(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111093707 A
(43)申请公布日 2020.05.01

(21)申请号 201780094901.3

(22)申请日 2017.12.31

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.03.13

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2017/120454 2017.12.31

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/127607 EN 2019.07.04

(71)申请人 杭州多禧生物科技有限公司
地址 310018 浙江省杭州市杭州经济技术开发区6号大街260号中自科技园12幢

(72)发明人 赵珞博永新 杨庆良 黄圆圆
赵林尧 盖顺 叶杭波 雷军
徐怡芳 郭辉辉 贾军翔 童茜茜
李雯君 周晓迈 谢洪生 白露
蔡湘 张秀珍 郑军
其他发明人请求不公开姓名

(51)Int.Cl.
A61K 47/00(2006.01)

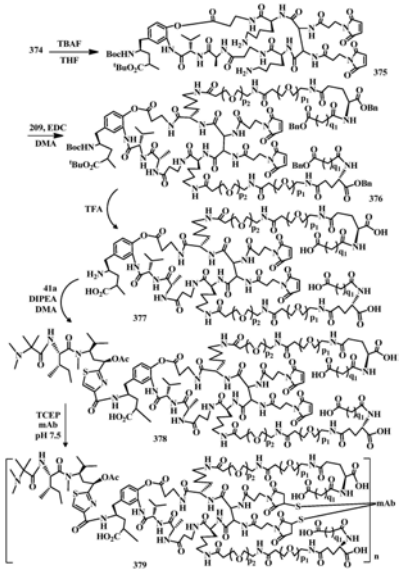
权利要求书87页 说明书223页 附图63页

(54)发明名称

含支链连接体的Tubulysin同系物偶联物

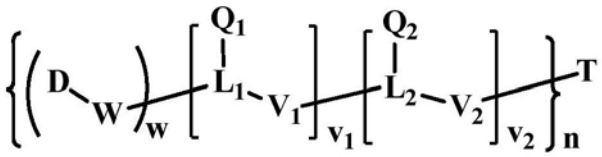
(57)摘要

本发明涉及以含支链(侧链)连接体偶联Tubulysin同系物和细胞结合分子,以更好地递送偶联物,靶向杀死异常细胞。本发明还涉及Tubulysin同系物与细胞结合剂的偶联方法,以及使用该偶联物靶向治疗癌症、感染和自身免疫疾病的方法。



CN 111093707 A

1.一种支链连接体连接的细胞结合剂-细胞毒素小分子的偶联物，其结构由式(I)表示：



(I)

其中

“—”代表单键；n为1到30；

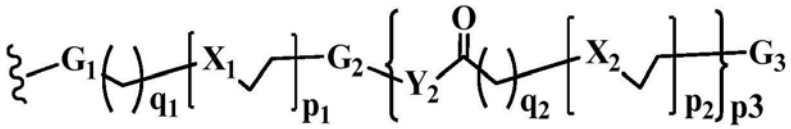
T是细胞结合剂或分子，选自抗体、单链抗体、结合靶细胞的抗体片段、单克隆抗体、单链单克隆抗体、结合靶细胞的单克隆抗体片段、嵌合抗体、结合靶细胞的嵌合抗体片段、结构域抗体、结合靶细胞的结构域抗体片段、adnectin类抗体、DARPin蛋白、淋巴因子、激素、维生素、生长因子、集落刺激因子、营养转运分子(转铁蛋白)和/或连接在白蛋白、聚合物、树状大分子、脂质体、纳米粒子、囊泡或(病毒)衣壳上的细胞结合肽、蛋白质或小分子；

L_1和L_2，相同或不同，独立地选自于O、NH、N、S、P、NNH、NHNH、N(R_3)、N(R_3)N(R_3')、CH、CO、C(O)NH、C(O)O、NHC(O)NH、NHC(O)O；如下列结构式的聚乙烯氧基：$(OCH_2CH_2)_pOR_3$、或$(OCH_2CH(CH_3))_pOR_3$、或$NH(CH_2CH_2O)_pR_3$、或$NH(CH_2CH(CH_3)O)_pR_3$、或$N[(CH_2CH_2O)_pR_3]-[(CH_2CH_2O)_{p'}R_3']$或$(OCH_2CH_2)_pCOOR_3$、或$CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_pCOOR_3$，其中p和p'是独立选自0到约1000的整数，或它们的组合；C_1-C_8烷基；C_2-C_8杂烷基、烷基环烷基、杂环烷基；C_3-C_8芳基、芳烷基、杂环、碳环、环烷基、杂烷基环烷基、烷基羰基、杂芳基；或$(Aa)_r$，r＝1-12(1至12个氨基酸单位)，(Aa)r为天然或非天然氨基酸，相同或不同序列的二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一肽或十二肽单元；

W是一个具有C_1-C_{18}延展体单元，通常是自毁灭的间隔体、一个多肽单元、腙、二硫化物、硫醚、酯或酰胺键；w是1或2或3；

V_1和V_2是独立的间隔体单元，选自O，NH，S，C_1-C_8烷基；C_2-C_8杂烷基、烯基或炔基；C_3-C_8芳基、杂环、碳环、环烷基、烷基环烷基、杂环烷基、杂芳烷基、杂烷基环烷基，或烷羰基；或$(Aa)_r$、r＝1-12(1-12个氨基酸单元)，(Aa)r为天然或非天然氨基酸，相同或不同序列的二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一肽或十二肽单元；或$(CH_2CH_2O)_p$、p为0-1000；v_1和v_2独立为0、1或2，v_1和v_2同时为0，当v_1或v_2为0时，意味着侧链Q_1或Q_2片段缺省。

Q_1和Q_2独立地由式(I-q1)表示：



(I-q1)；

其中∿是连接至L_1或L_2的位置，G_1和G_2独立地为OC(O)，NHC(O)，C(O)，CH_2，NH，OC(O)NH，NHC(O)NH，O，S，B，P(O)(OH)，NHP(O)(OH)，NHP(O)(OH)NH，CH_2P(O)(OH)NH，OP(O)(OH)O，CH_2P(O)(OH)O，$NHS(O)_2$，$NHS(O)_2NH$，$CH_2S(O)_2NH$，$OS(O)_2O$，$CH_2S(O)_2O$，Ar，$ArCH_2$，ArO，ArNH，ArS，$ArNR_1$，$(Aa)_r$；G_3为OH，SH，OR_1，SR_1，OC(O)R_1，NHC(O)R_1，C(O)R_1，CH_3，NH_2，NR_1，$^+NH(R_1)$，$^+N(R_1)(R_2)$，C(O)OH，C(O)NH_2，NHC(O)NH_2，BH_2，BR_1R_2，P(O)$(OH)_2$，NHP(O)$(OH)_2$，NHP(O)$(NH_2)_2$，S(O)$_2$(OH)，$(CH_2)_{q1}$C(O)OH，$(CH_2)_{q1}$P(O)$(OH)_2$，C(O)$(CH_2)_{q1}$C(O)OH，OC(O)$(CH_2)_{q1}$C(O)OH，NHC(O)$(CH_2)_{q1}$C(O)OH，CO$(CH_2)_{q1}$P(O)$(OH)_2$，NHC(O)O$(CH_2)_{q1}$C(O)OH，OC(O)NH$(CH_2)_{q1}$C(O)OH，

$NHCO(CH_2)_{q1}P(O)(OH)_2$，$NHC(O)(NH)(CH_2)_{q1}C(O)OH$，$CONH(CH_2)_{q1}P(O)(OH)_2$，$NHS(O)_2(CH_2)_{q1}C(O)OH$，$CO(CH_2)_{q1}S(O)_2(OH)$，$NHS(O)_2NH(CH_2)_{q1}C(O)OH$，$OS(O)_2NH(CH_2)_{q1}C(O)OH$，$NHCO(CH_2)_{q1}S(O)_2(OH)$，$NHP(O)(OH)(NH)(CH_2)_{q1}C(O)OH$，$CONH(CH_2)_{q1}S(O)(OH)$，$OP(O)(OH)_2$，$(CH_2)_{q1}P(O)(NH)_2$，$NHS(O)_2(OH)$，$NHS(O)_2NH_2$，$CH_2S(O)_2NH_2$，$OS(O)_2OH$，$OS(O)_2OR_1$，$CH_2S(O)_2OR_1$，Ar，$ArR_1$，ArOH，$ArNH_2$，ArSH，$ArNHR_1$或$(Aa)_{q1}$；$(Aa)_{q1}$为含有相同或不同序列的天然或非天然氨基酸的肽；$X_1$和$X_2$独立地为O，$CH_2$，S，S(O)，NH，$N(R_1)$，$^+NH(R_1)$，$^+N(R_1)(R_2)$，C(O)，OC(O)，OC(O)O，OC(O)NH，NHC(O)NH；

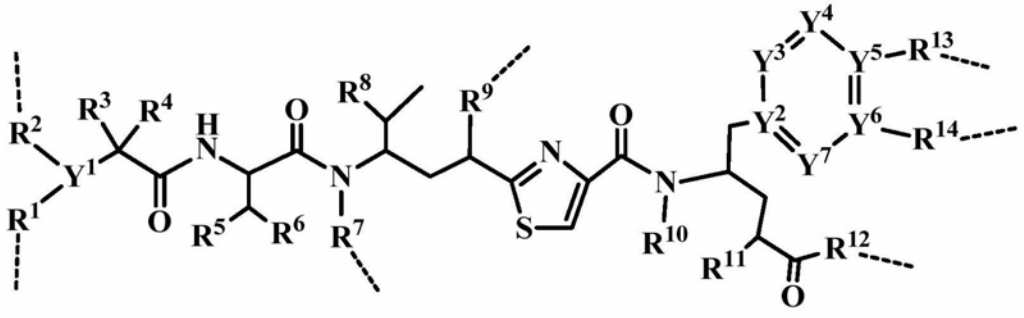
Y_2为O，NH，NR_1，CH_2，S，NHNH，Ar；p_1，p_2和p_3独立地是0-100，但是不同时为0；q_1和q_2独立地是0-24；

R_1，R_2，R_3和R_3'独立地为H，C_1-C_8烷基；C_2-C_8杂烷基或杂环；C_3-C_8芳基、芳基烷基、环烷基、烷基环烷基、杂环烷基、杂烷基环烷基，碳环、或烷羰基；

优选的Q_1和Q_2独立地是C_2-C_{100}聚羧酸或C_2-C_{100}聚烷基胺，C_6-C_{100}寡糖或多糖，C_6-C_{100}含季铵阳离子和羧酸阴离子的两性离子或含季铵阳离子和磺酸阴离子的两性离子，可生物降解的C_6-C_{100}聚合物，如聚乳酸/乙醇酸(PLGA)、聚(丙烯酸酯)、脱乙酰壳多糖、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺的共聚物、聚[2-(甲基丙烯酰氧基)乙基磷酸胆碱](PMPC)、聚-L-谷氨酸、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLG)、聚(乙二醇)(PEG)、聚(丙二醇)(PPG)、聚(乙二醇)修饰的肽、含聚(乙二醇)的氨基酸或者多肽、聚(乙二醇)修饰的脂、聚(乙二醇)修饰的烷基羧酸、聚(乙二醇)修饰的烷基胺、透明质酸(HA)、糖胺聚糖、肝素或硫酸乙酰肝素(HSGAG)、硫酸软骨素或硫酸皮素(CSGAG)、聚(乙二醇)修饰的烷基硫酸盐、聚(乙二醇)修饰的烷基磷酸盐或聚(乙二醇)修饰的烷基季铵盐；

W、Q_1、Q_2、L_1、L_2、V_1和V_2其中一个或多个可独立地缺省，但Q_1和Q_2不能同时缺省；

D是具有下式(II)结构的Tubulysin同系物：



(II)

或其药学上可接受的盐、水合物或水合盐；或多晶型结晶；或其光学异构体、外消旋物、非对映异构体或对映异构体，

其中-----是独立地连接至W的连接位点；

R^1，R^2，R^3和R^4独立地为H，C_1-C_8烷基；C_2-C_8杂烷基、烯基或炔基；C_3-C_8芳基、芳烷基、环烷基、烷基环烷基、杂环烷基、杂烷基环烷基，碳环或烷羰基；或R^1R^2、R^1R^3、R^2 R^3、R^3R^4、R^5R^6、R^{11} R^{12}或R^{13} R^{14}可形成3-7元的碳环、环烷、杂环、杂环烷、芳环或杂芳环结构；R^1和R^2独立地连接至W，它们独立地可以缺省；Y^1是N或CH；

R^5、R^6、R^8、R^{10}及R^{11}独立地是H或C_1-C_4烷基或杂烷基；

R^7选自H、R^{14}、$-R^{14}C(=O)X^1R^{15}$或$-R^{14}X^1R^{15}$；X^1是O、S、S-S、NH、CH_2或NR^{14}；

R^9选自H、OH、-O-、=O、$-OR^{14}$、$-OC(=O)R^{14}$、$-OC(=O)NHR^{14}$-、$-OC(=O)R^{14}SSR^{15}$-、OP(=O)

(OR^{14})-、-OC(=O)$NR^{14}R^{15}$、OP(=O)(OR^{14})或OR^{14}OP(=O)(OR^{15})；

R^{11}选自H、R^{14}、-R^{14}C(=O)R^{16}、-$R^{14}X^2R^{16}$、-R^{14}C(=O)X^2，X^2指-O-，-S-，-NH-、-N(R^{14})-、-O-R^{14}-、-S-R^{14}-、-S(=O)-R^{14}-、或-NHR^{14}；

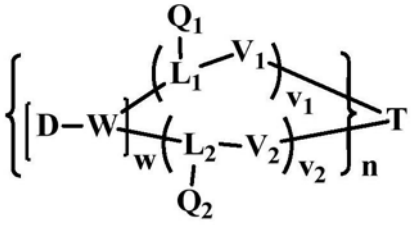
R^{12}是R^{15}、-OH、-SH、-NH_2、NH、$NHNH_2$、-NH(R^{15})、-OR^{15}、-R^{15}COR^{16}、-R^{15}COOR^{16}、-R^{15}C(O)NH_2、-R^{15}C(O)NHR^{17}、-SR^{16}、R^{15}S(=O)R^{16}、-R^{15}P(=O)$(OR^{17})_2$、-R^{15}OP(=O)$(OR^{17})_2$、-CH_2OP(=O)$(OR^{17})_2$、-$R^{15}SO_2R^{17}$、-$R^{15}X^2R^{16}$和-R^{15}C(=O)X^2，X^2指-O-、OH、SH、-S-、NH_2、-NH-、-N(R^{15})-、-OR^{15}-、-SR^{15}-、-S(=O)R^{15}-、CH_2或-NHR^{15}-；

R^{13}和R^{14}独立地是H、O、S、NH、N(R^{15})、NHNH、-OH、-SH、-NH_2、NH、-$NHNH_2$、-NH(R^{15})、-OR^{15}、CO、-COX^2、-COX^2R^{16}、R^{17}、F、Cl、Br、I、SR^{16}、N$R^{16}R^{17}$、N=NR^{16}、N=R^{16}、NO_2、SO$R^{16}R^{17}$、SO_2R^{16}、SO_3R^{16}、OSO_3R^{16}、P$R^{16}R^{17}$、PO$R^{16}R^{17}$、$PO_2R^{16}R^{17}$、OP(O)$(OR^{17})_2$、OCH_2OP(O)$(OR^{17})_2$、OC(O)R^{17}、OC(O)OP(O)$(OR^{17})_2$、PO$(OR^{16})$$(OR^{17})$、OP(O)$(OR^{17})$OP(O)$(OR^{17})_2$、OC(O)$NHR^{17}$；-O-($C_4$-$C_{12}$糖苷)、-N-($C_4$-$C_{12}$糖苷)；$C_1$-$C_8$烷基、杂烷基；$C_2$-$C_8$烯基、炔基、杂烷基、杂环烷基；$C_3$-$C_8$芳基、芳烷基、碳环、环烷基、杂烷基环烷基、烷基羰基、杂芳基、2-8个碳原子的酯、醚或酰胺；或含有1-8个氨基酸的肽(NH$(Aa)_{1-8}$或CO$(Aa)_{1-8}$)；或结构式是(OCH_2CH_2)p或$(OCH_2CH(CH_3))_p$的聚亚烷基二醇，其中p是0至约1000的整数；或上述基团的组合；X^2是O、S、S-S、NH、CH_2、OH、SH、NH_2、CHR^{14}或NR^{14}；

R^{15}、R^{16}及R^{17}独立地是H、C_1-C_8烷基、杂烷基；C_2-C_8烯基、炔基、杂烷基、杂环烷基；C_3-C_8芳基、芳烷基、碳环、环烷基、杂烷基环烷基、烷基羰基、杂芳基、烷基羰基或是它们的Na^+，K^+，Cs^+，Li^+，Ca^{2+}，Mg^+，Zn^{2+}，$N^+(R^1)(R^2)(R^3)(R^4)$，$HN^+(C_2H_5OH)_3$盐；

Y^1和Y^2独立地是N或CH；q是0或1；当q=0时，Y^3缺省，Y^4、Y^5、Y^6和Y^7独立地是CH、N、NH、O、S或N(R1)，此时Y^2、Y^4、Y^5、Y^6和Y^7形成杂芳环，如呋喃、吡咯、噻吩、噻唑、恶唑和咪唑、吡唑、三唑、四唑、噻二唑；当q=1时，Y^3、Y^4、Y^5、Y^6和Y^7独立地是CH或N，此时Y^2、Y^3、Y^4、Y^5、Y^6和Y^7形成芳香环，如苯、吡啶、哒嗪、嘧啶、吡嗪、三嗪、四嗪、哒嗪。

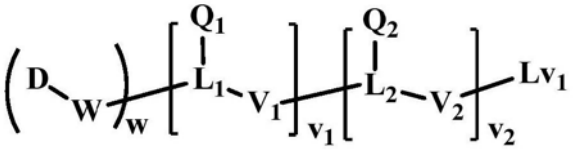
2.含有支链连接体的偶联物，其结构式表示如(III)：



(III)

其中，D、W、w、L_1、L_2、Q_1、Q_2、V_1、V_2、v_1、v_2、n和T的定义同权利要求1。

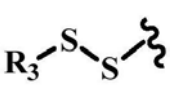
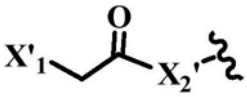
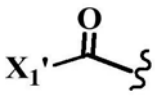
3.含支链连接体的化合物，其结构如(IV)所示，可以便利地与细胞结合分子T反应，形成式(I)中的偶联物：

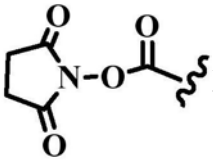
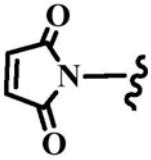
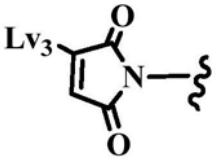


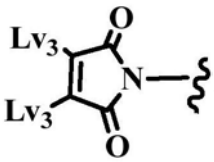
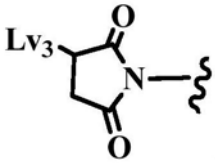
(IV)

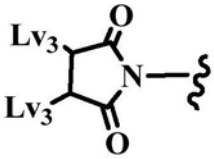
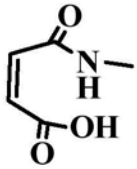
其中，D、W、w、L_1、L_2、Q_1、Q_2、V_1、V_2、v_1、v_2及n的定义同权利要求1；Lv_1是可以与细胞结合分子上的硫醇、胺、羧酸、硒醇、酚或羟基发生反应的官能团。Lv_1选自羟基(OH)；氟(F)；氯(Cl)；溴(Br)；碘(I)；硝基酚基；N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)基；苯酚基；二硝基苯酚基；五氟苯

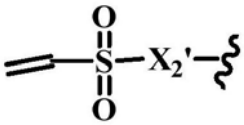
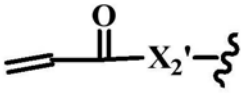
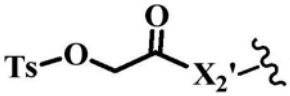
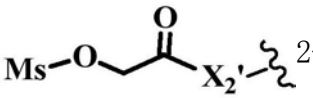
酚基;四氟苯酚基;三氟苯酚基;二氟苯酚基;一氟苯酚基;五氯苯酚基;三氟甲磺酰基;咪唑基;二氯苯酚基;三氯苯酚基;四氯苯酚基;1-羟基苯并三唑基;甲苯磺酰基;甲磺酰基;2-乙基-5-苯基异恶唑-3'-磺酰基、酸酐或与其它酸酐作用形成的酸酐,例如乙酸酐、甲酸酐;或与多肽缩合试剂、Mitsunobu反应试剂作用生成的中间体。缩合剂的例子如下:1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)、二环己基碳二亚胺(DCC)、N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)、N-环己基-N'-(2-吗啉代-乙基)碳二亚胺甲基对甲苯磺酸盐(CMC或CME-CDI)、1,1'-羰基二咪唑(CDI)、氧-(苯并三唑-1-)基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐(TBTU)、N,N,N',N'-四甲基-氧-(1H-苯并三唑-1-基)-六氟磷酸铵(HBTU)、(苯并三唑-1-基氧基)三(二甲基氨基)-六氟磷酸盐(BOP)、(苯并三唑-1-基氧基)三吡咯烷基六氟磷酸盐(PyBOP)、氰基膦酸二乙酯(DEPC)、氯-N,N,N',N'-四甲基甲脒六氟磷酸盐、1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶3-氧六氟磷酸盐(HATU)、1-[(二甲氨基)(吗啉代)亚甲基]-1H-[1,2,3]三唑并[4,5-b]吡啶-1-鎓3-氧六氟磷酸盐(HDMA)、2-氯-1,3-二甲基-咪唑六氟磷酸盐(CIP)、六氟磷酸氯代吡咯烷酮鎓(PyCloP)、氟-N,N,N',N'-双(四亚甲基)甲脒六氟磷酸盐(BTFFH)、N,N,N',N'-四甲基-S-(1-氧代-2-吡啶基)硫脲六氟磷酸盐、氧-(2-氧代-1(2H)吡啶基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐(TPTU)、S-(1-氧代-2-吡啶基)N,N,N',N'-四甲基硫脲四氟硼酸盐、氧-[(乙氧基羰基)-氰基甲基氨基]-N,N,N',N'-六氟磷酸四甲基脲(HOTU)、(1-氰基-2-乙氧基-2-氧代乙基氨基氧基)二甲氨基-吗啉代-六氟磷酸盐(COMU)、氧-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-双(四亚甲基)六氟磷酸盐(HBPyU)、N-苄基-N'-环己基-碳二亚胺(有或没有聚合物结合)、二吡咯烷基(N-琥珀酰亚胺基氧基)碳鎓六氟磷酸盐(HSPyU)、氯二吡咯烷基六氟磷酸盐(PyClU)、2-氯-1,3-二甲基咪唑四氟硼酸盐(CIB)、(苯并三唑-1-基氧基)二吡啶碳六氟磷酸盐(HBPipU)、氧-(6-氯苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐(TCTU)、溴代(二甲基氨基)-六氟磷酸盐(BroP)、丙基膦酸酐(PPACA、T3P®)、2-吗啉代乙基异氰化物(MEI)、N,N,N',N'-四甲基-氧-(N-琥珀酰亚胺基)六氟磷酸盐(HSTU)、2-溴-1-乙基-吡啶鎓四氟硼酸盐(BEP)、氧-[(乙氧基羰基)氰基-亚甲基氨基]-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐(TOTU)、4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉氯化物(MMTM、DMTMM)、N,N,N',N'-四甲基-氧-(N-琥珀酰亚胺基)脲四氟硼酸(TSTU)、氧-(3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐(TDBTU)、1,1'-(偶氮二羰基)-二吡啶(ADD)、二-(4-氯苄基)偶氮二羧酸酯(DCAD)、偶氮二羧酸二叔丁酯(DBAD)、偶氮二羧酸二异丙酯(DIAD)、偶氮二羧酸二乙酯(DEAD)。Lv_1可以是酸酐,或与其它C_1-C_8酸酐作用形成的酸酐,Lv_1优选自以下结构:

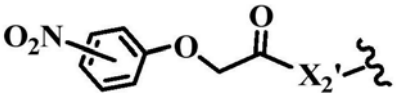
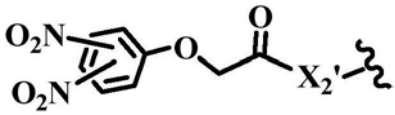
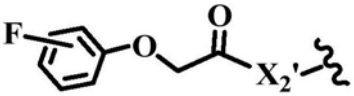
 二硫化物;  卤代乙酰基;  酰卤;

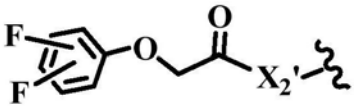
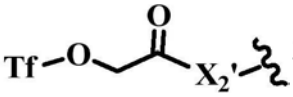
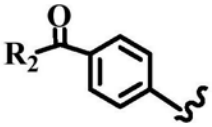
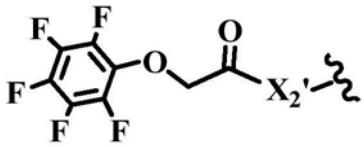
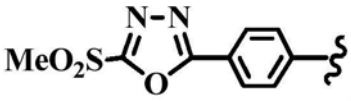
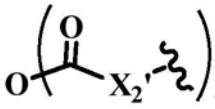
 N-羟基琥珀酰亚胺酯;  马来酰亚胺;  单取代

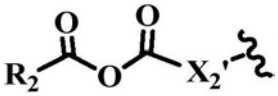
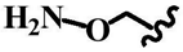
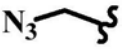
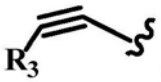
马来酰亚胺；  二取代马来酰亚胺；  单取代的琥珀酰亚胺；

 二取代马来酰亚胺；  取代马来酸；-CHO醛；

 乙烯磺酰基；  丙烯酰基；  2-(甲苯磺酰氧基)乙酰基；  2-(甲磺酰氧基)乙酰基；

 2-(硝基苯酚基)乙酰基；  2-(二硝基苯基)乙酰基；  2-(氟代苯酚基)-乙酰基；

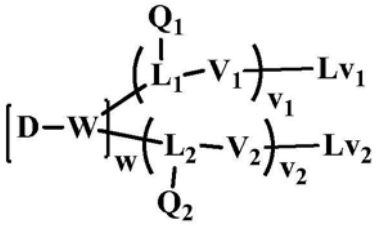
 2-(二氟苯酚基)-乙酰基；  2-((三氟甲基磺酰基)氧基)乙酰基；  酮或醛，  2-(五氟苯酚基)乙酰基；  ，甲基砜苯基恶二唑(ODA)；  ，

 酸酐，  烷氧基氨；  迭氮基，  炔基，或

 酰肼；

其中，X_1'是F、Cl、Br、I或Lv_3；X_2'是O、NH、N(R_1)或CH_2；R_3是H、芳基或杂芳基，其中一个或多个H原子可独立地被-R1、-卤素、-OR_1、-SR_1、-NR_1R_2、-NO_2、-S(O)R_1、-S(O)$_2R_1$或-$COOR_1$取代；Lv_3是离去基团，选自F、Cl、Br、I；硝基苯基；N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)；苯酚基；二硝基苯酚基；五氟苯酚基；四氟苯酚基；二氟苯酚基；单氟苯酚基；五氯苯酚基；三氟甲磺酰基；咪唑基；二氯酚基；四氯苯酚基；1-羟基苯并三唑基；甲苯甲磺酰基；甲磺酰基；2-乙基-5-苯基异恶唑-3′-磺酰基，酸酐或与其它酸酐作用形成的酸酐，例如乙酸酐、甲酸酐；或与多肽缩合试剂、Mitsunobu反应试剂作用生成的中间体。

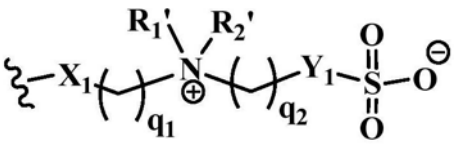
4.含支链连接体的化合物，其结构如(V)所示，可以便利地与细胞结合分子T反应，形成式(III)中的偶联物：



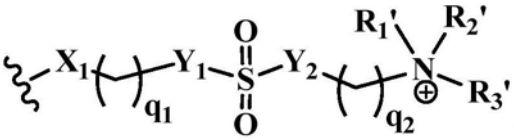
(V)

其中，D、W、w、L_1、L_2、Q_1、Q_2、V_1、V_2、v_1、v_2及n的定义同结构式(I)；Lv_1和Lv_2定义同权利要求3中(IV)中的Lv_1，Lv_1和Lv_2可以相同，也可以不同。

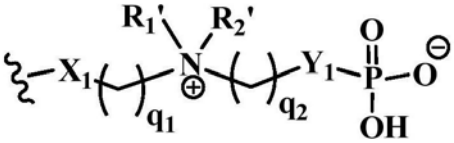
5.如权利要求1，2，3和4中所述的支链Q1和Q2，独立地选自下列结构：



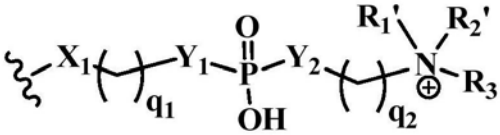
Iq-01，



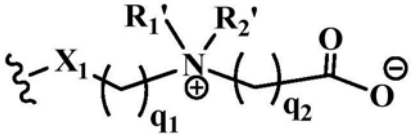
Iq-02，



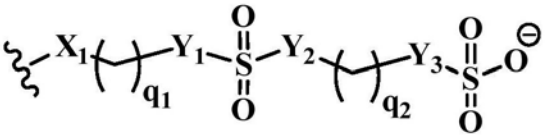
Iq-03，



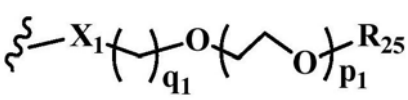
Iq-04，



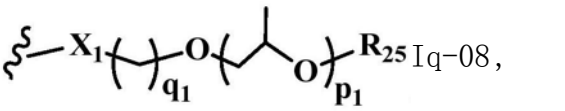
Iq-05，



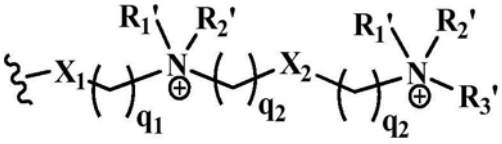
Iq-06，



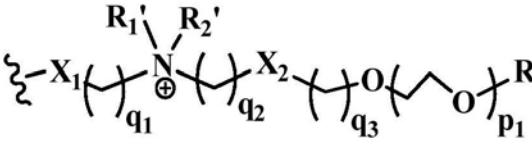
Iq-07，



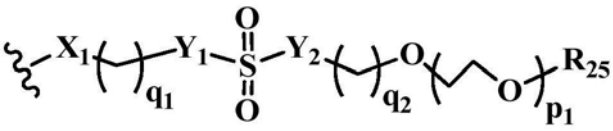
Iq-08，



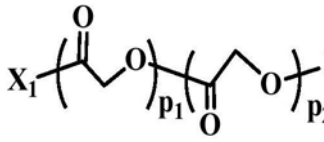
Iq-09，



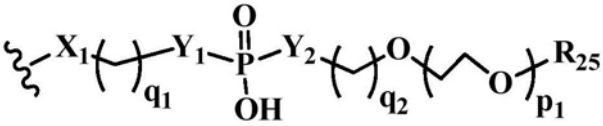
Iq-10，



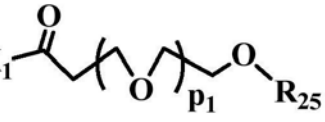
Iq-11，



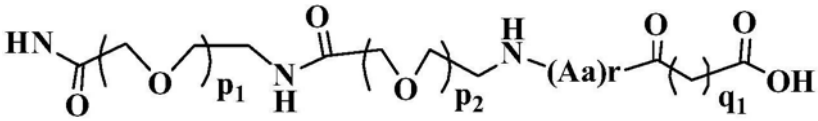
Iq-12，



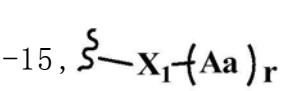
Iq-13，



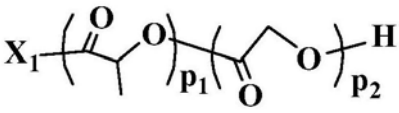
Iq-14，



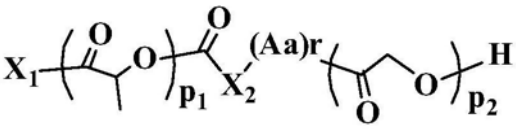
Iq-15，



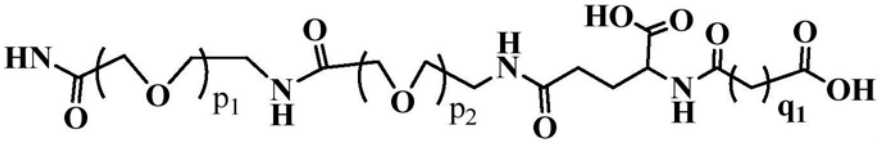
Iq-16，

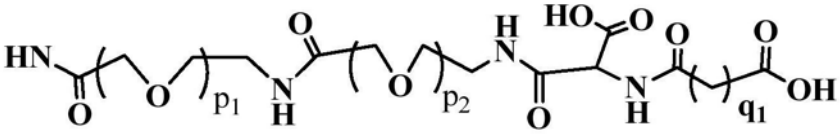


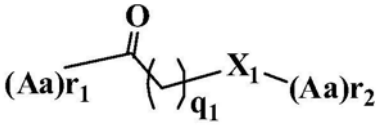
Iq-17，

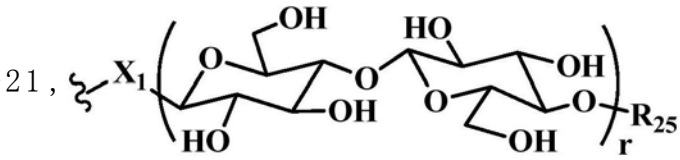


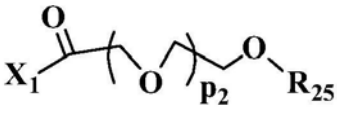
Iq-18，

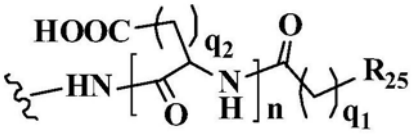

Iq-19,

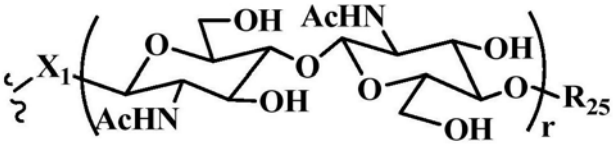

Iq-20,

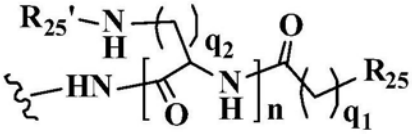

Iq-21,

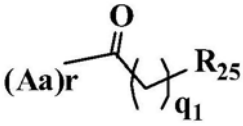

Iq-22,

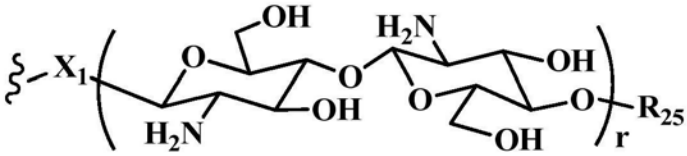

Iq-23,

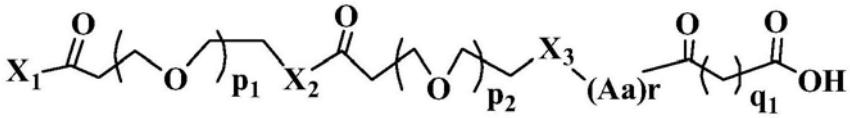

Iq-24,

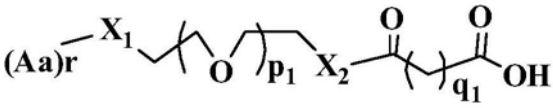

Iq-25,

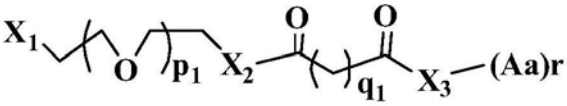

Iq-26,

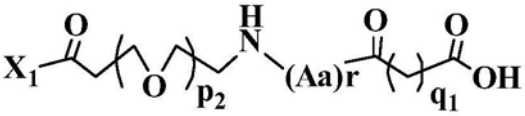

Iq-27,

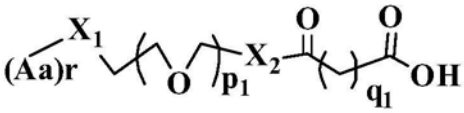

Iq-28,

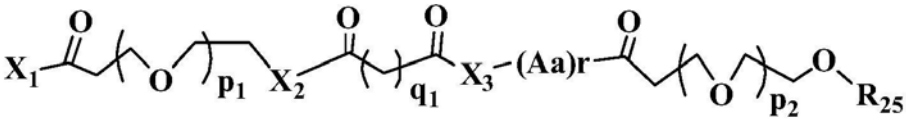

Iq-29,

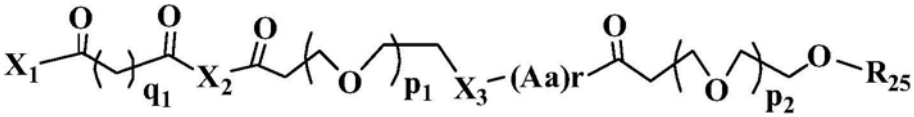

Iq-30,


Iq-31,


Iq-32,


Iq-33,

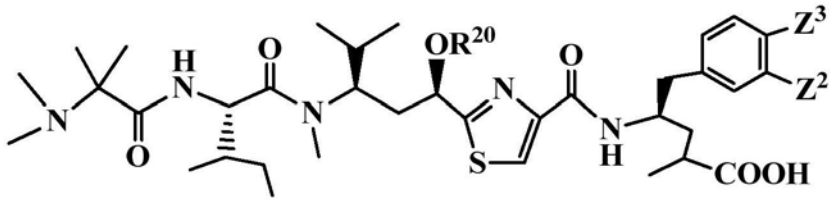

Iq-34


Iq-35

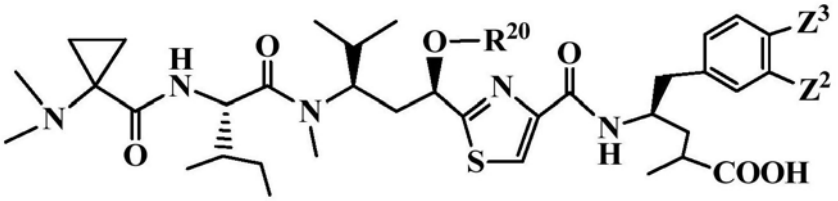
其中，R_{25}和R_{25}'独立地选自H、HC(O)、$CH_3C(O)$、$CH_3C(NH)$、C_1-C_{18}烷基、C_1-C_{18}烷基-Y_1-SO_3H、C_1-C_{18}烷基-Y_1-PO_3H_2、C_1-C_{18}烷基-Y_1-CO_2H、C_1-C_{18}烷基-Y_1-$N^+R_1'R_2'R_3'R_4'$、C_1-C_{18}烷基-Y_1-$CONH_2$、C_2-C_{18}烷基、C_2-C_{18}酯、C_2-C_{18}醚、C_2-C_{18}胺、C_2-C_{18}烷基羧酰胺、C_3-C_{18}芳基、C_3-C_{18}环烷

基、C_3-C_{18}杂环、1-24个氨基酸、C_2-C_{18}脂质、C_2-C_{18}脂肪酸或C_2-C_{18}脂肪铵脂质；X_1和X_2独立地选自NH、N(R1')、O、CH_2、S、C(O)、S(O)、S(O_2)、P(O)(OH)、NHNH、CH＝CH、Ar或$(Aa)_{q1}$，q_1＝0-24(0-24个氨基酸、q1＝0表示缺省)；X_1、X_2、X_3、X_4、Y_1、Y_2和Y_3独立地选自NH、N(R_1')、O、C(O)、CH_2、S、S(O)、NHNH、C(O)、OC(O)、OC(O)O、OC(O)NH、NHC(O)NH、Ar或$(Aa)_{q1}$，X_1、X_2、X_3、X_4、Y_1、Y_2和Y_3独立地可以缺省；p_1、p_2和p_3独立地为0-100，但不能同时为0；q_1、q_2和q_3独立地为0-24；R_1'、R_2'、R_3'和R_4'独立地选自H和C_1-C_6烷基；Aa是天然或非天然氨基酸；Ar或$(Aa)_{q1}$是同或不同的肽序列；q1＝0表示$(Aa)_{q1}$缺省。

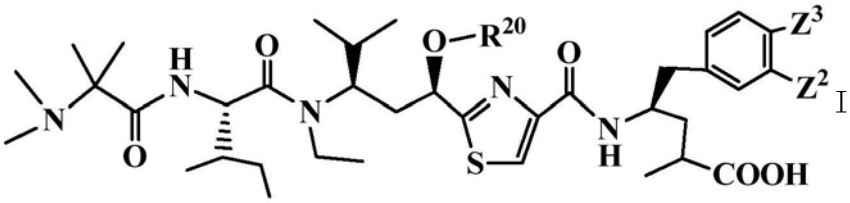
6.如权利要求1,2,3或4中所述的D(Tubulysin)的结构选自：



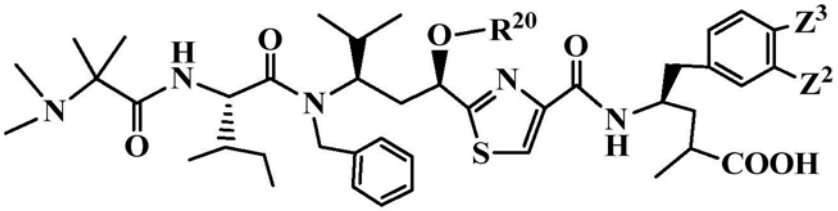
I-01



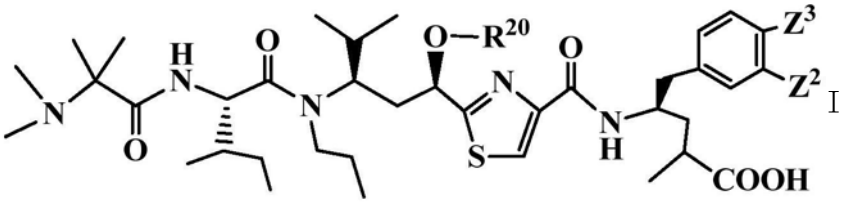
I-02



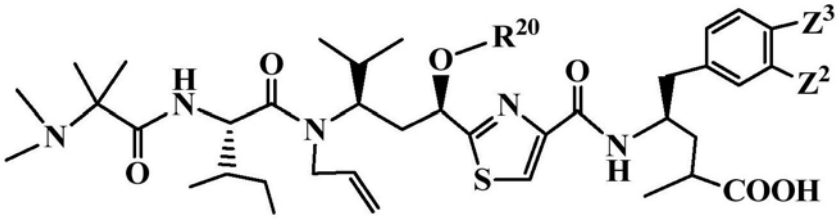
I-03



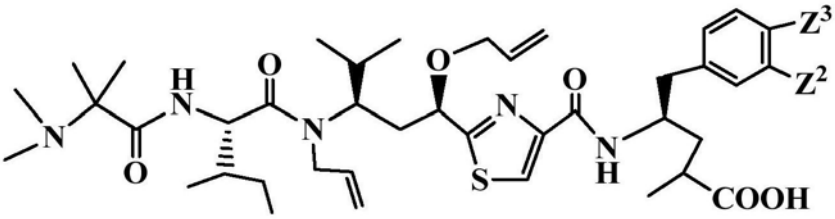
I-04



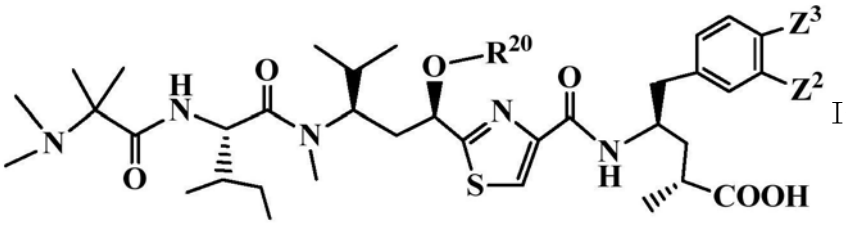
I-05



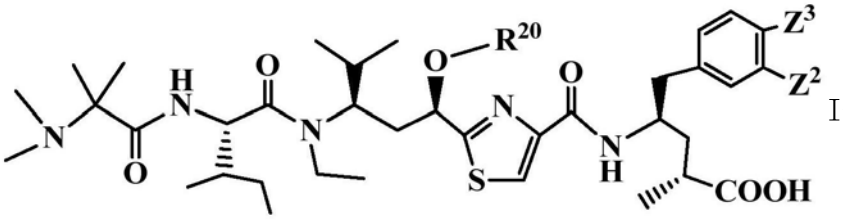
I-06



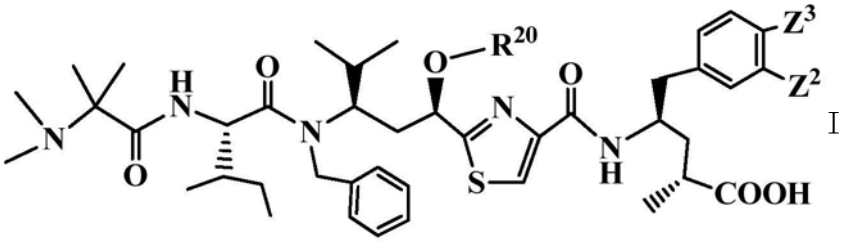
I-07



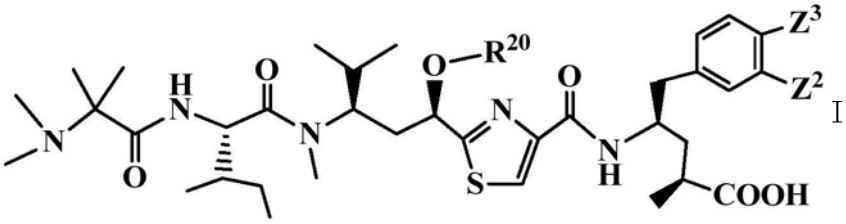
I-08



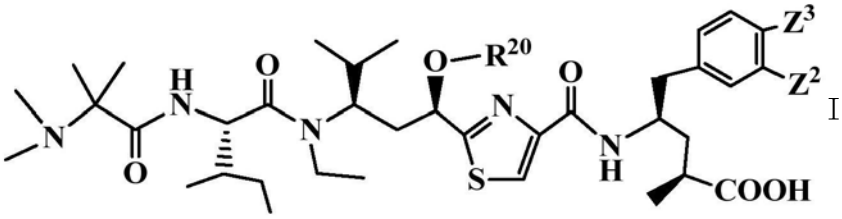
I-09



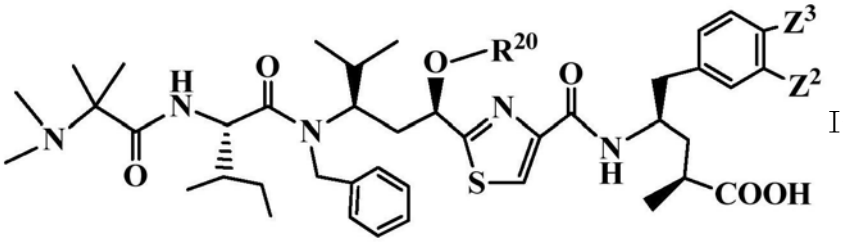
I-10



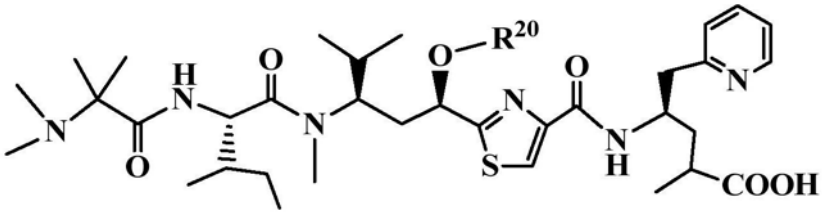
I-11



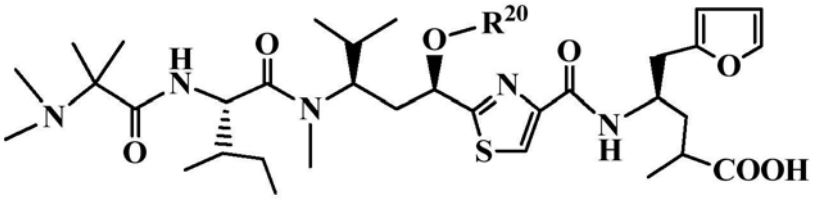
I-12



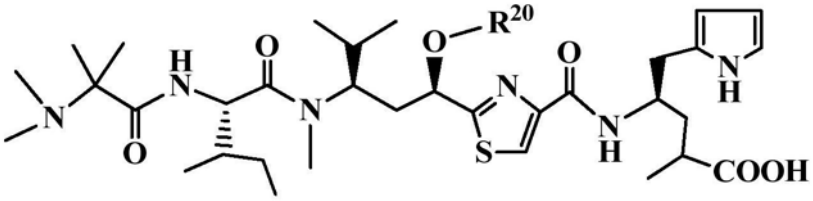
I-13



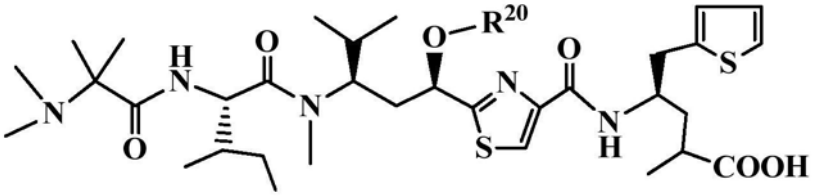
I-14



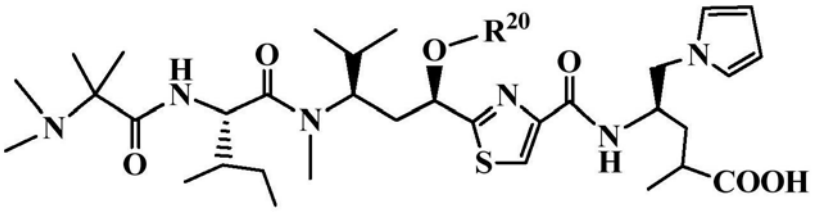
I-15



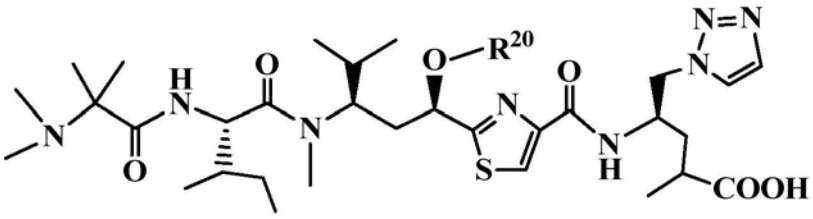
I-16



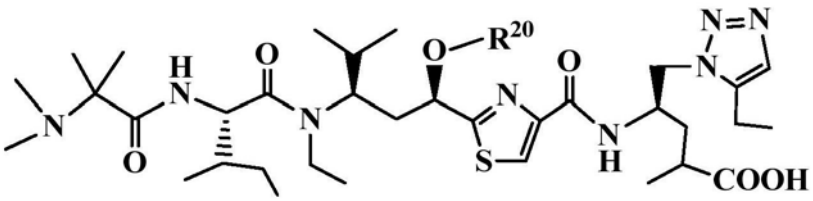
I-17



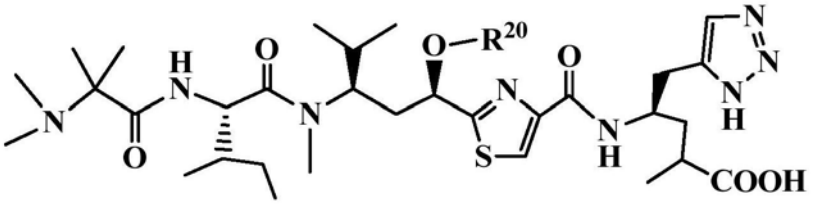
I-18



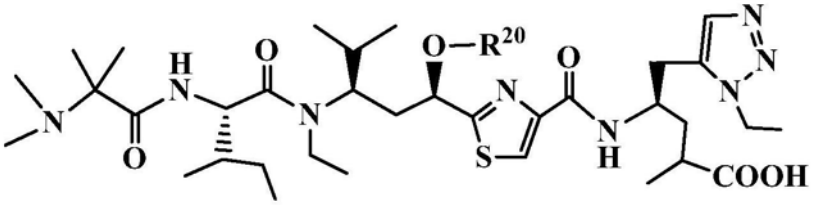
I-19



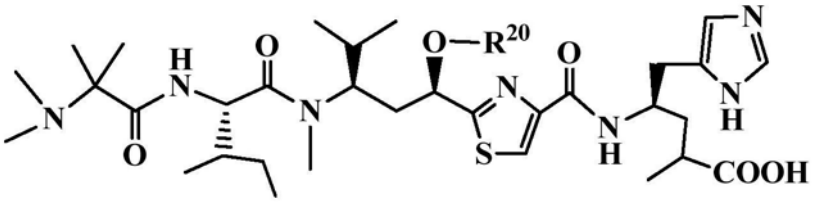
I-20



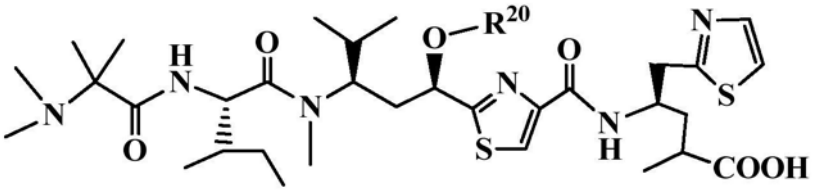
I-21



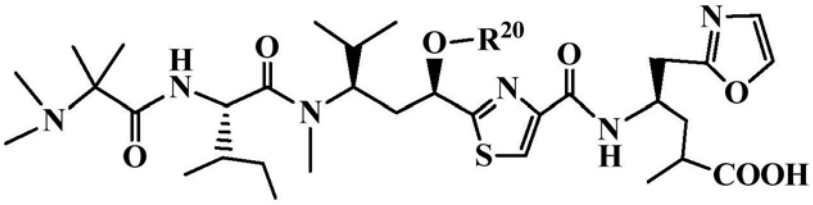
I-22



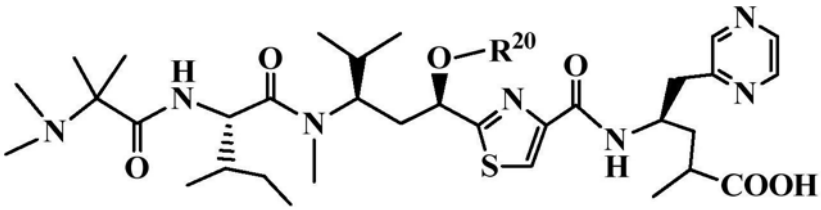
I-23



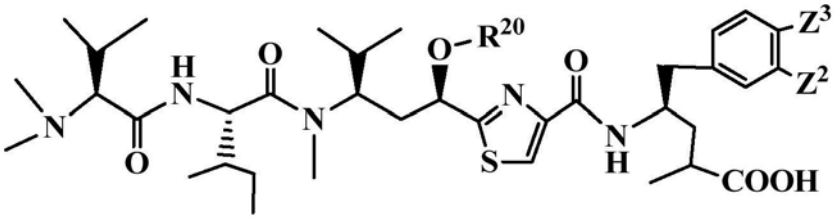
I-24



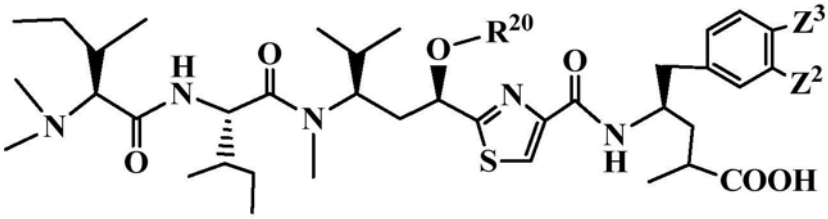
I-25



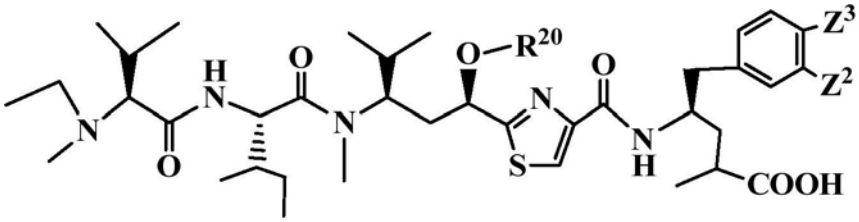
I-26



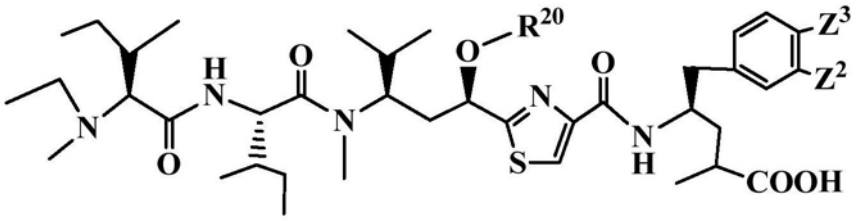
I-27

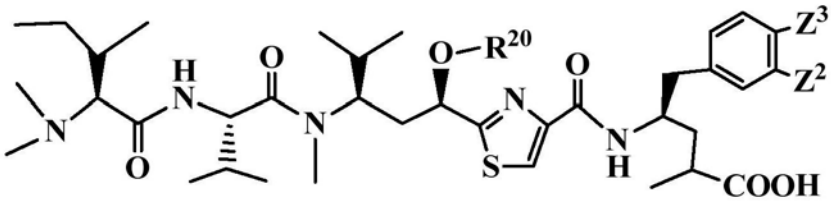


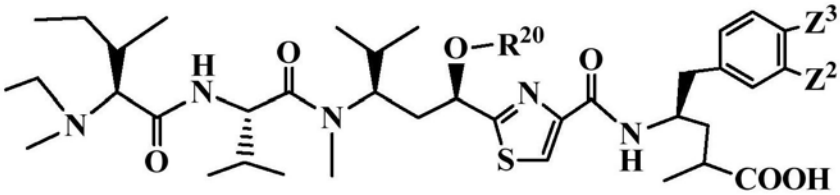
I-28

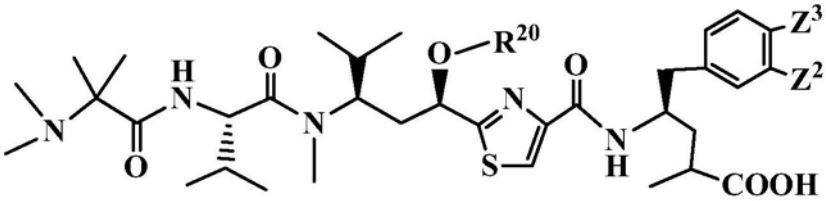


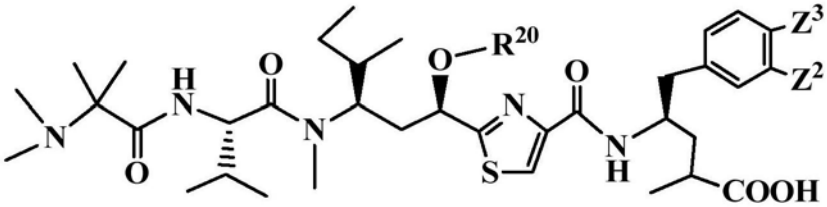
I-29

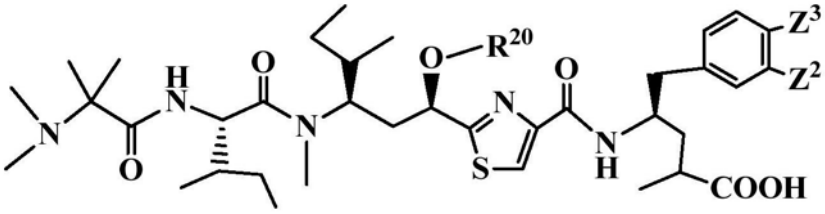

I-30

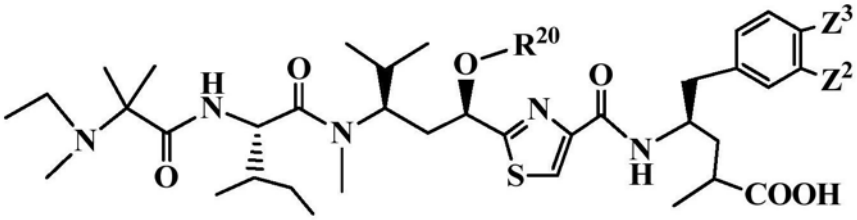

I-31

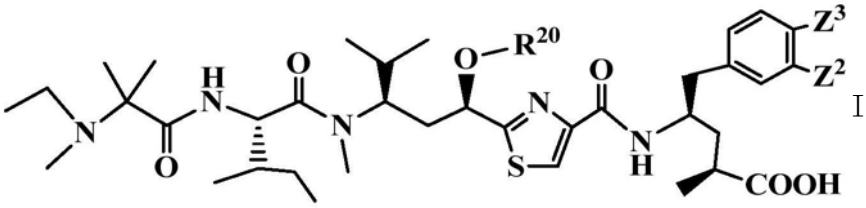

I-32

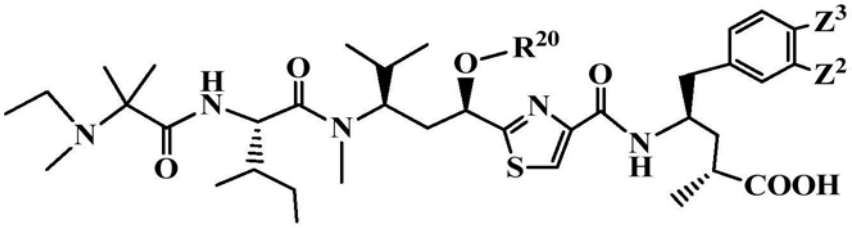

I-33


I-34

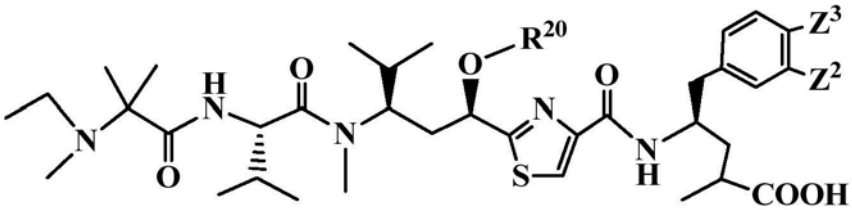

I-35


I-36

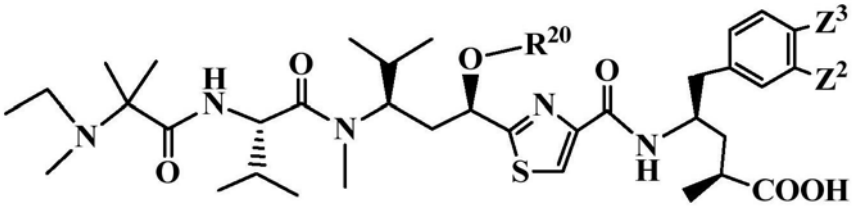

I-37



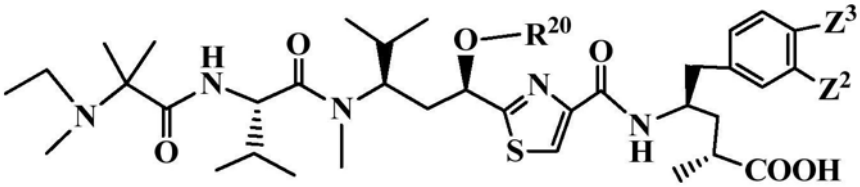
I-38



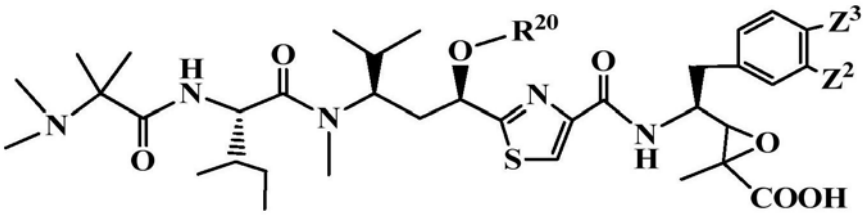
I-39



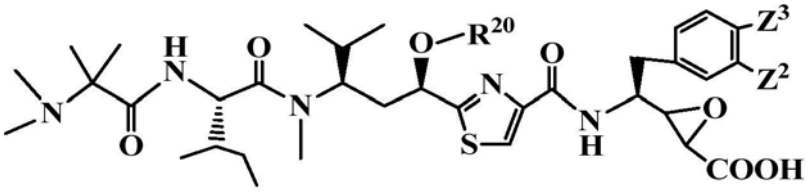
I-40



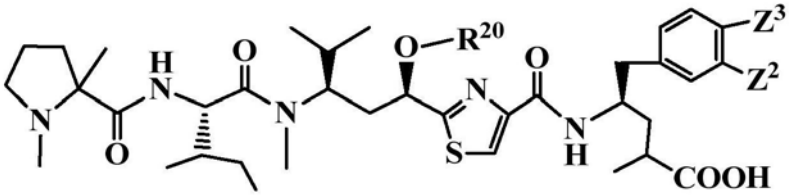
I-41



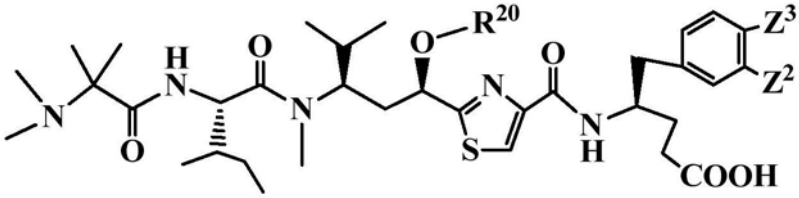
I-42



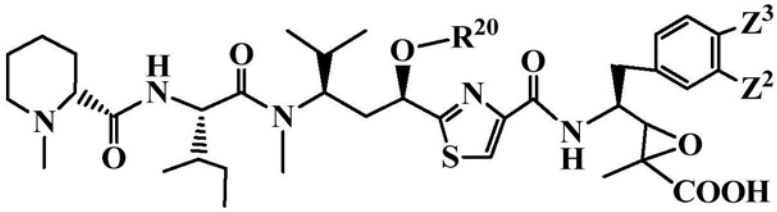
I-43

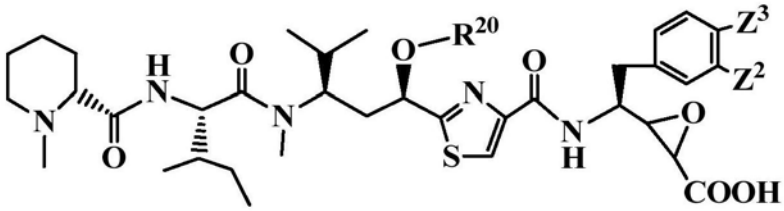


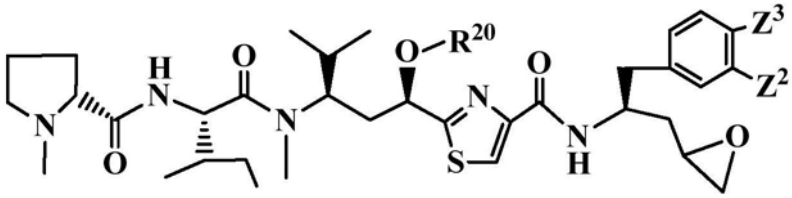
I-44

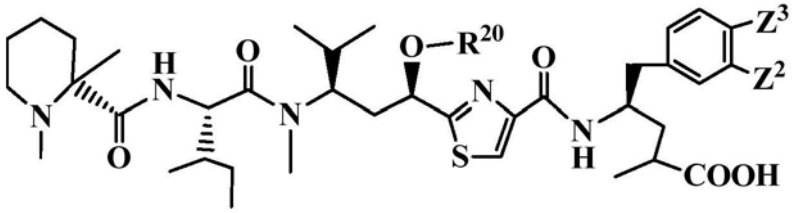


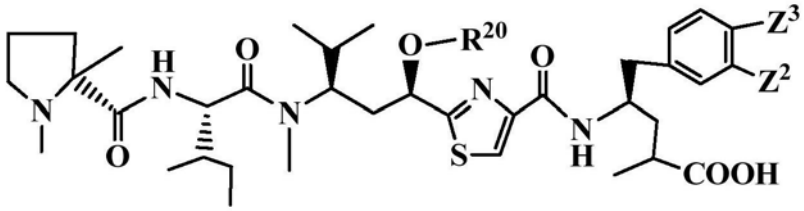
I-45

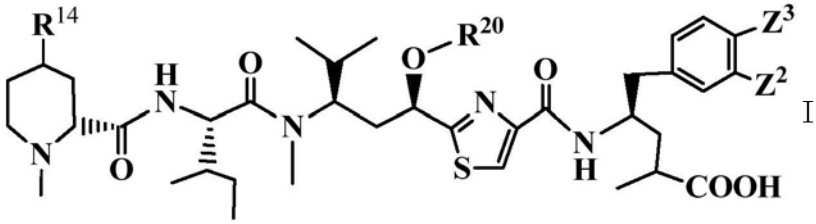

I-46

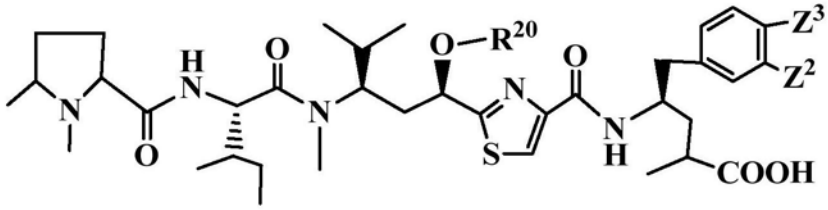

I-47

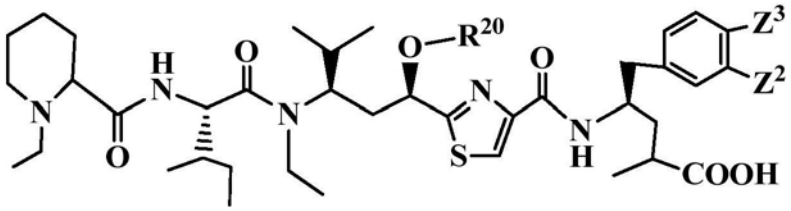

I-48

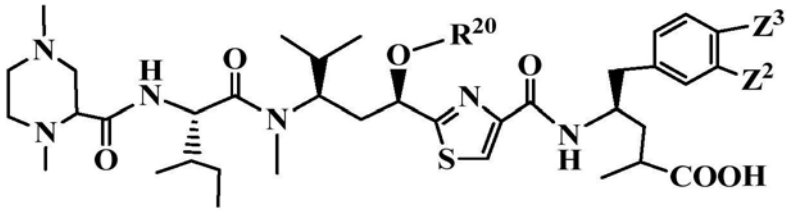

I-49

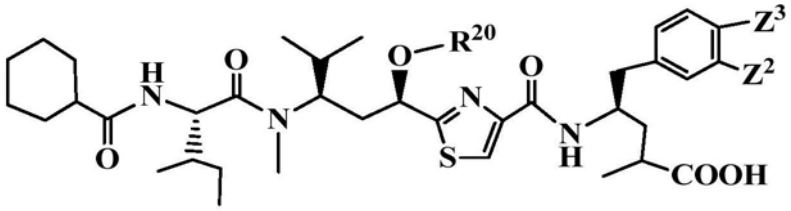

I-50

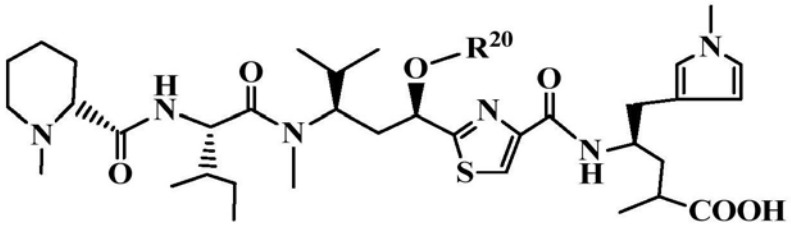

I-51

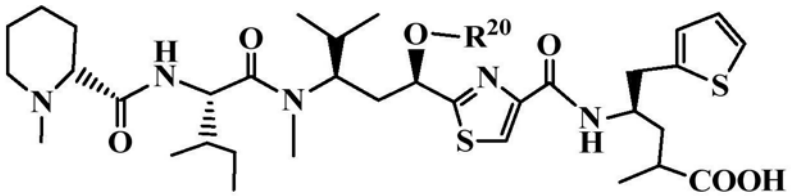

I-52

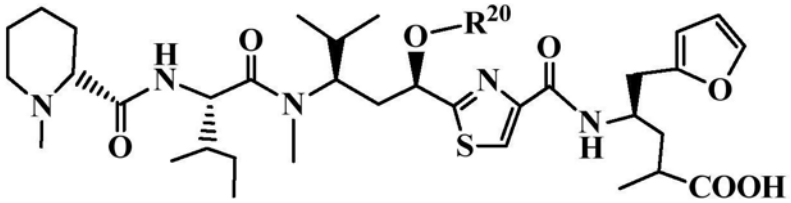

I-53

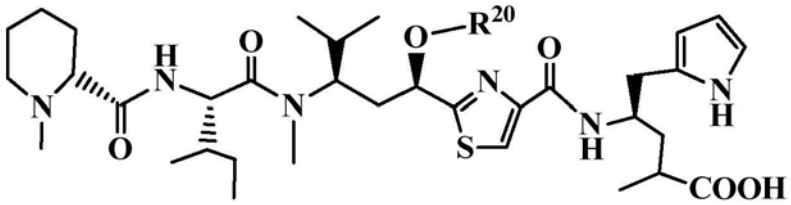

I-54

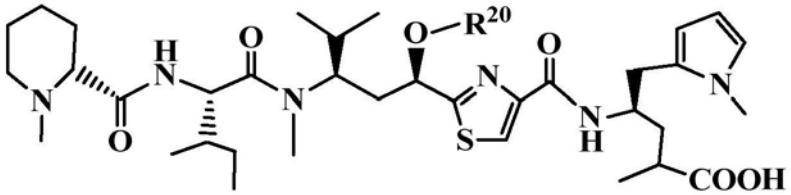

I-55

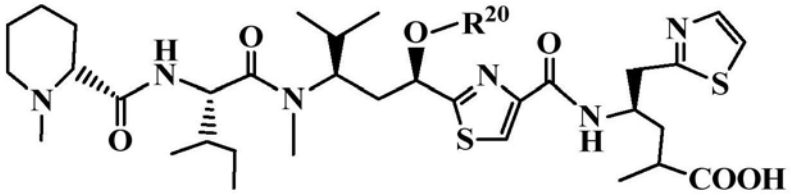

I-56

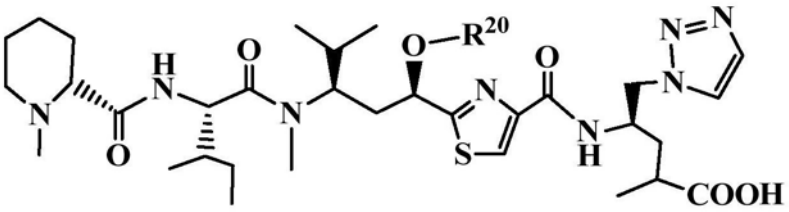

I-57

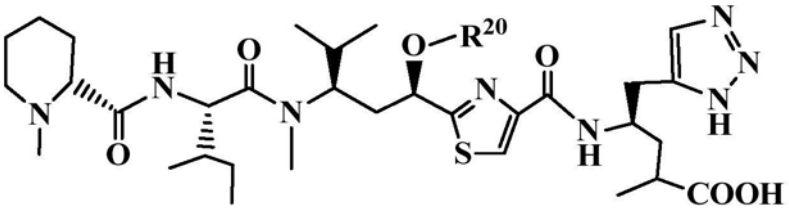

I-58

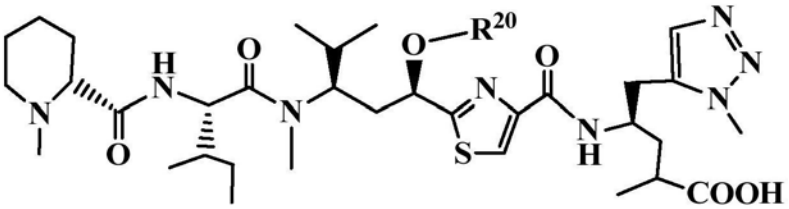

I-59

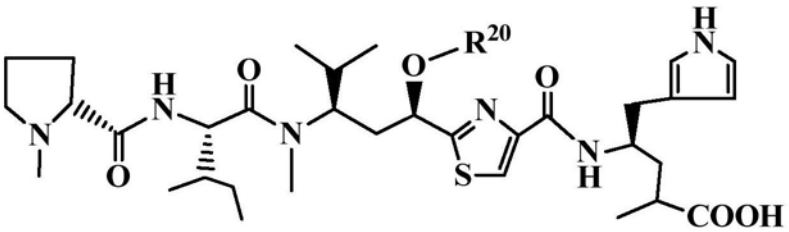

I-60

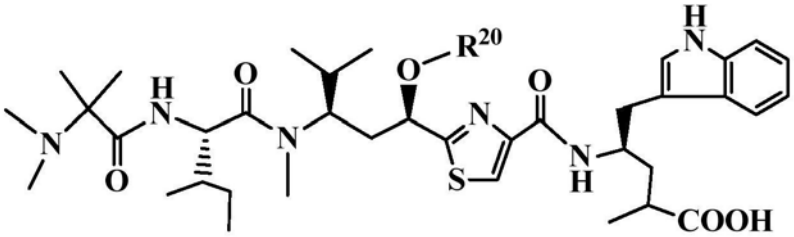

I-61

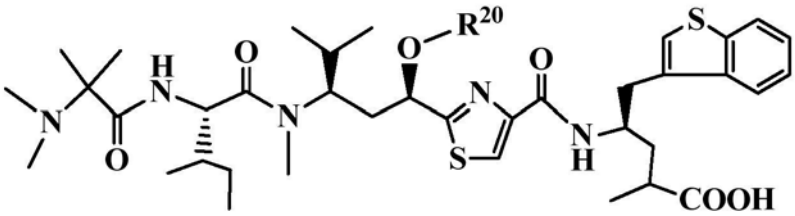

I-62

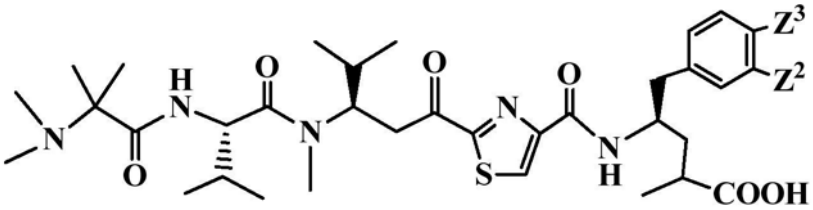

I-63

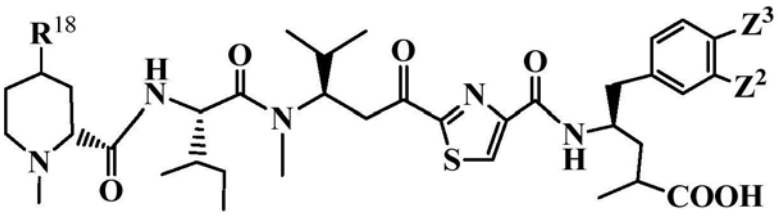

I-64

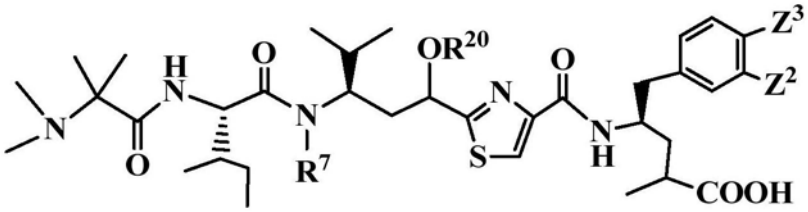

I-65

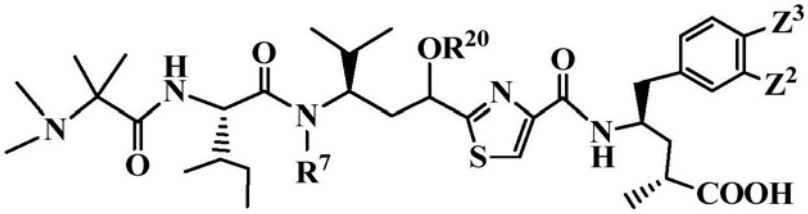

I-66

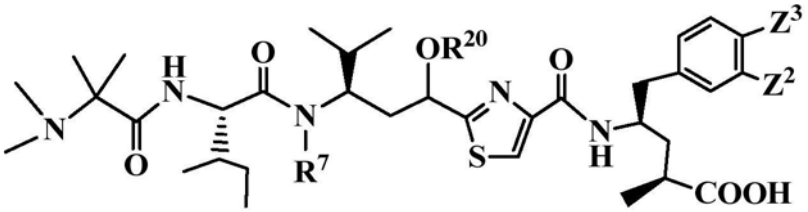

I-67

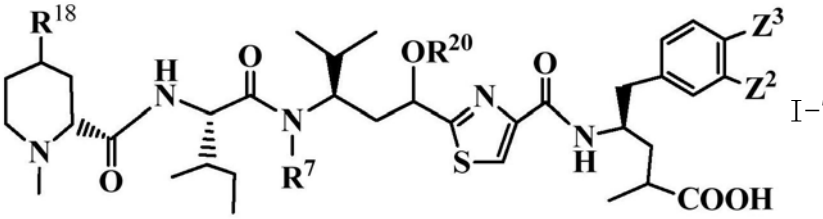

I-68

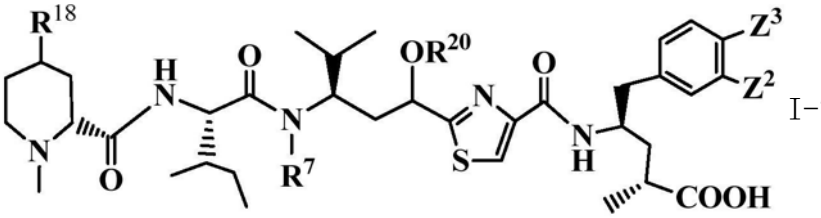

I-69

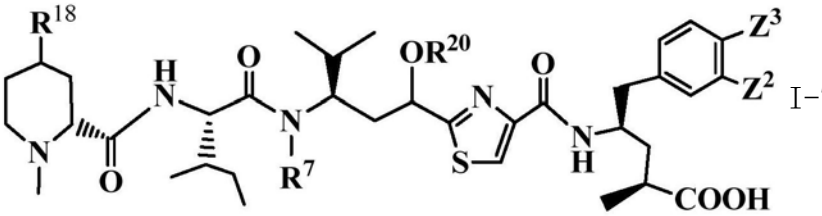

I-70


I-71


I-72


I-73

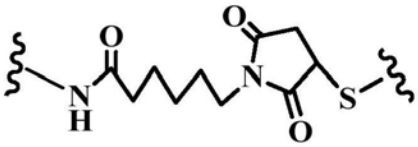
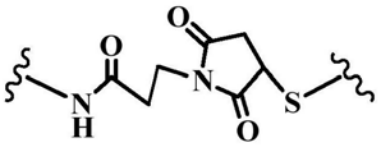
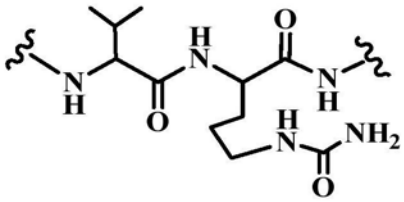
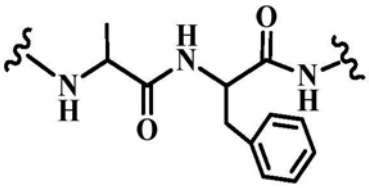
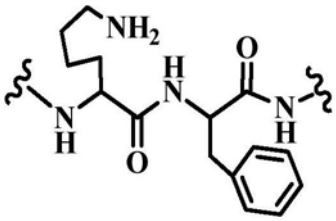
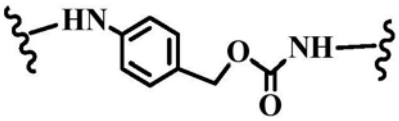
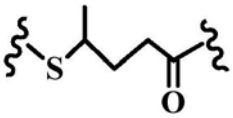
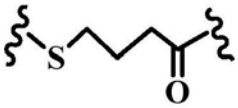
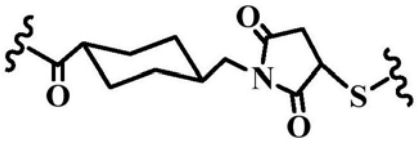
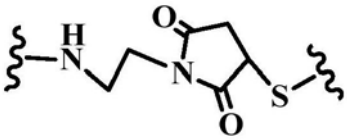
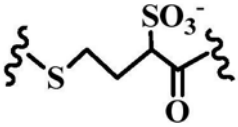
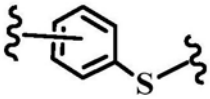
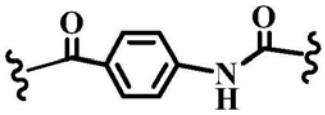
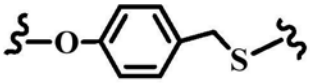
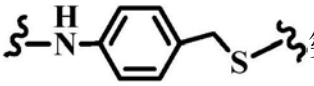

I-74

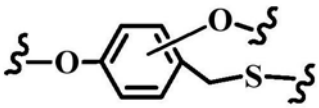
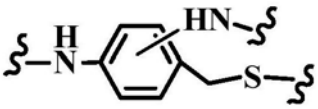
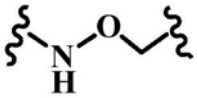
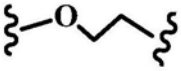
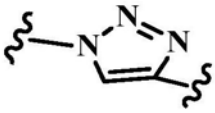
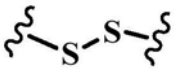
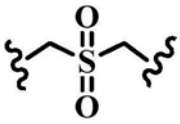
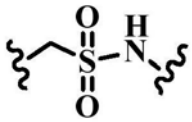
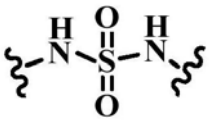
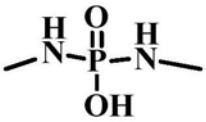
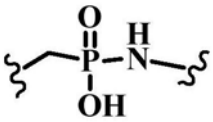
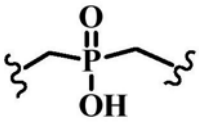
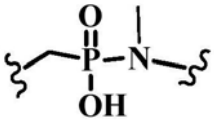
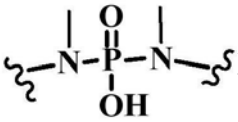
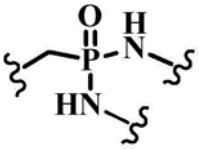
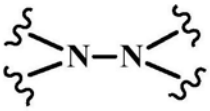
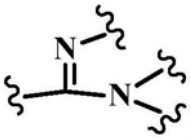

I-75

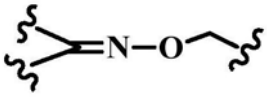
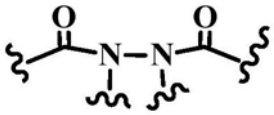
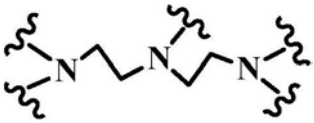
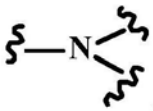
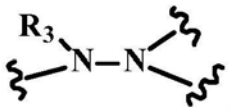
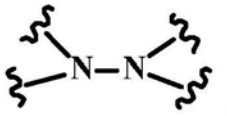
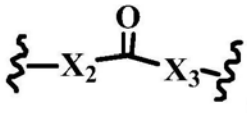
或其药学上可接受的盐、水合物或水合盐；或多晶型结晶；或其光学异构体、外消旋物、非对映异构体或对映异构体，其中R^{20}是H，C_1-C_8直链或支链烷基或杂烷基，C_2-C_8直链或支链烯基、炔基、烷基环烷基、杂环烷基，C_3-C_8直链或支链芳基、Ar-烷基、杂环、碳环、环烷基、杂烷基环烷基、烷基羰基、杂芳基，碳酸酯(-C(O)OR^{17})、氨基甲酸酯(-C(O)$NR^{17}R^{18}$)或1-8个碳原子的羧酸盐、酯、醚或酰胺，1-8个氨基酸，如式$(OCH_2CH_2)_p$或$(OCH_2CH(CH_3))_p$中的聚亚烷基二醇单元，其中p是0至约1000的整数，R^{20}或缺省而氧基形成酮，或以上的组合；Z^2和Z^3独立地为H、OH、NH_2、O、NH、COOH、COO、C(O)、C(O)NH、C(O)NH_2、R^{18}、$OCH_2OP(O)(OR^{18})_2$、OC(O)OP(O)$(OR^{18})_2$、OPO$(OR^{18})_2$、NHPO$(OR^{18})_2$、OP(O)(OR^{18})OP(O)$(OR^{18})_2$、OC(O)R^{18}、OC(O)NHR^{18}、$OSO_2(OR^{18})$、O-(C_4-C_{12}-糖苷)，C_1-C_8直链或支链烷基或杂烷基，C_2-C_8直链或支链烯基、炔基、烷基

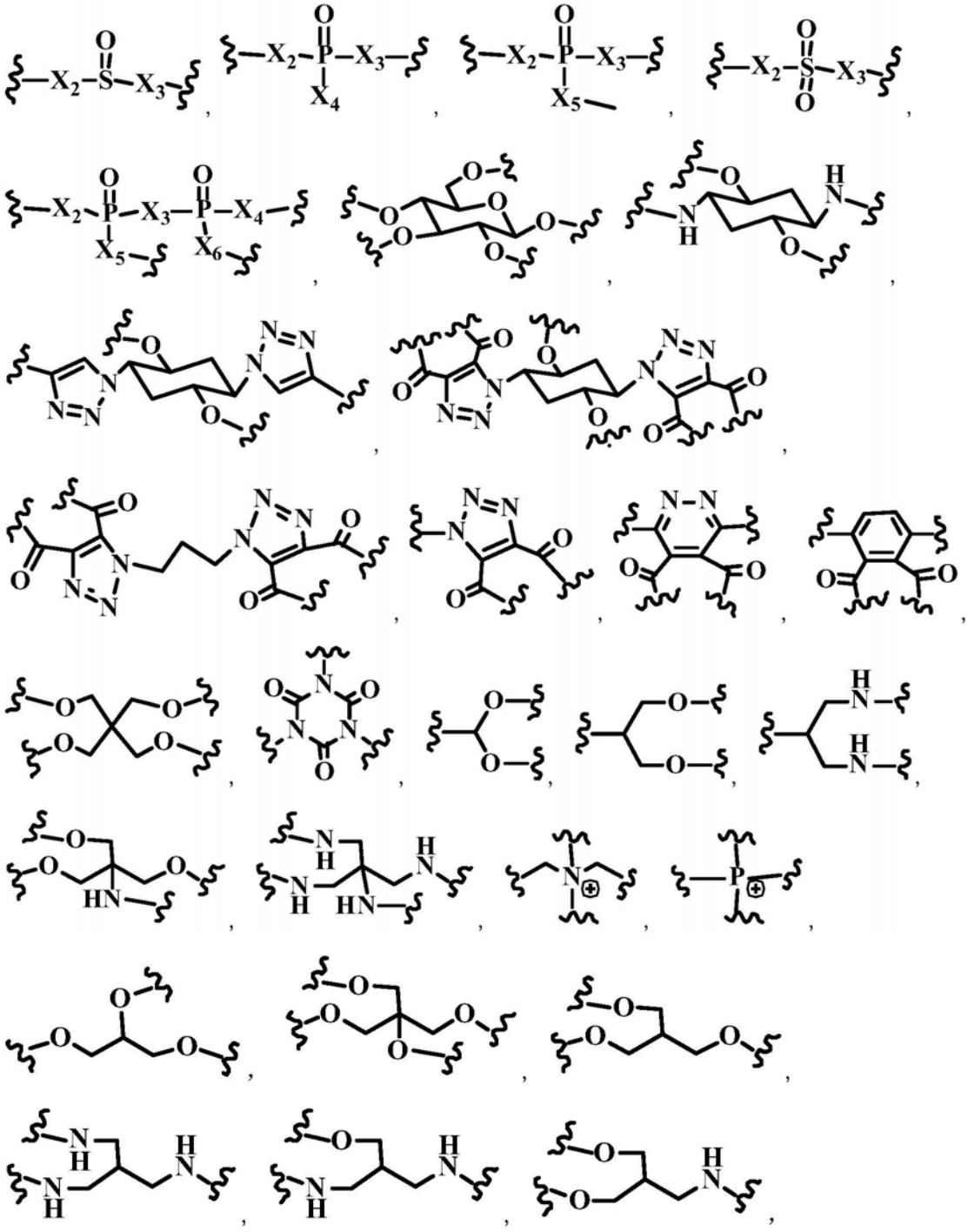
环烷基、杂环烷基；C_3-C_8直链或支链芳基、Ar-烷基、杂环、碳环、环烷基、杂烷基环烷基、烷基羰基、杂芳基，碳酸酯(-C(O)OR^{17})、氨基甲酸酯(-C(O)N$R^{17}R^{18}$)；R^{17}和R^{18}独立地为H、直链或支链烷基或杂烷基，C_2-C_8直链或支链烯基、炔基、烷基环烷基、杂环烷基，C_3-C_8直链或支链芳基、Ar-烷基、杂环、碳环、环烷基、杂烷基环烷基、烷基羰基、杂芳基，碳酸酯(-C(O)OR^{17})、氨基甲酸酯(-C(O)N$R^{17}R^{18}$)；R^7的定义与前文相同。

7.如权利要求1,2,3或4中所述的W、L_1、L_2、V_1和V_2可独立地由一个或多个下列连接体组分构成：


6-马来酰亚胺己酰基(MC)，

马来酰亚胺丙酰基(MP)，

缬氨酸-瓜氨酸(val-cit)，

丙氨酸-苯丙氨酸(ala-phe)，

赖氨酸-苯丙氨酸(lys-phe)，

对氨基苄氧基-羰基(PAB)，

4-硫戊酰基(SPP)，

4-硫丁酰基(SPDB)，

4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-酰基(MCC)，

马来酰亚胺乙氨基(ME)，

4-硫-2-羟基磺酰基-丁酰基(2-Sulfo-SPDB)，

芳基硫醚基(PySS)，

(4-乙酰基)氨基苯酰基(SIAB)，

氧苄基硫醚基，

氨

基苄基硫醚基，  二氧基苄基硫醚基、  二氨基苄基硫醚基、  氨基氧基苄基硫醚基，  烷氧基氨基(AOA)，  亚乙基氧基(EO)，  4-甲基-4-硫代-戊酰基(MPDP)，  三唑，  二硫、  烷基磺酰基，  烷基磺胺，  砜基二磺胺，  磷二酰胺，  烷基膦酰胺，  膦酸，  N-甲基烷基膦酰胺，  N,N'-二甲基磷二酰胺、  烷基膦二酰胺，  肼，  乙脒；

 肟，  二乙酰肼，  氨基乙基胺，  氨基乙基-氨基乙基胺和L-或D-，或含有1-20个氨基酸的天然或非天然肽，  ，  ，  ，  ，

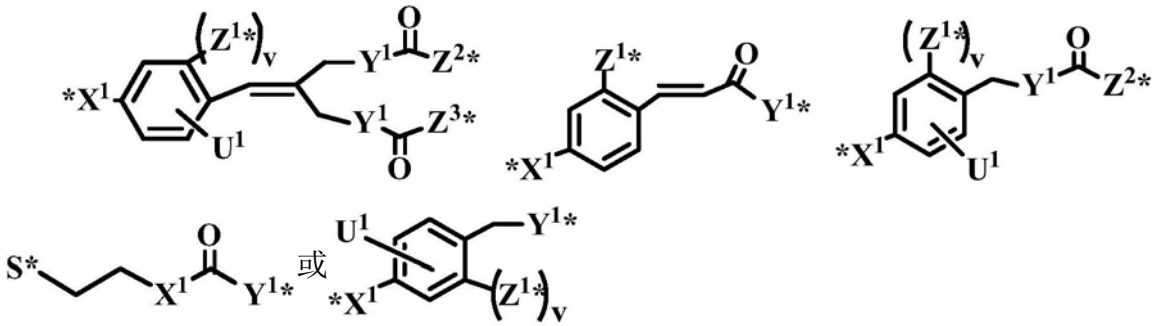


其中ξ是连接点；X_2、X_3、X_4、X_5和X_6独立地选自NH、NHNH、N(R_3)、N(R_3)N(R_3')、O、S，C_1-C_6烷基，C_2-C_6杂烷基、烷基环烷基、杂环烷基，C_3-C_8芳基、Ar-烷基、杂环、碳环、环烷基、杂烷基环烷基、烷基羰基、杂芳基，或1-8个氨基酸；其中R_3和R_3'独立地为H，C_1-C_8烷基，C_2-C_8杂烷基、烷基环烷基、杂环烷基，C_3-C_8芳基、Ar-烷基、杂环、碳环、环烷基、杂烷基环烷基、烷基羰基、杂芳基，或1-8个碳原子的酯、醚或酰胺，如结构式$(OCH_2CH_2)_p$或$(OCH_2CH(CH_3))_p$的聚亚烷基二醇单元，其中p是0至约1000的整数，或上述的组合。

8.如权利要求1,2,3或4中所述的W、L_1、L_2、V_1和V_2独立地由下列组分构成：

(A)自我毁灭组分、肽单元、腙键、二硫化物、酯、肟、酰胺或硫醚键。自我毁灭单元包括

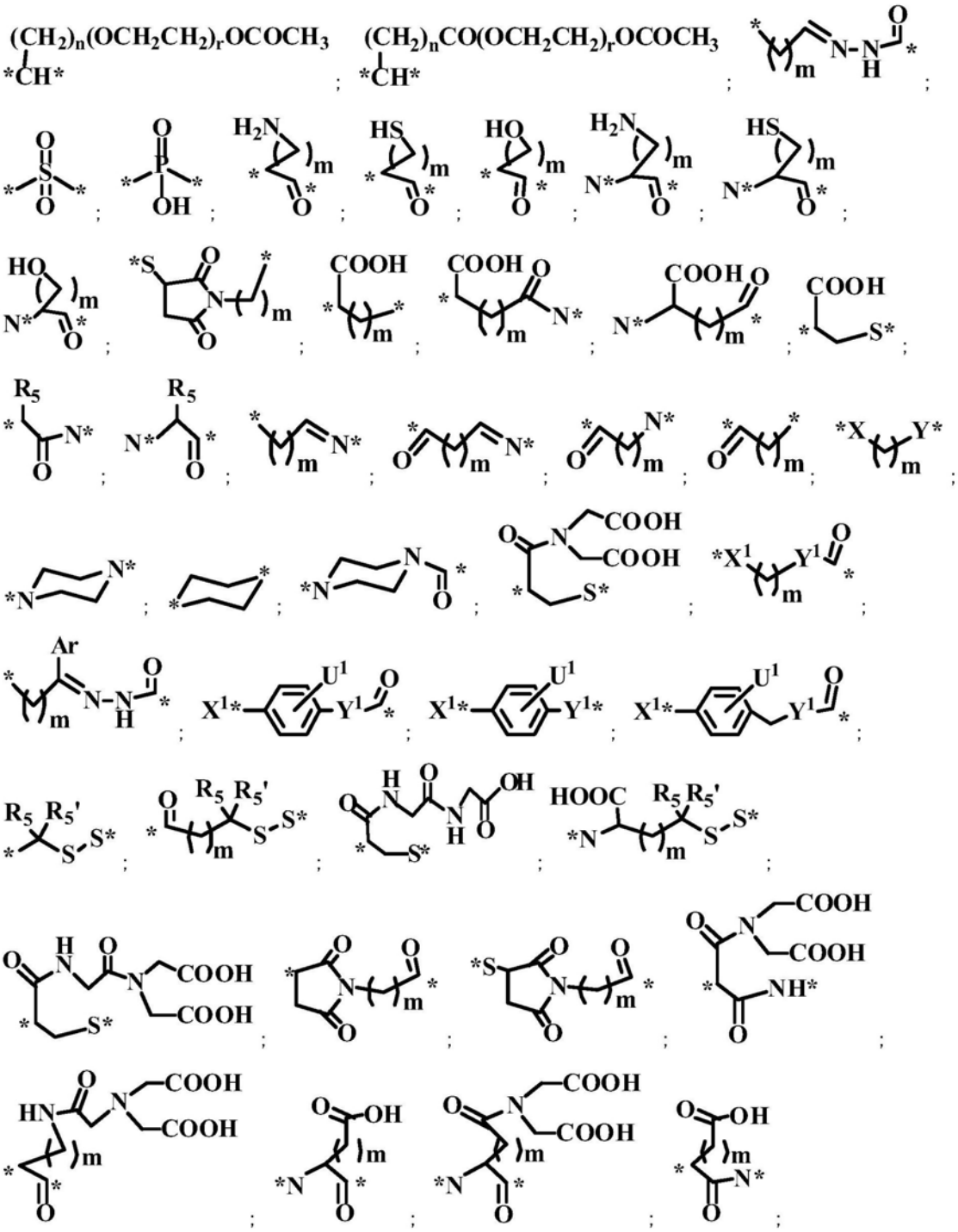
但不限于，与对氨基苄基氨甲酰基(PAB)的电子结构相似的芳香化合物，例如2-氨基咪唑-5-甲醇的衍生物、杂环PAB同系物、β-葡糖苷酸、以及邻或对氨基苄基缩醛，或以下结构之一：

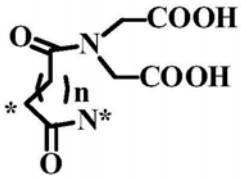
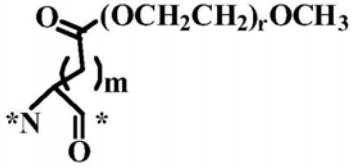
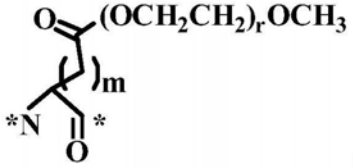
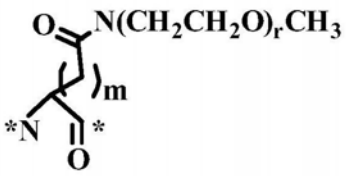
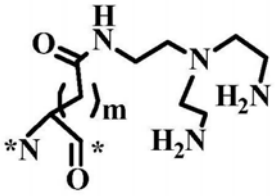
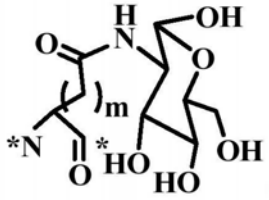


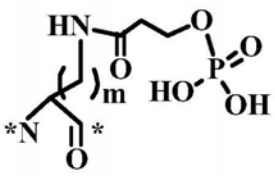
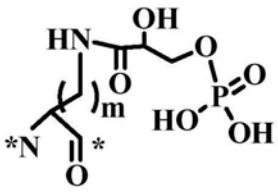
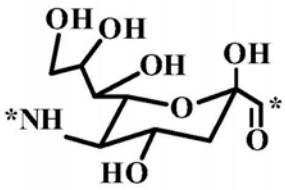
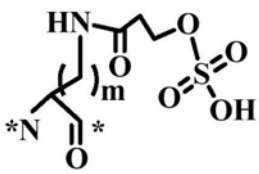
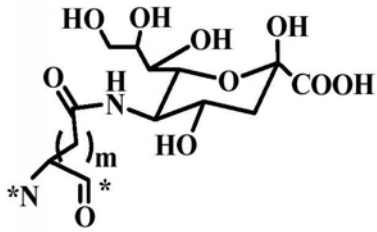
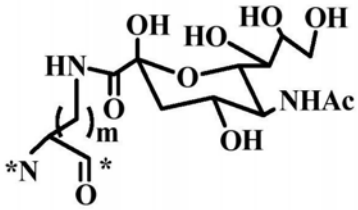
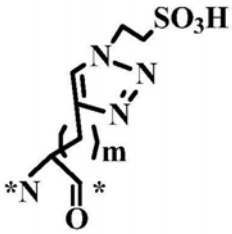
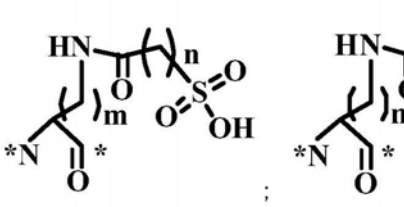
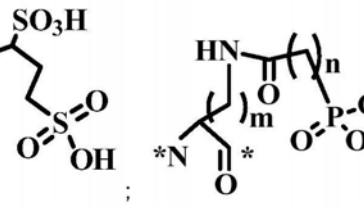
其中，*标记的是与另一组分的连接点；X^1、Y^1、Z^2和Z^3独立地为NH、O或S；Z^1为H、NHR_1、OR_1、SR_1、COX_1R_1，其中X_1和R_1如前文所定义；v为0或1；U^1为H、OH、C_1-C_6烷基、$(OCH_2CH_2)_n$、F、Cl、Br、I、OR_5、SR_5、NR_5R_5'、$N{=}NR_5$、$N{=}R_5$、NO_2、SOR_5R_5'、SO_2R_5、SO_3R_5、OSO_3R_5、PR_5R_5'、POR_5R_5'、$PO_2R_5R_5'$、$OPO(OR_5)(OR_5')$或$OCH_2PO(OR_5(OR_5')$，其中R_5和R_5'独立地选自H、C_1-C_8烷基；C_2-C_8烯基、炔基、杂烷基或氨基酸；C_3-C_8芳基、杂环、碳环、环烷基、杂环烷基、杂芳烷基、烷基羰基或糖苷；或药学上的阳离子盐；

(B)包含以下结构之一的非自我毁灭的连接体组分：

$*(CH_2CH_2O)_r*$；$*\underset{*}{CH}(CH_2)_nCO(OCH_2CH_2)_rOCH_3$；$*\underset{*}{CH}(CH_2)_nCON(CH_2CH_2O)_rCOCH_3$；



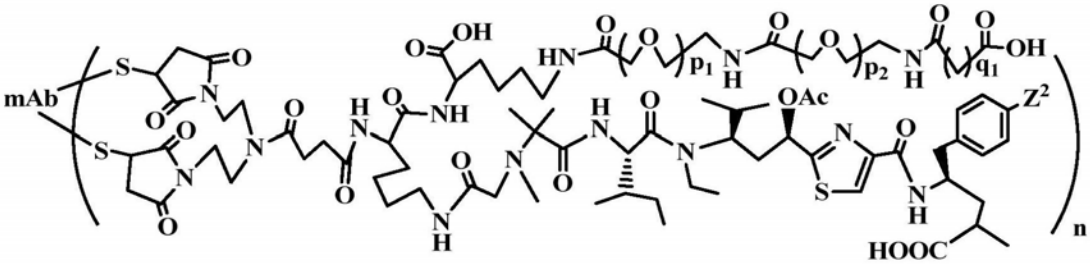
其中，*标记的是连接点；X^1、Y^1、U^1、R_5、R_5' 如前文所定义；r为0-100；m和n独立地为0-20；

(C)可释放的连接体组分，其中包含至少一个可在生理条件下被破坏的键，例如pH、酸、碱、氧化作用、代谢、生化或酶不稳定的键，为下列结构之一：

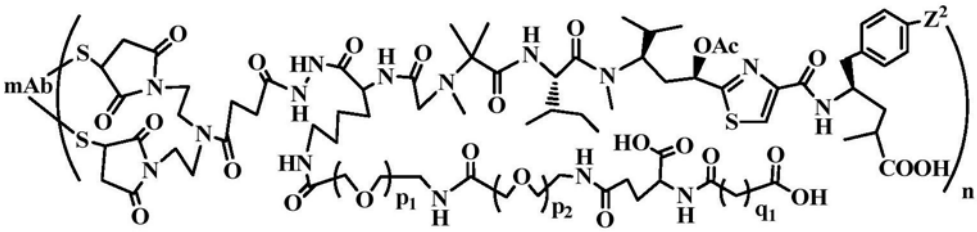
$-(CR_5R_6)_m(Aa)_r(CR_7R_8)_n(OCH_2CH_2)_t-$、$-(CR_5R_6)_m(CR_7R_8)_n(Aa)_r(OCH_2CH_2)_t-$、$-(Aa)_r-(CR_5R_6)_m(CR_7R_8)_n(OCH_2CH_2)_t-$、$-(CR_5R_6)_m(CR_7R_8)_n(OCH_2CH_2)_r(Aa)_t-$、$-(CR_5R_6)_m-(CR_7=CR_8)(CR_9R_{10})_n(Aa)_t(OCH_2CH_2)_r-$、$-(CR_5R_6)_m(NR_{11}CO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n-(OCH_2CH_2)_r-$、$-(CR_5R_6)_m(Aa)_t(NR_{11}CO)(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$、$-(CR_5R_6)_m(OCO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n-(OCH_2CH_2)_r-$、$-(CR_5R_6)_m(OCNR_7)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$、$-(CR_5R_6)_m(CO)(Aa)_t-(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$、$-(CR_5R_6)_m(NR_{11}CO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$、$-(CR_5R_6)_m-(OCO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n-(OCH_2CH_2)_r-$、$-(CR_5R_6)_m(OCNR_7)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$、$-(CR_5R_6)_m(CO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n-(OCH_2CH_2)_r-$、$-(CR_5R_6)_m-$phenyl-$CO(Aa)_t(CR_7R_8)_n-$、$-(CR_5R_6)_m-$呋喃-$CO(Aa)_t(CR_7R_8)_n-$、$-(CR_5R_6)_m-$恶唑-$CO(Aa)_t(CR_7R_8)_n-$、$-(CR_5R_6)_m-$噻唑基-$CO(Aa)_t(CCR_7R_8)_n-$、$-(CR_5R_6)_t-$噻吩-$CO(CR_7R_8)_n-$、$-(CR_5R_6)_t-$咪唑-$CO-(CR_7R_8)_n-$、$-(CR_5R_6)_t-$吗啉-$CO(Aa)_t-(CR_7R_8)_n-$、$-(CR_5R_6)_t$呱嗪-$CO(Aa)_t-(CR_7R_8)_n-$、$-(CR_5R_6)_t-$N-甲基呱嗪-$CO(Aa)_t-(CR_7R_8)_n-$、$-(CR_5R)_m-(Aa)_t$苯基-、$-(CR_5R_6)_m-(Aa)_t$呋喃-、$-(CR_5R_6)_m-$恶唑$(Aa)_t-$、$-(CR_5R_6)_m-$噻唑基$(Aa)_t-$、$-(CR_5R_6)_m-$噻吩基$-(Aa)_t-$、-

$(CR_5R_6)_m$-咪唑$(Aa)_t$-、-$(C\ R_5R_6)_m$-吗啉-$(Aa)_t$-、-$(CR_5R_6)_m$-呱嗪-$(Aa)_t$-、-$(CR_5R_6)_m$-N-甲基呱嗪-$(Aa)_t$-、-K$(CR_5R_6)_m(Aa)_r(CR_7R_8)_n(OCH_2CH_2)_t$-,-K$(CR_5R_6)_m(CR_7R_8)_n(Aa)_r(OCH_2CH_2)_t$-,-K$(Aa)_r$-$(CR_5R_6)_m(CR_7R_8)_n(OCH_2CH_2)_t$-,-K$(CR_5R_6)_m(CR_7R_8)_n(OCH_2CH_2)_r(Aa)_t$-,-K$(CR_5R_6)_m$-$(CR_7=CR_8)(CR_9R_{10})_n(Aa)_t(OCH_2CH_2)_r$-,-K$(CR_5R_6)_m(NR_{11}CO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r$-,-K$(CR_5R_6)_m(Aa)_t(NR_{11}CO)(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r$-,-K$(CR_5R_6)_m(OCO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n$-$(OCH_2CH_2)_r$-,-K$(CR_5R_6)_m(OCNR_7)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r$-,-K$(CR_5R_6)_m(CO)(Aa)_t$-$(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r$-,-K$(CR_5R_6)_m(NR_{11}CO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r$-,-K$(CR_5R_6)_m$-$(OCO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r$-,-K$(CR_5R_6)_m(OCNR_7)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r$-,-K-$(CR_5R_6)_m(CO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r$-,-K$(CR_5R_6)_m$-苯基-CO$(Aa)_t(CR_7R_8)_n$-,-K-$(CR_5R_6)_m$-呋喃-CO$(Aa)_t$-$(CR_7R_8)_n$-,-K$(CR_5R_6)_m$-恶唑-CO$(Aa)_t(CR_7R_8)_n$-,-K$(CR_5R_6)_m$-噻唑基-CO$(Aa)_t$-$(CR_7R_8)_n$-,-K$(CR_5R_6)_t$-噻吩-CO$(CR_7R_8)_n$-,-K$(CR_5R_6)_t$咪唑-CO-$(CR_7R_8)_n$-,-K$(CR_5R_6)_t$吗啉-CO$(Aa)_t(CR_7R_8)_n$-,-K$(CR_5R_6)_t$呱嗪-CO$(Aa)_t$-$(CR_7R_8)_n$-,-K$(CR_5R_6)_t$-N-甲基CO$(Aa)_t(CR_7R_8)_n$-,-K$(CR_5R)_m(Aa)_t$苯基,-K-$(CR_5R_6)_m$-$(Aa)_t$呋喃-,-K$(CR_5R_6)_m$-恶唑$(Aa)_t$-,-K$(CR_5R_6)_m$-噻唑基$(Aa)_t$-,-K$(CR_5R_6)_m$-噻吩-$(Aa)_t$-,-K$(CR_5R_6)_m$-咪唑$(Aa)_t$-,-K$(CR_5R_6)_m$-吗啉$(Aa)_t$-,-K$(CR_5R_6)_m$呱嗪-$(Aa)_t$G、-K$(CR_5R_6)_m$N-甲基呱嗪基$(Aa)_t$-;其中Aa、m、n、$R_3$、$R_4$和$R_5$在前文已有定义;t和r独立地为0-100;$R_5$、$R_6$、$R_7$、$R_8$、$R_9$、$R_{10}$和$R_{11}$独立地选自H,卤素,$C_1$-$C_8$烷基、芳基、烯基、炔基、醚、酯、胺或酰胺,这些基团均可以被以下成分所取代:一个或多个卤素、CN、NR_1R_2、CF_3、OR_1、芳基、杂环、$S(O)R_1$、SO_2R_1、-CO_2H、-SO_3H、-OR_1、-CO_2R_1、-$CONR_1$、-$PO_2R_1R_2$、-PO_3H或$P(O)R_1R_2R_3$;K是NR_1、-SS-、-C(=O)-、-C(=O)NH-、-C(=O)O-、-C=NH-O-、-C=N-NH-、-C(=O)NH-NH-、O、S、Se、B、Het(具有C_3-C_8的杂环或杂芳环),或含有1-20个氨基酸的肽。

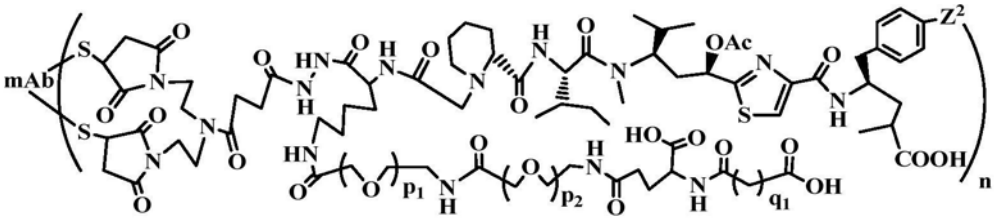
9.权利要求1中式(I)的偶联物具有以下结构:



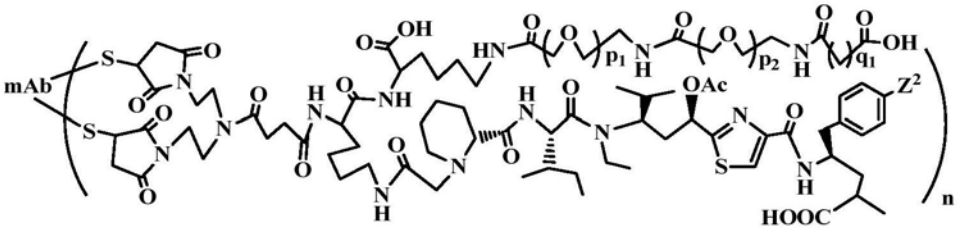
a-01,

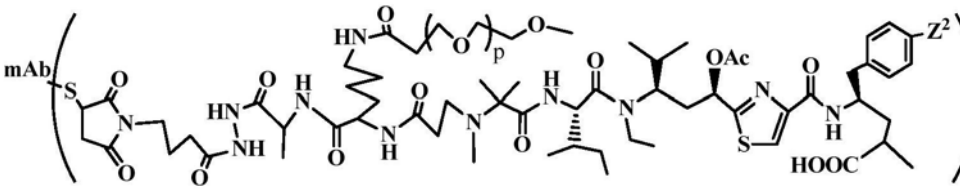


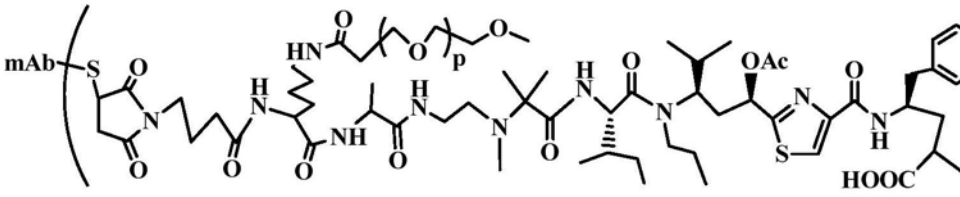
a-02,

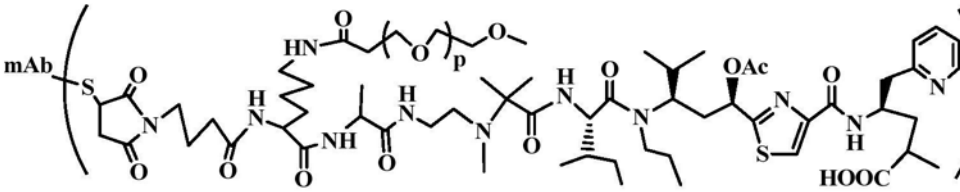


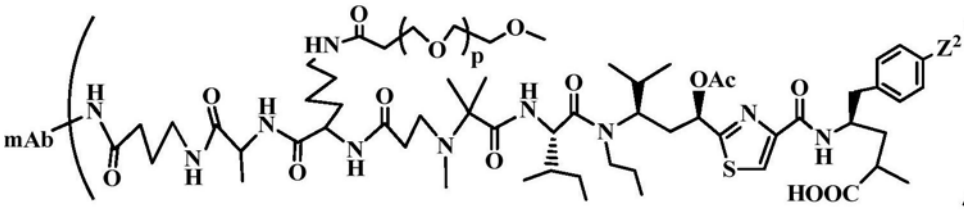
a-03,

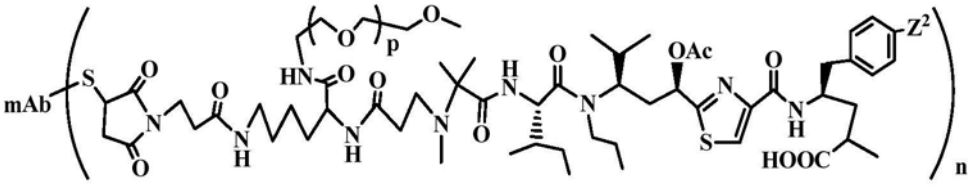

a-04,

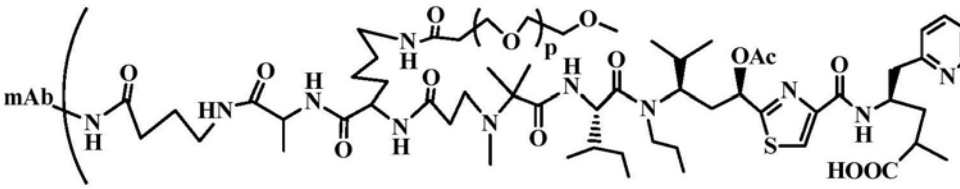

a-05,

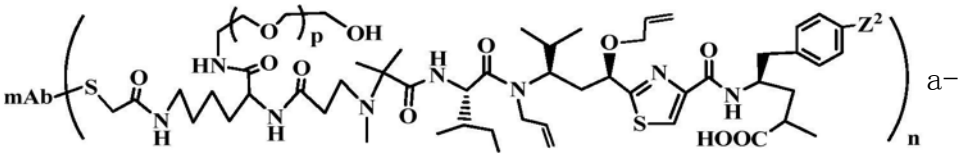

a-06,

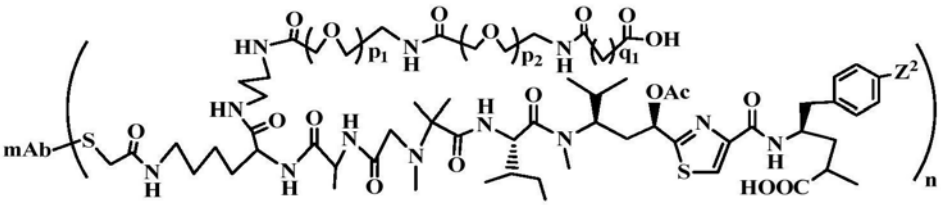

a-07,

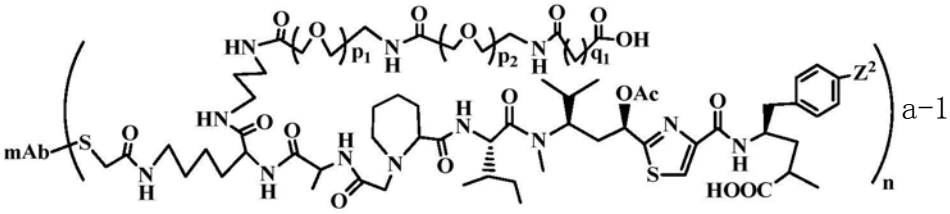

a-08,

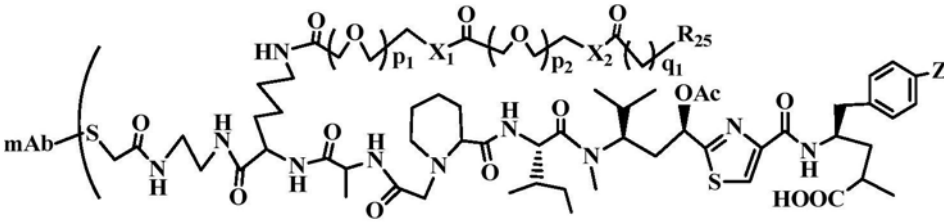

a-09,

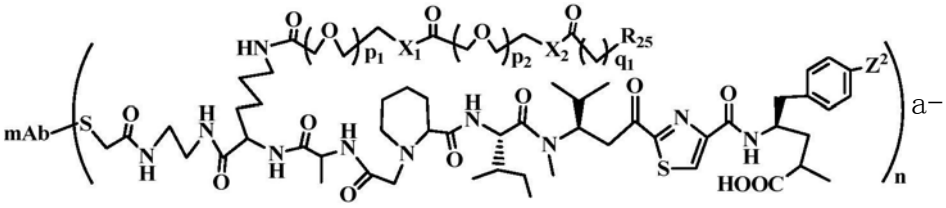

a-10,

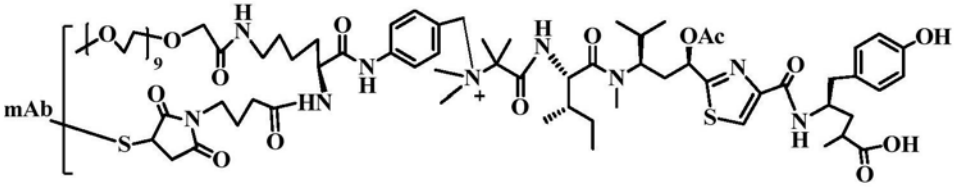

a-11,

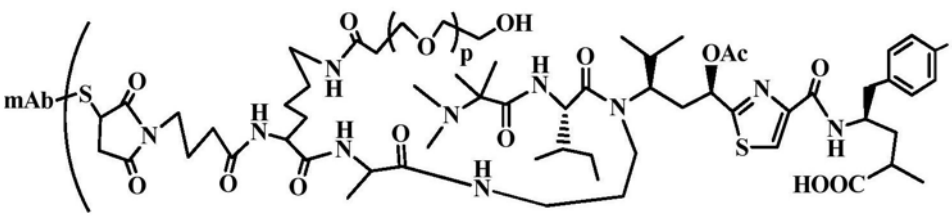

a-12,

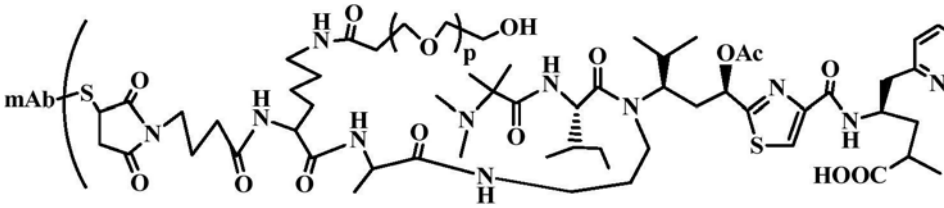

a-13,

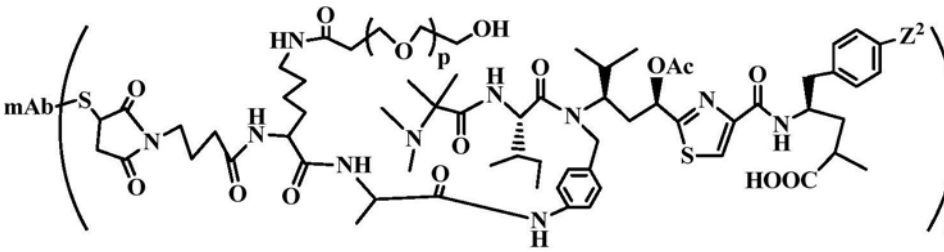

a-14,

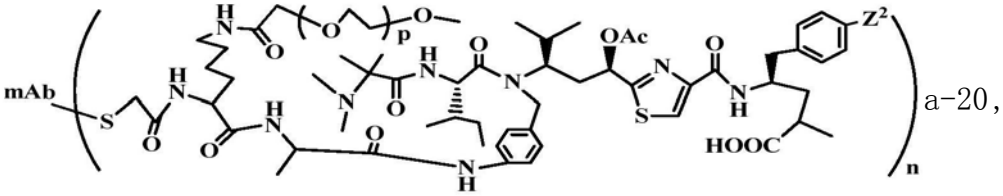

a-15,

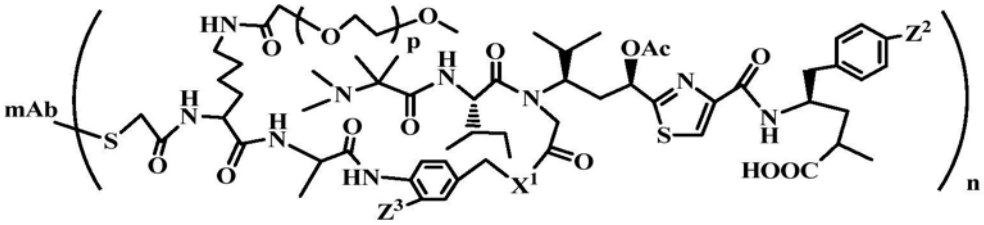

a-16,

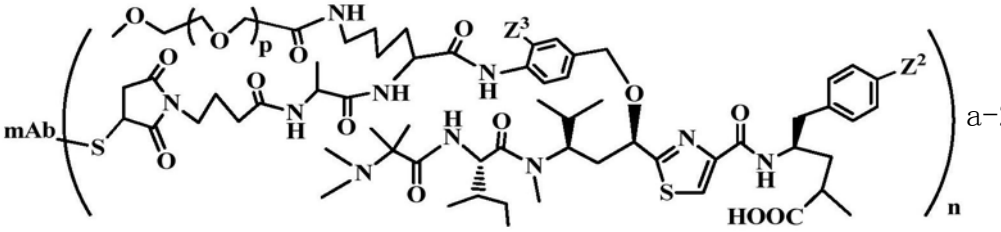

a-17,

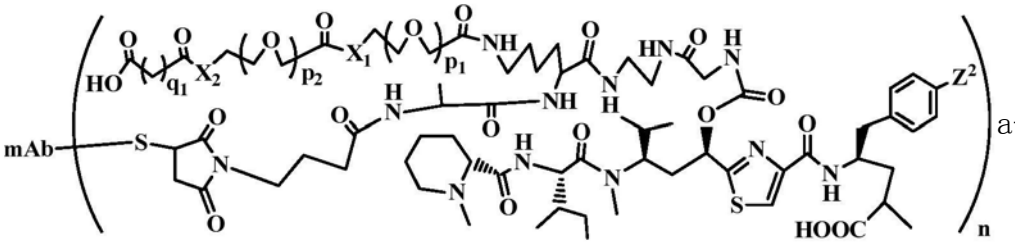

a-18

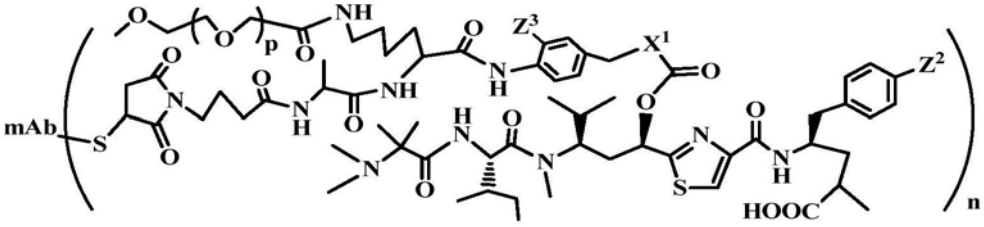

a-19,

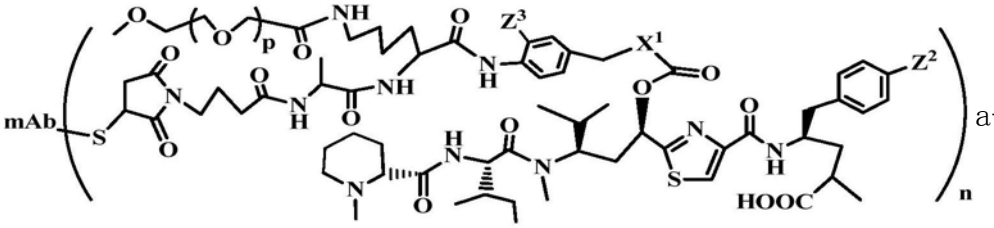

a-20,

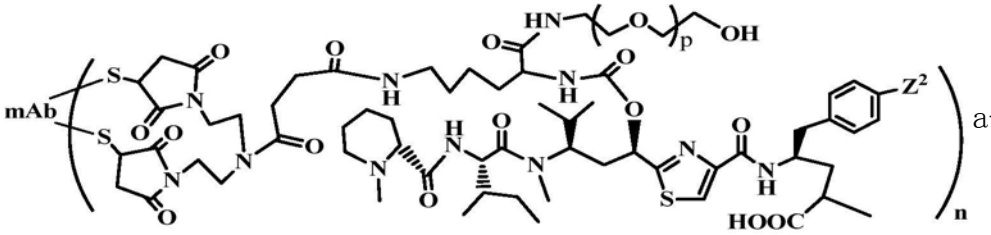

a-21,

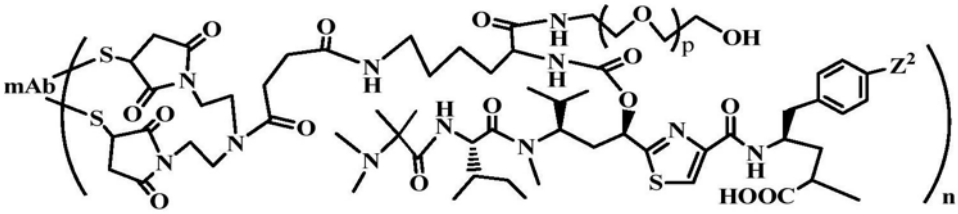

a-22,

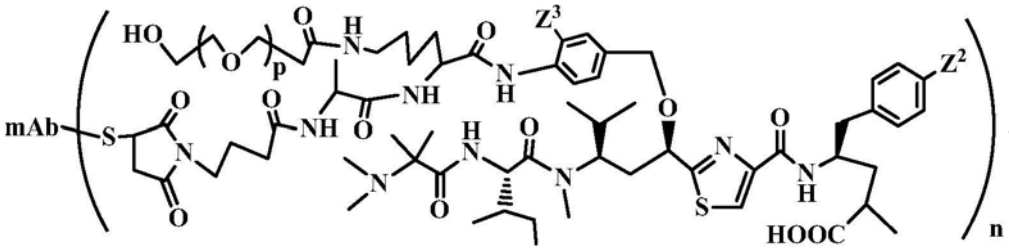

a-23,

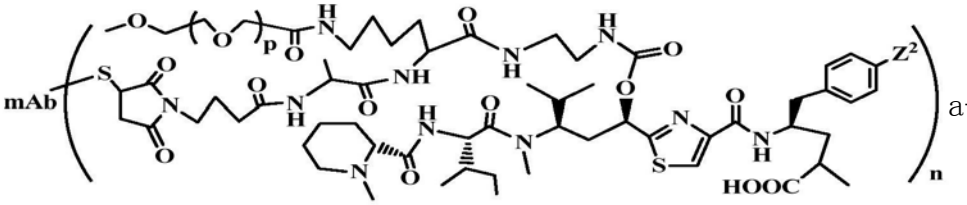

a-24,

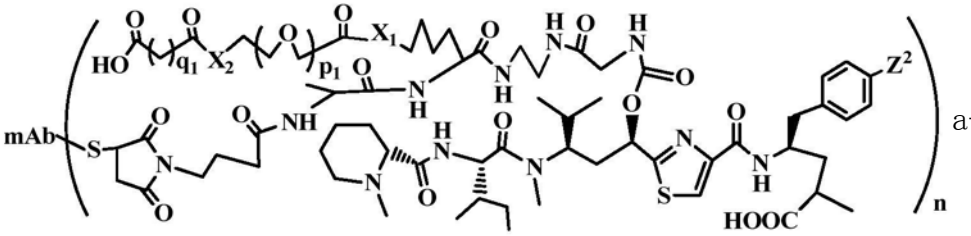

a-25,

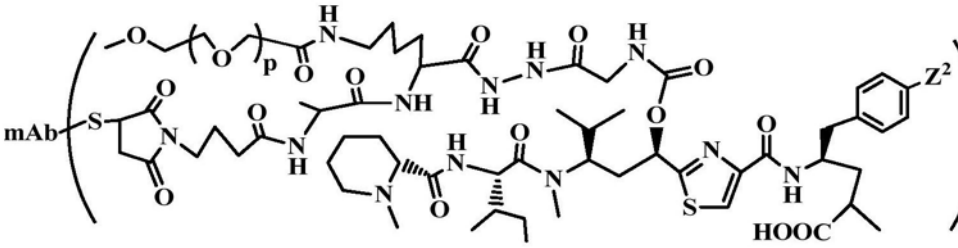

a-26,

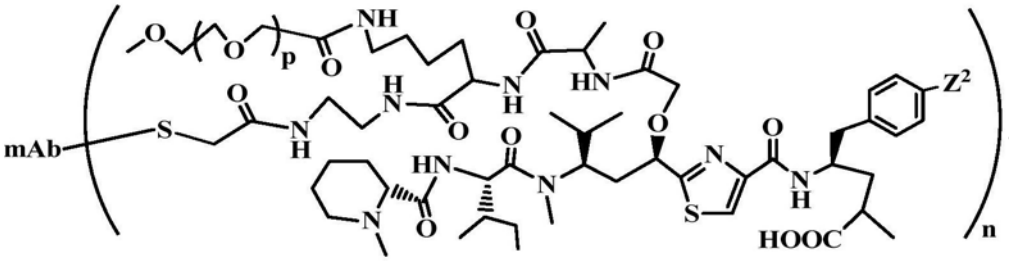

a-27,

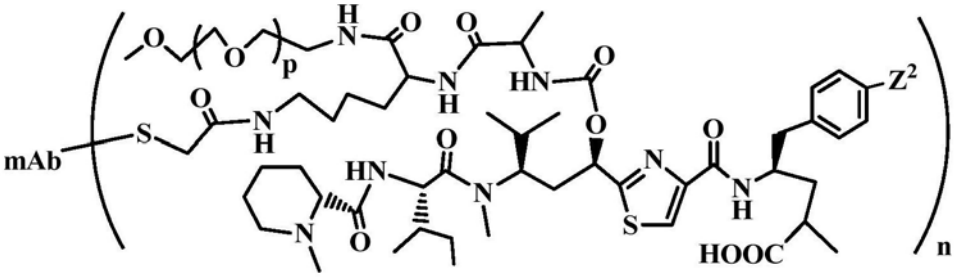

a-28,

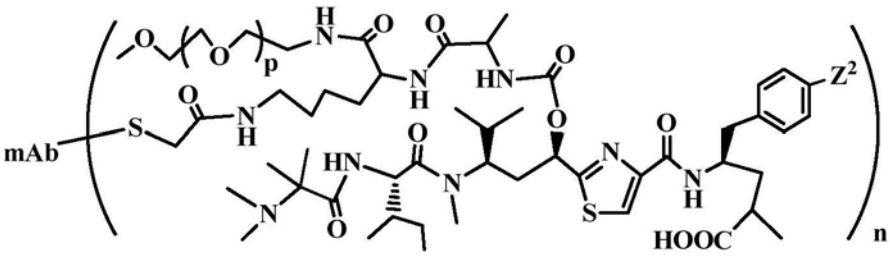

a-29,

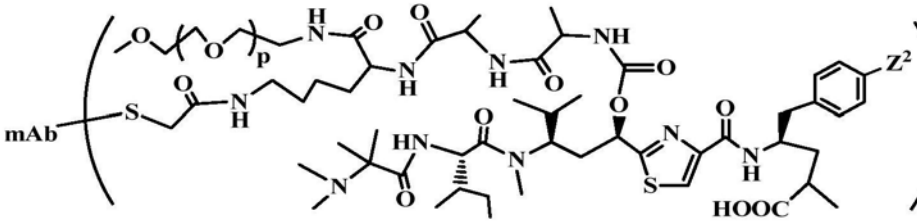

a-30,

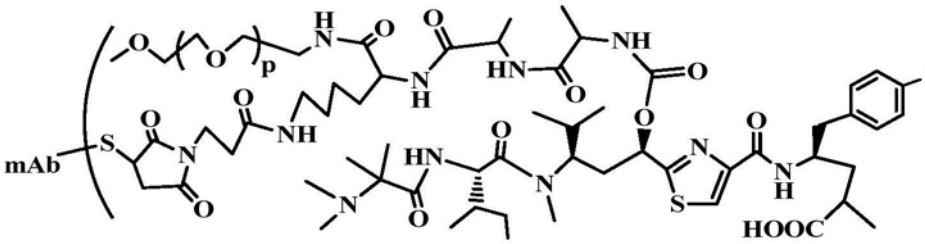

a-31,

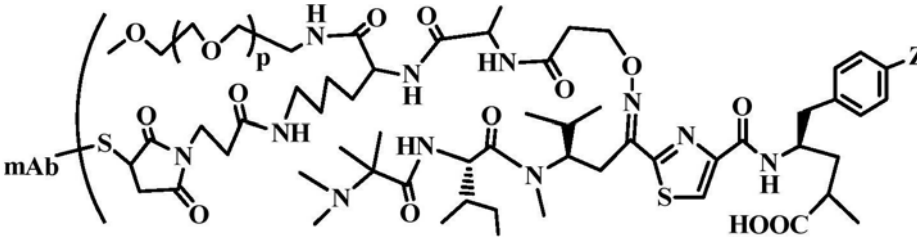

a-32,

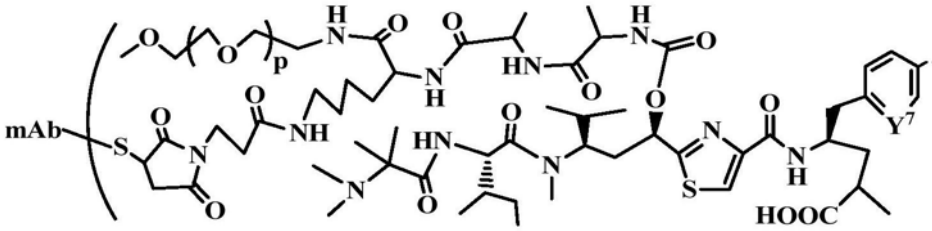

a-33,

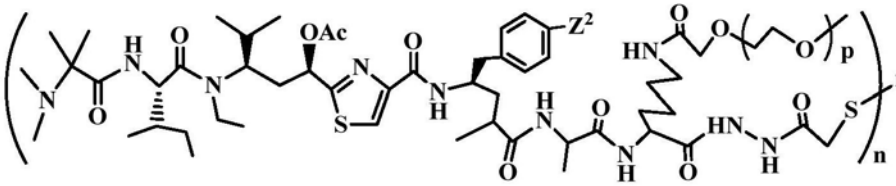

a-34,

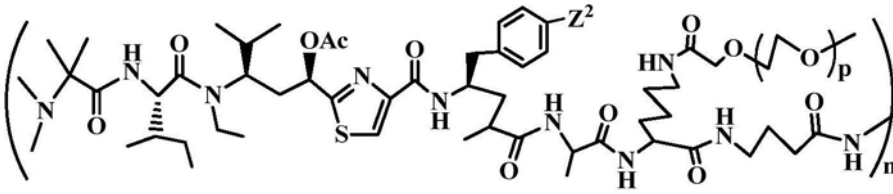

a-35,

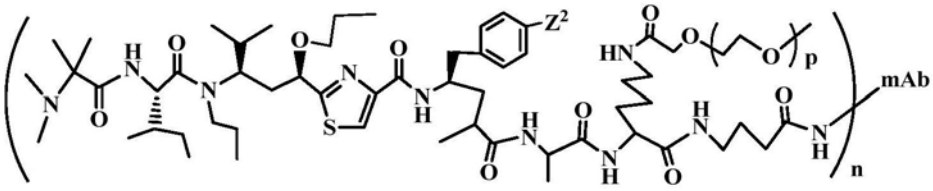

a-36,

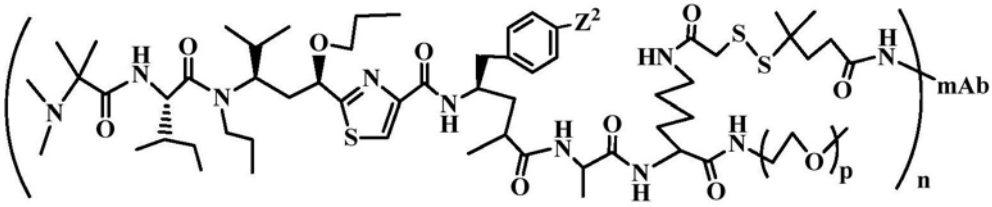

a-37,

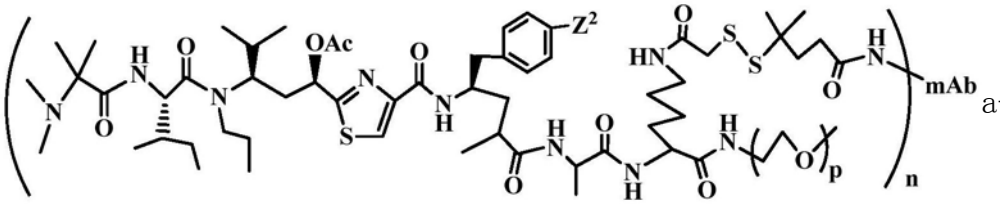

a-38,

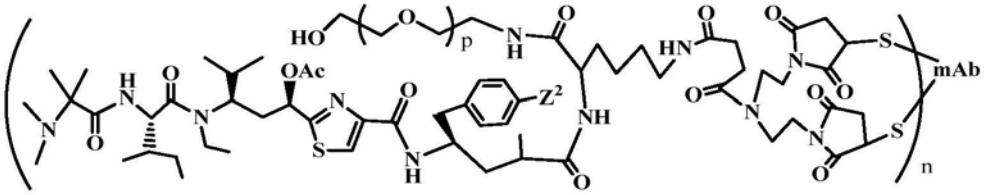

a-39,

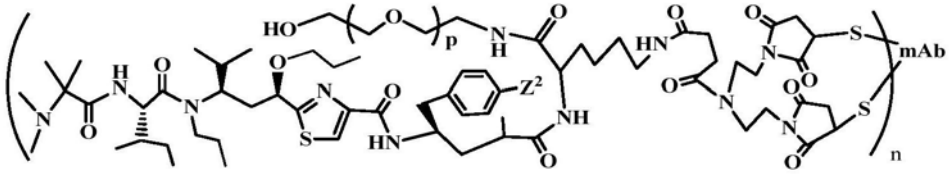

a-40,

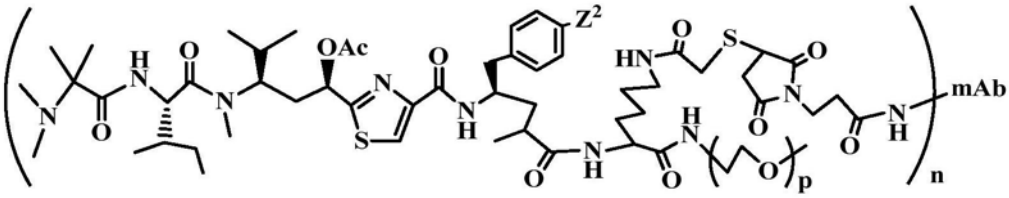

a-41,

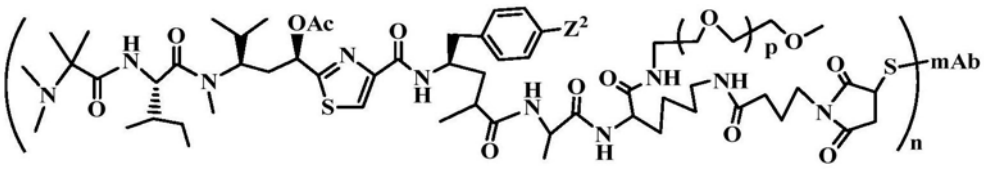

a-42,

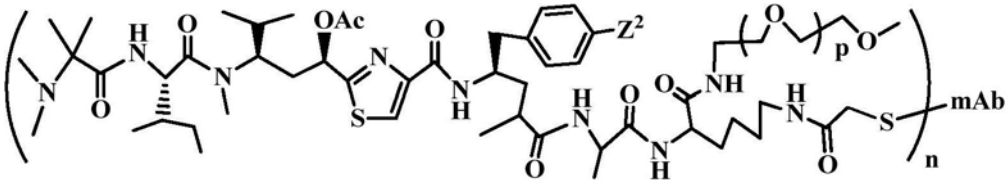

a-43,

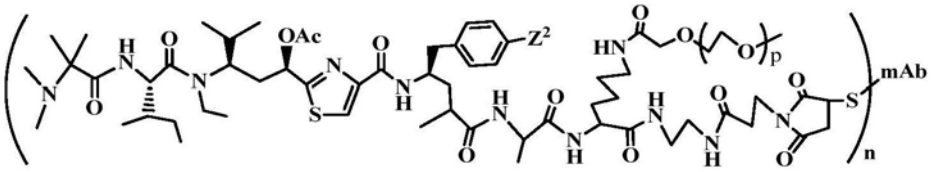

a-44,

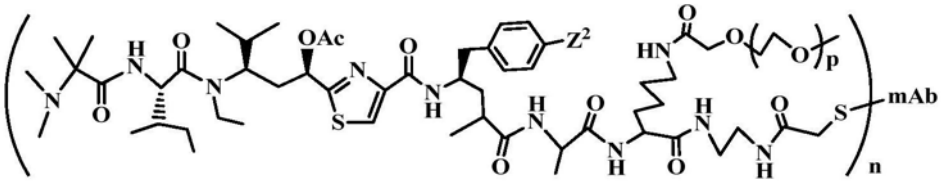

a-45,

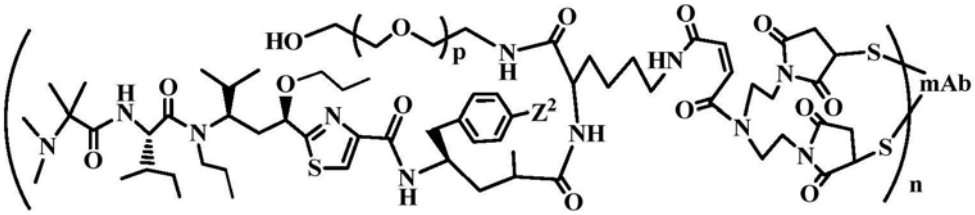

a-46,

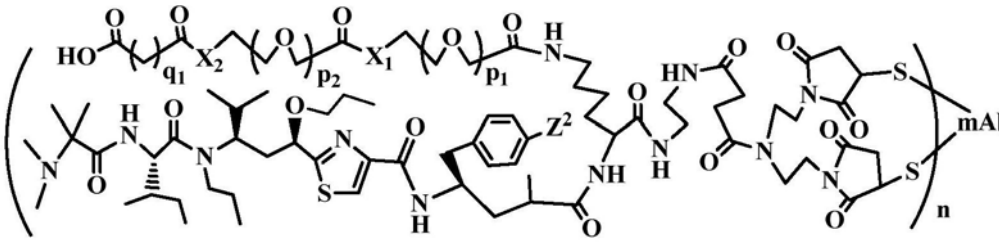

a-47,

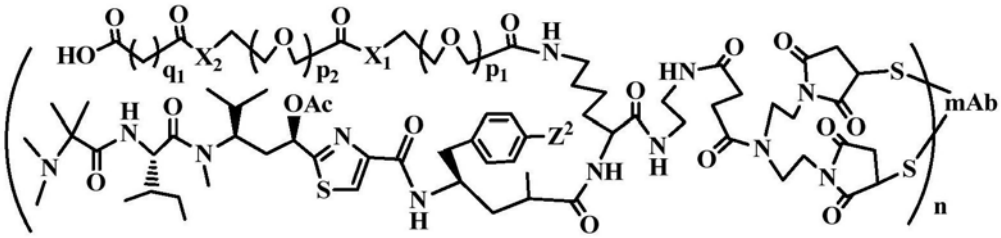

a-48,

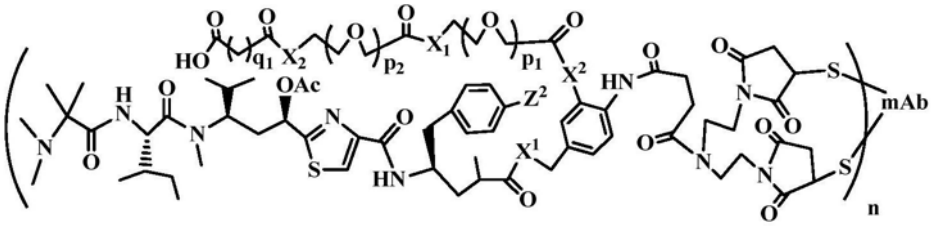

a-49,

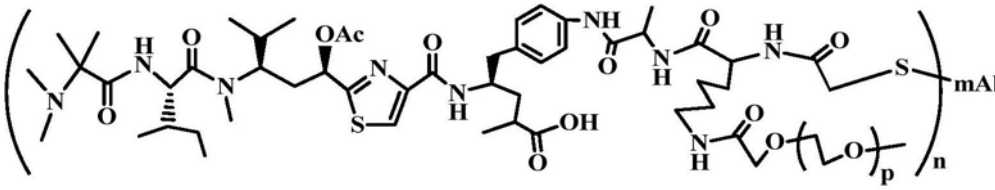

a-50,

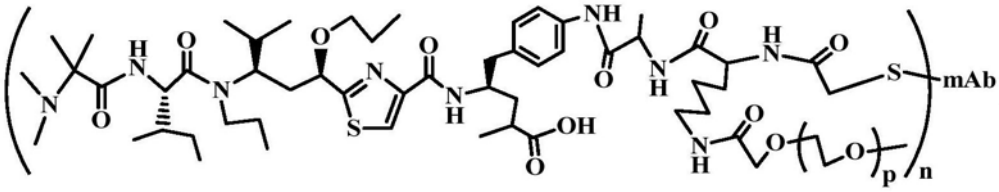

a-51,

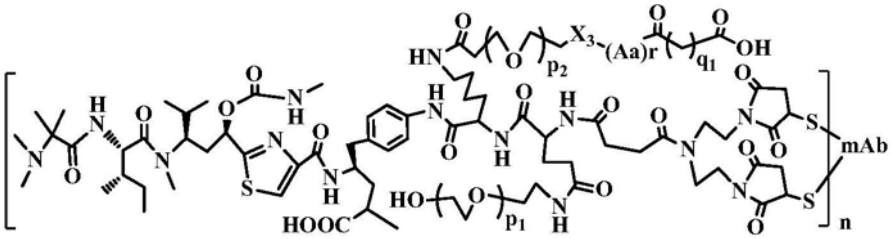

a-52,

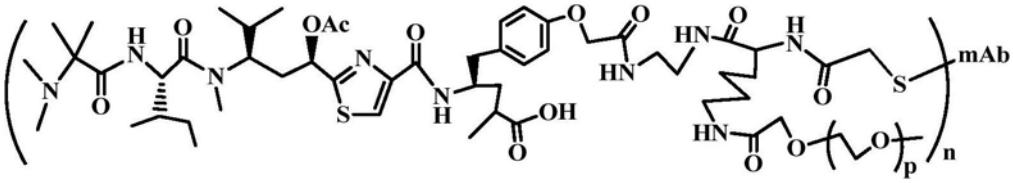

a-53,

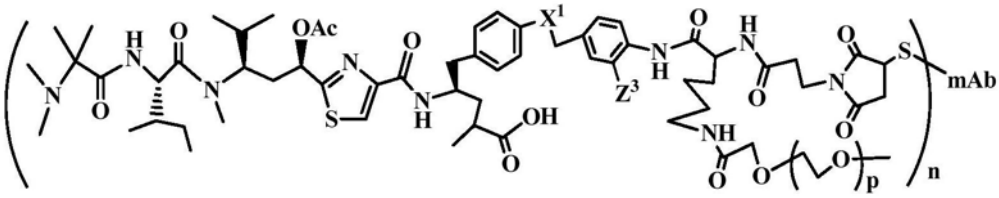

a-54,

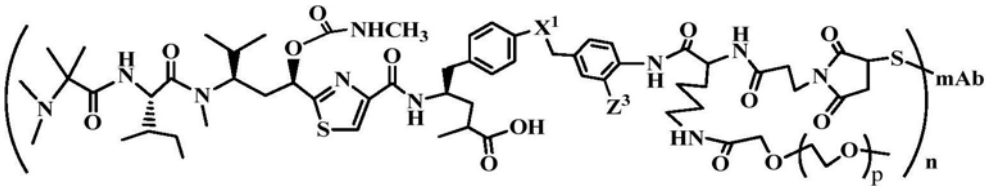

a-55,

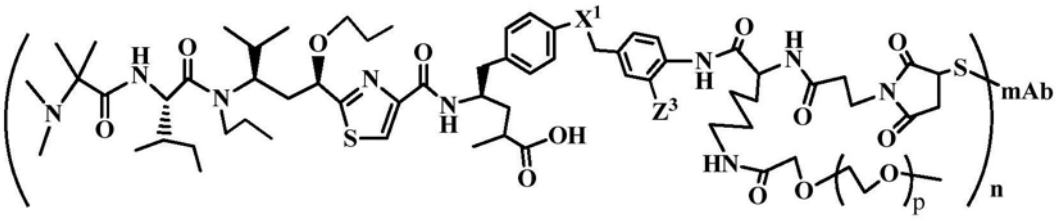

a-56,

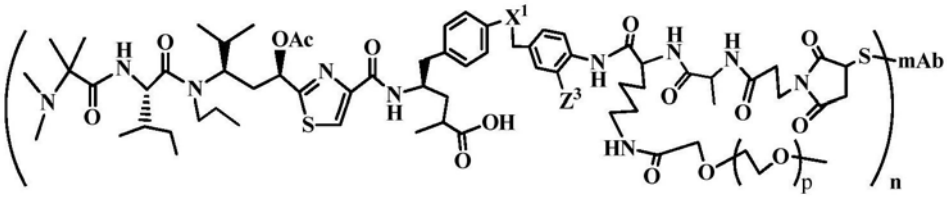

a-57,

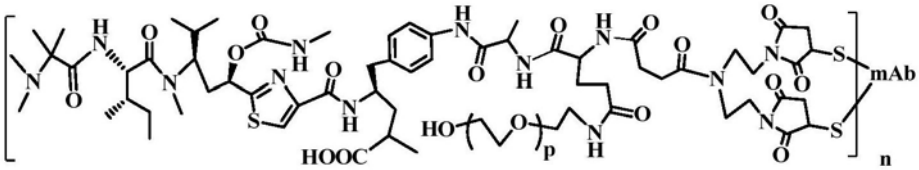

a-58,

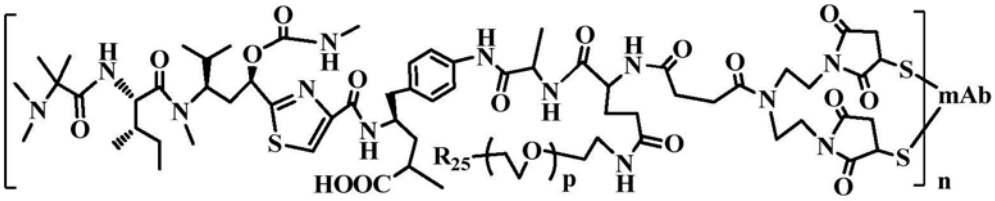

a-59,

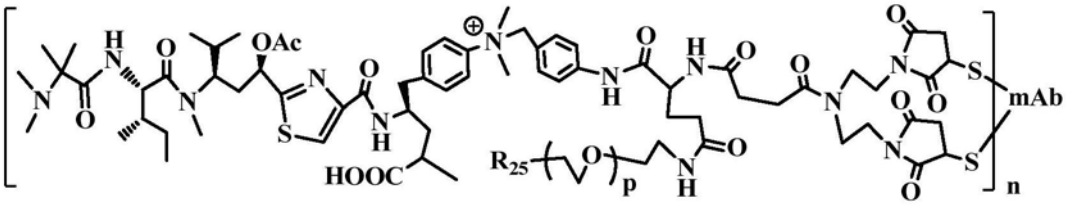

a-60,

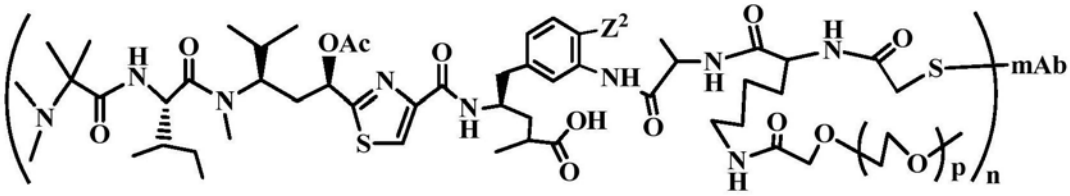

a-61,

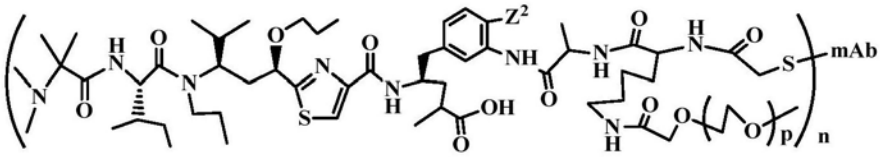

a-62,

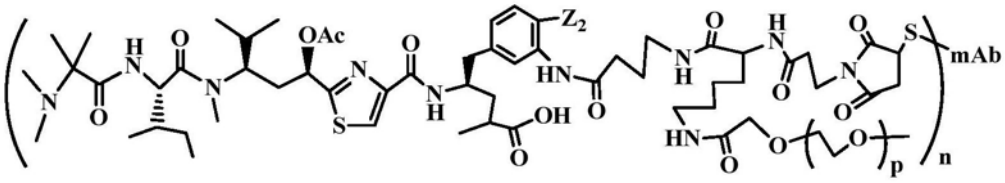

a-63,

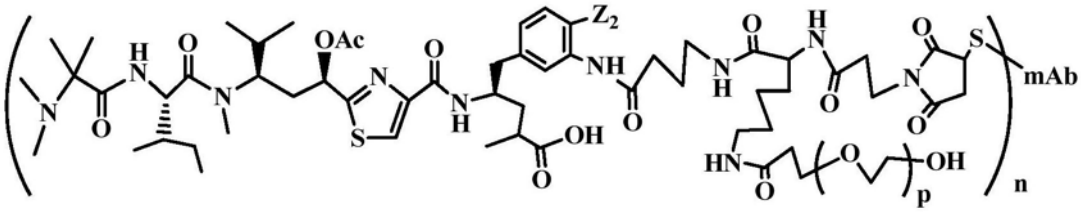

a-64,

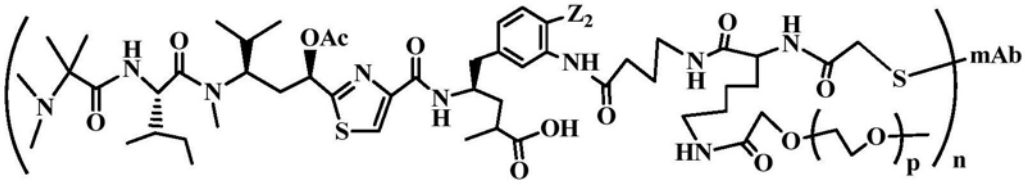

a-65,

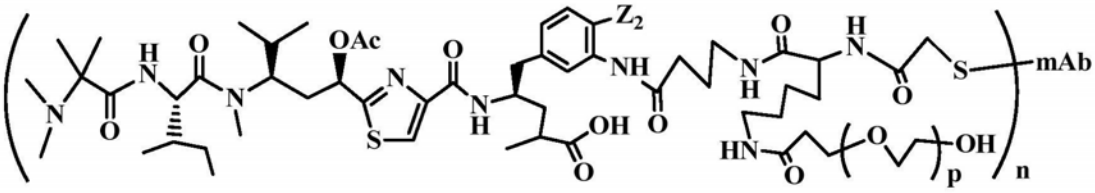

a-66,

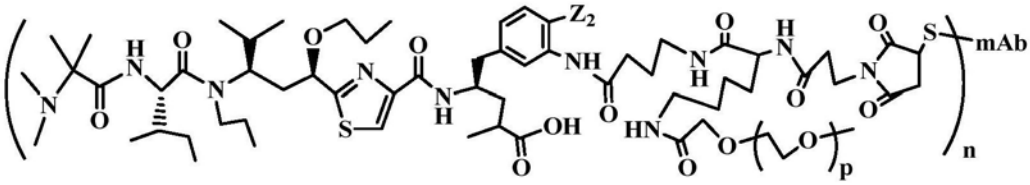

a-67,

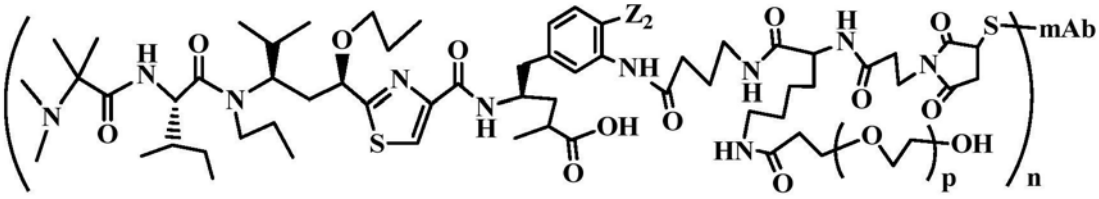

a-68,

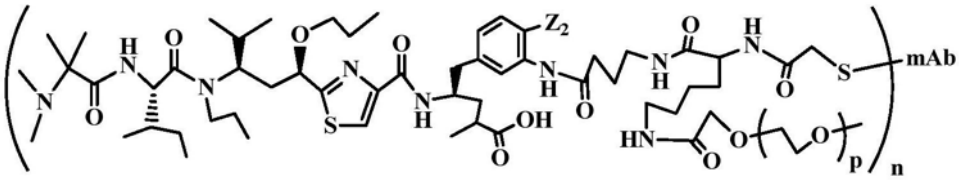

a-69,

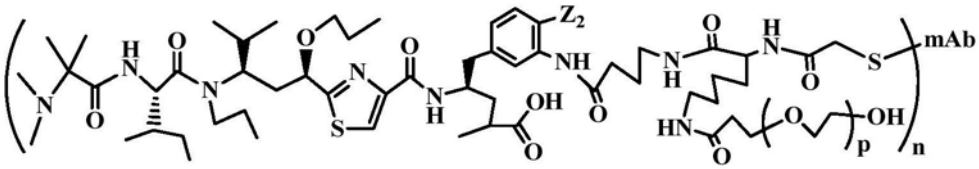

a-70,

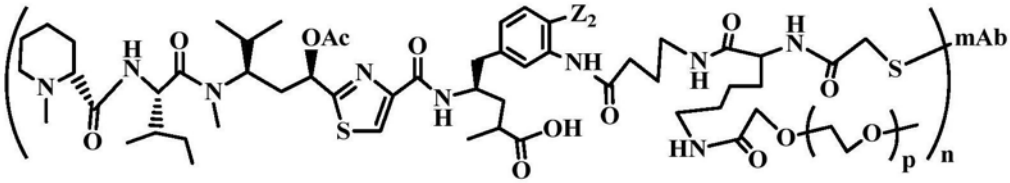

a-71,

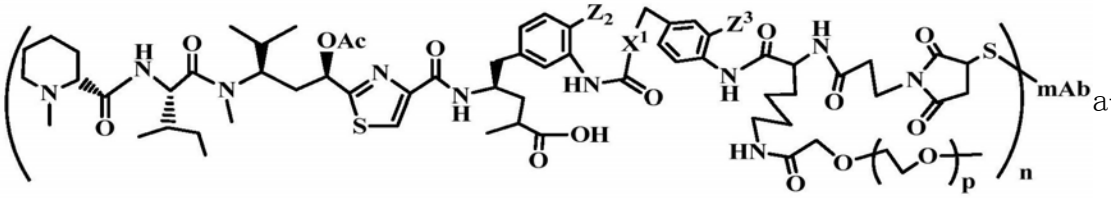

a-72,

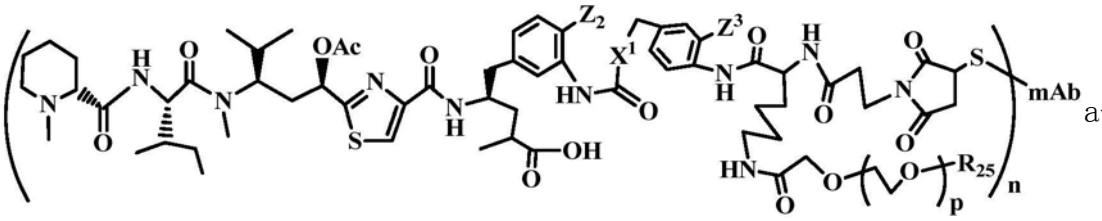

a-73,

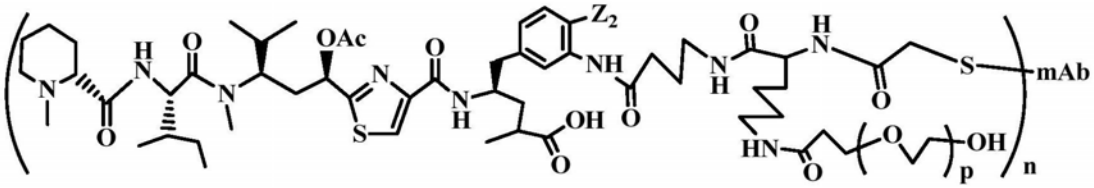

a-74,

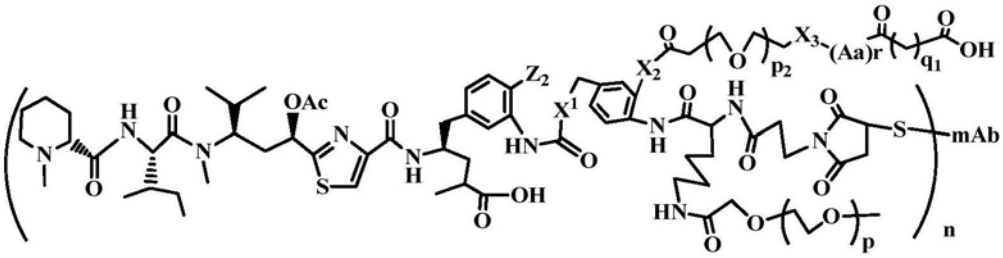

a-75,

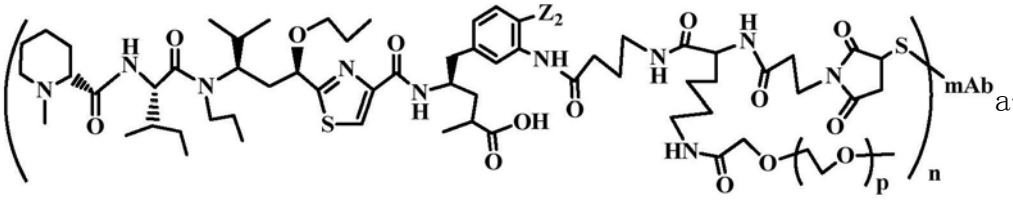

a-76,

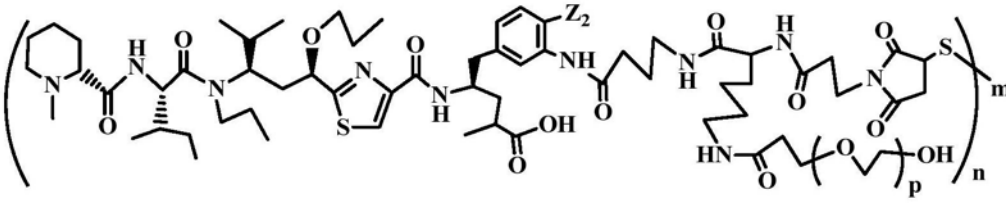

a-77,

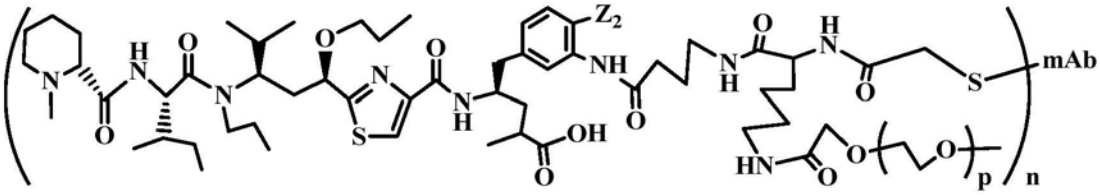

a-78,

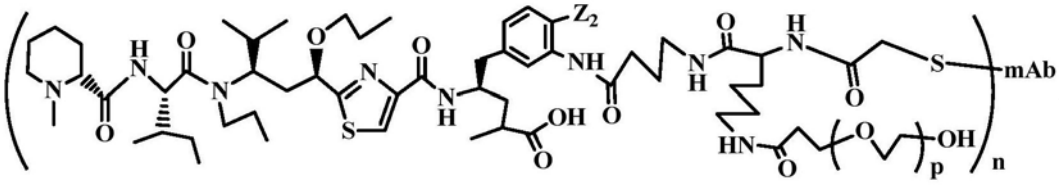

a-79,

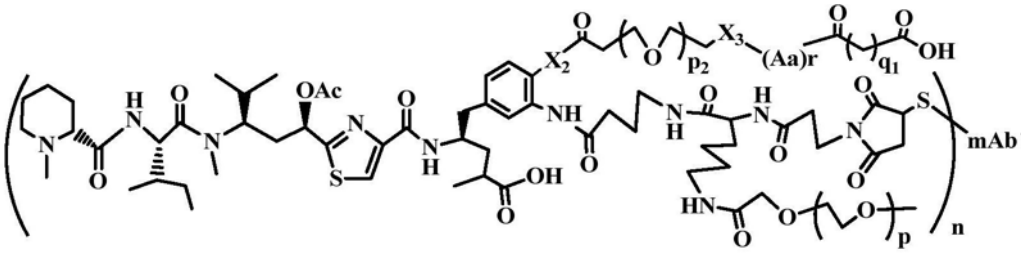

a-80,

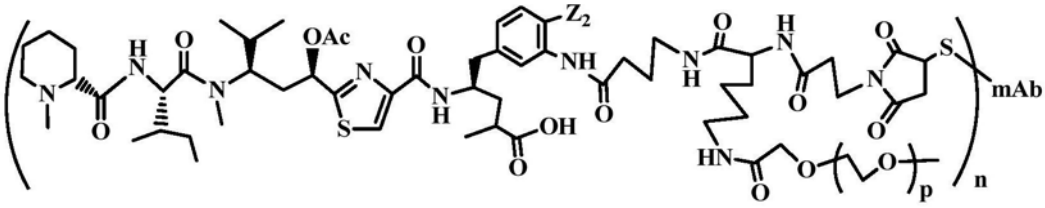

a-81,

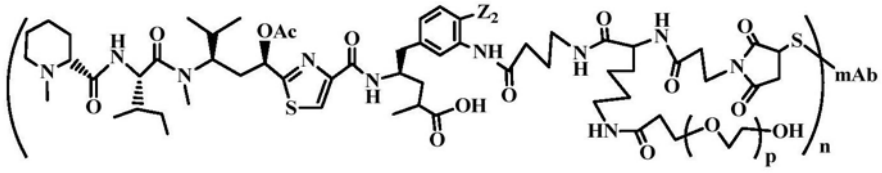

a-82,

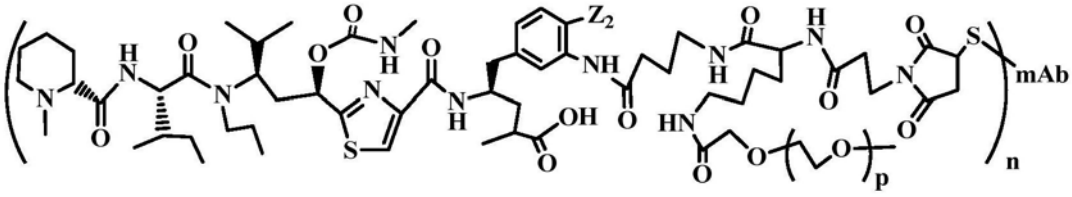

a-83,

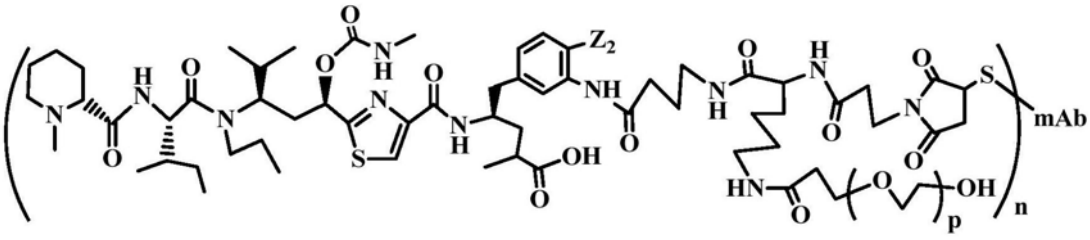

a-84,

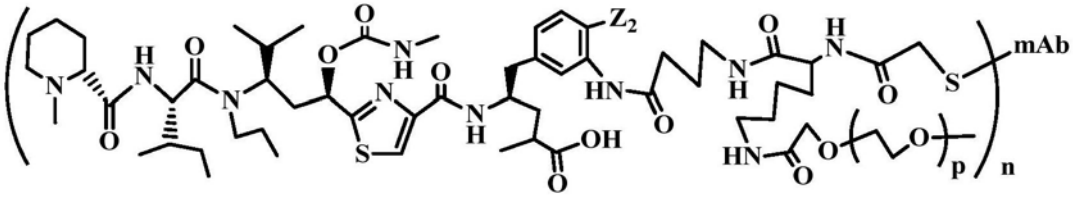

a-85,

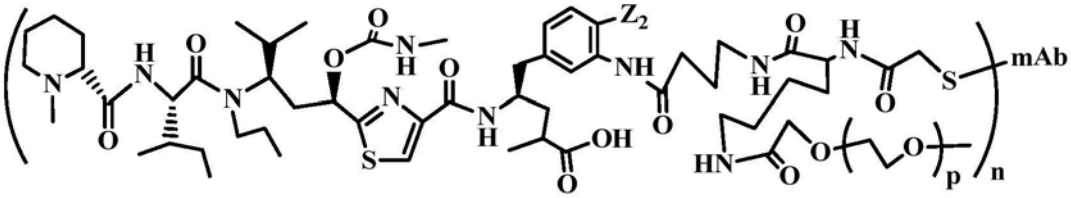

a-86,

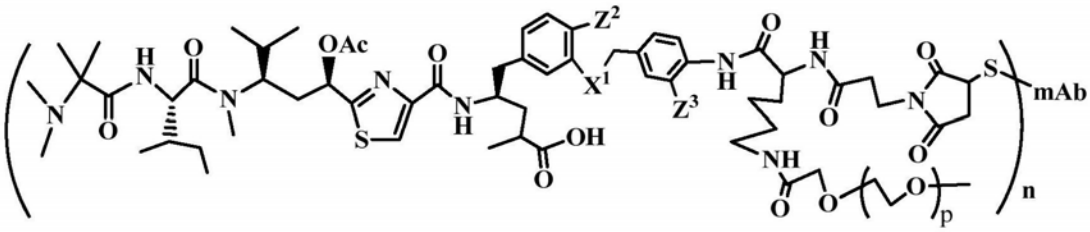

a-87,

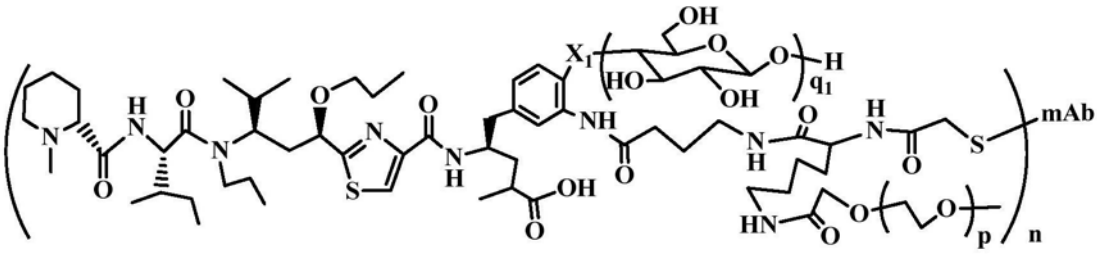

a-88,

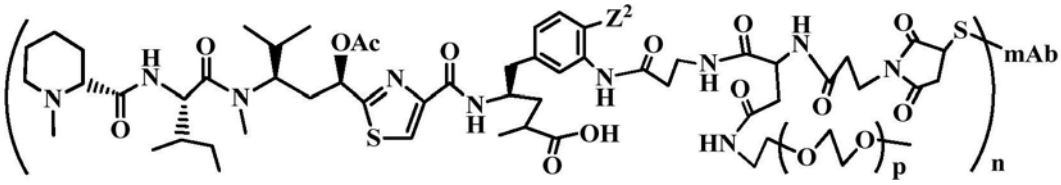

a-89,

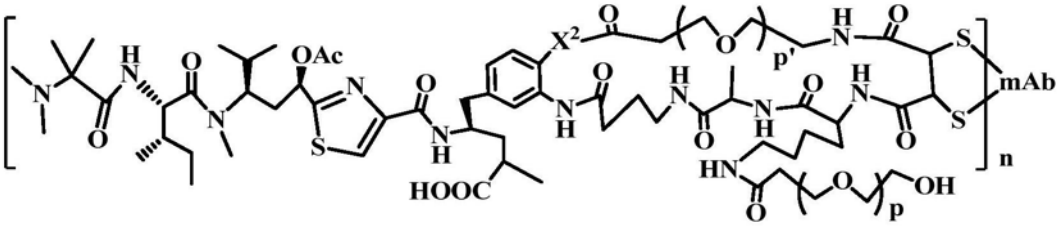

a-90,

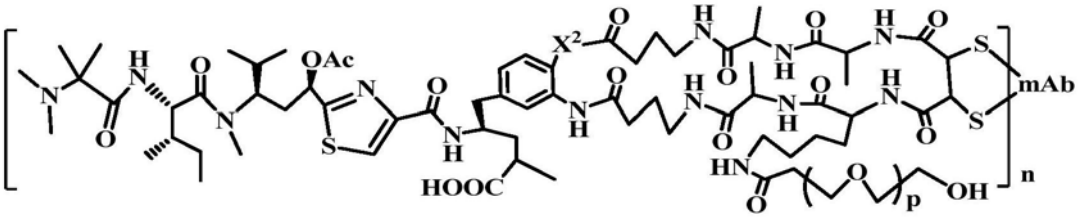

a-91,

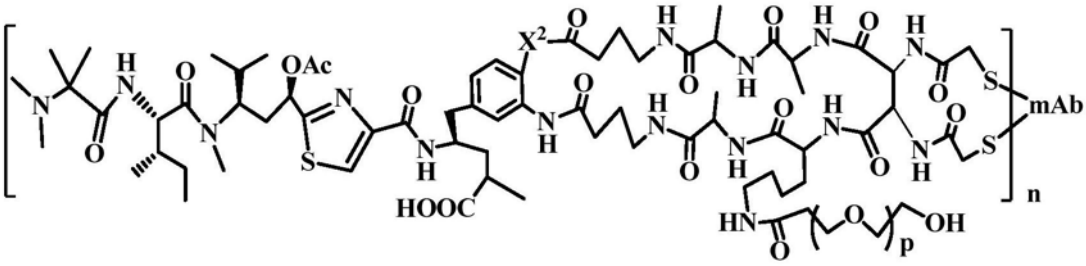

a-92,

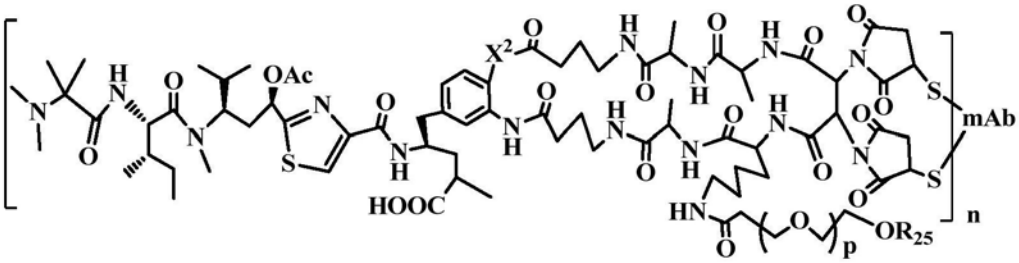

a-93,


a-94,

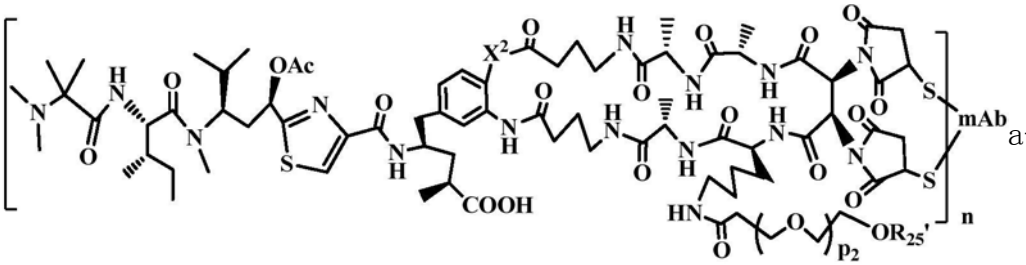

a-95,


a-96,

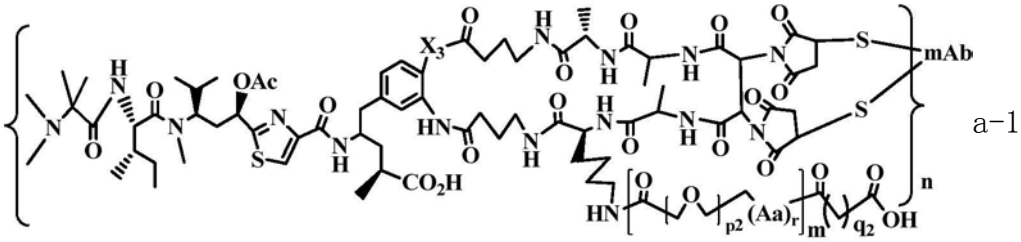

a-97,



a-98,



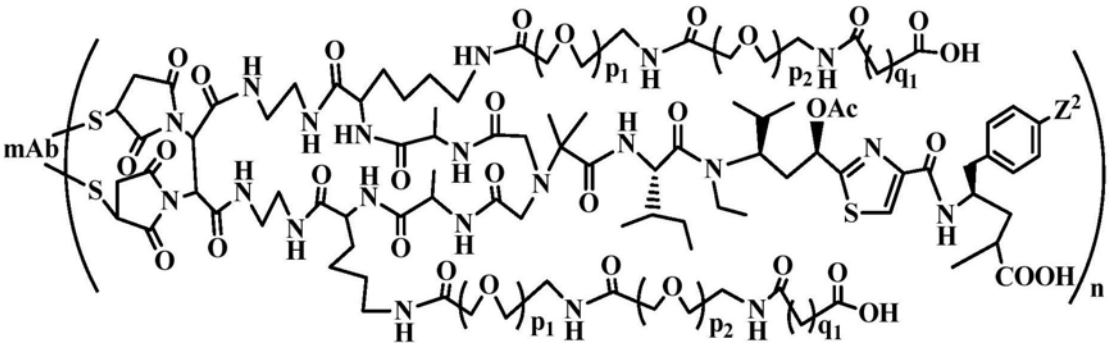
a-99,



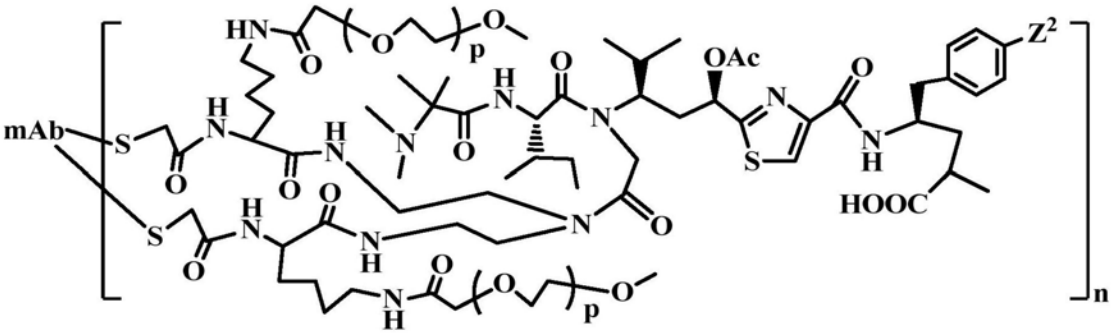
a-100

或它们在药学上可接受的盐、水合物或水合盐，或这些化合物的多晶型结构，或其光学异构体、外消旋体、非对映异构体或对映异构体；其中Z^3和Z^3独立地为H、OH、NH_2、O、NH、COOH、COO、C(O)、C(O)NH、C(O)NH_2、R^{18}、$OCH_2OP(O)(OR^{18})_2$、$OC(O)OP(O)(OR^{18})_2$、$OPO(OR^{18})_2$、$NHPO(OR^{18})_2$、$OP(O)(OR^{18})OP(O)(OR^{18})_2$、$OC(O)R^{18}$、$OC(O)NHR^{18}$、$OSO_2(OR^{18})$、O-($C_4$-$C_{12}$糖苷)，$C_1$-$C_8$直链或支链烷基或杂烷基，$C_2$-$C_8$直链或支链烯基、炔基、烷基环烷基、杂环烷基，$C_3$-$C_8$直链或支链芳基、Ar-烷基、杂环、碳环、环烷基、杂烷基环烷基、烷基羰基、杂芳基，碳酸酯(-C(O)OR^{17})、氨基甲酸酯(-C(O)$NR^{17}R^{18}$)；R^{19}为H、OH、NH_2、$OSO_2(OR^{18})$、$XCH_2OP(O)(OR^{18})_2$、$XPO(OR^{18})_2$、$XC(O)OP(O)(OR^{18})_2$、$XC(O)R^{18}$、$XC(O)NHR^{18}$、C_1-C_8烷基或羧酸，C_2-C_8烯基、炔基、烷基环烷基、杂环烷基，C_3-C_8芳基或烷基羰基，或药用盐；X、X_1、X_2和X_3独立地为O、S、NH、NHNH或CH_2；q_1、q_2和q_3独立地选自0-24；p、p_1及p_2独立地为1-100；R_1'、R_2'、R_3'及R_4'独立地选自H和C_1-C_6烷基；Aa是天然或非天然氨基酸；r是0-12，当r>2时，(Aa)r是含有相同或不同氨基酸序列的肽，r＝0表示(Aa)r缺省；m和n独立地为1-30。

