



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201119657 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 06 月 16 日

(21)申請案號：099128330

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 08 月 24 日

(51)Int. Cl. : *A61K31/5513 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01)

C07D487/04 (2006.01)

(30)優先權：2009/08/25 法國 0904043
2009/09/11 法國 0904368

(71)申請人：賽諾菲 安萬特公司(法國) SANOFI-AVENTIS (FR)
法國

(72)發明人：坎莫康 艾倫 COMMERCON, ALAIN (FR)；高茲 拉卓 勞倫斯 GAUZY-LAZO,
LAURENCE (FR)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：34 項 圖式數：5 共 91 頁

(54)名稱

新抗癌劑，該藥劑之製備及該藥劑之治療用途

NEW ANTICANCER AGENTS, PREPARATION OF SAID AGENTS AND THE THERAPEUTIC USE
OF SAID AGENTS

(57)摘要

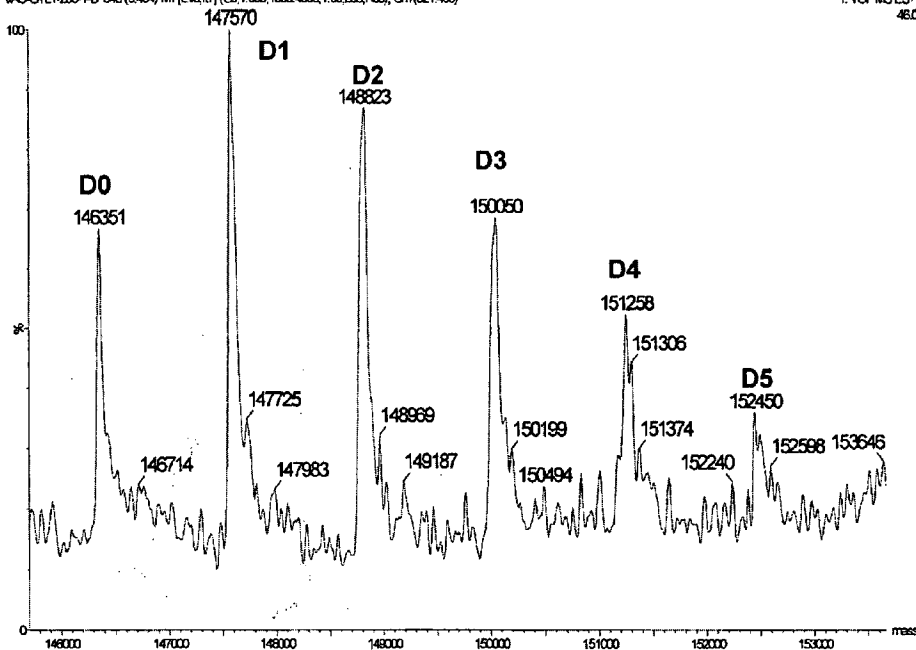
本發明係關於新穎吡咯并[1,4]苯并二氮呷二聚體結合物，其可用作抗癌劑。

實例 1 之結合物在去糖基化之後的高解析度質譜

H₂O-H₂O 順丁烯二醯亞胺-PEG-順丁烯二醯亞胺-衍生之托馬黴素-Q-TOF 2

WAC-GYL1-205-1-B 348 (6.464) M1 [E:0.107] (C₆:1.000;1.000-4.000;1.00;L33,R33; O_n(321.408)

08-Apr-2008
17:00:11
1: TOF MS ES+
46.0





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201119657 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 06 月 16 日

(21)申請案號：099128330

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 08 月 24 日

(51)Int. Cl. : A61K31/5513(2006.01)

C07D487/04 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2009/08/25 法國

0904043

2009/09/11 法國

0904368

(71)申請人：賽諾菲 安萬特公司(法國) SANOFI-AVENTIS (FR)

法國

(72)發明人：坎莫康 艾倫 COMMERCON, ALAIN (FR)；高茲 拉卓 勞倫斯 GAUZY-LAZO,

LAURENCE (FR)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：34 項 圖式數：5 共 91 頁

(54)名稱

新抗癌劑，該藥劑之製備及該藥劑之治療用途

NEW ANTICANCER AGENTS, PREPARATION OF SAID AGENTS AND THE THERAPEUTIC USE OF SAID AGENTS

(57)摘要

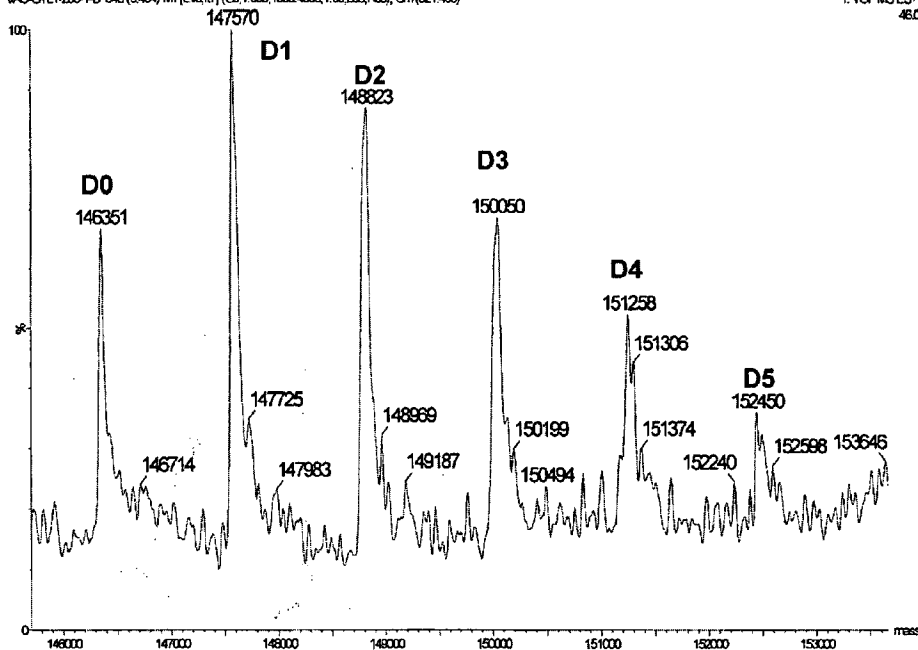
本發明係關於新穎吡咯并[1,4]苯并二氮呷二聚體結合物，其可用作抗癌劑。

實例 1 之結合物在去糖基化之後的高解析度質譜

H₂O/H₁順丁烯二醯亞胺-PEG-順丁烯二醯亞胺-衍生之托馬黴素-Q-TOF 2

VAC-GYL1-205-1-B 348 (6.464) M1 [E:0.107] (C₆:1.000;1.000-4.000;1.00;L33,R33; O_n(321.408)

08-Apr-2008
17:00:11
1: TOF MS ES+
46.0



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

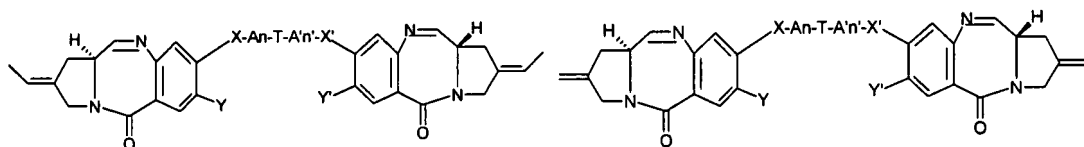
本發明係關於吡咯并[1,4]苯并二氮呋(PBD)二聚體結合物、包含其之組合物及其治療應用，詳言之用作抗癌劑。本發明亦係關於製備該等結合物之方法、其用作抗癌劑之應用及該等二聚體自身。

【先前技術】

吡咯并[1,4]苯并二氮呋二聚物為抗癌劑，其藉由共價鍵結至細胞之DNA上起作用。此等衍生物已描述於申請案WO 00/12508及WO 2005/085260中，及以下公開案中：*Eur. J. Med. Chem.*, 2005, 40, 641-654；*Tetrahedron Letters*, 1988, 29(40), 5105-5108。

結合物化學多年前即已知曉且已應用於若干細胞毒性劑家族，諸如類美登素(maytansinoid)(WO 04103272)、紫杉烷(taxan)(WO 06061258)、來普黴素(leptomycin)(WO 07144709)或CC-1065及其類似物(WO 2007102069)；關於結合物亦參見Monneret C.等人，*Bulletin du Cancer*, 2000, 87(11), 829-38；Ricart A.D.等人，*Nature Clinical Practice Oncology*, 2007, 4, 245-255；Singh R.及Rickson H.K., *Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols*, 2009, 525, 445-467。

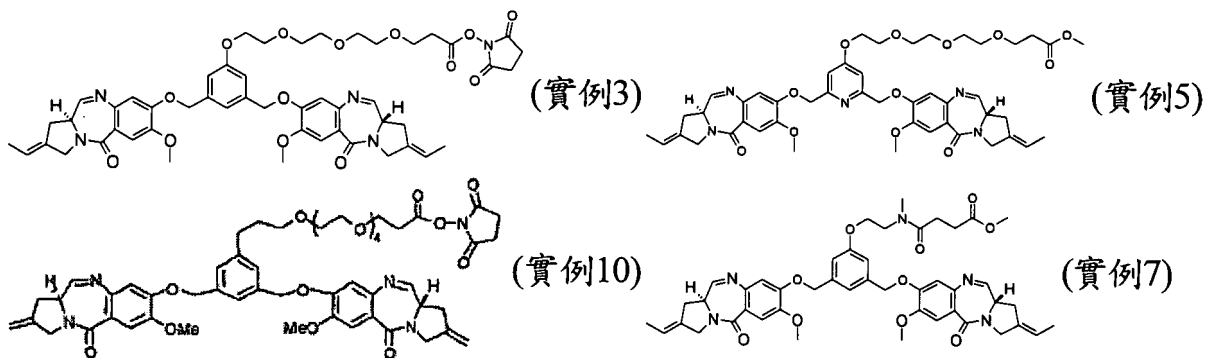
吡咯并[1,4]苯并二氮呋二聚體結合物已描述於申請案WO 07085930或WO 2009/016516中。所使用之二聚體更特定而言具有下式：



其中 T 可表示經 $-G-D-(Z)_p-SZ_a$ 或 $-G-D-(Z)_p-C(=O)Z_bR_b$ 取代之芳基或雜芳基。G 表示單鍵或雙鍵或者 $-O-$ 、 $-S-$ 或 $-NR-$ 。D 表示單鍵或者以下基團之一： $-E-$ 、 $-E-NR-$ 、 $-E-NR-F-$ 、 $-E-O-$ 、 $-E-O-F-$ 、 $-E-NR-CO-$ 、 $-E-NR-CO-F-$ 、 $-E-CO-$ 、 $-CO-E-$ 、 $-E-CO-F$ 、 $-E-S-$ 、 $-E-S-F-$ 、 $-E-NR-CS-$ 、 $-E-NR-CS-F-$ ，其中 E 及 F 係選自 $-(OCH_2CH_2)_i$ 烷基 $(OCH_2CH_2)_j-$ 、 $-$ 烷基 $(OCH_2CH_2)_i$ - 烷基 $-(OCH_2CH_2)_j-$ 、 $-CH_2CH_2)_i-$ 、 $-(OCH_2CH_2)_i$ 環烷基 $(OCH_2CH_2)_j-$ 、 $-(OCH_2CH_2)_i$ 雜環基 $(OCH_2CH_2)_j-$ 、 $-(OCH_2CH_2)_i$ 芳基 $(OCH_2CH_2)_j-$ 、 $-(OCH_2CH_2)_i$ 雜芳基 $(OCH_2CH_2)_j-$ 、 $-$ 烷基 $-(OCH_2CH_2)_i$ 烷基 $(OCH_2CH_2)_j-$ 、 $-$ 烷基 $-(OCH_2CH_2)_i-$ 、 $-$ 烷基 $-(OCH_2CH_2)_i$ 環烷基 $(OCH_2CH_2)_j-$ 、 $-$ 烷基 $(OCH_2CH_2)_i$ 雜環基 $(OCH_2CH_2)_j-$ 、 $-$ 烷基 $-(OCH_2CH_2)_i$ 芳基 $(OCH_2CH_2)_j-$ 、 $-$ 烷基 $(OCH_2CH_2)_i$ 雜芳基 $(OCH_2CH_2)_j-$ 、 $-$ 環烷基-烷基-、 $-$ 烷基-環烷基-、 $-$ 雜環基-烷基-、 $-$ 烷基-雜環基-、 $-$ 烷基-芳基-、 $-$ 芳基-烷基-、 $-$ 烷基-雜芳基-、 $-$ 雜芳基-烷基-。i 及 j 表示在 0 至 2000 範圍內之整數。Z 表示烷基且 p 為值為 0 或 1 之整數。

表徵本發明之一些化合物的基團 $L_2=-CH_2C(=O)NR_3-(CH_2CH_2O)_i-ALK-$ 包含醯胺單元 $(-CONR_3-)$ 且可僅對應於 WO 07085930 或 WO 2009/016516 中之單元 $-E-CONR-F-$ ，其中 E=烷基且 $F=-(CH_2CH_2O)_i$ - 烷基-。然而，在此兩個專

利申請案中未描述或提出連接至苯基或吡啶環且連接至 L_2 之基團 L_1 。特定言之，其可僅對應於單元G。實際上，G可僅為(單、雙、參)鍵或者-O-、-S-或-NR-。關於特徵在於連接基團-O-ALK-NR₃-ALK-S-(CH₂CH₂O)_i-ALK-的本發明之其他化合物，WO 07085930或WO 2009/016516之單元D皆不提供胺基NR₃與鍵-S-之組合。以下二聚體描述於WO 2009/016516中：



但此等二聚體皆不包含與本發明中所述者類似之連接基團(尤其無-ALK-S-單元)。

因此，兩個申請案WO 07085930及WO 2009/016516皆未描述或提出本發明化合物。

【發明內容】

【技術問題】

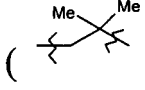
本發明欲解決之技術問題為提供新穎的吡咯并[1,4]苯并二氮呋二聚體結合物。

【定義】

以下術語具有隨附意義：

- 結合物：細胞毒性化合物之至少一個分子共價連接至細胞結合劑；

- 細胞結合劑：對生物目標具有親和力之分子；其可例如為配位體、蛋白質、抗體，更特定言之為單株抗體、蛋白質或抗體片段、肽、寡核苷酸或寡醣。結合劑之作用為引導諸如細胞毒性劑之生物活性化合物朝向生物目標；
- 生物目標：較佳位於癌細胞或與此腫瘤有關之基質細胞之表面處的抗原(或抗原群組)；此等抗原可能例如為生長因子受體、致癌基因產物或突變之「腫瘤抑制劑」基因產物、血管生成相關分子或黏著分子；
- 烷基：藉由自烷烴移除氫原子而獲得之飽和脂肪烴基團。烷基可為直鏈或分支鏈。可提及之實例為甲基、乙基、丙基、異丙基、丁基、異丁基、第三丁基、戊基、2,2-二甲基丙基或己基；
- 環烷基：在環狀結構中包含3至8個碳原子之環狀烷基。可提及之實例為環丙基、環丁基、環戊基或環己基；
- 芳基：不包含雜原子之單環或雙環芳族基團。更特定言之涉及苯基及萘基；
- 雜芳基：環中包含至少一個雜原子(O、S、N)且其連接至碳原子形成環的單環或雙環芳族基團。更特定言之涉及吡啶基、吡咯基、噻吩基、咪唑基、嘧啶基或三唑基；
- 雜環烷基：環中包含至少一個雜原子(O、S、N)且其連接至碳原子形成環的環烷基；
- 烷氧基：-O-烷基，其中烷基如上文所定義；
- 烷醯基氧基：-O-CO-烷基，其中烷基如上文所定義；
- 伸烷基：具有經驗式 $-C_mH_{2m}-$ 之飽和二價基團，其藉由自

烷烴移除兩個氫原子而獲得。烷烴可為直鏈或分支鏈。可提及之實例為亞甲基(-CH₂-)、伸乙基(-CH₂CH₂-)、伸丙基(-CH₂CH₂CH₂-)、伸丁基(-CH₂CH₂CH₂CH₂-)、伸異丁基()或伸己基(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-)。更特定言之，直鏈伸烷基可具有式-(CH₂)_m-，m表示整數；

●在值之範圍中，包括極限值(例如，「i在1至6之範圍內」之範圍類型包括極限值1及6)。

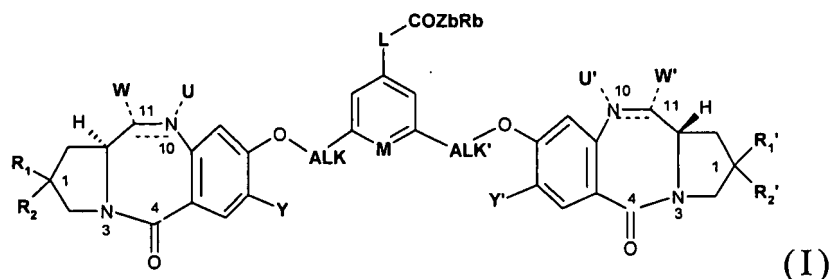
所使用之縮寫

AcOEt：乙酸乙酯；ALK：(C₁-C₁₂)伸烷基，更特定言之(C₁-C₆)伸烷基；TLC：薄層層析法；DAR：藥物抗體率；DBU：1,8-二氮雙環[5.4.0]十一碳-7-烯；DCC：N,N'-二環己基碳化二亞胺；DCM：二氯甲烷；DEAD：偶氮二甲酸二乙酯；DIC：N,N'-二異丙基碳化二亞胺；DIPEA：N,N'-二異丙基乙胺；DMA：二甲基乙醯胺；DMAP：4-二甲基胺基吡啶；DME：二甲氧基乙烷；DMF：二甲基甲醯胺；DMSO：二甲基亞砜；e：莫耳消光係數；EEDQ：2-乙氧基-1-乙氧羰基-1,2-二氮喹啉；EDCI：N-(3-二甲基胺基丙基)-N'-乙基碳化二亞胺；EDTA：乙二胺四乙酸；Fmoc：芴基甲氧基羰基；PG：保護基；Hal：鹵素原子；HOBt：1-羥基苯并三唑；HEPES：4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙磺酸；LG：離去基；NHS：N-羥基丁二醯亞胺；NMP：N-甲基吡咯啶酮；RP：減壓；R_f：滯留因子；SEC：空間排阻層析法；AT：環境溫度；TBDMS：第三丁基二甲基矽烷基；TEA：三乙胺；TFA：三氟乙酸；TIPS：三異丙基矽

烷基；THF：四氫呋喃；rt：滯留時間。

【實施方式】

本發明係關於下式之化合物：



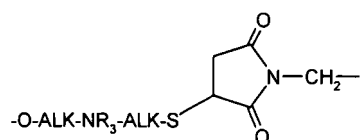
其中：

- --- 表示單鍵或雙鍵，其條件為若 ----- 表示單鍵，則：
 - ❖ ----- 表示單鍵；
 - ❖ 相同或不同之 U 及 / 或 U' 相互獨立地表示 H；
 - ❖ 相同或不同之 W 及 / 或 W' 相互獨立地表示：OH、-OR、-OCOR、-COOR、-OCOR、-OCONRR'、N10 與 C11 包括於一環中之環狀胺基甲酸酯基、-NRCONRR'、-OCSNHR、N10 與 C11 包括於一環中之環狀硫代胺基甲酸酯基、-SH、-SR、-SOR、-SOOR、-SO₃⁻、-NRSOOR'、-NRR'、N10 與 C11 包括於一環中之環狀胺、-NROR'、-NRCOR'、-N₃、-CN、Hal 或三烷基磷基或三芳基磷基；
- 相同或不同之 R₁、R₂、R₁' 及 R₂' 相互獨立地表示：H、Hal 或視情況經一或多個選自以下之取代基取代之 (C₁-C₆) 烷基：Hal、CN、NRR'、CF₃、OR、芳基或雜芳基，或 S(O)_qR，其中 q=0、1 或 2；

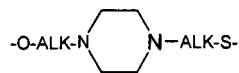
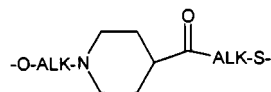
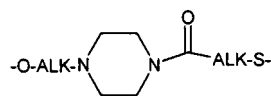
或者

- R_1 與 R_2 及 / 或 R_1' 與 R_2' 分別一起形成雙鍵 $=CH_2$ 或 $=CH-CH_3$;
- 相同或不同之 Y 及 Y' 相互獨立地表示 H 或 OR ;
- M 表示 CH 或 N ;
- 相同或不同之 ALK 及 ALK' 相互獨立地表示 (C_1-C_6) 伸烷基 ;
- R 及 R' 相互獨立地表示 H 或視情況經一或多個選自以下之取代基取代之 (C_1-C_6) 烷基或芳基 : Hal 、 CN 、 NRR' 、 CF_3 、 OR 或芳基或雜芳基 ;
- L 表示 :
 - ❖ $-L_1-L_2-$ 基團 , 其中 L_1 經由 ALK 或 $OALK$ 基團連接至包含 M 之芳環 , 且表示以下基團之一 :

$-ALK-S-$



$-O-ALK-NR_3-ALK-S-$



且 L_2 表示經由 $-CH_2C(=O)-$ 連接至 L_1 之 $-CH_2C(=O)-NR_3-$ $(CH_2CH_2O)_i-ALK-$ 基團 ;

或者

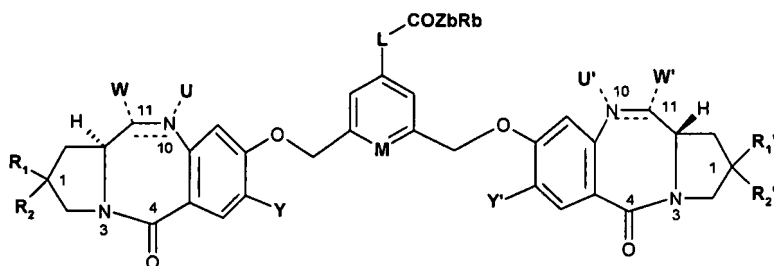
❖ 經由 $OALK$ 基團連接至包含 M 之芳環的 $-O-ALK-NR_3-$

ALK-S-(CH₂CH₂O)_i-ALK-基團；

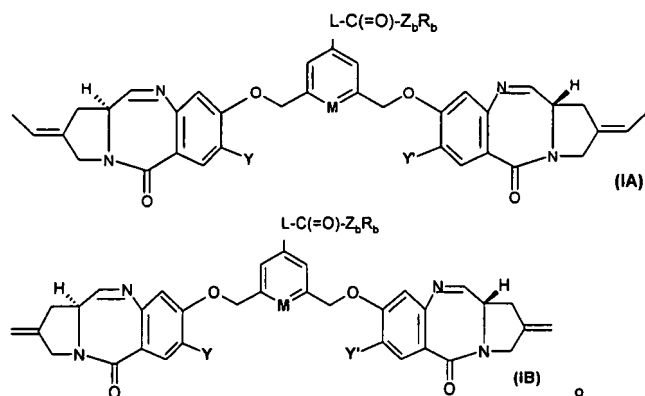
- R₃表示H或(C₁-C₆)烷基；
- i表示在1至40、更適當地1至20、較佳1至10範圍內之整數；
- Z_b表示單鍵、-O-或-NH-，且R_b表示H或(C₁-C₆)烷基、(C₃-C₇)環烷基、芳基、雜芳基或(C₃-C₇)雜環烷基，或者Z_b表示單鍵且R_b表示Hal。

式(I)化合物(包括所例示者)可以鹼形式或與醫藥學上可接受之酸之加成鹽形式以及此等鹼或此等鹽之水合物或溶劑合物形式存在。

更特定言之，連接至苯基或吡啶基核之兩個ALK及ALK'基團皆表示亞甲基：



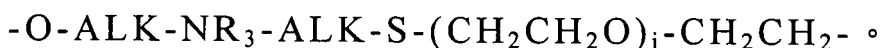
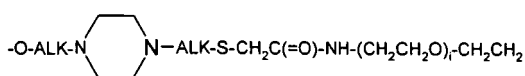
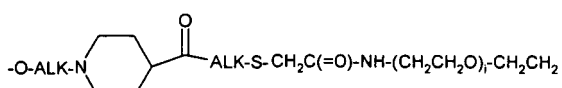
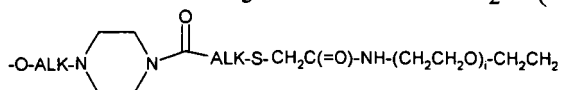
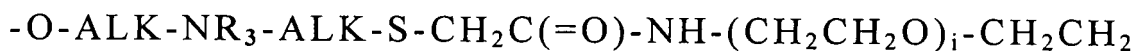
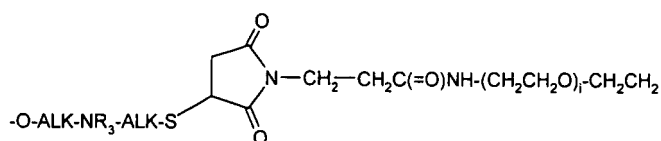
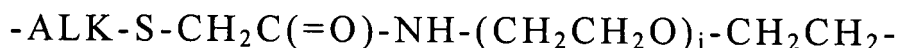
更特定言之，在式(I)化合物中，挑選出式(IA)或(IB)：



Y及Y'更特定言之表示(C₁-C₄)烷氧基，尤其甲氧基。R

及 R' 更特定言之可相互獨立地表示 H 或 (C_1-C_6) 烷基。根據特定形式， $U=U'$ 及 / 或 $W=W'$ 及 / 或 $R_1=R_1'$ 及 / 或 $R_2=R_2'$ 及 / 或 $Y=Y'$ 及 / 或 連接至苯基或吡啶基核之兩個 ALK 及 ALK' 基團相同。

更特定言之， L 可選自以下之一：



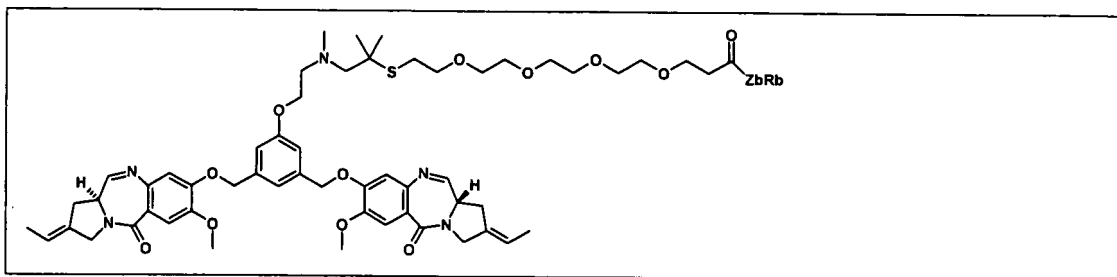
其中， ALK 更特定言之表示 (C_1-C_4) 伸烷基。詳言之， ALK 可為以下之一： $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CMe_2-$ 或 $-CH_2CH_2CMe_2-$ 。 L 亦可為下表 I 或表 II 中所述之一。

i 表示在 1 至 40、更適當地 1 至 20、較佳 1 至 10 範圍內之整數。 i 可為在 1 至 40 範圍內之每一值；詳言之， i 可具有值 3、4、5、6、7、8、9 或 10。

