且真空浓缩。通过用0.1%甲酸水溶液中的乙腈的线性梯度洗脱的C18HPLC来分离产物。将含有产物的级分合并并且真空浓缩以得到32.0mg(11%收率)的所需产物。MS计算值(M+Na)⁺, 815.3; 实测值, 815.2

[0392] 美登醇的己二酸酯(14b)。

[0393] 向含有美登醇的己二酸-1[2-三甲基甲硅烷基]乙基]酯酯(30mg, 0.038mmol)在THF(378μL)中的溶液的冰水冷却的烧瓶中加入1M四丁基氟化铵在四氢呋喃(45.4μL, 0.045mmol)中的溶液。冷却浴且经6h后用饱和氯化铵淬灭反应物、用EtOAc萃取, 用盐水洗涤, 经无水Na₂SO₄干燥并且真空浓缩。通过用0.1%甲酸水溶液中的乙腈的线性梯度洗脱的C18HPLC来分离产物。将含有产物的级分合并并且真空浓缩以得到5.4mg(21%收率)的所需产物。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ0.82(s, 3H), 1.35-1.17(m, 4H), 1.54-1.39(m, 2H), 1.61(d, J=13.7Hz, 1H), 1.68(s, 3H), 1.82-1.70(m, 2H), 2.20(d, J=11.9Hz, 2H), 2.36(d, J=11.1Hz, 3H), 2.61-2.50(m, 2H), 2.77-2.63(m, 2H), 2.91(d, J=9.7Hz, 1H), 3.16(s, 1H), 3.19(s, 3H), 3.37(s, 3H), 3.51(dd, J=17.7, 11.0Hz, 1H), 3.72(dd, J=14.1, 7.0Hz, 1H), 3.99(s, 3H), 4.29-4.21(m, 1H), 4.88(d, J=9.1Hz, 1H), 5.53(dd, J=15.5, 8.8Hz, 1H), 6.16(d, J=10.6Hz, 1H), 6.42(dd, J=15.3, 10.9Hz, 1H), 6.63(s, 1H), 6.79(s, 1H), 6.84(s, 1H)。MS计算值(M+Na)⁺, 715.3; 实测值, 715.3

[0394] 美登醇的己二酸酯的N-羟基琥珀酰亚胺(13)。

[0395] 在室温下向美登醇的己二酸酯(5mg, 7.21μmol)在CH₂Cl₂(1mL)中的溶液加入N-羟基琥珀酰亚胺(4.15mg, 0.036mmol)和N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(6.91mg, 0.036mmol)。24h后在真空下除去溶剂并且通过用0.1%甲酸水溶液中的乙腈的线性梯度洗脱的C18HPLC纯化残余物。将含有产物的级分直接冷冻并且冻干以得到0.91mg(16%收率)的所需产物。MS计算值(M+Na)⁺, 812.3; 实测值, 812.3

[0396] 实施例16. 如下制备含硫醇的安丝菌素6(参见图5)。

[0397] 美登醇的3-(甲基二硫代)丙酸酯(45)。

[0398] 在室温下向3-(甲基二硫代)丙酸(323.0mg, 2.12mmol)在CH₂Cl₂(2mL)中的溶液加入二环己基碳二亚胺(438mg, 2.124mmol)、4-二甲基氨基吡啶(89.3mg, 0.731mmol)和美登醇(197.0mg, 0.348mmol)。2h后过滤反应物并且真空浓缩。用0.1%甲酸水溶液中的乙腈的线性梯度洗脱的C18HPLC纯化产物。将含有产物的级分合并并且真空浓缩以得到93.6mg(38%收率)的所需产物。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ0.85(s, 3H), 1.24(d, J=13.7Hz, 1H), 1.28(d, J=6.4Hz, 3H), 1.53-1.41(m, 1H), 1.63(d, J=13.6Hz, 2H), 1.68(s, 3H), 2.19(dd, J=13.9, 2.6Hz, 1H), 2.43-2.40(m, 1H), 2.44(m, 2H), 2.52(dd, J=13.9, 12.0Hz, 1H), 2.87-2.77(m, 2H), 2.89(dd, J=8.5, 4.9Hz, 1H), 3.02-2.94(m, 3H), 3.18(s, 3H), 3.36(s, 3H), 3.52(d, J=8.9Hz, 1H), 3.56(d, J=12.9Hz, 1H), 3.99(s, 3H), 4.24(t, J=11.3Hz, 1H), 4.96(dd, J=

11.9, 2.7Hz, 1H), 5.61(dd, J=15.4, 8.9Hz, 1H), 6.27(d, J=11.0Hz, 1H), 6.34(s, 1H), 6.45(dd, J=15.4, 11.1Hz, 1H), 6.80(d, J=1.7Hz, 1H), 6.84(d, J=1.7Hz, 1H)。¹³C NMR(101MHz, CDCl₃) δ12.08, 14.51, 15.76, 22.16, 22.72, 24.70, 31.25, 33.41, 34.24, 35.68, 38.34, 47.15, 56.58, 56.72, 60.34, 66.18, 74.47, 81.09, 88.08, 113.02, 119.44, 122.28, 124.49, 128.09, 132.47, 140.09, 141.58, 142.51, 149.10, 152.32, 168.52, 170.51。MS计算值(M+Na)⁺, 721.2; 实测值, 721.2。

[0399] 美登醇的3-硫代丙酸酯(6)。

[0400] 在室温下向美登醇的3-(甲基二硫代)丙酸酯(45mg, 0.064mmol)在1,2-二甲氧基乙烷(3mL)中的溶液加入D,L-二硫苏糖醇(49.6mg, 0.322mmol)在100mM碳酸钾、2mM EDTA, pH 7.5缓冲液(3.00mL)中的溶液。1h后将反应物体积真空减至约其原体积的1/2并且通过用0.1%甲酸水溶液中的乙腈的线性梯度洗脱的C18HPLC来分离产物。将含有产物的级分直接冷冻并且冻干以得到4.0mg(9.5%收率)的所需产物6。MS计算值(M+Na)⁺, 675.2; 实测值, 675.2。

[0401] 实施例16. 如下制备含硫醇的安丝菌素55(参见图13a)。

[0402] 6-(甲基二硫代)己酸(53)。

[0403] 向含有6-巯基己酸(500.0mg, 3.37mmol)在去离子水(2mL)中的溶液的冷水浴冷却的烧瓶中加入S-甲基硫代磺酸甲酯(468mg, 3.71mmol)在乙醇(1mL)中的溶液。16小时后将反应物用饱和氯化钠(400mL)稀释并且用乙醚(3x150mL)萃取。将合并的萃取物用饱和NaCl(100mL)洗涤, 经无水Na₂SO₄干燥并且真空浓缩。通过用乙酸乙酯/己烷/乙酸(40:58:2)洗脱的硅胶色谱纯化产物。将含有产物的级分合并并且真空浓缩以得到482mg(73%收率)的所需产物。MS计算值(M+Na)⁺, 217.3; 实测值, 217.3

[0404] 美登醇的6-(甲基二硫代)己酸酯(54)。

[0405] 在室温下向6-(甲基二硫代)己酸(413.0mg, 2.12mmol)在CH₂Cl₂(2mL)中的溶液加入二环己基碳二亚胺(438mg, 2.124mmol)、4-二甲基氨基吡啶(86.0mg, 0.708mmol)和美登醇(200.00mg, 0.354mmol)中的溶液。2h后过滤反应物并且真空浓缩。产物通过用0.1%甲酸水溶液中的乙腈的线性梯度洗脱的C18HPLC来分离。将含有产物的级分合并并且真空浓缩以得到36.7mg(14%收率)的所需产物。MS计算值(M+Na)⁺, 763.3; 实测值, 763.3。

[0406] 美登醇的6-巯基己酸酯(55)。

[0407] 在室温下向美登醇的6-(甲基二硫代)己酸酯(30.0mg, 0.040mmol)在1,2-二甲氧基乙烷(3mL)中的溶液加入D,L-二硫苏糖醇(31.2mg, 0.202mmol)在100mM磷酸钾、2mM EDTA, pH 7.5缓冲液(3.00mL)中的溶液。4h后将反应物体积真空浓缩至约2/3体积并且通过用0.1%甲酸水溶液中的乙腈的线性梯度洗脱的半制备型C18HPLC来分离产物。收集后直接冷冻产物级分并且冻干以得到12.55mg(44%收率)的所需产物55。MS计算值(M+Na)⁺, 717.3; 实测值, 717.3。

[0408] 实施例17如下制备含硫醇的安丝菌素58(参见图13b)。

[0409] 2-(甲基二硫代)丙酸(56)。

[0410] 分批向2-巯基丙酸(2.0mL, 22.55mmol)在水(50.0mL)中的溶液加入碳酸钠(4.77g, 45.00mmol), 同时避免过度起泡。之后在室温下缓慢加入S-甲基硫代磺酸甲酯(2.77mL, 29.3mmol)在乙醇(50.0mL)中的溶液。2h后将反应物体积真空减至约其原体积的

1/2,然后使用1M HCl酸化至pH~2并用乙酸乙酯萃取(2x250mL)。将有机萃取液合并,用盐水洗涤并且真空浓缩以得到粗油状物,其通过用己烷:乙酸乙酯:乙酸(50:49:1)的混合物洗脱的硅胶色谱纯化。将含有产物的级分合并并且真空浓缩以得到2.3g(67%收率)的所需产物。¹H NMR(CDCl₃) δ 1.520(3H,d,J=7.2Hz),2.446(3H,s)和3.559(1H,m)ppm。

[0411] 美登醇的2-(甲基二硫代)丙酸酯(57)。

[0412] 向2-(甲基二硫代)丙酸(303.3mg,1.992mmol)在CH₂Cl₂(2mL)中的溶液加入二环己基碳二亚胺(438mg,2.124mmol)、4-二甲基氨基吡啶(86mg,0.708mmol)和美登醇(200.0mg,0.354mmol)。1h后加入乙酸乙酯(20mL)并过滤混合物,相继用饱和碳酸氢钠(10mL)和盐水(5mL)洗涤,然后经无水Na₂SO₄干燥并且真空浓缩。通过用0.1%甲酸水溶液中的乙腈的线性梯度洗脱的C18HPLC来分离产物。收集含有产物的级分,合并并且真空浓缩以得到8.53mg(3.3%收率)的所需产物。¹H NMR(CDCl₃,ref.7.26ppm) δ 0.821(3H,s),1.288(3H,d,J=6.4Hz),1.455(1H,m),1.650(1H,d,J=4Hz),1.679(3H,d,J=3.2Hz),1.693(3H,s),1.782(1H,d,J=7.2Hz),2.245(1H,dd,J=11.6,J=2.4Hz),2.494(3H,s),2.573(1H,dd,J=11.6,J=2Hz),2.877(1H,m),3.186(3H,s),3.359(3H,s),3.511(3H,m),3.645(1H,m),3.987(3H,s),4.265(1H,m),4.914(1H,dd,J=9.2,J=3.2Hz),5.539(1H,dd,J=11.6,J=6.4Hz),6.158(1H,d,J=11.2),6.308(1H,s),6.422(1H,dd,J=10.8,J=4.4Hz),6.834(1H,s)和6.905(1H,d,J=1.6Hz)。MS计算值(M+Na)⁺,721.2;实测值,721.2。MS计算值(M+Cl)⁻,733.2;实测值,735.1。

[0413] 美登醇的2-(硫代)丙酸酯(58)。

[0414] 在室温下向美登醇的2-(甲基二硫代)丙酸酯(8mg,0.011mmol)在1,2-二甲氧基乙烷(1mL)中的溶液加入D,L-二硫苏糖醇(5.29mg,0.034mmol)在100mM磷酸钾、2mM EDTA pH 7.5缓冲液(1.000mL)中的溶液。90min后将反应物体积真空减至干燥并且通过用0.1%甲酸水溶液中的乙腈的线性梯度洗脱的C18HPLC纯化。将含有产物的级分直接冷冻并冻干以得到1.6mg(18%收率)的所需产物。MS计算值(M+Na)⁺,675.2;实测值,676.2。MS计算值(M-H)⁻,651.1;实测值,651.2。

[0415] 实施例18:

[0416] 安丝菌素衍生物13a通过37与N-羟基琥珀酰亚胺的DCC偶联而制备。

[0417] 实施例19:

[0418] 安丝菌素13b通过37与磺基-N-羟基琥珀酰亚胺的DCC偶联而制备。

[0419] 实施例20:

[0420] 如下制备安丝菌素衍生物22。使30的羟基半族与甲磺酰氯反应以得到甲磺酸酯52。在低温下将美登醇在四氢呋喃中的溶液用丁基锂脱质子并且插入到52的溶液以形成醚键,然后将二硫化物半族用DTT切割。

[0421] 实施例21.通过二硫化物连接子将抗体与携带巯基的安丝菌素衍生物偶联

[0422] 通过前述的方法将抗体偶联到本发明的携带巯基的安丝菌素衍生物的数个分子上(W.C.Widdison等人,J.Med.Chem.,2006,49,4392-4408),这在本文被描述。首先将人源化抗体用含有胺反应性N-羟基琥珀酰亚胺基团(NHS基团)和硫醇反应性2-吡啶基二硫代基团(-SSPy基团)的异双官能连接子(SPDB、SPP、SPDP)修饰以并入每分子抗体的数个分子(例如1至10)的连接子。此后,将携带反应性硫醇基团的安丝菌素衍生物加至连接子修饰的抗

体以通过二硫键偶联安丝菌素衍生物与抗体。

[0423] 在具体实施例中,在室温下使用3至15倍摩尔过量的异双官能连接子例如SPDB、SPP和SPDP在pH 6.5-8的含水缓冲液中修饰浓度5-10mg/ml的人源化抗体0.25-3h并且通过凝胶过滤(使用例如,Sephadex G25色谱)纯化以获得用每抗体分子平均3-15个连接子基团修饰的抗体。通过在将过量的1,4-二硫苏糖醇(DTT)试剂添加到少量等分试样的连接子修饰的抗体样品时根据2-硫代吡啶酮在343nm的吸光度($\epsilon_{343\text{nm}}=8080\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)测量其的释放来评估所连接的基团。测量抗体上所连接的反应性基团的数目后,将连接子修饰的抗体与过量的携带硫醇的安丝菌素衍生物(通常每反应性连接子基团1.0-2.5倍摩尔过量的携带硫醇的安丝菌素衍生物)在约2.5mg/mL的抗体浓度下(pH 6.5-8)偶联,反应时间为2-24小时。通过凝胶过滤或透析纯化抗体-安丝菌素衍生物偶联物以除去未反应的安丝菌素衍生物。根据252nm和280nm下的吸光度测量并且使用安丝菌素衍生物和抗体在252nm和280nm下的吸光系数,测定纯化的偶联物中每抗体分子所连接的安丝菌素衍生物的数目(图13,m=1至10)。

[0424] 实施例22.通过不可切割的硫醚连接子将抗体与每抗体分子所连接的数个携带巯基的安丝菌素衍生物分子偶联

[0425] 硫醚连接的抗体-安丝菌素衍生物偶联物可用两步工艺制备。用携带胺反应性N-羟基琥珀酰亚胺基团(NHS基团)和硫醇反应性顺丁烯酰二亚胺基、乙烯基吡啶、乙烯砜、乙烯基磺酰胺或基于卤代乙酰基的基团的异双官能交联剂修饰人源化抗体以并入抗体分子中的数个连接子分子。包含基于顺丁烯酰二亚胺基的半族的交联剂包括4-(顺丁烯酰二亚胺基甲基)环己烷羧酸N-琥珀酰亚胺基酯(SMCC)、为SMCC“长链”类似物的N-琥珀酰亚胺基-4-(N-顺丁烯酰二亚胺基甲基)-环己烷-1-羧基-(6-酰胺基己酸酯)(LC-SMCC)、 κ -顺丁烯酰二亚胺基十一酸N-琥珀酰亚胺基酯(KMUA)、 γ -顺丁烯酰二亚胺基丁酸N-琥珀酰亚胺基酯(GMBS)、 ϵ -顺丁烯酰二亚胺基己酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(EMCS)、间-顺丁烯酰二亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、N-(α -顺丁烯酰二亚胺基乙酰氧基)-琥珀酰亚胺酯(AMAS)、琥珀酰亚胺基-6-(β -顺丁烯酰二亚胺基丙酰胺基)己酸酯(SMPH)、4-(对顺丁烯酰二亚胺基苯基)-丁酸N-琥珀酰亚胺基酯(SMPB)和N-(对顺丁烯酰二亚胺基苯基)异氰酸酯(PMPI)。描述了含有乙烯基吡啶的硫醇反应性的化合物(Friedman M.等人Int.J.Peptide Protein Res.1974,6,183-185;Mak A.等人Anal.Biochem.1978,84,432-440)。已描述了含有乙烯砜半族的硫醇反应性的化合物(Masri M.S.J.Protein Chem..1988,7,49-54;Morpurgo,M.等人Bioconjugate Chem.1996,7,363-368)。包含基于卤代乙酰基的半族的交联试剂包括N-琥珀酰亚胺基-4-(碘乙酰基)-氨基苯甲酸酯(SIAB)、N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯(SIA)、溴乙酸N-琥珀酰亚胺基酯(SBA)和3-(溴乙酰氨基)丙酸N-琥珀酰亚胺基酯(SBAP)。

