



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115651056 A

(43) 申请公布日 2023.01.31

(21) 申请号 202211283749.2

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2017.11.07

C07J 71/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07J 41/00 (2006.01)

62/419365 2016.11.08 US

A61K 47/61 (2017.01)

62/508317 2017.05.18 US

A61K 47/68 (2017.01)

(62) 分案原申请数据

A61K 47/69 (2017.01)

201780082517.1 2017.11.07

A61K 31/566 (2006.01)

(71) 申请人 里珍纳龙药品有限公司

A61P 31/58 (2006.01)

地址 美国纽约州.塔里敦.旧锯木厂河路
777号

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(72) 发明人 A.韩 W.奥尔森 J.A.墨菲

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理人 彭昶

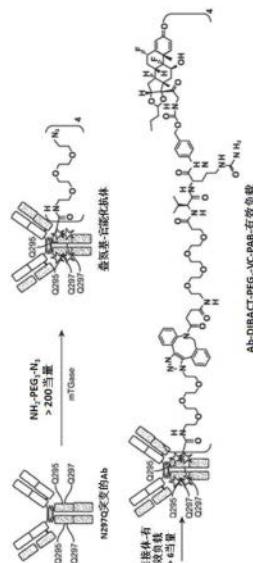
权利要求书32页 说明书239页 附图45页

(54) 发明名称

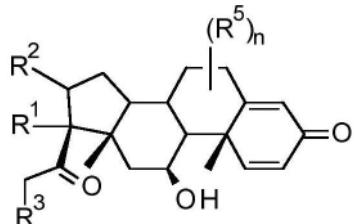
类固醇类化合物及其蛋白质-偶联物

(57) 摘要

本发明描述了蛋白质类固醇偶联物，其中糖皮质激素化合物与结合剂偶联，所述结合剂优选为抗体。这些蛋白质类固醇偶联物可用于例如将糖皮质激素 (GC) 靶向特异性递送至细胞。



1. 式(1000)所示化合物：



1000:

或其药学上可接受的盐、溶剂化物、立体异构体、或衍生物，
其中：



或者(a)、(b)、(c)或(d)：

(a) R³是选自由-X-C₆₋₂₀亚芳基-Y-NR^aR^b、-X-C₆₋₂₀亚杂芳基-Y-NR^aR^b和含NH-的杂环烷基组成的组；其中X是-NH-或-O-；其中Y是不存在或-CH₂-；和

R⁴是C₁₋₂₀烷基；

或

(b) R³是选自由-OH和-O-C(O)-C₁₋₂₀烷基组成的组；和

R⁴是选自由-C₁₋₂₀亚烷基-NR^aR^b和-X-C₆₋₂₀亚芳基-Y-NR^aR^b组成的组；其中X是不存在或-CH₂-；其中Y是不存在；

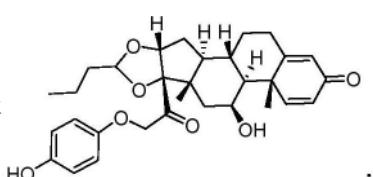
或

(c) R³是-NR^aR^b；和

R⁴是C₁₋₂₀烷基；

或

(d) 式(1000)所示化合物是



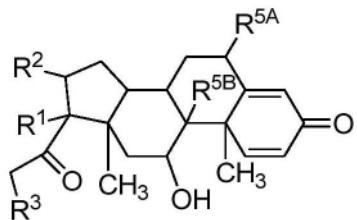
R⁵在每种情况下，独立地为-OH、卤素或C₁₋₂₀烷基并且各R⁵位于任何环原子上；

R^a和R^b在每种情况下，独立地为-H、C₁₋₂₀烷基、或任选取代的芳基；或者

R^a和R^b环化形成环杂烷基，所述环杂烷基具有3至6个环原子，包括一个杂原子，所述杂原子是同它们连接的所述N原子；和

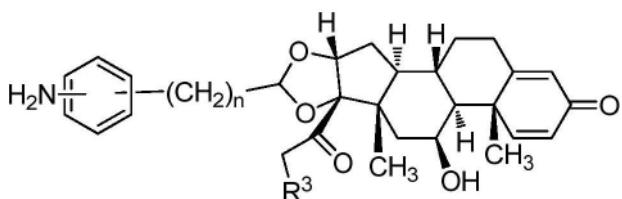
n是从0至16的整数。

2. 根据权利要求1所述的化合物，其中式(1000)所示化合物具有式(A¹)的结构：

(A¹)

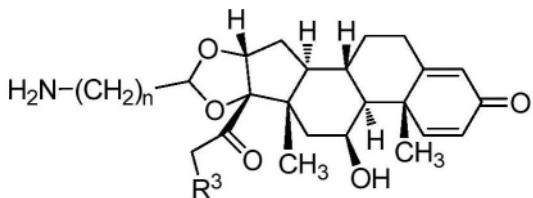
其中R¹-R³均具有如上所述定义,和R^{5A}和R^{5B}各自独立地为卤素或氢原子。

3. 根据权利要求2所述的化合物,其中R¹和R²一起形成 , 其中R⁴是C₁₋₂₀烷基,其任选地被-NR^aR^b取代。
4. 根据权利要求1-3任一项所述的化合物,其中R³是-OH或-NR^aR^b,R^a是H,和R^b是H或C₁₋₂₀烷基。
5. 根据权利要求1所述的化合物,其具有式(A²)所示结构:

(A²)

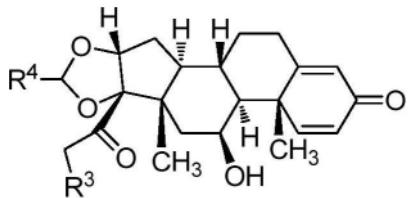
其中n是从0至1的整数,和R³是-OH。

6. 根据权利要求1所述的化合物,其具有式(A³)所示结构:

(A³)

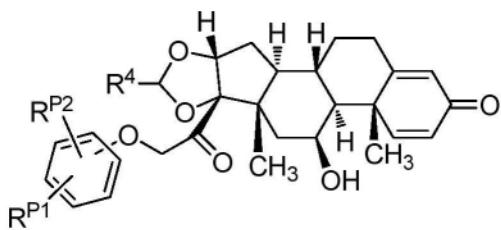
其中n是从1至4的整数,和R³是-OH。

7. 根据权利要求1所述的化合物,其具有式(A⁴)所示结构:

(A⁴)

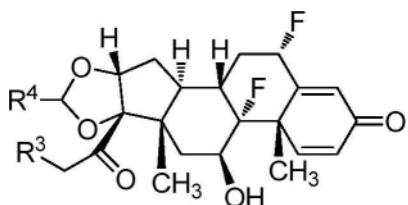
其中R³是-NR^aR^b,和R⁴是C₁₋₂₀烷基,其中R^a和R^b各自独立地为氢原子或C₁₋₂₀烷基。

8. 根据权利要求7所述的化合物,其中R⁴是C₁₋₄烷基。
9. 根据权利要求7或8所述的化合物,其中R³是-NH₂、-NHCH₃、或-N(CH₃)₂。
10. 根据权利要求1所述的化合物,其具有式(A⁵)所示结构:

(A⁵)

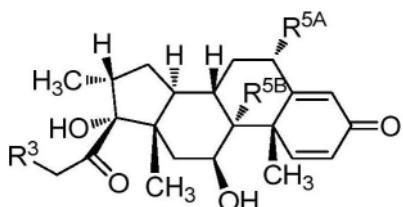
其中R⁴是烷基,R^{P1}是氢原子,和R^{P2}是-NR^aR^b,其中R^a和R^b各自独立地为氢原子或C₁₋₂₀烷基。

11.根据权利要求1所述的化合物,其具有式(A⁶)所示结构:

(A⁶)

其中R³是NR^aR^b,其中R^a和R^b各自独立地为氢原子或C₁₋₂₀烷基,和R⁴是C₁₋₂₀烷基。

12.一种化合物,其具有式(A⁷)所示结构:

(A⁷)

其中R^{5A}是氢原子或氟,和R^{5B}是氟;

其中R³是 $\xi-X-\textcircled{A}-(\text{CH}_2)_{0-1}-\text{NR}^a\text{R}^b$ 其中X是0或NR^a, \textcircled{A} 是C₆₋₂₀芳基或C₆₋₂₀杂芳基,R^p是卤素,t是0-2的整数,R^a和R^b各自独立地为氢原子或C₁₋₂₀烷基,

是卤素,t是0-2的整数,R^a和R^b各自独立地为氢原子或C₁₋₂₀烷基。

13.根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、或立体异构体,其中:



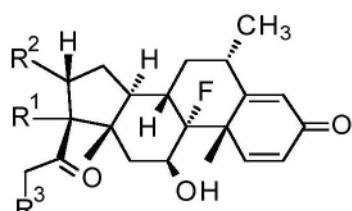
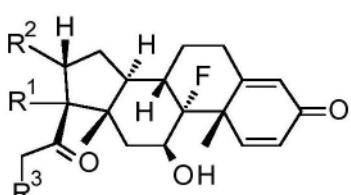
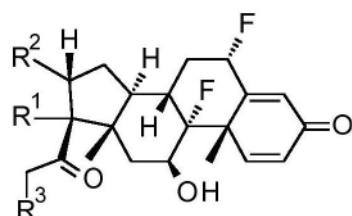
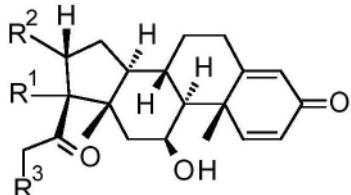
R³是-NR^aR^b;和

R⁴是C₁₋₂₀烷基;

R⁵在每种情况下,独立地选自由-OH、卤素、和C₁₋₂₀烷基组成的组的取代基;n是从0至16的整数;和各R⁵位于任何环原子上;

R^a和R^b在每种情况下,独立地选自由-H和C₁₋₂₀烷基组成的组。

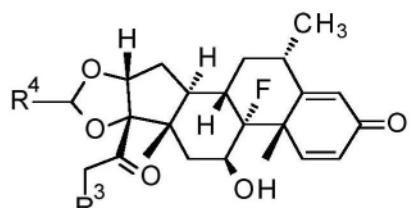
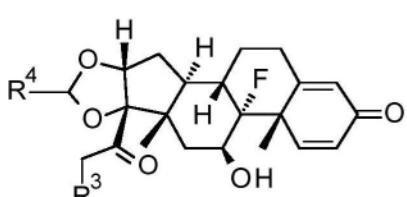
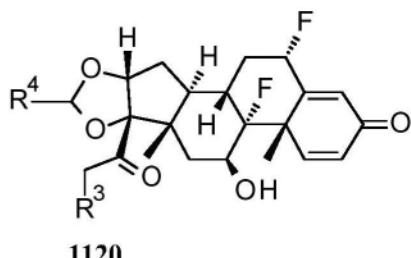
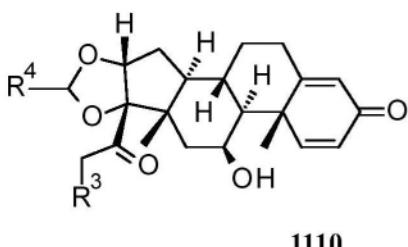
14. 根据权利要求13所述的化合物,其具有式1010、1020、1030、或1040所示结构:



其中R³是-OH或-O-C(=O)-C₁₋₂₀烷基和R⁴是-C₁₋₂₀亚烷基-NR^aR^b或-X-C₆₋₂₀亚芳基-NR^aR^b;其中X是不存在或-CH₂;或其药学上可接受的盐、溶剂化物、或立体异构体。

15. 根据权利要求13所述的化合物,其中R³是-NH₂。

16. 根据权利要求13所述的化合物,其具有式1110、1120、1130、或1140所示结构:



或其药学上可接受的盐、溶剂化物、或立体异构体。

17. 根据权利要求16所述的化合物,其中,

R³是-NR^aR^b;和

R⁴是正丙基。

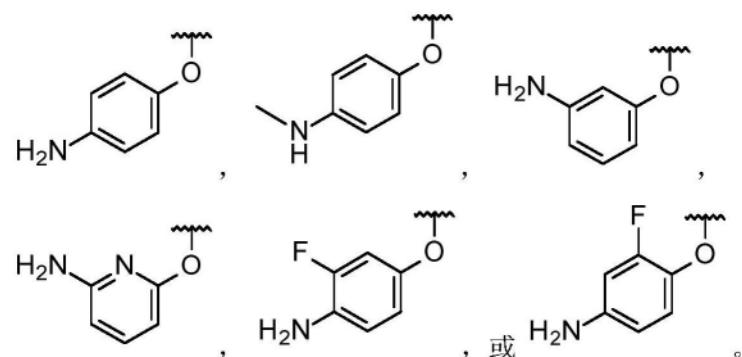
18. 根据权利要求17所述的化合物,其具有式1120所示结构。

19. 根据权利要求16所述的化合物,其中R⁴是H₂NCH₂CH₂-或H₂N-

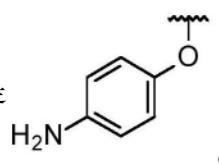
20. 根据权利要求16所述的化合物,其中,

R³是-NR^aR^b、-X-C₆₋₂₀亚芳基-Y-NR^aR^b或-X-C₆₋₂₀亚杂芳基-Y-NR^aR^b;其中X是-NH-或-O-;其中Y不存在。

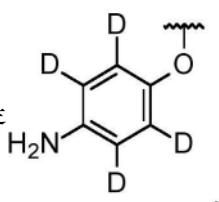
21. 根据权利要求20所述的化合物,其中R³是-NH₂、-N(H)CH₃或-N(CH₃)₂。
22. 根据权利要求20所述的化合物,其中R³是-O-C₆₋₂₀亚芳基-NR^aR^b、或-O-C₆₋₂₀亚杂芳基-NR^aR^b;其中亚芳基或亚杂芳基任选地被卤素、氘或羟基取代。
23. 根据权利要求20所述的化合物,其中R³是-O-苯基-NR^aR^b、或-O-亚杂芳基-NR^aR^b;其中苯基或亚杂芳基任选地被卤素或氘取代。
24. 根据权利要求20所述的化合物,其中R³是



25. 根据权利要求20所述的化合物,其中R³是

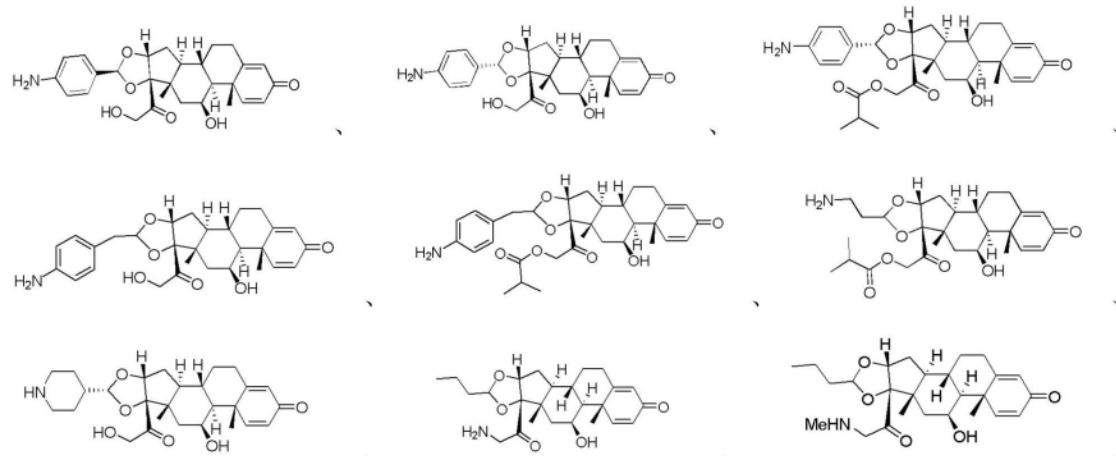


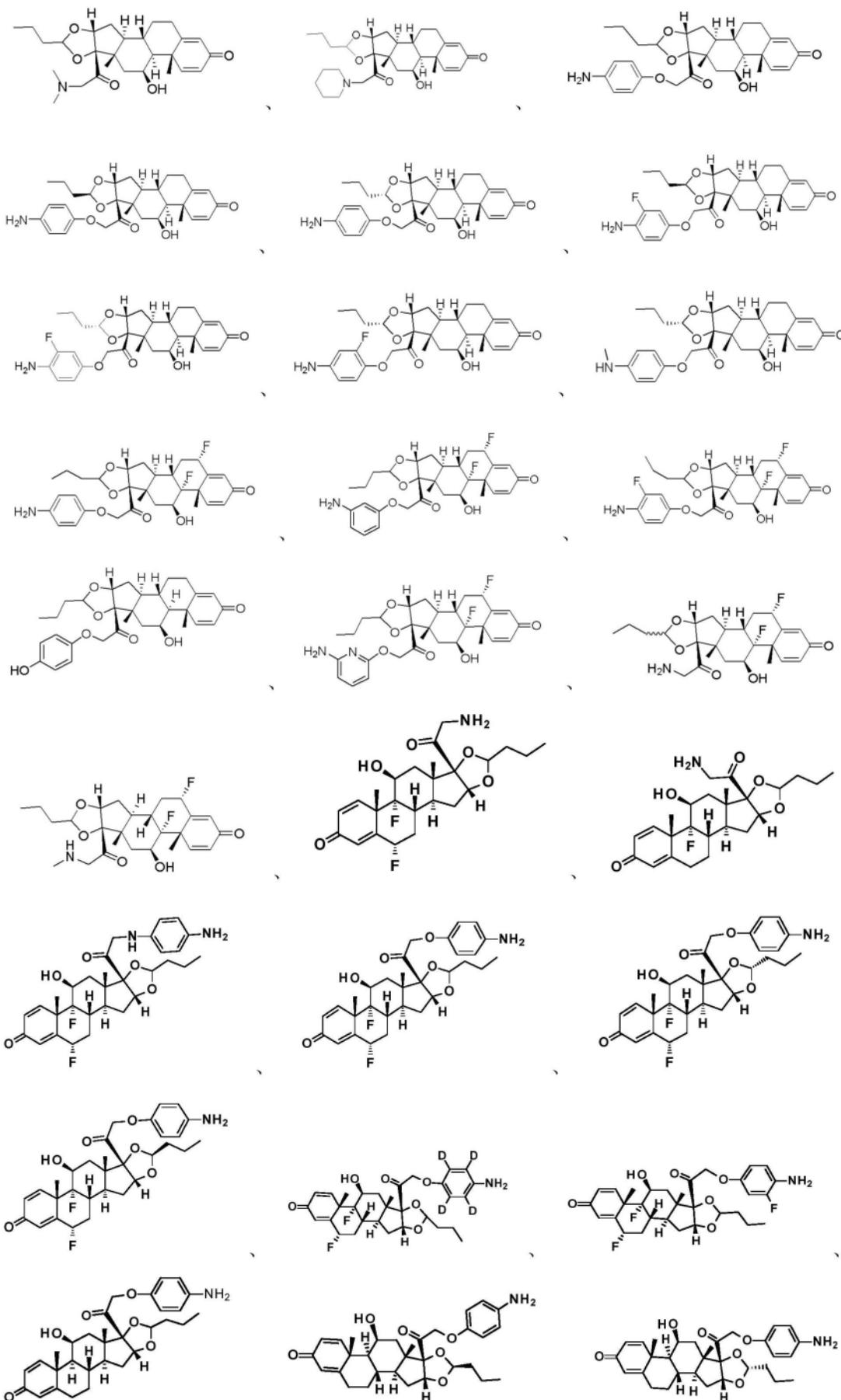
26. 根据权利要求20所述的化合物,其中R³是

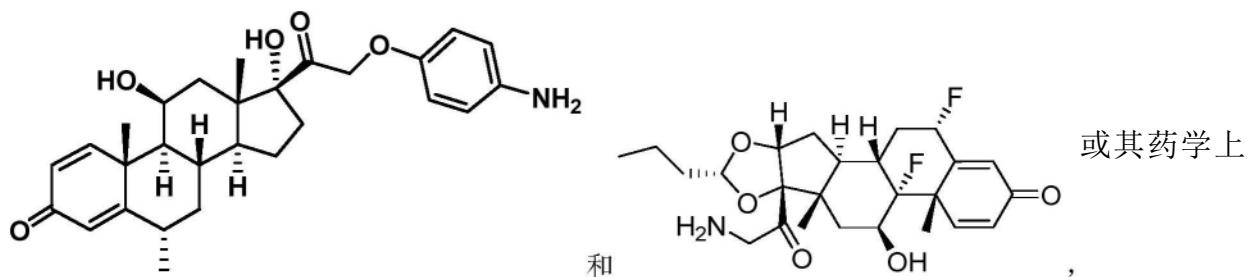


27. 根据权利要求20-26任一项所述的化合物,其中R⁴是正丙基。

28. 一种化合物,其选自:





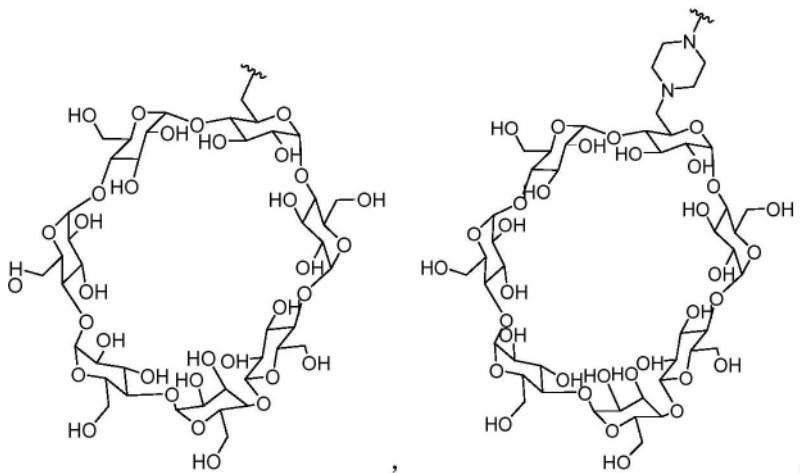
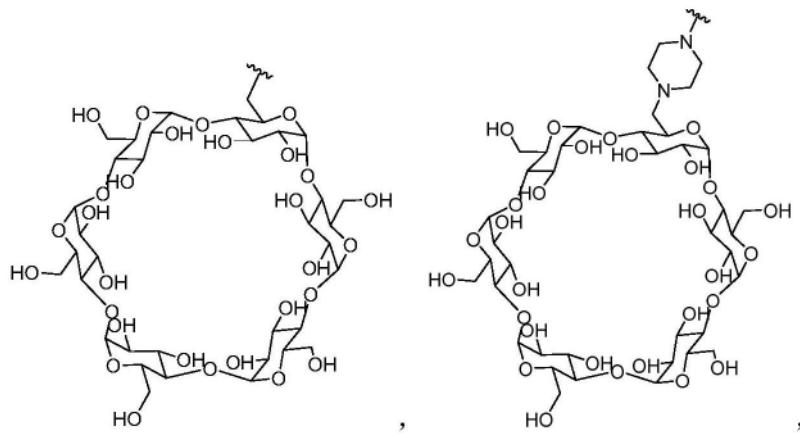


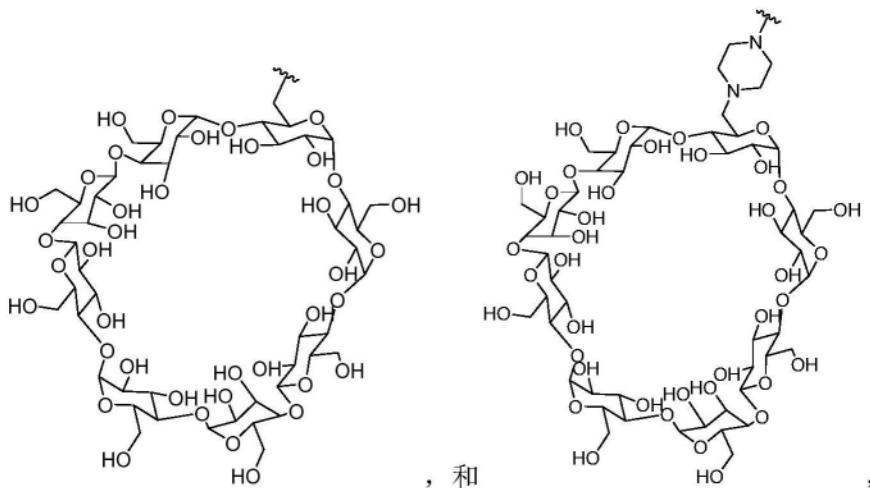
可接受的盐、溶剂化物、或立体异构体。

29. 化合物，其包含与权利要求1-28任一项所述的化合物偶联的结合剂，其中所述结合剂是抗体或其抗原结合片段。

30. 化合物，其包含与权利要求1-29任一项所述的化合物以及环糊精(CD)偶联的结合剂，其中所述结合剂是抗体或其抗原结合片段。

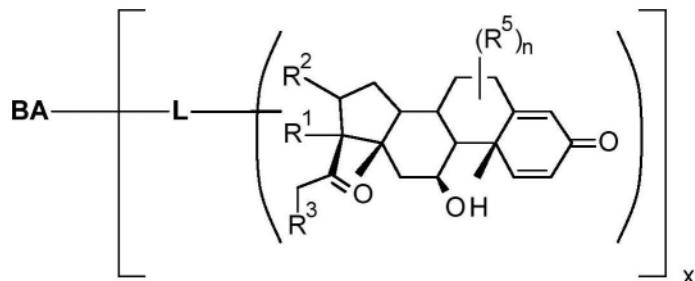
31. 根据权利要求30所述的化合物，其中CD是选自由以下组成的组：





其中 \sim 表示所述 CD 与所述蛋白质-类固醇偶联物连接的键。

32. 一种的化合物, 其具有式1200所示结构:



1200

或其药学上可接受的盐、溶剂化物、或立体异构体,

其中:

R¹和R²分别独立地选自由-H、-OH、C₁₋₂₀烷基和-O-C(0)-C₁₋₂₀烷基组成的组并且下文的(a)或(c);或



或者(a)、(b)、(c)或(d):

(a) R³是选自由-X-C₆₋₂₀亚芳基-Y-NR^aR^b、-X-C₆₋₂₀亚杂芳基-Y-NR^aR^b和含NH-的杂环烷基组成的组;其中X是-NH-或-O-;其中Y不存在或-CH₂-;和

R⁴是C₁₋₂₀烷基;

或

(b) R³是选自由-OH和-O-C(0)-C₁₋₂₀烷基组成的组;和

R⁴是选自由-C₁₋₂₀亚烷基-NR^aR^b和-X-C₆₋₂₀亚芳基-Y-NR^aR^b组成的组;其中X不存在或是-CH₂-;其中Y不存在;

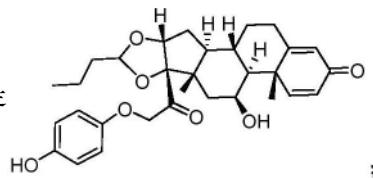
或

(c) R³是-NR^aR^b;和

R⁴是C₁₋₂₀烷基;

或

(d) 式(1000)所示化合物是



R⁵在每种情况下,独立地选自由-OH、卤素、和C₁₋₂₀烷基组成的组的取代基;n是从0至16的整数;和各R⁵位于任何环原子上;

R^a和R^b在每种情况下,独立地选自由-H和C₁₋₂₀烷基组成的组;

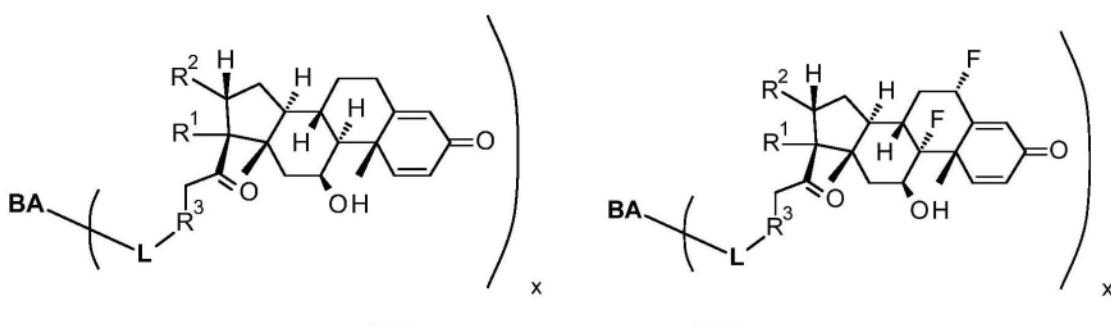
BA是结合剂;

各L是任选的连接体;

BA或L与R³或R⁴共价键合;和

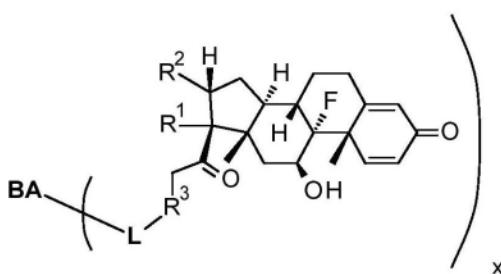
x是从1至30的整数。

33. 根据权利要求32所述的化合物,其具有式1210、1220、1230、或1240所示结构:

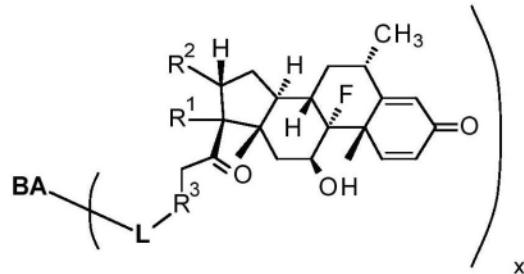


1210

1220



1230

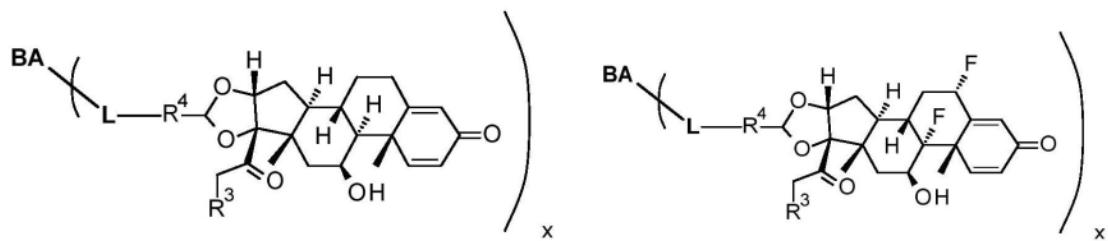


1240

或其药学上可接受的盐、溶剂化物、或立体异构体;

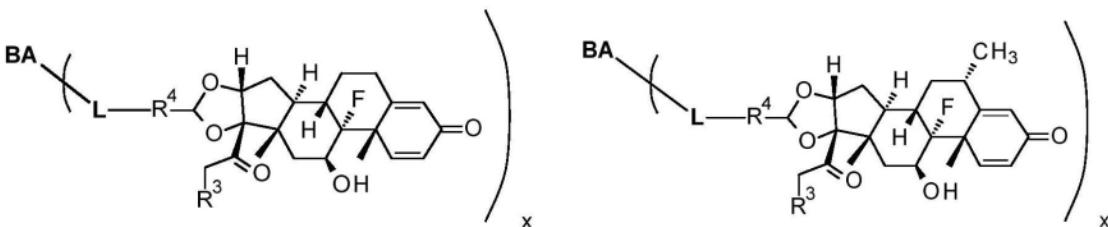
其中R³与L或BA共价键合。

34. 根据权利要求32所述的化合物,其具有式1310、1320、1330、或1340所示结构:



1310

1320



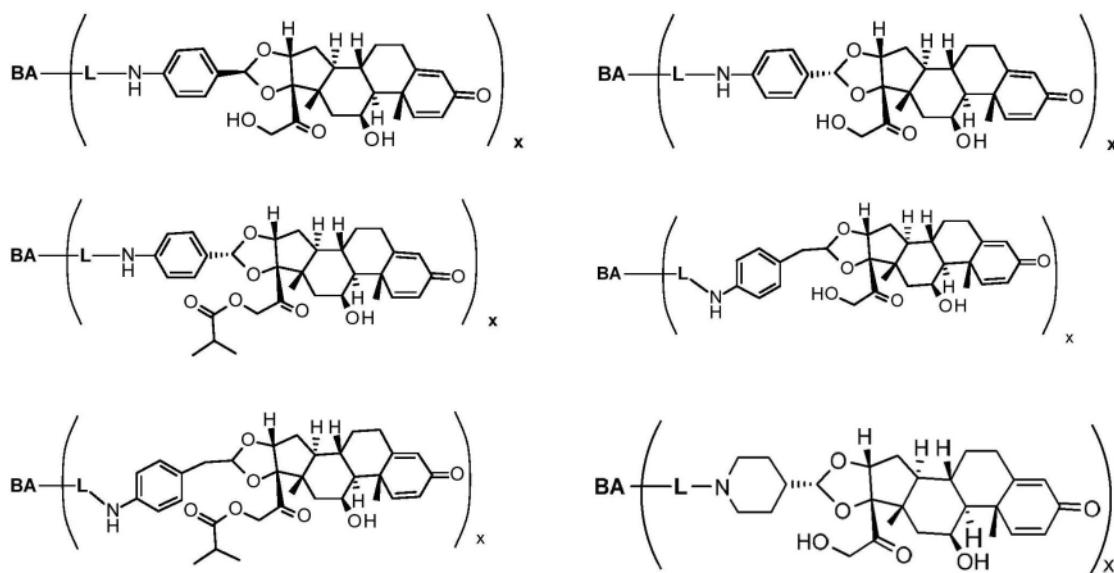
1330

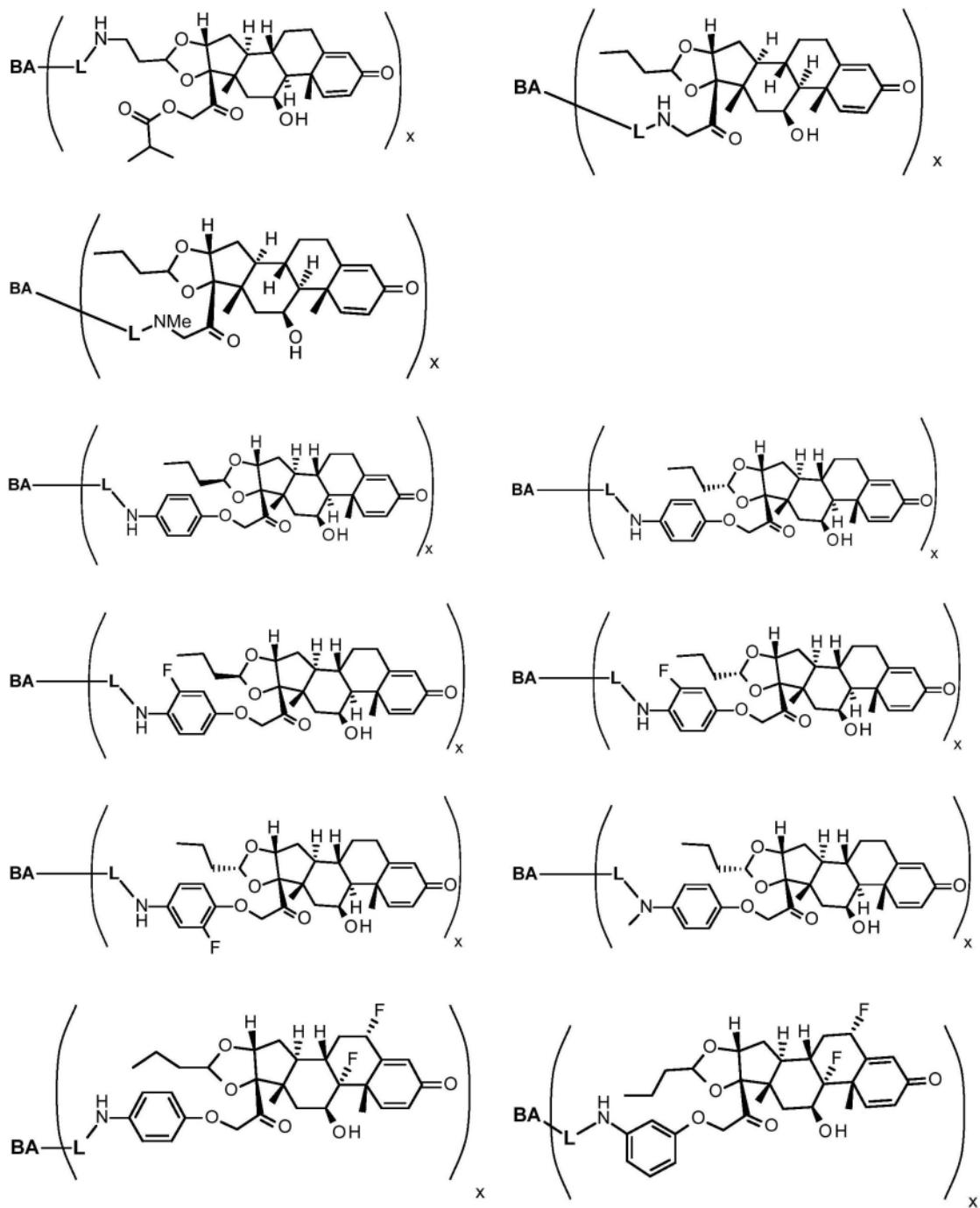
1340

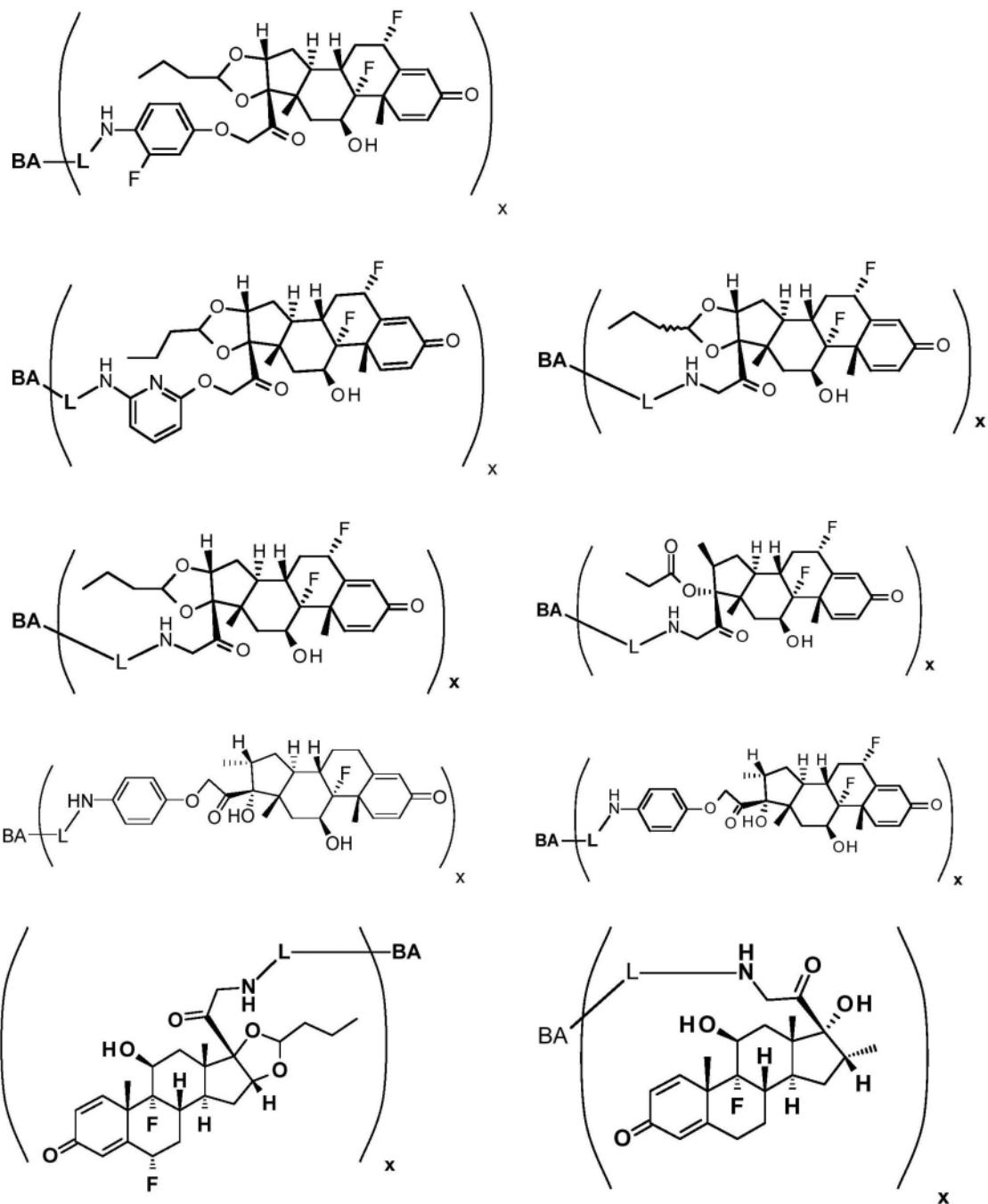
或其药学上可接受的盐、溶剂化物、或立体异构体；

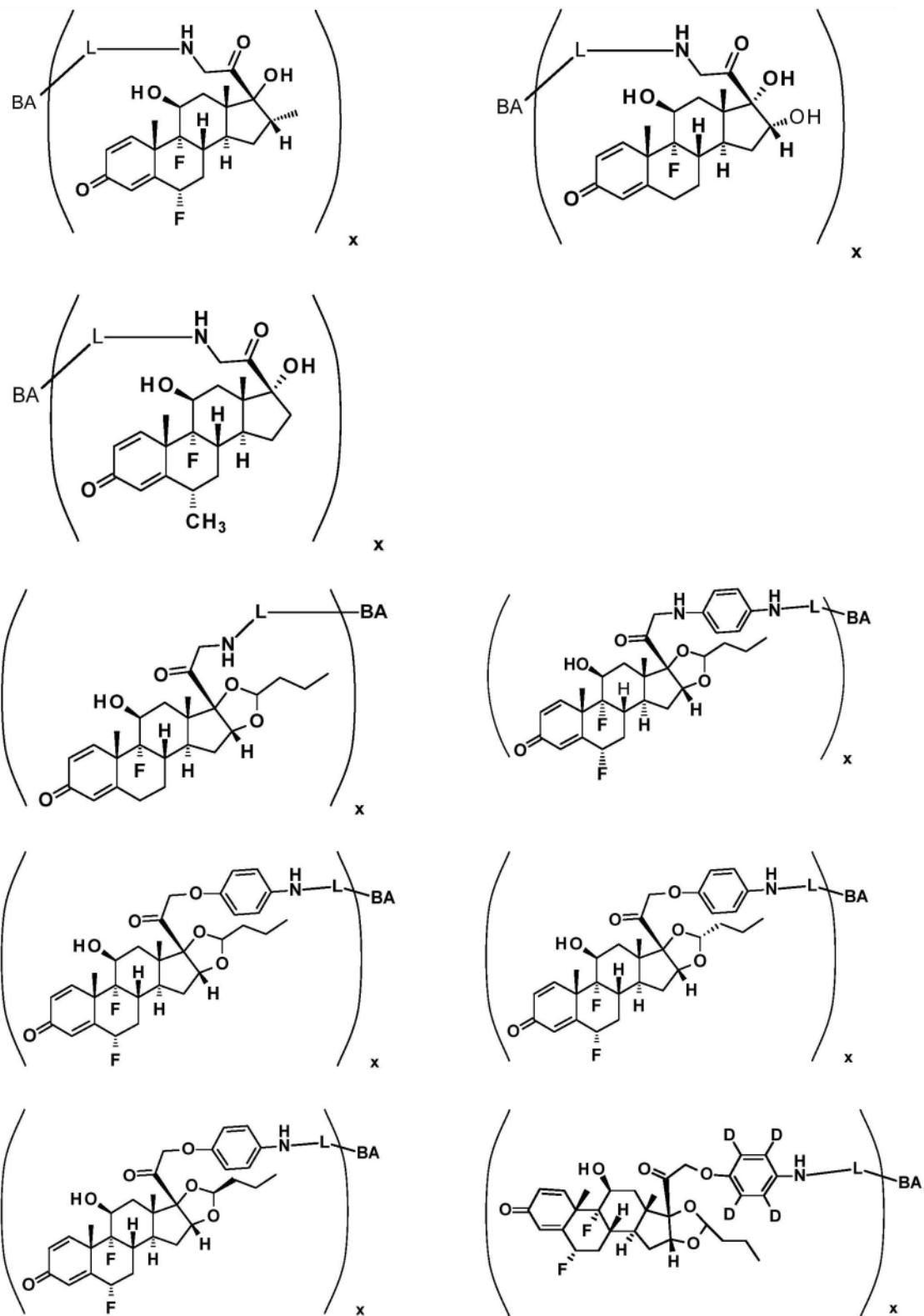
其中R⁴与L或BA共价键合。

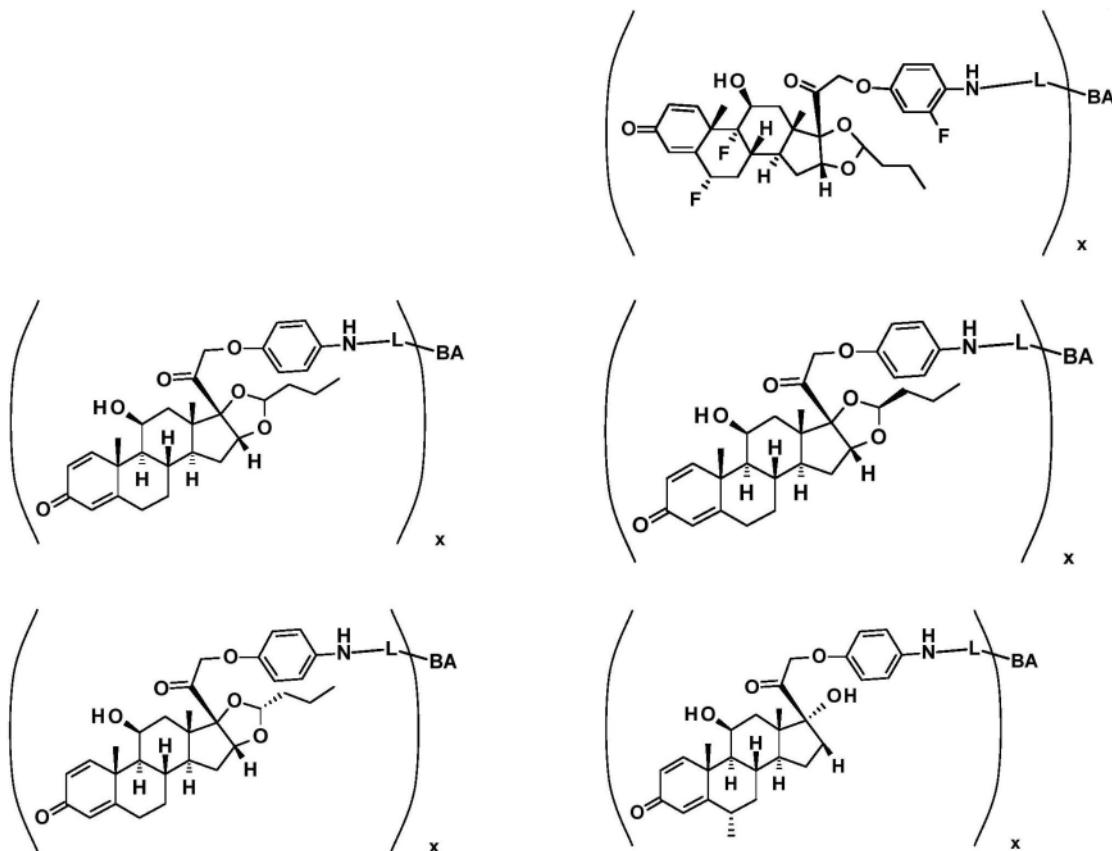
35. 根据权利要求29所述的化合物，其选自由以下组成的组：











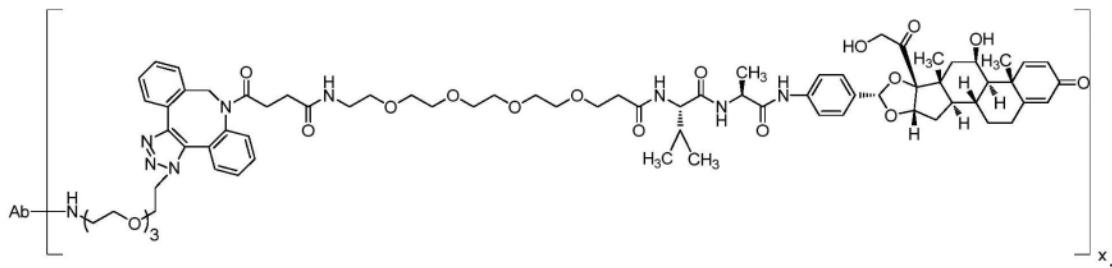
和其药学上可接受的盐、溶剂化物、或立体异构体；

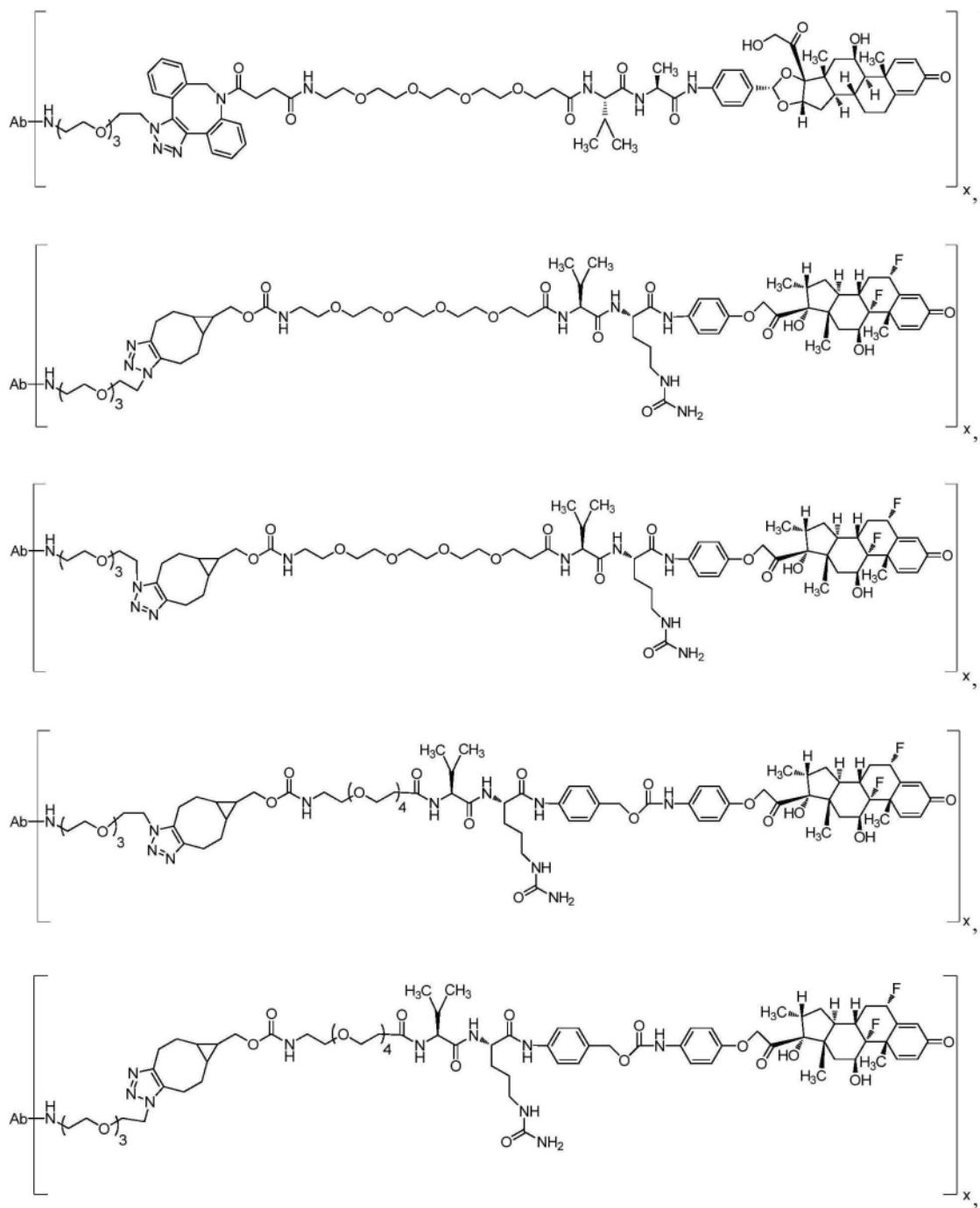
其中各L是任选的连接体；

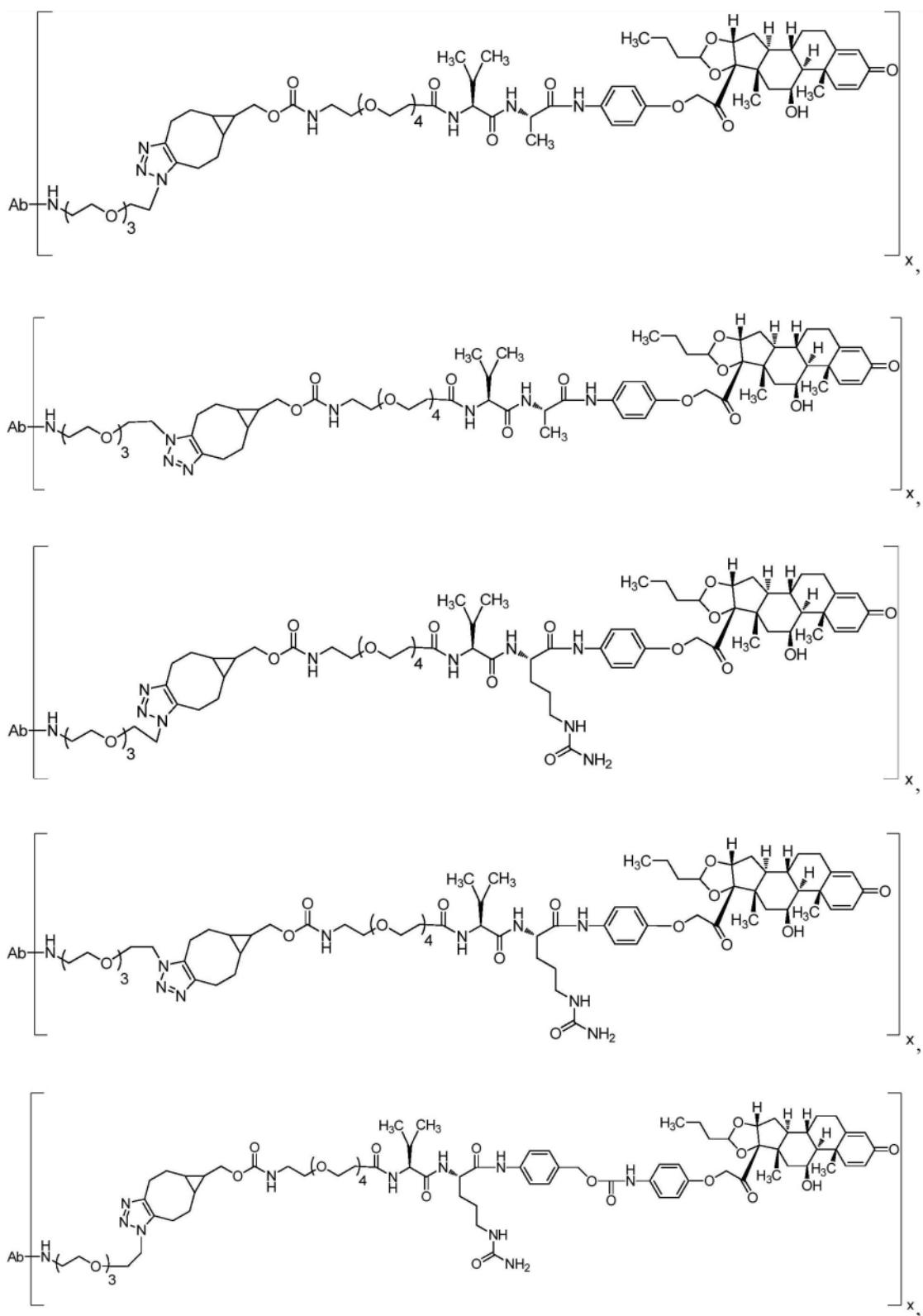
各BA是结合剂；和

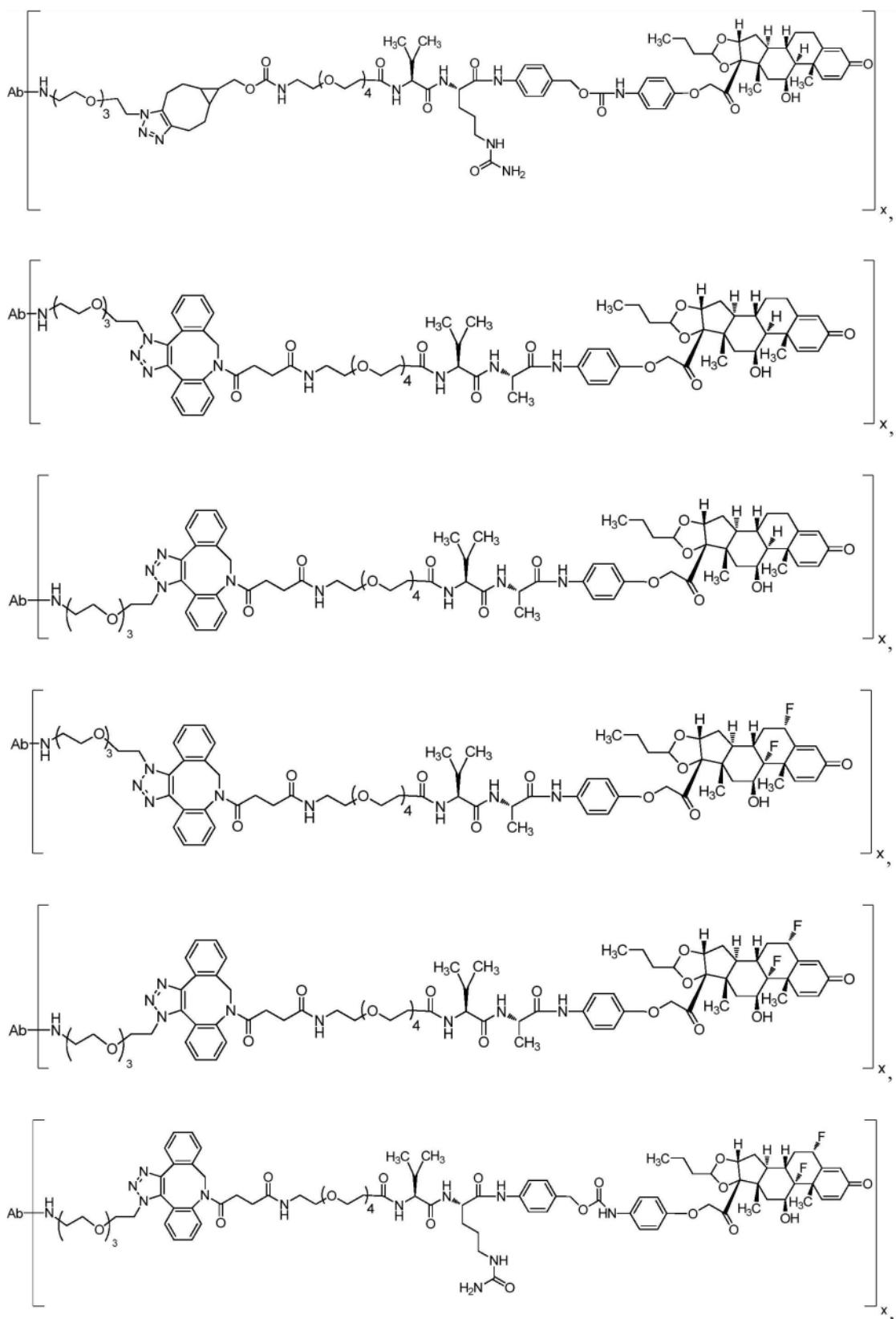
各x是从1至30的整数。

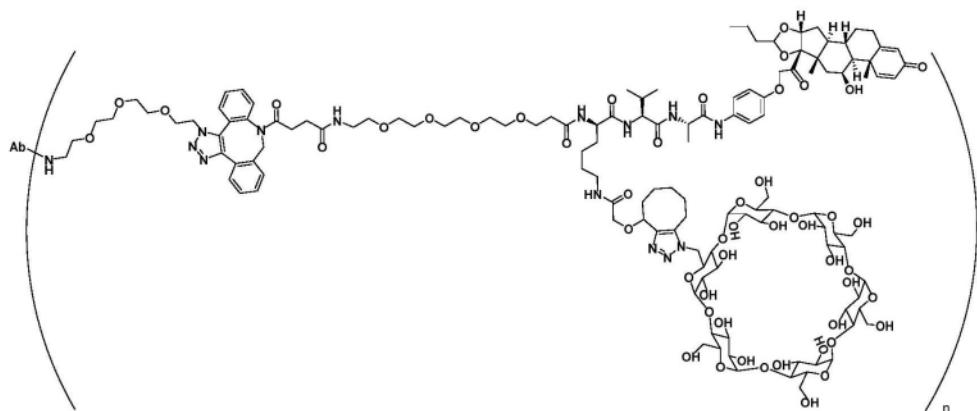
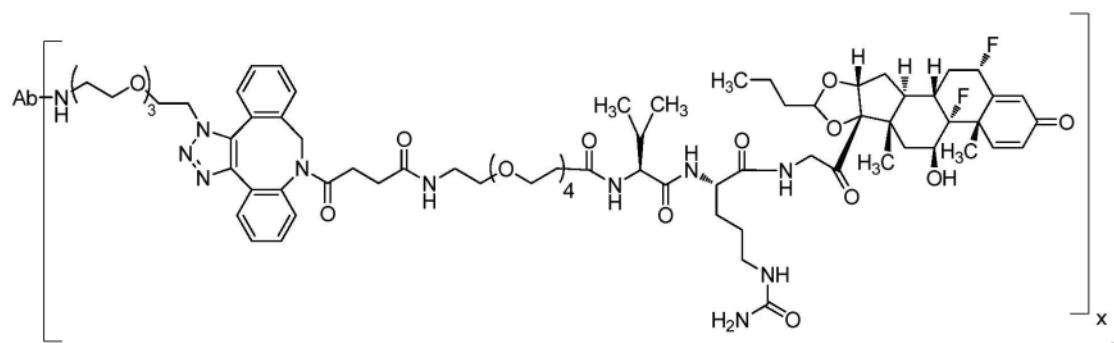
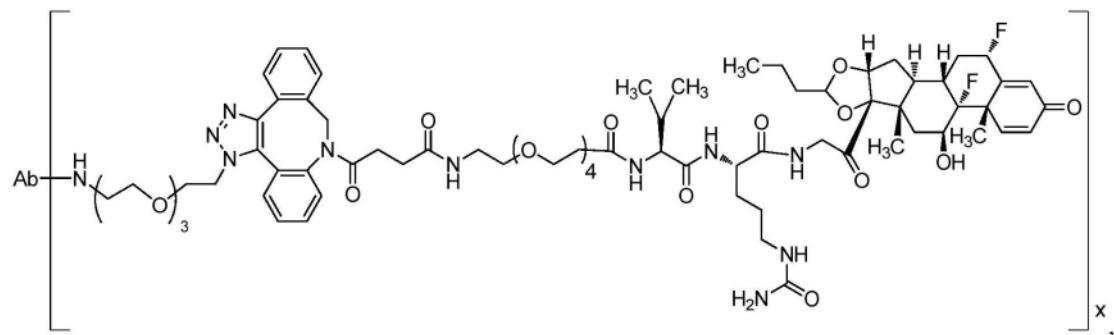
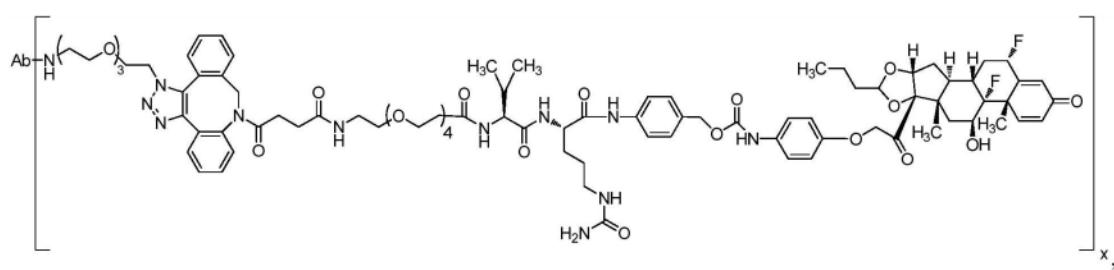
36. 根据权利要求29所述的化合物，其选自由以下组成的组：

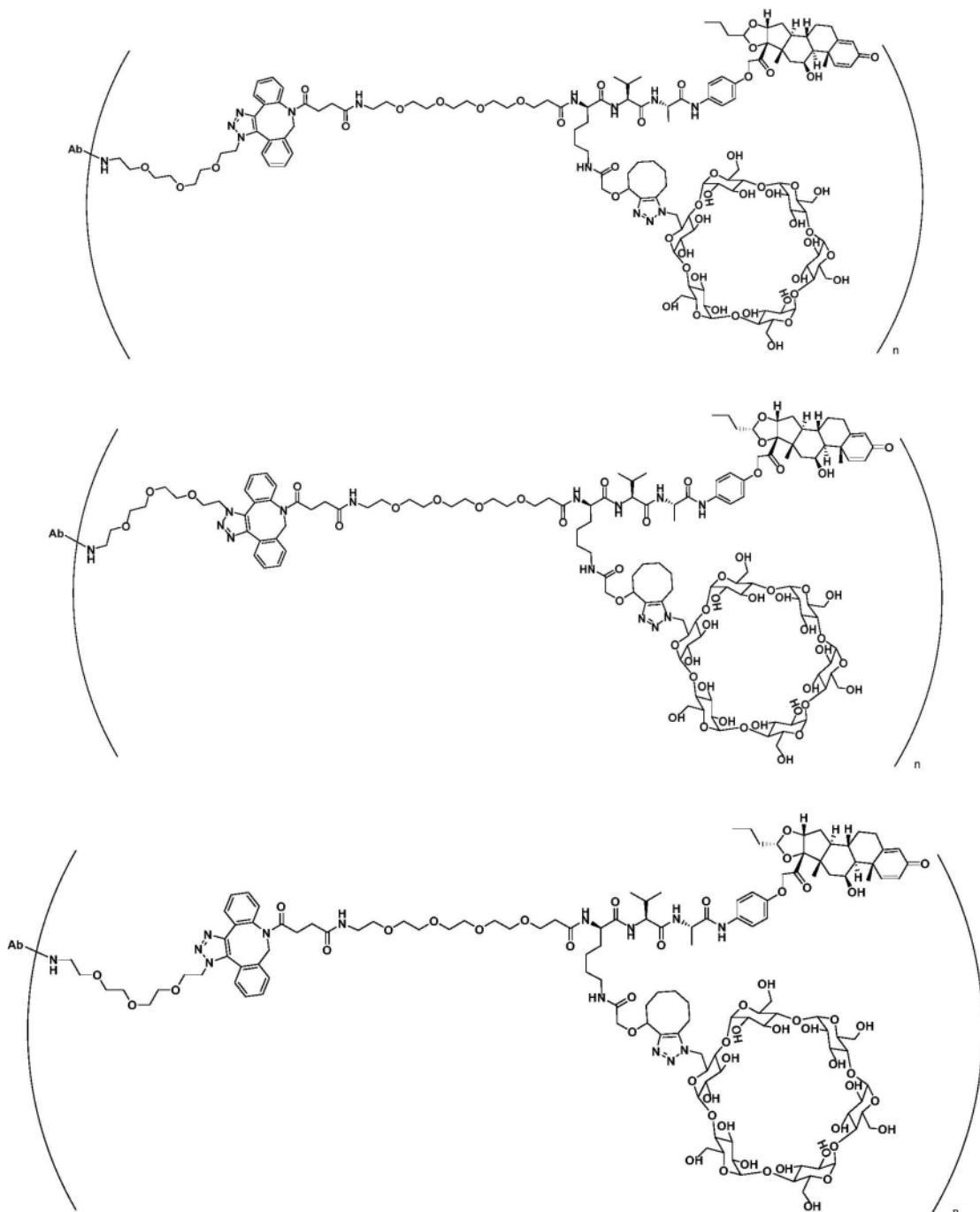


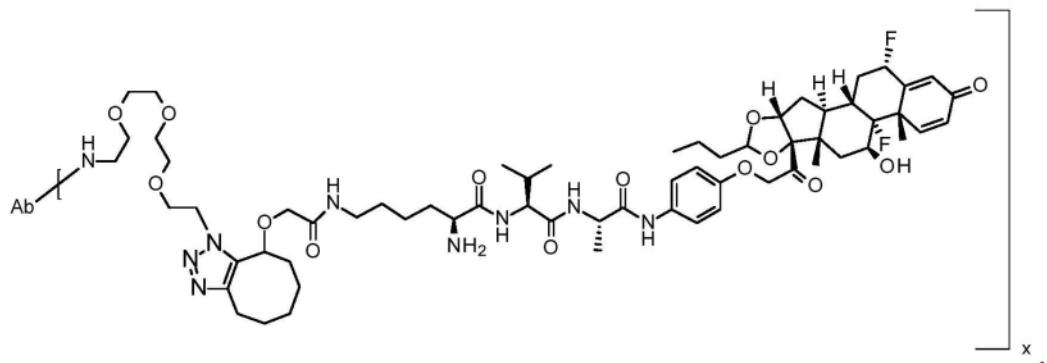
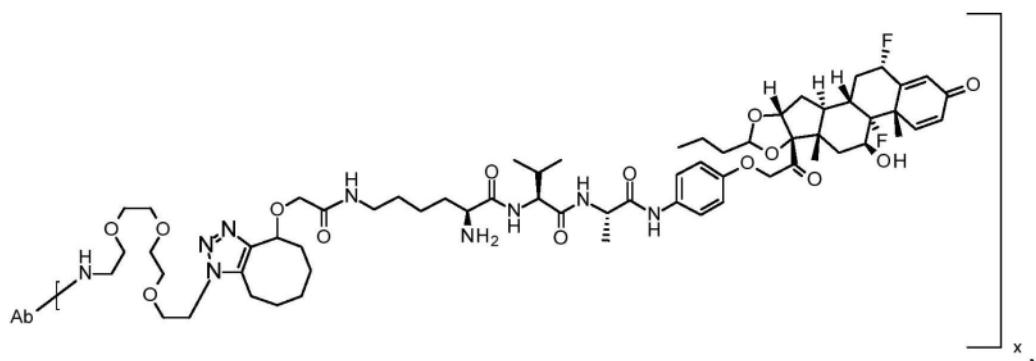
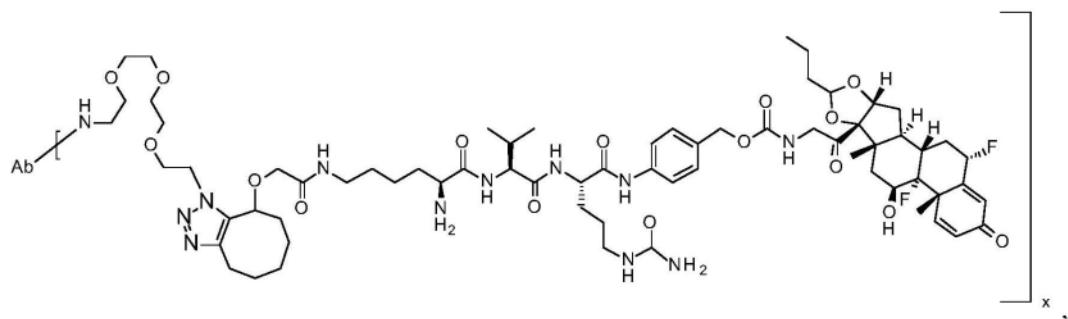
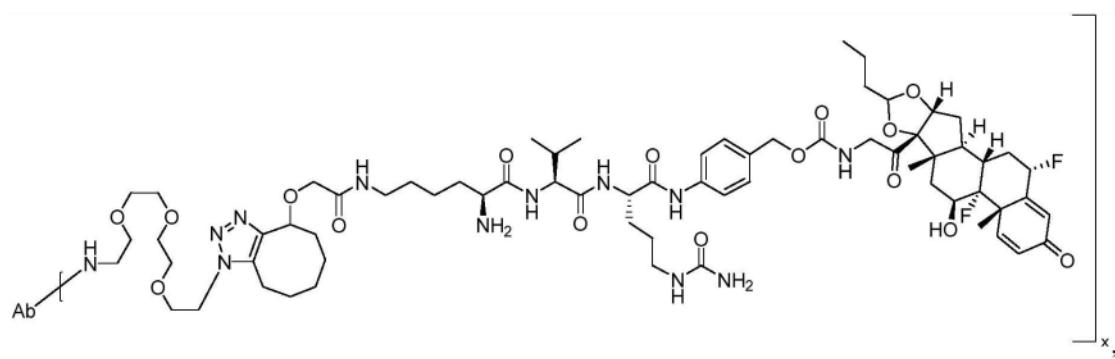


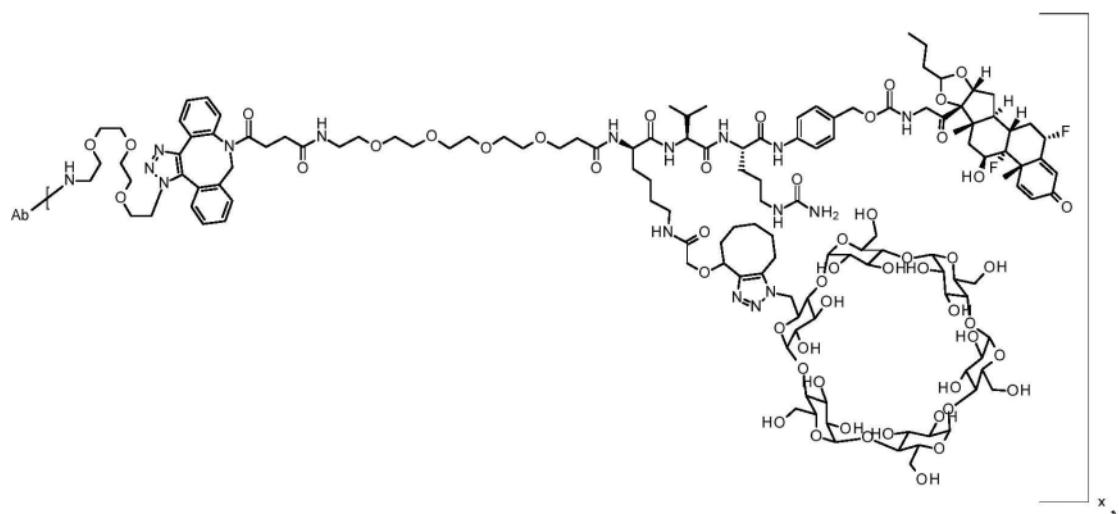
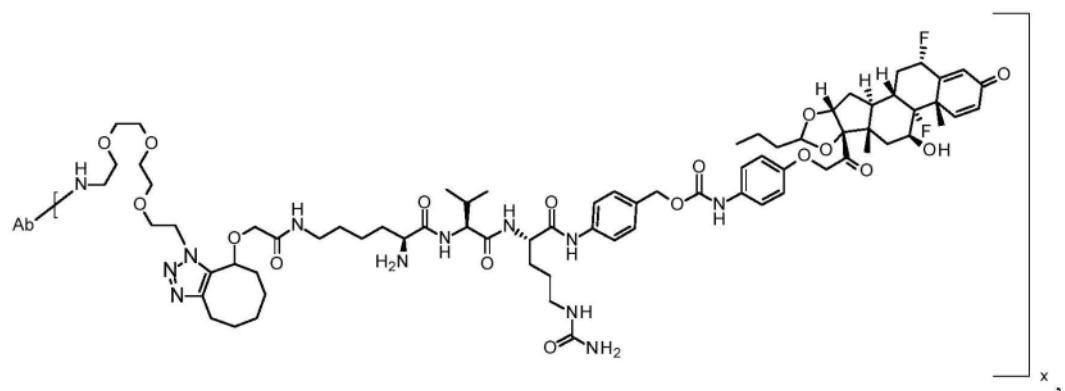
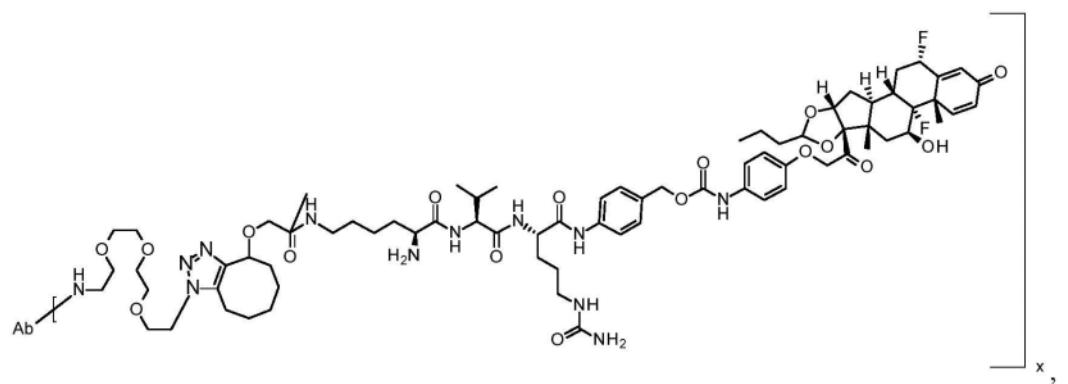


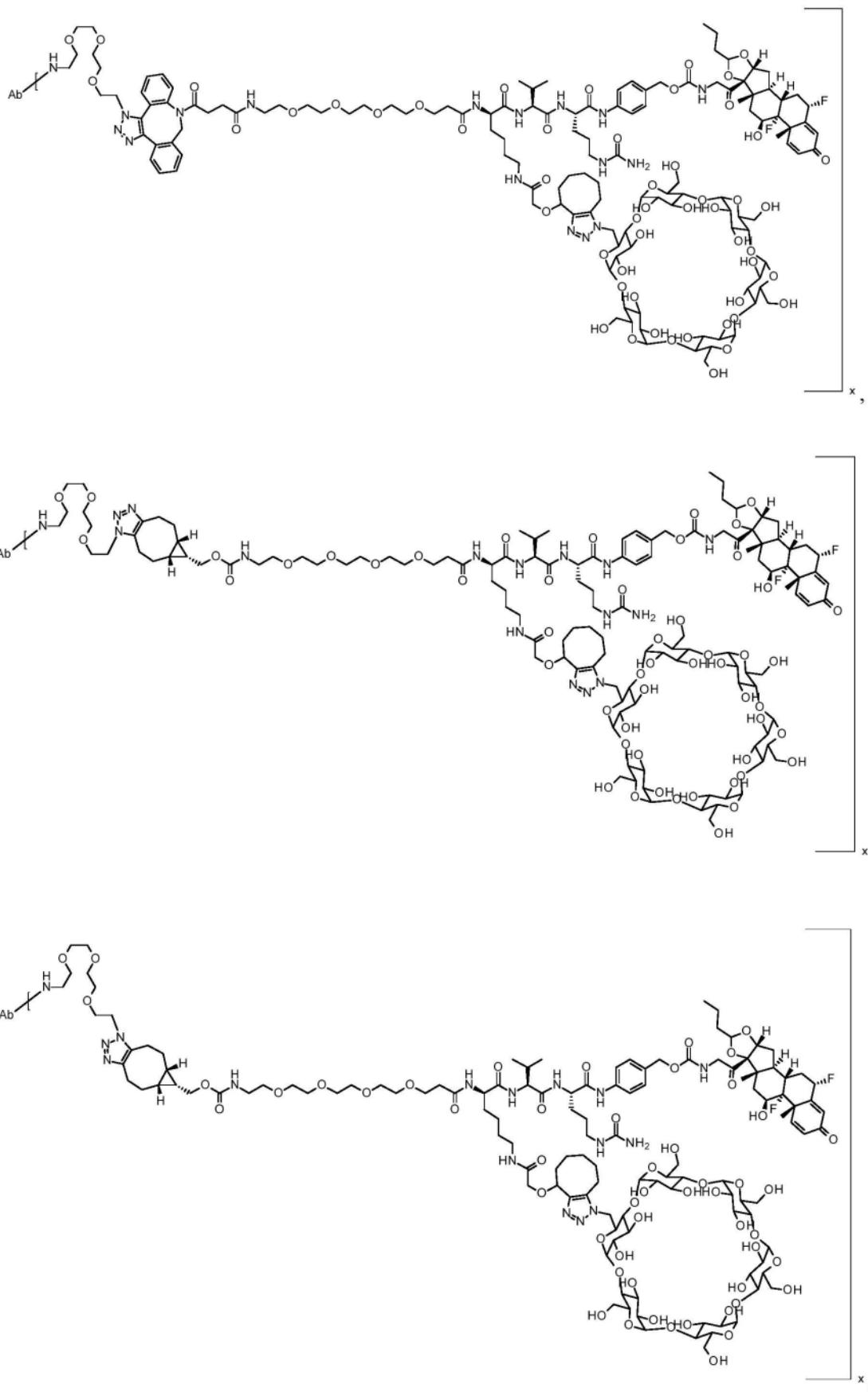


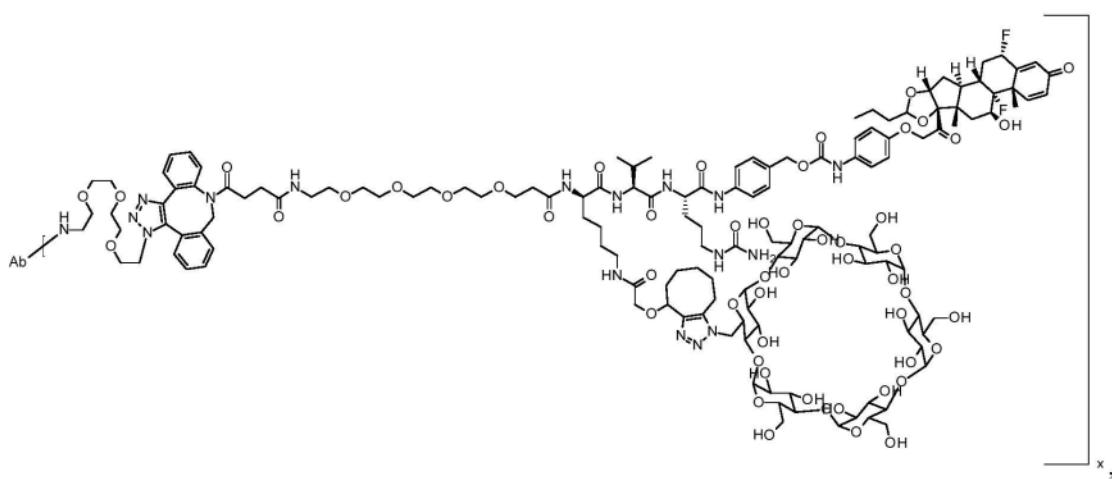
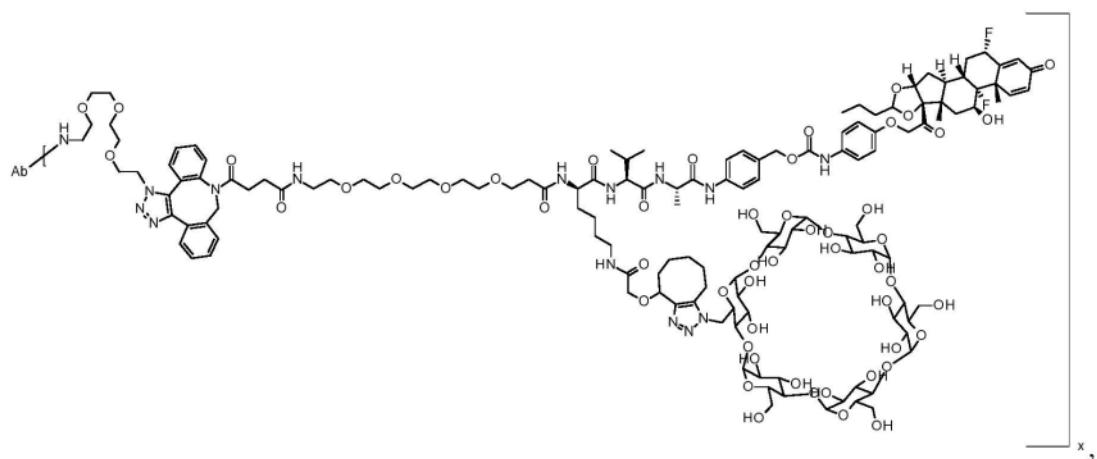
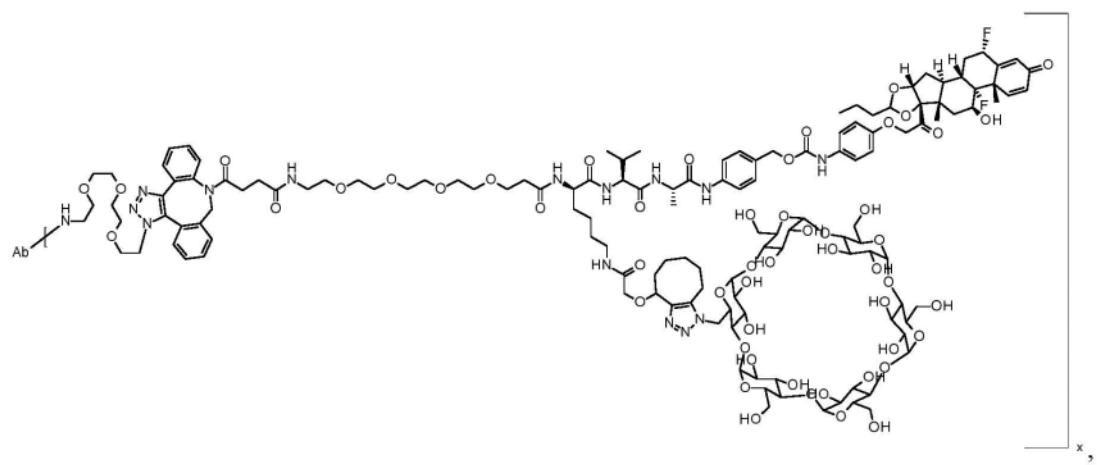


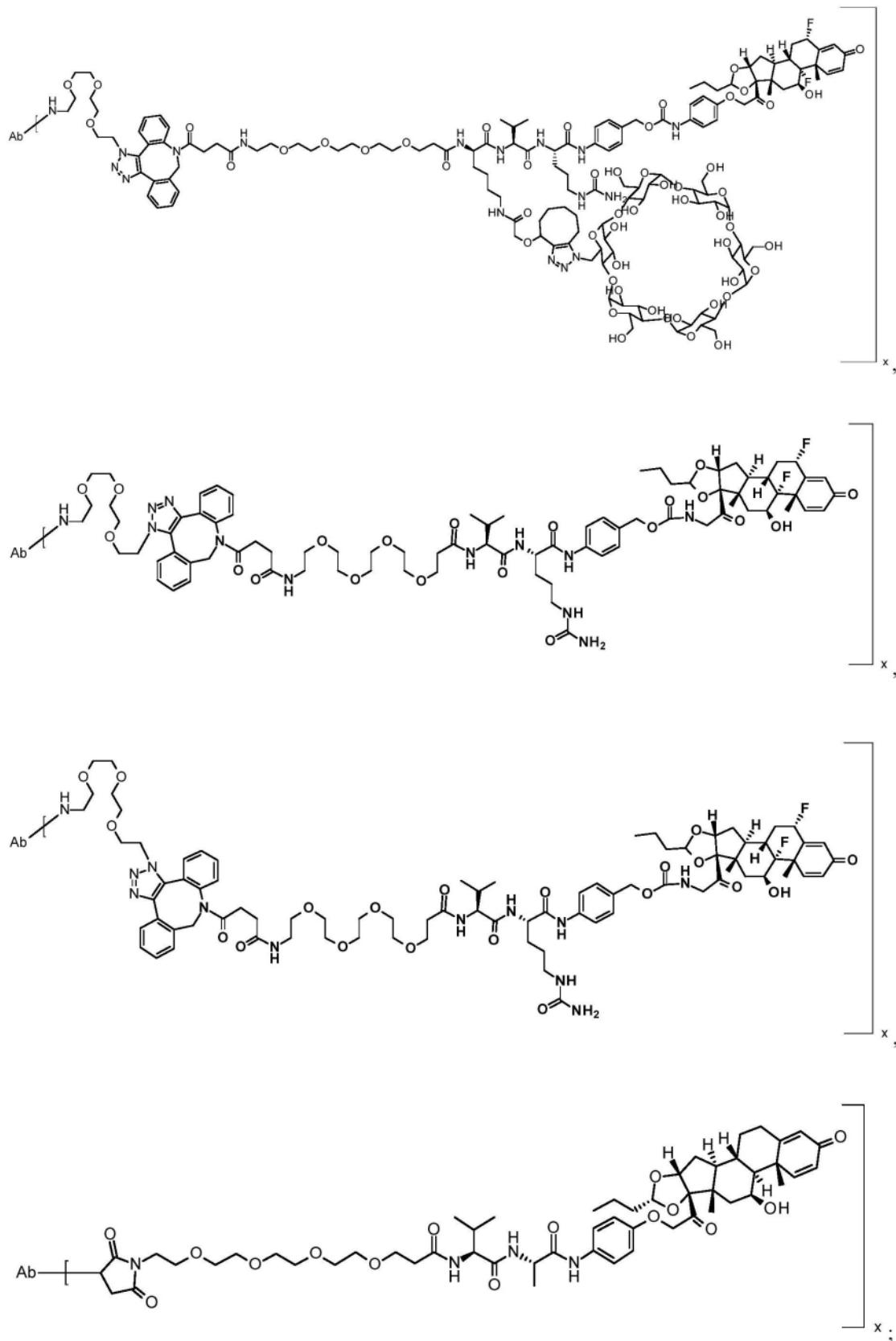


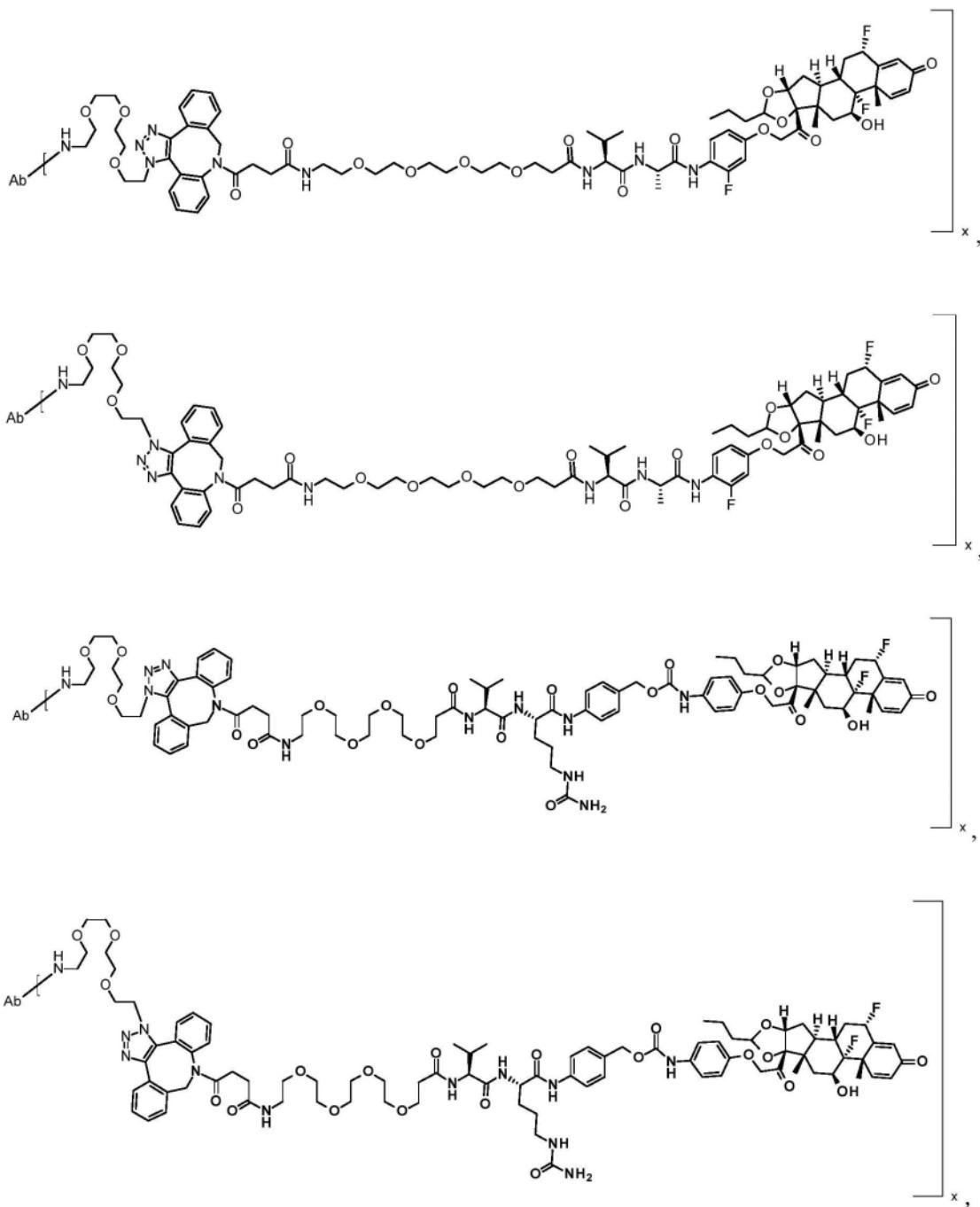












其中x是从1至30的整数；和n是从1至30的整数；
或其药学上可接受的盐、溶剂化物、或立体异构体。

37. 权利要求1-36任一项所述的化合物在制备用于治疗与糖皮质激素受体信号传导相关的疾病、病症或病况的药物中的用途。

38. 根据权利要求37所述的用途，其中，所述疾病、病症或病况是炎性疾病、病症或病况。

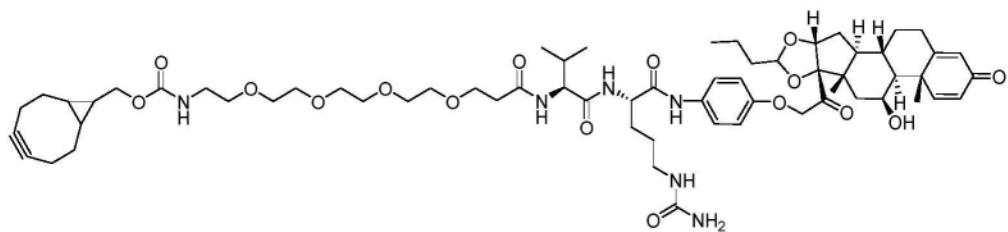
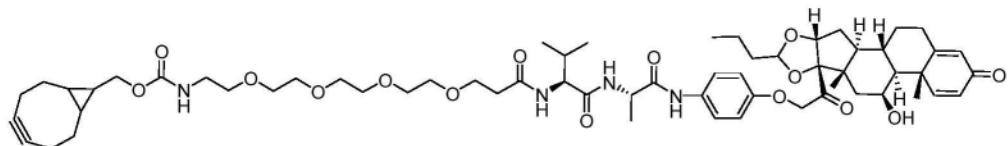
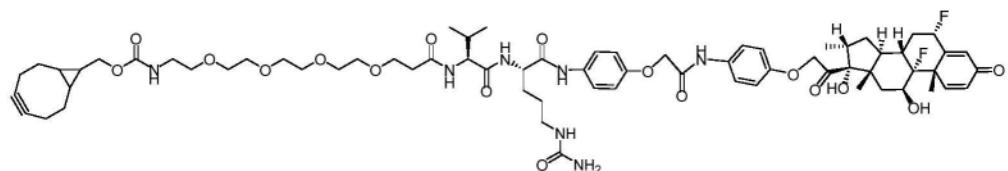
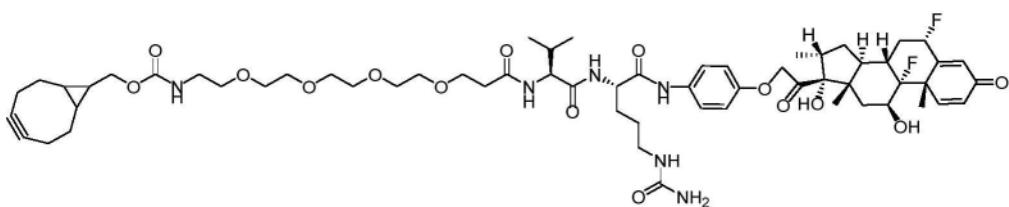
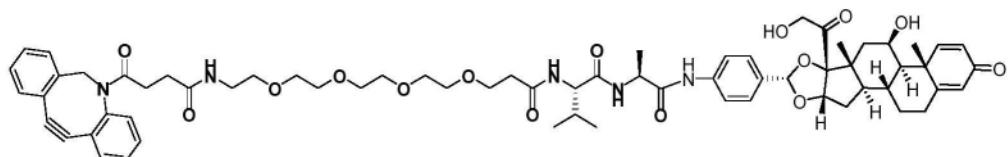
39. 权利要求14-18任一项所述的化合物在制备用于治疗与糖皮质激素受体信号传导相关的疾病、病症或病况的药物中的用途。

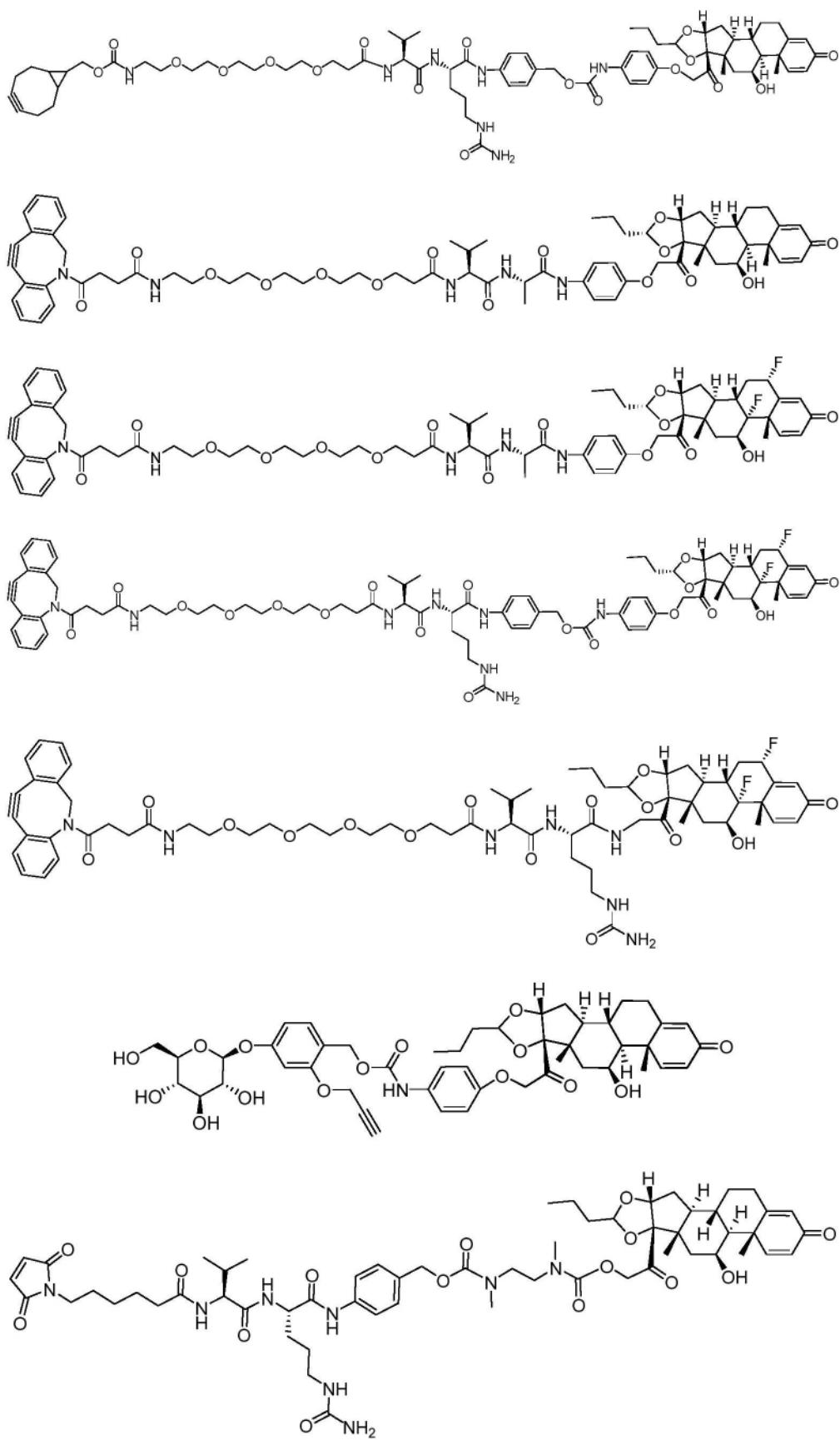
40. 根据权利要求39所述的用途，其中，减少了与施用所述化合物的所述未偶联的类固醇有效负载相关的副作用。

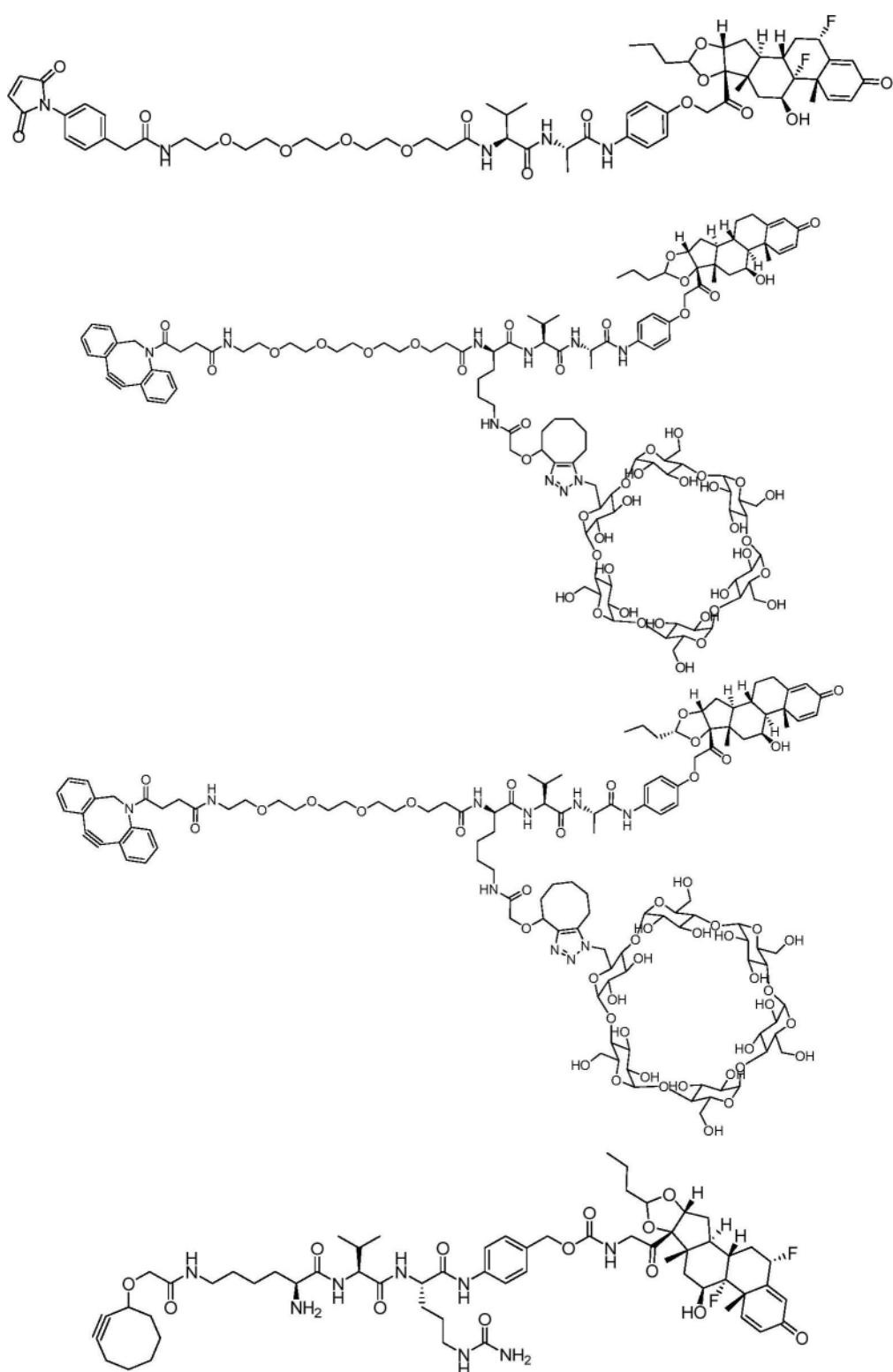
41. 向细胞递送权利要求1所述化合物的体外方法，包含使所述细胞与所述化合物的蛋白质类固醇偶联物接触，其中所述蛋白质偶联物包含抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段结合所述细胞的表面抗原。

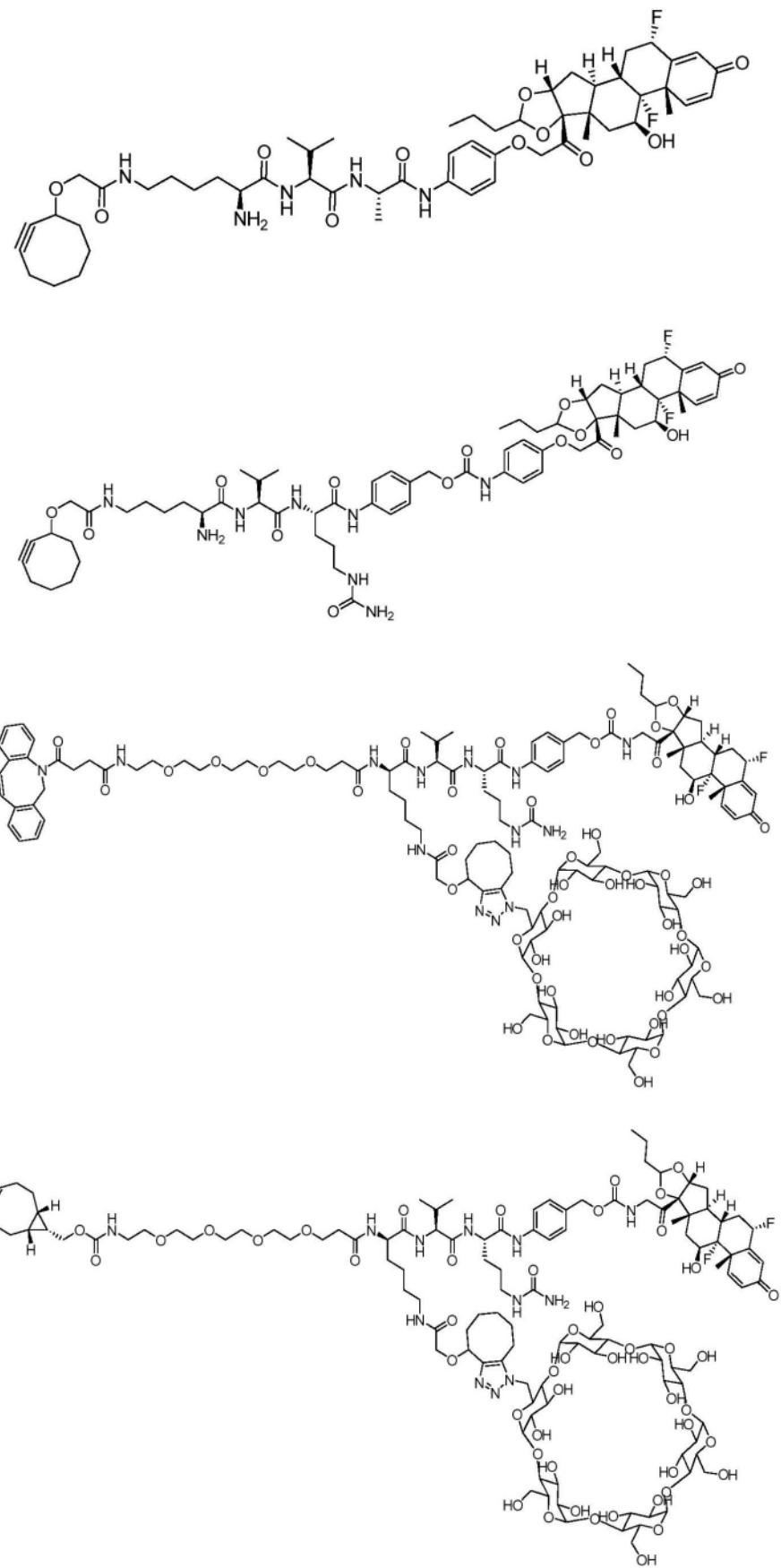
42. 连接体-有效负载，其包含任选地通过连接体，与活性基团连接的权利要求1-28任一项所述的化合物。

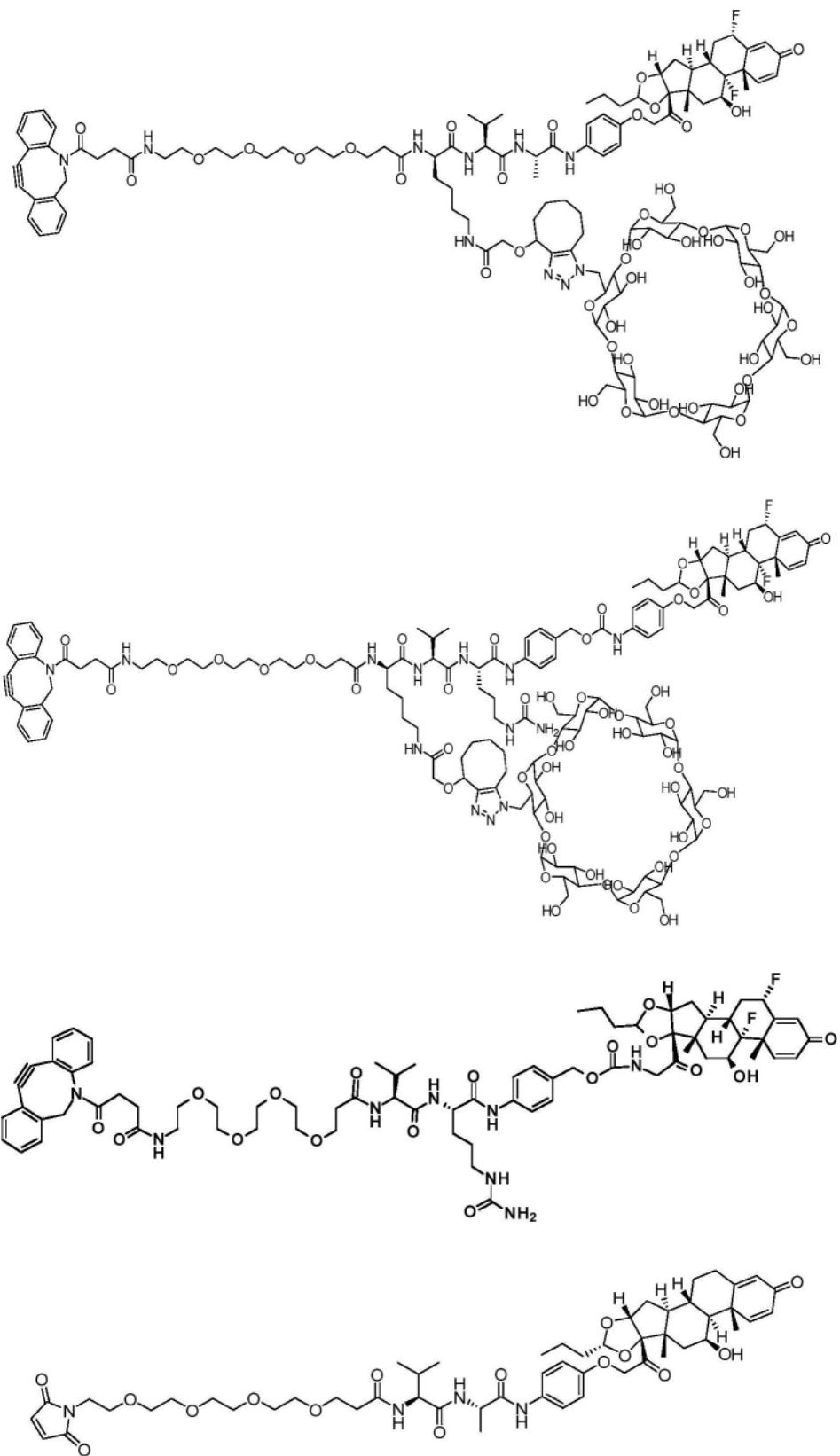
43. 连接体-有效负载，其包含任选地通过连接体，与活性基团连接的权利要求1-28任一项所述的化合物，所述连接体-有效负载选自由以下组成的组：

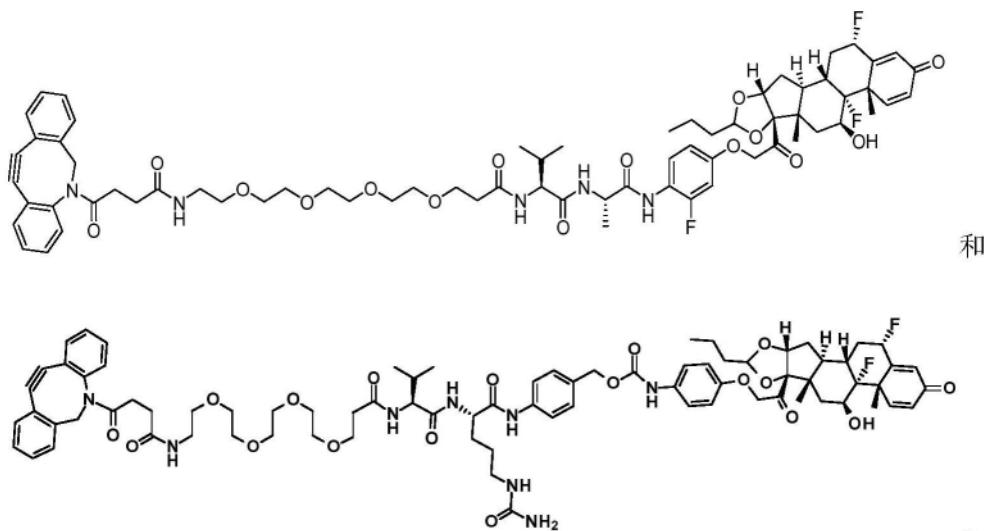












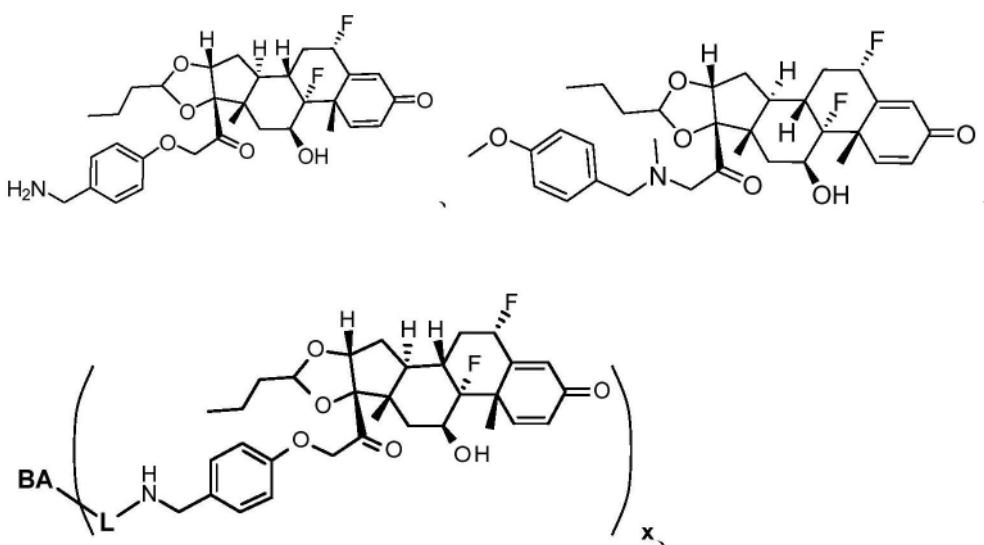
44. 根据权利要求36所述的化合物,其中x为2或4。

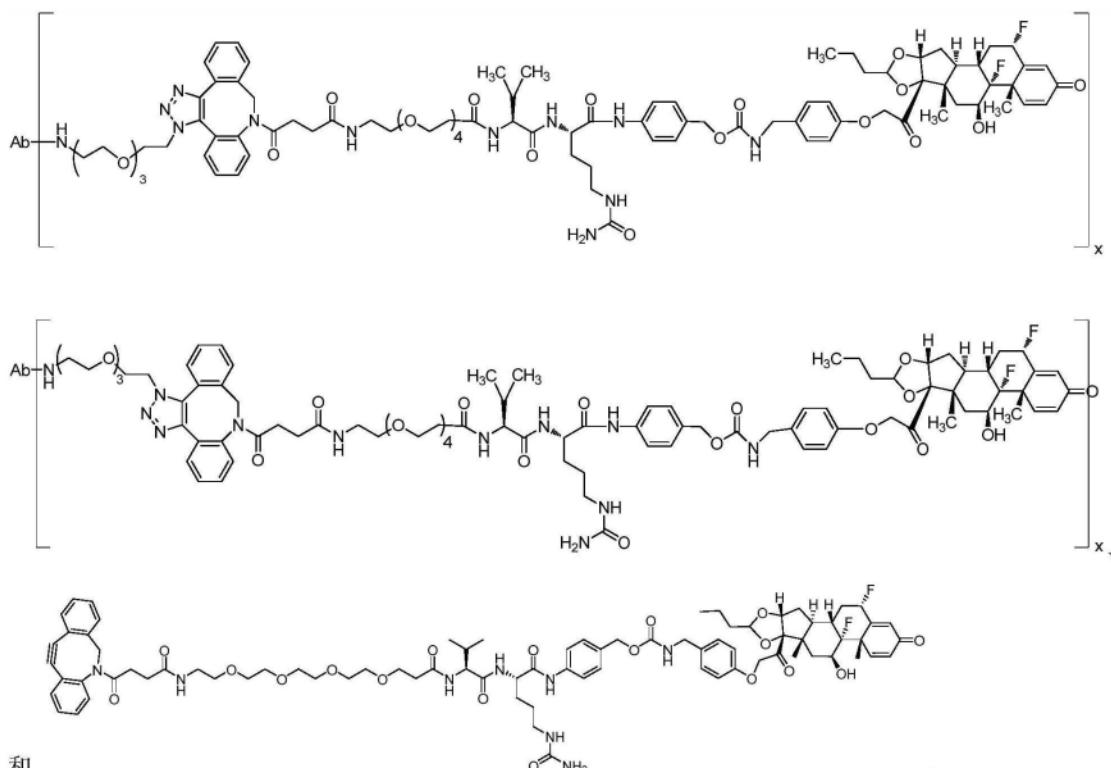
45. 根据权利要求36或44所述的化合物,其中

BA为在位置295 (EU编号) 具有谷氨酰胺残基的抗体,其中L键合至所述谷氨酰胺残基,
或

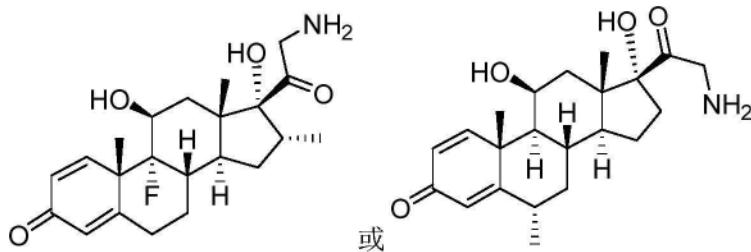
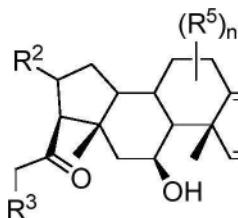
BA为在位置295 (EU编号) 具有谷氨酰胺残基和在位置297 (EU编号) 具有谷氨酰胺残基
的抗体,其中L键合至所述在位置295或297处的谷氨酰胺残基。

46. 一种化合物,其选自:





47. 根据权利要求32所述的化合物,其中



类固醇类化合物及其蛋白质-偶联物

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求于2017年5月18日提交的美国临时专利申请号62/508,317,以及于2016年11月8日提交的美国临时专利申请号62/419,365的优先权,各专利申请的全部内容在此通过引用其整体并入本发明用于所有目的。

发明领域

[0002] 本发明提供了新型类固醇类化合物,其蛋白质偶联物,以及用于治疗疾病、病症和病况的方法,包括施用所述类固醇类化合物和偶联物。

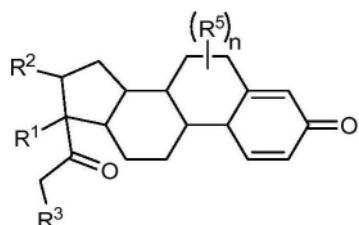
发明背景

[0003] 抗体-药物偶联物(ADC)是与生物活性小分子药物共价连接的抗体,因此可将抗体的靶向特异性与小分子药物的作用模式和效力相结合。ADC的治疗作用已在癌症治疗中得到验证,并且是研究的主要持续焦点。**ADCETRIS®** (brentuximab vedotin) 和**KADCYLA®** (ado-曲妥珠单抗emtansine偶联物 (ado-trastuzumab emtansine)) 是经批准用于治疗某些癌症类型的ADC,目前至少有四十种ADC正在临床开发中。

[0004] 糖皮质激素(GC)是与糖皮质激素受体(GR)结合的小分子类固醇类化合物,并且用于抗炎和免疫抑制疗法。然而,由于糖皮质激素受体在许多细胞类型中普遍表达,糖皮质激素治疗受到大多数器官系统毒性的影响。因此,需要新的糖皮质激素以及使糖皮质激素给药引起的副作用最小化的新疗法,特别是那些由非靶细胞中的糖皮质激素受体激活引起的副作用。本发明提供了对上述需求以及本发明所涉及的领域中的其他未满足需求的解决方案。本发明内容包括含有糖皮质激素有效负载的抗体-药物偶联物。

发明摘要

[0005] 本发明提供了可用于治疗各种疾病、病症或病况的化合物和方法。在某些方面,所述化合物具有式(A)所示结构:



(A);

或其药学上可接受的盐、溶剂化物、立体异构体、或衍生物,

其中:

R¹和R²分别独立地为-H、烷基、烷基-C(0)-O-、-OH、或卤素;或R¹和R²一起形成



其中R⁴是烷基、芳基、芳基烷基、或含N的杂环烷基，

其中所述烷基、芳基、芳基烷基和含N的杂环烷基，在每种情况下，独立任选地被-NR^aR^b取代；

R³是-OH、R^Z-C(O)-X-、杂烷基、哌啶基、-NR^aR^b、-氧基芳基-NR^aR^b、或-Z-A(R^P)_t；

R⁵在每种情况下独立地为-OH、卤素、烷基、或芳基烷基；

R^Z是烷基；

X是O或NR^a；

Z是S、S(0)、S(0)₂、SO₂NR^a、O、C(0)NR^a、C(0)、或NR^a；

A是芳基、芳基烷基、或杂芳基；

R^P在每种情况下独立地为卤素、任选取代的烷基、-OH、或-NR^aR^b；

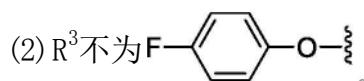
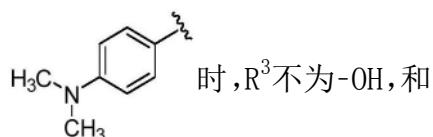
R^a和R^b在每种情况下，独立地为-H、任选取代的烷基、或任选取代的芳基；

n是从0至19的整数；和

t是从1至3的整数；

条件是：

(1) (a) 当R¹是-OH时或(b) 当R¹和R²一起形成，其中R⁴是C₁₋₉烷基或



[0006] 在某些方面，所述化合物是蛋白质-药物偶联物，例如抗体-药物偶联物，其包含抗原结合蛋白，例如抗体和式(A)所示化合物。

[0007] 在某些方面，所述化合物是蛋白质-药物偶联物，例如抗体-药物偶联物，其包含抗原结合蛋白，例如抗体、式(A)所示化合物和环糊精部分。

附图简要说明

- [0008] 图1示出了合成本发明所述的某些类固醇类化合物的序列。
- [0009] 图2示出了修饰布地奈德(budesonide)的伯醇位置的序列。
- [0010] 图3示出了修饰氟米松(Flumethasone)的伯醇位置的序列。
- [0011] 图4示出了修饰地塞米松(dexamethasone)的伯醇位置的序列。
- [0012] 图5示出了表1中化合物7-1R的二维核奥佛好塞(Overhauser)效应(NOE)磁共振光谱(下文称为“2D-NOESY”)。
- [0013] 图6示出了表1中化合物7-1S的2D-NOESY。
- [0014] 图7示出了表1中11-5R的2D-NOESY光谱。
- [0015] 图8示出了表1中化合物11-5S的2D-NOESY光谱。
- [0016] 图9示出了合成某些连接体-有效负载的一般方法。
- [0017] 图10示出了合成DIBAC-Suc-NHS(化合物(V))的序列。
- [0018] 图11示出了合成DIBAC-Suc-PEG₄-酸/NHS(化合物(VI))的序列。

- [0019] 图12示出了合成BCN-PEG₄-酸(化合物(VII))的序列。
- [0020] 图13示出了合成DIBAC-Suc-PEG₄-VC-pAB-PNP(化合物(VIII))的序列。
- [0021] 图14示出了合成连接体-有效负载1(LP1)的序列。
- [0022] 图15示出了合成连接体-有效负载2(LP2)和连接体-有效负载3(LP3)的序列。
- [0023] 图16示出了合成连接体-有效负载4-11(LP4-LP11)的序列。
- [0024] 图17示出了合成连接体-有效负载12(LP12)的序列。
- [0025] 图18示出了制备连接体-有效负载12(LP13)和连接体-有效负载14(LP14)的合成序列。
- [0026] 图19示出了通过与LP4的[2+3]点击反应进行ADC偶联的一般合成方法。
- [0027] 图20示出了如实施例59中所述的抗PRLR抗体、叠氮基官能化的抗PRLR抗体、和抗PRLR抗体-LP4偶联物的考马斯染色的SDS-PAGE凝胶(Coomassie-stained SDS-PAGE Gel)。
- [0028] 图21示出了如实施例59中所述的抗PRLR抗体、叠氮基官能化抗体、和4DAR抗PRLR-LP4偶联物的体积排除色谱(SEC)。
- [0029] 图22示出了如实施例59中所述的抗PRLR抗体、叠氮基官能化抗PRLR抗体、和抗PRLR抗体-LP4偶联物的ESI-MS。
- [0030] 图23示出了如实施例64中所述的通过类固醇ADC和布地奈德对照在293/PRLR/GRE-Luc细胞(图23A)和293/MMTV-Luc细胞(图23B)中的选择性GR激活。
- [0031] 图24示出了如实施例65中所述在293/PRLR/GRE-Luc细胞中测试的类固醇ADC和布地奈德对照对GR激活的连接体-有效负载的贡献。
- [0032] 图25示出了布地奈德、表1中的11-5和抗-IL2R γ ncADC在24小时、48小时或72小时时在HEK293/MMTV-1uc/IL-2R/IL7R细胞系中激活糖皮质激素受体,如实施例66中所述。
- [0033] 图26示出了合成连接体-有效负载(LP7)的序列。
- [0034] 图27示出了制备化合物(27b)的合成方法。
- [0035] 图28示出了合成连接体-有效负载(LP15和LP16)的序列。
- [0036] 图29示出了通过与环糊精-连接体-有效负载的[2+3]点击反应进行ADC偶联的一般合成方法。
- [0037] 图30示出了在相对光单位(RLU)与Log₁₀[M]的关系图中含有和不含环糊精连接体的类固醇ADC的生物活性。
- [0038] 图31示出了合成本发明所述的某些类固醇类化合物(有效负载1至6)的序列。
- [0039] 图32示出了合成某些连接体-类固醇类化合物(LP101至LP116)的序列。
- [0040] 图33示出了通过[2+3]点击反应进行ADC偶联的一般合成方法。
- [0041] 图34示出了抗PRLR Ab、抗PRLR Ab-N₃和抗PRLR-LP的ESI-MS。
- [0042] 图35示出了抗Fe1 d1 Ab、抗Fe1 d1 Ab-PEG₃-N₃和抗Fe1 d1 Ab-LP的ESI-MS。
- [0043] 图36示出了相对光单位(RLU)与Log₁₀[M]的关系图中抗原阳性细胞(293_PRLR_PBind GR/UAS-Luc细胞,图36A)与抗原阴性细胞(293_PBind GR/UAS-Luc细胞,图36B)中的类固醇ADC的生物活性。
- [0044] 图37A示出了化合物4b和6-I的平均血液浓度-时间。
- [0045] 图37B示出了如实施例120-121中所述的有效负载4b和6-I的血液样品中的TNF-α水平。

发明详述

A. 定义

[0046] 本发明使用的“烷基”是指一价且饱和的烃基基团部分。烷基是任选取代的，且可以是直链、支链或环状的，即环烷基。烷基包括但不限于具有1-20个碳原子，即C₁₋₂₀烷基；1-12个碳原子，即C₁₋₁₂烷基；1-8个碳原子，即C₁₋₈烷基；1-6个碳原子，即C₁₋₆烷基；和1-3个碳原子，即C₁₋₃烷基的那些。烷基基团部分的实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、异丁基、戊基基团部分、己基基团部分、环丙基、环丁基、环戊基和环己基。“亚烷基”是二价烷基。

[0047] 本发明使用的“卤代烷基”是指如上所定义的烷基，其中所述烷基包括至少一个选自卤素例如F、Cl、Br或I的取代基。

[0048] 本发明使用的“烯基”是指包含至少两个碳原子和一个或多个非芳族碳-碳双键的一价烃基基团部分。烯基是任选取代的，且可以是直链、支链或环状的。烯基包括但不限于具有2-20个碳原子，即C₂₋₂₀烯基；2-12个碳原子，即C₂₋₁₂烯基；2-8个碳原子，即C₂₋₈烯基；2-6个碳原子，即C₂₋₆烯基；和2-4个碳原子，即C₂₋₄烯基的那些。烯基基团部分的实例包括但不限于乙烯基、丙烯基、丁烯基和环己烯基。“亚烯基”是二价烯基。

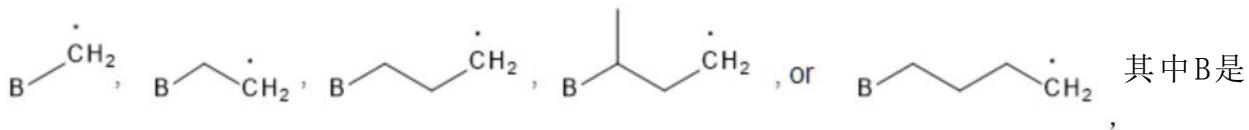
[0049] 本发明使用的“炔基”是指包含至少两个碳原子和一个或多个碳-碳三键的一价烃基基团部分。炔基是任选取代的，且可以是直链、支链或环状的。炔基包括但不限于具有2-20个碳原子，即C₂₋₂₀炔基；2-12个碳原子，即C₂₋₁₂炔基；2-8个碳原子，即C₂₋₈炔基；2-6个碳原子，即C₂₋₆炔基；和2-4个碳原子，即C₂₋₄炔基的那些。炔基基团部分的实例包括但不限于乙炔基、丙炔基和丁炔基。“亚炔基”是二价炔基。

[0050] 本发明使用的“烷氧基”是指一价且饱和的烃基基团部分，其中所述烃包括与氧原子连接的单键，和其中所述自由基位于氧原子上，例如乙氧基CH₃CH₂-O-。烷氧基取代基与它们通过所述烷氧基取代基的氧原子取代的化合物连接。烷氧基是任选取代的，且可以是直链、支链或环状的，即环烷氧基。烷氧基包括但不限于具有1-20个碳原子，即C₁₋₂₀烷氧基；1-12个碳原子，即C₁₋₁₂烷氧基；1-8个碳原子，即C₁₋₈烷氧基；1-6个碳原子，即C₁₋₆烷氧基；和1-3个碳原子，即C₁₋₃烷氧基的那些。烷氧基基团部分的实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、异丁氧基、戊氧基基团部分、己氧基基团部分、环丙氧基、环丁氧基、环戊氧基和环己氧基。

[0051] 本发明使用的“卤代烷氧基”是指如上所定义的烷氧基，其中所述烷氧基包括至少一个选自卤素例如F、Cl、Br或I的取代基。

[0052] 本发明使用的“芳基”是指一价基团部分，其是芳族化合物的原子团，其中所述环原子均是碳原子。芳基是任选取代的，且可以是单环或多环的，例如双环或三环。芳基基团部分的实例包括但不限于具有6至20个环碳原子，即C₆₋₂₀芳基；6至15个环碳原子，即C₆₋₁₅芳基，和6至10个环碳原子，即C₆₋₁₀芳基的那些。芳基基团部分的实例包括但不限于苯基、萘基、芴基、薁基、蒽基、菲基和芘基。

[0053] 本发明使用的“芳基烷基”是指作为烷基化合物的基团的一价基团部分，其中所述烷基化合物被芳香族取代基取代，即，所述芳香族化合物包括与烷基基团连接的单键，和其中所述自由基位于所述烷基基团上。芳基烷基基团通过所述烷基基团与所示的化学结构连接。芳基烷基可以由以下结构表示，例如，



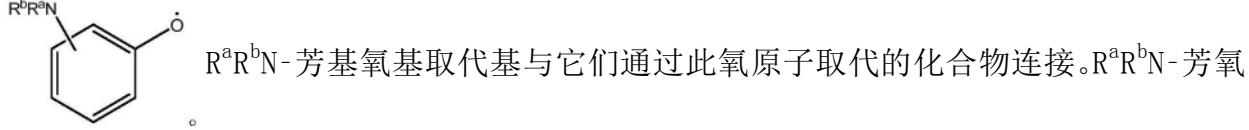
芳族基团部分，例如苯基。芳基烷基是任选取代的，即所述芳基基团和/或所述烷基基团，可以如本发明所述的那样被取代。芳基烷基的实例包括但不限于苄基。

[0054] 本发明使用的“芳氧基/芳基氧基”是指芳族化合物原子团的一价基团部分，其中所述环原子均是碳原子，和其中所述环被氧基取代，即所述芳族化合物包括与氧原子连接

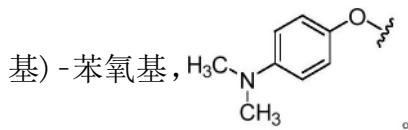
的单键，和其中所述自由基位于氧原子上，例如苯氧基 芳氧基取代基与它们通

过此氧原子取代的化合物连接。芳氧基是任选取代的。芳氧基包括但不限于具有6至20个环碳原子，即C₆₋₂₀芳氧基；6至15个环碳原子，即C₆₋₁₅芳氧基，和6至10个环碳原子，即C₆₋₁₀芳氧基的那些。芳氧基基团部分的实例包括但不限于苯氧基、萘氧基和蒽氧基。

[0055] 本发明使用的“R^aR^bN-芳基氧基”是指芳族化合物原子团的一价基团部分，其中所述环原子均是碳原子，和其中所述环被R^aR^bN-取代基和氧基取代，即所述芳族化合物包括与R^aR^bN-取代基连接的单键和与氧原子连接的单键，其中所述自由基位于氧原子上，例如



基是任选取代的。R^aR^bN-芳基氧基包括但不限于具有6至20个环碳原子，6至15个环碳原子，和6至10个环碳原子的那些。R^aR^bN-芳基氧基基团部分的实例包括但不限于4-(二甲基-氨



[0056] 本发明使用的“亚芳基”是指芳族化合物的二价基团部分，其中所述环原子仅为碳原子。亚芳基是任选取代的，且可以是单环或多环的，例如双环或三环。亚芳基基团部分的实例包括但不限于具有6至20个环碳原子，即C₆₋₂₀亚芳基；6至15个环碳原子，即C₆₋₁₅亚芳基；和6至10个环碳原子，即C₆₋₁₀亚芳基的那些。

[0057] 本发明使用的“杂烷基”是指其中一个或多个碳原子被杂原子替换的烷基。本发明使用的“杂烯基”是指其中一个或多个碳原子被杂原子替换的烯基。本发明使用的“杂炔基”是指其中一个或多个碳原子被杂原子替换的炔基。合适的杂原子包括但不限于氮、氧和硫原子。杂烷基是任选取代的。杂烷基基团部分的实例包括但不限于氨基烷基、磺酰基烷基、亚磺酰基烷基。杂烷基基团部分的实例还包括但不限于甲氨基、甲磺酰基和甲基亚磺酰基。

[0058] 本发明使用的“杂芳基”是指芳族化合物原子团的一价基团部分，其中所述环原子包含碳原子和至少一个氧、硫、氮或磷原子。杂芳基基团部分的实例包括但不限于具有5至20个环原子，5至15个环原子，和5至10个环原子的那些。杂芳基是任选取代的。

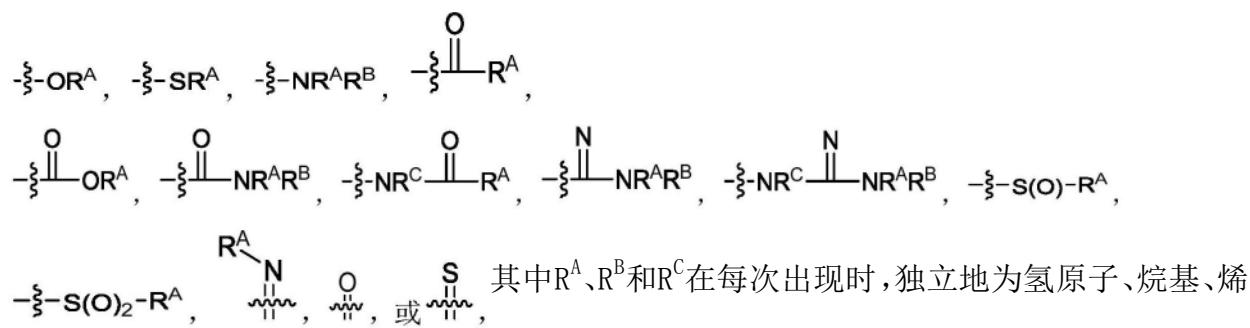
[0059] 本发明使用的“亚杂芳基”是指亚芳基，其中所述芳环的一个或多个环原子被氧、硫、氮或磷原子替换。亚杂芳基是任选取代的。

[0060] “杂环烷基”是指其中一个或多个碳原子被杂原子替代的环烷基。合适的杂原子包

括但不限于氮、氧和硫原子。杂环烷基是任选取代的。杂环烷基基团部分的实例包括但不限于吗啉基、哌啶基、四氢吡喃基、吡咯烷基、咪唑烷基、噁唑烷基、噻唑烷基、二氧戊环基、二硫杂环戊基、氧杂环戊烷基或硫杂环戊烷基。

[0061] 本发明使用的“含N的杂环烷基”是指其中一个或多个碳原子被杂原子替代,和其中至少一个杂原子是氮原子的环烷基。合适的杂原子除氮原子之外,还包括但不限于氧原子和硫原子。含N的杂环烷基是任选取代的。含N的杂环烷基基团部分的实例包括但不限于吗啉基、哌啶基、吡咯烷基、咪唑烷基、噁唑烷基、或噻唑烷基。

[0062] 本发明使用的“任选取代的”,当用于描述基团部分,例如任选取代的烷基时,是指此基团部分任选地与一个或多个取代基连接。此类取代基的实例包括但不限于卤素,氨基,硝基,卤代烷基,叠氮基,环氧基,任选取代的杂芳基,任选取代的杂环烷基,



