

配体-药物偶联物、偶联连接子及其用途

相关申请的交叉引用

本申请要求 2023 年 11 月 14 日向中国国家知识产权局提交的第 202311515509.5 号专利申请以及 2024 年 02 月 06 日向中国国家知识产权局提交的第 202410173706.1 号专利申请的权益和优先权，在此将它们的全部内容以援引的方式整体并入本文中。

技术领域

本公开属于生物医药领域，涉及一类结构新颖的配体-药物偶联物及其偶联连接子、含有该偶联物的药物组合物以及该偶联物作为抗肿瘤药物等方面的用途。

背景技术

抗体偶联药物（antibody drug conjugate, ADC）是近年来新型的一种药物治疗形式。从结构上看，ADC 的组成包括具有靶向作用的抗体、发挥药理活性作用的荷载（payload）以及一条连接链（linker）将抗体和荷载通过化学方式连接起来。从机制上讲，ADC 是通过抗体对抗原的特异性识别作用，增强 ADC 在抗原高表达的病灶组织部位富集，并经过内吞、溶酶体降解等方式，实现活性 payload 在病灶组织的靶向释放，进而产生药理作用。与此同时，ADC 在体循环内能够保持相对稳定的状态，相比于病灶组织，仅有少量的 payload 能够释放到体循环中，进而降低了高活性 payload 的全身性毒性。ADC 通过这样选择性释放的机制，进一步提高了对疾病的治疗效果并降低了毒性风险。而 linker 作为连接抗体与 payload 之间的桥梁，在如何控制 payload 的靶组织释放以及体循环中的稳定中，发挥着重要作用。

在 ADC 的 linker 中，将小分子与抗体通过化学键相连的部分称为偶联连接子。对于与抗体的偶联方式大致可分为，通过与抗体上天然氨基酸残基进行偶联（如赖氨酸、半胱氨酸等），以及通过工程化抗体改造所进行的定点偶联（如 N297 糖基偶联、非天然氨基酸偶联等）。针对不同的抗体偶联方式，对应的偶联连接子也有所不同。目前在已经上市的 ADC 中，通过半胱氨酸上的巯基进行偶联是最常用的偶联方式之一。通常情况下，抗体中含有 4 对链间二硫键，通过还原的方式可以得到 8 个含巯基的半胱氨酸。借助于巯基的亲核活性，可以与偶联连接子进行化学反应，将抗体与 linker-payload 连接在一起。其中最常用的偶联连接子为马来酰亚胺，其可通过迈克尔加成反应与半胱氨酸上的巯基高效地形成碳-硫键，进而将 payload 与抗体相连。例如，Adcetris, Enhertu 等均是通過马来酰亚胺进行半胱氨酸偶联得到的 ADC 产品。

发明内容

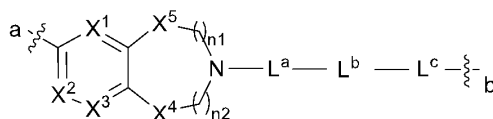
第一方面，本公开提供一种配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其结构通式为 $Pc-(L-D)_n$ ，

其中，

Pc 为配体单元；

D 为药物单元；

L 为以下结构的连接子单元，a 端与配体单元连接，



(L)

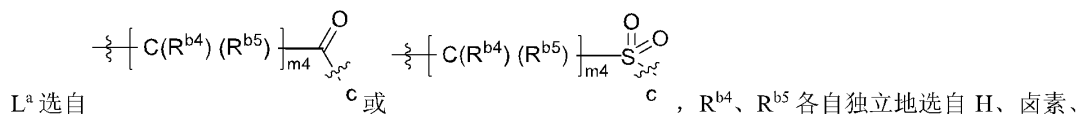
其中，

X^1 、 X^2 、 X^3 各自独立地选自 N 或 CR^{a1} ，且 X^1 、 X^2 、 X^3 中的至少一个选自 N，所述 R^{a1} 选自 H、卤素、CN、 C_1 - C_3 烷基、 C_2 - C_3 烯基、 C_2 - C_3 炔基、 C_3 - C_6 环烷基或 4-7 元杂环基；

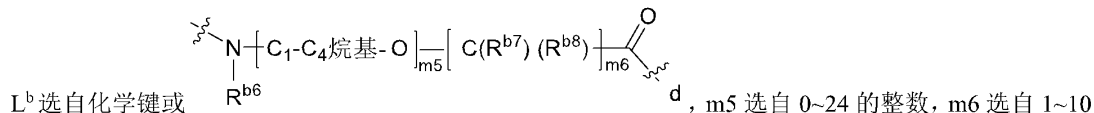
n_1 、 n_2 各自独立地选自 0、1、2；

X^4 、 X^5 各自独立地选自 $C(=O)$ 、 $C(R^{b1})(R^{b2})$ 、O、S、 $S(=O)$ 、 $S(=O)_2$ 、 NR^{b3} 或它们的任意组合，所述 R^{b1} 、 R^{b2} 、 R^{b3} 各自独立地选自 H 或 R^{c1} ，或者 R^{b1} 、 R^{b2} 与它们连接的碳原子共同形成 C_3 - C_6 环烷基或 4-7 元杂环基，所述 C_3 - C_6 环烷基或 4-7 元杂环基任选地被一个或多个 R^{c1} 取代；

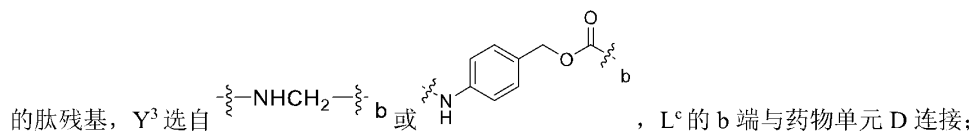
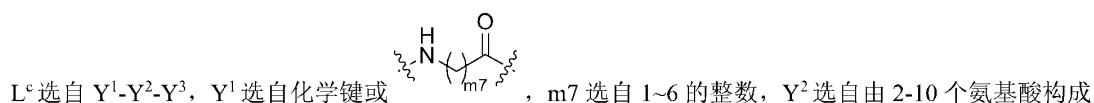
每一个 R^{c1} 独立地选自卤素、CN、 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_6 环烷基或者亲水性基团；



CN、C₁-C₃烷基、OH、O(C₁-C₃烷基)、NH₂、NH(C₁-C₃烷基)或N(C₁-C₃烷基)₂，或者R^{b4}、R^{b5}与它们连接的碳原子共同形成C₃-C₆环烷基或4-7元杂环基，m4选自1~10的整数，L^a的c端与L^b连接；



的整数，每一个 R^{b6} 、 R^{b7} 、 R^{b8} 各自独立地选自 H 或 R^{c6} ，所述 R^{c6} 选自卤素、CN、 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_6 环烷基或者亲水性基团， L^b 的 d 端与 L^c 连接；



n 为 1~16 的实数。

在一些实施方案中， X^1 、 X^2 均选自N， X^3 选自CH。

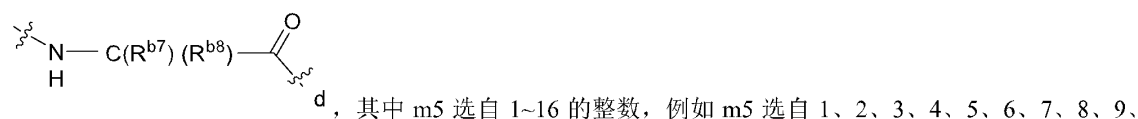
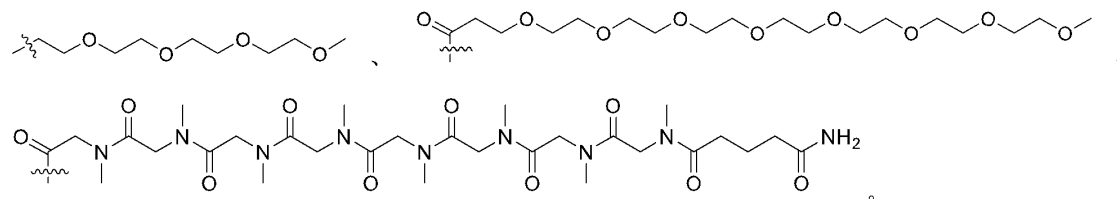
在一些实施方案中，n1、n2 各自独立地选自 0 或 1。

在一些实施方案中，n1 选自 1，n2 选自 0。

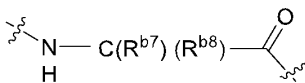
在一些实施方案中, X⁴、X⁵各自独立地选自 C(=O)或 C(R^{b1})(R^{b2}), 所述 R^{b1}、R^{b2}各自独立地选自 H 或 R^{c1}, 或者 R^{b1}、R^{b2}与它们连接的碳原子共同形成 C₃-C₆环烷基或 4-7 元杂环基, 所述 C₃-C₆环烷基或 4-7 元杂环基任选地被一个或多个 R^{c1}取代。

在一些实施方案中，X⁴选自 C(=O)，X⁵选自 C(R^{b1})(R^{b2})，所述 R^{b1}、R^{b2}各自独立地选自 H 或 R^{c1}，或者 R^{b1}、R^{b2}与它们连接的碳原子共同形成 C₃-C₆环烷基或 4-7 元杂环基，所述 C₃-C₆环烷基或 4-7 元杂环基任选地被一个或多个 R^{c1}取代。

在一些实施方案中, X⁴选自 C(=O), X⁵选自 C(R^{b1})(R^{b2}), 所述 R^{b1}、R^{b2}各自独立地选自 H 或 R^{c1}, 或者 R^{b1}、R^{b2}与它们连接的碳原子共同形成 C₄-C₆ 环烷基或 4-6 元含有 1 个 O 原子或 1 个 N 原子的杂环基, 所述 4-6 元含有 1 个 O 原子或 1 个 N 原子的杂环基任选地被一个 R^{c1} 取代; 其中每一个 R^{c1} 独立地选自