[0426] 在室温下用在含水缓冲液(pH 6.5-8)中过量的5-10mg/mL的异双官能交联剂修饰抗体0.25-3h,然后通过G25色谱纯化。使用少量等分试样的连接子修饰的抗体并且添加已知的高于顺丁烯二酰亚胺或卤代乙酰基浓度的过量硫醇(例如2-巯基乙醇),测定经修饰的抗体上连接的顺丁烯二酰亚胺或卤代乙酰基基团的数目。将硫醇与经修饰的抗体上引入的顺丁烯二酰亚胺或卤代乙酰基基团反应并且通过使用DTNB试剂的Ellman测定(412nm下TNB硫醇盐的吸光系数= $14150\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$;Riddles,P.W.等人,Methods Enzymol.,1983,91,49-

60; Singh, R., *Bioconjugate Chem.*, 1994, 5, 348-351) 测量过量硫醇。测量抗体上所连接的反应性基团的数目之后, 将连接子修饰的抗体与过量的携带硫醇的安丝菌素衍生物(通常每反应性连接子基团1.0-2.5倍摩尔过量的携带硫醇的安丝菌素衍生物)在约2.5mg/mL的抗体浓度下(pH6.5-8)偶联, 反应时间2-24小时。通过凝胶过滤或透析纯化不可切割的抗体-安丝菌素衍生物偶联物以除去未反应的安丝菌素衍生物。根据252nm和280nm下的吸光度测量并且使用安丝菌素衍生物和抗体在252nm和280nm下的吸光系数, 测定纯化的偶联物中每抗体分子所连接的不可切割的安丝菌素衍生物分子的数目(图14, 15, $m=1$ 至10)。

[0427] 实施例23. 抗体与每抗体分子连接的数个胺反应性安丝菌素衍生物分子的偶联

[0428] 可通过用本发明的胺反应性安丝菌素衍生物修饰人源化抗体上的赖氨酸残基, 以一步工艺制备抗体-安丝菌素衍生物偶联物。如在本说明书中所述, 制备携带胺反应性基团例如N-羟基琥珀酰亚胺基团(NHS基团)的安丝菌素衍生物。最初用数个过量的胺反应性安丝菌素衍生物滴定抗体, 以测定所需的安丝菌素衍生物对抗体的比率, 通常该范围为人源化抗体的6-10倍摩尔过量。

[0429] 在一步工艺中, 在室温下将人源化抗体与浓度5-10mg/mL的过量的携带胺反应性NHS基团的安丝菌素衍生物在含水缓冲液(pH6.0-8.0)中反应1-24h。通过凝胶色谱、然后透析来纯化抗体-安丝菌素衍生物偶联物。通过测量偶联物在252nm和280nm下的吸光度并且使用安丝菌素衍生物和抗体在这两个波长下的吸光系数, 测定最终偶联物中每抗体分子所连接的安丝菌素衍生物分子的数目(图19, $m=1$ 至10)。

[0430] 实施例24. 使用酸不稳定性连接子将抗体与每抗体分子所连接的数个安丝菌素衍生物分子偶联

[0431] 在偶联抗体与数个分子的本发明的携带羰基基团的安丝菌素衍生物的两步工艺中, 首先用过量的商购可得的含有胺反应性N-羟基琥珀酰亚胺基团(NHS基团)和羰基反应性肼基团的异双官能连接子修饰人源化抗体, 以并入抗体分子中数个分子的连接子。此类商购可得的交联剂的实例包括琥珀酰亚胺基6-肼基烟酰胺丙酮脒(SANH)、4-肼基对苯二甲酸琥珀酰亚胺基酯盐酸盐(SHTH)和烟酸琥珀酰亚胺基肼盐酸盐(SHNH)。经修饰的抗体然后与过量的携带酮或醛的安丝菌素衍生物反应以通过酸不稳定性键偶联安丝菌素衍生物与抗体。

[0432] 携带酸不稳定性键的偶联物也可使用本发明的携带肼的安丝菌素衍生物来制备。与上述的两步工艺类似, 用商购可得的携带胺反应性N-羟基琥珀酰亚胺基团和肼反应性羰基基团的异双官能交联剂修饰人源化抗体。此类交联剂的实例包括琥珀酰亚胺基-对甲酰基苯甲酸酯(SFB)和琥珀酰亚胺基-对甲酰基苯氧基乙酸酯(SFPA)。连接子修饰的抗体然后与过量的携带肼的安丝菌素衍生物反应以得到通过酸不稳定性键连接的抗体-安丝菌素衍生物偶联物(图20-22, $m=1$ to 10)。

[0433] 实施例25. 如下制备胺反应性安丝菌素衍生物13a(参见图11)。

[0434] 美登醇的己二酸-1-[三甲基甲硅烷基]乙基]酯(14a)。

[0435] 反应烧瓶装有6-氧代-6-(2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基)己酸(523mg, 2.124mmol)、N,N'-二环己基碳二亚胺(438mg, 2.124mmol)和二氯甲烷(2.5mL)。将4-二甲基氨基吡啶(86mg, 0.708mmol)加至搅拌的溶液, 然后添加美登醇(200mg, 0.354mmol)。在室温下搅拌反应物4h。继续进行4h后, 将粗反应混合物离心并且真空浓缩。将所得粗油状物通过半制备

型C18 HPLC纯化以得到32mg 14a,收率为11.4%。HRMS(M+Na)⁺实测值:815.3299,计算值:815.3312 ¹H NMR(400MHz,CDCl₃)δ6.84(s,1H),6.77(s,1H),6.43(dd,J=15.3,11.0Hz,1H),6.32(s,1H),6.17(d,J=10.9Hz,1H),5.52(dd,J=15.4,8.9Hz,1H),4.89(dd,J=11.9,2.8Hz,1H),4.24(t,J=10.5Hz,1H),4.15(m,2H),3.99(s,3H),3.52(m,2H),3.37(s,3H),3.22(s,2H),3.17(m,1H),3.16(s,3H),2.87(d,J=9.7Hz,1H),2.49(m,2H),2.34(m,2H),2.18(dd,J=13.9,2.7Hz,1H),2.00(s,3H),1.68(s,3H),1.63(d,J=13.6Hz,1H),1.46(m,1H),1.27(d,J=6.3Hz,3H),1.22(m,1H),0.97(m,2H),0.83(s,3H),0.03(s,9H)。

[0436] 美登醇的己二酸酯(14b)。

[0437] 将三甲基甲硅烷基-保护的安丝菌素衍生物14a(30mg,0.038mmol)溶解于四氢呋喃(0.38mL)中并冷却至0℃。一旦冷却,就用四氢呋喃中的1M四丁基氟化铵(0.045mL,0.045mmol)处理反应物。除去冷却浴并且将反应物升至室温,并搅拌6h。然后将反应物用饱和氯化铵淬灭,萃取到乙酸乙酯中,用盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥并且真空浓缩。通过半制备型C18HPLC纯化粗产物以得到5.4mg的所需羧酸安丝菌素衍生物14b,收率为20.6%。HRMS(M+Na)⁺实测值:715.2593,计算值:715.2604 ¹H NMR(400MHz,CDCl₃)δ6.84(s,1H),6.79(s,1H),6.63(s,1H),6.42(dd,J=15.3,10.9Hz,1H),6.16(d,J=10.6Hz,1H),5.53(dd,J=15.5,8.8Hz,1H),4.88(d,J=9.1Hz,1H),4.26(t,J=10.9Hz,1H),3.99(s,3H),3.72(m,2H),3.51(m,1H),3.37(s,3H),3.19(s,3H),2.91(d,J=9.7Hz,1H),2.71(m,1H),2.53(m,1H),2.41(m,3H),2.20(d,1H),2.01(s,3H),1.73(m,2H),1.68(s,3H),1.61(d,J=13.7Hz,1H),1.46(m,1H),1.26(m,3H),0.82(s,3H)。

[0438] 美登醇的己二酸酯的N-羟基琥珀酰亚胺(13a)。

[0439] 反应烧瓶装有14b(5mg,0.007mmol)和二氯甲烷(1mL)。相继地将N-羟基琥珀酰亚胺(4.15mg,0.036mmol)和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(6.91mg,0.036mmol)加至搅拌的反应混合物。反应在室温下继续进行过夜。完成后,将反应物体积真空浓缩并且通过半制备型C18HPLC纯化产物。收集含有产物的级分,冷冻并冻干以得到0.91mg所需的携带N-羟基琥珀酰亚胺基酯基团的安丝菌素衍生物13a,收率为15.9%。HRMS(M+Na)⁺实测值:812.2763,计算值:812.2768。

[0440] 实施例26.如下制备含硫醇的安丝菌素衍生物6(参见图5)。

[0441] 美登醇的3-(甲基二硫代)丙酸酯(45)。

[0442] 反应烧瓶装有3-巯基丙酸(28,318mg,2.088mmol)、N,N'-二环己基碳二亚胺(431mg,2.088mmol)和二氯甲烷(2.0mL)。当相继加入4-二甲基氨基吡啶(85mg,0.696mmol)和美登醇(197mg,0.348mmol)时搅拌溶液。在室温下将反应物搅拌2h。2h后,将反应物过滤以除去沉淀并且真空浓缩。通过半制备型C18HPLC分离产物。将含有产物的级分合并并且浓缩至干以得到93mg(38.4%)的化合物45。HRMS(M+Na)⁺实测值:763.2448,计算值:763.2460。¹H NMR(400MHz,CDCl₃)δ6.84(s,1H),6.82(s,1H),6.45(dd,J=15.4,11.1Hz,1H),6.32(s,1H),6.19(d,J=11.0Hz,1H),5.54(dd,J=15.4,8.8Hz,1H),4.98(dd,J=11.9,2.6Hz,1H),4.23(t,J=11.2Hz,1H),3.99(s,3H),3.52(t,J=12.1Hz,2H),3.37(s,3H),3.20(m,2H),3.16(s,3H),2.89(m,2H),2.83(d,J=9.7Hz,1H),2.70(m,2H),2.52(m,1H),2.20(dd,J=13.9,2.4Hz,1H),1.72(m,1H),1.68(s,3H),1.62(d,J=13.5Hz,2H),1.48(m,1H),1.28(d,J=6.3Hz,3H),1.23(d,J=13.5Hz,1H),0.84(s,3H)。

[0443] ^{13}C NMR(101MHz, CDCl_3) δ 170.65, 168.66, 152.46, 149.47, 142.65, 140.20, 128.24, 124.63, 122.42, 119.58, 113.16, 88.22, 81.24, 74.46, 66.32, 60.48, 56.86, 56.73, 47.29, 38.48, 35.83, 34.38, 33.55, 32.93, 31.39, 24.86, 22.87, 22.31, 15.90, 14.76, 14.65, 12.22.

[0444] 美登醇的3-硫代丙酸酯(6)。

[0445] 在装备有搅拌棒的10mL圆底烧瓶中,制备45(45mg, 0.064mmol)在1,2-二甲氧基乙烷(3mL)中的溶液。然后加入D,L-二硫苏糖醇(49.6mg, 0.322mmol)在磷酸缓冲液(pH 7.5)(3mL, 100mM磷酸钾, 2mM EDTA)中的溶液。反应烧瓶装备有隔片并且在室温于氩气气氛下伴随搅拌继续进行反应直到完成。将反应物体积真空浓缩并且通过半制备型C18纯化来分离产物。在进行化合物洗脱后将含有产物的级分冷冻,并且冻干以得到4mg(9.5%收率)的化合物6,为白色固体。HRMS($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 实测值:675.2092, 计算值:675.2114 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 6.84(s, 1H), 6.77(s, 1H), 6.43(dd, $J=15.3, 11.0\text{Hz}$, 1H), 6.32(s, 1H), 6.17(d, $J=10.9\text{Hz}$, 1H), 5.52(dd, $J=15.4, 8.9\text{Hz}$, 1H), 4.89(dd, $J=11.9, 2.8\text{Hz}$, 1H), 4.24(t, $J=10.5\text{Hz}$, 1H), 4.15(m, 2H), 3.99(s, 3H), 3.52(dd, $J=16.5, 11.0\text{Hz}$, 1H), 3.37(s, 3H), 3.20(m, 2H), 3.16(s, 3H), 2.87(d, $J=9.7\text{Hz}$, 1H), 2.51(m, 1H), 2.34(m, 2H), 2.18(dd, $J=13.9, 2.7\text{Hz}$, 1H), 1.68(s, 3H), 1.63(d, $J=13.6\text{Hz}$, 1H), 1.46(m, 1H), 1.27(d, $J=6.3\text{Hz}$, 2H), 1.22(m, 1H), 0.97(m, 1H), 0.83(s, 3H)。 ^{13}C NMR(101MHz, CDCl_3) δ 170.35, 168.71, 156.18, 152.32, 142.66, 140.37, 140.14, 132.55, 128.14, 124.48, 122.33, 119.61, 113.15, 88.26, 81.21, 77.30, 74.42, 66.16, 60.49, 56.88, 56.72, 47.31, 38.67, 38.48, 35.85, 35.81, 32.95, 19.84, 15.93, 14.65, 12.27.

[0446] 实施例27.如下制备含硫醇的安丝菌素58(参见图13B)。

[0447] 2-(甲基二硫代)丙酸(56)。

[0448] 向装备有搅拌棒的圆底烧瓶装入2-巯基丙酸(1.99mL, 2.39g, 22.55mmol)和水(50.0mL)。当将碳酸钠(4.77g, 45.00mmol)缓慢加至反应烧瓶时搅拌溶液。分开地,在乙醇(50.0mL)中制备甲基硫代磺酸甲酯(2.77mL, 29.3mmol)的溶液并且将其缓慢加至搅拌的反应溶液中。在室温于氩气气氛下继续进行2h。反应完成后,将反应物体积真空减至原体积的1/2。使用1M HCl将剩余的水溶液酸化至pH 2并且用乙酸乙酯(2x250mL)萃取。将有机萃取液合并,用盐水洗涤并且真空浓缩以得到粗油状物。通过用己烷:乙酸乙酯:乙酸(50:49:1)的混合物洗脱的硅胶色谱纯化产物。将含有产物的级分合并并且真空浓缩以得到2.3g纯化的56,为无色油状物,收率为67%。 ^1H NMR(CDCl_3) δ 1.520(3H, d, $J=7.2\text{Hz}$), 2.446(3H, s), 3.559(1H, m)。

[0449] 美登醇的2-(甲基二硫代)丙酸酯(57)。

[0450] 圆底烧瓶装2-(甲基二硫代)丙酸(56, 303.3mg, 1.992mmol)、二氯甲烷(2mL)和搅拌棒。当搅拌溶液时,加入N,N'-二环己基碳二亚胺(438mg, 2.124mmol),然后相继加入4-二甲基氨基吡啶(86mg, 0.708mmol)和美登醇(200.0mg, 0.354mmol)。烧瓶装备有隔片并且在室温下将反应伴随搅拌继续进行。1h后将反应物用乙酸乙酯(20mL)稀释,过滤,相继用饱和碳酸氢钠溶液(10mL)和盐水(5mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并且真空浓缩。通过用0.1%甲酸水溶液中的乙腈的线性梯度洗脱的半制备型C18 HPLC来分离产物。收集含有产物的级分,合并并且真空浓缩以得到8.53mg化合物57,收率为3.3%。HRMS($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 实测值:721.1998,

计算值:721.1991 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 6.91(d, $J=1.4\text{Hz}$, 1H), 6.83(s, 1H), 6.42(dd, $J=15.4, 11.0\text{Hz}$, 1H), 6.31(s, 1H), 6.16(d, $J=10.9\text{Hz}$, 1H), 5.54(dd, $J=15.5, 9.0\text{Hz}$, 1H), 4.91(dd, $J=12.0, 3.0\text{Hz}$, 1H), 4.26(t, $J=11.0\text{Hz}$, 1H), 3.99(s, 3H), 3.65(dd, $J=14.5, 7.2\text{Hz}$, 1H), 3.51(dd, $J=10.6, 7.9\text{Hz}$, 1H), 3.36(d, $J=3.6\text{Hz}$, 3H), 3.19(s, 3H), 2.86(m, 1H), 2.57(dd, $J=14.1, 12.0\text{Hz}$, 1H), 2.49(s, 3H), 2.24(m, 1H), 1.89(m, 1H), 1.78(d, $J=7.1\text{Hz}$, 1H), 1.69(s, 3H), 1.68(d, $J=3.1\text{Hz}$, 3H), 1.65(d, $J=4.1\text{Hz}$, 1H), 1.47(m, 1H), 1.29(d, $J=6.2\text{Hz}$, 3H), 1.25(s, 1H), 0.82(s, 3H)。

[0451] 美登醇的2-(硫代)丙酸酯(58)。

[0452] 圆底烧瓶装含有57(8mg, 0.011mmol)、1,2-二甲氧基乙烷(1mL)并且装备有搅拌棒。分开地,在磷酸缓冲液(pH 7.5)(3mL, 100mM磷酸钾, 2mM EDTA)中制备D,L-二硫苏糖醇(5.29mg, 0.034mmol)的溶液并且将其加至反应烧瓶。在室温于氩气气氛下将反应伴随搅拌继续进行直到完成。完成后(90min.),将反应混合物真空蒸发至干并且通过半制备型C18HPLC纯化。收集产物,冷冻并冻干以得到以97.1%纯度分离的1.6mg化合物58,收率为18.2%。MS计算值($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 675.2;实测值, 676.2, MS计算值($\text{M}-\text{H}$) $^-$ 651.1;实测值, 651.2。