[0063] 本发明使用的“结合剂”是指能够与给定结合配偶体特异性结合的任何分子。在一些实施方案,所述结合剂是抗体或其抗原结合片段。

[0064] 本发明使用的“连接体”是指将所述结合剂与本发明所述的类固醇共价连接的二价基团部分。

[0065] 本发明使用的“酰胺合成条件”是指适于促进形成酰胺,譬如,通过羧酸、活化的羧酸、或酰卤与胺进行反应的反应条件。在一些实施例,“酰胺合成条件”是指适于在羧酸和胺之间促进形成酰胺键的反应条件。在所述这些实施例的一些中,所述羧酸首先在活化羧酸与胺反应形成酰胺之前转化为活化羧酸。实现酰胺形成的适宜条件包括,但不限于,利用试剂来实现羧酸与胺之间反应的那些,包括但不限于,二环己基碳二亚胺(DCC)、二异丙基碳二亚胺(DIC)、(苯并三氮唑-1-基氧基)三(二甲基氨基)磷鎓六氟磷酸盐(BOP)、(苯并三唑-1-基氧基)三吡咯烷基磷鎓六氟磷酸盐(PyBOP)、(7-偶氮苯并三氮唑-1-基氧基)三吡咯烷基磷鎓六氟磷酸盐(PyAOP)、三吡咯烷基溴化磷鎓六氟磷酸盐(PyBrOP)、O-(苯并三氮唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐(HBTU)、O-(苯并三氮唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟硼酸盐(TBTU)、1-[双(二甲氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三氮唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化六氟磷酸盐(HATU)、2-乙氧基-1-乙氧羰基-1,2-二氢喹啉(EEDQ),1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳

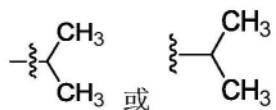
二亚胺(EDC)、2-氯-1,3-二甲基咪唑鎓六氟磷酸盐(CIP)、2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪(CDMT)、和羰二咪唑(CDI)。在一些实施例，首先将羧酸转化为活化的羧酸酯，然后与胺反应形成酰胺键。在一些实施方案，羧酸与试剂反应。所述试剂通过使羧酸去质子来活化羧酸，然后由于去质子化的羧酸亲核进攻到质子化试剂上，从而与去质子化的羧酸形成产物复合物。对于某些羧酸，相较羧酸转化成活化酯之前，所述活化酯更容易受到胺的亲核进攻。此举导致酰胺键形成。因此，所述羧酸被描述为活化的。示例性试剂包括DCC和DIC。

[0066] 本发明使用的“治疗有效量”是指足以在患者治疗或控制疾病或病症，或延迟或最小化与疾病或病症相关的一种或多种症状时，提供治疗益处的(化合物的)量。

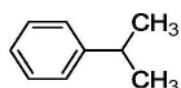
[0067] 本发明使用的“药学上可接受的衍生物”是指化合物的任何形式，例如化合物的酯或前药，其在对患者给药时提供所述化合物。

[0068] 本发明使用的“药学上可接受的盐”是指适于施用于患者的任何盐。合适的盐包括但不限于在Berge et al., "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci., 1977, 66:1中公开的那些，其通过引用并入本发明作为参考。盐的实例包括但不限于酸衍生的、碱衍生的、有机的、无机的、胺、和碱金属或碱土金属盐类，包括但不限于钙盐，镁盐，钾盐，钠盐，盐酸盐，氢溴酸盐，硫酸盐，硝酸盐，磷酸盐，乙酸盐，丙酸盐，乙醇酸盐，丙酮酸盐，草酸盐，马来酸盐，丙二酸盐，琥珀酸盐，富马酸盐，酒石酸盐，柠檬酸盐，苯甲酸盐，肉桂酸盐，扁桃酸盐，甲磺酸盐，乙磺酸盐，对甲苯磺酸盐和水杨酸盐等。

[0069] 某些基团、分子/基团部分、取代基、和原子被描述为具有与键相交的波浪线，以指示所述基团、分子/基团部分、取代基、原子通过其进行连接的原子。譬如，被丙基基团取代的苯基基团可表示为：



具有下述结构：

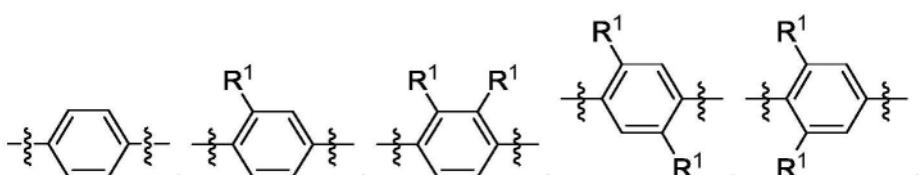


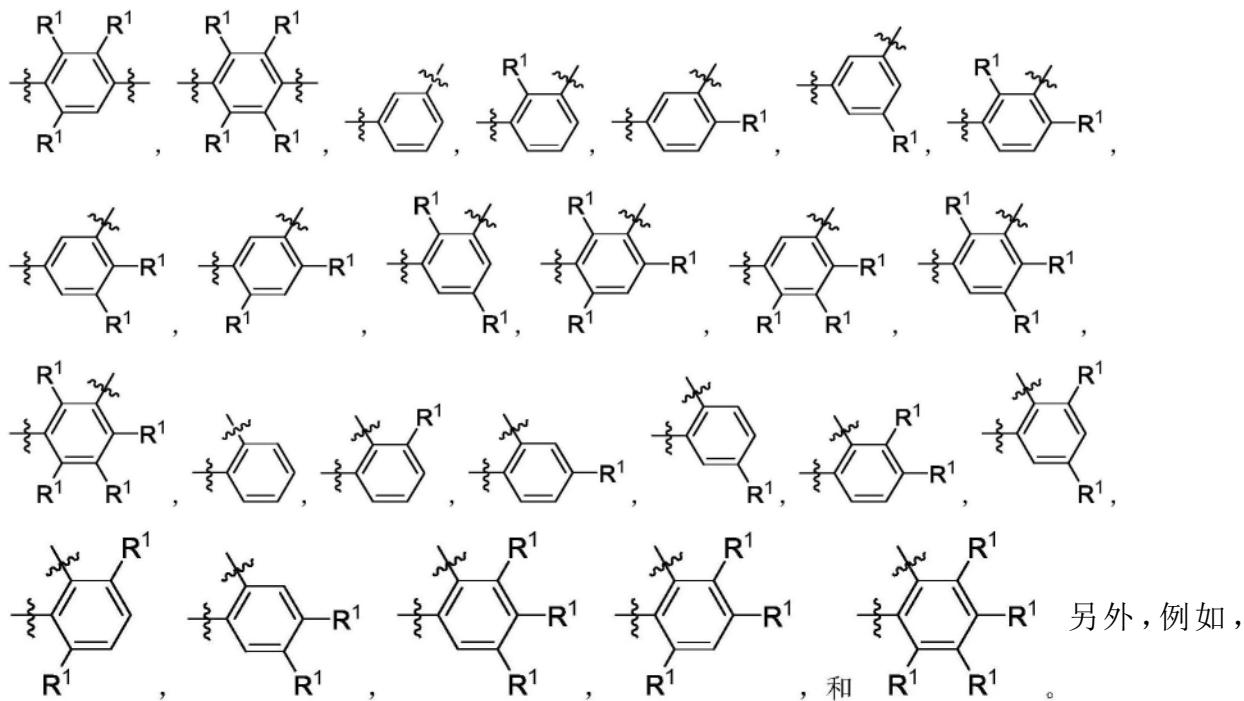
本发明使用的，通过环原子之间的键连接到环状基团(例如，芳环、

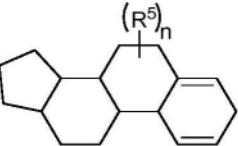
杂芳环、稠环、和饱和或不饱和环烷基或杂环烷基)的取代基的图示说明意在表示，除非另有说明，环状基团可根据本发明所阐述的技术或即时公开的涉及本领域已知的技术，在环

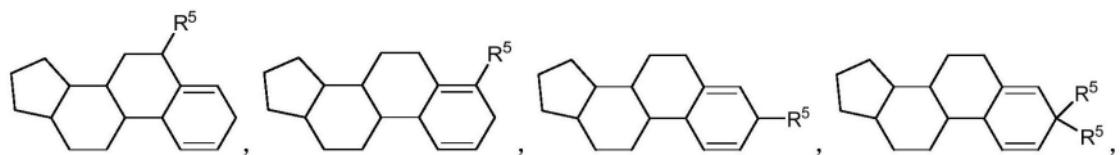
状基团的任何环位置或稠环基团的任何环上被取代基取代。譬如，所述基团，其中下标q是从0至4的整数，和其中取代基R¹的位置一般性地描述，即不直接连接至键合线结构的任何顶点，即特定的环碳原子，包括以下，其中取代基R¹与特定环碳原子连接的基团的非

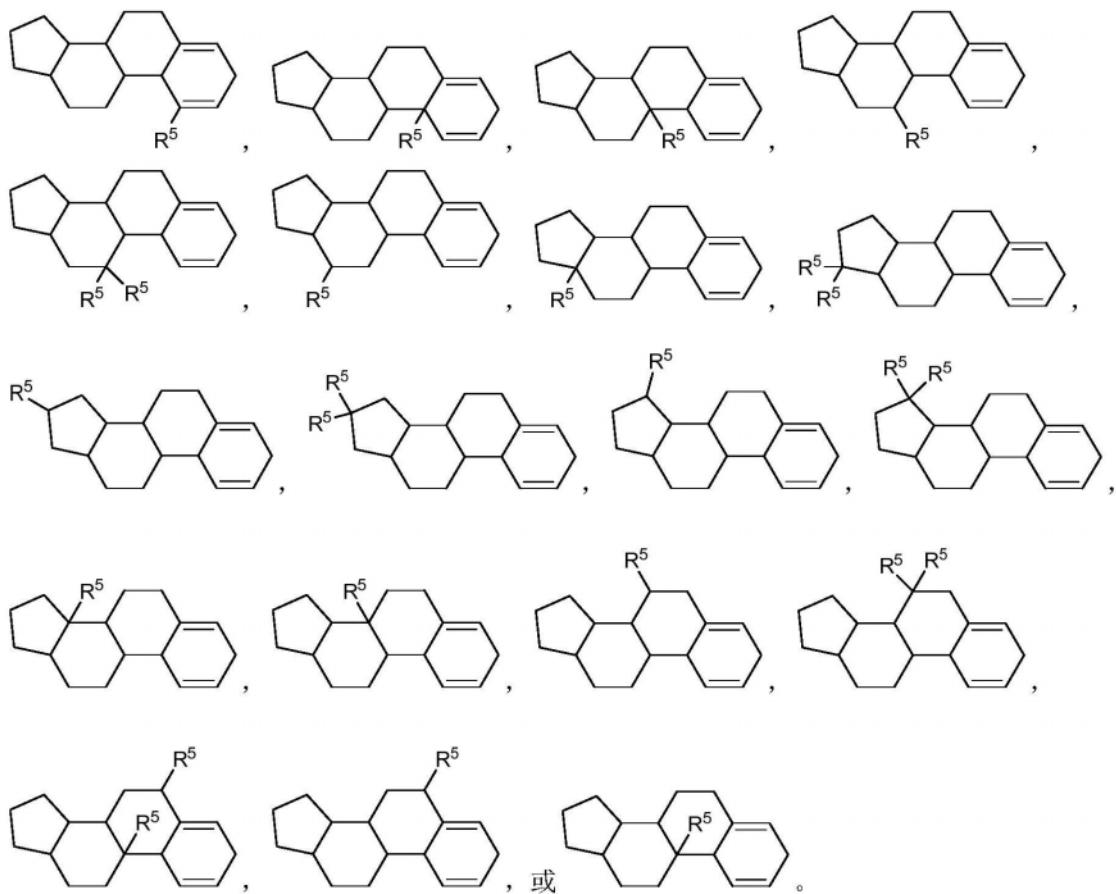
限制性实例：



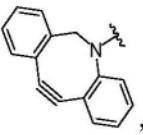


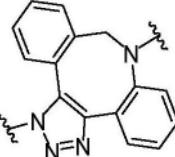
所述基团  其中下标n是从0至19的整数，和其中取代基R⁵的位置一般性描述，即，描绘为不直接连接到键合线结构的任何顶点，包括以下基团的非限制性实例，其中取代基R⁵与特定环碳原子连接：

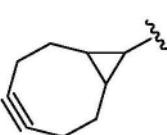
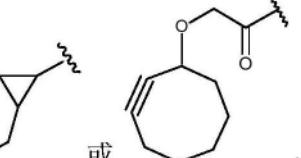


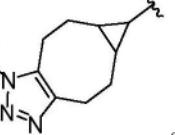


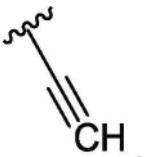
[0070] 短语“活性(反应性)连接体”或缩写“RL”是指包含活性(反应性)基团和连接基团的一价基团,如**RG-L-§**所示,其中RG是活性基团,L是连接基团。所述连接基团是将所述活性基团桥接至有效负载的任何二价基团部分。所述活性连接体(RL)与同它们连接的有效负载一起,组成可用作制备本发明所述抗体类固醇偶联物的合成前体的中间体(“连接体-有效负载”)。所述活性连接体包含活性基团(“RG”),其是与抗体、修饰的抗体或其抗原结合片段的活性部分反应的官能团或基团部分。由所述活性基团与所述抗体、经修饰的抗体或其抗原结合片段反应产生的基团部分与所述连接基团一起,组成本发明所述的偶联物的“结合剂连接体”(“BL”)部分。在某些实施方案,所述“活性基团”是与抗体或其抗原结合片段的半胱氨酸或赖氨酸残基反应的官能团或基团部分(例如,马来酰亚胺或NHS酯)。在某些实施方案,所述“活性基团”是能够进行点击化学反应的官能团或基团部分。在所述点击化学反应的一些实施方案中,所述活性基团是能够与叠氮化物进行1,3-环加成反应的炔烃。此类合适的活性基团包括但不限于应变炔烃类,例如适用于应变促进的炔-叠氮化物环加成(SPAAC)的那些,环炔烃类,例如环辛炔类、苯并环化的炔烃类、和在没有铜催化剂的情况下能够与叠氮化物进行1,3-环加成反应的炔烃类。合适的炔烃类还包括但不限于DIBAC, DIBO,BARAC,DIFO,取代的例如氟化炔烃类,氮杂-环炔烃类,BCN及其衍生物。包含此类活性基团的连接体-有效负载可用于偶联已用叠氮基官能化的抗体。此类官能化抗体包括用叠氮基-聚乙二醇基团官能化的抗体。在某些实施方案,此类官能化抗体通过在酶转谷氨酰胺酶存在下,使包含至少一个谷氨酰胺残基(例如重链Q295(EU编号))的抗体与式H₂N-LL-N₃所示化合物反应而得到,其中LL是二价聚乙二醇基团。

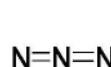
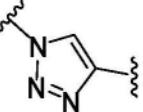
[0071] 在一些实施例,所述活性基团是炔烃,例如  其可通过点击化学与叠氮化

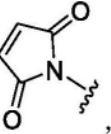
物(例如 )反应,以形成点击化学产物,例如  其区域异构体、或其混

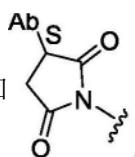
合物。在一些实施例,所述活性基团是炔烃,例如  或  其可通过点

击化学与叠氮化物(例如 )反应,以形成点击化学产物,例如  在一

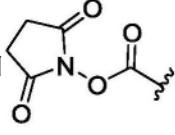
些实施例,所述活性基团是炔烃,例如  其可通过点击化学与叠氮化物(例如

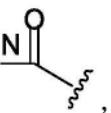
)反应,以形成点击化学产物,例如  其区域异构体、或其混合物。在一

些实施例,所述活性基团是官能团,例如  其与抗体或其抗原结合片段上的半胱氨酸

残基反应,与其形成键,例如  其中Ab是指抗体或其抗原结合片段,S是指半胱氨酸

残基上的S原子,所述官能团通过此半胱氨酸残基上的S原子与Ab结合。在一些实施例,所述

活性基团是官能团,例如  其与抗体或其抗原结合片段上的赖氨酸残基反应,

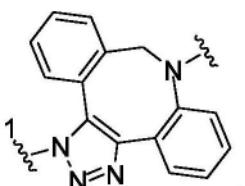
与其形成键,例如  其中Ab是指抗体或其抗原结合片段,N是指赖氨酸残基上的N原

子,所述官能团通过此赖氨酸残基上的N原子与Ab结合。

[0072] 本发明使用的短语“结合剂连接体”、或“BL”是指连接、结合或键合结合剂(例如,抗体或其抗原结合片段)与本发明所述的有效负载化合物(例如,类固醇)的任何二价基团

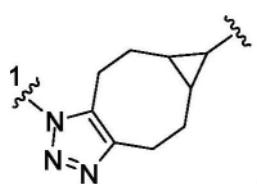
或基团部分。通常，本发明所述的抗体偶联物的合适的结合剂连接体是足以稳定以利用抗体的循环半衰期，并且同时能够在抗原介导的偶联物内化后释放其有效负载的那些。连接体可以是可切割的或不可切割的。可切割的连接体是内化后由细胞内代谢切割的连接体，例如通过水解、还原或酶促反应进行切割。不可切割的连接体是通过内化后抗体的溶酶体降解来释放附接的有效负载的连接体。合适的连接体包括但不限于酸不稳定连接体，水解不稳定连接体，酶促可切割连接体，还原不稳定连接体，自我牺牲连接体和不可切割连接体。合适的连接体还包括但不限于葡糖昔酸类，琥珀酰亚胺-硫醚类，聚乙二醇(PEG)单元类，腙类， ϵ -己酰单元类，二硫键单元类(例如，-S-S-，-S-C(R¹R²)-)，其中R¹和R²分别独立地为氢或烃基)，氨基甲酸酯单元类，对氨基苄基单元类(PAB)，磷酸酯单元类，例如单-、双-或三-磷酸酯单元类，和肽单元类，例如含有2、3、4、5、6、7、8、或更多个氨基酸的肽单元，包括但不限于缬氨酸-瓜氨酸单元的那些。在一些实施方案，所述结合剂连接体(BL)包含通过活性连接体(RL)的活性基团(RG)与结合剂(例如，抗体、经修饰的抗体、或其抗原结合片段)的活性部分进行反应形成的基团部分。

[0073] 在一些实施例，所述BL包含以下基团部分：



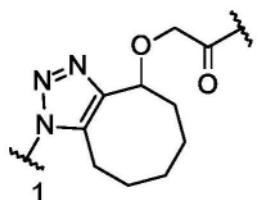
其区域异构体、或其

混合物，其中¹是与所述结合剂连接的键。在一些实施例，所述BL包含以下基团部分：



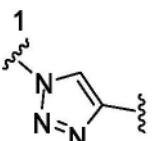
其区域异构体、或其混合物，其中¹是与所述结合剂连接的键。在一些实

施例，所述BL包含以下基团部分：



其区域异构体、或其混合物，其中¹是

与所述结合剂连接的键。在一些实施例，所述BL包含以下基团部分：



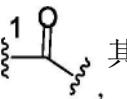
其区域异构

体、或其混合物，其中¹是与所述结合剂连接的键。在一些实施例，所述BL包含以下基团部

分：

其中¹是与所述抗体或其抗原结合片段的所述半胱氨酸连接的键。在一些实

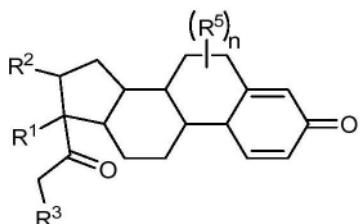
44

施例,所述BL包含以下基团部分: 其中

是与所述抗体或其抗原结合片段的所述赖氨酸连接的键。在所述这些实施例中,与所述结合剂连接的键是直接连接或通过连接体进行连接。在特定的实施方案中,用叠氮化物修饰所述结合剂以促进与BL的连接。实例描述如下。

B. 类固醇类化合物

[0074] 本发明提供了具有式(A)所示结构的化合物:

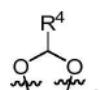


(A):

或其药学上可接受的盐、溶剂化物、立体异构体、或衍生物,

其中:

R¹和R²分别独立地为-H、烷基、亚烷基-C(0)-O-、-OH、或卤素;或R¹和R²一起形成



其中R⁴是烷基、芳基、芳基烷基、或含N的杂环烷基,

其中所述烷基、芳基、芳基烷基和含N的杂环烷基,在每种情况下,独立任选地被-NR^aR^b取代;

R³是-OH、R^z-C(0)-X-、杂烷基、哌啶基、-NR^aR^b、-氧基芳基-NR^aR^b、或-Z-A(R^P)_t;

R⁵在每种情况下,独立地为-OH、卤素、烷基、或芳基烷基;

R^z是烷基;

X是O或NR^a;

Z是S、S(0)、S(0)₂、SO₂NR^a、O、C(0)NR^a、C(0)、或NR^a;

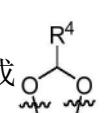
A是芳基或杂芳基;

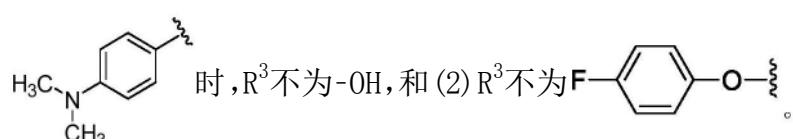
R^P在每种情况下,独立地为卤素、任选取代的烷基、-OH、或-NR^aR^b;

R^a和R^b在每种情况下,独立地为-H、或任选取代的烷基;

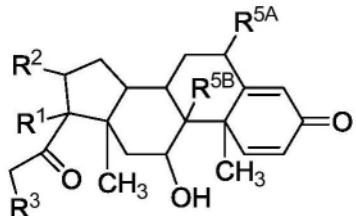
n是从0至19的整数;和

t是从1至3的整数;

条件是:(1)(a)当R¹是-OH时,或(b)当R¹和R²一起形成 其中R⁴是C₁₋₉烷基或



[0075] 在一些实施方案，式(A)所示化合物具有式(A¹)的结构：



(A¹)

其中R¹-R³均具有如上所述定义,和R^{5A}和R^{5B}各自独立地为卤素或氢原子。

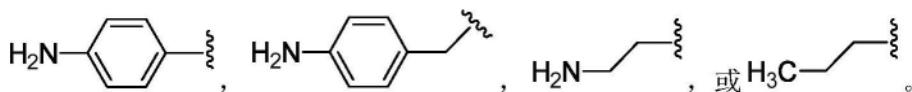
[0076] 在式(A¹)所示化合物的一些实施方案中，R^{5A}和R^{5B}均为氢原子。在式(A¹)所示化合物的一些实施方案中，R^{5A}和R^{5B}均为氟。在式(A¹)所示化合物的一些实施方案中，R^{5A}是氢原子，和R^{5B}是氟。

[0077] 在式(A¹)所示化合物的一些实施方案中, R¹是亚烷基-C(0)-O-或-OH, 和R²是烷基。

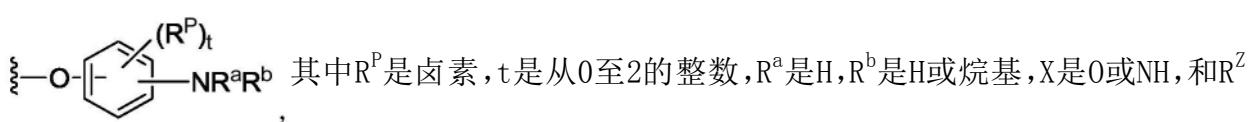
[0078] 在式(A¹)所示化合物的一些实施方案中, R¹和R²一起形成  其中R⁴是芳基、芳

基烷基、或烷基，其中所述芳基、芳基烷基、和烷基任选地被 $-NR^aR^b$ 取代。在一些实施方案， R^4 是-芳基- NR^aR^b 。在一些实施方案， R^4 是-苯基- NR^aR^b 。

[0079] 在式(A¹)所示化合物的一些实施方案中,R¹和R²一起形成，其中R⁴是

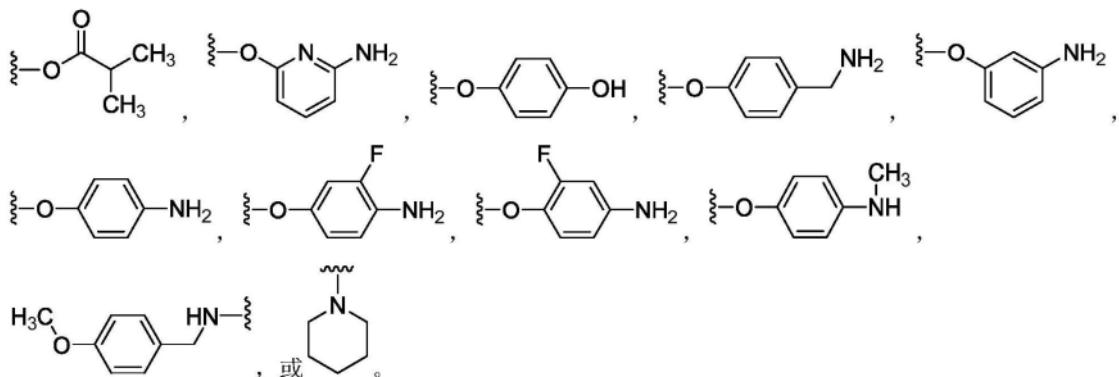


[0080] 在式(A¹)所示化合物的一些实施方案中，R³是-OH、-NR^aR^b、R^Z-C(0)-X-、或



是烷基。

[0081] 在式(A¹)所示化合物的一些实施方案中,R³是-OH,-NH₂,-NHCH₃,-N(CH₃)₂,



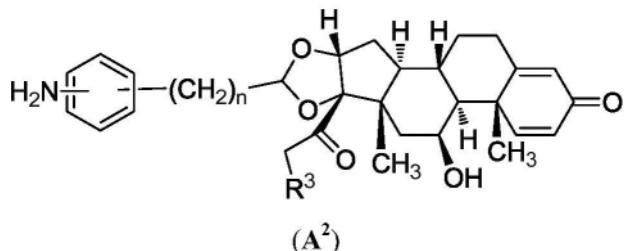
[0082] 在式(A¹)所示化合物的一些实施方案中, R¹和R²一起形成  其中R⁴是芳基、芳

基烷基、或烷基，其中所述芳基、芳基烷基、和烷基任选地被 $-NR^aR^b$ 取代； R^3 是 $-OH$ 、 $-NR^aR^b$ 、 R^Z 、

$C(0)-X-$ 、 ---O--- 或 ---NR^aR^b 其中 R^P 是卤素, t 是从0至2的整数, R^a 是H, R^b 是H或烷基, X 是

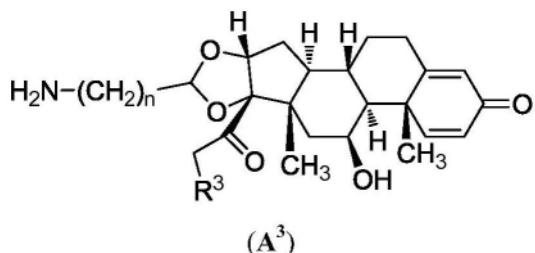
0或NH, 和 R^Z 是烷基; 和 R^5 在每种情况下, 独立地为氟或氢原子。

[0083] 本发明还提供了式(A²)所示化合物:



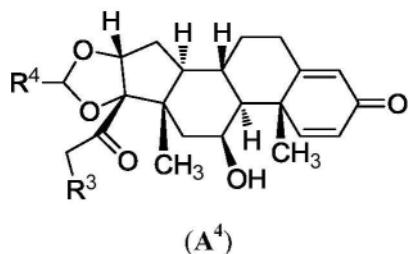
其中n是从0至4的整数, 和 R^3 是-OH或 $R^Z-C(0)-O-$; 其中 R^Z 是烷基。在某些实施方案, n是0或1。

[0084] 本发明还提供了式(A³)所示化合物:



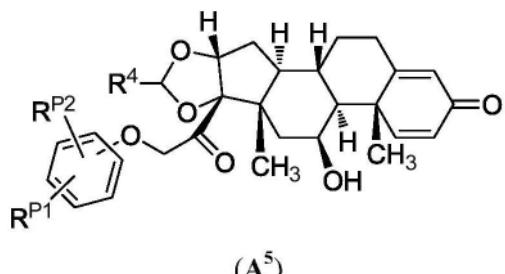
其中n是从1至4的整数, 和 R^3 是-OH或 $R^Z-C(0)-O-$; 其中 R^Z 是烷基。在某些实施方案, n是2。

[0085] 本发明还提供了式(A⁴)所示化合物:



其中 R^3 是-NR^aR^b, 和R⁴是烷基, 其中R^a和R^b各自独立地为氢原子或烷基, 或R^a和R^b一起形成3-7个原子组成的环。在某些实施方案, R⁴是C₁₋₄烷基。在一些实施方案, R⁴是丙基。在某些实施方案, R³是-NH₂、-NHCH₃、或-N(CH₃)₂。

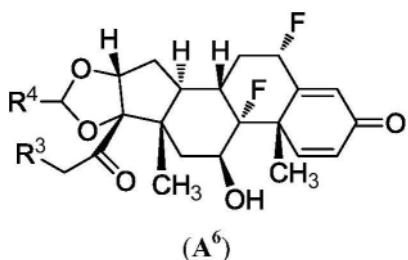
[0086] 本发明还提供了式(A⁵)所示化合物:



其中R⁴是烷基, R^{P1}是卤素或氢原子, 和R^{P2}是-NR^aR^b或-OH, 其中R^a和R^b各自独立地为

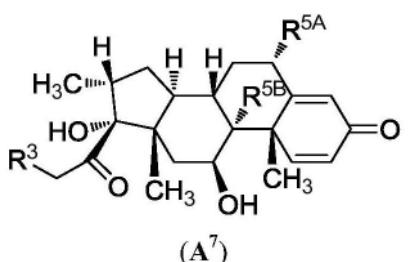
氢原子或烷基。在一些实施方案， R^4 是C₁₋₄烷基，和 R^{P2} 是-NH₂。

[0087] 本发明还提供了式(A⁶)所示化合物：



其中 R^3 是 $\xi-X-\overset{(R^P)_t}{\underset{\bigcirc}{A}}-(CH_2)_{0-1}-NR^aR^b$ 、 $R^ZC(O)X-$ 、 $\xi-NR^a-(CH_2)_{0-1}-$ 或 NR^aR^b ，其中X是0或NR^a， (A) 是芳基或杂芳基， R^P 是卤素，t是从0至2的整数， R^a 和 R^b 各自独立地为氢原子或烷基， R^Z 是烷基，和 R^Q 是烷氧基，以及 R^4 是烷基。在一些实施方案， R^3 是 $\xi-O-\overset{(R^P)_t}{\underset{\bigcirc}{A}}-NR^aR^b$ 。

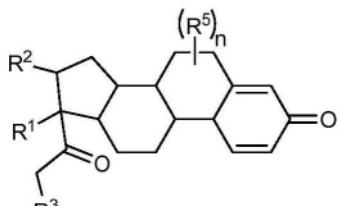
[0088] 本发明还涉及式(A⁷)所示化合物：



其中 R^3 是 $\xi-X-\overset{(R^P)_t}{\underset{\bigcirc}{A}}-(CH_2)_{0-1}-NR^aR^b$ ，其中X是0或NR^a， (A) 是芳基或杂芳基， R^P 是卤素，t是从0至2的整数， R^a 和 R^b 各自独立地为氢原子或烷基， R^{5A} 是氢原子或氟，和 R^{5B} 是氟。

在一些实施方案， R^3 是 $\xi-O-\overset{(R^P)_t}{\underset{\bigcirc}{A}}-NR^aR^b$ 。

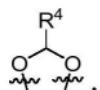
[0089] 在一些实施例，本发明提供了具有式(I)所示结构的化合物：



或其药学上可接受的盐、溶剂化物、立体异构体、或衍生物，

其中：

R^1 和 R^2 分别独立地为-H、烷基、烷基-C(0)-O-、-OH、或卤素；或 R^1 和 R^2 一起形成



其中R⁴是烷基、芳基、芳基烷基、或含N的杂环烷基，

其中所述烷基、芳基、芳基烷基和含N的杂环烷基，在每种情况下，独立任选地被-NR^aR^b取代；

R³是-OH、烷基-C(0)-O-、杂烷基、-NR^aR^b、-NR^aR^b-氨基芳基、或R^aR^bN-芳基氨基-，其中所述烷基-C(0)-O-、杂烷基、-NR^aR^b、和R^aR^bN-芳基氨基-任选地被卤素取代；

R⁵在每种情况下，独立地为-OH、卤素、烷基、或芳基烷基；

R^a和R^b在每种情况下，独立地为H或烷基；和

n是从0至19的整数；

条件是：当(a)或(b)时：(a) R¹是-OH，或(b)当R¹和R²一起形成 和R⁴是C₁₋₉烷基或

则R³不为-OH。
或

[0090] 在这些实施例的一些中，R¹和R²分别独立地选自-H、烷基、烷基-C(0)-O-、-OH、和卤

素。在一些其他实施例，R¹和R²一起形成。在某些实施例，R¹是-H。在某些其他实施例，

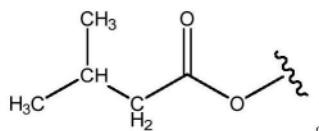
R¹是烷基。在一些实施例，R¹是烷基-C(0)-O-。在一些其他实施例，R¹是-OH。在某些实施例，R¹是卤素。在某些其他实施例，R¹是-F。在一些实施例，R¹是-C1。在一些其他实施例，R¹是-Br。在某些实施例，R¹是-I。在某些其他实施例，R²是-OH。在一些实施例，R²是卤素。在某些其他实施例，R²是-F。在某些实施例，R²是-C1。在某些其他实施例，R²是-Br。在一些实施例，R²是-I。

[0091] 在一些实施例，在式(I)中，R⁵是-OH。在一些实施例，R⁵是卤素，例如但不限于-F、-C1、-Br、或-I。在一些实施例，R⁵是-F。在一些实施例，R⁵是-C1。在一些实施例，R⁵是-Br。在一些实施例，R⁵是-I。在一些实施例，R⁵是烷基，例如但不限于甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基或壬基。在一些实施例，R⁵是苄基。

[0092] 在一些实施例，在式(I)中，R³选自-OH、烷基-C(0)-O-、和R^aR^bN-芳基氨基。在这些实施例的一些中，烷基-C(0)-O-或R^aR^bN-芳基氨基任选地被卤素取代。在一些实施例，R³是-OH。在一些实施例，R³是烷基-C(0)-O-。在一些实施例，R³是R^aR^bN-芳基氨基。在一些实施例，

R³是。在一些实施例，R³是。在一些实施例，R³是。

在一些实施例，R³是。在一些实施例，R³是。



[0093] 在式(I)的一些实施例中, R^3 是-OH、烷基-C(O)-O-、杂烷基、-NR^aR^b、或R^aR^bN-芳基氧基、其中烷基-C(O)-O-、杂烷基、-NR^aR^b、或R^aR^bN-芳基氧基任选地被卤素取代。R^a和R^b在每种情况下, 独立地为-H或烷基。

[0094] 在一些实施例, R^3 是R^aR^bN-芳基氧基, 其中R^a和R^b在每种情况下, 独立地为-H或烷基。

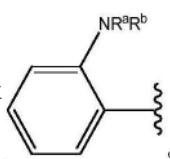
[0095] 在一些实施例, R^3 是

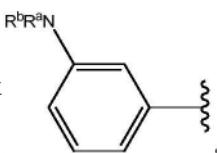
[0096] 在一些实施例, R^3 是R^aR^bN-芳基氧基, 其中R^a和R^b在每种情况下, 独立地为-H或烷基。

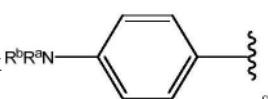
[0097] 在一些实施例, 在式(I)中, R^4 是选自由烷基、芳基、芳基烷基、和含N的杂环烷基组成的组。在这些实施例的一些中, 烷基、芳基、芳基烷基或含N的杂环烷基任选地被-NR^aR^b取

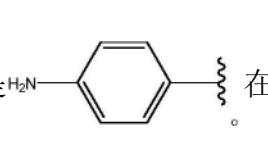
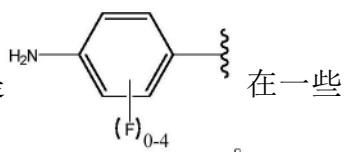
代。在一些实施例，R⁴是烷基，例如但不限于甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基或壬基。在一些实施例，R⁴是甲基。在一些实施例，R⁴是乙基。在一些实施例，R⁴是正丙基。在一些实施例，R⁴是异丙基。在一些实施例，R⁴是正丁基。在一些实施例，R⁴是异丁基。在一些实施例，R⁴是叔丁基。在一些实施例，R⁴是仲丁基。在一些实施例，R⁴是戊基。在一些实施例，R⁴是己基。在一些实施例，R⁴是庚基。在一些实施例，R⁴是辛基或壬基。在一些实施例，R⁴是芳基，例如但不限于苯基或萘基。在一些实施例，R⁴是苯基。在一些实例，R⁴是萘基。在一些实施例，R⁴是芳烷基-，例如但不限于苄基。在一些实施例，R⁴是含N的杂环烷基，例如但不限于哌啶基。在一些实施例，R⁴是4-氨基-苯基。在一些实施例，R⁴是任选地被卤素取代的4-氨基苯基。

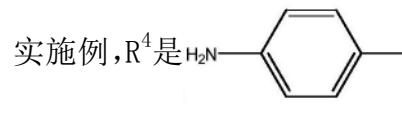
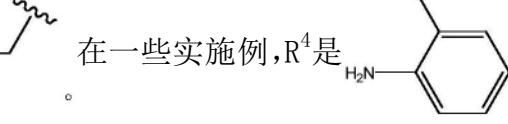
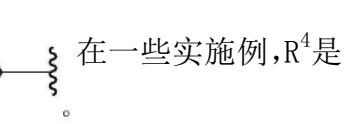
[0098] 在一些实施例，R⁴是 ，其中R^a和R^b在每种情况下，独立地为H或烷基。

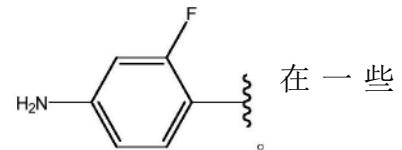
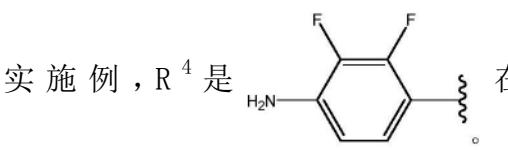
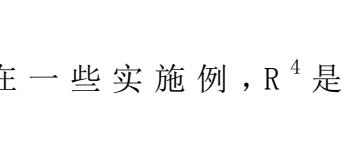
[0099] 在一些实施例，R⁴是 .

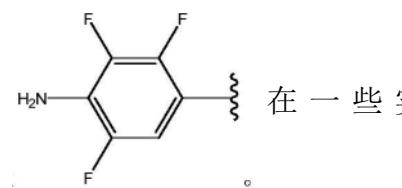
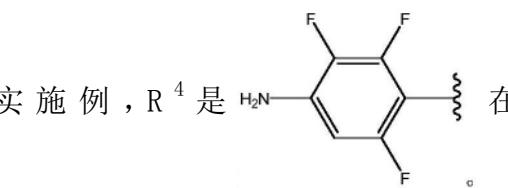
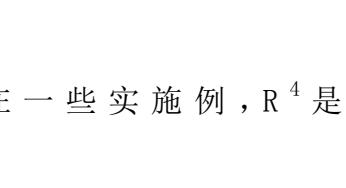
[0100] 在一些实施例，R⁴是 .

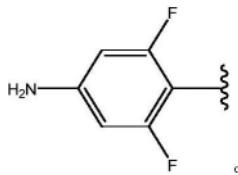
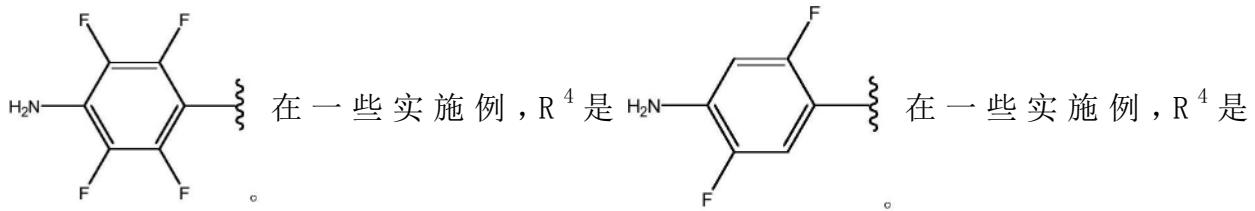
[0101] 在一些实施例，R⁴是 .

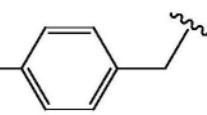
[0102] 在一些实施例，R⁴是 。在一些实施例，R⁴是 。在一些实施例，R⁴是 .

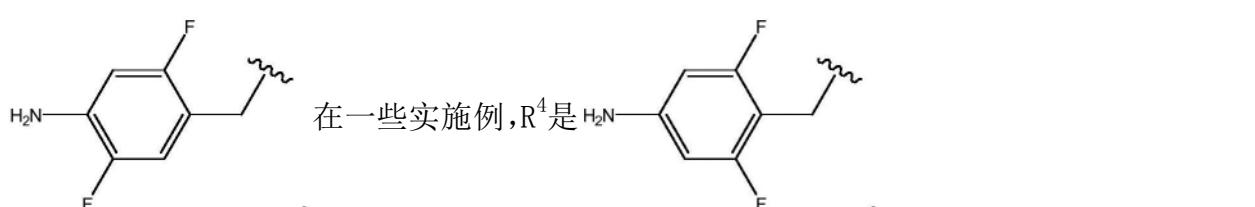
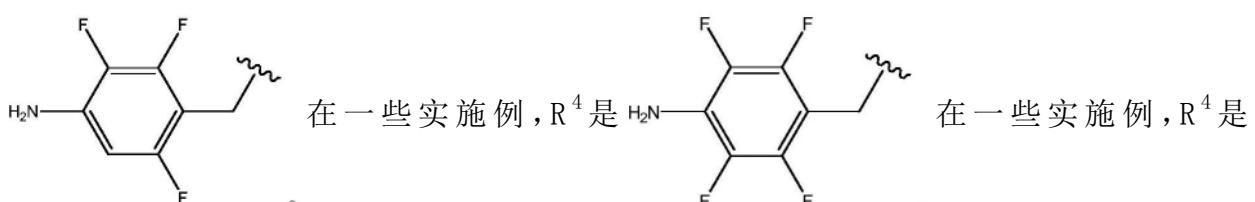
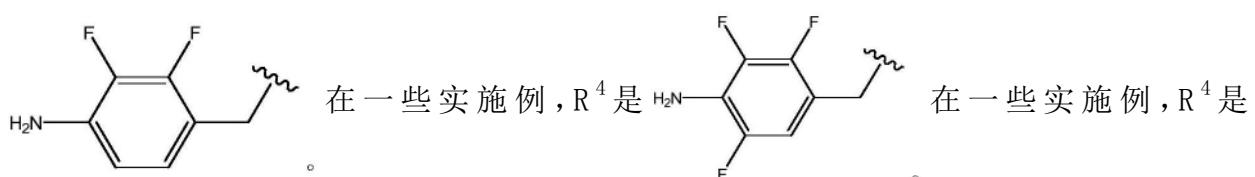
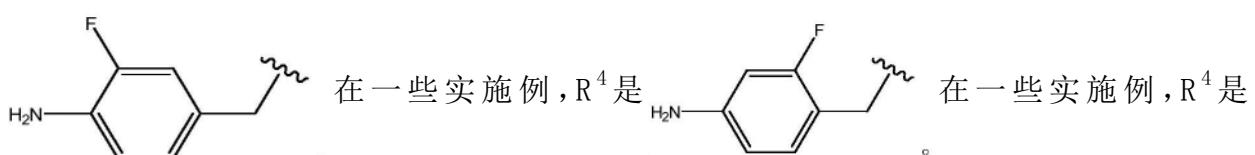
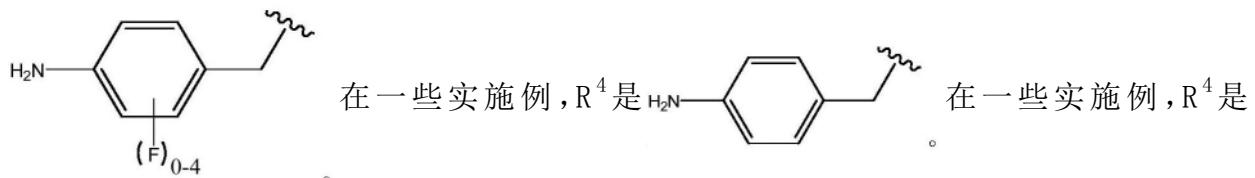
实施例，R⁴是 。在一些实施例，R⁴是 。在一些实施例，R⁴是 .

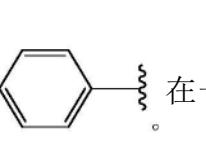
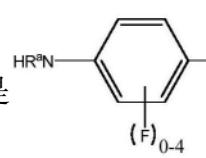
。在一些实施例，R⁴是 。在一些实施例，R⁴是 .

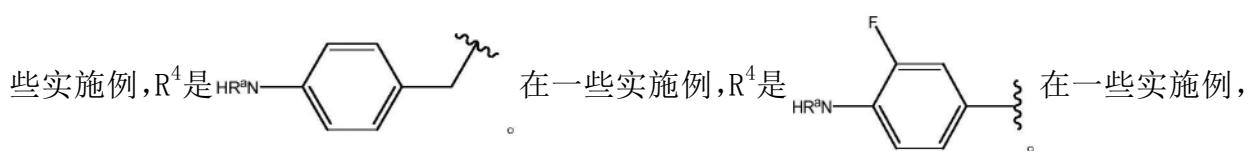
。在一些实施例，R⁴是 。在一些实施例，R⁴是 .

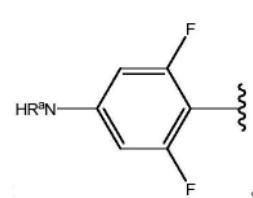
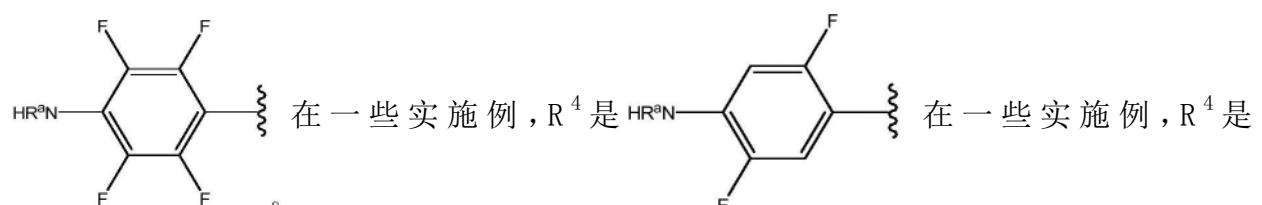
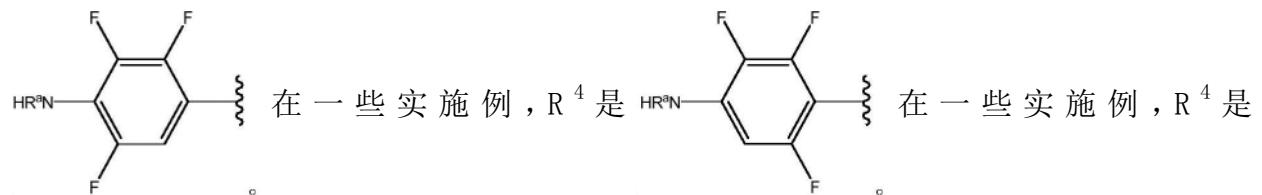
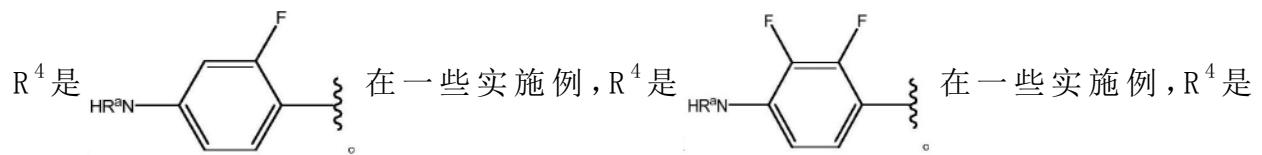


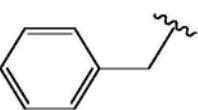
[0103] 在一些实施例，R⁴是  在一些实施例，R⁴是

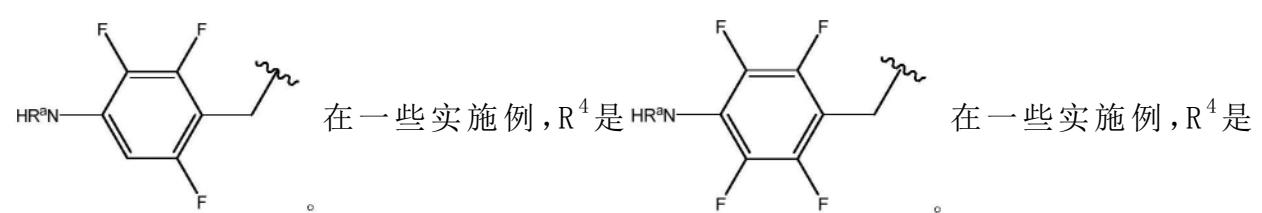
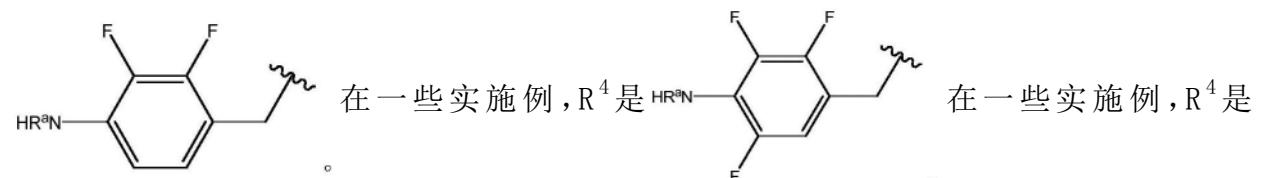


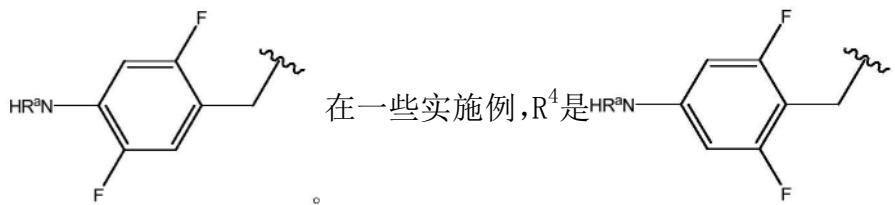
[0104] 在一些实施例，R⁴是  在一些实施例，R⁴是  在一



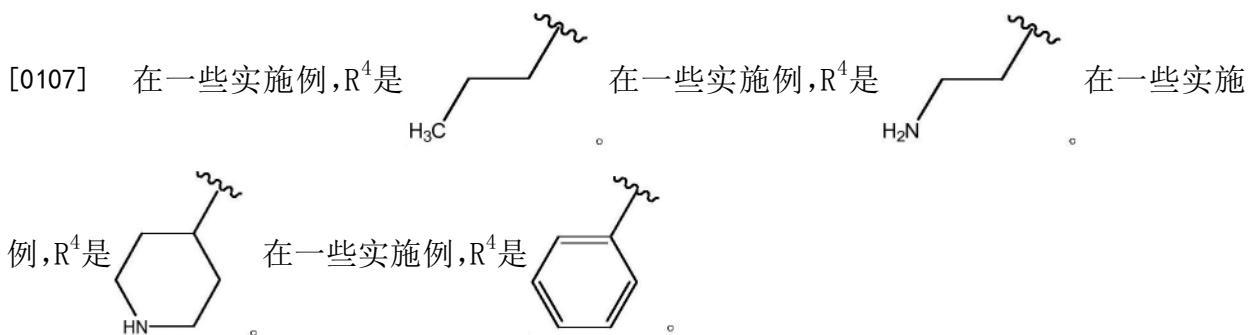


[0105] 在一些实施例，R⁴是  在一些实施例，R⁴是





[0106] 在一些实施例, R^4 是被氨基取代的烷基, 例如但不限于甲基-氨基、乙基-氨基、丙基-氨基、丁基-氨基、戊基-氨基、己基-氨基、庚基-氨基、辛基-氨基、或壬基-氨基。在一些实施例, R^4 是甲基-氨基。在一些实施例, R^4 是乙基-氨基。在一些实施例, R^4 是正丙基-氨基。在一些实施例, R^4 是异丙基-氨基。在一些实施例, R^4 是正丁基-氨基。在一些实施例, R^4 是异丁基-氨基。在一些实施例, R^4 是叔丁基-氨基。在一些实施例, R^4 是戊基-氨基。在一些实施例, R^4 是己基-氨基。在一些实施例, R^4 是庚基-氨基。在一些实施例, R^4 是辛基-氨基。在一些实施例, R^4 是壬基-氨基。



[0108] 在一些实施例, 在本发明中, R^{a} 和 R^{b} 在每种情况下, 分别独立地选自 H 或 烷基。在一些实施例, R^{a} 和 R^{b} 均为 H。在一些实施例, R^{a} 和 R^{b} 均为 甲基。在一些实施例, R^{a} 和 R^{b} 均为 乙基。在一些实施例, R^{a} 和 R^{b} 均为 丙基。在一些实施例, R^{a} 或 R^{b} 中的一个为 -H, 另一个为 烷基。在一些实施例, R^{a} 或 R^{b} 中的一个为 -H, 另一个为 甲基。在一些实施例, R^{a} 或 R^{b} 中的一个为 -H, 另一个为 乙基。在一些实施例, R^{a} 或 R^{b} 中的一个为 -H, 另一个为 丙基。

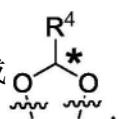
[0109] 在一些实施例, n 是从 0 至 19 的整数。在一些实施例, n 是 0。在一些其他实施例, n 是 1。在某些实施例, n 是 2。在一些其他实施例, n 是 3。在某些实施例, n 是 4。在一些实施例, n 是 5。在一些其他实施例, n 是 6。在某些实施例, n 是 7。在一些其他实施例, n 是 8。在某些实施例, n 是 9。在一些实施例, n 是 10。在一些其他实施例, n 是 11。在某些实施例, n 是 12。在一些其他实施例, n 是 13。在某些实施例, n 是 14。在某些实施例, n 是 15。在一些其他实施例, n 是 16。在某些实施例, n 是 17。在一些其他实施例, n 是 18。在某些实施例, n 是 19。

[0110] 在一些实施例, 在式 (I) 中, 当 R^1 是 -OH 时, R^3 不为 -OH。

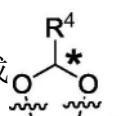
[0111] 在一些实施例, 在式 (I) 中, 当 R^1 和 R^2 一起形成 其中 R^4 是 C_{1-9} 烷基或 4-(二甲基-氨基)-苯基时, R^3 不为 -OH。

[0112] 在一些实施例, 本发明提供了式 (I) 所示化合物, 其中 R^1 和 R^2 一起形成 在这些实施例的一些中, R^4 是 烷基、芳基、芳基烷基、或含 N 的杂环烷基。在某些实施例, 烷基、芳

基、杂芳基、芳基烷基和含N的杂环烷基任选地被-NR^aR^b取代。在这些实施例的一些中，R⁴是烷基。在这些实施例的一些中，R⁴是芳基。在这些实施例的一些中，R⁴是芳基烷基。在这些实施例的一些中，R⁴是含N的杂环烷基。在一些实施例，R⁴是烷基，例如但不限于甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、或壬基。在一些实施例，R⁴是甲基。在一些实施例，R⁴是乙基。在一些实施例，R⁴是正丙基。在一些实施例，R⁴是异丙基。在一些实施例，R⁴是正丁基。在一些实施例，R⁴是异丁基。在一些实施例，R⁴是叔丁基。在一些实施例，R⁴是仲丁基。在一些实施例，R⁴是戊基。在一些实施例，R⁴是己基。在一些实施例，R⁴是庚基。在一些实施例，R⁴是辛基或壬基。在一些实施例，R⁴是芳基，例如但不限于苯基或萘基。在一些实施例，R⁴是苯基。在一些实施例，R⁴是萘基。在一些实施例，R⁴是杂芳基-，例如但不限于噻吩或苯酚。在一些实施例，R⁴是芳基烷基-，例如但不限于苄基。在一些实施例，R⁴是含N的杂环烷基，例如但不限于哌啶基。在一些实施例，R⁴是4-氨基-苯基。在一些实施例，R⁴是任选地被卤素取代的4-氨基苯基。

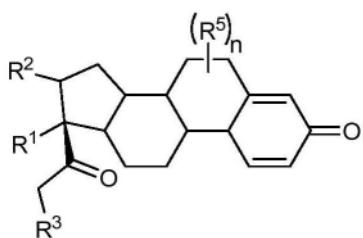
[0113] 在一些实施例，本发明提供了式(I)所示化合物，其中R¹和R²一起形成  其中，

R⁴是选自由烷基、芳基、芳基烷基、和含N的杂环烷基组成的组；和其中烷基、芳基、芳基烷基、或含N的杂环烷基任选地被-NR^aR^b取代；和其中由*表示的所述碳的立体化学是R构型。

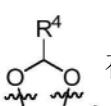
[0114] 在一些实施例，本发明提供了式(I)所示化合物，其中R¹和R²一起形成  其中，

R⁴是选自由烷基、芳基、芳基烷基、和含N的杂环烷基组成的组；和其中烷基、芳基、芳基烷基、或含N的杂环烷基任选地被-NR^aR^b取代；和其中由*表示的所述碳的立体化学是S构型。

[0115] 在一些实施例，本发明提供了式(I)所示化合物，其中所述化合物具有式(PIa)所示结构：



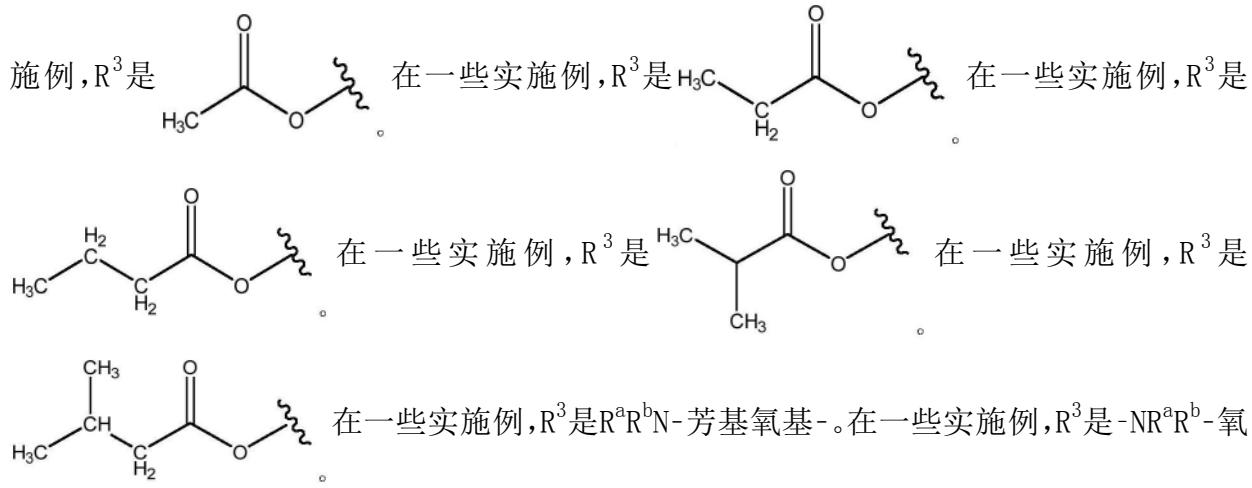
(PIa)。

在这些实施例的一些中，R¹和R²分别独立地选自-H、烷基、烷基-C(O)-O-、-OH、或卤素。在一些其他实施例，R¹和R²一起形成  在某些实施例，R¹是-H。在某些其他实施例，

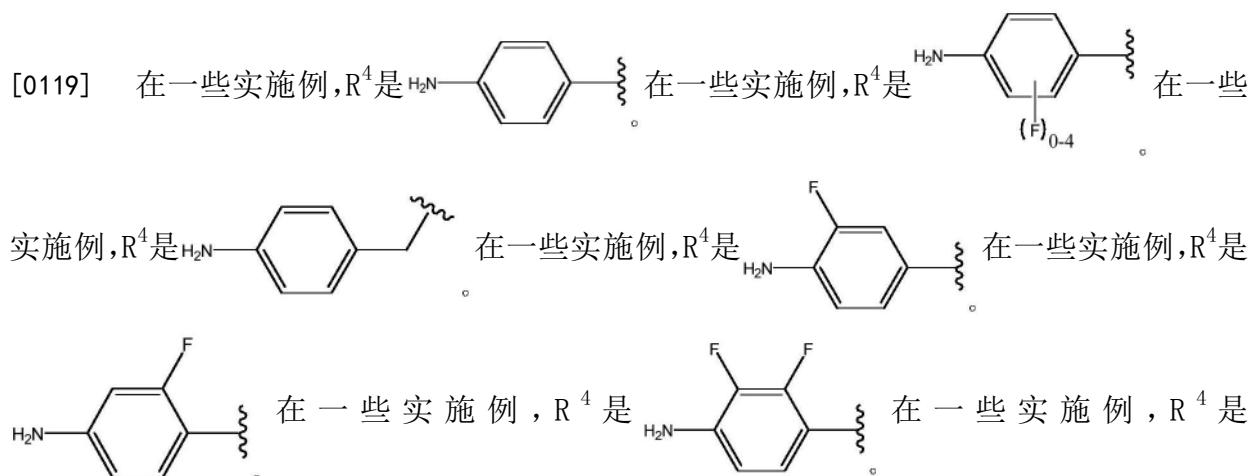
R¹是烷基。在一些实施例，R¹是烷基-C(O)-O-。在一些其他实施例，R¹是-OH。在某些实施例，R¹是卤素。在某些其他实施例，R¹是-F。在某些实施例，R¹是-C1。在一些其他实施例，R¹是-Br。在某些实施例，R¹是-I。在某些其他实施例，R²是-OH。在一些实施例，R²是卤素。在一些其他实施例，R²是-F。在某些实施例，R²是-C1。在某些其他实施例，R²是-Br。在一些实施例，R²是-I。

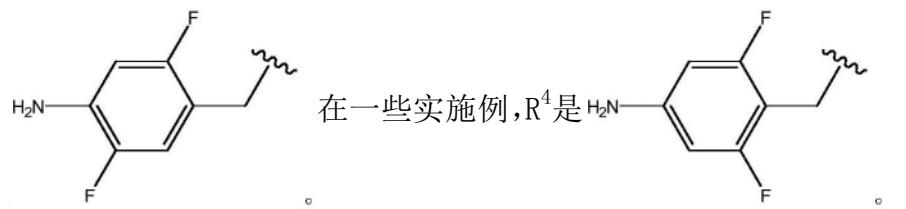
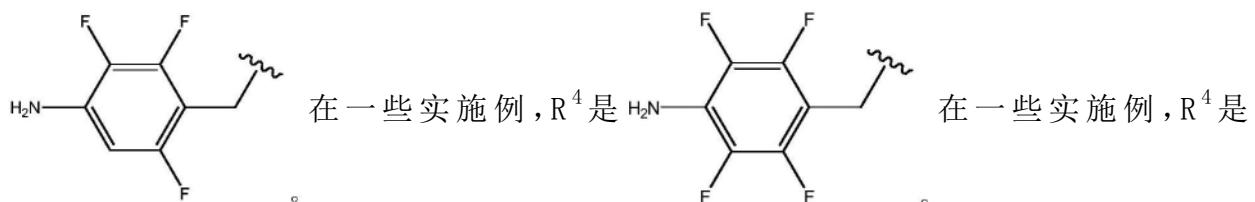
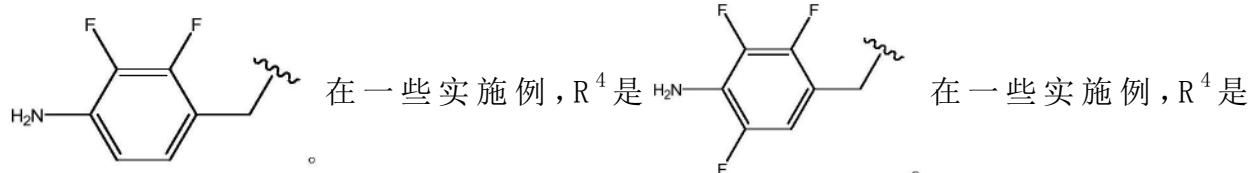
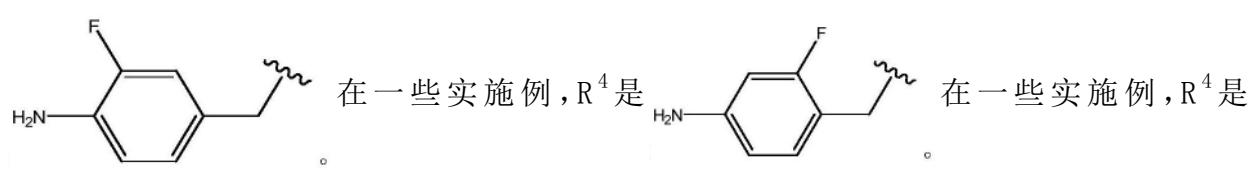
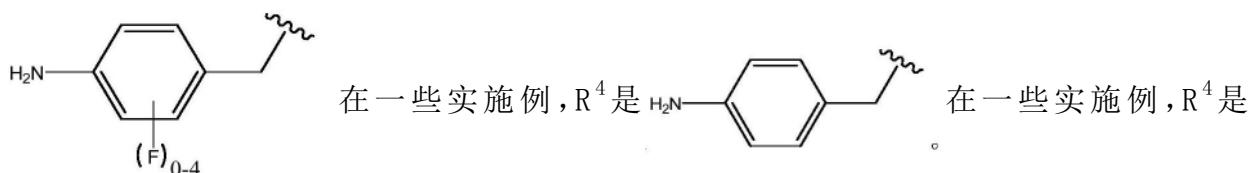
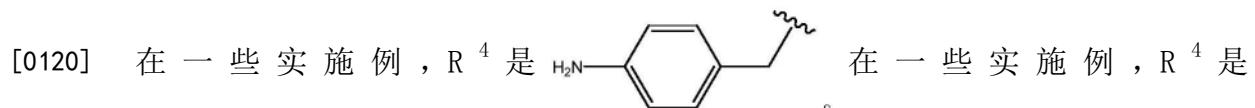
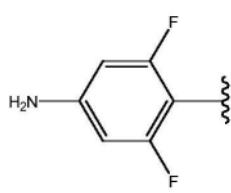
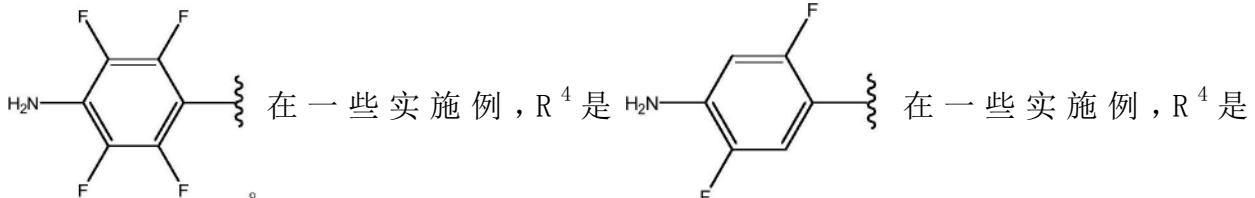
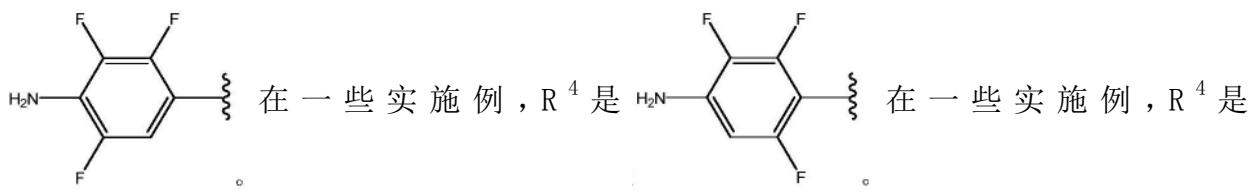
[0116] 在一些实施例，在式(PIa)中，R⁵是-OH。在一些实施例，R⁵是卤素，例如但不限于-F、-Cl、-Br、或-I。在一些实施例，R⁵是-F。在一些实施例，R⁵是-Cl。在一些实施例，R⁵是-Br。在一些实施例，R⁵是-I。在一些实施例，R⁵是烷基，例如但不限于甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、或壬基。

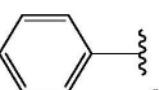
[0117] 在一些实施例，在式(PIa)中，R³选自-OH、烷基-C(O)-O-、和R^aR^bN-芳基氧基。在这些实施例的一些中，烷基-C(O)-O-或R^aR^bN-芳基氧基任选地被卤素取代。在一些实施例，R³是-OH。在一些实施例，R³是烷基-C(O)-O-。在一些实施例，R³是R^aR^bN-芳基氧基-。在一些实

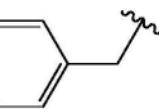


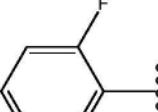
[0118] 在一些实施例，在式(PIa)中，R⁴是选自由烷基、芳基、芳基烷基、和含N的杂环烷基组成的组。在这些实施例的一些中，烷基、芳基、芳基烷基、或含N的杂环烷基任选地被-NR^aR^b取代。在一些实施例，R⁴是烷基，例如但不限于甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、或壬基。在一些实施例，R⁴是甲基。在一些实施例，R⁴是乙基。在一些实施例，R⁴是正丙基。在一些实施例，R⁴是异丙基。在一些实施例，R⁴是正丁基。在一些实施例，R⁴是异丁基。在一些实施例，R⁴是叔丁基。在一些实施例，R⁴是戊基。在一些实施例，R⁴是己基。在一些实施例，R⁴是庚基。在一些实施例，R⁴是辛基、或壬基。在一些实施例，R⁴是芳基，例如但不限于苯基或萘基。在一些实施例，R⁴是苯基。在一些实施例，R⁴是萘基。在一些实施例，R⁴是芳基烷基-，例如但不限于苄基。在一些实施例，R⁴是含N的杂环烷基，例如但不限于哌啶基。在一些实施例，R⁴是4-氨基-苯基。在一些实施例，R⁴是任选地被卤素取代的4-氨基苯基。

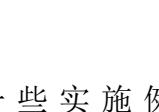


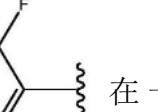


[0121] 在一些实施例， R^4 是 $\text{HR}^{\alpha}\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$ 。在一些实施例， R^4 是 $\text{HR}^{\alpha}\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$ 。


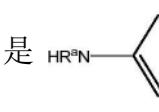
在一些实施例， R^4 是 $\text{HR}^{\alpha}\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$ 。在一些实施例， R^4 是 $\text{HR}^{\alpha}\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$ 。


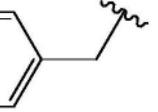
R^4 是 $\text{HR}^{\alpha}\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$ 。在一些实施例， R^4 是 $\text{HR}^{\alpha}\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$ 。在一些实施例， R^4 是


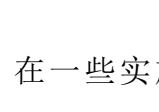
$\text{HR}^{\alpha}\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$ 。在一些实施例， R^4 是 $\text{HR}^{\alpha}\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$ 。在一些实施例， R^4 是


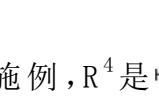
$\text{HR}^{\alpha}\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$ 。在一些实施例， R^4 是 $\text{HR}^{\alpha}\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$ 。在一些实施例， R^4 是


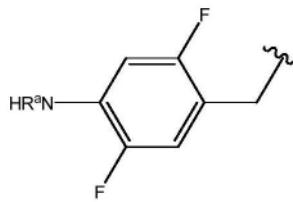
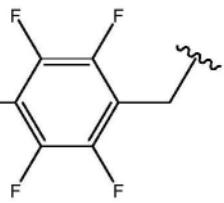
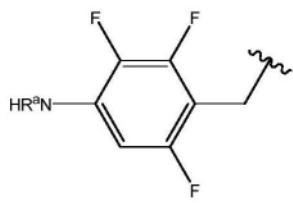
$\text{HR}^{\alpha}\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$ 。在一些实施例， R^4 是 $\text{HR}^{\alpha}\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$ 。在一些实施例， R^4 是


[0122] 在一些实施例， R^4 是 $\text{HR}^{\alpha}\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$ 。在一些实施例， R^4 是


$\text{HR}^{\alpha}\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$ 。在一些实施例， R^4 是 $\text{HR}^{\alpha}\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$ 。在一些实施例， R^4 是


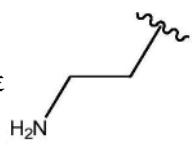
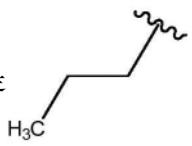
$\text{HR}^{\alpha}\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$ 。在一些实施例， R^4 是 $\text{HR}^{\alpha}\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$ 。在一些实施例， R^4 是


$\text{HR}^{\alpha}\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$ 。在一些实施例， R^4 是 $\text{HR}^{\alpha}\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$ 。在一些实施例， R^4 是


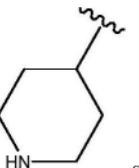


[0123] 在一些实施例, R^4 是被氨基取代的烷基, 例如但不限于甲基-氨基、乙基-氨基、丙基-氨基、丁基-氨基、戊基-氨基、己基-氨基、庚基-氨基、辛基-氨基、或壬基-氨基。在一些实施例, R^4 是甲基-氨基。在一些实施例, R^4 是乙基-氨基。在一些实施例, R^4 是正丙基-氨基。在一些实施例, R^4 是异丙基-氨基。在一些实施例, R^4 是正丁基-氨基。在一些实施例, R^4 是异丁基-氨基。在一些实施例, R^4 是叔丁基-氨基。在一些实施例, R^4 是戊基-氨基。在一些实施例, R^4 是己基-氨基。在一些实施例, R^4 是庚基-氨基。在一些实施例, R^4 是辛基-氨基。在一些实施例, R^4 是壬基-氨基。

[0124] 在一些实施例, R^4 是



例, R^4 是



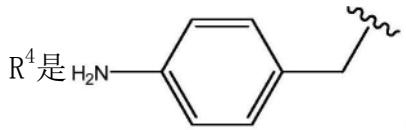
[0125] 在一些实施例, 在本发明中, R^a 和 R^b 在每种情况下, 独立地选自H或烷基。在一些实施例, R^a 和 R^b 均为-H。在一些实施例, R^a 和 R^b 均为甲基。在一些实施例, R^a 和 R^b 均为乙基。在一些实施例, R^a 和 R^b 均为丙基。在一些实施例, R^a 或 R^b 中的一个为-H, 另一个为烷基。在一些实施例, R^a 或 R^b 中的一个为-H, 另一个为甲基。在一些实施例, R^a 或 R^b 中的一个为-H, 另一个为乙基。在一些实施例, R^a 或 R^b 中的一个为-H, 另一个为丙基。

[0126] 在一些实施例, 在式(PIa)中, n 是从0至19的整数。在一些实施例, n 是0。在一些其他实施例, n 是1。在某些实施例, n 是2。在一些其他实施例, n 是3。在某些实施例, n 是4。在一些实施例, n 是5。在一些其他实施例, n 是6。在某些实施例, n 是7。在一些其他实施例, n 是8。在某些实施例, n 是9。在一些实施例, n 是10。在一些其他实施例, n 是11。在某些实施例, n 是12。在一些其他实施例, n 是13。在某些实施例, n 是14。在一些实施例, n 是15。在一些其他实施例, n 是16。在某些实施例, n 是17。在一些其他实施例, n 是18。在某些实施例, n 是19。

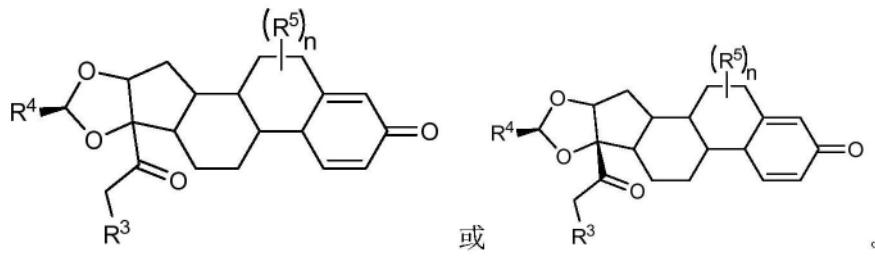
[0127] 在一些实施例, 在式(PIa)中, 当 R^1 是-OH时, R^3 不为-OH。

[0128] 在一些实施例, 在式(PIa)中, 当 R^1 和 R^2 一起形成 其中 R^4 是 C_{1-9} 烷基或4-(二

甲基-氨基) -苯基时 ,R³不为-OH。在一些实施例,R⁴是H₂N— 在一些实施例,



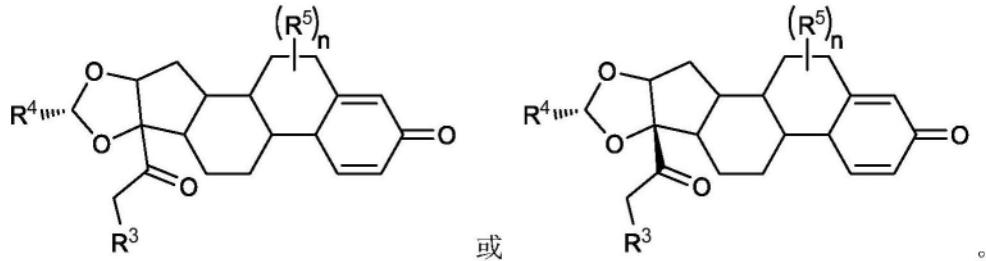
[0129] 在一些实施例,本发明提供了式 (PIa) 所示化合物,其中所述化合物具有式 (PIb-1) 或 (PIb-2) 所示结构:



(PIb-1)

(PIb-2)

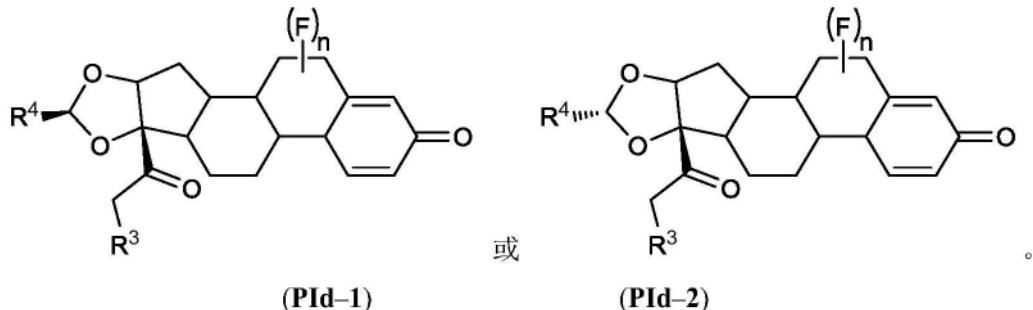
[0130] 在一些实施例,本发明提供了式 (PIa) 所示化合物,其中所述化合物具有式 (PIc-1) 或 (PIc-2) 所示结构:



(PIc-1)

(PIc-2)

[0131] 在一些实施例,本发明提供了式 (PIa) 所示化合物,其中所述化合物具有式 (PID-1) 或 (PID-2) 所示结构:

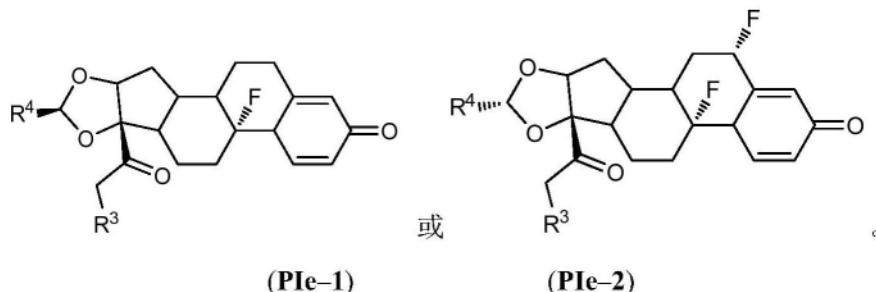


(PID-1)

(PID-2)

在一些实施例,n是0。在一些实施例,n是1。在一些实施例,n是2。

[0132] 在一些实施例,本发明提供了式 (I) 所示化合物,其中所述化合物具有式 (PIe-1) 或 (PIe-2) 所示结构:



[0133] 在一些实施例，本发明提供了式(PIa)、(PIb-1)、(PIb-2)、(PIc-1)、(PIc-2)、(PID-1)、(PID-2)、(PIe-1)、或(PIe-2)所示化合物，其中R³选自烷基-C(0)-O-或R^aR^bN-芳基氧基-；其中烷基-C(0)-O-或R^aR^bN-芳基氧基-任选地被卤素取代。

[0134] 在一些实施例，本发明提供了式(PIa)、(PIb-1)、(PIb-2)、(PIc-1)、(PIc-2)、(PID-1)、(PID-2)、(PIe-1)、或(PIe-2)所示化合物，其中R³是任选地被卤素取代的烷基-C(=O)-O-。

[0135] 在一些实施例中，本发明提供了式(PIa)、(PIb-1)、(PIb-2)、(PIc-1)、(PIc-2)、

(PId-1)、(PId-2)、(PIe-1)、或(PIe-2)所示化合物，其中R³是

[0136] 在一些实施例，本发明提供了式(PIa)、(PIb-1)、(PIb-2)、(PIc-1)、(PIc-2)、(PID-1)、(PID-2)、(PIe-1)、或(PIe-2)所示化合物，其中R³是任选地被卤素取代的R^aR^bN-芳基氨基-。

[0137] 在一些实施例，本发明提供了式(PIa)、(PIb-1)、(PIb-2)、(PIc-1)、(PIc-2)、(PID-1)、(PID-2)、(PIe-1)、或(PIe-2)所示化合物，其中R³是R^bR^aN—

[0138] 在一些实施例，本发明提供了式(PIa)、(PIb-1)、(PIb-2)、(PIc-1)、(PIc-2)、(PID-1)、(PID-2)、(PIe-1)、或(PIe-2)所示化合物，其中R³是H₂N—。

[0139] 在一些实施例，本发明提供了式(PIa)、(PIb-1)、(PIb-2)、(PIc-1)、(PIc-2)、(PID-1)、(PID-2)、(PIe-1)、或(PIe-2)所示化合物，其中R³选自-OH、烷基-C(O)-O-、和R^aR^bN-芳基氨基-。在这些实施例的一些中，烷基-C(O)-O-或R^aR^bN-芳基氨基-任选地被卤素取代。在一些实施例，R³是-OH。在一些实施例，R³是烷基-C(O)-O-。在一些实施例，R³是R^aR^bN-

芳基氧基-。在一些实施例， R^3 是  在一些实施例， R^3 是 

在一些实施例， R^3 是 。 在一些实施例， R^3 是 。 在一些实施例， R^3 是 。

实施例， R^3 是  在一些实施例， R^3 是 R^aR^bN- -芳基氧基-。在一些实施例， R^3 是 $-NR^aR^b-$ -氨基芳基。

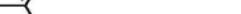
[0140] 在一些实施例，本发明提供了式(PIa)、(PIb-1)、(PIb-2)、(PIc-1)、(PIc-2)、(PID-1)、(PID-2)、(PIe-1)、或(PIe-2)所示化合物，其中R³是R^aR^bN-芳基氧基-，其中R^a和R^b在每种情况下，独立地为H或烷基。

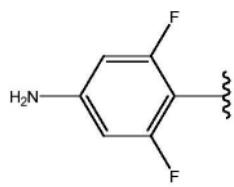
[0141] 在一些实施例，本发明提供了式(PIa)、(PIb-1)、(PIb-2)、(PIc-1)、(PIc-2)、(PID-1)、(PID-2)、(PIe-1)、或(PIe-2)所示化合物，其中R⁴是选自由烷基、芳基、芳基烷基、和含N的杂环烷基组成的组。在这些实施例的一些中，烷基、芳基、芳基烷基、或含N的杂环烷基任选地被-NR^aR^b取代。在一些实施例，R⁴是烷基，例如但不限于甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、或壬基。在一些实施例，R⁴是甲基。在一些实施例，R⁴是乙基。在一些实施例，R⁴是正丙基。在一些实施例，R⁴是异丙基。在一些实施例，R⁴是正丁基。在一些实施例，R⁴是异丁基。在一些实施例，R⁴是叔丁基。在一些实施例，R⁴是戊基。在一些实施例，R⁴是己基。在一些实施例，R⁴是庚基。在一些实施例，R⁴是辛基、或壬基。在一些实施例，R⁴是芳基，例如但不限于苯基或萘基。在一些实施例，R⁴是苯基。在一些实施例，R⁴是萘基。在一些实施例，R⁴是芳基烷基-，例如但不限于苄基。在一些实施例，R⁴是含N的杂环烷基，例如但不限于哌啶基。在一些实施例，R⁴是4-氨基-苯基。在一些实施例，R⁴是任选地被卤素取代的4-氨基苯基。

[0142] 在一些实施例，R⁴是。在一些实施例，R⁴是。在一些

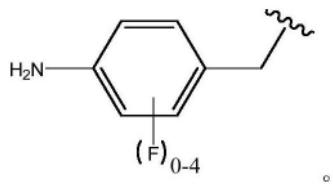
 在一些实施例，R⁴是 在一些实施例，R⁴是

 在一些实施例，R⁴是 在一些实施例，R⁴是

在一些实施例，R⁴是。在一些实施例，R⁴是。

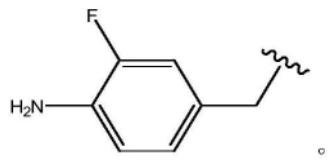


[0143] 在一些实施例， R^4 是



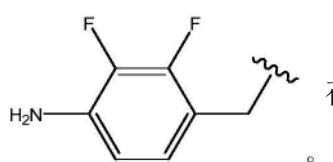
在一些实施例， R^4 是

在一些实施例， R^4 是



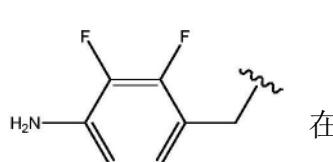
在一些实施例， R^4 是

在一些实施例， R^4 是



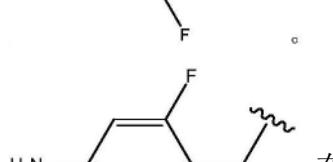
在一些实施例， R^4 是

在一些实施例， R^4 是



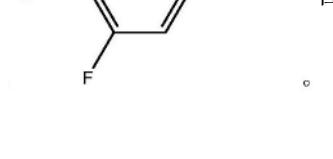
在一些实施例， R^4 是

在一些实施例， R^4 是



在一些实施例， R^4 是

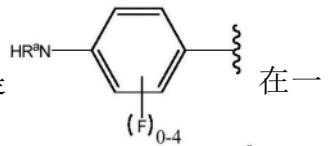
在一些实施例， R^4 是



在一些实施例， R^4 是

在一些实施例， R^4 是

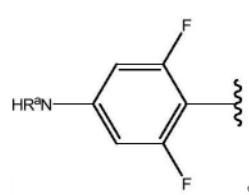
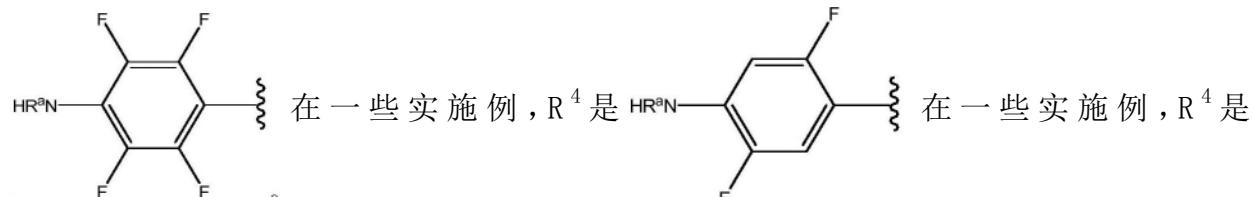
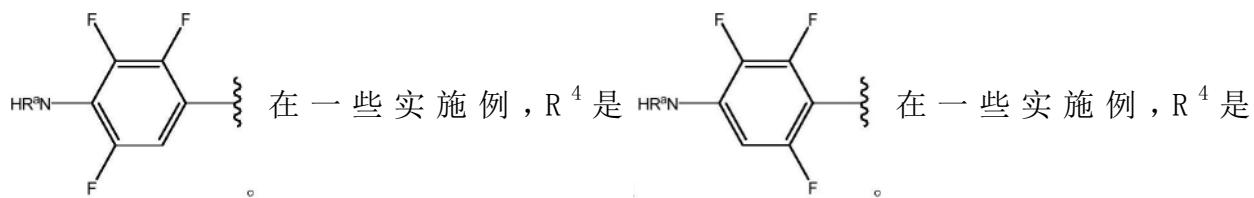
[0144] 在一些实施例， R^4 是

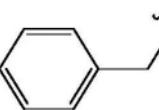


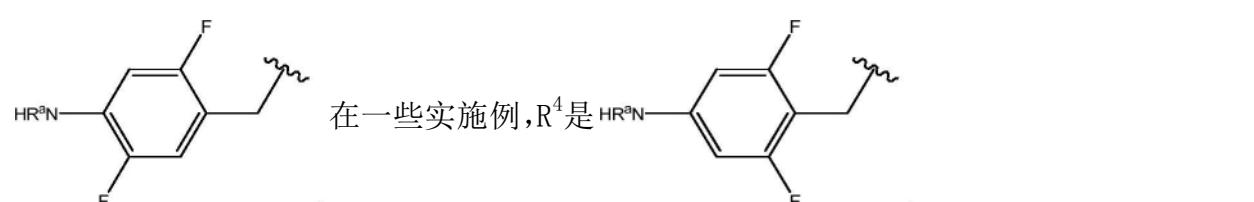
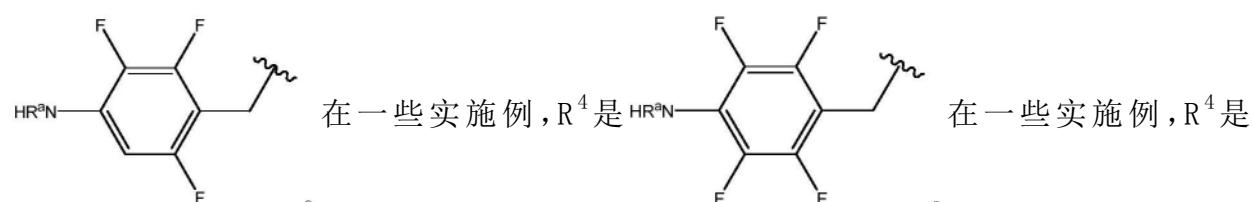
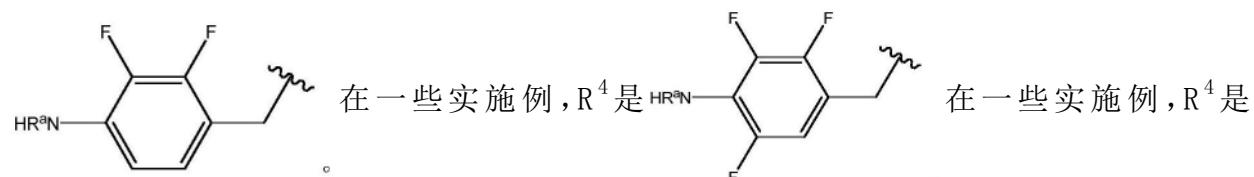
在一些实施例， R^4 是

在一些实施例， R^4 是

R^4 是

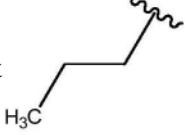
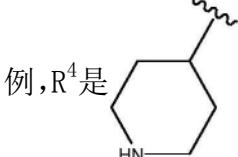


[0145] 在一些实施例，R⁴是  在一些实施例，R⁴是

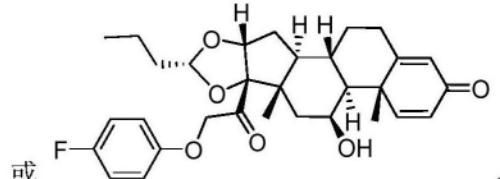
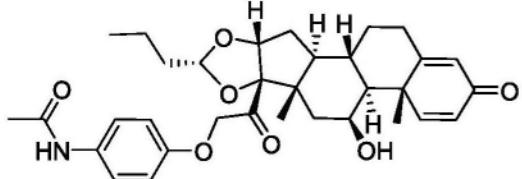
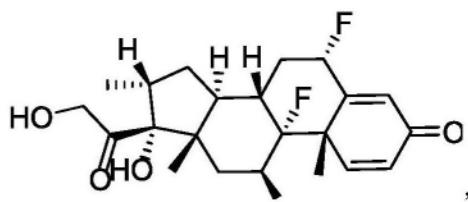
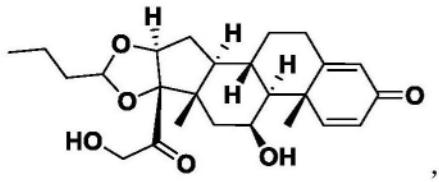


[0146] 在一些实施例，本发明提供了式(PIa)、(PIb-1)、(PIb-2)、(PIc-1)、(PIc-2)、(PID-1)、(PID-2)、(PIe-1)、或(PIe-2)所示化合物，其中R⁴是被氨基取代的烷基，例如但不

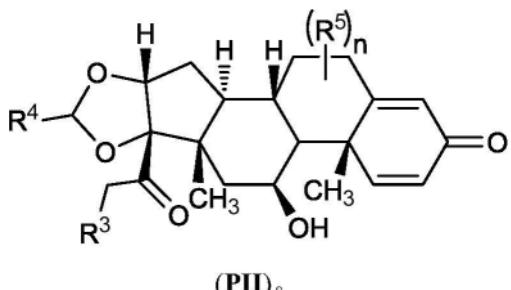
限于甲基-氨基、乙基-氨基、丙基-氨基、丁基-氨基、戊基-氨基、己基-氨基、庚基-氨基、辛基-氨基、或壬基-氨基。在一些实施例， R^4 是甲基-氨基。在一些实施例， R^4 是乙基-氨基。在一些实施例， R^4 是正丙基-氨基。在一些实施例， R^4 是异丙基-氨基。在一些实施例， R^4 是正丁基-氨基。在一些实施例， R^4 是异丁基-氨基。在一些实施例， R^4 是叔丁基-氨基。在一些实施例， R^4 是戊基-氨基。在一些实施例， R^4 是己基-氨基。在一些实施例， R^4 是庚基-氨基。在一些实施例， R^4 是辛基-氨基。在一些实施例， R^4 是壬基-氨基。

[0147] 在一些实施例， R^4 是  。 在一些实施例， R^4 是  。 在一些实施例， R^4 是  。

[0148] 式(I)所示化合物不为以下化合物之一：

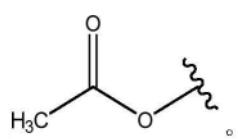


[0149] 在一些实施例，本发明提供了式(I)所示化合物，其中所述化合物具有式(PII)所示结构：

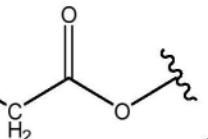


(PII)。

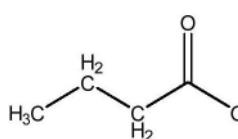
[0150] 在式(PII)中， R^3 选自- OH 、烷基-C(0)-O-、和 R^aR^bN -芳基氧基。在这些实施例的一些中，烷基-C(0)-O-或 R^aR^bN -芳基氧基任选地被卤素取代。在一些实施例， R^3 是- OH 。在一些实施例， R^3 是烷基-C(0)-O-。在一些实施例， R^3 是 R^aR^bN -芳基氧基-。在一些实施例， R^3 是



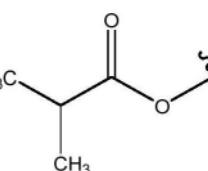
在一些实施例，R³是 $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_3$ 。



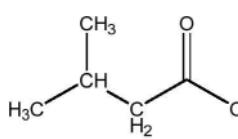
在一些实施例，R³是 $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}(\text{H}_3)-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_3$ 。



在一些实施例，R³是 $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}(\text{H}_3)-\text{C}(\text{H}_3)-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_3$ 。

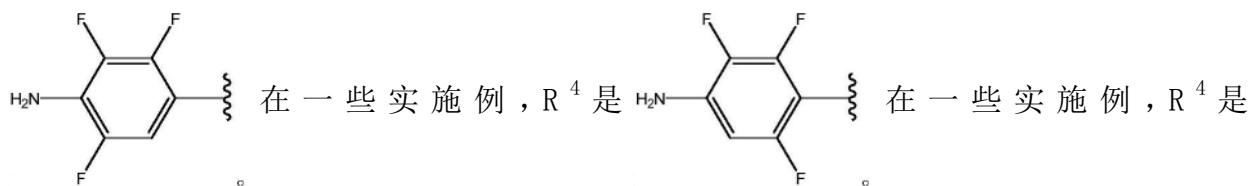
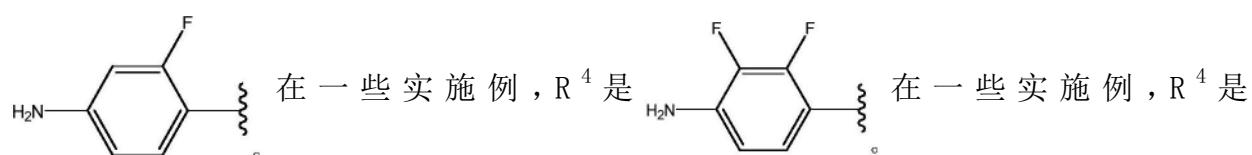
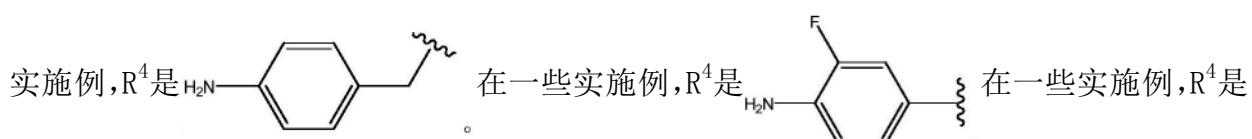
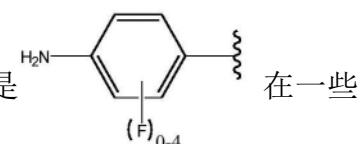
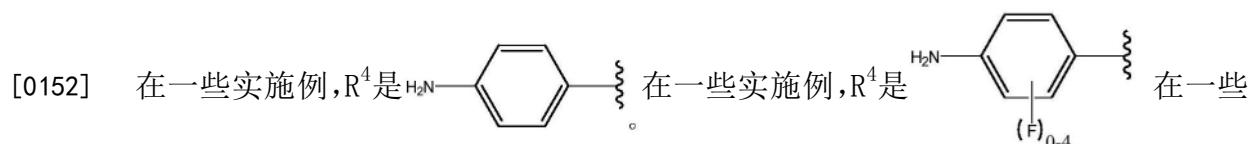


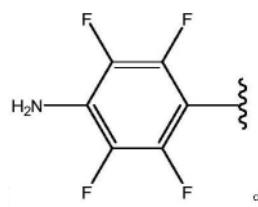
在一些实施例，R³是 $\text{R}^a\text{R}^b\text{N}-\text{芳基氧基}-$ 。



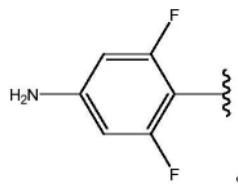
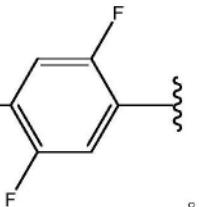
在一些实施例，R³是R^aR^b-芳基氧基-。

[0151] 在一些实施例，在式(PII)中，R⁴是选自由烷基、芳基、芳基烷基、和含N的杂环烷基组成的组。在这些实施例的一些中，烷基、芳基、芳基烷基、或含N的杂环烷基任选地被-NR^aR^b取代。在一些实施例，R⁴是烷基，例如但不限于甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、或壬基。在一些实施例，R⁴是甲基。在一些实施例，R⁴是乙基。在一些实施例，R⁴是正丙基。在一些实施例，R⁴是异丙基。在一些实施例，R⁴是正丁基。在一些实施例，R⁴是异丁基。在一些实施例，R⁴是叔丁基。在一些实施例，R⁴是仲丁基。在一些实施例，R⁴是戊基。在一些实施例，R⁴是己基。在一些实施例，R⁴是庚基。在一些实施例，R⁴是辛基、或壬基。在一些实施例，R⁴是芳基，例如但不限于苯基或萘基。在一些实施例，R⁴是苯基。在一些实施例，R⁴是萘基。在一些实施例，R⁴是芳基烷基-，例如但不限于苄基。在一些实施例，R⁴是含N的杂环烷基，例如但不限于哌啶基。在一些实施例，R⁴是4-氨基-苯基。在一些实施例，R⁴是任选地被卤素取代的4-氨基苯基。

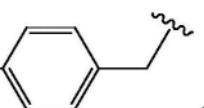




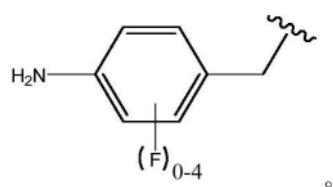
在一些实施例，R⁴是



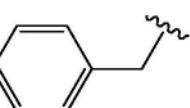
[0153] 在一些实施例，R⁴是



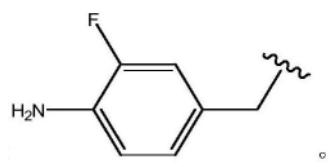
在一些实施例，R⁴是



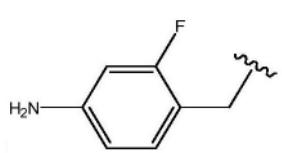
在一些实施例，R⁴是



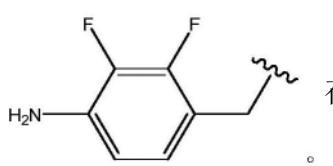
在一些实施例，R⁴是



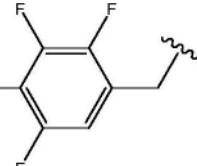
在一些实施例，R⁴是



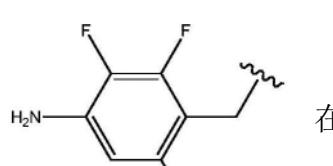
在一些实施例，R⁴是



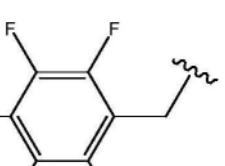
在一些实施例，R⁴是



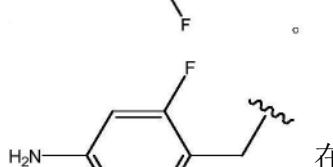
在一些实施例，R⁴是



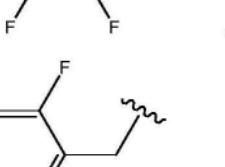
在一些实施例，R⁴是



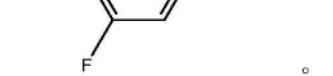
在一些实施例，R⁴是



在一些实施例，R⁴是



在一些实施例，R⁴是



在一些实施例，R⁴是

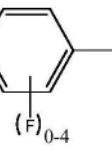


在一些实施例，R⁴是

[0154] 在一些实施例，R⁴是



在一些实施例，R⁴是



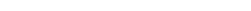
R⁴是 在一些实施例，R⁴是 在一些实施例，R⁴是 在一些实施例，R⁴是

在一些实施例，R⁴是 在一些实施例，R⁴是

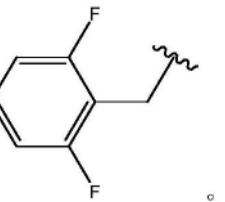
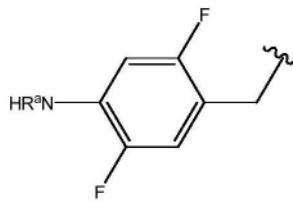
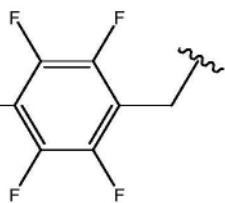
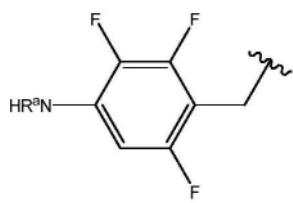
 在一些实施例，R⁴是 在一些实施例，R⁴是

N#Cc1ccc(F)c(F)c2sc(c2)oc1

在一些实施例，R⁴是。在一些实施例，R⁴是。

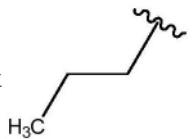
在一些实施例，R⁴是  在一些实施例，R⁴是 

○ 在一些实施例， R^4 是  在一些实施例， R^4 是 

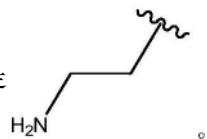


[0156] 在一些实施例， R^4 是被氨基取代的烷基，例如但不限于甲基-氨基、乙基-氨基、丙基-氨基、丁基-氨基、戊基-氨基、己基-氨基、庚基-氨基、辛基-氨基、或壬基-氨基。在一些实施例， R^4 是甲基-氨基。在一些实施例， R^4 是乙基-氨基。在一些实施例， R^4 是正丙基-氨基。在一些实施例， R^4 是异丙基-氨基。在一些实施例， R^4 是正丁基-氨基。在一些实施例， R^4 是异丁基-氨基。在一些实施例， R^4 是叔丁基-氨基。在一些实施例， R^4 是戊基-氨基。在一些实施例， R^4 是己基-氨基。在一些实施例， R^4 是庚基-氨基。在一些实施例， R^4 是辛基-氨基。在一些实施例， R^4 是壬基-氨基。

[0157] 在一些实施例， R^4 是



在一些实施例， R^4 是

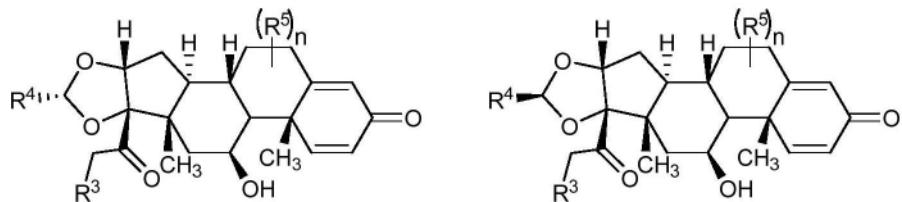


例， R^4 是

[0158] 在一些实施例，在本发明中， R^a 和 R^b 在每种情况下，分别独立地选自H或烷基。在一些实施例， R^a 和 R^b 均为H。在一些实施例， R^a 和 R^b 均为甲基。在一些实施例， R^a 和 R^b 均为乙基。在一些实施例， R^a 和 R^b 均为丙基。在一些实施例， R^a 或 R^b 中的一个为-H，另一个为烷基。在一些实施例， R^a 或 R^b 中的一个为-H，另一个为甲基。在一些实施例， R^a 或 R^b 中的一个为-H，另一个为乙基。在一些实施例， R^a 或 R^b 中的一个为-H，另一个为丙基。

[0159] 在一些实施例，在式(PII)中，n是从0至19的整数。在一些实施例，n是0。在一些其他实施例，n是1。在某些实施例，n是2。在一些其他实施例，n是3。在某些实施例，n是4。在一些实施例，n是5。在一些其他实施例，n是6。在某些实施例，n是7。在一些其他实施例，n是8。在某些实施例，n是9。在一些实施例，n是10。在一些其他实施例，n是11。在某些实施例，n是12。在一些其他实施例，n是13。在某些实施例，n是14。在某些实施例，n是15。在一些其他实施例，n是16。在某些实施例，n是17。在一些其他实施例，n是18。在某些实施例，n是19。

[0160] 在一些实施例，本发明提供了式(I)所示化合物，其中所述化合物具有式(PIIa)或(PIIb)所示结构：



(PIIa)

或

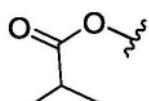
(PIIb)

。

[0161] 在一些实施例，本发明提供了式 (PIIa) 或 (PIIb) 所示化合物，其中 R^4 选自 4-氨基-苯基、4-氨基-1-甲基-苯基、2-氨基-乙基、哌啶基、或丙基。在一些实施例， R^4 是 4-氨基-苯基。在一些实施例， R^4 是 4-氨基-1-甲基-苯基。在一些实施例， R^4 是 2-氨基-乙基。在一些实施例， R^4 是 哌啶基。在一些实施例， R^4 是 丙基。在一些实施例， R^4 是 正丙基。在一些实施例， R^4 是 异丙基。

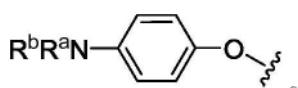
[0162] 在一些实施例，本发明提供了式 (PIIa) 或 (PIIb) 所示化合物，其中 R^3 选自 烷基-C(0)-O- 或 R^aR^bN -芳基氧基；其中 烷基-C(0)-O-、或 R^aR^bN -芳基氧基任选地被卤素取代。

[0163] 在一些实施例，本发明提供了式 (PIIa) 或 (PIIb) 所示化合物，其中 R^3 是

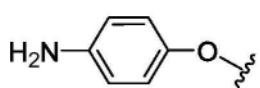


。

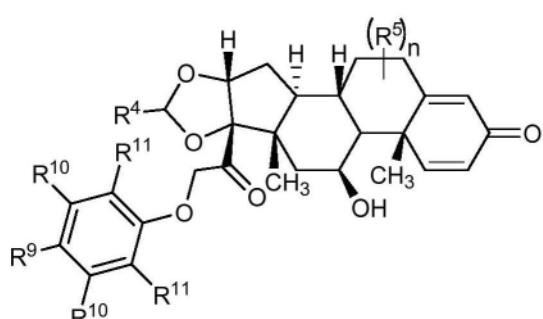
[0164] 在一些实施例，本发明提供了式 (PIIa) 或 (PIIb) 所示化合物，其中 R^3 是



[0165] 在一些实施例，本发明提供了式 (PIIa) 或 (PIIb) 所示化合物，其中 R^3 是



[0166] 在一些实施例，本发明提供了式 (PIIa) 或 (PIIb) 所示化合物，其中所述化合物具有式 (PIII) 所示结构：



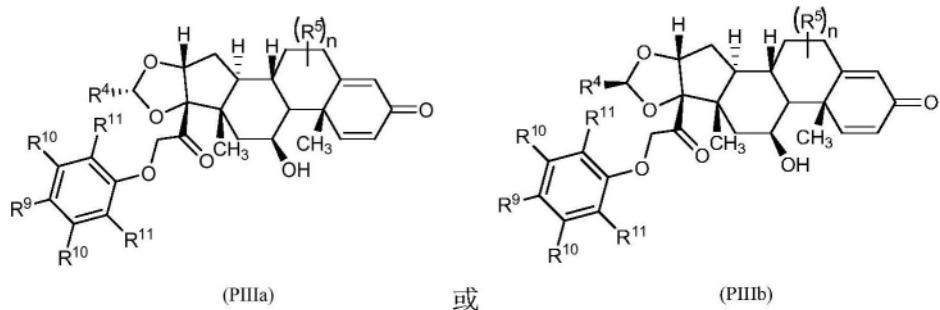
(PIII)

。

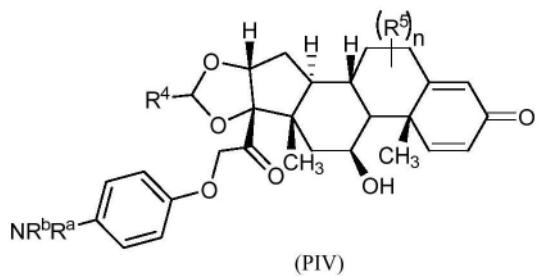
[0167] 在式 (PIII) 中， R^9 选自 H 或 $-NR^aR^b$ 。在一些实施例， R^9 是 H。在一些其他实施例， R^9 是 $-NR^aR^b$ ， R^4 、 R^4 、和下标 n 均具有式 I 中所述定义或具有上述定义。

[0168] 在式 (PIII) 中， R^{10} 和 R^{11} 在每种情况下，各自独立地选自 H、F、或 $-NR^aR^b$ 。

[0169] 在一些实施例，本发明提供了式 (III) 所示化合物，其中所述化合物具有式 (PIIIa) 或 (PIIIb) 所示结构：

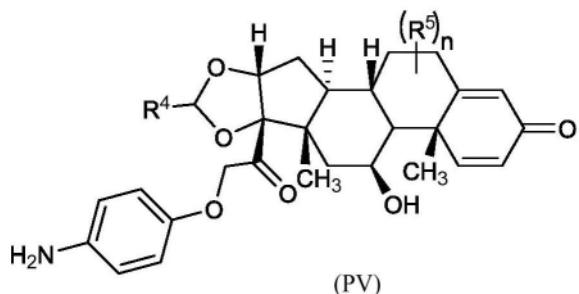


[0170] 在一些实施例,本发明提供了式(I)所示化合物,其中所述化合物具有式(PIV)所示结构:



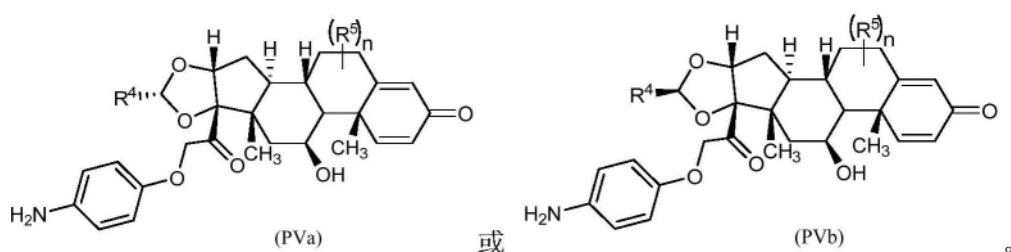
在式(PIV)中,-NR^aR^b、R⁴、R⁵、和下标n均具有式I中所述定义或具有上述定义。

[0171] 在一些实施例,本发明提供了式(I)所示化合物,其中所述化合物具有式(PV)所示结构:

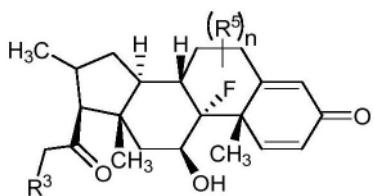


在式(PV)中,-NR^aR^b、R⁴、R⁵、和下标n均具有式I中所述定义或具有上述定义。

[0172] 在一些实施例,本发明提供了式(PV)所示化合物,其中所述化合物具有式(PVa)或(PVb)所示结构:



[0173] 在一些实施例,本发明提供了式(I)所示化合物,其中所述化合物具有式(PVI)所示结构:



(PVI)

在式(PVI)中, R^3 选自烷基-C(0)-O-或 R^aR^bN -芳基氧基, 其中烷基-C(0)-O-、或- NR^aR^b -氧基芳基任选地被卤素取代。

[0174] 在一些实施例, 在式(PVI)中, R^4 选自-H、-OH、卤素、或烷基。在一些实施例, R^4 是卤素, 例如但不限于-F、-Cl、-Br、或-I。在一些实施例, R^4 是-F。在一些实施例, R^4 是-Cl。在一些实施例, R^4 是-Br。在一些实施例, R^4 是-I。在一些实施例, R^4 是烷基, 例如但不限于甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、或壬基。下标n是从0至19的整数。在一些实施例, n是0。在一些其他实施例, n是1。在某些实施例, n是2。在一些其他实施例, n是3。在某些实施例, n是4。在一些实施例, n是5。在一些其他实施例, n是6。在某些实施例, n是7。在一些其他实施例, n是8。在某些实施例, n是9。在一些实施例, n是10。在一些其他实施例, n是11。在某些实施例, n是12。在一些其他实施例, n是13。在某些实施例, n是14。在一些实施例, n是15。在一些其他实施例, n是16。在某些实施例, n是17。在一些其他实施例, n是18。在某些实施例, n是19。

[0175] 在一些实施例, 在式(PVI)中, R^3 选自-OH、烷基-C(0)-O-、-NR^aR^b、或NR^aR^b-芳基氧基。在这些实施例的一些中, 烷基-C(0)-O-或NR^aR^b-芳基氧基任选地被卤素取代。在一些实施例, R^3 是-OH。在一些实施例, R^3 是烷基-C(0)-O-。在一些实施例, R^3 是NR^aR^b-芳基氧基。

[0176] 在一些实施例, R^3 是-NR^aR^b。在一些实施例, R^3 是-NH₂。在一些实施例, R^3 是-NH(CH₃)。

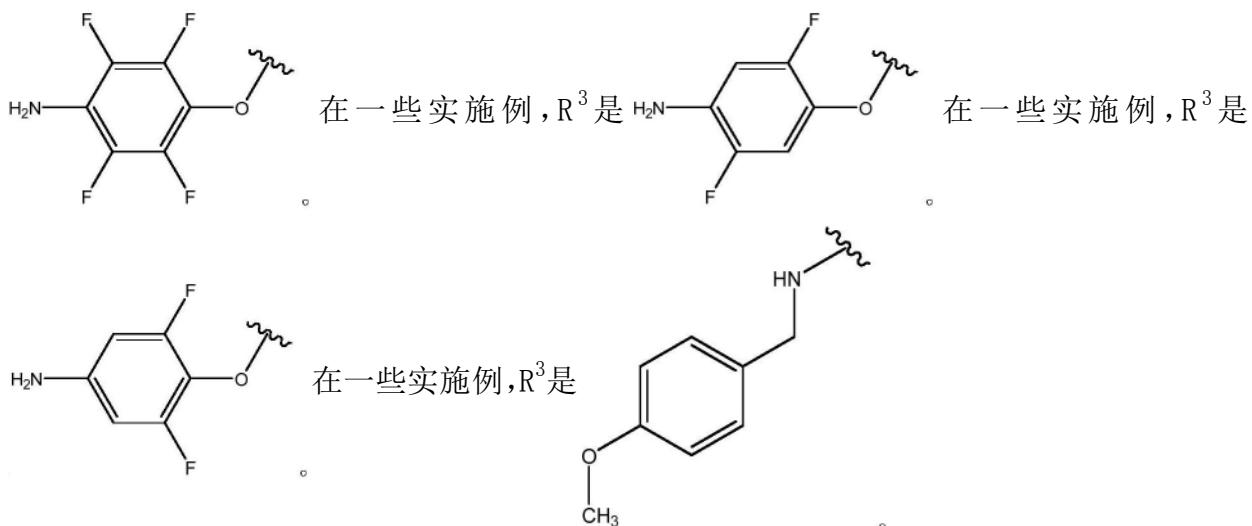
[0177] 在一些实施例, R^3 是NR^aR^b-芳基氧基。

[0178] 在一些实施例, R^3 是 。在一些实施例, R^3 是

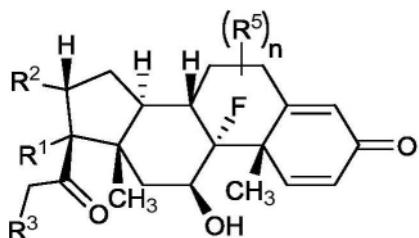
。在一些实施例, R^3 是 。在一些实施例, R^3 是

。在一些实施例, R^3 是 。在一些实施例, R^3 是

。在一些实施例, R^3 是 。在一些实施例, R^3 是



[0179] 在一些实施例，本发明提供了式(I)所示化合物，其中所述化合物具有式(PVII)所示结构：



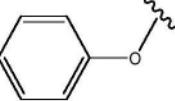
(PVII)

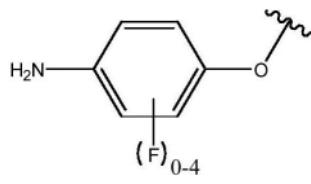
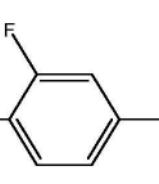
在式(PVII)中， R^3 选自烷基-C(0)-O-或 R^aR^bN -芳基氧基，其中烷基-C(0)-O-、或 NR^aR^b -芳基氧基任选地被卤素取代。

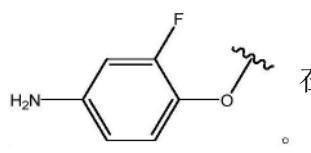
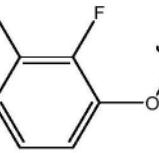
[0180] 在一些实施例，在式(PVII)中， R^4 选自-H、-OH、卤素、或烷基。在一些实施例， R^4 是卤素，例如但不限于-F、-Cl、-Br、或-I。在一些实施例， R^4 是-F。在一些实施例， R^4 是-Cl。在一些实施例， R^4 是-Br。在一些实施例， R^4 是-I。在一些实施例， R^4 是烷基，例如但不限于甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、或壬基。下标n是从0至19的整数。在一些实施例，n是0。在一些其他实施例，n是1。在某些实施例，n是2。在一些其他实施例，n是3。在某些实施例，n是4。在一些实施例，n是5。在一些其他实施例，n是6。在某些实施例，n是7。在一些其他实施例，n是8。在某些实施例，n是9。在一些实施例，n是10。在一些其他实施例，n是11。在某些实施例，n是12。在一些其他实施例，n是13。在某些实施例，n是14。在一些实施例，n是15。在一些其他实施例，n是16。在某些实施例，n是17。在一些其他实施例，n是18。在某些实施例，n是19。在一些实施例，在式(PVII)中， R^3 选自-OH、烷基-C(0)-O-、-NR^aR^b、或NR^aR^b-芳基氧基。在这些实施例的一些中，烷基-C(0)-O-或NR^aR^b-芳基氧基任选地被卤素取代。在一些实施例， R^3 是-OH。在一些实施例， R^3 是烷基-C(0)-O-。在一些实施例， R^3 是NR^aR^b-芳基氧基。

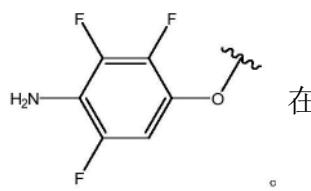
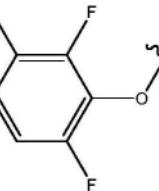
[0181] 在一些实施例， R^3 是-NR^aR^b。在一些实施例， R^3 是-NH₂。在一些实施例， R^3 是-NH(CH₃)。

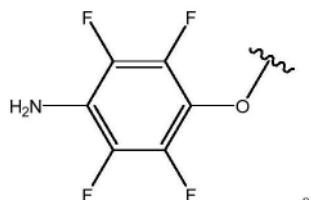
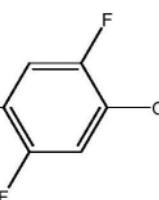
[0182] 在一些实施例， R^3 是NR^aR^b-芳基氧基。

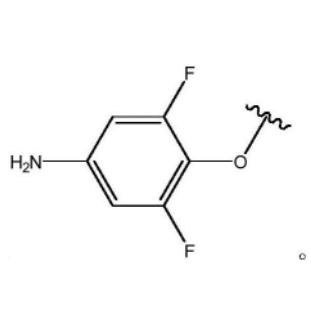
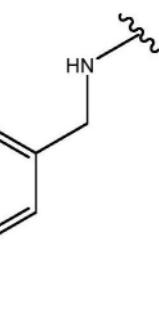
[0183] 在一些实施例，R³是  在一些实施例，R³是

 在一些实施例，R³是  在一些实施例，R³是

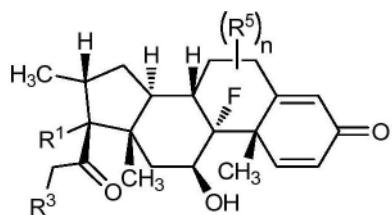
 在一些实施例，R³是  在一些实施例，R³是

 在一些实施例，R³是  在一些实施例，R³是

 在一些实施例，R³是  在一些实施例，R³是

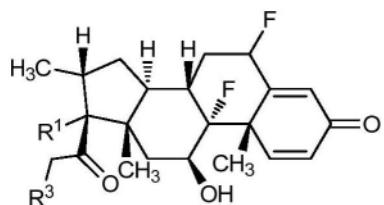
 在一些实施例，R³是  在一些实施例，R³是

[0184] 在一些实施例，本发明提供了式(PVII)所示化合物，其中所述化合物具有式(PVIIa)所示结构：



(PVIIa)。

[0185] 在一些实施例，本发明提供了式(PVII)所示化合物，其中所述化合物具有式(PVIIb)所示结构：



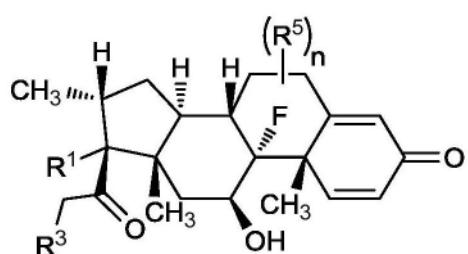
(PVIIb)。

[0186] 在一些实施例,本发明提供了式 (PVII)、(PVIIa) 或 (PVIIb) 所示化合物,其中R³是任选地被卤素取代的 $\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{NH} \\ | \\ \text{CH}_2 \end{array}$ 或 $\text{R}^a\text{R}^b\text{N}-\text{芳基氧基}-$ 。

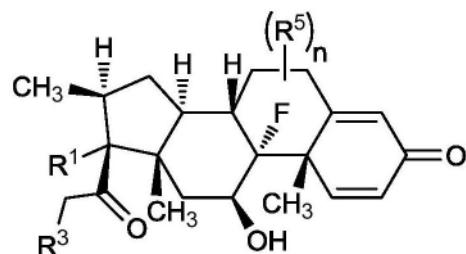
[0187] 在一些实施例,本发明提供了式 (PVII)、(PVIIa) 或 (PVIIb) 所示化合物,其中R³是 $\text{R}^b\text{R}^a\text{N}-\text{芳基}-\text{O}-$ 。

[0188] 在一些实施例,本发明提供了式 (PVII)、(PVIIa) 或 (PVIIb) 所示化合物,其中R³是 $\text{H}_2\text{N}-\text{芳基}-\text{O}-$ 。

[0189] 在一些实施例,本发明提供了式 (PVII) 所示化合物,其中所述化合物具有式 (PVIIb-1) 或 (PVIIb-2) 所示结构:



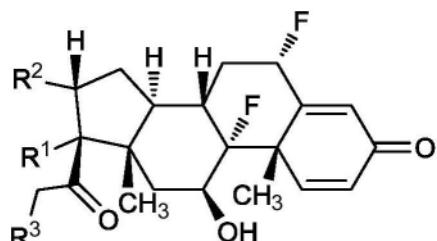
(PVIIb-1)



(PVIIb-2)。

[0190] 在一些实施例,本发明提供了式 (PVII)、(PVIIa)、(PVIIb)、(PVIIb-1)、或 (PVIIb-2) 所示化合物,其中R³是烷基-C(O)-O-或R^aR^bN-芳基氧基。

[0191] 在一些实施例,本发明提供了式 (I) 所示化合物,其中所述化合物具有式 (PVIII) 所示结构:



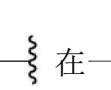
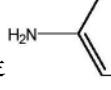
(PVIII)。

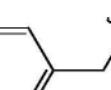
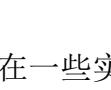
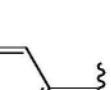
[0192] 在一些实施例,在任一式 (PI)、(PIa)、(PIb-1)、(PIb-2)、(PIc-1)、(PIc-2)、(PID-1)、(PID-2)、(PIe-1)、(PIe-2)、(PII)、(PIIa)、(PIIb)、(PIIIa)、(PIIIb)、(PIV)、(PV)、(PVA)、(PVb)、(PVI)、(PVII)、(PVIIa)、(PVIIb)、(PVIIb-1)、或 (PVIIb-2) 中,其中卤素,当存在时,为氟。

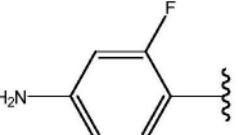
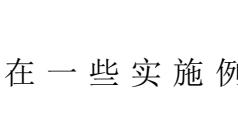
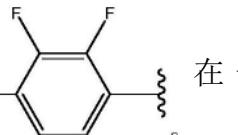
[0193] 在式(I)所示化合物的一些实施例中, R¹和R²分别独立地选自-H、烷基、烷基-C(0)-O-、-OH、或卤素。在一些其他实施例,R¹和R²一起形成。在某些实施例,R¹是-H。在某些其他实施例,R¹是烷基。在一些实施例,R¹是烷基-C(0)-O-。在一些其他实施例,R¹是-OH。在某些实施例,R¹是卤素。在某些其他实施例,R¹是-F。在一些实施例,R¹是-Cl。在一些其他实施例,R¹是-Br。在某些实施例,R¹是-I。在某些其他实施例,R²是-OH。在一些实施例,R²是卤素。在某些其他实施例,R²是-F。在某些实施例,R²是-Cl。在某些其他实施例,R²是-Br。在一些实施例,R²是-I。

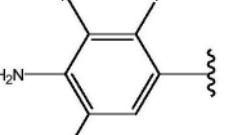
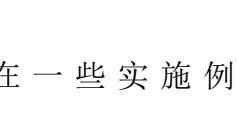
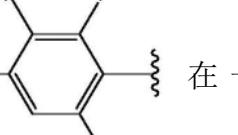
[0194] 在一些实施例,在式(I)中,R⁵在每种情况下,独立地选自-OH、卤素、烷基、或芳基烷基。在一些实施例,R⁵是-OH。在一些实施例,R⁵是卤素,例如但不限于-F、-Cl、-Br、或-I。在一些实施例,R⁵是-F。在一些实施例,R⁵是-Cl。在一些实施例,R⁵是-Br。在一些实施例,R⁵是-I。在一些实施例,R⁵是烷基,例如但不限于甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、或壬基。在一些实施例,R⁵是苄基。

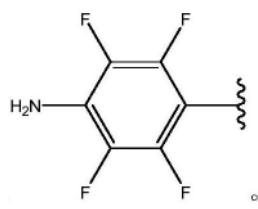
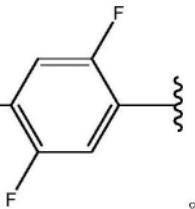
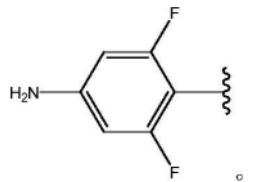
[0195] 在一些实施例,在式(I)中,R⁴是选自由烷基、芳基、芳基烷基、和含N的杂环烷基组成的组。在这些实施例的一些中,烷基、芳基、芳基烷基、或含N的杂环烷基任选地被-NR^aR^b取代。在一些实施例,R⁴是烷基,例如但不限于甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、或壬基。在一些实施例,R⁴是甲基。在一些实施例,R⁴是乙基。在一些实施例,R⁴是正丙基。在一些实施例,R⁴是异丙基。在一些实施例,R⁴是正丁基。在一些实施例,R⁴是异丁基。在一些实施例,R⁴是叔丁基。在一些实施例,R⁴是仲丁基。在一些实施例,R⁴是戊基。在一些实施例,R⁴是己基。在一些实施例,R⁴是庚基。在一些实施例,R⁴是辛基、或壬基。在一些实施例,R⁴是芳基,例如但不限于苯基或萘基。在一些实施例,R⁴是苯基。在一些实施例,R⁴是萘基。在一些实施例,R⁴是芳基烷基-,例如但不限于苄基。在一些实施例,R⁴是含N的杂环烷基,例如但不限于哌啶基。在一些实施例,R⁴是4-氨基-苯基。在一些实施例,R⁴是任选地被卤素取代的4-氨基苯基。

[0196] 在一些实施例,R⁴是。在一些实施例,R⁴是。在一些实施例,R⁴是.

实施例,R⁴是。在一些实施例,R⁴是。在一些实施例,R⁴是.

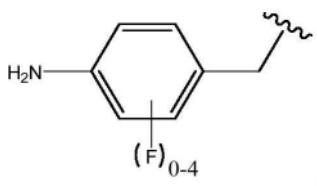
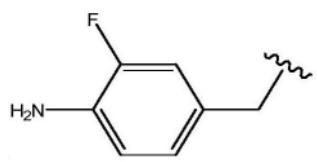
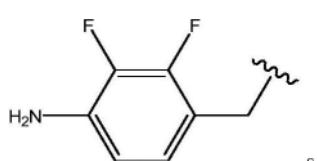
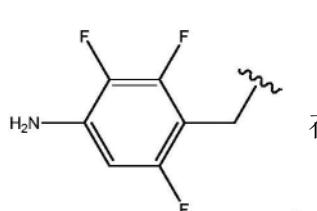
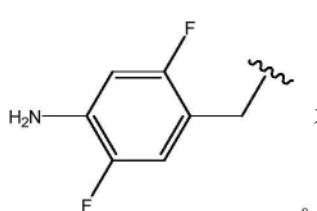
。在一些实施例,R⁴是。在一些实施例,R⁴是.

。在一些实施例,R⁴是。在一些实施例,R⁴是.

。 在一些实施例，R⁴是。 在一些实施例，R⁴是

。

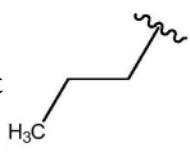
[0197] 在一些实施例，R⁴是 在一些实施例，R⁴是 。 在一些实施例，R⁴是 。

。 在一些实施例，R⁴是 在一些实施例，R⁴是 。。 在一些实施例，R⁴是 在一些实施例，R⁴是 。。 在一些实施例，R⁴是 在一些实施例，R⁴是 。。 在一些实施例，R⁴是 在一些实施例，R⁴是 。。 在一些实施例，R⁴是 在一些实施例，R⁴是 。

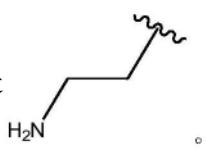
[0198] 在一些实施例，R⁴是被氨基取代的烷基，例如但不限于甲基-氨基、乙基-氨基、丙基-氨基、丁基-氨基、戊基-氨基、己基-氨基、庚基-氨基、辛基-氨基、或壬基-氨基。在一些实施例，R⁴是甲基-氨基。在一些实施例，R⁴是乙基-氨基。在一些实施例，R⁴是正丙基-氨基。在一些实施例，R⁴是异丙基-氨基。在一些实施例，R⁴是正丁基-氨基。在一些实施例，R⁴是异丁基-氨基。在一些实施例，R⁴是叔丁基-氨基。在一些实施例，R⁴是仲丁基-氨基。在一些实施例，R⁴是戊基-氨基。在一些实施例，R⁴是己基-氨基。在一些实施例，R⁴是庚基-氨基。在一些

实施例，R⁴是辛基-氨基。在一些实施例，R⁴是壬基-氨基。

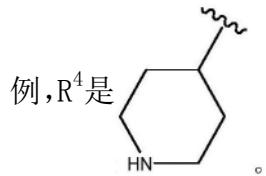
[0199] 在一些实施例，R⁴是



在一些实施例，R⁴是



在一些实施例，R⁴是



[0200] 在一些实施例，在本发明中，R^a和R^b在每种情况下，独立地选自H或烷基。在一些实施例，R^a和R^b均为H。在一些实施例，R^a和R^b均为甲基。在一些实施例，R^a和R^b均为乙基。在一些实施例，R^a和R^b均为丙基。在一些实施例，R^a或R^b中的一个为-H，另一个为烷基。在一些实施例，R^a或R^b中的一个为-H，另一个为甲基。在一些实施例，R^a或R^b中的一个为-H，另一个为乙基。在一些实施例，R^a或R^b中的一个为-H，另一个为丙基。

[0201] 在一些实施例，在式(I)中，n是从0至19的整数。在一些实施例，n是0。在一些其他实施例，n是1。在某些实施例，n是2。在一些其他实施例，n是3。在某些实施例，n是4。在一些实施例，n是5。在一些其他实施例，n是6。在某些实施例，n是7。在一些其他实施例，n是8。在某些实施例，n是9。在一些实施例，n是10。在一些其他实施例，n是11。在某些实施例，n是12。在一些其他实施例，n是13。在某些实施例，n是14。在某些实施例，n是15。在一些其他实施例，n是16。在某些实施例，n是17。在一些其他实施例，n是18。在某些实施例，n是19。

[0202] 在一些实施例，在式(I)中，当R¹是-OH时，R³不为-OH。

[0203] 在一些实施例，在式(I)中，当R¹和R²一起形成 其中R⁴是C₁₋₉烷基或4-(二甲基-氨基)-苯基时，R³不为-OH。

[0204] 在一些实施例，本发明提供了式(I)所示化合物，其中R¹和R²一起形成 在这些实施例的一些中，R⁴是烷基、芳基、芳基烷基、或含N的杂环烷基。在某些实施例，烷基、芳基、芳基烷基或含N的杂环烷基任选地被-NR^aR^b取代。在这些实施例的一些中，R⁴是烷基。在这些实施例的一些中，R⁴是芳基。在这些实施例的一些中，R⁴是芳基烷基。在这些实施例的一些中，R⁴是含N的杂环烷基。在一些实施例，R⁴是烷基，例如但不限于甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、或壬基。在一些实施例，R⁴是甲基。在一些实施例，R⁴是乙基。在一些实施例，R⁴是正丙基。在一些实施例，R⁴是异丙基。在一些实施例，R⁴是正丁基。在一些实施例，R⁴是异丁基。在一些实施例，R⁴是叔丁基。在一些实施例，R⁴是仲丁基。在一些实施例，R⁴是戊基。在一些实施例，R⁴是己基。在一些实施例，R⁴是庚基。在一些实施例，R⁴是辛基。在一些实施例，R⁴是壬基。在一些实施例，R⁴是芳基，例如但不限于苯基或萘基。在一些实施例，R⁴是苯基。在一些实施例，R⁴是萘基。在一些实施例，R⁴是芳基烷基，例如但不限于苄基。在一些实施例，R⁴是含N的杂环烷基，例如但不限于哌啶基。在一些实施例，R⁴是4-氨基-苯基。在一些实施例，R⁴是任选地被卤素取代的4-氨基苯基。

[0205] 在一些实施例,本发明提供了式(I)所示化合物,其中R¹和R²一起形成

R⁴是选自由烷基、芳基、芳基烷基、和含N的杂环烷基组成的组;和其中烷基、芳基、芳基烷基、或含N的杂环烷基任选地被-NR^aR^b取代;和其中由*表示的所述碳的立体化学是R构型。

[0206] 在一些实施例,本发明提供了式(I)所示化合物,其中R¹和R²一起形成

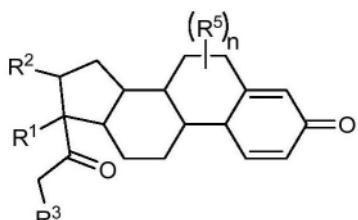
R⁴是选自由烷基、芳基、芳基烷基、和含N的杂环烷基组成的组;和其中烷基、芳基、芳基烷基、或含N的杂环烷基任选地被-NR^aR^b取代;和其中由*表示的所述碳的立体化学是S构型。

[0207] 在式(I)中,当R¹是-OH时,或当R¹和R²一起形成

基-氨基)-苯基时,R³不为-OH。

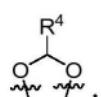
[0208] 在一些实施例,本发明所述的有效负载是布地奈德(budesonide)或二氟拉松(diflorasone)的衍生物或类似物。在某些实施例,所述衍生物是含胺或含苯胺的分子,其结构与布地奈德或二氟拉松相关。如本发明所述,基于本发明所述的方法,本发明所述的有效负载以及其他类固醇类化合物可以与抗体或其抗原结合片段偶联。如本发明所述,基于本发明所述的方法,本发明所述的有效负载以及其他类固醇类化合物可以与抗体或其抗原结合片段偶联,并且还与环糊精部分偶联。如本发明所教导的,稳定的连接体-有效负载可与这些偶联方法一起使用以生成抗体-类固醇-偶联物。在一些实施例,所述抗体-类固醇偶联物还包括环糊精部分。

[0209] 在一些实施方案,本发明提供了式(I¹)所示化合物:



(I¹);

或其药学上可接受的盐、溶剂化物、立体异构体、或衍生物,其中:

R¹和R²分别独立地为-H、烷基、烷基-C(0)-O-、-OH、或卤素;或R¹和R²一起形成


其中R⁴是烷基、芳基、芳基烷基、或含N的杂环烷基,

其中所述烷基、芳基、芳基烷基和含N的杂环烷基,在每种情况下,独立任选地被-NR^aR^b取代;

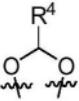
R⁵在每种情况下,独立地为-OH、卤素、烷基、或芳基烷基;

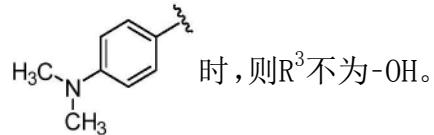
R³是-OH、烷基-C(0)-O-、或-X-芳基-NR^aR^b,其中X选自S、S(0)、S(0)₂、SO₂NR^a、CONR^a、C(0)-O-、或NR^a,其中所述烷基-C(0)-O-和-X-芳基-NR^aR^b任选地被卤素或前药取代。

R^a 和 R^b 在每种情况下,独立地为H、烷基、或芳基;

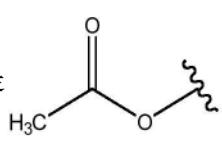
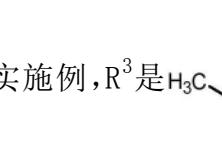
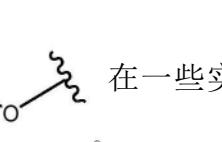
R^c 是-H或烷基;和

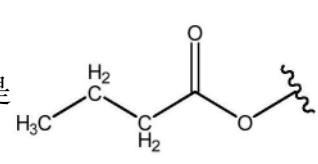
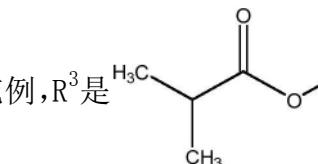
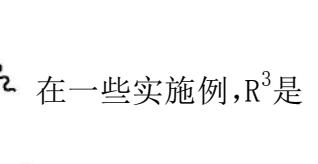
n是从0至19的整数;

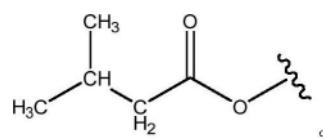
条件是:当(a)或(b):(a) R^1 是-OH,或(b) R^1 和 R^2 一起形成 和 R^4 是C₁₋₉烷基或



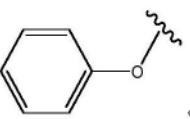
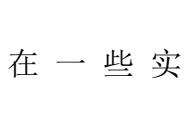
[0210] 在这些实施例的一些中,烷基-C(0)-O-或-X-芳基-NR^aR^b任选地被卤素取代。在一些实施例, R^3 是-OH。在一些实施例, R^3 是烷基-C(0)-O-。在一些实施例, R^3 是R^aR^bN-芳基氧基。

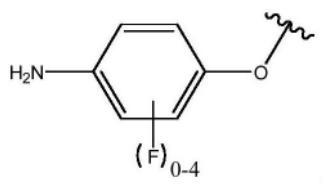
在一些实施例, R^3 是。 在一些实施例, R^3 是。 在一些实施例, R^3 是.