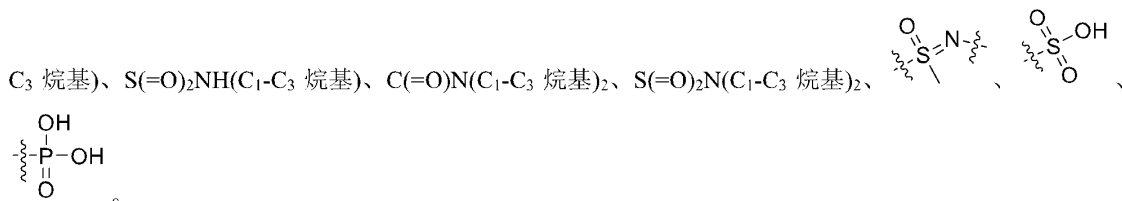


10、11、12、13、14、15 或 16, m6 选自 1~6 的整数, 例如 m6 选自 1、2、3、4、5 或 6, R^{b7} 、 R^{b8} 各自独立地选自 H 或 R^{c6} , L^b 的 d 端与 L^c 连接。



在一些实施方案中, L^b 选自化学键或 d , 其中 R^{b7} 为 H, 且 R^{b8} 为 H 或 R^{c6} , L^b 的 d 端与 L^c 连接。

在一些实施方案中, 每一个 R^{c1} 和 R^{c6} 各自独立地选自卤素、CN、 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_6 环烷基或者亲水性基团, 所述亲水性基团包含一个或多个以下原子团或结构片段: $C(=O)$ 、OH、 $O(C_1$ - C_3 烷基)、 NH_2 、 $NH(C_1$ - C_3 烷基)、 $N(C_1$ - C_3 烷基) $_2$ 、 C_1 - C_4 烷基-O、 $NHC(=O)$ 、 $N(CH_3)C(=O)$ 、 $C(=O)NH_2$ 、 $S(=O)_2NH_2$ 、 $C(=O)NH(C_1$ -



在一些实施方案中, 每一个 R^{c1} 和 R^{c6} 独立地选自卤素、CN、 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_6 环烷基或者 W^1 - W^2 - W^3 - W^4 - W^5 , 每一个 W^1 、 W^2 、 W^3 、 W^4 各自独立地选自化学键、 $A-(C_1$ - C_4 烷基-O) $_{m1}$ 或 $[A-(CR^{d1}R^{d2})_{m2}-NR^{d3}]_{m3}$ -B, 每一个 A 和 B 独立地选自化学键、 C_1 - C_{10} 亚烷基、 C_3 - C_6 亚环烷基、4-7 元亚杂环基、O、S、 NR^{d4} 、

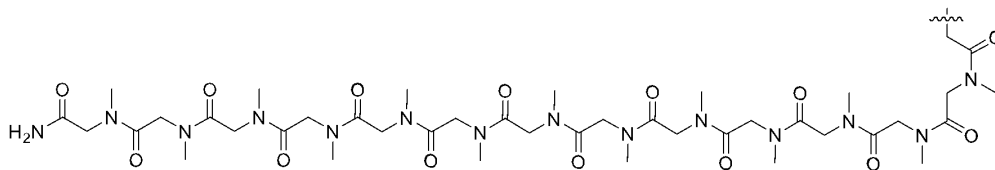
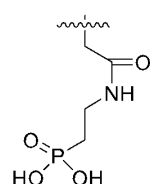
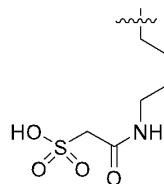
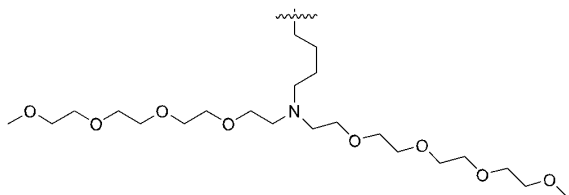
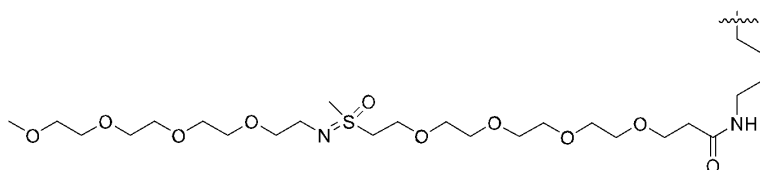
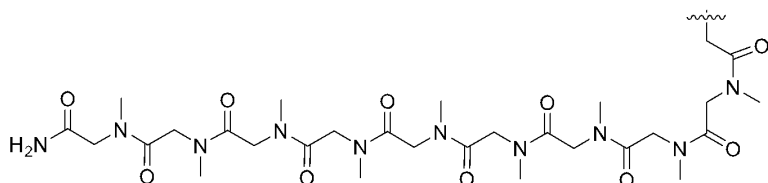
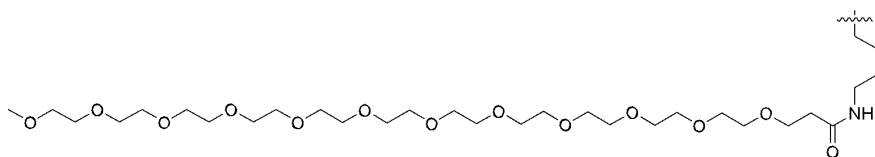
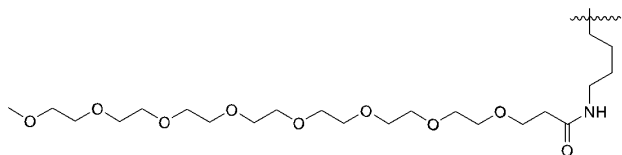
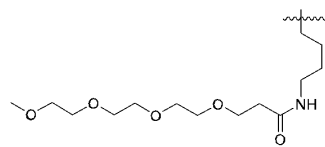
$C=O$ 、 $C(=O)NR^{d5}$ 、 $S(=O)_2$ 、 $S(=O)_2NR^{d6}$ 、 $S(=O)(=NR^{d7})$ 、 $\begin{array}{c} O \\ || \\ \sim S - N - \sim \\ | \\ R^{d8} \end{array}$ 或它们的任意组合, 所述 R^{d1} 、 R^{d2} 、 R^{d3} 、 R^{d4} 、 R^{d5} 、 R^{d6} 、 R^{d7} 、 R^{d8} 各自独立地选自 H、 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_6 环烷基、4-7 元杂环基或 $(C_1$ - C_4 烷基-O) $_{k1}$ - C_1 - C_6 烷基, 所述 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_6 环烷基或 4-7 元杂环基任选被卤素、CN、OH、 $O(C_1$ - C_3 烷基)、 NH_2 、 $NH(C_1$ - C_3 烷基)、 $N(C_1$ - C_3 烷基) $_2$ 、 $C(=O)NH_2$ 、 $NHC(=O)NH_2$ 或 COOH 取代, $m1$ 选自 0~30 的整数, $m2$ 选自 1~5 的整数, $m3$ 、 $k1$ 各自独立地选自 1~30 的整数, W^5 选自 H、 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_6 环烷基、4-7 元杂环基、OH、 $O(C_1$ - C_3 烷基)、 NH_2 、 $NH(C_1$ - C_3 烷基)、 $N(C_1$ - C_3 烷基) $_2$ 、 $C(=O)NH_2$ 、 $S(=O)_2NH_2$ 、 $C(=O)NH(C_1$ - C_3

烷基)、 $S(=O)_2NH(C_1$ - C_3 烷基)、 $C(=O)N(C_1$ - C_3 烷基) $_2$ 、 $S(=O)_2N(C_1$ - C_3 烷基) $_2$ 、 $\begin{array}{c} O \\ || \\ \sim S - N - \sim \\ | \\ R^{d8} \end{array}$ 、 $\begin{array}{c} O \\ || \\ \sim S - OH \\ | \\ \sim \end{array}$ 或 $\begin{array}{c} OH \\ | \\ \sim P - OH \\ || \\ O \end{array}$ 。

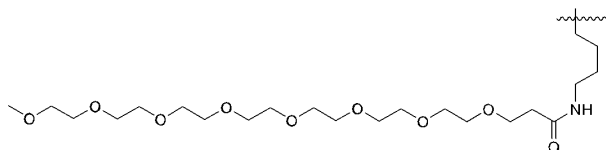
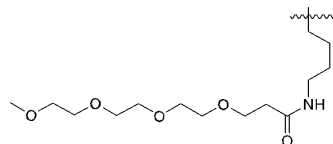
在一些实施方案中, 每一个 R^{c1} 和 R^{c6} 独立地选自 W^1 - W^2 - W^3 - W^4 - W^5 , W^1 、 W^2 均选自化学键, W^3 选自化学键或 $A-(C_1$ - C_4 烷基-O) $_{m1}$, W^4 选自 $A-(C_1$ - C_4 烷基-O) $_{m1}$ 或 $[A-(CR^{d1}R^{d2})_{m2}-NR^{d3}]_{m3}$ -B, 每一个 A 和 B 独立地选自化学键、 C_1 - C_{10} 亚烷基、 C_3 - C_6 亚环烷基、4-7 元亚杂环基、O、S、 NR^{d4} 、 $C=O$ 、 $C(=O)NR^{d5}$ 、