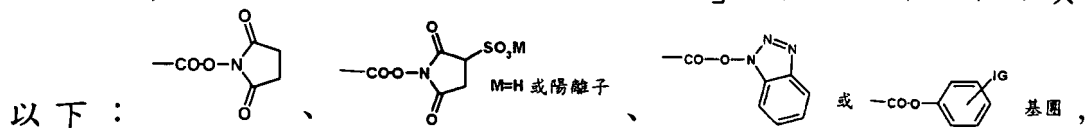
表 1 描述式 (IA) 之化合物之代表性實例。此表之每一化合物可以 $M=CH$ (苯) 或 $M=N$ (吡啶) 之形式存在。 $M=N$ 之化合物更可溶於水。

表 I

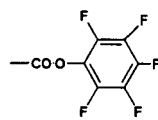
式 (IA) 化合物



本發明之化合物包含化學基團 $-C(=O)Z_bR_b(RCG1)$ ，其對於結合劑上存在之反應性化學基團 (RCG2) 具有反應性。RCG1 與 RCG2 之間的反應確保藉由形成共價鍵而使化合物連接至結合劑上。因此，化合物能夠結合至結合劑上。更特定言之， Z_b 表示 O；在此情況下，RCG1 表示酸官能基 ($R_b=H$) 或酯官能基。更特定言之， $-C(=O)Z_bR_b$ 表示 $-COOH$ 、 $-COO(C_1-C_6)$ 烷基，尤其 $-COOCH_3$ 或 $-COOCH_2CH=CH_2$ 。在酯官能基中，較佳為對於 RCG2 基團 (尤其對於抗體中存在之胺基) 展示優良反應性的「活性」酯。活性酯之實例為



其中 IG 表示至少一個誘導基 (inductive group)，諸如 $-NO_2$ 或 $-Hal$ ，尤其 $-F$ 。可涉及以下基團，例如 $-COO-$ 基團，

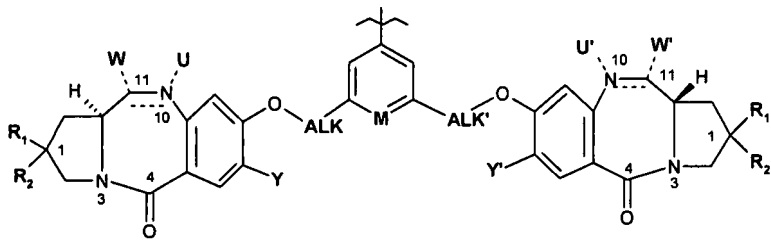


。另一類型 $-C(=O)Z_bR_b$ 基團為以下：

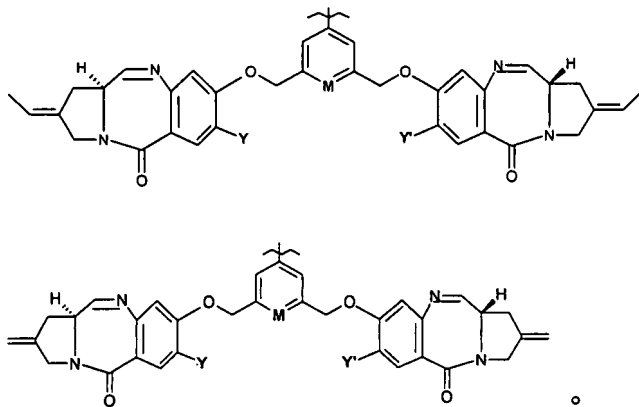
可提及之 RCG2 之實例為藉由存在於抗體表面處之離胺酸殘基之側鏈載運的離胺酸之 ϵ 胺基、銜鏈區之醯基或藉由鏈內二硫鍵之還原所得的半胱胺酸之硫醇基 (Garnett M.C. 等人，*Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, 53, 171-216)。最近，已考慮其他方法，諸如藉由突變引入半胱胺酸 (Junutula J.R. 等人，*Nature Biotechnology*, 2008,

26, 925-932; **WO 09026274**), 或引入非天然胺基酸, 使得可能實現其他化學類型 (de Graaf A.J. 等人, *Bioconjugate Chem.*, **2009**, 2009 年 2 月 3 日 (綜述); **DOI: 10.1021/bc800294a**; **WO 2006/069246**, 及根據 Chin J.W. 等人, *JACS*, **2002**, *124*, 9026-9027(ReCode[®] technology))。對抗體使用之此等連接方法可根據抗體之結構應用於所有已知結合劑。

因此本發明之化合物可用於製備結合劑, 下式之二聚體在 **M** 之對位處共價連接至該結合劑:

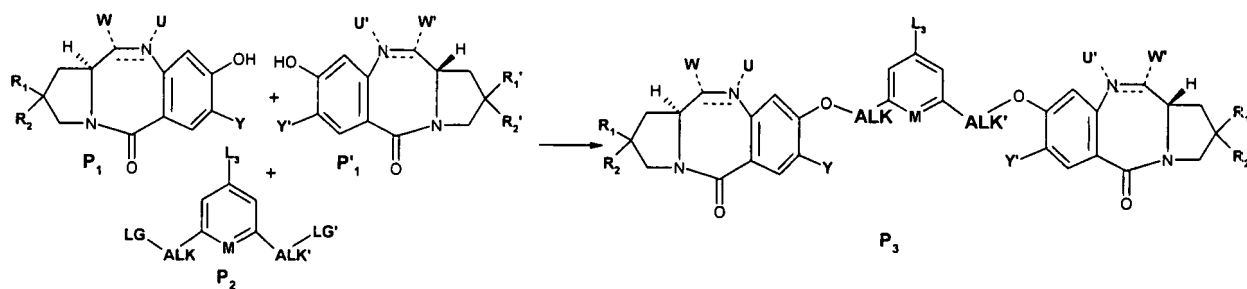


更特定言之, 結合劑為抗體。更特定言之, 二聚體具有下式:



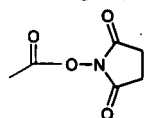
製備式(I)化合物之方法

式(I)化合物可根據流程1來製備:



流程 1

化合物 P_1 、 P'_1 及 P_2 一起反應得到 P_3 。 LG 及 LG' 表示離去基。 L_3 可表示 $-L-C(=O)Z_bR_b$ 基團；在此情況下， P_3 因而表示式 (I) 化合物。在 P_3 不表示 $-L-C(=O)Z_bR_b$ 基團之情況下，必須使用一或多個反應將 L_3 轉化成 $-L-C(=O)Z_bR_b$ 基團。詳言之，在 $-C(=O)Z_bR_b =$



之情況下，可能引入由 $-C(=O)Z_bR_b$ 基團 $= -C(=O)O-(C_1-C_4)$ 烷基或 $-C(=O)O-$ 烯丙基封端之 L_3 基團，該 $-C(=O)Z_bR_b$ 基團隨後轉化成 $-C(=O)OH$ 基團，其最終與碳酸 N,N' -二丁二醯亞胺酯或 NHS 反應。 $-COO$ 烷基/烯丙基向 $-COOH$ 之轉化可藉由用氫氧化鋰處理來進行。特定言之，尤其宜使用甲酯。與碳酸 N,N' -二丁二醯亞胺酯之反應係在例如 DIPEA 之鹼存在下進行；與 NHS 之反應係在例如 DCC 之偶合劑存在下進行。同樣，在 $-C(=O)Z_bR_b =$

之情況下，可能引入 $-C(=O)Z_bR_b$ 基團 $= -COOH$ ，其隨後與 N,N' -羰基二咪唑反應 (*JACS*, 1958, 80, 4423; *JACS*, 1960, 82, 4596)。

化合物 P_1 及 P'_1 描述於專利申請案 WO 00/12508、WO 00/12507、WO 2005/040170、WO 2005/085260、WO 07085930 或 WO 2009/016516 中或可藉由全合成獲得 (Mori M. 等人 *Tetrahedron*, 1986, 42, 3793-3806)。在 P_1 及 / 或 P'_1 表

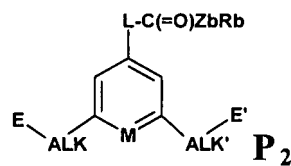
示下式之托馬黴素的情況下：



，後者可使用黃色鏈黴菌 (*Streptomyces croceus*) 菌株根據 FR 1516743 之教示或者藉由全合成來製備 (參見 *J. Antibiotics*, 1983, XXXVI(3), 276-282, Z. Tozuka, 「Studies on tomaymycin. Total syntheses of the antitumor antibiotics E- and Z- tomaymycins」)。亦存在商業性 P_1/P'_1 化合物。為引入 W/W' 基團，亞胺官能基 (—C=N— = 雙鍵) 上能夠添加各種 HW/HW' 化合物 (例如 H_2O 或醇 ROH)。

關於式 P_2 之化合物

此等化合物具有下式：

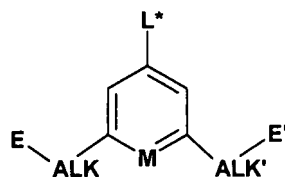


其中：

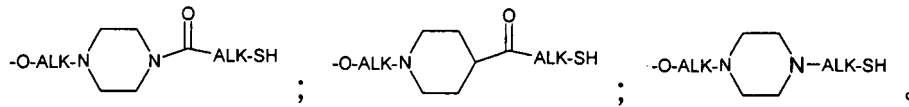
- L、M、ALK、ALK'、 Z_b 及 R_b 係如上文所定義；
- E 及 E' 相互獨立地表示 -OH 基或離去基。

L 可更特定地表示流程 2、2'、3、3'、3''、4、5、5'、6、6'、6''、7 中所述之一者。

亦挑選出下式之中間體：

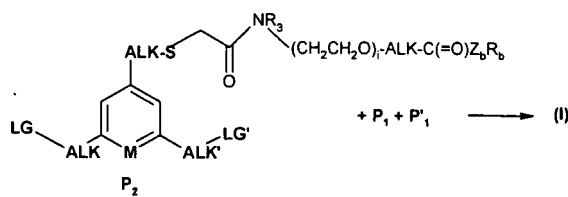
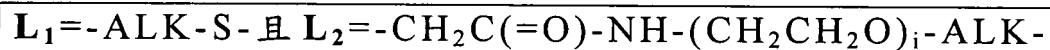
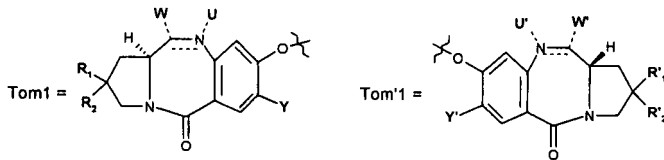


其中 L^* 係選自：-ALK-SH；-O-ALK-NR₃-ALK-SH；



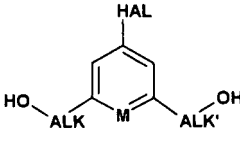
在本發明中，術語「離去基」表示在 P_2 與 P'_1 之間的異質反應中離開同時帶走連接 ALK 與 LG 或 LG' 之共價鍵的電子對之原子或原子團。離去基更特定地選自鹵素原子 (尤其氯或溴)、或甲磺酸酯基、甲苯磺酸酯基、硝基苯磺酸酯基或 $-OPPh_3^+$ 基。

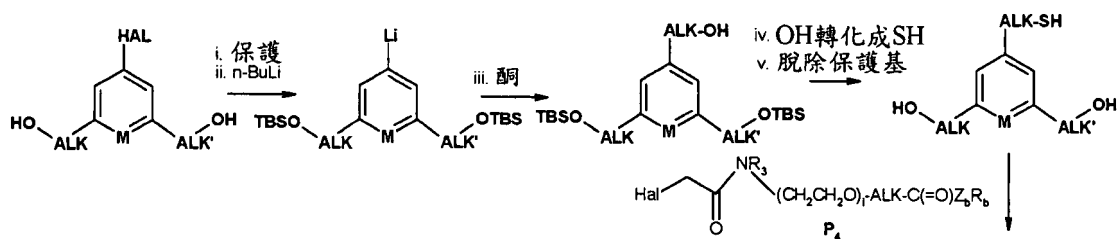
對於下文其他流程，為簡單起見，使用以下簡略形式：

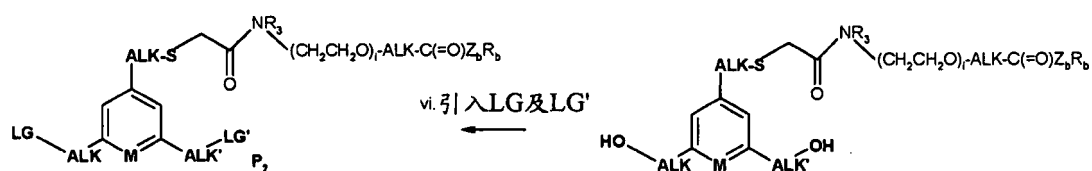


流程 2

製備 P_2

P_2 係根據實例 3 之教示自式  之相應鹵化二醇獲得 (流程 2')：





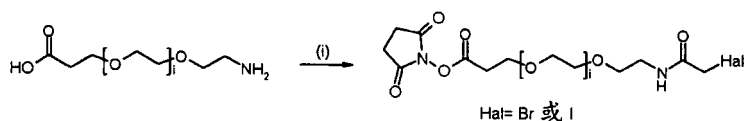
流程 2'

- i. 使用諸如第三丁基二甲基矽烷氧基 (TBS) 之保護基保護兩個醇官能基；
- ii. 分別使用 n-BuLi 或 鎂 來製備相應有機鋰 或有機鎂 衍生物；
- iii. 與酮親核加成以形成醇官能基；
- iv. 經由形成相應硫乙酸酯來製備硫醇 (參見實例 3.7 及 3.8)；
- v. 脫除保護基；
- vi. 引入 LG 及 LG'。在甲磺酸酯基之情況下，在諸如三級胺 (例如 TEA 或 DIPEA) 之鹼存在下使用甲磺醯氯；參見實例 1.4。

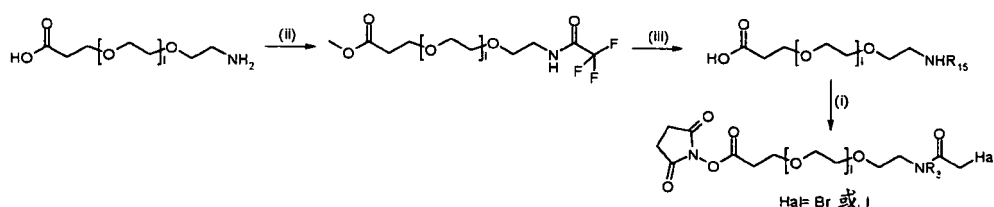
鹵化二醇及相應經保護二醇之實例為 **WO 2009/016516** 第 48 頁之流程 1 中所描述者 (流程 1 之化合物 2 及 3)。經保護二醇之兩個實例為 CAS 第 181225-40-1 號及第 181225-41-2 號之化合物。

鹵化二醇可藉由還原相應二酸或二酯化合物 (例如 CAS 第 193010-40-1 號之化合物) 獲得。在吡啶 (M=N) 之情況下，亦參見：*Liebigs Annalen der Chemie*, **1991**, *10*, 987-988 或 *Tetrahedron*, **2005**, *61*(7), 1755-1763 (流程 1 之化合物 3)。

製備 P₄

ALK=CH₂CH₂之情況**R₃=H之情況**

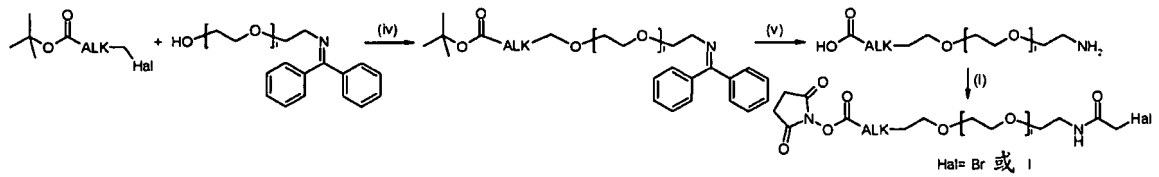
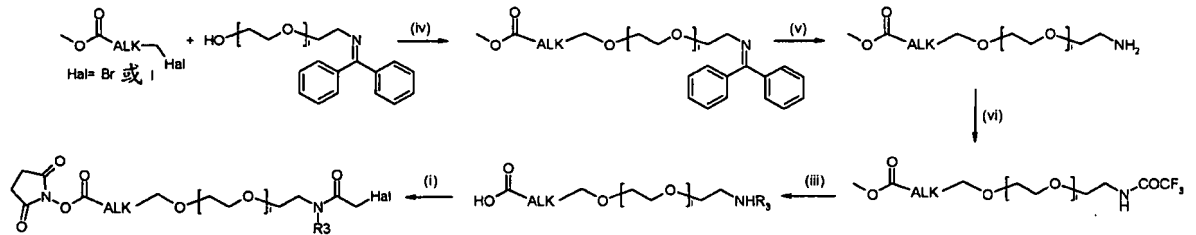
步驟 (i)： 醯胺之形成及酸之活化；此兩個步驟在諸如 DCM 之極性非質子性溶劑中連續進行：在胺官能基與 N-羥基丁二醯亞胺基鹵乙酸酯之間反應，隨後當場添加諸如 DIC 之偶合劑。

R₃≠H之情況

步驟 (ii)： 以甲酯形式保護羧酸及以三氟乙醯胺形式保護胺；該反應在諸如 DCM 之極性非質子性溶劑中以兩個連續步驟進行：藉由在甲醇存在下用三甲基矽烷基重氮甲烷處理來保護酸，隨後藉由添加三氟乙酸酐及諸如 TEA 之鹼來保護胺；

步驟 (iii)： 胺之烷基化及酯之皂化；該反應在諸如 THF 之無水極性非質子性溶劑中以兩個連續步驟進行：藉由在具有離核基團之反應物(諸如烷基鹵化物 R₃Hal)存在下用諸如 NaH 之鹼處理來進行胺之烷基化，隨後添加氫氧化鋰及水；

步驟 (i)： 在步驟 (iii) 之後，對於 R₃=H 之情況，重複步驟 (i) 之反應。

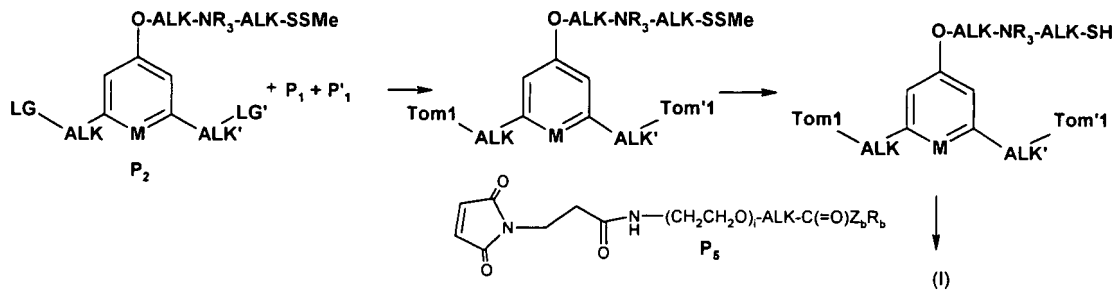
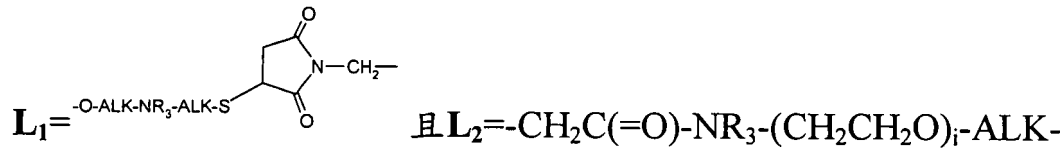
ALK≠CH₂CH₂之情況R₃=H之情況R₃≠H之情況

步驟 (iv)：PEG 鏈之伸長；在諸如 THF 或 DMF 之無水極性非質子性溶劑中藉由用由 NaH 或鉀萘 (potassium naphthalenide) 之作用產生之二苯甲酮/亞胺/PEG 醇的醇鹽處理鹵化酯來進行該反應(如 WO 2007/127440 中所述)；

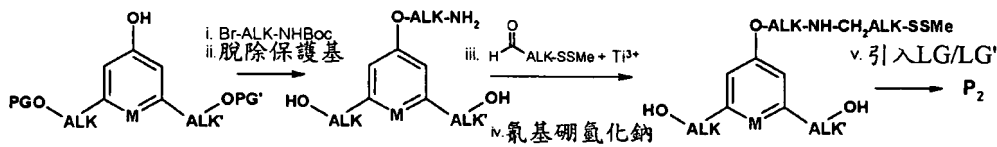
步驟 (v)：根據 Wessjohann L. 等人，*Synthesis*, 1989, 5, 359-63，在鈹/木炭存在下藉由氫化作用進行亞胺之選擇性斷裂；

步驟 (vi)：藉由添加三氟乙酸酐及諸如 TEA 之鹼來保護胺。

胺基/PEG 醇為可購得的(例如，i=3、4、7、8)或可根據 US 7230101 中所述之程序自可購得之 PEG 二醇製備(i=3 至 12)。二苯甲酮對胺官能基之保護可藉由在諸如 BF₃ 醚合物之路易斯酸(Lewis acid)存在下共沸脫水進行。

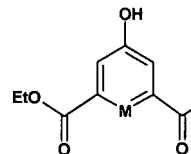


流程 3

製備 P₂

流程 3'

i. 在諸如 DMF、THF 或 MeCN 之極性溶劑中，在諸如 K_2CO_3 之鹼存在下，-OH 官能基之一(另外兩個經表示為保護基之 PG 及 PG' 保護)與經式 Br-ALK-NHBoc 之 Boc 保護之溴胺之間的親核反應(參見例如 **WO 07085930** 中第 63 頁之條件)。

根據替代形式，可能由式  之羥基二酯進行溴

胺之親核取代且隨後例如用硼氫化鈉還原酯官能基得到 $\text{-CH}_2\text{OH}$ 官能基；對此，可能應用 **WO 2007/085930** 中第 62-63 頁中提供之親核取代及還原之條件；

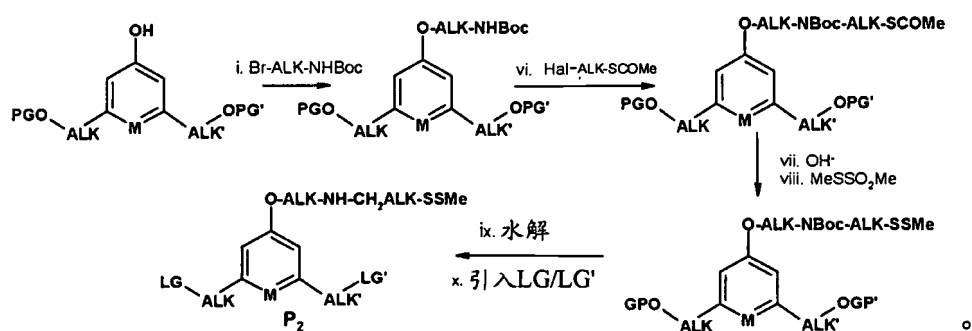
ii. 脫除保護基；

iii. 在異丙醇鈦存在下，用式 HC(=O)-ALK-SSMe 之醛進行還原胺化；該反應在諸如 THF 之無水極性非質子性溶劑中在環境溫度下進行；

iv. 形成中間體複合物，其經諸如氰基硼氫化鈉之還原劑當場還原；

v. 引入LG及LG'。在甲磺酸酯基之情況下，在諸如三級胺(例如TEA)之鹼存在下使用甲磺醯氯；參見實例1.4。

流程3''中表述之替代形式在於，尤其在由Kitagawa T.等人，*JACS*, 2006, 128(45), 14448-14449所述之用於將乙醯硫烷基鏈引入二級胺上的方法之啟發下，將-ALK-SSMe基團引入NHBoc基團上：



流程3''

根據此替代形式，使用中間體Hal-ALK-SCOMe(例如Hal=I)來進行烷基化，且隨後藉由在鹼性介質中處理來釋放硫醇：

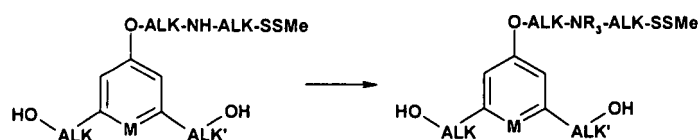
vi. 在諸如DMF之極性非質子性溶劑中，在碳酸鈉存在下由具有硫乙醯基之烷基鹵化物進行烷基化；

vii. 在弱鹼性介質中乙醯基之選擇性斷裂；

viii. 藉由中間體硫醇與MeSSO₂Me反應而形成-SSMe基團；

ix. 保護基PG及PG'之斷裂；

x. 羥基轉化成離核基團LG/LG'，較佳甲磺酸酯基。

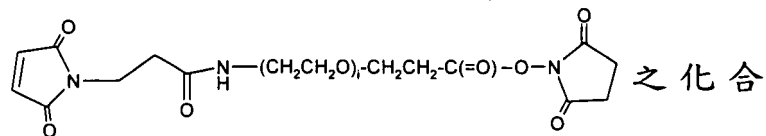


流程 3'''

在合成之不同步驟可能將 R_3 基團 $= (C_1-C_4)$ 烷基引入 NH 基團上 (流程 3''' 中提供一實例)。其例如藉由利用使用醛之瓦拉赫反應 (Wallach reaction) 來進行 (參見實例 1.5, 其中烷基化反應 $NH \Rightarrow NMe$ 使用甲醛)。

關於 P₅

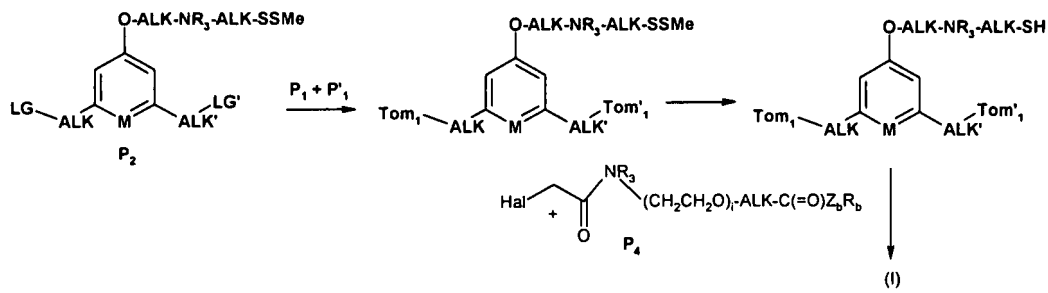
Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL 61105, USA, Jenkem Technology USA Inc., 2033 W. McDermott Dr, Allen, TX 75013-4675, USA, 及 Quanta BioDesign Ltd., 195 West Olentangy Street, Suite O, Powell, Ohio 43065-8720, USA 銷售通式