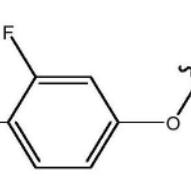
例, R^3 是。 在一些实施例, R^3 是。 在一些实施例, R^3 是.

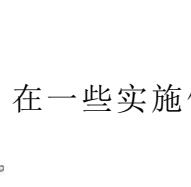


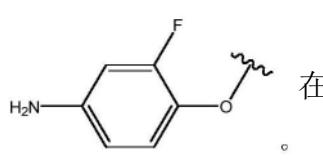
[0211] 在一些实施例, R^3 是-X-芳基-NR^aR^b。

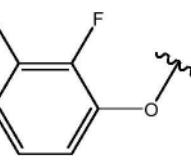
[0212] 在一些实施例, R^3 是。 在一些实施例, R^3 是.

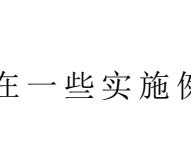


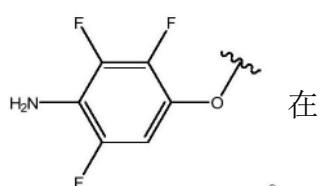
在一些实施例, R^3 是.

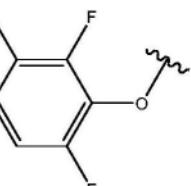
在一些实施例, R^3 是.

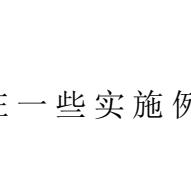


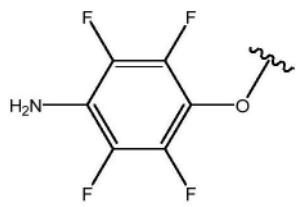
在一些实施例, R^3 是.

在一些实施例, R^3 是.

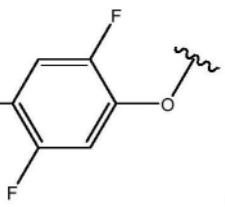


在一些实施例, R^3 是.

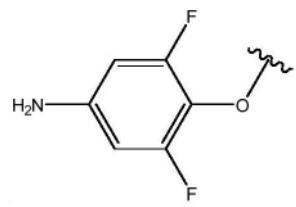
在一些实施例, R^3 是.



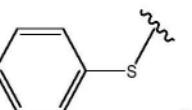
在一些实施例，R³是



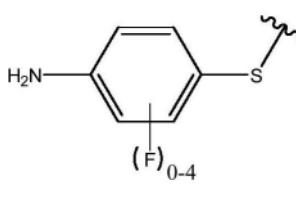
在一些实施例，R³是



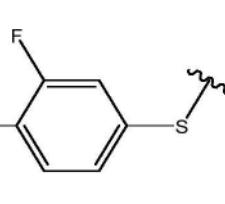
[0213] 在一些实施例，R³是



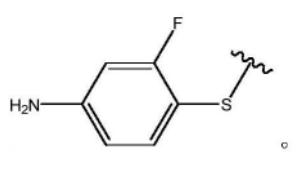
在一些实施例，R³是



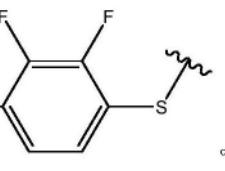
在一些实施例，R³是



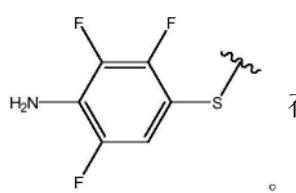
在一些实施例，R³是



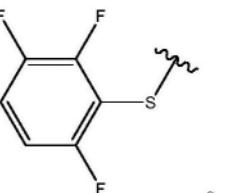
在一些实施例，R³是



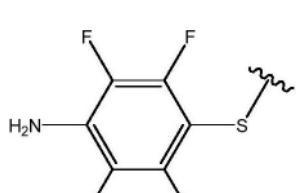
在一些实施例，R³是



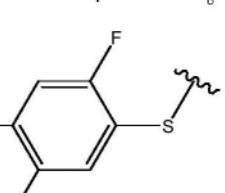
在一些实施例，R³是



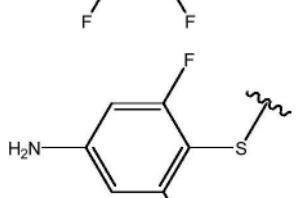
在一些实施例，R³是



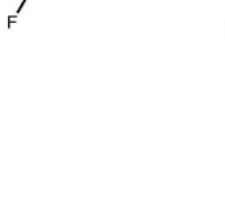
在一些实施例，R³是



在一些实施例，R³是



在一些实施例，R³是



在一些实施例，R³是

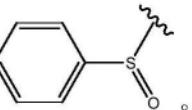


在一些实施例，R³是

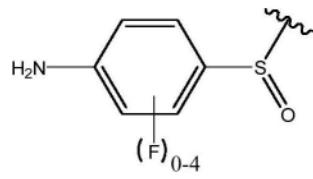


在一些实施例，R³是

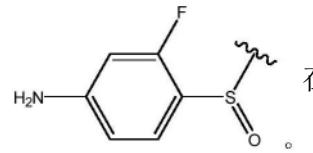
[0214] 在一些实施例，R³是



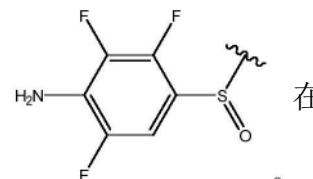
在一些实施例，R³是



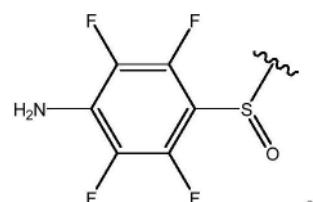
在一些实施例，R³是  在一些实施例，R³是



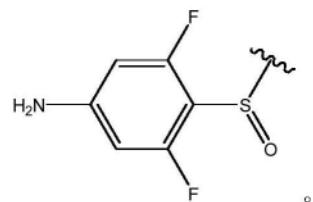
在一些实施例，R³是 在一些实施例，R³是

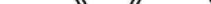


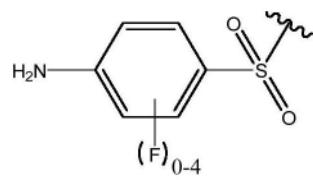
在一些实施例，R³是  在一些实施例，R³是

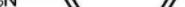


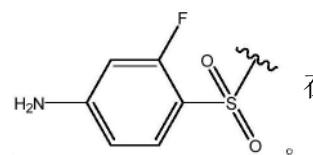
在一些实施例， R^3 是  在一些实施例， R^3 是



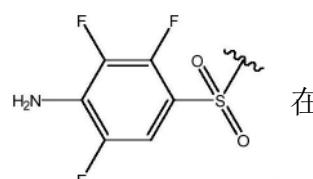
[0215] 在一些实施例，R³是  在一些实施例，R³是



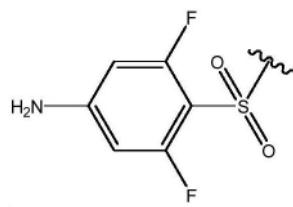
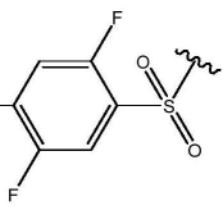
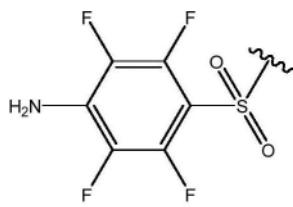
在一些实施例，R³是  在一些实施例，R³是



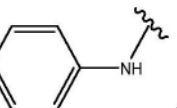
在一些实施例，R³是  在一些实施例，R³是



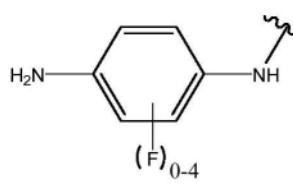
在一些实施例，R³是  在一些实施例，R³是



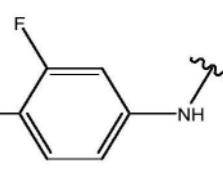
[0216] 在一些实施例，R³是



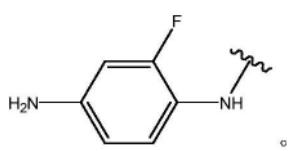
在一些实施例，R³是



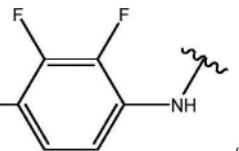
在一些实施例，R³是



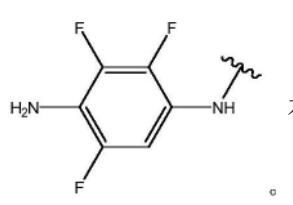
在一些实施例，R³是



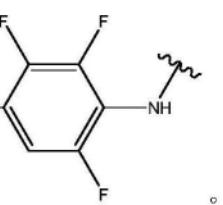
在一些实施例，R³是



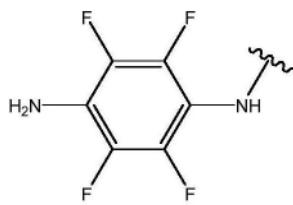
在一些实施例，R³是



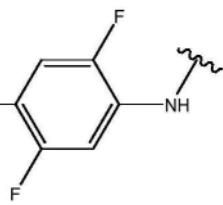
在一些实施例，R³是



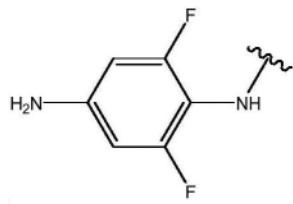
在一些实施例，R³是



在一些实施例，R³是



在一些实施例，R³是

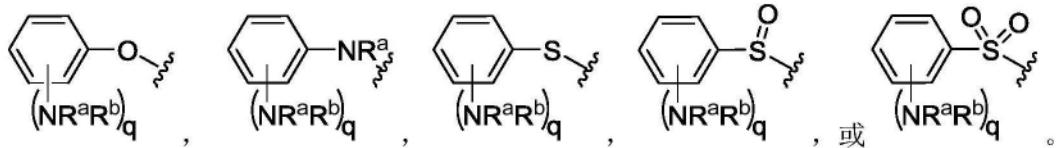


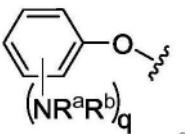
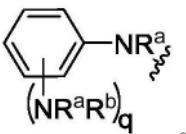
在一些实施例，R³是

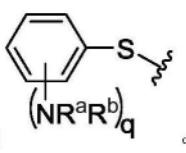
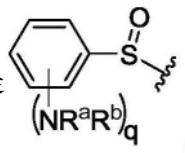
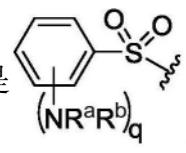


在一些实施例，R³是

[0217] 在一些实施例，本发明提供了式(I)所示化合物，其中R³具有选自以下结构式之一的结构：

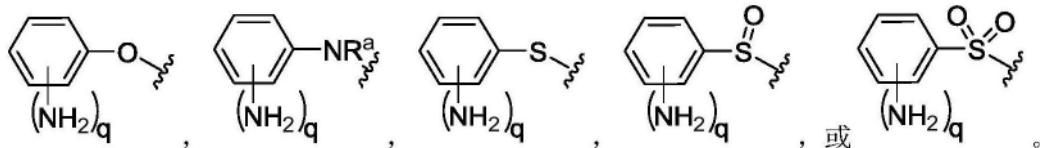


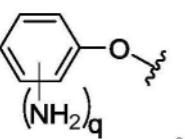
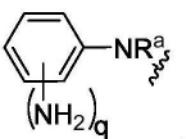
[0218] 在一些实施例, R³是  在一些实施例, R³是  在一些实施例。

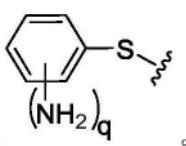
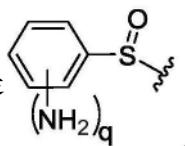
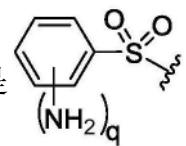
例, R³是  在一些实施例, R³是  在一些实施例, R³是  在一些实施例。

在这些实施例中, q是从0至5的整数。

[0219] 在一些实施例, 本发明提供了式(I)所示化合物, 其中R³具有选自以下结构式之一的结构:

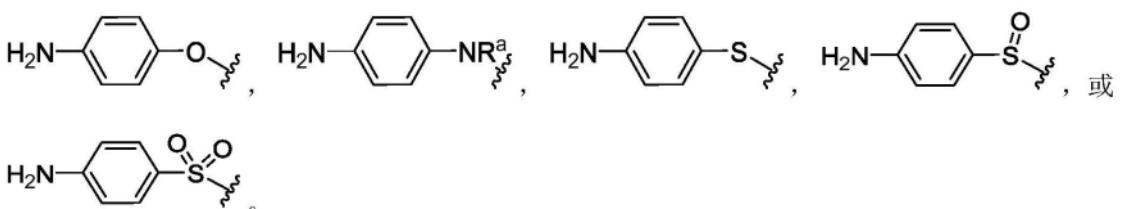


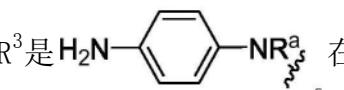
[0220] 在一些实施例, R³是  在一些实施例, R³是  在一些实施例。

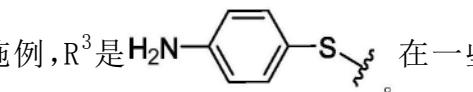
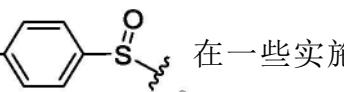
例, R³是  在一些实施例, R³是  在一些实施例, R³是  在一些实施例。

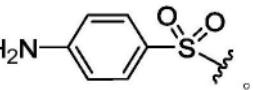
在这些实施例中, q是从0至5的整数。

[0221] 在一些实施例, 本发明提供了式(I)所示化合物, 其中R³具有选自以下结构式之一的结构:

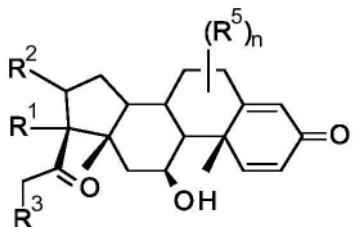


在一些实施例, R³是  在一些实施例, R³是  在一些实施例。

一些实施例, R³是  在一些实施例, R³是  在一些实施例。

例, R³是 

[0222] 在一些实施例, 本发明提供了式(I)所示化合物, 其中所述化合物具有式1000所示结构:



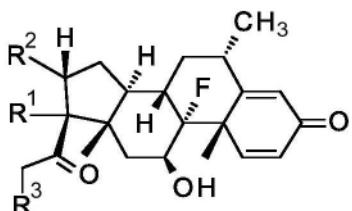
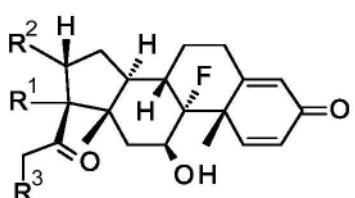
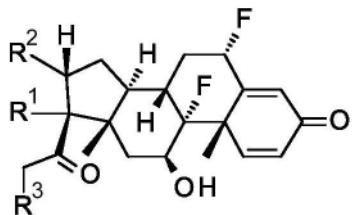
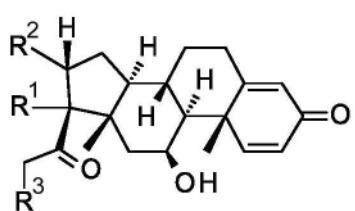
或其药学上可接受的盐、溶剂化物、立体异构体、或衍生物。在式1000中，R¹和R²分别独立地选自由-H、-OH、烷基、-O-C(0)-烷基、和卤素组成的组；或R¹和R²一起形成 ，其中R⁴是选自由烷基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、杂芳基、-亚烷基-NR^aR^b、-X-亚芳基-Y-NR^aR^b、-X-亚杂芳基-Y-NR^aR^b、和含N的杂环烷基组成的组；其中X不存在，或X是-N-、-CH₂-、或-O-；其中Y不存在，或Y是-CH₂-。R³是选自由-OH、-O-C(0)-烷基、-O-芳基、-NR^aR^b、-亚烷基-NR^aR^b、-X-亚芳基-Y-NR^aR^b、-X-亚杂芳基-Y-NR^aR^b、和含N的杂环烷基组成的组；其中X不存在，或X是-N-、-CH₂-、或-O-；其中Y不存在，或Y是-CH₂-。R⁵在每种情况下，独立地选自由-OH、卤素、和烷基组成的组的取代基；n是从0至19的整数；和各R⁵位于任何环原子上。R^a和R^b在每种情况下，分别独立地选自由-H和烷基组成的组；或R^a和R^b环化形成环杂烷基，所述环杂烷基具有3至6个环原子，包括一个杂原子，所述杂原子是同它们连接的所述N原子。R^a和R^b在每种情况下，独立任选地被至少一个选自由-OH、-PO₄H、NH₂、-C(0)OH、和-C(0)CH₃组成的组的取代基取代。

[0223] 在某些实施方案，本发明提供了式1000所示化合物，其中R³是选自由-亚烷基-NR^aR^b、-X-亚芳基-Y-NR^aR^b、-X-亚杂芳基-Y-NR^aR^b、和含N的杂环烷基组成的组；其中X不存在，或X是-N-、-CH₂-、或-O-；其中Y不存在，或Y是-CH₂-；和R⁴是选自由烷基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、杂芳基、-亚烷基-NR^aR^b、-X-亚芳基-Y-NR^aR^b、-X-亚杂芳基-Y-NR^aR^b、和含N的杂环烷基组成的组；其中X不存在，或X是-N-、-CH₂-、或-O-；其中Y不存在，或Y是-CH₂-。

[0224] 在某些实施方案，本发明提供了式1000所示化合物，其中R³是选自由-OH、-O-C(0)-烷基、-O-芳基、-NR^aR^b、-亚烷基-NR^aR^b、-X-亚芳基-Y-NR^aR^b、-X-亚杂芳基-Y-NR^aR^b、和含N的杂环烷基组成的组；其中X不存在，或X是-N-、-CH₂-、或-O-；其中Y不存在，或Y是-CH₂-；和R⁴是选自由-亚烷基-NR^aR^b、-X-亚芳基-Y-NR^aR^b、-X-亚杂芳基-Y-NR^aR^b、和含N的杂环烷基组成的组；其中X不存在，或X是-N-、-CH₂-、或-O-；其中Y不存在，或Y是-CH₂-。

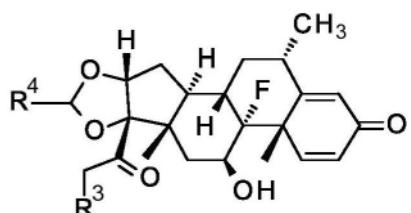
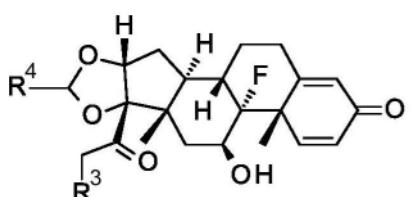
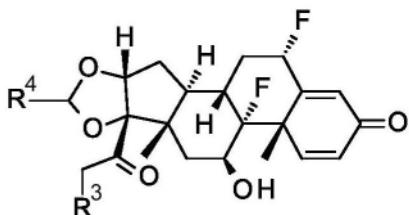
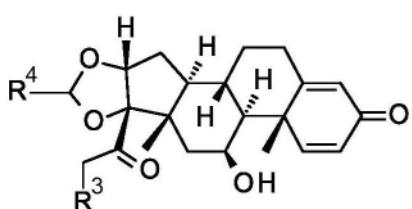
[0225] 在某些实施方案，本发明提供了式1000所示化合物，R³是-NR^aR^b；和R⁴是烷基。在某些实施方案，R³是-NH₂。在某些实施方案，R⁴是正丙基。在某些实施方案，R³是-NH₂，和R⁴是正丙基。

[0226] 在某些实施方案，式1000所示化合物具有式1010、1020、1030、或1040所示结构：



或其药学上可接受的盐、溶剂化物、或立体异构体。

[0227] 在某些实施方案，式1000所示化合物具有式1110、1120、1130、或1140所示结构：



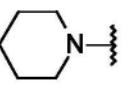
或其药学上可接受的盐、溶剂化物、或立体异构体。

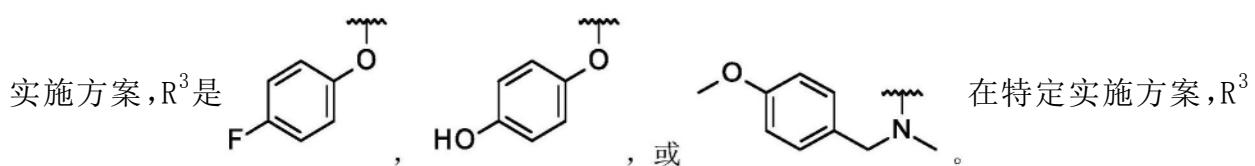
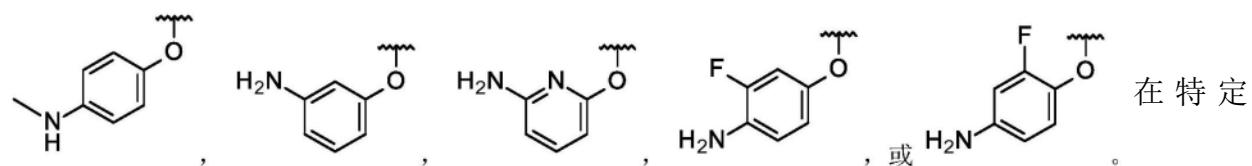
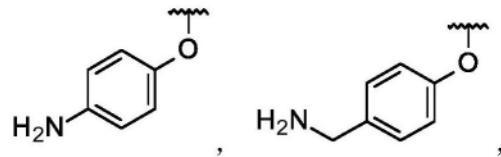
[0228] 在根据任一式1000-1140的某些实施方案中，R³是-OH或-O-C(=O)-烷基；和R⁴是-亚烷基-NR^aR^b、-X-亚芳基-NR^aR^b、-X-亚杂芳基-NR^aR^b、或含N的杂环烷基；其中X不存在，或X是-CH₂-。在某些实施方案，R⁴是-亚烷基-NH₂、-C₆H₅-NH₂或-CH₂-C₆H₅-NH₂。

[0229] 在根据任一式1000-1140的某些实施方案中，R³是-O-芳基、-NR^aR^b、-亚烷基-NR^aR^b、-X-亚芳基-Y-NR^aR^b、-X-亚杂芳基-Y-NR^aR^b、或含N的杂环烷基；其中X不存在，或X是-N-、-CH₂-、或-O-；其中Y不存在，或Y是-CH₂-；和R⁴是烷基、芳基、烷基芳基、或芳基烷基。在一些实施方案，R³是-O-亚芳基-NR^aR^b、或-O-亚杂芳基-NR^aR^b；其中芳基或杂芳基任选地被卤素、氘、羟基、或甲氧基取代。在一些实施方案，R³是-O-苯基-NR^aR^b、或-O-亚杂芳基-NR^aR^b；其中苯基或杂芳基任选地被卤素或氘取代。在根据本段落的某些实施方案中，R⁴是正丙基。

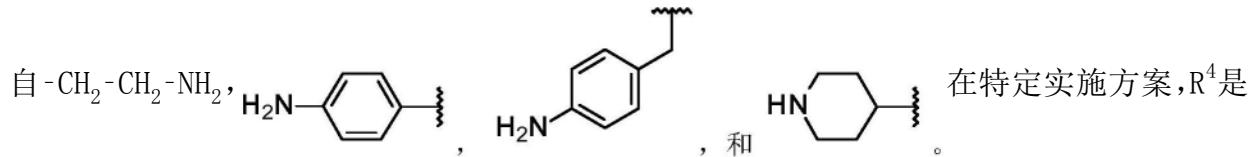
[0230] 在某些实施方案，本发明提供了式1000-1140任一所示的化合物，其中R³是-NR^aR^b；和R⁴是烷基。在某些实施方案，R³是-NH₂。在某些实施方案，R⁴是正丙基。在某些实施方案，R³

是 $-\text{NH}_2$, 和 R^4 是正丙基。

[0231] 在任一式1000-1140中, R^3 可以是上面提供的任何具体的 R^3 。在特定实施方案, R^3 是 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{N}(\text{H})\text{CH}_3$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、或。在特定实施方案, R^3 是

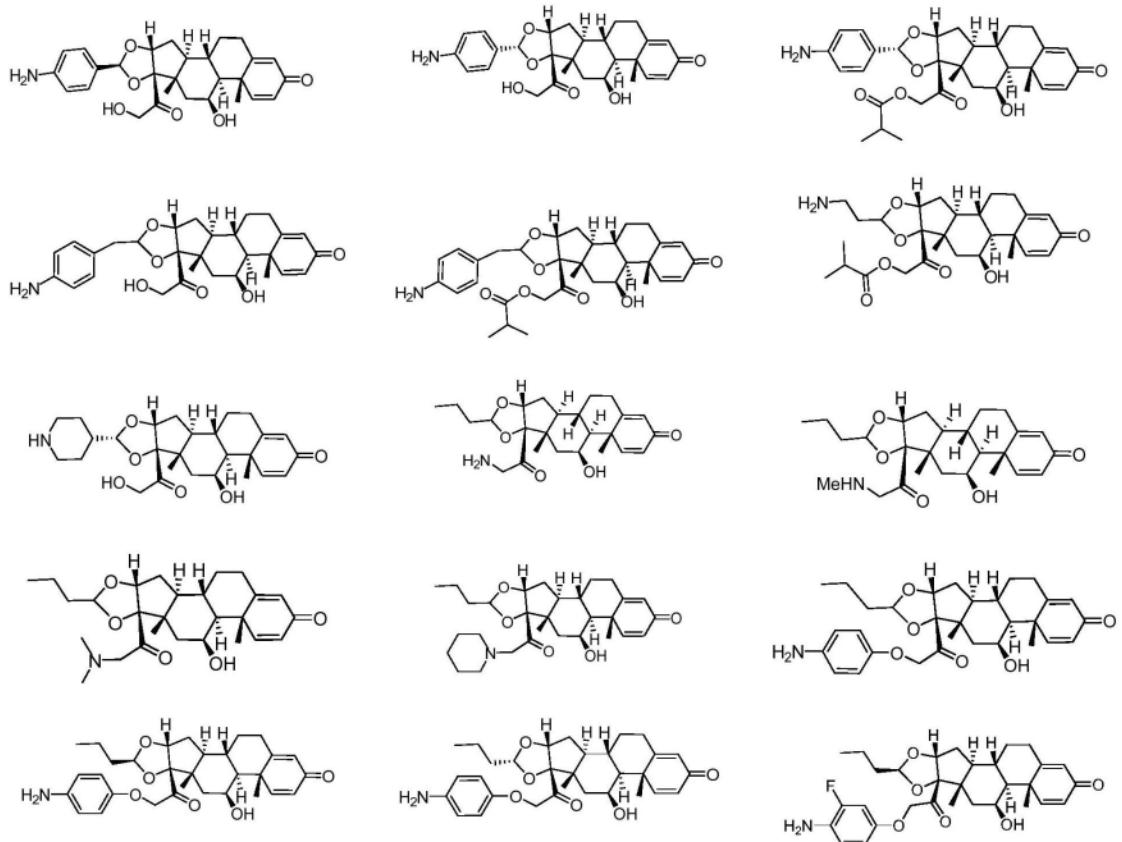


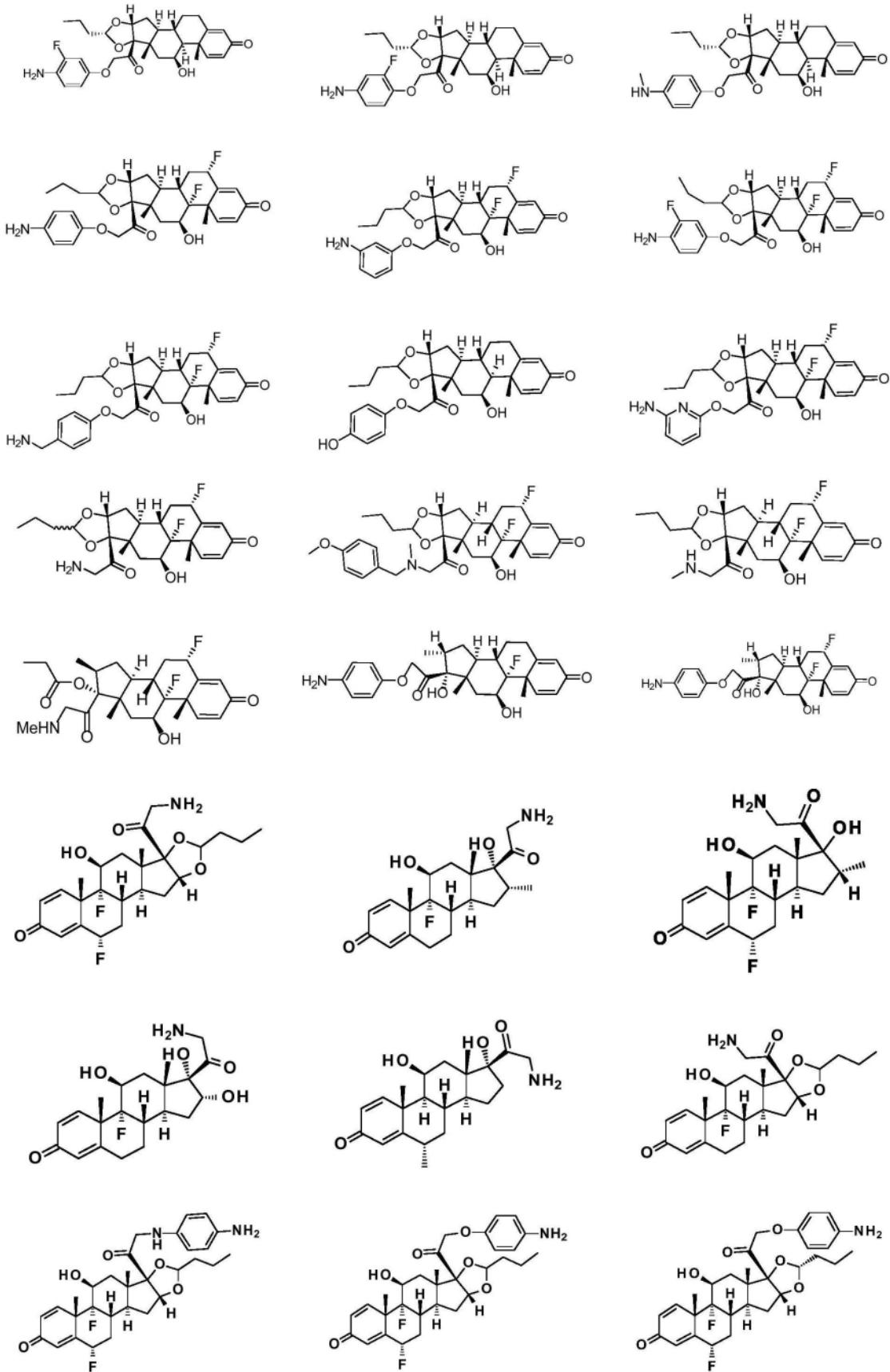
[0232] 在任一式1000-1140中, R^4 可以是上面提供的任何具体的 R^4 。在特定实施方案, R^4 选

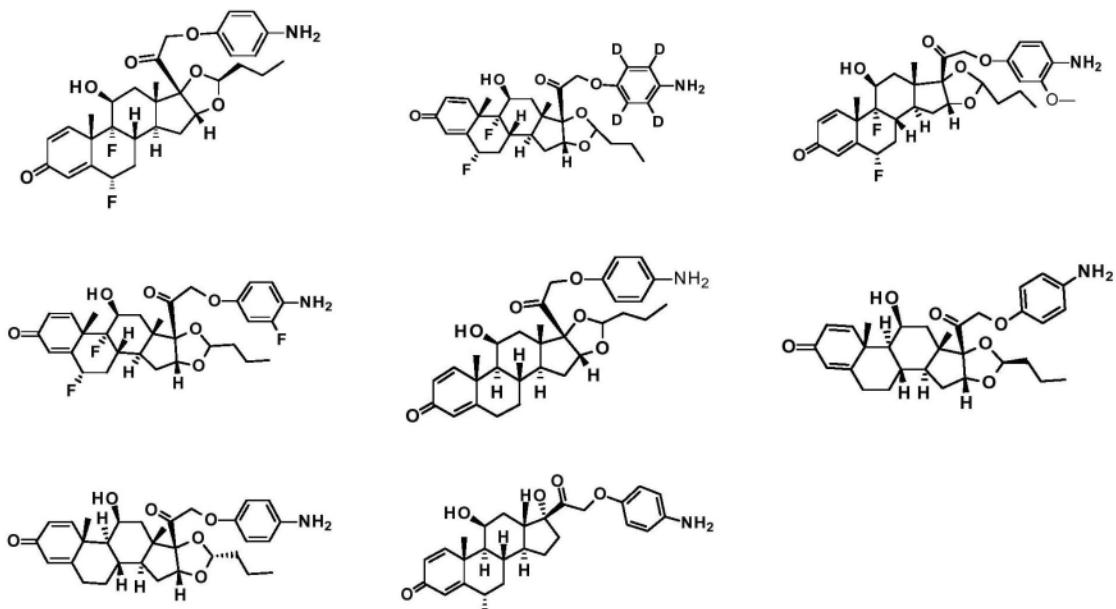


正丙基。

[0233] 本发明还提供了具有以下结构的化合物:







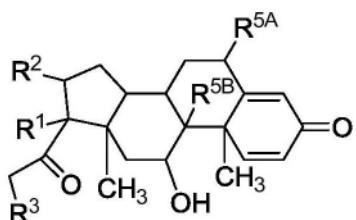
或其药学上可接受的盐、溶剂化物、或立体异构体。

[0234] 包括在本发明范围内的是药学上可接受的盐类，溶剂化物类，结晶形式，无定形形式，多晶型形式，区域异构体类，立体异构体类，前药类例如磷酸酶前药类、葡萄糖-前药类、酯前药类等，代谢物类，和本发明所述的类固醇有效负载(包括式(I)、(I¹)和(A¹)-(A⁷)所示的那些)的生理加合物类。

C. 蛋白质类固醇偶联物

[0235] 本发明提供了本发明所述类固醇类化合物的蛋白质偶联物。此类偶联物包括蛋白质，例如抗体或其抗原结合片段，其例如通过本发明所述的结合剂连接体与上文B章节中所述的化合物(例如式(A)、(A¹)、(A²)、(A³)、(A⁴)、(A⁵)、(A⁶)、(A⁷)、(I)、(I¹)、(PIa)、(PIb-1)、(PIb-2)、(PIc-1)、(PIc-2)、(PID-1)、(PID-2)、(PIe-1)、(PIe-2)、(PII)、(PIIa)、(PIIb)、(PIII)、(PIIIa)、(PIIIb)、(PIV)、(PV)、(PVA)、(PVb)、(PVI)、(PVII)、(PVIIa)、(PVIIb)、(PVIIb-1)、(PVIIb-2)、(PVIII)、和(1000)-(1140)的化合物)共价连接。

[0236] 所述结合剂连接体可以在类固醇的任何合适的部分或位置与本发明所述的类固醇连接，包括例如通过酰胺、醚、酯、氨基甲酸酯或胺。例如，所述结合剂连接体可以通过式(A¹)所示的R¹、R³或R⁴或羟基基团与化合物连接：



(A¹)。

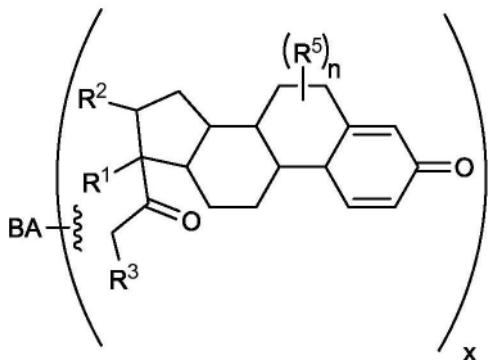
在某些实施方案，通过使类固醇的氨基或羟基基团与连接体上存在的合适的活性基团反应，将本发明所述的类固醇类化合物连接至所述结合剂连接体。在一些实施方案，所述结合剂连接体还包括环糊精部分。例如，所述环糊精部分可与所述结合剂连接体的化学骨架结构连接。

[0237] 在某些实施方案，本发明提供了具有以下结构式的化合物：



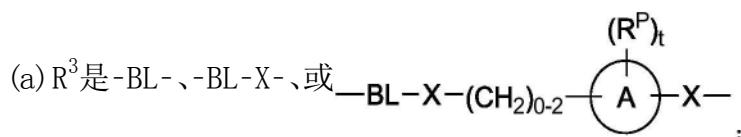
其中BA是如本发明所述的结合剂;L是如本发明所述的任选的连接体;PAY是如本发明所述的类固醇化合物;x是从1至30的整数。在特定的实施方案,各PAY是通过从选自由式(A)、(A¹)、(A²)、(A³)、(A⁴)、(A⁵)、(A⁶)、(A⁷)、(I)、(I¹)、(PIa)、(PIb-1)、(PIb-2)、(PIc-1)、(PIc-2)、(PID-1)、(PID-2)、(PIe-1)、(PIe-2)、(PII)、(PIIa)、(PIIb)、(PIII)、(PIIIa)、(PIIIb)、(PIV)、(PV)、(PVa)、(PVb)、(PVI)、(PVII)、(PVIIa)、(PVIIb)、(PVIIb-1)、(PVIIb-2)、(PVIII)、和(1000)-(1140)组成的组的通式所示的化合物中去除原子,例如氢原子,而得到的基团。此类化合物的示例将在下文进行详细描述。

[0238] 在某些实施方案,本发明提供了具有式(III)所示结构的化合物:

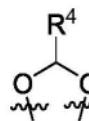


(III):

其中或者(a)、或(b):



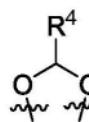
R¹和R²各自独立地为-H、烷基、烷基-C(0)-O-、-OH、或卤素;或R¹和R²一起形成



其中R⁴是烷基、芳基、芳基烷基、或含N的杂环烷基;其中所述烷基、芳基、芳基烷基、

和含N的杂环烷基任选地被-NR^aR^b取代;或

(b) R³是-OH、烷基-C(0)-O-、杂烷基、-NR^aR^b或芳基氧基,其中所述烷基-C(0)-O-、杂烷基、或芳基氧基任选地被-NR^aR^b、-NR^aR^b-芳基氧基、或卤素取代,和R¹和R²一起形成



其中R⁴是-BL-、—BL-X——(CH₂)₀₋₂—、-BL-X-(CH₂)₁₋₄-或-BL-Y,其中Y是含N的

二价杂环;

-BL-是二价结合剂连接体;

R⁵在每种情况下,独立地为-OH、卤素、烷基、或芳基烷基;

R^a和R^b在每种情况下,分别独立地为-H或烷基;

R^P在每种情况下,独立地为卤素;

BA是与-BL-连接的结合剂;

X在每种情况下，独立地为NR^a或0；

A是芳基或杂芳基；

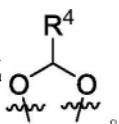
t是从0至2的整数；

x是从1至30的整数；和

n是从0至19的整数。

[0239] 在一些实施例，下标x是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、或30。在一些实施例，下标x是0。在一些实施例，下标x是1。在一些实施例，下标x是2。在一些实施例，下标x是3。在一些实施例，下标x是4。在一些实施例，下标x是5。在一些实施例，下标x是6。在一些实施例，下标x是7。在一些实施例，下标x是8。在一些实施例，下标x是9。在一些实施例，下标x是10。在一些实施例，下标x是11。在一些实施例，下标x是12。在一些实施例，下标x是13。在一些实施例，下标x是14。在一些实施例，下标x是15。在一些实施例，下标x是16。在一些实施例，下标x是17。在一些实施例，下标x是18。在一些实施例，下标x是19。在一些实施例，下标x是20。在一些实施例，下标x是21。在一些实施例，下标x是22。在一些实施例，下标x是23。在一些实施例，下标x是24。在一些实施例，下标x是25。在一些实施例，下标x是26。在一些实施例，下标x是27。在一些实施例，下标x是28。在一些实施例，下标x是29。在一些实施例，下标x是30。

[0240] 在式(III)的一些实施例中，R¹和R²各自独立地为-H、烷基、或-OH。在式(III)的一些实施例中，R¹或R²中的一个是-H、烷基、或-OH。在式(III)的一些实施例中，R¹和R²均为-H、烷基、或-OH。

[0241] 在式(III)的一些实施例中，R¹和R²一起形成  在一些实施例，R⁴是-RL。在一

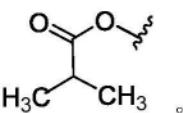
些实施例，R⁴是RL-NR^a-芳基。在一些其他实施例，R⁴是烷基。在某些实施例，R⁴是芳基烷基。在一些实施例，R⁴是芳基。在其他实施例，R⁴是含N的杂环烷基。在这些实施例的一些中，所述烷基、芳基、芳基烷基、或含N的杂环烷基是任选取代的。

[0242] 在式(III)的一些实施例中，R⁵是-H或卤素。在式(II)的一些实施例中，R⁵是-H或氟。在式(III)的一些实施例中，R⁵中的一个是-H或卤素。在式(III)的一些实施例中，R⁵是-H或卤素，和n是2。在式(III)的一些实施例中，R⁵是-F，和n是1。在式(II)的一些实施例中，R⁵是-F，和n是2。

[0243] 在式(III)的一些实施例中，R³是BL。在式(III)的一些实施例中，R³是RL-NR^a-芳基氧基-。在式(III)的一些其他实施例中，R³是-OH。在式(III)的一些其他实施例中，R³是烷基-C(0)-O-。在式(III)的一些其他实施例中，R³是杂烷基。在式(III)的一些其他实施例中，R³是-N-R^aR^b。在式(III)的一些其他实施例中，R³是芳基。在式(III)的一些其他实施例中，R³是芳基氧基。在式(III)的一些其他实施例中，烷基-C(0)-O-、杂烷基、或芳基氧基任选地被-NR^aR^b或卤素取代。

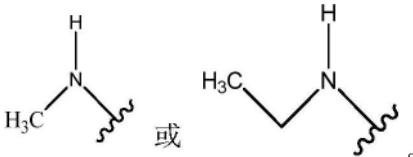
在式(II)的一些实施例中，R³是-OH。在式(III)的一些实施例中，R³是烷基-C(0)-

0-。在一些实施例，R³是。在式(III)的一些实施例中，R³是杂烷基。在一些实施



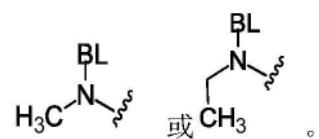
在式(III)的一些实施例中， R^3 是杂烷基。在一些实施

例， R^3 是  或  在式 (III) 的一些实施例中， R^3 是

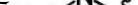


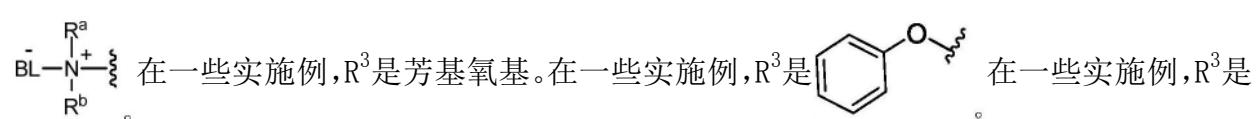
在式(III)的一些实施例中， R^3 是

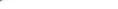
在式 (III) 的一些实施例中, R^3 是 $-NR^aR^b$ 。在一些实施例, R^3 是 $-NR^aR^b-$



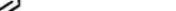
在式(III)的一些实施例中， R^3 是 $-NR^aR^b$ 。在一些实施例， R^3 是 $-NR^aR^b-$

氧基芳基。在一些实施例， R^3 是  在一些实施例， R^3 是  在一些实施例， R^3 是



 在一些实施例，R³是  在一些实施例，R³是

 在一些实施例，R³是  在一些实施例，R³是


在一些实施例，R³是


在一些实施例，R³是

在一些实施例， R^3 是 

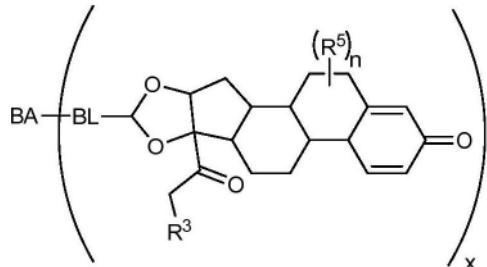
在一些实施例,R³是

CCN(C)Cc1ccc(OCC)c1

[0244] 在式 (III) 中,下标n是从0至19的整数。在一些实施例,n是0。在一些其他实施例,n是1。在某些实施例,n是2。在一些其他实施例,n是3。在某些实施例,n是4。在一些实施例,n

是5。在一些其他实施例,n是6。在某些实施例,n是7。在一些其他实施例,n是8。在某些实施例,n是9。在一些实施例,n是10。在一些其他实施例,n是11。在某些实施例,n是12。在一些其他实施例,n是13。在某些实施例,n是14。在一些实施例,n是15。在一些其他实施例,n是16。在某些实施例,n是17。在一些其他实施例,n是18。在某些实施例,n是19。

[0245] 在一些实施例,本发明提供了具有式(IIIa)所示结构的化合物:



(IIIa);

其中:

BA是结合剂;

R⁵在每种情况下,独立地为-OH、卤素、或烷基;

R³选自-OH、烷基-C(0)-O-、杂烷基、-NR^aR^b、-NR^aR^b-芳基氧基、或芳基氧基,其中所述烷基-C(0)-O-、杂烷基、或芳基氧基任选地被-NR^aR^b或卤素取代;

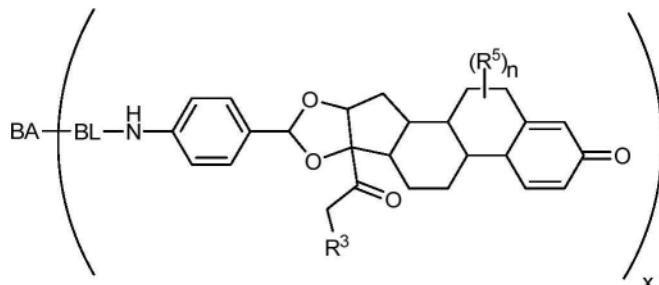
BL是结合剂连接体;

R^a和R^b在每种情况下,分别独立地选自H、烷基、和烷基-C(0);

n是从0至19的整数;和

x是从1至30的整数。

[0246] 在一些实施例,本发明提供了具有式(IIIa2)所示结构的化合物:



(IIIa2);

其中:

BA是结合剂;

R⁵在每种情况下,独立地为-OH、卤素、或烷基;

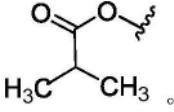
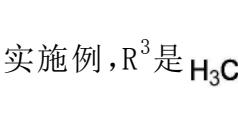
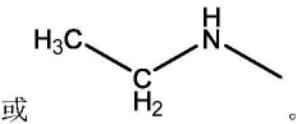
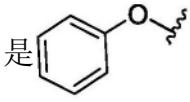
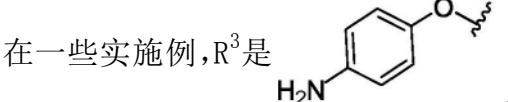
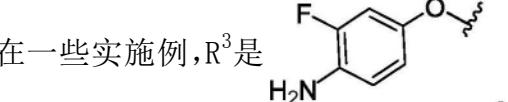
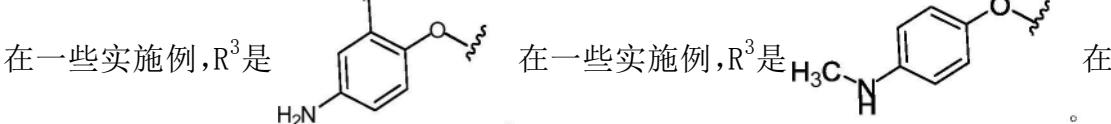
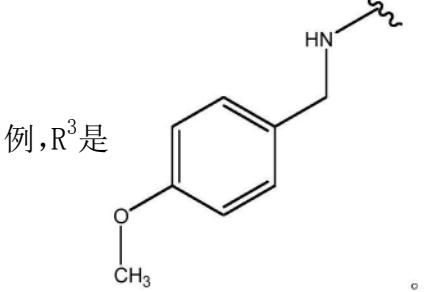
R³选自-OH、烷基-C(0)-O-、杂烷基、-NR^aR^b、-NR^aR^b-氧基芳基、或芳基氧基,其中所述烷基-C(0)-O-、杂烷基、或芳基氧基任选地被-NR^aR^b或卤素取代。

BL是结合剂连接体;

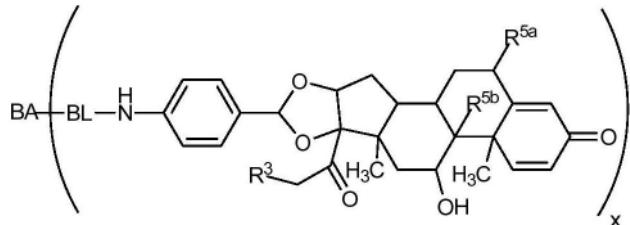
R^a和R^b在每种情况下,分别独立地选自H、烷基、和烷基-C(0);

n是从0至19的整数;和

x是从0至30的整数。

在式(IIIa2)的一些实施例中, R³是-OH。在式(IIIa2)的一些实施例中, R³是烷基-C(O)-O-。在一些实施例, R³是  在式(IIIa2)的一些实施例中, R³是杂烷基。在一些实施例, R³是  或  在式(IIIa2)的一些实施例中, R³是-NR^aR^b。在一些实施例, R³是  在一些实施例, R³是  在一些实施例, R³是  在一些实施例, R³是  在一些实施例, R³是 

[0247] 在一些实施例, 式(IIIa2)所示化合物具有以下结构:



其中:

BA是结合剂;

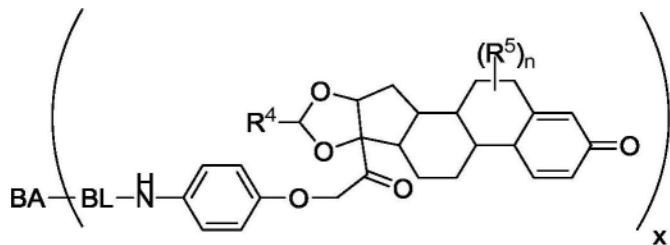
R³是-OH或烷基-C(O)-O-;

R^{5a}和R^{5b}各自独立地为-F或H;

BL是结合剂连接体; 和

x是从1至30的整数。

[0248] 在一些实施例, 本发明提供了具有式(IIIb)所示结构的化合物:



(IIIb);

其中：

BA是结合剂；

R⁵在每种情况下，独立地为-OH、卤素、或烷基；

R⁴选自烷基、芳基、芳基烷基、或含N的杂环烷基，其中所述烷基、芳基、芳基烷基、或含N的杂环烷基任选地被-NR^aR^b取代；

BL是结合剂连接体；

R^a和R^b在每种情况下，分别独立地选自H、烷基和烷基-C(0)；

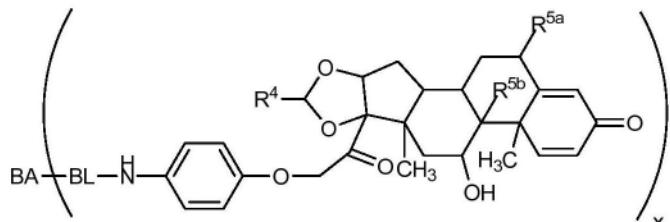
n是从0至19的整数；和

x是从0至30的整数。

[0249] 在式(IIIb)的一些实施例中，R⁵是-H或卤素。在式(IIIb)的一些实施例中，R⁵是氟。在式(IIIb)的一些实施例中，n至少为2，R⁵中的两个是卤素。在式(IIIb)的一些实施例中，R⁵是-F，和n是1。在式(IIIb)的一些实施例中，R⁵是-F。

[0250] 在式(IIIb)的一些实施例中，R⁴是烷基。在式(IIb)的一些实施例中，R⁴是甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、异丁基、戊基基团部分、己基基团部分、环丙基、环丁基、环戊基、或环己基。在式(IIIb)的一些实施例中，R⁴是正丙基。

[0251] 在一些实施例，式(IIIb)所示化合物具有以下结构：



其中：

BA是结合剂；

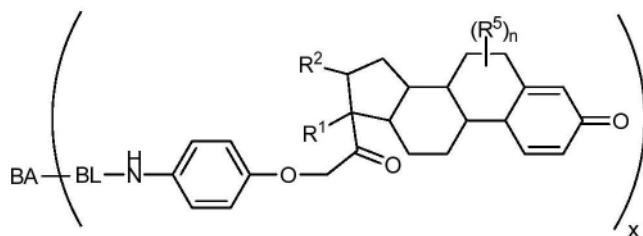
R⁴是烷基；

R^{5a}和R^{5b}各自独立地为-F或H；

BL是结合剂连接体；和

x是从1至30的整数。

[0252] 在一些实施例，本发明提供了具有式(IIIc)所示结构的化合物：



(IIIc);

其中：

BA是结合剂；

R¹和R²分别独立地为-H、烷基、烷基-C(0)-O-、-OH、或卤素；

R⁵在每种情况下，独立地选自-OH、卤素、或烷基；

BL是结合剂连接体；

n是从0至19的整数；和

x是从1至30的整数。

[0253] 在式(IIIc)的一些实施例中，R⁵是卤素。在式(IIIc)的一些实施例中，R⁵是氟。在式(IIIc)的一些实施例中，R⁵中的一个是卤素。在式(IIIc)的一些实施例中，R⁵中的两个是卤素。在式(IIIc)的一些实施例中，R⁵是-F，和n是2。

[0254] 在式(IIIc)的一些实施例中，R¹是CH₃。

[0255] 在式(IIIc)的其他实施例中，R¹是OH。

[0256] 在式(IIIc)的一些其他实施例中，R¹是H。

[0257] 在式(IIIc)的一些实施例中，R²是CH₃。

[0258] 在式(IIIc)的其他实施例中，R²是OH。

[0259] 在式(IIIc)的一些其他实施例中，R²是H。

[0260] 在式(IIIc)的一些实施例中，R¹是CH₃，和R²是CH₃。

[0261] 在式(IIIc)的其他实施例中，R¹是CH₃，和R²是OH。

[0262] 在式(IIIc)的一些实施例中，R¹是CH₃，和R²是H。

[0263] 在式(IIIc)的一些其他实施例中，R¹是OH，和R²是CH₃。

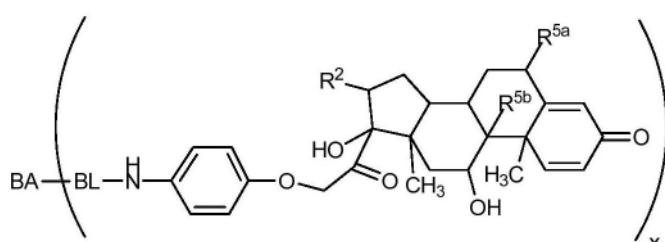
[0264] 在式(IIIc)的其他实施例中，R¹是OH，和R²是OH。

[0265] 在式(IIIc)的一些实施例中，R¹是H，和R²是H。

[0266] 在式(IIIc)的一些其他实施例中，R¹是H，和R²是OH。

[0267] 在式(IIIc)的其他实施例中，R¹是H，和R²是H。

[0268] 在一些实施方案，式(IIIc)所示化合物具有以下结构：

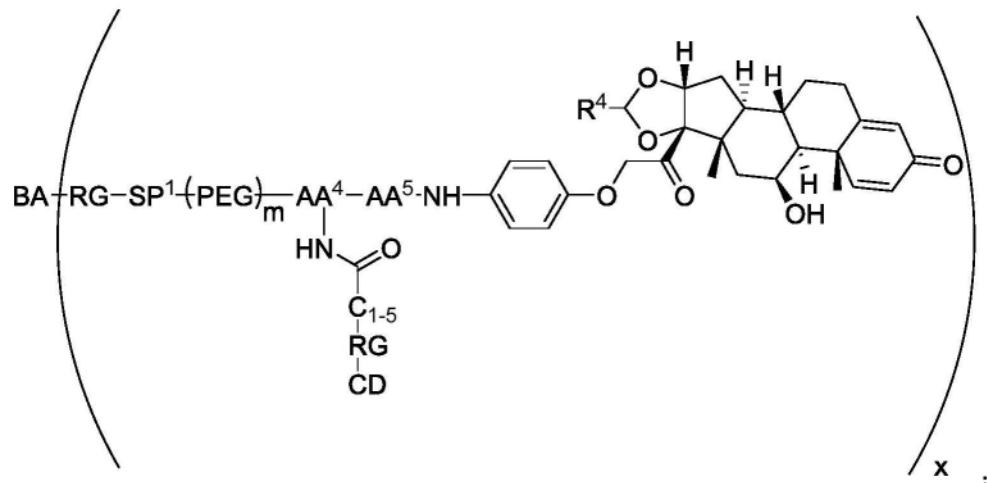


(IIIc)

其中：

BA是结合剂；
R²是甲基；
R^{5a}和R^{5b}各自独立地为-F或H；
BL是结合剂连接体；和
x是从0至30的整数。

[0269] 在一些实施方案，式 (IIIc) 所示化合物具有以下结构：



BA是结合剂；
RG是活性基团残基；
CD是环糊精；
SP¹是间隔基团；
AA⁴是氨基酸残基；
AA⁵是二肽残基；
PEG是聚乙二醇；
m是从0至4的整数；
x是从0至30的整数；

R^4 是烷基、芳基、芳基烷基、或含N的杂环烷基；其中所述烷基、芳基、芳基烷基和含N的杂环烷基任选地被 $-NR^aR^b$ 取代；

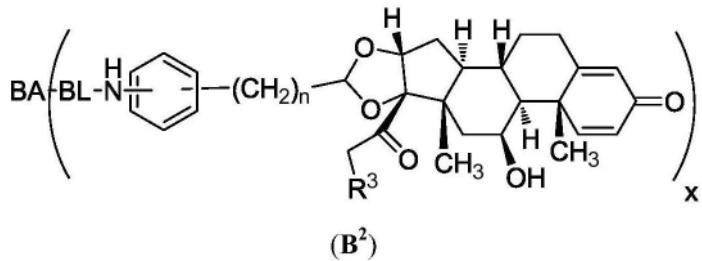
R^a和R^b在每种情况下，分别独立地为-H、或烷基；

BA是与-BL-连接的结合剂；

SP¹和SP²在每种情况下，独立地不存在，或独立地为间隔基团残基，和其中SP¹包含三价连接体；AA⁴是包含氨基酸残基的三价连接体；AA⁵是二肽残基；PEG是聚乙二醇残基；其中所述表示在通式中所示化学基团通过其与相邻基团连接的原子，CD在每种情况下独立地不存在或者独立地为环糊精残基，其中存在至少一个CD，下标m是从0至5的整数；在这些实施例中，下标m是0、1、2、3、4、或5。在一些实施例，下标m是0。在一些实施例，下标m是1。在一些实施例，下标m是2。在一些实施例，下标m是3。在一些实施例，下标m是4。在一些实施例，下标m是5。在一些实施例，AA⁴或AA⁵中的任一个在每种情况下，独立地分别包含选自丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸。

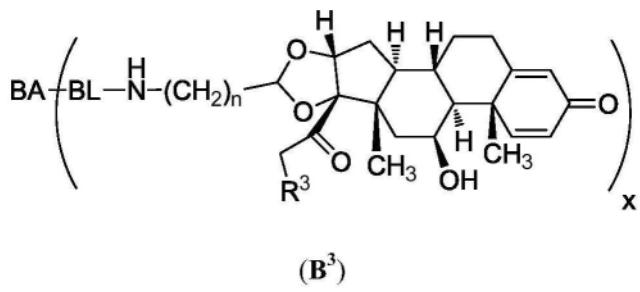
酸、酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、或瓜氨酸，其衍生物、或其组合的氨基酸。在某些实施方案，AA⁴是选自丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、或瓜氨酸，其衍生物、或其组合的氨基酸。在某些实施方案，AA⁴是赖氨酸。在某些实施方案，AA⁴是赖氨酸或赖氨酸的衍生物。在某些实施方案，AA⁵是缬氨酸-瓜氨酸。在某些实施方案，AA⁵是瓜氨酸-缬氨酸。在某些实施方案，AA⁵是缬氨酸-丙氨酸。在某些实施方案，AA⁵是丙氨酸-缬氨酸。在某些实施方案，AA⁵是缬氨酸-甘氨酸。在某些实施方案，AA⁵是甘氨酸-缬氨酸。在某些实施方案，AA⁵是谷氨酸-缬氨酸-瓜氨酸。在一些实施方案，AA⁵是谷氨酰胺-缬氨酸-瓜氨酸。在一些实施方案，AA⁵是赖氨酸-缬氨酸-丙氨酸。在一些实施方案，AA⁵是赖氨酸-缬氨酸-瓜氨酸。在一些实施方案，AA⁵是谷氨酸-缬氨酸-瓜氨酸。在一些实施例，SP¹在每种情况下，独立地选自由C₁₋₆亚烷基、-NH-、-C(0)-、(-CH₂-CH₂-O)_e、-NH-CH₂-CH₂-(-O-CH₂-CH₂)_e-C(0)-、-C(0)-(CH₂)_u-C(0)-、-C(0)-NH-(CH₂)_v-、和其组合组成的组，其中下标e是从0至4的整数，下标u是从1至8的整数，和下标v是从1至8的整数。在一些实施例，SP²在每种情况下，独立地选自由C₁₋₆亚烷基、-NH-、-C(0)-、(-CH₂-CH₂-O)_e、-NH-CH₂-CH₂-(-O-CH₂-CH₂)_e-C(0)-、-C(0)-(CH₂)_u-C(0)-、-C(0)-NH-(CH₂)_v-、和其组合组成的组，其中下标e是从0至4的整数，下标u是从1至8的整数，和下标v是从1至8的整数。

[0270] 本发明还提供了式(B²)所示化合物：



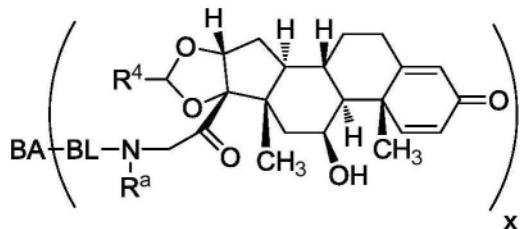
其中n是从0至4的整数，R³是-OH或R⁷-C(0)-O-；其中R⁷是烷基，BL是结合剂连接体，BA是结合剂，和x是从1至30的整数。在某些实施方案，n是0或1，和x是从1至6的整数。在某些实施方案，x是4。

[0271] 本发明还提供了式(B³)所示化合物：



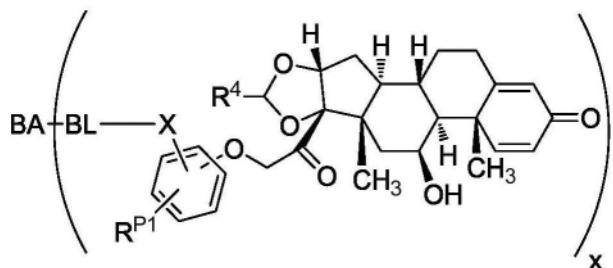
其中n是从1至4的整数，R³是-OH或R⁷-C(0)-O-；其中R⁷是烷基，BL是结合剂连接体，BA是结合剂，和x是从1至30的整数。在某些实施方案，n是2，和x是从1至6的整数。在某些实施方案，x是4。

[0272] 本发明还提供了式(B⁴)所示化合物：

(B⁴)

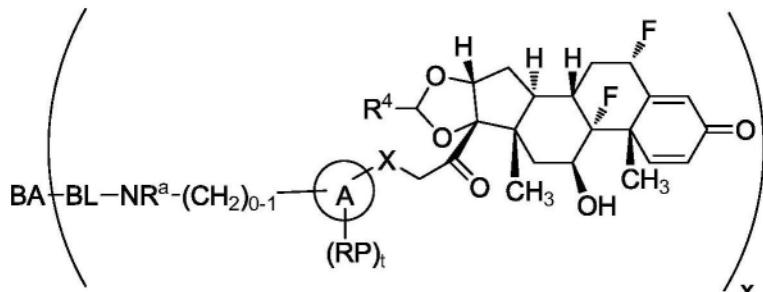
其中R⁴是烷基,其中R^a是氢原子或烷基,BL是结合剂连接体,和BA是结合剂。在某些实施方案,R⁴是C₁₋₄烷基。在某些实施方案,R⁴是丙基。在某些实施方案,R³是-NH₂、-NHCH₃、或-N(CH₃)₂。在某些实施方案,x是从1至6的整数。在某些实施方案,x是4。

[0273] 本发明还提供了式(B⁵)所示化合物:

(B⁵)

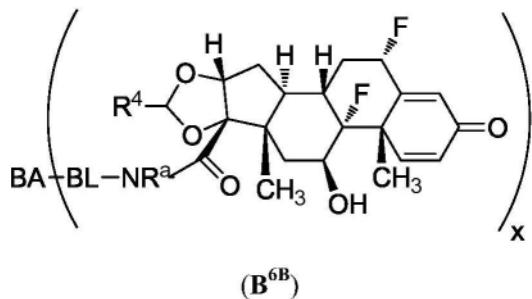
其中R⁴是烷基,R^{P1}是卤素或氢原子,和X是NR^a或0,其中R^a是氢原子或烷基,BL是结合剂连接体,BA是结合剂,和x是从1至30的整数。在一些实施方案,R⁴是C₁₋₄烷基,X是NH,和x是从1至6的整数。在某些实施方案,x是4。

[0274] 本发明还提供了式(B^{6A})所示化合物:

(B^{6A})

其中X是0或NR^a,Ⓐ是芳基或杂芳基,R^P是卤素,t是从0至2的整数,R^a是氢原子或烷基,BL是结合剂连接体,BA是结合剂,和x是从1至30的整数,和R⁴是烷基。在一些实施方案,X是0,R⁴是烷基,和x是从1至6的整数。在某些实施方案,x是4。

[0275] 本发明所述的还涉及式(B^{6B})所示化合物:



其中 R^a 是氢原子或烷基,BA是结合剂,和x是从1至30的整数。在一些实施方案,x是从1至6的整数。在一些实施方案,x是4。

[0276] 本发明使用的短语“结合剂连接体”或“BL”是指使结合剂(例如,抗体或其抗原结合片段)连接、关连或结合本发明所述的有效负载化合物(例如,类固醇)的任何二价基团或基团部分。通常,本发明所述的抗体偶联物的合适的结合剂连接体是足以稳定以利用抗体的循环半衰期,并且同时能够在抗原介导的偶联物内化后释放其有效负载的那些。连接体可以是可切割的或不可切割的。可切割连接体是内化后由细胞内代谢切割的连接体,例如通过水解、还原或酶促反应切割。不可切割的连接体是通过内化后抗体的溶酶体降解来释放附接的有效负载的连接体。合适的连接体包括但不限于酸不稳定连接体,水解不稳定连接体,酶促可切割连接体,还原不稳定连接体,自我牺牲连接体和不可切割连接体。合适的连接体还包括但不限于葡糖昔酸类,琥珀酰亚胺-硫醚类,聚乙二醇(PEG)单元类,氨基甲酸酯类,腙类, ϵ -己酰单元类,二硫键单元类(例如,-S-S-, -S-S-C(R¹)(R²)-, 其中R¹和R²分别独立地为氢或烃基),对氨基苄基(PAB)单元类,磷酸酯单元类,例如单-、双-或三-磷酸酯单元类,和肽类,例如含有2、3、4、5、6、7、8、或更多个氨基酸单元的肽单元类,包括但不限于缬氨酸-瓜氨酸单元类,缬氨酸-丙氨酸单元类,缬氨酸-精氨酸单元类,缬氨酸-赖氨酸单元类,-赖氨酸-缬氨酸-瓜氨酸单元类和-赖氨酸-缬氨酸-丙氨酸单元类。在一些实施方案,本发明所述偶联物的结合剂连接体基团衍生自本发明所述的连接体-有效负载的“活性连接体”基团与抗体的活性部分的反应。活性连接体基团(RL)是指包含活性基团和连接基团的一价基团,如RG-L—所示,其中RG是活性基团,L是连接基团,和波浪线表示与有效负载连接的键。所述连接基团是将活性基团桥接至有效负载的任何二价基团部分。连接基团也可以是桥接活性基团、有效负载和环糊精部分的任何三价基团部分。在一些实施例,连接基团是三价的并且包括与所述连接基团中的三价基团(例如赖氨酸残基)连接的环糊精部分。活性连接体(RL)与同它们连接的有效负载一起构成可用作制备本发明所述抗体类固醇偶联物的合成前体的中间体(“连接体-有效负载”)。活性连接体包含活性基团(RG),其是与抗体、经修饰的抗体或其抗原结合片段的活性部分反应的官能团或基团部分。由活性基团(RG)与抗体、经修饰的抗体或其抗原结合片段反应得到的基团部分与连接基团(L)一起构成本发明所述的偶联物的“结合剂连接体”(BL)部分。因此,在一些实施方案,BL具有以下结构:

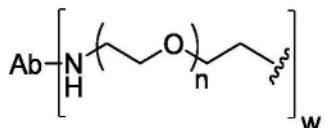


其中 $\underset{\text{BA}}{\text{\~{}}}$ 是与所述结合剂连接的键, RG^N 是由连接体-有效负载的活性基团与结合剂

的活性部分反应得到的基团部分,L是连接基团,和 P 是与有效负载连接的键。

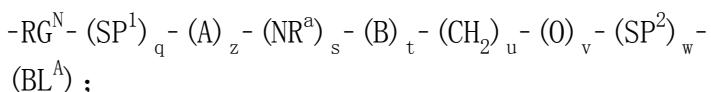
[0277] 在某些实施方案,RG^N衍生自RG与抗体或其抗原结合片段的半胱氨酸或赖氨酸残基的反应。在某些实施方案,RG^N衍生自点击化学反应。在所述点击化学反应的一些实施方案中,RG^N衍生自炔烃和叠氮化物之间的1,3-环加成反应。此类RG^N的非限制性实例包括衍生自应变炔烃的那些,例如适用于应变促进的炔烃-叠氮化物环加成(SPAAC),环炔烃类,例如环辛炔类、苯并环化的炔烃类、和在没有铜催化剂的情况下能够与叠氮化物进行1,3-环加成反应的炔烃类。合适的RG^N还包括但不限于衍生自DIBAC,DIBO,BARAC,DIFO,取代的例如氟化炔烃类、氮杂-环炔烃类、BCN及其衍生物的那些。包含此类RG^N基团的偶联物可衍生自己用叠氮基官能化的抗体。此类官能化抗体包括用叠氮基-聚乙二醇基团进行官能化的抗体。在某些实施方案,此种官能化抗体通过在酶转谷氨酰胺酶(例如,微生物转谷氨酰胺酶)存在下,使包含至少一个谷氨酰胺残基的抗体与式H₂N-LL-N₃所示化合物(其中LL是二价聚乙二醇基团)反应而得到。抗体的合适的谷氨酰胺残基包括Q295,或通过插入或突变(例如N297Q突变)衍生的那些。

[0278] 在一些实施方案,本发明所述的偶联物的BA是抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案,本发明所述的偶联物衍生自叠氮基官能化的抗体。在一些实施方案,本发明所述偶联物的BA是:



其中Ab是抗体或其抗原结合片段,n是从1至10的整数,w是连接体有效负载部分的数目,和 P 是与单个结合剂连接体(BL)连接的键,例如,与衍生自炔烃和叠氮化物之间的1,3-环加成反应的基团部分连接的键。在某些实施方案,w是3。在某些实施方案,w是2或4,即,所述偶联物包含2或4个连接体有效负载部分。

[0279] 在一些实施方案,BL是式((BL^A)所示的二价基团部分;



其中RG^N具有本发明所述定义;

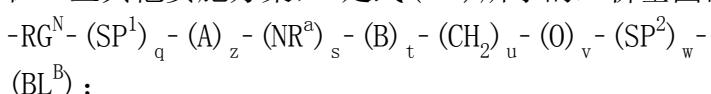
A是氨基酸或肽;

R^a是H或烷基;

B是芳基、杂芳基、或杂环烷基,其中芳基、杂芳基或杂环烷基任选地被烷基、-OH、或-NR^aR^b取代;

SP¹和SP²分别独立地为间隔基团;和q,z,s,t,u,v、和w在每种情况下,分别独立地为0或1。

[0280] 在一些其他实施方案,BL是式((BL^B)所示的三价基团部分;



其中RG^N具有本发明所述定义;

A是三肽，其中所述三肽中的至少一个氨基酸直接或间接地与环糊精部分连接；

R^a是H或烷基；

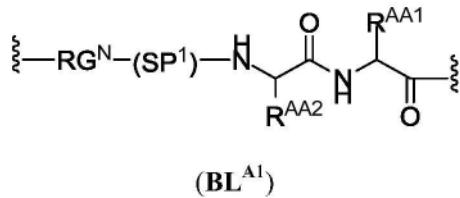
B是芳基、杂芳基、或杂环烷基，其中芳基、杂芳基或杂环烷基任选地被烷基、-OH、或-NR^aR^b取代；

SP¹和SP²分别独立地为间隔基团；和q、z、s、t、u、v、和w在每种情况下，分别独立地为0或1。

[0281] 在一些实施例，环糊精(CD)直接与氨基酸残基连接，例如直接与赖氨酸氨基酸残基连接。这意味着CD远离赖氨酸氨基酸共价连接体一个键位置。在这些实施例的一些中，所述共价连接体还直接连接至有效负载部分。这意味着共价连接体远离有效负载(例如但不限于本发明所述的类固醇有效负载)一个键位置。在这些实施例的一些中，所述共价连接体还直接与CD部分连接。这意味着所述共价连接体远离CD(例如本发明所述的CD)一个键位置。在这些实施例的一些中，所述共价连接体是赖氨酸氨基酸或其衍生物。

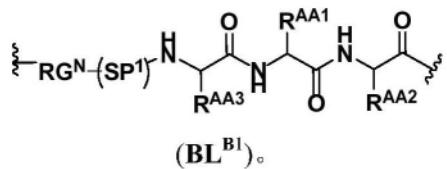
[0282] 在一些实施例，所述CD间接连接至连接基团(例如BL)中的共价连接体上。这意味着所述CD远离所述共价连接体多于一个键位置。这还意味着所述CD通过另一基团部分与所述共价连接体连接。例如，所述CD可以与马来酰亚胺基团连接，所述马来酰亚胺基团与聚乙二醇基团连接，所述聚乙二醇基团与所述共价连接体连接。在这些实施例的一些中，所述共价连接体还间接连接至有效负载部分。这意味着所述共价连接体远离有效负载(例如但不限于，本发明所述的类固醇有效负载)多于一个键位置。这还意味着所述共价连接体通过另一基团部分与所述有效负载连接。例如，所述共价连接体可以与二肽连接，例如但不限于Val-Ala或Val-Cit，其可与对氨基苯甲酰连接，所述对氨基苯甲酰可与所述有效负载连接。在这些实施例的一些中，所述共价连接体还间接与环糊精部分连接。这意味着所述共价连接体远离环糊精(例如本发明所述的环糊精)多于一个键位置。这还意味着所述共价连接体通过另一基团部分与所述环糊精连接。例如，所述共价连接体可以与聚乙二醇基团连接，所述聚乙二醇基团可与活性基团连接，所述活性基团可与所述环糊精连接。在这些实施例的一些中，所述共价连接体是赖氨酸氨基酸或其衍生物。

[0283] 在一些实施方案，BL是-RG^N- (SP¹)_q - (A)_z -。在一些实施方案，BL是-RG^N- (SP¹)_q - (A)₂ -。在一些实施方案，BL是式(BL^{A1})所示的基团部分：



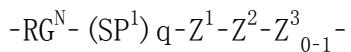
其中R^{AA1}和R^{AA2}各自独立地为氨基酸侧链。在式RL^{A1}的一些实施例中，SP¹是二价聚乙二醇基团，和RG^N是炔烃与叠氮化物之间反应的1,3-环加成反应加合物。

[0284] 在一些实施方案，BL是-RG^N- (SP¹)_q - (A)_z -。在一些实施方案，BL是-RG^N- (SP¹)_q - (A)₂ -。在一些实施方案，BL是式(BL^{B1})所示的基团部分：



[0285] 其中R^{AA1}和R^{AA2}各自独立地为氨基酸侧链。R^{AA3}是直接或间接与环糊精部分连接的氨基酸侧链。在式RL^{B1}的一些实施例中,SP¹是二价聚乙二醇基团,和RG^N是炔烃与叠氮化物之间反应的1,3-环加成反应加合物。

[0286] 在一些实施方案,BL具有以下结构式:



其中:

RG^N和SP¹均具有本发明所述定义;

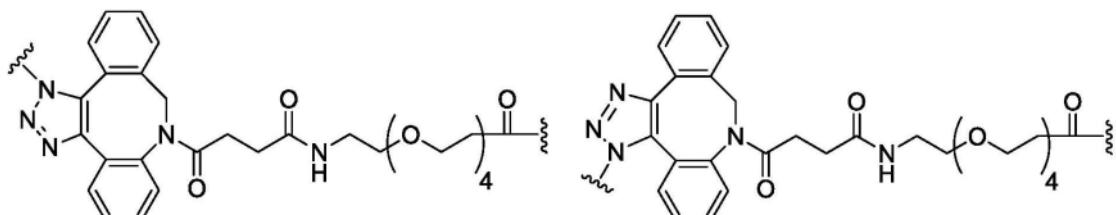
q是0或1;

Z¹是聚乙二醇或己酰基基团;

Z²是二肽或三肽;和

Z³是PAB基团。

在一些实施方案,RG^N衍生自点击化学活性基团,和Z¹是聚乙二醇基团。在某些实施方案,RG^N- (SP¹) q-Z¹-是:

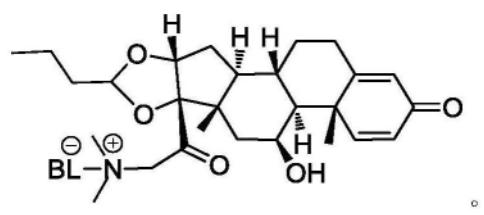
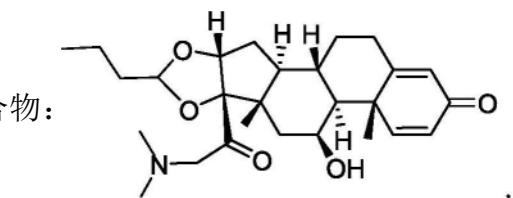


或其混合物;或 在一些实施方案,所述二肽是。

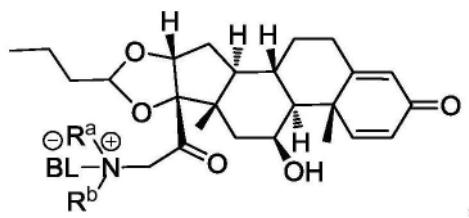
缬氨酸-瓜氨酸或缬氨酸-丙氨酸。

[0287] 在某些实施方案,所述BL通过叔胺与所述有效负载连接。例如,如果所述类固醇是

以下化合物: 则所述RL可如下所示与所述叔胺连接:



[0288] 在一些实施例,本发明提供了如下所示化合物:

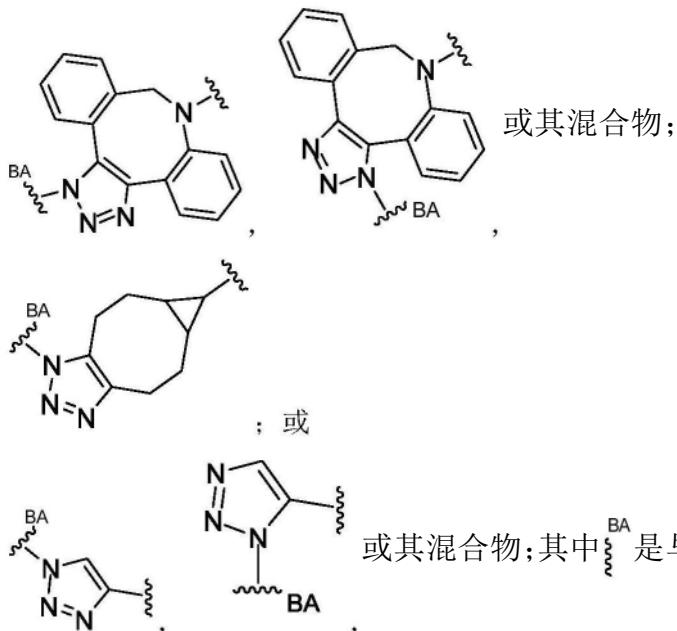


其中：

BL是具有上述定义的结合剂连接体；

R^a和R^b在每种情况下，分别独立地为-H或烷基。

[0289] 在一些实施例，本发明的RG^N衍生自点击化学活性基团。在一些实施例，RG^N是：



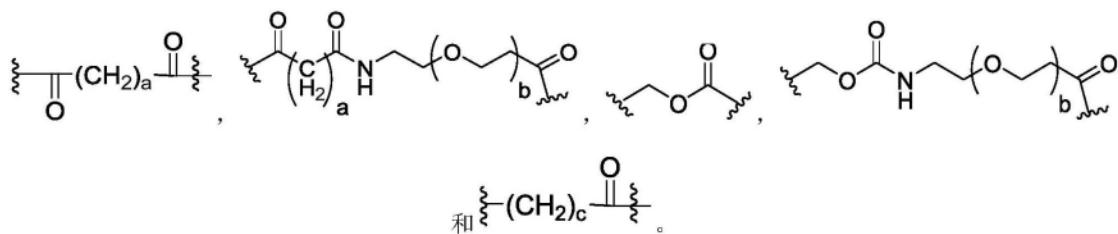
[0290] 在一些其他实施例，本发明的RG^N选自与抗体或其抗原结合片段上的半胱氨酸残

基或赖氨酸残基反应的基团。在一些实施例，RG^N是

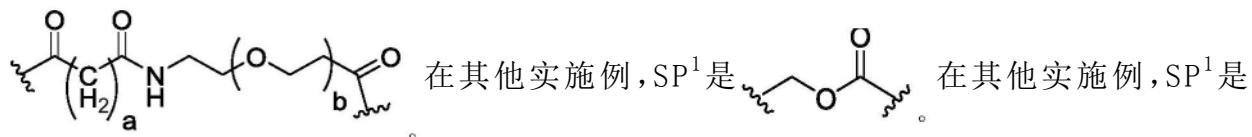
其中 S 是与结合剂（例如抗

体）的半胱氨酸连接的键。在一些实施例，RG^N是

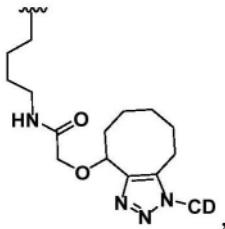
[0291] 在一些实施方案，SP¹选自：



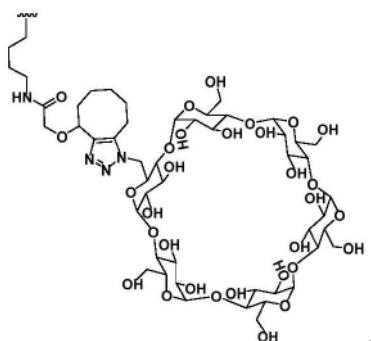
在一些实施例， SP^1 是 $\text{O}-(\text{CH}_2)_a-\text{O}$ 在一些其他实施例， SP^1 是



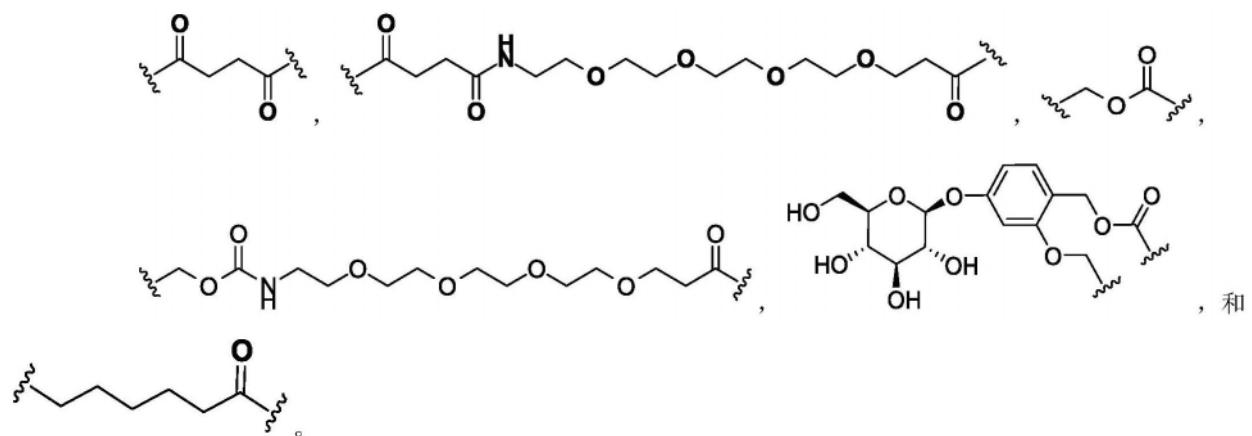
例，下标a、b和c在每种情况下，独立地为从1至20的整数。



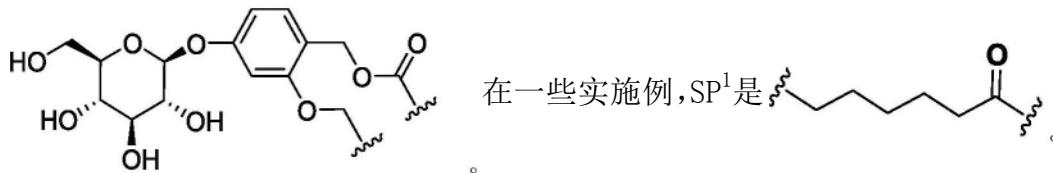
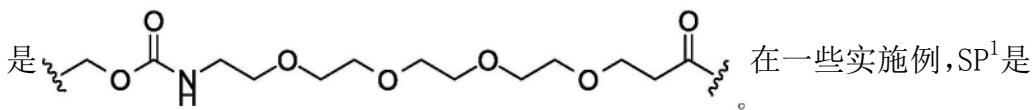
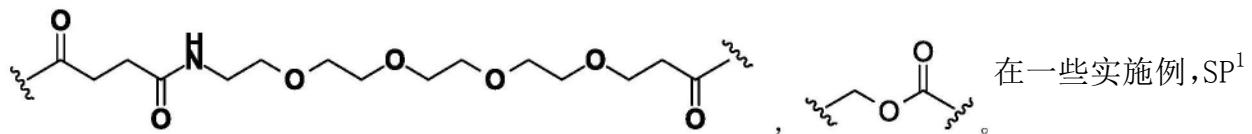
[0292] 在一些实施方案， R^{AA3} 选自  其中CD是环糊精部分。在一些实施方

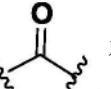
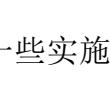


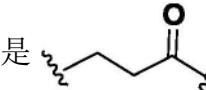
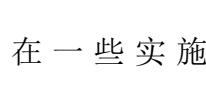
[0293] 在任一式(II)、(IIa)、(IIb)、或(IIc)所示化合物中,SP¹选自:

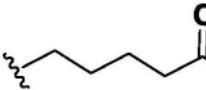
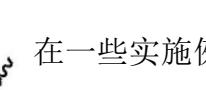


[0294] 在一些实施例，S P¹ 是  在一些实施例，S P¹ 是

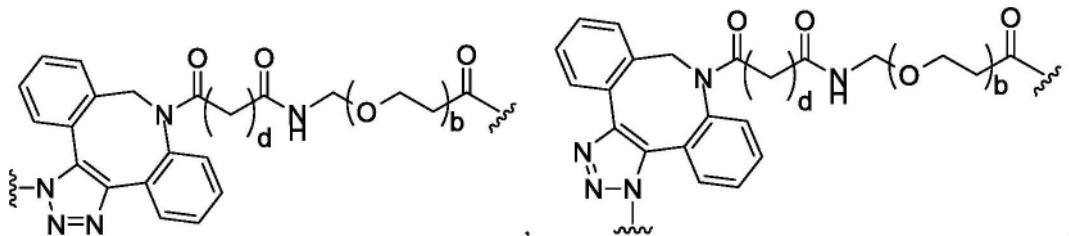


[0295] 在一些实施例, SP^1 是 。在一些实施例, SP^1 是 。在一些实施例, SP^1 是 .

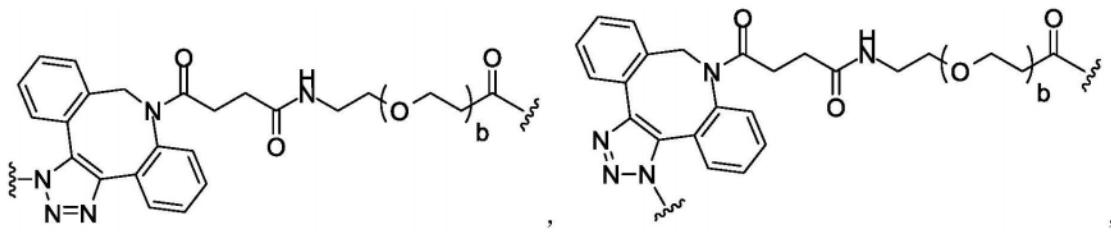
是 。在一些实施例, SP^1 是 。在一些实施例, SP^1 是 .

。在一些实施例, SP^1 是 。

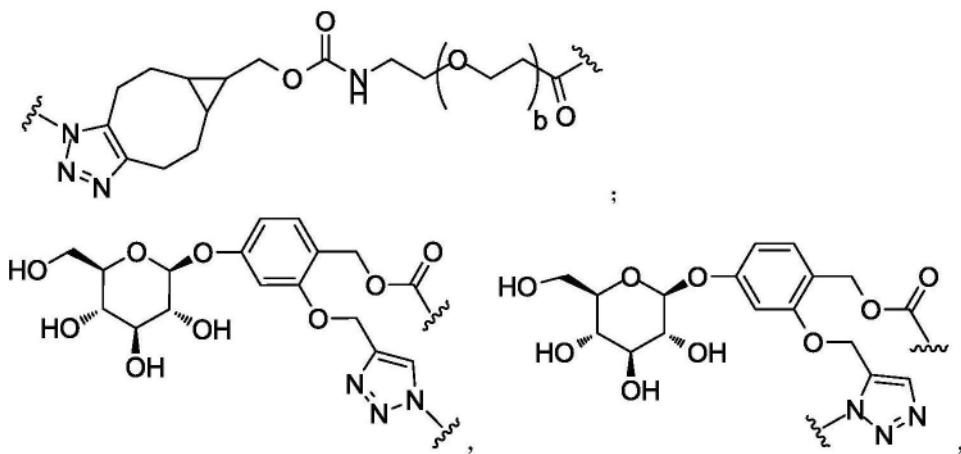
[0296] 在一些实施方案, $BL-SP^1$ 是:



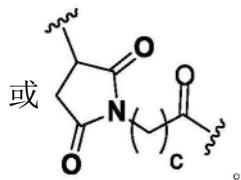
或其混合物;



或其混合物;



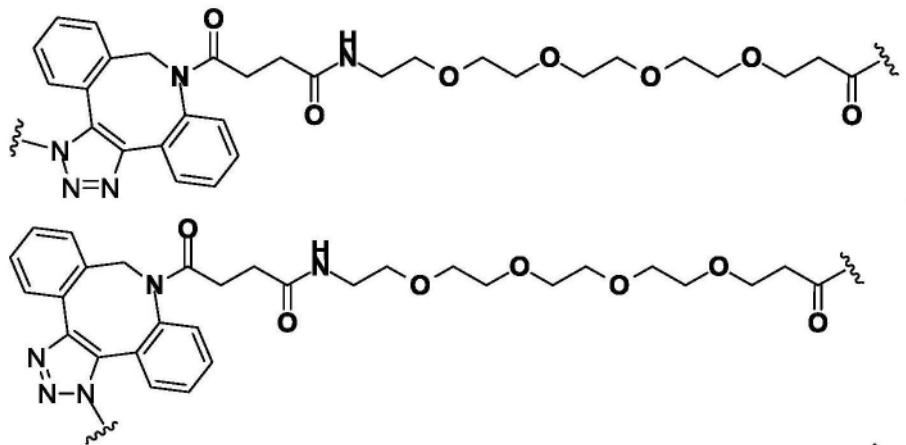
或其混合物；



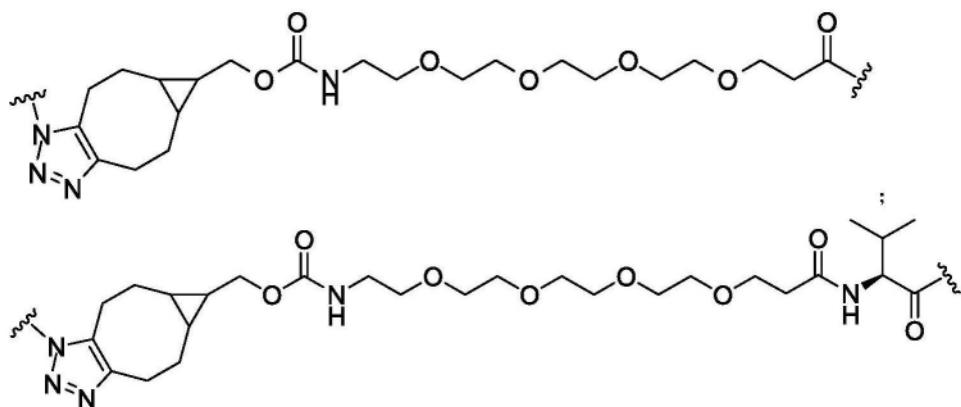
在这些实施例的一些中，下标b、c和d在每种情况下，独立地为从

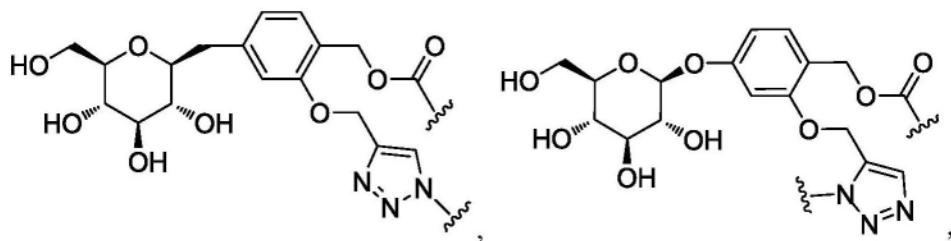
1至20的整数。

[0297] 在式(II)、(IIa)、(IIb)、或(IIc)任一所示化合物中，BL-SP¹选自：

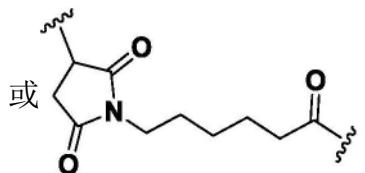


或其混合物；





或其混合物；



[0298] 在一些实施方案，A是选自缬氨酸-瓜氨酸，瓜氨酸-缬氨酸，赖氨酸-苯丙氨酸，苯丙氨酸-赖氨酸，缬氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-缬氨酸，苏氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-苏氨酸，丝氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-丝氨酸，苯丙氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-苯丙氨酸，亮氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-亮氨酸，异亮氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-异亮氨酸，甘氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-甘氨酸，谷氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-谷氨酸，瓜氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-瓜氨酸，丙氨酸-天冬酰胺，或天冬酰胺-丙氨酸的肽。

[0299] 在一些实施例，A是缬氨酸-瓜氨酸，或瓜氨酸-缬氨酸。

[0300] 在一些实施例，A是缬氨酸-丙氨酸，或丙氨酸-缬氨酸。

[0301] 在一些实施例，A是赖氨酸-缬氨酸-丙氨酸，或丙氨酸-缬氨酸-赖氨酸。

[0302] 在一些实施例，A是赖氨酸-缬氨酸-瓜氨酸，或瓜氨酸-缬氨酸-赖氨酸。

[0303] 在一些实施例，A是缬氨酸。

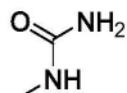
[0304] 在一些实施例，A是丙氨酸。

[0305] 在一些实施例，A是瓜氨酸。

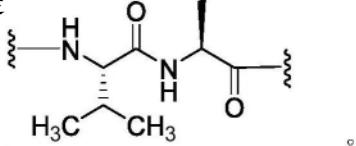
[0306] 在一些实施例，A是 在这些实施例的一些中，R^{AA1}是氨基酸侧链，和其中R^{AA2}是氨基酸侧链。

[0307] 在一些实施例，A是 在这些实施例的一些中，R^{AA1}是氨基酸侧链，R^{AA2}是氨基酸侧链，和R^{AA3}是直接或间接与环糊精部分连接的氨基酸侧链。

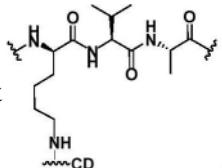
[0308] 在一些实施例，A是



[0309] 在一些实施例,A是



[0310] 在一些实施例,A是

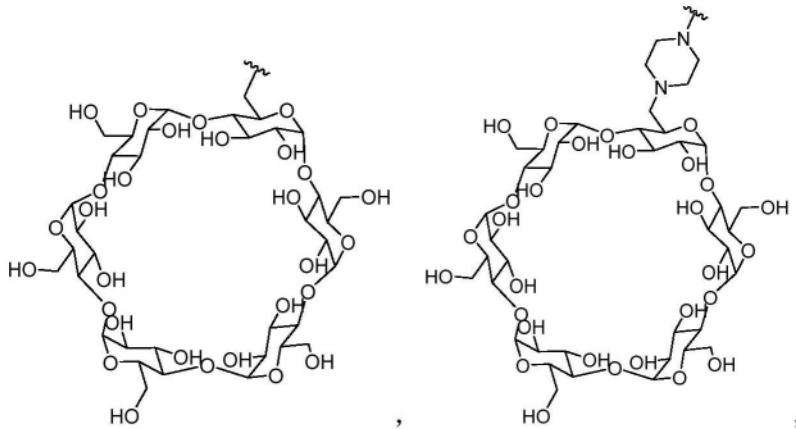


其中 **~~~~CD** 表示直接或间接与环糊精部分

,

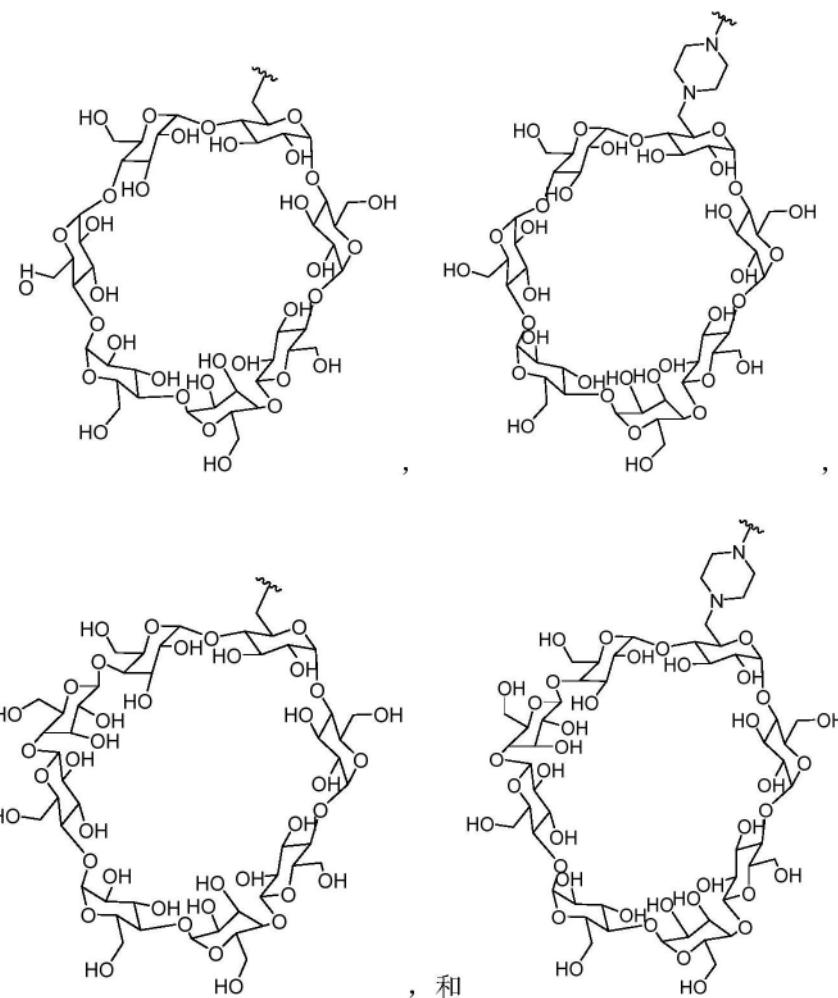
连接的键。

[0311] 在一些实施例,包括任何前述实施例,所述CD在每种情况下,独立地选自:

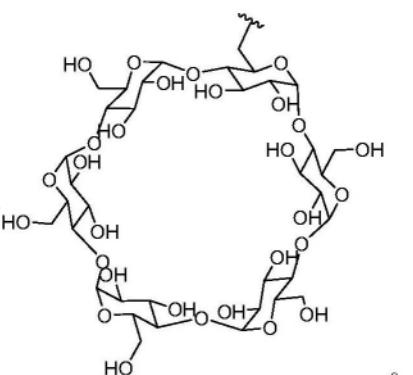


,

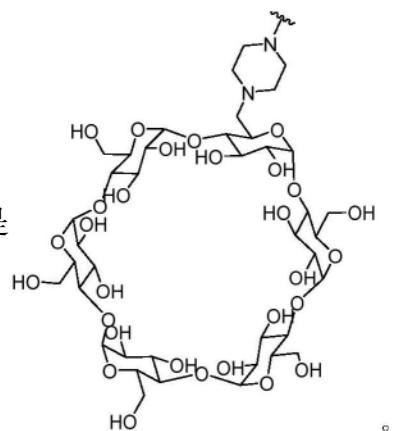
,



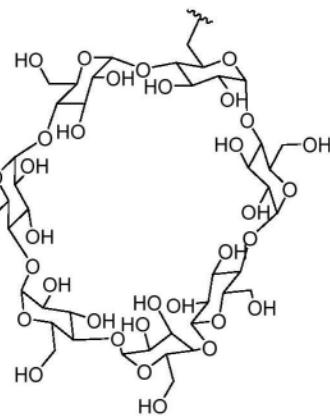
在一些实施例，所述CD是



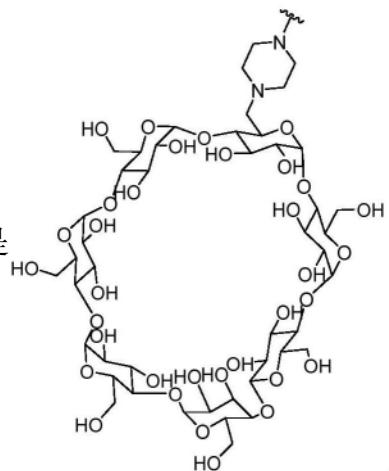
在一些实施例，所述CD是



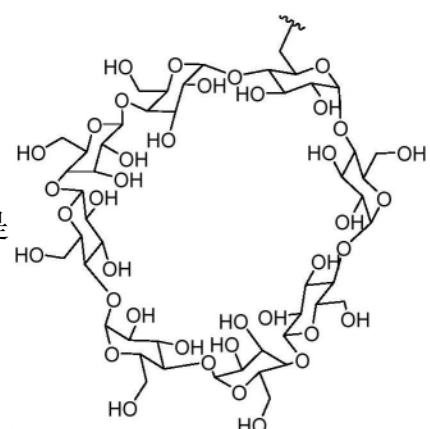
在一些实施例，所述CD是



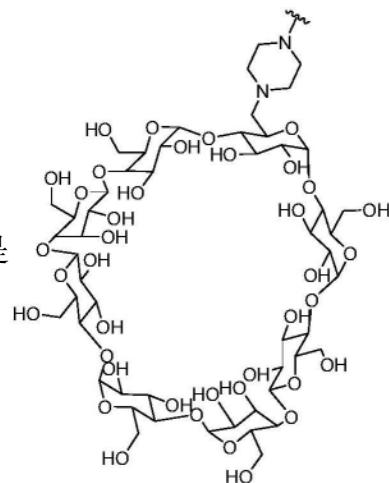
在一些实施例，所述CD是

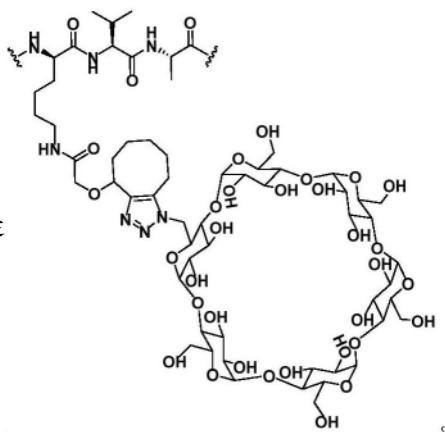


在一些实施例，所述CD是



在一些实施例，所述CD是





[0312] 在一些实施例,A是

[0313] 在一些实施例,R^a是H。

[0314] 在一些实施例,R^a是烷基。

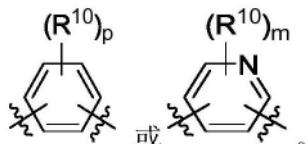
[0315] 在一些实施例,R^a是甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、或戊基。

[0316] 在一些实施方案,B是芳基。

[0317] 在一些实施例,B是苯基。

[0318] 在式(II)、(IIa)、(IIb)、或(IIc)所示化合物的一些实施例中,B是苯基或吡啶基。

[0319] 在本发明的一些实施例中,B是:

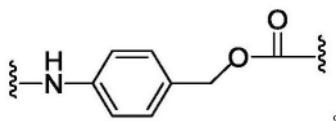


在这些实施例中,R¹⁰是烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、卤素、卤代烷基、卤代烷氧基、杂芳基、杂环烷基、羟基、氰基、硝基、-OR^A、-SO₂R^A、-C(=O)R^A、NR^aR^b、或叠氮基。在这些实施例中,下标p和m在每种情况下,独立地选自从0至4的整数。

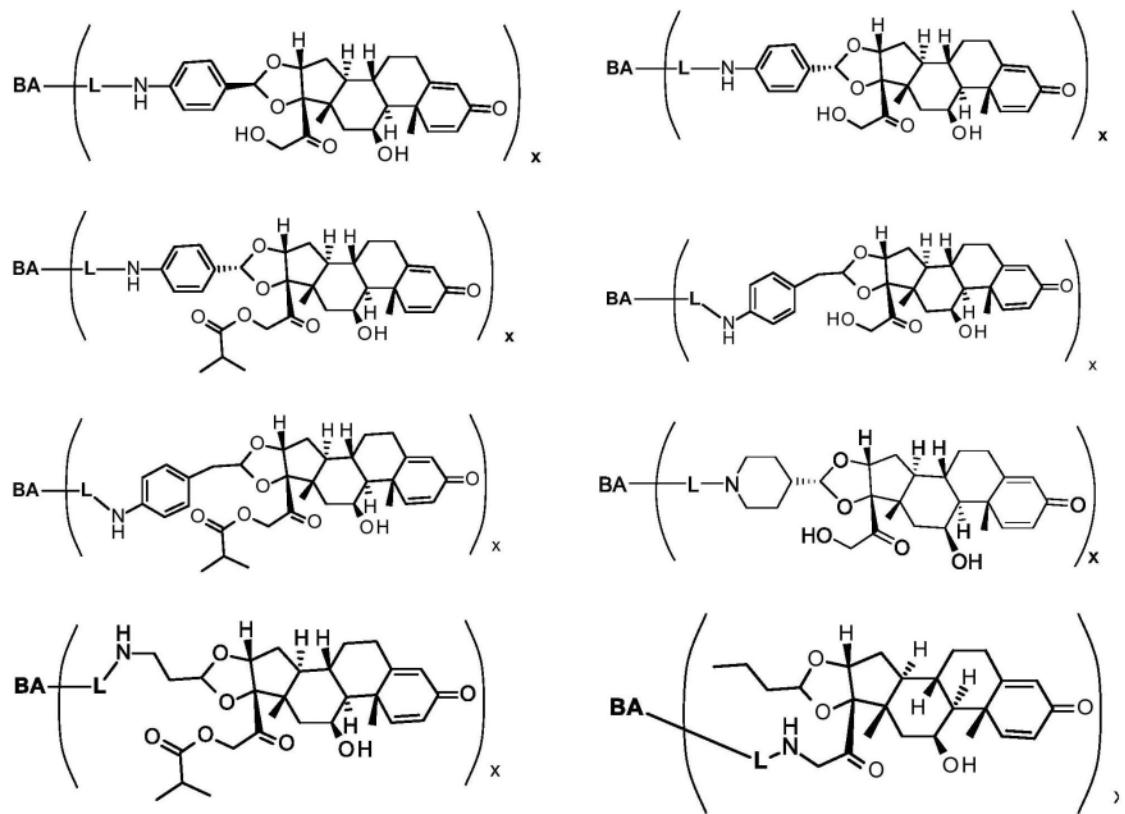
[0320] 在本发明的一些实施例中,B是: 在这些实施例中,p是0、1、2、3或4。在

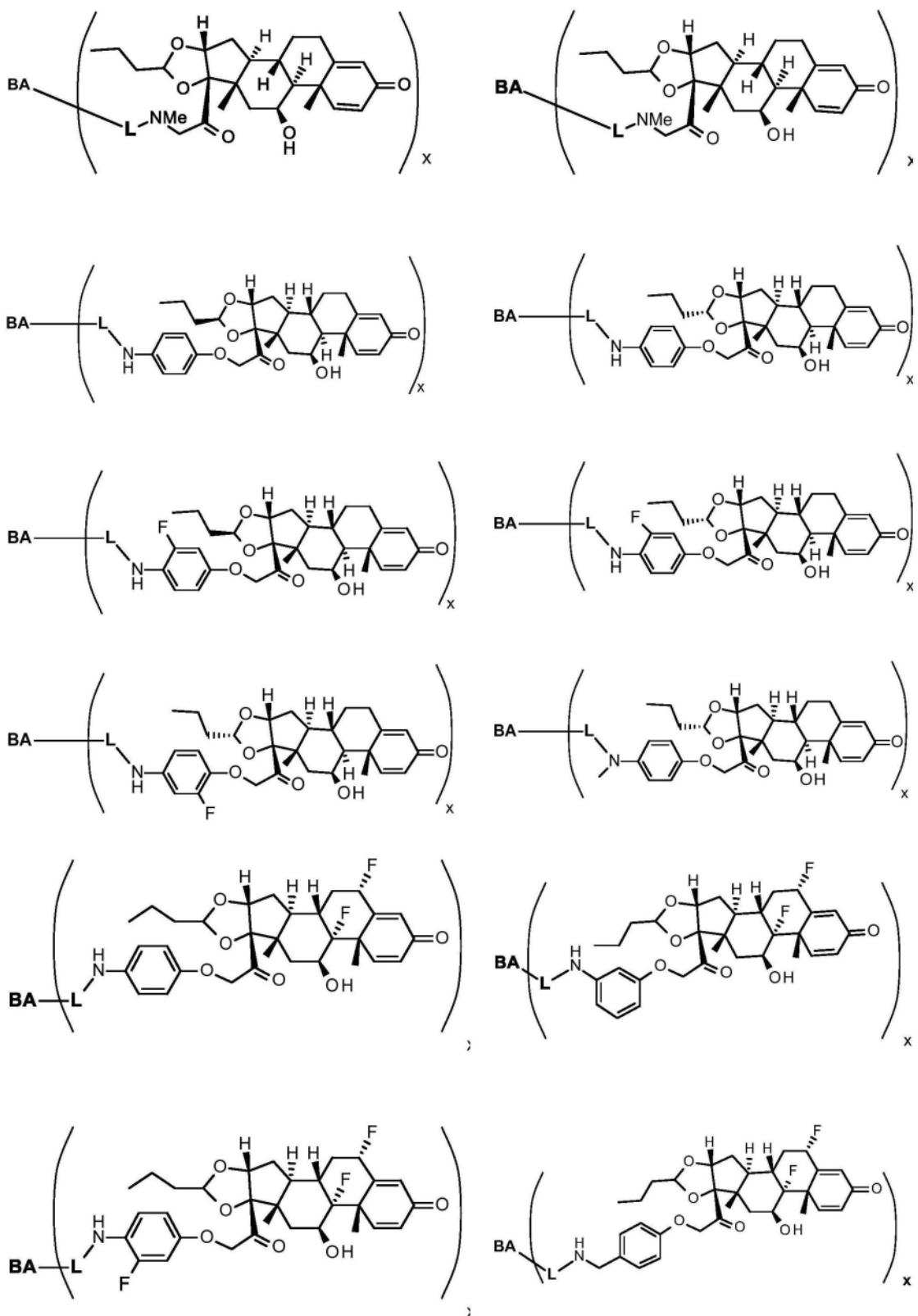
这些实施例的一些中,R¹在每种情况下,独立地为烷基、烷氧基、卤代烷基、或卤素。在一些实施例,R¹是烷基。在一些实施例,R¹是烷氧基。在一些实施例,R¹是卤代烷基。在一些实施例,R¹是卤素。

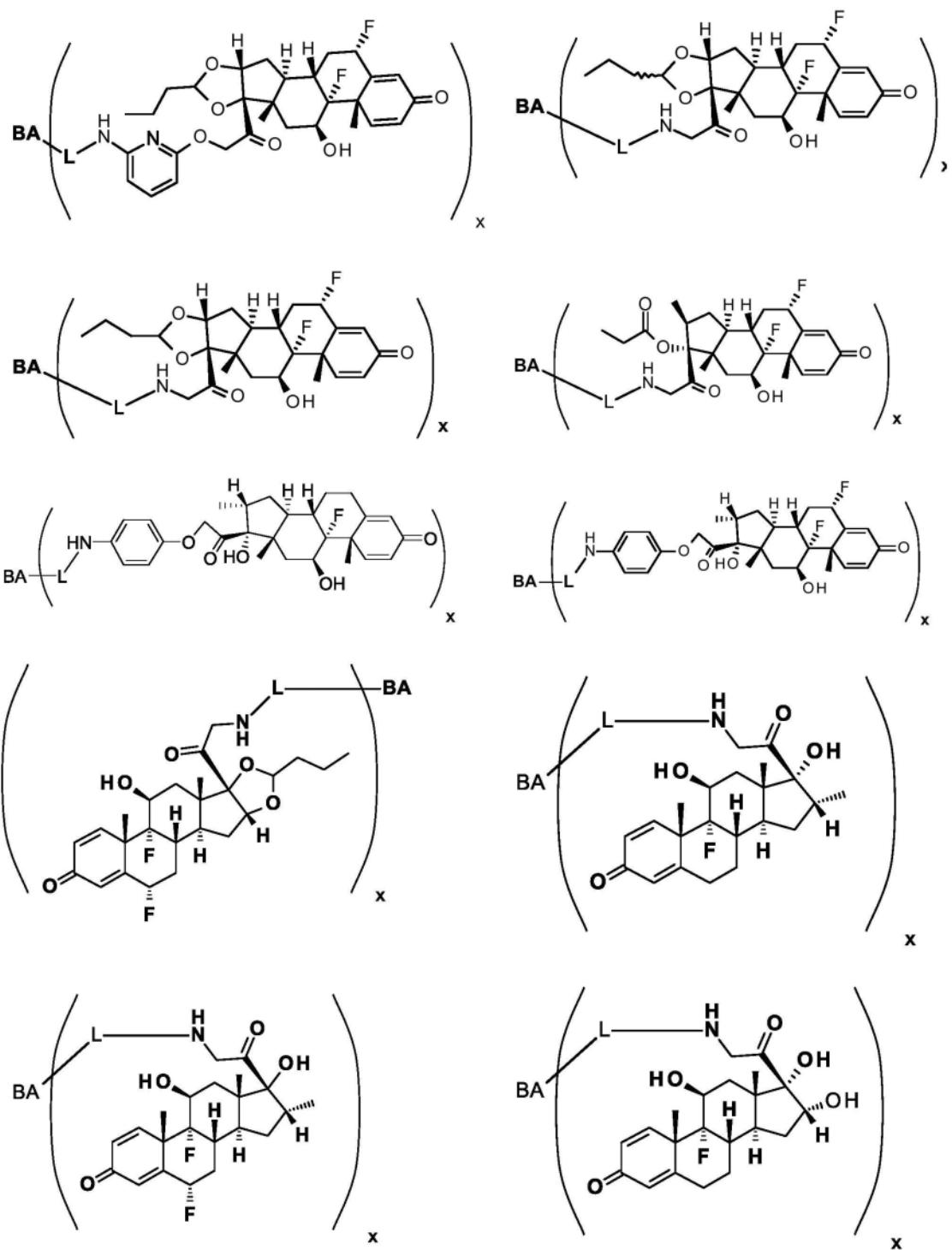
[0321] 在式(BL^A)的一些实施方案中,所述-(NR^a)_s-(B)_t-(CH₂)_u-(O)_v-(SP²)_w是:

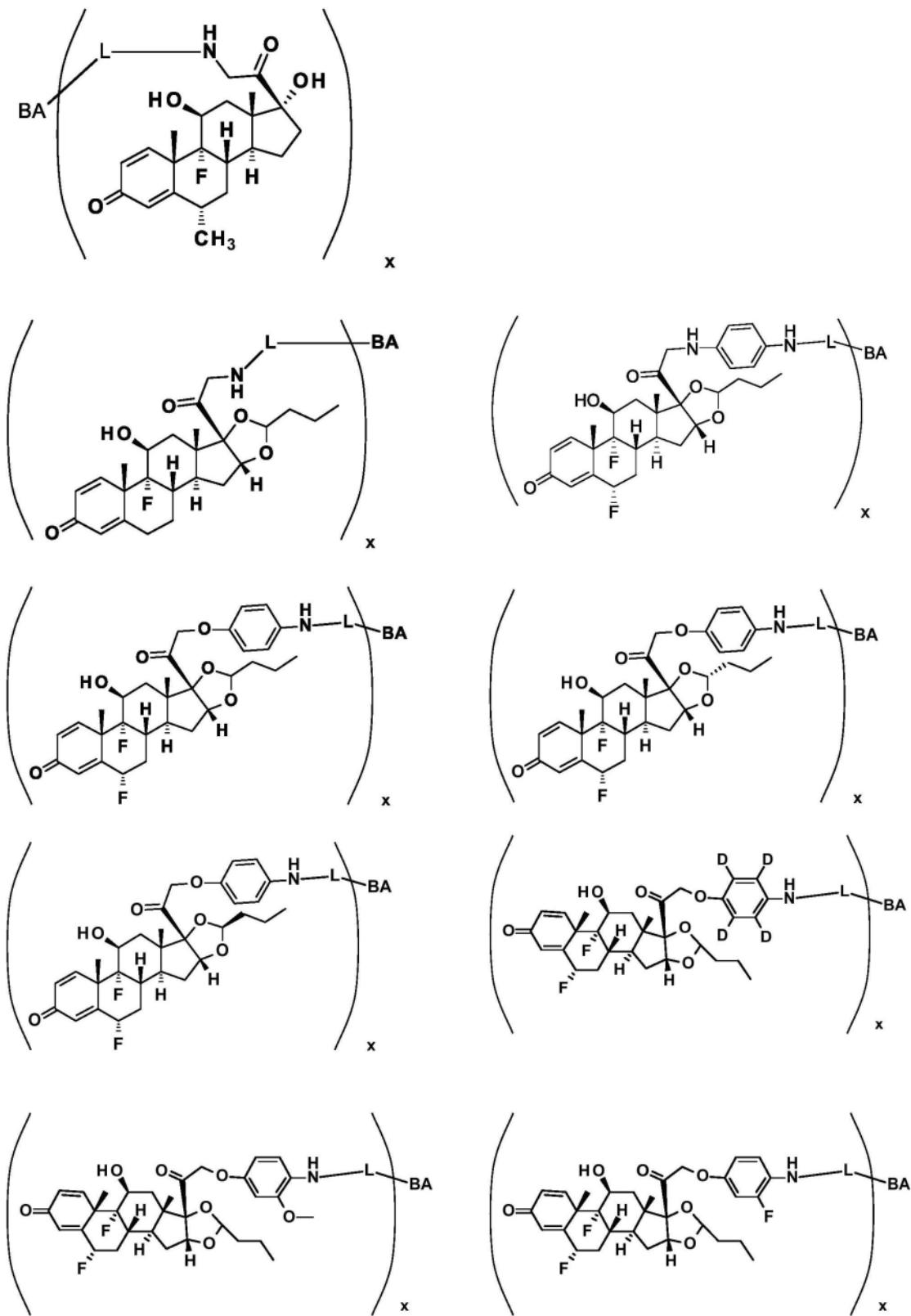


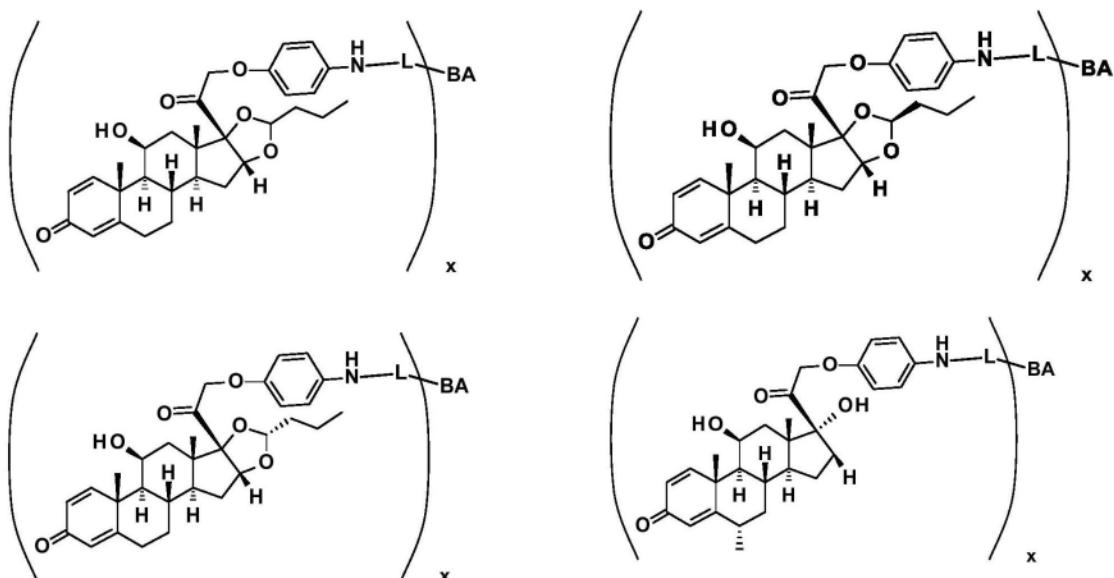
[0322] 本发明提供了具有以下通式的抗体-类固醇偶联物:







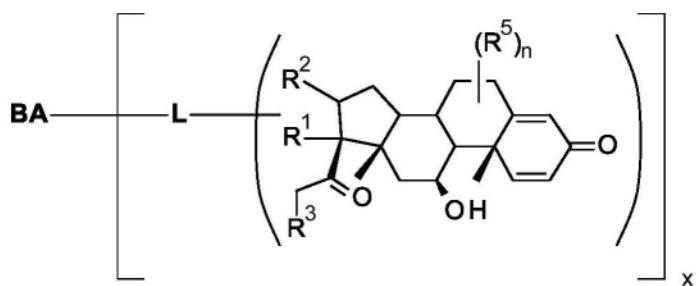




或其药学上可接受的盐或溶剂化物；

其中BA是结合剂，和x是从1至30的整数。在特定实施方案中，BA是抗体。在一些实施方案，x是从1至4的整数。在一些实施方案，x是4。在一些实施方案，x是2。

[0323] 本发明提供了式1200所示的抗体-类固醇偶联物：



1200

或其药学上可接受的盐、溶剂化物、或立体异构体，其中：BA是结合剂；各L是任选的连接体；BA或L与R³或R⁴共价连接；和x是从1至30的整数。本领域技术人员将认识到，当存在L时，L与R³或R⁴连接；当L不存在时，BA与R³或R⁴连接。下面将详细描述基团R³或R⁴。在特定实施方案中，BA是抗体。在一些实施方案，x是从1至4的整数。在一些实施方案，x是4。在一些实施方案，x是2。

[0324] 在式1200的一些实施方案中，R¹和R²分别独立地选自由-H、-OH、烷基、-O-C(0)-烷

基、和卤素组成的组；或R¹和R²一起形成 。在某些实施方案，R³是选自由-亚烷基-

NR^aR^b、-X-亚芳基-Y-NR^aR^b、-X-亚杂芳基-Y-NR^aR^b、和含N的杂环烷基组成的组；其中X不存在，或X是-N-、-CH₂-、或-O-；其中Y不存在，或Y是-CH₂-；和R⁴是选自由烷基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、杂芳基、-亚烷基-NR^aR^b、-X-亚芳基-Y-NR^aR^b、-X-亚杂芳基-Y-NR^aR^b、和含N的杂环烷基组成的组；其中X不存在，或X是-N-、-CH₂-、或-O-；其中Y不存在，或Y是-CH₂-。

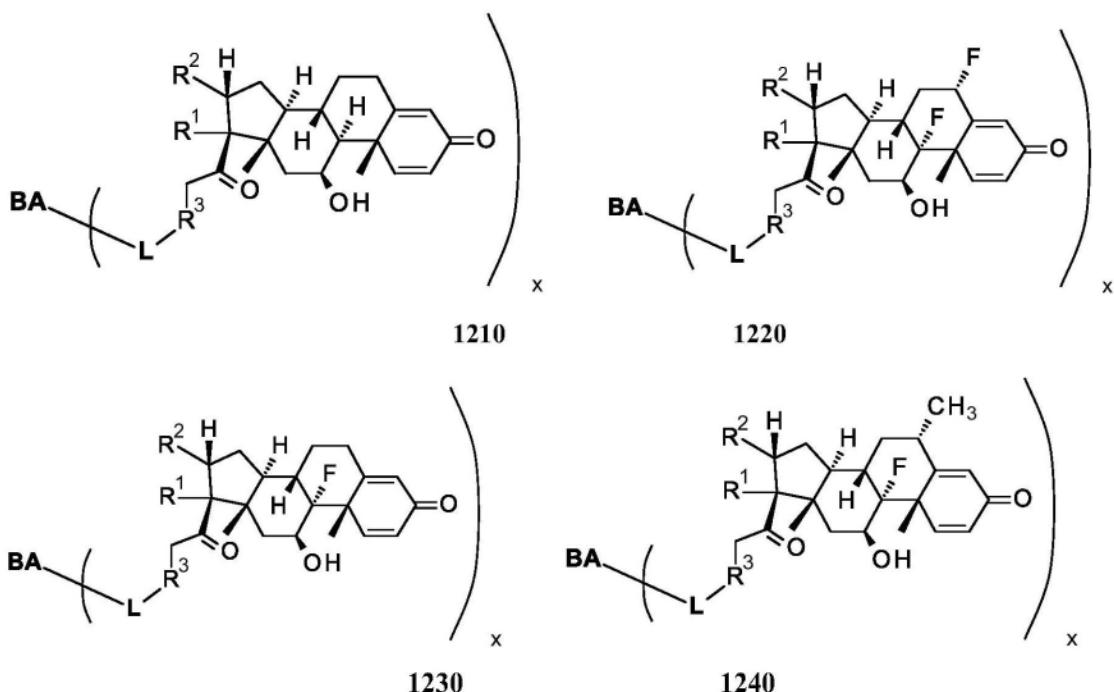
[0325] 在式1200的某些实施方案中，R³是选自由-OH、-O-C(0)-烷基、-O-芳基、-NR^aR^b、-亚烷基-NR^aR^b、-X-亚芳基-Y-NR^aR^b、-X-亚杂芳基-Y-NR^aR^b、和含N的杂环烷基组成的组；其中X

不存在,或X是-N-、-CH₂-、或-O-;其中Y不存在,或Y是-CH₂-;R⁴是选自由-亚烷基-NR^aR^b、-X-亚芳基-Y-NR^aR^b、-X-亚杂芳基-Y-NR^aR^b、和含N的杂环烷基组成的组;其中X不存在,或X是-N-、-CH₂-、或-O-;其中Y不存在,或Y是-CH₂-。

[0326] 在式1200的某些实施方案中,R³是-NR^aR^b;和R⁴是烷基。

[0327] 在式1200的每个实施方案中,BA或L与R³或R⁴中的官能团连接。例如,如果R³或R⁴包含氨基基团,则BA或L可与所述氨基基团连接,取代氢原子。在每个实施方案中,R⁵在每种情况下,独立地选自由-OH、卤素、和烷基组成的组的取代基;n是从0至19的整数;和各R⁵位于任何环原子上。在每个实施方案中,R^a和R^b在每种情况下,独立地选自由-H和烷基组成的组;或R^a和R^b环化形成环杂烷基,所述环杂烷基具有3至6个环原子,包括一个杂原子,所述杂原子是同它们连接的所述N原子。在特定实施方案,BA是抗体。在一些实施方案,x是从1至4的整数。在一些实施方案,x是4。在一些实施方案,x是2。

[0328] 本发明提供了式1210、1220、1230、或1240所示的抗体-类固醇偶联物:



或其药学上可接受的盐、溶剂化物、或立体异构体;其中R³与L或BA共价键合。

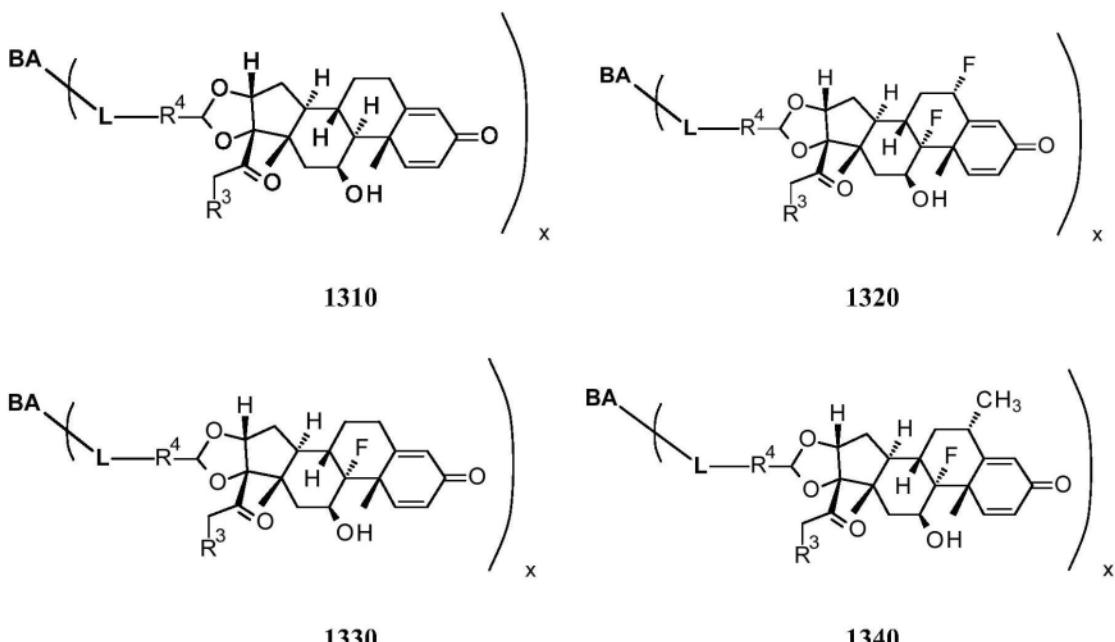
[0329] 在式1210、1220、1230、或1240的某些实施方案中,R¹和R²分别独立地选自由-H、-

OH、烷基、-O-C(0)-烷基、和卤素组成的组;或R¹和R²一起形成 在某些实施方案,R³是

选自由-亚烷基-NR^aR^b、-X-亚芳基-Y-NR^aR^b、-X-亚杂芳基-Y-NR^aR^b、和含N的杂环烷基组成的组;其中X不存在,或X是-N-、-CH₂-、或-O-;其中Y不存在,或Y是-CH₂-;和R⁴是选自由烷基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、杂芳基、-亚烷基-NR^aR^b、-X-亚芳基-Y-NR^aR^b、-X-亚杂芳基-Y-NR^aR^b、和含N的杂环烷基组成的组;其中X不存在,或X是-N-、-CH₂-、或-O-;其中Y不存在,或Y是-CH₂-。在某些实施方案,R³是-NR^aR^b;和R⁴是烷基。在每个实施方案中,BA或L与R³中的氨基基团连接,例如取代氢原子。在每个实施方案中,R^a和R^b在每种情况下,分别独立地选自由-H和烷基组成的组;或R^a和R^b环化形成环杂烷基,所述环杂烷基具有3至6个环原子,包括一个杂原子,所述杂原子是同它们连接的所述N原子。在特定实施方案,BA是抗体。在一些实施方

案,x是从1至4的整数。在一些实施方案,x是4。在一些实施方案,x是2。

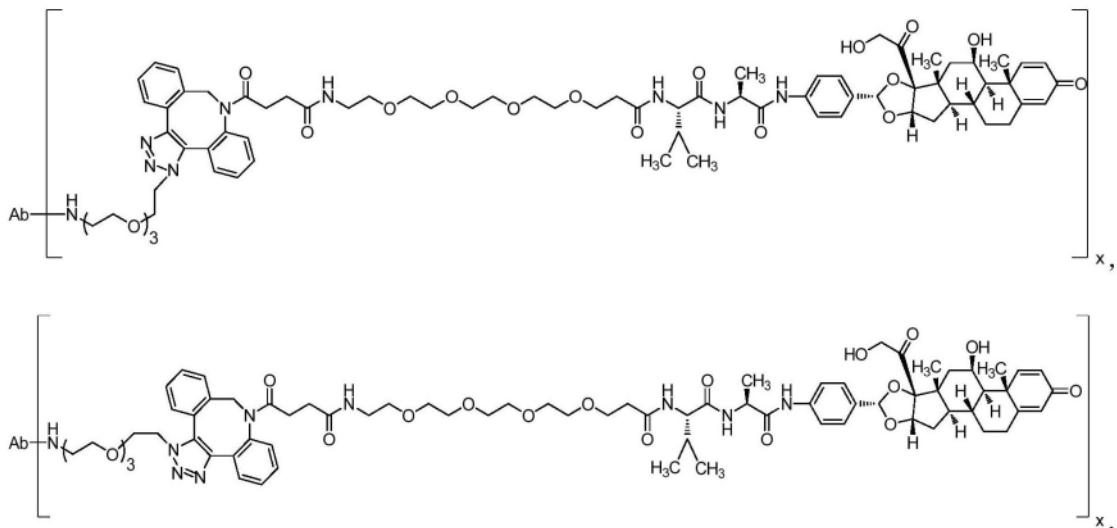
[0330] 本发明提供了式1310、1320、1330、或1340所示的抗体-类固醇偶联物:



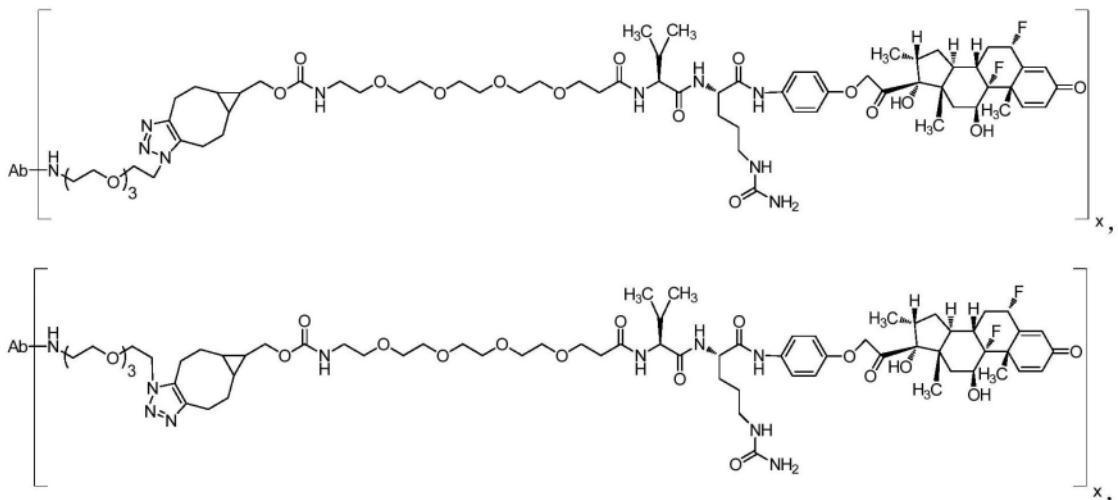
或其药学上可接受的盐、溶剂化物、或立体异构体;其中R⁴与L或BA共价键合。

[0331] 在式1310、1320、1330、或1340的某些实施方案中,R³是选自由-OH、-O-C(=O)-烷基、-O-芳基、-NR^aR^b、-亚烷基-NR^aR^b、-X-亚芳基-Y-NR^aR^b、-X-亚杂芳基-Y-NR^aR^b、和含N的杂环烷基组成的组;其中X不存在,或X是-N-、-CH₂-、或-O-;其中Y不存在,或Y是-CH₂-;和R⁴是选自由-亚烷基-NR^aR^b、-X-亚芳基-Y-NR^aR^b、-X-亚杂芳基-Y-NR^aR^b、和含N的杂环烷基组成的组;其中X不存在,或X是-N-、-CH₂-、或-O-;其中Y不存在,或Y是-CH₂-。在每个实施方案中,BA或L与R⁴中的氨基基团连接,例如取代氢原子。在每个实施方案中,R^a和R^b在每种情况下,分别独立地选自由-H和烷基组成的组;或R^a和R^b环化形成环杂烷基,所述环杂烷基具有3至6个环原子,包括一个杂原子,所述杂原子是同它们连接的所述N原子。在特定实施方案,BA是抗体。在一些实施方案,x是从1至4的整数。在一些实施方案,x是4。在一些实施方案,x是2。