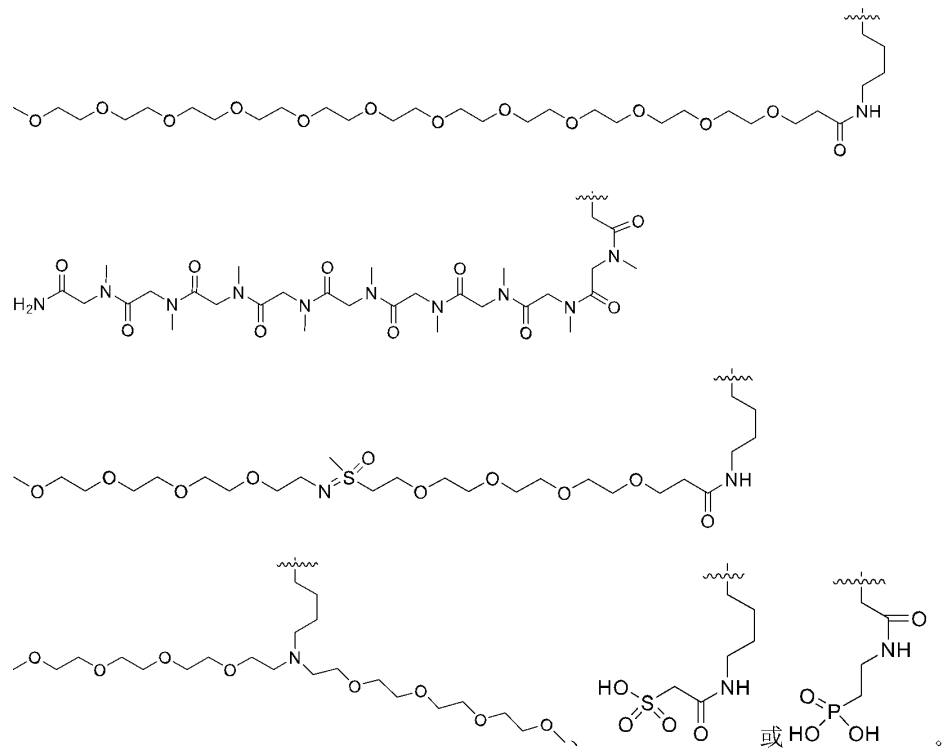
$S(=O)_2$ 、 $S(=O)_2NR^{d6}$ 、 $S(=O)(=NR^{d7})$ 、 $\begin{array}{c} O \\ || \\ \sim S - N - \sim \\ | \\ R^{d8} \end{array}$ 或它们的任意组合, 所述 R^{d1} 、 R^{d2} 、 R^{d3} 、 R^{d4} 、 R^{d5} 、 R^{d6} 、 R^{d7} 、 R^{d8} 各自独立地选自 H、 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_6 环烷基、4-7 元杂环基或 $(C_1$ - C_4 烷基-O) $_{k1}$ - C_1 - C_6 烷基, 所述 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_6 环烷基或 4-7 元杂环基任选被卤素、CN、OH、 $O(C_1$ - C_3 烷基)、 NH_2 、 $NH(C_1$ - C_3 烷基)、 $N(C_1$ - C_3 烷基) $_2$ 、 $C(=O)NH_2$ 、 $NHC(=O)NH_2$ 或 COOH 取代, $m1$ 选自 0~30 的整数, $m2$ 选自 1~5 的整数, $m3$ 、 $k1$ 各自独立地选自 1~30 的整数, W^5 选自 H、 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_6 环烷基、4-7 元杂环基、OH、 $O(C_1$ -

在 一 些 实 施 方 案 中 ， R^{c6} 选 自



在 一 些 实 施 方 案 中 ， R^{c6} 选 自





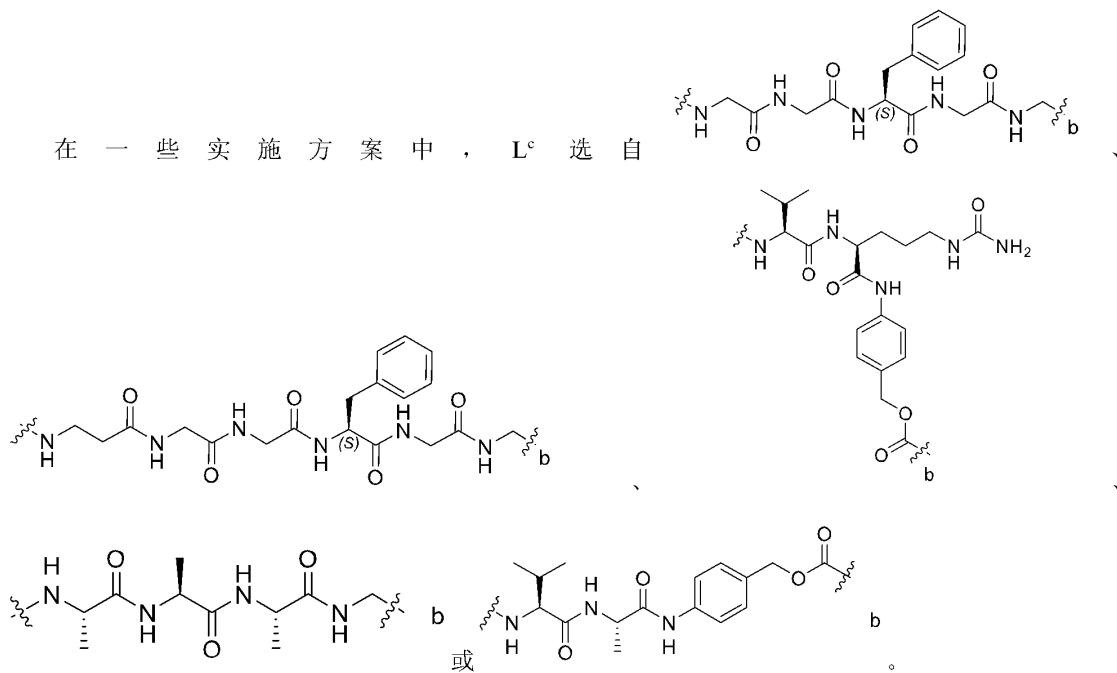
在一些实施方案中，L^a 选自 $\text{---} \left[\text{C}(\text{R}^{\text{b4}}) (\text{R}^{\text{b5}}) \right]_{\text{m4}} \text{---}$ 或 $\text{---} \left[\text{C}(\text{R}^{\text{b4}}) (\text{R}^{\text{b5}}) \right]_{\text{m4}} \text{---} \text{S}(\text{O})_2 \text{---}$ ，R^{b4}、R^{b5} 各自独立地选自 H，m4 选自 1~6 的整数，例如 m4 选自 1、2、3、4、5 或 6，L^a 的 c 端与 L^b 连接。在一些实施方案中，L^a 选自 $\text{---} \left[\text{C}(\text{R}^{\text{b4}}) (\text{R}^{\text{b5}}) \right]_{\text{m4}} \text{---}$ ，R^{b4}、R^{b5} 各自独立地选自 H，m4 选自 1~6 的整数，例如 m4 选自 1、2、3、4、5 或 6，L^a 的 c 端与 L^b 连接。

在一些实施方案中，L^c 选自 Y¹-Y²-Y³，Y¹ 选自化学键或 $\text{---} \text{NH} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---}$ ，Y² 选自 Val-Cit、Val-Ala、Gly-Gly-Phe-Gly、Ala-Ala-Ala 的二肽、三肽或四肽残基，Y³ 选自 $\text{---} \text{NHCH}_2 \text{---}$ 或 $\text{---} \text{NH} \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{O} \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---}$ ，L^c 的 b 端与药物单元 D 连接。

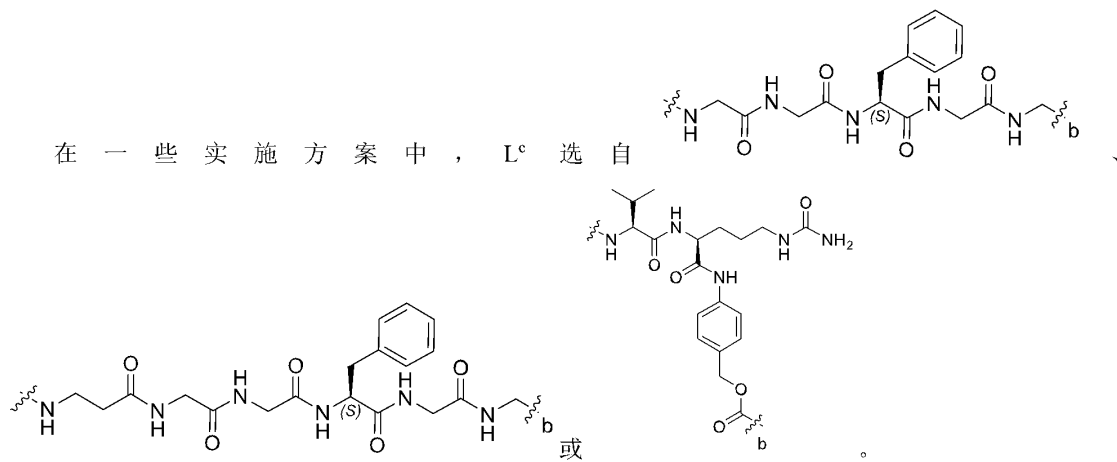
在一些实施方案中，L^c 选自 Y¹-Y²-Y³，Y¹ 选自化学键或 $\text{---} \text{NH} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---}$ ，Y² 选自 Val-Cit、Val-Ala、Gly-Gly-Phe-Gly 的二肽或四肽残基，Y³ 选自 $\text{---} \text{NHCH}_2 \text{---}$ 或 $\text{---} \text{NH} \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{O} \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---}$ ，L^c 的 b 端与药物