之化合物, 其表示為 NHS-PEG-順丁烯二醯亞胺。更特定言之可涉及 CAS 第 756525-99-2 號之化合物。

向順丁烯二醯亞胺單元中添加硫醇之反應係描述於「Bioconjugate Techniques」, Greg T. Hermanson, 第 2 版, Elsevier Inc. (ISBN-13: 978-0-12-370501-3; ISBN-10: 0-12-370501-0) 的第 721 頁。

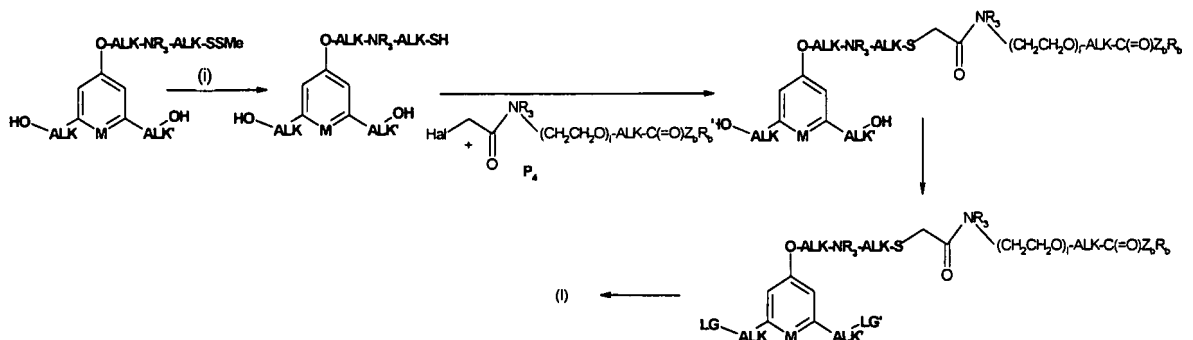
$L_1 = -O-ALK-NR_3-ALK-S-$ 且 $L_2 = -CH_2C(=O)-NR_3-(CH_2CH_2O)_i-ALK-$



流程 4

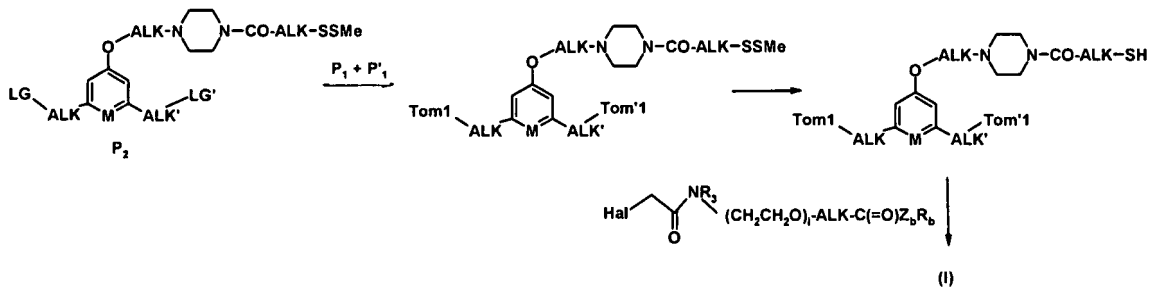
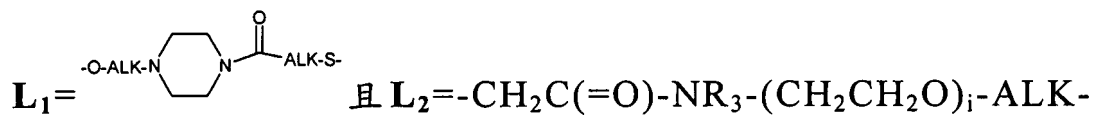
該製備類似於流程 3 中所述者， P_5 由 P_4 替換。

流程 4' 中所述之替代形式對應於流程 2 及 2' 中所述之類似製備。

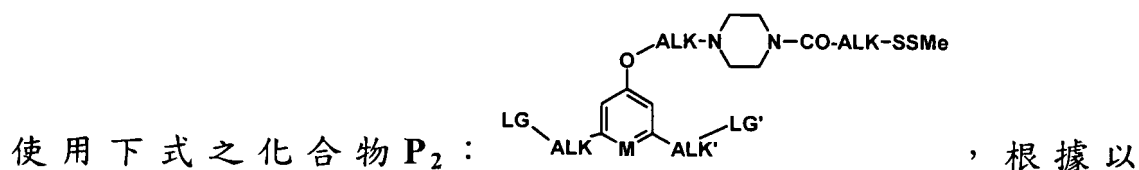


流程 4'

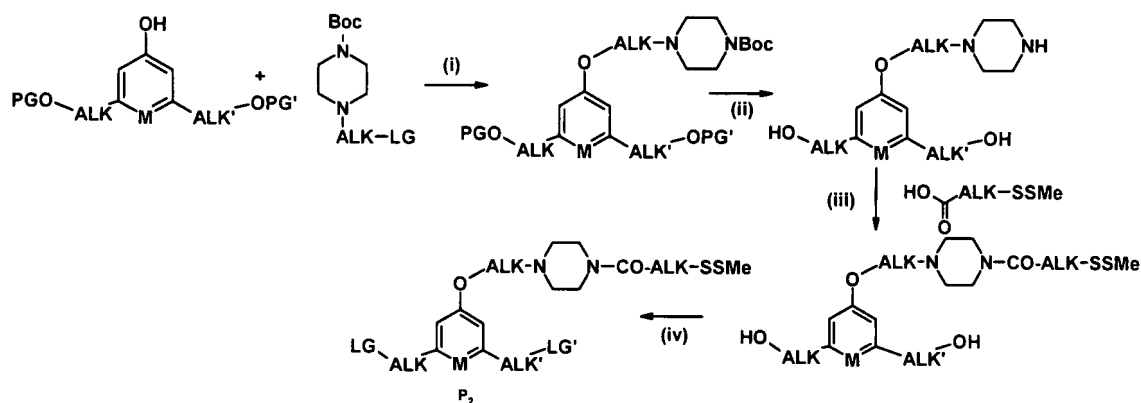
i. 藉由二硫化物還原來脫除保護基



流程 5

製備 P₂

下流程 5' 獲得其：



流程 5'

i. 藉由在哌嗪之 1 位單保護及在 4 位藉由離核 LG 基團進行末端位置之烷基鏈官能化，從而使芳環之羥基烷基化。較佳地，離核基團為甲磺酸酯基且威廉森反應 (Williamson reaction) 係在諸如 THF 或 DMF 之無水極性非質子性溶劑中在氫化物存在下進行；

ii. 較佳在酸性介質中脫除 Boc、PG 及 PG' 保護基，舉例而言，當 PG 及 PG' 基團為 TBDMS 時，在鹽酸或 TFA 存在下進行。

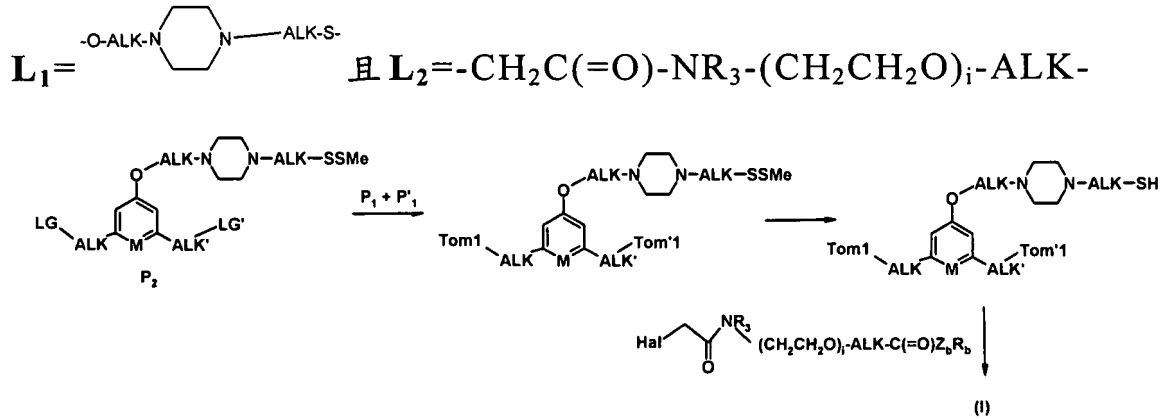
根據步驟 i 及 ii 之替代形式，可能進行由式

羥基二酯親核取代溴胺，且隨後例如用硼氫化鈉還原酯官能基得到 -CH₂OH 官能基；對此，可能應用 WO

2007/085930 中第 62-63 頁中提供之親核取代及還原之條件；

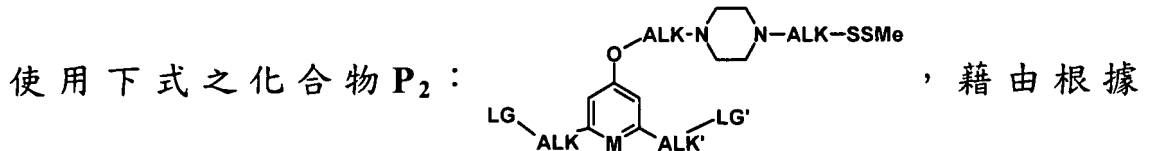
iii. 在酸之初始活化之後進行偶合，得到 NHS 酯；

iv. 引入離去基 LG 及 LG'。在甲磺酸酯基之情況下，在諸如三級胺(例如 TEA)之鹼存在下使用甲磺醯氯。

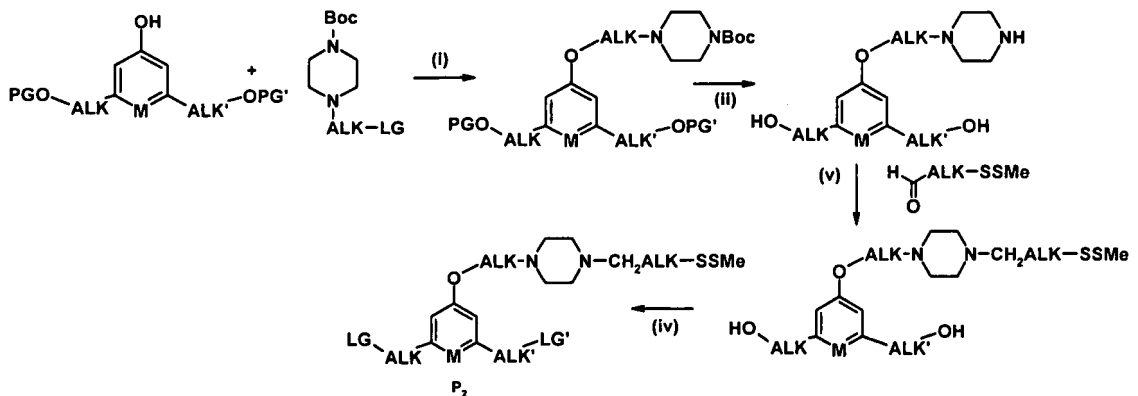


流程 6

製備 P₂



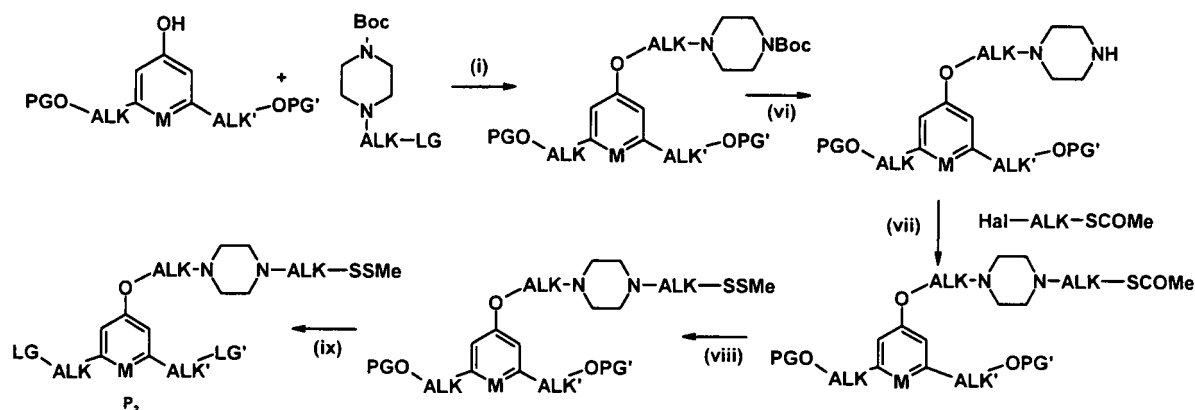
以下流程 6' 進行之還原胺化獲得其。



流程 6'

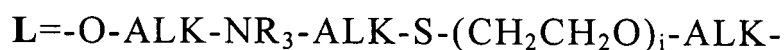
v. 藉由例如在氰基硼氫化鈉及異丙醇鈦存在下進行還原胺化引入 -ALK-SSMe 基團。

流程 6'' 中提供類似於流程 3'' 中所表述之替代形式且使用 Kitagawa T. 等人, *JACS*, 2006, 128(45), 14448-14449 中所述之烷基化方法:

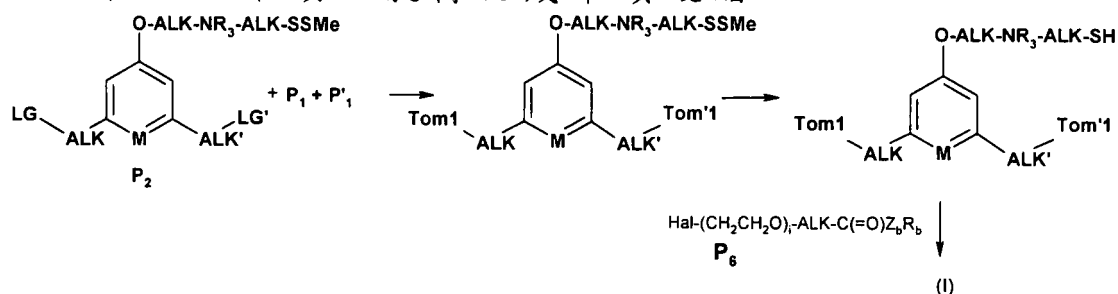


流程 6''

- i. 藉由經單保護之哌嗪進行烷基化(參照流程 5' 之步驟 i);
- vi. 在酸性介質中選擇性脫除 Boc 保護基;
- vii. 在諸如 DMF 之極性非質子性溶劑中, 在碳酸鈉存在下經具有硫乙醯基之烷基鹵化物進行烷基化;
- viii. 在弱鹼性介質中乙醯基之選擇性斷裂, 及藉由在諸如 TEA 之鹼存在下中間體硫醇與 MeSSO_2Me 反應而形成 -SSMe 基團;
- ix. 保護基 PG 及 PG' 之斷裂, 及羥基之



轉化, 較佳經甲磺醯氯轉化成甲磺酸酯。



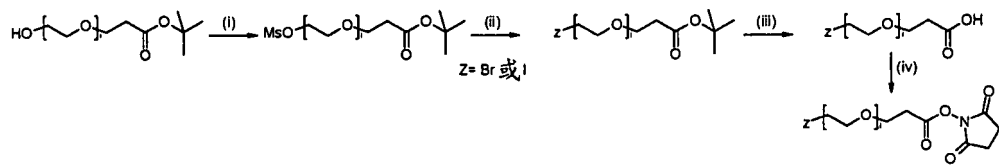
流程 7

此流程自先前流程3得到啟發。化合物P₆可例如為根據WO 03068144(參照圖7之化合物10a)製備的CAS第564476-32-0號之化合物，或者CAS第309916-91-4號之化合物。可以相應PEG化合物為起始物，根據WO 03068144之圖7的相同原理製備具有不同鏈長之類似化合物i。

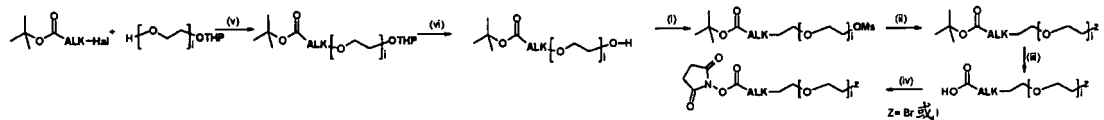
關於P₆

$\text{RbZb-CO-ALK-(OCH}_2\text{CH}_2)_i\text{-Br或I}$ 可根據以下流程製備：

ALK=CH₂CH₂之情況



ALK≠CH₂CH₂之情況



步驟(i)：將醇活化成甲磺酸酯形式；在諸如DCM之無水極性非質子性溶劑中藉由在諸如TEA之鹼存在下以甲磺醯氯處理進行該反應。

步驟(ii)：甲磺酸酯/鹵素交換；以諸如碘化鈉之鹵化鈉在諸如丙酮之極性非質子溶劑之回流下進行該反應。

步驟(iii)：使用鹽酸溶液(例如在二噁烷中之溶液)或三氟乙酸溶液脫除保護基。

步驟(iv)：酸之活化；在環境溫度下在諸如DCM之極性非質子性溶劑中，藉由在諸如DCC之偶合劑存在下以NHS處理來進行該反應。

步驟(v)：PEG鏈之伸長；在諸如THF或DMF之無水極性非質子性溶劑中，藉由用呈四氫呋喃(THF)醚形式之經單保護之PEG二醇之醇鹽處理鹵化酯來進行該反應。此類型之經單保護之PEG二醇的製備在以下文獻中充分描述；參見例如Richard A.等人，*Chem. Eur. J.*, **2005**, *11*, 7315-7321或Sakellariou E.G.等人，*Tetrahedron*, **2003**, *59*, 9083-9090。

步驟(vi)：使用0.1 N鹽酸溶液(例如在二噁烷或乙醇中之溶液)脫除保護基。

熟習此項技術者可自下文所述實例之操作條件中得到啟發。

製備結合物之方法

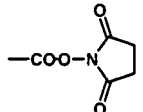
藉由以下方法獲得結合物：

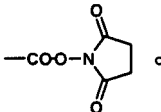
(i)使視情況經緩衝之結合劑水溶液與式(I)化合物之溶液接觸並反應；

(ii)且隨後視情況將步驟(i)中形成之結合物與未反應之式(I)化合物及/或結合劑及/或與可能形成之聚集體分離。

根據另一替代形式，步驟(i)中形成之結合物在步驟(ii)中與未反應之結合劑及溶液中可能存在之聚集體分離。根據另一替代形式，步驟(i)之結合物在步驟(ii)中僅與未反應之式(I)化合物以及與可能形成之聚集體分離，且使可能未反應之結合劑留在溶液中。

式(I)化合物較佳包含活性官能基 $-C(=O)Z_bR_b$ ，其對於RCG2基團，尤其對於抗體上存在之胺基具有反應性。很容易使用熟習此項技術者已知之一或多種化學反應，使相

對不起反應或反應性不夠之化學基團轉化成具較大反應性之基團；例如 $-\text{COOH} + \text{N}$ -羥基丁二醯亞胺 \rightarrow  或者

$-\text{COO}(\text{C}_1-\text{C}_6)$ 烷基 \rightarrow $-\text{COOH} \rightarrow$ $-\text{COOH} + \text{N}$ -羥基丁二醯亞胺 \rightarrow 。

實例 1 中提供適用於抗體及式 (I) 化合物的方法之實例。

可使用例如緩衝劑(諸如磷酸鉀或 N -(2-羥基乙基)哌嗪- N' -2-乙磺酸(HEPES 緩衝劑))來緩衝結合劑之水溶液。緩衝劑視結合劑之性質而定。將式 (I) 化合物溶於極性有機溶劑(例如 DMSO 或 DMA) 中。

反應通常在 20°C 與 40°C 之間的溫度下進行。反應持續時間可在 1 小時與 24 小時之間變化。結合劑與式 (I) 化合物之間的反應可由具有折射偵測器及/或紫外線偵測器之 SEC 監測，以便由此確定進展狀況。若接枝度不充分，則可使反應進行更長時間及/或可進一步添加式 (I) 化合物。關於結合可使用之特定條件的更多細節，可參考實例部分中提供之一般方法。

熟習此項技術者可利用各種層析技術用於步驟 (ii) 之分離：結合物可藉由以下方法純化，例如：空間排阻層析法 (SEC)、吸附層析法(諸如離子交換層析法，IEC)、疏水相互作用層析法 (HIC)、親和性層析法、混合載體(諸如陶瓷羥基磷灰石)上之層析法、或 HPLC。亦可使用透析或透析過濾進行純化。

應瞭解術語「聚集體」意謂可在兩種或兩種以上結合劑

之間形成之組合，該等結合劑已經過結合改質或未經過結合改質。聚集體能夠在許多參數影響下形成，諸如溶液中結合劑之高濃度、溶液之pH值、高剪切力、接枝二聚體之數目及其疏水性、或溫度(參見*J. Membrane Sci.*, 2008, 318, 311-316之序言中所引用之參考文獻)，有些參數之影響往往未明確闡明。在蛋白質或抗體之情況下，可參考*AAPS Journal*, 「Protein Aggregation and Bioprocessing」, 2006, 8(3), E572-E579。可使用已知技術測定聚集體含量，諸如SEC(在此情況下，參見*Analytical Biochemistry*, 1993, 212(2), 469-480)。

在步驟(i)或(ii)之後，可使結合物溶液經歷步驟(iii)之超濾及/或透析過濾。因此在此等步驟結束時獲得呈水溶液之結合物。

抗體

抗體(在此情況下，參見Janeway等人，「Immunobiology」，第5版，2001，Garland Publishing, New York)尤其可選自申請案WO 04043344、WO 08010101、WO 08047242及WO 05009369(抗CA6)中所述者。抗體尤其可為單株、多株或多特異性。亦可涉及抗體片段。亦可涉及鼠類、人類、人類化或嵌合抗體。

結合物

結合物通常包含大約1至10個連接至結合劑之吡咯并[1,4]苯并二氮呋二聚體(此為接枝度或藥物抗體比率(DAR))。此數字根據結合劑及二聚體之性質以及結合所用

之操作條件而變化(例如二聚體相對於結合劑之當量數、反應時間、溶劑性質及可能之共溶劑之性質)。使結合劑與二聚體接觸產生包含以下之混合物：因DAR不同而彼此個別不同之若干結合物；視情況存在之未反應之結合劑(在不完全反應之情況下)；及可能之聚集體。因此例如藉由UV光譜法對最終溶液所測定之DAR相當於平均DAR。

在結合劑為抗體之情況下，UV光譜法可為用來測定DAR之方法。此方法自Antony S. Dimitrov (編)，LLC, 2009, 「Therapeutic Antibodies and Protocols」, 第525卷, 445, Springer Science中所表述得到啟發。其在於在兩個波長(表示為LO1及LO2)下在分離步驟(ii)之後量測結合物之溶液的吸光度。使用以下在結合之前量測的裸抗體及吡咯并[1,4]苯并二氮呋二聚體之莫耳消光係數。

結合物溶液在LO1及LO2處之吸光度(A_{LO1} 及 A_{LO2})係根據SEC光譜之相應峰來量測(由此可能計算「DAR(SEC)」)或藉由使用習知UV分光光度計來量測(由此可能計算「DAR(UV)」)。吸光度可以如下形式表示：

$$A_{LO1} = (c_D \times e_{D LO1}) + (c_A \times e_{A LO1})$$

$$A_{LO2} = (c_D \times e_{D LO2}) + (c_A \times e_{A LO2})$$

對於該方程式：

- c_D 及 c_A 分別表示溶液中與吡咯并[1,4]苯并二氮呋二聚體有關之結合物之部分及與抗體有關之結合物之部分的濃度；
- $e_{D LO1}$ 及 $e_{D LO2}$ 分別表示結合之前在兩個波長LO1及

LO2下吡咯并[1,4]苯并二氮呋二聚體之莫耳吸光係數；

- $e_{A\ LO1}$ 及 $e_{A\ LO2}$ 分別表示在兩個波長LO1及LO2下裸抗體之莫耳吸光係數。

應瞭解術語「裸抗體」意謂未與吡咯并[1,4]苯并二氮呋二聚體連接之抗體，亦即結合步驟之前之抗體。

此兩個方程式之求解過程得到：

$$c_D = [(e_{A\ LO1} \times A_{LO2}) - (e_{A\ LO2} \times A_{LO1})] / [(e_{D\ LO2} \times e_{A\ LO1}) - (e_{A\ LO2} \times e_{D\ LO1})]$$

$$c_A = [A_{LO1} - (c_D \times e_{D\ LO1})] / e_{A\ LO1}$$

平均DAR則等於 c_D/c_A 。在吡咯并[1,4]苯并二氮呋二聚體之情況下，涉及兩個波長LO1=280 nm及LO2=320 nm。根據SEC光譜量測之平均DAR較佳介於1與10之間，較佳介於1.5與7之間。

結合物可用作抗癌劑。由於存在結合劑，致使結合物對腫瘤細胞而非健康細胞呈現高度選擇性。由此可能引導具有抗癌活性之式(I)化合物朝向此等腫瘤細胞之近旁周圍或直接進入此等腫瘤細胞內部(在此情況下，參見以下出版物，其描述治療癌症時使用單株抗體之結合物：

「Antibody-drug conjugates for cancer therapy」，Carter P.J.等人，*Cancer J.*, 2008, 14, 154-169；「Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs」，Chari R., *Acc. Chem. Res.*, 2008, 41, 98-107)。可能治療實體或非實體癌症。

結合物以通常介於1與10 mg/ml之間的濃度調配成經緩

衝之水溶液形式。此溶液可原樣以輸注形式注射或可經再稀釋以形成輸注溶液。

[實例]

化學位移(δ ，單位為ppm)係以ppm表示。

方法A：高壓液相層析-質譜法(LCMS)

該光譜係在正及/或負電噴霧模式(ES+/-)下之 Waters UPLC-SQD裝置上獲得。層析條件：管柱：ACQUITY BEH C18 1.7 μm -2.1 \times 50 mm；溶劑：A：H₂O(0.1%甲酸)，B：CH₃CN(0.1%甲酸)；管柱溫度：50 $^{\circ}\text{C}$ ；流動速率：1 ml/min；梯度(2分鐘)：在0.8分鐘內自5至50% B；1.2分鐘：100% B；1.85分鐘：100% B；1.95分鐘：5% B。