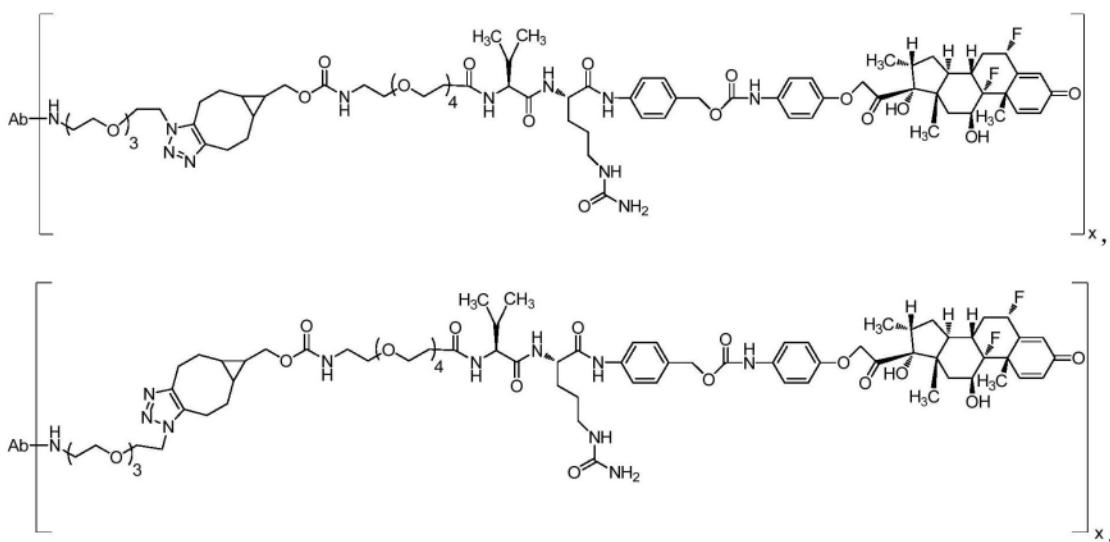
[0332] 本发明还提供了具有以下通式所示结构的抗体-类固醇偶联物:



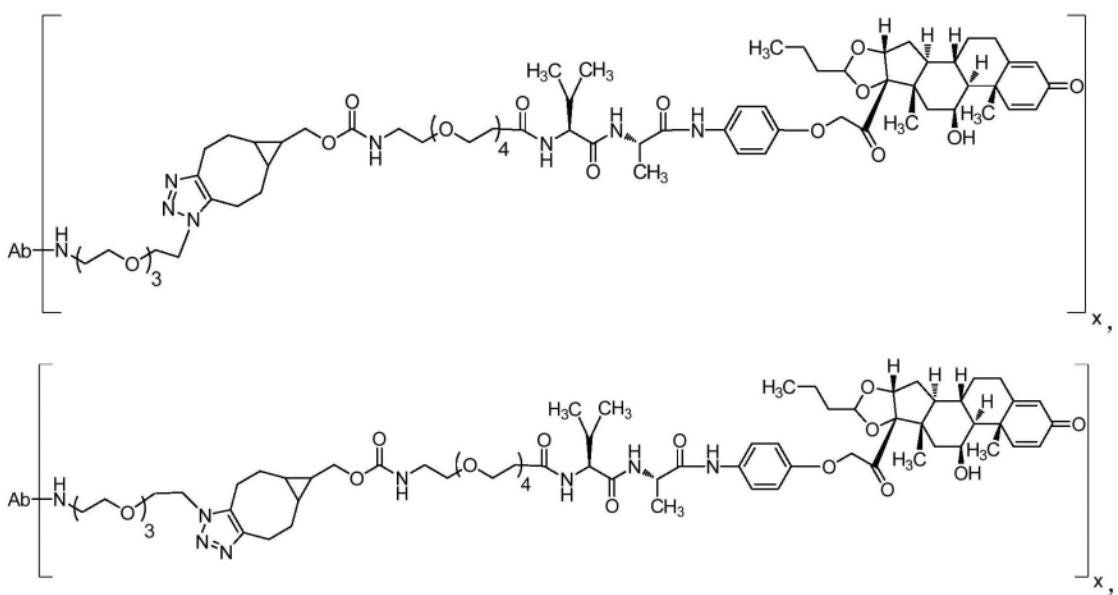
或其混合物；



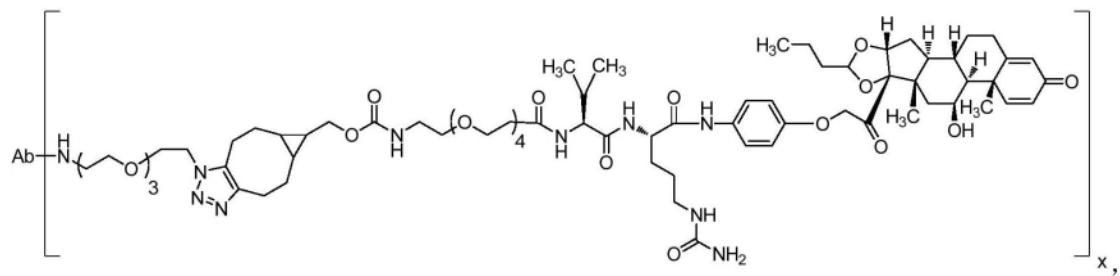
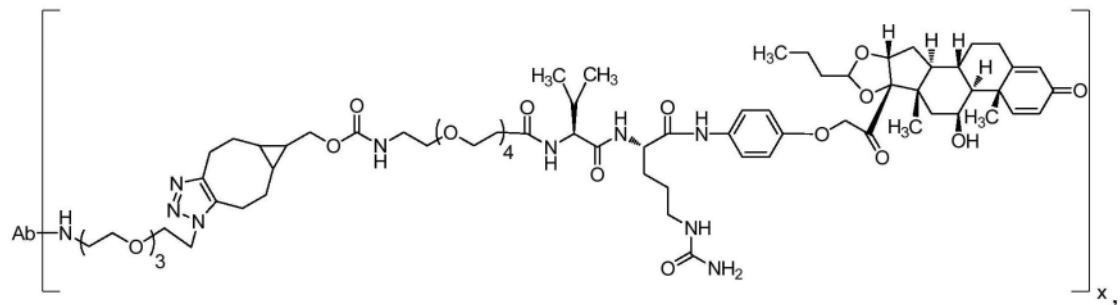
或其混合物；



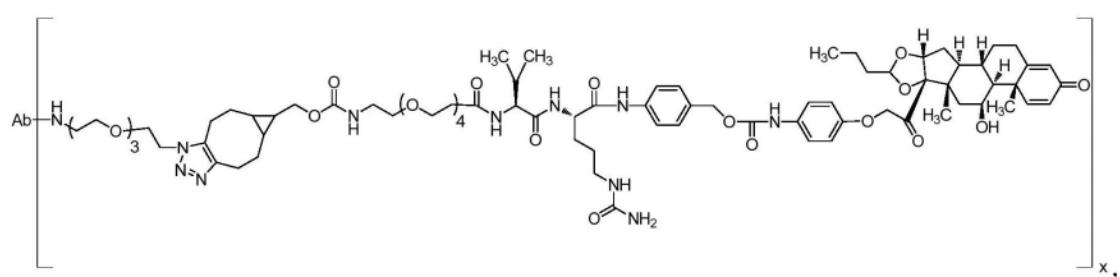
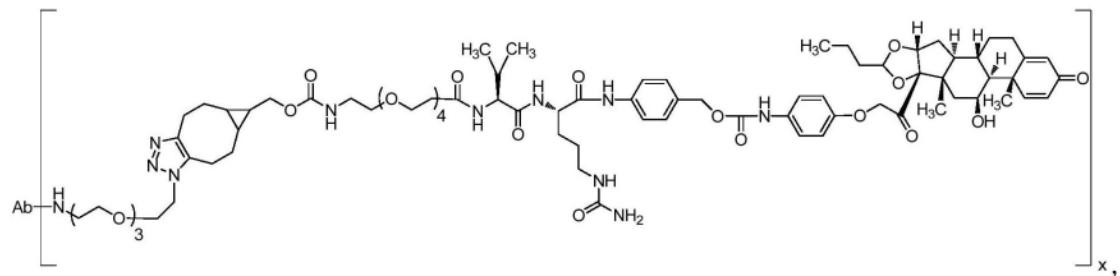
或其混合物；



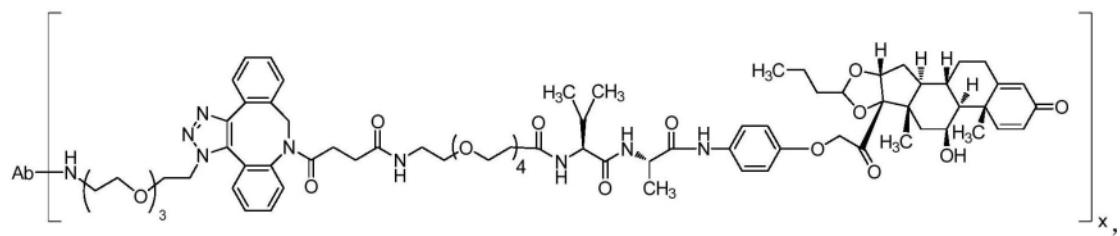
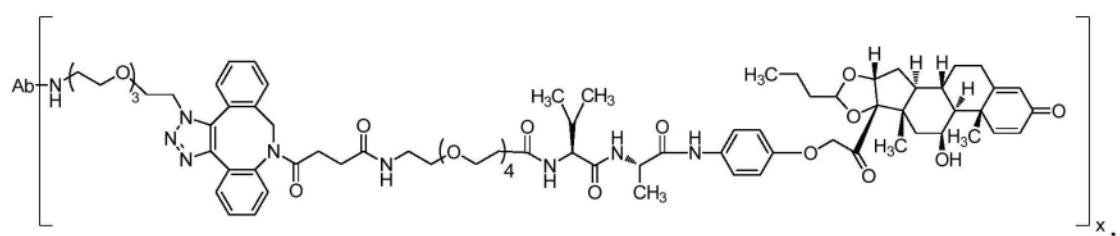
或其混合物；



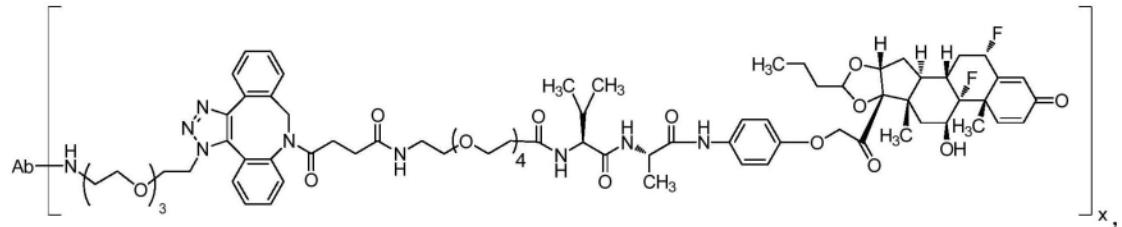
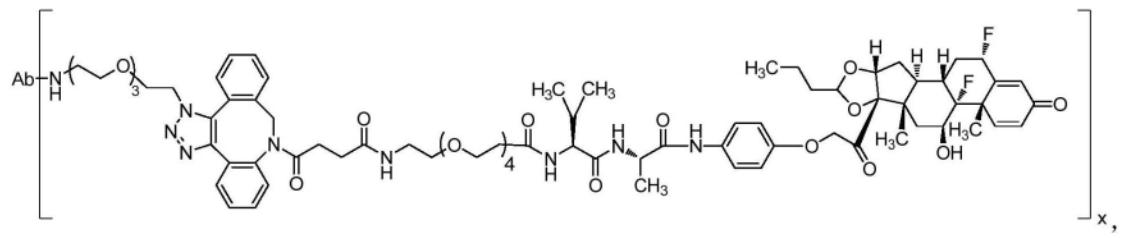
或其混合物；



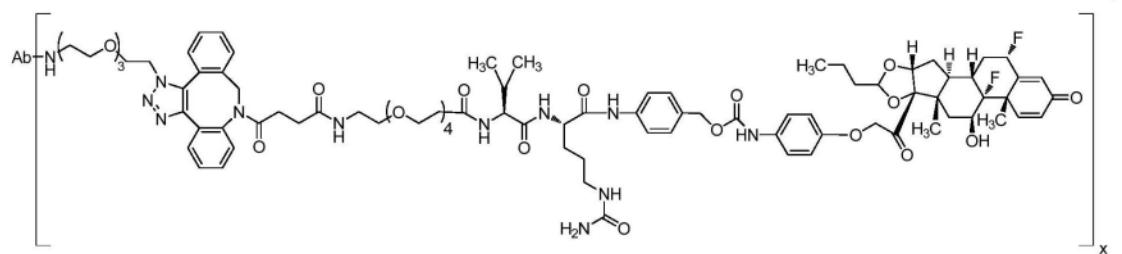
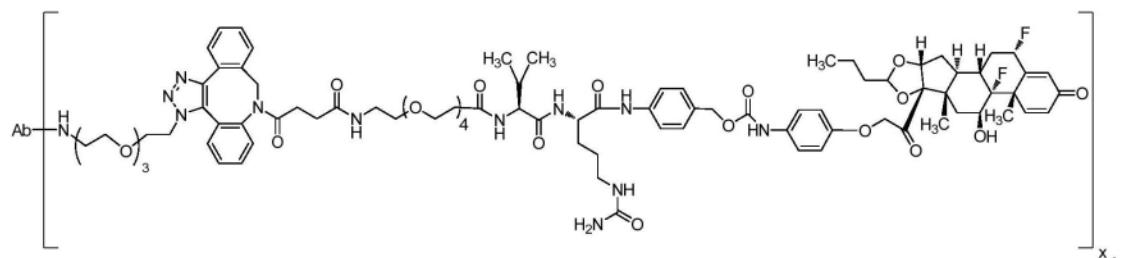
或其混合物；



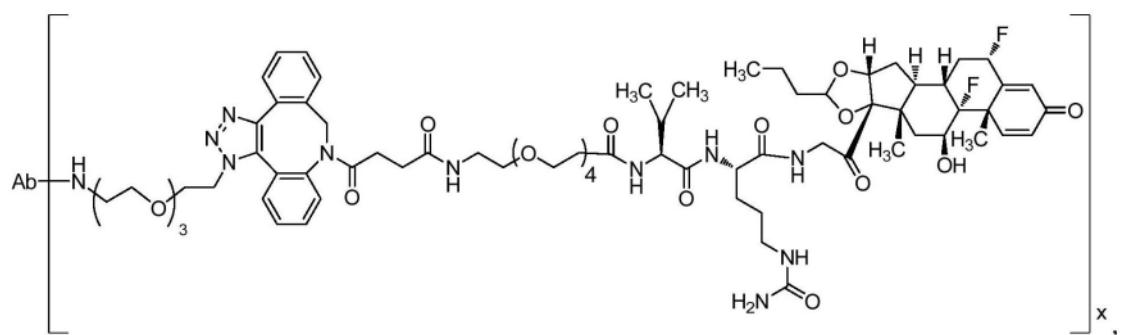
或其混合物；

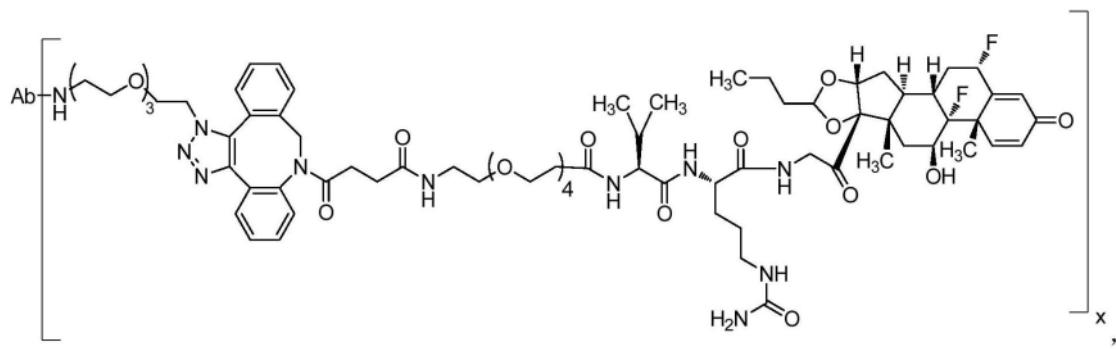


或其混合物；

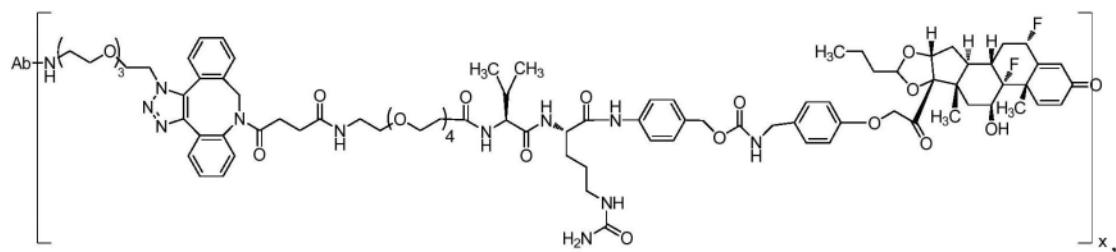
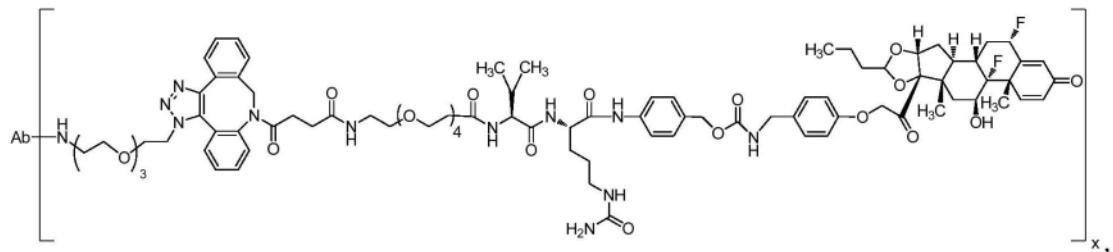


或其混合物；





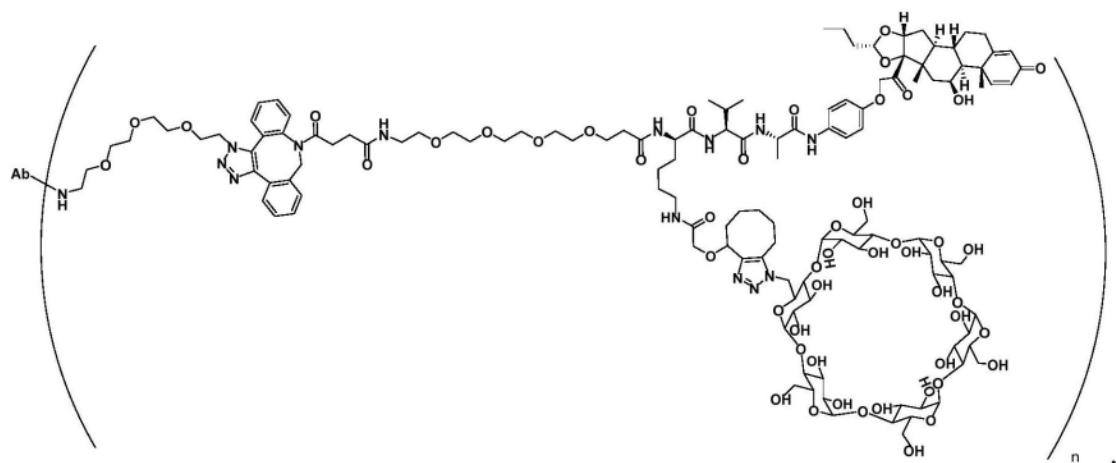
或其混合物；

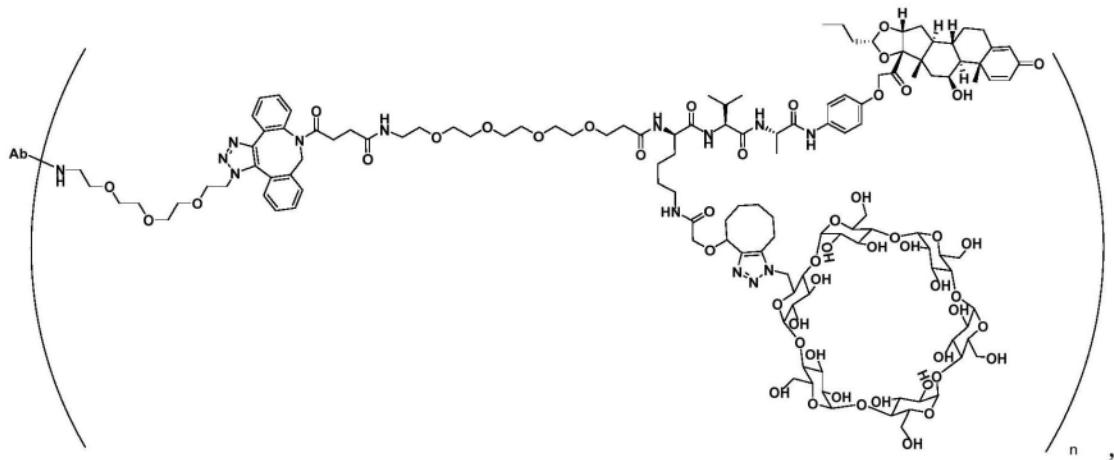


或其混合物；

其中Ab是抗体，和x是从1至30的整数。在一些实施方案，x是从1至4的整数。在一些实施方案，x是4。在一些实施方案，x是2。

[0333] 本发明还提供了具有以下通式所示结构的抗体-类固醇偶联物：

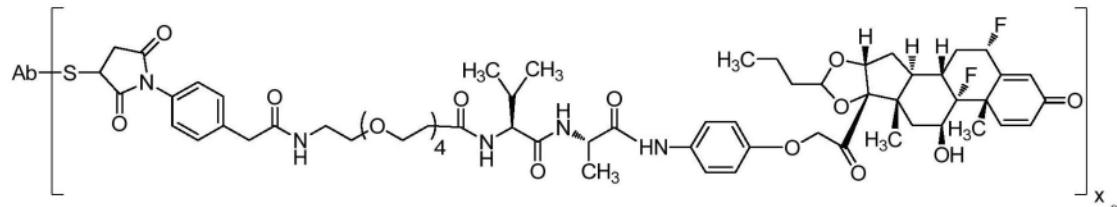




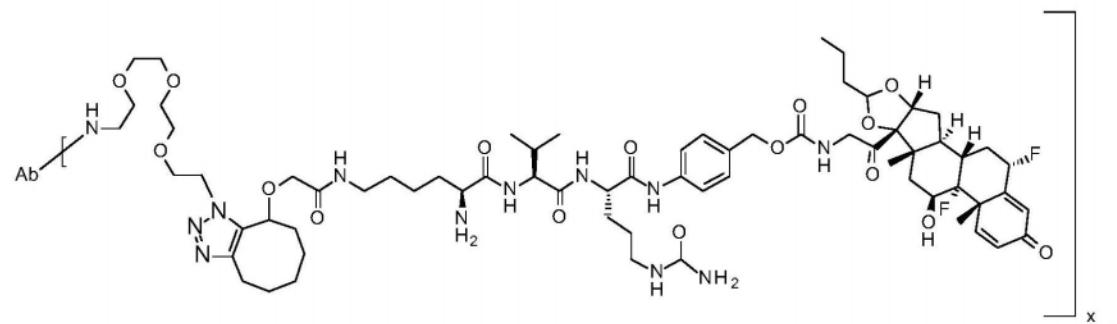
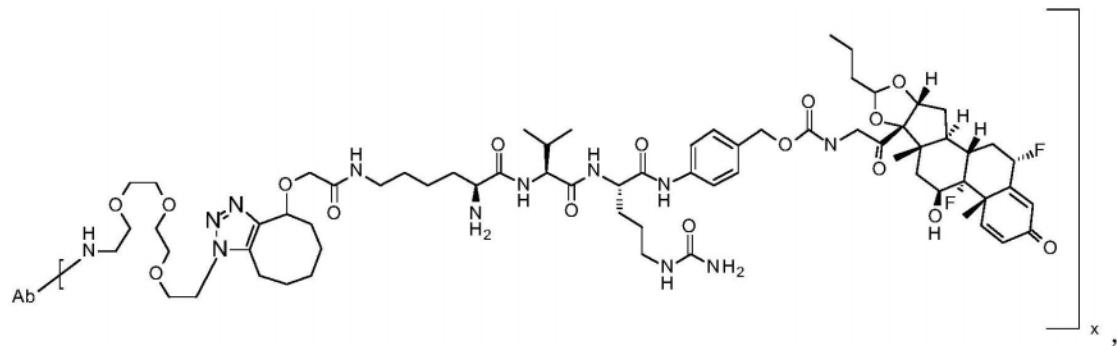
或其混合物。

在特定实施方案，Ab是抗体，和x是从1至30的整数。在一些实施方案，x是从1至4的整数。在一些实施方案，x是4。在一些实施方案，x是2。

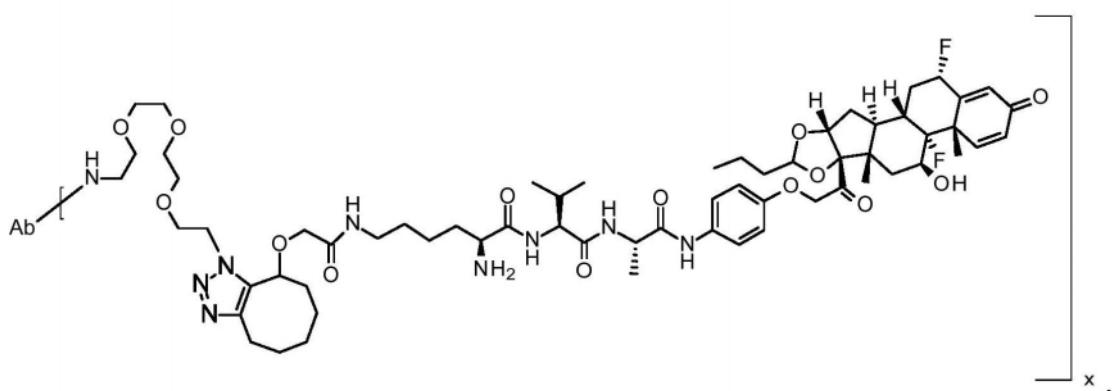
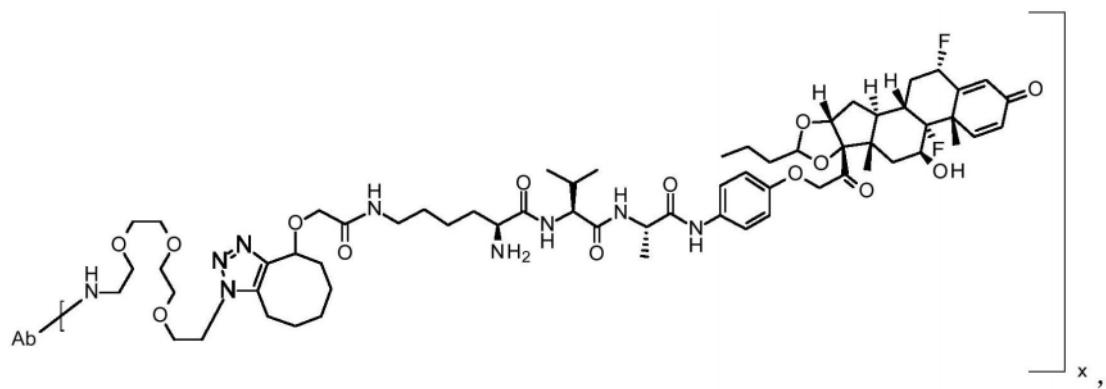
[0334] 本发明还提供了具有以下通式所示结构的抗体-类固醇偶联物：



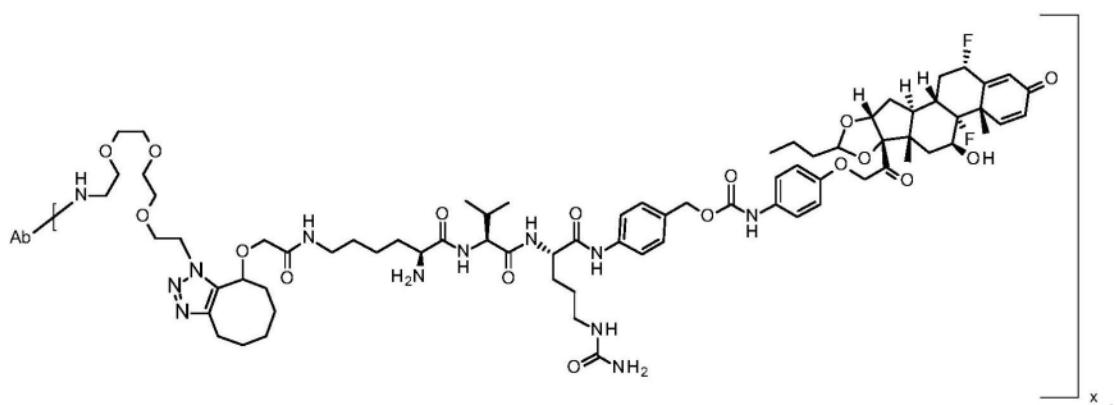
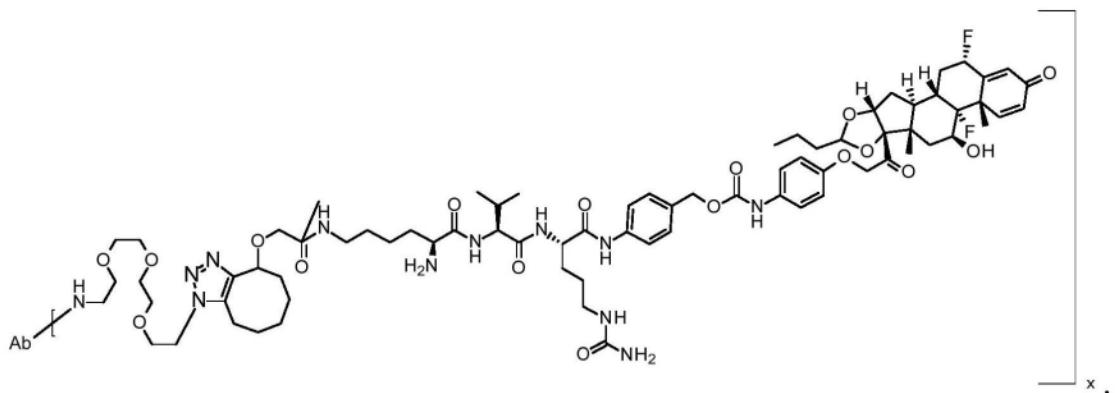
[0335] 本发明还提供了具有以下通式所示结构的抗体-类固醇偶联物：



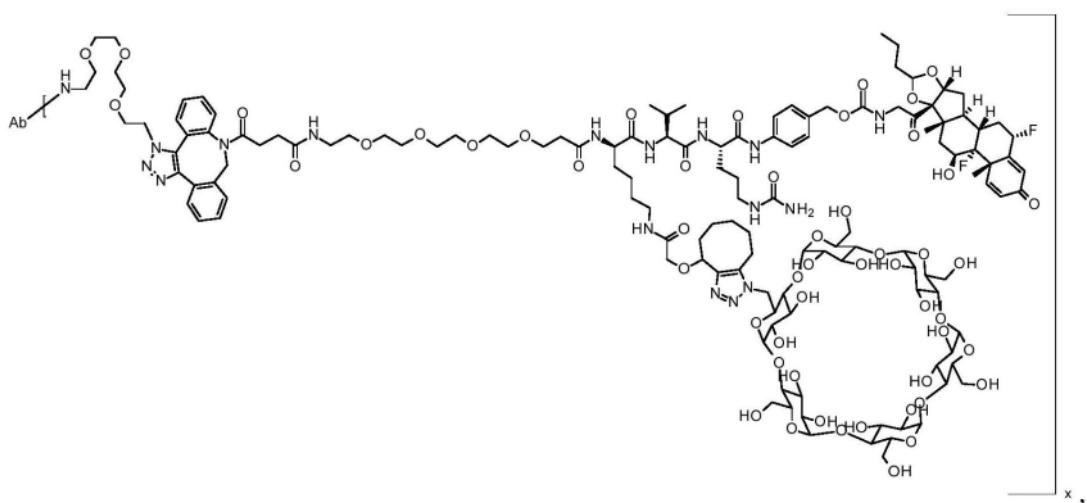
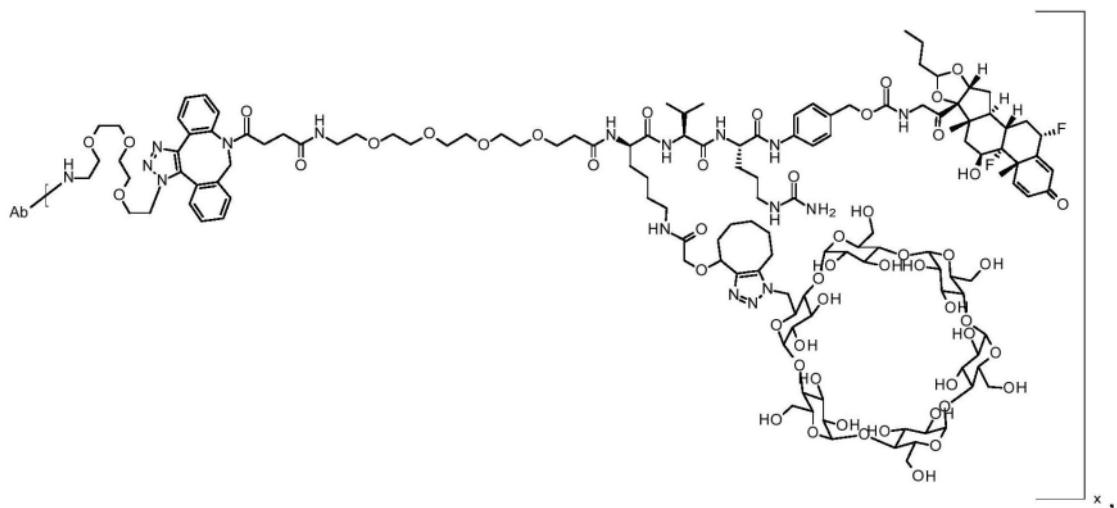
或其混合物；



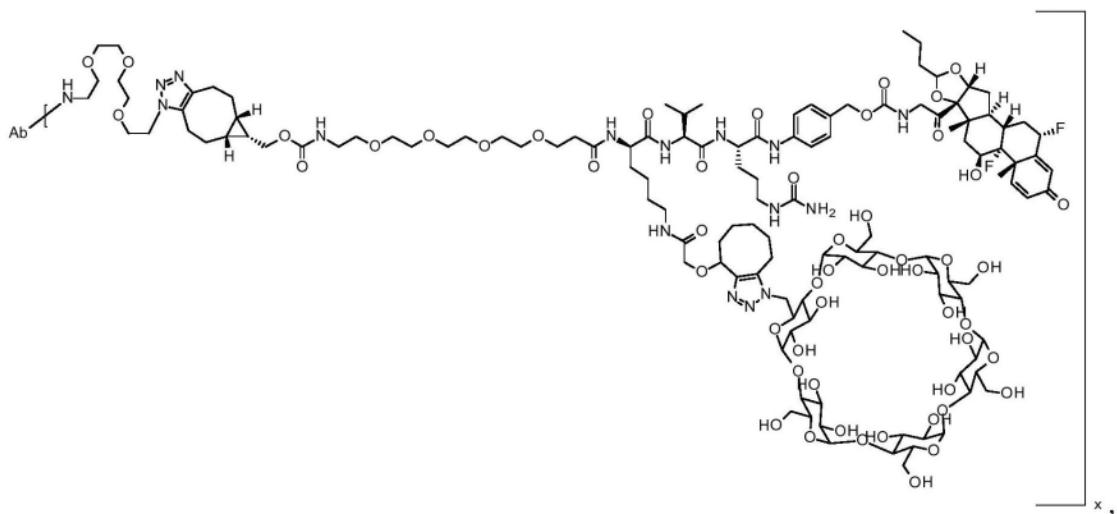
或其混合物；

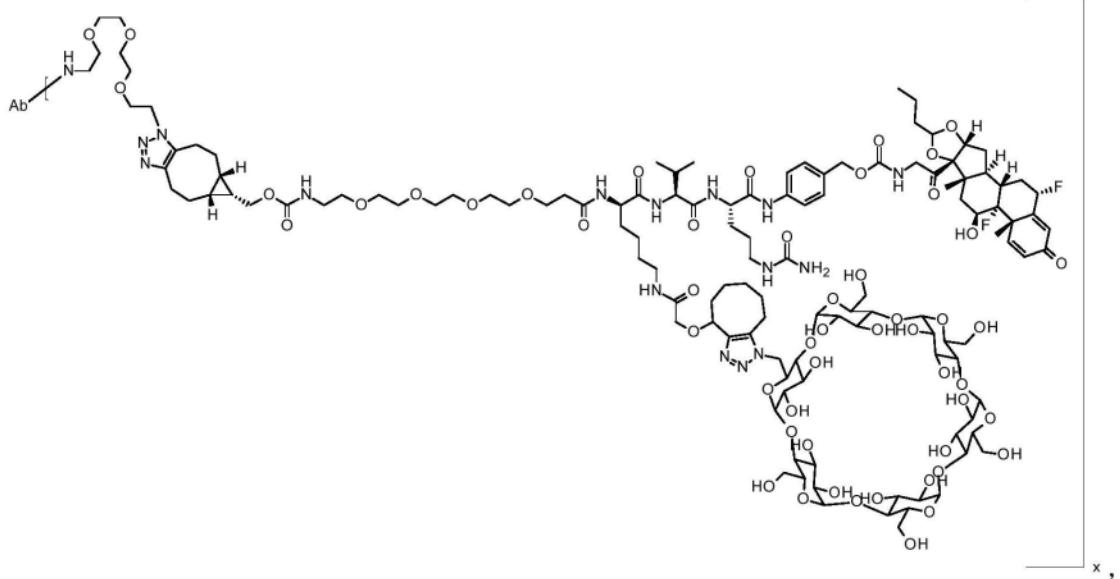


或其混合物；

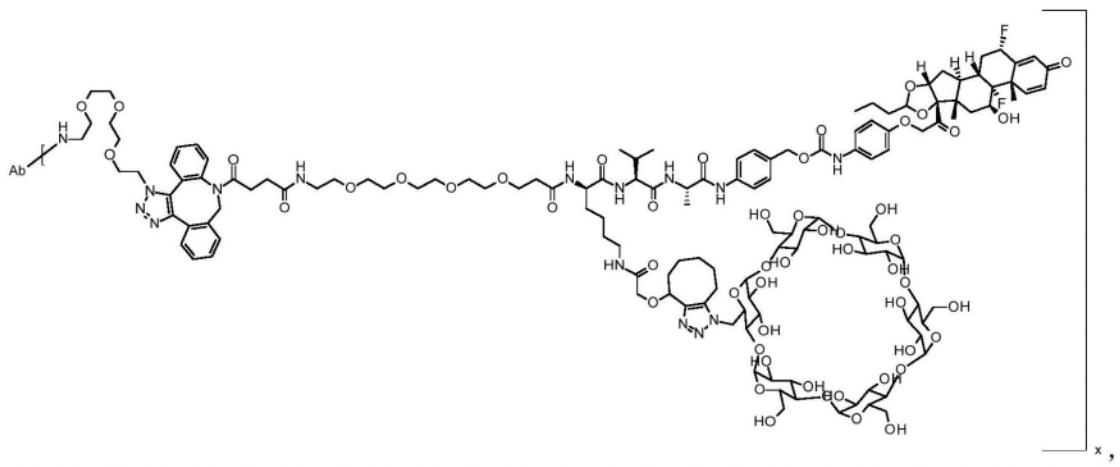
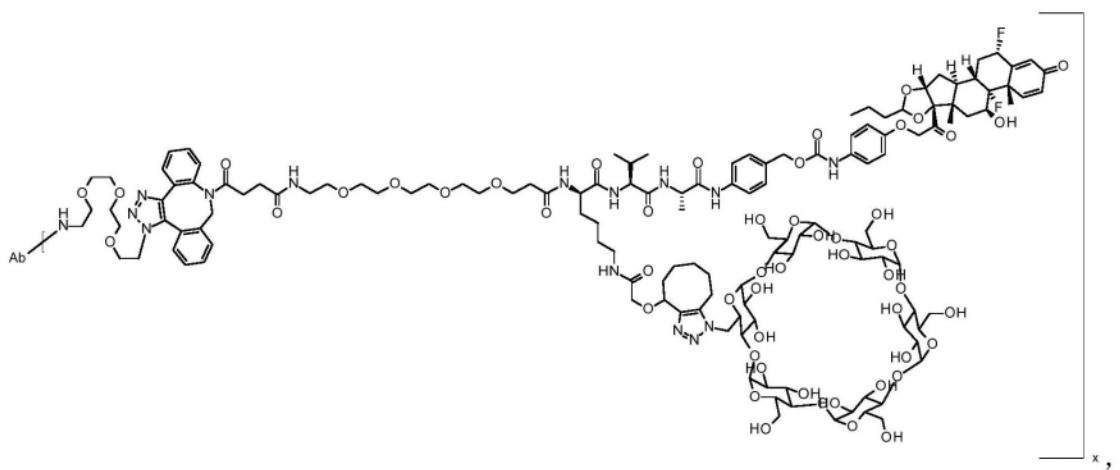


或其混合物；

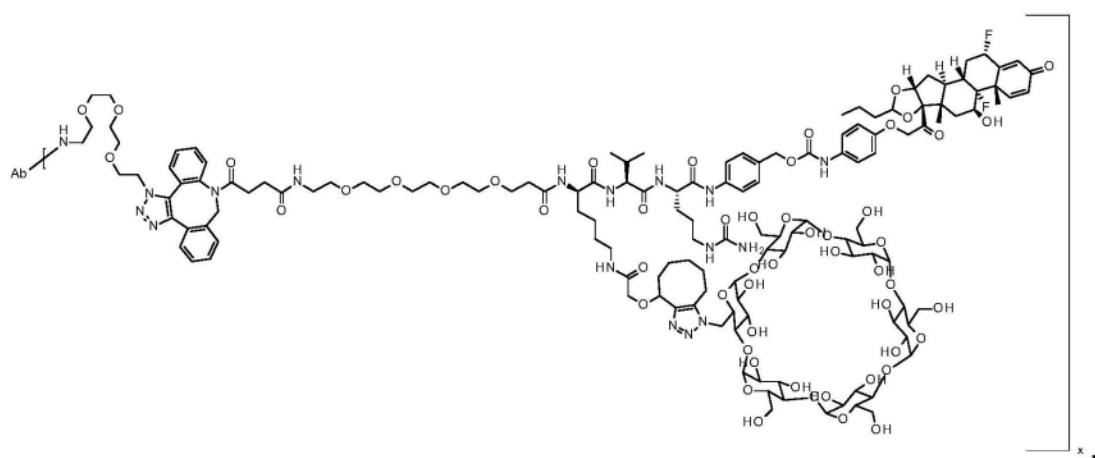
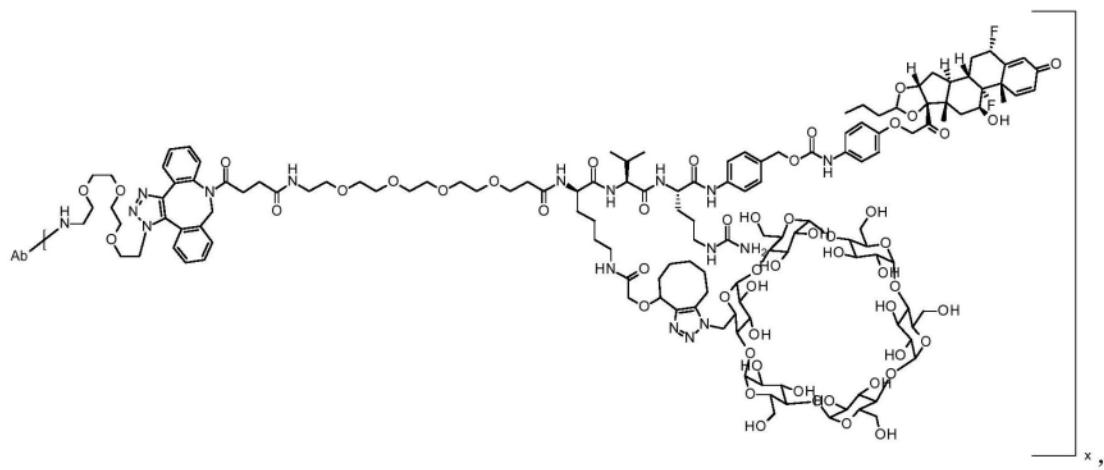




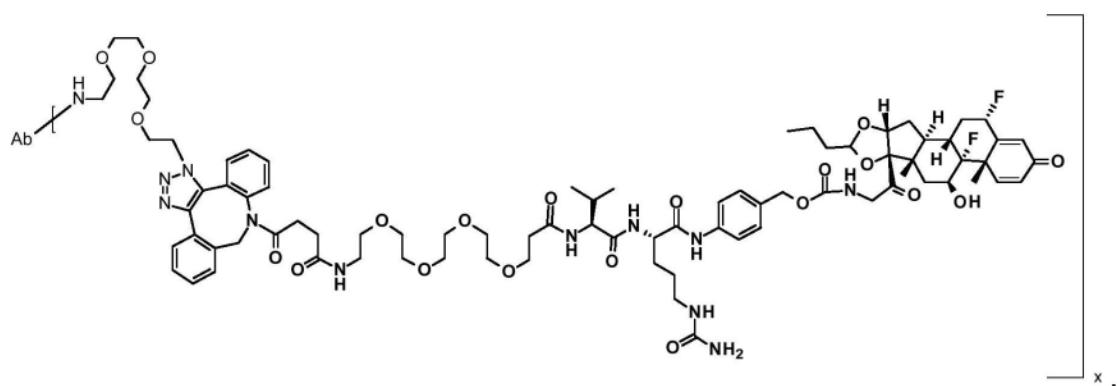
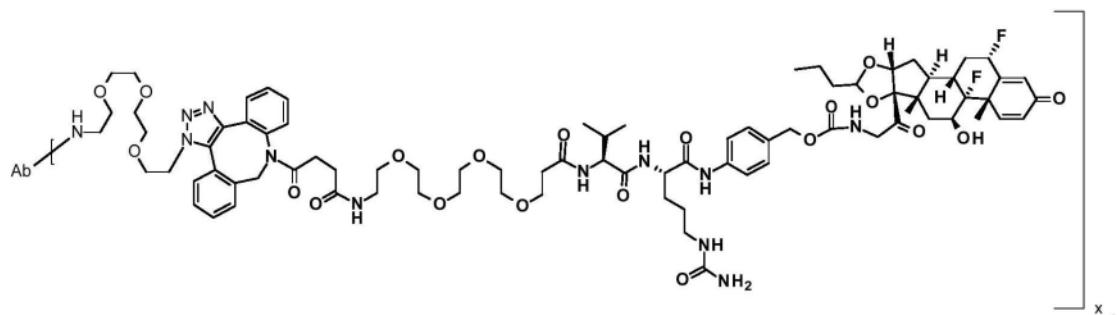
或其混合物；



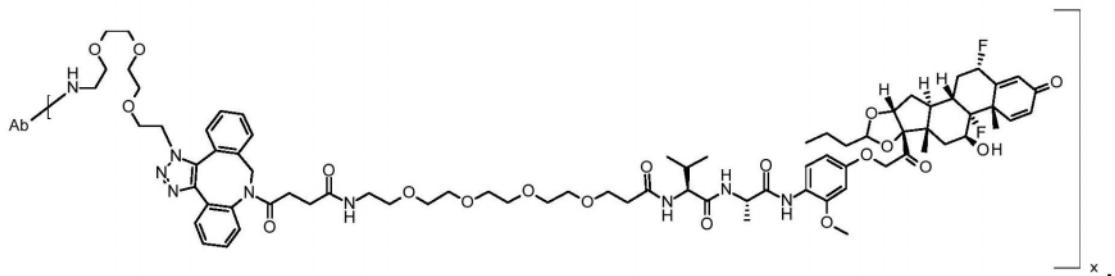
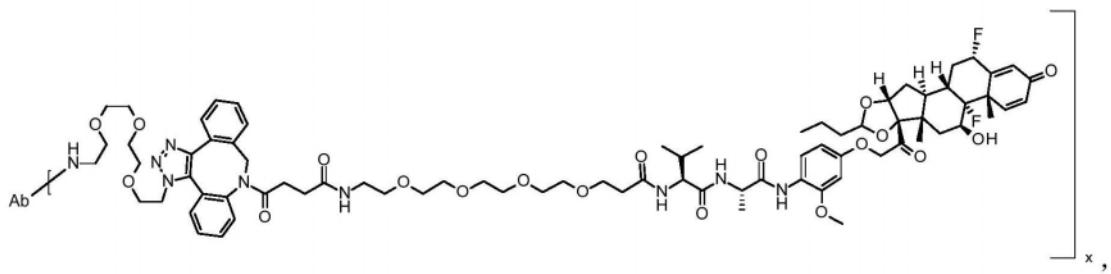
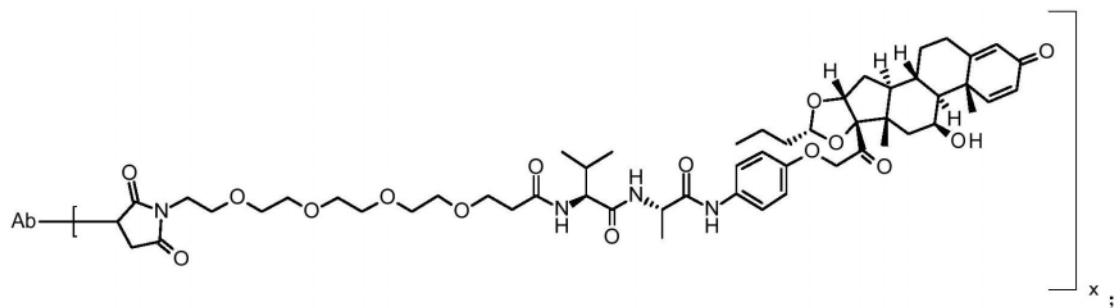
或其混合物；



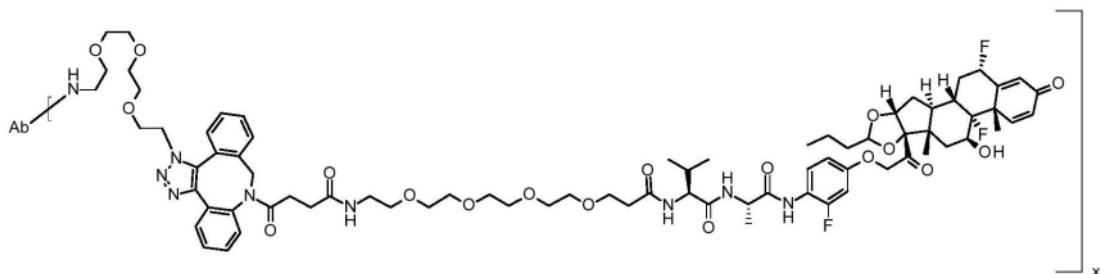
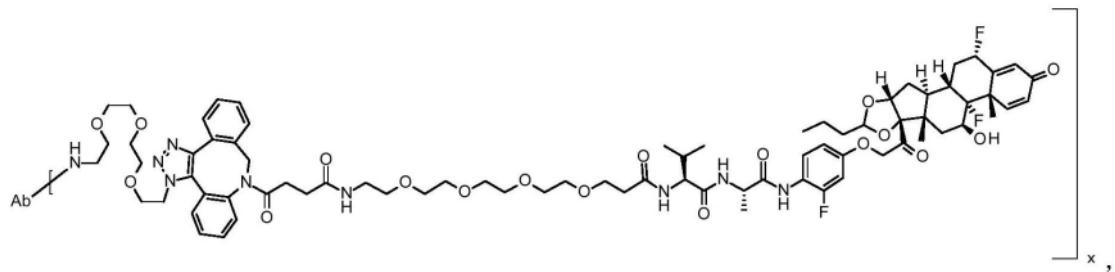
或其混合物；



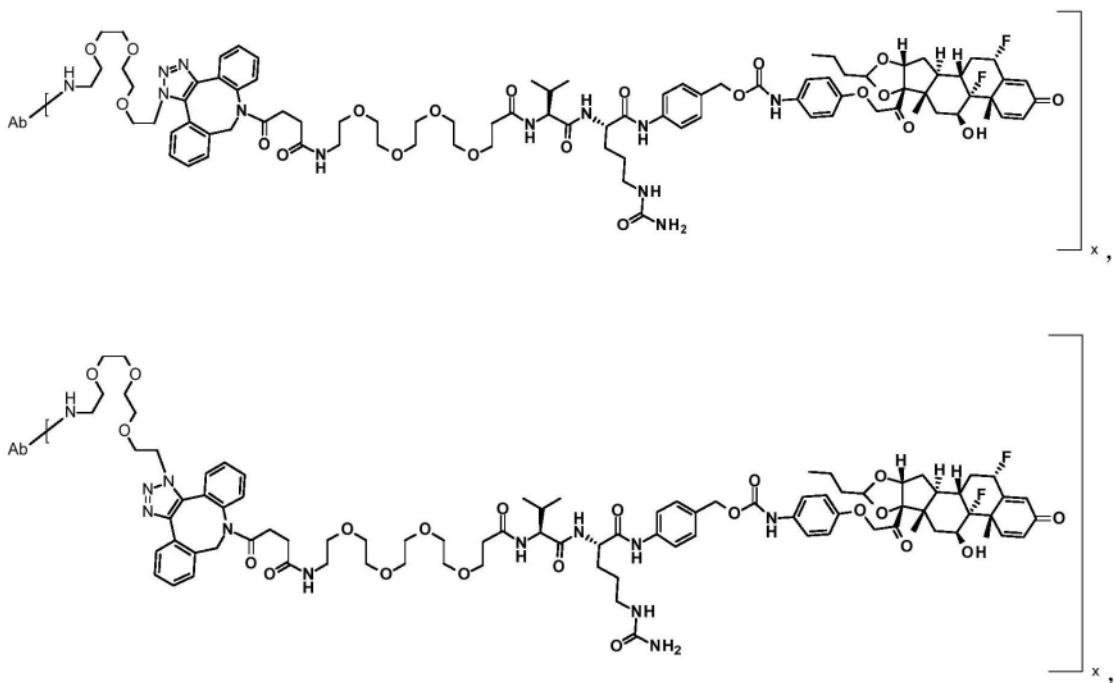
或其混合物；



或其混合物；



或其混合物；



或其混合物。

在特定实施方案，Ab是抗体，和x是从1至30的整数。在一些实施方案，x是从1至4的整数。在一些实施方案，x是4。在一些实施方案，x是2。

[0336] 本发明还提供了布地奈德或二氟拉松的结合剂偶联物。

[0337] 本发明中提供的任何偶联物的合适结合剂包括但不限于抗体类，淋巴因子类，激素类，生长因子类，病毒受体类，白细胞介素类，或任何其他细胞结合分子或肽结合分子或物质。

[0338] 在一些实施方案，所述结合剂是抗体。本发明使用的术语“抗体”意指包含至少一个互补决定区(CDR)的任何抗原结合分子或分子复合物，所述互补决定区(CDR)与特定抗原特异性结合或相互作用。术语“抗体”包括免疫球蛋白分子，所述免疫球蛋白分子包含四条多肽链，通过二硫键相互连接的两条重(H)链和两条轻(L)链，以及其多聚体(例如IgM)。每条重链包含重链可变区(本发明缩写为HCVR或V_H)和重链恒定区。所述重链恒定区包含三个结构域，C_H1、C_H2和C_H3。每条轻链包含轻链可变区(本发明中缩写为LCVR或V_L)和轻链恒定区。所述轻链恒定区包含一个结构域(C_L1)。所述V_H和V_L区可进一步细分为高变区，称为互补决定区(CDR)，散布有更保守的区域，称为框架区(FR)。每个V_H和V_L由三个CDR和四个FR组成，按照以下顺序从氨基端到羧基端排列：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。在一些实施方案，所述抗体(或其抗原结合部分)的FR可以与人种系序列相同，或者可以是天然、或人工修饰的。可基于两个或更多个CDR的并列分析来定义氨基酸共有序列。

[0339] 本发明使用的术语“抗体”还包括完整抗体分子的抗原结合片段。本发明使用的术语抗体的“抗原结合部分”，抗体的“抗原结合片段”等包括任何天然存在的、可酶促得到的、合成的、或基因工程化的多肽或糖蛋白，其特异性结合抗原形成复合物。抗体的抗原结合片段可以例如使用任何合适的标准技术，例如涉及操纵和表达编码抗体可变结构域和任选恒定结构域的DNA的蛋白水解消化或重组基因工程技术，由完整抗体分子衍生得到。此种DNA是已知的和/或容易从例如商业来源，DNA文库(包括例如噬菌体-抗体文库)得到，或可以合

成得到。可对DNA进行测序和化学操作或通过使用分子生物学技术进行操作,例如,将一个或多个可变结构域和/或恒定结构域排列成合适的构型,或引入密码子,产生半胱氨酸残基,修饰、添加或删除氨基酸等。

[0340] 抗原结合片段的非限制性实例包括:(i) Fab片段;(ii) F(ab')2片段;(iii) Fd片段;(iv) Fv片段;(v) 单链Fv(scFv)分子;(vi) dAb片段;和(vii)由模拟抗体高变区的氨基酸残基(例如,分离的互补决定区(CDR),例如CDR3肽)或受约束的FR3-CDR3-FR4肽组成的小识别单元。其他工程化分子,如结构域特异性抗体类,单结构域抗体类,结构域缺失抗体类,嵌合抗体类,CDR嫁接抗体类,双抗体类,三抗体类,四抗体类,微抗体类,纳米抗体类(例如一价纳米抗体类,二价纳米抗体类等),小型模块化免疫药物(SMIP)和鲨鱼可变IgNAR结构域也包含在本发明所使用的表达“抗原结合片段”内。

[0341] 抗体的抗原结合片段通常包含至少一个可变结构域。所述可变结构域可具有任何大小或氨基酸组成,并且通常包含至少一个CDR,所述至少一个CDR与一个或多个框架序列相邻或在框内的。在具有与V_L结构域相关的V_H结构域的抗原结合片段中,所述V_H和V_L结构域可以任何合适的排列相对于彼此进行定位。譬如,所述可变区可以是二聚的并含有V_H-V_H、V_H-V_L或V_L-V_L二聚体。或者,所述抗体的抗原结合片段可包含单体V_H或V_L结构域。

[0342] 在某些实施方案,抗体的抗原结合片段可包含至少一个可变结构域,所述可变结构域与至少一个恒定结构域共价连接。可在本发明公开的抗体的抗原结合片段内发现的可变结构域和恒定结构域的非限制性示例性构型包括:(i) V_H-C_H1;(ii) V_H-C_H2;(iii) V_H-C_H3;(iv) V_H-C_H1-C_H2;(v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3;(vi) V_H-C_H2-C_H3;(vii) V_H-C_L;(viii) V_L-C_H1;(ix) V_L-C_H2;(x) V_L-C_H3;(xi) V_L-C_H1-C_H2;(xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3;(xiii) V_L-C_H2-C_H3;和(xiv) V_L-C_L。在可变结构域和恒定结构域的任何构型中,包括上文列出的任何示例性构型,所述可变结构域和恒定结构域可以彼此直接连接或可以通过完整或部分铰链或连接体区域进行连接。铰链区可由至少2个(例如,5、10、15、20、40、60个或更多个)氨基酸组成,所述氨基酸导致单个多肽分子中相邻可变结构域和/或恒定结构域之间的柔性或半柔性连接。此外,本发明公开的抗体的抗原结合片段可包含上文列出的任何可变结构域和恒定结构域的同二聚体或异二聚体(或其他多聚体),其彼此非共价结合和/或与具有一个或多个单体V_H或V_L结构域(例如,通过二硫键)非共价结合。

[0343] 与完整抗体分子一样,抗原结合片段可以是单特异性的或多特异性的(例如,双特异性的)。抗体的多特异性抗原结合片段通常包含至少两个不同的可变结构域,其中每个可变结构域能够特异性结合单独的抗原或结合同一抗原上的不同表位。任何多特异性抗体形式,包括本发明公开的示例性双特异性抗体形式,可使用本领域可用的常规技术,适用于本发明公开的抗体的抗原结合片段。

[0344] 本发明所述抗体可通过补体依赖性细胞毒性(CDC)或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)而起作用。“补体依赖性细胞毒性”(CDC)是指在补体存在下,本发明的抗体对表达抗原的细胞的裂解。“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”(ADCC)是指细胞介导的反应,其中表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如,自然杀伤(Natural Killer,NK)细胞、中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上的结合抗体,从而导致靶细胞裂解。可使用本领域熟知和可用的测定方法来测定CDC和ADCC。(参见例如,美国专利号5,500,362和5,821,337,以及Clynes et al. (1998) Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 95:652-656)。抗体的恒定区在抗体固

定补体和介导细胞依赖性细胞毒性的能力中是重要的。因此,可基于抗体是否需要介导细胞毒性来选择抗体的同种型。

[0345] 可用于本发明化合物的抗体包括人抗体。本发明使用的术语“人抗体”旨在包括具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。人抗体可包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变而引入的突变),例如在CDR中,特别是在CDR3中。然而,本发明使用的术语“人抗体”不旨在包括其中衍生自另一种哺乳动物物种(例如小鼠)的种系的CDR序列已移植到人框架序列上的抗体。术语“人抗体”不包括在天然存在的、未经修饰的生物体中通常不经修饰或人为干预/操作而存在的天然存在的分子。

[0346] 在一些实施方案,所述抗体可以是重组人抗体。本发明使用的术语“重组人抗体”旨在包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人抗体,例如使用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体(下文进一步描述);从重组、组合人抗体文库分离的抗体(下文进一步描述);从动物(例如小鼠)分离的抗体,所述动物是人免疫球蛋白基因的转基因动物(参见例如,Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295);或通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接到其他DNA序列的任何其他方法制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人抗体具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施方案,对此种重组人抗体进行体外诱变(或者,当使用转基因人Ig序列的动物时,进行体内体细胞诱变),并因此重组抗体的V_H和V_L区的氨基酸序列是衍生自人种系V_H和V_L序列并与之相关的序列,其在体内可不天然存在于人抗体种系库中。

[0347] 人抗体可以与铰链异质性相关的两种形式存在。在一种形式中,免疫球蛋白分子包含约150-160kDa的稳定四链构建体,其中二聚体通过链间重链二硫键连接在一起。在第二种形式中,所述二聚体不通过链间二硫键连接,并且形成约75-80kDa的分子,其由共价偶联的轻链和重链(半抗体)组成。即使在亲和纯化后,这些形式也极难分离。

[0348] 在各种完整IgG同种型中出现第二种形式的频率是由于但不限于与抗体的铰链区同种型相关的结构差异。人IgG4铰链的铰链区中的单个氨基酸置换可以显著地将第二种形式(Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105)的出现降低至通常使用人IgG1铰链观察到的水平。本发明公开内容包括在铰链、C_H2或C_H3区域中具有一个或多个突变的抗体,所述突变可能是例如在生成中所需的,以提高所需抗体形式的产量。

[0349] 可用于本发明化合物的抗体可以是分离的抗体。本发明使用的“分离的抗体”是指已经从其天然环境的至少一种组分中鉴定和分离和/或回收的抗体。例如,为了本发明的目的,已从生物体的至少一种组分或从其中天然存在或天然产生的抗体的组织或细胞中分离或除去的抗体是“分离的抗体”。分离的抗体还包括重组细胞内的原位抗体。分离的抗体是已经过至少一个纯化或分离步骤的抗体。根据某些实施方案,分离的抗体可以基本上不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0350] 与衍生抗体的相应种系序列相比,可用于本发明所述化合物的抗体可在重链和轻链可变结构域的框架和/或CDR区中包含一个或多个氨基酸置换、插入和/或缺失。通过将本发明公开的氨基酸序列与可从例如公共抗体序列数据库获得的种系序列进行比较,可以容易地确定此类突变。本发明包括抗体及其抗原结合片段,其衍生自本发明的任何氨基酸序列,其中一个或多个框架和/或CDR区内的一一个或多个氨基酸突变为衍生抗体的种系序列的

相应残基,或突变为另一个人种系序列的相应残基,或突变为相应种系残基的保守氨基酸置换(此类序列变化在本发明中统称为“种系突变”)。本领域普通技术人员从本发明公开的重链和轻链可变区序列开始,可以容易地生成许多抗体和抗原结合片段,所述抗体和抗原结合片段包含一个或多个个体种系突变或其组合。在某些实施方案,V_H和/或V_L结构域内的所有框架和/或CDR残基突变回在衍生抗体的原始种系序列中发现的残基。在其他实施方案,仅有某些残基突变回原始种系序列,例如,仅在FR1的前8个氨基酸内或在FR4的最后8个氨基酸内发现的突变残基,或仅在CDR1、CDR2或CDR3中发现的突变残基。在其他实施方案,将一个或多个框架和/或CDR残基突变为不同种系序列(即,种系序列不同于最初衍生抗体的种系序列)的相应残基。此外,本发明所述抗体可包含框架和/或CDR区内的两个或更多个种系突变的任何组合,例如,其中某些个体残基突变为特定种系序列的相应残基,而某些与原始种系序列不同的其他残基保持或突变为不同种系序列的相应残基。一旦得到,可容易地测试含有一个或多个种系突变的抗体和抗原结合片段的一种或多种所需特性,例如改善的结合特异性,增加的结合亲和力,改善或增强的拮抗或激动的生物学特性(视情况而定),降低的免疫原性等。

[0351] 在一些实施方案,所述抗体是单克隆抗体,多克隆抗体,抗体片段(Fab、Fab'、和F(ab)2,微抗体,双抗体,三抗体等)或双特异性抗体。本发明所述的抗体可以使用美国专利号6,596,541和美国公开号2012/0096572中所述的方法进行人源化,各专利/申请通过引用其整体并入本发明。

[0352] 当结合剂是抗体时,其结合作为多肽的抗原结合配偶体,并且可以是跨膜分子(例如,受体)或可以是可被糖基化或磷酸化的生长因子。

[0353] 所述结合剂结合的合适靶标包括需要类固醇递送的任何靶标。在一些实施方案,所述结合剂是抗体、经修饰的抗体或其抗原结合片段,其结合选自以下的靶标:AXL,BAFFR,BCMA,BCR-列表组分(BCR-list components),BDCA2,BDCA4,BTLA,BTNL2BTNL3,BTNL8,BTNL9,C10orf54,CCR1,CCR3,CCR4,CCR5,CCR6,CCR7,CCR9,CCR10,CD11c,CD137,CD138,CD14,CD168,CD177,CD19,CD20,CD209,CD209L,CD22,CD226,CD248,CD25,CD27,CD274,CD276,CD28,CD30,CD300A,CD33,CD37,CD38,CD4,CD40,CD44,CD45,CD46,CD47,CD48,CD5,CD52,CD55,CD56,CD59,CD62E,CD68,CD69,CD70,CD74,CD79a,CD79b,CD8,CD80,CD86,CD90.2,CD96,CLEC12A,CLEC12B,CLEC7A,CLEC9A,CR1,CR3,CRTAM,CSF1R,CTLA4,CXCR1/2,CXCR4,CXCR5,DDR1,DDR2,DEC-205,DLL4,DR6,FAP,FCamR,FCMR,FcR's,Fire,GITR,HHLA2,HLAII类,HVEM,ICOSLG,IFNLR1,IL10R1,IL10R2,IL12R,IL13RA1,IL13RA2,IL15R,IL17RA,IL17RB,IL17RC,IL17RE,IL20R1,IL20R2,IL21R,IL22R1,IL22RA,IL23R,IL27R,IL29R,IL2Rg,IL31R,IL36R,IL3RA,IL4R,IL6R,IL5R,IL7R,IL9R,整合素(Integrins),LAG3,LIFR,MAG/Siglec-4,MMR,MSR1,NCR3LG1,NKG2D,NKp30,NKp46,PDCD1,PROKR1,PVR,PVRIG,PVRL2,PVRL3,RELT,SIGIRR,Siglec-1(唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-1),Siglec-10,Siglec-5,Siglec-6,Siglec-7,Siglec-8,Siglec-9,SIRPA,SLAMF7,TACI,TCR-列表组分/assoc,PTCRA,TCRb,CD3z,CD3,TEK,TGFBR1,TGFBR2,TGFBR3,TIGIT,TLR2,TLR4,TROY,TSLPR,TYRO,VLDLR,VSIG4和VTCN1。

[0354] 所述结合剂连接体可通过抗体或抗原结合分子内特定氨基酸处的附接而与所述结合剂(例如,抗体或抗原结合分子)连接。可在本发明此方面的上下文中使用的示例性氨

基酸附接包括,例如,赖氨酸(参见例如,US 5,208,020;US 2010/0129314;Hollander et al.,Bioconjugate Chem.,2008,19:358-361;WO 2005/089808;US 5,714,586;US 2013/0101546;和US 2012/0585592),半胱氨酸(参见例如,US 2007/0258987;WO 2013/055993;WO 2013/055990;WO 2013/053873;WO 2013/053872;WO 2011/130598;US 2013/0101546;和US 7,750,116),硒代半胱氨酸(参见例如,WO 2008/122039;和Hofer et al., Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,2008,105:12451-12456),甲酰甘氨酸(参见例如,Carrico et al.,Nat.Chem.Biol.,2007,3:321-322;Agarwal et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,2013,110:46-51,和Rabuka et al.,Nat.Protocols,2012,10:1052-1067),非天然氨基酸(参见例如,WO 2013/068874,和WO 2012/166559),和酸性氨基酸(参见例如,WO 2012/05982)。连接体可通过谷氨酰胺通过基于转谷氨酰胺酶的化学-酶促偶联而进行偶联(参见例如,Dennler et al.,Bioconjugate Chem.2014,25,569-578)。连接体也可通过与碳水化合物(参见例如,US 2008/0305497,WO 2014/065661,和Ryan et al.,Food&Agriculture Immunol.,2001,13:127-130)和二硫键连接体的附接(参见例如,WO 2013/085925,WO 2010/010324,WO 2011/018611,WO 2014/197854,和Shaunak et al.,Nat.Chem.Biol.,2006,2:312-313)而与抗原结合蛋白偶联。在一些实施例,所述结合剂是抗体,和所述抗体通过赖氨酸残基与所述连接体连接。在一些实施方案,所述抗体通过半胱氨酸残基与所述连接体连接。

D. 制备化合物的方法

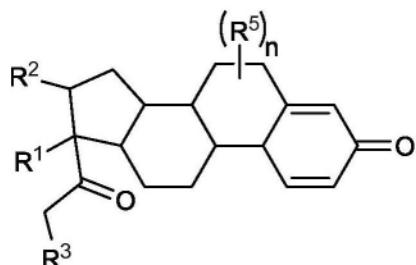
[0355] 本发明所述的偶联物可通过将本发明所述的连接体-有效负载与结合剂(例如标准偶联条件下的抗体)偶联合成得到(参见例如,Drug Deliv.2016Jun;23 (5) :1662-6;AAPS Journal,Vol.17,No.2,March2015;和Int.J.Mol.Sci.2016,17,561,其全部内容通过引用并入本发明)。连接体-有效负载是合成中间体,其包含目标有效负载和连接基团部分,所述连接基团部分最终用作连接所述结合剂与所述有效负载的基团部分(或其部分)。连接体-有效负载包含活性基团,所述活性基团与所述结合剂反应以形成本发明所述的偶联物。当所述结合剂是抗体时,所述抗体可通过所述抗体的一个或多个半胱氨酸、赖氨酸或其他残基与连接体-有效负载偶联。连接体有效负载可与半胱氨酸残基偶联,例如,通过使抗体经受还原剂(例如,二硫苏糖醇(dithiotheritol)),以裂解抗体的二硫键,例如通过凝胶过滤来纯化还原所述的抗体,并随后使所述抗体与含有活性基团部分(例如,马来酰亚胺基基团)的连接体-有效负载反应。合适的溶剂包括但不限于水、DMA、DMF和DMSO。含有活性基团(例如活化的酯或酰卤基团)的连接体-有效负载可以与赖氨酸残基偶联。合适的溶剂包括但不限于水、DMA、DMF和DMSO。可使用已知的蛋白质技术,包括例如体积排除色谱法、透析法和超滤/渗滤法,来纯化偶联物。

[0356] 结合剂,例如抗体,还可通过点击化学反应进行偶联。在所述点击化学反应的一些实施方案中,所述连接体-有效负载包含活性基团,例如能够与叠氮化物进行1,3-环加成反应的炔烃。此类合适的活性基团包括但不限于应变炔烃类,例如适用于应变促进的炔-叠氮化物环加成(SPAAC)的那些,环炔烃类,例如环辛炔类,苯并环化的炔烃类和在没有铜催化剂的情况下能够与叠氮化物进行1,3-环加成反应的炔烃类。合适的炔烃还包括但不限于DIBAC,DIBO,BARAC,DIFO,取代的例如氟化炔烃类,氮杂-环炔烃类,BCN,及其衍生物。包含此类活基团的连接体-有效负载可用于偶联已用叠氮基官能化的抗体。此类官能化抗体包

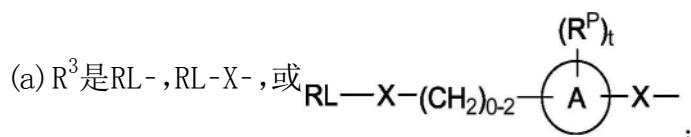
括用叠氮基-聚乙二醇基团官能化的抗体。在某些实施方案，此种官能化抗体通过在酶转谷氨酰胺酶存在下，使包含至少一个谷氨酰胺残基（例如重链Q295）的抗体与式 $\text{H}_2\text{N}-\text{LL}-\text{N}_3$ 所示化合物（其中LL是二价聚乙二醇基团）反应而得到。为方便起见，在本发明的某些通式中，所述抗体Ab是具有一个或多个共价连接的-LL-N₃基团或其残基的经修饰的抗体。优选地，各-LL-N₃与所述抗体的谷氨酰胺残基的氨基酸侧链共价连接。进一步优选地，所述-LL-N₃是活性基团RG或可以与活性基团RG反应以形成与连接体-有效负载连接的共价键。同样为方便起见，在本发明的某些通式中，明确地示出了-LL-N₃基团。

[0357] 本发明提供了合成本发明所述偶联物的方法，所述方法包括使结合剂（例如抗体）与本发明所述的连接体-有效负载接触。在某些实施方案，所述连接体-有效负载包括环糊精部分。

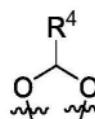
[0358] 在一些实施方案，所述连接体有效负载是式(II)所示化合物：



(II)



R^1 和 R^2 各自独立地为-H、烷基、烷基-C(0)-O-、-OH、或卤素；或 R^1 和 R^2 一起形成



其中 R^4 是烷基、芳基、芳基烷基、或含N的杂环烷基；其中所述烷基、芳基、芳基烷基

和含N的杂环烷基任选地被 $-\text{NR}^a\text{R}^b$ 取代；或

(b) R^3 是-OH、烷基-C(0)-O-、杂烷基、 $-\text{NR}^a\text{R}^b$ 或芳基氧基，其中所述烷基-C(0)-O-、

杂烷基、或芳基氧基任选地被 $-\text{NR}^a\text{R}^b$ 或卤素取代，和 R^1 和 R^2 一起形成 其中 R^4 是- $\text{RL}-$,

$\text{RL}-\text{X}-\text{A}-\text{(CH}_2\text{)}_{0-2}-$, $\text{BL}-\text{X}-\text{(CH}_2\text{)}_{1-4}-$ 或 $\text{RL}-\text{Y}$, 其中Y

是含N的二价杂环；

RL是活性连接体；

R^5 在每种情况下，独立地为-OH、卤素、烷基、或芳基烷基；

R^a 和 R^b 在每种情况下，分别独立地为-H或烷基；

R^P 在每种情况下，独立地为卤素；

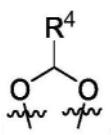
X在每种情况下，独立地为 $-\text{NR}^a$ 或O；

(A) 是芳基或杂芳基; 和

n是从0至19的整数。

[0359] 式 (II) 所示化合物是连接体-有效负载, 其可用作合成本发明所述偶联物的合成中间体。这些连接体-有效负载包含可与抗体反应以形成本发明所述偶联物的活性基团。

[0360] 在式 (II) 的一些实施例中, R¹和R²各自独立地为-H、烷基或-OH。在式 (II) 的一些实施例中, R¹或R²中的一个为-H、烷基或-OH。在式 (II) 的一些实施例中, R¹和R²均为-H、烷基、或-OH。

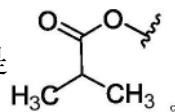
[0361] 在式 (II) 的一些实施例中, R¹和R²一起形成  在一些实施例, R⁴是-RL。在一

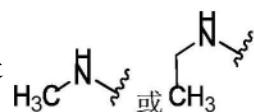
些实施例, R⁴是RL-NR^a-芳基。在一些其他实施例, R⁴是烷基。在某些实施例, R⁴是芳基烷基。在一些实施例, R⁴是芳基。在其他实施例, R⁴是含N的杂环烷基。在这些实施例的一些中, 所述烷基、芳基、芳基烷基、或含N的杂环烷基任选地被取代。

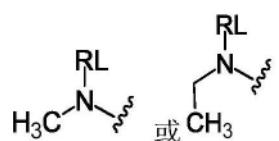
[0362] 在式 (II) 的一些实施例中, R⁵是卤素。在式 (II) 的一些实施例中, R⁵是氟。在式 (II) 的一些实施例中, R⁵中的一个为卤素。在式 (II) 的一些实施例中, R⁵是卤素, 和n是2。在式 (II) 的一些实施例中, R⁵是-F, 和n是1。在式 (II) 的一些实施例中, R⁵是-F, 和n是2。

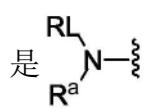
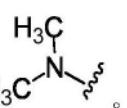
[0363] 在式 (II) 的一些实施例中, R³是RL。在式 (II) 的一些实施例中, R³是RL-NRa-芳基氧基-。在式 (II) 的一些其他实施例中, R³是-OH。在式 (II) 的一些其他实施例中, R³是烷基-C(0)-O-。在式 (II) 的一些其他实施例中, R³是杂烷基。在式 (II) 的一些其他实施例中, R³是-N-R^aR^b。在式 (II) 的一些其他实施例中, R³是芳基。在式 (II) 的一些其他实施例中, R³是芳基氧基。在式 (II) 的一些其他实施例中, 烷基-C(0)-O-、杂烷基、或芳基氧基任选地被-NR^aR^b或卤素取代。

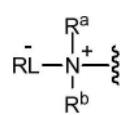
[0364] 在式 (II) 的一些实施例中, R³是-OH。在式 (II) 的一些实施例中, R³是烷基-C(0)-

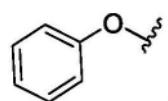
0-。在式 (II) 的一些实施例中, R³是  在式 (II) 的一些实施例中, R³是杂烷基。在

式 (II) 的一些实施例中, R³是  或  在式 (II) 的一些实施例中, R³是

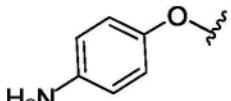
 在式 (II) 的一些实施例中, R³是-NR^aR^b。在式 (II) 的一些实施例中, R³是

 在式 (II) 的一些实施例中, R³是  在式 (II) 的一些实施例中, R³是

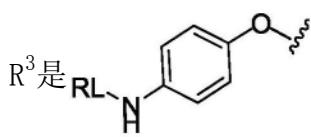
 在式 (II) 的一些实施例中, R³是芳基氧基。在式 (II) 的一些实施例中, R³是



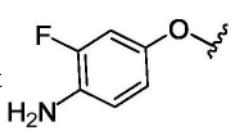
在式 (II) 的一些实施例中, R³ 是



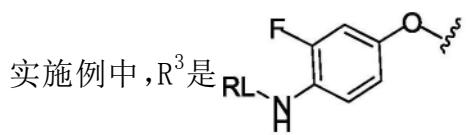
在式 (II) 的一些实施例中,



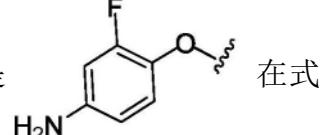
在式 (II) 的一些实施例中, R³ 是



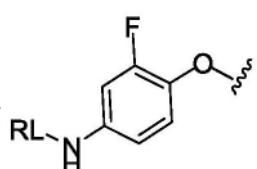
在式 (II) 的一些



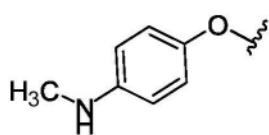
在式 (II) 的一些实施例中, R³ 是



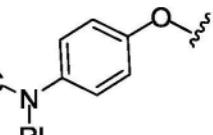
(II) 的一些实施例中, R³ 是



在式 (II) 的一些实施例中, R³ 是



在式 (II) 的一些实施例中, R³ 是



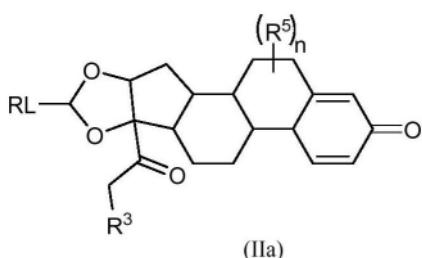
在式 (II) 的一些



实施例中, R³ 是

[0365] 在式 (II) 中, 下标n是从0至19的整数。在一些实施例, n是0。在一些其他实施例, n是1。在某些实施例, n是2。在一些其他实施例, n是3。在某些实施例, n是4。在一些实施例, n是5。在一些其他实施例, n是6。在某些实施例, n是7。在一些其他实施例, n是8。在某些实施例, n是9。在一些实施例, n是10。在一些其他实施例, n是11。在某些实施例, n是12。在一些其他实施例, n是13。在某些实施例, n是14。在一些实施例, n是15。在一些其他实施例, n是16。在某些实施例, n是17。在一些其他实施例, n是18。在某些实施例, n是19。

[0366] 在一些实施例, 本发明提供了具有式 (IIa) 所示结构的化合物:



;

其中:

R⁵在每种情况下, 独立地为-OH、卤素、或烷基;

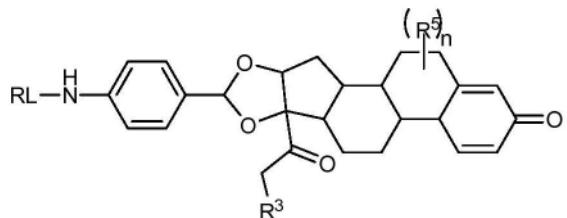
R³选自-OH、烷基-C(0)-O-、杂烷基、-NR^aR^b或芳基氧基, 其中所述烷基-C(0)-O-、杂烷基、或芳基氧基任选地被-NR^aR^b或卤素取代;

RL是活性连接体;

R^a和R^b在每种情况下, 独立地选自H、烷基、和烷基-C(0); 和

n是从0至19的整数。

[0367] 在一些实施例,本发明提供了具有式 (IIa2) 所示结构的化合物:



(IIa2);

其中:

R⁵在每种情况下,独立地为-OH、卤素、或烷基;

R³是-OH、烷基-C(O)-O-、杂烷基、-NR^aR^b或芳基氧基,其中所述烷基-C(O)-O-、杂烷基、或芳基氧基任选地被-NR^aR^b或卤素取代;

RL是活性连接体;

R^a和R^b在每种情况下,独立地选自H、烷基、或烷基-C(O);和

n是从0至19的整数。

在式 (IIa2) 的一些实施例中,R³是-OH。在式 (IIa2) 的一些实施例中,R³是烷基-C

(O)-O-。在一些实施例,R³是 在式 (IIa2) 的一些实施例中,R³是杂烷基。在一些

实施例,R³是 在式 (IIa2) 的一些实施例中,R³是-NR^aR^b。在一些实施例,R³是

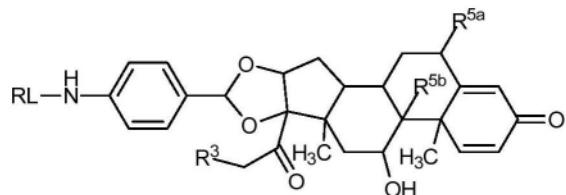
在式 (IIa2) 的一些实施例中,R³是芳基氧基。在式 (IIa2) 的一些实施例中,R³是

在式 (IIa2) 的一些实施例中,R³是 在式 (IIa2) 的一些实施例

中,R³是 在式 (IIa2) 的一些实施例中,R³是 在式 (IIa2) 的

一些实施例中,R³是 。

[0368] 在一些实施例,式 (IIa2) 所示化合物具有以下结构:



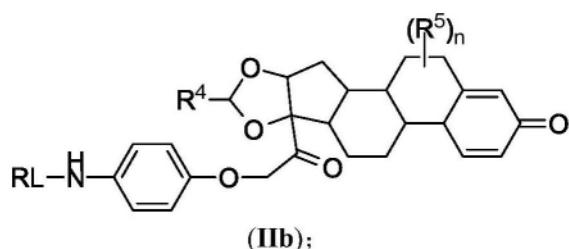
其中：

R³是-OH或烷基-C(=O)-O-；

R^{5a} 和 R^{5b} 各自独立地为 -F 或 H: 和

RL是活性连接体。

[0369] 在一些实施例,本发明提供了具有式(I)所示结构的化合物:



其中：

R^5 在每种情况下，独立地为-OH、卤素、或烷基；

R^4 选自烷基、芳基、芳基烷基、或含N的杂环烷基，其中所述烷基、芳基、芳基烷基、或含N的杂环烷基任选地被 $-NR^aR^b$ 取代；

RL是活性连接体；

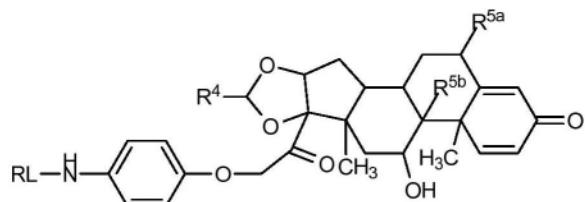
R^a 和 R^b 在每种情况下，独立地选自H、烷基、和烷基-C(0)；和

n是从0至19的整数。

[0370] 在式 (IIb) 的一些实施例中, R^5 是卤素。在式 (IIb) 的一些实施例中, R^5 是氟。在式 (IIb) 的一些实施例中, n 至少为 2, 和 R^5 中的两个是卤素。在式 (IIb) 的一些实施例中, R^5 是 F, 和 n 是 1。在式 (IIb) 的一些实施例中, R^5 是 -F。

[0371] 在式 (IIb) 的一些实施例中, R^4 是烷基。在式 (IIb) 的一些实施例中, R^4 是甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、异丁基、戊基基团部分、己基基团部分、环丙基、环丁基、环戊基、或环己基。在式 (IIb) 的一些实施例中, R^4 是正丙基。

[0372] 在一些实施例，式 (IIb) 所示化合物具有以下结构：



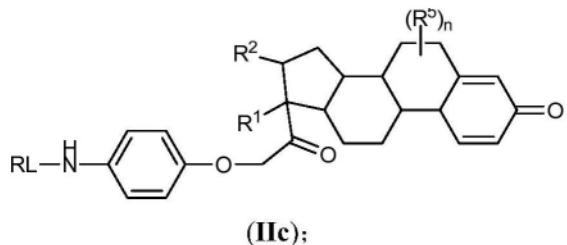
其中：

R^4 是烷基·

R^{5a} 和 R^{5b} 各自独立地为 -F 或 H: 和

RI 是活性连接体。

[0373] 在一些实施例中，本发明提供了具有式(IIC)所示结构的化合物：



其中：

R¹和R²分别独立地为-H、烷基、烷基-C(0)-O-、-OH、或卤素；

R⁵在每种情况下，独立地选自-OH、卤素、或烷基；

RL是活性连接体；和

n是从0至19的整数。

[0374] 在式(IIc)的一些实施例中，R⁵是卤素。在式(IIc)的一些实施例中，R⁵是氟。在式(IIc)的一些实施例中，R⁵中的一个是卤素。在式(IIc)的一些实施例中，R⁵中的两个是卤素。在式(IIc)的一些实施例中，R⁵是-F，和n是2。

[0375] 在式(IIc)的一些实施例中，R¹是CH₃。

[0376] 在式(IIc)的其他实施例中，R¹是OH。

[0377] 在式(IIc)的一些其他实施例中，R¹是H。

[0378] 在式(IIc)的一些实施例中，R²是CH₃。

[0379] 在式(IIc)的其他实施例中，R²是OH。

[0380] 在式(IIc)的一些其他实施例中，R²是H。

[0381] 在式(IIc)的一些实施例中，R¹是CH₃，和R²是CH₃。

[0382] 在式(IIc)的其他实施例中，R¹是CH₃，和R²是OH。

[0383] 在式(IIc)的一些实施例中，R¹是CH₃，和R²是H。

[0384] 在式(IIc)的一些其他实施例中，R¹是OH，和R²是CH₃。

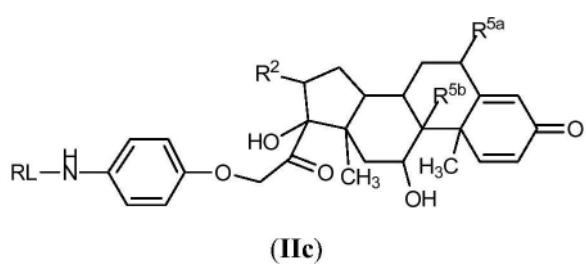
[0385] 在式(IIc)的一些其他实施例中，R¹是OH，和R²是OH。

[0386] 在式(IIc)的一些实施例中，R¹是H，和R²是H。

[0387] 在式(IIc)的一些其他实施例中，R¹是H，和R²是OH。

[0388] 在式(IIc)的其他实施例中，R¹是H，和R²是H。

[0389] 在一些实施方案，式(IIc)所示化合物具有以下结构：



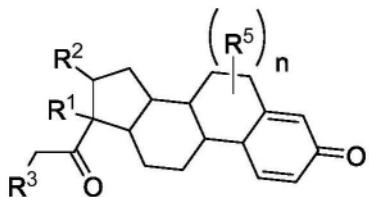
其中：

R²是甲基；

R^{5a}和R^{5b}各自独立地为-F或H；和

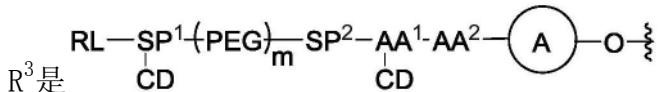
RL是活性连接体。

[0390] 在一些实施方案，本发明提供了具有式(III-R)所示结构的化合物：



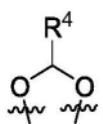
(III-R);

其中：



；

R¹和R²各自独立地为-H、烷基、烷基-C(0)-O-、-OH、或卤素；或R¹和R²一起形成



和含N的杂环烷基任选地被-NR^aR^b取代；

R⁵在每种情况下，独立地为-OH、卤素、烷基、或芳基烷基；

R^a和R^b在每种情况下，独立地为-H或烷基；

R^p在每种情况下，独立地为卤素；

A是芳基或杂芳基；

t是从0至2的整数；

x是从1至30的整数；和其中：

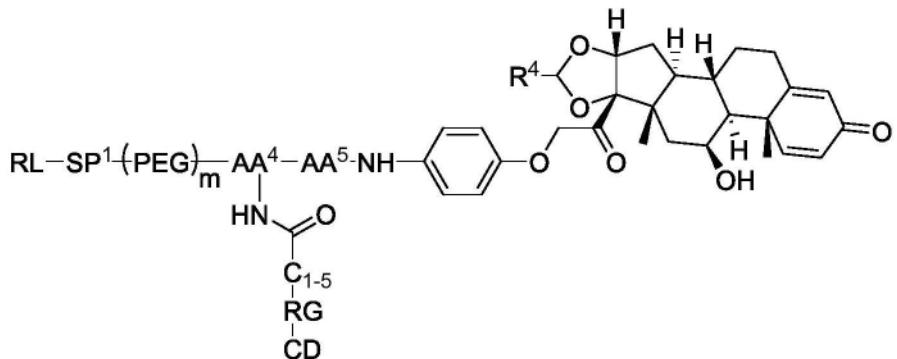
RL是活性连接体，定义如下；SP¹和SP²在每种情况下，各自独立地不存在，或各自独立地为间隔基团残基，和其中SP¹包含三价连接体；AA¹是包含氨基酸残基的三价连接体；AA²是二肽残基；

PEG是聚乙二醇残基；其中所述表示所示化学基团与通式中相邻基团连接的原

子，CD在每种情况下，独立地不存在，或独立地为环糊精残基，其中存在至少一个CD，下标m是从0至5的整数。在这些实施例中，下标m是0、1、2、3、4、或5。在一些实施例，下标m是0。在一些实施例，下标m是1。在一些实施例，下标m是2。在一些实施例，下标m是3。在一些实施例，下标m是4。在一些实施例，下标m是5。在一些实施例，AA¹或AA²中的任一个在每种情况下，独立地分别包含选自丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、或瓜氨酸，其衍生物，或其组合的氨基酸。在某些实施方案，AA¹是选自丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、或瓜氨酸，其衍生物，或其组合的氨基酸。在某些实施方案，AA¹是赖氨酸。在某些实施方案，AA¹是赖氨酸或缬氨酸的衍生物。在某些实施方案，AA²是缬氨酸-瓜氨酸。在一些实施方案，AA²是瓜氨酸-缬氨酸。在一些实施方案，AA²是缬氨酸-丙氨酸。在一些实施方案，AA²是丙氨酸-缬氨酸。在

一些实施方案，AA²是缬氨酸-甘氨酸。在一些实施方案，AA²是甘氨酸-缬氨酸。在一些实施方案，AA²是谷氨酸-缬氨酸-瓜氨酸。在一些实施方案，AA²是谷氨酰胺-缬氨酸-瓜氨酸。在一些实施方案，AA²是赖氨酸-缬氨酸-丙氨酸。在一些实施方案，AA²是赖氨酸-缬氨酸-瓜氨酸。在一些实施方案，AA²是谷氨酸-缬氨酸-瓜氨酸。在一些实施例，SP¹在每种情况下，独立地选自由C₁₋₆亚烷基、-NH-、-C(0)-、(-CH₂-CH₂-O)_e、-NH-CH₂-CH₂-(-O-CH₂-CH₂)_e-C(0)-、-C(0)-(CH₂)_u-C(0)-、-C(0)-NH-(CH₂)_v-、和其组合组成的组，其中下标e是从0至4的整数，下标u是从1至8的整数，和下标v是从1至8的整数。在一些实施例，SP²在每种情况下，独立地选自由C₁₋₆亚烷基、-NH-、-C(0)-、(-CH₂-CH₂-O)_e、-NH-CH₂-CH₂-(-O-CH₂-CH₂)_e-C(0)-、-C(0)-(CH₂)_u-C(0)-、-C(0)-NH-(CH₂)_v-、和其组合组成的组，其中下标e是从0至4的整数，下标u是从1至8的整数，和下标v是从1至8的整数。

[0391] 在某些实施方案，本发明提供了具有式(IIIc-R)所示结构的化合物：



式(IIIc-R)

RL是活性连接体；

CD是环糊精；

SP¹是间隔基团；

AA⁴是氨基酸残基；

AA⁵是二肽残基；

PEG是聚乙二醇；

m是从0至4的整数；

x是从0至30的整数；

R⁴是烷基、芳基、芳基烷基、或含N的杂环烷基；其中所述烷基、芳基、芳基烷基、和含N的杂环烷基任选地被-NR^aR^b取代；

R^a和R^b在每种情况下，独立地为-H或烷基；

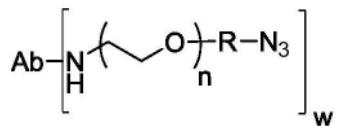
SP¹和SP²在每种情况下，各自独立地不存在，或各自独立地为间隔基团残基，和其中SP¹包含三价连接体；AA⁴是包含氨基酸残基的三价连接体；AA⁵是二肽残基；PEG是聚乙二醇残基；其中所述表示所示化学基团与通式中相邻基团连接的原子，CD在每种情况下，

独立地不存在，或独立地为环糊精残基，其中存在至少一个CD，下标m是从0至5的整数。在这些实施例中，下标m是0、1、2、3、4、或5。在一些实施例，下标m是0。在一些实施例，下标m是1。在一些实施例，下标m是2。在一些实施例，下标m是3。在一些实施例，下标m是4。在一些实施例，下标m是5。在一些实施例，AA⁴或AA⁵中的任一个在每种情况下，独立地分别包含选自丙氨

酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、或瓜氨酸，其衍生物，或其组合的氨基酸。在某些实施方案，AA⁴是选自丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、或瓜氨酸，其衍生物，或其组合的氨基酸。在某些实施方案，AA⁴是赖氨酸。在某些实施方案，AA⁴是赖氨酸或赖氨酸的衍生物。在某些实施方案，AA⁵是缬氨酸-瓜氨酸。在一些实施方案，AA⁵是瓜氨酸-缬氨酸。在一些实施方案，AA⁵是缬氨酸-丙氨酸。在一些实施方案，AA⁵是丙氨酸-缬氨酸。在一些实施方案，AA⁵是缬氨酸-甘氨酸。在一些实施方案，AA⁵是甘氨酸-缬氨酸。在一些实施方案，AA⁵是谷氨酸-缬氨酸-瓜氨酸。在一些实施方案，AA⁵是谷氨酰胺-缬氨酸-瓜氨酸。在一些实施方案，AA⁵是赖氨酸-缬氨酸-丙氨酸。在一些实施方案，AA⁵是赖氨酸-缬氨酸-瓜氨酸。在某些实施方案，AA⁵是谷氨酸-缬氨酸-瓜氨酸。在一些实施例，SP¹在每种情况下，独立地选自由C₁₋₆亚烷基、-NH-、-C(0)-、(-CH₂-CH₂-O)_e、-NH-CH₂-CH₂-(-O-CH₂-CH₂)_e-C(0)-、-C(0)-(CH₂)_u-C(0)-、-C(0)-NH-(CH₂)_v-、和其组合组成的组，其中下标e是从0至4的整数，下标u是从1至8的整数，和下标v是从1至8的整数。在一些实施例，SP²在每种情况下，独立地选自由C₁₋₆亚烷基、-NH-、-C(0)-、(-CH₂-CH₂-O)_e、-NH-CH₂-CH₂-(-O-CH₂-CH₂)_e-C(0)-、-C(0)-(CH₂)_u-C(0)-、-C(0)-NH-(CH₂)_v-、和其组合组成的组，其中下标e是从0至4的整数，下标u是从1至8的整数，和下标v是从1至8的整数。

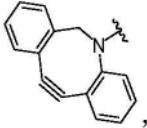
[0392] 本发明使用的短语“活性连接体”、或其缩写“RL”是指包含活性基团和连接基团的一价基团，表示为RG-L- ξ ，其中RG是所述活性基团，L是所述连接基团。所述连接基团是将所述活性基团桥接至有效负载的任何二价基团部分。所述连接基团还包括桥接所述活性基团、环糊精部分和有效负载的任何三价基团部分。所述活性连接体(RL)与同它们连接的有效负载一起构成可用作制备本发明所述抗体类固醇偶联物的合成前体的中间体(“连接体-有效负载”)。所述活性连接体包含活性基团(“RG”), 其是与抗体、经修饰的抗体或其抗原结合片段的活性部分反应的官能团或基团部分。由所述活性基团与抗体、经修饰的抗体或其抗原结合片段反应而产生的基团部分与所述连接基团一起，构成本发明所述偶联物的“结合剂连接体”(“BL”)部分。在某些实施方案，所述“活性基团”是与抗体或其抗原结合片段的半胱氨酸残基或赖氨酸残基反应的官能团或基团部分(例如，马来酰亚胺或NHS酯)。在某些实施方案，所述“活性基团”是能够进行点击化学反应的官能团或基团部分。在所述点击化学反应的一些实施方案中，所述活性基团是能够与叠氮化物进行1,3-环加成反应的炔烃。此类合适的活性基团包括但不限于应变炔烃类，例如适用于应变促进的炔-叠氮化物环加成(SPAAC)的那些，环炔烃类，例如环辛炔类，苯并环化的炔烃类，和在没有铜催化剂的情况下能够与叠氮化物进行1,3-环加成反应的炔烃类。合适的炔烃类还包括但不限于DIBAC, DIBO, BARAC, 取代的例如氟化炔烃类，氮杂-环炔烃类, BCN及其衍生物。包含此类活性基团的连接体-有效负载可用于偶联已用叠氮基官能化的抗体。此类官能化抗体包括用叠氮基-聚乙二醇基团官能化的抗体。在某些实施方案，此类官能化抗体通过在酶转谷氨酰胺酶存在下，使包含至少一个谷氨酰胺残基(例如重链Q295)的抗体与式H₂N-LL-N₃所示化合物反应而得到，其中LL是例如二价聚乙二醇基团，或其中LL是包括聚乙二醇和环糊精部分的三价

基团。在一些实施方案，所述抗体是具有以下结构的官能化抗体：



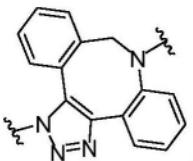
其中Ab是抗体，R是烃基，n是从1至10的整数，w是从1至10的整数。在某些实施方案，R是亚乙基。在某些实施方案，n是3。在某些实施方案，w是2或4。

在一些实施例，所述活性基团是炔烃，例如



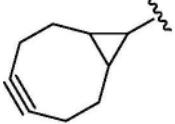
其可通过点击化学与叠氮化

物，例如 $\text{N}=\text{N}=\text{N}$ 反应，以形成点击化学产物，例如



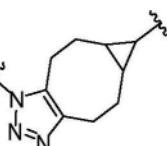
其区域异构体，或其混

合物。在一些实施例，所述活性基团是炔烃，例如



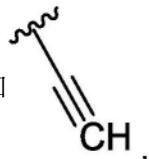
其可通过点击化学与叠氮化

物，例如 $\text{N}=\text{N}=\text{N}$ 反应，以形成点击化学产物，例如



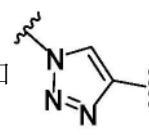
在一些实施例，所述活

性基团是炔烃，例如



其可通过点击化学与叠氮化物，例如 $\text{N}=\text{N}=\text{N}$ 反应，以形成

点击化学产物，例如

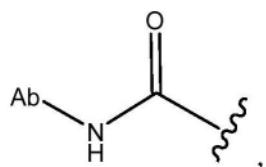


其区域异构体，或其混合物。在一些实施例，所述活性基团

是官能团，例如 $\text{O}=\text{C}=\text{N}-\text{S}$ ，其与抗体或其抗原结合片段上的半胱氨酸残基反应，与其形成键，

例如 $\text{Ab}-\text{S}-\text{C}(=\text{O})-\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{S}-\text{Ab}$ ，其中Ab是指抗体或其抗原结合片段，S是指半胱氨酸残基上的S原子，所述官能团通过此半胱氨酸残基上的S原子与Ab结合。在一些实施例，所述活性基团是官能团，例

如 $\text{O}=\text{C}=\text{N}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{S}-\text{Ab}$ ，其与抗体或其抗原结合片段上的赖氨酸残基反应，与其形成键，例如

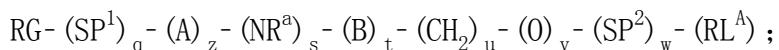


其中Ab是指抗体或其抗原结合片段,和-NH-是指赖氨酸残基上的末端,

所述官能团通过此赖氨酸残基上的末端与Ab结合。在一些实施例,官能团连接的赖氨酸残



[0393] 在一些实施方案,RL是式(RL^A)所示的一价基团部分;



其中,RG是活性基团;

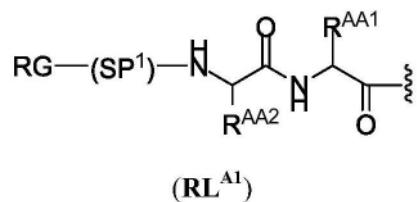
A是氨基酸或肽;

R^a 是H或烷基;

B是芳基、杂芳基、或杂环烷基,其中芳基、杂芳基、或杂环烷基任选地被烷基、-OH、或-N-R^aR^b取代;

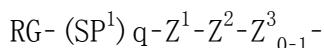
SP¹和SP²分别独立地为间隔基团;和q、z、s、t、u、v和w在每种情况下,独立地为0或1。

[0394] 在一些实施方案,RL是RG- $(SP^1)_q - (A)_z$ 。在一些实施方案,RL是RG- $(SP^1)_q - (A)_2$ 。在一些实施方案,RL是式(RL^{A1})所示的基团部分:



其中R^{AA1}和R^{AA2}各自独立地为氨基酸侧链。在式RL^{A1}的一些实施例中,SP¹是二价聚乙二醇基团,和RG是包含炔烃的基团,所述炔烃能够与叠氮化物进行1,3-环加成反应。

[0395] 在一些实施方案,RL具有一些结构:



其中:

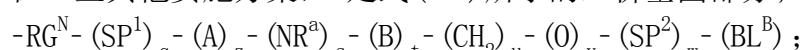
RG、SP¹和q均具有本发明所述定义;

Z¹是聚乙二醇基团或己酰基基团;

Z²是二肽;和

Z³是PAB基团。

[0396] 在一些其他实施方案,BL是式(BL^B)所示的三价基团部分;



其中RG^N具有本发明所述定义;

A是三肽,其中所述三肽中的所述氨基酸中的至少一个直接或间接地连接至环糊精部分;

R^a 是H或烷基;

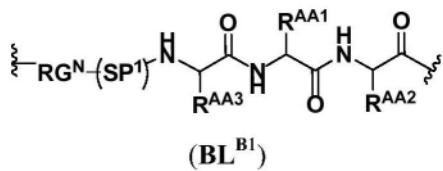
B是芳基、杂芳基、或杂环烷基，其中芳基、杂芳基、或杂环烷基任选地被烷基、-OH、或-NR^aR^b取代；

SP¹和SP²分别独立地为间隔基团；和q、z、s、t、u、v和w在每种情况下，独立地为0或1。

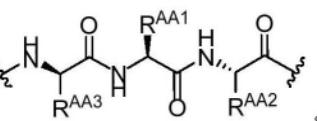
[0397] 在一些实施例，所述环糊精(CD)直接连接至氨基酸残基，例如赖氨酸氨基酸残基。这意味着CD远离赖氨酸氨基酸共价连接体一个键位置。在这些实施例的一些中，所述共价连接体还直接连接至有效负载部分。这意味着共价连接体远离有效负载(例如但不限于本发明所述的类固醇有效负载)一个键位置。在这些实施例的一些中，所述共价连接体还直接与CD部分连接。这意味着所述共价连接体远离CD(例如本发明所述的CD)一个键位置。在这些实施例的一些中，所述共价连接体是赖氨酸氨基酸或其衍生物。

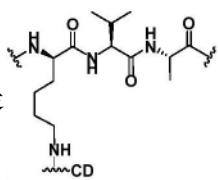
[0398] 在一些实施例，所述CD间接连接至连接基团(例如BL)中的共价连接体上。这意味着所述CD远离所述共价连接体多于一个键位置。这还意味着所述CD通过另一基团部分与所述共价连接体连接。例如，所述CD可以与马来酰亚胺基团连接，所述马来酰亚胺基团与聚乙二醇基团连接，所述聚乙二醇基团与所述共价连接体连接。在这些实施例的一些中，所述共价连接体还间接连接至有效负载部分。这意味着所述共价连接体远离有效负载(例如但不限于，本发明所述的类固醇有效负载)多于一个键位置。这还意味着所述共价连接体通过另一基团部分与所述有效负载连接。例如，所述共价连接体可以与二肽连接，例如但不限于Val-Ala或Val-Cit，其可与对氨基苯甲酰连接，所述对氨基苯甲酰可与所述有效负载连接。在这些实施例的一些中，所述共价连接体还间接与环糊精部分连接。这意味着所述共价连接体远离环糊精(例如本发明所述的环糊精)多于一个键位置。这还意味着所述共价连接体通过另一基团部分与所述环糊精连接。例如，所述共价连接体可与聚乙二醇基团连接，所述聚乙二醇基团可与活性基团连接，所述活性基团可与所述环糊精连接。在这些实施例的一些中，所述共价连接体是赖氨酸氨基酸或其衍生物。

[0399] 在一些实施方案，BL是-RG^N- (SP¹)_q - (A)_z -。在一些实施方案，BL是-RG^N- (SP¹)_q - (A)₂ -。在一些实施方案，BL是式(BL^{B1})所示的基团部分：



其中R^{AA1}和R^{AA2}各自独立地为氨基酸侧链。R^{AA3}是与环糊精部分直接或间接连接的氨基酸侧链。在式RL^{B1}的一些实施例中，SP¹是二价聚乙二醇基团，和RG^N是炔烃与叠氮化物之间反应的1,3-环加成反应加成物。

[0400] 在一些实施例，A是。在这些实施例的一些中，R^{AA1}是氨基酸侧链，R^{AA2}是氨基酸侧链，和R^{AA3}是与环糊精部分直接或间接连接的氨基酸侧链。

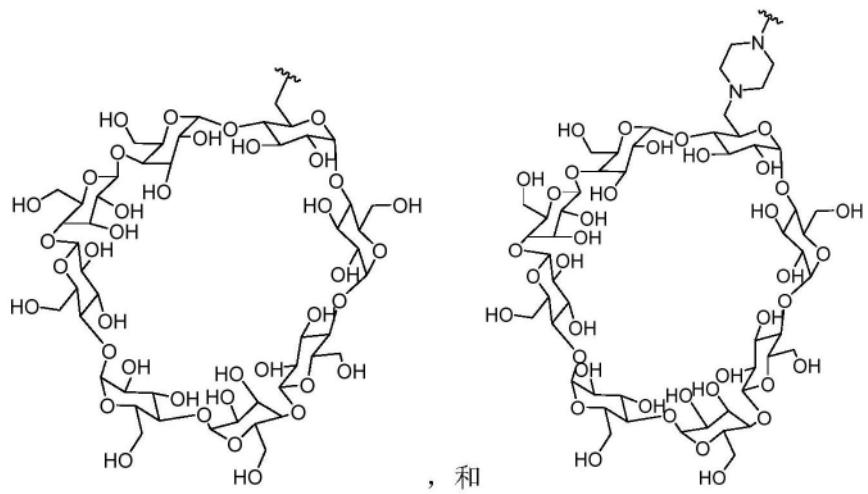
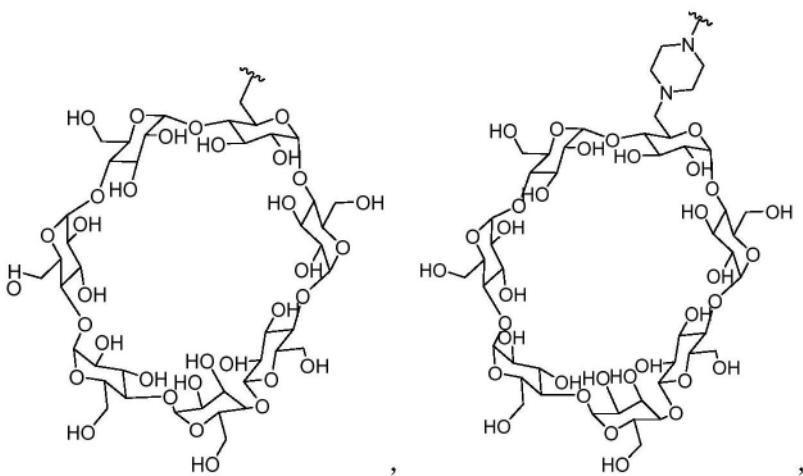
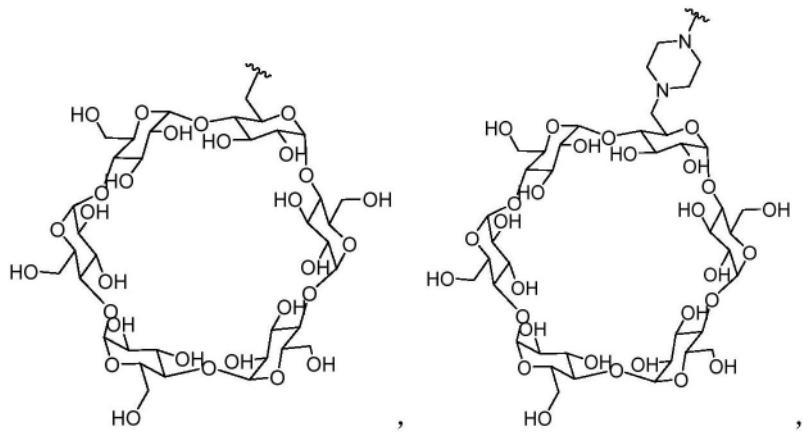


[0401] 在一些实施例,A是

其中 *weww* CD 表示与环糊精部分直接或间接

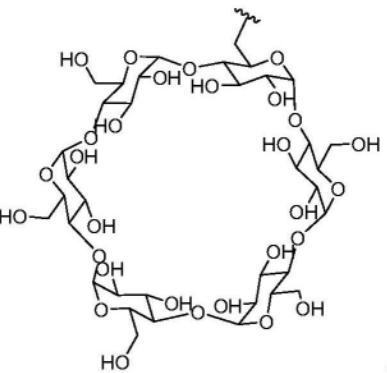
连接的键。

[0402] 在一些实施例,包括前述任一实施例,CD在每种情况下独立地选自:

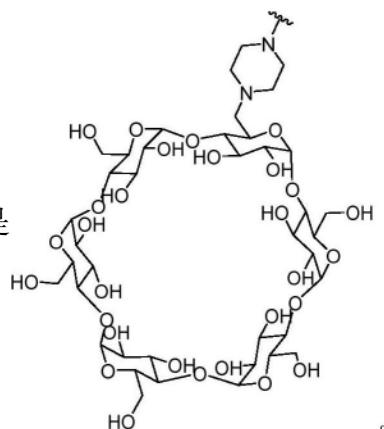


, 和

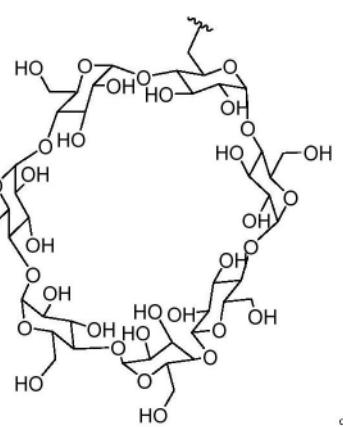
在一些实施例，所述CD是



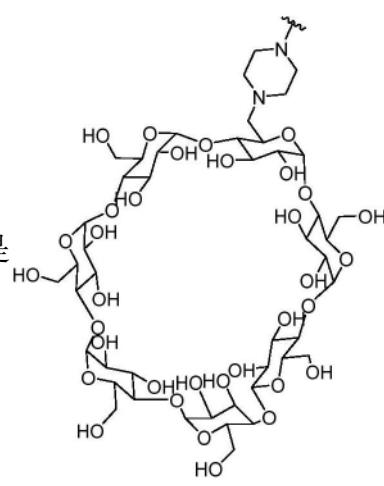
在一些实施例，所述CD是



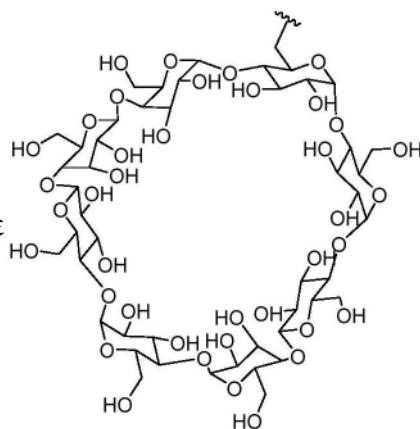
在一些实施例，所述CD是



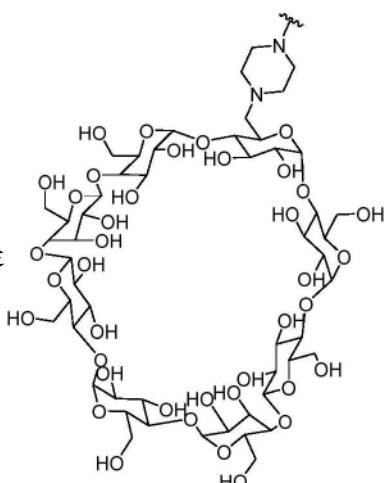
在一些实施例，所述CD是



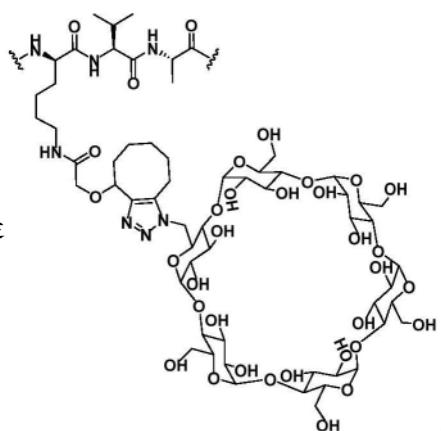
在一些实施例，所述CD是



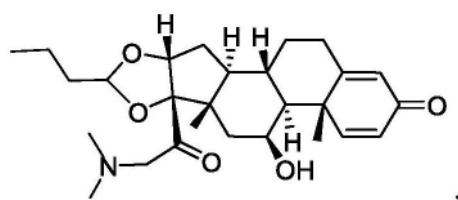
在一些实施例，所述CD是



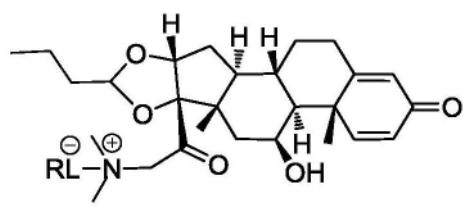
[0403] 在一些实施例，A是

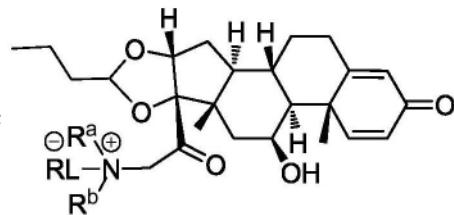


[0404] 在一些实施方案，所述RL连接至叔胺。譬如，如果所述类固醇是以下化合物：



则所述RL可如下所示与所述叔胺连接：





[0405] 在一些实施例，本发明提供了如下所示化合物：

其中：

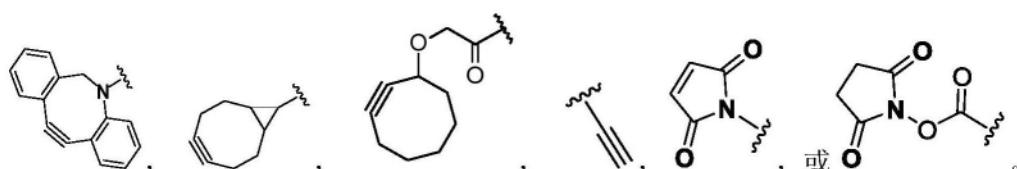
RL是具有上述定义的活性连接体；

R^a和R^b在每种情况下，独立地为-H或烷基。

[0406] 在一些实施例，本发明的RG选自点击化学活性基团。

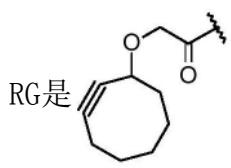
[0407] 在一些其他实施例，本发明的RG选自与抗体或其抗原结合片段上的半胱氨酸残基或赖氨酸残基反应的基团。

[0408] 在一些实施方案，RG是：

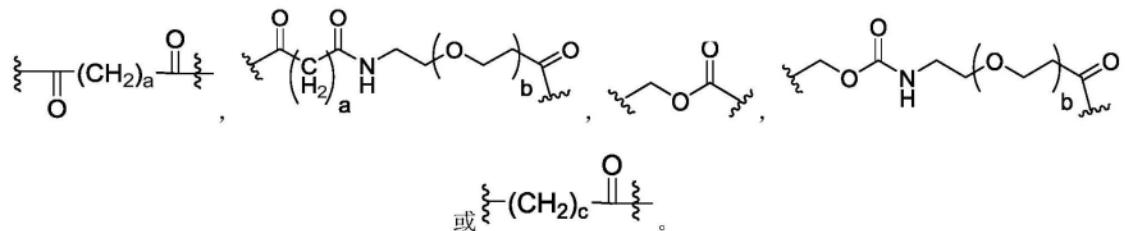


在一些实施例，RG是 。在其他实施例，RG是 。在一些其他实施例，RG是 。

RG是 。在一些实施例，RG是 。在其他实施例，RG是 。在其他实施例，RG是 。

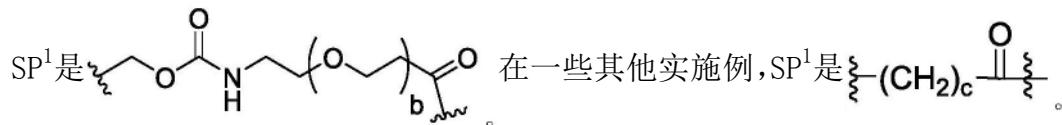


[0409] 在一些实施方案，SP¹可选自：



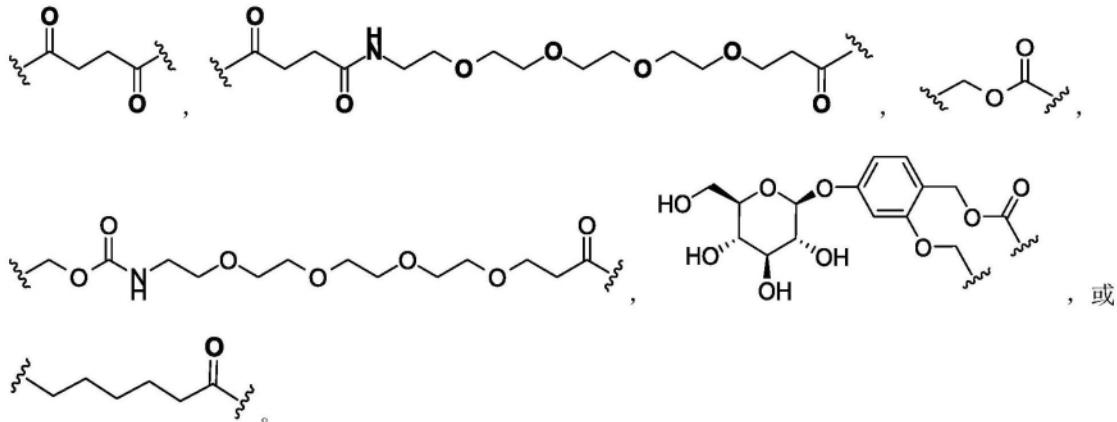
在一些实施例，SP¹是 。在一些其他实施例，SP¹是 .

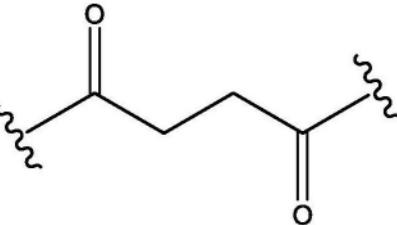
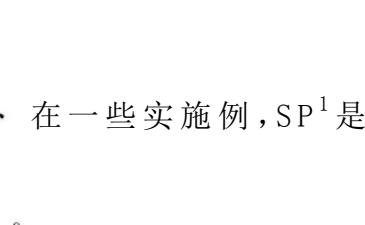
在其他实施例，SP¹是 。在其他实施例，SP¹是 .

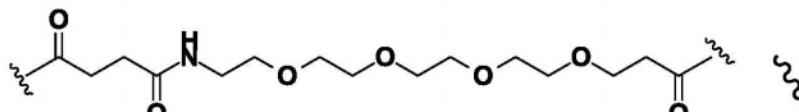
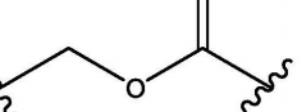


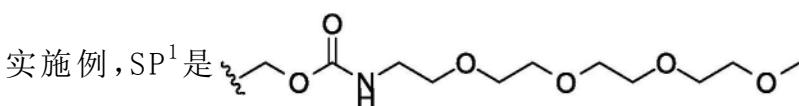
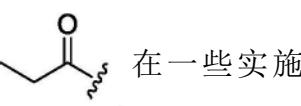
[0410] 在任一上述实施例中,下标a、b和c在每种情况下,独立地为从1至20的整数。

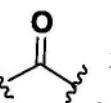
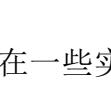
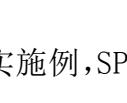
[0411] 在式(II)、(IIa)、(IIb)、或(IIc)任一所示化合物中,SP¹可选自:

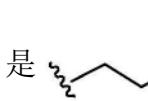
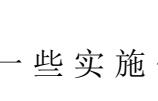


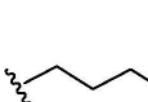
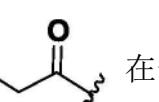
[0412] 在一些实施例,SP¹是。在一些实施例,SP¹是.

实施例,SP¹是。在一些实施例,SP¹是.

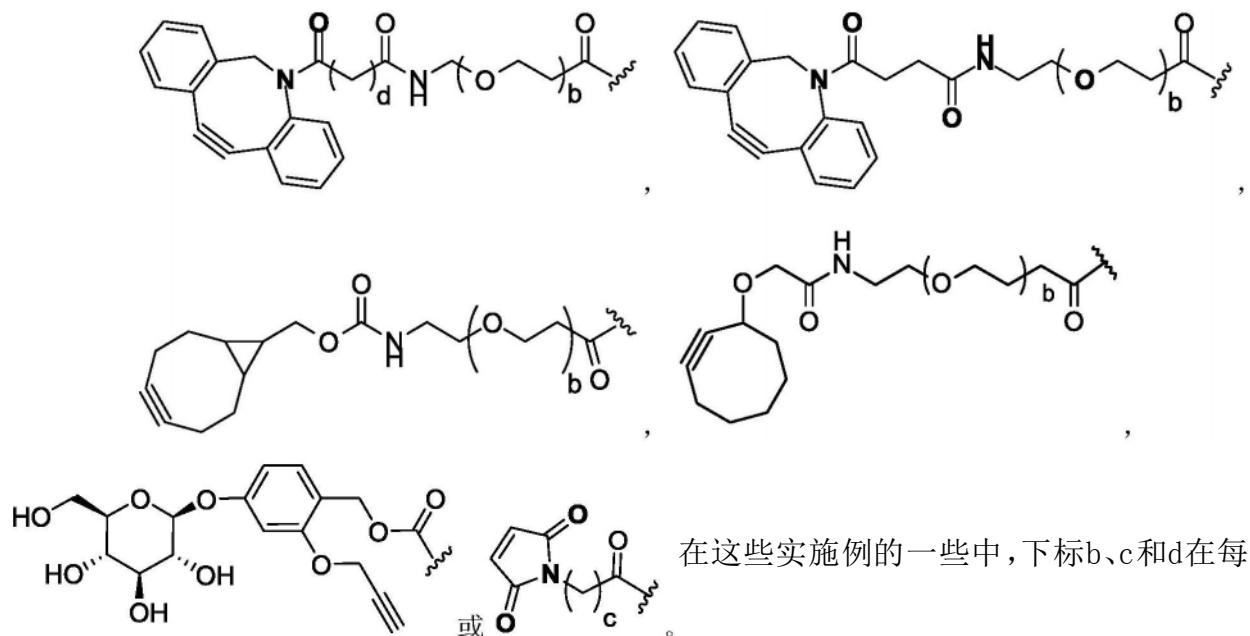
实施例,SP¹是。在一些实施例,SP¹是.

[0413] 在一些实施例,SP¹是。在一些实施例,SP¹是。在一些实施例,SP¹是.

是。在一些实施例,SP¹是。在一些实施例,SP¹是.

在一些实施例,SP¹是。在一些实施例,SP¹是.

[0414] 在一些实施方案,RL-SP¹可选自由以下组成的组:



[0415] 在一些实施例，RL-SP¹-是 在一些实施例，
。

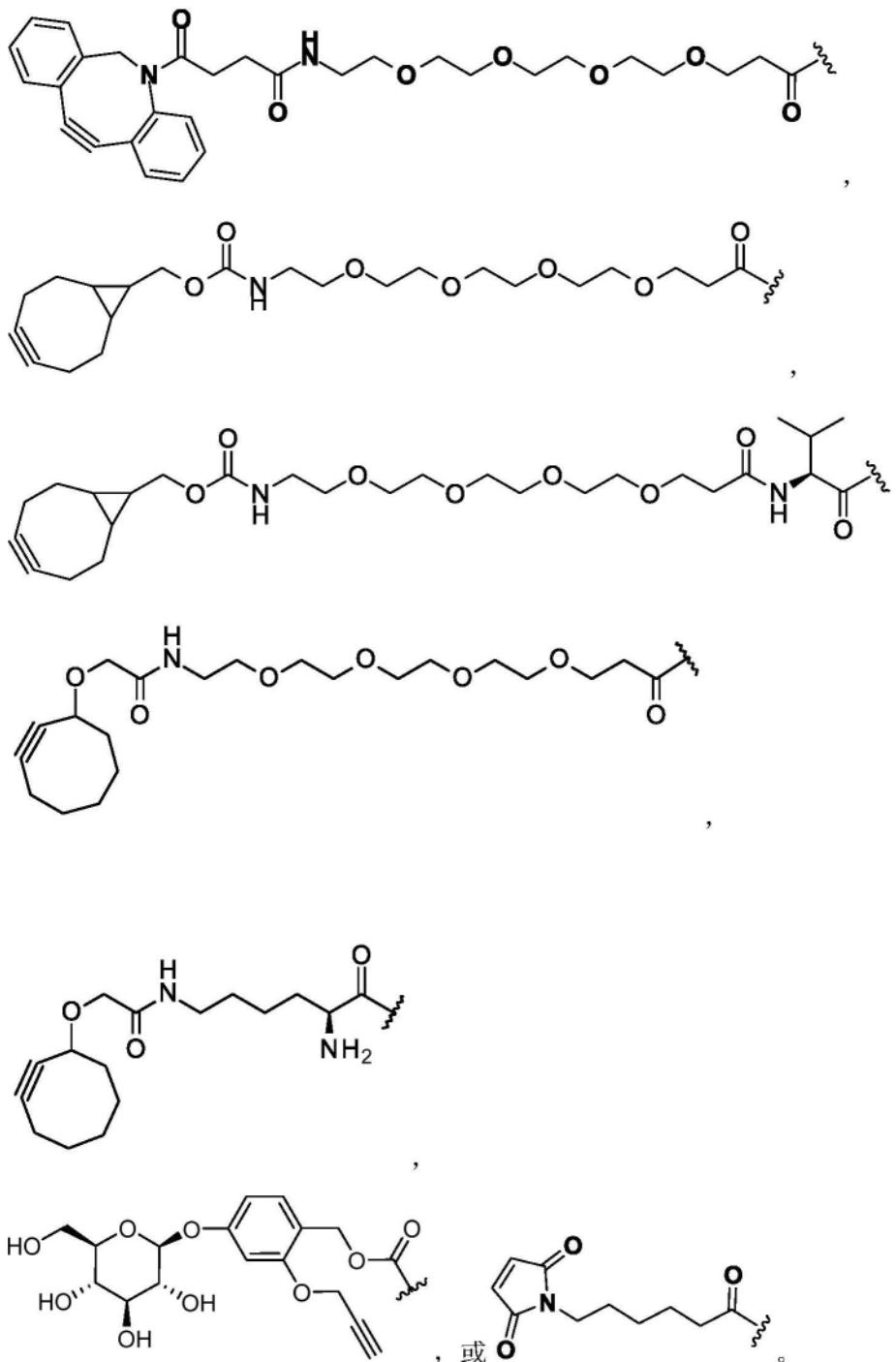
RL - SP¹ 是 在一些实施例，RL - SP¹ 是
。

在一些实施例，RL-SP¹是
。

在一些实施例，RL-SP¹是
。

在一些实施例，RL-SP¹是 。
。

[0416] 在式(II)、(IIa)、(IIb)、或(IIc)任一所示化合物中，RL-SP¹选自：



[0417] 在一些实施方案，A是选自缬氨酸-瓜氨酸，瓜氨酸-缬氨酸，赖氨酸-苯丙氨酸，苯丙氨酸-赖氨酸，缬氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-缬氨酸，苏氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-苏氨酸，丝氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-丝氨酸，苯丙氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-苯丙氨酸，亮氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-亮氨酸，异亮氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-异亮氨酸，甘氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-甘氨酸，谷氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-谷氨酸，瓜氨酸-天冬酰胺，天冬酰胺-瓜氨酸，丙氨酸-天冬酰胺，或天冬酰胺-丙氨酸的肽。

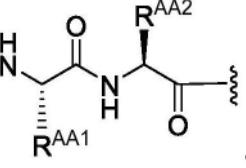
[0418] 在一些实施例，A是缬氨酸-瓜氨酸，或瓜氨酸-缬氨酸。

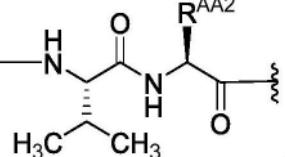
[0419] 在一些实施例，A是缬氨酸-丙氨酸，或丙氨酸-缬氨酸。

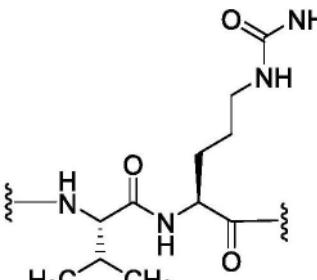
[0420] 在一些实施例，A是缬氨酸。

[0421] 在一些实施例,A是丙氨酸。

[0422] 在一些实施例,A是瓜氨酸。

[0423] 在一些实施例,A是。在这些实施例的一些中,R^{AA1}是氨基酸侧链,和其中R^{AA2}是氨基酸侧链。

[0424] 在一些实施例,A是.

[0425] 在一些实施例,A是.