[0453] 实施例28.如下制备含硫醇的安丝菌素55(参见图13A)。

[0454] 6-(甲基二硫烷基)己酸(53)。

[0455] 将反应烧瓶在冰浴中冷却并且装有6-巯基己酸(500mg, 3.37mmol)和水(2mL)。当加入溶解于乙醇(1mL)中的甲基硫代磺酸甲酯(468mg, 3.71mmol)时搅拌溶液。在室温于氩气气氛下搅拌溶液过夜。然后将反应混合物用饱和氯化钠(400mL)稀释,并且萃取到醚(3x150mL)中。将合并的萃取液用氯化钠溶液洗涤,经无水硫酸钠干燥并且真空浓缩。通过用己烷:乙酸乙酯:乙酸的1:0.9:0.1混合物洗脱的硅胶快速色谱法分离产物,以得到482mg(73.5%收率)化合物53。 ^1H NMR(CDCl_3 , 参考(ref.)) δ 1.473(2H, m), 1.702(4H, m), 2.359(2H, t), 2.405(3H, s), 2.708(2H, t)。

[0456] 美登醇的6-(甲基二硫代)己酸酯(54)。

[0457] 反应烧瓶装含有6-(甲基二硫烷基)己酸(53, 413mg, 2.124mmol)和二氯甲烷(2.0mL)。将搅拌溶液相继用N,N'-二环己基碳二亚胺(438mg, 2.124mmol)、4-二甲基氨基吡啶(86mg, 0.708mmol)和美登醇(200mg, 0.354mmol)处理。在室温下将反应伴随搅拌继续进行过夜。过滤反应混合物,真空浓缩,并且通过半制备型C18HPLC纯化以得到36.7mg 54,收率为13.9%。HRMS($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 实测值:763.2448, 计算值:763.2460 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 6.83(s, 1H), 6.77(s, 1H), 6.44(m, 1H), 6.39(s, 1H), 6.15(d, $J=11.2\text{Hz}$, 1H), 5.49(m, 1H), 4.89(dd, $J=11.8, 2.6\text{Hz}$, 1H), 4.24(t, $J=10.5\text{Hz}$, 1H), 3.98(s, 3H), 3.51(m, 1H), 3.36(s, 3H), 3.20(d, 1H), 3.17(s, 3H), 2.87(m, 1H), 2.69(m, 2H), 2.50(m, 2H), 2.42(s, 3H), 2.39(s, 1H), 2.39(s, 1H), 2.34(m, 1H), 2.17(d, 1H), 2.00(s, 3H), 1.72(m, 6H), 1.45(m, 2H), 1.27(d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H), 0.82(s, 3H)。 ^{13}C NMR(101MHz, CDCl_3) δ 172.04, 168.97, 159.49, 156.21, 152.51, 151.65, 142.70, 140.17, 132.50, 128.19, 124.60, 122.23, 113.13, 88.32, 81.14, 74.47, 66.44, 60.49, 56.72, 47.35, 44.03, 38.60, 38.03, 35.76, 34.05, 32.91, 28.93, 27.90, 25.37, 24.36, 23.30, 22.30, 15.92, 14.67, 12.23。

[0458] 美登醇的6-巯基己酸酯(55)。

[0459] 于装备有搅拌棒的10mL圆底烧瓶中将携带二硫化物的安丝菌素衍生物54

(30.0mg, 0.040mmol)溶解于1,2-二甲氧基乙烷(3mL)中。在磷酸缓冲液(pH 7.5)(3mL, 100mM磷酸钾, 2mM EDTA)中加入D,L-二硫苏糖醇(31.2mg, 0.202mmol)。反应烧瓶装隔片并且在室温于氩气气氛下将反应伴随搅拌继续进行3.5h。通过半制备型C18HPLC纯化来分离产物。洗脱之后将产物冷冻,并且冻干以得到12.5mg(44.6%收率)的55。HRMS(M+Na)⁺实测值:717.2563,计算值:717.2583 ¹H NMR(400MHz, CDCl₃)δ6.84(d, J=1.5Hz, 1H), 6.77(d, J=1.5Hz, 1H), 6.44(dd, J=15.4, 11.0Hz, 1H), 6.34(s, 1H), 6.16(d, J=11.2Hz, 1H), 5.49(dd, J=15.4, 8.9Hz, 1H), 4.89(dd, J=11.9, 2.8Hz, 1H), 4.25(t, J=10.5Hz, 1H), 3.99(s, 3H), 3.72(q, J=7.0Hz, 1H), 3.51(m, 1H), 3.37(s, 3H), 3.21(d, J=12.8Hz, 1H), 3.17(s, 3H), 2.88(m, 1H), 2.52(m, 6H), 2.35(m, 1H), 2.19(dd, J=13.7, 2.7Hz, 1H), 1.66(d, J=7.3Hz, 3H), 1.61(m, 2H), 1.46(m, 4H), 1.36(m, 1H), 1.26(m, 3H), 0.83(s, 3H)。¹³C NMR(101MHz, CDCl₃)δ172.04, 168.82, 156.22, 152.41, 142.72, 140.19, 132.51, 128.17, 124.58, 122.22, 119.67, 113.12, 88.34, 81.14, 74.45, 66.47, 60.46, 56.73, 47.37, 44.03, 38.61, 35.75, 34.07, 33.66, 32.91, 29.85, 29.43, 28.70, 28.32, 27.81, 24.41, 15.92, 14.67, 12.23。

[0460] 实施例29.如下制备含硫醇的安丝菌素衍生物19(参见图6B)。

[0461] 4-((甲基二硫烷基)甲基)苯甲酸(37b)

[0462] 将4-(巯基甲基)苯甲酸(36, 500mg, 2.97mmol)溶解于水(10mL)中并且在冰浴中冷却。当加入溶解于乙醇(5.00mL)中的甲基硫代磺酸甲酯(413mg, 3.27mmol)时搅拌经冷却的溶液。添加后,去除冷却浴并且在室温下将反应物搅拌过夜。继续进行过夜后,将反应物用饱和氯化钠稀释并且用醚萃取。将合并的萃取液用氯化钠洗涤,经无水硫酸钠干燥,并且真空浓缩。通过使用含有1%乙酸的在己烷中的40-60%乙酸乙酯洗脱20min的硅胶快速色谱法来分离产物,以得到482mg的所需产物4-((甲基二硫烷基)甲基)苯甲酸(37b),收率为73.5%。¹H NMR(CDCl₃)δ2.121(3H, s), 3.938(2H, s), 7.457(2H, d, J=8.4Hz), 8.068(2H, d, J=8Hz)。

[0463] 美登醇的4-((甲基二硫烷基)甲基)苯甲酸酯(59)。

[0464] 将4-((甲基二硫烷基)甲基)苯甲酸(37b, 228mg, 1.062mmol)在二氯甲烷(2.0mL)中的溶液相继用N,N'-二环己基碳二亚胺(219mg, 1.062mmol)、4-二甲基氨基吡啶(43.2mg, 0.354mmol)和美登醇(100mg, 0.177mmol)处理。将反应伴随搅拌继续进行72h,之后过滤反应混合物,真空浓缩并且通过半制备型C18HPLC纯化,以得到3.4mg化合物59(2.5%收率)。HRMS(M+Na)⁺实测值:783.2155,计算值:783.2147 ¹H NMR(400MHz, CDCl₃)δ8.03(d, J=8.2Hz, 2H), 7.49(d, J=8.2Hz, 2H), 7.05(d, J=1.5Hz, 1H), 6.85(d, J=1.5Hz, 1H), 6.28(dd, J=15.4, 10.9Hz, 1H), 6.12(s, 1H), 5.88(d, J=10.8Hz, 1H), 5.02(dd, J=12.0, 3.3Hz, 1H), 4.78(dd, J=15.4, 9.1Hz, 1H), 4.27(t, J=10.4Hz, 1H), 4.00(s, 3H), 3.97(s, 2H), 3.48(d, J=12.9Hz, 1H), 3.34(d, J=9.1Hz, 1H), 3.23(s, 3H), 3.19(s, 3H), 3.14(d, J=9.6Hz, 1H), 2.75(t, J=13.2Hz, 1H), 2.33(dd, J=14.3, 3.2Hz, 1H), 2.23(s, 3H), 1.66(s, 3H), 1.59(d, J=13.3Hz, 1H), 1.53-1.36(m, 1H), 1.31(d, J=6.3Hz, 3H), 1.14(t, J=12.9Hz, 2H), 0.84(s, 3H)。

[0465] 美登醇的4-巯基甲基苯甲酸酯(19)。

[0466] 10mL圆底烧瓶装59(3mg, 0.004mmol)、1,2-二甲氧基乙烷(3mL)和搅拌棒。分开

地,制备D,L-二硫苏糖醇(3.04mg,0.020mmol)在磷酸缓冲液(pH 7.5)(3mL,100mM磷酸钾,2mM EDTA)中的溶液并且将其加至反应烧瓶。反应烧瓶装备有隔片,并且在室温于氩气气氛下将反应伴随搅拌继续进行3.5h。然后将反应物体积真空浓缩并且通过半制备型C18纯化来分离产物。洗脱之后将含有产物的级分冷冻并且冻干以得到1.4mg化合物19,为白色固体(35.5%收率)。HRMS(M+Na)⁺实测值:737.2269,计算值:737.2270

[0467] 实施例30.如下制备聚乙二醇化硫醇反应性安丝菌素60(参见图7B)。

[0468] 美登醇的PEG₄-SPDP酯(60)。

[0469] 10mL圆底烧瓶装是有SPDP-dPEG₄-酸(Quanta Biodesign,Ltd.,Cat.#10373,100mg,0.216mmol)和二氯甲烷(2mL)。烧瓶装备有搅拌棒并且当加入N,N'-二环己基碳二亚胺(134mg,0.648mmol)时搅拌溶液。然后相继加入美登醇(61.0mg,0.108mmol)和4-二甲基氨基吡啶(26.4mg,0.216mmol)。烧瓶装备有隔片并且在室温下将反应伴随搅拌继续进行。2.5h后过滤粗反应混合物,真空浓缩并且通过半制备型C18HPLC纯化。将含有产物的级分合并并且真空浓缩以得到30mg化合物60,为澄清油状物,收率为27%。MS计算值(M+Na)⁺,1031.3;实测值,1031.3;MS计算值(M+Cl)⁻,1043.3;实测值,1043.2 ¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ 8.43(d,J=4.1Hz,1H),7.67(m,2H),7.08(m,1H),6.82(s,1H),6.76(d,J=1.3Hz,1H),6.65(s,1H),6.42(dd,J=15.4,11.0Hz,1H),6.20(d,J=11.0Hz,1H),5.61(dd,J=15.5,8.9Hz,1H),4.93(dd,J=11.8,2.5Hz,1H),4.55(s,1H),4.24(t,J=11.2Hz,1H),3.97(s,3H),3.87(m,1H),3.63(m,8H),3.50(m,3H),3.32(s,3H),3.15(s,3H),3.07(m,2H),2.81(d,J=9.5Hz,2H),2.70(m,1H),2.62(m,2H),2.48(m,1H),2.16(dd,J=13.9,2.4Hz,1H),1.91(m,1H),1.69(m,2H),1.65(s,3H),1.59(m,2H),1.47(m,1H),1.32(m,2H),1.26(d,J=6.4Hz,3H),1.10(m,4H),0.84(s,3H)。¹³C NMR(101MHz,CDCl₃) δ 171.03,170.01,168.76,160.03,156.94,156.09,152.88,149.71,142.59,140.33,139.72,137.28,132.21,128.87,124.74,122.27,120.91,119.91,119.46,113.15,88.79,80.87,74.44,70.92,70.57,70.47,70.34,70.13,69.91,66.38,66.17,60.60,56.80,56.69,49.24,47.20,39.41,38.39,35.72,35.55,34.62,34.08,25.76,25.08,15.82,14.68,12.19。

[0470] 实施例31.如下制备安丝菌素衍生物64a和64b(参见图13C)。

[0471] 3,7-二甲基氧杂环庚烷-2-酮(61)。

[0472] 250mL圆底烧瓶装入2,6-二甲基环己酮(2.162mL,2.0g,15.85mmol)和126mL 1:1甲醇/水混合物。当加入单过氧酞酸镁六水合物(MMPP,15.68g,31.7mmol)和碳酸氢钠(2.66g,31.7mmol)时搅拌溶液。在室温下将反应伴随搅拌继续进行。第二天,将粗产物萃取到乙酸乙酯中,相继用饱和碳酸氢钠溶液、盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥,然后真空浓缩以得到1.07g(47.5%收率)的3,7-二甲基氧杂环庚烷-2-酮(61),为澄清无色油状物。

[0473] 6-巯基-2-甲基庚酸(62)。

[0474] 装备有搅拌棒的10mL圆底烧瓶装3,7-二甲基氧杂环庚烷-2-酮(61,0.729g,5.13mmol)、氢碘酸(2.029mL,15.38mmol)和硫脲(2.73g,35.91mmol)。烧瓶装冷却水的水冷凝器,置于氮气气氛下并加热至回流。在回流下将反应继续进行过夜。然后将在水(5mL)中的氢氧化钠(3.69g,92mmol)溶液加至反应烧瓶。将反应物回流过夜。将反应混合物从热移除,冷却至室温,并且将烧瓶内容物转移至分液漏斗。将水层用乙酸乙酯萃取并且将萃取液放一边静置。将水层用HCl 酸化至pH 2并且用乙酸乙酯(2x100mL)和二氯甲烷(1x100mL)

萃取。将有机萃取液合并,用30mL盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥并且真空浓缩以得到823mg粗6-巯基-2-甲基庚酸(62,92%收率),为浅褐色油状物。

[0475] 2-甲基-6-(甲基二硫烷基)庚酸(63)。

[0476] 100mL圆底烧瓶装有粗6-巯基-2-甲基庚酸(62,832.3mg,4.72mmol)和水(30mL)。将碳酸钠(1.001g,9.44mmol)加至搅拌溶液。分开地,在乙醇(30mL)中制备甲基硫代磺酸甲酯(0.668mL,7.08mmol)的溶液并且将其缓慢加至搅拌的反应混合物。添加完成后,将反应烧瓶装备有隔片并且在氩气气氛下放置。将反应混合物在室温下搅拌3h。

[0477] 3h后将反应物体积真空减半。将剩余的水相转移至分液漏斗并且用乙酸乙酯(2x40mL)萃取两次。当用浓HCl将水相酸化至pH 2时将有机萃取液放一边静置。酸化后,将水相用乙酸乙酯(3x70mL)萃取。合并有机萃取液并且将产物反萃取到饱和碳酸氢钠(3x100mL)中。合并含水萃取液并且用浓HCl将其酸化至pH 2。然后将经酸化的水相转移到分液漏斗,并且将产物萃取到乙酸乙酯(3x100mL)中。将有机萃取液合并,用50mL盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥,并且真空浓缩以得到粗黄色油状物。通过用己烷:乙酸乙酯:乙酸的66:33:1混合物洗脱的硅胶色谱法来纯化产物。将含有产物的级分合并并且真空浓缩以得到292mg化合物63,收率为28%。¹H NMR(CDCl₃) δ1.189(3H,d,J=7.2Hz),1.317(3H,d J=6.4Hz),1.442-1.706(6H,m),2.392(3H,s),2.475(1H,m),2.840(1H,m)。

[0478] 美登醇的2-甲基-6-(甲基二硫烷基)庚酸酯(64a和64b)。

[0479] 10mL圆底烧瓶装有美登醇(29.6mg,0.052mmol)、二氯甲烷(3mL)和搅拌棒。当加入2-甲基-6-(甲基二硫烷基)庚酸(63,69.9mg,0.314mmol),然后相继加入N,N'-二环己基碳二亚胺(64.8mg,0.314 mmol)和4-二甲基氨基吡啶(12.8mg,0.105mmol)时搅拌溶液。反应烧瓶装备有隔片并且在室温下将反应继续进行4h。将粗反应混合物转移至分液漏斗并且用乙酸乙酯稀释。将有机相用两部分的饱和碳酸氢钠洗涤,用盐水洗涤一次并且真空浓缩以得到粗黄色油状物。通过半制备型C18HPLC纯化产物。分开地收集对应于产物的外消旋体的两个峰并且真空浓缩以得到总计为4.7mg的合并的所需化合物(64a:2.1mg和64b:2.6mg)。MS (M+Na)⁺实测值64a:791.0,计算值:791.3;(M+Cl)⁻实测值64a:802.9,计算值:803.2。MS(M+Na)⁺实测值64b:791.1,计算值:791.3;(M+Cl)⁻实测值64b:802.9,计算值:803.2。

[0480] 实施例32.如下制备安丝菌素衍生物66(参见图10B)。

[0481] 美登醇的二甲基氨基丁酸酯(66)

[0482] 反应烧瓶装有4-(二甲基氨基)-丁酸HCl(93.5mg,0.558mmol)、N,N-二异丙基乙胺(15.45μL,0.088mmol)和二氯甲烷(0.2mL)。然后相继加入N,N'-二环己基碳二亚胺(110mg,0.531mmol)、4-二甲基氨基吡啶(21.62mg,0.177mmol)和美登醇(50mg,0.088mmol)。反应烧瓶装备有隔片并且在室温下将反应伴随搅拌继续进行72h。过滤粗反应混合物,真空浓缩并且通过半制备型C18HPLC纯化。收集含有产物的级分,合并并且真空浓缩以得到8.2mg(13.7%收率)化合物66。MS计算值(M+H)⁺;678.3;实测值,678.2。