方法B：高壓液相層析-質譜法(LCMS)

該光譜係在正及/或負電噴霧模式(ES+/-)下之 Waters ZQ裝置上獲得。層析條件：管柱：XBridge C18 2.5 μm 3 \times 50 mm；溶劑：A：H₂O(0.1%甲酸)，B：CH₃CN(0.1%甲酸)；管柱溫度：70 $^{\circ}\text{C}$ ；流動速率：0.9 ml/min；梯度(7分鐘)：在5.3分鐘內自5至100% B；5.5分鐘：100% B；6.3分鐘：5% B。

方法C：質譜法(MS)

該光譜係使用化學電離(反應氣體：氬氣)在 WATERS GCT裝置(無LC而直接引入)上記錄。

方法D：高壓液相層析-質譜法(LCMS)

該光譜係在正及/或負電噴霧模式(ES+/-)下之 Waters UPLC-SQD裝置上獲得。層析條件：管柱：ACQUITY BEH

C18 1.7 μm -2.1 \times 50 mm；溶劑：A：H₂O(0.1%甲酸)，B：CH₃CN(0.1%甲酸)；管柱溫度：70 $^{\circ}$ C；流動速率：1 ml/min；梯度(2分鐘)：在1分鐘內自5至50% B；1.3分鐘：100% B；1.45分鐘：100% B；1.75分鐘：5% B。

方法E：高壓液相層析-質譜法(LCMS)

該光譜係以電噴霧電離模式在正及/或負模式(ES+/-)下之 Waters UPLC-SQD 裝置上獲得。層析條件：管柱：ACQUITY BEH C18 1.7 μm -2.1 \times 50 mm；溶劑：A：H₂O(0.1%甲酸)，B：CH₃CN(0.1%甲酸)；管柱溫度：70 $^{\circ}$ C；流動速率：1 ml/min；梯度(4分鐘)：在3.15分鐘內自5至100% B；3.75分鐘：5% B。

方法F：高壓液相層析-質譜法(LCMS)

該光譜係以電噴霧電離模式在正及/或負模式(ES+/-)下之 Waters UPLC-SQD 裝置上獲得。層析條件：管柱：ACQUITY BEH C18 1.7 μm -2.1 \times 30 mm；溶劑：A：H₂O(0.1%甲酸)，B：CH₃CN(0.1%甲酸)；管柱溫度：45 $^{\circ}$ C；流動速率：0.6 ml/min；梯度(2分鐘)：在1分鐘內自5至50% B；1.3分鐘：100% B；1.45分鐘：100% B；1.75分鐘：5% B。

方法G：結合物之去糖基化及質譜法(HRMS)

去糖基化為使用醣苷酶進行酶促消化之技術。其以500 μl 結合物+100 μl Tris HCl 50 mM緩衝液+10 μl 聚糖酶-F(glycanase-F)(100單位凍乾酶/100 μl 水)為起始物進行。使混合物渦旋且維持在37 $^{\circ}$ C下隔夜。由此準備好去糖基化

樣品以供HRMS分析之用。視情況，樣品之HRMS分析亦可在無先前去糖基化之情況下進行。在該兩種情況下，質譜皆在正電噴霧模式(ES+)下之Waters Q-Tof-2裝置上獲得。層析條件：管柱：4 μ m BioSuite 250 URH SEC 4.6 \times 300 mm(Waters)；溶劑：A：25 mM甲酸銨+1%甲酸，B：CH₃CN；管柱溫度：30 $^{\circ}$ C；流動速率：0.4 ml/min；等位溶劑：70% A+30% B(15分鐘)。

在式(I)化合物之製備中主張本專利申請案中所述之所有中間體化合物之用途。更特定言之，在各別式(I)化合物之製備中主張各實例中所描述之所有中間體化合物之用途。

實例1

1.1. 製備結合物

藉由使 hu2H11(在 WO 2008010101 第 15 頁中亦稱為 hu53 2H11；其為包含胺基酸序列為 SED ID No. 24 之 VH 之抗體)與 3-(2-{2-[2-(2-{3-[3-(2-{[2-(2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呋-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶-4-基氧基)乙基](甲基)胺基}-1,1-二甲基乙基硫烷基)-2,5-二側氧基吡咯啶-1-基]丙醯基胺基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)丙酸 N-羥基丁二醯亞胺酯反應來製備結合物。

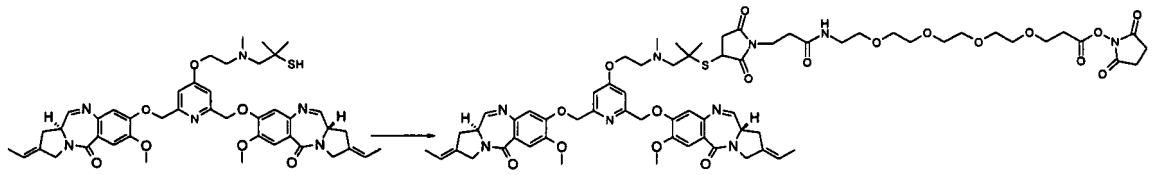
將 516 μ g 3-(2-{2-[2-(2-{3-[3-(2-{[2-(2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呋-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶-4-基氧基)乙基](甲基)胺基}-1,1-二甲基乙基硫烷基)-2,5-二側氧基吡咯啶-1-基]丙

醯基胺基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)丙酸N-羥基丁二醯亞胺酯於540 μl DMA中之溶液添加至8.19 mg hu2H11於2.16 ml pH=8的含水緩衝液中，該緩衝液含有0.05 M濃度之N-(2-羥基乙基)哌嗪-N'-2-乙磺酸(HEPES)、0.05 M濃度之NaCl及2 mM濃度之乙二胺四乙酸(EDTA)。在AT下攪拌3小時後，將混合物經由Millex^R-SV 0.45 μM (PVDF Durapore Millipore)過濾且在藉由添加HCl而使pH=6.5之磷酸鹽緩衝鹽水中預平衡之SuperdexTM 200製備級管柱(HiloadTM 26/60 GE管柱)上純化。合併所關注之溶離份且在Amicon Ultra-15(Ultracel 50k Millipore)上濃縮，接著經由在具有10 mM濃度之組胺酸的含水緩衝液中預平衡之Sephadex G-25(NAP-5及NAP-10 GE管柱)過濾，該含水緩衝液包含10%蔗糖及5% NMP。

藉由分光光度法使用4-{2-[甲基(2-甲基-2-巰基丙基)胺基]乙氧基}-2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呋-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶之消光係數($e_{319\text{ nm}}=8848\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 且 $e_{280\text{ nm}}=8634\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)及hu2H11之消光係數($e_{280\text{ nm}}=208\text{ 380 M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)來定量測定所獲得之結合物(2.5 ml)：在1.52 mg/ml之濃度下測定每個抗體分子平均有3.8個托馬黴素二聚體。

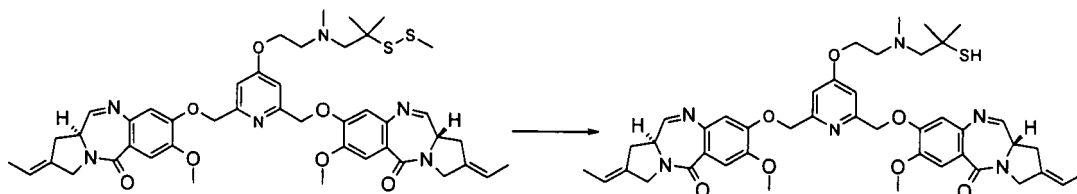
1.2. 3-(2-{2-[2-(2-{3-[3-(2-{[2-(2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呋-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶-4-基氧基)乙基](甲基)胺基}-1,1-二甲基乙基硫烷基)-2,5-二側氧基吡咯啶-1-基]丙醯基胺基}

乙氧基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)丙酸N-羥基丁二醯亞胺酯



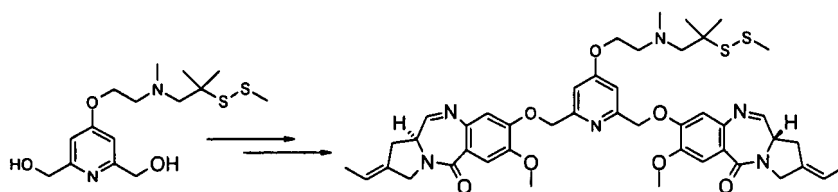
將 9.82 mg 4-{2-[甲基(2-甲基-2-巰基丙基)胺基]乙氧基}-2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呷-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶於 50 μ l DMA 中之溶液及 6.8 mg 3-{2-[2-(2-{2-[3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫吡咯-1-基)丙醯基胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸N-羥基丁二醯亞胺酯於 50 μ l DMA 中之溶液添加至 3.3 mg 負載於樹脂上之二異丙基乙胺中 (3.72 mmol/g)。在 AT 下將所獲得之混合物攪拌 24 小時，且接著使用 0 至 10% 甲醇於 DCM 中之梯度經由二氧化矽 (Interchrom Puriflash Silica 15/35U 2G) 過濾。合併包含所要產物之溶離份，在 RP 下濃縮，且接著藉由二氧化矽 (Interchrom Puriflash Silica 15/35U 2G) 上之急驟層析，使用 0 至 10% MeOH 於 DCM 中之梯度進行純化。合併包含所要產物之溶離份且在 RP 下濃縮。由此獲得 1.16 mg 3-(2-{2-[2-(2-{3-[3-(2-{[2-(2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呷-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶-4-基氧基)乙基](甲基)胺基}-1,1-二甲基乙基硫烷基)-2,5-二側氧基吡咯啉-1-基]丙醯基胺基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)丙酸N-羥基丁二醯亞胺酯。LC/MS (E): rt=1.38 min; [M+H]⁺: m/z 1322。

1.3. 4-{2-[甲基(2-甲基-2-巰基丙基)胺基]乙氧基}-2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮吡-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶



將 40 mg 參(2-羧乙基)膦鹽酸鹽及 36.6 mg NaHCO_3 於 680 μl 水中之溶液添加至 40 mg 4-{2-[甲基(2-甲基-2-甲基二硫烷基丙基)胺基]乙氧基}-2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮吡-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶於 2.1 ml 甲醇及 930 μl DMF 中之溶液中。將混合物在 AT 下攪拌 45 分鐘，接著在 RP 下濃縮，且藉由二氧化矽(Merck SuperVarioFlash 15 g 管柱，Si60 15-40 μm) 上之急驟層析，使用 0 至 10% MeOH 於 DCM/乙腈 9:1 混合物中之梯度進行純化。合併包含所要產物之溶離份且在 RP 下濃縮。由此獲得 21 mg 4-{2-[甲基(2-甲基-2-巰基丙基)胺基]乙氧基}-2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮吡-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶。LC/MS (E): $\text{rt}=1.28$ min; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 809; $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$: m/z 827。

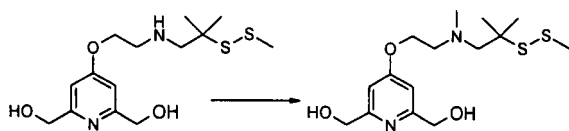
1.4. 4-{2-[甲基(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)胺基]乙氧基}-2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮吡-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶



將 19.6 μl 甲磺醯氯添加至冷卻至 -25°C 的 22 mg 4-{2-[甲基(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)胺基]乙氧基}-2,6-雙(羥基甲基)吡啶及 53 μl TEA 於 0.5 ml DCM 中之溶液中。攪拌 30 分鐘後，使混合物水解且有機相以水洗滌，隨後經 MgSO_4 乾燥且在 RP 下濃縮。將由此獲得之殘餘物 (22 mg) 以及 30 mg K_2CO_3 及 12 mg KI 添加至 20 mg 托馬黴素於 0.7 ml DMF 中之溶液中。將混合物在 30°C 下攪拌 2 小時，且接著用 4 ml 水來水解。所得沈澱用水洗滌，在真空下乾燥，隨後溶於 DCM 中，在 RP 下濃縮且藉由二氧化矽 (Merck SuperVarioFlash 15 g 管柱，Si60 15-40 μm) 上之急驟層析，使用 0 至 5% MeOH 於 DCM 中之梯度進行純化。合併包含所要產物之溶離份且在 RP 下濃縮。由此獲得 8 mg 4-{2-[甲基(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)胺基]乙氧基}-2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呋-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶。 ^1H NMR (500 MHz, d-氯仿): 1.28 (s, 6 H); 1.76 (d, $J=6.4$ Hz, 6 H); 2.39 (s, 3 H); 2.43 (s, 3 H); 2.60 (s, 2 H); 2.91 (s, 2 H); 2.97 (s, 4 H); 3.91 (d, $J=4.2$ Hz, 2 H); 4.00 (s, 6 H); 4.09 (s, 2 H); 4.27 (s, 4 H); 5.27 (s, 4 H); 5.61 (q, $J=6.4$ Hz, 2 H); 6.85 (s, 2 H); 7.00 (s, 2 H); 7.56 (s, 2 H); 7.65 (d, $J=4.2$ Hz, 2 H)。LC/MS (A): $\text{rt}=0.74$ min; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z

855; $[M-H]^-$: m/z 853。

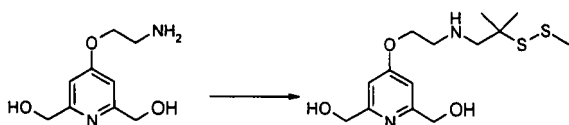
1.5. 4-{2-[甲基(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)胺基]乙氧基}-2,6-雙(羥基甲基)吡啶



將 365 μ l 甲酸添加至冷卻至 0°C 的 322 mg 4-[2-(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基胺基)乙氧基]-2,6-雙(羥基甲基)吡啶於 262 μ l 甲醛中之懸浮液中。將混合物在 100°C 下加熱 1¼ 小時。降回至環境溫度之後，使混合物水解，且接著添加 5 N 氫氧化鈉水溶液直至實現 pH=12。水相經 AcOEt 萃取 3 次，且合併之有機相經 $MgSO_4$ 乾燥並在 RP 下濃縮。由此獲得 310 mg 4-{2-[甲基(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)胺基]乙氧基}-2,6-雙(羥基甲基)吡啶。

1H NMR (300 MHz, d_6 -DMSO): 1.26 (s, 6 H); 2.39 (s, 3 H); 2.40 (s, 3 H); 2.60 (s, 2 H); 2.88 (t, $J=5.7$ Hz, 2 H); 4.13 (t, $J=5.7$ Hz, 2 H); 4.45 (d, $J=6.0$ Hz, 4 H); 5.31 (t, $J=6.0$ Hz, 2 H); 6.85 (s, 2 H)。LC/MS (A): $rt=0.22$ min; $[M+H]^+$: m/z 333; $[M+HCO_2H-H]^-$: m/z 377。

1.6. 4-[2-(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基胺基)乙氧基]-2,6-雙(羥基甲基)吡啶



將 270 μ l 2-(甲基二硫基)異丁醛及 730 μ l 異丙醇鈦添加

至 390 mg 4-[2-胺基乙氧基]-2,6-雙(羥基甲基)吡啶(自 WO 07085930 第 101 頁中所述之 4-(2-(第三丁氧羰基胺基)乙氧基)-2,6-雙(羥基甲基)吡啶上脫除 Boc 保護基之後所製備)於 2 ml THF 中之懸浮液中。20 分鐘後，添加另外 270 μ l 2-(甲基二硫基)異丁醛及另外 730 μ l 異丙醇鈦且將混合物在 AT 下攪拌 2 小時。接著添加 6 ml 乙醇至混合物中，將混合物在 AT 下攪拌 20 分鐘，且隨後添加 124 mg 氰基硼氫化鈉至混合物中。攪拌 45 分鐘之後，添加另外 124 mg 氰基硼氫化鈉，且在攪拌 1 小時之後，在 RP 下濃縮混合物且將殘餘物在 AcOEt 及水中稀釋。濾出所得沈澱且將其溶於 1 M HCl 水溶液中。所獲得之水相經 5 M 氫氧化鈉水溶液調至鹼性 pH 值，並用 DCM 萃取三次，且合併之有機相在 RP 下濃縮。由此獲得 322 mg 4-[2-(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基胺基)乙氧基]-2,6-雙(羥基甲基)吡啶。

^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): 1.26 (s, 6 H); 1.81 (寬峰 m, 1 H); 2.39 (s, 3 H); 2.67 (寬峰 s, 2 H); 2.94 (寬峰 t, $J=5.7$ Hz, 2 H); 4.11 (t, $J=5.7$ Hz, 2 H); 4.45 (d, $J=5.5$ Hz, 4 H); 5.32 (t, $J=5.5$ Hz, 2 H); 6.85 (s, 2 H)。LC/MS (A): $rt=0.24$ min; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 347。

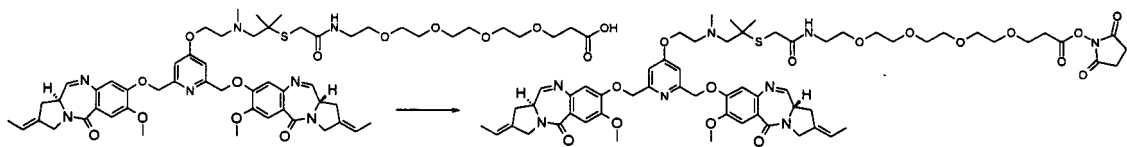
實例 2

2.1. 製備結合物

如關於實例 1 所述，藉由使 hu2H11 與 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{[2-(2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氫呋-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶-4-基

氧基)乙基](甲基)胺基}-1,1-二甲基乙基硫烷基)乙醯基胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸N-羥基丁二醯亞胺酯反應來製備結合物。藉由分光光度法，使用4-{2-[甲基(2-甲基-2-巰基丙基)胺基]乙氧基}-2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮吡-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶之消光係數($e_{319 \text{ nm}}=8848 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ， $e_{280 \text{ nm}}=8634 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)及hu2H11之消光係數($e_{280 \text{ nm}}=208 \text{ 380 M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)來定量測定所獲得之結合物：測定每個抗體分子平均有5.6個托馬黴素二聚體。

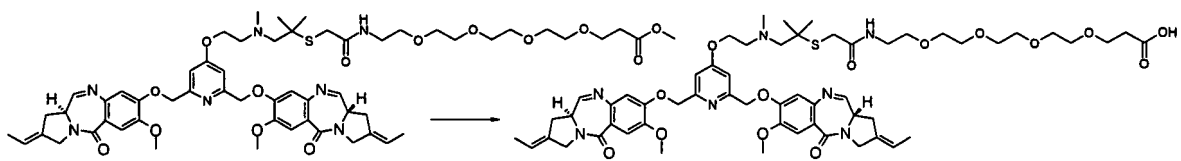
2.1. 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{[2-(2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮吡-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶-4-基氧基)乙基](甲基)胺基}-1,1-二甲基乙基硫烷基)乙醯基胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸N-羥基丁二醯亞胺酯



將5.5 mg碳酸N,N'-二丁二醯亞胺酯及15 μl DIPEA添加至12 mg 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{[2-(2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮吡-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶-4-基氧基)乙基](甲基)胺基}-1,1-二甲基乙基硫烷基)乙醯基胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸於1 ml THF及1 ml DCM中之溶液中。在AT下3小時之後，添加4 ml DCM且用水洗滌所得有機相兩次，

經 MgSO_4 乾燥且在 RP 下濃縮，且藉由二氧化矽 (Interchrom Puriflash Silica 15/35U 2G) 上之急驟層析，使用 3 至 8% 甲醇於 DCM 中之梯度純化殘餘物。由此獲得 8 mg 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{[2-(2,6-雙 [(S)-2-亞 -(E)-乙基 -7-甲氧基 -1,2,3,11a-四氫吡咯并 [2,1-c][1,4] 苯并二氮呋 -5-酮 -8-基氧基甲基]吡啶 -4-基氧基)乙基](甲基)胺基}-1,1-二甲基乙基硫烷基)乙醯基胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸 N-羥基丁二醯亞胺酯。LC/MS (E): $\text{rt}=1.36$ min; $[\text{M}+2\text{H}_2\text{O}+\text{Na}]^+$: m/z 1270; $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{Na}]^+$: m/z 1252; $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$: m/z 1229; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 1211。

2.2. 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{[2-(2,6-雙 [(S)-2-亞 -(E)-乙基 -7-甲氧基 -1,2,3,11a-四氫吡咯并 [2,1-c][1,4] 苯并二氮呋 -5-酮 -8-基氧基甲基]吡啶 -4-基氧基)乙基](甲基)胺基}-1,1-二甲基乙基硫烷基)乙醯基胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸

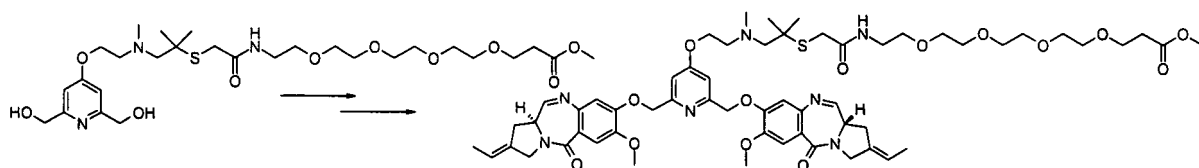


將 17.5 μl 氫氧化鋰水溶液及 100 μl 水添加至 18 mg 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{[2-(2,6-雙 [(S)-2-亞 -(E)-乙基 -7-甲氧基 -1,2,3,11a-四氫吡咯并 [2,1-c][1,4] 苯并二氮呋 -5-酮 -8-基氧基甲基]吡啶 -4-基氧基)乙基](甲基)胺基}-1,1-二甲基乙基硫烷基)乙醯基胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸甲酯於 270 μl THF 中之溶液中。2 小時之後，於 DCM 中稀

釋混合物且添加磷酸鹽緩衝液至 pH=3。所得水相經 DCM 萃取 3 次，合併之有機相經 MgSO₄ 乾燥且在 RP 下濃縮，且藉由二氧化矽 (Interchrom Puriflash Silica 15/35U 2G) 上之急驟層析，使用 3 至 15% 甲醇於 DCM 中之梯度純化殘餘物。由此獲得 11.5 mg 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{[2-(2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呋-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶-4-基氧基)乙基](甲基)胺基}-1,1-二甲基乙基硫烷基)乙醯基胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸。LC/MS (D): rt=0.88 min; [M+H₂O+Na]⁺: m/z 1154; [M+H₂O+H]⁺: m/z 1133; [M+H]⁺: m/z 1115。

2.3. 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{[2-(2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呋-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶-4-基氧基)乙基](甲基)胺基}-1,1-二甲基乙基硫烷基)乙醯基胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸甲酯

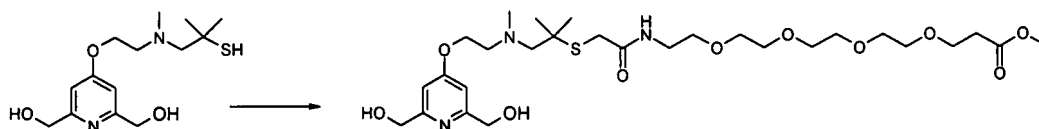
根據實例 1 自 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{[2-(2,6-雙(羥基甲基)吡啶-4-基氧基)乙基]甲基胺基}-1,1-二甲基乙基硫烷基)乙醯基胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸甲酯來製備：



LC/MS (D): rt=0.93 min; [M+H₂O+H]⁺: m/z 1146; [M+H]⁺:

m/z 1128。

2.4. 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{[2-(2,6-雙(羥基甲基)吡啶-4-基氧基)乙基](甲基)胺基}-1,1-二甲基乙基硫烷基)乙醯基胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸甲酯

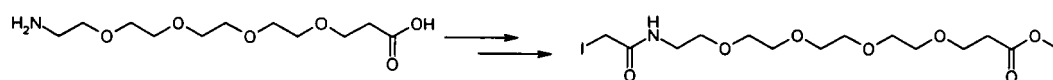


將 73.7 mg 3-[2-(2-{2-[2-(2-碘乙醯基胺基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酸甲酯於 1 ml DMF 及 39 μ l DIPEA 中之溶液添加至 45 mg 4-{2-[(2-巯基-2-甲基丙基)(甲基)胺基]乙氧基}-2,6-雙(羥基甲基)吡啶於 1 ml DMF 中之溶液中。在 AT 下 24 小時之後，在 RP 下濃縮混合物，且藉由二氧化矽 (Analogix Super Flash SiO₂ SF25-8g) 上之急驟層析，使用 0 至 10% 甲醇於 DCM 中之梯度進行純化。由此獲得 53 mg 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{[2-(2,6-雙(羥基甲基)吡啶-4-基氧基)乙基](甲基)胺基}-1,1-二甲基乙基硫烷基)乙醯基胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸甲酯。

¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO): 1.21 (s, 6 H); 2.40 (s, 3 H); 2.50-2.56 (m, 4 H); 2.87 (t, J=5.8 Hz, 2 H); 3.15-3.23 (m, 4 H); 3.40 (t, J=5.8 Hz, 2 H); 3.47-3.52 (m, 12 H); 3.59 (s, 3 H); 3.62 (t, J=6.2 Hz, 2 H); 4.13 (t, J=5.8 Hz, 2 H); 4.45 (d, J=5.8 Hz, 4 H); 5.31 (t, J=5.8 Hz, 2 H); 6.85 (s, 2 H); 7.98 (t, J=5.8 Hz, 1 H)。LC/MS (A): rt=0.35 min; [M+H]⁺: m/z 620; [M+2H]²⁺: m/z 310.5 (基峰); [M-H+HCO₂H]⁻: m/z

664。

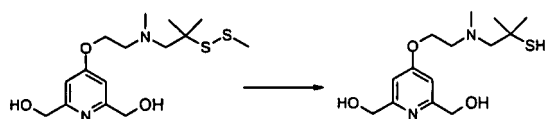
2.5. 3-[2-(2-{2-[2-(2-碘乙醯基胺基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酸甲酯



將 117.4 mg 碘乙醯基 N-羥基丁二醯亞胺酯於 3 ml DCM 中之溶液添加至 100 mg 3-(2-(2-{2-[2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)丙酸中。在 AT 下 2 小時之後，添加 330 μ l MeOH 且將混合物冷卻至 0 $^{\circ}$ C。添加 360 μ l 三甲基矽烷基重氮甲烷於己烷中之 2 M 溶液。1 小時之後，藉由添加 50 μ l 乙酸中和混合物，且接著添加飽和 NaHCO₃ 水溶液直至實現 pH=8。有機相經 MgSO₄ 乾燥且在 RP 下濃縮，且藉由二氧化矽 (Interchrom Puriflash Silica 15/35U 10G) 上之急驟層析，使用 0 至 10% 甲醇於 DCM 中之梯度純化殘餘物。由此獲得 132 mg 3-[2-(2-{2-[2-(2-碘乙醯基胺基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酸甲酯。

¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO): 2.54 (t, J=6.4 Hz, 2 H); 3.20 (q, J=5.8 Hz, 2 H); 3.41 (t, J=5.8 Hz, 2 H); 3.48-3.53 (m, 12 H); 3.60 (s, 3 H); 3.63 (t, J=6.4 Hz, 2 H); 3.65 (s, 2 H); 8.27 (寬峰 t, J=5.8 Hz, 1 H)。LC/MS (A): rt=0.54 min; [M+H]⁺: m/z 448; [M+HCO₂H-H]⁻: m/z 492。

2.6. 4-{2-[(2-巯基-2-甲基丙基)(甲基)胺基]乙氧基}-2,6-雙(羥基甲基)吡啶



將 198 mg 參(2-羧乙基)膦鹽酸鹽於 730 µl 水中之溶液添加至 80 mg 4-{2-[甲基(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)胺基]乙氧基}-2,6-雙(羥基甲基)吡啶於 1.95 ml 甲醇中之溶液中。在 AT 下 2 小時之後，將混合物在 RP 下濃縮且將殘餘物溶解於 10 ml 水中。藉由添加氫氧化鈉水溶液使水相達至 pH=8，且接著用 AcOEt 萃取 2 次。合併之有機相經飽和 NaCl 水溶液洗滌且在 RP 下濃縮。獲得 68 mg 4-{2-[(2-巯基-2-甲基丙基)(甲基)胺基]乙氧基}-2,6-雙(羥基甲基)吡啶。

¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO): 1.28 (s, 6 H); 2.43 (s, 3 H); 2.54 (s, 2 H); 2.62 (s, 1H); 2.91 (t, J=5.7 Hz, 2 H); 4.15 (t, J=5.7 Hz, 2 H); 4.45 (d, J=5.8 Hz, 4 H); 5.30 (t, J=5.8 Hz, 2 H); 6.85 (s, 2 H)。LC/MS (A): rt=0.11 min; [M+H]⁺: m/z 301。

實例 3

3.1. 製備結合物

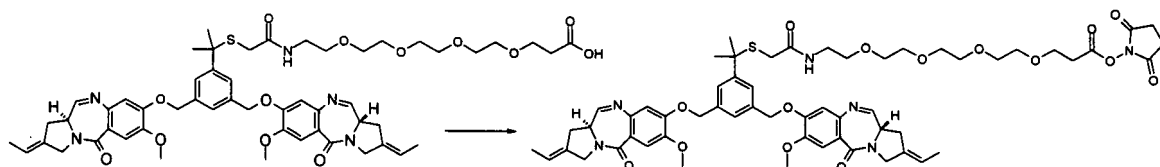
如關於實例 1 所述，藉由使 hu2H11 與 3-(2-{2-[2-(2-{2-[1-(3,5-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮-8-基氧基甲基]苯基-4-基)-1-甲基乙基硫烷基]乙醯基胺基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)丙酸 N-羥基丁二醯亞胺酯反應來製備結合物。

藉由分光光度法，使用 1-(1-甲基-1-(甲基二硫烷基)乙基)-3,5-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯

并[2,1-c][1,4]苯并二氮呋-5-酮-8-基氧基甲基]苯之消光係數($e_{319\text{ nm}}=8460\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 且 $e_{280\text{ nm}}=10\ 531\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)及hu2H11之消光係數($e_{280\text{ nm}}=208\ 380\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)來定量測定所獲得之結合物：測定每個抗體分子平均有4.2個托馬黴素衍生物。

3.2. 3-(2-{2-[2-(2-{2-[1-(3,5-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呋-5-酮-8-基氧基甲基]苯基-4-基)-1-甲基乙基硫烷基]乙醯基胺基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)丙酸N-羥基丁二醯亞胺酯

如關於實例2所述，自3-(2-{2-[2-(2-{2-[1-(3,5-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呋-5-酮-8-基氧基甲基]苯基-4-基)-1-甲基乙基硫烷基]乙醯基胺基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)丙酸來製備：

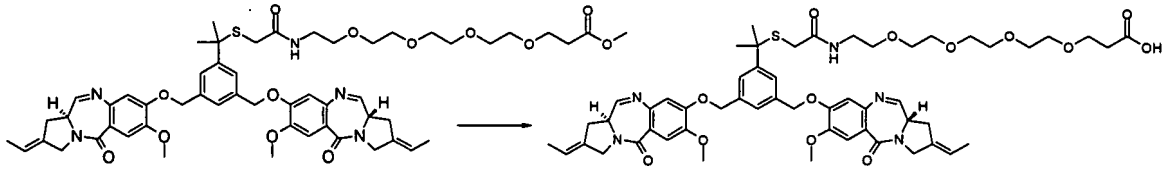


LC/MS (F): $rt=1.27\text{ min}$; $[M+H]^+$: $m/z\ 1123$ 。

3.3. 3-(2-{2-[2-(2-{2-[1-(3,5-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呋-5-酮-8-基氧基甲基]苯基-4-基)-1-甲基乙基硫烷基]乙醯基胺基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)丙酸

如關於實例2所述，自3-(2-{2-[2-(2-{2-[1-(3,5-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呋-5-酮-8-基氧基甲基]苯基-4-基)-1-甲基-乙基硫烷

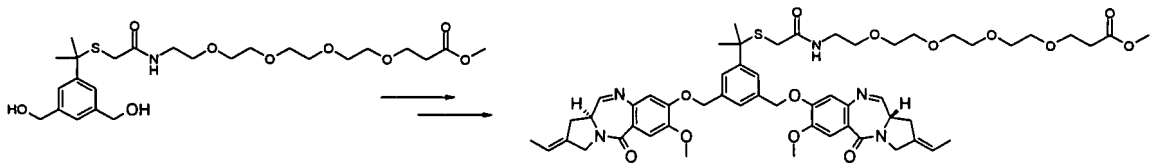
基]乙醯基胺基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)丙酸甲酯
來製備：



LC/MS (F): $rt=1.19$ min; $[M+H]^+$: m/z 1026。

3.4. 3-(2-{2-[2-(2-{2-[1-(3,5-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮吡-5-酮-8-基氧基甲基]苯基-4-基)-1-甲基乙基硫烷基]乙醯基胺基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)丙酸甲酯

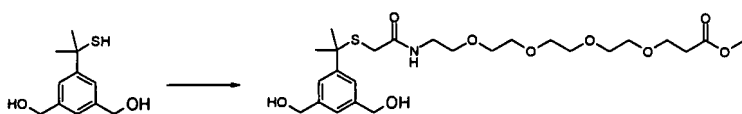
如關於實例2所述，自3-(2-{2-[2-(2-{2-[1-(3,5-雙(羥基甲基)苯基)-1-甲基乙基硫烷基]乙醯基胺基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)丙酸甲酯來製備：



LC/MS (F): $rt=1.28$ min; $[M+H]^+$: m/z 1040。

3.5. 3-(2-{2-[2-(2-{2-[1-(3,5-雙(羥基甲基)苯基)-1-甲基乙基硫烷基]-乙醯基胺基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)丙酸甲酯

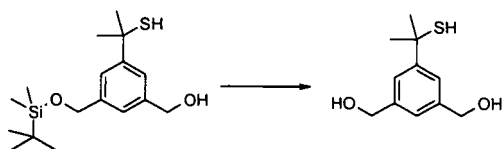
如關於實例2所述，自3,5-雙(羥基甲基)-1-(1-巰基-1-甲基乙基)苯來製備：



1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): 1.64 (s, 6 H); 2.53 (t, $J=6.2$

Hz, 2 H); 2.93 (s, 2 H); 3.15 (q, J=6.0 Hz, 2 H); 3.37 (t, J=6.0 Hz, 2 H); 3.49 (m, 12 H); 3.59 (s, 3 H); 3.62 (t, J=6.2 Hz, 2 H); 4.49 (d, J=5.6 Hz, 4 H); 5.13 (t, J=5.6 Hz, 2 H); 7.14 (s, 1 H); 7.32 (s, 2 H); 7.84 (t, J=6.0 Hz, 1 H)。
 LC/MS (B): rt=2.98 min; [M+H]⁺: m/z 532; 基峰: m/z 354; [M-H+HCO₂H]⁻: m/z 576。

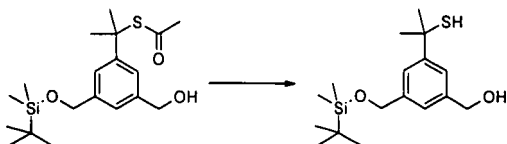
3.8. 3,5-雙(羥基甲基)-1-(1-巰基-1-甲基乙基)苯



將 43 mg 5-羥基甲基-1-(1-巰基-1-甲基乙基)-3-[(第三丁基)二甲基矽烷基氧基甲基]苯於 1 ml 乙酸/THF/水(3/1/1)混合物中之溶液在 AT 下攪拌 4.5 小時且在 RP 下濃縮，接著將殘餘物溶解於 3 ml 水中。藉由添加 10% Na₂CO₃ 水溶液使水相之 pH 值達到 7，且接著用 AcOEt 萃取水相。有機相經 MgSO₄ 乾燥且在 RP 下濃縮。由此獲得 18 mg 3,5-雙(羥基甲基)-1-(1-巰基-1-甲基乙基)苯。

¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO): 1.76 (s, 6 H); 3.19 (s, 1 H); 4.48 (d, J=5.9 Hz, 4 H); 5.14 (t, J=5.9 Hz, 2 H); 7.13 (s, 1 H); 7.36 (s, 2 H)。MS (C): CI: [M+NH₄]⁺: m/z 230。

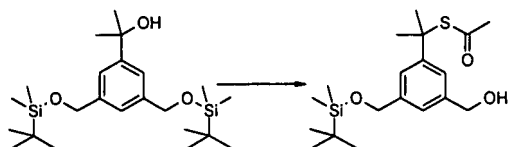
3.9. 5-羥基甲基-1-(1-巰基-1-甲基乙基)-3-[(第三丁基)二甲基矽烷基氧基甲基]苯



將 114 μl 水合肼添加至 336 mg 硫乙酸 1-[3-[(第三丁基)二甲基矽烷基氧基甲基]-5-(羥基甲基)苯基]-1-甲基乙酯於 3.7 ml 乙腈中之溶液中。在 AT 下 3 小時之後，在 RP 下濃縮混合物且藉由二氧化矽 (Biotage 25+M) 上之急驟層析，使用 0 至 55% AcOEt 於庚烷中之梯度純化殘餘物。由此獲得 230 mg 5-羥基甲基-1-(1-巰基-1-甲基乙基)-3-[(第三丁基)二甲基矽烷基氧基甲基]苯。

^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): 0.08 (s, 6 H); 0.92 (s, 9 H); 1.76 (s, 6 H); 3.19 (s, 1H); 4.48 (d, $J=5.7$ Hz, 2 H); 4.71 (s, 2 H); 5.14 (t, $J=5.7$ Hz, 1 H); 7.10 (s, 1 H); 7.33 to 7.42 (m, 2 H)。MS (C): CI: $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: m/z 344。

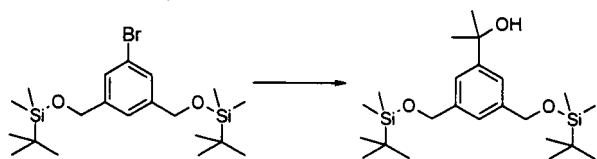
3.10. 硫乙酸 1-[3-[(第三丁基)二甲基矽烷基氧基甲基]-5-(羥基甲基)苯基]-1-甲基乙酯



將 404 μl 硫乙酸及 376 mg 碘化鋅添加至 1 g 1-(1-羥基-1-甲基乙基)-3,5-雙[(第三丁基)二甲基矽烷基氧基甲基]苯於 4.7 ml 1,2-二氯乙烷中之溶液中。將混合物在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下加熱 40 分鐘。降回至 AT 後，藉由過濾移除鹽，在 RP 下濃縮有機相且藉由二氧化矽 (Biotage 40+M) 上之急驟層析，使用 0 至 30% AcOEt 於庚烷中之梯度純化殘餘物。由此獲得 248 mg 硫乙酸 1-[3-[(第三丁基)二甲基矽烷基氧基甲基]-5-(羥基甲基)苯基]-1-甲基乙酯。

^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): 0.08 (s, 6 H); 0.91 (s, 9 H); 1.79 (s, 6 H); 2.17 (s, 3H); 4.48 (d, $J=5.6$ Hz, 2 H); 4.70 (s, 2 H); 5.16 (t, $J=5.6$ Hz, 1 H); 7.11 (s, 1 H); 7.33 (s, 1 H); 7.35 (s, 1H) 。 LC/MS (A): $rt=1.23$ min; $[\text{M}+\text{Na}]^+$: m/z 391 。

3.11. 1-(1-羥基-1-甲基乙基)-3,5-雙[(第三丁基)二甲基矽烷基氧基甲基]苯



將10.5 ml n -BuLi於己烷中之1.6 M溶液逐滴添加至冷卻至 -71°C 的4.32 g 1-溴-3,5-雙[(第三丁基)二甲基矽烷基氧基甲基]苯(G.T. Crisp及P.D. Turner, *Tetrahedron*, 2000, 56 (42), 8335)於150 ml THF中之溶液中。1小時30分鐘之後，逐滴添加4.27 ml丙酮。使混合物回復至AT，接著用飽和 NH_4Cl 水溶液水解。水相經100 ml AcOEt萃取，合併之有機相經 MgSO_4 乾燥並在RP下濃縮，且藉由二氧化矽(Biotage 65+M)上之急驟層析，使用0至20% AcOEt於庚烷中之梯度純化殘餘物。由此獲得2.48 g 1-(1-羥基-1-甲基乙基)-3,5-雙[(第三丁基)二甲基矽烷基氧基甲基]苯。

^1H NMR (400 MHz, d -氯仿): 0.11 (s, 12 H); 0.96 (s, 18 H); 1.59 (s, 6H); 1.69 (s, 1 H); 4.76 (s, 4 H); 7.21 (s, 1 H); 7.33 (s, 2 H) 。 LC/MS (B): $rt=6.43$ min; $[\text{M}+\text{Na}]^+$: m/z 447; 基峰: m/z 407 。

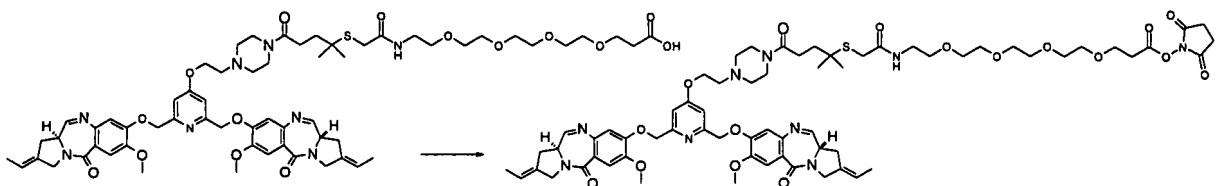
實例 4

4.1. 製備結合物

如關於實例1所述，藉由使hu2H11與3-{2-[2-(2-{2-[2-(4-{4-[2-(2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呋-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶-4-基氧基)乙基]哌嗪-1-基}-1,1-二甲基-4-側氧基丁基硫烷基)乙醯基胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸N-羥基丁二醯亞胺酯反應來製備結合物。藉由分光光度法，使用托馬黴素二聚體之消光係數 $e_{320\text{ nm}}=7876\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 且 $e_{280\text{ nm}}=4334\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 及 hu2H11 之消光係數 $e_{280\text{ nm}}=208\ 380\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 來定量測定所獲得之結合物：測定每個抗體分子平均有 3.13 個托馬黴素二聚體。

4.2. 3-{2-[2-(2-{2-[2-(4-{4-[2-(2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呋-5-酮-8-基氧基甲基]-吡啶-4-基氧基)乙基]哌嗪-1-基}-1,1-二甲基-4-側氧基丁基硫烷基)乙醯基胺基]-乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸N-羥基丁二醯亞胺酯：

根據實例2，自3-{2-[2-(2-{2-[2-(4-{4-[2-(2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呋-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶-4-基氧基)乙基]哌嗪-1-基}-1,1-二甲基-4-側氧基丁基硫烷基)乙醯基胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸來製備

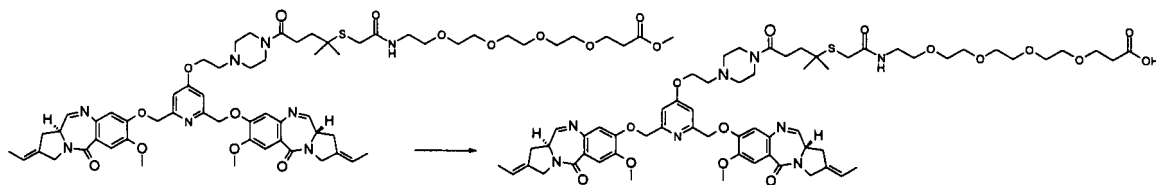


LC/MS (B): $rt=3.27\text{ min}$; $[M+H]^+$: $m/z\ 1309$; $[M+2H]^{2+}$: m/z

655。

4.3. 3-{2-[2-(2-{2-[2-(4-{4-[2-(2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呋-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶-4-基氧基)乙基]哌嗪-1-基}-1,1-二甲基-4-側氧基丁基硫烷基)乙醯基胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸

根據實例 2，自 3-{2-[2-(2-{2-[2-(4-{4-[2-(2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呋-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶-4-基氧基)乙基]哌嗪-1-基}-1,1-二甲基-4-側氧基丁基硫烷基)乙醯基胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸甲酯來製備

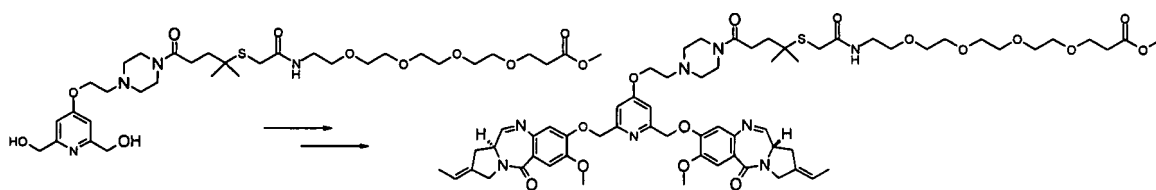


LC/MS (B): $rt=3.16$ min; $[M+H]^+$: m/z 1212; $[M+2H]^{2+}$: m/z 606。

4.4. 3-{2-[2-(2-{2-[2-(4-{4-[2-(2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呋-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶-4-基氧基)乙基]-哌嗪-1-基}-1,1-二甲基-4-側氧基丁基硫烷基)乙醯基胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]-乙氧基}丙酸甲酯

根據實例 2，自 3-{2-[2-(2-{2-[2-(4-{4-[2-(2,6-雙(羥基甲基)吡啶-4-基氧基)乙基]哌嗪-1-基}-1,1-二甲基-4-側氧基丁基硫烷基)-乙醯基胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸甲酯來製備

丙酸甲酯來製備

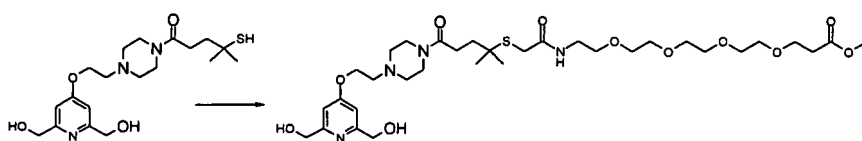


^1H NMR (500 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$): 1.22 (s, 6 H); 1.69 (m, 8 H); 2.37 (m, 2 H); 2.40 (m, 2 H); 2.48 (m, 2 H); 2.53 (t, $J=6.1$ Hz, 2 H); 2.72 (m, 2 H); 2.92 (m, 2 H); 3.04 (m, 2 H); 3.11 (s, 2 H); 3.19 (q, $J=5.4$ Hz, 2 H); 3.39 (t, $J=5.4$ Hz, 2 H); 3.42 (m, 4 H); 3.49 (m, 12 H); 3.59 (s, 3 H); 3.62 (t, $J=6.1$ Hz, 2 H); 3.86 (s, 6 H); 3.88 (m, 2 H); 4.10 (m, 4 H); 4.22 (m, 2 H); 5.17 (d, $J=13.0$ Hz, 2 H); 5.22 (d, $J=13.0$ Hz, 2 H); 5.55 (m, 2 H); 6.94 (s, 2 H); 7.09 (s, 2 H); 7.38 (s, 2 H); 7.77 (d, $J=3.9$ Hz, 2 H); 8.01 (t, $J=5.4$ Hz, 1 H)。

LC/MS (B): $\text{rt}=3.30$ min; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 1225; $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$: m/z 613 (基峰)。

4.5. 3-{2-[2-(2-{2-[2-(4-{4-[2-(2,6-雙(羥基甲基)吡啶-4-基氧基)乙基]哌嗪-1-基}-1,1-二甲基-4-側氧基丁基硫烷基)乙醯基胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸甲酯

根據實例 2，自 4-(2-[4-(4-巯基-4-甲基戊醯基)哌嗪-1-基]乙氧基)-2,6-雙(羥基甲基)吡啶來製備

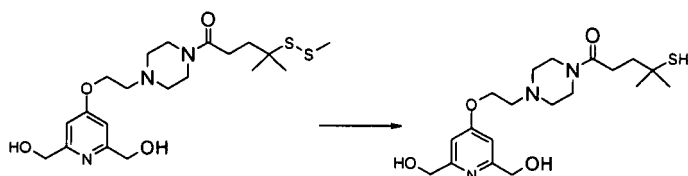


^1H NMR (500 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$): 所有信號皆為寬峰：1.22 (s, 6 H); 1.71 (m, 2 H); 2.20-2.58 (經部分遮蔽之 m, 8 H);

2.75 (m, 2 H); 3.12 (m, 2 H); 3.19 (m, 2 H); 3.47-3.53 (m, 18 H); 3.60 (m, 5 H); 4.18 (m, 2 H); 4.46 (m, 4 H); 5.31 (m, 2 H); 6.86 (s, 2 H); 8.00 (m, 1 H)。LC/MS (B): $rt=2.20$ min; $[M+H]^+$: m/z 717; $[M-H+HCO_2H]^-$: m/z 761。

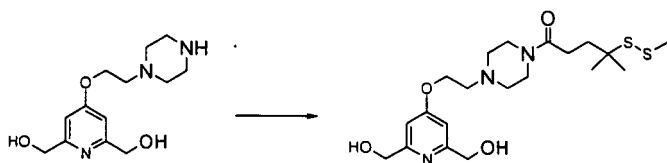
4.6. 4-(2-[4-(4-巯基-4-甲基戊醯基)哌嗪-1-基]乙氧基)-2,6-雙(羥基甲基)吡啶

根據實例 2，自 4-(2-[4-(4-甲基-4-(甲基二硫烷基)戊醯基)哌嗪-1-基]乙氧基)-2,6-雙(羥基甲基)吡啶來製備



1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): 1.32 (s, 6 H); 1.76 (m, 2 H); 2.36-2.53 (經部分遮蔽之 m, 6 H); 2.66 (s, 1 H); 2.75 (t, $J=5.5$ Hz, 2 H); 3.40-3.52 (m, 4 H); 4.18 (t, $J=5.5$ Hz, 2 H); 4.46 (s, 4 H); 5.30 (極寬峰 m, 2 H); 6.86 (s, 2 H)。LC/MS (B): $rt=0.76$ min; $[M+H]^+$: m/z 398; $[M-H]^-$: m/z 396。

4.7. 4-(2-[4-(4-甲基-4-(甲基二硫烷基)戊醯基)哌嗪-1-基]乙氧基)-2,6-雙(羥基甲基)吡啶

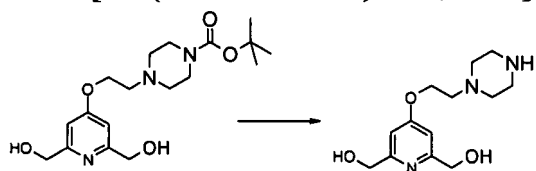


向 600 mg 4-[2-(哌嗪-1-基)乙氧基]-2,6-雙(羥基甲基)吡啶於 12 ml DMF 中之溶液中添加 344 μ L TEA 且接著在攪拌 10 分鐘後，添加 748 mg 4-甲基-4-(甲基二硫烷基)戊酸、

417 μ l 二異丙基碳化二亞胺及 69 mg 1-羥基苯并三唑水合物。在 AT 下 15 小時之後，在 RP 下濃縮混合物，添加 15 ml 水，且用 AcOEt 進行 2 次萃取。合併之有機相經 $MgSO_4$ 乾燥且在 RP 下濃縮，且藉由二氧化矽 (Analogix Super Flash SiO_2 SF25-80g) 上之急驟層析，使用 2 至 10% MeOH 於 DCM 中之梯度純化殘餘物。由此獲得 390 mg 4-(2-[4-(4-甲基-4-(甲基二硫烷基)戊醯基)哌嗪-1-基]乙氧基)-2,6-雙(羥基甲基)吡啶。

1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): 1.26 (s, 6 H); 1.79 (m, 2 H); 2.36 (m, 2 H); 2.39 (s, 3 H); 2.40-2.53 (經部分遮蔽之 m, 4 H); 2.75 (t, $J=5.6$ Hz, 2 H); 3.45 (m, 4 H); 4.18 (t, $J=5.6$ Hz, 2 H); 4.46 (d, $J=5.9$ Hz, 4 H); 5.30 (t, $J=5.9$ Hz, 2 H); 6.86 (s, 2 H)。LC/MS (A): $rt=0.42$ min; $[M+H]^+$: m/z 444; $[M-H+HCO_2H]^-$: m/z 488。

4.8. 4-[2-(哌嗪-1-基)乙氧基]-2,6-雙(羥基甲基)吡啶

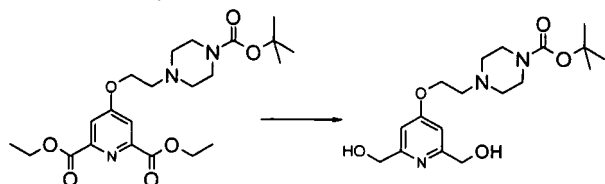


將 19 ml HCl 於二噁烷中之 4 M 溶液添加至 2.3 g 4-(2-(4-(第三丁氧基羰基)哌嗪-1-基)乙氧基)-2,6-雙(羥基甲基)吡啶於 33 ml 二噁烷中之溶液中。在 AT 下 12 小時之後，藉由在燒結玻璃漏斗上過濾回收所得沈澱，將其溶解於 MeOH 中，且接著在 RP 下濃縮，且在 40 ml MeOH/水之 1/1 混合物中稀釋殘餘物。將所得溶液沈積於 Mega BE-SCX, 25 GM 150 ML (Varian) 上。用 MeOH 洗滌該相之後，以 2 N 氫之甲