[0426] 在一些实施例,R^a是H。

[0427] 在一些实施例,R^a是烷基。

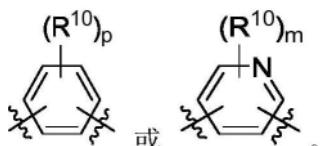
[0428] 在一些实施例,R^a是甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、或戊基。

[0429] 在一些实施方案,B是芳基。

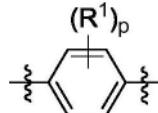
[0430] 在一些实施例,B是苯基。

[0431] 在式(II)、(IIa)、(IIb)、或(IIc)所示化合物的一些实施例中,B是苯基或吡啶基。

[0432] 在本发明的一些实施例中,B是:

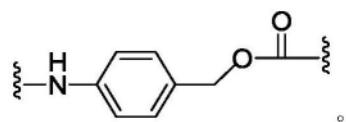


[0433] 在这些实施例中,R¹⁰是烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、卤素、卤代烷基、卤代烷氧基、杂芳基、杂环烷基、羟基、氰基、硝基、-OR^A、-SO₂R^A、-C(=O)R^A、NR^aR^b、或叠氮基。在这些实施例中,下标p和m在每种情况下,分别独立地选自从0至4的整数。

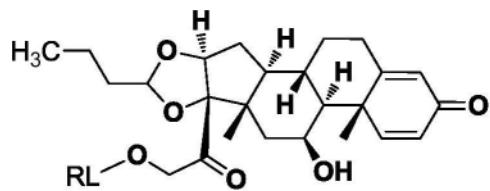
在本发明的一些实施例中,B是:。在这些实施例中,p是0、1、2、3或4。在这些实施

例的一些中,R¹在每种情况下独立地为烷基、烷氧基、卤代烷基、或卤素。在一些实施例,R¹是烷基。在一些实施例,R¹是烷氧基。在一些实施例,R¹是卤代烷基。在一些实施例,R¹是卤素。

[0434] 在式(RL^A)的一些实施方案中,所述-(NR^a)_s-(B)_t-(CH₂)_u-(O)_v-(SP²)_w是:

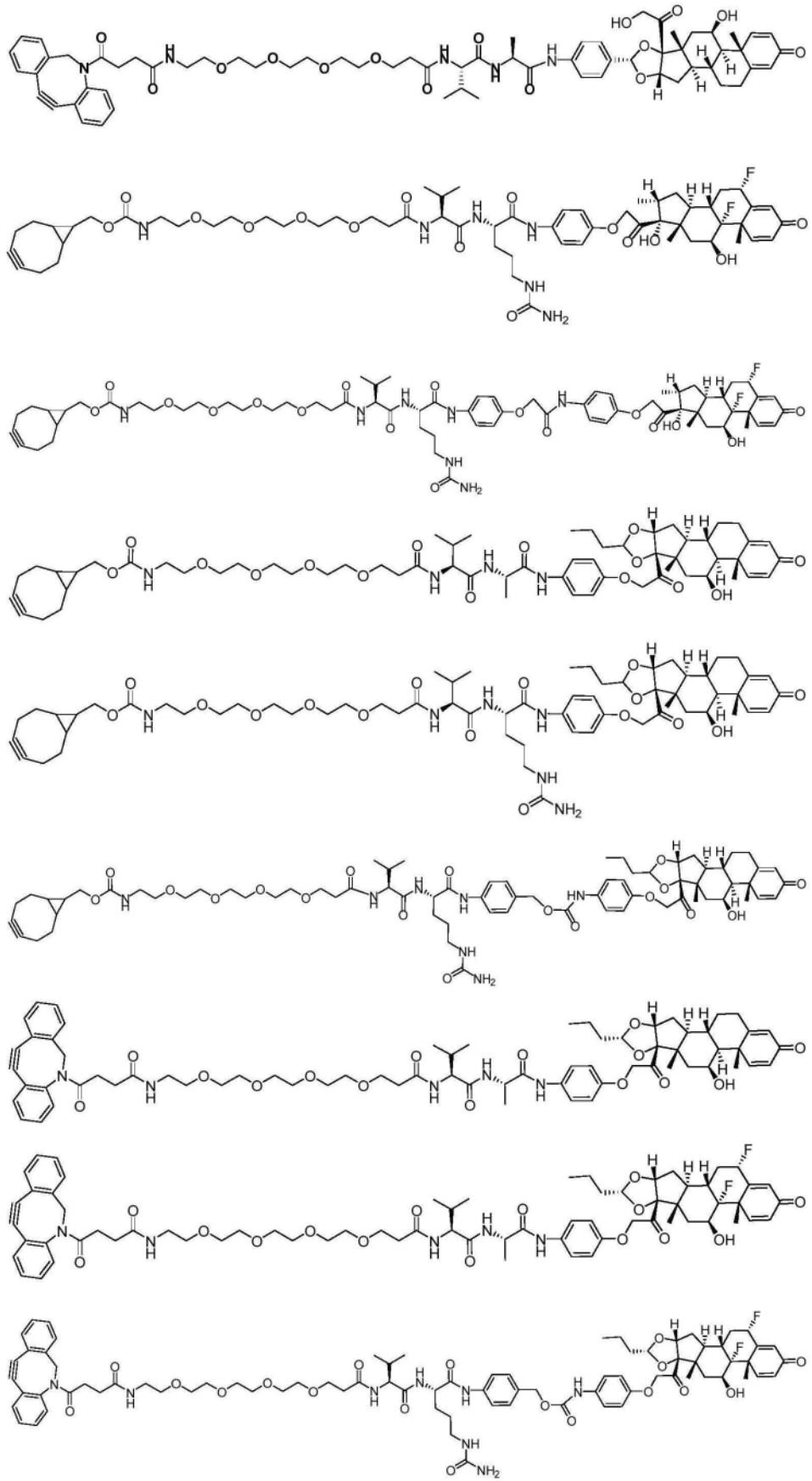


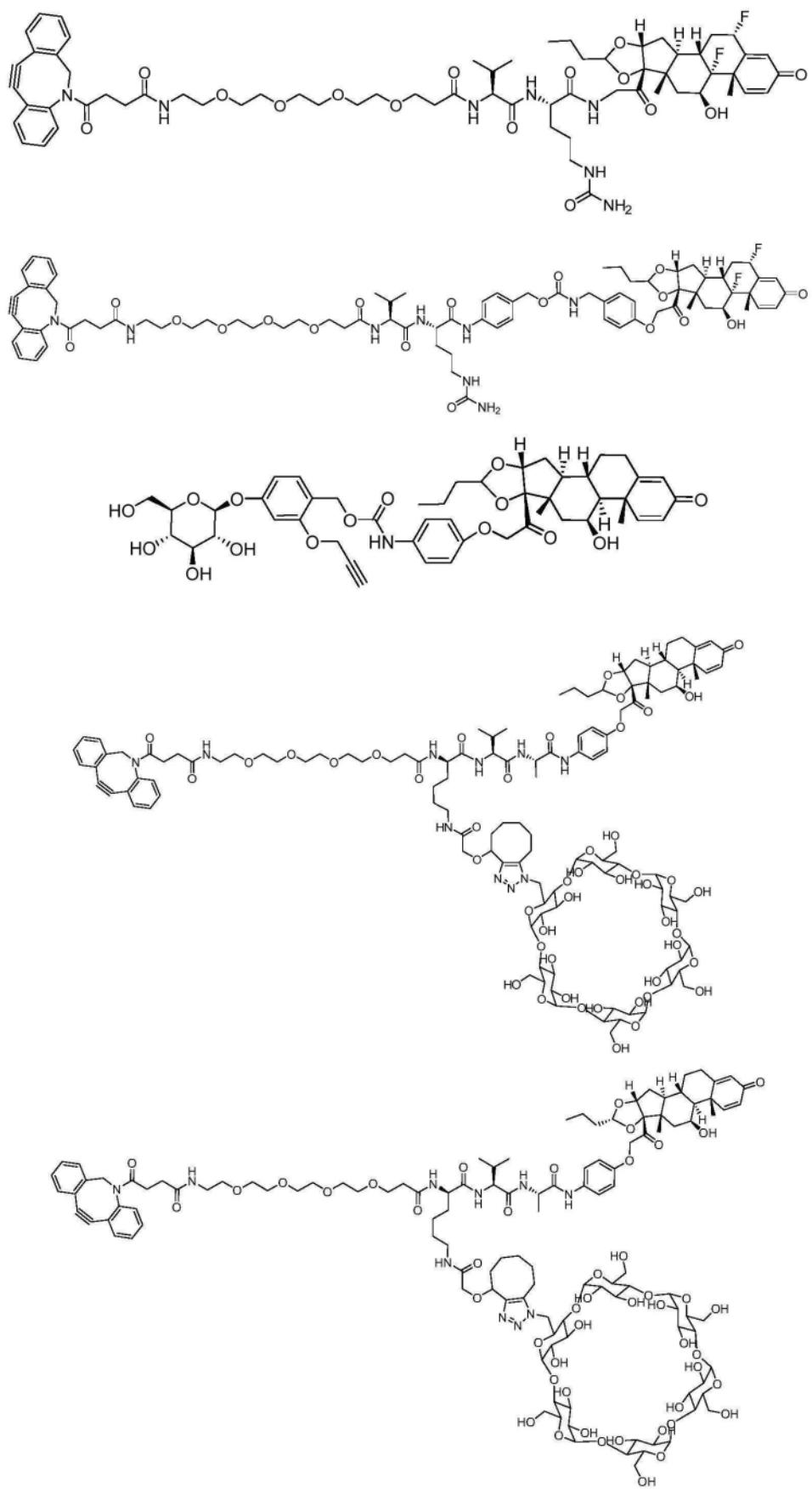
[0435] 本发明还提供了布地奈德或二氟拉松的连接体-有效负载。在一些实施方案，本发明提供了具有以下结构的连接体-有效负载：

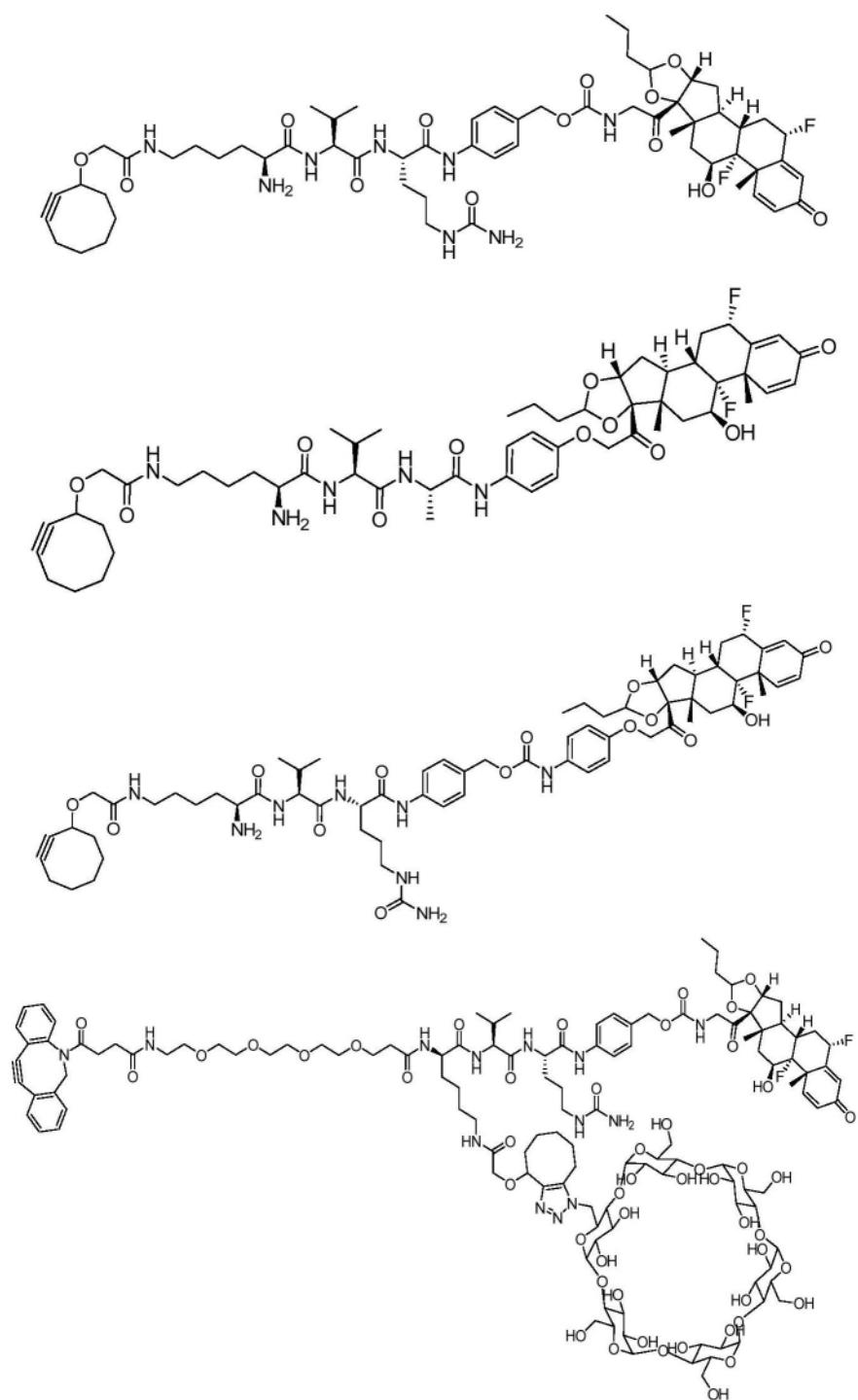


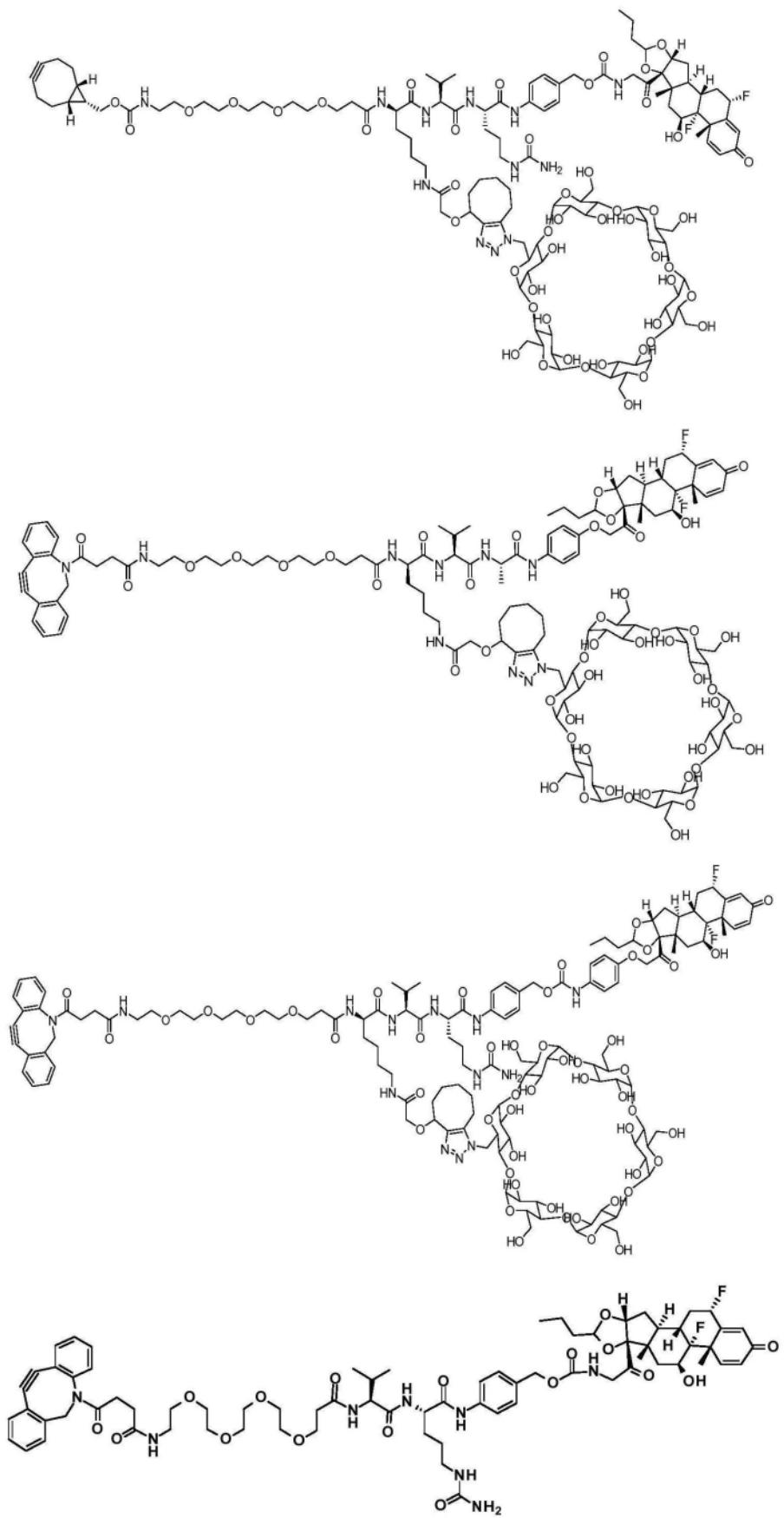
其中RL是活性连接体。

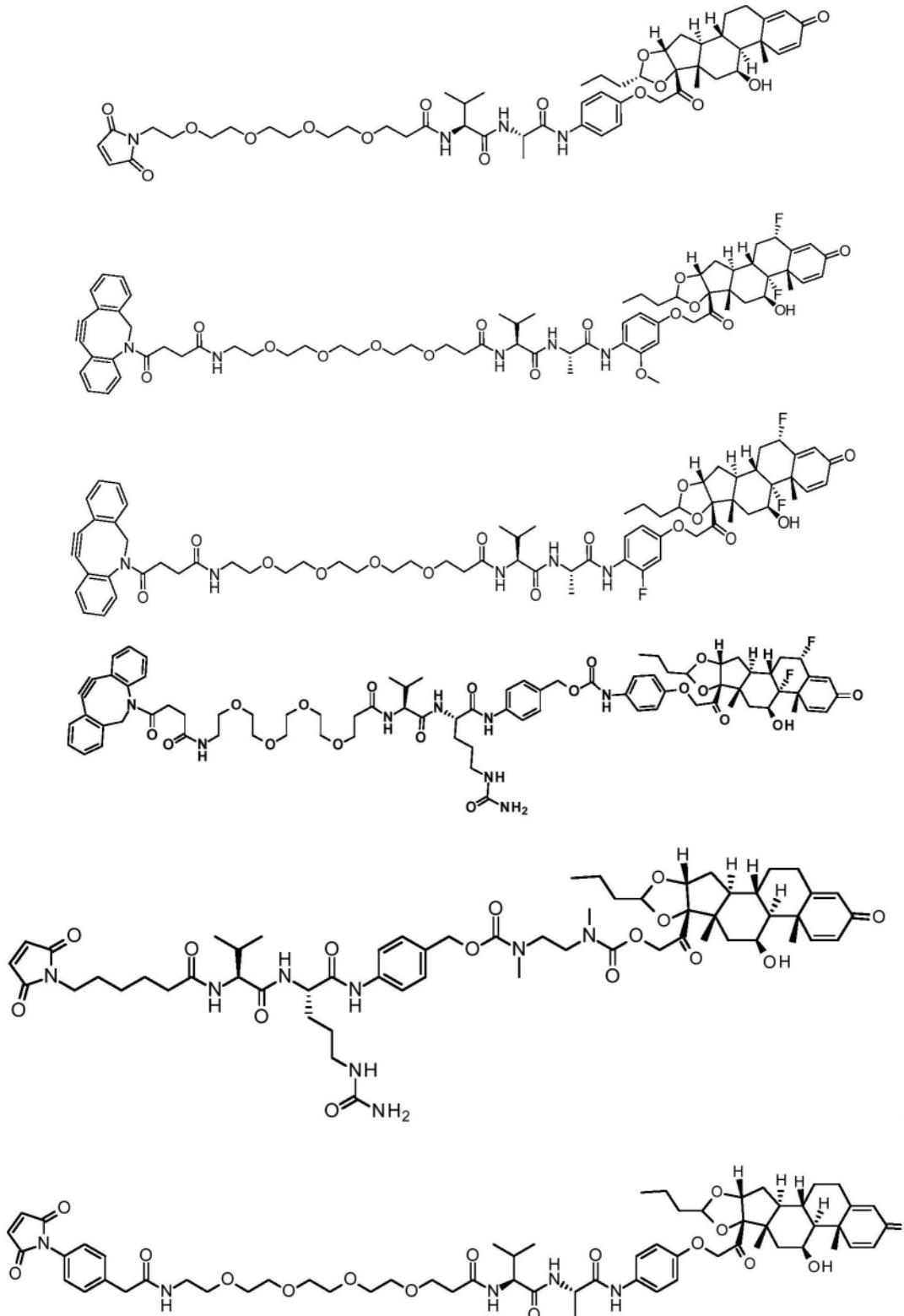
[0436] 连接体-有效负载的实例包括,但不限于：











及其盐。

E. 药物组合物和治疗方法

[0437] 本发明包括治疗疾病、病症或病况(例如炎性疾病和自身免疫性病症)或控制其症状的方法,包括施用治疗有效量的一种或多种本发明公开的化合物。包括与糖皮质激素受体、糖皮质激素结合和/或糖皮质激素受体信号传导相关的任何疾病、病症或病况。此类方法包括向患者施用本发明所述的类固醇有效负载或其蛋白质偶联物。因此,包括在本发明

中的是治疗与糖皮质激素受体相关的疾病、病症或病况的方法,包括对患有所述疾病、病症或病况的患者施用式(I)、(I)¹的化合物或其蛋白质偶联物,例如式(III)所示化合物。本发明提供了治疗与糖皮质激素受体相关的疾病、病症或病况的方法,包括施用选自由式(A)、(A¹)、(A²)、(A³)、(A⁴)、(A⁵)、(A⁶)、(A⁷)、(I)、(I¹)、(PIa)、(PIb-1)、(PIb-2)、(PIc-1)、(PIc-2)、(PID-1)、(PID-2)、(PIe-1)、(PIe-2)、(PII)、(PIIa)、(PIIb)、(PIII)、(PIIIa)、(PIIIb)、(PIV)、(PV)、(PVa)、(PVb)、(PVI)、(PVII)、(PVIIa)、(PVIIb)、(PVIIb-1)、(PVIIb-2)、(PVIII)、和其组合组成的组的化合物的蛋白质偶联物。

[0438] 在一些实施方案,所述疾病、病症或病况是过敏状态,包括但不限于哮喘,特应性皮炎,接触性皮炎,药物过敏反应,常年性或季节性过敏性鼻炎,和血清病;皮肤病,包括但不限于大疱性疱疹性皮炎,剥脱性红皮病,蕈样真菌病,天疱疮,和多形性严重红斑(Stevens-Johnson综合征);内分泌失调,包括但不限于原发性或继发性肾上腺皮质功能不全,先天性肾上腺增生,与癌症相关的高钙血症,和非化脓性甲状腺炎;胃肠道疾病;血液系统疾病,包括但不限于获得性(自身免疫性)溶血性贫血,先天性(红系)发育不良性贫血(Diamond-Blackfan贫血),成人特发性血小板减少性紫癜,纯红细胞再生障碍,和继发性血小板减少症;旋毛虫病;结核性脑膜炎伴蛛网膜下腔阻滞或即将阻滞;肿瘤性疾病,包括但不限于白血病和淋巴瘤;神经系统疾病,包括但不限于多发性硬化症的急性加重,与原发性或转移性脑肿瘤相关的脑水肿,开颅手术,或头部损伤;眼科疾病,包括但不限于交感性眼炎,颞动脉炎,葡萄膜炎,和对局部皮质类固醇无反应的眼部炎症;肾脏疾病,包括但不限于诱发特发性肾病综合征或红斑狼疮引起的利尿或蛋白尿缓解;呼吸系统疾病,包括但不限于铍中毒,与适当的抗结核化疗同时使用时的暴发性或播散性肺结核,特发性嗜酸性粒细胞性肺炎,症状性结节病;和风湿性疾病,包括但不限于用于急性痛风性关节炎,急性风湿性心脏炎,强直性脊柱炎,银屑病性关节炎,类风湿性关节炎,包括青少年类风湿性关节炎的短期给药的辅助治疗(使患者渡过急性发作或恶化),以及用于皮肌炎,多发性肌炎和系统性红斑狼疮。

[0439] 在一些实施例,本发明提供了用于治疗疾病、病症或病况的方法,所述疾病、病症或病况选自自身免疫性疾病,过敏(变态反应),关节炎,哮喘,呼吸障碍,血液疾病,癌症,胶原病,结缔组织疾病,皮肤疾病,眼病,内分泌问题,免疫疾病,炎性疾病,肠道疾病,胃肠道疾病,神经疾病,器官移植病症,类风湿性疾病,皮肤病,肿胀病症,伤口愈合病症,及其组合,包括施用本发明所述的类固醇有效负载或其偶联物。

[0440] 在一些实施例,所述自身免疫性疾病选自多发性硬化症,自身免疫性肝炎,带状疱疹,系统性红斑狼疮(即狼疮),重症肌无力,杜氏肌营养不良,和结节病。在一些实施例,所述呼吸障碍选自哮喘,慢性阻塞性肺病,支气管炎症,和急性支气管炎。在一些实施例,所述癌症选自白血病,淋巴细胞白血病,急性淋巴细胞白血病,慢性淋巴细胞白血病,霍奇金淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤(NHL),和多发性骨髓瘤。在一些实施例,所述胶原疾病是系统性红斑狼疮。在一些实施例,所述眼病是角膜炎。在一些实施例,所述内分泌问题选自爱迪生氏病(Addison's Disease),肾上腺皮质功能不全,肾上腺皮质和先天性肾上腺增生。在一些实施例,所述炎性疾病选自关节炎症,肌腱炎症,滑囊炎,上髁炎,克罗恩病(Crohn's disease),炎性肠病,脂性肺炎甲状腺炎,荨麻疹,心包炎,肾病综合征,和葡萄膜炎。在一些实施例,所述肠道疾病选自溃疡性结肠炎,克罗恩病和炎性肠病。在一些实施例,所述类风

湿性疾病选自类风湿性关节炎,风湿性多肌痛,银屑病性关节炎,强直性脊柱炎,和系统性红斑狼疮。在一些实施例,所述皮肤病选自牛皮癣,湿疹,和接触毒漆引起的皮疹(poison ivy)。在一些实施例,所述神经疾病是慢性炎性脱髓鞘性多发性神经根神经病。

[0441] 在一些实施方案,将本发明所述的化合物施用于患者以治疗急性炎症性事件,包括但不限于休克,脑水肿和移植物抗宿主病。在一些实施方案,施用本发明所述的化合物以治疗淋巴溶解作用,包括但不限于与血液恶性肿瘤相关的那些,例如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。

[0442] 在一些实施例,本发明提供了用于减轻有此需要的受试者的炎症的方法,其包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的本发明所述的类固醇或其偶联物。在一些实施例,本发明提供了用于调节有此需要的受试者的免疫系统的方法,其包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的本发明所述的类固醇或其偶联物。在一些实施例,本发明提供了用于调节有此需要的受试者的皮质醇水平的方法,其包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的本发明所述的类固醇或其偶联物。在一些实施例,本发明提供了减少有此需要的受试者中淋巴细胞迁移的方法,其包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的本发明所述的类固醇或其偶联物。在一些实施例,本发明提供了治疗由癌症引起的高钙血症,梅尼埃病(Meniere's disease),偏头痛,丛集性头痛,严重口疮性溃疡,喉炎,严重结核病,对梅毒的Hershheimer反应,失代偿性心力衰竭,过敏性鼻炎或鼻息肉的方法,其包括向有此需要的受试者施用本发明所述的类固醇有效负载或其偶联物。在一些实施例,本发明公开的化合物可用于治疗炎性肠病,克罗恩病或溃疡性结肠炎。在一些实施例,所述疾病、病症或病况是慢性炎性疾病,包括但不限于哮喘,皮肤感染和眼部感染。在一些实施例,本发明所述的化合物用于进行器官移植的患者的免疫抑制。

[0443] 在一些实施方案,将本发明所述的类固醇有效负载及其偶联物施用于患者以治疗与GR信号传导相关的神经病症,包括但不限于精神疾病例如精神分裂症,药物成瘾,创伤后应激障碍(PTSD),情绪障碍,药物滥用,压力和焦虑。在一些实施方案,将本发明所述的类固醇有效负载及其偶联物施用于患者以治疗视觉系统疾病,包括但不限于眼部炎症(例如,结膜炎、角膜炎、葡萄膜炎),黄斑水肿和黄斑变性。在一些实施方案,将本发明所述的类固醇有效负载及其偶联物施用于患者以治疗心血管疾病。在一些实施方案,将本发明所述的类固醇有效负载及其偶联物施用于患者以治疗葡萄糖和/或肝代谢紊乱。在一些实施方案,将本发明所述的类固醇有效负载及其偶联物施用于患者以治疗肌肉骨骼系统疾病。在一些实施方案,将本发明所述的类固醇有效负载及其偶联物施用于患者以治疗皮肤炎性病症,例如湿疹和牛皮癣。

[0444] 本发明所述的蛋白质偶联物提供了将其类固醇有效负载靶向递送至特定细胞或器官系统的手段,从而减少或预防由施用游离的未偶联的类固醇有效负载引起的副作用。因此,本发明提供了治疗与糖皮质激素受体相关的疾病、病症或病况的方法,包括将式(I)或(I)¹的偶联物施用于患有所述疾病、病症或病况的患者,其中减少了与施用所述偶联物的所述游离类固醇有效负载相关的副作用。此外,本发明提供了将式(I)或(I)¹的化合物递送至细胞的方法,包括使所述细胞与式(I)或(I)¹的化合物的蛋白质偶联物接触,其中所述蛋白质偶联物包含结合所述细胞表面抗原的抗体或其抗原结合片段。

[0445] 本发明所述的化合物可以单独给药或与一种或多种附加治疗剂一同给药。所述一

种或多种附加治疗剂可在本发明所述化合物给药之前、同时给药,或给药不久之后进行给药。本发明还包括药物组合物,其包含本发明所述的任一化合物与一种或多种附加治疗剂组合使用/联用,以及治疗方法,其包含将此类组合施用于有此需要的患者。

[0446] 合适的附加治疗剂包括但不限于:第二糖皮质激素,自身免疫性治疗剂,激素,生物制剂或单克隆抗体。合适的治疗剂还包括但不限于本发明所述化合物的任何药学上可接受的盐类、酸类或衍生物类。

[0447] 本发明所述化合物还可与抗病毒剂类、抗生素类、镇痛剂类、皮质类固醇类、类固醇类、氧分子、抗氧化剂类、COX抑制剂类、心脏保护剂类、金属螯合剂类、IFN- γ 、和/或NSAID类组合/联合施用和/或共同配制。

[0448] 在本发明所述方法的一些实施方案中,多剂量的本发明化合物(或包含本发明所述化合物与本发明提及的任何附加治疗剂的组合的药物组合物)可在规定时间内对受试者进行给药。本发明此方面的方法包括向受试者顺序施用多剂量的本发明所述化合物。本发明使用的“依次施用/给药”是指每种剂量的所述化合物在不同的时间点,例如在以预定间隔(如几小时、几天、几周、或几个月)分开的不同天数,对受试者进行给药。本发明包括方法,其包含对患者依次施用单个初始剂量的本发明所述化合物,随后施用一个或多个二次剂量的所述化合物,以及任选地后续一个或多个三次剂量的化合物。

[0449] 术语“初始剂量”,“二次剂量”,和“三次剂量”是指本发明所述化合物的给药时间顺序。因此,“初始剂量”是在治疗方案开始时给药的剂量(也称为“基线剂量”);“二次剂量”是在所述初始剂量给药后施用的剂量;和“三次剂量”是在所述二次剂量给药后施用的剂量。所述初始、二次和三次剂量均可含有相同量的本发明化合物,但通常可在给药频率方面彼此不同。在一些实施方案,在治疗过程中,所述初始、二次和/或三次剂量中所含的化合物的量彼此变化(例如,酌情上调或下调)。在一些实施方案,在治疗方案开始时,将两种或更多种(例如,2、3、4或5种)剂量施用为“负荷剂量”,随后以较不频繁的方式施用后续剂量(例如“维持剂量”)。

[0450] 在本发明所述的一些示例性实施方案中,每个二次和/或三次剂量在紧随前述剂量之后进行给药1至26周(例如,1、 $1\frac{1}{2}$ 、2、 $2\frac{1}{2}$ 、3、 $3\frac{1}{2}$ 、4、 $4\frac{1}{2}$ 、5、 $5\frac{1}{2}$ 、6、 $6\frac{1}{2}$ 、7、 $7\frac{1}{2}$ 、8、 $8\frac{1}{2}$ 、9、 $9\frac{1}{2}$ 、10、 $10\frac{1}{2}$ 、11、 $11\frac{1}{2}$ 、12、 $12\frac{1}{2}$ 、13、 $13\frac{1}{2}$ 、14、 $14\frac{1}{2}$ 、15、 $15\frac{1}{2}$ 、16、 $16\frac{1}{2}$ 、17、 $17\frac{1}{2}$ 、18、 $18\frac{1}{2}$ 、19、 $19\frac{1}{2}$ 、20、 $20\frac{1}{2}$ 、21、 $21\frac{1}{2}$ 、22、 $22\frac{1}{2}$ 、23、 $23\frac{1}{2}$ 、24、 $24\frac{1}{2}$ 、25、 $25\frac{1}{2}$ 、26、 $26\frac{1}{2}$ 、或更多)。本发明使用的短语“紧随前述剂量”是指在多次给药的序列中,在施用紧邻下一个剂量之前,对患者施用本发明化合物的剂量,在所述给药序列中不存在干预剂量。

[0451] 本发明此方面的方法可包含向患者施用任何数量的二次和/或三次剂量的本发明化合物。譬如,在一些实施方案,仅向患者施用单次二次剂量。在其他实施方案,向患者施用两次或更多次(例如,2、3、4、5、6、7、8或更多次)二次剂量。同理,在一些实施方案,仅向患者施用单次的三次剂量。在其他实施方案,向患者施用两次或更多次(例如,2、3、4、5、6、7、8或更多次)三次剂量。给药方案可在特定受试者的寿命期内无限期地进行,或者直至此种治疗不再是治疗需要或有利的。

[0452] 在涉及多个二次剂量的实施方案中,每个二次剂量可以与其他二次剂量相同的频率施用/给药。譬如,每个二次剂量可在紧随前述剂量之后,对患者进行给药1至2周或1至2个月。同理,在涉及多个三次剂量的实施方案中,每个三次剂量可以与其他三次剂量相同的

频率施用/给药。譬如,每个三次剂量可在紧随前述剂量之后,对患者进行给药2至12周。在本发明的一些实施方案中,向患者施用二次和/或三次剂量的频率可在治疗方案的过程中变化。也可根据临床检查后的个体患者的需要,由医师在治疗过程中调整给药频率。

[0453] 本发明包括其中以第一频率(例如,每周一次,每两周一次,每三周一次,每月一次,每两个月一次等)向患者施用2至6次负荷剂量,然后以较不频繁的方式向患者施用两次或更多次维持剂量的给药方案。例如,根据本发明的此方面,如果以每月一次的频率施用负荷剂量,那么维持剂量可以每6周施用一次,每两个月施用一次,每三个月施用一次等。

[0454] 本发明包括本发明所述化合物和/或偶联物如式(I)和(II)所示化合物的药物组合物,譬如,组合物包含本发明所述化合物、其盐、立体异构体、多晶型物,和药学上可接受的载体、稀释剂、和/或辅料。合适的载体、稀释剂和辅料的实例包括,但不限于:用于维持适当组合物pH值的缓冲剂类(例如,柠檬酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、乳酸盐缓冲液、草酸盐缓冲液等),载体蛋白类(如人血清白蛋白),纳米粒子类,盐水,多元醇类(例如,海藻糖、蔗糖、木糖醇、山梨糖醇等),表面活性剂类(例如,聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80、聚氧乙烯酸酯(polyoxolane)等),抗微生物剂类,和抗氧化剂类。

[0455] 在一些实施例,本发明提供了治疗疾病、病症或病况的方法,包括向患有所述病症的患者施用治疗有效量的式I、III的化合物或其药物组合物。

[0456] 在一些实施例,本发明提供了治疗疾病、病症或病况的方法,包括向患有所述病症的患者施用治疗有效量的本发明所述化合物或其药物组合物。

[0457] 在一些实施例,本发明提供了治疗选自由免疫性疾病、自身免疫性疾病、炎症、哮喘、或炎性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎组成的组的疾病、病症或病况的方法。

[0458] 在一些实施例,本发明提供了通过靶向抗原(例如表达细胞表面的抗原)来治疗疾病、病症或病况的方法,其中类固醇给药可实现治疗益处,包括施用本发明所述的偶联物。在一些实施方案,所述抗原是AXL,BAFFR,BCMA,BCR-列表组分,BDCA2,BDCA4,BTLA,BTNL2BTNL3,BTNL8,BTNL9,C10orf54,CCR1,CCR3,CCR4,CCR5,CCR6,CCR7,CCR9,CCR10,CD11c,CD137,CD138,CD14,CD168,CD177,CD19,CD20,CD209,CD209L,CD22,CD226,CD248,CD25,CD27,CD274,CD276,CD28,CD30,CD300A,CD33,CD37,CD38,CD4,CD40,CD44,CD45,CD47,CD46,CD48,CD5,CD52,CD55,CD56,CD59,CD62E,CD68,CD69,CD70,CD74,CD79a,CD79b,CD8,CD80,CD86,CD90.2,CD96,CLEC12A,CLEC12B,CLEC7A,CLEC9A,CR1,CR3,CRTAM,CSF1R,CTLA4,CXCR1/2,CXCR4,CXCR5,DDR1,DDR2,DEC-205,DLL4,DR6,FAP,FCamR,FCMR,FcR's,Fire,GITR,HHLA2,HLA II类,HVEM,ICOSLG,IFNLR1,IL10R1,IL10R2,IL12R,IL13RA1,IL13RA2,IL15R,IL17RA,IL17RB,IL17RC,IL17RE,IL20R1,IL20R2,IL21R,IL22R1,IL22RA,IL23R,IL27R,IL29R,IL2Rg,IL31R,IL36R,IL3RA,IL4R,IL6R,IL5R,IL7R,IL9R,整合素(Integrins),LAG3,LIFR,MAG/Siglec-4,MMR,MSR1,NCR3LG1,NKG2D,NKp30,NKp46,PDCD1,PROKR1,PVR,PVRIG,PVRL2,PVRL3,RELT,SIGIRR,Siglec-1,Siglec-10,Siglec-5,Siglec-6,Siglec-7,Siglec-8,Siglec-9,SIRPA,SLAMF7,TACI,TCR-列表组分/assoc,PTCRA,TCRb,CD3z,CD3,TEK,TGFBR1,TGFBR2,TGFBR3,TIGIT,TLR2,TLR4,TROY,TSLPR,TYRO,VLDLR,VSIG4,或VTCN1。在一些实施方案,所述抗原是IL2R- γ 。

[0459] 在一些实施例,本发明提供了用于治疗选自免疫性疾病、自身免疫性疾病、炎性疾病、皮肤病,或胃肠道疾病的疾病、病症或病况的方法。

[0460] 在一些实施例,所述疾病是克罗恩病、溃疡性结肠炎、库欣综合征 (Cushing's syndrome)、肾上腺皮质功能不全、或先天性肾上腺皮质增生症。

[0461] 在一些实施例,所述疾病是炎症、哮喘或炎性肠病。

[0462] 在一些实施例,所述疾病是选自多发性硬化症、类风湿性关节炎、炎性肠病、溃疡性结肠炎、牛皮癣、或湿疹的自身免疫性疾病。

[0463] 在一些实施例,本发明提供了用于减轻或改善化学疗法的副作用的方法,其中所述方法包括向患有所述病症的患者施用治疗有效量的本发明所述的化合物或组合物。

[0464] 在一些实施例,本发明提供了用于减轻或改善免疫抑制疗法的副作用的方法,其中所述方法包括向患有所述病症的患者施用治疗有效量的本发明所述的化合物或组合物。

[0465] 在一些实施例,本发明提供了用于治疗癌症的方法,其中所述方法包括向患有所述病症的患者施用治疗有效量的本发明所述的化合物或组合物。在一些实施例,所述癌症选自急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、或多发性骨髓瘤,以及其他。

F. 实施例

[0466] 通过以下非限制性实施例来说明某些实施方案。

[0467] 除非另有明确说明,否则试剂和溶剂均得自商业来源,例如国药集团化学试剂有限公司 (Sinopharm Chemical Reagent Co. (SCRC))、Sigma-Aldrich、Alfa或其他供应商。

[0468] 在Bruker A VIII400或Bruker A VIII500上记录¹H NMR和其他NMR光谱。用Nuts 软件或MestReNova软件处理数据,测定内标四甲基硅烷低磁场的质子位移百万分率 (ppm)。

[0469] HPLC-MS测定在Agilent 1200 HPLC/6100 SQ系统上运行,使用以下条件:

[0470] 用于HPLC-MS测定的方法A包括作为流动相:A:水 (0.01% 三氟乙酸TFA) 和B:乙腈 (0.01% TFA)。梯度相为5%的B,其在15分钟 (min) 的时间段内以1.0mL/min的流速增加至95%的B。使用的色谱柱是SunFire C18, 4.6x50mm, 3.5μm。柱温为50°C。检测器包括模数转换器ELSD (蒸发光散射检测器,下文称为“ADCELSD”) 调你,DAD (二极管阵列检测器,214nm和254nm) 和电喷雾电离-大气压电离 (ES-API)。

[0471] 用于HPLC-MS测定的方法B包括作为流动相:A:水 (10mM NH₄HCO₃) 和B:乙腈。梯度相为5%的B,其在15分钟 (min) 的时间段内以1.0mL/min的流速增加至95%的B。使用的色谱柱是XBridge C18, 4.6x50mm, 3.5μm。柱温为50°C。检测器包括ADCELSD, DAD (214nm和254nm) 和质量检测器 (MSDES-API)。

[0472] LC-MS测定在Agilent 1200 HPLC/6100 SQ系统上运行,使用以下条件:

[0473] 用于LC-MS测定的方法A在WATERS 2767仪器上进行。色谱柱是Shimadzu Shim-Pack, PRC-ODS, 20x250mm, 15μm, 两个串联连接。流动相为A:水 (0.01% TFA) 和B:乙腈 (0.01% TFA)。梯度相为5%的B,其在3分钟的时间段内以1.8-2.3mL/min的流速增加至95%的B。使用的色谱柱是SunFire C18, 4.6x50mm, 3.5μm。柱温为50°C。检测器包括模数转换器 ELSD (蒸发光散射检测器),DAD (二极管阵列检测器) (214nm和254nm) 和ES-API。

[0474] 用于LC-MS测定的方法B在Gilson GX-281仪器上进行。色谱柱是Xbridge Prep C18 10μmOBD, 19x250mm。流动相为A:水 (10mM NH₄HCO₃) 和B:乙腈。梯度相为5%的B,其在3分钟的时间段内以1.8-2.3mL/min的流速增加至95%的B。使用的色谱柱是XBridge C18, 4.6x50mm, 3.5μm。柱温为50°C。检测器包括ADC ELSD, DAD (214nm和254nm) 和质量选择检测

器 (MSD) (ES-API)。

[0475] 在Gilson GX-281仪器上进行制备型高压液相色谱 (制备型HPLC)。使用两种溶剂系统,一种是酸性的,一种是碱性的。所述酸性溶剂系统包括Waters SunFire 10 μm C18柱 (100 \AA , 250x19mm)。用于制备型HPLC的溶剂A是0.05%TFA的水溶液,溶剂B是乙腈。洗脱条件是线性梯度,其在20分钟的时间段内以30mL/min的流速,从5%的溶剂B增至100%的溶剂B。基本溶剂系统包括Waters Xbridge 10 μm C18柱 (100 \AA , 250x19mm)。制备型HPLC的溶剂A是10mM碳酸氢铵 (NH_4HCO_3) 的水溶液,溶剂B是乙腈。洗脱条件是线性梯度,其在20分钟的时间段内以30mL/min的流速,从5%的溶剂B增至100%的溶剂B。

[0476] 使用Agela Flash Columnsilica-CS在Biotage仪器上进行快速色谱法。除非另有明确说明,否则在Biotage仪器上使用BostonODS或Agela C18进行反相快速色谱法。

[0477] 以下缩写词用于实施例和整个说明书中:

缩写词	术语
ADC	抗体-药物偶联物
无糖基化抗体 (Aglycosylated antibody)	抗体不含任何聚糖残基
API	大气压电离
aq	水溶液
Boc	N-叔丁氧基羰基
BupH TM	Thermo Scientific Prod# 28372, 除非另有说明, 否则包含 100 mM 磷酸钠和 150 mM 氯化钠, 不含钾, pH 值从 7.2 调节至 7.6-7.8 MQ

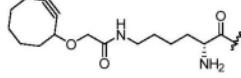
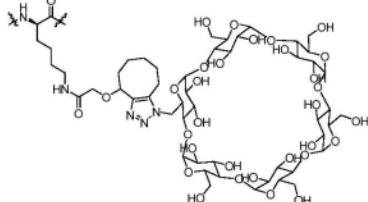
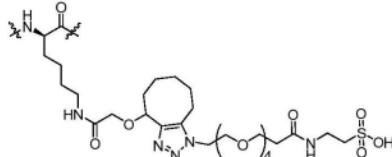
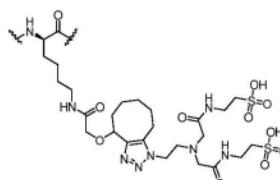
缩写词	术语
CD	环糊精
COT	环辛炔醇 (Cyclooctynol)
Da	道尔顿
DAD	二极管阵列检测器
DAR	药物与抗体的比值
DCM	二氯甲烷
DIBAC	二苯并环辛炔；或 11,12-二脱氢-5,6-二氢-二苯并[b,f]吖辛因；或二苯并[b,f]吖辛因-5(6H)-丁酸, 11,12-二脱氢
DIBAC-Suc	11,12-二脱氢-5,6-二氢-二苯并[b,f]吖辛因 琥珀酰胺酸
DIBAC-Suc-PEG ₄ -VC-pAB-PNP	{4-[2S)-2-[2S)-2-[1-(4-{2- 氮 杂 三 环 [10.4.0.0 ^{4,9}] 十 六 碳 -1(12),4(9),5,7,13,15-六烯-10-炔-2-基}-4-氧丁酰胺基)-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺基]-3-甲基丁酰胺基]-5-(氨基甲酰基氨基)戊酰胺基]苯基}甲基 4-硝基苯基碳酸酯
DIBACT	3H-苯并[c]-1,2,3-三唑并[4,5-e][1]苯并吖辛因, 8,9-二氢-；或二苯并环辛炔三唑
DIPEA	二异丙基乙胺
DMF	N,N-二甲基甲酰胺
DMSO	二甲亚砜
EC	酶学委员会
ELSD	蒸发光散射检测器
ESI	电喷雾电离
Fmoc	芴基甲氧基羰基氯
Fmoc-vcPAB-PNP	N-Fmoc-L-缬氨酸-L-瓜氨酸-p-氨基苄醇 p-硝基苯基碳酸酯
g	克
HATU	2-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸盐
HC	免疫球蛋白的重链
HEK	人胚肾 (细胞)
HPLC	高效液相色谱
Hr 或 hrs	小时
LC	液相色谱法
HPLC	高压液相色谱
MALDI	基质辅助的激光解吸/电离
MC	马来酰亚胺基己酰基
mg	毫克
min	分钟
mL	毫升
mmh	myc-myC-六组氨酸标签
μL	微升
mM	毫摩尔
μM	微摩尔
MMAE	单甲基奥瑞他汀 E (auristatin E)
MS	质谱

缩写词	术语
MsCl	甲磺酰氯
MSD	质量选择检测器
MTG	微生物转谷氨酰胺酶(MTG EC 2.3.2.13, Zedira, 达姆施塔特 (Darmstadt), 德国 (Germany))
MW	分子量
ncADC	非细胞毒性抗体药物偶联物
NHS	N-羟基琥珀酰亚胺
nM	纳摩尔
NMR	核磁共振
NOESY	二维 NOE 谱/核奥佛好塞 (Overhauser) 效应磁共振光谱
PAB	对氨基苄醇
PABC	对氨基苄氧基(羰基)
PBS	10 mM 磷酸钠缓冲液和 150 mM 氯化钠
PBSg	10 mM 磷酸盐, 150 mM 氯化钠, 5% 甘油
PEG	聚乙二醇
PNP	对硝基苯基
MC-VC-PAB-PNP	
ppm	百万分率 (化学位移)
RP	反相
RT	室温
SDS-PAGE	十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳
SEC	体积排除色谱/尺寸排阻色谱
Suc	琥珀酸
TCEP	三(2-羧乙基)膦 盐酸盐
TEA	三乙胺
TFA	三氟乙酸

缩写词	术语
TG	转谷氨酰胺酶/谷氨酰胺转移酶
THF	四氢呋喃
TOF	飞行时间
UPLC	超高效液相色谱
UV	紫外
VA	缬氨酸-丙氨酸
VC	缬氨酸-瓜氨酸
VC-PABC	缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧基(羧基)
CD	环糊精
HATU	2-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸盐
MC	马来酰亚胺基己酰基
COT	环辛炔醇 (Cyclooctynol)
SFC	超临界流体色谱

缩写词	IUPAC 命名	结构式
Boc-vcPAB-P NP (L2a)	叔丁基 (<i>S</i>)-3-甲基-1-((<i>S</i>)-1-(4-(((4-硝基苯氧基)羰基氧基)甲基)苯基氨基)-1-氧-5-脲基戊烷-2-基氨基)-1-氧丁烷-2-基氨基甲酸酯	
Fmoc-vcPAB- PNP (L2b)	(9 <i>H</i> -芴-9-基)甲基 (<i>S</i>)-3-甲基-1-((<i>S</i>)-1-(4-(((4-硝基苯氧基)羰基氧基)甲基)苯基氨基)-1-氧-5-脲基戊烷-2-基氨基)-1-氧丁烷-2-基氨基甲酸酯	
Boc-Val-Ala-O H (L3a)	(<i>S</i>)-2-((<i>S</i>)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-甲基丁酰胺基)丙酸	
Fmoc-Val-Ala- OH (L3b)	(<i>S</i>)-2-((<i>S</i>)-2-(((9 <i>H</i> -芴-9-基)甲氧基)羰基氨基)-3-甲基丁酰胺基)丙酸	
Boc-Val-Cit-O H (L3c)	(6 <i>S</i> ,9 <i>S</i>)-1-氨基-9-异丙基-13,13-二甲基-1,8,11-三氧-12-氧杂-2,7,10-三氮杂十四烷-6-羧酸	
Fmoc-D-Lys-C OT (L5)	(2 <i>R</i>)-2-((9 <i>H</i> -芴-9-基)甲氧基)羰基氨基-6-(2-(环辛-2-炔基氧基)乙酰胺基)己酸	

缩写词	IUPAC 命名	结构式
CD-N ₃ (L7a)	5-(叠氮基甲基)-10,15,20,25,30-五(羟甲基)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-十二氧杂七环[26.2.2.2 ^{3,6} .2 ^{8,11} .2 ^{13,16} .2 ^{18,21} .2 ^{23,26}]四十二烷-31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-十二醇	
N ₃ -PEG ₄ -CONHCH ₂ CH ₂ SO ₃ H (L7b)	1-叠氮基-15-氧-3,6,9,12-四氧杂-16-氮杂十八烷-18-磺酸	
BCN-PEG ₄ - 酸 (L9a)	(内)-1-(双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基)-3-氧-2,7,10,13,16-五氧杂-4-氮杂十九烷-19-酸	
DIBAC-PEG ₄ -酸 (L9b)	1-(4-{2-氮杂三环[10.4.0.0 ^{4,9}]十六碳-1(12),4(9),5,7,13,15-六烯-10-炔-2-基}-4-氧丁酰胺基)-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酸	
BCN-PEG ₄ -NHS (L10a)	(内)-2,5-二氧吡咯烷-1-基 1-(双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基)-3-氧-2,7,10,13,16-五氧杂-4-氮杂十九烷-19-酸酯	
DIBAC-PEG ₄ -NHS (L10b)	2,5-二氧吡咯烷-1-基 1-(4-{2-氮杂三环[10.4.0.0 ^{4,9}]十六碳-1(12),4(9),5,7,13,15-六烯-10-炔-2-基}-4-氧丁酰胺基)-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酸酯	
MAL-PEG ₄ -NHS (L10c)	2,5-二氧吡咯烷-1-基 1-(2,5-二氧-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酸酯	
DIBAC-PEG ₄ -vcPAB-PNP (L11)	{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-氮杂三环[10.4.0.0 ^{4,9}]十六碳-1(12),4(9),5,7,13,15-六烯-10-炔-2-基}-4-氧丁酰胺基)-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺基]-5-(氨基甲酰基氨基)戊酰胺基]苯基}甲基 4-硝基苯基碳酸酯	
Lk-DIBAC	-	
Lk-BCN	-	
Lk-MAL	-	

缩写词	IUPAC 命名	结构式
Lk-CCK	-	
aCDCCK	-	
SulCCK	-	
dualSulCCK	-	

制备方法

实施例1

[0478] 本实施例说明了一种制备具有在C²²位置的立体化学控制的地奈德(Desonide)化学衍生物的方法。在图1和2中,化合物7、8和11的C²²位置用星号(即*)表示。按照图1和2中所示的合成路线,对在C²²位置具有立体化学控制的类固醇类化合物进行合成。

[0479] 使地奈德(1),其通用名为(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-8-(2-羟基乙酰基)-6,6,9,13-四甲基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮,与异丁酸酐(化合物2)反应,通过在化合物1的伯醇位置进行酯化,生成中间体3。通过在强酸HClO₄条件下,使化合物3与一系列醛类化合物(4-1;4-2;4-3;和4-4,各自相对于这些数字标记右侧所示的R-CHO基团进行区分)进行转乙酰化反应,以生成醇5和酯6。如图1所示,这些醛类化合物相对于图1中所示的R基团彼此不同。

[0480] 醇5和酯6均通过柱色谱法分离得到。

[0481] 各醇5或酯6各自与二乙胺反应以除去Fmoc-基团或与Fe/NH₄Cl反应以还原硝基,从而提供分别在C²²具有R/S立体化学的差向异构体化合物7和8。

[0482] 如下所述,分离R和S差向异构体并鉴定它们的R-和S-构型。分离出例如图1中化合物7和8的R-差向异构体,并通过¹H NMR确证其为大多数立体异构体的90%以上。通过2D-NOESY光谱研究,确定每个差向异构体的C²²构型。

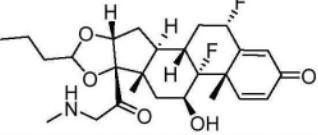
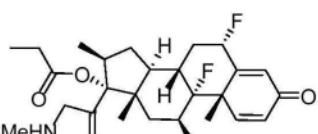
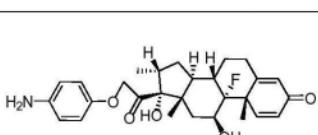
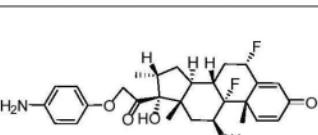
[0483] 下表1示出了使用本发明所述方法制得的类固醇类化合物。

表1-化合物的结构式和化学物理性质

化 合 物 编 号	C ²²	结构式	MF	MW (计算 值)	MS (M+H)	HPLC 纯度 (%)	cLog P
7-1	S		C ₂₈ H ₃₃ NO ₆	479.6	480.2	96	2.53
7-1	R		C ₂₈ H ₃₃ NO ₆	479.6	480.3	100	2.53
8-1	R		C ₃₂ H ₃₉ NO ₇	549.7	550.3	96	4.22
7-2	R/S		C ₂₉ H ₃₅ NO ₆	493.6	494.3	98	2.59
8-2	R/S		C ₃₃ H ₄₁ NO ₇	563.7	564.3	98	4.28
8-3	R/S		C ₂₇ H ₃₇ NO ₆	471.6	472.2	96	1.63
7-4	R		C ₂₇ H ₃₇ NO ₆	471.6	472.2	96	1.63

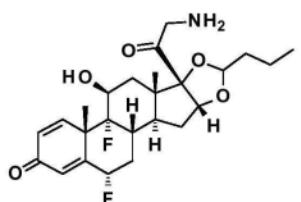
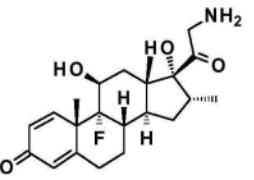
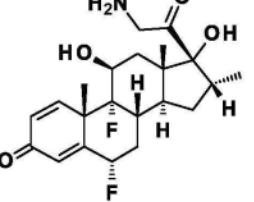
11-1	R/S		C ₂₅ H ₃₅ NO ₅	429.6	429.9	100	2.63
11-2	R/S		C ₂₆ H ₃₇ NO ₅	443.6	444.2	96	3.06
11-3	R/S		C ₂₇ H ₃₉ NO ₅	457.6	458.2	100	3.44
11-4	R/S		C ₃₀ H ₄₃ NO ₅	497.3	498.2	94	4.29
11-5	R/S		C ₃₁ H ₃₉ NO ₆	521.6	522.3	100	4.24
11-5	S		C ₃₁ H ₃₉ NO ₆	521.6	522.2	99.8	4.24
11-5	R		C ₃₁ H ₃₉ NO ₆	521.6	522.2	99.1	4.24
11-6	S		C ₃₁ H ₃₈ FNO ₆	539.6	540.3	98	4.38
11-6	R		C ₃₁ H ₃₈ FNO ₆	539.6	540.3	100	4.38
11-7	R		C ₃₁ H ₃₈ FNO ₆	539.6	540.2	100	4.38
11-8	R		C ₃₂ H ₄₁ NO ₆	535.7	518.2 (M+H-H ₂ O)	100	4.54

11-10	R/S		C ₃₁ H ₃₇ FO ₆	524.3	525.3	100	5.21
11-11	R/S		C ₃₃ H ₄₁ NO ₇	563.7	564.4	100	4.31
11-12	R/S		C ₃₁ H ₃₇ F ₂ NO ₆	557.6	558.3	97	3.94
11-12	R		C ₃₁ H ₃₇ F ₂ NO ₆	557.6	558.2	100	
11-13	R		C ₃₁ H ₃₇ F ₂ NO ₆	557.6	558.2	100	3.94
11-14	R/S		C ₃₁ H ₃₆ F ₃ NO ₆	575.6	576.2	100	4.09
11-15	R/S		C ₃₂ H ₃₉ F ₂ NO ₆	554.2	555.2	100	3.90
11-16	R/S		C ₃₁ H ₃₈ O ₇	522.3	523.5	100	4.76
11-17	R/S		C ₃₀ H ₃₆ F ₂ N ₂ O ₆	558.6	559.2	100	3.91
11-19	R/S		C ₂₅ H ₃₃ F ₂ NO ₅	465.2	466.2	98.5	2.33
11-19	R					100	
11-20	R/S		C ₃₄ H ₄₃ F ₂ NO ₆	599.2	600.3	100	4.71

11-21	R/S		C ₂₆ H ₃₅ F ₂ NO ₅	479.3	480.2	100	2.76
14-2			C ₂₆ H ₃₅ F ₂ NO ₅	479.6	480.2	98	2.81
15-5			C ₂₆ H ₃₅ F ₂ NO ₅	479.6	480.2	98	2.81
16-5			C ₂₈ H ₃₃ F ₂ NO ₅	483.6	484	98	2.85

[0484] 下表2示出了使用本发明所述方法制得的类固醇类化合物。

表2-化合物的结构式和化学物理性质

化合物 编号	结构式	MF	MS (m/z) 100%	最高 m/z 峰 值	HPLC 纯度(%)
4b		C ₂₅ H ₃₃ F ₂ NO ₅ , C ₂ HF ₃ O ₂	466.2 (M+H)	466.2 (M+H)	98.5
4c		C ₂₄ H ₃₁ F ₄ NO ₆	392.2 (M+H)	392.2 (M+H)	> 99
4d		C ₂₄ H ₃₀ F ₅ NO ₆	410.2 (M+H)	410.2 (M+H)	98

化合物 编号	结构式	MF	MS (m/z) 100%	最高 m/z 峰 值	HPLC 纯度(%)
4e		C ₂₁ H ₂₈ FNO ₅ .C ₂ HF ₃ O ₂	394.2 (M+H)	394.2 (M+H)	> 99
4f		C ₂₂ H ₃₁ NO ₄	374.3 (M+H)	374.3 (M+H)	> 99
4h		C ₂₅ H ₃₄ FNO ₅ .C ₂ HF ₃ O ₂	448.2 (M+H)	448.2 (M+H)	> 99
5-I		C ₃₁ H ₃₈ F ₂ N ₂ O ₅ .C ₂ H F ₃ O ₂	557.1 (M+H)	557.1 (M+H)	> 99
6-I		C ₃₁ H ₃₇ F ₂ NO ₆	522.3 (M+H)	522.3 (M+H)	97
R-6-I		C ₃₁ H ₃₇ F ₂ NO ₆	522.2 (M+H)	522.2 (M+H)	> 99
S-6-I		C ₃₁ H ₃₇ F ₂ NO ₆	522.2 (M+H)	522.2 (M+H)	97

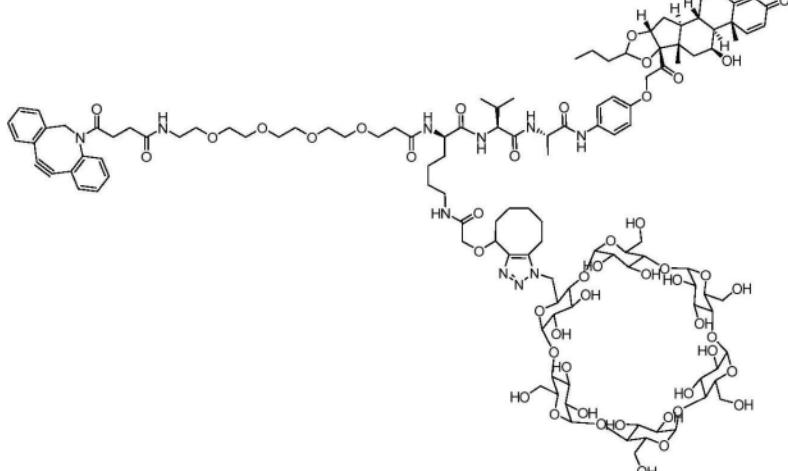
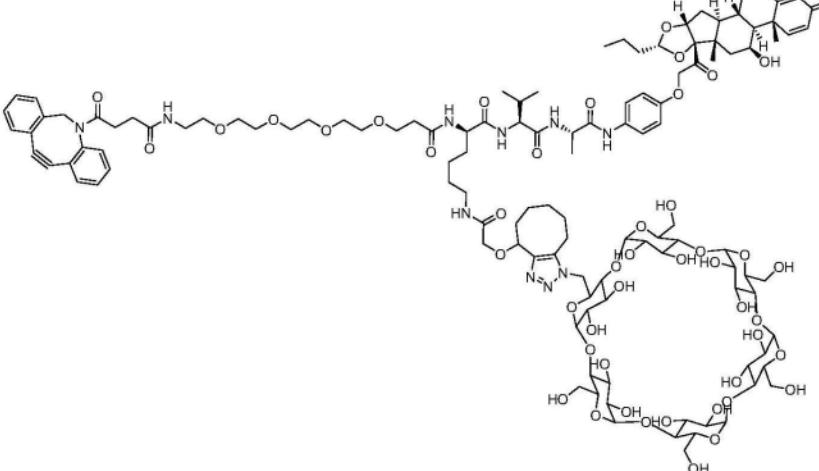
化合物 编号	结构式	MF	MS (m/z) 100%	最高 m/z 峰 值	HPLC 纯度(%)
6-I D		C ₃₁ H ₃₇ F ₂ NO ₆	297.6 (M/2+H) (10%)	558.2 (M+H)	98.4
6-II		C ₃₂ H ₃₉ F ₂ NO ₇ .C ₂ HF 3O ₂	558.3 (M+H)	558.3 (M+H)	> 99
6-III		C ₃₁ H ₃₆ F ₃ NO ₆	558.3 (M+H)	558.3 (M+H)	> 99
6-VI		C ₃₁ H ₃₉ NO ₆	576.2 (M+H)	576.2 (M+H)	> 99
R-6-VI		C ₃₁ H ₃₉ NO ₆	588.3 (M+H)	588.3 (M+H)	> 99
S-6-VI		C ₃₁ H ₃₉ NO ₆	587.2 (M-55) (25%)	665.2 (M+Na)	> 99
6-VII		C ₂₈ H ₃₅ NO ₅	587.3 (M+H)	587.3 (M+H)	> 99

[0485] 下表3示出了使用本发明所述的方法制得的连接体有效负载。

表3. 连接体-有效负载的实例

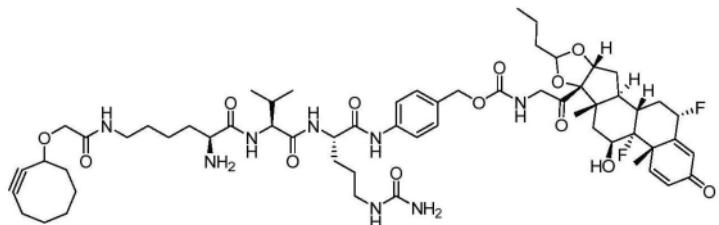
LP 编号	连接体-有效负载的结构式
LP1	
LP2	
LP3	
LP4	
LP5	
LP6	
LP7	
LP8	

LP 编号	连接体-有效负载的结构式
LP9	
LP10	
LP11	
LP12	
LP13	
LP14	

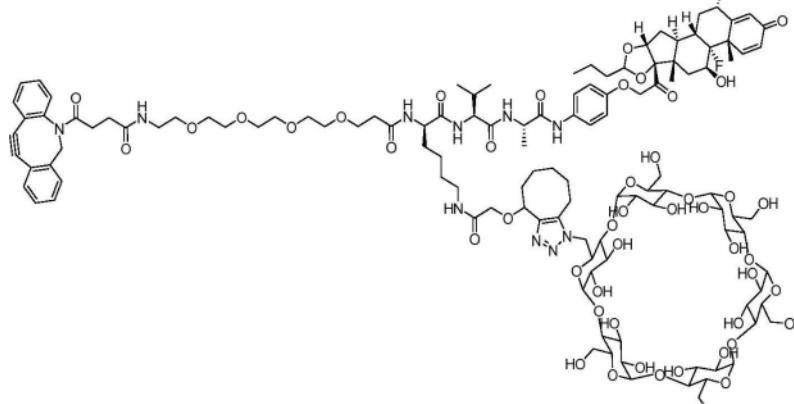
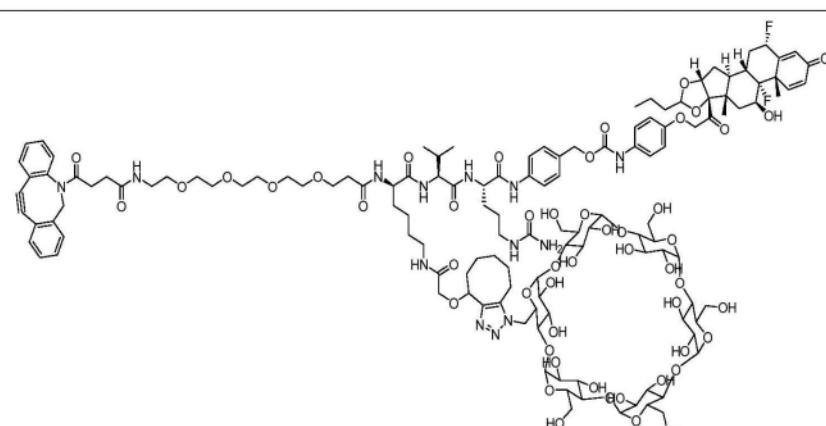
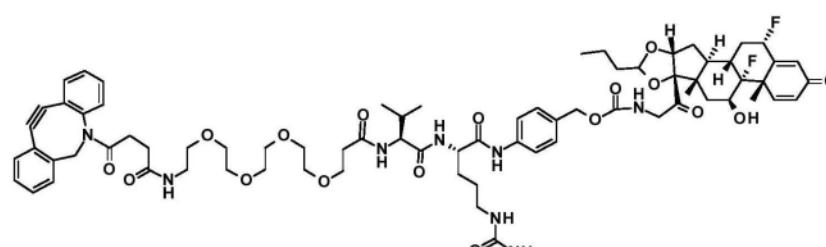
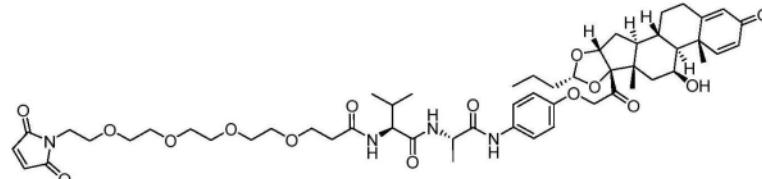
LP 编号	连接体-有效负载的结构式
LP15	
LP16	

[0486] 下表4示出了使用本发明所述的方法制得的连接体有效负载。

表4. 连接体-有效负载的实例

	结构式
LP101	

	结构式
LP102	
LP103	
LP104	
LP105	

	结构式
LP108	
LP110	
LP112	
LP113	

	结构式
LP114	
LP115	
LP116	

实施例2

[0487] 本实施例说明了制备布地奈德(budesonide)、地塞米松(dexamethasone)和氟米松(flumethasone)的化学衍生物的方法。通常,如图2、3和4所示,来说明这些方法。

[0488] 如图2所示,布地奈德(9)或其二氟类似物(9B)的甲磺酸酯类似物与烷基胺类化合物或取代的酚类化合物(10)反应,得到含苯胺或胺的化合物(11),如图2中的化合物11-1至11-23。

[0489] 如图3所示,地塞米松(12)的甲磺酸酯类似物与烷基胺类化合物或取代的酚类化合物(10)反应,得到图3中的含苯胺或胺的化合物(14)或(15)。

[0490] 如图4所示,氟米松(13)的甲磺酸酯类似物与烷基胺类化合物或取代的酚类化合物(10)反应,得到图4中的含苯胺或胺的化合物(16)。

[0491] 如下所述,表1中的11-5S和11-5R的立体化学纯的差向异构体通过从它们相应的R/S异构体的混合物中进行手性分离而得到。通过2D-NOESY测定每个化合物的绝对立体化学。2D-NOESY光谱显示在11-5R中H²²和H¹⁸相关,并且在11-5S中H²²和H¹⁸之间没有相关性。同理,通过2D-NOESY鉴定表1中的化合物7-1S、7-1R、7-4R、8-1R、11-6S、11-6R、11-7R、11-8R、11-12R、11-13R、和11-19R的C²²位的手性中心。

实施例3

[0492] 本实施例说明了制备表1中化合物7-1S和7-1R的方法。本实施例涉及图1中的编号化合物。

[0493] 2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-9,13-二甲基-6-(4-硝基苯基)-16-氧-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙基2-甲基丙酸酯(5-1)和

[0494] (1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-8-(2-羟基乙酰基)-9,13-二甲基-6-

(4-硝基苯基)-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(6-1)。

[0495] 步骤1:化合物3根据US2007/135398中的方法,通过使地奈德(1)与异丁酸在丙酮中反应合成得到,此专利申请的全部内容通过引用其整体并入本发明用于所有目的。

[0496] 步骤2:在0℃下,向化合物3(320mg,0.657mmol)的硝基丙烷(20mL)溶液中滴加高氯酸水溶液(70%,1.90g,1.33mmol),然后加入4-硝基苯甲醛(4-1,151mg,1.00mmol)。将所得混合物在室温下搅拌过夜,然后用乙酸乙酯(80mL)稀释。将所得混合物用饱和碳酸氢钠水溶液(30mL x3)洗,然后用盐水(30mL x2)洗。然后所得溶液经硫酸钠干燥,真空浓缩。所得残余物经快速色谱法纯化,用0-35%乙酸乙酯的石油醚溶液洗脱,得到化合物(5-1)为黄色固体(120mg,收率32%),其为基于¹H NMR的比率为3/1的5R/5S差向异构体的混合物,并进一步用60-70%乙酸乙酯的石油醚溶液洗脱,得到化合物(6-1)为黄色固体(150mg,收率36%),其为基于¹H NMR的比率为5/1的6R/6S差向异构体的混合物(未测定R/S)。

[0497] 化合物(5-1):ESIm/z:580 (M+H)⁺.¹H NMR (CDCl₃, 400MHz, 差向异构体A和B, 其比值=3) 88.27和8.25 (d, J=8.8Hz, 2H), 7.62和7.55 (d, J=8.8Hz, 2H), 7.28-7.21 (m, 1H), 6.33-6.23 (m, 1H), 6.03和6.05 (s, 1H), 5.62和6.16 (s, 1H), 5.12和5.43 (d, J=5.4Hz, 1H), 4.97和4.77 (d, J=17.6Hz, 1H), 4.88和4.33 (d, J=17.6Hz, 1H), 4.52 (brs, 1H), 2.80-2.50 (m, 2H), 2.44-2.29 (m, 1H), 2.29-2.05 (m, 3H), 2.01-1.84 (m, 2H), 1.80-1.67 (m, 2H), 1.51和1.59 (brs, 1H), 1.46和1.48 (s, 3H), 1.29-1.07 (m, 7H), 1.03和1.05 (s, 3H) ppm。

[0498] 化合物6-1:ESIm/z:510 (M+H)⁺.¹H NMR (DMSO_{d6}, 400MHz, 差向异构体A和B, 其比值=5) 88.26和8.24 (d, J=8.8Hz, 2H), 7.77和7.57 (d, J=8.8Hz, 2H), 7.32 (d, J=10.0Hz, 1H), 6.17和6.18 (dd, J=10.0Hz, 1.8Hz, 1H), 5.93和5.95 (s, 1H), 5.63和6.28 (s, 1H), 5.14和5.03 (t, J=6.0Hz, 1H), 4.99和5.35 (d, J=6.3Hz, 1H), 4.82 (d, J=3.2Hz, 1H), 4.64-4.13 (m, 3H), 2.64-2.51 (m, 1H), 2.37-2.24 (m, 1H), 2.20-1.99 (m, 2H), 1.94-1.57 (m, 5H), 1.40 (s, 3H), 1.14-0.98 (m, 2H), 0.88 (s, 3H) ppm。

[0499] 步骤3:制备表1中的(1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12S,13R)-6-(4-氨基苯基)-11-羟基-8-(2-羟基乙酰基)-9,13-二甲基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(7-1R)和表1中的(1S,2S,4R,6S,8S,9S,11S,12S,13R)-6-(4-氨基苯基)-11-羟基-8-(2-羟基乙酰基)-9,13-二甲基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(7-1S)。

[0500] 将铁粉(56.0mg,1.00mmol)和氯化铵(53.5mg,1.00mmol)同时加至化合物5-1(51.0mg,0.100mmol)的乙醇(3mL)和水(0.5mL)的混合溶液中。将悬浮液在80℃下搅拌1小时,并通过硅藻土过滤以除去固体。将滤液真空浓缩,残余物经制备型HPLC(方法B)纯化,得到化合物7-1R(30mg,收率63%)为白色固体,和化合物7-1S(8mg,收率17%)为白色固体。

[0501] 2D-NOESY光谱法用于测定化合物7-1R和化合物7-1S的手性中心的立体化学构型。

2D-NOESY光谱证实化合物7-1R中H²²和H²¹之间存在相关性,这表明其具有R构型手性中心。而在化合物7-1S中H²²和H²¹之间未观察到相关性,表明其具有S构型手性中心。NMR研究还表明化合物7-1R中H²²的位移(5.33ppm)远高于化合物7-1S中H²²的位移(6.01ppm),表明化合物7-1R的H²²受到阻碍更大。化合物7-1-22R和化合物7-1-22S的2D-NOESY光谱如图5和图6所示。

[0502] 表1中化合物7-1R:ESIm/z:480 (M+H)⁺.¹H NMR (MeOD_{d4}, 400MHz) δ7.46 (d, J=

10.1Hz, 1H) , 7.17 (d, J=8.4Hz, 2H) , 6.67 (d, J=8.4Hz, 2H) , 6.27 (dd, J=10.1, 1.8Hz, 1H) , 6.04 (s, 1H) , 5.33 (s, 1H) , 5.00 (d, J=5.4Hz, 1H) , 4.61 (d, J=19.4Hz, 1H) , 4.50-4.39 (m, 1H) , 4.31 (d, J=19.4Hz, 1H) , 2.78-2.61 (m, 1H) , 2.47-2.35 (m, 1H) , 2.35-2.22 (m, 1H) , 2.22-2.10 (m, 1H) , 2.04-1.94 (m, 1H) , 1.91-1.66 (m, 4H) , 1.51 (s, 3H) , 1.25-1.11 (m, 1H) , 1.07 (dd, J=11.2Hz, 3.5Hz, 1H) , 0.99 (s, 3H) ppm。

[0503] 表1中化合物7-1S:ESIm/z:480 (M+H)⁺.¹H NMR (MeOD_{d4}, 400MHz) δ7.47 (d, J=10.1Hz, 1H) , 7.02 (d, J=8.4Hz, 2H) , 6.65 (d, J=8.5Hz, 2H) , 6.27 (dd, J=10.1, 1.8Hz, 1H) , 6.03 (s, 1H) , 6.01 (s, 1H) , 5.36 (d, J=6.2Hz, 1H) , 4.46-4.31 (m, 2H) , 4.12 (d, J=19.2Hz, 1H) , 2.75-2.61 (m, 1H) , 2.47-2.35 (m, 1H) , 2.27-2.11 (m, 2H) , 2.08-1.97 (m, 1H) , 1.96-1.73 (m, 4H) , 1.51 (s, 3H) , 1.33-1.17 (m, 2H) , 1.17-1.09 (m, 1H) , 1.01 (s, 3H) ppm。

实施例4

[0504] 本实施例阐明了制备表1中化合物(8-1R/S)和化合物(8-1R)的方法。本实施例涉及图1中的编号化合物。

[0505] 2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-6-(4-氨基苯基)-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙基2-甲基丙酸酯(8-1R)。

[0506] 将铁粉 (56.0mg, 1.00mmol) 和氯化铵 (53.5mg, 1.00mmol) 同时加至化合物(6-1) (58.0mg, 0.100mmol) 的乙醇 (3mL) 和水 (1mL) 的混合溶液中。将所得悬浮液在80℃下搅拌1小时，并通过硅藻土过滤以除去固体。将滤液真空浓缩，残余物经制备型HPLC(方法B)纯化，得到化合物(8-1R)及其对映异构体(即，C²²处为S立体化学)(26mg, 收率45%)为白色固体。通过HPLC和¹H NMR确定，R-差向异构体与S-差向异构体的比例为4:1。ESIm/z:550 (M+H)⁺。

[0507] 进一步分离得到R-差向异构体，并通过2DNMR确定构型。

[0508] 化合物(8-1R):ESIm/z:550 (M+H)⁺.¹H NMR (MeOD_{d4}, 500MHz) δ7.46 (d, J=10.0Hz, 1H) , 7.19 (d, J=8.5Hz, 2H) , 6.69 (d, J=8.4Hz, 2H) , 6.27 (dd, J=10.0Hz, 2.0Hz, 1H) , 6.05 (s, 1H) , 5.44 (s, 1H) , 5.07 (d, J=17.5Hz, 1H) , 4.96 (d, J=5.5Hz, 1H) , 4.88 (d, J=17.5Hz, 1H) , 4.48-4.44 (m, 1H) , 2.73-2.64 (m, 2H) , 2.42-2.39 (m, 1H) , 2.32-2.24 (m, 1H) , 2.19-2.15 (m, 1H) , 2.03-1.99 (m, 1H) , 1.95-1.92 (m, 1H) , 1.90-1.83 (m, 2H) , 1.76-1.69 (m, 1H) , 1.52 (s, 3H) , 1.27-1.12 (m, 7H) , 1.09-1.05 (m, 1H) , 1.02 (s, 3H) ppm。

实施例5

[0509] 本实施例说明了制备表1中化合物(7-2R/S)的方法。本实施例涉及图1中的编号化合物。

[0510] 步骤1:(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-8-(2-羟基乙酰基)-9,13-二甲基-6-[(4-硝基苯基) 甲基]-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(5-2)。

[0511] 根据Synthesis, 2011, 18, 2935-2940(其全部内容通过引用其整体并入本发明用于所有目的)中的合成方法，在0℃下，向化合物(3) (226mg, 0.464mmol)的硝基丙烷 (10mL) 溶液中滴加高氯酸水溶液 (70%, 985mg, 6.90mmol)，然后加入2-(4-硝基苯基)乙醛 (4-2, 115mg, 0.696mmol)。将所得混合物在室温下搅拌过夜，然后用乙酸乙酯 (60mL) 稀释。所得混合物用饱和碳酸氢钠水溶液 (50mLx3) 洗，然后用盐水 (50mLx3) 洗，经硫酸钠干燥，真空浓

缩。残余物经快速色谱法纯化,采用0-35%乙酸乙酯的石油醚溶液洗脱,得到化合物(6-2)为棕色固体(95mg,收率34%,包括由¹H NMR确定的比率>10/1的22R/S差向异构体),并进一步用60-70%乙酸乙酯的石油醚溶液洗脱,得到化合物(5-2)(145mg,收率60%)为棕色固体。

[0512] 化合物(5-2):ESIm/z:524 (M+H)⁺.¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 8.09 (d, J=8.7Hz, 2H), 7.39 (d, J=8.7Hz, 2H), 7.17 (d, J=10.1Hz, 1H), 6.31 (dd, J=10.1Hz, 1.8Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 4.92 (d, J=5.3Hz, 1H), 4.86 (t, J=3.6Hz, 1H), 4.52-4.39 (m, 2H), 4.28-4.17 (m, 1H), 3.08 (d, J=3.5Hz, 2H), 2.96 (t, J=4.9Hz, 1H), 2.53-2.40 (m, 1H), 2.32-2.19 (m, 1H), 2.04-1.95 (m, 1H), 1.95-1.82 (m, 2H), 1.60-1.46 (m, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.34 (brs, 1H), 0.91-0.77 (m, 4H), 0.76-0.62 (m, 2H) ppm。

[0513] 步骤2:(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-6-[(4-氨基苯基) 甲基]-11-羟基-8-(2-羟基乙酰基)-9,13-二甲基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(7-2R/S)

[0514] 将铁粉(78.0mg,1.40mmol)和氯化铵(75.0mg,1.40mmol)同时加至化合物(5-2)(75.0mg,0.143mmol)的乙醇(4mL)和水(0.5mL)的混合溶液中。将悬浮液在80℃下搅拌1.5小时,并通过硅藻土过滤以除去固体。将滤液真空浓缩,残余物经制备型HPLC(方法B)纯化,得到化合物(7-2R/S)(26mg,收率37%)为白色固体。ESIm/z:494 (M+H)⁺.¹H NMR (MeOD_{d4}, 400MHz) δ 7.44 (d, J=10.1Hz, 1H), 6.93 (d, J=8.3Hz, 2H), 6.48 (d, J=8.3Hz, 2H), 6.30 (dd, J=10.1Hz, 1.9Hz, 1H), 6.07 (s, 1H), 4.85-4.77 (m, 2H), 4.51 (d, J=19.4Hz, 1H), 4.35-4.29 (m, 1H), 4.24 (d, J=19.4Hz, 1H), 2.87-2.72 (m, 2H), 2.62-2.47 (m, 1H), 2.38-2.28 (m, 1H), 2.08-1.93 (m, 1H), 1.90-1.78 (m, 2H), 1.67-1.58 (m, 1H), 1.53-1.37 (m, 5H), 0.91-0.77 (m, 5H), 0.74 (dd, J=11.2Hz, 3.4Hz, 1H) ppm。

实施例6

[0515] 本实施例说明了制备表1中化合物(8-2R/S)的方法。本实施例涉及图1中的编号化合物。

[0516] 步骤1:2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-9,13-二甲基-6-[(4-硝基苯基) 甲基]-16-氧-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙基2-甲基丙酸酯(6-2)

[0517] 化合物6-2的合成如上文实施例5中所述。化合物6-2:ESIm/z:594 (M+H)⁺.¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 8.15 (d, J=8.7Hz, 0.1H) 和 8.09 (d, J=8.7Hz, 1.9H), 7.40 (d, J=8.6Hz, 2H), 7.20 (d, J=10.1Hz, 1H), 6.31 (dd, J=10.1Hz, 1.8Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 4.94 (t, J=3.6Hz, 1H), 4.87 (d, J=5.1Hz, 1H), 4.81 (d, J=17.6Hz, 1H), 4.71 (d, J=17.6Hz, 1H), 4.46 (s, 1H), 3.09 (d, J=3.5Hz, 2H), 2.73-2.61 (m, 1H), 2.53-2.41 (m, 1H), 2.31-2.21 (m, 1H), 2.07-1.96 (m, 1H), 1.94-1.84 (m, 2H), 1.84-1.76 (m, 1H), 1.63-1.43 (m, 3H), 1.39 (s, 3H), 1.22 (t, J=7.0Hz, 6H), 0.92-0.82 (m, 4H), 0.76-0.61 (m, 2H) ppm。

[0518] 步骤2:2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-6-[(4-氨基苯基) 甲基]-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙基2-甲基丙酸酯(8-2R/S)

[0519] 向化合物6-2(65.0mg,0.109mmol)的乙醇(5mL)和水(1mL)的混合溶液中同时加入

铁粉 (61.0mg, 1.09mmol) 和氯化铵 (58.4mg, 1.09mmol)。将悬浮液在80℃下搅拌1小时，并通过硅藻土过滤以除去固体。将滤液真空浓缩，残余物经制备型HPLC (方法B) 纯化，得到化合物 (8-2R/S) (30mg, 收率49%) 为白色固体。ESIm/z:564 (M+H)⁺.¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ7.25 (d, J=10.2Hz, 1H), 6.95 (d, J=8.3Hz, 2H), 6.44 (d, J=8.3Hz, 2H), 6.31 (dd, J=10.1, 1.8Hz, 1H), 6.05 (s, 1H), 4.92-4.84 (m, 2H), 4.80 (d, J=5.2Hz, 1H), 4.73 (d, J=17.7Hz, 1H), 4.41 (s, 1H), 3.48 (brs, 1H), 2.85 (d, J=2.7Hz, 2H), 2.75-2.62 (m, 1H), 2.56-2.41 (m, 1H), 2.31-2.19 (m, 1H), 2.05-1.91 (m, 2H), 1.88-1.80 (m, 1H), 1.77-1.70 (m, 1H), 1.55-1.41 (m, 3H), 1.39 (s, 3H), 1.29-1.18 (m, 8H), 0.91-0.74 (m, 5H) ppm。

实施例7

[0520] 本实施例说明了制备表1中化合物 (8-3R/S) 的方法。本实施例涉及图1中的编号化合物。

[0521] 步骤1:2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-6-(2-{[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]氨基}乙基)-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-5,7-二氧化杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙基2-甲基丙酸酯 (6-3)

[0522] 根据J.Am.Chem.Soc., 2006, 128 (12), 4023-4034 (其全部内容通过引用其整体并入本发明用于所有目的) 中的合成方法, 在0℃下, 向化合物3 (240mg, 0.493mmol) 的硝基丙烷 (5mL) 溶液中滴加高氯酸水溶液 (70%, 214mg, 1.49mmol), 然后加入Fmoc-3-氨基-1-丙醛 (4-3, 236mg, 0.799mmol)。将所得混合物在室温下搅拌过夜, 然后用乙酸乙酯 (80mL) 稀释。混合物用饱和碳酸氢钠水溶液 (50mLx3) 洗, 然后用水 (50mLx2) 洗, 最后用盐水 (50mL) 洗, 然后经硫酸钠干燥, 真空浓缩。残余物经制备型TLC (硅胶, 甲醇/二氯甲烷, v/v=1/25) 纯化, 得到化合物 (6-3) (200mg, 收率56%, 6R/6S差向异构体) 为灰白色固体。ESIm/z:724 (M+H)⁺.¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ7.76 (d, J=7.6Hz, 2H), 7.56 (d, J=7.2Hz, 2H), 7.40 (d, J=7.2Hz, 1H), 7.32-7.20 (m, 3H), 6.28-6.25 (m, 2H), 6.00 (s, 1H), 5.28-5.04 (m, 2H), 4.87-4.76 (m, 1H), 4.46-4.35 (m, 3H), 4.18 (t, J=6.8Hz, 1H), 3.49 (s, 1H), 3.39-3.24 (m, 2H), 2.77-2.49 (m, 2H), 2.37-2.26 (m, 1H), 2.23-1.96 (m, 3H), 1.96-1.47 (m, 6H), 1.45-1.41 (m, 3H), 1.28-1.06 (m, 10H), 1.02-0.94 (m, 3H) ppm。

[0523] 步骤2:2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-6-(2-氨基乙基)-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-5,7-二氧化杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙基2-甲基丙酸酯 (8-3R/S)

[0524] 将化合物 (6-3) (40.0mg, 55.3μmol) 的二乙胺 (1mL) 和二氯甲烷 (1mL) 溶液在室温下搅拌过夜。真空浓缩除去挥发物, 残余物经制备型HPLC (方法B) 纯化, 然后经制备型TLC (薄层色谱法) (硅胶, 二氯甲烷/甲醇, v/v=75/10) 纯化, 得到化合物 (8-3R/S) (3mg, 收率11%) 为灰白色固体。ESIm/z:502 (M+H)⁺.¹H NMR (MeOD_{d4}, 400MHz) δ7.36 (d, J=10.1Hz, 1H), 6.16 (dd, J=10.1Hz, 1.8Hz, 1H), 5.91 (s, 1H), 5.23 (t, J=4.4Hz, 1H), 5.08-4.90 (m, 1H), 4.75-4.65 (m, 1H), 4.38-4.28 (m, 1H), 2.83-2.50 (m, 2H), 2.33-2.23 (m, 1H), 2.13-2.00 (m, 2H), 1.90-1.46 (m, 6H), 1.39 (s, 3H), 1.24-1.12 (m, 2H), 1.23-0.78 (m, 11H) ppm。

实施例8

[0525] 本实施例说明了制备表1中化合物7-4R的方法。本实施例涉及图1中的编号化合物。

[0526] (1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-8-(2-羟基乙酰基)-9,13-二甲基-6-(哌啶-4-基)-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(7-4R)。

[0527] 在0℃下,向地奈德(1,0.10g,0.25mmol)的硝基丙烷(5mL)溶液中滴加高氯酸水溶液(70%,0.11g,0.75mmol),然后加入1-Boc-4-哌啶甲醛(4-4,64mg,0.30mmol)。在室温下搅拌过夜后,将悬浮液真空浓缩。所得残余物通过加入氨的甲醇溶液(7M,10mL)进行碱化。将所得混合物真空浓缩,并将粗产物经制备型HPLC纯化两次(方法B),得到化合物7-4R(15mg,收率13%)为白色固体。ESI m/z :472 (M+H)⁺.¹H NMR (MeOD_{d4}, 500MHz) δ 7.47 (d, J=10.0Hz, 1H), 6.27 (dd, J=10.0Hz, 2.0Hz, 1H), 6.03 (s, 1H), 4.90 (d, J=4.0Hz, 1H), 4.50 (d, J=19.0Hz, 1H), 4.46-4.43 (m, 1H), 4.41 (d, J=4.0Hz, 1H), 4.29 (d, J=19.0Hz, 1H), 3.13-3.09 (m, 2H), 2.71-2.60 (m, 3H), 2.42-2.38 (m, 1H), 2.27-2.13 (m, 2H), 1.99-1.96 (m, 1H), 1.85-1.64 (m, 7H), 1.52 (s, 3H), 1.51-1.38 (m, 2H), 1.14-0.99 (m, 2H), 0.96 (s, 3H) ppm。化合物7-4R的立体化学R-构型通过2DNMR进行确证。

实施例9

[0528] 本实施例说明了制备表1中化合物(11-1R/S)的方法。所述方法通常如图2所示。

[0529] 步骤1:2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙基甲磺酸酯(9)

[0530] 由其醇合成甲磺酸酯类化合物的一般方法A:向醇(1.0当量)的DCM(10mL/g起始物料)溶液中加入三乙胺或4-二甲基氨基吡啶(2当量)和甲磺酰氯(1.2当量)。在0℃下搅拌半小时,或直至根据TLC确定起始物料耗尽后,向反应混合物中加入硅胶(100-200目),真空浓缩。具有硅胶的残余物经硅胶柱色谱法(0-50%乙酸乙酯的石油醚溶液)纯化,得到甲磺酸酯产物。或者,将混合物用稀释的盐酸水溶液(1N)洗,然后用盐水洗,经硫酸钠干燥,浓缩。所得粗产物经快速色谱法(0-2%MeOH的DCM溶液)纯化,得到相应的甲磺酸酯产物。

[0531] 制备化合物9的另一种方法:在0℃下,向布地奈德(0.28mg,0.65mmol)的吡啶(5mL)溶液中滴加4-二甲基氨基吡啶(0.16g,1.3mmol),然后加入甲磺酰氯(0.11g,0.97mmol)。在室温下搅拌2小时后,将所得混合物倒入乙酸乙酯(100mL)中。混合物用稀释的盐酸水溶液(1N)洗,然后用盐水洗,经硫酸钠干燥,浓缩。所得粗产物经快速色谱法(0-1%甲醇的二氯甲烷溶液)纯化,得到化合物(9)(0.26g,收率85%)为白色固体。ESI m/z :509 (M+H)⁺.¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) (含差向异构体) δ 7.25和7.22 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.30-6.27 (m, 1H), 6.03-6.02 (m, 1H), 5.17-5.11 (m, 1.5H), 5.06-4.96 (m, 1.5H), 4.87-4.86 (m, 0.5H), 4.59 (d, J=4.5Hz, 0.5H), 4.52-4.50 (m, 1H), 3.24 (s, 3H), 2.60-2.53 (m, 1H), 2.36-2.33 (m, 1H), 2.24-2.00 (m, 3H), 1.86-1.62 (m, 4H), 1.53-1.33 (m, 8H), 1.21-1.09 (m, 2H), 1.02-0.96 (m, 3H), 0.94-0.91 (m, 3H) ppm。

[0532] 步骤2:(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-8-(2-氨基乙酰基)-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(11-1R/S)

[0533] 在室温下,向氨的MeOH(7M,15mL)溶液中加入化合物9(0.10g,0.20mmol)。将所得溶液密封并在40℃下搅拌过夜。真空浓缩除去挥发物,粗产物经制备型HPLC(方法B)纯化,得到化合物(11-1R/S)(8.0mg,9%收率)为灰白色固体。ESI m/z :429.9 (M+H)⁺.¹H NMR

(MeOD_{d4}, 400MHz) δ 7.46 (d, J=10.0Hz, 1H), 6.26 (d, J=10.0Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.22-5.15 (m, 1.5H), 4.88 (m, 0.6H), 4.58 (m, 0.5H), 4.42 (m, 1H), 3.96-3.81 (m, 0.7H), 3.50-3.41 (m, 0.7H), 2.70-2.63 (m, 1H), 2.40-2.37 (m, 1H), 2.22-1.94 (m, 3H), 1.87-1.25 (m, 11H), 1.17-0.80 (8H) ppm。分析型HPLC:>95%，保留时间:7.63min(方法B)。

实施例10

[0534] 本实施例说明了制备表1中化合物11-2R/S的方法。本实施例涉及图2中的编号化合物。

[0535] (1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-9,13-二甲基-8-[2-(甲基氨基)乙酰基]-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(11-2R/S)

[0536] 将化合物9(51mg, 0.10mmol)的甲胺(2MTHF溶液, 0.5mL)溶液置于密封管中, 并在20-25℃下搅拌4小时, 然后在40℃下搅拌过夜。真空浓缩除去挥发物, 残余物经制备型HPLC(方法A)纯化, 然后经制备型HPLC(方法B)纯化, 得到化合物(11-2R/S)(15mg, 33%收率)为白色固体。ESIm/z:444.3 (M+H)⁺.¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 7.26-7.23 (d, J=10.8Hz, 1H), 6.30-6.26 (m, 1H), 6.03-6.02 (m, 1H), 5.20-5.16 (m, 1H), 4.90-4.89 (d, J=4.8Hz, 0.5H), 4.69-4.66 (t, J=4.8Hz, 0.5H), 4.49-4.51 (m, 1H), 3.50-3.29 (m, 2H), 2.61-2.52 (m, 1H), 2.37-2.32 (m, 1H), 2.17-2.16 (d, J=3.6Hz, 3H), 2.14-2.08 (m, 3H), 1.86-1.74 (m, 3H), 1.59-1.48 (m, 2H), 1.45 (s, 3H), 1.42-0.89 (m, 12H) ppm。

实施例11

[0537] 本实施例说明了制备表1中化合物11-3R/S的方法。本实施例涉及图2中的编号化合物。

[0538] (1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-8-[2-(二甲基氨基)乙酰基]-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(11-3R/S)

[0539] 在室温下, 向化合物9(51mg, 0.10mmol)的THF(3mL)溶液中滴加二甲胺的THF(2M, 0.75mL, 1.5mmol)溶液。反应混合物在50℃下搅拌过夜。将反应混合物浓缩, 所得粗产物经制备型HPLC(方法B)纯化, 得到化合物11-3R/S(15mg, 33%收率)为白色固体。ESIm/z:458.2 (M+H)⁺.¹H NMR (MeOD_{d4}, 400MHz) δ 7.46 (d, J=10.4Hz, 1H), 6.26 (d, J=10.0Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.21 (t, J=4.8Hz, 0.6H), 5.17 (d, J=7.2Hz, 0.6H), 4.58 (d, J=4.4Hz, 0.4H), 4.44-4.41 (m, 1H), 3.80-3.57 (m, 1H), 3.26 (d, J=18.8Hz, 0.7H), 3.08-2.91 (m, 0.7H), 2.70-2.61 (m, 1H), 2.49-2.33 (m, 7H), 2.26-2.11 (m, 2H), 2.02-1.95 (m, 1H), 1.85-1.55 (m, 5H), 1.49 (s, 3H), 1.49-1.30 (m, 3H), 1.09-1.00 (m, 2H), 0.98-0.90 (m, 6H) ppm。分析型HPLC:>95%, 保留时间:8.34min(方法B)。

实施例12

[0540] 本实施例说明了制备表1中化合物11-5R/S的方法。本实施例涉及图2中的编号化合物。

[0541] (1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-8-[2-(4-氨基苯氧基)乙酰基]-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.00^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(11-5R/S)

[0542] 由其甲磺酸酯前体制备取代的酚醚的一般方法B:向热的乙腈或丙酮(60-65℃)中加入甲磺酸酯前体(1当量),取代酚(2.0-2.5当量),和碳酸钾或碳酸铯(2.0-3.0当量)。将所得悬浮液回流2-3小时,并通过LCMS和/或TLC监测反应。将反应冷却至室温后,真空浓缩除去挥发物,向所得残余物中加入水。含水混合物用乙酸乙酯萃取。将合并的有机溶液用水和盐水洗,经硫酸钠干燥,真空浓缩。所得粗产物直接用于下一步骤或通过快速色谱法或制备型HPLC纯化。

[0543] 步骤1:将化合物9(0.13g,0.26mmol),4-硝基苯酚(10-5,72mg,0.52mmol)和碳酸钾(72mg,0.52mmol)的丙酮(10mL)混合溶液回流(60℃)过夜。过滤除去固体后,将滤液真空浓缩。所得粗产物经快速色谱法(0-1%甲醇的二氯甲烷溶液)纯化,得到硝基-中间体(0.11g,收率77%)为褐色油状物。ESIm/z:552 (M+H)⁺.¹H NMR (CDCl₃, 500MHz) (含差向异构体) δ8.23-8.15 (m, 2.4H), 7.26-7.23 (m, 1H), 6.97-6.91 (m, 2.4H), 6.31-6.28 (m, 1H), 6.05-6.04 (m, 1H), 5.22-5.18 (m, 1.4H), 5.10-5.07 (m, 0.6H), 4.93 (d, J=5.0Hz, 0.6H), 4.83-4.77 (m, 1H), 4.67 (d, J=5.0Hz, 0.6H), 4.56-4.53 (m, 1H), 2.62-2.55 (m, 1H), 2.38-2.5 (m, 1H), 2.24-2.07 (m, 3H), 1.88-1.56 (m, 5H), 1.46-1.40 (m, 6H), 1.20-1.13 (m, 2H), 1.05-0.99 (m, 3H), 0.97-0.94 (m, 3H) ppm。

[0544] 步骤2:将铁粉(0.10g,1.9mmol)和氯化铵(0.10g,1.9mmol)同时加至硝基-中间体(0.10g,0.19mmol)的乙醇(20mL)和水(2mL)的混合溶液中。悬浮液在80℃下搅拌2小时,并通过硅藻土过滤以除去无机盐。将滤液真空浓缩,残余物经制备型HPLC(方法B)纯化,得到化合物(11-5R/S)(50mg,收率50%)为白色固体。ESIm/z:522 (M+H)⁺.¹H NMR (MeOD_{d4}, 500MHz) (含差向异构体) δ7.47 (d, J=10.0Hz, 1H), 6.78-6.70 (m, 4H), 6.29-6.26 (m, 1H), 6.04 (brs, 1H), 5.25 (t, J=5.0Hz, 0.4H), 5.20 (d, J=7.0Hz, 0.4H), 5.06 (d, J=18.0Hz, 0.4H), 4.98 (d, J=18.0Hz, 0.6H), 4.90-4.87 (m, 0.6H), 4.75-4.66 (m, 1.6H), 4.46-4.44 (m, 1H), 2.71-2.64 (m, 1H), 2.42-2.38 (m, 1H), 2.28-2.18 (m, 2H), 2.06-2.00 (m, 1H), 1.87-1.83 (m, 1H), 1.76-1.73 (m, 1H), 1.69-1.61 (m, 3H), 1.55-1.38 (m, 3H), 1.51 (s, 3H), 1.20-1.02 (m, 3H), 0.98-0.92 (m, 5H) ppm。

[0545] 通过手性HPLC分离表1中化合物11-5R和化合物11-5S的两种差向异构体的混合物(0.30g,0.58mmol)(仪器:Gilson-281,柱:OZ-H20*250mm,10μm)(Dace1),使用流动相:己烷(0.1%DEA)/乙醇(0.1%DEA)=70/30,流速为60mL/min,在214nm处检测。将所得溶液浓缩,分别得到化合物11-5S(30mg,10%收率)和化合物11-5R(50mg,17%收率)为白色固体。化合物11-5S和化合物11-5R的结构通过2D-NOESY进行确证。

[0546] (1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-8-[2-(4-氨基苯氧基)乙酰基]-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(11-5S):HPLC的第一峰值;ESIm/z:522 (M+H)⁺.HPLC中的保留时间(方法A):7.54min;手性SFC(CC4):保留时间4.71min,99.5d.e.%;¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ7.21 (d, J=10.1Hz, 1H), 6.77 (d, J=8.8Hz, 2H), 6.63 (d, J=8.8Hz, 2H), 6.24 (dd, J=10.1, 1.6Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.20 (d, J=6.8Hz, 1H), 5.18 (t, J=4.8Hz, 1H), 4.99 (d, J=-17.9Hz, 1H), 4.61 (d, J=-17.9Hz, 1H), 4.43 (s, 1H), 3.46 (s, 2H), 2.57 (td, J=13.2, 4.4Hz, 1H), 2.34 (dd, J=13.4, 3.2Hz, 1H), 2.16-2.01 (m, 4H), 1.85-1.68 (m, 3H), 1.59-1.49 (m, 3H), 1.44 (s, 3H), 1.44-1.26 (m, 2H), 1.18-1.09 (2H), 1.00 (s, 3H), 0.91 (t, J=7.3Hz, 3H) ppm.¹³C NMR (100MHz,

CDCl_3) δ 204.0, 186.7, 170.0, 156.3, 151.4, 141.0, 127.9, 122.6, 116.5, 116.4, 108.4, 98.6, 83.2, 72.6, 69.8, 55.3, 53.0, 47.2, 44.2, 41.5, 37.3, 34.1, 33.0, 32.0, 31.1, 21.2, 17.9, 17.7, 14.1 ppm。

[0547] (1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-8-[2-(4-氨基苯氧基)乙酰基]-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(11-5R) :HPLC的第二峰值;ESIm/z:522 (M+H)⁺;HPLC中的保留时间(方法A):7.58min;手性SFC(CC4):保留时间3.80min,98.1d.e.%;¹H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.23 (d, J =10.1Hz, 1H), 6.79 (dd, J =8.8Hz, 2H), 6.65 (d, J =8.8Hz, 2H), 6.27 (dd, J =10.1, 1.7Hz, 1H), 6.04 (s, 1H), 4.94 (d, J =4.4Hz, 1H), 4.89 (d, J =-18.0Hz, 1H), 4.65 (d, J =-18.0Hz, 1H), 4.61 (t, J =4.4Hz, 1H), 4.48 (d, J =2.1Hz, 1H), 3.51 (s, 2H), 2.58 (td, J =13.3, 4.9Hz, 1H), 2.35 (dd, J =13.4, 2.8Hz, 1H), 2.23-1.99 (m, 4H), 1.79-1.61 (m, 6H), 1.46-1.38 (m, 2H), 1.44 (s, 3H), 1.23-1.09 (m, 2H), 0.95 (s, 3H), 0.93 (t, J =7.3Hz, 3H) ppm.¹³C NMR (101MHz, CDCl_3) δ 204.9, 186.6, 170.0, 156.2, 151.2, 141.0, 127.9, 122.5, 116.3, 116.3, 104.5, 97.6, 81.9, 72.6, 69.9, 55.1, 49.8, 45.7, 44.0, 41.1, 35.0, 34.0, 33.3, 31.9, 30.3, 21.1, 17.5, 17.1, 14.0 ppm。

实施例13

[0548] 本实施例说明了制备表1中化合物11-5S和(11-5R)的方法。本实施例涉及图2中的编号化合物。

[0549] 根据实施例9中所述的一般方法A,分别由(R)-布地奈德制备得到化合物9R,和由(S)-布地奈德制备得到化合物9S。使用与实施例12中所述相同的方法,分别由化合物(9S)与化合物(10-12)反应得到化合物(11-5S),和由化合物(9R)与化合物(10-9)反应得到化合物(11-5R)。代表性程序如下。向化合物(9R)或化合物(9S)(100mg)的丙酮(10mL)溶液中同时加入化合物10-9(2当量)和Cs₂CO₃(2当量)。将混合物回流2小时,粗产物通过以下步骤进行后处理:真空浓缩除去丙酮,用乙酸乙酯萃取粗产物,用水洗无机盐,并通过色谱法(0-50%乙酸乙酯的石油醚溶液)纯化所得产物,得到化合物11-5R或化合物11-5S(25-60%收率)为浅黄色固体。ESIm/z:522 (M+H)⁺。分析型HPLC:98%。化合物11-5R和化合物11-5S的2D-NOESY光谱如图7和8所示。

实施例14

[0550] 本实施例说明了制备表1中化合物11-6S和11-6R的方法。本实施例涉及图2中的编号化合物。

[0551] (1S,2S,4R,6S,8S,9S,11S,12S,13R)-8-[2-(4-氨基-3-氟苯氧基)乙酰基]-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(11-6S) 和 (1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12S,13R)-8-[2-(4-氨基-3-氟苯氧基)乙酰基]-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(11-6R)。

[0552] 根据实施例12中所述的方法来制备化合物11-6R/S的外消旋混合物。通过手性SFC(详见2.3节中所述)分离所述外消旋产物,得到化合物11-6S(第二峰值)和化合物11-6R(第一峰值)为灰白色固体。

[0553] 化合物11-6S(30mg,7.9%收率).ESIm/z:540.2 (M+H)⁺.¹H NMR (500MHz, DMSO_{d6}) δ

7.32 (d, $J=10.1\text{Hz}$, 1H), 6.71-6.62 (m, 2H), 6.49 (dd, $J=8.5, 2.0\text{Hz}$, 1H), 6.19-6.16 (m, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.21 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 1H), 5.10 (d, $J=7.3\text{Hz}$, 1H), 5.02 (d, $J=18.1\text{Hz}$, 1H), 4.69 (dd, $J=58.9, 28.6\text{Hz}$, 4H), 4.31 (s, 1H), 2.56-2.51 (m, 1H), 2.29 (d, $J=10.6\text{Hz}$, 1H), 2.06-1.97 (m, 3H), 1.89 (s, 2H), 1.79-1.72 (m, 1H), 1.30 (m, 10H), 0.88-0.85 (m, 6H) ppm。保留时间: 2.94min, 手性SFC (AD) 中为98%。分析型HPLC:>96.94%, 保留时间: 7.94min (方法B)。

[0554] 化合物11-6R (28mg, 7.4%收率) .ESIm/z: 540.3 (M+H)⁺.¹H NMR (500MHz, DMSO_{d6}) δ 7.32 (d, $J=10.1\text{Hz}$, 1H), 6.72-6.68 (m, 2H), 6.52 (dd, $J=8.6, 2.1\text{Hz}$, 1H), 6.18 (d, $J=10.1\text{Hz}$, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.01 (d, $J=18.3\text{Hz}$, 1H), 4.77 (dd, $J=12.9, 3.3\text{Hz}$, 2H), 4.71 (s, 2H), 4.65 (t, $J=4.3\text{Hz}$, 1H), 4.32 (s, 1H), 3.17 (d, $J=5.2\text{Hz}$, 1H), 2.57-2.51 (m, 1H), 2.30 (d, $J=10.5\text{Hz}$, 1H), 2.10 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 2.01-1.99 (m, 1H), 1.84 (s, 2H), 1.62-1.52 (m, 5H), 1.39-1.33 (m, 5H), 1.23 (s, 1H), 1.02-0.95 (m, 2H), 0.87 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 3H), 0.83 (s, 3H) ppm。保留时间: 2.25min, 手性SFC (AD) 中为100%。分析型HPLC:>98.50%, 保留时间: 8.01min (方法B)。

实施例15

[0555] 本实施例说明了制备表1中化合物11-7R的方法。本实施例涉及图2中的编号化合物。

[0556] (1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-8-[2-(4-氨基-3-氟苯氧基)乙酰基]-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(11-7S和11-7R)

[0557] 根据实施例12中所述的方法来制备类固醇类化合物11-7-22R/S的外消旋混合物。通过手性SFC(详见2.3节中所述)分离所述外消旋产物, 得到化合物11-7S(第二峰值)和化合物11-7R(第一峰值)。

[0558] 化合物11-7R:ESIm/z: 540.2 (M+H)⁺.¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 7.25 (d, $J=10.1\text{Hz}$, 1H), 6.87 (dt, $J=15.5, 7.7\text{Hz}$, 1H), 6.47 (dd, $J=12.8, 2.4\text{Hz}$, 1H), 6.37 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 1H), 6.29 (dd, $J=9.9, 4.4\text{Hz}$, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.22-4.49 (m, 5H), 3.61 (s, 2H), 2.58 (td, $J=13.5, 4.9\text{Hz}$, 1H), 2.36 (d, $J=10.3\text{Hz}$, 1H), 2.19-2.03 (m, 3H), 1.87-1.72 (m, 2H), 1.67-1.55 (m, 3H), 1.51-1.33 (m, 7H), 1.21-1.11 (m, 2H), 1.00-0.90 (m, 6H)。分析型HPLC:>62.24%, 36.49%, 保留时间: 7.78, 7.86min (方法B)。

实施例16

[0559] 本实施例说明了制备表1中化合物11-8R的方法。本实施例涉及图2中的编号化合物。

[0560] (1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-9,13-二甲基-8-{2-[4-(甲基氨基)苯氧基]乙酰基}-6-丙基-5,7-二氧杂五环-[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(11-8R)

[0561] 类固醇11-8是根据实施例13中所述的方法制备得到。

[0562] 得到化合物(11-8R)为白色固体(14mg, 54%收率) .ESIm/z: 525.3 (M+H)⁺.¹H NMR (500MHz, MeOD_{d4}) δ 7.47 (d, $J=10.1\text{Hz}$, 1H), 6.83-6.80 (m, 2H), 6.65-6.62 (m, 2H), 6.28 (dd, $J=10.1, 1.9\text{Hz}$, 1H), 6.04 (s, 1H), 4.99 (d, $J=18.2\text{Hz}$, 1H), 4.90 (d, $J=4.8\text{Hz}$, 1H), 4.74 (d, $J=10.1, 1.9\text{Hz}$, 1H), 4.65 (d, $J=18.2\text{Hz}$, 1H), 4.49 (d, $J=4.8\text{Hz}$, 1H), 4.32 (s, 1H), 3.95 (s, 1H), 3.61 (s, 2H), 3.44 (s, 2H), 3.36 (s, 2H), 3.28 (s, 2H), 3.17 (s, 2H), 2.98 (s, 2H), 2.80 (s, 2H), 2.72 (s, 2H), 2.64 (s, 2H), 2.56 (s, 2H), 2.48 (s, 2H), 2.40 (s, 2H), 2.32 (s, 2H), 2.24 (s, 2H), 2.16 (s, 2H), 2.08 (s, 2H), 2.00 (s, 2H), 1.92 (s, 2H), 1.84 (s, 2H), 1.76 (s, 2H), 1.68 (s, 2H), 1.60 (s, 2H), 1.52 (s, 2H), 1.44 (s, 2H), 1.36 (s, 2H), 1.28 (s, 2H), 1.20 (s, 2H), 1.12 (s, 2H), 1.04 (s, 2H), 0.96 (s, 2H), 0.88 (s, 2H), 0.80 (s, 2H), 0.72 (s, 2H), 0.64 (s, 2H), 0.56 (s, 2H), 0.48 (s, 2H), 0.40 (s, 2H), 0.32 (s, 2H), 0.24 (s, 2H), 0.16 (s, 2H), 0.08 (s, 2H), -0.04 (s, 2H) ppm。分析型HPLC:>96.94%, 保留时间: 7.94min (方法B)。

=18.1Hz,1H),4.66(t,J=4.5Hz,1H),4.46(d,J=3.0Hz,1H),2.75(s,3H),2.67(td,J=13.6,5.2Hz,1H),2.40(dd,J=13.5,2.7Hz,1H),2.30-2.22(m,1H),2.16-2.12(m,1H),2.02(dd,J=13.7,3.3Hz,1H),1.85(dd,J=13.7,2.6Hz,1H),1.76(d,J=6.9Hz,1H),1.67-1.63(m,4H),1.51(s,3H),1.48-1.44(m,2H),1.17-1.08(m,1H),1.05(dd,J=11.2,3.5Hz,1H),0.98-0.94(m,6H) ppm。分析型HPLC:100%,保留时间:7.56min(方法A)。

实施例17

[0563] 本实施例说明了制备表1中化合物(11-10R/S)的方法。本实施例涉及图2中的编号化合物。

[0564] (1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12S,13R)-8-[2-(4-氟苯氧基)乙酰基]-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(11-10R/S)。

[0565] 类固醇类化合物11-10R/S是根据实施例13中所述的方法制备得到。

[0566] 得到化合物11-10R/S为白色固体(14mg,54%收率)。ESIm/z:525.2(M+H)⁺.¹H NMR(400MHz,MeOD_{d4}) 87.47(d,J=10.1Hz,1H),7.02(t,J=8.7Hz,2H),6.94-6.90(m,2H),6.27(dd,J=10.1,1.8Hz,1H),6.03(s,1H),5.06(d,J=18.1Hz,1H),4.90-4.88(m,1H),4.82(d,J=18.1Hz,1H),4.69(t,J=4.4Hz,1H),4.46(d,J=2.8Hz,1H),2.71-2.63(m,1H),2.42-2.38(m,1H),2.30-2.11(m,2H),2.05-2.01(m,1H),1.89-1.84(m,1H),1.77-1.63(m,5H),1.51-1.41(m,5H),1.18-1.02(m,2H),0.97-0.93(m,6H) ppm。分析型HPLC:100%,保留时间:9.94min(方法A)。

实施例18

[0567] 本实施例说明了制备表1中化合物11-11R/S的方法。本实施例涉及图2中的编号化合物。

[0568] N-(4-{2-[(1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}苯基)乙酰胺(11-11R/S)

[0569] 类固醇类化合物11-11R/S是根据实施例13中所述的方法制备得到。

[0570] 得到化合物11-11R/S为白色固体(25mg,46%收率)。ESIm/z:564.3(M+H)⁺.¹H NMR(500MHz,MeOD_{d4}) 87.49-7.45(m,3H),6.89(d,J=9.0Hz,2H),6.28(d,J=10.2Hz,1H),6.04(s,1H),5.09(d,J=18.1Hz,1H),4.91-4.89(m,1H),4.83(d,J=18.1Hz,1H),4.70(t,J=4.3Hz,1H),4.47(d,J=3Hz,1H),2.72-2.65(m,1H),2.43-2.39(m,1H),2.30-2.22(m,1H),2.18-2.12(n,4H),2.06-2.03(m,1H),1.90-1.86(m,1H),1.77-1.65(m,5H),1.48(m,5H),1.18-1.09(m,1H),1.07-1.04(m,1H),0.99-0.95(m,6H) ppm。分析型HPLC:100%,保留时间:7.33min(方法B)。

实施例19

[0571] 本实施例说明了制备表1中化合物11-12R/S的方法。本实施例涉及图2中的编号化合物。

[0572] (1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-8-[2-(4-氨基苯氧基)乙酰基]-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(11-12R/S)

[0573] 步骤1:根据实施例9所述的一般方法A来制备化合物(9B)。在0℃下,向(6S,9R)2F-布地奈德(80mg,0.17mmol)的DCM(1mL)溶液中滴加三乙胺(34mg,0.34mmol)和甲磺酰氯(30mg,0.26mmol)。将混合物在此温度下搅拌半小时,直至由TLC监测(6S,9R)2F-布地奈德已耗尽。然后反应混合物用DCM(100mL)稀释,并用饱和氯化铵水溶液(30mL)淬灭。将有机溶液用饱和氯化铵水溶液洗,然后用盐水洗,经硫酸钠干燥,真空浓缩。粗产物经快速色谱法(0-2%MeOH的DCM溶液)纯化,得到相应的甲磺酸酯产物(9B)。

[0574] 步骤2:将化合物9B溶于丙酮(0.5mL)。向所得溶液中加入4-氨基苯酚(10-9,37mg,0.34mmol)和碳酸铯(0.11g,0.34mmol)。将反应混合物回流1.5小时,或直至根据TLC和LCMS确定(9B)完全耗尽。然后将混合物用乙酸乙酯稀释,过滤。将滤液真空浓缩,残余物经制备型HPLC(方法B)纯化,得到化合物11-12R/S(6.0mg,由(6S,9R)2F-布地奈德开始的收率为6.3%)为白色固体。ESIm/z:558(M+H)⁺.¹H NMR(500MHz,MeOD_{d4})δ7.34(d,J=10.0Hz,1H),6.78-6.71(m,4H),6.37-6.33(m,2H),5.63-5.49(m,1H),5.10-4.99(m,1H),4.77-4.63(m,2H),4.33(d,J=9.1Hz,1H),2.74-2.57(m,1H),2.39-2.13(m,3H),1.98-1.31(m,12H),1.03-0.93(m,6H)ppm。分析型HPLC:纯度97.4%,保留时间:7.55min(方法B)。

[0575] (1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-8-[2-(4-氨基苯氧基)乙酰基]-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(11-12R)

[0576] 根据实施例9所述的一般方法A来制备化合物9BR。使化合物9BR(0.90g,1.7mmol)与4-氨基苯酚(0.20g,1.8mmol)和碳酸铯(1.1g,3.4mmol)在乙腈(20mL)中反应,然后经硅胶柱色谱法(50-80%乙酸乙酯的石油醚溶液)纯化后,得到(11-12R)(0.20g,54%收率)为黄色油状物。ESIm/z:558(M+H)⁺.¹H NMR(500MHz,DMSO_{d6})δ7.26(d,J=10.5Hz,1H),6.64(d,J=5.0Hz,2H),6.50(d,J=5.0Hz,2H),6.30(dd,J=10Hz,2Hz,1H),6.11(s,1H),5.72-5.65(m,0.5H),5.62-5.55(m,0.5H),5.52-5.48(m,1H),5.0(s,0.5H),4.95(s,0.5H),4.80-4.78(m,1H),4.75-4.65(m,1H),4.24-4.16(m,1H),2.70-2.52(m,1H),2.30-2.21(m,1H),2.11-2.00(m,2H),1.77(d,J=13.0Hz,1H),1.61-1.54(m,4H),1.49(s,3H),1.36(q,J=7.5Hz,3H),1.23(s,1H),0.87(d,J=7.5Hz,3H),0.83(s,3H)ppm。分析型HPLC:100%,保留时间:8.44min(方法B)。

实施例20

[0577] 本实施例说明了制备表1中化合物11-13R的方法。本实施例涉及图2中的编号化合物。

[0578] (1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-8-[2-(3-氨基苯氧基)乙酰基]-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(11-13R)。

[0579] 类固醇11-13R是根据实施例19中所述的方法制备得到。

[0580] 经制备型HPLC(方法A)纯化后,得到化合物(11-13R)为浅橙色固体(9.0mg,44%收率)。ESIm/z:558(M+H)⁺.¹H NMR(500MHz,MeOD_{d4})δ7.35(dd,J=10.1,1.3Hz,1H),7.29(t,J=8.1Hz,1H),6.76-6.70(m,3H),6.40-6.29(m,2H),5.66-5.48(m,1H),5.14(d,J=18.1Hz,1H),4.93-4.91(m,1H),4.90-4.87(m,1H),4.77(t,J=4.3Hz,1H),4.35(d,J=9.3Hz,1H),2.76-2.62(m,1H),2.41-2.18(m,3H),1.83-1.56(m,9H),1.50(dt,J=15.4,7.6Hz,2H),

0.99-0.96 (m, 6H) ppm。分析型HPLC:100%，保留时间:7.77min(方法A)。

实施例21

[0581] 本实施例说明了制备表1中化合物11-14R/S的方法。本实施例涉及图2中的编号化合物。

[0582] (1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-8-[2-(4-氨基-3-氟苯氧基)乙酰基]-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(11-14R/S)。

[0583] 室温下,向(9B)(0.20g,0.37mmol)的DMSO(3mL)溶液中加入4-氨基-3-氟苯酚(10-14,0.25g,2.0mmol)和氢氧化钾(0.11g,2.0mmol)。在氮气保护下,将所得混合物在60℃下搅拌1小时直至反应完成,通过TLC和LCMS进行监测。反应混合物冷却至室温并通过膜过滤后,反应溶液经制备型HPLC(方法A)直接纯化,得到化合物11-14R/S(40mg,19%收率)为灰白色固体。ESIm/z:576 (M+H)⁺.¹H NMR (500MHz, MeOD_{d4}) δ 7.40-7.31 (m, 1H), 7.20 (td, J=9.1, 1.9Hz, 1H), 6.91-6.84 (m, 1H), 6.80-6.76 (m, 1H), 6.40-6.30 (m, 2H), 5.57 (ddd, J=48.6, 9.7, 6.8Hz, 1H), 5.15 (d, J=18.1Hz, 1H), 4.90-4.79 (m, 2H), 4.75 (t, J=4.3Hz, 1H), 4.41-4.28 (m, 1H), 2.78-2.57 (m, 1H), 2.40-2.12 (m, 3H), 1.98-1.39 (m, 11H), 1.07-0.92 (m, 6H) ppm。分析型HPLC:100%，保留时间:8.10min(方法A)。

实施例22

[0584] 本实施例说明了制备表1中化合物11-15R/S的方法。本实施例涉及图2中的编号化合物。

[0585] 叔丁基N-[(4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}苯基)甲基]氨基甲酸酯(N-Boc-11-15R/S)。

[0586] 步骤1:在室温下,通过注射器向4-(氨基甲基)苯酚(1.2g,10mmol)的甲醇(70mL)和水(5mL)的溶液中滴加Boc₂O(2.4g,11mmol)。将所得混合物在室温下搅拌1小时,直至4-(氨基甲基)苯酚完全耗尽,通过LCMS和TLC进行监测。真空浓缩除去挥发物,将残余物溶于乙酸乙酯(150mL)。溶液用饱和柠檬酸水溶液(50mLx2)洗,然后盐水洗,经硫酸钠干燥,真空浓缩,得到N-Boc-4-氨基甲基苯酚(2.1g,94%收率)为棕色油状物。ESIm/z:246 (M+Na)⁺.¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 7.12 (d, J=7.8Hz, 2H), 6.82-6.71 (m, 2H), 4.84 (s, 1H), 4.23 (d, J=5.3Hz, 2H), 1.46 (s, 9H) ppm。

[0587] 步骤2:根据实施例19中所述的方法制备得到化合物(N-Boc-11-15R/S)。

[0588] (1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-8-{2-[4-(氨基甲基)苯氧基]乙酰基}-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(11-15R/S)

[0589] 在0℃下,通过注射器向(N-Boc-11-15R/S)(30mg,45μmol)的DCM(2mL)溶液中滴加TFA(0.4mL)。将所得混合物在室温下搅拌1小时,直至完全脱去Boc,通过LCMS进行监测。真空浓缩除去挥发物,残余物经制备型HPLC(方法A)纯化,得到化合物(11-15R/S)(15mg,49%收率)为白色固体。ESIm/z:572 (M+H)⁺.¹H NMR (500MHz, MeOD_{d4}) δ 7.45-7.32 (m, 3H), 7.01-6.96 (m, 2H), 6.41-6.30 (m, 2H), 5.57 (ddd, J=18.2, 10.4, 7.3Hz, 1H), 5.21 (dd, J=19.7Hz, 1H), 4.93-4.91 (m, 1H), 4.85 (d, J=18.0Hz, 1H), 4.77 (t, J=4.3Hz, 1H), 4.37-4.32 (m, 1H),

4.07 (s, 2H) , 2.75-2.58 (m, 1H) , 2.40-2.15 (m, 3H) , 1.86-1.40 (m, 11H) , 1.08-0.92 (m, 6H) ppm。分析型HPLC:100%, 保留时间:7.47min (方法A)。

实施例23

[0590] 本实施例说明了制备表1中化合物11-16R/S的方法。本实施例涉及图2中的编号化合物。

[0591] (1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-8-[2-(4-羟基苯氧基)乙酰基]-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(11-16R/S)

[0592] 根据实施例12中所述的方法制备得到化合物11-16R/S。

[0593] 经制备型HPLC(方法A)纯化后,得到化合物11-16R/S(20mg,38%收率)为棕褐色固体。ESI m/z :523.2 ($M+H$)⁺.¹H NMR (500MHz, MeOD_{d4}) δ 7.47 (d, $J=10.1$ Hz, 1H) , 6.82-6.77 (m, 2H) , 6.75-6.70 (m, 2H) , 6.28 (dd, $J=10.1, 1.8$ Hz, 1H) , 6.04 (s, 1H) , 5.00 (d, $J=18.1$ Hz, 1H) , 4.91-4.89 (m, 1H) , 4.75 (d, $J=18.1$ Hz, 1H) , 4.67 (t, $J=4.5$ Hz, 1H) , 4.46 (d, $J=3.1$ Hz, 1H) , 2.68 (td, $J=13.6, 5.8$ Hz, 1H) , 2.40 (dd, $J=13.5, 2.8$ Hz, 1H) , 2.31-2.21 (m, 1H) , 2.17-2.13 (m, 1H) , 2.02 (dd, $J=13.7, 3.3$ Hz, 1H) , 1.86 (dd, $J=13.7, 2.6$ Hz, 1H) , 1.80-1.58 (m, 5H) , 1.53-1.40 (m, 5H) , 1.18-0.93 (m, 8H) ppm。制备型HPLC:100%, 保留时间:8.92min (方法A)。

实施例24

[0594] 本实施例说明了制备表1中化合物11-17R/S的方法。本实施例涉及图2中的编号化合物。

[0595] (1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-8-{2-[(6-氨基吡啶-2-基)氨基]乙酰基}-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(11-17R/S)

[0596] 根据实施例19中所述的方法制备得到化合物11-17R/S。

[0597] 经快速色谱法(10-50%乙酸乙酯的石油醚溶液)纯化后,得到化合物11-17R/S(50mg,24%收率)为白色固体。ESI:559 ($M+H$)⁺.¹H NMR (500MHz, DMSO_{d6}) δ 7.35-7.31 (m, 2H) , 6.31 (d, $J=11.5$ Hz, 1H) , 6.13 (s, 1H) , 6.03 (d, $J=8.0$ Hz, 1H) , 5.98 (d, $J=7.5$ Hz, 1H) , 5.84-5.82 (m, 1H) , 5.68-5.56 (m, 3H) , 5.25-4.72 (m, 4H) , 4.29 (brs, 1H) , 2.66-2.57 (m, 1H) , 2.28-2.05 (m, 4H) , 1.63-1.58 (m, 4H) , 1.50-1.30 (m, 6H) , 0.95-0.87 (m, 6H) ppm。分析型HPLC:100%, 保留时间:8.65min (方法A)。

实施例25

[0598] 本实施例说明了制备表1中化合物11-19的方法。本实施例涉及图2中的编号化合物。

[0599] (1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-8-(2-叠氮基乙酰基)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(11-19)

[0600] 步骤1:将化合物9B(1.0g,1.8mmol)和叠氮化钠(1.2g,18mmol)的丙酮(15mL)悬浮液在50℃下搅拌过夜,根据LCMS确定反应完成。冷却后,将反应混合物倒入冷水(80mL)中。含水混合物用乙酸乙酯(50mLx3)萃取。合并的有机溶液用盐水(30mL)洗,经硫酸钠干燥,真

空浓缩,得到(11-19R/S)的粗品化合物叠氮基前体(0.90g,>99%收率)为黄色固体,其无需进一步纯化即可用于下一步骤。ESIm/z:492 (M+H)⁺。

[0601] (1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-8-(2-氨基乙酰基)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮三氟乙酸盐(11-19R/S)

[0602] 步骤2:向化合物11-19R/S的前体(0.85g,1.7mmol)的THF(20mL)溶液中加入盐酸水溶液(1N,10mL)。将混合物在28-32℃下搅拌直至其变澄清,然后在此温度下向其中加入三苯基膦(0.68g,2.6mmol)。将所得黄色澄清溶液在28-32℃下搅拌18小时,根据TLC和LCMS确定反应完成。将混合物真空浓缩,残余物经反相快速色谱法(0-50%乙腈的TFA(0.05%)水溶液)纯化,得到化合物11-19R/S(0.56g,57%收率,TFA盐)为灰白色固体。ESIm/z:466 (M+H)⁺.¹H NMR (400MHz, MeOD_{d4}) δ 7.33 (d, J=9.9Hz, 1H), 6.40-6.29 (m, 2H), 5.69-5.45 (m, 1H), 4.93-4.92 (m, 1H), 4.71 (t, J=4.3Hz, 1H), 4.35-4.27 (m, 2H), 3.90-3.84 (m, 1H), 2.81-2.54 (m, 1H), 2.42-2.06 (m, 3H), 1.82-1.32 (m, 11H), 1.09-0.87 (m, 6H) ppm.¹⁹F NMR (376MHz, MeOD_{d4}) δ -77.01, -166.24, -166.92, -188.81, -188.83 ppm。分析型HPLC:100%,保留时间:6.86min(方法A)。

[0603] (1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-8-(2-氨基乙酰基)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮三氟乙酸盐(11-19R)

[0604] 步骤1:使用与上述相同的方法,经快速色谱法(0-50%乙酸乙酯的石油醚溶液)纯化后,由化合物(9BR)制备得到(11-19R)的叠氮基前体(0.12g,87%收率)为白色固体。ESIm/z:492 (M+H)⁺.¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 7.10 (dd, J=10.2, 1.3Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.38 (dd, J=10.2, 1.8Hz, 1H), 5.48-5.31 (m, 1H), 4.92 (d, J=5.4Hz, 1H), 4.62 (t, J=4.4Hz, 1H), 4.43 (dd, J=5.6, 2.7Hz, 1H), 4.22 (d, J=18.7Hz, 1H), 3.94 (d, J=18.7Hz, 1H), 2.56-2.39 (m, 2H), 2.32-2.18 (m, 2H), 1.85-1.71 (m, 3H), 1.67-1.54 (m, 7H), 1.46-1.37 (m, 2H), 0.97-0.90 (m, 6H) ppm。

[0605] 步骤2:使用与上述相同的方法,经制备型HPLC(方法A)纯化后,得到化合物11-19R(30mg,66%收率)为白色固体。ESIm/z:466 (M+H)⁺.¹H NMR (500MHz, MeOD_{d4}) δ 7.34 (d, J=10.0Hz, 1H), 6.40-6.30 (m, 2H), 5.65-5.46 (m, 1H), 4.94-4.91 (m, 1H), 4.72 (t, J=4.3Hz, 1H), 4.34-4.28 (m, 2H), 3.88 (d, J=18.8Hz, 1H), 2.78-2.60 (m, 1H), 2.39-2.34 (m, 1H), 2.33-2.18 (m, 2H), 1.77-1.54 (m, 9H), 1.53-1.40 (m, 2H), 0.99-0.95 (m, 6H) ppm。分析型HPLC:100%,保留时间:6.85min(方法A)。

实施例26

[0606] 本实施例说明了制备表1中化合物11-20R/S的方法。本实施例涉及图2中的编号化合物。

[0607] (1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-8-{[(4-甲氧基苯基)甲基](甲基)氨基}乙酰基)-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮三氟乙酸(11-20R/S)

[0608] 在室温下,向化合物9B(0.54g,1.0mmol)的乙腈(10mL)溶液中依次加入N-PMB-甲胺(0.30g,2.0mmol)和碳酸钾(0.28g,2.0mmol)。反应混合物在70℃下搅拌过夜。冷却后,将

混合物用DCM稀释,过滤。滤液真空浓缩,所得残余物经快速色谱法(10-90%乙酸乙酯的石油醚溶液)纯化,得到粗品化合物(11-20R/S)(0.20g,33%收率)为白色固体。粗产物(30mg)经制备型HPLC(方法A)进一步纯化,得到纯的化合物(11-20R/S)为白色固体(12mg,13%收率)。ESI m/z :600 ($M+H$)⁺.¹H NMR (500MHz, MeOD-d₄) δ 7.50-7.43 (m, 2H), 7.34 (d, J=10.1Hz, 1H), 7.07 (d, J=8.5Hz, 2H), 6.39-6.30 (m, 2H), 5.56 (ddd, J=48.5, 10.7, 6.5Hz, 1H), 5.24-5.21 (m, 1H), 4.94-4.92 (m, 1H), 4.64-4.53 (m, 1H), 4.38-4.16 (m, 4H), 3.86 (s, 3H), 2.92-2.91 (m, 3H), 2.76-2.56 (m, 1H), 2.39-2.31 (m, 1H), 2.28-2.09 (m, 2H), 1.97 (td, J=13.2, 7.8Hz, 1H), 1.78-1.23 (m, 10H), 1.08-0.88 (m, 6H) ppm。分析型HPLC:100%,保留时间:7.81min(方法A)。

实施例27

[0609] 本实施例说明了制备表1中化合物11-21R/S的方法。本实施例涉及图2中的编号化合物。

[0610] (1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-8-[2-(甲基氨基)乙酰基]-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮三氟乙酸(11-21R/S)

[0611] 向化合物11-20R/S(30mg,0.053mmol)的4mL螺旋盖小瓶中加入1-氯乙基氯甲酸酯(1滴)和氯仿(0.4mL)。混合物在70℃下搅拌2小时,直至通过TLC监测起始物料耗尽。冷却至室温后,向混合物中加入甲醇(1.5mL)。将混合物在70℃下搅拌1小时直至反应完成,通过TLC和LCMS进行监测。真空浓缩除去挥发物,残余物经制备型HPLC(方法A)纯化,得到化合物11-21R/S(8.0mg,28%收率)为白色固体。ESI m/z :480 ($M+H$)⁺.¹H NMR (400MHz, MeOD-d₄) δ 7.34 (d, J=10.1Hz, 1H), 6.41-6.26 (m, 2H), 5.56 (ddd, J=48.7, 10.0, 6.8Hz, 1H), 5.28 (t, J=4.9Hz, 1H), 5.23 (d, J=7.4Hz, 1H), 4.47-4.41 (m, 1H), 4.34-4.30 (m, 1H), 4.07-4.00 (m, 1H), 2.82-2.54 (m, 4H), 2.43-2.09 (m, 3H), 1.96 (td, J=13.6, 7.9Hz, 1H), 1.81-1.34 (m, 10H), 1.10-0.85 (m, 6H) ppm.¹⁹F NMR (376MHz, MeOD-d₄) δ -76.96, -166.28, -166.95, -188.80, -188.83 ppm。分析型HPLC:99%,保留时间:6.97min(方法A)。

实施例28

[0612] 本实施例说明了制备表1中化合物14-2的方法。本实施例涉及图3中的编号化合物。

[0613] (1R,2S,8S,10S,11S,13S,14R,15S,17S)-1,8-二氟-17-羟基-2,13,15-三甲基-14-[2-(甲基氨基)乙酰基]-5-氧四环[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]十七烷-3,6-二烯-14-基丙酸酯(14-2)

[0614] 甲磺酸氟米松(12)的合成报告在Bioorg.Med.Chem.Lett.,2015,25,2837-2843中,此文献的全部内容通过引用其整体并入本发明用于所有目的。

[0615] 将12(82mg粗品)的甲胺(2MTHF溶液,1.5mL,3.000mmol)溶液置于密封管中,并在室温下搅拌过夜,然后在60℃下加热3小时直至反应完成。将溶液真空浓缩,所得残余物经制备型HPLC(0-80%乙腈的水溶液,含10mMNH₄HCO₃)纯化,得到化合物14-2(8mg,两步反应收率为11%)为白色固体。ESI m/z :480.2 ($M+H$)⁺.¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz) δ 7.27-7.25 (d, J=10.4Hz, 1H), 6.30-6.27 (dd, J=10.4, 2.0Hz, 1H), 6.10 (s, 1H), 5.73-5.56 (m, 1H), 5.43-5.32 (m, 2H), 4.62-4.42 (m, 1H), 4.25-4.18 (m, 1H), 4.15 (brs, 1H), 2.87 (s, 2H), 2.70 (s,

1H), 2.60-2.56 (m, 1H), 2.36-1.90 (m, 7H), 1.49-1.35 (m, 5H), 1.10-0.91 (m, 10H)。

实施例29

[0616] 本实施例说明了制备表1中化合物15-5的方法。本实施例涉及图3中的编号化合物。

[0617] (1R,2S,8S,10S,11S,13R,14R,15S,17S)-14-[2-(4-氨基苯氧基)乙酰基]-1,8-二氟-14,17-二羟基-2,13,15-三甲基四环[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]十七烷-3,6-二烯-5-酮(15-5)

[0618] 步骤1: 将化合物(12) (0.16g, 0.33mmol), 4-硝基苯酚 (10-5, 92mg, 0.67mmol) 和碳酸钾 (92mg, 0.67mmol) 的丙酮 (15mL) 混合溶液回流 (60°C) 18小时。反应混合物冷却至室温后, 真空浓缩除去挥发物。残余物经快速色谱法 (0-1% 乙酸乙酯的石油醚溶液) 纯化, 得到硝基-中间体 (0.14g, 收率79%) 为白色固体。ESIm/z: 532 (M+H)⁺. ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 8.20 (d, J=9.0Hz, 2H), 7.10 (d, J=10.5Hz, 1H), 6.94 (d, J=9.0Hz, 2H), 6.43 (brs, 1H), 6.39-6.37 (m, 1H), 5.45-5.32 (m, 1H), 5.26 (d, J=18.0Hz, 1H), 4.85 (d, J=18.0Hz, 1H), 4.43-4.40 (m, 1H), 3.21-3.16 (m, 1H), 2.60 (s, 1H), 2.52-2.40 (m, 2H), 2.30-2.20 (m, 2H), 2.06-1.99 (m, 1H), 1.86-1.68 (m, 3H), 1.53-1.48 (m, 2H), 1.09 (s, 3H), 0.99 (d, J=7.0Hz, 3H) ppm。

[0619] 步骤2: 向硝基-中间体 (0.13g, 0.25mmol) 的乙醇 (20mL) 和水 (2mL) 混合溶液中加入铁粉 (0.14g, 2.5mmol), 然后加入氯化铵 (0.14g, 2.5mmol)。在80°C下搅拌2小时后, 将悬浮液冷却至室温, 并通过硅藻土过滤以除去无机盐。将滤液真空浓缩, 残余物经制备型HPLC (方法B) 纯化, 得到化合物15-5 (90mg, 收率70%) 为白色固体。ESIm/z: 502 (M+H)⁺. ¹H NMR (DMSO_{d6}, 500MHz) δ 7.27 (d, J=10.0Hz, 1H), 6.59 (d, J=8.5Hz, 2H), 6.49 (d, J=8.5Hz, 2H), 6.31-6.28 (m, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.77-5.57 (m, 1H), 5.42-5.39 (m, 1H), 5.22 (s, 1H), 5.07 (d, J=18.5Hz, 1H), 4.63 (s, 1H), 4.59 (d, J=18.5Hz, 1H), 4.29-4.10 (m, 1H), 2.99-2.91 (m, 1H), 2.55-2.43 (m, 3H), 2.25-2.19 (m, 3H), 1.71-1.64 (m, 1H), 1.56-1.43 (m, 5H), 1.15-1.10 (m, 1H), 0.88 (s, 3H), 0.83 (d, J=6.0Hz, 3H) ppm。

实施例30

[0620] 本实施例说明了制备表1中化合物16-5的方法。本实施例涉及图4中的编号化合物。

[0621] (1R,2S,10S,11S,13R,14R,15S,17S)-14-[2-(4-氨基苯氧基)乙酰基]-1-氟-14,17-二羟基-2,13,15-三甲基四环[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]十七烷-3,6-二烯-5-酮(16-5)

[0622] 甲磺酸地塞米松(13)的合成报告在J.Pharmacol., 172, 1360 (2015) 中, 此文献的全部内容通过引用其整体并入本发明用于所有目的。

[0623] 将甲磺酸地塞米松(13, 94mg, 0.20mmol), 4-硝基苯酚 (10-5, 42mg, 0.30mmol) 和碳酸钾 (55mg, 0.40mmol) 的丙酮 (10mL) 混合溶液回流 (60°C) 3小时, 然后浓缩。将粗产物真空浓缩, 然后将残余物经快速色谱法 (0-50% 乙酸乙酯的石油醚溶液) 直接纯化, 得到硝基-中间体 (0.10g, 收率97%) 为白色固体。ESIm/z: 514 (M+H)⁺. ¹H NMR (MeOD_{d4}, 400MHz) δ 88.23 (d, J=9.0Hz, 2H), 7.43 (d, J=10.5Hz, 1H), 7.04 (d, J=9.0Hz, 2H), 6.31 (dd, J=10.0Hz, 2.0Hz, 1H), 6.11 (brs, 1H), 5.41 (d, J=18.0Hz, 1H), 4.96 (d, J=18.0Hz, 1H), 4.34-4.30 (m, 1H), 3.13-3.06 (m, 1H), 2.79-2.72 (m, 1H), 2.57-2.41 (m, 3H), 2.32-2.26 (m, 1H), 1.94-1.90 (m, 1H), 1.82-1.75 (m, 1H), 1.62 (s, 3H), 1.62-1.53 (m, 2H), 1.28-1.23 (m, 1H), 1.07 (s, 3H),

0.92 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 3H) ppm。

[0624] 向硝基-中间体(即,图4中的 NO_2^- -类似物,60mg,0.12mmol)的乙醇(3mL)和水(0.5mL)的组合溶液中加入铁粉(67mg,1.2mmol),然后加入氯化铵(64mg,1.2mmol)。在80°C下搅拌1.5小时后,将悬浮液冷却至室温,并通过硅藻土过滤以除去无机盐。将滤液真空浓缩,残余物经制备型HPLC(方法B)纯化,得到化合物16-5(20mg,收率35%)为白色固体。ESI m/z :484 ($M+H$)⁺. ^1H NMR (MeOD_{d_4} , 500MHz) δ 7.42 (d, $J=10.5\text{Hz}$, 1H), 6.78-6.74 (m, 2H), 6.73-6.70 (m, 2H), 6.31 (dd, $J=10.0\text{Hz}, 2.0\text{Hz}$, 1H), 6.10 (brs, 1H), 5.08 (d, $J=18.0\text{Hz}$, 1H), 4.71 (d, $J=18.0\text{Hz}$, 1H), 4.30-4.27 (m, 1H), 3.14-3.09 (m, 1H), 2.78-2.71 (m, 1H), 2.54-2.37 (m, 3H), 2.30-2.24 (m, 1H), 1.94-1.89 (m, 1H), 1.81-1.74 (m, 1H), 1.62 (s, 3H), 1.59-1.52 (m, 2H), 1.26-1.21 (m, 1H), 1.06 (s, 3H), 0.91 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 3H) ppm。

实施例31

[0625] 本实施例阐明了分离本发明公开的某些化合物的立体异构体的方法。

[0626] SFC(超临界流体色谱法)技术用于纯化小分子化合物,其是热不稳定的,包括手性化合物。SFC使用超临界流体二氧化碳作为流动相,有机聚合物结合固体吸附剂作为固定相。基于两相中差向异构体的不同分配系数,可通过调节流动相的密度来分离混合差向异构体。仪器和色谱柱条件描述如下:仪器:SFC-200 (Thar, Waters), 色谱柱:AD20*250mm, 5um (Decial), 柱温:35°C, 流动相: CO_2/EtOH (1%甲醇氨)=65/35, 流速:80g/min, 背压:100bar, 检测波长:214nm, 循环时间:4.5分钟, 样品溶液:130mg溶于30ml甲醇, 注射量:1.5ml)。通过使用手性AD-H柱,分离20克22R/S-布地奈德,得到8.9克R-布地奈德和8.9克S-布地奈德,总回收率为89%。同理,化合物11-5R/S的两个差向异构体也通过SFC进行分离。详细分离条件如下表5所述。

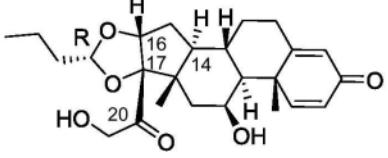
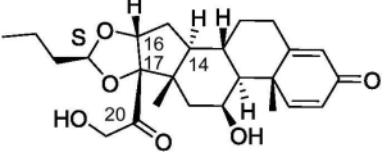
表5:表1中布地奈德和化合物(11-5)的手性分离条件

化合物	布地奈德	11-5R/S
仪器	SFC-200 (Thar, Waters)	SFC-200 (Thar, Waters)
柱子	AD-H 20*250mm, 5um (Dace1)	SC 20*250mm, 5um
柱温	35°C	35°C
流动相	$\text{CO}_2/\text{甲醇}(0.5\%\text{NH}_4\text{OH})=70/30$	$\text{CO}_2/\text{甲醇}(0.5\%\text{NH}_4\text{OH})=60/40$
流速	120g/min	140g/min
背压	100bar	100bar
检测波长	214nm	214nm
循环时间	4.0min	5.0min
样品溶液	20g溶于130ml甲醇	10g溶于130ml甲醇
注射量	1.0ml	0.5ml