[0483] 实施例23.安丝菌素衍生物的体外活性

[0484] 图28-30示出本发明的各种安丝菌素衍生物抵抗KB、COLO 205和COLO 205-MDR细胞系的细胞毒性活性。携带二硫化物的安丝菌素衍生物45、54、57、59、64a和64b是有效的,其中抵抗KB细胞系的IC₅₀值在0.27nM至4nM的范围内(图28a-d)。当抵抗人结肠癌细胞系COLO 205测试时,携带二硫化物的安丝菌素衍生物54和59显示类似的效力,所测量的IC₅₀值

分别为0.31nM和0.53nM。

[0485] 抵抗KB、COLO 205和COLO 205-MDR细胞系评价合成的化合物13a的前体—可连接的胺反应性安丝菌素衍生物。TMS-保护的前体14a抵抗三种细胞系的活性在0.40nM(抵抗COLO 205细胞)至4.8nM(抵抗COLO 205MDR细胞系)的范围内。在除去TMS保护基团之后,分离携带末端羧酸14b的安丝菌素衍生物并且抵抗KB细胞系体外评价。当与TMS-保护的前体相比时,观察到14b抵抗KB细胞系的活性下降15倍。效力的下降主要是由于荷电安丝菌素羧酸盐的细胞渗透性较差。然而,细胞内的递送可通过与细胞结合剂例如单克隆抗体偶联以增强效力。

[0486] 所测试化合物中,二甲基氨基丁酸安丝菌素衍生物66是抵抗三种细胞系的效力最低的化合物。所测量的该化合物抵抗非-MDR细胞系的 IC_{50} 为11-12nM,抵抗COLO 205MDR细胞系的 $IC_{50} > 20nM$ (图30)。

[0487] 实施例34.通过二硫化物连接子将抗体与携带巯基的安丝菌素衍生物偶联

[0488] 在DMA中制备携带巯基的安丝菌素衍生物55的溶液(8.4mM储备液,w/v)。将储备溶液在乙醇中稀释并且相对于乙醇和DMA的试剂空白,测量280nm下的吸光度。储备液55的浓度通过使用280nm下的吸光系数 $5,456M^{-1}$ (其是用实验方法确定的美登木素在该波长下的吸光系数)来计算。

[0489] 在室温下,将在pH 7.5 20mM磷酸钠、含有DMA(5%,v/v)的150mM氯化钠缓冲液中的抗-EpCam抗体(5mg/mL)与8倍摩尔过量的SPP(10mM于DMA中)反应3小时。然后用pH 6.5 20mM磷酸钠、50mM氯化钠、2mM EDTA缓冲液将经修饰的抗体稀释至2.5mg/mL并且用每摩尔过量的在修饰反应中所用的SPP的2倍摩尔过量的55处理。在室温下含有DMA(7.5%,v/v)的pH 6.5缓冲液中进行偶联反应20小时。然后在NAP-25(Sephadex G25)柱上纯化、透析并且过滤偶联物,所述柱在由10mM组氨酸、250mM甘氨酸、1%蔗糖(pH 5.5)组成的缓冲液中平衡。透析之后,偶联物具有每抗体分子连接的3.8个安丝菌素分子。使用所测量的偶联物在252nm和280nm下的吸光度以及使用已知的美登木素和抗体在这两个波长下的吸光系数,测定最终偶联物中每抗体分子的安丝菌素分子的数目。对偶联物进行SEC HPLC,显示其在偶联后为86%单体。

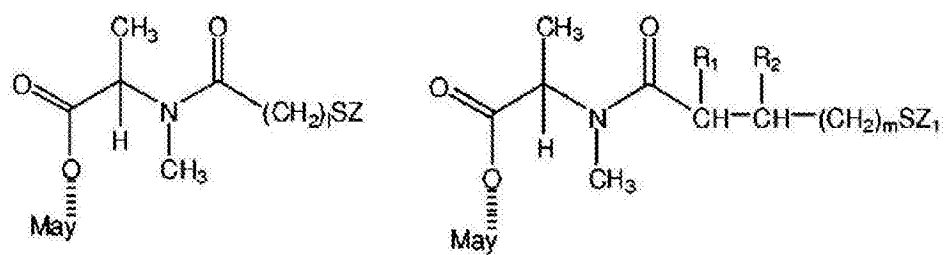
[0490] 实施例34.抗体与胺反应性安丝菌素衍生物的偶联

[0491] 在DMA中制备胺反应性安丝菌素衍生物13a的5mM储备液(w/v)。在乙醇中稀释储备溶液并且相对于乙醇和DMA的试剂空白,测量280nm下的吸光度。储备液13a的浓度通过使用280nm下的吸光系数 $5,456M^{-1}$ (其是用实验方法确定的美登木素在该波长下的吸光系数)来计算。

[0492] 在室温下,将抗-EpCam抗体在pH 7.5 20mM磷酸钠、含有DMA(10%,v/v)的150mM氯化钠缓冲液中与12倍摩尔过量的13a(2.5mg/mL)偶联4.5小时。然后在NAP-10(Sephadex G25)柱上纯化、透析并且过滤偶联物,所述柱在由10mM组氨酸、250mM甘氨酸、1%蔗糖(pH 5.5)组成的缓冲液中平衡。透析之后,偶联物具有每抗体分子连接的3.3个安丝菌素分子并且未在偶联物中检测出游离药物。使用所测量的偶联物在252nm和280nm下的吸光度以及使用已知的美登木素和抗体在这两个波长下的吸光系数,测定最终偶联物中每抗体分子的安丝菌素分子的数目(图20)。对偶联物进行SEC HPLC,显示其在偶联后为91%单体。

[0493] 实施例35.用安丝菌素衍生物和美登木素制备的偶联物的体外细胞毒性

[0494] 体外评价用可连接的安丝菌素衍生物55和13a制备的靶向EpCam抗原的偶联物抵抗表达EpCam的细胞系COL0 205的效力。二硫化物-连接的mAb-SPP-55偶联物是有效且特异的,所测量的活性为0.23nM(图31)。不可切割的安丝菌素偶联物mAb-13a的活性比二硫化物偶联物略高,其IC₅₀值为0.14nM(图31)。所测试的两种偶联物对所靶向的细胞系的抵抗是特异的,这由测试偶联物对COL0205细胞(所述COL0 205细胞在用抗-EpCam mAb-安丝菌素偶联物孵育之前用过量的未偶联的抗-EpCam抗体预处理)的抵抗时的活性损耗指示(图31)。



(May = 美登木素)

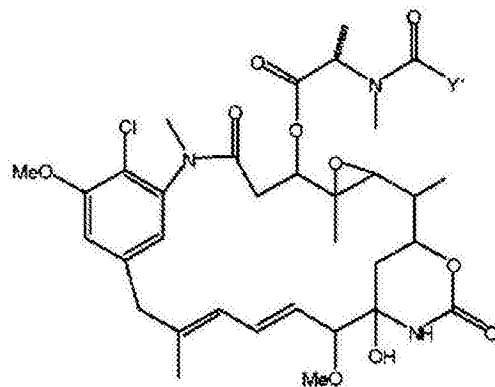
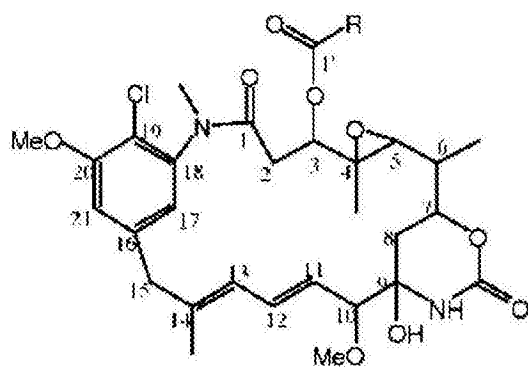


图1



安丝菌素 P1: $R = -CH_3$

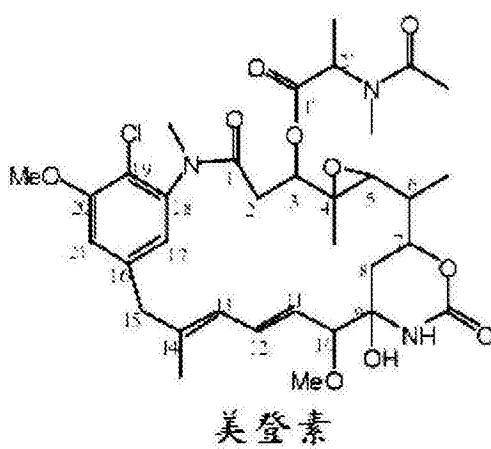
安丝菌素 P2: $R = -CH_2CH_3$

安丝菌素 P3: $R = -CH(CH_3)_2$

安丝菌素 P3': $R = -CH_2CH_2CH_3$

安丝菌素 P4: $R = -CH_2CH(CH_3)_2$

安丝菌素 P4': $R = -CH_2CH_2CH_2CH_3$



美登素

图2

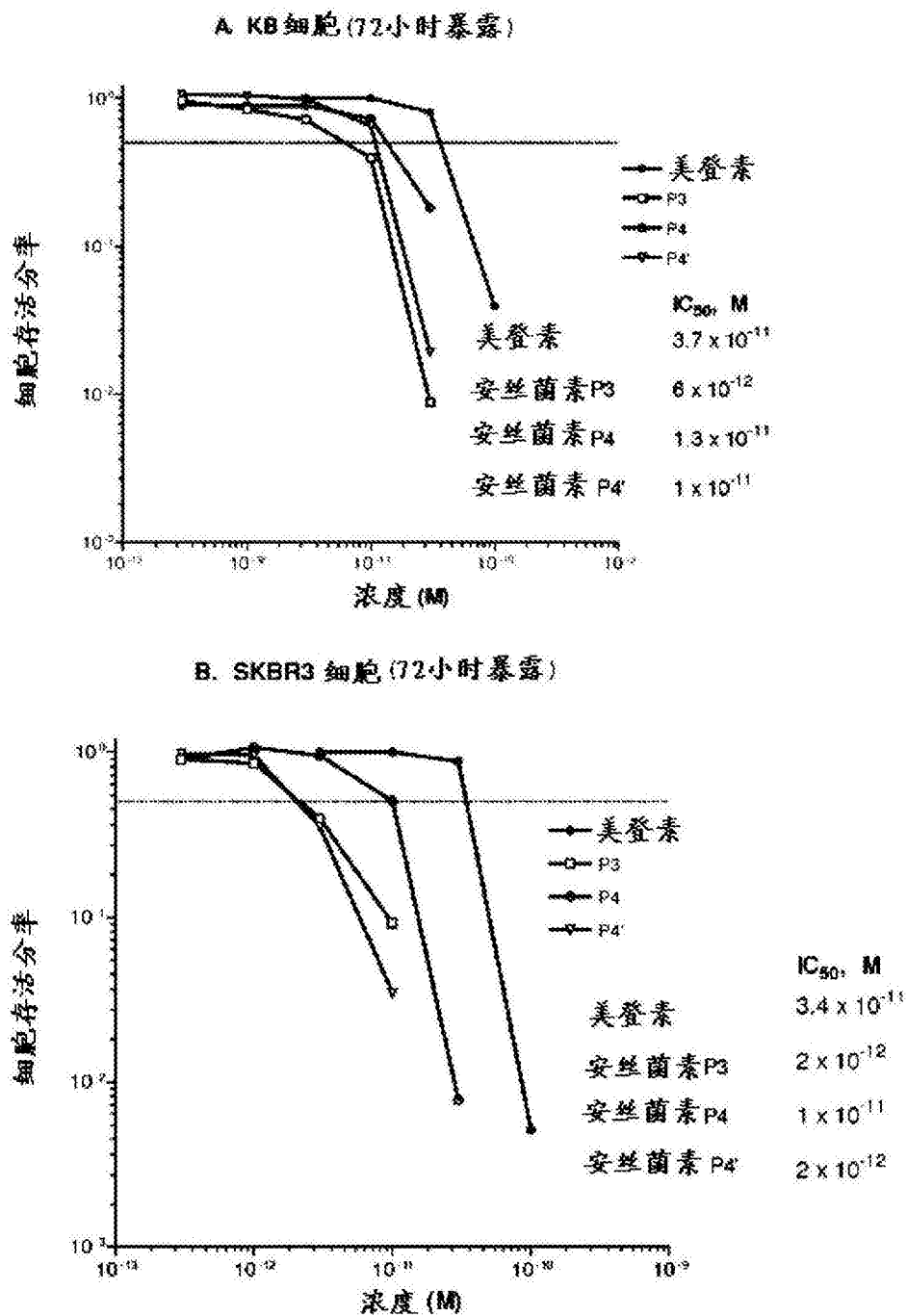
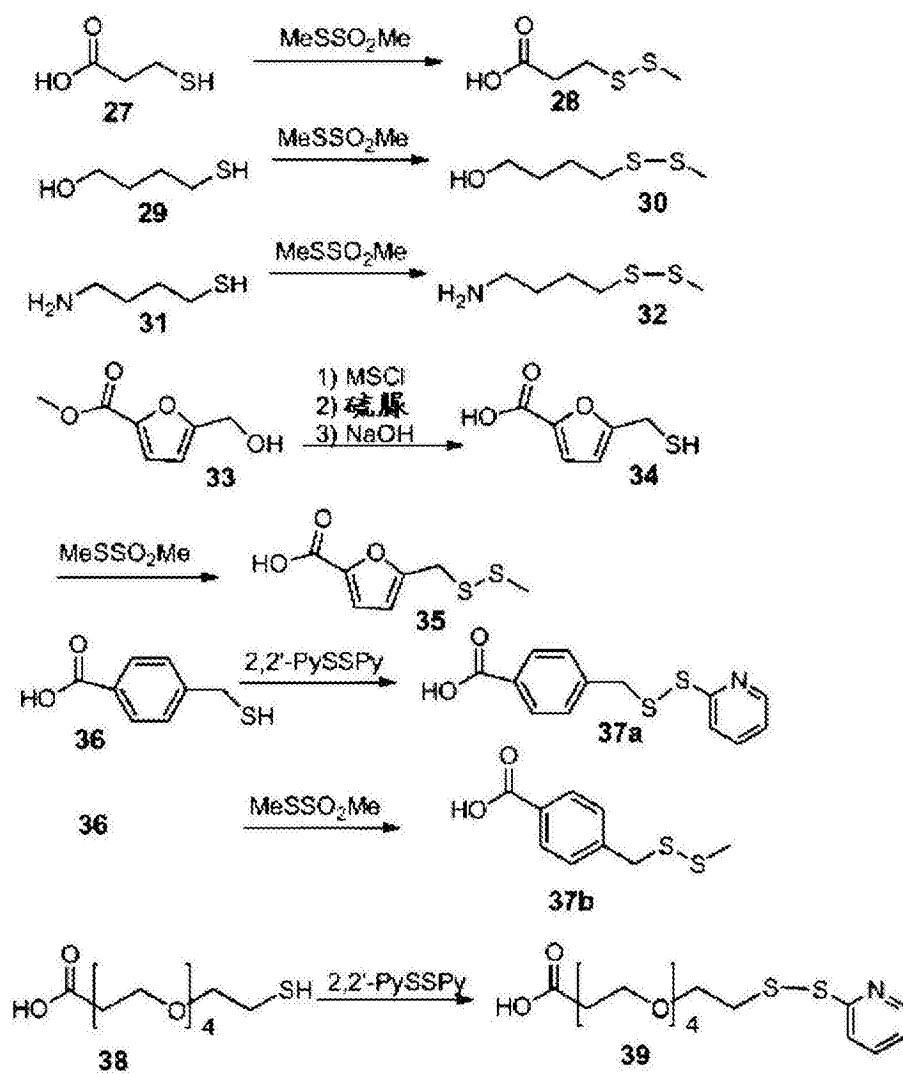
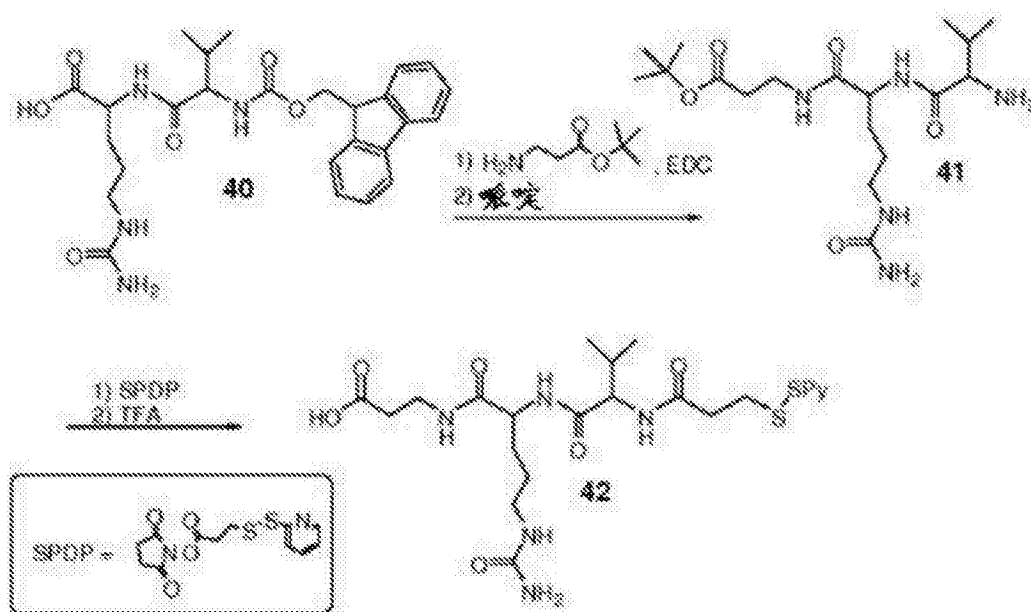