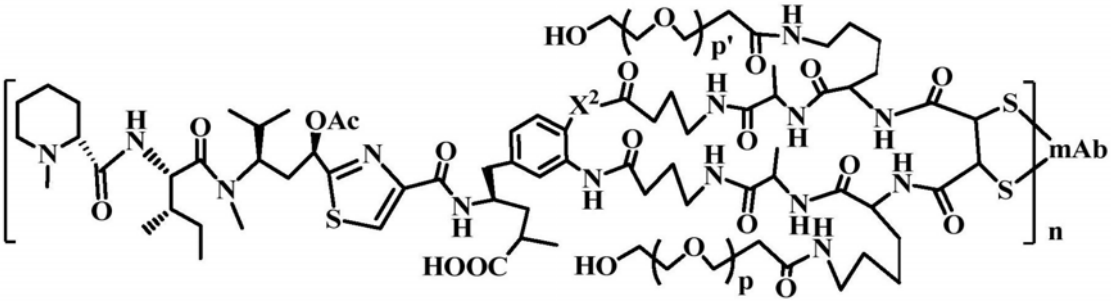
10.如权利要求2所述，偶联物(III)具有如下结构：



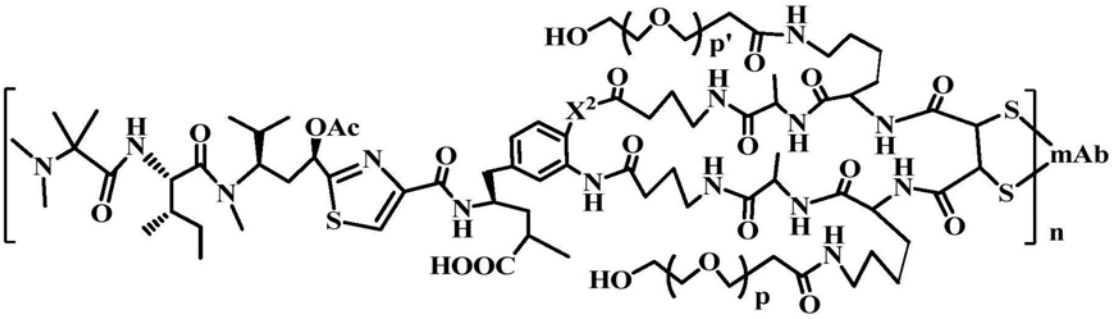
b-01,



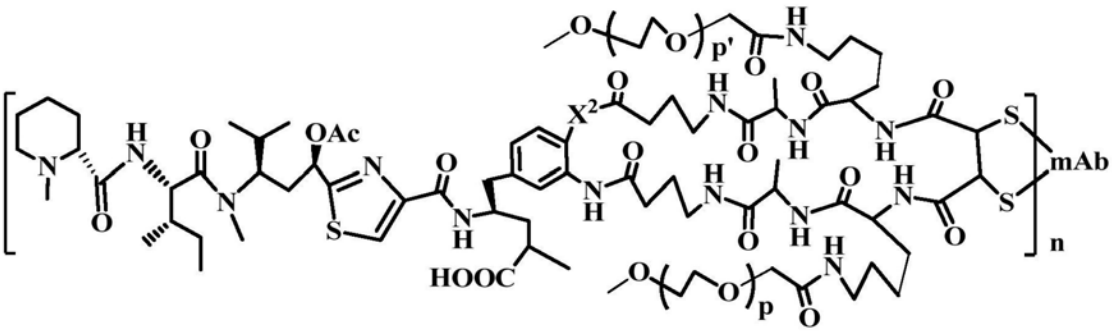
b-02,



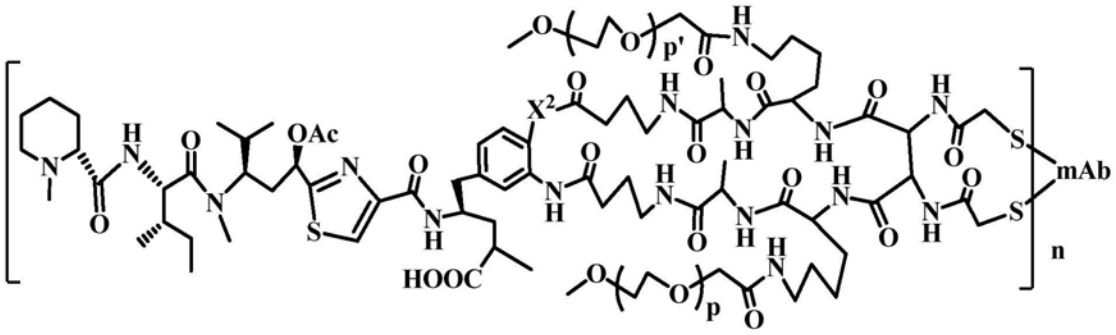
b-03,



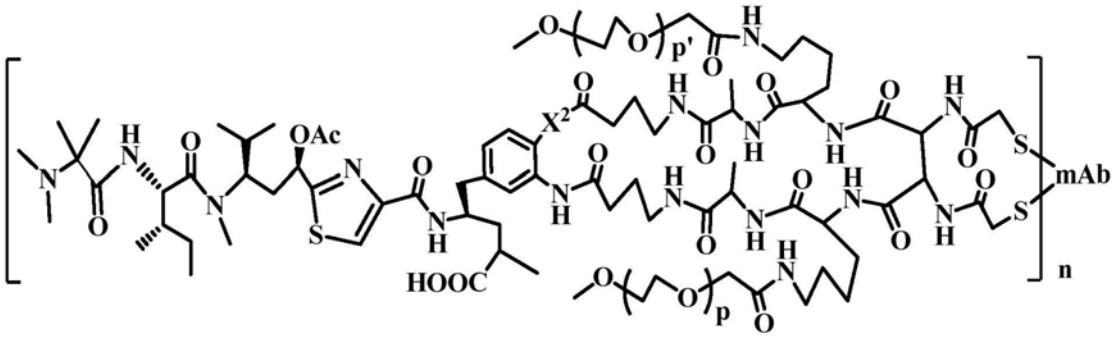
b-04,



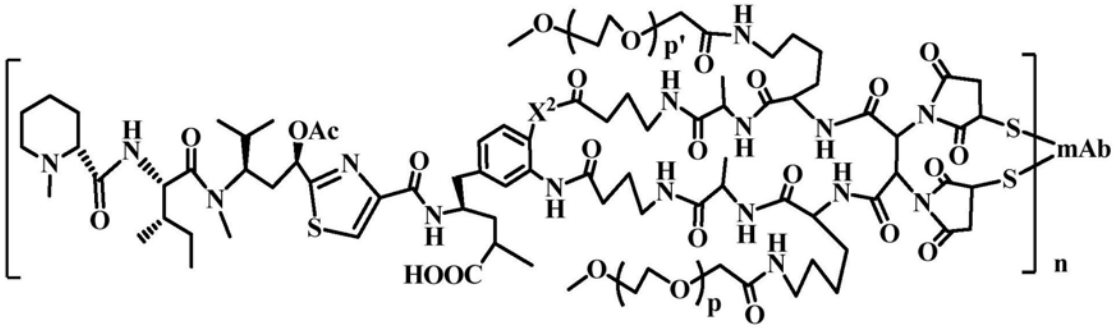
b-05,



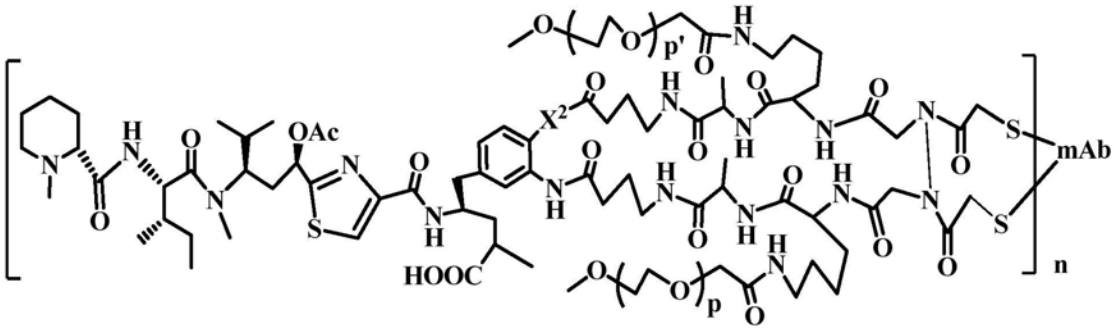
b-06,



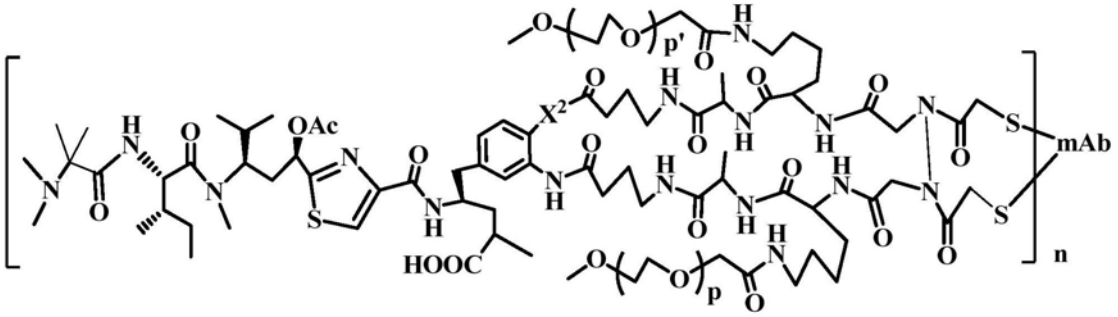
b-07,



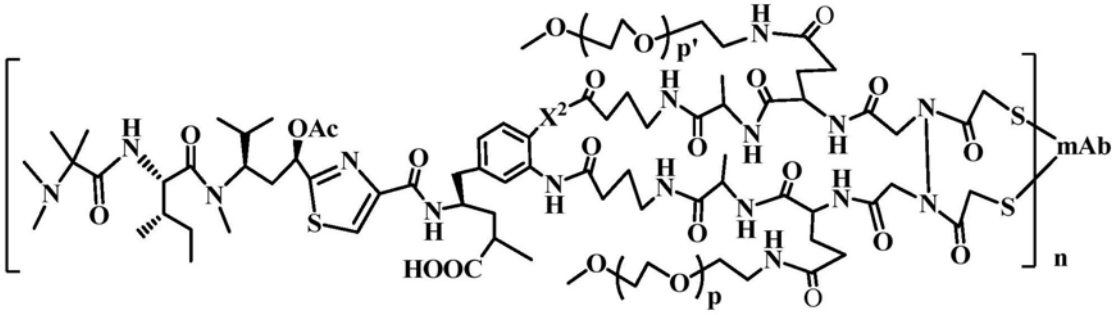
b-08,



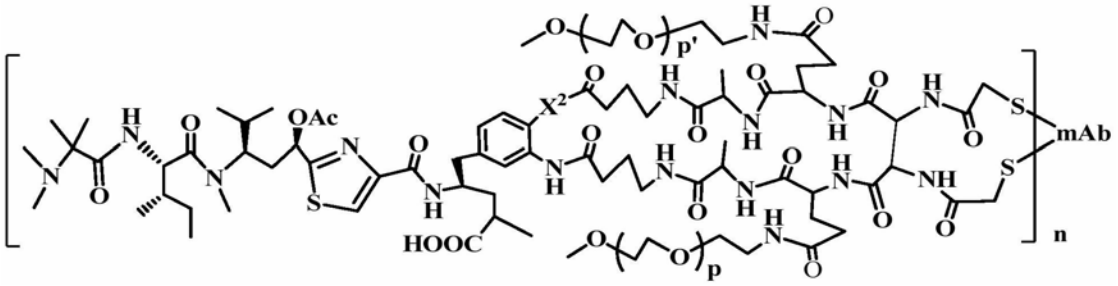
b-09,



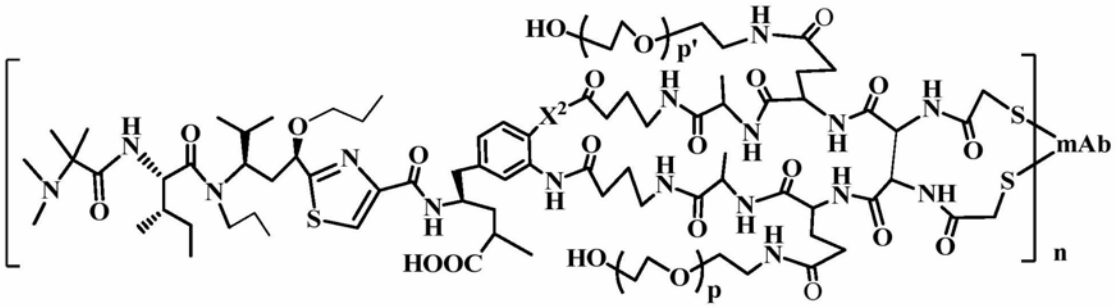
b-10,



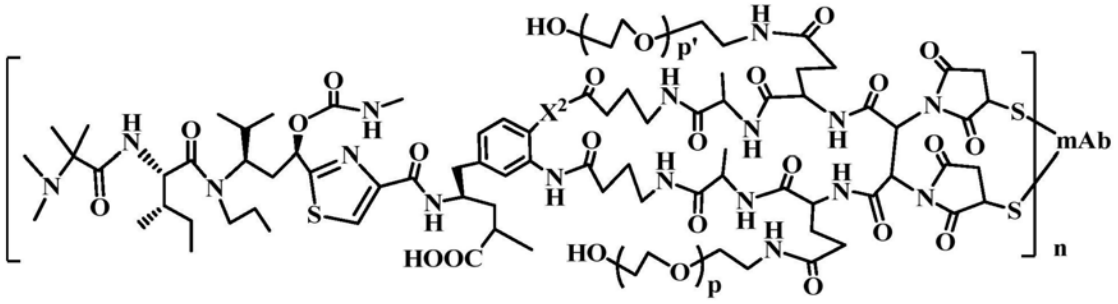
b-11,



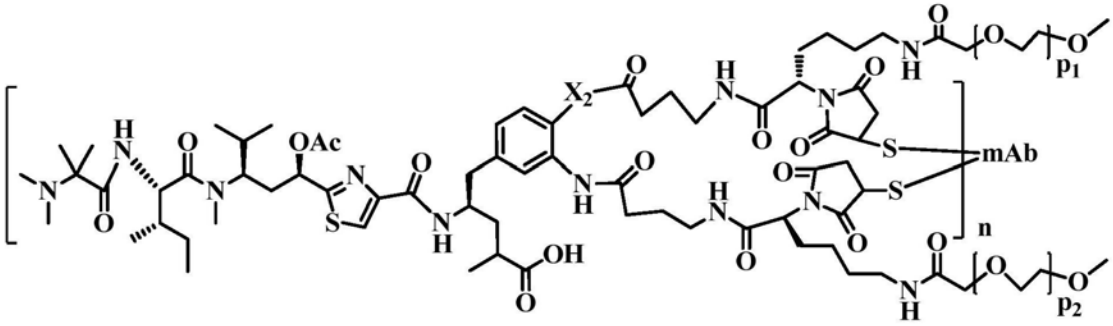
b-12,



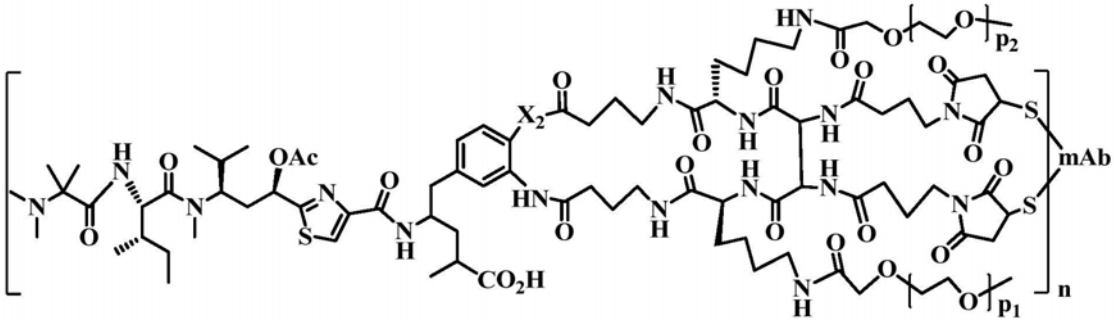
b-13,



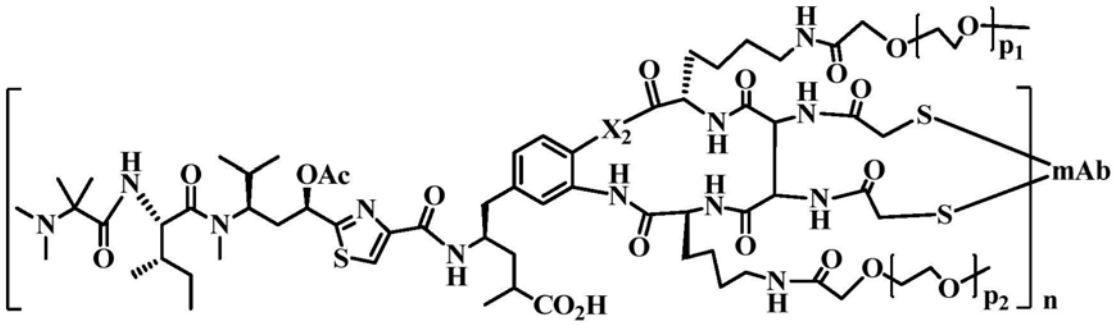
b-14,



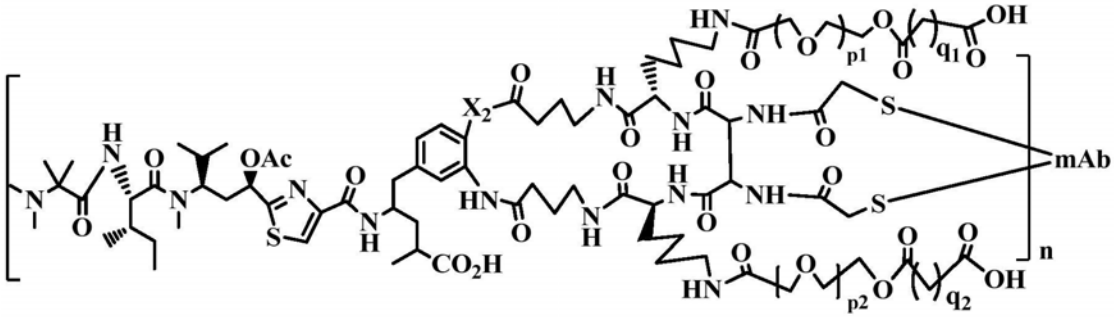
b-15,



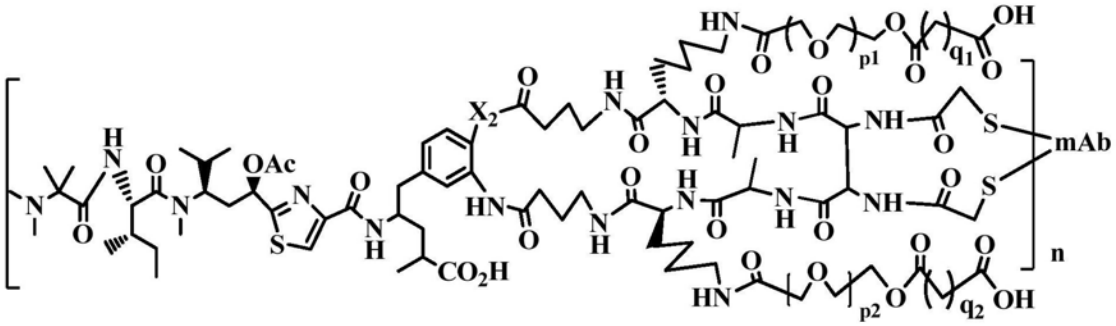
b-16,



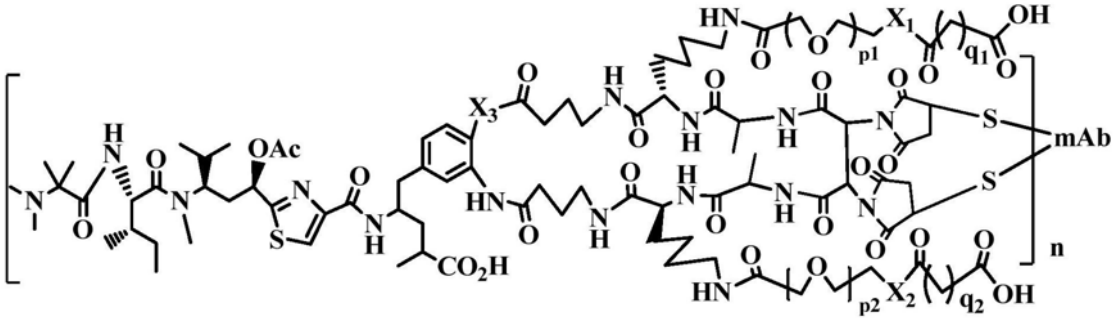
b-17,



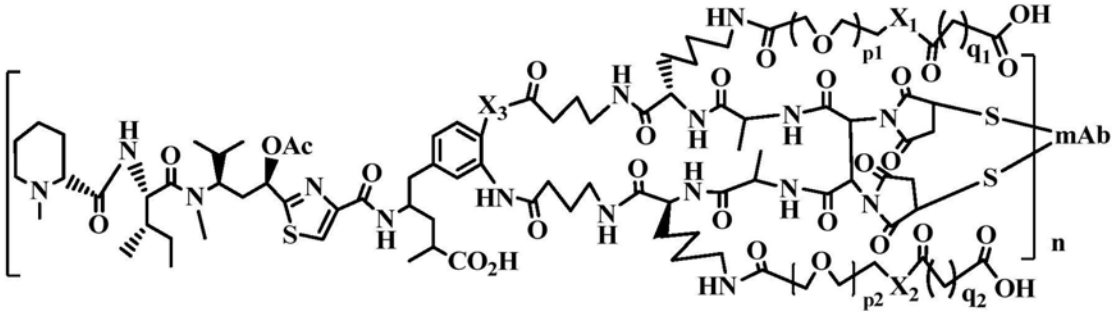
b-18,



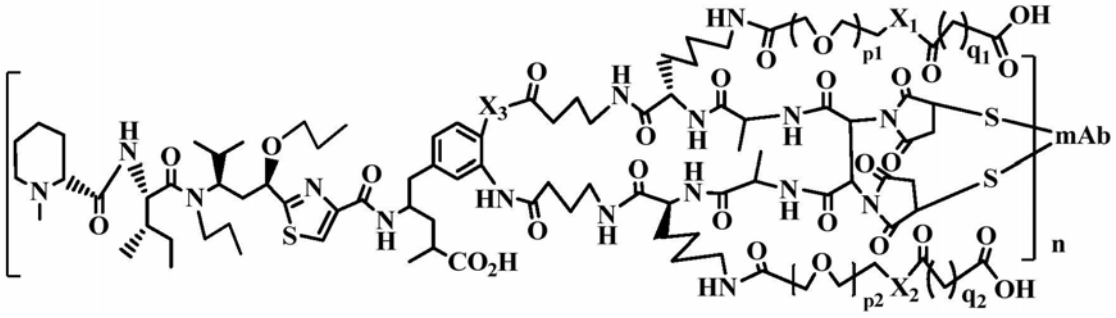
b-19,



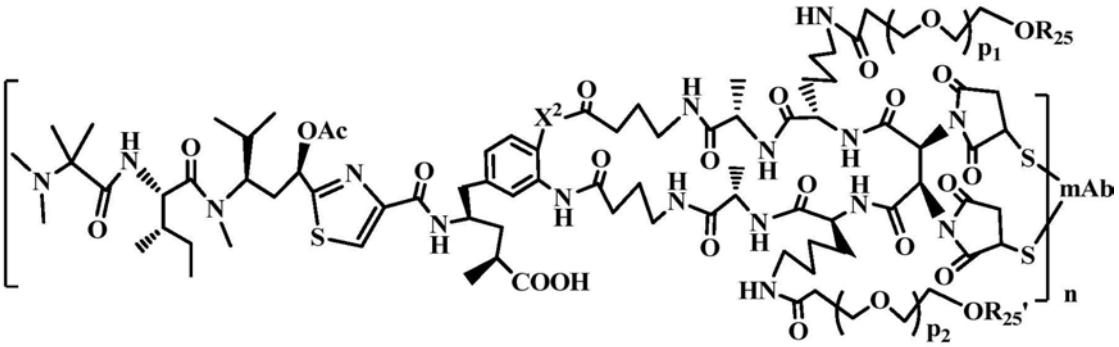
b-20,



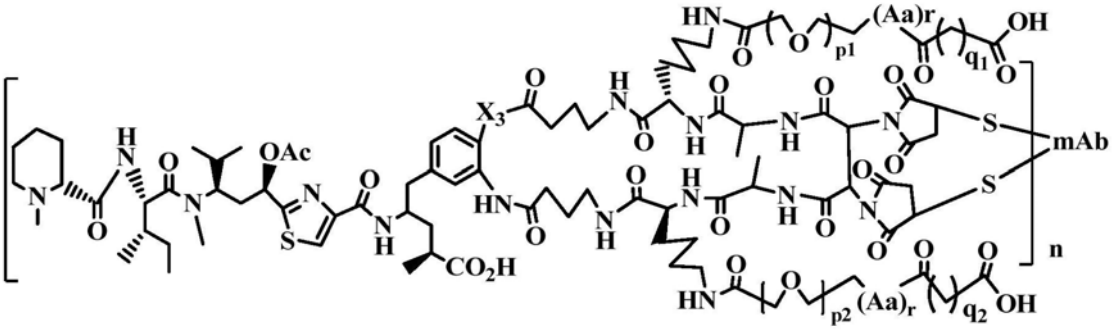
b-21,



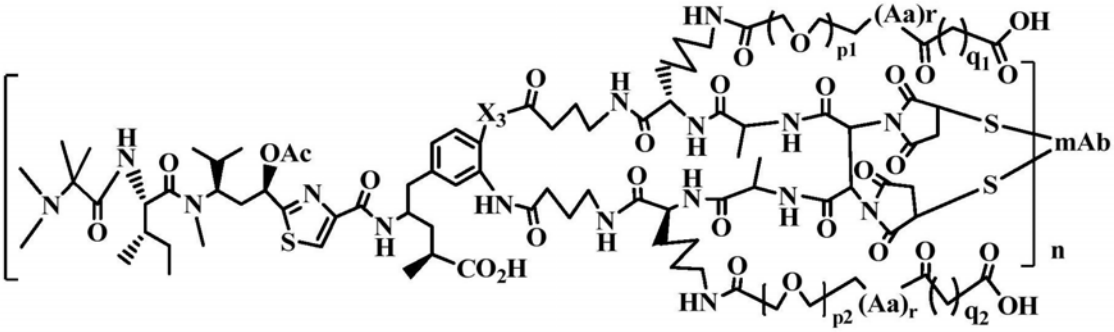
b-22,



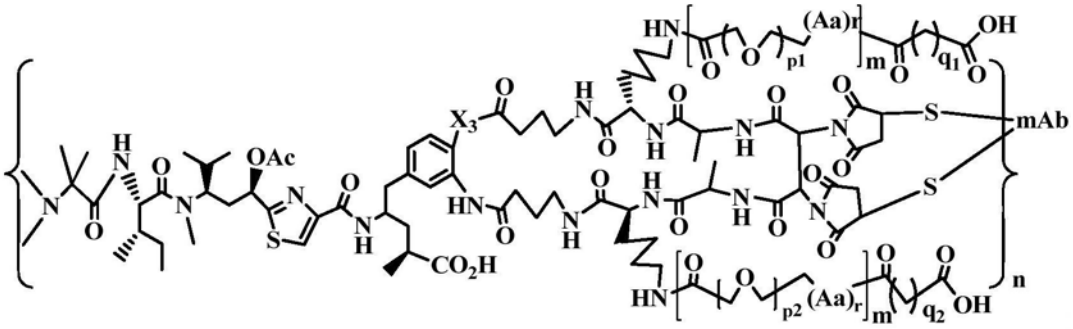
b-23,



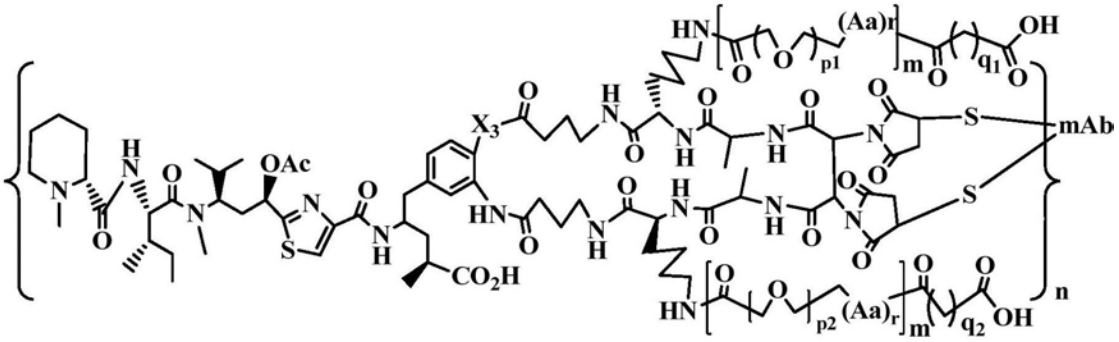
b-24,



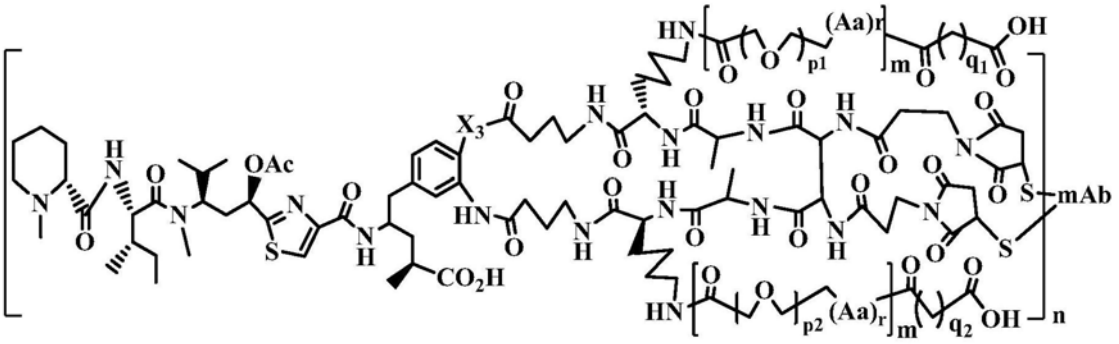
b-25,



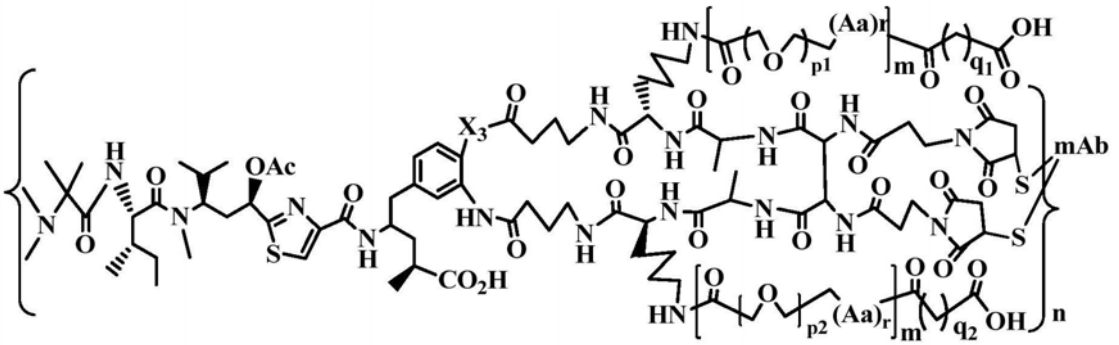
b-26,



b-27,



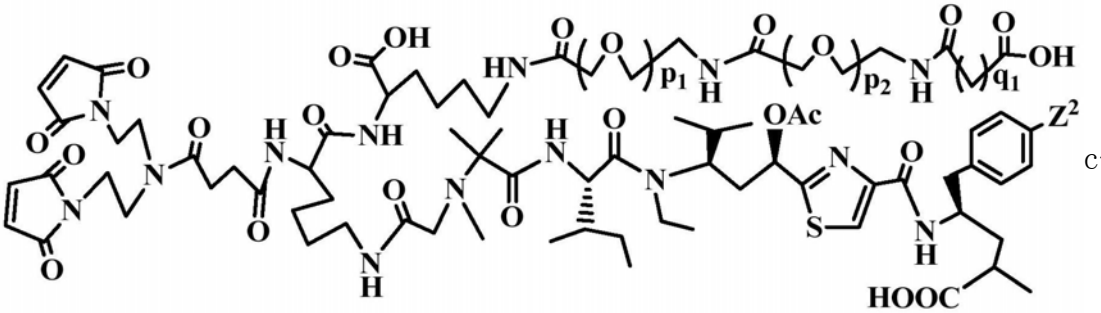
b-28



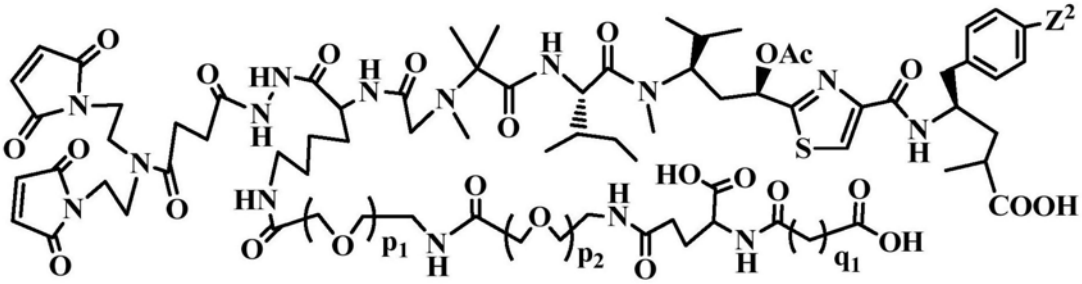
b-29

或其药学上可接受的盐、水合物或水合盐;或这些化合物的多晶型结构;或其光学异构体、外消旋体、非对映异构体或对映异构体;其中mAb、X_1、X_2、X_3、m、n、$(Aa)_r$、p_1、p_2、p_3、q_1和q_2定义如前文所述。

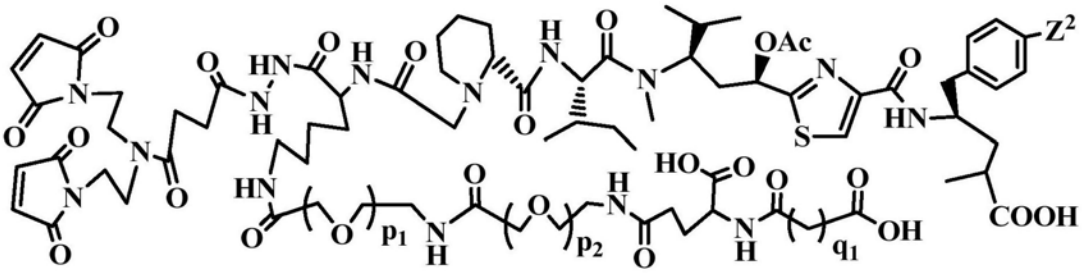
11.权利要求3中所述的式(IV)的化合物具有以下结构:



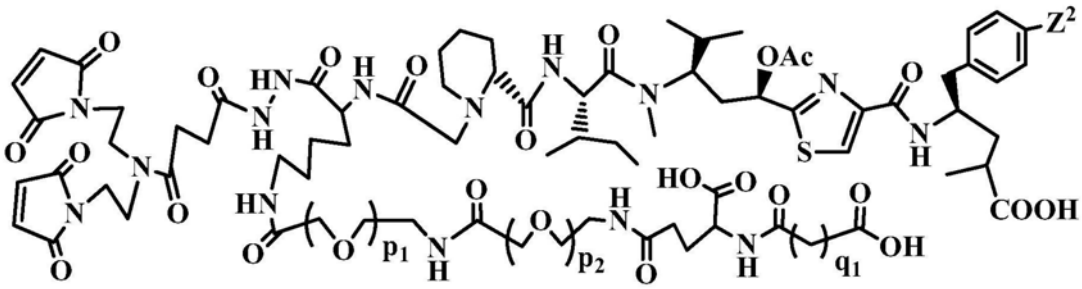
c-01,



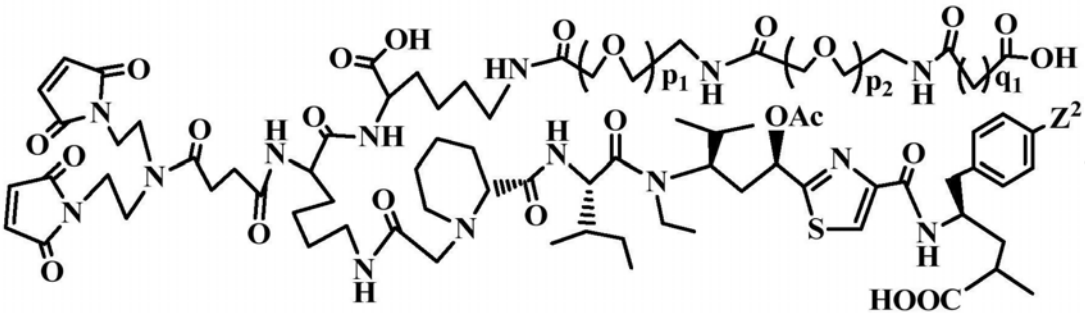
c-02,



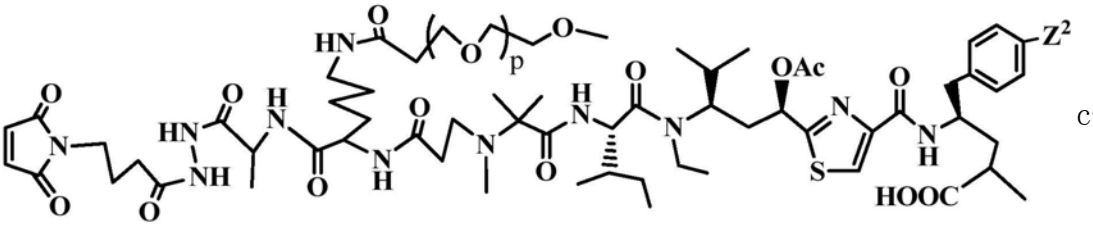
c-03,



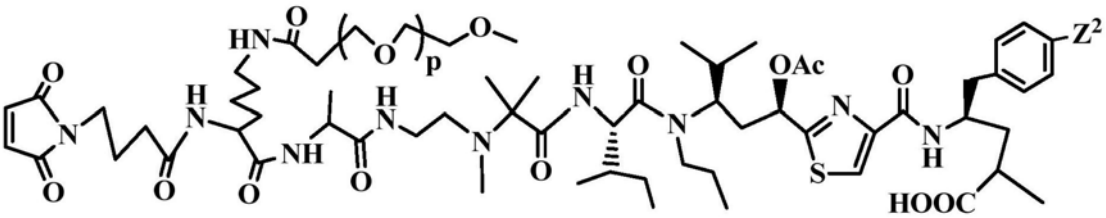
c-04,



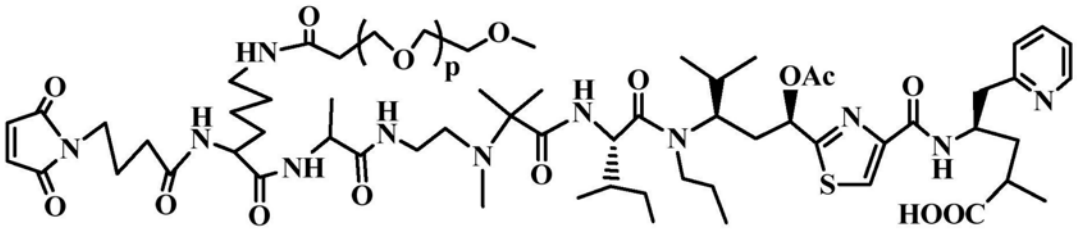
c-05,

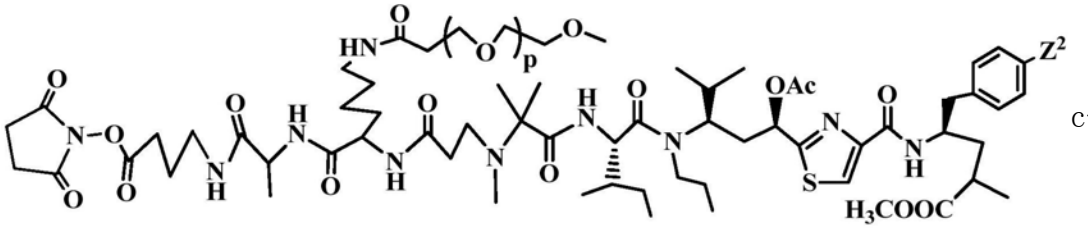


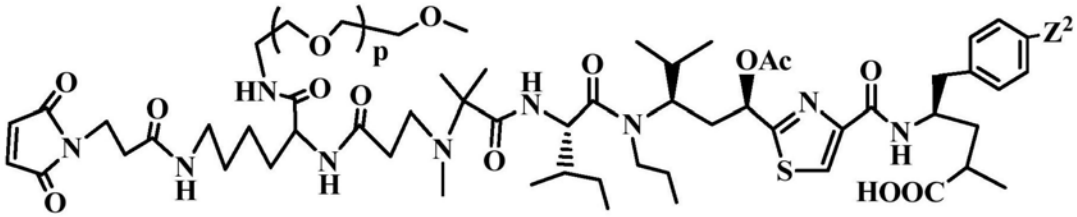
c-06,

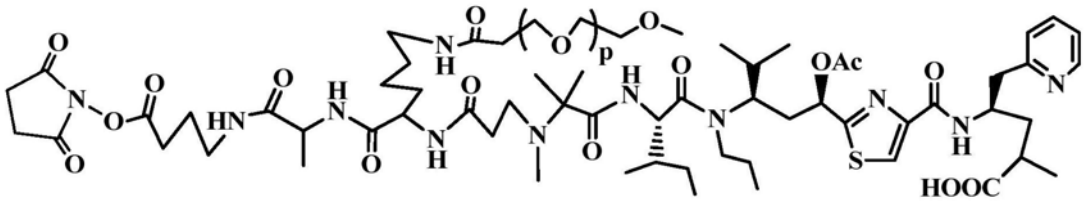


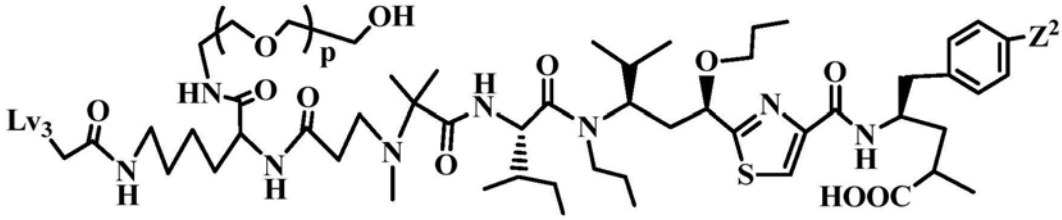
c-07

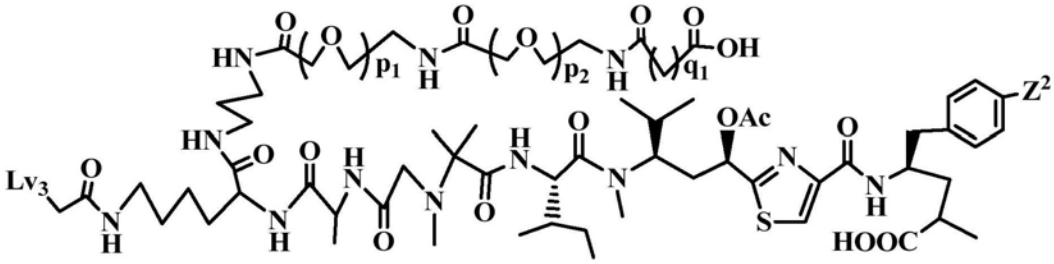

c-08,

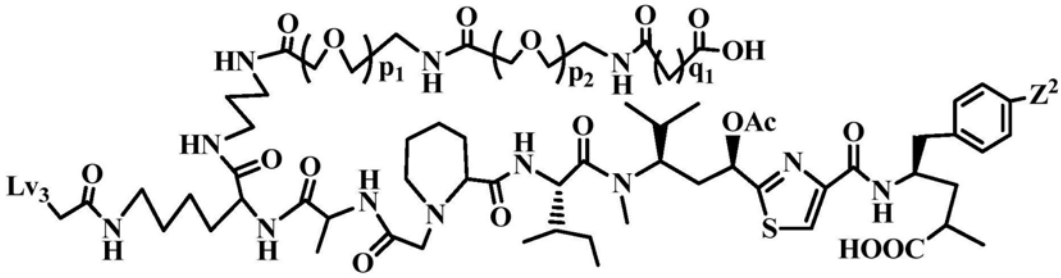

c-09,

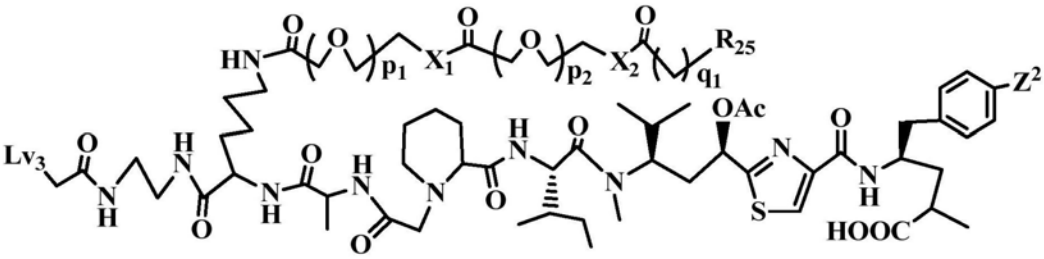

c-10,


c-11,

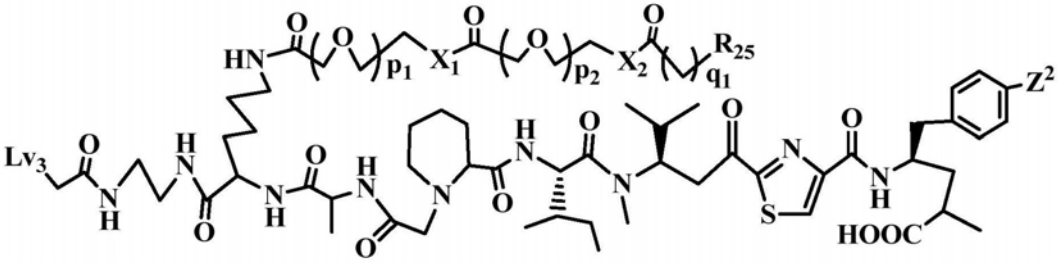

c-12,


c-13,

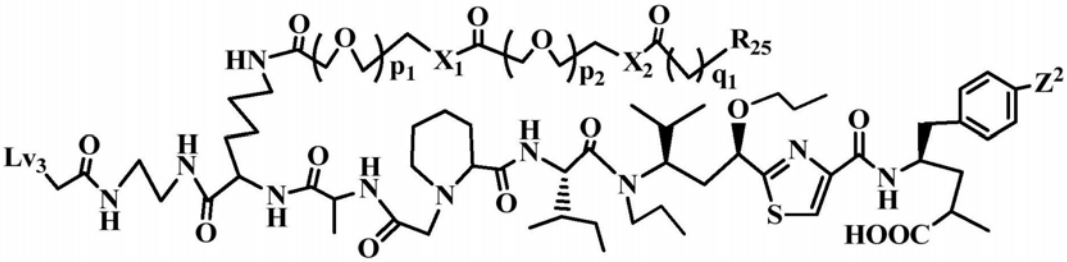

c-14,



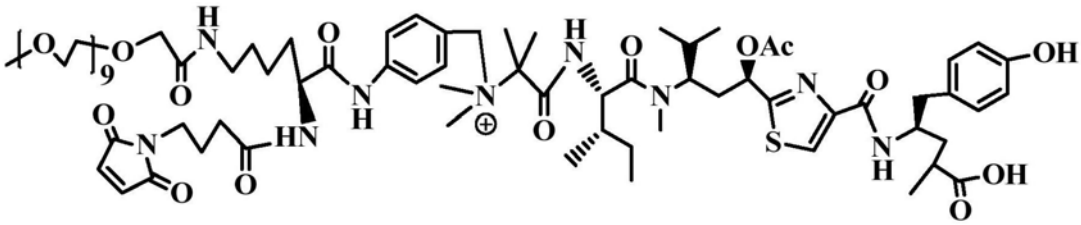
c-15,



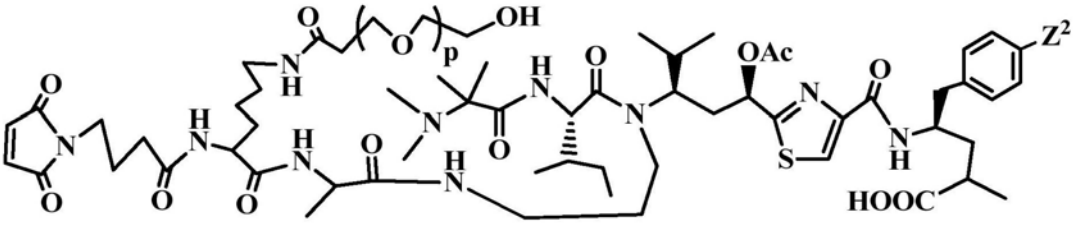
c-16,



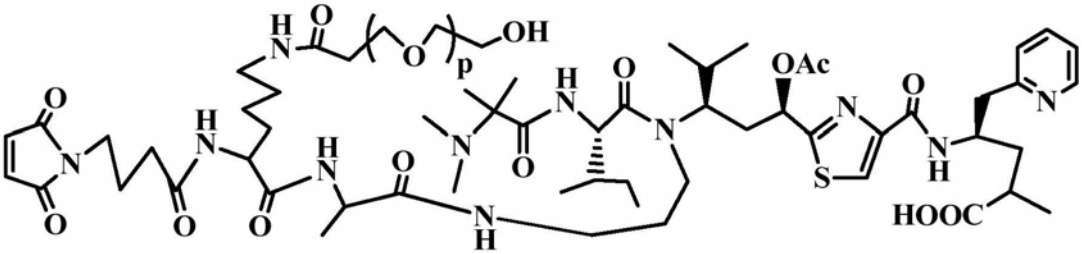
c-17,



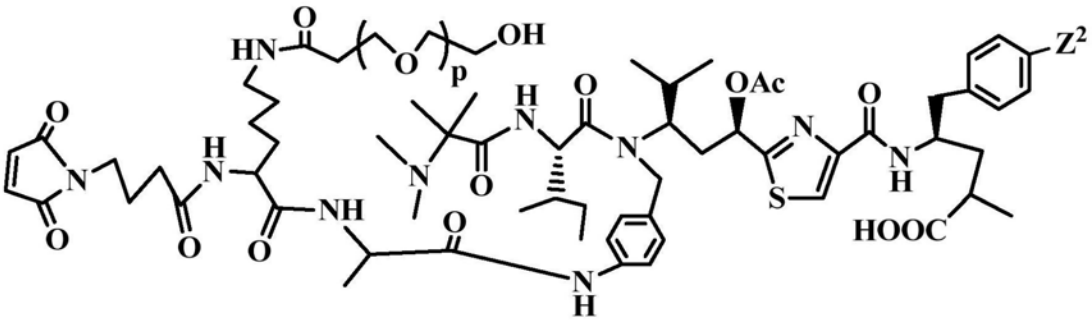
c-18,



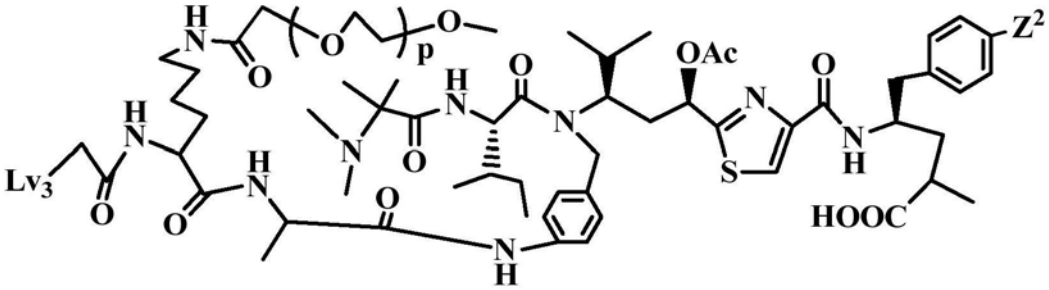
c-19,



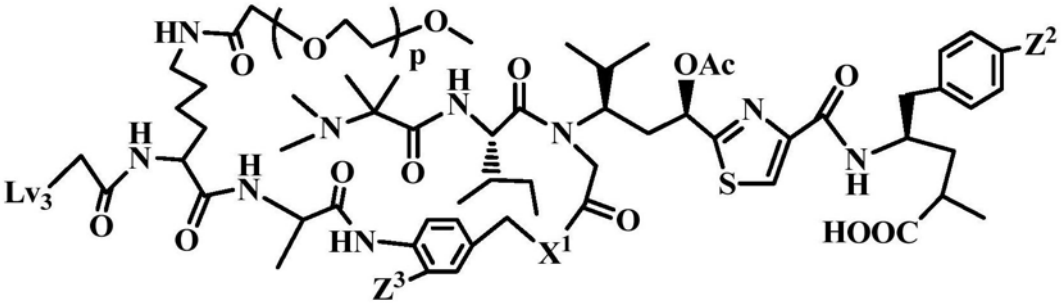
c-20,



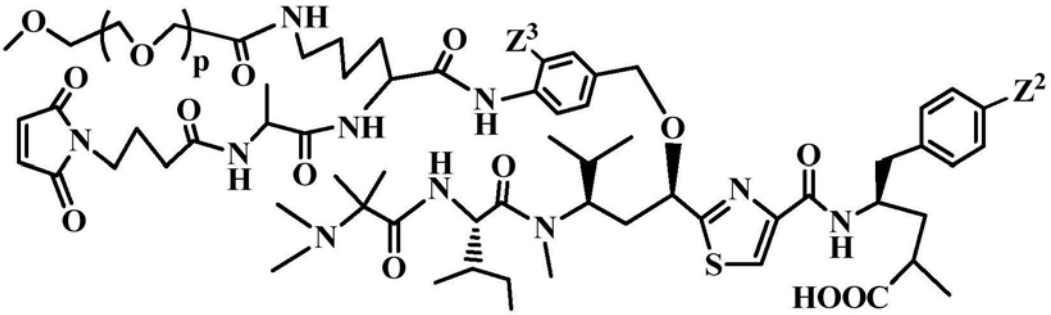
c-21,



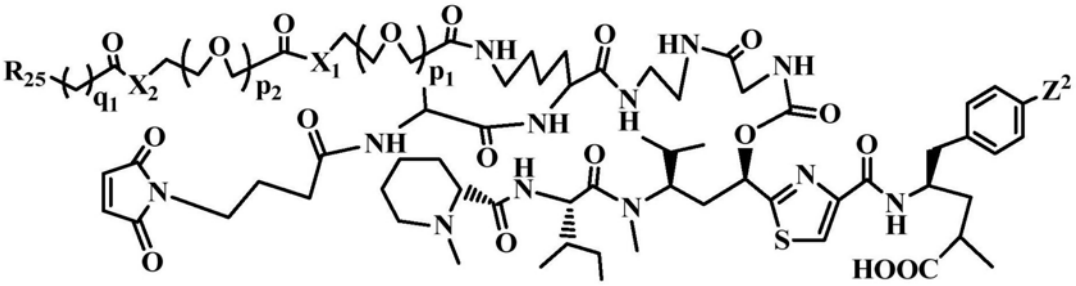
c-22,



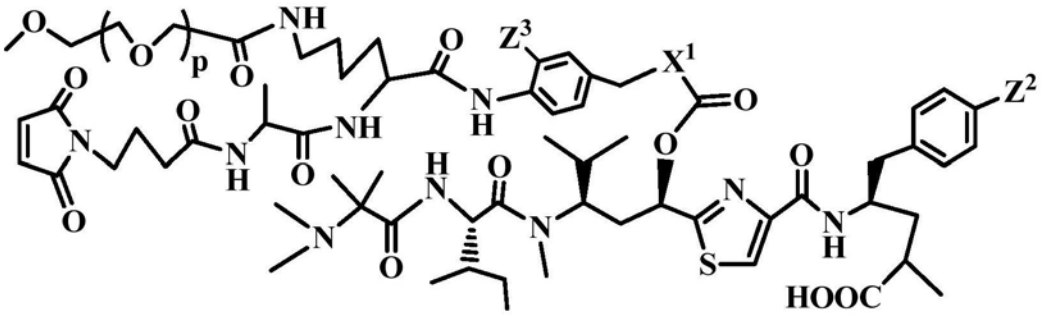
c-23,



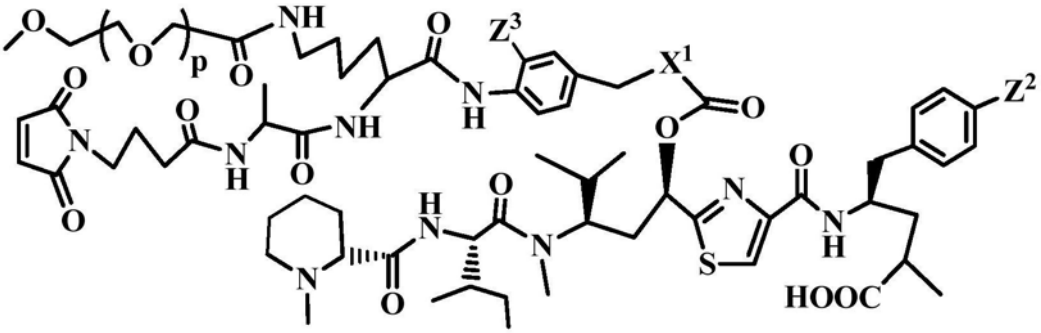
c-24,



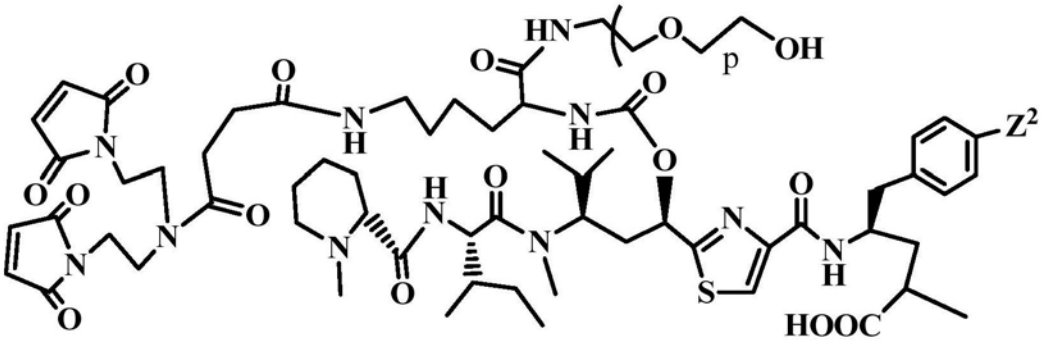
c-25,



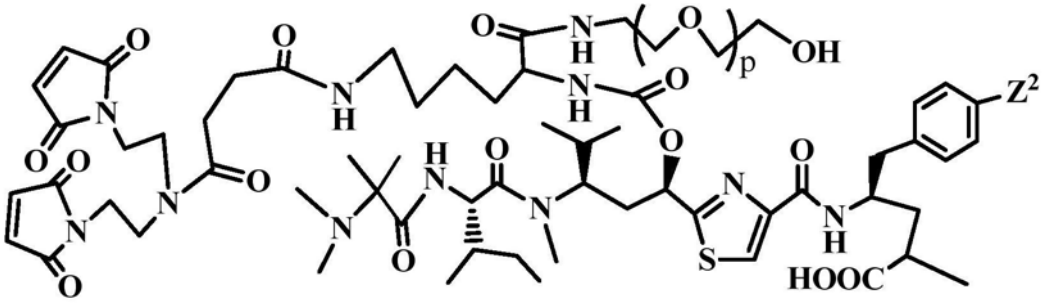
c-26,



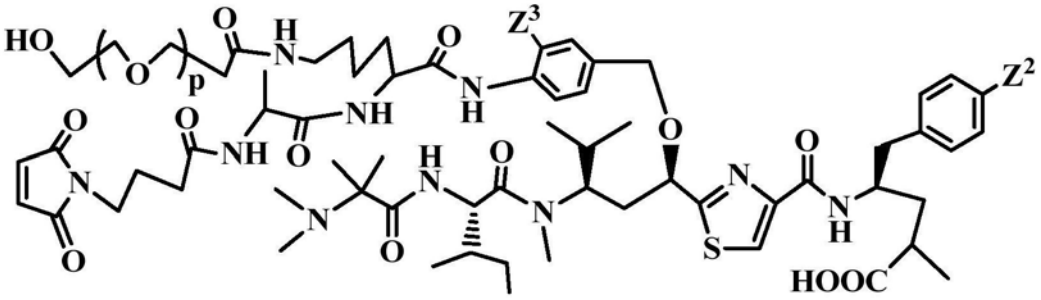
c-27,



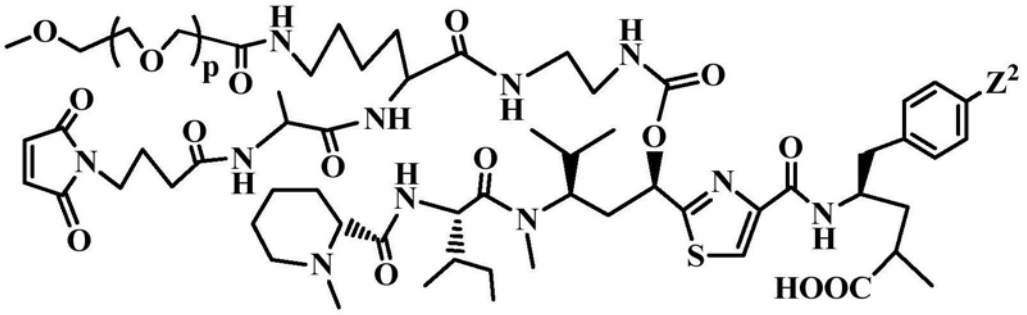
c-28,



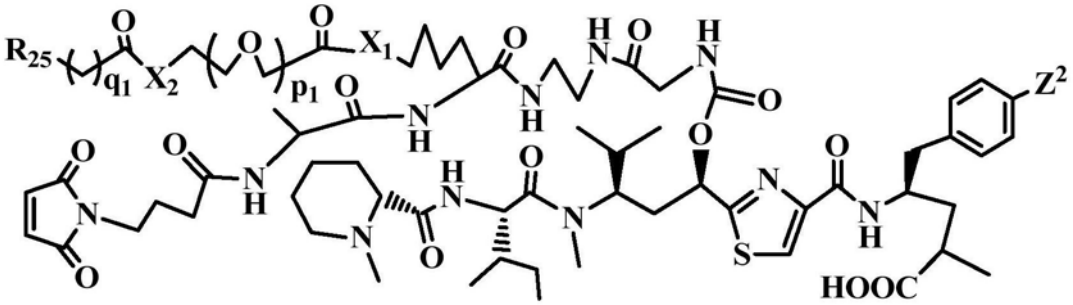
c-29,



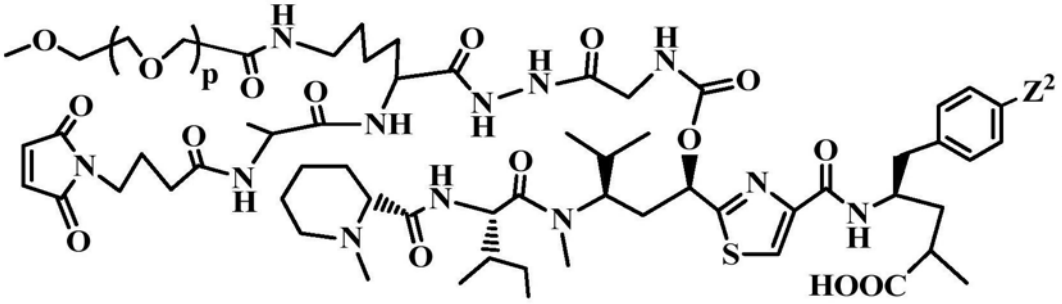
c-30,



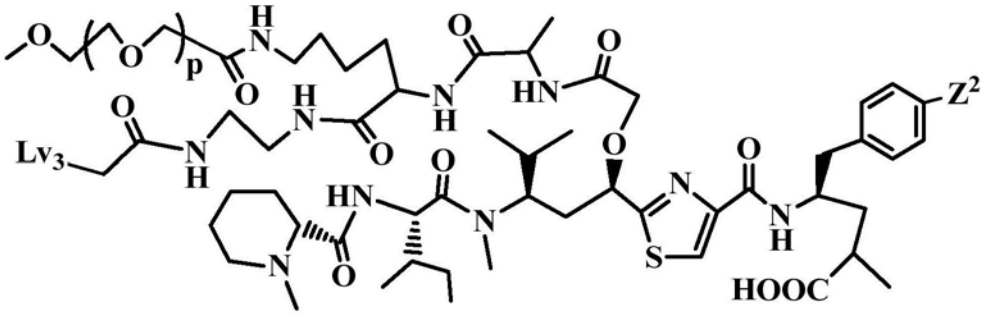
c-31,



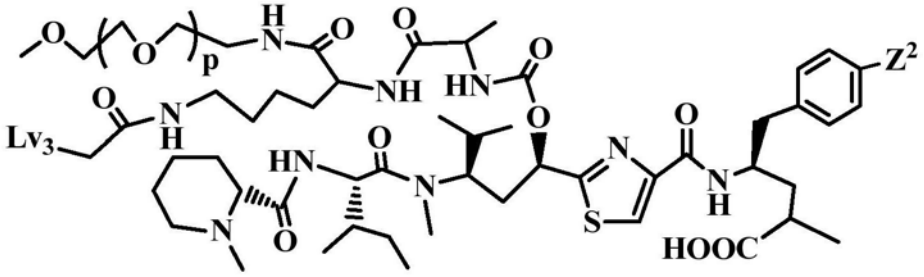
c-32,



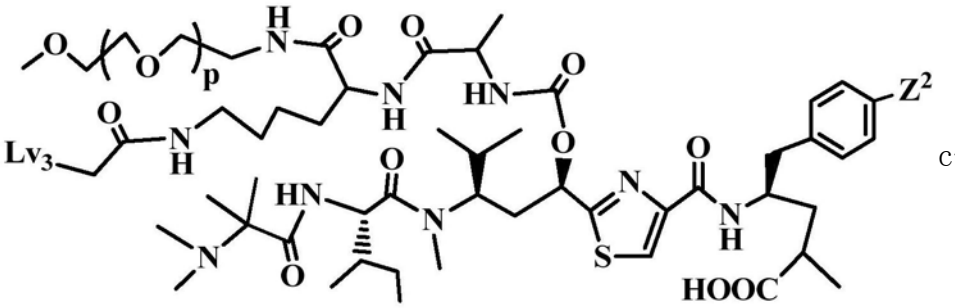
c-33,



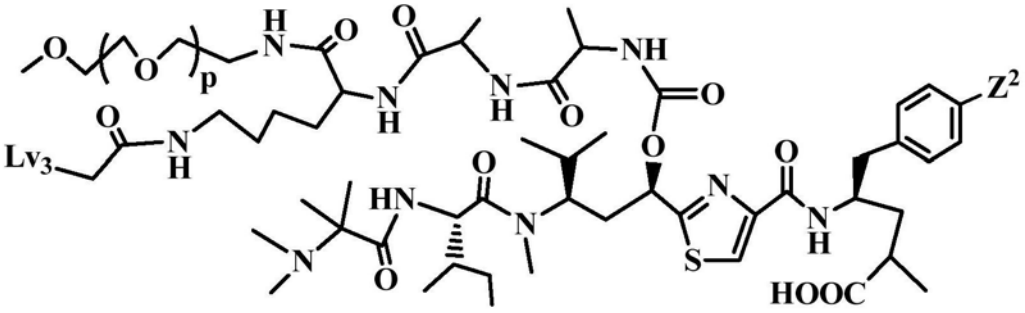
c-34,



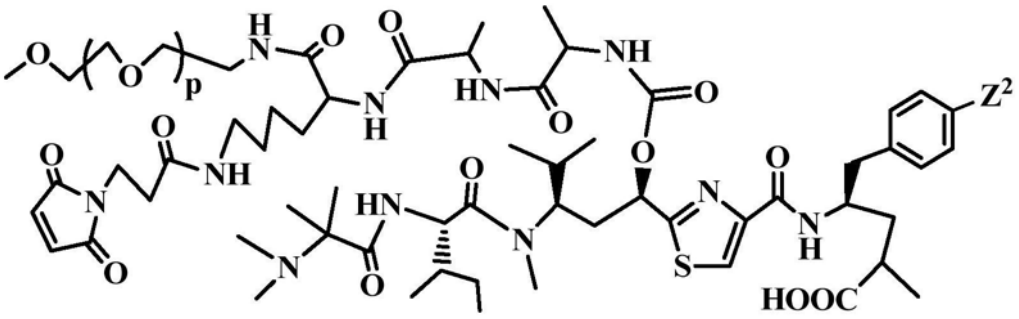
c-35,



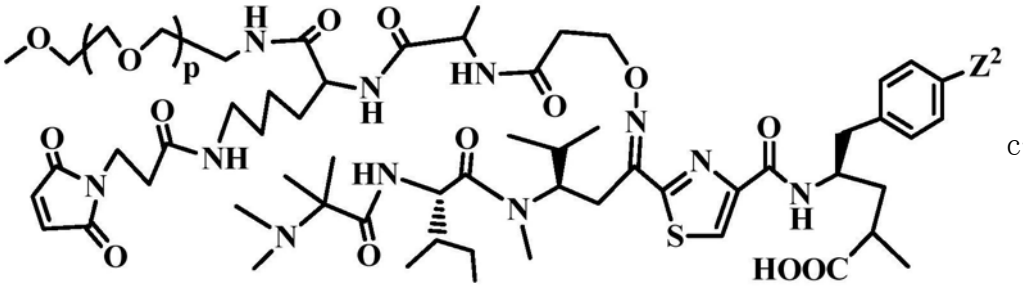
c-36,



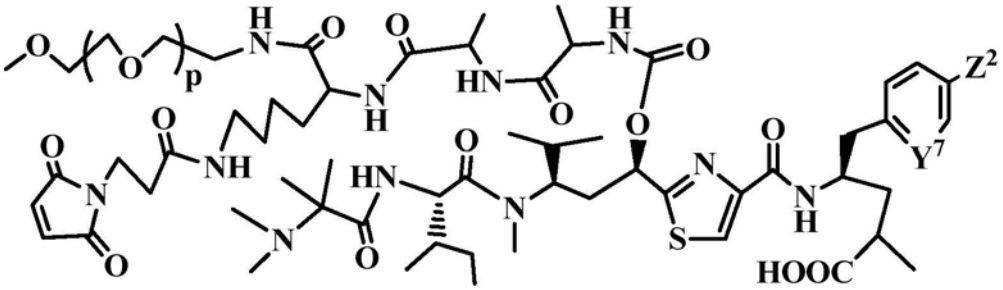
c-37,



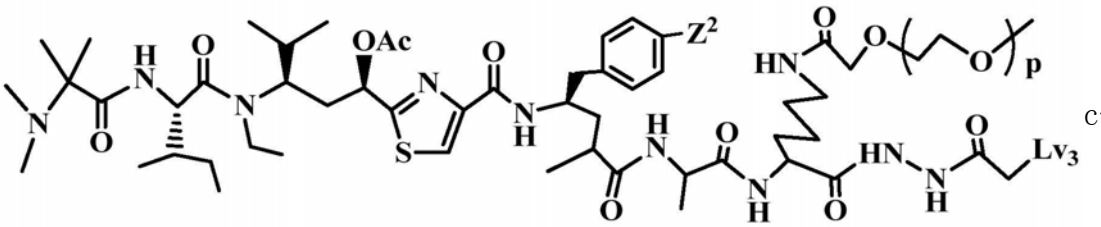
c-38,



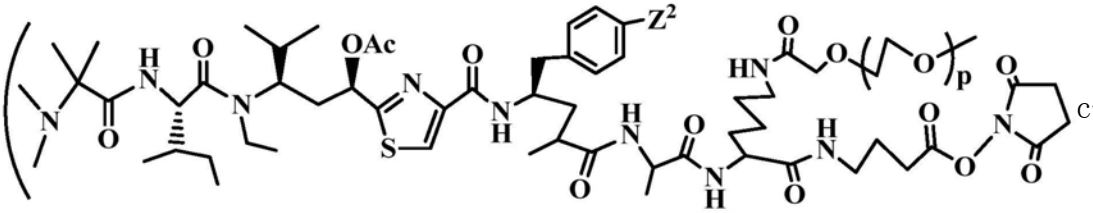
c-39,

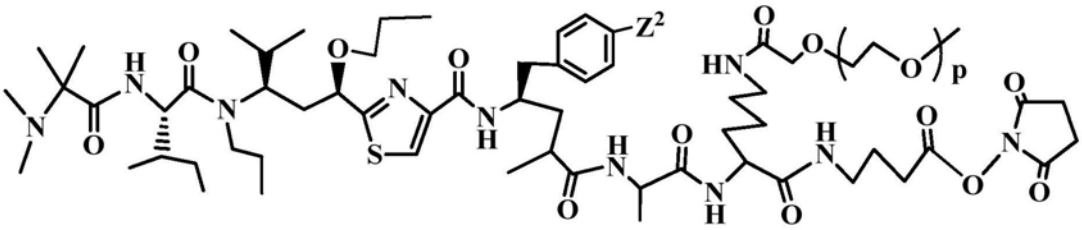


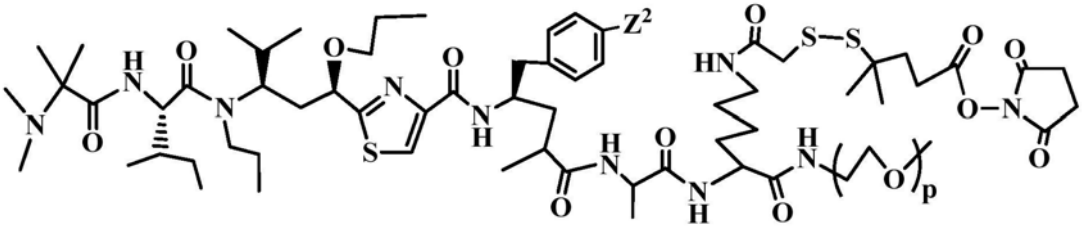
c-40,

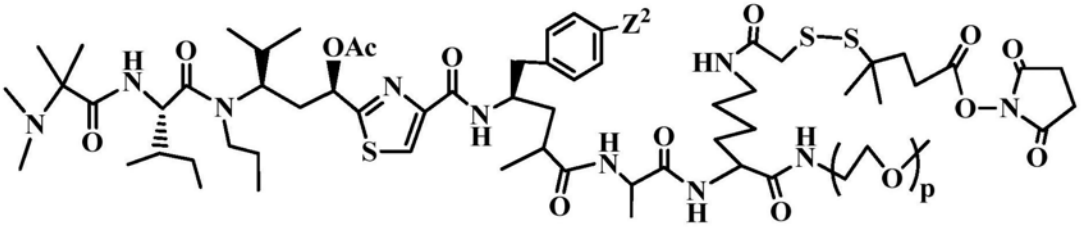


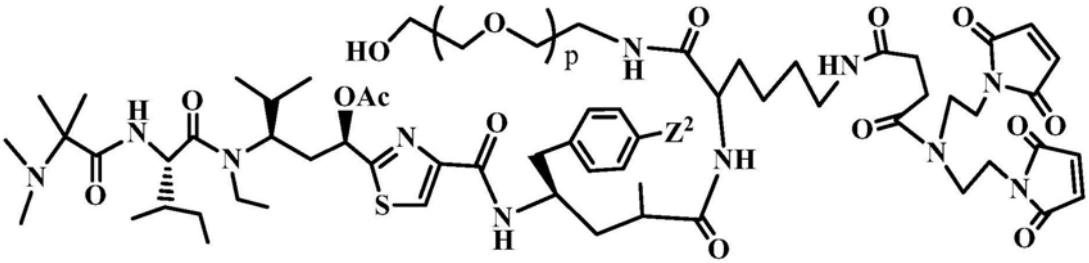
c-41,

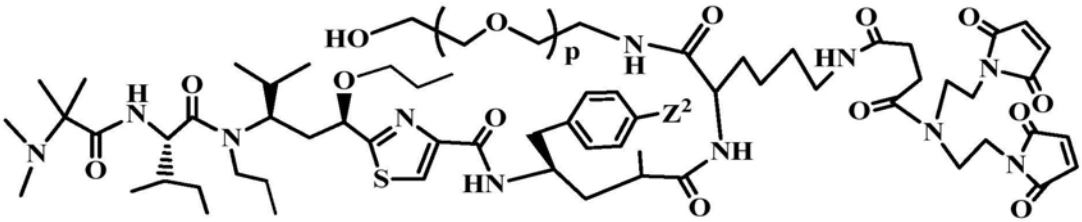

c-42,

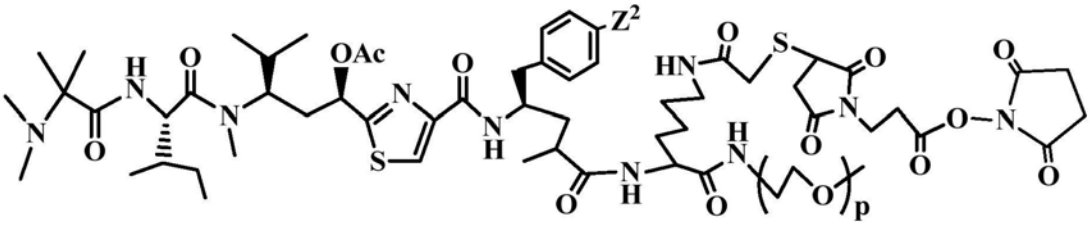

c-43,

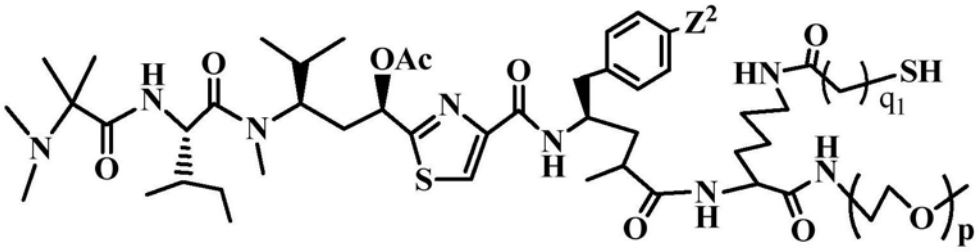

c-44,

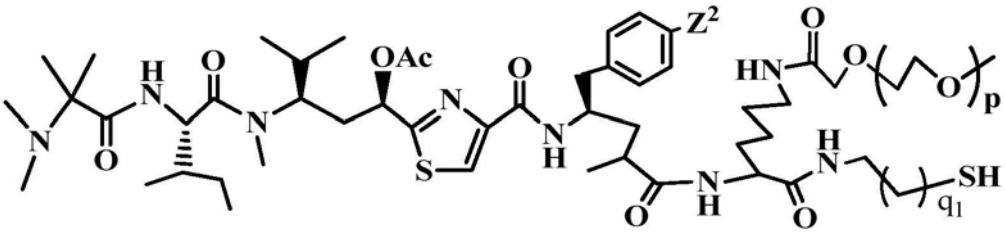

c-45,

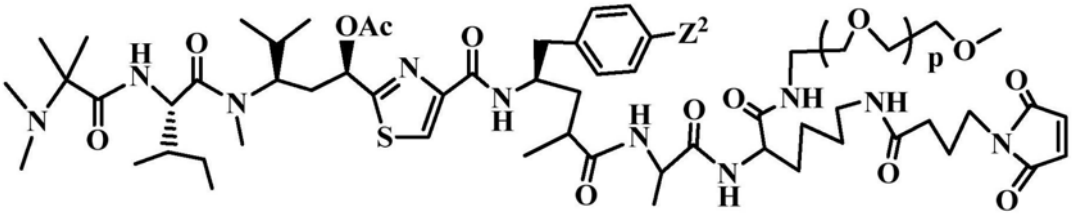

c-46,

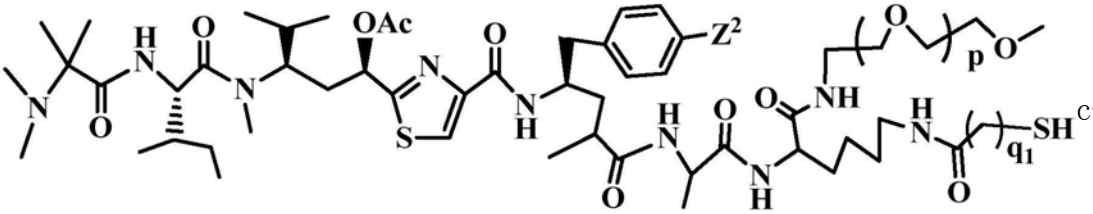

c-47,

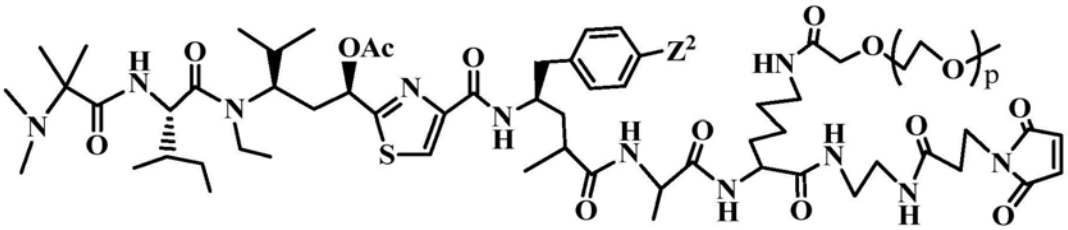

c-48,

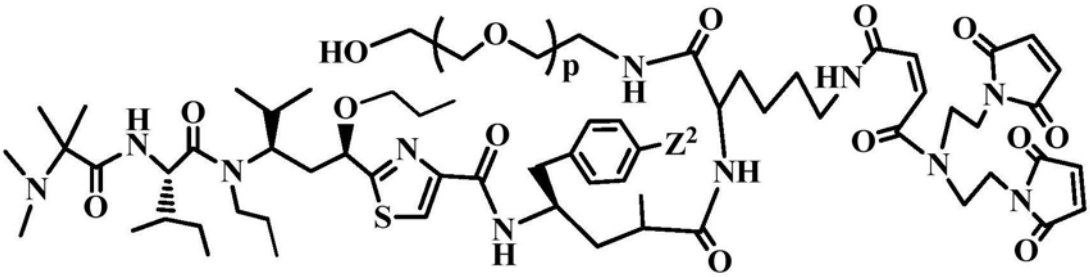

c-49,

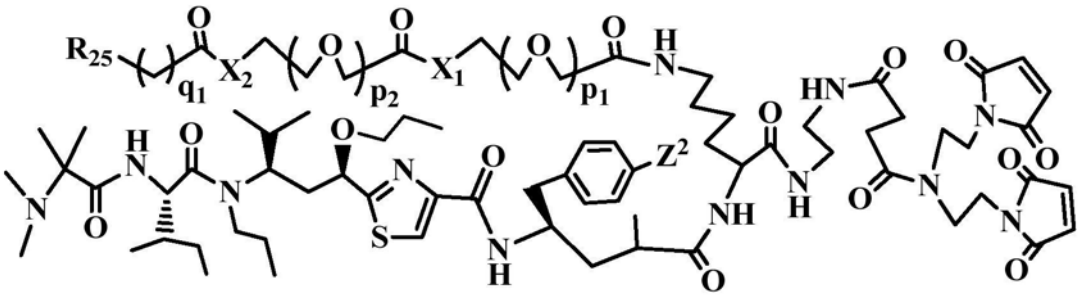

c-50,

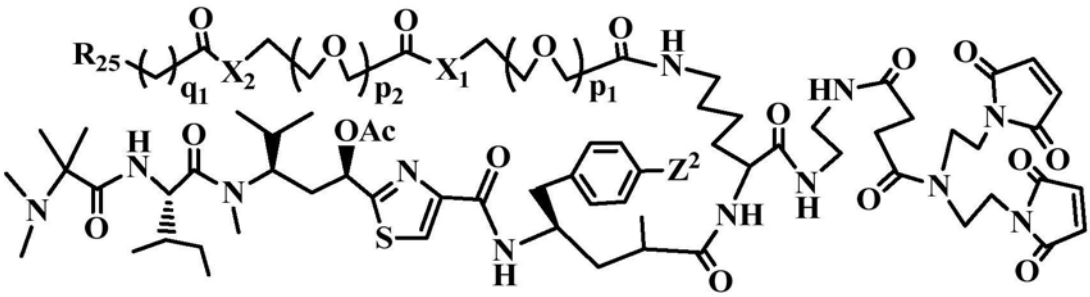

c-51,

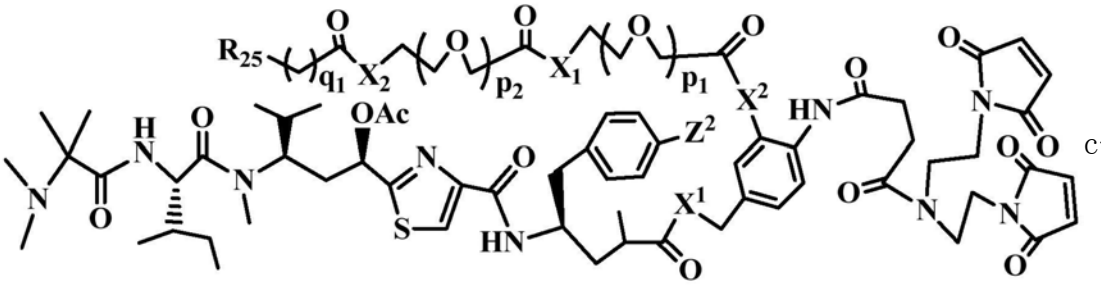

c-52,

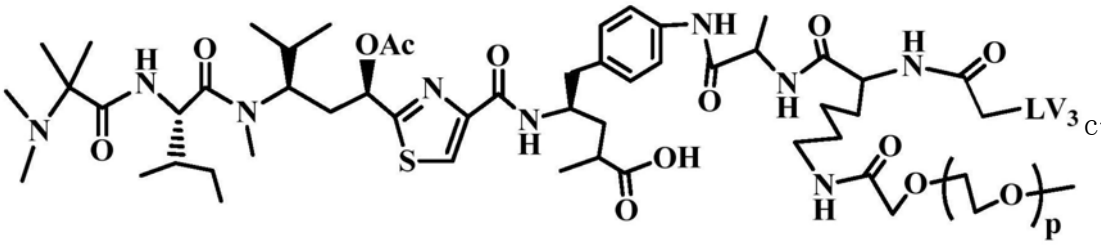

c-53,

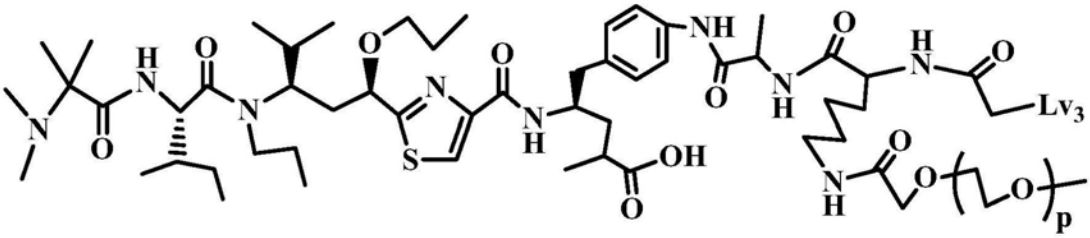

c-54,

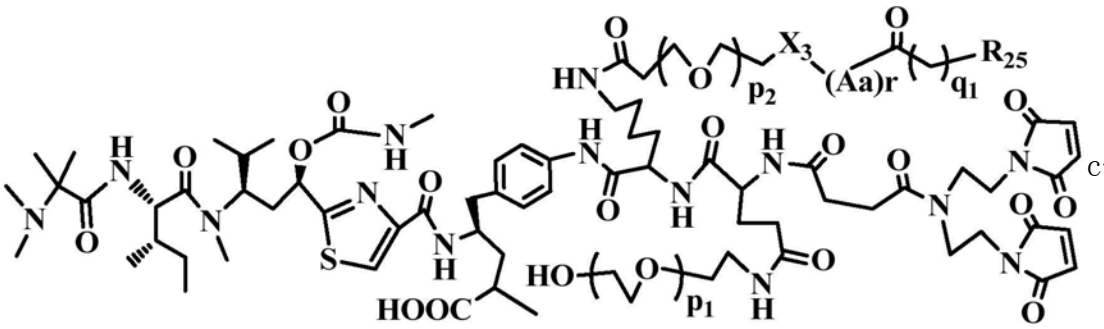

c-55,

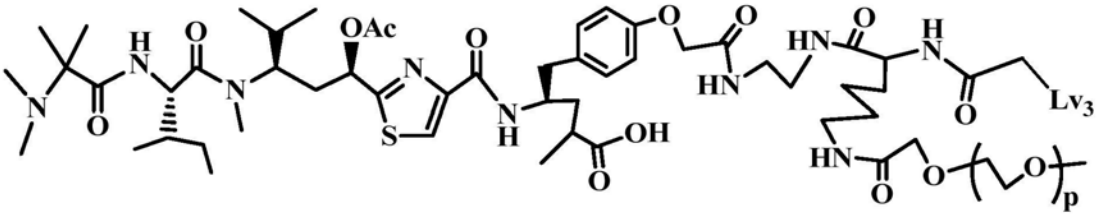

c-56,

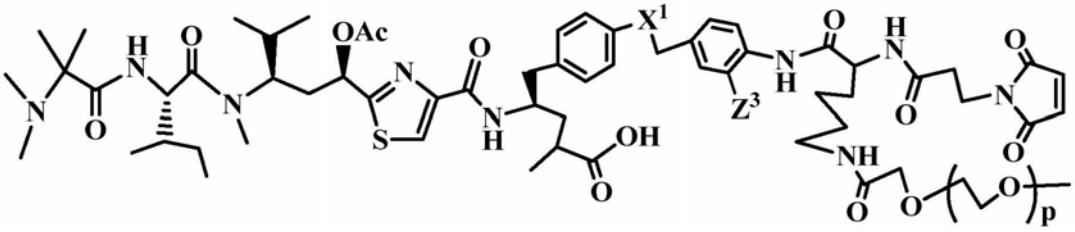

c-57,

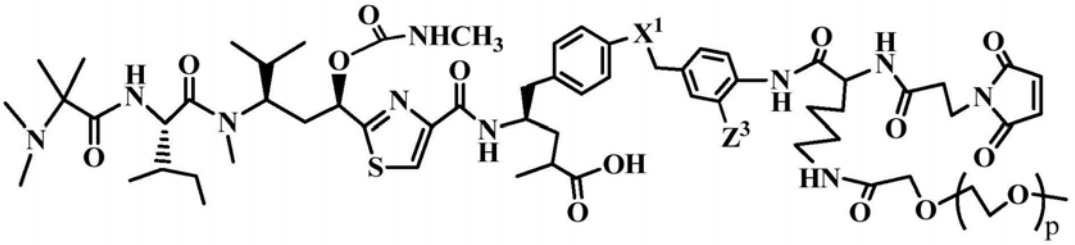

c-58,

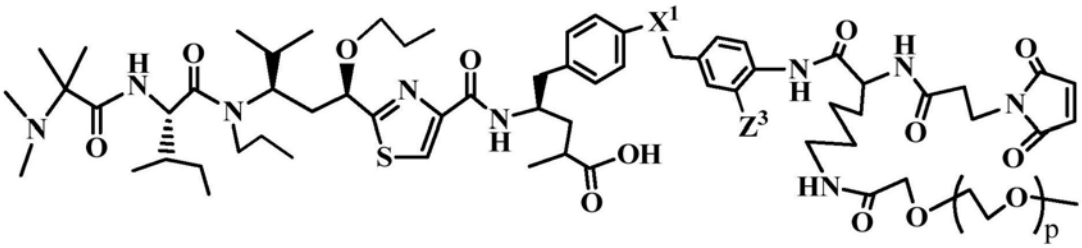

c-59,

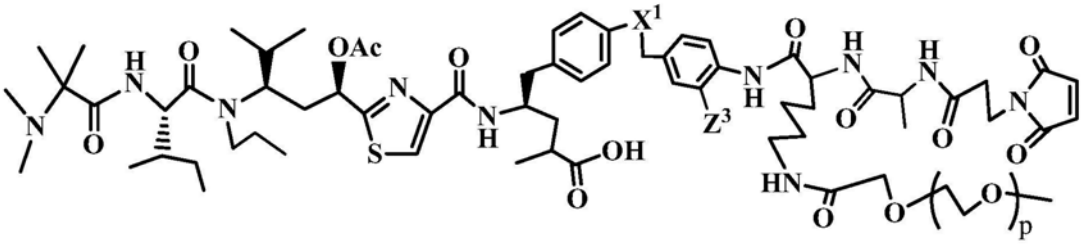

c-60,

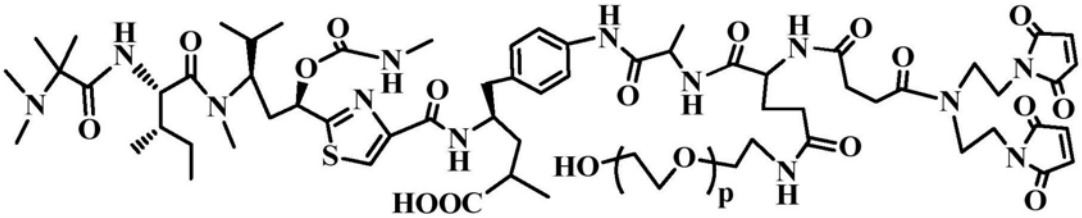

c-61,

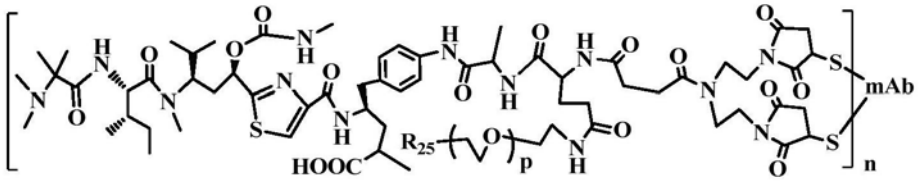

c-62,

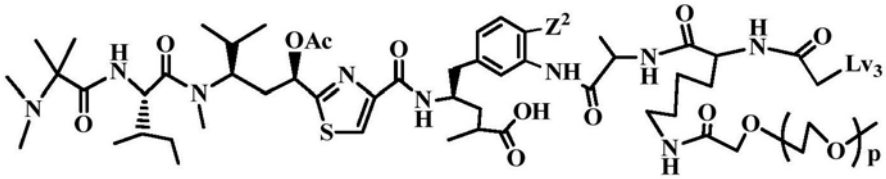

c-63,

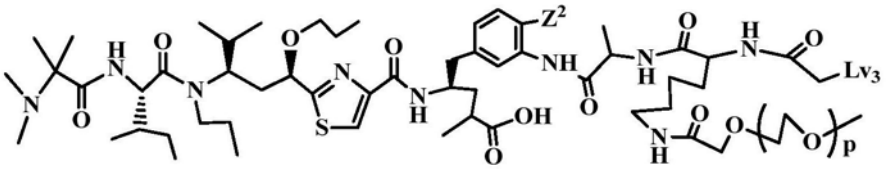

c-64,

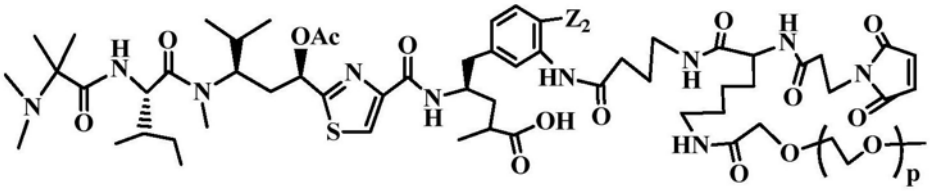

c-65,

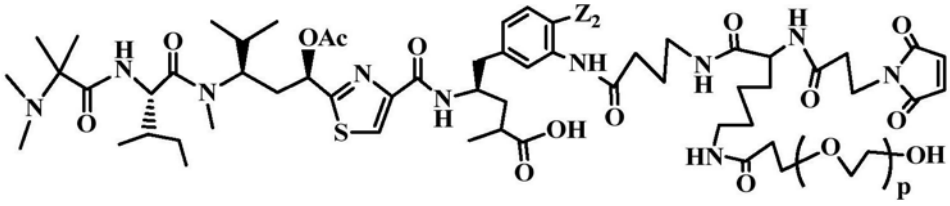

c-66,

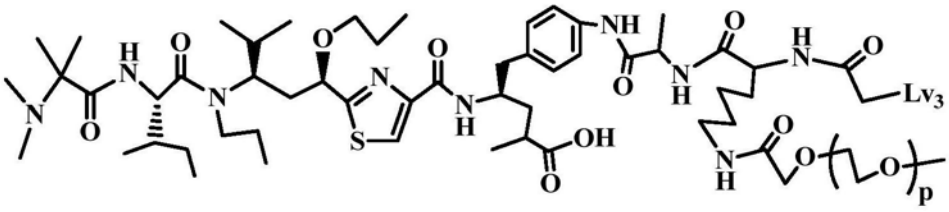

c-67,

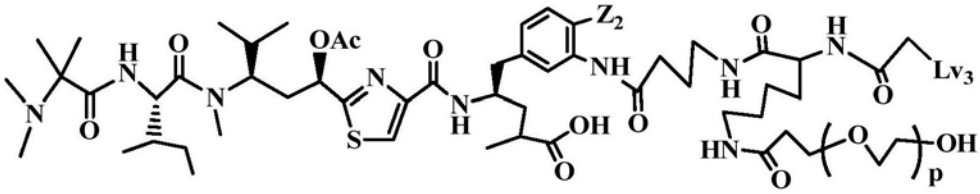

c-68,

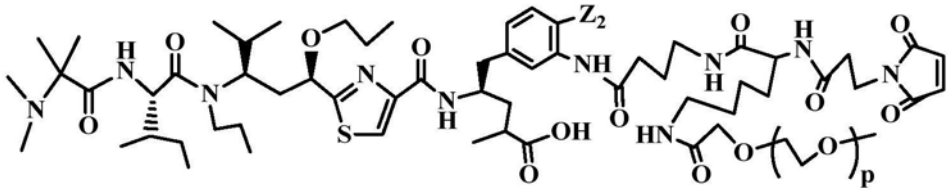

c-69,

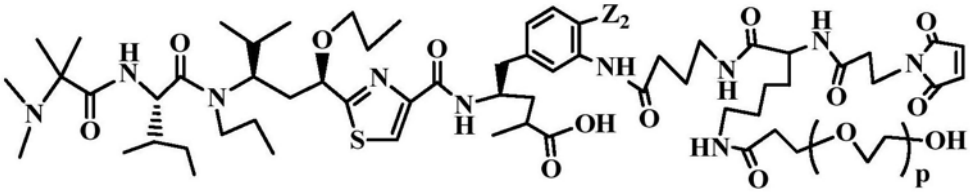

c-70,

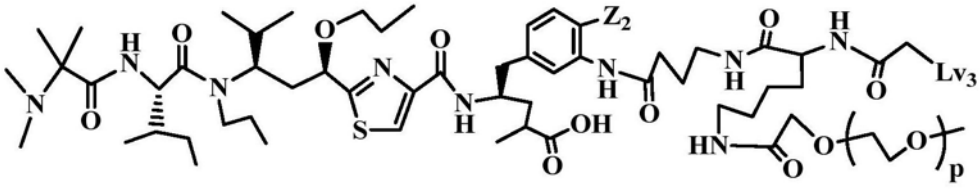

c-71,

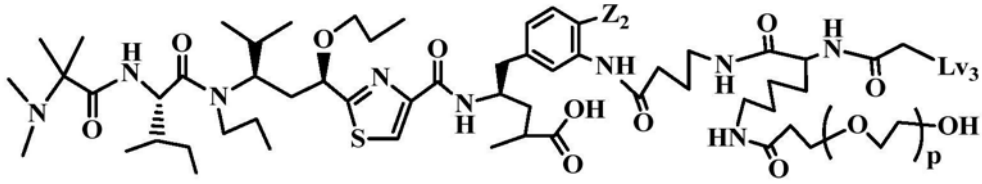

c-72,

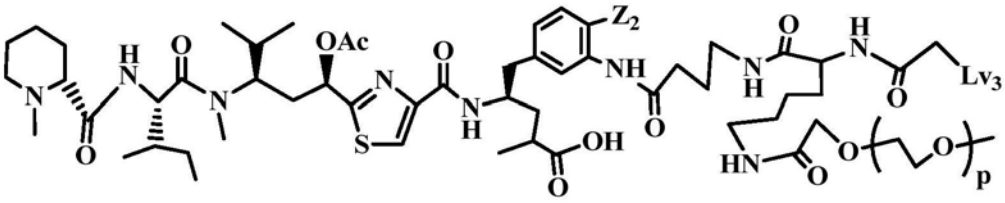

c-73,

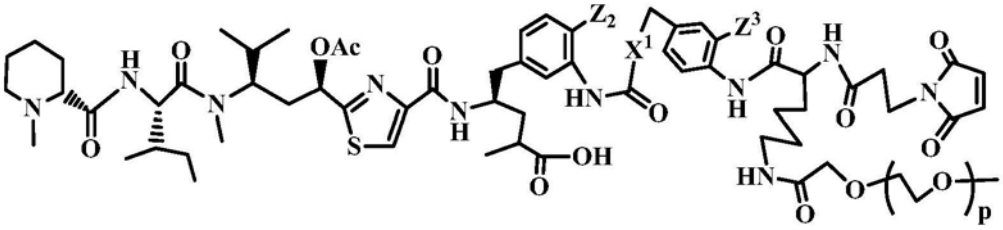

c-74,

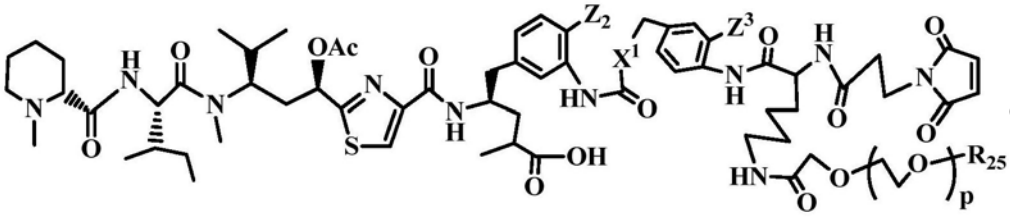

c-75,

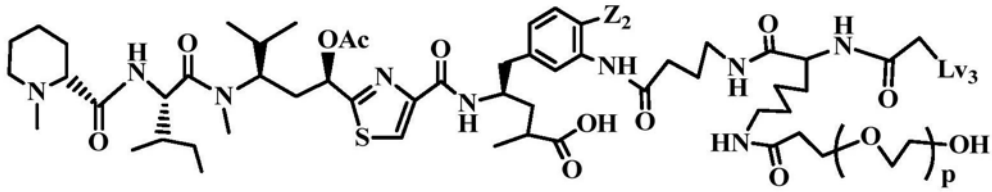

c-76,

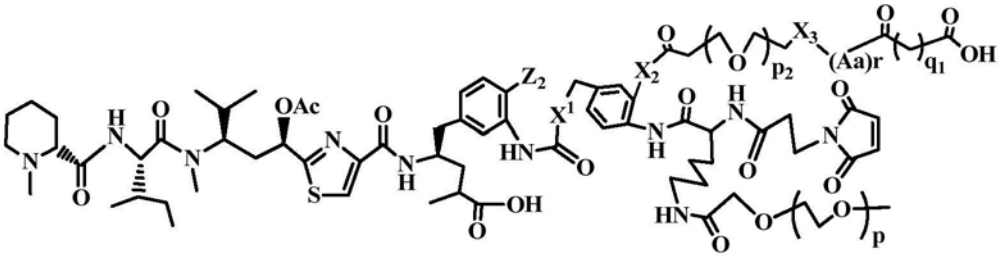

c-77,

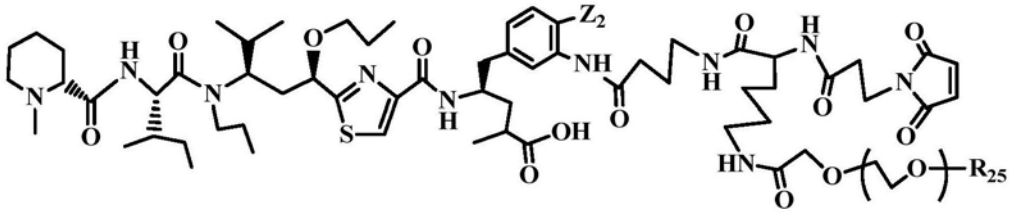

c-78,

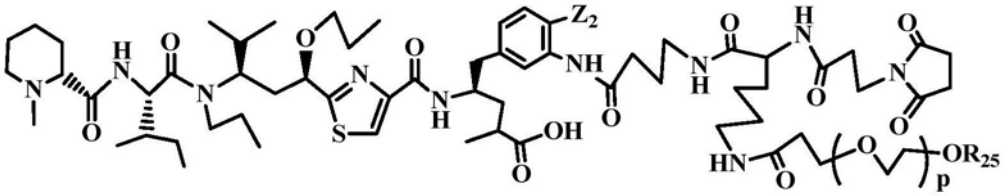

c-79,

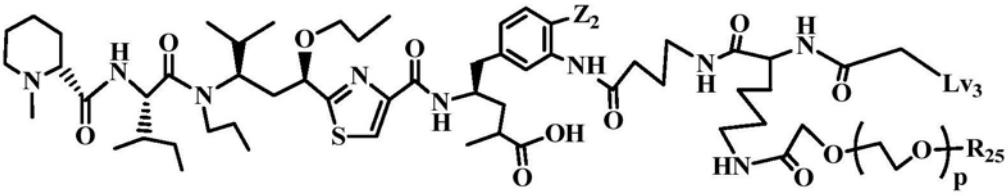

c-80,

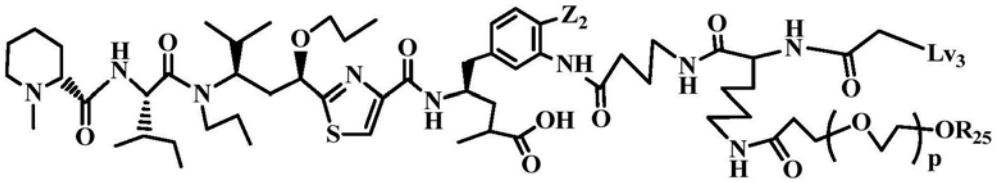

c-81,

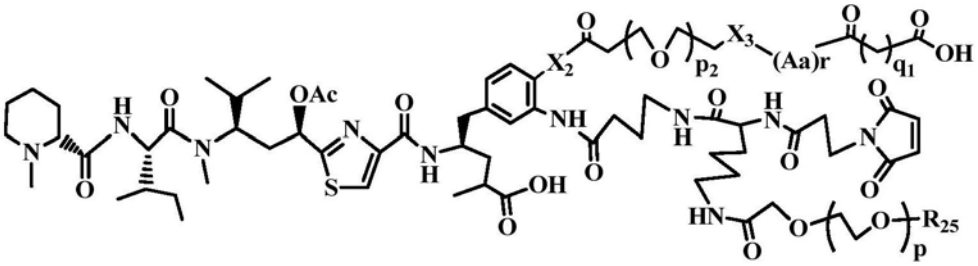

c-82,

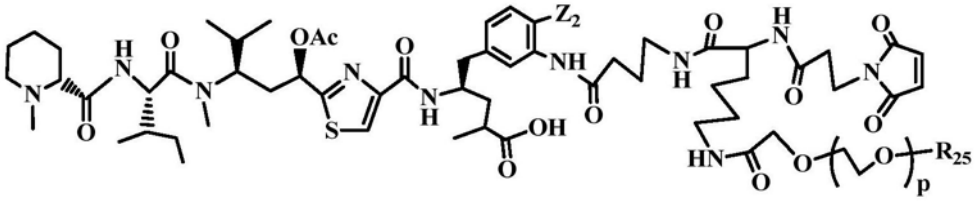

c-83,

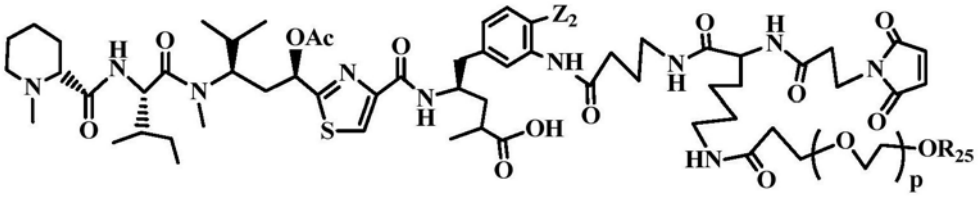

c-84,

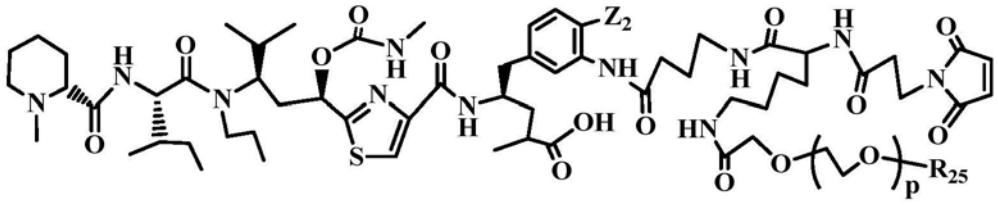

c-85,

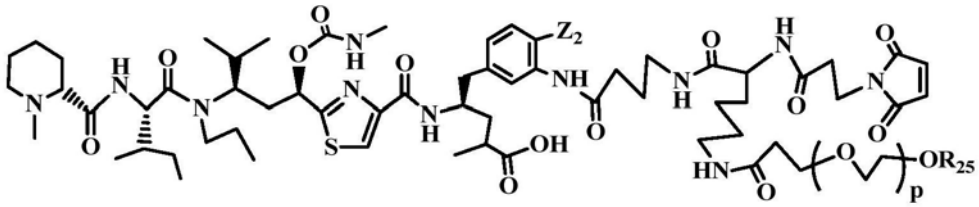

c-86,

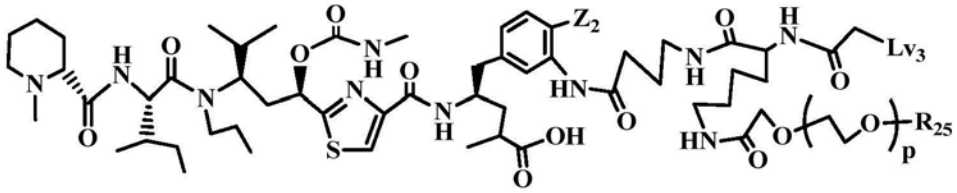

c-87,

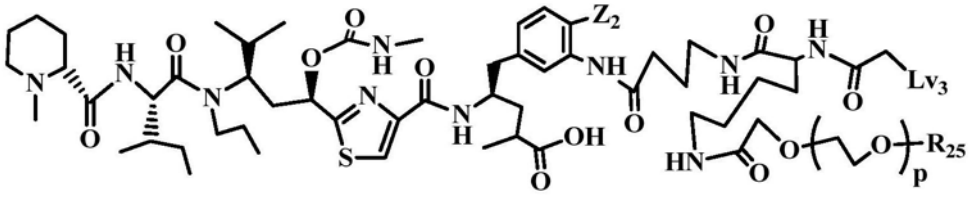

c-88,

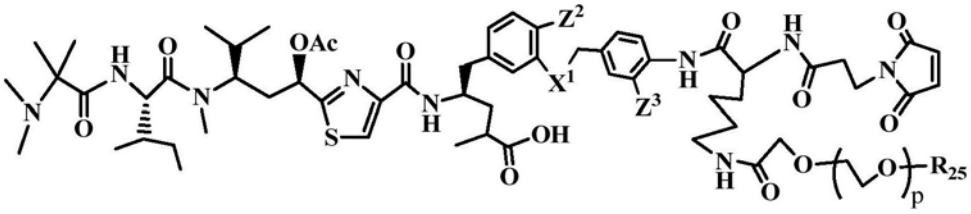

c-89,


c-90,

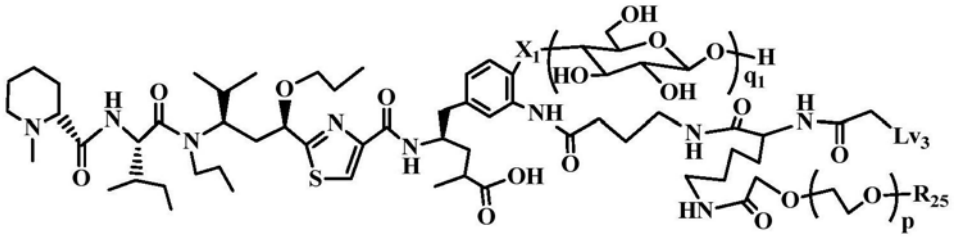

c-91,


c-92,

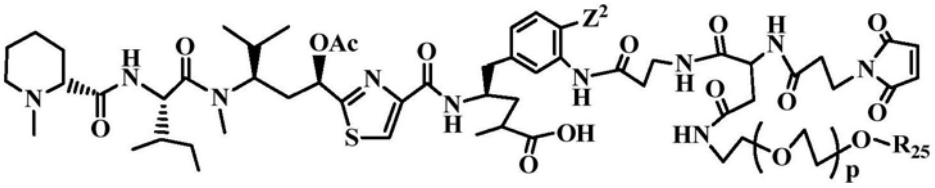

c-93,



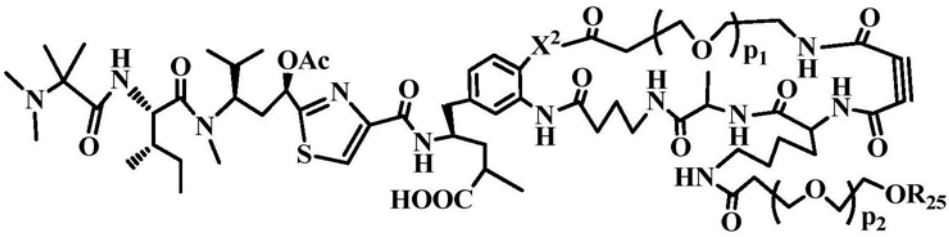
c-94,



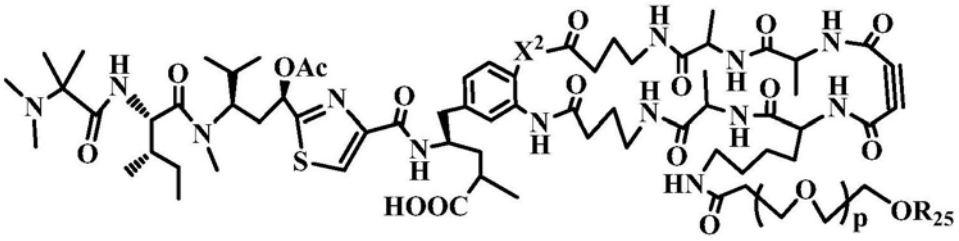
c-95,



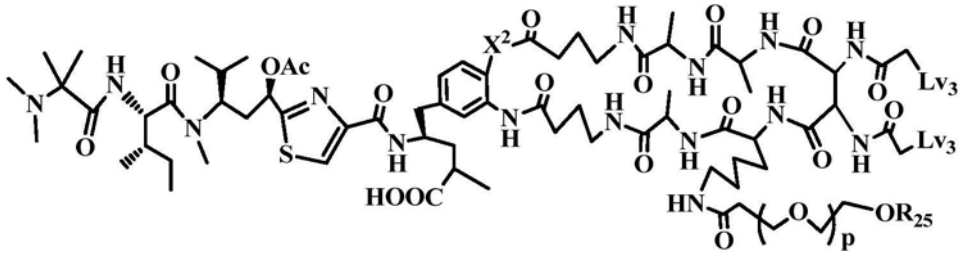
c-96,



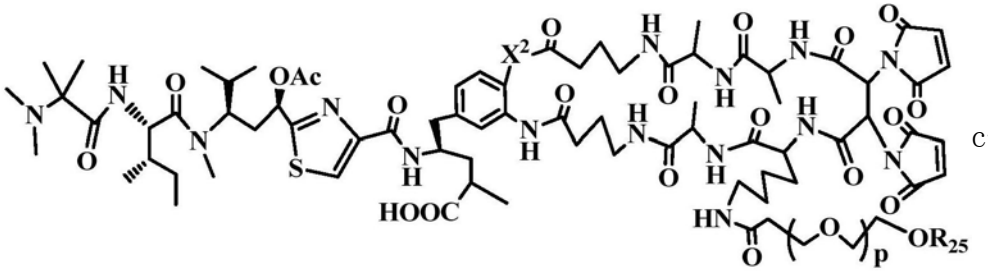
c-97,



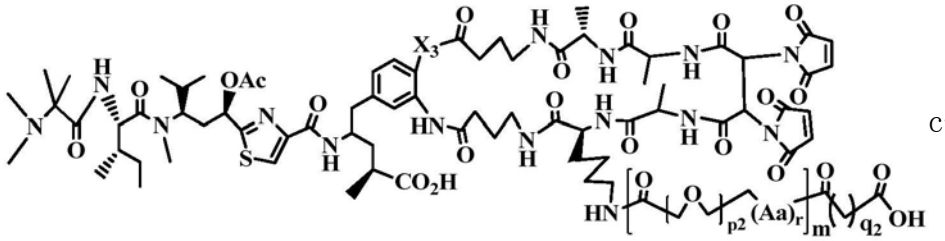
c-98,



c-99,



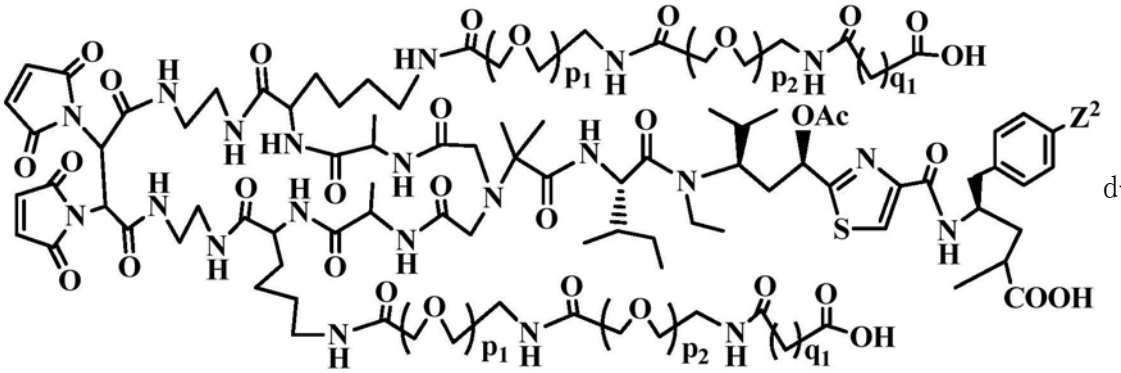
c-100,



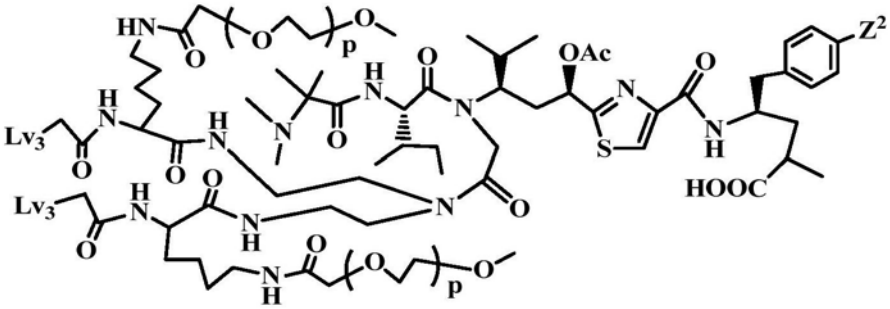
c-101

或是其药学上可接受的盐、水合物或水合盐；或这些化合物的多晶型结构；或其光学异构体、外消旋体、非对映异构体或对映异构体；其中X_1、X_2、X_3、Z_2、Z_3、p_1、p_2、p_3、q_1、q_2、Lv_3、$(Aa)_r$、R_{25}、R_{25}'及m定义如前文所述。

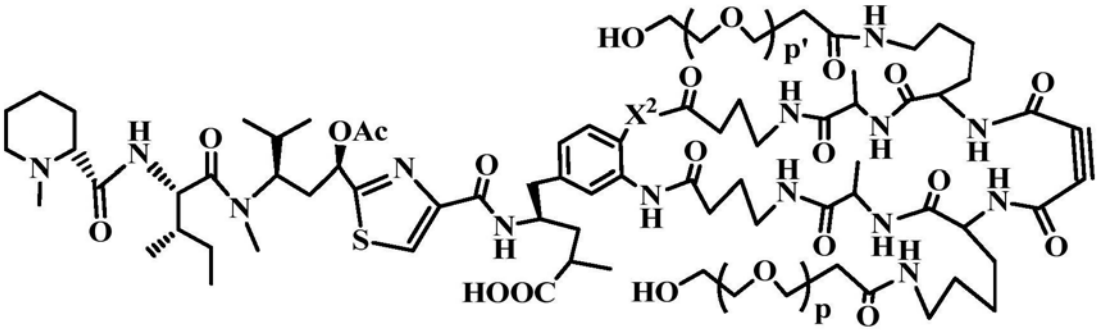
12.如权利要求4中所述的式(V)化合物具有以下结构：



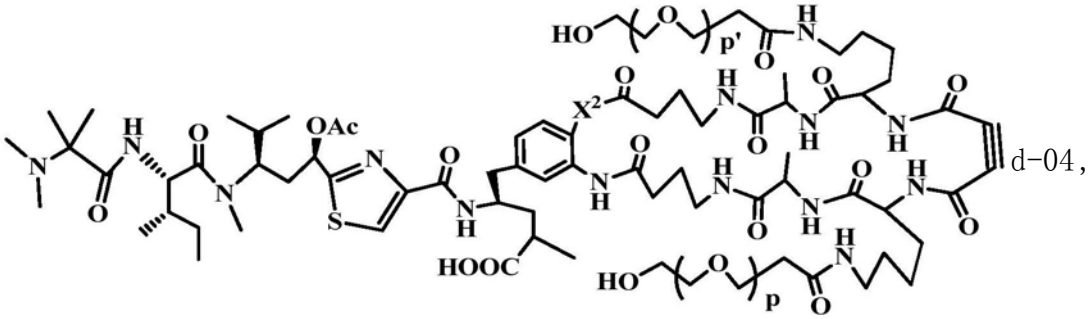
d-01,



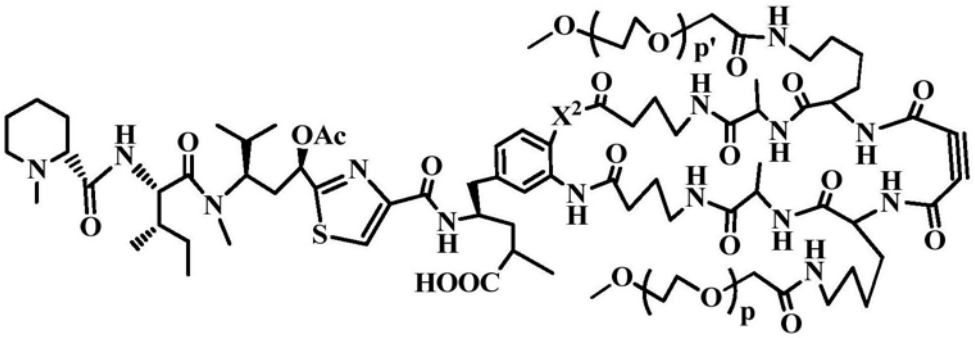
d-02,

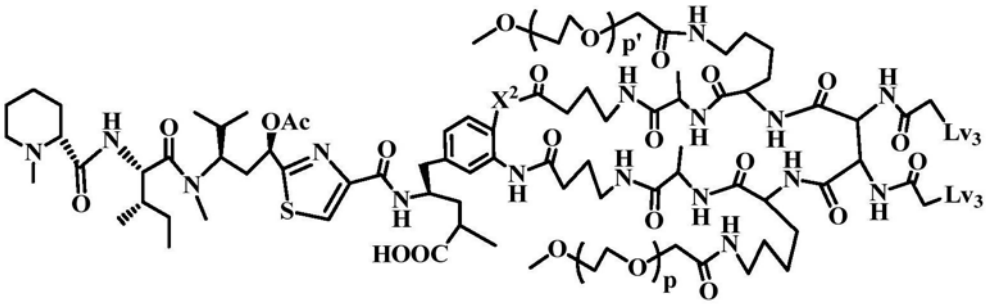


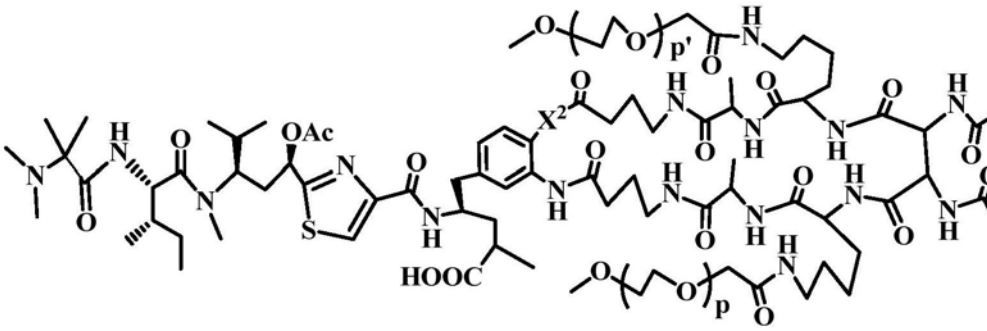
d-03,

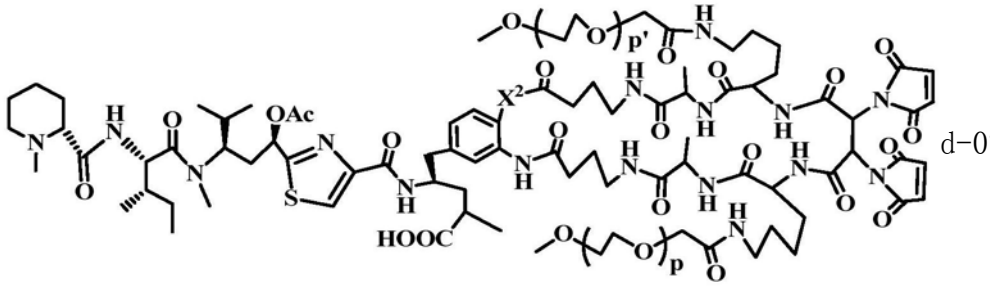


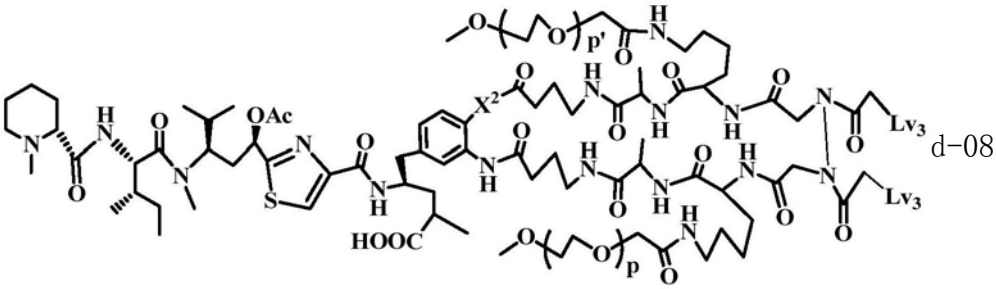
d-04,

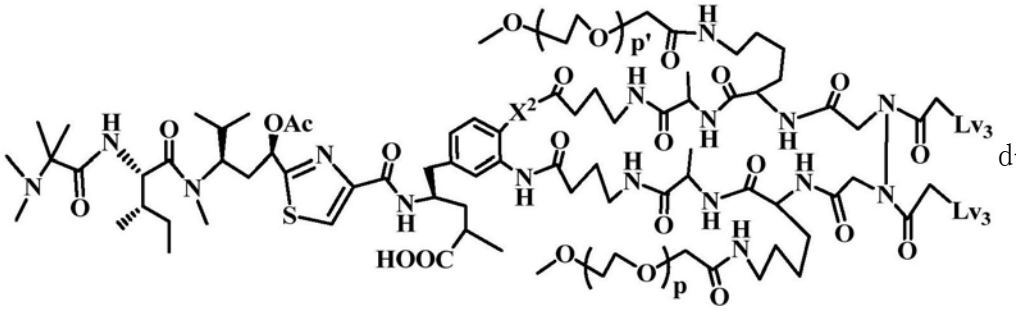

d-05,

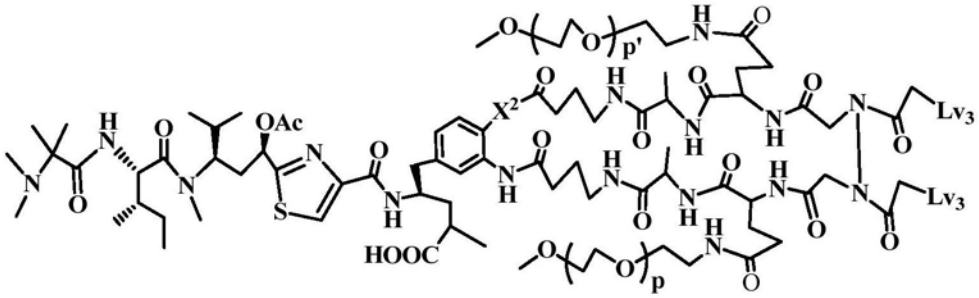

d-05,

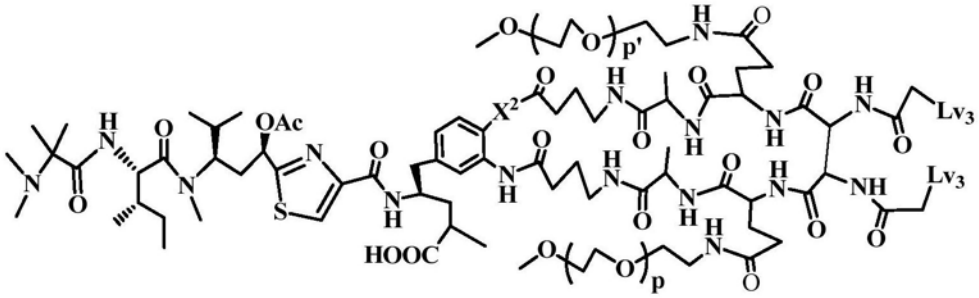

d-06,

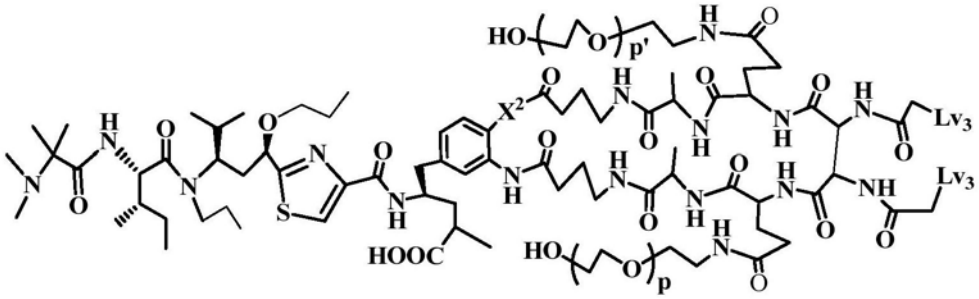

d-07,

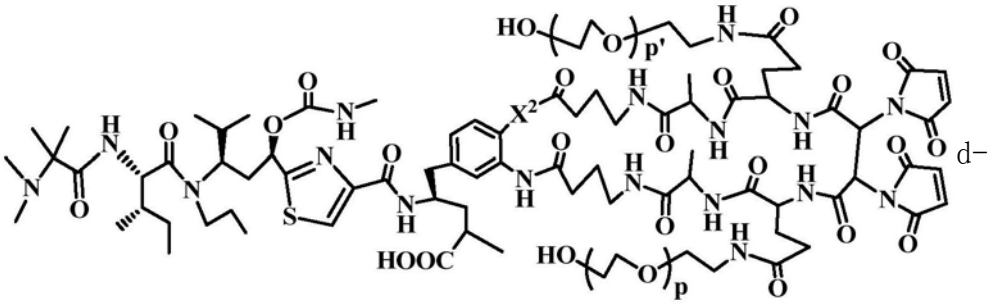

d-08,

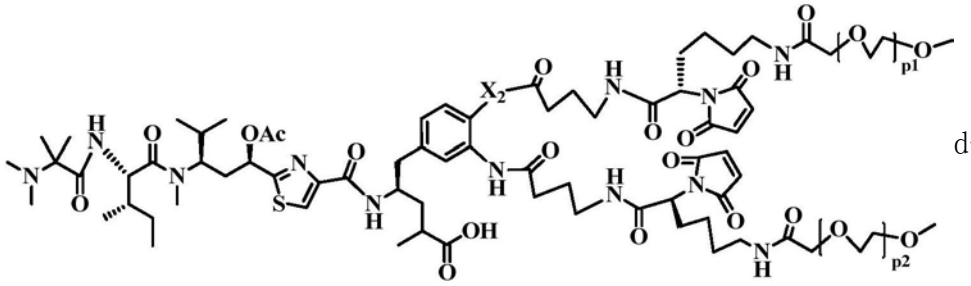

d-09,


d-10,

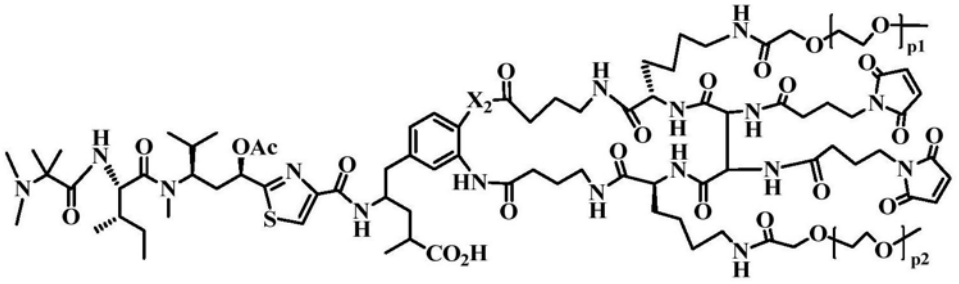

d-11,


d-12,

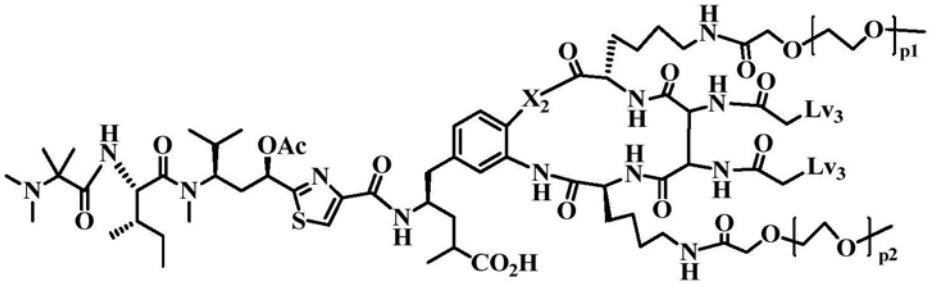

d-13,



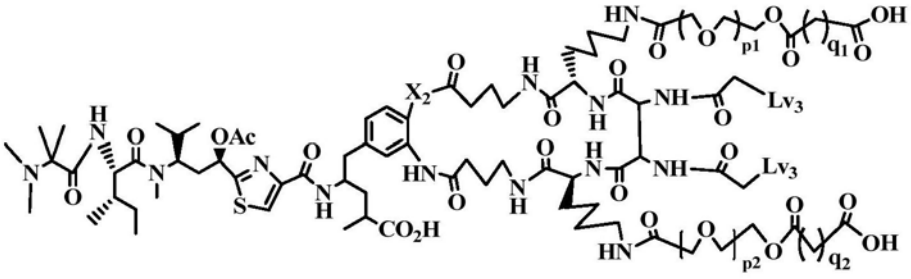
d-14,



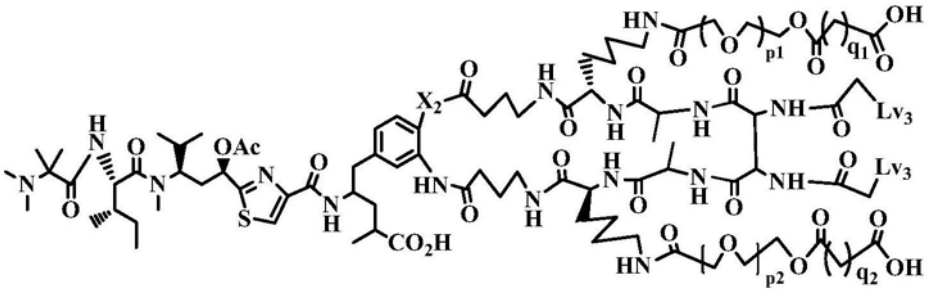
d-15,



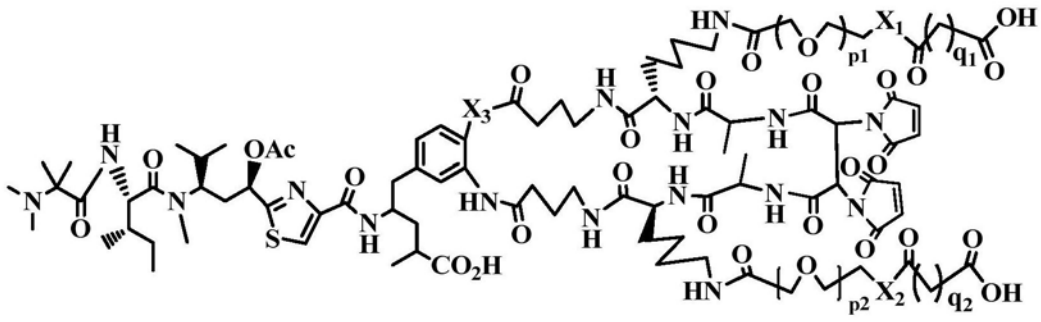
d-16,



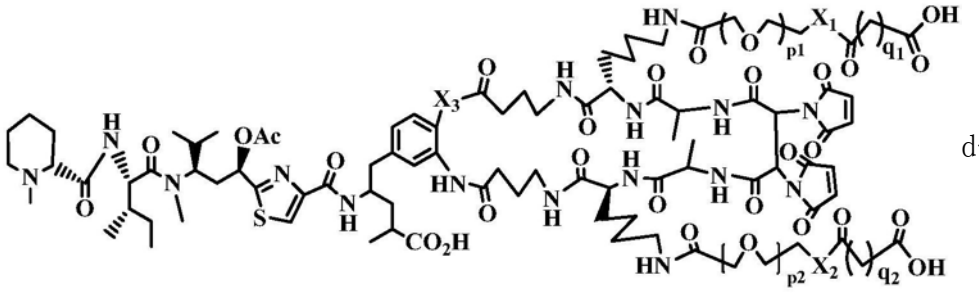
d-17,



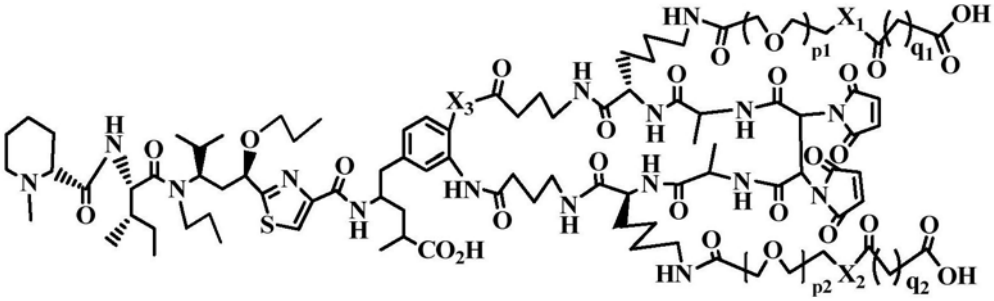
d-18,



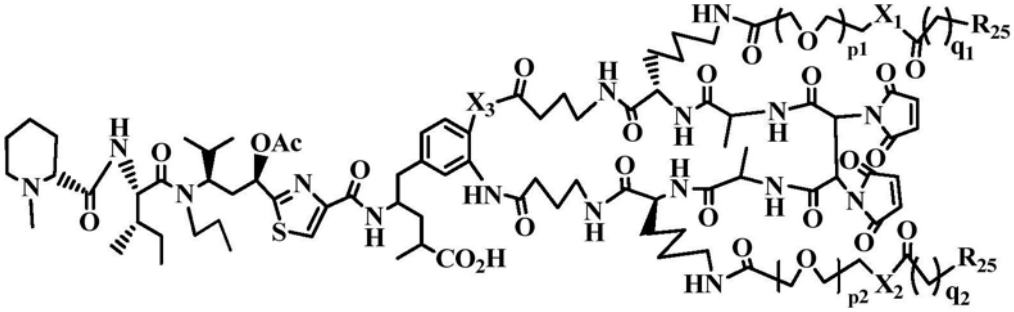
d-19,



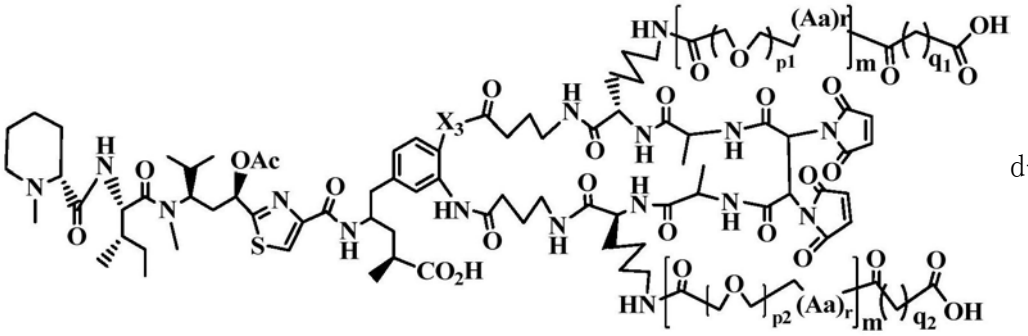
d-20,



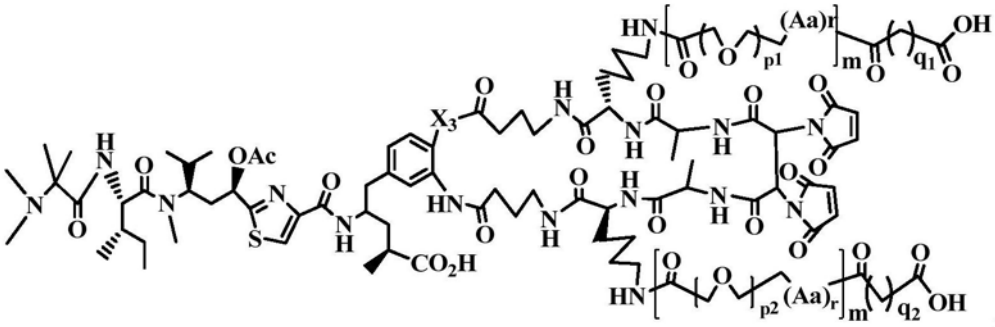
d-21,



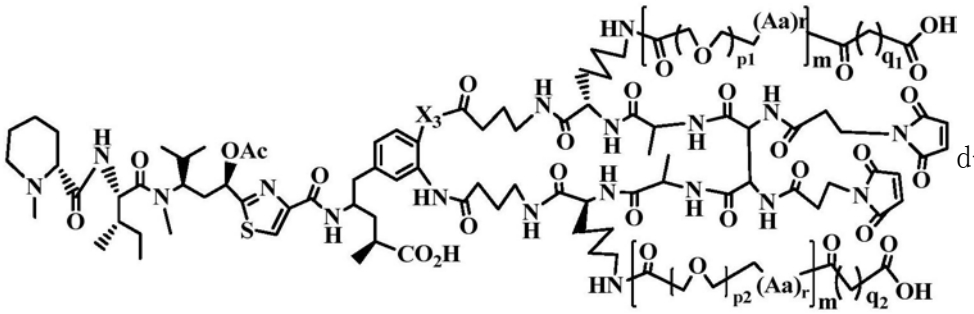
d-22,



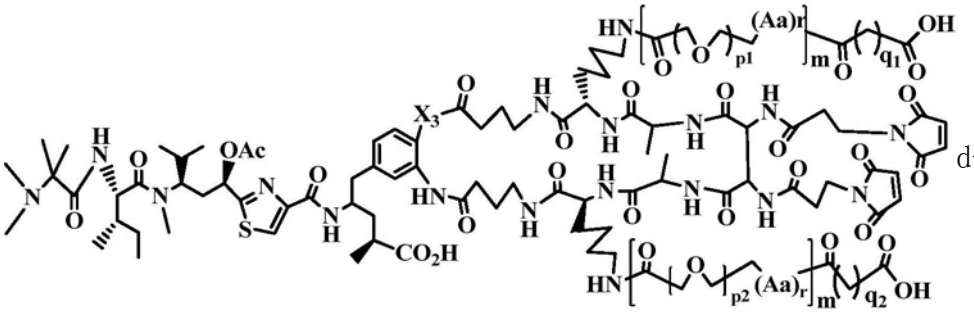
d-23,



d-24,



d-25,



d-26,

其中X_1、X_2、X_3、Z_2、Z_3、p_1、p_2、p_3、q_1、q_2、Lv_3、$(Aa)_r$、R_{25}、$R_{25'}$及m定义如前文所述。

13.如权利要求1,2,9或10中所述的细胞结合剂或细胞结合分子选自下列结构：

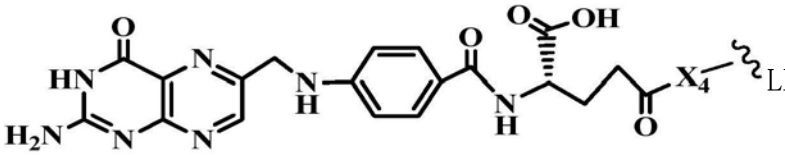
(A)由抗体、蛋白质、probody、纳米抗体、维生素(包括叶酸)、肽、聚合物胶束、脂质体、脂蛋白药物载体、纳米颗粒药物载体、树枝状大分子、和包覆或连接了细胞结合配体的上述分子或粒子,或以上的组合；

(B)类抗体蛋白、完整抗体(多克隆抗体,单克隆抗体,二聚体,多聚体)、多特异性抗体(例如双特异性、三特异性或四特异性抗体)、单链抗体、与靶细胞结合的抗体片段、单克隆抗体、单链单克隆抗体、结合靶细胞的单克隆抗体片段、嵌合抗体、结合靶细胞的嵌合抗体片段、结构域抗体、结合靶细胞的结构域抗体片段、表面修饰的抗体、单链表面修饰的抗体、结合靶细胞的表面修饰的抗体、人源化抗体、单链人源化抗体、结合靶细胞的单链人源化抗体、抗独特型(抗-Id)抗体、CDR、双价抗体、三价抗体、四价抗体、微型抗体、probody、probody片段、小免疫蛋白(SIP)、淋巴因子、激素、维生素、生长因子、集落刺激因子、营养转运分子、大分子量蛋白、融合蛋白、激酶抑制剂、基因靶向剂、经抗体或大分子量蛋白修饰的纳米微粒或聚合物。

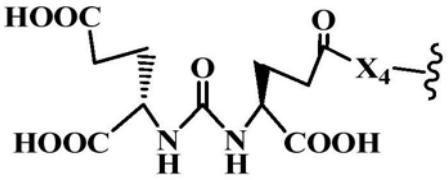
(C)选自以下的配体或受体激动剂:叶酸衍生物;谷氨酸脲衍生物;生长抑制素及其同系物,如奥曲肽(Sandostatin)和兰瑞肽(Somatuline);芳香磺酰胺;垂体腺苷酸环化酶启动肽(PACAP)(PAC1);血管活肠肽(VIP)(VPAC1,VPAC2);α-黑素细胞刺激素(α-MSH);胆囊收缩素(CCK)或胃泌素;铃蟾肽(Pyr-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH_2)或胃泌素释放肽(GRP);神经降压素受体(NTR1,NTR2,NTR3);物质P;神经肽Y(Y1-Y6);归巢肽包括RGD(Arg-Gly-Asp)、NGR(Asn-Gly-Arg)、二聚和多聚环状RGD肽(如cRGDfV)、TAASGVRSMH或LTLRWVGLMS(硫酸软骨素蛋白多糖NG2受体配体)和F3肽;细胞穿透肽(CPPs);肽激素,例如促黄体激素释放激素(LHRH)的激动剂和拮抗剂,促性腺激素释放激素(GnRH)激动剂,通过靶向卵泡刺激素(FSH)和促黄体激素(LH)以及睾酮产生而作用,如布舍瑞林(Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(OtBu)-Leu-Arg-Pro-NHEt)、戈那瑞林(Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH2)、戈舍瑞林(Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser

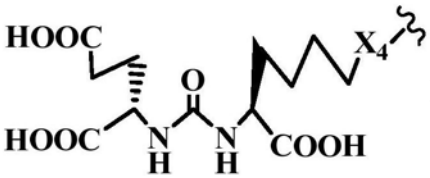
(OtBu)-Leu-Arg-Pro-AzGly-NH_2)、组氨瑞林(Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-His(N-Bn)-Leu-Arg-Pro-NHEt)、亮丙瑞林(Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt)、那法瑞林(Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-2Nal-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2)、曲普瑞林(Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2)、纳法瑞林、地洛林、阿贝瑞林(Ac-D-2Nal-D-4-chloroPhe-D-3-(3-pyridyl)Ala-Ser-(N-Me)Tyr-D-Asn-Leu-isopropylLys-Pro-DAla-NH_2)、西曲瑞克(Ac-D-2Nal-D-4-chloro-Phe-D-3-(3-pyridyl)Ala-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH2)、地加瑞克(Ac-D-2Nal-D-4-chloroPhe-D-3-(3-pyridyl)Ala-Ser-4-aminoPhe(L-hydroorotyl)-D-4-aminoPhe(carba-moyl)-Leu-isopropylLys-Pro-D-Ala-NH_2)和甘乃利(Ac-D-2Nal-D-4-chloroPhe-D-3-(3-pyridyl)Ala-Ser-Tyr-D-(N9,N10-diethyl)-homoArg-Leu-(N9,N10-diethyl)-homoArg-Pro-D-Ala-NH_2)；模式识别受体(PRRs)，如Toll样受体(TLRs)配体、C型凝集素和结节状的受体(NLRs)配体；降钙素受体；整合素受体及其受体子类(如αVβ1,αVβ3,αVβ5,αVβ6,α6β4,α7β1,αLβ2,αIIbβ3等)激动剂(选自GRGDSPK、环(RGDfV)(L1)及其衍生物(环(-N(Me)R-GDfV)、环(R-Sar-DfV)、环-(RG-N(Me)D-fV)、环(RGD-N(Me)fV)、环(RGDf-N(Me)V-)(西仑吉肽))；纳米抗体(VHH衍生物(骆驼科动物Ig))；结构域抗体(dAb,VH或VL结构域的衍生物)；双特异性T细胞接头(BiTE,双特异性双抗体)；双重亲和力复位向抗体(DART,双特异性二价抗体)；四价串联抗体(TandAb,二聚的双特异性二价抗体)；Anticalin(Lipocalins的衍生物)；Adnectin(第10个FN3(纤连蛋白))；设计的锚蛋白重复蛋白(DARPins)；Avimer；EGF受体或VEGF受体的激动剂。

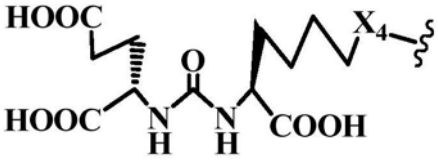
(D)下列小分子细胞结合分子/配体或细胞受体激动剂：LB01(叶酸)、LB02(PMSA配体)、LB03(PMSA配体)、LB04(PMSA配体)、LB05(生长抑制素)、LB06(生长抑制素)、LB07(奥曲肽、生长抑制素同系物)、LB08(兰瑞肽、生长抑制素同系物)、LB09(伐普肽(Sanvar)、生长抑制素同系物)、LB10(CAIX配体)、LB11(CAIX配体)、LB12(胃泌素释放肽受体(GRPr)、MBA)、LB13(促黄体激素释放激素(LH-RH)和GnRH配体)、LB14(促黄体激素释放激素(LH-RH)和GnRH配体)、LB15(GnRH拮抗剂、Abarelix)、LB16(钴胺素、维生素B12同系物)、LB17(钴胺素、维生素B12同系物)、LB18(用于αvβ3整联蛋白受体、环状RGD五肽)、LB19(VEGF受体的异二价肽配体)、LB20(神经髓质素B)、LB21(蛙皮素，作用于G蛋白偶联受体)、LB22(TLR2，作用于类Toll受体)、LB23(作用于雄性激素受体)、LB24(西仑吉肽或环(-RGDfV-)结合物，作用于αv整合素受体)LB25(利福布汀同系物)、LB26(利福布汀同系物)、LB27(利福布汀同系物)、LB28(氟氢可的松)、LB29(地塞米松)、LB30(丙酸氟替卡松)、LB31(丙酸倍氯米松)、LB32(醋酸曲安奈德)、LB33(泼尼松龙)、LB35(甲基强的松龙)、LB36(倍他米松)、LB37(伊立替康同系物)、LB38(克唑替尼同系物)、LB39(硼替佐米同系物)、LB40(卡菲佐米同系物)、LB41(卡非佐米同系物)、LB42(亮丙瑞林同系物)、LB43(曲普瑞林同系物)、LB44(克林霉素)、LB45(利拉鲁肽同系物)、LB46(半长春新碱同系物)、LB47(瑞他帕林同系物)、LB48(丁布尔同系物)、LB49(长春碱同系物)、LB50(利西森肽同系物)、LB51(奥西丁尼同系物)、LB52(核苷同系物)、LB53(厄洛替尼同系物)和LB5 4(拉帕替尼同系物)，其结构如下所示：

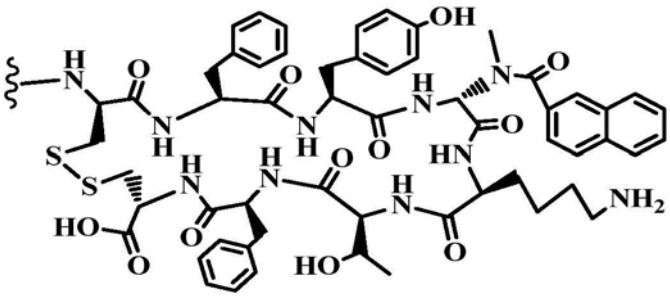


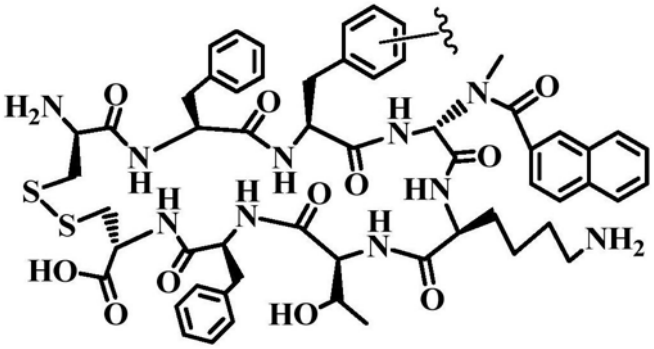
LB01(叶酸偶联物)，

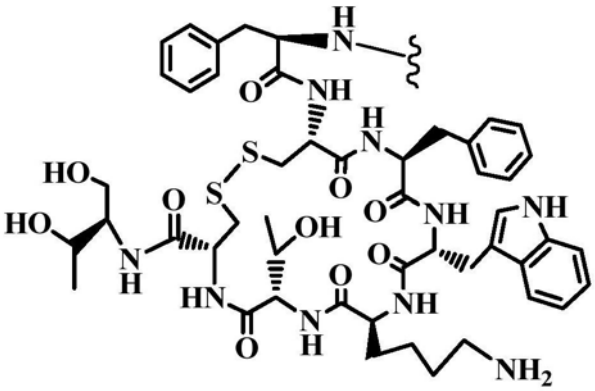

LB02(PMSA配体偶联物)，

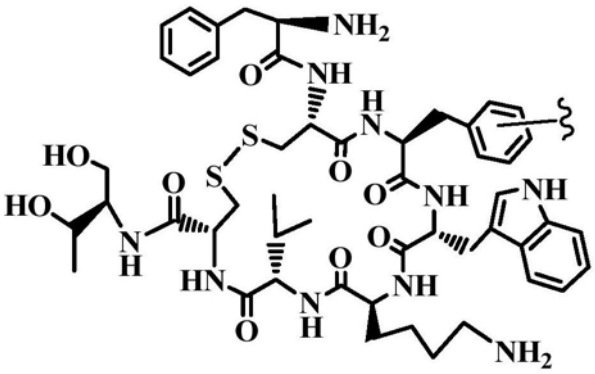

LB03(PMSA配体偶联物)，


LB04(PMSA配体)，

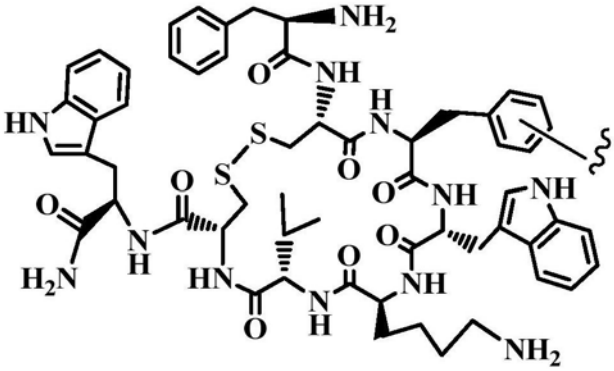

LB05(生长激素抑制素)，


LB06(生长激素抑制素)，

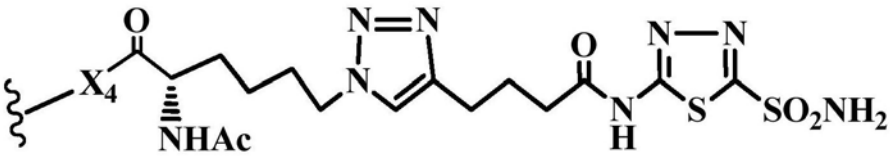

LB07(奥曲肽、生长抑制素同系物)，



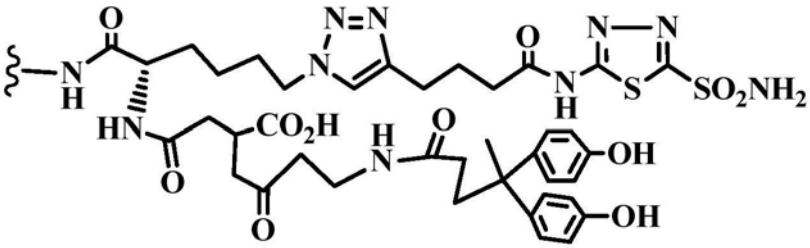
LB08(兰肽、生长抑制素同系物),



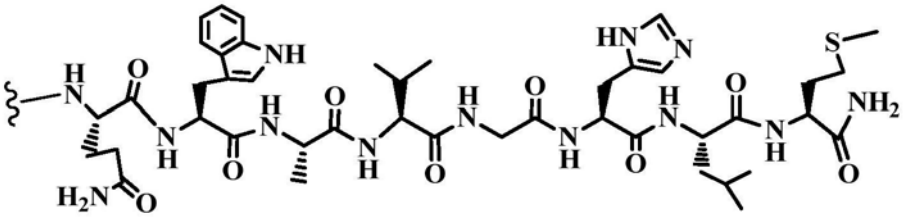
LB09(氨肽(Sanvar)、生长抑制素同系物),



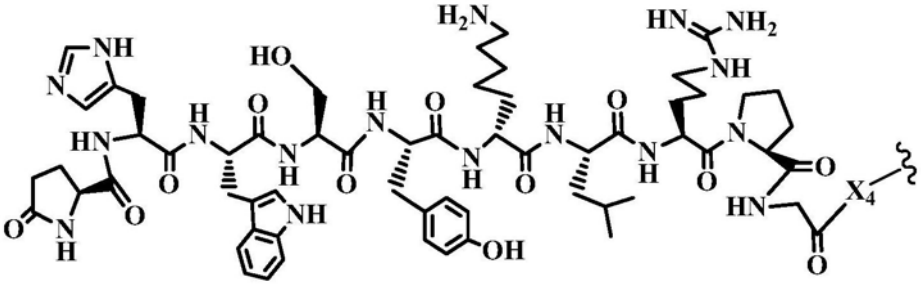
LB10(CAIX配体),



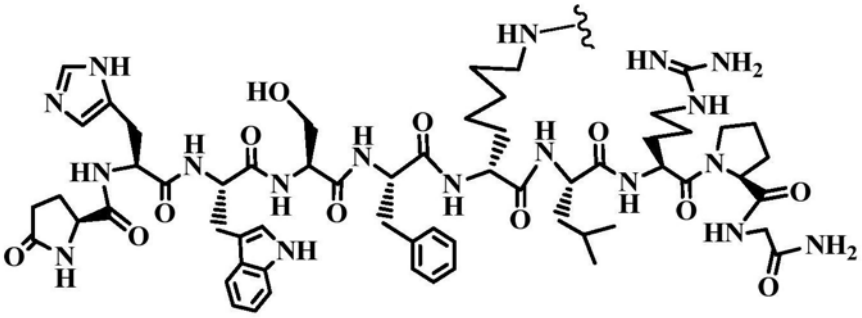
LB11(CAIX配体),



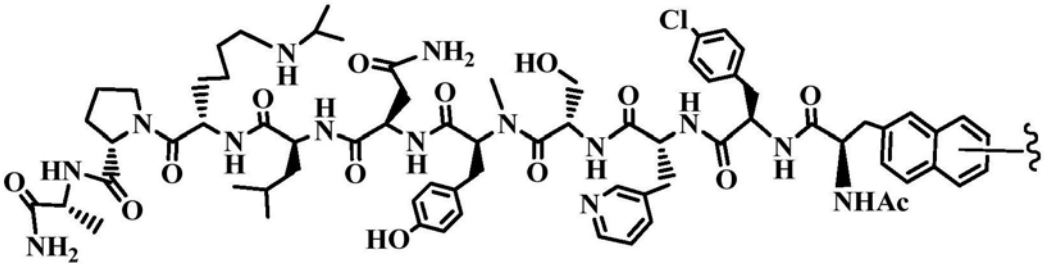
LB12(胃泌素释放肽受体(GRPr),MBA),



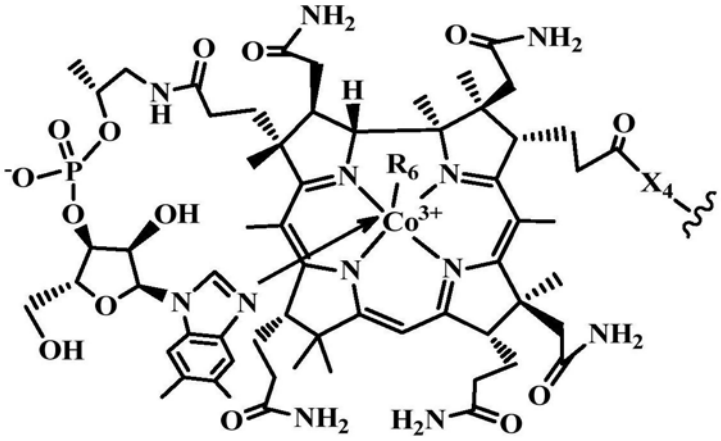
LB13(促黄体激素释放激素(LH-RH)和促性腺激素释放激素GnRH配体),



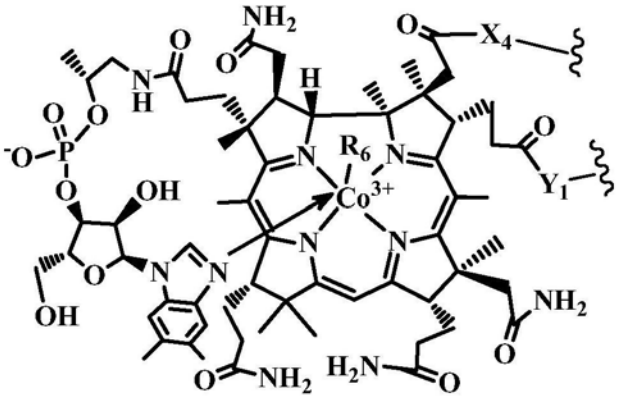
LB14(促黄体激素释放激素(LH-RH)和促性腺激素释放激素GnRH配体),



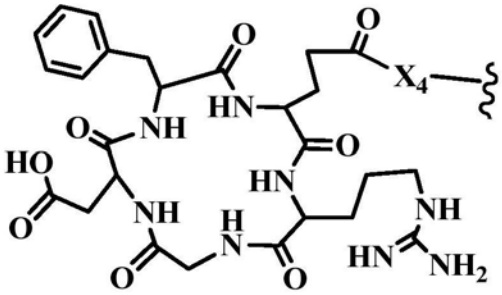
LB15(GnRH拮抗物、阿巴瑞克),



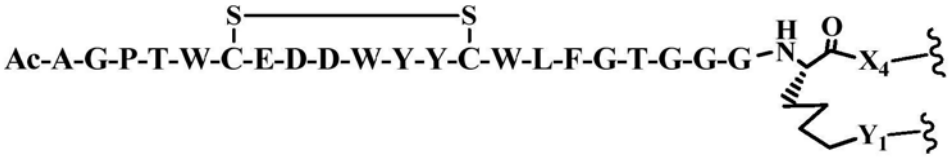
LB16(钴胺素,维生素B12同系物),



LB17(钴胺素,维生素B12同系物),

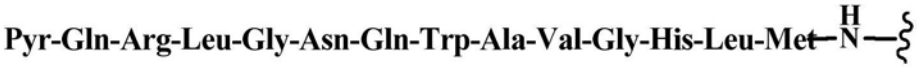


LB18(环RGD五肽,作用于$\alpha_v\beta_3$整联蛋白受体),

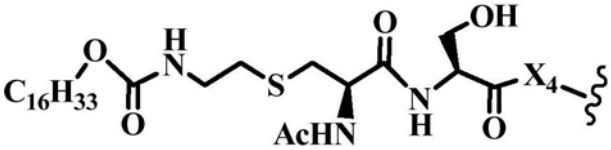


LB19(异源二价肽配体偶联物,作用于血管内皮生长因子VEGF受体),

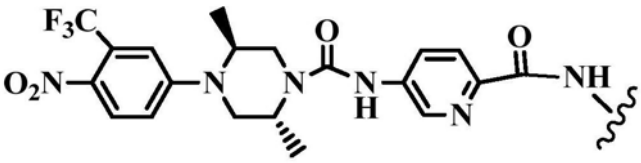
LB20(神经髓质素B),



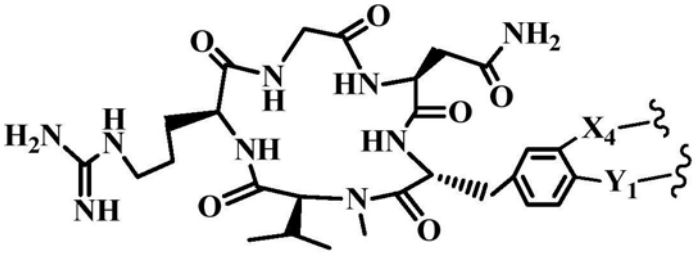
LB21(蛙皮素偶联物,作用于G蛋白偶联受体),



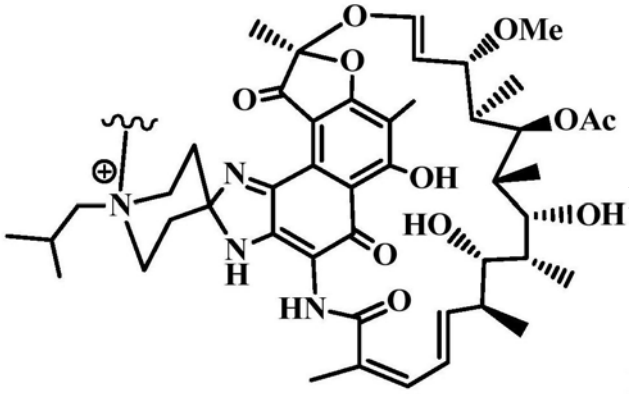
LB22(TLR2偶联物,作用于类Toll受体),



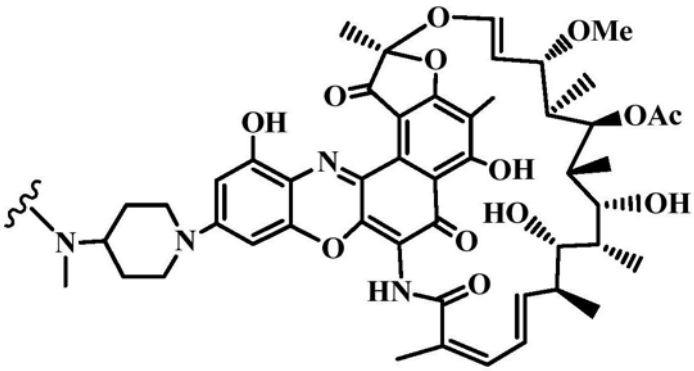
LB23(雄激素受体),



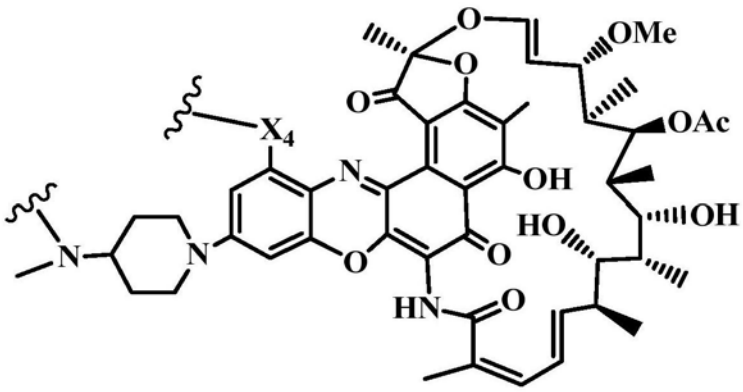
LB24(西伦吉肽/环(-RGDfV-)偶联物,作用于α_v整合素受体)



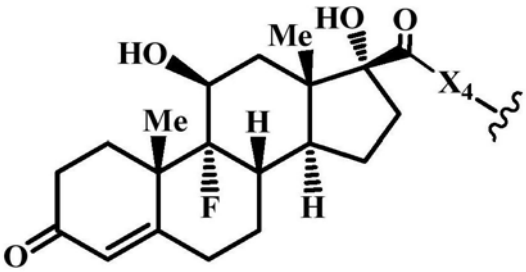
LB25(利福布汀同系物)，



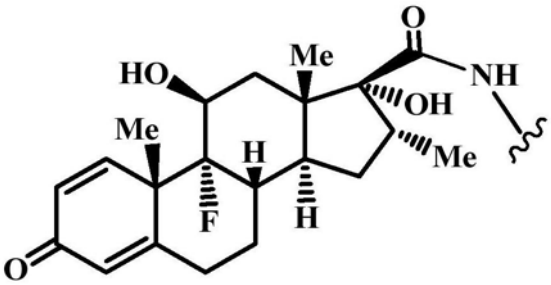
LB26(利福布汀同系物)，



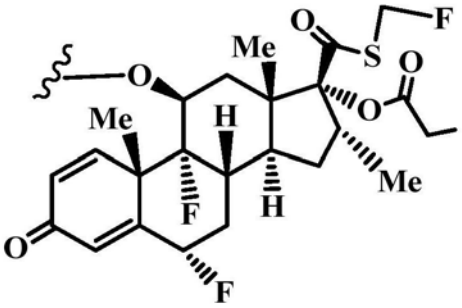
LB27(利福布汀同系物)，



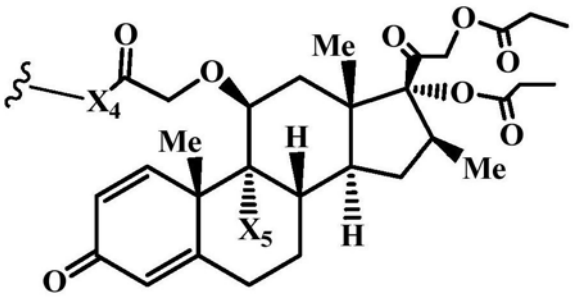
LB28(氟氢可的松)，



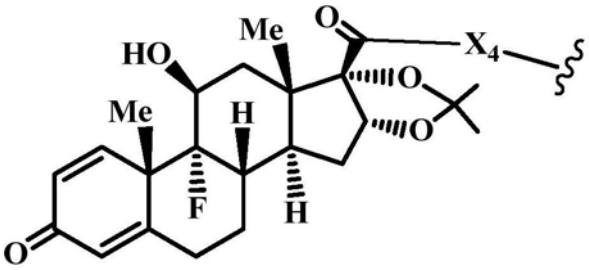
LB29(地塞米松)，



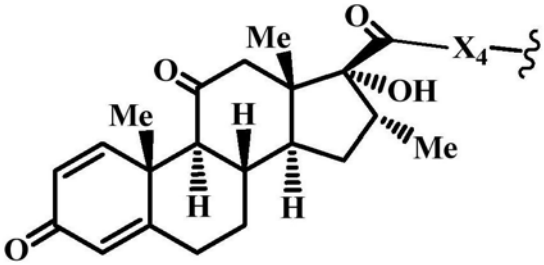
LB30(丙酸氟替卡松),



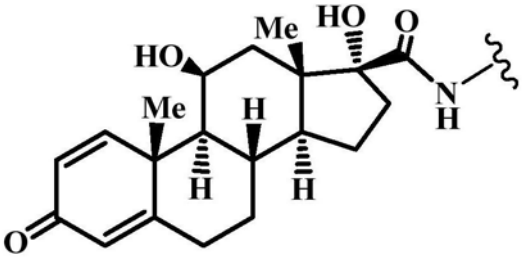
LB31(倍氯米松丙酸酯),



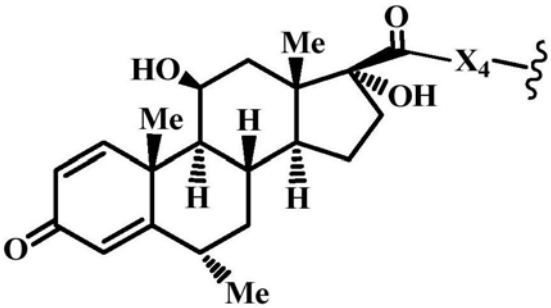
LB32(曲安奈德),



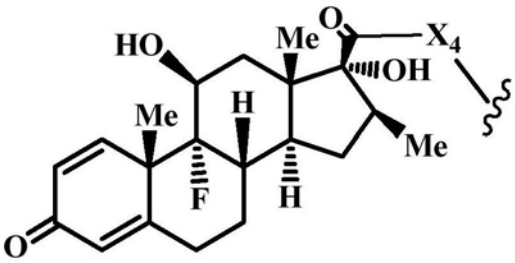
LB33(泼尼松),

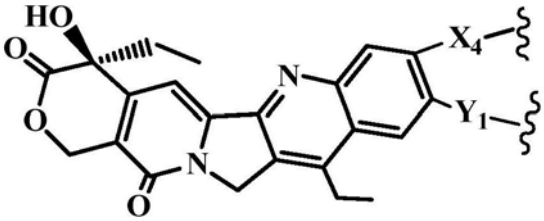


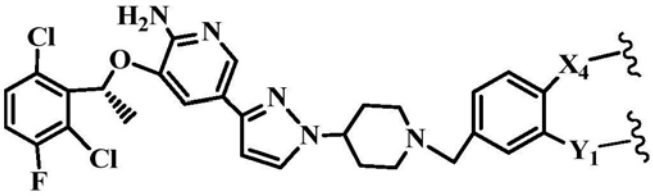
LB34(泼尼松龙),

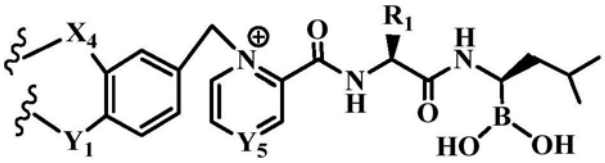


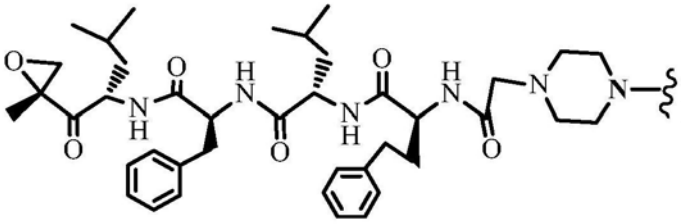
LB35(甲基强的松龙),

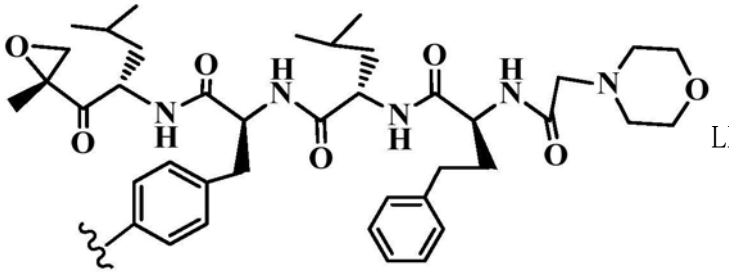

LB36(倍氟美松)，

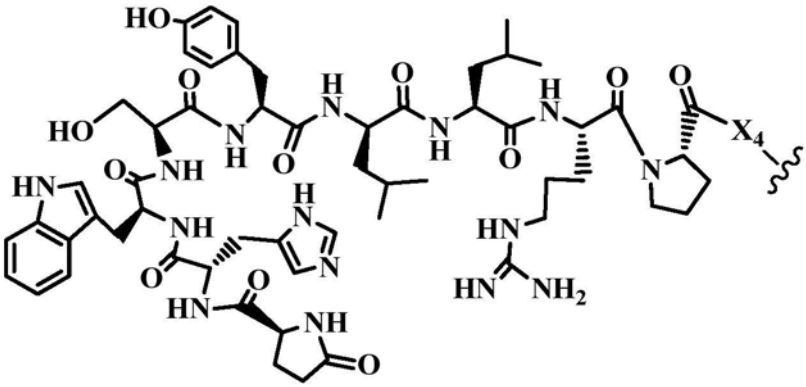

LB37(伊立替康同系物)，


LB38(克唑替尼同系物)，

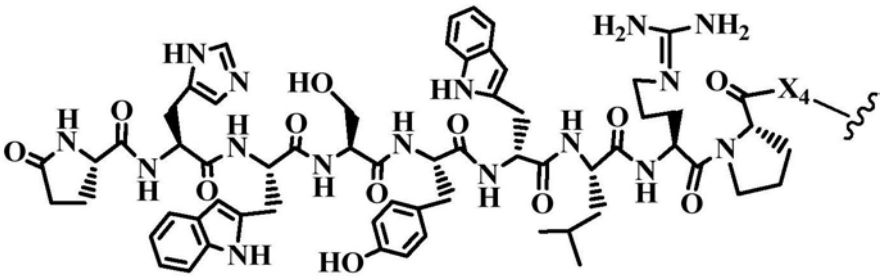

LB39(硼替佐米同系物)，其中Y_5是N、CH、C(Cl)、C(CH_3)或C($COOR_1$)；R_1是H、C_1-C_6烷基、C_3-C_8芳基；


LB40(卡菲佐米同系物)，

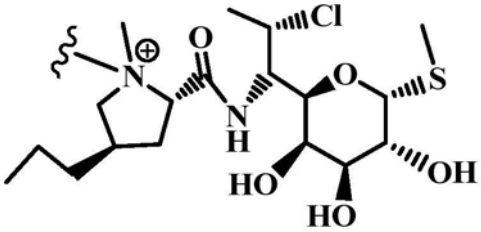

LB41(卡菲佐米同系物)，



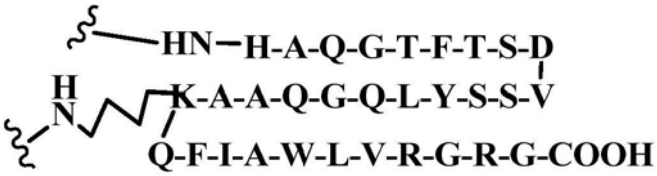
LB42(亮丙瑞利同系物),



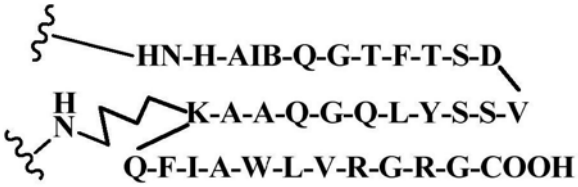
LB43(曲普瑞林同系物),



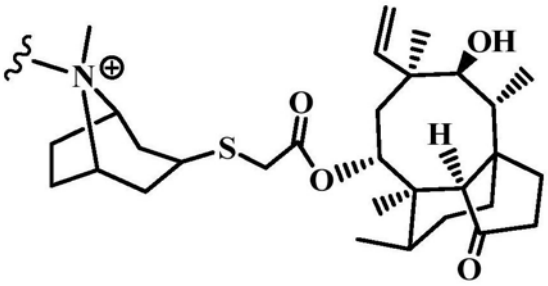
LB44(克林霉素),



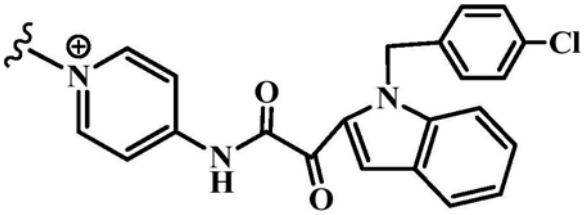
LB45(利拉鲁肽同系物),



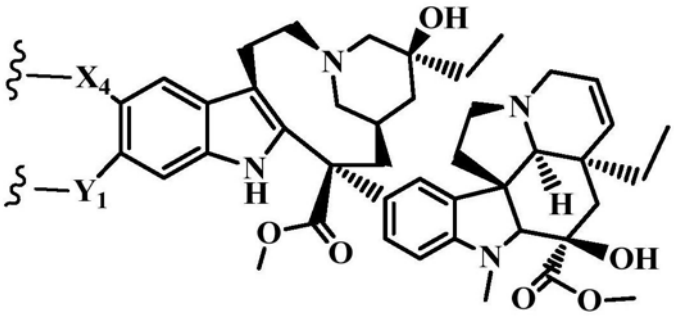
LB46(索马鲁肽同系物),



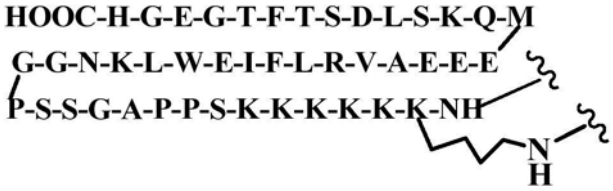
LB47(瑞他帕林同系物),



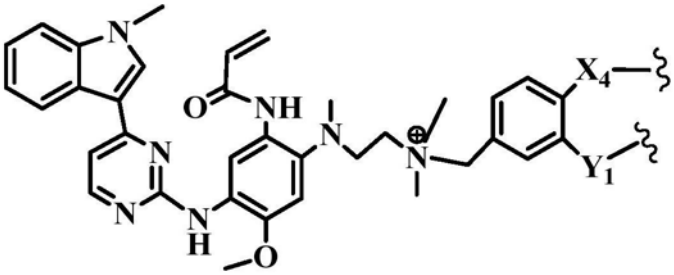
LB48(丁布尔同系物),



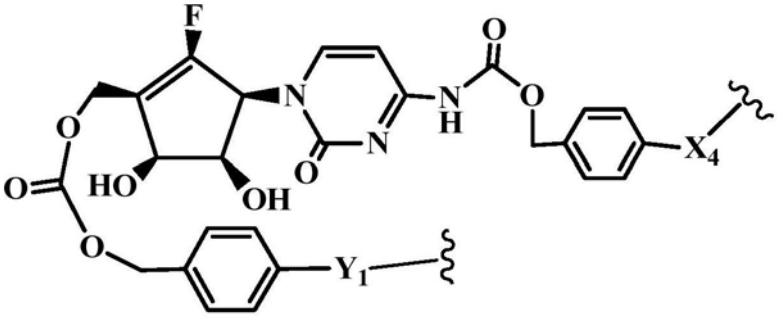
LB49(长春碱同系物),



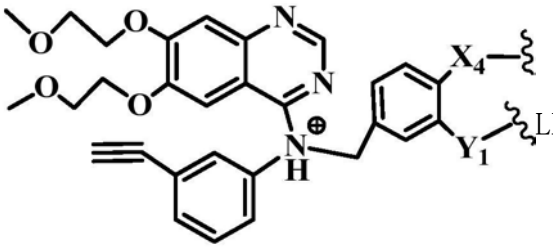
LB50(利西森肽同系物),



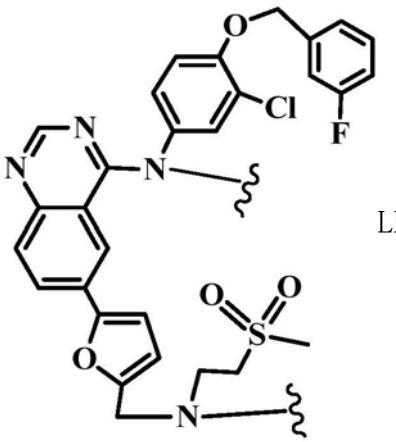
LB51(奥西丁尼同系物),



LB52(核苷同系物),



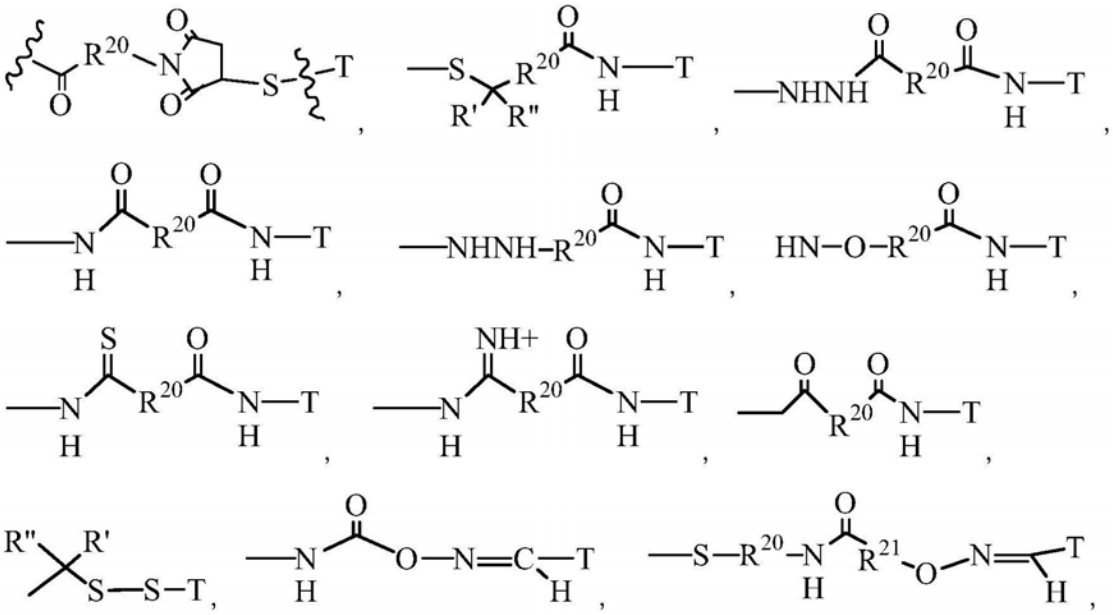
LB53(埃罗替尼同系物),

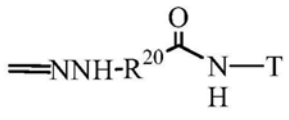
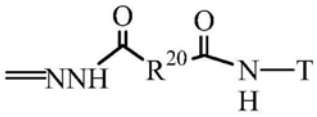
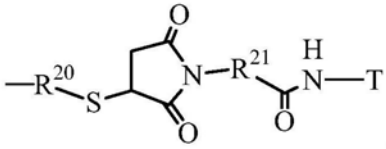


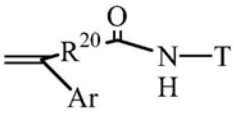
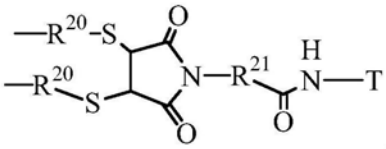
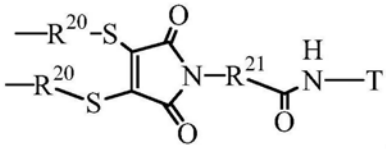
LB54(拉帕替尼同系物)，

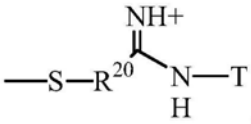
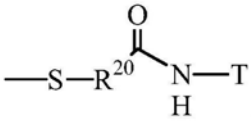
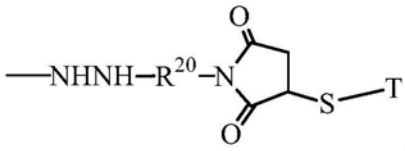
其中“∿∿”是支链连接体的连接位置；X_4和Y_1独立地是O、NH、NHNH、NR_1、S、C(O)O、C(O)NH、OC(O)NH、OC(O)O、NHC(O)NH、NHC(O)S、OC(O)N(R_1)、N(R_1)C(O)N(R_1)、CH_2、C(O)NHNHC(O)和C(O)NR_1；X_1是H、CH_2、OH、O、C(O)、C(O)NH、C(O)N(R_1)、R_1、NHR_1、NR_1、C(O)R_1或C(O)O；X_5是H、CH_3、F或Cl；M_1和M_2分别是H、Na、K、Ca、Mg、NH_4、N($R_1R_2R_3$ R_4)；R_1、R_2、R_3和R_4定义同权利要求1。

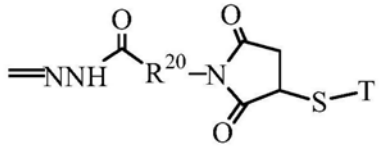
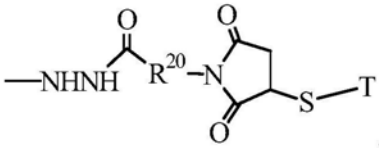
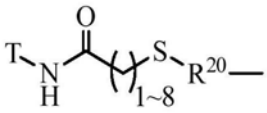
14.如权利要求1,2或13所述的细胞结合分子T，当与结构式(I)和(III)中V_1和/或V_2连接时、或与L_1和/或L_2直接连接时，其特征在于V_1和/或V_2缺省，并且具有以下一个或多个以下结构：

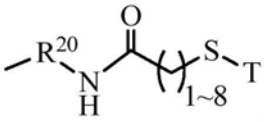
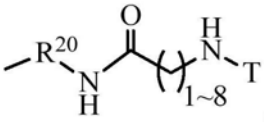
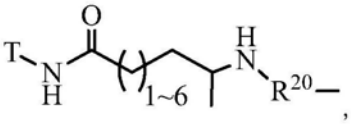


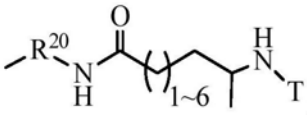
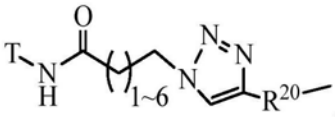
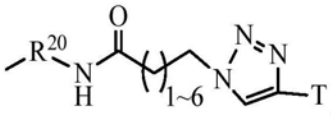

,

,

,

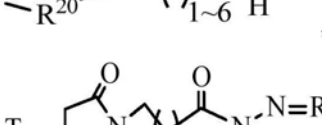
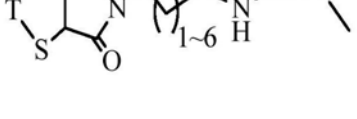
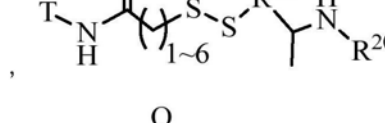

,

,

,


,

,

,


,

,

,

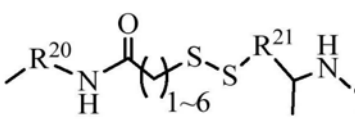
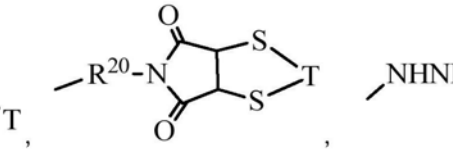

,

,

,

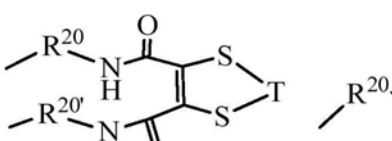
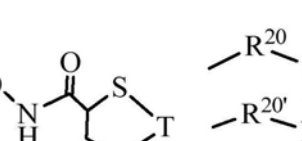
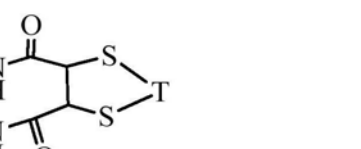

,

,

,

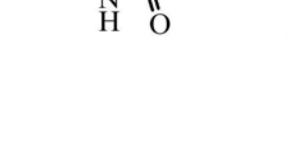
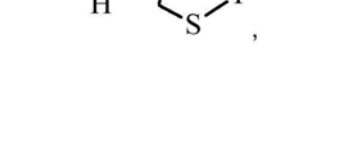

,

,

,

,

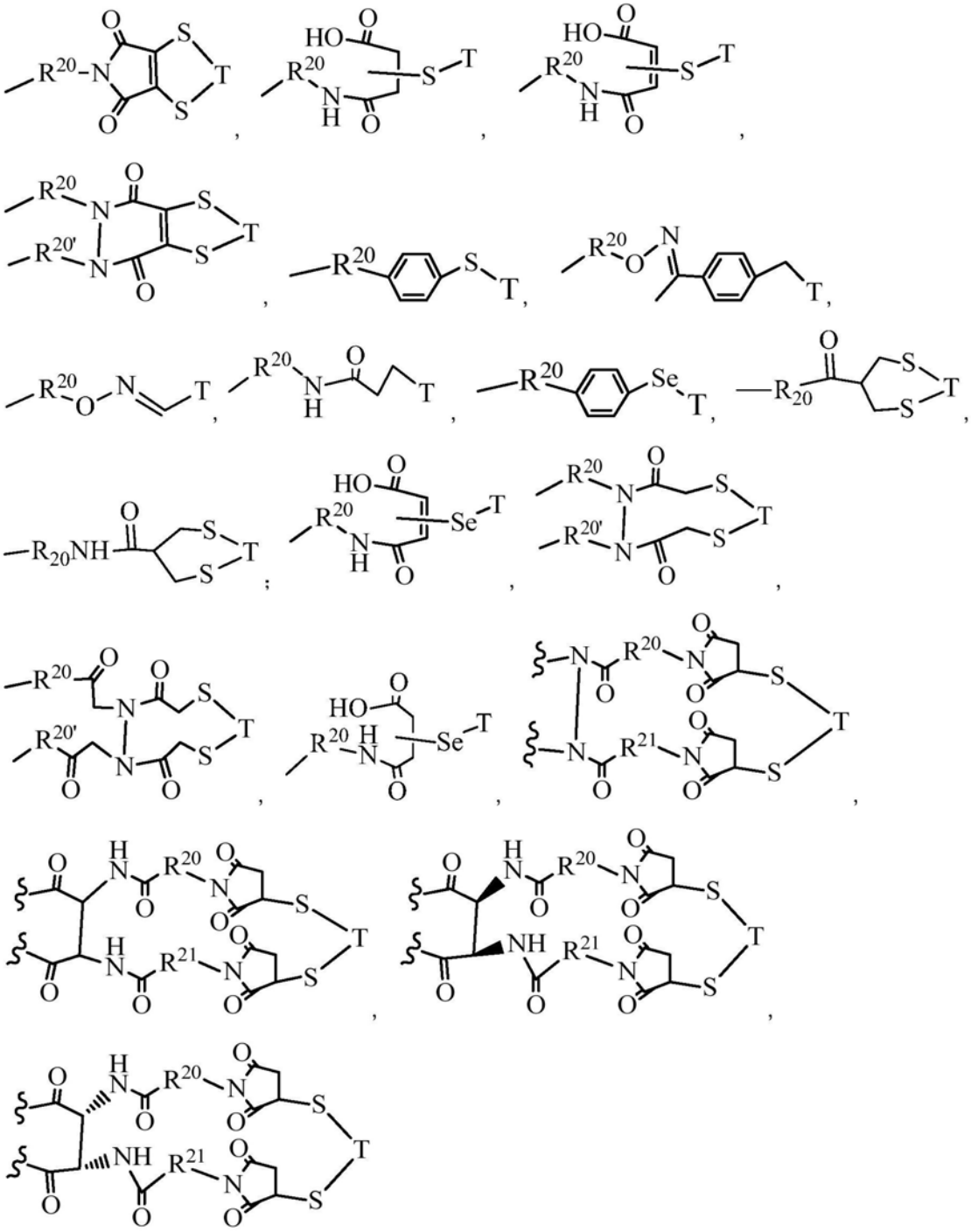
,


,

,


,

,

,


,

,

,



其中R^{20}和R^{21}独立地是C_1-C_8烷基，C_2-C_8杂烷基或杂环，C_3-C_8芳基、Ar-烷基、环烷基、烷基环烷基、杂环烷基、杂烷基环烷基、碳环或烷基羰基，或C_2-C_{100}具有式$(CH_2CH_2O)_p$的聚亚烷基二醇，p如前文所定义。

15.如权利要求1,2,9或10中所述的细胞结合剂或细胞结合分子，其特征在于能够抗以下细胞：肿瘤细胞，病毒感染细胞，微生物感染细胞，寄生虫感染细胞，自身免疫细胞，活化的细胞，骨髓细胞，活化的T细胞，B细胞，黑色素细胞，或任何表达下列抗原或受体的细胞：CD1，CD1a，CD1b，CD1c，CD1d，CD1e，CD2，CD3，CD3d，CD3e，CD3g，CD4，CD5，CD6，CD7，CD8，CD8a，CD8b，CD9，CD10，CD11a，CD11b，CD11c，CD11d，CD12w，CD14，CD15，CD16，CD16a，CD16b，CDw17，CD18，CD19，CD20，CD21，CD22，CD23，CD24，CD25，CD26，CD27，CD28，CD29，CD30，CD31，CD32，

CD32a,CD32b,CD33,CD34,CD35,CD36,CD37,CD38,CD39,CD40,CD41,CD42,CD42a,CD42b,CD42c,CD42d,CD43,CD44,CD45,CD46,CD47,CD48,CD49b,CD49c,CD49d,CD49f,CD50,CD51,CD52,CD53,CD54,CD55,CD56,CD57,CD58,CD59,CD60,CD60a,CD60b,CD60c,CD61,CD62E,CD62L,CD62P,CD63,CD64,CD65,CD65s,CD66,CD66a,CD66b,CD66c,CD66d,CD66e,CD66f,CD67,CD68,CD69,CD70,CD71,CD72,CD73,CD74,CD75,CD75s,CD76,CD77,CD78,CD79,CD79a,CD79b,CD80,CD81,CD82,CD83,CD84,CD85,CD85a,CD85b,CD85c,CD85d,CD85e,CD85f,CD85g,CD85g,CD85i,CD85j,CD85k,CD85m,CD86,CD87,CD88,CD89,CD90,CD91,CD92,CD93,CD94,CD95,CD96,CD97,CD98,CD99,CD100,CD101,CD102,CD103,CD104,CD105,CD106,CD107,CD107a,CD107b,CD108,CD109,CD110,CD111,CD112,CD113,CD114,CD115,CD116,CD117,CD118,CD119,CD120,CD120a,CD120b,CD121,CD121a,CD121b,CD122,CD123,CD123a,CD124,CD125,CD126,CD127,CD128,CD129,CD130,CD131,CD132,CD133,CD134,CD135,CD136,CD137,CD138,CD139,CD140,CD140a,CD140b,CD141,CD142,CD143,CD144,CD145,CD145w,CD146,CD147,CD148,CD149,CD150,CD151,CD152,CD153,CD154,CD155,CD156,CD156a,CD156b,CD156c,CD156d,CD157,CD158,CD158a,CD158b1,CD158b2,CD158c,CD158d,CD158e1,CD158e2,CD158f2,CD158g,CD158h,CD158i,CD158j,CD158k,CD159,CD159a,CD159b,CD159c,CD160,CD161,CD162,CD163,CD164,CD165,CD166,CD167,CD167a,CD167b,CD168,CD169,CD170,CD171,CD172,CD172a,CD172b,CD172g,CD173,CD174,CD175,CD175s,CD176,CD177,CD178,CD179,CD179a,CD179b,CD180,CD181,CD182,CD183,CD184,CD185,CD186,CDw186,CD187,CD188,CD189,CD190,CD191,CD192,CD193,CD194,CD195,CD196,CD197,CD198,CD199,CDw198,CDw199,CD200,CD201,CD202,CD202(a,b),CD203,CD203c,CD204,CD205,CD206,CD207,CD208,CD209,CD210,CDw210a,CDw210b,CD211,CD212,CD213,CD213a1,CD213a2,CD214,CD215,CD216,CD217,CD218,CD218a,CD218,CD21b9,CD220,CD221,CD222,CD223,CD224,CD225,CD226,CD227,CD228,CD229,CD230,CD231,CD232,CD233,CD234,CD235,CD235a,CD235b,CD236,CD237,CD238,CD239,CD240,CD240ce,CD240d,CD241,CD242,CD243,CD244,CD245,CD246,CD247,CD248,CD249,CD250,CD251,CD252,CD253,CD254,CD255,CD256,CD257,CD258,CD259,CD260,CD261,CD262,CD263,CD264,CD265,CD266,CD267,CD268,CD269,CD270,CD271,CD272,CD273,CD274,CD275,CD276,CD277,CD278,CD279,CD281,CD282,CD283,CD284,CD285,CD286,CD287,CD288,CD289,CD290,CD291,CD292,CD293,CD294,CD295,CD296,CD297,CD298,CD299,CD300,CD300a,CD300b,CD300c,CD301,CD302,CD303,CD304,CD305,CD306,CD307,CD307a,CD307b,CD307c,CD307d,CD307e,CD307f,CD308,CD309,CD310,CD311,CD312,CD313,CD314,CD315,CD316,CD317,CD318,CD319,CD320,CD321,CD322,CD323,CD324,CD325,CD326,CD327,CD328,CD329,CD330,CD331,CD332,CD333,CD334,CD335,CD336,CD337,CD338,CD339,CD340,CD341,CD342,CD343,CD344,CD345,CD346,CD347,CD348,CD349,CD350,CD351,CD352,CD353,CD354,CD355,CD356,CD357,CD358,CD359,CD360,CD361,CD362,CD363,CD364,CD365,CD366,CD367,CD368,CD369,CD370,CD371,CD372,CD373,CD374,CD375,CD376,CD377,CD378,CD379,CD381,CD382,CD383,CD384,CD385,CD386,CD387,CD388,CD389,CRIPTO,CRIPTO,CR,CR1,CRGF,CRIPTO,CXCR5,LY64,TDGF1,4-1BB,APO2,ASLG659,BMPR1B,4-1BB,5AC,5T4(Trophoblast糖蛋白,TPBG,WNT-活化抑制因子1或WAIF1),腺癌抗原,AGS-

5,AGS-22M6,启动素受体激酶1,AFP,AKAP-4,ALK,α整合素,αvβ6,氨基肽酶N,淀粉样蛋白β,雄激素受体,促血管新生蛋白因子2,促血管新生蛋白因子3,膜联蛋白A1,炭疽毒素保护性抗原,抗转移蛋白受体,AOC3(VAP-1),B7-H3,炭疽杆菌,BAFF(B细胞启动因子),B淋巴瘤细胞,bcr-abl,蛙皮素,BORIS,C5,C242抗原,CA125(糖抗原125,MUC16),CA-IX(或CAIX,碳酸酐酶9),CALLA,CanAg,犬红斑狼疮IL31,碳酸酐酶IX,心肌肌凝蛋白,CCL11(C-C片段趋化因子11),CCR4(C-C趋化因子受体4,CD194),CCR5,CD3E(ε),CEA(癌胚抗原),CEACAM3,CEACAM5(癌胚抗原),CFD(因子D),Ch4D5,胆囊收缩素2(CCK2R),CLDN18(Claudin-18),丛生因子A,CRIPTO,FCSF1R(集落刺激因子1受体,CD115),CSF2(集落刺激因子2,粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)),CTLA4(细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4),CTAA16.88肿瘤抗原,CXCR4(CD184),C-X-C趋化因子受体4,环状ADP核糖核酸酶,细胞周期蛋白B1,CYP1B1,巨细胞病毒,巨细胞病毒糖蛋白B,Dabigatran,DLL3(类Δ配体3),DLL4(类Δ配体4),DPP4(双肽-肽酶4),DR5(死亡受体5),大肠杆菌shiga毒素类型-1,大肠杆菌shiga毒素类型-2,ED-B,EGFL7(类EGF结构域蛋白7),EGFR,EGFRII,EGFRvIII,内皮因子(CD105),内皮素B受体,内毒素,EpCAM(上皮细胞粘附分子),EphA2,Episialin,ERBB2(表皮生长因子受体2),ERBB3,ERG(TMPRSS2 ETS融合基因),大肠杆菌,ETV6-AML,FAP(成纤维细胞活化蛋白α),FCGR1,甲胎蛋白,纤维蛋白IIβ链,纤连蛋白额外结构域-B,FOLR(叶酸受体),叶酸受体α,叶酸水解酶,Fos相关抗原1,呼吸道合胞病毒的F蛋白,卷曲的受体,岩藻糖GM1,GD2神经节苷脂,G-28(细胞表面抗原糖脂),GD3独特型,GloboH,Glypican 3,N-羟乙酰神经氨酸,GM3,GMCSF受体α链,生长分化因子8,GP100,GPNMB(跨膜糖蛋白NMB),GUCY2C(鸟苷酸环化酶2C),鸟苷酸环化酶C(GC-C),肠鸟苷酸环化酶,鸟苷酸环化酶C受体,热稳定肠毒素受体(hSTAR),热休克蛋白,血凝素,乙肝表面抗原,乙型肝炎病毒,HER1(人类表皮生长因子受体1),HER2,HER2/neu,HER3(ERBB-3),IgG4,HGF/SF(肝细胞生长因子/分散因子),HHGFR,HIV-1,组蛋白复合物,HLA-DR(人类白细胞抗原),HLA-DR10,HLA-DRB,HMWMAA,人类绒毛膜促性腺激素,HNGF,人类分散因子受体激酶,HPV E6/E7,Hsp90,hTERT,ICAM-1(细胞间粘附分子1),独特型,IGF1R(IGF-1,类胰岛素生长因子1受体),IGHE,IFN-γ,流感血凝素,IgE,IgE Fc区,IGHE,白细胞介素(IL-1,IL-2,IL-3,IL-4,IL-5,IL-6,IL-6R,IL-7,IL-8,IL-9,IL-10,IL-11,IL-12,IL-13,IL-15,IL-17,IL-17A,IL-18,IL-19,IL-20,IL-21,IL-22,IL-23,IL-27,IL-28),IL31RA,ILGF2(类胰岛素生长因子2),整合蛋白(α4、αIIbβ3、αvβ3、α4β7、α5β1、α6β4、α7β7、αllβ3、α5β5、αvβ5),干扰素γ诱导蛋白质,ITGA2,ITGB2,KIR2D,Kappa Ig,LCK,Le,Legumain,Lewis-Y抗原,LFA-1(淋巴细胞功能相关抗原1,CD11a),LHRH,LINGO-1,脂磷壁酸,LIV1A,LMP2,LTA,MAD-CT-1,MAD-CT-2,MAGE-1,MAGE-2,MAGE-3,MAGE A1,MAGE A3,MAGE 4,MART1,MCP-1,MIF(巨噬细胞迁移抑制因子,或糖基抑制因子(GIF)),MS4A1(跨膜4结构域亚家族A成员1),MSLN(间皮素),MUC1(粘蛋白1,细胞表面相关(MUC1)或多态性上皮粘蛋白(PEM)),MUC1-KLH,MUC16(CA125),MCP1(单核细胞趋化蛋白1),MelanA/MART1,ML-IAP,MPG,MS4A1,MYCN,髓磷脂相关糖蛋白,Myostatin,NA17,NARP-1,NCA-90(粒细胞抗原),Nectin-4(ASG-22ME),NGF,神经细胞凋亡调控蛋白酶1,NOGO-A,Notch受体,核仁素,Neu致癌基因产物,NY-BR-1,NY-ESO-1,OX-40,OxLDL(氧化低密度脂蛋白),OY-TES1,P21,p53非突变体,P97,PAP,抗(N-羟乙酰神经氨酸)抗体结合部位,PAX3,PAX5,PCSK9,PDCD1(PD-1、程序性细胞死亡蛋白1),PDGF-Rα(α血小板源生长因子受体),PDGFR-β,PDL-1,PLAC1,类PLAP睾丸碱性磷酸酶,血小

板衍生生长因子受体β,磷酸钠联合转运体,PMEL 17,聚唾液酸,蛋白酶3(PR1),前列腺癌,PS(磷脂酰丝氨酸),前列腺癌细胞,铜绿假单胞菌,PSMA,PSA,PSCA,狂犬病病毒糖蛋白,RHD(Rh多肽1(RhPI),CD240),Rhesus因子,RANKL,RhoC,Ras突变,RGS5,ROBO4,呼吸道合胞病毒,RON,ROR1,肉瘤易位断点,SART3,Sclerostin,SLAMF7(SLAM成员7),Selectin P,SDC1(多配体蛋白聚糖1),系统性红斑狼疮(a),生长调节素C,SIP(1-磷酸鞘氨醇),生长激素抑制素,精子蛋白17,SSX2,STEAP1(6-跨膜上皮前列腺抗原1),STEAP2,STn,TAG-72(肿瘤相关糖蛋白),存活素,T细胞受体,T细胞跨膜蛋白,TEM1(肿瘤血管内皮标记1),TENB2,Tenascin C(TN-C),TGF-α,TGF-β(转化生长因子β),TGF-β1,TGF-β2(转化生长因子2),Tie(CD202b),Tie2,TIM-1(CDX-014),Tn,TNF,TNF-α,TNFRSF8,TNFRSF10B(肿瘤坏死因子受体超家族成员10B),TNFRSF13B(肿瘤坏死因子受体超家族成员13B),TPBG(滋养细胞糖蛋白),TRAIL-R1(TNF相关坏死诱导配体受体1),TRAILR2(死亡受体5(DR5)),肿瘤相关的钙信号传感子2,肿瘤特异糖基化的MUC1,TWEAK受体,TYRP1(糖蛋白75),TRP-2,酪氨酸酶,VCAM-1,VEGF,VEGF-A,VEGF-2,VEGFR-1,VEGFR-2,vimentin,WT1,XAGE1,表达胰岛素生长因子受体的细胞,或表达表皮生长因子受体的细胞。

16.权利要求15所述的肿瘤细胞选自淋巴瘤细胞,骨髓瘤细胞,肾细胞,乳腺癌细胞,前列腺癌细胞,卵巢癌细胞,结直肠癌细胞,胃癌细胞,鳞状细胞癌细胞,小细胞肺癌细胞,非小细胞肺癌细胞,睾丸癌细胞,恶性细胞或任何因不受控快速生长和分裂导致癌症的细胞。

17.药物组合物,其中包含治疗有效量的权利要求1,2,9或10中的偶联物及其药学上可接受的盐,载体,稀释剂或辅料,或其组合,用于治疗或预防癌症或自身免疫疾病或传染病。

18.权利要求17中的药物组合物为液体配方或冻干固体,当被重新制成制剂施用于病人时,其组成(重量)为:0.01%-99%的一种或多种权利要求1,2,9或10中任一偶联物;0.0%-20.0%的一种或多种多元醇;0.0%-2.0%的一种或多种表面活性剂;0.0%-5.0%的一种或多种防腐剂;0.0%-30%的一种或多种氨基酸;0.0%-5.0%的一种或多种抗氧化剂;0.0%-0.3%的一种或多种金属螯合剂;0.0%-30.0%的一种或多种缓冲盐,用于将制剂的pH调节至pH 4.5至7.5;0.0%-30.0%一种或多种等渗剂,用于调节渗透压至约250-350mOsm。

其中,多元醇选自果糖,甘露糖,麦芽糖,乳糖,阿拉伯糖,木糖,核糖,鼠李糖,半乳糖,葡萄糖,蔗糖,海藻糖,山梨糖,松三糖,棉子糖,甘露醇,木糖醇,赤藓糖醇,麦芽糖醇,乳糖醇,赤藓糖醇,苏糖醇,山梨糖醇,甘油或L-葡萄糖酸盐及其金属盐。

表面活性剂选自聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯65、聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯81或聚山梨醇酯85,泊洛沙姆,聚(环氧乙烷)-聚(环氧丙烷),聚乙烯-聚丙烯,Triton,十二烷基硫酸钠(SDS),月桂基硫酸钠,辛基糖苷钠,十二烷基、肉豆蔻酰基、亚油基或硬脂基磺基甜菜碱,十二烷基、肉豆蔻酰基、亚油基或硬脂基肌氨酸,亚油酸、肉豆蔻基或十六烷基甜菜碱,月桂酰氨基丙基、椰油酰胺丙基、亚油酰胺基丙基、肉豆蔻酰基丙基、棕榈酰基丙基或异硬脂酰氨-丙基-甜菜碱(例如月桂酰胺丙基),肉豆蔻酰胺丙基、棕榈酰丙基或异硬脂酰氨基丙基-二甲胺,甲基椰油酰基钠或甲基油基牛磺酸二钠,十二烷基甜菜碱,十二烷基二甲基氧化胺,椰油酰胺丙基甜菜碱和可可两性甘氨酸酯,异硬脂基乙基亚胺鎓乙基硫酸盐,聚乙二醇,聚丙二醇,乙二醇和丙二醇的共聚物。

防腐剂选自十八烷基二甲基苄基氯化铵、六甲基氯化铵、苯扎氯铵,苄索氯铵,苯酚,丁

基和苄基醇，对羟基苯甲酸烷基酯，如甲酯或丙酯，儿茶酚、间苯二酚、环己醇、3-戊醇或间甲酚。

氨基酸选自精氨酸、胱氨酸、甘氨酸、赖氨酸、组氨酸、鸟氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、甘氨酸谷氨酸或天冬氨酸。

抗氧化剂选自抗坏血酸，谷胱甘肽，胱氨酸或蛋氨酸。

金属螯合剂选自EDTA或EGTA。

缓冲盐选自柠檬酸、抗坏血酸、葡萄糖酸、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或邻苯二甲酸的钠、钾、铵或三羟乙基氨基盐，Tris或氨丁三醇的盐酸、磷酸或硫酸盐，精氨酸、甘氨酸、甘氨酰甘氨酸或组氨酸的乙酸盐、氯化物、磷酸盐、硫酸盐或琥珀酸盐。

等渗剂选自甘露醇，山梨糖醇，乙酸钠，氯化钾，磷酸钠，磷酸钾，柠檬酸三钠或氯化钠。

19.如权利要求17或18中所述的药物组合物，其特征在于以液体或冻干固体的形式包装在小瓶，瓶子，预填充注射器或预填充自动注射器中。

20.权利要求1,2,9或10中的偶联物，或权利要求17或18的药物组合物中的偶联物，具有体外，体内或离体细胞杀伤活性。

21.如权利要求17或18所述的药物组合物，其特征在于与化学治疗药物，放射疗法，免疫治疗药物，自身免疫病药物，抗感染药物或其他偶联物同时施用，用于协同治疗或预防癌症、自身免疫性疾病或传染病。

22.如权利要求21中所述的化学治疗药物选自：

1)化疗药物：

a)烷基化剂：氮芥类，氯苯那普，氯普那嗪，环磷酰胺，达卡巴嗪，雌二醇氮芥，异环磷酰胺，氮芥，盐酸二甲氧胺，氧化二氮芥，盐酸氨氯地平，麦考酚酸，卫矛醇，呱泊溴烷，新氮芥，苯芥胆甾醇，松龙苯芥，噻替呱，曲磷胺对，尿嘧啶；CC-1065，其阿多来新，卡折来新，比折来新及其合成同系物；多卡霉素及其合成同系物，KW-2189，CBI-TMI或CBI二聚体；苯并二氮卓二聚体或吡咯苯并二氮卓(PBD)二聚体，托美霉素二聚体，吲哚苯并二氮卓二聚体，咪唑苯并噻二氮卓二聚体或恶唑烷苯并二氮卓的二聚体；亚硝基脲，包括卡莫司汀，洛莫司汀，氯化梭菌素，福莫司汀，尼莫司汀，拉莫司汀；烷基磺酸盐，包括白苏芬、树苏芬、磺胺异丙磺胺和皮苏芬；三氮烯类，达卡巴嗪；含铂化合物，包括卡铂，顺铂，奥沙利铂；吖丙啶类，苯并二氢吡喃酮，卡洛酮，美妥替派和乌雷多巴；乙烯亚胺和甲基三聚氰胺，包括六甲蜜胺，三亚乙基三胺，三乙基磷酰胺，三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基甲基胺；

b)植物生物碱：长春花生物碱，包括长春新碱，长春碱，长春地辛，长春瑞滨，去甲长春碱；紫杉醇类，包括紫杉醇，多西紫杉醇及其同系物；美登素类包括DM1，DM2，DM3，DM4，DM5，DM6，DM7，美登素和安沙霉素及其同系物；Cryptophycin(Cryptophycin 1和Cryptophycin 8)；埃博霉素，软珊瑚醇，迪莫利德，草苔虫内酯，海兔毒素，奥瑞他汀，Cephalostatin；Pancratistatin；Sarcodictyin；海绵抑制素；

c)DNA拓扑异构酶抑制剂：依托泊苷替尼，9-氨基喜树碱，喜树碱，克立那托，多拉霉素，依托泊苷，磷酸依托泊苷，伊立替康，米托蒽醌，诺消灵，视黄酸(视黄醇)，替尼泊苷，拓扑替康，9-硝基喜树碱(RFS 2000)；丝裂霉素及其同系物；

d)抗代谢物：抗叶酸剂，DHFR抑制剂(甲氨蝶呤，曲麦克特，二甲叶酸，蝶罗呤，氨喋呤(4-氨基苯甲酸)或其他叶酸同系物)；IMP脱氢酶抑制剂(麦考酚酸，噻唑呋林，利巴韦林，