醇溶液溶離所關注之產物。在RP下濃縮MeOH/NH₃相。由此獲得1.6 g 4-[2-(哌嗪-1-基)乙氧基]-2,6-雙(羥基甲基)吡啶。

¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO): 2.40 (m, 4 H); 2.68 (m, 6 H); 4.15 (t, J=5.7 Hz, 2H); 4.44 (m, 4 H); 5.29 (m, 2 H); 6.85 (s, 2 H)。LC/MS (A): rt=0.10 min; [M+H]⁺: m/z 268; [M+2H]²⁺: m/z 134.5; 基峰: m/z 113。

4.9. 4-(2-(4-(第三丁氧基羰基)哌嗪-1-基)乙氧基)-2,6-雙(羥基甲基)吡啶

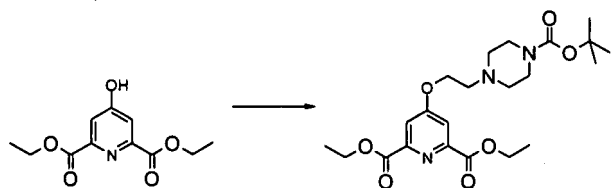


將779 mg 硼氫化鈉及2.29 g CaCl₂添加至3.1 g 4-[2-(4-(第三丁氧基羰基)哌嗪-1-基)乙氧基]吡啶-2,6-二甲酸二乙酯於105 ml EtOH中之溶液中。在AT下3小時之後，將混合物水解且在RP下濃縮。添加水至所獲得之殘餘物中，且所得水相經AcOEt萃取4次。合併之有機相經飽和NaCl水溶液洗滌，且隨後在RP下濃縮。由此獲得2.4 g 4-(2-(4-(第三丁氧基羰基)哌嗪-1-基)乙氧基)-2,6-雙(羥基甲基)吡啶。

¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO): 1.39 (s, 9 H); 2.43 (m, 4 H); 2.73 (t, J=5.6 Hz, 2 H); 3.30 (經部分遮蔽之m, 4 H); 4.17 (t, J=5.6 Hz, 2 H); 4.45 (d, J=5.9 Hz, 4 H); 5.30 (t, J=5.9 Hz, 2H); 6.86 (s, 2 H)。LC/MS (A): rt=0.24 min; [M+H]⁺: m/z 368。

4.10. 4-[2-(4-(第三丁氧基羰基)哌嗪-1-基)乙氧基]吡啶-

2,6-二甲酸二乙酯



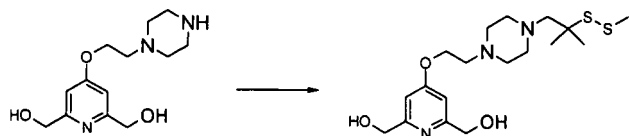
向冷卻至 0°C 的 5 g 1-(第三丁氧基羰基)-4-(2-羥基乙基)哌嗪於 102 ml DCM 中之溶液中添加 4.5 ml TEA，且接著添加 2 ml 甲磺醯氯。1 小時之後，使混合物回復至 AT。再攪拌 1 小時之後，混合物經水解且有機相以水洗滌 2 次，接著經 MgSO₄ 乾燥且在 RP 下濃縮。向所得殘餘物 (6.7 g) 中添加 140 ml DMF，且使混合物達到 60°C。隨後添加 190 mg 白屈胺酸之二乙酯 (Scrimin P., Tecilla P., Tonellato U. 及 Vendrame T.J., *Org. Chem.*, **1989**, *54*, 5988) 及 549 mg K₂CO₃，且將混合物加熱至 80°C 歷時 20 小時。混合物在 RP 下濃縮之後經水解且以 AcOEt 萃取 3 次，合併之有機相以飽和 NaCl 溶液洗滌且在 RP 下濃縮，且藉由二氧化矽 (Analogix Super Flash SiO₂ SF25-150g) 上之急驟層析，使用 60 至 85% AcOEt 於庚烷中之梯度純化殘餘物。由此獲得 3.1 g 4-[2-(4-(第三丁氧基羰基)哌嗪-1-基)乙氧基]吡啶-2,6-二甲酸二乙酯。

¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO): 1.34 (t, J=7.2 Hz, 6 H); 1.39 (s, 9 H); 2.44 (m, 4 H); 2.76 (t, J=5.7 Hz, 2 H); 3.30 (經部分遮蔽之 m, 4 H); 4.34 (t, J=5.7 Hz, 2 H); 4.38 (q, J=7.1 Hz, 4 H); 7.74 (s, 2 H)。LC/MS (B): rt=2.81 min; [M+H]⁺: m/z 452; [MH+HCO₂H]⁻: m/z 496。

實例 5

5.1. 4-{2-[4-(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)哌嗪-1-基]乙氧基}-2,6-雙(羥基甲基)吡啶

根據實例 1，自 4-[2-(哌嗪-1-基)乙氧基]-2,6-雙(羥基甲基)吡啶來製備。



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$): 1.25 (s, 6 H); 2.39 (s, 3 H); 2.40 (s, 2 H); 2.44-2.57 (經部分遮蔽之 m, 8 H); 2.69 (t, $J=5.7$ Hz, 2 H); 4.14 (t, $J=5.7$ Hz, 2 H); 4.45 (d, $J=5.7$ Hz, 4 H); 5.29 (t, $J=5.7$ Hz, 2 H); 6.85 (s, 2 H)。 LC/MS (B) : $\text{rt}=0.51$ min; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 402。

實例 6

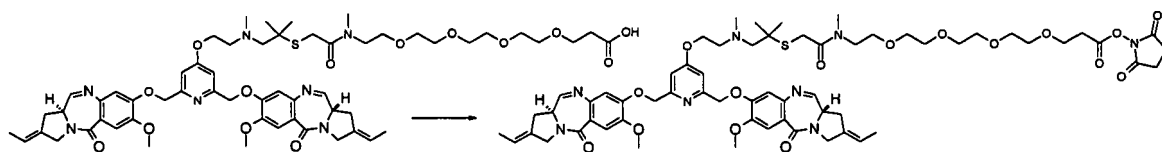
6.1. 製備結合物

如關於實例 1 所述，藉由使 hu2H11 與 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-(2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呋-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶-4-基氧基)乙基](甲基)胺基}-1,1-二甲基乙基硫烷基)乙醯基(甲基)胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸 N-羥基丁二醯亞胺酯反應來製備結合物。藉由分光光度法，使用托馬黴素二聚體之消光係數 $e_{319 \text{ nm}}=7789 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 且 $e_{280 \text{ nm}}=4362 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 及 hu2H11 之消光係數 $e_{280 \text{ nm}}=208 \ 380 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 來定量測定所獲得之結合物：測定每個抗體分子平均有 2.90 個

托馬黴素二聚體。

6.2. 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{[2-(2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呷-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶-4-基氧基)乙基](甲基)胺基}-1,1-二甲基乙基硫烷基)乙醯基(甲基)胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸N-羥基丁二醯亞胺酯

根據實例2，自3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{[2-(2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呷-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶-4-基氧基)乙基](甲基)胺基}-1,1-二甲基乙基硫烷基)乙醯基(甲基)胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸來製備：

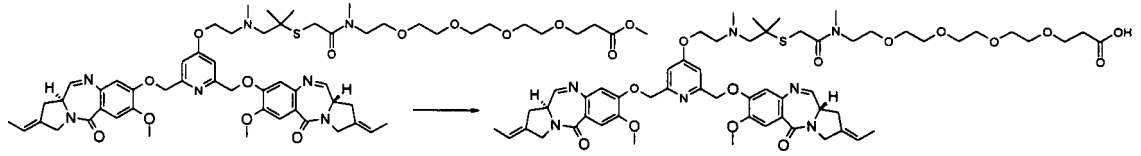


LC/MS (F): $rt=1.02$ min; $[M+H]^+$: m/z 1225; $[M+H_2O+H]^+$: m/z 1243。

6.3. 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{[2-(2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呷-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶-4-基氧基)乙基](甲基)胺基}-1,1-二甲基乙基硫烷基)乙醯基(甲基)胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸

根據實例2，自3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{[2-(2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呷-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶-4-基氧基)乙基](甲基)胺基}-1,1-二甲基乙基硫烷基)乙醯基(甲基)胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸來製備：

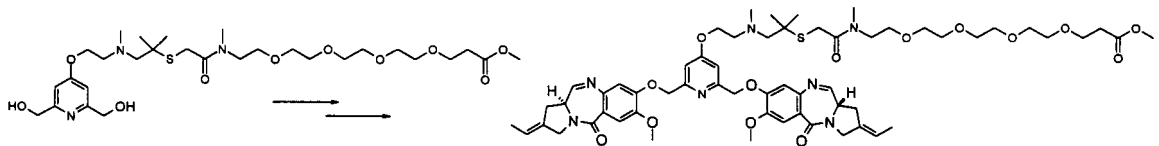
基}-1,1-二甲基乙基硫烷基)乙醯基(甲基)胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸甲酯來製備：



LC/MS (F): rt=0.97 min; $[M+H]^+$: m/z 1129。

6.4. 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{[2-(2,6-雙[(S)-2-亞-(E)-乙基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮吡-5-酮-8-基氧基甲基]吡啶-4-基氧基)乙基](甲基)胺基}-1,1-二甲基乙基硫烷基)乙醯基(甲基)胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸甲酯

根據實例 2，自 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{[2-(2,6-雙(羥基甲基)吡啶-4-基氧基)乙基](甲基)胺基}-1,1-二甲基乙基硫烷基)乙醯基(甲基)胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸甲酯來製備：

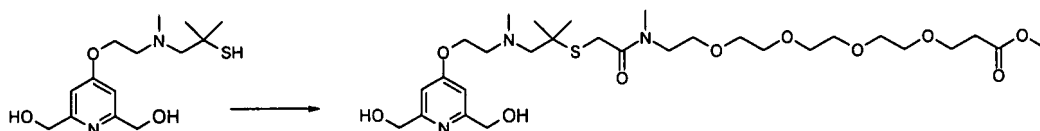


^1H NMR (500 MHz, d_6 -DMSO): 以下吸收峰為寬峰：1.20 (s, 6 H); 1.58-1.73 (m, 6 H); 2.38 (s, 3 H); 2.52-3.07 (m, 13 H); 3.36-3.63 (m, 23 H); 3.67-3.91 (m, 8 H); 4.06-4.26 (m, 6 H); 5.02-5.26 (m, 4 H); 5.33-5.60 (m, 2 H); 6.39-7.42 (m, 6 H); 7.76 (m, 2 H)。

LC/MS (A): rt=0.77 min; $[M+H]^+$: m/z 1142; $[M+2H]^{2+}$: m/z 571.5 (基峰)。

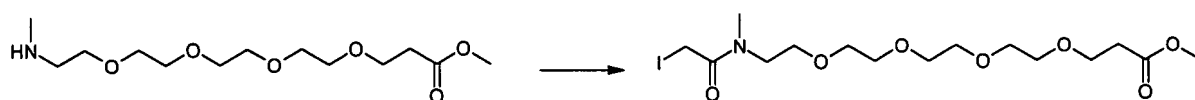
6.5. 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{[2-(2,6-雙(羥基甲基)吡啶-4-基氧基)乙基](甲基)胺基}-1,1-二甲基乙基硫烷基)乙醯基(甲基)胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸甲酯：

根據實例 2，自 3-{2-[2-(2-{2-[(2-碘乙醯基)(甲基)胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸甲酯來製備：



^1H NMR (400 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$): 50/50 解析度之旋轉異構體：1.22 (s, 3H); 1.24 (s, 3 H); 2.41 (s, 3 H); 2.53 (t, $J=6.2$ Hz, 2 H); 2.56 (m, 2 H); 2.80 (s, 1 H); 2.88 (t, $J=5.9$ Hz, 2 H); 3.05 (s, 2 H); 3.35-3.58 (m, 18 H); 3.59 (s, 3 H); 3.62 (t, $J=6.2$ Hz, 2 H); 4.13 (t, $J=5.9$ Hz, 2 H); 4.45 (d, $J=5.9$ Hz, 4 H); 5.29 (t, $J=5.9$ Hz, 2 H); 6.85 (s, 2 H)。LC/MS (B): $\text{rt}=2.18$ min; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 634; $[\text{M}-\text{H}+\text{HCO}_2\text{H}]^-$: m/z 678。

6.6. 3-{2-[2-(2-{2-[(2-碘乙醯基)(甲基)胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸甲酯



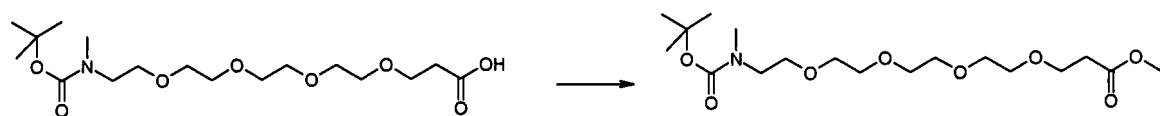
將 117.4 mg 碘乙酸 N-羥基丁二醯亞胺酯於 6.5 ml DCM 中之溶液添加至 215 mg 3-(2-{2-[2-(2-(2-(2-(2-(2,6-雙(羥基甲基)吡啶-4-基氧基)乙基](甲基)胺基)乙氧基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基}丙酸甲酯中。在 AT 下 2 小時之後，在 RP 下濃縮混合物，且藉由二氧化矽 (Analogix Super Flash SiO_2 SF25-24g) 上之急驟層析，使用 0 至 6% MeOH 於 DCM

中之梯度純化殘餘物。由此獲得210 mg 3-{2-[2-(2-{2-[(2-碘乙醯基)(甲基)胺基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸甲酯。¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO): 55/45解析度之旋轉異構體: 2.54 (t, J=6.2 Hz, 2 H); 2.83 (s, 1.35 H); 3.02 (s, 1.65 H); 3.36-3.55 (m, 16 H); 3.60 (s, 3 H); 3.63 (t, J=6.2 Hz, 2 H); 3.83 (s, 1.1 H); 3.88 (s, 0.9 H)。LC/MS (A): rt=0.62 min; [M+H]⁺: m/z 462。

6.7. 3-(2-{2-[2-(2-(甲基胺基)乙氧基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)丙酸甲酯

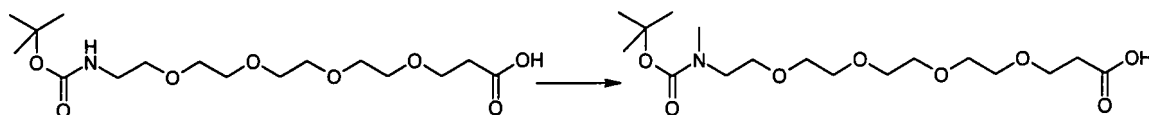
將3 ml HCl於二噁烷中之4 M溶液添加至390 mg 3-[2-(2-{2-[2-((第三丁氧基羰基)(甲基)胺基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酸甲酯於5.3 ml二噁烷中之溶液中。在AT下12小時之後，在RP下濃縮混合物，且將殘餘物溶於最少量之甲醇中，且沈積於Mega BE-SCX, 10GM 60ML(Varian)上。用MeOH洗滌該相之後，以2 N氨之甲醇溶液溶離所關注之產物。在RP下濃縮甲醇/NH₃相。由此獲得270 mg 3-(2-{2-[2-(2-(甲基胺基)乙氧基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)丙酸甲酯。¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO): 2.28 (s, 3 H); 2.54 (t, J=6.2 Hz, 2 H); 2.59 (t, J=5.9 Hz, 2 H); 3.44 (t, J=5.9 Hz, 2 H); 3.47 to 3.54 (m, 12 H); 3.60 (s, 3 H); 3.63 (t, J=6.2 Hz, 2 H)。LC/MS (A) (ELSD): rt=0.30 min; [M+H]⁺: m/z 294。

6.8. 3-[2-(2-{2-[2-((第三丁氧基羰基)(甲基)胺基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酸甲酯



將 2 ml 三甲基矽烷基重氮甲烷於己烷中之 2 M 溶液添加至冷卻至 0°C 的 500 mg 3-[2-(2-{2-[2-((第三丁氧基羰基)(甲基)胺基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酸於 4.8 ml MeOH 中之溶液中。2 小時之後，藉由添加 120 μ l 乙酸中和混合物，且接著在 RP 下濃縮，且藉由二氧化矽 (Analogix Super Flash SiO₂ SF25-40g) 上之急驟層析，使用 0 至 5% 甲醇於 DCM 中之梯度純化殘餘物。由此獲得 400 mg 3-[2-(2-{2-[2-((第三丁氧基羰基)(甲基)胺基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酸甲酯。¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO): 1.38 (s, 9 H); 2.54 (t, J=6.2 Hz, 2 H); 2.80 (寬峰 s, 3 H); 3.29 (經部分遮蔽之 t, J=5.9 Hz, 2 H); 3.45-3.55 (m, 14 H); 3.59 (s, 3 H); 3.63 (t, J=6.2 Hz, 2 H)。LC/MS (A): rt=0.84 min; [M+Na]⁺: m/z 416 (基峰); LC/MS (A): rt=0.84 min; [M+Na]⁺: m/z 416 (基峰)。

6.9. 3-[2-(2-{2-[2-((第三丁氧基羰基)(甲基)胺基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酸



將 85.4 mg NaH 逐份添加至冷卻至 0°C 的 520 mg 3-[2-(2-{2-[2-((第三丁氧基羰基)胺基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酸於 14 ml THF 中之溶液中。攪拌 5 分鐘之後，添加 150 μ l 碘甲烷。接著在 AT 下攪拌混合物 2 小時，且隨後

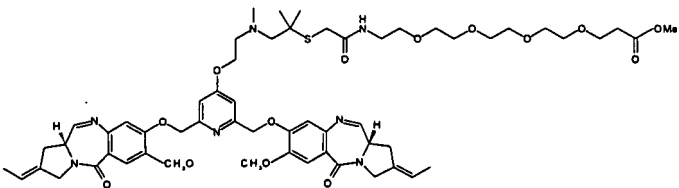
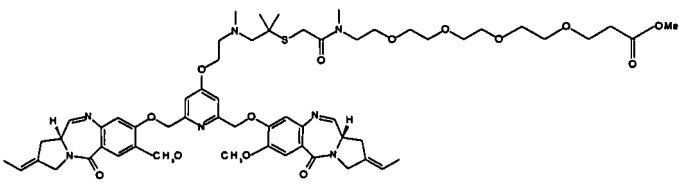
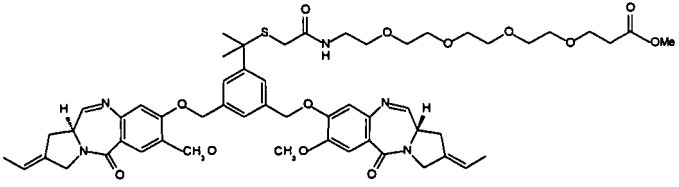
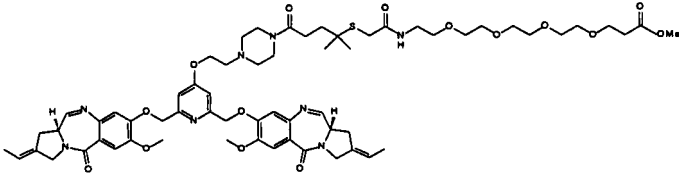
另外添加 150 μ l 碘甲烷。在 AT 下 12 小時後，混合物經水解，且接著藉由在 0°C 下添加乙酸水溶液使其達到酸性 pH 值。水相經 AcOEt 萃取 3 次，合併之有機相經 MgSO₄ 乾燥並在 RP 下濃縮，且所獲得之粗產物與 85 mg NaH 及 176 μ l 碘甲烷再次根據相同方案反應另外 2 小時。由此獲得 500 mg 3-[2-(2-{2-[2-((第三丁氧基羰基)(甲基)胺基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酸。LC/MS (F): rt=1.01 min; [M+H]⁺: m/z 380。

評估式 (IA) 化合物 (其中 Z_bR_b=-OMe 且 Y=Y'=-OMe) 對 MDA-MB-231、MDA-A1 及 HCT116 細胞株增殖的抑制作用

以胰蛋白酶處理呈指數級生長相之 MDA-MB-231、MDA-A1 或 HCT116 細胞，且再懸浮於其各別培養基中 (對於 MDA 細胞，DMEM/F12 Gibco #21331, 10% FCS Gibco #10500-056, 2 nM 麩醯胺酸 Gibco #25030；對於 HCT116 細胞，DMEM Gibco #11960, 10% FCS Gibco #10500-056, 2 mM 麩醯胺酸 Gibco #25030)。將細胞懸浮液以 5000 個細胞/孔 (MDA-MB-231、MDA-A1、HCT116) 之密度接種於 Cytostar 96-孔培養盤 (GE Healthcare Europe, #RPNQ0163) 中的含有血清之完全培養基中。培育 4 小時之後，將托馬黴素二聚體之連續稀釋液添加至各孔中，每種濃度一式三份。在細胞毒性劑存在下，在含有 5% CO₂ 之氛圍下，於 37°C 下培養細胞 3 天。在第 4 天，將 10 μ l ¹⁴C-胸苷溶液 (0.1 μ Ci/孔, Perkin Elmer #NEC56825000) 添加至各孔中。使用 MicroBeta 放射性計數器 (Perkin Elmer) 在實驗開始之後 96

小時量測¹⁴C-胸苷之併入。藉由測定經細胞毒性劑處理之細胞所獲得之計數與對照孔之細胞(僅用培養基處理)所獲得之計數之間的比率，以存活%之形式表示數據。

表 II

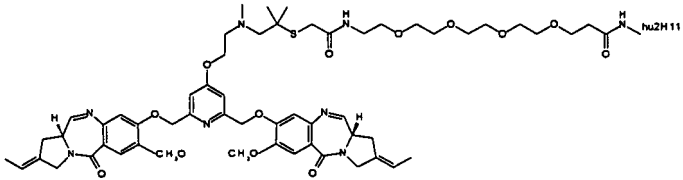
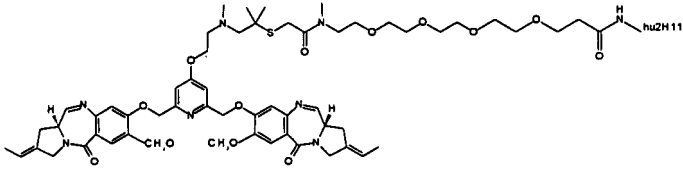
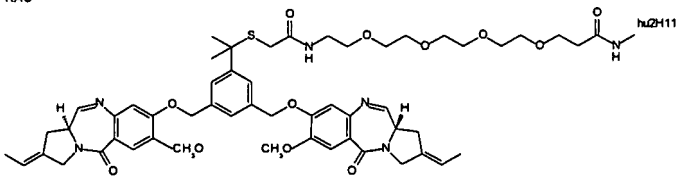
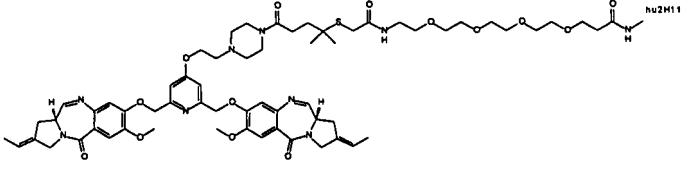
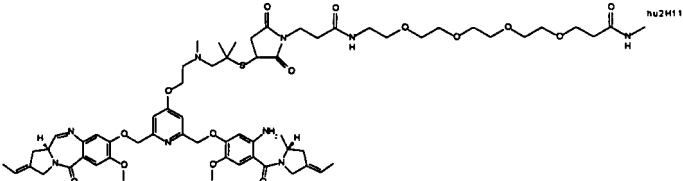
對增殖之抑制作用(96小時處的 ¹⁴ C-胸苷脈衝)	IC ₅₀ [nM]		
式(IA)化合物之結構	HCT116	MDA-A1	MDA-MB231
	0.030	1.991	0.009
	0.120	2.260	0.070
	0.127	>10	0.084
	1.250	>10	0.450

已發現Z_bR_b=-OMe之測試化合物的抗癌活性強大；此令人推測特徵在於另一-Z_bR_b基團之類似化合物傾向於展示相同活性。

評估 hu2H11-細胞毒性劑結合物對MDA-MB-231細胞株增殖之抑制作用

以胰蛋白酶處理呈指數級生長相之MDA-MB-231細胞，且再懸浮於其培養基(DMEM/F12 Gibco #21331, 10% FCS Gibco #10500-056, 2 nM麩醯胺酸Gibco #25030)中。將細胞懸浮液以5000個細胞/孔之密度接種於Cytostar 96-孔培養盤(GE Healthcare Europe, #RPNQ0163)中的含有血清之完全培養基中。培育4小時之後，將抗體-細胞毒性劑免疫結合物之連續稀釋液以自 10^{-7} 降至 10^{-12} M之濃度添加至各孔中(每種濃度一式三份)。在抗體-細胞毒性劑免疫結合物存在下，在含有5% CO₂之氛圍下，於37°C下培養細胞3天。在第4天，將10 μ l ¹⁴C-胸苷溶液(0.1 μ Ci/孔, Perkin Elmer #NEC56825000)添加至各孔中。使用MicroBeta放射性計數器(Perkin Elmer)在實驗開始之後96小時量測¹⁴C-胸苷之併入。藉由測定經免疫結合物處理之細胞所獲得之計數與對照孔之細胞(僅用培養基處理)所獲得之計數之間的比率，以存活%之形式表示數據。在某些實驗*中，在實驗開始時將裸抗體hu2H11以1 μ M之濃度添加至各孔中，且如上所述量測對增殖之抑制作用。

表 III

對增殖之抑制作用(96小時處的 ¹⁴ C-胸苷脈衝)	IC ₅₀ [pM]		
結構	平均 IC ₅₀	平均 IC ₅₀ (+裸 hu2H11*)	IC ₅₀ 率
	31	540	17
	910	5095	6
<p>RAC</p> 	54	3981	74
<p>---</p> 	1255	9125	7
	68.5	1119	16