单元 D 连接。

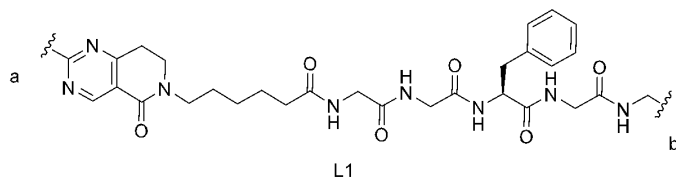
在 一 些 实 施 方 案 中 , L^c 选 自

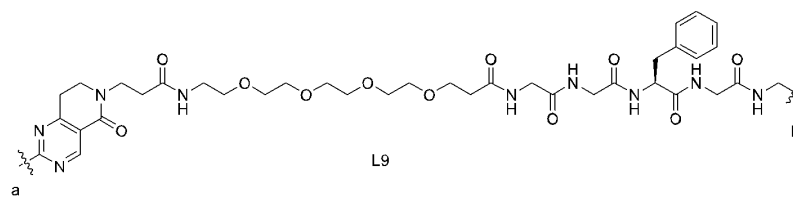
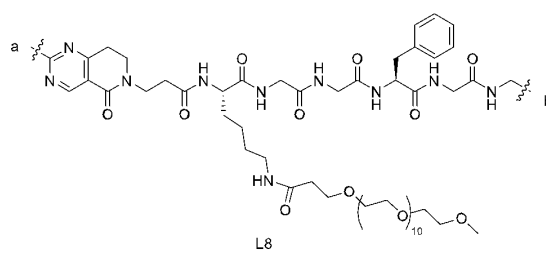
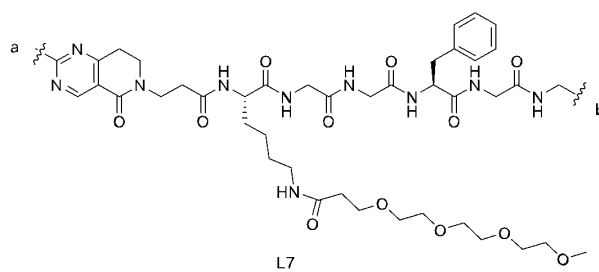
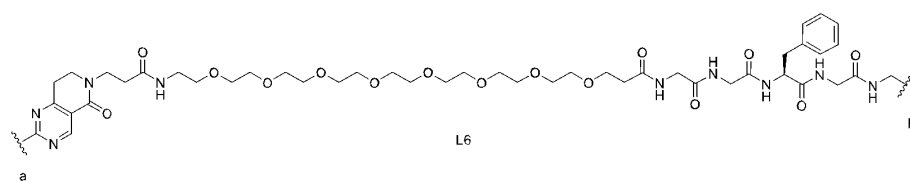
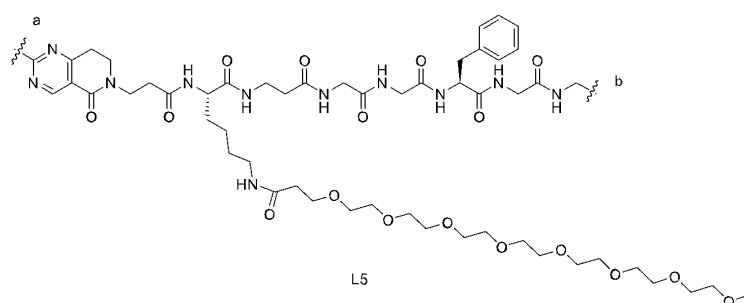
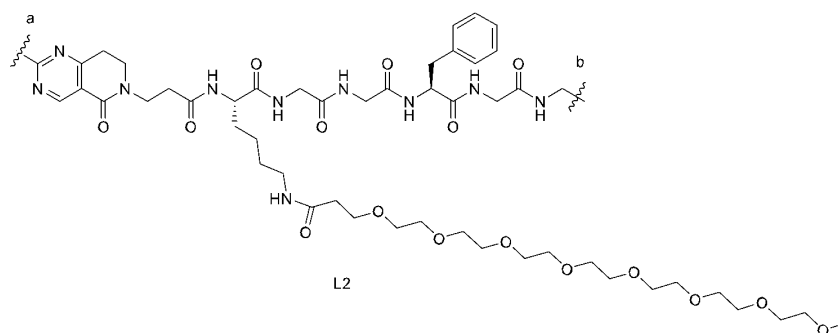


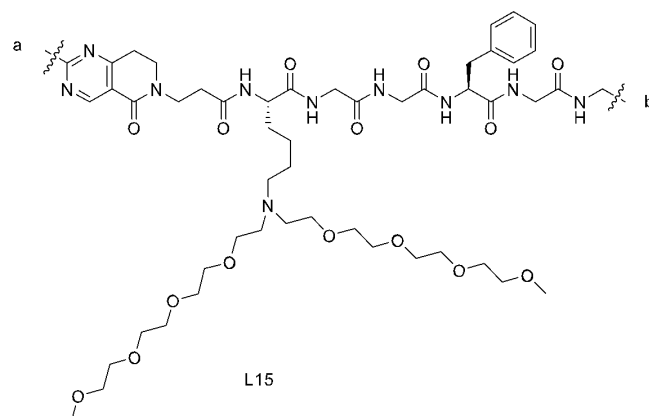
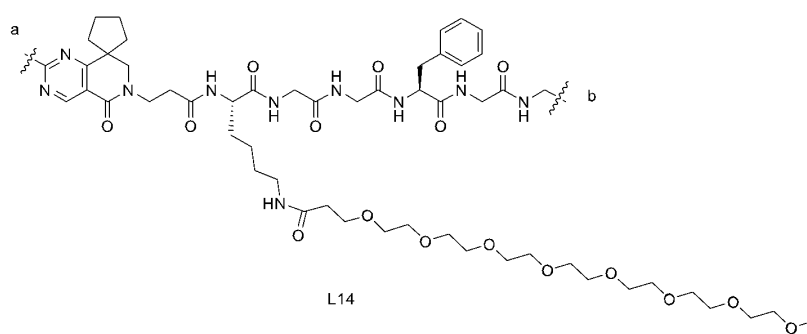
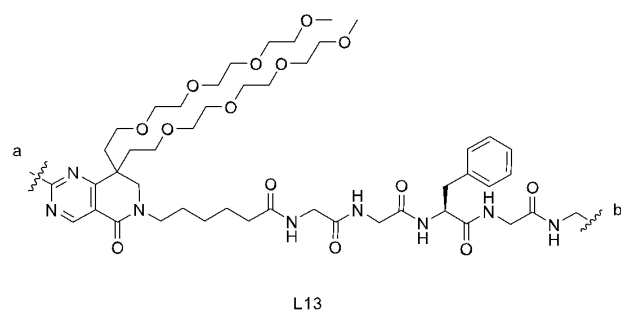
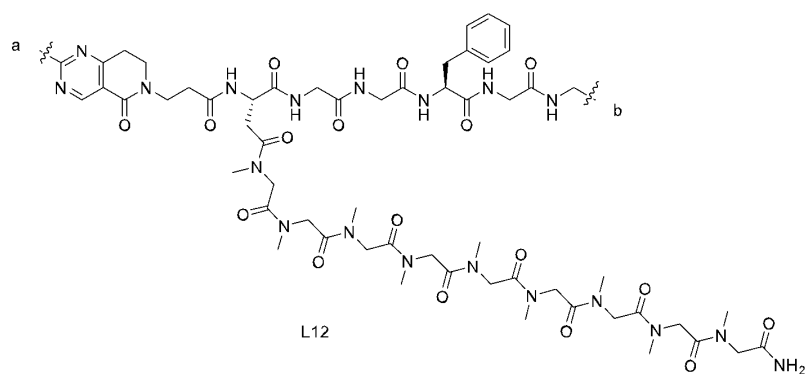
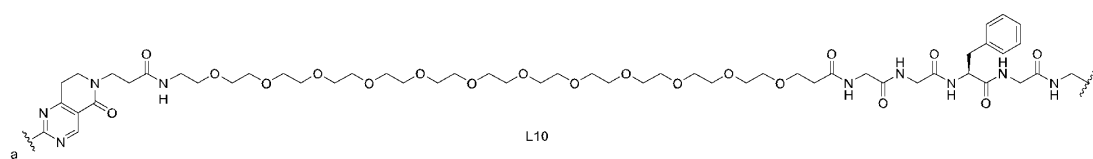
在 一 些 实 施 方 案 中 ， L^c 选 自