图3

A



B



C

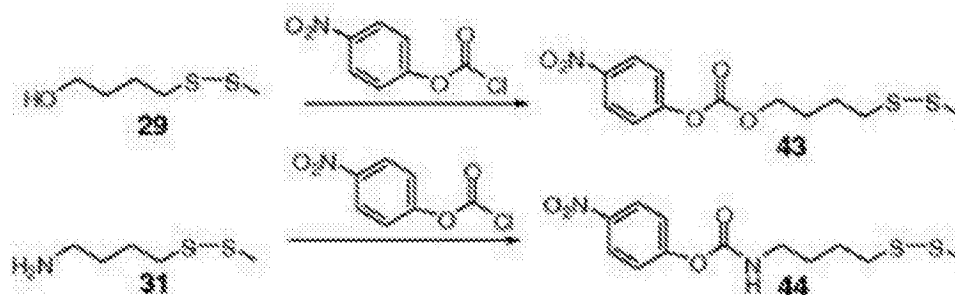


图4

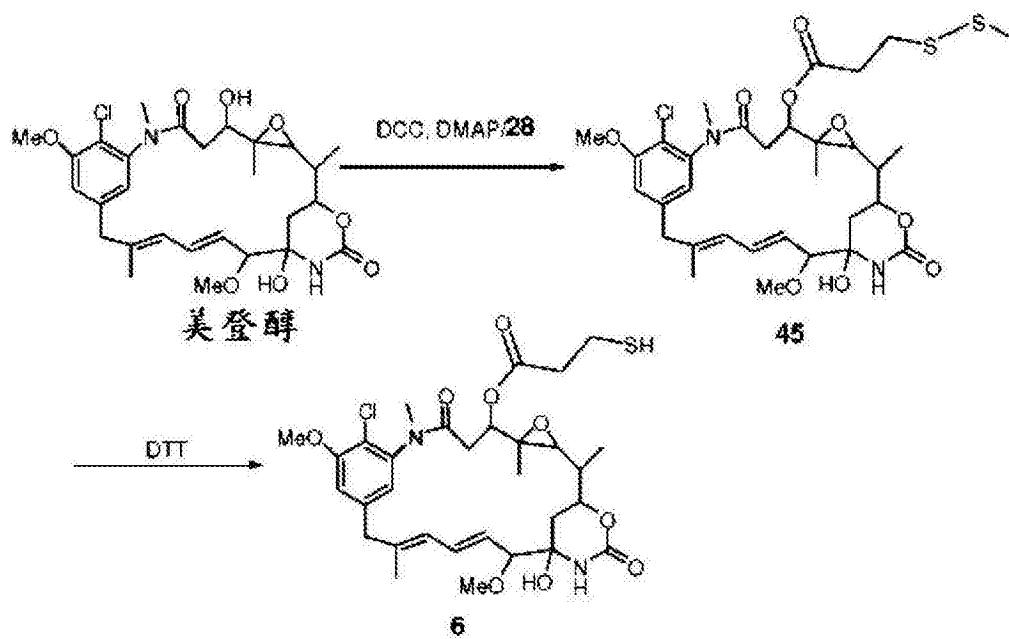
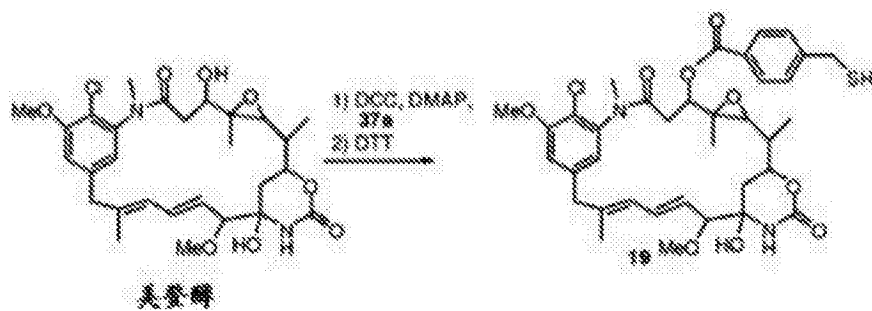
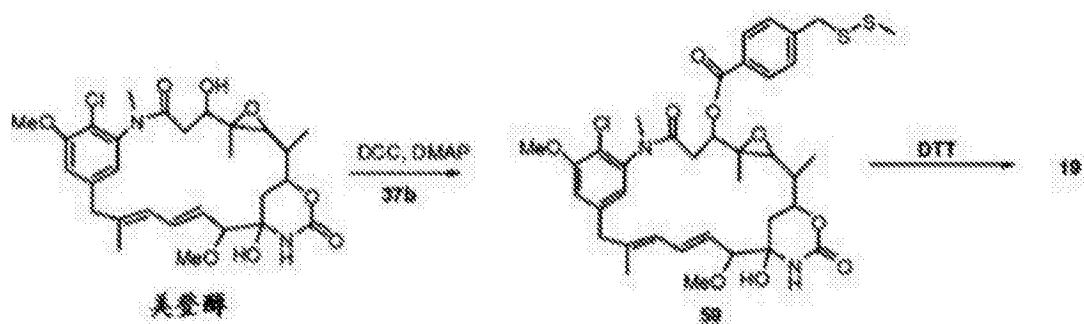


图5

A



B



C

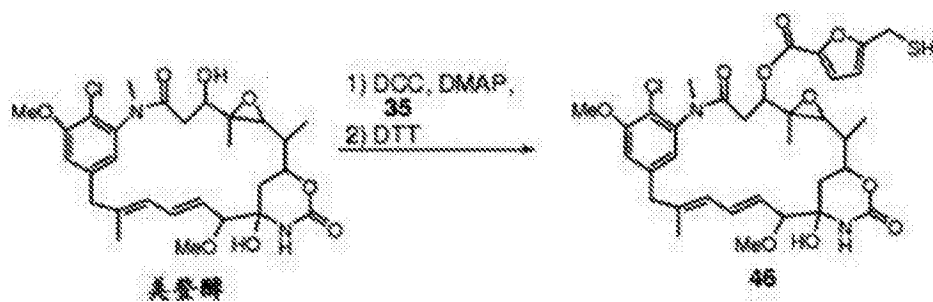
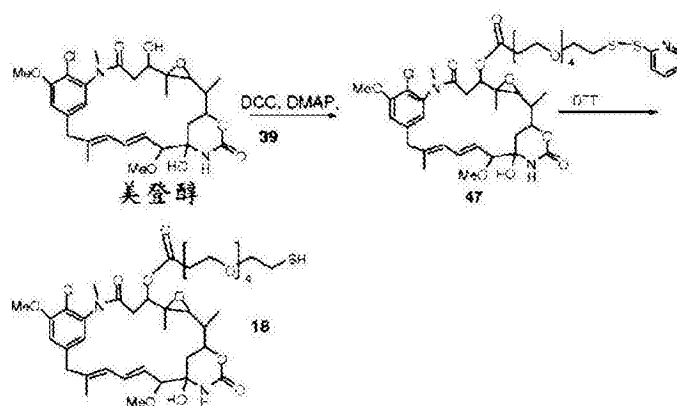


图6

A



B

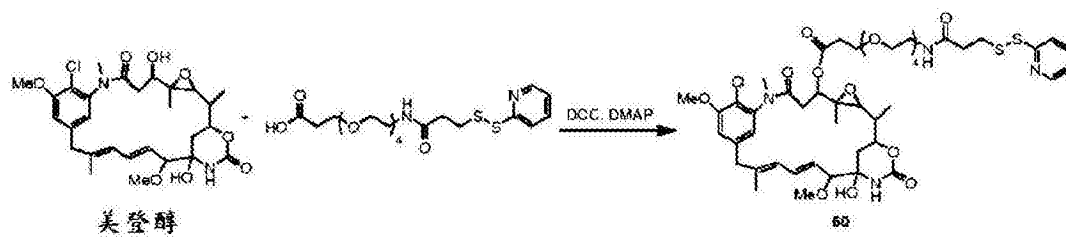


图7

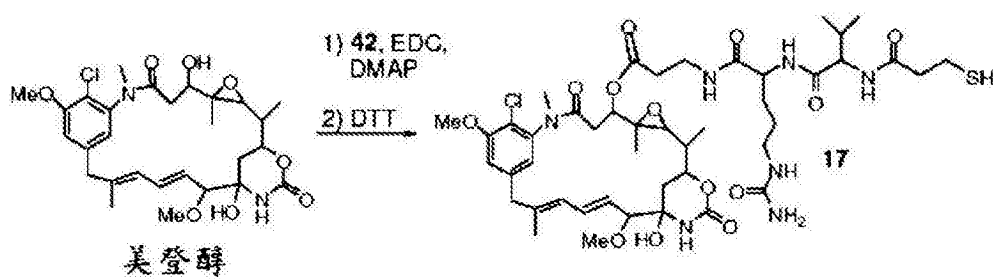


图8

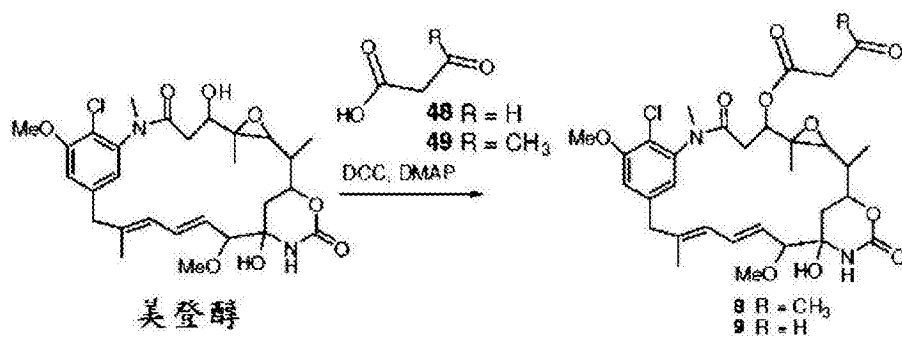
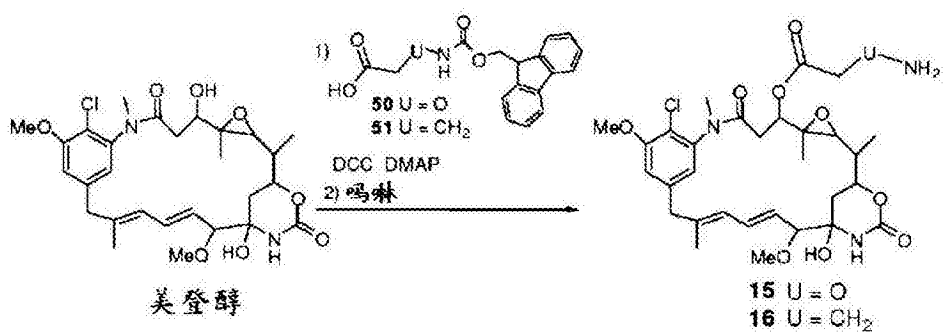


图9

A



B

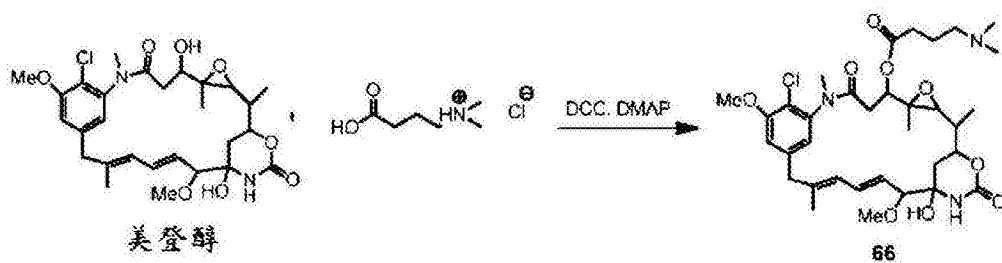


图10

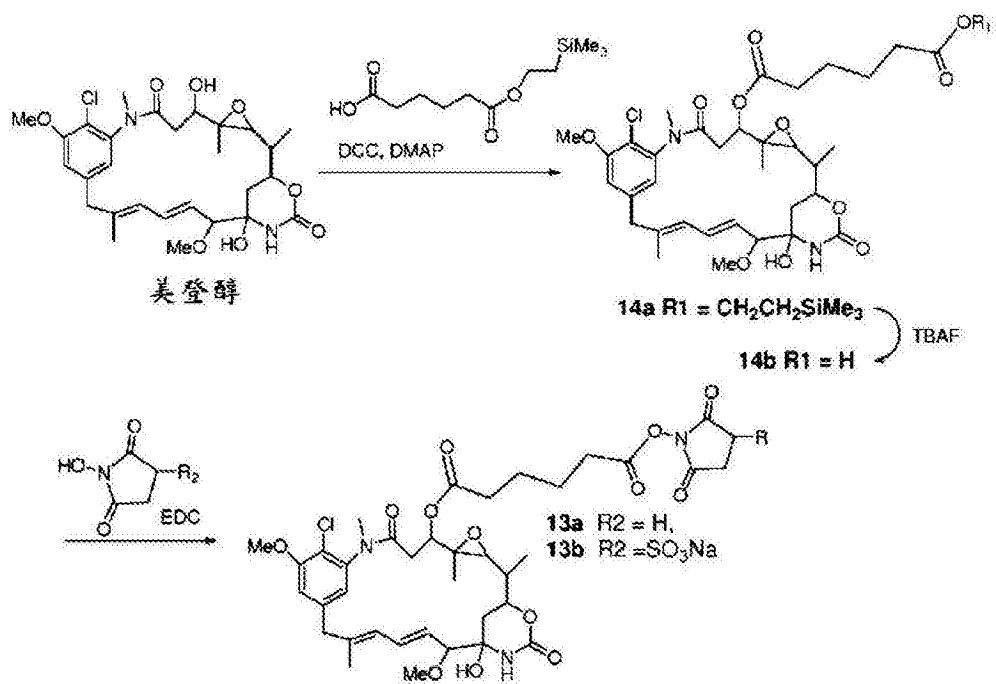
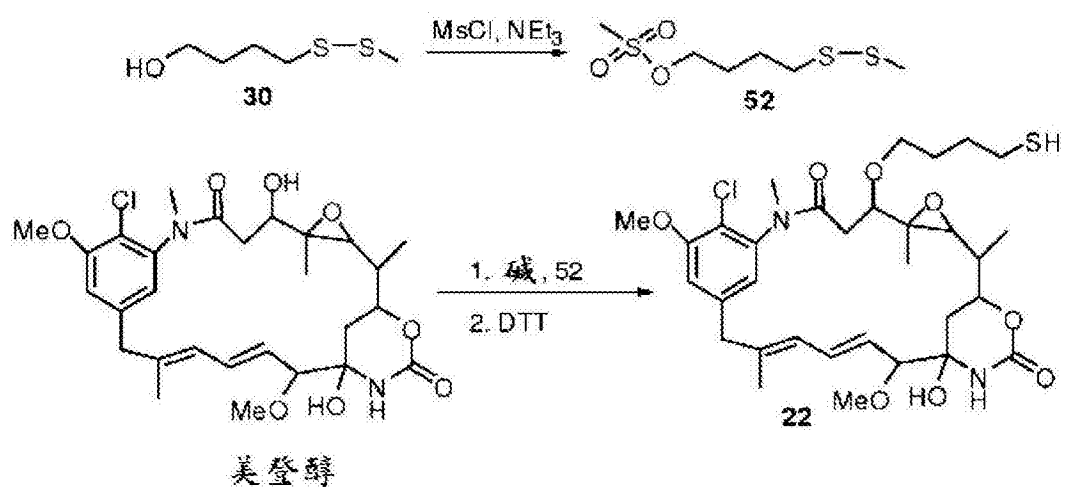