不可斷裂之托馬黴素二聚體結合物之單體穩定性

用國際申請案 WO 09016516 之實例 3 及 5 中所述之托馬黴素二聚體製備的不可斷裂之 hu2H11 結合物具有以下傾向：

在 3-5°C 下儲存數月之後其單體純度隨時間降低。特別地，在 pH 6.5 且含有 10% 蔗糖及 5% NMP 的組胺酸濃度為 10 mM 之含水緩衝液中調配的此等結合物展示每個抗體分子平均有 3 至 3.5 個托馬黴素二聚體，其初始單體純度為約 97.5%，在 6 至 8 個月中單體純度可降低 6 至 15%。未觀察到實例 3 之結合物有此現象，該結合物每個抗體分子平均具有 3.5 個托馬黴素二聚體，在相同儲存條件下 4 個月中保持大於 99% 之單體純度，由此提示此特定結合物有較佳穩定性。在結合物領域中所期望之一般目標為能夠獲得隨時間變化而保持單體純度之結合物。

評估 hu2H11-細胞毒性劑結合物對於具有晚期人類乳腺癌 MDA-MB-231 之雌性 SCID 小鼠的抗腫瘤活性

針對皮下移植於雌性 SCID 小鼠上的可量測乳腺腫瘤 MDA-MB-231 評估 4 種劑量的表示為 C1 (用國際申請案 WO 09016516 之實例 5 中所述之托馬黴素二聚體製備) 及 C2 (實例 3 之結合物) 的相同抗體 hu2H11 之兩種結合物。對照組未經處理。兩種結合物之劑量係以托馬黴素二聚體 (μg)/kg 給出。其係對於 C1 在第 13 天且對於 C2 在第 24 天以 80、40、20 及 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 藉由快速式靜脈內注射 (IV) 來投與。

關於評估結合物之抗腫瘤活性，每日稱重動物且使用卡尺每週兩次量測腫瘤。在最大耐受劑量 (MTD) 下評估抗腫瘤活性。造成體重最少減輕 20% 或造成 10% (或 10% 以上) 死亡率的與結合物有關之劑量被視為有毒的。動物體重包括腫瘤重量。腫瘤重量係根據下式計算：重量 (mg) = [長度

$(\text{mm}) \times \text{寬度}(\text{mm})^2] / 2$ 。功效參數為消退之平均百分比 $\Delta T / \Delta C$ 、部分及完全消退 (PR 及 CR) 及研究結束時無腫瘤小鼠之數目 (TFM)。

對各腫瘤藉由以下方法來計算各經處理小鼠 (T) 及對照組小鼠 (C) 之腫瘤體積變化：在研究開始之日的腫瘤體積減去指定觀察日之腫瘤體積。對於經處理組計算平均 ΔT ，且對於對照組計算平均 ΔC 。隨後計算比率 $\Delta T / \Delta C$ ，且表示為百分數： $\Delta T / \Delta C = (\delta T / \delta C) \times 100$ 。

$\Delta T / \Delta C$ 小於 40% 之劑量被認為具有治療活性且 $\Delta T / \Delta C$ 小於 10% 之劑量被認為極有活性。當 $\Delta T / \Delta C$ 小於 0 時，該劑量被認為具有高度活性且隨後計算消退百分數 (根據 Plowman J., Dykes D.J., Hollingshead M., Simpson-Herren L. 及 Alley M.C., *Human tumor xenograft models in NCI drug development*: Feibig H.H. BA, 編輯。Basel: Karger.; 1999, 第 101-125 頁)。

腫瘤消退百分數係定義為在指定觀察日經處理組中腫瘤體積相較於治療第一天其之體積減小的百分數。在指定時間 t 及對於每一動物計算腫瘤消退百分數。隨後計算該組之平均消退百分數。

$$\text{消退百分數 (時間 } t \text{ 時)} = \frac{\text{體積}_{10} - \text{體積}_t}{\text{體積}_{10}} \times 100$$

部分消退 (PR)：當腫瘤體積減小達到處理開始之時的腫瘤體積之 50% 時，此種消退係定義為部分消退。

完全消退 (CR)：當腫瘤體積 = 0 mm^3 時獲得完全消退 (當

腫瘤體積不可量測時，認為存在CR)。

TFM：無腫瘤小鼠係定義為在研究結束時(處理超過100天)不展示可偵測之腫瘤的小鼠。

表 IV-評估結合物 C1及 C2對於具有晚期人類乳腺癌 MDA-MB-231之雌性 SCID 小鼠的抗腫瘤活性

結合物	投藥途徑/藉由注射投與之劑量 (ml/kg)	托馬徽素二聚體之劑量 (µg/kg)(mg prot/kg)	投藥天數	死亡率	最少平均體重減輕 % (日)	平均 $\Delta T/\Delta C$ % (日)	消退之平均百分數 (日)	消退部分	完全	TFM (第120日)	生物解譯
C1	IV	80 (3.76)	13	5/5	-	-	-	-	-	-	毒性
DAR 2.9	10 ml/kg	40 (1.88)		0/5	-9.6 (20)	7 (28)	-	3/5	0/5	0/5	MTD, 極具活性
		20 (0.94)		0/5	-3.5 (30)	13 (28)	-	0/5	0/5	0/5	活性
		10 (0.47)		0/5	-1.1 (27)	23 (28)	-	0/5	0/5	0/5	活性
C2	IV	80 (2.98)	24	4/6	-	-	-	-	-	-	毒性
DAR 3.5	10 ml/kg	40 (1.49)		0/6	-5.0 (31)	<0 (46)	96.2 (46)	6/6	1/6	1/6	MTD, 高度活性
		20 (0.75)		0/6	-4.4 (31)	<0 (46)	66.4 (46)	4/6	0/6	0/6	高度活性
		10 (0.37)		0/6	-4.0 (31)	14 (46)	-	0/6	0/6	0/6	活性

縮寫：MTD=最大耐受劑量，TFM=研究結束時之無腫瘤小鼠

根據單劑量投藥方案，經證實在此研究中此等兩種結合物之最高測試劑量(80 µg/kg)有毒，造成體重減輕及死亡。

在MTD(40 µg/kg)下，C1極具活性且造成體重最少減輕9.6%， $\Delta T/\Delta C$ 為7%且造成5個SCID小鼠中有3個PR。在20及10 µg/kg之較低劑量下亦觀察到抗腫瘤活性而不造成PR。

在MTD(40 µg/kg)下，C2具有高度活性且造成體重最少減輕5%，且腫瘤消退為96.2%，同時6個小鼠中有6個PR，包括1個TFM。其在20 µg/kg之較低劑量下亦極具活性，且

腫瘤消退為66.4%，且6個小鼠中有4個PR。然而，在10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之最低劑量下亦觀察到抗腫瘤活性而不造成消退或PR。

總之，發現C2展示強抗癌活性，且在MTD下顯示出在腫瘤消退、PR及TFM(在相同劑量下對於C1未觀察到此等現象)方面比C1更佳之活性。

【圖式簡單說明】

圖1：實例1之結合物在去糖基化之後的高解析度質譜；

圖2：實例2之結合物在去糖基化之後的高解析度質譜；

圖3：實例3之結合物在去糖基化之後的高解析度質譜；

圖4：實例4之結合物在去糖基化之後的高解析度質譜；及

圖5：實例6之非去糖基化結合物的高解析度質譜。

此等圖示在解迴旋(deconvolution)之後顯示，各結合物攜帶0至8個托馬黴素(tomaymycin)二聚體之實體的分佈(D_0 ：無二聚體； D_x ：x個二聚體)。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：**99128330**

※申請日：

※IPC 分類：**C07D; A61K; A61P**

99. 8. 24
一、發明名稱：(中文/英文)

A61K 31/5513 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

新抗癌劑，該藥劑之製備及該藥劑之治療用途

NEW ANTICANCER AGENTS, PREPARATION OF SAID AGENTS
AND THE THERAPEUTIC USE OF SAID AGENTS

二、中文發明摘要：

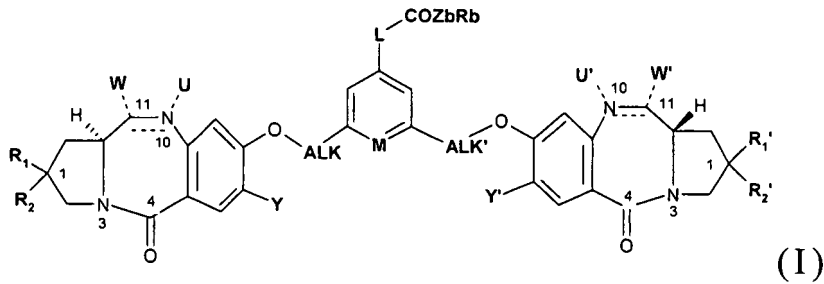
本發明係關於新穎吡咯并[1,4]苯并二氮呋二聚體結合
物，其可用作抗癌劑。

三、英文發明摘要：

The invention relates to novel pyrrolo[1,4]benzodiazepine
dimer conjugates which can be used as anticancer agents.

七、申請專利範圍：

1. 一種式(I)化合物，



其中：

——表示單鍵或雙鍵，其條件為若 —— 表示單鍵，則：

----表示單鍵；

相同或不同之U及/或U'相互獨立地表示H；

相同或不同之W及/或W'相互獨立地表示：OH、-OR、-OCOR、-COOR、-OCOOR、-OCONRR'、N10與C11包括於一環中之環狀胺基甲酸酯基、-NRCONRR'、-OCSNHR、N10與C11包括於一環中之環狀硫代胺基甲酸酯基、-SH、-SR、-SOR、-SOOR、-SO₃⁻、-NRSOOR'、-NRR'、N10與C11包括於一環中之環狀胺、-NROR'、-NRCOR'、-N₃、-CN、Hal或三烷基磷基或三芳基磷基；

相同或不同之R₁、R₂、R₁'及R₂'相互獨立地表示：H、Hal或視情況經一或多個選自以下之取代基取代之(C₁-C₆)烷基：Hal、CN、NRR'、CF₃、OR、芳基或雜芳基，或S(O)_qR，其中q=0、1或2；

或者

R₁與R₂及/或R₁'與R₂'分別一起形成雙鍵=CH₂或=CH-

CH₃ ;

相同或不同之 Y 及 Y' 相互獨立地表示 H 或 OR ;

M 表示 CH 或 N ;

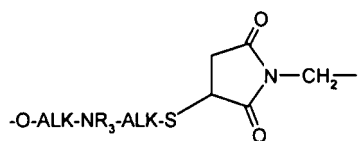
相同或不同之 ALK 及 ALK' 相互獨立地表示 (C₁-C₆) 伸烷基 ;

R 及 R' 相互獨立地表示 H 或視情況經一或多個選自以下之取代基取代之 (C₁-C₆) 烷基或芳基 : Hal、CN、NRR'、CF₃、OR 或芳基或雜芳基 ;

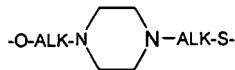
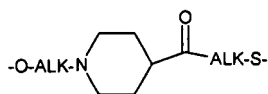
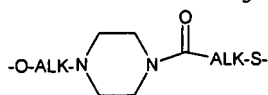
L 表示 :

- L₁-L₂-基團，其中 L₁ 經由該 ALK 或 OALK 基團連接至包含 M 之芳環，且表示以下基團之一：

- ALK-S-



-O-ALK-NR₃-ALK-S-



且 L₂ 表示經由 -CH₂C(=O)- 連接至 L₁ 之 -CH₂C(=O)-NR₃-
(CH₂CH₂O)_i-ALK- 基團 ;

或者

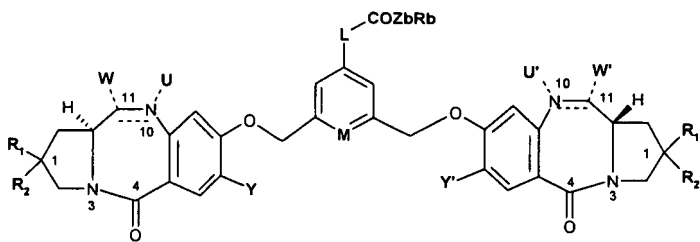
經由該 OALK 基團連接至該包含 M 之芳環的 -O-ALK-NR₃-ALK-S-(CH₂CH₂O)_i-ALK- 基團 ;

R_3 表示 H 或 (C_1-C_6) 烷基；

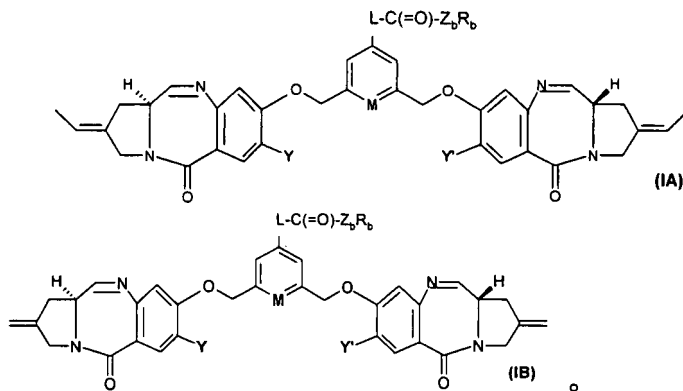
i 表示在 1 至 40，更適當地 1 至 20，較佳 1 至 10 範圍內之整數；

Z_b 表示單鍵、 $-O-$ 或 $-NH-$ ，且 R_b 表示 H 或 (C_1-C_6) 烷基、 (C_3-C_7) 環烷基、芳基、雜芳基或 (C_3-C_7) 雜環烷基，或者 Z_b 表示單鍵且 R_b 表示 Hal。

2. 如請求項 1 之化合物，其具有下式

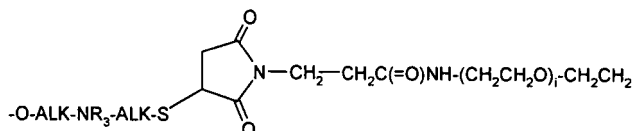
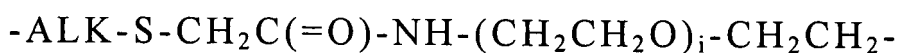


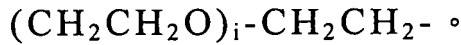
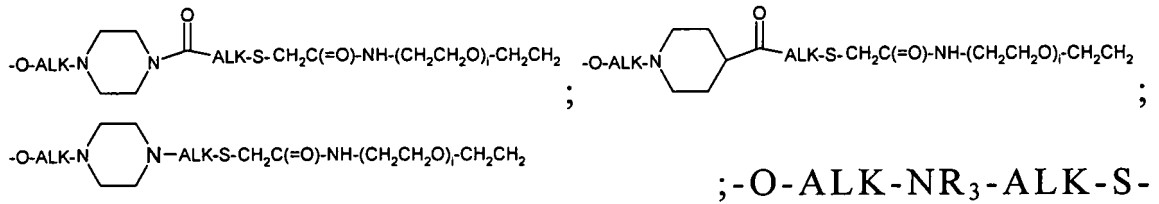
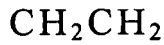
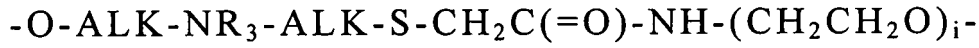
3. 如請求項 1 之化合物，其具有式 (IA) 或 (IB)



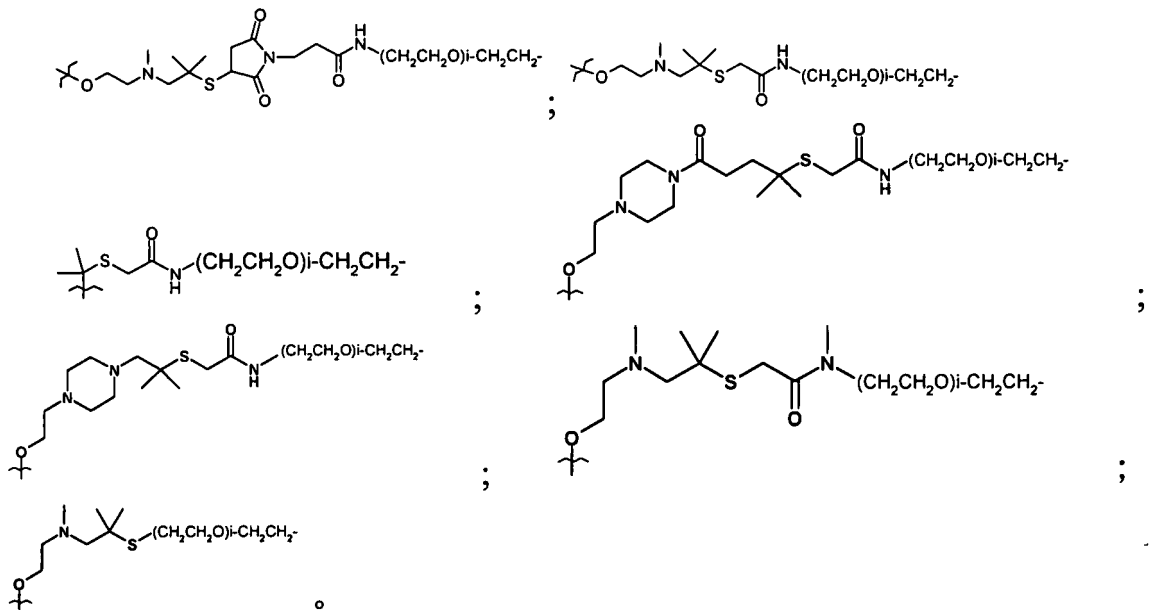
4. 如請求項 1 至請求項 3 之化合物，其中 Y 及 Y' 表示 (C_1-C_4) 烷氧基，更特定言之甲氧基。

5. 如請求項 1 至請求項 4 之化合物，其中 L 係選自：

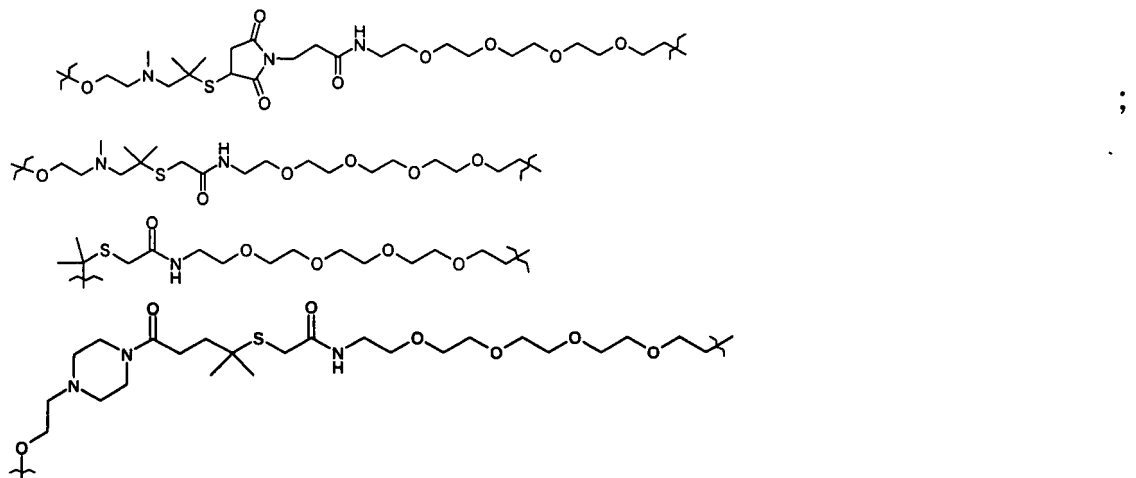


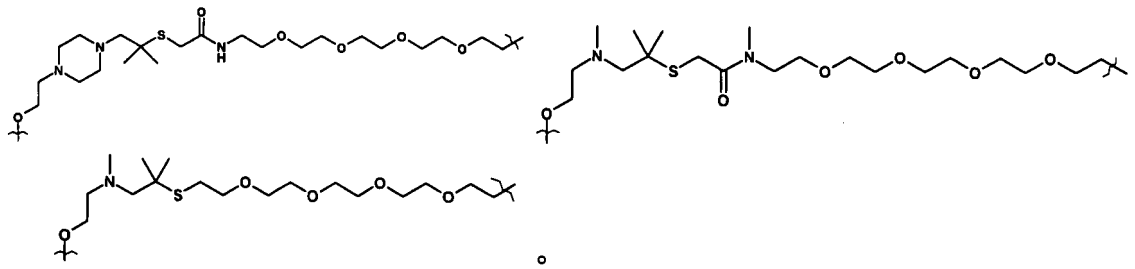


6. 如請求項1或請求項5之化合物，其中L係選自：

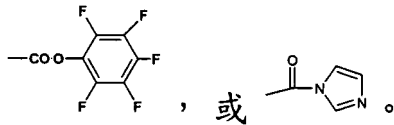
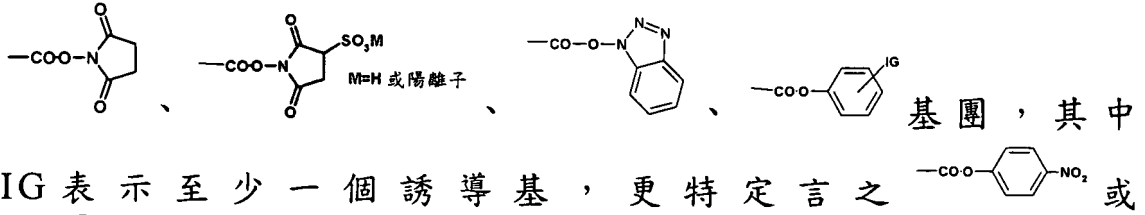


7. 如請求項1或請求項5之化合物，其中L係選自：

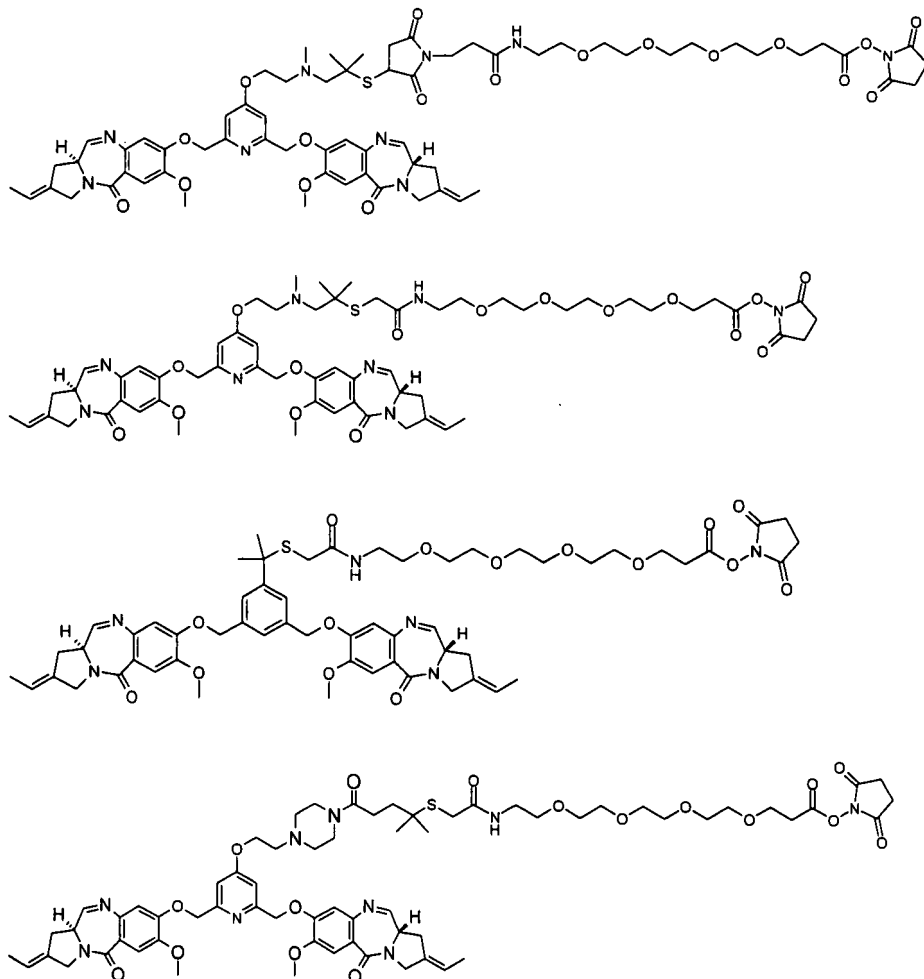


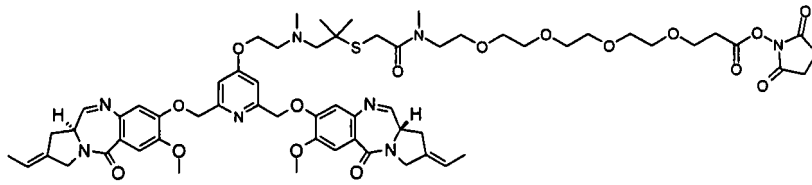


8. 如請求項1至請求項7之化合物，其中 $-\text{COZ}_b\text{R}_b$ 表示 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{COO}(\text{C}_1\text{-C}_6)$ 烷基、 $-\text{COOCH}_3$ 、 $-\text{COOCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ 、



9. 如請求項1之化合物，其係選自以下之一：





10. 一種製備結合物之方法，其包括：

(i)使視情況經緩衝之結合劑水溶液與如請求項1至9中任一項所定義之化合物之溶液接觸並反應；

(ii)且隨後視情況將步驟(i)中形成之結合物與未反應之式(I)化合物及/或結合劑及/或與可能形成之聚集體分離。

11. 如請求項10之方法，其中該 $-C(=O)Z_bR_b$ 基團對於該結合劑上存在之化學基團具有反應性，尤其對於抗體上存在之胺基具有反應性，以便藉由形成共價鍵而確保該式(I)化合物與該結合劑之連接。

12. 如請求項10及請求項11之方法，其中步驟(ii)包括：

將步驟(i)中形成之該結合物與未反應之結合劑及溶液中可能存在之聚集體分離；

或者

僅將步驟(i)之該結合物與未反應之式(I)化合物以及可能形成之聚集體分離，且使可能未反應之結合劑留在該溶液中。

13. 如請求項10至12中任一項之方法，其中該結合劑為配位體、蛋白質、抗體，更特定言之為單株抗體、蛋白質或抗體片段、肽、寡核苷酸或寡糖。

14. 如請求項10至請求項13之方法，其中該反應在 20°C 與

40°C之間的溫度下進行，及/或該反應之持續時間在1小時與24小時之間變化。

15. 如請求項10至14中任一項之方法，其中在步驟(i)或(ii)之後，使該結合物之溶液經歷步驟(iii)之超濾及/或透析過濾。
16. 一種能夠藉由如請求項10至15中任一項之方法獲得之結合物。
17. 如請求項16之結合物，其中該結合劑為抗體，較佳為單株抗體，其特徵在於平均DAR介於1與10之間，較佳介於1.5與7之間，