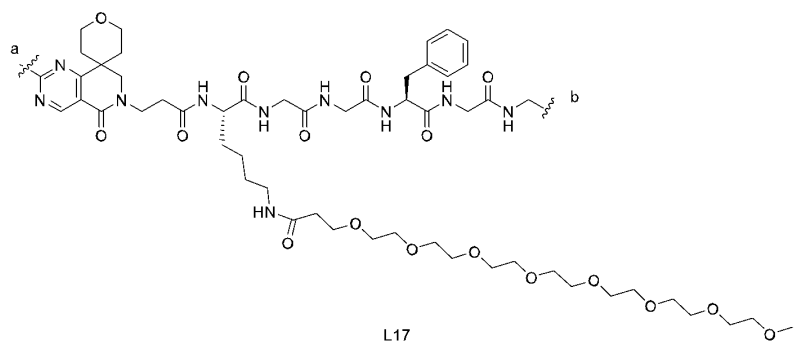


在一些实施方案中，连接子单元 L 选自以下结构：

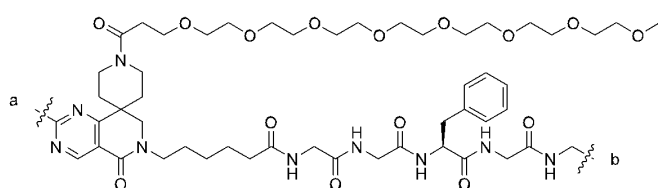




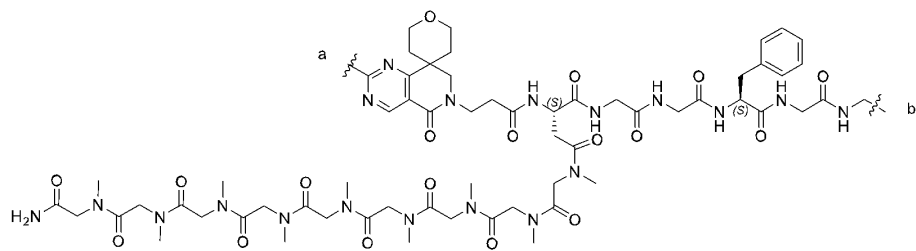




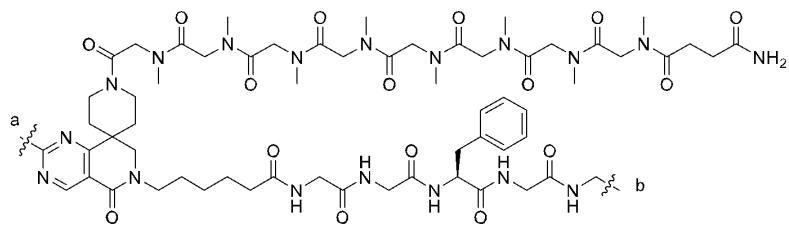
L17



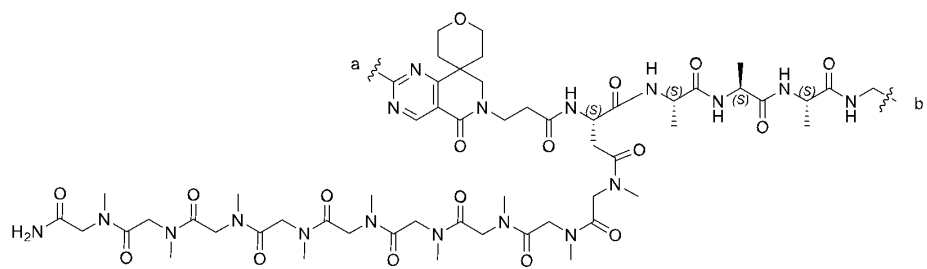
L18



L19

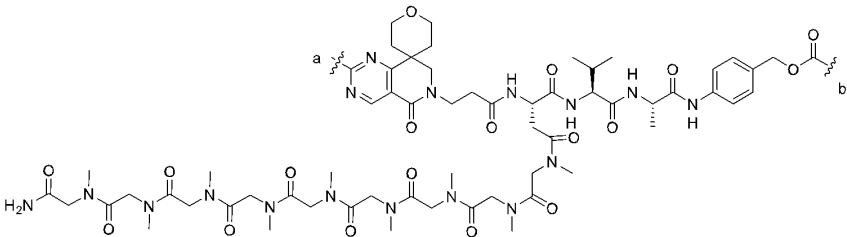


L20

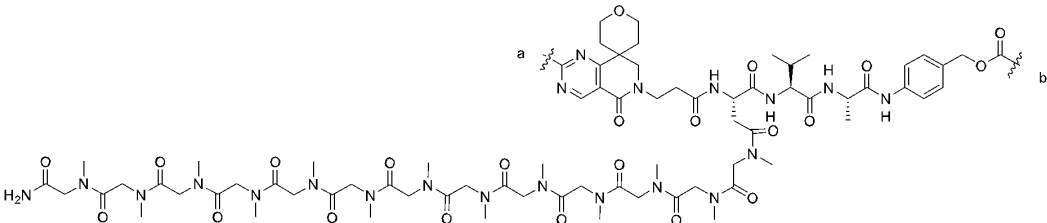


L21

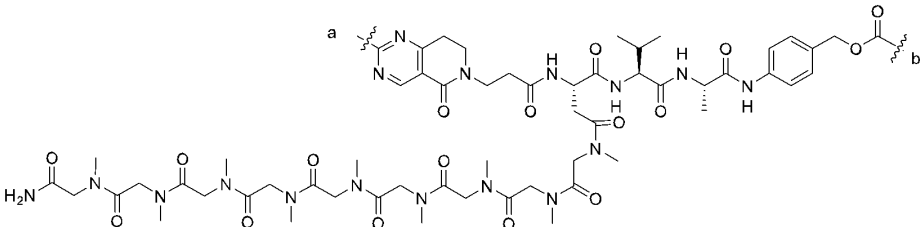
11



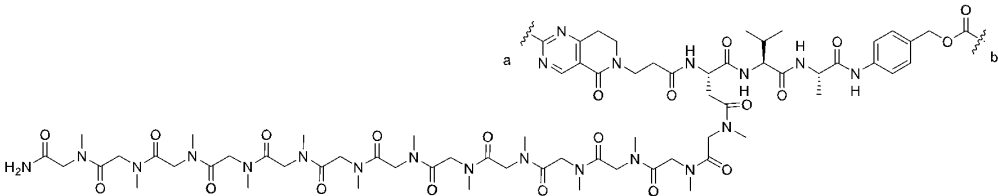
L22



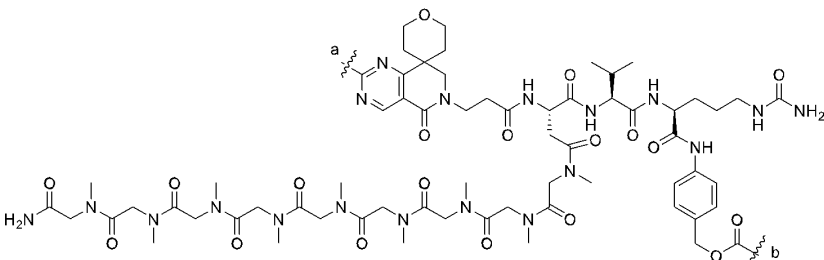
L23



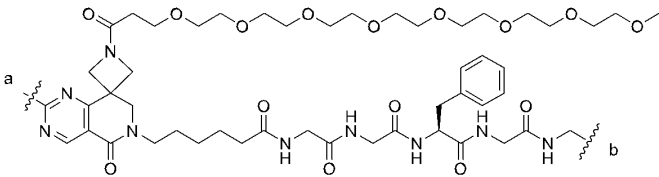
L24

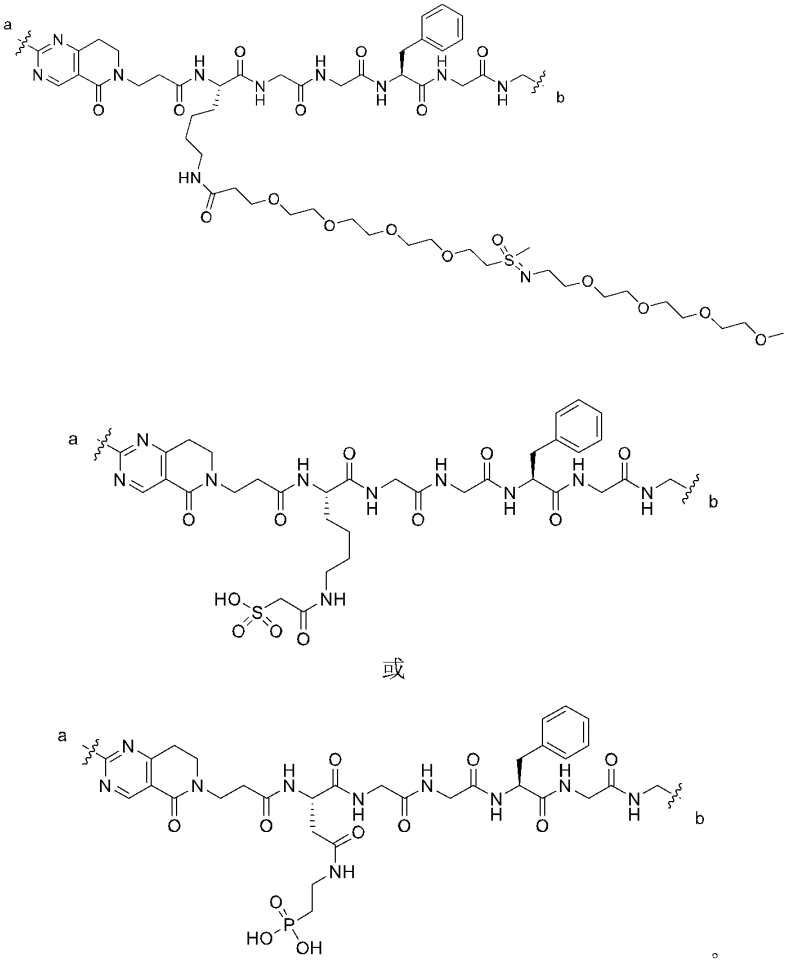


L25



L26





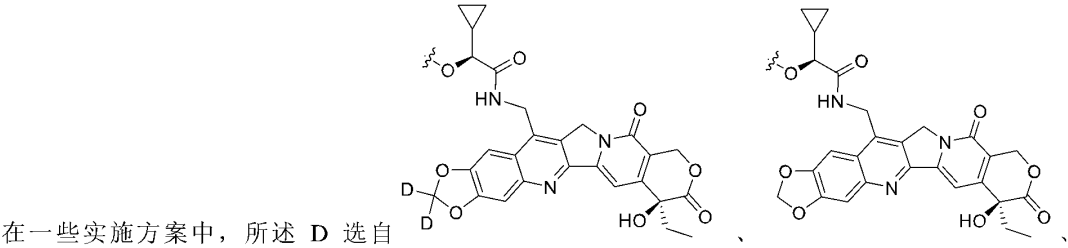
在一些实施方案中，所述药物单元 D 选自细胞毒性药物和蛋白降解剂。

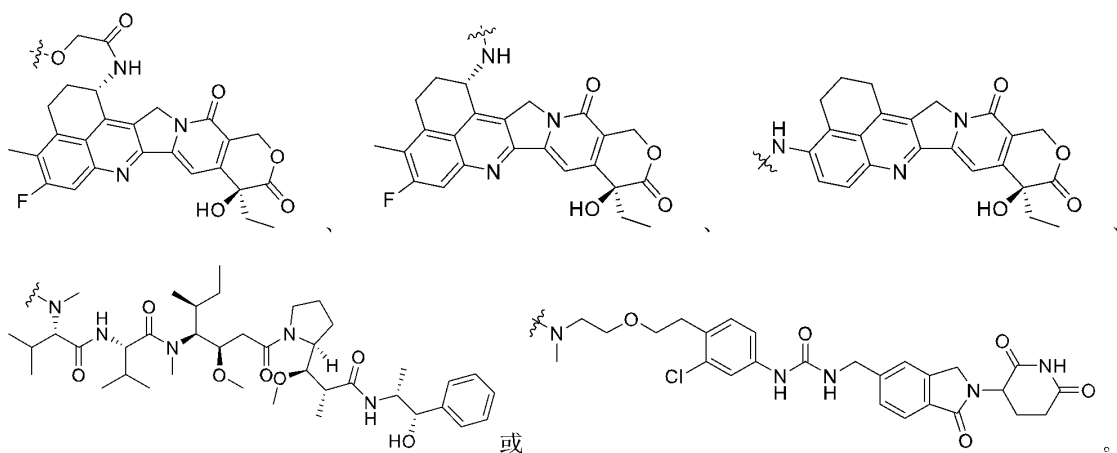
在一些实施方案中，所述细胞毒性药物选自微管蛋白抑制剂、DNA 损伤剂或拓扑异构酶抑制剂，所述微管蛋白抑制剂包括但不限于海兔毒素(dolastatin)类、澳瑞他汀(auristatin)类、美登素(maytansine)类、微管溶素(Tubulysins)类和隐粘菌素(cryptomycins)类药物，所述 DNA 损伤剂包括但不限于 PBD 类、杜卡霉素(duocarmycin)类和卡齐霉素(calicheamicin)类药物，所述拓扑异构酶抑制剂包括但不限于喜树碱类药物。