EICAR)；核糖核苷酸还原酶抑制剂(羟基脲，去铁胺)；嘧啶同系物，尿嘧啶同系物(安西他滨，阿扎胞苷，6-氮尿嘧啶，卡培他滨，卡莫氟，阿糖胞苷，双脱氧尿苷，脱氧氟尿苷，依诺他滨，5-氟尿嘧啶，氟尿苷，Ratitrexed(Tomudex)；胞嘧啶同系物(阿糖胞苷，胞嘧啶阿拉伯糖苷，氟达拉滨)；嘌呤同系物(硫唑嘌呤，氟达拉滨，巯嘌呤，硫胺素，硫鸟嘌呤)；叶酸补充剂，弗洛林酸；

e)激素疗法剂：受体拮抗剂，抗雌激素(甲地孕酮，雷洛昔芬，他莫昔芬)，LHRH兴奋剂(戈斯他林，醋酸亮丙瑞林)；抗雄激素药(比卡鲁胺，氟他胺，卡鲁司酮，丙酸倍他雄酮，表雄甾醇，戈舍瑞林，亮丙瑞林，美替利定，尼鲁米特，睾内酯，曲洛司坦及其他雄激素抑制剂)；维甲类化合物，维生素D3同系物(CB1093，EB1089，KH1060，胆钙化醇，麦角钙化甾醇)；光动力疗法剂(维替泊芬，酞菁，光敏剂Pc4，去甲氧基-竹红菌素A)；细胞因子(干扰素-α，干扰素-γ，肿瘤坏死因子(TNF)，含TNF的人蛋白)；

f)激酶抑制剂：BIBW 2992(抗-EGFR/Erb2)，伊马替尼，吉非替尼，呱加他尼，索拉非尼，达沙替尼，舒尼替尼，厄洛替尼，尼洛替尼，拉帕替尼，阿西替尼，帕唑帕尼，凡德他尼，E7080(抗VEGFR2)，Mubritinib，普纳替尼，Bafetinib，Bosutinib，卡博替尼，维莫德吉，Iniparib，鲁索利替尼，CYT387，阿西替尼，Tivozanib，索拉非尼，贝伐单抗，西妥昔单抗，曲妥珠单抗，雷珠单抗，帕尼单抗，伊斯平斯；

g)聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)抑制剂：奥拉帕里、尼拉帕里、依尼帕里、塔拉佐帕里、维利帕里、维利帕里、CEP 9722(Cephalon)、E7016(Eisai)、BGB-290(Beigene)、3-氨基苯甲酰酰胺；

h)抗生素：烯二炔类抗生素(加利车霉素，加利车霉素γ1，δ1，α1和β1，达因霉素，包括达因霉素A和脱氧米霉素，埃斯培拉霉素，卡达霉素，C-1027，Maduropeptin，新卡嗪奥斯汀和相关色蛋白烯二炔抗生素)，Aclacinomysins，放线菌素，安曲霉素，重氮丝氨酸，博来霉素，卡诺霉素，卡拉霉素，洋红霉素，嗜癌素，色霉素类、达金霉素、柔红霉素、去柔红霉素、6-重氮-5-氧代-L-去甲亮氨酸、阿霉素、吗啉-阿霉素、氰基吗啉-阿霉素，2-吡咯啉阿霉素和脱氧柔红霉素，表柔比星，阿柔比星，伊达比星，马可霉素，Nitomycin，霉酚酸，诺加霉素，橄榄霉素，Peplomycin，Potfiromycin，嘌呤霉素，奎拉霉素，罗道霉素，链黑霉素，链脲霉素，杀结核菌素，乌苯美司，净司他丁，佐柔比星；

i)聚酮化合物(番荔素)，Bullatacin和Bullatacinone；吉西他滨，环氧酶素卡菲偌米布，硼替佐米，沙利度胺，来那度胺，Pomalidomide，Tosedostat，Zybrestat，PLX4032，STA-9090，Stimuvax，Allovectin-7，Xegeva，Provenge，Yervoy，异戊二烯化抑制剂，洛伐他汀，多巴胺能神经毒素，1-甲基-4-苯基吡啶离子，细胞周期抑制剂(包括葡萄球菌素)，放线菌素(如放线菌素D，更生霉素)，鹅膏毒素，博莱霉素(如博来霉素A2，博莱霉素B2，培洛霉素)，蒽环类抗生素(如柔红霉素)，阿霉素(亚德里亚霉素)，伊达比星，表柔比星，吡柔比星，佐柔比星，米托蒽醌，MDR抑制剂或维拉帕米，Ca^{2+}ATP酶抑制剂或毒胡萝卜素，组蛋白去乙酰酶抑制剂(伏立诺他，罗米地辛，帕比司他，丙戊酸，Mocetinostat(MGCD0103)，Belinostat，PCI-24781，恩替诺特，SB939，Resminostat，Givinostat，AR-42，CUDC-101，萝卜硫素，曲古抑菌素A)；塞来昔布，格列酮类，表没食子儿茶素，没食子酸酯，双硫仑，Salinosporamide A；抗肾上腺药物，如氨鲁米特，米托坦，曲洛司坦，醋葡醛内酯，醛磷酰胺，氨基乙酰丙酸，安吖啶，阿拉伯糖苷，Bestrabucil，比生群，Edatraxate，Defofamine，美可辛，地吖醌，依氟鸟氨

酸(DFMO),Elfomithine,依利醋铵,依托格鲁,硝酸镓,胞嘧啶,羟基脲,伊班膦酸盐,香菇多糖,氯尼达明,米托胍腙,米托蒽醌,莫呱达醇,二胺硝吖啶,喷司他丁,蛋氨氮芥,吡柔比星,鬼臼酸,2-乙肼,甲基苄肼;PSK®;呱嗪二酮丙烷;根霉素;西佐;螺环锗;细格孢氮杂酸;三亚胺醌;三氯三乙胺;单端孢霉烯(包括T-2毒素,疣孢菌素A,杆孢菌素A和Anguidine),聚氨酯,siRNA,反义药物和核酸分解酶。

2)自身免疫疾病药物:环孢菌素,环孢菌素A,氨基己酸,硫唑嘌呤,溴隐亭,苯丁酸氮芥,氯喹,环磷酰胺,皮质类固醇(例如安西奈德,倍他米松,布地奈德,氢化可的松,氟尼缩松,丙酸氟替卡松,氟可龙达那唑,地塞米松,曲安奈德,二丙酸倍氯米松),DHEA,依那西普,羟基氯喹,英夫利昔单抗,美洛昔康,甲氨蝶呤,麦考酚酸酯,泼尼松,西罗莫司,他克莫司。

3)抗感染性疾病药物:

a)氨基糖苷类:阿米卡星,阿司米星,庆大霉素(奈替米星,西索米星,异帕米星),潮霉素B,卡那霉素(阿米卡星,阿贝卡星,氨基脱氧卡那霉素,地贝卡星,妥布霉素),新霉素(Framycetin,巴龙霉素,核糖霉素),奈替米星,壮观霉素,链霉素,妥布霉素,甲基姿苏霉素;

b)酰胺醇类:迭氮氯霉素,氯霉素,氟苯尼考,甲砜霉素;

c)安沙霉素:格尔德霉素,除莠霉素;

d)碳青霉烯类:比阿培南,多利培南,厄他培南,亚胺培南,西司他丁,美罗培南,帕尼培南;

e)头孢烯:碳头孢烯(洛拉卡比),头孢乙腈,氯氨苄青霉素,头孢拉定,头孢羟氨,头孢洛宁,头孢噻啶,头孢噻吩或头孢金素,头孢氨苄,头孢来星,头孢孟多,头孢匹林,羟胺唑头孢菌素,氟唑头孢菌素,孢西酮,唑啉头孢菌素,头孢拉宗,头孢卡品,头孢达肟,头孢吡,头孢克肟,头孢西丁,头孢罗齐,头孢甲氧环烯胺,头孢替唑,头孢呋辛,头孢克肟,头孢地尼,头孢托仑,头孢吡,头孢他美,头孢甲肟,头孢地嗪,头孢尼西,头孢呱酮,头孢雷特,头孢噻肟,噻乙胺唑头孢菌素,头孢唑兰,头孢氨苄,头孢咪唑,头孢匹胺,头孢匹罗,头孢泊肟,头孢罗齐,头孢喹诺,头孢磺啶,头孢他啶,头孢特仑,头孢布腾,头孢噻林,头孢唑肟,头孢吡普,头孢曲松,头孢呋辛,头孢唑南,头霉素(头孢西丁,头孢替坦,头孢氰唑),氧(碳)头孢烯(氟氧头孢,拉氧头孢);

f)糖肽:博来霉素,万古霉素(奥利万星,特拉万星),替考拉宁(达巴万星),雷莫拉宁;

g)甘氨酰环素:替加环素;

h)β-内酰胺酶抑制剂:青霉烷(舒巴坦,他唑巴坦),氧青霉烷(克拉维酸);

i)林可酰胺:克林霉素,林可霉素;

j)脂肽:达托霉素,A54145,钙依赖性抗生素(CDA);

k)大环内酯类:阿奇霉素,克霉素,克拉霉素,地红霉素,红霉素,氟雷霉素,交沙霉素,酮内酯(泰利霉素,塞红霉素),麦迪霉素,米卡霉素,竹桃霉素,利福霉素(异烟肼、利福平,利福布丁,利福喷汀),罗匹霉素,罗红霉素,大观霉素,螺旋霉素,他克莫司(FK506),醋竹桃霉素,泰利霉素;

l)单环胺:氨曲南,替吉莫南;

m)恶唑烷酮类:利奈唑胺;

n)青霉素类:阿莫西林,氨苄青霉素(匹氨西林,海洛西林,巴氨西林,氨苄青霉素,阿霉

素),阿替代西林,阿洛西林,苄青霉素,苄星青霉素苄青霉素,苄星青霉素苯氧甲基青霉素,克洛西林,普鲁卡因青霉素(美替西林),美洛西林,甲氧西林,萘夫西林,苯唑西林,醋甲西林,青霉素,非奈西林,苯氧基甲基青霉素,呱拉西林,氨苄西林,磺苯西林,替莫西林,替卡西林;

o)多肽:杆菌肽,粘菌素,多粘菌素B;

p)喹诺酮类:阿拉曲沙星,巴洛沙星,环丙沙星,克林沙,达氟沙星,二氟沙星,依诺沙星,恩诺沙星,加雷沙星,加替沙星,吉米沙星,格帕沙星,卡诺曲伐沙星,左氧氟沙星,洛美沙星,麻保沙星,莫西沙星,那氟沙星,诺氟沙星,奥比沙星,氧氟沙星,培氟沙星,曲伐沙星,格帕沙星,西他沙星,司帕沙星,替马沙星,托沙星,曲伐沙星;

q)链阳性菌素:普那霉素,奎奴普丁/达福普汀;

r)磺胺类:氨苄磺胺,偶氮磺胺,磺胺嘧啶,磺胺甲异唑、磺胺酰亚胺、磺胺吡啶、磺胺异恶唑、甲氧苄啶、磺胺甲恶唑(复方磺胺甲恶唑);

s)类固醇抗菌药物:如夫西地酸;

t)四环素类:强力霉素,金霉素,氯米西环素,地美环素,雷莫昔林,美西环素,美他环素,米诺环素,土霉素,潘美环素,吡咯烷甲基四环素,四环素,甘氨酰环素(如替加环素);

u)其他类型的抗生素:番荔枝素,胂凡纳明,细菌萜醇抑制剂(杆菌肽),DANAL/AR抑制剂(环丝氨酸),Dictyostatin,圆皮海绵内酯,软珊瑚醇,埃博霉素,乙胺丁醇,依托泊苷,法罗培南,夫西地酸,呋喃唑酮,异烟肼,Laulimalide,甲硝唑,莫匹罗星,NAM合成抑制剂(磷霉素),呋喃妥因,紫杉醇,普兰西霉素,吡嗪酰胺,奎奴普丁/达福普汀,利福平,他唑巴坦替硝唑,乌菊花素。

4)抗病毒药物:

a)侵入/融合抑制剂:阿帕韦洛,马拉韦罗,Vicriviroc,Gp41(恩夫韦肽),PRO 140,CD4(艾巴利珠单抗);

b)整合酶抑制剂:雷特格韦,Elvite-gravir,Globoidnan A;

c)成熟抑制剂:Bevirimat,Vivecon;

d)神经氨酸酶抑制剂:奥司他韦,扎那米韦,帕拉米韦;

e)核苷和核苷酸:阿巴卡韦,阿昔单韦,阿德福韦,阿莫西韦,阿昔单抗,溴夫定,西多福韦,克拉夫定,地塞米松,去羟肌苷(ddI),Elvucitabine,恩曲他滨(FTC),恩替卡韦,泛昔洛韦,氟拉西林(5-FU),3'-氟取代的2',3'-脱氧核苷同系物,如3'-氟-2',3'-双脱氧胸苷(FLT)和3'-氟-2',3'-双脱氧鸟苷(FLG),福米韦生,9-鸟嘌呤,碘苷,拉米夫定(3TC),1-核苷(例如β-1-胸苷和β-1-2'-脱氧胞苷),喷昔洛韦,racivir,利巴韦林,迪替丁,司他夫定(d4T),塔利巴韦林(Viramidine),替比夫定,替诺福韦,三氟尿苷伐昔洛韦,缬更昔洛韦,扎西他滨(ddC),齐多夫定(AZT);

f)非核苷类:金刚烷胺,阿替吡啶,卡普韦林,二芳基嘧啶(依曲韦林,Rilpivirine),地拉夫定,二十二烷醇,乙米韦林,依法韦仑,膦甲酸(磷酰基甲酸),咪喹莫特,聚乙二醇干扰素,洛韦胺,洛德腺苷,甲吲噻腙,奈韦拉平,NOV-205,长效干扰素α,鬼臼毒素,利福平,金刚乙胺,瑞喹莫德(R-848),醋胺金刚烷;

g)蛋白酶抑制剂:安普那韦,阿扎那韦,Boceprevir,Darunavir,福萨那韦,印地那韦,洛匹那韦,奈非那韦,普来可那立,利托那韦,沙奎那韦,Telaprevir(VX-950),替拉那韦;

h)其它类型的抗病毒药物:抗体酶,阿比朵尔,Aalanolide A,Ceragenin,氰维林-n,二芳基嘧啶,表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG),膦甲酸,格里菲辛,Taribavirin(viramidine),羟基脲,KP-1461,米替福新,普来可那立,混成抑制剂,利巴韦林,Seliciclib。

5)上述药物的药学上可接受的盐、酸、衍生物、水合物或水合盐;或多晶型结晶;或其光学异构体、外消旋物、非对映异构体或对映异构体。

23.如权利要求20所述的协同治疗药物选自以下药物中的一种或几种:阿巴西普,阿巴霉素,醋酸阿比嗪,阿巴拉辛,对乙酰氨基酚/氢可酮,Acalabrutinib,阿杜卡单抗,阿达木单抗,ADXS31-142,ADXS-HER2,阿法替尼马来酸,阿地白介素,Alectinib,阿仑单抗,阿利维A酸,ado-trastuzumab emtansine,安非他明/右旋安非他命,阿那曲唑,阿立呱唑,蒽环霉素,阿立呱唑,阿扎那韦,Atezolizumab,阿托伐他汀,阿维鲁单抗,Axicabtagene ciloleucel,阿西替尼,贝利司他,BCG Live,贝伐单抗,贝沙罗汀,布列那图单抗,硼替佐米,博苏替尼,Brentuximab vedotin,布地奈德,布地奈德/福莫特罗,丁丙诺啡,卡巴他赛,卡博替尼,Capmatinib,卡培他滨,卡非佐米,嵌合抗原受体工程T细胞(CAR-T),塞来昔布,色瑞替尼,西妥昔单抗,西达本胺,环孢霉素,西那卡塞,克唑替尼,Cobimetinib,Cosentyx,克唑替尼,CTL019,达比加群酯,达拉非尼,达卡巴嗪,达利珠单抗,达克罗替尼,达托霉素,达拉图单单抗,达比泊汀阿尔法,达鲁那韦,达沙替尼,地尼白介素-白喉毒素,狄诺苏单抗,丙戊酸钠,地塞兰索拉唑,右旋呱醋甲酯,地塞米松,地奈卡普,二努妥昔单抗,多西环素,度洛西汀,双维利西布,杜瓦卢单抗,埃洛妥珠单抗,恩曲他滨/利匹韦林/替诺福韦酯,恩曲他滨/替诺福韦/埃法韦伦茨,依诺肝素,Ensartinib,恩杂鲁胺,Epoetinα,厄洛替尼,埃索美拉唑,艾司佐匹克隆,依那西普,依维莫司,依西美坦,依维莫司,艾塞那肽,依泽替米贝,依泽替米贝/辛伐他汀,非诺贝特,非格司亭,芬戈莫德,丙酸氟替卡松,氟替卡松/沙美特罗,氟维司群,吉非替尼,格拉替雷,醋酸戈舍瑞林,Icotinib,伊马替尼,Ibritumomab tiuxetan,依鲁替尼,Idelalisib,异环磷酰胺,英夫利昔单抗,咪喹莫特,ImmuCyst,Immuno BCG,Iniparib,门冬胰岛素,地特胰岛素,甘精胰岛素,胰岛素赖脯胰岛素,干扰素α,干扰素α-1b,干扰素α-2a,干扰素α-2b,干扰素β,干扰素β1a,干扰素β1b,干扰素γ-1a,拉帕替尼,Ipilimumab,异丙托溴铵/沙丁胺醇,Ixazomib,Kanuma,醋酸兰瑞肽,来那度胺,来那度胺,楽伐替尼甲磺酸盐,来曲唑,左旋甲状腺素,利多卡因,利奈唑胺,利拉鲁肽,Lisdexamfetamine,LN-144,劳拉替尼,美金刚,呱甲酯,美托洛尔,曲美替尼,Mericitabine/利匹韦林/替诺福韦,莫达非尼,莫米他松,Mycidac-C,耐昔妥珠单抗,来那替尼,尼洛替尼,Niraparib,Nivolumab,奥法木单抗,奥滨尤妥珠单抗,奥拉帕尼,奥美沙坦酯,奥美沙坦/氢氯噻嗪,奥马珠单抗,Omega-3脂肪酸乙酯,安珂瑞,奥司他韦,奥西替尼,羟可酮,帕博西尼,帕丽珠单抗,帕尼单抗,Panobinostat,帕唑帕尼,Pembrolizumab,PD-1抗体,PD-L1抗体,培美曲塞,帕妥珠单抗,肺炎球菌结合疫苗,泊马度胺,普瑞巴林,ProscaVax,普萘洛尔,喹硫平,雷贝拉唑,镭223氯化物,雷洛昔芬,雷特格韦,雷莫芦单抗,雷珠单抗,瑞格列单,Ribociclib,利妥昔单抗,利伐沙班,罗米地辛,瑞舒伐他汀,鲁素替尼磷酸盐,沙丁胺醇,Savolitinib,素马鲁肽,司维拉姆,西地那非,司妥昔单抗,Sipuleucel-T,西他列汀,西他列汀/二甲双胍,索非那新,Solanezumab,索尼吉布,索拉非尼,舒尼替尼,他克莫司,Tacrimus,他达拉非,他莫昔芬,达拉非尼,Talimogene laherparepvec,

Talazoparib,特拉匹韦,Talazoparib,替莫唑胺,替西罗莫司,替诺福韦/恩曲他滨,替诺福韦酯,睾酮凝胶,沙利度胺,TICE BCG,噻托溴铵,Tisagenlecleucel,托瑞米芬,曲妥珠单抗,曲贝替定(Ecteinascidin 743),曲美替尼,Tremelimumab,三氟尿嘧啶/替吡嘧啶,维生素A酸,Uro-BCG,尤特克单抗,缬沙坦,维利帕尼,凡德他尼,维罗非尼,Venetoclax,伏立诺他,阿柏西普,Zostavax及其同系物、衍生物、药学上可接受的盐、载体、稀释剂或其辅料,或上述组合。

含支链连接体的Tubulysin同系物偶联物

技术领域

[0001] 本发明涉及以含支链(侧链)连接体偶联Tubulysin同系物和细胞结合分子,产生的偶联物具有更好的药代动力学性质、从而能更精确地靶向杀死异常细胞。本发明还涉及Tubulysin同系物与细胞结合剂的偶联方法,以及使用该偶联物靶向治疗癌症、感染和自身免疫疾病的方法。

背景技术

[0002] Adcetris治疗复发或难治性霍奇金淋巴瘤的临床成功(Okeley,N.等Hematol Oncol.Clin.North.Am,2014,28,13-25;Gopal,A.,等,Blood 2015,125,1236-43)和Kadcyla用于治疗复发的HER2阳性乳腺癌的成功(Peddi,P.,Hurvitz,S.,Ther.Adv.Med.Oncol.2014,6(5),202-9;Lambert,J.和Chari,R.,J.Med.Chem.2014,57,6949-64)证明了抗体药物偶联物(ADC)是一种非常有前景的癌症靶向治疗方法。产生一个成功的ADC药物需要考虑的要素包括单克隆抗体、细胞毒性分子和连接体等三个组成部分,以及连接体-细胞毒性分子与抗体的连接位点(L.Ducry和B Stump,Bioconjugate Chem.,2010,21,5-13;GS Hamilton,Biologicals 2015,43,318-32)。连接体需要满足可以和药物上特定的反应性官能团反应,在人体血液循环系统具有稳定性,并且在与抗原结合和细胞内吞后要容易释放药物,尤其重要的是连接体-细胞毒性分子一旦在血液循环中脱靶后不能损害正常组织等特性,虽然人们对于ADC各组分,包括连接体的研究已持续有三十年的历史,但现有的连接技术仍然有限(Ponte,J.等,Bioconj.Chem.,2016,27(7),1588-98;Dovgan,I.等Sci.Rep.2016,6,30835;Ross,P.L.和Wolfe,J.L.,J Pharm.Sci.105(2),391-7;Chen,T.等J.Pharm.Biomed.Anal.,2016,117,304-10)。

[0003] 在早期主要用于靶向治疗液体肿瘤的ADC药物中,连接体很不稳定,导致游离药物在血液循环中被释放,进而出现脱靶毒性(B和er,N.H.等,Clin.Adv.Hematol.Oncol.,2012,10,1-16)。当前的ADC上的连接体更稳定,细胞毒性剂的活性也更高(Behrens,C.R.和Liu,B.,mAbs,2014.6,46-53)。然而,脱靶毒性目前仍然是ADC药物开发中的主要挑战之一(Roberts,S.A.等,Regul.Toxicol.Pharmacol.2013,67,382-91)。例如在临床实践中Ado-trastuzumab emtansine(T-DM1,Kadcyla®)使用了稳定的(不可切割的)MCC连接体,它对HER2阳性患有转移性乳腺癌(mBC),或已经接受了mBC治疗,或在辅助治疗的六个月内HER2肿瘤复发的患者有很大益处(Peddi,P.和Hurvitz,S.,Ther.Adv.Med.Oncol.2014,6(5),202-209;Piwko C.等,Clin Drug Investig.2015,35(8),487-93;Lambert,J.和Chari,R.,J.Med.Chem.2014,57,6949-64)。但是,在临床试验中,T-DM1作为HER2阳性的无法切除的局部晚期或转移性乳腺癌患者的一线治疗药物已经失败,作为HER2阳性晚期胃癌的二线治疗药物,与其产生的毒副作用相比,它对患者的益处不大(Ellis,PA,等,J.Clin.Oncol.2015,33(2015ASCO会议摘要507);Shen,K.等,Sci Rep.2016,6,23262;de Goeij,B.E.和Lambert,J.M.Curr Opin Immunol 2016,40,14-23;Barrios,C.H.等,J Clin Oncol2016,34,(2016ASCO会议摘要593))。

[0004] 为了解决脱靶毒性的问题，ADC化学研发的一个方向就是，将连接体-细胞毒性剂组分类别和偶联化学扩展，不仅仅应用单个的细胞毒性剂，这样做同时还解决了ADC的连接体-细胞毒性剂对目标疾病的活性问题(Lambert,JM Ther Deliv 2016,7,279-82;Zhao,RY等,2011,J.Med.Chem.54,3606-23)。许多药物的研发者和学术机构都集中力量来开发新型的可靠的特异偶联连接体，定点ADC偶联方法，产生的ADC的循环半衰期更长，疗效更高，能降低脱靶毒性，ADC具有窄的体内药代动力学(PK)特性，生产工艺的批间一致性更好(Hamblett,K.J.等Clin.Cancer Res.2004,10,7063-70;Adem,Y.T.等,Bioconjugate Chem.2014,25,656-664;Boylan,N.J.Bioconjugate Chem.2013,24,1008-1016;Strop,P.等,Chem.Biol.2013,20,161-67;Wakankar,A.mAbs,2011,3,161-172)。已见报导的这些定点偶联方法包括：抗体中引入经改造的半胱氨酸(Junutula,J.R.等,Nat.Biotechnol.2008,26,925-32;Junutula,JR,等2010 Clin.Cancer Res.16,4769;US专利8,309,300;7,855,275;7,521,541;7,723,485,WO2008/141044)，硒代半胱氨酸(Hofer,T.等,Biochemistry 2009,48,12047-57;Li,X.等,Methods 2014,65,133-8;US专利8,916,159)，含全氟芳香族试剂标签的半胱氨酸(Zhang,C.等,Nat.Chem.2015,8,1-9)，硫代海藻糖(Okeley,N.M.等,Bioconjugate Chem.2013,24,1650)，非天然氨基酸(Axup,J.Y.等,Proc.Nat.Acad.Sci.USA.2012,109,16101-6;Zimmerman,E.S.等,2014,Bioconjug.Chem.25,351-361;Wu,P.,等,2009Proc.Natl.Acad.Sci.106,3000-5;Rabuka,D.,等,Nat.Protoc.2012,7,1052-67;美国专利8,778,631和美国专利申请号.20100184135,WO2010/081110;WO2006/069246,2007/059312;美国专利7,332,571,7,696,312和7,638,299;WO2007/130453,美国专利7,632,492和7,829,659)；还原抗体分子间双硫键后通过下列基团再成桥：二溴马来酰胺(Jones,MW等.J.Am.Chem.Soc.2012,134,1847-52)，双砜试剂(Badescu,G.等.Bioconjug.Chem.2014,25,1124-36;WO2013/190272,WO2014/064424)和双溴哒嗪二酮(Maruani,A.等.Nat.Commun.2015,6,6645)；通过半乳糖和唾液酸转移酶(Zhou,Q.等.Bioconjug.Chem.2014,25,510-520;美国专利申请号20140294867Sanofi-Genzyme公司)，甲酰甘氨酸生成酶(FGE)(Drake,PM等.Bioconj.Chem.2014,25,1331-41;Carrico,IS等美国专利7,985,783;8,097,701;8,349,910和美国专利申请号20140141025,20100210543)，磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(PPTases)(Grünewald,J.等.Bioconjug.Chem.2015,26,2554-62)，分选酶A(Beerli,RR,等.PLoS One 2015,10,e0131177)，用茂原链轮丝菌转谷氨酰胺酶引入的谷氨酰胺标签(mTG)(Strop,P.,Bioconj.Chem.,2014,25,855-62;Strop,P.,等.,Chem.Biol.2013,20,161-7;美国专利8,871,908)，或是用微生物转谷氨酰胺酶(MTGase)引入的谷氨酰胺标签(Dennler,P.,等,2014,Bioconjug.Chem.25,569-78;Siegmund,V.等.Angew.Chemie-Int.Ed.2015,54,13420-4;美国专利申请号20130189287;美国专利7,893,019)，通过酶或细菌在蛋白质主链外形成异肽键-肽键(Kang,HJ,等.Science 2007,318,1625-8;Zakeri,B.等.Proc.Natl.Acad.Sci.USA2012,109,E690-7;Zakeri,B.&Howarth,MJ Am.Chem.Soc.2010,132,4526-7)等。

[0005] 我们已经公开了几种偶联方法，重新桥接天然抗体链间二硫化物被还原产生的一对硫醇，例如使用溴马来酰亚胺和二溴马来酰亚胺连接体(WO2014/009774)，2,3-二取代琥珀酸/2-单取代/2,3-二取代富马酸或马来酸连接体(WO2015/155753,WO20160596228)，乙

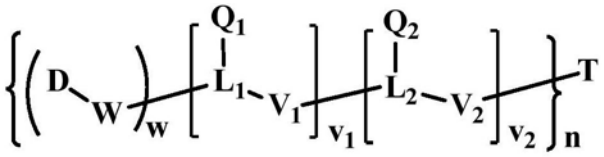
炔二羧基连接体(WO2015/151080,WO20160596228)或肼连接体(WO2015/151081)。相较于与抗体上的半胱氨酸或赖氨酸残基偶联的传统非选择性方法相比,用这些连接体和偶联方法制备的ADC的治疗窗口更大。在此我们公开一种含有长支链连接体的Tubulysin偶联物。长支链连接体可以防止抗体药物偶联物被水解酶如蛋白酶或酯酶等水解,使偶联物在循环系统中更加稳定。

[0006] Tubulysin是一类高效的细胞毒性剂,它在本领域广为熟知,可以基于已知方法从天然产物中分离或通过有机合成的方法制备(如Balasubramanian,R.,等.J.Med.Chem.,2009,52,238-40;Wipf,P.,等.Org.Lett.,2004,6,4057-60;Pando,O.,等.J.Am.Chem.Soc.,2011,133,7692-5;Reddy,J.A.,等.Mol.Pharmaceutics,2009,6,1518-25;Raghavan,B.,等.J.Med.Chem.,2008,51,1530-33;Patterson,A.W.,等.J.Org.Chem.,2008,73,4362-9;Pando,O.,等.Org.Lett.,2009,11(24),5567-9;Wipf,P.,等.Org.Lett.,2007,9(8),1605-7;Friestad,G.K.,Org.Lett.,2004,6,3249-52;Peltier,H.M.,等.J.Am.Chem.Soc.,2006,128,16018-9;Chanrasekhar,S.,等J.Org.Chem.,2009,74,9531-4;Liu,Y.,等.Mol.Pharmaceutics,2012,9,168-75;Friestad,G.K.,等.Org.Lett.,2009,11,1095-8;Kubicek,K.,等.,Angew Chem Int Ed Engl,2010.49:4809-12;Chai,Y.,等.,Chem Biol,2010,17:296-309;Ullrich,A.,等.,Angew Chem Int Ed Engl,2009,48,4422-5;Sani,M.,等.Angew Chem Int Ed Engl,2007,46,3526-9;Domling,A.,等.,Angew Chem Int Ed Engl,2006,45,7235-9;Zanda,M.,等,Can.Pat.Appl.CA 2710693(2011);Chai,Y.,等.Eur.Pat.Appl.2174947(2010),WO 2010034724;Leamon,C.等,WO2010033733,WO 2009002993;Ellman,J.,等,PCT WO2009134279;WO 2009012958;美国专利申请20110263650,20110021568;Matschiner,G.,等,WO2009095447;Vlahov,I.,等,WO2009055562,WO 2008112873;Low,P.,等,WO2009026177;Richter,W.,WO2008138561;Kjems,J.,等,WO 2008125116;Davis,M.;等,WO2008076333;Diener,J.;等,美国专利申请20070041901,WO2006096754;Matschiner,G.,等,WO2006056464;Vaghefi,F.,等,WO2006033913;Doemling,A.,Ger.Offen.DE102004030227,WO2004005327,WO2004005326,WO2004005269;Stanton,M.,等,美国专利申请20040249130;Hoefle,G.,等,Ger.Offen.DE10254439,DE10241152,DE10008089;Leung,D.,等,WO2002077036;Reichenbach,H.,等,Ger.Offen.DE19638870;Wolfgang,R.,US20120129779;Chen,H.,美国专利申请20110027274。我们先前公开了用于靶向治疗癌症,感染和自身免疫疾病的Tubulysin偶联物(PCT/IB2012/053554)的构建。本发明中的含有长支链连接体的Tubulysin偶联物在靶向传送期间半衰期增加,在血液循环中对非靶细胞、组织或器官的暴露最小,导致脱靶毒性降低。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明描述了连接Tubulysin同系物与抗体的支链连接体,还描述了使用该连接体将Tubulysin同系物与抗体偶联的方法。

[0009] 此项发明的一个方面,含有支链连接体的偶联物以结构式(I)表示:

[0010] 

(I)

[0011] 其中

[0012] “–”代表单键;n为1到30;

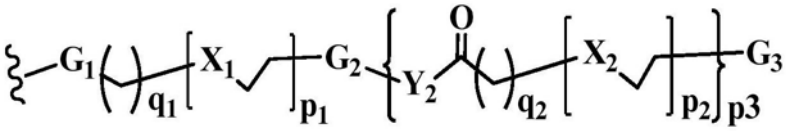
[0013] T是细胞结合剂或分子,选自抗体、单链抗体、与靶细胞结合的抗体片段、单克隆抗体、单链单克隆抗体、结合靶细胞的单克隆抗体片段、嵌合抗体、结合靶细胞的嵌合抗体片段、结构域抗体、结合靶细胞的结构域抗体片段、adnectin类抗体、DARPin蛋白、淋巴因子、激素、维生素、生长因子、集落刺激因子、营养转运分子(转铁蛋白)和连接在白蛋白、聚合物、树状大分子、脂质体、纳米粒子、囊泡或(病毒)衣壳上的细胞结合肽、蛋白质或小分子;

[0014] L_1和L_2是由C、N、O、S、Si和P等原子构成的链状结构,优选具有0-500个原子的,共价连接W和V_1,V_1和V_2。构成L_1和L_2的原子可以以任何化学方式相组合,例如形成亚烷基、亚烯基和亚炔基、醚、聚氧化烯、酯、胺、亚胺、多胺、肼、腙、酰胺、脲、氨基脲、二氨基脲、烷氧基胺、氨基甲酸酯、氨基酸、肽、酰氧基胺、异羟肟酸或上述的组合。优选的L_1和L_2,相同或不同,独立地选自于O、NH、N、S、P、NNH、NHNH、N(R_3)、N(R_3)N(R_3')、CH、CO、C(O)NH、C(O)O、NHC(O)NH、NHC(O)O;如下列结构式的聚乙烯氧基:$(OCH_2CH_2)_pOR_3$、或$(OCH_2CH(CH_3))_pOR_3$、或$NH(CH_2CH_2O)_pR_3$、或$NH(CH_2CH(CH_3)O)_pR_3$、或$N[(CH_2CH_2O)_pR_3]-[(CH_2CH_2O)_{p'}R_3']$或$(OCH_2CH_2)_pCOOR_3$、或$CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_pCOOR_3$,其中p和p'是独立选自0到约1000的整数,或它们的组合;C_1-C_8烷基;C_2-C_8杂烷基、烷基环烷基、杂环烷基;C_3-C_8芳基、芳烷基、杂环、碳环、环烷基、杂烷基环烷基、烷基羰基、杂芳基;或$(Aa)_r$,r=1-12(1至12个氨基酸单位),包括天然或非天然氨基酸,相同或不同序列的二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一肽或十二肽单元;

[0015] W是一个延展体单元,通常是自毁灭的间隔体、一个多肽单元、腙、二硫化物、硫醚、酯或酰胺键;w是1或2或3;

[0016] V_1和V_2是独立的间隔体单元,选自O,NH,S,C_1-C_8烷基;C_2-C_8杂烷基、烯基或炔基;C_3-C_8芳基、杂环、碳环、环烷基、烷基环烷基、杂环烷基、杂芳烷基、杂烷基环烷基,或烷羰基;或$(Aa)_r$、r=1-12(1-12个氨基酸单元),包括天然或非天然氨基酸,相同或不同序列的二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一肽或十二肽单元;或$(CH_2CH_2O)_p$,p为0-1000;v_1和v_2独立为0、1或2,但v_1和v_2不同时为0,当v_1或v_2为0时,意味着侧链Q_1或Q_2片段缺省。

[0017] Q_1和Q_2独立地由式(I-q1)表示:

[0018] 

(I-q1);

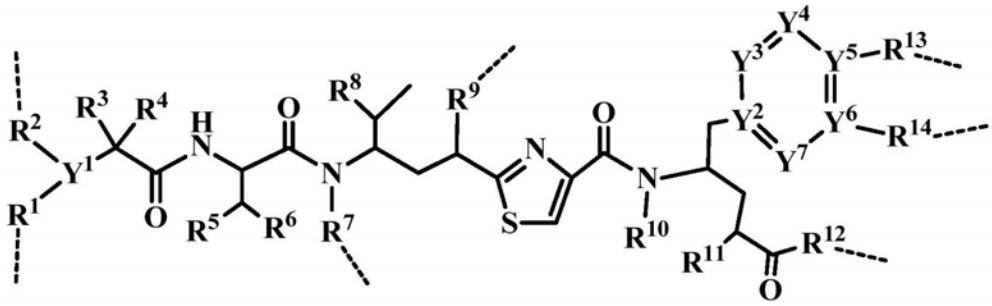
[0019] 其中∿∿是连接至L_1或L_2的位置,G_1和G_2独立地为OC(O),NHC(O),C(O),CH_2,NH,OC(O)NH,NHC(O)NH,O,S,B,P(O)(OH),NHP(O)(OH),NHP(O)(OH)NH,CH_2P(O)(OH)NH,OP(O)(OH)O,CH_2P(O)(OH)O,NHS$(O)_2$,NHS$(O)_2$NH,CH_2S$(O)_2$NH,OS$(O)_2$O,CH_2S$(O)_2$O,Ar,ArCH_2,ArO,ArNH,ArS,ArNR_1,$(Aa)_r$,(r=1-12);X_1和X_2独立地为O,CH_2,S,NH,N(R_1),$^+$NH(R_1),$^+$N(R_1)(R_2),C(O),

OC(O),OC(O)O,OC(O)NH,NHC(O)NH;Y_2为O,NH,NR_1,CH_2,S;G_3为OH,SH,OR_1,SR_1,OC(O)R_1,NHC(O)R_1,C(O)R_1,CH_3,NH_2,NR_1,$^+NH(R_1)$,$^+N(R_1)(R_2)$,C(O)OH,C(O)NH_2,NHC(O)NH_2,BH_2,BR_1R_2,P(O)$(OH)_2$,NHP(O)$(OH)_2$,NHP(O)$(NH_2)_2$,S(O)$_2$(OH),$(CH_2)_{q1}$C(O)OH,$(CH_2)_{q1}$P(O)$(OH)_2$,C(O)$(CH_2)_{q1}$C(O)OH,OC(O)$(CH_2)_{q1}$C(O)OH,NHC(O)$(CH_2)_{q1}$C(O)OH,CO$(CH_2)_{q1}$P(O)$(OH)_2$,NHC(O)O$(CH_2)_{q1}$C(O)OH,OC(O)NH$(CH_2)_{q1}$C(O)OH,NHCO$(CH_2)_{q1}$P(O)$(OH)_2$,NHC(O)(NH)$(CH_2)_{q1}$C(O)OH,CONH$(CH_2)_{q1}$P(O)$(OH)_2$,NHS(O)$_2$$(CH_2)_{q1}$C(O)OH,CO$(CH_2)_{q1}$S(O)$_2$(OH),NHS(O)$_2NH(CH_2)_{q1}$C(O)OH,OS(O)$_2NH(CH_2)_{q1}$C(O)OH,NHCO$(CH_2)_{q1}$S(O)$_2$(OH),NHP(O)(OH)(NH)$(CH_2)_{q1}$C(O)OH,CONH$(CH_2)_{q1}$S(O)(OH),OP(O)$(OH)_2$,$(CH_2)_{q1}$P(O)$(NH)_2$,NHS(O)$_2$(OH),NHS(O)$_2NH_2$,$CH_2S(O)_2NH_2$,OS(O)$_2$OH,OS(O)$_2OR_1$,$CH_2S(O)_2OR_1$,Ar,$ArR_1$,ArOH,$ArNH_2$,ArSH,$ArNHR_1$或$(Aa)_{q1}$,$p_1$,$p_2$和$p_3$独立地是0-100,但是不同时为0,$q_1$和$q_2$独立地是0-24;

[0020] 优选的Q_1和Q_2独立地是C_2-C_{90}聚羧酸或C-$_2$-C_{90}聚烷基胺,C_6-C_{90}寡糖或多糖,C_6-C_{90}含季铵阳离子和羧酸阴离子的两性离子或含季铵阳离子和磺酸阴离子的两性离子(PSB),可生物降解的聚合物,如聚乳酸/乙醇酸(PLGA)、聚(丙烯酸酯)、脱乙酰壳多糖、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺的共聚物、聚[2-(甲基丙烯酰氧基)乙基磷酸胆碱](PMPC)、聚-L-谷氨酸、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLG)、聚(乙二醇)(PEG)、聚(丙二醇)(PPG)、聚(乙二醇)改性肽、聚(乙二醇)改性脂质体、聚(乙二醇)改性烷基羧酸、聚(乙二醇)改性烷基胺、透明质酸(HA)(糖胺聚糖)、肝素或硫酸乙酰肝素(HSGAG)、硫酸软骨素或硫酸皮素(CSGAG)、聚(乙二醇)改性的烷基硫酸盐、聚(乙二醇)改性的烷基磷酸盐或聚(乙二醇)改性的烷基季铵盐;

[0021] D是具有以下结构式(II)的Tubulysin同系物:

[0022]



(II)

[0023] 或是其药学上可接受的盐、水合物或水合盐;或多晶型结晶;或其光学异构体、外消旋物、非对映异构体或对映异构体,

[0024] 其中-----是独立地连接至W的连接位点;

[0025] R^1,R^2,R^3和R^4独立地为H,C_1-C_8烷基;C_2-C_8杂烷基、烯基或炔基;C_3-C_8芳基、芳烷基、环烷基、烷基环烷基、杂环烷基、杂烷基环烷基,碳环或烷羰基;或R^1R^2、R^1R^3、R^2 R^3、R^3 R^4、R^5 R^6、R^{11} R^{12}或R^{13} R^{14}可形成3-7元的碳环、环烷、杂环、杂环烷、芳环或杂芳环结构;R^1和R^2独立地连接至W,它们独立地可以缺省;Y^1是N或CH;

[0026] R^5、R^6、R^8、R^{10}及R^{11}独立地是H或C_1-C_4烷基或杂烷基;

[0027] R^7选自H、R^{14}、-R^{14}C(=O)X^1R^{15}或-$R^{14}X^1R^{15}$;X^1是O、S、S-S、NH、CH_2或NR^{14};

[0028] R^9选自H、OH、-O-、=O、-OR^{14}、-OC(=O)R^{14}、-OC(=O)NHR^{14}-、-OC(=O)R^{14}SSR^{15}-、OP(=O)(OR^{14})-、-OC(=O)N$R^{14}R^{15}$、OP(=O)(OR^{14})或OR^{14}OP(=O)(OR^{15});

[0029] R^{11}选自H、R^{14}、-R^{14}C(=O)R^{16}、-$R^{14}X^2R^{16}$、-R^{14}C(=O)X^2,X^2指-O-,-S-,-NH-、-N

(R^{14})-、-O-R^{14}-、-S-R^{14}-、-S(=O)-R^{14}-、或-NHR^{14}；

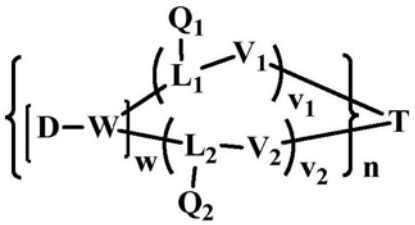
[0030] R^{12}是R^{15}、-OH、-SH、-NH_2、NH、$NHNH_2$、-NH(R^{15})、-OR^{15}、-R^{15}C(O)R^{16}、-R^{15}COOR^{16}、-R^{15}C(O)NH_2、-R^{15}C(O)NHR^{17}、-SR^{16}、R^{15}S(=O)R^{16}、-R^{15}P(=O)$(OR^{17})_2$、-R^{15}OP(=O)$(OR^{17})_2$、-CH_2OP(=O)$(OR^{17})_2$、-$R^{15}SO_2R^{17}$、-$R^{15}X^2R^{16}$和-R^{15}C(=O)X^2，X^2指-O-、OH、SH、-S-、NH_2、-NH-、-N(R^{15})-、-OR^{15}-、-SR^{15}-、-S(=O)R^{15}-、CH_2或-NHR^{15}-；

[0031] R^{13}和R^{14}独立地是H、O、S、NH、N(R^{15})、NHNH、-OH、-SH、-NH_2、NH、-$NHNH_2$、-NH(R^{15})、-OR^{15}、CO、-COX^2、-COX^2R^{16}、R^{17}、F、Cl、Br、I、SR^{16}、N$R^{16}R^{17}$、N=NR^{16}、N=R^{16}、NO_2、SO$R^{16}R^{17}$、SO_2R^{16}、SO_3R^{16}、OSO_3R^{16}、P$R^{16}R^{17}$、PO$R^{16}R^{17}$、$PO_2R^{16}R^{17}$、OP(O)$(OR^{17})_2$、OCH_2OP(O)$(OR^{17})_2$、OC(O)R^{17}、OC(O)OP(O)$(OR^{17})_2$、PO(OR^{16})(OR^{17})、OP(O)(OR^{17})OP(O)$(OR^{17})_2$、OC(O)NHR^{17}；-O-(C_4-C_{12}糖苷)、-N-(C_4-C_{12}糖苷)；C_1-C_8烷基、杂烷基；C_2-C_8烯基、炔基、杂烷基、杂环烷基；C_3-C_8芳基、芳烷基、碳环、环烷基、杂烷基环烷基、烷基羰基、杂芳基、2-8个碳原子的酯、醚或酰胺；或含有1-8个氨基酸的肽(NH(Aa)$_{1-8}$或CO(Aa)$_{1-8}$)；或结构式是$(OCH_2CH_2)_p$或$(OCH_2CH(CH_3))_p$的聚亚烷基二醇，其中p是0至约1000的整数；或上述基团的组合；X^2是O、S、S-S、NH、CH_2、OH、SH、NH_2、CHR^{14}或NR^{14}；

[0032] R^{15}、R^{16}及R^{17}独立地是H、C_1-C_8烷基、杂烷基；C_2-C_8烯基、炔基、杂烷基、杂环烷基；C_3-C_8芳基、芳烷基、碳环、环烷基、杂烷基环烷基、烷基羰基、杂芳基、烷基羰基或是它们的Na^+，K^+，Cs^+，Li^+，Ca^{2+}，Mg^+，Zn^{2+}，$N^+(R^1)(R^2)(R^3)(R^4)$，$HN^+(C_2H_5OH)_3$盐；

[0033] Y^1和Y^2独立地是N或CH；q是0或1；当q=0时，Y^3缺省，Y^4、Y^5、Y^6和Y^7独立地是CH、N、NH、O、S或N(R1)，此时Y^2、Y^4、Y^5、Y^6和Y^7形成杂芳环，如呋喃、吡咯、噻吩、噻唑、恶唑和咪唑、吡唑、三唑、四唑、噻二唑；当q=1时，Y^3、Y^4、Y^5、Y^6和Y^7独立地是CH或N，此时Y^2、Y^3、Y^4、Y^5、Y^6和Y^7形成芳香环，如苯、吡啶、哒嗪、嘧啶、吡嗪、三嗪、四嗪、哒嗪；

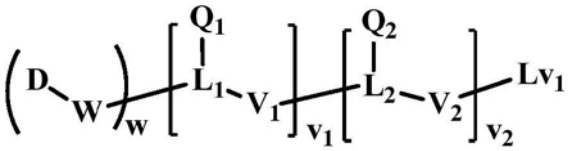
[0034] 本发明的另一方面，含有支链连接体的偶联物的结构式表示如(III)：

[0035] 

(III)

[0036] 其中，D、W、w、L_1、L_2、Q_1、Q_2、V_1、V_2、v_1、v_2、n和T的定义同结构式(I)。

[0037] 本发明的另一个方面，支链连接体化合物的结构如(IV)所示、它可以便利地与细胞结合分子T反应，形成式(I)中的偶联物：

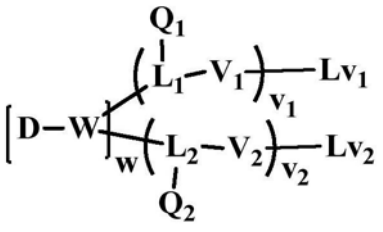
[0038] 

(IV)

[0039] 其中，D、W、w、L_1、L_2、Q_1、Q_2、V_1、V_2、v_1、v_2及n的定义同结构式(I)；

[0040] Lv1是下文所述的官能团。

[0041] 本发明的另一个方面，支链连接体化合物的结构如(V)所示、它可以便利地与细胞结合分子T反应，形成式(III)中的偶联物：

[0042] 

(V)

[0043] 其中，D、W、w、L_1、L_2、Q_1、Q_2、V_1、V_2、v_1、v_2及n的定义同结构式(I)。

[0044] Lv_1和Lv_2为相同或不同的反应官能团，这些官能团可以与细胞结合分子上的硫醇、胺、羧酸、硒醇、酚或羟基发生反应。Lv_1和Lv_2独立地选自羟基(OH)；氟(F)；氯(Cl)；溴(Br)；碘(I)；硝基酚基；N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)基；苯酚基；二硝基苯酚基；五氟苯酚基；四氟苯酚基；三氟苯酚基；二氟苯酚基；一氟苯酚基；五氯苯酚基；三氟甲磺酰基；咪唑基；二氯苯酚基；三氯苯酚基；四氯苯酚基；1-羟基苯并三唑基；甲苯磺酰基；甲磺酰基；2-乙基-5-苯基异恶唑-3'-磺酰基、酸酐或与其它酸酐作用形成的酸酐，例如乙酸酐、甲酸酐；或与多肽缩合试剂、Mitsunobu反应试剂作用生成的中间体。缩合剂的例子如下：1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)、二环己基碳二亚胺(DCC)、N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)、N-环己基-N'-(2-吗啉代-乙基)碳二亚胺甲基对甲苯磺酸盐(CMC或CME-CDI)、1,1'-羰基二咪唑(CDI)、氧-(苯并三唑-1-)基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐(TBTU)、N,N,N',N'-四甲基-氧-(1H-苯并三唑-1-基)-六氟磷酸铵(HBTU)、(苯并三唑-1-基氧基)三(二甲基氨基)-六氟磷酸盐(BOP)、(苯并三唑-1-基氧基)三吡咯烷基六氟磷酸盐(PyBOP)、氰基膦酸二乙酯(DEPC)、氯-N,N,N',N'-四甲基甲脒六氟磷酸盐、1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶3-氧六氟磷酸盐(HATU)、1-[(二甲氨基)(吗啉代)亚甲基]-1H-[1,2,3]三唑并[4,5-b]吡啶-1-鎓3-氧六氟磷酸盐(HDMA)、2-氯-1,3-二甲基-咪唑六氟磷酸盐(CIP)、六氟磷酸氯代吡咯烷酮鎓(PyCloP)、氟-N,N,N',N'-双(四亚甲基)甲脒六氟磷酸盐(BTFFH)、N,N,N',N'-四甲基-S-(1-氧代-2-吡啶基)硫脲六氟磷酸盐、氧-(2-氧代-1(2H)吡啶基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐(TPTU)、S-(1-氧代-2-吡啶基)N,N,N',N'-四甲基硫脲四氟硼酸盐、氧-[(乙氧基羰基)-氰基甲基氨基]-N,N,N',N'-六氟磷酸四甲基脲(HOTU)、(1-氰基-2-乙氧基-2-氧代乙基氨基氧基)二甲氨基-吗啉代-六氟磷酸盐(COMU)、氧-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-双(四亚甲基)六氟磷酸盐(HBPyU)、N-苄基-N'-环己基-碳二亚胺(有或没有聚合物结合)、二吡咯烷基(N-琥珀酰亚胺基氧基)碳鎓六氟磷酸盐(HSPyU)、氯二吡咯烷基六氟磷酸盐(PyClU)、2-氯-1,3-二甲基咪唑四氟硼酸盐(CIB)、(苯并三唑-1-基氧基)二吡啶碳六氟磷酸盐(HBPipU)、氧-(6-氯苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐(TCTU)、溴代(二甲基氨基)-六氟磷酸盐(BroP)、丙基膦酸酐(PPACA、T3P®)、2-吗啉代乙基异氰化物(MEI)、N,N,N',N'-四甲基-氧-(N-琥珀酰亚胺基)六氟磷酸盐(HSTU)、2-溴-1-乙基-吡啶鎓四氟硼酸盐(BEP)、氧-[(乙氧基羰基)氰基-亚甲基氨基]-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐(TOTU)、4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉氯化物(MMTM、DMTMM)、N,N,N',N'-四甲基-氧-(N-琥珀酰亚胺基)脲四氟硼酸(TSTU)、O-(3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐(TDBTU)、1,1'-(偶氮二羰基)-二吡啶(ADD)、二-(4-氯苄基)偶氮二羧酸酯(DCAD)、偶氮二羧酸二叔丁酯(DBAD)、偶氮二羧酸二异丙酯(DIAD)、偶氮二羧酸二乙酯(DEAD)。另外，Lv_1和Lv_2可以是酸酐，或与其它C_1-C_8酸酐作用形成的酸酐；

[0045] 本发明进一步涉及(I)和(III)中的细胞结合分子-药物偶联物的制备方法,以及(I)和(III)中的偶联物的应用。

附图说明

[0046] 图1.Tubulysin同系物中Tuv片段的合成线路。

[0047] 图2.Tubulysin片段的合成。

[0048] 图3.Tubulysin片段的合成。

[0049] 图4.Tubulysin同系物片段的合成。

[0050] 图5.Tubulysin同系物片段的合成。

[0051] 图6.Tubulysin同系物片段的合成。

[0052] 图7.Tubulysin同系物片段的合成。

[0053] 图8.含有连接体的Tubulysin同系物片段的合成。

[0054] 图9.Tubulysin同系物片段的合成及其与抗体的偶联。

[0055] 图10.支链连接体片段的合成。

[0056] 图11.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0057] 图12.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0058] 图13.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0059] 图14.含有支链连接体的Tubulysin同系物片段的合成及其与抗体的偶联。

[0060] 图15.支链连接体片段的合成及其与Tup片段的连接。

[0061] 图16.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0062] 图17.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0063] 图18.Tubulysin同系物片段的合成。

[0064] 图19.Tubulysin同系物片段的合成。

[0065] 图20.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0066] 图21.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0067] 图22.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0068] 图23.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。。

[0069] 图24.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0070] 图25.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0071] 图26.含有支链连接体的Tubulysin片段的合成。

[0072] 图27.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其通过抗体上的一对巯基与抗体偶联。

[0073] 图28.含有支链连接体的Tubulysin片段的合成。

[0074] 图29.有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其通过抗体上的一对巯基与抗体偶联。

[0075] 图30.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其通过抗体上的一对巯基与抗体偶联。

[0076] 图31.Tubulysin片段的合成。

[0077] 图32.Tubulysin片段的合成。

[0078] 图33.Tubulysin片段的合成。

[0079] 图34.含有支链连接体的Tubulysin片段的合成。

[0080] 图35.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0081] 图36.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0082] 图37.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0083] 图38.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0084] 图39.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0085] 图40.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0086] 图41.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0087] 图42.Tubulysin同系物的合成。

[0088] 图43.Tubulysin同系物的合成。

[0089] 图44.Tubulysin同系物的合成。

[0090] 图45.Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0091] 图46.Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0092] 图47.Tubulysin同系物的合成。

[0093] 图48.Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0094] 图49.Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0095] 图50.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0096] 图51.Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0097] 图52.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0098] 图53.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其通过抗体上的一对巯基与抗体偶联。

[0099] 图54.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其通过抗体上的一对巯基与抗体偶联。

[0100] 图55.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0101] 图56.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0102] 图57.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0103] 图58.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其通过抗体上的一对巯基与抗体偶联。

[0104] 图59.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其通过抗体上的一对巯基与抗体偶联。

[0105] 图60.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其通过抗体上的一对巯基与抗体偶联。

[0106] 图61.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0107] 图62.含有支链连接体的Tubulysin同系物的合成及其与抗体的偶联。

[0108] 图63.在人胃癌N87细胞模型上，在6mg/kg剂量下静脉一次注射，偶联化合物474、486、493、601、626、637、641、669、673、680和692与T-DM1的抗肿瘤作用的比较。

[0109] 图64.在小鼠血清中有支链连接体的偶联物(680和692)以及常规单连接的偶联物(133)与T-M1的稳定性的比较。

发明内容

[0110] 定义

[0111] “烷基”是指在烷烃上除去一个或两个氢原子而产生的脂肪烃基团或单价基团。它可以是直链或是支链的，在链中具有C_1-C_8(1-8个碳原子)。“支链”是指直链烷基上连接有一个或多个低碳数的烷基，如甲基、乙基或丙基。示例性的烷基包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、正戊基、3-戊基、辛基、壬基、癸基、环戊基、环己基、2,2-二甲基丁基、2,3-二甲基丁基、2,2-二甲基戊基、2,3-二甲基戊基、3,3-二甲基戊基、2,3,4-三甲基戊基、3-甲基-己基、2,2-二甲基己基、2,4-二甲基己基、2,5-二甲基己基、3,5-二甲基己基、2,4-二甲基戊基、2-甲基庚基、3-甲基庚基、正庚基、异庚基、正辛基和异辛基。C_1-C_8烷基可以是未被取代的或被一个或多个基团取代，包括但不限于-C_1-C_8烷基、-O-(C_1-C_8烷基)、-芳基、-C(O)R’、-OC(O)R’、-C(O)OR’、-C(O)NH_2,-C(O)NHR’、-C(O)N(R’)$_2$、-NHC(O)R’、-SR’、-S(O)$_2$R’、-S(O)R’、-OH、-卤素、-N_3、-NH_2、-NH(R’)、-N(R’)$_2$和-CN;其中每个R’独立地选自-C_1-C_8烷基和芳基。

[0112] “卤素”指氟、氯、溴或碘原子;优选氟和氯原子。

[0113] “杂烷基”指其中1至4个碳原子独立地被选自O、S和N的杂原子所取代的C_2-C_8烷基。

[0114] “碳环”指含有3到8个碳原子的饱和或不饱和单环，或含有7到13个碳原子的饱和或不饱和双环。单环碳环有3到6个环原子，典型的有5或6个环原子。双环碳环有7到12个环原子，构成[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]的双环系统，或有9个或10个环原子，构成[5、6]或[6,6]的双环系统。具有代表性的C_3-C_8的碳环包括但不限于:-环丙基、-环丁基、-环戊基、-环戊二烯基、-环己基、-环己烯基、-1,3-环己二烯基、-1,4-环己二烯基、-环庚基、-1,3-环庚二烯基、-1,3,5-环庚三烯基、-环辛基和-环辛二烯基。

[0115] C_3-C_8碳环可以是未被取代的或被一个或多个基团取代，包括但不限于-C_1-C_8烷基、-O-(C_1-C_8烷基)、-芳基、-C(O)R’、-OC(O)R’、-C(O)OR’、-C(O)NH_2、-C(O)NHR’、-C(O)N(R’)$_2$、-NHC(O)R’、-SR’、-S(O)R’、-S(O)$_2$R’、-OH、-卤素、-N_3、-NH_2、-NH(R’)、-N(R’)$_2$及-CN;其中每个R’独立地选自-C_1-C_8烷基和芳基。

[0116] “烯基”指含有碳-碳双键的直链或支链脂肪烃基团，链内含有2-8个碳原子。示例性的烯基包括乙烯基、丙烯基、正丁烯基、异丁烯基、3-甲基丁-2-烯基、正戊烯基、己烯基、庚烯基、辛烯基。

[0117] “炔基”指含有碳-碳三键的直链或支链脂肪烃基团，链内含有2-8个碳原子。示例性的炔基包括乙炔基、丙炔基、正丁炔基、2-丁炔基、3-甲基丁炔基、5-戊炔基、正戊炔基、己炔基、庚炔基和辛炔基。

[0118] “亚烷基”是指含1-18个碳原子的饱和的支炼或直链或环状烃基，并带有两个通过从母体烷烃的相同或两个不同碳原子上除去两个氢原子而产生的一价自由基。典型的亚烷基包括但不限于:亚甲基(-CH_2-)、1,2-乙基(-CH_2CH_2-)、1,3-丙基(-$CH_2CH_2CH_2$-)、1,4-丁基(-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-)等。

[0119] “亚烯基”指含2-18个碳原子的不饱和的支炼或直链或环状烃基，并带有两个通过从母体烯烃的相同或两个不同碳原子上除去两个氢原子而产生的一价自由基。典型的亚烯基包括但不限于:1,2-亚乙基(-CH=CH-)。

[0120] “亚炔基”指含2-18个碳原子的不饱和的支炼或直链或环状烃基，并带有两个通过

从母体炔的相同或两个不同碳原子上除去两个氢原子而产生的一价自由基。典型的亚炔基包括但不限于：乙炔、炔丙基和4-戊炔基。

[0121] “芳基”或“芳香基”指由一个或多个环组成的芳香或杂芳香基团，包含三至十四个碳原子，优选六至十个碳原子。术语“杂芳香基团”是指芳香基团上的一个或几个碳，最优是一个、两个、三个或四个碳原子，被氧(O)、氮(N)、硅(Si)、硒(Se)、磷(P)或(S)所取代，优选被氧、硫和氮所取代而产生的基团。术语“芳基”或“芳香基”也指其中一个或几个氢原子独立地被-R'、卤素、-OR'，-SR'、-NR'R"、-N＝NR'、-N＝R'、-NR'R"、$-NO_2$、-S(O)R'、$-S(O)_2R'$、$-S(O)_2OR'$、$-OS(O)_2OR'$、-PR'R"、-P(O)R'R"、-P(OR')(OR")、-P(O)(OR')(OR")或-OP(O)(OR')(OR")所取代而产生的芳香基团。其中R'和R"独立地为氢、烷基、烯基、炔基、杂烷基、芳基、芳烷基、羰基或其药用盐。

[0122] “杂环”指其中一到四个环碳原子独立地被O、N、S、Se、B、Si或P等杂原子所取代而产生的的环结构。优选的杂原子是O、N和S。在《化学与物理手册》第78版的225-226页(The Handbook of Chemistry and Physics,78th Edition,CRC Press,Inc.,1997-1998,p.225to 226)上也有杂环化合物的相关描述，在此引作参考。优选的非芳基杂环包括环氧基、氮丙啶基、硫杂丙基、吡咯烷基、吡唑烷基、咪唑烷基、环氧乙烷基、四氢呋喃基、二氧戊环基、四氢吡喃基、二恶烷基、二氧戊环基、呱啶基、呱嗪基、吗啉基、吡喃基、咪唑啉基、吡咯啉基、吡唑啉基、噻唑烷基、四氢噻喃基、二噻烷基、硫代吗啉基、二氢吡喃基、四氢吡喃基、二氢吡喃基、四氢吡啶基、二氢吡啶基、四氢嘧啶基、二氢噻喃基、氮杂环庚烷基，以及上述基团与苯基缩合得到的稠环体系。

[0123] 术语“杂芳基”或“芳基杂环”是指含3到14，优选5至10个原子的芳香性杂环、包含单环、双环或多环。示例包括吡咯基、吡啶基、吡唑基、噻吩基、嘧啶基、吡嗪基、四唑基、吲哚基、喹啉基、嘌呤基、咪唑基、噻吩基、噻唑基、苯并噻唑基、呋喃基、苯并呋喃基、1,2,4-噻二唑基、异噻唑基、三唑基、四唑基、异喹啉基、苯并噻吩基、异苯并呋喃基、吡唑基、咔唑基、苯并咪唑基、异恶唑基、吡啶基-N-氧化物，以及上述基团与苯基缩合得到的稠环体系。

[0124] “烷基”、“环烷基”、“烯基”、“炔基”、“芳基”、“杂芳基”、“杂环”等，也包含各自对应的“亚烷基”、“亚环烷基”、“亚烯基”、“亚炔基”、“亚芳基”、“亚杂芳基”、“亚杂环”等，为论述方便，本专利申请对它们未做完全区分。

[0125] “芳烷基”指一类非环烷基，其中一个与碳原子(通常为末端或sp^3碳原子)键合的氢原子被芳基取代。典型的芳烷基包括苄基、2-苯基乙-1-基、2-苯基乙烯-1-基、萘基甲基、2-萘基乙-1-基、2-萘基乙-1-基、萘并苄基、2-萘基苯基-1-基等。

[0126] “杂芳烷基”指一类非环烷基，其中一个与碳原子(通常为末端或sp^3碳原子)键合的氢原子被杂芳基取代。杂芳烷基的实例有2-苯并咪唑基甲基、2-呋喃基乙基。

[0127] “羟基保护基”的实例包括甲氧基甲基醚、2-甲氧基乙氧基甲基醚、四氢吡喃基醚、苄基醚、对甲氧基苄基醚、三甲基甲硅醚、三乙基硅醚、三异丙基硅醚、叔丁基二甲基硅醚、三苯基甲基硅醚、乙酸酯、取代乙酸酯、特戊酸酯、苯甲酸酯、甲磺酸酯和对甲苯磺酸酯。

[0128] “离去基团”指可以被另一个官能团取代的官能团。这些离去基团是本领域公知的、实例包括卤化物(如氯化物、溴化物和碘化物)、甲磺酰基、对甲苯磺酰基和三氟甲磺酰基。优选的离去基团选自硝基苯酚基；N-羟基琥珀酰亚胺基(NHS)；苯酚基；二硝基苯酚基；五氟苯酚基；四氟苯酚基；二氟苯酚基；一氟苯酚基；五氯苯酚基；三氟甲磺酰基；咪唑基；氯

酚基;四氯苯酚基;1-羟基苯并三唑基;甲苯磺酰基;甲磺酰基;2-乙基-5-苯基异恶唑-3'-磺酰基,酸酐或与其它酸酐作用形成的酸酐,例如乙酸酐、甲酸酐;或与多肽缩合试剂、Mitsunobu反应试剂作用生成的中间体。

[0129] 以下缩写为本发明所采用,其定义为:Boc,叔丁氧基羰基;BroP,溴代十四烷基鏻六氟磷酸盐;CDI,1,1'-羰基二咪唑;DCC,二环己基碳二亚胺;DCE,二氯乙烷;DCM,二氯甲烷;DEAD,偶氮二甲酸二乙酯;DIAD,偶氮二甲酸二异丙基酯;DIBAL-H,二异丁基氢化铝;DIPEA或DEA,二异丙基乙胺;DEPC,二乙基氰基磷酸酯;DMA,N,N-二甲基乙酰胺;DMAP,4-(N,N-二甲基氨基)吡啶;DMF,N,N-二甲基甲酰胺;DMSO,二甲基亚砜;DTPA,二亚乙基三胺五乙酸;DTT,二硫苏糖醇;EDC,1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐;ESI-MS,电喷雾质谱;EtOAc,乙酸乙酯;Fmoc,N-(9-芴基甲氧基羰基);HATU,O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐;HOBt,1-羟基苯并三唑;HPLC,高效液相色谱;NHS,N-羟基琥珀酰亚胺;MeCN,乙腈;MeOH,甲醇;MMP,4-甲基吗啉;PAB,对氨基苯甲酸;PBS,磷酸盐缓冲液(pH 7.0-7.5);Ph,苯基;Phe,L-苯丙氨酸;PyBrop,溴-三-吡咯烷-鏻六氟磷酸盐;PEG,聚乙二醇;SEC,尺寸排阻色谱;TCEP,三(2-羧乙基)膦;TFA,三氟乙酸;THF,四氢呋喃;Val,缬氨酸;TLC,薄层色谱;UV是紫外线。

[0130] "氨基酸"可以是天然或非天然的,优选α-氨基酸。天然氨基酸可以由遗传密码所编码,它们是丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、色氨酸和缬氨酸。非天然氨基酸是蛋白质氨基酸的衍生物,包括羟脯氨酸、羊毛硫氨酸、2-氨基异丁酸、脱氢丙氨酸、γ-氨基丁酸(神经递质)、鸟氨酸、瓜氨酸、β-丙氨酸(3-氨基丙酸)、γ-羧基谷氨酸、硒代半胱氨酸(存在于许多非真核以及大多数真核细胞中、但不是由DNA直接进行编码)、吡咯赖氨酸(仅在一些古细菌和一种细菌中发现)、N-甲酰基甲硫氨酸(通常是细菌、线粒体和叶绿体中蛋白质中最初的氨基酸)、5-羟色氨酸、L-二羟基苯丙氨酸、三碘甲腺原氨酸、L-3,4-二羟基苯丙氨酸(DOPA)和O-磷酸丝氨酸。术语"氨基酸"还包括氨基酸同系物和模拟物。同系物是具有与天然氨基酸相同结构通式$H_2N(R)CHCO_2H$的化合物,其中R在天然氨基酸里。同系物的实例包括高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸-亚砜和甲硫氨酸甲基锍。更优的是氨基酸模拟物,它是具有与α-氨基酸的化学结构不同、但是作用方式类似的化合物。天然氨基酸多为"L"立体化学构型,"非天然氨基酸"也用于代表"D"构型的氨基酸。在本专利申请中使用1至8个氨基酸时、其序列优选为蛋白水解酶可识别的序列。许多水解酶识别序列是本领域已知的,可以参见:Matayoshi等.Science 247:954(1990);Dunn等.Meth.Enzymol.241:254(1994);Seidah等.Meth.Enzymol.244:175(1994);Thornberry,Meth.Enzymol.244:615(1994);Weber等.Meth.Enzymol.244:595(1994);Smith等.Meth.Enzymol.244:412(1994);及Bouvier等.Meth.Enzymol.248:614(1995);此处引作参考。特别是选自以下序列:Val-Cit、Ala-Val、Ala-Ala、Val-Val、Val-Ala-Val、Lys-Lys、Ala-Asn-Val、Val-Leu-Lys、Cit-Cit、Val-Lys、Ala-Ala-Asn、Asp-Lys、Asp-Glu、Glu-Lys、Lys、Cit、Ser及Glu。

[0131] "糖苷"是糖通过糖苷键在其异头碳上与另一基团键合得到的分子。糖苷可以通过O-(产生O-糖苷)、N-(产生糖基胺)、S-(产生硫代糖苷)或C-(产生C-糖苷)糖苷键连接,其实验式为$C_m(H_2O)_n$(其中m可以不同于n、m、n<36),本发明中的糖苷包括葡萄糖(右旋糖)、果糖

(左旋糖)、阿洛糖、阿卓糖、甘露糖、古洛糖、艾杜糖、半乳糖、塔罗糖、半乳糖胺、氨基葡萄糖、唾液酸、N-乙酰氨基葡萄糖、磺基奎诺糖(6-脱氧-6-磺基-D-吡喃葡萄糖)、核糖、阿拉伯糖、木糖、来苏糖、山梨糖醇、甘露醇、蔗糖、乳糖、麦芽糖、海藻糖、麦芽糖糊精、棉子糖、葡萄糖醛酸(葡糖苷酸)和水苏糖。它可以是D或L的构型、5原子环状呋喃糖的形式、6原子环状吡喃糖的形式,或是非环形式、α-异构体(异头碳的-OH在Haworth投影碳原子平面之下)、或β-异构体(异头碳的-OH在Haworth投影碳原子平面之上)。本发明中亦称为单糖、二糖、多元醇或含3-6个糖单元的低聚糖。

[0132] 本发明中的“抗体”指全长免疫球蛋白分子或全长免疫球蛋白分子的免疫活性部分,如含有抗原结合位点的分子,该结合位点免疫特异性地与靶标抗原或部分靶标抗原结合,靶标包括但不限于,癌细胞或产生与自身免疫疾病相关的自免疫抗体的细胞。本发明中的免疫球蛋白可以是免疫球蛋白的任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或子类。免疫球蛋白可以来自任何物种,但优选的免疫球蛋白来源于人、鼠或兔。本发明的抗体优选是单克隆抗体,包括但不限于多克隆、单克隆、双特异性、人、人源化或嵌合抗体,单链抗体,Fv、Fab片段、F(ab')片段、$F(ab')_2$片段、由Fab表达库产生的片段,抗独特型(抗Id)抗体,CDR和任何能免疫特异性地结合癌细胞抗原、病毒抗原或微生物抗原的上述结构的表位结合片段。

[0133] “对映异构体”,也称为“光学异构体”,是两个立体异构体中的一个,它们是彼此的镜像,不可重迭(不等同),就像人的左右手,除非沿着某一平面被翻转,它们是不可重迭的(仅通过改变方向不能让双手重迭)。化合物中的单个手性原子或类似的结构特征使得该化合物具有两种可能的结构,它们不可重迭,是彼此的镜像。在某一化合物中存在的多个手性特征增加了可能存在的构型的数目,其中可能会有一些互为镜像。对映体纯的化合物是指在检测方法的能力范围内,仅具有同一种手性的样品。在对称的环境中,两个对映体可以使平面偏振光(+/-)在相反的方向上等量旋转(偏振光可以被认为是不对称的介质),除此之外,它们具有相同的化学性质和物理性质。由于这个原因,它们有时也被称为光学异构体。光学活性异构体及其等量的对映体的混合物被称为外消旋体,它对平面偏振光无净旋转,因为每个正旋转(+)都被负旋转(-)完全抵消。通常两个对映异构体与其他的对映异构体物质发生不同的化学反应。由于许多生物分子是对映体,因此有时两种对映体对生物有机体的影响存在显著差异。例如,在药物中,通常只有一种对映体可以发生想要的生理作用、而另一种对映体或是活性较低、或无活性,有时甚至产生不良反应。基于这样的发现,可以开发仅由一种对映体(“对映体纯”)组成的药物以增强药理学效力,有时还可以消除一些副作用。

[0134] 同位素是特定化学元素的质子数相同,中子数不同的不同核素。同一元素的所有同位素具有相同数量的质子。一个原子序数指定一个特定的元素,但非同位素;特定元素原子可以有不同的中子数。核子(质子和中子)的数量是原子的质量数,特定元素的每个同位素具有不同的质量数。例如、碳-12、碳-13和碳-14是碳元素的三种同位素,质量数分别为12,13和14。碳的原子序数为6,意味着每个碳原子都有6个质子,因此这些同位素的中子数分别为6、7和8。氢原子有三种同位素:氕(1H)、氘(^2H)和氚(^3H),氘的质量是氕的两倍,氚的质量是氕的三倍。通过动力学同位素效应,同位素替代实验可用于确定化学反应的机理。同位素替代实验还可用于研究外源化合物通过吸收和分布机制进入体内后,身体如何对它产

生作用，体内物质的代谢变化(例如通过细胞色素P450或葡萄糖醛酸转移酶等代谢酶的作用)，以及药物代谢产物的排泄途径，是为药代动力学(PK)研究。同位素替代实验可用于研究药物的生化和生理作用，包括在动物(包括人类)、微生物或生物组合(例如感染)上所显现出来的作用，是为药效学(PD)研究。两者(PK和PD)一起决定药物的剂量、益处及副作用。同位素可以采用一种稳定的(非放射性的)或非稳定的元素。药物的同位素取代物还可能具有与原始药物不同的治疗功效。

[0135] “药学上”或“药学上可接受的”是指当分子实体和组合物酌情施用于动物或人时，不会产生不利、过敏或其他不良反应。

[0136] “药学上可接受的溶剂化物”或“溶剂化物”是指一种或多种溶剂分子与本发明公开的化合物的结合物。形成药学上可接受的溶剂合物，溶剂的实例包括但不限于水、异丙醇、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸和乙醇胺。

[0137] “药学上可接受的辅料”包括任何载体、稀释剂、佐剂或其它，例如防腐剂或抗氧化剂、填充剂、崩解剂、润湿剂、乳化剂、悬浮剂、溶剂、分散介质、包衣剂、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。这些介质和药剂用于药物活性物质在本领域内是熟知的。任何传统介质或药剂，除非与活性成分不兼容，也可以考虑将其用于治疗组合物中。补充活性成分也可以加入组合物中，成为合适的治疗组合。

[0138] 如本文所用，“药用盐”是指所公开化合物的衍生物，通过制备母体化合物的酸盐或碱盐来获得。药学上可接受的盐包括由无毒无机酸或有机酸与母体化合物形成的常规无毒盐或季铵盐。例如，所述常规无毒盐包括衍生自无机酸(例如盐酸、氢溴酸盐、硫酸、氨基磺酸、磷酸、硝酸等)的盐；以及由有机酸(例如乙酸、丙酸、琥珀酸、酒石酸、柠檬酸、甲磺酸、苯磺酸、葡萄糖醛酸、谷氨酸、苯甲酸、水杨酸、甲苯磺酸、草酸、富马酸、马来酸及乳酸等制备的盐。另外的加成盐包括铵盐，如三甲胺、葡甲胺、丙三醇等的盐、金属盐、如钠、钾、钙、锌或镁盐。

[0139] 本发明的药用盐可由含有碱性或酸性部分的母体化合物，通过常规化学方法合成。通常而言，这些盐可以通过在水或有机溶剂中或两者的混合物中，向母体化合物里，加入等当量的适当碱或酸来制备。一般来说，乙醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈是非水介质的首选。适用盐的列表见于1985年由麦克出版公司出版的《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences)，其公开内容纳入本文作参考。

[0140] “施用”或“给药”是指以任何方式向受试者转移、递送、引入或运输药物或其他药剂。这些方式包括口服用药、局部接触、静脉内、腹膜内、肌肉内、病灶内、鼻内、皮下或鞘内给药。本发明还考虑使用装置或器械来施用药剂。这种装置可以使用主动或被动型传输，而且可以是缓释或快速释放递送装置。

[0141] 就癌症而言，术语“治疗”包括以下任何一项或全部：阻止肿瘤细胞或癌细胞生长、复制，减轻整体肿瘤量，以及改善与该疾病相关的一个或多个症状。

[0142] 就自身免疫性疾病而言，术语“治疗”包括以下任一项或全部：阻止与自身免疫性疾病相关的细胞的复制，包括但不限于能够产生自身免疫性抗体的细胞，减轻自身免疫性抗体量和改善自身免疫性疾病的一个或多个症状。

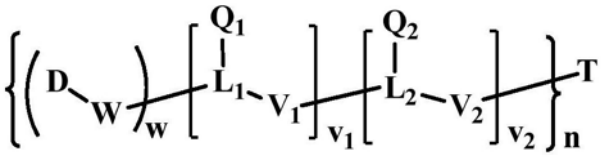
[0143] 就传染病而言、术语“治疗”包括以下任何一项或全部：阻止引起传染病的病原体的生长、增殖或复制、以及改善传染病的一个或多个症状。

[0144] “哺乳动物”或“动物”的实例包括但不限于人、鼠、家鼠、豚鼠、猴、猪、山羊、牛、马、狗、猫、鸟和家禽。

[0145] 本发明所公开的新型偶联物使用了支链连接体。实施例1至34展示了一些适当的连接体及其合成。

[0146] 一种支链连接体连接的细胞结合剂-细胞毒素小分子的偶联物

[0147] 本发明的一个方面，含有支链连接体偶联物的结构由式(I)表示：

[0148] 

(I)

[0149] 其中

[0150] “–”代表单键；n为1到30；

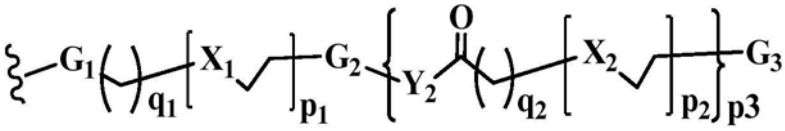
[0151] T是细胞结合剂或分子，选自抗体、单链抗体、结合靶细胞的抗体片段、单克隆抗体、单链单克隆抗体、结合靶细胞的单克隆抗体片段、嵌合抗体、结合靶细胞的嵌合抗体片段、结构域抗体、结合靶细胞的结构域抗体片段、adnectin类抗体、DARPin蛋白、淋巴因子、激素、维生素、生长因子、集落刺激因子、营养转运分子(转铁蛋白)和/或连接在白蛋白、聚合物、树状大分子、脂质体、纳米粒子、囊泡或(病毒)衣壳上的细胞结合肽、蛋白质或小分子；

[0152] L_1和L_2是由C、N、O、S、Si和P等原子构成的链状结构，优选具有0-500个原子的，共价连接W和V_1，V_1和V_2。构成L_1和L_2的原子可以以任何化学方式相组合，例如形成亚烷基、亚烯基和亚炔基、醚、聚氧化烯、酯、胺、亚胺、多胺、肼、腙、酰胺、脲、氨基脲、二氨基脲、烷氧基胺、氨基甲酸酯、氨基酸、肽、酰氧基胺、异羟肟酸或上述的组合。优选的L_1和L_2，相同或不同，独立地选自于O、NH、N、S、P、NNH、NHNH、$N(R_3)$、$N(R_3)N(R_3')$、CH、CO、C(O)NH、C(O)O、NHC(O)NH、NHC(O)O；如下列结构式的聚乙烯氧基：$(OCH_2CH_2)_pOR_3$、或$(OCH_2CH(CH_3))_pOR_3$、或$NH(CH_2CH_2O)_pR_3$、或$NH(CH_2CH(CH_3)O)_pR_3$、或$N[(CH_2CH_2O)_pR_3]-[(CH_2CH_2O)_{p'}R_3']$或$(OCH_2CH_2)_pCOOR_3$、或$CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_pCOOR_3$，其中p和p'是独立选自0到约1000的整数，或它们的组合；C_1-C_8烷基；C_2-C_8杂烷基、烷基环烷基、杂环烷基；C_3-C_8芳基、芳烷基、杂环、碳环、环烷基、杂烷基环烷基、烷基羰基、杂芳基；或$(Aa)_r$，r＝1-12(1至12个氨基酸单位)，(Aa)r为天然或非天然氨基酸，相同或不同序列的二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一肽或十二肽单元；

[0153] W是一个延展体单元，通常是自毁灭的间隔体、一个多肽单元、腙、二硫化物、硫醚、酯或酰胺键；w是1或2或3；

[0154] V_1和V_2是独立的间隔体单元，选自O，NH，S，C_1-C_8烷基；C_2-C_8杂烷基、烯基或炔基；C_3-C_8芳基、杂环、碳环、环烷基、烷基环烷基、杂环烷基、杂芳烷基、杂烷基环烷基，或烷羰基；或$(Aa)_r$、r＝1-12(1-12个氨基酸单元)，(Aa)r为天然或非天然氨基酸，相同或不同序列的二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一肽或十二肽单元；或$(CH_2CH_2O)_p$、p为0-1000；v_1和v_2独立为0、1或2，但v_1和v_2不同时为0，当v_1或v_2为0时，意味着侧链Q_1或Q_2片段缺省。

[0155] Q_1和Q_2独立地由式(I-q1)表示：

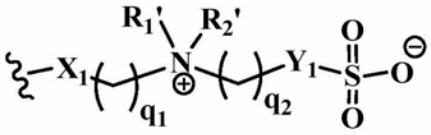
[0156] 

(I-q1)；

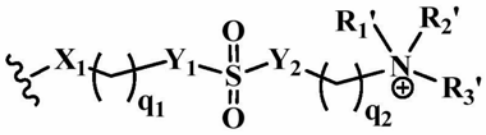
[0157] 其中∿∿是连接至L_1或L_2的位置，G_1和G_2独立地为OC(O)，NHC(O)，C(O)，CH_2，NH，OC(O)NH，NHC(O)NH，O，S，B，P(O)(OH)，NHP(O)(OH)，NHP(O)(OH)NH，CH_2P(O)(OH)NH，OP(O)(OH)O，CH_2P(O)(OH)O，NHS(O)$_2$，NHS(O)$_2$NH，CH_2S(O)$_2$NH，OS(O)$_2$O，CH_2S(O)$_2$O，Ar，ArCH_2，ArO，ArNH，ArS，ArNR_1，(Aa)$_r$，(r＝1-12)；X_1和X_2独立地为O，CH_2，S，NH，N(R_1)，$^+$NH(R_1)，$^+$N(R_1)(R_2)，C(O)，OC(O)，OC(O)O，OC(O)NH，NHC(O)NH；Y_2为O，NH，NR_1，CH_2，S；G_3为OH，SH，OR_1，SR_1，OC(O)R_1，NHC(O)R_1，C(O)R_1，CH_3，NH_2，NR_1，$^+$NH(R_1)，$^+$N(R_1)(R_2)，C(O)OH，C(O)NH_2，NHC(O)NH_2，BH_2，BR_1R_2，P(O)(OH)$_2$，NHP(O)(OH)$_2$，NHP(O)(NH_2)$_2$，S(O)$_2$(OH)，(CH_2)$_{q1}$C(O)OH，(CH_2)$_{q1}$P(O)(OH)$_2$，C(O)(CH_2)$_{q1}$C(O)OH，OC(O)(CH_2)$_{q1}$C(O)OH，NHC(O)(CH_2)$_{q1}$C(O)OH，CO(CH_2)$_{q1}$P(O)(OH)$_2$，NHC(O)O(CH_2)$_{q1}$C(O)OH，OC(O)NH(CH_2)$_{q1}$C(O)OH，NHCO(CH_2)$_{q1}$P(O)(OH)$_2$，NHC(O)(NH)(CH_2)$_{q1}$C(O)OH，CONH(CH_2)$_{q1}$P(O)(OH)$_2$，NHS(O)$_2$(CH_2)$_{q1}$C(O)OH，CO(CH_2)$_{q1}$S(O)$_2$(OH)，NHS(O)$_2$NH(CH_2)$_{q1}$C(O)OH，OS(O)$_2$NH(CH_2)$_{q1}$C(O)OH，NHCO(CH_2)$_{q1}$S(O)$_2$(OH)，NHP(O)(OH)(NH)(CH_2)$_{q1}$C(O)OH，CONH(CH_2)$_{q1}$S(O)(OH)，OP(O)(OH)$_2$，(CH_2)$_{q1}$P(O)(NH)$_2$，NHS(O)$_2$(OH)，NHS(O)$_2$$NH_2$，$CH_2$S(O)$_2$$NH_2$，OS(O)$_2$OH，OS(O)$_2OR_1$，$CH_2$S(O)$_2OR_1$，Ar，Ar$R_1$，ArOH，Ar$NH_2$，ArSH，Ar$NHR_1$或(Aa)$_{q1}$，$p_1$，$p_2$和$p_3$独立地是0-100，但是不同时为0，$q_1$和$q_2$独立地是0-24；$R^1$，$R^2$，$R^3$和$R^{3'}$独立地为H，$C_1$～$C_8$烷基；$C_2$～$C_8$杂烷基，或杂环；$C_3$-$C_8$芳基，Ar-烷基，环烷基，烷基环烷基，杂环烷基，杂烷基环烷基，碳环或烷基羰基；

[0158] 优选的Q_1和Q_2独立地是C_2-C_{100}聚羧酸或C-$_2$-C_{90}聚烷基胺，C_6-C_{90}寡糖或多糖，C_6-C_{100}含季铵阳离子和磺酸根阴离子的两性离子甜菜碱或两性离子聚(磺基甜菜碱)(PSB)，C_6-C_{100}含可生物降解的聚合物，如聚乳酸/乙醇酸(PLGA)、聚(丙烯酸酯)、脱乙酰壳多糖、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺的共聚物、聚[2-(甲基丙烯酰氧基)乙基磷酸胆碱](PMPC)、聚-L-谷氨酸、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLG)、聚(乙二醇)(PEG)、聚(丙二醇)(PPG)、聚(乙二醇)改性肽、聚(乙二醇)改性脂质体、聚(乙二醇)改性烷基羧酸、聚(乙二醇)改性烷基胺、透明质酸(HA)(糖胺聚糖)、肝素或硫酸乙酰肝素(HSGAG)、硫酸软骨素或硫酸皮素(CSGAG)、聚(乙二醇)改性的烷基硫酸盐、聚(乙二醇)改性的烷基磷酸盐或聚(乙二醇)改性的烷基季铵盐；

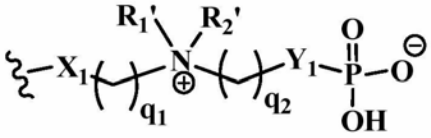
[0159] Q_1和Q_2的结构示例如下：



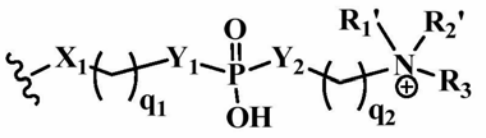
Iq-01,



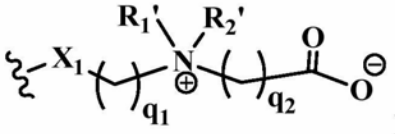
Iq-02,

[0160] 

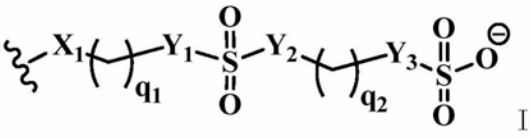
Iq-03,



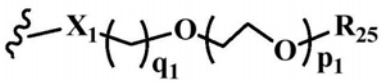
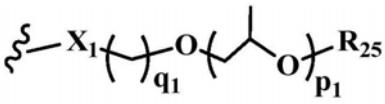
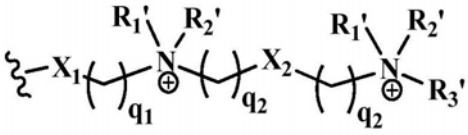
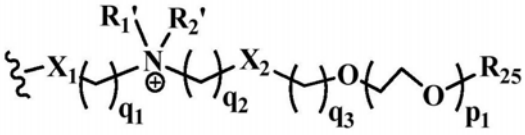
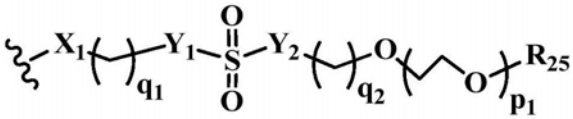
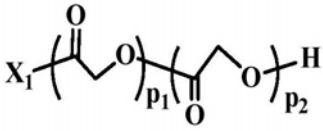
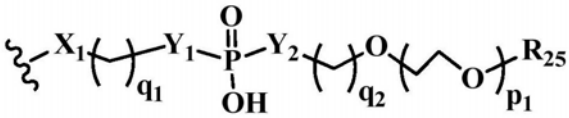
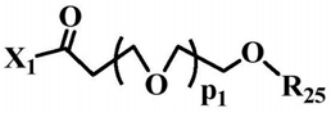
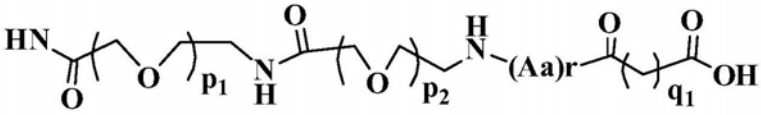
Iq-04,

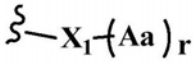
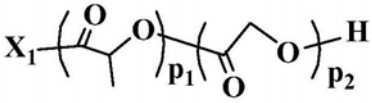
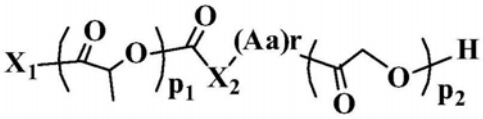
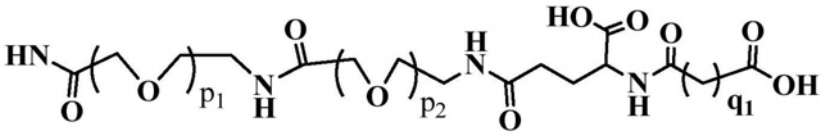
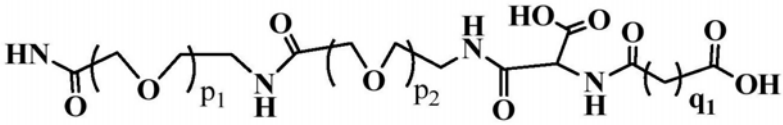
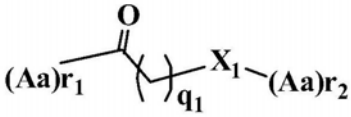
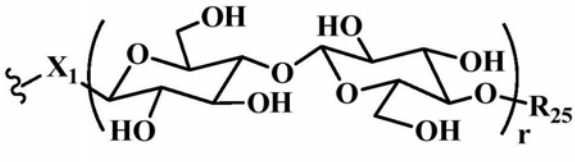
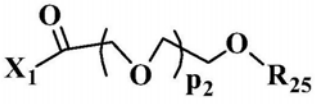
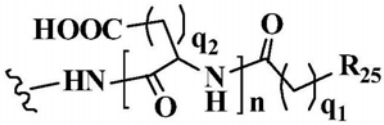


Iq-05,

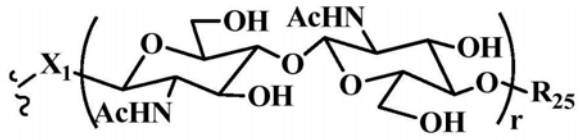


Iq-06,

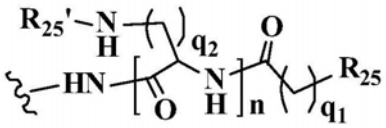

Iq-07,

Iq-08,

Iq-09,

Iq-10,

Iq-11,

Iq-12,

Iq-13,

Iq-14,

Iq-15,

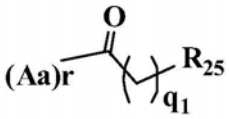
[0161]

Iq-16,

Iq-17,

Iq-18,

, Iq-19,

Iq-20,

Iq-21,

Iq-22,

Iq-23,

Iq-24,

[0162]

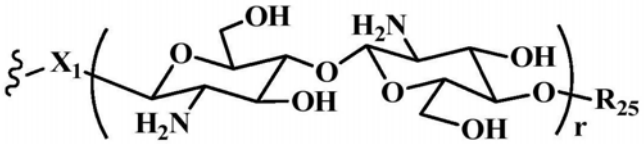


Iq-25,

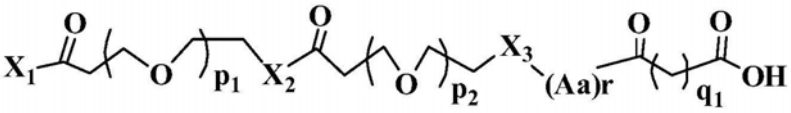




Iq-26,

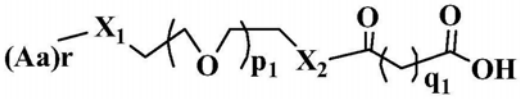


Iq-27,

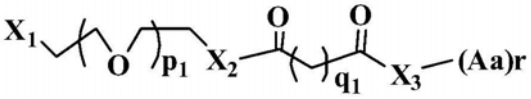


Iq-28,

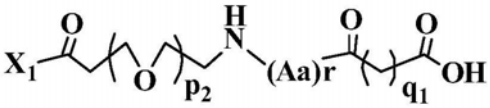
Iq-29,



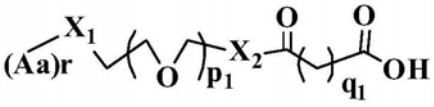
Iq-30,



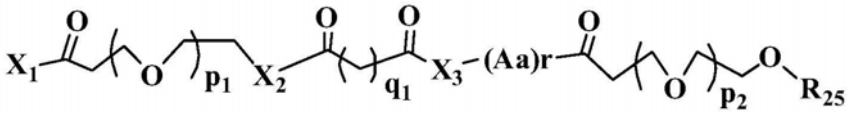
Iq-31,



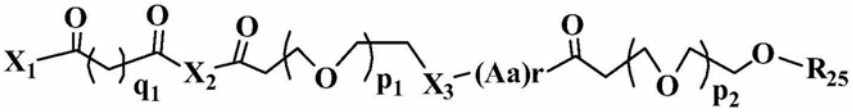
Iq-32,



Iq-33,



Iq-34



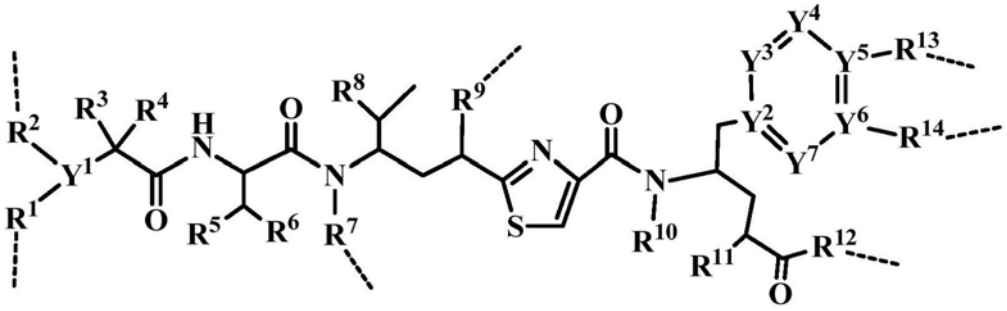
Iq-35

[0163] 其中，R_{25}和R_{25}'独立地选自H、HC(O)、$CH_3C(O)$、$CH_3C(NH)$、C_1-C_{18}烷基、C_1-C_{18}烷基-Y_1-SO_3H、C_1-C_{18}烷基-Y_1-PO_3H_2、C_1-C_{18}烷基-Y_1-CO_2H、C_1-C_{18}烷基-Y_1-$N^+R_1'R_2'R_3'R_4'$、C_1-C_{18}烷基-Y_1-$CONH_2$、C_2-C_{18}烷基、C_2-C_{18}酯、C_2-C_{18}醚、C_2-C_{18}胺、C_2-C_{18}烷基羧酰胺、C_3-C_{18}芳基、C_3-C_{18}环烷基、C_3-C_{18}杂环、1-24个氨基酸、C_2-C_{18}脂质、C_2-C_{18}脂肪酸或C_2-C_{18}脂肪铵脂质；X_1和X_2独立地选自NH、N(R1')、O、CH_2、S、C(O)、S(O)、$S(O_2)$、P(O)(OH)、NHNH、CH＝CH、Ar或$(Aa)_{q1}$，q1＝0-24(0-24个氨基酸、q1＝0表示缺省)；X_1、X_2、X_3、X_4、Y_1、Y_2和Y_3独立地选自NH、N(R_1')、O、C(O)、CH_2、S、S(O)、NHNH、C(O)、OC(O)、OC(O)O、OC(O)NH、NHC(O)NH、Ar或$(Aa)_{q1}$，X_1、X_2、X_3、X_4、Y_1、Y_2和Y_3独立地可以缺省；p_1、p_2和p_3独立地为0-100，但不能同时为0；

[0164] q_1、q_2和q_3独立地为0-24；R_1'、R_2'、R_3'和R_4'独立地选自H和C_1-C_6烷基；Aa是天然或非天然氨基酸；Ar或$(Aa)_{q1}$是同或不同的肽序列；q1＝0表示$(Aa)_{q1}$缺省；

[0165] D是具有下式(II)结构的Tubulysin同系物：

[0166]



(II)

[0167] 或其药学上可接受的盐、水合物或水合盐；或多晶型结晶；或其光学异构体、外消旋物、非对映异构体或对映异构体，

[0168] 其中-----是独立地连接至W的连接位点；

[0169] 其中R^1，R^2，R^3和R^4独立地为H，C_1-C_8烷基；C_2-C_8杂烷基、烯基或炔基；C_3-C_8芳基、芳烷基、环烷基、烷基环烷基、杂环烷基、杂烷基环烷基，碳环或烷羰基；或R^1R^2、R^1R^3、R^2 R^3、R^3 R^4、R^5 R^6、R^{11} R^{12}或R^{13} R^{14}可形成3-7元的碳环、环烷、杂环、杂环烷、芳环或杂芳环结构；R^1和R^2独立地连接至W，它们独立地可以缺省；Y^1是N或CH；

[0170] 其中R^5、R^6、R^8、R^{10}及R^{11}独立地是H或C_1-C_4烷基或杂烷基；

[0171] 其中R^7选自H、R^{14}、$-R^{14}C(=O)X^1R^{15}$或$-R^{14}X^1R^{15}$；X^1是O、S、S-S、NH、CH_2或NR^{14}；

[0172] 其中R^9选自H、OH、-O-、=O、$-OR^{14}$、$-OC(=O)R^{14}$、$-OC(=O)NHR^{14}-$、$-OC(=O)R^{14}SSR^{15}-$、$OP(=O)(OR^{14})-$、$-OC(=O)NR^{14}R^{15}$、$OP(=O)(OR^{14})$或$OR^{14}OP(=O)(OR^{15})$；

[0173] 其中R^{11}选自H、R^{14}、$-R^{14}C(=O)R^{16}$、$-R^{14}X^2R^{16}$、$-R^{14}C(=O)X^2$，X^2指-O-，-S-，-NH-、$-N(R^{14})-$、$-O-R^{14}-$、$-S-R^{14}-$、$-S(=O)-R^{14}-$、或$-NHR^{14}$；

[0174] 其中R^{12}是R^{15}、-OH、-SH、$-NH_2$、NH、$NHNH_2$、$-NH(R^{15})$、$-OR^{15}$、$-R^{15}COR^{16}$、$-R^{15}COOR^{16}$、$-R^{15}C(O)NH_2$、$-R^{15}C(O)NHR^{17}$、$-SR^{16}$、$R^{15}S(=O)R^{16}$、$-R^{15}P(=O)(OR^{17})_2$、$-R^{15}OP(=O)(OR^{17})_2$、$-CH_2OP(=O)(OR^{17})_2$、$-R^{15}SO_2R^{17}$、$-R^{15}X^2R^{16}$和$-R^{15}C(=O)X^2$，X^2指-O-、OH、SH、-S-、NH_2、-NH-、$-N(R^{15})-$、$-OR^{15}-$、$-SR^{15}-$、$-S(=O)R^{15}-$、CH_2或$-NHR^{15}-$；

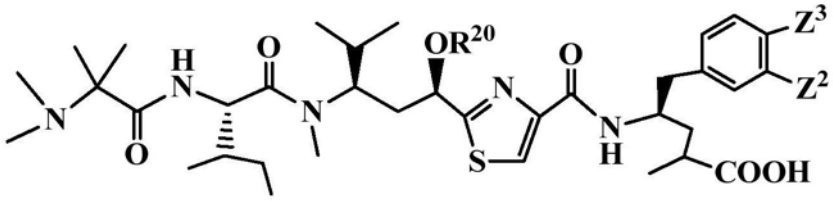
[0175] R^{13}和R^{14}独立地是H、O、S、NH、$N(R^{15})$、NHNH、-OH、-SH、$-NH_2$、NH、$-NHNH_2$、$-NH(R^{15})$、$-OR^{15}$、CO、$-COX^2$、$-COX^2R^{16}$、R^{17}、F、Cl、Br、I、SR^{16}、$NR^{16}R^{17}$、$N=NR^{16}$、$N=R^{16}$、NO_2、$SOR^{16}R^{17}$、SO_2R^{16}、SO_3R^{16}、OSO_3R^{16}、$PR^{16}R^{17}$、$POR^{16}R^{17}$、$PO_2R^{16}R^{17}$、$OP(O)(OR^{17})_2$、$OCH_2OP(O)(OR^{17})_2$、$OC(O)R^{17}$、$OC(O)OP(O)(OR^{17})_2$、$PO(OR^{16})(OR^{17})$、$OP(O)(OR^{17})OP(O)(OR^{17})_2$、$OC(O)NHR^{17}$；-O-($C_4$-$C_{12}$糖苷)、-N-($C_4$-$C_{12}$糖苷)；$C_1$-$C_8$烷基、杂烷基；$C_2$-$C_8$烯基、炔基、杂烷基、杂环烷基；$C_3$-$C_8$芳基、芳烷基、碳环、环烷基、杂烷基环烷基、烷基羰基、杂芳基、2-8个碳原子的酯、醚或酰胺；或含有1-8个氨基酸的肽($NH(Aa)_{1-8}$或$CO(Aa)_{1-8}$)；或结构式是$(OCH_2CH_2)p$或$(OCH_2CH(CH_3))_p$的聚亚烷基二醇，其中p是0至约1000的整数；或上述基团的组合；X^2是O、S、S-S、NH、CH_2、OH、SH、NH_2、CHR^{14}或NR^{14}；

[0176] R^{15}、R^{16}及R^{17}独立地是H、C_1-C_8烷基、杂烷基；C_2-C_8烯基、炔基、杂烷基、杂环烷基；C_3-C_8芳基、芳烷基、碳环、环烷基、杂烷基环烷基、烷基羰基、杂芳基、烷基羰基或是它们的Na^+，K^+，Cs^+，Li^+，Ca^{2+}，Mg^+，Zn^{2+}，$N^+(R^1)(R^2)(R^3)(R^4)$，$HN^+(C_2H_5OH)_3$盐；

[0177] Y^1和Y^2独立地是N或CH；q是0或1；当q=0时，Y^3缺省，Y^4、Y^5、Y^6和Y^7独立地是CH、N、NH、O、S或N(R1)，此时Y^2、Y^4、Y^5、Y^6和Y^7形成杂芳环，如呋喃、吡咯、噻吩、噻唑、恶唑和咪唑、吡唑、三唑、四唑、噻二唑；当q=1时，Y^3、Y^4、Y^5、Y^6和Y^7独立地是CH或N，此时Y^2、Y^3、Y^4、Y^5、Y^6和Y^7

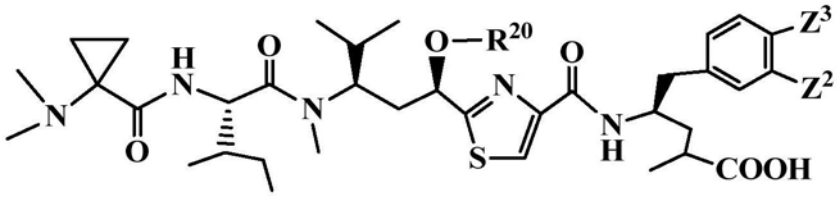
形成芳香环，如苯、吡啶、哒嗪、嘧啶、吡嗪、三嗪、四嗪、哒嗪；

[0178] Tubulysin的结构示例如下：

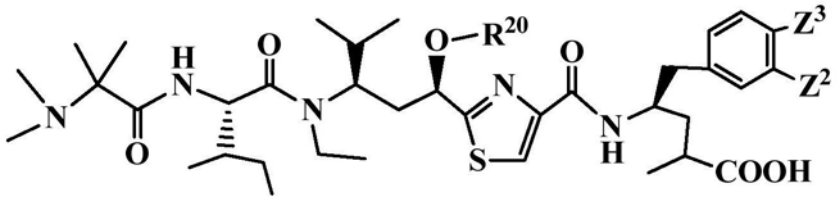


I-01

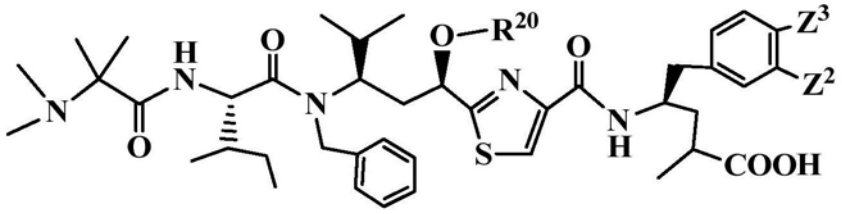
[0179]



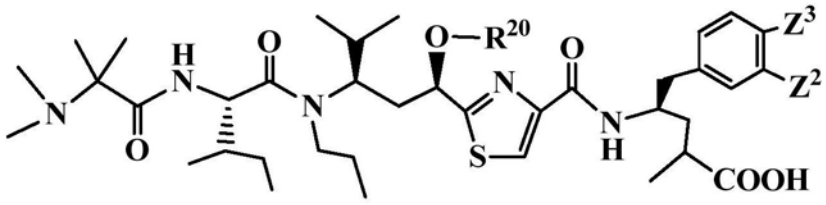
I-02



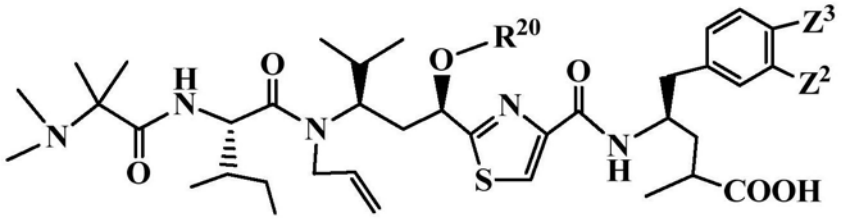
I-03



I-04

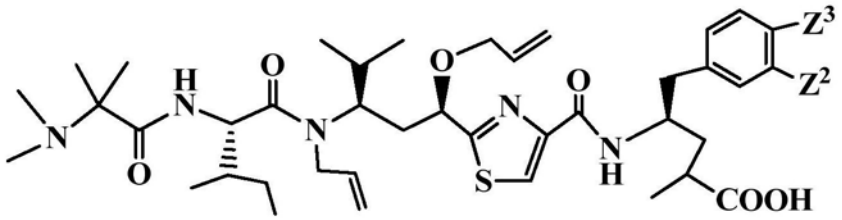


I-05

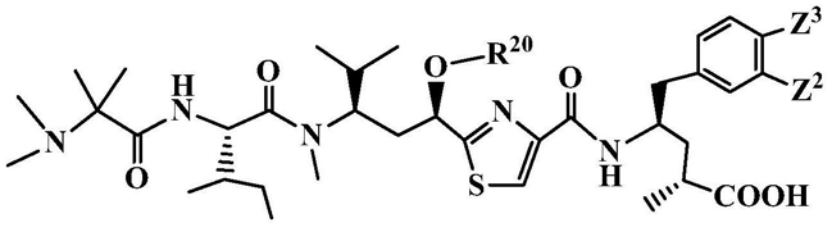


I-06

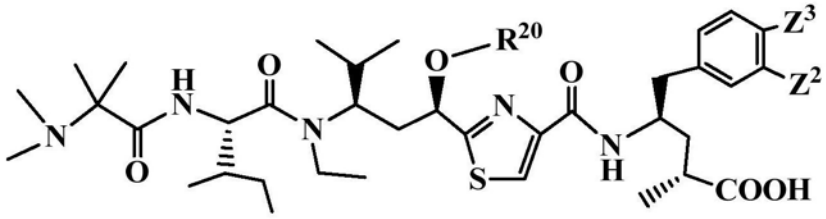
[0180]



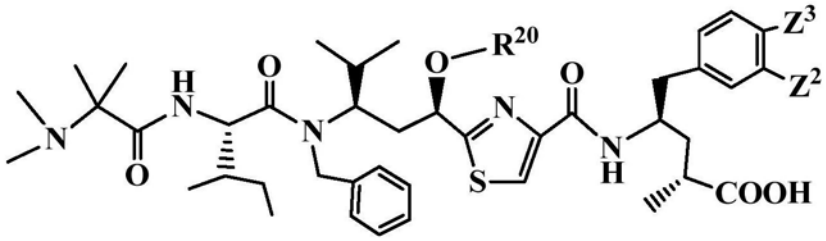
I-07



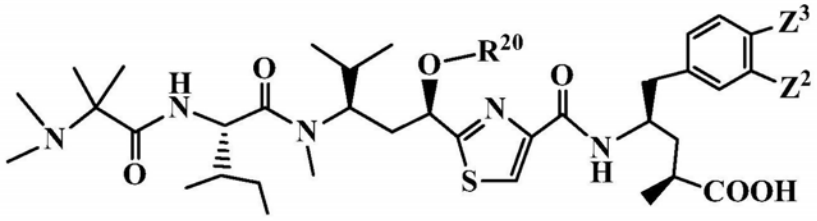
I-08



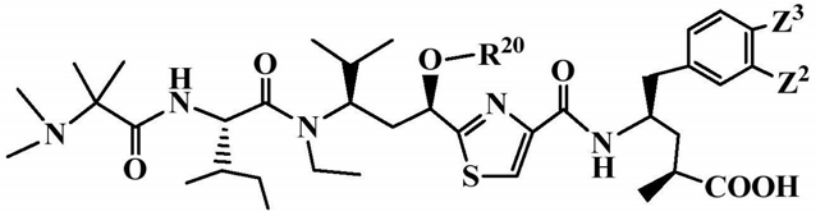
I-09



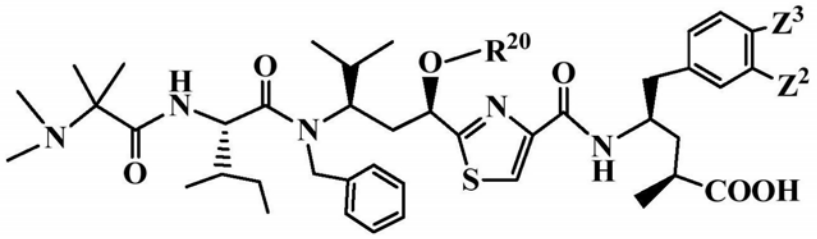
I-10



I-11

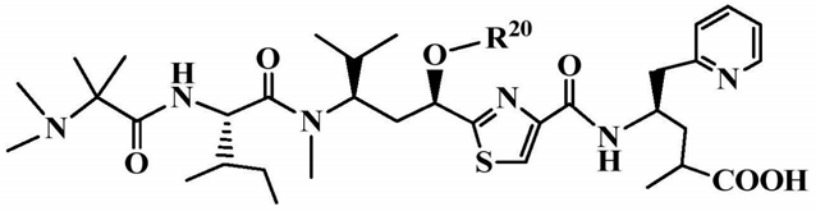


I-12

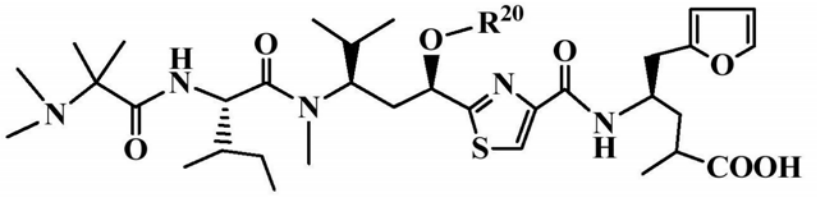


I-13

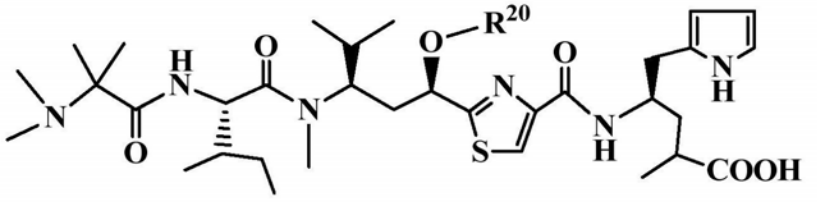
[0181]



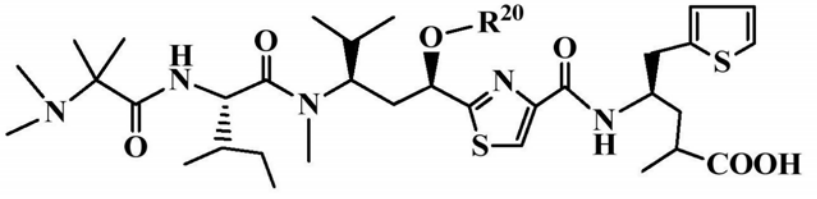
I-14



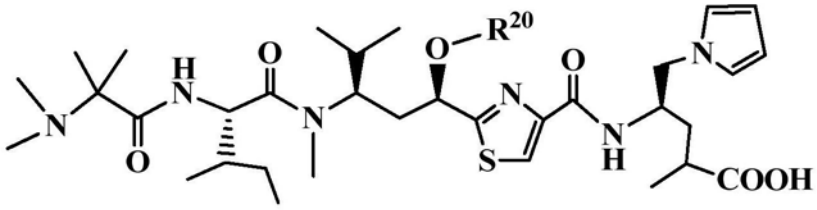
I-15



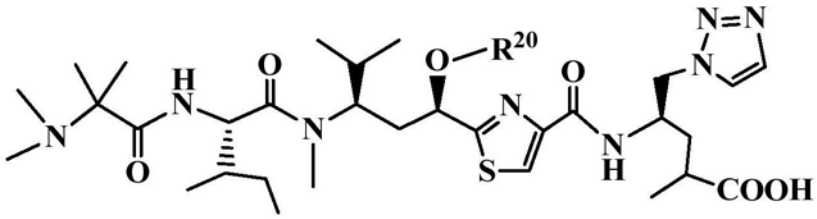
I-16



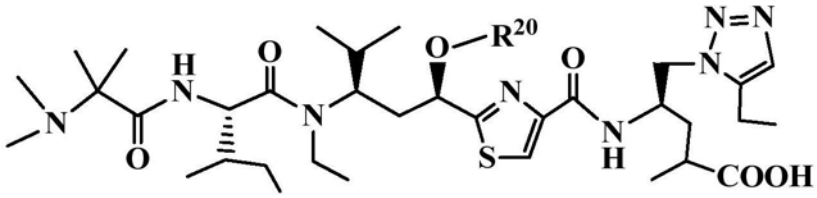
I-17



I-18

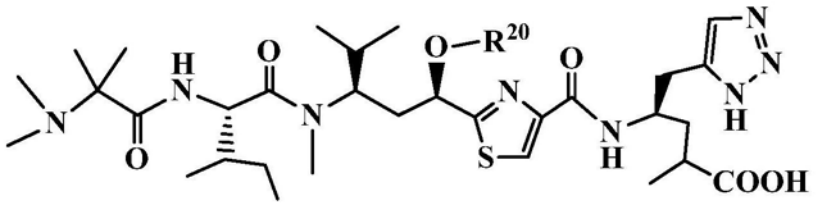


I-19

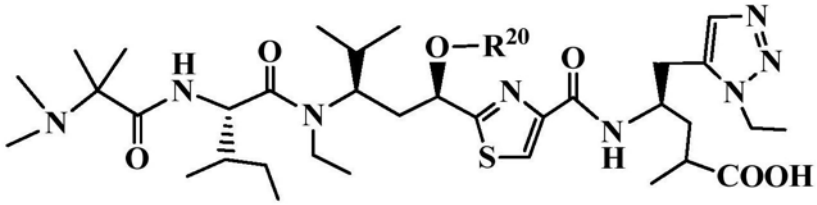


I-20

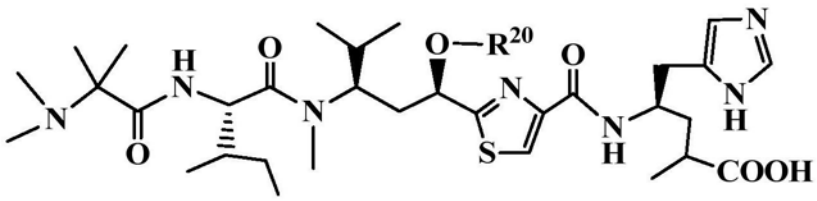
[0182]



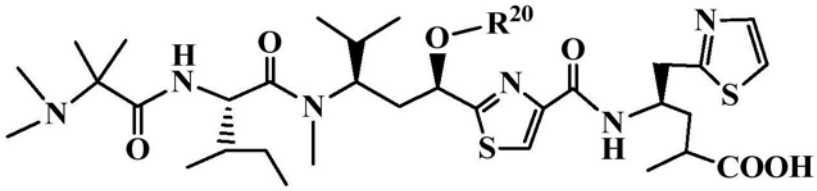
I-21



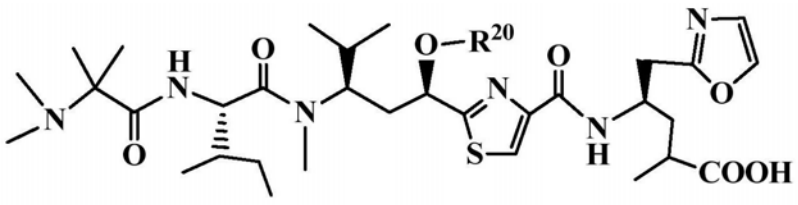
I-22



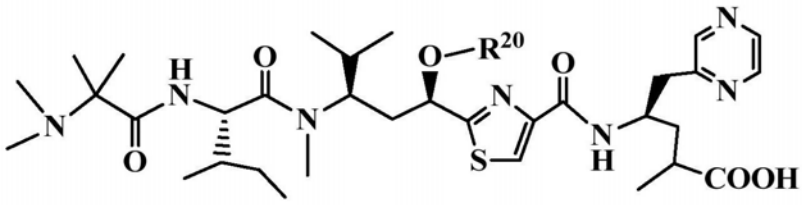
I-23



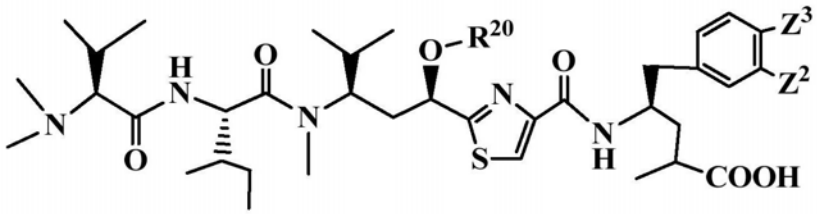
I-24



I-25

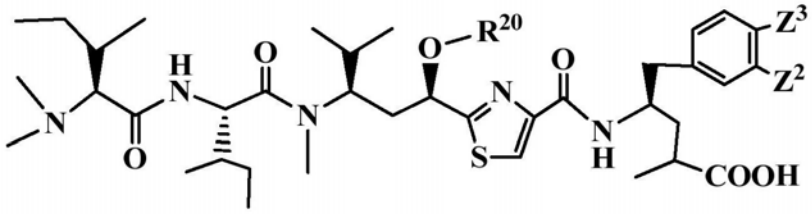


I-26

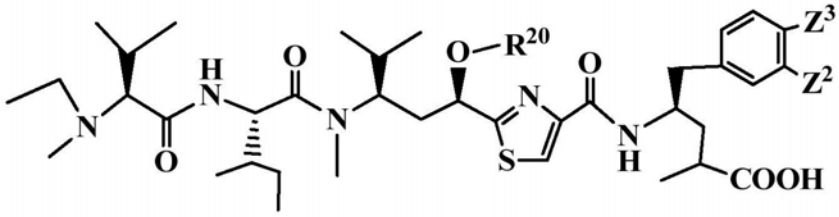


I-27

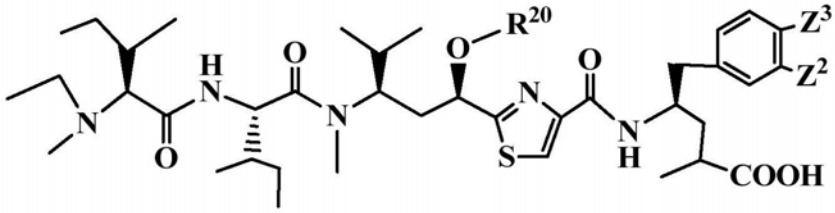
[0183]



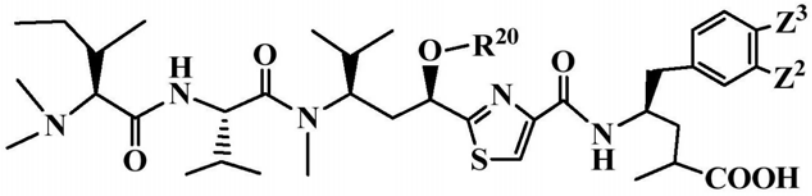
I-28



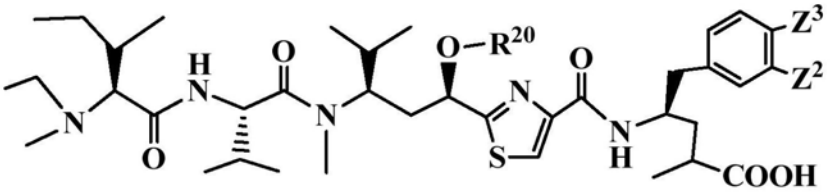
I-29



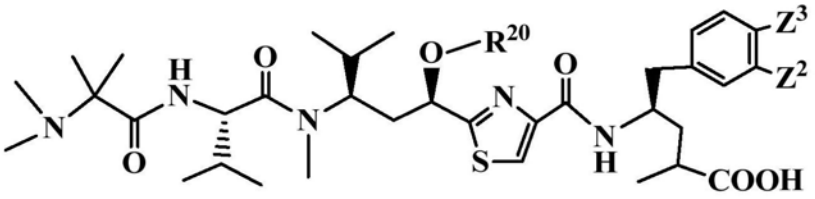
I-30



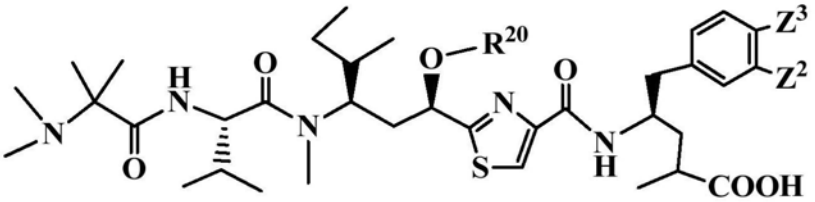
I-31



I-32

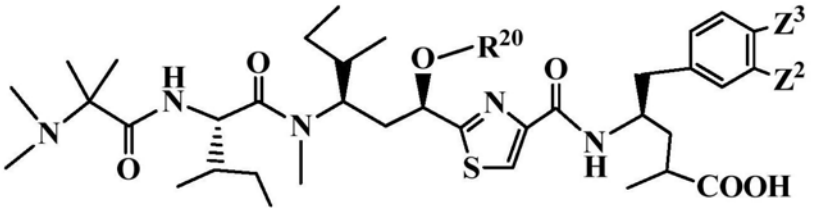


I-33

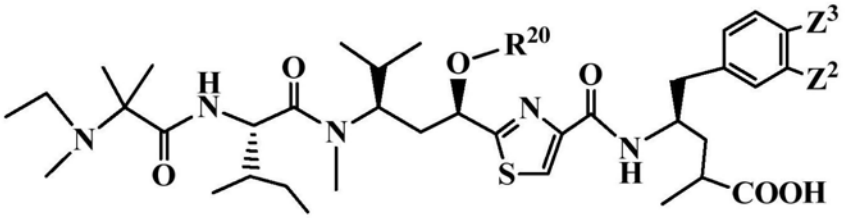


I-34

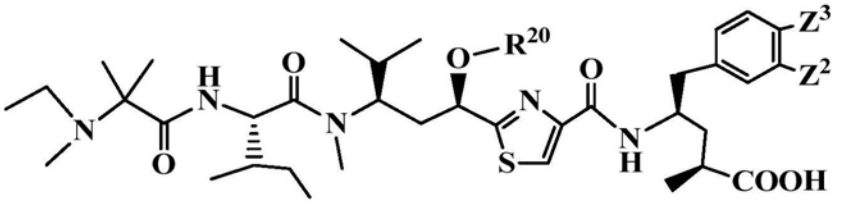
[0184]



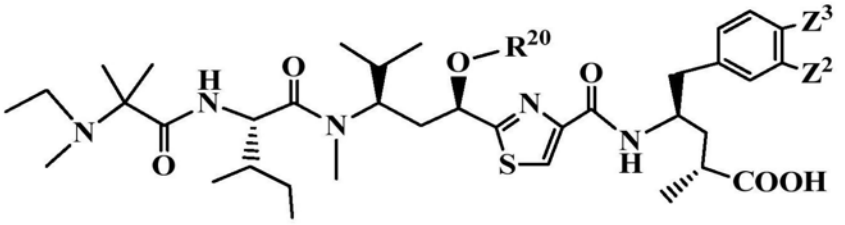
I-35



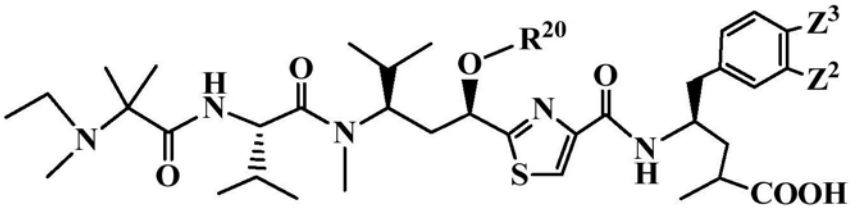
I-36



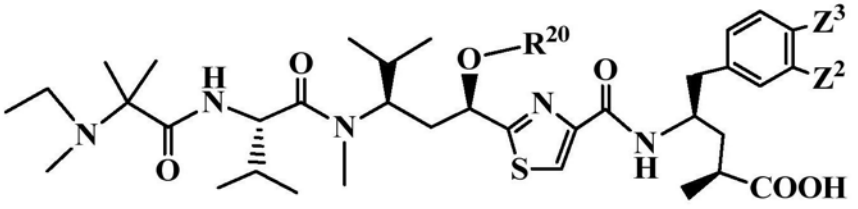
I-37



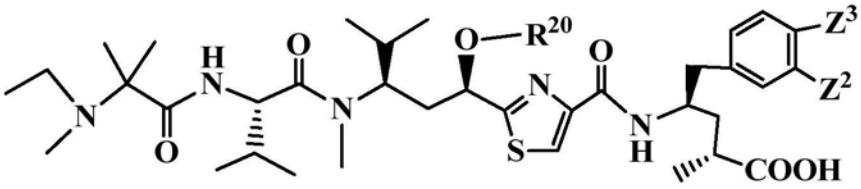
I-38



I-39

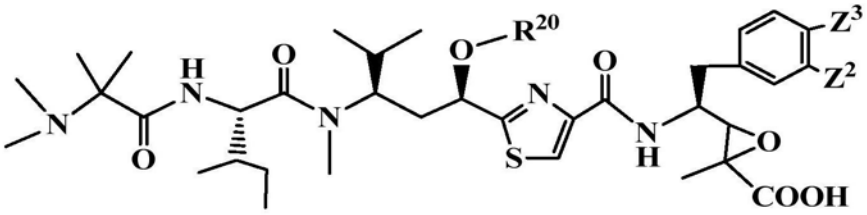


I-40

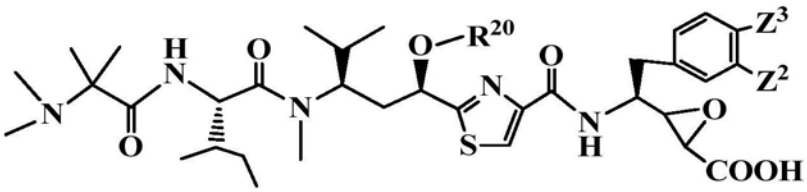


I-41

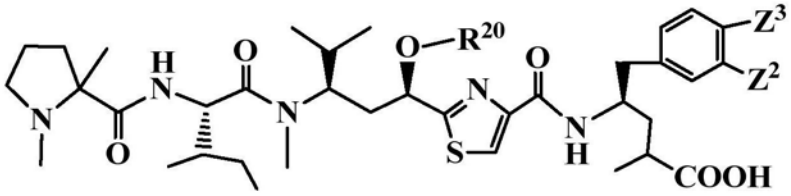
[0185]



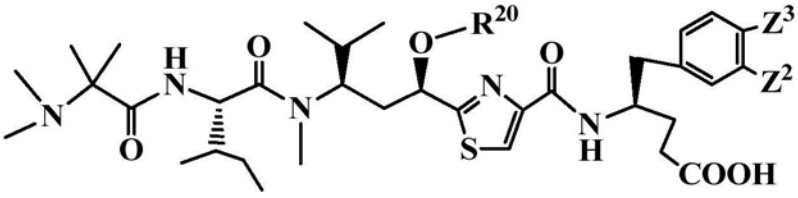
I-42



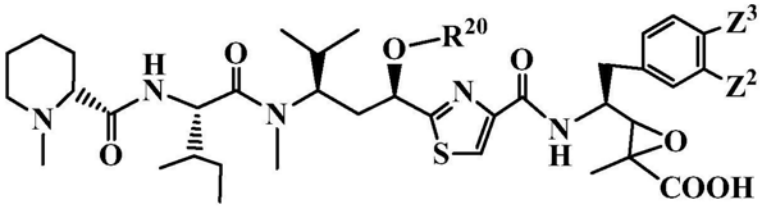
I-43



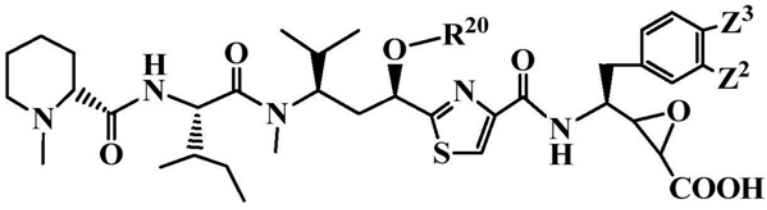
I-44



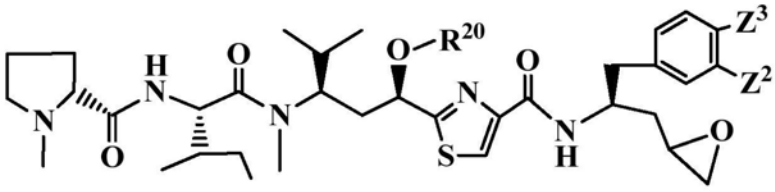
I-45



I-46

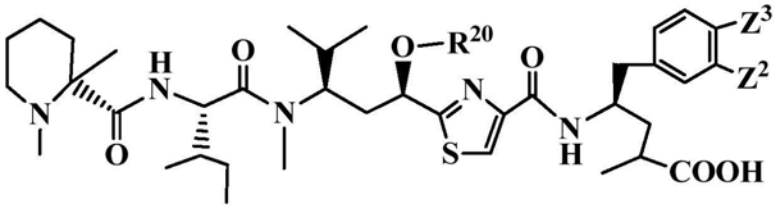


I-47

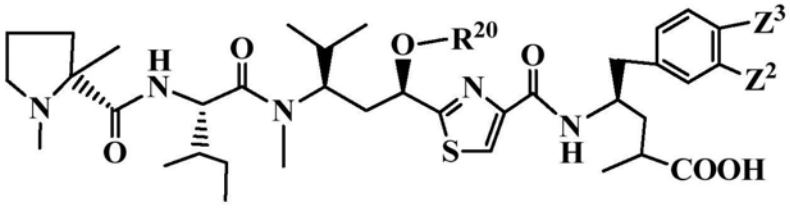


I-48

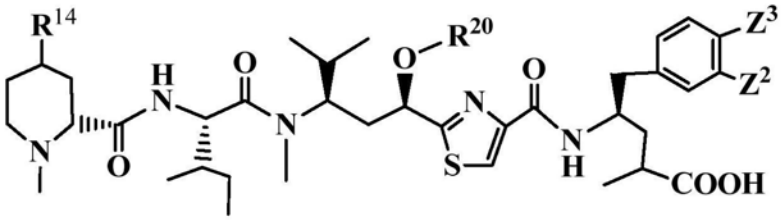
[0186]



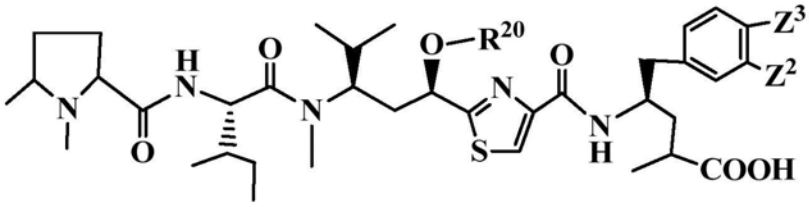
I-49



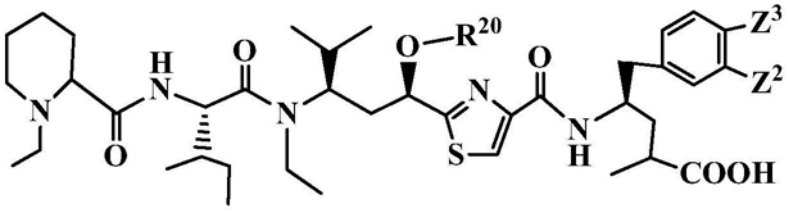
I-50



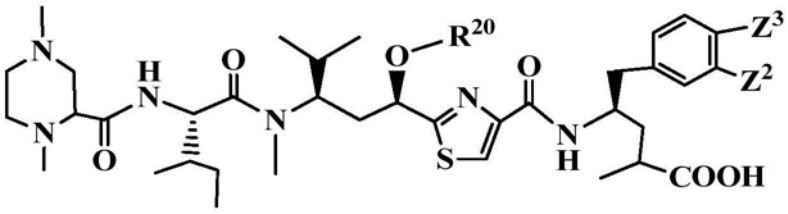
I-51



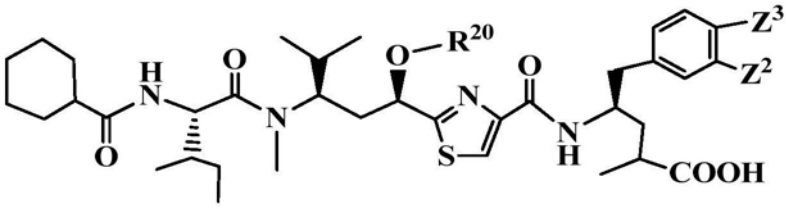
I-52



I-53

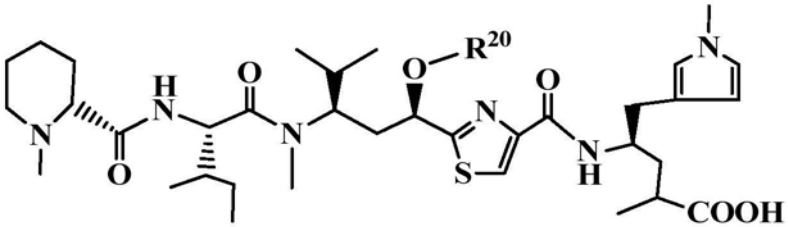


I-54

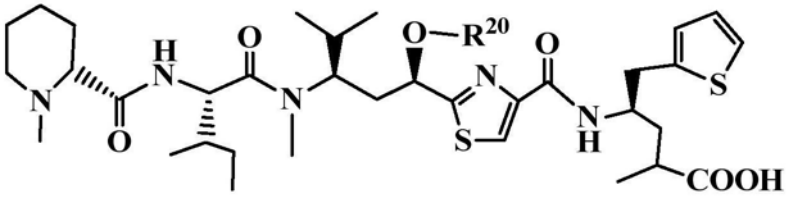


I-55

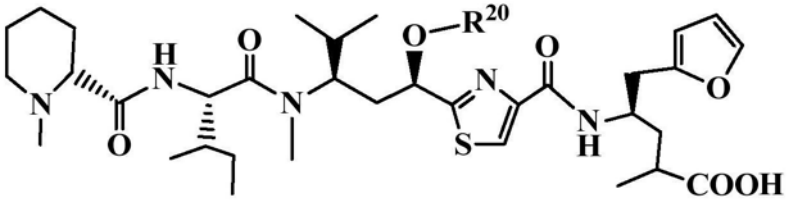
[0187]



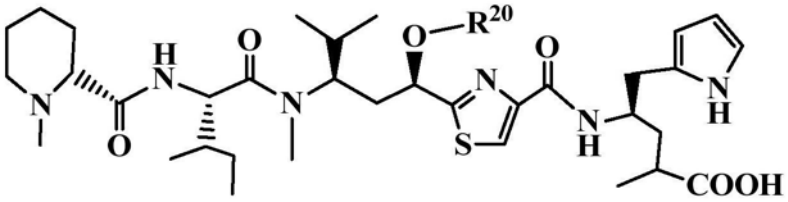
I-56



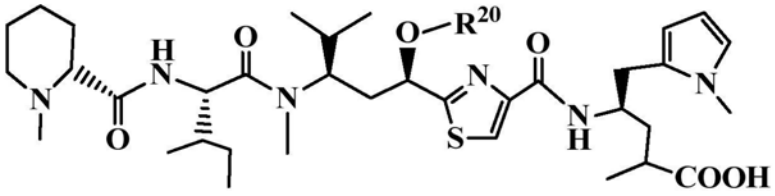
I-57



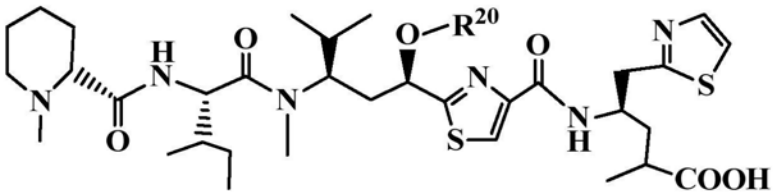
I-58



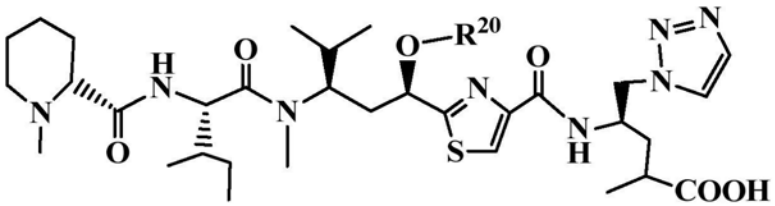
I-59



I-60

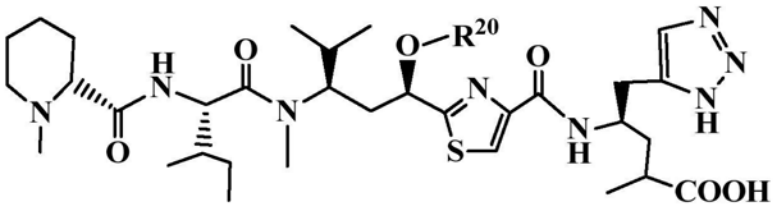


I-61

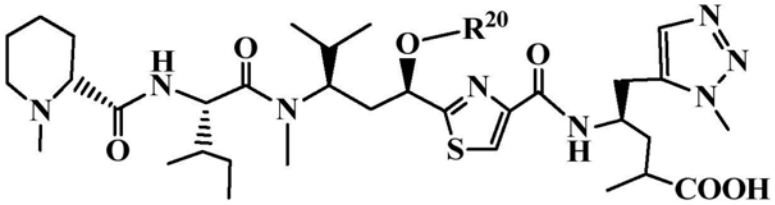


I-62

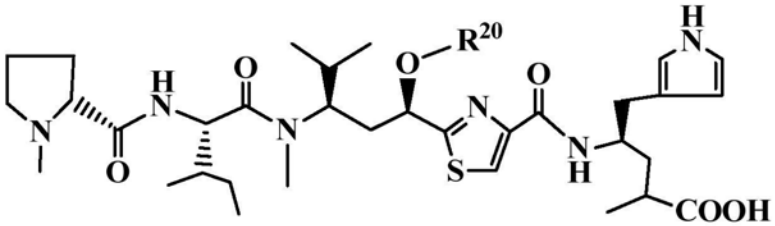
[0188]



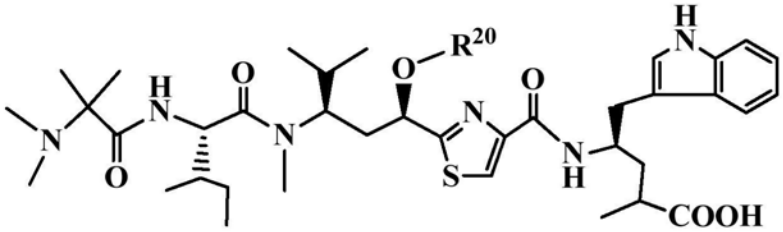
I-63



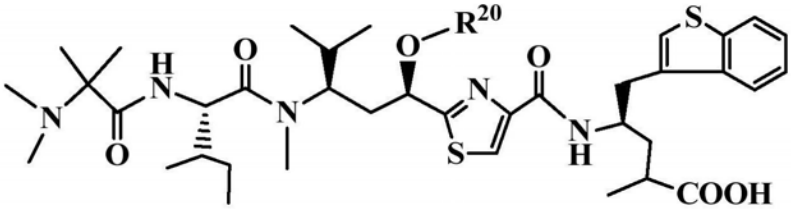
I-64



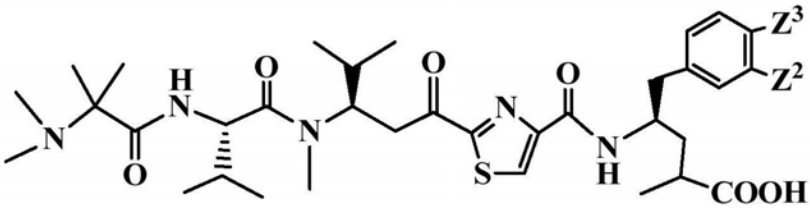
I-65



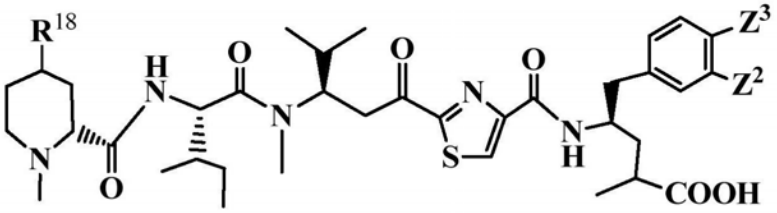
I-66



I-67

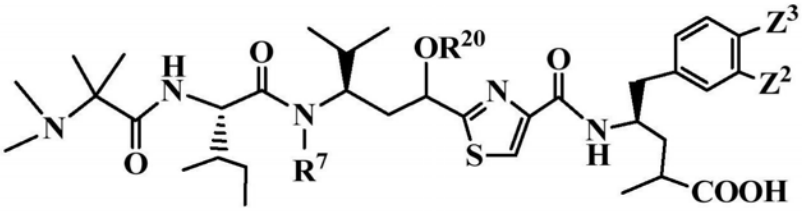


I-68

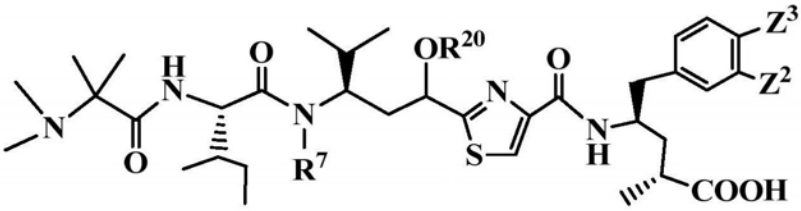


I-69

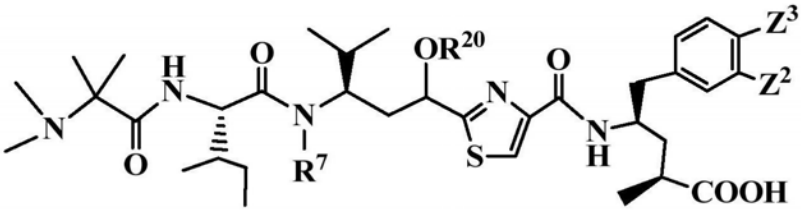
[0189]



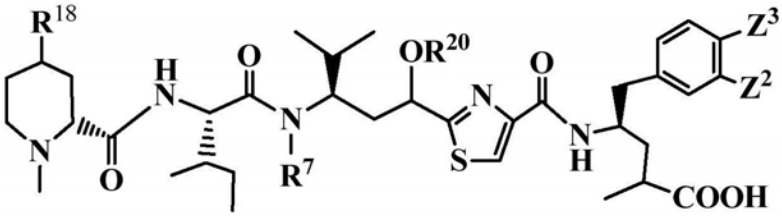
I-70



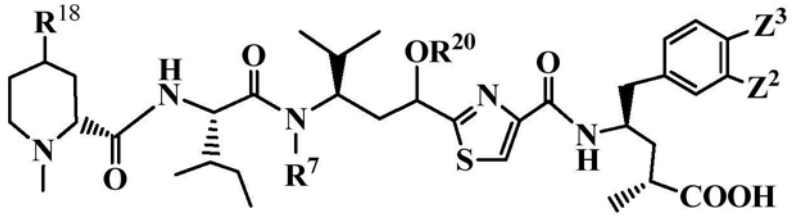
I-71



I-72

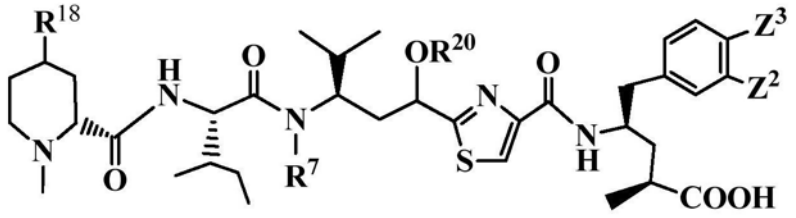


I-73



I-74

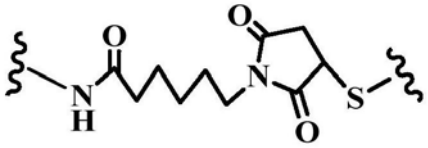
[0190]

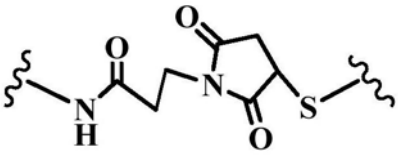
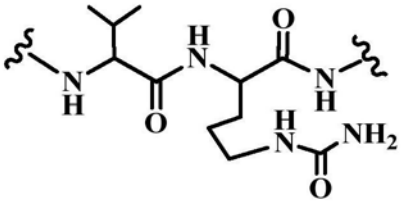
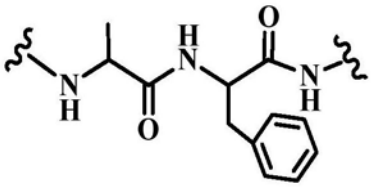
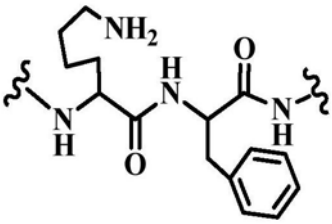
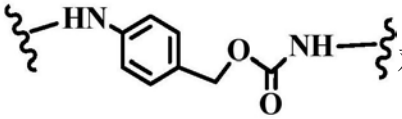
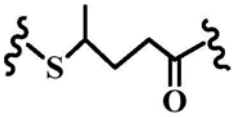
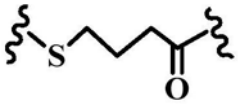
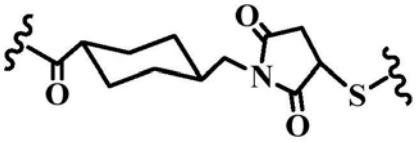
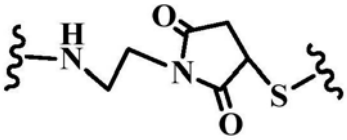
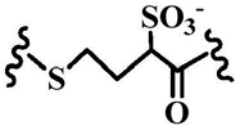
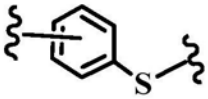
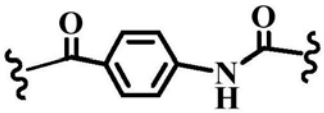
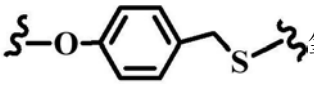
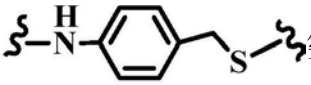
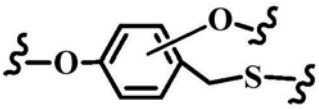
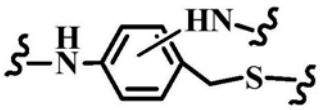
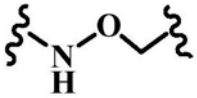
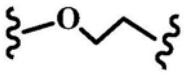
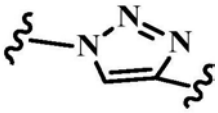
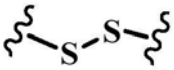
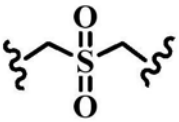
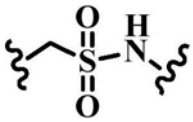


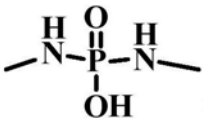
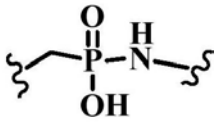
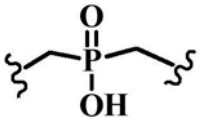
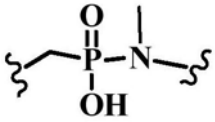
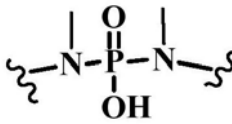
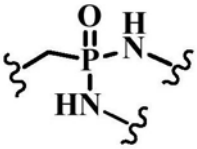
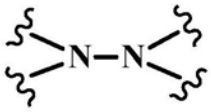
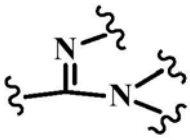
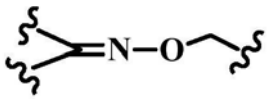
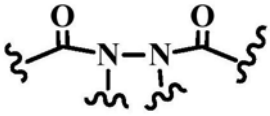
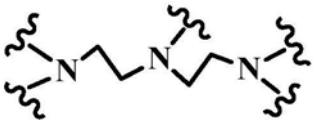
I-75

[0191] 其中R^{20}是H，C_1-C_8直链或支链烷基或杂烷基，C_2-C_8直链或支链烯基、炔基、烷基环烷基、杂环烷基，C_3-C_8直链或支链芳基、Ar-烷基、杂环、碳环、环烷基、杂烷基环烷基、烷基羰基、杂芳基，碳酸酯(-C(O)OR^{17})、氨基甲酸酯(-C(O)$NR^{17}R^{18}$)或1-8个碳原子的羧酸盐、酯、醚或酰胺，1-8个氨基酸，如式$(OCH_2CH_2)_p$或$(OCH_2CH(CH_3))_p$中的聚亚烷基二醇单元，其中p是0至约1000的整数，R^{20}或缺省而氧基形成酮，或以上的组合；Z^2和Z^3独立地为H、OH、NH_2、O、NH、COOH、COO、C(O)、C(O)NH、C(O)NH_2、R^{18}、$OCH_2OP(O)(OR^{18})_2$、$OC(O)OP(O)(OR^{18})_2$、$OPO(OR^{18})_2$、$NHPO(OR^{18})_2$、$OP(O)(OR^{18})OP(O)(OR^{18})_2$、$OC(O)R^{18}$、$OC(O)NHR^{18}$、$OSO_2(OR^{18})$、O-($C_4$-$C_{12}$-糖苷)，$C_1$-$C_8$直链或支链烷基或杂烷基，$C_2$-$C_8$直链或支链烯基、炔基、烷基环烷基、杂环烷基；$C_3$-$C_8$直链或支链芳基、Ar-烷基、杂环、碳环、环烷基、杂烷基环烷基、烷基羰基、杂芳基，碳酸酯(-C(O)OR^{17})、氨基甲酸酯(-C(O)$NR^{17}R^{18}$)；R^{17}和R^{18}独立地为H、直链或支链烷基或杂烷基，C_2-C_8直链或支链烯基、炔基、烷基环烷基、杂环烷基，C_3-C_8直链或支链芳基、Ar-烷基、杂环、碳环、环烷基、杂烷基环烷基、烷基羰基、杂芳基，碳酸酯(-C(O)OR^{17})、氨基甲酸酯(-C(O)$NR^{17}R^{18}$)；R^7的定义与前文相同。

[0192] 另外，W、L_1、L_2、V_1和V_2可独立地由一个或多个下列连接体组分构成：6-马来酰亚胺基己酰基(“MC”)、马来酰亚胺丙酰基(“MP”)、缬氨酸-瓜氨酸(“val-cit”或“vc”)、丙氨酸-苯丙氨酸(“ala-phe”or“af”)、对氨基苄氧基-羰基(“PAB”)、4-硫代戊酰基(“SPP”)、4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1酰基(“MCC”)、(4-乙酰基)氨基苯酰基(“SIAB”)、4-硫丁酰基(SPDB)、4-硫-2-羟基磺酰基-丁酰基(2-Sulfo-SPDB)，结构如下所示，或含有1-12个天然或非天然氨基酸单元的天然或非天然肽。天然氨基酸最好选自天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、组氨酸、赖氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、硒代半胱氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、脯氨酸、色氨酸、丙氨酸；

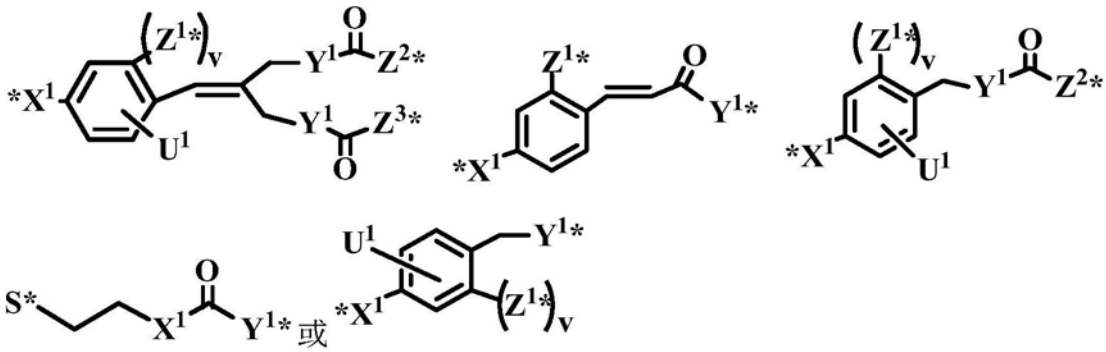
[0193]  6-马来酰亚胺己酰基(MC)，

 马来酰亚胺丙酰基(MP)，  缬氨酸-瓜氨酸(val-cit)，  丙氨酸-苯丙氨酸(ala-phe)，  赖氨酸-苯丙氨酸(lys-phe)，  对氨基苄氧基-羰基(PAB)，  4-硫戊酰基(SPP)，  4-硫丁酰基(SPDB)，  4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-酰基(MCC)，  马来酰亚胺乙氨基(ME)，  4-硫-2-羟基磺酰基-丁酰基(2-Sulfo-SPDB)，  芳基硫醚基(PySS)，  (4-乙酰基)氨基苯酰基(SIAB)，  氧苄基硫醚基，  氨基苄基硫醚基，  二氧基苄基硫醚基、  二氨基苄基硫醚基、  氨基氧基苄基硫醚基，  烷氧基氨基(AOA)，  亚乙基氧基(EO)，  4-甲基-4-硫代-戊酰基(MPDP)，  三唑，  二硫、  烷基磺酰基，  烷基磺

胺，  砜基二磺胺，  磷二酰胺，  烷基膦酰胺，  膦酸，  N-甲基烷基膦酰胺，  N,N'-二甲基磷二酰胺、  烷基膦二酰胺，  肼，  乙脒；  肟，  二乙酰肼，  氨基乙基胺，  氨基乙基-氨基乙基胺和L-或D-，或含有1-20个氨基酸的天然或非天然肽；

[0194] W、L_1、L_2、V_1和V_2独立地也可以含有自我毁灭或非自我毁灭的组分、肽单元、腙键、二硫化物、酯、肟、酰胺或硫醚键。自我毁灭单元包括但不限于，与对氨基苄基氨甲酰基(PAB)的电子结构相似的芳香化合物，例如2-氨基咪唑-5-甲醇的衍生物、杂环PAB同系物、β-葡糖苷酸、以及邻或对氨基苄基缩醛；

[0195] 优选的自我毁灭型连接体组分具有以下结构之一：

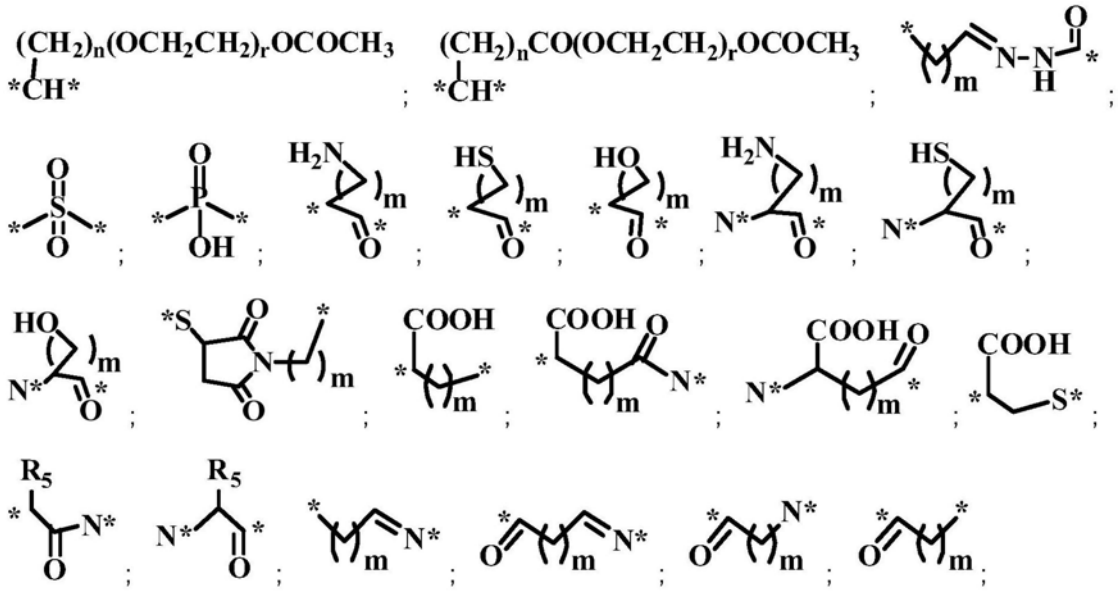
[0196] 

[0197] 其中，*标记的是额外的间隔体或可释放的连接体、或细胞毒性剂、和/或结合分子(CBA)的连接点；X^1、Y^1、Z^2和Z^3独立地为NH、O或S；Z^1为H、NHR_1、OR_1、SR_1、COX_1R_1，其中X_1和R_1如前文所定义；v为0或1；U^1为H、OH、C_1-C_6烷基、$(OCH_2CH_2)_n$、F、Cl、Br、I、OR_5、SR_5、NR_5R_5'、N＝NR_5、N＝R_5、NO_2、SOR_5R_5'、SO_2R_5、SO_3R_5、OSO_3R_5、PR_5R_5'、POR_5R_5'、$PO_2R_5R_5'$、$OPO(OR_5)(OR_5')$或$OCH_2PO(OR_5(OR_5')$，其中R_5和R_5'独立地选自H、C_1-C_8烷基；C_2-C_8烯基、炔基、杂烷基或氨基酸；C_3-C_8芳基、杂环、碳环、环烷基、杂环烷基、杂芳烷基、烷基羰基或糖苷；或药学上的阳离子盐；

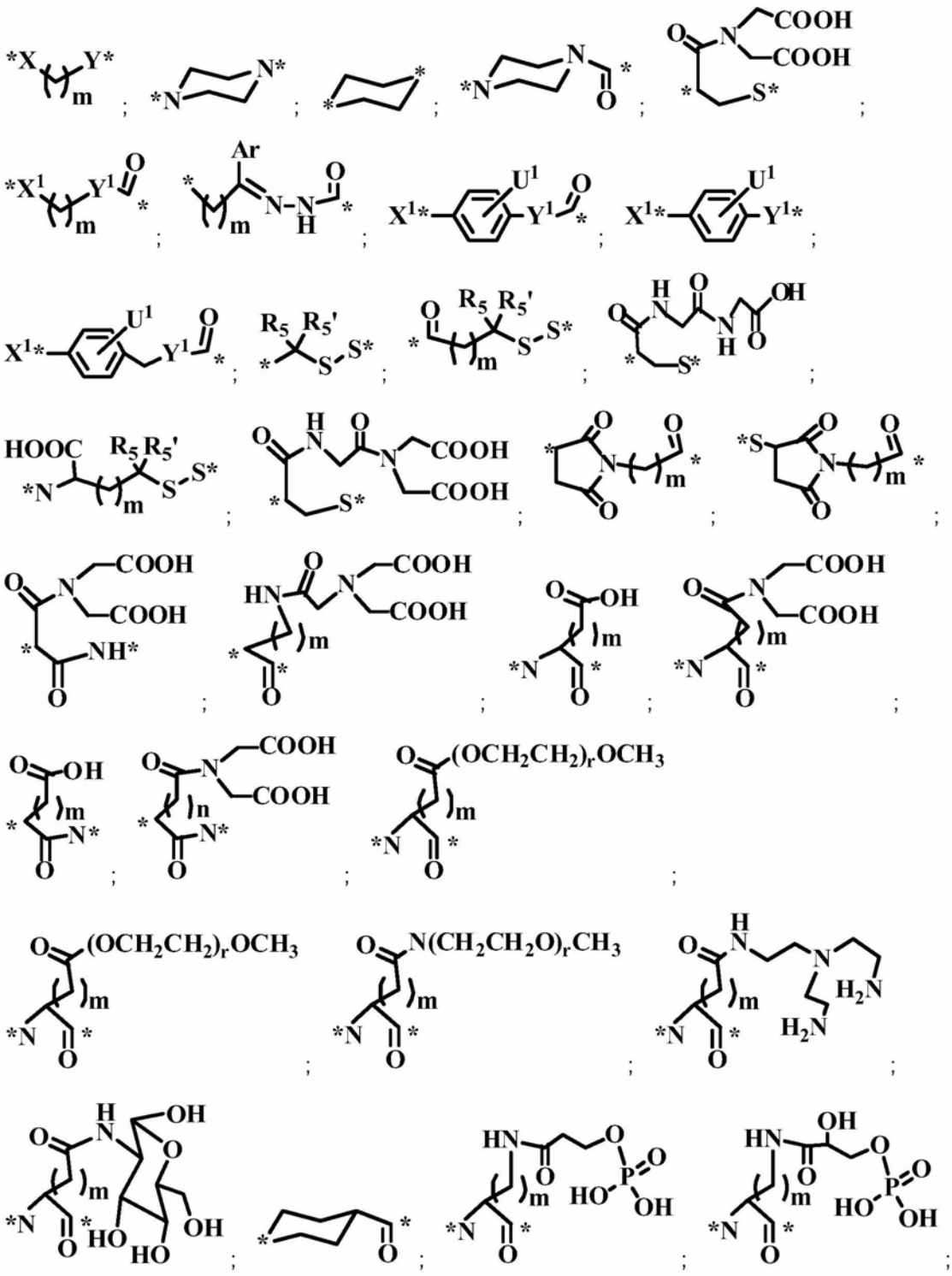
[0198] W、L_1、L_2、V_1和V_2独立地也可以为包含以下结构之一的非自我毁灭的连接体组分：

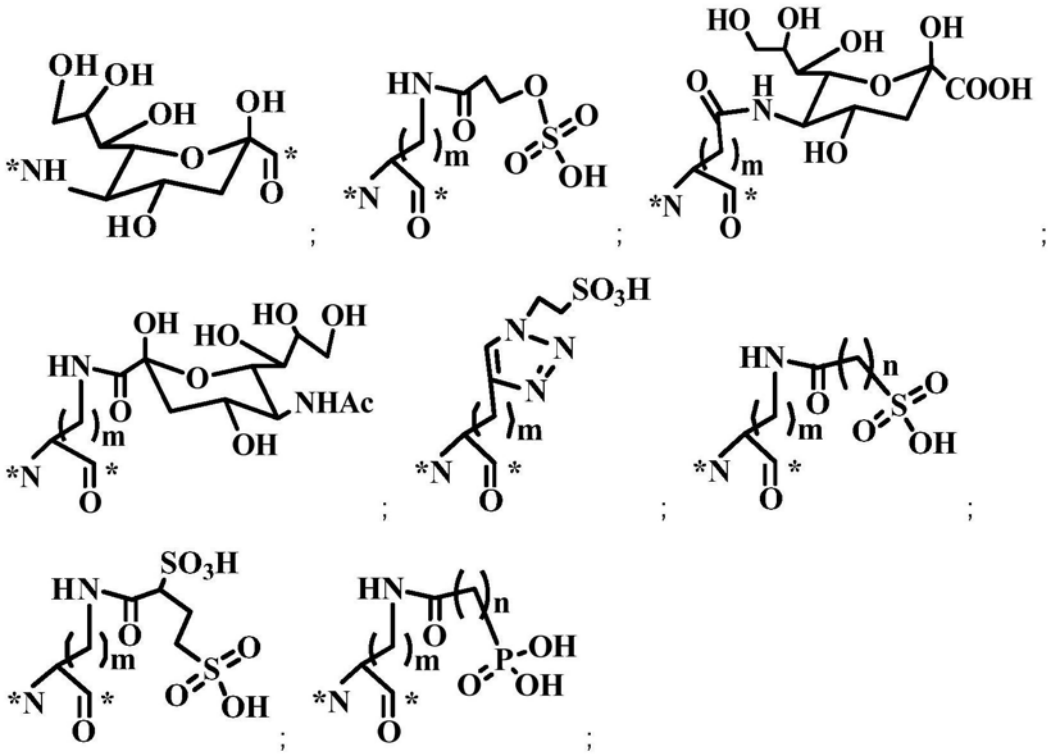
[0199] $*(CH_2CH_2O)_r*$；$\underset{*CH*}{(CH_2)_nCO(OCH_2CH_2)_rOCH_3}$；$\underset{*CH*}{(CH_2)_nCON(CH_2CH_2O)_rCOCH_3}$；

[0200]



[0201]



[0202] 

[0203] 其中，*标记的是额外的间隔体或可释放的连接体、或细胞毒性剂、和/或结合分子(CBA)的连接点；X^1、Y^1、U^1、R_5、R_5' 如前文所定义；r为0-100；m和n独立地为0-6；

[0204] 更为优选的是，W、L_1、L_2、V_1和V_2独立地是可释放的连接体组分。术语“可释放的”是指连接体上包含至少一个可在生理条件下被破坏的键，例如pH、酸、碱、氧化作用、代谢、生化或酶不稳定的键。应当理解，导致键断裂不一定是生物或代谢过程、而可能是一个化学反应、例如水解或取代反应，这种生理条件的例子有：pH值比细胞浆内pH低的内涵体，恶性细胞内存在的毫摩尔浓度的大量谷胱甘肽，它能够与细胞内硫醇发生二硫键交换反应；

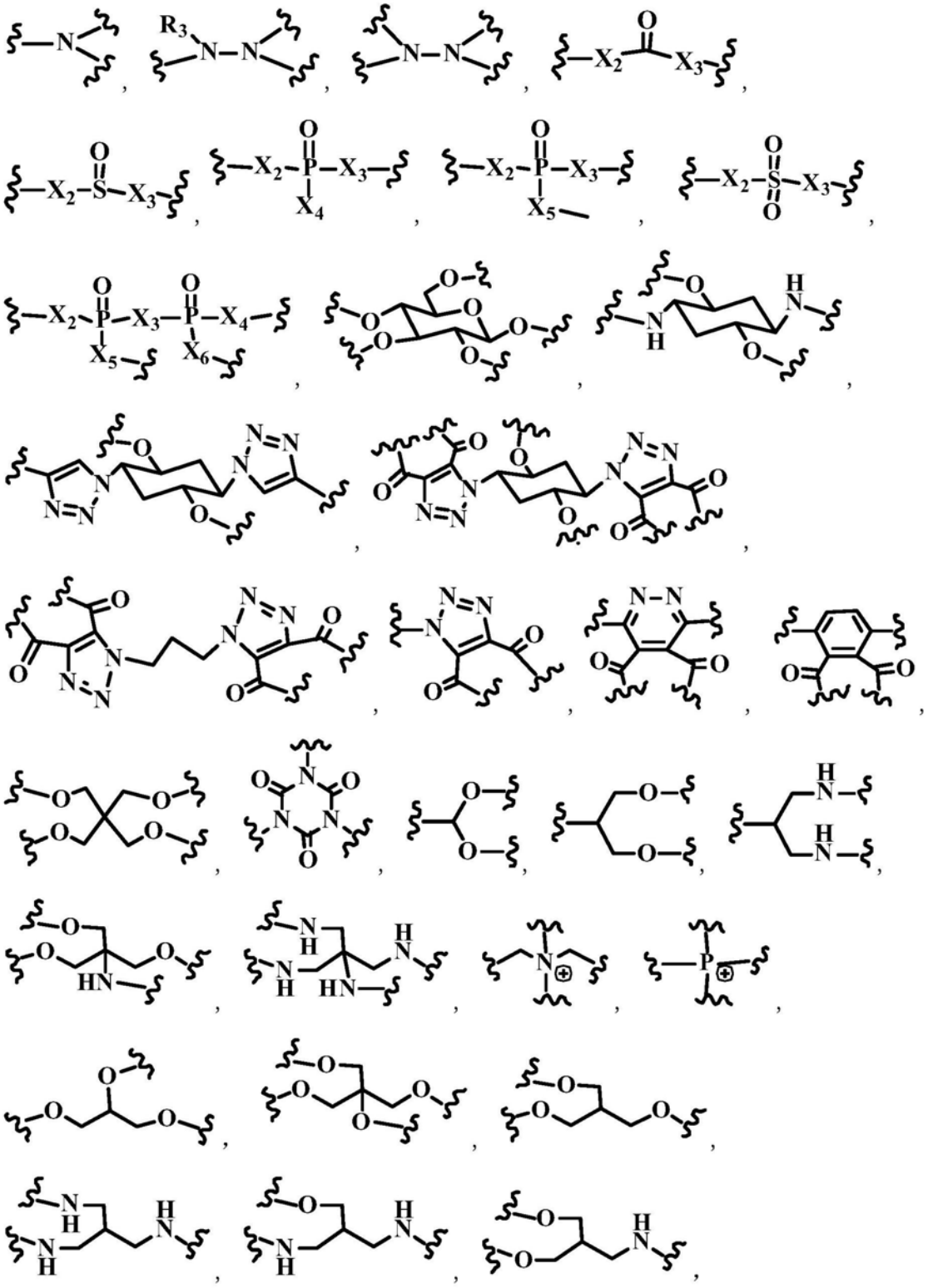
[0205] W、L_1、L_2、V_1和V_2中可释放组件的实例，包括但不限于：

[0206] $-(CR_5R_6)_m(Aa)_r(CR_7R_8)_n(OCH_2CH_2)_t-$、$-(CR_5R_6)_m(CR_7R_8)_n(Aa)_r(OCH_2CH_2)_t-$、$-(Aa)_r-(CR_5R_6)_m(CR_7R_8)_n(OCH_2CH_2)_t-$、$-(CR_5R_6)_m(CR_7R_8)_n(OCH_2CH_2)_r(Aa)_t-$、$-(CR_5R_6)_m-(CR_7=CR_8)(CR_9R_{10})_n(Aa)_t(OCH_2CH_2)_r-$、$-(CR_5R_6)_m(NR_{11}CO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n-(OCH_2CH_2)_r-$、$-(CR_5R_6)_m(Aa)_t(NR_{11}CO)(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$、$-(CR_5R_6)_m(OCO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n-(OCH_2CH_2)_r-$、$-(CR_5R_6)_m(OCNR_7)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$、$-(CR_5R_6)_m(CO)(Aa)_t-(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$、$-(CR_5R_6)_m(NR_{11}CO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$、$-(CR_5R_6)_m-(OCO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n-(OCH_2CH_2)_r-$、$-(CR_5R_6)_m(OCNR_7)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$、$-(CR_5R_6)_m(CO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n-(OCH_2CH_2)_r-$、$-(CR_5R_6)_m-$phenyl-CO$(Aa)_t(CR_7R_8)_n-$、$-(CR_5R_6)_m-$呋喃-CO$(Aa)_t(CR_7R_8)_n-$、$-(CR_5R_6)_m-$恶唑-CO$(Aa)_t(CR_7R_8)_n-$、$-(CR_5R_6)_m-$噻唑基-CO$(Aa)_t(CCR_7R_8)_n-$、$-(CR_5R_6)_t-$噻吩-CO$(CR_7R_8)_n-$、$-(CR_5R_6)_t-$咪唑-CO-$(CR_7R_8)_n-$、$-(CR_5R_6)_t-$吗啉-CO$(Aa)_t-(CR_7R_8)_n-$、$-(CR_5R_6)_t$呱嗪-CO$(Aa)_t-(CR_7R_8)_n-$、$-(CR_5R_6)_t-$N-甲基呱嗪-CO$(Aa)_t-(CR_7R_8)_n-$、$-(CR_5R)_m-(Aa)_t$苯基-、$-(CR_5R_6)_m-(Aa)_t$呋喃-、$-(CR_5R_6)_m-$恶唑$(Aa)_t-$、$-(CR_5R_6)_m-$噻唑基$(Aa)_t-$、$-(CR_5R_6)_m-$噻吩基$-(Aa)_t-$、$-(CR_5R_6)_m-$咪唑$(Aa)_t-$、$-(C\ R_5R_6)_m-$吗啉$-(Aa)_t-$、$-(CR_5R_6)_m-$呱嗪$-(Aa)_t-$、$-(CR_5R_6)_m-$N-甲基呱嗪$-(Aa)_t-$、

[0207] $-K(CR_5R_6)_m(Aa)_r(CR_7R_8)_n(OCH_2CH_2)_t-$，$-K(CR_5R_6)_m(CR_7R_8)_n(Aa)_r(OCH_2CH_2)_t-$，-K

$(Aa)_r-(CR_5R_6)_m(CR_7R_8)_n(OCH_2CH_2)_t-$,$-K(CR_5R_6)_m(CR_7R_8)_n(OCH_2CH_2)_r(Aa)_t-$,$-K(CR_5R_6)_m-(CR_7=CR_8)(CR_9R_{10})_n(Aa)_t(OCH_2CH_2)_r-$,$-K(CR_5R_6)_m(NR_{11}CO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$,$-K(CR_5R_6)_m(Aa)_t(NR_{11}CO)(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$,$-K(CR_5R_6)_m(OCO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n-(OCH_2CH_2)_r-$,$-K(CR_5R_6)_m(OCNR_7)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$,$-K(CR_5R_6)_m(CO)(Aa)_t-(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$,$-K(CR_5R_6)_m(NR_{11}CO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$,$-K(CR_5R_6)_m-(OCO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$,$-K(CR_5R_6)_m(OCNR_7)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$,$-K-(CR_5R_6)_m(CO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$,$-K(CR_5R_6)_m-$苯基$-CO(Aa)_t(CR_7R_8)_n-$,$-K-(CR_5R_6)_m-$呋喃$-CO(Aa)_t-(CR_7R_8)_n-$,$-K(CR_5R_6)_m-$恶唑$-CO(Aa)_t(CR_7R_8)_n-$,$-K(CR_5R_6)_m-$噻唑基$-CO(Aa)_t-(CR_7R_8)_n-$,$-K(CR_5R_6)_t-$噻吩$-CO(CR_7R_8)_n-$,$-K(CR_5R_6)_t$咪唑$-CO-(CR_7R_8)_n-$,$-K(CR_5R_6)_t$吗啉$-CO(Aa)_t(CR_7R_8)_n-$,$-K(CR_5R_6)_t$呱嗪$-CO(Aa)_t-(CR_7R_8)_n-$,$-K(CR_5R_6)_t-N-$甲基$CO(Aa)_t(CR_7R_8)_n-$,$-K(CR_5R)_m(Aa)_t$苯基,$-K-(CR_5R_6)_m-(Aa)_t$呋喃-,$-K(CR_5R_6)_m-$恶唑$(Aa)_t-$,$-K(CR_5R_6)_m-$噻唑基$(Aa)_t-$,$-K(CR_5R_6)_m-$噻吩$-(Aa)_t-$,$-K(CR_5R_6)_m-$咪唑$(Aa)_t-$,$-K(CR_5R_6)_m-$吗啉$(Aa)_t-$,$-K(CR_5R_6)_m$呱嗪$-(Aa)_tG$、$-K(CR_5R_6)_mN-$甲基呱嗪基$(Aa)_t-$;其中Aa、m、n、$R_3$、$R_4$和$R_5$在前文已有定义;t和r独立地为0-100;$R_5$、$R_6$、$R_7$、$R_8$、$R_9$、$R_{10}$和$R_{11}$独立地选自H,卤素,$C_1-C_8$烷基、芳基、烯基、炔基、醚、酯、胺或酰胺,这些基团均可以被以下成分所取代:一个或多个卤素、CN、NR_1R_2、CF_3、OR_1、芳基、杂环、$S(O)R_1$、SO_2R_1、$-CO_2H$、$-SO_3H$、$-OR_1$、$-CO_2R_1$、$-CONR_1$、$-PO_2R_1R_2$、$-PO_3H$或$P(O)R_1R_2R_3$;K是NR_1、-SS-、-C(=O)-、-C(=O)NH-、-C(=O)O-、-C=NH-O-、-C=N-NH-、-C(=O)NH-NH-、O、S、Se、B、Het(具有C_3-C_8的杂环或杂芳环),或含有1-20个氨基酸的肽;

[0208] 另外,W、L_1、L_2、V_1和V_2独立地可以包含以下亲水结构:



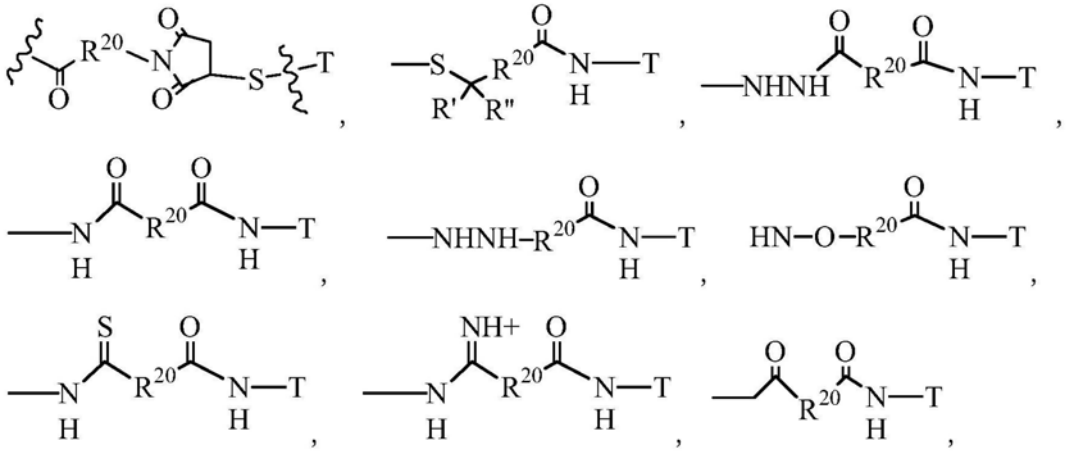
[0209]

[0210] 其中ξ是连接点；X_2、X_3、X_4、X_5和X_6独立地选自NH、NHNH、N(R_3)、N(R_3)N(R_3')、O、S、C_1-C_6烷基，C_2-C_6杂烷基、烷基环烷基、杂环烷基、C_3-C_8芳基、Ar-烷基、杂环、碳环、环烷基、杂烷基环烷基、烷基羰基、杂芳基，或1-8个氨基酸；其中R_3和R_3'独立地为H，C_1-C_8烷基，C_2-C_8杂烷基、烷基环烷基、杂环烷基，C_3-C_8芳基、Ar-烷基、杂环、碳环、环烷基、杂烷基环烷基、烷基羰基、杂芳基，或1-8个碳原子的酯、醚或酰胺，如结构式$(OCH_2CH_2)_p$或$(OCH_2CH(CH_3))_p$的聚亚烷基二醇单元，其中p是0至约1000的整数，或上述的组合；

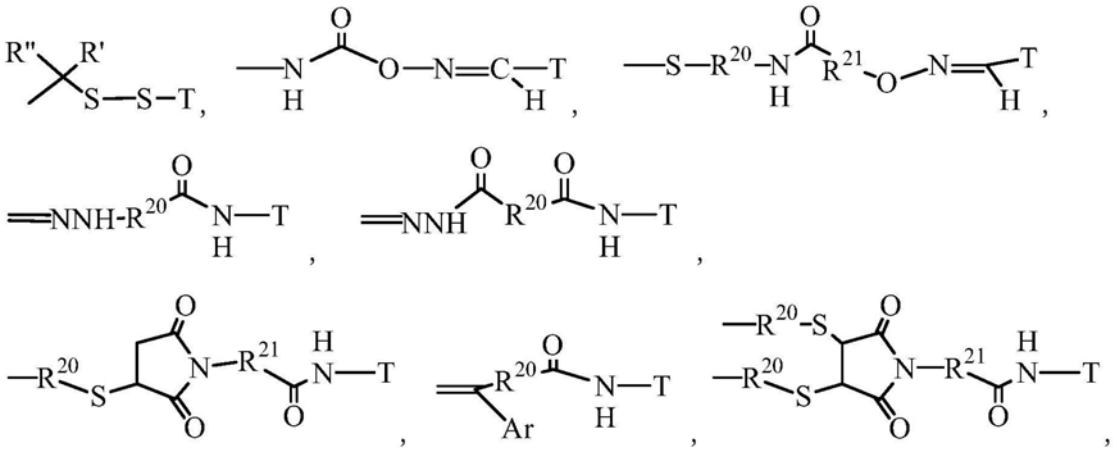
[0211] 更为优选地，W、L_1、L_2、V_1和V_2独立地为具有1-6个碳原子的直链烷基，或结构如式$(OCH_2CH_2)_p$的聚乙烯氧基单元，p＝1-5000，或是含有1-4个氨基酸单元的肽(L或D形式)，或以上的组合。

[0212] 或者W、Q_1、Q_2、L_1、L_2、V_1或V_2中的任何一个或多个独立地可以缺省、但Q_1和Q_2不能同时缺省。

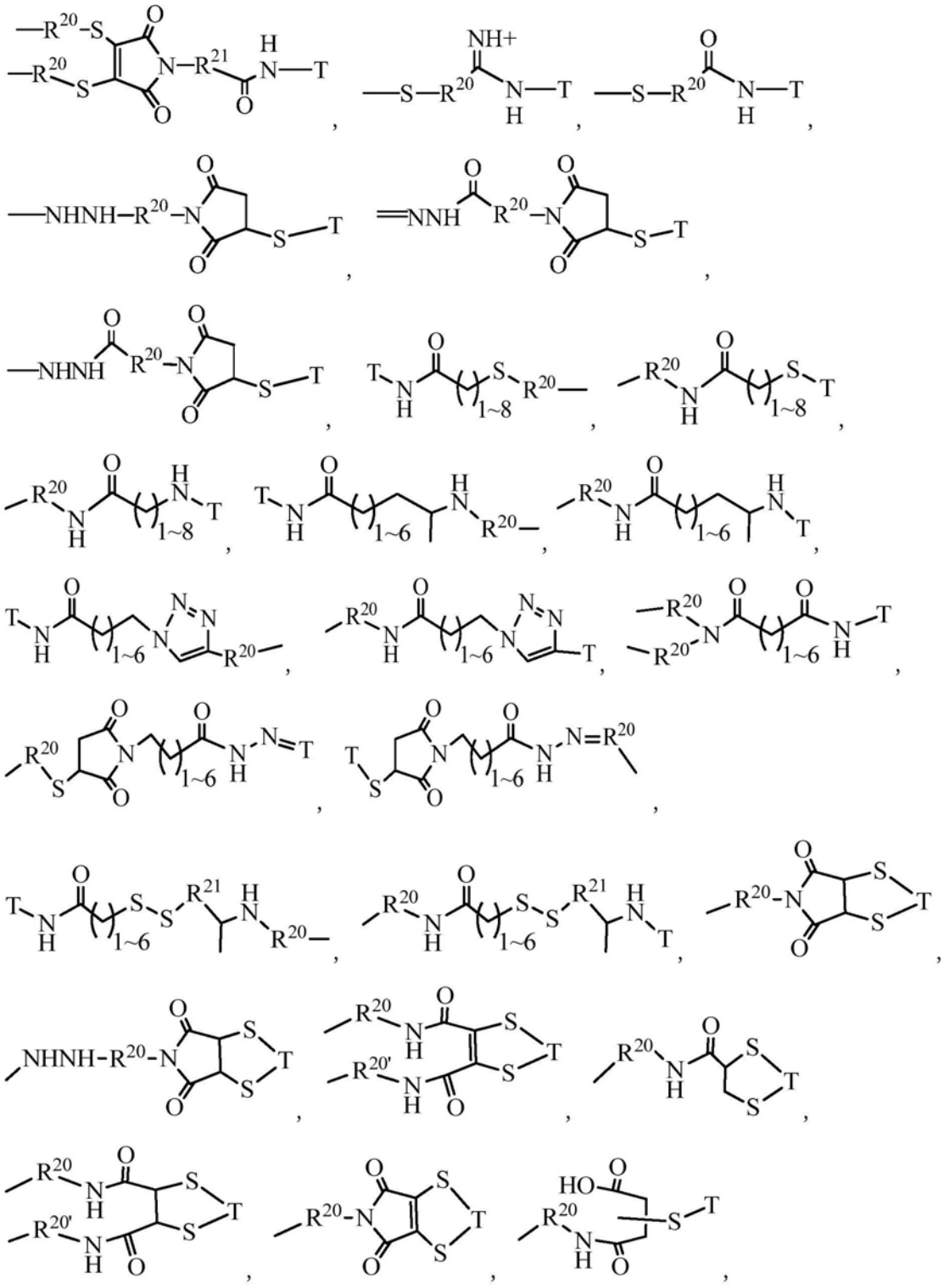
[0213] 在另一方面，一般而言，当细胞结合分子T与结构式(I)和(III)中V_1和/或V_2连接时、或与L_1和/或L_2直接连接时(V_1和V_2缺省)，产生以下一个或多个结构：



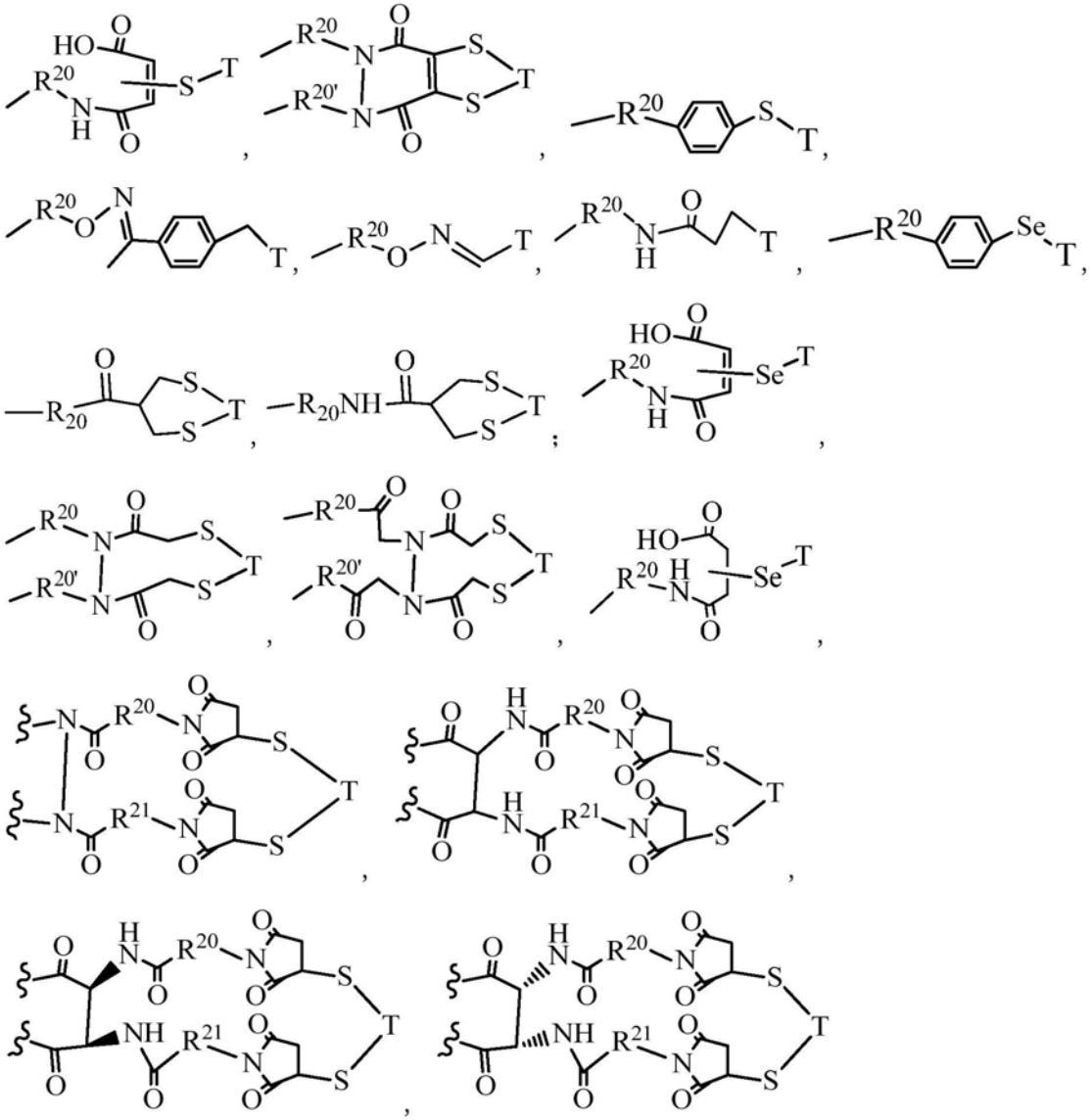
[0214]



[0215]



[0216]

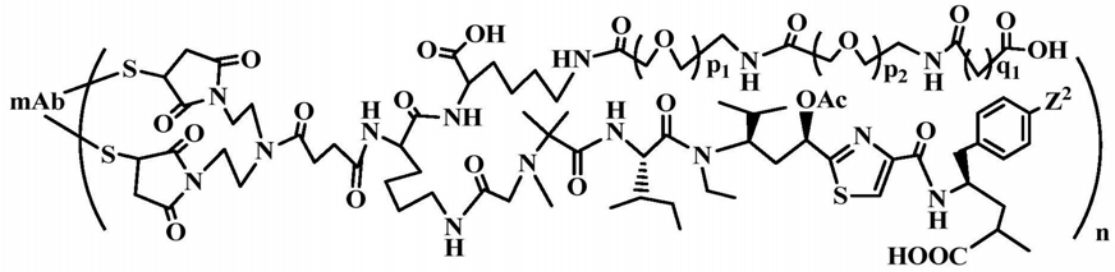


[0217] 其中R^{20}和R^{21}独立地是C_1-C_8烷基，C_2-C_8杂烷基或杂环，C_3-C_8芳基、Ar-烷基、环烷基、烷基环烷基、杂环烷基、杂烷基环烷基、碳环或烷基羰基，或C_2-C_{100}具有式$(CH_2CH_2O)_p$的聚亚烷基二醇，p如前文所定义。

[0218] 在另一方面，Q_1和Q_2优选自含有C_2-C_{18}脂质、或C_2-C_{18}脂肪酸或C_2-C_{18}脂肪铵脂质的聚亚烷基二醇。聚亚烷基二醇不仅使偶联物更具有亲水，而且能防止偶联物连接体被水解酶，如蛋白水解酶或酯酶水解。偶联体上的脂质可以结合哺乳动物血液中的白蛋白，让偶联物在血液循环中从该复合物中缓慢释放。因此，本专利申请的支链连接体可以让偶联物在血液循环中更加稳定。这里的聚亚烷基二醇包括但不限于聚乙二醇(PEG)、聚(丙二醇)及环氧乙烷与环氧丙烷的共聚物，优选的是PEG，更优选的是单官能团活化的羟基PEG(例如一个末端被活化的羟基PEG，包括羟基PEG-羧酸的反应活性酯、羟基PEG-单醛、羟基PEG-单胺、羟基PEG-单酰肼、羟基PEG-单肼基甲酸酯、羟基PEG-单碘乙酰胺、羟基PEG-单马来酰亚胺、羟基PEG-单原甲酰基二硫化物、羟基PEG-单肟、羟基PEG-单苯基碳酸酯、羟基PEG-单苯基乙二醛、羟基PEG-单噻唑烷-2-硫酮、羟基PEG-单硫代酯、羟基PEG-单硫醇、羟基PEG-单三嗪和羟基PEG-单乙烯基砜)。聚亚烷基二醇的分子量约为10Da至约200kDa，优选范围在约88Da至约40kDa之间，两个支链，每个的分子量为约88Da至约40kDa；更优选为两个支链，每个分子量

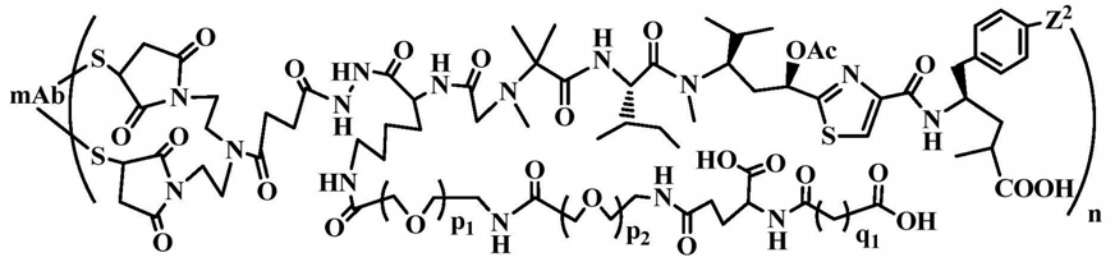
为约88Da至约20kDa。在一个具体实例中，聚亚烷基二醇是聚乙二醇且具有约10kDa、20或40kDa的分子量。在其它具体的实例中，PEG是直链或支链10kDa的PEG、直链或支链20kDa PEG、直链或支链40kDa PEG。许多美国专利已经公开了直链或支链“非抗原性”PEG聚合物及其衍生物或偶联物的制备，如美国专利5,428,128;5,621,039;5,622,986;5,643,575;5,728,560;5,730,990;5,738,846;5,811,076;5,824,701;5,840,900;5,880,131;5,900,402;5,902,588;5,919,455;5,951,974;5,965,119;5,965,566;5,969,040;5,981,709;6,011,042;6,042,822;6,113,906;6,127,355;6,132,713;6,177,087及6,180,095。

[0219] 结构式(I)的示例如下：

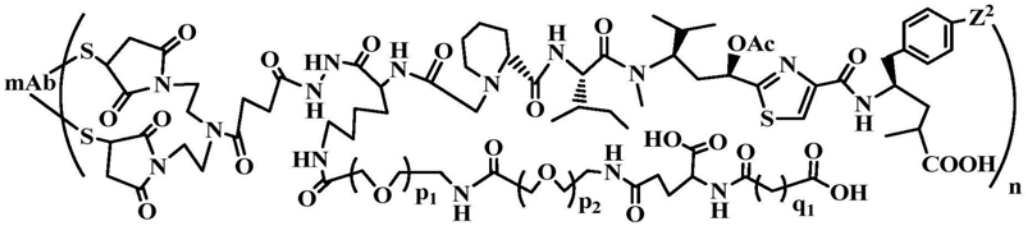


a-01,

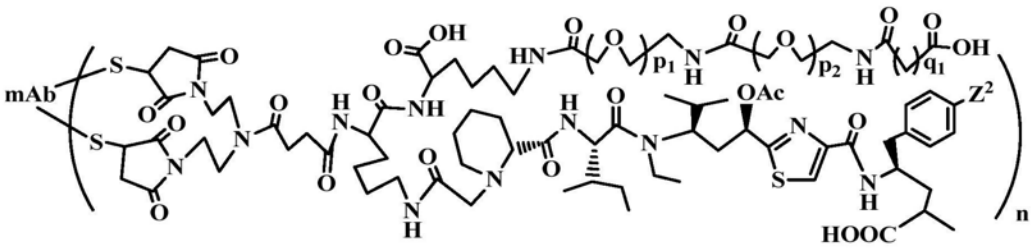
[0220]



a-02,

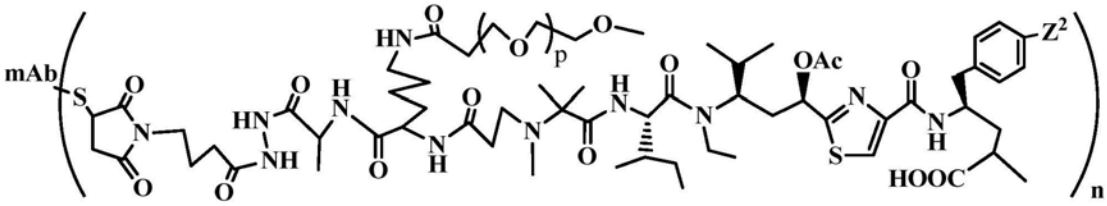


a-03,

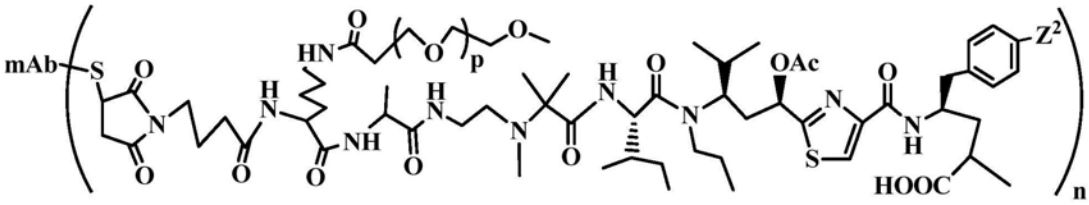


a-04,

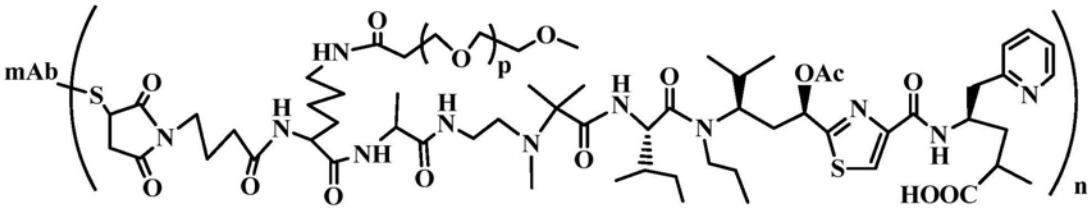
[0221]



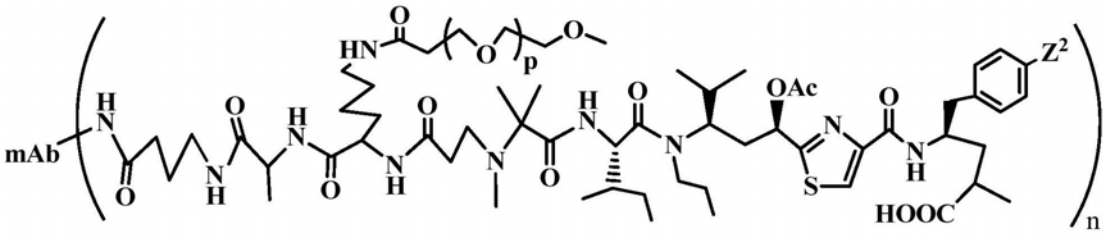
a-05,



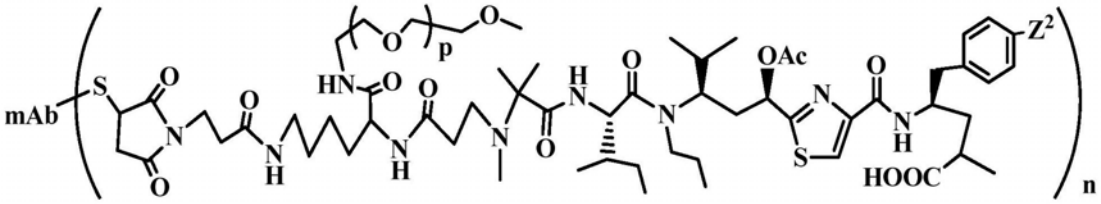
a-06,



a-07,

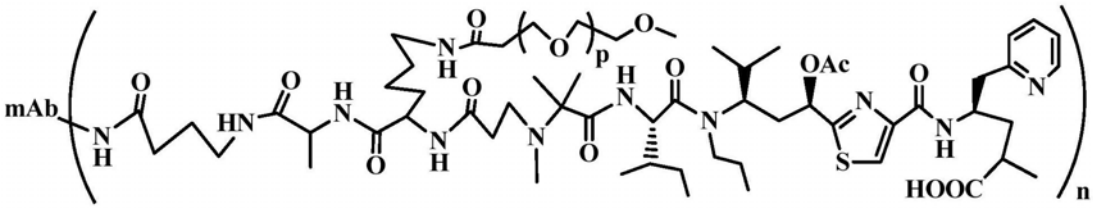


a-08,

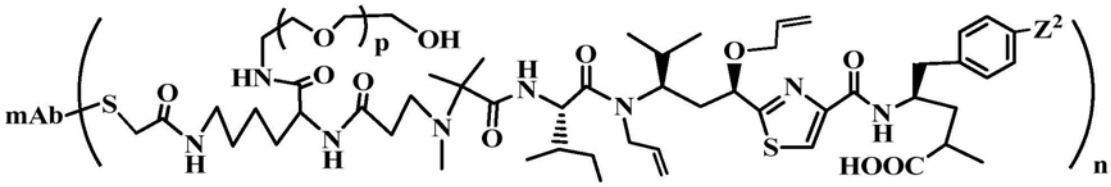


a-09,

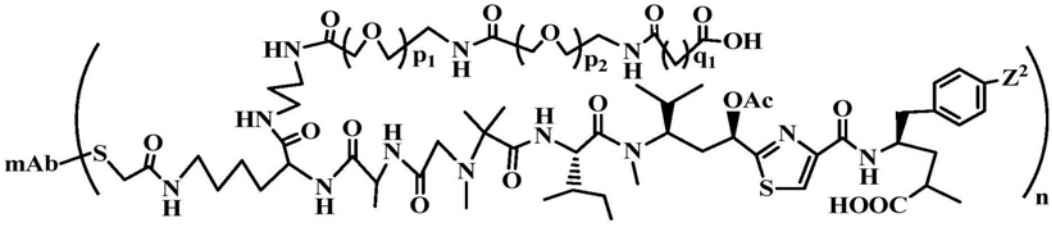
[0222]