[0627] 22R/S-布地奈德的结构通过2D-NOESY进行立体特异性确证。与报道的22R/S-布地奈德的质子NMR数据相比,来自手性SFC的第一化合物被确定为R-差向异构体,而第二化合物被确定为S-差向异构体。 C^{22} 的构型影响相邻质子的磁共振。在S-光谱中观察到具有 $J_{16\beta\text{H}-15\beta\text{H}}=5.0\text{Hz}$ 和 $J_{16\beta\text{H}-15\alpha\text{H}}=2.5\text{Hz}$ 的二双重峰,这是由于在S-差向异构体中使 C^{16} 质子去屏蔽的22-丙基取代基的空间排斥所致。在R-差向异构体中未观察到此种效应。与R-差向异构体相比,S-差向异构体中的 C^{22} 质子也向低场移动,表明由于S-差向异构体中的17 β -酮醇取

代基与 22β -丙基链之间的空间排斥作用,导致S-差向异构体中的C²²质子去屏蔽。同理,R-差向异构体中的C²²质子被 $22R$ -差向异构体中的C20-羰基基团的各向异性效应屏蔽。详细的化学位移描述于下表6中。

表6

质子位 置	D-氯仿中的化学位移 (ppm)			
				
	报告的 R-差向异构 体	来自手性 SFC 的第一 化合物	报告的 S-差向异构体	来自手性 SFC 的第 二化合物
C-1	7.26 (d, $J_{1,2} = 10.1$)	7.26 (d, $J_{1,2} = 10.1$)	7.23 (d, $J_{1,2} = 10.1$)	7.26 (d, $J_{1,2} = 10.0$)
C-2	6.27 (dd, $J_{1,2} = 10.1$, $J_{2,4} = 1.8$)	6.28 (dd, $J_{1,2} = 10.1$, $J_{2,4} = 1.7$)	6.27 (dd, $J_{1,2} = 10.1$, $J_{2,4} = 1.8$)	6.27 (dd, $J_{1,2} = 10.1$, $J_{2,4} = 1.7$)
C-4	6.03 (m)	6.03 (s)	6.02 (m)	6.02 (s)
C-11	4.4–4.6 (m)	4.42–4.60 (m)	4.50 (m)	4.50 (br s)
C-16	4.90 (dd, $J_{16\beta\text{H}-15\beta\text{H}} = 4.2$)	4.90 (d, $J_{16\beta\text{H}-15\beta\text{H}} = 4.4$)	5.16 (dd, $J_{16\beta\text{H}-15\beta\text{H}} = 5.0$, $J_{16\beta\text{H}-15\alpha\text{H}} = 2.5$)	5.23–5.11 (m)
C-18	0.92 (s)	0.92 (s)	0.99 (s)	0.99 (s)
C-19	1.45 (s)	1.44 (s)	1.45 (s)	1.46 (s)
C-21	4.50 (dd), 4.25 (dd) ($J_{21\text{H}, \text{H}'} = -20.2$, $J_{21\text{H}-21\text{OH}} = 4.8$)	4.50 (m), 4.26 (dd, $J_{21\text{H}, \text{H}'} = 20.1$, $J_{21\text{H}-21\text{OH}} = 4.3$)	4.60 (dd), 4.20 (dd) ($J_{21\text{H}, \text{H}'} = -20.2$, $J_{21\text{H}-21\text{OH}} = 4.8$)	4.62 (d), 4.21 (d) ($J_{21\text{H}, \text{H}'} = 19.9$)
C-22	4.55 (t, $J_{22,23} = 4.2$)	4.55 (t, $J_{22,23} = 4.6$)	5.16 (t, $J_{22,23} = 4.6$)	5.23–5.11 (m)
C-25	0.92 (t, $J_{24,25} = 6.7$)	0.92 (t, $J_{24,25} = 7.3$)	0.91 (t, $J_{24,25} = 7.3$)	0.91 t, $J_{24,25} = 7.3$)

实施例32

[0628] 本实施例说明了制备连接体以及连接体-有效负载的一般方法。

[0629] 图9中示出了用于制备连接体-有效负载的三种一般方法。在图9中,R'是类固醇胺或苯胺;R''是含炔的基团部分,如片段A或B,或马来酰亚胺部分,如C;R₁是氨基酸残基;P是保护基团,如Fmoc或Boc;n是从0至11的整数;m是从2至4的整数;p是从0至5的整数。方法I由类固醇胺或苯胺(21,Q=NH或NR)与二肽(22)之间的偶联反应,然后进行N-去保护,形成酰胺(23)。然后将胺(23)与酸或其活性酯(24),如图10中的V-5、V-7、V,图11中的VI-8和VI,以及图12中的VII偶联,以生成连接体-有效负载(25)。方法II由酸或其活性酯(26)与VC-pAB(27)之间的偶联反应,然后进行N-去保护,形成酰胺(28)。然后将化合物28转化为其PNP衍生物,所述衍生物进一步与21反应以生成连接体-有效负载氨基甲酸酯(29)。方法III由N-保护的二肽-pAB-PNP(19)和类固醇胺或苯胺(21)反应,然后进行N-去保护,形成氨基甲酸

酯(30)；然后将30中的胺部分与酸或其活性酯(26)偶联以生成29。

实施例33

[0630] 本实施例说明了制备连接体DIBAC-Suc-NHS(V)的方法。以下实施例参照图10。

[0631] 参见J.Org.Chem., 2010, 75, 627-636中所述的方法，通过引用其整体并入本发明用于所有目的。

[0632] 步骤1:N-[三环[9.4.0.0^{3,8}]十五碳-1(11),3,5,7,9,12,14-七烯-2-亚基]羟胺(V-2)：将二苯并环庚烯酮(V-1)(21g,0.10mol)和盐酸羟胺(9.3g,0.14mol)的无水乙醇(100mL)和吡啶(200mL)的混合溶液搅拌并回流15小时。TLC显示起始物料耗尽(TLC:5%甲醇的二氯甲烷溶液)。冷却至25℃以下后，将反应混合物用二氯甲烷(500mL)稀释，所得溶液用HCl水溶液(1N,3x200mL)洗，然后盐水(200mL)洗。有机溶液经硫酸钠干燥，真空浓缩，得到粗品V-2(22g,98%粗收率)为浅棕色固体。ESIm/z:222.1(M+H)⁺。

[0633] 步骤2:2-氮杂三环[10.4.0.0^{4,9}]十六碳-1(16),4(9),5,7,10,12,14-七烯(V-3)：在-5℃下，向肟(V-2)(5.5g,25mmol)的无水二氯甲烷(本发明中还称为二氯甲烷或DCM)(150mL)溶液中滴加DIBAL-H(1M的甲苯溶液,250μl)，同时保持温度低于-5℃。然后将反应物在室温下搅拌过夜，随后在0℃下用氟化钠固体(38g,0.90mol)的水(12mL)溶液淬灭。将浆体在0℃下再搅拌30分钟，并通过硅藻土过滤。用二氯甲烷彻底清洗硅藻土，将合并的有机溶液真空浓缩，得到V-3(4.6g,89%收率)为黄色固体。ESIm/z:222.1(M+H)⁺。

[0634] 步骤3:4-[2-氮杂三环[10.4.0.0^{4,9}]十六碳-1(16),4(9),5,7,10,12,14-七烯-2-基]-4-氧丁酸(V-5)：向(V-3)(5.0g,24mmol)的二氯甲烷(50mL)溶液中加入DIPEA(3.1g,24mmol)，然后加入琥珀酸酐(V-4,2.9g,29mmol)。将混合物在室温下搅拌4小时，用硫酸氢钠水溶液(1N,100mL)淬灭，然后用二氯甲烷(3x100mL)萃取。合并的有机溶液用水(100mL)洗，然后盐水(100mL)洗，经硫酸钠干燥，真空浓缩，得到(V-5)(7.7g,95%收率)为白色固体，其无需进一步纯化即可使用。ESIm/z:308.2(M+H)⁺。

[0635] 步骤4:4-{10,11-二溴-2-氮杂三环[10.4.0.0^{4,9}]十六碳-1(16),4(9),5,7,12,14-六烯-2-基}-4-氧丁酸(V-6)：将(V-5)(15g,49mmol)的二氯甲烷(200mL)溶液通入氮气冲洗并冷却至0℃。在0℃下，通过注射器向所得溶液中滴加液体溴(23g,0.14mol)。在此温度下搅拌反应2小时，TLC显示反应完成(TLC:10%甲醇的二氯甲烷溶液)。将反应混合物用二氯甲烷(50mL)稀释，并温热至室温。有机溶液用饱和亚硫酸钠水溶液(3x50mL)洗，水(50mL)洗，然后盐水(50mL)洗，经硫酸钠干燥，真空浓缩，得到(V-6)(13g,99%粗收率)为灰白色固体。ESIm/z:467.9(M+H)⁺.¹H NMR(CDCl₃, 400MHz) : 87.71(d, J=6.8Hz, 1H), 7.25-7.01(m, 6H), 6.94-6.88(m, 1H), 5.90(d, J=9.6Hz, 1H), 5.84-5.79(m, 1H), 5.25-5.25(m, 1H), 4.24-4.10(m, 1H), 2.87-2.80(m, 1H), 2.68-2.47(m, 3H) ppm。

[0636] 步骤5:4-{2-氮杂三环[10.4.0.0^{4,9}]十六碳-1(16),4(9),5,7,12,14-六烯-10-炔-2-基}-4-氧丁酸(V-7)：将(V-6)(5.0g,11mmol)的无水THF(50mL)溶液用干冰/乙腈浴冷却至-40℃，并在氩气氛下，向此溶液中滴加叔丁醇钾的四氢呋喃(1N,37mL,37mmol)溶液。加入后，将反应混合物在此温度下搅拌半小时。TLC显示反应完成(TLC:10%甲醇的二氯甲烷溶液)。将反应混合物温热至室温，并用硫酸氢钠水溶液(1N)淬灭，调pH值为1。混合物用二氯甲烷(3x50mL)萃取。将合并的有机溶液用水(50mL)洗，然后盐水(50mL)洗，经硫酸钠干燥，真空浓缩，得到化合物(V-7)(2.7g,95%收率)为灰白色固体。ESIm/z:306.1(M+H)⁺.¹H

NMR ($\text{DMSO}_{\text{d}6}$, 500MHz) : δ 11.98 (s, 1H), 7.67-7.29 (m, 8H), 5.02 (d, $J=13.5\text{Hz}$, 1H), 3.61 (d, $J=14.5\text{Hz}$, 1H), 2.61-2.56 (m, 1H), 2.32-2.27 (m, 1H), 2.21-2.16 (m, 1H), 1.80-1.76 (m, 1H) ppm。

[0637] 步骤6:4-{2-氮杂三环[10.4.0.0^{4,9}]十六碳-1(12),4(9),5,7,13,15-六烯-10-炔-2-基}-4-氧丁酸(V):向酸(V-7)(50mg, 0.16mmol)的二氯甲烷(10mL)溶液中依次加入N-羟基琥珀酰亚胺(HOSu, 28mg, 0.24mmol)和N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDCI, 47mg, 0.24mmol)。在室温下搅拌过夜后,将混合物用水洗,然后用盐水洗,经硫酸钠干燥,真空浓缩,得到中间体V,其可直接用于下一步骤。ESIm/z:403.0 (M+H)⁺。

实施例34

[0638] 本实施例说明了制备连接体DIBAC-Suc-PEG₄-酸/NHS(VI)的方法。以下实施例参照图11。

[0639] 步骤1:叔丁基-1-羟基-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酸酯(VI-3):向三缩四乙二醇(VI-1, 58g, 0.30mol)的无水THF(200mL)溶液中加入钠(0.12g),搅拌混合物直至钠被耗尽。然后向所得溶液中滴加丙烯酸叔丁酯(VI-2, 13g, 0.10mol)的无水THF(50mL)溶液,将所得混合物在室温下搅拌过夜。反应首先用乙酸(0.1mL)淬灭,然后用水(0.5mL)淬灭,所得混合物在室温下搅拌半小时,然后用乙酸乙酯(3x200mL)萃取。合并的有机溶液用水(30mL)洗,然后盐水(3x100mL)洗,经硫酸钠干燥,过滤,浓缩,得到产物(VI-3, 26g, 81%收率)为无色油状物。ESIm/z:340 (M+18)⁺。

[0640] 步骤2:1-(甲磺酰氧基)-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酸叔丁酯(VI-4):在冰水浴中,向(VI-3)(26g, 81mmol)和三乙胺(12mL, 89mmol)的二氯甲烷(150mL)溶液中滴加甲磺酰氯(10g, 89mmol)的DCM(50mL)溶液。混合物在室温下搅拌14小时,然后真空浓缩。将残余物与水(30mL)混合,然后用乙酸乙酯(3x200mL)萃取。合并的有机层用盐水(3x100mL)洗,经硫酸钠干燥,过滤,真空浓缩,得到所需产物(VI-4)(31g, 95%收率)为浅黄色油状物。ESIm/z:418 (M+18)⁺。

[0641] 步骤3:1-叠氮基-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酸叔丁酯(VI-5):向(VI-4)(27g, 67mmol)的DMF(70mL)溶液中加入叠氮化钠(6.6g, 0.10mol),然后在80℃下搅拌4-16小时。冷却至室温后,混合物用乙酸乙酯(3x150mL)稀释。将合并的溶液用水(30mL)洗,然后用盐水(3x100mL)洗,经硫酸钠干燥,过滤,真空浓缩。粗产物经硅胶柱色谱法(石油醚/乙酸乙酯(含1%至2%甲醇)=4/1)纯化,得到(VI-5)(18g, 67%收率)为无色油状物。ESIm/z:365 (M+18)⁺。

[0642] 步骤4:1-氨基-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酸叔丁酯(VI-6):在氮气氛下,向(VI-5)(1.5g, 4.3mmol)的乙酸乙酯(20mL)溶液中加入湿的Pd/C(10%, 0.15g)。然后将混合物用氢气冲洗,并在室温下在氢气球下搅拌过夜。将混合物通过硅藻土过滤。用乙酸乙酯(10mL)清洗硅藻土。将合并的滤液真空浓缩,得到粗品(VI-6)(1.4g)为浅黄色油状物,其不经进一步纯化即可用于下一步骤。ESIm/z:322 (M+H)⁺。

[0643] 步骤5:1-氨基-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酸(VI-7):向上述得到的(VI-6)(1.4g)的二氯甲烷(10mL)溶液中加入TFA(5mL)。混合物在室温下搅拌1小时。真空浓缩除去挥发物,得到粗产物(VI-7),为其TFA盐(1.6g),为黄色油状物,其不经进一步纯化即可用于下一步骤。ESIm/z:266 (M+H)⁺。

[0644] 步骤6:1-(4-{2-氮杂三环[10.4.0.0⁴⁻⁹]十六碳-1(12),4(9),5,7,13,15-六烯-10-炔-2-基}-4-氧丁酰胺基)-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酸(VI-8):向4-{2-氮杂三环[10.4.0.0⁴⁻⁹]十六碳-1(12),4(9),5,7,13,15-六烯-10-炔-2-基}-4-氧丁酸(图11中的V,1.0g,2.5mmol)和(VI-7)(0.91g,2.5mmol)的DMF(10mL)混合溶液中加入三乙胺(0.50g,5.0mmol)。将混合物在室温下搅拌过夜。反应混合物经反相快速色谱法(0-100%乙腈的水溶液(NH₄HCO₃10mM))直接纯化,得到(VI-8)(1.0g,由VI-5开始的3步的收率为74%)为棕色油状物。ESIm/z:553.3(M+H)⁺.¹H NMR(MeOD-d₄,400MHz):δ7.65(d,J=7.2Hz,1H),7.64-7.58(m,1H),7.49-7.42(m,3H),7.40-7.30(m,2H),7.28-7.22(m,1H),5.12(d,J=13.6Hz,1H),3.75-3.68(m,3H),3.63-3.50(m,12H),3.50-3.39(m,2H),3.25(t,J=5.6Hz,2H),2.76-2.66(m,1H),2.52(t,J=6.0Hz,2H),2.41-2.30(m,1H),2.21-2.14(m,1H),2.03-1.93(m,1H)ppm。

[0645] 步骤7:2,5-二氧代吡咯烷-1-基1-(4-{2-氮杂三环[10.4.0.0⁴⁻⁹]十六碳-1(12),4(9),5,7,13,15-六烯-10-炔-2-基}-4-氧丁酰胺)-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酸酯(VI):向(VI-8)(40mg,72μmol)的二氯甲烷(10mL)溶液中依次加入HOt(1-羟基吡咯烷-2,5-二酮,12mg,0.11mmol)和EDCI(21mg,0.11mmol)。将混合物在室温下搅拌过夜,然后用二氯甲烷(50mL)稀释。将有机溶液用水(50mL)洗,然后用盐水(50mL)洗,经硫酸钠干燥,过滤,真空浓缩,得到中间体(VI),其不经进一步纯化即可用于下一步骤。ESIm/z:650(M+H)⁺.¹H NMR(CDCl₃,400MHz):δ7.70(m,1H),7.66(m,1H),7.55-7.47(m,3H),7.38-7.24(m,4H),6.33(brs,1H),5.13(d,J=13.6Hz,1H),3.83-3.78(m,1H),3.66-3.60(m,13H),3.47-3.35(m,2H),2.99-2.82(m,6H),2.51-2.43(m,2H),2.20-1.89(m,4H)ppm。

实施例35

[0646] 本实施例说明了制备1-((1R,8S,9s)-双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基)-3-氧-2,7,10,13,16-五氧杂-4-氮杂十九烷-19-酸(BCN-PEG₄-酸,VII)的方法。以下实施例参照图12。

[0647] 向中间体VII-1(0.10g,0.33mmol)的四氢呋喃(THF)(5mL)溶液中依次加入二异丙基乙胺(0.17g,1.3mmol),中间体(VI-7)(89mg,0.33mmol)和1-羟基苯并三唑(HOBt,43mg,0.33mmol)。将混合物在室温下搅拌过夜。过滤除去不溶性固体,真空浓缩后,反应混合物经制备型HPLC(方法B)直接纯化,得到BCN-PEG₄-酸(VII)(25mg,17%收率)为无色油状物。¹H NMR(CDCl₃,400MHz):δ85.07(brs,1H),4.14(d,J=7.6Hz,2H),3.77(t,J=6.4Hz,2H),3.70-3.55(m,14H),3.40-3.31(m,2H),2.58(t,J=6.0Hz,2H),2.30-2.19(m,6H),1.61-1.52(m,2H),1.43-1.32(m,1H),1.0-0.92(m,2H)ppm。

实施例36

[0648] 本实施例说明了制备{4-[2S]-2-[2S]-2-[1-(4-{2-氮杂三环[10.4.0.0⁴⁻⁹]十六碳-1(12),4(9),5,7,13,15-六烯-10-炔-2-基}-4-氧丁酰胺基)-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺基]-3-甲基丁酰胺基]-5-(氨基甲酰基氨基)戊酰胺基}苯基}甲基4-硝基苯基碳酸酯(DIBAC-Suc-PEG₄-VC-pAB-PNP,VIII)的方法。以下实施例参照图13。

[0649] 1-(4-{2-氮杂三环[10.4.0.0⁴⁻⁹]十六碳-1(12),4(9),5,7,13,15-六烯-10-炔-2-基}-4-氧丁酰胺基)-N-[(1S)-1-{{(1S)-4-(氨基甲酰基氨基)-1-{{[4-(羟甲基)苯基]氨基甲酰基}丁基}氨基甲酰基}-2-甲基丙基}-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺(VIII-3)

[0650] 步骤1:向化合物(VIII-1)(300mg,0.54mmol)和化合物(VIII-2,205mg,0.54mmol)

的DMF (10ml) 溶液中加入HATU (309mg, 0.81mmol), 然后加入DIEA (140mg, 1.08mmol)。将混合物在室温下搅拌3小时。过滤除去不溶性固体, 真空浓缩后, 反应混合物经反向快速色谱法 (NH_4HCO_3 作为缓冲液) 直接纯化, 得到白色固体 (VIII-3) (300mg, 60%)。ESIm/z: 617 (M+1)。

[0651] {4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-氨基杂三环[10.4.0.0⁴⁻⁹]十六碳-1(12),4(9),5,7,13,15-六烯-10-炔-2-基)-4-氧丁酰胺基]-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺基]-3-甲基丁酰胺基]-5-(氨基甲酰基氨基)戊酰胺基]苯基}甲基4-硝基苯基碳酸酯 (VIII)

[0652] 步骤2: 向 (VIII-3) (150mg, 0.16mmol) 和 (VIII-4) (150mg, 0.49mmol) 的DMF (10mL) 溶液中加入DIEA (63mg, 0.49mmol)。将混合物在室温下搅拌3小时。过滤除去不溶性固体, 真空浓缩后, 反应混合物经快速色谱法 (NH_4HCO_3 作为缓冲液) 直接纯化, 得到 (VIII) 为黄色固体 (50mg, 28%)。ESIm/z: 1079 (M+1)。

实施例37

[0653] 本实施例说明了制备连接体-有效负载 (LP1) 的方法。以下实施例参照图14。

[0654] 叔丁基N-[(1S)-1-{4-[(1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-8-(2-羟基乙酰基)-9,13-二甲基-16-氧-5,7-二氧杂五环[10.8.00^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-6-基]苯基}氨基甲酰基]乙基]氨基甲酸酯 (31)

[0655] 步骤1: 将Boc-Ala-OH (0.20g, 0.42mmol), DIPEA (0.12g, 0.84mmol) 和HATU (0.24g, 0.63mmol) 的DMF (5mL) 混合溶液在23℃下搅拌30分钟。然后向此溶液中加入化合物7-1R (87mg, 0.46mmol)。在23℃下再搅拌2小时后, 混合物经制备型HPLC (方法B) 直接纯化, 得到化合物31 (0.11g, 40% 收率) 为白色固体。ESIm/z: 651 (M+H)⁺。

[0656] (2S)-2-氨基-N-{4-[(1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-8-(2-羟基乙酰基)-9,13-二甲基-16-氧-5,7-二氧杂五环[10.8.00^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-6-基]苯基}丙酰胺 (32)

[0657] 步骤2: 向化合物31 (0.10g, 0.15mmol) 的二氯甲烷 (3mL) 溶液中滴加TFA (0.3mL)。将混合物在23℃下搅拌1小时, 真空浓缩除去挥发物, 得到粗产物 (32) (83mg) 为油状物, 其不经进一步纯化即可用于下一步骤。ESIm/z: 551 (M+H)⁺。

[0658] 叔丁基N-[(1S)-1-{[(1S)-1-{4-[(1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-8-(2-羟基乙酰基)-9,13-二甲基-16-氧-5,7-二氧杂五环[10.8.00^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-6-基]苯基}氨基甲酰基]乙基]氨基甲酸酯 (33)

[0659] 步骤3: 将 (32) (83mg, 0.15mmol), 三乙胺 (31mg, 0.31mmol) 和Boc-Val-NHS (58mg, 0.19mmol) 的DMF (5mL) 混合溶液在23℃下搅拌4小时, 反应混合物经制备型HPLC (方法B) 直接纯化, 得到 (33) (52mg, 2步收率为20%) 为白色固体。ESIm/z: 750 (M+H)⁺. ¹H NMR (500MHz, $\text{DMSO}_{\text{d}6}$) δ 10.00 (s, 1H), 8.07 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 1H), 7.58 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 2H), 7.40 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 7.31 (d, $J=10.0\text{Hz}$, 1H), 6.72 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 6.16 (dd, $J=1.5, 10.0\text{Hz}$, 1H), 5.91 (s, 1H), 5.38 (s, 1H), 5.08 (t, $J=6.5\text{Hz}$, 1H), 4.92 (d, $J=5.1\text{Hz}$, 1H), 4.78 (d, $J=3.0\text{Hz}$, 1H), 4.55-4.46 (m, 1H), 4.42 (t, $J=7.0\text{Hz}$, 1H), 4.29 (s, 1H), 4.21-4.14 (m, 1H), 3.82 (t, $J=8.5\text{Hz}$, 1H), 2.65-2.52 (m, 1H), 2.37-2.25 (m, 1H), 2.18-2.06 (m, 1H), 2.04-1.88 (m, 2H), 1.85-1.57 (m, 5H), 1.40 (s, 3H), 1.37 (s, 9H), 1.29 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 3H), 1.15-0.98 (m, 2H), 0.96-0.76 (m, 9H) ppm。

[0660] (2S)-2-氨基-N-[(1S)-1-{4-[(1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-8-

(2-羟基乙酰基)-9,13-二甲基-16-氧-5,7-二氧杂五环[10.8.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-6-基]苯基}氨基甲酰基)乙基]-3-甲基丁酰胺(34g)

[0661] 步骤4:向化合物33(50mg,67μmol)的二氯甲烷(3mL)溶液中滴加TFA(0.3mL),然后在23℃下搅拌1小时。真空浓缩除去挥发物,得到粗化合物34g(42mg)为油状物,其不经进一步纯化即可用于下一步骤。ESIm/z:650(M+H)⁺。

[0662] 1-(4-{2-氮杂三环[10.4.0.0^{4,9}]十六碳-1(12),4(9),5,7,13,15-六烯-10-炔-2-基}-4-氧丁酰胺基)-N-[1S]-1-{[(1S)-1-({4-[(1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-8-(2-羟基乙酰基)-9,13-二甲基-16-氧-5,7-二氧杂五环[10.8.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-6-基]苯基}氨基甲酰基)乙基]氨基甲酰基}-2-甲基丙基]-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺(LP1)

[0663] 步骤5:将DIBAC-suc-PEG₄-OH(VI-8,41mg,74μmol),DIPEA(24mg,0.19mmol)和HATU(47mg,0.12mmol)的DMF(5mL)溶液在23℃下搅拌30分钟,然后加入(34g)(40mg,62μmol)。在23℃下再搅拌2小时后,反应混合物经制备型HPLC(方法B)直接纯化,得到LP1(33mg,2步收率为44%)为白色固体。ESIm/z:1185(M+H)⁺.¹H NMR(500MHz,DMSO_{d6})δ9.97(s,1H),8.18(d,J=6.5Hz,1H),7.87(d,J=8.5Hz,1H),7.75(t,J=5.5Hz,1H),7.67(d,J=6.5Hz,1H),7.63-7.56(m,3H),7.53-7.41(m,3H),7.427.27(m,6H),6.19-6.14(m,1H),5.93(s,1H),5.38(s,1H),5.08(t,J=6.5Hz,1H),5.03(d,J=14.0Hz,1H),4.92(d,J=5.1Hz,1H),4.78(d,J=3.0Hz,1H),4.55-4.46(m,1H),4.42(t,J=7.0Hz,1H),4.29(s,1H),4.21-4.14(m,2H),3.63-3.55(m,3H),3.50-3.40(m,12H),3.32-3.26(m,2H),3.10-3.05(m,2H),2.65-2.52(m,2H),2.48-2.48(m,2H),2.40-2.25(m,3H),2.18-2.06(m,1H),2.04-1.88(m,3H),1.85-1.57(m,5H),1.40(s,3H),1.28(d,J=7.0Hz,3H),1.15-0.98(m,2H),0.96-0.84(m,6H),0.84-0.80(d,J=7.0Hz,3H)ppm。

实施例38

[0664] 本实施例说明了制备连接体-有效负载(LP2)的方法。以下实施例参照图15。

[0665] 叔丁基N-[1S]-1-{[(1S)-4-(氨基甲酰基氨基)-1-[(4-{2-[(1R,2S,8S,10S,11S,13R,14R,15S,17S)-1,8-二氟-14,17-二羟基-2,13,15-三甲基-5-氧四环[8.7.0.0^{2,7·0^{11,15}]}十七碳-3,6-二烯-14-基]-2-氧乙氧基}苯基}氨基甲酰基]丁基]氨基甲酰基}-2-甲基丙基]氨基甲酸酯(34e)}

[0666] 一般方法C:在20-25℃下,向Boc-Val-Ala-OH或Boc-Val-Cit-OH(1.0当量)的有机溶剂(例如DCM或DMF)溶液中加入碱(例如DIPEA)(2.0当量)和HATU(1.2当量)。将混合物在20-25℃下搅拌30分钟,然后加入苯胺(1.1当量)。将混合物进一步搅拌16小时,直至根据LCMS确定所述肽耗尽。然后向反应混合物中加入TFA(0.05mL/10mg肽)。将混合物在20-25℃下再搅拌一小时。减压浓缩除去挥发物,残余物经制备型HPLC(方法B)直接纯化。

[0667] 步骤1:向Boc-VC(VC为Val-Cit)(67mg,0.18mmol)的DMF(3mL)溶液中加入HATU(68mg,0.18mmol)和NMM(30mg,0.30mmol),所得溶液在23℃下搅拌10分钟。然后向反应混合物中加入化合物15-5(75mg,0.15mmol)。在23℃下搅拌过夜后,将反应混合物倒入乙酸乙酯(80mL)中,用盐水洗,然后经无水硫酸钠干燥。将合并的有机溶液真空浓缩,残余物经快速色谱法(0-10%甲醇的二氯甲烷溶液)纯化,得到(34e)(0.12g,收率89%)为白色固体。ESIm/z:858(M+H)⁺.¹H NMR(MeOD_{d4},500MHz)δ7.54-7.47(m,2H),7.36(d,J=10.0Hz,1H),

6.90-6.87 (m, 2H) , 6.34 (dd, $J=10.0, 1.5$ Hz, 1H) , 6.31 (s, 1H) , 5.63-5.50 (m, 1H) , 5.20 (d, $J=18.0$ Hz, 1H) , 4.80 (d, $J=18.0$ Hz, 1H) , 4.54-4.47 (m, 1H) , 4.32-4.30 (m, 1H) , 3.92-3.81 (m, 1H) , 3.23-3.11 (m, 3H) , 2.65-2.52 (m, 1H) , 2.43-2.32 (m, 3H) , 2.11-1.99 (m, 1H) , 1.79-1.58 (m, 9H) , 1.46-1.24 (m, 11H) , 1.06 (s, 3H) , 1.00-0.92 (m, 9H) ppm。

[0668] 双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基N- (14- {[(1S) -1- {[(1S) -4- (氨基甲酰基氨基) -1- [(4- {2- [(1R,2S,8S,10S,11S,13R,14R,15S,17S) -1,8-二氟-14,17-二羟基-2,13,15-三甲基-5-氧四环[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]十七碳-3,6-二烯-14-基]-2-氧乙氧基} 苯基) 氨基甲酰基]丁基]氨基甲酰基} -2-甲基丙基]氨基甲酰基} -3,6,9,12-四氧杂十四烷-1-基) 氨基甲酸酯 (LP2)

[0669] 步骤2: 向中间体化合物34e (25mg, 29μmol) 的二氯甲烷 (2mL) 溶液中加入TFA (1mL) , 将所得混合物在23℃下搅拌1小时。真空浓缩除去挥发物, 得到残余物 (25mg, ESI m/z : 758.3 ($M+H$)⁺) 为棕色油状残余物。

[0670] 向BCN-PEG₄-酸(图12中的VII, 18mg, 41μmol)的DMF (2mL) 溶液中加入HATU (15mg, 41μmol) 和NMM (6.9mg, 41μmol) , 将所得溶液在23℃下搅拌半小时。然后向反应溶液中加入上述得到的棕色油状残余物的DMF (1mL) 溶液。在23℃下搅拌过夜后, 将混合物进行后处理, 并经制备型HPLC (方法B) 直接纯化, 得到LP2 (15mg, 37% 收率) 为白色固体。ESI m/z : 1181.4 ($M+H$)⁺ . ¹H NMR (DMSO_{d6}, 400MHz) (旋转异构体) 89.82和9.37 (s, 1H) , 8.39 (d, $J=8.0$ Hz, 0.4H) , 8.09 (d, $J=7.2$ Hz, 0.6H) , 8.00 (d, $J=8.0$ Hz, 0.4H) , 7.88 (d, $J=8.8$ Hz, 0.6H) , 7.55 (d, $J=8.8$ Hz, 1H) , 7.49 (d, $J=8.8$ Hz, 1H) , 7.27 (d, $J=10.0$ Hz, 1H) , 7.10 (brs, 1H) , 6.80 (m, 2H) , 6.29 (dd, $J=10.0, 1.0$ Hz, 1H) , 6.11 (s, 1H) , 5.99-5.94 (m, 1H) , 5.72-5.56 (m, 1H) , 5.43-5.41 (m, 3H) , 5.31 (s, 1H) , 5.22 (d, $J=18.0$ Hz, 1H) , 4.71 (d, $J=18.0$ Hz, 1H) , 4.37-4.31 (m, 1H) , 4.24-4.14 (m, 2H) , 4.04 (s, 1H) , 4.02 (s, 1H) , 3.62-3.56 (m, 2H) , 3.50-3.45 (m, 12H) , 3.40-3.37 (m, 2H) , 3.13-3.08 (m, 2H) , 3.00-2.92 (m, 3H) , 2.54-2.33 (m, 2H) , 2.25-2.08 (m, 8H) , 2.09-1.90 (m, 1H) , 1.78-1.23 (m, 15H) , 1.14-1.09 (m, 1H) , 0.89-0.82 (m, 14H) ppm。

实施例39

[0671] 本实施例说明了制备连接体-有效负载 (LP3) 的方法。以下实施例参照图15。

[0672] {4- [(2S) -2- [(2S) -2-氨基-3-甲基丁酰胺基] -5- (氨基甲酰基氨基) 戊酰胺基] 苯基} 甲基N- (4- {2- [(1R,2S,8S,10S,11S,13R,14R,15S,17S) -1,8-二氟-14,17-二羟基-2,13,15-三甲基-5-氧四环[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]十七碳-3,6-二烯-14-基]-2-氧乙氧基} 苯基) 氨基甲酸酯 (34f)

[0673] 一般方法D: 步骤1: 室温下, 向有效负载、苯胺 (1.0当量) 的DMF溶液加入Fmoc-vcPAB-PNP (1.1当量), HOBt (1.5当量) 和DIPEA (2.0当量) 。将混合物在室温 (18-30℃) 下搅拌, 直至根据LCMS确定起始物料耗尽。步骤2: 向反应混合物中加入哌啶 (0.03mL/10mg有效负载), 将混合物在室温 (18-30℃) 搅拌1小时, 直至通过LCMS监测已脱去Fmoc。反应混合物通过膜过滤后, 反应溶液经反相快速色谱法或制备型HPLC直接纯化, 得到vcPAB碳酸酯。

[0674] 当在步骤1反应中使用N-Boc-vcPAB-PNP代替Fmoc-vcPAB-PNP时, 则由步骤1所述方法得到N-BocvcPAB碳酸酯。纯化后, 将N-BocvcPAB碳酸酯重新溶于DCM中, 并在0℃下用TFA (TFA浓度<25%) 处理, 直至通过LCMS监测已脱去Boc。将反应混合物浓缩以除去挥发物,

所得残余物经色谱法或制备型HPLC纯化,得到vcPAB碳酸酯。

[0675] 室温下,向Fmoc-vcPAB-PNP(73mg,96 μ mol)的DMF(1mL)溶液中依次加入化合物15-5(40mg,80 μ mol),DMAP(20mg,0.16mmol),HOEt(23mg,0.16mmol)和DIPEA(55mg,0.40mmol)。将反应混合物在室温下搅拌半小时,直至根据LCMS(ESI:565.3(M+H)⁺)确定(15-5)完全耗尽。然后在室温下,向所得混合物中加入哌啶(34mg,0.40mmol)。在室温下再搅拌30分钟后,通过LCMS监测,所得混合物经反相快速色谱法(0-30%乙腈的水溶液)直接纯化,得到(34f)(50mg,收率69%)为淡黄色固体。ESI:907(M+H)⁺。

[0676] 双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基N-(14-{[(1S)-1-{[(1S)-4-(氨基甲酰基氨基)-1-{[4-({[4-{2-[1R,2S,8S,10S,11S,13R,14R,15S,17S]-1,8-二氟-14,17-二羟基-2,13,15-三甲基-5-氧四环[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]十七碳-3,6-二烯-14-基]-2-氧乙氧基}苯基)氨基甲酰基]氧基}甲基]苯基]氨基甲酰基}丁基]氨基甲酰基}-2-甲基丙基]氨基甲酰基}-3,6,9,12-四氧杂十四烷-1-基)氨基甲酸酯(LP3)

[0677] 步骤3:室温下,向BCN-PEG₄-酸(60mg,67 μ mol)的DMF(3.6mL)溶液中依次加入HATU(27mg,70 μ mol)和DIPEA(20mg,0.15mmol)。将反应混合物在室温下搅拌半小时,然后分批加入化合物(34f)(50mg,60 μ mol)。将反应混合物在室温下搅拌2小时,直至根据LCMS确定化合物34f完全耗尽。然后反应混合物经制备型HPLC(方法B)直接纯化,得到化合物LP3(36mg,收率54%)为白色固体。ESI:1330(M+H)⁺.¹H NMR(400MHz,DMSO_{d6}) δ 10.02(s,1H),9.56(s,1H),8.14(d,J=7.2Hz,1H),7.89(d,J=8.8Hz,1H),7.62(d,J=8.4Hz,2H),7.35(d,J=8.4Hz,4H),7.27(d,J=10.4Hz,1H),7.11(t,J=4.4Hz,1H),6.78(d,J=8.8Hz,2H),6.33-6.26(m,1H),6.10(s,1H),5.98(t,J=5.4Hz,1H),5.75-5.52(m,1H),5.42(s,3H),5.30(s,1H),5.20(d,J=18.4Hz,1H),5.05(s,2H),4.70(d,J=18.4Hz,1H),4.43-4.35(m,1H),4.26-4.15(m,2H),4.02(d,J=7.6Hz,2H),3.64-3.55(m,2H),3.49(s,11H),3.38(t,J=6.0Hz,2H),3.11(dd,J=11.8,5.9Hz,2H),3.05-2.88(m,3H),2.44-2.31(m,2H),2.28-2.08(m,9H),2.02-1.90(m,1H),1.76-1.10(m,16H),0.91-0.77(m,14H)ppm。HPLC纯度:>99%,保留时间:7.03min。

实施例40

[0678] 本实施例说明了制备连接体-有效负载(LP4)的方法。以下实施例参照图16。

[0679] (2S)-2-氨基-N-[(1S)-1-[(4-{2-[1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R]-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}苯基)氨基甲酰基]乙基]-3-甲基丁酰胺(34a)

[0680] 一般方法E:在20-25℃下,向Fmoc-Val-Ala-OH(1.2当量)的DMF(0.2mL/10mg肽)溶液中加入DIPEA(3.0当量)和HATU(1.4当量)。将混合物在20-25℃下搅拌5分钟,然后加入苯胺(1.0当量)。将混合物再搅拌2小时直至根据LCMS确定所述肽完全耗尽。然后向反应混合物中加入哌啶(5.0当量)。混合物在20-25℃下搅拌2小时。通过膜过滤后,反应溶液经反相快速色谱法(0-100%乙腈的碳酸氢铵水溶液(10mM))或制备型HPLC(方法B)直接纯化。按照此一般方法得到化合物(34a)。

[0681] 或者,根据一般方法C制备得到化合物(34a)。向Boc-Val-Ala-OH(0.29g,1.0mmol)的二氯甲烷(5mL)溶液中加入DIPEA(0.26g,2.0mmol)和HATU(0.46g,1.2mmol),混合物在23℃下搅拌30分钟,然后向反应混合物中加入化合物(11-5)(0.57g,1.1mmol)。在23℃下再搅

拌16小时后,向反应混合物中加入TFA(1.5mL),并将所得混合物在23℃下再搅拌1小时。减压浓缩除去挥发物,残余物经制备型HPLC(方法B)直接纯化,得到34a(0.17g,2步收率为25%)为白色固体。ESIm/z:692(M+H)⁺.¹H NMR(500MHz,DMSO_{d6})δ10.00(s,1H),8.47(d,J=6.5Hz,1H),7.57-7.47(m,2H),7.33(d,J=10Hz,1H),6.87-6.82(m,2H),6.18(d,J=10Hz,1H),5.93(s,3H),5.25-5.11(m,1H),5.09(d,J=6.5Hz,1H),4.92-4.65(m,3H),4.55-4.40(m,1H),4.40-4.30(m,1H),2.32-2.22(m,1H),2.18-1.80(m,5H),1.65-1.45(m,5H),1.45-1.25(m,9H),1.25-0.98(m,2H),0.96-0.76(m,13H)ppm。

[0682] 双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基N-(14-{[(1S)-1-{[(1S)-1-[(4-{2-[1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R]-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}苯基]氨基甲酰基]乙基]氨基甲酰基}-2-甲基丙基]氨基甲酰基}-3,6,9,12-四氧杂十四烷-1-基)氨基甲酸酯(LP4)

[0683] 一般方法F:向BCN-PEG₄-酸或其NHS-酯的DMF溶液中加入HATU(1当量)和DIPEA(2.5当量)。将混合物在25℃下搅拌30分钟,然后加入胺溶液。通过LC-MS监测,在25℃下搅拌2小时后,起始原料耗尽,混合物经制备型HPLC直接纯化,得到所需的酰胺。

[0684] 向BCN-PEG₄-酸(IX,70mg,0.16mmol)的DMF(8mL)溶液中依次加入HATU(66mg,0.17mmol)和DIPEA(56mg,0.43mmol)。将混合物在25℃下搅拌30分钟,然后加入34a(0.10g,0.15mmol)的溶液。在25℃下搅拌2小时后,混合物经制备型HPLC(方法B)直接纯化,得到LP4(25mg,16%收率)为白色固体.ESIm/z=1116(M+H)⁺。

[0685] 使用手性化合物11-5R作为起始原料,根据一般方法F,得到手性(R)-LP4为白色固体(24mg,31%收率)。ESIm/z:1115(M+H)⁺.¹H NMR(500MHz,DMSO_{d6})(旋转异构体)δ9.78(s,0.5H),9.69(s,0.5H),8.40(d,J=7.5Hz,0.5H),8.15(d,J=7.0Hz,0.5H),8.01(d,J=8.0Hz,0.5H),7.89(d,J=9.0Hz,0.5H),7.57(d,J=9.0Hz,1H),7.51(d,J=9.0Hz,1H),7.32(d,J=10.1Hz,1H),7.09(s,1H),6.85(d,J=9.1Hz,2H),6.18(d,J=11.4Hz,1H),5.93(s,1H),5.10(d,J=18.5Hz,1H),4.86-4.67(m,4H),4.45-4.36(m,1H),4.33(s,1H),4.20(t,J=7.5Hz,0.5H),4.10(t,J=7.8Hz,0.5H),4.03(d,J=8.0Hz,2H),3.59(d,J=6.6Hz,2H),3.49-3.45(m,11H),3.39(s,2H),3.30(s,2H),3.11(dd,J=11.4,5.9Hz,2H),2.47-2.43(m,1H),2.38-2.12(m,8H),2.03-1.83(s,5H),1.62-1.51(m,6H),1.42-1.24(m,10H),1.02-0.94(m,2H),0.90-0.82(m,14H)ppm。分析型HPLC:100%,保留时间:9.49min(方法A)。

实施例41

[0686] 本实施例说明了制备连接体-有效负载(LP5)的方法。以下实施例参照图16。

[0687] (2S)-2-[(2S)-2-氨基-3-甲基丁酰胺基]-5-(氨基甲酰基氨基)-N-(4-{2-[1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R]-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}苯基)戊酰胺(34c)

[0688] 根据一般方法C制备得到化合物34c。将Boc-vc(0.26g,0.50mmol),DIPEA(0.19g,0.60mmol)和HATU(0.23g,0.60mmol)的DMF(10mL)混合溶液在23℃下搅拌30分钟,然后向混合物中加入11-5(0.28g,0.55mmol)。在23℃下搅拌16小时后,反应混合物经反相快速色谱法(0-50%乙腈的水溶液)直接纯化,得到粗品(ESIm/z878(M+H)⁺),将其溶于二氯甲烷(8mL)中并用TFA(3mL)处理。将所得混合物在23℃下搅拌1小时。减压浓缩除去挥发物,残余物经制备型HPLC(方法B)直接纯化,得到化合物34c(0.12g,2步收率为31%)为白色固体。

ESIm/z:778 (M+H)⁺. ¹H NMR (500MHz, DMSO_{d6}) δ 9.97 (d, J=12.0Hz, 1H), 8.10 (m, 1H), 7.51 (d, J=6.5Hz, 2H), 7.32 (dd, J=10.1, 2.5Hz, 1H), 6.83 (dd, J=15.9, 9.0Hz, 2H), 6.17 (d, J=10.0Hz, 1H), 5.97 (t, J=5.0Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.22 (t, J=4.8Hz, 1H), 5.12 (d, J=6.0Hz, 1H), 5.09 (d, J=6.5Hz, 1H), 4.83-4.67 (m, 3H), 4.47-4.37 (m, 1H), 4.35-4.29 (m, 1H), 3.05-2.90 (m, 3H), 2.57-2.51 (m, 1H), 2.30 (d, J=12.0Hz, 1H), 2.13-1.74 (m, 7H), 1.70-1.46 (m, 7H), 1.45-1.29 (m, 7H), 1.17-0.93 (m, 2H), 0.91-0.82 (m, 9H), 0.77 (dd, J=6.7, 2.7Hz, 3H) ppm。

[0689] 双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基N- (14-{[(1S)-1-{[(1S)-4-(氨基甲酰基氨基)-1-[4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}苯基)氨基甲酰基]丁基]氨基甲酰基}-2-甲基丙基]氨基甲酰基}-3,6,9,12-四氧杂十四烷-1-基)氨基甲酸酯 (LP5)

[0690] 根据一般方法F制备得到LP5。将BCN-PEG₄-酸(图15中的IX, 0.28g)的二氯甲烷(6mL)溶液加至HATU(59mg, 0.15mmol)和DIPEA(50mg, 0.39mmol)的DMF(5mL)混合溶液中。将反应混合物在25℃下搅拌30分钟，并向其中一次性加入化合物34c(0.10g, 0.13mmol)。所得混合物在25℃搅拌过夜，并通过制备型HPLC(方法B)直接纯化，得到LP5(35mg, 23%收率)为浅黄色固体。ESIm/z=1202 (M+H)⁺. ¹H NMR (400MHz, MeOD_{d4}) δ 7.61-7.43 (m, 3H), 6.87 (t, J=8.6Hz, 2H), 6.26 (d, J=10.0Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.29-5.02 (m, 2H), 4.84-4.65 (m, 2H), 4.51-4.44 (s, 2H), 4.22-4.05 (m, 3H), 3.80-3.68 (m, 2H), 3.67-3.45 (m, 14H), 3.22-3.08 (m, 2H), 2.72-2.50 (m, 3H), 2.45-2.33 (m, 1H), 2.30-2.02 (m, 10H), 1.99-1.82 (m, 2H), 1.81-1.32 (m, 17H), 1.26-0.85 (m, 17H) ppm。

实施例42

[0691] 本实施例说明了制备连接体-有效负载(LP6)的方法。以下实施例参照图16。

[0692] {4-[(2S)-2-[(2S)-2-氨基-3-甲基丁酰胺基]-5-(氨基甲酰基氨基)戊酰胺基]苯基}甲基N- (4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}苯基)氨基甲酸酯(34d)

[0693] 根据一般方法D制备得到化合物34d。

[0694] 步骤1:向表1中的化合物(11-5)(66mg, 0.10mmol)的DMF(3.5mL)溶液中依次加入Boc-vcPAB-PNP(64mg, 0.12mmol), HOBt(14mg, 0.10mmol), 和DIPEA(13.0mg, 0.10mmol)。将反应混合物在13℃搅拌过夜，并通过制备型HPLC(方法B)直接纯化，得到中间体Boc-34d(61mg, 收率58%)为白色固体。ESIm/z:1027.3 (M+H)⁺. ¹H NMR (MeOD_{d4}, 400MHz) δ 7.60 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.46 (d, J=10.4Hz, 1H), 7.38-7.33 (m, 4H), 6.87-6.83 (m, 2H), 6.26 (dt, J=10.0, 2.0Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.26-5.03 (m, 4.2H), 4.82-4.67 (m, 1.8H), 4.54-4.51 (m, 1H), 4.48-4.43 (m, 1H), 3.91 (d, J=6.4Hz, 1H), 3.31-3.18 (m, 1H), 3.14-3.08 (m, 1H), 2.70-2.63 (m, 1H), 2.40-2.37 (m, 1H), 2.26-2.00 (m, 4H), 1.94-1.72 (m, 4H), 1.68-1.35 (m, 20H), 1.22-0.92 (m, 14H) ppm。

[0695] 步骤2:在0℃下,向Boc-34d(59mg, 58μmol)的DCM(2mL)和MeOH(1mL)溶液中滴加HCl的二氯六环溶液(4N, 1.5mL)。然后将混合物在室温(14℃)下搅拌4小时。真空浓缩除去

挥发物,得到34d(60mg,粗品)为棕色油状物,将其直接用于下一步骤。ESIm/z:927 (M+H)⁺。

[0696] 双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基N-(14-{[(1S)-1-{[(1S)-4-(氨基甲酰基氨基)-1-{{[4-({2-[{(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}苯基)氨基甲酰基]氧基}甲基)苯基]氨基甲酰基}丁基]氨基甲酰基}-2-甲基丙基]氨基甲酰基}-3,6,9,12-四氧杂十四烷-1-基)氨基甲酸酯(LP6)

[0697] 根据一般方法F制备得到LP6为白色固体(24mg,31%收率)。ESIm/z:1350.5 (M+H)⁺
¹H NMR (DMSO_{d6}, 400MHz) δ10.02 (s, 1H), 9.58 (s, 1H), 8.13 (d, J=7.6Hz, 1H), 7.88 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.61 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.36-7.30 (m, 5H), 7.11 (t, J=4.8Hz, 1H), 6.84-6.78 (m, 2H), 6.19-6.16 (m, 1H), 5.98 (t, J=5.2Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.23-5.06 (m, 4H), 4.80-4.67 (m, 3H), 4.39-4.31 (m, 2H), 4.23 (t, J=7.2Hz, 1H), 4.02 (d, J=8.0Hz, 2H), 3.64-3.55 (m, 2H), 3.49 (m, 12H), 3.42-3.27 (m, 3H), 3.13-2.89 (m, 4H), 2.41-2.12 (m, 9H), 2.03-1.95 (m, 2H), 1.91-1.82 (m, 2H), 1.75-1.68 (m, 1H), 1.61-1.20 (m, 16H), 1.15-0.95 (m, 2H), 0.92-0.81 (m, 15H) ppm。分析型HPLC:69%+31%=100%,保留时间:8.86min和8.92min(方法B)。

实施例43

[0698] 本实施例说明了制备连接体-有效负载(LP7)的方法。以下实施例参照图16。

[0699] (双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基N-(14-{[(1S)-1-{[(1S)-1-{{[4-{{2-[{(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}苯基)氨基甲酰基]乙基]氨基甲酰基}-2-甲基丙基]氨基甲酰基}-3,6,9,12-四氧杂十四烷-1-基)氨基甲酸酯(LP7)

[0700] 根据一般方法F制备得到LP7(24mg,从34a开始的3步收率为31%)为白色固体。ESI m/z:1115 (M+H)⁺
¹H NMR (500MHz, DMSO_{d6}) (旋转异构体) δ9.78 (s, 0.5H), 9.69 (s, 0.5H), 8.40 (d, J=7.5Hz, 0.5H), 8.15 (d, J=7.0Hz, 0.5H), 8.01 (d, J=8.0Hz, 0.5H), 7.89 (d, J=9.0Hz, 0.5H), 7.57 (d, J=9.0Hz, 1H), 7.51 (d, J=9.0Hz, 1H), 7.32 (d, J=10.1Hz, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.85 (d, J=9.1Hz, 2H), 6.18 (d, J=11.4Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.10 (d, J=18.5Hz, 1H), 4.86-4.67 (m, 4H), 4.45-4.36 (m, 1H), 4.33 (s, 1H), 4.20 (t, J=7.5Hz, 0.5H), 4.10 (t, J=7.8Hz, 0.5H), 4.03 (d, J=8.0Hz, 2H), 3.59 (d, J=6.6Hz, 2H), 3.49-3.45 (m, 11H), 3.39 (s, 2H), 3.30 (s, 2H), 3.11 (dd, J=11.4, 5.9Hz, 2H), 2.47-2.43 (m, 1H), 2.38-2.12 (m, 8H), 2.03-1.83 (s, 5H), 1.62-1.51 (m, 6H), 1.42-1.24 (m, 10H), 1.02-0.94 (m, 2H), 0.90-0.82 (m, 14H) ppm。分析型HPLC:100%,保留时间:9.47min(方法A)。

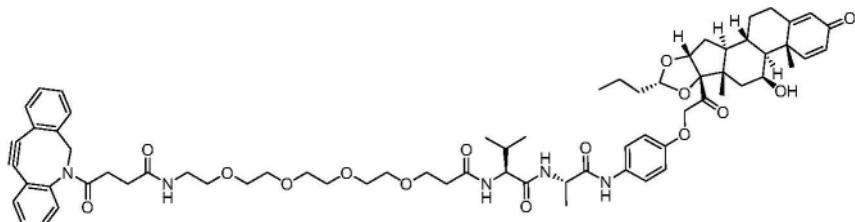
实施例44

[0701] 本实施例还说明了制备连接体-有效负载(LP7)的方法。以下实施例参照图26。使用以下反应条件:

胺 mg (μmol)		酸 mg (μmol)		步骤 1					mg 收 率%	MS m/z
				HATU mg (μmol)	DIPEA mg (μmol)	DMF (mL)	温 度 ($^{\circ}\text{C}$)	时 间 (hr)		
26b	30 (43)	VI-8	48 (87)	40 (105)	17 (132)	1	25	16	30 56%	1227.6 (M+H) ⁺

[0702] 室温下,向酸(VI-8) (1.0-2.5当量)的DMF(或DCM/DMF)溶液中依次加入DIPEA (1.5-10当量)和HATU (2.5-4.0当量)。将所得混合物在此温度下搅拌0.5-1小时,然后加入胺(26b) (1.0当量)。将反应混合物在室温下搅拌2-16小时,直至通过LCMS监测所述胺被完全耗尽。反应混合物通过膜过滤,将滤液浓缩,所得残余物经制备型HPLC(方法B)分离,得到实施例化合物LP7 (20-69%收率)为白色固体。

1-(4-{2-氮杂三环[10.4.0.0^{4,9}]十六碳-1(12),4(9),5,7,13,15-六烯-10-炔-2-基}-4-氧丁酰胺基)-N-[(1S)-1-[(1S)-1-[(4-{2-[(1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧化杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}苯基)氨基甲酰基]乙基]氨基甲酰基}-2-甲基丙基]-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺(LP7)



ESI m/z:1227.6 (M+H)⁺。

¹H NMR (500MHz, DMSO_{d6}) (旋转异构体) 89.79 (s, 0.5H), 9.70 (s, 0.5H), 8.41 (d, J=7.5Hz, 0.5H), 8.17 (d, J=7.0Hz, 0.5H), 8.02 (d, J=8.0Hz, 0.5H), 7.89 (d, J=8.6Hz, 0.5H), 7.77 (t, J=4.8Hz, 1H), 7.68 (d, J=7.3Hz, 1H), 7.62 (d, J=7.3Hz, 1H), 7.58 (d, J=9.0Hz, 1H), 7.53-7.43 (m, 4H), 7.40-7.28 (m, 4H), 6.88-6.82 (m, 2H), 6.18 (d, J=9.1Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.10 (d, J=18.4Hz, 1H), 5.03 (d, J=14.0Hz, 1H), 4.83-4.67 (m, 4H), 4.45-4.29 (m, 2H), 4.23-4.17 (m, 0.5H), 4.11 (t, J=7.7Hz, 0.5H), 3.64-3.40 (m, 15H), 3.31-3.26 (m, 2H), 3.13-3.03 (m, 2H), 2.65-2.52 (m, 2H), 2.47-1.26 (m, 24H), 1.06-0.93 (m, 2H), 0.90-0.80 (m, 12H) ppm。

[0703] 分析型HPLC:99%,保留时间:8.55min(方法B)。

[0704] 溶解度:<0.1mg/mL水;0.06mg/mL20%DMSO的水溶液;0.07mg/mL30%DMSO的水溶液。

实施例45

[0705] 本实施例说明了制备连接体-有效负载(LP15)的方法。以下实施例参照图27-28。注意,在图27中,化合物11b与图2中的化合物11-5相同。

步骤1:参照图27,制备化合物(13b)。

[0706] 在25℃下,向酸性Fmoc-Va1-Ala-OH(12b)的DMF溶液中加入HATU (1.0-2.8当量)和TEA (2.0-5.0当量)。将混合物在25℃下搅拌30分钟后,通过注射器加入胺(11b,即有效负载,1.0当量)的DMF (1mL)溶液。将所得混合物在25℃下搅拌2-24小时,直至根据LCMS确定大部分胺已耗尽。然后向混合物中加入哌啶或二乙胺(过量),并将混合物在25℃下搅拌1-16小时,直至通过LCMS监测已完全脱去Fmoc。将反应混合物通过膜过滤,滤液浓缩,残余物经制备型HPLC(方法B)或反相快速色谱法直接纯化,得到化合物13b (23-64%收率)为白色固体。具体而言,使用以下条件:

胺 mg (mmol)	酸 mg (mmol)	步骤1				步骤2		纯化*	收率% mg	m/z (M+1) ⁺
		HATU mg (μmol)	DIPE A mg (mmol)	DMF (mL)	时间 (hr)	Et ₂ NH (mL)	时间 (hr)			
11b	85 (0.076)	12b	69 (0.088)	69 (0.18)	TEA 18 (0.18)	3	2	0.5	16	RP 17, 43% 832.2 (M/2 + H) ⁺

步骤2:参照图27,制备化合物(17a)。

[0707] 在25℃下,向化合物13b的DMF溶液中加入HATU(1.0-2.8当量)和DIPEA或TEA(2.0-5.0当量)。将混合物在25℃下搅拌30分钟后,通过注射器加入Fmoc-Lys-(PEG)₄-COT(13c,1.0当量)的DMF(1mL)溶液。将所得混合物在25℃下搅拌2-24小时,直至根据LCMS确定所述胺(13b)大部分已耗尽。然后向混合物中加入哌啶或二乙胺(过量),将混合物在25℃下搅拌1-16小时,直至通过LCMS监测已完全脱去Fmoc。将反应混合物通过膜过滤,滤液浓缩,残余物经制备型HPLC(方法B)或反相快速色谱法直接纯化,得到化合物(17a)(23-64%收率)为白色固体。

步骤3:参照图27,制备化合物(27b)。

[0708] 向炔(17a)(1.0当量)的DMF或DMSO溶液中加入α-环糊精-叠氮化物(16a)(参见Synth.Commun., 2002, 32 (21), 3367-3372; J.Am.Chem.Soc., 2012, 134 (46), 19108-19117; J.Med.Chem., 1997, 40 (17), 2755-2761; J.Am.Chem.Soc., 1993, 115 (12), 5035-5040,这些出版物中的每一个的全部内容通过引用其整体并入本发明用于所有目的)(1.5-3.0当量)。然后将所得混合物在20-30℃下搅拌16小时保持3天,直至通过LCMS监测,化合物16a大部分已耗尽,并检测到所需的中间体质量。过滤后,将所得混合物经制备型HPLC直接纯化(或直接使用),得到化合物27b(25-58%收率)为白色固体(含三唑区域异构体)。

具体而言,使用以下条件。

炔 mg (mmol)	16a mg (mmol)	溶剂 (mL)	温度 (°C)	时间 (hr)	纯化	收率	m/z
50 (0.030)	60 (0.06)	DMSO (2)	25	48	RP-B	46 mg, 58%	887.9 (M/3 + H) ⁺

步骤4:参照图28,制备化合物(LP15)。

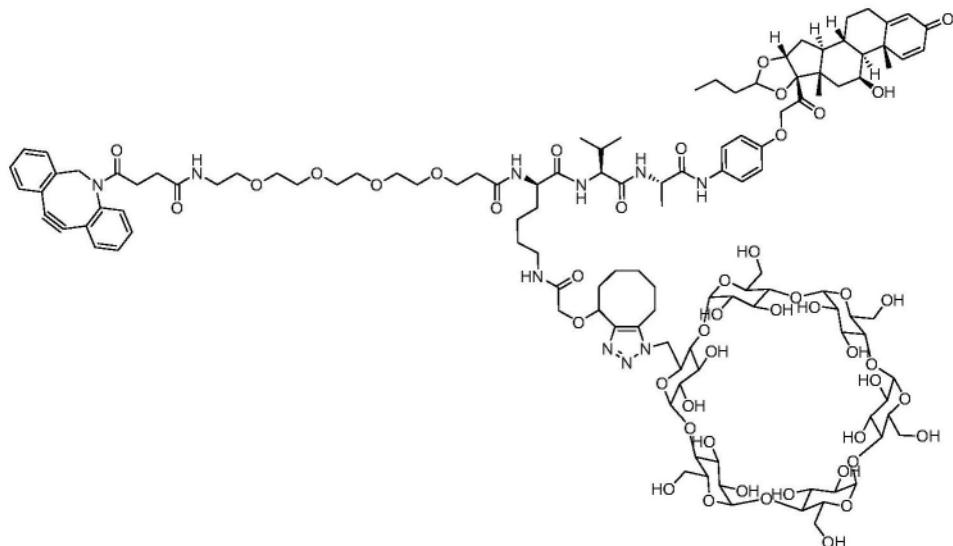
[0709] 使用以下反应条件:

胺 mg (μmol)	酸 mg (μmol)						mg 收 率%	MS m/z	
		HATU mg (μmol)	DIPEA mg (μmol)	DMF (mL)	温度 (°C)	时间 (hr)			
27b	13 (6.0)	VI-8	20 (36)	15 (39)	4.0 (31)	2	25	2	6.0 36% 1259.1 (M/2 + H) ⁺

[0710] 在室温下向酸(VI-8)(1.0-2.5当量)的DMF(或DCM/DMF)溶液中依次加入DIPEA(1.5-10当量)和HATU(2.5-4.0当量)。将所得混合物在此温度下搅拌0.5-1小时,然后加入

胺(27b) (1.0当量)。将反应混合物在室温下搅拌2-16小时,直至通过LCMS监测,胺(27b)已完全耗尽。将反应混合物通过膜过滤,滤液浓缩,残余物经制备型HPLC(方法B)分离,得到实施例化合物(20-69%收率)为白色固体。

1- (4- {2- 氮杂三环[10.4.0.0^{4,9}]十六碳-1(12),4(9),5,7,13,15-六烯-10-炔-2-基} -4- 氧丁酰胺基)-N- [(1R)-5- {2- [(1- {[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-十二羟基-10,15,20,25,30-五(羟甲基)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-十二氧杂七环[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]四十二烷-5-基]甲基}-1H,4H,5H,6H,7H,8H,9H-环辛并[d][1,2,3]三唑-4-基) 氧基]乙酰胺基}-1- {[(1S)-1- {[(1S)-1- [(4- {2- [(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2- 氧乙氧基} 苯基) 氨基甲酰基]乙基]氨基甲酰基}-2- 甲基丙基]氨基甲酰基} 戊基]-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺(LP15)



ESIm/z:1259.1 (M/2+H)⁺。

¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) (旋转异构体) δ 9.84 (s, 1H), 8.34 (s, 0.5H), 8.15 (d, J=7.3Hz, 1H), 8.04 (d, J=6.6Hz, 1H), 7.90-7.84 (m, 1H), 7.81-7.74 (m, 1.5H), 7.72-7.56 (m, 4H), 7.56-7.27 (m, 11H), 6.89-6.79 (m, 2H), 6.17 (d, J=10.0Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.64-5.44 (m, 12H), 5.24-5.00 (m, 5H), 4.86-4.51 (m, 16H), 4.40-4.16 (m, 5H), 4.05-3.96 (m, 1H), 3.86-3.73 (m, 10H), 3.67-2.88 (m, 35H), 2.80-2.69 (m, 1H), 2.62-2.55 (m, 1H), 2.41-2.20 (m, 6H), 2.10-1.71 (m, 10H), 1.66-1.07 (m, 26H), 1.05-0.79 (m, 17H) ppm。

分析型HPLC:97%,保留时间:6.62和6.67min(方法B)。保留时间来自两个三唑-区域异构体。

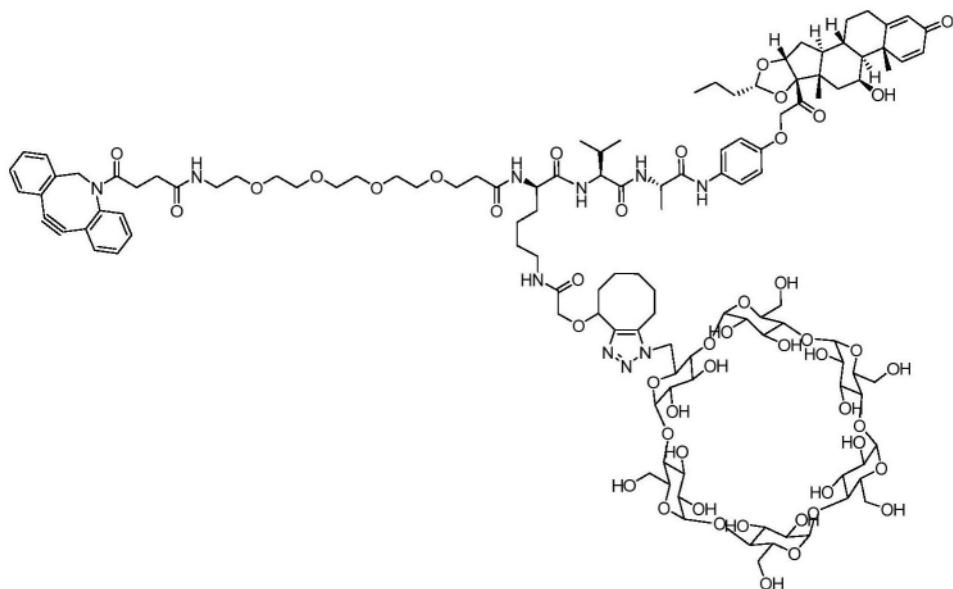
实施例46

[0711] 本实施例说明了制备连接体-有效负载(LP16)的方法。以下实施例参照图27-28。制备LP16的方法与本发明实施例45中制备LP15的方法相同,不同之处在于使用不同的有效负载,如图27-28所示。使用以下反应条件:

胺 mg (μmol)	酸 mg (μmol)	步骤 1					纯化	mg 收率%	MS m/z	
		HATU mg (μmol)	DIPEA mg (μmol)	DMF (mL)	温度 ($^{\circ}\text{C}$)	时间 (hr)				
27b	30 (15)	VI-8	10 (18)	8.0 (21)	6.0 (47)	1	15-20	16	B 18 47% $(\text{M}/2+\text{H})^+$	1259.1 ($\text{M}/2+\text{H})^+$

[0712] 在室温下,向酸VI-8 (1.0-2.5当量) 的DMF (或DCM/DMF) 溶液中依次加入DIPEA (1.5-10当量) 和HATU (2.5-4.0当量)。将所得混合物在此温度下搅拌0.5-1小时,然后加入胺(27b) (1.0当量)。将反应混合物在室温下搅拌2-16小时,直至通过LCMS监测,胺(27b)完全耗尽。将反应混合物通过膜过滤,滤液浓缩,残余物经制备型HPLC (方法B) 分离,得到实施例化合物(20-69%收率)为白色固体。

1-(4-{2-氮杂三环[10.4.0.0^{4,9}]十六碳-1(12),4(9),5,7,13,15-六烯-10-炔-2-基}-4-氧丁酰胺基)-N-[(1R)-5-{2-[1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-十二羟基-10,15,20,25,30-五(羟甲基)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-十二氧杂七环[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]四十二烷-5-基]甲基}-1H,4H,5H,6H,7H,8H,9H-环辛并[d][1,2,3]三唑-4-基)氨基]乙酰胺基}-1-[(1S)-1-[(1S)-1-[(4-{2-[1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}苯基)氨基甲酰基]乙基]氨基甲酰基]-2-甲基丙基]氨基甲酰基]戊基]-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺 (LP16)



ESIm/z: 839.5 ($\text{M}/3+\text{H})^+$, 1259.1 ($\text{M}/2+\text{H})^+$ (60%)。

^1H NMR (500MHz, DMSO_{d6}) (含三唑区域异构体) 89.77-9.42 (m, 1H), 8.27-8.20 (m, 0.5H), 8.17-8.01 (m, 2H), 7.86-7.74 (m, 2.5H), 7.70-7.60 (m, 4H), 7.57-7.43 (m, 7H), 7.39-7.28 (m, 6H), 6.88-6.81 (m, 2H), 6.21-6.14 (m, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.61-5.42 (m, 10H), 5.16-4.97 (m, 4H), 4.89-4.48 (m, 17H), 4.40-4.28 (m, 4H), 4.16-4.10 (m, 1H), 4.04-3.94 (m, 1H), 3.83-3.74 (m, 7H), 3.65-3.56 (m, 9H), 3.48-3.21 (m, 23H), 3.15-3.06 (m, 4H), 2.97-2.89 (m, 1H), 2.81-2.69 (m, 1H), 2.61-2.53 (m, 2H), 2.40-2.20 (m, 6H), 2.14-2.06 (m, 2H), 2.03-1.95 (m, 4H), 1.91-1.70 (m, 5H), 1.64-1.52 (m, 9H), 1.49-1.25 (m, 14H), 1.13-0.81 (m, 19H) ppm。

分析型HPLC:98%,保留时间:6.61(59%)min和6.73(39%)min(方法B)。保留时间来自两个三唑-区域异构体。

溶解度:0.1mg/mL10%DMSO的水溶液。

实施例47

[0713] 本实施例说明了制备连接体-有效负载(LP8)的方法。以下实施例参照图16。

[0714] (2S)-2-[(2S)-2-氨基-3-甲基丁酰胺基]-5-(氨基甲酰基氨基)-N-(4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}苯基)戊酰胺(34h)

[0715] 根据一般方法C,经制备型HPLC(方法B)纯化后,制备得到化合物(34h)为白色固体。ESIm/z:778(M+H)⁺.¹H NMR(500MHz,DMSO_{d6})δ9.97(d,J=12.0Hz,1H),8.10(m,1H),7.51(d,J=6.5Hz,2H),7.32(dd,J=10.1,2.5Hz,1H),6.83(dd,J=15.9,9.0Hz,2H),6.17(d,J=10.0Hz,1H),5.97(t,J=5.0Hz,1H),5.93(s,1H),5.40(s,2H),5.22(t,J=4.8Hz,1H),5.12(d,J=6.0Hz,1H),5.09(d,J=6.5Hz,1H),4.83-4.67(m,3H),4.47-4.37(m,1H),4.35-4.29(m,1H),3.05-2.90(m,3H),2.57-2.51(m,1H),2.30(d,J=12.0Hz,1H),2.13-1.74(m,7H),1.70-1.46(m,7H),1.45-1.29(m,7H),1.17-0.93(m,2H),0.91-0.82(m,9H),0.77(dd,J=6.7,2.7Hz,3H)ppm。

[0716] 1-(4-{2-氮杂三环[10.4.0.0^{4,9}]十六碳-1(12),4(9),5,7,13,15-六烯-10-炔-2-基}-4-氧丁酰胺基)-N-[(1S)-1-{[(1S)-1-[(4-{2-[(1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}苯基]氨基甲酰基]乙基]氨基甲酰基]-2-甲基丙基]-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺(LP8)

[0717] 根据一般方法F制备得到化合物LP8(25mg,20%收率)为白色固体。ESIm/z:1263(M/+H)⁺.¹H NMR(400MHz,DMSO_{d6})δ9.79(s,0.7H),9.69(s,0.3H),8.41(d,J=8.0Hz,0.3H),8.16(d,J=8.0Hz,0.7H),8.01(d,J=7.6Hz,0.3H),7.89(d,J=7.6Hz,0.7H),7.77(t,J=5.2Hz,1H),7.70-7.66(m,1H),7.64-7.60(m,1H),7.60-7.54(m,1H),7.54-7.44(m,4H),7.40-7.24(m,4H),6.90-6.82(m,2H),6.30(dd,J=10Hz,1.2Hz,1H),6.11(s,1H),5.72-5.55(m,1H),5.52-5.48(m,1H),5.16-5.08(m,1H),5.06-5.00(m,1H),4.88-4.80(m,1H),4.80-4.76(m,1H),4.74(t,J=4.0Hz,1H),4.42-4.33(m,1H),4.26-4.06(m,2H),3.64-3.54(m,3H),3.50-3.40(m,12H),3.12-3.02(m,2H),2.70-2.55(m,2H),2.40-2.20(m,4H),2.12-1.90(m,4H),1.86-1.70(m,2H),1.64-1.54(m,4H),1.49(s,4H),1.46-1.34(m,3H),1.29(d,J=6.8Hz,3H),0.90-0.80(m,13H)ppm。分析型HPLC:100%,保留时间:8.26min(方法B)。

实施例48

[0718] 本实施例说明了制备连接体-有效负载(LP9)的方法。以下实施例参照图16。

[0719] {4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-氮杂三环[10.4.0.0^{4,9}]十六碳-1(12),4(9),5,7,13,15-六烯-10-炔-2-基)-4-氧丁酰胺基]-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺基]-3-甲基丁酰胺基]-5-(氨基甲酰基氨基)戊酰胺基]苯基}甲基N-(4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}苯基)氨基甲酸酯(LP9)

[0720] 根据一般方法D制备得到化合物(34i)为白色固体。

[0721] 根据一般方法F制备得到化合物LP9(20mg,22%收率)。ESIm/z:1499(M+H)⁺.¹H NMR(400MHz,DMSO_{d6})δ10.02(s,1H),9.59(s,1H),8.14(d,J=7.6Hz,1H),7.88(d,J=8.8Hz,1H),7.80-7.75(m,1H),7.70-7.66(m,1H),7.65-7.60(m,3H),7.53-7.45(m,3H),7.40-7.28(m,7H),6.84(d,J=9.2Hz,2H),6.30(dd,J=10.4Hz,J=1.6Hz,1H),6.11(s,1H),6.10-6.0(m,1H),5.72-5.55(m,1H),5.52(s,1H),5.43(s,2H),5.16-5.05(m,4H),4.88-4.70(m,3H),4.43-4.33(m,1H),4.25-4.20(m,2H),3.65-3.55(m,3H),3.50-3.40(m,12H),3.30-3.25(m,2H),3.12-2.90(m,4H),2.70-2.55(m,2H),2.48-2.43(m,1H),2.40-2.35(m,1H),2.30-2.20(m,2H),2.15-1.95(m,4H),1.86-1.75(m,2H),1.64-1.54(m,5H),1.49(s,4H),1.46-1.34(m,4H),1.23(s,2H),0.90-0.80(m,12H)ppm。分析型HPLC:100%,保留时间:7.83min(方法B)。

实施例49

[0722] 本实施例说明了制备连接体-有效负载(LP10)的方法。以下实施例参照图16。

[0723] (1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-8-(2-氨基乙酰基)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(34j)

[0724] 根据一般方法D,由化合物1-19制备得到化合物34j(80mg,64%收率)。ESIm/z:871(M+H)⁺。

{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-氮杂三环[10.4.0.0^{4,9}]十六碳-1(12),4(9),5,7,13,15-六烯-10-炔-2-基)-4-氧丁酰胺基)-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺基]-3-甲基丁酰胺基]-5-(氨基甲酰基氨基)戊酰胺基]苯基}甲基N-(4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}苯基)氨基甲酸酯(LP10)

[0725] 根据一般方法F,由34j(43mg,50μmol)与DIBAC-suc-PEG₄-NHS酯(VI)反应,并经由制备型HPLC(方法B)纯化后,得到化合物(LP10)(20mg,22%收率)。ESIm/z:1406(M+H)⁺.¹H NMR(DMSO_{d6},500MHz)δ9.99(s,1H),8.11(d,J=7.5Hz,1H),7.88(d,J=8.5Hz,1H),7.80-7.75(m,1H),7.70-7.66(m,1H),7.65-7.60(m,3H),7.53-7.33(m,6H),7.33-7.28(m,3H),6.30(dd,J=10.0Hz和1.5Hz,1H),6.11(s,1H),6.10-6.00(m,1H),5.72-5.55(m,2H),5.41(s,2H),5.05-5.01(m,1H),4.97(s,2H),4.80-4.72(m,1H),4.60-4.58(m,1H),4.43-4.33(m,1H),4.25-4.10(m,3H),3.88-3.80(m,1H),3.65-3.55(m,3H),3.50-3.40(m,12H),3.30-3.25(m,2H),3.12-2.90(m,4H),2.70-2.55(m,2H),2.48-2.35(m,2H),2.30-2.20(m,2H),2.15-1.95(m,4H),1.86-1.65(m,3H),1.64-1.54(m,5H),1.49(s,4H),1.46-1.34(m,5H),0.90-0.80(m,12H)ppm。分析型HPLC:100%,保留时间:7.40min(方法B)。

实施例50

[0726] 本实施例说明了制备连接体-有效负载LP11的方法。以下实施例参照图16。

{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-氮杂三环[10.4.0.0^{4,9}]十六碳-1(12),4(9),5,7,13,15-六烯-10-炔-2-基)-4-氧丁酰胺基)-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺基]-3-甲基丁酰胺基]-5-(氨基甲酰基氨基)戊酰胺基]苯基}甲基N-[(4-{2-[(1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环

[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}苯基)甲基]氨基甲酸酯(LP11)

[0727] 根据一般方法D,由(11-19)制备得到化合物34k(80mg,64%收率)。

[0728] 根据一般方法C,由化合物(34k)反应得到化合物(LP11)(18mg,31%收率)为白色固体。ESIm/z:756.5(M/2+H)⁺.¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆)δ10.02(s,1H),8.14(d,J=8.0Hz,1H),7.88(d,J=8.0Hz,1H),7.76(t,J=5.5Hz,1H),7.72(t,J=5.5Hz,1H),7.70-7.66(m,1H),7.65-7.60(m,3H),7.53-7.45(m,3H),7.40-7.31(m,2H),7.31-7.25(m,4H),7.20-7.15(m,2H),6.86-6.80(m,2H),6.30(dd,J=10.4Hz,1.6Hz,1H),6.11(s,1H),6.10-6.00(m,1H),5.72-5.55(m,1H),5.52(s,1H),5.43(s,2H),5.16-5.10(m,1H),5.06-5.00(m,1H),5.00-4.93(m,2H),4.90-4.76(m,2H),4.75(t,J=4.0Hz,1H),4.43-4.33(m,1H),4.25-4.20(m,2H),4.12(d,J=6.0Hz,2H),3.65-3.55(m,3H),3.50-3.40(m,12H),3.30-3.25(m,2H),3.12-2.90(m,4H),2.70-2.55(m,2H),2.48-2.43(m,1H),2.40-2.35(m,1H),2.30-2.20(m,2H),2.15-1.95(m,4H),1.86-1.70(m,3H),1.64-1.54(m,5H),1.49(s,4H),1.46-1.34(m,4H),0.90-0.80(m,12H)ppm。分析型HPLC:99%,保留时间:7.89min(方法B)。

实施例51

[0729] 本实施例说明了制备连接体-有效负载LP12的方法。以下实施例参照图17。

[0730] [(2R,3R,4S,5R,6S)-3,4,5-三(乙酰氧基)-6-[4-甲酰基-3-(丙-2-炔-1-基氧基)苯氧基]噁烷-2-基]甲基乙酸酯(45)

[0731] 步骤1:文献Carbohydrate Research,1986,146,241-249报告了[(2R,3R,4S,5R,6S)-3,4,5-三(乙酰氧基)-6-(4-甲酰基-3-羟基苯氧基)噁烷-2-基]甲基乙酸酯(43)的合成,其全部内容通过引用其整体并入本发明。向中间体化合物43(2.8g,6.0mmol)的丙酮(40mL)溶液中同时加入碳酸钾(1.7g,12mmol)和3-溴丙-1-炔(44,3.5g,30mmol),所得混合物回流过夜。然后将混合物真空浓缩,残余物经快速色谱法(0-33%乙酸乙酯的石油醚溶液)纯化,得到化合物45(1.9g,收率63%)为棕色固体。ESIm/z:507(M+H)⁺.¹H NMR(MeOD-d₄,500MHz)δ10.26(s,1H),7.78(d,J=8.5Hz,1H),6.87(d,J=2.0Hz,1H),6.77(dd,J=8.5,2.0Hz,1H),5.51(d,J=8.0Hz,1H),5.41(t,J=9.5Hz,1H),4.93(t,J=2.5Hz,2H),5.23-5.19(m,1H),5.14(t,J=9.5Hz,1H),4.34-4.30(m,1H),4.22-4.15(m,2H),3.11(t,J=2.0Hz,1H),2.05-1.99(m,12H)ppm。

[(2R,3R,4S,5R,6S)-3,4,5-三(乙酰氧基)-6-[4-(羟甲基)-3-(丙-2-炔-1-基氧基)苯氧基]噁烷-2-基]甲基乙酸酯(46)

[0732] 步骤2:向化合物45(0.83g,1.6mmol)的异丙醇(50mL)溶液中加入硼氢化钠(31mg,0.82mmol)。混合物在23℃下搅拌2小时,然后真空浓缩。残余物用乙酸乙酯稀释,并用盐水洗。有机溶液经硫酸钠干燥,浓缩,得到化合物46(0.70g,收率84%)为棕色油状物。ESIm/z:526.1(M+H₂O)⁺.¹H NMR(MeOD-d₄,500MHz)δ7.32(d,J=8.0Hz,1H),6.78(d,J=2.0Hz,1H),6.67(dd,J=8.0,2.0Hz,1H),5.40(t,J=9.0Hz,1H),5.33(dd,J=7.5Hz,1H),5.20-5.11(m,2H),4.78(t,J=2.5Hz,2H),4.59(s,2H),4.32(d,J=12.5,5.0Hz,1H),4.21(dd,J=12.5,2.5Hz,1H),4.12-4.08(m,1H),3.02(t,J=2.0Hz,1H),2.07-2.0。

[0733] [(2R,3R,4S,5R,6S)-3,4,5-三(乙酰氧基)-6-(4-[(4-硝基苯氧基羰基)氧基]甲基)-3-(丙-2-炔-1-基氧基)苯氧基]噁烷-2-基]甲基乙酸酯(48)

[0734] 步骤3:向化合物46(0.40g,0.79mmol)的二氯甲烷(30mL)溶液中加入氯甲酸4-硝基苯酯(47,0.24g,1.2mmol),4-二甲基氨基吡啶(0.19g,1.6mmol)和二异丙基乙胺(0.20g,1.6mmol)。将混合物在23℃搅拌过夜,然后用二氯甲烷(50mL)稀释。有机溶液用饱和氯化铵水溶液(50mL)洗,然后用盐水(50mL)洗,经硫酸钠干燥,浓缩。残余物经快速色谱法(0-33%乙酸乙酯的石油醚溶液)纯化,得到化合物48(0.30g,收率57%)为灰白色固体。ESIm/z:691.0(M+H₂O)⁺.¹H NMR(CDCl₃,500MHz)δ8.27(d,J=9.0Hz,2H),7.38(d,J=9.0Hz,2H),7.35(d,J=8.5Hz,1H),6.75(d,J=2.5Hz,1H),6.64(dd,J=9.0,2.5Hz,1H),5.33-5.26(m,4H),5.21-5.17(m,1H),4.76(t,J=2.0Hz,2H),4.28(dd,J=12.5,5.0Hz,1H),4.20(dd,J=12.5,2.5Hz,1H),3.89-3.88(m,1H),2.56(t,J=7.0Hz,1H),2.08-2.04(m,12H)ppm。

[2(R,3R,4S,5R,6S)-3,4,5-三(乙酰氧基)-6-[4-{[(4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.002,9.04,8.013,18]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}苯基]氨基甲酰基]氧基}甲基]-3-(丙-2-炔-1-基氧基)苯氧基]噁烷-2-基]甲基乙酸酯(49)

[0735] 步骤4:向化合物48(0.15g,0.22mmol)的DMF(5mL)溶液中依次加入11-5(0.14g,0.26mmol),HOBt(59mg,0.44mmol)和二异丙基乙胺(57mg,0.44mmol)。混合物在23℃下搅拌过夜,然后通过制备型HPLC(方法B)纯化,得到化合物49(0.14g,62%收率)为白色固体。ESIm/z:1056.3(M+H)⁺.¹H NMR(MeODd₄,400MHz)δ7.46(d,J=10.4Hz,1H),7.35-7.26(m,3H),6.87-6.80(m,3H),6.67(dd,J=8.0,2.4Hz,1H),6.26(dt,J=10.0,2.4Hz,1H),6.03(brs,1H),5.42-5.34(m,2.5H),5.26-5.03(m,5.5H),4.88-4.64(m,4H),4.46-4.43(m,1H),4.34-4.30(m,1H),4.21-4.18(m,1H),4.12-4.08(m,1H),3.03(t,J=2.0Hz,1H),2.71-2.62(m,1H),2.41-2.38(m,1H),2.28-2.15(m,2H),2.06-2.04(m,12H),1.90-1.39(m,12H),1.20-0.89(m,8H)ppm。

[0736] [2-(丙-2-炔-1-基氧基)-4-{[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟甲基)噁烷-2-基]氧基}苯基]甲基N-(4-{2-[(1S,2S,4S,8R,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-4,9,13-三甲基-16-氧-6-丙基-7-氧杂五环[10.8.002,9.04,8.013,18]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}苯基)氨基甲酸酯(LP12)

[0737] 步骤5:向化合物49(35mg,33μmol)的甲醇(3mL)溶液中加入另一份LiOH/H₂O(14mg,0.33mmol)溶液的水(1mL)溶液。将混合物在23℃下搅拌1.5小时,然后用HOAc(20mg)淬灭。将混合物真空浓缩,残余物经制备型HPLC(方法B)纯化,得到连接体-有效负载LP12(26mg,88%收率)为白色固体。ESIm/z:888(M+H)⁺.¹H NMR(MeOD_{d4},400MHz)δ7.46(d,J=10.0Hz,1H),7.35-7.30(m,3H),6.91(d,J=2.0Hz,1H),6.87-6.83(m,2H),6.74(dd,J=8.0,2.0Hz,1H),6.27(dt,J=10.0,2.0Hz,1H),6.03(s,1H),5.25(t,J=4.8Hz,0.5H),5.19(d,J=7.2Hz,0.5H),5.13-5.03(m,3H),4.94-4.91(m,1H),4.82-4.75(m,3H),4.71-4.67(m,1H),4.46-4.43(m,1H),3.91(dd,J=12.0,2.0Hz,1H),3.70(dd,J=12.0,5.2Hz,1H),3.48-3.36(m,4H),2.99(t,J=2.4Hz,1H),2.71-2.62(m,1H),2.40-2.37(m,1H),2.26-2.12(m,2H),2.07-2.00(m,1H),1.88-1.61(m,5H),1.56-1.35(m,6H),1.20-0.92(m,8H)ppm。

实施例52

[0738] 本实施例说明了制备连接体-有效负载LP13的方法。以下实施例参照图18。

2-[(1S,2S,4S,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-

二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙基N-(2-{[(4-[2S]-5-(氨基甲酰基氨基)-2-[2S]-2-[6-(2,5-二氧-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基]-3-甲基丁酰胺基]戊酰胺基]苯基}甲氧基)羧基](甲基氨基)乙基)-N-甲基氨基甲酸酯(LP13)

[0739] 向布地奈德-DME碳酸酯(20mg, 0.037mmol)的DMF(1ml)溶液中依次加入MC-VC-PAB-PNP(22mg, 0.03mmol), DIPEA(12mg, 0.09mmol)和HOBr(6mg, 0.05mmol)。将此混合物在室温下搅拌12小时, 然后进行制备型HPLC分离纯化, 得到两种差向异构体, 差向异构体1:3.3mg(收率10%)和差向异构体2:4.1mg(收率12%)。

[0740] 差向异构体1:ESIm/z:1143.4(M+1).¹H NMR(400MHz, MeOD) δ7.63-7.62(m, 2H), 7.50-7.49(m, 1H), 7.37-7.35(m, 2H), 6.81(s, 1H), 6.29-6.27(m, 1H), 6.03(brs, 1H), 5.37-5.08(m, 5H), 4.83-4.79(m, 3H), 4.53-4.46(m, 2H), 4.18-4.15(m, 1H), 3.69-3.37(m, 6H), 3.25-3.13(m, 3H), 3.12-2.96(m, 5H), 2.90-2.86(m, 2H), 2.68-2.64(m, 1H), 2.41-2.40(m, 1H), 2.31-2.28(m, 2H), 2.26-1.95(m, 7H), 1.93-1.77(m, 11H), 1.51(s, 3H), 1.42-1.30(m, 10H), 1.25-0.89(m, 15H)。

[0741] 差向异构体2:ESIm/z:1143.4(M+1).¹H NMR(400MHz, MeOD) δ7.62-7.34(m, 5H), 6.81(brs, 1H), 6.29-6.23(m, 1H), 6.05-6.00(m, 1H), 5.27-5.17(m, 4H), 4.92-4.79(m, 2H), 3.75-3.37(m, 7H), 3.03-2.86(m, 5H), 2.72-2.63(m, 1H), 2.41-2.28(m, 3H), 2.23-2.04(m, 7H), 1.91-1.32(m, 31H), 1.19-0.90(m, 14H)。

实施例53

[0742] 本实施例说明了制备连接体-有效负载LP14的方法。以下实施例参照图18。

[0743] N-[(1S)-1-{[(1S)-1-[(4-{2-[(1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基]苯基}氨基甲酰基]乙基]氨基甲酰基}-2-甲基丙基]-1-{2-[4-(2,5-二氧-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)苯基]乙酰胺基}-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰基(LP14)

[0744] 根据一般方法F制备得到化合物34h-2(0.18g, 2步收率为74%)。ESIm/z:728(M+H)⁺。

[0745] 制备得到化合物LP14(20mg, 从34h开始, 3步收率为14%)为白色固体。ESI:1189(M+H)⁺.¹H NMR(500MHz, DMSO_{d6}) δ9.81-9.67(m, 1H), 8.43-8.13(m, 2H), 8.03-7.84(m, 1H), 7.61-7.47(m, 2H), 7.35(d, J=8.4Hz, 2H), 7.29-7.21(m, 3H), 7.17(s, 2H), 6.88-6.81(m, 2H), 6.33-6.28(dd, J=10.1, 1.8Hz, 1H), 6.11(s, 1H), 5.71-5.56(m, 1H), 5.51(s, 1H), 5.12(d, J=18.5Hz, 1H), 4.84(d, J=18.5Hz, 1H), 4.79-4.76(m, 1H), 4.74(t, J=4.3Hz, 2H), 4.38-4.33(m, 1H), 4.25-4.17(m, 2H), 3.63-3.55(m, 2H), 3.52-3.44(m, 14H), 3.42(t, J=5.8Hz, 2H), 3.21(q, J=5.7Hz, 1H), 2.69-2.55(m, 1H), 2.47-2.41(m, 1H), 2.41-2.34(m, 1H), 2.29-2.23(m, 1H), 2.14-2.02(m, 2H), 1.99-1.90(m, 1H), 1.82(d, J=13.0Hz, 1H), 1.65-1.53(m, 4H), 1.49(s, 3H), 1.47-1.41(m, 1H), 1.40-1.33(m, 2H), 1.29(d, J=7.1Hz, 3H), 0.90-0.80(m, 12H) ppm。分析型HPLC:100%, 保留时间:8.45min(方法A)。

[0746] 下表7总结了LP1-LP16的某些物理性质。

表7:某些连接体-有效负载的物理性质

LP 编号	MF	MW	纯度 (%)	MS m/z (100%)	最高m/z	HPLC RT (min)
LP1	C ₆₆ H ₈₁ N ₅ O ₁₅	1184.4	98	593 (M/2+H)	1185 (M+H, 20%)	6.53 (B)
LP2	C ₆₁ H ₈₆ F ₂ N ₆ O ₁₅	1181.4	100	1181.4 (M+H)	1181.4 (M+H)	7.83 (B)
LP3	C ₇₀ H ₉₄ F ₂ N ₆ O ₁₇	1329.5	100	1330.4 (M+H)	1330.4 (M+H)	7.03 (B)
LP4	C ₆₁ H ₈₆ N ₄ O ₁₅	1115.4	100	1115 [M+H]	1115 [M+H]	8.17 (A) 8.24 (B)
LP5	C ₆₄ H ₉₂ N ₆ O ₁₆	1201.5	100	1201 [M+H]	1201 [M+H]	7.34 (A) 7.44 (B)
LP6	C ₇₂ H ₉₉ N ₇ O ₁₈	1350.6	100	1350.5 (M+H)	1350.5 (M+H)	8.87 (A)
LP7	C ₆₁ H ₈₆ N ₄ O ₁₅	1226.5	100	1227.8 (M+H)	1227.8 (M+H)	9.47 (A)
LP8	C ₆₉ H ₈₅ F ₂ N ₅ O ₁₅	1262.4	100	1262.4 (M+H)	1262.4 (M+H)	8.26 (B)
LP9	C ₈₀ H ₉₈ F ₂ N ₈ O ₁₈	1497.7	100	749.5 (M/2+H)	1497.7 (M+H)	7.99 (B)
LP10	C ₇₄ H ₉₄ F ₂ N ₈ O ₁₇	1405.6	100	703.5 (M/2+H)	1405.7 (M+H) (5%)	7.40 (B)
LP11	C ₈₁ H ₁₀₀ F ₂ N ₈ O ₁₈	1511.7	99.3	756.5 (M/2+H)	756.5 (M/2+H)	7.89 (B)
LP12	C ₄₈ H ₅₇ NO ₁₅	888.0	100	566.2(M-葡萄糖-PAB)	889.1 (M+H, 25%)	8.02 (A) 8.08 (B)
LP13	C ₇₂ H ₉₉ N ₇ O ₁₈	1350.6	100	1350.5 (M+H)	1350.5 (M+H)	8.87 (A)
LP14	C ₆₂ H ₇₉ F ₂ N ₅ O ₁₆	1188.31	100	594.8 (M/2+H)	1188.5 (M+H, 40%)	7.99 (B)
LP15	C ₁₂₁ H ₁₇₀ N ₁₀ O ₄₇	2516.71	97	1259 (M/2 +H)	1259.1 (M/2 + H) ⁺	6.62和6.67 (B)
LP16	C ₁₂₁ H ₁₇₀ N ₁₀ O ₄₇	2516.71	98	1258 (M/2+H)	1259.1 (M/2+H,60%)	6.61(59%)和6.73 (39%) (B)

实施例54

[0747] 本实施例说明了制备抗体或其抗原结合片段与有效负载的位点特异性偶联物的一般方法。本实施例参照图19。

[0748] 在其中一个实施例，通过微生物转谷氨酰胺酶 (MTG EC 2.3.2.13, Zedira, Darmstadt, 德国) (本发明称为“基于MTG”)，两步偶联N297Q或N297D突变抗体而生成位点特异性偶联物。在第一步中，通过基于MTG的酶促反应，用叠氮基-PEG₃-胺使突变的抗体官能化。参见例如，于2017年2月24日提交的国际专利申请号PCT/US17/19537，发明名称为“OPTIMIZED TRANSGLUTAMINASE SITE-SPECIFIC ANTIBODY CONJUGATION”，通过引用其整体并入本发明用于所有目的。在第二步中，通过[2+3]1,3-偶极环加成反应将炔烃官能化的连接体-有效负载连接至所述叠氮基官能化的抗体上(参见例如，图19，其示出了与通过[2+3]环化衍生的叠氮基官能化抗体偶联的DIBAC官能化的连接体-有效负载)。此方法提供了位点特异性和化学计量的偶联物，具有约50-80%分离产率。

实施例55

[0749] 本实施例说明了制备炔烃-连接体-有效负载与抗体的位点特异性偶联物的具体步骤。

[0750] 本实施例涉及图29中示出的化合物。

[0751] 在本实施例中，位点特异性偶联物分两步生成。第一步是基于微生物转谷氨酰胺酶(MTG)的小分子(例如叠氮化物-PEG₃-胺(同上))与具有Q-标签的抗体(参考文献中为Qtag)进行酶促连接(下文中称为“基于MTG”偶联)。第二步采用通过[2+3]环加成(例如，叠氮化物与环辛炔之间的1,3-偶极环加成(也称为无铜点击化学))将连接体-有效负载连接至所述叠氮基官能化抗体。参见，Baskin, J.M.; Prescher, J.A.; Laughlin, S.T.; Agard, N.J.; Chang, P.V.; Miller, I.A.; Lo, A.; Codelli, J.A.; Bertozzi, C.R. PNAS 2007, 104 (43), 16793-7, 其全部内容通过引用其整体并入本发明用于所有目的。图28中示出了具有通过[2+3]环加成与叠氮基官能化抗体偶联的DIBAC部分的连接体-有效负载的实例。此方法提供了位点特异性和化学计量的偶联物，具有约50-80%分离产率。

[0752] 通过[2+3]点击反应进行ADC偶联。

[0753] 步骤1:叠氮基官能化抗体的制备。

[0754] 将具有N297Q突变的无糖基化人抗体IgG(IgG1, IgG4等)或人IgG1同种型在PBS(pH6.5-8.0)中与≥200摩尔当量的叠氮基-dPEG₃-胺(MW=218.26g/mol)混合。将所得溶液与MTG(EC2.3.2.13, 来自Zedira, Darmstadt, Germany或Modernist Pantry[L#210115A]-ACTIVA TI, 包含来自Ajinomoto, Japan的麦芽糖环糊精)(25U/mL; 5UMTG/mg抗体)混合，导致抗体的终浓度为0.5-5mg/mL，然后将所述溶液在37°C下孵育4-24小时，同时轻轻振荡。通过ESI-MS监测反应。反应完成后，通过SEC或蛋白A柱色谱法除去过量的胺和MTG，以生成叠氮基官能化的抗体。此产物通过SDS-PAGE和ESI-MS进行表征。将叠氮基-dPEG₃-胺添加至抗体的两个位点，导致所述2DAR抗体-PEG₃-叠氮化物偶联物增加204Da。

[0755] 在具体实验中，在MTG(0.350mL, 35U, mTGase(微生物转谷氨酰胺酶), Zedira, Darmstadt, 德国)的存在下，将N-末端Q标签抗体(24mg)的7mL无钾PBS缓冲液(pH7.3)与>200摩尔当量的叠氮基-PEG₃-胺(MW218.26)一起孵育。将反应物在37°C下孵育过夜，同时轻轻混合。通过体积排除色谱法(SEC, Superdex 200 PG, GE Healthcare)除去过量的叠氮基-PEG₃-胺和mTGase。

[0756] 步骤2: 使用点击化学反应来制备药物与抗体的位点特异性偶联物。

[0757] 通过叠氮基官能化抗体与含炔烃的连接体-有效负载之间的[2+3]点击反应制备表10中与人IgG(IgG1, IgG4等)的位点特异性抗体药物偶联物。详细的偶联步骤如下。通过将mAb-PEG₃-N₃(1-3mg/mL)在含水介质(例如，PBS, 含有5%甘油的PBS, HBS)中与溶解于合适有机溶剂(例如，DMSO、DMF或DMA(即反应混合物含有5-20%有机溶剂, v/v))的≥6摩尔当量的LP在24°C至37°C下孵育超过6h来制备具有连接体-有效负载(LP)的位点特异性抗体偶联物。通过ESI-MS监测反应进程，若不存在mAb-PEG₃-N₃，表明偶联完成。通过SEC用PBS洗脱，或通过蛋白A柱色谱法，用酸性缓冲液洗脱，然后用Tris(三羟甲基氨基甲烷, pH8.0)中和，来除去过量的LP和有机溶剂。

[0758] 在具体实施例中，在室温下，用6摩尔当量的DIBAC-PEG₄-D-Lys(COT-∞-CD)-VC-PABC-有效负载(浓度为10mg/mL的DMSO溶液)处理叠氮基官能化抗体(1mg)的0.800mL PBSg(PBS, 5%甘油, pH7.4)溶液6-12小时，并通过体积排除色谱法(SEC, Superdex 200 HR, GE

Healthcare) 除去过量的连接体有效负载 (LP)。

[0759] 终产物通过超速离心进行浓缩，并通过UV、SEC、SDS-PAGE和ESI-MS进行表征。

实施例56

[0760] 本实施例说明了制备叠氮基官能化抗体药物偶联物的方法。

[0761] 将具有人IgG1同种型的无糖基化抗体的BupHTM溶液 (pH7.6-7.8) 与≥200摩尔当量的叠氮基-dPEG₃-胺 (MW. 218.26g/mol) 混合。将所得溶液与转谷氨酰胺酶 (25U/mL; 5U MTG/mg抗体, Zedira, Darmstadt, Germany) 混合，使抗体的终浓度为0.5-3mg/mL，然后将溶液在37°C下孵育4-24小时，同时轻轻振荡。通过SDS-PAGE或ESI-MS监测反应。反应完成后，通过体积排除色谱法(参见图21)除去过量的胺和MTG，以生成叠氮基官能化的抗体。此产物在SDS-PAGE(参见图20)和ESI-MS(参见图22)上进行分析。将叠氮基-dPEG₃-胺添加至抗体的两个位点-Q295和Q297-，导致所述4DAR无糖基化的抗体-PEG₃-叠氮化物偶联物增加804Da。通过胰蛋白酶消化的重链的肽序列作图，在EEQ^{Linker}YQ^{Linker}STYR (EEQ^{连接体}YQ^{连接体}STYR) 处鉴定和确证所述4DAR叠氮基官能化抗体的耦合位点。

实施例57

[0762] 本实施例说明了使用点击化学反应来制备药物与抗体的位点特异性偶联物的方法。

[0763] 通过叠氮基官能化抗体与含炔烃的连接体-有效负载之间的[2+3]点击反应来制备位点特异性无糖基化抗体药物与下文表8中含有N297Q突变的人IgG1偶联物。如表8中所示，抗Her2-PEG₃-N₃与化合物LP1、LP2、LP3、LP4、LP5、LP6、LP7、LP8、LP9、LP10和LP11偶联。如表8中所示，抗PRLR-PEG₃-N₃与LP1、LP2、LP3、LP4、LP5、LP6、LP7、LP8、LP9、LP10、LP11、LP15和LP16偶联。如表8中所示，抗IL2Rg-PEG₃-N₃与LP4和LP7偶联。如表8中所示，抗F1d1-PEG₃-N₃与LP4偶联。

[0764] 对于所述偶联，通过将mAb-PEG₃-N₃ (1-3mg/mL) 在含水介质(例如，PBS，含有5%甘油的PBS, HBS) 中与溶解于合适有机溶剂(例如，DMSO、DMF或DMA(即反应混合物含有10-20%有机溶剂,v/v)) 的≥6摩尔当量LP在24°C至37°C下孵育超过6h来制备叠氮基官能化的无糖基化人IgG1抗体(mAb-PEG₃-N₃) 和连接体-有效负载(LP)偶联物。通过ESI-MS监测反应进程。通过ESI-MS监测反应，若不存在mAb-PEG₃-N₃，表明偶联完成。通过SEC用PBS洗脱来除去过量的LP和有机溶剂。所述纯化的偶联物通过SEC、SDS-PAGE和ESI-MS进行分析。表8中示出了来自相应LP的无毒类固醇抗体偶联物(ncADC)，它们的分子量和ESI-DAR值的列表。在表8中，Ab是指抗体，Ab-N₃是指叠氮化物官能化抗体，ncADC是指非细胞毒性抗体药物偶联物。

表8

	Ab, Ab-N ₃ 或 ncADC	MS m/z (ncADC)	LP #	M.W. (LP)	DAR (ESI-MS)
1	抗 Her2 mAb	145126			
2	抗 Her2-PEG ₃ -N ₃	145930	NH ₂ -PEG ₃ -N ₃	218.3	4
3	抗 Her2-LP1	150683	LP1	1184.4	4
4	抗 Her2-LP2	150671	LP2	1181.4	4
5	抗 Her2-LP3	151274	LP3	1330.5	4
6	抗 Her2-LP4	150406	LP4	1115.4	4
7	抗 Her2-LP5	150726	LP5	1201.5	4
8	抗 Her2-LP6	151358	LP6	1350.6	4
9	抗 Her2-LP7	151297	LP7	1226.5	4
10	抗 Her2-LP8	152239	LP8	1262.4	4
11	抗 Her2-LP9	151868	LP9	1497.7	4
12	抗 Her2-LP10	152293	LP10	1405.6	4
13	抗 Her2-LP11	145430	LP11	1511.7	4
14	抗 PRLR mAb	144579			
15	抗 PRLR-PEG ₃ -N ₃	145373	NH ₂ -PEG ₃ -N ₃	218.3	4
16	抗 PRLR-LP1	150110	LP1	1184.4	4
17	抗 PRLR-LP2	150101	LP2	1181.4	4
18	抗 PRLR-LP3	150721	LP3	1330.5	4
19	抗 PRLR-LP4	149836	LP4	1115.4	4
20	抗 PRLR-LP5	150181	LP5	1201.5	4
21	抗 PRLR-LP6	150795	LP6	1350.6	4
22	抗 PRLR-LP7	150311	LP7	1226.5	4
23	抗 PRLR-LP8	150444	LP8	1262.4	4
24	抗 PRLR-LP9	151386	LP9	1497.7	4
25	抗 PRLR-LP10	151015	LP10	1405.6	4
26	抗 PRLR-LP11	151447	LP11	1511.7	4

27	抗 IL2Rg mAb	144960			
28	抗 IL2Rg-PEG ₃ -N ₃	145768	NH ₂ -PEG ₃ -N ₃	218.26	4
29A	抗 IL2Rg-LP4	150237	LP4	1115.37	4
29B	抗 IL2Rg-LP7	150670	LP7	1226.5	4
30	抗 Fel d 1 mAb	145430			
31	抗 Fel d 1-PEG ₃ -N ₃	146235	NH ₂ -PEG ₃ -N ₃	218.26	4
32	抗 Fel d 1-LP4	150705	LP4	1115.37	4
33	抗 PRLR-LP15	155460	LP15	2515.1	4
34	抗 PRLR-LP16	155486	LP16	2515.1	4

实施例58

[0765] 本实施例说明了使用硫醇-马来酰亚胺反应来制备药物与抗体的非位点特异性偶联物的方法。

[0766] 使用与Mol Pharm. 2015 Jun 1;12(6):1863-71中所述的那些类似的方法,以两步进行抗体半胱氨酸偶联。

[0767] 在pH7.5下,单克隆抗体(mAb, 10mg/ml, 在50mM HEPES, 150mM NaCl中)用1mM二硫苏糖醇(0.006mg/mg抗体)或TCEP(2.5摩尔当量抗体)在37°C下还原30分钟。凝胶过滤(G-25, pH4.5乙酸钠)后,将化合物LP13的DMSO溶液(10mg/mL)加入到所述经还原的抗体中,并用1M HEPES(pH7.4)将混合物调节至pH7.0。使所述反应进行3-14小时。所得偶联物通过SEC进行纯化。使用测量的ncADC吸光度以及抗体与LP13的消光系数来确定DAR(UV)值。

实施例59

[0768] 本实施例说明了表征抗体和非细胞毒性抗体药物偶联物(ncADC)的方法。

[0769] 所述抗体和ncADC通过SDS-PAGE、SEC和MS(ESI)进行表征。通过其叠氮基官能化抗体(抗PRLR-PEG₃-N₃)从抗PRLR抗体生成的表8中的抗PRLR-LP4偶联物,通过在非还原和还原条件下进行的SDS-PAGE(图20)、SEC(图21)和ESI-MS(图22)进行表征,证明了ncADC形成的完成。

[0770] SDS-PAGE用于分析ADC的完整性和纯度。

[0771] 在其中一种方法中,SDS-PAGE运行条件包括非还原和还原样品(2-4μg)以及BenchMark预染色蛋白质梯(BenchMark Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen, 目录号10748-010; L#1671922),每泳道加载(1.0mm x10孔)Novex4-20%Tris-甘氨酸凝胶,并在180V、300mA下运行80分钟。使用Novex Tris-甘氨酸SDS缓冲液(2X)(Invitrogen, 目录号LC2676)来制备分析样品,并用含有10%2-巯基乙醇的SDS样品缓冲液(2X)来制备所述还原样品。

[0772] 在图20中示出了在非还原和还原条件下进行的SDS-PAGE上的抗体和ncADC的分子量。由于相对较小的质量变化百分比,在非还原条件下质量变化不明显。然而,重链的质量从裸抗体增加至叠氮基官能化抗体,并进一步增加至ncADC偶联物。未发现可检测到的交联物质。

[0773] 如图20所示,基于表9中的以下泳道标记,SDS-PAGE泳道包括以下物种。

表9

泳道	样品
1	标准品(测定基准点 (Bench Mark) 10 μ L)
2	抗 PRLR 抗体
3	抗 PRLR 抗体-NH-PEG ₃ -N ₃
4	抗 PRLR 抗体-LP4
8	抗 PRLR 抗体 (经还原的)
9	抗 PRLR 抗体 NH-PEG ₃ -N ₃ (经还原的)
10	抗 PRLR 抗体-LP4 (经还原的)
$\sim 2 \mu\text{g}$ 非还原的/还原的样品/泳道。	

[0774] 通过体积排除色谱法 (SEC) 来分析ADC的纯度。

[0775] 为了测定抗体药物偶联物的纯度,采用体积排除色谱法。使用Waters 600仪器,在Superdex 200 (1.0x30cm) HR柱上,使用PBS pH 7.4以0.80mL/min的流速进行分析性SEC实验,并使用Waters 2998 PDA在 λ 280下进行监测。分析样品由200 μ L PBS (pH 7.4) 和30-100 μ L测试样品组成。使用来自GE Healthcare的AKTA仪器,在Superdex 20AP G (2.6x60cm) 柱上,以2mL/min的流速,用pH7.4的PBSg洗脱,进行制备性SEC纯化,并在 λ 280nm处监测。图21中的SEC结果表明单体mAb及其偶联物的典型保留时间,并且未发现可检测到的聚集或降解。

[0776] 抗体和ADC经LC-ESI-MS通过完整质量分析进行分析。

[0777] 通过LC-ESI-MS来测定ncADC样品的完整质量以确定药物-有效负载分布曲线,并计算完整ADC形式的平均DAR。将每个测试样品 (20 - 50ng, 5 μ L) 上样到Acquity UPLC ProteinBEHC4柱 (10K psi, 300 Å, 1.7 μ m, 75 μ m × 100mm; 目录号186003810) 上。脱盐3分钟后,对蛋白质进行洗脱,并通过WatersSynaptG2-Si质谱仪(Waters) 获得质谱。

[0778] 如图22中所示,解卷积质谱示出了分子量为144579.0Da的无糖基化抗PRLR抗体的主要峰,并且其叠氮基官能化抗PRLR抗体的主要峰具有145373.0Da的分子量,表明与其无糖基化的亲本抗体相比增加了794.0Da (对应于与每种无糖基化抗体偶联的4个氨基-PEG₃-叠氮化物)。此外,抗PRLR-LP4偶联物的主要峰具有149836.0Da的分子量,表明与其无糖基化的亲本抗体 (对应于与每种无糖基化抗体偶联的4个LP4) 相比增加了4463Da。如表8所示,本发明中的大多数位点特异性ADC均具有4DAR。

[0779] 对于非位点特异性抗体药物偶联物,基于ESIQ-TOF质量分析来确定DAR值。使用最大熵算法 (Maximum Entropy algorithm, MassLynx), 将ESIQ-TOF质谱解卷积为零电荷质谱。所得质谱证明了每种药物偶联的抗体的分布。峰面积百分比表示特定载药抗体种类的相对分布。使用峰面积信息百分比和抗体上的药物载量数来计算平均DAR。

实施例60

[0780] 本实施例使用LanthaScreen TR-FRET GR竞争性结合试验证明,本发明所述的有效负载类固醇类化合物与糖皮质激素受体(GR)结合。

[0781] 为了评估新型类固醇类化合物结合糖皮质激素受体(GR)的能力,使用LanthaScreen TR-FRET GR竞争性结合试验试剂盒(Life Technologies,目录号A15901)进行无细胞结合试验。根据制造商的说明书进行测定试验。布地奈德是商业GR类固醇,并且在结合测定试验和本发明后面所述的其他基于细胞的测定试验中用作参考对照。简言之,从100nM(最终浓度的100倍)开始,在100%DMSO中制备布地奈德和下述衍生化合物的三倍连续稀释液。将连续稀释液在具有5mM DTT和0.1mM稳定肽的核受体缓冲液F中进一步稀释50倍,并转移至384孔测定板中。接下来,将Fluormone GS1 Green、GR-LBD(GST)和Tb抗GST抗体依次加至384孔测定板中。然后将板在室温下孵育2.5小时,同时进行避光处理。所述板在Envision多标记微孔检测仪(Envision Multilabel Plate Reader,PerkinElmer)上进行分析,激发设定在340nm处,发射滤光器设定在520nm和486nm处。FRET比计算为520nm/486nm。 IC_{50} 值是使用四参数逻辑方程在12点响应曲线(GraphPad Prism)上进行测定。

[0782] 如表10中所示,布地奈德在GR测定试验中竞争结合Fluormone GS1 Green,其 IC_{50} 值在10至100nM之间。布地奈德的N-类似物类似地竞争结合,其 IC_{50} 值范围从小于10nM至大于100nM。本发明测试的新型类固醇类化合物在此测定试验中,与布地奈德相比,表现出与其相当或更好(较低的 IC_{50} 值)的活性,并且GR配体具有相似的置换。22R-异构体通常比22S-异构体更有效或至少与22S-异构体效力相同。

表10:无细胞结合和基于细胞的功能活性

	化合物编号	HEK293/9xUAS-Luc2P/pBind-GR/PRLR-H A 高细胞 EC ₅₀ (nM)		GR 竞争性结合试验 IC ₅₀ (nM)
1	布地奈德	+++	完全激活	++
2	二氟拉松	+++	完全激活	++
3	7-1 S	+	部分激活	+++
4	7-1 R	+++	完全激活	++
5	7-2S/R	+++	无激活	+++
6	7-4 S/R	+	无激活	+++
7	8-1 R	++	完全激活	NT
8	8-2 S/R	+	无激活	+++
9	8-3 S/R	+	无激活	+++
10	11-1 S/R	+++	完全激活	++
11	11-2 S/R	+	完全激活	++
12	11-3 S/R	++	部分激活	+++
13	11-5 S/R	+++	完全激活	++
14	11-5 S	+++	完全激活	++
15	11-5 R	+++	完全激活	++
16	11-6 S	+++	完全激活	++
17	11-6 S/R	++	完全激活	++
18	11-7 R	++	完全激活	++
19	11-8 R	+++	完全激活	++
20	11-10 S/R	+	无激活	+++
21	11-11 S/R	+	无激活	+++
22	11-12 S/R	+++	完全激活	++
23	11-13 R	+++	完全激活	+++
24	11-14 S/R	+++	完全激活	+++
25	11-15 S/R	++	部分激活	+++
26	11-17 S/R	++	完全激活	+++
28	11-19 S/R	+++	完全激活	+++
29	11-20 S/R	+	无激活	+++
30	11-21 S/R	++	部分激活	+++
31	14-2	+	无激活	+++
32	15-5	++	完全激活	++
33	16-5	++	完全激活	++

+++ : ≤10nM; ++ : ≤100nM>10nM; + : >100nM; NT: 未测试。

完全激活: 布地奈德诱导的>75%的倍数激活。部分激活: 布地奈德诱导的(20%, 75%)的倍数激活。无激活: 布地奈德诱导的<20%的倍数激活。无细胞试验用于评估化合物与重组GRLBD的直接结合, 无论其渗透性如何。基于细胞的试验用于测定化合物在通过质膜后如何激活细胞内GR介导的转录, 因此化合物的膜渗透性是活性的先决条件。

实施例61

- [0783] 本实施例阐明了PRLR-ncADC被内化到HEK293/PRLR细胞中。
- [0784] 在工程化表达全长人PRLR的HEK293细胞中评估抗PRLR抗体和同种型对照抗体的内化(登录号NP_000940.1的氨基酸1至622, 具有K2E突变; HEK293/PRLR)。还评估了HEK293

亲本细胞作为阴性对照。将细胞以20,000个细胞/孔接种在完全培养基中，并在37℃下孵育过夜。次日，用PBS清洗孔，并置于冰上。将0.1-100nM的抗体连续稀释液加入到具有2%FBS的PBS溶液的适当孔中，并在冰上孵育30分钟。细胞用PBS清洗两次，然后与Alexa488偶联的Fab片段山羊抗hIgG (Jackson Immunoresearch, 目录号109-547-003)一起在冰上孵育30分钟。细胞用PBS清洗两次，然后在3.7%甲醛的PBS溶液中固定(4℃对照条件)或在37℃下孵育3小时，以使其内化。孵育3小时后，将细胞在3.7%甲醛的PBS溶液中固定15分钟，用PBS清洗，并在Molecular Devices ImagExpress MicroXL上成像。

[0785] 将抗PRLR-ncADC和亲本PRLR抗体内化到HEK293/PRLR细胞中，而同种型对照ncADC和同种型对照亲本抗体均未被内化，因为它们不与测试的细胞系上发现的蛋白质结合。对于任何测试样品，在HEK293亲本细胞中未观察到内化。

实施例62

[0786] 本发明所述的生物测定法用于评估游离类固醇类化合物和抗PRLR-ncADC的功效。在其中一个实施例，所述生物测定法在位点特异性抗PRLR-GC类固醇ADC内化到细胞中之后，以结合pBIND-GR以及随后的荧光素酶报告基因激活，评估类固醇类化合物的活性。对于此测定试验，将293细胞系工程化以表达人全长PRLR。然后用嵌合受体进一步转染此种稳定的细胞系，所述嵌合受体由与酵母Ga14 DNA结合结构域(pBind-GR, Promega目录号E1581)融合的GR配体结合结构域和Ga14上游激活因子序列(9xGa14UAS-Luc2P)组成，所述Ga14上游激活因子序列驱动荧光素酶基因表达。此种测定形式提供高灵敏度以及与其他核受体的低交叉反应性。由于两个载体一起作为整体用于监测GR配体结合和反式激活，因此为了简便起见，将所得稳定细胞系在本发明中称为293/PRLR/GRE-Luc (参见Improved Dual-Luciferase Reporter Assays for Nuclear Receptors, Current Chem Genomics, 2010; 4:43-49; Aileen Paguio, Pete Stecha, Keith V Wood和Frank Fan)。

[0787] 在第二实施例中，生物测定法评估了游离类固醇类化合物的功效以及抗PRLR-ncADC的任何非特异性活性。对于此测定试验，用pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro]载体(目录号E1360, Promega)转染293细胞系。所得细胞系在本发明中称为293/MMTV-Luc。

实施例63

[0788] 使用基于糖皮质激素受体(GR)共激活因子荧光素酶报告基因细胞的测定试验，通过布地奈德和本发明所述的类固醇类化合物与时间的函数关系来分析GR激活。

[0789] 孵育72小时后，研究293/PRLR/GRE-Luc细胞中类固醇类化合物的活性。对于此测定试验，将20,000个细胞接种在含有补充有10%FBS和青霉素/链霉素(完全培养基)的DMEM的培养基的96孔板中，并在37℃、5%CO₂下生长过夜。对于游离药物或ncADC剂量响应曲线，向细胞中加入100nM至5.1pM的连续稀释的试剂，并在37℃下孵育72小时。通过添加One-GloTM试剂(Promega, 目录号E6130)来测定荧光素酶活性，并在Victor光度计(Perkin Elmer)上测定相对光单位(RLU)。使用GraphPad Prism在10点响应曲线上，由四参数逻辑方程测定EC₅₀值。所述类固醇类化合物的递送将导致293/PRLR/GRE-Luc细胞中Luc报告基因的激活。

[0790] 如表11所示，在72小时时间点处，布地奈德激活293/PRLR/GRE-Luc细胞，其IC₅₀值在10至100nM之间。布地奈德的N-类似物激活293/PRLR/GRE-Luc细胞，其具有相似的倍数激活和IC₅₀值，范围从小于10nM至大于100nM。

实施例64

- [0791] ADC在靶细胞系中的选择性GR激活。
- [0792] 在293/PRLR/GRE-Luc细胞系以及293/MMTV-Luc细胞(其不表达如实施例61中所述的PRLR),和293/PRLR细胞(其不表达实施例62中所述的荧光素酶报告基因)中内化后,在孵育72小时时,使用实施例63中概述的测定方法,在100nM至5.1pM的浓度下研究所述类固醇类化合物和所述类固醇ncADC的活性。
- [0793] 在两种类型的细胞系中研究PRLR-LP4偶联物(如表8中所示)及其同种型对照偶联物,以及游离有效负载和未偶联的抗体。所述PRLR-LP4偶联物(表8中的抗PRLR-LP4)证明了293/PRLR/GRE-Luc细胞系的选择性激活(图23A),并且293/MMTV-Luc细胞中没有GR激活(图23B),其不表达PRLR。
- [0794] 如图23A所示,在293/PRLR/GRE-Luc细胞中,具有与LP4位点特异性偶联的抗PRLR抗体(表8中的抗PRLR-LP4)诱导完全的GRE-Luc激活,其EC₅₀值<10nM。与LP4偶联的同种型对照抗体(表8中的抗Her2-LP4)不诱导显著的GRE-Luc激活。未偶联的同种型对照抗体不诱导显著的GRE-Luc激活。表1中的游离有效负载11-5(LP4的有效负载)诱导完全的GRE-Luc激活,EC₅₀<10nM。参比对照布地奈德诱导完全的GRE-Luc激活,EC₅₀<10nM。如图23B所示,在293/MMTV-Luc细胞中,仅有表1中的游离有效负载11-5(LP4的有效负载)和参考对照布地奈德诱导GRE-Luc激活:表1中的11-5(LP4的有效负载)诱导完全的GRE-Luc激活,其EC₅₀值在10至100nM之间,布地奈德诱导完全的GRE-Luc激活,EC₅₀值在10至100nM之间。

[0795] 本发明实施例证明了表8中的抗PRLR-LP4特异性激活表达靶PRLR和类固醇诱导的GRE荧光素酶报告基因的293/PRLR/GRE-Luc细胞,但对类固醇响应性293-MMTV-Luc细胞系或表达293-PRLR细胞系的靶标没有影响。

实施例65

- [0796] 在本实施例中检测了连接体和有效负载对ncADC的GR激活的贡献。
- [0797] 在孵育72小时时,使用实施例63中概述的测定方法,在100nM至5.1pM的浓度下研究游离类固醇类化合物及其相应的ncADC在293/PRLR/GRE-Luc细胞系中内化后的活性。
- [0798] 如表11中所示并且如图24中所示,在293/PRLR/GRE-Luc细胞中,位点特异性地与LP4偶联的抗PRLR抗体(表8中的抗PRLR-LP4)诱导完全的GRE-Luc激活,在72小时时,其EC₅₀<10nM。与LP4偶联的同种型对照抗体(表8中的抗Her2-LP4)不诱导显著的GRE-Luc激活。表1中的游离有效负载11-5(LP4的有效负载)诱导完全的GRE-Luc激活,EC₅₀<10nM。
- [0799] 与LP2位点特异性偶联的抗PRLR抗体(表8中的抗PRLR-LP2)诱导完全的GRE-Luc激活,EC₅₀<10nM。与LP2偶联的同种型对照抗体(表8中的抗Her2-LP2)不诱导显著的GRE-Luc激活。表1中的游离有效负载16-5(LP2的有效载荷)诱导完全的GRE-Luc激活,EC₅₀<10nM。最后,与LP1特异性偶联的抗PRLR抗体(表8中的抗PRLR-LP1)诱导完全的GRE-Luc激活,其EC₅₀在10-100nM之间。与LP1偶联的同种型对照抗体(表8中的抗Her2-LP1)不诱导显著的GRE-Luc激活。表1中的游离有效负载7-1R(LP1的有效负载)诱导完全的GRE-Luc激活,其EC₅₀在10-100nM之间。
- [0800] 本实施例证明,使用相同的抗体和连接体,表1中有效负载11-5(LP4的有效负载)的效力大于表1中有效负载16-5(LP2的有效负载)的效力,而所述有效负载16-5(LP2的有效负载)的效力大于表1中7-1R(LP1的有效负载)的效力。表8中的抗PRLR-LP4具有比表8中的

抗PRLR-LP2更高的效力,而所述抗PRLR-LP2具有比表8中的抗PRLR-LP1更高的效力。

表11:连接体-有效负载在293/PRLR/GRE-Luc细胞中测试的类固醇ncADC的GR激活中的贡献

测试样品	倍数激活	EC ₅₀ (nM)
抗PRLR-LP1	完全激活	++
抗PRLR-LP2	完全激活	+++
抗PRLR-LP4	完全激活	+++
抗Her2-LP1	NA	NA
抗Her2-LP2	NA	NA
抗Her2-LP4	NA	NA
7-2 (LP1有效负载)	完全激活	++
16-5 (LP2有效负载)	完全激活	+++
11-5 (LP4 有效负载)	完全激活	+++
布地奈德	完全激活	+++

NA=不适用;+++: $\leqslant 10\text{nM}$;++:10-100nM;+: $>100\text{nM}$ 。

实施例66

[0801] 用HEK293/MMTV-luc/IL2R γ /IL7R细胞进行IL2R γ -ncADC生物测定

[0802] 常见的细胞因子受体 γ 链,也称为IL2R γ 和CD132,是I型细胞因子受体,其对于白细胞介素-2(IL-2)、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、和IL-21的信号传导途径是共同的,并在免疫系统的形成和调节中起重要作用(Rochmanetal.2009)。IL2R γ 主要在免疫细胞上表达,因此可作为通过非细胞毒性抗体-药物偶联物(ncADC)递送免疫抑制药物如类固醇类化合物的有用靶标,并抑制免疫细胞活性,同时避免与全身性使用类固醇相关的脱靶副作用。

[0803] 本发明所述的基于细胞的测定试验用于检测糖皮质激素受体(GR)的转录激活,其通过ncADC与已用于研究GR激活的鼠乳腺肿瘤病毒长末端重复(MMTV LTR)区域进行(Deroo et al.2001)。首先生成HEK293细胞系以稳定表达荧光素酶报告基因pGL4.36[1uc2P/MMTV/Hygro](Promega,#E136A),在本发明中称为HEK293/MMTV-luc,并保持在含有10%FBS、NEAA、青霉素/链霉素/L-谷氨酰胺和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素(完全培养基)的DMEM中。然后用编码全长人IL2R γ (表达氨基酸1-369,登录号NP_000197.1)的质粒转染亲本HEK293/MMTV-luc稳定细胞系,并用编码全长IL7Ra(表达氨基酸1-459,登录号NP_002176.2)的质粒转导,并通过流式细胞术分选IL2R γ 和IL7Ra的高表达。将所得细胞系,本发明中也称为HEK293/MMTV-luc/IL-2R γ /IL7R,保持在补充有1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素和500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418硫酸盐的完全培养基中。

[0804] 对于所述生物测定,将HEK293/MMTV-luc或HEK293/MMTV-luc/IL2R γ /IL7R细胞以10,000个细胞/孔接种到96孔测定板上的完全培养基中,并在37°C下、在5%CO₂中孵育过

夜。次日清晨,测试GR激活,布地奈德、表1中的化合物11-5(LP4有效负载)和表1中的化合物16-5(LP2有效负载)、抗IL2R γ -LP4偶联物(表8中所示)、对照抗体(表8中的同种型对照)以及裸抗体均以1:3从200nM-1μM连续稀释至0.002-0.01nM,并加至细胞中。根据ncADC的药物与抗体比值和本领域技术人员已知的其他技术来调节浓度。不含任何测试样品的一个孔也被包括作为对照。

[0805] 在VictorX仪器(Perkin Elmer)上在37°C、5%CO₂下孵育6、24、48和72小时后,测定荧光素酶活性。采用Prism6软件(GraphPad)使用非线性回归(4-参数逻辑)来分析结果,以得到EC₅₀值。通过测定每个样品的荧光素酶活性与未添加任何测试样品时所观察到的荧光素酶活性的比例来计算倍数激活。

[0806] 如表12中所示,孵育6、24和48小时后,布地奈德显示出最高的GR激活和完全激活;表1中的16-5(LP2有效负载)和表1中的11-5(LP4有效负载)显示出部分激活。在72小时的较长孵育时间中,表1中的16-5(LP2有效负载)和表1中的11-5(LP4有效负载)显示出与完全激活的布地奈德相似的GR激活水平。这些结果表明表1中的布地奈德、16-5(LP2有效负载)和11-5(LP4有效负载)激活GR,其EC₅₀在10-100nM之间。

表12:在6、24、48或72小时时,布地奈德、表1中的11-5或表1中的16-5激活HEK293/MMTV-luc/IL-2R γ /IL7R细胞中的糖皮质激素受体

取样点	6 小时		24 小时		48 小时		72 小时	
	药物	倍数激活	EC ₅₀ [nM]	倍数激活	EC ₅₀ [nM]	倍数激活	EC ₅₀ [nM]	倍数激活
布地奈德	完全激活	++	完全激活	++	完全激活	++	完全激活	++
表1中化合物 11-5	部分激活	+	部分激活	+	部分激活	++	完全激活	++
表1中化合物 16-5	部分激活	+	部分激活	+	部分激活	++	完全激活	++

+++: \leqslant 10nM;++:10-100nM;+:>100nM。

[0807] 布地奈德,连接体-有效负载LP4(有效负载11-5)和连接体-有效负载LP7(有效负载R-11-5),与LP4和LP7偶联的抗-IL2R γ 、抗-IL2R γ mAb-ncADC(也被称为抗-IL2R γ -LP4和抗IL2R γ -LP7),以及对照mAb-LP7和未偶联的抗IL2R γ mAb,加至HEK293/MMTV-Luc/IL2R γ /IL7R细胞中并孵育24小时(A)、48小时(B)、72小时(C),或加至HEK293/MMTV-Luc细胞中孵育72小时(D),其最大浓度为200nM(RLU,相对光单位),如图25和表13中所示。

[0808] 如表13.1和图25所示,孵育24小时后,布地奈德在HEK293/MMTV-Luc/IL2R γ /IL7R细胞中显示出最高的最大倍数激活,并且与布地奈德相比,11-5和R-11-5显示出相对较低的激活水平(图25A)。对于48和72小时的较长孵育时间,11-5和R-11-5显示出与布地奈德相似的激活水平(图25B和图25C)。

[0809] 在孵育24小时后,抗IL2R γ -LP4和抗IL2R γ -LP7在HEK293/MMTV-Luc/IL2R γ /IL7R细胞中显示出很少或没有激活(图25A),但在48小时和72小时的更长孵育时间时,显示出更高水平的激活(图25B和25C)。所述抗IL2R γ -ncADC、抗-IL2R γ -LP4和抗-IL2R γ -LP7

在HEK293/MMTV-Luc细胞中未显示出任何激活(图25D),表明类固醇类化合物的ncADC递送依赖于与细胞表面上的IL2R γ 抗原的结合和随后的内化。相反,未偶联的抗IL2R γ 抗体、未偶联和偶联的同种型对照抗体在任何条件下均未显示出任何显著的激活。在孵育72小时时,布地奈德、11-5和R-11-5在HEK293/MMTV-Luc中显示出激活,表明GR被游离药物激活(图25D)。

[0810] 表13.1:类固醇类有效负载和抗IL2R γ -类固醇ADC以及对照ADC在HEK293/MMTV-Luc/IL-2R γ /IL7R中的糖皮质激素受体激活

治疗	最大倍数激活		
	24 小时时	48 小时时	72 小时时
抗 IL2R γ -LP4	NA	+	++
抗 IL2R γ -LP7	NA	+	++
有效负载 LP4 (11-5)	+	++	+++
有效负载 LP7 (R-11-5)	+	++	+++
布地奈德	+++	+++	+++
对照 Ab-LP7	NA	NA	NA

+++: $\leqslant 10\text{nM}$;++:10-100nM;+:>100nM。

实施例67

[0811] 本实施例示出了含有和不含环糊精连接体的细胞毒性ADC的生物活性(图30)。

[0812] 为了评估具有和不具有CD的ADC的可比性,所述CD含细胞毒性有效负载,使用SKBR3细胞进行细胞毒性测定试验。SKBR3细胞通常用于评估抗Her2 ADC活性。在PRBR3细胞毒性测定试验中,抗PRLR ADC已被用作对照mAb ADC。对于所述测定试验,使用CellTiter-Glo测定试剂盒(Promega,目录号G7573)来评估抗PRLR ADC的体外细胞毒性,其中存在的ATP的量用于确定培养物中存活细胞的数量。对于所述测定试验,将SKBR3细胞以6000个细胞/孔接种在Nunclon white 96孔板上的完全生长培养基中,并在37°C、5%CO₂中生长过夜。对于细胞活力曲线,将1:4连续稀释的ADC或游离有效负载以100nM开始的浓度,包括无处理对照,加至细胞中,然后孵育5天。孵育5天后,将细胞在室温下与100μL CellTiter-Glo试剂一起孵育5分钟。在Victor读板器(Victor plate reader,PerkinElmer)上测定相对发光单位(RLU)。通过10点响应曲线(GraphPad Prism)上的四参数逻辑方程来确定IC₅₀值。所有曲线和EC₅₀值均针对有效负载当量进行了校正。所有IC₅₀值均以nM浓度和报告的最高测试浓度的细胞杀伤百分比(杀伤%)表示。

[0813] 含有和不含环糊精连接体的类固醇ADC的生物活性如图30所示。

[0814] 为了测试具有和不具有CD的ADC的可比性,所述CD含类固醇有效负载,在孵育72小时时,研究它们在293/PRLR/GRE-Luc细胞中的活性。对于此测定试验,将20,000个细胞接种在含有DMEM的培养基的96孔板中,所述DMEM补充有10%FBS和青霉素/链霉素(完全培养基),并在37°C下、在5%CO₂中生长过夜。对于游离药物或ADC剂量响应曲线,将连续稀释的试剂(100nM至5.1pM)加至细胞中,并在37°C下温育72小时。通过添加One-GloTM试剂(Promega,目录号E6130)来测定荧光素酶活性,并在Victor光度计(Perkin Elmer)上测定相对光单位(RLU)。使用GraphPad Prism在10点响应曲线上由四参数逻辑方程来确定EC₅₀值。类固醇类化合物的递送将导致293/PRLR/GRE-Luc细胞中Luc报告基因的激活。此测定试

验中的完全激活定义为采用游离有效负载测定的最大激活的90%和100%之间的激活。此测定试验中的部分激活定义为采用游离有效负载测定的最大激活的10%和90%之间的激活。此测定试验中的最小激活定义为小于采用游离有效负载测定的最大激活的10%的激活。

[0815] 如表13.2和图30所示,含有CD的抗PRLRAbADC(抗PRLR Ab-Ex46)与不含CD的抗PRLR Ab ADC(抗PRLRAb-Ex44)在293/PRLR/GRE-Luc细胞中激活GRE-Luc报告基因,两者具有相似的功效和效力。在此测定试验中,同种型对照ADC,无论它们是否含有CD,以及未偶联的抗体,在此测定试验中未显示出任何显著的作用。

表13.2:含有或不含环糊精连接体的类固醇类ADC在293/PRLR/GRE-LUC细胞中的GR激活

测试分子	最大激活	EC ₅₀ (nM)	测试分子	最大激活	EC ₅₀ (nM)
抗 PRLR Ab-Ex46	部分激活	8.6	同种型对照 Ab-Ex46	最小激活	NA
抗 PRLR Ab-Ex45	部分激活	9.5	同种型对照 Ab-Ex45	最小激活	NA
游离有效负载(化合物 1c)	完全激活	8.4	抗 PRLR Ab	最小激活	NA

NA=不适用

表14. 连接体-类固醇类化合物的化学物理性质

条目	MF	MW	cLogP	HPLC 纯度 (%)	HPLC RT (min)	MS (m/z) 100%	最高 m/z 峰
LP101	C ₆₀ H ₈₄ F ₂ N ₈ O ₁₃	1163.35	4.04	100	7.07 (B)	1163.6 (M+H)	1163.6 (M+H)
LP102	C ₅₅ H ₇₅ F ₂ N ₅ O ₁₁	1020.21	5.41	> 99	8.44 (A) 8.47 (B)	510.8 (M/2+H)	1020.3 (M+H) (33%)
LP103	C ₆₆ H ₈₈ F ₂ N ₈ O ₁₄	1255.45	5.9	> 99	8.46 (A)	1255.5 (M+H)	1255.5 (M+H)
LP104	C ₁₂₆ H ₁₇₇ F ₂ N ₁₃ O ₄₉	2695.81	-5.09	> 99	6.23 (B)	899.2 (M/3+H)	1348.6 (M/2+H) (40%)
LP105	C ₁₁₈ H ₁₇₆ F ₂ N ₁₂ O ₄₉	2584.71	-5.21	> 99	7.37 (A) 7.41 (B)	1293.6 (M/2+H)	1293.6 (M/2+H)
LP108	C ₁₂₁ H ₁₆₈ F ₂ N ₁₀ O ₄₇	2552.66	-3.72	> 99	7.76 (B)	851.4 (M/3+H)	1276.8 (M/2+H) (83%)
LP110	C ₁₃₂ H ₁₈₁ F ₂ N ₁₃ O ₅₀	2787.9	-3.23	> 99	7.94(A) 8.02 (B)	930.3 (M/3+H)	1394.2 (M/2+H) (33%)
LP112	C ₇₄ H ₉₄ F ₂ N ₈ O ₁₇	1405.60	4.39	> 99	7.40 (B)	703.5 (M/2+H)	703.5 (M/2+H)
LP113	C ₅₄ H ₇₄ N ₄ O ₁₅	1019.18	3.46	100	7.46 (B)	510.3 (M/2+H)	1041.3 (M+Na) (10%)
LP114	C ₇₀ H ₈₇ F ₂ N ₅ O ₁₆	1292.46	5.61	99	9.18 (A) 9.22 (B)	1292.1 (M+H)	1292.1 (M+H)
LP115	C ₆₉ H ₈₄ F ₃ N ₅ O ₁₅	1280.42	5.91	100	8.34 (B)	1279.6 (M+H)	1279.6 (M+H)
LP116	C ₈₀ H ₉₈ F ₂ N ₈ O ₁₈	1497.70	6.25	99	7.99 (B)	1498.7 (M/2+H)	1498.7 (M+H) (10%)

表15. 连接体-类固醇类化合物的物理性质

LP #	结构		cLogP	MW
	有效负载	连接体		

	结构式	切割片段 L3	亲水片段 L2	偶联连接体 L1		
LP112		vcPAB	/	Lk-DIBAC	4.39	1405.58
LP101		vcPAB	/	LkCCK	4.04	1163.35
LP104		vcPAB	aCDCCK	Lk-DIBAC	-5.09	2695.81
LP105		vcPAB	aCDCCK	Lk-BCN	-5.21	2584.71
LP102		VA	/	Lk-CCK	5.41	1020.2
LP108		VA	aCDCCK	Lk-DIBAC	-3.72	2552.66
LP116		vcPAB	/	Lk-DIBAC	6.25	1497.67
LP103		vcPAB	/	LkCCK	5.90	1255.5
LP110		vcPAB	aCDCCK	Lk-DIBAC	-3.23	2787.9
LP113		VA	/	Lk-MAL	3.46	1019.18
LP114		VA	/	Lk-DIBAC	5.61	1292.46
LP115		VA	/	Lk-DIBAC	5.91	1280.42

表16.位点特异性类固醇-抗体偶联物列表

LP		Ab, Ab-N3, 或 Ab-类固醇偶联物		
实例	MS m/z	名称	MW (Da)	DAR
		抗 PRLR Ab	144602	4.0
PEG ₃ -N ₃	218.3	抗 PRLR-Ab-N ₃	145385	3.9
LP112	1405.6	抗 PRLR Ab-LP12z	151015	4.0
LP104	2695.9	抗 PRLR Ab-LP4z	156198	4.0
LP116	1497.7	抗 PRLR Ab-LP16z	151015	4.0

		抗 Fel D1 Ab		
PEG ₃ -N ₃	218.3	抗 Fel D1 Ab-N3z	146251	4
LP112	1405.6	抗 Fel D1 Ab-LP12z	151871	3.9
LP116	1497.7	抗 Fel D1 Ab-LP16z	152235	3.9

实施例68

[0816] 本实施例涉及表2和图31中的化合物。

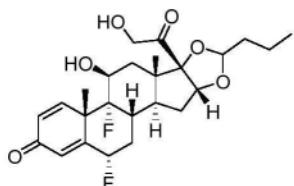
[0817] 商业类固醇类化合物包括氟轻松(1a),地塞米松(1c),氟米松(1d),曲安西龙(triamcinolone,1e)和甲基泼尼松龙(1f),和曲安奈德(1g),其均用作起始物料。化合物1b是由1a通过在高氯酸存在下与丁醛进行缩酮交换制备得到,并且其两种手性异构体由手性SFC分离得到。采用相同的方法,由1g制备得到化合物1h。将化合物1b-f和1h转化为相应的甲磺酸酯衍生物(2b-f,2h),然后用叠氮基团部分替换甲磺酸酯基团,形成化合物3b-f和3h,其进一步还原成胺类化合物(4b-f,4h)。化合物2b中的甲磺酸酯部分也被苯胺类化合物替换,得到5-Iz,而用烷基胺类化合物替换,得到5-II,用酚类化合物替换,得到6-I至6-III。通过用4-氨基-苯酚替换地奈德的甲磺酸酯得到化合物6-VI,和用4-氨基-苯酚替换2f中的甲磺酸酯得到6-VII。