在一些实施方案中，所述细胞毒性药物包括但不限于喜树碱、羟基喜树碱、9-氨基喜树碱、SN-38、伊立替康、拓扑替康、贝洛替康、卢比替康、放线菌素 D、多柔比星、多卡米星、柔红霉素、米托蒽醌、鬼臼毒素、依托泊苷、长春新碱、长春碱、紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛、美登素、类美登素、DM1、DM3、DM4、卡齐霉素、MMAE、MMAF 和 Tubulysin D。

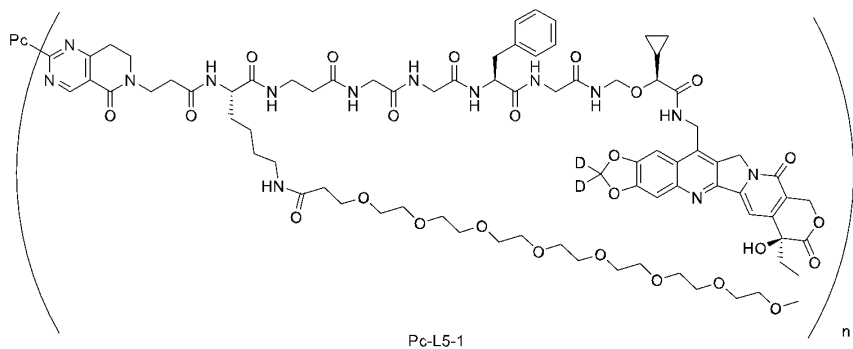
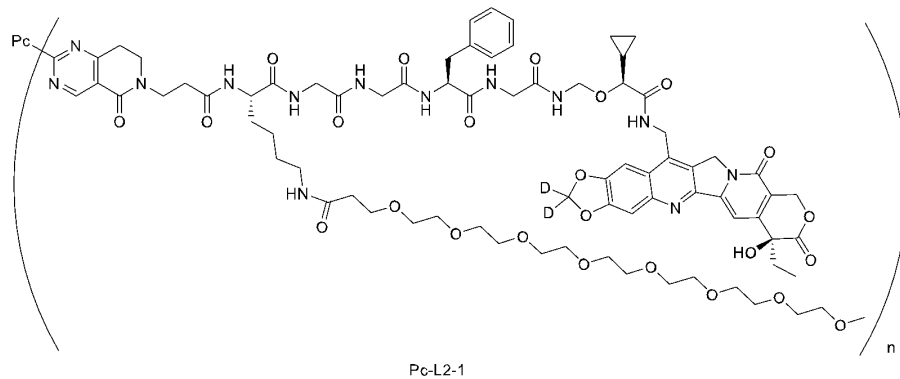
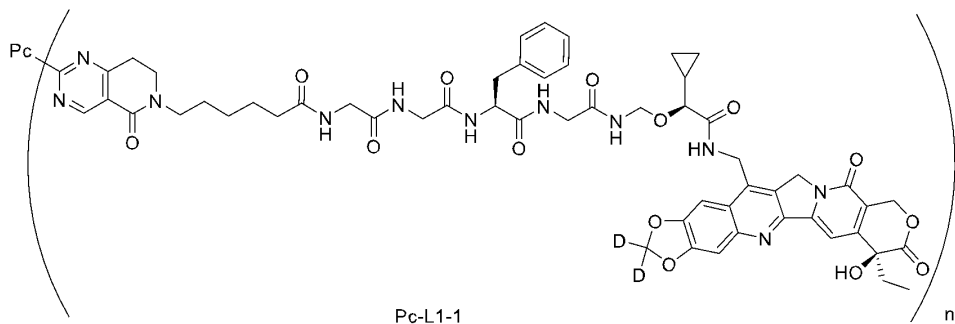
在一些实施方案中，所述药物单元 D 选自拓扑异构酶 I 抑制剂或澳瑞他汀类药物。

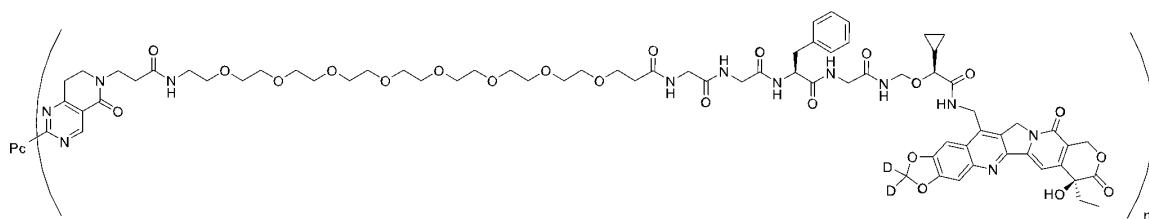
在一些实施方案中，所述蛋白降解剂选自 GSPT1 蛋白降解剂。



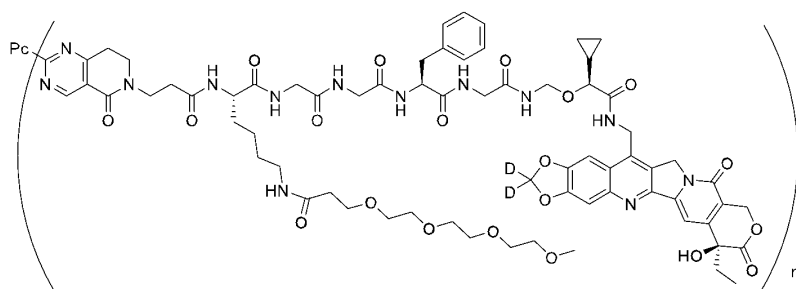


在一些实施方案中，本公开通式为 $Pc-(L-D)_n$ 的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐选自以下化合物或其药学上可接受的盐：