該DAR係藉由方程式 $DAR=c_D/c_A$ 來計算

其中：

$$c_D = [(e_{A_{LO1}} \times A_{LO2}) - (e_{A_{LO2}} \times A_{LO1})] / [(e_{D_{LO2}} \times e_{A_{LO1}}) - (e_{A_{LO2}} \times e_{D_{LO1}})]$$

$$c_A = [A_{LO1} - (c_D \times e_{D_{LO1}})] / e_{A_{LO1}}$$

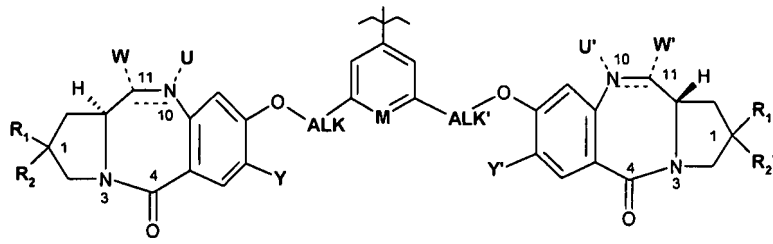
A_{LO1} 及 A_{LO2} 表示該結合物之水溶液在波長 $LO1$ 及 $LO2$ 處之吸光度，根據SEC光譜之相應峰來量測，

$e_{D_{LO1}}$ 及 $e_{D_{LO2}}$ 分別表示結合之前在該兩個波長 $LO1$ 及 $LO2$ 下吡咯并[1,4]苯并二氮呋二聚體之莫耳吸光係數；

$e_{A_{LO1}}$ 及 $e_{A_{LO2}}$ 分別表示在該兩個波長 $LO1$ 及 $LO2$ 下裸抗體之莫耳吸光係數，

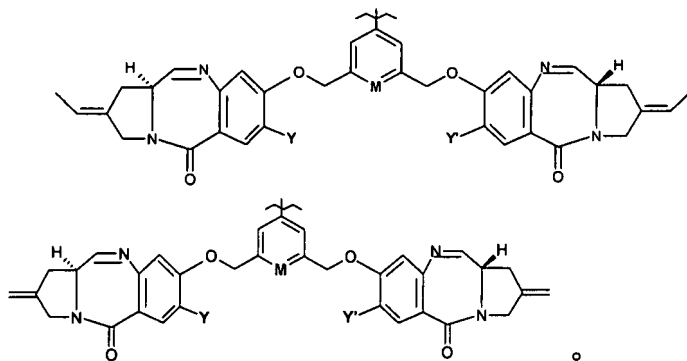
$LO1=280 \text{ nm}$ 且 $LO2=320 \text{ nm}$ 。

18. 一種如請求項1至9中任一項之化合物之用途，其係用於製備與下式之二聚體在M之對位共價連接之結合劑：



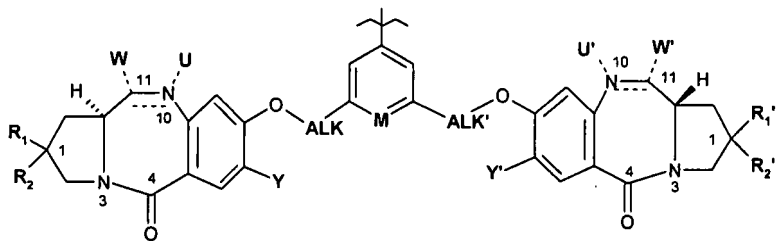
19. 如請求項18之用途，其中該結合劑為抗體，較佳為單株抗體。

20. 如請求項18或請求項19之用途，其中該二聚體具有下式：



21. 如請求項18至請求項20之用途，其中Y及Y'表示(C₁-C₄)烷氧基，更特定言之甲氧基。

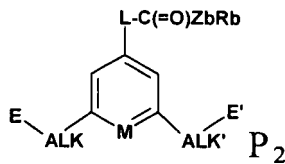
22. 一種結合劑，其在與如請求項1至9中任一項所定義之化合物反應後與下式之二聚體在M之對位共價連接：



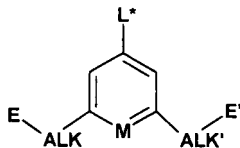
23. 如請求項22之結合劑，其中該二聚體係如請求項20及21中任一項所定義。

24. 如請求項23之結合劑，其對於位於與腫瘤有關之癌細胞或基質細胞上之抗原或抗原群組具有親和力。

25. 如請求項22至請求項24之結合劑，其為抗體，較佳為單株抗體。
26. 一種能夠藉由如請求項10至15中任一項之方法獲得之結合物的溶液。
27. 如請求項1至9中任一項之化合物，其用作抗癌劑。
28. 如請求項16或請求項17之結合物，其用作抗癌劑。
29. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至9中任一項之化合物或如請求項16或請求項17之結合物，及至少一種賦形劑。
30. 一種式P₂化合物



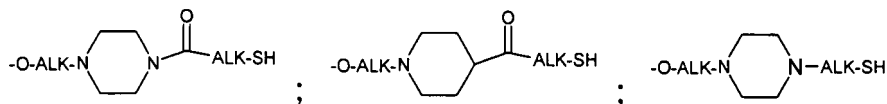
或下式化合物之用途：



其中L*係選自：

-ALK-SH；

-O-ALK-NR₃-ALK-SH；



在該等式子中：

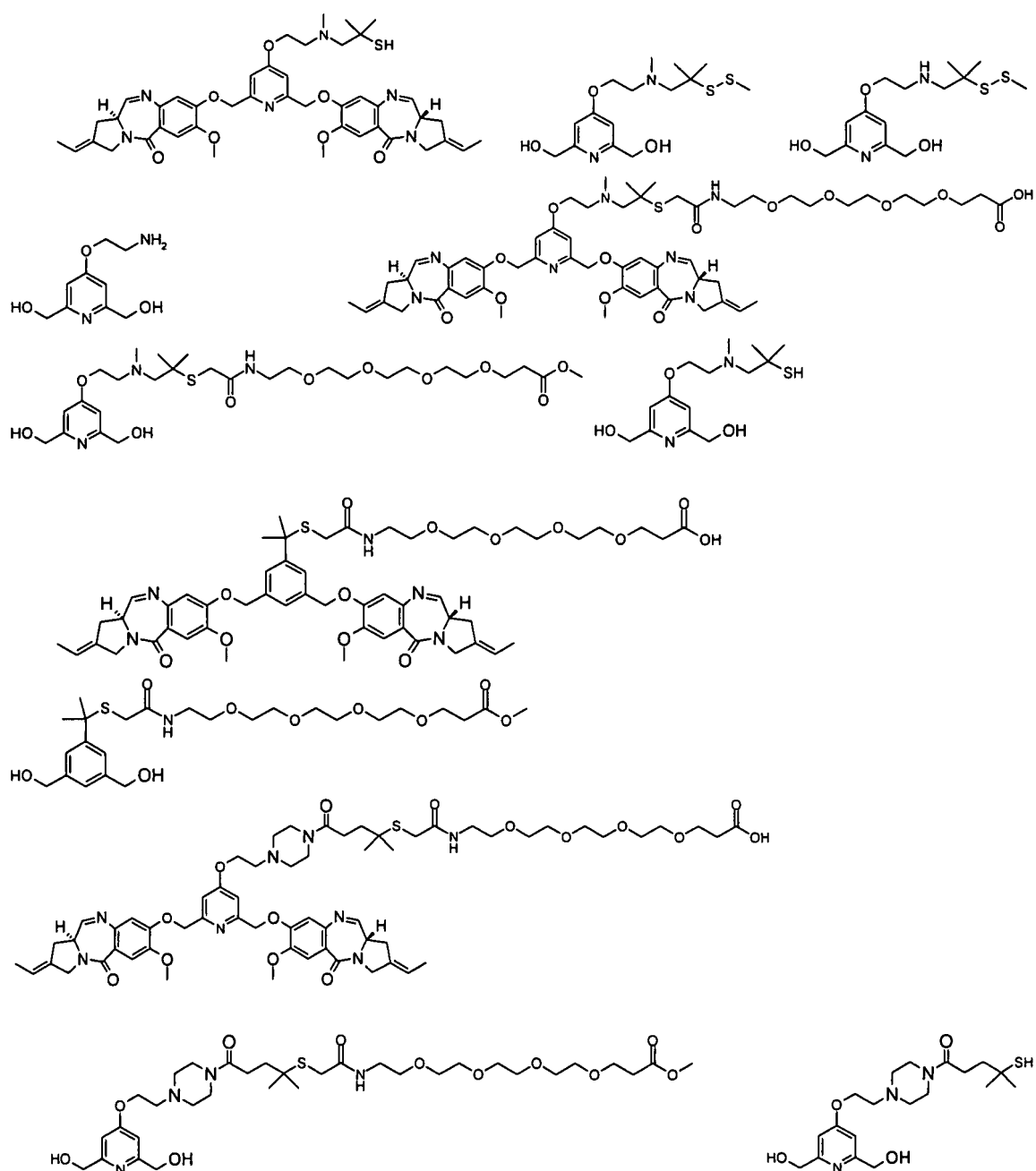
L、M、ALK、ALK'、R₃、Z_b及R_b係如請求項1至9中任一項所定義；

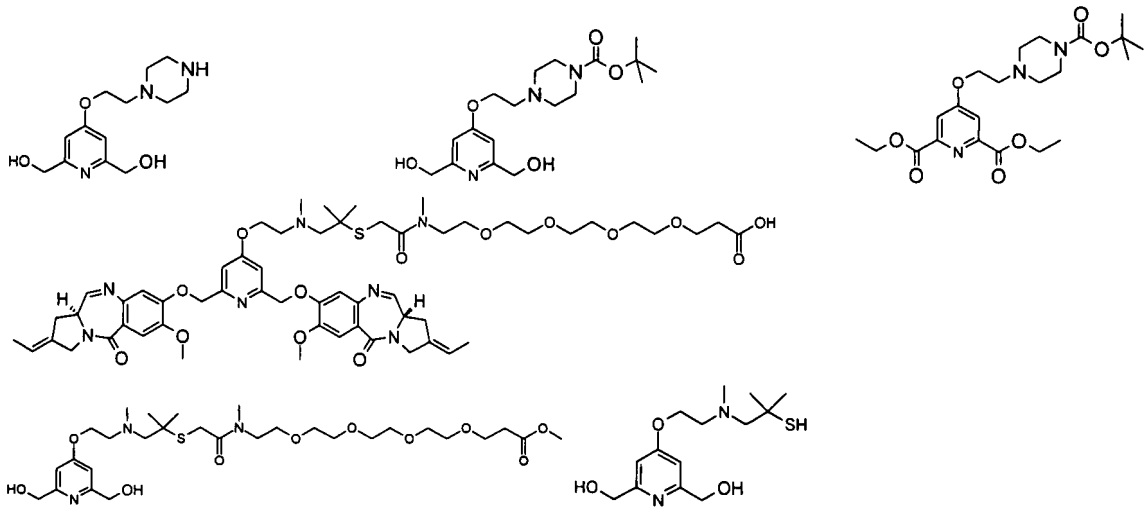
E及E'相互獨立地表示-OH基或離去基；

其在製備如請求項1至9中任一項所定義之式(I)化合物時用作中間體。

31. 如請求項30之用途，其中該離去基係選自鹵素原子或甲磺酸酯基、甲苯磺酸酯基、硝基苯磺酸酯基或 $-OPPh_3^+$ 基。

32. 一種化合物之用途，該化合物係選自以下之一：





應瞭解 $-COOH$ 末端官能基可經 $-COO(C_1-C_6)$ 烷基末端官能基，尤其 $-COOMe$ 末端官能基置換，且 $-SH$ 末端官能基可經二硫化物官能基，尤其 $-SSMe$ 官能基置換，

該化合物在製備如請求項 1 至 9 中任一項所定義之式 (I) 化合物時用作中間體。

33. 一種如請求項 1 至 9 中任一項之化合物之用途，其用於製造抗癌劑。
34. 一種如請求項 16 或請求項 17 之結合物之用途，其用於製造抗癌劑。

八、圖式：

實例 1 之結合物在去糖基化之後的高解析度質譜

H₂H₁₄-順丁烯二醯亞胺-PEG-順丁烯二醯亞胺-衍生之托馬黴素 Q-TOF 2

08-Apr-2009
17:00:11
1: TOF MS ES+
46.0

VAC-GYL1-205-1-B 348 (6.464) M1 [Ev0,117] (Gs 1.000,1000:4000,1.00,1.33,F33); Om (321.408)

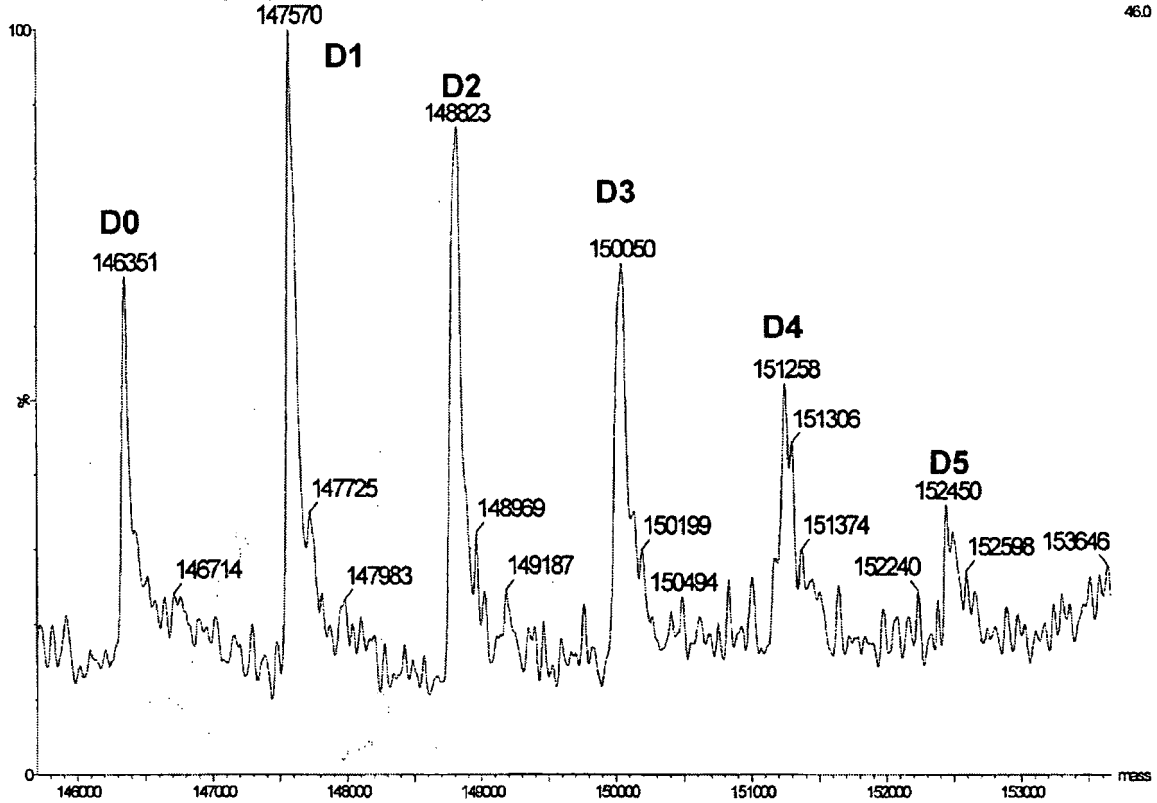


圖 1

實例 2 之結合物在去糖基化之後的高解析度質譜；

100 μ l

Q-TOF 2

30-Apr-2009

10:07:02

VAC-GYL1-229-1 370 (6.872) M1 [E+83153,It5] (Gs,1.000,2544:4000,1.00,L33,R33); Om(318:479)

1: TOF MS ES+
38

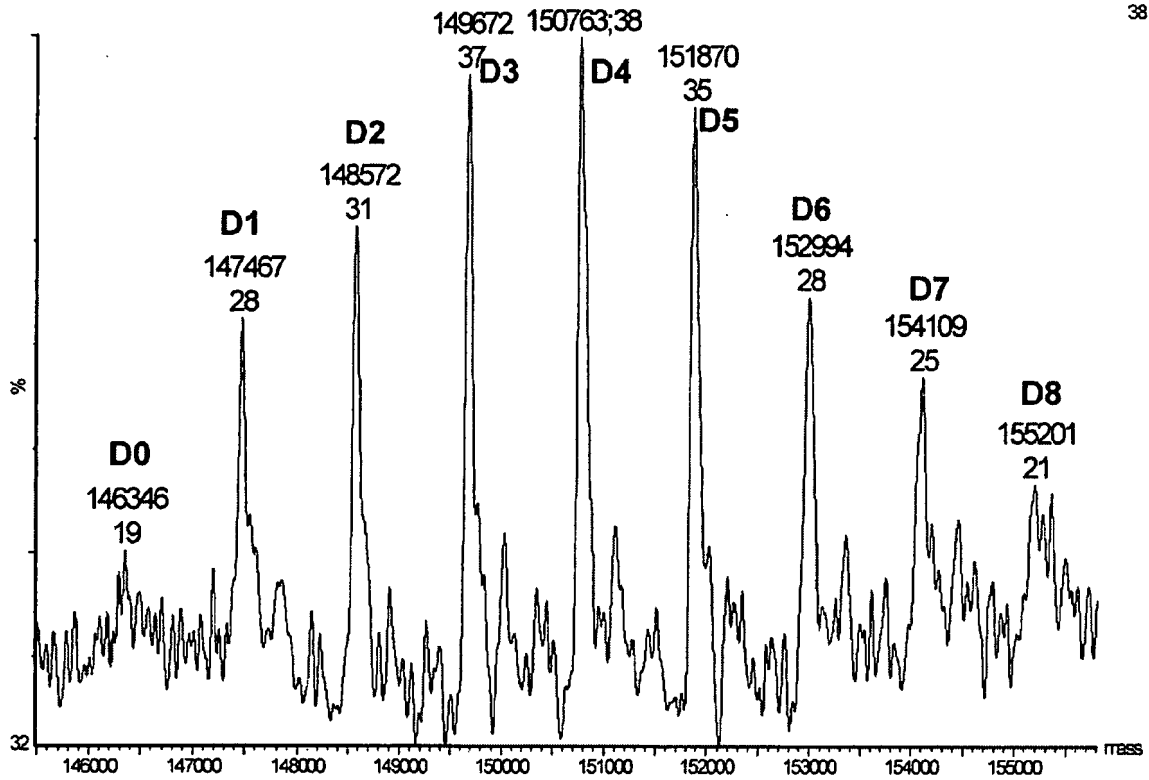


圖 2

實例 3 之結合物在去糖基化之後的高解析度質譜；

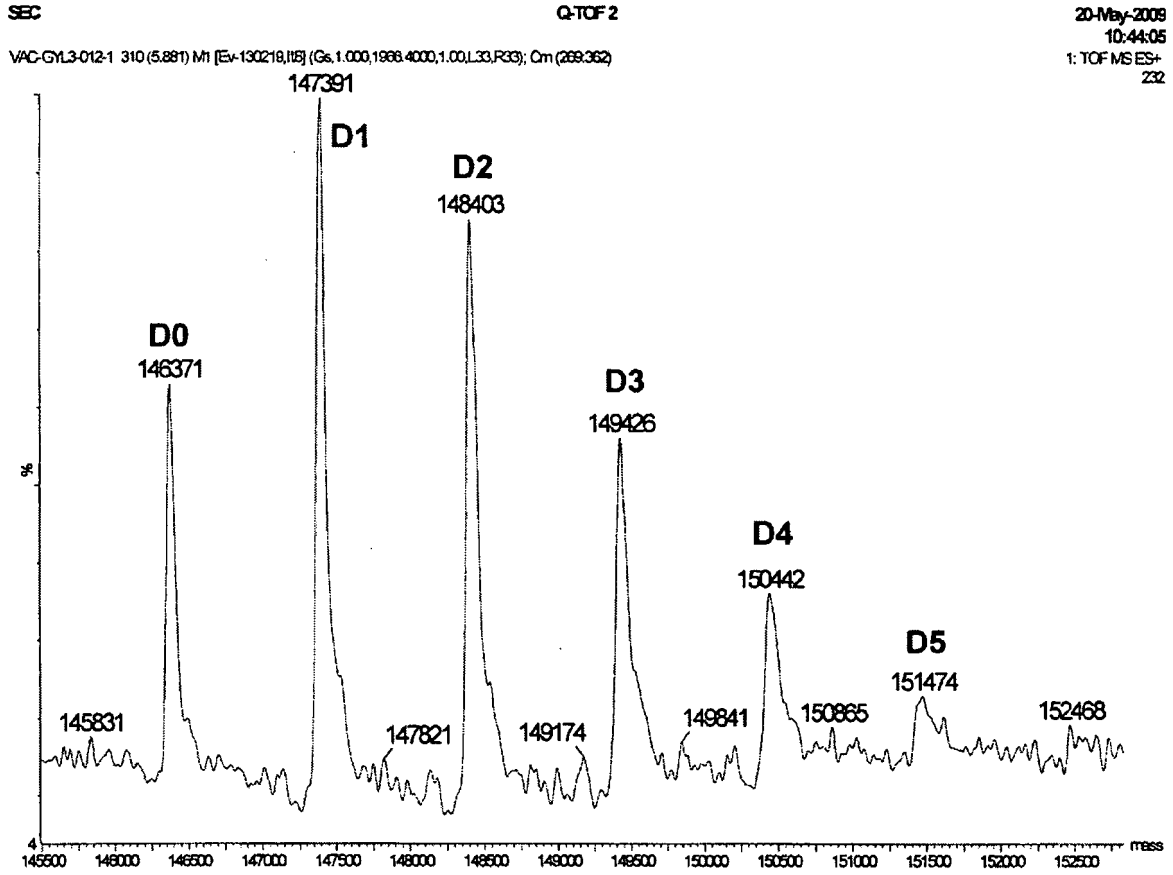


圖 3

實例 4 之結合物在去糖基化之後的高解析度質譜；

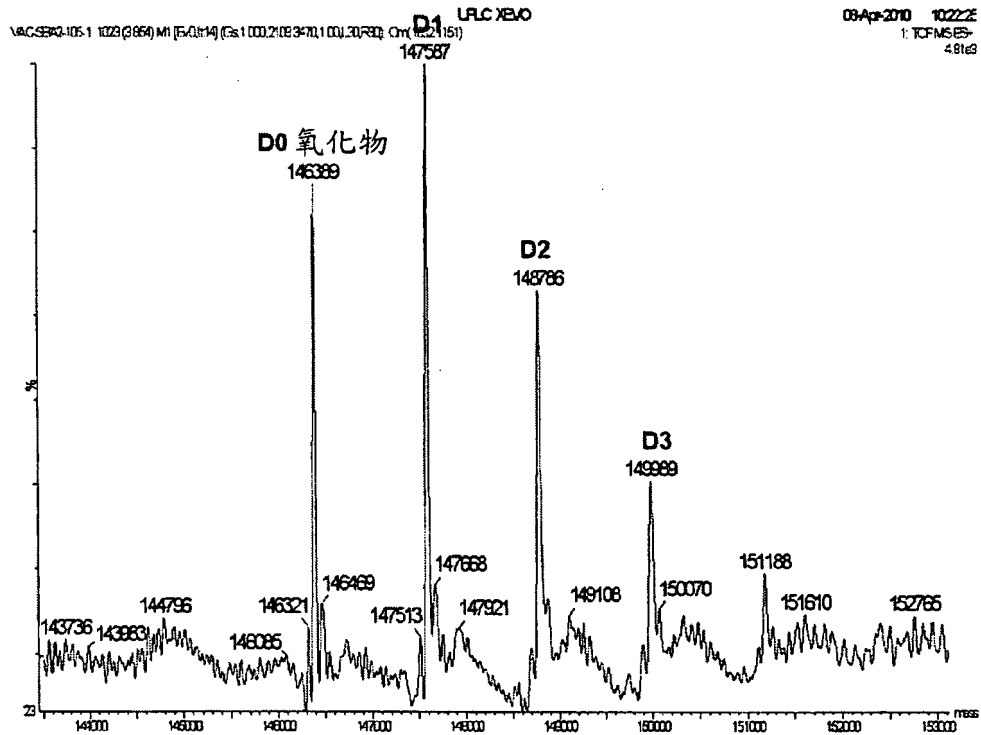


圖 4

實例 6 之非去糖基化結合物的高解析度質譜。

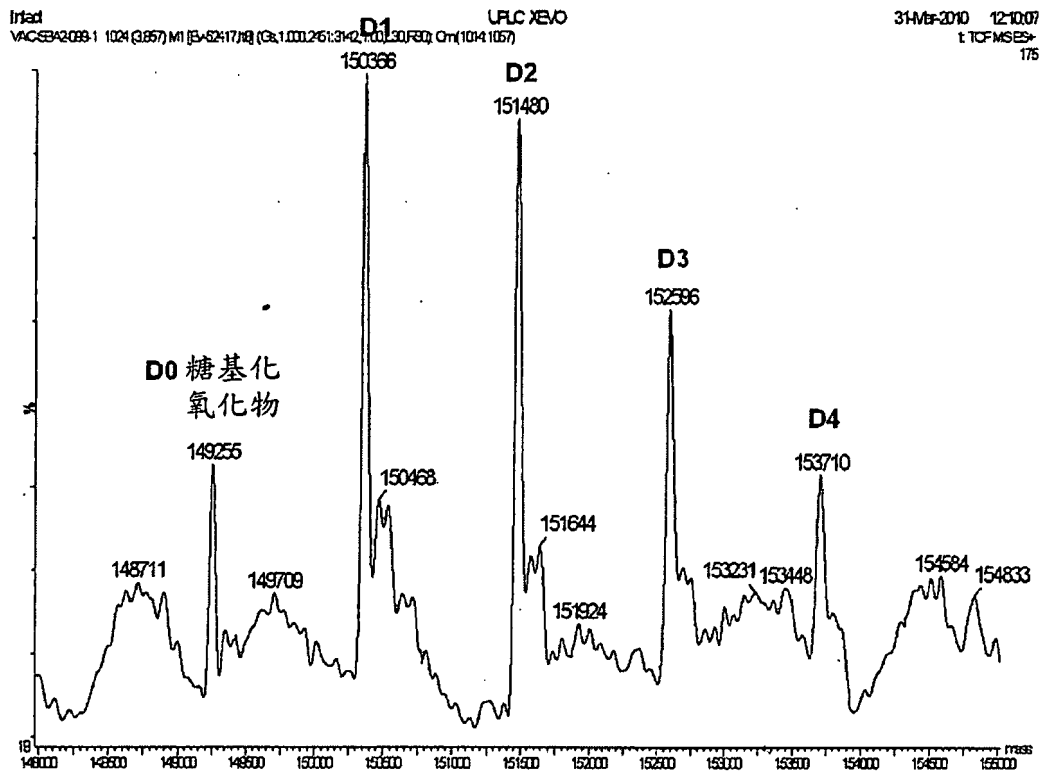


圖 5

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