实施例69

[0818] 化合物1b、R-1b、S-1b、和1h的合成。

[0819] 本实施例涉及表2和图31中的化合物。

[0820] (1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-8-(2-羟基乙酰基)-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(1b)

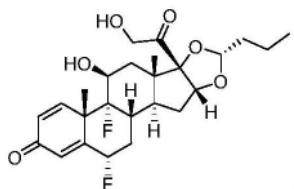


[0821] 在10℃下,向氟轻松(1a,0.90g,2.0mmol)和硅胶(18g)的庚烷(90mL)混合物中加入丁醛(0.27mL,3.0mmol),悬浮液在10-20℃下搅拌10分钟。在0℃下,向混合物中滴加高氯酸(70%,0.68mL,8.3mmol)。然后将反应混合物在10-20℃搅拌过夜。根据TLC和LCMS确定大多数化合物1a被耗尽。将反应混合物用石油醚稀释,并用饱和碳酸钠水溶液淬灭。将悬浮液过滤,所得固体用DCM/甲醇(v/v=1)洗。合并的滤液真空浓缩。残余物经快速色谱法(0-100%乙酸乙酯的石油醚溶液)纯化,得到化合物1b(0.15g,16%收率)为白色固体。ESIm/z:467.1(M+H)⁺。化合物1b经制备型HPLC(方法B)进一步纯化,得到化合物R-1b(40mg,39%收率)和S-1b(10mg,9%收率)为白色固体。ESIm/z:467(M+H)⁺。

[0822] (1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-8-(2-羟基乙酰基)-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(R-1b)

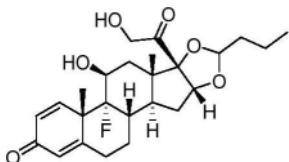
[0823] 采用EP0262108A1(其全部内容通过引用其整体并入本发明用于所有目的)中的某些方法和/或中间体。

[0824] 化合物R-1b是



[0825] ^1H NMR (400MHz, MeOD_{d4}) δ 7.34 (dd, $J=10.1, 1.3\text{Hz}$, 1H), 6.37-6.32 (m, 2H), 5.65-5.48 (m, 1H), 4.63 (t, $J=4.3\text{Hz}$, 1H), 4.55 (d, $J=19.4\text{Hz}$, 1H), 4.33-4.28 (m, 2H), 2.74-2.59 (m, 1H), 2.38-2.32 (m, 1H), 2.26-2.16 (m, 2H), 1.70-1.41 (m, 12H), 0.97-0.93 (m, 6H) ppm。分析型HPLC:>99.9%，保留时间:8.05min(方法A)。

[0826] (1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S)-12-氟-11-羟基-8-(2-羟基乙酰基)-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(1h)



[0827] 根据制备化合物1b的方法,将化合物1g (1.3g, 3.0mmol) 转化为化合物1h (1.1g, 85%收率),为白色固体。ESI m/z :449 ($M+1$)⁺。

实施例70

[0828] 用于合成图31中的甲磺酸酯类化合物(Ms)2的一般方法A:

[0829] 本实施例涉及表2和图31中的化合物。

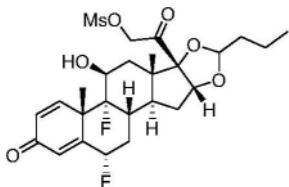
[0830] 在0℃下,向化合物1 (1c,1d,1e,1f或1h,1当量) 的吡啶 (10mL/g的化合物1) 溶液中滴加4-二甲氨基吡啶 (2当量) 和甲磺酰氯 (1.5当量)。在室温下搅拌2小时并通过LCMS监测反应,直至化合物1 (1c,1d,1e,1f或1h,1当量) 完全耗尽,将所得混合物倒入乙酸乙酯 (100mL) 中。混合物用稀释的盐酸水溶液 (1N) 洗至pH=7,然后用盐水洗,经硫酸钠干燥,浓缩。粗产物经快速色谱法 (0-2%MeOH的DCM溶液) 纯化,得到化合物2 (2c,2d,2e,2f或2h,1当量)。

实施例71

[0831] 本实施例涉及表2和图31中的化合物。

[0832] 2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙基甲磺酸酯(2b)

[0833] 本实施例涉及表2和图31中的化合物。



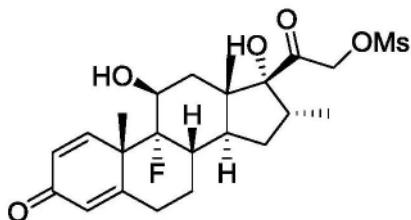
[0834] 向化合物1b (0.28g, 0.65mmol)) 的DCM (3mL) 溶液中加入三乙胺 (0.13g, 1.3mmol) 和甲磺酰氯 (89mg, 0.78mmol)。在0℃下搅拌半小时,直至根据TLC确定化合物1b耗尽,将反应混合物真空浓缩。残余物在硅胶上经硅胶柱色谱法 (0-50%乙酸乙酯的石油醚溶液) 纯化,得到化合物2b (0.26g,>99%收率) 为白色固体。ESI m/z :545 ($M+H$)⁺。

实施例72

[0835] 本实施例涉及表2和图31中的化合物。

[0836] 2-[(1R,2S,10S,11S,13R,14R,15S,17S)-1-氟-14,17-二羟基-2,13,15-三甲基-5-氧四环[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]十七烷-3,6-二烯-14-基]-2-氧乙基甲磺酸酯(2c)

[0837] 采用W02015/71657A1(其全部内容通过引用其整体并入本发明用于所有目的)中的某些方法和/或中间体:

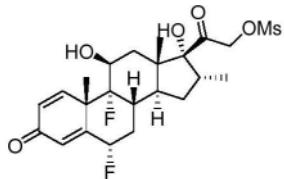


[0838] 根据一般方法A,由地塞米松(1c,0.53g,1.4mmol)制备得到化合物2c(0.32g,50%收率)为白色固体。ESIm/z:471(M+H)⁺.¹H NMR(MeOD_{d4},500MHz)δ7.42(d,J=10.0Hz,1H),6.31(dd,J=10.0,2.0Hz,1H),6.10(s,1H),5.27(d,J=18.0Hz,1H),5.04(d,J=18.0Hz,1H),4.30-4.27(m,1H),3.21(s,3H),3.10-3.05(m,1H),2.78-2.71(m,1H),2.55-2.40(m,1H),2.36-2.32(m,1H),2.27-2.21(m,1H),1.93-1.88(m,1H),1.82-1.74(m,1H),1.61(s,3H),1.58-1.51(m,2H),1.25-1.20(m,1H),1.06(s,3H),0.89(d,J=7.5Hz,3H)ppm。

实施例73

[0839] 本实施例涉及表2和图31中的化合物。

[0840] 2-[(1R,2S,8S,10S,11S,13R,14R,15S,17S)-1,8-二氟-14,17-二羟基-2,13,15-三甲基-5-氧四环[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]十七烷-3,6-二烯-14-基]-2-氧乙基甲磺酸酯(2d)



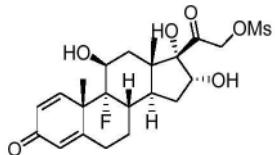
[0841] 采用Bioorg.Med.Chem.Lett.,2015,25,2837-2843中的某些方法和/或中间体,其全部内容通过引用其整体并入本发明用于所有目的。

[0842] 根据一般方法A,由氟米松(1d,0.20g,0.49mmol)制备得到化合物2d(0.17g,71%收率)为白色固体。ESIm/z:489(M+H)⁺。

实施例74

[0843] 本实施例涉及表2和图31中的化合物。

[0844] 2-((8S,9R,10S,11S,13S,14S,16R,17S)-9-氟-11,16,17-三羟基-10,13-二甲基-3-氧-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十二氢-3H-环戊并[a]菲-17-基)-2-氧乙基甲磺酸酯(2e)



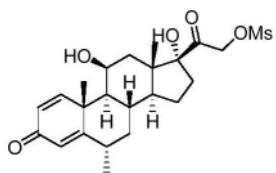
[0845] 根据一般方法A,由曲安西龙(1e,0.39g,1.0mmol)制备得到化合物2e(0.38g,81%收率)为白色固体。ESIm/z:473(M+H)⁺。

实施例75

[0846] 本实施例涉及表2和图31中的化合物。

[0847] 2-((6S,8S,9S,10R,11S,13S,14S,17R)-11,17-二羟基-6,10,13-三甲基-3-氧-6,

7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十二氢-3H-环戊并[a]菲-17-基)-2-氧基乙基甲磺酸酯(2f)

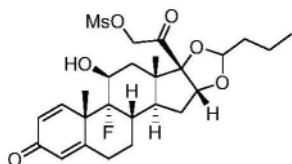


[0848] 根据一般方法A,由甲基泼尼松龙(1f,0.38g,1.0mmol)制备得到化合物2f(0.16g,35%收率)为白色固体。ESIm/z:453 (M+H)⁺。

实施例76

[0849] 本实施例涉及表2和图31中的化合物。

[0850] 2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S)-12-氟-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙基甲磺酸酯(2h)



[0851] 本实施例涉及表2和图31中的化合物。

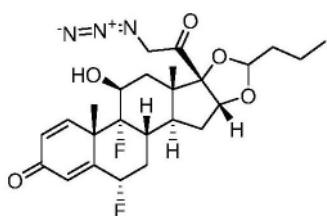
[0852] 根据一般方法A,由甲基泼尼松龙(1h,0.39g,1.0mmol)制备得到化合物2h(0.45g,85%收率)为白色固体。ESIm/z:528 (M+H)⁺。

实施例77

[0853] 本实施例涉及表2和图31中的化合物。

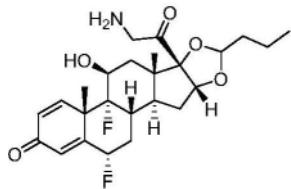
[0854] 类固醇有效负载4b的合成。

[0855] (1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-8-(2-叠氮基乙酰基)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(3b)



[0856] 将化合物2b(1.0g,1.8mmol)和叠氮化钠(1.2g,18mmol)的丙酮(15mL)悬浮液在50℃下搅拌过夜,此时根据LCMS分析反应完成。将悬浮液冷却后,将反应混合物倒入冷水(80mL)中。含水混合物用乙酸乙酯(50mL x3)萃取。合并的有机溶液用盐水(30mL)洗,经硫酸钠干燥,真空浓缩,得到粗品化合物3b(0.90g,>99%收率)为黄色固体,其不经进一步纯化即可用于下一步骤。ESIm/z:492 (M+H)⁺。

[0857] (1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-8-(2-氨基乙酰基)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0⁴⁴⁸.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮三氟乙酸盐(4b)

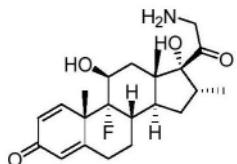


[0858] 向100mL圆底烧瓶中加入化合物3b (0.85g, 1.7mmol), 然后加入THF (20mL) 和盐酸水溶液 (1N, 10mL)。将混合物在28-32℃下搅拌直至其变澄清, 然后在此温度下向其中加入三苯基膦 (0.68g, 2.6mmol)。将得到的黄色澄清溶液在28-32℃下搅拌18小时, 此时根据TLC和LCMS监测完成反应。将混合物真空浓缩, 残余物经反相快速色谱法 (0-50%乙腈的TFA水溶液 (0.05%)) 纯化, 得到标题化合物4b (0.56g, 57%收率, TFA盐) 为灰白色固体。ESI m/z : 466 ($M+H$)⁺. 1H NMR (400MHz, MeOD_{d4}) δ 7.33 (d, J =9.9Hz, 1H), 6.40-6.29 (m, 2H), 5.69-5.45 (m, 1H), 4.93-4.92 (m, 1H), 4.71 (t, J =4.3Hz, 1H), 4.35-4.27 (m, 2H), 3.90-3.84 (m, 1H), 2.81-2.54 (m, 1H), 2.42-2.06 (m, 3H), 1.82-1.32 (m, 11H), 1.09-0.87 (m, 6H) ppm. ^{19}F NMR (376MHz, MeOD_{d4}) δ -77.01, -166.24, -166.92, -188.81, -188.83 ppm。分析型HPLC: 100%, 保留时间: 6.86min (方法A)。

实施例78

[0859] 本实施例涉及表2和图31中的化合物。

[0860] (1R,2S,10S,11S,13R,14R,15S,17S)-14-(2-氨基乙酰基)-1-氟-14,17-二羟基-2,13,15-三甲基四环[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]十七烷-3,6-二烯-5-酮三氟乙酸盐 (4c)

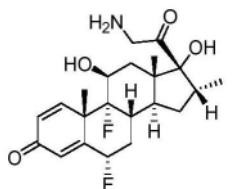


[0861] 根据实施例77中制备化合物4b的方法, 但用化合物2c代替化合物2b, 得到化合物4c为TFA盐 (0.50g, 2步收率为53%), 为白色固体。ESI m/z : 392 ($M+H$)⁺. 1H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 8.22 (s, 3H), 7.35 (d, J =10.0Hz, 1H), 6.19 (d, J =10.0Hz, 1H), 5.98 (s, 1H), 5.60 (d, J =4.0Hz, 1H), 5.38 (s, 1H), 4.30-4.10 (m, 2H), 3.62 (d, J =18.8Hz, 1H), 2.98-2.83 (m, 1H), 2.65-2.50 (m, 1H), 2.50-2.22 (m, 2H), 2.20-2.01 (m, 2H), 1.80-1.72 (m, 1H), 1.72-1.58 (m, 1H), 1.46 (s, 3H), 1.46-1.25 (m, 2H), 1.13-1.01 (m, 1H), 0.89 (s, 3H), 0.78 (d, J =6.8Hz, 3H) ppm. ^{19}F NMR (376MHz, DMSO_{d6}) δ -73.79, -164.32 ppm。分析型HPLC: >99%, 保留时间: 6.34min (方法A)。

实施例79

[0862] 本实施例涉及表2和图31中的化合物。

[0863] (1R,2S,8S,10S,11S,13R,14R,15S,17S)-14-(2-氨基乙酰基)-1,8-二氟-14,17-二羟基-2,13,15-三甲基四环[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]十七烷-3,6-二烯-5-酮三氟乙酸盐 (4d)

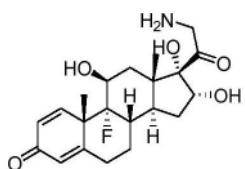


[0864] 根据实施例77中制备化合物4b的方法,但用化合物2d代替化合物2b,得到化合物4d为TFA盐(0.18g,2步收率为21%),为白色固体。ESIm/z:410 (M+H)⁺.¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 88.17 (s, 3H), 7.36 (d, J=10.3Hz, 1H), 6.29 (dd, J=10.2, 1.7Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.74-5.54 (m, 2H), 5.42 (s, 1H), 4.28-4.10 (m, 2H), 3.70-3.59 (m, 1H), 3.02-2.89 (m, 1H), 2.58-2.40 (m, 1H), 2.31-2.12 (m, 3H), 2.08 (s, 1H), 1.77-1.64 (m, 1H), 1.51-1.44 (m, 4H), 1.16-1.06 (m, 1H), 0.91 (s, 3H), 0.82 (d, J=7.2Hz, 3H) ppm.¹⁹F NMR (376MHz, DMSO_{d6}) δ -73.65, -163.75, -186.04 ppm。分析型HPLC:>99%,保留时间:6.36min(方法A)。

实施例80

[0865] 本实施例涉及表2和图31中的化合物。

[0866] (8S,9R,10S,11S,13S,14S,16R,17S)-17-(2-氨基乙酰基)-9-氟-11,16,17-三羟基-10,13-二甲基-7,8,11,12,13,15,16,17-八氢-6H-环戊并[a]菲-3(9H,10H,14H)-酮三氟乙酸盐(4e)

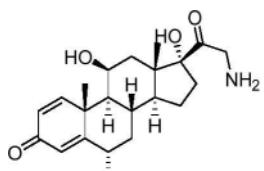


[0867] 根据实施例77中制备化合物4b的方法,但用化合物2e代替化合物2b,得到化合物4e为TFA盐(28mg,2步收率为21%),为白色固体。ESIm/z:394 (M+H)⁺.¹H NMR (500MHz, DMSO_{d6}) δ 88.04 (s, 3H), 7.33 (d, J=10Hz, 1H), 6.24 (dd, J=10Hz, 1.0Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.53 (d, J=5.5Hz, 1H), 5.50-5.45 (m, 1H), 5.04 (s, 1H), 4.76-4.70 (m, 1H), 4.20-4.12 (m, 2H), 3.68 (d, J=20Hz, 1H), 2.66-2.57 (m, 1H), 2.40-2.20 (m, 3H), 2.20-2.10 (m, 1H), 1.90-1.70 (m, 2H), 1.50-1.20 (m, 6H), 0.89 (s, 3H) ppm。分析型HPLC:>99%,保留时间:5.79min(方法A)。

实施例81

[0868] 本实施例涉及表2和图31中的化合物。

[0869] (6S,8S,9S,10R,11S,13S,14S,17R)-17-(2-氨基乙酰基)-11,17-二羟基-6,10,13-三甲基-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十二氢-3H-环戊并[a]菲-3-酮(4f)

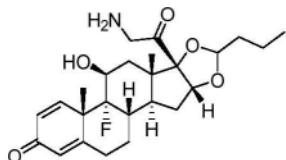


[0870] 根据实施例77中制备化合物4b的步骤,但在第二步中,用2f替换2b并在60℃下搅拌,而非在28~32℃下,经制备型HPLC(方法B)纯化后,得到化合物4f(10mg,2步收率为14%)为黄色固体。ESIm/z:466 (M+H)⁺.¹H NMR (400MHz, MeOD_{d4}) δ 88.50 (s, 1H), 7.50 (d, J=10.0Hz, 1H), 6.27 (dd, J=1.6Hz, 10.0Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 4.43-4.42 (m, 1H), 4.32-4.27 (m, 1H), 3.80-3.76 (m, 1H), 2.79-2.73 (m, 2H), 2.29-2.15 (m, 3H), 1.83-1.50 (m, 7H), 1.10-0.80 (m, 8H) ppm。

实施例82

[0871] 本实施例涉及表2和图31中的化合物。

[0872] (1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S)-8-(2-氨基乙酰基)-12-氟-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(4h),22R/S异构体(比例为2:1)

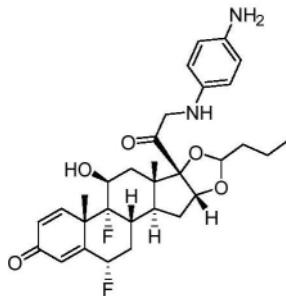


[0873] 根据实施例77中制备化合物4b的步骤,但用2h(0.26g,0.5mmol)替换2b,经制备型HPLC(方法A)纯化后,得到化合物4h(5mg,2步收率为6%)为黄色固体。ESIm/z:448(M+H)⁺.¹H NMR(500MHz,DMSO_{d6})δ88.04(s,3H),7.95-7.70(m,1H),7.32(d,J=10Hz,1H),6.24(d,J=9.0Hz,1H),6.02(s,1H),5.65-5.55(m,1H),5.18(t,J=4Hz,0.24H),5.12(d,J=5Hz,0.24H),4.77(d,J=5.0Hz,0.76H),4.66(t,J=4Hz,0.76H),4.25-4.10(m,2H),3.80-3.70(m,1H),2.65-2.55(m,1H),2.36-2.30(m,1H),2.05-1.95(m,2H),1.85-1.75(m,1H),1.70-1.55(m,4H),1.48(s,3H),1.40-1.30(m,3H),1.25-1.20(m,1H),0.90-0.80(m,6H)ppm.¹⁹F NMR(376MHz,DMSO_{d6})δ-73.51(3F),-164.50(0.3F),-165.27(0.7F)ppm。

实施例83

[0874] 本实施例涉及表2和图31中的化合物。

[0875] (1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-8-{2-[4-氨基苯基]氨基}-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮三氟乙酸盐(5-I)



[0876] 向螺旋盖管中的化合物2b(0.10g,0.18mmol)的DMF(2mL)溶液中加入4-羟基苯胺(0.10mg,0.92mmol),三乙胺(0.20g,2.0mmol)和碘化钠(0.10g,0.67mmol)。混合物在70℃下搅拌5小时,通过LCMS进行监测。反应混合物经制备型HPLC(方法A)直接纯化两次,得到化合物5-I(10mg,8%收率)为白色固体。ESIm/z:557(M+H)⁺.¹H NMR(500MHz,DMSO_{d6})δ89.59(brs,3H),7.50-5.96(m,8H),5.76-3.81(m,7H),2.73-2.55(m,1H),2.28(s,1H),2.20-1.99(m,2H),1.86-1.79(m,1H),1.70-1.27(m,10H),0.93-0.76(m,6H)ppm.¹⁹FNMR(376MHz,DMSO_{d6})δ-73.90,-164.22,-165.02,-186.37ppm。分析型HPLC:>99%,保留时间:7.55min(方法A)。

实施例84

[0877] 本实施例涉及表2和图31中的化合物。

用酚代替化合物2,制备化合物6的一般方法B:

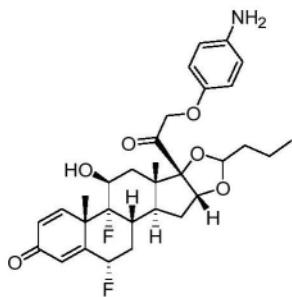
[0878] 向热乙腈或丙酮(60-65℃)中加入化合物2(1当量),相应的酚(2.0-2.5当量)和碳酸钾或碳酸铯(2.0-3.0当量)。所得悬浮液回流2-3小时,通过LCMS和TLC监测。冷却至室温

后,真空浓缩除去挥发物,向残余物中加入水。含水混合物用乙酸乙酯萃取。合并的有机溶液用水洗,然后盐水洗,经硫酸钠干燥,真空浓缩。粗产物直接用于下一步骤,或经快速色谱法或制备型HPLC纯化,得到纯的芳基酯6。

实施例85

[0879] 本实施例涉及表2和图31中的化合物。

[0880] (1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-8-[2-(4-氨基苯氧基)乙酰基]-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(6-I)

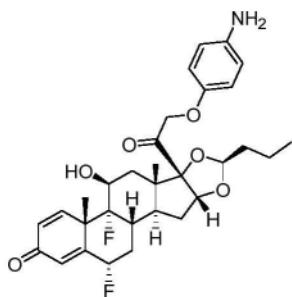


[0881] 根据一般方法B,使2b(计算为0.17mmol)与4-氨基苯酚(37mg,0.34mmol)和碳酸铯(0.11g,0.34mmol)在丙酮(0.5mL)中反应,经制备型HPLC(方法B)纯化后,得到标题化合物6-I(6.0mg,由1b开始的收率为6.3%)为白色固体。ESIm/z:298(M/2+H)⁺,558(M+H)⁺(10%)。¹H NMR(500MHz,MeOD_{d4})δ7.34(d,J=10.0Hz,1H),6.78-6.71(m,4H),6.37-6.33(m,2H),5.63-5.49(m,1H),5.10-4.99(m,1H),4.77-4.63(m,2H),4.33(d,J=9.1Hz,1H),2.74-2.57(m,1H),2.39-2.13(m,3H),1.98-1.31(m,12H),1.03-0.93(m,6H)ppm。分析型HPLC:纯度97.4%,保留时间:7.55min(方法B)。

实施例86

[0882] 本实施例涉及表2和图31中的化合物。

[0883] (1S,2S,4R,6S,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-8-[2-(4-氨基苯氧基)乙酰基]-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(S-6-I)



[0884] 根据一般方法B,但用S-2b代替2b,得到化合物S-6-I(19mg,由S-2b开始的2步收率为19%)为白色固体。ESIm/z:558(M+H)⁺。¹H NMR(400MHz,DMSO_{d6})δ7.26(dd,J=10.2,1.0Hz,1H),6.65-6.55(m,2H),6.51-6.44(m,2H),6.30(dd,J=10.2,1.9Hz,1H),6.11(s,1H),5.74-5.46(m,2H),5.23(t,J=4.9Hz,1H),5.14(d,J=7.2Hz,1H),4.99(d,J=18.2Hz,1H),4.74-4.55(m,3H),4.26-4.12(m,1H),2.65-2.53(m,1H),2.29-2.19(m,1H),2.13-1.94(m,2H),1.86-1.22(m,11H),0.92-0.78(m,6H)ppm。¹⁹F NMR(376MHz,DMSO_{d6})δ-164.26,-

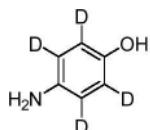
186.38ppm。分析型HPLC:>99%，保留时间:7.34min(方法B)。

实施例87

[0885] 本实施例涉及表2和图31中的化合物。

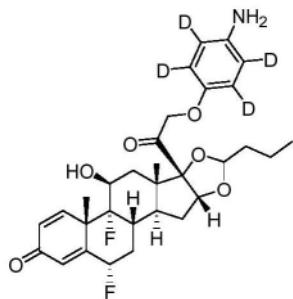
[0886] 采用Org.Biomol.Chem., 2014, 12, 7551-7560中的某些方法,其通过引用其整体并入本发明用于所有目的。

[0887] 步骤1:4-氨基(²H₄)苯酚:



[0888] 向20mL微波管中加入4-羟基苯胺(0.97g, 8.9mmol), 氧化氘(D₂O, 10mL)和浓氯化氘(DCl, 125μL), 得到悬浮液。使所述管充满氮气氛, 密封并在180℃下用微波(CEMDiscoverSP)辐照2.5小时, 通过LCMS监测反应。然后将混合物冷却至室温(28-32℃)并在此温度下保持18小时。真空浓缩除去挥发物, 得到棕色残余物, 将其悬浮在20mL微波管中的氧化氘(10mL)中。用氮气充满所述管, 密封并在180℃下用微波辐照5.5小时。冷却至室温(28-32℃)后, 将混合物在此温度下保持16小时。真空浓缩除去挥发物, 残余物经快速色谱法纯化(10-60%乙酸乙酯的石油醚溶液), 得到4-氨基(²H)苯酚(0.50g, 50%收率)为棕色固体。¹H NMR(500MHz, DMSO_{d6}) δ 88.31(s, 1H), 4.36(s, 2H) ppm。

[0889] (1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-8-{2-[4-氨基(2,3,5,6-²H₄)苯氧基]乙酰基}-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(6-ID)



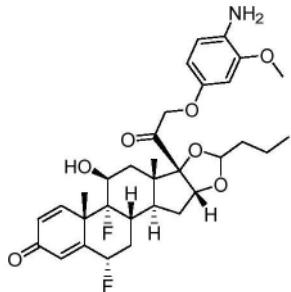
[0890] 步骤2:向4-氨基(²H₄)苯酚(0.10g, 0.88mmol)的DMSO(3mL)混合溶液中加入氢氧化钾(45mg, 0.80mmol)。混合物在28-32℃下搅拌2分钟, 然后在60℃下搅拌后, 向混合物中一次性加入化合物2b(0.20g, 0.40mmol), 并在氮气保护下在60℃下搅拌1小时。冷却至室温后, 混合物经制备型HPLC(方法A)、然后经制备型HPLC(方法B)直接纯化, 得到6-II(10mg, 4.4%收率)为灰白色固体。ESIm/z: 562(M+H)⁺. ¹H NMR(400MHz, DMSO_{d6}) δ 7.27(d, J=10.1Hz, 1H), 6.30(dd, J=10.1, 1.7Hz, 1H), 6.12(s, 1H), 5.74-5.45(m, 2H), 5.03-4.93(m, 1H), 4.82-4.58(m, 4H), 4.27-4.14(m, 1H), 3.33(s, 1H), 2.70-2.53(m, 1H), 2.31-2.20(m, 1H), 2.14-1.93(m, 2H), 1.86-1.70(m, 1H), 1.67-1.24(m, 10H), 0.92-0.73(m, 6H) ppm. ¹⁹F NMR(376MHz, DMSO_{d6}) δ -164.24, -165.05, -186.35ppm。分析型HPLC:98.41%, 保留时间:7.34min(方法B)。

[0891] 化合物6-ID可用于例如分析方法。

实施例88

[0892] 本实施例涉及表2和图31中的化合物。

[0893] (1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-8-[2-(4-氨基-3-甲氧基苯氧基)乙酰基]-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮三氟乙酸盐(6-II)



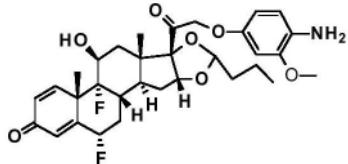
[0894] 根据一般方法B,使化合物2b (0.50g,0.92mmol)与4-氨基-3-甲氧基苯酚(0.32g,2.3mmol)和碳酸铯(0.60g,1.8mmol)在乙腈(20mL)中反应,得到化合物6-II (0.25g,47%收率)为白色固体。ESI m/z :588 ($M+H$)⁺.¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 9.00 (s, 2H), 7.33-7.23 (m, 1H), 7.16-7.08 (m, 1H), 6.77-6.68 (m, 1H), 6.52-6.41 (m, 1H), 6.35-6.27 (m, 1H), 6.12 (s, 1H), 5.74-5.51 (m, 2H), 5.31-5.11 (m, 2H), 4.98-4.68 (m, 3H), 4.28-4.15 (m, 1H), 3.90-3.83 (m, 3H), 2.74-2.55 (m, 1H), 2.35-2.21 (m, 1H), 2.17-1.97 (m, 2H), 1.88-1.75 (m, 1H), 1.67-1.28 (m, 10H), 0.93-0.78 (m, 6H) ppm。分析型HPLC:>99%,保留时间:7.68和7.72min(方法A)。

实施例89

[0895] 本实施例涉及表2和图31中的化合物。

[0896] 制备化合物6-III

[0897] (1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-8-[2-(4-氨基-3-氟苯氧基)乙酰基]-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-16-酮(6-III)

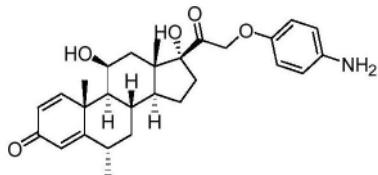


[0898] 在室温下,向圆底瓶中加入化合物2e (0.20g,0.37mmol),4-氨基-3-氟苯酚(0.25g,2.0mmol),氢氧化钾(0.11g,2.0mmol)和DMSO(3mL)。在氮气保护下,将所得混合物在60℃下搅拌1小时直至反应完成,通过TLC和LCMS进行监测。反应混合物冷却至室温并通过膜过滤后,反应溶液经制备型HPLC(方法A)直接纯化,得到标题化合物6-III (40mg,19%收率)为灰白色固体。ESI m/z :576 ($M+H$)⁺.¹H NMR (500MHz, MeOD_{d4}) δ 7.40-7.31 (m, 1H), 7.20 (td, J=9.1, 1.9Hz, 1H), 6.91-6.84 (m, 1H), 6.80-6.76 (m, 1H), 6.40-6.30 (m, 2H), 5.57 (ddd, J=48.6, 9.7, 6.8Hz, 1H), 5.15 (d, J=18.1Hz, 1H), 4.90-4.79 (m, 2H), 4.75 (t, J=4.3Hz, 1H), 4.41-4.28 (m, 1H), 2.78-2.57 (m, 1H), 2.40-2.12 (m, 3H), 1.98-1.39 (m, 11H), 1.07-0.92 (m, 6H) ppm。分析型HPLC:100%,保留时间:8.10min(方法A)。

实施例90

[0899] 本实施例涉及表2和图31中的化合物。

[0900] (6S,8S,9S,10R,11S,13S,14S,17R)-17-(2-(4-氨基苯氧基)乙酰基)-11,17-二羟基-6,10,13-三甲基-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十二氢-3H-环戊并[a]菲-3-酮(6-VI)



[0901] 向化合物2f (60mg, 0.13mmol) 的DMF (3mL) 溶液中加入碳酸铯 (86mg, 0.26mmol) 和 N-Boc-4-氨基苯酚 (28mg, 0.13mmol)。反应混合物在室温下搅拌18小时,通过LCMS进行监测。混合物用乙酸乙酯 (10mL) 稀释。将有机溶液用水 (10mL) 洗,经硫酸钠干燥,浓缩。将白色残余物 (50mg, ESI m/z : 566 ($M+H$)⁺) 溶解在DCM (5mL) 中,并向所述溶液中加入TFA (0.5mL)。反应混合物在室温下搅拌2小时,直至根据LCMS确定完全脱去Boc。真空浓缩除去挥发物。残余物经反相快速色谱法 (0-25% 乙腈的水溶液) 纯化,得到6-VI (10mg, 7.5% 收率) 为白色固体。ESI m/z : 466 ($M+H$)⁺. 1H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 7.32 (d, J =10.0Hz, 1H), 6.61-6.58 (m, 2H), 6.51-6.47 (m, 2H), 6.19 (dd, J =10.0, 1.6Hz, 1H), 5.82 (t, J =1.6Hz, 1H), 5.39 (s, 1H), 5.04-5.01 (m, 3H), 4.66 (d, J =3.2Hz, 1H), 4.58 (d, J =18.0Hz, 1H), 4.30 (d, J =2.4Hz, 1H), 2.67-2.50 (m, 2H), 2.13-2.01 (m, 2H), 1.93-1.89 (m, 1H), 1.67-1.61 (m, 3H), 1.45-1.30 (m, 5H), 1.01 (d, J =3.2Hz, 3H), 0.95-0.71 (m, 5H) ppm。

实施例91

[0902] 本实施例说明了制备表4中的连接体-有效负载的中间体的一般合成方法。

[0903] 本实施例涉及表4以及图31和图33中的化合物。

[0904] 连接体-有效负载 (LP1-LP16) 的合成开始于通过胺类化合物 (4) 或苯胺类化合物 (6) 与受保护的Val-Cit-PAB-PNP (L2a或L2b) 的反应制备碳酸酯类化合物L4,然后进行N-去保护,或在苯胺类化合物 (6) 与Boc或Fmoc保护的Val-Cit-OH或Fmoc-Val-Ala-OH (L3a-c) 之间生成酰胺类化合物L4,然后进行N-去保护。然后将化合物L4与L9或L10直接偶联以生成最终的连接体-类固醇类化合物LP1、LP2、LP3、LP13、LP14、LP15和LP16。化合物L4还与Fmoc-D-Lys-COTL5偶联,然后脱去Fmoc,得到L6,其与叠氮基-环糊精 (7a) 或叠氮基碘酸盐 (7b或7c) 一起进行[3+2]环加成以产生L8。最后,使用L8与PEG_n酸或NHS酯 (L9或L10) 的偶联反应来生成连接体-有效负载LP5、LP8、LP10和LP12。

[0905] 合成中间体L4的一般方法C:

[0906] 室温下,向有效负载4或6 (1.0当量) 和Boc-vcPAB-PNP (1.1当量) 的DMF (1mL/10mg 有效负载) 溶液中加入HOBt (1.0当量) 和DIPEA (2.0当量)。将所得混合物在室温 (18-30°C) 搅拌过夜,直至通过LCMS监测有效负载耗尽。通过膜过滤后,反应溶液经制备型HPLC直接纯化,得到Boc-L4 (52% 收率) 为白色固体,然后将其溶于DCM (0.6mL/mg Boc-L4)。在0°C下,向此溶液中滴加TFA (0.2mL/mg Boc-L4)。混合物在室温 (18-30°C) 下搅拌1小时,直至通过LCMS监测已脱去Boc。真空浓缩除去挥发物,得到化合物L4,其不经进一步纯化即可用于下一步骤。

[0907] 合成中间体L4的一般方法D:

[0908] 室温下,向有效负载4或6(1.0当量)的DMF(0.3mL/10mg有效负载)溶液中加入Fmoc-vcPAB-PNP(1.1当量),HOBt(1.5当量)和DIPEA(2.0当量)。将混合物在室温(18-30℃)下搅拌3小时,直至通过LCMS监测有效负载完全耗尽。向反应混合物中加入哌啶(0.03mL/10mg有效负载),将混合物在室温(18-30℃)下搅拌1小时直至脱去Fmoc,通过LCMS进行监测。混合物通过膜过滤后,反应溶液经反相快速色谱法或制备型HPLC直接纯化,得到化合物L4。

[0909] 合成中间体L4的一般方法E:

[0910] 在20-25℃下,向Boc-Val-Ala-OH或Boc-Val-Cit-OH(1.0当量)的DCM(0.2mL/10mg肽)溶液中加入DIPEA(2.0当量)和HATU(1.2当量)。将混合物在20-25℃下搅拌30分钟,然后加入苯胺(1.1当量)并进一步搅拌16小时直至肽完全耗尽,通过LCMS进行监测。然后向反应混合物中加入TFA(0.05mL/10mg肽)。将混合物在20-25℃下再搅拌一小时。减压浓缩除去挥发物,残余物经制备型HPLC(方法B)直接纯化,得到化合物L4。

[0911] 合成中间体L4的一般方法F:

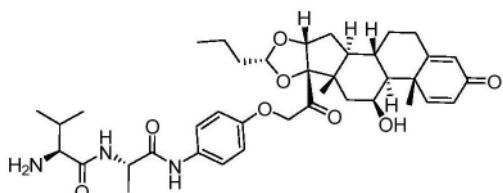
[0912] 在20-25℃下,向Fmoc-Val-Ala-OH的DMF(0.2mL/10mg肽)溶液中加入DIPEA(3.0当量)和HATU(1.4当量)。将混合物在20-25℃下搅拌5分钟,然后加入苯胺(1.0当量),并将所得混合物进一步搅拌2小时,直至肽完全耗尽,通过LCMS进行监测。然后向反应混合物中加入哌啶(5.0当量)。将混合物在20-25℃下搅拌2小时。通过膜过滤后,反应溶液经反相快速色谱法(0-100%乙腈的碳酸氢铵水溶液(10mM))或制备型HPLC(方法B)直接纯化,得到化合物L4。

实施例92

[0913] 本实施例涉及表4和图33中的化合物。

[0914] 制备化合物L4a、VA-R-6-VI

[0915] (2S)-2-氨基-N-[{(1S)-1-[(4-{2-[(1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}苯基)氨基甲酰基]乙基]-3-甲基丁酰胺



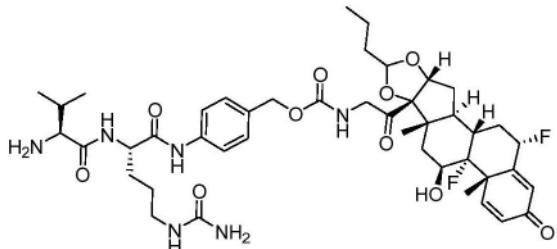
[0916] 根据一般方法E(65%收率)或一般方法F(53%收率),由化合物R-6-VI制备得到化合物L4a为白色固体。ESIm/z:692(M+H)⁺.¹H NMR(500MHz,DMSO_{d6})δ9.95(d,J=8.2Hz,1H),8.19-8.09(m,1H),7.54-7.47(m,2H),7.33(d,J=10.1Hz,1H),6.85(d,J=9.0Hz,2H),6.22-6.13(m,1H),5.93(s,1H),5.14-5.04(m,1H),4.86-4.77(m,2H),4.75(d,J=4.2Hz,1H),4.70(t,J=4.3Hz,1H),4.48-4.38(m,1H),4.34(s,1H),3.01(t,J=5.0Hz,1H),2.58-2.52(m,1H),2.33-2.25(m,1H),2.13-2.06(m,1H),2.03-2.00(m,1H),1.95-1.89(m,1H),1.88-1.84(m,2H),1.63-1.53(m,5H),1.45-1.33(m,6H),1.32-1.26(m,3H),1.06-0.93(m,2H),0.92-0.82(m,10H),0.80-0.75(m,3H)ppm。

实施例93

[0917] 本实施例涉及表4和图33中的化合物。

[0918] 制备化合物L4b、vcPAB-4b

[0919] {4-[(2S)-2-[(2S)-2-氨基-3-甲基丁酰胺基]-5-(氨基甲酰基氨基)戊酰胺基]苯基}甲基N-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙基}氨基甲酸酯



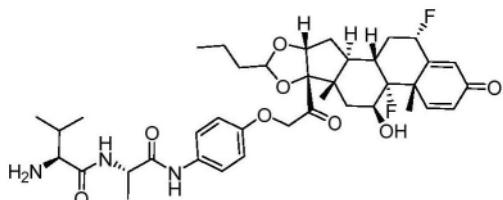
[0920] 根据一般方法D,由化合物4b(93mg,0.20mmol)进行制备,经反相快速色谱法(50-80%乙腈的碳酸氢铵水溶液(10mM))纯化,得到化合物vcPAB-4b(0.13g,73%收率)为白色固体。ESIm/z:871(M+H)⁺。

实施例94

[0921] 本实施例涉及表4和图33中的化合物。

[0922] 制备化合物L4c、VA-6-I

[0923] (2S)-2-氨基-N-[(1S)-1-[(4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基]苯基]氨基甲酰基]乙基]-3-甲基丁酰胺



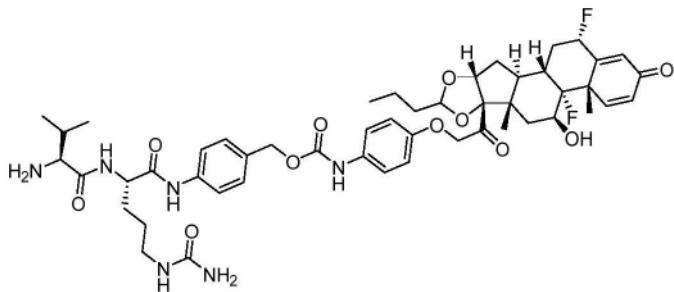
[0924] 根据一般方法E,由化合物6-I(0.50g,0.90mmol)与Boc-Val-Ala-OH,制备得到粗化合物L4c(0.69g,2步收率为72%)为黄色油状物,其可直接用于下一步骤。ESIm/z:728(M+H)⁺。

实施例95

[0925] 本实施例涉及表4和图33中的化合物。

[0926] 制备化合物L4d、VC-PAB-6-I

[0927] {4-[(2S)-2-[(2S)-2-氨基-3-甲基丁酰胺基]-5-(氨基甲酰基氨基)戊酰胺基]苯基}甲基N-(4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基]苯基}氨基甲酸酯



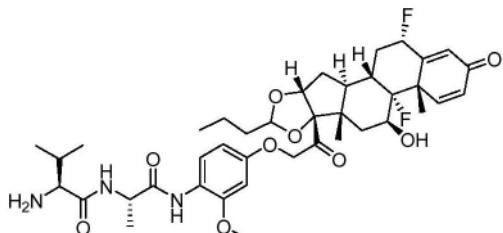
[0928] 根据一般方法E,由化合物6-I (87mg, 0.15mmol) 进行制备,经制备型HPLC(方法B)纯化后,得到化合物L4d (80mg, 64%收率) 为白色固体。ESI m/z :963 (M+H)⁺. ¹H NMR (500MHz, DMSO_{d6}) δ10.22 (s, 1H), 9.57 (s, 1H), 8.69 (d, J=7.5Hz, 1H), 8.08 (s, 3H), 7.61 (d, J=6.8Hz, 2H), 7.36 (d, J=6.8Hz, 3H), 7.27 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.22-7.0 (m, 1H), 6.84 (d, J=7.2Hz, 2H), 6.30 (dd, J=8.0Hz, J=1.6Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.10-6.0 (m, 1H), 5.72-5.55 (m, 1H), 5.52 (s, 1H), 5.48 (s, 1H), 5.16-5.05 (m, 3H), 4.88-4.80 (m, 1H), 4.80-4.76 (m, 1H), 4.75-4.70 (m, 1H), 4.55-4.48 (m, 1H), 4.25-4.20 (m, 1H), 3.70-3.60 (m, 1H), 3.12-2.90 (m, 2H), 2.70-2.55 (m, 1H), 2.40-2.20 (m, 1H), 2.15-2.0 (m, 3H), 1.86-1.75 (m, 1H), 1.75-1.65 (m, 1H), 1.64-1.54 (m, 5H), 1.49 (s, 4H), 1.46-1.34 (m, 4H), 0.97-0.91 (m, 5H), 0.90-0.85 (m, 4H), 0.85-0.80 (m, 3H) ppm。

实施例96

[0929] 本实施例涉及表4和图33中的化合物。

[0930] 制备化合物L4e、VA-6-II

[0931] (2S)-2-氨基-N-[(1S)-1-[(4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}-2-甲氧基苯基]氨基甲酰基]乙基]-3-甲基丁酰胺



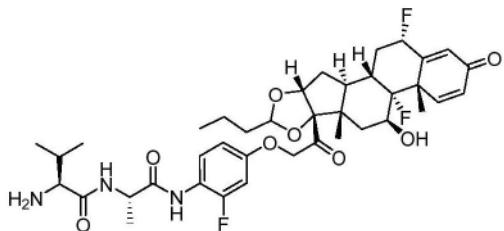
[0932] 根据一般方法F,由化合物6-III (0.10g, 0.17mmol),制备得到粗品化合物L4e (0.12g,2步收率为82%),其不经进一步纯化即可用于下一步骤。ESI m/z :758 (M+H)⁺。

实施例97

[0933] 本实施例涉及表4和图33中的化合物。

[0934] 制备化合物L4f、VA-6-III

[0935] (2S)-2-氨基-N-[(1S)-1-[(4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}-2-氟苯基]氨基甲酰基]乙基]-3-甲基丁酰胺



[0936] 根据一般方法F,由化合物L4f (95mg, 0.17mmol),制备得到粗品标题化合物L4f (0.10g,2步收率为66%) ,其不经进一步纯化即可用于下一步骤。ESIm/z:746 (M+H)⁺。

实施例98

[0937] 本实施例涉及表4和图33中的化合物。

[0938] 连接体-有效负载的中间体L6的合成

[0939] 一般方法:室温下,向化合物L5 (1.2当量) 的DMF (0.2mL/10mgL5) 溶液中加入HATU (1.4当量) 和DIPEA (3当量) 。将混合物在室温下搅拌5分钟,然后加入化合物L4 (1.0当量) 。然后将反应混合物在室温下搅拌2小时直至化合物L4完全耗尽,通过LCMS进行监测。混合物通过膜过滤后,反应溶液经制备型HPLC直接纯化,得到环辛炔L6。

实施例99

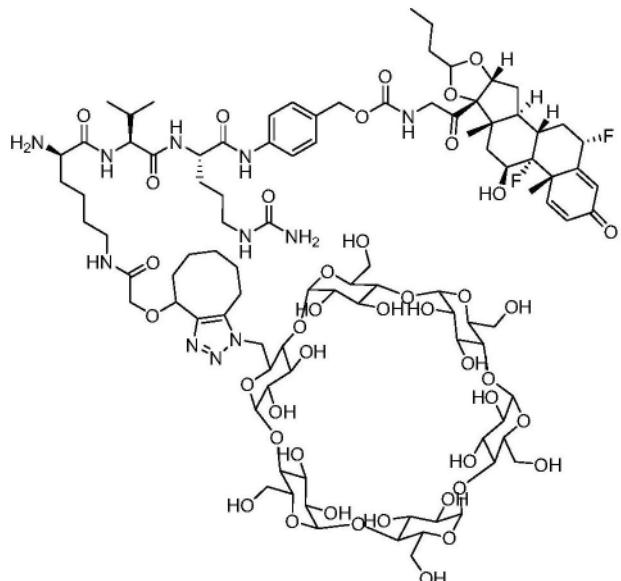
[0940] 制备中间体8的一般方法H。

[0941] 在室温下,向L6的DMF (0.5mL/10mgL6) 溶液中加入叠氮基化合物 (L7a (CD-N₃) ,L7b (N₃-PEG₄-磺酸盐) 或L7c (N₃-双磺酸盐) ,相对于L6为1.5当量) ,和DIPEA (0.1mL/10mgL6) 。在30℃下搅拌24小时后,通过LCMS监测已消耗大部分起始物料。反应混合物经制备型HPLC直接纯化,得到化合物L8为白色固体。

实施例100

[0942] 制备化合物L8a、aCDCCK-vcPAB-4b

[0943] {4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-氨基-6-{2-[(1-[{31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-十二羟基-10,15,20,25,30-五(羟甲基)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-十二氧杂七环[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]四十二烷-5-基]甲基}-1H,4H,5H,6H,7H,8H,9H-环辛并[d][1,2,3]三唑-4-基)氧基]乙酰胺基}己酰胺基]-3-甲基丁酰胺基]-5-(氨基甲酰基氨基)戊酰胺基]苯基}甲基N-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0⁴,8.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙基}氨基甲酸酯 (L8a)

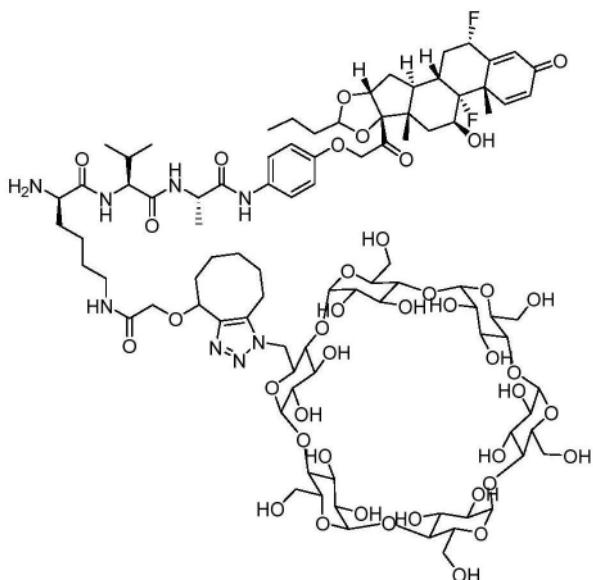


[0944] 根据一般方法H,由化合物L6a (0.12g, 0.10mmol) 和L7a制备得到化合物L8a (0.11g, 51%收率) 为白色固体。ESI m/z :1081 ($M/2+H$)⁺.¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 10.05 (s, 1H), 8.30-7.80 (m, 3H), 7.80-7.55 (m, 2H), 7.50-7.40 (m, 1H), 7.40-7.25 (m, 3H), 6.30 (d, J = 12.5Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.0 (s, 1H), 5.80-5.35 (m, 16H), 5.25-5.05 (m, 1H), 4.97 (s, 2H), 4.90-4.50 (m, 13H), 4.50-4.00 (m, 5H), 3.95-3.55 (m, 22H), 3.30-3.20 (m, 8H), 3.20-3.00 (m, 4H), 3.00-2.85 (m, 5H), 2.25-2.20 (m, 2H), 2.10-1.95 (m, 4H), 1.80-1.00 (m, 30H), 1.00-0.90 (m, 4H), 0.90-0.80 (m, 14H) ppm。

实施例101

[0945] 制备化合物L8d、aCDCCK-VA-2168

[0946] (2R)-2-氨基-N-[(1S)-1-[(1S)-1-[(4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0⁴,⁸.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基]苯基]氨基甲酰基]乙基]氨基甲酰基]-2-甲基丙基]-6-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-十二羟基-10,15,20,25,30-五(羟甲基)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-十二氧杂七环[26.2.2.2^{3,6}.2⁸,¹¹.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]四十二烷-5-基]甲基}-1H,4H,5H,6H,7H,8H,9H-环辛并[d][1,2,3]三唑-4-基]氧基]乙酰胺基}己酰胺(L8d)

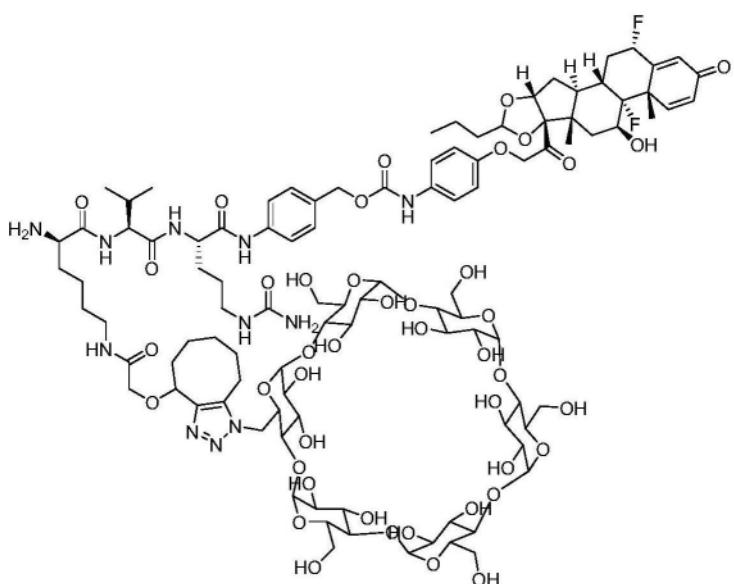


[0947] 根据一般方法H,由化合物L6b (60mg, 59μmol) 和L7a制备得到化合物L8d (40mg, 34%收率) 为白色固体。ESIm/z:1009.5 (M/2+H)⁺。

实施例102

[0948] 制备化合物L8f、aCDCCCK-vcPAB-6-I

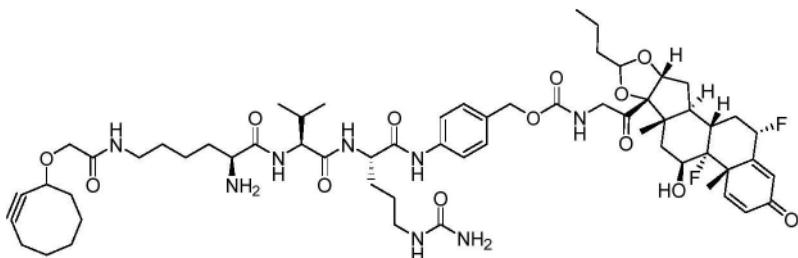
[0949] {4- [(2S) -2- [(2S) -2- [(2R) -2- 氨基-6- {2- [(1- {[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-十二羟基-10,15,20,25,30-五(羟甲基)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-十二氧杂七环[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]四十二烷-5-基]甲基}-1H,4H,5H,6H,7H,8H,9H-环辛并[d][1,2,3]三唑-4-基) 氧基]乙酰胺基}己酰胺基]-3-甲基丁酰胺基]-5-(氨基甲酰基氨基)戊酰胺基]苯基} 甲基N- (4- {2- [(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0⁴,8.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基} 苯基) 氨基甲酸酯



[0950] 根据一般方法H,由化合物L6c (0.10g, 80μmol) 和L7a制备得到化合物L8f (0.11g, 58%收率) 为白色固体。ESIm/z:751 (M/3+H)⁺。

实施例103

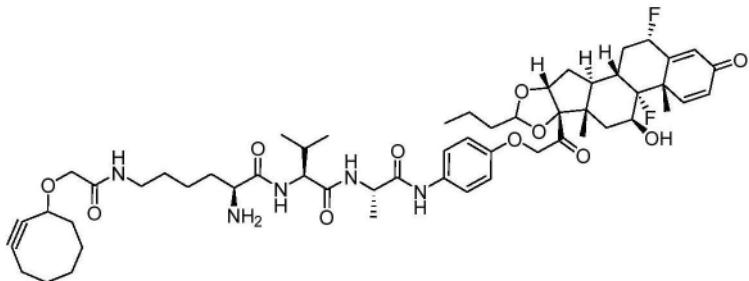
- [0951] 制备连接体-有效负载LP101至LP116
- [0952] 制备化合物LP1:L6a (COT-dLys-vcPAB-4b)
- [0953] {4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-氨基-6-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基]己酰胺基]-3-甲基丁酰胺基]-5-(氨基甲酰基氨基)戊酰胺基]苯基}甲基N-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧化杂五环[10.8.0.0^{2,9}-12⁸-12,¹⁸]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙基}氨基甲酸酯



[0954] 根据一般方法G,由化合物L4b (0.20g,0.23mmol) 进行制备,经制备型HPLC(方法B)纯化后,得到化合物L6a (0.12g,45% 收率) 为白色固体。ESIm/z:1385 (M+H)⁺.¹H NMR (400MHz, MeOD_{d4}) δ7.65-7.55 (m, 2H), 7.40-7.26 (m, 3H), 6.39-6.27 (m, 2H), 5.65-5.45 (m, 1H), 5.13-5.01 (m, 2H), 4.71-4.50 (m, 2H), 4.40-4.14 (m, 4H), 4.11-3.82 (m, 3H), 3.46-3.39 (m, 1H), 3.29-3.09 (m, 4H), 2.76-2.54 (m, 1H), 2.41-2.10 (m, 7H), 2.09-1.99 (m, 1H), 1.96-1.80 (m, 5H), 1.78-1.21 (m, 23H), 1.06-0.82 (m, 12H) ppm。

实施例104

- [0955] 制备化合物LP102:L6b (COT-dLys-VA-6-I)
- [0956] (2R)-2-氨基-6-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基]-N-[(1S)-1-{[(1S)-1-[(4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧化杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙基}氨基甲酰基]乙基]氨基甲酰基}-2-甲基丙基]己酰胺

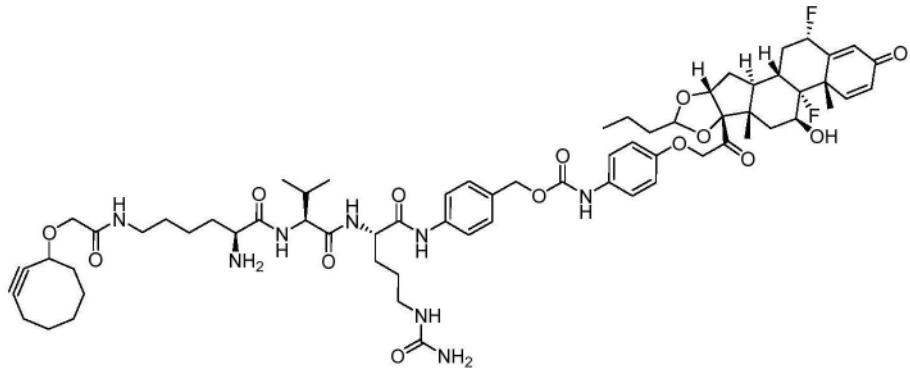


[0957] 根据一般方法G,由化合物L4c (0.28g,0.38mmol) 进行制备,经制备型HPLC(方法B)纯化后,得到化合物L6b (0.21g,46% 收率) 为白色固体。ESIm/z:1021.5 (M+H)⁺.¹H NMR (400MHz, MeOD_{d4}) δ7.33-7.60 (m, 3H), 6.87-6.91 (m, 2H), 6.32-6.37 (m, 2H), 5.47-5.65 (m, 1H), 5.07-5.30 (m, 1H), 4.72-4.86 (m, 3H), 4.34-4.51 (m, 3H), 3.83-4.20 (m, 3H), 3.33-3.49 (m, 1H), 3.14-3.27 (m, 3H), 2.59-2.75 (m, 1H), 1.31-2.39 (m, 33H), 0.93-1.05 (m, 12H) ppm。

实施例105

- [0958] 制备化合物LP103:L6c (COT-dLys-vcPAB-6-I)
- [0959] {4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-氨基-6-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基]己酰胺基]-3-甲基丁酰胺基]-5-(氨基甲酰基氨基)戊酰胺基]苯基}甲基N-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧化杂五环[10.8.0.0^{2,9}-12⁸-12,¹⁸]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙基}氨基甲酸酯

酰胺基]-3-甲基丁酰胺基]-5-(氨基甲酰基氨基)戊酰胺基]苯基}甲基N-(4-{2-[*(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}苯基)氨基甲酸酯*



[0960] 根据一般方法G,由化合物L4d (0.14g, 0.15mmol) 进行制备,经制备型HPLC(方法B)纯化后,得到化合物L6c (0.10g, 57% 收率) 为白色固体。ESIm/z:1255.5 (M+H)⁺.¹H NMR (400MHz, MeOD-d₄) 87.61 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.32-7.39 (m, 4H), 6.84-6.88 (m, 2H), 6.31-6.36 (m, 2H), 5.43-5.63 (m, 1H), 5.05-5.16 (m, 3H), 4.71-4.83 (m, 1H), 4.50-4.54 (m, 1H), 4.18-4.33 (m, 3H), 3.00-2.85 (m, 2H), 3.40-3.51 (m, 1H), 3.00-3.29 (m, 6H), 1.31-2.35 (m, 34H), 1.29 (t, J=7.2Hz, 2H), 0.93-1.02 (m, 12H) ppm。

实施例106

[0961] 用于制备LP104至LP116的一般方法I:

[0962] 在室温下,向PEG₄-酸L9 (1.2-1.3当量) 的DMF (1mL/10mgL9) 溶液中加入HATU (1.3当量) 和DIPEA (5.0当量)。将混合物在室温 (19℃) 下搅拌半小时,然后加入化合物L4或L8 (1.0当量) 的DMF溶液 (0.6mg/10mgL4或L8)。所得混合物在室温下搅拌2小时,直至化合物L4或L8耗尽,通过LCMS进行监测。通过膜过滤后,滤液经制备型HPLC直接纯化,得到化合物L1。(L9a:BCN-PEG₄-酸,L9b:DIBAC-PEG₄-酸,L9c:MAL-PEG₄-酸)

[0963] 用于制备LP104至LP116的一般方法J:

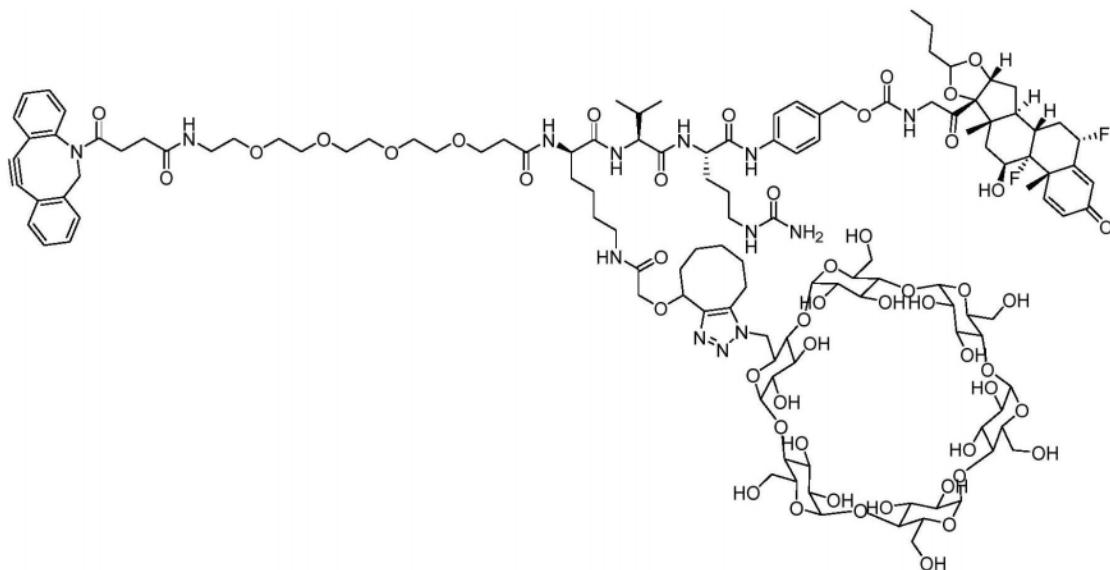
[0964] 在室温下,向化合物L4或L8 (1.0当量) 的DMF (1mL/50mg) 溶液中加入化合物DIBAC-PEG₄-NHSL10b (1.1-1.2当量) 和DIPEA (5.0当量)。反应混合物在室温下搅拌3小时,通过LCMS进行监测。反应混合物经制备型HPLC(方法B)直接纯化,得到化合物L1。

实施例107

[0965] 制备化合物LP104:L11a (DIBAC-PEG4-aCDCCK-vcPAB-4b

[0966] {4-[*(2S)-2-[*(2S)-2-[*(2R)-2-[1-(4-{2-氮杂三环[10.4.0.0^{4,9}]十六碳-1(12),4(9),5,7,13,15-六烯-10-炔-2-基}-4-氧丁酰胺基]-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺基]-6-{2-[*(1-[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-十二羟基-10,15,20,25,30-五(羟甲基)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-十二氧杂七环[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2¹³,16.2^{18,21}.2^{23,26}]四十二烷-5-基]甲基}-1H,4H,5H,6H,7H,8H,9H-环辛并[d][1,2,3]三唑-4-基)氧基]乙酰胺基}己酰胺基]-3-甲基丁酰胺基]-5-(氨基甲酰基氨基)戊酰胺基]苯基}甲基N-{2-[*(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙*****

基}氨基甲酸酯

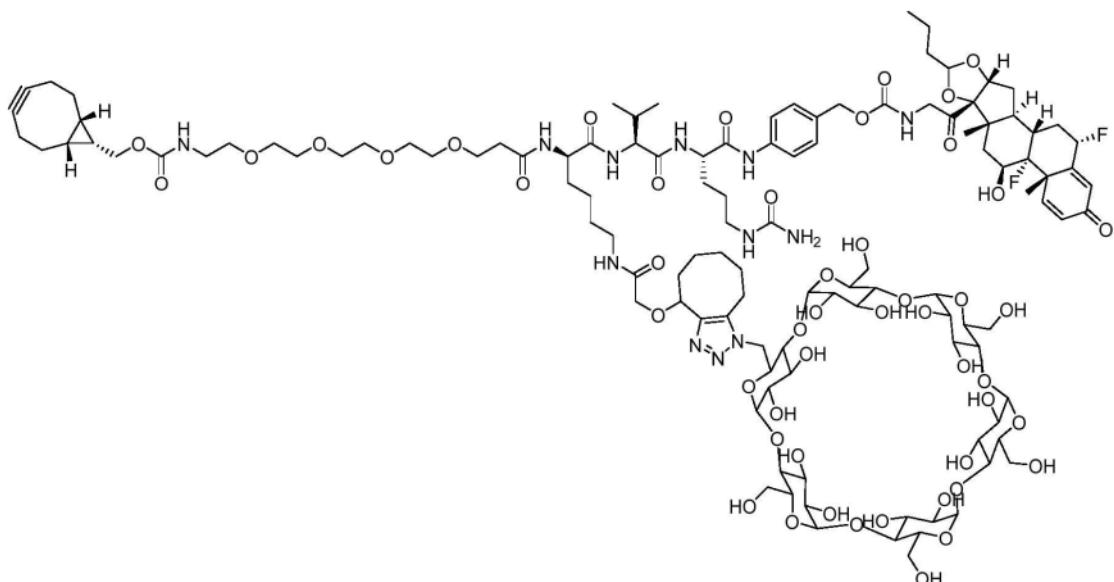


[0967] 根据一般方法I,由化合物L8a (0.10g,46 μ mol)与L9b,制备得到化合物L1a (26mg,收率22%)为白色固体。ESIm/z:1349 (M/2+H)⁺.¹H NMR (500MHz, DMSO_{d6}) δ 9.71 (s, 1H), 8.30-8.00 (m, 3H), 8.00-7.74 (m, 2H), 7.70-7.58 (m, 5H), 7.52-7.20 (m, 12H), 6.35-6.20 (m, 2H), 6.15-5.85 (m, 3H), 5.80-5.35 (m, 18H), 5.25-4.90 (m, 6H), 4.90-4.50 (m, 14H), 4.40-4.25 (m, 4H), 4.25-4.10 (m, 3H), 4.10-3.95 (m, 2H), 3.95-3.55 (m, 22H), 3.55-3.40 (m, 22H), 3.20-3.00 (m, 6H), 3.00-2.85 (m, 3H), 2.65-2.55 (m, 1H), 2.25-2.20 (m, 4H), 2.10-1.95 (m, 6H), 1.80-1.70 (m, 5H), 1.70-1.50 (m, 10H), 1.50-1.45 (m, 9H), 0.90-0.80 (m, 14H) ppm。分析型HPLC:>99%,保留时间:6.23min(方法B)。

实施例108

[0968] 制备化合物LP105:L11b (BCN-PEG4-aCDCCCK-vcPAB-4b

[0969] (1R,8S,9S)-双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基N-(14-{[(1R)-1-{[(1S)-1-[(1S)-4-(氨基甲酰基氨基)-1-[(4-{[(2-{[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙基}氨基甲酰基]氧基]甲基}苯基]氨基甲酰基]丁基]氨基甲酰基}-2-甲基丙基]氨基甲酰基}-5-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-十二羟基-10,15,20,25,30-五(羟甲基)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-十二氧杂七环[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]四十二烷-5-基]甲基}-1H,4H,5H,6H,7H,8H,9H-环辛并[d][1,2,3]三唑-4-基]氧基]乙酰胺基]戊基]氨基甲酰基}-3,6,9,12-四氧杂十四烷-1-基)氨基甲酸酯

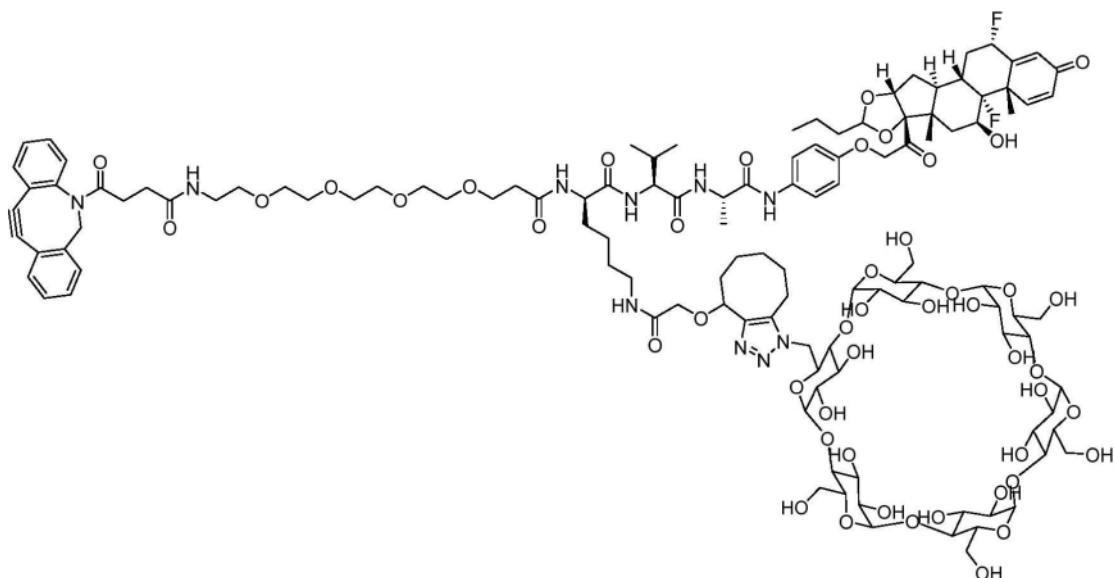


[0970] 根据一般方法I,由化合物L8a (22mg,10 μ mol)与BCN-PEG₄-羧酸L9a,制备得到化合物L1b (10mg,38%收率)为白色固体。ESIm/z:1293 (M/2+H)⁺.¹H NMR (500MHz,DMSO_{d6}) δ 9.68 (s, 1H), 8.14-7.08 (m, 11H), 6.30 (d, J=10.0Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.99 (s, 1H), 5.67-5.31 (m, 15H), 5.21-3.33 (m, 61H), 3.13-2.60 (m, 22H), 2.30-1.96 (m, 46H), 0.95-0.80 (m, 17H) ppm。分析型HPLC:保留时间:7.31min (48%) 和7.41 (52%) (方法B)。

实施例109

[0971] 制备化合物LP108:L11e (DIBAC-PEG4-aCDCCCK-VA-6-I)

[0972] 1-(4-{2-氮杂三环[10.4.0.0^{4,9}]十六碳-1(12),4(9),5,7,13,15-六烯-10-炔-2-基}-4-氧丁酰胺基)-N-[(1R)-1-{{[(1S)-1-[(4-{2-[1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S]-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}苯基]氨基甲酰基}乙基]氨基甲酰基}-2-甲基丙基]氨基甲酰基}-5-{2-[(1-[[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-十二羟基-10,15,20,25,30-五(羟甲基)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-十二氧杂七环[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]四十二烷-5-基]甲基}-1H,4H,5H,6H,7H,8H,9H-环辛并[d][1,2,3]三唑-4-基]氨基]乙酰胺基}戊基]-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺

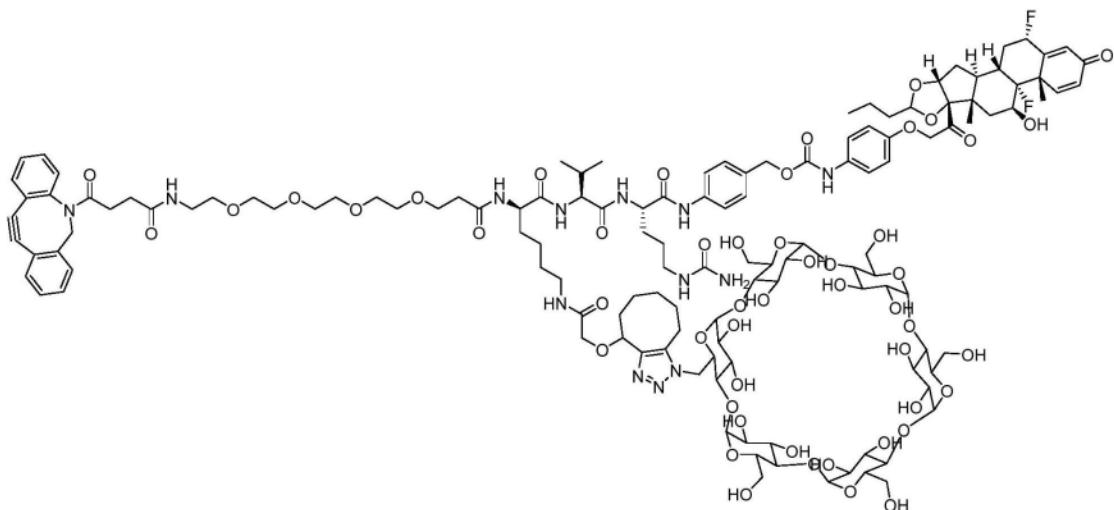


[0973] 根据一般方法J,由化合物L8d (19mg, 9.4 μ mol) 与DIBAC-PEG₄-NHSI10b,制备得到化合物L1e (7.0mg, 29% 收率) 为白色固体。ESIm/z:1276.8 (M/2+H)⁺.¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ9.80-9.47 (m, 1H), 8.23-7.91 (m, 3H), 7.83-7.11 (m, 13H), 6.87-6.66 (m, 2H), 6.32-6.11 (m, 2H), 5.85-5.23 (m, 14H), 5.14-5.01 (m, 3H), 4.86-3.99 (m, 19H), 3.85-3.40 (m, 38H), 3.27-2.87 (m, 13H), 2.76-2.55 (m, 3H), 2.33-2.20 (m, 4H), 2.12-1.91 (m, 6H), 1.83-1.72 (m, 4H), 1.59-0.98 (m, 31H), 0.89-0.84 (m, 12H) ppm。分析型HPLC:100%,保留时间: 7.76min (方法B)。

实施例110

[0974] 制备化合物LP110:L11g (DIBAC-PEG4-aCDCCCK-vcPAB-6-I

[0975] {4- [(2S)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-[1-(4-{2-氮杂三环[10.4.0.0^{4,9}]十六碳-1(12), 4(9),5,7,13,15-六烯-10-炔-2-基}-4-氧丁酰胺基)-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺基]-6-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-十二羟基-10,15,20,25,30-五(羟甲基)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-十二氧杂七环[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2¹³, 16.2^{18,21}.2^{23,26}]四十二烷-5-基]甲基}-1H,4H,5H,6H,7H,8H,9H-环辛并[d][1,2,3]三唑-4-基)氧基]乙酰胺基}己酰胺基]-3-甲基丁酰胺基]-5-(氨基甲酰基氨基)戊酰胺基]苯基}甲基N-(4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}苯基)氨基甲酸酯

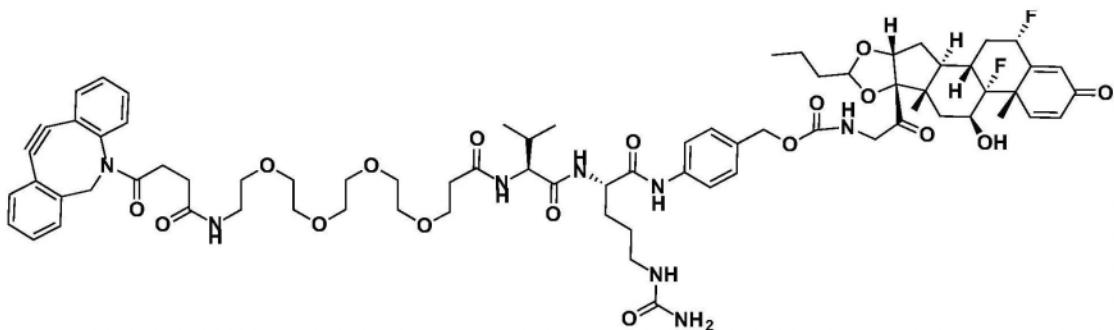


[0976] 根据一般方法I,由化合物L8d (0.10g, 44 μ mol) 与DIBAC-PEG₄-酸L9b,制备得到化合物L1g (29mg, 24% 收率) 为白色固体。ESIm/z: 1394 (M/2+H)⁺. ¹H NMR (500MHz, DMSO_{d4}) δ 9.67 (s, 1H), 9.56 (s, 1H), 8.20-8.05 (m, 2H), 7.85-7.70 (m, 2H), 7.70-7.60 (m, 4H), 7.50-7.25 (m, 12H), 6.90-6.80 (m, 2H), 6.30 (d, J=12.5Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.0 (s, 1H), 5.80-5.35 (m, 16H), 5.25-5.00 (m, 6H), 4.90-4.65 (m, 10H), 4.65-4.45 (m, 4H), 4.40-4.00 (m, 6H), 3.95-3.55 (m, 22H), 3.50-3.30 (m, 22H), 3.20-2.85 (m, 12H), 2.65-2.55 (m, 2H), 2.45-2.35 (m, 2H), 2.35-2.20 (m, 3H), 2.15-1.95 (m, 5H), 1.90-1.70 (m, 4H), 1.70-1.50 (m, 10H), 1.50-1.00 (m, 18H), 0.90-0.80 (m, 12H) ppm。分析型HPLC:保留时间:7.93 (82%) 和8.02 (18%) min (方法B)。

实施例111

[0977] 制备化合物LP112: (DIBAC-PEG₄-aCDCCCK-vcPAB-4b

[0978] {4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-氨基杂三环[10.4.0.0']十六碳-1(12),4(9),5,7,13,15-六烯-10-炔-2-基}-4-氧丁酰胺基)-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺基]-3-甲基丁酰胺基]-5-(氨基甲酰基氨基)戊酰胺基]苯基} 甲基N-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0².⁹.0^{4,7}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙基} 氨基甲酸酯



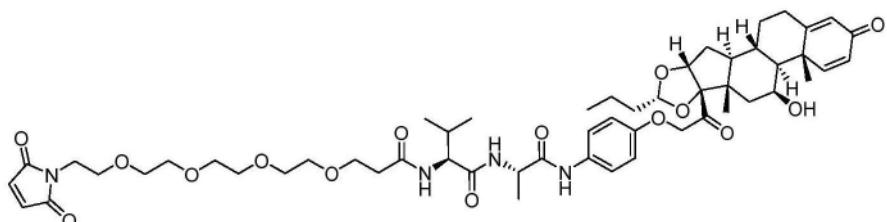
[0979] 根据一般方法J,由化合物L4b (43mg, 50 μ mol) 与DIBAC-suc-PEG₄-酸 (L9b) 进行制备,经制备型HPLC (方法B) 纯化后,得到标题化合物L12 (16mg, 23% 收率) 为白色固体。ESIm/z: 1406 (M+H)⁺. ¹H NMR (DMSO_{d6}, 500MHz) δ 9.99 (s, 1H), 8.11 (d, J=7.5Hz, 1H), 7.88 (d, J=8.5Hz, 1H), 7.80-7.75 (m, 1H), 7.70-7.66 (m, 1H), 7.65-7.60 (m, 3H), 7.53-7.33 (m, 6H), 7.33-7.28 (m, 3H), 6.30 (dd, J=10.0Hz和1.5Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.10-6.00 (m, 1H), 5.72-

5.55 (m, 2H), 5.41 (s, 2H), 5.05-5.01 (m, 1H), 4.97 (s, 2H), 4.80-4.72 (m, 1H), 4.60-4.58 (m, 1H), 4.43-4.33 (m, 1H), 4.25-4.10 (m, 3H), 3.88-3.80 (m, 1H), 3.65-3.55 (m, 3H), 3.50-3.40 (m, 12H), 3.30-3.25 (m, 2H), 3.12-2.90 (m, 4H), 2.70-2.55 (m, 2H), 2.48-2.35 (m, 2H), 2.30-2.20 (m, 2H), 2.15-1.95 (m, 4H), 1.86-1.65 (m, 3H), 1.64-1.54 (m, 5H), 1.49 (s, 4H), 1.46-1.34 (m, 5H), 0.90-0.80 (m, 12H) ppm。分析型HPLC:100%,保留时间:7.40min(方法B)。

实施例112

[0980] 制备化合物LP113:MAL-PEG4-VA-R-11-5

[0981] 1-(2,5-二氧-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-[(1S)-1-{[(1S)-1-{[4-{2-[{(1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}苯基]氨基甲酰基}乙基]氨基甲酰基}-2-甲基丙基]-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺

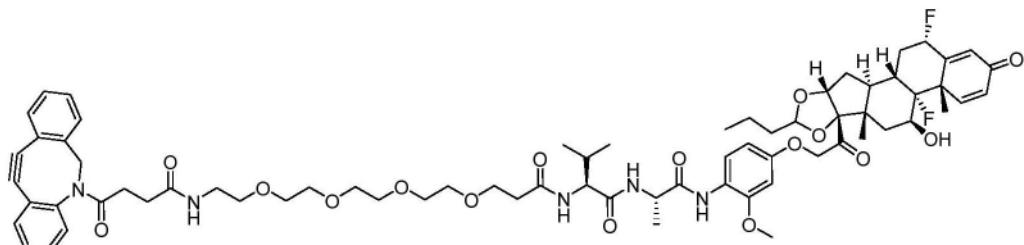


[0982] 根据一般方法J,由化合物L4a (20mg, 25μmol)与MAL-PEG₄-NHSI10c,制备得到化合物LP113 (7mg, 27%收率)为白色固体。ESIm/z:1119 (M+H)⁺.¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 9.89-9.60 (m, 1H), 8.51-6.73 (m, 10H), 6.18 (dd, J=10.1, 1.7Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.17-4.05 (m, 9H), 4.02-3.52 (m, 13H), 2.71-2.54 (m, 1H), 2.46-2.20 (m, 5H), 2.15-1.77 (m, 5H), 1.63-1.53 (m, 5H), 1.47-1.20 (m, 9H), 1.10-0.94 (m, 2H), 0.95-0.65 (m, 12H) ppm。分析型HPLC:100%,保留时间:7.46min(方法B)。

实施例113

[0983] 制备化合物LP114:L11j (DIBAC-PEG4-VA-6-II)

[0984] 1-(4-{2-氮杂三环[10.4.0.0^{4,9}]十六碳-1(16),4(9),5,7,12,14-六烯-10-炔-2-基}-4-氧丁酰胺基)-N-[(1S)-1-{[(1S)-1-{[4-{2-[{(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-二氟-11-羟基-9,13-二甲基-16-氧-6-丙基-5,7-二氧杂五环[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]二十烷-14,17-二烯-8-基]-2-氧乙氧基}-2-甲氧基苯基]氨基甲酰基}乙基]氨基甲酰基}-2-甲基丙基]-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺



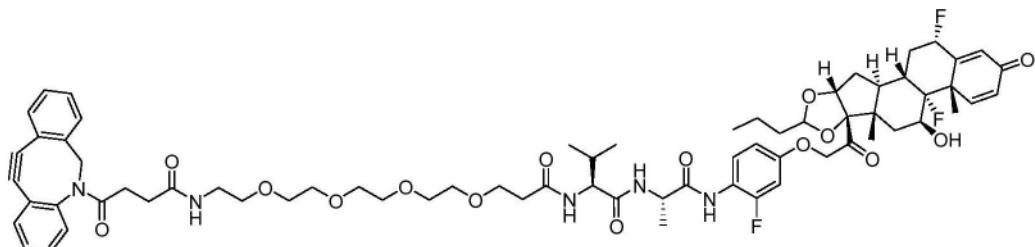
[0985] 根据一般方法I,由化合物L4e (40mg, 47μmol)与DIBAC-suc-PEG₄-酸L9b,制备得到化合物L1 j (25mg, 41%收率)为白色固体。ESIm/z:1293 (M+H)⁺.¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 8.98-8.86 (m, 1H), 8.37-8.30 (m, 1H), 7.94-7.88 (m, 1H), 7.87-7.72 (m, 2H), 7.70-7.57 (m,

2H), 7.52-7.42 (m, 3H), 7.41-7.22 (m, 4H), 6.65-6.59 (m, 1H), 6.44-6.34 (m, 1H), 6.33-6.27 (m, 1H), 6.12 (s, 1H), 5.77-5.49 (m, 2H), 5.18-5.11 (m, 1H), 5.07-4.98 (m, 1H), 4.91-4.70 (m, 3H), 4.54-4.43 (m, 1H), 4.29-4.16 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.65-3.53 (m, 3H), 3.51-3.38 (m, 12H), 3.30-3.22 (m, 2H), 3.13-3.03 (m, 2H), 2.72-2.54 (m, 2H), 2.47-2.18 (m, 4H), 2.13-1.91 (m, 4H), 1.85-1.72 (m, 2H), 1.64-1.55 (m, 3H), 1.52-1.33 (m, 6H), 1.31-1.23 (m, 3H), 0.99-0.77 (m, 13H) ppm。分析型HPLC:99%, 保留时间:9.18和9.22min(方法B)。

实施例114

[0986] 制备化合物LP115:L11k (DIBAC-PEG4-VA-6-III)

[0987] 1- (4- {2- 氮杂三环 [10.4.0.0^{4,9}] 十六碳-1 (12) ,4 (9) ,5,7,13,15- 六烯-10- 炔-2- 基} -4- 氧丁酰胺基) -N- [(1S) -1- {[(1S) -1- [(4- {2- [(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S) -12,19- 二氟-11- 羟基-9,13- 二甲基-16- 氧-6- 丙基-5,7- 二氧杂五环 [10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}] 二十烷-14,17- 二烯-8- 基]-2- 氧乙氧基} -2- 氟苯基] 氨基甲酰基] 乙基] 氨基甲酰基} -2- 甲基丙基] -3,6,9,12- 四氧杂十五烷-15- 酰胺

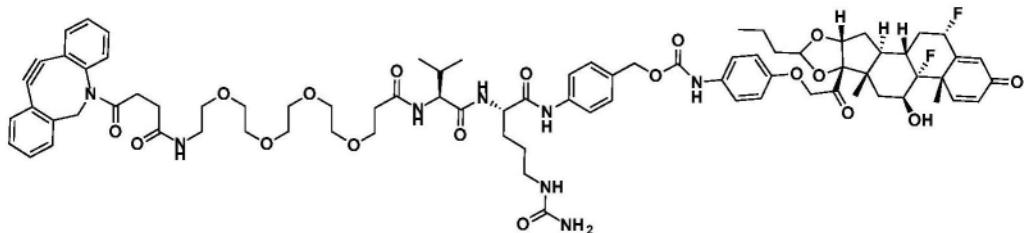


[0988] 根据一般方法I,由化合物L4f (82mg, 0.11mmol) 与DIBAC-suc-PEG₄-酸L9b,制备得到化合物L11k (50mg, 35%收率) 为白色固体。ESIm/z:1280 (M+H)⁺. ¹H NMR (500MHz, DMSO_{d6}) δ 9.54 (s, 1H), 8.41-8.15 (m, 1H), 8.01-7.17 (m, 12H), 6.90 (d, J=10.8Hz, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.31 (d, J=9.9Hz, 1H), 6.12 (s, 1H), 5.77-5.46 (m, 2H), 5.28-4.65 (m, 5H), 4.58-4.42 (m, 1H), 4.29-4.11 (m, 2H), 3.71-3.43 (m, 15H), 3.29 (s, 2H), 3.08 (s, 2H), 2.71-2.54 (m, 2H), 2.47-2.17 (m, 4H), 2.16-1.88 (m, 4H), 1.88-1.69 (m, 2H), 1.69-1.19 (m, 13H), 0.95-0.80 (m, 12H) ppm. ¹⁹F NMR (376MHz, DMSO) δ-121.11 和 -121.92, -165.13 和 -165.14, -186.38 和 -186.40 ppm。分析型HPLC:>99%, 保留时间:8.32min(方法B)。

实施例115

[0989] 制备化合物LP116:L11k (DIBAC-PEG4-VC-PAB-4b)

[0990] {4- [(2S) -2- [(2S) -2- [1- (4- {2- 氮杂三环 [10.4.0.0^{4,9}] 十六碳-1 (12) ,4 (9) ,5,7,13,15- 六烯-10- 炔-2- 基)-4- 氧丁酰胺基) -3,6,9,12- 四氧杂十五烷-15- 酰胺基] -3- 甲基丁酰胺基] -5- (氨基甲酰基氨基) 戊酰胺基] 苯基} 甲基N- (4- {2- [(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S) -12,19- 二氟-11- 羟基-9,13- 二甲基-16- 氧-6- 丙基-5,7- 二氧杂五环 [10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}] 二十烷-14,17- 二烯-8- 基]-2- 氧乙氧基} 苯基) 氨基甲酸酯



[0991] 根据一般方法I,由化合物L4k (58mg,60 μ mol)与DIBAC-suc-PEG₄-酸L9b,制备得到标题化合物L1v (20mg,22%收率)为白色固体。ESIm/z:1499 (M+H)⁺.¹H NMR (400MHz,DMSO-d₆) δ 10.02 (s,1H), 9.59 (s,1H), 8.14 (d,J=7.6Hz,1H), 7.88 (d,J=8.8Hz,1H), 7.80-7.75 (m,1H), 7.70-7.66 (m,1H), 7.65-7.60 (m,3H), 7.53-7.45 (m,3H), 7.40-7.28 (m,7H), 6.84 (d,J=9.2Hz,2H), 6.30 (dd,J=10.4Hz,J=1.6Hz,1H), 6.11 (s,1H), 6.10-6.0 (m,1H), 5.72-5.55 (m,1H), 5.52 (s,1H), 5.43 (s,2H), 5.16-5.05 (m,4H), 4.88-4.70 (m,3H), 4.43-4.33 (m,1H), 4.25-4.20 (m,2H), 3.65-3.55 (m,3H), 3.50-3.40 (m,12H), 3.30-3.25 (m,2H), 3.12-2.90 (m,4H), 2.70-2.55 (m,2H), 2.48-2.43 (m,1H), 2.40-2.35 (m,1H), 2.30-2.20 (m,2H), 2.15-1.95 (m,4H), 1.86-1.75 (m,2H), 1.64-1.54 (m,5H), 1.49 (s,4H), 1.46-1.34 (m,4H), 1.23 (s,2H), 0.90-0.80 (m,12H) ppm。分析型HPLC:100%,保留时间:7.83min(方法B)。

实施例116

[0992] ADC偶联物

[0993] 类固醇抗体偶联物概述于图33中。在其中一个实施例,通过微生物转谷氨酰胺酶(MTGC2.3.2.13,Zedira,Darmstadt,Germany)(本本发明中称为“基于MTG”)两步偶联N297Q或N297D突变抗体而生成位点特异性偶联物。在第一步骤中,通过基于MTG的酶促反应,用叠氮基-PEG₃-胺使N297Q突变的抗体官能化。参见例如,于2017年2月24日提交的国际PCT专利申请号PCT/US17/19537,其通过引用其整体并入本发明用于所有目的。在第二步骤中,通过[2+3]1,3-偶极环加成反应,将炔烃官能化的连接体-有效负载连接至叠氮基官能化的抗体上(图33描绘了与通过[2+3]环化衍生的叠氮基官能化抗体偶联的DIBAC官能化的连接体-有效负载(LP112))。此方法提供了位点特异性和化学计量的偶联物,分离收率为约50-80%。

[0994] 图33中制备得到的类固醇-抗体偶联物

[0995] 本实施例阐明了有效负载与抗体或其抗原结合片段进行位点特异性偶联的一般方法。本实施例参照图33。

[0996] 以下实施例阐明了制备表16中列出的叠氮基官能化抗体药物偶联物的方法。

[0997] 在BupHTM中具有人IgG1同种型的无糖基化抗体(pH7.6的抗体,在BupH化的₃-胺(BupHonalized₃-amine,MW.218.26g/mol)中具有人IgG1同种型)。将所得溶液与转谷氨酰胺酶(25U/mL;5UMTG/mg抗体)混合,使抗体的终浓度为0.5-3mg/mL,然后将溶液在37℃下孵育4-24小时,同时轻轻振荡。通过SDS-PAGE或ESI-MS监测反应。反应完成后,通过体积排除色谱法(SEC)除去过量的胺和MTG,以生成叠氮基官能化的抗体。在SDS-PAGE和ESI-MS上分析此产物。将叠氮基-dPEG₃-胺添加至抗体的两个位点-Q295和Q297-,导致所述4DAR无糖基化的抗体-PEG₃-叠氮化物偶联物增加804Da。通过胰蛋白酶消化的重链的肽序列作图,在EEQ^{连接体}YQ^{连接体}STYR(EEQ^{Linker}YQ^{Linker}STYR)处鉴定和确证所述4DAR叠氮基官能化抗体的偶联位点。

[0998] 以下实施例说明了使用点击化学反应制备药物与抗体的位点特异性偶联物的方法。

[0999] 通过叠氮基官能化抗体与含有炔烃的连接体-有效负载之间的[2+3]点击反应来制备位点特异性无糖基化抗体药物与下文表16中含有N297Q突变的人IgG1偶联物。如表16所示,抗PRLRAb-PEG₃-N₃与LP112、LP104和LP116偶联;和抗Fe1D1Ab-PEG₃-N₃与LP112和

LP116偶联。

[1000] 详细的偶联程序如下。通过将mAb-PEG₃-N₃(1-3mg/mL)在含水介质(例如,PBS,含有5%甘油的PBS,HBS)中与溶解于合适有机溶剂(例如,DMSO、DMF或DMA(即反应混合物含有5-20%有机溶剂,v/v))的≥6摩尔当量的LP在24℃至37℃下孵育超过6h来制备具有连接体-有效负载(LP)的位点特异性抗体偶联物。通过ESI-MS监测反应进程,若不存在mAb-PEG₃-N₃,表明偶联完成。通过SEC用PBS洗脱,或通过蛋白A柱色谱法,用酸性缓冲液洗脱,然后用Tris(三羟甲基氨基甲烷,pH8.0)中和,来除去过量的LP和有机溶剂。通过SEC、SDS-PAGE和ESI-MS来分析经纯化的偶联物。表16中示出了来自相应LP的类固醇抗体偶联物的列表,它们的分子量和ESI-DAR值。

[1001] 在具体实施例中,室温下,用6摩尔当量的DIBAC-PEG₄-D-Lys(COT-∞-CD)-VC-PABC-有效负载(浓10mg/mL的DMSO溶液)处理叠氮基官能化抗体(1mg)的0.800mLPBSg(PBS,5%甘油,pH7.4)溶液6-12小时,然后通过体积排除色谱法(SEC,Superdex 200 HR,GE Healthcare)除去过量的连接体有效负载(LP)。终产物通过超速离心进行浓缩,并通过UV、SEC、SDS-PAGE和ESI-MS进行表征。

实施例117

[1002] ADC通过LC-ESI-MS进行表征

[1003] 通过LC-ESI-MS测定ADC样品的完整质量以确定药物-有效负载分布曲线并计算平均DAR。将每个测试样品(20-50ng,5uL)上样到Acquity UPLC Protein BEH C4柱(10Kpsi,300 Å,1.7μm,75μm×100mm;目录号186003810)上。脱盐3分钟后,洗脱蛋白,并通过Waters Synapt G2-Si质谱仪获得质谱。

[1004] 如下图34所示,解卷积质谱示出了无糖基化抗PRLR抗体的主要峰,其分子量为144602Da,以及叠氮基官能化抗PRLR抗体的主要峰,其分子量为145385Da,表明与其无糖基化的亲本抗体相比增加了783Da(即,对应于与每种无糖基化抗体偶联的4个氨基-PEG₃-叠氮化物)。此外,抗PRLR-LP12偶联物的主要峰具有151015Da的分子量,表明与其叠氮基官能化的抗体相比增加了5630Da(对应于与每种无糖基化抗体偶联的4个LP4(MW=1405.6Da))。同样,其他位点特异性的抗PRLR-ADC具有3.9-4DAR。

[1005] 如下图35所示,解卷积质谱示出了无糖基化抗Fe1 D1抗体的主要峰,其分子量为145441Da,以及叠氮基官能化抗Fe1 d1抗体的主要峰,其分子量为146235Da,表明与其无糖基化的亲本抗体相比增加了794Da(即,对应于与每种无糖基化抗体偶联的4个氨基-PEG₃-叠氮化物)。此外,抗Fe1 d1-LP12偶联物的主要峰具有151871.0Da的分子量,表明与其叠氮基官能化的抗体相比增加了5635Da(对应于与每种无糖基化抗体偶联的4个LP4(MW=1405.6Da))。同样,其他位点特异性的抗Fe1d1-ADC具有3.9-4DAR。

[1006] 表16中列出了来自相应LP的非细胞毒性类固醇抗体偶联物(ncADC),它们的裸抗体、叠氮基官能化抗体、LP和类固醇ADC的分子量,以及ESI-DAR值。在此表中,Ab是指抗体,Ab-N₃是指叠氮基官能化抗体,ncADC是指非细胞毒性类固醇抗体偶联物。

实施例118

[1007] 体外酶促测定

[1008] 组织蛋白酶B测定中的连接体-有效负载切割

[1009] 连接体-有效负载在组织蛋白酶B测定中进行测试。在含有和不含CapB抑制剂

(VA074) 的组织蛋白酶B (CapB) 中孵育4小时后, 使用LC-MS/MS来评估连接体-有效负载和游离有效负载。结果表明, 与非亲水性连接体-有效负载 (LP12) 相比, 亲水性连接体-有效负载 (LP104) 可以被CapB切割并释放更多的有效负载 (4b)。

[1010] CapB测定程序如下: 将连接体-有效负载储备溶液 (10mM的DMSO溶液) 掺入孵育缓冲液 (100mM NaOAc, 10mM二硫苏糖醇, pH5) 中, 得到50μM底物溶液。将4μL的0.47μg/μL人肝组织蛋白酶B (Athens Research&Technology, Athens, GA) 的50mM NaOAc、1mM EDTA、pH5溶液加至196μL的50μM底物溶液中。将反应混合物在37°C下孵育4小时。然后将5μL乙酸和150μL乙腈 (含有利胆酚 (osalmid) 作为内标) 加至50μL反应混合物等分试样中。涡旋后, 将淬灭的样品在-70°C深度冷冻器中冷冻, 然后解冻, 并以14,000rpm离心。然后用等体积的水稀释50μL等份试样的所得上清液, 并通过LC-ESI-MS/MS来分析释放的有效负载。

表17. 组织蛋白酶B切割结果

化合物	有效负载	连接体			含有或不含 CA074		转化率(%)
		切割片段	亲水连接体	偶联的片段			
LP101	4b	vcPAB	/	Lk-CCK	不含	平均值	48.20
						RSD	
					含有	平均值	<1.00
						RSD	
LP112	4b	vcPAB	/	Lk-DIBAC	不含	平均值	20.8
						RSD	
					含有	平均值	<1.00
						RSD	
LP104	4b	vcPAB	aCDCCK	Lk-DIBAC	不含	平均值	29.0
						RSD	
					含有	平均值	<1.00
						RSD	
LP102	6-I	Val-Ala	/	Lk-CCK	不含	平均值	22.72
						RSD	
					含有	平均值	<1.00
						RSD	
LP108	6-I	Val-Ala	aCDCCK	Lk-DIBAC	不含	平均值	
						RSD	
LP116	6-I	vcPAB	/	Lk-DIBAC	含有	平均值	
						RSD	
					不含	平均值	
						RSD	
LP103	6-I	vcPAB	/	Lk-CCK	含有	平均值	<1.00
						RSD	
					不含	平均值	29.0
						RSD	

					含有	平均值	
						RSD	
LP116	6-I	vcPAB	/	Lk-DIBAC	不含	平均值	
						RSD	
					含有	平均值	<1.00
						RSD	
LP103	6-I	vcPAB	/	Lk-CCK	不含	平均值	29.0
						RSD	
					含有	平均值	<1.00
						RSD	

[1011] CapB测定实验包括以下程序。

1. 预热分析缓冲液: 0.1M NaOAc/0.01M DTT (pH 5.0)

2. 用于测试化合物的掺入溶液 (Spiking solutions) : 用于测试化合物的25μM掺

入溶液:将2 μ L的5mM储备溶液加至398 μ L的0.1M NaOAc/0.01M DTT缓冲液(pH 5.0)中。

3. 制备0.47 μ g/ μ L组织蛋白酶B的50mM NaOAc/1mM EDTA (pH 5.0) 溶液。放置在冰上。

4. 不含CA074样品:将4 μ L的0.47 μ g/ μ L组织蛋白酶B加至196 μ L25 μ M掺入溶液(来自步骤2)中,所述管在37°C下孵育。

5. 含CA074样品:将4 μ L的0.47 μ g/ μ L组织蛋白酶B与4 μ L的10mM抑制剂(CA074) 加至196 μ L25 μ M掺入溶液(来自步骤2)中,所述管在37°C下孵育。

6. 4小时后,取5 μ L的等分试样(含有CA074和不含CA074)进行酶活性试验(步骤15-17)。同时,在此时间点(4小时)取50 μ L等分试样,加入5 μ L乙酸,然后加入150 μ L ACN (IS) 终止反应。

7.淬火后,摇动所述板并以14000rpm离心。

8. 将50 μ L上清液从每个孔转移至含有50 μ L超纯水(Millipore,ZMQS50F01)的96孔样品板中,用于LC/MS分析。

[1012] CapB测定实验包括参考化合物和以下程序。

9. 预热测定缓冲液:100mM Na/K磷酸盐,pH 6.0,含1.33mM EDTA和2mM DTT。

10. 制备0.024 μ g/ μ L组织蛋白酶B:将1 μ L的0.47 μ g/ μ L组织蛋白酶B原液加至19 μ L测定缓冲液(来自步骤11)中。

11. 将2 μ L的0.024 μ g/ μ L组织蛋白酶B(来自步骤12)加至不透明的96孔板中。

12. 向每个样品中加入96 μ L测定缓冲液。

13. 加入2 μ L的10mM底物Z-RR-MNA (200 μ M终浓度)。

对于阴性对照(含抑制剂),加入2 μ L的10mM抑制剂(CA074)。

14. 立即以动力学模式读取样品,激发波长为340nm/发射波长为425nm(每30秒读取一次板,持续3分钟)。

组织蛋白酶B在孵育样品中的稳定性:

15. 取5 μ L孵育样品加至93 μ L测定缓冲液(来自步骤11)中,然后加入2 μ L的10mM底物

(Z-RR-MNA)。

16. 将样品在37°C下孵育2分钟。

17. 在激发波长为340nm/发射波长为425nm下读取样品。

实施例119

[1013] 体外无细胞和基于细胞的活性

[1014] 在LanthaScreen TR-FRET GR竞争性结合试验中无细胞结合糖皮质激素受体(GR)。

[1015] 为了评估新型类固醇类化合物结合糖皮质激素受体(GR)的能力,使用LanthaScreen TR-FRET GR竞争性结合试验试剂盒(Life Technologies,目录号A15901)进行无细胞结合测定试验。根据制造商的说明书进行测定试验。布地奈德是商业GR类固醇,并且在结合测定试验和本发明后面所述的其他基于细胞的测定试验中用作参考对照。简而言之,从100nM(最终浓度的100倍)开始,在100%DMSO中制备布地奈德和下述衍生化合物的三倍连续稀释液。将连续稀释液在具有5mM DTT和0.1mM稳定肽的核受体缓冲液F中进一步稀

释50倍，并转移至384孔测定板中。接下来，将Fluormone GS1 Green、GR-LBD (GST) 和Tb抗GST抗体依次加至384孔测定板中。所述板在Envision多标记微孔检测仪 (Envision Multilabel Plate Reader, PerkinElmer) 上进行分析，激发设定在340nm处，发射滤光器设定在520nm和486nm处。FRET比计算为520nm/486nm。IC₅₀值是使用四参数逻辑方程在12点响应曲线 (GraphPad Prism) 上进行测定。

[1016] 如表18所示，布地奈德在GR测定中竞争结合Fluormone GS1 Green，IC₅₀值在10至100nM之间。布地奈德的N-类似物类似地竞争结合，IC₅₀值范围从小于10nM至大于100nM。本发明测试的新型类固醇类化合物在此测定试验中，与布地奈德相比，表现出与其相当或更好(较低的IC₅₀值)的活性，并且GR配体具有相似的置换。

表18:无细胞结合和基于细胞的功能活性

化合物编号	HEK293/9xUAS-Luc2P/pBind-GR/PRLR-HA 高细胞 EC ₅₀ (nM)	GR 竞争性结合试验 IC50 (nM)
布地奈德	+++	完全激活
4b	+++	完全激活

化合物编号	HEK293/9xUAS-Luc2P/pBind-GR/PRLR-HA 高细胞 EC ₅₀ (nM)	GR 竞争性结合试验 IC50 (nM)
4d	++	部分激活
4h	+++	完全激活
5-I	+++	完全激活
6-I	+++	完全激活
R-6-I	+++	完全激活
S-6-I	+++	完全激活
6-ID	+++	完全激活
6-II	+++	完全激活
6-III	+++	完全激活
6-VI	+++	完全激活
6-VII	NA	无激活

[1017] 在表18中：+++<10nM；10nM≤++<50nM；50nM≤+；NT=未测试；NA=无激活。完全激活：布地奈德诱导的>75%的倍数激活。部分激活：布地奈德诱导的(20%，75%)的倍数激活。无激活：布地奈德诱导的<20%的倍数激活。无细胞试验用于评估化合物与重组GRLBD的直接结合，无论其渗透性如何。基于细胞的试验用于测定化合物在通过质膜后如何激活细胞内GR介导的转录，因此化合物的膜渗透性是活性的先决条件。

实施例120

[1018] 基于糖皮质激素受体 (GR) 共激活因子荧光素酶报告基因细胞的测定试验

[1019] 糖皮质激素激活测定

[1020] 采用基于荧光素酶报告基因细胞的测定法，使用实施例62中所述的293/PRLR/

GRE-luc细胞系以及含嵌合受体的抗原阴性293细胞系,对类固醇有效负载和抗PRLR类固醇ncADC的活性进行了研究,其中所述嵌合受体由与酵母CAL4DNA结合结构域(pBind-GR, Promega目录号E1581)融合的GR配体结合结构域和驱动荧光素酶表达的Gal4上游激活因子序列(9XGal4UAS-Luc)组成。所得细胞系称为293/GRE-Luc。

[1021] 使用如实施例63中所述的测定法,使用这两种细胞系,tesgin抗PRLR-LP112,地塞米松,布地奈德,化合物4b,对照Ab-LP112以及单独的抗PRLR Ab进行生物测定。

[1022] 如图36A和下表所示,培养72小时后,抗PRLR-LP112在293/PRLR/GRE-luc细胞系中显示出最高倍数,而LP112(4b)的有效负载显示出比布地奈德和地塞米松更佳的IC₅₀值。对照Ab-LP112和未偶联的抗PRLRmAb在此细胞系中未显示出活性。

[1023] 如图36B和下表所示,孵育72小时后,抗PRLR-LP112在不表达PRLR的293/PRLR/GRE-luc细胞系中未显示出激活,表明抗PRLR-ncADC的类固醇递送是抗原依赖性的。有效负载LP112(4b)再次显示出比布地奈德和地塞米松更佳的IC₅₀值。所述对照Ab-LP112和未偶联的抗PRLRAb在此细胞系中未显示出任何活性。

[1024] 下表参照图36A和36B。

	293/PRLR/GRE-Luc (M) 中的EC ₅₀	293/GRE-Luc (M) 中的EC ₅₀
抗PRLR Ab-LP112	+++	+
对照Ab-LP112	+	+
抗PRLR Ab	NA	NA
4b (LP112的有效负载)	+++	+++
布地奈德	++	+++
地塞米松	+++	+++

在此表中,+++<5nM,5nM<++<10nM,10nM<+。

实施例121

[1025] 本实施例描述了LPS诱导的细胞因子释放的小鼠模型

[1026] 本研究的目的是评估测试化合物4b和6-I对小鼠中LPS诱导的细胞因子释放的抑制。在LPS攻击前48小时、24小时和2小时时施用测试化合物,在LPS攻击后2小时和4小时时间点测定包括TNF-α和IL6的血液样品中的细胞因子水平。

[1027] 物料和试剂

[1028] 衍生自大肠杆菌(E.Coli)K12的脂多糖(LPS)购自Invivogen(San Diego, California, USA, 目录号T1rl-eklps),地塞米松购自ADAMAS(Emeryville, CA, USA, 目录号50-02-2)。小鼠TNF-αELISA试剂盒来自ebioscience(ThermoFisher Scientific, 目录号88-7324)。小鼠IL6ELISA试剂盒来自ebioscience(ThermoFisher Scientific, 目录号88-7064)。

[1029] 实验方法

[1030] 动物饲养方法:

[1031] 在此研究中使用总共18只空白C57BL/6j小鼠。动物均为雄性,在研究开始时体重为18-20g。动物购自中国科学院上海实验动物中心(SLAC),并在SPF环境中饲养于睿智化学(ChemPartner)的动物室。到达后,检查动物的健康状况,包括表皮、四肢、孔口、以及姿势或

运动的异常迹象，并适应环境7天以上。

[1032] 将动物每笼3只小鼠圈养在SPF环境中的IVC聚碳酸酯鞋盒笼中；将动物室的环境控制设定为保持温度为20-26°C，湿度为40-70%，以及12小时光照/12小时黑暗循环。

[1033] 在整个研究期间随意提供标准食物(SLAC-M01, 来自上海实验室动物中心)和纯化水(经过滤的, 市政水质)。

[1034] 实验程序

[1035] 分组：在研究开始前将动物随机分配为6组(A-F)。每组包括3只小鼠。A组作为单纯对照；B组接受地塞米松并作为阳性对照；C组用4b处理，和D-F组用6-I处理。

[1036] 实验程序

[1037] 所有小鼠通过腹腔注射以0.5mpk的剂量接受溶解在PBS中的LPS。A组小鼠接受PBS, B组小鼠接受Dex(地塞米松, 5mpk), C组小鼠在LPS攻击前2小时时腹腔注射接受4b(5mpk)；D组、E组和F组中的小鼠分别在LPS攻击前2小时、24小时和48小时时，通过腹腔注射，以5mpk的剂量接受。

[1038] 在LPS攻击后2小时和4小时时间点收集血液样品，置于含肝素的管中。将血液样品离心，收集血浆样品，并在分析前，于-80°C下储存。

[1039] 使用ELISA试剂盒，按照制造商推荐的标准程序，测定血浆中TNF α 的水平。

[1040] PK结果提供在图37A和表20中。

表20.4b和6-I的PK参数总结

PK 参数	单位	地塞米松 (IP, 雄性 C57BL/6 小鼠, 1mg/Kg)			4b (IP, 雄性 C57BL/6 小鼠, 1mg/Kg)			6-I (IP, 雄性 C57BL/6 小鼠, 1mg/Kg)		
		平均值	SD	CV(%)	平均值	SD	CV(%)	平均值	SD	CV(%)
T _{max}	hr	0.625	0.433	69.3	0.438	0.375	85.7	0.250	0.00	0.00
C _{max}	ng/mL	231	7.97	3.45	39.4	1.75	4.43	44.8	4.77	10.6
终末 t _{1/2}	hr	1.64	0.187	11.4	1.69	0.620	36.7	1.91	0.210	11.0
AUC _{last}	hr*ng/ mL	545	60.6	11.1	84.6	7.71	9.12	107	13.6	12.7
AUC _{IN F}	hr*ng/ mL	562	67.2	11.9	89.2	8.20	9.19	113	14.1	12.5

[1041] PD结果

[1042] 在2小时取样时间点观察到的此药效学模型中LPS激发诱导TNF- α 释放。结果与小鼠LPS激发模型中细胞因子释放的报道动力学一致，TNF- α 水平在4小时时间点下降。因此，测试化合物的效果将无法测定，与此一致的是，在4小时时间点，各组之间没有观察到显著性抑制。

[1043] 在LPS攻击后2小时和4小时时收集血液样品；测定血浆中的TNF- α 水平。通过单向分析，数据表示为相对于A组的平均值±SEM,*p<0.05,**p<0.01。

[1044] 如图37A所示，在2小时时间点，4b以5mpk的剂量显著抑制TNF- α 的生成；6-I显示出时间依赖性抑制，并且在LPS攻击前2小时给药时，显著抑制TNF- α 生成。DEX能够在2小时的

采样时间点显著抑制TNF- α 。

[1045] 在LPS攻击后2小时和4小时时收集血液样品;测定血浆中的TNF- α 水平。通过单向ANOVA分析,数据表示为相对于A组的平均值±SEM,*p<0.05,**p<0.01。

[1046] ANOVA分析提供在图37B和表21中。

表21.TNF- α 的原始数据

TNF- α (pg/ml)	A:PBS	B: DEX 5MPK (-2h)	C:4b 5MPK (-2h)	D: 6-I 5MPK(-2h)	E) 6-I 5MPK(-24h)	F) 6-I 5MPK(-48h)
2hr	840.2	644.3	56.5	110.6	23.1	1280.1
	1293.6	508.5	10.4	30.8	997.3	1149.4
	968.6	487.1	274.8	240.8	55.4	750.0

实施例122

[1047] 小鼠树突细胞

[1048] 为了确定化合物4b对离体LPS诱导的炎性免疫应答的影响,从野生型C57B1/6小鼠(Jackson Labs,档案号426.0)的脾中分离CD11c⁺树突细胞(DC)。使用胶原酶D消化(400U/mL胶原酶D(Roche目录号11088858001),20g/mL DNaseI(脱氧核糖核酸酶,Roche目录号10104159001),2%FCS的HEPES-缓冲的RPMI-1640溶液)来分离脾DC,并在37°C下孵育25分钟。孵育后,用RPMI-1640清洗脾组织并通过70μm过滤器过滤,然后使用ACK裂解缓冲液(Gibco目录号A1049201)进行红细胞裂解,持续1分钟。随后使用RPMI-1640清洗细胞悬浮液两次。使用CD11c磁性微珠(magnetic MicroBeads,Milteny Biotec目录号130108338)从单核细胞悬浮液中分离得到经典DC。简言之,根据Milteny Biotec建立的方案,在4°C下用CD11c⁺磁微珠(Micro Beads)孵育30分钟之前,用autoMACS运行缓冲液(Milteny Biotec目录号130091221)清洗细胞悬浮液两次。通过阳性选择来分离CD11c⁺细胞,清洗,悬浮于完全RPMI[RPMI-1640(ThermoFisher Scientific,目录号15140122),含有10%FBS(ThermoFisher Scientific,目录号10082147)和1%青霉素-链霉素(ThermoFisher Scientific,目录号11875093)]中,并在培养之前以每孔2x10⁵个细胞计数。将对照完全-RPMI、化合物4b处理的完全RMPI(以10nM和100nM),或地塞米松(Sigma,目录号D4902-25MG)处理的完全RMPI(以10nM和100nM)加至96孔培养皿的细胞中。将DC/对照、化合物4b或地塞米松处理的细胞在37°C下孵育24小时,然后用10ng/mL LPS刺激24小时。

[1049] 人树突细胞:

[1050] 为了确定化合物4b对人体先天免疫细胞中离体LPS诱导的炎性免疫应答的影响,分离CD14⁺单核细胞(Lonza目录号2W-400C)并在补充有人IL4(50ng/mL)(Milteny Biotec,目录号130-093-922)和人GM-CSF(100ng/mL)(Milteny Biotec,目录号130093866)的完全RPMI[RPMI-1640(ThermoFisher Scientific,目录号15140122),含有10%FBS(ThermoFisher Scientific,目录号10082147)和1%青霉素-链霉素(ThermoFisher Scientific,目录号11875093)]存在下进行培养,持续7天。每三天更换一次含有IL4和GM-CSF的完全RPMI。开发了两种特定的培养条件:条件1:用对照完全RPMI、化合物4b处理完全RMPI(以10nM和100nM),或地塞米松(Sigma)处理完全RMPI(以10nM和100nM)孵育CD14⁺单核

细胞整7天的培养；或条件2：在用对照完全RMPI、化合物4b处理的完全RMPI（以10nM和100nM），或地塞米松（Sigma，目录号D4902-25MG）处理的完全RMPI（以10nM和100nM）孵育之前，用对照完整RPMI孵育CD14⁺单核细胞5天，直至第7天。在第7天，用10ng/mL LPS刺激各个实验组24小时。

[1051] LPS离体攻击后24小时时测定上清液中的细胞因子：

[1052] 在LPS攻击后24小时时将上清液收集到96孔圆底组织培养板中，并在-20℃下储存直至进一步分析。根据制造商的说明书，使用Pro-inflammatory Panel 1（Pro-炎症小组1，小鼠）多重免疫测定试剂盒（MesoScale Discovery，目录号K15048D）或Pro-inflammatory Panel 1（人类）多重免疫测定试剂盒（MesoScale Discovery，目录号K15049D）来测定上清液中的细胞因子浓度。简言之，将50μL/孔的校准物和样品（用稀释剂1:2进行稀释）加至预先用捕获抗体包被的板中，并在室温下孵育，同时以700rpm振荡2小时。然后将板用含有0.05%（w/v）吐温-20的1xPBS清洗3次，然后加入稀释在稀释剂45（Diluent45）中的25μL检测抗体溶液（Detection Antibody Solution）。在室温下振荡孵育2小时后，将板清洗3次，并向每个孔中加入150μL的2x Read Buffer（读数缓冲液）。立即在MSDSpector[®]仪器上读取电化学发光。使用GraphPad PrismTM软件进行数据分析。组内的统计显著性通过单向ANOVA分析与土耳其的多重比较后测试（Turkey's multiple comparison post-test）和平均标准误差（SEM±）进行计算确定。

[1053] 结果总结与结论：

[1054] 如表22所示，离体LPS攻击诱导脾CD11c⁺DC强烈产生IL12p70, IL1β, IL6, KC-GRO和TNF-α。相反，体外施用地塞米松和化合物4b，在24小时不断增加剂量情况下，显著降低了CD11c⁺DC中LPS诱导的细胞因子应答。

[1055] 表22：化合物4b和地塞米松（Sigma）抑制CD11c⁺脾DC中LPS诱导的细胞因子产生。

细胞因子	对照	对照+LPS	地塞米松 (10 nM)	地塞米松(10 nM) +LPS	地塞米松 (100 nM)	地塞米松(100 nM) +LPS
IL-12p70	17.43±2.72	77.02±4.40	8.55±1.08	30.41±3.22	6.05±1.13	9.29±3.28
IL-1b	9.53±0.26	162.48±5.69	6.299±0.33	34.76±4.33	5.25±0.12	10.58±0.88
IL-6	144.49±16.69	1492.12±66.47	98.93±8.98	714.89±77.13	55.07±1.76	303.48±11.37
KC-GRO	111.69±10.96	536.47±49.90	75.75±8.03	399.40±49.75	65.99±2.75	233.49±18.48
TNF-α	0±0	8644.14±74.73	0±0	2496.27±415.75	0±0	405.49±70.23
	4b (10 nM)	4b (10 nM) +LPS	4b (100 nM)	4b (100 nM) +LPS		
IL-12p70	5.24±1.12	3.84±2.88	6.43±0.67	8.21±2.79		
IL-1b	5.22±0.11	6.32±0.83	5.65±0.18	4.80±0.99		
IL-6	47.90±4.55	184.54±21.59	63.87±4.78	201.10±20.96		
KC-GRO	62.85±6.51	186.57±15.71	84.30±6.06	211.96±25.23		
TNF-α	0±0	146.46±18.66	0±0	193.29±25.56		

[1056] 如表23所示，离体LPS攻击诱导人单核细胞衍生的DC强烈表达IL12p70, IL1β, IL6和TNF-α。相反，用化合物4b和地塞米松（Sigma）培养整个7天调理期（条件1）的单核细胞导致促炎细胞因子的产生显著降低。此外，与对照DCLPS刺激相比，用化合物4b和地塞米松（Sigma）调节成熟单核细胞衍生的DC也显著降低IL12p70, IL6和TNF-α的产生。

[1057] 表23：化合物4b和地塞米松（Sigma）抑制人单核细胞衍生的DC中LPS诱导的细胞因

子产生。

条件 1				
细胞因子	对照	对照+LPS	地塞米松 (10 nM)	地塞米松 (10 nM) +LPS
IL-12p70	0.79±0.04	994.23±19.89	0.65±0.02	4.83±0.05
IL-1b	0.80±0.001	12.97±0.186	0.625±0.006	1.77±0.11
IL-6	8.71±0.23	5669.2±266.12	2.68±0.03	687.45±2.17
IL-8	850.50±0.89	1677.86±20.06	174.59±0.68	8789.98±126.98
TNF-α	44.20±1.08	7476.12±177.0	2.32±0.098	242.34±10.75
	4b (10 nM)	4b (10 nM) + LPS	4b (100 nM)	4b (100 nM) + LPS
IL-12p70	0.58±0.002	1.05±0.08	0.66±0.03	0.50±0.19
IL-1b	0.61±0.007	1.18±0.11	0.641±0.15	1.01±0.07

IL-6	2.23±0.002	325.46±2.12	3.45±0.13	159.32±7.31
IL-8	166.99±2.01	8670.27±268.97	136.50±0.87	8461.59±522.77
TNF-α	1.28±0.087	117.75±6.63	1.46±0.10	123.31±0.11
条件 2				
细胞因子	对照	对照+LPS	地塞米松 (10 nM)	地塞米松 (10 nM) +LPS
IL-12p70	5.83±2.55	49.64±2.05	0.64±0.03	6.32±1.69
IL-1b	3.13±0.05	13.03±1.26	0.611±0.003	37.88±1.90
IL-6	37.74±1.50	6679.97±173.8	14.76±0.267	5747.37±234.08
IL-8	1541.04±82.6	1958.27±5.35	288.23±6.02	3314.0±37.86
TNF-α	61.49±4.82	2690.61±164.5	1.73±0.02	994.92±73.66
IL-12p70	4b (10 nM)	4b (10 nM) + LPS	4b (100 nM)	4b (100 nM) + LPS
IL-1b	0.60±0.01	4.81±0.63	0.61±0.02	2.03±0.16
IL-6	0.59±0.005	30.10±0.93	0.59±0.03	18.20±1.04
IL-8	12.87±0.312	5124.75±114.8	11.25±0.82	4680.03±104.90
TNF-α	274.75±1.75	3003.52±212.16	317.46±14.83	2735.36±87.88
	2.03±0.14	874.18±30.46	1.37±0.251	696.26±75.10

[1058] 上述实施方案和实施例仅用于说明而非限制。本领域技术人员将认识到或将能够使用不超过常规实验来确定许多等同的具体化合物、物料/材料和方法/程序。所有此类等同物均被认为是在所附权利要求范围内并且包含在所附权利要求中。

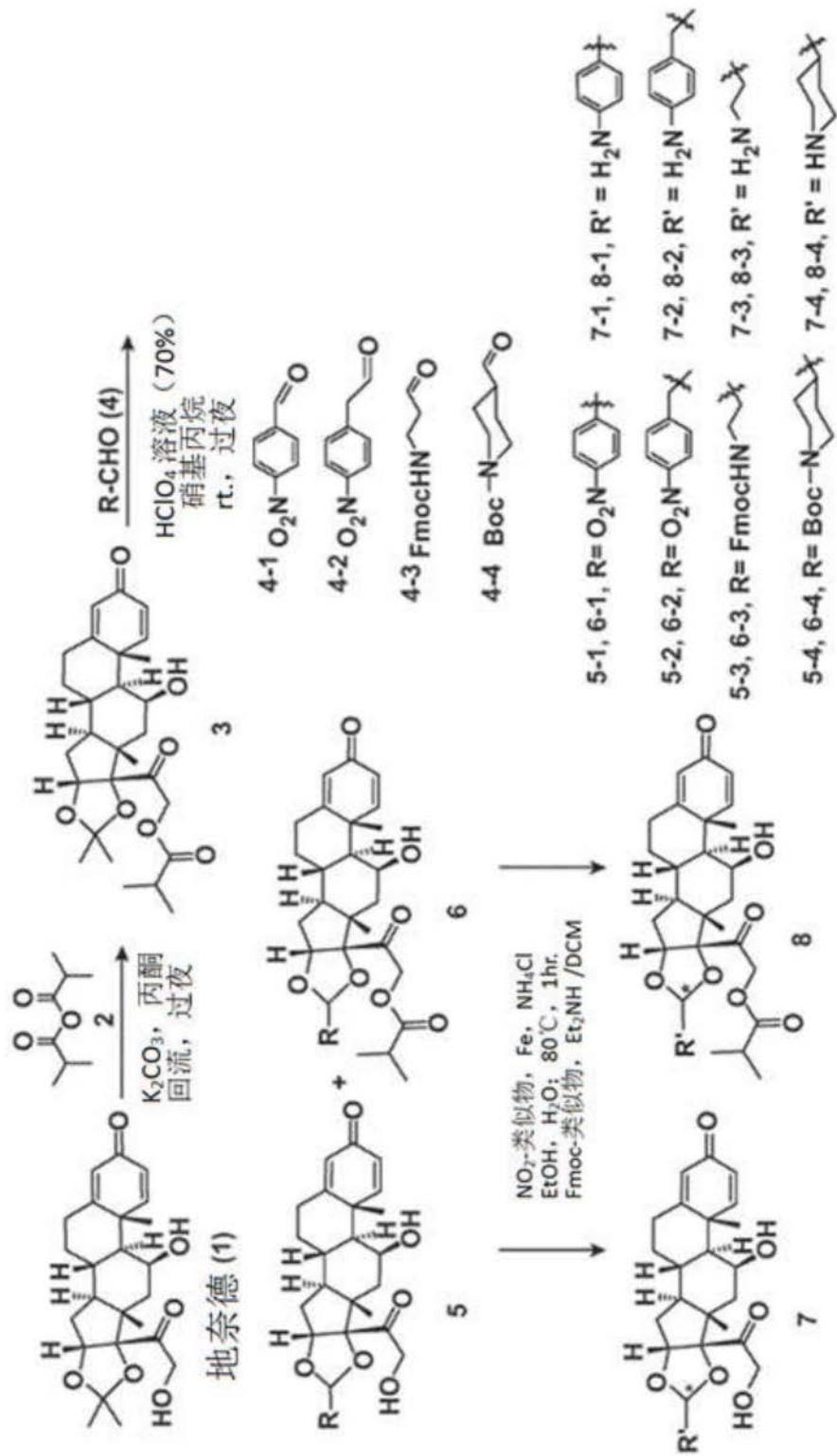


图1

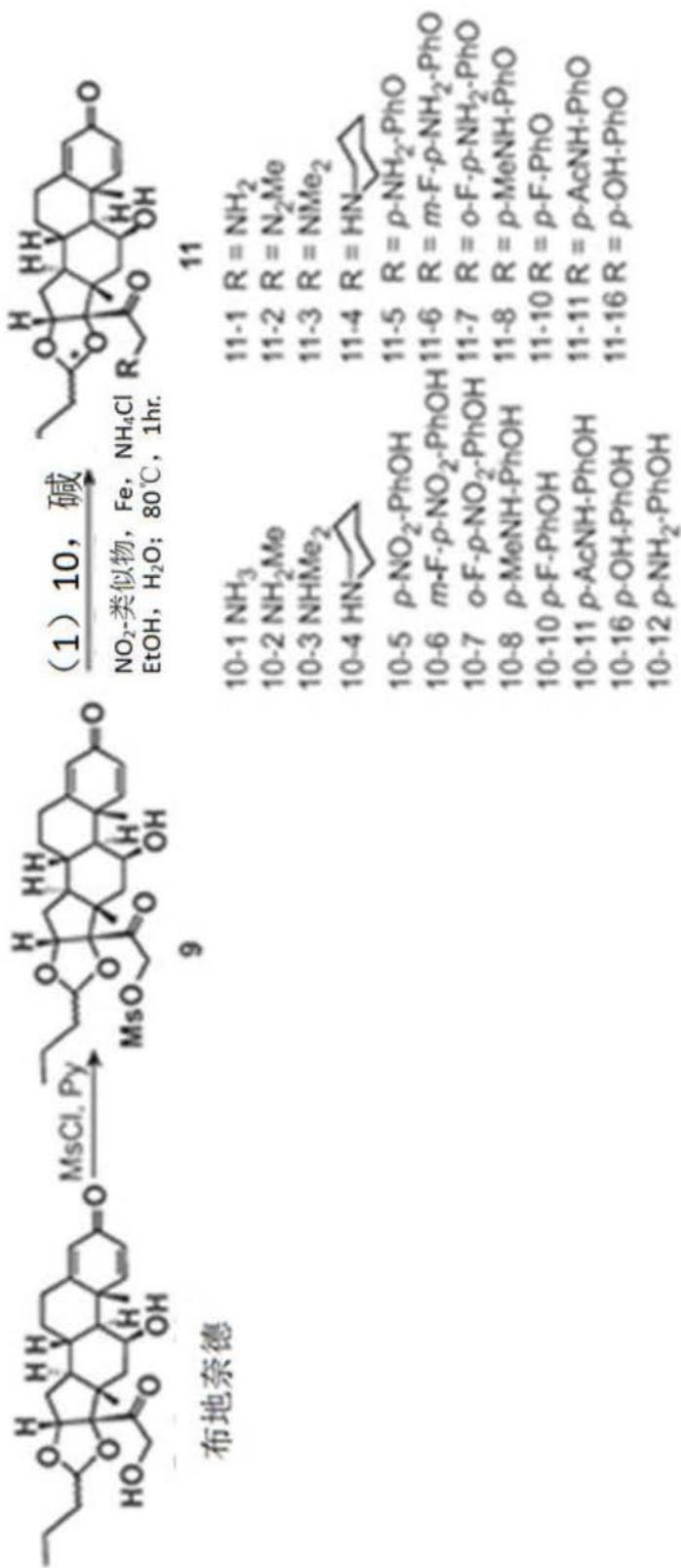


图2

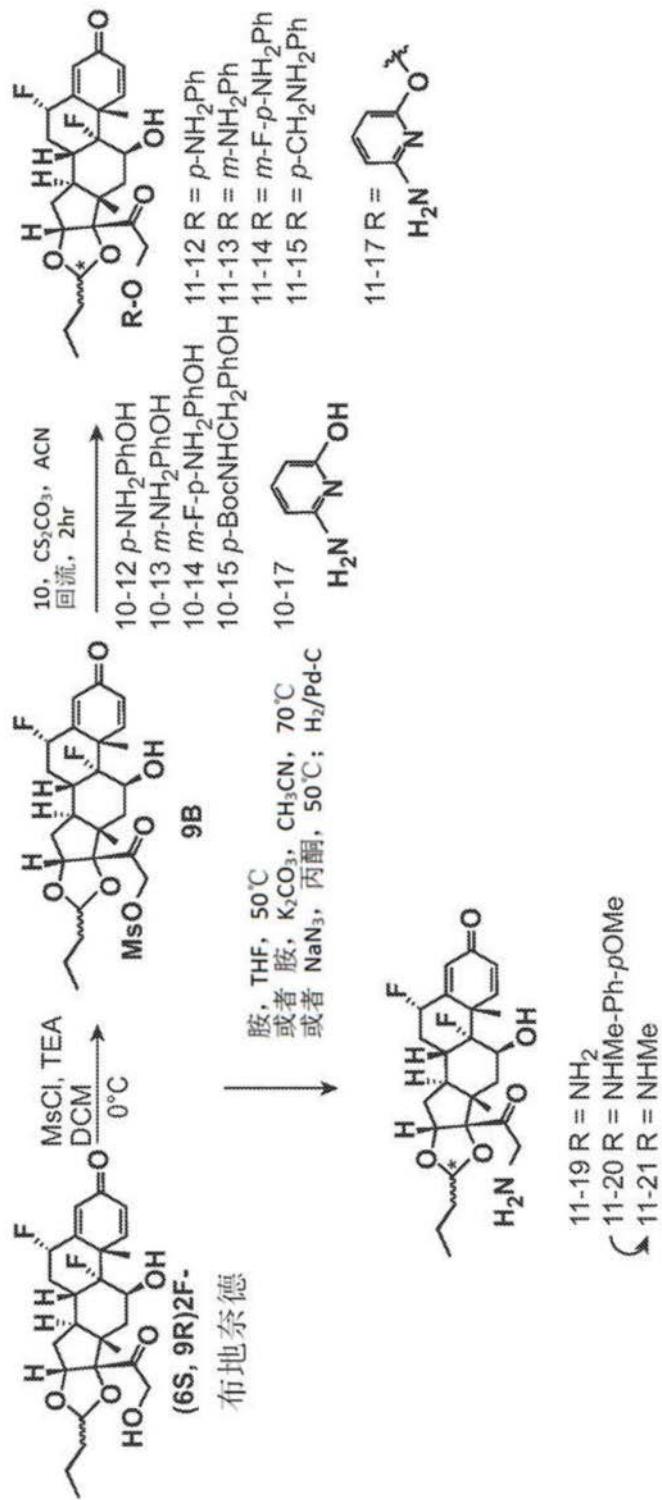


图2(续)