图11

A



B

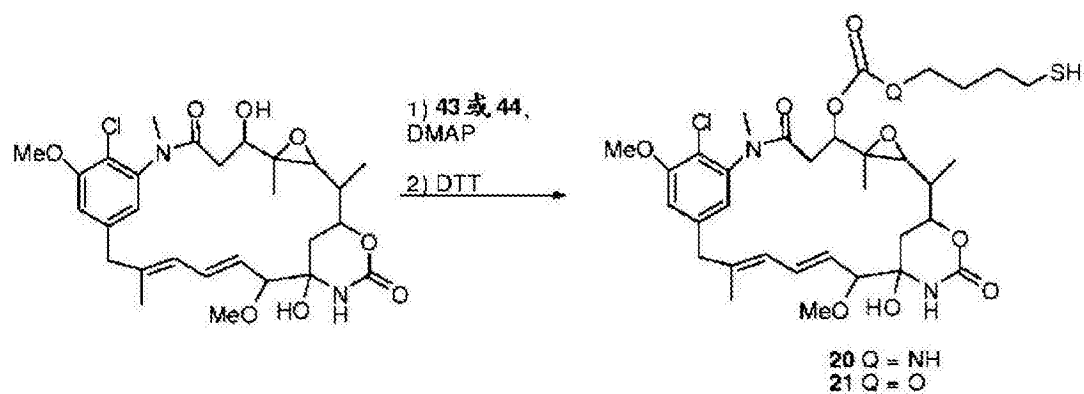
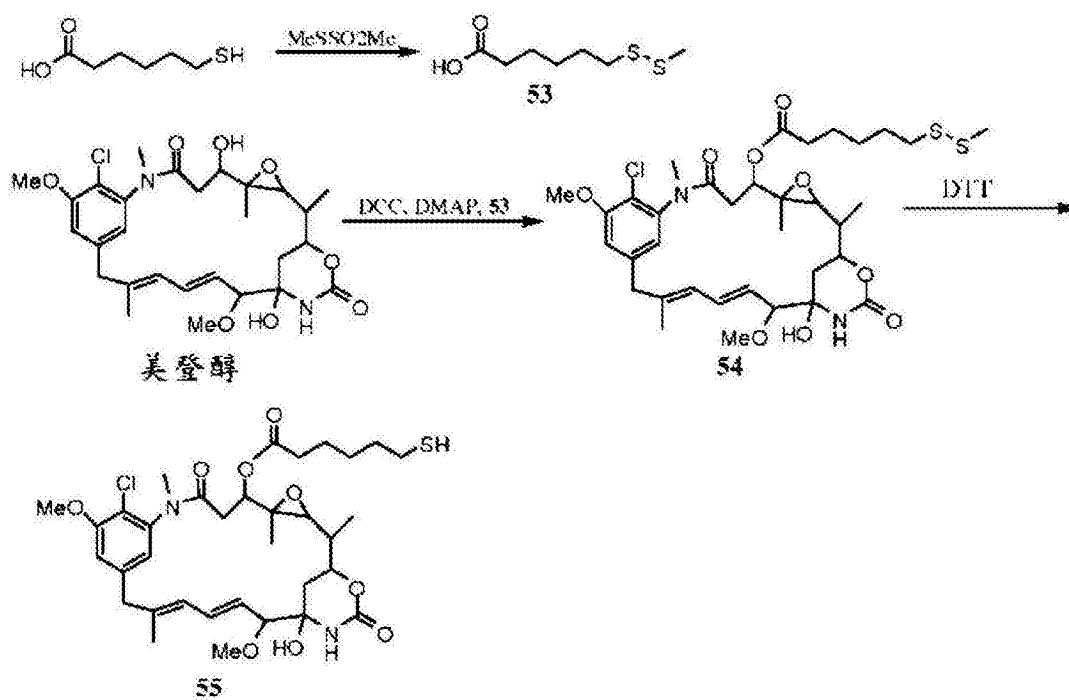
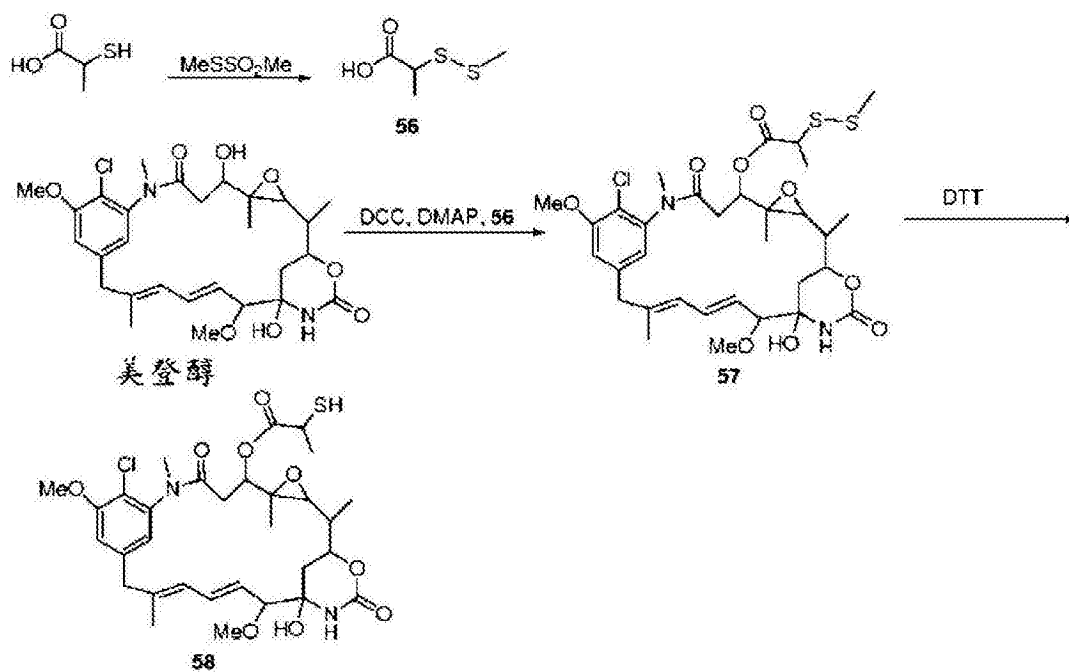