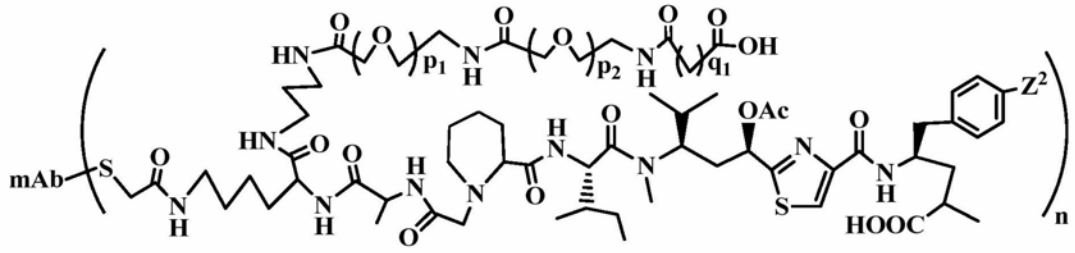
a-10,



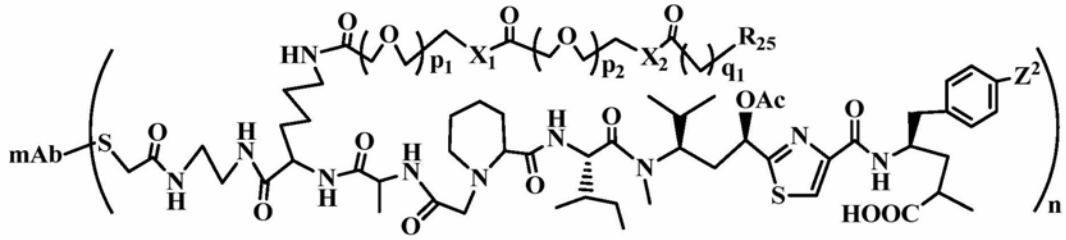
a-11,



a-12,

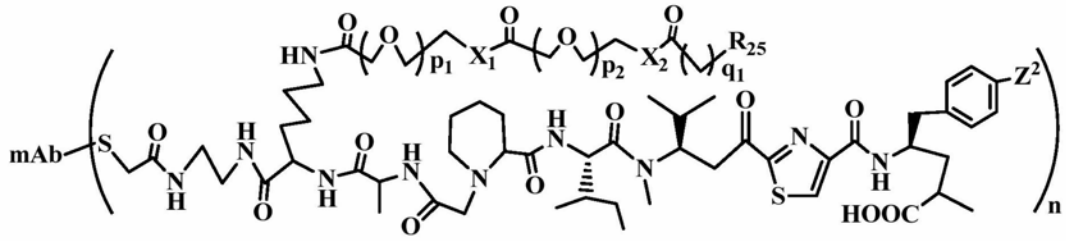


a-13,

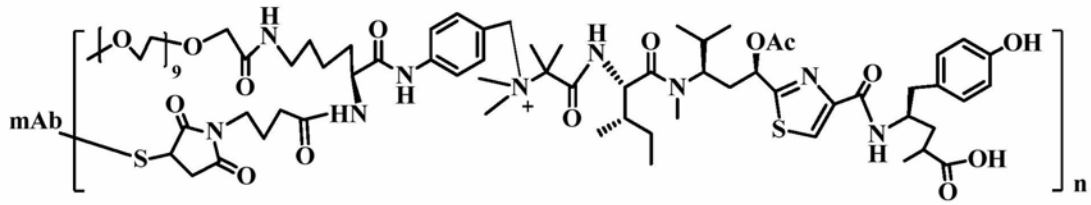


a-14,

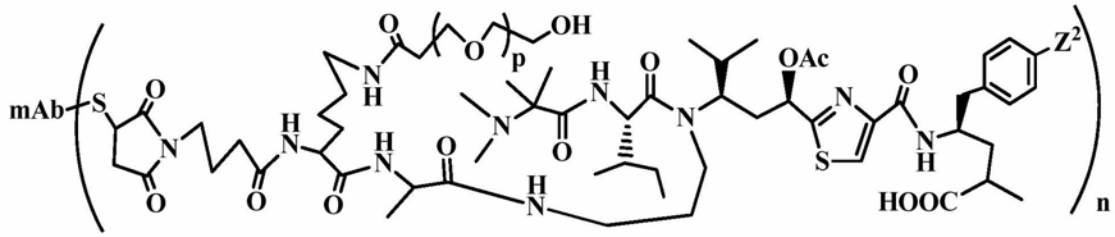
[0223]



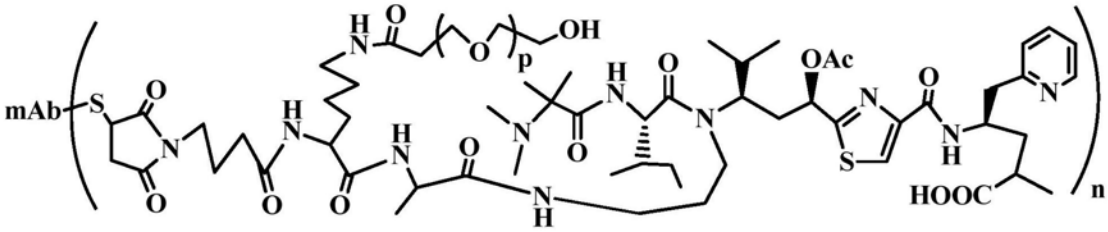
a-15,



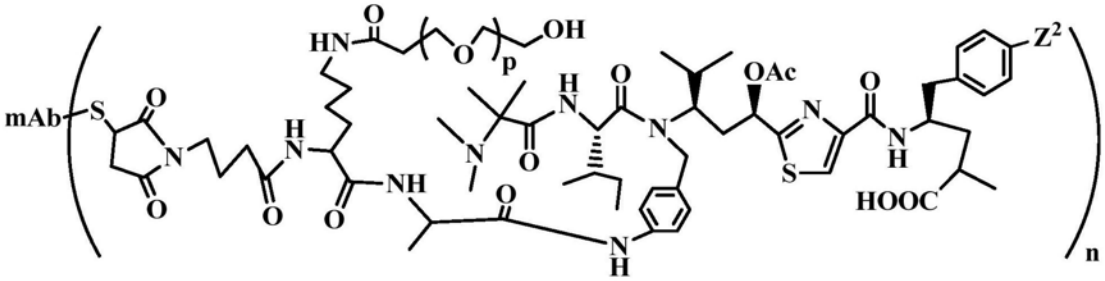
a-16,



a-17,

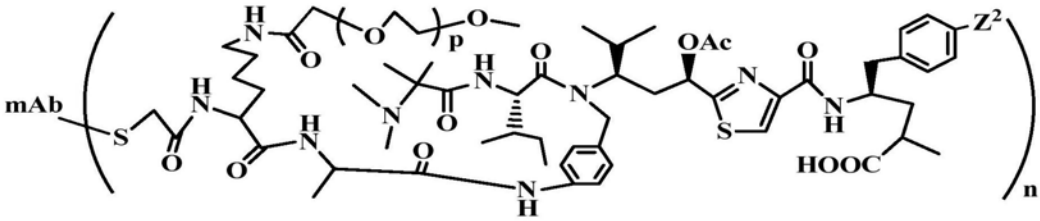


a-18

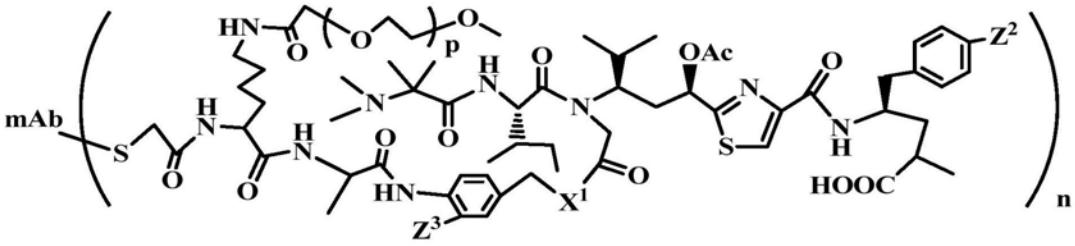


a-19,

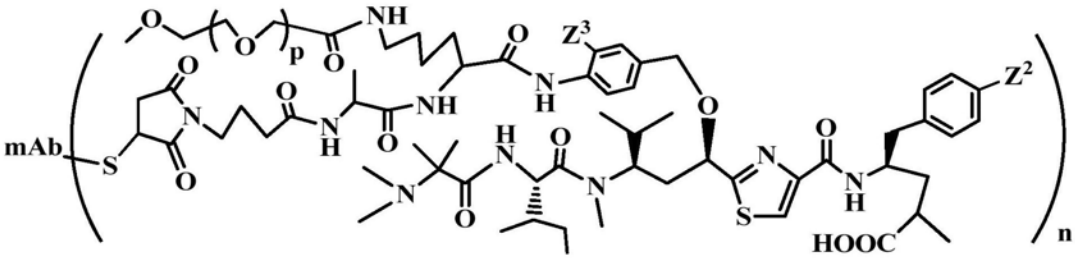
[0224]



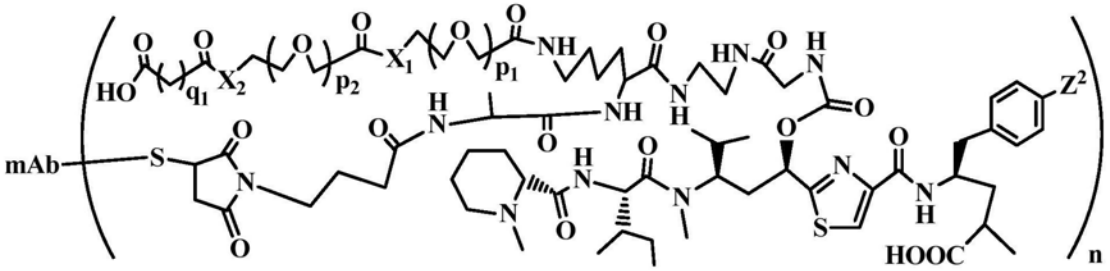
a-20,



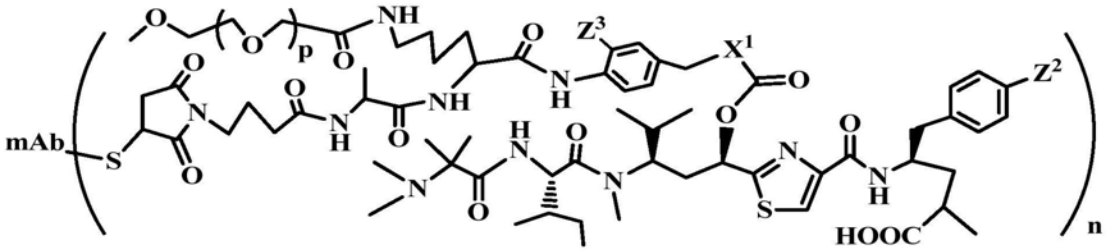
a-21,



a-22,

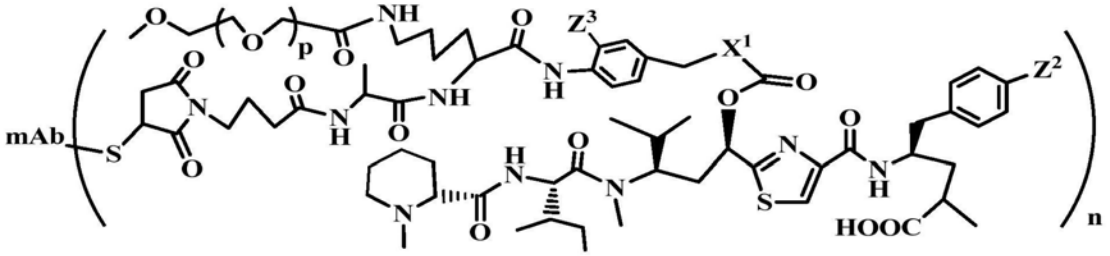


a-23,

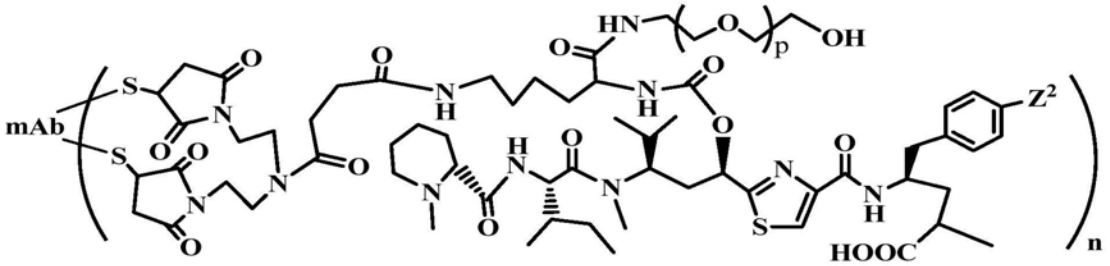


a-24,

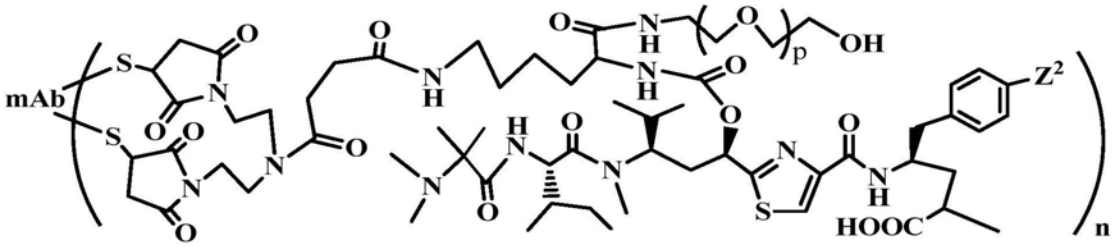
[0225]



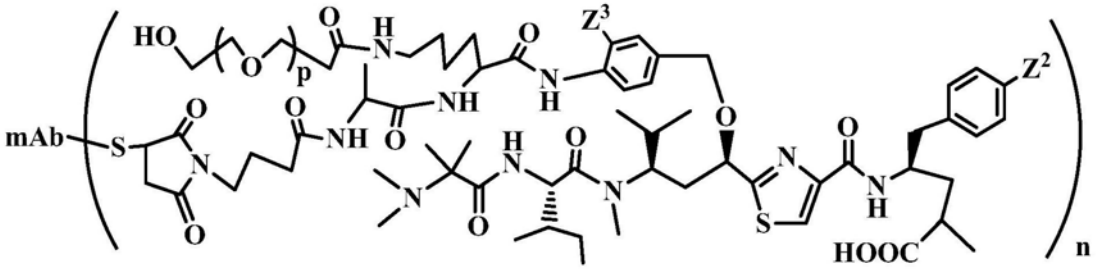
a-25,



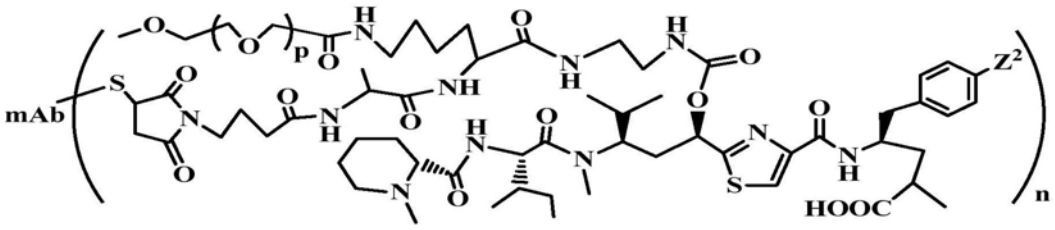
a-26,



a-27,

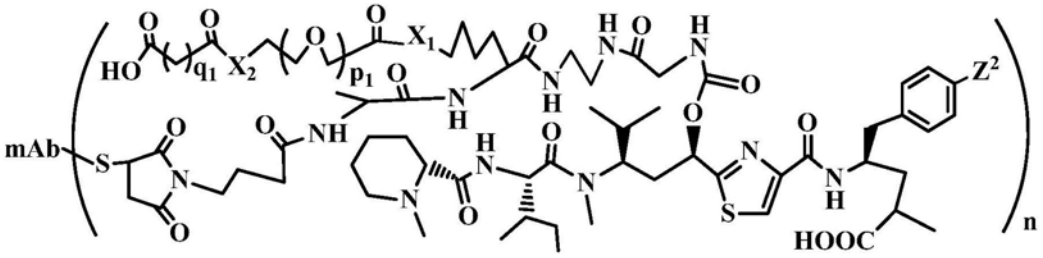


a-28,

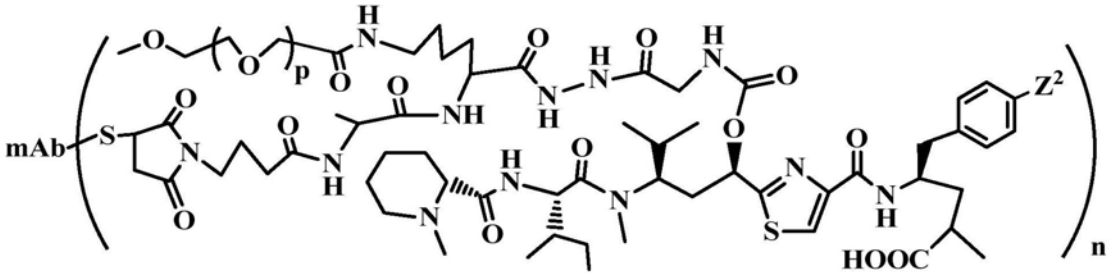


a-29,

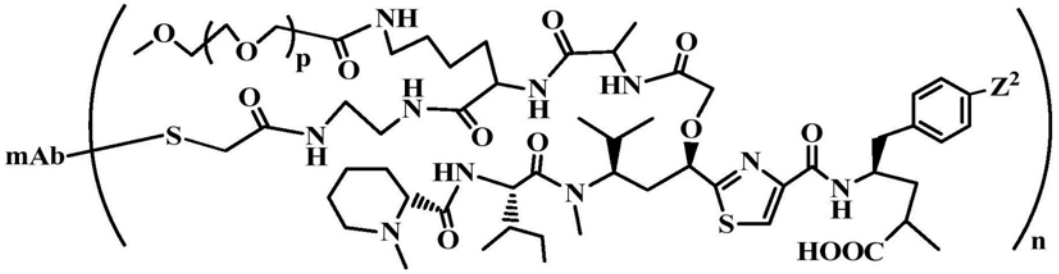
[0226]



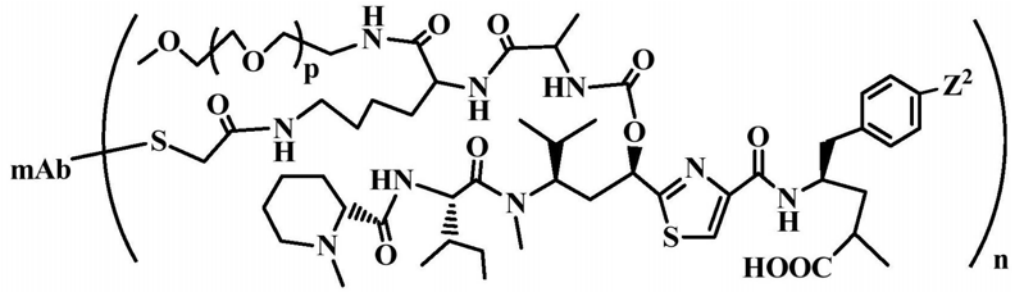
a-30,



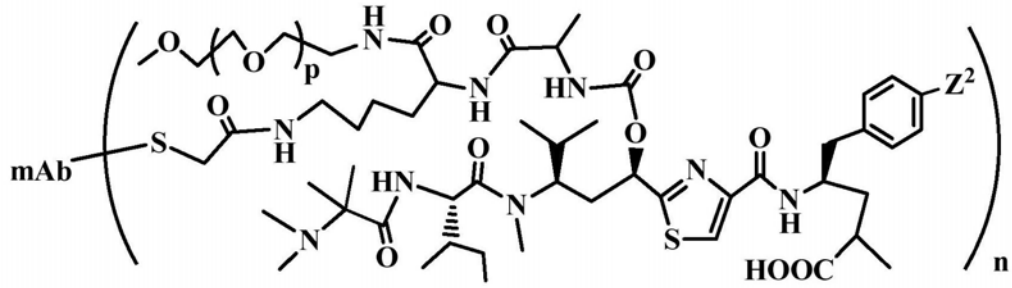
a-31,



a-32,

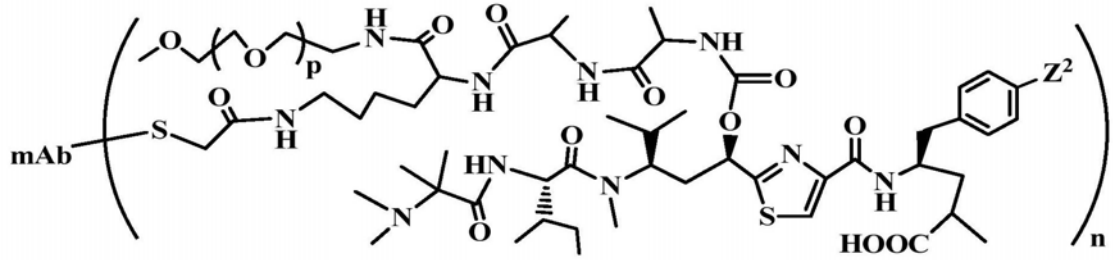


a-33,

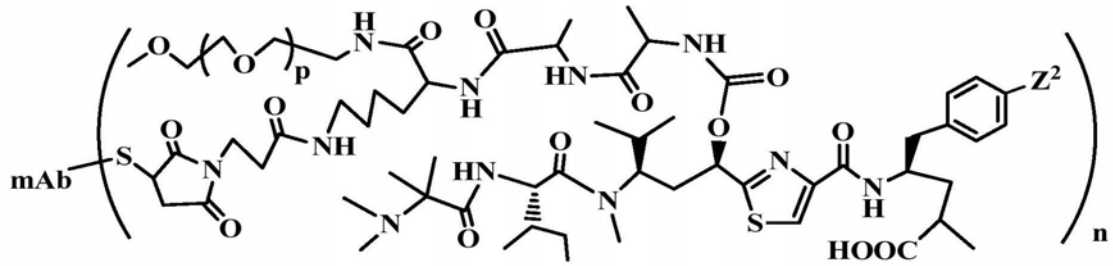


a-34,

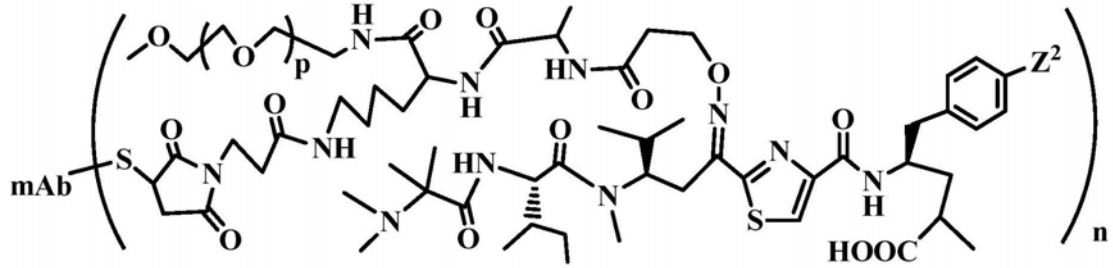
[0227]



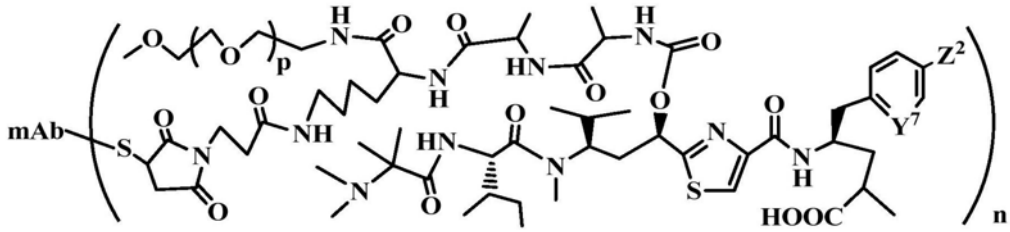
a-35,



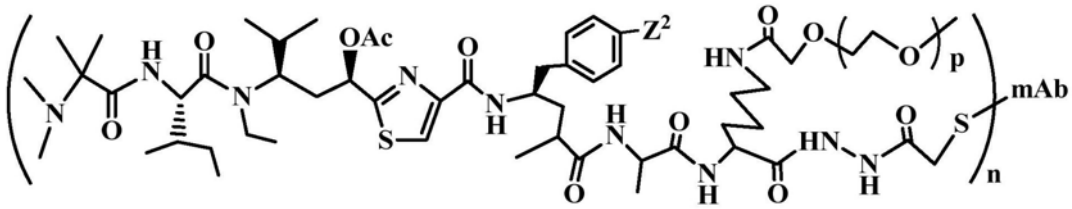
a-36,



a-37,

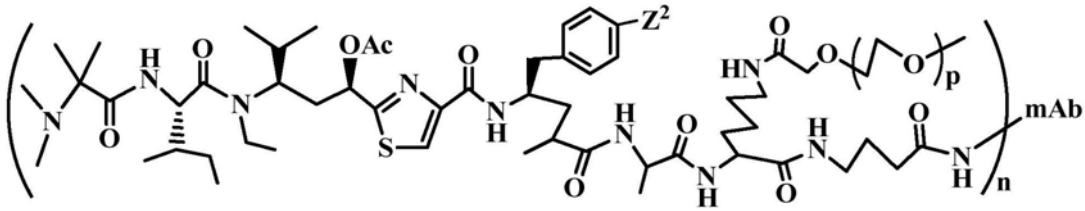


a-38,

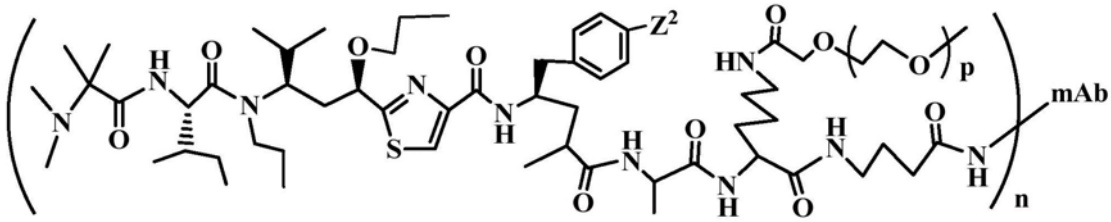


a-39,

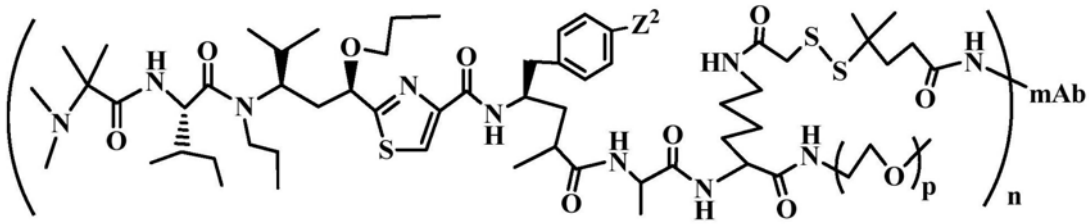
[0228]



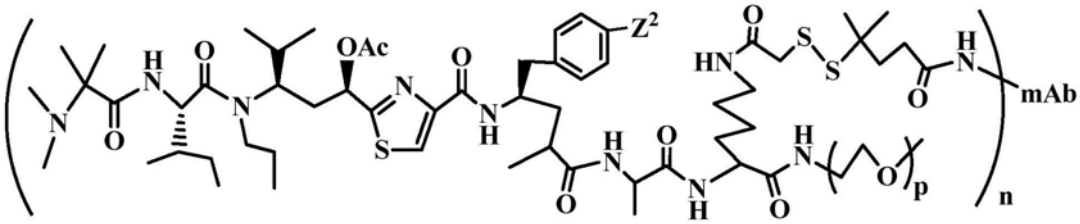
a-40,



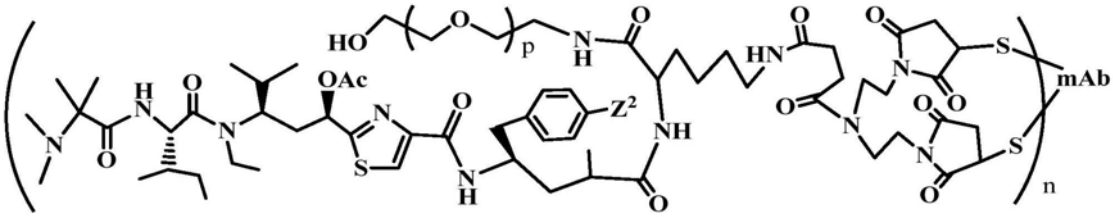
a-41,



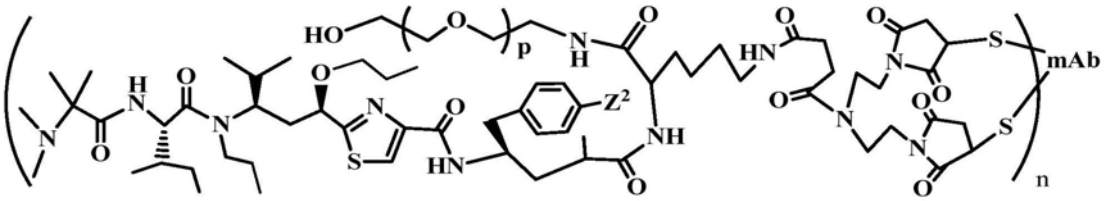
a-42,



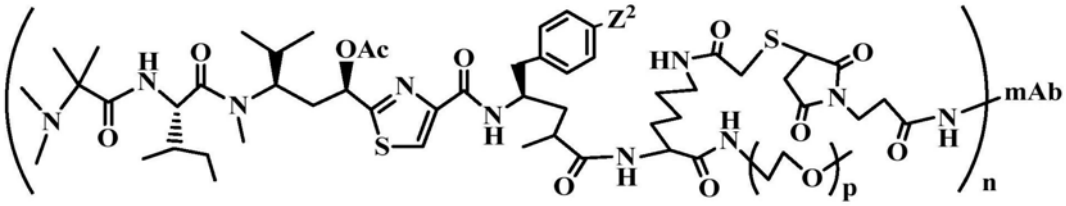
a-43,



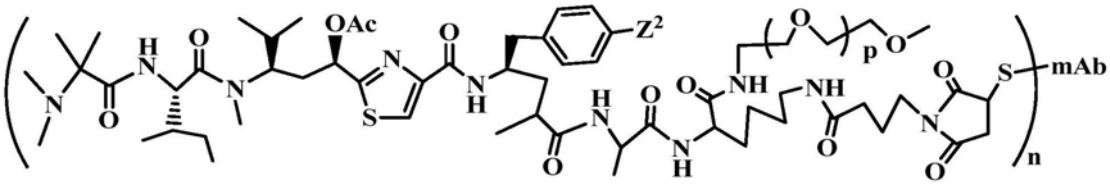
a-44,



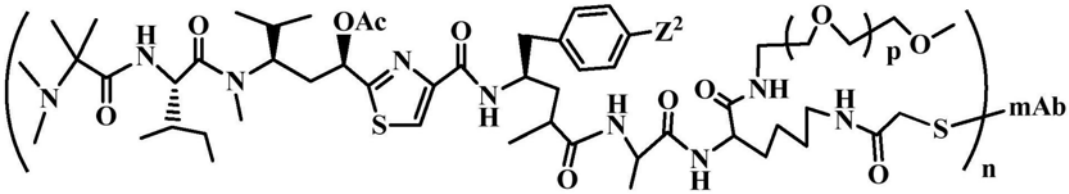
[0229] a-45,



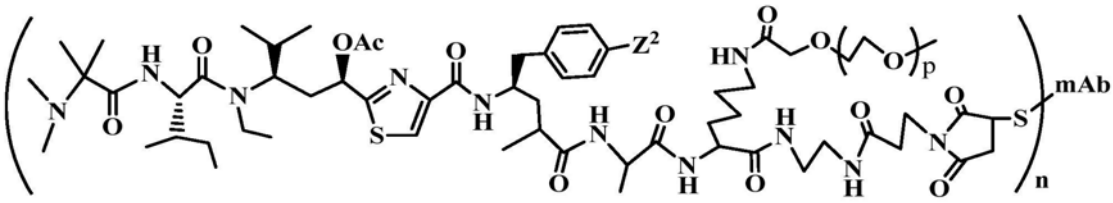
a-46,



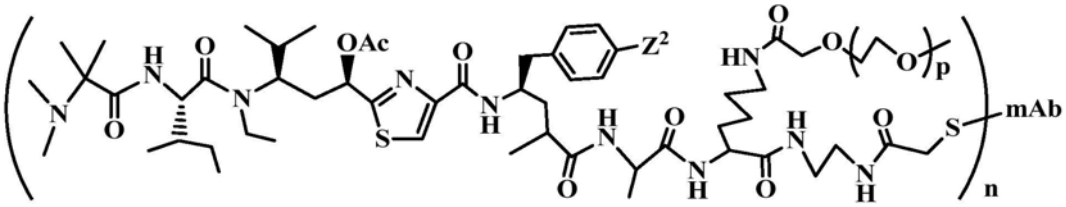
a-47,



a-48,

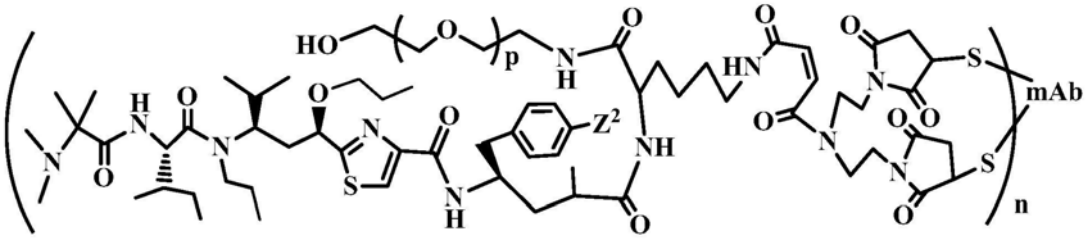


a-49,

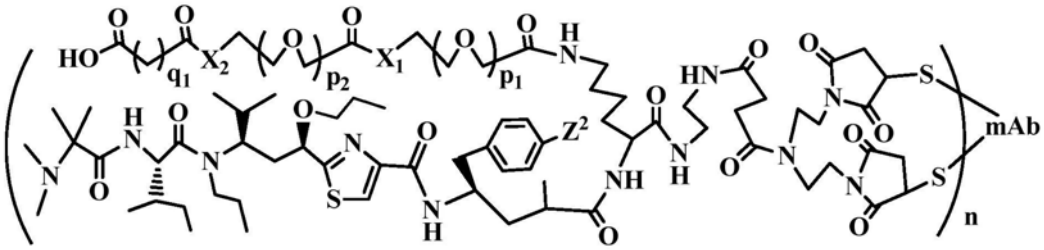


a-50,

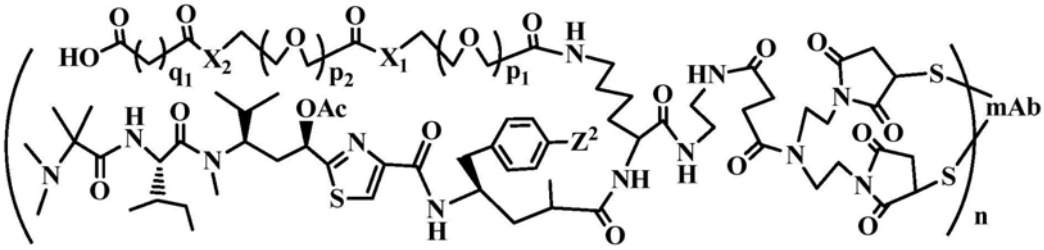
[0230]



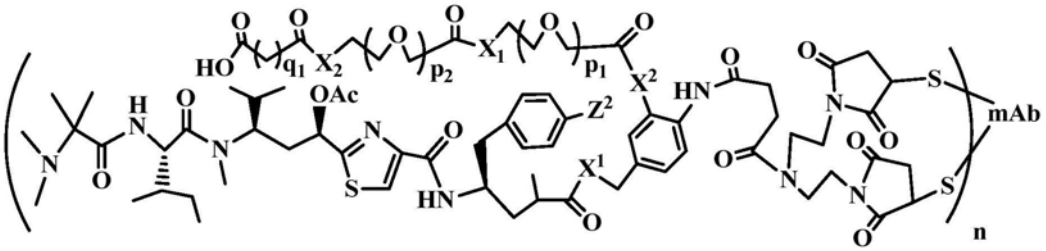
a-51,



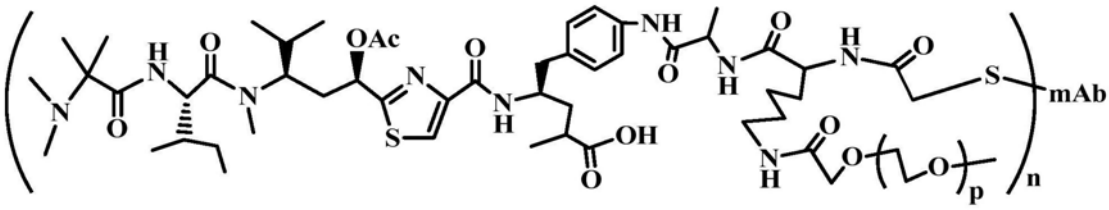
a-52,



a-53,

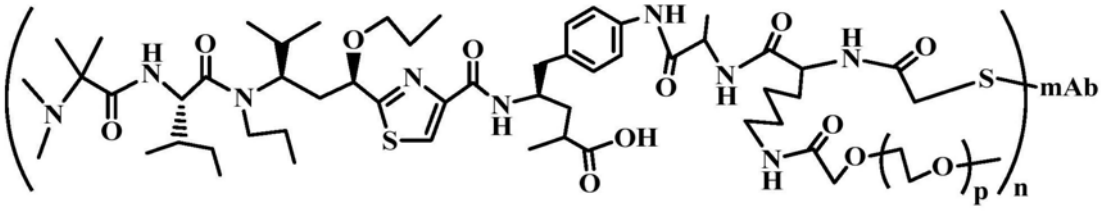


a-54,

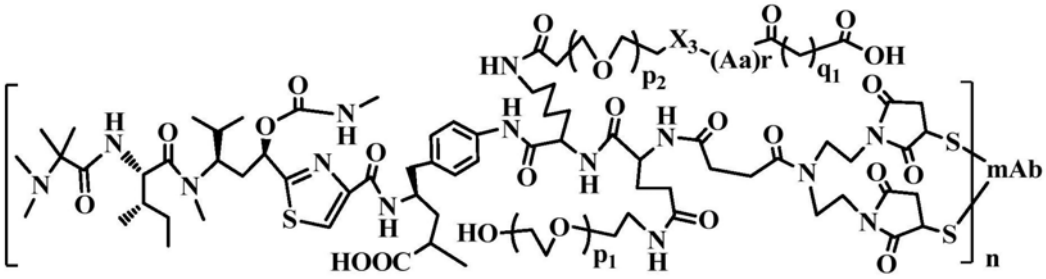


a-55,

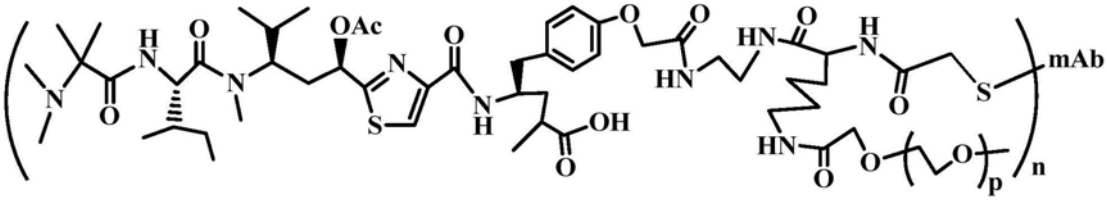
[0231]



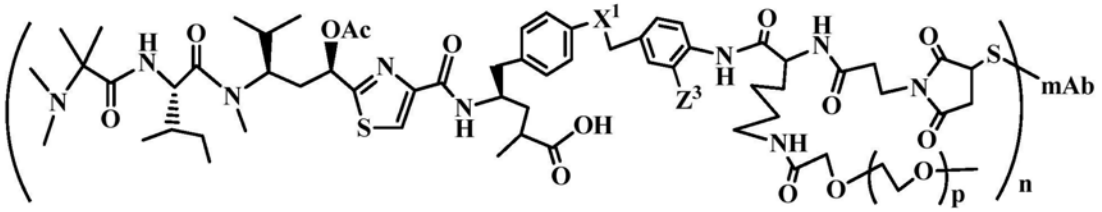
a-56,



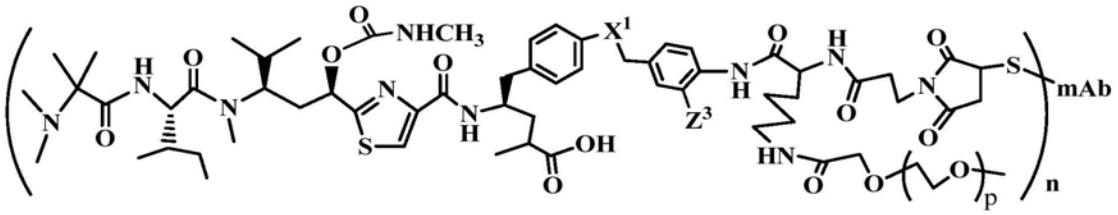
a-57,



a-58,

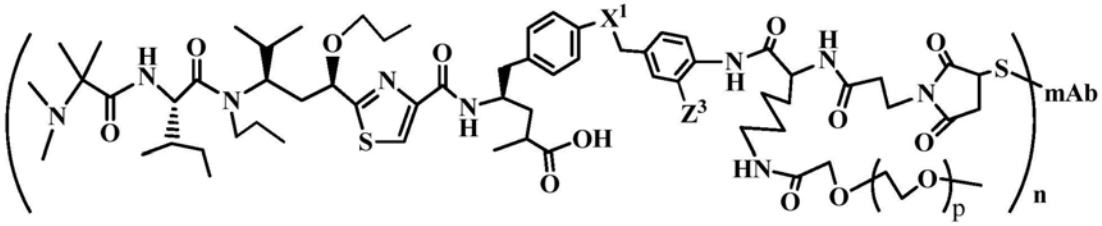


a-59,

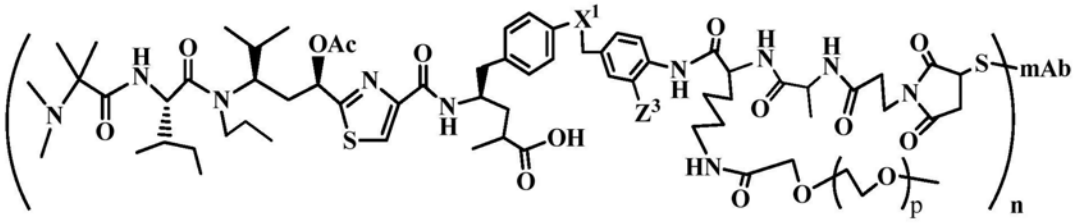


a-60,

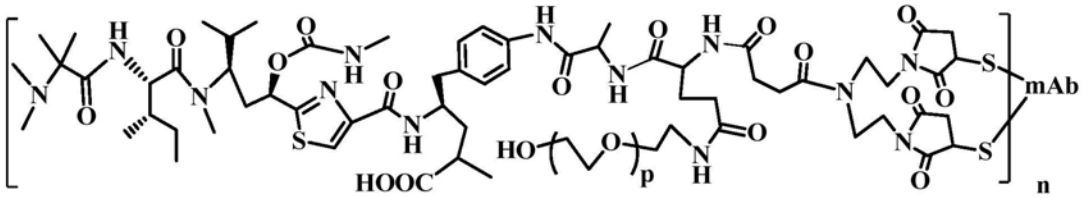
[0232]



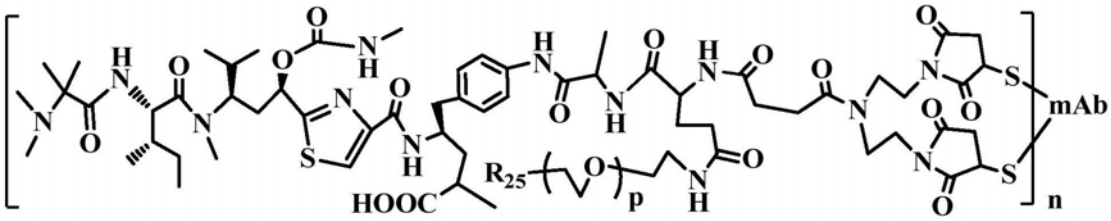
a-61,



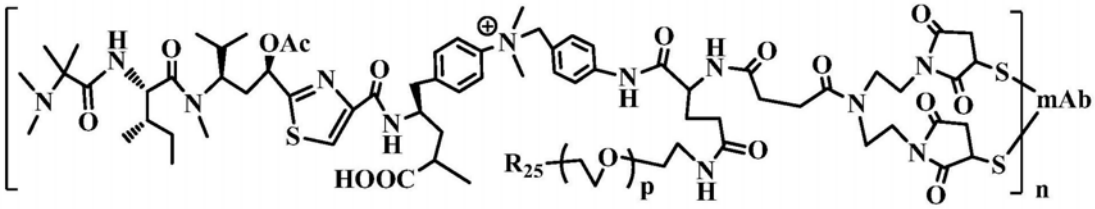
a-62,



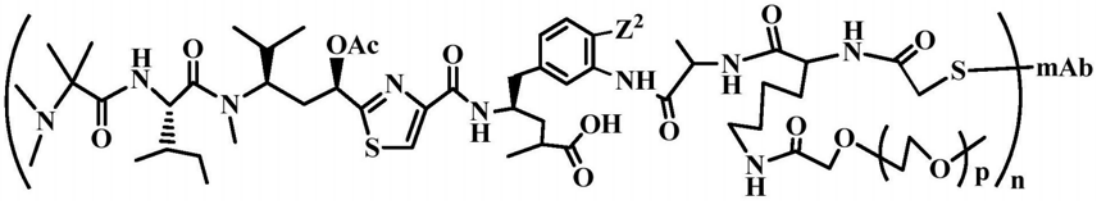
a-63,



a-64,

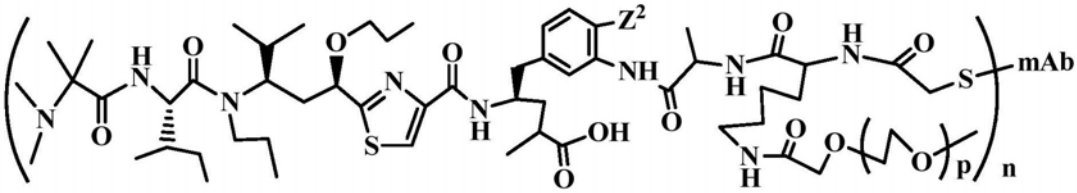


a-65,

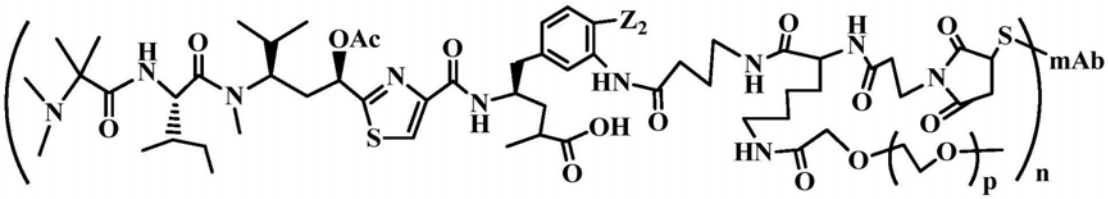


a-66,

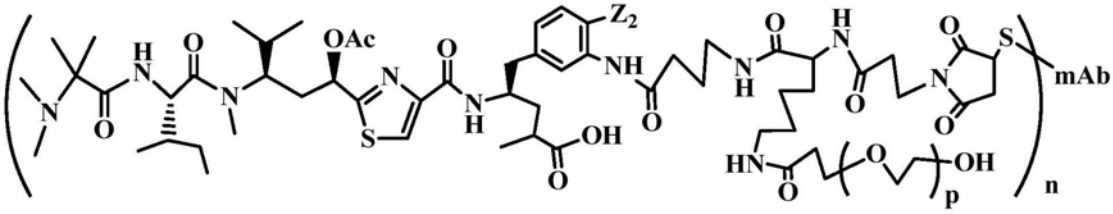
[0233]



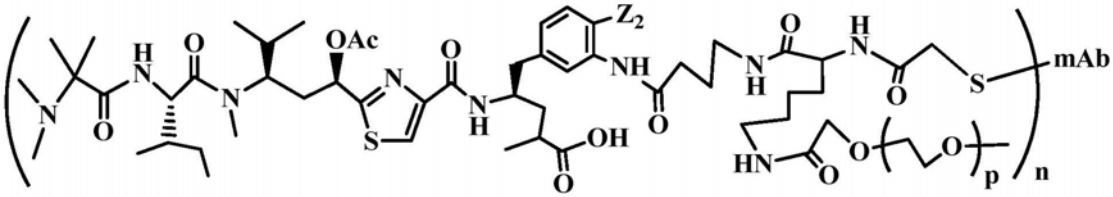
a-67,



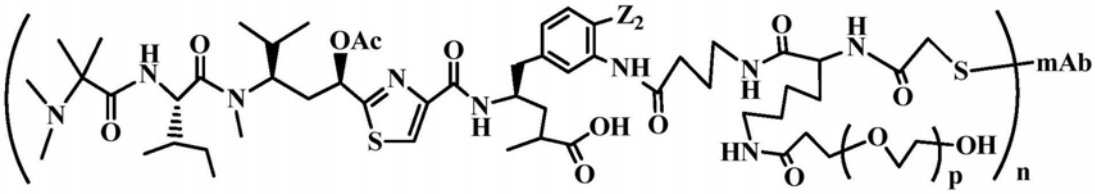
a-68,



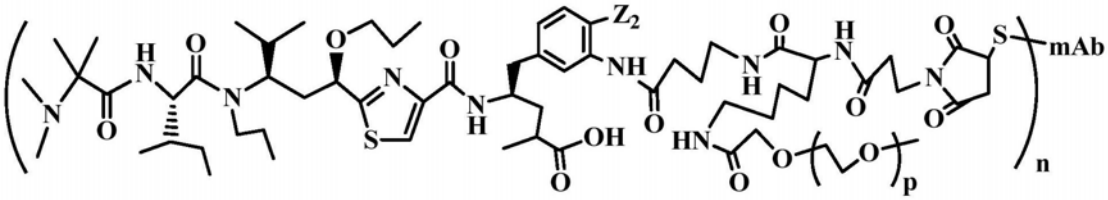
a-69,



a-70,

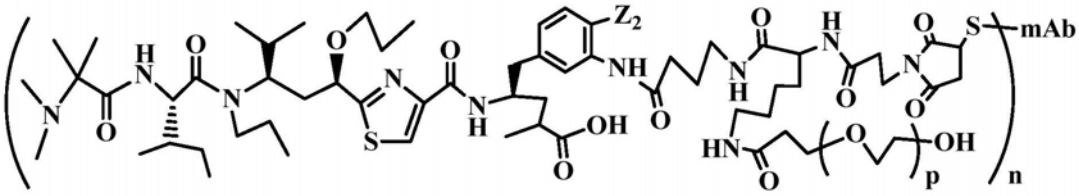


a-71,

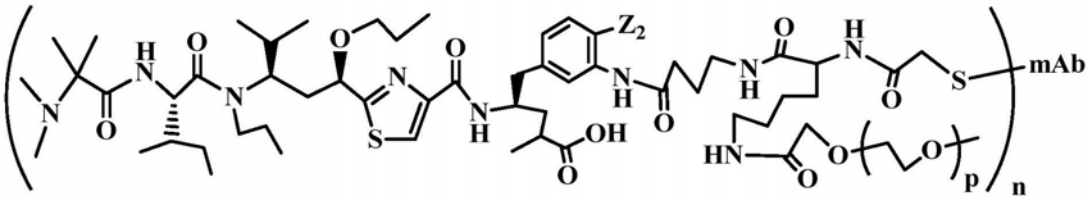


a-72,

[0234]

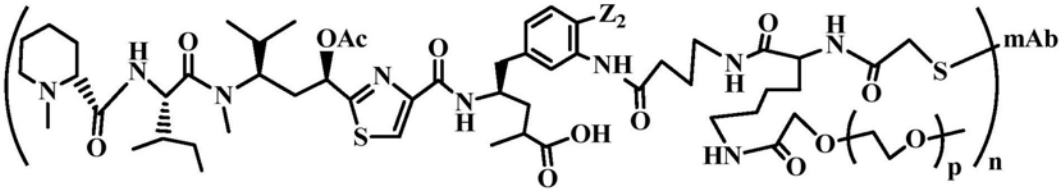


a-73,

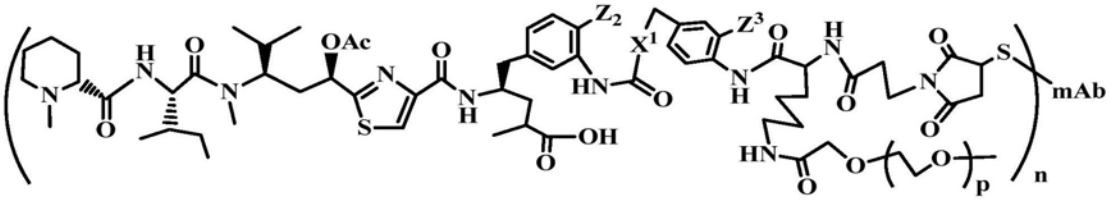


a-74,

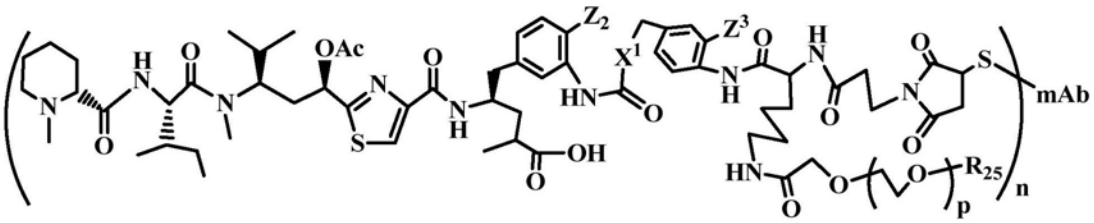
a-75,



a-76,

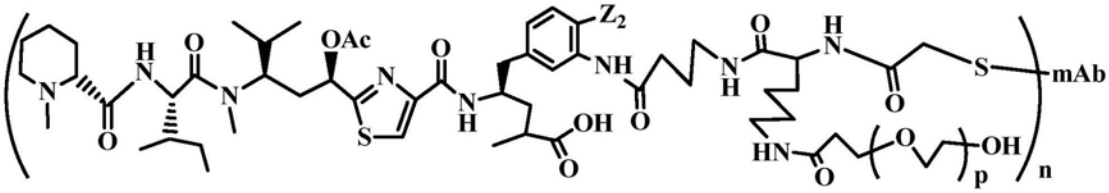


a-77,

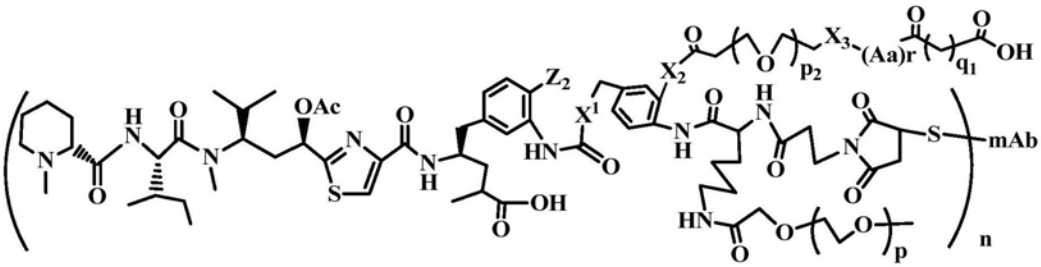


a-78,

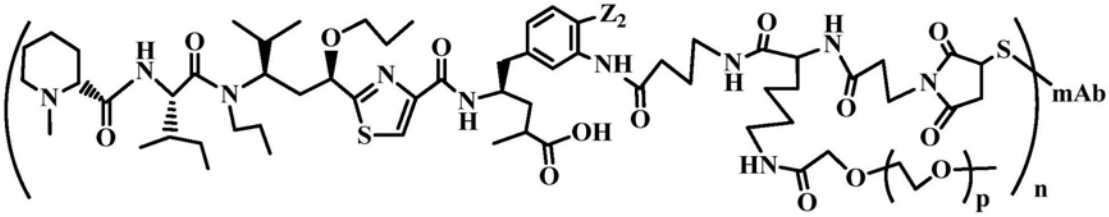
[0235]



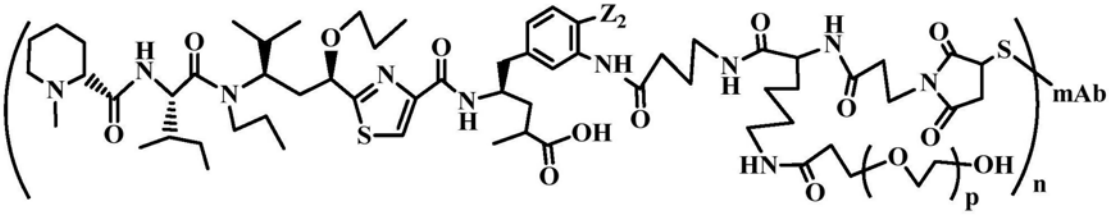
a-79,



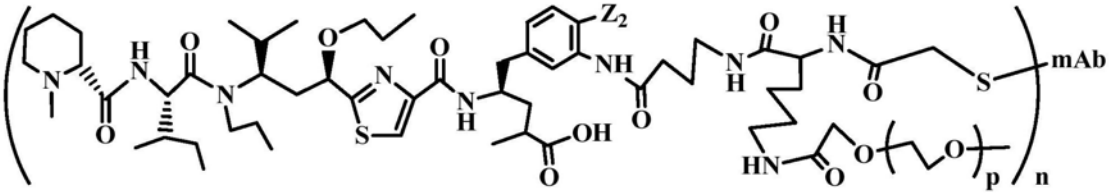
a-80,



a-81,

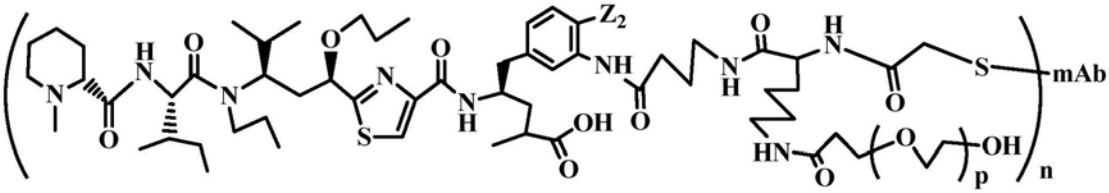


a-82,

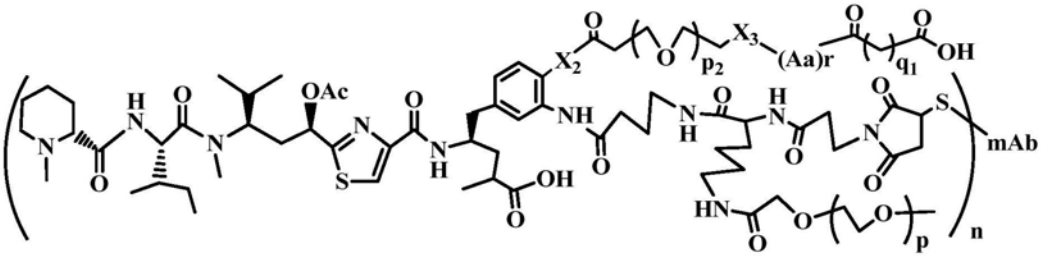


a-83,

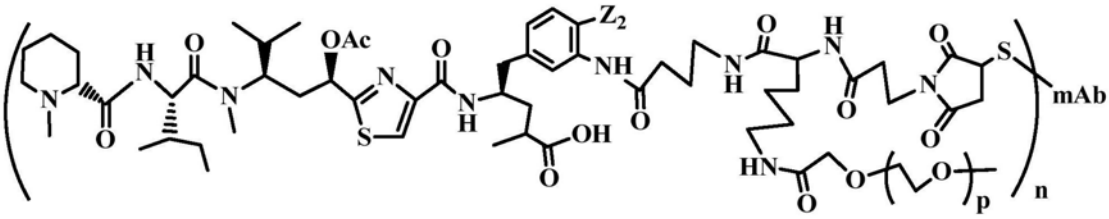
[0236]



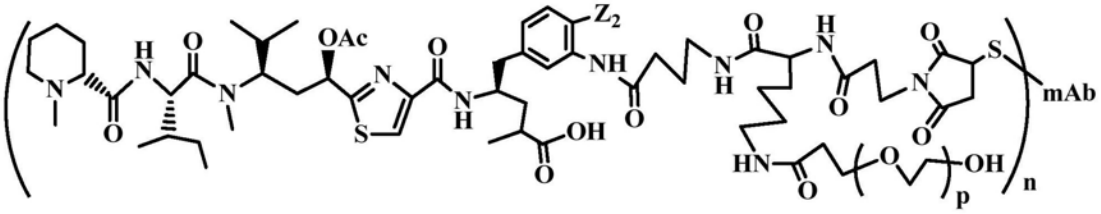
a-84,



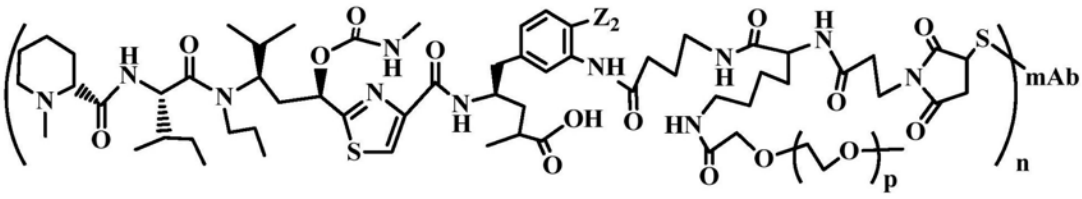
a-85,



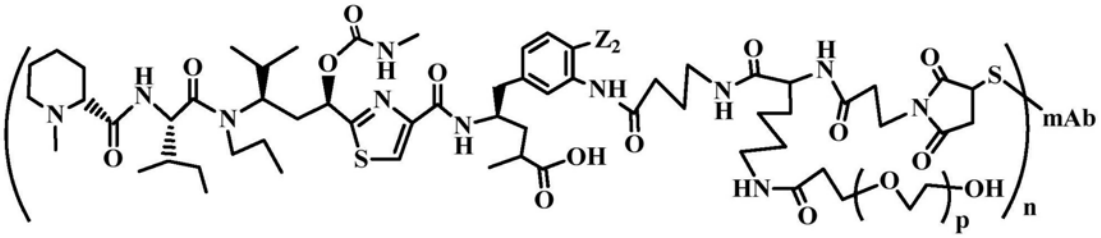
a-86,



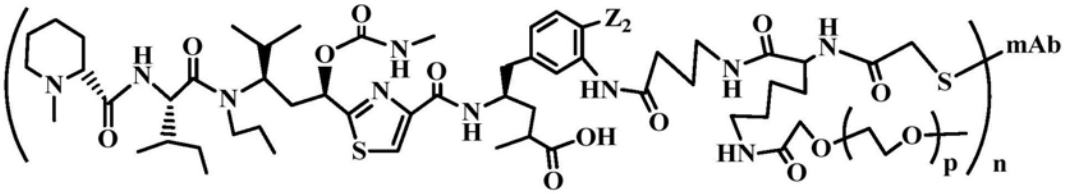
a-87,



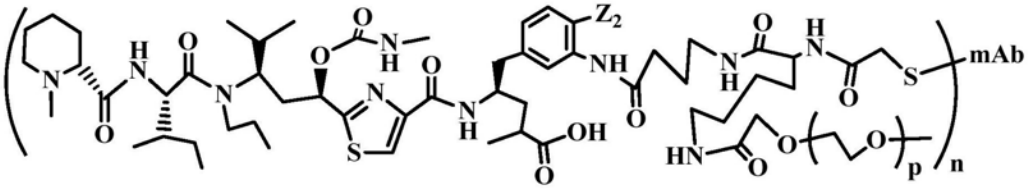
a-88,



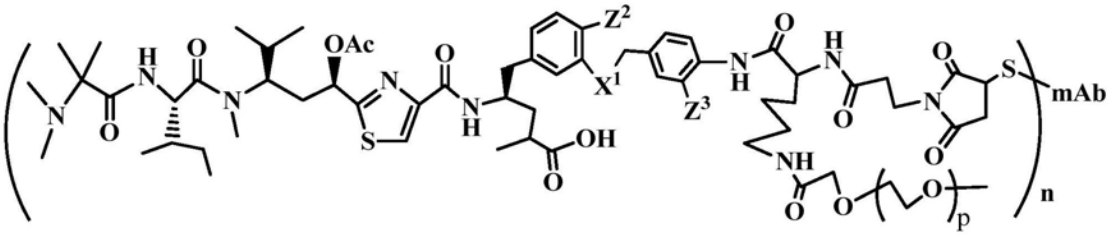
[0237] a-89,



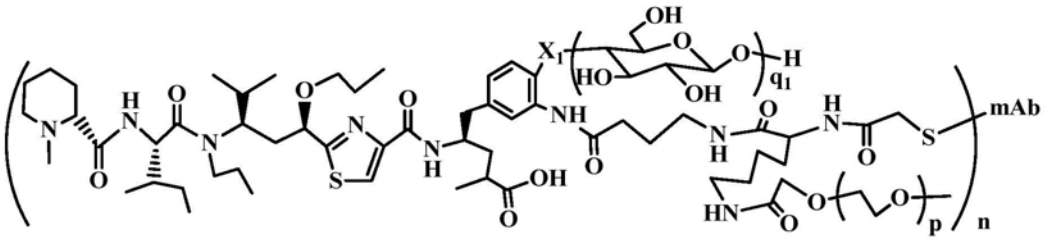
a-90,



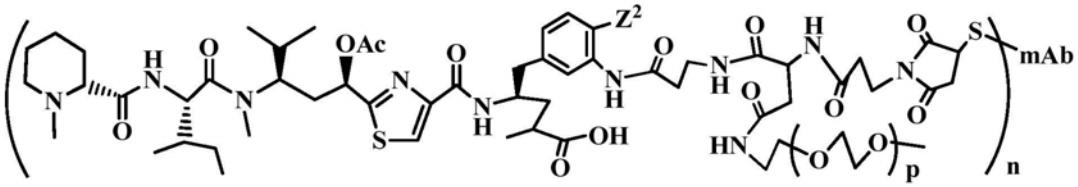
a-91,



a-92,

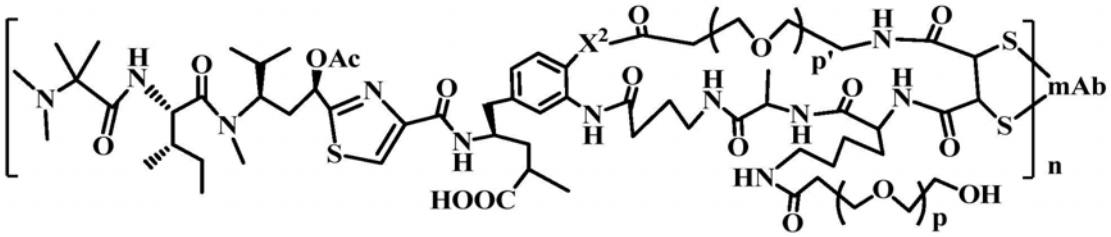


a-93,

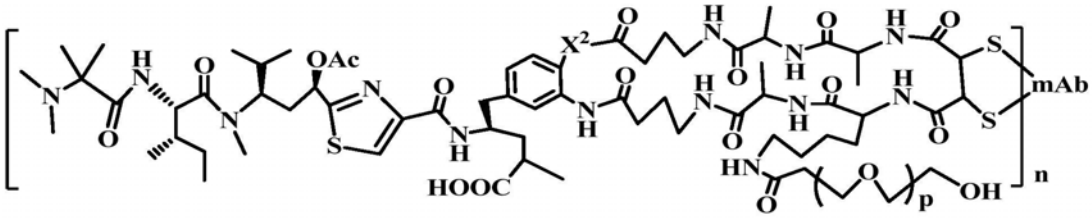


a-94,

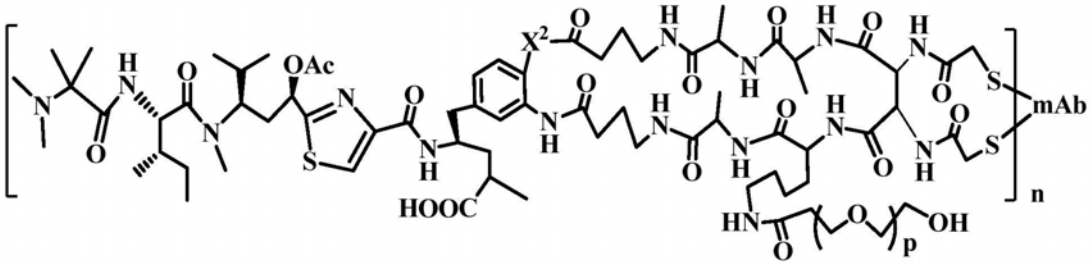
[0238]



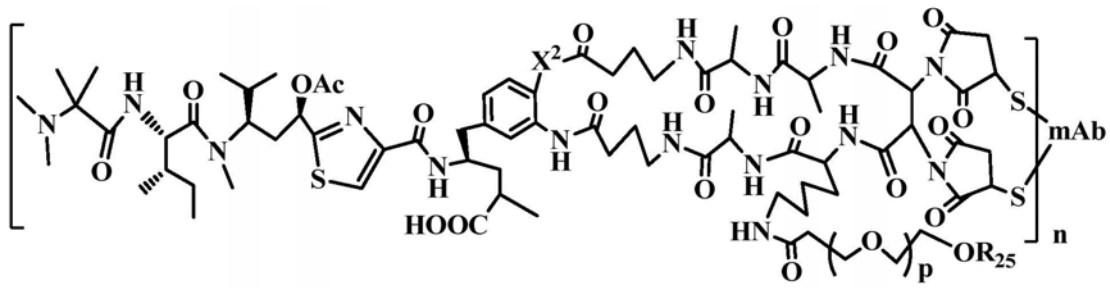
a-95,



a-96,

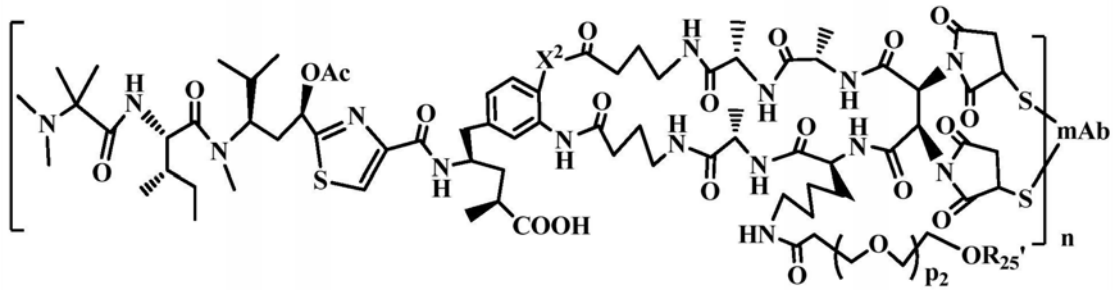


a-97,

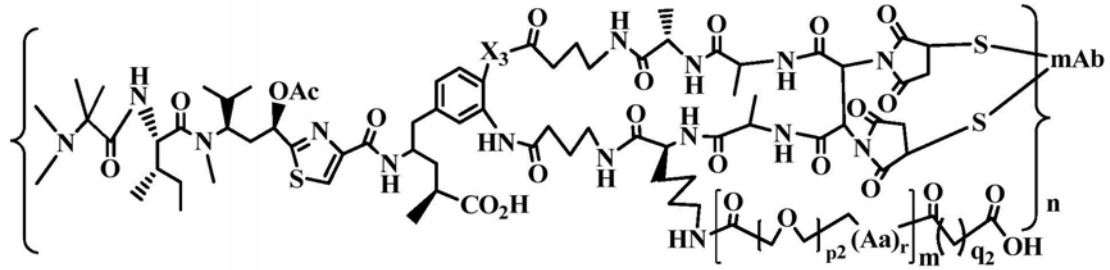


a-98,

[0239]



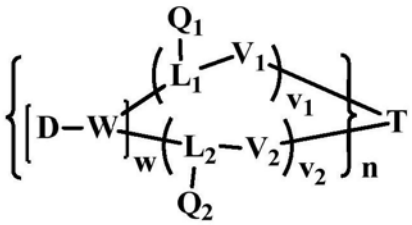
a-99,



a-100,

[0240] 或它们在药学上可接受的盐、水合物或水合盐，或这些化合物的多晶型结构，或其光学异构体、外消旋体、非对映异构体或对映异构体；其中Z^3和Z^3独立地为H、OH、NH_2、O、NH、COOH、COO、C(O)、C(O)NH、C(O)NH_2、R^{18}、$OCH_2OP(O)(OR^{18})_2$、$OC(O)OP(O)(OR^{18})_2$、$OPO(OR^{18})_2$、$NHPO(OR^{18})_2$、$OP(O)(OR^{18})OP(O)(OR^{18})_2$、$OC(O)R^{18}$、$OC(O)NHR^{18}$、$OSO_2(OR^{18})$、O-($C_4$-$C_{12}$糖苷)，$C_1$-$C_8$直链或支链烷基或杂烷基，$C_2$-$C_8$直链或支链烯基、炔基、烷基环烷基、杂环烷基，$C_3$-$C_8$直链或支链芳基、Ar-烷基、杂环、碳环、环烷基、杂烷基环烷基、烷基羰基、杂芳基，碳酸酯(-C(O)OR^{17})、氨基甲酸酯(-C(O)$NR^{17}R^{18}$)；R^{19}为H、OH、NH_2、$OSO_2(OR^{18})$、$XCH_2OP(O)(OR^{18})_2$、$XPO(OR^{18})_2$、$XC(O)OP(O)(OR^{18})_2$、$XC(O)R^{18}$、$XC(O)NHR^{18}$、C_1-C_8烷基或羧酸，C_2-C_8烯基、炔基、烷基环烷基、杂环烷基，C_3-C_8芳基或烷基羰基，或药用盐；X、X_1、X_2和X_3独立地为O、S、NH、NHNH或CH_2；q_1、q_2和q_3独立地选自0-24；p、p_1及p_2独立地为1-100；R_1'、R_2'、R_3'及R_4'独立地选自H和C_1-C_6烷基；Aa是天然或非天然氨基酸；r是0-12，当r>2时，(Aa)r是含有相同或不同氨基酸序列的肽，r＝0表示(Aa)r缺省；m和n独立地为1-30。

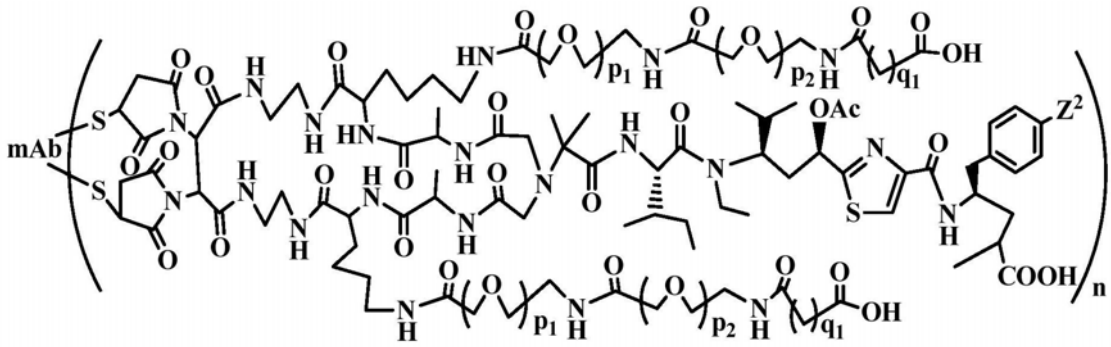
[0241] 本发明的另一方面，含有支链连接体的偶联物的结构式表示如(III)：

[0242] 

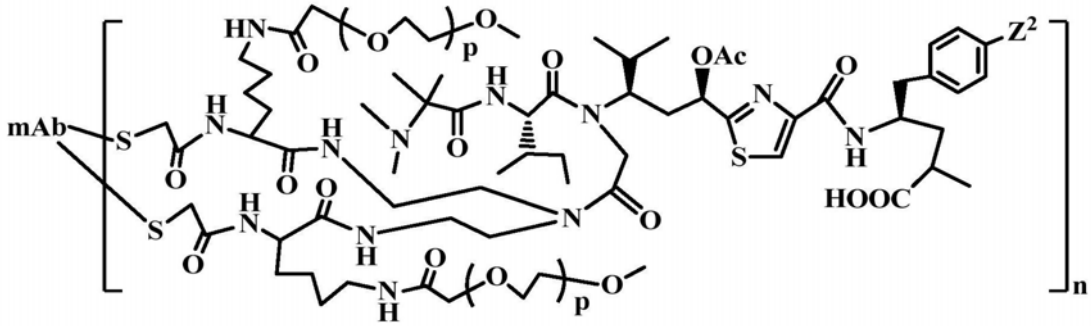
(III)

[0243] 其中,D、W、w、L_1、L_2、Q_1、Q_2、V_1、V_2、v1、v2、n和T与式(I)中定义相同。

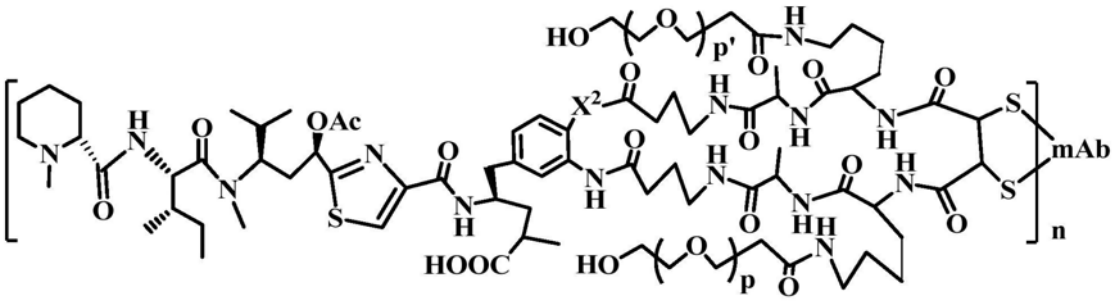
[0244] 结构式(III)的示例如下:



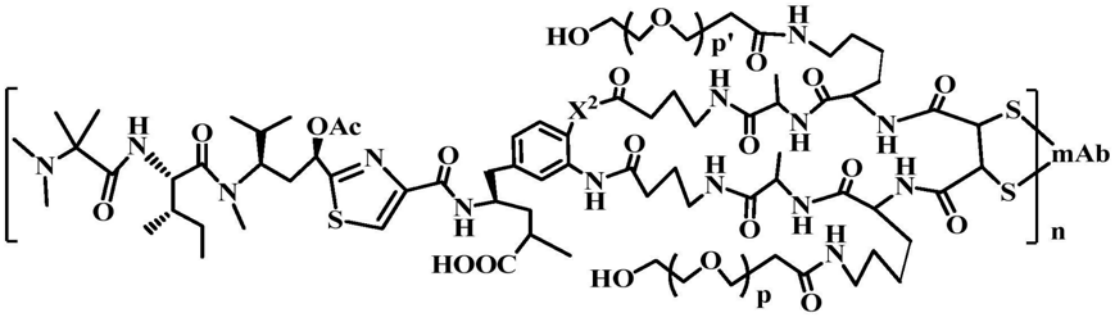
b-01,

[0245] 

b-02,

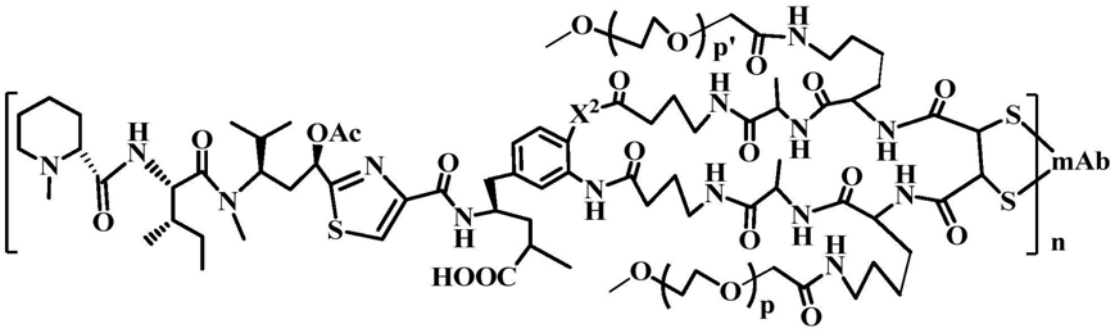


b-03,

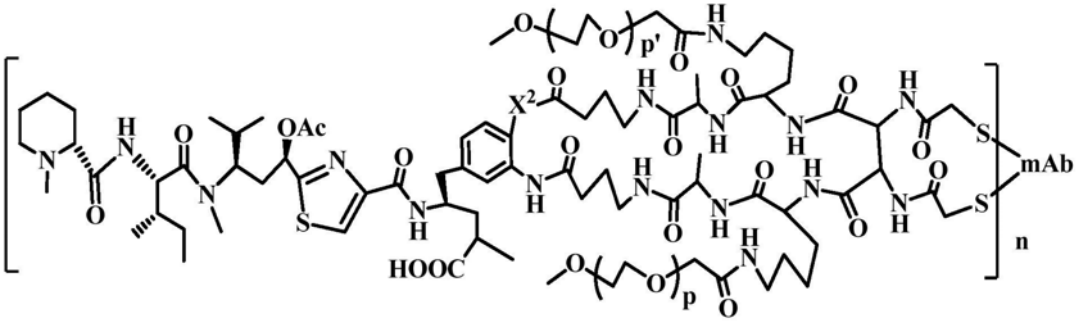


b-04,

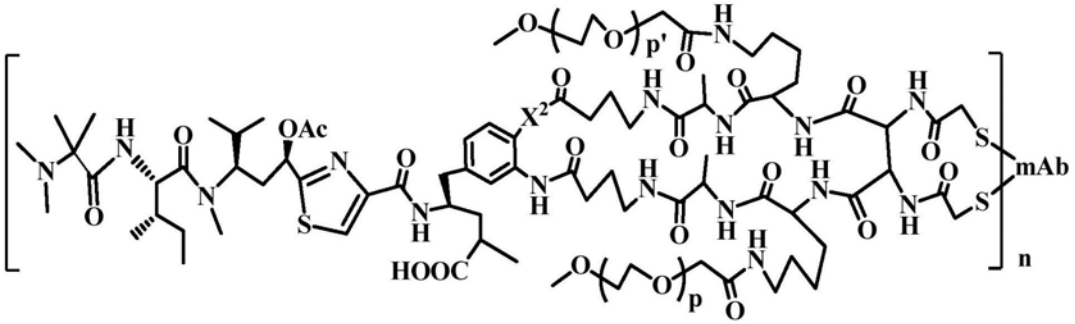
[0246]



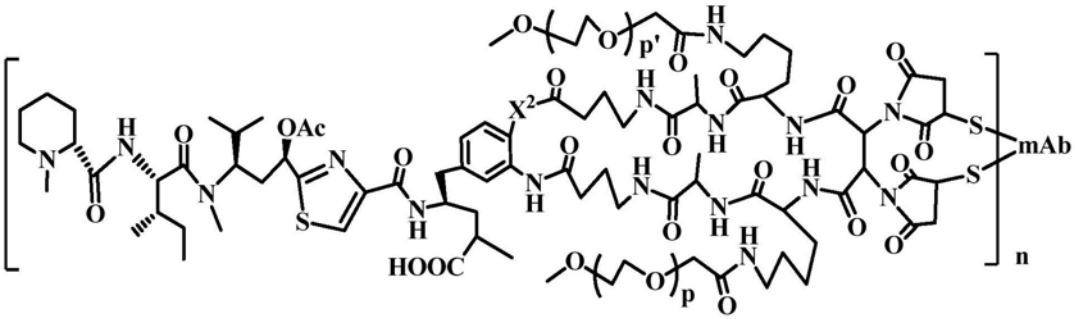
b-05,



b-06,

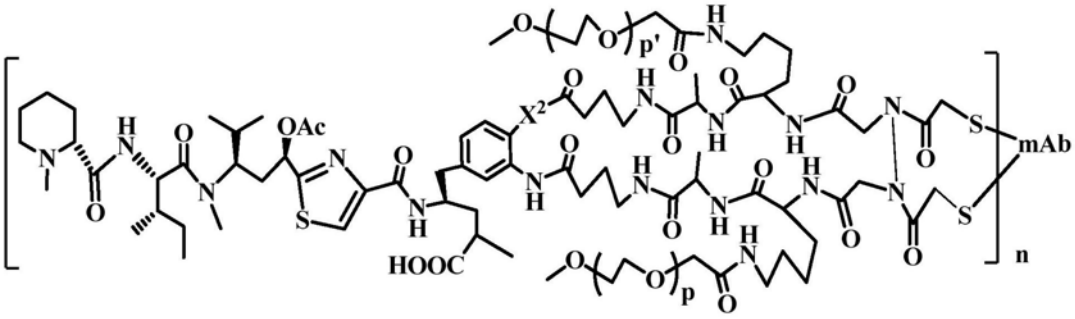


b-07,

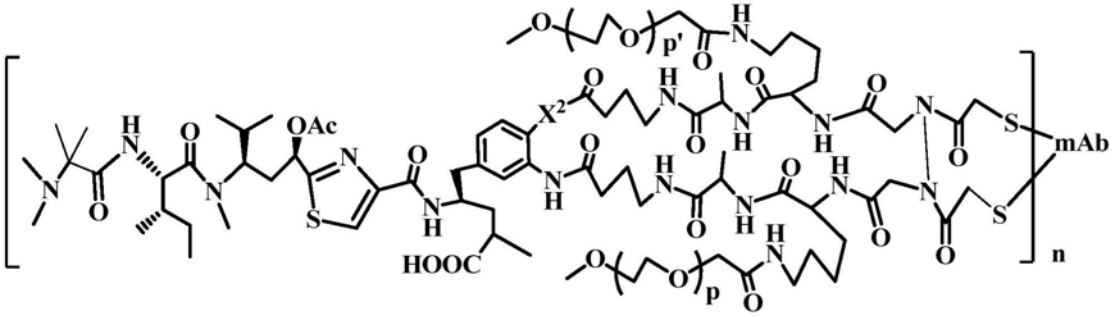


b-08,

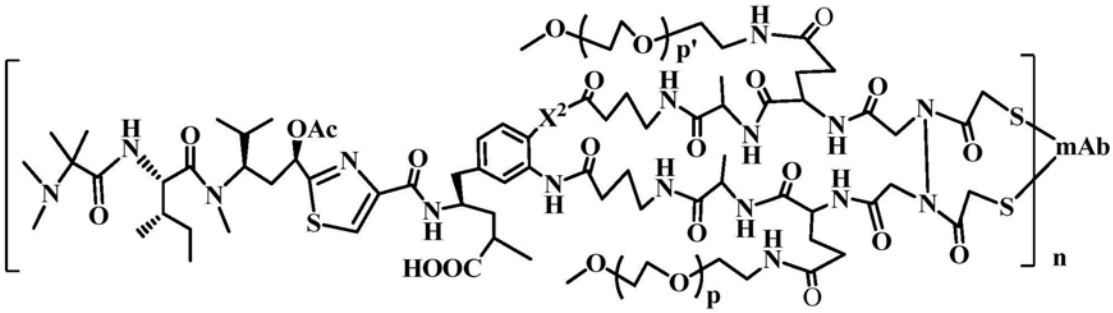
[0247]



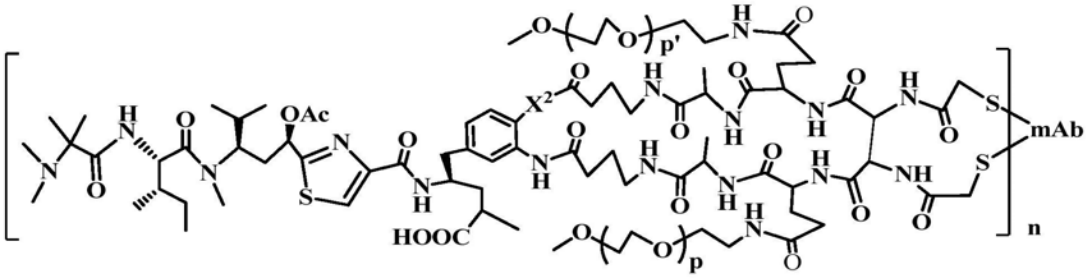
b-09,



b-10,

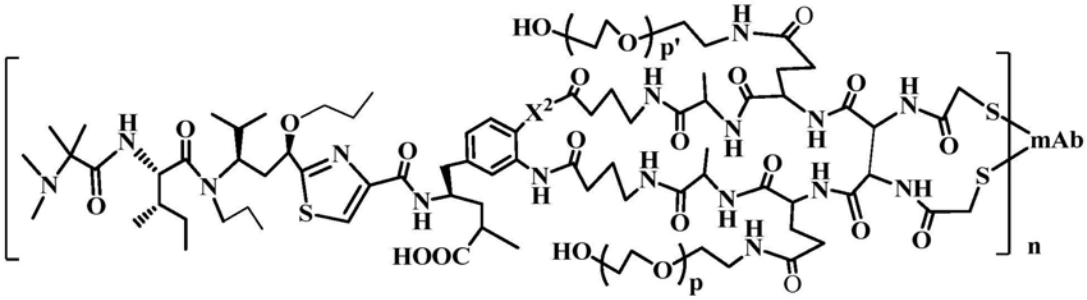


b-11,

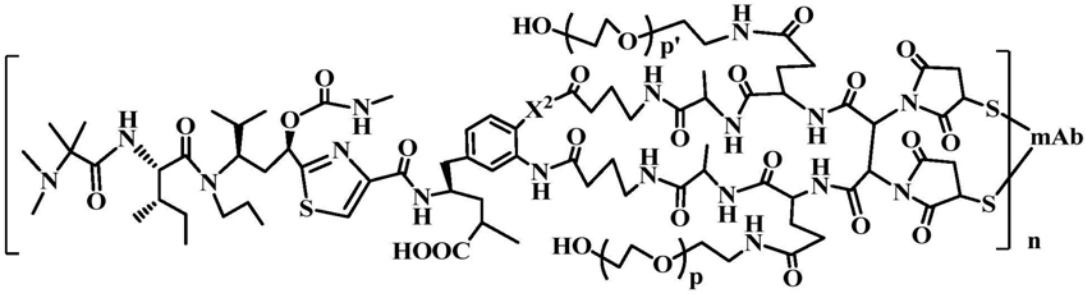


b-12,

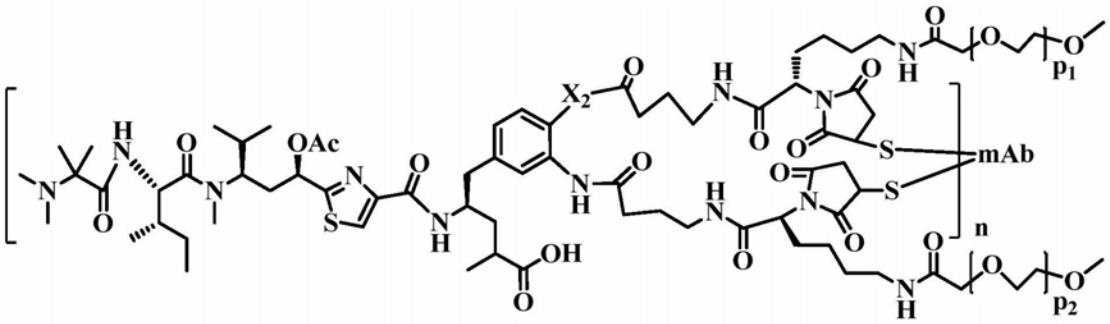
[0248]



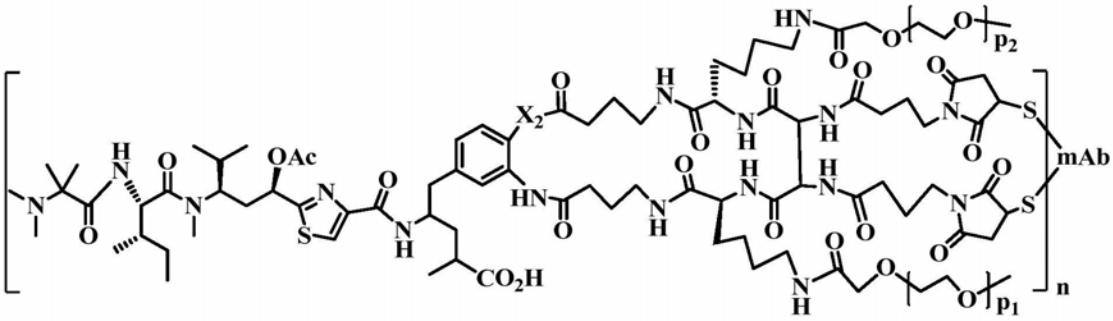
b-13,



b-14,

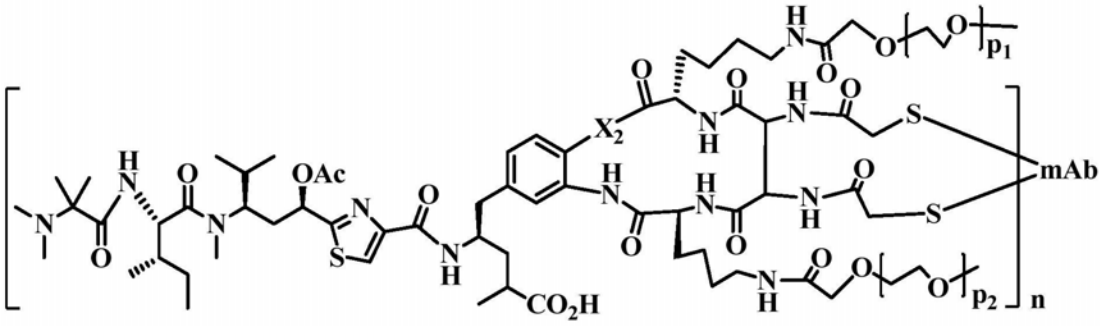


b-15,

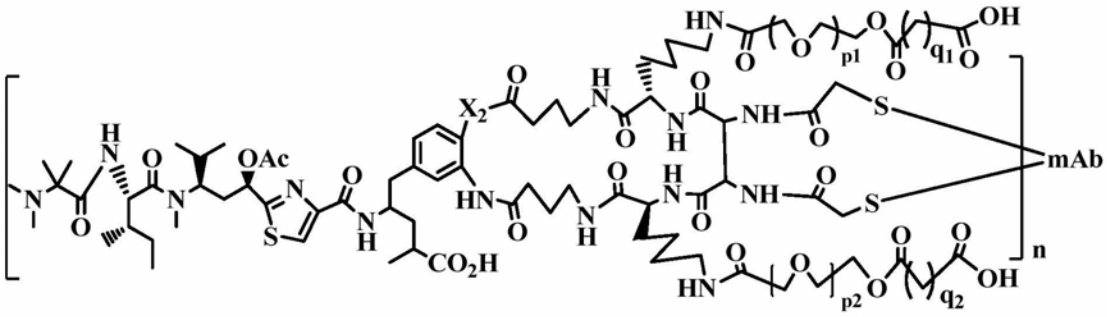


b-16,

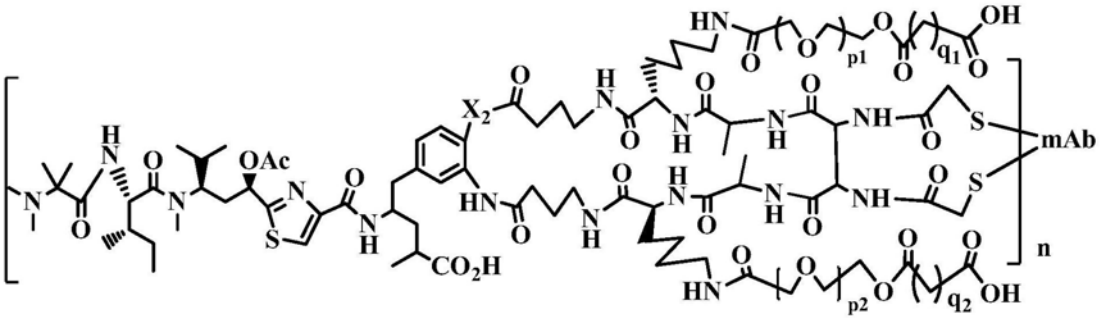
[0249]



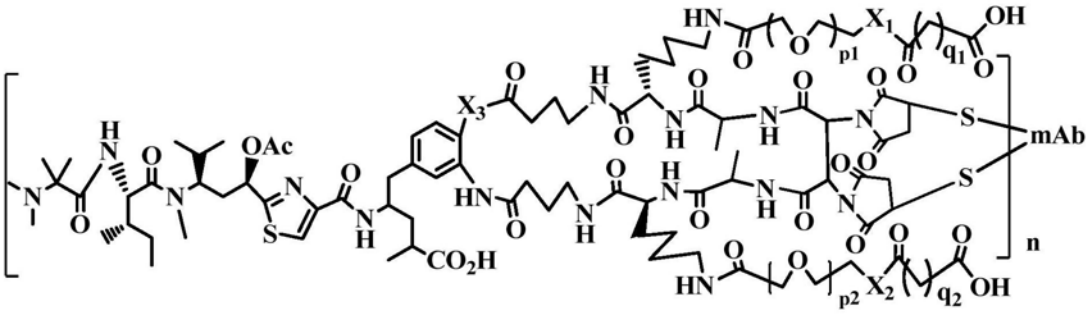
b-17,



b-18,

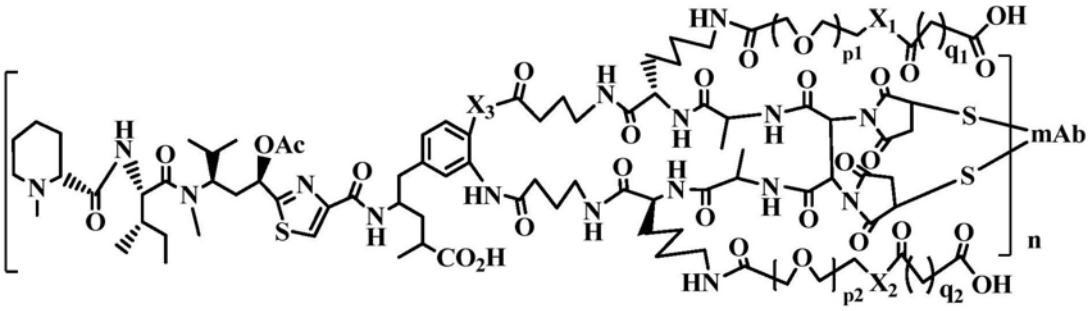


b-19,

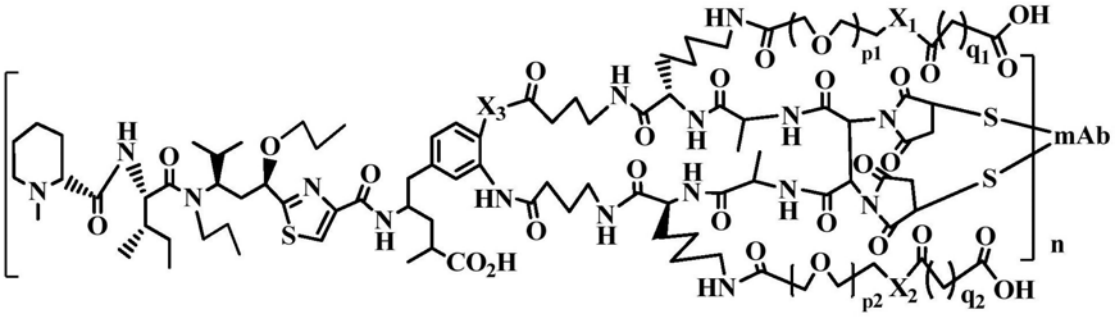


b-20,

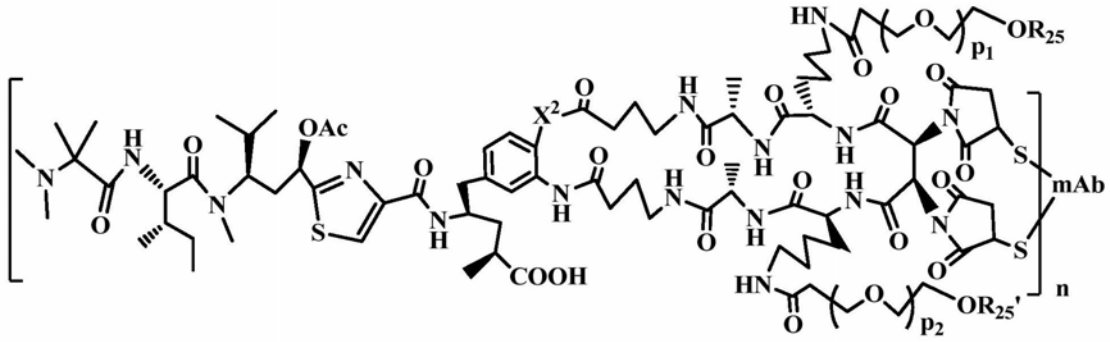
[0250]



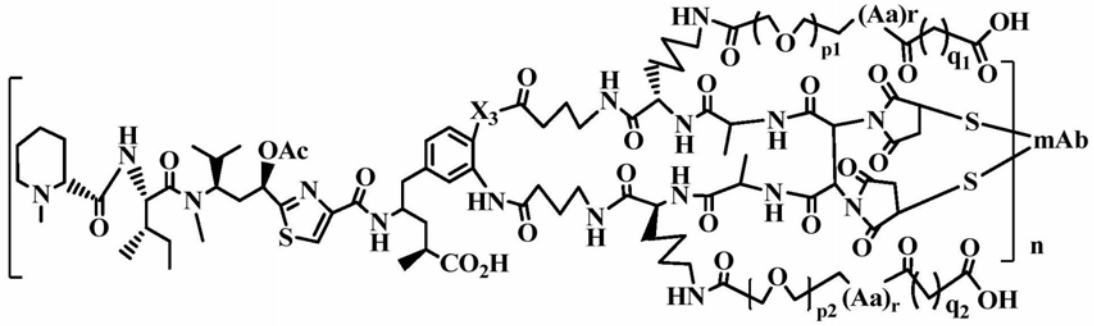
b-21,



b-22,

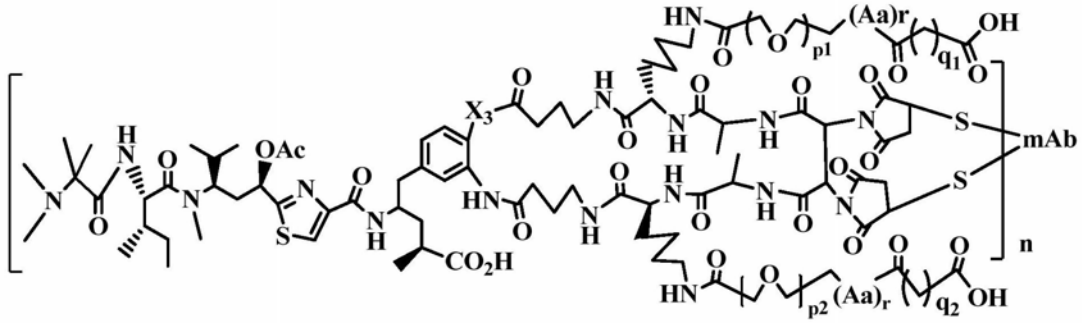


b-23,

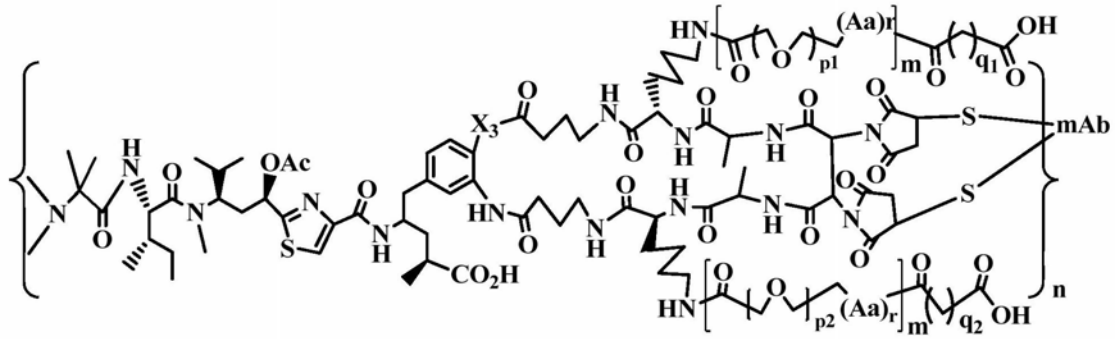


b-24,

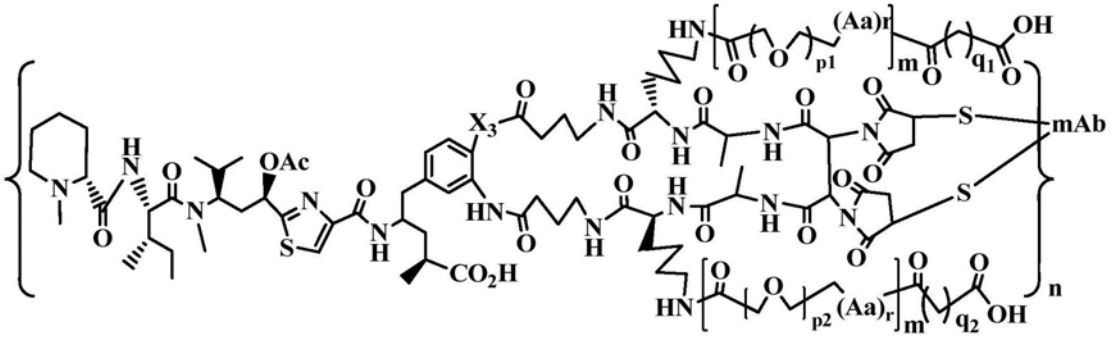
[0251]



b-25,

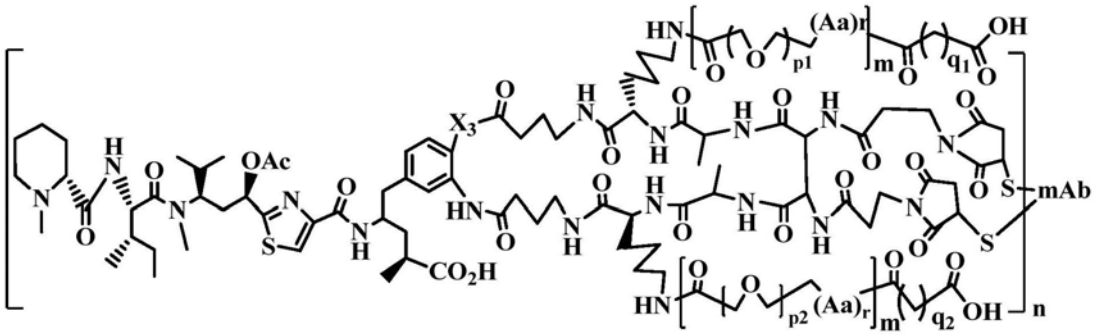


b-26,

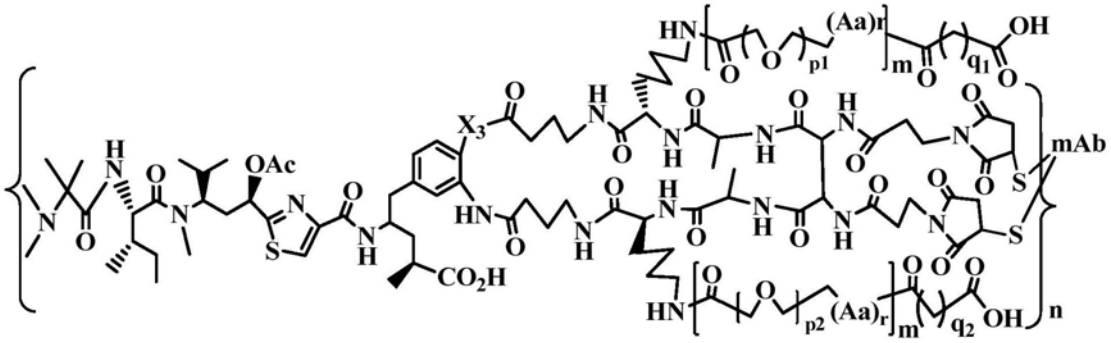


b-27,

[0252]



b-28

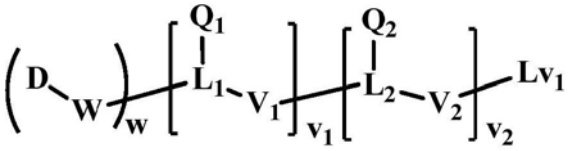


b-29

[0253] 或其药学上可接受的盐、水合物或水合盐;或这些化合物的多晶型结构;或其光学异构体、外消旋体、非对映异构体或对映异构体;其中X_1、X_2、X_3、m、n、$(Aa)_r$、p_1、p_2、p_3、q_1和q_2定义如前文所述。

[0254] 本发明的另一个方面,支链连接体化合物的结构如(IV)所示、它可以便利地与细胞结合分子T反应,形成式(I)中的偶联物:

[0255]



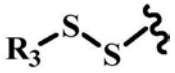
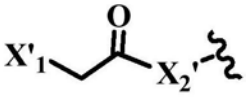
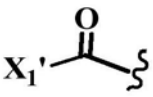
(IV)

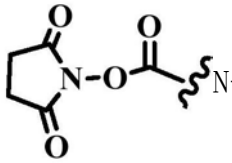
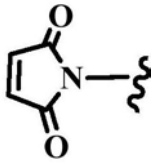
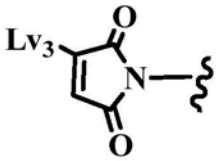
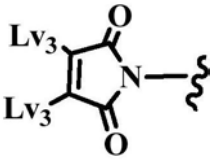
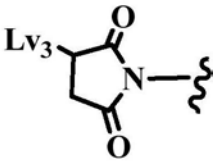
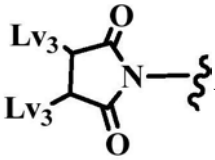
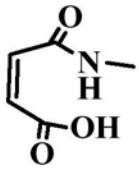
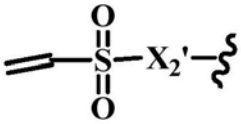
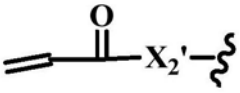
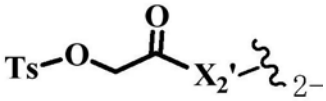
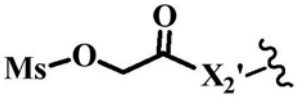
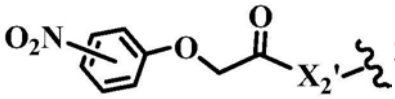
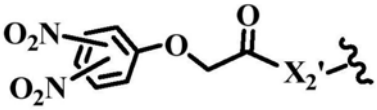
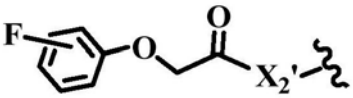
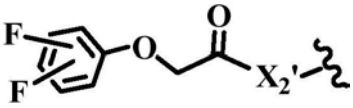
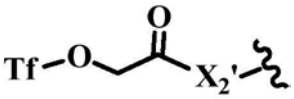
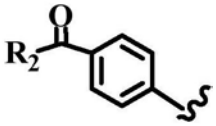
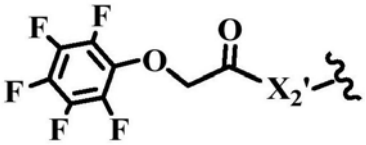
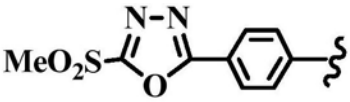
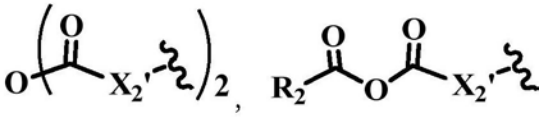
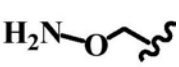
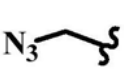
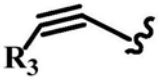
[0256] 其中,D、W、w、L_1、L_2、Q_1、Q_2、V_1、V_2、v_1、v_2及n的定义同结构式(I);

[0257] Lv_1为一反应官能团,可以与细胞结合分子上的硫醇、胺、羧酸、硒醇、酚或羟基发生反应。它包括,但不限于卤素(如氟、氯、溴、碘);甲磺酰基;甲苯磺酰基;三氟甲磺酰基;硝基酚基;N-羟基琥珀酰亚胺基(NHS);苯酚基;二硝基苯酚基;五氟苯酚基;四氟苯酚基;三氟苯酚基;二氟苯酚基;一氟苯酚基;五氯苯酚基;咪唑基;一氯酚基;二氯酚基;三氯酚基;四

氯苯酚基;N-(苯并三唑基)氧基;2-乙基-5-苯基异恶唑基-3′-磺酰基;苯氧二唑基磺酰基;2-乙基-5-苯基异恶唑基;苯氧二唑基;恶二唑基;不饱和碳(碳-碳、碳-氮、碳-硫、碳-磷、硫-氮、磷-氮、氧-氮或碳-氧之间的双键或三键);或与Mitsunobu反应试剂作用生成的中间体。缩合剂的例子如下:1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)、二环己基碳二亚胺(DCC)、N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)、N-环己基-N'-(2-吗啉代-乙基)碳二亚胺甲基对甲苯磺酸盐(CMC或CME-CDI)、1,1'-羰基二咪唑(CDI)、(O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐(TBTU)、N,N,N',N'-四甲基-氧-(1H-苯并三唑-1-基)-六氟磷酸铵(HBTU)、(苯并三唑-1-基氧基)三(二甲基氨基)-六氟磷酸盐(BOP)、(苯并三唑-1-基氧基)三吡咯烷基六氟磷酸盐(PyBOP)、氰基膦酸二乙酯(DEPC)、氯-N,N,N',N'-四甲基甲脒六氟磷酸盐、1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶3-氧六氟磷酸盐(HATU)、1-[(二甲氨基)(吗啉代)亚甲基]-1H-[1,2,3]三唑并[4,5-b]吡啶-1-鎓3-氧六氟磷酸盐(HDMA)、2-氯-1,3-二甲基-咪唑六氟磷酸盐(CIP)、六氟磷酸氯代吡咯烷酮鎓(PyCloP)、氟-N,N,N',N'-双(四亚甲基)甲脒六氟磷酸盐(BTFFH)、N,N,N',N'-四甲基-S-(1-氧代-2-吡啶基)硫脲六氟磷酸盐、O-(2-氧代-1(2H)吡啶基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐(TPTU)、S-(1-氧代-2-吡啶基)N,N,N',N'-四甲基硫脲四氟硼酸盐、O-[(乙氧基羰基)-氰基甲基氨基]-N,N,N',N'-六氟磷酸四甲基脲(HOTU)、(1-氰基-2-乙氧基-2-氧代乙基氨基氧基)二甲氨基-吗啉代-六氟磷酸盐(COMU)、O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-双(四亚甲基)六氟磷酸盐(HBPyU)、N-苄基-N'-环己基-碳二亚胺(有或没有聚合物结合)、二吡咯烷基(N-琥珀酰亚胺基氧基)碳鎓六氟磷酸盐(HSPyU)、氯二吡咯烷基六氟磷酸盐(PyClU)、2-氯-1,3-二甲基咪唑四氟硼酸盐(CIB)、(苯并三唑-1-基氧基)二吡啶碳六氟磷酸盐(HBPipU)、O-(6-氯苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐(TCTU)、溴代(二甲基氨基)-六氟磷酸盐(BroP)、丙基膦酸酐(PPACA、T3P®)、2-吗啉代乙基异氰化物(MEI)、N,N,N',N'-四甲基-氧-(N-琥珀酰亚胺基)六氟磷酸盐(HSTU)、2-溴-1-乙基-吡啶鎓四氟硼酸盐(BEP)、O-[(乙氧基羰基)氰基-亚甲基氨基]-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐(TOTU)、4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉氯化物(MMTM、DMTMM)、N,N,N',N'-四甲基-氧-(N-琥珀酰亚胺基)脲四氟硼酸(TSTU)、O-(3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐(TDBTU)、1,1'-(偶氮二羰基)-二吡啶(ADD)、二-(4-氯苄基)偶氮二羧酸酯(DCAD)、偶氮二羧酸二叔丁酯(DBAD)、偶氮二羧酸二异丙酯(DIAD)、偶氮二羧酸二乙酯(DEAD)。另外,Lv_1可以是酸酐,或与其它C_1-C_8酸酐作用形成的酸酐;

[0258] 优选的Lv_1包含以下物质:卤化物(如氟化物、氯化物、溴化物和碘化物)、甲磺酰基(mesyl)、甲苯磺酰基(tosyl)、三氟甲基磺酰基(triflate)、三氟甲基磺酸盐、硝基苯酚基、N-琥珀酰亚胺基(NHS)、苯酚基;二硝基苯酚基;五氟苯酚基、四氟苯酚基、三氟苯酚基、二氟苯酚基、一氟苯酚基、五氯苯酚基、1H-咪唑-1-基、一氯苯酚基、二氯苯酚基、三氯苯酚基、四氯苯酚基、N-(苯并三唑基)氧基、2-乙基-5-苯基异恶唑-3′-磺酰基、苯基恶二唑-磺酰基、2-乙基-5-苯基异恶唑基、苯基恶二唑基、恶二唑基、不饱和碳(碳-碳、碳-氮、碳-硫、碳-磷、硫-氮、磷-氮、氧-氮或碳-氧之间的双键或三键),或以下结构之一:

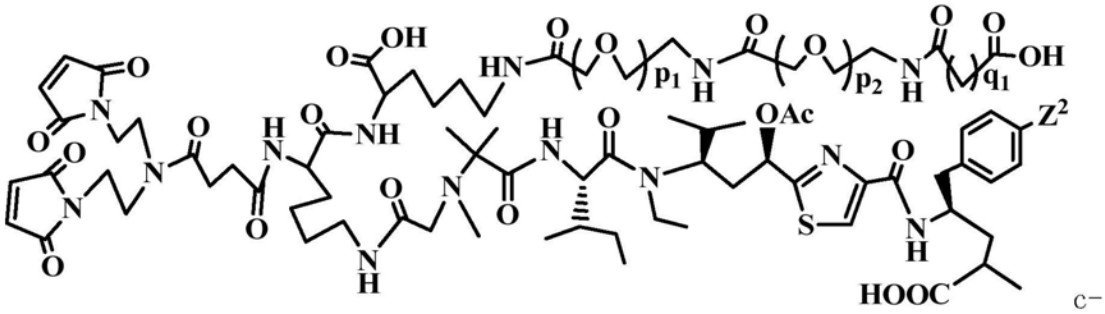
[0259]  二硫化物;  卤代乙酰基;  酰卤;

 N-羟基琥珀酰亚胺酯；  马来酰亚胺；  单取代马来酰亚胺；  二取代马来酰亚胺；  单取代的琥珀酰亚胺；  二取代马来酰亚胺；  取代马来酸；-CHO醛；  乙烯磺酰基；  丙烯酰基；  (甲苯磺酰氧基)乙酰基；  2-(甲磺酰氧基)乙酰基；  2-(硝基苯酚基)乙酰基；  2-(二硝基苯基)乙酰基；  2-(氟代苯酚基)-乙酰基；  2-(二氟苯酚基)-乙酰基；  2-((三氟甲基磺酰基)氧基)乙酰基；  酮或醛，  2-(五氟苯酚基)乙酰基；  甲基砜苯基恶二唑(ODA)；  酸酐，  烷氧基氨；  叠氮基，  炔基，或  酰肼；

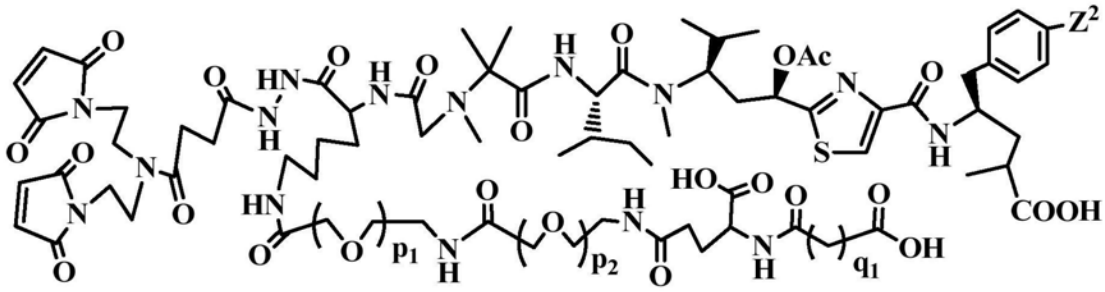
[0260] 其中，X_1'是F、Cl、Br、I或Lv_3；X_2'是O、NH、N(R_1)或CH_2；R_3是H、芳基或杂芳基，其中一个或多个H原子可独立地被-R1、-卤素、-OR_1、-SR_1、-NR_1R_2、-NO_2、-S(O)R_1、-S(O)$_2R_1$或-$COOR_1$取代；Lv_3是离去基团，选自F、Cl、Br、I；硝基苯基；N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)；苯酚基；二硝基苯酚基；五氟苯酚基；四氟苯酚基；二氟苯酚基；单氟苯酚基；五氯苯酚基；三氟甲磺酰基；咪唑基；二氯酚基；四氯苯酚基；1-羟基苯并三唑基；甲苯甲磺酰基；甲磺酰基；2-乙基-5-苯基异恶唑-3′-磺酰基，酸酐或与其它酸酐作用形成的酸酐，例如乙酸酐、甲酸酐；或与多肽缩

合试剂、Mitsunobu反应试剂作用生成的中间体。

[0261] 结构式(IV)的示例如下

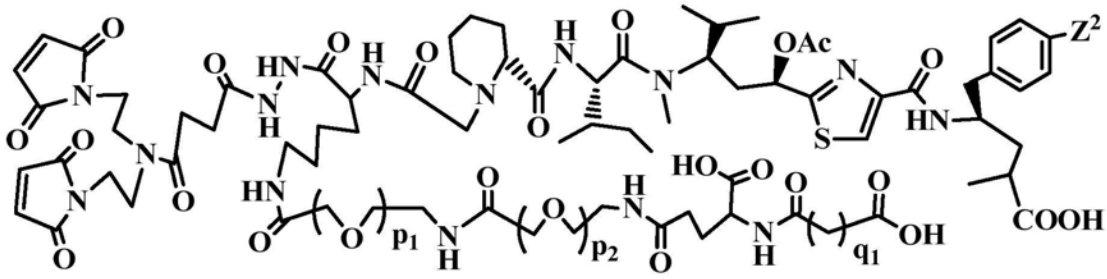


c-01,

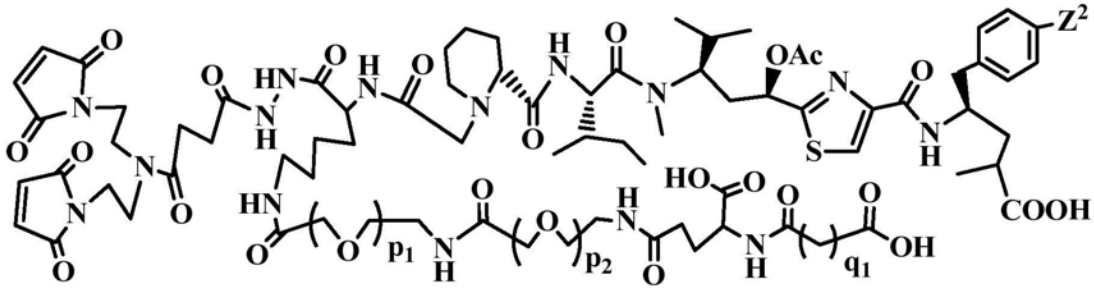


c-02,

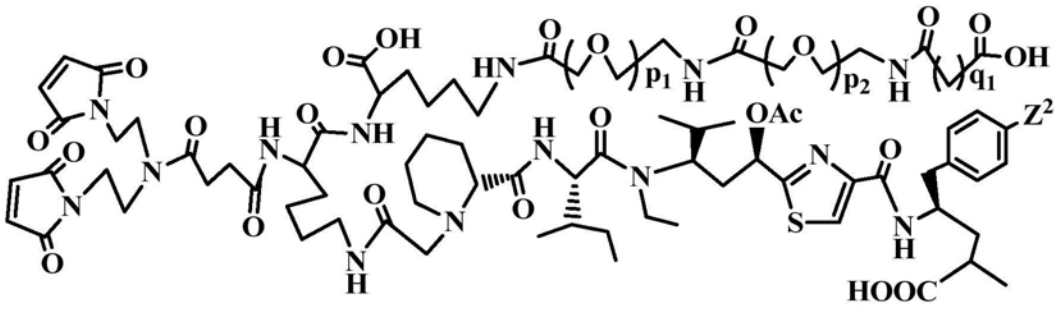
[0262]



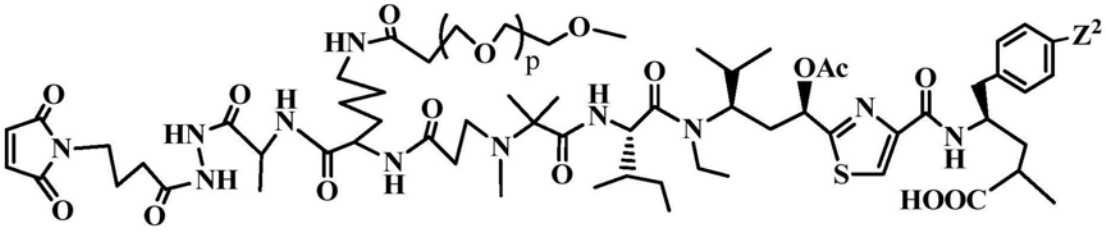
c-03,



c-04,

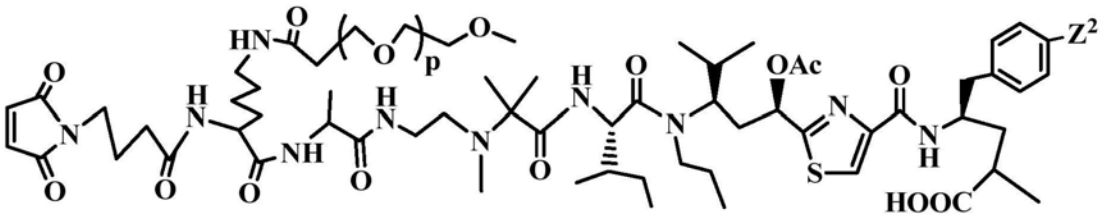


c-05,

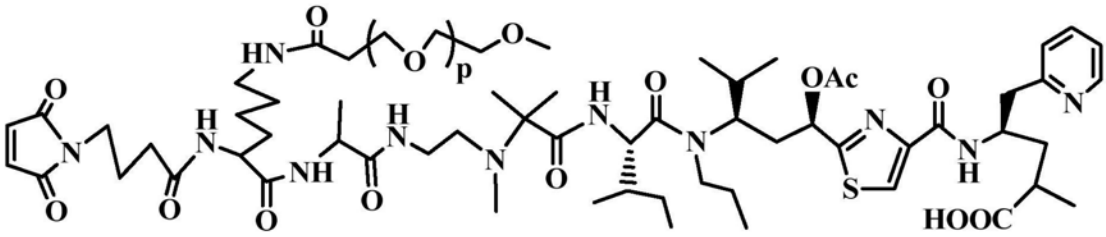


c-06,

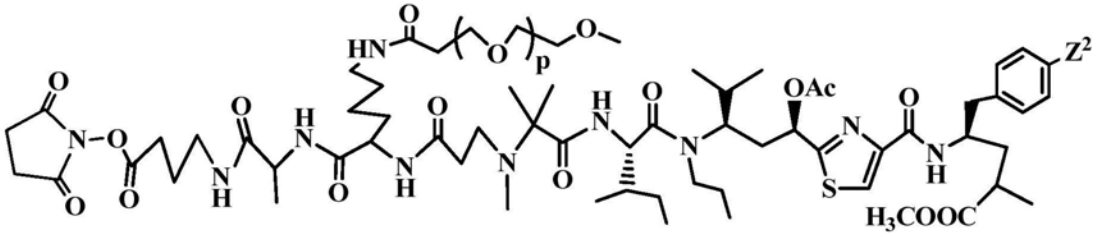
[0263]



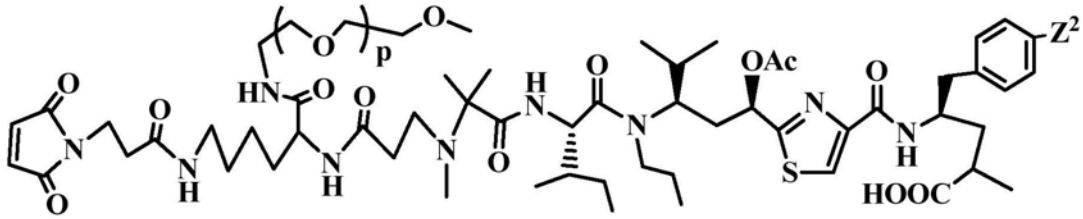
c-07



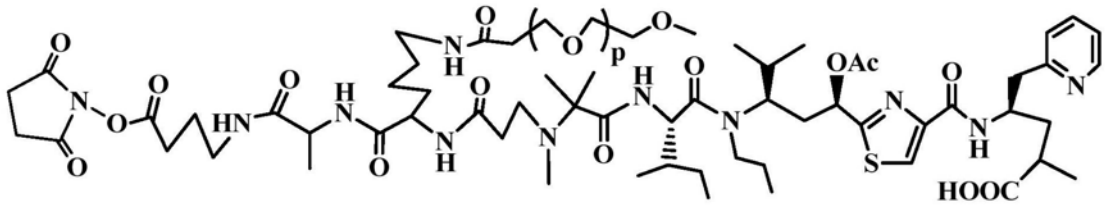
c-08,



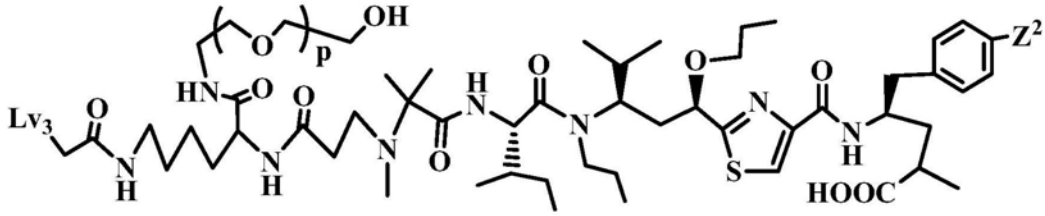
c-09,

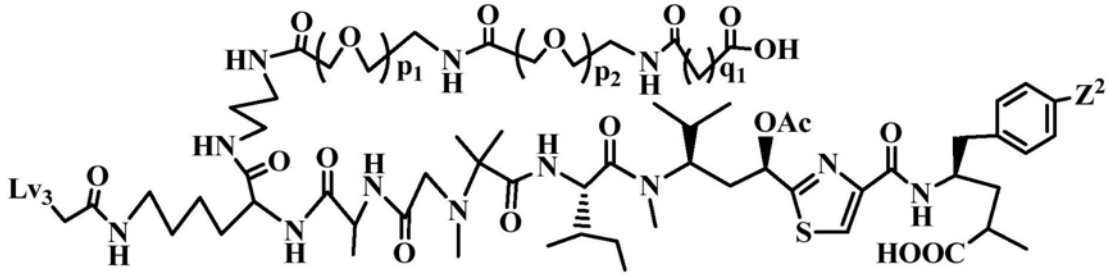


c-10,

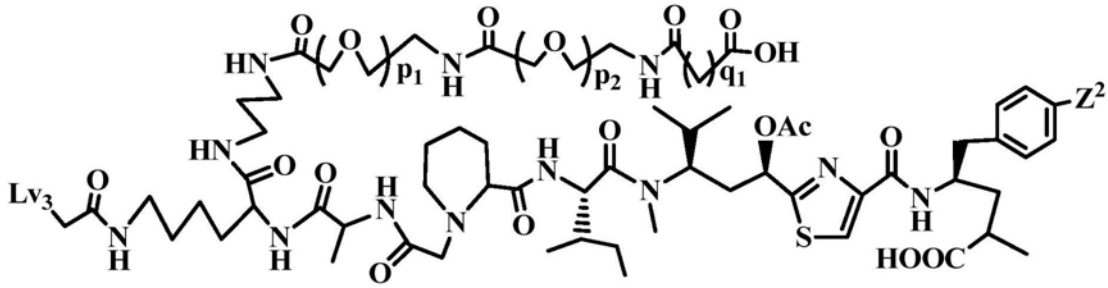


c-11,

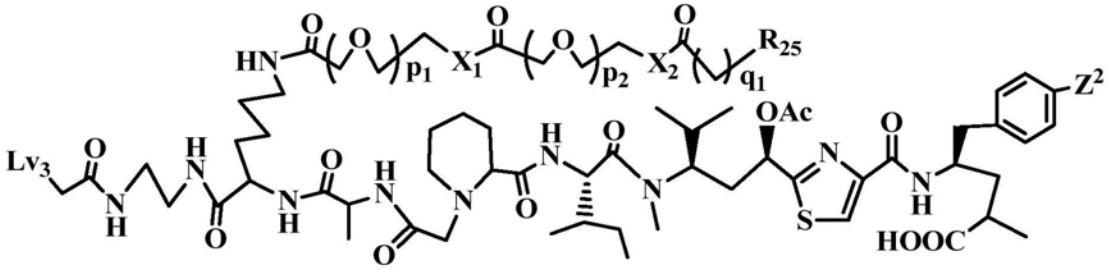
[0264]  c-12,



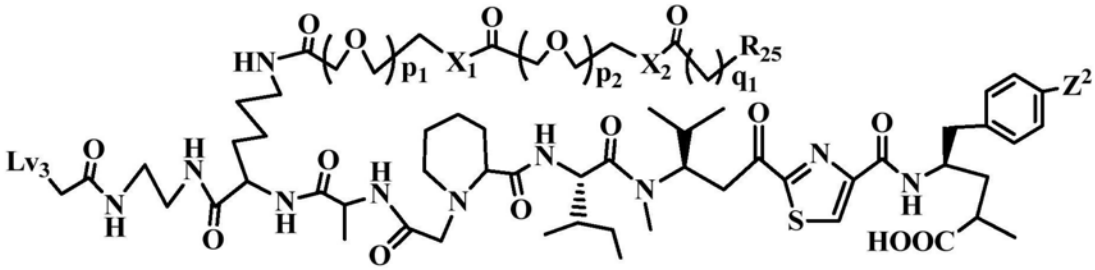
c-13,



c-14,

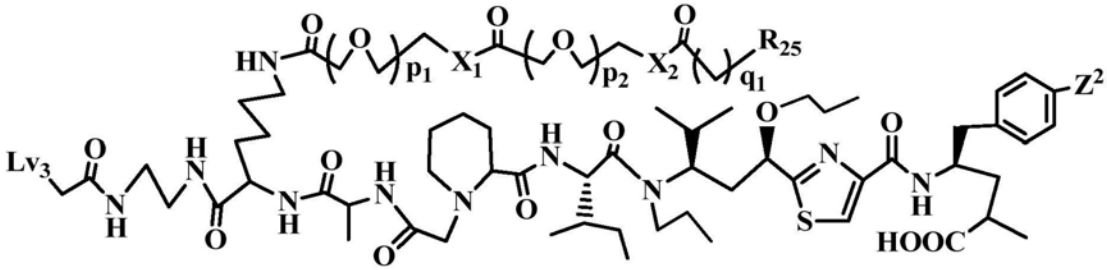


c-15,

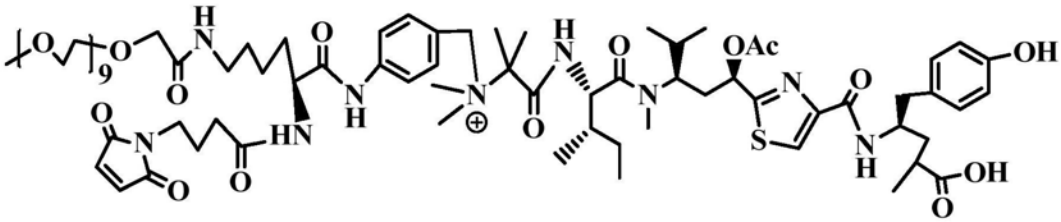


c-16,

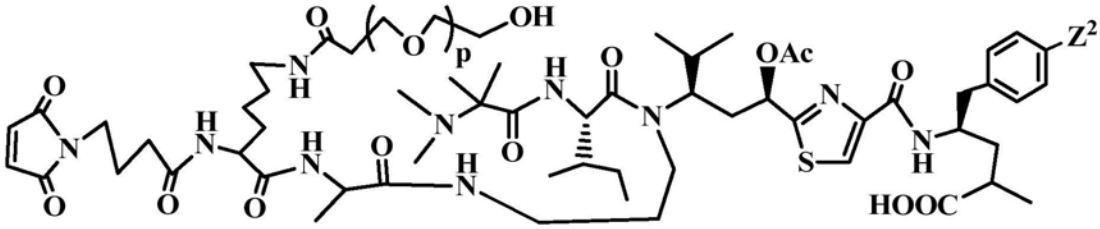
[0265]



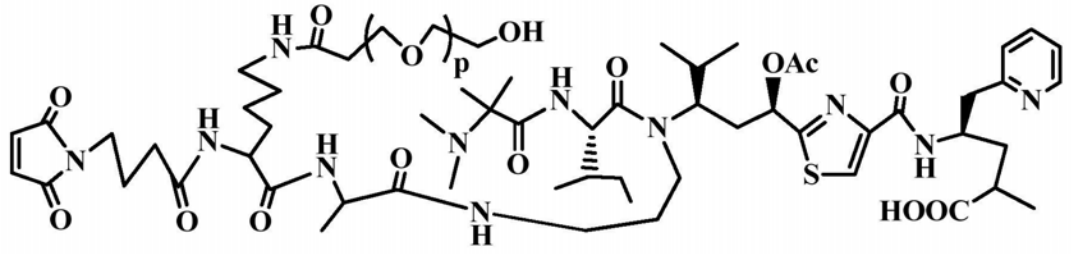
c-17,



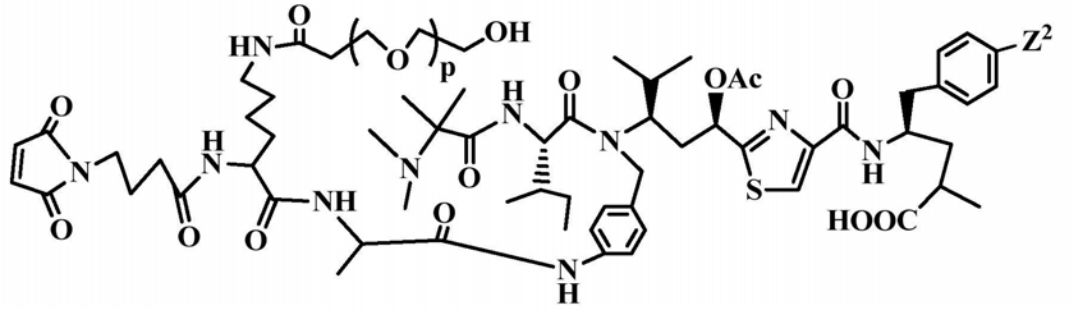
c-18,



c-19,

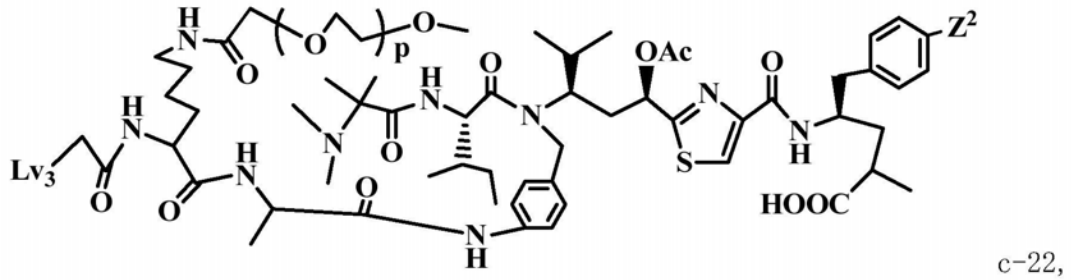


c-20,

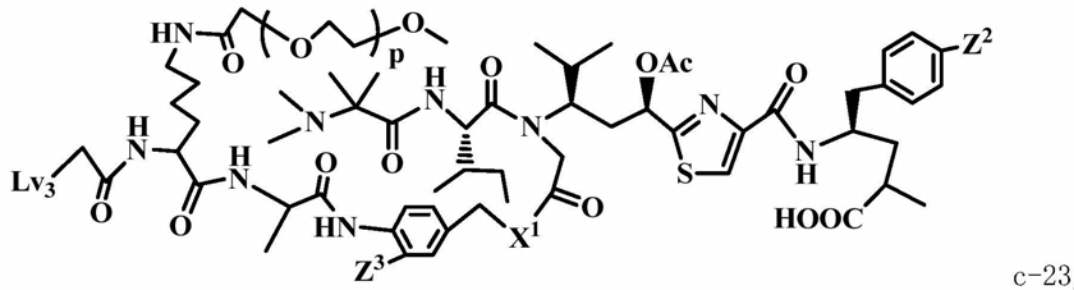


c-21,

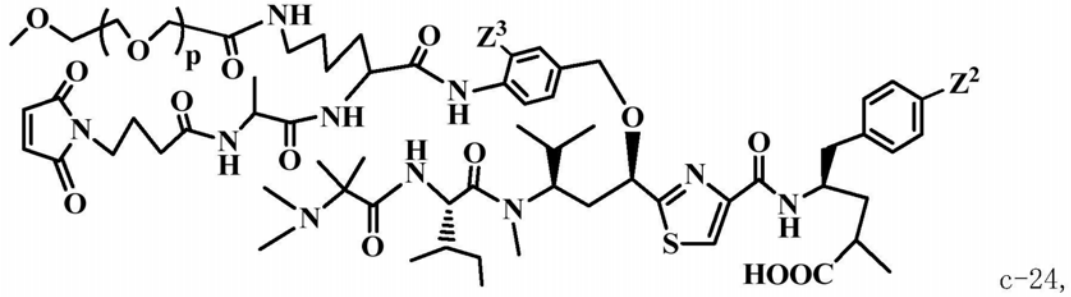
[0266]



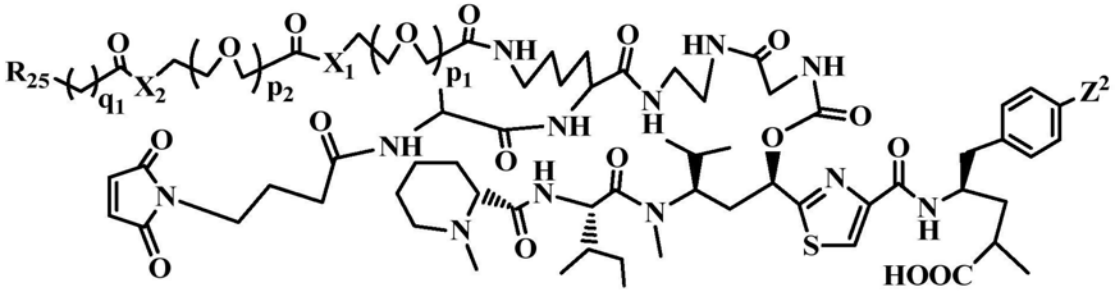
c-22,



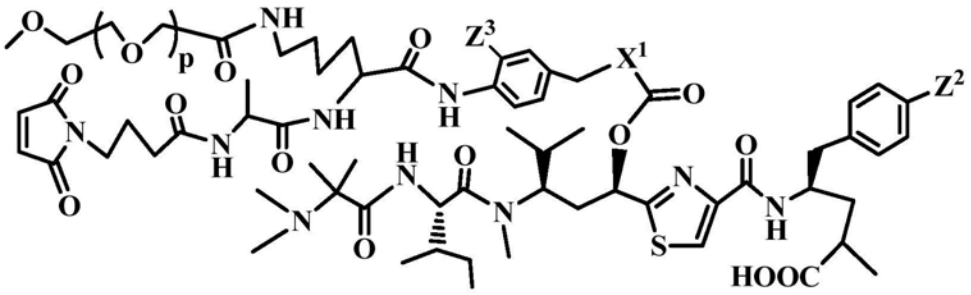
c-23,



c-24,

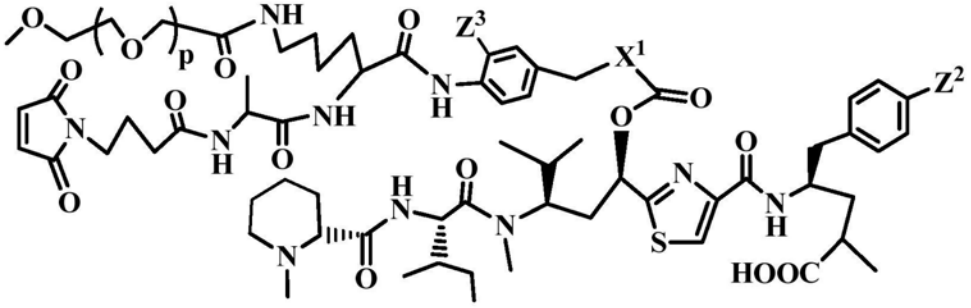


c-25,

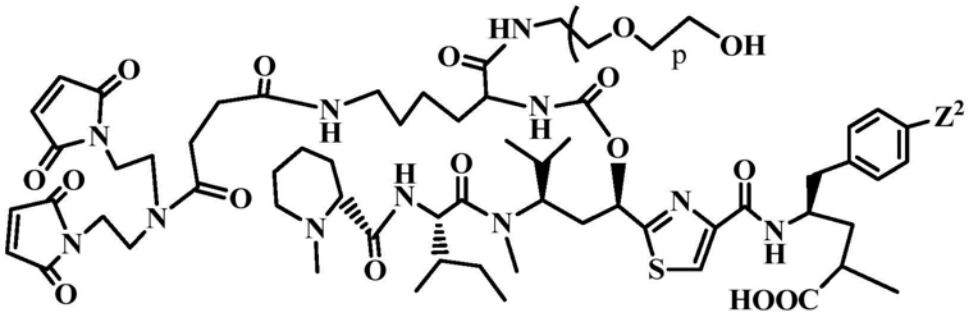


c-26,

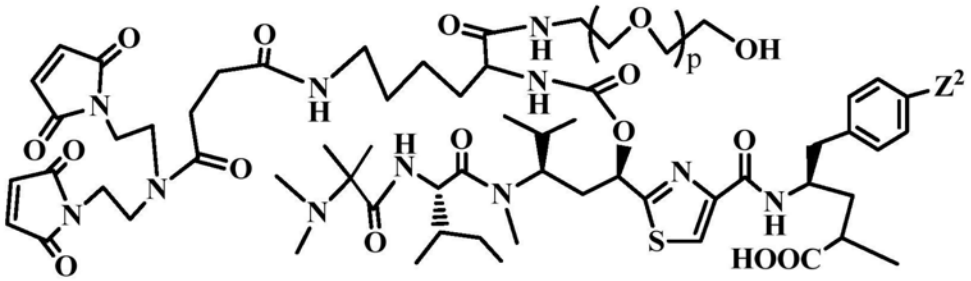
[0267]



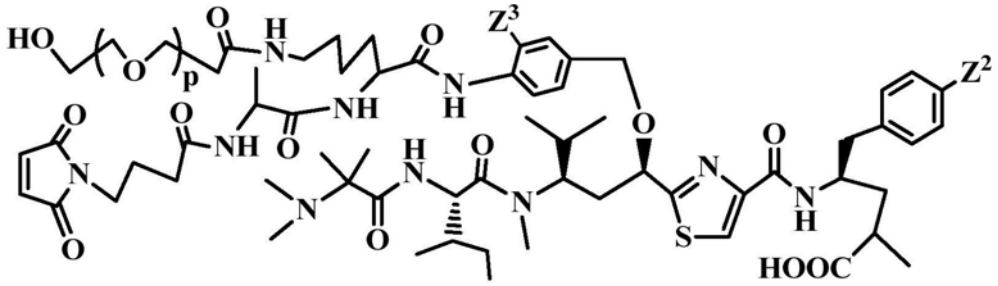
c-27,



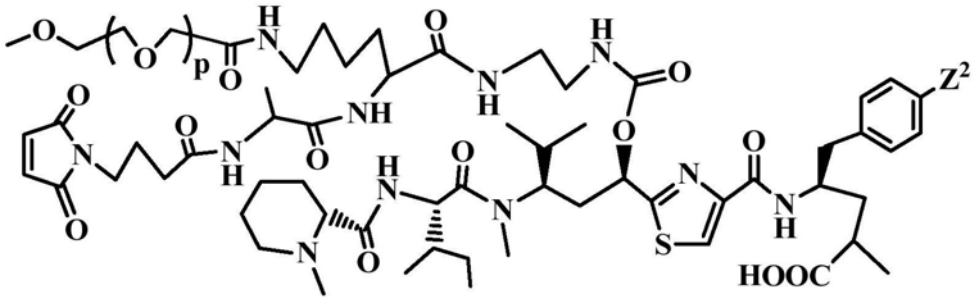
c-28,



c-29,

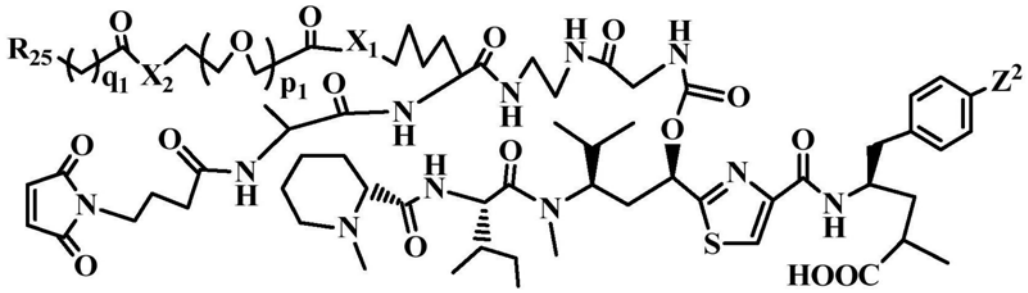


c-30,

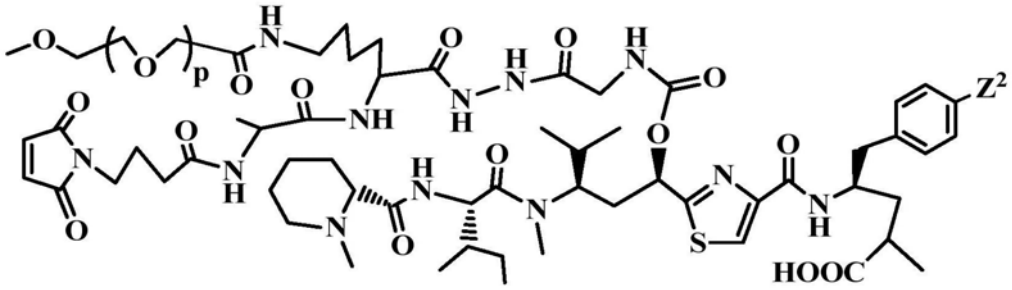


c-31,

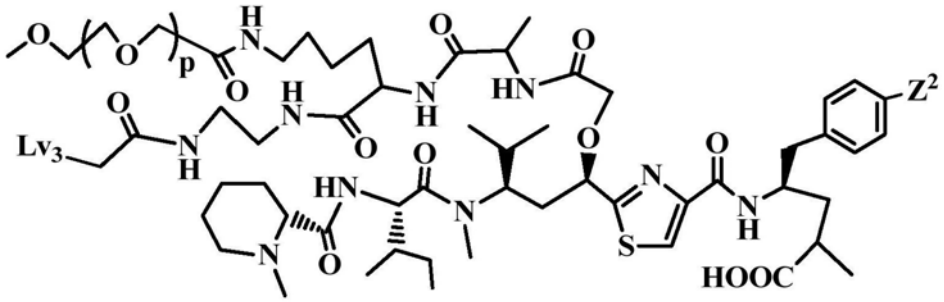
[0268]



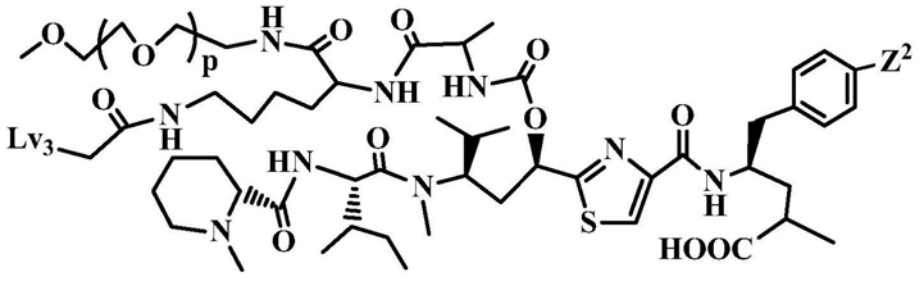
c-32,



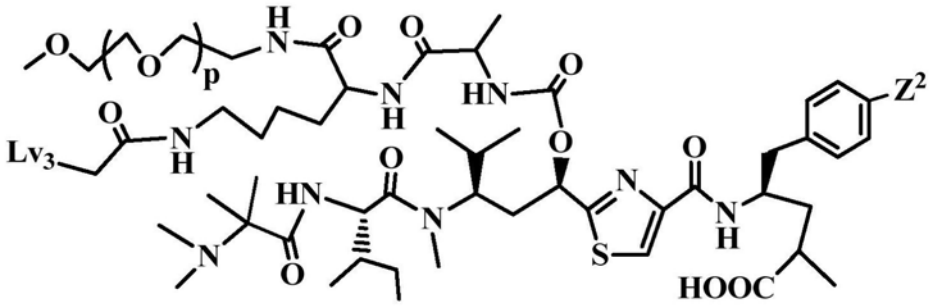
c-33,



c-34,

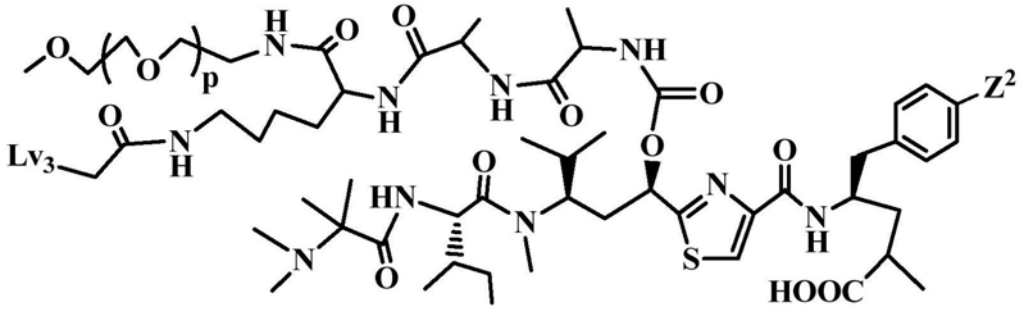


c-35,

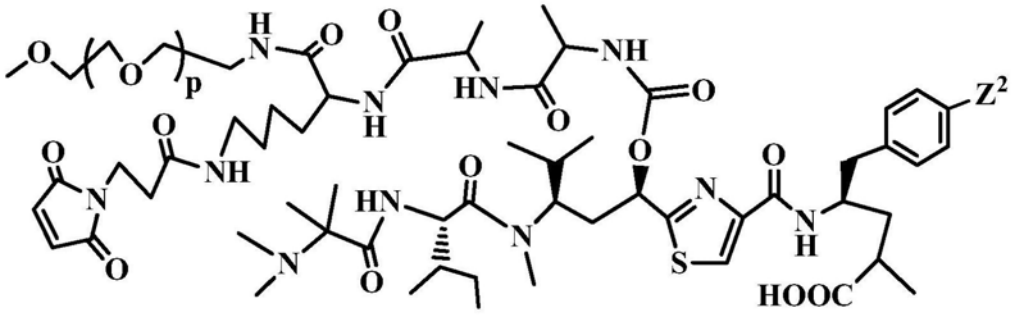


c-36,

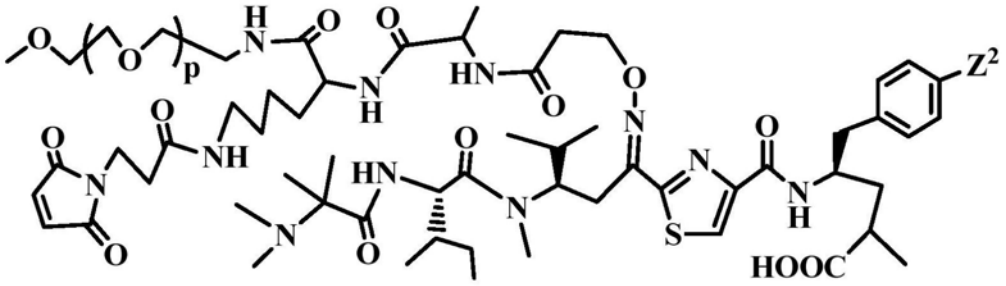
[0269]



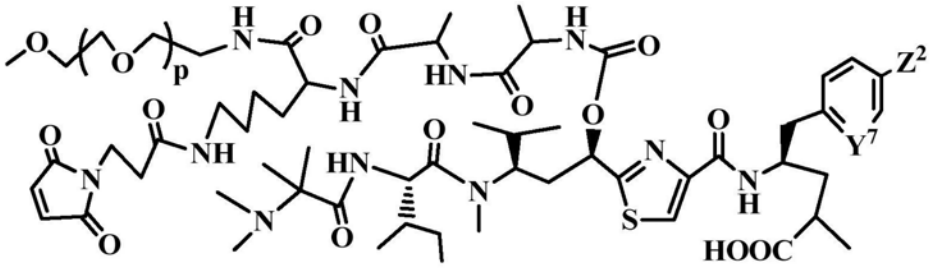
c-37,



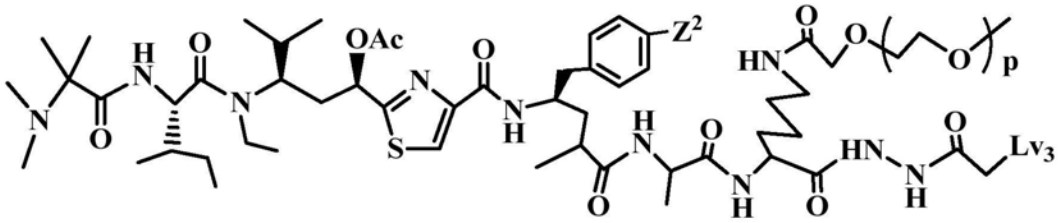
c-38,



c-39,

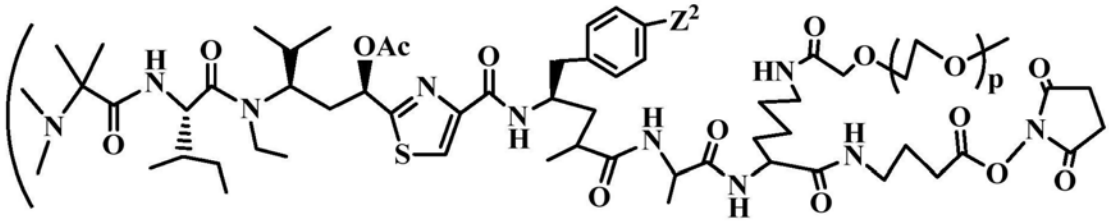


c-40,

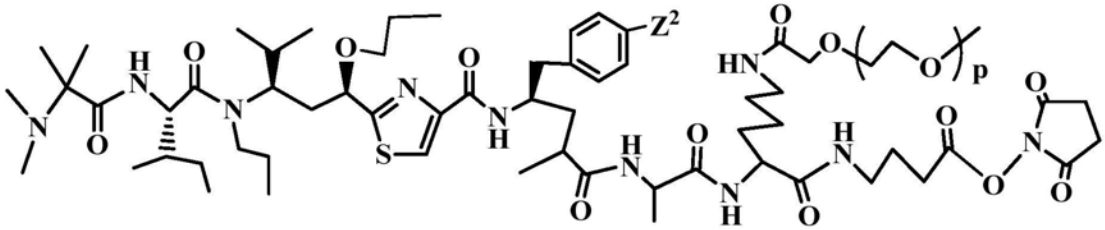


c-41,

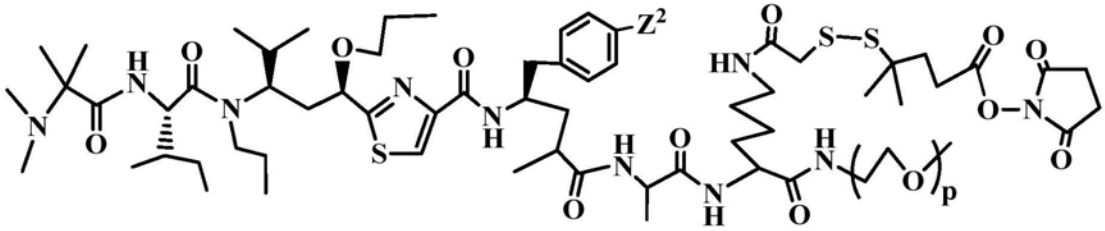
[0270]



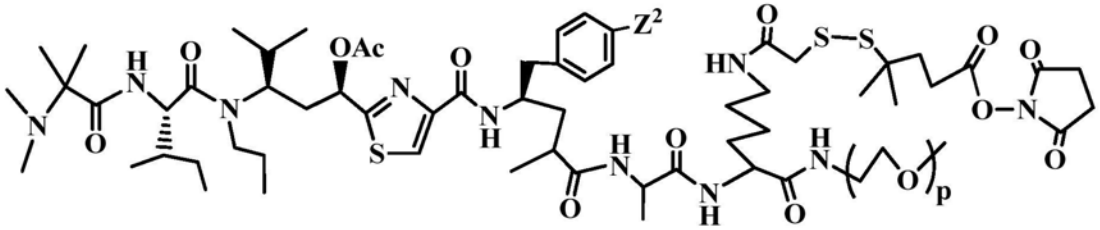
c-42,



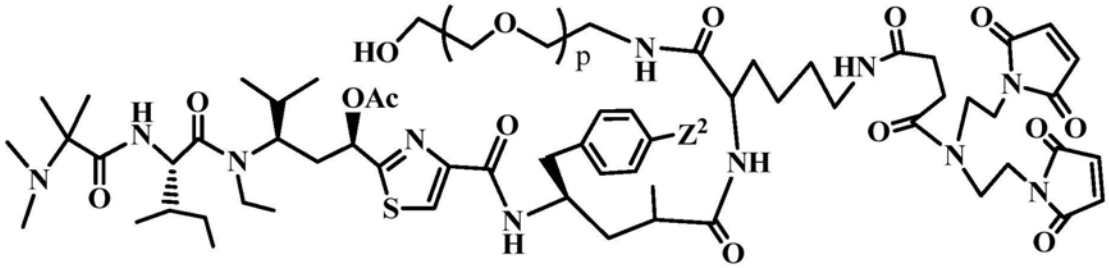
c-43,



c-44,

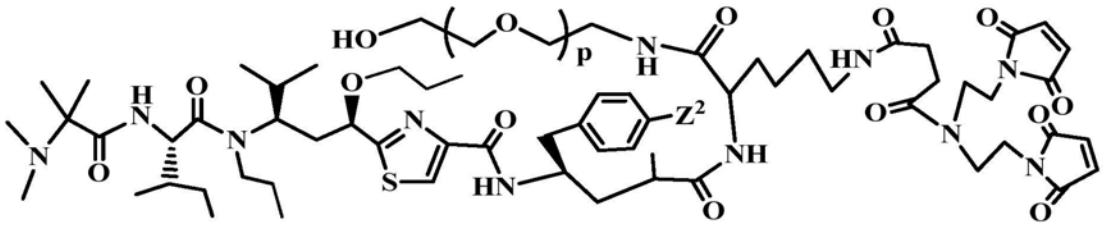


c-45,

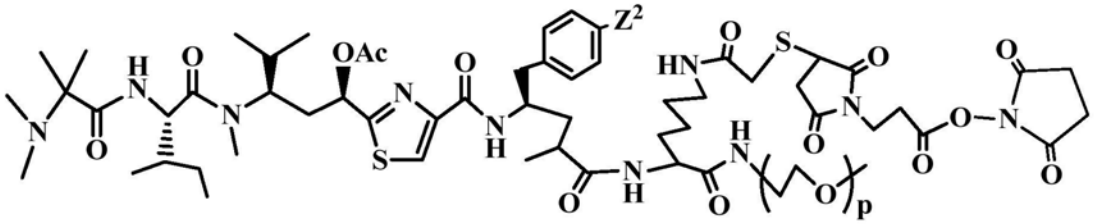


c-46,

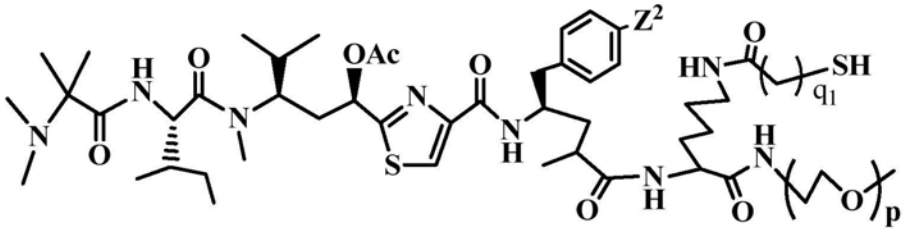
[0271]



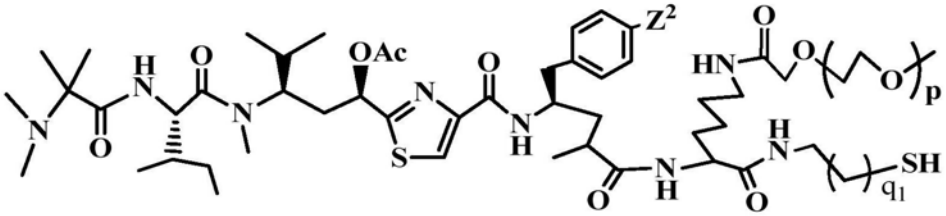
c-47,



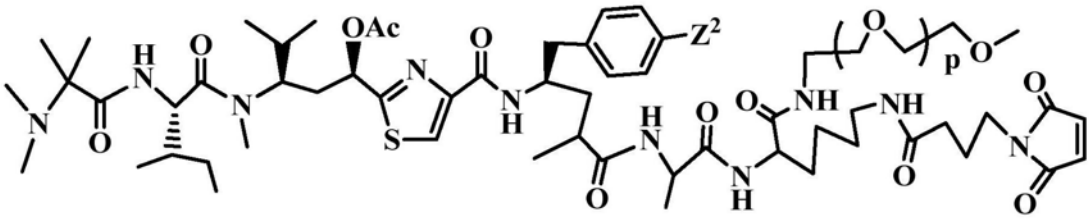
c-48,



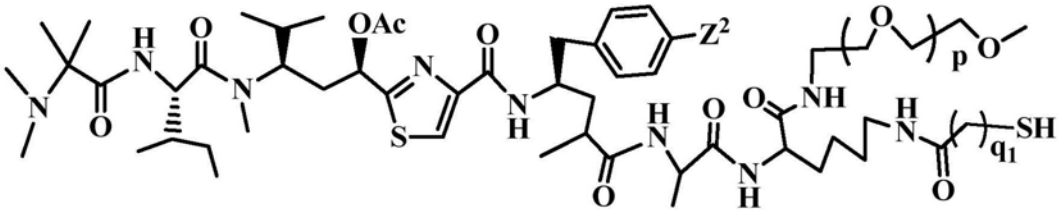
c-49,



c-50,

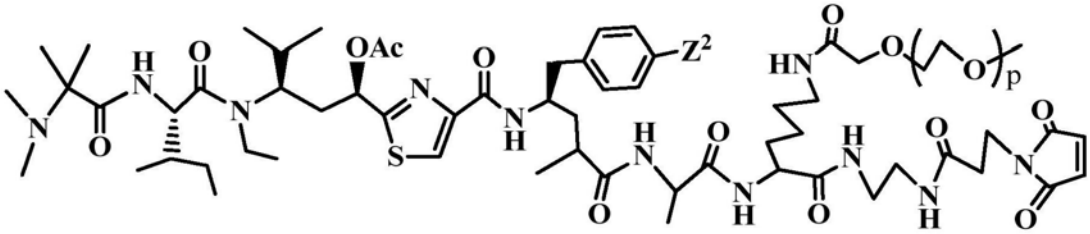


c-51,

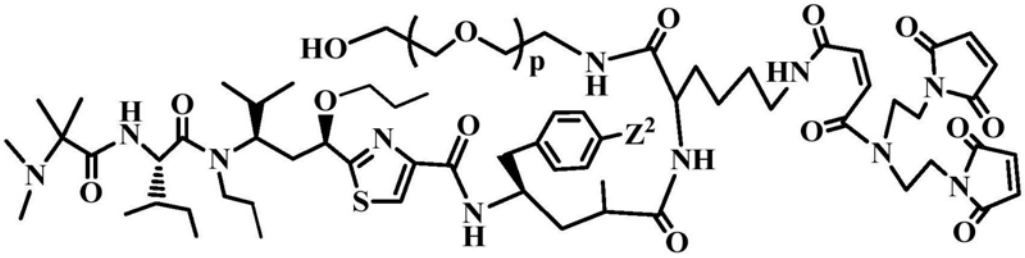


c-52,

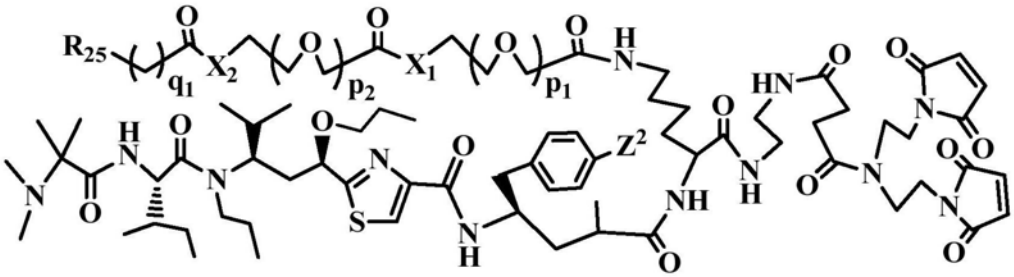
[0272]



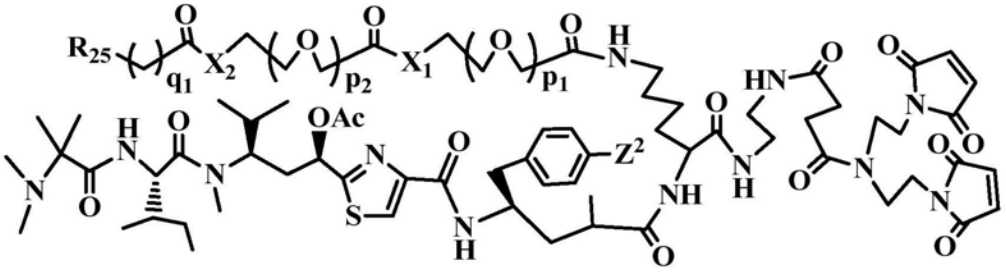
c-53,



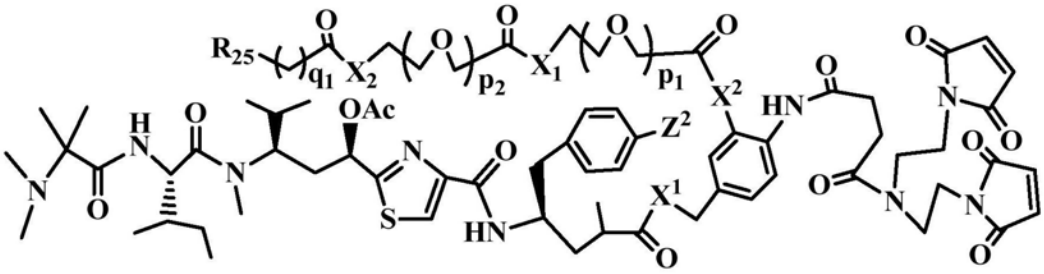
c-54,



c-55,

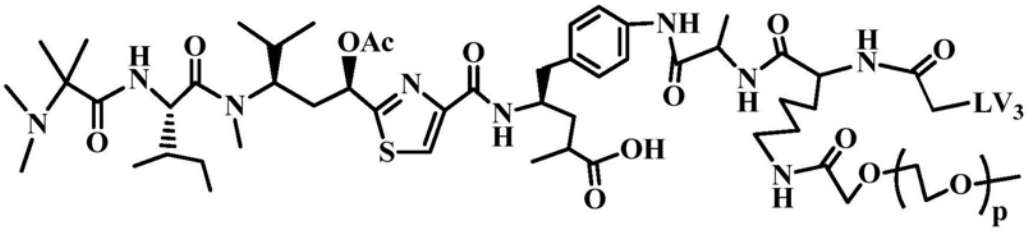


c-56,

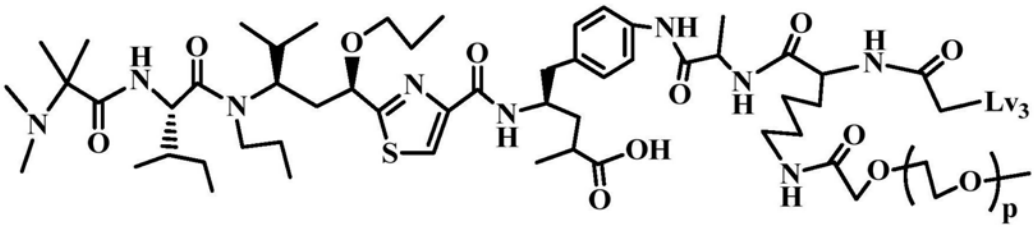


c-57,

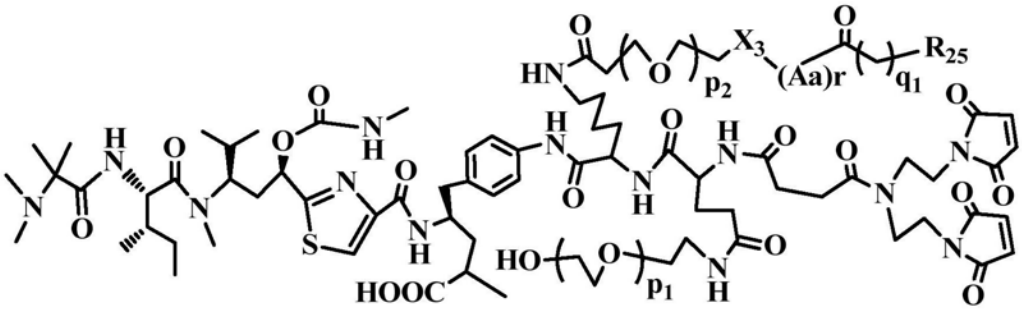
[0273]



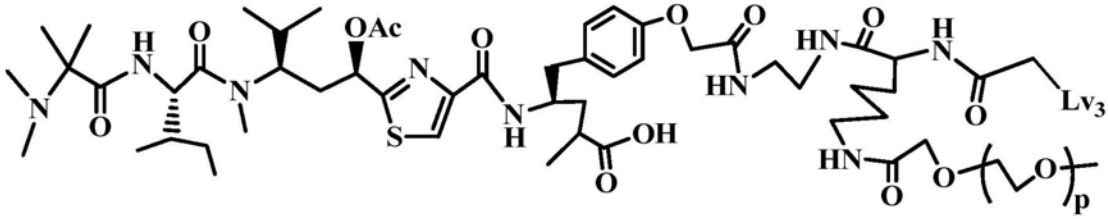
c-58,



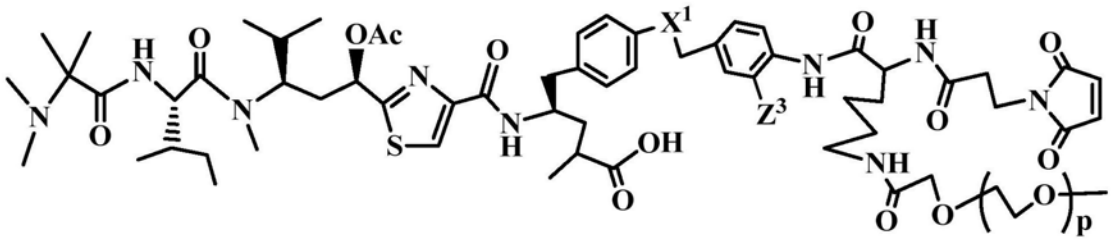
c-59,



c-60,

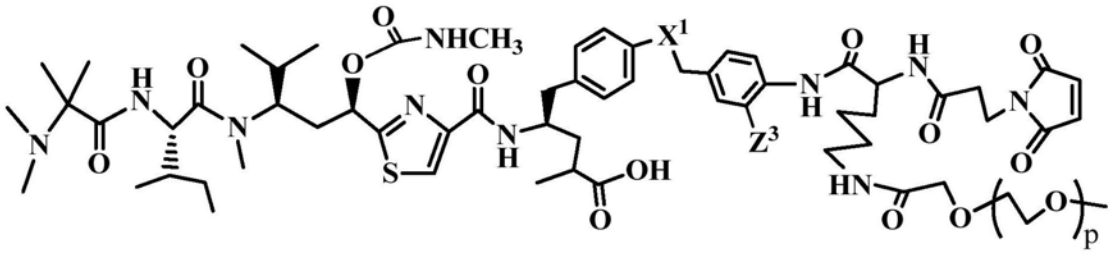


c-61,

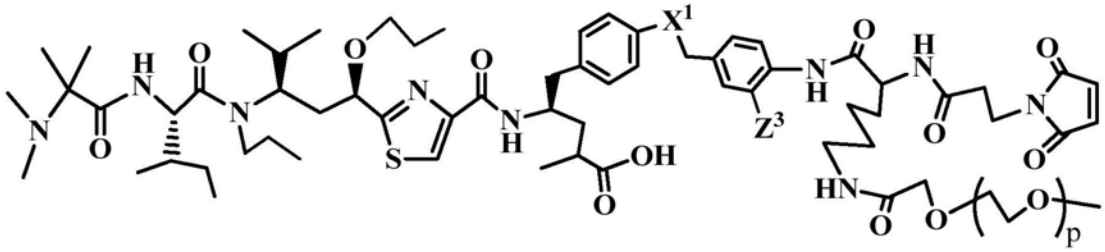


c-62,

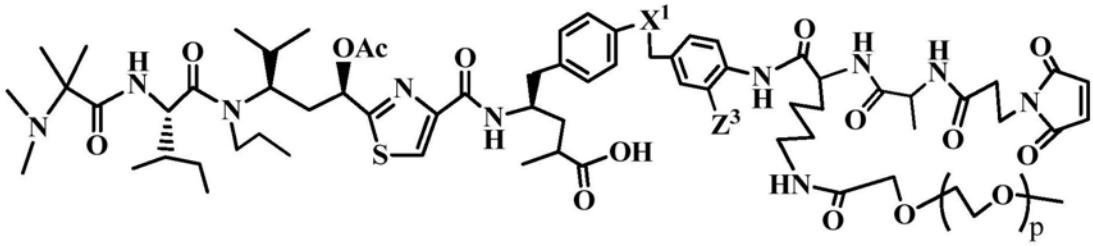
[0274]



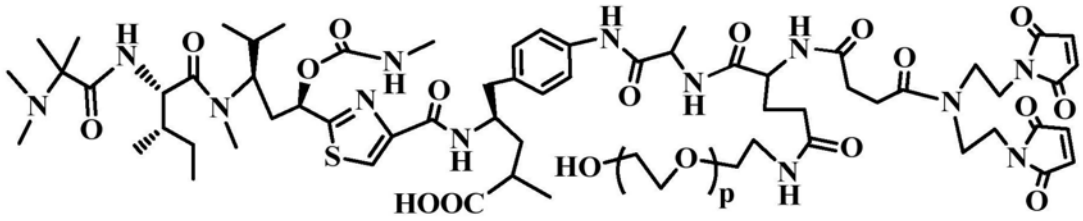
c-63,



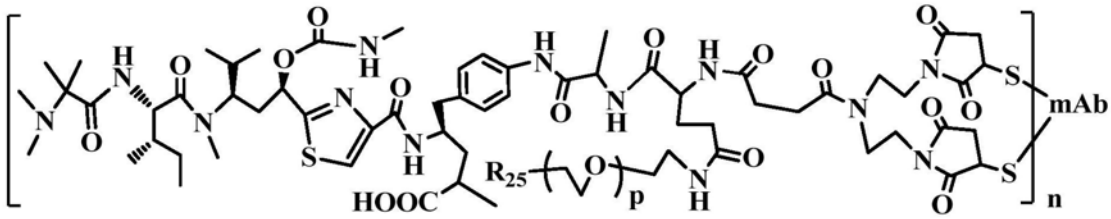
c-64,



c-65,

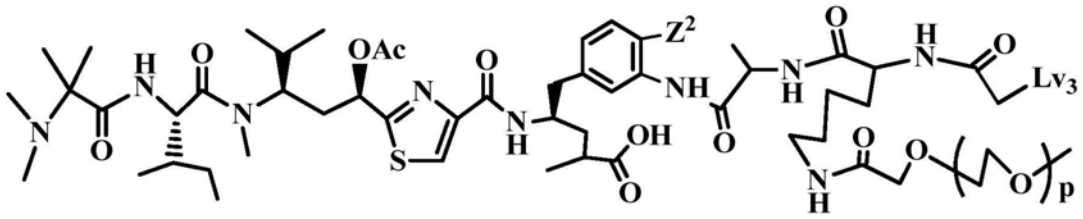


c-66,

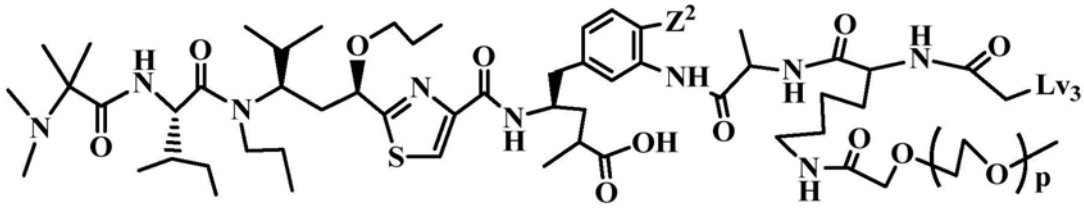


c-67,

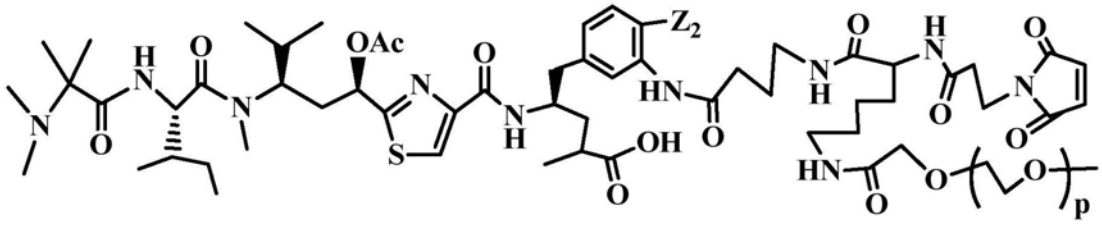
[0275]



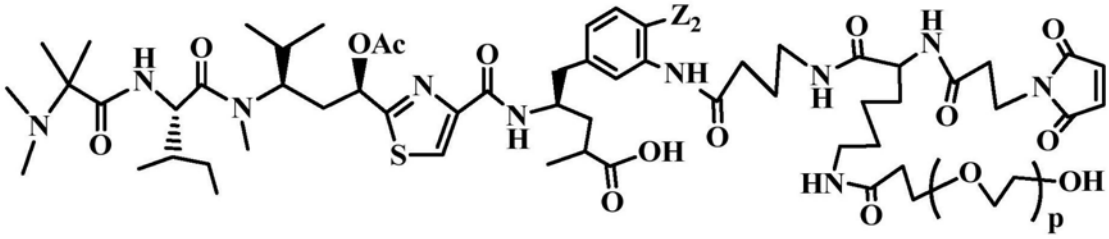
c-68,



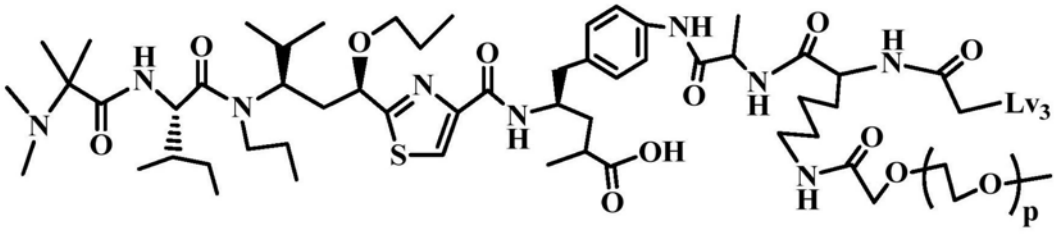
c-69,



c-70,

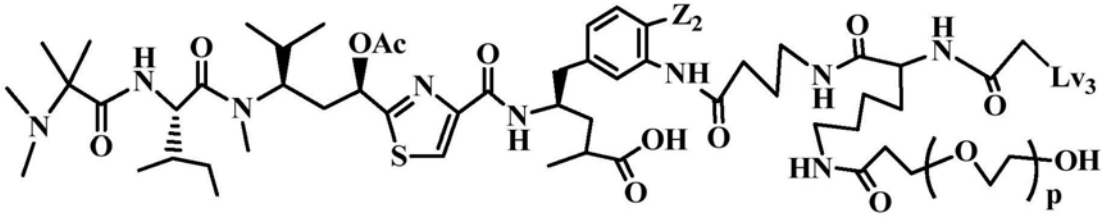


c-71,

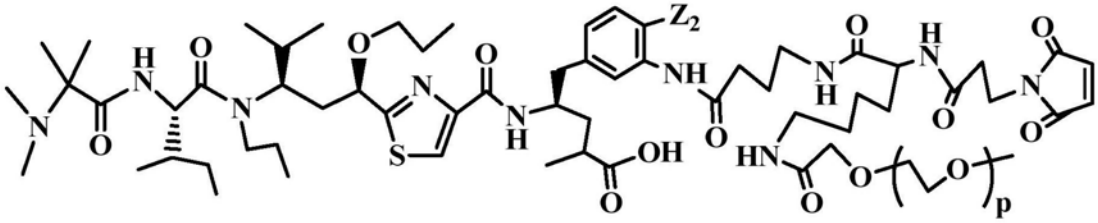


c-72,

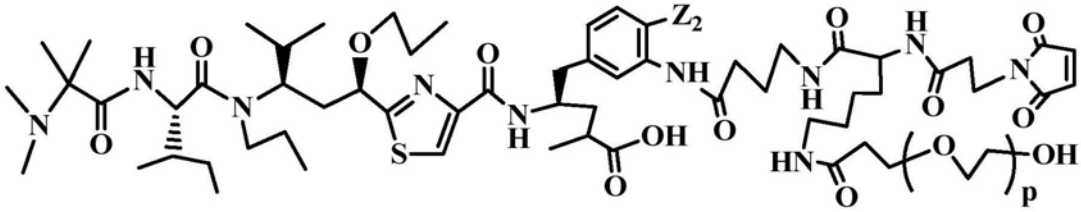
[0276]



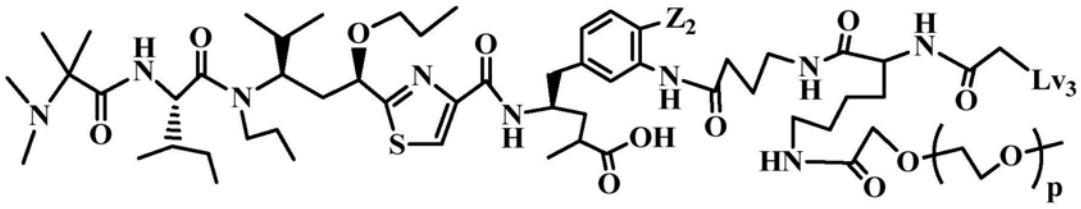
c-73,



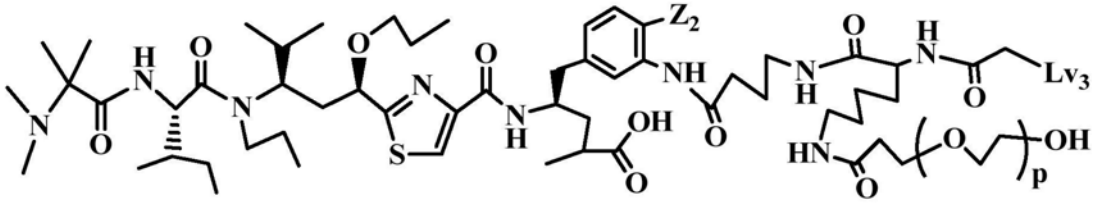
c-74,



c-75,

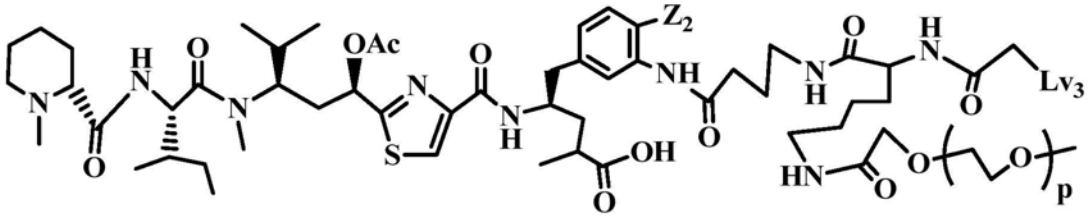


c-76,

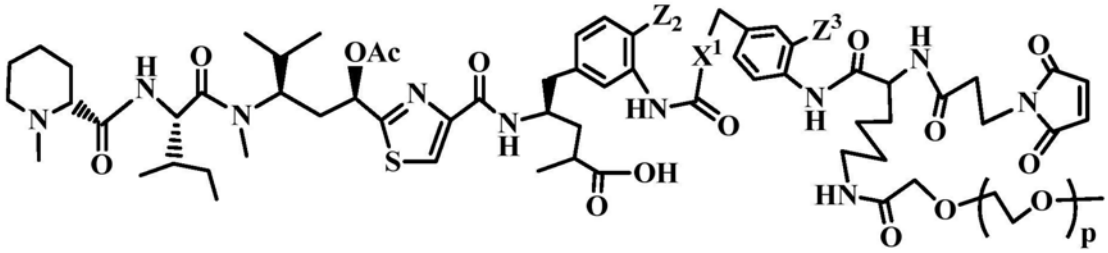


c-77,

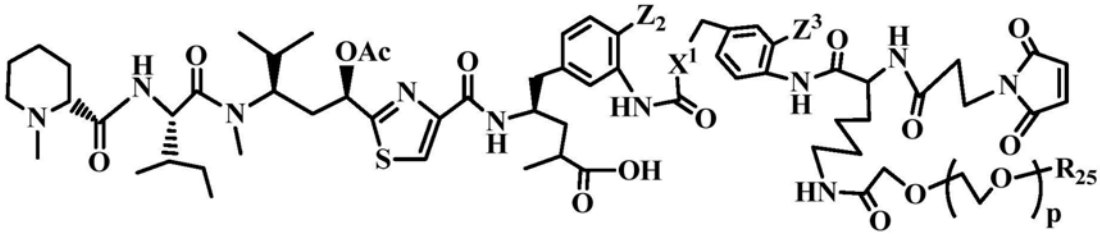
[0277]



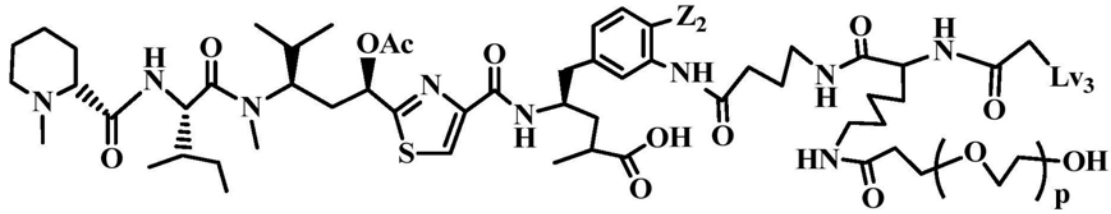
c-78,



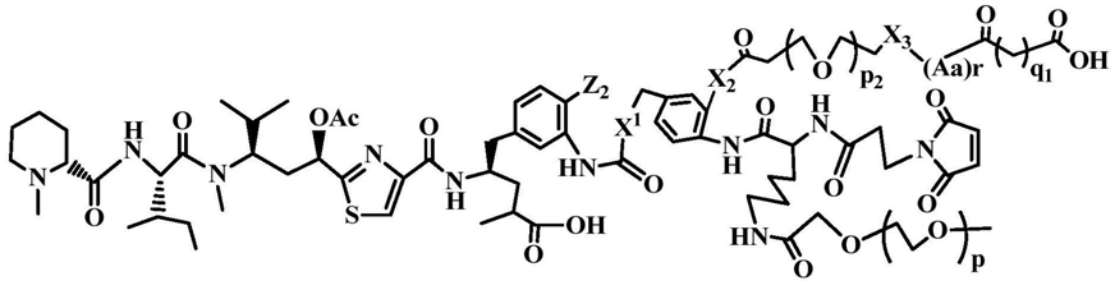
c-79,



c-80,

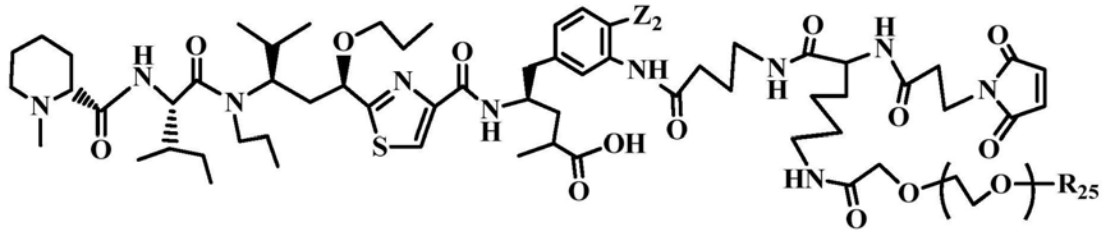


c-81,

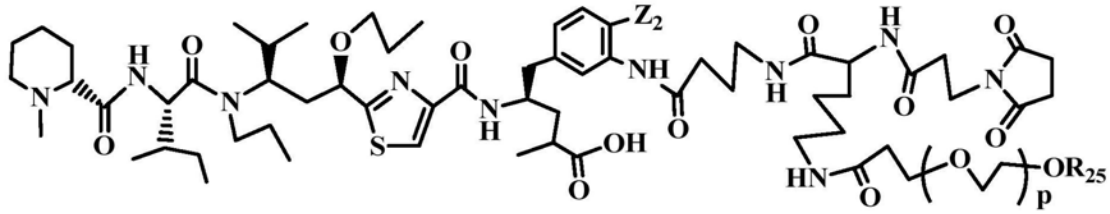


c-82,

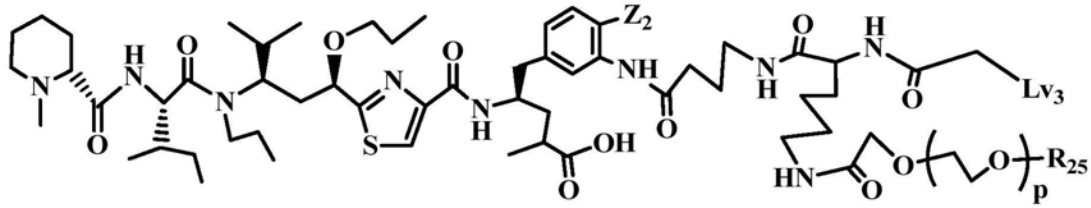
[0278]



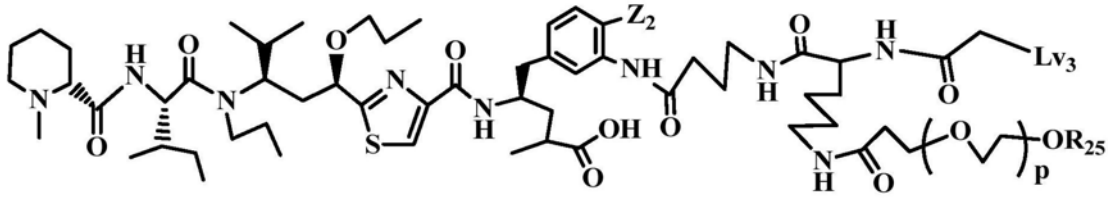
c-83,



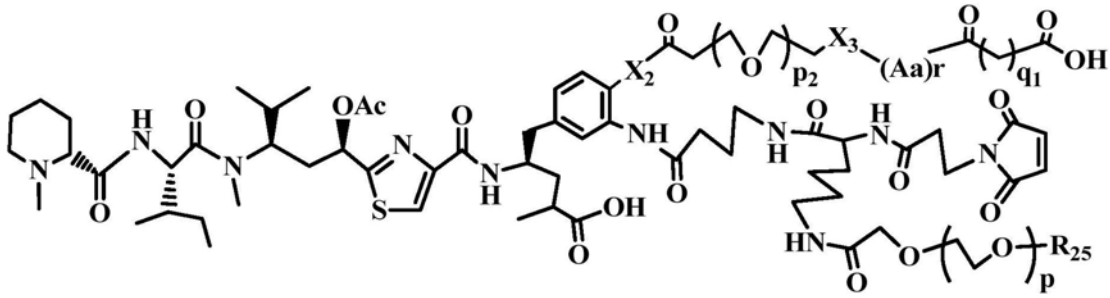
c-84,



c-85,

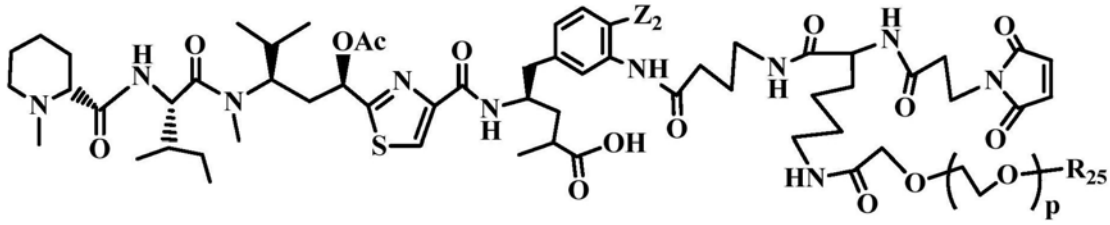


c-86,

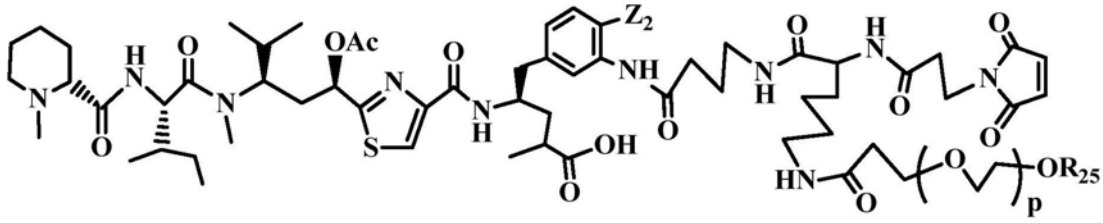


c-87,

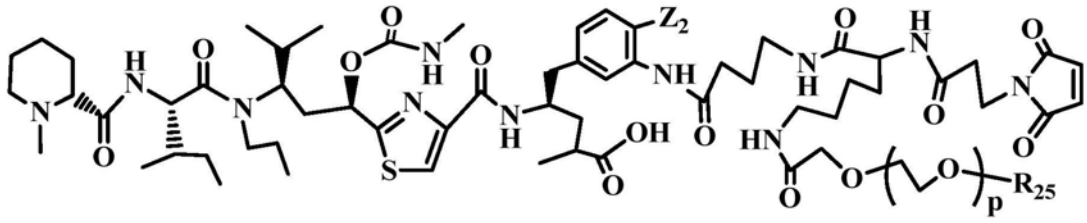
[0279]



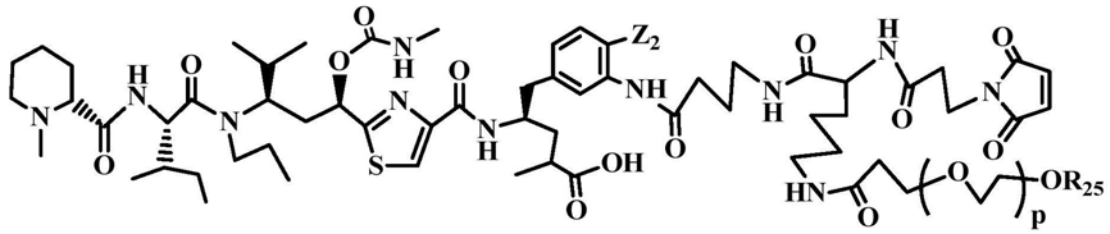
c-88,



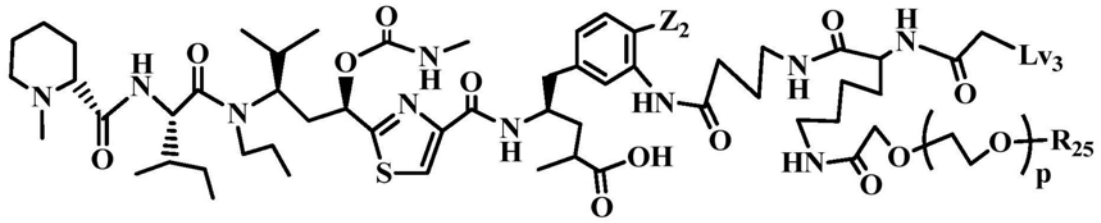
c-89,



c-90,

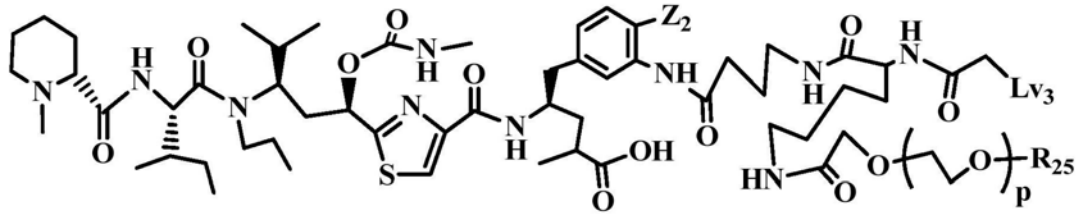


c-91,

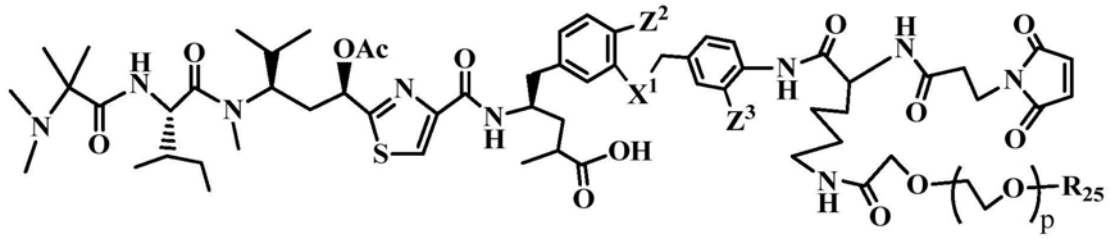


c-92,

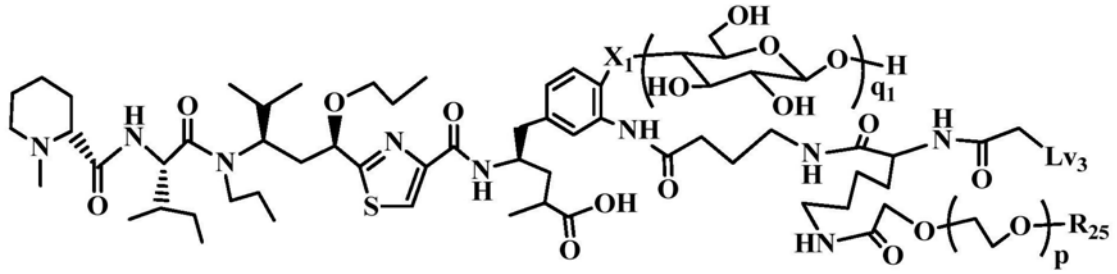
[0280]