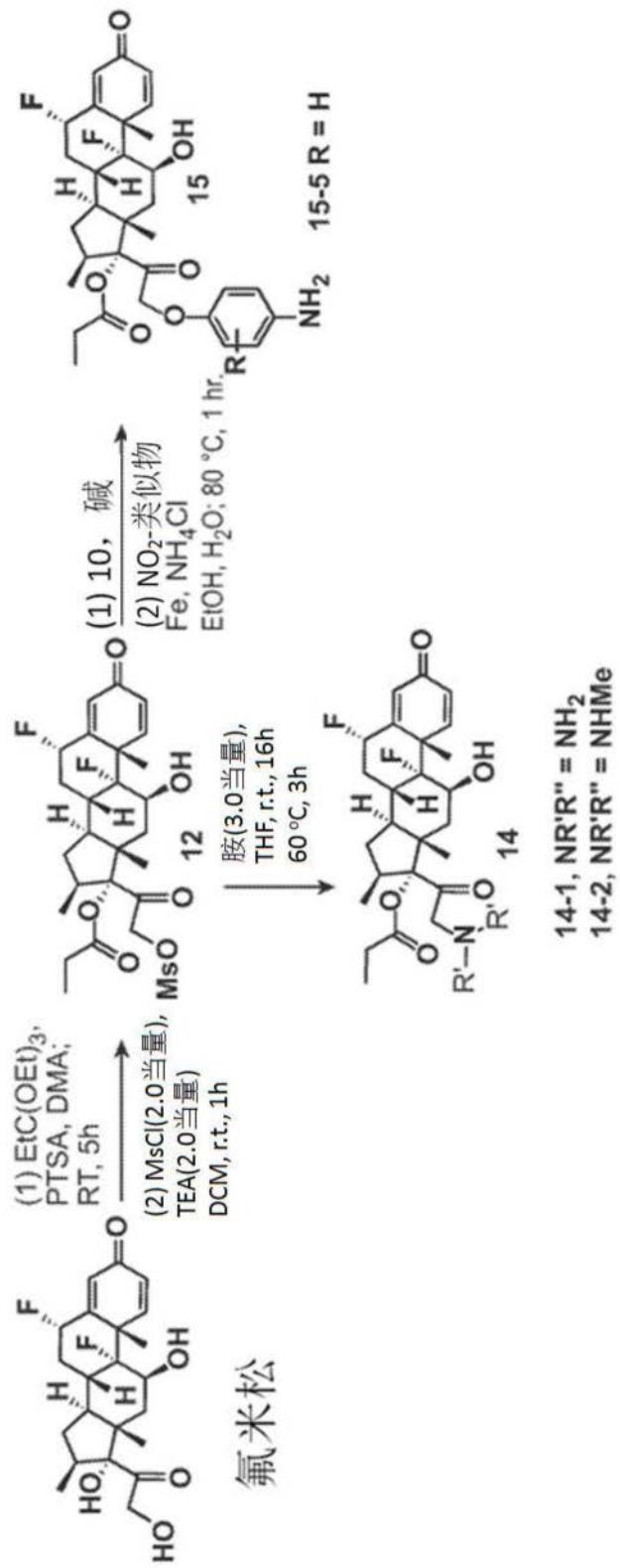


图3

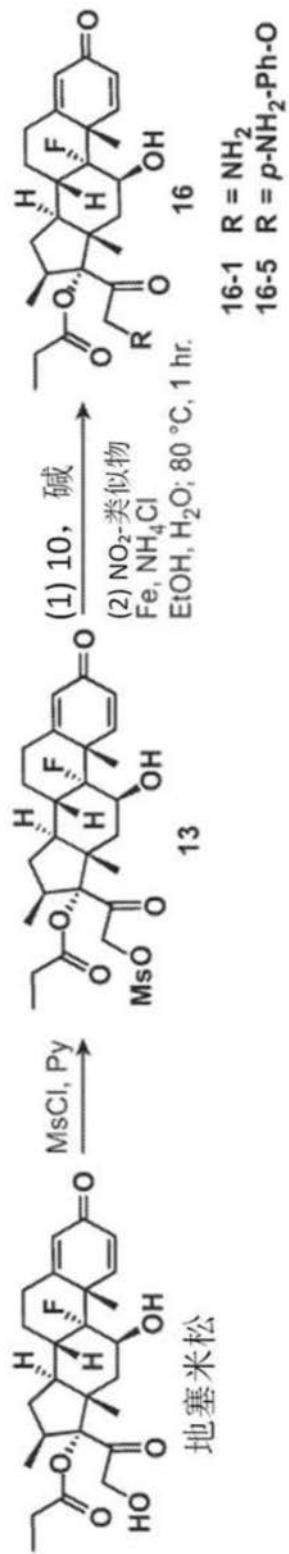


图4

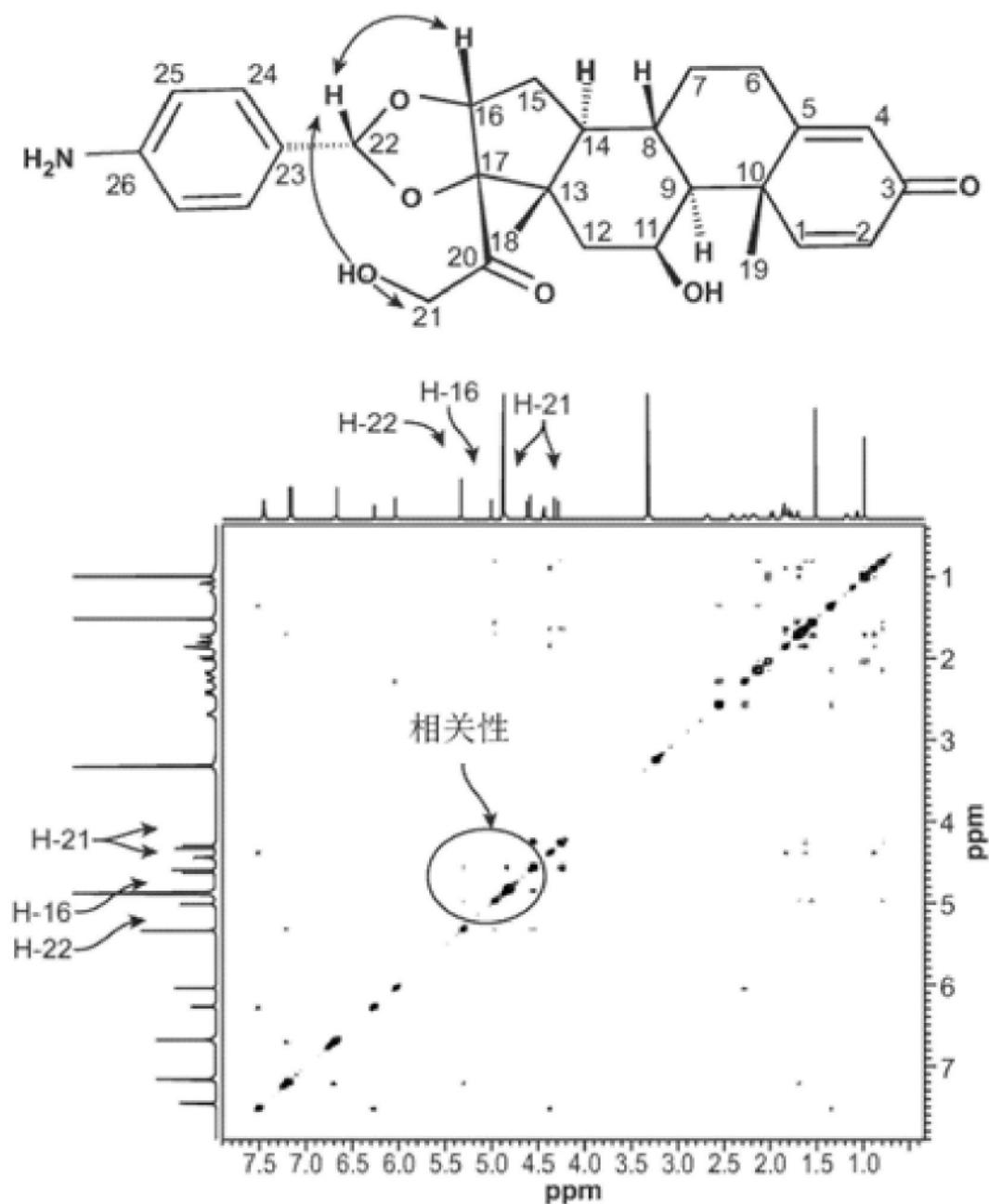


图5

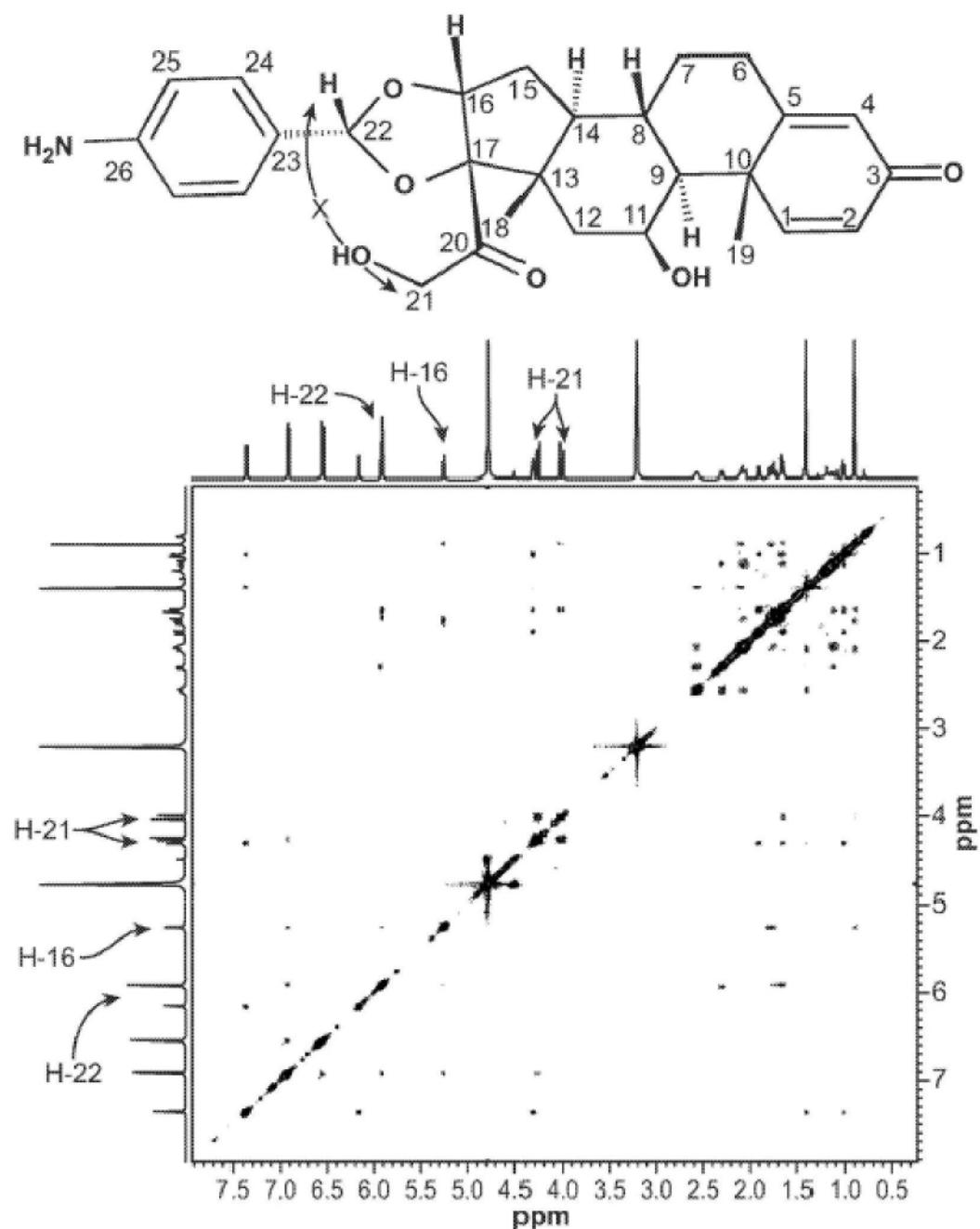


图6

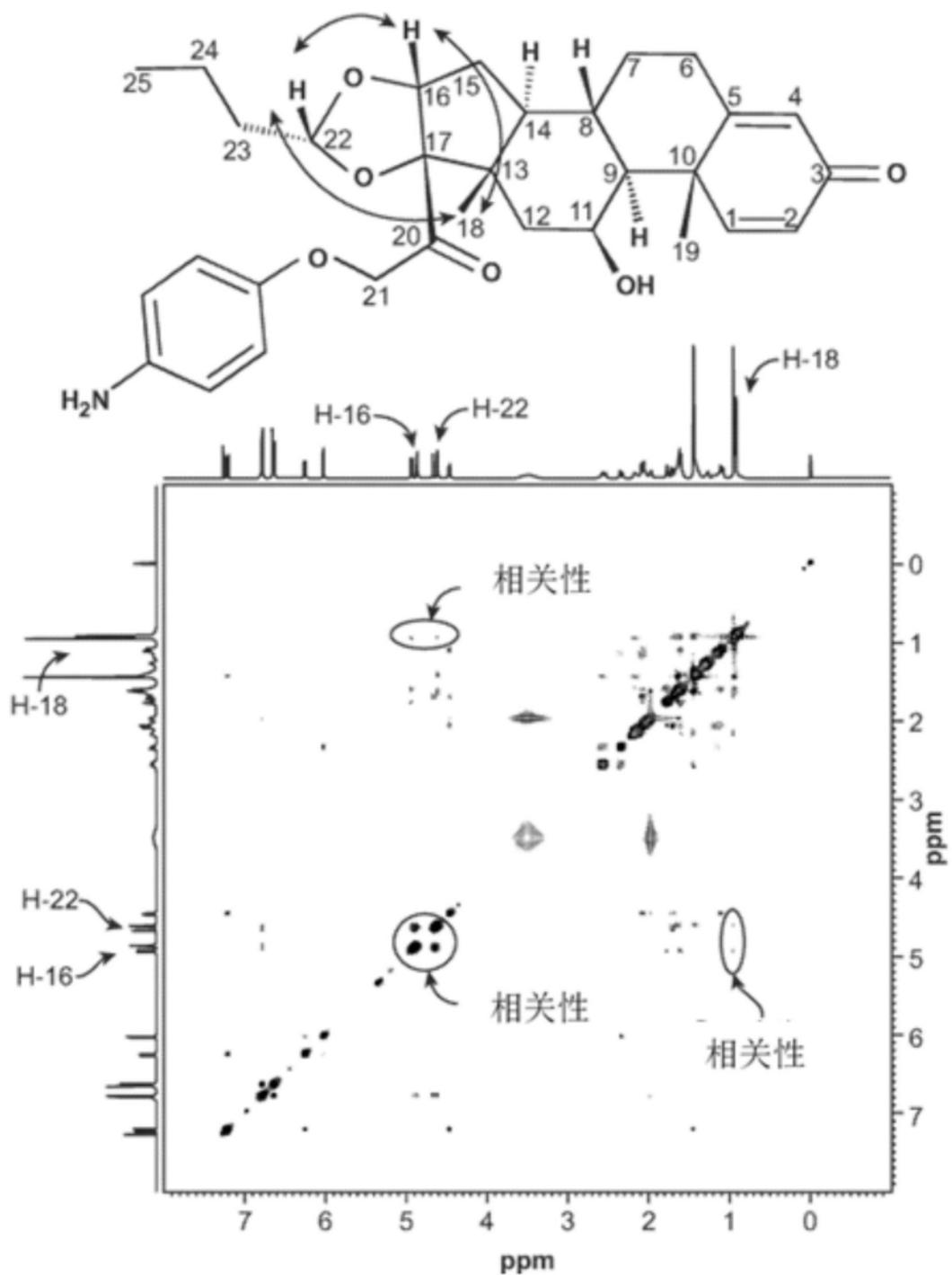


图7

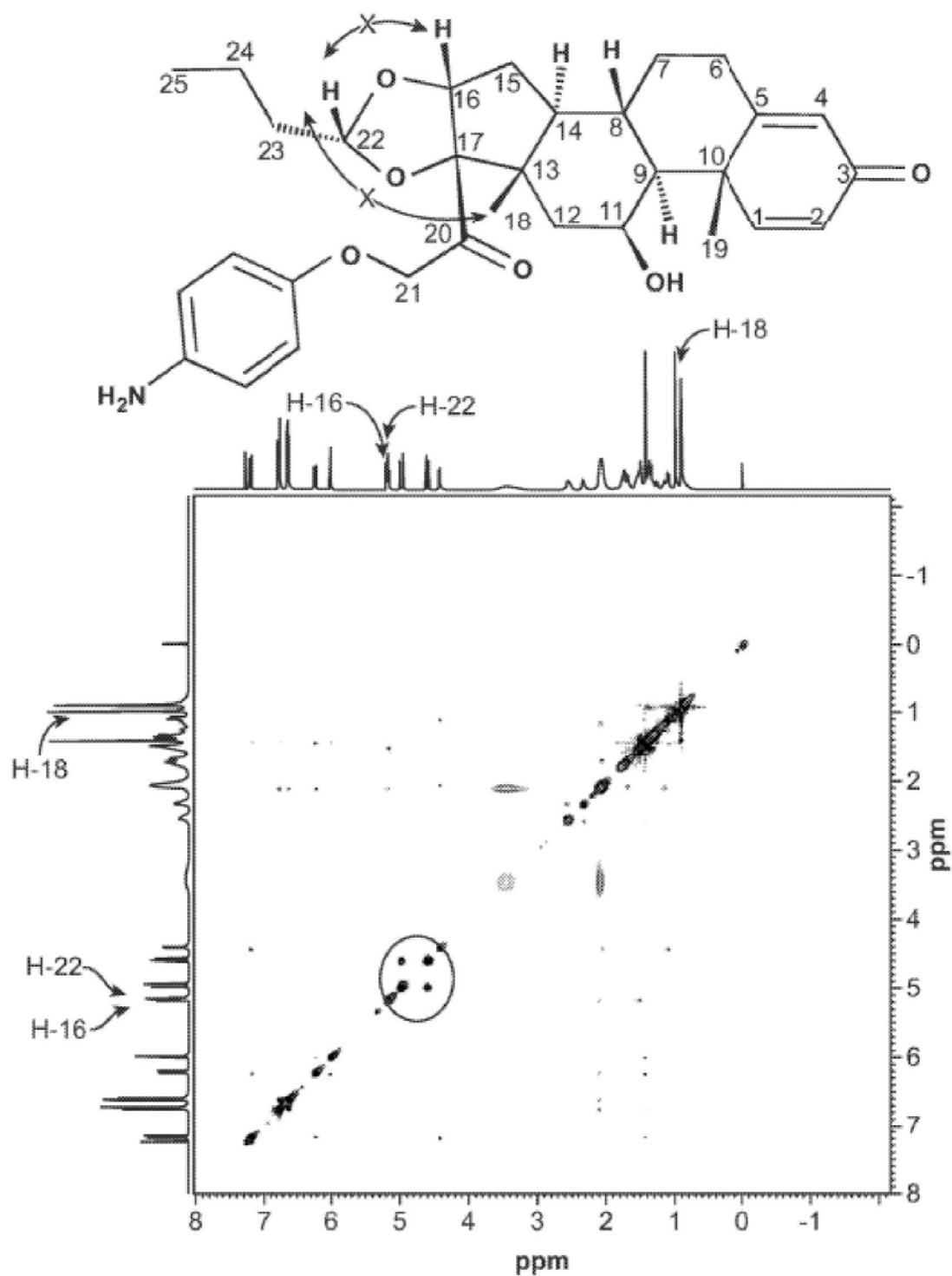


图8

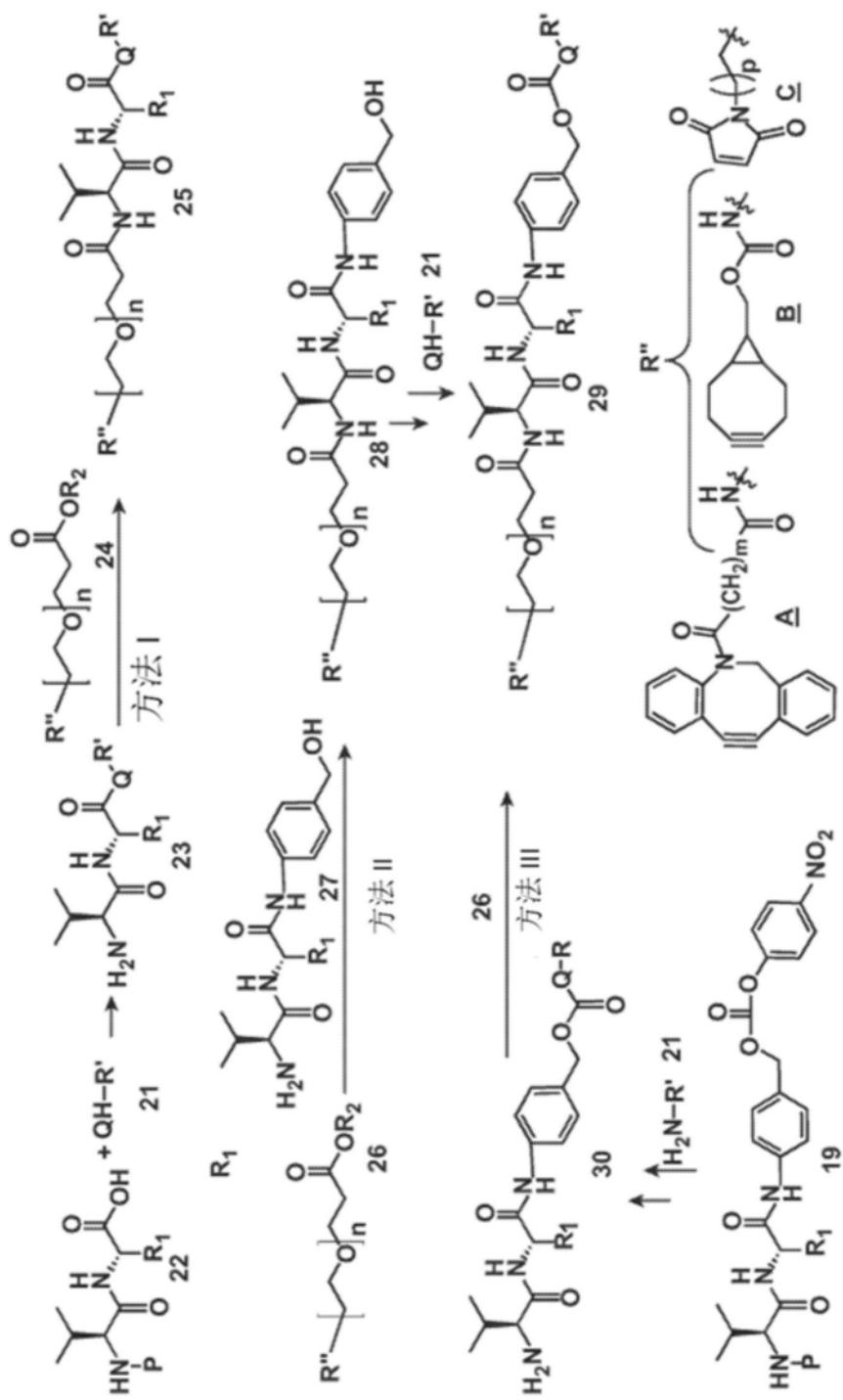


图9

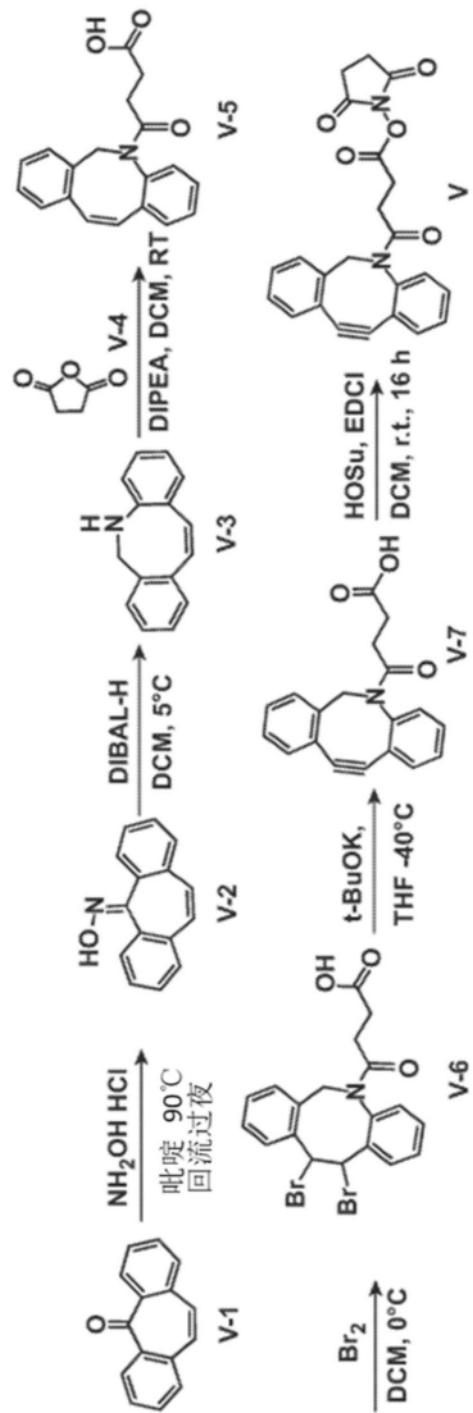


图10

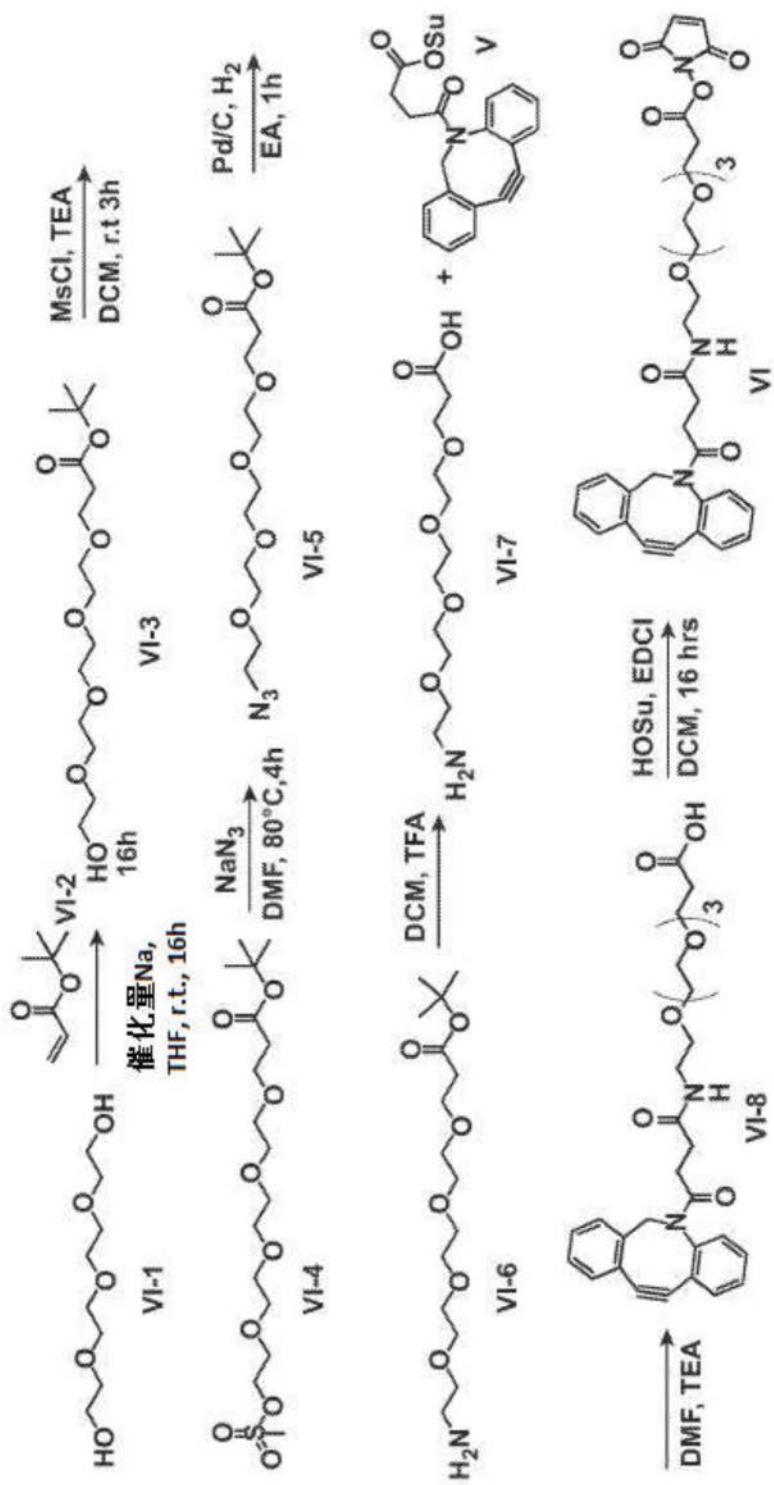


图11

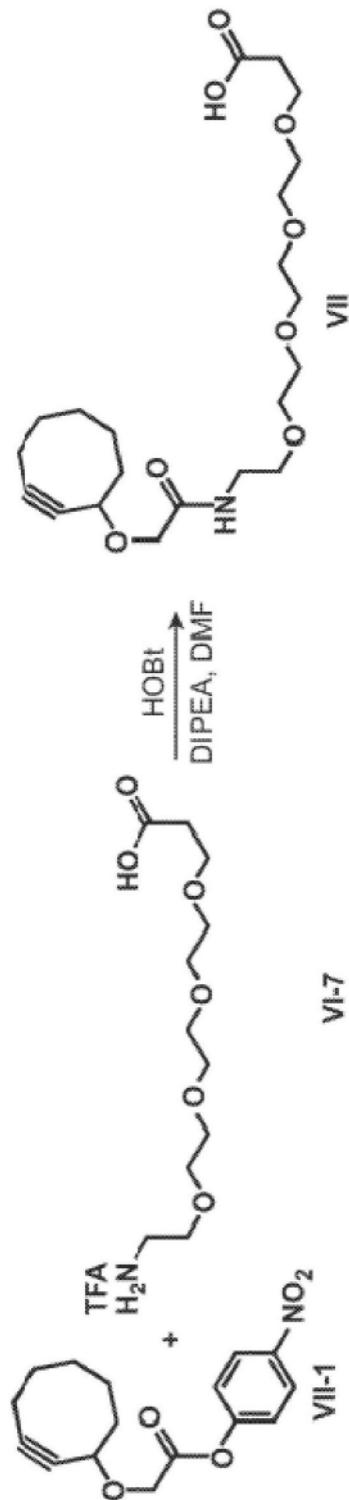


图12

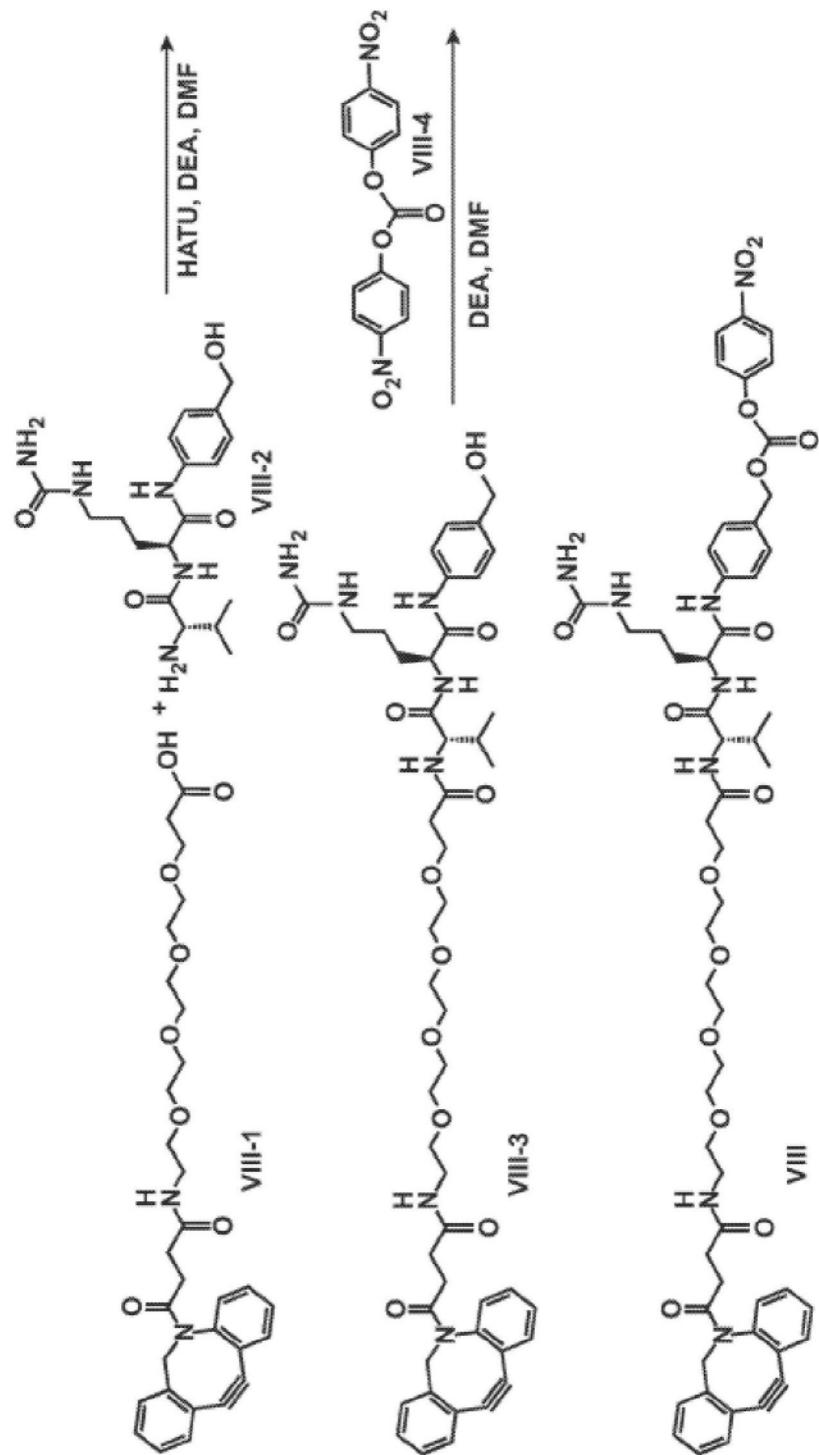


图13

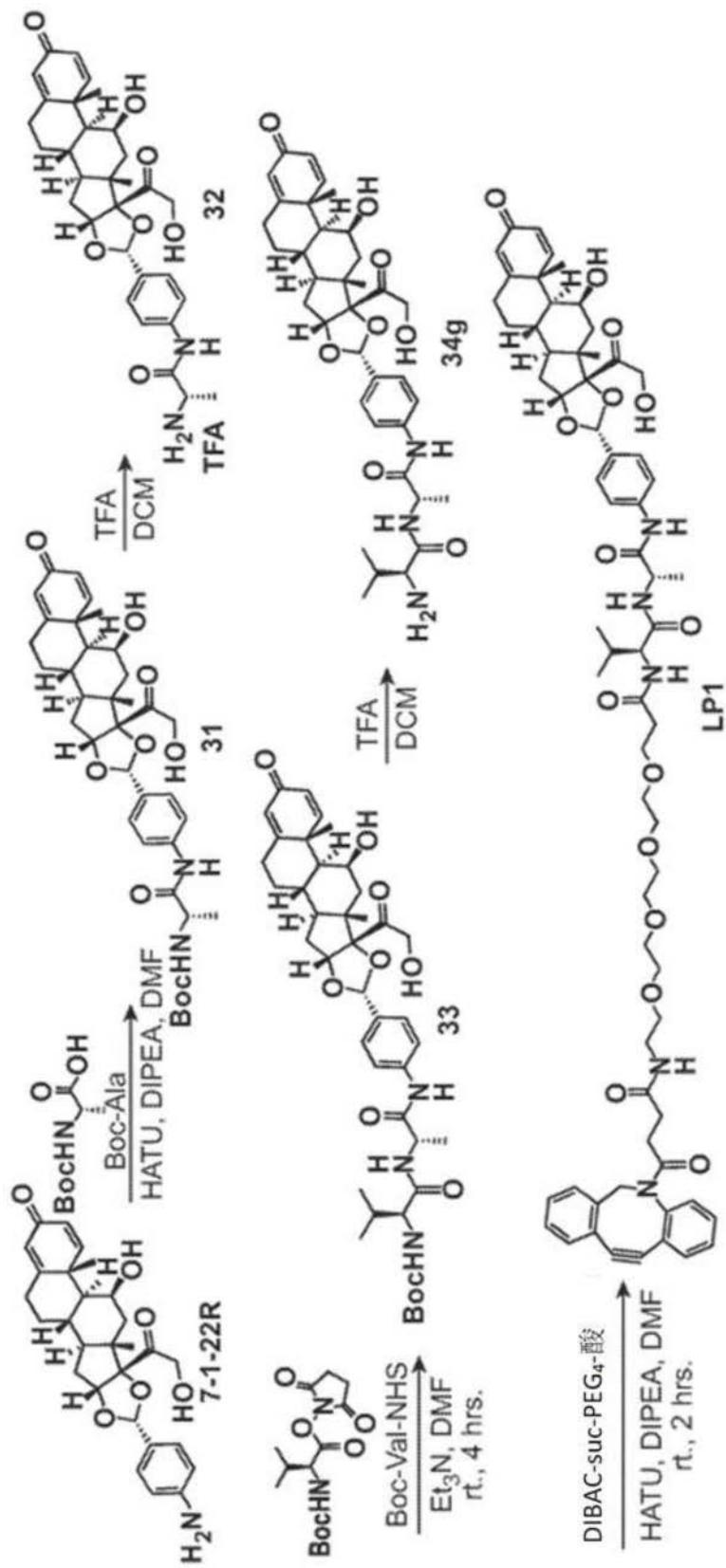


图14

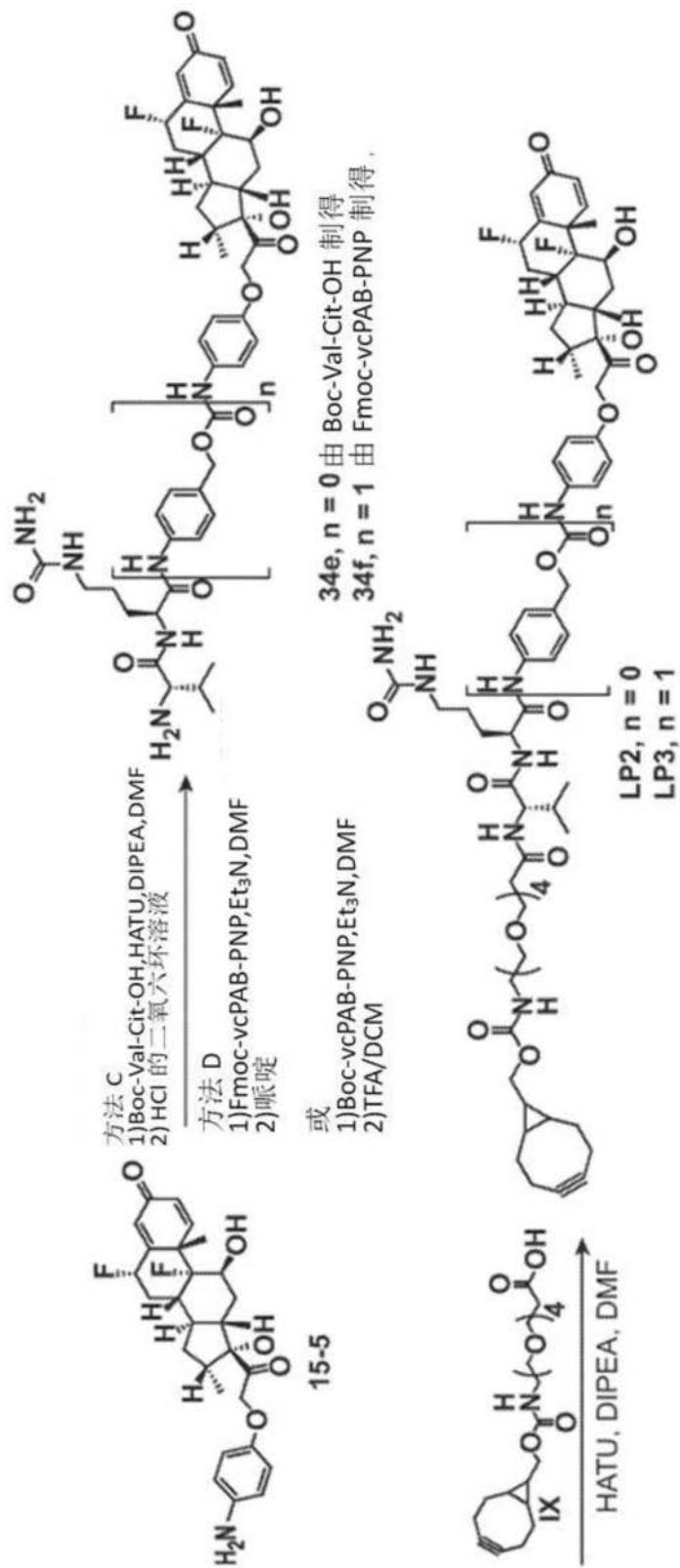


图15

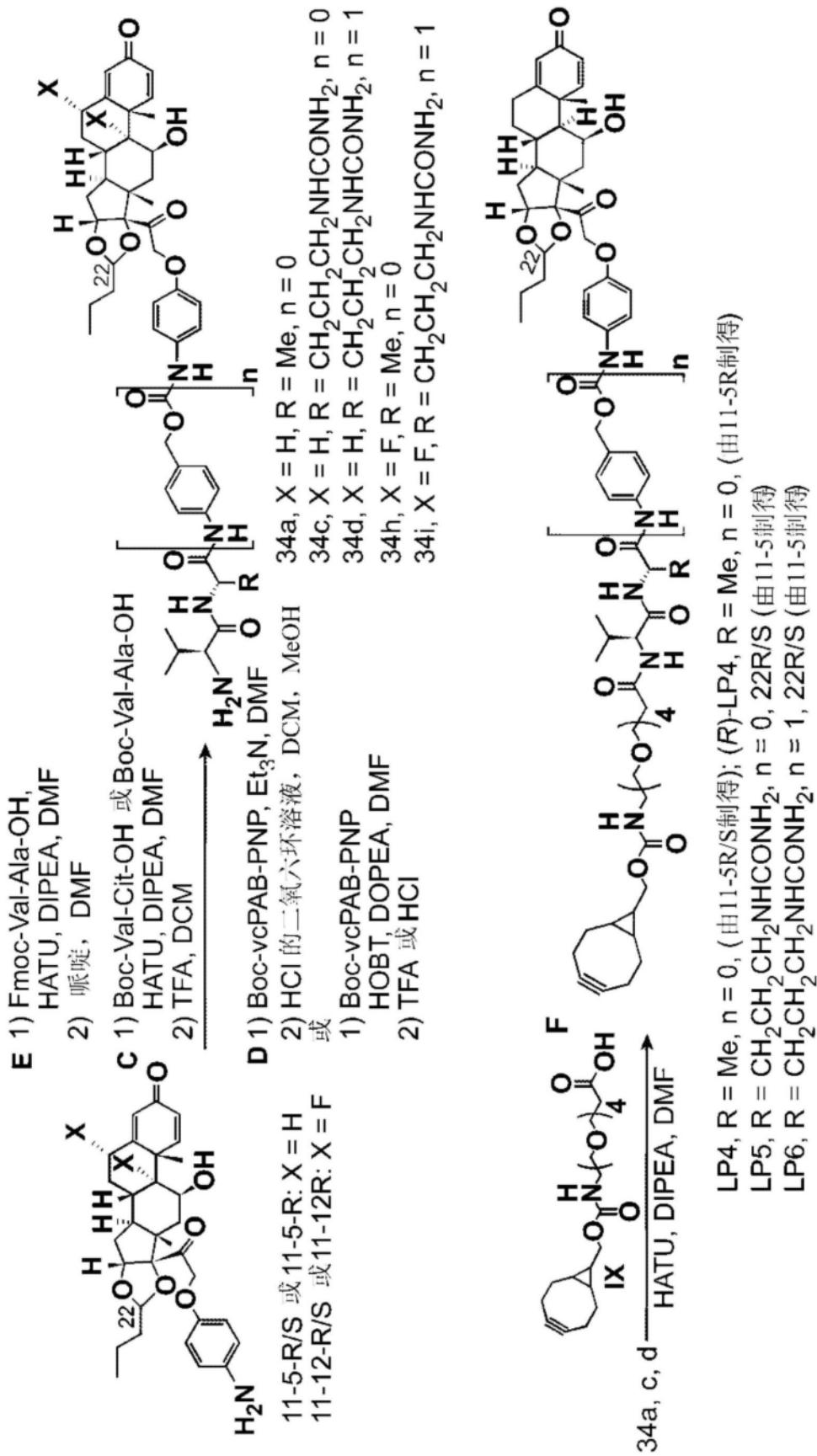


图 16

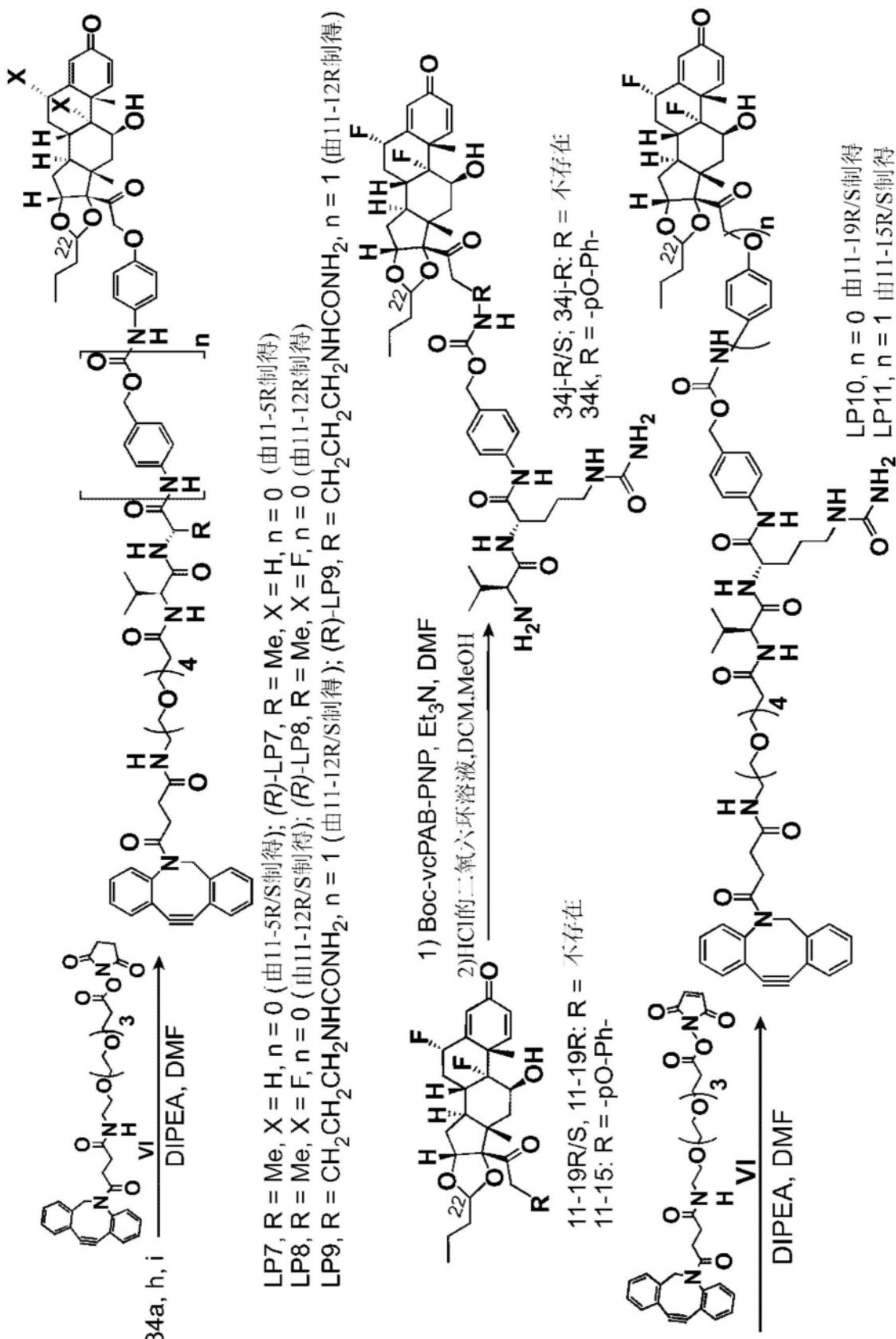


图16 (续)

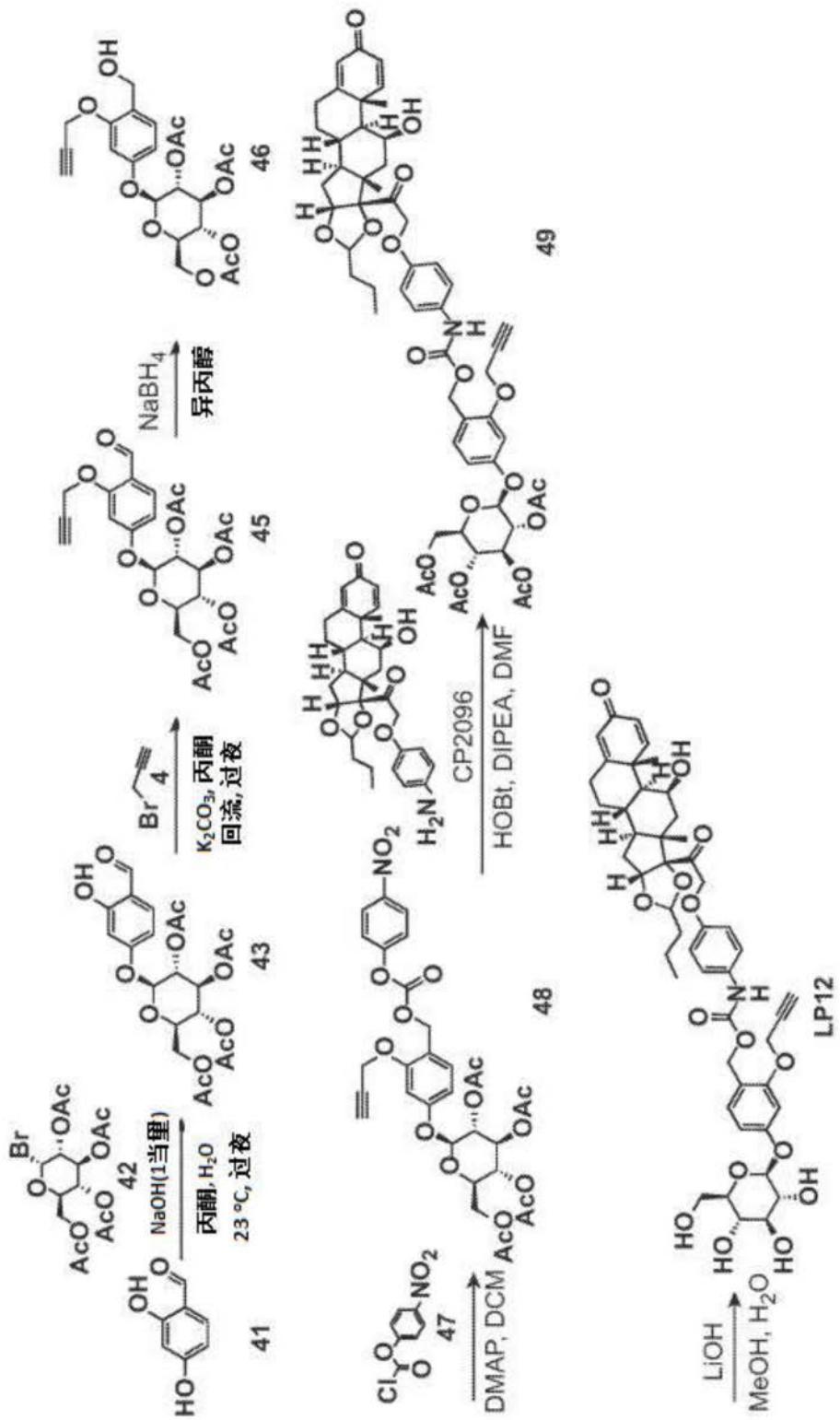


图17

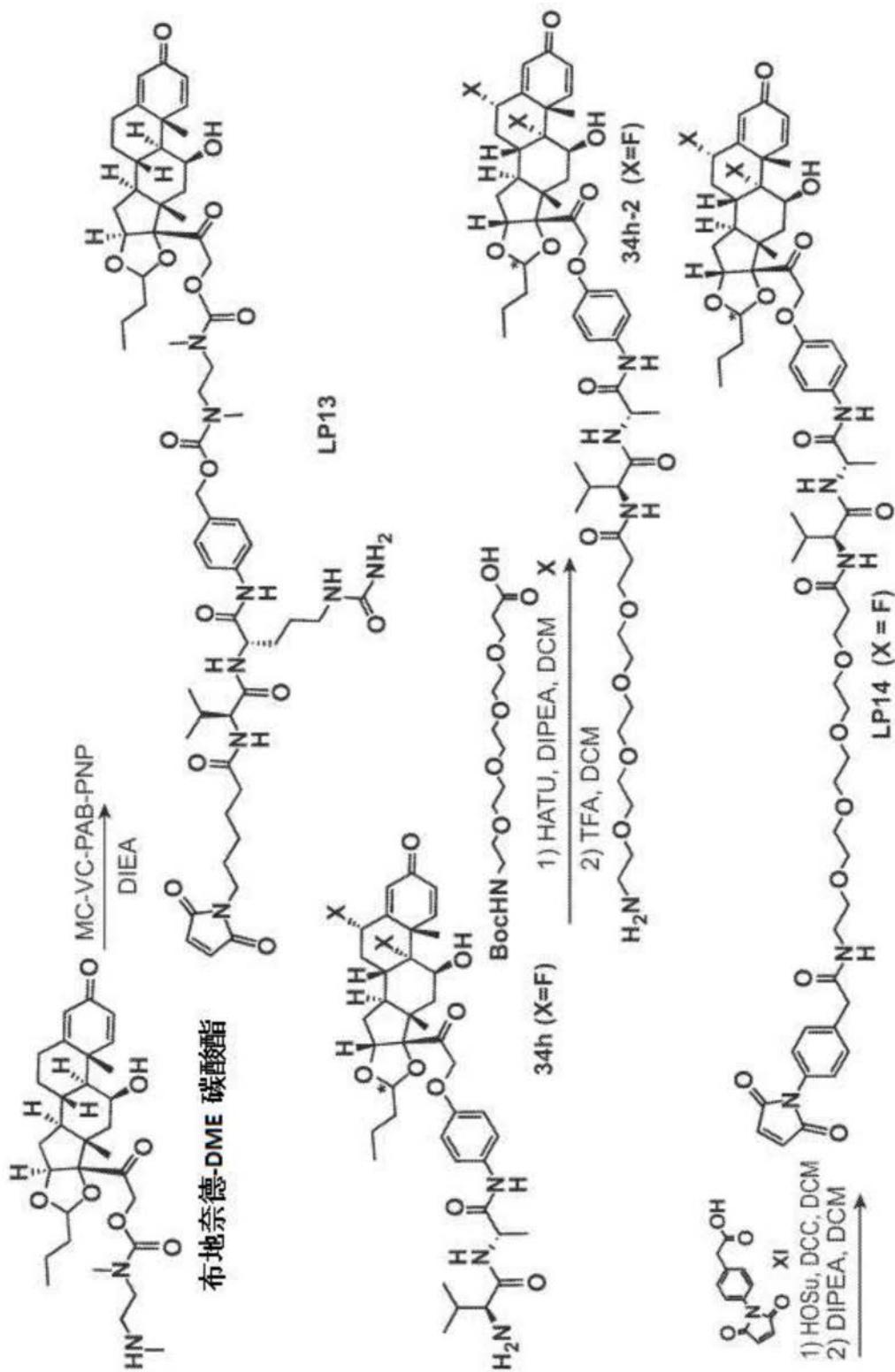


图18

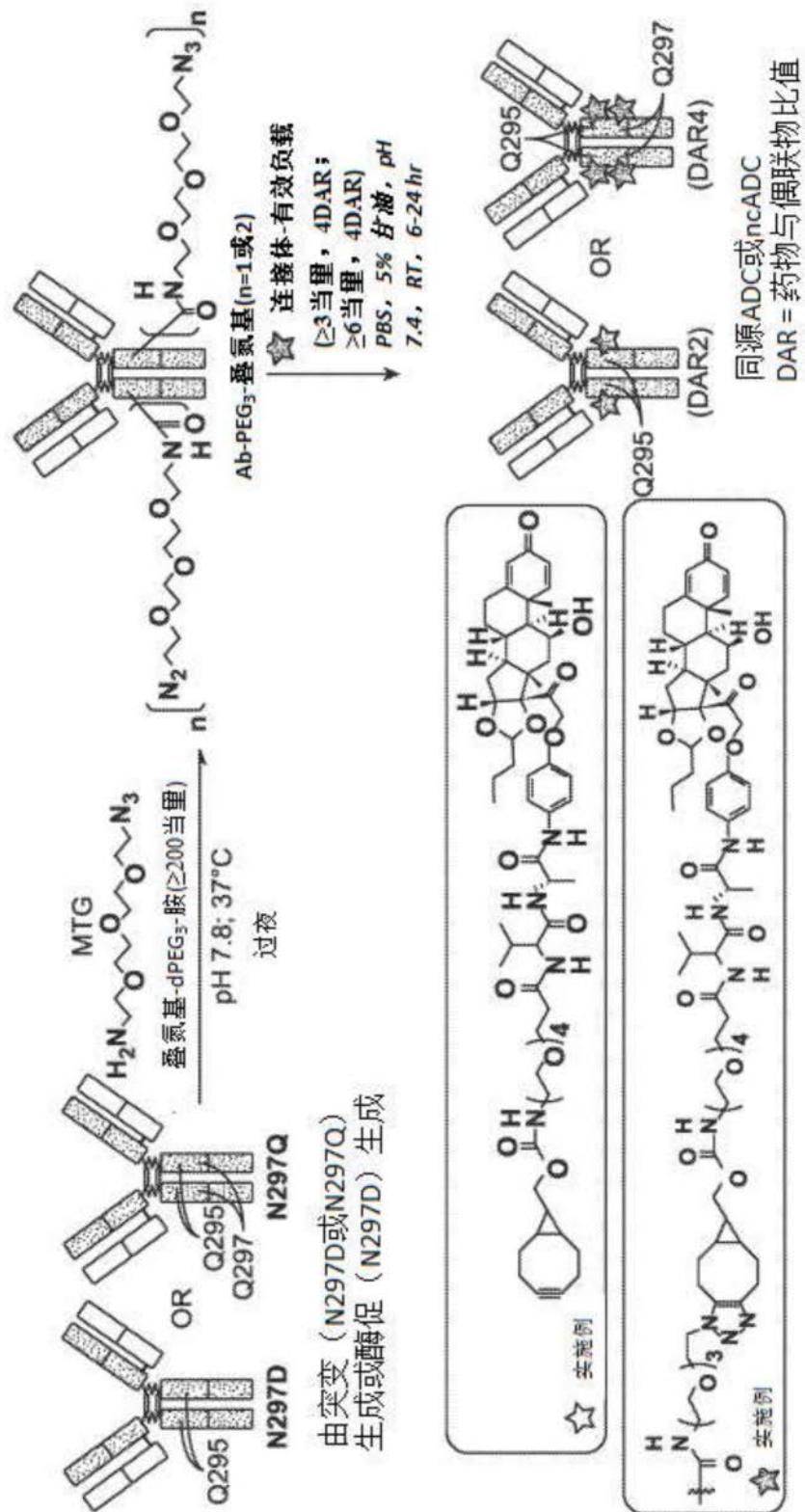


图19

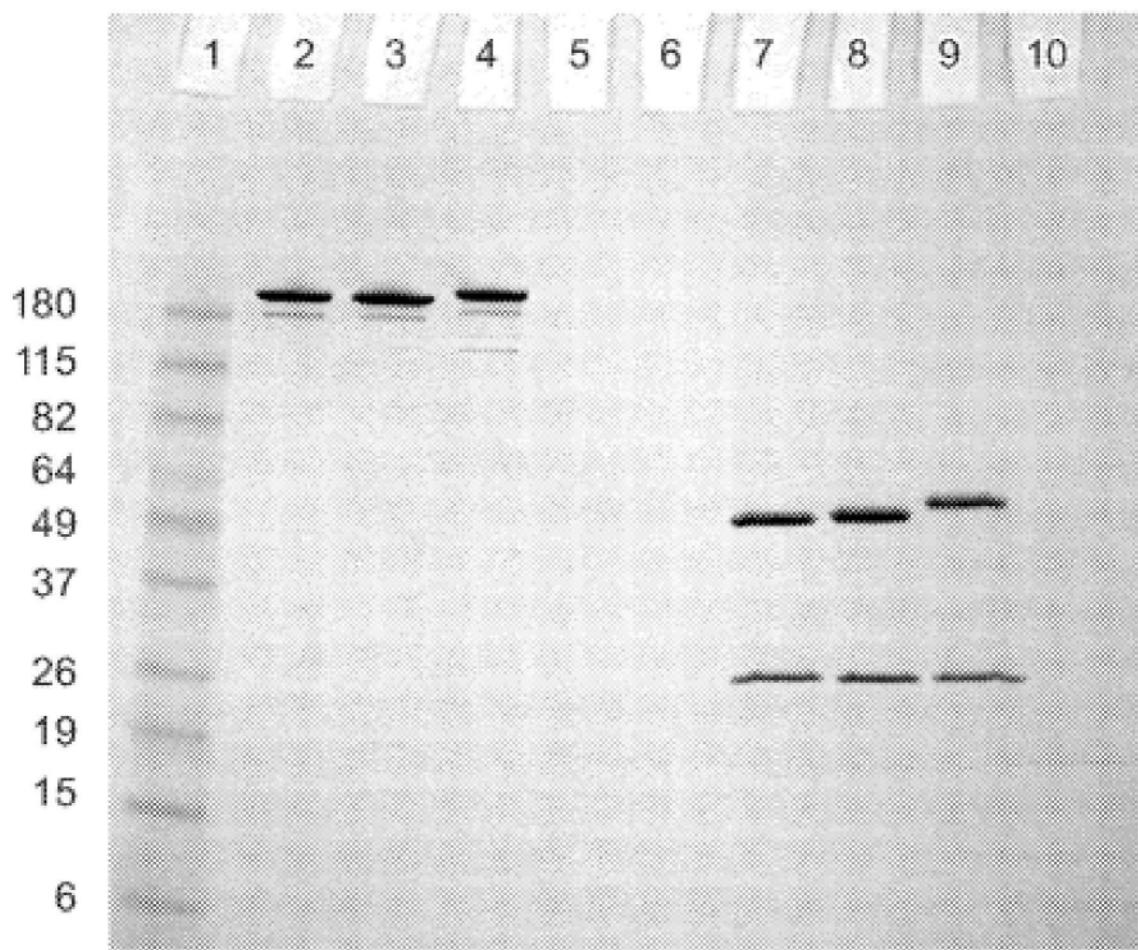


图20

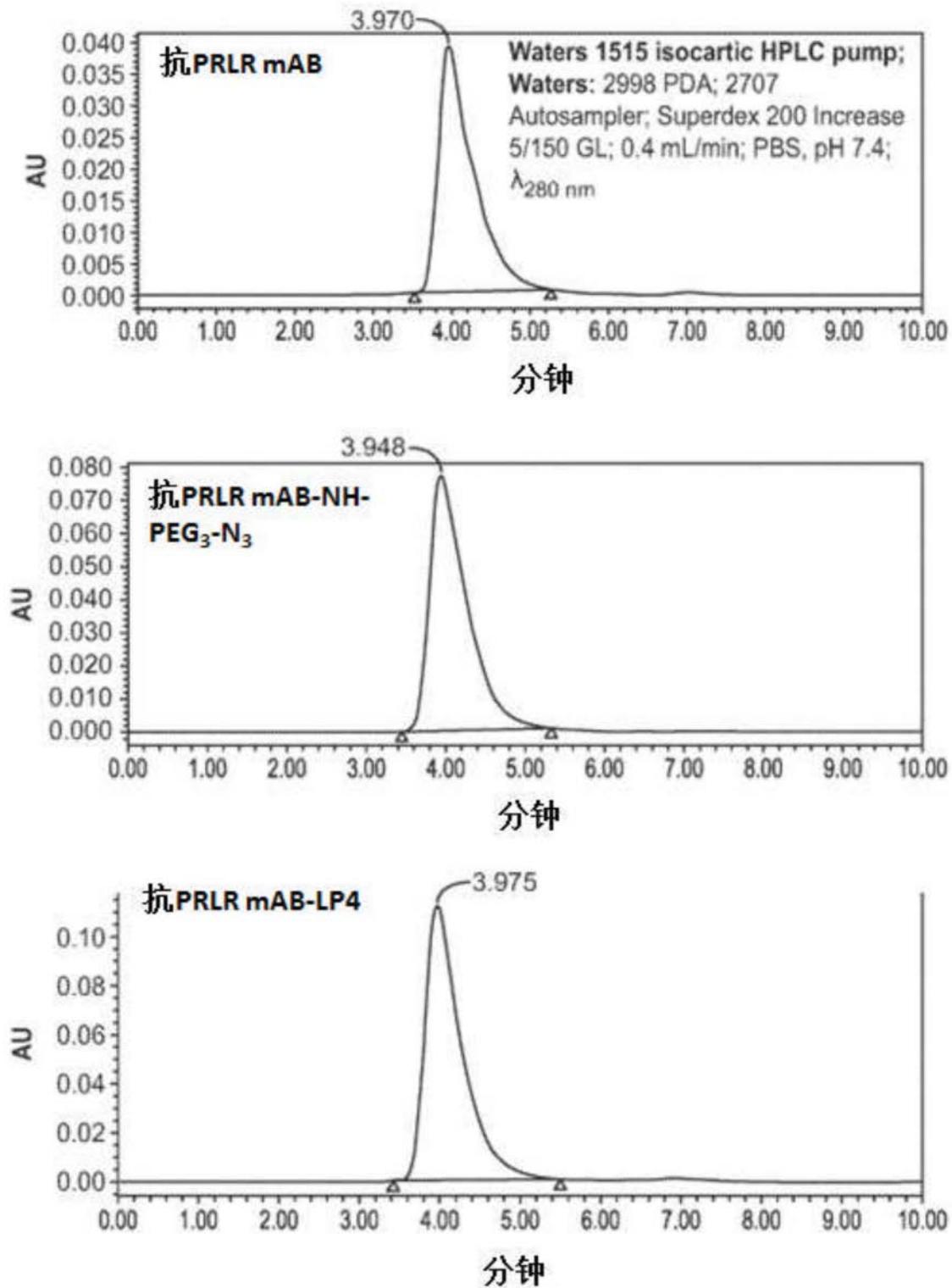


图21

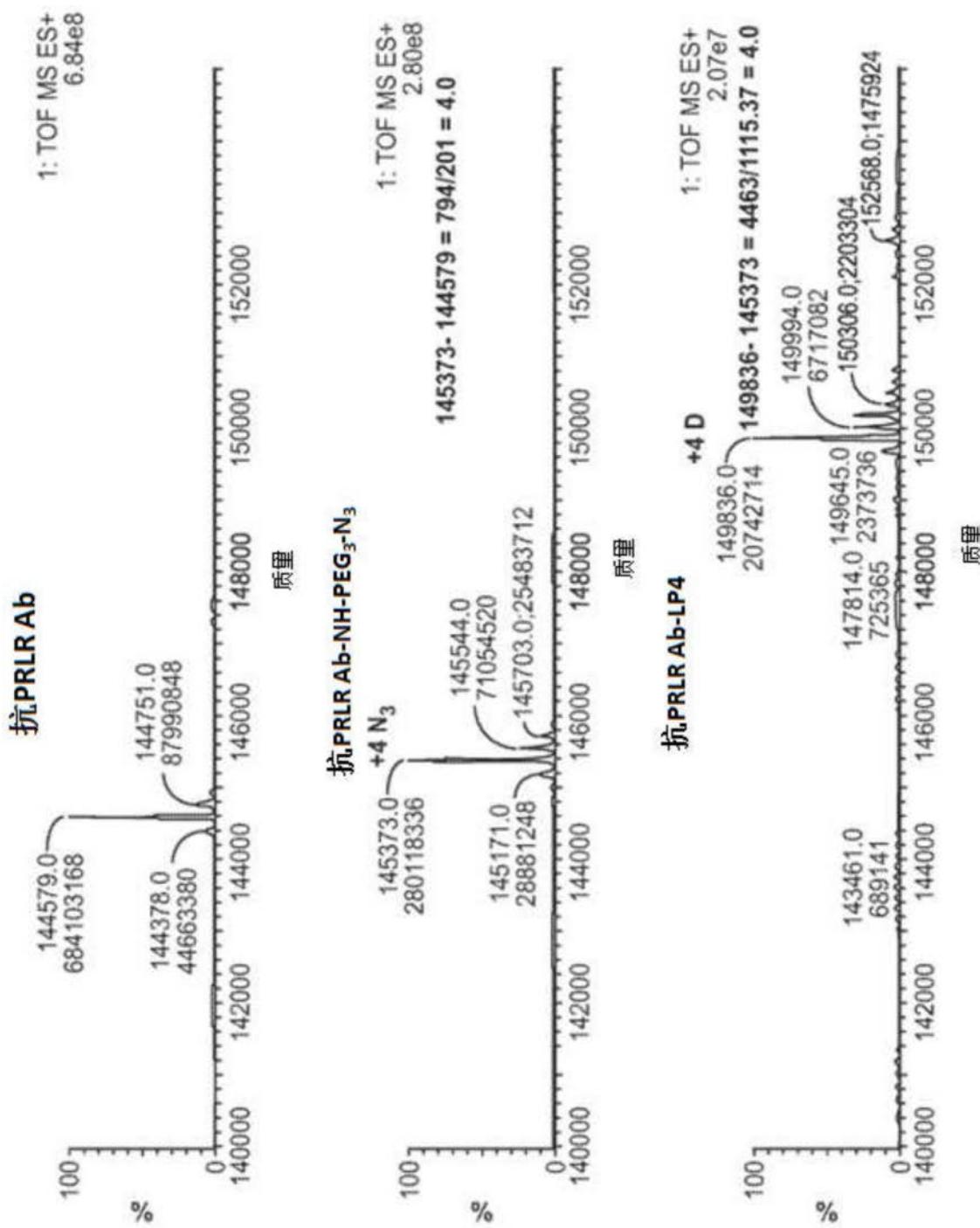


图22

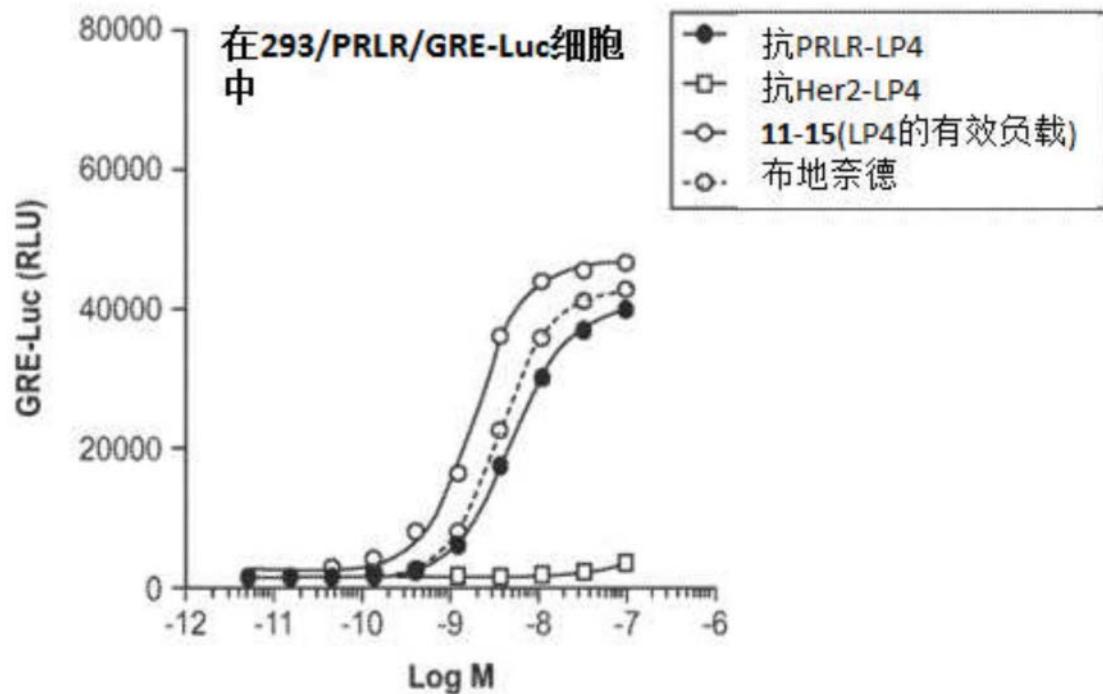


图23A

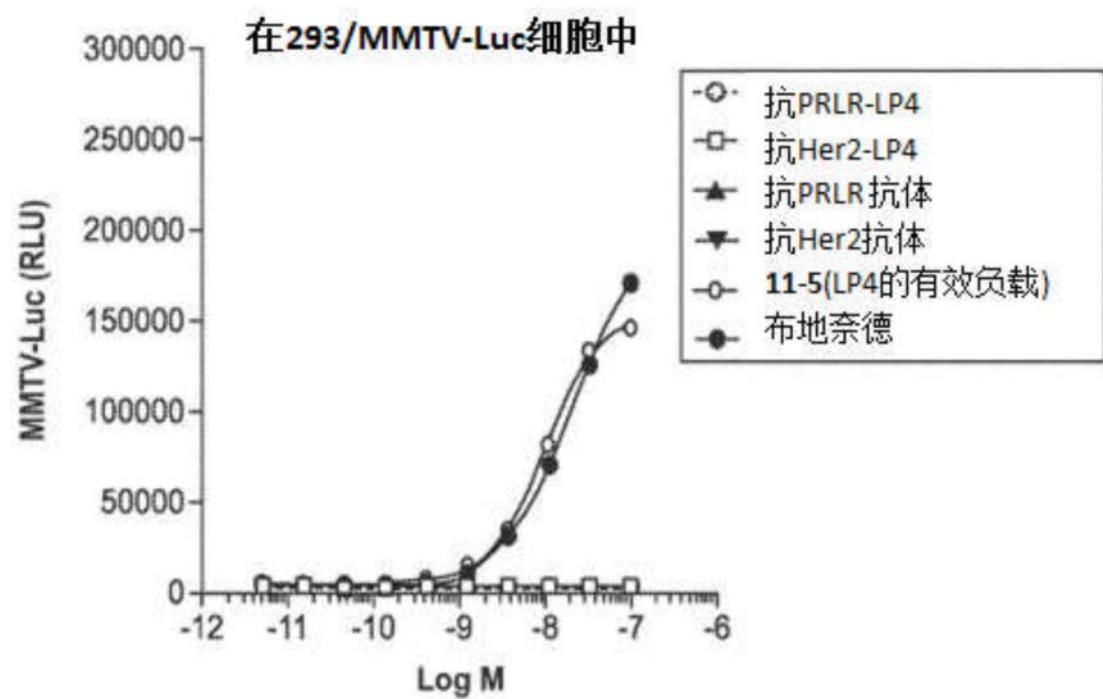


图23B

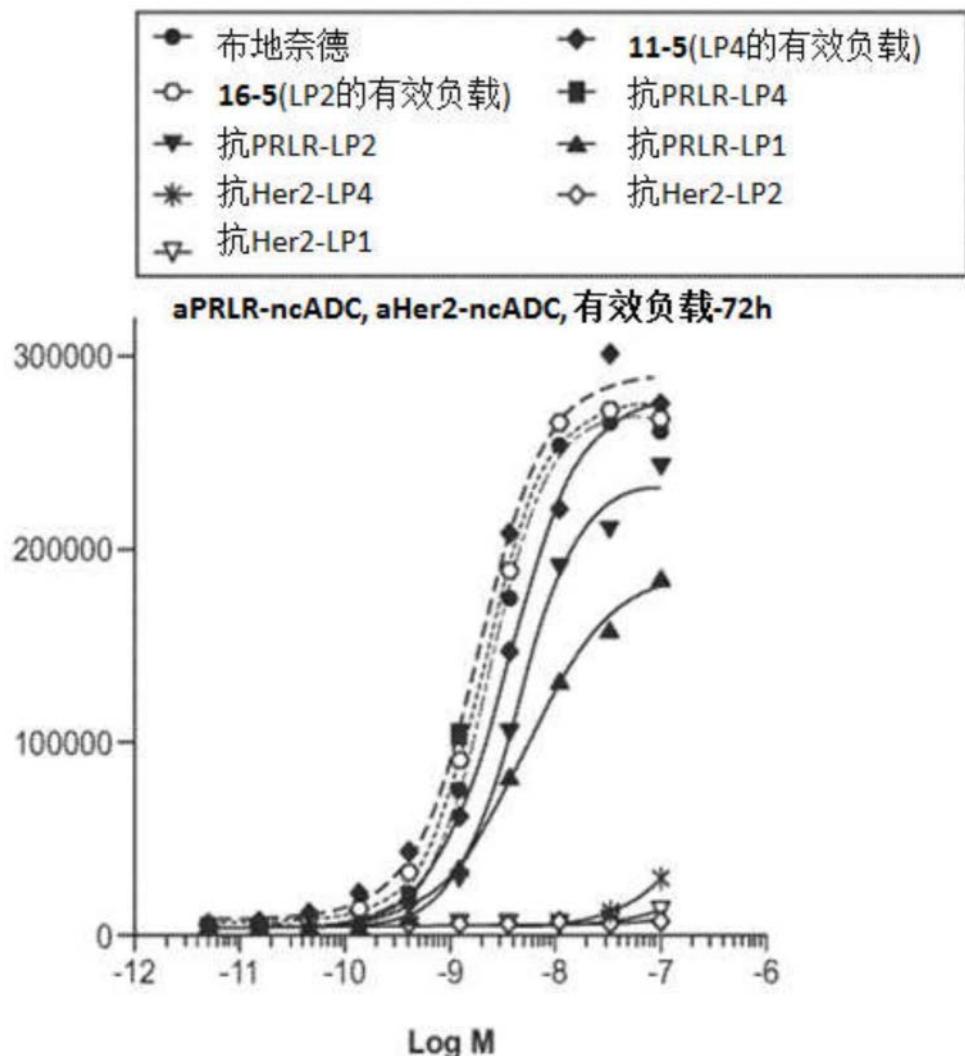


图24

293/MMTV-luc/IL2Rg+IL7R - 24 hr

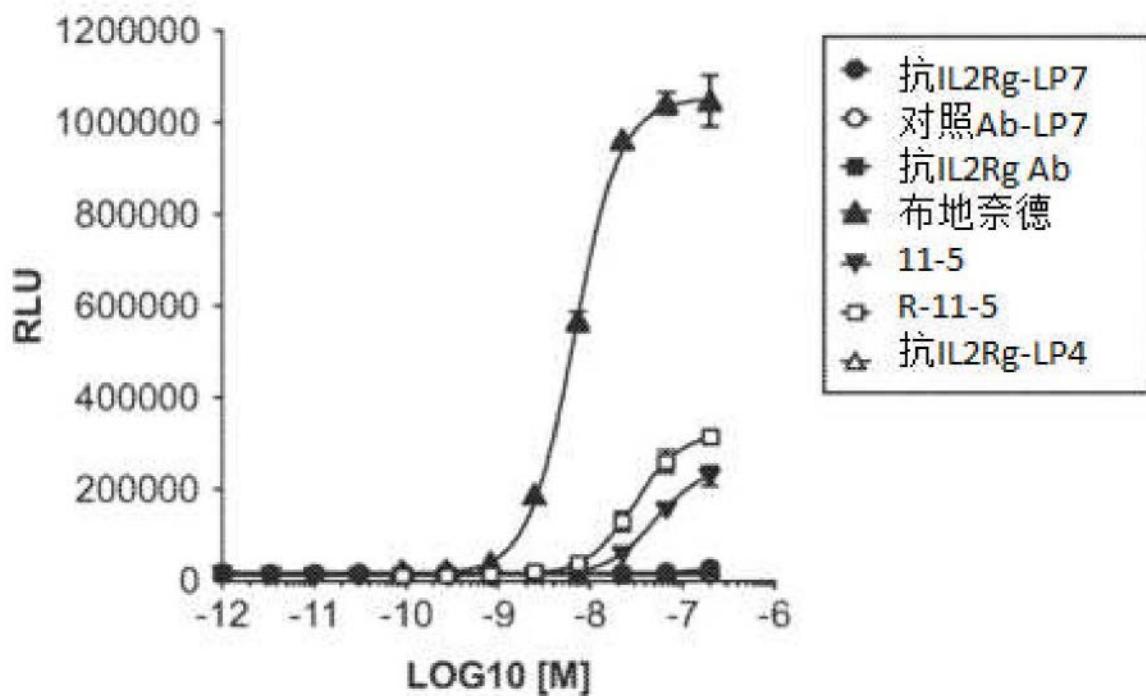


图25A

293/MMTV-luc/IL2Rg+IL7R - 48 hr

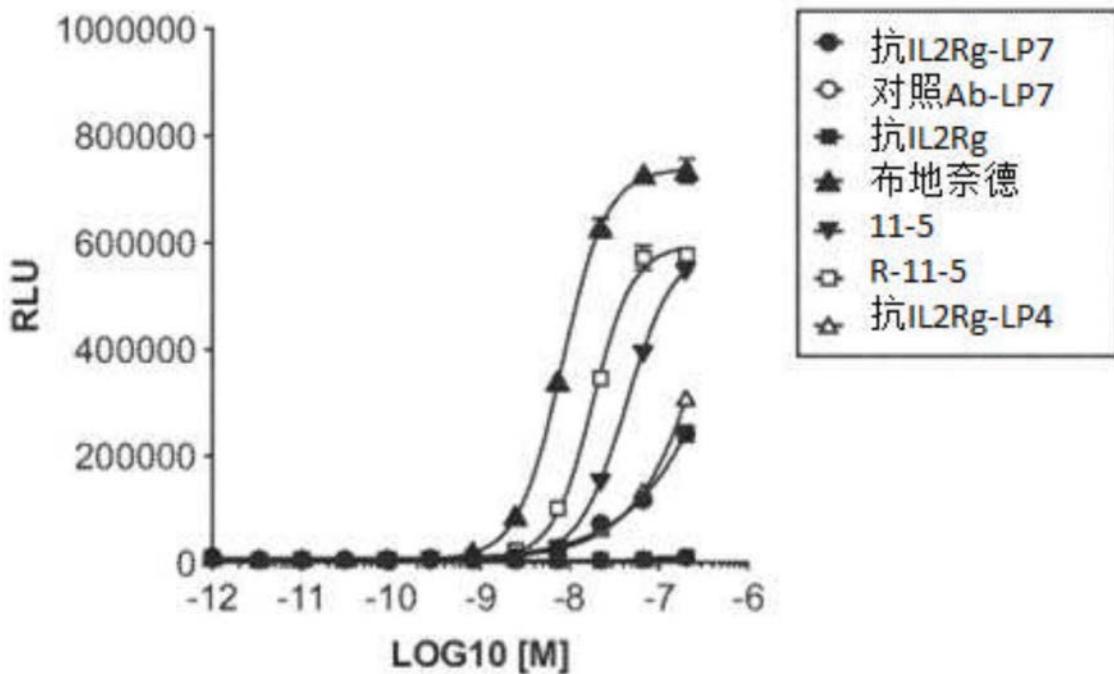


图25B

293/MMTV-luc/IL2Rg+IL7R - 72 hr

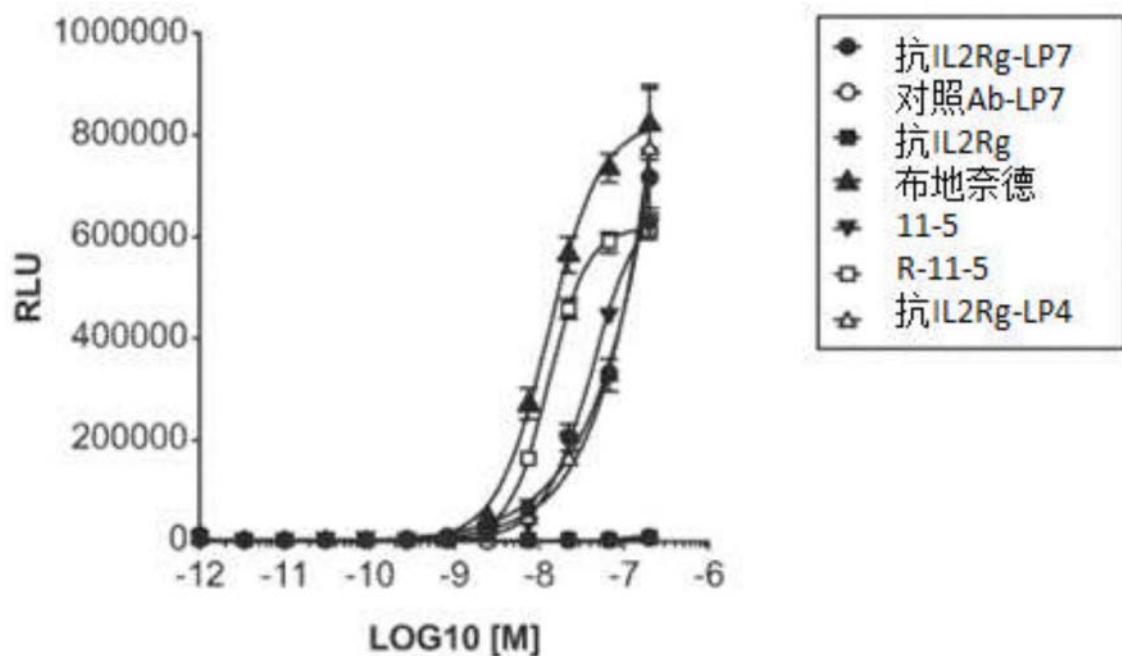


图25C

293/MMTV-luc - 72 hr

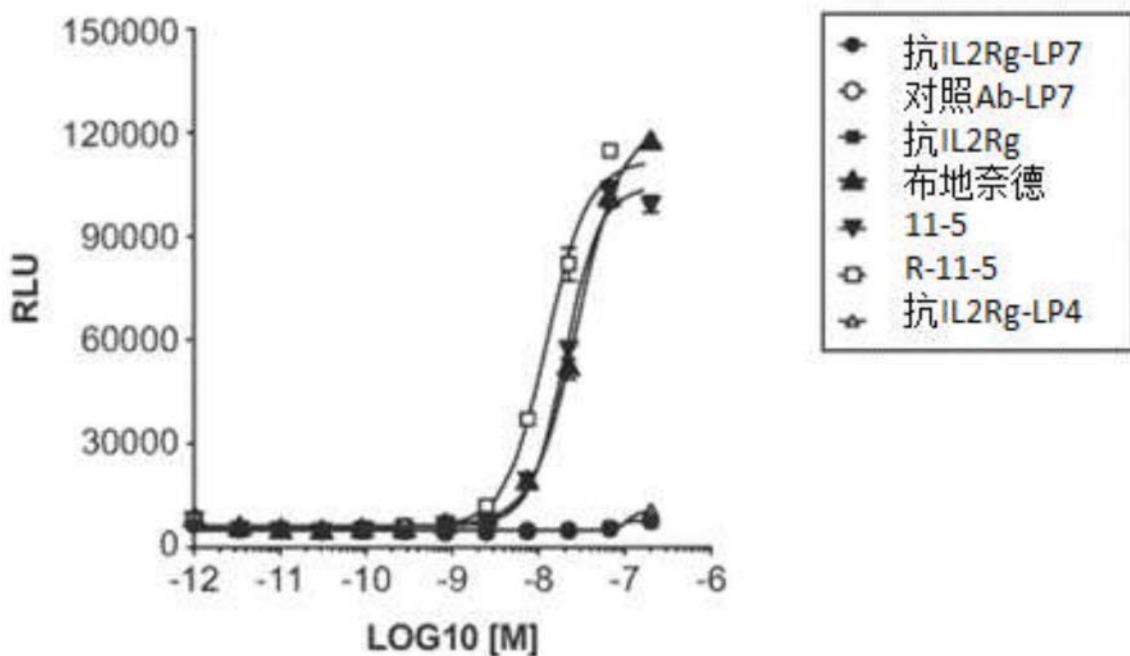


图25D

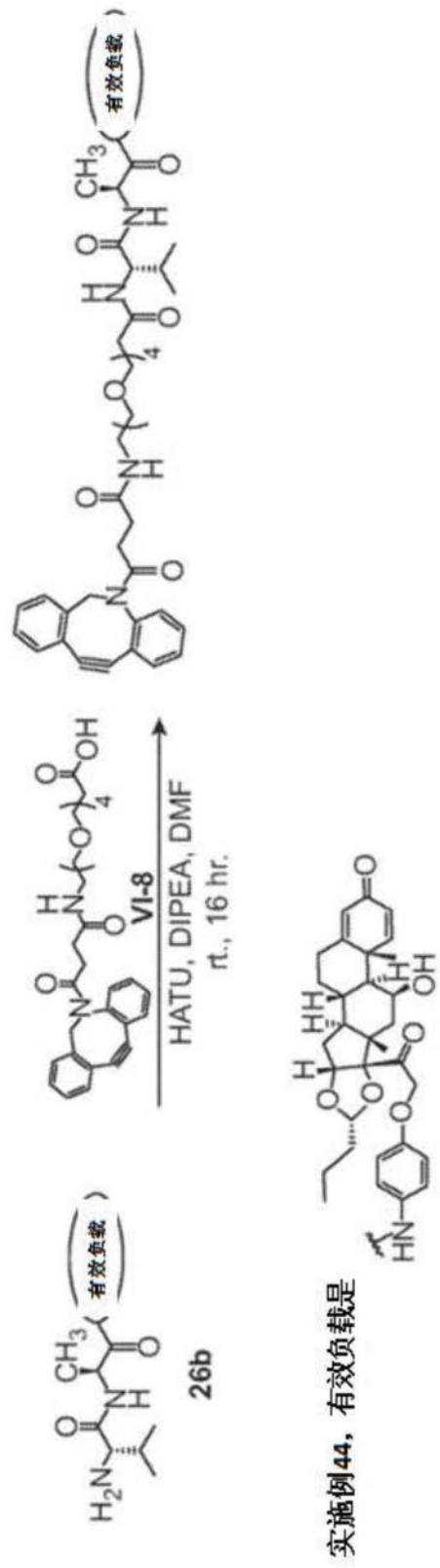


图26

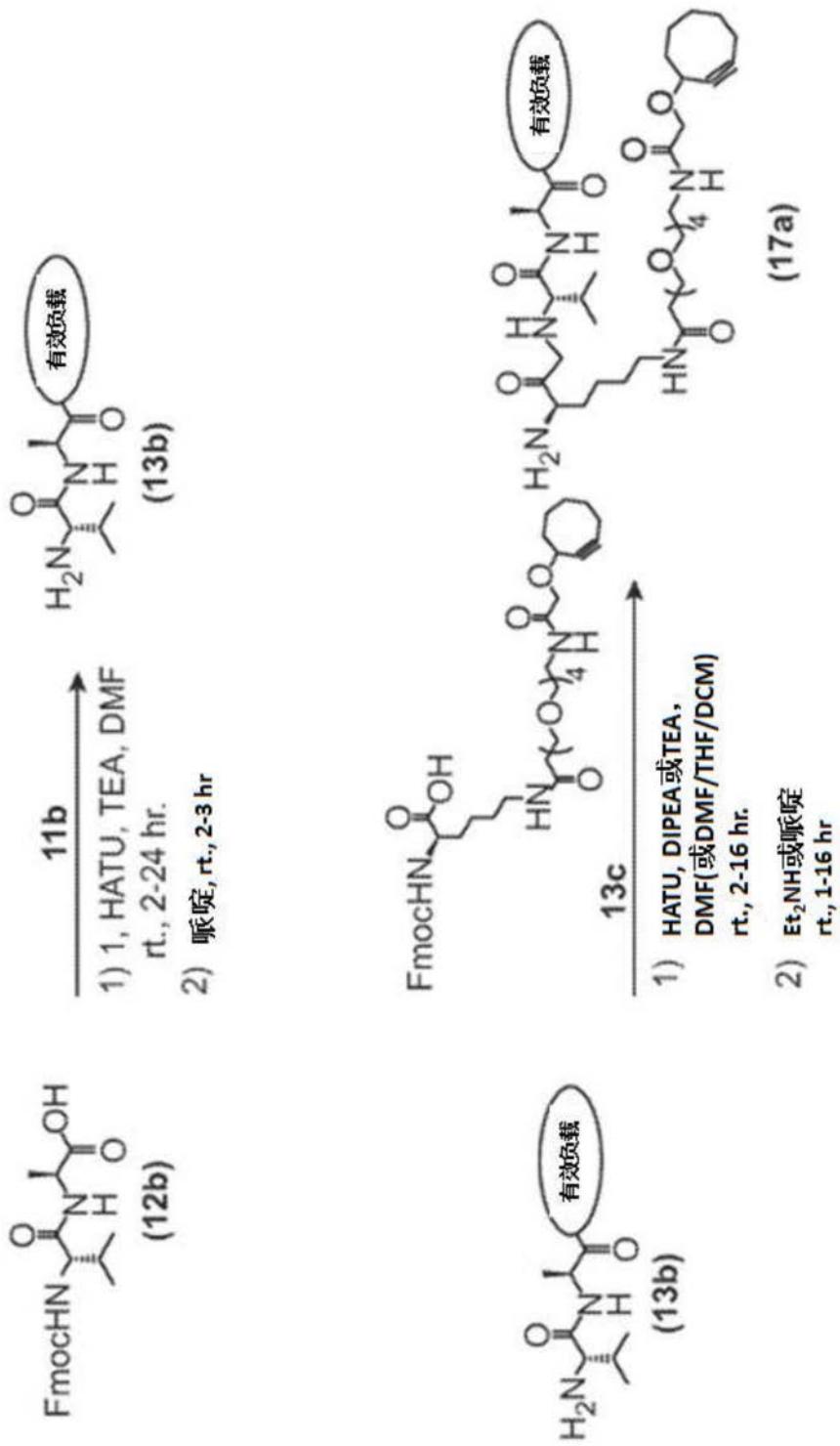


图27

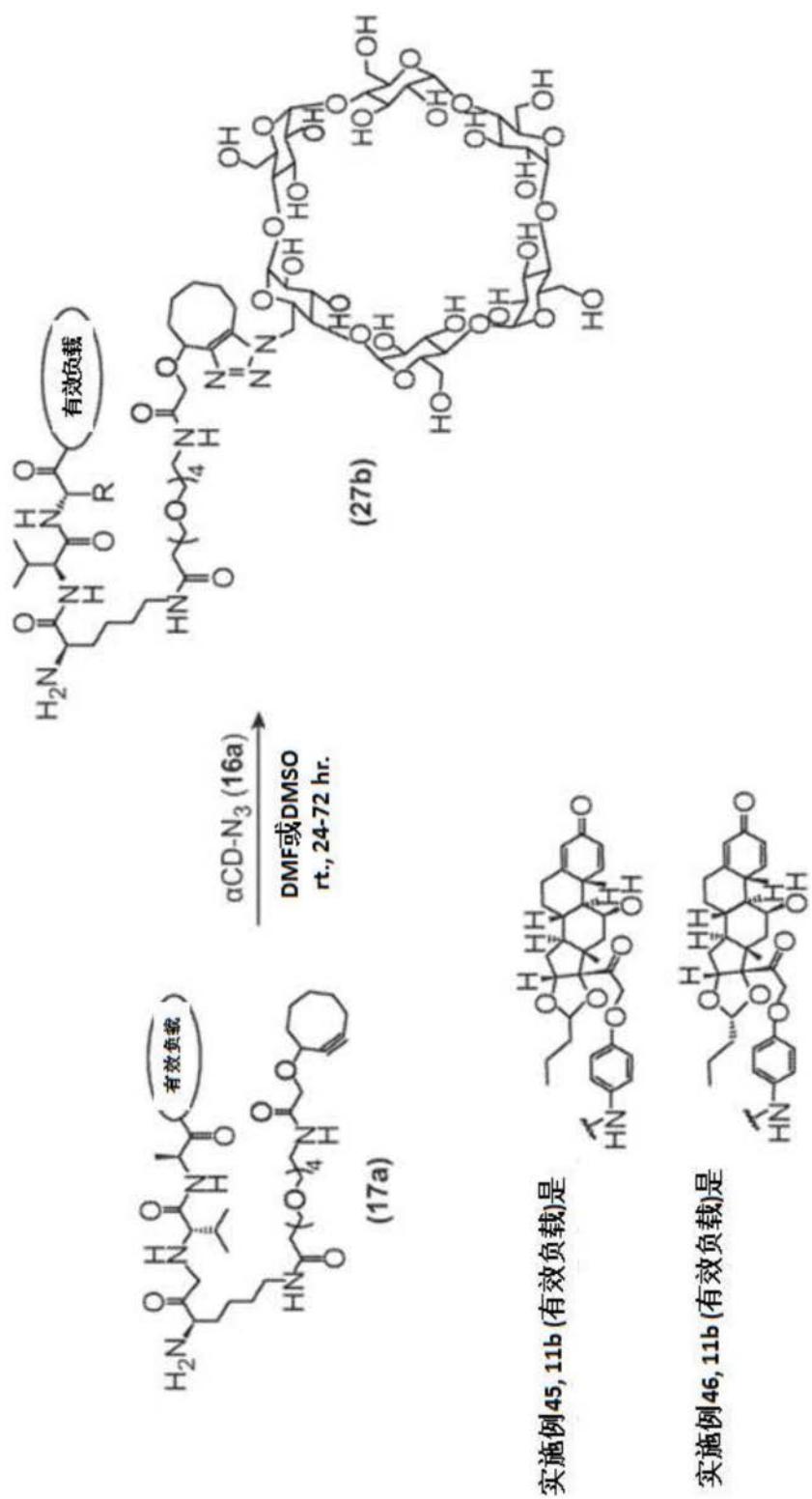


图27 (续)

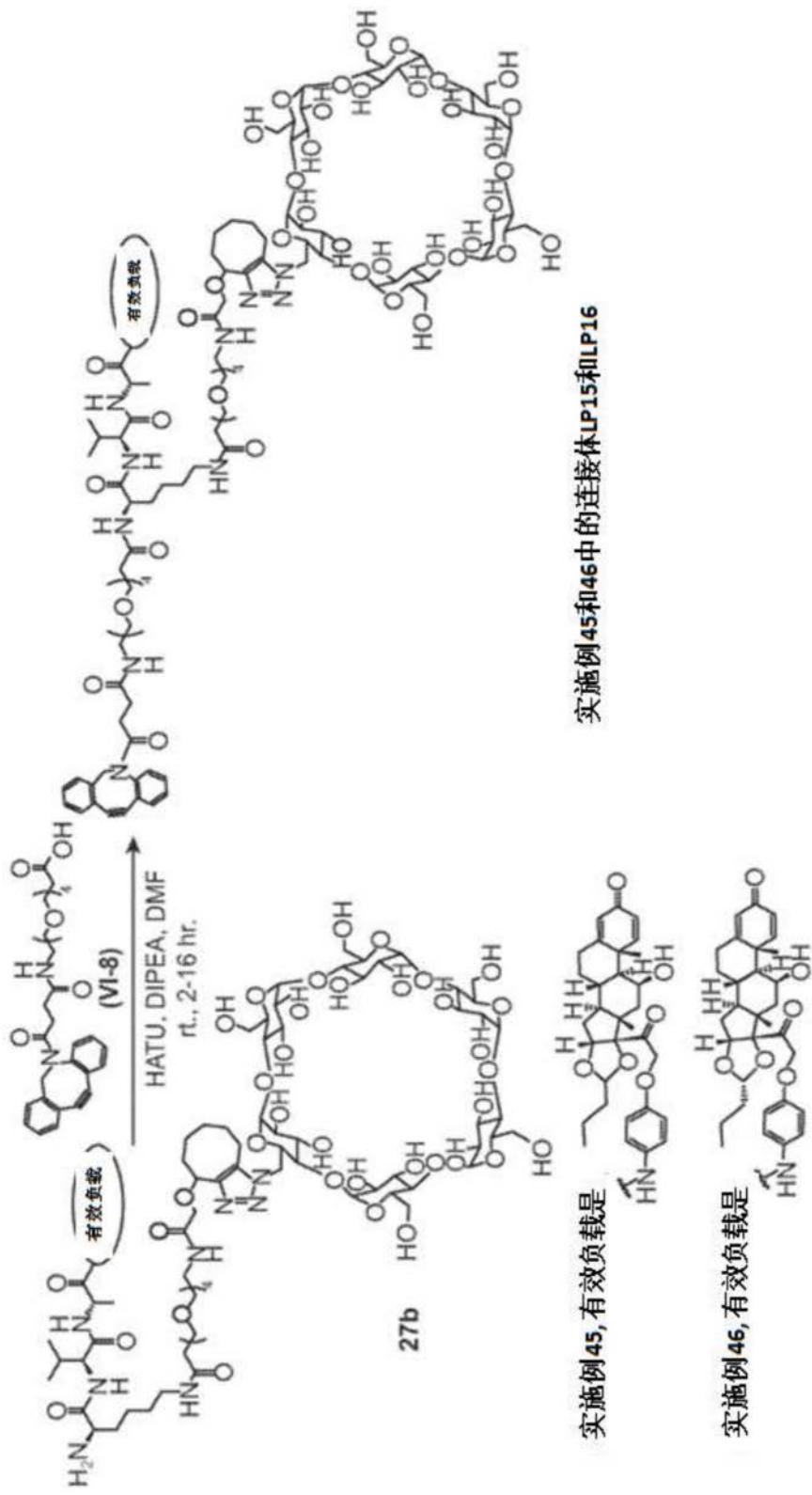


图28

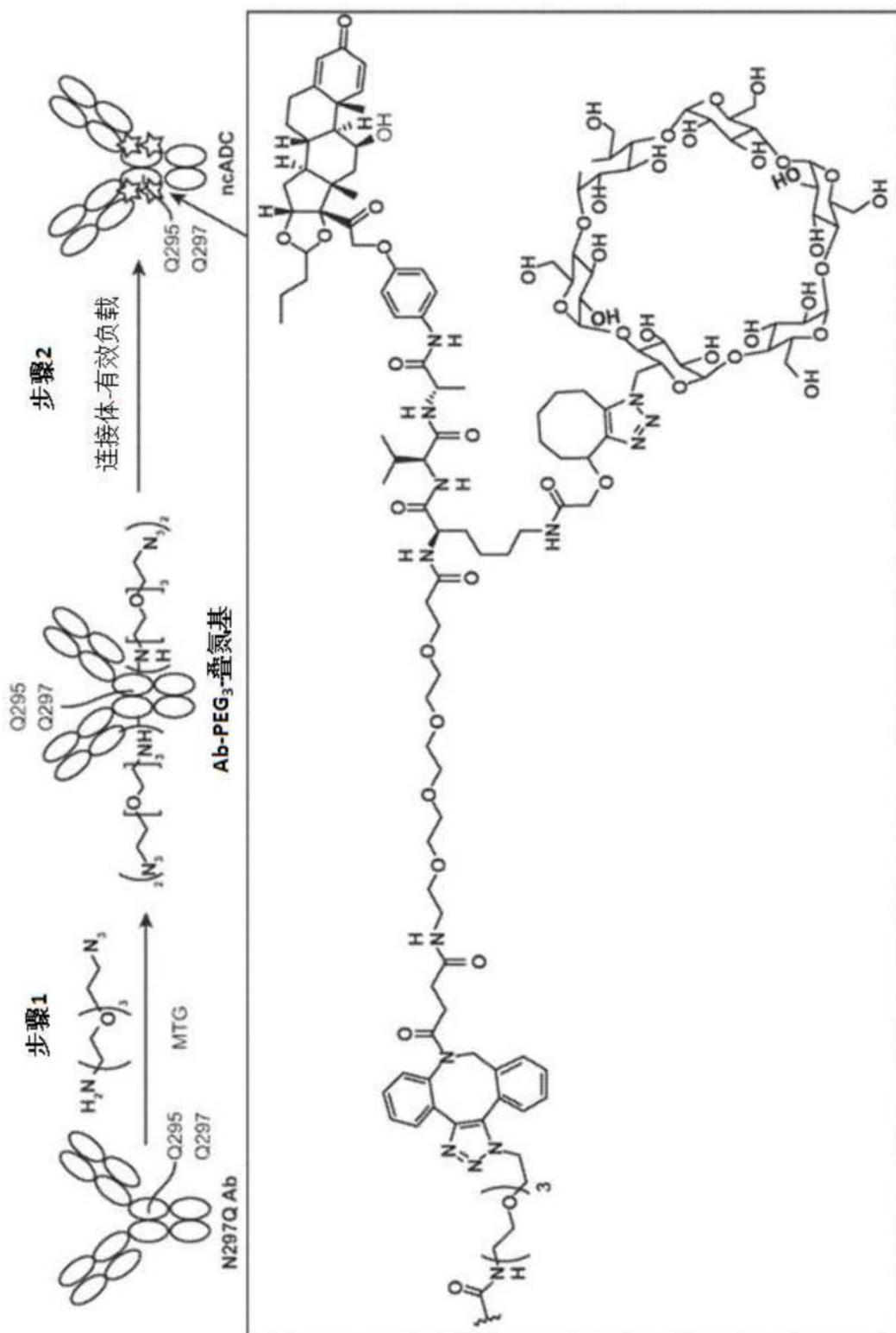


图29

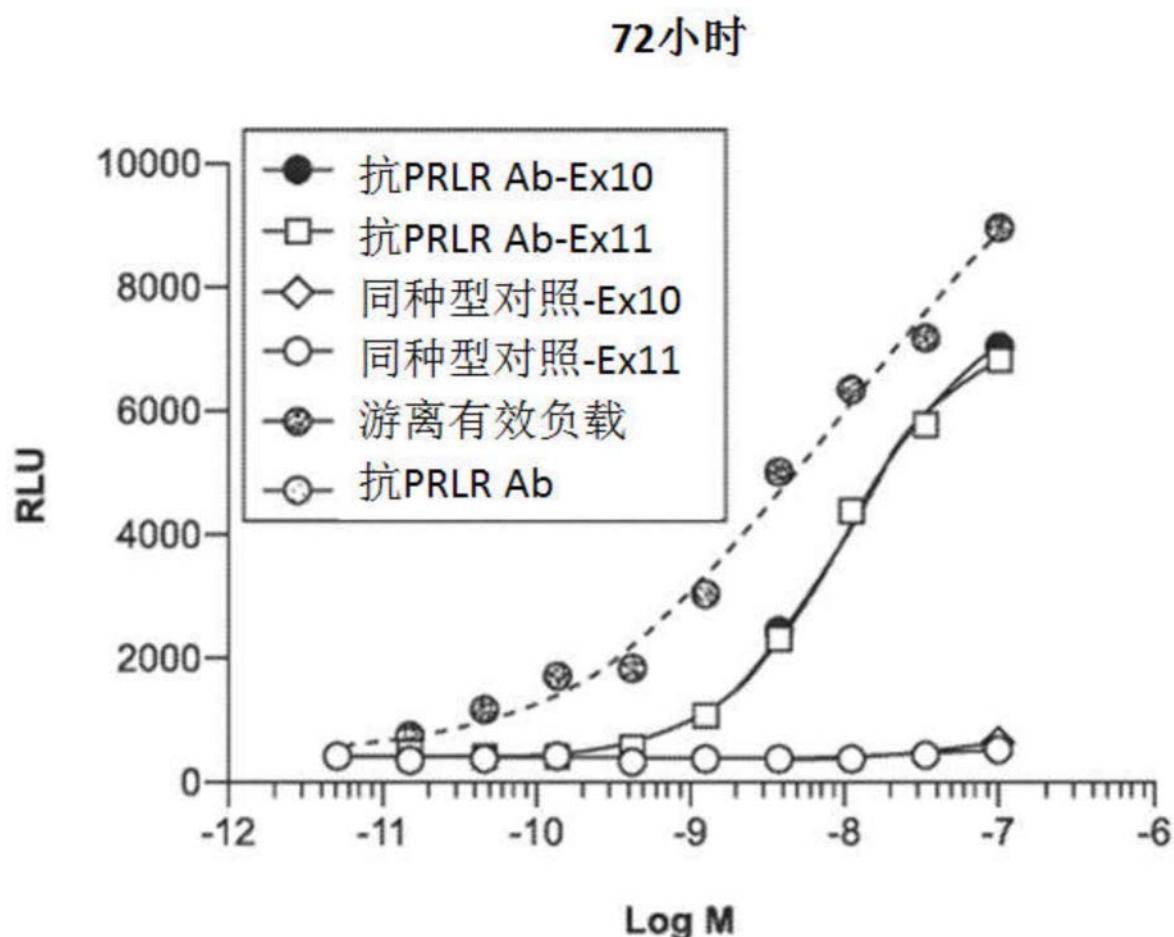


图30

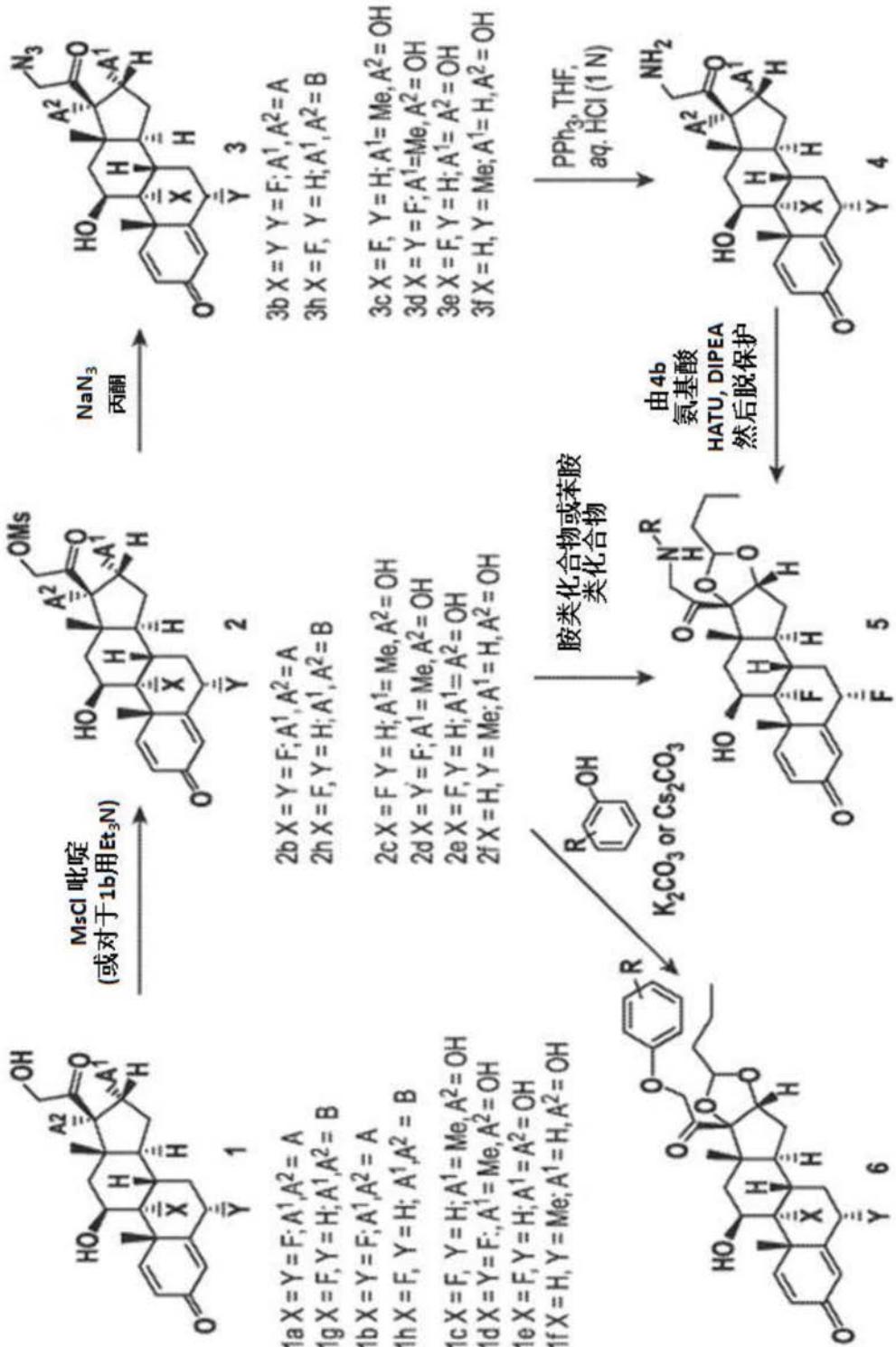


图31

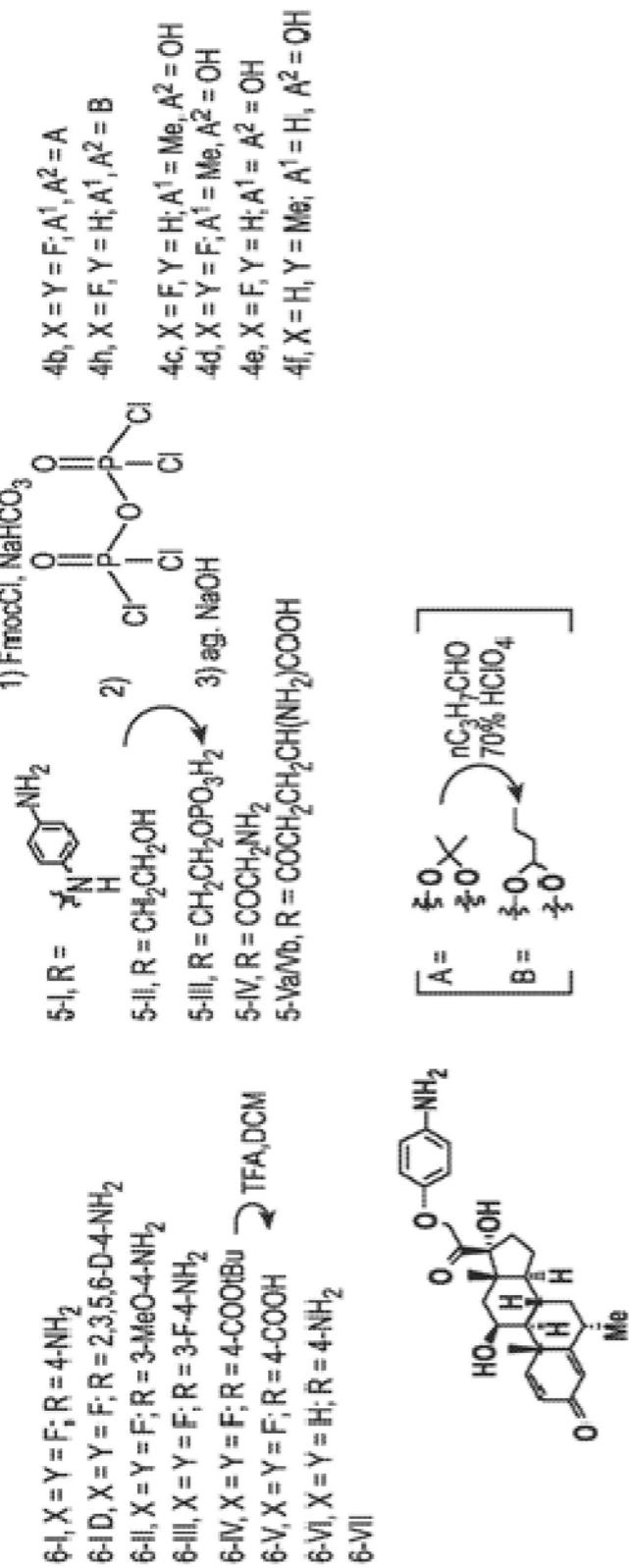


图31 (续)

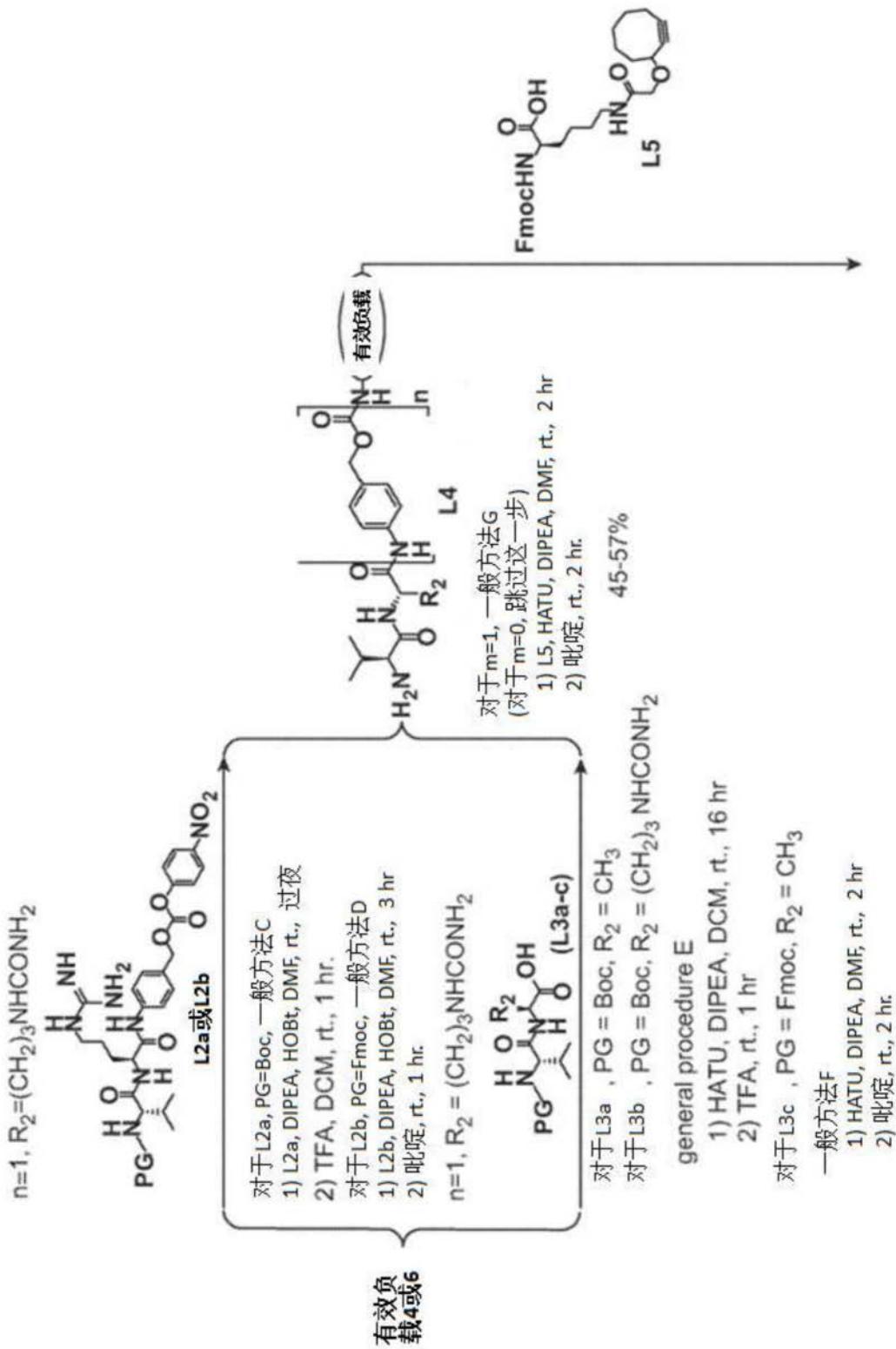


图32

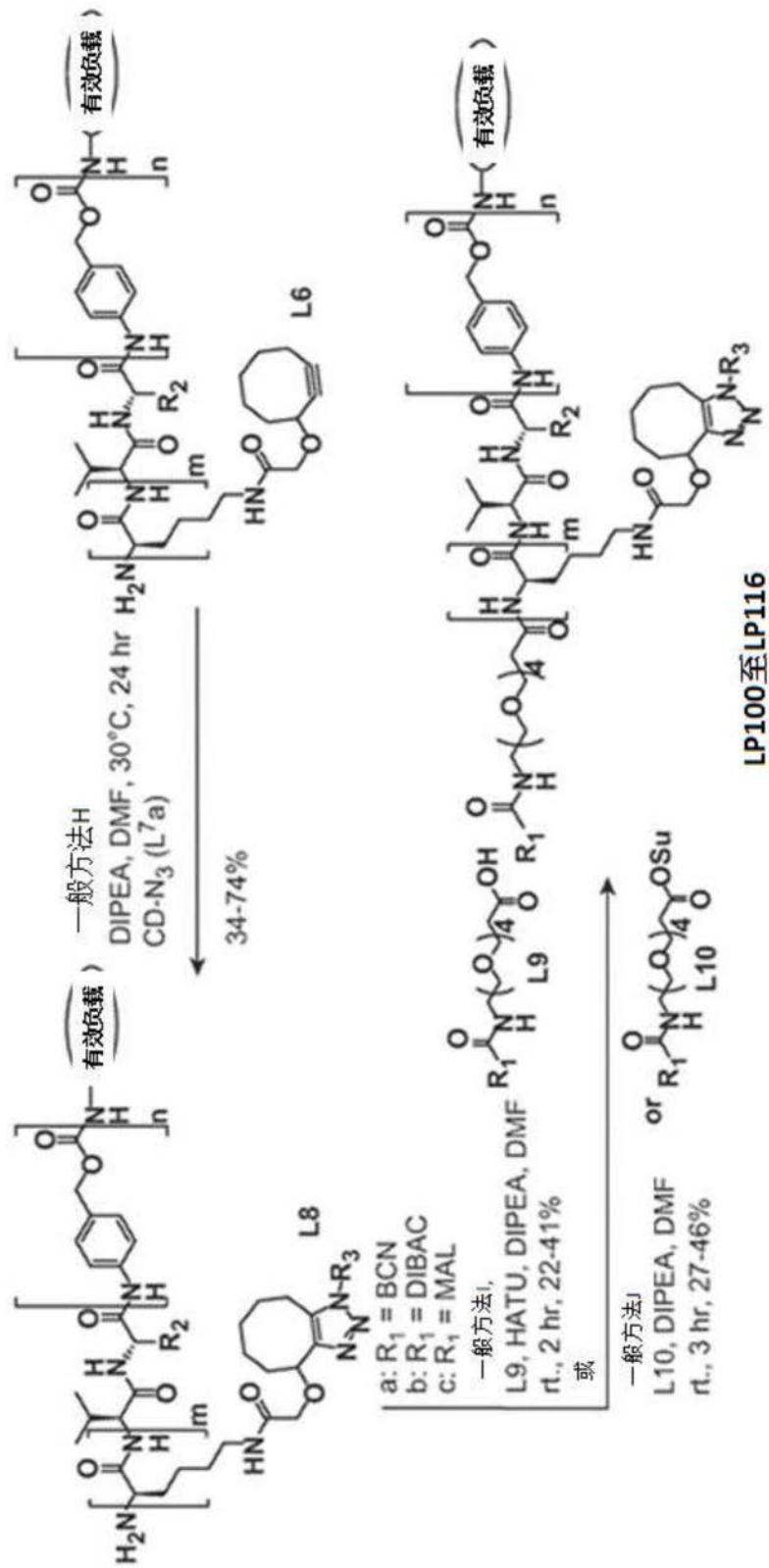


图32 (续)

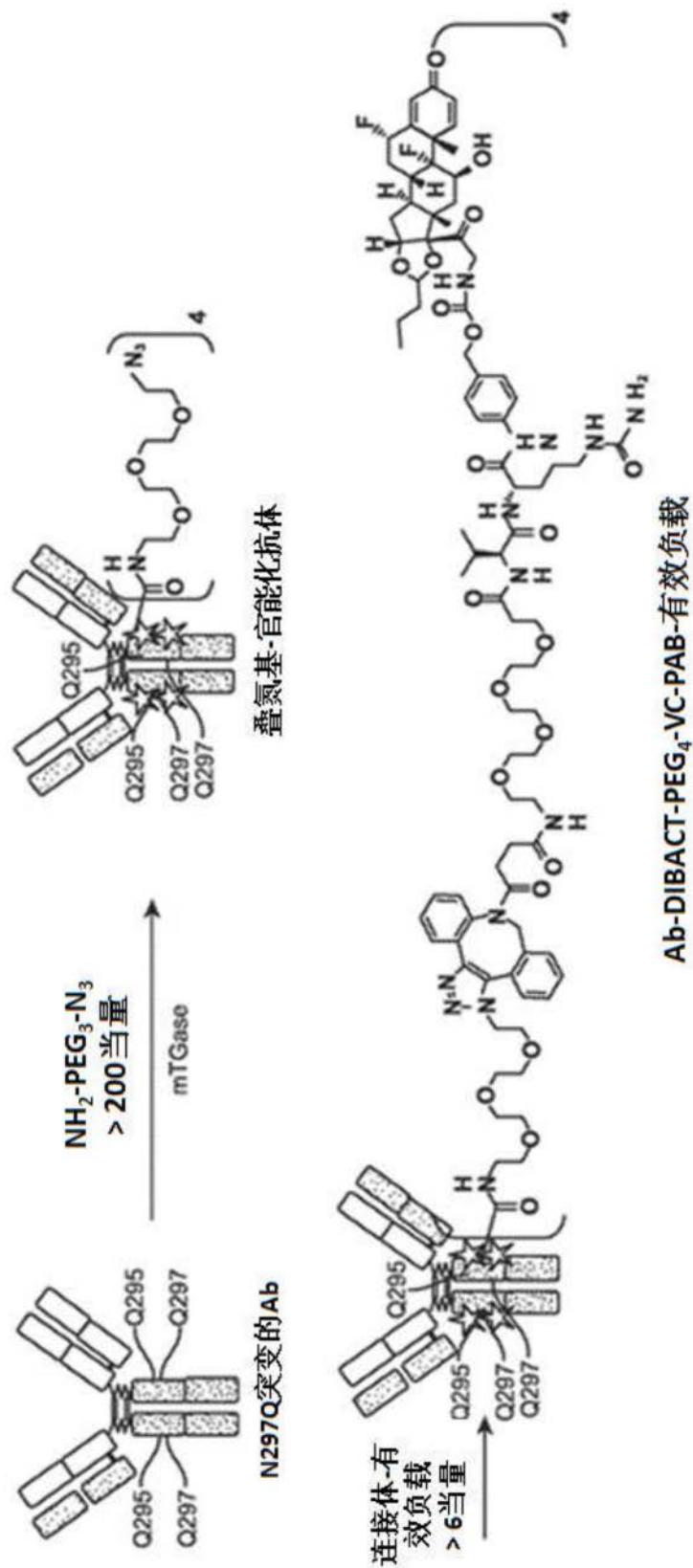


图33

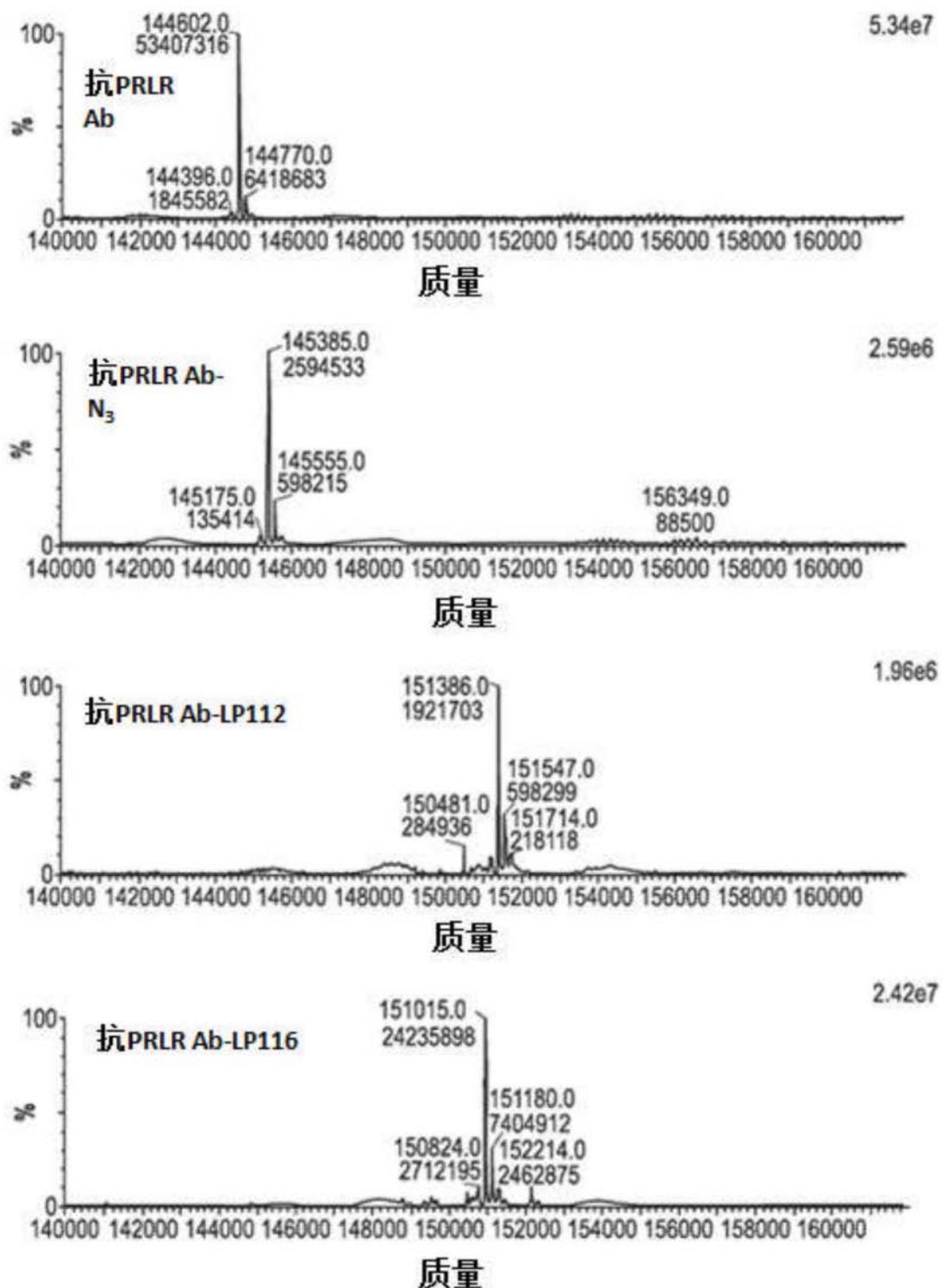
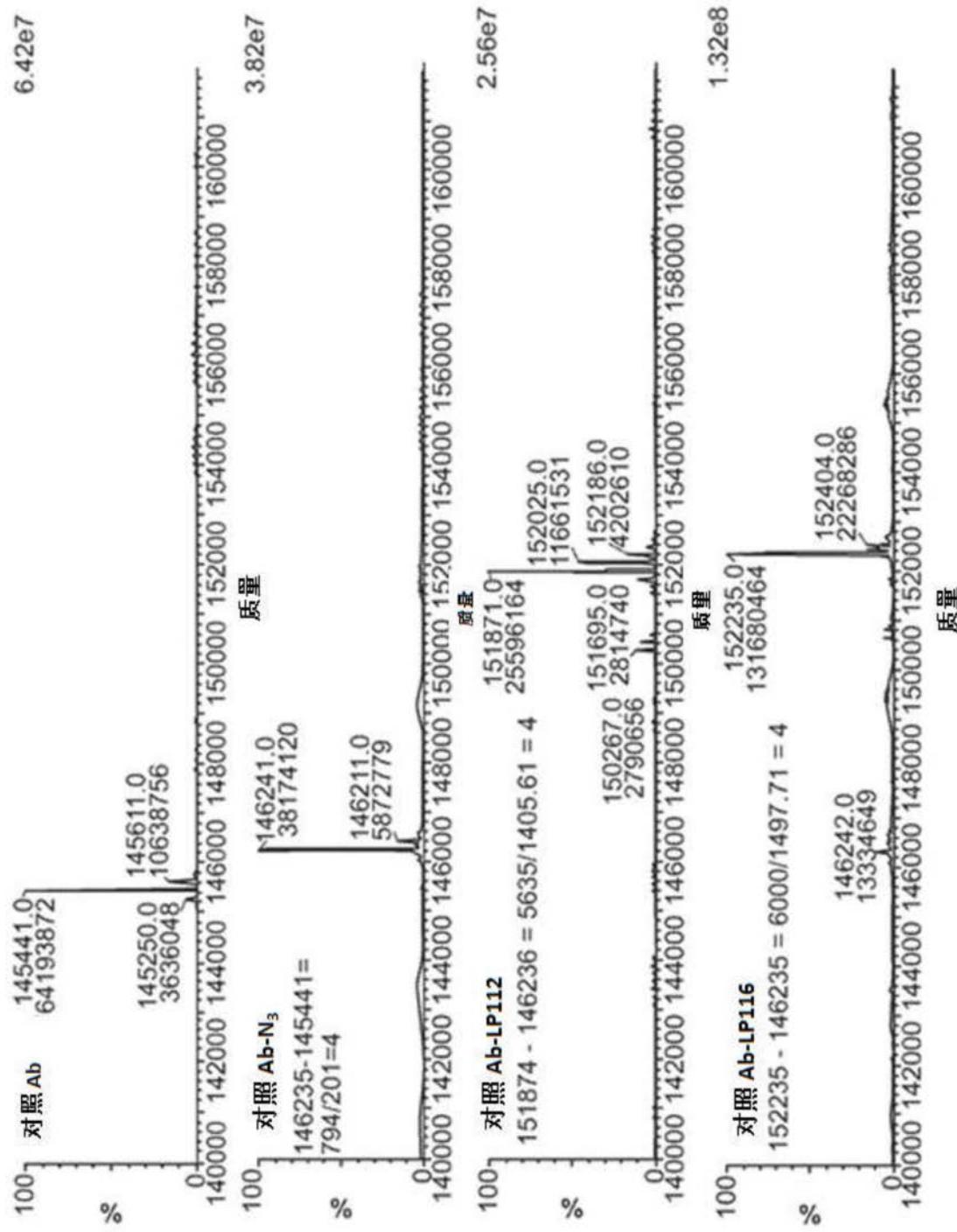


图34



293_PRLR_UAS-Luc_ncADC (PRLR+细胞)

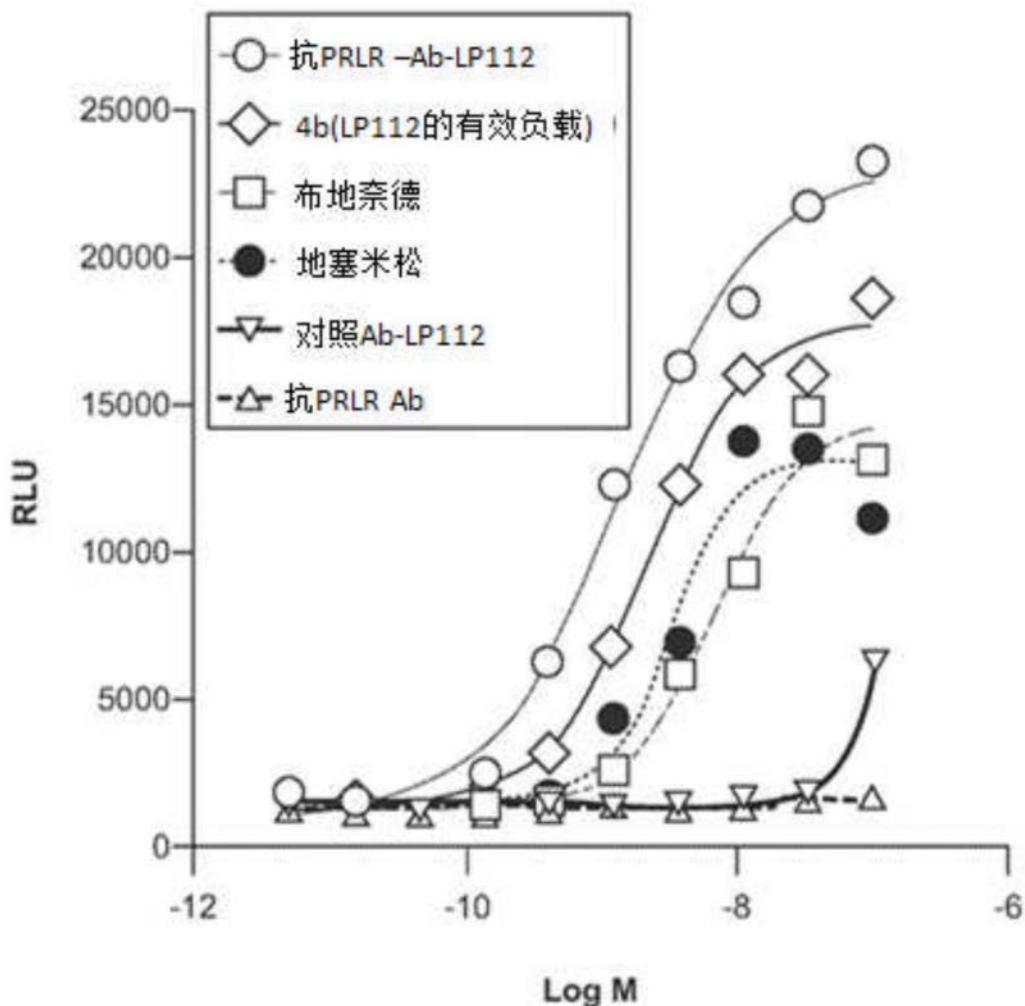


图36A

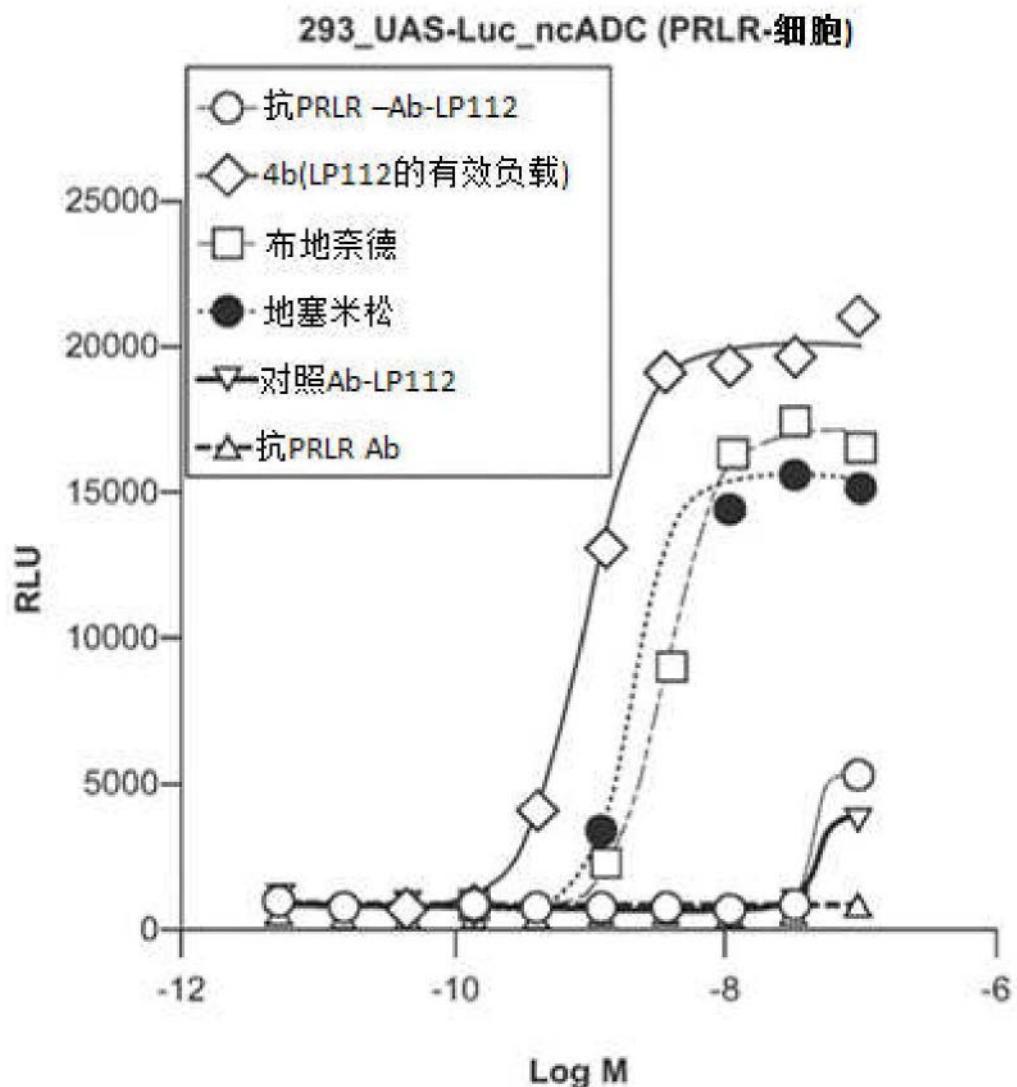
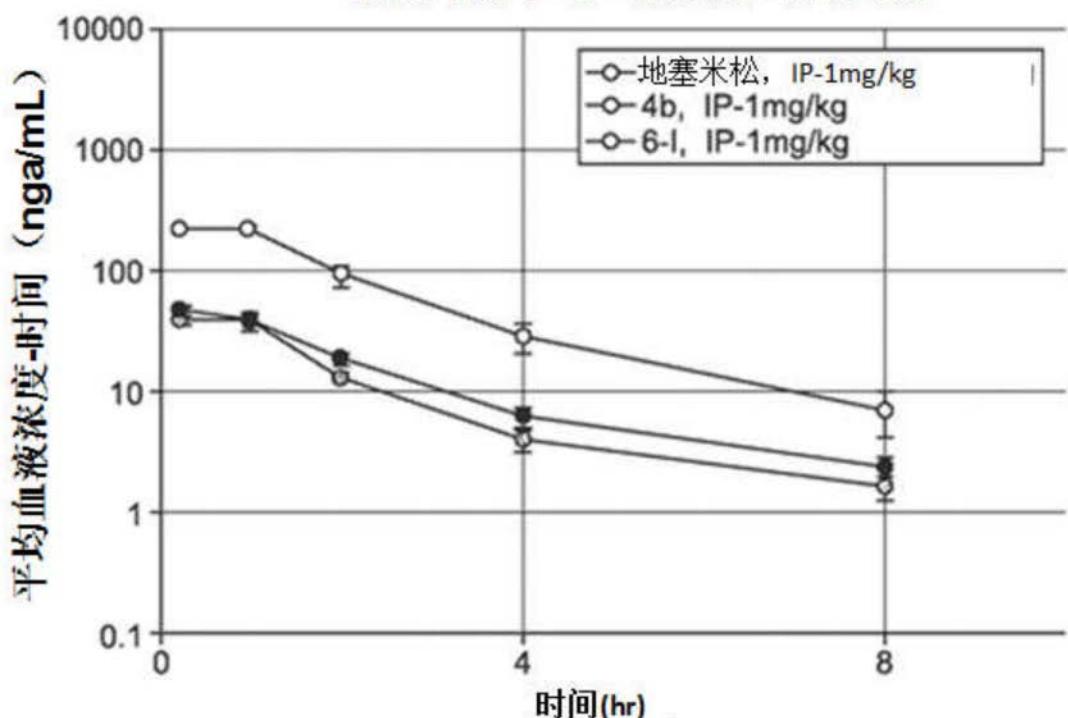


图36B

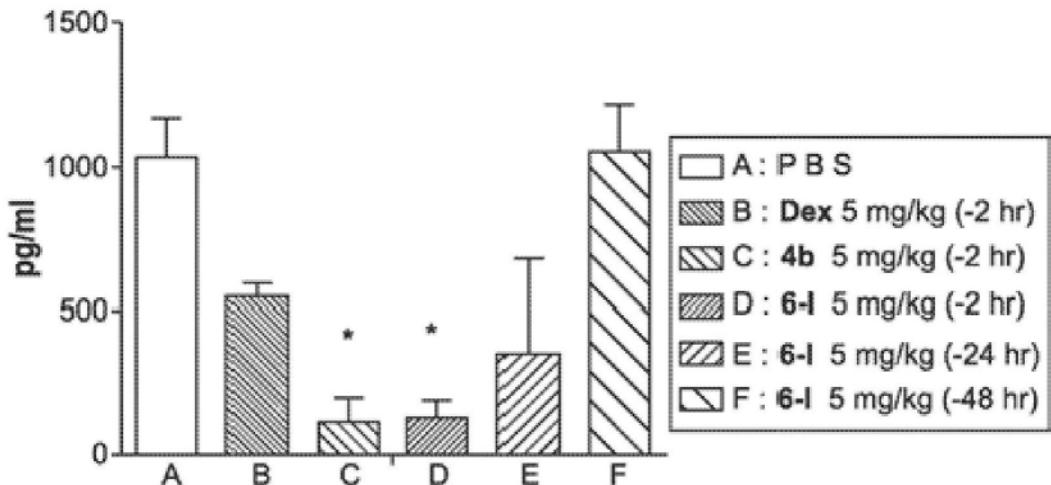
**测试样品在雄性C57BL/6小鼠 (N=4) 中以1 mg/kg
给药时的平均血液浓度-时间曲线**



PK 参数	单位	地塞米松 (IP, 雄性C57BL/6小 鼠, 1mg/kg)			4b (IP, 雄性C57BL/6小鼠, 1mg/kg)			6-I (IP, 雄性C57BL/6小鼠, 1mg/kg)		
		平均值	SD	CV(%)	平均值	SD	CV(%)	平均值	SD	CV(%)
T _{max}	hr	0.625	0.433	69.3	0.438	0.375	85.7	0.250	0.00	0.00
C _{max}	ng/mL	231	7.97	3.45	39.4	1.75	4.43	44.8	4.77	10.6
终末 t _{1/2}	hr	1.64	0.187	11.4	1.69	0.620	36.7	1.91	0.210	11.0
AUC _{last}	hr·ng/m L	545	60.6	11.1	84.6	7.71	9.12	107	13.6	12.7
AUC _{INF}	hr·ng/m L	562	67.2	11.9	89.2	8.20	9.19	113	14.1	12.5

图37A

TNF-a ELISA



TNF-a (pg/ml)	A:PBS	B: DEX 5MPK (-2h)	C:4b 5MPK (-2h)	D:6-I 5MPK (-2h)	E:6-I 5MPK (-24h)	F:6-I 5MPK (-48h)
2hr	840.2	644.3	56.5	110.6	23.1	1280.1
	1293.6	508.5	10.4	30.8	997.3	1149.4
	968.6	487.1	274.8	240.8	55.4	750.0

图37B