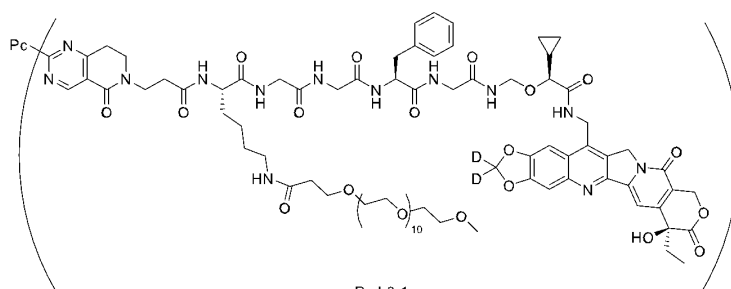




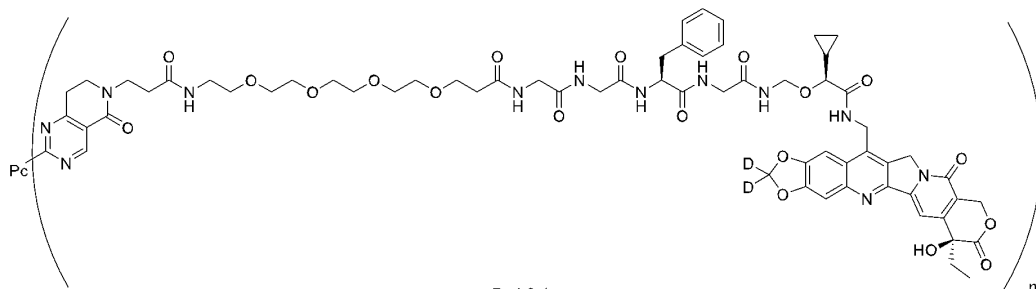
Pc-L6-1



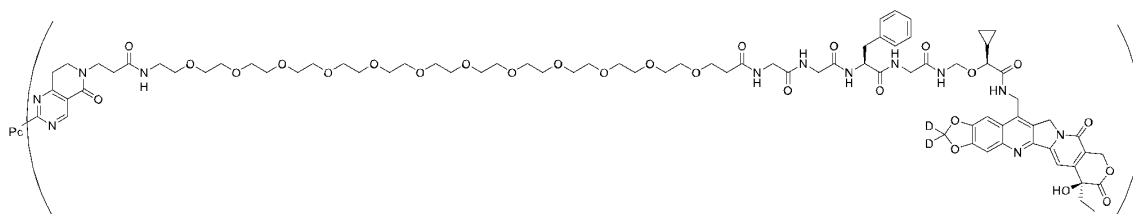
Pc-L7-1



Pc-L8-1

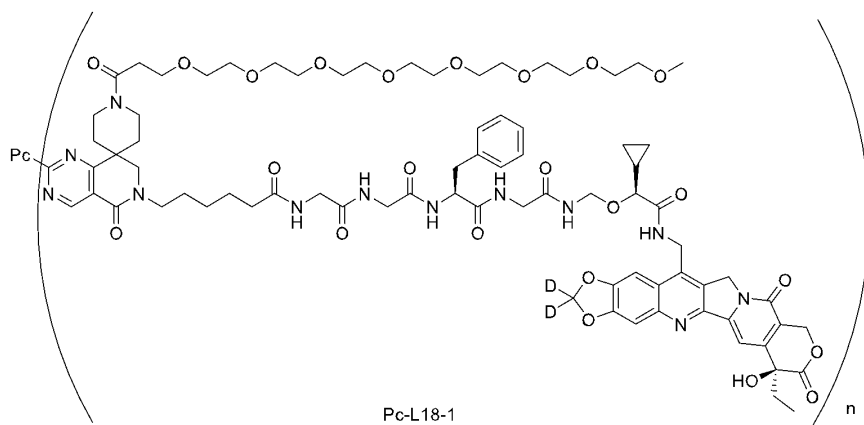


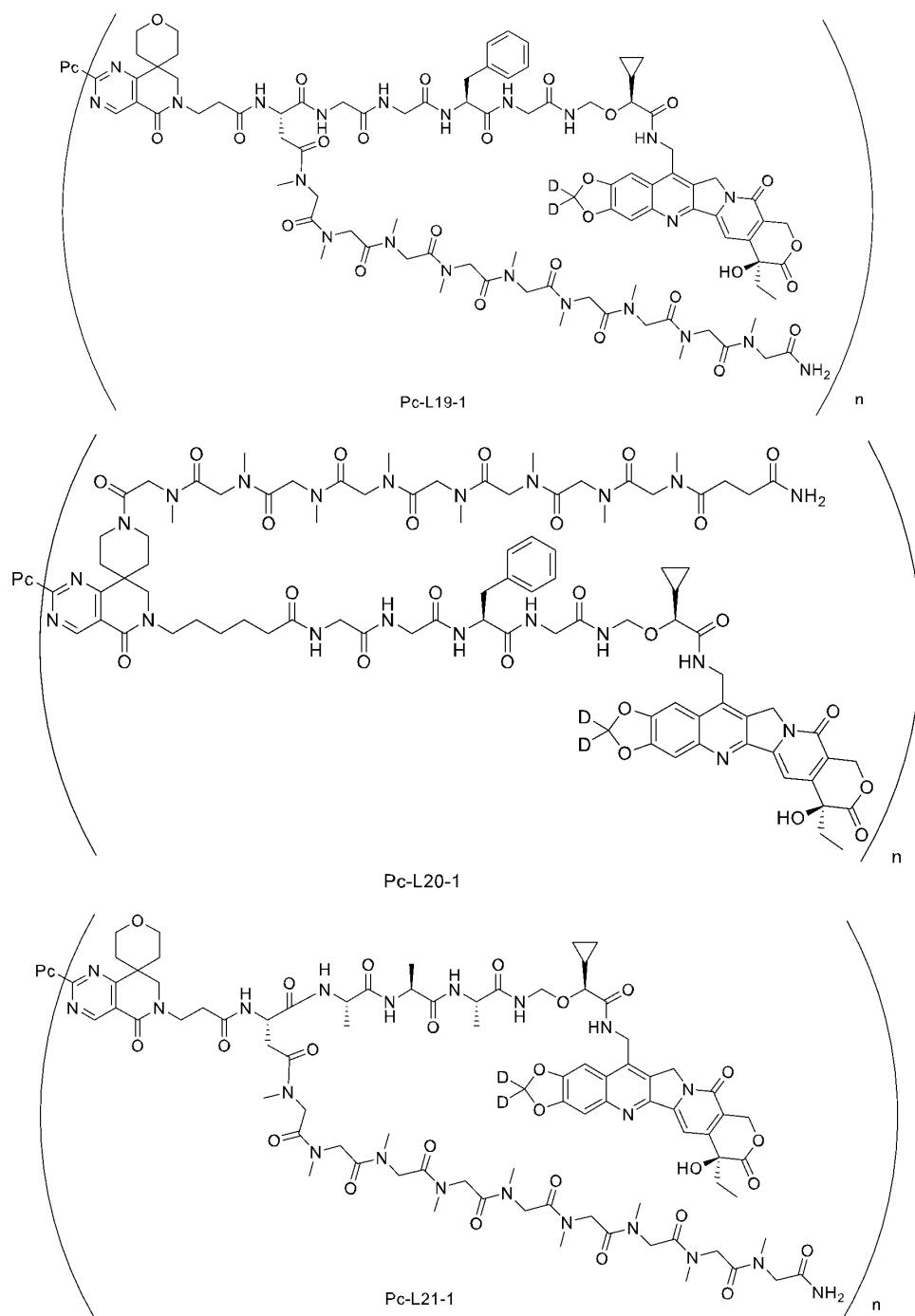
Pc-L9-1

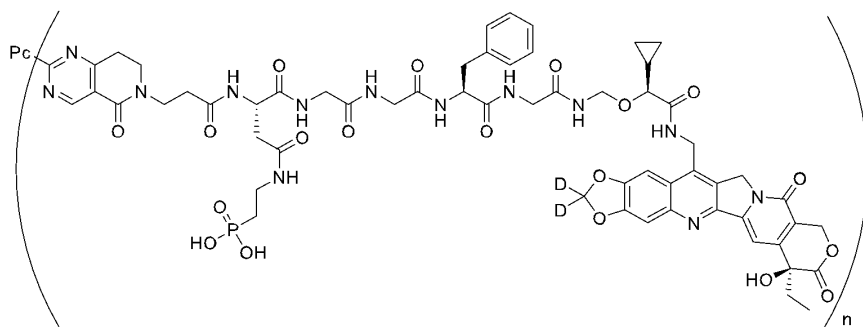
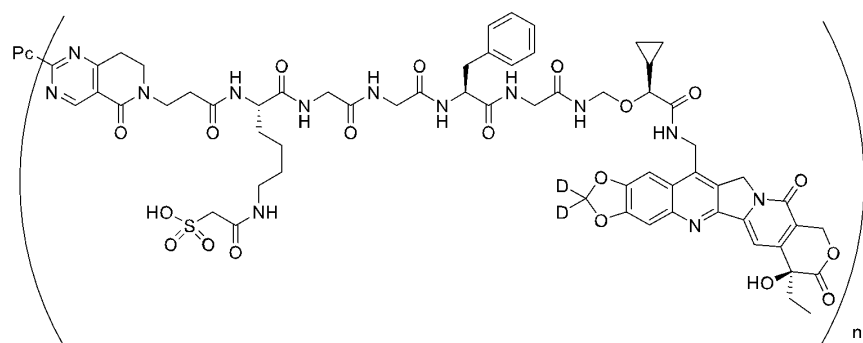
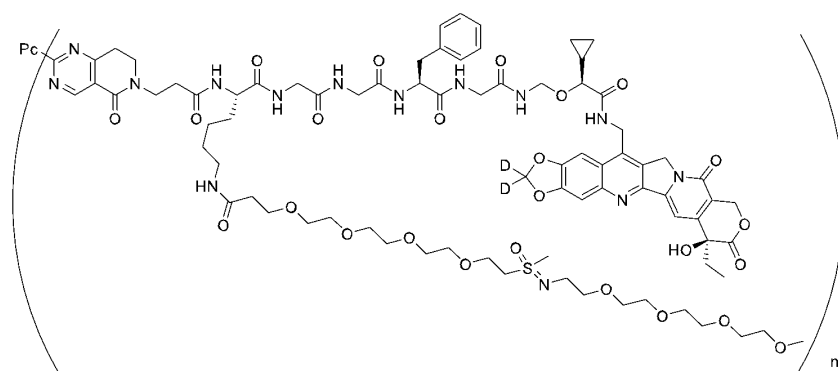
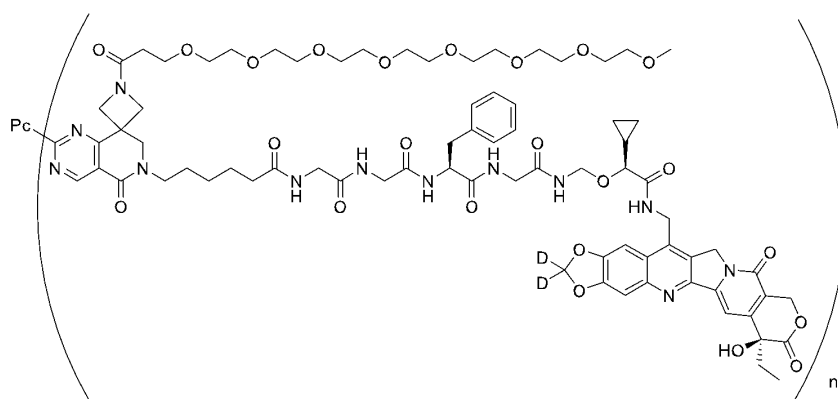