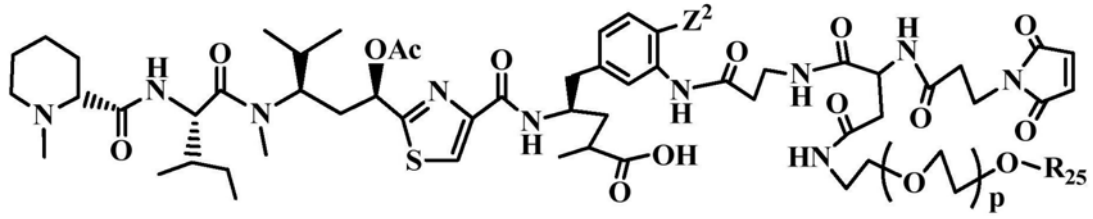
c-93,



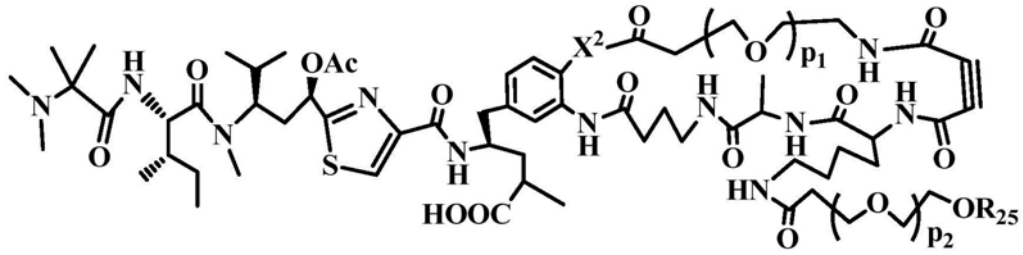
c-94,



c-95,

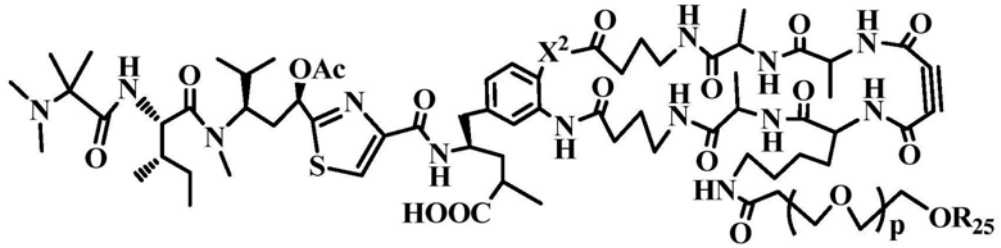


c-96,

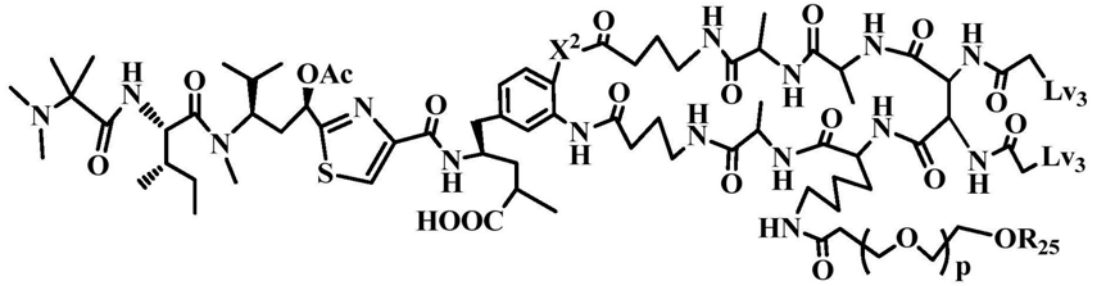


c-97,

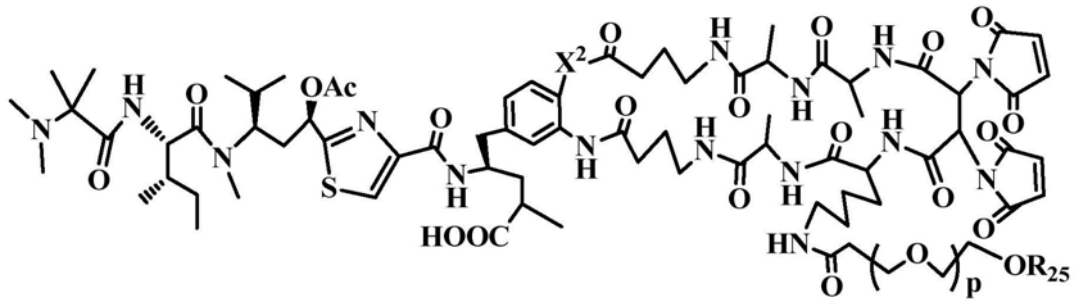
[0281]



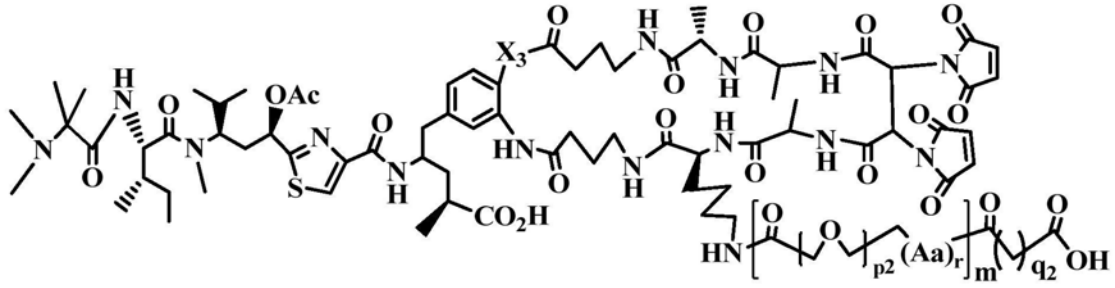
c-98,



c-99,



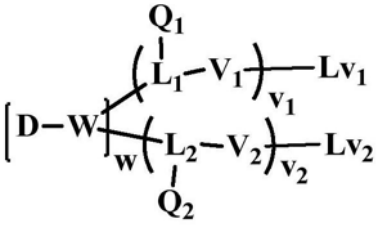
c-100,

[0282] 

c-101

[0283] 或是其药学上可接受的盐、水合物或水合盐;或这些化合物的多晶型结构;或其光学异构体、外消旋体、非对映异构体或对映异构体;其中X_1、X_2、X_3、Z_2、Z_3、p_1、p_2、p_3、q_1、q_2、Lv_3、$(Aa)_r$、R_{25}、R_{25}'及m定义如前文所述。

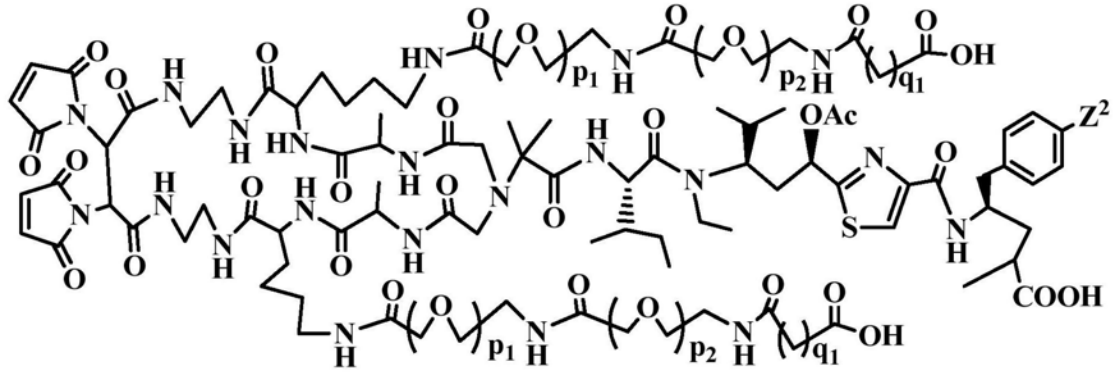
[0284] 本发明的另一个方面,支链连接体化合物的结构如(V)所示、它可以便利地与细胞结合分子T反应,形成式(III)中的偶联物:

[0285] 

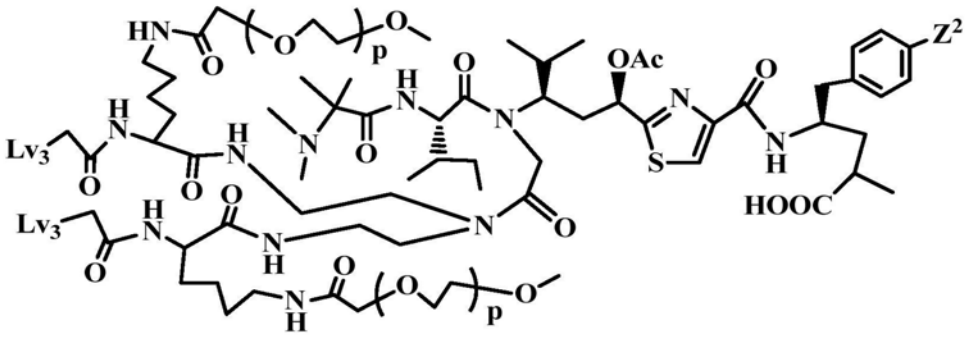
(V)

[0286] 其中,D、W、w、L_1、L_2、Q_1、Q_2、V_1、V_2、v_1、v_2及n的定义同结构式(I);Lv_1和Lv_2定义同式(IV)中的Lv_1,Lv_1和Lv_2可以相同,也可以不同。

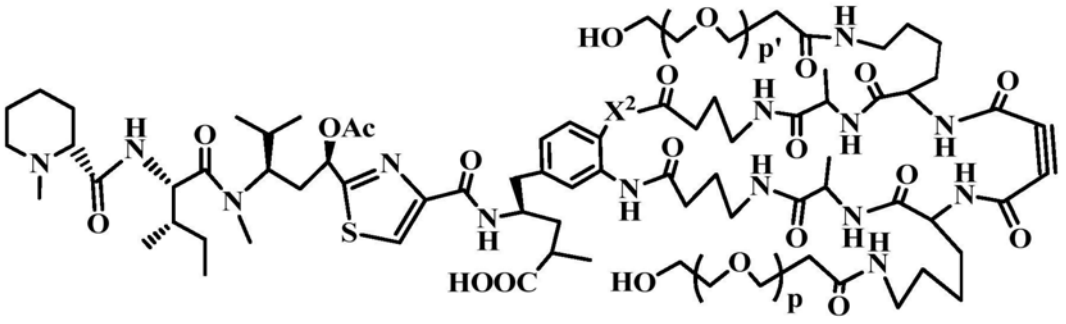
[0287] 结构式(V)的示例如下:

[0288] 

d-01,

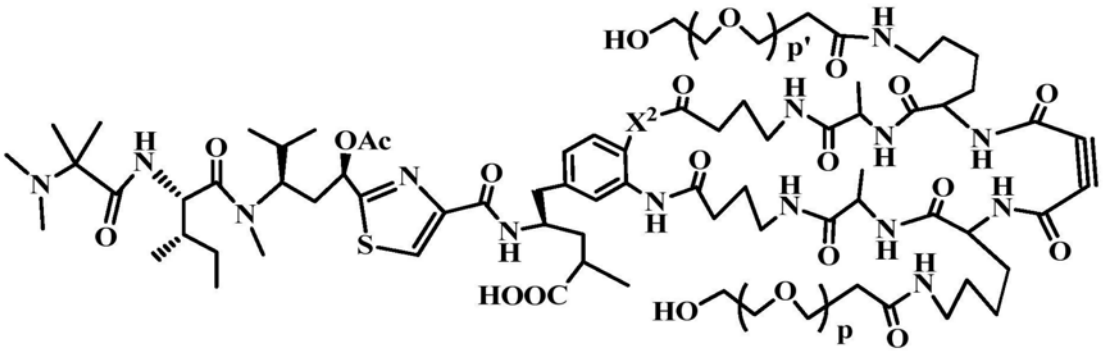


d-02,

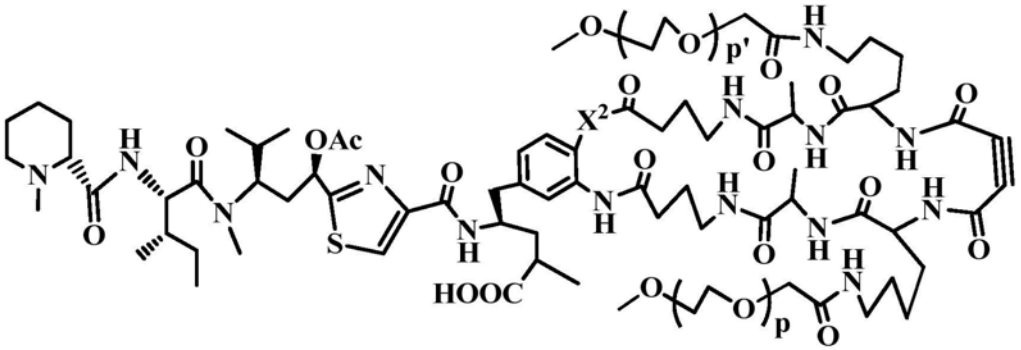


d-03,

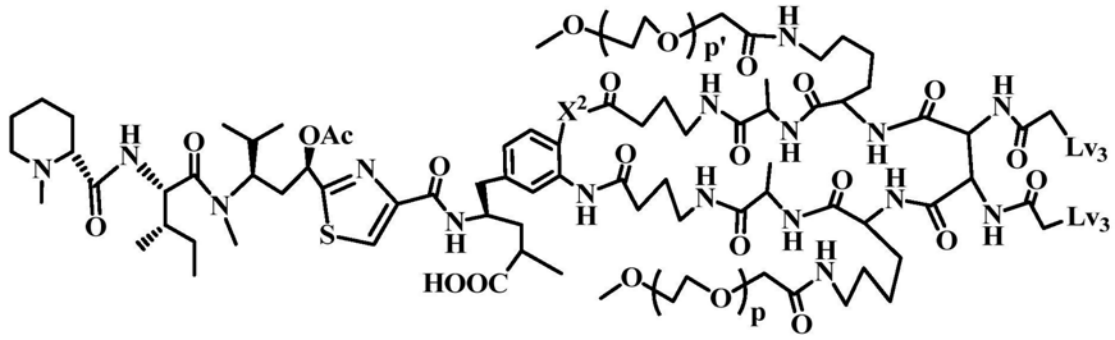
[0289]



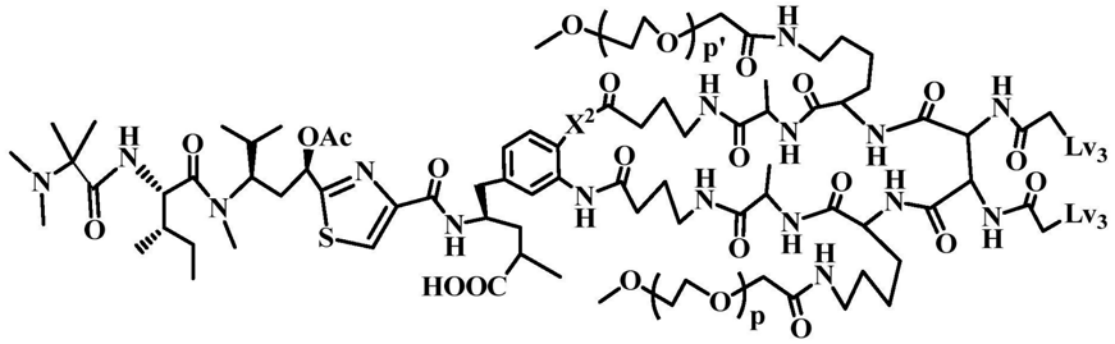
d-04,



d-05,

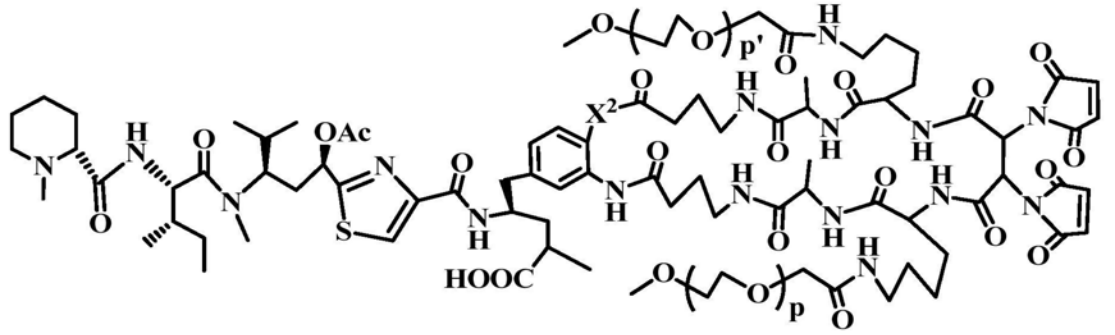


d-05,

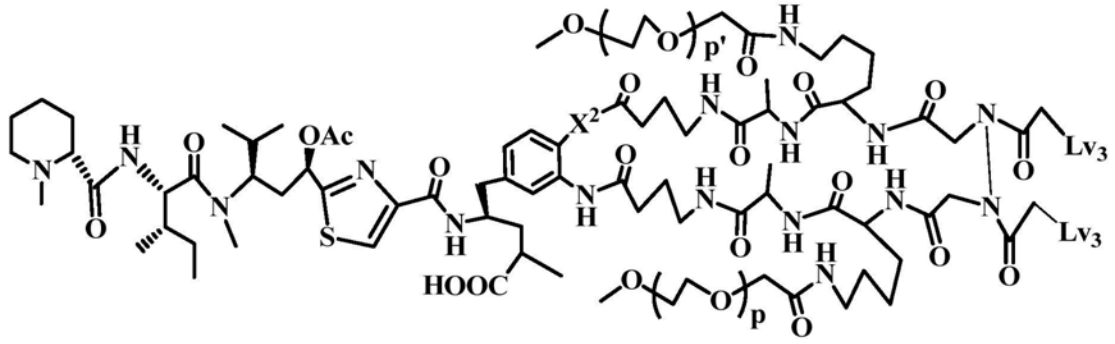


d-06,

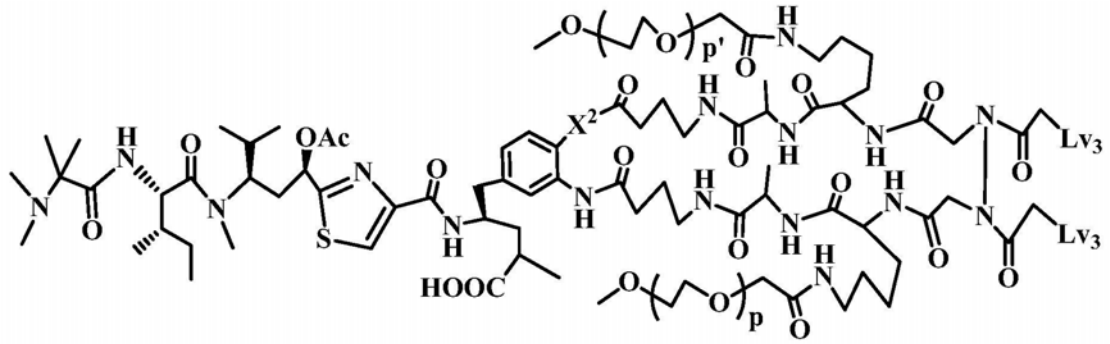
[0290]



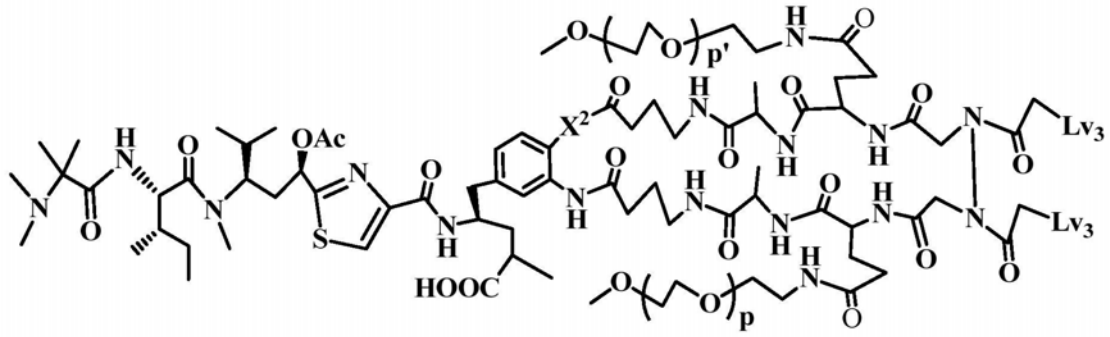
d-07,



d-08,

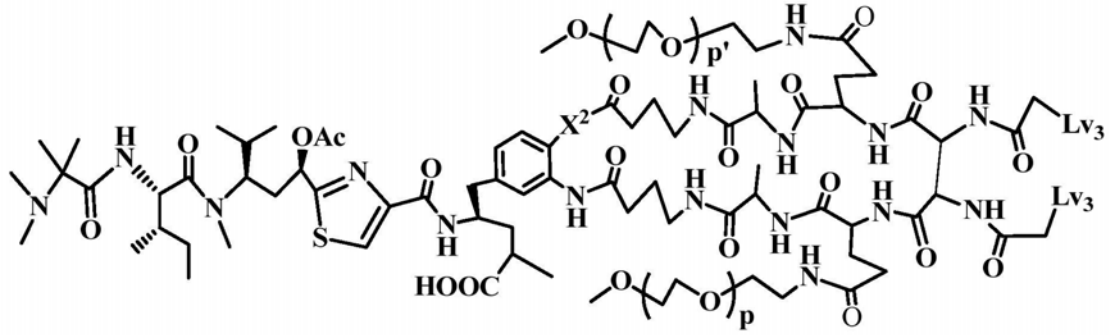


d-09,

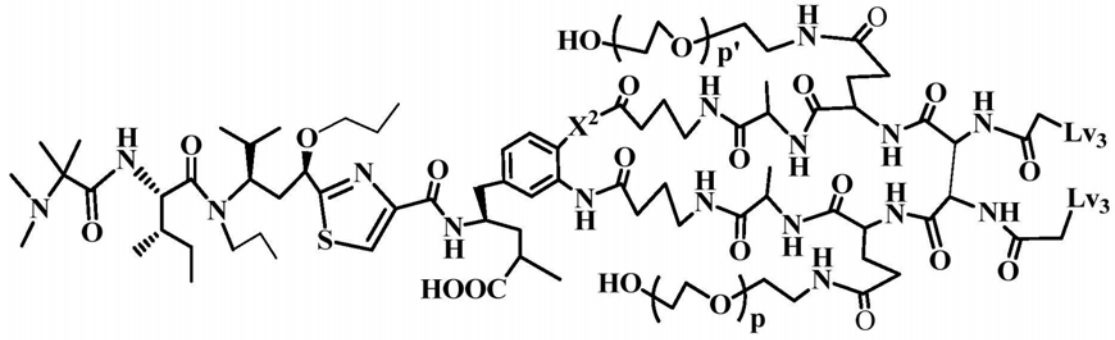


d-10,

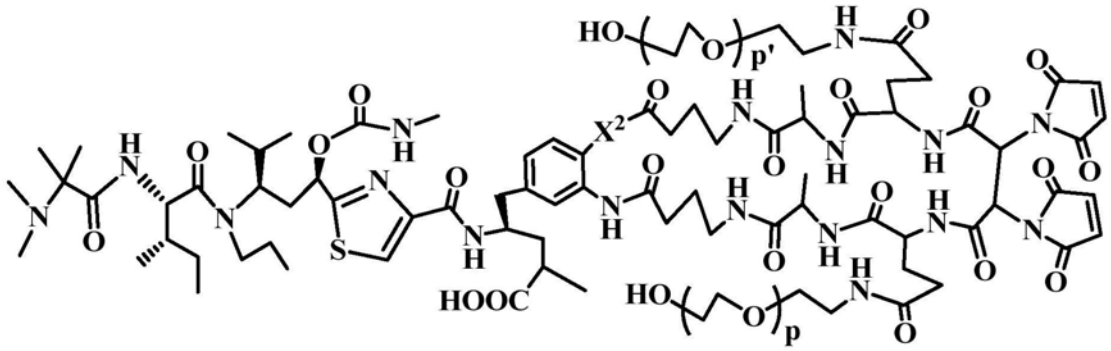
[0291]



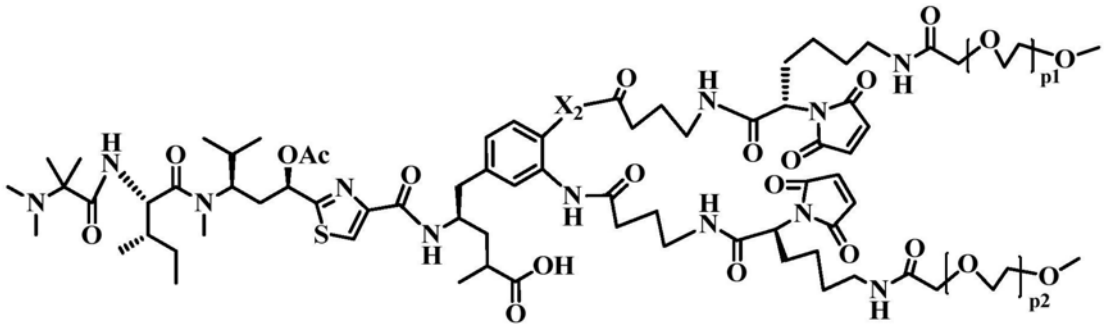
d-11,



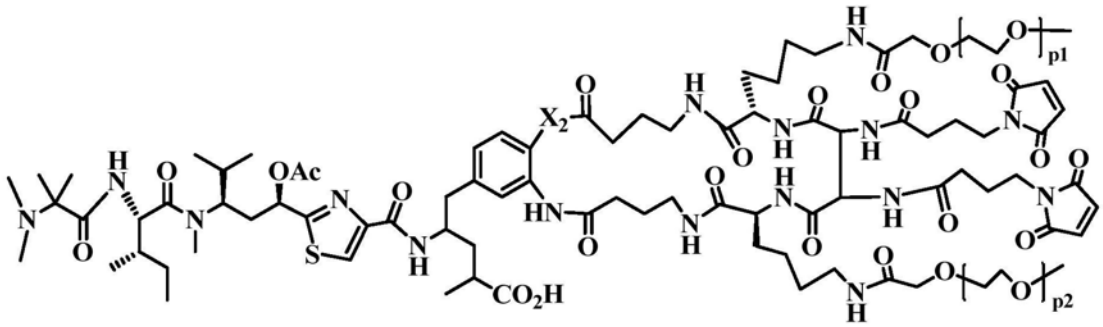
d-12,



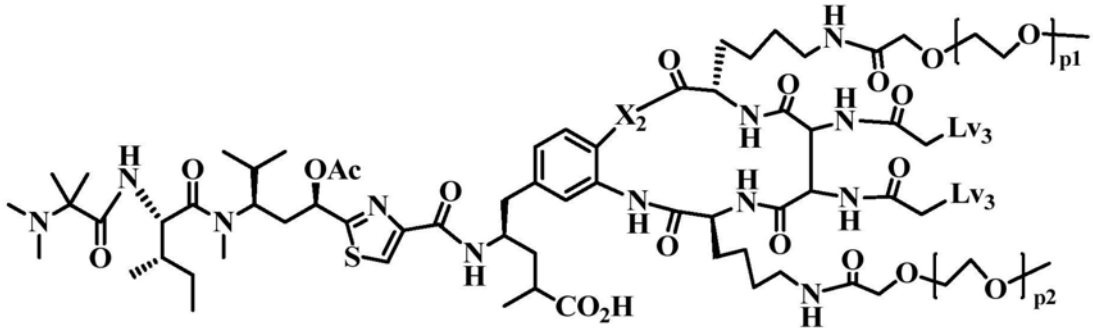
d-13,



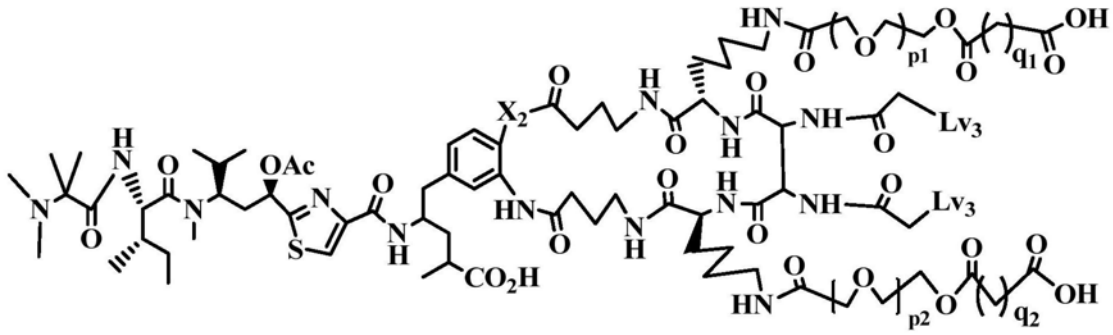
[0292] d-14,



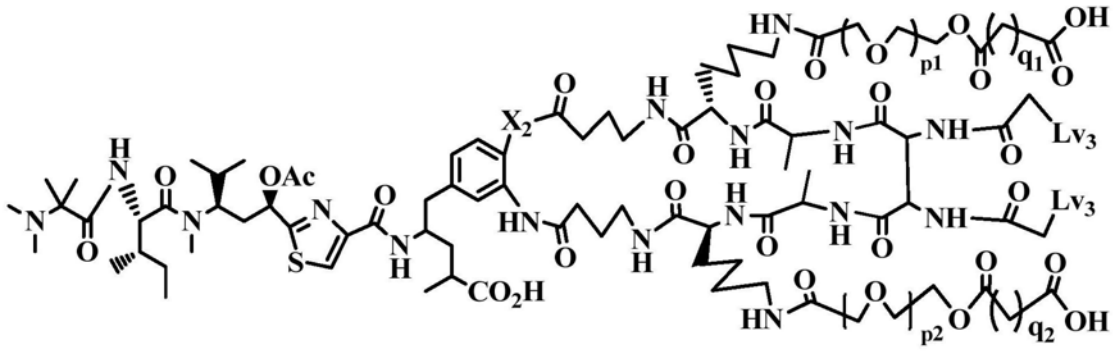
d-15,



d-16,

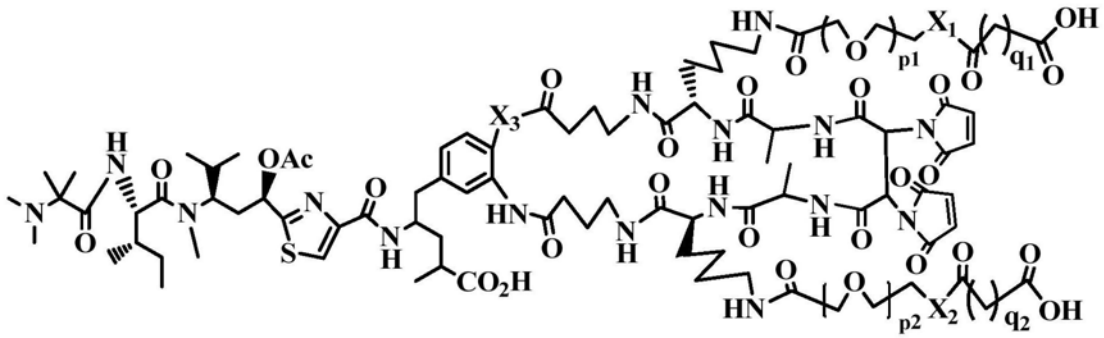


d-17,

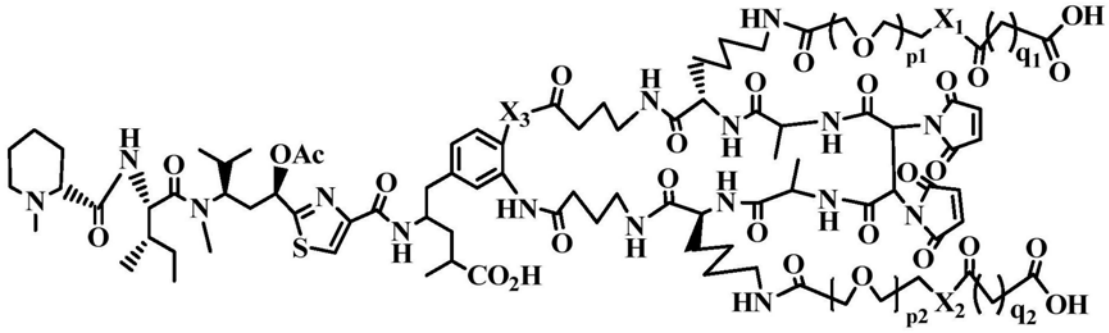


d-18,

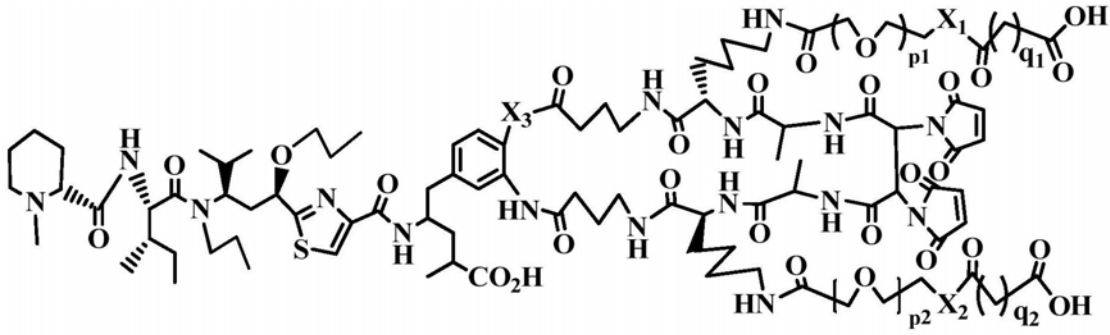
[0293]



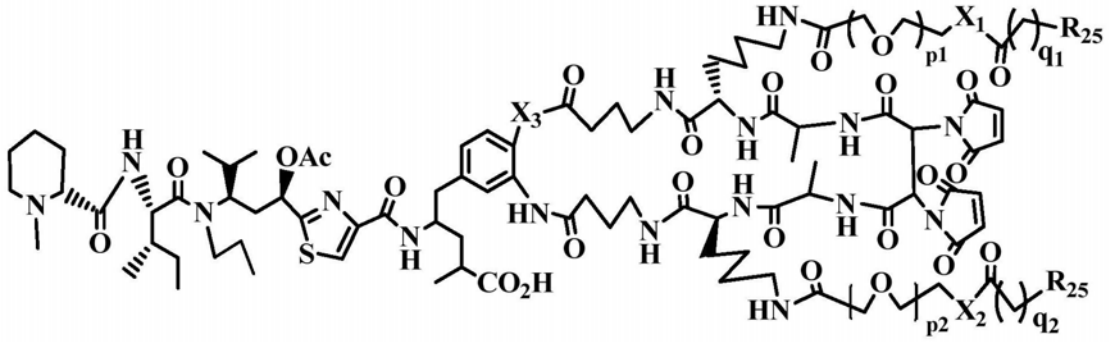
d-19,



d-20,

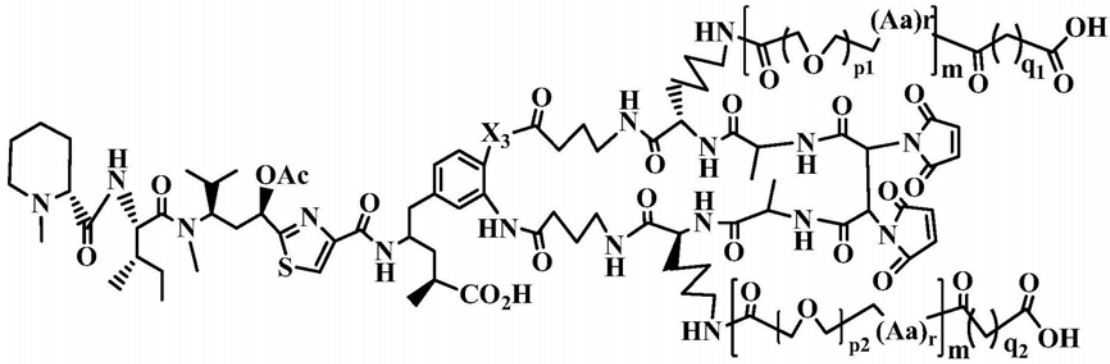


d-21,

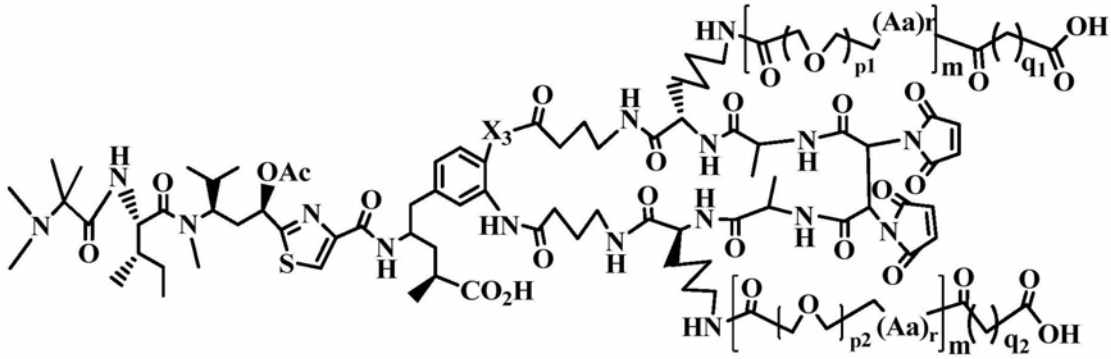


d-22,

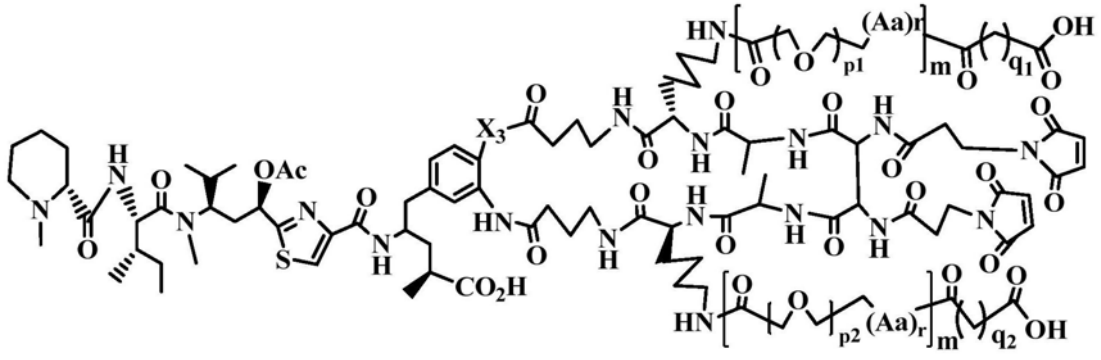
[0294]



d-23,

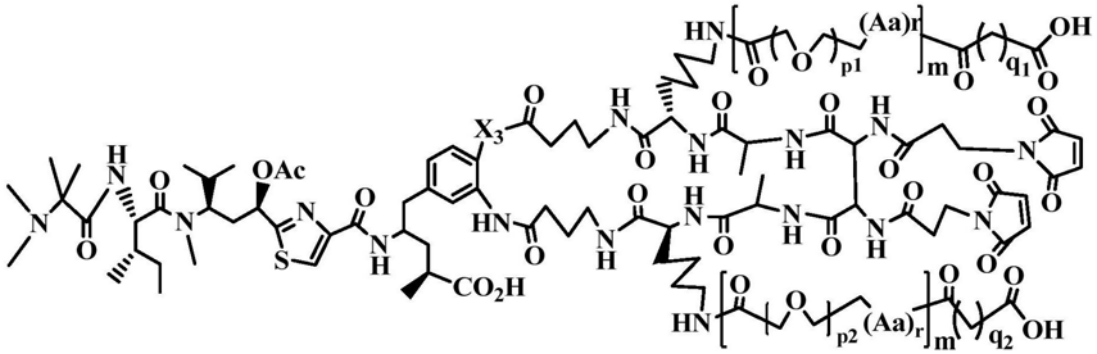


d-24,



d-25,

[0295]



d-26,

[0296] 其中X_1、X_2、X_3、Z_2、Z_3、p_1、p_2、p_3、q_1、q_2、Lv_3、$(Aa)_r$、R_{25}、$R_{25'}$及m定义如前文所述。

[0297] 本发明进一步涉及结构式(I)和(III)中细胞结合分子-Tubulysin同系物偶联物的制备方法,以及这些偶联物的应用。

[0298] 细胞结合剂或细胞结合分子T,可以是目前已知的或即将公开的,具有治疗意义或者可以被生物学方式修饰的,能够与细胞的部分相结合、复合或反应的任何种类的分子。优选的细胞结合剂或细胞结合分子是免疫治疗蛋白、抗体及单链抗体;结合靶细胞的抗体片段;单克隆抗体;单链单克隆抗体;或结合靶细胞的单克隆抗体片段;嵌合抗体;结合靶细胞的嵌合抗体片段;域抗体;结合靶细胞的域抗体片段;adnectin类抗体、DARPin蛋白、淋巴因子、激素、维生素、生长因子、集落刺激因子、营养转运分子(转铁蛋白)和/或连接在白蛋白、聚合物、树状大分子、脂质体、纳米粒子、囊泡或(病毒)衣壳上的含有四个以上氨基酸片段的细胞结合肽、蛋白质或小分子;

[0299] 优选的Lv_1和Lv_2可以与细胞结合剂或细胞结合分子上的巯基对反应。巯基最优是由细胞结合剂的链间二硫键被还原产生,还原剂选自二硫苏糖醇(DTT)、二硫赤藓糖醇(DTE)、L-谷胱甘肽(GSH)、二(2-碳氧乙基)膦(TCEP)、2-巯基乙胺(β-MEA)和/或β-巯基乙醇(β-ME,2-ME)。

[0300] 以支链连接体连接的Tubulysin同系物与细胞结合分子偶联物的制备

[0301] 图1-51说明了Tubulysin同系物与本发明中细胞结合分子偶联物的制备和以支链连接体进行偶联的合成线路。

[0302] 式(I)和(III)中的偶联物可分别由式(IV)和(V)的中间体化合物制备。通常,(IV)和(V)中的Tubulysin同系物具有Lv_1和Lv_2的官能团,可以很便利地与细胞结合分子或修饰的细胞结合分子发生反应。图1-51中说明了(IV)和(V)中Tubulysin同系物的制备和部分

(I)和(III)中偶联物的制备。

[0303] 通常情况下，为了合成式(I)中的偶联物，式(IV)中的官能团Lv_1与细胞结合分子上的一个、两个或多个基团反应，反应在0-60℃，pH 5-9的水性介质中，可添加或不添加0-30％与水能混溶的有机溶剂，如DMA、DMF、乙醇、甲醇、丙酮、乙腈、THF、异丙醇、二恶烷、丙二醇或乙二醇，然后进行透析或色谱纯化以得到式(I)中的偶联物。细胞结合分子上的反应官能团(用于偶联的基团)可以通过蛋白质工程的方法获得。

[0304] 式(III)中的偶联物也可以通过式(V)中的官能团Lv_1和Lv_2，与细胞结合分子上的两个或多个基团的反应获得，优选为细胞结合分子上通过还原双硫键产生的一对游离巯基，反应在0-60℃、pH5-9的水性介质中发生，可添加或不添加0-30％的水溶性(混溶)有机溶剂，形成偶联物分子。成对的巯基，优选是，通过还原细胞结合剂上的链间二硫键而生成，还原剂可选自二硫苏糖醇(DTT)、二硫赤藓糖醇(DTE)、L-谷胱甘肽(GSH)、三(2-羧乙基)膦(TCEP)、2-巯基乙胺(β-MEA)、或是和β巯基乙醇(β-ME，2-ME)，反应在pH4-9的水介质中进行，可加入或不加入0-30％的水溶性(混溶)有机溶剂。

[0305] 式(IV)和(V)中的Lv_1和Lv_2的反应基团独立地可以为以下基团：二硫化物、硫醇、硫酯、马来酰亚胺、卤素取代的马来酰亚胺、卤代乙酰基、迭氮化物、1-炔、酮、醛、烷氧基氨基、三氟甲磺酰基、羰基咪唑、甲苯磺酰基、甲磺酰基、2-乙基-5-苯基异恶唑-3′-磺酰基、硝基苯酚基、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、苯酚基；二硝基苯酚基、五氟苯酚基、四氟苯酚基、二氟苯酚基、单氟苯酚基、五氯苯酚基、二氯苯酚基、四氯苯酚基、1-羟基苯并三唑、酸酐或酰肼基团、酯或其他酸衍生物。可与细胞结合分子或细胞结合试剂上的一个、两个或多个基团同时或依次反应，在0-60℃、pH为4-9.5的水性介质中进行，可添加或不添加0-30％水溶性(混溶)有机溶剂、经柱层析或透析后得到式(I)和(III)的偶联物。式(IV)和(V)的Lv_1和Lv_2的反应性基团，与改性的细胞结合分子反应采用相应的不同的方式。例如，制备式(I)中含双硫键连接体的细胞结合剂-Tubulysin同系物偶联物，可以通过修饰的细胞结合剂中的二硫键与含游离巯基的Lv_1和Lv_2之间进行二硫键交换，或通过修饰的细胞结合剂中的游离巯基，与Lv_1和/或Lv_2上的二硫键进行交换。为了加速二硫化物交换反应，二硫化物基团通常选自二硫吡啶、二硫硝基吡啶、二硫硝基苯、二硫硝基苯甲酸或二硫基二硝基苯等基团。

[0306] 式(I)和(III)的偶联物中，含有硫醚键的连接通常是通过以下方式实现的：在(IV)和(V)中的修饰的细胞结合剂或Tubulysin同系物上的马来酰亚胺基或卤代乙酰基或乙基磺酰基，分别与Tubulysin同系物上的自由巯基或是修饰的细胞结合剂上的巯基反应；含有易被酸降解的腙键的连接可以通过药物-连接体或细胞结合分子上的羰基，与细胞结合分子上的或药物-连接体上的酰肼基反应而实现，这些方法是本领域熟知的(参见如P.Hamann等.,Cancer Res.53,3336-34,1993;B.Laguzza等.,J.Med.Chem.,32,548-55,1959;P.Trail等.,Cancer Res.,57,100-5,1997)；含有三唑键的连接可以通过药物-连接体或细胞结合分子上的炔基，与相应的叠氮，进行点击化学(Huisgen环加成)反应(Lutz,JF.等,2008,Adv.Drug Del.Rev.60,958-70;Sletten,EM等2011,AccChem.Research 44,666-76)而实现。含有肟键的连接可以通过药物-连接体或细胞结合分子上的酮或醛，与相应的羟胺反应而实现。含巯基的细胞结合分子可以与式(IV)和(V)中的，含有马来酰亚胺、卤代乙酰基或乙基磺酰基取代基的药物-连接体分子，在pH为5.5-9.0的缓冲液中反应，得到式(I)和(III)中以硫醚连接的偶联物。含巯基的细胞结合分子，也可以与式(IV)和(V)中

带有吡啶基二硫基的药物-连接体发生二硫键交换，得到以二硫键连接的偶联物。带有羟基或巯基的细胞结合分子可以与式(IV)和(V)中，带有卤素，特别是羧酸酯的α位卤素的药物-连接体，在温和的碱存在的情况下，比如pH为8.0-9.5，反应会得到带有醚或硫醚键的偶联药物。细胞结合分子上的羟基或氨基，可与(IV)和(V)中带有羧基的药物-连接体，在缩合剂如EDC或DCC存在的情况下，缩合生成酯连接体。含有氨基的细胞结合分子可以与药物-连接体分子上的下列基团的羧酸酯缩合，得到含酰胺键连接体的偶联物：NHS、咪唑、硝基苯酚基、苯酚基、二硝基苯酚基、五氟苯酚基、四氟苯酚基、二氟苯酚基、单氟苯酚基、五氯苯酚基、三氟甲磺酰基、二氯苯酚基、四氯苯酚基、1-羟基苯基三唑、甲苯磺酰基、甲磺酰基、2-乙基-5-苯基异恶唑基-3′-磺酰基。

[0307] 合成的偶联物可以通过标准生物化学方法纯化，例如在Sephadex G25或Sephacryl S300柱上进行凝胶过滤，吸附色谱，离子交换，或透析。在一些情况下，细胞结合剂为小分子化合物(例如叶酸、黑素细胞刺激激素、EGF等)，与小分子药物偶联后，可以通过色谱法纯化，例如HPLC、中压柱层析法或离子交换色谱法。

[0308] 为了使与优选抗体的，细胞结合分子上的一对游离巯基的偶联反应有更高产率，可能需要在反应混合物中加入少量水溶性有机溶剂或相转移剂。可将式(IV)或(V)上的交联剂(连接体)，以高浓度如1-500mM溶解于可与水混溶的极性有机溶剂中，例如不同的醇(如甲醇、乙醇和丙醇)、丙酮、乙腈、四氢呋喃(THF)、1,4-二恶烷、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基乙酰胺(DMA)或二甲基亚砜(DMSO)。同时，将细胞结合分子，如抗体以1～50mg/ml浓度溶解在pH4～9.5，最优pH6～8.5的缓冲液中，再用0.5～20当量的TCEP或DTT处理20分钟至48小时。还原后，DTT可通过SEC色谱纯化去除。TCEP也可以通过SEC色谱法去除，或者留在反应混合物中，无需进一步纯化，但最好用迭氮化物(如4-叠氮苯甲酸、4-(叠氮甲基)苯甲酸、叠氮聚乙二醇(如2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙醇)中和TCEP。此外，以TCEP还原抗体或其他细胞结合剂，可以在式(IV)或(V)的药物共存时进行，此时药物与细胞结合分子的偶联，可以与TCEP还原同时实现。

[0309] 进行修饰细胞结合剂反应的水溶液为pH4至9之间缓冲液，优选在6.0至7.5之间，并且可以含有适合用于这个pH范围的任何非亲核性缓冲盐。典型的缓冲液包括磷酸盐、乙酸盐、三乙醇胺盐酸盐、HEPES和MOPS缓冲液，也可含有其它组分，例如环糊精、羟丙基-β-环糊精、聚乙二醇、蔗糖和其它盐，如NaCl和KCl。在将式(IV)或(V)中的药物-连接体加入到含有还原的细胞结合分子的溶液中后，反应混合物在4℃至45℃，优选15℃的温度下保温。对反应进程的监测，可以测量在某一特定紫外线波长(例如252nm)吸亮度的减少，或某一特定紫外线波长(例如280nm)吸亮度的增加，或选择其它适当波长。反应完成后，被修饰的细胞结合剂可以以常规方式被分离，例如使用凝胶过滤色谱、离子交换色谱、吸附色谱，硅胶或氧化铝柱层析色谱，结晶、制备薄层色谱或HPLC方法。

[0310] 可以通过测量反应生成的硝基吡啶硫酮、二硝基吡啶二硫酮、吡啶硫酮、羧基酰胺基吡啶二硫酮和二羧基酰氨基吡啶二硫酮基团的紫外吸亮度，对修饰程度进行评估。对于没有发色基团分子的偶联反应、修饰或偶联反应可以通过LC-MS监测、优选HPLC-MS/MS、UPLC-QTOF质谱或毛细管电泳质谱法(CE-MS)监测。本发明所述的支链连接体含有多种官能团，可与细胞结合分子，尤其是具有合适取代基的修饰的细胞结合分子反应。例如，带有氨基或羟基的修饰的细胞结合分子，可以与带有N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯的药物反应，带有

巯基的修饰的细胞结合分子，可以与带有马来酰亚胺基或卤代乙酰基的药物反应。另外，通过蛋白质工程、酶促反应或化学修饰得到的带有羰基(酮或醛)的修饰的细胞结合分子，可以与带有酰肼或烷氧基胺的药物反应。基于修饰的细胞结合分子上官能团的反应活性，本领域技术人员可以很容易地确定使用哪种药物-连接体分子。

[0311] 细胞结合剂

[0312] 本发明中的细胞结合剂，包括偶联物内和被修饰的细胞结合剂，可以是目前已知的或即将公开的，能够与细胞片段结合，复合或反应的，具有治疗意义或者被生物学修饰的任何种类分子。

[0313] 细胞结合剂包括，但不仅限于大分子量蛋白质，例如完整抗体(多克隆抗体，单克隆抗体，二聚体，多聚体，多特异性抗体，例如双特异性抗体)；单链抗体；抗体片段如Fab，Fab'，$F(ab')_2$，F_v(Parham，J.Immunol.1983，131，2895-2902)；由Fab表达库产生的片段，抗独特型(抗-Id)抗体；CDR；双价抗体；三价抗体；四价抗体；微型抗体；小免疫蛋白；上述任何抗体的表位结合片段，能免疫特异性结合癌细胞抗原，病毒抗原，微生物抗原；由免疫系统产生的蛋白质，能够识别、结合特定抗原或具有期望的生物学活性(Miller et al J.of Immunology 2003，170，4854-4861)；干扰素(如I，II，III型)；多肽；淋巴因子如IL-2，IL-3，IL-4，IL-5，IL-6，IL-10，GM-CSF，干扰素-γ(IFN-γ)；激素例如胰岛素，TRH(促甲状腺激素释放激素)，MSH(促黑素细胞激素)，类固醇激素如雄激素和雌激素；生长因子和集落刺激因子，如表皮生长因子(EGF)，粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)，转化生长因子(TGF)如TGFα，TGFβ，胰岛素和胰岛素样生长因子(IGF-I，IGF-II)，G-CSF，M-CSF和GM-CSF(Burgess，Immunology Today 1984，5，155-158)；牛痘生长因子(VGF)；成纤维细胞生长因子(FGF)；小分子量的蛋白质；多肽；肽和肽激素，如铃蟾肽，胃泌素，胃泌素释放肽；血小板衍生的生长因子；白细胞介素和细胞因子，例如，白细胞介素-2(IL-2)，白细胞介素-6(IL-6)，白血病抑制因子，粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)；维生素，如叶酸；脱辅基蛋白和糖蛋白，如转铁蛋白(O'Keefe et al，J.Biol.Chem.1985 260 932-937)；糖结合蛋白或脂蛋白，如凝集素；细胞营养传递分子；小分子抑制剂，如前列腺特异性膜抗原(PSMA)抑制剂和小分子酪氨酸激酶抑制剂(TKI)，非肽或任何其它细胞结合分子或物质，如生物活性聚合物(Dhar，et al，Proc.Natl.Acad.Sci.2008，105，17356-61)，融合蛋白，激酶抑制剂，基因靶向剂，生物活性树枝状大分子(Lee，et al，Nat.Biotechnol.2005，23，1517-26；Almutairi，et al；Proc.Natl.Acad.Sci.2009，106，685-90)，纳米粒子(Liong，et al，ACS Nano，2008，19，1309-12；Medarova，et al，Nat.Med.2007，13，372-7；Javier，et al，Bioconjugate Chem.2008，19，1309-12)，脂质体(Medinai，et al，Curr.Phar.Des.2004，10，2981-9)和病毒外壳(Flenniken，et al，Viruses Nanotechnol.2009，327，71-93)。

[0314] 一般而言，如果适当的单克隆抗体是可用的，则优选单克隆抗体作为细胞表面结合剂。抗体可以是鼠源，人源，人源化，嵌合或源于其他物种。

[0315] 用于本发明中的抗体的生产包括体内或体外方法或其组合。生产多克隆抗受体肽抗体的方法在本领域是公知的，例如美国专利4，493，795中所述。通常是通过将骨髓瘤细胞，与已经用所需抗原免疫的小鼠的脾细胞融合，来制备单克隆抗体(Köhler，G.；Milstein，C.Nature1975，256:495-497)。详细的过程在"Antibodies--A Laboratory Manual，Harlow and Lane，eds.，Cold Spring Harbor Laboratory Press，New York(1988)"中有描述，此

处引作参考。具体地，可以用目标抗原，如从靶细胞、完整的病毒、灭活的全病毒和病毒蛋白质分离的抗原，来免疫小鼠，大鼠，仓鼠或任何其它哺乳动物而制备。通常使用聚乙二醇(PEG)6000将脾细胞与骨髓瘤细胞融合。通过对HAT(次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶)的敏感性来筛选融合细胞。通过它们免疫反应特异性受体的能力或抑制靶细胞上的受体活性的能力，可以确定实施本发明的单克隆抗体的杂交瘤。

[0316] 用于本发明中的单克隆抗体的生产在单克隆杂交瘤培养物里进行，其中包含营养培养基和能分泌具有合适抗原特异性的抗体分子的杂交瘤。培养物在合适的条件下保持足够长的一段时间，以使杂交瘤将抗体分子分泌到培养基。然后收集含有抗体的培养基。使用通过公知的技术进一步分离抗体分子，如蛋白质A亲和层析，阴离子、阳离子、疏水或体积排阻色谱法(特别是通过蛋白质A亲和层析和体积排阻色谱法)，离心，差异溶解度或任何其他纯化蛋白质的标准技术。

[0317] 可用于制备这些组合物的培养基在本领域中是公知的，并且可商业获得，也包括合成培养基。一个合成的培养基的例子是Dulbecco最少必需培养基(DMEM;Dulbecco et al.,Virol.1959,8,396)补充有4.5g/ml葡萄糖，0-20mM谷氨酰胺，0-20％胎牛血清，几个ppm的Cu，Mn，Fe或Zn等重金属或/和重金属盐，以及消泡剂如聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物。

[0318] 另外，生产抗体的细胞系也可以通过融合以外的技术来获得，例如将成瘤DNA移植至B淋巴细胞，或成瘤病毒转染，如爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV，也称为人类疱疹病毒4(HHV-4))或卡波西肉瘤相关疱疹病毒(KSHV)，见于美国专利4,341,761;4,399,121;4,427,783;4,444,887;4,451,570;4,466,917;4,472,500;4,491,632;4,493,890。单克隆抗体也可以通过含末端羧基的抗受体肽或肽制备，这些都为如本领域所公知，可参考文献Niman et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1983,80:4949-4953;Geysen et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1985,82:178-182;Lei et al.Biochemistry 1995,34(20):6675-6688。通常，作为产生抗受体肽单克隆抗体免疫原，抗受体肽或肽同系物可以单独使用或连接至免疫原性载体。

[0319] 用作本发明中结合分子的单克隆抗体也可以通过其他本领域已知的技术获得。特别有用的是制造完整人源抗体的方法。一种方法是噬菌体显示技术，它使用亲和富集的方式，可用于选择能与抗原特异性结合的人源抗体。噬菌体展示技术在文献中也有详细描述，噬菌体展示库的构建和筛选在本领域也是众所周知的，可参考文献Dente et al,Gene.1994,148(1):7-13;Little et al,Biotechnol Adv.1994,12(3):539-55;Clackson et al.,Nature 1991,352:264-628;Huse et al.,Science1989,246:1275-1281。

[0320] 通过与非人如小鼠细胞融合的杂交瘤产生的单克隆抗体，可以被人源化以避免产生人类抗小鼠抗体。常见的抗体人源化方法是互补决定区移植技术，这些方法也已被详细地描述，如美国专利5,859,205和6,797,492;Liu et al,Immunol Rev.2008,222:9-27;Almagro et al,Front Biosci.2008,13:1619-33;Lazar et al,MolImmunol.2007,44(8):1986-98;Li et al,Proc.Natl.Acad.Sci.U S A.2006,103(10):3557-62，此处引为参考。完整人抗体也可以通过用免疫原免疫携带大部分的人类球蛋白重轻链的转基因小鼠、兔子、猴子或其他哺乳动物来制备。这些老鼠的例子有:Xenomouse(Abgenix/Amgen)，HuMAb-Mouse(Medarex/BMS)和VelociMouse(Regeneron)，参考美国专利6,596,541,6,207,418,6,

150,584,6,111,166,6,075,181,5,922,545,5,661,016,5,545,806,5,436,149和5,569,825。用于人类治疗时,小鼠的可变区域和人的恒定区域也可以被融合,成为“嵌合抗体”,它在人类身上的免疫原性显著低于小鼠单抗(Kipriyanov et al,MolBiotechnol.2004,26:39-60;Houdebine,CurrOpinBiotechnol.2002,13:625-9)。另外,在抗体可变区域的定点诱变能导致抗体具有较高的亲和性和特异性(Brannigan et al,Nat Rev Mol Cell Biol.2002,3:964-70;Adams et al,J Immunol Methods.1999,231:249-60),抗体恒定区域的改变可以提高其介导结合和细胞毒性的效应功能。

[0321] 恶性肿瘤细胞抗原的免疫特异性抗体也可以从商业途径获得或通过任何已知方法生产,例如化学合成或重组表达技术。对恶性肿瘤细胞抗原具有免疫特异性的抗体的核苷酸序列编码可以商业获得,例如从GenBank数据库或类似数据库,文献出版物获得,或从常规克隆和测序得到。

[0322] 除了抗体之外,与目标细胞上的表位或相应的受体相互作用(结合、阻断、靶向或其他类型作用)的一种肽或蛋白质也可以作为结合分子。这些肽或蛋白质可能是任何随机的肽或蛋白质,它们对表位或相应的受体有亲和力,不一定非得是免疫球蛋白家族成员。这些肽可以通过类似噬菌体显示抗体的技术分离出来(Szardenings,J Recept Signal Transduct Res.2003;23(4):307-49)。从随机肽库中获得的肽可以同抗体和抗体片段类似地被使用。肽或蛋白质结合分子可以偶联或连接至大分子或其他物质,包括但不限于白蛋白、聚合物、脂质体、纳米粒子、树形分子,只要这样的连接能保留肽或蛋白质的抗原结合特异性。

[0323] 在治疗癌症、自身免疫性疾病和/或传染性疾病的偶联物上,和药物分子通过本发明的连接体连接的抗体的例子包括,但不限于3F8(抗GD2),阿巴单抗(抗CA-125),阿昔单抗(抗CD41(整联蛋白α-IIb),阿达木单抗(抗TNF-α),Adecatumumab(抗EpCAM,CD326),阿非莫单抗(抗TNF-α),Afutuzumab(抗CD20),Alacizumab单抗(抗VEGFR2),ALD518(抗IL-6),Alemtuzumab(Campath,MabCampath,抗CD52),Altumomab(抗CEA),Anatumomab(抗TAG-72),Anrukinzumab(IMA-638,抗-IL-13),Apolizumab(抗-HLA-DR),阿奇单抗(抗-CEA),阿塞珠单抗(抗-L-选择蛋白CD62L),Atlizumab(tocilizumab,Actemra,RoActemra,抗-IL-6受体),Atorolimumab(抗-Rhesus因子),Bapineuzumab(抗-β淀粉样蛋白),Basiliximab(Simulect,抗CD25(IL-2受体的α链)),Bavituximab(抗磷脂酰丝氨酸),Bectumomab(LymphoScan,抗-CD22),贝利单抗(Benlysta,LymphoStat-B,抗BAFF),Benralizumab(抗CD125),Bertilimumab(抗CCL11(eotaxin-1)),Besilesomab(Scintimun,抗CEA相关抗原),贝伐单抗(Avastin,抗VEGF-A),Biciromab(FibriScint,抗纤维蛋白IIβ链),Bivatuzumab(抗-CD44v6),Blinatumomab(BiTE,抗CD19),Brentuximab(cAC10,抗-CD30 TNRSF8),Briakinumab(抗IL-12,IL-23),Canakinumab(Ilaris,抗IL-1),Cantuzumab(C242,抗CanAg),Capromab,Catumaxomab(Removab,抗EpCAM,抗CD3),CC49(抗TAG-72),Cedelizumab(抗CD4),Certolizumab单抗(Cimzia抗TNF-α),西妥昔单抗(爱必妥,IMC-C225,抗EGFR),Citatuzumab bogatox(抗EpCAM),Cixutumumab(抗IGF-1),Clenoliximab(抗CD4),Clivatuzu-mab(抗MUC1),Conatumumab(抗TRAIL-R2),CR6261(抗流感A血凝素),Dacetuzumab(抗CD40),Daclizumab(Zenapax,抗CD25(IL-2受体α链)),Daratumumab(抗CD38(环ADP核糖水解酶),Denosumab(Prolia,抗RANKL),Detumomab(抗B淋巴瘤细胞),

Dorlimomab,Dorlixizumab,Ecromeximab(抗GD3神经节苷脂),Eculizumab(Soliris,抗-C5),Edobacomab(抗内毒素),Edrecolomab(Panorex,MAb17-1A,抗-EpCAM),Efalizumab(Raptiva,抗LFA-1(CD11a)),Efungumab(Mycograb,抗Hsp90),Elotuzumab(抗SLAMF7),Elsilimomab(抗IL-6),Enlimomab单抗(抗ICAM-1(CD54)),Epitumomab(抗episialin),依他珠单抗(抗-CD22),Erlizumab(抗-ITGB2(CD18)),Ertumaxomab(Rexomun,抗HER2/neu,CD3),依他拉单抗(Abegrin,抗整联蛋白αvβ3),Exbivirumab(抗乙肝表面抗原),Fanolesomab(NeutroSpec,抗CD15),Faralimomab(抗干扰素受体),Farletuzumab(抗叶酸受体1),Felvizumab(抗呼吸道合胞病毒),Fezakinumab(抗-IL-22),Figitumumab(抗-IGF-1受体),Fontolizumab(抗-IFN-γ),Foravirumab(抗狂犬病病毒糖蛋白),Fresolimumab(抗TGF-β),Galiximab(抗CD80),Gantenerumab(抗β淀粉样蛋白),Gavilimomab(抗CD147(basigin)),Gemtuzumab(抗CD33),Girentuximab(抗碳酸酐酶9),Glembatumumab(CR011,抗GPNMB),Golimumab(Simponi,抗-TNF-α),Gomiliximab(抗-CD23(IgE受体)),Ibalizumab(抗-CD4),Ibritumomab(抗CD20),Igovomab(Indimacis-125,抗CA-125),Imciromab(Myoscint,抗心肌肌凝蛋白),Infliximab(Remicade,抗TNF-α),Intetumumab(抗CD51),Inolimomab(抗CD25(IL-2受体α链),伊珠单抗(抗-CD22),Ipilimumab(抗CD152),Iratumumab(抗CD30(TNFRSF8)),Keliximab(抗-CD4),Labetuzumab(CEA-Cide,抗CEA),Lebrikizumab(抗IL-13),Lemalesomab(抗NCA-90(粒细胞抗原)),Lerdelimumab(抗TGFβ2),Lexatumumab(抗TRAIL-R2),Libivirumab(抗乙肝表面抗原),Lintuzumab(抗CD33),鲁米木单抗(抗CD40),鲁米单抗(抗CD23(IgE受体),Mapatumumab(抗TRAIL-R1),马西莫单抗(抗T-细胞受体),马妥珠单抗(抗EGFR),Mepolizumab(Bosatria,抗IL-5),Metelimumab(抗TGFβ1),Milatuzumab(抗CD74),Minretumomab(抗TAG-72),Mitumomab(BEC-2,抗GD3神经节苷脂),Morolimumab(抗恒河猴因子),Motavizumab(Numax,抗呼吸道合胞病毒),Muromonab-CD3(Orthoclone OKT3,抗CD3),Nacolomab(抗C242),Naptumomab(抗5T4),那他珠单抗(Tysabri,抗整联蛋白α4),奈巴单抗(抗内毒素),Necitumumab(抗EGFR),Nerelimomab(抗-TNF-α),Nimotuzumab(Theracim,Theraloc,抗-EGFR),Nofetumomab,Ocrelizumab(抗CD20),奥利木单抗(Afolimomab,抗LFA-1(CD11a)),Ofatumumab(Arzerra,抗CD20),Olaratumab(抗PDGF-Rα),Omalizumab(Xolair,抗IgE Fc区)Oportuzumab(抗EpCAM),Oregovomab(OvaRex,抗CA-125),Otelixizumab(抗CD3),Pagibaximab(抗脂磷壁酸),Palivizumab(Synagis,Abbosynagis,抗呼吸道合胞病毒),帕尼单抗(Vectibix,ABX-EGF,抗EGFR),Panobacumab(抗铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)),帕考珠单抗(抗IL-4),Pemtumomab(Theragyn,抗MUC1),Pertuzumab(Omnitarg,2C4,抗HER2/neu),Pexelizumab(抗C5),Pintumomab(抗腺癌抗原),Priliximab(抗-D4),Pritumumab(抗波形蛋白),PRO140(抗-CCR5)Racotumomab(1E10,抗-N-羟乙酰神经氨酸(NeuGc,NGNA)-神经节苷脂GM3)),Rafivirumab(抗狂犬病病毒糖蛋白),Ramucirumab(抗VEGFR2),Ranibizumab(Lucentis,抗VEGF-A),Raxibacumab(抗炭疽毒素,保护性抗原),Regavirumab(抗巨细胞病毒糖蛋白B),Reslizumab(抗-IL-5),Rilotumumab(抗-HGF),Rituximab(MabThera,Rituxanmab,抗-CD20),Robatumumab(抗-IGF-1受体),Rontalizumab(抗IFN-α),Rovelizumab(LeukAr-rest,抗CD11,CD18),Ruplizumab(Antova,抗CD154(CD40L)),Satumomab(抗TAG-72),Sevirumab(抗巨细胞病毒),Sibrotuzumab(抗FAP),西法木单抗(抗

IFN-α),Siltuximab(抗IL-6),Siplizumab(抗CD2),Smart MI95(抗CD33),Solanezumab(抗β淀粉状蛋白),Sonepcizumab(抗鞘氨醇-1-磷酸),Sontuzumab(抗-episialin),Stamulumab(抗-myostatin),Sulesomab(LeukoScan,抗NCA-90(粒细胞抗原)),Tacatuzumab(抗α甲胎蛋白),Tadocizumab(抗整联蛋白αIIbβ3),Talizumab(抗IgE),Tanezumab(anti-NGF),Taplitumomab(抗CD19),Tefibazumab(Aurexis,(抗凝聚因子A)),Telimomab,Tenatumomab(抗腱生蛋白C),Teneliximab(抗CD40),Teplizumab(抗CD3),TGN1412(抗CD28),Ticilimumab(Tremelimumab,抗-CTLA-4),Tigatuzumab(抗TRAIL-R2),TNX-650(抗IL-13),Tocilizumab(Atlizumab,Actemra,RoActemra,IL-6受体),Toralizumab(抗CD154(CD40L)),Tositumomab(抗CD20),曲妥珠单抗(赫赛汀,抗HER2/neu),Tremelimumab(抗CTLA-4),Tucotuzumab celmoleukin(抗EpCAM),Tuvirumab(抗乙型肝炎病毒),Urtoxazumab(抗大肠杆菌),Ustekinumab(Stelara,抗-IL-12,IL-23),Vapaliximab(抗-AOC3(VAP-1)),维多珠单抗(抗整联蛋白α4β7),维妥珠单抗(抗CD20),Vepalimomab(抗AOC3(VAP-1)),Visilizumab(Nuvion,抗CD3),Vitaxin(抗血管整合素avb3),Volociximab(抗整联蛋白α5β1),Votumumab(HumaSPECT,抗肿瘤抗原CTAA16.88),Zalutumumab(HuMax-EGFR,Zanolimumab(HuMax-CD4,抗-CD4),Ziralimumab(抗-CD147(basigin)),Zolimomab(抗-CD5),依那西普(Enbrel®),Alefacept(Amevive®),Abatacept(Orencia®),Rilonacept(Arcalyst),14F7(抗IRP-2(铁调节蛋白2)),14G2a(抗GD2神经节苷脂,源于Nat.Cancer Inst.,治疗黑素瘤和实体瘤),J591(抗-PSMA,源于Weill Cornell医学院,治疗前列腺癌),225.28S(抗HMW-MAA(高分子量黑素瘤相关抗原),Sorin Radiofarmaci SRL(源于意大利米兰,治疗黑色素瘤),COL-1(抗CEACAM3,CGM1,源于Nat Cancer Inst.治疗结肠直肠癌和胃癌),CYT-356(oncoltad®,治疗前列腺癌),HNK20(OraVax Inc.治疗呼吸道合胞病毒感染),ImmuRAIT(源于Immunomedics,治疗NHL),Lym-1(抗HLA-DR10,Peregrine Pharm),MAK-195F(抗TNF(肿瘤坏死因子,TNFA,TNF-α,TNFSF2,源于Abbott/Knoll,治疗脓毒症中毒性休克),MEDI-500(T10B9,抗CD3,TRαβ(T细胞受体α/β),源于MedImmune Inc,用于移植物抗宿主疾病病),RING SCAN(抗TAG 72(肿瘤相关糖蛋白72),源于Neoprobe Corp.,用于乳腺癌,结肠癌和直肠癌),Avicidin(抗EPCAM(上皮细胞粘附分子)),抗-TACSTD1(肿瘤相关钙信号转导1),抗GA733-2(胃肠肿瘤相关蛋白2),抗EGP-2(上皮糖蛋白2),抗KSA,KS1/4抗原,M4S,肿瘤抗原17-1A,CD326(源于NeoRx公司,治疗结肠癌,卵巢癌,前列腺癌和NHL),LymphoCide(源于Immunomedics),Smart ID10(源于Protein Design Labs),Oncolym(源于Techniclone Inc),Allomune(源于BioTransplant),抗VEGF(源于Genentech),CEAcide(源于Immunomedics),IMC-1C11(源于ImClone Systems)和Cetuximab(源于ImClone)。

[0324] 其他可作为细胞结合分子/配体的抗体,包括但不限于,以下抗原的抗体:氨肽酶N(CD13),膜联蛋白A1,B7-H3(CD276,各种癌症),CA125(卵巢癌),CA15-3(各种癌症),CA19-9(各种癌症),L6(各种癌症),路易斯Y(各种癌症),路易斯X(各种癌症),甲胎蛋白(各种癌症),CA242(结直肠癌),胎盘碱性磷酸酶(各种癌症),前列腺特异抗原(前列腺癌),前列腺酸磷酸酶(前列腺癌),表皮生长因子(各种癌症),CD2(霍奇金症,NHL淋巴瘤,多发性骨髓瘤),CD3ε(T细胞淋巴瘤,肺癌,乳腺癌,胃癌,卵巢癌,自身免疫性疾病,恶性腹水),CD19(B细胞恶性肿瘤),CD20(非霍奇金淋巴瘤),CD22(白血病,淋巴瘤,多发性骨髓瘤,SLE),CD30

(霍奇金淋巴瘤),CD33(白血病,自身免疫性疾病),CD38(多发性骨髓瘤),CD40(淋巴瘤,多发性骨髓瘤,白血病(CLL)),CD51(转移性黑色素瘤,肉瘤),CD52(白血病),CD56(小细胞肺癌,卵巢癌,梅克细胞癌,以及液体肿瘤,多发性骨髓瘤),CD66e(各种癌症),CD70(转移性肾细胞癌和非霍奇金淋巴瘤),CD74(多发性骨髓瘤),CD80(淋巴瘤),CD98(各种癌症),粘液素(各种癌症),CD221(实体肿瘤)、CD227(乳腺癌、卵巢癌)、CD262(非小细胞肺癌及其他癌症)、CD309(卵巢癌)、CD326(实体肿瘤)、CEACAM3(结肠直肠癌、胃癌)、CEACAM5(癌胚抗原,CEA,CD66e)(乳腺,结直肠癌和肺癌),DLL4,EGFR(表皮生长因子受体,各种癌症),CTLA4(黑色素瘤),CXCR4(CD184,血液肿瘤,实体肿瘤),Endoglin(CD105,实体瘤),EPCAM(上皮细胞粘附分子,膀胱癌,头颈癌,结肠癌,NHL前列腺癌,卵巢癌),ERBB2(表皮生长因子受体2,肺癌,乳腺癌,前列腺癌),FCGR1(自身免疫性疾病),FOLR(叶酸受体,卵巢癌),GD2神经节苷(各种癌症),G-28(细胞表面抗原糖脂质,黑色素瘤),GD3独特型(各自癌症),热休克蛋白(各种癌症),HER1(肺癌,胃癌),HER2(乳腺癌,肺癌和卵巢癌),HLA-DR10(NHL),HLA-DRB(NHL,B细胞白血病),人绒毛膜促性腺激素(各种癌症),IGF1R(类胰岛素生长因子1受体,实体瘤,血癌),IL-2受体(白介素2受体,T细胞白血病和淋巴瘤),IL-6R(白介素6受体,多发性骨髓瘤,风湿性关节炎,Castleman病,白细胞介素6依赖肿瘤),整合蛋白(αvβ3、α5β1、α6β4、αllβ3、α5β5、αvβ5,各种癌症),MAGE-1(各种癌症),MAGE-2(各种癌症),MAGE-3(各种癌症),MAGE 4(各种癌症),抗转铁蛋白受体(各种癌症),p97(黑色素瘤),MS4A1(跨膜4结构域亚家族A成员1,非霍奇金B细胞淋巴瘤,白血病),MUC1或MUC1-KLH(乳腺癌、卵巢癌、子宫颈癌、支气管癌和α胃肠道癌),MUC16(CA125)(卵巢癌),CEA(结直肠癌),gp100(黑色素瘤),MART1(黑色素瘤),MPG(黑素瘤),MS4A1(跨膜4结构域亚家族A成员1,小细胞肺癌,NHL),Nucleolin,Neu癌基因产物(各自癌症),P21(各种癌),抗(N-羟乙酰神经氨酸)抗体结合部位(乳腺癌,黑色素瘤),类PLAP睾丸碱性磷酸酶(卵巢癌、睾丸癌),PSMA(前列腺瘤),PSA(前列腺癌),ROBO4,TAG 72(肿瘤相关糖蛋白72,AML,胃癌、结肠直肠癌、卵巢癌),T细胞跨膜蛋白(各种癌症),Tie(CD202b),TNFRSF10B(肿瘤坏死因子受体超家族成员10B,各种癌症),TNFRSF13B(肿瘤坏死因子受体超家族成员13B,多发性骨髓瘤,NHL,其他癌症,RA和SLE),TPBG(滋养细胞糖蛋白,肾细胞癌),TRAIL-R1(TNF相关坏死诱导配体受体1,淋巴瘤,NHL,结直肠癌,肺癌),VCAM-1(CD106,黑色素瘤),VEGF,VEGF-a,VEGF-2(CD309)(各种癌症)。其它可被抗体识别的,肿瘤相关抗原已被总结和评述(Gerber,et al,mAbs 2009,1:3,247-253;Novellino et al,Cancer ImmunolImmunother.2005,54(3),187-207;Franke,et al,Cancer BiotherRadiopharm.2000,15,459-76)。

[0325] 细胞结合剂,优选为抗体,能够抗以下细胞:肿瘤细胞,病毒感染细胞,微生物感染细胞,寄生虫感染细胞,自身免疫细胞,活化的细胞,骨髓细胞,活化的T细胞,B细胞,或黑色素细胞。更具体地,细胞结合剂可以是任何能够抗下列抗原或受体之一的试剂/分子:CD1,CD1a,CD1b,CD1c,CD1d,CD1e,CD2,CD3,CD3d,CD3e,CD3g,CD4,CD5,CD6,CD7,CD8,CD9,CD10,CD11a,CD11b,CD11c,CD12w,CD14,CD15,CD16,CDw17,CD18,CD19,CD20,CD21,CD22,CD23,CD24,CD25,CD26,CD27,CD28,CD29,CD30,CD31,CD32,CD33,CD34,CD35,CD36,CD37,CD38,CD39,CD40,CD41,CD42,CD43,CD44,CD45,CD46,CD47,CD48,CD49b,CD49c,CD51,CD52,CD53,CD54,CD55,CD56,CD58,CD59,CD61,CD62E,CD62L,CD62P,CD63,CD66,CD68,CD69,CD70,CD72,CD74,CD79,CD79a,CD79b,CD80,CD81,CD82,CD83,CD86,CD87,CD88,CD89,CD90,CD91,

CD95,CD96,CD98,CD100,CD103,CD105,CD106,CD109,CD117,CD120,CD125,CD126,CD127,CD133,CD134,CD135,CD138,CD141,CD142,CD143,CD144,CD147,CD151,CD147,CD152,CD154,CD156,CD158,CD163,CD166,.CD168,CD174,CD180,CD184,CDw186,CD194,CD195,CD200,CD200a,CD200b,CD209,CD221,CD227,CD235a,CD240,CD262,CD271,CD274,CD276(B7-H3),CD303,CD304,CD309,CD326,4-1BB,5AC,5T4(Trophoblast糖蛋白,TPBG,WNT-活化抑制因子1或WAIF1),腺癌抗原,AGS-5,AGS-22M6,启动素受体激酶1,AFP,AKAP-4,ALK,α整合素,αvβ6,氨基肽酶N,淀粉样蛋白β,雄激素受体,促血管新生蛋白因子2,促血管新生蛋白因子3,膜联蛋白A1,炭疽毒素保护性抗原,抗转移蛋白受体,AOC3(VAP-1),B7-H3,炭疽杆菌,BAFF(B细胞启动因子),B淋巴瘤细胞,bcr-abl,蛙皮素,BORIS,C5,C242抗原,CA125(糖抗原125,MUC16),CA-IX(或CAIX,碳酸酐酶9),CALLA,CanAg,犬红斑狼疮IL31,碳酸酐酶IX,心肌肌凝蛋白,CCL11(C-C片段趋化因子11),CCR4(C-C趋化因子受体4,CD194),CCR5,CD3E(ε),CEA(癌胚抗原),CEACAM3,CEACAM5(癌胚抗原),CFD(因子D),Ch4D5,胆囊收缩素2(CCK2R),CLDN18(Claudin-18),丛生因子A,CRIPTO,FCSF1R(集落刺激因子1受体,CD115),CSF2(集落刺激因子2,粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)),CTLA4(细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4),CTAA16.88肿瘤抗原,CXCR4(CD184),C-X-C趋化因子受体4,环状ADP核糖核酸酶,细胞周期蛋白B1,CYP1B1,巨细胞病毒,巨细胞病毒糖蛋白B,Dabigatran,DLL3(类Δ配体3),DLL4(类Δ配体4),DPP4(双肽-肽酶4),DR5(死亡受体5),大肠杆菌shiga毒素类型-1,大肠杆菌shiga毒素类型-2,ED-B,EGFL7(类EGF结构域蛋白7),EGFR,EGFRII,EGFRvIII,内皮因子(CD105),内皮素B受体,内毒素,EpCAM(上皮细胞粘附分子),EphA2,Episialin,ERBB2(表皮生长因子受体2),ERBB3,ERG(TMPRSS2 ETS融合基因),大肠杆菌,ETV6-AML,FAP(成纤维细胞活化蛋白α),FCGR1,甲胎蛋白,纤维蛋白IIβ链,纤连蛋白额外结构域-B,FOLR(叶酸受体),叶酸受体α,叶酸水解酶,Fos相关抗原1,呼吸道合胞病毒的F蛋白,卷曲的受体,岩藻糖GM1,GD2神经节苷脂,G-28(细胞表面抗原糖脂),GD3独特型,GloboH,Glypican 3,N-羟乙酰神经氨酸,GM3,GMCSF受体α链,生长分化因子8,GP100,GPNMB(跨膜糖蛋白NMB),GUCY2C(鸟苷酸环化酶2C),鸟苷酸环化酶C(GC-C),肠鸟苷酸环化酶,鸟苷酸环化酶C受体,热稳定肠毒素受体(hSTAR),热休克蛋白,血凝素,乙肝表面抗原,乙型肝炎病毒,HER1(人类表皮生长因子受体1),HER2,HER2/neu,HER3(ERBB-3),IgG4,HGF/SF(肝细胞生长因子/分散因子),HHGFR,HIV-1,组蛋白复合物,HLA-DR(人类白细胞抗原),HLA-DR10,HLA-DRB,HMWMAA,人类绒毛膜促性腺激素,HNGF,人类分散因子受体激酶,HPV E6/E7,Hsp90,hTERT,ICAM-1(细胞间粘附分子1),独特型,IGF1R(IGF-1,类胰岛素生长因子1受体),IGHE,IFN-γ,流感血凝素,IgE,IgE Fc区,IGHE,IL-1,IL-2R(白介素2受体),IL-4,IL-5,IL-6,IL-6R(白介素6受体),IL-9,IL-10,IL-12,IL-13,IL-17,IL-17A,IL-20,IL-22,IL-23,IL31RA,ILGF2(类胰岛素生长因子2),整合蛋白(α4、αIIbβ3、αvβ3、α4β7、α5β1、α6β4、α7β7、αllβ3、α5β5、αvβ5),干扰素γ诱导蛋白质,ITGA2,ITGB2,KIR2D,LCK,Le,Legumain,Lewis-Y抗原,LFA-1(淋巴细胞功能相关抗原1,CD11a),LHRH,LINGO-1,脂磷壁酸,LIV1A,LMP2,LTA,MAD-CT-1,MAD-CT-2,MAGE-1,MAGE-2,MAGE-3,MAGE A1,MAGE A3,MAGE 4,MART1,MCP-1,MIF(巨噬细胞迁移抑制因子,或糖基抑制因子(GIF)),MS4A1(跨膜4结构域亚家族A成员1),MSLN(间皮素),MUC1(粘蛋白1,细胞表面相关(MUC1)或多态性上皮粘蛋白(PEM)),MUC1-KLH,MUC16(CA125),MCP1(单核细胞趋化蛋白1),MelanA/MART1,ML-IAP,MPG,MS4A1,MYCN,髓磷

脂相关糖蛋白,Myostatin,NA17,NARP-1,NCA-90(粒细胞抗原),Nectin-4(ASG-22ME),NGF,神经细胞凋亡调控蛋白酶1,NOGO-A,Notch受体,核仁素,Neu致癌基因产物,NY-BR-1,NY-ESO-1,OX-40,OxLDL(氧化低密度脂蛋白),OY-TES1,P21,p53非突变体,P97,PAP,抗(N-羟乙酰神经氨酸)抗体结合部位,PAX3,PAX5,PCSK9,PDCD1(PD-1、程序性细胞死亡蛋白1,CD279),PDGF-Rα(α血小板源生长因子受体),PDGFR-β,PDL-1,PLAC1,类PLAP睾丸碱性磷酸酶,血小板衍生生长因子受体β,磷酸钠联合转运体,PMEL 17,聚唾液酸,蛋白酶3(PR1),前列腺癌,PS(磷脂酰丝氨酸),前列腺癌细胞,铜绿假单胞菌,PSMA,PSA,PSCA,狂犬病病毒糖蛋白,RHD(Rh多肽1(RhPI),CD240),Rhesus因子,RANKL,RhoC,Ras突变,RGS5,ROBO4,呼吸道合胞病毒,RON,肉瘤易位断点,SART3,Sclerostin,SLAMF7(SLAM成员7),Selectin P,SDC1(多配体蛋白聚糖1),系统性红斑狼疮(a),生长调节素C,SIP(1-磷酸鞘氨醇),生长激素抑制素,精子蛋白17,SSX2,STEAP1(6-跨膜上皮前列腺抗原1),STEAP2,STn,TAG-72(肿瘤相关糖蛋白),存活素,T细胞受体,T细胞跨膜蛋白,TEM1(肿瘤血管内皮标记1),TENB2,Tenascin C(TN-C),TGF-α,TGF-β(转化生长因子β),TGF-β1,TGF-β2(转化生长因子2),Tie(CD202b),Tie2,TIM-1(CDX-014),Tn,TNF,TNF-α,TNFRSF8,TNFRSF10B(肿瘤坏死因子受体超家族成员10B),TNFRSF13B(肿瘤坏死因子受体超家族成员13B),TPBG(滋养细胞糖蛋白),TRAIL-R1(TNF相关坏死诱导配体受体1),TRAILR2(死亡受体5(DR5)),肿瘤相关的钙信号传感子2,肿瘤特异糖基化的MUC1,TWEAK受体,TYRP1(糖蛋白75),TRP-2,酪氨酸酶,VCAM-1(CD106),VEGF,VEGF-A,VEGF-2(CD309),VEGFR-1,VEGFR-2,vimentin,WT1,XAGE 1,表达胰岛素生长因子受体的细胞,或表达表皮生长因子受体的细胞。

[0326] 在另一个具体实施例中,细胞结合分子可以是选自以下的配体或受体激动剂:叶酸衍生物(与叶酸受体结合、在卵巢癌和其他恶性肿瘤中超表达的蛋白质)(Low,PS等2008,Acc.Chem.Res.41,120-9);谷氨酸脲衍生物(与前列腺特异性膜抗原结合、前列腺癌细胞的表面标志物)(Hillier,SM等,2009,Cancer Res.69,6932-40);生长抑制素(也称为生长激素抑制激素(GHIH)或生长激素释放抑制因子(SRIF)或生长激素释放抑制激素)及其同系物,如奥曲肽(Sandostatin)和兰瑞肽(Somatuline)(特别是用于神经内分泌肿瘤,产生GH的垂体腺瘤、副神经节瘤、非功能性垂体腺瘤、嗜铬细胞瘤(Ginj,M.,等,2006,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 103,16436-41),以下瘤中生长激素抑制素受体亚型(sst1、sst2、sst3、sst4和sst5):分泌GH的垂体腺瘤(Reubi JC,L和olt,AM 1984J.Clin.Endocrinol Metab 59:1148-51;Re ubi JC,L和olt AM 1987J Clin Endocrinol Metab 65:65-73;Moyse E,等,J Clin Endocrinol Metab 61:98-103),胃肠胰腺肿瘤(Reubi JC,等,1987J Clin Endocrinol Metab 65:1127-34;Reubi,J.C,等,1990 Cancer Res 50:5969-77),嗜铬细胞瘤(Epel-baum J,等1995J Clin Endocrinol Metab 80:1837-44;Reubi J C等,1992J Clin Endocrinol Metab 74:1082-9),神经母细胞瘤(Prevost G,1996Neuroendocrinology 63:188-197;Moertel,C.L,等1994Am J Clin Path 102:752-756),甲状腺髓样癌(Reubi,J.C,等1991Lab Invest 64:567-573),小细胞肺癌(Sagman U,等,1990 Cancer66:2129-2133),脑膜瘤、成神经管细胞瘤或胶质瘤(Reubi JC,等1986J Clin Endocrinol Metab 63:433-8;Reubi JC,等1987Cancer Res 47:5758-64;Fruhwald,M.C,等1999Pediatr Res 45:697-708),乳腺癌(Reubi JC,等1990Int J Cancer 46:416-20;Srkalovic G,等1990J Clin Endocrinol Metab 70:661-669),淋巴瘤(Reubi

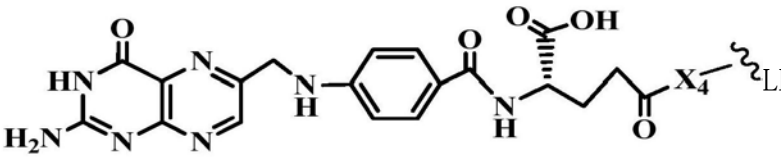
JC,等1992,Int J Cancer50:895-900),肾细胞癌(Reubi JC,等1992,Cancer Res 52:6074-6078),间充质肿瘤(Reubi JC,等1996Cancer Res 56:1922-31),前列腺癌(Reubi J C,等1995,J.Clin.Endocrinol Metab 80:2806-14;等1989,Prostate 14:191-208;Halmos G,等J.Clin.Endo-crinol Metab 85:2564-71),卵巢癌(Halmos,G,等,2000J Clin Endocrinol Metab 85:3509-12;Reubi JC,等1991Am J Pathol138:1267-72),胃癌(Reubi JC,等1999,Int J Cancer 81:376-86;Miller,G.V,1992Br J Cancer 66:391-95),肝癌(Kouroumalis E,等1998Gut 42:442-7;Reubi J C,等1999Gut 45:66-774)及鼻咽癌(Loh K.S,等,2002Virchows Arch 441:444-8);芳香磺酰胺(碳酸酐酶IX特异性)(缺氧和肾细胞癌的标志物)(Neri,D.,等,Nat.Rev.Drug Discov.2011,10,767-7);垂体腺苷酸环化酶启动肽(PACAP)(PAC1)(用于嗜铬细胞瘤和副神经节瘤);血管活肠肽(VIP)及其受体亚型(VPAC1,VPAC2);α-黑素细胞刺激素(α-MSH)受体;胆囊收缩素(CCK)或胃泌素受体及其受体亚型(CCK1(以前称为CCK-A)和CCK2;血管活性肠肽(VIP)及其受体子类(VPAC1、VPAC2);α-黑素细胞刺激素(α-MSH)受体;胆囊收缩素(CCK)或胃泌素受体及其受体亚型(CCK);铃蟾肽(Pyr-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH_2)或胃泌素释放肽(GRP)及其受体子类(BB1,GRP受体子类(BB2)、BB3和BB4)(Ohlsson,B.,等,1999,Sc和.J.Gastroenterology 34(12):1224-9;Weber,HC,2009,Cur.Opin.Endocri.Diab.Obesity 16(1):66-71,Gonzalez N,等,2008,Cur.Opin.Endocri.Diab.Obesity 15(1),58-64);神经降压素受体及其受体亚型(NTR1,NTR2,NTR3);物质P受体及其受体亚型(例如神经胶质肿瘤的NK1受体,Hennig I M,等1995Int.J.Cancer 61,786-792);神经肽Y(NPY)受体及其受体亚型(Y1-Y6);归巢肽包括RGD(Arg-Gly-Asp)、NGR(Asn-Gly-Arg)、二聚和多聚环状RGD肽(如cRGDfV)(Laakkonen P,Vuorinen K.2010,Integr Biol(Camb).2(7-8):326-337;Chen K,Chen X.2011,Theranostics.1:189-200;Garanger E,等,Anti-Cancer Agents Med Chem.7(5):552-558;Kerr,JS等,Anticancer Research,19(2A),959-968;Thumshirn,G,等,2003Chem.Eur.J.9,2717-2725),及TAASGVRSMH或LTLRWVGLMS(硫酸软骨素蛋白多糖NG2受体)和F3肽(与细胞表面表达的核仁素受体结合的31个氨基酸肽)(Zitzmann,S.,2002Cancer Res.,62,18,5139-5143;Temminga,K.,2005,Drug Resistance Updates,8,381-402;P.Laakkonen和K.Vuorinen,2010Integrative Biol,2(7-8),326-337;M.A.Burg,1999Cancer Res.,59(12),2869-2874;K.Porkka等2002,Proc.Nat.Acad.Sci.USA 99(11),7444-9);细胞穿透肽(CPPs)(Nakase I,等,2012,J.Control Release.159(2),181-188);肽激素,例如促黄体激素释放激素(LHRH)的激动剂和拮抗剂,促性腺激素释放激素(GnRH)激动剂,通过靶向卵泡刺激素(FSH)和促黄体激素(LH)以及睾酮产生而作用,如布舍瑞林(Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(OtBu)-Leu-Arg-Pro-NHEt)、戈那瑞林(Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH2)、戈舍瑞林(Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(OtBu)-Leu-Arg-Pro-AzGly-NH_2)、组氨瑞林(Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-His(N-Bn)-Leu-Arg-Pro-NHEt)、亮丙瑞林(Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt)、那法瑞林(Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-2Nal-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2)、曲普瑞林(Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2)、纳法瑞林、地洛林、阿贝瑞林(Ac-D-2Nal-D-4-chloroPhe-D-3-(3-pyridyl)Ala-Ser-(N-Me)Tyr-D-Asn-Leu-isopropylLys-Pro-DAla-NH_2)、西曲瑞克(Ac-D-2Nal-D-4-chloro-Phe-D-3-(3-pyridyl)Ala-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH2)、

地加瑞克(Ac-D-2Nal-D-4-chloroPhe-D-3-(3-pyridyl)Ala-Ser-4-aminoPhe(L-hydroorotyl)-D-4-aminoPhe(carba-moyl)-Leu-isopropylLys-Pro-D-Ala-NH_2)和甘乃利(Ac-D-2Nal-D-4-chloroPhe-D-3-(3-pyridyl)Ala-Ser-Tyr-D-(N9,N10-diethyl)-homoArg-Leu-(N9,N10-diethyl)-homoArg-Pro-D-Ala-NH_2)(Thundimadathil,J.,J.Amino Acids,2012,967347;Boccon-Gibod,L.;等,2011,Therapeutic Advances in Urology3(3):127-140;Debruyne,F.,2006,Future Oncology,2(6),677-696;Schally A.V;Nagy,A.1999Eur J Endocrinol 141:1-14;Koppan M,等1999Prostate 38:151-158);模式识别受体(PRRs),如Toll样受体(TLRs)、C型凝集素和结节状的受体(NLRs)(Fukata,M.等,2009,Semin.Immunol.21,242-253;Maisonneuve,C.等,2014,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 111,1-6;Botos,I.等,2011,Structure 19,447-459;Means,T K等,2000,Life Sci.68,241-258),其分子量范围从小分子(咪喹莫特、鸟嘌和腺苷同系物)到大型和复杂的生物大分子,如脂多糖(LPS)、核酸(CpG DNA,polyI:C)和脂肽(Pam3CSK4)(Kasturi,S P等,2011,Nature 470,543-547;Lane,T.,2001,JR Soc.Med.94,316;Hotz,C.,和Bourquin,C.,2012,Oncoimmunology 1,227-228;Dudek,A Z等,2007,Clin.Cancer Res.13,7119-25);降钙素受体,它是一种32-氨基酸神经肽,主要通过其对破骨细胞和肾脏的作用参与钙水平的调节(Zaidi M,等,1990 Crit Rev Clin Lab Sci 28,109-174;Gorn,A H,等1995J Clin Invest 95:2680-91);整合素受体及其受体子类(如αVβ1,αVβ3,αVβ5,αVβ6,α6β4,α7β1,αLβ2,αIIbβ3等),通常在血管生成中起重要作用,在多种细胞,特别是破骨细胞、内皮细胞和肿瘤细胞的表面表达(Ruoslahti,E.等,1994Cell 77,477-8;Albelda,SM等,1990 Cancer Res.,50,6757-64)。短肽,GRGDSPK和环状RGD五肽,如环(RGDfV)(L1)及其衍生物(环(-N(Me)R-GDfV)、环(R-Sar-DfV)、环-(RG-N(Me)D-fV)、环(RGD-N(Me)fV)、环(RGDf-N(Me)V-)(西仑吉肽))具有对整合素受体高亲和力(Dechantsreiter,MA等,1999J.Med.Chem.42,3033-40,Goodman,SL,等,2002J.Med.Chem.45,1045-51)。

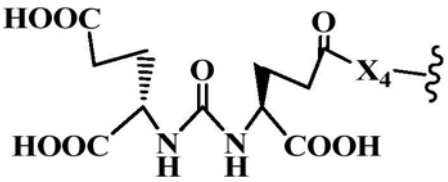
[0327] 细胞结合分子或配体或细胞受体激动剂可以是基于Ig和非基于Ig的蛋白质支架分子。基于Ig的支架可以选自但不限于,纳米抗体(VHH的衍生物(骆驼科动物Ig))(Muyldermans S.,2013Annu Rev Biochem.82,775-97);结构域抗体(dAb,VH或VL结构域的衍生物)(Holt,L.J,等,2003,Trends Biotechnol.21,484-90);双特异性T细胞接头(BiTE、双特异性双抗体)(Baeuerle,P.A等,2009,Curr.Opin.Mol.Ther.11,22-30);双重亲和力复位向剂(DART,双特异性双抗体)(Moore PA P等.2011,Blood 117(17),4542-51);四价串联抗体(T和Ab,、二聚双特异性双抗体)(Cochlovius,B等.2000,Cancer Res.60(16):4336-4341)。非Ig支架可以选自但不限于,Anticalin(Lipocalins的衍生物)(Skerra A.2008,FEBS J.,275(11):2677-83;Beste G等,1999Proc.Nat.Acad.USA.96(5):1898-903;Skerra,A.2000Biochim Biophys Acta,1482(1-2):337-50;Skerra,A.2007,Curr Opin Biotechnol.18(4):295-304;Skerra,A.2008,FEBS J.275(11):2677-83);Adnectin(第10个FN3(纤连蛋白))(Koide,A等,1998J.Mol.Biol.,284(4):1141-51;Batori V,2002,Protein Eng.15(12):1015-20;Tolcher,A.W,2011,Clin.Cancer Res.17(2):363-71;Hackel,B.J,2010,Protein Eng.Des.Sel.23(4):211-19);设计的锚蛋白重复蛋白(DARPins)(锚蛋白重复(AR)蛋白的衍生物)(Boersma,Y L等,2011Curr Opin Biotechnol.22(6):849-57),例如DARPin C9、DARPin Ec4及DARPin E69_LZ3_E01(Winkler

J等,2009Mol Cancer Ther.8(9),2674-83;Patricia MK.M.等,Clin Cancer Res.2011;17(1):100-10;Boersma Y.L等,2011J.Biol.Chem.286(48),41273-85);高亲和性多聚体(域A/低密度脂蛋白(LDL)受体)(Boersma Y.L,2011J.Biol.Chem.286(48):41273-41285;Silverman J等,2005Nat.Biotechnol.,23(12):1556-61)。

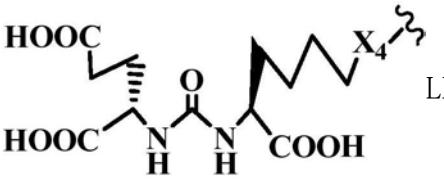
[0328] 本专利申请的小分子细胞结合分子/配体或细胞受体激动剂的结构示例如下：LB01(叶酸)、LB02(PMSA配体)、LB03(PMSA配体)、LB04(PMSA配体)、LB05(生长抑制素)、LB06(生长抑制素)、LB07(奥曲肽、生长抑制素同系物)、LB08(兰瑞肽、生长抑制素同系物)、LB09(伐普肽(Sanvar)、生长抑制素同系物)、LB10(CAIX配体)、LB11(CAIX配体)、LB12(胃泌素释放肽受体(GRPr)、MBA)、LB13(促黄体激素释放激素(LH-RH)和GnRH配体)、LB14(促黄体激素释放激素(LH-RH)和GnRH配体)、LB15(GnRH拮抗剂、Abarelix)、LB16(钴胺素、维生素B12同系物)、LB17(钴胺素、维生素B12同系物)、LB18(用于αvβ3整联蛋白受体、环状RGD五肽)、LB19(VEGF受体的异二价肽配体)、LB20(神经髓质素B)、LB21(蛙皮素,作用于G蛋白偶联受体)、LB22(TLR2,作用于类Toll受体)、LB23(作用于雄性激素受体)、LB24(西仑吉肽或环(-RGDfV-)结合物,作用于αv整合素受体)LB25(利福布汀同系物)、LB26(利福布汀同系物)、LB27(利福布汀同系物)、LB28(氟氢可的松)、LB29(地塞米松)、LB30(丙酸氟替卡松)、LB31(丙酸倍氯米松)、LB32(醋酸曲安奈德)、LB33(泼尼松龙)、LB35(甲基强的松龙)、LB36(倍他米松)、LB37(伊立替康同系物)、LB38(克唑替尼同系物)、LB39(硼替佐米同系物)、LB40(卡菲佐米同系物)、LB41(卡非佐米同系物)、LB42(亮丙瑞林同系物)、LB43(曲普瑞林同系物)、LB44(克林霉素)、LB45(利拉鲁肽同系物)、LB46(半长春新碱同系物)、LB47(瑞他帕林同系物)、LB48(丁布尔同系物)、LB49(长春碱同系物)、LB50(利西森肽同系物)、LB51(奥西丁尼同系物)、LB52(核苷同系物)、LB53(厄洛替尼同系物)和LB5 4(拉帕替尼同系物),其结构如下所示：

[0329] 

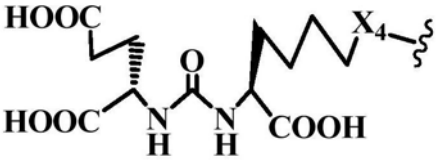
LB01(叶酸偶联物),

[0330] 

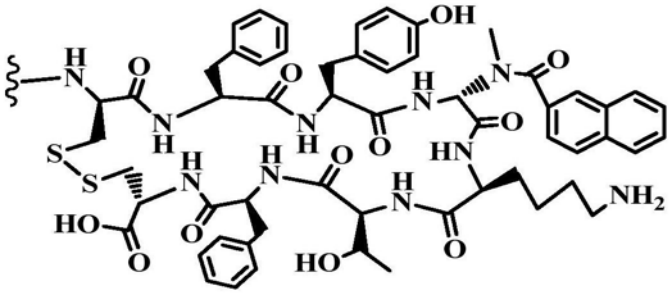
LB02(PMSA配体偶联物),

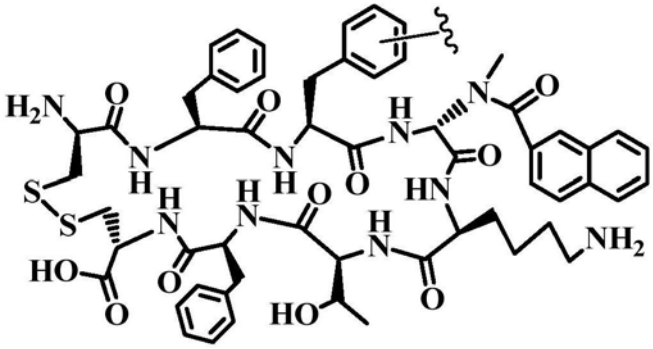
[0331] 

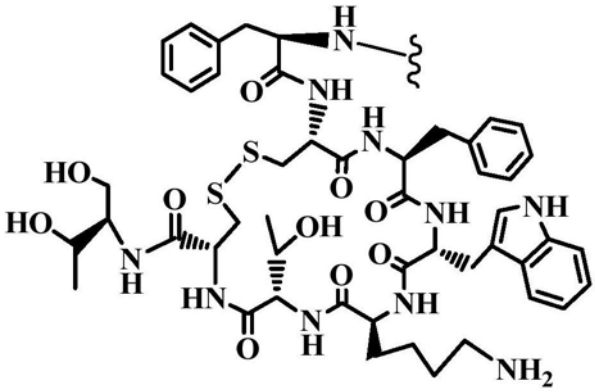
LB03(PMSA配体偶联物),

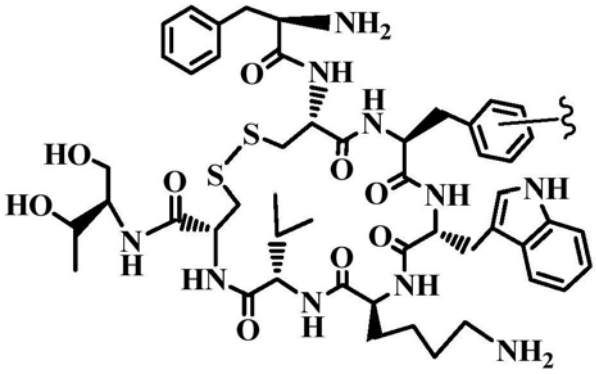
[0332] 

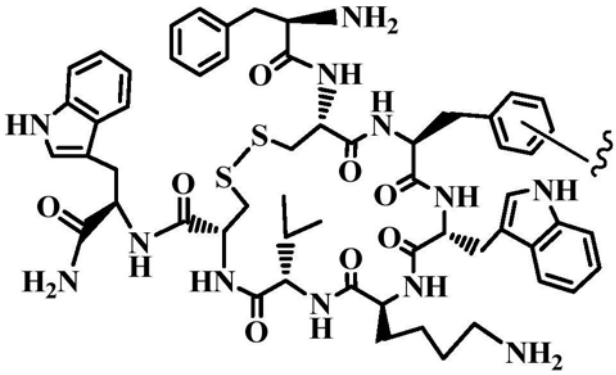
LB04(PMSA配体),

[0333]  LB05(生长激素抑制素),

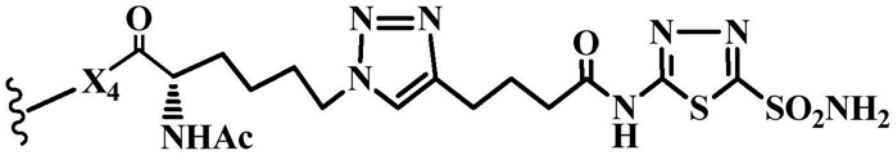
[0334]  LB06(生长激素抑制素),

[0335]  LB07(奥曲肽、生长抑制素同系物),

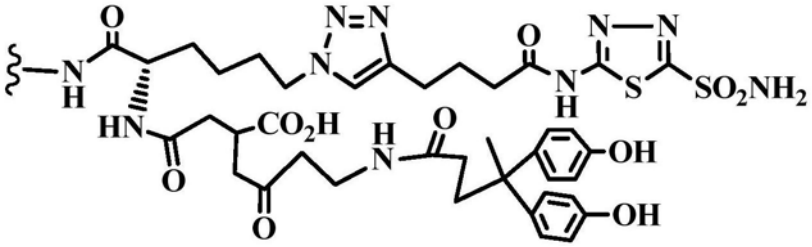
[0336]  LB08(兰肽、生长抑制素同系物),

[0337]  LB09(氨肽(Sanvar)、生长抑制素同

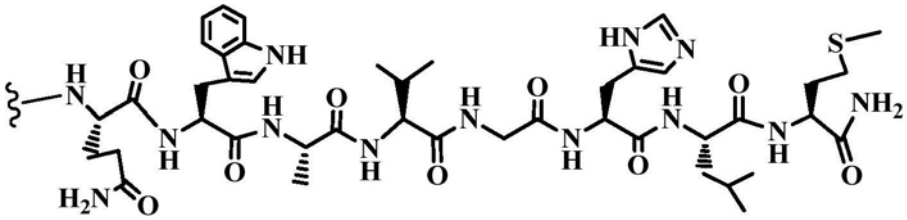
系物)，

[0338] 

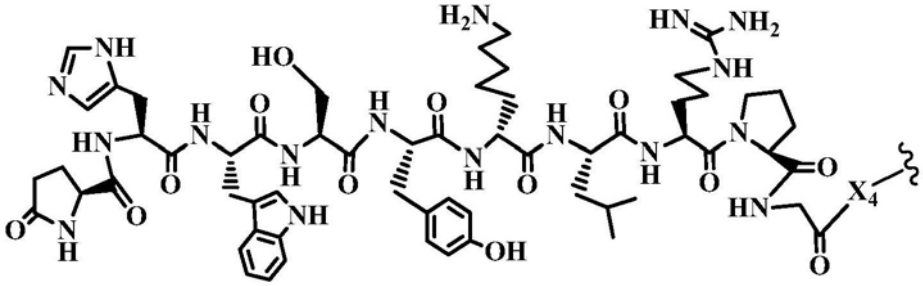
LB10(CAIX配体)，

[0339] 

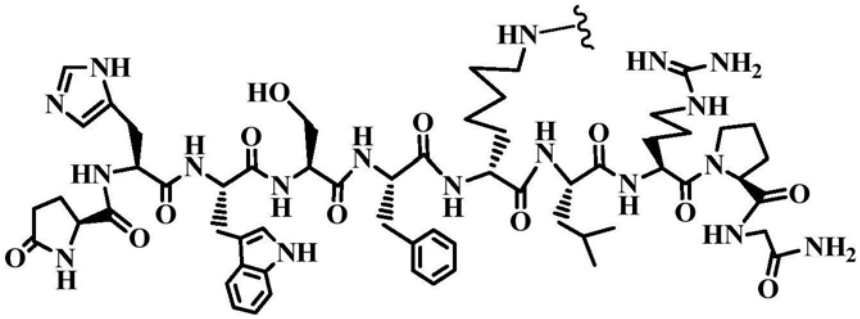
LB11(CAIX配体)，

[0340] 

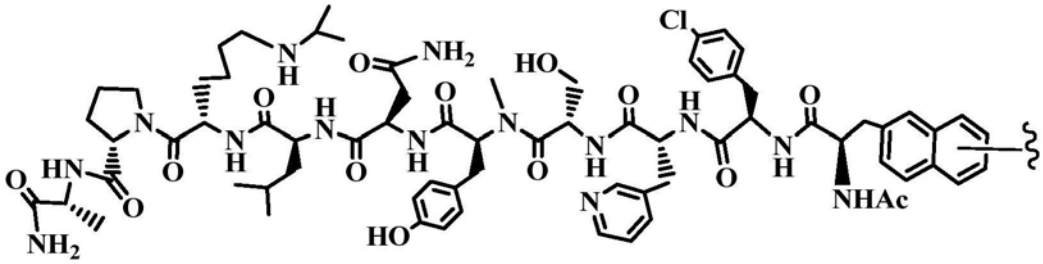
LB12(胃泌素释放肽受体(GRPr),MBA)，

[0341] 

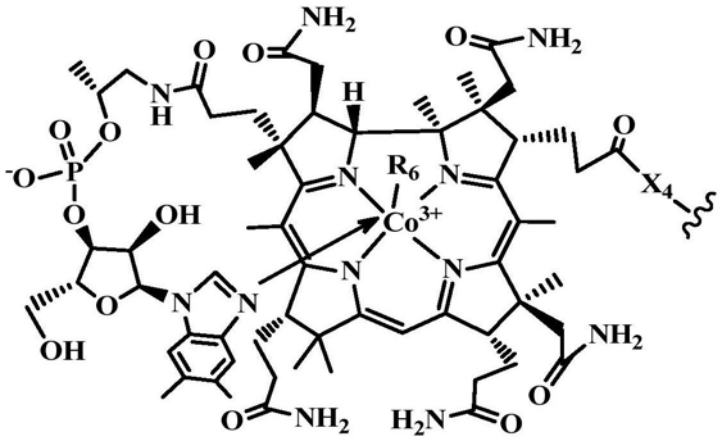
[0342] LB13(促黄体激素释放激素(LH-RH)和促性腺激素释放激素GnRH配体)，

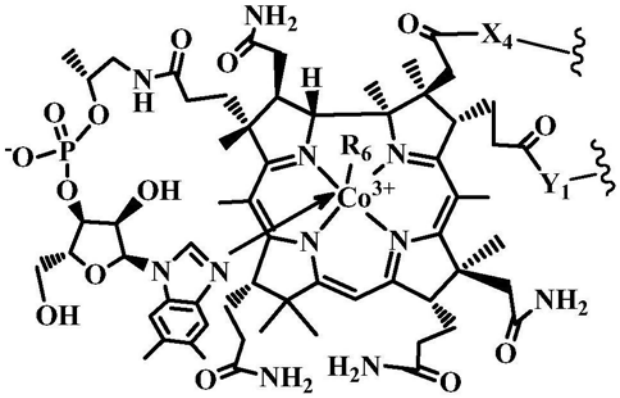
[0343] 

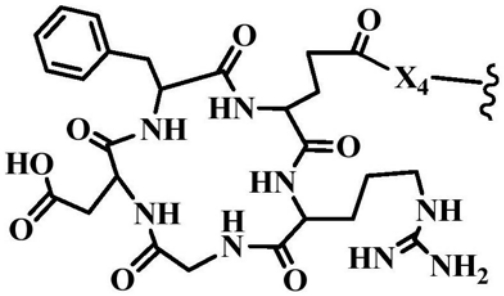
[0344] LB14(促黄体激素释放激素(LH-RH)和促性腺激素释放激素GnRH配体)，

[0345] 

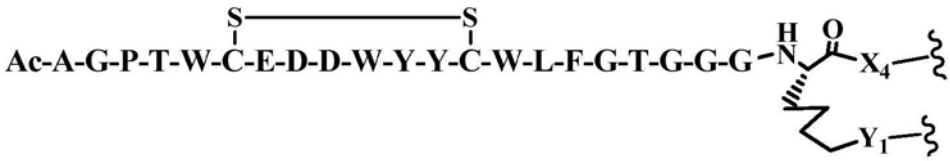
[0346] LB15(GnRH拮抗物、阿巴瑞克)，

[0347]  LB16(钴胺素,维生素B12同系物),

[0348]  LB17(钴胺素,维生素B12同系物),

[0349] 

[0350] LB18(环RGD五肽,作用于$\alpha_v\beta_3$整联蛋白受体),

[0351] 

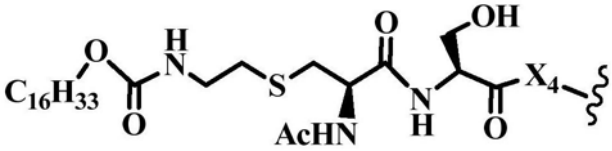
[0352] LB19(异源二价肽配体偶联物,作用于血管内皮生长因子VEGF受体),

[0353] 

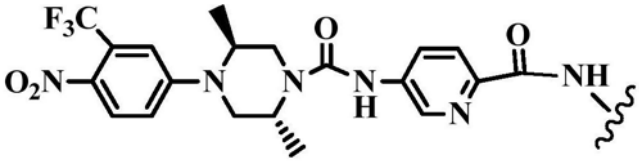
LB20(神经髓质素B),

[0354] 

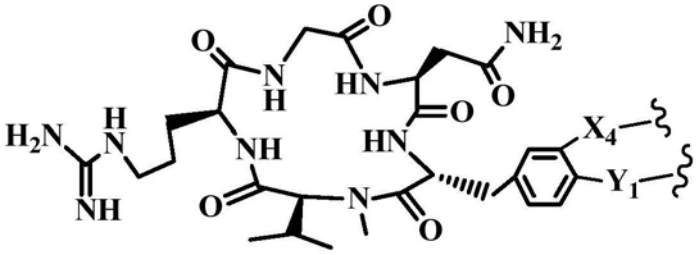
[0355] LB21(蛙皮素偶联物,作用于G蛋白偶联受体),

[0356] 

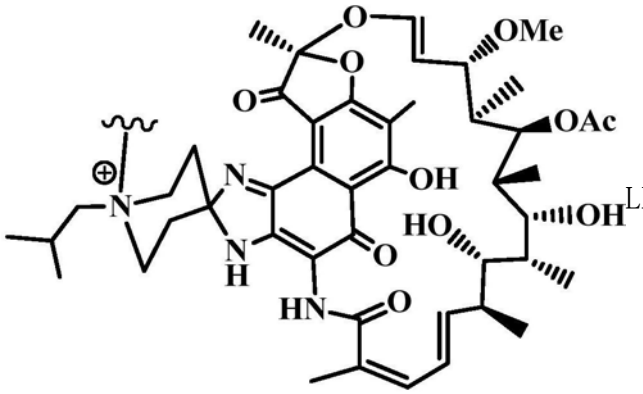
LB22(TLR2偶联物,作用于类Toll受体),

[0357] 

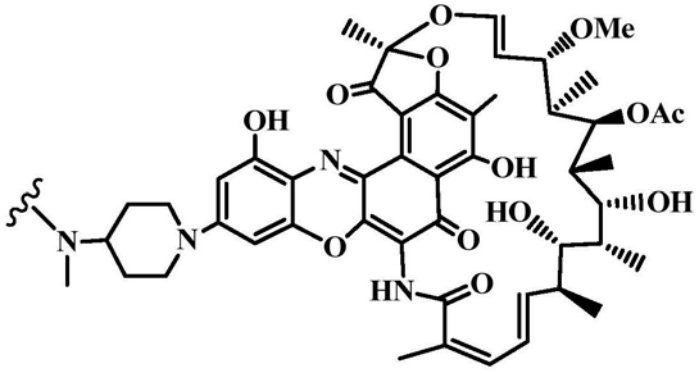
LB23(雄激素受体),

[0358] 

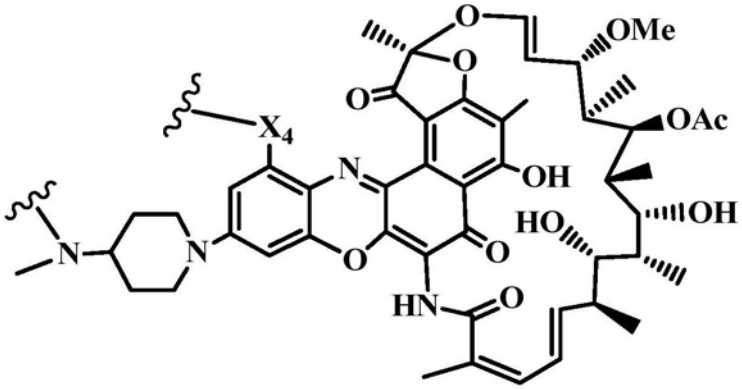
LB24(西伦吉肽/环(-RGDfV-)偶联物,作用于α_v整合素受体)

[0359] 

LB25(利福布汀同系物),

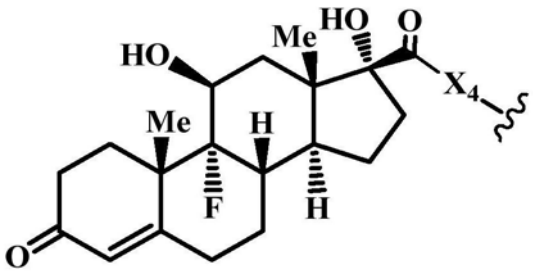
[0360] 

LB26(利福布汀同系物),



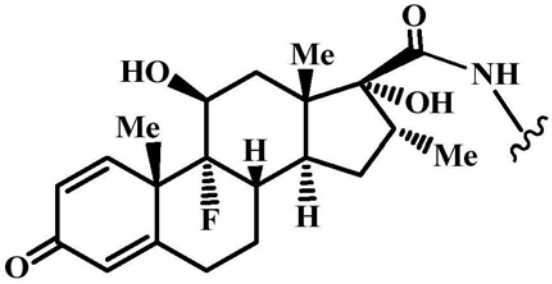
LB27(利福布汀同系物)，

[0361]



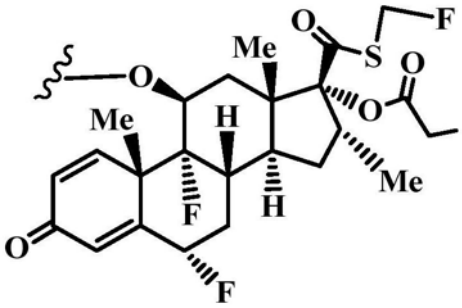
LB28(氟氢可的松)，

[0362]



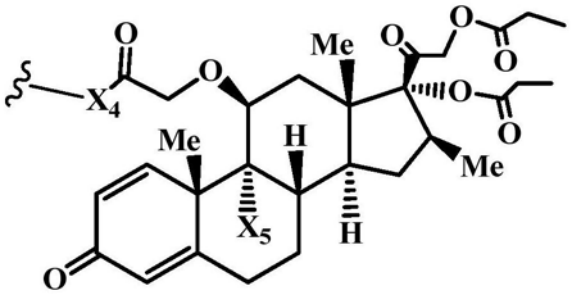
LB29(地塞米松)，

[0363]

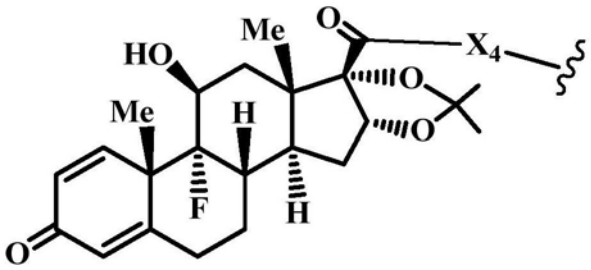


LB30(丙酸氟替卡松)，

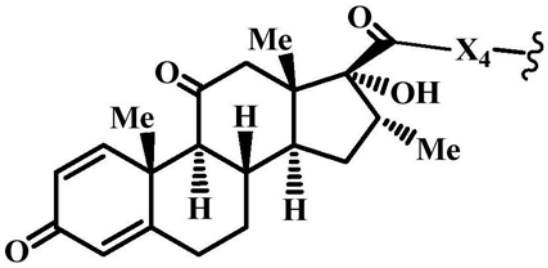
[0364]



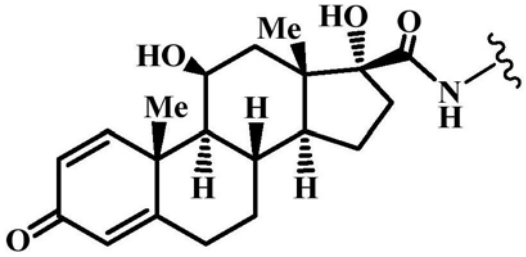
LB31(倍氯米松丙酸酯)，

[0365] 

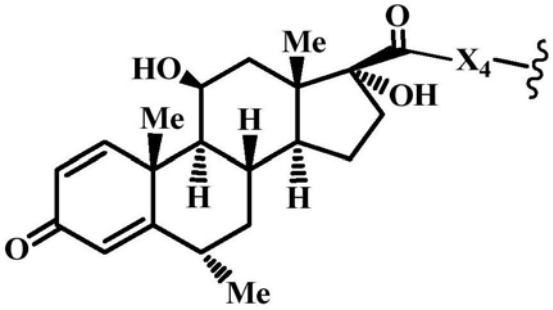
LB32(曲安奈德)，

[0366] 

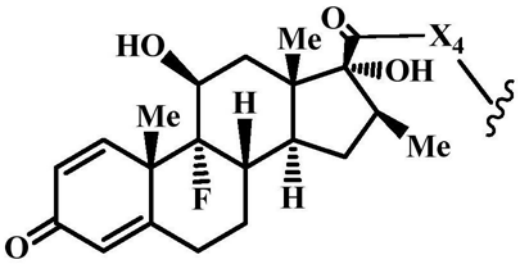
LB33(泼尼松)，

[0367] 

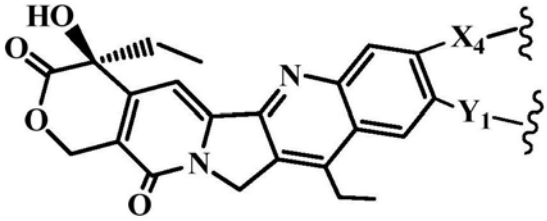
LB34(泼尼松龙)，

[0368] 

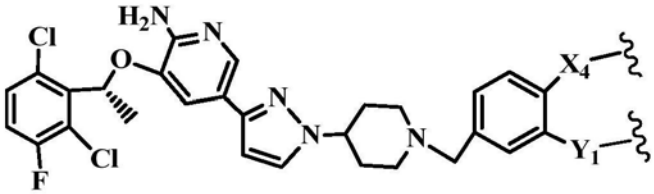
LB35(甲基强的松龙)，

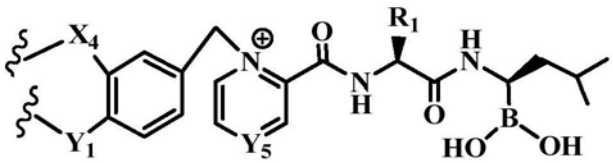
[0369] 

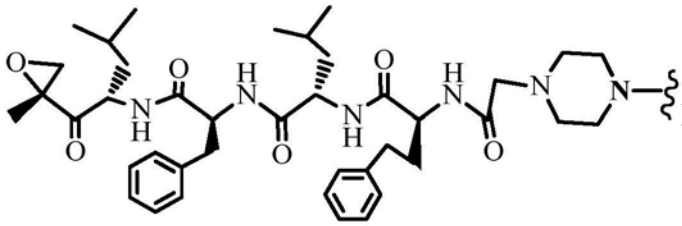
LB36(倍氟美松)，

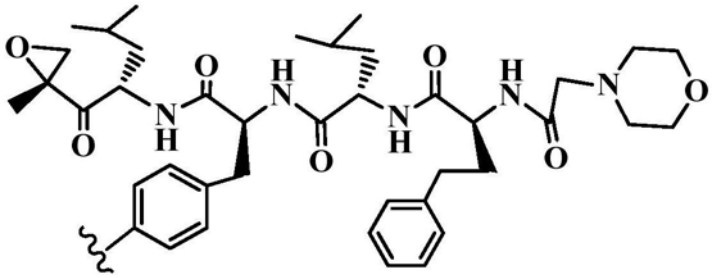
[0370] 

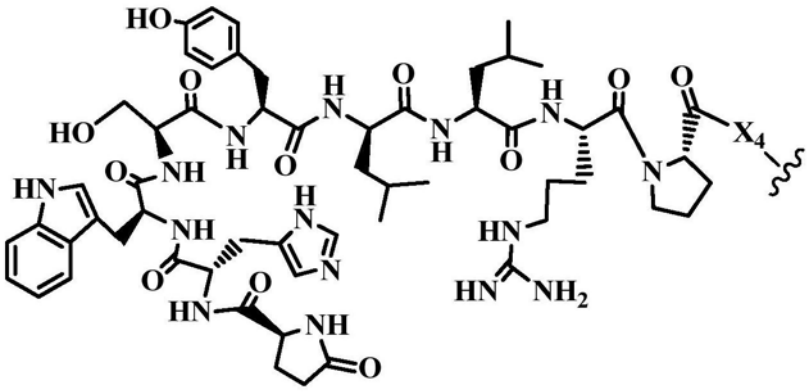
LB37(伊立替康同系物)，

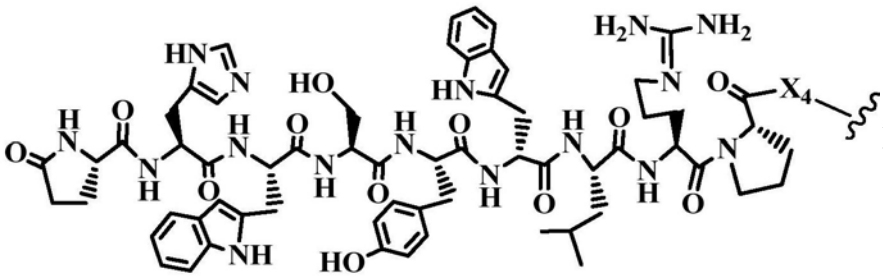
[0371]  LB38(克唑替尼同系物)，

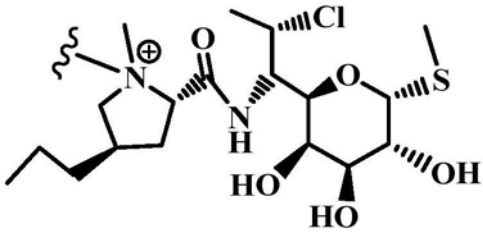
[0372]  LB39(硼替佐米同系物)，其中Y_5是N、CH、C(Cl)、C(CH_3)或C($COOR_1$)；R_1是H、C_1-C_6烷基、C_3-C_8芳基；

[0373]  LB40(卡菲佐米同系物)，

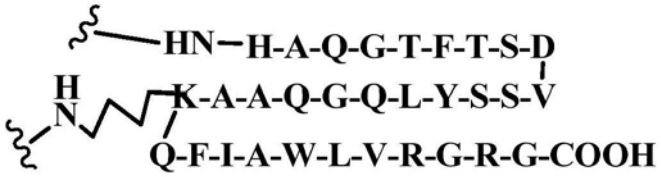
[0374]  LB41(卡菲佐米同系物)，

[0375]  LB42(亮丙瑞利同系物)，

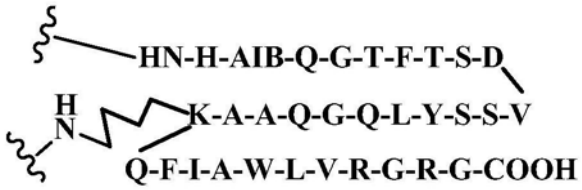
[0376]  LB43(曲普瑞林同系物)，

[0377] 

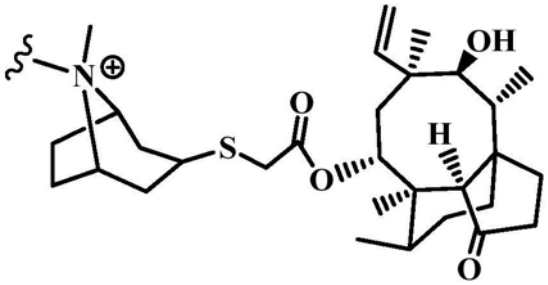
LB44(克林霉素),

[0378] 

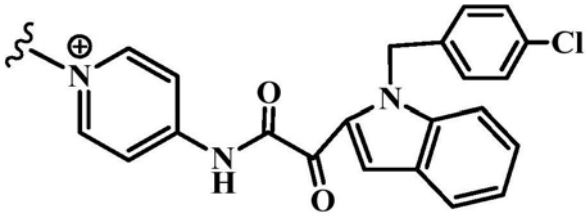
LB45(利拉鲁肽同系物),

[0379] 

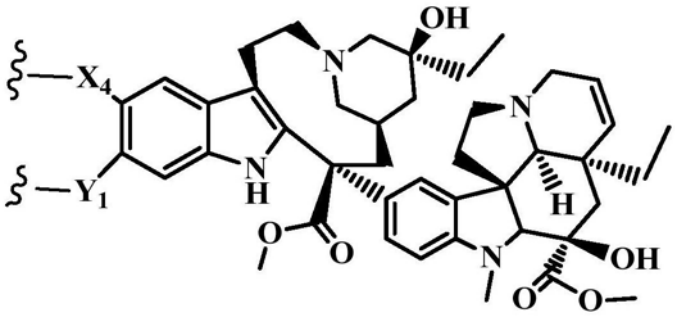
LB46(索马鲁肽同系物),

[0380] 

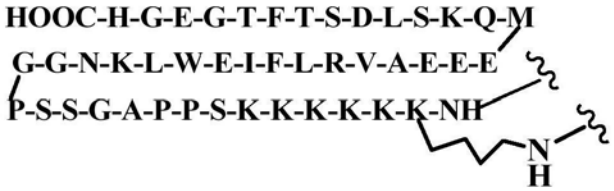
LB47(瑞他帕林同系物),

[0381] 

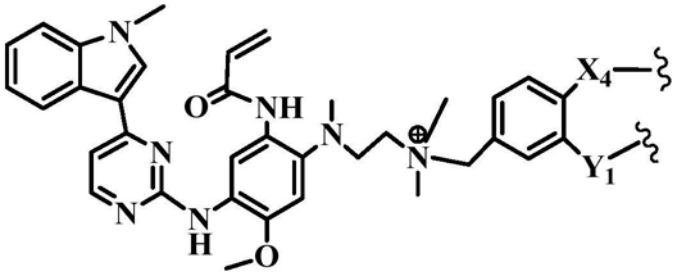
LB48(丁布尔同系物),

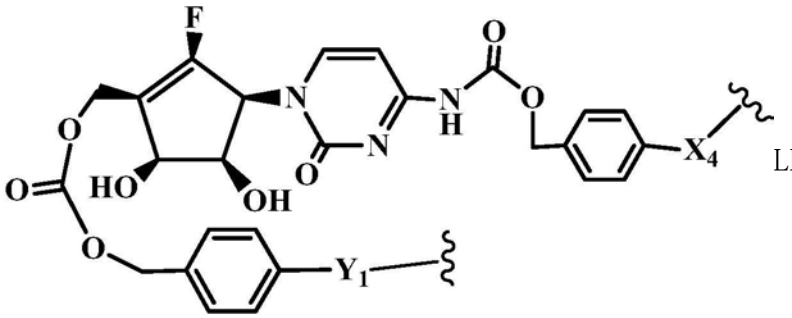
[0382] 

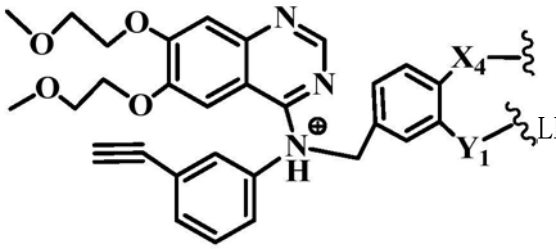
LB49(长春碱同系物),

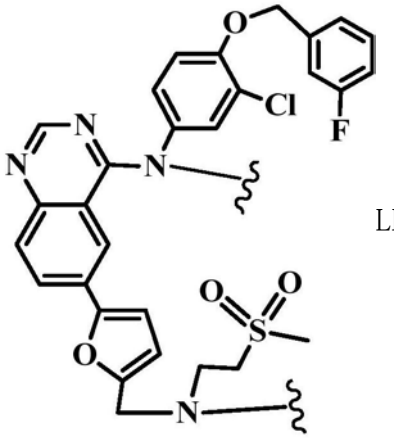
[0383] 

LB50(利西森肽同系物),

[0384]  LB51(奥西丁尼同系物)，

[0385]  LB52(核苷同系物)，

[0386]  LB53(埃罗替尼同系物)，

[0387]  LB54(拉帕替尼同系物)，

[0388] 其中“∿∿”是支链连接体的连接位置；X_4和Y_1独立地是O、NH、NHNH、NR_1、S、C(O)O、C(O)NH、OC(O)NH、OC(O)O、NHC(O)NH、NHC(O)S、OC(O)N(R_1)、N(R_1)C(O)N(R_1)、CH_2、C(O)NHNHC(O)和C(O)NR_1；X_1是H、CH_2、OH、O、C(O)、C(O)NH、C(O)N(R_1)、R_1、NHR_1、NR_1、C(O)R_1或C(O)O；X_5是H、CH_3、F或Cl；M_1和M_2分别是H、Na、K、Ca、Mg、NH_4、N($R_1R_2R_3$ R_4)；R_1、R_2、R_3和R_4定义同式(I)。

[0389] 偶联物的应用

[0390] 在一个具体实施例中，通过本专利的支链连接体连接的细胞结合剂-药物偶联物，可用作癌症靶向治疗。目标癌症包括但不限于，肾上腺皮质癌、肛门癌、膀胱癌、大脑肿瘤(脑干神经胶质瘤、小脑星形细胞瘤、脑星形细胞瘤、室管膜瘤、成神经管细胞瘤、幕上原始神经外胚层和松果体肿瘤、视觉通路和下丘脑胶质瘤)、乳腺癌、类癌肿瘤、胃肠道癌症、未知小细胞癌、宫颈癌、结肠癌、子宫内膜癌、食道癌、肝外胆管癌、尤因家族肿瘤(PNET)、颅内

生殖细胞肿瘤、眼癌、眼内黑色素瘤、胆囊癌、胃癌(胃癌)、性腺外生殖细胞瘤、孕周滋养细胞瘤、头颈癌、下咽癌、胰岛细胞癌、肾癌(肾细胞癌)、喉癌、白血病(急性淋巴细胞,急性髓系,慢性淋巴细胞,慢性粒细胞,毛细胞)、嘴唇和口腔癌症、肝癌、肺癌(非小细胞,小细胞)、淋巴瘤(艾滋病相关,中枢神经系统,皮肤T细胞,霍奇金病,非霍奇金病)、恶性间皮瘤、黑色素瘤、梅克尔细胞癌、转移性鳞状颈癌与隐匿性原发性癌、多发性骨髓瘤和其他浆细胞肿瘤、蕈样肉芽肿、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常、鼻咽癌、神经母细胞瘤、口腔癌、口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌(上皮、生殖细胞瘤、低恶性肿瘤)、胰腺癌(外分泌,胰岛细胞癌)、副鼻窦和鼻腔癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、嗜铬细胞瘤、垂体肿瘤、浆细胞肿瘤、前列腺癌横纹肌肉瘤、直肠癌、肾细胞癌(肾癌)、肾盂和输尿管(移行细胞)、唾腺癌、赛塞里综合症、皮肤癌(皮肤T细胞淋巴瘤,卡波西氏肉瘤,黑色素瘤)、小肠肿瘤、软组织肉瘤、胃癌、睾丸癌、胸腺瘤(恶性)、甲状腺癌、尿道癌症、子宫癌、不寻常的少年癌症、阴道肿瘤、外阴肿瘤和维尔姆斯瘤。

[0391] 在另一个具体的实施例中,通过本专利的支链连接体连接的细胞结合剂-药物偶联物,可用作治疗或预防自身免疫疾病的成分和方法。自身免疫性疾病包括但不限于,Achlorhydra自身免疫性活动性慢性肝炎,急性播散性脑脊髓炎,急性出血性脑白质炎,艾迪生病,无精症,斑秃,肌萎缩侧索硬化症,强直性脊柱炎,抗GBM/TBM肾炎,抗磷脂综合征,抗异常酶综合征,关节炎,特应性过敏,特应性皮炎,自身免疫性再生障碍性贫血,自身免疫性心肌病,自身免疫性溶血性贫血,自身免疫性肝炎,自身免疫性内耳疾病,自身免疫性淋巴组织增生综合征,自身免疫性周围神经病,自身免疫性胰腺炎,自身免疫性多内分泌综合征I,II和III型,自身免疫性黄体酮皮炎,自身免疫性血小板减少性紫癜,自身免疫性葡萄膜炎,Balo病/Balo同心硬化症,Bechets综合征,Berger氏病,Bickerstaff脑炎,Blau综合征,大疱性类天疱疮,Castleman病,Chagas病,慢性疲劳免疫功能障碍综合征,慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病,慢性复发性多灶性骨髓炎,慢性莱姆病,慢性阻塞性肺病,Churg-Strauss综合征,瘢痕性类天疱疮,乳糜泄,Cogan综合征,冷凝集素病,补体成分2缺乏症,颅骨动脉炎,CREST综合征,Crohns病(特发性炎症性肠病),库欣综合征,皮肤白细胞增多性血管炎,德戈氏病,Dercum氏病,疱疹样皮炎,皮肌炎,1型糖尿病,弥漫性皮肤系统性硬化症,Dressler综合征,盘状红斑狼疮,湿疹,子宫内膜异位症,附着点炎相关的关节炎,Eosinophilic筋膜炎,大疱性表皮松解症,结节性红斑,特发性混合性冷球蛋白血症,伊文氏综合征,纤维发育不良性骨化症,纤维肌痛,纤维化性肌炎,纤维性肺泡炎,胃炎,胃肠类天疱疮,巨细胞动脉炎,肾小球肾炎,古德帕斯丘尔综合征,格雷夫斯病,格林-巴利综合征,桥本氏脑炎,桥本氏甲状腺炎,溶血性贫血,过敏性紫癜,妊娠性肝炎,化脓性汗腺炎,休斯综合征(抗磷脂综合征),低丙球蛋白血症,特发性炎性脱髓鞘疾病,特发性肺纤维化,特发性血小板减少性紫癜(自身免疫性血小板减少性紫癜),IgA肾病(伯杰氏病),包涵体肌炎,炎性脱髓鞘性多神经炎,间质性膀胱炎,过敏性肠综合征,少年特发性关节炎,青少年类风湿性关节炎,川崎氏病,朗伯-伊顿重症肌无力综合征,白细胞碎屑性血管炎,扁平苔癣,硬化性硬化症,线状IgA疾病(LAD),Lou Gehrig病(也称肌萎缩侧索硬化症),狼疮性肝炎,红斑狼疮,Majeed综合征,美尼尔氏病,显微镜下多动脉炎,米勒-费希尔综合征,混合性结缔组织病,硬斑病,穆罕默德-哈贝曼病,麦考利综合征,多发性骨髓瘤,多发性硬化症,重症肌无力,肌炎,嗜睡症,视神经脊髓炎(Devic病),神经性肌强直,眼睑瘢痕性类天疱疮,Opsoclonus myoclonus综合征,Ord甲状腺炎,回文风湿病,PANDAS(与链球菌相关的小儿自

身免疫性神经精神病),Paraneoplastic小脑变性,阵发性睡眠性血红蛋白尿症,Parry Romberg综合征,Parsonnage-Turner综合征,睫状体平部炎,天疱疮,寻常型天疱疮,贫血,周围脑脊髓炎,POEMS综合征,结节性多动脉炎,风湿性多肌痛,多发性肌炎,原发性胆汁性肝硬化,原发性硬化性胆管炎,进行性炎症性神经病变,牛皮癣,牛皮癣性关节炎,坏疽性皮肤炎,纯红细胞再生障碍,Rasmussen脑炎,雷诺现象,复发性多软骨炎,赖特综合征,不宁腿综合症,后神经纤维化,类风湿性关节炎,类风湿热,结节病,精神分裂症,施密特综合征,Schnitzler综合征,施尼茨勒综合征,巩膜炎,硬皮病,干燥综合征,脊椎关节病,粘稠血症,Still病,僵人综合征,亚急性细菌性心内膜炎,苏萨克综合征,Sweet综合征,小舞蹈病,交感神经性贫血,Takayasu动脉炎,颞动脉炎(巨细胞动脉炎),Tolosa-Hunt综合征,横贯性脊髓炎,溃疡性结肠炎(特发性炎性肠病),未分化结缔组织病,未分化脊柱关节病,血管炎,白癜风,韦格纳肉芽肿病,威尔逊氏综合征,威斯科特-奥尔德里奇综合征。

[0392] 在另一个具体的实施例中,在用于治疗或预防自身免疫性疾病的偶联物上,和药物分子通过本专利的支链连接体连接的结合分子,包括但不限于,抗弹性蛋白抗体,Abys抗上皮细胞抗体,抗地下室膜IV型胶原蛋白抗体,抗核抗体,抗ds DNA,抗ss DNA,抗心磷脂抗体IgM,IgG,抗乳糜泻抗体,抗磷脂抗体IgK,IgG,抗SM抗体,抗线粒体抗体,甲状腺抗体,微粒体抗体,T细胞抗体,甲状腺球蛋白抗体,抗SCL-70,抗Jo,抗U.sub.1RNP,抗La/SSB,抗SSA,抗SSB,抗壁细胞抗体,抗组蛋白,抗RNP,C-ANCA,P-ANCA,抗着丝粒,抗纤维蛋白原,抗GBM抗体,抗神经节苷脂抗体,抗Desmogein 3抗体,抗p62抗体,抗sp100抗体,抗线粒体(M2)抗体,类风湿因子抗体,抗MCV抗体,抗拓扑异构酶抗体,抗中性粒细胞胞质(cANCA)抗体。

[0393] 在某些优选的实施例中,本专利中偶联物上的结合分子,可以与自身免疫性疾病相关的活化淋巴细胞上表达的受体或受体复合物相结合。受体或受体复合物包含,免疫球蛋白基因超家族成员(例如CD2,CD3,CD4,CD8,CD19,CD20,CD22,CD28,CD30,CD33,CD37,CD38,CD56,CD70,CD79,CD79b,CD90,CD125,CD147,CD152/CTLA-4,PD-1或ICOS),TNF受体超家族成员(例如CD27,CD40,CD95/Fas,CD134/OX40,CD137/4-1BB,INF-R1,TNFR-2,RANK,TACI,BCMA,骨保护素,Apo2/TRAIL-R1,TRAIL-R2,TRAIL-R3,TRAIL-R4和APO-3),整合蛋白,细胞因子受体,趋化因子受体,主要组织兼容性蛋白,凝集素(C型,S型或I型)或补体控制蛋白。

[0394] 在另一个具体实施例中,可用的对病毒或微生物抗原具有免疫特异性的细胞结合配体是人源化或人单克隆抗体。“病毒抗原”包括但不限于,任何能够引发免疫应答的病毒肽,多肽蛋白(例如HIV gp120,HIV nef,RSV F糖蛋白,流感病毒神经氨酸苷酶,流感病毒血凝素,HTLV Tax,疱疹单纯疱疹病毒糖蛋白(例如gB,gC,gD和gE)和乙型肝炎表面抗原)。“微生物抗原”包括但不限于,任何能够引发免疫应答的微生物肽,多肽,蛋白质,糖,多糖或脂质分子(例如细菌,真菌,致病原生动物或酵母多肽,包括如LPS和荚膜多糖)。可用于治疗病毒或微生物感染的抗体的实例,包括但不限于:帕利珠单抗,它是用于治疗RSV感染的,人源化抗呼吸道合胞病毒单克隆抗体;PRO542,是一种CD4融合抗体,用于治疗HIV感染;奥斯他韦,是一种用于治疗乙型肝炎病毒的人抗体;PROTVIR,是一种人源化IgG1抗体,用于治疗巨细胞病毒,和抗LPS抗体。

[0395] 通过本专利的支链连接体制得的细胞结合分子-药物偶联物可用于治疗感染性疾病。这些感染性疾病包括但不限于,不动杆菌属感染,放线菌病,非洲昏睡病(非洲锥虫病),

艾滋病(获得性免疫缺陷综合症),阿米巴病,无形体病,炭疽,溶血性耶尔森菌感染,阿根廷出血热,蛔虫病,曲霉病,星状病毒感染,巴贝斯虫病,蜡状芽孢杆菌感染,细菌性肺炎,细菌性阴道炎,类杆菌感染,小袋虫病,蛔虫感染,BK病毒感染,黑色发结节病,人芽囊原虫感染,芽生菌病,玻利维亚出血热,疏螺旋体感染,肉毒中毒(和婴儿肉毒中毒),巴西出血热,布鲁氏杆菌病,伯克霍尔德氏菌感染,布鲁里溃疡,杯状病毒感染(诺如病毒和沙波病毒),弯曲杆菌病,念珠菌病(念珠菌病,鹅口疮),猫抓病,蜂窝组织炎,Chagas病(美洲锥虫病),子囊,水痘,衣原体,肺炎衣原体感染,霍乱,色素母细胞瘤,华支睾吸虫,艰难梭状芽孢杆菌感染,球孢子菌病,科罗拉多蜱热病,普通感冒(急性病毒性鼻咽炎,急性鼻炎),克雅氏病,克里米亚-刚果出血热,隐球菌病,隐孢子虫病,皮肤幼虫迁徙,环孢子虫病,肠杆菌感染,肠道病毒感染,流行性斑疹伤寒,传染性红斑(第五种疾病),急疹,姜片虫病,肝片吸虫病,致命性家族性失眠,丝虫病,产气荚膜梭菌食物中毒,自由活体阿米巴感染,梭杆菌感染,气性坏疽(梭菌性肌坏死),地丝菌病,格斯特曼-斯特拉斯勒-谢克尔病综合征,贾第鞭毛虫病,马鼻疽,淋病,肉芽肿性腹泻(第五性病),A群链球菌感染,B群链球菌感染,流感嗜血杆菌感染,手足口病(HFMD),汉坦病毒肺综合征,幽门螺杆菌感染,溶血性尿毒综合征,肾综合征出血热,甲型肝炎,乙型肝炎,丙型肝炎,丁型肝炎,戊型肝炎,单纯性疱疹,组织胞浆菌病,钩虫感染,人类博卡病毒感染,人类ewingii埃里希体病,人类粒细胞无形体病,人类偏肺病毒感染,人类单核细胞埃里希体病,人乳头瘤病毒感染,人副流感病毒感染,膜壳绦虫病,艾巴氏病毒传染性单核细胞增多症(单),流行性感冒,等孢子虫病,川崎病,角膜炎,金格杆菌感染,库鲁病,拉沙热,军团病(退伍军人症),军团病(庞蒂亚克热),利什曼病,莱姆病,淋巴丝虫病(象皮病),淋巴细胞性脉络丛脑膜炎,疟疾,马尔堡出血热,麻疹,类鼻疽病(惠氏病),脑膜炎,脑膜炎球菌病,后殖吸虫病,微孢子虫病,传染性软疣,腮腺炎,小鼠斑疹伤寒(地方性斑疹伤寒),支原体肺炎,足菌肿,蝇蛆病,新生儿结膜炎(新生儿眼病),变异型克雅氏病(vCJD,nvCJD),诺卡氏菌病,盘尾丝虫病(河盲症),副球孢子菌病(南美芽生菌病),肺吸虫病,巴斯德氏菌病,头虱,体虱,阴虱,盆腔炎,百日咳,鼠疫,肺炎球菌感染,肺孢子虫肺炎,肺炎,脊髓灰质炎,普氏菌感染,原发性阿米巴脑膜脑炎,进行性多灶性白质脑病,鹦鹉热,Q热,狂犬病,鼠咬热,呼吸道合胞病毒感染,鼻孢子虫病,鼻病毒感染,立克次体感染,立克次体痘,裂谷热,落基山斑疹热,轮状病毒感染,风疹,沙门氏菌病,SARS(严重急性呼吸综合征),疥疮,血吸虫病,败血症,志贺氏菌病(Bacillary痢疾),带状疱疹(带状疱疹),天花(天花),孢子丝菌,葡萄球菌食物中毒,感染金黄色葡萄球菌,粪类圆线虫病,梅毒,绦虫病,破伤风,须癣(Barber痒),头皮癣,体癣,股癣,手癣,掌黑癣,足癣(香港脚),甲癣(灰指甲),花斑癣,弓蛔虫病(眼幼虫移行症),弓蛔虫病(内脏幼虫移行症),弓形体病,旋毛虫病,滴虫病,鞭虫病(鞭虫感染),肺结核,兔热病,解脲脲原体感染,委内瑞拉马脑炎,委内瑞拉出血热,病毒性肺炎,西尼罗河热,白毛结节病(白癣),假结核耶尔森氏菌,耶尔森氏鼠疫杆菌肠道病,黄热病,接合菌病。

[0396] 本发明的细胞结合分子,更优选为抗体,对抗的病原菌株包括但不限于,鲍氏不动杆菌,以色列放线菌,放线菌和丙酸杆菌,布氏锥虫,HIV(人免疫缺陷病毒病毒),溶组织内阿米巴,无形体属,炭疽芽孢杆菌,溶血弧菌,胡宁病毒,蛔虫属,曲霉属,星状病毒科,巴贝虫属,蜡状芽孢杆菌,多种细菌,拟杆菌属,大肠杆菌,蛔虫属,BK病毒,结节菌,人芽囊原虫,皮炎芽生菌,马丘波病毒,疏螺旋体属,肉毒梭菌,清风藤属,布鲁氏菌属,通常为洋葱伯克

霍尔德菌和其他伯克霍尔德氏菌种，溃疡分枝杆菌，杯状病毒科，弯曲杆菌属，通常为白色假丝酵母和其他假丝酵母属，汉赛巴尔通体，A群链球菌和葡萄球菌，克氏锥虫，杜克雷嗜血杆菌，VZV，沙眼衣原体，科罗拉多蜱热病毒，鼻病毒，冠状病毒，CJD朊病毒，克里米亚-刚果出血热病毒，新型隐球菌，隐孢子虫属，巴西钩虫，多种寄生虫，环孢子虫，带状绦虫，巨细胞病毒，登革热病毒(DEN-1，DEN-2，DEN-3和DEN-4)-黄病毒，脆弱双歧杆菌，白喉棒状杆菌，裂头绦虫，麦地那龙线虫，埃博拉病毒，棘球绦虫属，埃立克体肠球菌属，肠道病毒属，普氏立克次体，细小病毒B19，人疱疹病毒6和人疱疹病毒7，布氏姜片虫，肝片吸虫和巨大片吸虫，FFI朊病毒，丝虫目超家族，产气荚膜梭菌，梭杆菌属，其他梭状芽孢杆菌，白地霉，GSS朊病毒，肠道贾第虫，伯克霍尔德氏菌，刺孢小芽孢杆菌和革兰氏假丝酵母，淋球菌，肉芽肿克雷伯氏菌，化脓性链球菌，无乳链球菌，流感嗜血杆菌，肠道病毒，主要是柯萨奇A病毒和肠道病毒71，无名病毒，幽门螺旋杆菌，大肠杆菌O157:H7，布尼亚病毒科，甲型肝炎病毒，乙型肝炎病毒，丙型肝炎病毒，丁型肝炎病毒，戊型肝炎病毒，单纯疱疹病毒1，单纯疱疹病毒2，荚膜组织胞浆菌，十二指肠腺瘤和壶腹癌流感嗜血杆菌，人博卡病毒，埃里希体，嗜吞噬细胞无嗜血杆菌，人偏肺病毒，查菲埃里希体，人乳头瘤病毒，人副流感病毒，微小膜壳绦虫和缩小膜壳绦虫，艾巴氏病毒，正粘病毒科家族，贝氏等孢球虫，金格杆菌，肺炎克雷伯菌，克雷伯氏菌，嗜肺军团菌，嗜肺军团菌，嗜肺军团菌，利什曼原虫属，麻风分枝杆菌和结核分枝杆菌，钩端螺旋体属，单核细胞增多性李斯特氏菌，伯氏疏螺旋体和其他疏螺旋体属物种，班氏旋毛虫和马来丝虫，淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)疟原虫属，马尔堡病毒，麻疹病毒，类鼻疽伯克霍尔德氏菌，脑膜炎奈瑟氏球菌，横川后殖吸虫，小孢子虫目门，传染性软疣病毒(MCV)，腮腺炎病毒，伤寒立克次氏体，肺炎支原体，多种细菌和真菌寄生双翅蝇幼虫，沙眼衣原体和淋病奈瑟菌，vCJD朊病毒，诺卡氏菌和其他诺卡氏菌属，盘尾丝虫属，盘鲍拟亚科，副龙属西马尼和其他副属，巴斯德氏菌属，头虱，人体虱，百日咳博德特氏菌鼠疫耶尔森氏菌，肺炎链球菌，肺炎球菌，脊髓灰质炎病毒，普雷沃氏菌属，奈氏格氏杆菌，JC病毒，鹦鹉热衣原体，伯氏考克斯体，狂犬病病毒，单链球菌和螺旋菌，呼吸道合胞病毒，鼻孢子菌，鼻病毒，立克次体属，由小株立克次体，裂谷热病毒，立克次体立克次体，轮状病毒，风疹，沙门氏菌属，SARS冠状病毒，人疥螨，血吸虫属，体细胞属，志贺菌属，水痘带状疱疹病毒，天花少校或天花小，申克孢子丝菌，金黄色葡萄球菌属，金黄色葡萄球菌，链球菌化脓，圆线虫，梅毒螺旋体，绦虫属，破伤风，癣属癣音铀，癣属，絮状表皮癣菌，红色毛癣菌，须毛癣菌，红色毛癣菌，威尼克外瓶霉，毛癣菌属属，细胞死亡属，弓箭毒或弓箭毒，刚地弓形虫、旋毛虫，阴道毛滴虫，三丘里三种，结核分枝杆菌，弗朗西拉图拉菌，尿素和马脑炎病毒，委内瑞拉马脑炎病毒，霍乱弧菌，瓜纳里托病毒，西尼罗河病毒，beigelii丝孢，假结核耶尔森氏菌，小肠结肠炎耶尔森氏菌，黄热病病毒，毛霉菌目阶(毛霉菌病)和虫霉目阶(虫霉属真菌病)，毛霉菌目绿脓杆菌，弯曲杆菌(弧菌)，气单胞菌，艾氏菌，耶尔森氏菌，志贺痢疾杆菌，志贺氏杆菌，志贺氏菌，沙门氏菌，伤寒沙门氏菌，雅司螺旋体，奋森氏螺旋体，伯氏疏螺旋体，细螺旋体，卡氏肺孢子虫，流产布鲁氏菌，布鲁杆菌，布鲁氏菌，支原体属，普氏立克次体，恙虫病立克次氏体，衣原体属，致病性真菌(烟曲霉，白色念珠菌，荚膜组织胞浆菌)，原生动物(溶组织内阿米巴，Tenas毛滴虫，Hominis毛滴虫，冈比亚锥虫，罗得西亚锥虫，罗氏利什曼原虫，热带利什曼原虫，巴西利什曼原虫，肺孢子虫肺炎，间日疟原虫，恶性疟原虫，疟原虫疟疾)或Helminiths(日本血吸虫，曼氏血吸虫，埃及血吸虫和钩虫)。

[0397] 其他用作治疗病毒性疾病的偶联物上的抗体，包括但不限于，抗下列致病性病毒抗原的抗体：痘病毒；疱疹病毒；腺病毒；小黄病毒；肠病毒；小核糖核酸病毒；细小病毒；呼肠病毒；逆转录病毒；流感病毒；副流感病毒；腮腺炎；麻疹；呼吸道合胞病毒；风疹；虫媒病毒；弹状病毒；沙门氏菌；非a/非b型肝炎病毒；鼻病毒；冠状病毒；罗托病毒；致癌病毒，如HBV(肝细胞癌)，人乳头状瘤病毒(宫颈癌，肛门癌)，卡波济氏肉瘤相关的疱疹病毒(卡波济氏肉瘤肉瘤)、人类疱疹病毒第四型(鼻咽癌、伯基特淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤)、瘤病毒(默克尔细胞癌)、SV40(猿猴病毒40)、HCV(肝细胞癌)，HTLV-1(成人T细胞白血病/淋巴瘤)；免疫紊乱导致病毒，如人类免疫缺陷病毒(艾滋病)；中枢神经系统病毒，如JCV(进行性多灶性脑白质病)，丙型肝炎病毒(亚急性硬化性全脑炎)，LCV(淋巴细胞性脉络丛脑膜炎)，亚博病毒脑炎，正粘病毒(脑炎性脑炎)，RV(狂犬病)，长鼻病毒，疱疹病毒脑膜炎，拉姆齐亨特综合征II型，脊髓灰质炎病毒(脊髓灰质炎病毒，后脊髓灰质炎综合征)，HTLV-1(热带麻痹性麻痹))；巨细胞病毒(巨细胞病毒视网膜炎，HSV(疱疹性角膜炎)；心血管病毒，如CBV(心包炎，心肌炎)；呼吸系统/急性病毒性鼻内炎/病毒性肺炎，如爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV感染/传染性单核病)，巨细胞病毒，非典冠状病毒(严重急性呼吸综合征)或正黏液病毒，流感病毒a/b/c(流感/禽流感)，副粘病毒，人类副流感病毒，RSV(人类呼吸道合胞病毒)，hMPV；消化系统病毒(腮腺炎病毒，巨细胞病毒(巨细胞病毒食管炎)，腺病毒(腺病毒感染)，轮状病毒，诺瓦克病毒，星状病毒，冠状病毒，乙型肝炎病毒，CBV，甲型肝炎病毒，丙型肝炎病毒，丁型肝炎病毒，戊型肝炎病毒，HGV)；泌尿生殖病毒，如BK病毒，MuV(腮腺炎)。

[0398] 更进一步，本发明也包括本发明中偶联物和可接受的载体，稀释剂或辅料构成的组合物，以治疗癌症、感染或自身免疫性疾病。治疗癌症、感染和自身免疫性疾病的方法可以在体外，体内或离体实施。体外用途的实例包括用它处理细胞培养物，以杀死除了不表达靶抗原的变体以外的所有细胞；或者杀死表达不需要的抗原的变体。离体使用的例子包括在进行移植(HSCT)之前对造血干细胞(HSC)进行处理，以杀死患病或恶性肿瘤细胞。例如，在癌症治疗中的自体移植之前或在自身免疫性疾病的治疗中从骨髓中去除肿瘤细胞或淋巴细胞，或在移植之前为了防止移植物抗宿主疾病从同种异体骨髓或组织中除去T细胞和其他淋巴细胞。这样的临床离体治疗可以按如下步骤进行：从患者或其他个体收获骨髓，然后在含有血清的培养基中约37℃下孵育约30分钟至约48小时，在该培养基中加入本发明的偶联物，浓度范围从约1pM至0.1mM。具体的药物浓度和孵育时间应当由专业临床医师决定。孵育后，用含血清的培养基洗涤骨髓细胞，并按照已知的方法通过静脉注射给患者。若患者在骨髓采集和再输注治疗细胞之间，还接受其它治疗(例如消融化疗或全身辐射疗程)的情况下，应使用标准医疗设备将处理后的骨髓细胞在液氮中冷冻储存。

[0399] 用于协同作用的化学治疗药物或细胞毒性药物

[0400] 可以与本发明一起协同作用的化学治疗药物是包括细胞毒性剂在内的小分子药物。本发明中的“小分子药物”泛指分子量为100至2500，更优200至2000的有机、无机或金属有机化合物。这些小分子药物在本领域文献中已被充分描述，如WO05058367A2和美国专利4,956,303等，此处引作参考。小分子药物包括已知的药物和即将被公开的药物。

[0401] 已知的药物包括但不限于：

[0402] 1)化疗药物：a)烷基化剂，如氮芥：氯苯那普，氯普那嗪，环磷酰胺，达喀尔巴嗪，雌二醇氮芥，异环磷酰胺，氮芥，盐酸二甲氧胺，氧化二氮芥，盐酸氨氯地平，麦考酚酸，卫矛

醇,呱泊溴烷,新氮芥,苯芥胆甾醇,松龙苯芥,噻替呱,曲磷胺对,尿嘧啶;CC-1065(包括其阿多来新、卡折来新、比折来新及其合成同系物);多卡霉素(包括KW-2189和CBI-TMI、及其合成同系物);苯并二氮卓二聚体(例如吡咯苯并二氮卓(PBD)或托美霉素,吲哚苯并二氮卓,咪唑苯并噻二氮卓或恶唑烷苯并二氮卓的二聚体);亚硝基脲(卡莫司汀,洛莫司汀,氯化梭菌素,福莫司汀,尼莫司汀,拉莫司汀);烷基磺酸盐(白苏芬、树苏芬、磺胺异丙磺胺和皮苏芬);三氮烯(达喀尔巴嗪);含铂化合物(卡铂,顺铂,奥沙利铂);吖丙啶类,如苯并二氢吡喃酮,卡洛酮,美妥替派和乌雷多巴;乙烯亚胺和甲基三聚氰胺,包括六甲蜜胺,三亚乙基三胺,三乙基磷酰胺,三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基甲基胺;

[0403] b)植物生物碱:如长春花生物碱(长春新碱,长春碱,长春地辛,长春瑞滨,去甲长春碱);紫杉醇类(紫杉醇,多西紫杉醇及其同系物);美登素类(DM1、DM2、DM3、DM4、美登素、安沙霉素及其同系物);cryptophycin(特别是cryptophycin 1和cryptophycin 8);埃博霉素,软珊瑚醇,迪莫利德,草苔虫内酯,海兔毒素,奥瑞他汀,cephalostatin;pancratistatin;sarcodictyin;海绵抑制素;c)DNA拓扑异构酶抑制剂,例如依托泊苷替尼(9-氨基喜树碱,喜树碱,克立那托,多拉霉素,依托泊苷,磷酸依托泊苷,伊立替康,米托蒽醌,诺消灵,视黄酸(视黄醇),替尼泊苷,拓扑替康,9-硝基喜树碱(RFS 2000));丝裂霉素(丝裂霉素C);d)抗代谢物,例如抗叶酸剂,DHFR抑制剂(甲氨蝶呤,曲麦克特,二甲叶酸,蝶罗呤,氨喋呤(4-氨基苯甲酸)或其他叶酸同系物);IMP脱氢酶抑制剂(麦考酚酸,噻唑呋林,利巴韦林,EICAR);核糖核苷酸还原酶抑制剂(羟基脲,去铁胺);嘧啶同系物,尿嘧啶同系物(安西他滨,阿扎胞苷,6-氮尿嘧啶,卡培他滨(希罗达),卡莫氟,阿糖胞苷,双脱氧尿苷,脱氧氟尿苷,依诺他滨,5-氟尿嘧啶,氟尿苷,ratitrexed(Tomudex);胞嘧啶同系物(阿糖胞苷,胞嘧啶阿拉伯糖苷,氟达拉滨);嘌呤同系物(硫唑嘌呤,氟达拉滨,巯嘌呤,硫胺素,硫鸟嘌呤);叶酸补充剂,如弗洛林酸;e)激素疗法剂,如受体拮抗剂,抗雌激素(甲地孕酮,雷洛昔芬,他莫昔芬),LHRH兴奋剂(戈斯他林,醋酸亮丙瑞林);抗雄激素药(比卡鲁胺,氟他胺,卡鲁司酮,丙酸倍他雄酮,表雄甾醇,戈舍瑞林,亮丙瑞林,美替利定,尼鲁米特,睾内酯,曲洛司坦及其他雄激素抑制剂);维甲类化合物,维生素D3同系物(CB1093,EB1089,KH1060,胆钙化醇,麦角钙化甾醇);光动力疗法剂(维替泊芬,酞菁,光敏剂Pc4,去甲氧基-竹红菌素A);细胞因子(干扰素-α,干扰素-γ,肿瘤坏死因子(TNF),含TNF的人蛋白);f)激酶抑制剂,如BIBW 2992(抗-EGFR/Erb2),伊马替尼,吉非替尼,呱加他尼,索拉非尼,达沙替尼,舒尼替尼,厄洛替尼,尼洛替尼,拉帕替尼,阿西替尼,帕唑帕尼,凡德他尼,E7080(抗VEGFR2),mubritinib,普纳替尼(AP24534),bafetinib(INNO-406),bosutinib(SKI-606),卡博替尼,维莫德吉,iniparib,鲁索利替尼,CYT387,阿西替尼,tivozanib,索拉非尼,贝伐单抗,西妥昔单抗,曲妥珠单抗,雷珠单抗,帕尼单抗,伊斯平斯;g)聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)抑制剂,如奥拉帕里、尼拉帕里、依尼帕里、塔拉佐帕里、维利帕里、维利帕里、CEP 9722(Cephalon)、E7016(Eisai)、BGB-290(Beigene)、3-氨基苯甲酰酰胺;h)抗生素,如烯二炔类抗生素(加利车霉素,特别是加利车霉素γ1,δ1,α1和β1(参考J.Med.Chem.1996,39(11),2103-2117;Angew Chem Intl.Ed.Engl.1994,33:183-186),达因霉素,包括达因霉素A和脱氧米霉素,埃斯培拉霉素,卡塔尔霉素,C-1027,maduropeptin,新卡嗪奥斯汀和相关色蛋白烯二炔抗生素),aclacinomysins,放线菌素,安曲霉素,重氮丝氨酸,博来霉素,卡诺霉素,卡拉霉素,洋红霉素,嗜癌素,色霉素,达金霉素,柔红霉素,去柔红霉素,6-重氮-5-氧代-L-

去甲亮氨酸,阿霉素,吗啉-阿霉素,氰基吗啉-阿霉素,2-吡咯啉阿霉素和脱氧柔红霉素,表柔比星,阿柔比星,伊达比星,马可霉素,nitomycin,霉酚酸,诺加霉素,橄榄霉素,Peplomycin,potfiromycin,嘌呤霉素,奎拉霉素,罗道霉素,链黑霉素,链脲霉素,杀结核菌素,乌苯美司,净司他丁,佐柔比星;i)其他,如聚酮化合物(番荔素),特别是bullatacin和bullatacinone;吉西他滨,环氧酶素(如卡菲偌米布),硼替佐米,沙利度胺,来那度胺,pomalidomide,tosedostat,zybrestat,PLX4032,STA-9090,Stimuvax,allovectin-7,Xegeva,Provenge,Yervoy,异戊二烯化抑制剂(如洛伐他汀),多巴胺能神经毒素(如星形孢菌素),放线菌素(如放线菌素D,更生霉素),博莱霉素(如博来霉素A2,博莱霉素B2,培洛霉素),蒽环类抗生素(如柔红霉素),鹅膏毒素,阿霉素(亚德里亚霉素),伊达比星,表柔比星,吡柔比星,佐柔比星,米托蒽醌,MDR抑制剂(如维拉帕米),Ca^{2+}ATP酶抑制剂(如毒胡萝卜素),组蛋白去乙酰酶抑制剂(伏立诺他,罗米地辛,帕比司他,丙戊酸,Mocetinostat(MGCD0103),Belinostat,PCI-24781,恩替诺特,SB939,Resminostat,Givinostat,AR-42,CUDC-101,萝卜硫素,曲古抑菌素A);塞来昔布,格列酮类,表没食子儿茶素没食子酸酯,双硫仑,Salinosporamide A;抗肾上腺药物,如氨鲁米特,米托坦,曲洛司坦,醋葡醛内酯,醛磷酰胺,氨基乙酰丙酸,安吖啶,阿拉伯糖苷,bestrabucil,比生群,edatraxate,defofamine,美可辛,地吖醌,依氟鸟氨酸(DFMO),elfomithine,依利醋铵,依托格鲁,硝酸镓,胞嘧啶,羟基脲,伊班膦酸盐,香菇多糖,氯尼达明,米托胍腙,米托蒽醌,莫呱达醇,二胺硝吖啶,喷司他丁,蛋氨氮芥,吡柔比星,鬼臼酸,2-乙肼,甲基苄肼;PSK®;呱嗪二酮丙烷;根霉素;西佐;螺环锗;细格孢氮杂酸;三亚胺醌;三氯三乙胺;单端孢霉烯(特别是T-2毒素,疣孢菌素A,杆孢菌素A和anguidine),聚氨酯,siRNA,反义药物和核酸分解酶。

[0404] 2)自身免疫疾病药物,包括但不限于,环孢菌素,环孢菌素A,氨基己酸,硫唑嘌呤,溴隐亭,苯丁酸氮芥,氯喹,环磷酰胺,皮质类固醇(例如安西奈德,倍他米松,布地奈德,氢化可的松,氟尼缩松,丙酸氟替卡松,氟可龙达那唑,地塞米松,曲安奈德,二丙酸倍氯米松),DHEA,依那西普,羟基氯喹,英夫利昔单抗,美洛昔康,甲氨蝶呤,麦考酚酸酯,泼尼松,西罗莫司,他克莫司。

[0405] 3)抗感染性疾病药物,包括但不限于a)氨基糖苷类:阿米卡星,阿司米星,庆大霉素(奈替米星,西索米星,异帕米星),潮霉素B,卡那霉素(阿米卡星,阿贝卡星,氨基脱氧卡那霉素,地贝卡星,妥布霉素),新霉素(framycetin,巴龙霉素,核糖霉素),奈替米星,壮观霉素,链霉素,妥布霉素,甲基姿苏霉素;b)酰胺醇类:迭氮氯霉素,氯霉素,氟苯尼考,甲砜霉素;c)安沙霉素:格尔德霉素,除莠霉素;d)碳青霉烯类:比阿培南,多利培南,厄他培南,亚胺培南/西司他丁,美罗培南,帕尼培南;e)头孢烯:碳头孢烯(洛拉卡比),头孢乙腈,氯氨苄青霉素,头孢拉定,头孢羟氨,头孢洛宁,头孢噻啶,头孢噻吩或头孢金素,头孢氨苄,头孢来星,头孢孟多,头孢匹林,羟胺唑头孢菌素,氟唑头孢菌素,孢西酮,唑啉头孢菌素,头孢拉宗,头孢卡品,头孢达肟,头孢吡,头孢克肟,头孢西丁,头孢罗齐,头孢甲氧环烯胺,头孢替唑,头孢呋辛,头孢克肟,头孢地尼,头孢托仑,头孢吡,头孢他美,头孢甲肟,头孢地嗪,头孢尼西,头孢呱酮,头孢雷特,头孢噻肟,噻乙胺唑头孢菌素,头孢唑兰,头孢氨苄,头孢咪唑,头孢匹胺,头孢匹罗,头孢泊肟,头孢罗齐,头孢喹诺,头孢磺啶,头孢他啶,头孢特仑,头孢布腾,头孢噻林,头孢唑肟,头孢吡普,头孢曲松,头孢呋辛,头孢唑南,头霉素(头孢西丁,头孢替坦,头孢氰唑),氧(碳)头孢烯(氟氧头孢,拉氧头孢);f)糖肽:博来霉素,万古霉素(奥

利万星,特拉万星),替考拉宁(达巴万星),雷莫拉宁;g)甘氨酰环素:如替加环素;h)β-内酰胺酶抑制剂:青霉烷(舒巴坦,他唑巴坦),氧青霉烷(克拉维酸);i)林可酰胺:克林霉素,林可霉素;j)脂肽:达托霉素,A54145,钙依赖性抗生素(CDA);k)大环内酯类:阿奇霉素,克霉素,克拉霉素,地红霉素,红霉素,氟雷霉素,交沙霉素,酮内酯(泰利霉素,塞红霉素),麦迪霉素,米卡霉素,竹桃霉素,利福霉素(异烟肼、利福平,利福布丁,利福喷汀),罗匹霉素,罗红霉素,大观霉素,螺旋霉素,他克莫司(FK506),醋竹桃霉素,泰利霉素;l)单环胺:氨曲南,替吉莫南;m)恶唑烷酮类:利奈唑胺;n)青霉素类:阿莫西林,氨苄青霉素(匹氨西林,海洛西林,巴氨西林,氨苄青霉素,阿霉素),阿替代西林,阿洛西林,苄青霉素,苄星青霉素苄青霉素,苄星青霉素苯氧甲基青霉素,克洛西林,普鲁卡因青霉素(美替西林),美洛西林,甲氧西林,萘夫西林,苯唑西林,醋甲西林,青霉素,非奈西林,苯氧基甲基青霉素,呱拉西林,氨苄西林,磺苯西林,替莫西林,替卡西林;o)多肽:杆菌肽,粘菌素,多粘菌素B;p)喹诺酮类:阿拉曲沙星,巴洛沙星,环丙沙星,克林沙,达氟沙星,二氟沙星,依诺沙星,恩诺沙星,加雷沙星,加替沙星,吉米沙星,格帕沙星,卡诺曲伐沙星,左氧氟沙星,洛美沙星,麻保沙星,莫西沙星,那氟沙星,诺氟沙星,奥比沙星,氧氟沙星,培氟沙星,曲伐沙星,格帕沙星,西他沙星,司帕沙星,替马沙星,托沙星,曲伐沙星;q)链阳性菌素:普那霉素,奎奴普丁/达福普汀;r)磺胺类:氨苄磺胺,偶氮磺胺,磺胺嘧啶,磺胺甲异唑、磺胺酰亚胺、磺胺吡啶、磺胺异恶唑、甲氧苄啶、磺胺甲恶唑(复方磺胺甲恶唑);s)类固醇抗菌药物:如夫西地酸;t)四环素类:强力霉素,金霉素,氯米西环素,地美环素,雷莫昔林,美西环素,美他环素,米诺环素,土霉素,潘美环素,吡咯烷甲基四环素,四环素,甘氨酰环素(如替加环素);u)其他类型的抗生素:番荔枝素,肿凡纳明,细菌萜醇抑制剂(杆菌肽),DANAL/AR抑制剂(环丝氨酸),dictyostatin,圆皮海绵内酯,软珊瑚醇,埃博霉素,乙胺丁醇,依托泊苷,法罗培南,夫西地酸,呋喃唑酮,异烟肼,laulimalide,甲硝唑,莫匹罗星,NAM合成抑制剂(例如磷霉素),呋喃妥因,紫杉醇,普兰西霉素,吡嗪酰胺,奎奴普丁/达福普汀,利福平,他唑巴坦替硝唑,乌菊花素。

[0406] 4)抗病毒药物:a)侵入/融合抑制剂:阿帕韦洛,马拉韦罗,vicriviroc,gp41(恩夫韦肽),PRO 140,CD4(艾巴利珠单抗);b)整合酶抑制剂:雷特格韦,elvite-gravir,globoidnan A;c)成熟抑制剂:bevirimat,vivecon;d)神经氨酸酶抑制剂:奥司他韦,扎那米韦,帕拉米韦;e)核苷和核苷酸:阿巴卡韦,阿昔单韦,阿德福韦,阿莫西韦,阿昔单抗,溴夫定,西多福韦,克拉夫定,地塞米松,去羟肌苷(ddI),elvucitabine,恩曲他滨(FTC),恩替卡韦,泛昔洛韦,氟拉西林(5-FU),3'-氟取代的2',3'-脱氧核苷同系物,如3'-氟-2',3'-双脱氧胸苷(FLT)和3'-氟-2',3'-双脱氧鸟苷(FLG),福米韦生,9-鸟嘌呤,碘苷,拉米夫定(3TC),1-核苷(例如β-1-胸苷和β-1-2'-脱氧胞苷),喷昔洛韦,racivir,利巴韦林,迪替丁,司他夫定(d4T),塔利巴韦林(viramidine),替比夫定,替诺福韦,三氟尿苷伐昔洛韦,缬更昔洛韦,扎西他滨(ddC),齐多夫定(AZT);f)非核苷类:金刚烷胺,阿替吡啶,卡普韦林,二芳基嘧啶(依曲韦林,rilpivirine),地拉夫定,二十二烷醇,乙米韦林,依法韦仑,膦甲酸(磷酰基甲酸),咪喹莫特,聚乙二醇干扰素,洛韦胺,洛德腺苷,甲吲噻腙,奈韦拉平,NOV-205,长效干扰素α,鬼臼毒素,利福平,金刚乙胺,瑞喹莫德(R-848),醋胺金刚烷;g)蛋白酶抑制剂:安普那韦,阿扎那韦,boceprevir,darunavir,福萨那韦,印地那韦,洛匹那韦,奈非那韦,普来可那立,利托那韦,沙奎那韦,telaprevir

[0407] (VX-950),替拉那韦;h)其它类型的抗病毒药物:抗体酶,阿比朵尔,calanolide

a,ceragenin,氰维林-n,二芳基嘧啶,表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG),膦甲酸,格里菲辛,taribavirin(viramidine),羟基脲,KP-1461,米替福新,普来可那立,混成抑制剂,利巴韦林,seliciclib。

[0408] 5)放射治疗使用的放射性同位素。放射性同位素(放射性核素)的实例有^{3}H,^{11}C,^{14}C,^{18}F,^{32}P,^{35}S,^{64}Cu,^{68}Ga,^{86}Y,^{99}Tc,^{111}In,^{123}I,^{124}I,125I,^{131}I,^{133}Xe,^{177}Lu,^{211}At或^{213}Bi。放射性同位素标记的抗体可用于受体靶向成像实验,或者可用于如本发明的抗体-药物偶联物的靶向治疗(Wu et al Nature Biotechnology 2005,23(9):1137-1146)。细胞结合分子,例如抗体可以通过本专利的连接体连结配体试剂,进行标记。配体可以用文献(Current Protocols in Immunology,Volumes 1and 2,Coligen et al,Ed.Wiley-Interscience,New York,N.Y.,Pubs.(1991))所述的方法与放射性金属结合、螯合或生成复合物。可以络合金属离子的螯合配体包括DOTA,DOTP,DOTMA,DTPA和TETA(Macrocyclics,Dallas,TX)等。

[0409] 6)另一种细胞结合分子-药物偶联物作为协同剂。优选的协同偶联物上的细胞毒性分子为:Tubulysin同系物、美登木素生物碱同系物、紫杉醇(紫杉烷)同系物、CC-1065同系物、柔红霉素和多柔比星化合物、鹅膏毒素同系物、苯并二氮杂二聚体(如吡咯苯并二氮杂的二聚体(PBD、托马霉素、安曲霉素、吲哚苯并噻二氮卓类、咪唑苯并噻二氮卓类或恶唑烷苯并二氮卓类)、加利西霉素和烯二炔类抗生素化合物、放线菌素、重氮丝氨酸、博莱霉素、表柔比星、他莫昔芬、伊达比星、海兔毒素、奥瑞他汀(如MMAE、MMAF、奥瑞他汀PYE、奥瑞他汀TP、奥瑞他汀2-AQ、6-AQ、EB(AEB)和EFP(AEFP))、多卡米星、格尔德霉素、氨甲喋呤、噻替派、长春碱、长春新碱、hemiasterlin、纳沙酰胺、小金霉素、radiosumin、互花米草素、microsclerodermin、噻吩甲酰胺、埃斯呱霉素、PNU-159682,以及它们的其同系物及以上所述物质的衍生物。

[0410] 7)上述任何药物的在药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0411] 在另一个实施例中,免疫毒素可以作为协同药物与细胞结合分子偶联。本发明的免疫毒素是大分子药物,通常是源自细菌或植物蛋白的细胞毒性蛋白,例如白喉毒素(DT)、霍乱毒素(CT)、天花粉蛋白(TCS)、香石竹毒蛋白、假单胞菌外毒素A(ETA)、红细胞毒素,白喉毒素,AB毒素,III型外毒素等。它也可以是一种带有剧毒的细菌成孔原毒素,经过蛋白酶水解启动。原毒素的一个例子是前溶血素及其基因改造的形式topsalysin。Topsalysin是一种经过改性的重组蛋白,经过改造后被前列腺中的酶选择性地启动,致使局部细胞死亡和组织破坏,却不会损伤邻近的组织和神经。

[0412] 在另一种协同免疫疗法中,下列分子的抗体:检查点抑制剂、TCR(T细胞受体)T细胞、CAR(嵌合抗原受体)T细胞、B细胞受体(BCR)、自然杀伤(NK)细胞,或CD3、CD4、CD8、CD16(FcγRIII)、CD27、CD40、CD40L、CD45RA、CD45RO、CD56、CD57、CD57bright、TNFβ、脂肪酸合成酶配体、MHCI类分子(HLA-A,B,C)或NKR-P1的抗体,优选与本发明的偶联物用于协同治疗。

[0413] 制剂与应用

[0414] 本专利申请的偶联物被配制成液体,或者适于冻干的形态,冻干后被重新制成液体制剂。液体配方或配制的冻干粉末中的偶联物,为配方的主要成分,占0.01%-99%的重量。一般而言,可在病人上施用,无高水平抗体聚集的液体制剂除了包含0.1克/升-300克/升的偶联物活性成分,还包括一种或多种多元醇(例如糖)、pH值为4.5至7.5的缓冲液、表面活性剂(如聚山梨酸20或80)、抗氧化剂(例如抗坏血酸和/或蛋氨酸)、强化剂(如甘露醇、山

梨醇或氯化钠)、螯合剂(如EDTA)、金属络合物(如锌-蛋白络合物)、可生物降解聚合物(如聚酯)、防腐剂(如苯甲醇)和/或游离氨基酸。

[0415] 用于制剂的合适缓冲液包括但不限于,有机酸盐,例如柠檬酸、抗坏血酸、葡糖酸、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或邻苯二甲酸的钠、钾、铵或三羟乙基氨基盐,氨基丁三醇盐酸、硫酸或磷酸缓冲液。此外,氨基酸阳离子也可用作缓冲液。这些氨基酸包括但不限于,精氨酸、甘氨酸、甘氨酰甘氨酸和组氨酸。精氨酸缓冲液包括精氨酸乙酸盐、精氨酸氯化物、精氨酸磷酸盐、精氨酸硫酸盐,精氨酸琥珀酸盐等。在一个实施例中,精氨酸缓冲液是精氨酸乙酸盐。组氨酸缓冲液的实例包括组氨酸氯化物-精氨酸氯化物、组氨酸乙酸盐-精氨酸乙酸盐、组氨酸磷酸盐-精氨酸磷酸盐、组氨酸硫酸盐-精氨酸硫酸盐、组氨酸琥珀酸盐-精氨酸琥珀酸盐等。缓冲液的pH是4.5至pH7.5,优选约4.5至约6.5,更优选约5.0至约6.2。在一些实施例中,缓冲液中有机酸盐的浓度为约10mM至约500mM。

[0416] 在制剂中可选地含有的“多元醇”是具有多个羟基的物质。多元醇可用作液体和冻干制剂中的稳定辅料和/或等渗剂。多元醇可以保护生物药物免受物理和化学降解。最好能被排除的共溶剂增加了蛋白质接口处溶剂的有效表面张力,能量最有利的结构构像是表面积最小的那些溶剂。多元醇包括糖(还原和非还原糖)、糖醇和糖酸。“还原糖”是指含有半缩醛基团的糖,它能够还原金属离子,或与蛋白质中的赖氨酸和其他氨基发生反应,“非还原糖”是指不具有还原糖性质的糖。还原糖的例子有果糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、阿拉伯糖、木糖、核糖、鼠李糖、半乳糖和葡萄糖。非还原糖包括蔗糖、海藻糖、山梨糖、松解糖和棉子糖。糖醇选自甘露醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、赤藓糖醇、苏糖醇、山梨醇和甘油。糖酸包括L-葡萄糖酸盐及其金属盐。液体配方或冻干制剂中的多元醇含量,按重量计,为0.0%-20%。在配方中优选浓度约为0.1%到15%的非还原糖,蔗糖或海藻糖,其中由于海藻糖的溶液稳定性,海藻糖更优。

[0417] 在制剂中可选的表面活性剂可选自聚山梨醇酯(聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯65、聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯81、聚山梨醇酯85等);泊洛沙姆(如泊洛沙姆188、聚(环氧乙烷)-聚(环氧丙烷)、泊洛沙姆407或聚丙二醇-丙二醇等);Triton;十二烷基硫酸钠(SDS);月桂基硫酸钠;辛基糖苷钠;十二烷基、肉豆蔻酰基、亚油基或硬脂基磺基甜菜碱;十二烷基、肉豆蔻酰基、亚油基或硬脂基肌氨酸;亚油酸、肉豆蔻基或十六烷基甜菜碱;月桂酰氨基丙基、椰油酰胺丙基、亚油酰胺基丙基、肉豆蔻酰基丙基、棕榈酰基丙基或异硬脂酰氨基丙基-甜菜碱(例如月桂酰胺丙基);肉豆蔻酰胺丙基、棕榈酰丙基或异硬脂酰氨基丙基-二甲胺;甲基椰油酰基钠或甲基油基牛磺酸二钠;十二烷基甜菜碱、十二烷基二甲基氧化胺、椰油酰胺丙基甜菜碱和可可两性甘氨酸酯;MONAQUAT™系列(如异硬脂基乙基亚胺鎓乙基硫酸盐);聚乙二醇,聚丙二醇,乙二醇和丙二醇的共聚物(如Pluronic、PF68等)。优选的表面活性剂是聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯,如聚山梨醇酯20、40、60或80(Tween20、40、60或80)。制剂中表面活性剂的浓度范围,按照重量计,为0.0%至约2.0%。在某些特定实施例中,表面活性剂浓度为约0.01%至约0.2%。在一个实施例中,表面活性剂浓度为约0.02%。

[0418] 在制剂中可选的“防腐剂”是从根本上可以减小其中细菌的化合物。防腐剂的实例包括十八烷基二甲基苄基氯化铵、六甲基氯化铵、苯扎氯铵(烷基苄基二甲基氯化铵的混合物,其中烷基为长链烷基)和苄索氯铵。其他类型的防腐剂包括芳香醇如苯酚,丁基和苄基醇,对羟基苯甲酸烷基酯,如甲酯或丙酯,儿茶酚、间苯二酚、环己醇、3-戊醇和间甲酚。液体

配方或冻干粉末中的防腐剂含量，按照重量计，为0.0%-5.0%。在一个实施例中，所用防腐剂是苯甲醇。

[0419] 在制剂中作为填充物质或张力剂或渗透压调节剂的，合适的游离氨基酸，选自但不限于精氨酸、胱氨酸、甘氨酸、赖氨酸、组氨酸、鸟氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、甘氨酸谷氨酸或天冬氨酸中的一种或多种。优选碱性氨基酸为精氨酸、赖氨酸和/或组氨酸。如果组成中包含组氨酸，它可以充当缓冲剂和游离氨基酸，但是当使用组氨酸缓冲液时，通常还要包含一个非组氨酸的游离氨基酸，如赖氨酸。氨基酸可以以D-和/或L-型存在，但L-型比较常见。氨基酸可以任何合适的盐的形式存在，如精氨酸盐酸盐。液体配方或冻干粉末中的氨基酸含量，以重量计，为0.0%-30%。

[0420] 可选地，制剂还包含甲硫氨酸，谷胱甘肽、半胱氨酸、胱氨酸或抗坏血酸作为抗氧化剂，在液体配方中浓度最多为约5毫克/毫升，在冻干粉末中的含量，以重量计，为0.0%-5.0%；可选地，制剂包含金属螯合剂，例如EDTA，EGTA等，在液体配方中浓度为约2mM，在冻干粉末中的含量，以重量计，为0.0%-0.3%。

[0421] 最终的制剂可以用缓冲调节剂(如一种酸，包括HCl、H_2SO_4、乙酸，H_3PO_4、柠檬酸等，或是碱，如NaOH、KOH、NH_4OH、乙醇胺、二乙醇胺或三乙醇胺、磷酸钠、磷酸钾、柠檬酸三钠、氨基丁三醇等)调节至优选的pH值。制剂还应当被调节至“等渗”，即目标制剂具有与人血基本相同的渗透压。等渗制剂渗透压通常为250至350mOsm。可以使用蒸气压或冰冻型渗透压计测量等渗性。等渗剂选自甘露醇、山梨糖醇、乙酸钠、氯化钾、磷酸钠、磷酸钾、柠檬酸三钠或NaCl。通常，缓冲盐和等渗剂在制剂中含量最多为30%(重量)。

[0422] 可用在本专利液体或冻干制剂中其他辅料还包括：如岩藻糖、纤维二糖、麦芽三糖、蜜二糖、辛酮糖、核糖、木糖醇、精氨酸、组氨酸、甘氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、谷氨酸、赖氨酸、咪唑、甘氨酰甘氨酸、甘露糖基甘油酸酯、Triton X-100、Pluoronic F-127、纤维素、环糊精、(2-羟丙基)-β-环糊精、葡聚糖(10,40和/或70kD)、聚葡萄糖、麦芽糖糊精、聚蔗糖、明胶、羟丙基甲基纤维素、磷酸钠、磷酸钾、$ZnCl_2$、锌、氧化锌、柠檬酸钠、柠檬酸三钠、氨基丁三醇、铜、纤连蛋白、肝素、人血清白蛋白、鱼精蛋白、甘油、EDTA、甲酚、苯甲醇、苯酚、多元醇、羰基被氢化还原成伯或仲羟基的糖。

[0423] 其它可以在本专利申请的液体制剂中使用的辅料还包括：如调味剂、抗微生物剂、甜味剂、抗氧化剂、抗静电剂、脂质如磷脂或脂肪酸脂、类固醇如胆固醇、蛋白质辅料如血清白蛋白(人血清白蛋白)、重组人白蛋白、明胶、酪蛋白、成盐反离子如钠等。这些和另外的适用于本发明制剂的，已知的药物辅料和/或添加剂为本领域公知，如在由美国医药协会罗威(Rowe)等人编着的第四版《药用辅料手册》(The Handbook of Pharmaceutical Excipients)中所列；以及由威尔金斯出版公司出版(2005)，热纳罗(Gennaro)等人编着的第21版《雷明顿：药学科学与实践》(Remington:the Science and Practice of Pharmacy)中所列。

[0424] 容纳本专利申请中的偶联物制剂的药物容器或器具有：小瓶，瓶，预填充注射器，预填充或自动注射器。液体配方可以在硼硅酸盐或钠钙玻璃小瓶中冷冻干燥，或滚筒干燥，成饼或粉末形式。固体粉末也可以通过有效的喷雾干燥制备，然后用小瓶或药物容器包装，用于储存和配送。

[0425] 在更进一步的实施例中，本发明提供了制剂的制备方法，包括以下步骤：(a)冻干

包含偶联物，辅料和缓冲体系的液体；(b)在介质中复溶步骤(a)中的冻干混合物，以使得复溶的制剂稳定。步骤(a)重的液体可进一步包含稳定剂和一种或多种辅料，选自前述填充剂、盐、表面活性剂和防腐剂。复溶介质可选用水，如无菌水，抑菌性注射用水(BWFI)、乙酸、丙酸、琥珀酸、氯化钠、氯化镁、氯化钠的酸性溶液、氯化镁的酸性溶液或精氨酸的酸性溶液，其含量为约10至约250mM。

[0426] 本专利申请的偶联物的液体制剂应具有各种设定的特征。需要考虑的主要问题之一是其稳定性，因为蛋白质/抗体在制造和储存期间，常会形成可溶及不溶的聚集体。此外，溶液中会发生各种化学反应(脱酰胺、氧化、剪切、异构化等)，导致降解产物水平增加和/或生物活性丧失。液体或冻干制剂中的偶联物最好应在25℃下，具有超过6个月的货架期。更优的液体或冻干制剂中的偶联物应在25℃下具有超过12个月的货架期。最为优选的液体制剂应该在2-8℃下具有约24至36个月的货架期，冻干粉末在2-8℃下，应该具有长达约60个月的货架期。液体制剂和冻干制剂应该具有在-20℃或-70℃下至少两年货架期。

[0427] 在某些实施例中，制剂在冷冻(例如-20℃或-70℃)和解冻后，如在冷冻和解冻1、2或3个循环后，还是稳定的。稳定性可以通过各种不同的方式进行定性和/或定量评估，包括评估药物/抗体(蛋白质)比率和多聚体的生成(如使用紫外吸收光谱、尺寸排除色谱法、测量混浊度和/或通过目视检查)；评估电荷异质性(使用阳离子交换色谱法、图像毛细管等电聚焦(ICIEF)或毛细管电泳)；氨基末端或羧基末端序列分析；质谱分析或MALDI/TOF MS或HPLC-MS/MS分析；SDS-PAGE分析，以比较还原及完整的抗体；肽图(如胰蛋白酶或LYS--C)分析；评估抗体的生物活性或抗原结合能力等。制剂不稳定性可能涉及下列一种或多种内容：聚集、去酰胺(例如Asn脱酰胺)、氧化(例如Met氧化)、异构化(例如Asp异构化)、剪切或水解或裂解(例如铰链区裂解)、琥珀酰亚胺生成、半胱氨酸不成对、N端延伸、C端加工及糖基化差异等。

[0428] 如果在给定时间(例如12个月)内，所述偶联物的生物活性变动能够保持在制备时活性的约20％，优选约10％(测定的误差范围内)，那么该稳定的偶联物在药物制剂中应当可以“保持其生物活性”。生物活性可以通过如抗原结合和/或者体外细胞毒性分析测定。

[0429] 用于临床，本发明的支链连接体偶联物将以溶液或冻干固体的形式提供，所述冻干固体可被重新溶解于无菌注射用水中。示例的施用偶联物的方案如下：每天、每周、每两周、每三周或每月一次，静脉推注8-54周。在50至1000毫升的生理盐水中加入药物，可选地，加入人血清白蛋白(例如0.5至1毫升浓缩的人血清白蛋白溶液，100毫克/毫升)。每周给药量为约50μg至20mg/kg体重，静脉注射(每次注射10μg至200mg/kg体重)。治疗结束后4-54周内，患者可接受第二疗程治疗。有关给药途径、辅料、稀释剂、剂量、时间等的具体临床方案可由熟练的临床医师确定。

[0430] 用体内或者离体杀死特定细胞的方法，可以治疗的疾病的实例包括任何类型癌症的恶性肿瘤、自身免疫疾病、移植物排斥和感染(病毒、细菌或寄生虫)。

[0431] 达到所需治疗效果需要的偶联物的量取决于许多因素，包括偶联物的化学特性、效力和生物利用度、疾病类型、患者所属物种、患者患病状态、给药途径，这些决定了所需药物剂量、给药方式和给药方案。

[0432] 一般而言，可将本发明的偶联物配制成含有0.1至10％w/v偶联物的生理缓冲溶液中，供注射使用。典型的剂量范围是从1μg/kg至0.1g/kg(体重)，每天、每周、每两周、每三周

或每月一次。优选的剂量范围是每天0.01mg/kg至20mg/kg体重/每天，每周，每两周、每三周或每月，或幼儿等效剂量。待施用的药物的优选剂量可能取决于诸如疾病或病症的进展的类型和程度，特定患者的总体健康状况，所选化合物的相对生物功效，药物的配方，给药途径(静脉内，肌肉内或其他)，药物指定运送途径的药代动力学性质，以及给药速度(推注或连续输注)和给药方案(给定时间内的重复次数)。

[0433] 本发明的偶联物还能够以单位剂量形式给药，其中术语“单位剂量”是指能够给予患者的单次剂量，并且可以很容易地处置和包装，同时活性偶联物本身或如下文所述的药学上可接受的组合物，保持物理和化学上稳定的单位剂量。典型的每天/每周/每两周/每月总剂量范围是从0.01至100mg/kg体重。作为一般指导原则，人类的单位剂量范围为1mg到3000mg每天/每周/每两周/每三周/每月。单位剂量优选1至500mg，一月一次至四次，更优选为1mg至100mg，每周/每两周/每三周一次。本文提供的偶联物可以通过与一种或多种药学上可接受的辅料混合而配制成药物组合物。这样的单位剂量组合物可以通过口服给药，如片剂，简单胶囊或软凝胶胶囊的形式的药物；或鼻内给药，如粉剂，滴鼻剂或气雾剂的药物；或皮肤给药，如使用局部用软膏，乳膏，乳液，凝胶或喷雾剂或通过透皮贴剂给药。

[0434] 在另一个实施方案中，包含治疗有效剂量的结构式为(I)或(III)的偶联物，或本发明中描述的其它任何偶联物的药物组合物，可以与其他治疗剂，如化学治疗剂，放射治疗剂，免疫治疗剂，自身免疫病症治疗剂，抗感染剂或其他偶联物协同给药，以有效治疗或预防癌症或自身免疫疾病或感染性疾病。协同剂优选自以下药物中的一种或几种：阿巴西普，醋酸阿比特龙，对乙酰氨基酚/氢可酮，阿达木单抗，阿法替尼马来酸盐，阿仑单抗，阿利维A酸，曲妥珠单抗，苯丙胺混合盐(苯丙胺/右苯丙胺)阿那曲唑，阿立呱唑，阿扎那韦，Atezolizumab，阿托伐他汀，阿昔替尼，贝林，贝伐单抗，卡巴他赛，卡博替，贝沙罗汀，blinatumomab，硼替佐米，波舒替尼，brentuximab vedotin，布地奈德，布地奈德/福莫特罗，丁丙诺啡，卡培他滨，卡非佐米，塞来考昔，ceritinib，西妥昔单抗，环孢素，西那卡塞，克里唑替尼，达比加群，达拉菲尼，阿法达贝汀，地瑞那韦，甲磺酸伊马替尼，达沙替尼，地尼白介素，狄诺塞麦，双丙戊酸钠，右兰索拉唑，右呱甲酯，Dinutuximab，多西环素，度洛西汀，恩曲他滨/利匹韦林/替诺福韦地索普西富马酸盐，恩曲他滨/替诺福韦/依法韦仑，依诺肝素，恩杂鲁胺，阿法依泊汀，厄洛替尼，埃索美拉唑，依折麦布，依折麦布/辛伐他汀，非诺贝特，非格司亭，芬戈莫德，丙酸氟替卡松，氟替卡松/沙美特罗，氟维司群，吉非替尼，格拉替雷，醋酸戈舍瑞林，伊马替尼，替伊莫单抗，依鲁替尼，胰岛素门冬胰岛素，地特胰岛素，甘精胰岛素，赖脯胰岛素，干扰素β1a，干扰素β1b，拉帕替尼，Ipilimumab，异丙托溴铵/沙丁胺醇，醋酸兰乐肽，来那度胺，联合二甲苯磺酸盐，来曲唑，左甲状腺素，左旋甲状腺素，利多卡因，利奈唑胺，利拉鲁肽，MEDI4736，美金刚，呱醋甲酯，美托洛尔，莫达非尼，莫米松，尼罗替尼，Nivolumab，奥法木单抗，奥立他珠单抗，帕唑帕尼，派姆单抗，培美曲塞，帕妥珠单抗，肺炎球菌结合疫苗，泊马度胺，普瑞巴林，喹硫平，雷贝拉唑氯化镭223，雷洛昔芬，拉替拉韦，雷莫瑞单抗，雷珠单抗，瑞格菲尼，利妥昔单抗，利伐沙班，罗米地辛，罗苏伐他汀，鲁索替尼磷酸盐，沙丁胺醇，司维拉明，西地那非，siltuximab，西他列汀，西他列汀/二甲双胍，索非那新，索拉非尼，舒尼替尼，他达拉非，他莫昔芬，替拉普韦，替西罗莫司，替诺福韦/恩曲他滨，睾酮凝胶，沙利度胺(Talidex)，噻托溴铵，托瑞米芬，曲美替尼，曲妥珠单抗，Tretinoin，尤特克单抗，缬沙坦，凡德他尼，维罗非尼，伏立诺他，阿柏西普，Zostavax及其

同系物、衍生物、药学上可接受的盐、载体、稀释剂或辅料，或其组合。

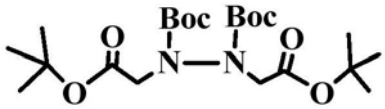
[0435] 通过本发明中的支链连接体偶联的药物/细胞毒性剂，可以是本发明中描述的Tubulysin的任何同系物和/或衍生物。药物/细胞毒剂领域的专业技术人员可以理解，本发明所述的Tubulysin均可以被修饰，只要获得的化合物仍保留起始化合物的特异性和/或活性。本领域技术人员应理解，可以使用这些化合物来代替本发明所述的Tubulysin同系物。因此，本发明的Tubulysin同系物还包括这些衍生和被修饰的化合物。

[0436] 本说明书和下文实施例中引用的所有文献参考数据均全文引用作为参考。

实施例

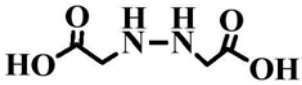
[0437] 本发明用下面的实施例进一步地说明，这些实施例的内容并不旨在限制本发明的范围。在实施例中细胞系，除了特殊说明之外，均是依据美国标准培养物保藏中心(ATCC)、德国菌种保藏中心(DSMZ)或中国科学院上海细胞培养中心规范的条件保存。除了特殊说明外，细胞培养试剂来自于Invitrogen公司。所有的无水试剂均由商业途径获得，并储存于Sure-Seal密封瓶中。其他的试剂和溶剂均按照最高规格购买，使用时未经进一步的处理。用Varain PreStar HPLC进行制备HPLC分离。NMR谱在Bruker 500MHz仪器上获得，化学位移以ppm为单位，四甲基硅烷为参考(0ppm)，耦合常数(J)的单位是Hz。质谱数据在Waters Xevo Q Tof质谱仪(连接Waters Acquity UPLC高效液相色谱仪和TUV检测器)上获得。

[0438] 实施例1.1，2-双(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)肼-1，2-二甲酸二叔丁酯的合成

[0439] 