图12

A



B



C

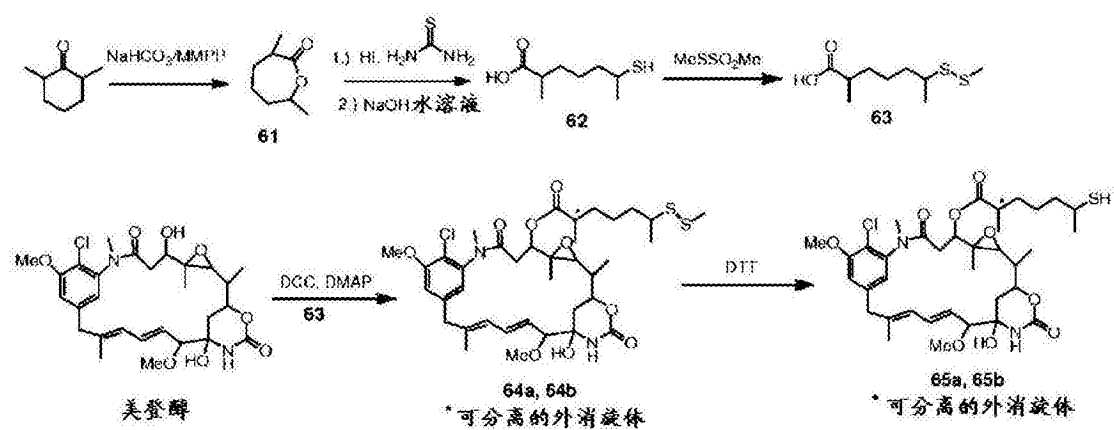


图13

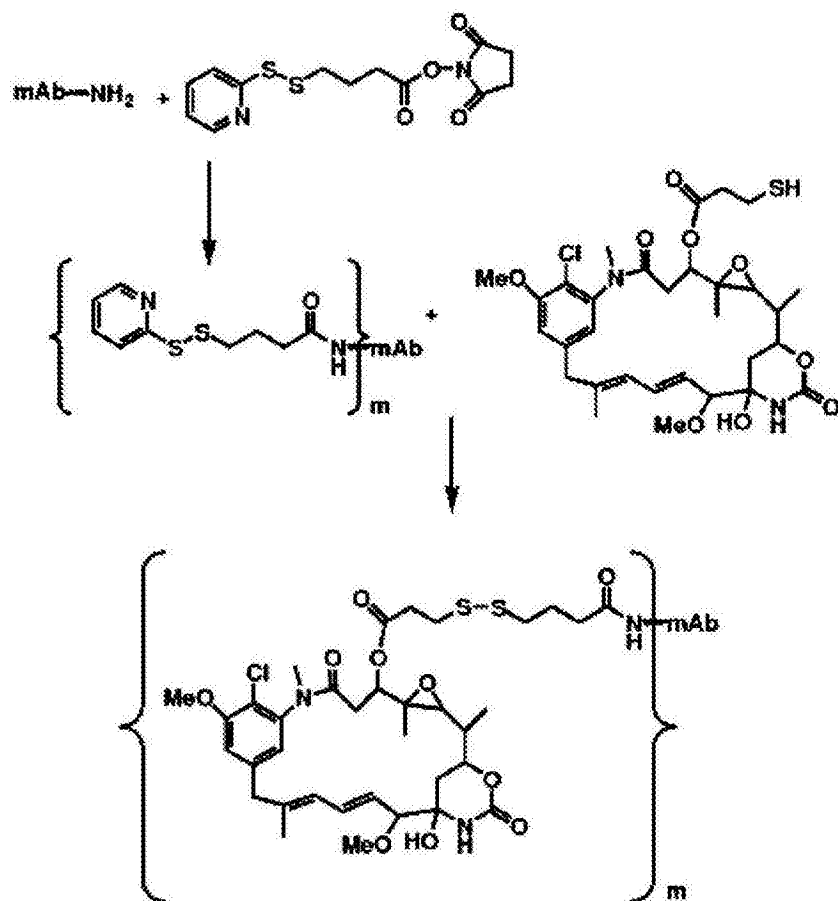


图14

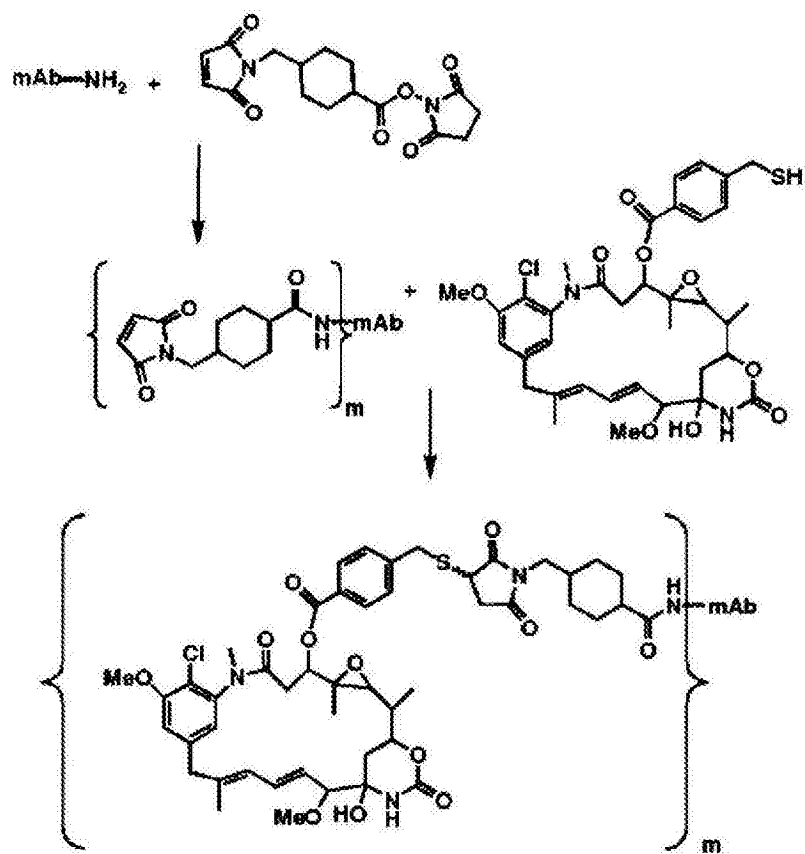


图15

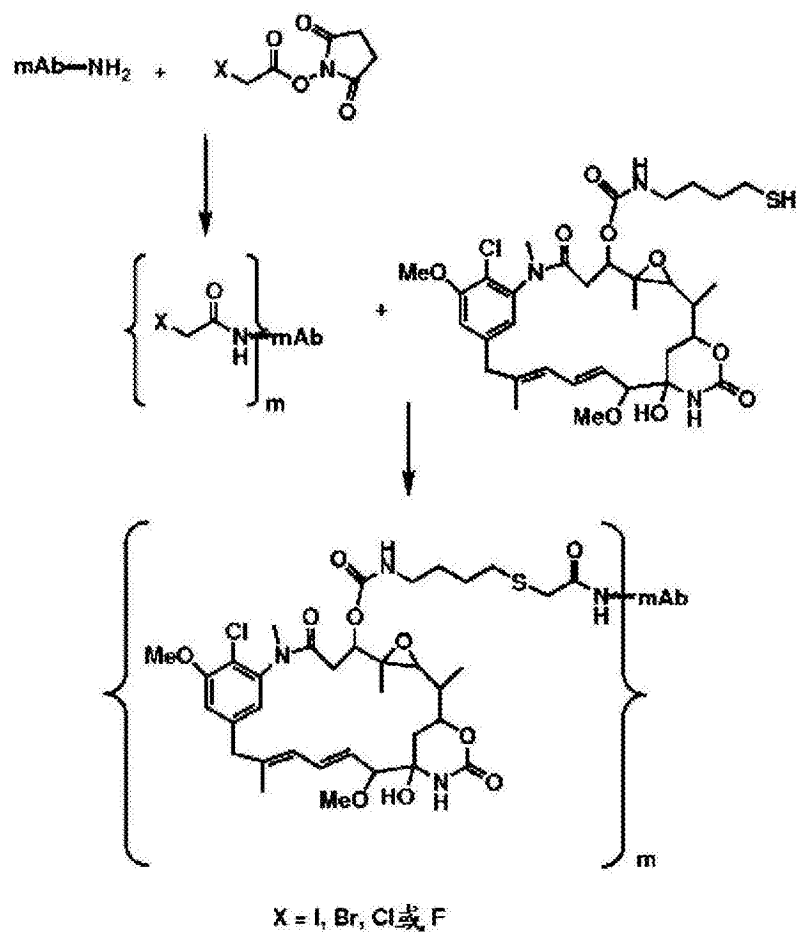


图16

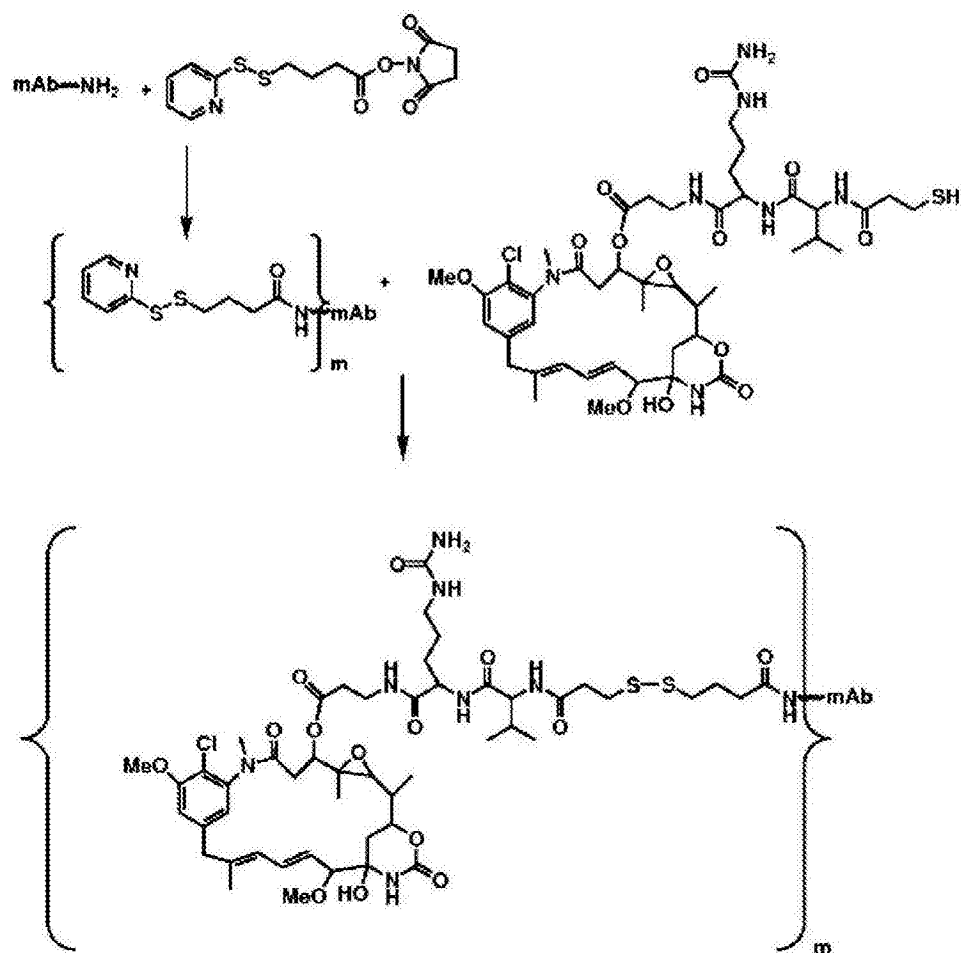


图17

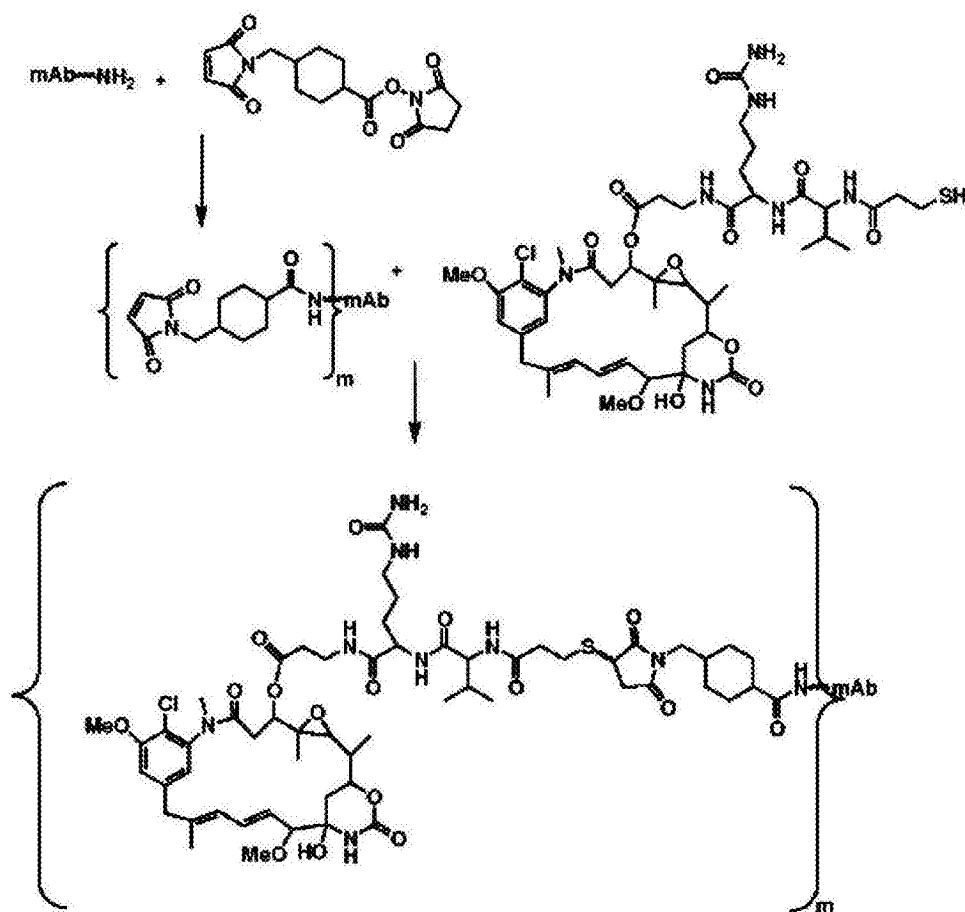


图18

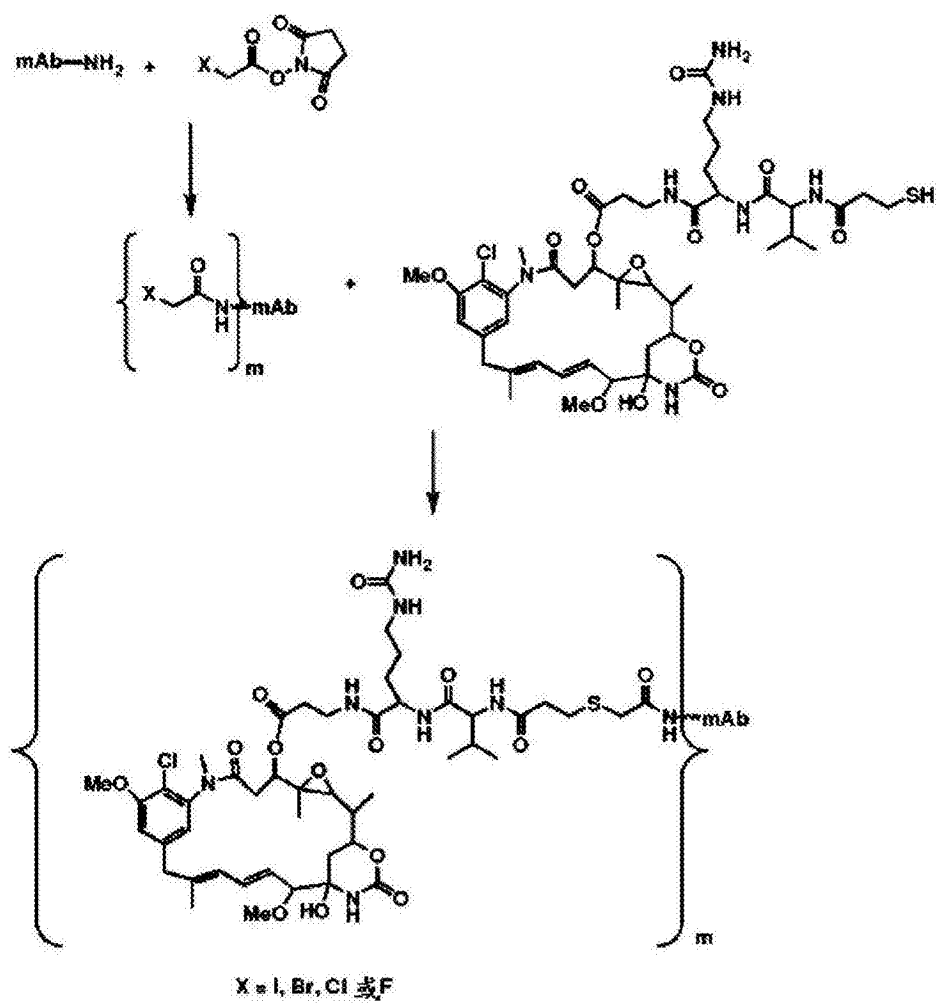


图19

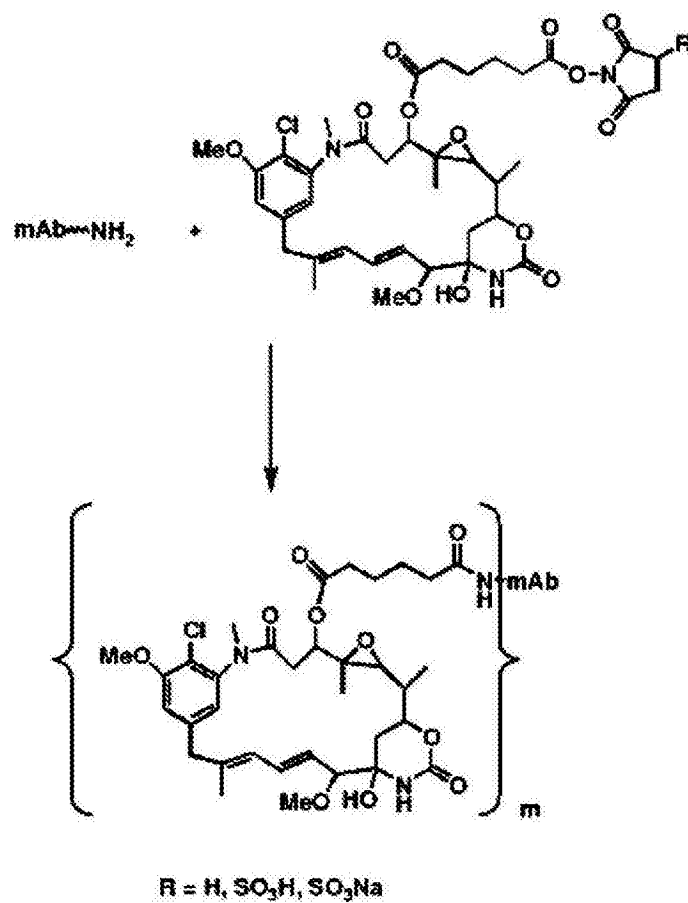


图20

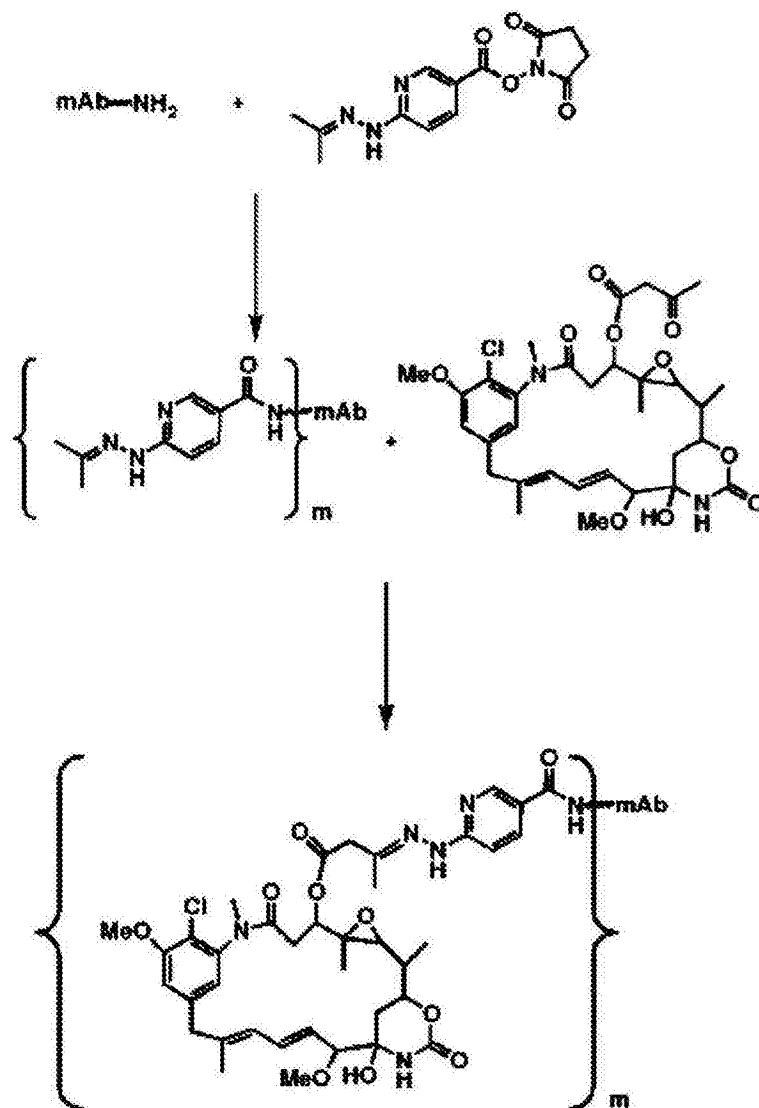


图21

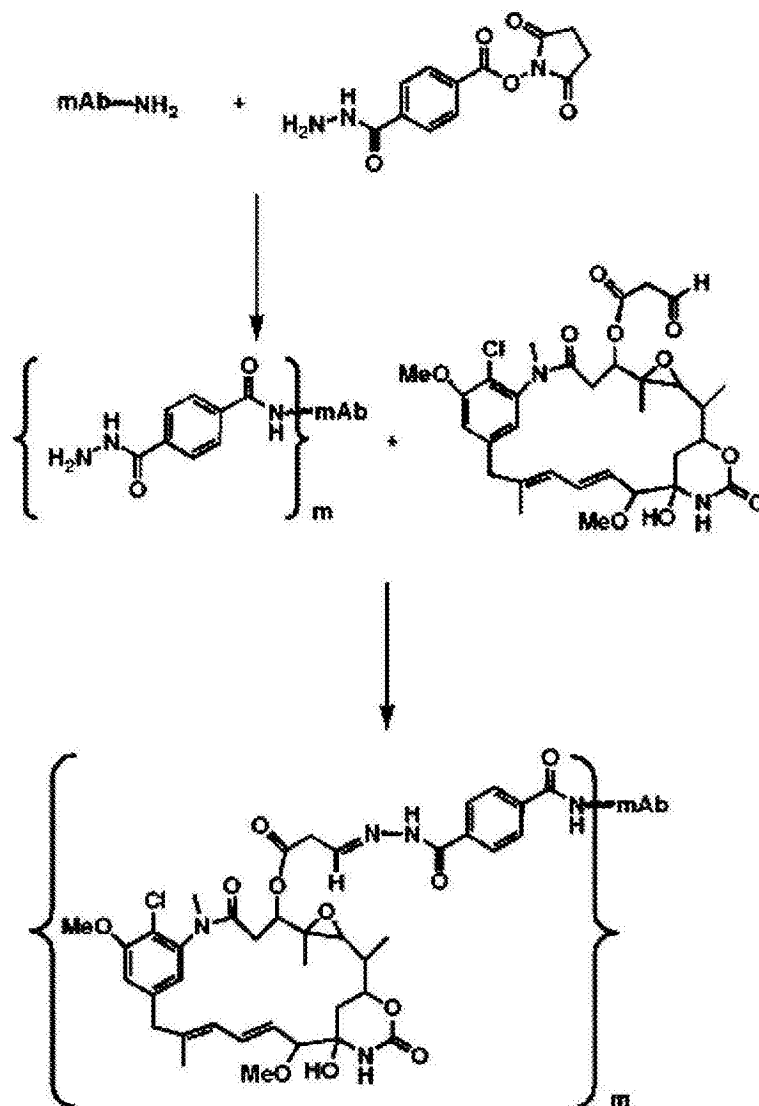


图22

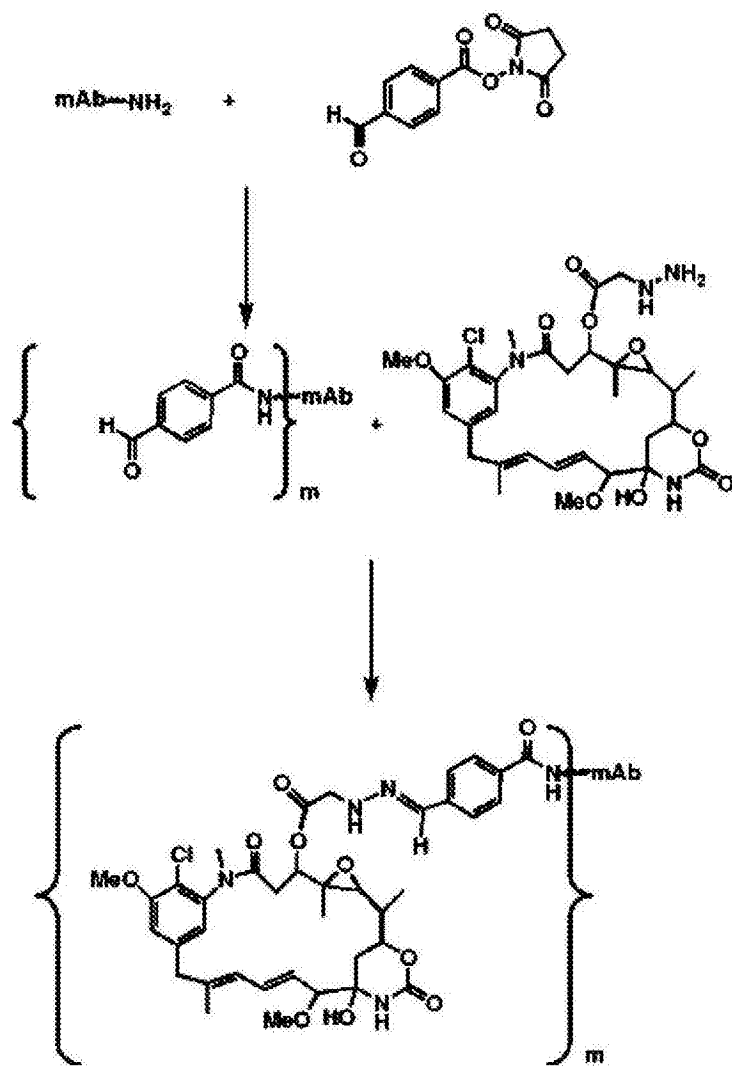
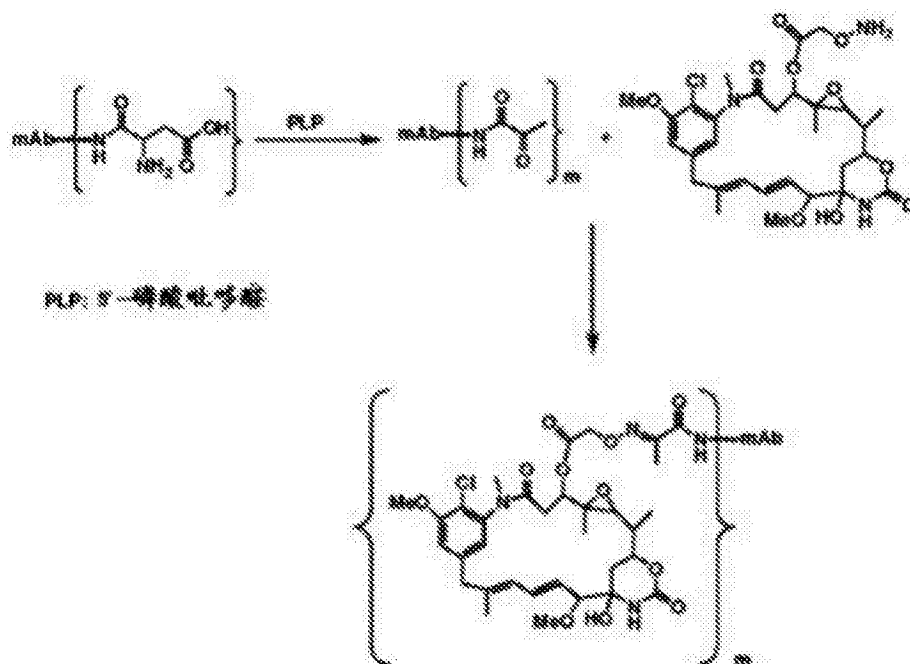