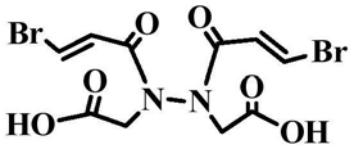
[0440] 向1，2-二甲酸肼二叔丁酯(8.01g，34.4mmol)的DMF(150ml)溶液中加入NaH(60%，矿物油中，2.76g，68.8mmol)。在室温下搅拌30分钟后，加入2-溴乙酸叔丁酯(14.01g，72.1mmol)。将混合物搅拌过夜，加入甲醇(3ml)淬灭、浓缩后用乙酸乙酯(100ml)和水(100ml)稀释、分层，水层用乙酸乙酯(2×50ml)萃取。将有机层合并，用硫酸镁进行干燥、过滤、浓缩，并通过硅胶柱层析法(乙酸乙酯/己烷1:5至1:3)纯化，得到无色油状的目标化合物(12.98g，82%产率)。MS ESI m/z $C_{22}H_{41}N_2O_8[M+H]^+$：计算值461.28，实测值461.40。

[0441] 实施例2.2，2'-(1，2-肼基)二乙酸的合成

[0442] 

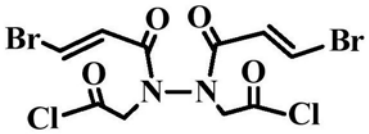
[0443] 向1，2-双(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)肼-1，2-二甲酸二叔丁基酯(6.51g，14.14mmol)的1，4-二恶烷(40ml)溶液中加入盐酸(12N，10ml)。将混合物搅拌30分钟，用二恶烷(20ml)和甲苯(40ml)稀释、浓缩，并依次与二恶烷(20ml)和甲苯(40ml)共同浓缩至干，得目标产品(2.15g，产率为103%，纯度约93%)，不做进一步纯化，用在下一步。MS ESI m/z $C_4H_9N_2O_4[M+H]^+$：计算值149.05，实测值149.40。

[0444] 实施例3.2，2'-(1，2-双((E)-3-溴丙烯酰)-1，2-肼基)二乙酸的合成

[0445] 

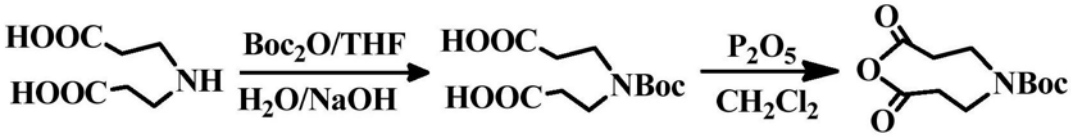
[0446] 向2,2'-(1,2-肼基)二乙酸(1.10g,7.43mmol)的四氢呋喃(50ml)和磷酸二氢钠(0.1M,80ml,pH 6.0)的混合物中加入(E)-3-溴丙烯酰溴(5.01g,23.60mmol)。将混合物搅拌6小时,浓缩并在硅胶柱上纯化,用含有3%甲酸的水/乙腈(1:9)洗脱,得到目标化合物(2.35g,77%产率,-93%的纯度)。MS ESI m/z $C_{10}H_{11}Br_2N_2O_6$[M+H]$^+$:计算值412.89,实测值413.50。

[0447] 实施例4.2,2'-(1,2-双((E)-3-溴丙烯酰)-1,2-肼基)二乙酰氯的合成

[0448] 

[0449] 向2,2'-(1,2-双((E)-3-溴丙烯酰基)-1,2-肼基)二乙酸(210mg,0.509mmol)的二氯乙烷(15ml)溶液中加入草酰氯(505mg,4.01mmol),然后加入0.040ml DMF。在室温下搅拌2小时后,将混合物浓缩,依次与二氯乙烷(2×20ml)和甲苯(2×15ml)共浓缩至干,得到目标产物(245mg,107%产率),无需进一步纯化(不稳定)。MS ESI m/z $C_{10}H_9Br_2Cl_2N_2O_4$[M+H]$^+$:计算值448.82,450.82,452.82,454.82,实测值448.60,450.60,452.60,445.60。

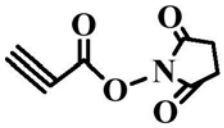
[0450] 实施例5.2,8-二氧代-1,5-恶唑烷-5-酸叔丁酯的合成

[0451] 

[0452] 在4℃下,向3,3'-亚氨基二丙酸(10.00g,62.08mmol)的1.0N NaOH(300ml)溶液中,加入二碳酸二叔丁酯(22.10g,101.3mmol)的200ml THF溶液。添加1小时后,将混合物在4℃下搅拌2小时。用0.2M H_3PO_4将混合物小心酸化至pH-4,真空浓缩,用二氯甲烷萃取,用硫酸钠干燥,浓缩后用硅胶柱纯化,用AcOH/MeOH/CH_2Cl_2(0.01:1:5)洗脱,得到3,3'-((叔丁氧基羰基)亚氨基)二丙酸(13.62g,产率84%)。ESI MS m/z $C_{11}H_{19}NO_6$[M+H]$^+$:计算值262.27,实测值262.40。

[0453] 在0℃,向3,3'-((叔丁氧基羰基)亚氨基)二丙酸(8.0g,30.6mmol)的二氯甲烷(500ml)溶液中加入五氧化二磷(8.70g,61.30mmol)。将混合物在0℃下搅拌2小时,然后在室温下搅拌1小时,通过短硅胶柱过滤,并用乙酸乙酯/二氯甲烷(1:6)洗脱。浓缩滤液,用乙酸乙酯/正己烷打浆,得到目标化合物(5.64g,74%产率)。ESI MS m/z $C_{11}H_{17}NO_5$[M+H]$^+$:计算值244.11,实测值244.30。

[0454] 实施例6.2,5-二氧代吡咯烷-1-丙炔酸酯的合成

[0455] 

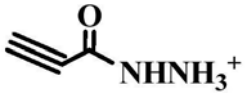
[0456] 在丙炔酸(5.00g,71.4mmol)的二氯甲烷(150ml)溶液中加入N,N'-二异丙基乙胺(5ml,28.7mmol)、NHS(9.01g,78.3mmol)和EDC(20.0g,104.1mmol),搅拌过夜,通过柱层析法(乙酸乙酯/正己烷1:4)纯化,浓缩得到无色油状的目标化合物(9.30g,产率79%)。^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ2.68(s,1H),2.61(s,4H)。MS ESI m/z $C_7H_5NaNO_4$[M+Na]$^+$:计算值190.02,实测值190.20。

[0457] 实施例7.2-丙炔基肼羧酸叔丁酯的合成

[0458] 

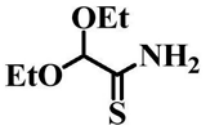
[0459] 向丙炔酸(5.00g,71.4mmol)、肼基羧酸叔丁酯(9.45g,71.5mmol)的二氯甲烷(150ml)溶液中加入N,N'-二异丙基乙胺(5ml,28.7mmol)和EDC(20.0g,104.1mmol),搅拌过夜,通过柱层析法(乙酸乙酯/正己烷1:5)纯化,浓缩得到呈无色油状的目标化合物(7.92g,产率84%)。^{1}H NMR(500MHz,CDCl3)δ8.76(m,2H),2.68(s,1H),1.39(s,9H)。MS ESI m/z $C_5H_{12}NaN_2O_2$[M+Na]$^+$:计算值155.09,实测值155.26。

[0460] 实施例8.丙炔酰肼盐酸盐的合成

[0461] 

[0462] 将溶解在1,4-二恶烷(12mL)中的2-丙醇酰肼羧酸叔丁酯(4.01g,30.35mmol)与4ml浓盐酸在4℃搅拌30分钟,用二恶烷(30ml)和甲苯(30ml)稀释,并减压浓缩。将粗品用硅胶柱纯化,使用甲醇/二氯甲烷(5%至10%,含1%的甲酸)的混合物作为洗脱剂洗脱,得到目标化合物(2.11g,产率83%),ESI MS m/z $C_3H_5N_2O$[M+H]$^+$:计算值85.03,实测值85.30。

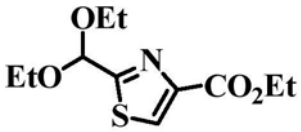
[0463] 实施例9.化合物2的合成

[0464] 

2

[0465] 在10-L反应釜中将二乙氧基乙腈(1.00kg,7.74mol)溶解于甲醇(6.0L),在室温下加入$(NH_4)_2S$(48%水溶液,1.41kg,9.29mol)。釜内温度升至33℃而后又降回室温。搅拌过夜后,浓缩反应液。向残留物中加入乙酸乙酯(5L),用饱和$NaHCO_3$溶液(4×1.0L)洗,水相用乙酸乙酯(5×1.0L)反萃。合并有机相,用饱和食盐水(3L)洗,之后用无水硫酸钠干燥,过滤后减压浓缩。粗品用石油醚打浆,真空抽滤,收集固体并用石油醚洗涤。滤液浓缩后再用石油醚打浆,合并收集所得固体,总共得到1.1kg(87%产率)目标产物,为白色或亮黄色固体。^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ7.81(d,J=71.1Hz,2H),5.03(s,1H),3.73(dq,J=9.4,7.1Hz,2H),3.64(dq,J=9.4,7.0Hz,2H),1.25(t,J=7.1Hz,6H)。

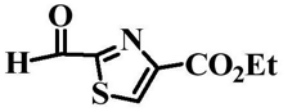
[0466] 实施例10.化合物3的合成

[0467] 

3

[0468] 在5-L三颈圆底瓶上装备一个回流冷凝管和一个恒压滴液漏斗。在其中加入分子筛(3Å,500g)和硫酰胺2(350g,2.14mol)的乙醇溶液(3L),30分钟内滴入3-溴丙酮酸乙酯(纯度80%,404mL,2.57mol)。滴加过程中内温稍有上升,随后将反应液加热至回流并搅拌30分钟。将反应液冷却至室温后用硅藻土过滤除去不溶物,并用乙酸乙酯洗滤饼。滤液浓缩后的粗产物和硅胶(1.5kg)混合拌匀,通过硅胶柱(10kg)柱层析(10-20%乙酸乙酯/石油醚梯度洗脱)纯化,得到棕色油状物,为目标化合物(509g,92%产率)。

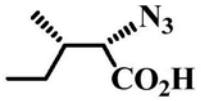
[0469] 实施例11.化合物4的合成

[0470] 

4

[0471] 将缩醛(300g,1.16mol)的丙酮(3.0L)溶液加热至回流,在1.0小时内滴加4N HCl溶液(250mL)。TLC显示起始原料反应完全。反应液减压浓缩后分离两相。有机相加入乙酸乙酯稀释(1.5L),并依次用饱和$NaHCO_3$水溶液(1.0L)、水(1.0L)和食盐水(1.0L)洗,然后用无水硫酸钠干燥。合并所有的水相并用乙酸乙酯反萃,并用无水硫酸钠干燥有机相。滤出干燥剂后浓缩有机相,所得粗产品用石油醚/乙酸乙酯(5:1)溶液打浆,析出的固体经真空过滤收集,并用石油醚/乙酸乙酯(10:1)溶液洗。滤液浓缩用柱层析纯化(0-15%乙酸乙酯/石油醚),所有固体合并,得目标产物40g(43%产率),为白色或亮黄色固体。^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ10.08-10.06(m,1H),8.53-8.50(m,1H),4.49(q,J=7.1Hz,2H),1.44(t,J=7.1Hz,3H)。MS ESI m/z $C_7H_8NO_3S[M+H]^+$:计算值186.01,实测值186.01。

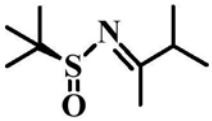
[0472] 实施例12.化合物6的合成

[0473] 

6

[0474] 将NaN_3(740g,11.4mol)溶于水(2.0L)后加入二氯甲烷(2.0L)并冷却至0℃,向该溶液中加入Tf_2O(700mL,4.10mol),历时1.5小时。加完后在0℃下继续搅拌3小时。分离出有机相,水相用二氯甲烷萃取(2×500mL)。合并有机相,用饱和$NaHCO_3$(3×1.0L)洗。室温下将此二氯甲烷溶液加入到(L)-异亮氨酸(300g,2.28mol),碳酸钾(472g,3.42mol),五水硫酸铜(5.7g,22.8mmol)的混合甲醇/水(1:1v/v,6.0L)溶液中。加料过程中反应体系内温度会稍微升高。混合液在室温下搅拌16小时,减压蒸去溶剂,水相用浓盐酸(大约280mL)酸化至pH6-6.5(约280mL),然后用磷酸盐缓冲液稀释(0.25M,pH 6.2,6.0L),用乙酸乙酯(6×2.0L)洗去磺酸胺副产物。水相用浓盐酸(大约400mL)酸化至pH 3后用乙酸乙酯(4×2.0L)萃取。合并有机相,饱和食盐水洗(2.0L),无水硫酸钠干燥,过滤浓缩得产物6(320g,89%产率),为亮黄色油状物。^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ12.01(s,1H),3.82(d,J=5.9Hz,1H),2.00(ddd,J=10.6,8.6,5.5Hz,1H),1.54(dqd,J=14.8,7.5,4.4Hz,1H),1.36-1.24(m,1H),1.08-0.99(m,3H),0.97-0.87(m,3H)。

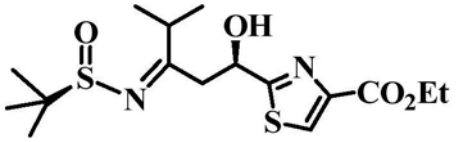
[0475] 实施例13.化合物10的合成

[0476] 

10

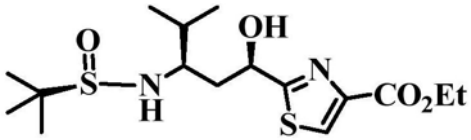
[0477] 在N2保护下室温下向(S)-叔丁基亚磺酸胺(100g,0.825mol)的四氢呋喃(1L)溶液中加入Ti(OEt)4(345mL,1.82mol)和3-甲基-2-丁酮(81mL,0.825mol)。加热反应液,回流16小时后冷却至室温,然后倒入冰水(1L)。过滤并且用乙酸乙酯洗滤饼。分离滤液中的有机相,无水硫酸钠干燥后减压浓缩,其残留物减压蒸馏(15-20torr,95℃)得目标产物10(141g,90%产率),为黄色油状物。^{1}H NMR(500MHz,CDCl3)δ2.54-2.44(m,1H),2.25(s,3H),1.17(s,9H),1.06(dd,J=6.9,5.1Hz,6H)。MS ESI m/z $C_9H_{19}NaNOS[M+Na]^+$:计算值212.12,实测值212.11。

[0478] 实施例14.合物11的合成

[0479] 

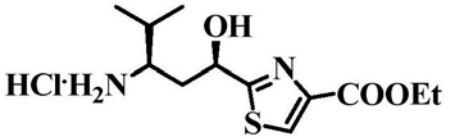
[0480] 在N_2保护下，于-78℃下向二异丙胺(264mL,1.87mol)的四氢呋喃溶液中加入正丁基锂溶液(2.5M,681mL,1.70mol)。反应在30分钟内升温至0℃然后重新冷却至-78℃，向其中加入化合物10(258g,1.36mol)并用四氢呋喃(50mL)冲洗。搅拌1小时后滴加$ClTi(O^iPr)_3$(834g,3.17mol)的四氢呋喃(1.0L)溶液。滴加完成1小时后再缓慢滴入化合物4(210g,1.13mol)的四氢呋喃(500mL)溶液，耗时1小时。所得溶液在-78℃继续搅拌3小时。TLC监测反应进行完全后，用乙酸和四氢呋喃(体积比1:1,300mL)的混合液淬灭反应，而后将反应液倒入盐水(2L)，用乙酸乙酯萃取(8×1L)。有机相用水和食盐水洗，无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩。残留物经柱层析(二氯甲烷/乙酸乙酯/石油醚2:1:2)纯化，得化合物11(298g,74%产率)，为无色油状物。^{1}H-NMR(500MHz,CDCl3)δ8.13(s,1H),6.63(d,J=8.2Hz,1H),5.20-5.11(m,1H),4.43(q,J=7.0Hz,2H),3.42-3.28(m,2H),2.89(dt,J=13.1,6.5Hz,1H),1.42(t,J=7.1Hz,3H),1.33(s,9H),1.25-1.22(m,6H)。MS ESI m/z $C_{16}H_{26}NaN_2O_4S_2[M+Na]^+$:计算值397.13,实测值397.11。

[0481] 实施例15.化合物12的合成

[0482] 

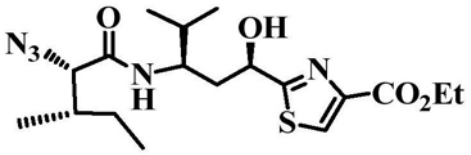
[0483] 将化合物11(509g,1.35mol)溶于四氢呋喃(200mL)，冷却至-78℃，向其中缓慢加入$Ti(OEt)_4$(570mL,2.72mol)，加完后搅拌1小时。然后在90分钟内分批加入$NaBH_4$(51.3g,1.36mol)，反应在-78℃搅拌3小时。TLC监测发现起始原料仍有剩余。缓慢加入EtOH(50mL)，继续搅拌1.5小时后将反应液倒入饱和食盐水(2L,含250mL HOAc)，升至室温。经过硅藻土过滤，分离有机相。水洗、饱和食盐水洗、无水硫酸钠干燥有机相、过滤并浓缩。残留物经柱层析(乙酸乙酯/石油醚1:1)纯化得化合物12(364g,71%产率)，为白色固体。^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ8.10(s,1H),5.51(d,J=5.8Hz,1H),5.23-5.15(m,1H),4.41(q,J=7.0Hz,2H),3.48-3.40(m,1H),3.37(d,J=8.3Hz,1H),2.29(t,J=13.0Hz,1H),1.95-1.87(m,1H),1.73-1.67(m,1H),1.40(t,J=7.1Hz,3H),1.29(s,9H),0.93(d,J=7.3Hz,3H),0.90(d,J=7.2Hz,3H).MS ESI m/z计算值$C_{16}H_{28}NaN_2O_4S_2[M+Na]^+$:399.15,实测值399.14。

[0484] 实施例16.化合物13的合成

[0485] 

[0486] 在0℃下于化合物12(600g,1.60mol)的乙醇(590mL)溶液中加入4N HCl的1,4-二氧六环(590mL)溶液。反应逐渐升至室温后搅拌2.5小时。过滤收集析出的白色固体并用乙酸乙酯洗。滤液浓缩后用乙酸乙酯打浆。合并两次获得的白色固体，共446g(90%产率)。

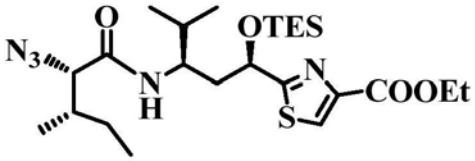
[0487] 实施例17.化合物14的合成

[0488] 

14

[0489] 将叠氮-Ile-OH(6,153g,0.97mol)溶于四氢呋喃(1.5L)并冷却至0℃,依次加入NMM(214mL,1.94mol)和氯甲酸异丁酯(95mL,0.73mol)。在0℃搅拌1小时后分批加入化合物13(150g,0.49mmol)。在0℃搅拌30分钟后,逐渐升至室温并继续搅拌2小时。反应在0℃下加冰水淬灭并用乙酸乙酯萃取三遍。合并有机相用1N HCl洗,饱和$NaHCO_3$洗和食盐水洗,无水硫酸钠干燥。过滤浓缩,残留物经柱层析(0-30%乙酸乙酯/石油醚)纯化得到白色固体(140g,70%产率)。^{1}H NMR(500MHz,CDCl3)δ8.14(s,1H),6.57(d,J=8.9Hz,1H),4.91(d,J=11.1Hz,1H),4.44(dd,J=13.2,6.3Hz,2H),4.08-3.95(m,2H),2.21(dd,J=24.4,11.5Hz,2H),1.90-1.79(m,3H),1.42(t,J=6.6Hz,3H),1.37-1.27(m,2H),1.11(d,J=6.4Hz,3H),1.01-0.94(m,9H)。MS ESI m/z计算值$C_{18}H_{30}N_5O_4S$[M+H]$^+$:412.19,实测值412.19。

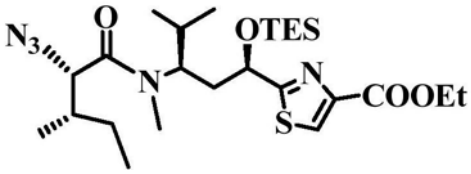
[0490] 实施例18.化合物15的合成

[0491] 

15

[0492] 在0℃下依次向化合物14(436g,1.05mol)的二氯甲烷(50mL)溶液中加入咪唑(94g,1.37mmol)和三乙基氯硅烷(222mL,1.32mol)。反应液历时1小时升至室温后,继续搅拌1小时。加入饱和食盐水淬灭,分出有机相,水相用乙酸乙酯萃取。合并后的有机相经干燥、过滤、浓缩后用柱层析(15-35%乙酸乙酯/石油醚)纯化得产物15(557.4g,95%产率),为无色油状物。^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ8.12(s,1H),6.75(d,J=8.0Hz,1H),5.20-5.12(m,1H),4.44(q,J=7.0Hz,2H),4.06-3.97(m,1H),3.87(d,J=3.8Hz,1H),2.14(d,J=3.8Hz,1H),2.01-1.91(m,3H),1.42(t,J=7.1Hz,3H),1.34-1.25(m,2H),1.06(d,J=6.8Hz,3H),1.00-0.93(m,18H),0.88(dd,J=19.1,6.8Hz,6H).MS ESI m/z $C_{24}H_{44}N_5O_4SSi$[M+H]$^+$:计算值526.28,实测值526.28。

[0493] 实施例19.化合物16的合成

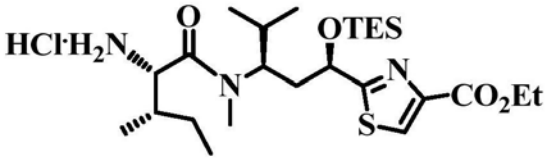
[0494] 

16

[0495] 在0℃下向化合物15(408g,0.77mol)和碘甲烷(145mL,2.32mol)的四氢呋喃(4L)溶液中加入钠氢(60%,62.2g,1.55mol)。将所得的反应液在0℃搅拌过夜,而后倒入激烈搅拌的冰水饱和氯化铵(5L)溶液中。用乙酸乙酯(3×500mL)萃取。合并后的有机相经干燥、过滤、浓缩后用柱层析(15-35%乙酸乙酯/石油醚)纯化得产物16(388g,93%产率),为亮黄色油状物。^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ8.09(s,1H),4.95(d,J=6.6Hz,1H),4.41(q,J=7.1Hz,2H),3.56(d,J=9.5Hz,1H),2.98(s,3H),2.27-2.06(m,4H),1.83-1.70(m,2H),1.41(t,J=7.2Hz,3H),1.29(ddd,J=8.9,6.8,1.6Hz,3H),1.01(d,J=6.6Hz,3H),0.96(dt,J=8.0,

2.9Hz,15H),0.92(d,J=6.6Hz,3H),0.90(d,J=6.7Hz,3H).MS ESI m/z $C_{25}H_{46}N_5O_4SSi$[M+H]$^+$:计算值540.30,实测值540.30。

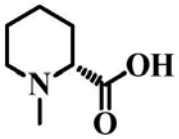
[0496] 实施例20.化合物17的合成

[0497] 

17

[0498] 向化合物16(1.01g,1.87mmol)的甲醇(15mL)溶液中滴入0.1N HCl直到pH为中性。加入Pd/C(10wt%,583mg)后将该混合溶液在H_2(1atm)环境于室温搅拌16小时。滤去Pd/C,甲醇洗。滤液旋干,残留物复溶于乙酸乙酯(50mL)中,用无水硫酸钠干燥,过滤后浓缩得化合物17(900mg,94%产率),为浅黄色油状物。

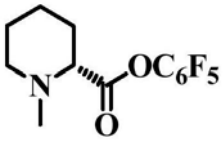
[0499] 实施例21.化合物22的合成

[0500] 

22

[0501] 向D-呱啶酸(10.0g,77.4mmol)的甲醇(100mL)溶液中加入甲醛(37%水溶液,30.8mL,154.8mmol)和Pd/C(10wt%,1.0g)。将该反应液在H_2(1atm)环境中搅拌过夜,而后用硅藻土过滤,甲醇洗。滤液浓缩得化合物22(10.0g,90%产率),为白色固体。

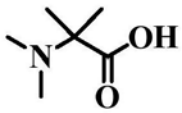
[0502] 实施例22.化合物23的合成

[0503] 

23

[0504] 向D-N-甲基呱啶酸(2.65g,18.5mmol)的乙酸乙酯(50mL)溶液中加入五氟苯酚(3.75g,20.4mmol)和DCC(4.21g,20.4mmol)。反应在室温下搅拌16小时,硅藻土过滤,用10mL乙酸乙酯洗。滤液不用进一步纯化,直接使用。

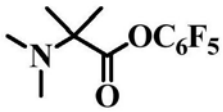
[0505] 实施例23.化合物28的合成

[0506] 

28

[0507] 将2-甲基丙氨酸(500g,4.85mol),甲醛(37%水溶液,1.0L,12.1mol)和甲酸(1.0L)的混合液加热至回流(80℃)。搅拌3.0小时后冷却至室温,加入6N HCl(850mL),而后浓缩反应液。过滤收集所得的固体并用乙酸乙酯洗三遍(1.0L)。将固体溶于水(1.5L)并用4N NaOH(约1.0L)中和至pH 7。浓缩并用乙醇(2.0L)共沸以除水。残留物用甲醇(2.0L)溶解,过滤除去NaCl固体,乙酸乙酯洗。滤液浓缩后得白色固体639.2g,包含有少量NaCl,可直接使用不用进一步纯化。

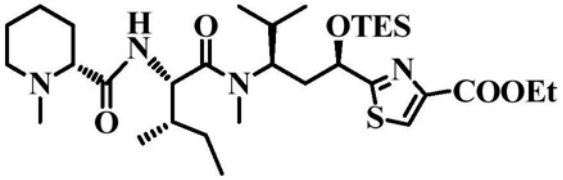
[0508] 实施例24.化合物29的合成

[0509] 

29

[0510] 向化合物2-(二甲基氨基)-2-甲基丙酸(97g,0.74mol)的乙酸乙酯(1L)溶液中加入五氟苯酚(163g,0.88mol)和DIC(126mL,0.81mol)。反应室温搅拌24小时后用硅藻土过滤,用10mL乙酸乙酯洗。滤液不经进一步纯化直接使用。

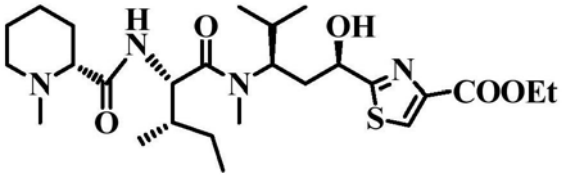
[0511] 实施例25.化合物30的合成

[0512] 

30

[0513] 向五氟苯基酯23的乙酸乙酯溶液中加入干Pd/C(10wt%,300mg)和叠氮化合物16(3.33g,6.61mmol)。反应液在氢气(1atm)环境中搅拌27小时,而后用硅藻土过滤,乙酸乙酯洗。滤液旋干经柱层析(0-5%甲醇/乙酸乙酯)纯化得化合30(3.90g,86%产率)。MS ESI m/z $C_{32}H_{59}N_4O_5SSi$[M+H]$^+$计算值639.39,实测值639.39。

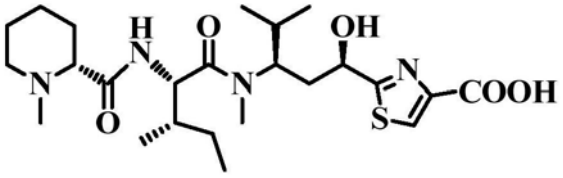
[0514] 实施例26.化合物31的合成

[0515] 

31

[0516] 将化合物30(3.90g,6.1mmol)溶于乙酸/水/四氢呋喃(v/v/v 3:1:1,100mL)混合溶液中,室温搅拌48小时。然后浓缩,残留物经柱层析(2:98至15:85甲醇/乙酸乙酯)纯化得化合物31(2.50g,两步产率72%).MS ESI m/z $C_{26}H_{45}N_4O_5S$[M+H]$^+$:计算值525.30,实测值525.33。

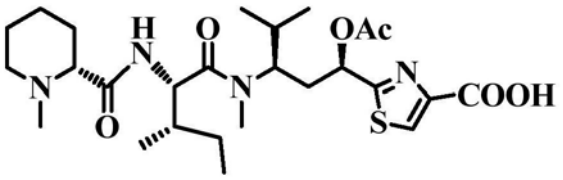
[0517] 实施例27.化合物32的合成

[0518] 

32

[0519] 在0℃下将LiOH(0.4N,47.7mL,19.1mmol)水溶液加入化合物31(2.50g,4.76mmol,1.0eq.)的二恶烷(47.7mL)溶液中。室温搅拌2小时后浓缩。残留物经柱层析(100%二氯甲烷至二氯甲烷/甲醇/氨水80:20:1)纯化得化合物32(2.36g,99%产率),为无定形白色固体。MS ESI m/z $C_{24}H_{41}N_4O_5S$[M+H]$^+$:计算值497.27,实测值497.28。

[0520] 实施例28.化合物33的合成

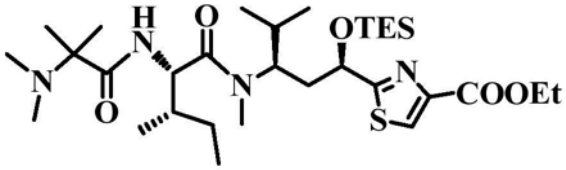
[0521] 

33

[0522] 在0℃下向化合物32(2.36g,4.75mmol)的吡啶(50mL)溶液中滴入乙酸酐(2.25mL,24mmol)。反应经2小时逐渐升至室温,并继续搅拌24小时。浓缩后加入二恶烷/水(v/v 1:1,10mL)混合液搅拌1小时,以破坏可能生成的酸酐。浓缩后的残留物经柱层析(100%二氯甲烷至二氯甲烷/甲醇/氨水50:50:1)纯化,得化合物33(2.25g,88%产率)为无定形白色固

体。MS ESI m/z $C_{26}H_{43}N_4O_6S[M+H]^+$:计算值539.28,实测值539.28。

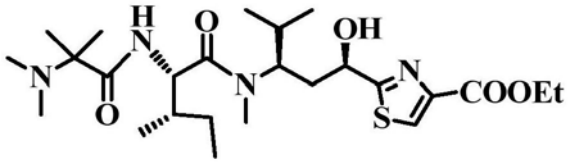
[0523] 实施例29.化合物38的合成

[0524] 

38

[0525] 向上述五氟苯基酯29的乙酸乙酯溶液中加入化合物16(200g,0.37mol)和干的Pd/C(10wt%,10g)。反应液在氢气(1atm)环境中搅拌27小时。硅藻土过滤,乙酸乙酯洗。合并的有机相浓缩后经柱层析(0-5%甲醇/乙酸乙酯)纯化得化合物38(184g,79%产率).MS ESI m/z $C_{31}H_{58}N_4O_5SSi[M+H]^+$:计算值627.39,实测值627.39。

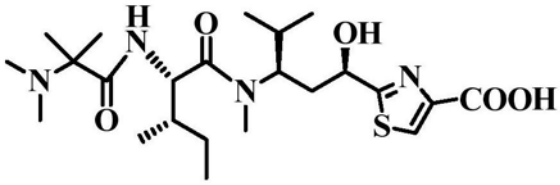
[0526] 实施例30.化合物39的合成

[0527] 

39

[0528] 将化合物38(200g,0.32mmol)溶于乙酸/水/四氢呋喃(v/v/v 3:1:1,638mL)混合溶液中,室温搅拌4天。反应液浓缩后用甲苯共沸带干,此步骤重复两遍后得化合物39,直接用于下一步反应。MS ESI m/z $C_{25}H_{45}N_4O_5S[M+H]^+$:计算值513.30,实测值513.30。

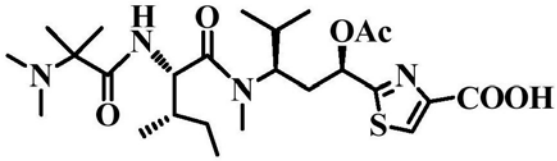
[0529] 实施例31.化合物40的合成

[0530] 

40

[0531] 在0℃下将氢氧化锂(0.4N,600mL,2.55mol)的水溶液加入化合物39(160g,0.319mol,1.0eq.)的甲醇(1.2L)溶液中。反应在室温搅拌2小时后浓缩。经柱层析(100%二氯甲烷至80:20:1二氯甲烷/甲醇/氨水)得化合物40(140g,两步产率91%)为无定形白色固体。MS ESI m/z $C_{23}H_{40}N_4O_5S[M+H]^+$:计算值485.27,实测值485.27。

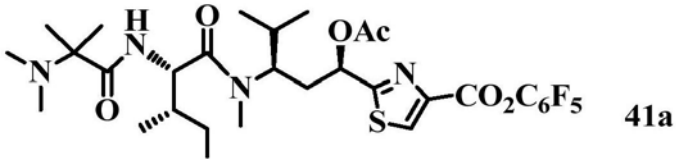
[0532] 实施例32.化合物41的合成

[0533] 

41

[0534] 将化合物27(143g,0.30mol,1.0eq.)和DMAP(0.36g,2.95mmol,0.01eq.)溶于无水四氢呋喃(1.4L)与无水DMF(75mL)的混合溶液中。冷却至0℃,加入三乙胺(82.2mL,0.59mmol,2.0eq.)和乙酸酐(56mL,0.59mmol,2.0eq.)。反应逐渐升至室温并搅拌24小时。浓缩后经柱层析(5-50%甲醇/二氯甲烷)纯化得化合物41(147g,95%产率),为无定形白色固体。MS ESI m/z $C_{25}H_{44}N_4O_6S[M+H]^+$:计算值527.28,实测值527.28。

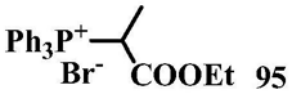
[0535] 实施例33.化合物41a的合成

[0536] 

41a

[0537] 在室温下的氮气环境中，向化合物41(5.0g，9.5mmol，1.0当量)的无水二氯甲烷(100mL)溶液中加入EDC(4.6g，23.8mmol，2.5当量)和五氟苯酚(4.4g，23.8mmol，2.5当量)。将混合物在室温下搅拌2小时，然后在二氯甲烷(100mL)中稀释，用水(2×200mL)和盐水(200mL)洗涤，经无水硫酸钠干燥，过滤、浓缩，并通过硅胶柱层析法(50%EtOAc/PE)纯化，得到白色固体状的化合物41a(5.2g，产率79%)。MS ESI m/z $C_{31}H_{42}F_5N_4O_6S[M+H]^+$：计算值693.27，实测值693.27。

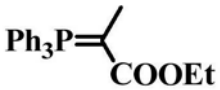
[0538] 实施例34.化合物95的合成

[0539] 

95

[0540] 向配备有机械搅拌棒的500mL圆底瓶中加入三苯基膦(100g，381mmol，1.0eq.)和2-溴丙酸乙酯(100mL，762mmol，2.0eq.)。反应液在N_2保护下加热至50℃，搅拌过夜。当白色固体(PPh_3)全部溶解后，大量的白色产物开始析出。经石油醚/乙酸乙酯打浆后抽滤收集白色固体，得化合物95(135g，80%产率)。MS ESI m/z $C_{23}H_{24}O_2P[M-Br]^+$：计算值363.15，实测值363.13.。

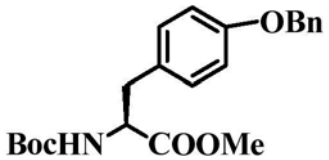
[0541] 实施例35.化合物96的合成

[0542] 

96

[0543] 在剧烈的搅拌下将化合物95(135.42g，305.7mmol)的二氯甲烷(500mL)溶液加入到10%NaOH(450mL)水溶液中。有机相立即变黄，搅拌30分钟后，TLC显示反应完全。分离出有机相，水相用二氯甲烷(2×200mL)萃取。合并后的有机相经饱和食盐水洗，无水硫酸钠干燥后浓缩得黄色固体96(104g，94%产率)。MS ESI m/z $C_{23}H_{24}O_2P[M+H]^+$：计算值362.14，实测值363.13。粗产物直接用于下一步。

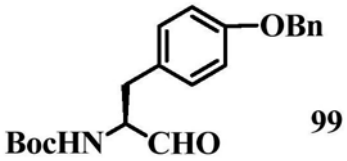
[0544] 实施例36.化合物98的合成

[0545] 

98

[0546] 向Boc-L-酪氨酸甲酯(670g，2.27mol，1.1eq.)，碳酸钾(358g，2.5mol，1.1eq.)和碘化钾(38g，0.227mol，0.1eq.)的丙酮(3L)溶液中缓慢加入苄基溴(283mL，2.38mol，1.05eq.)。回流过夜，冷却后加入水(6L)，用乙酸乙酯(5×100L)萃取。合并后的有机相用饱和食盐水(2L)洗，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩后经硅胶柱层析(4:1石油醚/乙酸乙酯)得白色固体98(795g，91%产率)．^1H NMR(500MHz，$CDCl_3$)δ7.43(d，J=7.0Hz，2H)，7.38(t，J=7.4Hz，2H)，7.32(t，J=7.2Hz，1H)，7.04(d，J=8.5Hz，2H)，6.91(d，J=8.6Hz，2H)，5.04(s，2H)，4.55(d，J=6.9Hz，1H)，3.71(s，3H)，3.03(qd，J=14.0，5.8Hz，2H)，1.43(s，9H)。MS ESI m/z $C_{22}H_{28}NO_5[M+H]^+$：计算值386.19，实测值386.19。

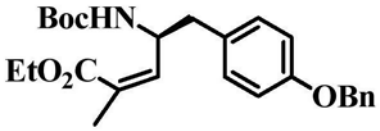
[0547] 实施例37.化合物99的合成

[0548] 

99

[0549] 在-78℃下向化合物98(380g,987mmol,1.0eq.)的无水二氯甲烷(1L)溶液中缓慢滴加DIBAL(1.0M正己烷溶液,2.9L,2.9eq.),历时3小时。加完后用3L乙醇淬灭反应。滴加1N HCl至pH 4。所得混合液逐渐升至0℃,分出有机相,水相用乙酸乙酯(3×3L)萃取。合并后的有机相用饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥,并浓缩。经石油醚/乙酸乙酯打浆得白色固体99(263g,75%产率).1H NMR(500MHz,CDCl3)δ9.65(s,1H),7.45(d,J=7.1Hz,2H),7.41(t,J=7.4Hz,2H),7.35(t,J=7.1Hz,1H),7.11(d,J=8.6Hz,2H),6.95(d,J=8.6Hz,2H),5.07(s,2H),4.42(dd,J=12.4,6.1Hz,1H),3.09(d,J=6.2Hz,2H),1.46(s,9H).MS ESI m/z $C_{21}H_{26}NO_4$[M+H]$^+$:计算值356.18,实测值356.19。

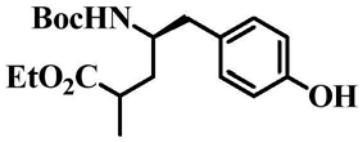
[0550] 实施例38.化合物100的合成

[0551] 

100

[0552] 室温下向化合物99(81.4g,229mmol,1.0eq.)的无水二氯甲烷(800mL)溶液中加入叶立德96(2.0eq.)的无水二氯甲烷(800mL)溶液,历时30分钟。反应在室温搅拌过夜后浓缩,经硅胶柱层析(6:1石油醚/乙酸乙酯)纯化后得白色固体100(63.4g,63%产率).^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ7.45-7.41(m,2H),7.40-7.35(m,2H),7.33(d,J=7.2Hz,1H),7.10-7.06(m,2H),6.92-6.88(m,2H),6.50(dd,J=8.8,1.3Hz,1H),5.04(s,2H),4.57(s,2H),4.18(q,J=7.1Hz,2H),2.86(d,J=8.5Hz,1H),2.72(dd,J=13.6,6.8Hz,1H),1.71(d,J=1.4Hz,3H),1.41(d,J=2.2Hz,9H),1.28(td,J=7.5,5.1Hz,4H).MS ESI m/z $C_{26}H_{33}NaNO_5$[M+Na]$^+$:计算值462.24,实测值462.22。

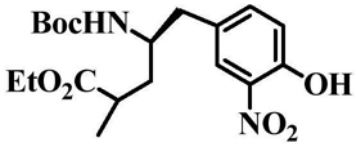
[0553] 实施例39.化合物101的合成

[0554] 

101

[0555] 在氢化反应瓶中将Pd/C(1.83g,10wt%,50%水)加入到化合物100(30.2g,68.9mmol)的四氢呋喃(100mL)与甲醇(300mL)混合溶液中。混合物在1atm H_2环境下振荡过夜。硅藻土过滤,滤液浓缩得化合物101(25.0g,接近理论产率),为无色油状物。^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ6.99(d,J=7.0Hz,2H),6.72(d,J=7.6Hz,2H),4.39(s,1H),4.18-4.04(m,2H),3.82(s,1H),2.60(dd,J=37.2,20.9Hz,4H),1.95-1.81(m,1H),1.39(s,11H),1.24(dd,J=9.5,4.3Hz,3H),1.13(t,J=8.9Hz,3H).MS ESI m/z $C_{19}H_{31}NO_5$[M+H]$^+$:计算值352.20,实测值352.19。

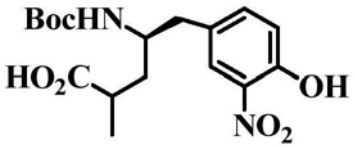
[0556] 实施例40.化合物102的合成

[0557] 

102

[0558] 在室温下向化合物101(5.96g,35.9mmol,1.0eq.)的无水二氯甲烷(200mL)溶液中加入乙酸酐(3.2mL,33.9mmol,2.0eq.)和硝酸(65%-68%水溶液,3.5mL,50.79mmol,3.0eq.)。室温搅拌30分钟后,TLC显示反应完全。反应液用水(3×200mL)洗,水相用二氯甲烷(3×100mL)反萃。合并的二氯甲烷相用饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥,过滤并浓缩。经硅胶柱层析(5:1石油醚/乙酸乙酯)纯化得化合物102(4.18g,72%产率),为一黄色固体。^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ10.49(s,1H),7.89(s,1H),7.44(d,J=8.4Hz,1H),7.09(d,J=8.6Hz,1H),4.32(d,J=8.3Hz,1H),4.12(dd,J=14.0,7.0Hz,2H),3.80(s,1H),2.76(dd,J=13.0,6.8Hz,2H),2.59(s,1H),1.88(s,1H),1.37(t,J=8.7Hz,9H),1.25(dd,J=13.5,6.9Hz,4H),1.16(t,J=8.0Hz,3H).MS ESI m/z $C_{19}H_{28}NaN_2O_7$[M+Na]$^+$:计算值419.19,实测值419.17。

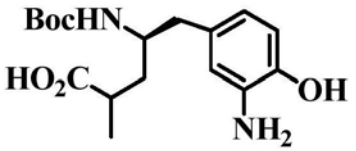
[0559] 实施例41.化合物103的合成

[0560] 

103

[0561] 向室温下向化合物102(15.3g,38.6mmol,1.0eq.)的四氢呋喃(100mL)与甲醇(100mL)混合溶液中加入LiOH·H_2O(16.3g,389mmol,10.0eq.)的水溶液(190mL)。反应室温搅拌40分钟后,加水(400mL)稀释并用1N $KHSO_4$调至pH 3-4。用乙酸乙酯(3×300mL)萃取后,有机相用饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩得103(14.4g,约100%产率),为一黄色固体。^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ10.48(s,1H),7.98-7.88(m,1H),7.42(dd,J=18.4,8.2Hz,1H),7.14-7.03(m,1H),4.48(d,J=8.6Hz,1H),3.90(s,1H),2.82-2.53(m,3H),1.97-1.82(m,2H),1.42-1.27(m,10H),1.21(d,J=6.7Hz,4H).MS ESI m/z $C_{17}H_{23}N_2O_7$[M-H]$^-$:计算值367.16,实测值367.14。

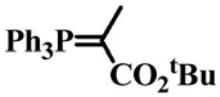
[0562] 实施例42.化合物104的合成

[0563] 

104

[0564] 在氢化反应瓶中将Pd/C(2.60g,10wt%)加入到化合物103(26.0g,70.6mmol,1.0eq.)的甲醇(260mL)溶液中。混合物在1atm H_2环境下搅拌反应过夜。硅藻土过滤,滤液浓缩得化合物104(24.0g,约100%产率),为绿色油状物。

[0565] 实施例43.化合物106的合成

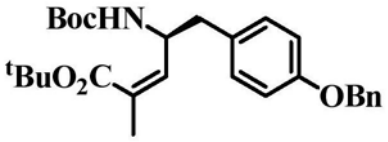
[0566] 

106

[0567] 将2-溴丙酸叔丁酯(255g,1.22mol,1.0eq.)和三苯基膦(320g,1.22mol,1.0eq.)的干燥乙腈(1L)溶液在室温搅拌18小时。减压旋去乙腈后加入甲苯使白色固体析出。倾倒

出甲苯后将白色固体溶于二氯甲烷(1L)并转移至分液漏斗。加入10%NaOH水溶液(1L),摇晃后有机相很快变黄。分出有机相,水相用二氯甲烷(1L)反萃一次。合并二氯甲烷相,饱和食盐水(400mL)洗,无水硫酸钠干燥,过滤后浓缩得叶立德106(280g,58%),为一黄色固体。

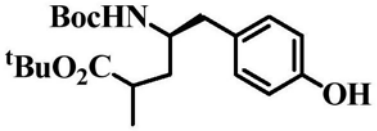
[0568] 实施例44.化合物107的合成

[0569] 

107

[0570] 向化合物99(450g,1.27mol,1.0eq.)的干燥二氯甲烷(3L)溶液中加入叶立德106(546g,1.40mmol,1.1eq.)。室温搅拌过夜。TLC监测反应完全后,经柱层析(10-50%乙酸乙酯/石油醚)纯化得化合物107(444g,75%产率),为一白色固体。ESI m/z $C_{28}H_{38}NO_5[M+H]^+$:计算值468.27,实测值468.22。

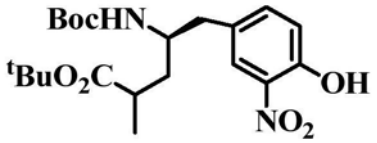
[0571] 实施例45.化合物108的合成

[0572] 

108

[0573] 将化合物107(63g,0.13mol)溶于甲醇(315mL),加入Pd/C(10wt%,6.3g),在氢气(1atm)环境下室温搅拌过夜。过滤除去催化剂后浓缩滤液得化合物108(45.8g,93%产率)。

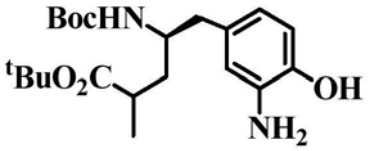
[0574] 实施例46.化合物109的合成

[0575] 

109

[0576] 在室温下向化合物108(390g,1.03mol,1.0eq.)的四氢呋喃(4L)溶液中加入亚硝酸叔丁酯(1.06kg,10.3mol.,1.0eq.)。搅拌过夜后旋去四氢呋喃,残留物经柱层析(10-50%乙酸乙酯/石油醚)纯化得化合物109(314g,72%产率),为一亮黄色固体。

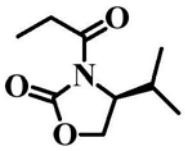
[0577] 实施例47.化合物110的合成

[0578] 

110

[0579] 在氮气保护下向化合物109(166g,0.392mol,1.0eq.)的乙酸乙酯(500mL)溶液中加入Pd/C(10wt%,16g)。通入氢气,真空置换三次。反应液在氢气(1atm)环境中于室温搅拌16小时。硅藻土过滤,浓缩得化合物110(146g,97%产率),为一黄色泡沫状固体。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ6.62(d,J=7.9Hz,1H),6.55(s,1H),6.43(d,J=7.3Hz,1H),4.39(dd,J=53.0,44.2Hz,1H),3.77(s,4H),2.72-2.29(m,3H),1.83-1.58(m,1H),1.40(d,J=7.6Hz,18H),1.24(s,1H),1.06(t,J=5.7Hz,3H).MS ESI m/z $C_{21}H_{35}N_2O_5[M+H]^+$:计算值394.25,实测值395.25。

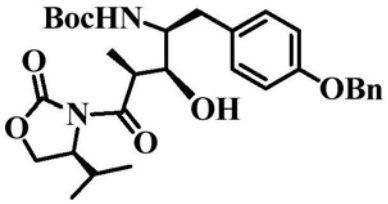
[0580] 实施例48.化合物114的合成

[0581] 

114

[0582] 在在氮气保护下，将(S)-4-异丙基恶唑烷-2-酮(5.00g,38.7mmol,1.0eq.)溶于无水四氢呋喃(200mL)中，降温至-78℃，30分钟内将正丁基锂(2.5M正己烷溶液，17.0mL，1.2eq.)滴加进反应瓶中，在-78℃下反应1小时。然后滴加丙酰氯(4.0mL,42.58mmol，1.1eq.)，滴加完毕后，在-78℃下反应1小时，薄层色谱监测反应完毕，将反应液倒入饱和食盐水溶液(250mL)中，乙酸乙酯萃取(3×100mL)，合并有机相，用1N NaOH溶液(200mL)洗涤一次，饱和食盐水溶液(300mL)洗涤一次，无水硫酸钠干燥，过滤，旋干，用硅胶柱纯化(7:1石油醚/乙酸乙酯)得到无色油状物6.36g，产率89%。MS ESI m/z $C_9H_{16}NO_3[M+H]^+$计算值186.10，实测值186.10。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ4.48-4.39(m,1H)，4.27(t,J=8.7Hz,1H)，4.21(dd,J=9.1,3.1Hz,1H)，3.06-2.82(m,2H)，2.38(dtd,J=14.0,7.0,4.0Hz,1H)，1.17(t,J=7.4Hz,3H)，0.90(dd,J=17.0,7.0Hz,6H)。

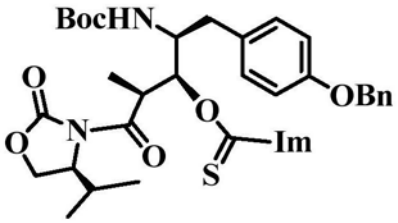
[0583] 实施例49.化合物115的合成

[0584] 

115

[0585] 在氮气保护下，将化合物(S)-4-异丙基-3-丙酰基恶唑烷-2-酮(2.00g,11.9mmol)溶于无水二氯甲烷(200mL)中，降温至0℃，将二异丙基乙基胺(2.3mL,12.9mmol,1.2eq.)和n-Bu_2BOTf(1.0M二氯甲烷溶液，12.0mL,1.1eq.)滴加进反应瓶中，0℃下反应45分钟，再降温至-78℃，将化合物99(4.24mL,10.8mmol,1.0eq.)的二氯甲烷溶液滴加进反应瓶中，-78℃下反应1小时，然后慢慢升温至室温并反应过夜。次日，将磷酸盐缓冲液(0.1M,pH 7.0,100mL)加进反应瓶中，分液，水相用二氯甲烷萃取(3×50mL)，合并有机相，用饱和食盐水溶液(200mL)洗涤一次，无水硫酸钠干燥，旋干得粗品。将粗品溶于甲醇(100mL)中，降温至0℃，将H_2O_2(30%水溶液，26mL)滴入，0℃下反应3小时，旋蒸除去甲醇，加水(100mL)，用乙酸乙酯萃取(3×100mL)，合并有机相，饱和食盐水溶液(300mL)洗涤一次，无水硫酸钠干燥，过滤，旋干，硅胶柱纯化(3:1石油醚/乙酸乙酯)得到白色泡沫状固体2.7g，产率49%。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ7.36(ddd,J=24.2,14.2,7.1Hz,5H)，7.12(d,J=8.4Hz,2H)，6.90(d,J=8.5Hz,2H)，5.02(s,2H)，4.69(d,J=9.0Hz,1H)，4.45(d,J=4.1Hz,1H)，4.33(t,J=8.4Hz,1H)，4.15(d,J=8.6Hz,1H)，3.90(dd,J=16.6,8.0Hz,1H)，3.85-3.77(m,2H)，2.81(d,J=7.6Hz,2H)，2.27(dd,J=11.4,6.7Hz,1H)，1.35(s,9H)，0.89(dd,J=14.3,6.9Hz,6H)。MS ESI m/z $C_{30}H_{41}N_2O_7[M+H]^+$计算值541.28，实测值541.30。

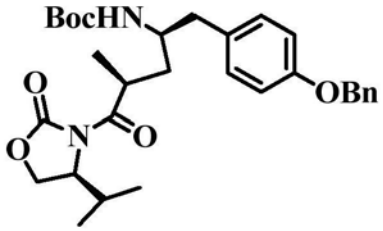
[0586] 实施例50.化合物116的合成

[0587] 

116

[0588] 在氮气保护下，将化合物115(2.50g,4.63mmol,1.0eq.)溶于无水四氢呋喃(46mL)中，加入二硫羰基咪唑(2.48g,13.89mmol,3.0eq.)，回流反应过夜。次日，加水(100mL)，乙酸乙酯萃取(3×50mL)，合并有机相，用饱和食盐水溶液(300mL)洗涤一次，无水硫酸钠干燥，过滤，旋干，硅胶柱纯化(3:1石油醚/乙酸乙酯)得到黄色泡沫状固体2.33g，产率77%。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.41(s,1H),7.67(s,1H),7.36(dt,J=16.0,6.9Hz,6H),7.09(s,1H),7.05(d,J=8.4Hz,2H),6.86(d,J=8.4Hz,2H),6.32(d,J=9.5Hz,1H),5.01(s,2H),4.56-4.43(m,2H),4.32(ddd,J=16.2,15.6,7.8Hz,3H),4.19(d,J=8.7Hz,1H),2.96(dd,J=14.6,4.4Hz,1H),2.49(dd,J=14.5,10.5Hz,1H),2.29(td,J=13.4,6.7Hz,1H),1.73(s,1H),1.29(s,9H),0.91(dd,J=13.9,6.9Hz,6H)。MS ESI m/z $C_{34}H_{43}N_4O_7S[M+H]^+$计算值651.27，实测值651.39。

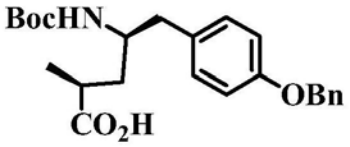
[0589] 实施例51.化合物117的合成

[0590] 

117

[0591] 在氮气保护下，将化合物116(1.90g,2.92mmol,1.0eq.)溶于无水甲苯(30mL)中，加入偶氮二异丁腈(0.05g,0.584mmol,2.0eq.)和三丁基锡烷(1.6mL,5.84mmol)，回流反应2.5小时，旋干，硅胶柱纯化(5:1石油醚/乙酸乙酯)得到白色泡沫状固体1.21g，产率79%。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ7.36(ddd,J=24.5,14.5,7.1Hz,5H),7.08(d,J=8.5Hz,2H),6.90(d,J=8.5Hz,2H),5.04(d,J=5.1Hz,2H),4.48(d,J=4.2Hz,1H),4.33(t,J=8.4Hz,1H),4.22(d,J=9.7Hz,1H),4.15(d,J=8.8Hz,1H),3.81(s,2H),2.73(dd,J=14.1,5.9Hz,1H),2.61(dd,J=14.0,7.2Hz,1H),2.29(dq,J=13.5,6.8Hz,1H),2.11-2.00(m,1H),1.60(dd,J=15.2,6.2Hz,2H),1.35(s,9H),1.20(d,J=6.9Hz,3H),0.89(dd,J=14.0,6.9Hz,6H)。MS ESI m/z $C_{30}H_{41}N_2O_6[M+H]^+$：计算值525.28，实测值525.37。

[0592] 实施例52.化合物118的合成

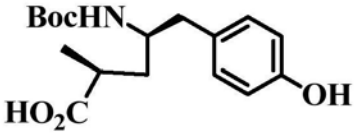
[0593] 

118

[0594] 将化合物117(1.20g,2.29mmol,1.0eq.)溶于四氢呋喃(30mL)和水(6mL)中，冰浴下加入LiOH(0.192g,4.58mmol,2.0eq.)和H_2O_2(30%水溶液,1.4mL)，冰浴反应3小时，加入亚硫酸钠(1.5M,30mL)，冰浴下搅拌30分钟后用1N $KHSO_4$调节pH至4，乙酸乙酯萃取(3×50mL)，合并有机相，饱和食盐水溶液(200mL)洗涤一次，无水硫酸钠干燥，过滤，旋干，硅胶

柱纯化(3:1石油醚/乙酸乙酯)得到白色固体0.78g,产率82%。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ 7.46-7.28(m,5H),7.07(d,J=7.7Hz,2H),6.91(d,J=7.8Hz,2H),5.04(s,2H),4.52(d,J=8.5Hz,1H),3.87(d,J=41.8Hz,1H),2.82-2.43(m,3H),1.85(t,J=12.2Hz,1H),1.41(s,9H),1.17(d,J=6.9Hz,3H)。MS ESI m/z $C_{24}H_{32}NO_5$[M+H]$^+$计算值414.22,实测值414.21。

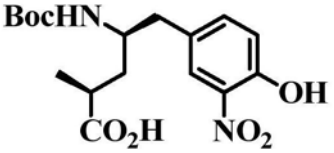
[0595] 实施例53.化合物119的合成

[0596] 

119

[0597] 将化合物118(0.77g,1.86mmol,1.0eq.)溶于甲醇(15mL)中,加入Pd/C(10wt%,0.25g),催化加氢(1atm H_2)反应16小时,过滤,旋干得到白色固体0.58g,产率96%。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ7.00(d,J=7.5Hz,2H),6.80(s,2H),4.51(d,J=9.0Hz,1H),3.88(s,1H),2.66(dd,J=65.6,22.6Hz,4H),1.88(t,J=12.2Hz,1H),1.42(s,9H),1.14(d,J=6.6Hz,3H)。MS ESI m/z $C_{17}H_{26}NO_5$[M+H]$^+$:计算值324.17,实测值324.16。

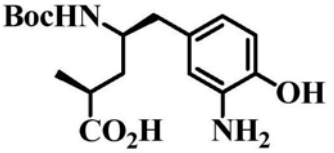
[0598] 实施例54.化合物120的合成

[0599] 

120

[0600] 将化合物119(0.57g,1.76mmol,1.0eq.)溶于无水四氢呋喃(10mL)中,冰浴下滴加亚硝酸叔丁酯(0.63mL,5.28mmol,3.0eq.),完毕升温至室温反应2h,加水(50mL),用乙酸乙酯萃取(3×30mL),合并有机相,用饱和食盐水溶液(100mL)洗涤一次,无水硫酸钠干燥,过滤,旋干,硅胶柱纯化(2:1石油醚/乙酸乙酯,含0.1%乙酸)得到黄色固体0.50g,产率77%。^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ12.00(s,1H),10.68(s,1H),7.67(s,1H),7.34(d,J=8.4Hz,1H),7.03(d,J=8.4Hz,1H),6.69(d,J=8.9Hz,1H),3.56(d,J=3.8Hz,1H),2.67(dd,J=13.5,5.1Hz,1H),2.41(dd,J=13.8,6.6Hz,1H),1.78-1.65(m,1H),1.27(s,9H),1.18(s,1H),1.05(d,J=7.1Hz,3H)。MS ESI m/z $C_{17}H_{25}N_2O_7$[M+H]$^+$:计算值369.15,实测值369.14。

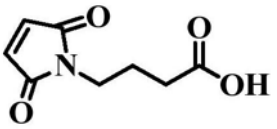
[0601] 实施例55.化合物121的合成

[0602] 

121

[0603] 将化合物120(0.77g,1.86mmol)溶于甲醇(10mL)中,加入Pd/C(10wt%,0.02g),催化加氢(1atm H_2)反应1小时,过滤,旋干得到白色固体0.43g,产率93%。MS ESI m/z $C_{17}H_{27}N_2O_5$[M+H]$^+$计算值339.18,实测值339.17。^{1}H NMR(400MHz,MeOD)δ6.60(d,J=7.9Hz,2H),6.44(d,J=7.3Hz,1H),3.71(d,J=6.3Hz,1H),2.62-2.37(m,3H),1.83(ddd,J=13.7,9.9,3.7Hz,1H),1.39(s,9H),1.13(d,J=7.1Hz,3H)。

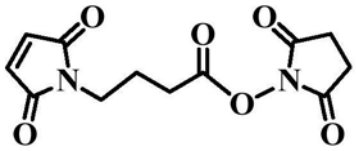
[0604] 实施例56.化合物124的合成

[0605] 

124

[0606] 将马来酸酐(285g,2.76mol)溶于乙酸(1L)中,加入4-氨基丁酸(285g,2.76mo),室温反应30分钟,升温至回流后反应1.5小时,冷却至室温,旋蒸除去溶剂,用乙酸乙酯溶解,水洗,饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥,过滤,旋干,粗品用石油醚和乙酸乙酯重结晶得到白色固体(400g,产率80%)。^{1}H NMR(500MHz,CDCl3)δ6.71(s,2H),3.60(t,J=6.7Hz,2H),2.38(t,J=7.3Hz,2H),2.00-1.84(m,2H)。

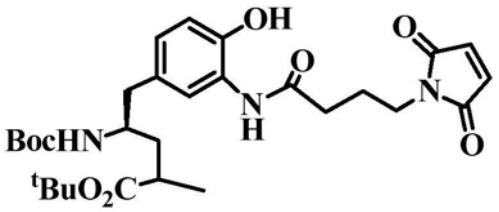
[0607] 实施例57.化合物125的合成

[0608] 

125

[0609] 将化合物124(400g,2.18mol,1.0eq.)溶于无水二氯甲烷(1.5L)中,加入N-羟基马来酰亚胺(276g,2.40mmol,1.1eq.)和DIC(303g,2.40mol,1.1eq.),室温反应过夜,旋干,硅胶柱纯化(1:2石油醚/乙酸乙酯)得到白色固体382g,产率63%。^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ6.74(s,2H),3.67(t,J=6.8Hz,2H),2.85(s,4H),2.68(t,J=7.5Hz,2H),2.13-2.03(m,2H)。

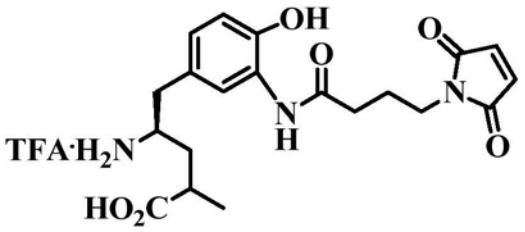
[0610] 实施例58.化合物126的合成

[0611] 

126

[0612] 将化合物124(60g,328mmol,1.3eq.)溶于THF(600mL)中,冰浴,滴加N-甲基吗啉(85.3mL,984mmol,3.0eq.)和氯甲酸异丁酯(44.6mL,426mmol,1.3eq.),0℃下反应2小时后,滴加化合物104(102g,259mmol)的THF(400mL)溶液,完毕,0℃反应30分钟,加水(300mL),用乙酸乙酯萃取(3×300mL),合并有机相,饱和食盐水溶液(100mL)洗涤一次,无水硫酸钠干燥,过滤,旋干,硅胶柱纯化(9-35%乙酸乙酯/石油醚)得到浅黄色固体104g,产率73%。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.86(s,1H),8.40(d,J=17.3Hz,1H),6.87(s,3H),6.70(s,2H),4.53-4.16(m,0H),3.79(s,0H),3.62(t,J=6.1Hz,1H),2.63(s,1H),2.40(t,J=6.9Hz,1H),2.12-1.88(m,4H),1.84-1.64(m,0H),1.38(t,J=9.6Hz,6H),1.06(t,J=6.0Hz,3H)。

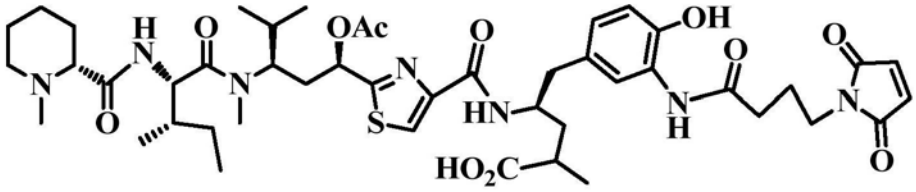
[0613] 实施例59.化合物127的合成

[0614] 

127

[0615] 将溶解在二氯甲烷(20mL)中的化合物126(12.7g,22.7mmol),在0℃用三氟乙酸(40mL)处理,温热反应物至室温,并搅拌3小时。浓缩混合物并与甲苯一起浓缩三次。将残留物用乙醚研磨,收集浅黄色固体127(11.4g,理论产率)。

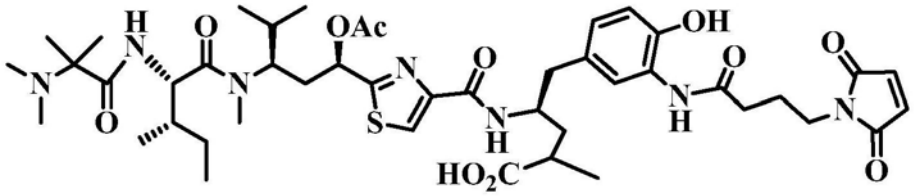
[0616] 实施例60.化合物128的合成

[0617] 

128

[0618] 将化合物33(40mg,0.074mmol,1.0eq.)溶于乙酸乙酯中,加入五氟苯酚(27mg,0.148mmol,2.0eq.)和DCC(23mg,0.111mmol,1.5eq.),室温反应16小时,硅胶垫过滤,用乙酸乙酯洗脱,将滤液浓缩,再溶于DMA(6mL)中,加入化合物127(56.6mg,0.13mmol)和N,N'-二异丙基乙胺(47.4μL,0.18mmol),室温反应24小时,浓缩,制备HPLC(C_{18}柱,10-100%乙腈/水)纯化得到白色固体128(43mg,产率63%)。MS ESI m/z $C_{46}H_{66}N_7O_{11}S[M+H]^+$:计算值924.45,实测值924.45。

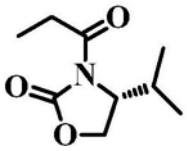
[0619] 实施例61.化合物132的合成

[0620] 

132

[0621] 将化合物41a(11g,15.9mmol,1.0eq.)和化合物127(12.3g,23.8mmol,1.5eq.)溶于DMF(100mL)中,冰浴下加入N,N'-二异丙基乙胺(6.9mL,39.7mmol),升温至室温反应1小时,浓缩,硅胶柱纯化(0-10%甲醇/二氯甲烷)得到无定型固体10g,产率69%。MS ESI m/z $C_{45}H_{65}N_7O_{11}S[M+H]^+$:计算值912.45,实测值912.45。

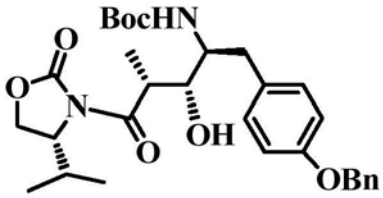
[0622] 实施例62.化合物166的合成

[0623] 

166

[0624] 将(R)-4-异丙基-2-恶唑烷酮(25.0g,0.194mol,1.0eq.)溶于1150mL无水THF中,在N_2保护下,降温至-70℃,滴加n-BuLi(85.0mL,0.213mol,1.1eq.)(温度控制在-70至-65℃之间),滴加过程中有大量白色固体析出,滴加完毕,-70℃下反应1h,再滴加丙酰氯(20.0mL,0.232mol,1.2eq.),滴加完毕,-70℃下反应1h,薄层色谱跟踪,反应完毕。将反应液倒入到1.2L饱和氯化铵溶液中,乙酸乙酯萃取(700mL×1,350mL×2),合并乙酸乙酯相,用1L 1mol/LNaOH溶液洗涤一次,1L水洗涤一次,1L饱和氯化钠溶液洗涤一次,无水硫酸钠干燥,旋干,得无色液体。乙酸乙酯/石油醚(6-10%)过柱,得产物32.6g,产率90.8%。ESI:m/z:$C_9H_{17}NO_3[M+H]^+$:计算值186.1,实测值186.1。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ4.48-4.37(m,1H),4.27(t,J=8.7Hz,1H),4.21(dd,J=9.1,3.1Hz,1H),3.04-2.82(m,2H),2.45-2.30(m,1H),1.17(t,J=7.4Hz,3H),0.90(dd,J=17.1,7.0Hz,6H)。

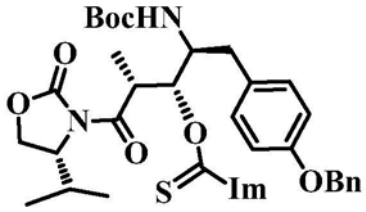
[0625] 实施例63.化合物167的合成

[0626] 

167

[0627] 向(R)-4-异丙基-3-丙酰基氧唑烷-2-(18.4g,99.5mmol,1.1eq)的无水DCM(200mL)中的溶液中添加Bu2BOTf(1M二氯甲烷溶液,100mL,100mmol,1.1eq)和DIPEA(19mL,108.6mmol,1.2eq)于0℃在N2下搅拌,并将混合物在相同温度下搅拌45分钟。在-78℃下,将醛99(32.2g,90.5mmol,1.0eq)的二氯甲烷(320mL)溶液加入,并在相同温度下搅拌1h,然后将该溶液在15小时内缓慢温热至室温。将混合物倒入700mL磷酸钾缓冲液(pH 7.0)中,并用乙酸乙酯萃取。有机萃取液用盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤,然后真空浓缩。将残余物溶于甲醇(730mL)中并冷却至0℃,然后缓慢加入30%H_2O_2水溶液(225mL),并将混合物在相同温度下搅拌3小时。加入水(750mL)后,将混合物真空浓缩以除去甲醇。所得水溶液用乙酸乙酯(500mL,150mL×2)萃取,有机萃取液用5%碳酸氢钠溶液和盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤,真空浓缩,并用SiO_2柱色谱纯化(PE:EA=3:1)得到标题化合物,为白色泡沫状物(31.7g,64.8%)。ESI:m/z:$C_{30}H_{41}N_2O_7$[M+H]$^+$:计算值541.3,实测值541.3。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ7.49-7.26(m,3H),7.17(t,J=10.7Hz,1H),6.93(d,J=7.0Hz,2H),5.06(s,1H),4.28(dd,J=44.4,36.4Hz,2H),4.04-3.52(m,1H),3.11-2.73(m,1H),2.35(s,1H),1.41(t,J=16.3Hz,9H),0.91(dd,J=15.6,6.4Hz,5H)

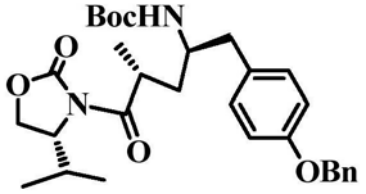
[0628] 实施例64.化合物168的合成

[0629] 

168

[0630] 向化合物167(28.3g,52.3mmol,1.0eq)的无水THF(350mL)溶液中加入1,1-硫代羰基二咪唑(TCDI)(35.1g,157.0mmol,3.0eq),并将混合物加热并回流下过夜。通过TLC监测原料消耗后,将混合物真空浓缩并通过SiO_2柱色谱法纯化(PE:EA=3:1),得到标题化合物,为浅黄色泡沫状物(26.1g,76.8%)。ESI:m/z:$C_{34}H_{43}N_4O_7S$[M+H]$^+$:计算值651.3,实测值651.3。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.21(s,1H),7.43(d,J=11.8Hz,1H),7.42-7.28(m,5H),7.06(d,J=8.3Hz,2H),7.01(s,1H),6.80(d,J=8.3Hz,2H),6.17(dd,J=8.5,2.9Hz,1H),4.96(s,2H),4.42-4.04(m,5H),2.83(dd,J=14.2,6.2Hz,1H),2.69(dd,J=14.2,7.1Hz,1H),2.32(dd,J=6.8,4.2Hz,1H),1.37(s,9H),1.30(d,J=6.9Hz,3H),0.87(dd,J=9.9,7.0Hz,6H)。

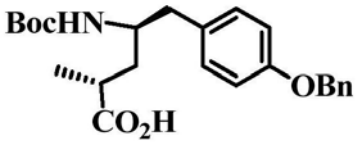
[0631] 实施例65.化合物169的合成

[0632] 

169

[0633] 向化合物168(26.0g,40.0mmol,1.0eq.)的无水甲苯(350mL)中的溶液中,添加n-Bu 3SnH(21.5mL,80.0mmol,2.0eq)和2,2′-偶氮双(2-甲基丙腈),(AIBN)(0.066g,0.01eq),在N_2下,,将混合物回流加热1小时。在通过TLC监测原料消耗之后,将混合物真空浓缩并通过SiO_2柱色谱法纯化(PE:EA=5:1),得到标题化合物,为白色泡沫状物(6.0g,37.3%)。ESI:m/z:$C_{30}H_{41}N_2O_6$[M+H]$^+$:计算值525.3,实测值525.3。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ7.37(ddd,J=25.1,15.1,7.1Hz,5H),7.08(d,J=7.9Hz,2H),6.89(d,J=8.4Hz,2H),5.03(s,2H),4.61(d,J=8.4Hz,1H),4.40(s,1H),4.32-4.08(m,2H),3.91-3.66(m,2H),2.83(d,J=8.4Hz,1H),2.60(t,J=10.1Hz,1H),2.33(s,1H),1.71(s,1H),1.41(s,9H),1.15(d,J=6.5Hz,3H),0.87(dd,J=17.0,7.0Hz,6H)。

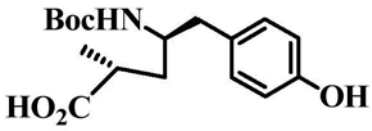
[0634] 实施例66.化合物170的合成

[0635] 

170

[0636] 将化合物169(7.84g,15.0mmol,1.0eq)溶于90mL THF和30mL水中,冰浴。将LiOH·H_2O(1.57g,37.5mmol,2.5eq)溶于30%H_2O_2(11.4mL,112.5mmol,7.5eq)中,并将该溶液滴加到反应体系中,有浅黄色固体析出,冰浴下反应3h,薄层色谱跟踪,反应完毕。滴加160mL 1.5M Na_2SO_3溶液,冰浴反应30min,用1N $KHSO_4$溶液调节pH至4,乙酸乙酯萃取(200mL×1,750mL×2),合并乙酸乙酯相,饱和氯化钠溶液洗涤一次,无水硫酸钠干燥,过滤,将混合物真空浓缩并通过SiO_2柱色谱法纯化(PE:EA=2:1),得到标题化合物,为白色泡沫状物,得6.18g白色固体,产率:100%。ESI m/z $C_{24}H_{32}NO_5$[M+H]$^+$:计算值414.2,实测值414.2。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ7.39(ddd,J=24.5,15.0,7.2Hz,5H),7.11(d,J=7.8Hz,2H),6.93(d,J=8.3Hz,2H),5.06(s,2H),4.44(t,J=8.3Hz,1H),3.83(d,J=69.4Hz,1H),2.85-2.61(m,2H),2.61-2.40(m,1H),1.99-1.70(m,1H),1.39(d,J=26.1Hz,9H),1.19(s,3H)。

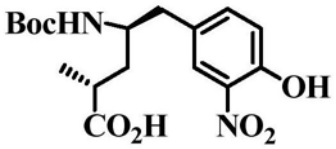
[0637] 实施例67.化合物171的合成

[0638] 

171

[0639] 将化合物170(6.18g,15.0mmol,1.0eq)溶于50mL甲醇中,加入0.6g10%Pd/C,催化加氢,室温过夜,薄层色谱跟踪,反应完毕。加入50mL乙酸乙酯,过滤,乙酸乙酯洗涤,旋干,真空抽干,得到4.8g无色透明油状物,产率:99.4%。ESI m/z $C_{17}H_{26}NO_5$[M+H]$^+$:计算值324.2,实测值324.2。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ6.97(d,J=6.5Hz,2H),6.74(d,J=8.2Hz,2H),3.93-3.66(m,1H),2.58(tdd,J=19.5,12.9,7.4Hz,3H),1.75(ddd,J=20.1,16.3,7.7Hz,1H),1.37(d,J=21.5Hz,9H),1.11(d,J=7.0Hz,3H)。

[0640] 实施例68.化合物172的合成

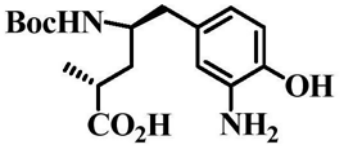
[0641] 

172

[0642] 将化合物171(4.8g,15.0mmol,1.0eq)溶于75mL无水THF中,冰浴,N_2保护下滴加t-

BuONO(18.0mL,150mmol,1.0eq),升温至室温反应3h,薄层色谱跟踪,反应完毕。冰浴条件下慢慢滴加100mL饱和$NaHCO_3$溶液,有大量气泡产生,再用1N $KHSO_4$调节pH至4,乙酸乙酯萃取(150mL×1,75mL×2),有机萃取液用盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,真空浓缩,残留物用SiO_2柱色谱法纯化(PE:EA=3:1)得到标题化合物,为黄色固体(3.6g,65.4%)。ESI m/z $C_{17}H_{25}N_2O_7[M+H]^+$:计算值369.2,实测值369.2。^{1}H NMR(400MHz,MeOD)δ7.93(d,J=2.0Hz,1H),7.48(dd,J=8.6,2.1Hz,1H),7.06(d,J=8.5Hz,1H),3.83-3.71(m,1H),2.82(dd,J=13.6,5.0Hz,1H),2.66-2.41(m,2H),1.84(ddd,J=14.0,10.6,5.6Hz,1H),1.65-1.51(m,1H),1.28(d,J=24.9Hz,9H),1.15(d,J=7.0Hz,3H)。

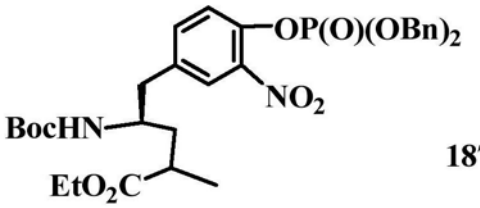
[0643] 实施例69.化合物173的合成

[0644] 

173

[0645] 将化合物172(3.2g,7.74mmol,1.0eq)溶于20mL甲醇中,加入Pd/C(0.2g,10%Pd/C),催化加氢,室温反应3h,薄层色谱跟踪,反应完毕。加入20mL乙酸乙酯,过滤,乙酸乙酯洗涤,旋干,真空抽干,得到2.3g白色泡沫状固体,产率:92.0%。ESI m/z $C_{17}H_{27}N_2O_5[M+H]^+$:计算值339.2,实测值339.2。^{1}H NMR(400MHz,MeOD)δ6.61(d,J=8.0Hz,2H),6.45(d,J=6.3Hz,1H),3.72(d,J=7.3Hz,1H),2.68-2.34(m,3H),1.81-1.66(m,1H),1.56-1.45(m,1H),1.36(d,J=29.0Hz,9H),1.08(d,J=6.9Hz,3H)。

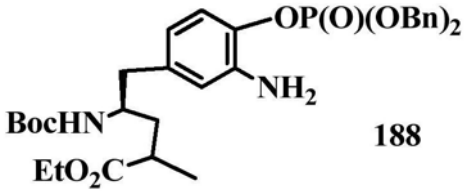
[0646] 实施例70.化合物187的合成

[0647] 

187

[0648] 将化合物102(1.00g,2.52mmol)溶于乙腈(10mL)中,降温至-25℃,加入CCl_4(2.2mL,22.7mmol,9.0eq.),搅拌10分钟,加入N,N'-二异丙基乙胺(0.88mL,5.04mmol,2.0eq.)和DMAP(0.03g,0.252mmol,0.1eq.),再滴加亚磷酸二苄酯(0.84mL,3.78mmol,1.5eq.),滴加完毕,升温至室温反应1.5小时,用KH_2PO_4(0.5M,50mL)淬灭,乙酸乙酯萃取(3×50mL),无水硫酸钠干燥,过滤,旋干,硅胶柱纯化(10-50%乙酸乙酯/石油醚)得到无色油状物187(1.60g,产率96%)。MS ESI m/z $C_{33}H_{41}N_2O_{10}P[M+H]^+$计算值657,实测值657。

[0649] 实施例71.化合物的188合成

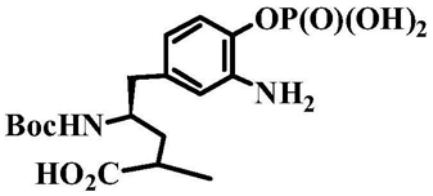
[0650] 

188

[0651] 将化合物187(1.60g,2.43mmol)溶于甲醇(20mL)中,加入Pd/C(10wt%,160mg),将反应混合物在H_2条件(1atm)下在室温搅拌。保持3小时,然后通过硅藻土过滤并减压浓缩,得到为白色固体的化合物188(1.00g,91%产率)。MS ESI m/z $C_{19}H_{31}N_2O_8P[M-H]^-$计算值

447,实测值447。

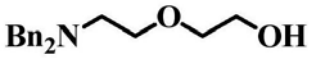
[0652] 实施例72.化合物的189合成

[0653] 

189

[0654] 将化合物188(730mg,1.63mmol)溶于甲醇(10mL)中,加入1N NaOH(16mL,16.3mmol,10eq.),室温反应过夜,浓缩减压。加水(20mL)稀释,用1N HCl酸化至pH 6,浓缩,将残留物用甲醇/乙酸乙酯(80:20,5mL)打浆,过滤,收集得到白色固体189(0.68g,产率99%)。MS ESI m/z $C_{17}H_{27}N_2O_8P$[M-H]$^-$计算值417,实测值417。

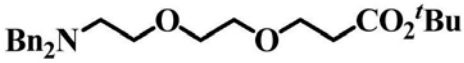
[0655] 实施例73.化合物299的合成

[0656] 

299

[0657] 将2-(2-氨基乙氧基)乙醇(21.0g,200mmol)和碳酸钾(83.0g,600mmol)混合于乙腈(350mL)中,加入苄基溴(57.0mL,480mmol)。将混合物回流过夜后,加入水(1L),用乙酸乙酯(3×300mL)萃取。将合并的有机层用饱和食盐水(1000mL)洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩并通过硅胶柱色谱(4:1石油醚/乙酸乙酯)纯化,得到无色油状物(50.97g,产率89.2%)。MS ESI m/z $C_{18}H_{23}NO_2Na$[M+Na]$^+$:计算值309.17,实测值309.19。

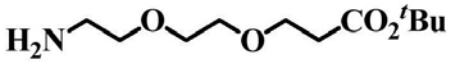
[0658] 实施例74.化合物300的合成

[0659] 

300

[0660] 向2-(2-(二苄基氨基)乙氧基)乙醇(47.17g,165.3mmol,1.0eq.),丙烯酸叔丁酯(72.0mL,495.9mmol,3.0eq.)和四丁基碘化铵(6.10g,16.53mmol,,0.1eq.)的DCM(560mL)溶液中加入50%氢氧化钠水溶液(300mL)。将混合物搅拌过夜。分离有机层,水层用乙酸乙酯(3×100mL)萃取。合并有机层并用水(3×300mL)和饱和食盐水(300mL)洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩并通过硅胶柱色谱(7:1石油醚/乙酸乙酯)纯化,得到无色油状物(61.1g,89.4%产率)。MS ESI m/z $C_{25}H_{36}NO_4$[M+H]$^+$:计算值414.2566,实测值414.2384。

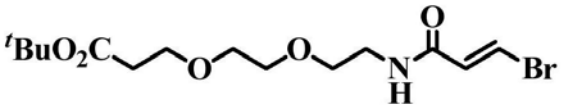
[0661] 实施例75.化合物的301合成

[0662] 

301

[0663] 在氢化瓶中向3-(2-(2-(2-(二苄基氨基)乙氧基)乙氧基)丙酸叔丁酯(20.00g,48.36mmol,1.0当量)的四氢呋喃(30mL)和甲醇(60mL)溶液中加入Pd/C(2.00g,10wt%)。将混合物在氢气环境中(1atm)振荡过夜,通过硅藻土(助滤剂)过滤,浓缩滤液,得到无色油状物(10.58g,93.8%产率)。MS ESI m/z $C_{11}H_{24}NO_4$[M+H]$^+$:计算值234.1627,实测值234.1810。

[0664] 实施例76.化合物302的合成

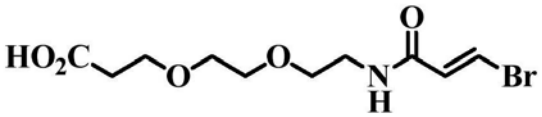
[0665] 

302

[0666] 在0℃下,向(E)-3-溴丙烯酸(0.15g,1mmol),DMAP(0.15g,1.2mmol)和DCC(0.21g,1mmol)的二氯甲烷(10ml)溶液中加入化合物291(0.23g,1mmol)。将反应混合物升温至室

温，搅拌过夜。将粗产物浓缩并通过硅胶柱色谱用乙酸乙酯/二氯甲烷梯度洗脱，得到化合物302(0.31g，85％产率)。ESI MS m/z $C_{14}H_{25}BrNO_5$[M+H]$^+$：计算值366.08，实测值366.08。

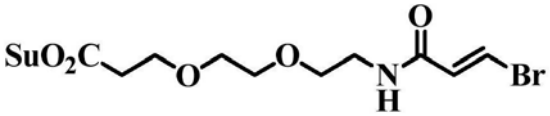
[0667] 实施例77.化合物303的合成

[0668] 

303

[0669] 将化合物302(0.31g，0.84mmol)在0℃下溶解于甲酸(4mL)中，然后加入水(2mL)。将反应混合物升温至室温，并搅拌过夜。将粗产物浓缩后直接用于下一步。ESI MS m/z $C_{10}H_{17}BrNO_5$[M+H]$^+$：计算值310.02，实测值310.03。

[0670] 实施例78.化合物304的合成

[0671] 

304

[0672] 将化合物303(0.12g，0.39mmol)，N-羟基琥珀酰亚胺(0.067g，0.58mmol)和EDCI(0.11g，0.58mmol)溶于二氯甲烷(10mL)中，混合物在室温下搅拌过夜，浓缩并通过硅胶柱色谱纯化，得到化合物304(0.13g，82％产率)。ESI MS m/z $C_{14}H_{20}BrN_2O_7$[M+H]$^+$：计算值407.04，实测值407.04。

[0673] 实施例79.化合物326的合成

[0674] 

326

[0675] 将4-氨基丁酸(7.5g，75mmol)和NaOH(6g，150mmol)在H20(40mL)中的溶液冷却至0℃，并用CbzCl(16.1g，95mmol)的溶液处理滴加THF(32ml)。1小时后，使反应升温至室温。搅拌3小时。在真空下除去THF，通过添加6N HCl将水溶液的pH调节至1.5。溶液用乙酸乙酯萃取，有机层用盐水洗涤，干燥并浓缩，得到化合物326(16.4g，92％产率)。MS ESI m/z $C_{12}H_{16}NO_4$[M+H]$^+$：计算值238.10，实测值238.22。

[0676] 实施例80.化合物327的合成

[0677] 

327

[0678] 将DMAP(0.8g，6.56mmol)和DCC(17.1g，83mmol)加入到4-((((苄氧基)羰基)氨基)丁酸(16.4g，69.2mmol)和叔丁醇(15.4g，208mmol)的二氯甲烷(100mL)溶液。室温搅拌过夜，将反应物过滤并浓缩滤液。将残留物溶于乙酸乙酯中，用1N HCl，饱和食盐水洗涤，用硫酸钠干燥，过滤，浓缩后通过柱色谱(10至50％乙酸乙酯/石油醚)纯化，得到化合物327(7.5g，37％产率)。MS ESI m/z $C_{16}H_{23}NO_4Na$[M+Na]$^+$：计算值316.16，实测值316.13。

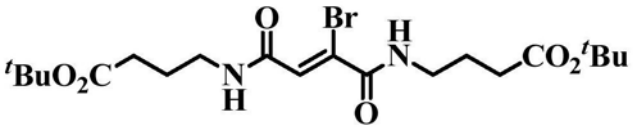
[0679] 实施例81.化合物328的合成

[0680] 

328

[0681] 将4-((((苄氧基)羰基)氨基)丁酸叔丁酯(560mg，1.91mmol)溶于甲醇(50mL)中，与Pd/C催化剂(10wt％，100mg)混合，然后氢化(1atm)反应3小时。滤出催化剂，减压蒸馏除去所有挥发物，得到化合物328(272mg，90％产率)。MS ESI m/z $C_8H_{18}NO_2$[M+H]$^+$：计算值160.13，实测值160.13。

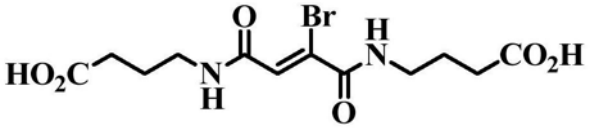
[0682] 实施例82.化合物330的合成

[0683] 

330

[0684] 将4-氨基丁酸叔丁酯(477mg,3mmol)和2,3-二溴代琥珀酸(414mg,1.5mmol)溶于二氯甲烷(35mL)中,向其中加入N,N'-二异丙基乙胺(1.16g,9mmol)和EDC(0.86g,4.5mmol)。将所得溶液在室温下搅拌过夜,然后用饱和食盐水洗涤,用硫酸钠干燥,过滤,浓缩后通过柱色谱法(纯二氯甲烷至10%甲醇/二氯甲烷)纯化,得到化合物330(160mg,22%产率)。MS ESI m/z $C_{20}H_{34}BrN_2O_6$[M+H]$^+$:计算值477.15,实测值477.16。

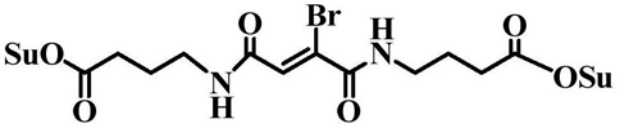
[0685] 实施例83.化合物331的合成

[0686] 

331

[0687] 将化合物330(80mg,0.168mmol)溶于二氯甲烷(5mL)中,并在38℃下与甲酸(8mL)搅拌过夜。减压蒸馏除去所有挥发物,得到化合物331(61mg,99%产率)。MS ESI m/z $C_{12}H_{18}BrN_2O_6$[M+H]$^+$:计算值365.03,实测值365.05。

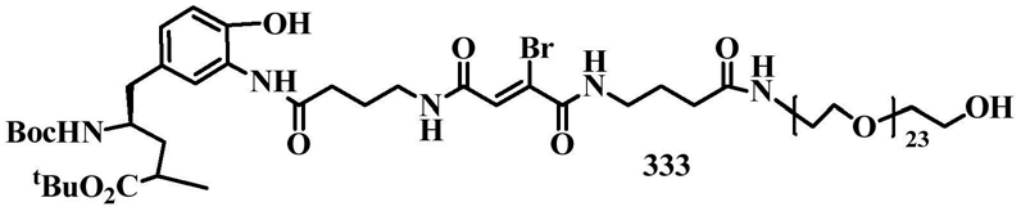
[0688] 实施例84.化合物332的合成

[0689] 

332

[0690] 将N-羟基琥珀酰亚胺(60mg,0.504mmol)和EDCI(97mg,0.504mmol)加入到化合物331(61mg,0.168mmol)的二氯甲烷(10mL)溶液中。在室温搅拌过夜,将反应混合物浓缩并通过柱色谱(0至10%甲醇/二氯甲烷)纯化,得到化合物332(72mg,77%产率)。MS ESI m/z $C_{20}H_{24}BrN_4O_{10}$[M+H]$^+$:计算值559.06,实测值559.78。

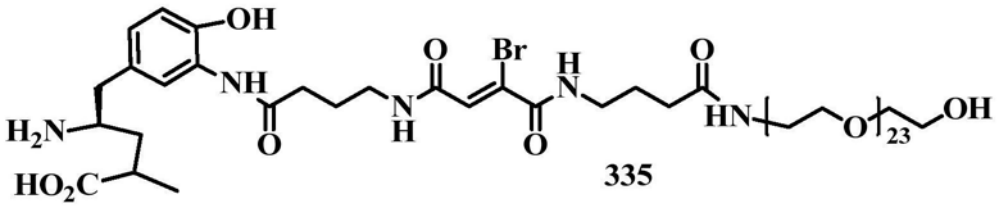
[0691] 实施例85.化合物333的合成

[0692] 

333

[0693] 将磷酸二氢钠水溶液(0.1M,1mL)加入到化合物332(36mg,0.065mmol)和化合物110(25mg,0.063mmol)的乙醇(5mL)溶液中。将所得溶液在室温下搅拌过夜,然后向其中加入HO-(PEG)$_{24}$-NH$_2$(95mg),室温下搅拌过夜。减压蒸馏除去所有挥发物,并通过柱色谱(纯二氯甲烷至10%甲醇/二氯甲烷)纯化残留物,得到化合物333(28mg,24%产率)。MS ESI m/z 1798.93([M+H]$^+$)。

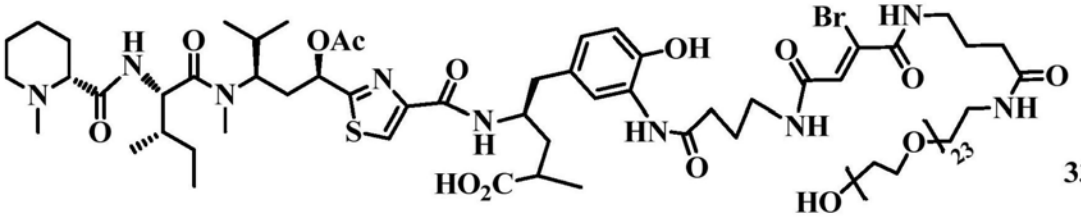
[0694] 实施例86.化合物335的合成

[0695] 

335

[0696] 将化合物333(28mg,0.0156mmol)溶于二氯甲烷(2mL)中,加入TFA(2mL),在室温下搅拌2小时。减压蒸馏除去所有挥发物,得到化合物335(25mg,98%产率),直接用于下一步。MS ESI m/z 1642.82([M+H]$^+$)。

[0697] 实施例87.化合物337的合成

[0698] 

337

[0699] 将化合物335(25mg,0.0152mmol)和五氟苯基酯33a(15mg,0.0213mmol)溶于DMA(5mL)中。向其中加入N,N'-二异丙基乙胺(10mg,0.077mmol)。将所得混合物在室温下搅拌过夜,浓缩后通过制备HPLC(C_{18}柱,10-90%乙腈/水)纯化,得到化合物337(13mg,40%产率)。MS ESI m/z 2163.82([M+H]$^+$)。

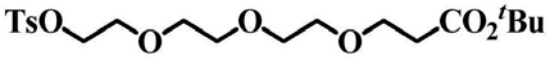
[0700] 实施例88.化合物341的合成

[0701] 

341

[0702] 向2,2'-(乙烷-1,2-二基双(氧))二乙醇(55.0mL,410.75mmol)的无水四氢呋喃(200mL)溶液中加入钠(0.1g)。将混合物搅拌直至钠消失,然后滴加丙烯酸叔丁酯(20.0mL,137.79mmol),搅拌过夜,然后在0℃下用盐酸溶液(20.0mL,1N)淬灭。通过旋转蒸发除去四氢呋喃,加入饱和食盐水(300mL),所得混合物用乙酸乙酯(3×100mL)萃取。有机层用饱和食盐水洗涤(3×300mL),用无水硫酸钠干燥,过滤并浓缩,得到无色油状物(30.20g,收率79.0%),无需进一步纯化即可使用。MS ESI m/z$C_{13}H_{27}O_6$[M+H]$^+$:计算值278.1729,实测值278.1730。

[0703] 实施例89.化合物342的合成

[0704] 

342

[0705] 向3-(2-(2-(2-(2-羟基乙氧基)乙氧基)乙氧基)丙酸叔丁酯(30.20g,108.5mmol)和对甲苯磺酰氯(41.37g,217.0mmol,2.0eq.)的无水二氯甲烷(220mL)溶液中加入三乙胺(30.0mL,217.0mmol,1.0eq.)。将反应在室温下搅拌过夜,然后用水(3×300mL)和饱和食盐水(300mL)洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩并通过硅胶柱色谱(3:1石油醚/乙酸乙酯)纯化至得到无色油状物(39.4g,收率84.0%)。MS ESI m/z$C_{20}H_{33}O_8S$[M+H]$^+$:计算值433.1818,实测值433.2838。

[0706] 实施例90.化合物343的合成

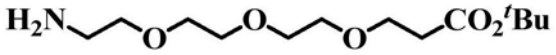
[0707] 

343

[0708] 向3-(2-(2-(2-(2-甲氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)丙酸叔丁酯(39.4g,

91.1mmol)的无水DMF(100mL)溶液中加入NaN_3(20.67g,316.6mmol),在室温下搅拌过夜。加入水(500mL),用乙酸乙酯(3×300mL)萃取。将合并的有机层用水(3×900mL)和饱和食盐水(900mL)洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩并通过硅胶柱色谱(5:1石油醚/乙酸乙酯)纯化,得到浅黄色油状物(23.8g,85.5%产率)。MS ESI m/z $C_{13}H_{25}O_3N_5Na[M+Na]^+$:计算值326.2,实测值326.2。

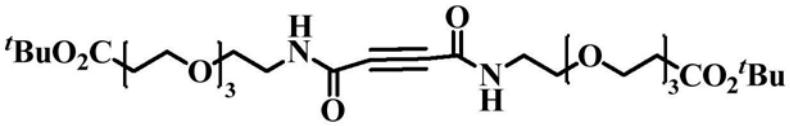
[0709] 实施例91.化合物344的合成

[0710] 

344

[0711] 将雷尼镍(7.5g,悬浮在水中)用水(三次)和异丙醇(三次)洗涤,并与化合物343(5.0g,16.5mmol)异丙醇溶液混合。将混合物在室温氢气球下搅拌16小时,然后用硅藻土垫过滤,用异丙醇洗涤。将滤液浓缩并通过柱色谱(5-25%甲醇/二氯甲烷)纯化,得到淡黄色油状物(2.60g,57%产率)。MS ESI m/z $C_{13}H_{28}NO_5[M+H]^+$:计算值279.19;实测值279.19。

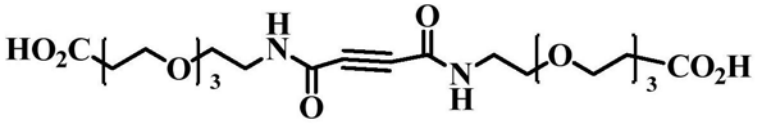
[0712] 实施例92.化合物345的合成

[0713] 

345

[0714] 将乙炔二羧酸(0.35g,3.09mmol,1.0eq.)溶解在NMP(10mL)中并冷却至0℃,向其中加入化合物344(2.06g,7.43mmol,2.4eq.),随后加入DMTMM(2.39g,8.65mmol,2.8eq.)。将反应在0℃下搅拌6小时,然后用乙酸乙酯稀释,用水和饱和食盐水洗涤。将有机溶液浓缩并用乙酸乙酯和石油醚的混合溶剂打浆。滤出固体,浓缩滤液并通过柱色谱(80-90%乙酸乙酯/石油醚)纯化,得到淡黄色油状物(2.26g,>100%产率),不经进一步纯化直接使用。MS ESI m/z $C_{30}H_{53}N_2O_{12}[M+H]^+$:计算值633.35;实测值633.30。

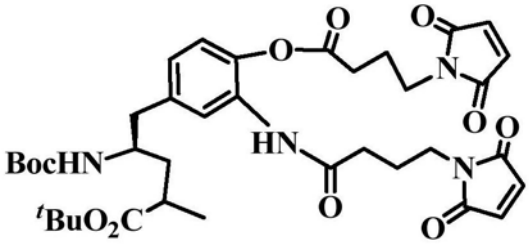
[0715] 实施例93.化合物346的合成

[0716] 

346

[0717] 将化合物345(2.26g)溶于二氯甲烷(15mL)中并冷却至0℃,然后加入三氟乙酸(15mL),将反应升温至室温,并搅拌45分钟,然后在旋转蒸发器上除去溶剂和残留的TFA。将粗产物通过柱色谱(0-15%甲醇/二氯甲烷)纯化,得到淡黄色油状物(1.39g,两步收率86%)。MS ESI m/z$C_{22}H_{37}N_2O_{12}[M+H]^+$:计算值521.23,实测值521.24。

[0718] 实施例94.化合物380的合成

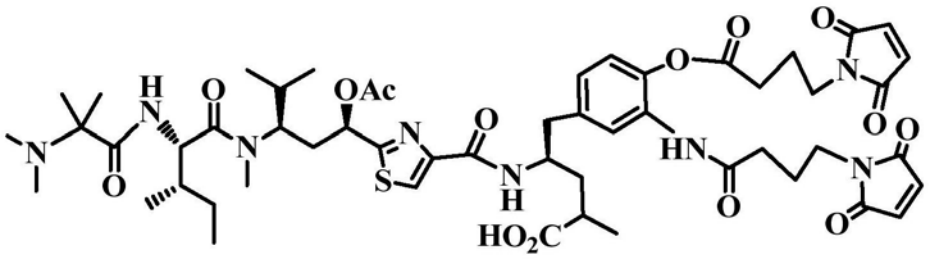
[0719] 

380

[0720] 将化合物110(68mg,0.17mmol),化合物124(94.5mg,0.52mmol)和HATU(162mg,0.425mmol)溶于二氯甲烷(50mL)中。然后加入三乙胺(73μL,0.52mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜,然后减压蒸馏除去溶剂,残留物用SiO_2柱纯化,得到标题化合物380(98mg,

80%产率)。ESI m/z $C_{37}H_{49}N_4O_{11}[M+H]^+$:计算值725.33,实测值725.34。

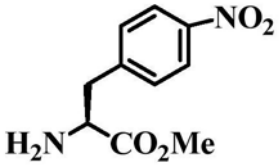
[0721] 实施例95.化合物381的合成

[0722] 

381

[0723] 将化合物380(98mg,0.135mmol)溶解在二氯甲烷(1.0mL)中,在室温下加入TFA(1.0mL),搅拌2小时。然后浓缩,重新溶解在DMA(1mL)中,加入五氟苯基酯41a(44mg,0.06mmol)和N,N'-二异丙基乙胺(45.8μL,0.27mmol)。将反应搅拌过夜,然后浓缩,残留物通过制备HPLC(乙腈/H_2O梯度洗脱)纯化,得到标题化合物381(37mg,55%产率)。ESI m/z $C_{53}H_{73}N_8O_{14}S[M+H]^+$:计算值1077.49,实测值1077.50。

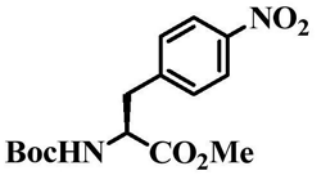
[0724] 实施例96.化合物384的合成

[0725] 

384

[0726] 在0℃下,向含(S)-2-氨基-3-(4-硝基苯基)丙酸(13.2g,62.8mmol)的甲醇(120mL)溶液中加入氯化亚砜(9mL,125.6mmol)。将反应混合物加热至回流并搅拌1小时,然后减压浓缩并分散至乙酸乙酯(50mL)中。过滤混合物,收集得到白色固体目标化合物(14.5g,产率91%)。ESI m/z $C_{10}H_{13}N_2O_4[M+H]^+$:计算值225.08,实测值225.08。

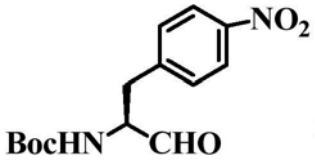
[0727] 实施例97.化合物385的合成

[0728] 

385

[0729] 向化合物384(9.5g,36.4mmol)的THF(200mL)溶液中加入三乙胺(12.6mL,91.1mmol)。将混合物搅拌30分钟后,加入二碳酸二叔丁酯(12.5mL,54.7mmol),将反应混合物搅拌1小时,然后用乙酸乙酯(200mL)稀释,用1N HCl(30mL)、水(30mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩,得到白色固体(11.4g,产率97%)。ESI m/z $C_{15}H_{21}N_2O_6[M+H]^+$:计算值325.13,实测值325.13。

[0730] 实施例98.化合物386的合成

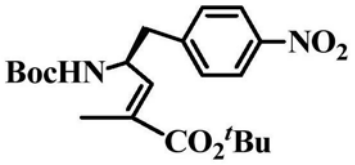
[0731] 

386

[0732] 在-78℃下,向化合物385(14g,43.2mmol)的无水二氯甲烷(150mL)溶液中加入DIBAL-H(108mL,108mmol)。将反应混合物在-78℃下搅拌30分钟,然后倒入冰水(200mL)中,用乙酸乙酯(3×80mL)萃取。将合并的有机相用1N HCl(2×50mL)、水(50mL)洗涤,经硫酸钠

干燥，过滤，减压浓缩，并通过硅胶柱层析法纯化，得到目标化合物(8.6g，产率68%)。ESI m/z $C_{14}H_{19}N_2O_5$[M+H]$^+$：计算值295.12，实测值295.12。

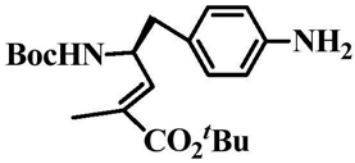
[0733] 实施例99.化合物387的合成

[0734] 

387

[0735] 在0℃下，向化合物106(8.1g，20.8mmol)的二氯甲烷(100mL)溶液中加入化合物386(5.2g，17.8mmol)。将反应混合物升温至室温，并搅拌30分钟。将反应物减压浓缩，用硅胶柱纯化，得到黄色固体(5.9g，产率82%)。ESI m/z $C_{21}H_{31}N_2O_6$[M+H]$^+$：计算值406.21，实测值406.21。

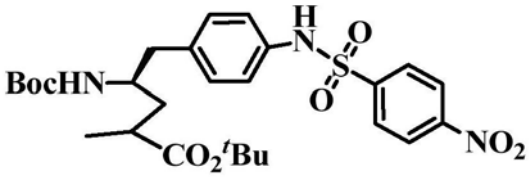
[0736] 实施例100.化合物388的合成

[0737] 

388

[0738] 在氢化瓶中，向化合物387(4g，9.85mmol)的甲醇(40mL)溶液中加入Pd/C(0.4g，10wt%)。将混合物在1atm氢气下搅拌过夜，通过硅藻土过滤，浓缩滤液，得到化合物388(3.6g，产率-100%)。ESI m/z $C_{21}H_{35}N_2O_4$[M+H]$^+$：计算值379.25，实测值379.25。

[0739] 实施例101.化合物389的合成

[0740] 

389

[0741] 在0℃下，向化合物388(3.6g，9.52mmol)和三乙胺(1.3mL，9.52mmol)的二氯甲烷(50mL)溶液中加入4-硝基苯磺酰氯(2.1g，9.52mmol)。加热至室温并搅拌1小时，然后用二氯甲烷(50mL)稀释，用1N盐水(20mL)和水(20mL)洗涤，经硫酸钠干燥，过滤并减压浓缩，然后通过硅胶柱层析法纯化，得到黄色固体(4g，产率75%)。ESI m/z $C_{27}H_{38}N_3O_8S$[M+H]$^+$：计算值564.23，实测值564.23。

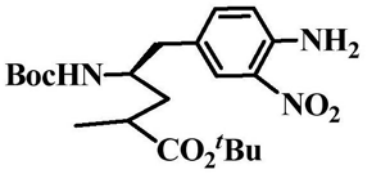
[0742] 实施例102.化合物390的合成

[0743] 

390

[0744] 室温下，向化合物389(3.6g，6.39mmol)的乙腈(40mL)溶液中加入亚硝酸叔丁酯(2.29mL，19.1mmol)。将反应混合物加热至45℃并搅拌6小时。然后将反应混合物减压浓缩，并通过硅胶柱层析法纯化，得到目标化合物(3g，产率79%)。ESI m/z $C_{27}H_{37}N_4O_{10}S$[M+H]$^+$：计算值609.22，实测值609.22。

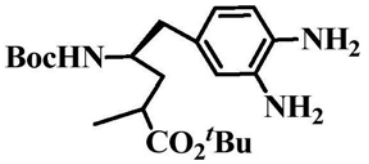
[0745] 实施例103.化合物391的合成

[0746] 

391

[0747] 向化合物390(3.0g,4.92mmol)的乙腈/DMSO(30mL/1mL)溶液中加入4-甲氧基苯硫酚(2.76g,19.7mmol)和碳酸钾(2.7g,19.7mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜,然后用乙酸乙酯(100mL)稀释,用水(20mL)和盐水(20mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩,并通过硅胶柱层析法纯化,得到目标化合物(1.7g,产率85%)。ESI m/z $C_{21}H_{34}N_3O_6[M+H]^+$:计算值424.24,实测值424.24。

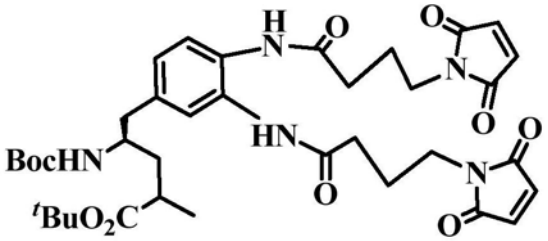
[0748] 实施例104.化合物392的合成

[0749] 

392

[0750] 在氢化瓶中,向含化合物391(100mg,0.236mmol)的甲醇(4mL)溶液中,加入Pd/C(10mg,10wt%)。将混合物在1atm氢气下搅拌过夜,通过硅藻土过滤,浓缩滤液,得到目标化合物(92.9mg,-100%产率)。ESI m/z $C_{21}H_{36}N_3O_4[M+H]^+$:计算值394.26,实测值394.26。

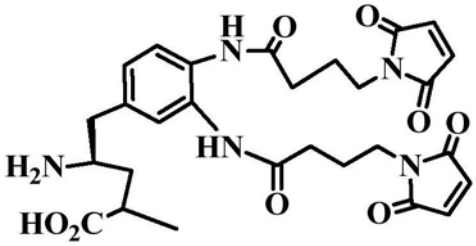
[0751] 实施例105.化合物393的合成

[0752] 

393

[0753] 将化合物392(66mg,0.17mmol),化合物124(94.5mg,0.52mmol)和HATU(162mg,0.425mmol)溶解在二氯甲烷(50mL)中,然后加入三乙胺(73μL,0.52mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜,减压蒸馏除去溶剂,残留物用硅胶柱纯化,得到目标产物393(98mg,产率80%)。ESI m/z $C_{37}H_{50}N_5O_{10}[M+H]^+$:计算值724.35,实测值724.35。

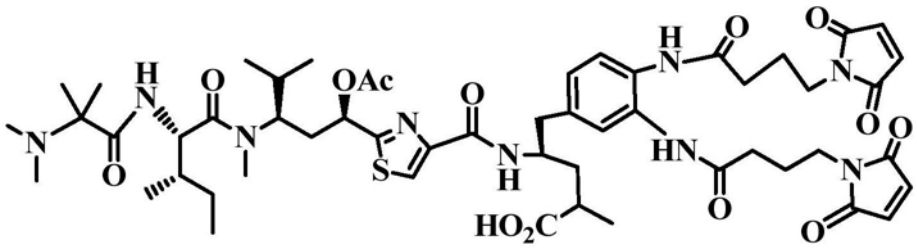
[0754] 实施例106.化合物394的合成

[0755] 

394

[0756] 将化合物393(98mg,0.135mmol)溶解在二氯甲烷(1.0mL)中,与三氟乙酸(1.0mL)在室温下搅拌2小时,然后浓缩,得到化合物394,无需进一步纯化即可用于下一步骤。

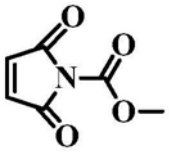
[0757] 实施例107.化合物395的合成

[0758] 

395

[0759] 向含化合物394(76.9mg,0.135mmol)的DMA(1mL)溶液中加入五氟苯酯41a(44mg,0.06mmol)和N,N'-二异丙基乙胺(45.8μL,0.27mmol)。将反应物搅拌过夜,然后浓缩,浓缩液通过制备HPLC用MeCN/H_2O梯度洗脱,得到目标产物395(37mg,产率55%)。ESI m/z $C_{53}H_{74}N_9O_{13}S[M+H]^+$:计算值1076.50,实测值1076.50。

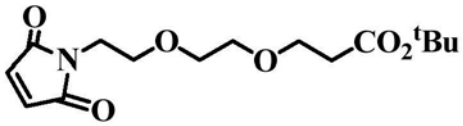
[0760] 实施例108.化合物409的合成

[0761] 

409

[0762] 在0℃下,向马来酰亚胺(6.35g,65.4mmol,1.0当量)的EtOAc(120mL)溶液中加入N-甲基吗啉(8.6mL,78.5mmol,1.2当量)和氯甲酸甲酯(6.0mL,78.5mmol,1.2当量)。将反应在0℃下搅拌30分钟,室温搅拌1小时。滤出固体并浓缩滤液,将残留物溶于二氯甲烷后通过硅胶柱过滤,并用二氯甲烷洗脱,以除去颜色。将产品收集浓缩,得到的固体用10%乙酸乙酯/石油醚打浆,得到白色固体9.00g(89%产率)。

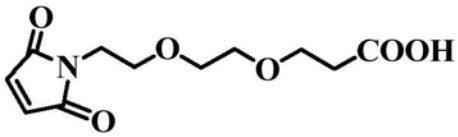
[0763] 实施例109.化合物410的合成

[0764] 

410

[0765] 将化合物301(8.16g,35.0mmol,1.0当量)和饱和$NaHCO_3$(40mL)的混合物冷却至0℃,向其中分批加入化合物409(5.43g,35.0mmol,1.0当量)。在0℃下搅拌1小时后,将反应升温至室温,并搅拌1小时。用二氯甲烷(3×100mL)萃取反应物,用盐水洗涤有机萃取物,用无水硫酸钠干燥,浓缩并通过硅胶柱层析法纯化,得到白色固体(6.76g,产率62%)。MS ESI m/z $C_{15}H_{23}NO_6[M+H]^+$:计算值314.15,实测值314.15。

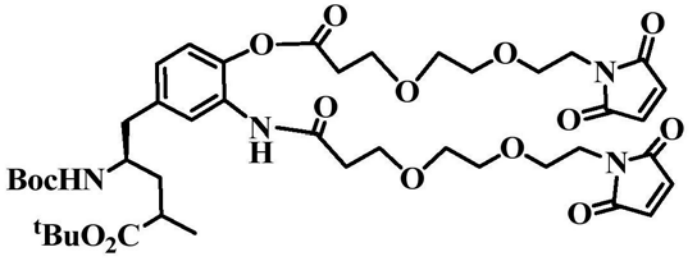
[0766] 实施例110.化合物411的合成

[0767] 

411

[0768] 将化合物410(1.85g,5.9mmol)溶解在二氯甲烷(20mL)中并在室温下与三氟乙酸(7mL)搅拌16小时,然后浓缩并通过硅胶柱层析法纯化,得到白色泡沫(1.47g,97%产率)。MS ESI m/z $C_{11}H_{15}NO_6[M+H]^+$:计算值258.09,实测值258.09。

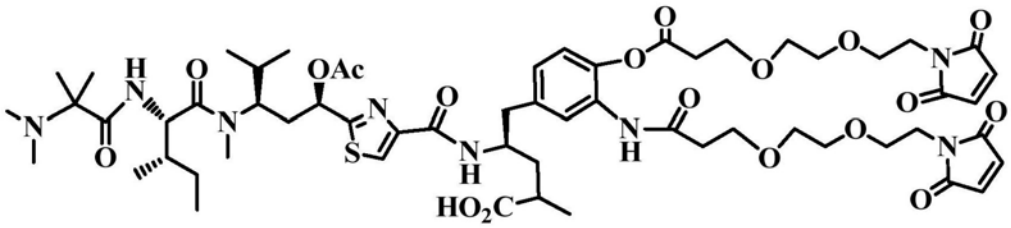
[0769] 实施例111.化合物412的合成

[0770] 

412

[0771] 将化合物110(100mg,0.25mmol)、化合物411(65mg,0.25mmol)和HATU(190mg,0.5mmol)溶解在二氯甲烷(50ml)中。和TEA(73μL,0.5mmol),并将反应混合物在室温下搅拌过夜。减压蒸馏除去溶剂,残留物通过硅胶柱纯化,得到目标产物412(164mg,75%产率)。ESI m/z $C_{43}H_{61}N_4O_{15}[M+H]^+$:计算值873.41,实测值873.41。

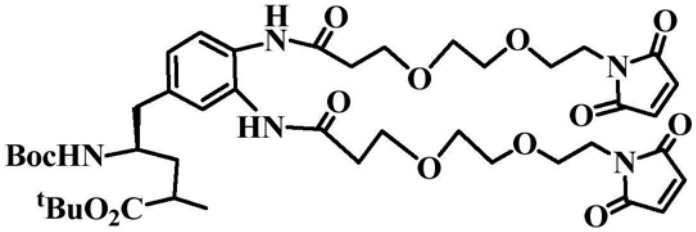
[0772] 实施例112.化合物413的合成

[0773] 

413

[0774] 将化合物412(52.4mg,0.06mmol)溶解在二氯甲烷(1.0mL)中,在室温下与三氟乙酸(1.0mL)搅拌2小时,浓缩后重新溶解在DMA(1mL)中,加入五氟苯基酯41a(44mg,0.06mmol)和DIPEA(34μL,0.20mmol)。将反应混合物搅拌过夜,然后浓缩,浓缩液通过制备HPLC用MeCN/H $_2$O梯度洗脱,得到目标产物413(33mg,45%产率)。ESI m/z $C_{59}H_{85}N_8O_{18}S[M+H]^+$:计算值1225.56,实测值1225。

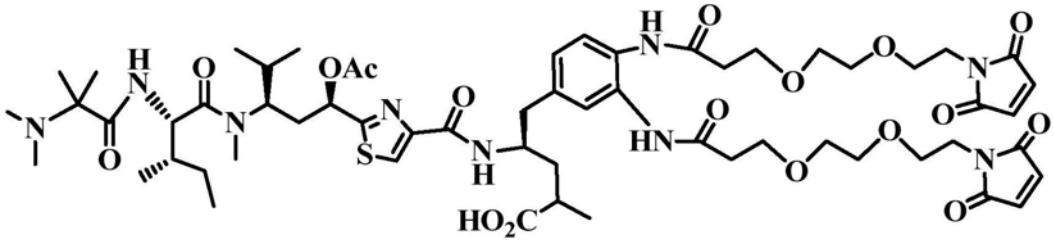
[0775] 实施例113.化合物415的合成

[0776] 

415

[0777] 将化合物392(98mg,0.25mmol)、化合物411(130mg,0.5mmol)溶解在二氯甲烷(50ml)中,加入HATU(190mg,0.5mmol)和三乙胺(73μL,0.5mmol),并将反应混合物在室温下搅拌过夜。减压除去反应溶剂,残留物通过硅胶柱纯化,得到目标产物415(163mg,75%产率)。ESI m/z $C_{43}H_{62}N_5O_{14}[M+H]^+$:计算值872.42,实测值872.42。

[0778] 实施例114.化合物416的合成

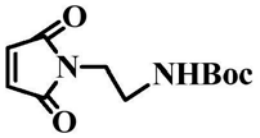
[0779] 

416

[0780] 将化合物415(54.3mg,0.06mmol)溶解在二氯甲烷(1.0mL)中,与三氟乙酸(1.0mL)

在室温下搅拌2小时，然后浓缩并重新溶解在DMA(1mL)中，向其中加入五氟苯基酯41a(44mg，0.06mmol)和DIPEA(34μL，0.20mmol)。将反应物搅拌过夜，然后浓缩，浓缩液通过制备HPLC用MeCN/H_2O梯度洗脱，得到目标产物416(33mg，45％产率)。ESI m/z $C_{59}H_{86}N_9O_{17}S[M+H]^+$：计算值1224.58，实测值1224.58。

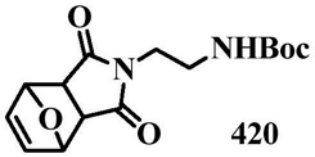
[0781] 实施例115.化合物419的合成

[0782] 

419

[0783] 将N-Boc-乙二胺(5.6mL，35.4mmol，1.1eq.)和饱和$NaHCO_3$(60mL)的混合物冷却至0℃，分批加入化合物409(5.00g，32.2mmol，1.0eq.)。在0℃下搅拌30分钟后，将反应温度升至室温并搅拌1小时。过滤，收集沉淀并用冷水洗涤，然后溶于乙酸乙酯中，用饱和食盐水洗涤，无水Na_2SO_4干燥并浓缩，得到白色固体(6.69g，87％产率)。

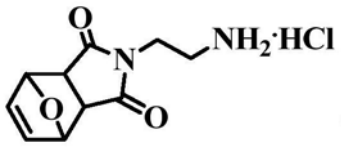
[0784] 实施例116.化合物420的合成

[0785] 

420

[0786] 在高压反应管中将化合物419(6.00g，25.0mmol)，呋喃(18.0mL)的甲苯(120mL)溶液加热至回流并搅拌16小时。无色溶液在反应过程中变黄。将反应物冷却至室温后浓缩，将所得白色固体用乙醚打浆，得到化合物420(6.5g，84％产率)。

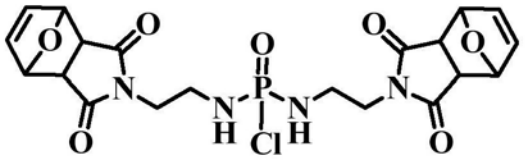
[0787] 实施例117.化合物421的合成

[0788] 

421

[0789] 将化合物420(9.93g，32.2mmol)溶于二恶烷(15mL)中，在室温下加入浓HCl(15mL)，搅拌3小时后将反应液浓缩，通过过滤收集所得固体，用乙酸乙酯洗涤滤饼。将固体在烘箱(50℃)中干燥过夜，得到化合物421(6.94g，88％产率)。

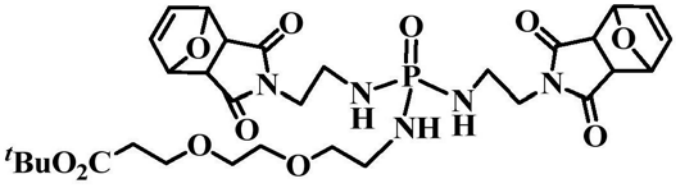
[0790] 实施例118.化合物422的合成

[0791] 

422

[0792] 在-10℃下，向化合物421(0.85g，3.47mmol)的THF(10mL)溶液中加入三氯氧磷(162μL，1.73mmol)，然后加入三乙胺(966μL，6.95mmol)。将反应物在-10℃下搅拌3小时，然后用二氯甲烷(20mL)稀释并通过硅藻土过滤，将滤液浓缩，得到化合物422，将其直接用于下一步骤。ESI m/z $C_{20}H_{23}ClN_4O_7P[M+H]^+$：计算值497.09，实测值497.09。

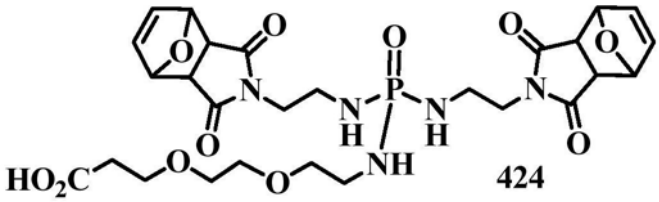
[0793] 实施例119.化合物423的合成

[0794] 

423

[0795] 在0℃下将化合物422(0.50g,1.0mmol)和N,N'-二异丙基乙胺(0.4mL,2.4mmol)溶于二氯甲烷(5.0mL)中,然后加入化合物301(0.23g,1.0mmol)。将反应在0℃下搅拌2.5小时,浓缩并通过SiO_2柱纯化,得到标题化合物423(0.30g,43%)。ESI m/z $C_{31}H_{45}N_5O_{11}P[M+H]^+$:计算值694.28,实测值694.28。

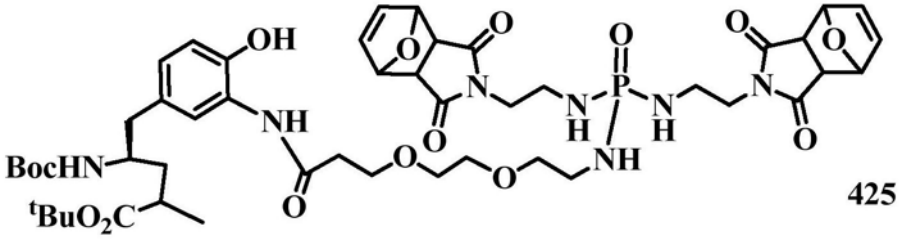
[0796] 实施例120.化合物424的合成

[0797] 

424

[0798] 将化合物423(0.30g,0.5mmol)溶于二氯甲烷(3mL)中,在室温下加入TFA(3mL)后搅拌2小时,浓缩后得到化合物424,不经进一步纯化即用于下一步骤。

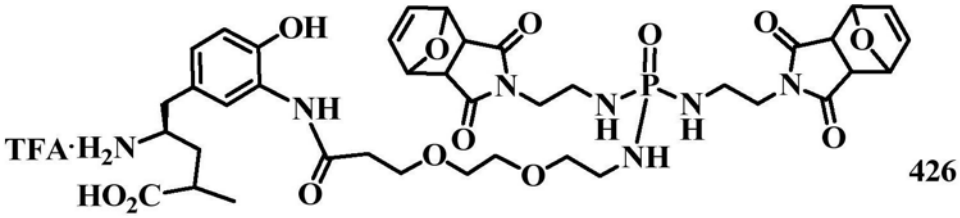
[0799] 实施例121.化合物425的合成

[0800] 

425

[0801] 将化合物424(40mg,0.063mmol),化合物110(40mg,0.10mmol)溶于二氯甲烷(5mL)中,然后加入HATU(24mg,0.063mmol)和三乙胺(27.8μL,0.2mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜,然后减压蒸馏除去溶剂,残留物用硅胶柱纯化,得到标题化合物425(53.4mg,收率84%)。ESI m/z $C_{48}H_{69}N_7O_{15}P[M+H]^+$:计算值1014.45,实测值1014.45。

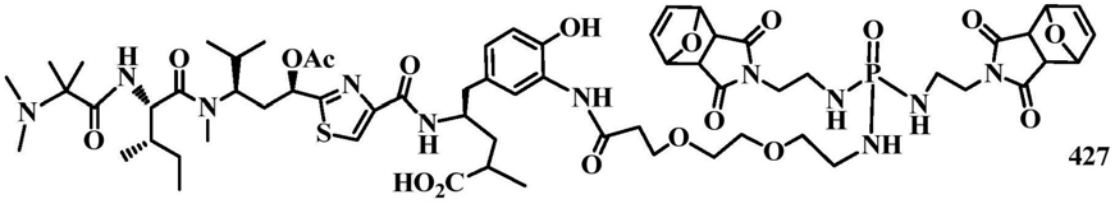
[0802] 实施例122.化合物426的合成

[0803] 

426

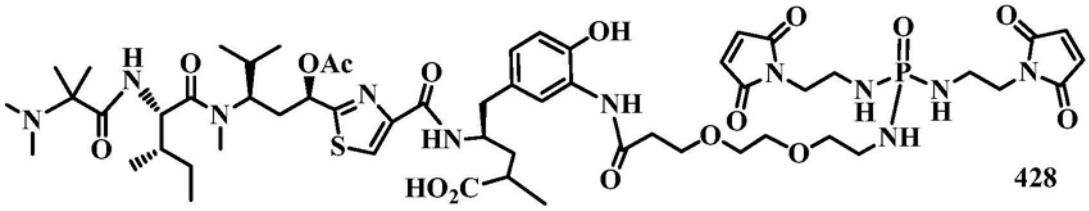
[0804] 将化合物425(53.4mg,0.053mmol)溶于二氯甲烷(2mL)中,在室温下加入TFA(2mL)后搅拌2小时,浓缩后得到化合物426,不经进一步纯化用于下一步骤。

[0805] 实施例123.化合物427的合成

[0806] 

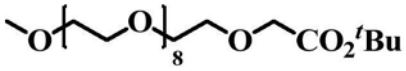
[0807] 向化合物426(45.0mg,0.053mmol)的DMA(1mL)溶液中加入五氟苯基酯41a(37.0mg,0.053mmol)和DIPEA(17μL,0.1mmol)。将反应物搅拌过夜并浓缩,通过制备HPLC(乙腈/水梯度洗脱)纯化残留物,得到标题化合物427(26.2mg,36%产率)。ESI m/z $C_{64}H_{93}N_{11}O_{18}PS[M+H]^+$:计算值1366.61,实测值1366.61。

[0808] 实施例124.化合物428的合成

[0809] 

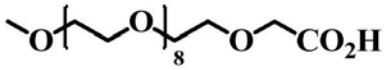
[0810] 将化合物427(8.0mg,0.0058mmol)溶于甲苯(5.0mL)中,加热回流过夜,然后浓缩,用制备HPLC(乙腈/水梯度洗脱)纯化,得到标题化合物428(6.4mg,90%产率)。ESI m/z $C_{56}H_{85}N_{11}O_{16}PS[M+H]^+$:计算值1230.56,实测值1230.56。

[0811] 实施例125.化合物432的合成

[0812] 

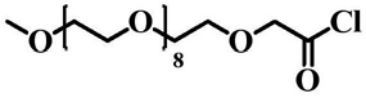
[0813] 在室温下将钠氢(60%,8g,200mmol)加入HO-PEG$_9$-OMe(42.8g,100mmol)的四氢呋喃(1L)的溶液中。搅拌30分钟后,将溴乙酸叔丁酯(48.8g,250mmol)加入,在室温下搅拌1小时,然后倒入冰水中,用二氯甲烷萃取,有机层用饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥。硅胶柱层析纯化(0-5%甲醇/二氯甲烷)得到化合物432,为黄色油状物状物(32g,59%产率)。

[0814] 实施例126.化合物433的合成

[0815] 

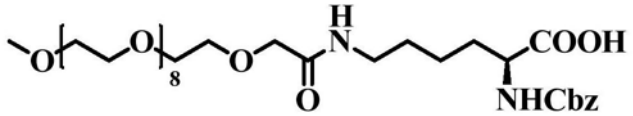
[0816] 将化合物432(40g,73.8mmol)溶解在二氯甲烷(400mL)中,然后加入甲酸(600mL),25℃搅拌过夜。减压蒸馏除去所有的挥发物,得到黄色油状物(36g,约100%产率)。ESI m/z $C_{21}H_{43}O_{12}[M+H]^+$:计算值487.27,实测值487.24。

[0817] 实施例127.化合物434的合成

[0818] 

[0819] 将化合物433(36g,73.8mmol)溶解在二氯甲烷(640mL),依次加入草酰氯(100mL)、DMF(52g,0.74mmol)。将得到的溶液在室温下搅拌4小时,减压蒸馏除去所有的挥发物,得到黄色油状物。

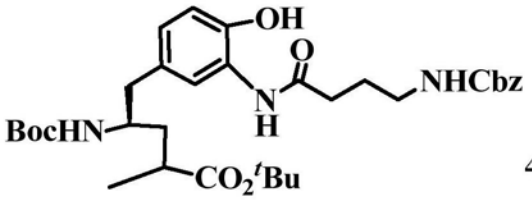
[0820] 实施例128.化合物436的合成

[0821] 

436

[0822] 将Z-L-Lys-OH(41.4g,147.6mmol)、碳酸钠(23.4g,221.4mmol)和NaOH(5.9g,147.6mmol)溶解于水(720ml)中,冷却到0℃,然后加入化合物434(37.2g,73.8mmol)的四氢呋喃溶液(20mL)。得到的混合物在室温下搅拌1小时,减压蒸馏除去THF,在冰浴下用浓盐酸调节至pH 3。溶液用二氯甲烷萃取,饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥,得到黄色油状物(55g,99%产率)。ESI m/z $C_{35}H_{60}N_2O_{15}$[M+H]$^+$:计算值749.40,实测值749.39。

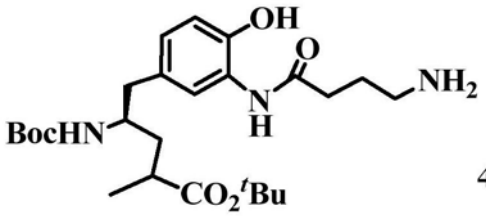
[0823] 实施例129.化合物437的合成

[0824] 

437

[0825] 将HATU(39.9g,105mmol)加入到化合物4-(((苄氧基)羰基)氨基)丁酸(26.1g,110mmol)的DMF(300mL)溶液。在室温下搅拌30分钟后,将该反应混合物加入到化合物110(39.4g,100mmol)和三乙胺(20.2g,200mmol)的DMF(300mL)溶液。反应在室温搅拌2小时,用水稀释,经乙酸乙酯萃取,有机层用饱和食盐水洗,硫酸钠干燥。浓缩后通过硅胶柱层析纯化(20-70%乙酸乙酯/石油醚),得到白色固体(45g,产率73%)。ESI m/z $C_{33}H_{48}N_3O_8$[M+H]$^+$:计算值614.34,实测值614.15。

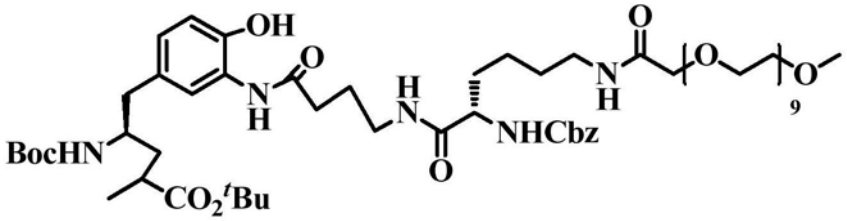
[0826] 实施例130.化合物438的合成

[0827] 

438

[0828] 将化合物437(100g,163mmol)溶解在甲醇(500mL)中,加入Pd/C催化剂(10wt%,10g),在室温氢化反应(1atm H_2)过夜。将催化剂过滤掉后,滤液减压浓缩,得到棕色泡沫状固体438(75.8g,产率97%)。^{1}H NMR(400MHz,CDCl3)δ7.11(s,1H),6.83(d,J=10.3Hz,2H),5.04-4.52(m,6H),3.90-3.56(m,1H),2.81(d,J=5.3Hz,2H),2.63(dd,J=12.5,6.1Hz,2H),2.54-2.26(dd,J=14.0,7.6Hz,4H),1.94-1.64(m,3H),1.44-1.36(m,18H),1.08(d,J=6.9Hz,3H)。ESI m/z $C_{25}H_{42}N_3O_6$[M+H]$^+$:计算值480.30,实测值480.59。

[0829] 实施例131.化合物439的合成

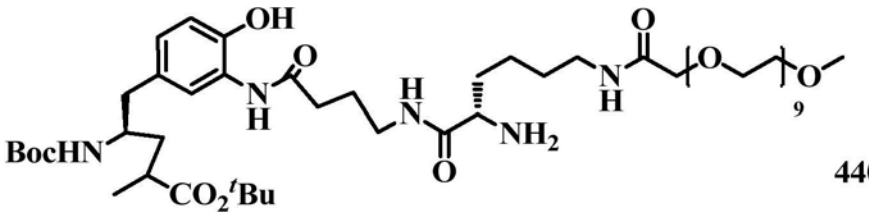
[0830] 

439

[0831] 在0℃,在化合物436(130g,174mmol,1.1eq)的DMF(500mL)溶液中在0℃依次加入三乙胺(66mL,474mmol,3eq)和HATU(72g,190mmol,1.2eq),然后将反应混合物升温至室温,

搅拌2小时。将化合物438(75.8g,158mmol)的DMF(500mL)溶液在0℃下加入到上述溶液中,反应在室温下搅拌1小时。将反应液倒入水(4L)中,用乙酸乙酯萃取(3×500ml),合并有机层,用饱和食盐水洗(2L),硫酸钠干燥,过滤浓缩后粗品439(190g)直接用于下一步反应。ESI m/z $C_{60}H_{100}N_5O_{20}[M+H]^+$:计算值1210.69,实测值1210.69。

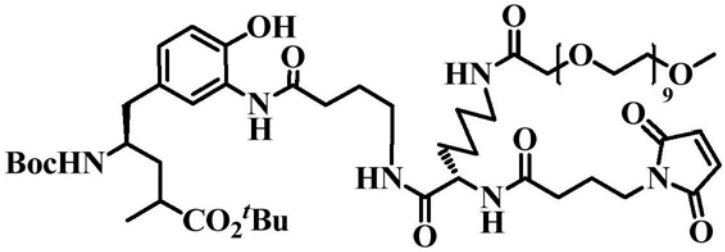
[0832] 实施例132.化合物440的合成

[0833] 

440

[0834] 将上一步反应得到的439粗品(190g)溶解在甲醇(900mL)中,加入Pd/C催化剂(10wt%,19g),和在室温氢化(1atm H_2)反应过夜。滤除催化剂,将滤液减压浓缩,用硅胶柱纯化(0-10%甲醇/二氯甲烷)得到一棕色油状物(105g,两步产率62%)。ESI m/z $C_{52}H_{95}N_5O_{18}[M+H]^+$:计算值1077.65,实测值1077.65。

[0835] 实施例133.化合物441的合成

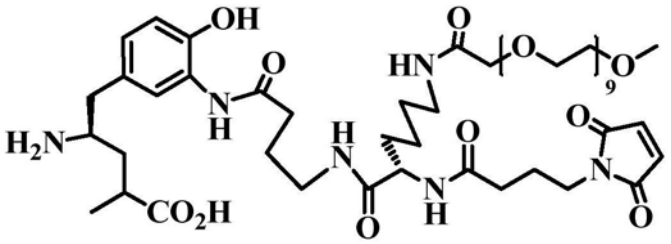
[0836] 

441

[0837] 室温下在化合物440(105g,97.1mmol)的EtOH(5.3L)溶液中,加入化合物125(54.4g,194.2mmol)和0.1N磷酸二氢钠溶液(1.1L),反应在室温下搅拌过夜。减压蒸馏除去EtOH,残留水溶液倒入水(3L)中,然后用乙酸乙酯萃取

[0838] (4×500ml),合并有机相,用饱和食盐水洗(2L),硫酸钠干燥、浓缩,粗产品用硅胶柱纯化(0-10%甲醇/二氯甲烷)得到一黄色油状物441(100g,83%产率)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ9.43(s,1H),7.35(s,1H),7.23(t,J=5.1Hz,1H),7.01(d,J=4.5Hz,2H),6.89(s,2H),6.70(s,2H),4.56-4.45(m,1H),4.30(t,J=9.7Hz,1H),3.97(s,2H),3.86-3.74(m,1H),3.66-3.63(m,36H),3.58-3.52(m,5H),3.38(s,3H),3.33-3.19(m,3H),2.47(d,J=6.2Hz,4H),2.23(dd,J=11.6,6.1Hz,2H),1.91(dtd,J=26.8,13.6,6.5Hz,7H),1.71(d,J=7.7Hz,2H),1.56-1.49(m,2H),1.42(s,9H),1.39(s,9H),1.10(d,J=6.5Hz,3H)。ESI m/z $C_{60}H_{101}N_6O_{21}[M+H]^+$:计算值1241.69,实测值1241.69。

[0839] 实施例134.化合物442的合成

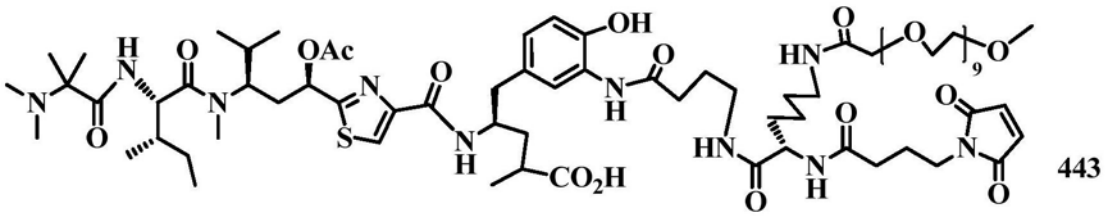
[0840] 

442

[0841] 将化合物441(79.1mg,0.062mmol)溶于二氯甲烷(2mL),在室温下加入TFA(2mL)后

搅拌2小时，减压蒸馏并与甲苯共沸蒸馏，得到化合物442，直接用于下一步。

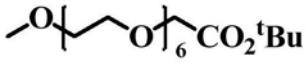
[0842] 实施例135.化合物443的合成

[0843] 

443

[0844] 将化合物442(67mg，0.062mmol)和化合物41a(43mg，0.062mmol)溶解在DMA(4mL)中，然后加入N，N'-二异丙基乙胺(43μL，0.248mmol)。在室温下搅拌3小时后，减压蒸馏除去溶剂，残留物用制备HPLC(C_{18}柱，乙腈/水10-90%)纯化，得到化合物443(59mg，60%产率)。ESI m/z $C_{76}H_{125}N_{10}O_{24}S[M+H]^+$：计算值1594.92，实测值1594.24。

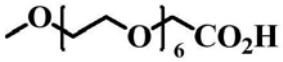
[0845] 实施例136.化合物457的合成

[0846] 

457

[0847] 将NaH(60%，0.64g，16mmol)分批加入HO-PEG_6-OMe(2.37g，8mmol)的四氢呋喃(25mL)溶液。在室温下搅拌15min后，加入溴乙酸叔丁酯(3.90g，20mmol)，在室温搅拌过夜。将反应混合物倒入冰水中，用二氯甲烷萃取，有机相用饱和食盐水洗，硫酸钠干燥，经硅胶柱层析纯化(20-50%乙酸乙酯/石油醚)，得一无色油状物(1.47g，45%)。ESI m/z $C_{19}H_{39}O_9[M+H]^+$：计算值411.25，实测值411.15。

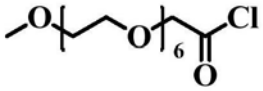
[0848] 实施例137.化合物458的合成

[0849] 

458

[0850] 将化合物457(1.47g，3.60mmol)溶解在二氯甲烷(30mL)中，与甲酸(50mL)在38℃搅拌过夜。减压蒸馏除去所有挥发物，得标题化合物(1.20g，94%产率)，为黄色油状物的标题化合物。ESI m/z $C_{15}H_{31}O_9[M+H]^+$：计算值355.19，实测值355.18。

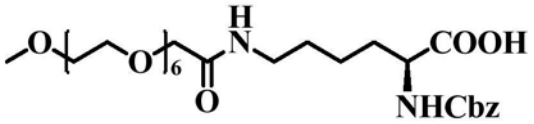
[0851] 实施例138.化合物459的合成

[0852] 

459

[0853] 将化合物458(1.10g，3.20mmol)溶解在二氯甲烷(20mL)中，依次加入草酰氯(4mL)和DMF(3滴)。将得到的溶液在室温下搅拌4小时，减压蒸馏除去所有挥发物，得黄色油状物，直接用于下一步。

[0854] 实施例139.化合物460的合成

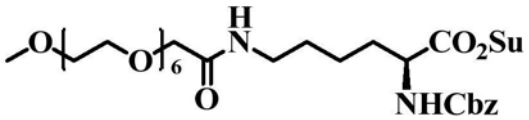
[0855] 

460

[0856] 将Z-L-Lys-OH(1.80g，6.4mmol)、碳酸钠(1g，9.6mmol)和NaOH(0.26g，6.4mmol)溶解于水(30mL)，冷却到0℃后，加入化合物459(1.20g，3.2mmol)的四氢呋喃(10mL)溶液。所得混合物在室温下搅拌1小时，减压蒸馏除去THF，水溶液在冰浴下用浓盐酸条件pH至3。用二氯甲烷萃取，饱和食盐水洗，无水硫酸钠干燥，得标题化合物(1.77g，90%)，为棕色油状

物的标题化合物。ESI m/z $C_{29}H_{49}N_2O_{12}[M+H]^+$:计算值617.32,实测值617.31。

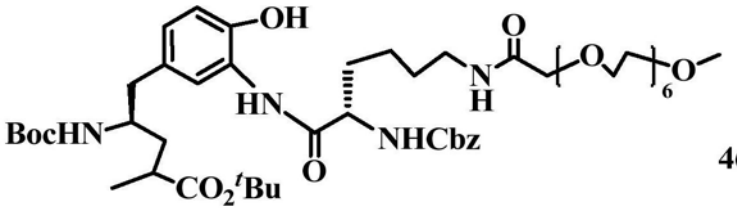
[0857] 实施例140.化合物461的合成

[0858] 

461

[0859] 将NHS(644mg,5.60mmol)和EDC(1.08g,5.60mmol)加入到化合物460(2.30g,3.70mmol)的二氯甲烷(100mL)溶液中。在室温搅拌过夜后,将反应混合物直接在硅胶柱上样,纯化(0-10%甲醇/二氯甲烷),得到一棕色油状物(2.10g,产率80%)。ESI m/z $C_{33}H_{52}N_3O_{14}[M+H]^+$:计算值714.34,实测值714.32。

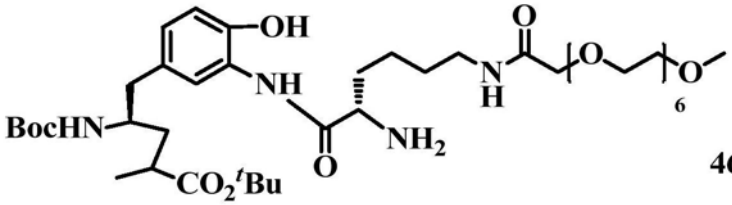
[0860] 实施例141.化合物462的合成

[0861] 

462

[0862] 将磷酸二氢钠(0.1M,3mL)加入到化合物461(357mg,0.50mmol)和化合物110(200mg,0.50mmol)的乙醇(15mL)溶液。将所得溶液在室温下搅拌24小时,减压蒸馏除去全部挥发物,残留物经硅胶柱层析纯化(5-10%甲醇/二氯甲烷)得到标题化合物(216mg,44%产率),为一棕色油状物。ESI m/z $C_{50}H_{81}N_4O_{16}[M+H]^+$:计算值993.56,实测值993.57。

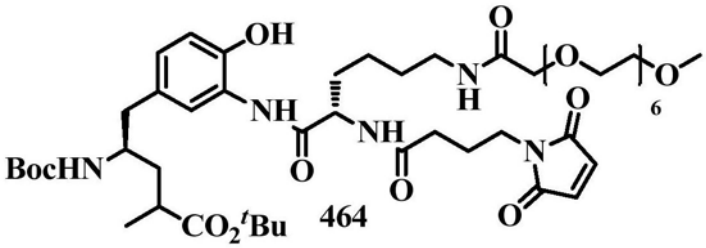
[0863] 实施例142.化合物463的合成

[0864] 

463

[0865] 将化合物462(108mg,0.109mmol)溶解在甲醇(5mL)中,加入钯催化剂(10wt%、50mg)后,在氢气氛下(1atm)室温搅拌3小时,过滤掉催化剂,滤液减压蒸馏,得标题化合物(94mg),为一黄色油状物。ESI m/z $C_{42}H_{75}N_4O_{14}[M+H]^+$:计算值859.52,实测值859.93。

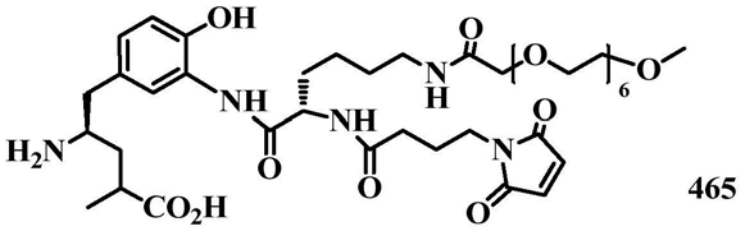
[0866] 实施例143.化合物464的合成

[0867] 

464

[0868] 将磷酸二氢钠(0.1M,2mL)加入到化合物463(94mg,0.109mmol)和化合物125(61mg,0.218mmol)的乙醇(10mL)溶液。将得到的溶液在室温下搅拌24小时,减压蒸馏除去全部挥发物,残留物通过柱色谱法纯化(5-10%甲醇/二氯甲烷)得一黄色油状物(40mg,36%产率)。ESI m/z $C_{50}H_{82}N_5O_{17}[M+H]^+$:计算值1024.56,实测值1024.98。

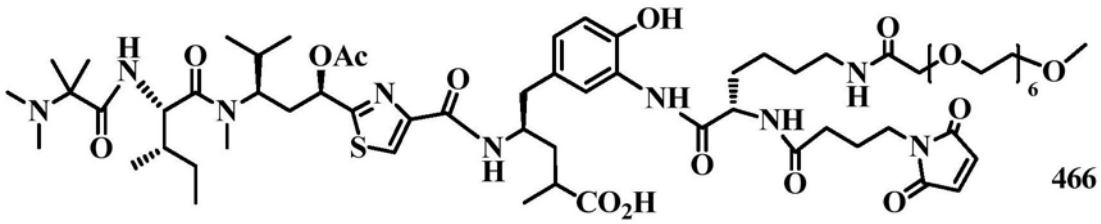
[0869] 实施例144.化合物465的合成

[0870] 

465

[0871] 将化合物464(20mg,0.0196mmol)溶解在二氯甲烷(3mL)中,和TFA(3mL)在室温下搅拌2小时,减压蒸馏除去所有挥发物,得标题化合物(17mg),为一黄色油状物。ESI m/z $C_{41}H_{66}N_5O_{15}$[M+H]$^+$:计算值868.45,实测值868.47。

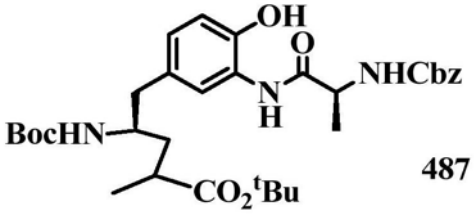
[0872] 实施例145.化合物466的合成

[0873] 

466

[0874] 将化合物465(17mg,0.0196mmol)和化合物41a(14mg,0.0196mmol)溶解在DMA(3mL)中。加入N,N'-二异丙基乙胺(10μL,0.0588mmol)后在室温搅拌3小时,然后减压蒸馏除去溶剂,残留物通过制备HPLC(C18柱,乙腈/水10-90%)纯化,得化合物466(15mg,产率64%),为一黄色油状物。ESI m/z $C_{66}H_{106}N_9O_{20}S$[M+H]$^+$:计算值1376.72,实测值1376.72。

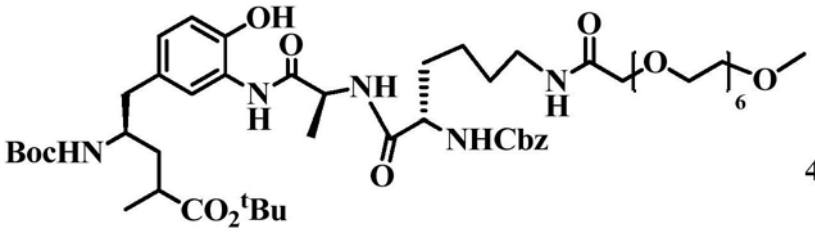
[0875] 实施例146.化合物487的合成

[0876] 

487

[0877] 将化合物110(0.30g,0.76mmol),Z-L-Ala-OH(0.17g,0.76mmol)和HATU(0.29g,0.76mmol)溶于二氯甲烷(20mL)中,向其中加入三乙胺(110μL,0.8mmol)。在室温下搅拌过夜,然后减压蒸馏除去溶剂,残留物通过SiO_2柱纯化,得到标题化合物(0.43g,95%产率)。ESI m/z $C_{32}H_{46}N_3O_8$[M+H]$^+$:计算值600.32,实测值600.32。

[0878] 实施例147.化合物488的合成

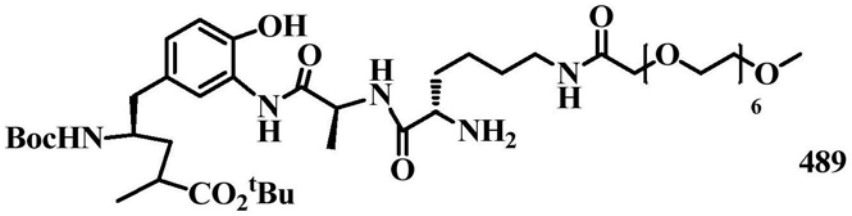
[0879] 

488

[0880] 在氢化反应瓶中,向化合物487(0.3g,0.5mmol)的甲醇(10mL)溶液中加入Pd/C(0.10g,33wt%,50%wet)。将混合物在1atm H_2下振荡过夜,然后通过硅藻土过滤,浓缩滤液然后与化合物461(357mg,0.5mmol)在乙醇(20mL)中混合,将磷酸二氢钠(0.1M,4mL)加入,在室温下搅拌24小时,减压蒸馏除去全部挥发物,残留物通过柱色谱(5-10%甲醇/二氯甲烷)纯化,得到一黄色油状物的标题化合物(176mg,33%)。ESI m/z $C_{53}H_{86}N_5O_{17}$[M+H]$^+$:计

算值1064.59,实测值1064.60。

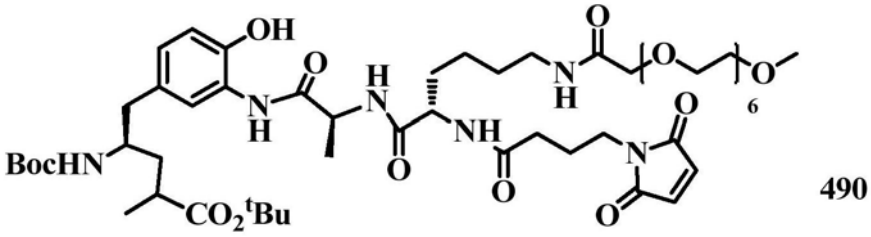
[0881] 实施例148.化合物489的合成

[0882] 

489

[0883] 将化合物488(176mg,0.166mmol)溶解在甲醇(15mL)中,加入钯催化剂(10%,80mg),在室温氢化(1atm)反应3小时,催化剂被过滤掉后,减压蒸馏浓缩滤液,得标题化合物(154mg),为一黄色油状物。ESI m/z $C_{45}H_{80}N_5O_{15}[M+H]^+$:计算值930.56,实测值930.56。

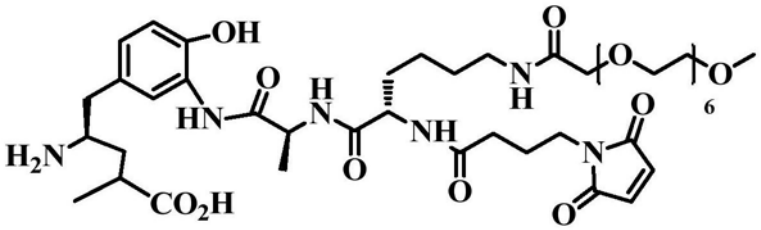
[0884] 实施例149.化合物490的合成

[0885] 

490

[0886] 将磷酸二氢钠(0.1M,4mL)加入到化合物489(154mg,0.166mmol)和化合物125(93mg,0.332mmol)的乙醇(20mL)溶液。将得到的溶液在室温下搅拌24小时,减压蒸馏除去全部挥发物,残留物通过硅胶柱层析纯化(5-10%甲醇/二氯甲烷),得到一黄色油状物(117mg,64%)。ESI m/z $C_{53}H_{87}N_6O_{18}[M+H]^+$:计算值1095.60,实测值1095.61。

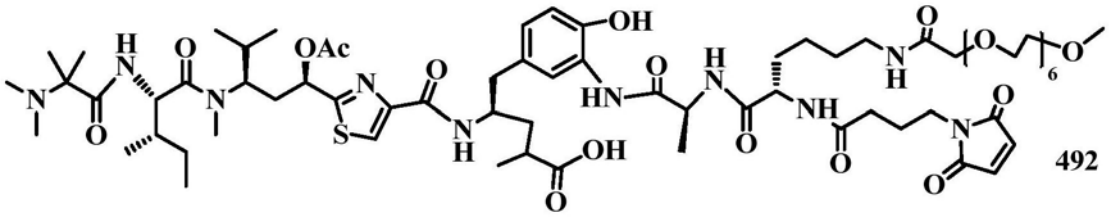
[0887] 实施例150.化合物491的合成

[0888] 

491

[0889] 将化合物490(39mg,0.0356mmol)溶解在二氯甲烷(3mL)中,和TFA(3mL)在室温下搅拌2小时,减压蒸馏除去全部挥发物,得标题化合物(33mg),为一黄色油状物。ESI m/z $C_{44}H_{71}N_6O_{16}[M+H]^+$:计算值939.48,实测值939.49。

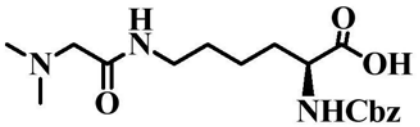
[0890] 实施例151.化合物492的合成

[0891] 

492

[0892] 将化合物491(33mg,0.0356mmol)和化合物41a(25mg,0.0356mmol)溶解在DMA(3mL)中,向其中加入N,N'-二异丙基乙胺(15mg,0.116mmol),室温搅拌3小时,减压蒸馏除去反应溶剂,残留物通过制备HPLC(C18柱,乙腈/水10-90%)纯化,得化合物492(17mg,33%),为一黄色油状物。ESI m/z $C_{69}H_{111}N_{10}O_{21}S[M+H]^+$:计算值1447.76,实测值1448.78。

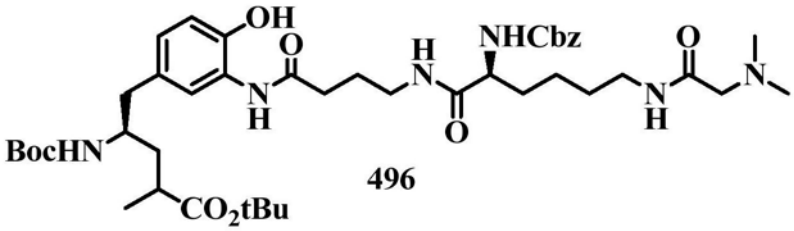
[0893] 实施例152.化合物495的合成

[0894] 

495

[0895] 将化合物2-(二甲氨基)乙酸(0.60g,4.30mmol)和HATU(1.08g,2.86mmol)溶解在DMF(2mL),加入三乙胺(1mL,7.16mmol)后在室温下搅拌1H,加入Z-L-LyS-OH(0.80g,2.86mmol)的DMF(2mL)溶液。反应液在室温下搅拌2H,然后减压浓缩。粗品用制备HPLC(C_{18}柱,乙腈/水10-90%)纯化,得到无色油状物495(0.50g,50%产率)。MS ESI m/z $C_{18}H_{28}N_3O_5$ $[M+H]^+$:计算值366.20,实测值366.20。

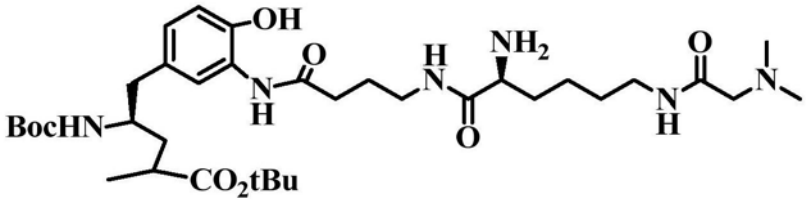
[0896] 实施例153.化合物496的合成

[0897] 

496

[0898] 将化合物495(0.50g,1.37mmol)溶于二氯甲烷(15mL),向其中加入五氟苯酚(0.38g,2.05mmol)和EDCI(0.52g,2.74mmol)。室温搅拌过夜,反应液通过硅藻土过滤,用二氯甲烷洗涤滤饼。滤液浓缩得到的五氟苯酚的酯,将其溶于10mL二氯甲烷。将化合物438(0.44g,0.91mmol)和N,N'-二异丙基乙胺(0.32mL,1.82mmol)加入上述溶液中,在室温下搅拌2小时,然后浓缩。用硅胶柱纯化粗品,甲醇/二氯甲烷梯度洗脱得化合物496(1.02g,约100%产率)。MS ESI m/z $C_{43}H_{67}N_6O_{10}$ $[M+H]^+$:计算值827.48,实测值827.48。

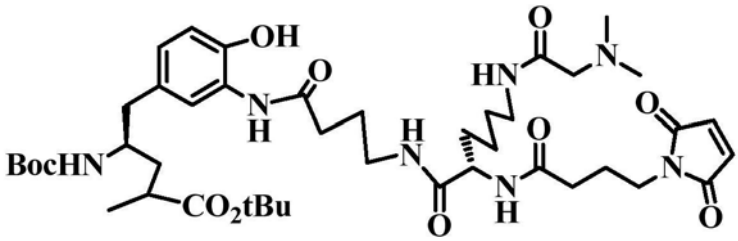
[0899] 实施例154.化合物497的合成

[0900] 

497

[0901] 将化合物496(1.02g,1.23mmol)溶解在甲醇(10mL)中,加入钯催化剂(10%,100mg),在H_2气氛下(1atm)室温搅拌过夜。真空抽滤除去催化剂,浓缩反应液,得到黄色油状物497(0.76g,89%)。MS ESI m/z $C_{35}H_{61}N_6O_8$ $[M+H]^+$计算值:693.45,实测值693.45。

[0902] 实施例155.化合物498的合成

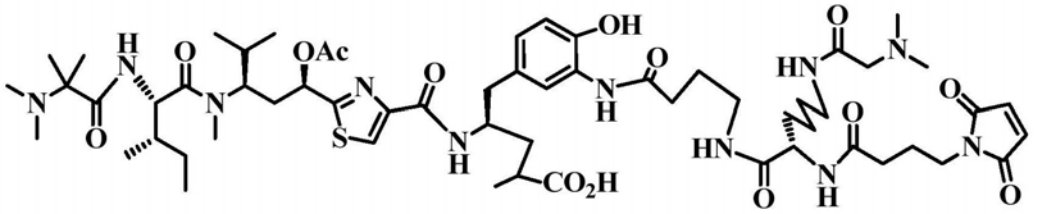
[0903] 

498

[0904] 将化合物497(0.25g,0.36mmol)和化合物125(0.15g,0.54mmol)溶于乙醇(5mL),加入磷酸二氢钠(0.1M,1mL)后,在室温下搅拌过夜。真空浓缩反应液,粗品通过柱色谱法纯化(5%～10%甲醇/二氯甲烷)得到化合物498(0.15g,48%)。MS ESI m/z $C_{43}H_{68}N_7O_{11}$ $[M+H]^+$:

计算值858.49,实测值858.49。

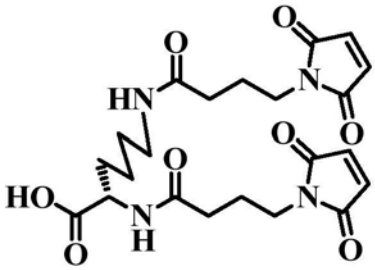
[0905] 实施例156.化合物499的合成

[0906] 

499

[0907] 将化合物498(0.15g,0.175mmol)溶解在二氯甲烷(1mL)和三氟乙酸(2mL)中,在室温下搅拌两小时,真空浓缩,得到黄色油状物,将其溶于DMA(2mL),向其中加入五氟苯基酯41a(121.1mg,0.175mmol),接着加入N,N'-二异丙基乙胺(91μL,0.525mmol)。反应在室温搅拌过夜,然后低压浓缩,粗品用制备HPLC(C_{18}柱,乙腈/水10-90%)纯化,得到化合物499(30.7mg,14%)。MS ESI m/z $C_{59}H_{92}N_{11}O_{14}S[M+H]^+$:计算值1210.65,实测值1210.62。

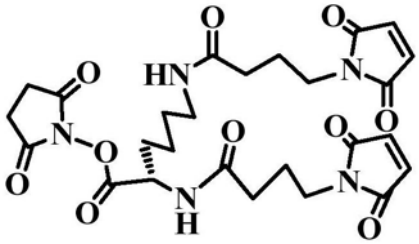
[0908] 实施例157.化合物501的合成

[0909] 

501

[0910] 将H-LyS-OH(0.31g,2.14mmol,1eq)溶于乙醇(20mL),向其中加入化合物125(1.80g,6.42mmol,3eq)和0.5M的磷酸氢二钠(4mL),反应液在室温下搅拌过夜。浓缩后,粗品用制备HPLC(C_{18}柱,乙腈/水10-90%)纯化,得到黄色油状物501(0.26g,26%)。MS ESI m/z $C_{22}H_{29}N_4O_8$:计算值477.19,实测值477.19。

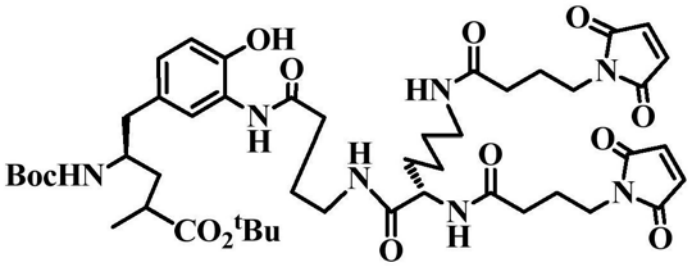
[0911] 实施例158.化合物502的合成

[0912] 

502

[0913] 将化合物501(0.26g,0.55mmol)溶于二氯甲烷(10mL),加入NHS(0.095g,0.825mmol)和EDCI(0.16g,0.825mmol)。反应混合物在室温条件下搅拌过夜,然后浓缩,用水(50mL)稀释后,用乙酸乙酯萃取(2×20mL)。合并有机层,硫酸钠干燥,过滤,浓缩得到粗产品502(0.34g),直接用于下一步反应。MS ESI m/z $C_{26}H_{32}N_5O_{10}[M+H]^+$:计算值574.21,实测值574.21。

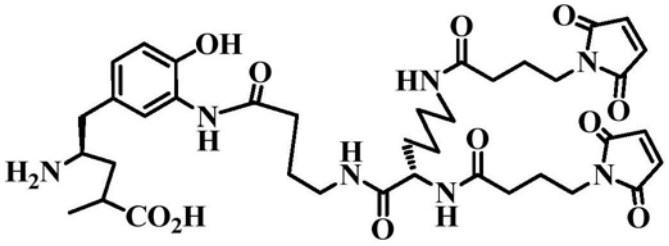
[0914] 实施例159.化合物503的合成

[0915] 

503

[0916] 将化合物438(0.19g,0.4mmol)溶于乙醇(30mL),加入化合物502(0.34g,0.6mmol)和0.1M的磷酸二氢钠(6mL)。反应混合物在室温下搅拌过夜,然后真空浓缩。残留物用水(100mL)稀释,乙酸乙酯萃取(2×40mL)。合并有机层,硫酸钠干燥,硅胶柱纯化(二氯甲烷/甲醇为洗脱剂梯度洗脱),得化合物503(0.115g,31%)。MS ESI m/z $C_{47}H_{68}N_7O_{13}[M+H]^+$:计算值938.48,实测值938.49。

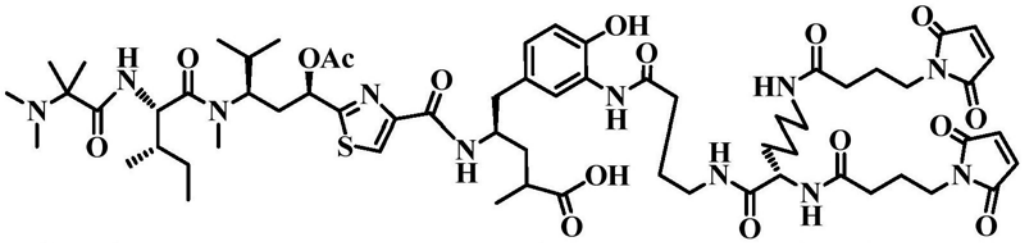
[0917] 实施例160.化合物504的合成

[0918] 

504

[0919] 将化合物503(0.115g,0.12mmol)溶于二氯甲烷(1mL),加入2mL的TFA。反应混合物在室温下搅拌2h后低压浓缩,粗品用制备HPLC(C_{18}柱,乙腈/水10-90%)纯化,得到黄色油状物504(0.0312g,33%)。MS ESI m/z $C_{22}H_{29}N_4O_8[M+H]^+$:计算值477.19,实测值477.19。

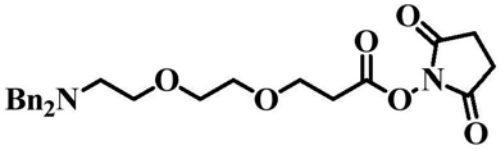
[0920] 实施例161.化合物505的合成

[0921] 

505

[0922] 将化合物504(31.2mg,0.04mmol)溶于DMA(2mL),向其中加入五氟苯基酯41a(27mg,0.04mmol),接着加入N,N'-二异丙基乙胺(16μL,0.08mmol)。反应液在室温搅拌过夜,低压浓缩,通过制备液相色谱(10-90%乙腈/水)纯化,得到化合物505(11.9mg,24%)。MS ESI m/z $C_{63}H_{92}N_{11}O_{16}S[M+H]^+$:计算值1290.64,实测值1290.64。

[0923] 实施例162.化合物508的合成

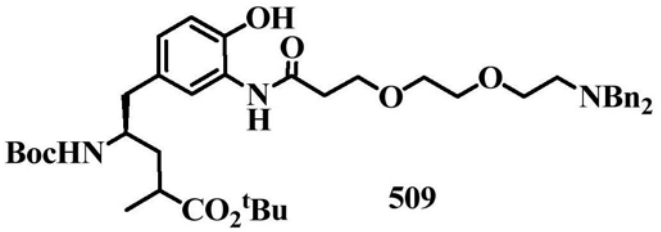
[0924] 

508

[0925] 将3-(2-(2-(二苄基氨基)乙氧基)乙氧基)丙酸叔丁基酯300(5g,12.1mmol)溶于二氯甲烷(10mL)中,加入5mL的三氟乙酸。反应混合物在室温下搅拌1小时,然后浓缩。粗产品溶于二氯甲烷(50ml),依次加入NHS(4.25g,37mmol)和EDCI(7.10g,37mmol)。反应混合物在室温搅拌过夜,然后浓缩,硅胶柱纯化(二氯甲烷/甲醇梯度洗脱),得到黄色油状物508

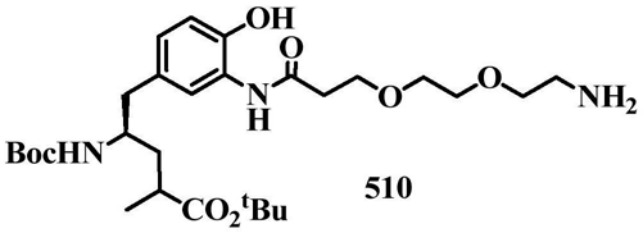
(5g,91%)。MS ESI m/z $C_{25}H_{31}N_2O_6[M+H]^+$计算值:455.21,实测值455.21。

[0926] 实施例163.化合物509的合成

[0927] 

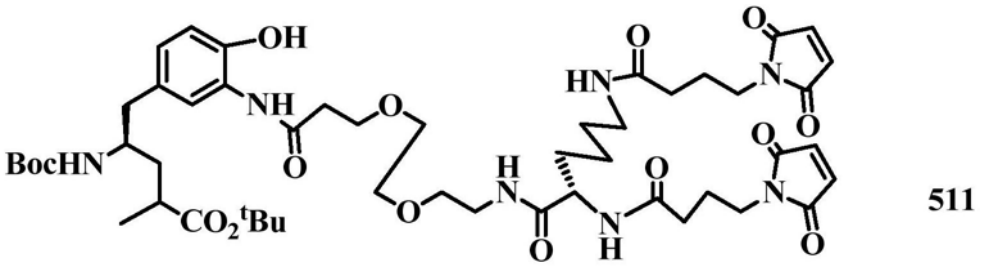
[0928] 将化合物110(1g,2.5mmol,1.0eq)溶于乙醇(10ml),加入化合物508(1.80g,3.9mmol,1.5eq)和0.1M的磷酸二氢钠(2mL),在室温下反应过夜,然后浓缩。残留物用水(100mL)稀释,用乙酸乙酯萃取(3×50ml)。合并有机层用硫酸钠干燥,过滤,浓缩,硅胶柱纯化(二氯甲烷/甲醇体系梯度洗脱),得到黄色油状物509(0.93g,50%)。MS ESI m/z $C_{42}H_{60}N_3O_8[M+H]^+$计算值:734.43,实测值734.43。

[0929] 实施例164.化合物510的合成

[0930] 

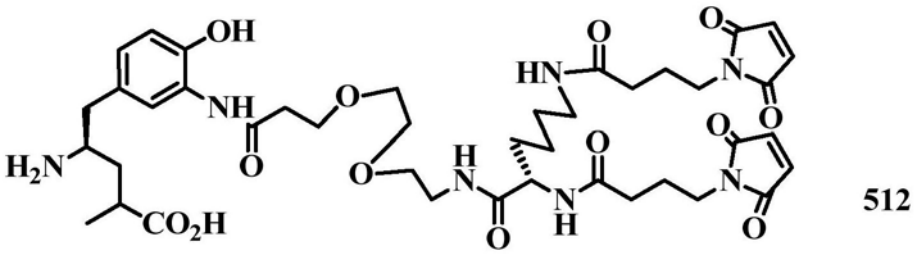
[0931] 将化合物509(0.93g,1.27mmol),乙酸乙酯(20mL)和Pd/C(0.093g,10wt%)加入到氢化瓶中,在氢气(1atm)下搅拌过夜,然后通过硅藻土过滤固体。滤液浓缩得到化合物510(0.57g,81%),产物不用进一步纯化。MS ESI m/z $C_{28}H_{48}N_3O_8[M+H]^+$计算值:554.34,实测值554.34。

[0932] 实施例165.化合物511的合成

[0933] 

[0934] 将化合物510(0.25g,0.45mmol,1.0eq)溶于乙醇(5mL)中,室温下加入化合物502(0.39g,0.68mmol,1.5eq)和磷酸二氢钠(0.1M,1mL),反应混合物在室温搅拌过夜。反应液真空浓缩后用水(100mL)稀释,用乙酸乙酯萃取(2×50mL)。合并有机层,硫酸钠干燥,过滤,浓缩,硅胶柱纯化(甲醇/二氯甲烷梯度洗脱),得到黄色油状物511(0.076g,17%)。MS ESI m/z $C_{50}H_{74}N_7O_{15}[M+H]^+$计算值:1012.52,实测值:1012.53。

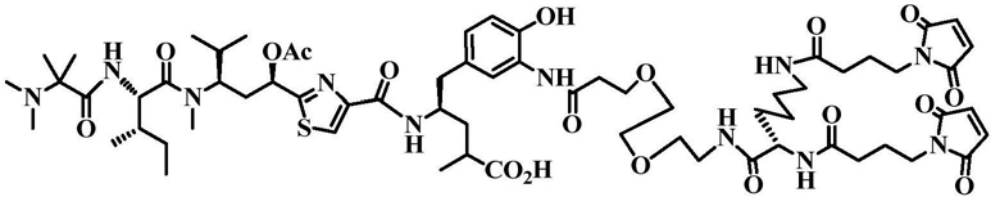
[0935] 实施例166.化合物512的合成

[0936] 

512

[0937] 将化合物511(0.076g,75mmol)溶于二氯甲烷(2mL),加入4mL的TFA后在室温下搅拌1小时,浓缩,得到的粗品512直接用于下一步反应。MS ESI m/z $C_{41}H_{58}N_7O_{13}$[M+H]$^+$计算值:856.40,实测值856.40。

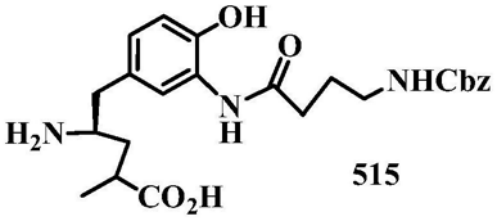
[0938] 实施例167.化合物513的合成

[0939] 

513

[0940] 将化合物512溶于DMA(2mL),加入化合物41a(33mg,0.048mmol)和N,N'-二异丙基乙胺(25μL,0.144mmol)。反应在室温下搅拌3小时,然后浓缩和制备HPLC纯化(乙腈/水梯度洗脱),得到黄色油状物513(21.3mg,32%)。MS ESI m/z $C_{66}H_{98}N_{11}O_{18}S$[M+H]$^+$计算值:1364.67,实测值1364.67。

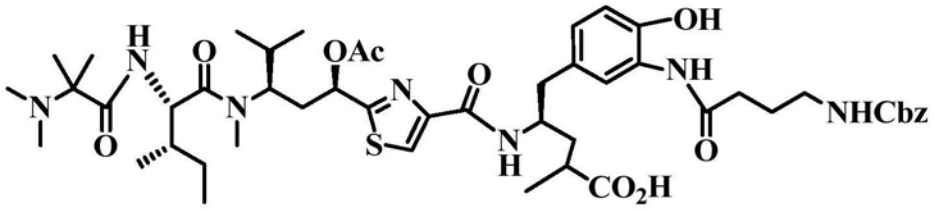
[0941] 实施例168.化合物515的合成

[0942] 

515

[0943] 将化合物437(1g,1.63mmol)溶于二氯甲烷(1mL),向其中加入2mL TFA,反应混合物在室温下搅拌1小时,然后浓缩,得到的粗品515直接用于下一步反应。MS ESI m/z $C_{24}H_{32}N_3O_6$[M+H]$^+$计算值:458.22,实测值:458.22。

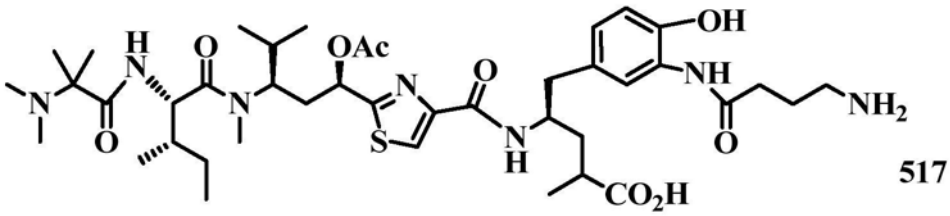
[0944] 实施例169.化合物516的合成

[0945] 

516

[0946] 将化合物515溶于DMF(3mL),向其中加入五氟苯基酯41a(0.63g,0.91mmol)和N,N'-二异丙基乙胺(0.46mL,2.73mmol)。反应在室温下搅拌过夜,然后浓缩,硅胶柱纯化(二氯甲烷/甲醇梯度洗脱),得到黄色油状物的标题化合物516(1.75g)。MS ESI m/z $C_{49}H_{72}N_7O_{11}S$[M+H]$^+$计算值:966.49,实测值966.49。

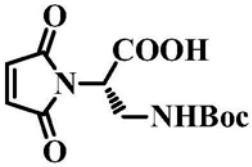
[0947] 实施例170.化合物517的合成

[0948] 

517

[0949] 将化合物516(0.20g,0.20mmol),甲醇(15mL)和Pd/C(0.02g,10wt%)加入到氢化瓶中,然后用1N HCl调节pH值至4左右。在H_2(1atm)下搅拌过夜,垫硅藻土过滤,滤液浓缩得到化合物517,直接用于下一步反应。MS ESI m/z $C_{41}H_{66}N_7O_9S[M+H]^+$计算值:832.46,实测值832.46。

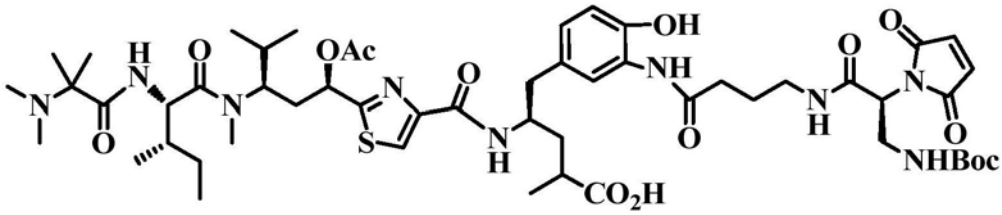
[0950] 实施例171.化合物519的合成

[0951] 

519

[0952] 将化合物H-Dap(Boc)-OH(1g,4.9mmol)与饱和$NaHCO_3$溶液(20mL)混合,在0℃下加入化合物409(2.30g,14.7mmol)。反应在0℃搅拌1h,然后升温到室温搅拌1h。加入硫酸氢钾(1M)调整pH至约6,产生的混合物用乙酸乙酯萃取(2×50ml)。合并有机层,硫酸钠干燥,过滤,浓缩得化合物519(0.42g,30%产量)。MS ESI m/z $C_{12}H_{15}N_2O_6[M-H]^-$计算值:283.10,实测值283.10。

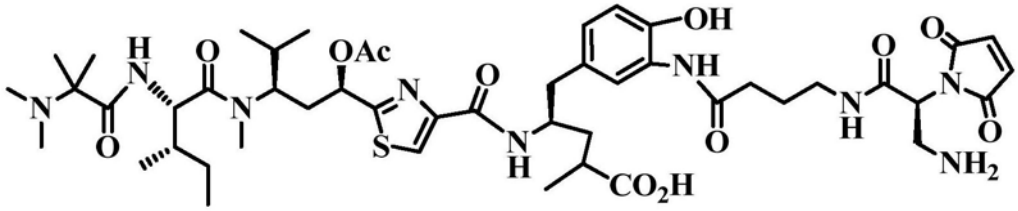
[0953] 实施例172.化合物520的合成

[0954] 

520

[0955] 将化合物519(0.21g,0.74mmol)溶于乙酸乙酯(10mL),然后加入五氟苯酚(0.27g,1.48mmol)和DCC(0.30g,1.48mmol)。反应混合物在室温下搅拌过夜,然后过滤,用EtOAC洗涤滤饼。浓缩滤液得到活化酯(0.17g,0.37mmol),溶于1mL DMF,向其中加入化合物517(0.36g,0.43mmol)和N,N'-二异丙基乙胺(0.13mL,0.74mmol),反应混合物在室温下搅拌2小时,浓缩,制备HPLC纯化(梯度的乙腈/水),得到化合物520(50mg,13%)。MS ESI m/z $C_{53}H_{80}N_9O_{14}S[M+H]^+$计算值:1098.55,计算1098.55。

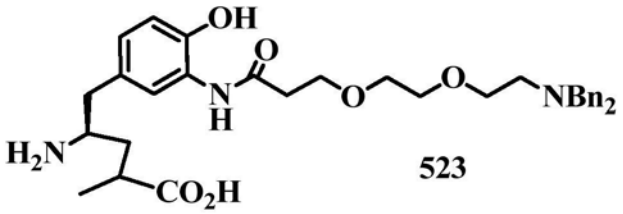
[0956] 实施例173.化合物521的合成

[0957] 

521

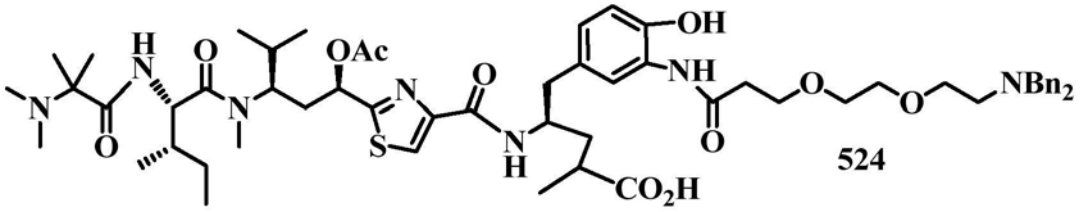
[0958] 将化合物520(50mg,0.046mmol)溶于0.5mL的二氯甲烷中,加入1mL三氟乙酸后在室温下反应1小时,浓缩并用制备HPLC(流动相乙腈/水)纯化得到产物521(11mg,25%产率)。MS ESI m/z $C_{48}H_{72}N_9O_{12}S[M+H]^+$:计算值998.49,实测值998.49。

[0959] 实施例174.化合物523的合成

[0960] 

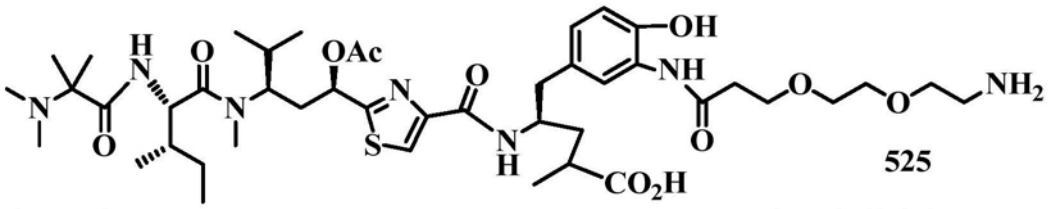
[0961] 将化合物509(1.00g,1.36mmol)溶于2mL二氯甲烷中,并向其中加入4mL三氟乙酸,加完后后室温下反应1小时。浓缩得到化合物523。MS ESI m/z $C_{33}H_{44}N_3O_6[M+H]^+$:计算值578.32,实测值578.32。

[0962] 实施例175.化合物524的合成

[0963] 

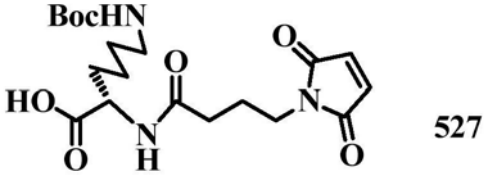
[0964] 将化合物523溶于5mL DMF中,向其中加入化合物41a(0.78g,1.13mmol)和N,N'-二异丙基乙胺(0.8mL,4.52mmol)。加完后后室温搅拌过夜,浓缩后用硅胶柱纯化(流动相甲醇/二氯甲烷)得到产物524(1.64g,100%产率)。MS MS ESI m/z $C_{58}H_{84}N_7O_{11}S[M+H]^+$:计算值1086.59,实测值1086.58。

[0965] 实施例176.化合物525的合成

[0966] 

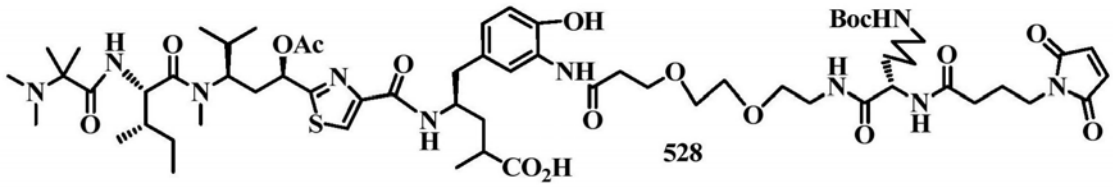
[0967] 将化合物524(0.80g,0.20mmol)溶于10mL甲醇中,向其中加入Pd/C(0.08g,10wt%),并用1N HCl调pH到4。氢气置换3次后,搅拌过夜。垫硅藻土过滤,滤液浓缩得到化合物525,其含有一些未反应的原料,无需进一步纯化即可用于下一步骤。MS ESI m/z $C_{41}H_{66}N_7O_9S[M+H]^+$:计算值832.46,实测值832.46。

[0968] 实施例177.化合物527的合成

[0969] 

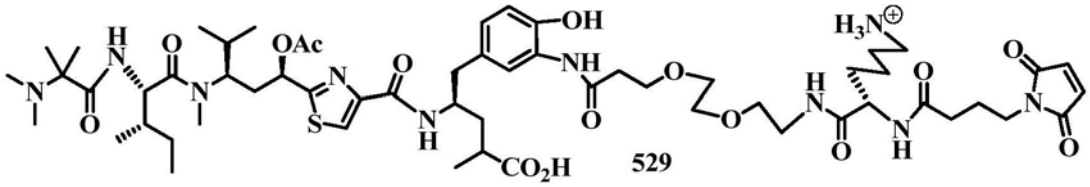
[0970] 将H-Lys(Boc)-OH(1.00g,3.8mmol,1.0eq)溶于16mL乙醇中,向其中加入化合物125(1.00g,5.6mmol,1.5eq)和磷酸二氢钠(3mL),加完后后室温搅拌过夜。反应液浓缩并用硅胶柱纯化(流动相甲醇/二氯甲烷),得到产物527(1.62g,理论产率)。MS ESI m/z $C_{19}H_{30}N_3O_7[M+H]^+$:计算值412.20,实测值412.20。

[0971] 实施例178.化合物528的合成

[0972] 

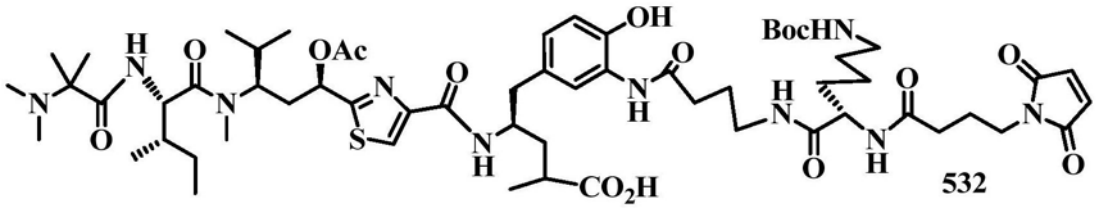
[0973] 将化合物527(0.24g,0.58mmol)溶于10mL乙酸乙酯中,加入五氟苯酚(0.21g,1.17mmol)和DCC(0.24g,1.17mmol)。加完后后室温搅拌过夜,过滤并浓缩滤液得到产物(32mg,0.056mmol),将此化合物溶于DMF中,向其中加入化合物525(50mg,0.056mmol)和N,N'-二异丙基乙胺(29μL,0.168mmol)。加完后后室温反应2小时,浓缩后用制备HPLC纯化(流动相:乙腈/水),得到产物528(3mg,4%产率)。MS ESI m/z $C_{63}H_{99}N_{10}O_{17}S[M+H]^+$:计算值1299.68,实测值1299.68。

[0974] 实施例179.化合物529的合成

[0975] 

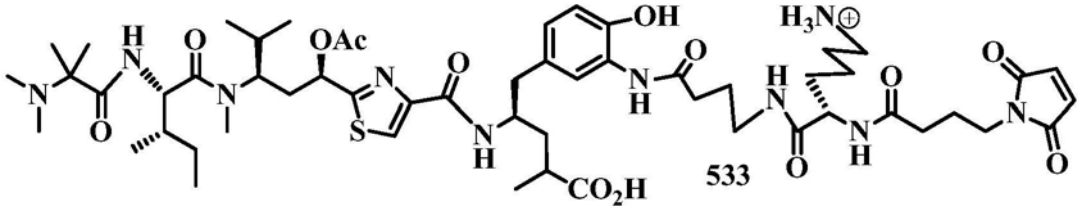
[0976] 将化合物528(3mg,0.002mmol)溶于0.5mL二氯甲烷中,加入1mL三氟乙酸。加完后后室温反应1小时,浓缩并用制备HPLC纯化(流动相:乙腈/水),得到产物529(1.43mg,52%产率)。MS ESI m/z $C_{58}H_{91}N_{10}O_{15}S[M+H]^+$:计算值1199.63,实测值1199.62。

[0977] 实施例180.化合物532的合成

[0978] 

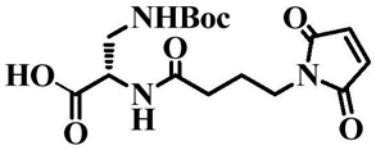
[0979] 将化合物527(0.11g,0.19mmol)的五氟苯酚酯溶于1mL DMF中,加入化合物517(0.21g,0.25mmol)和N,N'-二异丙基乙胺(86μL,0.5mmol)。加完后后室温反应2小时并浓缩,用制备HPLC纯化(流动相:乙腈/水)得到产物532(20mg,9%产率)。MS ESI m/z计算值$C_{60}H_{93}N_{10}O_{15}S[M+H]^+$:1225.65,实测值1225.66。

[0980] 实施例181.化合物533的合成

[0981] 

[0982] 将化合物532(20mg,0.016mmol)溶于1mL二氯甲烷中,加入2mL三氟乙酸,加完后后室温反应1小时。反应液浓缩并用制备HPLC纯化(流动相:乙腈/水)得到化合物533(8.9mg,18%产率)。MS ESI m/z $C_{55}H_{85}N_{10}O_{13}S[M+H]^+$:计算值1125.59,实测值1125.59。

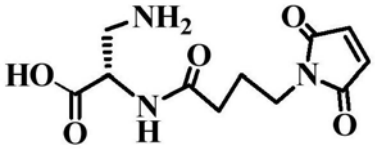
[0983] 实施例182.化合物536的合成

[0984] 

536

[0985] 在室温下，将化合物3-[[叔丁氧羰基]氨基]-L-丙氨酸(1.00g，4.9mmol，1.0eq)溶于30mL乙醇中，加入化合物125(2.00g，7.3mmol，1.5eq)和0.1M磷酸二氢钠(6mL)。加完后室温搅拌过夜，浓缩后用硅胶柱纯化(流动相：甲醇/二氯甲烷)，得到产物536(1.41g，78%产率)。MS ESI m/z $C_{16}H_{24}N_3O_7$[M+H]$^+$：计算值370.15，实测值370.15。

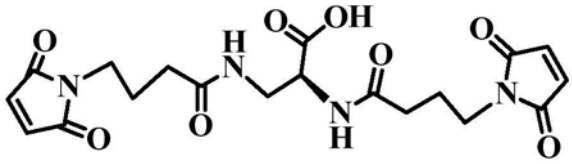
[0986] 实施例183.化合物537的合成

[0987] 

537

[0988] 将化合物536(1.41g，3.8mmol)溶于2mL的二氯甲烷中，加入5mL三氟乙酸后室温反应1小时。反应液浓缩得到产物537，无需进一步纯化即可用于下一步骤。MS ESI m/z $C_{11}H_{16}N_3O_5$[M+H]$^+$：计算值270.10，实测值270.10。

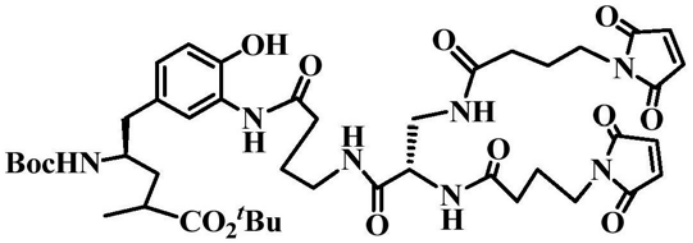
[0989] 实施例184.化合物538的合成

[0990] 

538

[0991] 将化合物537溶于20mL乙醇中，在室温下，加入化合物125(1.90g，6.9mmol)和0.1M磷酸二氢钠(4mL)，加完后室温搅拌过夜。反应液浓缩后用制备HPLC纯化(流动相：乙腈/水)得到产物538(0.45g，22%产率)。MS ESI m/z $C_{19}H_{23}N_4O_8$[M+H]$^+$：计算值435.14，实测值435.14。

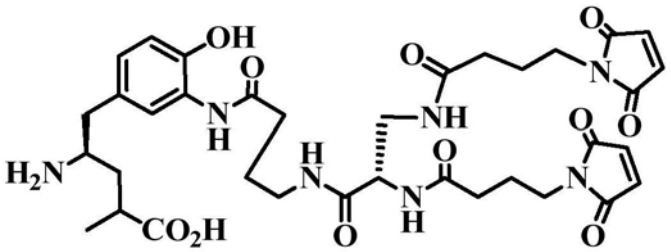
[0992] 实施例185.化合物539的合成

[0993] 

539

[0994] 将化合物538(0.15g，0.34mmol)和化合物438(0.17g，0.34mmol)溶于DMF(2mL)中，向其中加入HATU(0.16g，0.41mmol)和三乙胺(95μL，0.68mmol)，加完后室温反应1小时。反应液浓缩后用制备HPLC纯化(流动相：乙腈/水)得到产物539(34mg，11%产率)。MS ESI m/z $C_{44}H_{62}N_7O_{13}$[M+H]$^+$：计算值896.43，实测值896.42。

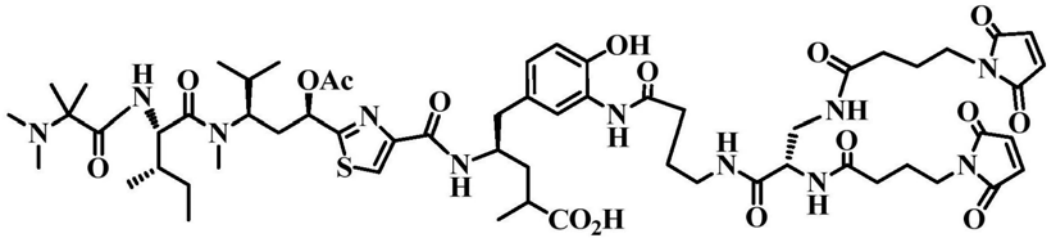
[0995] 实施例186.化合物540的合成

[0996] 

540

[0997] 将化合物539(34mg,0.04mmol)溶于0.5mL二氯甲烷中,加入1mL三氟乙酸后,室温反应2小时。反应液浓缩后得到化合物540。MS ESI m/z $C_{35}H_{46}N_7O_{11}[M+H]^+$:计算值740.30,实测值740.32。

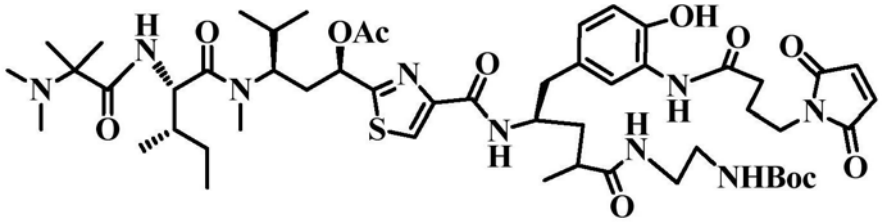
[0998] 实施例187.化合物541的合成

[0999] 

541

[1000] 将化合物540溶于DMA(2mL)中,向其中加入化合物41a(28mg,0.04mmol)和N,N'-二异丙基乙胺(21μL,0.12mmol)。加完后搅拌过夜,浓缩后用制备HPLC纯化得到产物541(14.4mg,29%产率)。MS ESI m/z $C_{60}H_{86}N_{11}O_{16}S[M+H]^+$:计算值1248.59,实测值1248.60。

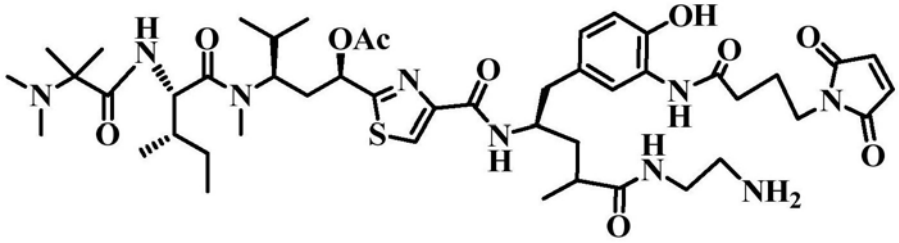
[1001] 实施例188.化合物544的合成

[1002] 

544

[1003] 将化合物132(0.300g,0.329mmol,1.0eq)和N-Boc-乙二胺盐酸盐(0.063g,0.395mmol,1.2eq)溶于二氯甲烷(30mL),在0℃下向其中加入EDCI(0.189g,0.988mmol),10分钟后升至室温,搅拌过夜。反应液用二氯甲烷稀释后,水洗、盐水洗、硫酸钠干燥,浓缩并用硅胶柱纯化,得到黄色泡沫状固体(0.132g,54%产率)。MS ESI m/z $C_{52}H_{80}N_9O_{12}S[M+H]^+$:计算值1054.6,实测值1054.6。

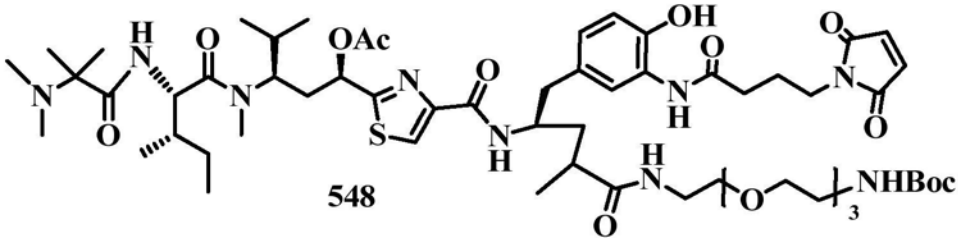
[1004] 实施例189.化合物545的合成

[1005] 

545

[1006] 将化合物544(0.132g,0.125mmol,1.0eq)溶于二氯甲烷(4.5mL),加入1.5mL三氟乙酸,室温反应1小时。反应液浓缩后用制备HPLC纯化得到产物545(111mg,93%产率)。MS ESI m/z $C_{47}H_{72}N_9O_{10}S[M+H]^+$:计算值954.5,实测值954.5。

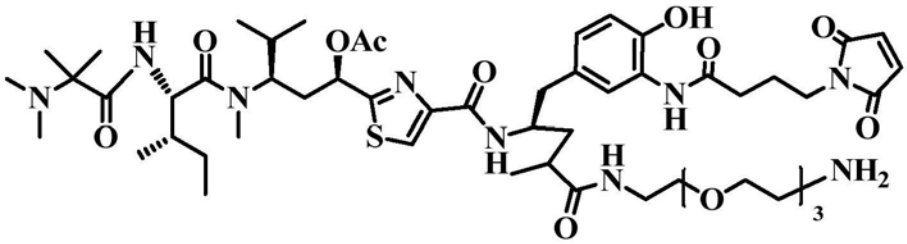
[1007] 实施例190.化合物548的合成

[1008] 

548

[1009] 将化合物132(0.050g,0.0549mmol,1.0eq)和N-Boc-1,11-二氨基-3,6,9-三氧杂十一烷(0.024g,0.0549mmol,1.5eq)溶于二氯甲烷(10mL),在0℃下向其中加入EDCI(0.032g,0.1647mmol,3.0eq),反应10分钟后,升至室温,搅拌过夜。反应液用二氯甲烷稀释后水洗、盐水洗、硫酸钠干燥、过滤浓缩,用硅胶柱纯化得到产物548(0.030g,46%产率)。MS ESI m/z $C_{58}H_{92}N_9O_{15}S[M+H]^+$:计算值1186.6,实测值1186.6。

[1010] 实施例191.化合物549的合成

[1011] 

549

[1012] 将化合物548(0.030g,0.0253mmol,1.0eq)溶于3mL二氯甲烷中,加入1mL三氟乙酸,室温反应1小时。浓缩后得到黄色油状液体,用制备HPLC纯化(C_{18}柱,流动相A:水,流动相B:乙腈,60分钟的时间,从B的10%到B的80%)得到产物549(11.7mg,43%产率)。MS ESI m/z $C_{53}H_{84}N_9O_{13}S[M+H]^+$:计算值1086.6,实测值1086.6。

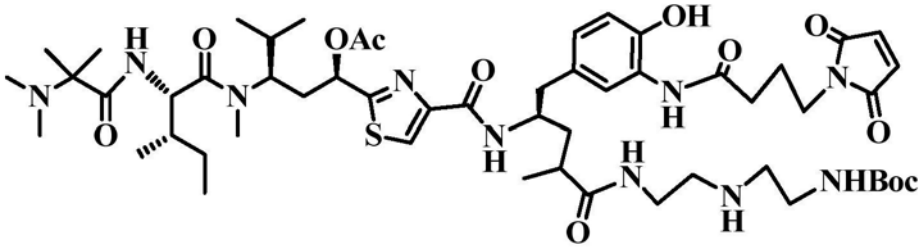
[1013] 实施例192.化合物552的合成

[1014] 

552

[1015] 将化合物二乙基三胺(28.7g,275mmol,10.0eq)和DMAP(0.034g,0.000275mmol,0.01eq.)溶于二氯甲烷(350mL),在0℃下加入Boc_2O(6.0g,0.0275mmol,1.0eq)。加完后室温搅拌过夜,浓缩反应液,并用硅胶柱纯化得到黄色油状物(45g,80%产率)。MS ESI m/z $C_9H_{22}N_3O_2[M+H]^+$:计算值204.2,实测值204.2。

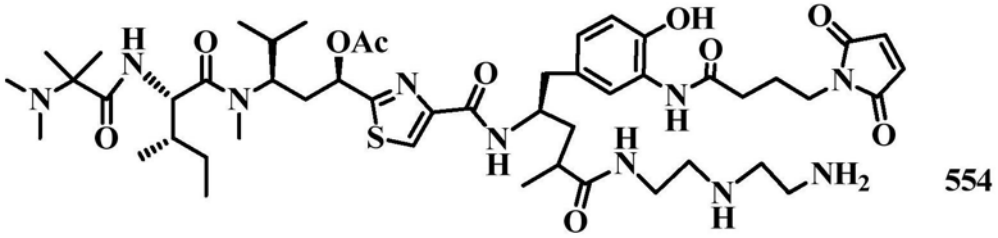
[1016] 实施例193.化合物553的合成

[1017] 

553

[1018] 将化合物132(0.060g,0.0658mmol,1.0eq)和N-Boc-2,2'-亚氨基二乙胺(0.016g,0.0790mmol,1.2eq)溶于二氯甲烷(6mL),在0℃下加入EDCI(0.038g,0.1974mmol,3.0eq),加完后升至室温,搅拌过夜。反应液浓缩后用制备HPLC(C_{18}柱,流动相A:水,流动相B:乙腈,60分钟的时间,从B的10%到B的80%)纯化得到产物553(48mg,66%产率)。MS ESI m/z $C_{54}H_{85}N_{10}O_{12}S[M+H]^+$:计算值1097.6,实测值1097.6。

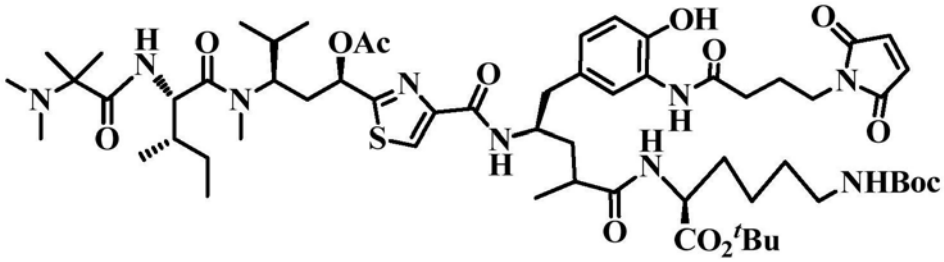
[1019] 实施例194.化合物554的合成

[1020] 

554

[1021] 将化合物553(0.048g,0.0437mmol,1.0eq)溶于3mL二氯甲烷中,加入1mL三氟乙酸后,室温反应1小时。反应液浓缩后用制备HPLC纯化(C_{18}柱,流动相A:水,流动相B:乙腈,60分钟后从B的10%升到B的80%)得到产物554(111mg,93%产率)。MS ESI m/z $C_{49}H_{77}N_{10}O_{10}S[M+H]^+$:计算值997.5,实测值997.5。

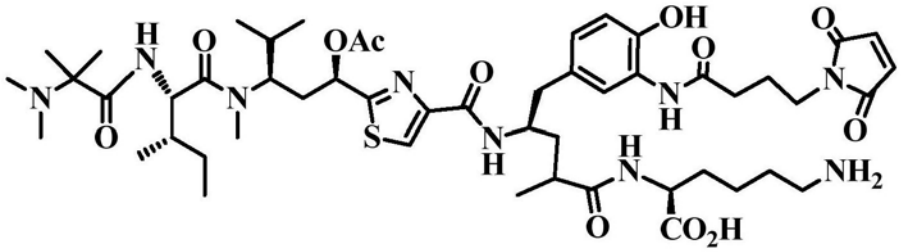
[1022] 实施例195.化合物558的合成

[1023] 

558

[1024] 将化合物132(0.400g,0.439mmol,1.0eq)和H-Lys(Boc)-O^{t}Bu·HCl(0.135g,0.528mmol,1.2eq)溶于二氯甲烷(40mL)中,在0℃下加入EDCI(0.189g,1.317mmol,3.0eq),加完后升至室温,搅拌过夜。反应液用二氯甲烷稀释后,水洗、盐水洗、硫酸钠干燥、过滤,浓缩并用硅胶柱纯化得到产物558(0.43g,82%产率)。MS ESI m/z $C_{60}H_{94}N_9O_{14}S[M+H]^+$:计算值1196.7,实测值1196.7。

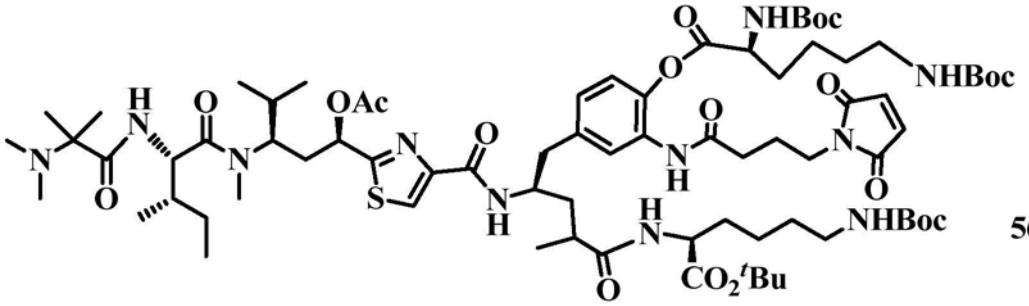
[1025] 实施例196.化合物559的合成

[1026] 

559

[1027] 将化合物558(0.230g,0.192mmol,1.0eq)溶于二氯甲烷(6mL)中,加入三氟乙酸(2mL),室温反应3小时,浓缩后用制备HPLC纯化(C_{18}柱,流动相A:水,流动相B:乙腈;60分钟从10%的B到80%的B)得到产物559(153mg,76%产率)。MS ESI m/z $C_{51}H_{78}N_9O_{12}S[M+H]^+$:计算值1040.5,实测值1040.5。

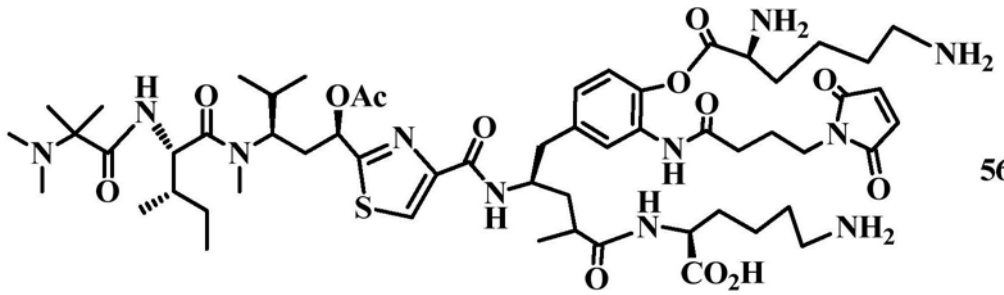
[1028] 实施例197.化合物562的合成

[1029] 

562

[1030] 将化合物558(0.200g,0.167mmol,1.0eq)和Boc-L-Lys(Boc)-OH(0.070g,0.200mmol,1.2eq)溶于二氯甲烷(10mL),在0℃下加入HATU(0.095g,0.250mmol,1.5eq)和三乙胺(46μL,0.334mmol,2.0eq)。反应液升至室温,搅拌过夜,二氯甲烷稀释后水洗、盐水洗、硫酸钠干燥、过滤、浓缩并用硅胶柱纯化,得到产物562(0.270g,约100%收率)。MS ESI m/z $C_{76}H_{122}N_{11}O_{19}S[M+H]^+$:计算值1524.9,实测值1524.9。

[1031] 实施例198.化合物563的合成

[1032] 

563

[1033] 将化合物562(0.27g,0.177mmol,1.0eq)溶于二氯甲烷(6mL),加入三氟乙酸(2mL),室温反应4小时。反应液浓缩后用制备HPLC纯化(C_{18}柱,流动相A:水,流动相B:乙腈;60分钟从10%的B到80%的B)得到产物563(172mg,83%产率)。MS ESI m/z $C_{57}H_{90}N_{11}O_{13}S[M+H]^+$:计算值1168.6,实测值1168.6。

[1034] 实施例199.化合物566的合成

[1035] 

566

[1036] 将乙二胺(3.0g,0.5mmol,10.0eq)溶于二氯甲烷(500mL)中,降温至0℃,然后加入CbzCl(8.53g,0.050mol,1.0eq),加完后升至室温,搅拌过夜。反应液水洗、盐水洗、硫酸钠干燥、过滤并浓缩得到N-苄氧羰基-1,2-二氨基乙烷(7.0g,94%产率).MS ESI m/z $C_{10}H_{14}N_2O_2[M+H]^+$:计算值195.1,实测值195.2。

[1037] 实施例200.化合物567的合成

[1038] 

567

[1039] 将化合物566(7g,35.8 mmol,1.0eq)和37%甲醛(14mL,0.1772mmol,5.0eq)溶于甲醇(120mL)中,在0℃下加入氰基硼氢化钠(3.9g,0.062mol,1.6eq),用乙酸(3mL)调pH至7,加完后升至室温,搅拌过夜。反应液用二氯甲烷(200mL)稀释,水洗、盐水洗、硫酸钠干燥、过滤、浓缩并用硅胶柱纯化得到产物黄色油状物(6.4g,80%产率)。MS ESI m/z $C_{12}H_{18}N_2O_2[M+H]^+$:计算值224.1,实测值224.1。

[1040] 实施例201.化合物568的合成

[1041] 

568

[1042] 将化合物567(3.0g,13.4mmol,1.0eq)溶于甲醇(100mL)中,然后加入Pd/C(0.3g,10wt%,50%wet)和HCl(3mL),加完后在100psi压力的氢气下反应5小时。反应液垫硅藻土过滤、浓缩得到产物568(2.1g,98%产率)。^{1}H NMR(400MHz,D_2O)δ3.33(d,J=4.6Hz,2H),3.27(s,2H),2.79(s,6H)。

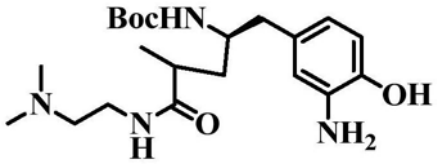
[1043] 实施例202.化合物569的合成

[1044] 

569

[1045] 将化合物103(0.58g,1.58mmol,1.0eq)和化合物568(0.051g,3.15mmol,2.0eq)溶于无水DMF(10mL)中,在0℃下加入HATU(0.09g,2.37mmol,1.5eq)和三乙胺(0.656mL,4.74mmol,3.0eq)。加完后升至室温,反应90分钟。反应用水稀释,并用乙酸乙酯萃取(3×100mL),合并有机相,水洗、盐水洗、硫酸钠干燥、过滤并浓缩得到黄色固体(0.67g,97%产率)。MS ESI m/z $C_{21}H_{35}N_4O_6$[M+H]$^+$:计算值439.2,实测值439.2。

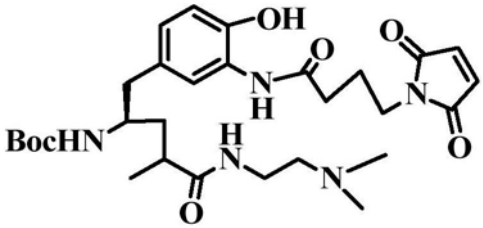
[1046] 实施例203.化合物570的合成

[1047] 

570

[1048] 将Pd/C(0.2g,10wt%)加入到化合物569(0.6g,13.7mmol,1.0eq)的乙酸乙酯(10mL)溶液中,在100psi的氢气压力下反应4小时。反应液垫硅藻土过滤、浓缩得到绿色油状物(5.5g,98%产率)。MS ESI m/z $C_{21}H_{37}N_4O_{64}$[M+H]$^+$:计算值409.3,实测值409.3。

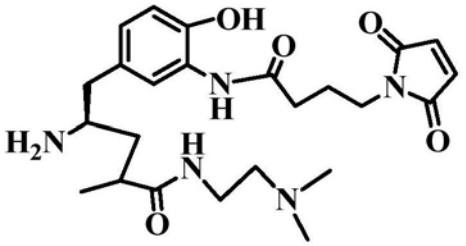
[1049] 实施例204.化合物571的合成

[1050] 

571

[1051] 将化合物570(0.5g,1.22mmol,1.0eq)溶于95%乙醇(10mL)中,加入0.1M NaH_2PO_4(2mL)和化合物125(0.683g,2.44mmol,2.0eq),加完后搅拌过夜。反应液浓缩并用硅胶柱纯化(流动相:甲醇/二氯甲烷)得到产物黄色油状物(0.624g,89%产率)。MS ESI m/z计算值$C_{29}H_{44}N_5O_7$[M+H]$^+$:574.3,实测值574.3。

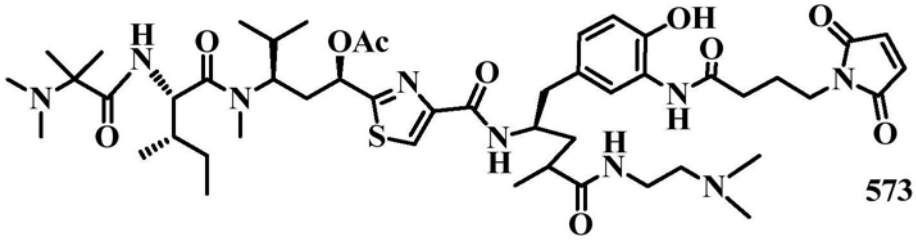
[1052] 实施例205.化合物572的合成

[1053] 

572

[1054] 将化合物571(0.2g,0.349mmol,1.0eq)溶于6mL二氯甲烷中,加入2mL的三氟乙酸后,室温反应2小时。然后用无水甲苯稀释并浓缩,重复该操作三次,得到黄色油状的目标化合物(165mg,-100%产率)。MS ESI m/z $C_{24}H_{36}N_5O_5$[M+H]$^+$:计算值474.3,实测值474.3。

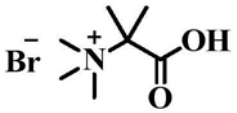
[1055] 实施例206.化合物573的合成

[1056] 

573

[1057] 将化合物572(0.165g,0.349mmol,1.0eq)溶于2mL DMF中,在0℃下加入化合物41a(0.29g,1.047mmol,1.2eq)的DMF(3mL)溶液,加完后搅拌10分钟,升至室温,反应1小时。反应液浓缩并用制备HPLC纯化(C_{18}柱,流动相A:水,流动相B:乙腈;60分钟从10%的B到80%的B)得到产物(58mg,17%产率)。MS ESI m/z $C_{49}H_{76}N_9O_{10}S$[M+H]$^+$:计算值982.5,实测值982.5。

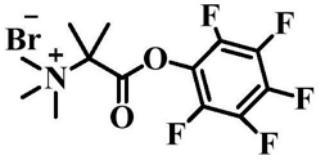
[1058] 实施例207.化合物576的合成

[1059] 

576

[1060] 将2-溴代异丁酸(3g,17.9mmol)溶于四氢呋喃中(30mL),向其中加入三甲胺(1M的THF溶液,17.9mL,35.9mmol)。加完后搅拌过夜,加入乙酸乙酯,过滤收集固体,得到产物576(4g,约100%)。MS ESI m/z $C_7H_{16}NO_2$[M+H]$^+$:计算值146,实测值146。

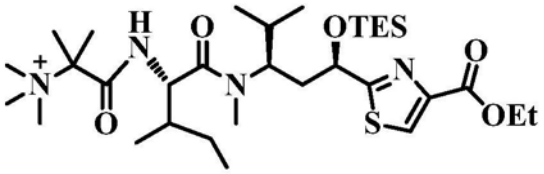
[1061] 实施例208.化合物577的合成

[1062] 

577

[1063] 将化合物576(1.55g,6.9mmol)和五氟苯酚(2.5g,13.8mmol)溶于二氯甲烷(20mL)中,加入DCC(2.8g,13.8mmol),加完后搅拌过夜。反应液过滤并浓缩得到油状产物577。MS ESI m/z $C_{13}H_{15}F_5NO_2$[M+H]$^+$:计算值312,实测值312。

[1064] 实施例209.化合物578的合成

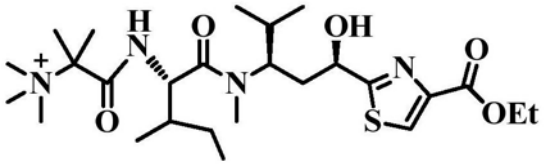
[1065] 

578

[1066] 将化合物17(1.78g,3.4mmol)和化合物577(6.9mmol)溶于DMF(20mL),在0℃下加

入N,N'-二异丙基乙胺(1.8mL,10.4mmol),加完后升温至室温反应1小时。反应液浓缩并用硅胶柱纯化(1:100至1:5甲醇/二氯甲烷),得到产物578(1.2g,54%产率)。MS ESI m/z $C_{32}H_{61}N_4O_5SSi$[M+H]$^+$:计算值642,实测值642。

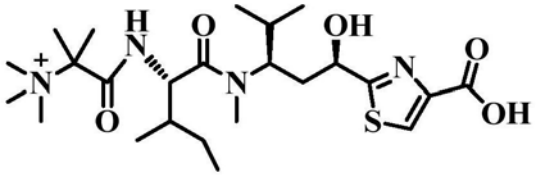
[1067] 实施例210.化合物579的合成

[1068] 

579

[1069] 将化合物578(1.20g,1.86mmol)溶于AcOH/THF/H_2O(体积比3:1:1,20mL)中,室温搅拌过夜。反应液浓缩得到泡沫状固体,不经进一步纯化即可用于下一步。MS ESI m/z $C_{26}H_{47}N_4O_5S$[M+H]$^+$:计算值527,实测值527。

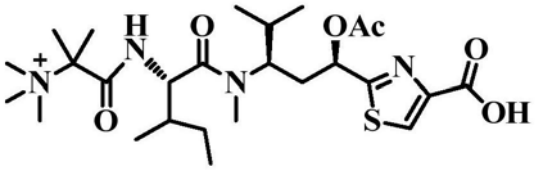
[1070] 实施例211.化合物580的合成

[1071] 

580

[1072] 将化合物579(1.86mmol)溶于1,4-二恶烷(10mL),向其中加入1N氢氧化钠(9.3mL),室温反应2小时。反应液浓缩后用1N盐酸调pH至4,再次浓缩得到白色固体产物580。MS ESI m/z $C_{24}H_{43}N_4O_5S$[M+H]$^+$:计算值499,实测值499。

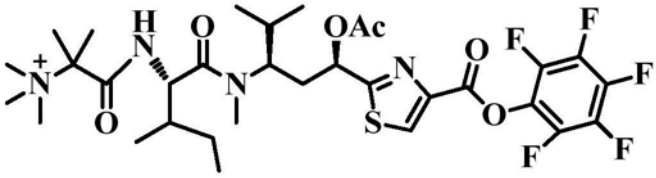
[1073] 实施例212.化合物581的合成

[1074] 

581

[1075] 将化合物580(1.86mmol)溶于吡啶(10mL)中,在0℃下加入乙酸酐(884μL,9.36mmol),反应升温至室温,搅拌过夜。反应液用水(20mL)稀释后,用乙酸乙酯洗涤(3×10mL),水相浓缩得到黄色固体产物581。MS ESI m/z $C_{26}H_{45}N_4O_6S$[M+H]$^+$:计算值541,实测值541。

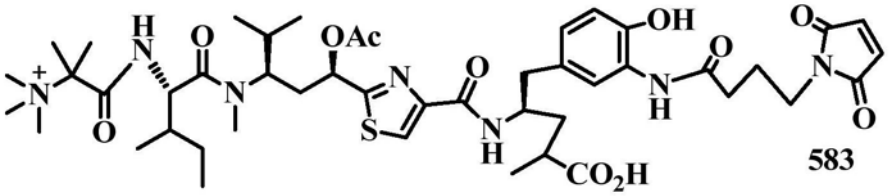
[1076] 实施例213.化合物582的合成

[1077] 

582

[1078] 将化合物581(150mg,0.277mmol)和五氟苯酚(76.5mg,0.415mmol)溶于二氯甲烷(2mL)中,加入EDCI(63.7mg,0.33mmol)后,室温反应3小时。反应液浓缩得到黄色油状物582。MS ESI m/z $C_{32}H_{44}F_5N_4O_6S$[M+H]$^+$:计算值707,实测值707。

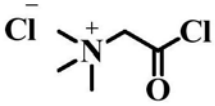
[1079] 实施例214.化合物583的合成

[1080] 

583

[1081] 将化合物127(50mg,0.07mmol)和化合物582(0.14mmol)溶于DMF(2mL)中,在0℃下加入N,N'-二异丙基乙胺(49μL,0.28mmol),加完后室温反应1小时。反应液浓缩并用制备HPLC纯化(10-90%MeCN/H_2O),得到白色固体产物583(30mg,46%产率)。MS ESI m/z $C_{46}H_{68}N_7O_{11}S[M+H]^+$:计算值926,实测值926。

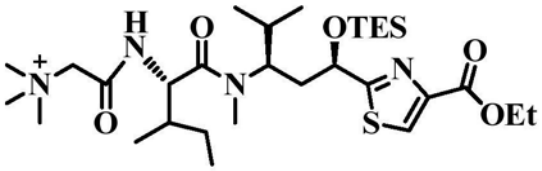
[1082] 实施例215.化合物586的合成

[1083] 

586

[1084] 将甜菜碱(870mg,7.4mmol)的氯化亚砜(10mL)悬浊液加热到70℃反应2小时。反应液浓缩并用甲苯(3×10mL)共沸,得到黄色固体586,不经进一步纯化即可用于下一步骤。

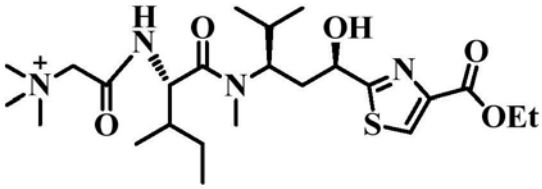
[1085] 实施例216.化合物587的合成

[1086] 

587

[1087] 将化合物17(1.90g,3.71mmol)溶于二氯甲烷(20mL)中,加入N,N'-二异丙基乙胺(2.58mL,14.8mmol),降温至0℃,滴加化合物586的二氯甲烷(20mL)溶液,加完后升至室温反应1小时。反应液浓缩并用硅胶柱纯化(1:100至1:5甲醇/二氯甲烷),得到产物587(2.3g,约100%收率)。MS ESI m/z $C_{30}H_{57}N_4O_5SSi[M+H]^+$:计算值613,实测值613。

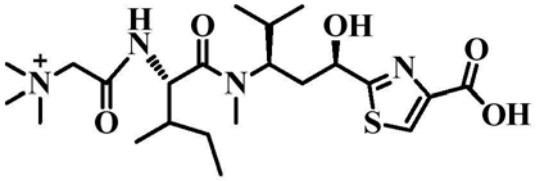
[1088] 实施例217.化合物588的合成

[1089] 

588

[1090] 将化合物587(2.3g,3.7mmol)溶于AcOH/THF/H2O(体积比3:1:1,40mL)中,搅拌过夜。反应液浓缩后,得到化合物588,无需任何纯化即可用于下一步骤。MS ESI m/z $C_{24}H_{43}N_4O_5S[M+H]^+$:计算值499,实测值499。

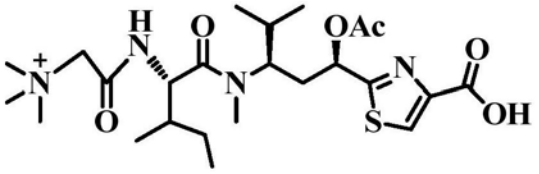
[1091] 实施例218.化合物589的合成

[1092] 

589

[1093] 将化合物588(3.7mmol)溶于1,4-二恶烷(20mL)中,向其中加入1N氢氧化钠(18.5mL),室温反应2小时。反应液浓缩后,加入1N盐酸调pH至4,再次浓缩得白色固体产物589(1.00g,57%产率)。MS ESI m/z $C_{22}H_{39}N_4O_5S[M+H]^+$:计算值471,实测值471。

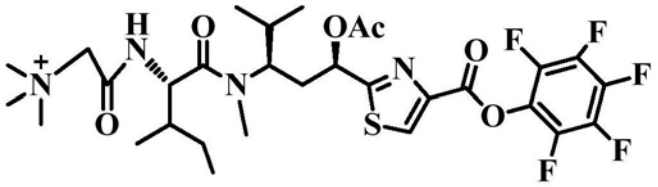
[1094] 实施例219.化合物590的合成

[1095] 

590

[1096] 在0℃下,向化合物589(1.00g,2.12mmol)的吡啶(10mL)溶液中,加入乙酸酐(1mL,10.6mmol)。将反应混合物升温至室温并搅拌过夜,真空浓缩,然后用水(20mL)稀释,并用EA(3×10mL)洗涤。将水相真空浓缩,得到化合物590,为黄色固体。ESI m/z $C_{24}H_{41}N_4O_6S[M+H]^+$:计算值513,实测值513。

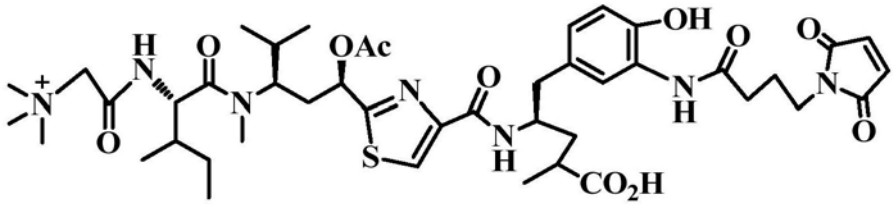
[1097] 实施例220.化合物591的合成

[1098] 

591

[1099] 向化合物590(70mg,0.136mmol)和五氟苯酚(30mg,0.163mmol)的二氯甲烷(2mL)溶液中,加入DCC(33.7mg,0.163mmol)。将反应混合物搅拌3小时,减压浓缩,得到化合物591,为黄色油状物。ESI m/z C30H40F5N4O6S[M+H]+:计算值679,实测值679。

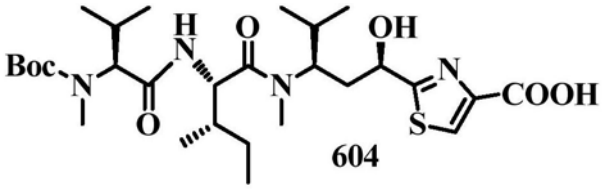
[1100] 实施例221.化合物592的合成

[1101] 

592

[1102] 在0℃下,向化合物591(0.136mmol)和化合物127(0.11g,0.273mmol)的DMF(2mL)溶液中,加入N,N'-二异丙基乙胺(71μL,0.408mmol)。将反应混合物升温至室温。搅拌1小时后真空浓缩,用制备型HPLC纯化,得到化合物592(30.9mg,25%产率),为黄色固体。ESI m/z $C_{44}H_{64}N_7O_{11}S[M+H]^+$:计算值899,实测值899。

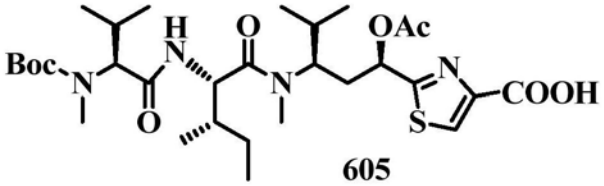
[1103] 实施例222.化合物604的合成

[1104] 

604

[1105] 将(S)-2-((叔丁氧基羰基)(甲基)氨基)-3-甲基丁酸(33mg,0.14mmol),DCC(32mg,0.154mmol)和五氟苯酚(39mg,0.21mmol)溶解于乙酸乙酯(20mL),在室温下搅拌过夜。然后将反应混合物浓缩至干得到化合物602,溶于2mL DMA中,并加入化合物603(52mg,0.14mmol)的DMA溶液(3mL)和N,N'-二异丙基乙胺(48.5μL,0.28mmol)。将反应在室温下搅拌过夜,然后浓缩。残留物用1mL乙腈稀释,并通过反相HPLC(MeCN/H_2O梯度)纯化,得到化合物604(40.2mg,49%产率。ESI m/z $C_{28}H_{49}N_4O_7S[M+H]^+$:计算值585.32,实测值585.32。

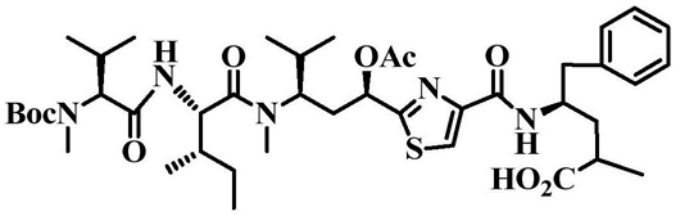
[1106] 实施例223.化合物605的合成

[1107] 

605

[1108] 在0℃下，向化合物604(40mg，0.069mmol)的吡啶(8mL)溶液中，加入乙酸酐(20.4mg，0.2mmol)，将反应混合物升温至室温并搅拌过夜，然后浓缩。通过柱层析法(甲醇/二氯甲烷)纯化残留物，得到目标化合物605(48.1mg，约100％产率)。ESI m/z $C_{30}H_{51}N_4O_8S[M+H]^+$：计算值627.33，实测值627.33。

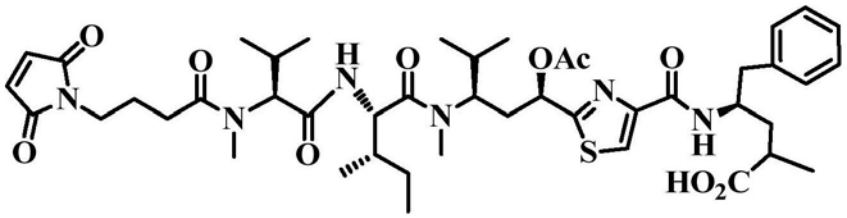
[1109] 实施例224.化合物608的合成

[1110] 

608

[1111] 将化合物605(48.1mg，0.077mmol)、DCC(17.4mg，0.085mmol)和五氟苯酚(21.2mg，0.115mmol)溶解在乙酸乙酯(10mL)中，在室温下搅拌过夜，然后浓缩至干，得到化合物606，将其溶于4mL DMA中，加入化合物607(20.7mg，0.1mmol)的DMA(3mL)溶液和N，N'-二异丙基乙胺(26.8μL，0.154mmol)。将反应在室温下搅拌过夜，然后浓缩。用1mL乙腈稀释残留物，并通过反相HPLC(MeCN/H_2O梯度)纯化，得到化合物608(63mg，～100％理论产量)。ESI m/z $C_{42}H_{66}N_5O_9S[M+H]^+$：计算值816.45，实测值816.45。

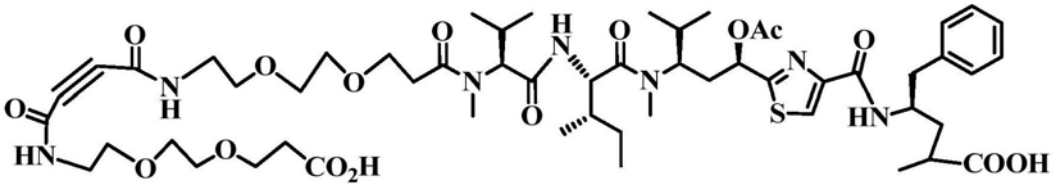
[1112] 实施例225.化合物609的合成

[1113] 

609

[1114] 将化合物608溶解在二氯甲烷(1mL)中，并在室温下与三氟乙酸(1mL)反应2小时。浓缩反应物并将残留物溶解在乙醇(20mL)中。加入化合物125(30.8mg，0.11mmol)和0.1M NaH_2PO_4(4mL)，在室温下搅拌过夜，然后浓缩，通过柱层析法(甲醇/二氯甲烷)纯化残留物，得到目标化合物609(28.5mg，42％产率)。ESI m/z $C_{45}H_{65}N_6O_{10}S[M+H]^+$：计算值881.44，实测值881.44。

[1115] 实施例226.化合物612的合成

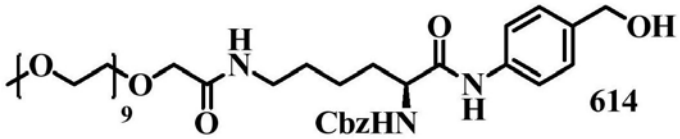
[1116] 

612

[1117] 在室温下，将化合物608(63mg，0.077mmol)的二氯甲烷(1mL)溶液与三氟乙酸(1mL)搅拌2小时，然后浓缩，将残留物溶于DMA(4mL)中。加入化合物611(65.8mg，0.11mmol)和N，N'-二异丙基乙胺(27μL，0.154mmol)，在室温下搅拌过夜，然后浓缩，残留物通过反相

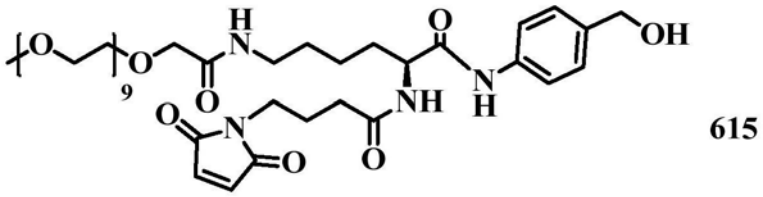
HPLC，用MeCN/H_2O梯度洗脱纯化，得到化合物612(14mg，16%产率)。ESI m/z $C_{55}H_{84}N_7O_{16}S$[M+H]$^+$：计算值1130.56，实测值1130.57。

[1118] 实施例227.化合物614的合成

[1119] 

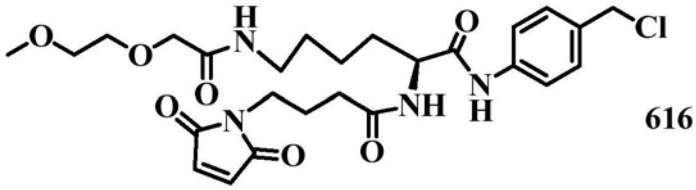
[1120] 向化合物436(3.0g，4.00mmol)的DMF(50mL)溶液中，加入HATU(2.3g，6mmol)和三乙胺(1.7mL，12mmol)。将反应在0℃下搅拌20分钟，升温至室温，并搅拌3小时。然后，加入(4-氨基苯基)甲醇(0.99g，8mmol)的DMF(10mL)溶液，在室温下搅拌反应物1.5小时，然后倒入含有150mL水的分液漏斗中，用50mL乙酸乙酯萃取两次。收集有机相，用无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩。通过柱层析法(甲醇/二氯甲烷)纯化残留物，得到目标化合物614(3.9g，约100%产率)。ESI m/z $C_{42}H_{68}N_3O_{15}$[M+H]$^+$：计算值854.46，实测值854.46。

[1121] 实施例228.化合物615的合成

[1122] 

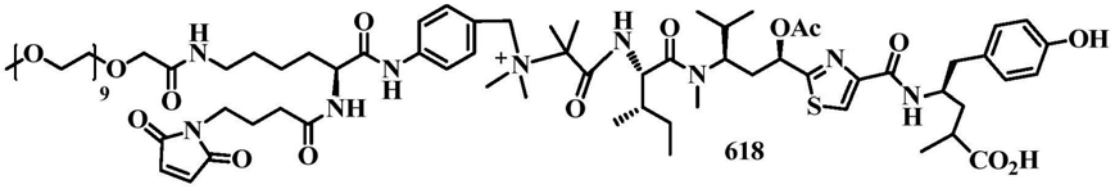
[1123] 在氢化瓶中，向化合物614(1.9g，2.22mmol)的甲醇(20mL)溶液中，加入Pd/C(0.19g，10wt%)。将混合物振荡50分钟，通过硅藻土过滤，浓缩滤液，然后溶解在乙醇(100mL)中。加入化合物125(0.61g，2.20mmol)和0.1M NaH_2PO_4(20mL)，将混合物在室温下搅拌过夜，然后浓缩。残留物用甲醇稀释，并通过反相HPLC(MeCN/H_2O梯度)纯化，得到化合物615(0.30g，19%产率)。ESI m/z $C_{42}H_{69}N_4O_{16}$[M+H]$^+$：计算值885.46，实测值885.44。

[1124] 实施例229.化合物616的合成

[1125] 

[1126] 在0℃下，向化合物615(0.12g，0.14mmol)的DMF(50mL)溶液中，加入氯化亚砜(11μL，0.154mmol)。将反应在0℃下搅拌1小时，然后浓缩至干，得到粗产物616(0.13g，0.14mmol)。ESI m/z $C_{42}H_{68}ClN_4O_{15}$[M+H]$^+$：计算值903.43，实测值903.44。

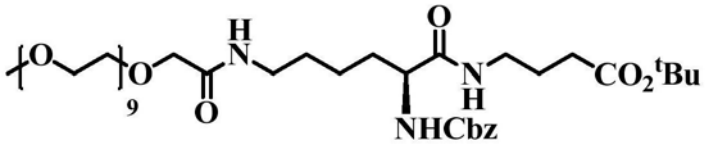
[1127] 实施例230.化合物618的合成

[1128] 

[1129] 向化合物616(0.13g，0.14mmol)和化合物617(0.06g，0.07mmol)的DMF(10mL)溶液中，加入TBAI(16mg，0.042mmol)和N，N'-二异丙基乙胺(64μL，0.35mmol)。在室温下搅拌1小

时后浓缩。残留物通过反相HPLC(MeCN/H_2O)纯化,得到化合物618(10mg,8.9%产率)。ESI m/z $C_{79}H_{125}N_9O_{23}S[M+H]^+$:计算值1599.85,实测值1599.82。

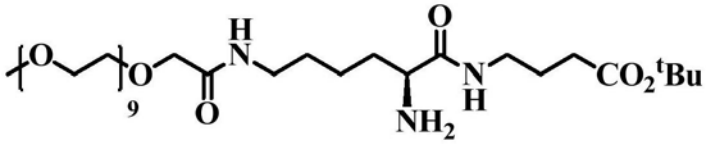
[1130] 实施例231.化合物620的合成

[1131] 

620

[1132] 将4-氨基丁酸叔丁酯(1.03g,6.12mmol)和化合物436(4.16g,5.56mmol)在DMF(18mL)中混合,冷却至0℃,依次加入加入HATU(2.32g,6.12mmol)和三乙胺(1.2mL,8.34mmol)。将反应搅拌50分钟,然后用水(300mL)稀释,并用乙酸乙酯(3×250mL)萃取。将乙酸乙酯溶液用盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩并通过硅胶柱层析法(32:1二氯甲烷/甲醇)纯化,得到化合物620(5.98g)。MS ESI m/z $C_{43}H_{75}N_3O_{16}[M+H]^+$:计算值890.51,实测值891.09。

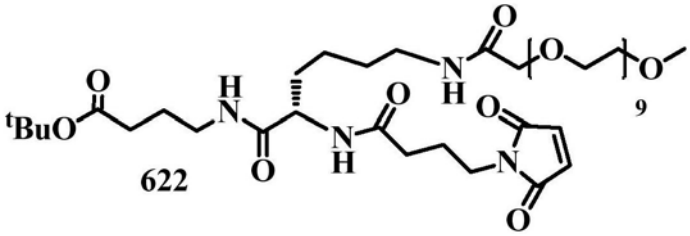
[1133] 实施例232.化合物621的合成

[1134] 

621

[1135] 在氢化瓶中,向化合物620(1.0g,1.13mmol)的甲醇溶液中,加入Pd/C(10wt%,0.10g)。将混合物振荡2小时,通过硅藻土过滤,浓缩滤液,得到化合物621(1.0g,1.32mmol,约100%产率)。ESI m/z $C_{35}H_{70}N_3O_{14}[M+H]^+$:计算值756.48,实测值756.47。

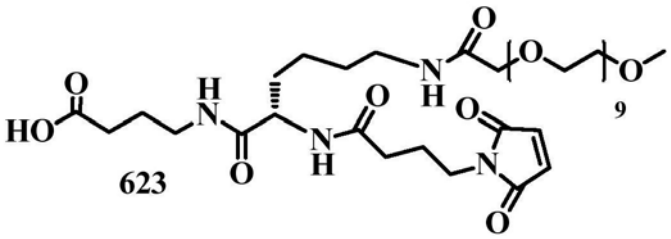
[1136] 实施例233.化合物622的合成

[1137] 

622

[1138] 在室温下,向化合物621(0.93g,1.23mmol,1.0当量)和化合物125(0.95g,1.84mmol,1.5当量)的95%乙酸乙酯中(50mL)溶液中,加入NaH_2PO_4溶液(0.1M,pH 5.0,10mL)。将混合物搅拌过夜,然后浓缩并用水(50mL)稀释,用二氯甲烷(80mL×3)萃取,经无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩并通过硅胶柱色层析法(二氯甲烷:甲醇=25:1)纯化,得到浅黄色油状的目标化合物(0.90g,80%)。ESI m/z $C_{43}H_{77}N_4O_{17}[M+H]^+$:计算值921.5,实测值921.5.

[1139] 实施例234.化合物623的合成

[1140] 

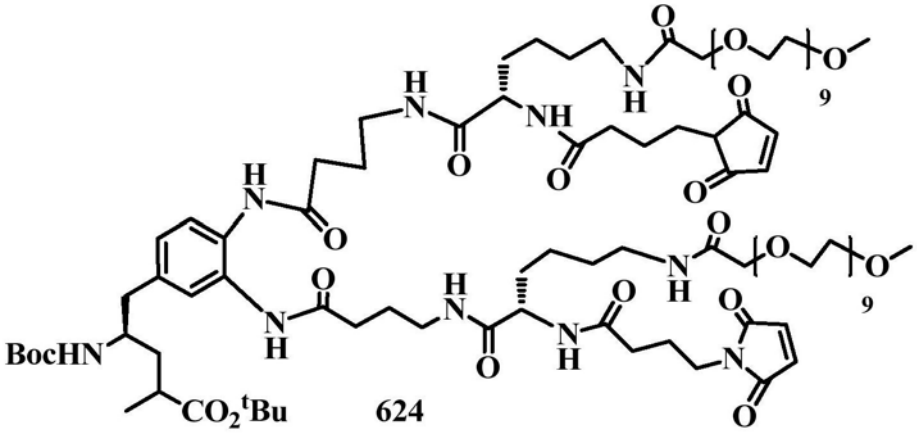
623

[1141] 将化合物622(0.90g,0.98mmol)溶解在甲酸(50mL)中,并在室温下搅拌1小时。减

压浓缩反应混合物，并与甲苯一起浓缩两次，进一步将残留物置于真空泵上浓缩，得到化合物623(0.85g，0.98mmol，粗产物)。ESI m/z $C_{39}H_{69}N_4O_{17}[M+H]^+$：计算值865.46，实测值865.44。

[1142] 实施例235.化合物624的合成

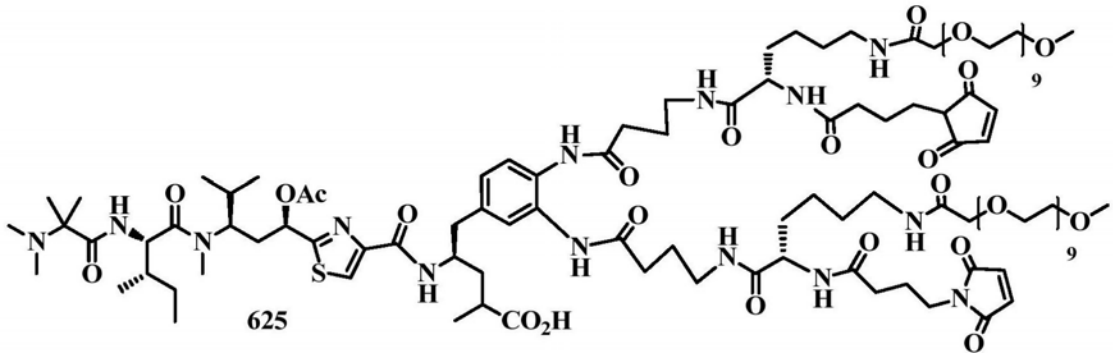
[1143]



[1144] 在0℃，向化合物392(92.9mg，0.236mmol)和化合物623(510mg，0.59mmol)的DMF(3mL)溶液中，加入HATU(179mg，0.472mmol)和三乙胺(82μL，0.59mmol)。将混合物升温至室温并搅拌1小时，然后用二氯甲烷(50mL)稀释，用1N盐酸(5mL)、水(5mL)洗，经硫酸钠干燥，过滤并减压浓缩，通过硅胶柱层析法纯化，得到目标产物(295mg，60％产率)。ESI m/z计算值$C_{99}H_{168}N_{11}O_{36}[M+H]^+$：2087.16，实测值2087.14。

[1145] 实施例236.化合物625的合成

[1146]



[1147] 向化合物624(100mg，0.047mmol)的二氯甲烷(3ml)溶液中加入三氟乙酸(3ml)，在室温下搅拌2小时，然后浓缩。将残留物溶解于DMF(3ml)，加入化合物41a(49.7mg，0.071mmo)的DMF(3ml)溶液和N，N'-二异丙基乙胺(12μL，0.071mmol)。在室温下将反应混合物搅拌1小时，然后减压浓缩并通过制备HPLC纯化，得到目标化合物(57mg，50％产率)。ESI m/z $C_{115}H_{192}N_{11}O_{39}S[M+H]^+$：计算值2439.31，实测值2439.30。

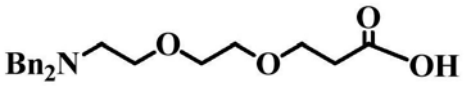
[1148] 实施例237.化合物627的合成

[1149]

[1150] 向十二烷二酸(1.73g，8mmol)的DMF(30mL)溶液中，加入K_2CO_3(1.1g，8mmol)和苄溴(1.36g，8mmol)。将混合物在室温下搅拌过夜，然后浓缩并通过柱层析法(石油醚/乙酸乙酯)纯化，得到目标化合物627(1.1g，45％产率)。ESI m/z $C_{18}H_{27}O_4[M+H]^+$：计算值307.18，实

测值307.15。

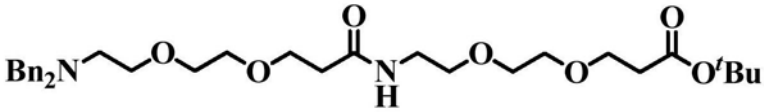
[1151] 实施例238.化合物628的合成

[1152] 

628

[1153] 将化合物300(2.00g,4.84mmol)的二氯甲烷(5mL)溶液,与甲酸(5mL)在室温下搅拌过夜,然后减压浓缩至干,再与二氯甲烷共浓缩两次,残留物置于真空泵上进一步浓缩,得到化合物628(1.72g,约100%产率)。ESI m/z $C_{21}H_{27}NO_4$[M+H]$^+$:计算值358.19,实测值358.19。

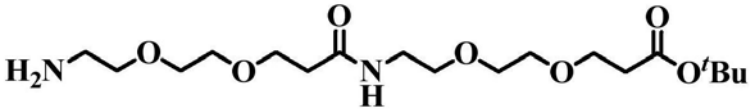
[1154] 实施例239.化合物629的合成

[1155] 

629

[1156] 在0℃下,向化合物301(1.12g,4.83mmol)和化合物628(1.72g,4.83mmol)的二氯甲烷(30mL)溶液中,加入HATU(1.83g,4.83mmol)和三乙胺(0.68mL,4.83mmol)。将反应升温至室温并搅拌1小时,然后用50mL二氯甲烷稀释,倒入含有50mL水的分液漏斗中。分离有机相,用盐水(50mL)洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤并浓缩。通过柱层析法(甲醇/二氯甲烷)纯化残留物,得到目标化合物629(2.21g,80%产率)。ESI m/z $C_{32}H_{48}N_2O_7$[M+H]$^+$:计算值573.35,实测值573.35。

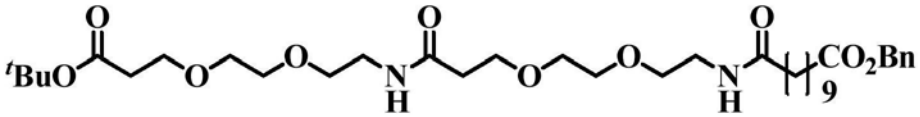
[1157] 实施例240.化合物630的合成

[1158] 

630

[1159] 在氢化瓶中,向化合物629(2.21g,3.86mmol)的甲醇溶液中(20ml)中加入Pd/C(10wt%,0.2g)。将混合物在1atm氢气下搅拌过夜,通过硅藻土过滤,浓缩滤液,得到化合物630(1.5g,约100%产率)。ESI m/z $C_{18}H_{36}N_2O_7$[M+H]$^+$:计算值393.25,实测值393.25。

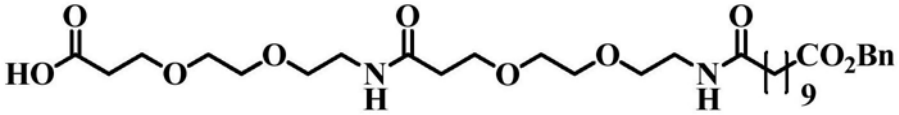
[1160] 实施例241.化合物631的合成

[1161] 

631

[1162] 在0℃下,向化合物630(1.50g,3.86mmol)和化合物627(1.10g,3.6mmol)的二氯甲烷(50mL)溶液中,加入HATU(1.48g,3.9mmol)和三乙胺(0.55mL,3.9mmol)。在室温下搅拌反应混合物1小时,然后用50mL二氯甲烷稀释并倒入含有50mL水的分液漏斗中。分离有机相,用盐水(50mL)洗涤,用无水硫酸钠,干燥,过滤。残留物通过柱层析法(甲醇/二氯甲烷)纯化,得到目标化合物631(1.50g,61%产率)。ESI m/z $C_{36}H_{61}N_2O_{10}$[M+H]$^+$:计算值681.42,实测值681.42。

[1163] 实施例242.化合物632的合成

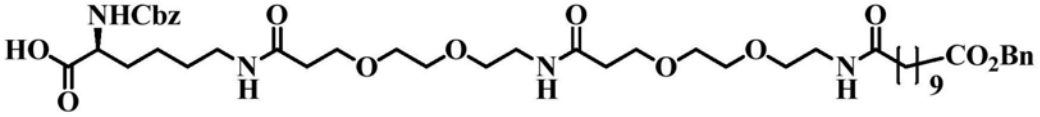
[1164] 

632

[1165] 向化合物631(1.50g,2.2mmol)的二氯甲烷(1mL)溶液中加入三氟乙酸(3mL),搅拌

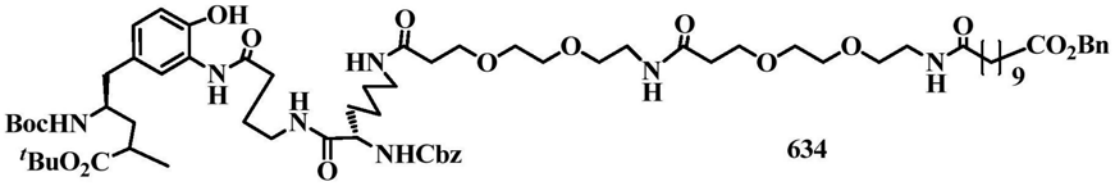
1小时，然后浓缩至干，再与二氯甲烷共浓缩两次，将残留物在真空泵上进一步浓缩，得到化合物632(0.09g，2.2mmol，粗产物)。ESI m/z $C_{32}H_{53}N_2O_{10}[M+H]^+$：计算值625.36，实测值625.35。

[1166] 实施例243.化合物633的合成

[1167] 

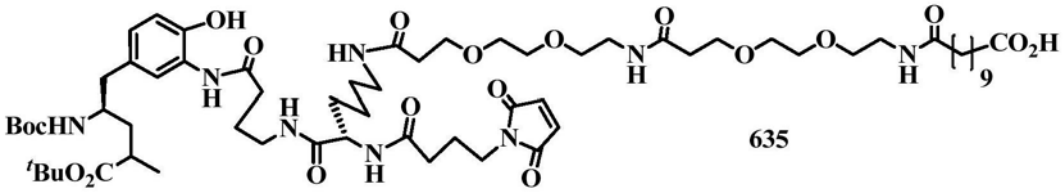
[1168] 在0℃下，向化合物632(1.50g，2.20mmol)和Z-Lys-OH(0.62g，2.20mmol)的二氯甲烷(50mL)溶液中，加入HATU(0.84g，2.20mmol)和三乙胺(0.31mL，2.20mmol)。将反应混合物在室温下搅拌1小时，然后用50mL二氯甲烷稀释，倒入含有100mL水的分液漏斗中。分离有机相，用盐水(100mL)洗涤，用无水硫酸钠，干燥，过滤并浓缩。通过柱层析法(甲醇/二氯甲烷)纯化残留物，得到目标化合物633(1.00g，53%产率)。ESI m/z $C_{46}H_{71}N_4O_{13}[M+H]^+$：计算值887.49，实测值887.50。

[1169] 实施例244.化合物634的合成

[1170] 

[1171] 向化合物633(0.50g，0.56mmol)的DMF(5mL)溶液中，加入HATU(0.21g，0.56mmol)，室温下搅拌30分钟。之后，在0℃下依次加入化合物438(0.27g，0.56mmol)的DMF(5mL)溶液和三乙胺(85μL，0.6mmol)，并将反应搅拌1小时。将反应混合物倒入含有100mL水的分液漏斗中，并用50mL乙酸乙酯萃取两次。将有机相用100mL盐水洗涤一次，经无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩。残留物通过柱层析法(甲醇/二氯甲烷)纯化，得到目标化合物634(0.40g，55%产率)。ESI m/z $C_{71}H_{110}N_7O_{18}[M+H]^+$：计算值1348.78，实测值1348.78。

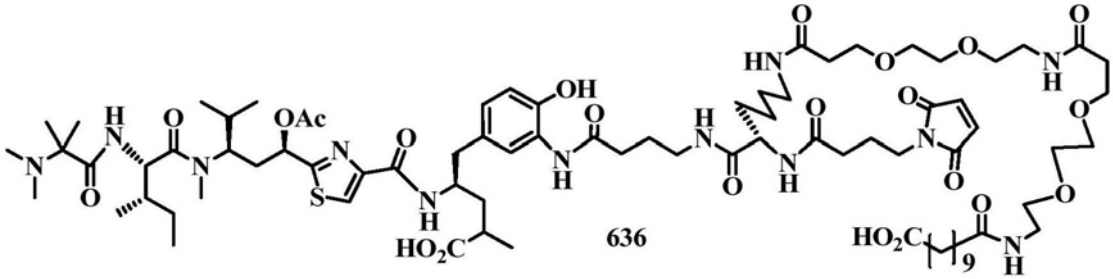
[1172] 实施例245.化合物635的合成

[1173] 

[1174] 在氢化瓶中，向化合物634(0.40g，0.30mmol)甲醇(20mL)溶液中，加入Pd/C(10wt%，0.2g)。将混合物在1atm氢气下搅拌过夜，通过硅藻土过滤，浓缩滤液并重新溶解在甲醇(20mL)中。向其中加入化合物125(88.5mg，0.30mmol)和0.1M NaH_2PO_4(4mL)。将混合物在室温下搅拌过夜，然后浓缩，残留物通过柱层析法(甲醇/二氯甲烷)纯化，得到目标化合物635(0.10g，26%产率)。ESI m/z $C_{64}H_{106}N_9O_{19}[M+H]^+$：计算值1304.75，实测值1304.75。

[1175] 实施例246.化合物636的合成

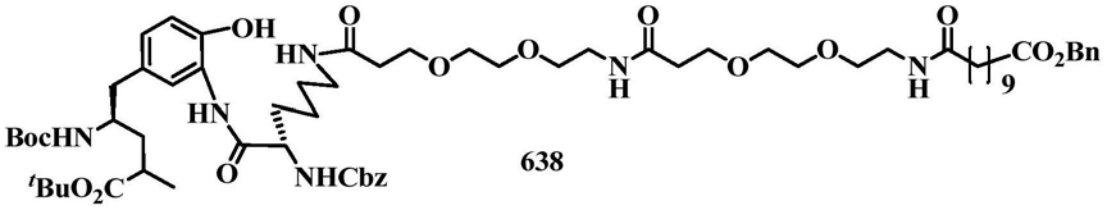
[1176]



[1177] 将化合物635(0.10g,0.077mmol)的二氯甲烷(1mL)溶液与三氟乙酸(3mL)在室温下搅拌30分钟,然后浓缩至干,再与二氯甲烷共浓缩两次,将残留物溶于DMA(4mL)中。向其中加入化合物41a(65.8mg,0.11mmol)和N,N'-二异丙基乙胺(26μL,0.15mmol)。将反应混合物在室温下搅拌1小时,然后浓缩,残留物用2mL乙腈稀释,并通过反相HPLC(MeCN/H_2O梯度)纯化,得到化合物636(20mg,15%产率)。ESI m/z $C_{80}H_{130}N_{13}O_{22}S[M+H]^+$:计算值1656.90,实测值1656.91。

[1178] 实施例247.化合物638的合成

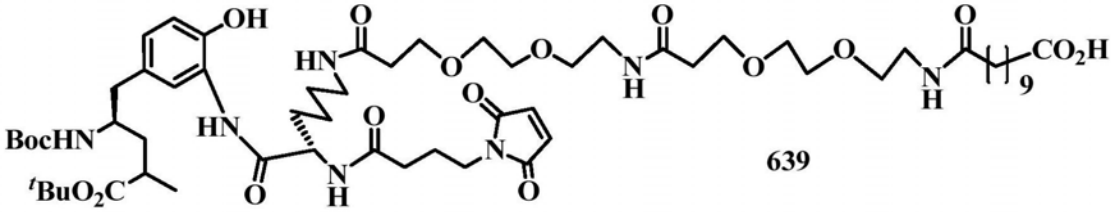
[1179]



[1180] 向化合物633(0.50g,0.56mmol)的DMF(5mL)溶液中,加入HATU(0.21g,0.56mmol),在室温下搅拌30分钟。之后,在0℃下加入化合物110(0.22g,0.56mmol)的DMF(5mL)溶液和三乙胺(85μL,0.60mmol)。搅拌1小时后,将反应混合物倒入含有100mL水的分液漏斗中,并用50mL乙酸乙酯萃取两次。分离有机相,用100mL盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤并浓缩。残留物通过柱层析法(甲醇/二氯甲烷)纯化,得到目标化合物638(0.20g,26%产率)。ESI m/z $C_{67}H_{103}N_6O_{17}[M+H]^+$:计算值1263.73,实测值1263.73。

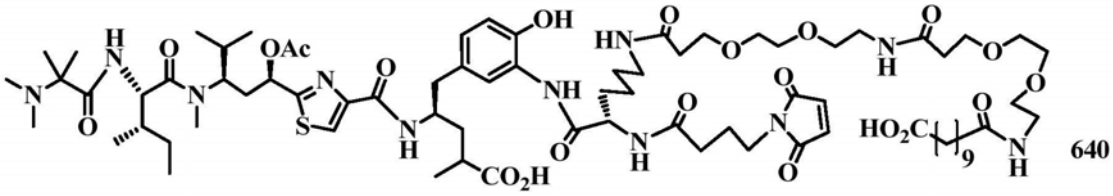
[1181] 实施例248.化合物639的合成

[1182]



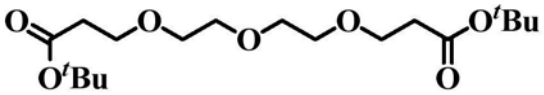
[1183] 在氢化瓶中,向化合物638(0.20g,0.16mmol)的甲醇(20mL)溶液中加入Pd/C(10wt%,0.2g)。将混合物在1atm氢气下搅拌过夜,通过硅藻土过滤,浓缩滤液,然后溶解在乙醇(20mL)中,随后加入化合物125(47.2mg,0.30mmol)和0.1M NaH_2PO_4(4mL)。将混合物在室温下搅拌过夜,然后浓缩,残留物通过柱层析法(甲醇/二氯甲烷)纯化,得到目标化合物639(75mg,40%产率)。ESI m/z $C_{60}H_{98}N_7O_{18}[M+H]^+$:计算值1204.69,实测值1204.68。

[1184] 实施例249.化合物640的合成

[1185] 

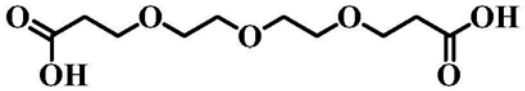
[1186] 向化合物639(75mg,0.06mmol)的二氯甲烷(1mL)溶液中加入三氟乙酸(3mL),在室温下搅拌30分钟,然后浓缩至干,再与二氯甲烷一起浓缩两次,将残留物溶于DMA(2mL)中。向其中加入化合物41a(41mg,0.06mmol)和N,N'-二异丙基乙胺(26μL,0.15mmol),在室温下搅拌1小时,然后浓缩。将残留物用2mL乙腈稀释,并通过反相HPLC(MeCN/H_2O梯度)纯化,得到化合物640(34mg,37%产率)。ESI m/z $C_{76}H_{122}N_{11}O_{21}S[M+H]^+$:计算值1556.85,实测值1556.85。

[1187] 实施例250.化合物642的合成

[1188] 

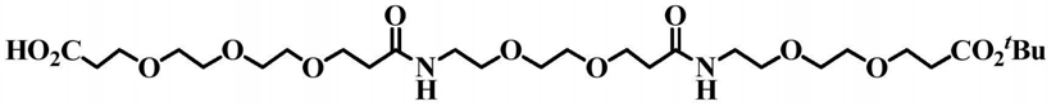
[1189] 向二乙二醇(20g,0.188mol)的THF(200mL)溶液中加入钠块(0.43g,0.018mol)。在室温下搅拌1小时后,加入丙烯酸叔丁酯(48g,0.376mol),在室温下搅拌2天。将反应混合物真空浓缩,并通过柱层析法纯化,得到目标化合物(34g,50%产率)。ESI m/z $C_{18}H_{35}O_7[M+H]^+$:计算值363.23,实测值363.23。

[1190] 实施例251.化合物643的合成

[1191] 

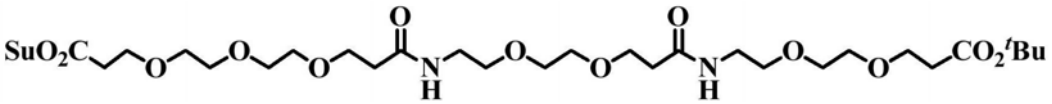
[1192] 在室温下将化合物642(34g,0.093mol)溶解在甲酸(100mL)中并搅拌过夜。真空浓缩反应物,得到目标化合物。ESI m/z $C_{10}H_{19}O_7[M+H]^+$:计算值251.11,实测值251.11。

[1193] 实施例252.化合物644的合成

[1194] 

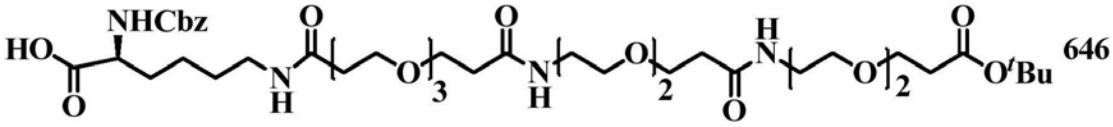
[1195] 在0℃下,向胺630(1.50g,3.82mmol)和二酸643(1.90g,7.64mmol)的DMF(10mL)溶液中,加入HATU(1.45g,3.82mmol)和N,N'-二异丙基乙胺(0.66mL,3.82mmol)。将反应混合物升温至室温并搅拌1小时,然后用二氯甲烷(80mL)稀释,用水(10mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤,浓缩并通过硅胶柱层析法纯化,得到无色液体(1.75g,75%产率)。ESI m/z $C_{28}H_{53}N_2O_{13}[M+H]^+$:计算值625.35,实测值625.35。

[1196] 实施例253.化合物645的合成

[1197] 

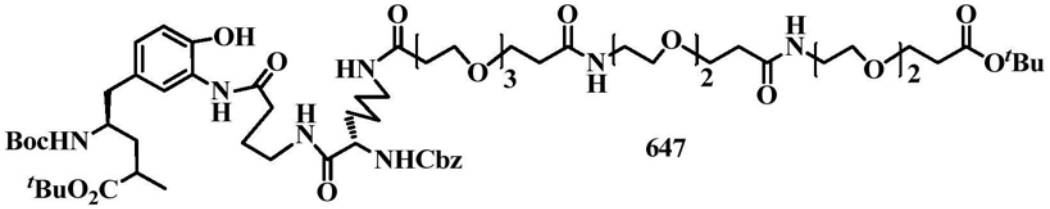
[1198] 在0℃下,向化合物644(1.75g,2.8mmol)的二氯甲烷(20mL)溶液中,加入EDCI(1.07g,5.6mmol)和NHS(0.64g,5.6mmol)。将反应升温至室温并搅拌过夜,然后用二氯甲烷(80mL)稀释,用水(10mL)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩,得到目标化合物(2.00g,约100%产率)。ESI m/z $C_{32}H_{56}N_3O_{15}[M+H]^+$:计算值722.36,实测值722.36。

[1199] 实施例254.化合物646的合成

[1200] 

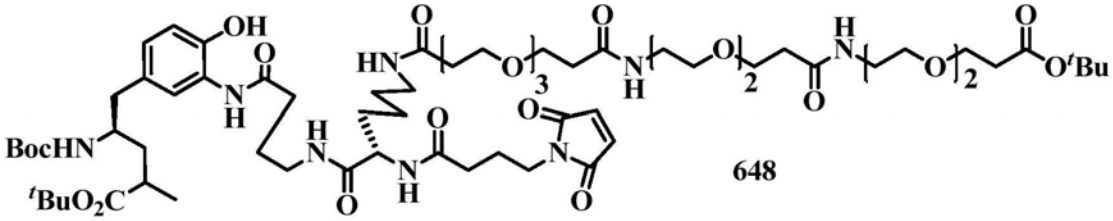
[1201] 向N-α-Cbz-L-赖氨酸(1.17g,4.2mmol)的水(10mL)溶液中加入碳酸氢钠(0.47g,5.6mmol),冷却至5℃,加入溶解在1,4-二恶烷(10mL)中的化合物645(2.00g,2.8mmol)。升温至室温并搅拌1小时,然后加入1N盐酸,酸化至pH3,用二氯甲烷(50mL×3)萃取。用水(20mL)洗涤有机萃取物,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩,得到目标产物(2.3g,92%产率)。ESI m/z $C_{42}H_{71}N_4O_{16}[M+H]^+$:计算值887.48,实测值887.48。

[1202] 实施例255.化合物647的合成

[1203] 

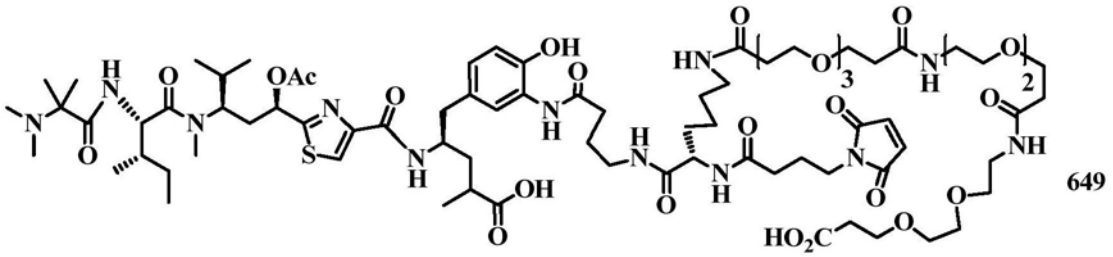
[1204] 在0℃下向胺438(1.87g,3.9mmol)和酸646(2.3g,2.59mmol)的二氯甲烷(30mL)溶液中,加入HATU(0.98g,2.59mmol)和N,N'-二异丙基乙胺(450μL,2.59mmol)。将反应混合物升温至室温并搅拌1小时,然后真空浓缩,通过硅胶柱层析法纯化,得到目标化合物(2.4g,70%产率)。ESI m/z $C_{67}H_{110}N_7O_{21}[M+H]^+$:计算值1348.77,实测值1348.77。

[1205] 实施例256.化合物648的合成

[1206] 

[1207] 在氢化瓶中,向化合物647(2.4g,1.78mmol)的甲醇(20mL)溶液中,加入Pd/C(10wt%,0.2g)。将混合物在1atm氢气下搅拌过夜,通过硅藻土过滤,浓缩滤液并重新溶解在甲醇(20mL)中。加入化合物125(0.79g,2.67mmol)和0.1M NaH_2PO_4(10mL),并将混合物在室温下搅拌过夜,然后浓缩,残留物通过柱层析法(甲醇/二氯甲烷)纯化,得到目标化合物648(1.52g,62%产率)。ESI m/z $C_{67}H_{111}N_8O_{22}[M+H]^+$:计算值1379.77,实测值1379.75。

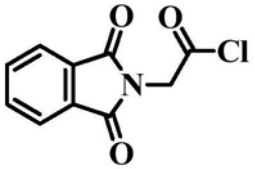
[1208] 实施例257.化合物649的合成

[1209] 

[1210] 向化合物648(51mg,0.037mmol)的二氯甲烷(2mL)溶液中,加入三氟乙酸(2mL),在室温下搅拌2小时,然后浓缩并再次溶于DMF(1.0毫升)中。在0℃下,加入化合物41a(38.4mg,0.055mmol)的DMF(1.0mL)溶液,然后加入N,N'-二异丙基乙胺(13μL,0.074mmol)。

将反应混合物升温至室温，并搅拌1小时，真空浓缩，用制备HPLC纯化，得到目标化合物649(36.5mg，产率60%)。ESI m/z $C_{79}H_{127}N_{12}O_{25}S[M+H]^+$：计算值1675.86，实测值1675.86。

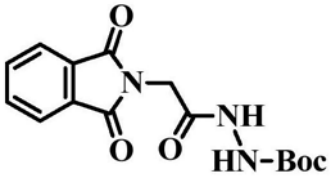
[1211] 实施例258.化合物651的合成

[1212] 

651

[1213] 在室温下向N-邻苯二甲酰基甘氨酸(10.0g，48.7mmol)的二氯甲烷(100mL)溶液中，加入草酰氯(6.3mL，73.1mmol)，和几滴DMF。将反应物搅拌2小时，然后浓缩，得到化合物651(10.8g)，为黄色固体。

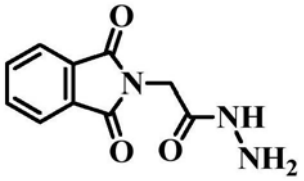
[1214] 实施例259.化合物652的合成

[1215] 

652

[1216] 向肼基甲酸叔丁酯(7.08g，53.5mmol)的二氯甲烷(200mL)溶液中，加入Et_3N(13.5mL，97.4mmol)，然后在0℃加入化合物651(10.8g，48.7mmol)。将反应物在室温下搅拌30分钟后倒入冰水(100mL)中，用二氯甲烷(3×100mL)萃取。将合并的有机相用水(100mL)和盐水(100mL)洗涤，经无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩，得到白色固体(15.5g，100%产率)。ESI m/z $C_{15}H_{18}N_3O_5[M+H]^+$：计算值320.12，实测值320.12。

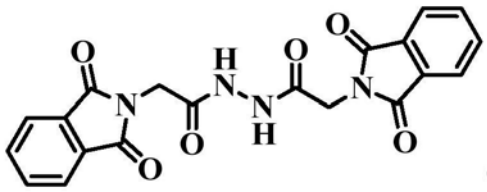
[1217] 实施例260.化合物653的合成

[1218] 

653

[1219] 将化合物652(15.5g，48.7mmol)溶解在二氯甲烷(150mL)中，在室温下与三氟乙酸(50mL)搅拌1小时，然后浓缩，得到白色固体(10.6g，约100%产率)。ESI m/z $C_{10}H_{10}N_3O_3[M+H]^+$：计算值220.06，实测值220.06。

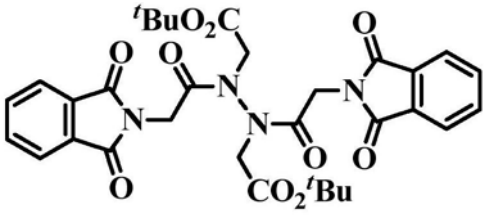
[1220] 实施例261.化合物654的合成

[1221] 

654

[1222] 在0℃下，向化合物653(10.6g，48.7mmol)的二氯甲烷(200mL)溶液中，加入Et_3N(13.5mL，97.4mmol)和化合物651(10.8g，48.7mmol)。将反应升温至室温并搅拌过夜。过滤收集沉淀物，分散在水(100mL)中，搅拌20分钟。将混合物再次过滤，得到白色固体(15.7g，80%产率)。ESI m/z $C_{20}H_{15}N_4O_6[M+H]^+$：计算值407.09，实测值407.09。

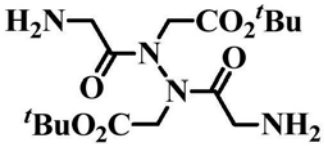
[1223] 实施例262.化合物655的合成

[1224] 

655

[1225] 在0℃下将NaH(0.5g,12.3mmol)分批加入到化合物654(2.0g,4.92mmol)的DMF(40mL)溶液中。将混合物升温至室温,并搅拌3小时。然后加入溴乙酸叔丁酯(2.0g,10.3mmol),搅拌过夜后倒入冰水(100mL)中,用二氯甲烷(3×50mL)萃取。将合并的有机相用水(50mL)、盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并浓缩,通过硅胶层析法纯化,得到白色固体(1.5g,50%产率)。ESI m/z $C_{32}H_{35}N_4O_{10}[M+H]^+$:计算值635.23,实测值635.23。

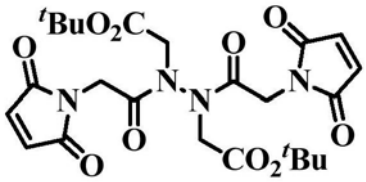
[1226] 实施例263.化合物656的合成

[1227] 

656

[1228] 将化合物655(1.5g,2.36mmol)和肼(442mg,7.08mmol)在乙醇(30mL)中的混合物回流1小时,然后冷却至室温并过滤。浓缩滤液后溶于乙酸乙酯(20mL)中,再次过滤。浓缩滤液,得到白色固体(750mg,85%产率)。ESI m/z $C_{16}H_{31}N_4O_6[M+H]^+$:计算值375.22,实测值375.22。

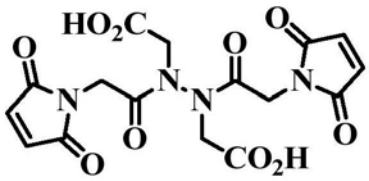
[1229] 实施例264.化合物657的合成

[1230] 

657

[1231] 将化合物656(750mg,2mmol)的THF(2mL)溶液,加入到饱和$NaHCO_3$水溶液(30mL)中,冷却至0℃后加入化合物409(622mg,4mmol)。将该反应在0℃下搅拌1小时,过滤收集白色固体(854mg,80%产率)。ESI m/z $C_{24}H_{31}N_4O_{10}[M+H]^+$:计算值535.20,实测值535.20。

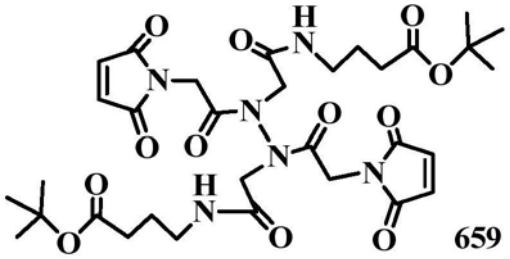
[1232] 实施例265.化合物658的合成

[1233] 

658

[1234] 将化合物657(854mg,1.6mmol)溶解在二氯甲烷(3mL)中,并在室温下与三氟乙酸(3mL)搅拌2小时,然后浓缩反应物,得到化合物658(675mg,约100%产率)。ESI m/z $C_{16}H_{15}N_4O_{10}[M+H]^+$:计算值423.07,实测值423.07。

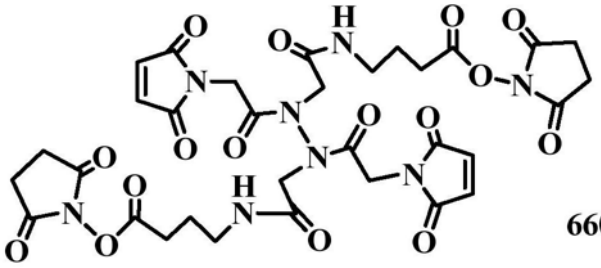
[1235] 实施例266.化合物659的合成

[1236] 

659

[1237] 在0℃下，向化合物658(200mg，0.47mmol)的DMF(5mL)溶液中，加入4-氨基丁酸叔丁酯(158mg，0.99mmol)和EDC(189.7mg，0.99mmol)。将反应升温至室温并搅拌过夜，倒入冰水中，用二氯甲烷(3×10mL)萃取。将合并的有机相用1N盐酸(5mL)、水(5mL)、盐水(5mL)洗涤，经无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩，得到白色固体(330mg，约100%产率)。

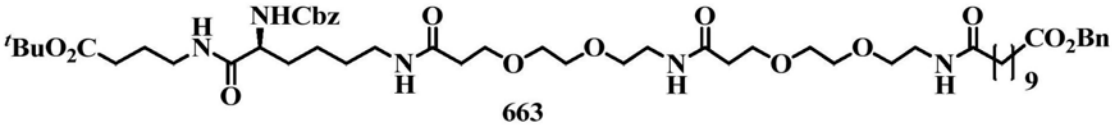
[1238] 实施例267.化合物660的合成

[1239] 

660

[1240] 将化合物659(330mg，0.47mmol)溶解于二氯甲烷(3mL)中，与三氟乙酸(3毫升)在室温下搅拌2小时，浓缩，再溶解于DMF(5mL)中，冷却至0℃，依次加入NHS(113mg，0.98mmol)和EDC(189mg，0.98mmol)。将反应升温至室温，搅拌过夜，倒入冰水中，用二氯甲烷(3×20ml)萃取。用水(5ml)、盐水(5ml)洗涤合并的有机相，经无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩，得到白色固体(369mg，产率约100%)。ESI m/z $C_{32}H_{35}N_8O_{16}[M+H]^+$：计算值787.21，实测值787.21。

[1241] 实施例268.化合物663的合成

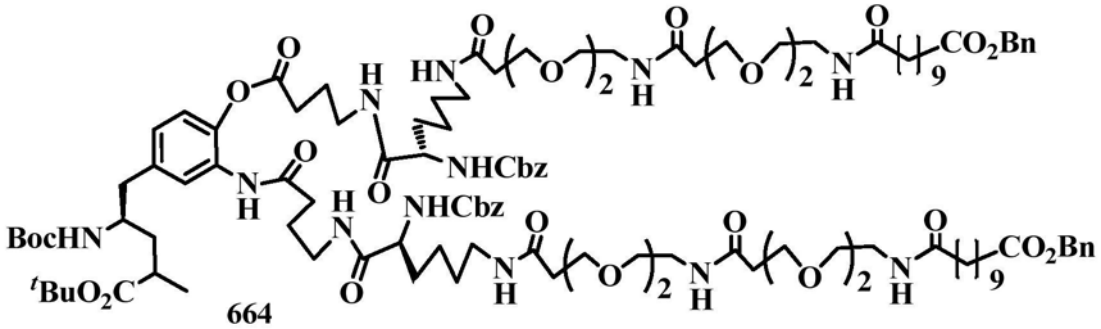
[1242] 

663

[1243] 将化合物633(200mg，0.225mmol)溶解于DMF(5ml)中，冷却至0℃，依次加入4-氨基丁酸叔丁酯(71.8mg，0.45mmol)和EDC(86.2mg，0.45mmol)。将反应物升温至室温，搅拌过夜，倒入冰水中，用二氯甲烷(3×10ml)萃取。用水(5ml)、盐水(5ml)洗涤合并的有机相，经无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩得到化合物663(231mg，产率约100%)。ESI m/z $C_{54}H_{86}N_5O_{14}[M+H]^+$：计算值1028.61，实测值1028.61。

[1244] 实施例269.化合物664的合成

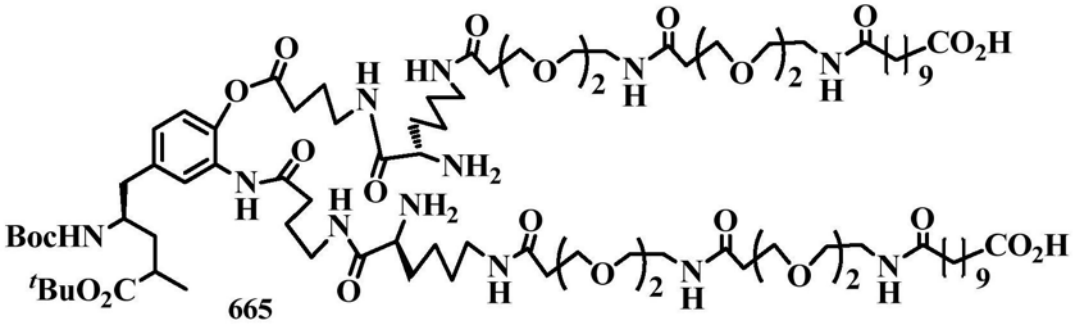
[1245]



[1246] 将化合物663(231mg,0.225mmol)溶解于二氯甲烷(3mL)中,与三氟乙酸(3mL)在室温下搅拌1小时,将反应浓缩后再溶解于DMF(5mL)中,冷却至0℃,依次加入化合物110(44mg,0.112mmol)、HATU(85.5mg,0.225mmol)和N,N'-二异丙基乙胺(39μL,0.225mmol)。升温至室温,搅拌过夜,将反应液倒入冰水中,用二氯甲烷(3×10ml)萃取。将有机相用1N盐酸(5mL)、水(5mL)、盐水(5mL)洗涤,在无水硫酸钠上干燥、过滤并浓缩,用硅胶柱层析法(0%-5%甲醇/二氯甲烷)纯化,得到白色泡沫(206mg,产率80%)。ESI m/z $C_{121}H_{185}N_{12}O_{31}[M+H]^+$:计算值2302.32,实测值2302.34。

[1247] 实施例270.化合物665的合成

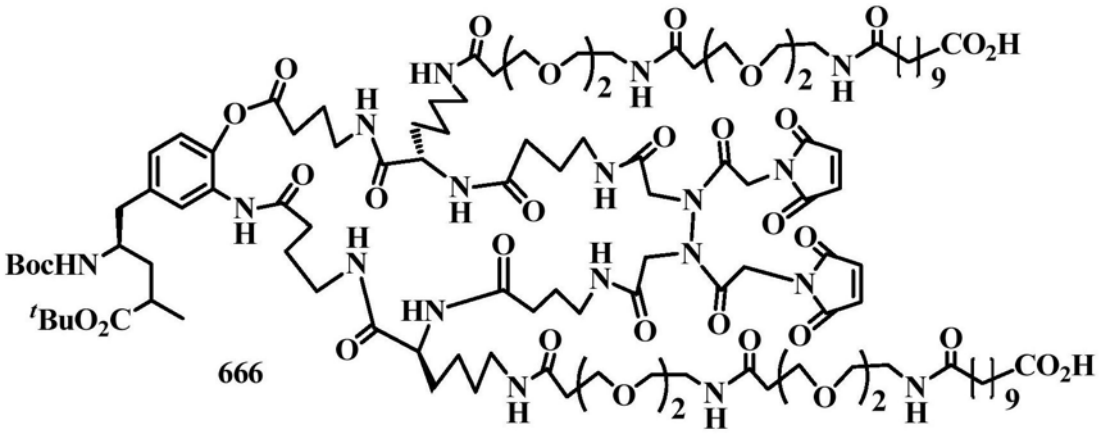
[1248]



[1249] 将化合物664(206mg,0.089mmol)溶解于甲醇(5ml)中,加入Pd/C(10wt%,20mg),在1atm氢气压力下搅拌过夜。然后通过硅藻土过滤混合物,浓缩滤液得到化合物665(165mg,产率约100%)。ESI m/z $C_{91}H_{161}N_{12}O_{27}[M+H]^+$:计算值1854.15,实测值1854.15。

[1250] 实施例271.化合物666的合成

[1251]

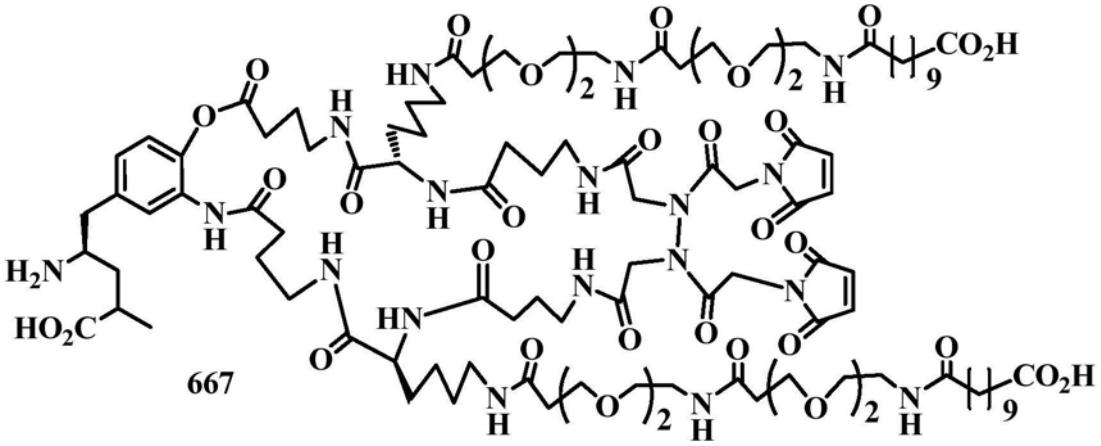


[1252] 在0℃下,向化合物665(165mg,0.089mmol)的乙醇(10mL)溶液中加入化合物660(140mg,0.178mmol)和磷酸盐缓冲液(0.5M,pH 7.5,3mL)。在室温下搅拌,然后浓缩,用硅胶柱层析法(0%-5%甲醇/二氯甲烷)纯化,得到化合物666(128mg,产率61%)。ESI m/z

$C_{115}H_{185}N_{18}O_{37}[M+H]^+$:计算值2410.31,实测值2410.31。

[1253] 实施例272.化合物667的合成

[1254]

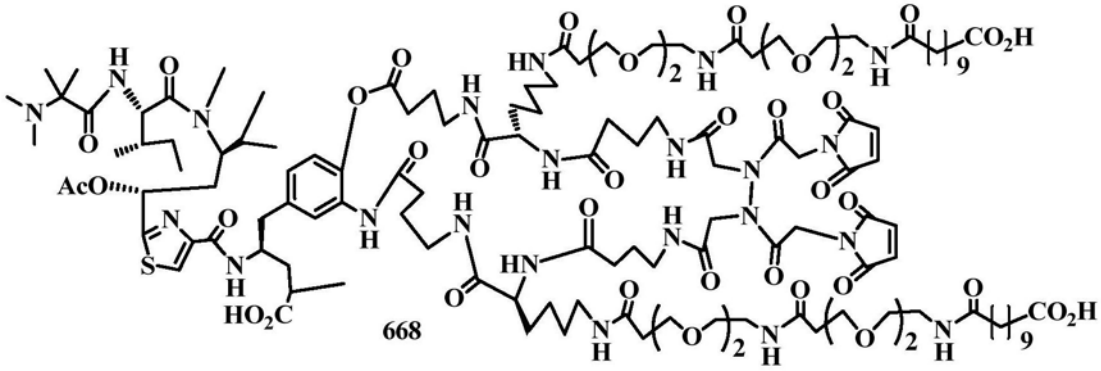


667

[1255] 将化合物666(128mg,0.053mmol)溶解于二氯甲烷(3mL)中,与三氟乙酸(3mL)在室温下搅拌2小时,将反应浓缩,再与二氯甲烷共蒸3次,得到化合物667(120mg,产率约100%)。ESI m/z $C_{106}H_{169}N_{18}O_{35}[M+H]^+$:计算值2254.19,实测值2254.19。

[1256] 实施例273.化合物668的合成

[1257]

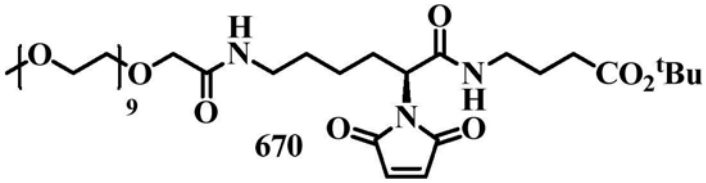


668

[1258] 将化合物667(120mg,0.053mmol)和化合物41a(36.6mg,0.053mmol)溶解于DMA(5ml)中,冷却至0℃。加入N,N'-二异丙基乙胺(18μL,0.106mmol),升温至室温,搅拌1小时。浓缩反应混合物后,残留物用制备HPLC(10-90%乙腈/水)纯化,得到化合物668(73mg,产率50%)。ESI m/z $C_{131}H_{209}N_{22}O_{40}S[M+H]^+$:计算值2762.46,实测值2762.46。

[1259] 实施例274.化合物670的合成

[1260]

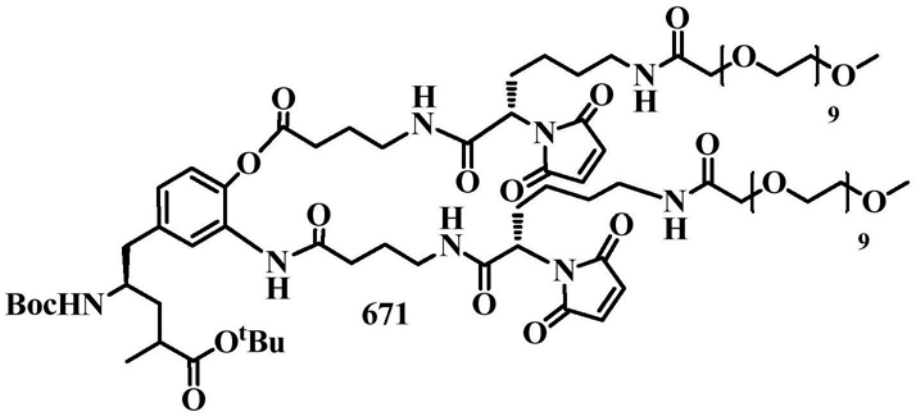


670

[1261] 向$NaHCO_3$(20ml)饱和溶液中加入化合物621(1g,1.32mmol),然后在0℃加入化合物409(0.4g,2.64mmol)。搅拌30分钟后倒入含有100ml乙酸乙酯的分液漏斗中,分离有机相,用50ml水和50ml盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤浓缩得到化合物670(0.8g,产率72%)。ESI m/z $C_{39}H_{70}N_3O_{16}[M+H]^+$:计算值836.47,实测值836.47。

[1262] 实施例275.化合物671的合成

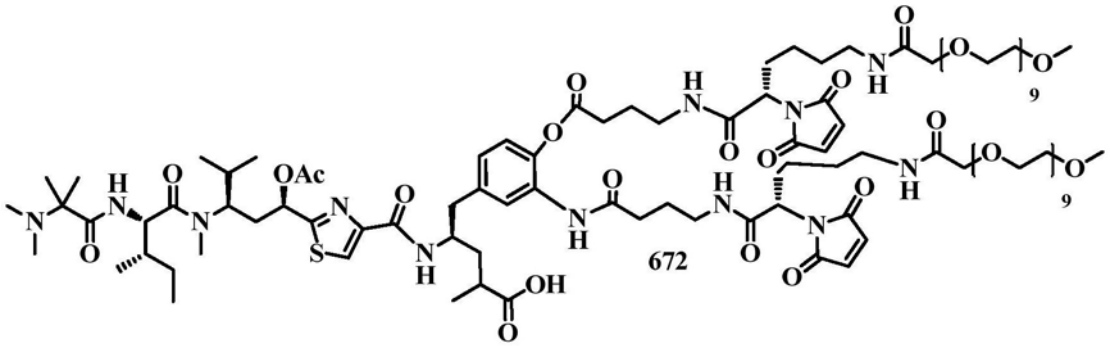
[1263]



[1264] 将化合物670(0.9g,0.98mmol)溶解于甲酸(50ml)中,室温下搅拌1小时。将反应混合物浓缩,与甲苯共蒸两次,将残留物置于真空泵上进一步浓缩,得到油状物。将上述一半物料溶解于DMF(10ml)中,在0℃下加入化合物110(0.35g,0.48mmol)、HATU(0.36g,0.96mmol)和三乙胺(0.15ml,1.44mmol)。搅拌30分钟后,将反应混合物倒入含有100ml水的分液漏斗中,用50ml乙酸乙酯萃取两次。合并有机相,经无水硫酸钠干燥,过滤并浓缩。残留物通过柱层析法(甲醇/二氯甲烷)纯化,得到目标化合物671(21mg,2%产率)。ESI m/z $C_{91}H_{153}N_8O_{35}[M+H]^+$:计算值1919.04,实测值1919.04。

[1265] 实施例276.化合物672的合成

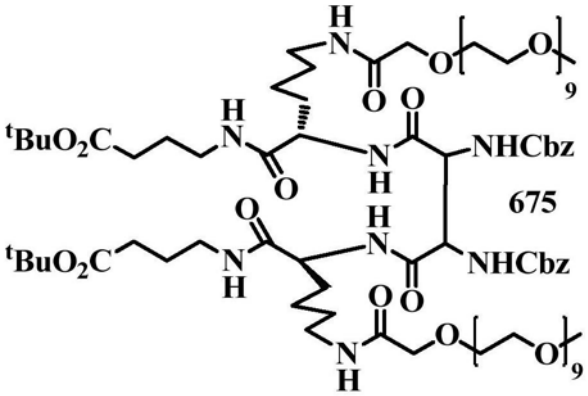
[1266]



[1267] 将化合物671(21mg,0.01mmol)的二氯甲烷(0.5ml)溶液与三氟乙酸(1ml)在室温下搅拌1小时,然后用二氯甲烷共同浓缩两次,将残留物置于真空泵上2小时后溶解在DMA(2ml)中。加入化合物41a(6.9mg,0.01mmol)和N,N'-二异丙基乙胺(17μL,0.1mmol)。混合物在室温下搅拌30分钟,然后浓缩。残留物通过反相HPLC(MeCN/H_2O的梯度)纯化,得到化合物672(10mg,产率44%)。ESI m/z $C_{107}H_{177}N_{12}O_{38}S[M+H]^+$:计算值2271.20,实测值2271.20。

[1268] 实施例277.化合物675的合成

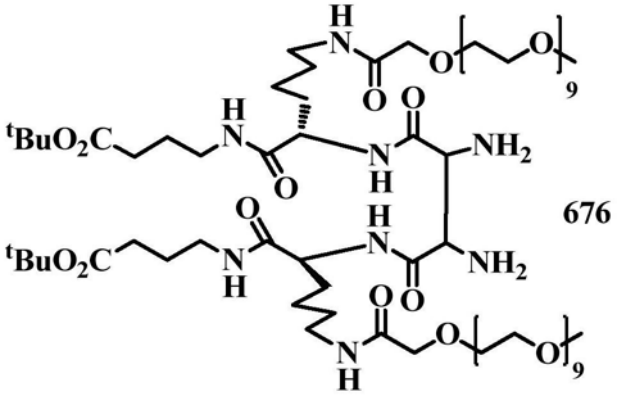
[1269]



[1270] 将化合物621(5.98g,6.73mmol)和Pd/C(10wt%,0.6g)在甲醇(30ml)中的混合物,在1atm氢气压力下搅拌过夜,然后通过硅藻土过滤。将滤液浓缩并重新溶解于THF(60ml),加入化合物674(1.01g,2.42mmol)和HOBT(817mg,6.05mmol),于0℃下添加DCC(1.25g,6.05mmol)和N,N'-二异丙基乙胺(2.1ml,12.10mmol)。将反应物在室温下搅拌过夜,然后用乙酸乙酯(400ml)稀释,用1N盐酸、饱和碳酸氢钠和盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,并用硅胶柱层析法(24:1二氯甲烷/甲醇)纯化,得到化合物675(5.65g,产率49%产率)。MS ESI m/z $C_{90}H_{154}N_8O_{34}[M+H]^+$:计算值1892.06,实测值1892.83。

[1271] 实施例278.化合物676的合成

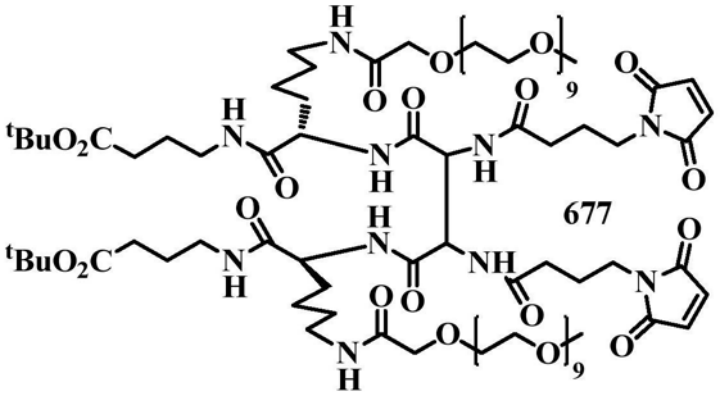
[1272]



[1273] 将化合物675(3.71g,1.96mmol)和Pd/C(10wt%,0.40g)在甲醇(50ml)中的混合物,在1atm氢气下搅拌过夜,然后通过硅藻土过滤。浓缩滤液得到化合物676(4.57g,产率51%)。MS ESI m/z $C_{74}H_{142}N_8O_{30}[M+H]^+$:计算值1623.98,实测值1624.42。

[1274] 实施例279.化合物677的合成

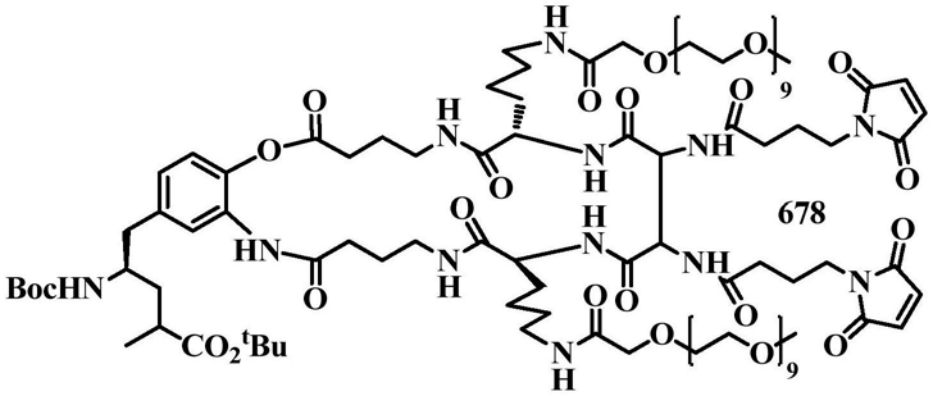
[1275]



[1276] 向化合物676(315mg,0.194mmol)的乙醇(10ml)溶液中加入Na_2HPO_4水溶液(0.5m,2.5ml)和化合物125(136mg,0.485mmol)。将混合物在室温下搅拌3天,浓缩,通过硅胶柱层析法(3:2H_2O/MeCN)纯化,得到油状物(50mg,13%产率),将其溶解于二氯甲烷(5ml)中,并在室温下与三氟乙酸(5ml)搅拌过夜,然后浓缩,得到化合物677(47mg,产率98%)。MS ESI m/z $C_{82}H_{140}N_{10}O_{36}[M+H]^+$:计算值1841.94,实测值1841.88。

[1277] 实施例280.化合物678的合成

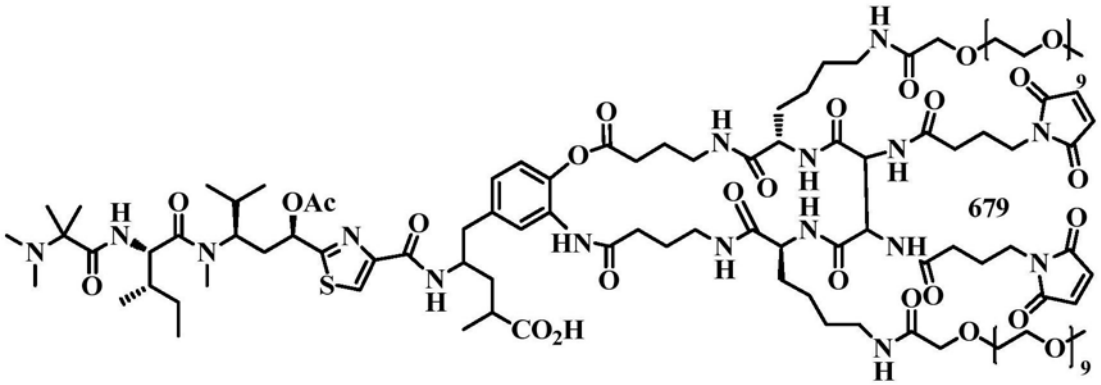
[1278]



[1279] 将化合物677(154mg,0.0837mmol)与化合物110(33mg,0.0837mmol)溶于DMF(6ml)中,冷却至0℃,依次加入HATU(64mg,0.167mmol)和三乙胺(46μL,0.335mmol)。将反应物搅拌1小时,然后用水(100ml)稀释,并用乙酸乙酯(3×100ml)萃取。用盐水洗涤乙酸乙酯溶液,经无水硫酸钠干燥,过滤、浓缩,用硅胶柱层析法(6:1二氯甲烷/甲醇)纯化,得到化合物678(98mg,产率53%)。ESI m/z $C_{103}H_{170}N_{12}O_{39}[M+H]^+$:计算值2200.17,实测值2200.15。

[1280] 实施例281.化合物679的合成

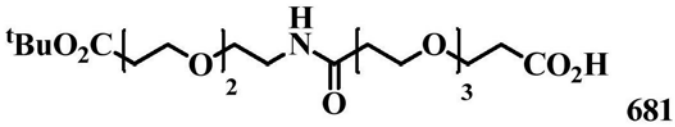
[1281]



[1282] 将化合物678(98mg,0.045mmol)的二氯甲烷(3ml)溶液与三氟乙酸(6ml)在室温下搅拌1小时,然后浓缩并重新溶解于DMA(1ml),加入化合物41a(31mg,0.045mmol)和N,N'-二异丙基乙胺(12μL,0.068mmol)。在室温下搅拌90分钟,浓缩后通过制备HPLC(10-100%乙腈/水)纯化,得到化合物679(33.6mg,产率30%)。ESI m/z $C_{119}H_{194}N_{16}O_{42}S[M+H]^+$:计算值1276.66,实测值1276.65。

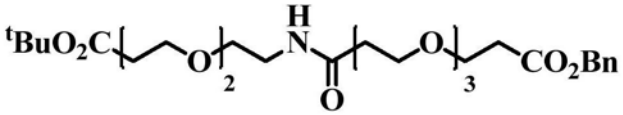
[1283] 实施例282.化合物681的合成

[1284]



[1285] 向化合物301(1.0g,4.3mmol)和化合物643(1.6g,6.4mmol)的二氯甲烷(15ml)溶液中加入HATU(1.83g,4.83mmol)和三乙胺(0.68ml,4.83mmol),反应混合物在0℃搅拌90分钟,浓缩,然后用柱层析法(甲醇/二氯甲烷)纯化,得到目标化合物681(2.0g,产率>100%,含硅胶)。ESI m/z $C_{21}H_{40}NO_{10}[M+H]^+$:计算值466.26,实测值466.23。

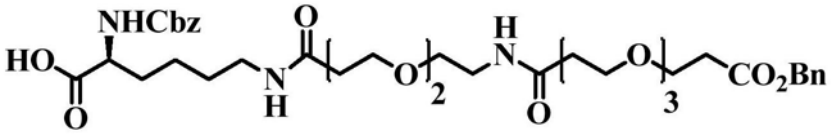
[1286] 实施例283.化合物682的合成

[1287] 

682

[1288] 向化合物681(2.0g,4.3mmol)的DMF(30ml)溶液中加入K_2CO_3(1.2g,8.6mmol)和苄溴(1.47g,8.6mmol)。将混合物在室温下搅拌过夜,然后倒入含有100ml水的分液漏斗中,并用乙酸乙酯(3×50ml)萃取。有机相经无水硫酸钠干燥,过滤、浓缩并通过柱层析法(甲醇/二氯甲烷)纯化,得到目标化合物682(1.0g,产率42%)。ESI m/z $C_{28}H_{46}NO_{10}[M+H]^+$:计算值556.30,实测值556.30。

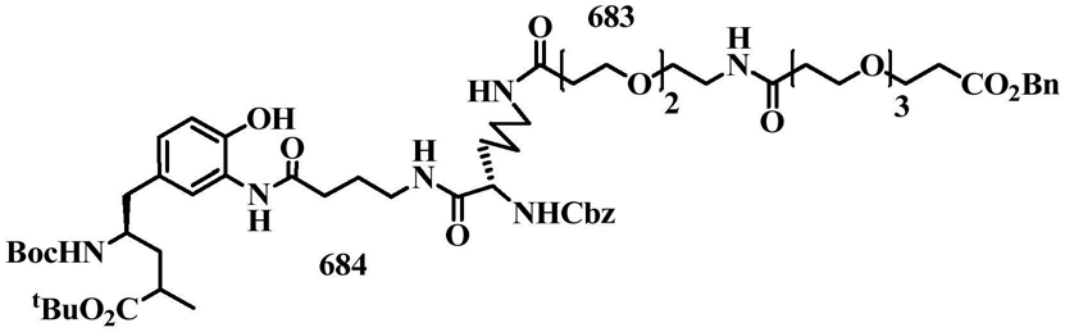
[1289] 实施例284.化合物683的合成

[1290] 

683

[1291] 向化合物682(1.0g,1.8mmol)的二氯甲烷(1ml)溶液中,加入三氟乙酸(3ml),在室温下搅拌1小时,然后浓缩至干,与二氯甲烷共蒸两次后溶解于二氯甲烷(50ml)中。在0℃下添加Z-Lys-OH(0.5g,1.8mmol)、HATU(1.83g,4.83mmol)和三乙胺(0.68ml,4.83mmol)。将混合物在室温下搅拌1小时,然后倒入含有100ml水的分液漏斗中,用50ml二氯甲烷萃取3次。将有机相合并,用100ml盐水洗涤一次,然后经无水硫酸钠干燥,过滤并浓缩。残留物通过柱层析法(甲醇/二氯甲烷)纯化,得到目标化合物683(1.0g,产率71%)。ESI m/z $C_{38}H_{56}N_3O_{13}[M+H]^+$:计算值762.37,实测值762.37。

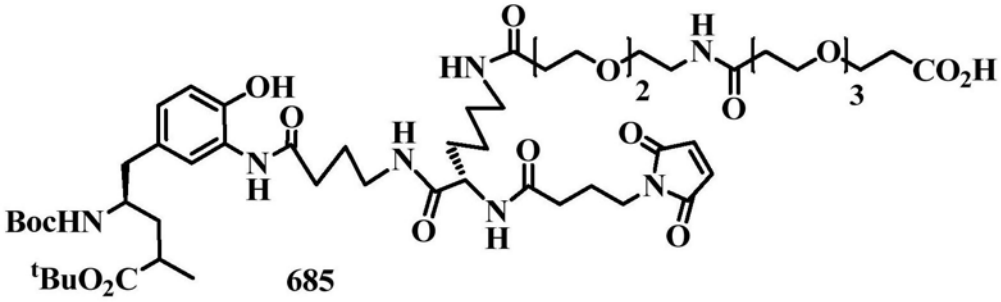
[1292] 实施例285.化合物684的合成

[1293] 

684

[1294] 向化合物683(1.0g,1.3mmol)的DMF(10ml)溶液中加入HATU(0.60g,1.56mmol),在室温下搅拌30分钟,然后在0℃下加入化合物438(0.51g,1.3mmol)的DMF(10ml)溶液和三乙胺(0.28ml,2mmol),在0℃下将反应搅拌1小时,然后倒入含有100毫升水的分液漏斗中,用乙酸乙酯(50毫升)萃取两次。将有机相合并,用100ml盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并浓缩。残留物通过柱层析法(甲醇/二氯甲烷)纯化,得到目标化合物684(1.20g,产率73%)。ESI m/z $C_{63}H_{95}N_6O_{18}[M+H]^+$:计算值1223.66,实测值1223.66。

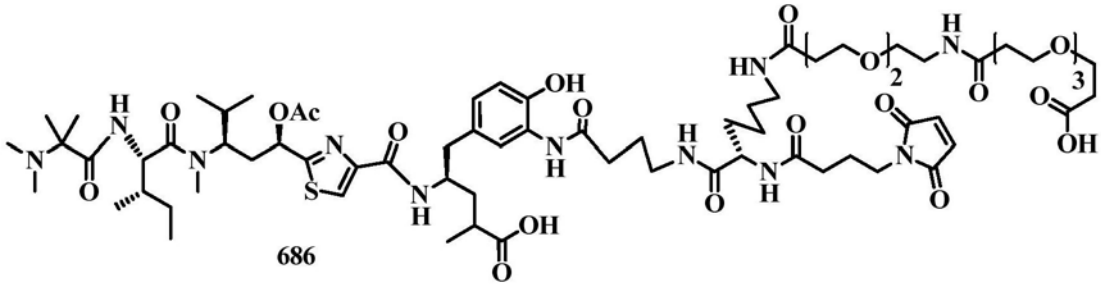
[1295] 实施例286.化合物685的合成

[1296] 

685

[1297] 在氢化瓶中，将化合物684(1.20g，0.98mmol)的甲醇(20mL)溶液和Pd/C(0.1g，10wt%，50%水分)振荡过夜，通过硅藻土过滤，浓缩滤液，然后再溶解在乙醇(50mL)中。加入化合物125(0.32g，1.16mmol)和0.1M NaH_2PO_4(10mL)，并将混合物在室温下搅拌过夜。浓缩后，残留物通过柱层析法(甲醇/二氯甲烷)纯化，得到目标化合物685(0.57g，产率50%)。ESI m/z $C_{56}H_{90}N_7O_{19}[M+H]^+$：计算值1164.62，实测值1164.62。

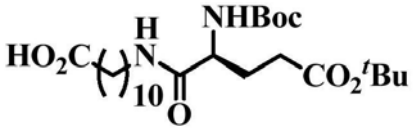
[1298] 实施例287.化合物686的合成

[1299] 

686

[1300] 向化合物685(0.10g，0.086mmol)的二氯甲烷(1mL)溶液中，加入三氟乙酸(3mL)，在室温下搅拌30分钟，然后浓缩至干，并与二氯甲烷共浓缩两次，然后溶于DMA(2mL)，加入化合物41a(59mg，0.086mmol)和N，N'-二异丙基乙胺(26μL，0.15mmol)。将混合物在室温下搅拌1小时，然后浓缩，溶于2mL乙腈中，并通过反相HPLC(MeCN/H_2O梯度)纯化，得到化合物686(34mg，产率26%)。ESI m/z $C_{72}H_{114}N_{11}O_{22}S[M+H]^+$：计算值1516.78，实测值1516.78。

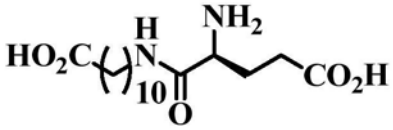
[1301] 实施例288.化合物688的合成

[1302] 

688

[1303] 向Boc-Glu(OtBu)-OH(0.50g，1.65mmol)的DMF(10mL)溶液中，加入HATU(0.69g，1.82mmol)和三乙胺(0.26mL，1.82mmol)。搅拌30分钟后，加入11-氨基十一烷酸(0.33g，1.65mmol)的DMF(10mL)溶液，在室温下搅拌1小时，然后倒入含有200毫升1N盐酸的分液漏斗中，用二氯甲烷(3×50毫升)萃取。将有机相用100mL盐水洗涤一次，然后经无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩。残留物通过柱层析法(甲醇/二氯甲烷)纯化，得到目标化合物688(1.0g，产率>约100%)。ESI m/z $C_{25}H_{47}N_2O_7[M+H]^+$：计算值487.33，实测值487.34。

[1304] 实施例289.化合物689的合成

[1305] 

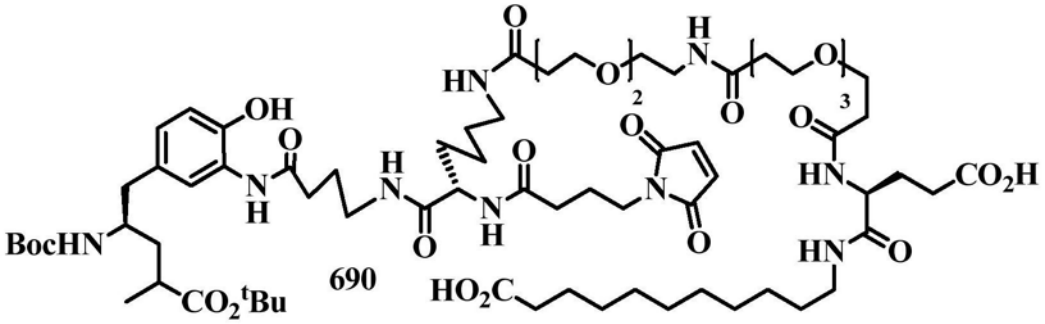
689

[1306] 将化合物688(1.0g)的二氯甲烷(1mL)溶液和三氟乙酸(3mL)在室温下搅拌30分

钟，然后浓缩至干，并用二氯甲烷共浓缩两次。最后，再放在真空泵上浓缩，得到化合物689(0.68g，2.06mmol)。ESI m/z $C_{16}H_{31}N_2O_5$[M+H]$^+$：计算值331.22，实测值331.22。

[1307] 实施例290.化合物的690合成

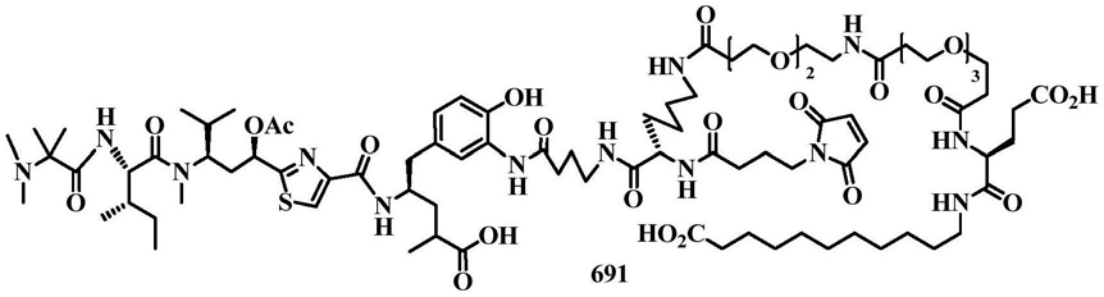
[1308]



[1309] 向化合物685(0.10g，0.086mmol)的乙酸乙酯(6mL)溶液中，加入五氟苯酚(18.4mg，0.1mmol)和EDC(19.1mg，0.1mmol)。将反应在室温下搅拌1小时，然后倒入含有100mL水的分液漏斗中，并用50mL的乙酸乙酯萃取。收集有机相，用无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩。将残留物重新溶解在5mL DMF中，加入化合物125(43mg，0.13mmol)的DMF(5mL)溶液和N，N'-二异丙基乙胺(35μL，0.222mmol)。在室温下搅拌90分钟后倒入含有100mL 1N盐酸的分液漏斗中，用二氯甲烷(2×50mL)萃取。将有机相用100mL盐水洗涤一次，然后经无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩。残留物通过柱曾分析法(甲醇/二氯甲烷)纯化，得到目标化合物690(0.11g，产率87%)。ESI m/z $C_{72}H_{118}N_9O_{23}$[M+H]$^+$：计算值1476.83，实测值1476.84。

[1310] 实施例291.化合物691的合成

[1311]



[1312] 将化合物691(0.11g，0.074mmol)的二氯甲烷(1mL)溶液和三氟乙酸(3mL)在室温下搅拌30分钟，然后浓缩至干，并与二氯甲烷共浓缩两次，再溶解在DMA(6mL)中。加入化合物41a(100mg，0.148mmol)和N，N'-二异丙基乙胺(35μL，0.222mmol)，在室温下搅拌2小时并浓缩。将残留物溶于2mL乙腈中，并通过反相HPLC(MeCN/H_2O梯度)纯化，得到化合物691(28.6mg，产率21%)。ESI m/z $C_{88}H_{142}N_{13}O_{26}S$[M+H]$^+$：计算值1828.98，实测值1828.98。

[1313] 实施例292.偶联物133、339、382、396、414、444、455、467、474、480、486、493、500、522、530、534、546、550、556、560、564、574、584、593、601、613、619、626、637、641、650、669、673、680、687、692、E1、E2、E3、E4、E5、E6和E7制备的通用方法：

[1314] 向2.0mL、10mg/ml、pH 6.0-8.0的赫赛汀混合物中，加入0.70-2.0mL、100mM NaH_2PO_4缓冲液，pH为6.5-8.5的缓冲液，TCEP(14-35μL，20mM水溶液)以及化合物132、337、338、381、395、413、443、454、466、473、479、485、492、499、521、529、533、545、549、554、559、563、573、583、592、600、612、618、625、636、640、649、668、672、679、686、691或E1、E2、E3、E4、E5、E6或E7的马来酰亚胺前体(独立地是14-28μL，20mM DMA溶液)，然后加入4-(迭氮基甲

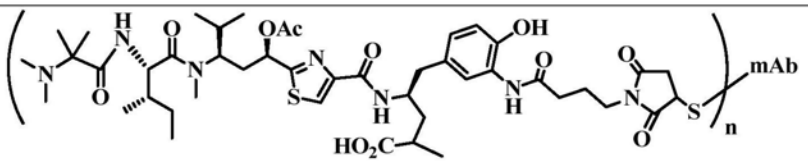
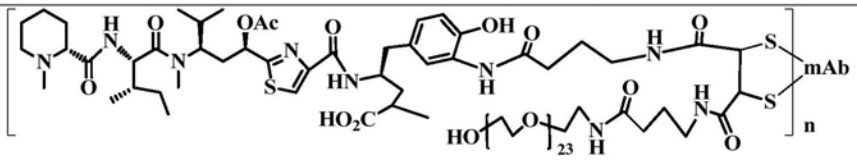
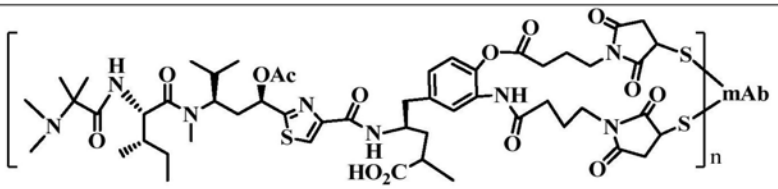
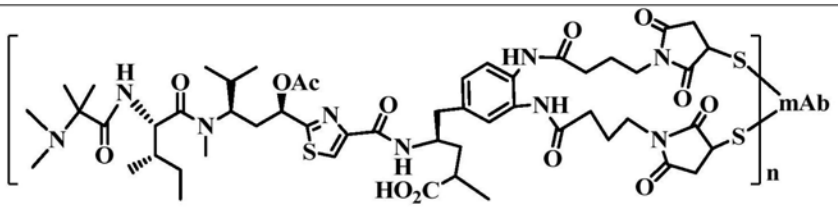
基)苯甲酸(14-50μL,20mM,pH 7.5PBS缓冲液)。将混合物在室温下孵育4-18小时,然后加入DHAA(135μL,50mM)。在室温下孵育过夜后,将混合物在G-25柱上纯化,用100mM NaH_2PO_4、50mM NaCl pH为6.0-7.5缓冲液洗脱,得到在13.4-15.8毫升的NaH_2PO_4缓冲液中的12.2-18.6mg不等的偶联物133、339、382、396、414、444、455、467、474、480、486、493、500、522、530、534、546、550、556、560、564、574、584、593、601、613、619、626、637、641、650、669、673、680、687、692、E1、E2、E3、E4、E5、E6和E7(60%-93%产率)。偶联物的药物/抗体比(DAR)为3.4-4.1,其DAR是通过UPLC-QTOF质谱确定。SEC HPLC(Tosoh Bioscience,Tskgel G3000SW,7.8mm ID x 30cm,0.5ml/min,100min)测得单体含量94%至99%,SDS-PAGE凝胶显示单一条带。

[1315] 实施例293.与T-DM1对比,偶联物133、339、382、396、414、444、455、467、474、480、486、493、500、522、530、534、546、550、556、560、564、574、584、593、601、613、619、626、637、641、650、669、673、680、687、692、E1、E2、E3、E4、E5、E6和E7的体外细胞毒性评价:

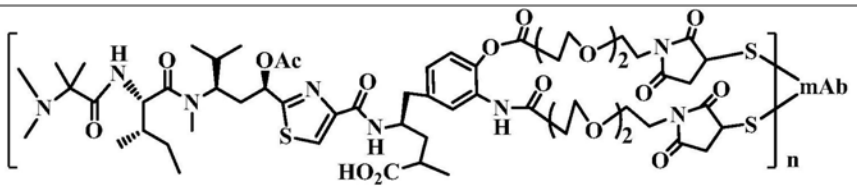
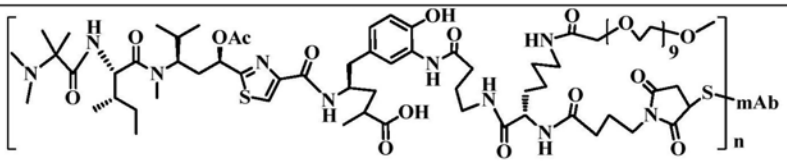
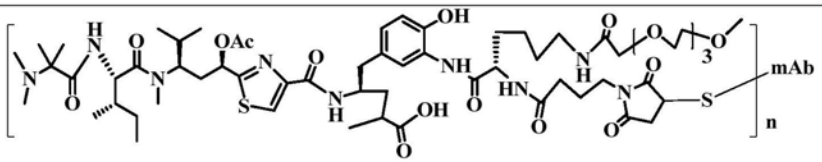
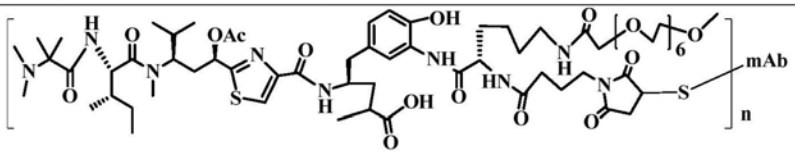
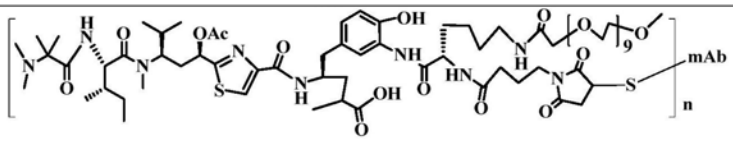
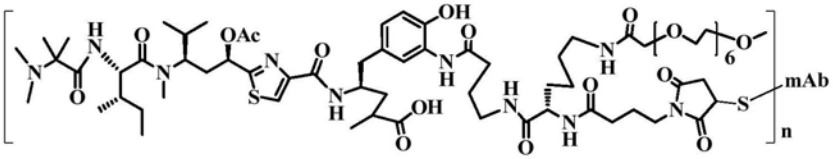
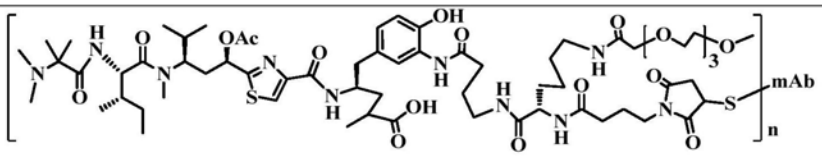
[1316] 用于体外细胞毒性评价的细胞系是一种人类胃癌细胞系NCI-N87,细胞在含有10%FBS的RPMI-1640中生长。为了进行测定,将细胞(180μL,6000个细胞)加入到96孔板的每个孔中,并在37℃、5%CO_2下温育24小时。接着,在合适的细胞培养基(总体积,0.2mL)中用各种浓度的测试化合物(20μL)处理细胞。对照孔含有细胞和培养基,但无测试化合物。将孔板在37℃、5%CO_2下孵育120小时,然后将MTT(5mg/mL,20μL)加入孔中,将板在37℃下温育1.5小时。小心地除去培养基,然后加入DMSO(180μL)。振摇15分钟后,在490nm和570nm处测量吸光度(用620nm的参比滤光片)。根据下式计算抑制比:抑制%=[1-(测定值-空白)/(对照值-空白)]×100。结果列于表1中。

[1317] 表1.本专利申请中Her2-Tubulysin同系物偶联物的结构及其细胞毒性结果

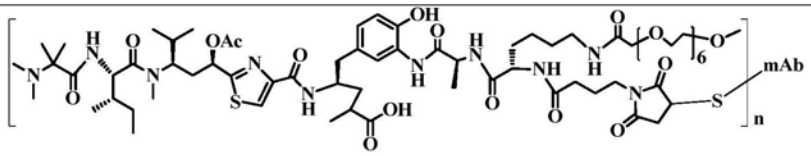
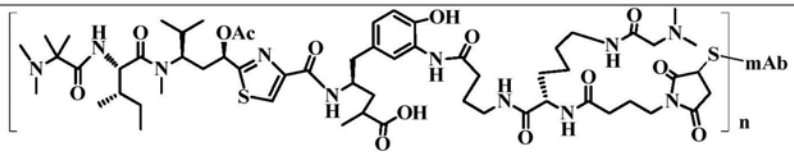
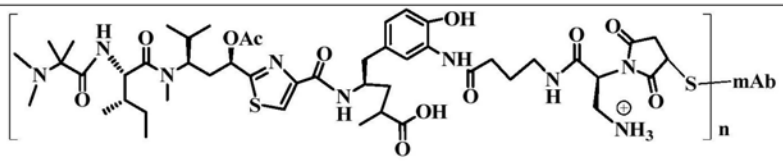
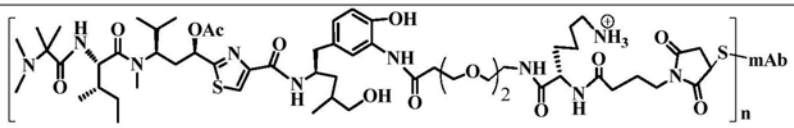
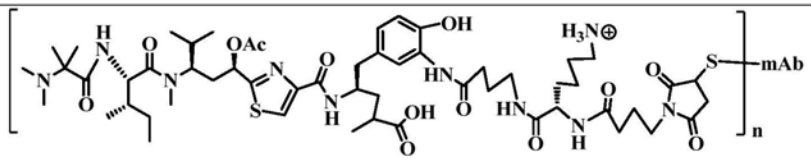
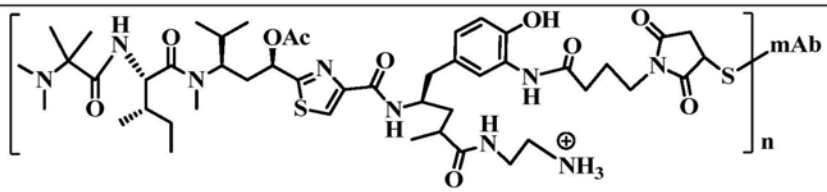
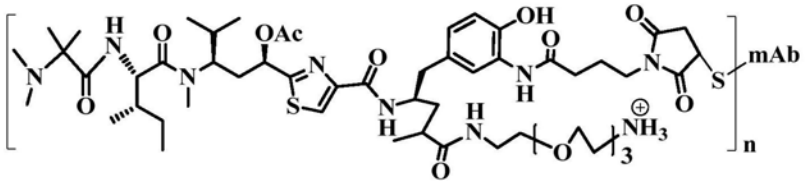
[1318]

化合物#	结构及其杀死 NCI-N87 细胞的 IC_{50}
133	 IC_{50} =0.17nM (DAR= 3.6)
339	 IC_{50} =9.17nM (DAR= 3.6)
382	 IC_{50} = 0.73 nM (DAR= 3.8)
396	 IC_{50} = 13.06 nM(DAR= 3.9)

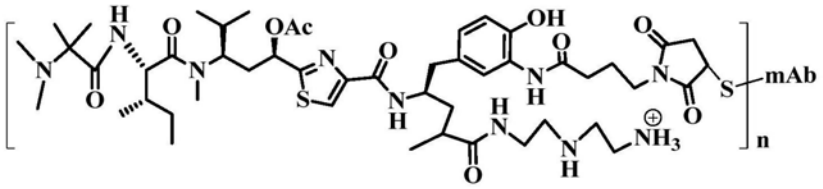
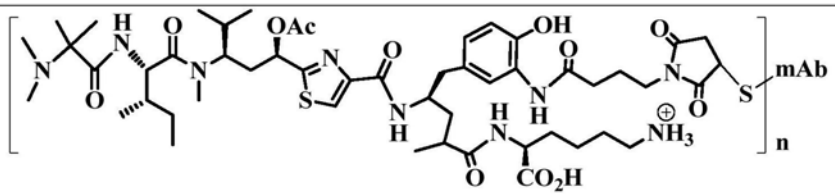
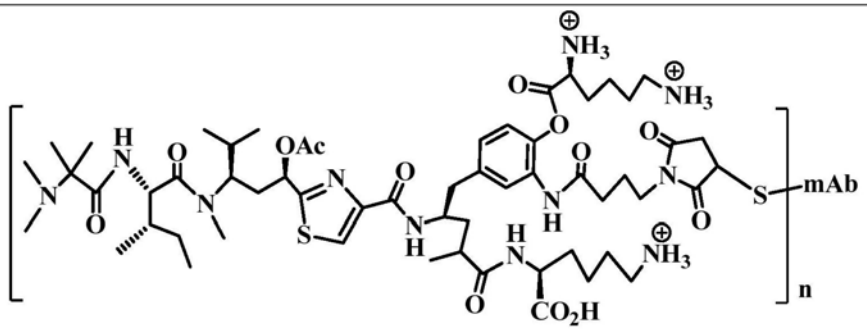
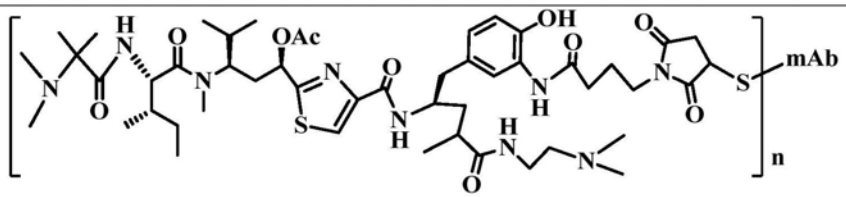
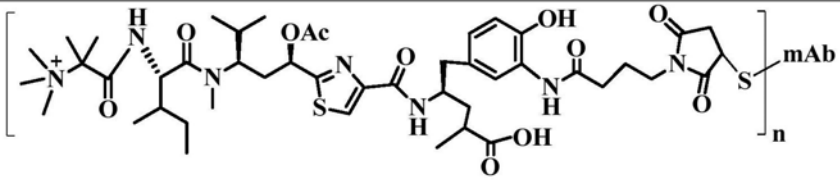
[1319]

414	 IC_{50} = 0.51 nM (DAR= 3.8)
444	 IC_{50} =0.22nM (DAR= 3.7)
455	 IC_{50} =0.06nM (DAR= 3.8)
467	 IC_{50} =0.07nM (DAR= 3.6)
474	 IC_{50} =0.31nM (DAR= 3.8)
480	 IC_{50} =0.24nM (DAR= 3.7)
486	 IC_{50} =0.62nM (DAR= 3.5)

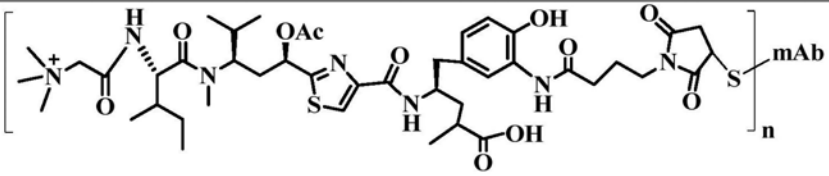
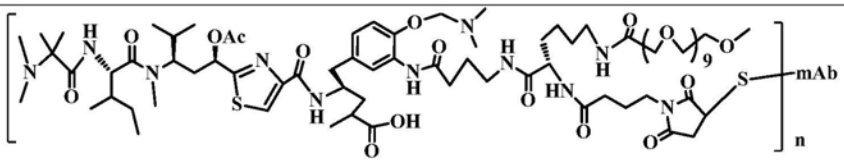
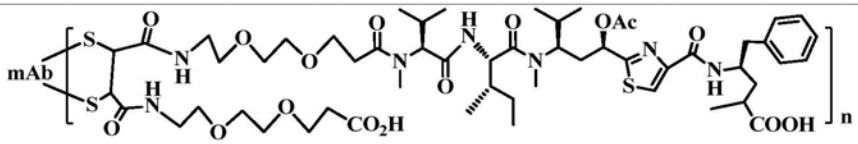
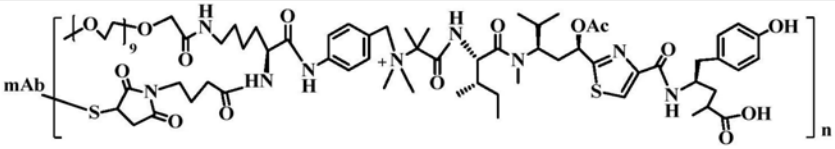
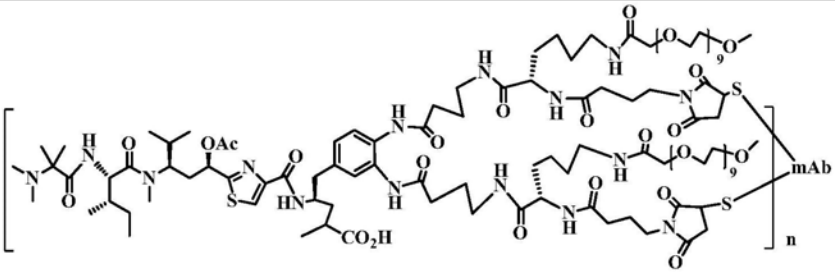
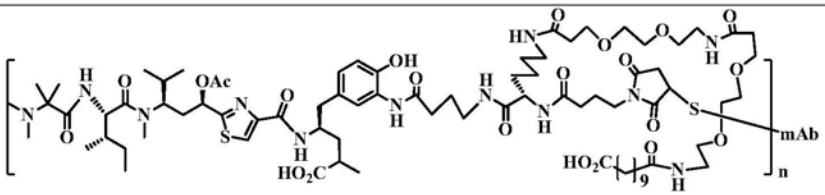
[1320]

493	 IC_{50} =0.15nM (DAR= 3.8)
500	 IC_{50} = 0.37 nM (DAR= 3.6)
522	 IC_{50} =0.51nM (DAR= 3.5)
530	 IC_{50} =0.18nM (DAR= 3.7)
534	 IC_{50} = 0.11 nM (DAR= 3.6)
546	 IC_{50} = 3.56 nM (DAR= 3.8)
550	 IC_{50} =9.01 nM (DAR= 3.8)

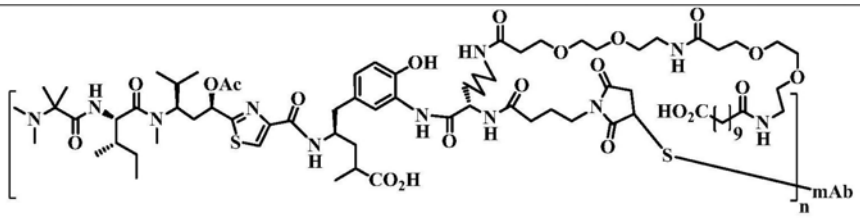
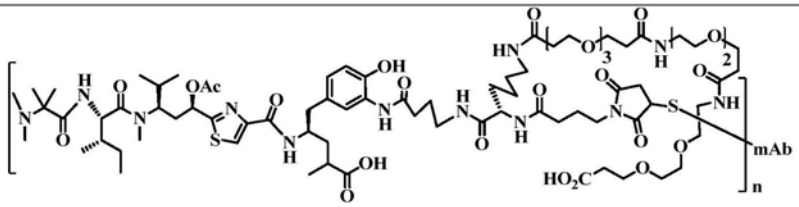
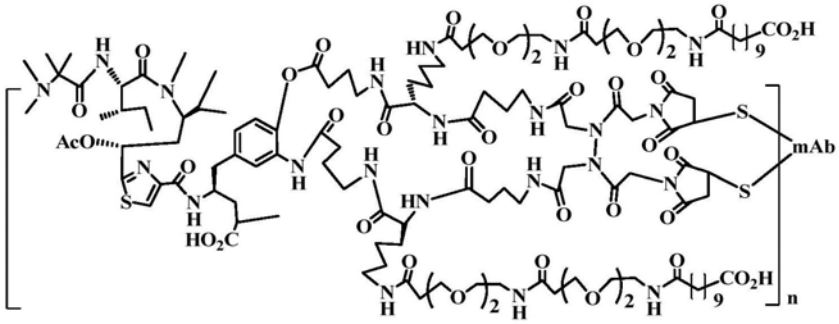
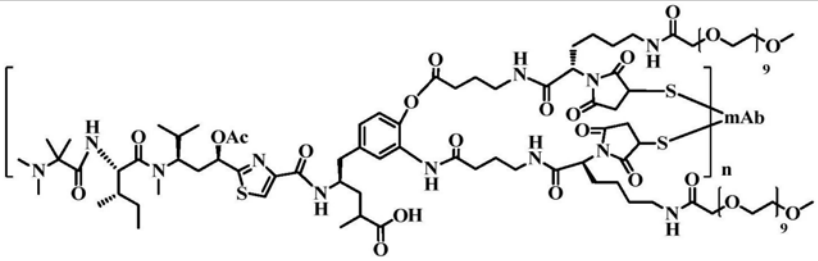
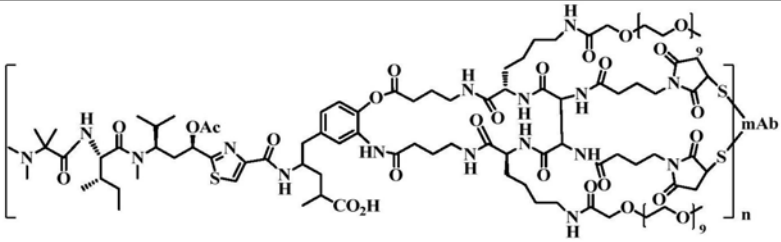
[1321]

556	 IC_{50} =3.51nM (DAR= 3.6)
560	 IC_{50} =2.3 nM (DAR= 3.8)
564	 IC_{50} =4.21nM (DAR= 3.8)
574	 IC_{50} = 1.35 nM (DAR= 3.7)
584	 IC_{50} =0.32nM (DAR= 3.7)

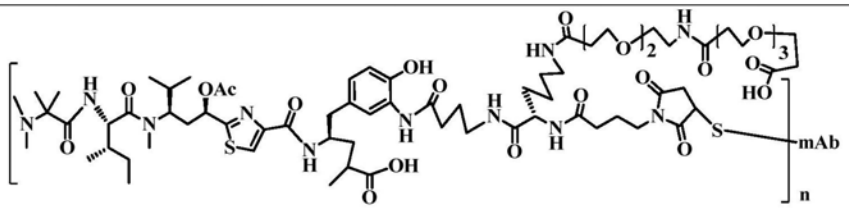
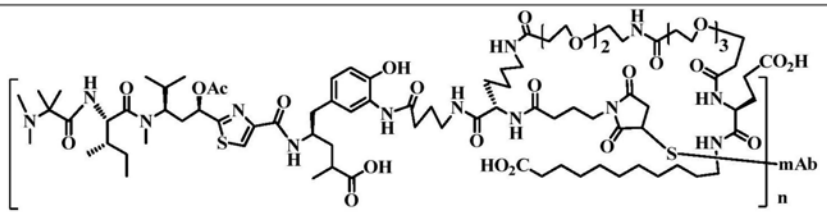
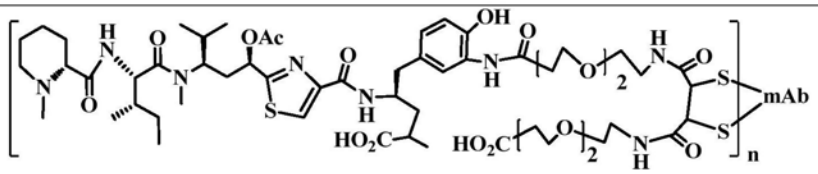
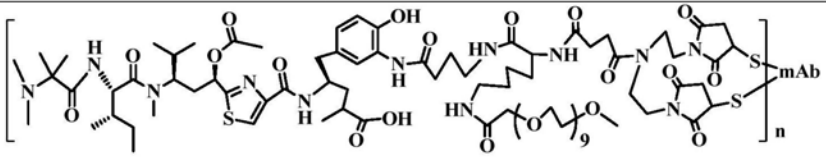
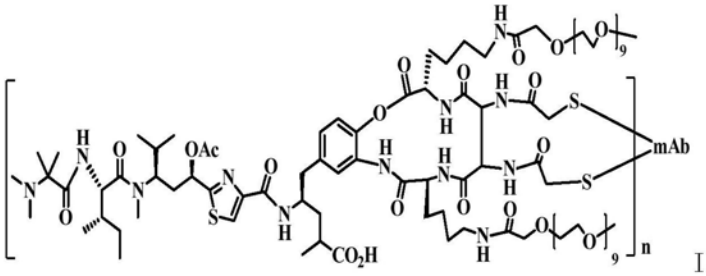
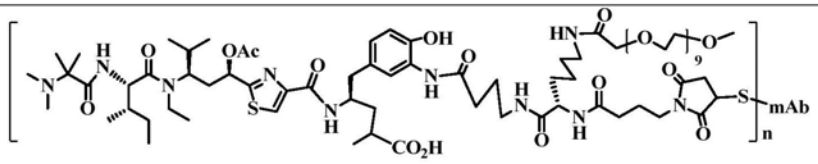
[1322]

593	 IC_{50} =0.22nM (DAR= 3.8)
601	 IC_{50} = 2.31 nM (DAR= 3.6)
613	 IC_{50} =11.2 nM (DAR= 3.6)
619	 IC_{50} =0.98 nM (DAR= 3.7)
626	 IC_{50} = 10.5 nM (DAR= 3.8)
637	 IC_{50} = 0.23 nM (DAR= 3.6)

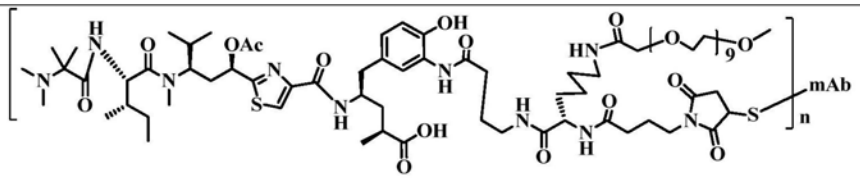
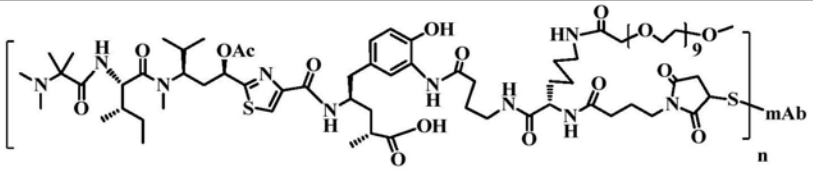
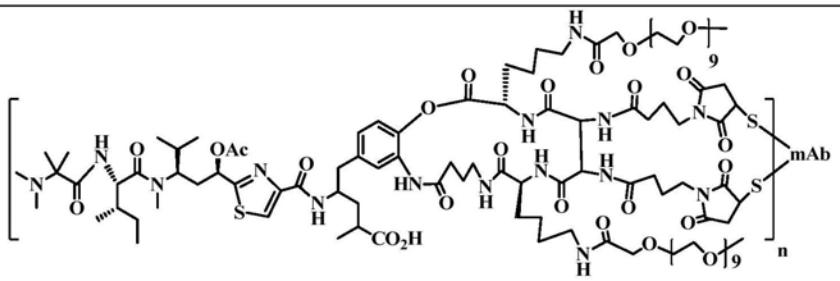
[1323]

641	 IC_{50} = 1.35 nM (DAR= 3.6)
650	 IC_{50} = 0.73 nM (DAR= 3.6)
669	 IC_{50} = 1.08 nM (DAR= 3.9)
673	 IC_{50} =0.42nM (DAR= 3.8)
680	 IC_{50} =2.7 nM (DAR= 3.9)

[1324]

687	 IC_{50} = 0.87 nM (DAR= 3.8)
692	 IC_{50} = 1.36 nM (DAR= 3.6)
E1	 IC_{50} =8.21nM (DAR= 3.6)
E2	 IC_{50} = 0.47 nM (DAR= 3.9)
E3	 IC_{50} = 11.5 nM (DAR= 3.6)
E4	 IC_{50} = 0.27 nM (DAR= 3.6)

[1325]

E5	 IC_{50} =0.17 nM (DAR= 3.7)
E6	 IC_{50} = 0.43 nM (DAR= 3.6)
E7	 IC_{50} = 1.65 nM (DAR= 3.8)

[1326] 实施例294.体内抗肿瘤活性(BALB/c裸鼠,携带NCI-N87异种移植肿瘤)

[1327] 在人胃癌N-87细胞系肿瘤异种移植模型中,评估偶联物474、486、493、601、626、637、641、669、673、680和692以及T-DM1在体内的疗效。将5周龄的雌性BALB/c裸鼠(78只动物)在右肩下区域皮下接种N-87癌细胞(细胞数5×10^6,置于0.1mL无血清培养基中)。让肿瘤生长8天至平均尺寸140mm^3。然后将动物随机分成13组(每组6只动物)。第一组小鼠作为对照组,注射磷酸盐缓冲液(PBS)。另12组分别静脉注射6mg/kg剂量的偶联物474、486、493、601、626、637、641、669、673、680、692和T-DM1。每3天或4天(每周两次)测量肿瘤的三个维度,并使用公式肿瘤体积=1/2(长×宽×高)计算肿瘤体积。同时测量动物的体重。当满足以下任何一个条件时,需要处死小鼠:(1)较治疗前体重,体重减轻超过20%,(2)肿瘤体积大于1500mm^3,(3)病得太重而无法进食和进水,或(4)皮肤坏死。如果没有看感知的肿瘤,则认为小鼠无肿瘤。

[1328] 结果绘制在图63中。所有的12个偶联物均未引起动物体重减轻。7个偶联物(673、637、650、692、474、493和486)表现出优于比T-DM1的抗肿瘤活性。化合物474、493和486组中的所有动物的肿瘤在第16天至第28天几乎测量不到。相比之下,相同剂量的T-DM1不能消除肿瘤,仅抑制肿瘤生长26天。6mg/kg剂量的偶联物物601、669、680、673、637、650和692不能完全根除肿瘤,它们抑制肿瘤生长情况如下:

偶联物	肿瘤生长延迟时间
T-DM1	26 天
626	< 4 天
601	13 天
669	18 天
680	25 天
[1329] **673**	>30 天
637	>30 天
650	>30 天
692	>30 天
474	>30 天
493	>30 天
486	>30 天

[1330] 实施例295.含支链连接体的偶联物及常规偶联物(化合物133)和T-DM1在小鼠血清中稳定性对比

[1331] 将6-7周龄的60只雌性ICR小鼠分成4组。每组包括15只小鼠，用于一个ADC药物的PK研究。将这15只小鼠进一步随机分成三组(n＝5)。每只小鼠分别静脉注射偶联物T-DM1、133、680和692，剂量为10mg/kg。血液采集遵循NCI的囓齿动物采血指南。原则上，每组中的小鼠依次采血，避免一只在24小时内采血超过两次。用70μL毛细血管，在给药前(0时)以及用药0.083、0.25、0.5、1、4、8、24、48、96、168、312和504小时后，从眼眶后窦中取血。通过特异性ELISA技术分析血浆样品的总抗体和偶联药物的抗体。简而言之，以如下方法测量小鼠血清中偶联的抗体或的总抗体浓度：将96孔ELISA板分别在4℃下用抗DM1抗体，抗Tubulysin抗体或抗Her2的Fab抗体包被过夜(在pH 7.2、10mM PBS中浓度为1μg/mL)。然后将孔板用洗涤缓冲液PBS-T(PBS/0.02％的吐温20)洗涤三次，然后用1％(w/v)BSA/PBS-T稀释缓冲液在37℃封闭1小时。移除封闭缓冲液后，将标准品或小鼠血清样品用1％BSA/PBS-T的缓冲液中稀释(每个重复三份)，在37℃下孵育1小时，然后在将测定板洗涤后，加入AP-偶联的驴抗人体抗体，37℃下放置30分钟。再次洗涤测定板，接着加入用于显色的pNPP底物，然后用1mol/L氢氧化钠淬灭显色反应，在405nm波长的酶标仪上读数。从标准曲线的四参数曲线拟合获得偶联的抗体或总抗体的浓度。

[1332] 结果如图64所示，给药ADC后，总抗体和偶联药物抗体的PK行为表现为典型的两相清除曲线。用药后8小时后血浆和外周组织之间等值。消除期出现在用药后24小时后，并持续至最后的取样时间点。总之，偶联物T-DM1、133、680和692的Auc_{last}分别为14981，14857，17012和17212hr·μg/kg。所有偶联物的分布体积是总血液体积的两倍。偶联物的清除率(CL)为0.59，0.59，0.49和0.46mL/hr/kg，几乎是总抗体的一半。偶联物692和680的偶联抗体和总抗体的清除率小于T-DM1和常规偶联物133，这表明含支链偶联物的抗体比常规偶联

物在小鼠血清中更稳定。

[1333] 实施例296.含支链的偶联物和常规偶联物(化合物133和T-DM1)的肝毒性对比。将6-7周龄的84只雌性ICR小鼠分成14组。每组包括6只小鼠用于肝脏毒性研究。第一组小鼠作为对照组,注射磷酸盐缓冲液(PBS)。其它13组分别注射偶联物133、474、486、493、601、626、637、641、669、673、680、692和T-DM1,静脉注射,剂量200mg/kg。血液采集遵循NCI的嚙齿动物采血指南。通常而言,给药后第5天和第12天通过小鼠的眶后窦采血,离心以获得血清。使用PUS-2018半自动生化分析仪,分析天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)和碱性磷酸酶(ALP)的水平。根据制造商的建议,通过跟随反应动力学建立参考值。平均结果如下表2所示:

[1334]

化合物	AST (IU/mL)		ALT(IU/mL)		ALP(IU/mL)	
	Day 5	Day 12	Day 5	Day 12	Day 5	Day 12
PBS	91	95	46	36	186	179
T-DM1	3276	1509	412	453	495	502
133	3683	1762	461	523	498	382
474	1283	276	184	125	288	228

[1335]

486	1873	1539	201	263	381	301
493	1521	602	197	165	323	287
601	111	105	86	46	206	189
626	151	108	96	49	197	193
637	851	178	186	79	267	187
641	918	183	186	87	287	172
650	832	173	186	78	279	167
673	653	158	136	59	207	181
680	193	98	76	39	256	189
692	238	91	106	37	273	189

[1336] 肝脏毒性的结果表明,在150mg/kg的高剂量下,含有支链的偶联物(474、486、493、601、626、637、641、669、673、680和692)要比更低剂量的T-DM1和常规偶联物133的毒性低。由于偶联物474、486、493、601、626、637、641、669、673、680和692具有比T-DM1更好的体内活性,因此整体上,偶联物474、486、493、601、626、637、641、669、673、680和692的治疗窗口将明显大于T-DM1。

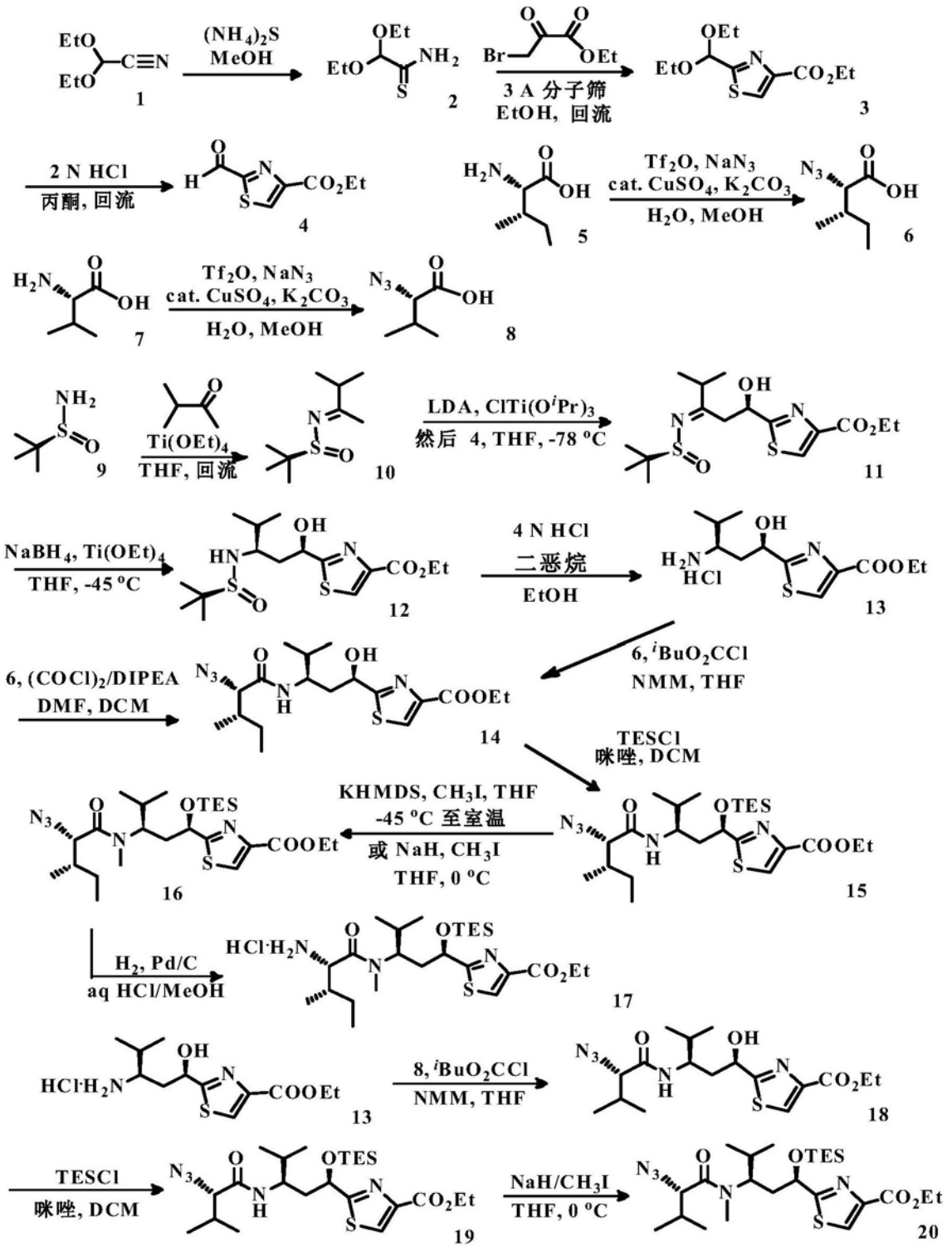

(NH4)2S
MeOH
3 A 分子筛
EtOH, 回流
2 N HCl
丙酮, 回流
Tf2O, NaN3
cat. CuSO4, K2CO3
H2O, MeOH
Ti(OEt)4
THF, 回流
LDA, ClTi(OiPr)3
然后 4, THF, -78 °C
NaBH4, Ti(OEt)4
THF, -45 °C
4 N HCl
二恶烷
EtOH
6, (COCl)2/DIPEA
DMF, DCM
6, iBuO2CCl
NMM, THF
TESCl
咪唑, DCM
KHMDS, CH3I, THF
-45 °C 至室温
或 NaH, CH3I
THF, 0 °C
H2, Pd/C
aq HCl/MeOH
8, iBuO2CCl
NMM, THF
NaH/CH3I
THF, 0 °C

图1

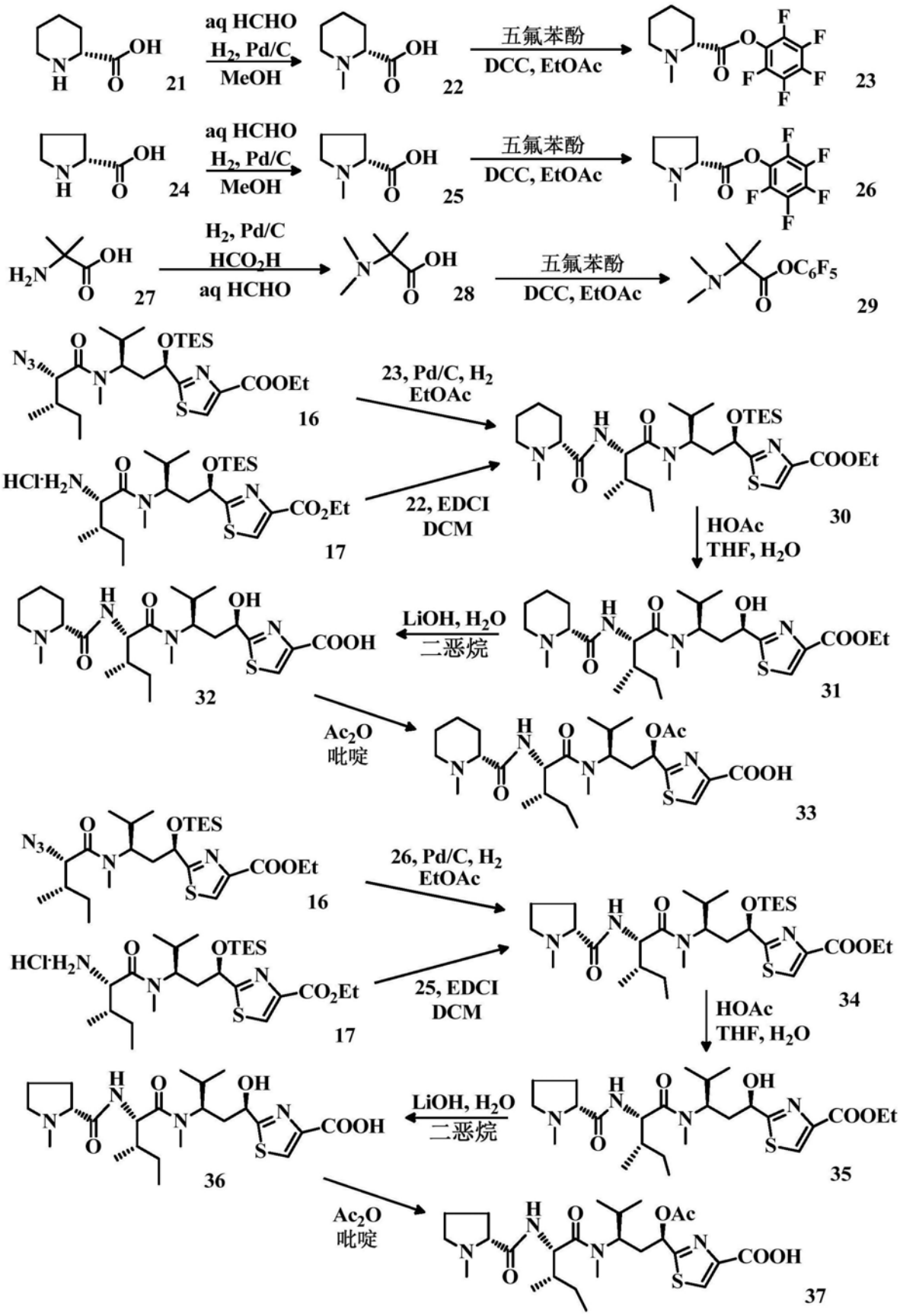

aq HCHO
H2, Pd/C
MeOH
五氟苯酚
DCC, EtOAc
H2, Pd/C
HCO2H
aq HCHO
23, Pd/C, H2
EtOAc
22, EDCI
DCM
HOAc
THF, H2O
LiOH, H2O
二恶烷
Ac2O
吡啶
26, Pd/C, H2
EtOAc
25, EDCI
DCM
21
22
23
24
25
26
27
28
29
16
17
30
31
32
33
34
35
36
37

图2

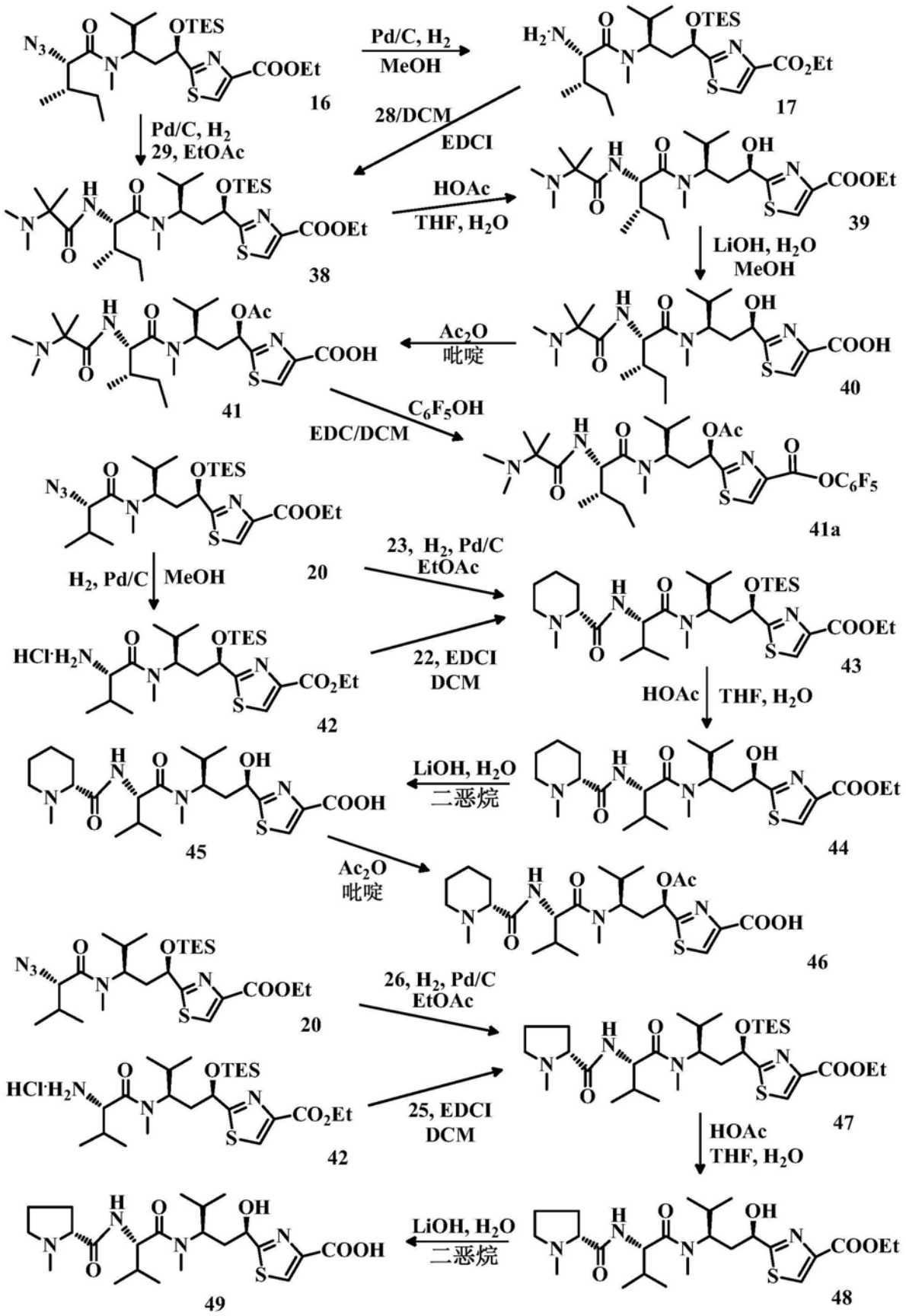

Pd/C, H2
MeOH
28/DCM
EDCI
Pd/C, H2
29, EtOAc
HOAc
THF, H2O
LiOH, H2O
MeOH
Ac2O
吡啶
C6F5OH
EDC/DCM
23, H2, Pd/C
EtOAc
H2, Pd/C
MeOH
22, EDCI
DCM
HOAc
THF, H2O
LiOH, H2O
二恶烷
Ac2O
吡啶
26, H2, Pd/C
EtOAc
25, EDCI
DCM
HOAc
THF, H2O
LiOH, H2O
二恶烷
16
17
38
39
40
41
41a
20
42
43
44
45
46
20
42
47
48
49

图3

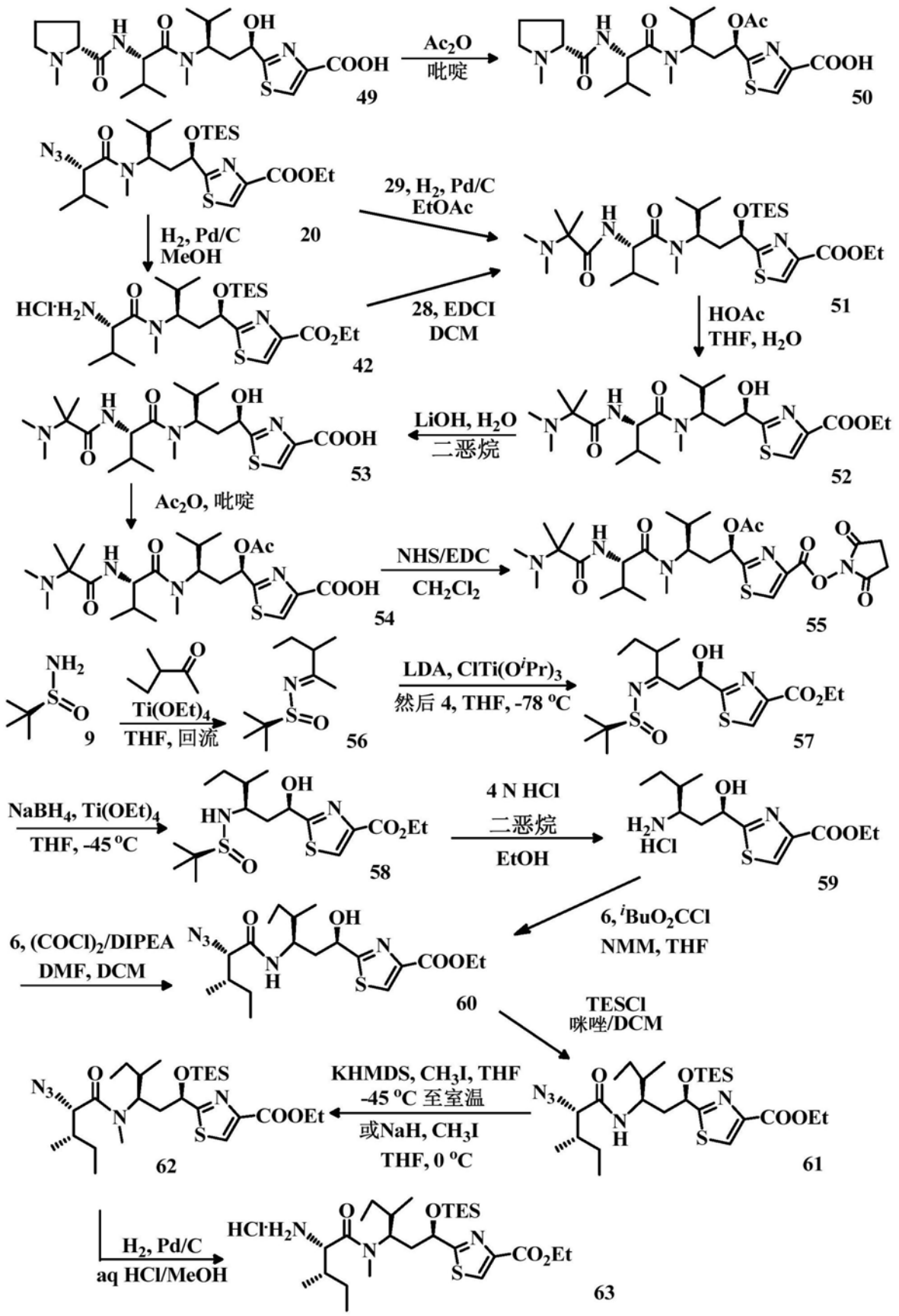

Ac2O
吡啶
49
50
29, H2, Pd/C
EtOAc
H2, Pd/C
MeOH
20
28, EDCI
DCM
42
51
HOAc
THF, H2O
LiOH, H2O
二恶烷
53
52
Ac2O, 吡啶
NHS/EDC
CH2Cl2
54
55
Ti(OEt)4
THF, 回流
9
56
LDA, ClTi(OiPr)3
然后 4, THF, -78 °C
57
NaBH4, Ti(OEt)4
THF, -45 °C
58
4 N HCl
二恶烷
EtOH
59
6, (COCl)2/DIPEA
DMF, DCM
60
6, iBuO2CCl
NMM, THF
TESCl
咪唑/DCM
KHMDS, CH3I, THF
-45 °C 至室温
或NaH, CH3I
THF, 0 °C
62
61
H2, Pd/C
aq HCl/MeOH
63

图4

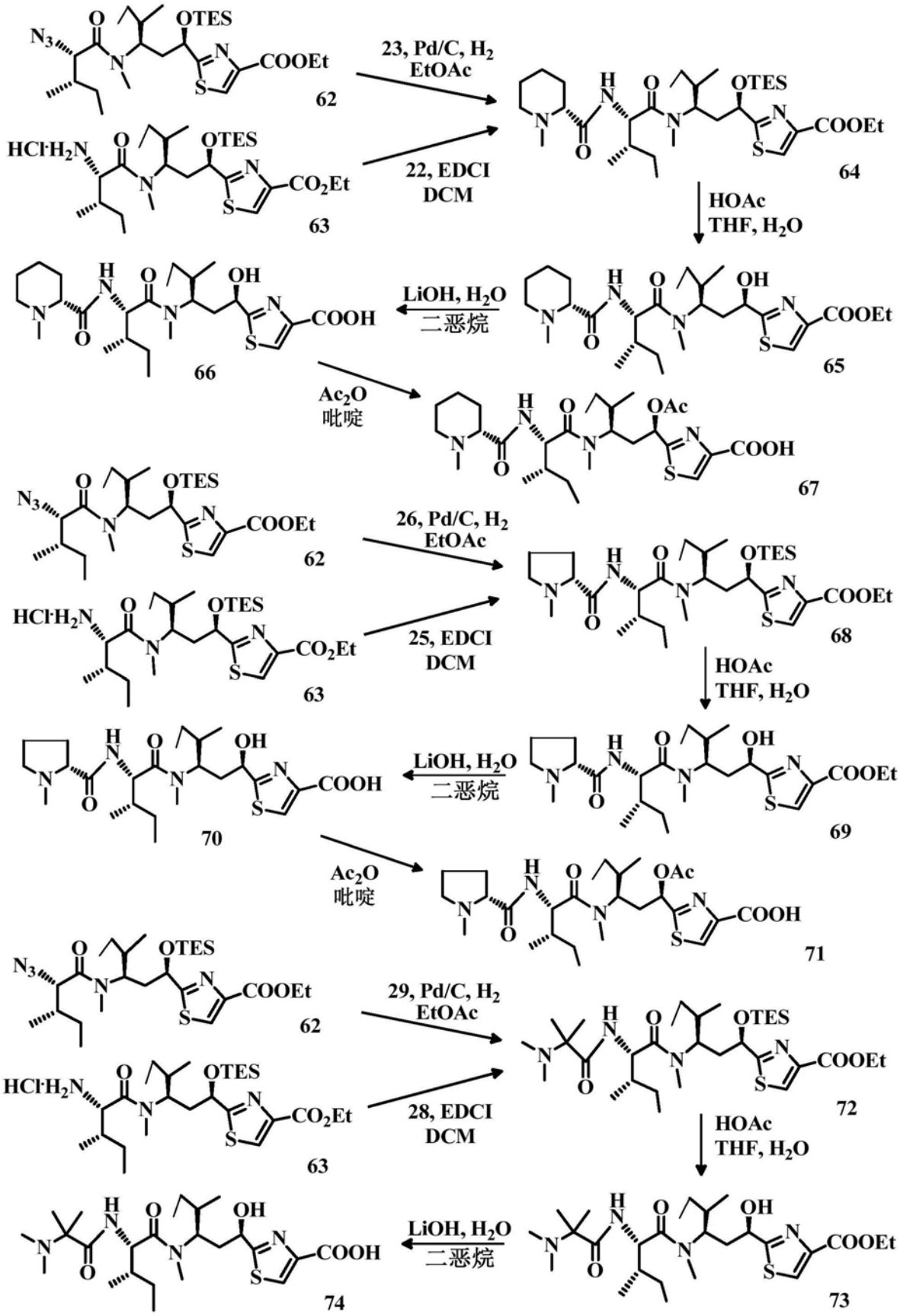

23, Pd/C, H2
EtOAc
22, EDCI
DCM
HOAc
THF, H2O
LiOH, H2O
二恶烷
Ac2O
吡啶
26, Pd/C, H2
EtOAc
25, EDCI
DCM
29, Pd/C, H2
EtOAc
28, EDCI
DCM
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74

图5

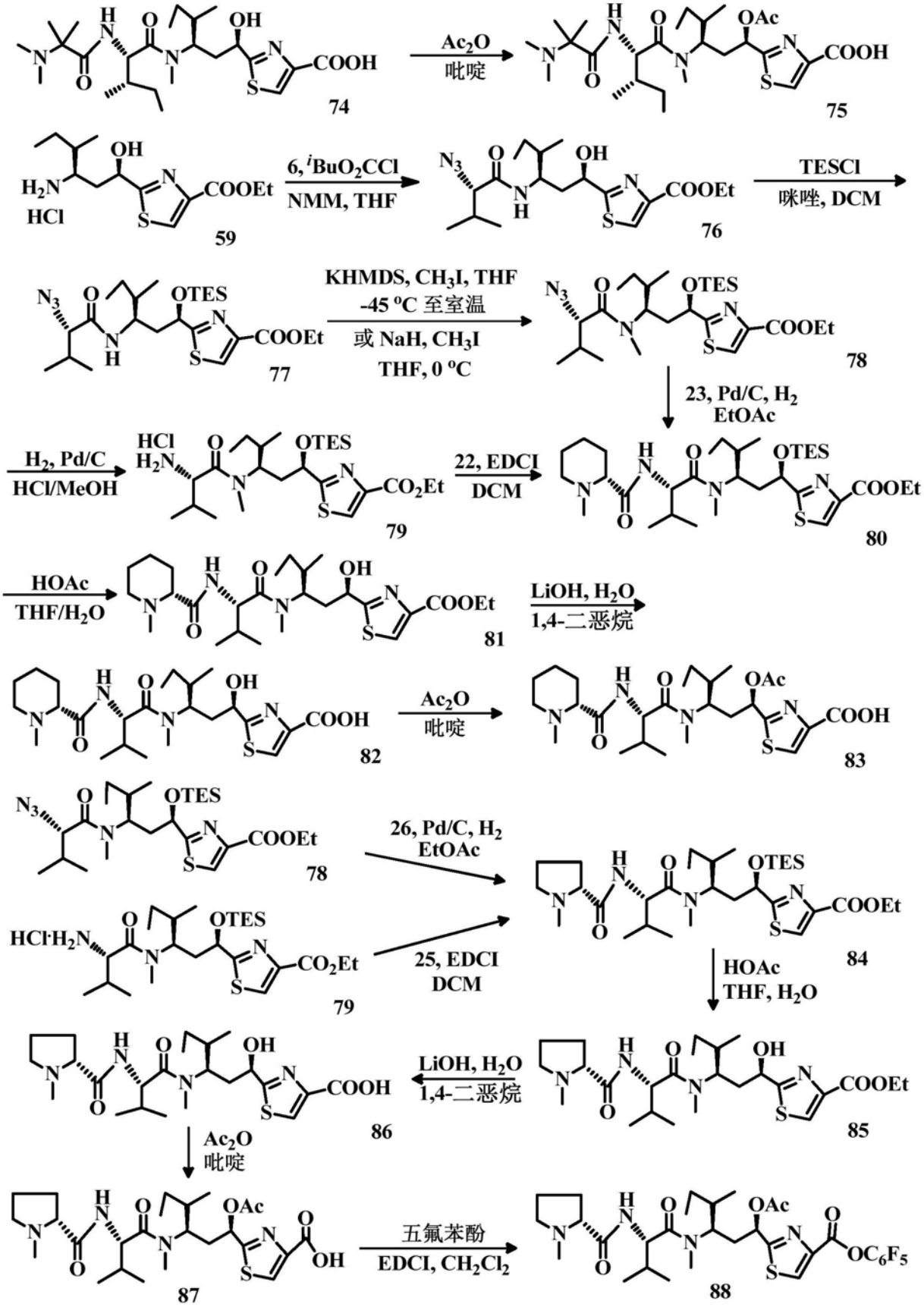

74
Ac2O
吡啶
75
59
6, iBuO2CCl
NMM, THF
76
TESCl
咪唑, DCM
77
KHMDS, CH3I, THF
-45 °C 至室温
或 NaH, CH3I
THF, 0 °C
78
23, Pd/C, H2
EtOAc
H2, Pd/C
HCl/MeOH
79
22, EDCI
DCM
80
HOAc
THF/H2O
81
LiOH, H2O
1,4-二恶烷
82
83
26, Pd/C, H2
EtOAc
25, EDCI
DCM
84
HOAc
THF, H2O
85
86
87
五氟苯酚
EDCI, CH2Cl2
88

图6

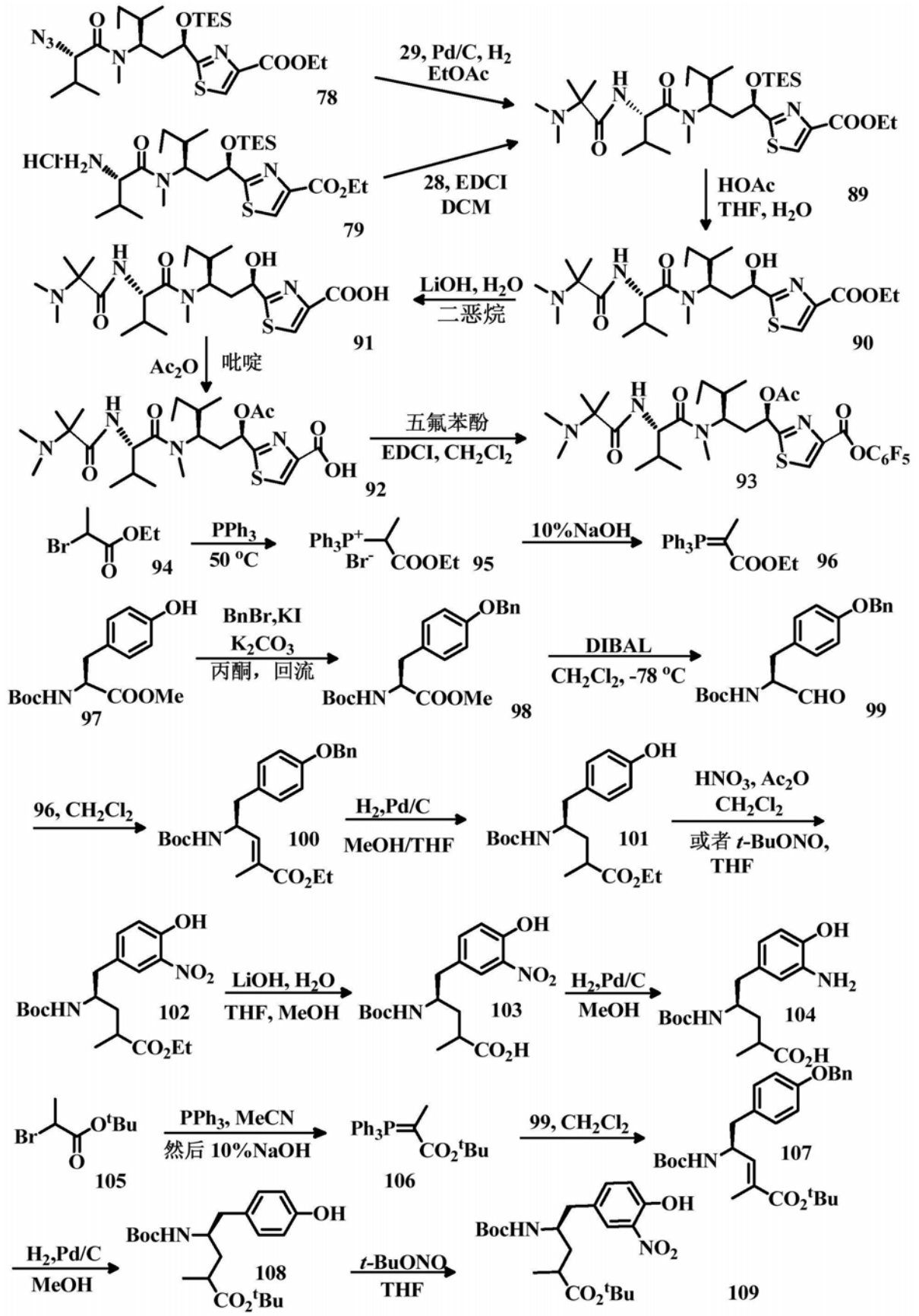

29, Pd/C, H2
EtOAc
28, EDCI
DCM
HOAc
THF, H2O
LiOH, H2O
二恶烷
Ac2O
吡啶
五氟苯酚
EDCI, CH2Cl2
PPh3
50 °C
10%NaOH
BnBr,KI
K2CO3
丙酮，回流
DIBAL
CH2Cl2, -78 °C
96, CH2Cl2
H2,Pd/C
MeOH/THF
HNO3, Ac2O
CH2Cl2
或者 t-BuONO,
THF
LiOH, H2O
THF, MeOH
H2,Pd/C
MeOH
PPh3, MeCN
然后 10%NaOH
99, CH2Cl2
t-BuONO
THF
78
79
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109

图7

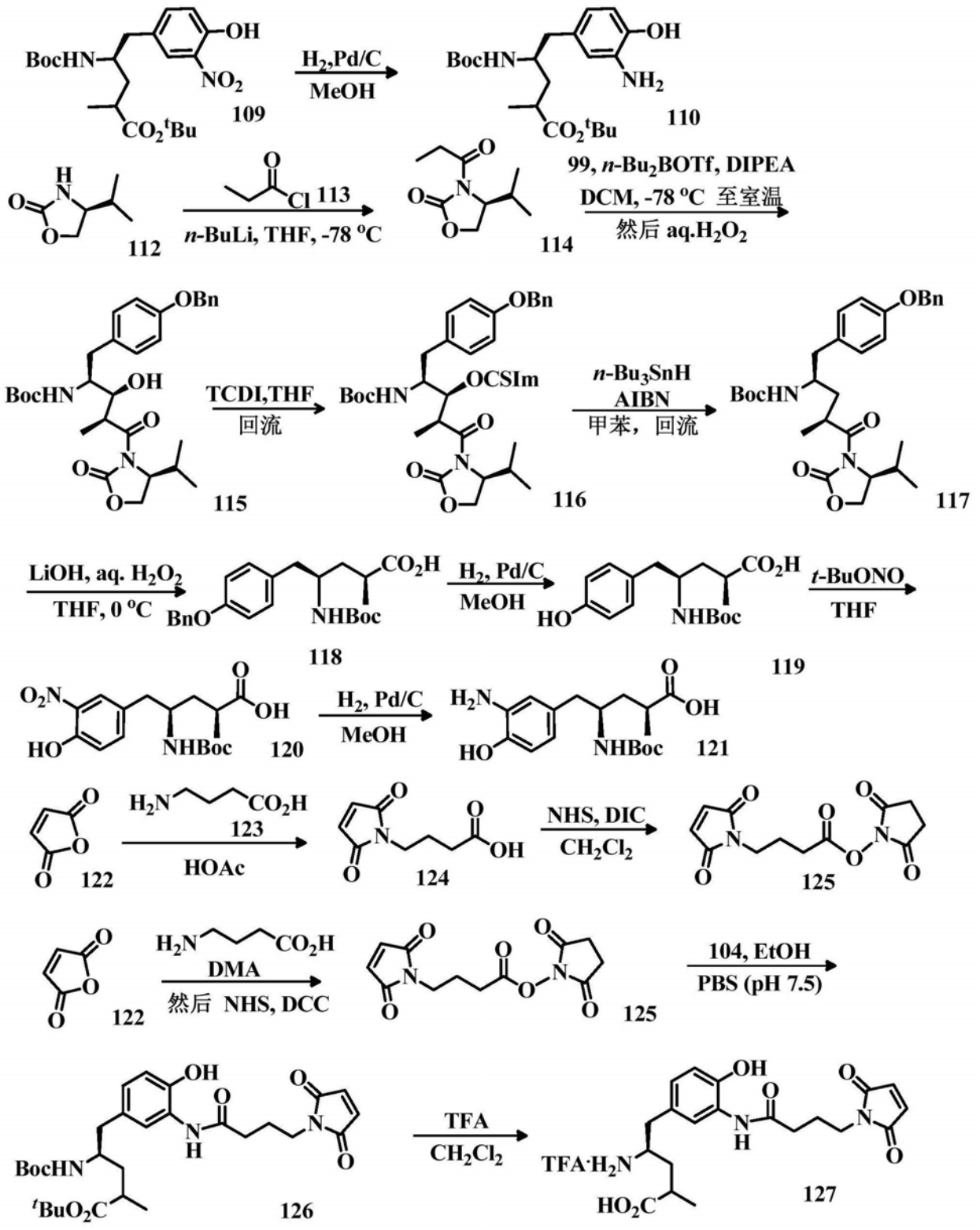

BocHN
OH
NO2
CO2tBu
109
H2,Pd/C
MeOH
NH2
110
112
113
n-BuLi, THF, -78 °C
114
99, n-Bu2BOTf, DIPEA
DCM, -78 °C 至室温
然后 aq.H2O2
OBn
115
TCDI,THF
回流
OCSIm
116
n-Bu3SnH
AIBN
甲苯，回流
117
LiOH, aq. H2O2
THF, 0 °C
BnO
CO2H
NHBoc
118
H2, Pd/C
MeOH
HO
119
t-BuONO
THF
O2N
120
H2N
121
122
123
HOAc
124
NHS, DIC
CH2Cl2
125
DMA
然后 NHS, DCC
104, EtOH
PBS (pH 7.5)
126
TFA
CH2Cl2
TFA·H2N
HO2C
127

图8

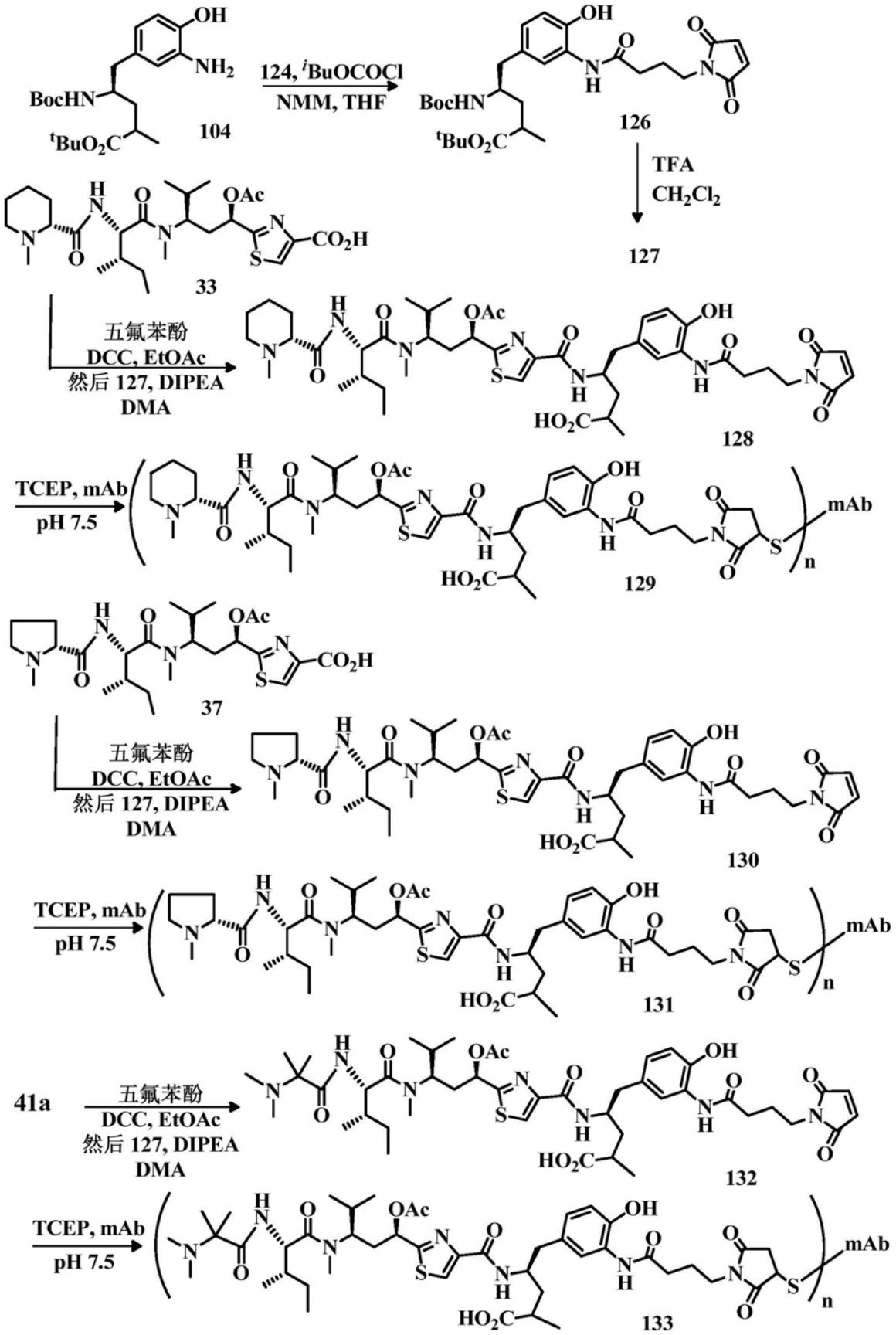

124, iBuOCOCl
NMM, THF
104
126
TFA
CH2Cl2
127
33
五氟苯酚
DCC, EtOAc
然后 127, DIPEA
DMA
128
TCEP, mAb
pH 7.5
129
37
130
131
41a
132
133
mAb

图9

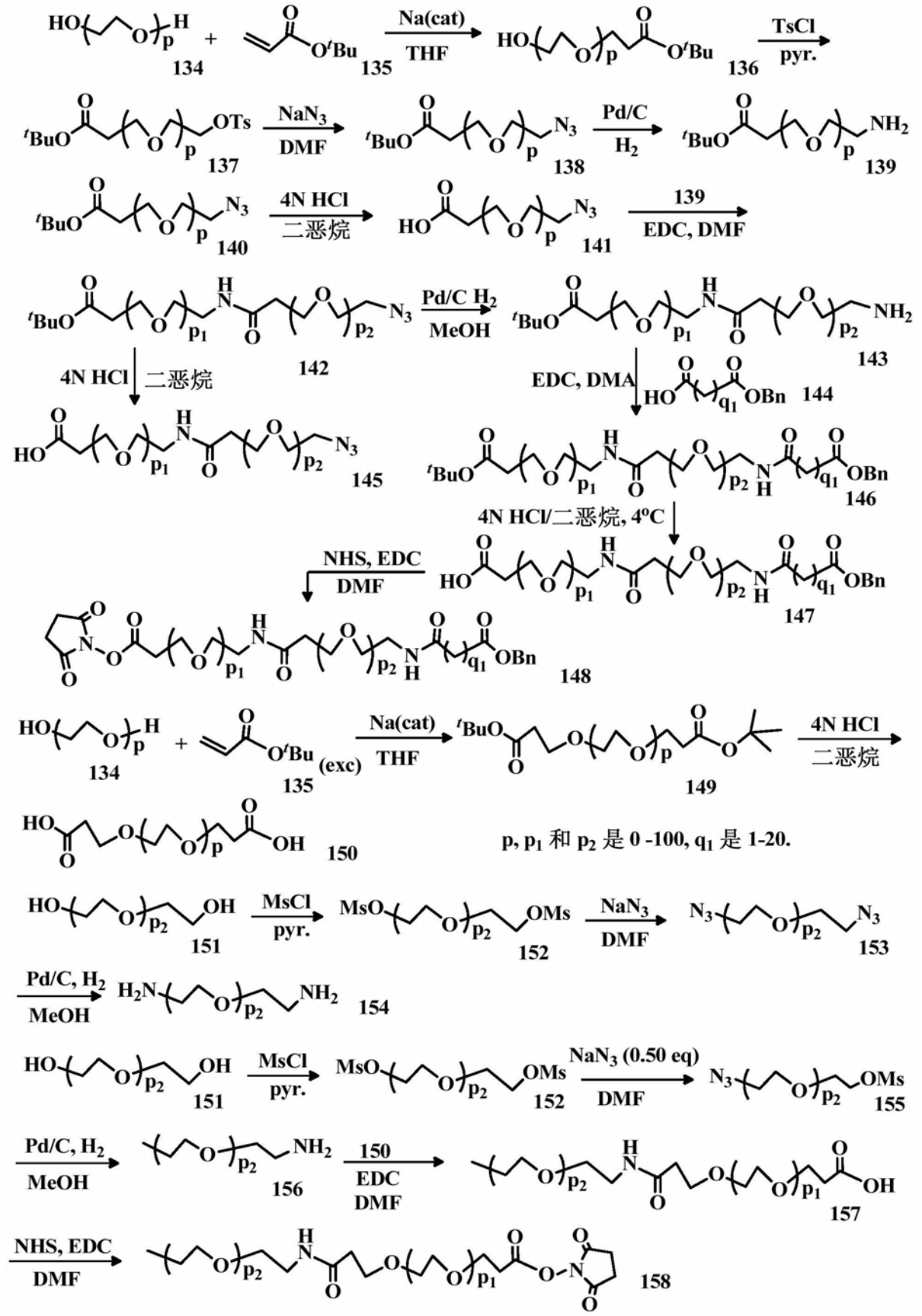

Na(cat)
THF
TsCl
pyr.
NaN3
DMF
Pd/C
H2
4N HCl
二恶烷
139
EDC, DMF
Pd/C H2
MeOH
EDC, DMA
4N HCl/二恶烷, 4°C
NHS, EDC
DMF
(exc)
p, p1 和 p2 是 0 -100, q1 是 1-20.
MsCl
pyr.
NaN3 (0.50 eq)
150
EDC
DMF

图10

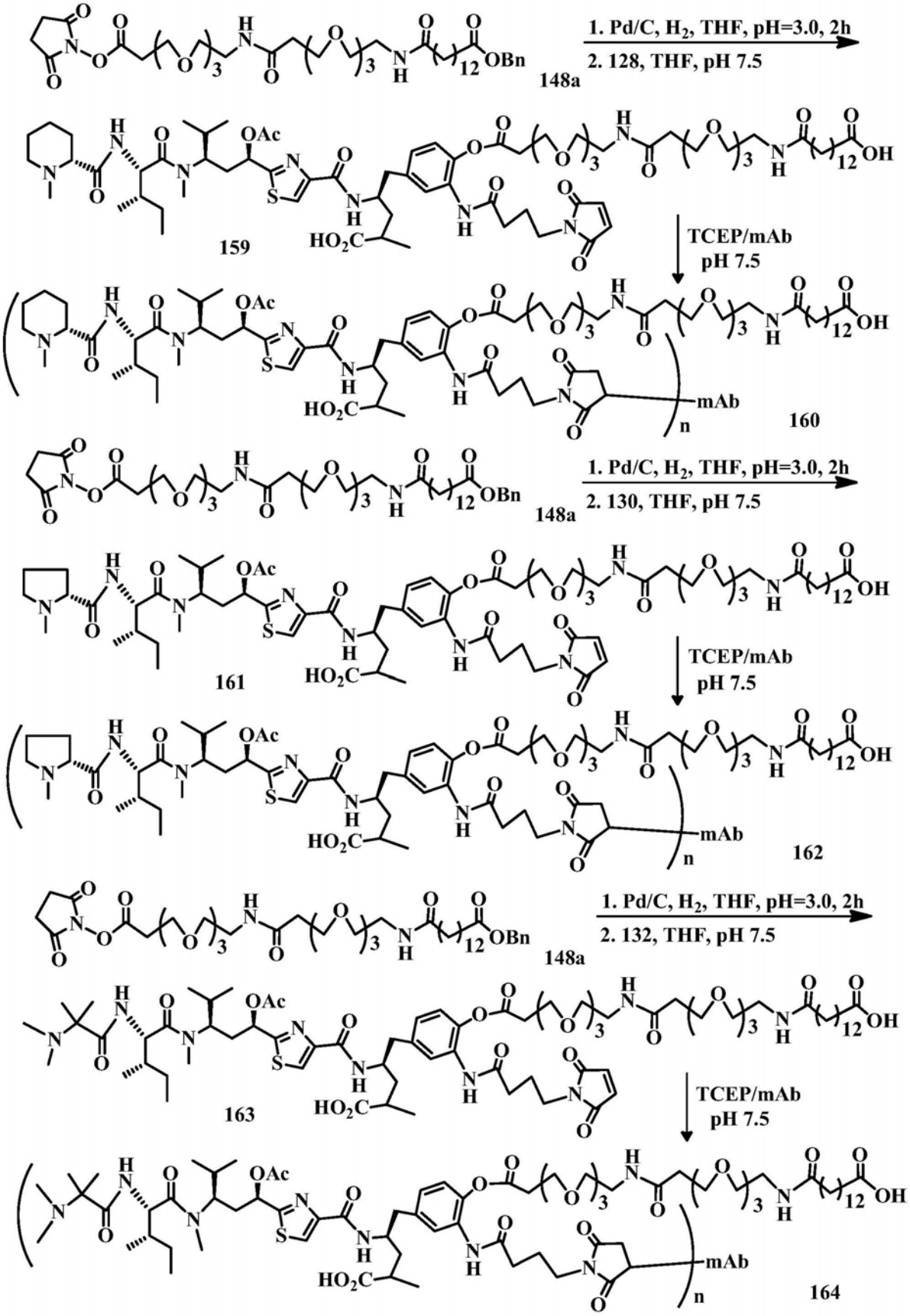

1. Pd/C, H2, THF, pH=3.0, 2h
2. 128, THF, pH 7.5
148a
159
TCEP/mAb
pH 7.5
160
1. Pd/C, H2, THF, pH=3.0, 2h
2. 130, THF, pH 7.5
148a
161
TCEP/mAb
pH 7.5
162
1. Pd/C, H2, THF, pH=3.0, 2h
2. 132, THF, pH 7.5
148a
163
TCEP/mAb
pH 7.5
164

图11

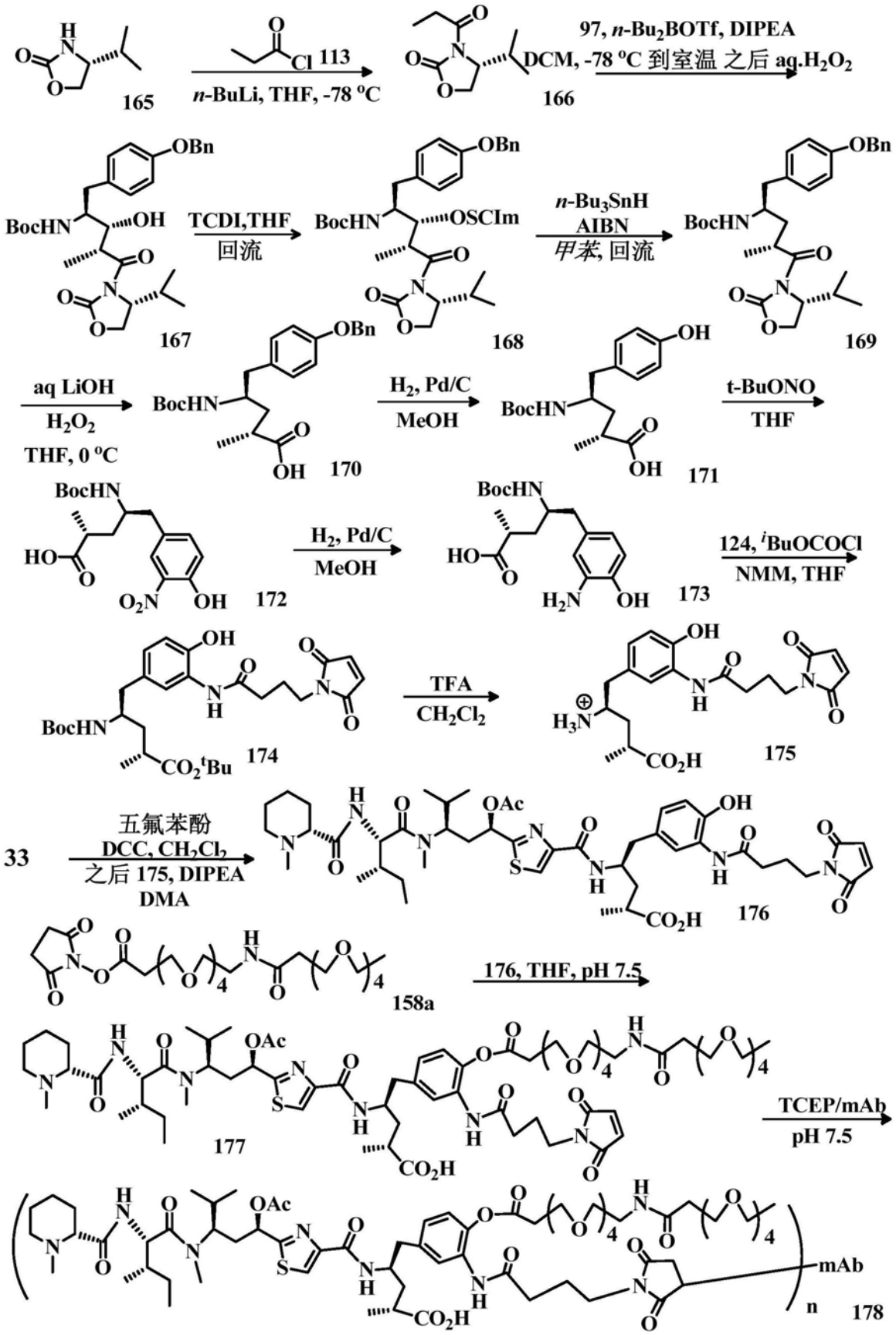

165
113
n-BuLi, THF, -78 °C
166
97, n-Bu2BOTf, DIPEA
DCM, -78 °C 到室温 之后 aq.H2O2
167
TCDI,THF
回流
168
n-Bu3SnH
AIBN
甲苯, 回流
169
aq LiOH
H2O2
THF, 0 °C
170
H2, Pd/C
MeOH
171
t-BuONO
THF
172
H2, Pd/C
MeOH
173
124, iBuOCOCl
NMM, THF
174
TFA
CH2Cl2
175
33
五氟苯酚
DCC, CH2Cl2
之后 175, DIPEA
DMA
176
158a
176, THF, pH 7.5
177
TCEP/mAb
pH 7.5
178

图12

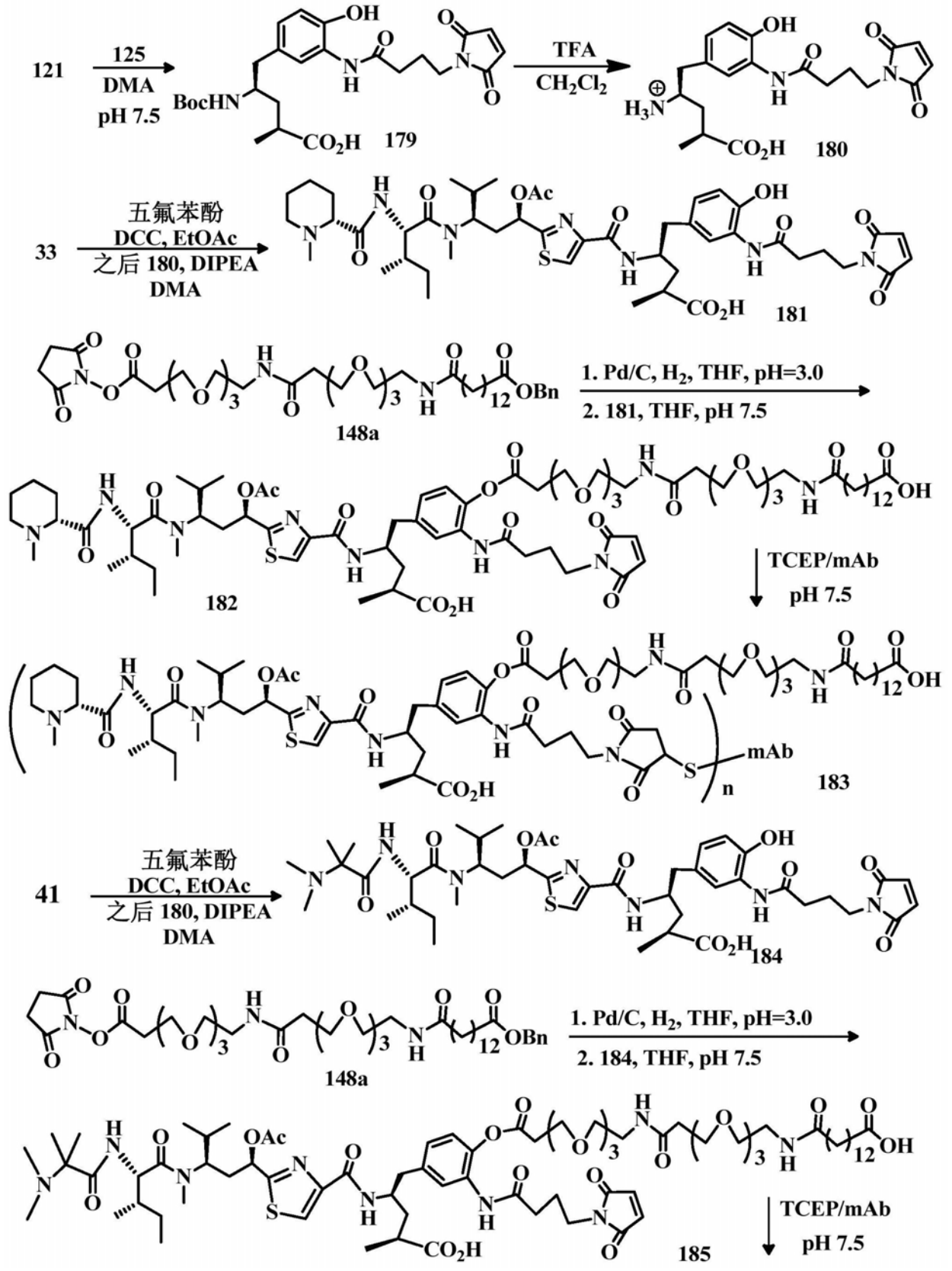

121
125
DMA
pH 7.5
BocHN
179
TFA
CH_2Cl_2
180
33
五氟苯酚
DCC, EtOAc
之后 180, DIPEA
DMA
181
148a
1. Pd/C, H_2, THF, pH=3.0
2. 181, THF, pH 7.5
182
TCEP/mAb
pH 7.5
183
41
184
2. 184, THF, pH 7.5
185