图23

A



B

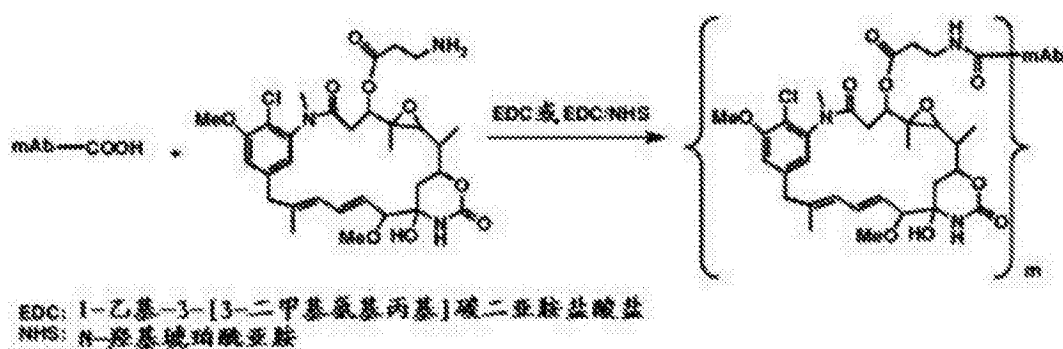


图24

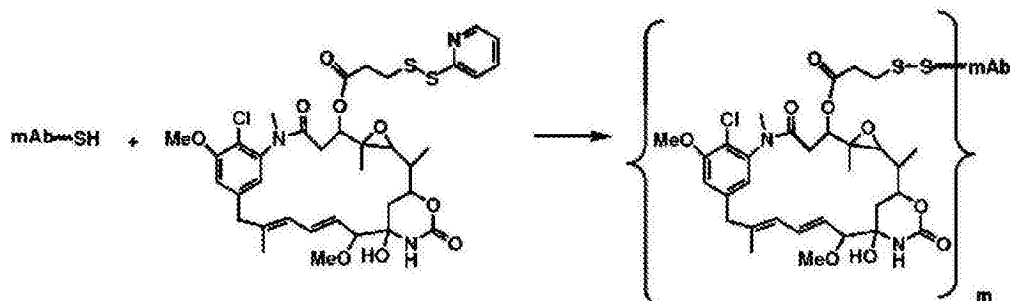
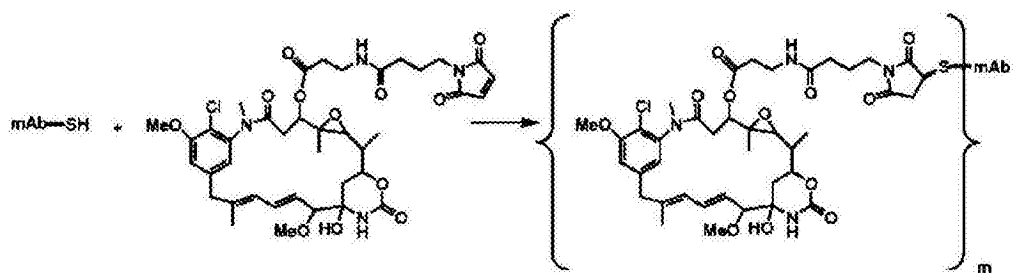
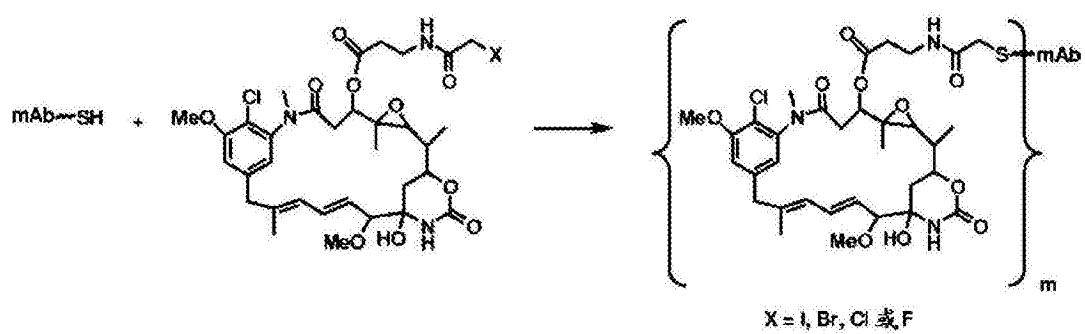


图25

A.



B.



C.

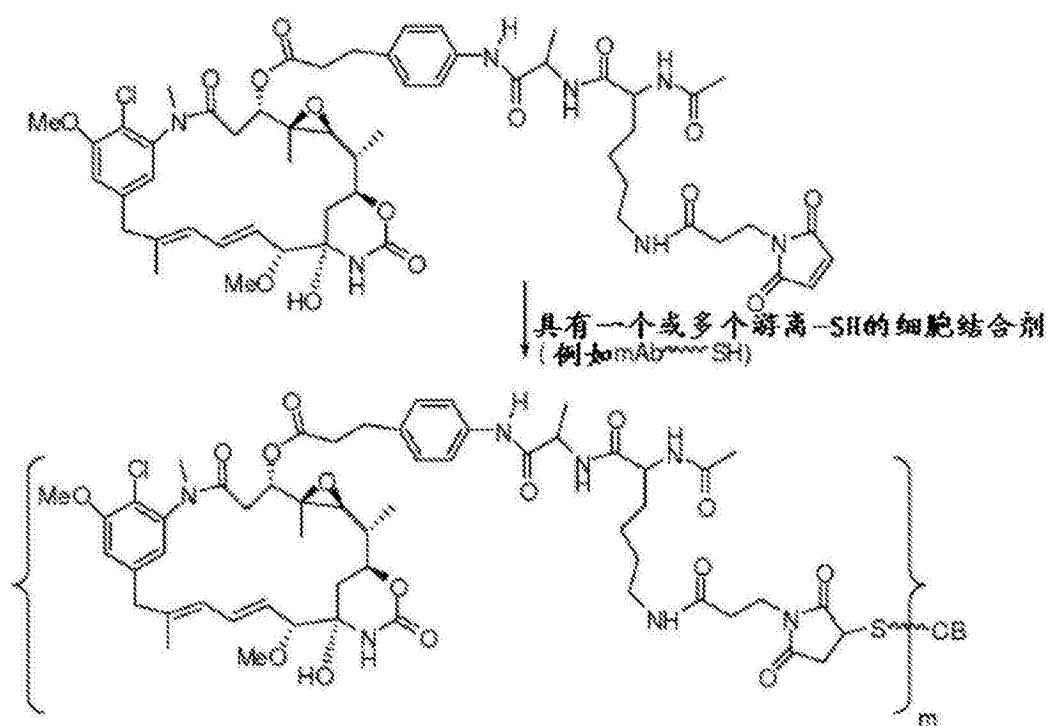
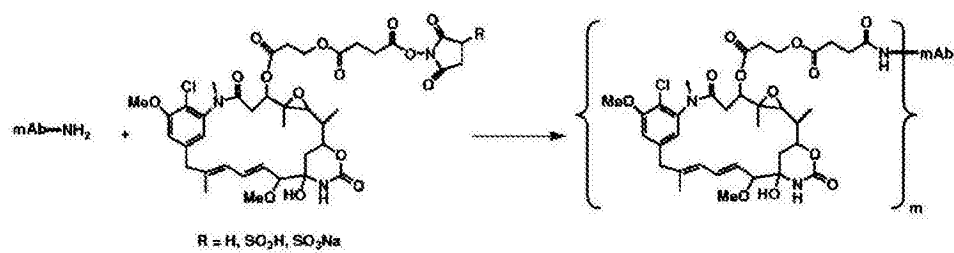


图26

A.



B.

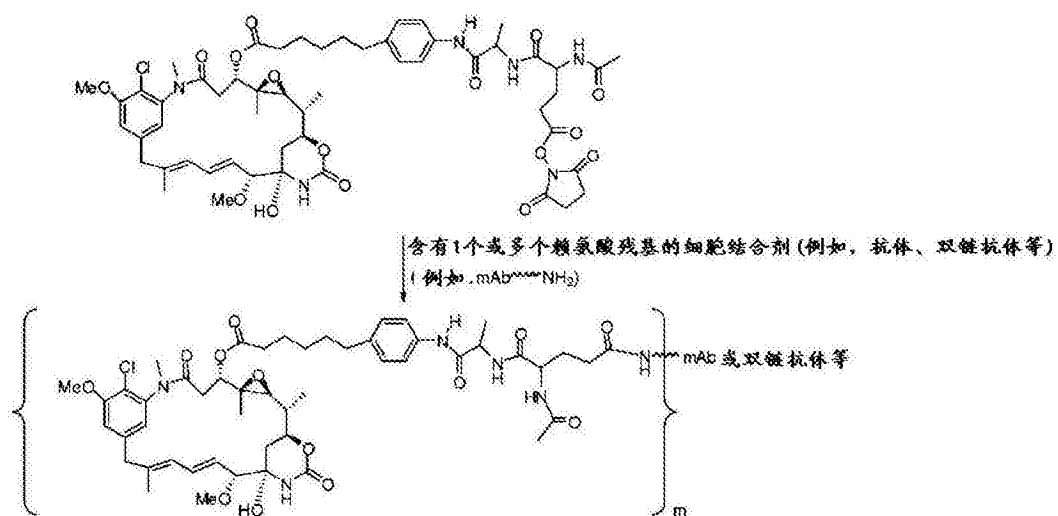


图27

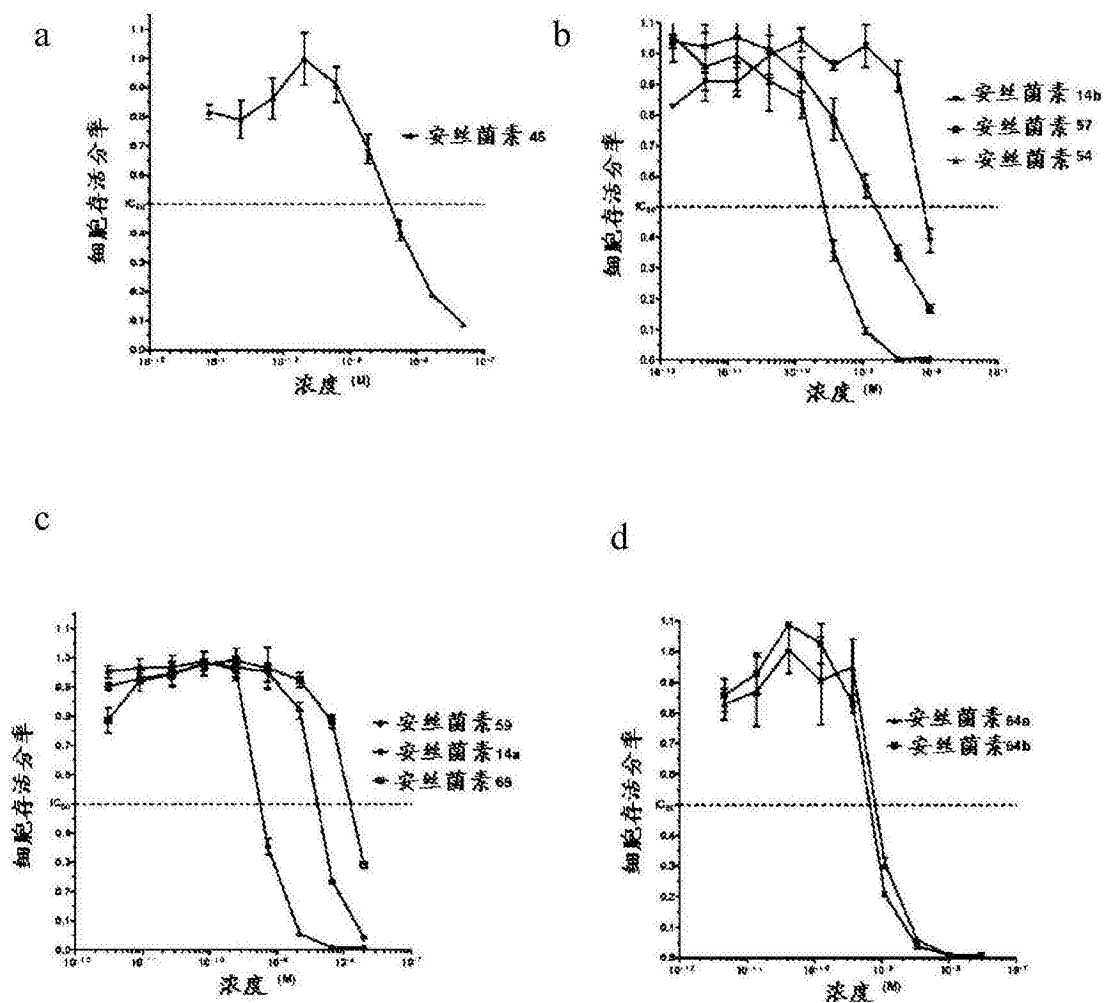


图28

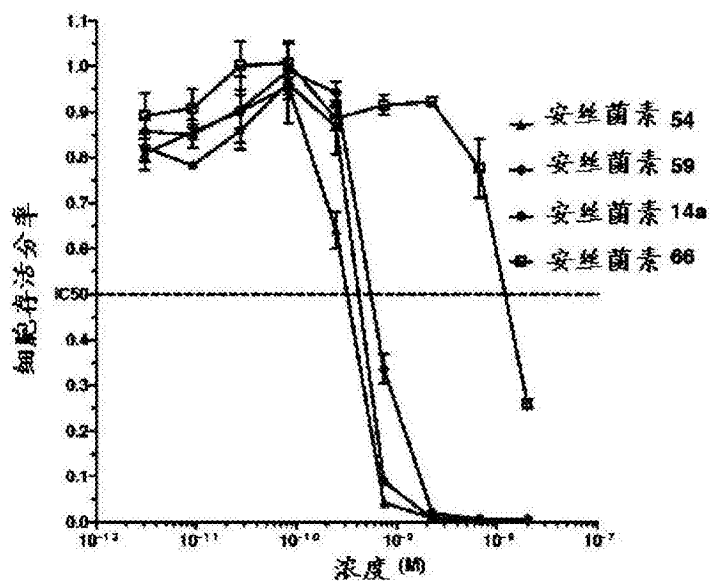


图29

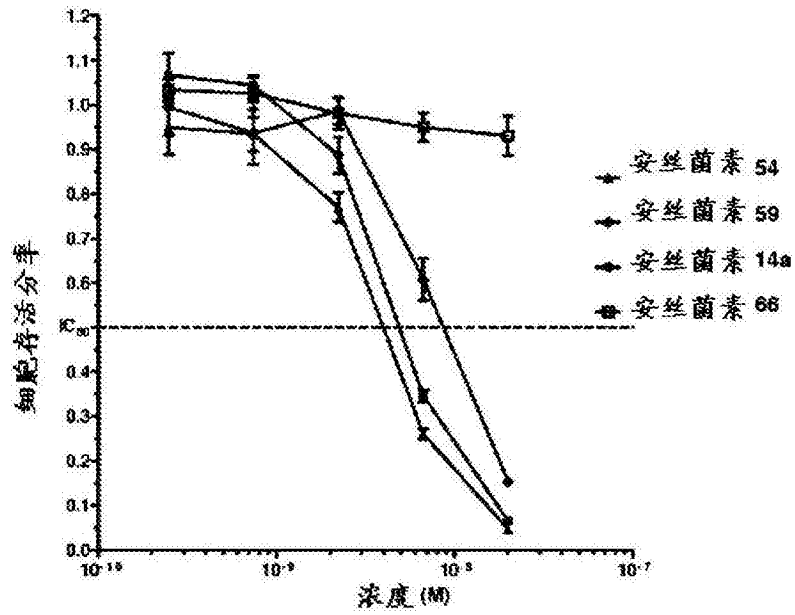


图30

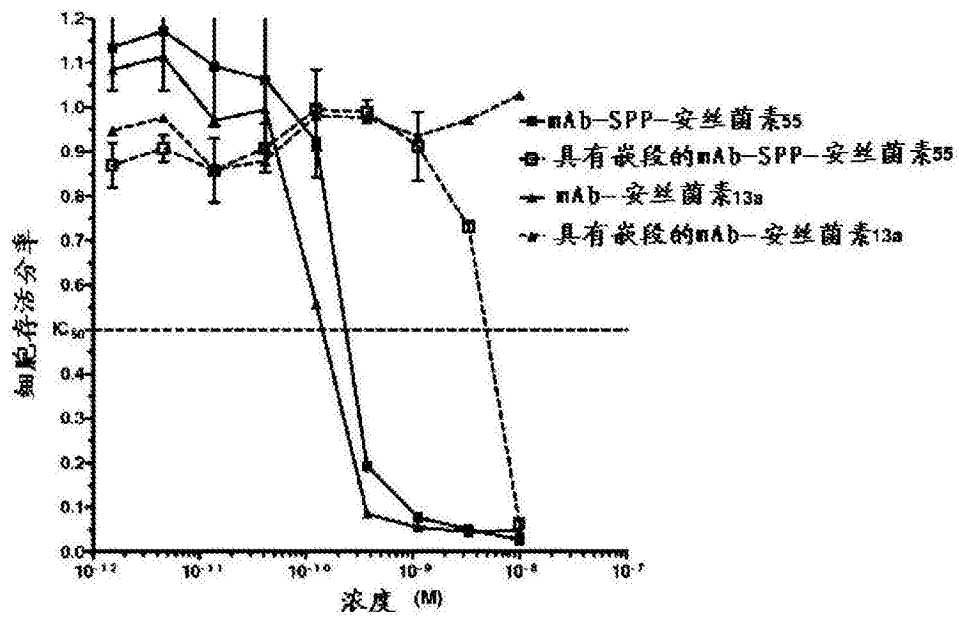


图31