图13

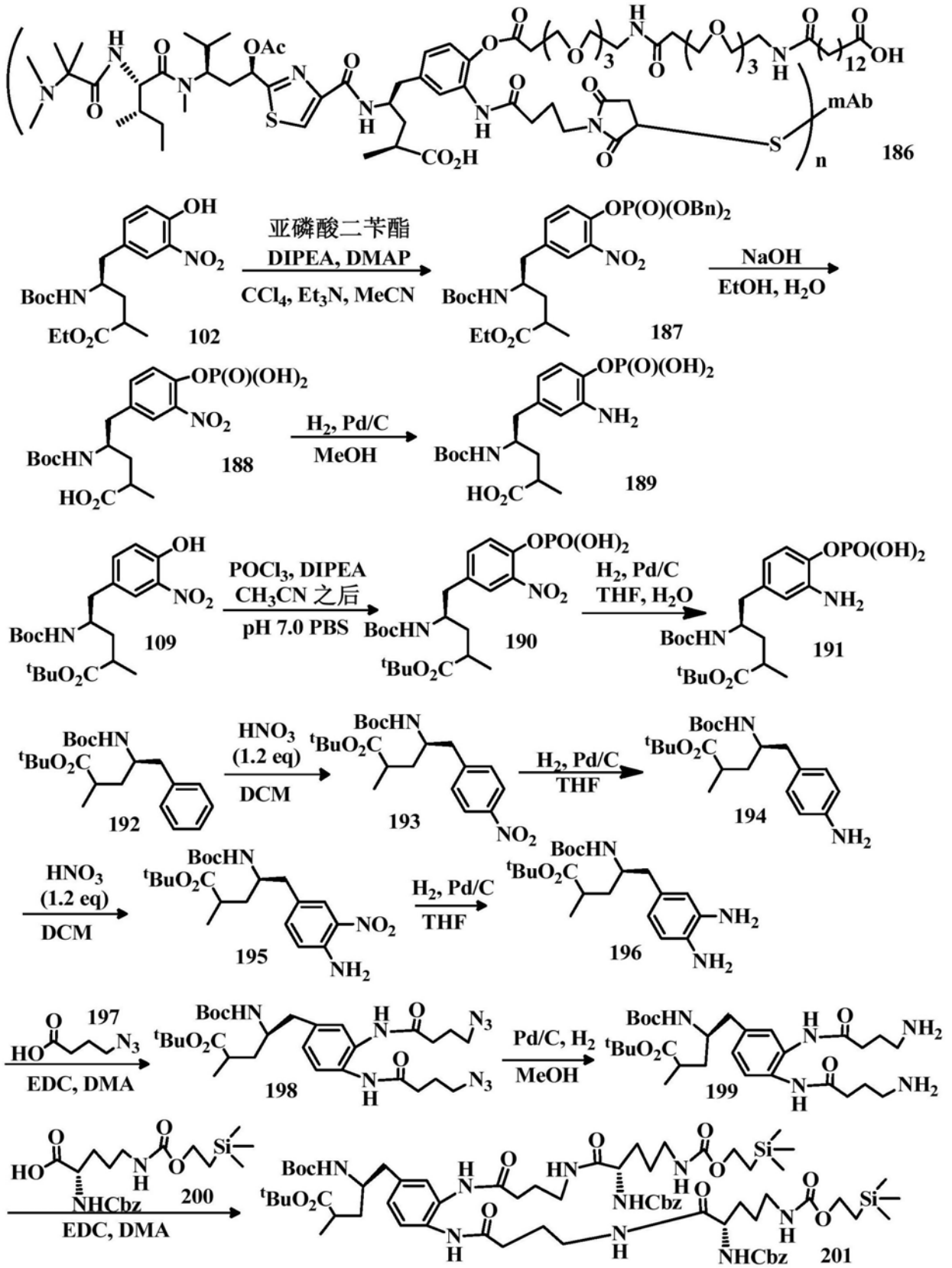

186
亚磷酸二苄酯
DIPEA, DMAP
CCl4, Et3N, MeCN
102
187
NaOH
EtOH, H2O
188
H2, Pd/C
MeOH
189
POCl3, DIPEA
CH3CN 之后
pH 7.0 PBS
109
190
H2, Pd/C
THF, H2O
191
192
HNO3
(1.2 eq)
DCM
193
H2, Pd/C
THF
194
195
196
197
EDC, DMA
198
Pd/C, H2
MeOH
199
200
201

图14

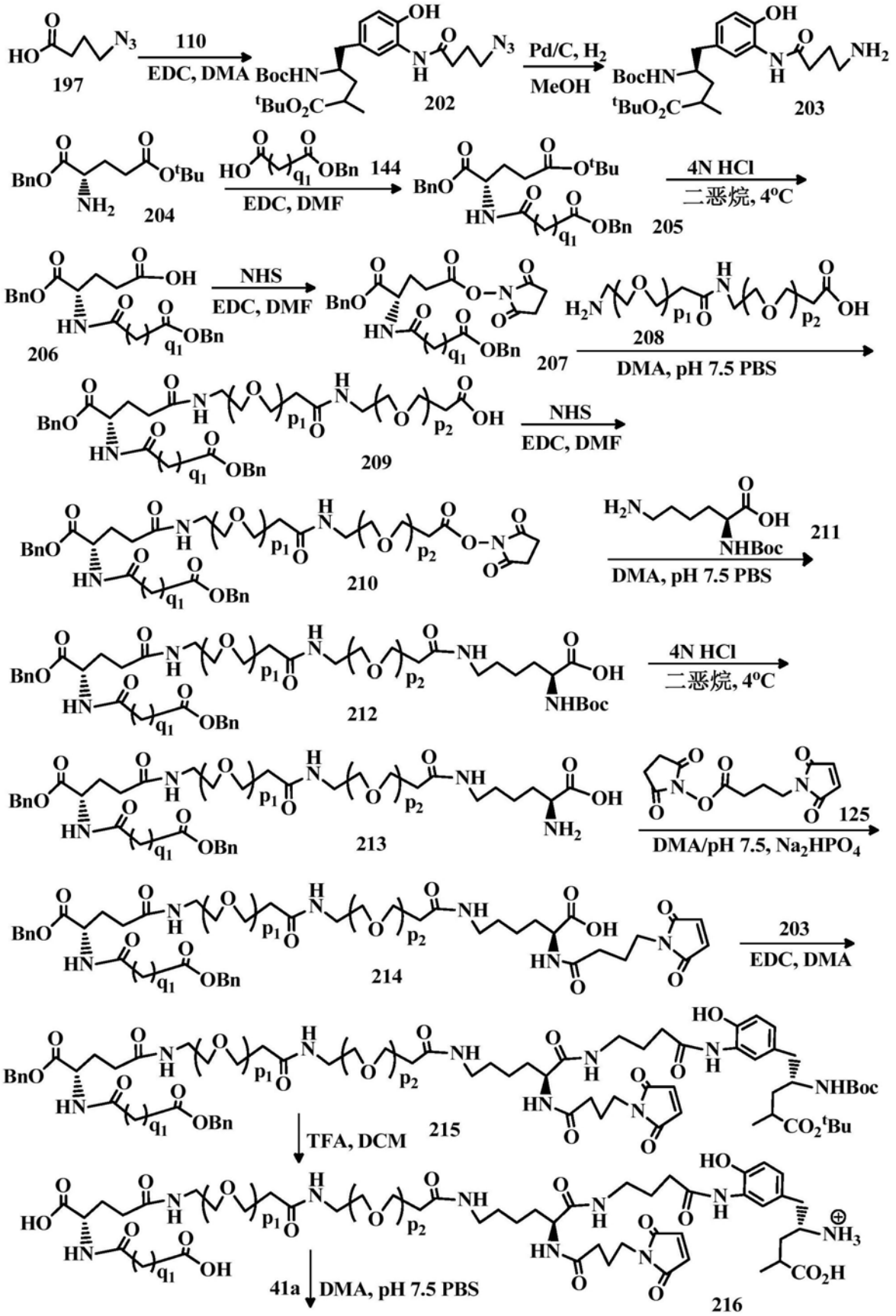

197
110
EDC, DMA
202
Pd/C, H2
MeOH
203
204
144
EDC, DMF
205
4N HCl
二恶烷, 4°C
206
NHS
EDC, DMF
207
208
DMA, pH 7.5 PBS
209
NHS
EDC, DMF
210
211
DMA, pH 7.5 PBS
212
4N HCl
二恶烷, 4°C
213
125
DMA/pH 7.5, Na2HPO4
214
203
EDC, DMA
215
TFA, DCM
41a
DMA, pH 7.5 PBS
216

图15

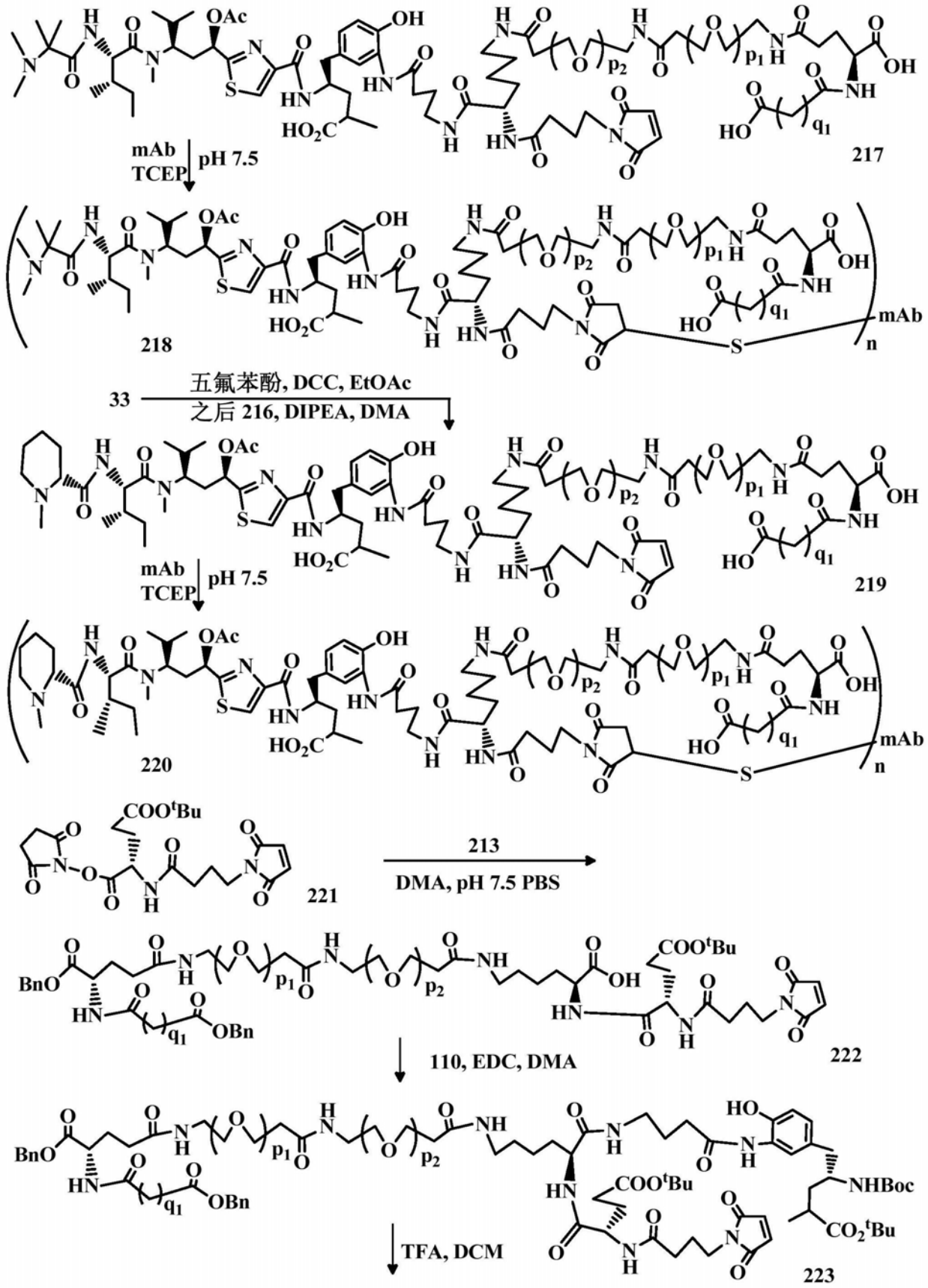

mAb
TCEP
pH 7.5
217
218
mAb
n
33
五氟苯酚, DCC, EtOAc
之后 216, DIPEA, DMA
219
220
221
213
DMA, pH 7.5 PBS
222
110, EDC, DMA
TFA, DCM
223

图16

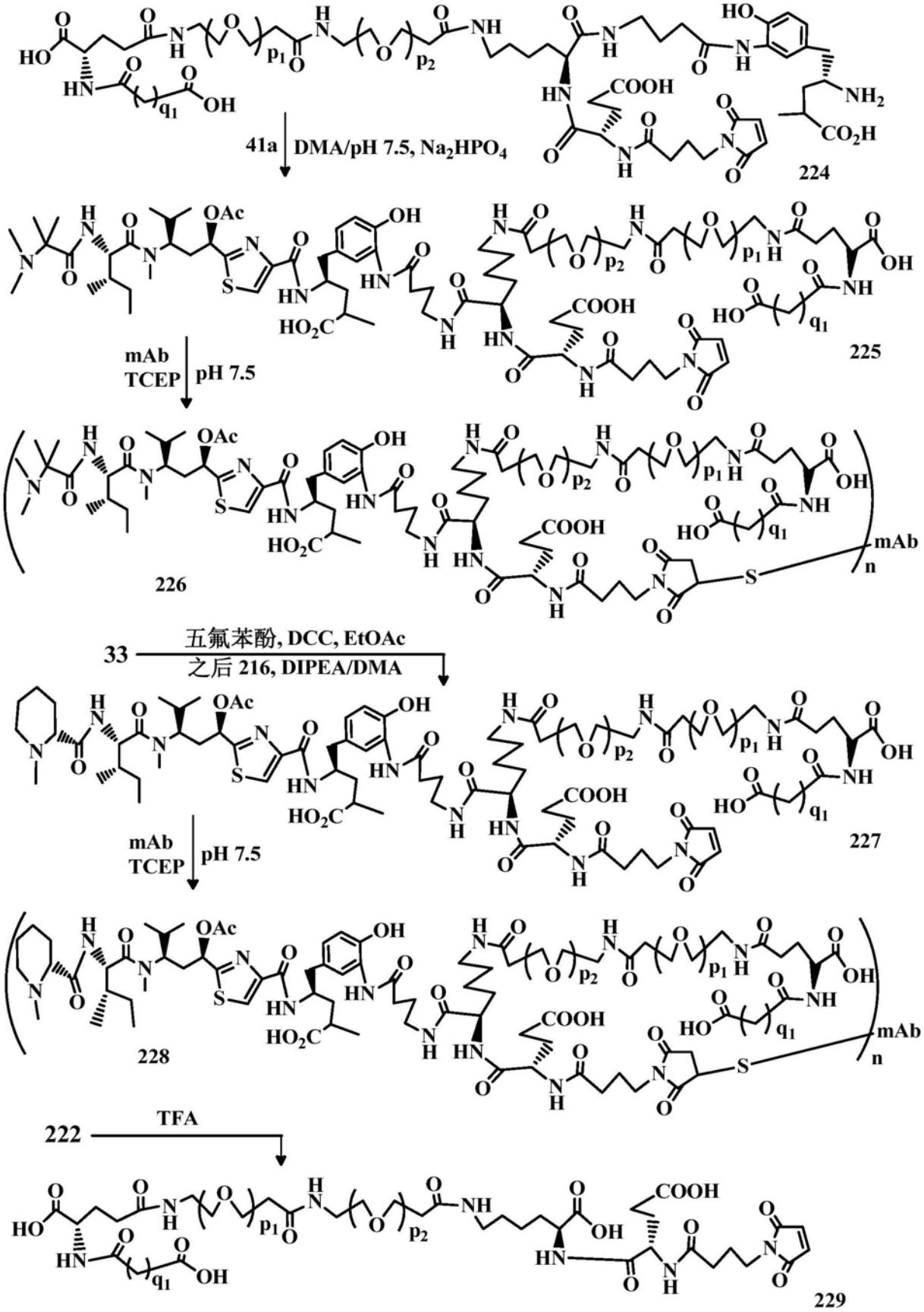

41a
DMA/pH 7.5, Na2HPO4
224
225
mAb
TCEP
pH 7.5
226
33
五氟苯酚, DCC, EtOAc
之后 216, DIPEA/DMA
227
228
222
TFA
229

图17

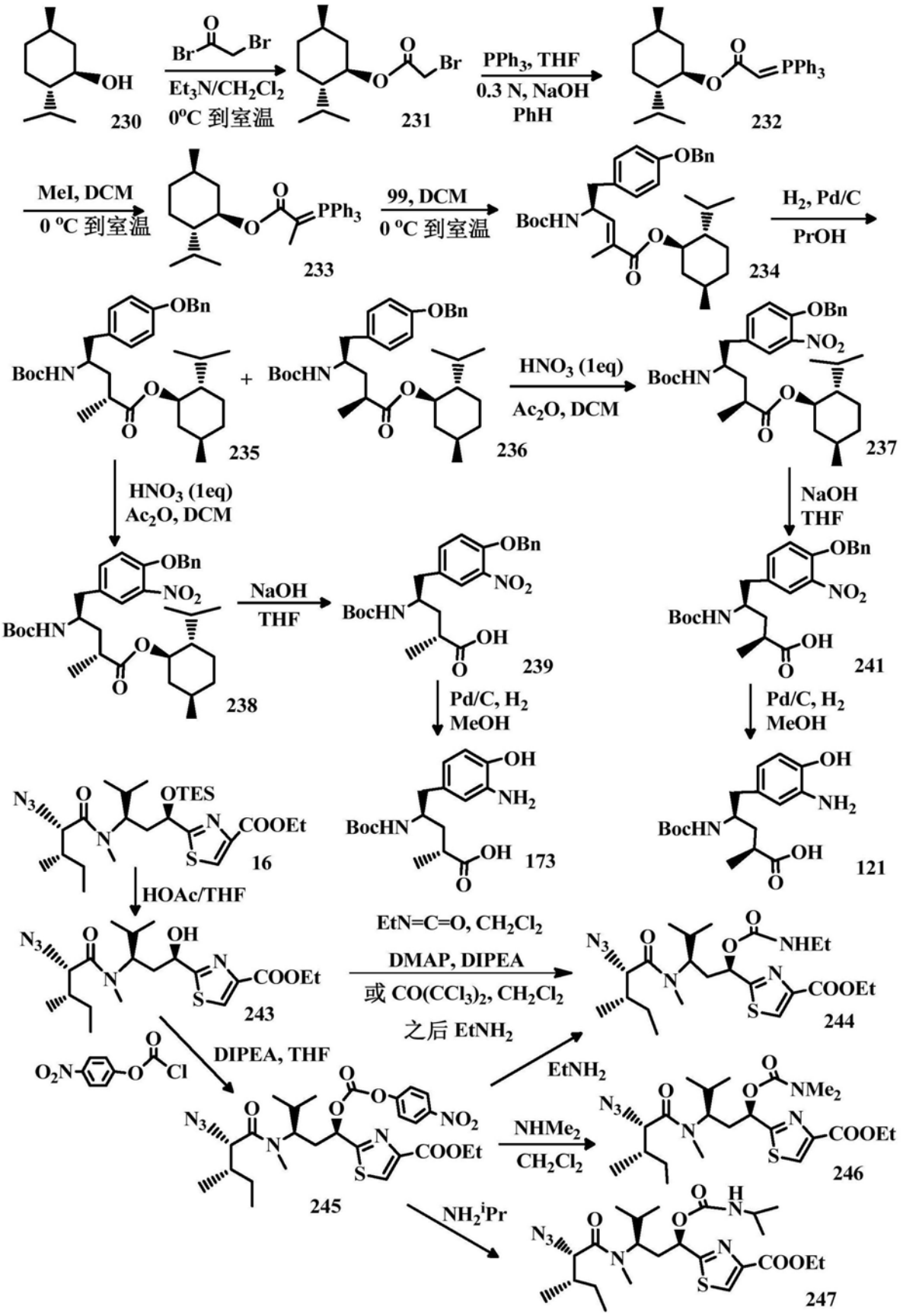

230
Br Br
Et3N/CH2Cl2
0°C 到室温
231
PPh3, THF
0.3 N, NaOH
PhH
232
MeI, DCM
0 °C 到室温
233
99, DCM
0 °C 到室温
234
H2, Pd/C
PrOH
235
236
HNO3 (1eq)
Ac2O, DCM
237
238
NaOH
THF
239
241
Pd/C, H2
MeOH
16
173
121
HOAc/THF
243
EtN=C=O, CH2Cl2
DMAP, DIPEA
或 CO(CCl3)2, CH2Cl2
之后 EtNH2
244
DIPEA, THF
245
EtNH2
NHMe2
CH2Cl2
246
NH2iPr
247

图18

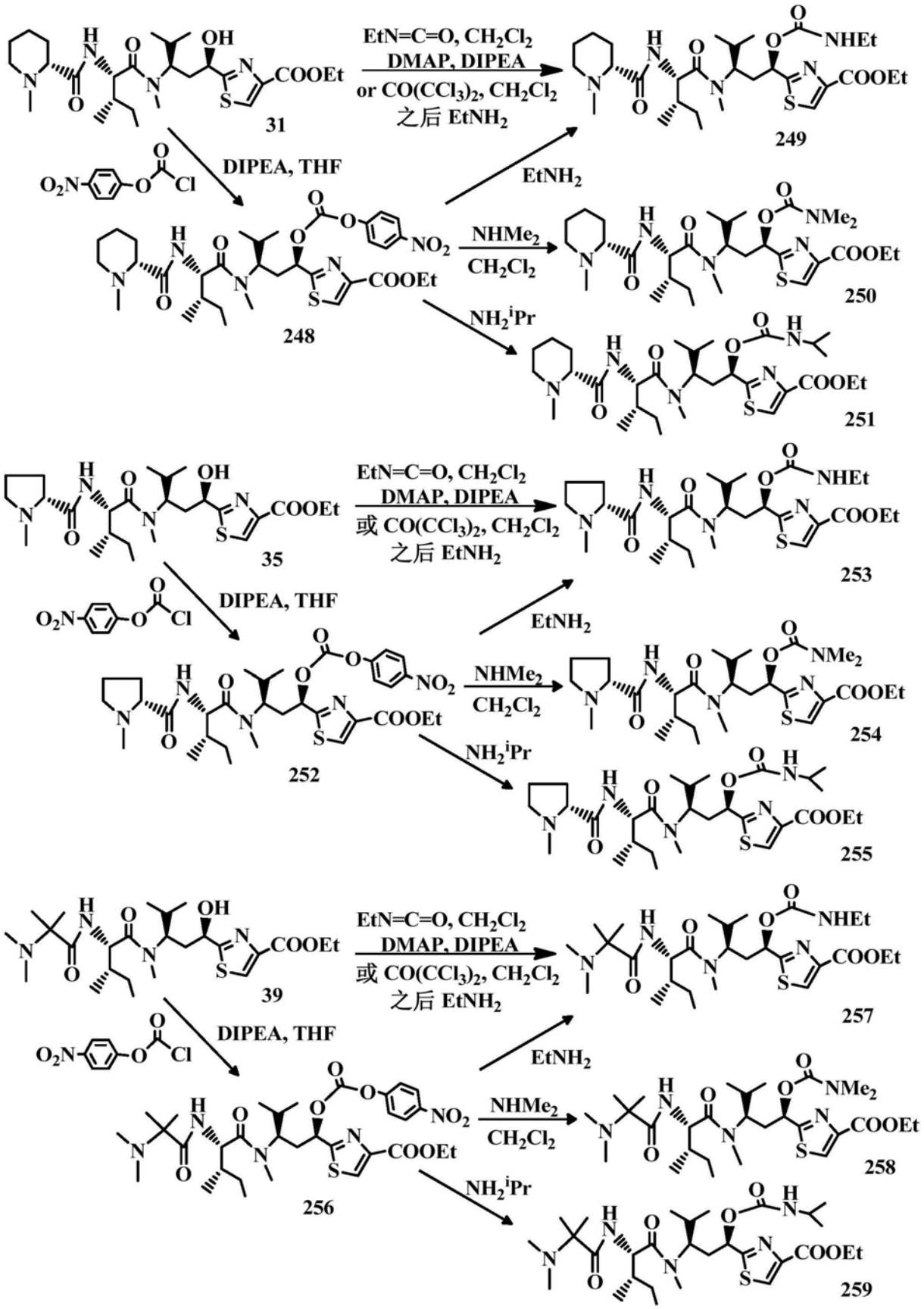

EtN=C=O, CH2Cl2
DMAP, DIPEA
or CO(CCl3)2, CH2Cl2
之后 EtNH2
DIPEA, THF
EtNH2
NHMe2
CH2Cl2
NH2iPr
31
248
249
250
251
或 CO(CCl3)2, CH2Cl2
35
252
253
254
255
39
256
257
258
259

图19

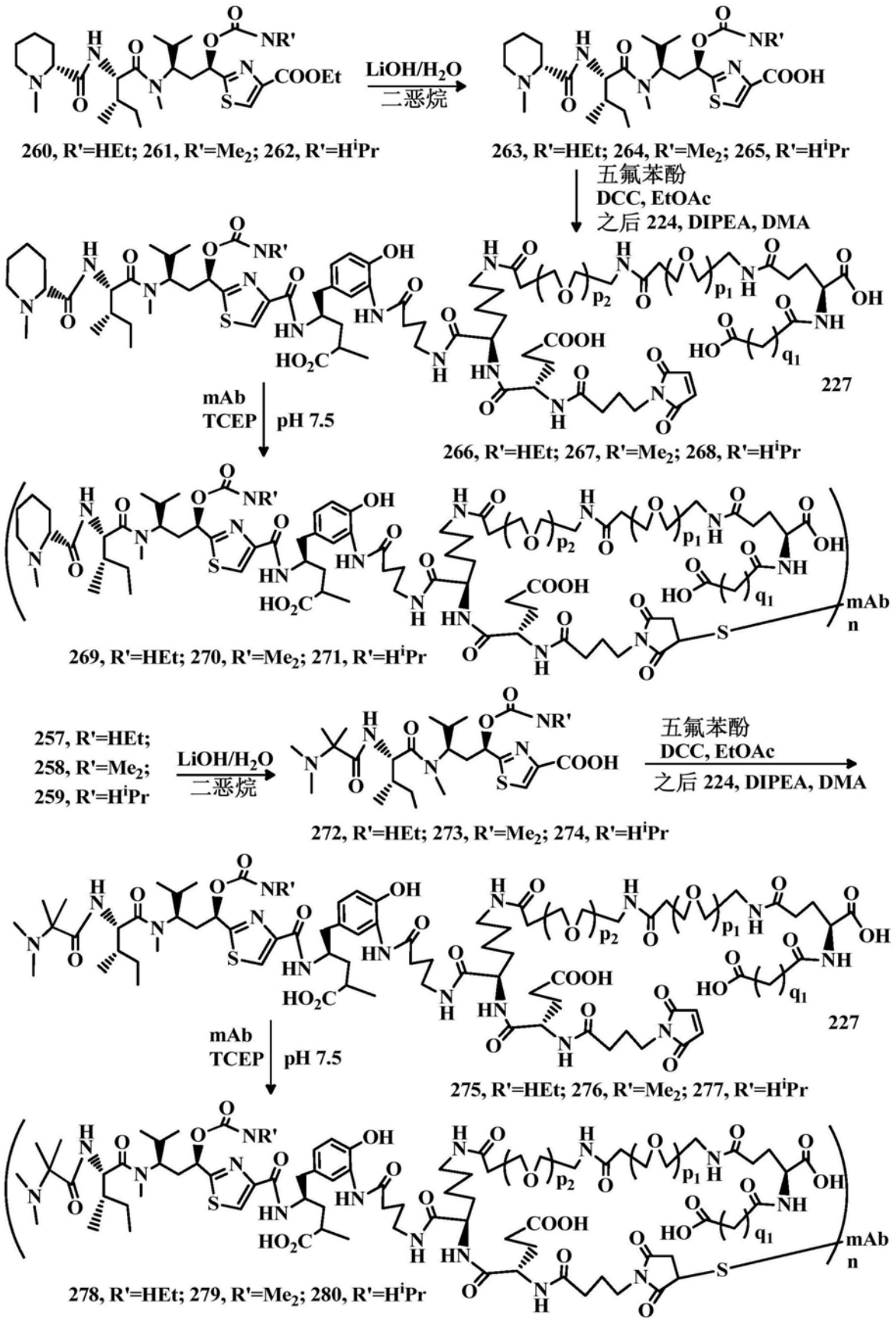

LiOH/H2O
二恶烷
260, R'=HEt; 261, R'=Me2; 262, R'=HiPr
263, R'=HEt; 264, R'=Me2; 265, R'=HiPr
五氟苯酚
DCC, EtOAc
之后 224, DIPEA, DMA
227
mAb
TCEP
pH 7.5
266, R'=HEt; 267, R'=Me2; 268, R'=HiPr
269, R'=HEt; 270, R'=Me2; 271, R'=HiPr
257, R'=HEt;
258, R'=Me2;
259, R'=HiPr
LiOH/H2O
二恶烷
五氟苯酚
DCC, EtOAc
之后 224, DIPEA, DMA
272, R'=HEt; 273, R'=Me2; 274, R'=HiPr
227
mAb
TCEP
pH 7.5
275, R'=HEt; 276, R'=Me2; 277, R'=HiPr
278, R'=HEt; 279, R'=Me2; 280, R'=HiPr

图20

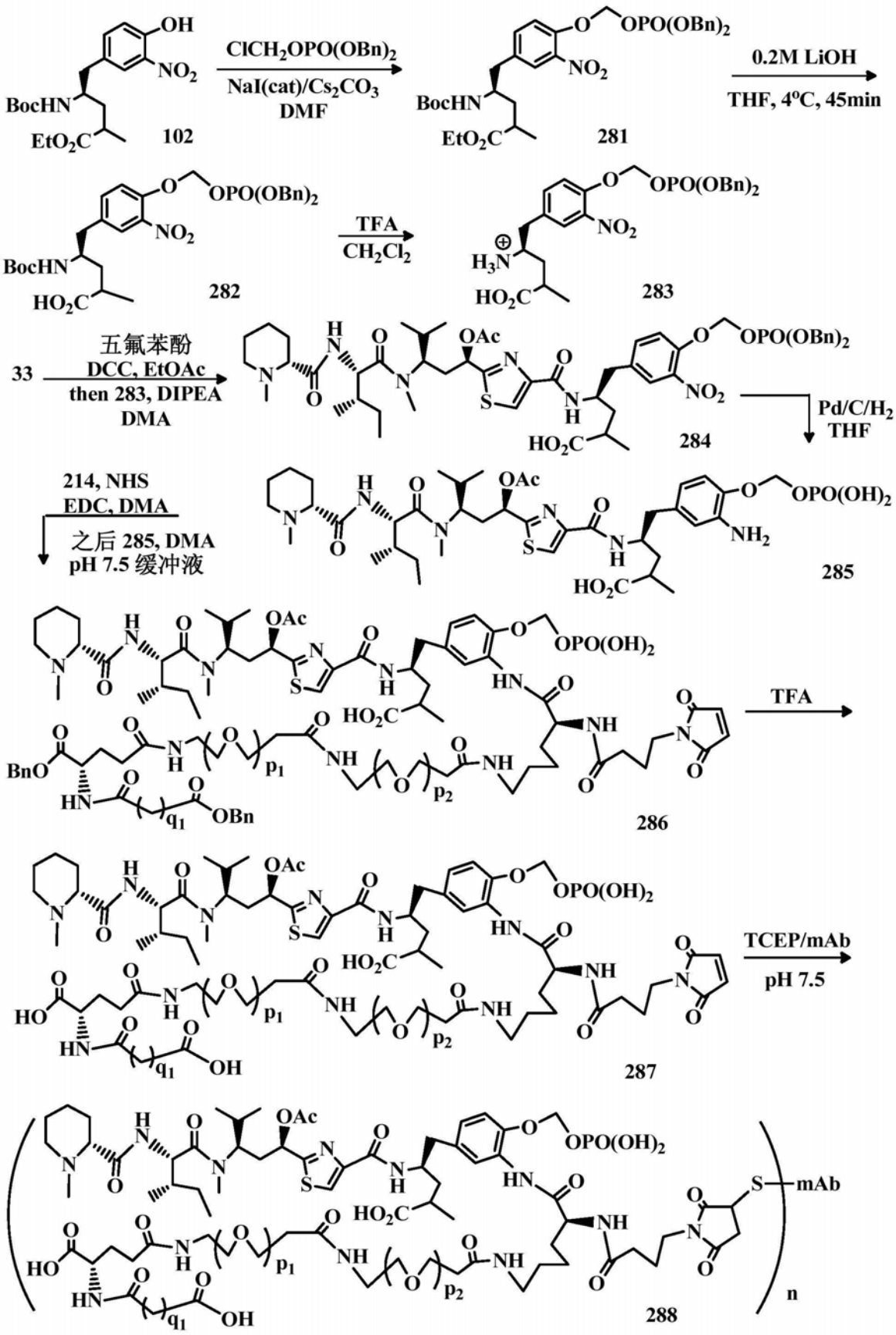

ClCH2OPO(OBn)2
NaI(cat)/Cs2CO3
DMF
0.2M LiOH
THF, 4°C, 45min
102
281
282
283
TFA
CH2Cl2
33
五氟苯酚
DCC, EtOAc
then 283, DIPEA
DMA
284
Pd/C/H2
THF
214, NHS
EDC, DMA
之后 285, DMA
pH 7.5 缓冲液
285
286
TFA
287
TCEP/mAb
pH 7.5
288
mAb
n

图21

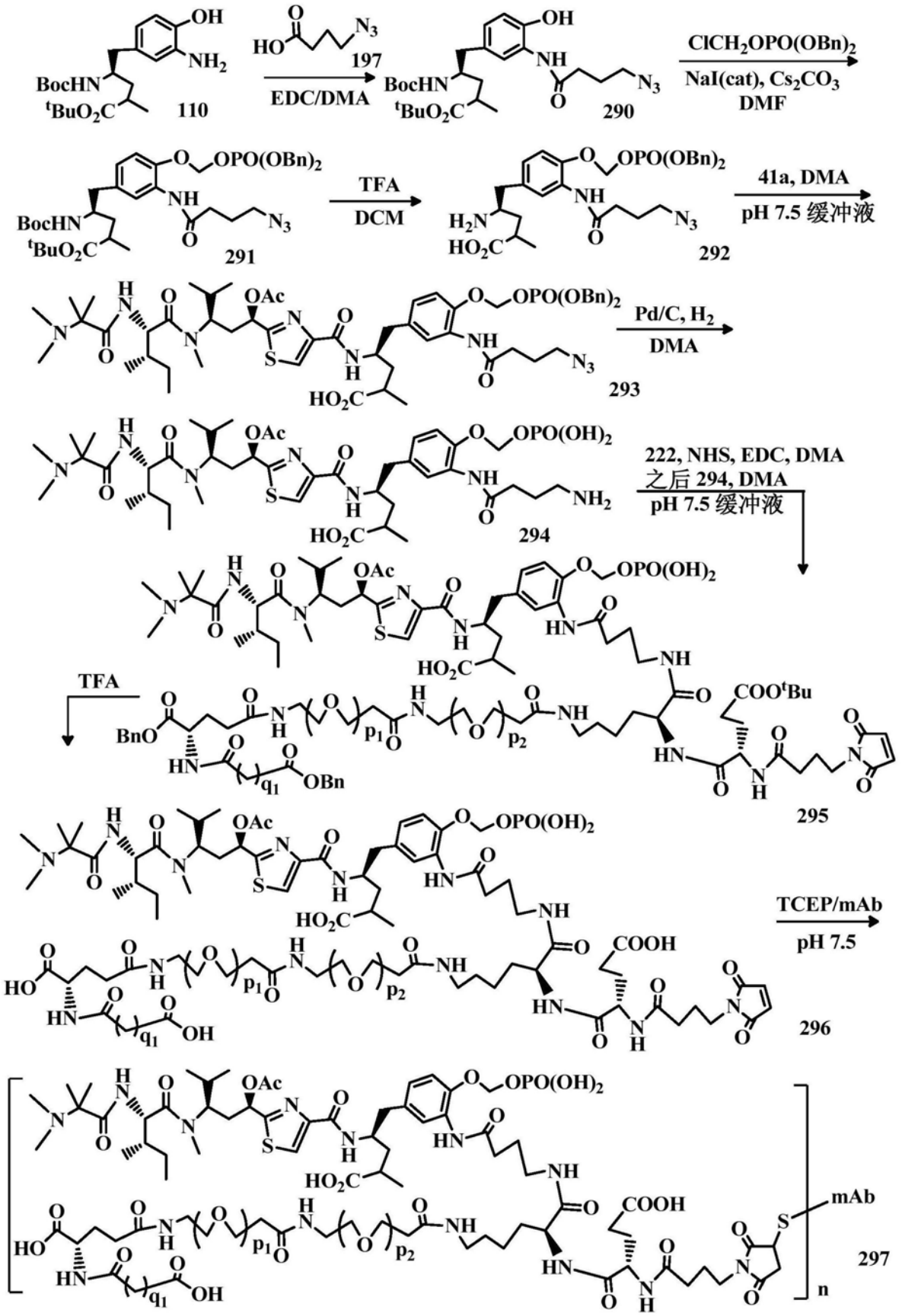

110
197
EDC/DMA
290
ClCH2OPO(OBn)2
NaI(cat), Cs2CO3
DMF
291
TFA
DCM
292
41a, DMA
pH 7.5 缓冲液
293
Pd/C, H2
DMA
294
222, NHS, EDC, DMA
之后 294, DMA
pH 7.5 缓冲液
TFA
295
296
TCEP/mAb
pH 7.5
297
mAb

图22

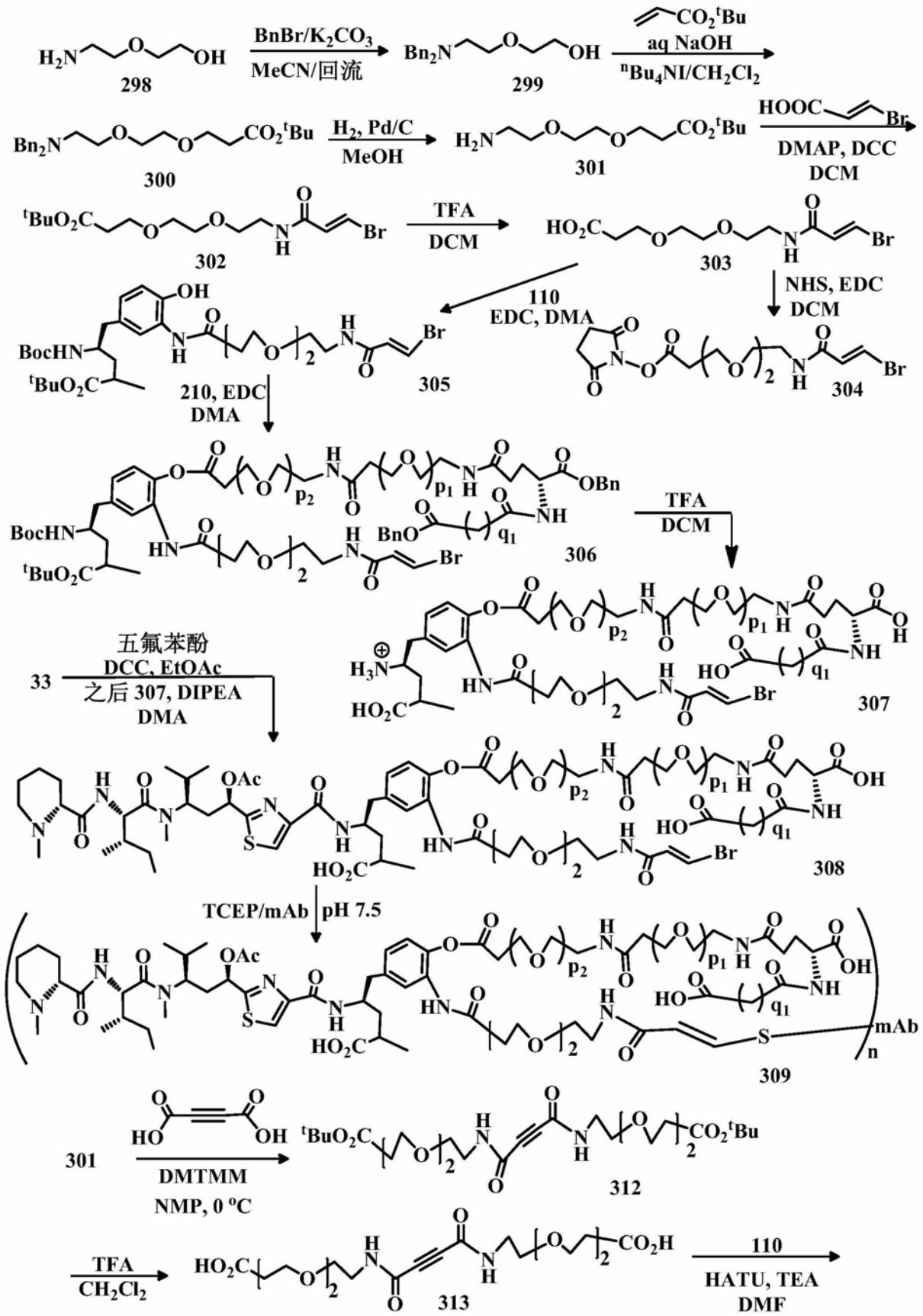

BnBr/K2CO3
MeCN/回流
298
299
aq NaOH
nBu4NI/CH2Cl2
300
H2, Pd/C
MeOH
301
HOOC
DMAP, DCC
DCM
302
TFA
DCM
303
110
EDC, DMA
NHS, EDC
DCM
304
305
210, EDC
DMA
306
TFA
DCM
307
五氟苯酚
DCC, EtOAc
33
之后 307, DIPEA
DMA
308
TCEP/mAb
pH 7.5
309
mAb
301
DMTMM
NMP, 0 °C
312
TFA
CH2Cl2
313
110
HATU, TEA
DMF

图23

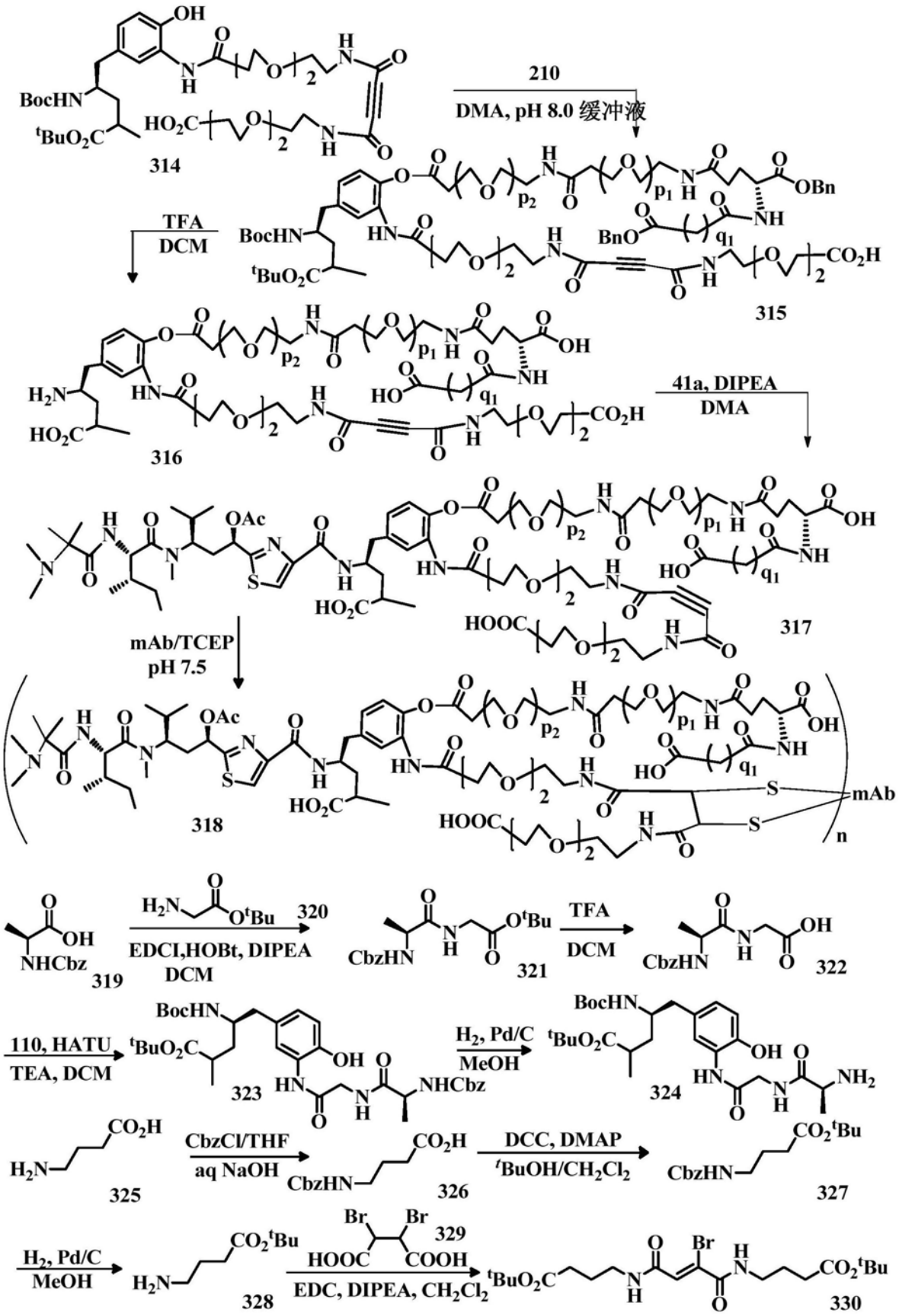

210
DMA, pH 8.0 缓冲液
314
315
TFA
DCM
316
41a, DIPEA
DMA
317
mAb/TCEP
pH 7.5
318
mAb
n
319
320
EDCI,HOBt, DIPEA
DCM
321
TFA
DCM
322
110, HATU
TEA, DCM
323
H2, Pd/C
MeOH
324
325
CbzCl/THF
aq NaOH
326
DCC, DMAP
tBuOH/CH2Cl2
327
H2, Pd/C
MeOH
328
329
EDC, DIPEA, CH2Cl2
330

图24

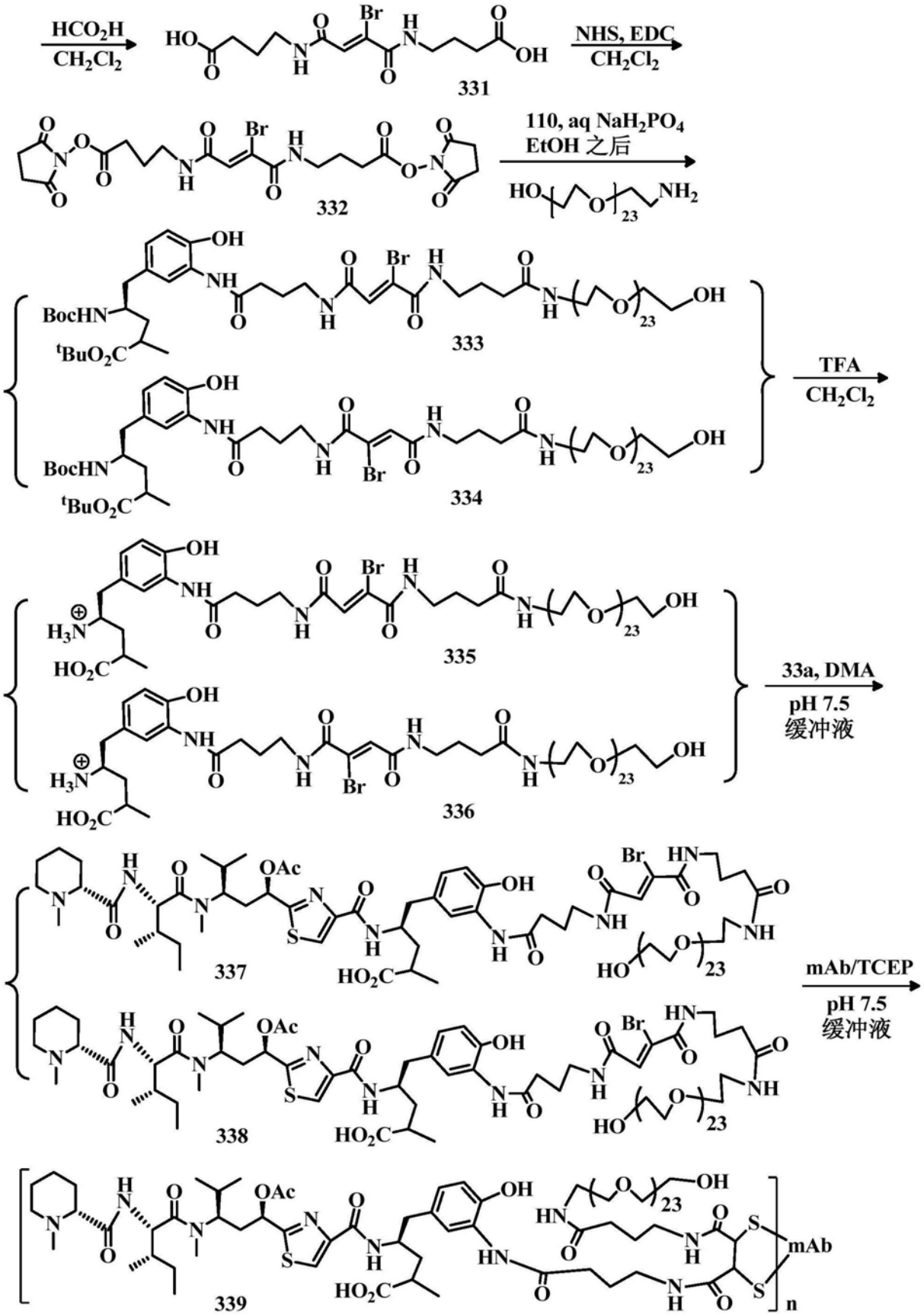

HCO2H
CH2Cl2
331
NHS, EDC
CH2Cl2
332
110, aq NaH2PO4
EtOH 之后
333
334
TFA
CH2Cl2
335
336
33a, DMA
pH 7.5
缓冲液
337
338
mAb/TCEP
pH 7.5
缓冲液
339
mAb
n

图25

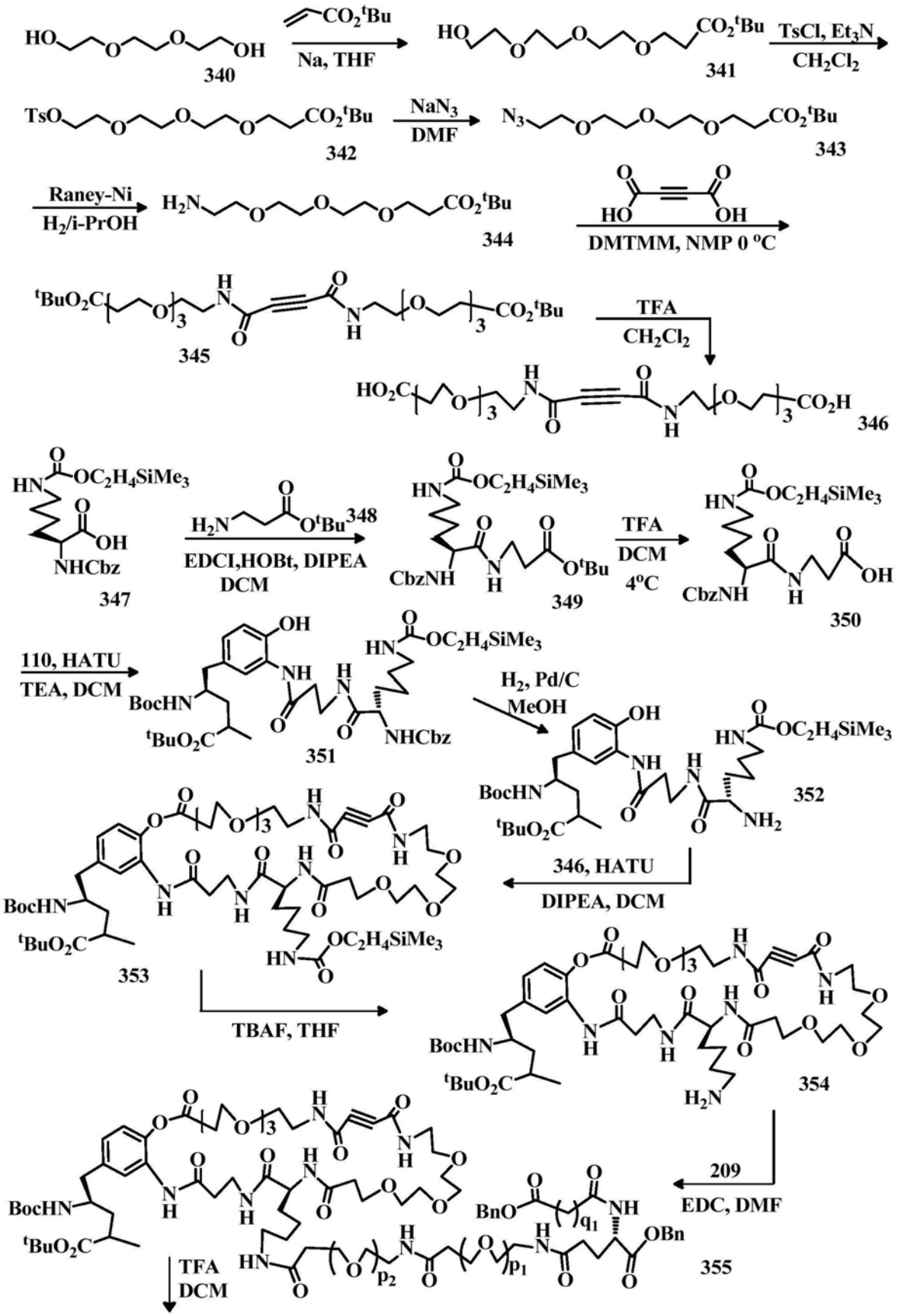

340
Na, THF
341
TsCl, Et3N
CH2Cl2
342
NaN3
DMF
343
Raney-Ni
H2/i-PrOH
344
DMTMM, NMP 0 °C
345
TFA
CH2Cl2
346
347
348
EDCI,HOBt, DIPEA
DCM
349
TFA
DCM
4°C
350
110, HATU
TEA, DCM
351
H2, Pd/C
MeOH
352
346, HATU
DIPEA, DCM
353
TBAF, THF
354
209
EDC, DMF
355
TFA
DCM

图26

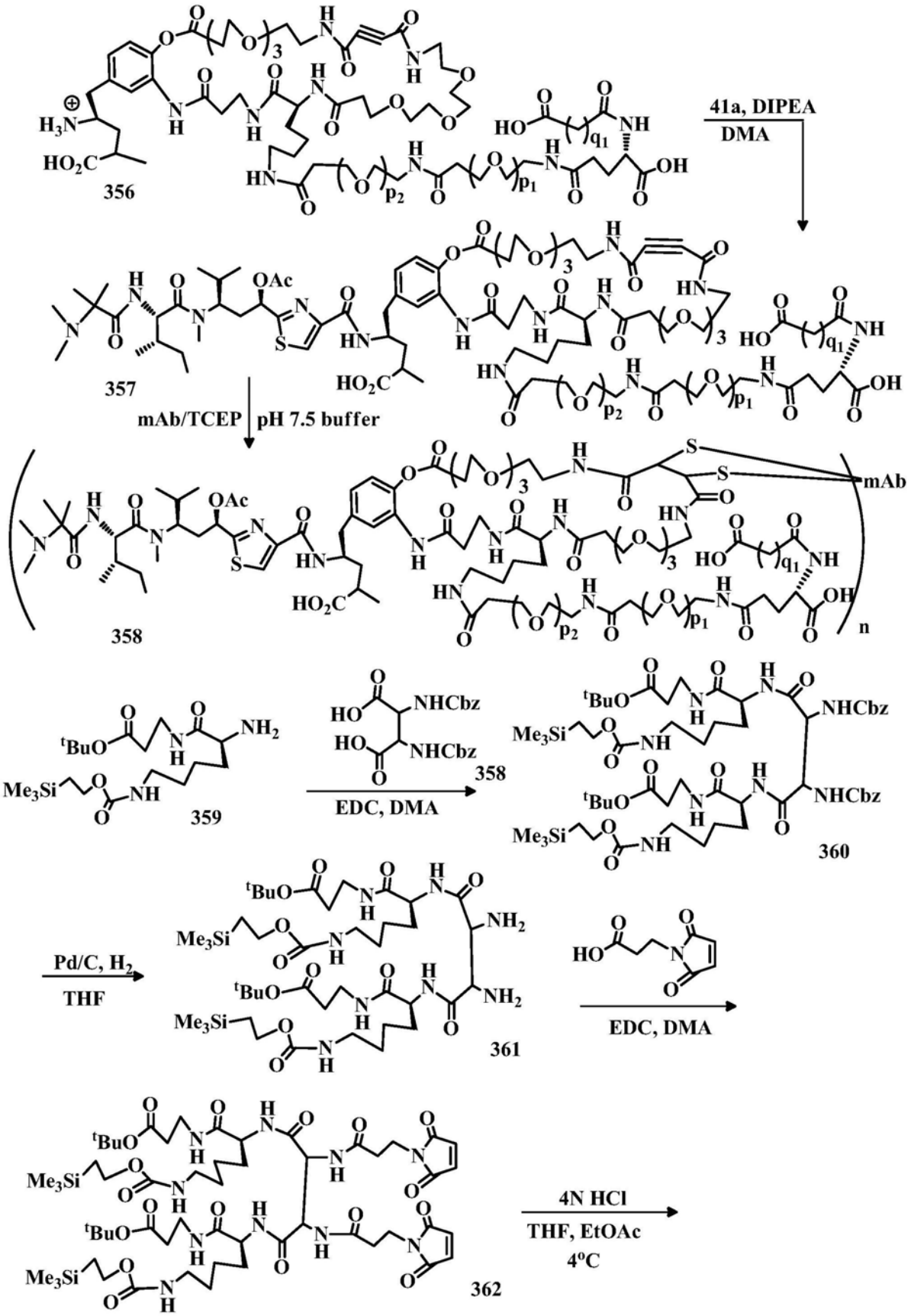

356
41a, DIPEA
DMA
357
mAb/TCEP
pH 7.5 buffer
358
mAb
n
359
EDC, DMA
360
Pd/C, H2
THF
361
EDC, DMA
362
4N HCl
THF, EtOAc
4°C

图27

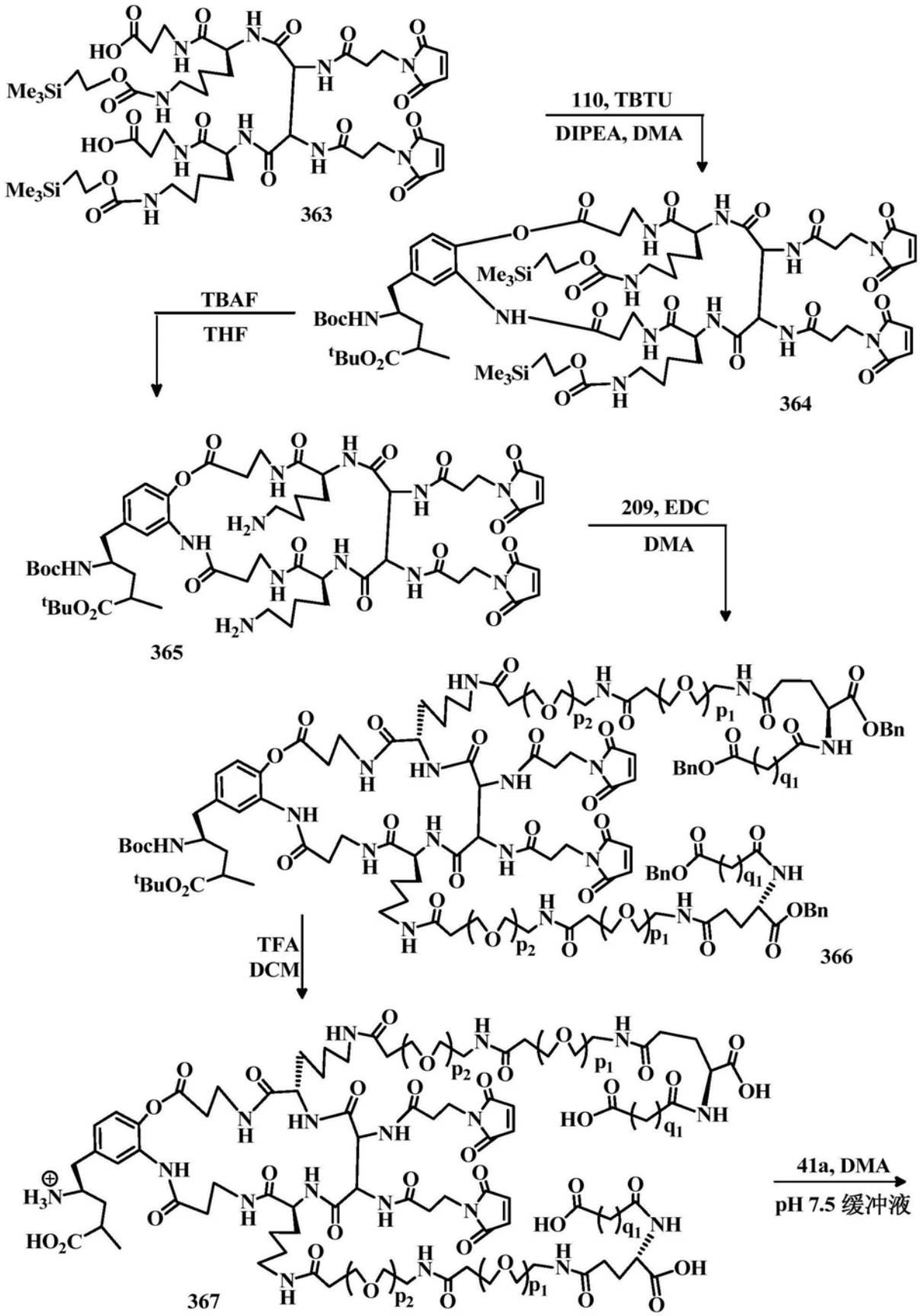

110, TBTU
DIPEA, DMA
363
364
TBAF
THF
365
209, EDC
DMA
366
TFA
DCM
367
41a, DMA
pH 7.5 缓冲液

图28

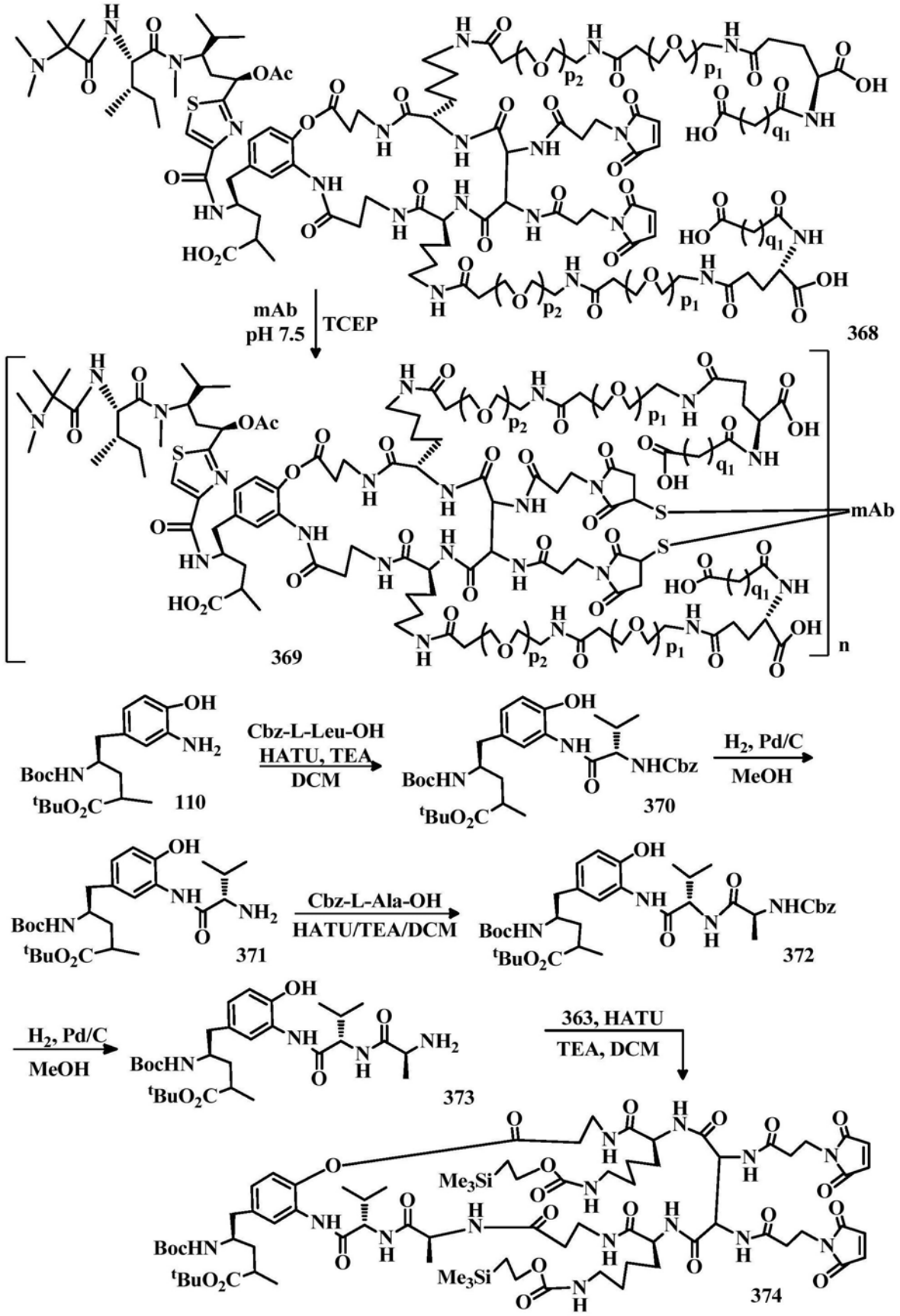

368
mAb
pH 7.5
TCEP
369
mAb
n
110
Cbz-L-Leu-OH
HATU, TEA
DCM
370
H2, Pd/C
MeOH
371
Cbz-L-Ala-OH
HATU/TEA/DCM
372
H2, Pd/C
MeOH
373
363, HATU
TEA, DCM
374

图29

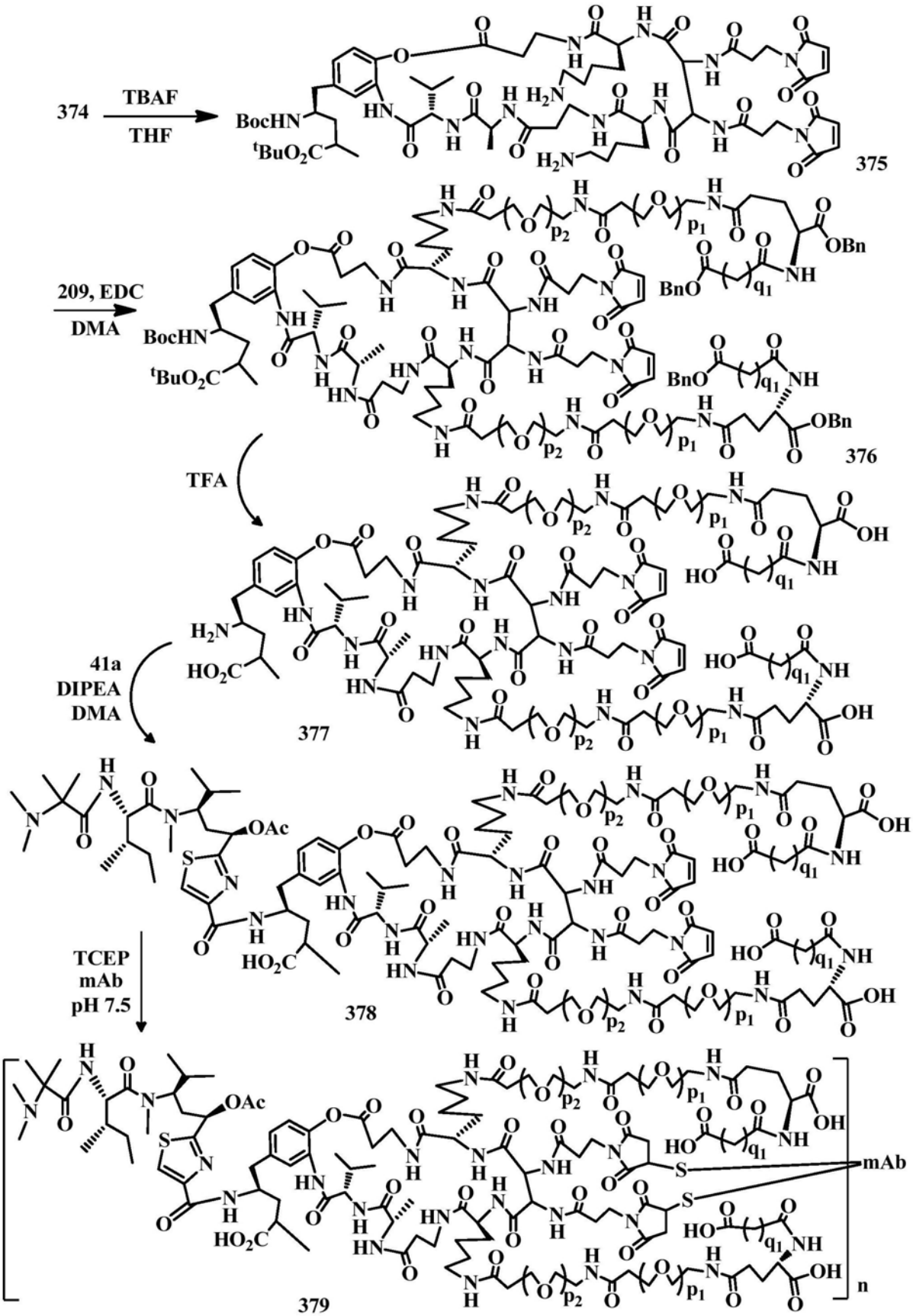

374
TBAF
THF
BocHN
tBuO2C
375
209, EDC
DMA
BocHN
tBuO2C
BnO
OBn
376
TFA
H2N
HO2C
OH
377
41a
DIPEA
DMA
OAc
378
TCEP
mAb
pH 7.5
mAb
379
n

图30

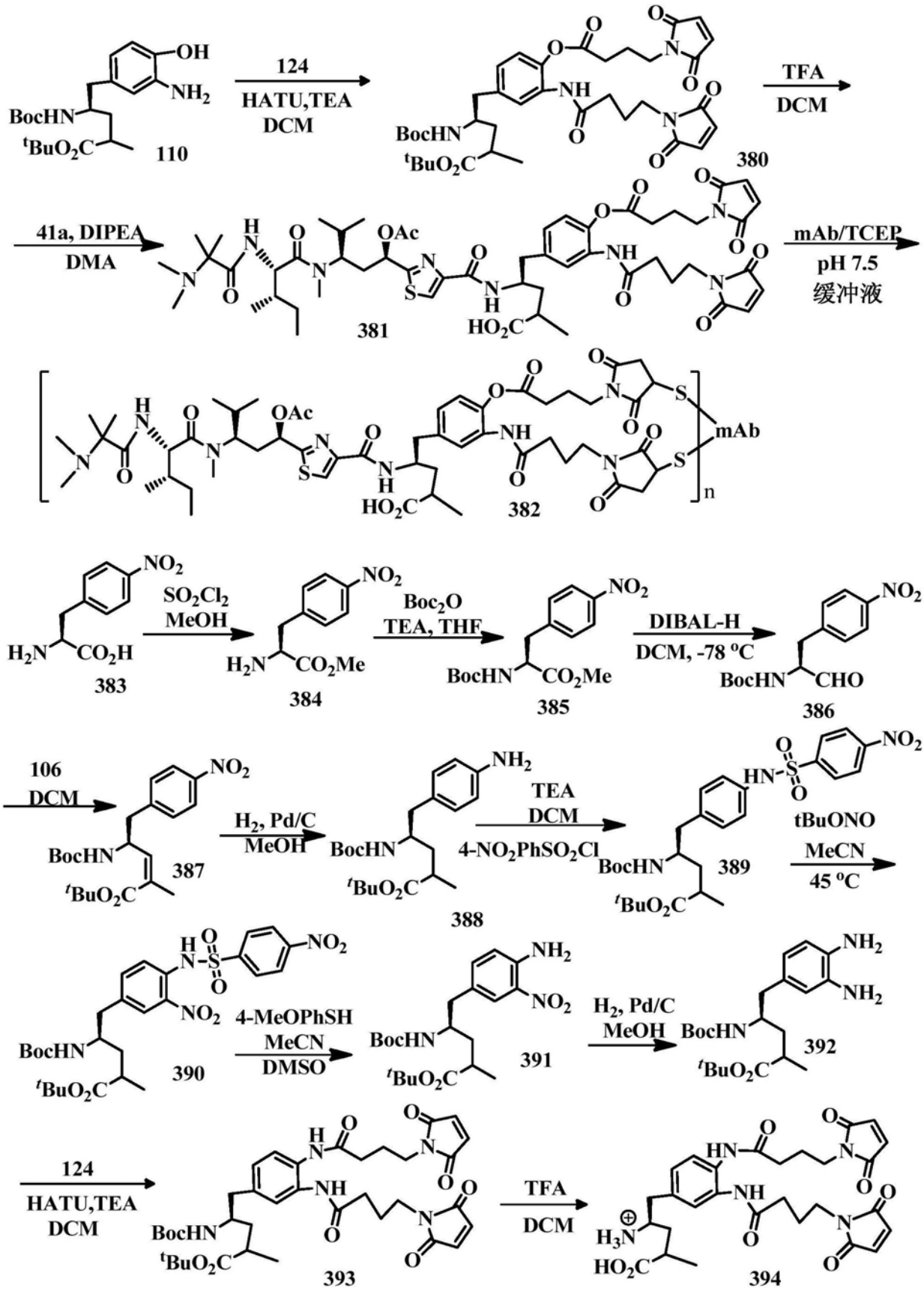

124
HATU,TEA
DCM
TFA
DCM
110
380
41a, DIPEA
DMA
mAb/TCEP
pH 7.5
缓冲液
381
382
mAb
SO2Cl2
MeOH
Boc2O
TEA, THF
DIBAL-H
DCM, -78 °C
383
384
385
386
106
DCM
H2, Pd/C
MeOH
TEA
DCM
4-NO2PhSO2Cl
tBuONO
MeCN
45 °C
387
388
389
390
4-MeOPhSH
MeCN
DMSO
391
392
393
394

图31

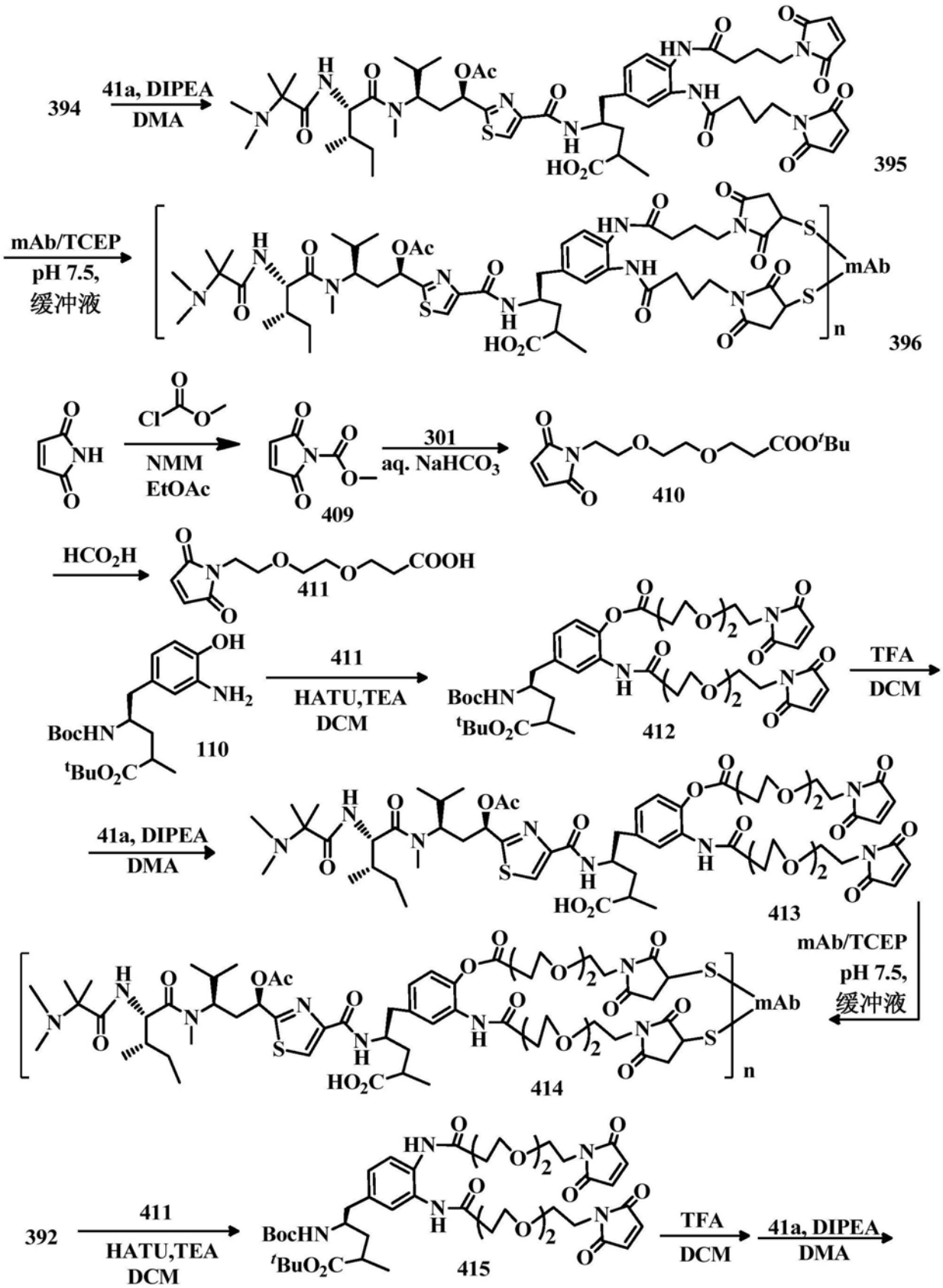

394
41a, DIPEA
DMA
395
mAb/TCEP
pH 7.5,
缓冲液
mAb
n
396
NMM
EtOAc
409
301
aq. NaHCO3
410
HCO2H
411
110
411
HATU,TEA
DCM
412
TFA
DCM
41a, DIPEA
DMA
413
mAb/TCEP
pH 7.5,
缓冲液
414
392
411
HATU,TEA
DCM
415
TFA
DCM
41a, DIPEA
DMA

图32

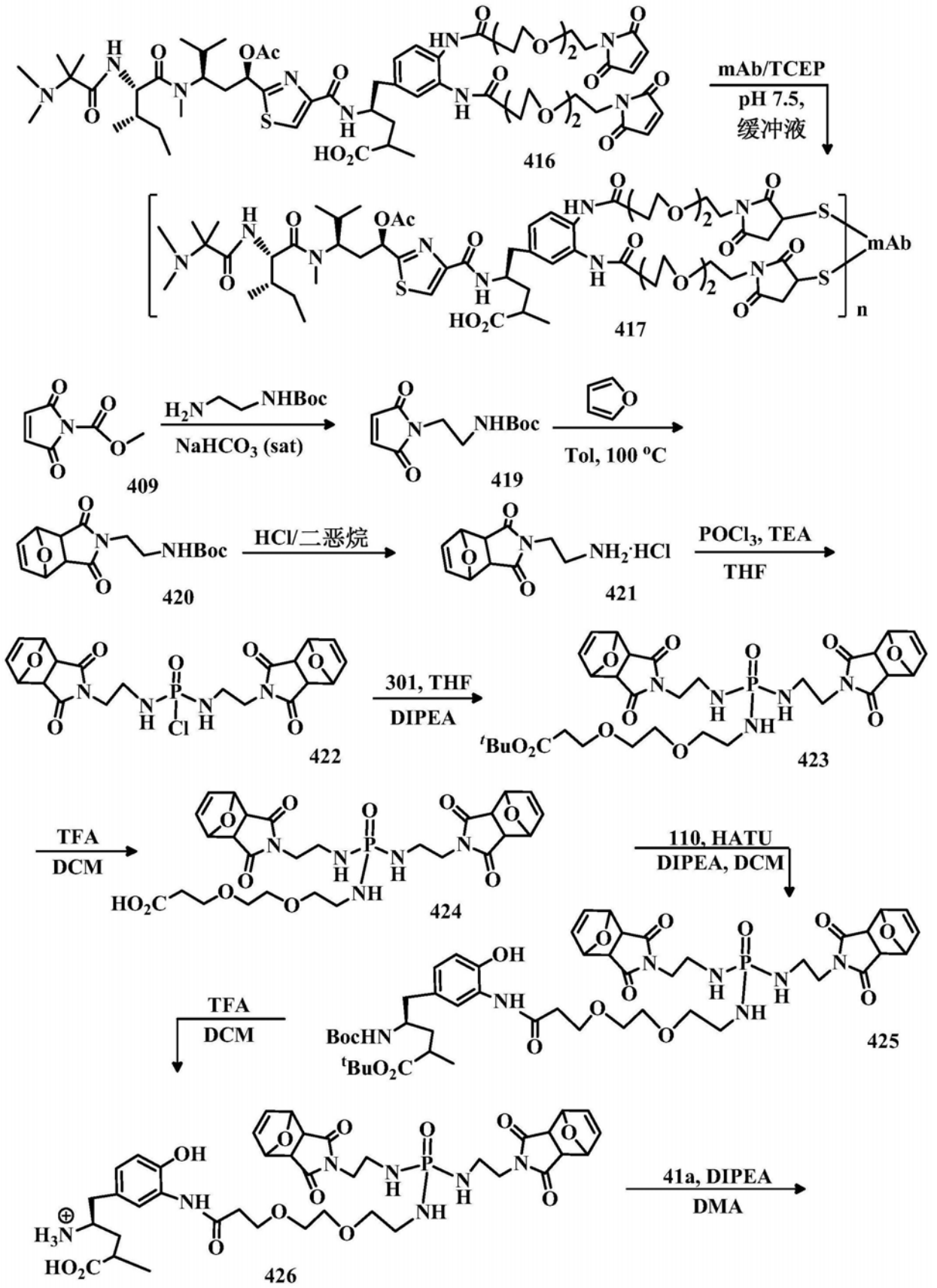

mAb/TCEP
pH 7.5,
缓冲液
416
417
mAb
n
409
H_2N NHBoc
$NaHCO_3$ (sat)
419
Tol, 100 °C
420
HCl/二恶烷
421
$POCl_3$, TEA
THF
422
301, THF
DIPEA
423
TFA
DCM
424
110, HATU
DIPEA, DCM
425
TFA
DCM
426
41a, DIPEA
DMA

图33

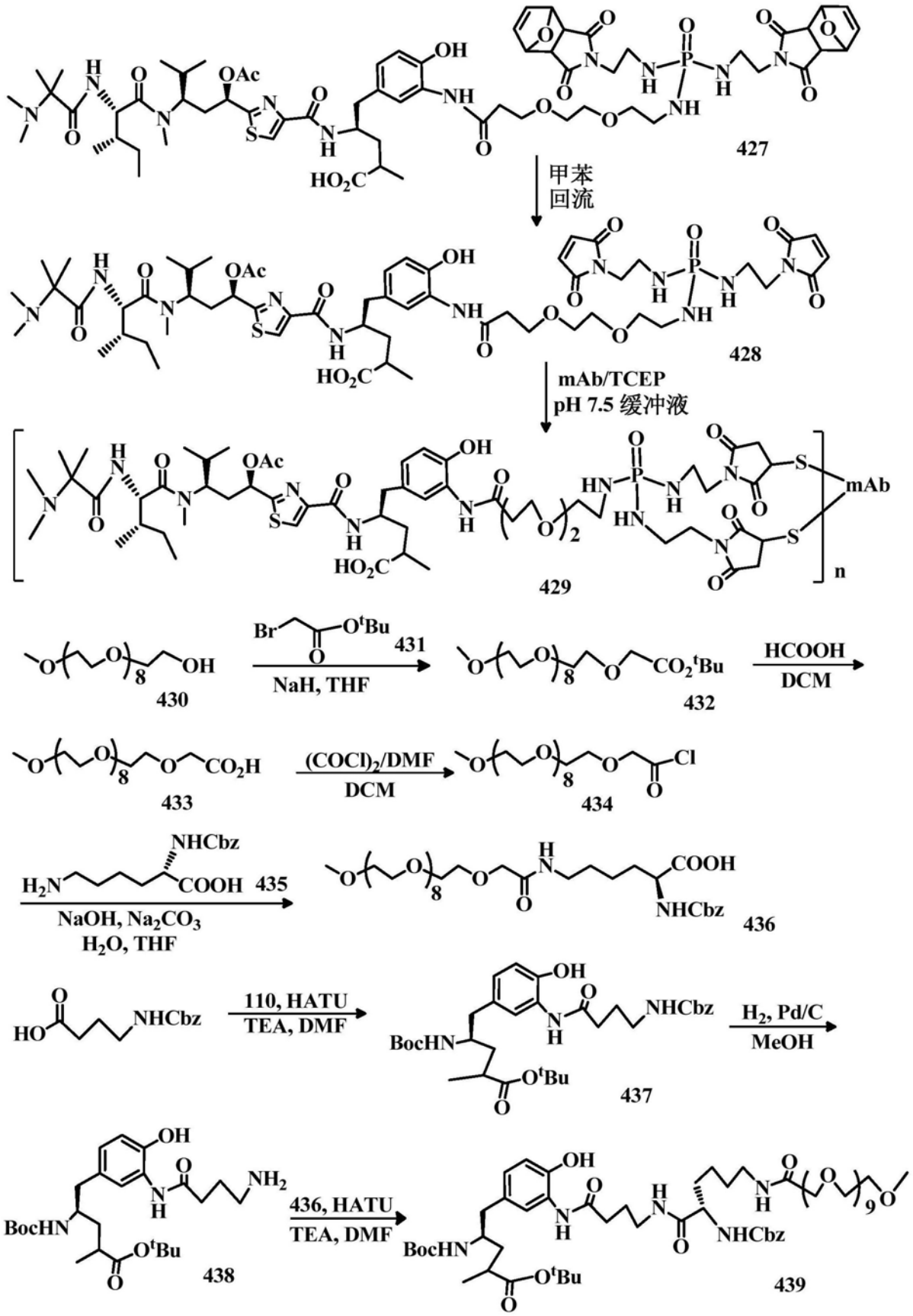

427
甲苯
回流
428
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液
429
mAb
n
430
431
NaH, THF
432
HCOOH
DCM
433
(COCl)2/DMF
DCM
434
435
NaOH, Na2CO3
H2O, THF
436
110, HATU
TEA, DMF
437
H2, Pd/C
MeOH
438
436, HATU
TEA, DMF
439

图34

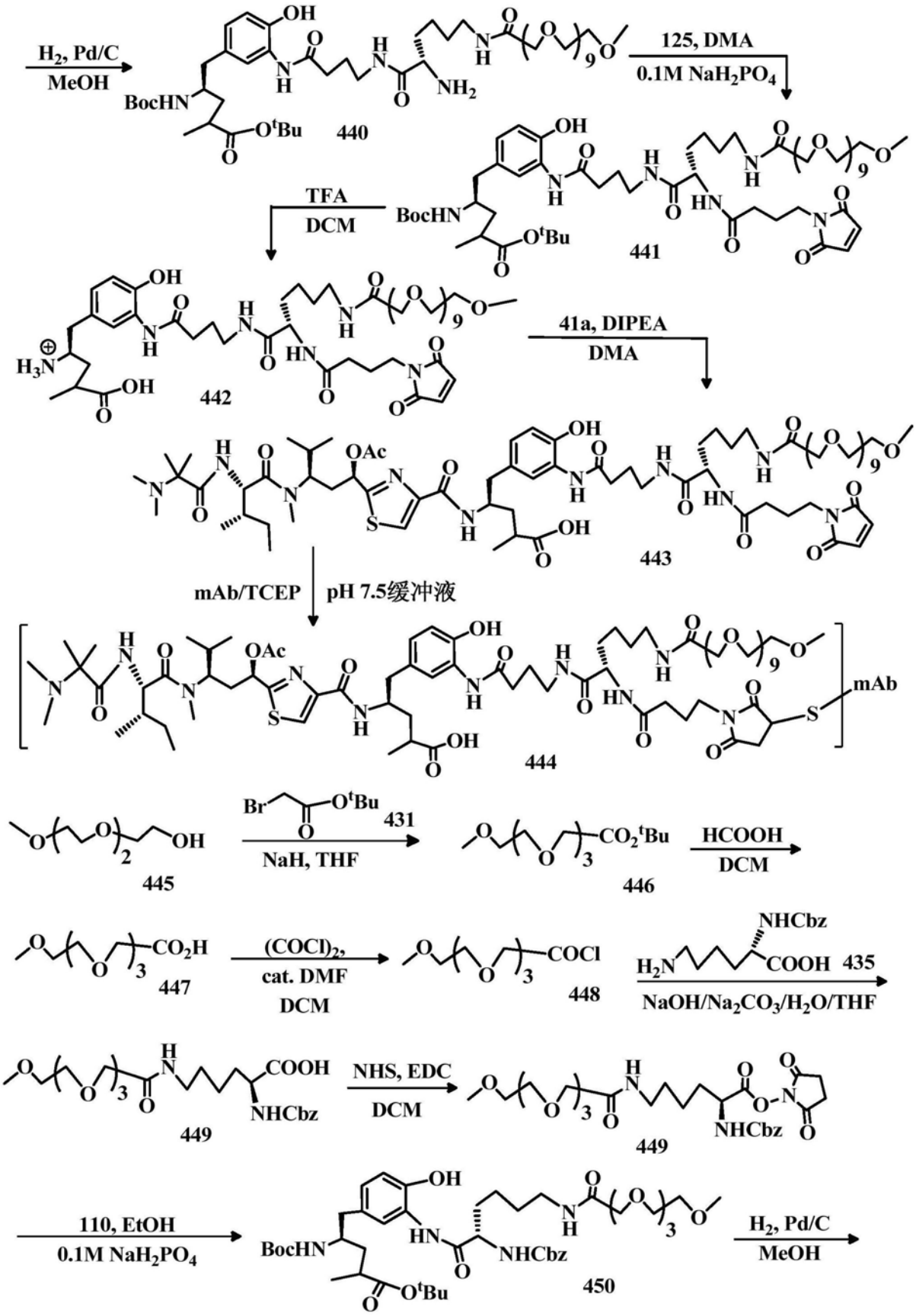

H2, Pd/C
MeOH
440
125, DMA
0.1M NaH2PO4
441
TFA
DCM
442
41a, DIPEA
DMA
443
mAb/TCEP
pH 7.5缓冲液
444
445
431
NaH, THF
446
HCOOH
DCM
447
(COCl)2,
cat. DMF
DCM
448
435
NaOH/Na2CO3/H2O/THF
449
NHS, EDC
DCM
110, EtOH
0.1M NaH2PO4
450

图35

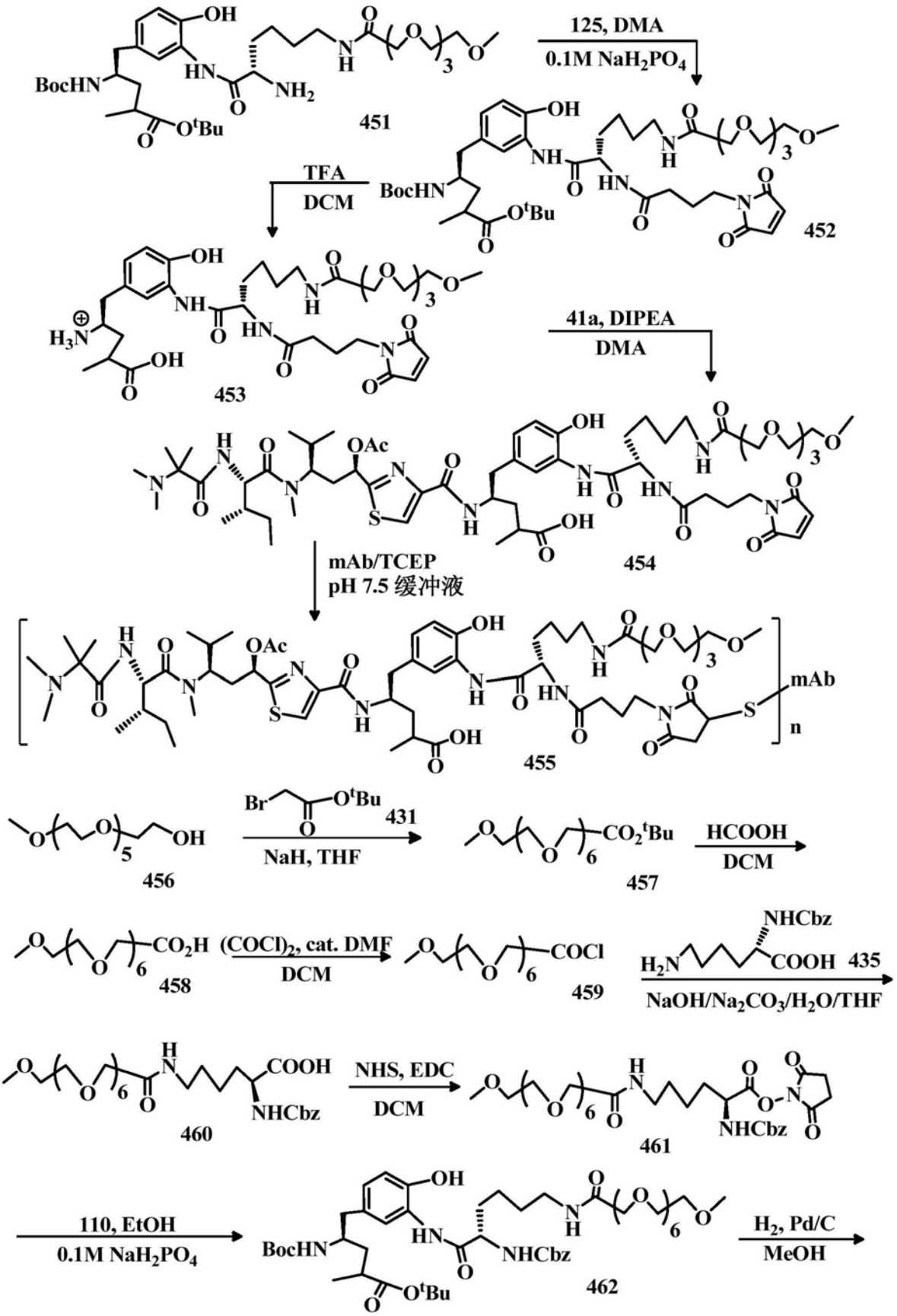

125, DMA
0.1M NaH2PO4
451
452
TFA
DCM
453
41a, DIPEA
DMA
454
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液
455
mAb
456
431
NaH, THF
457
HCOOH
DCM
458
(COCl)2, cat. DMF
DCM
459
435
NaOH/Na2CO3/H2O/THF
460
NHS, EDC
DCM
461
110, EtOH
0.1M NaH2PO4
462
H2, Pd/C
MeOH

图36

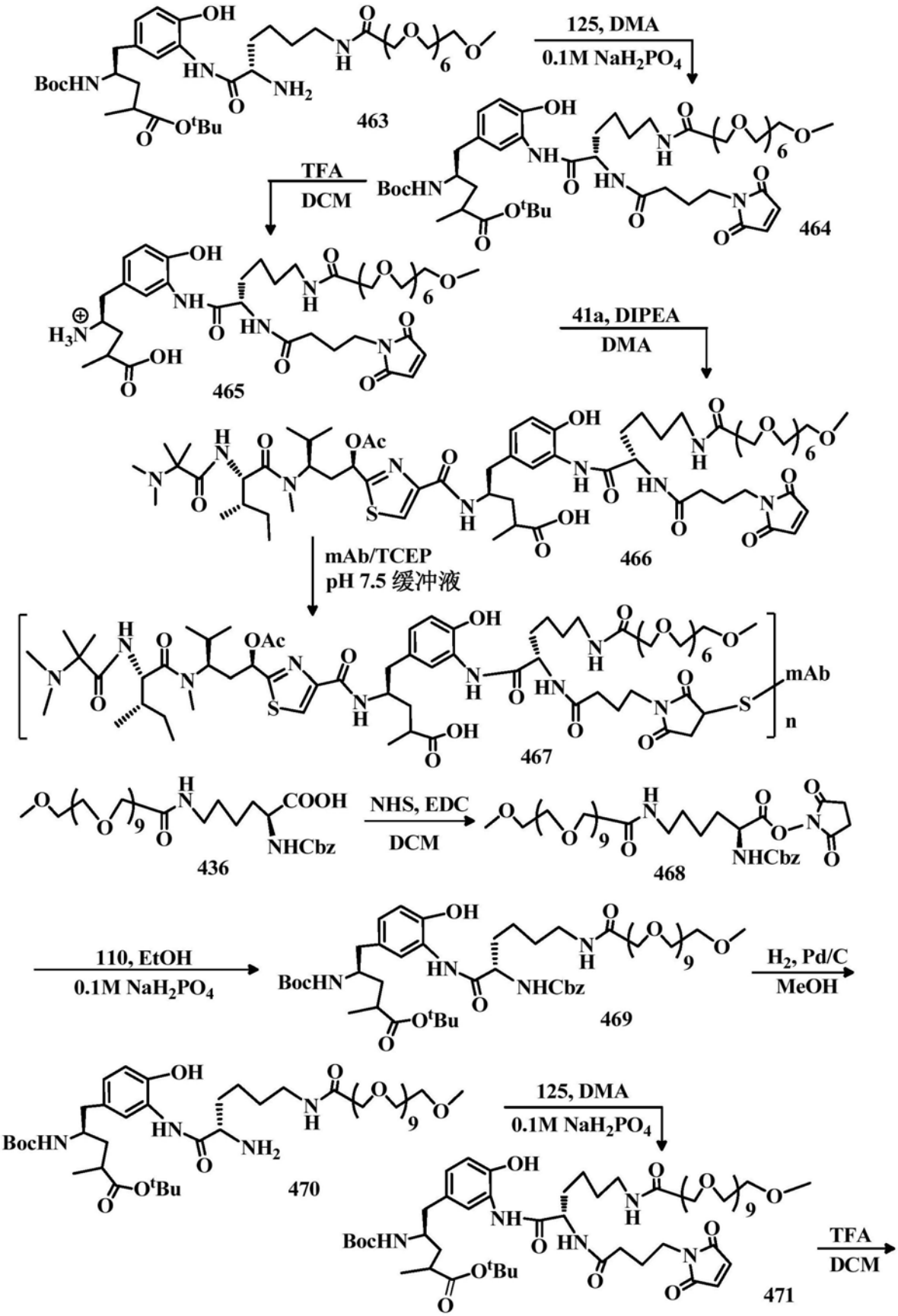

125, DMA
0.1M NaH2PO4
463
464
TFA
DCM
465
41a, DIPEA
DMA
466
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液
467
436
NHS, EDC
DCM
468
110, EtOH
0.1M NaH2PO4
469
H2, Pd/C
MeOH
470
125, DMA
0.1M NaH2PO4
471
TFA
DCM

图37

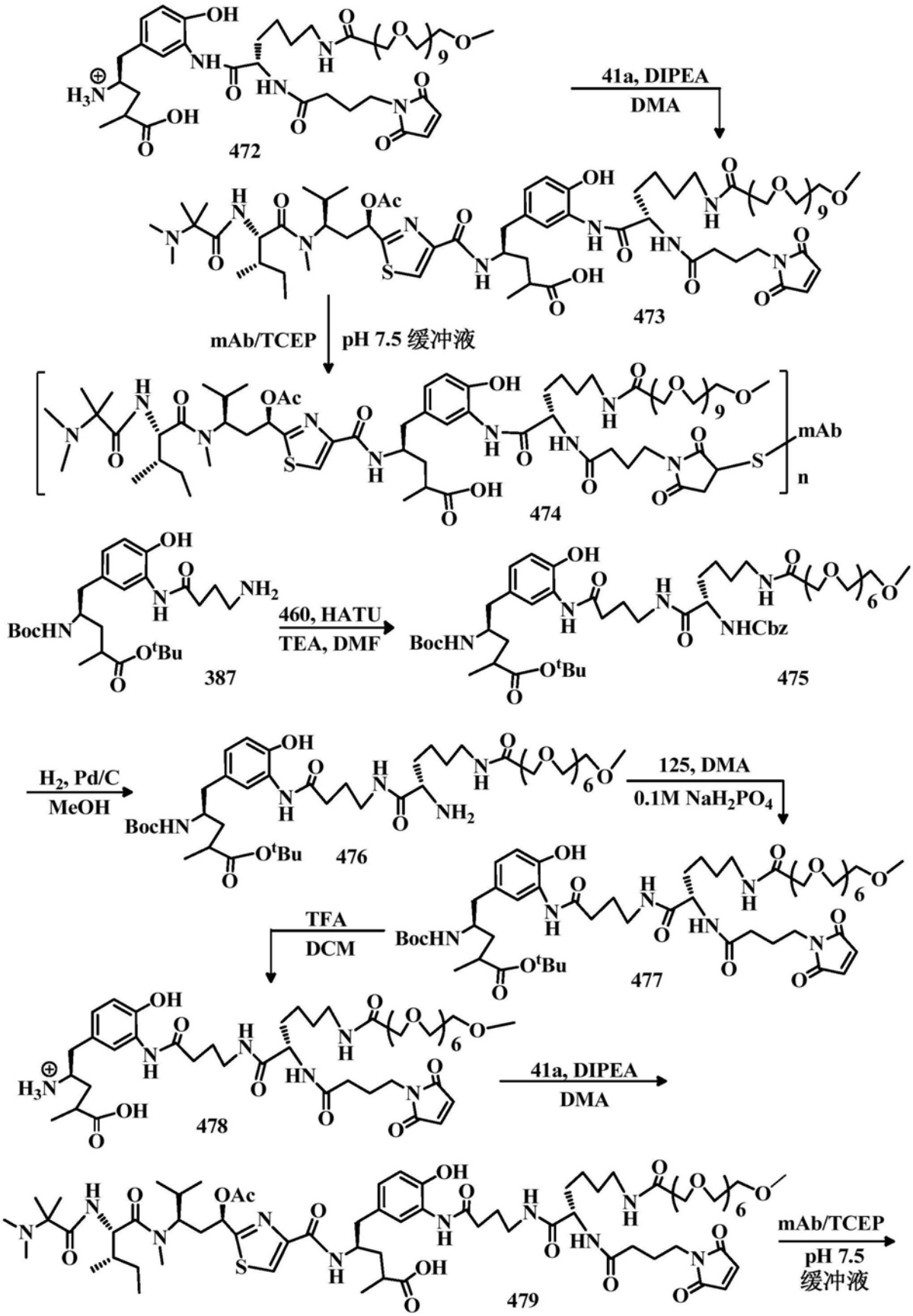

41a, DIPEA
DMA
472
473
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液
474
mAb
n
460, HATU
TEA, DMF
387
475
H2, Pd/C
MeOH
476
125, DMA
0.1M NaH2PO4
477
TFA
DCM
478
41a, DIPEA
DMA
479
mAb/TCEP
pH 7.5
缓冲液

图38

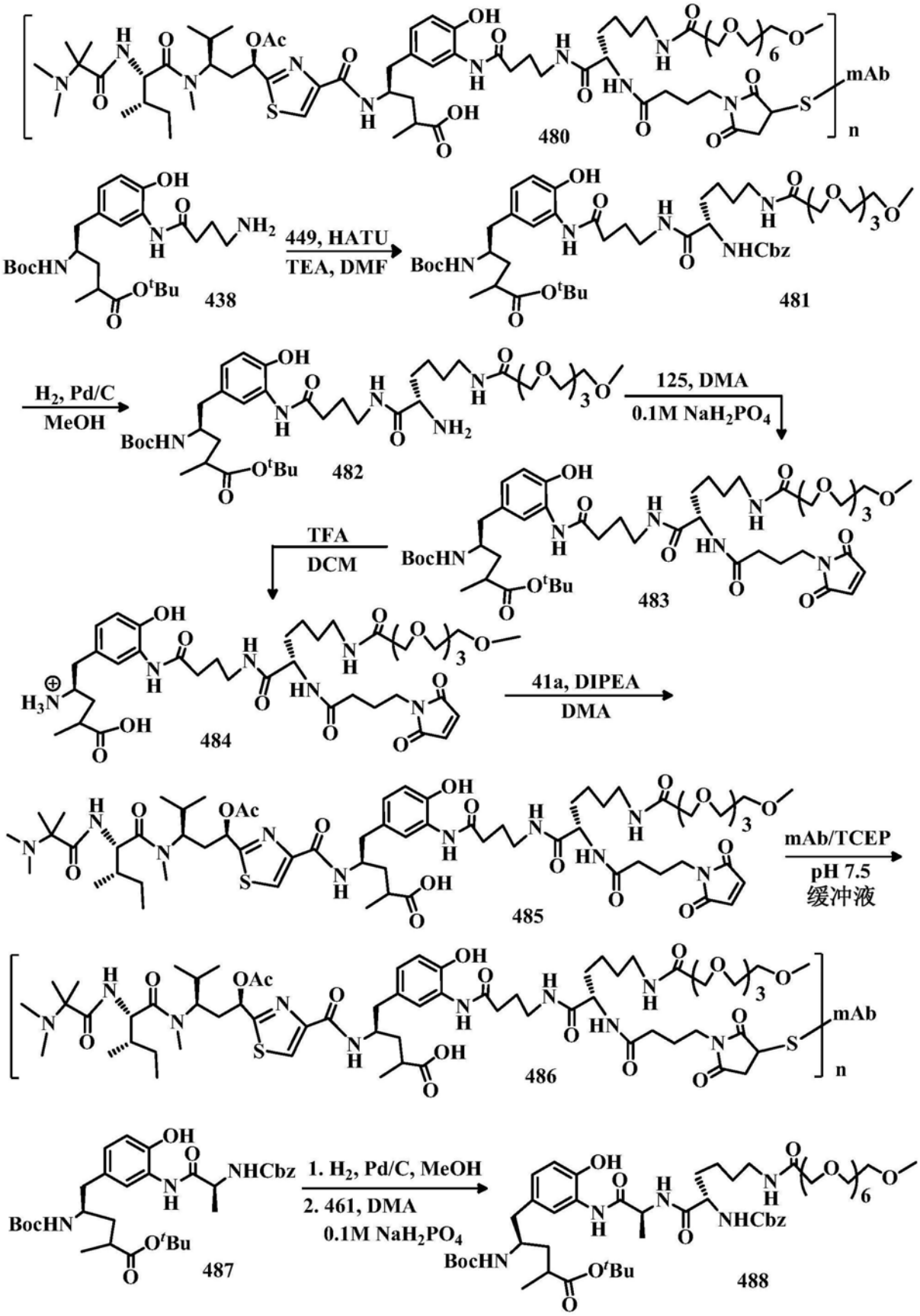

480
mAb
n
438
449, HATU
TEA, DMF
481
H2, Pd/C
MeOH
482
125, DMA
0.1M NaH2PO4
483
TFA
DCM
484
41a, DIPEA
DMA
485
mAb/TCEP
pH 7.5
缓冲液
486
487
1. H2, Pd/C, MeOH
2. 461, DMA
0.1M NaH2PO4
488

图39

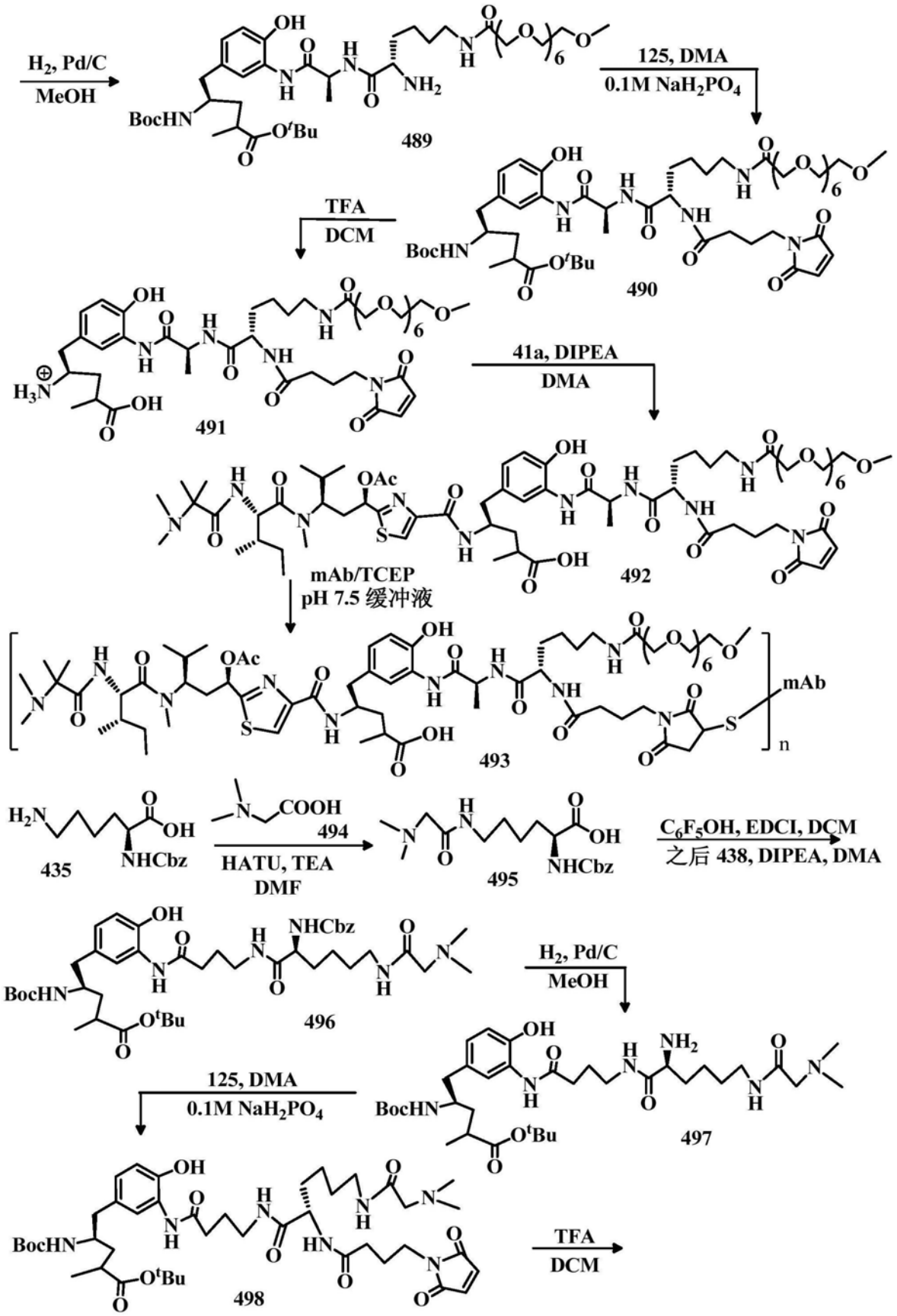

H2, Pd/C
MeOH
489
125, DMA
0.1M NaH2PO4
490
TFA
DCM
491
41a, DIPEA
DMA
492
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液
493
mAb
435
494
HATU, TEA
DMF
495
C6F5OH, EDCI, DCM
之后 438, DIPEA, DMA
496
H2, Pd/C
MeOH
497
125, DMA
0.1M NaH2PO4
498
TFA
DCM

图40

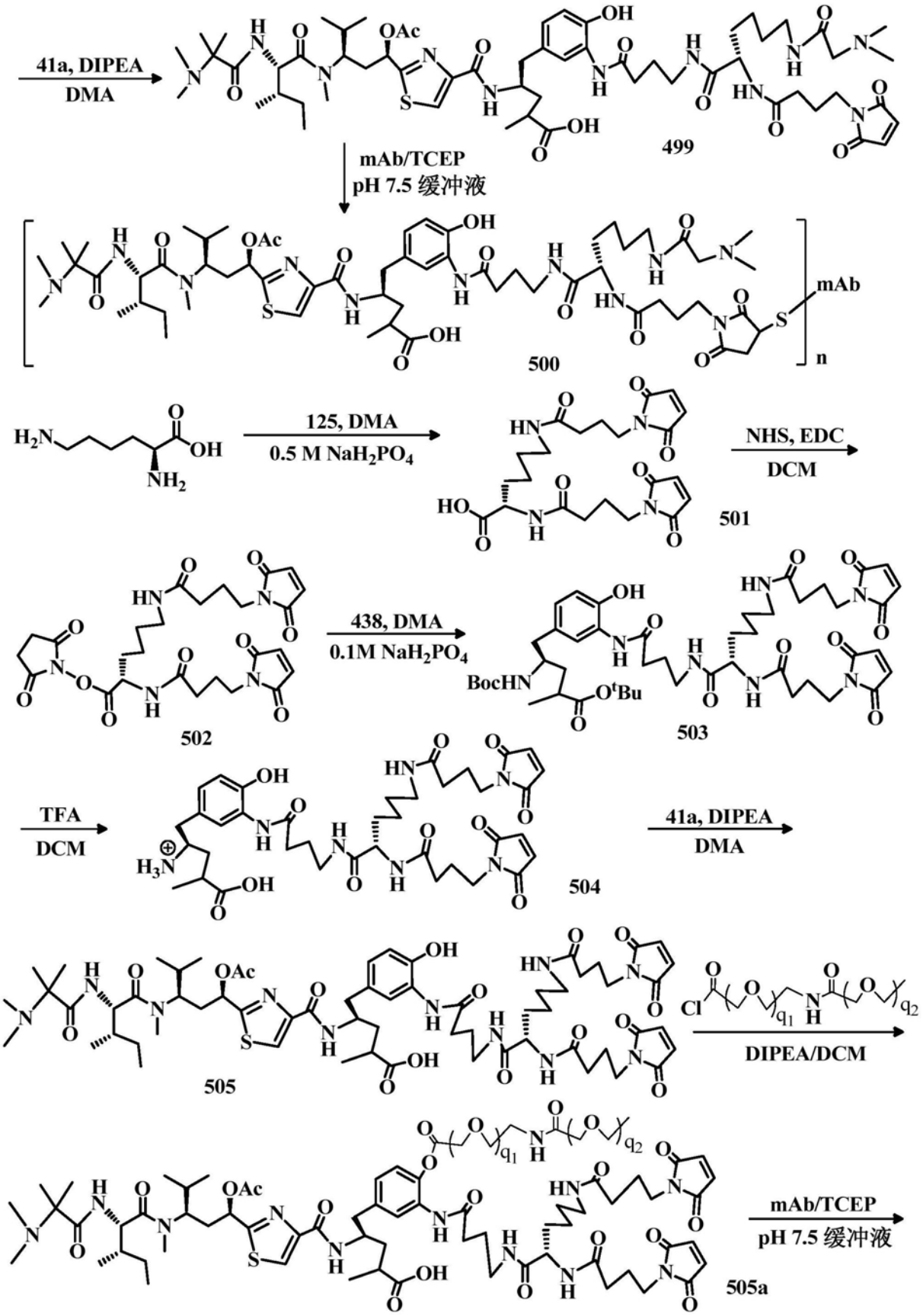

41a, DIPEA
DMA
499
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液
500
mAb
n
125, DMA
0.5 M NaH2PO4
501
NHS, EDC
DCM
502
438, DMA
0.1M NaH2PO4
503
TFA
DCM
504
41a, DIPEA
DMA
505
DIPEA/DCM
505a
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液

图41

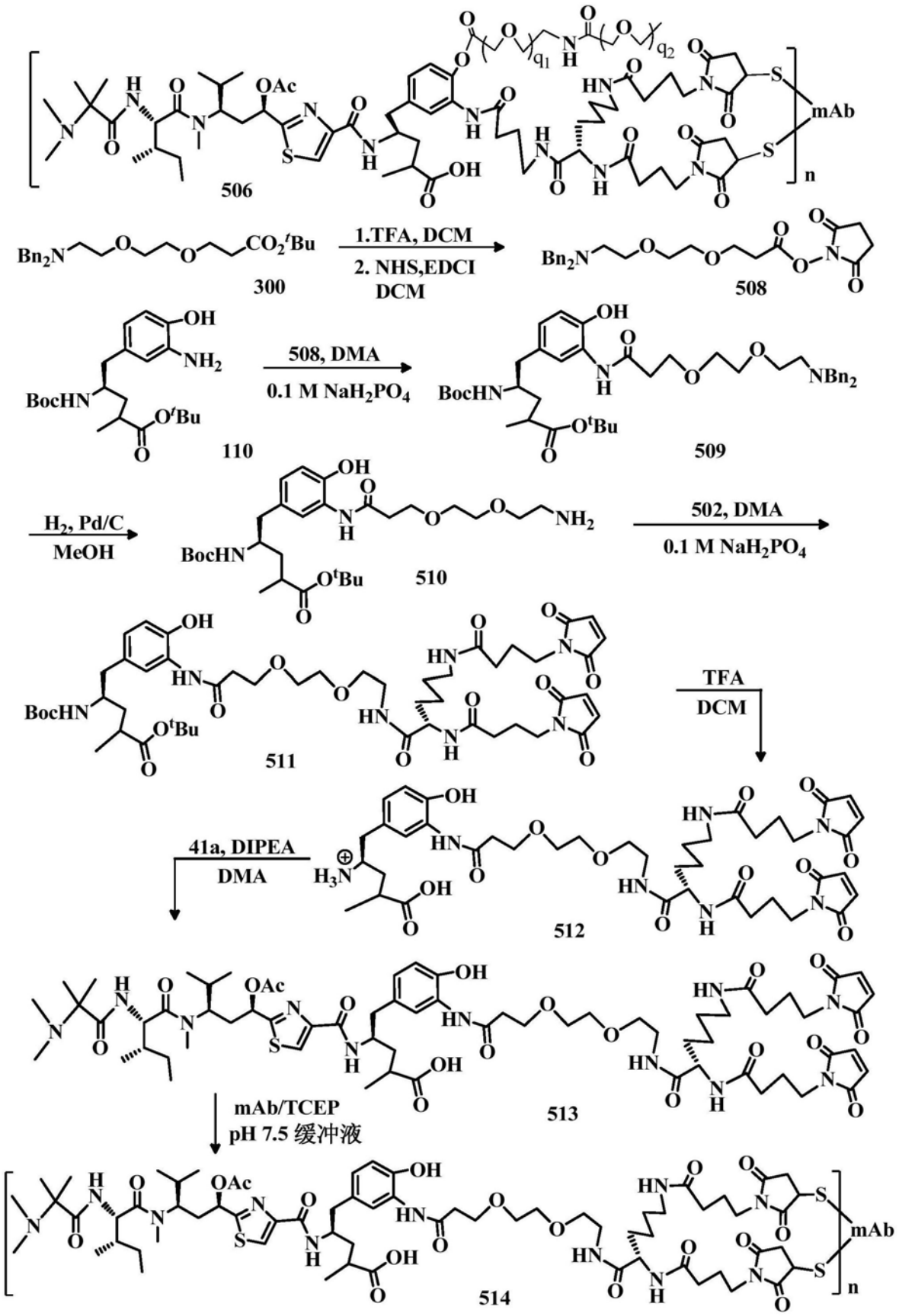

506
mAb
n
300
1.TFA, DCM
2. NHS,EDCI
DCM
508
110
508, DMA
0.1 M NaH2PO4
509
H2, Pd/C
MeOH
510
502, DMA
0.1 M NaH2PO4
511
TFA
DCM
41a, DIPEA
DMA
512
513
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液
514

图42

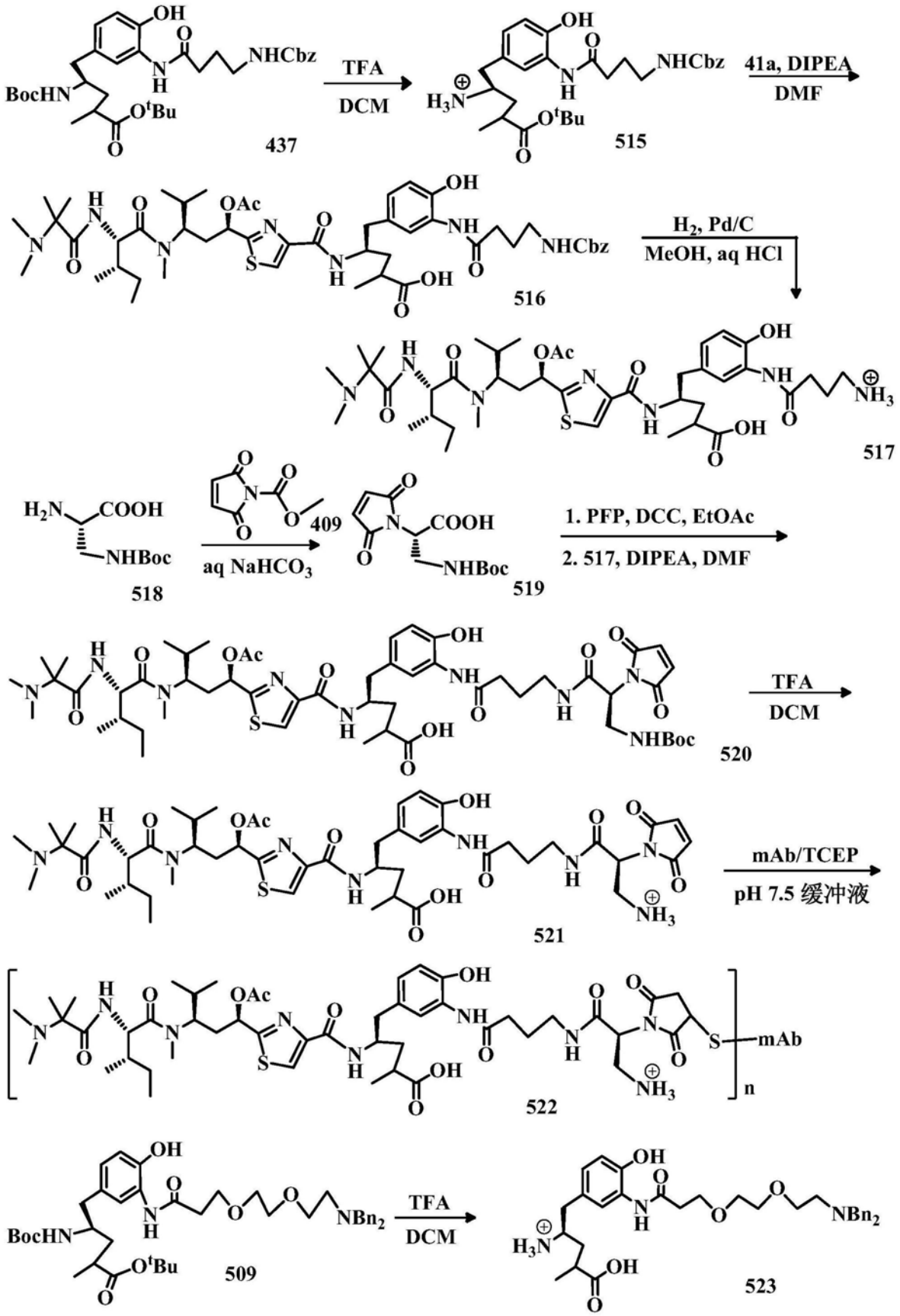

TFA
DCM
437
515
41a, DIPEA
DMF
516
H2, Pd/C
MeOH, aq HCl
517
518
409
aq NaHCO3
519
1. PFP, DCC, EtOAc
2. 517, DIPEA, DMF
520
521
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液
522
509
523

图43

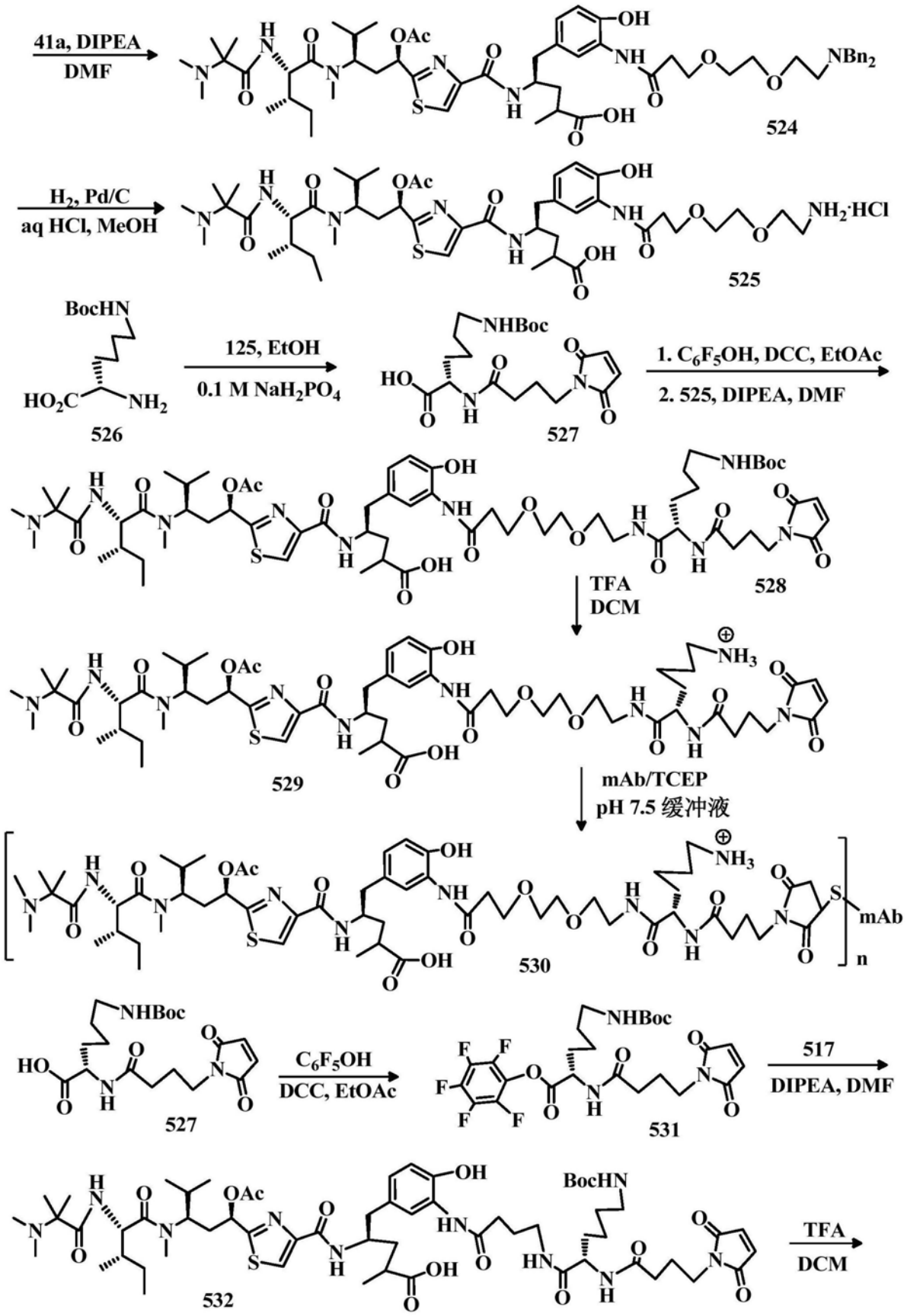

41a, DIPEA
DMF
524
H2, Pd/C
aq HCl, MeOH
525
BocHN
HO2C
NH2
526
125, EtOH
0.1 M NaH2PO4
NHBoc
527
1. C6F5OH, DCC, EtOAc
2. 525, DIPEA, DMF
528
TFA
DCM
529
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液
530
mAb
n
C6F5OH
DCC, EtOAc
531
517
DIPEA, DMF
532
TFA
DCM

图44

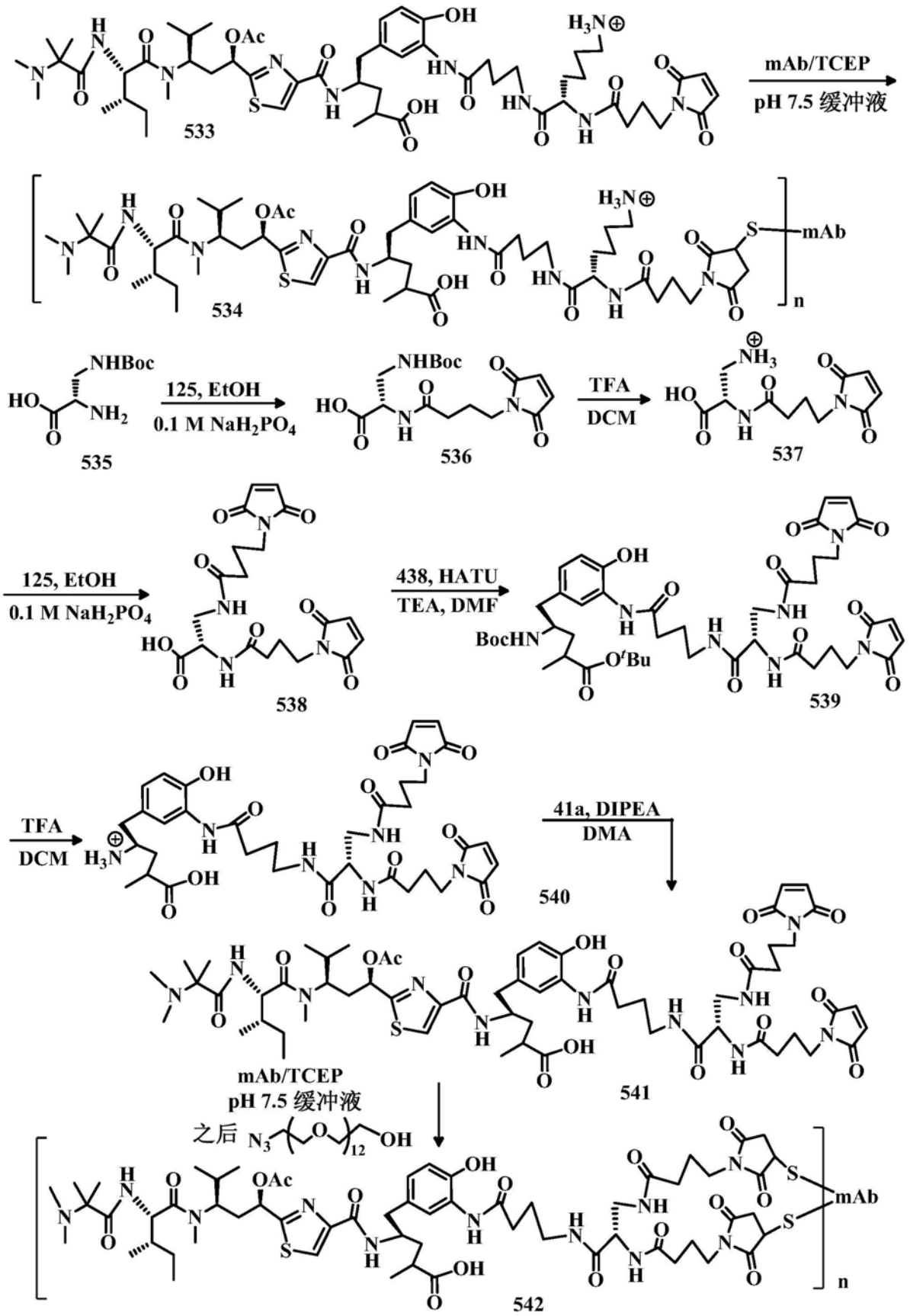

533
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液
534
mAb
n
535
125, EtOH
0.1 M NaH2PO4
536
TFA
DCM
537
538
438, HATU
TEA, DMF
539
540
41a, DIPEA
DMA
541
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液
之后
542

图45

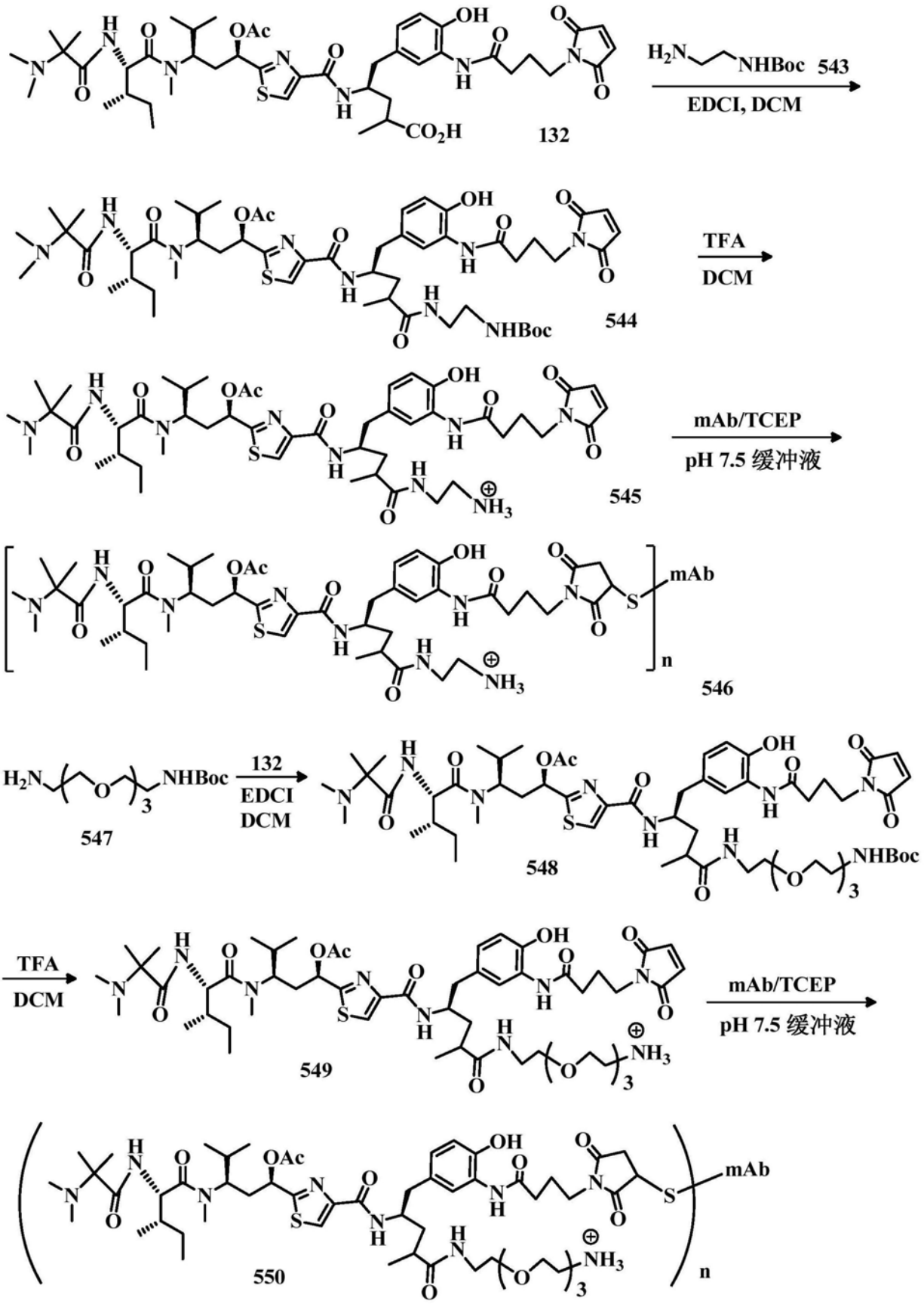

132
543
EDCI, DCM
544
TFA
DCM
545
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液
546
547
132
EDCI
DCM
548
549
550

图46

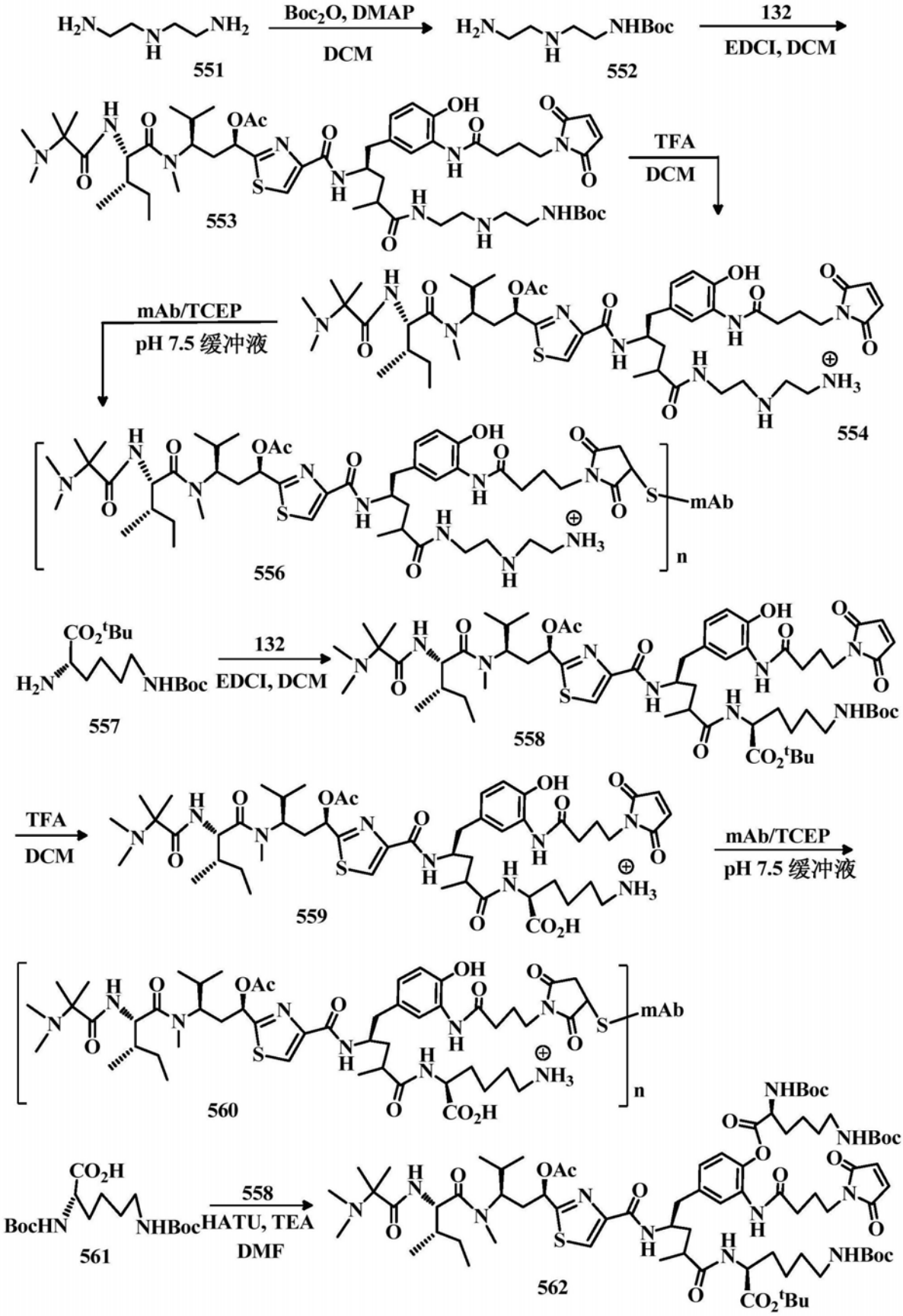

Boc2O, DMAP
DCM
551
552
132
EDCI, DCM
553
TFA
DCM
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液
554
556
557
558
559
560
561
558
HATU, TEA
DMF
562

图47

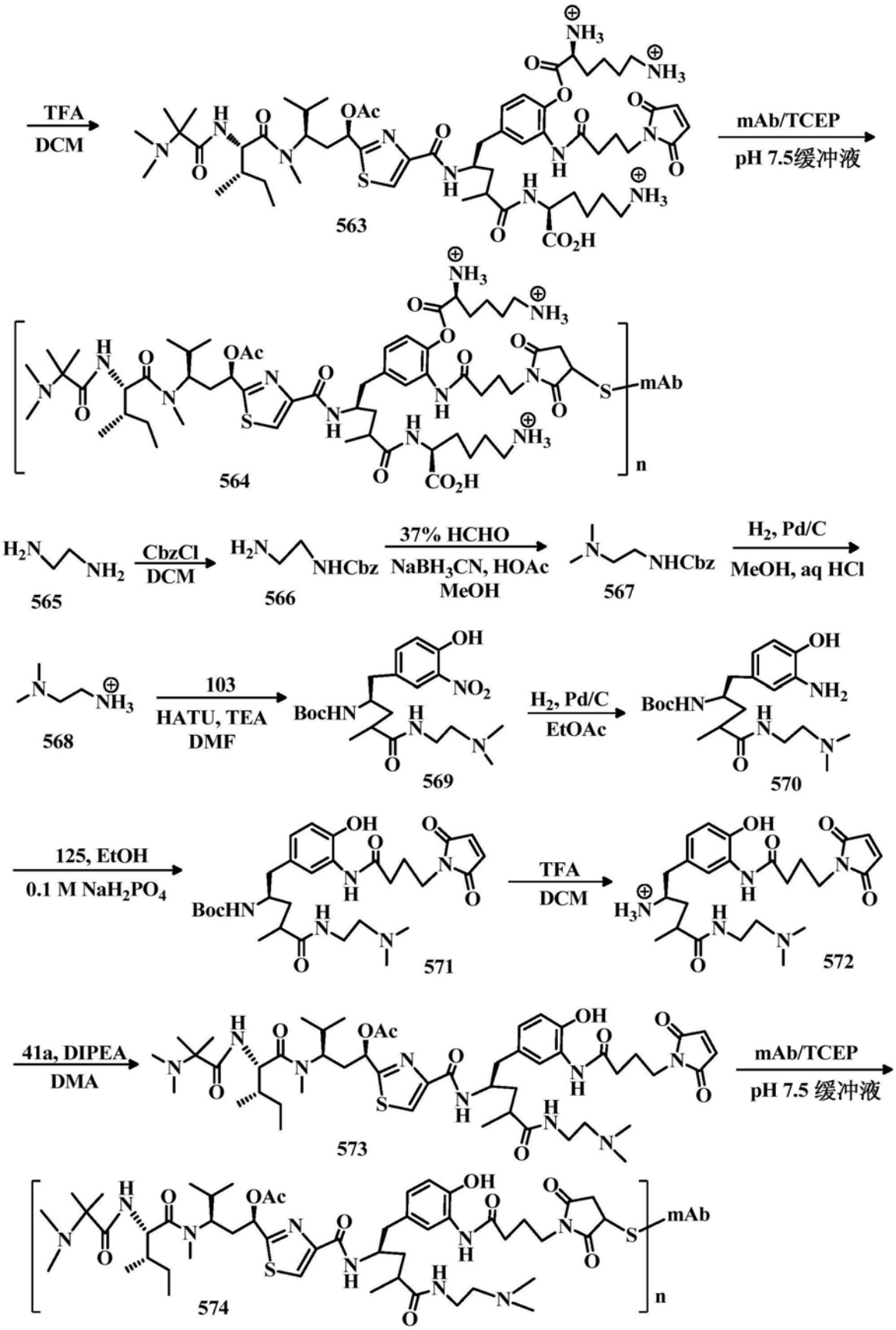

TFA
DCM
563
mAb/TCEP
pH 7.5缓冲液
564
mAb
n
565
CbzCl
DCM
566
37% HCHO
NaBH3CN, HOAc
MeOH
567
H2, Pd/C
MeOH, aq HCl
568
103
HATU, TEA
DMF
569
H2, Pd/C
EtOAc
570
125, EtOH
0.1 M NaH2PO4
571
TFA
DCM
572
41a, DIPEA
DMA
573
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液
574

图48

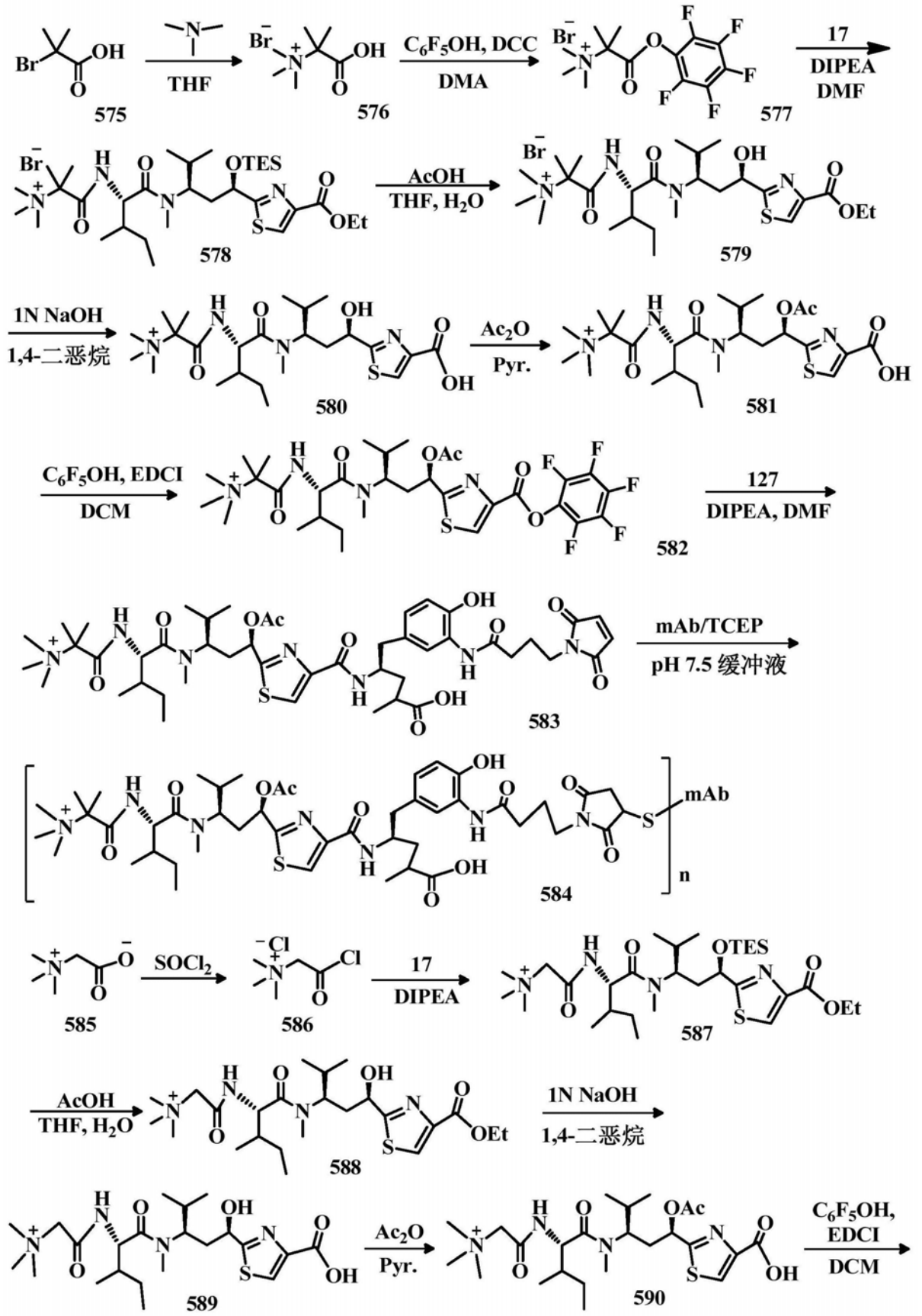

575
THF
576
C_6F_5OH, DCC
DMA
577
17
DIPEA
DMF
578
AcOH
THF, H_2O
579
1N NaOH
1,4-二恶烷
580
Ac_2O
Pyr.
581
C_6F_5OH, EDCI
DCM
582
127
DIPEA, DMF
583
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液
584
585
$SOCl_2$
586
17
DIPEA
587
AcOH
THF, H_2O
588
1N NaOH
1,4-二恶烷
589
Ac_2O
Pyr.
590
C_6F_5OH,
EDCI
DCM

图49

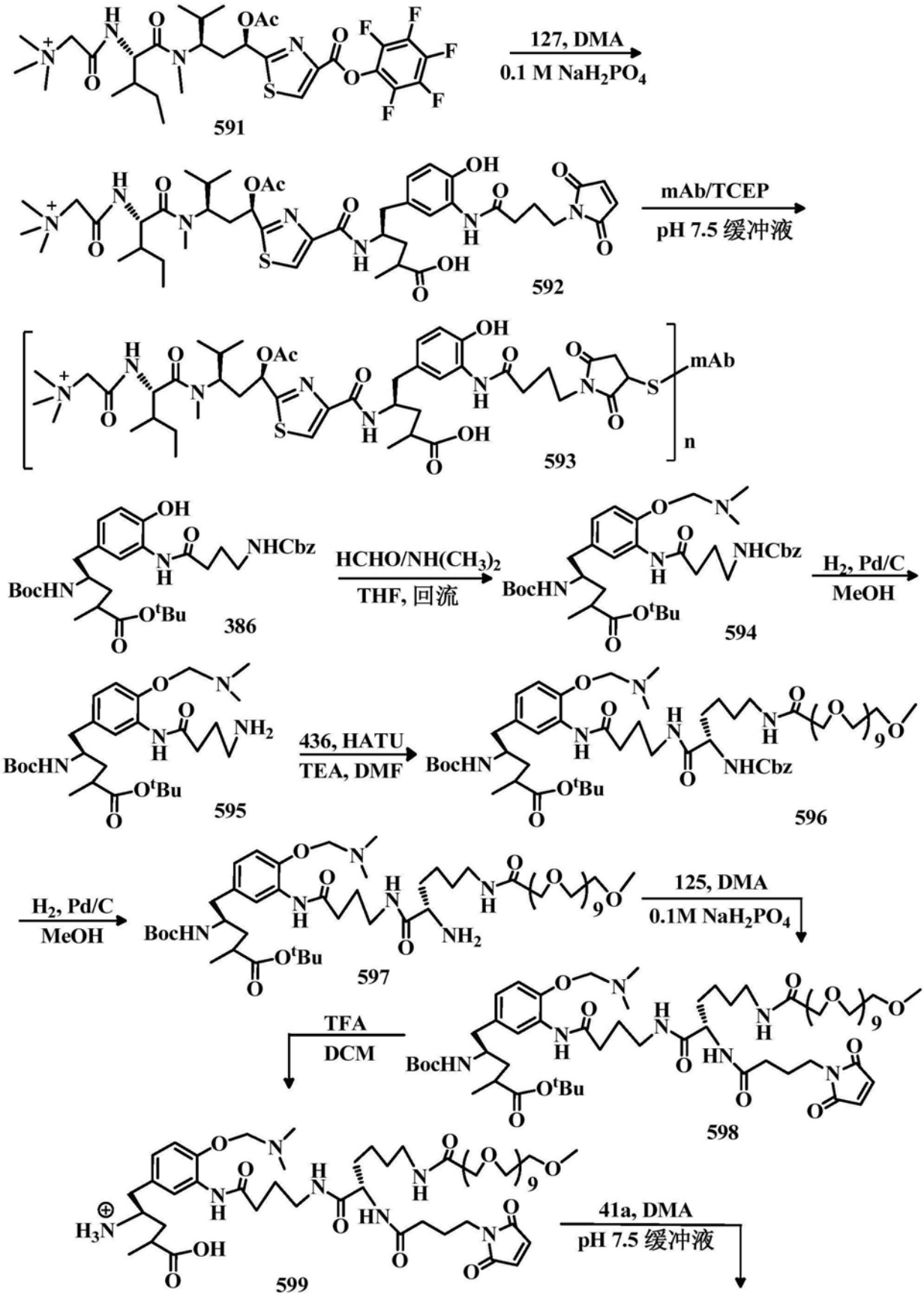

127, DMA
0.1 M NaH2PO4
591
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液
592
mAb
n
593
HCHO/NH(CH3)2
THF, 回流
386
594
H2, Pd/C
MeOH
595
436, HATU
TEA, DMF
596
125, DMA
0.1M NaH2PO4
597
TFA
DCM
598
41a, DMA
pH 7.5 缓冲液
599

图50

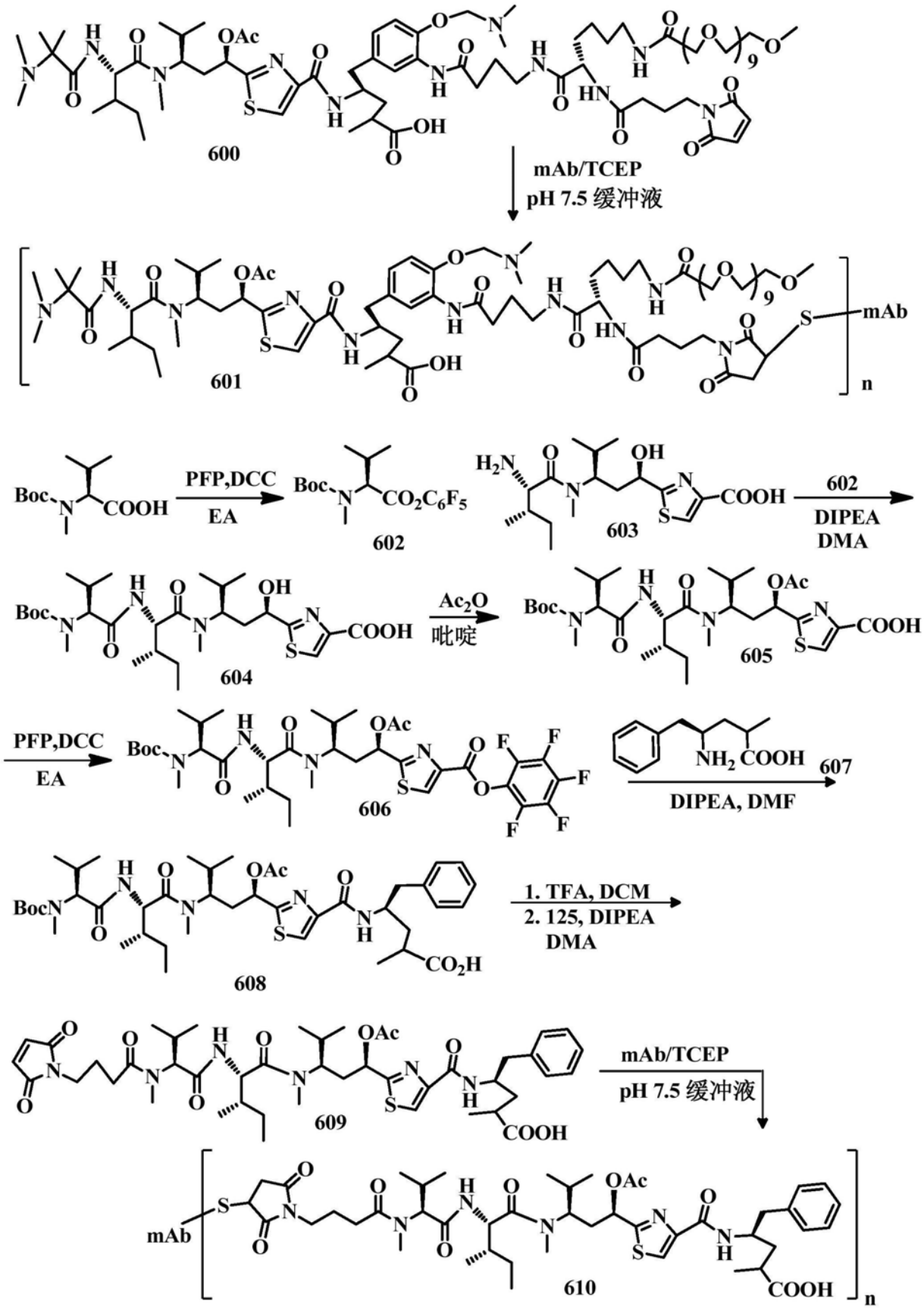

600
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液
601
mAb
n
Boc
COOH
PFP,DCC
EA
$CO_2C_6F_5$
602
H_2N
603
DIPEA
DMA
604
Ac_2O
吡啶
605
606
F
607
NH_2
DIPEA, DMF
608
1. TFA, DCM
2. 125, DIPEA
DMA
CO_2H
609
610

图51

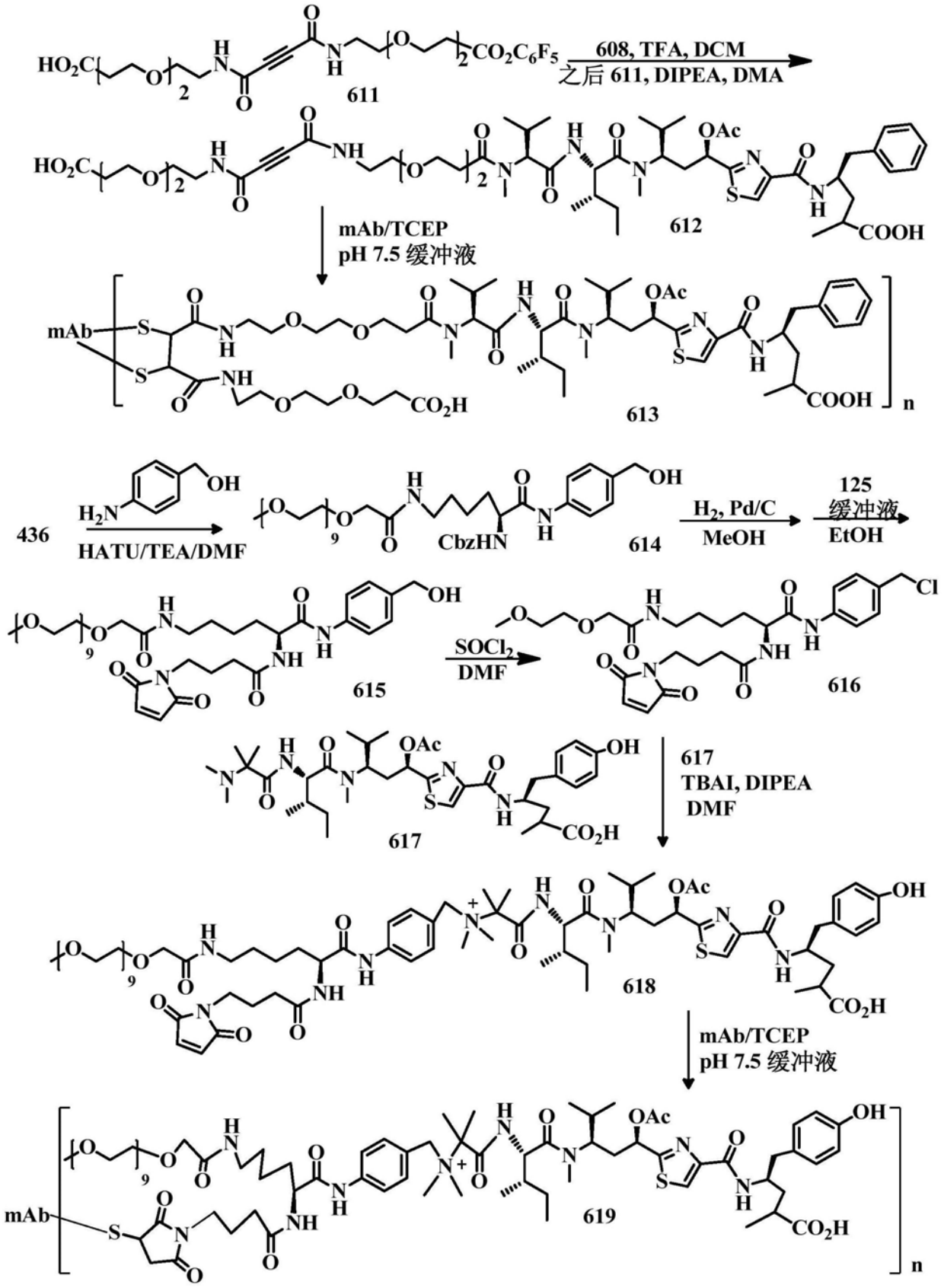

608, TFA, DCM
之后 611, DIPEA, DMA
611
612
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液
613
436
HATU/TEA/DMF
614
H2, Pd/C
MeOH
125
缓冲液
EtOH
615
SOCl2
DMF
616
617
TBAI, DIPEA
DMF
618
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液
619

图52

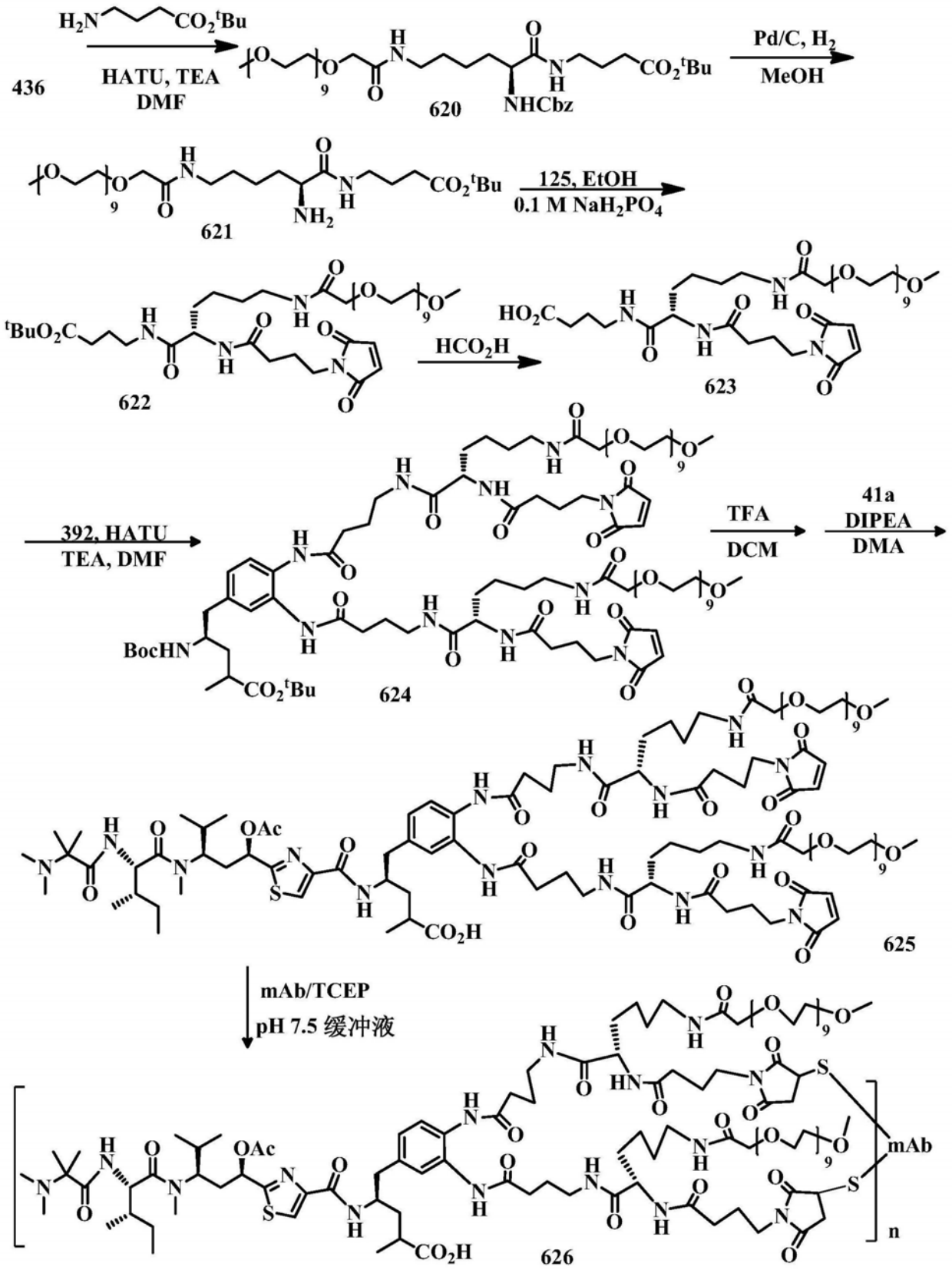

436
HATU, TEA
DMF
620
Pd/C, H2
MeOH
621
125, EtOH
0.1 M NaH2PO4
622
HCO2H
623
392, HATU
TEA, DMF
624
TFA
DCM
41a
DIPEA
DMA
625
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液
626
mAb

图53

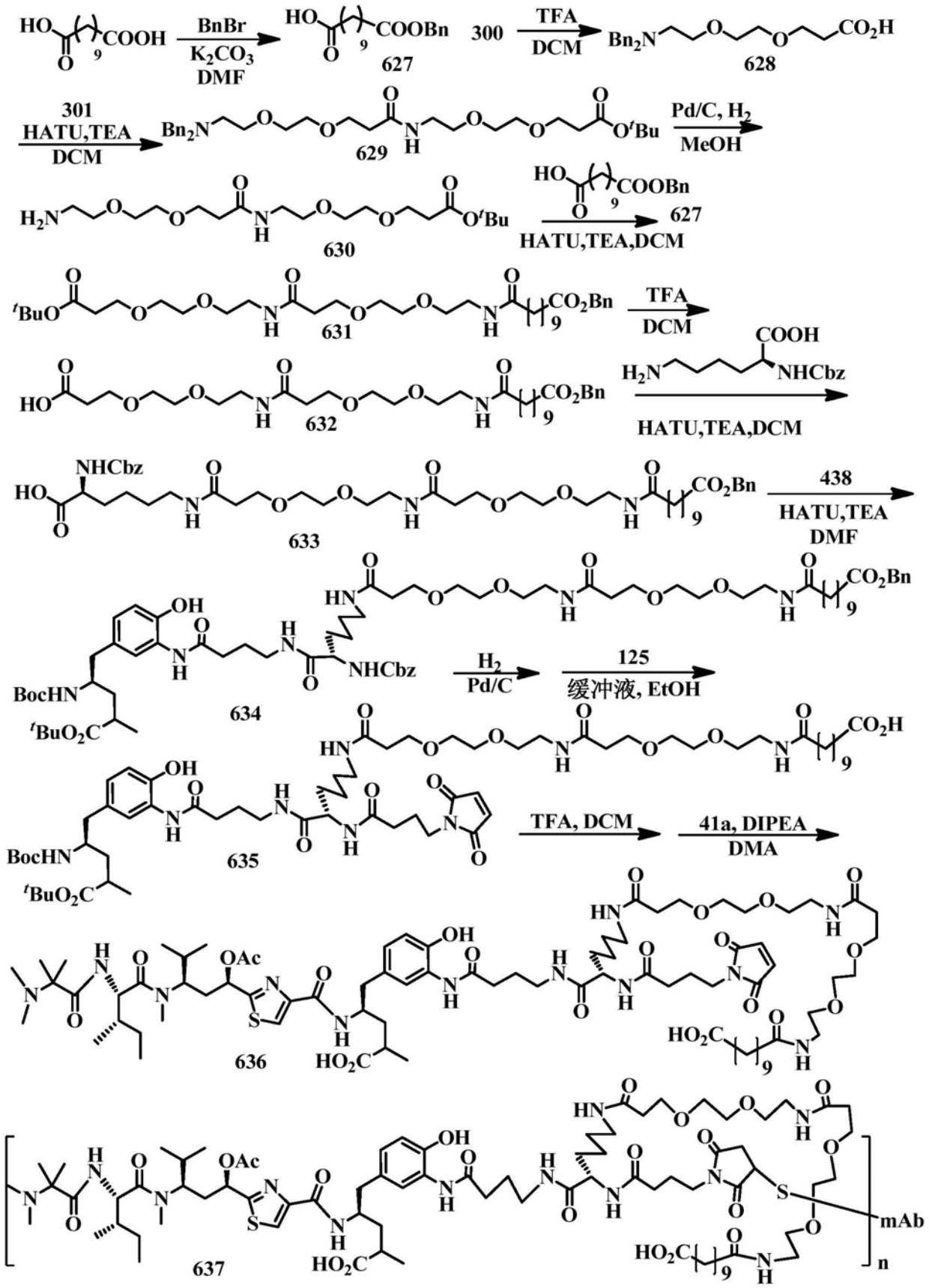

BnBr
K2CO3
DMF
627
300
TFA
DCM
628
301
HATU,TEA
DCM
629
Pd/C, H2
MeOH
630
HATU,TEA,DCM
631
TFA
DCM
632
HATU,TEA,DCM
633
438
HATU,TEA
DMF
634
H2
Pd/C
125
缓冲液, EtOH
635
TFA, DCM
41a, DIPEA
DMA
636
637
mAb

图54

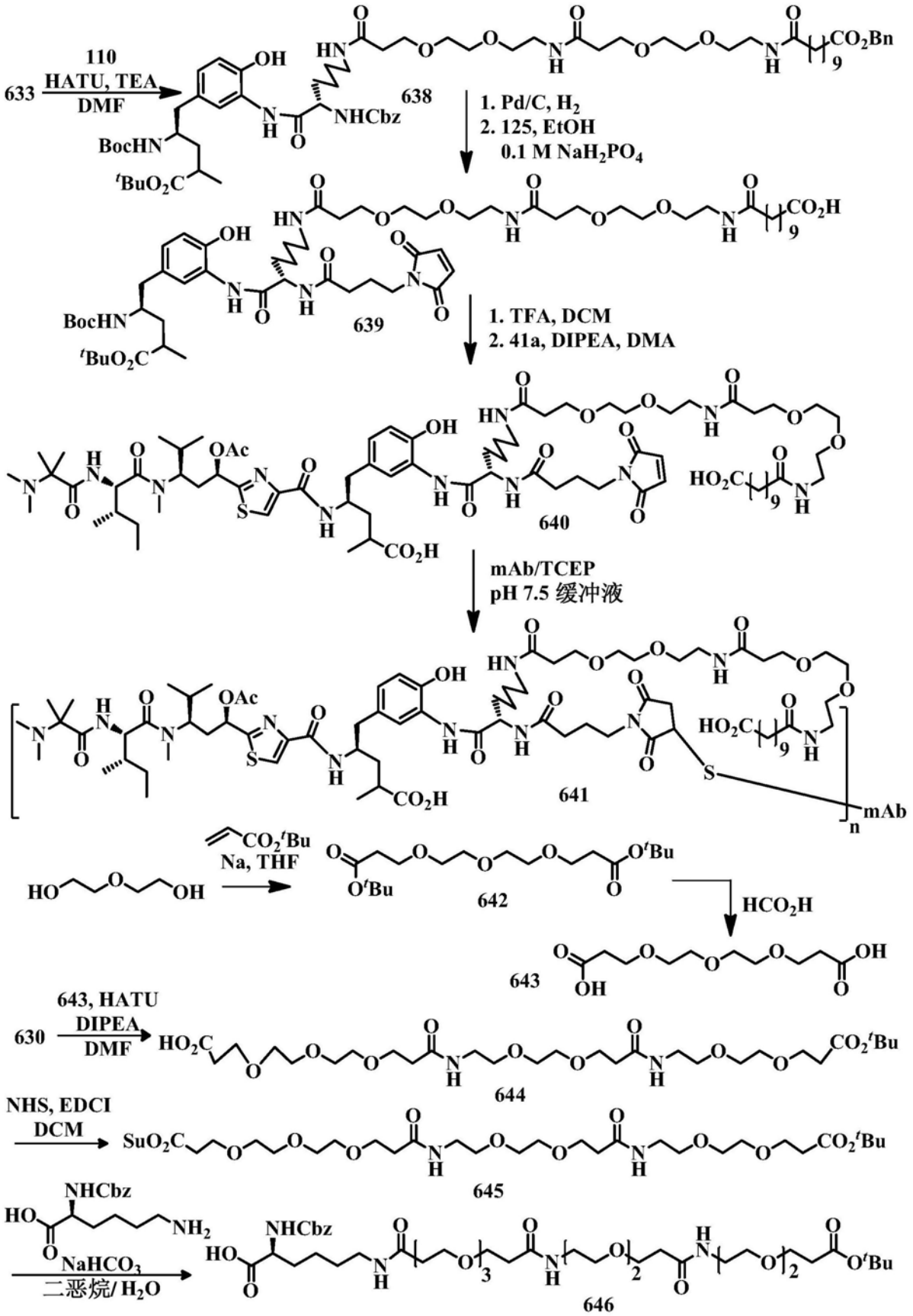

110
633
HATU, TEA
DMF
638
1. Pd/C, H2
2. 125, EtOH
0.1 M NaH2PO4
639
1. TFA, DCM
2. 41a, DIPEA, DMA
640
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液
641
mAb
Na, THF
642
HCO2H
643
643, HATU
DIPEA
DMF
630
644
NHS, EDCI
DCM
645
NaHCO3
二恶烷/ H2O
646

图55

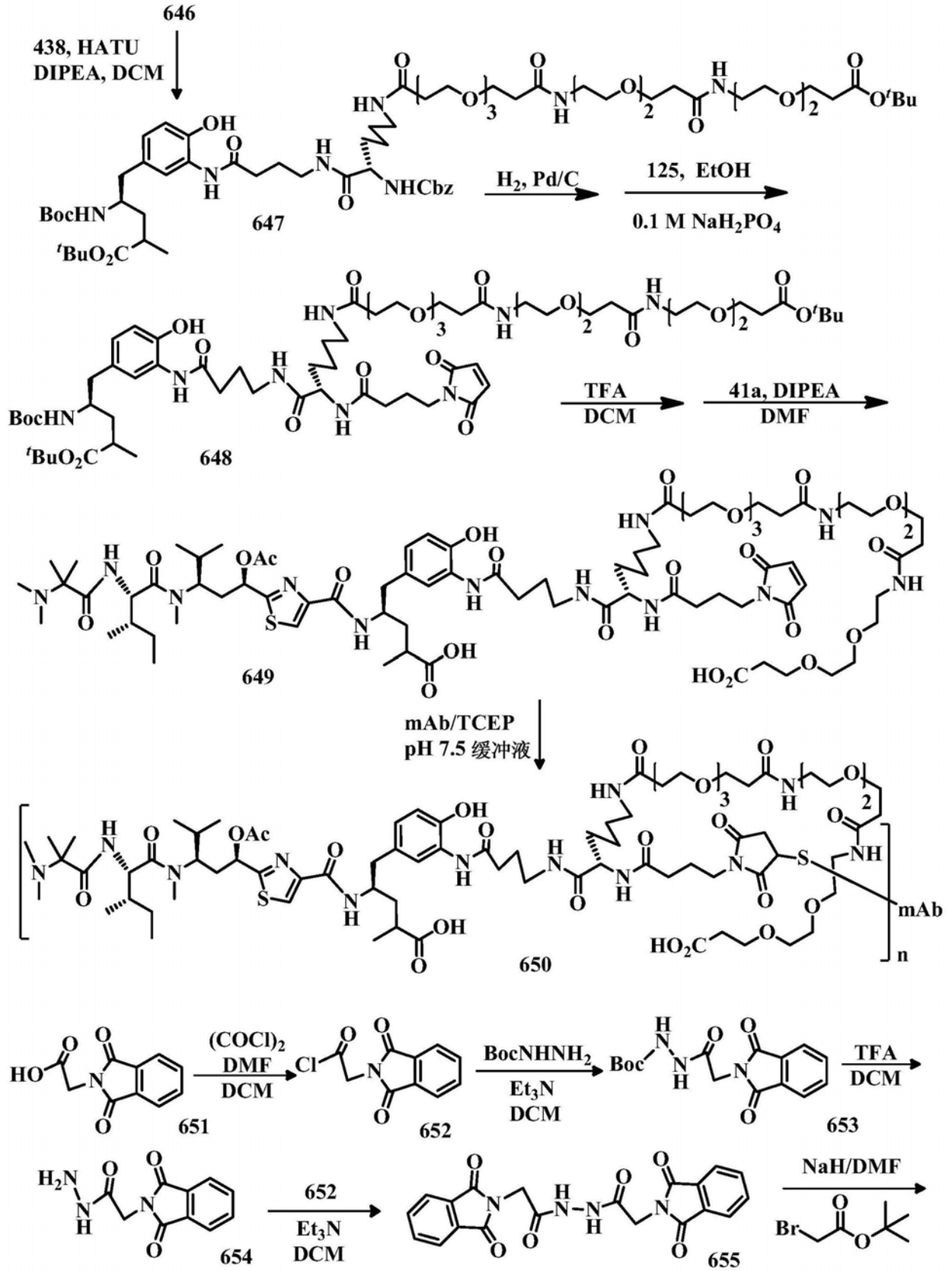

646
438, HATU
DIPEA, DCM
647
H2, Pd/C
125, EtOH
0.1 M NaH2PO4
648
TFA
DCM
41a, DIPEA
DMF
649
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液
650
mAb
n
651
(COCl)2
DMF
DCM
652
BocNHNH2
Et3N
DCM
653
TFA
DCM
654
652
Et3N
DCM
655
NaH/DMF

图56

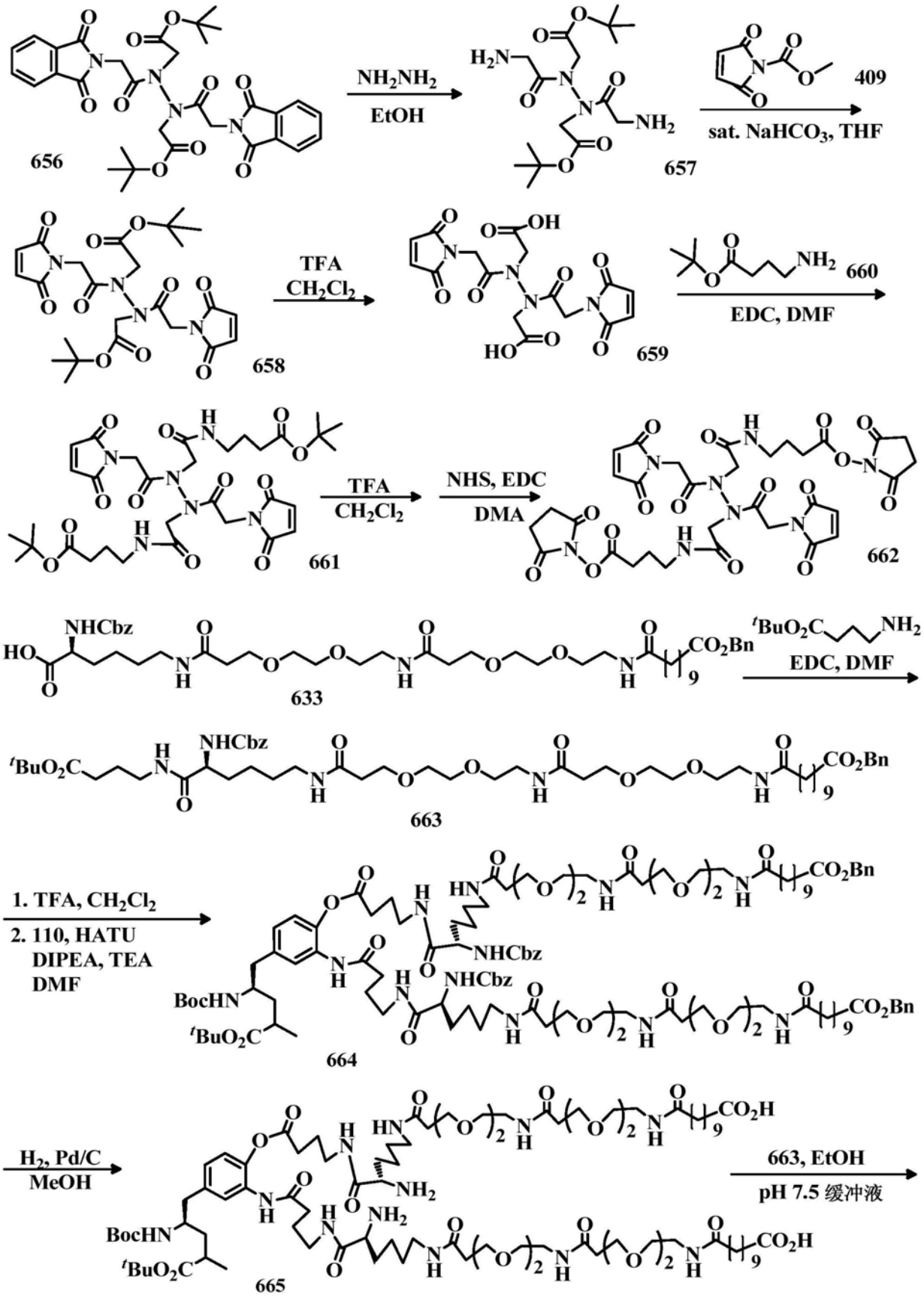

656
NH2NH2
EtOH
657
409
sat. NaHCO3, THF
658
TFA
CH2Cl2
659
660
EDC, DMF
661
TFA
CH2Cl2
NHS, EDC
DMA
662
633
EDC, DMF
663
1. TFA, CH2Cl2
2. 110, HATU
DIPEA, TEA
DMF
664
H2, Pd/C
MeOH
663, EtOH
pH 7.5 缓冲液
665

图57

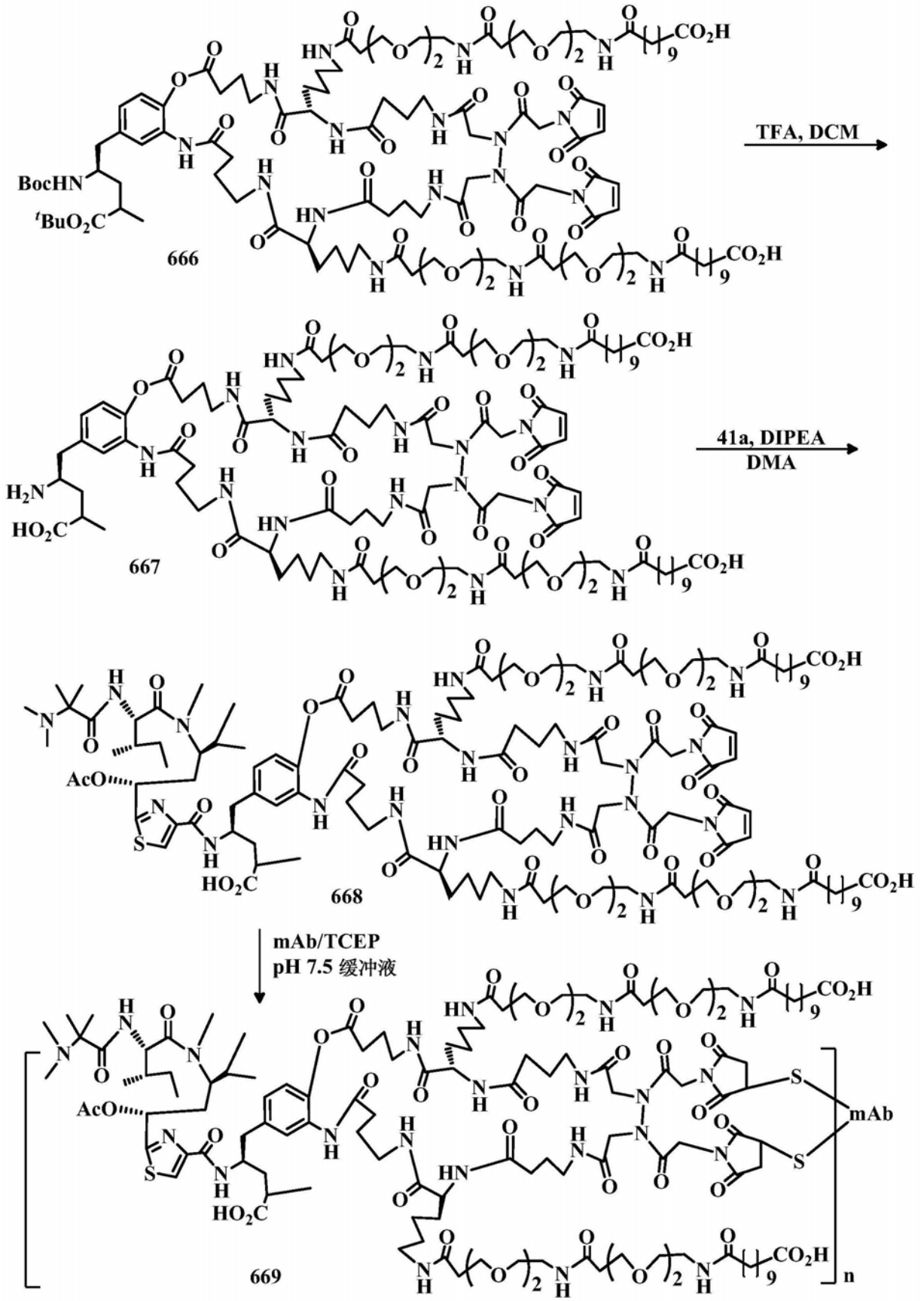

TFA, DCM
BocHN
tBuO2C
666
41a, DIPEA
DMA
H2N
HO2C
667
AcO
HO2C
668
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液
mAb
669

图58

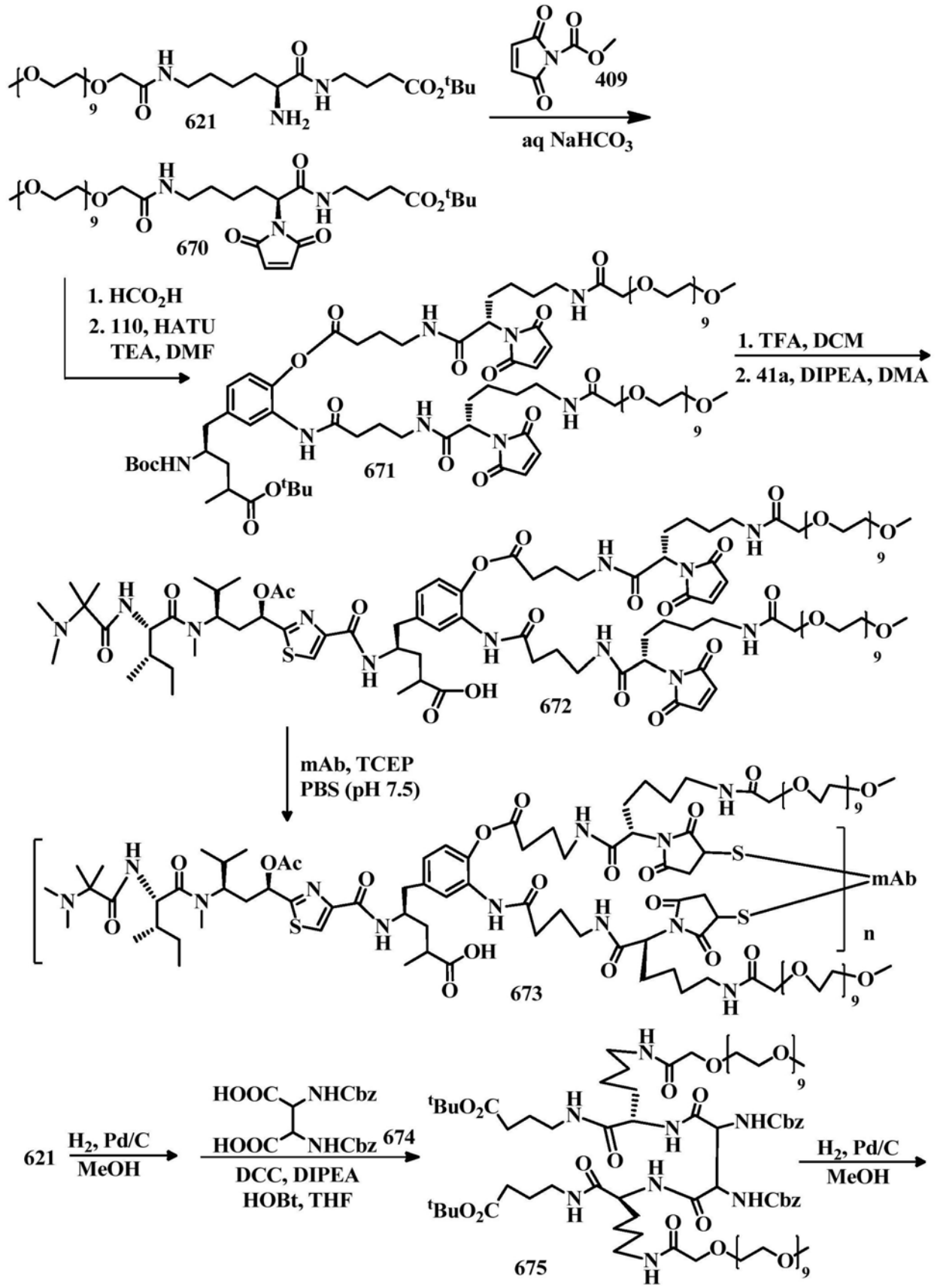

621
409
aq NaHCO3
670
1. HCO2H
2. 110, HATU
TEA, DMF
671
1. TFA, DCM
2. 41a, DIPEA, DMA
672
mAb, TCEP
PBS (pH 7.5)
673
mAb
n
621
H2, Pd/C
MeOH
HOOC NHCbz
HOOC NHCbz
674
DCC, DIPEA
HOBt, THF
675
H2, Pd/C
MeOH

图59

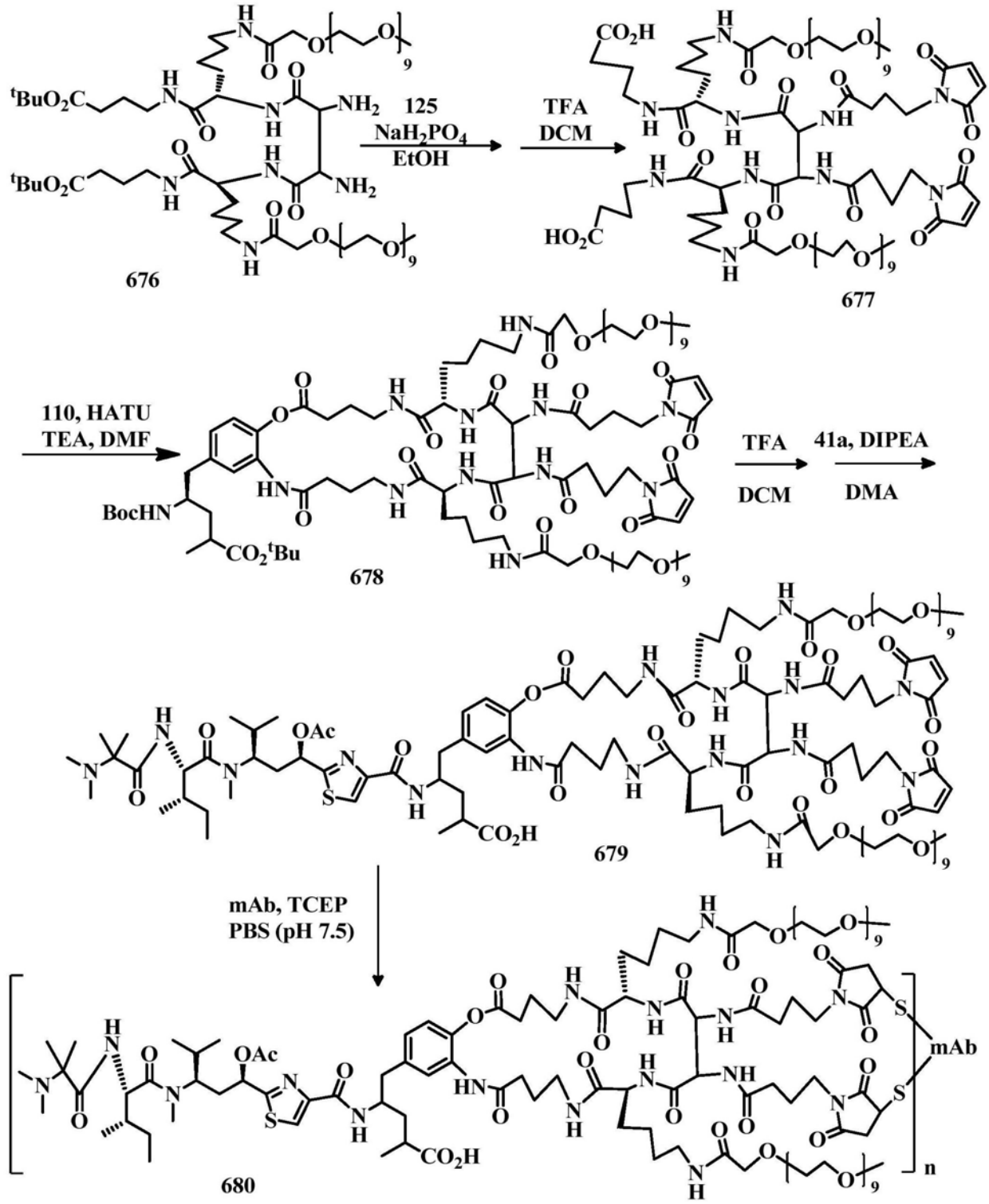

676
125
NaH2PO4
EtOH
TFA
DCM
677
110, HATU
TEA, DMF
678
TFA
DCM
41a, DIPEA
DMA
679
mAb, TCEP
PBS (pH 7.5)
680
mAb
n

图60

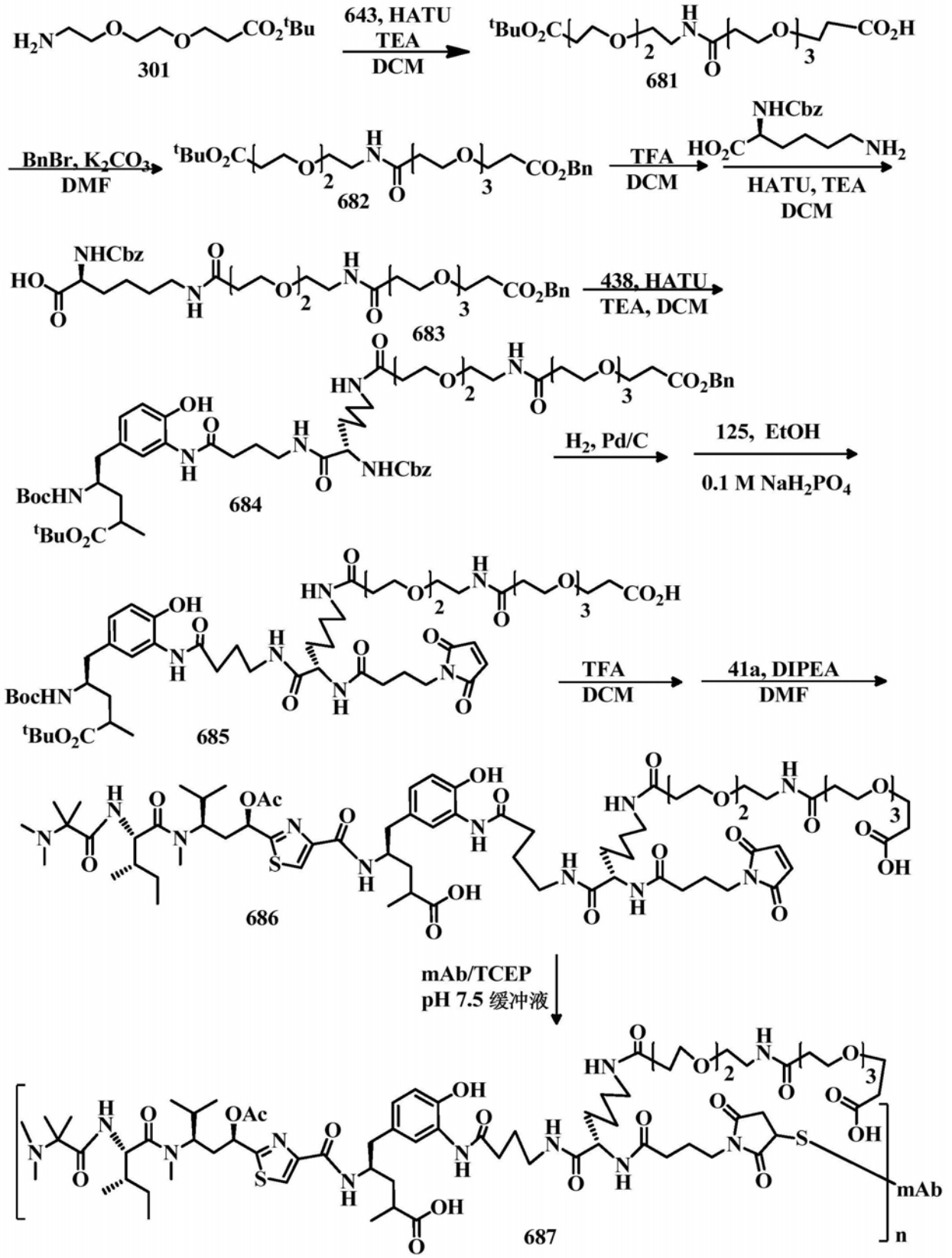

643, HATU
TEA
DCM
301
681
BnBr, K2CO3
DMF
682
TFA
DCM
NHCbz
HATU, TEA
DCM
683
438, HATU
TEA, DCM
684
H2, Pd/C
125, EtOH
0.1 M NaH2PO4
685
TFA
DCM
41a, DIPEA
DMF
686
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液
687
mAb
n

图61

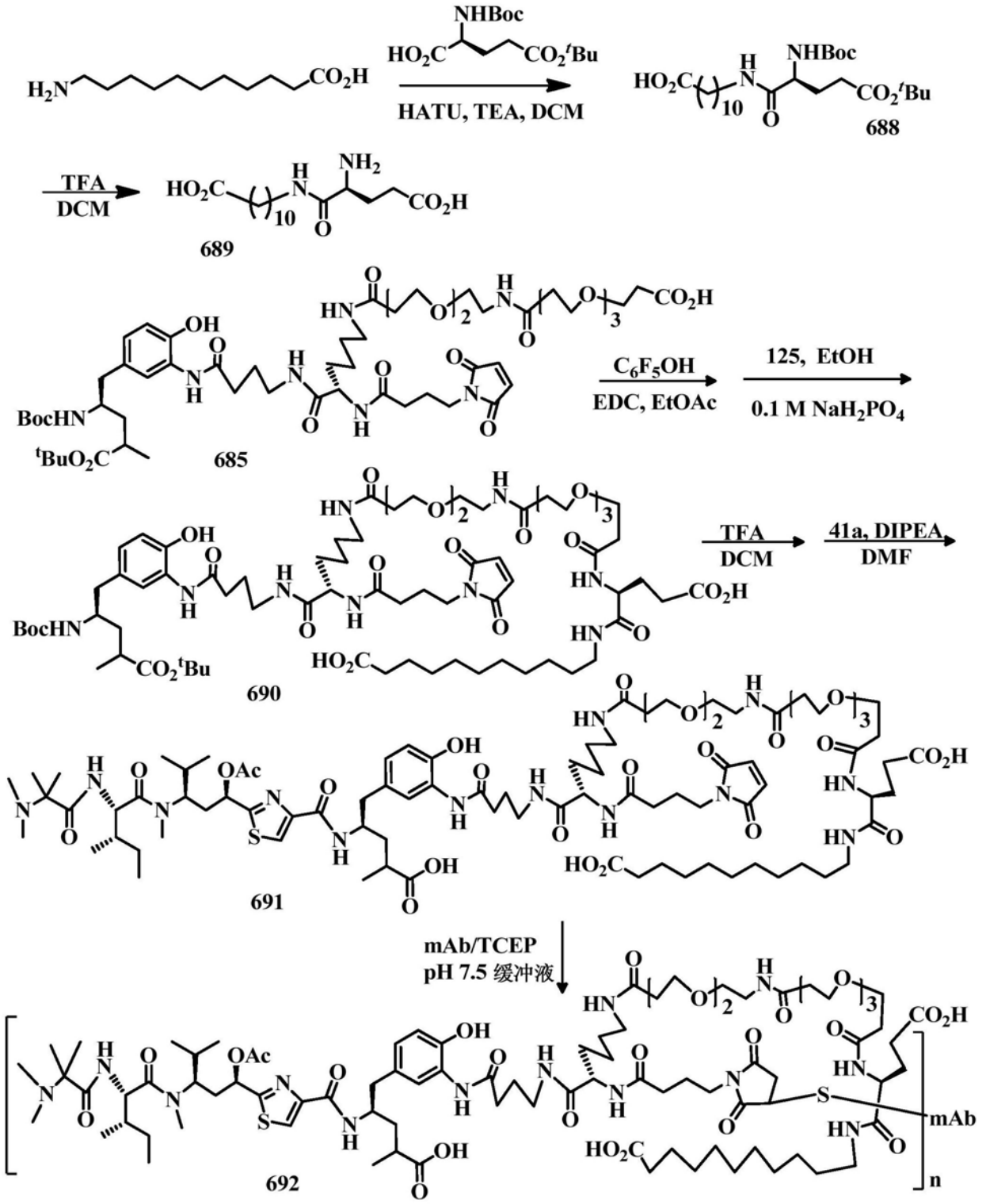

NHBoc
HO2C
CO2tBu
H2N
CO2H
HATU, TEA, DCM
688
TFA
DCM
NH2
689
C6F5OH
EDC, EtOAc
125, EtOH
0.1 M NaH2PO4
BocHN
tBuO2C
685
690
41a, DIPEA
DMF
691
mAb/TCEP
pH 7.5 缓冲液
692
mAb
n

图62

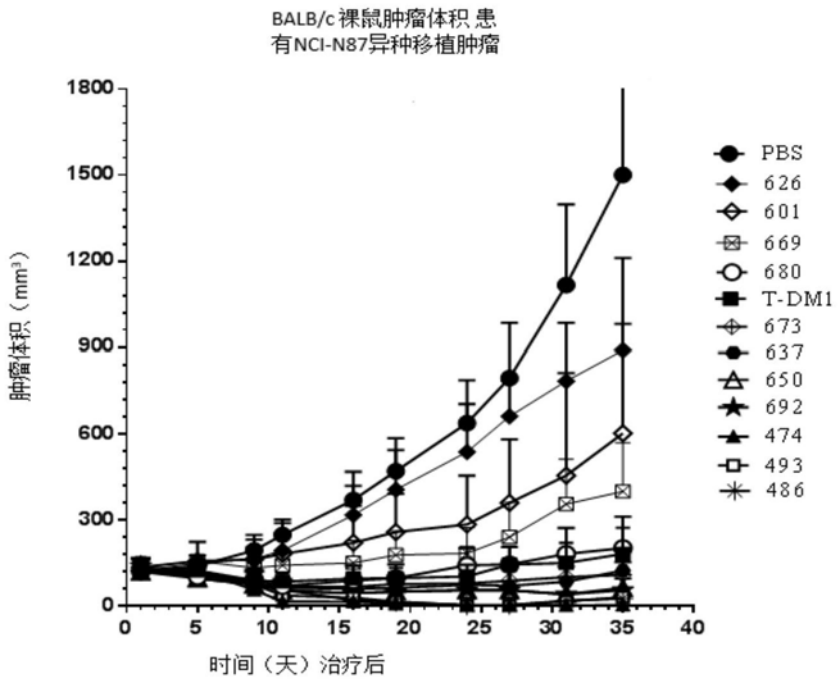

BALB/c裸鼠肿瘤体积 患
有NCI-N87异种移植肿瘤
肿瘤体积（mm³）
1800
1500
1200
900
600
300
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
时间（天）治疗后
PBS
626
601
669
680
T-DM1
673
637
650
692
474
493
486

图63

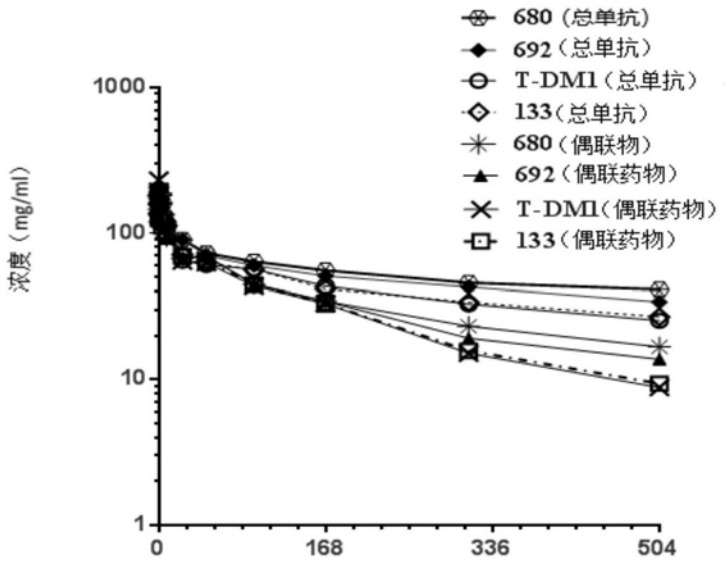

680（总单抗）
692（总单抗）
T-DM1（总单抗）
133（总单抗）
680（偶联物）
692（偶联药物）
T-DM1（偶联药物）
133（偶联药物）
浓度（mg/ml）
1000
100
10
1
0
168
336
504

图64