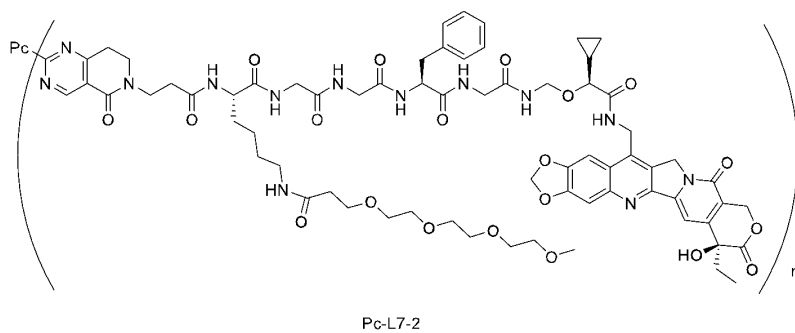
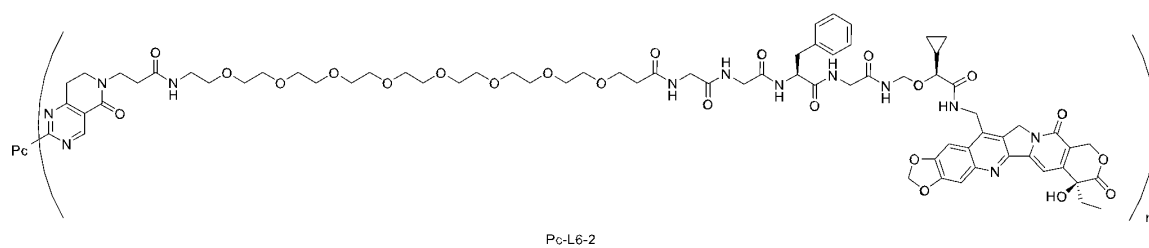
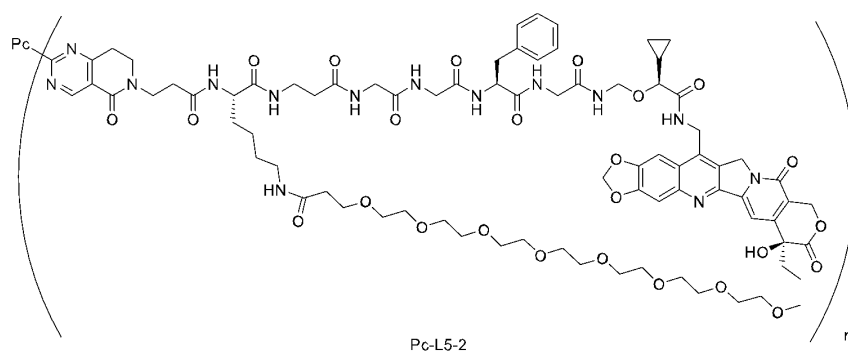
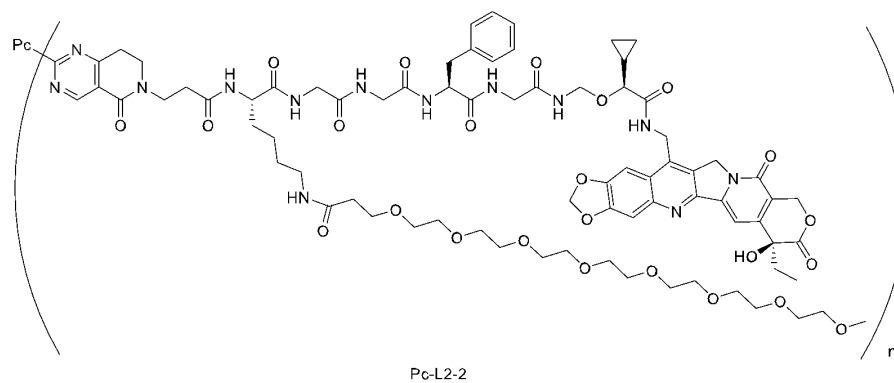
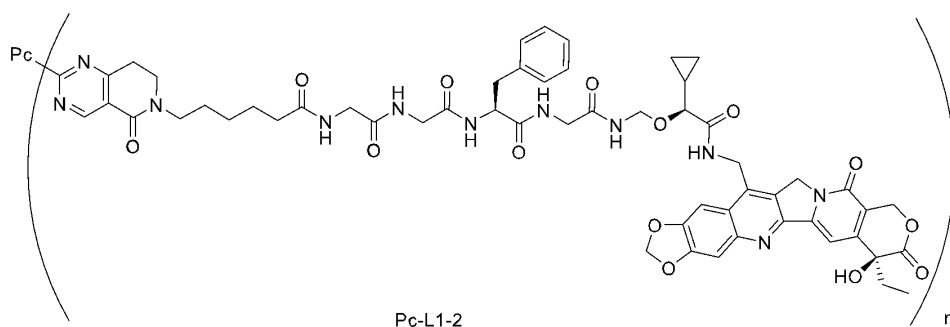
Pc-L10-1

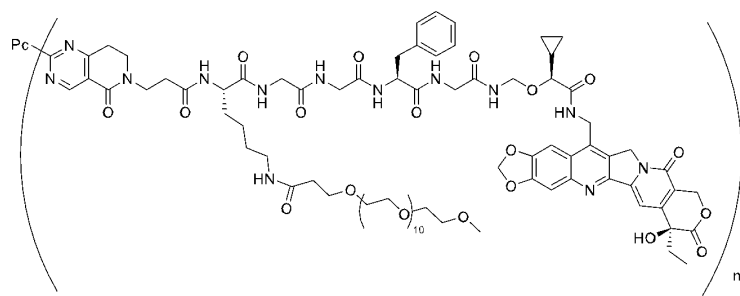




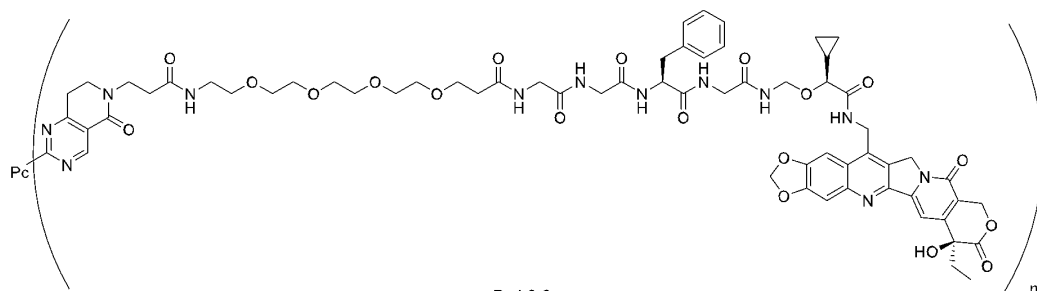




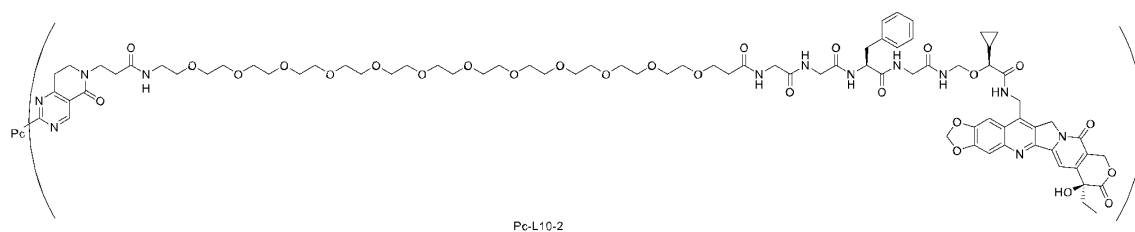




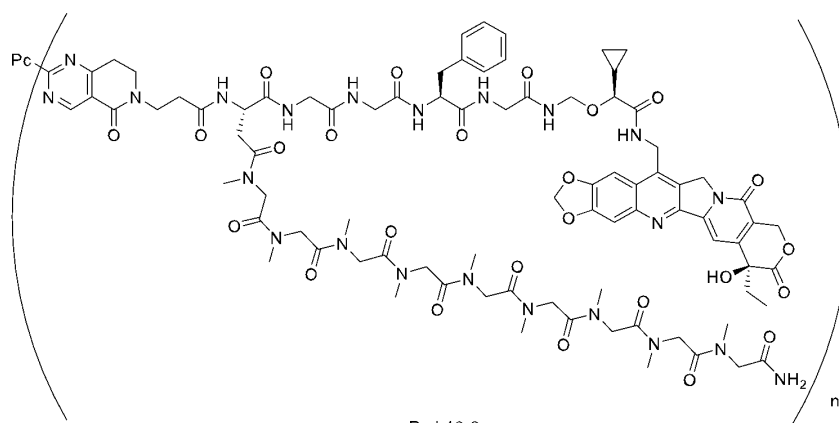
Pc-L8-2



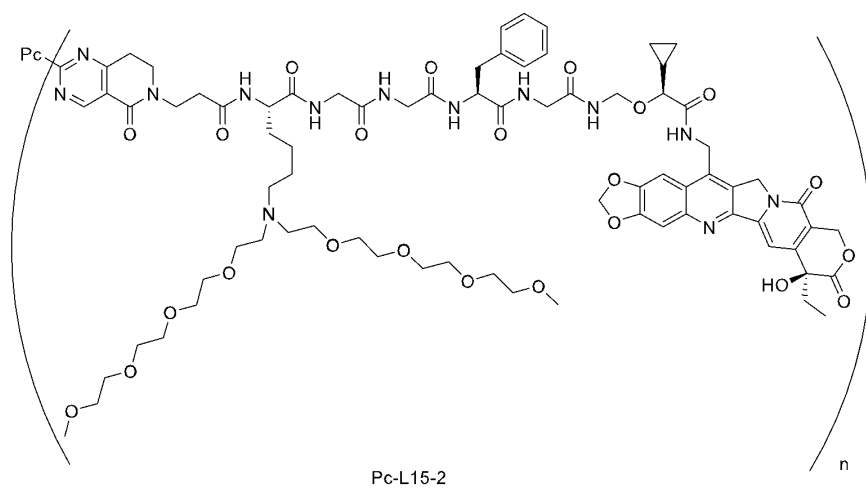
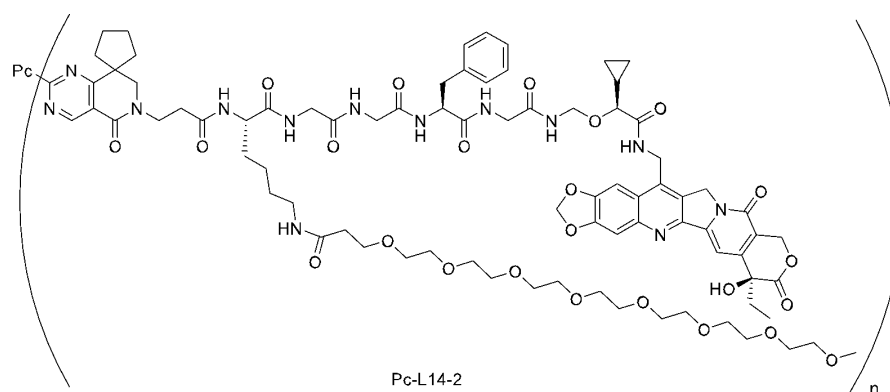
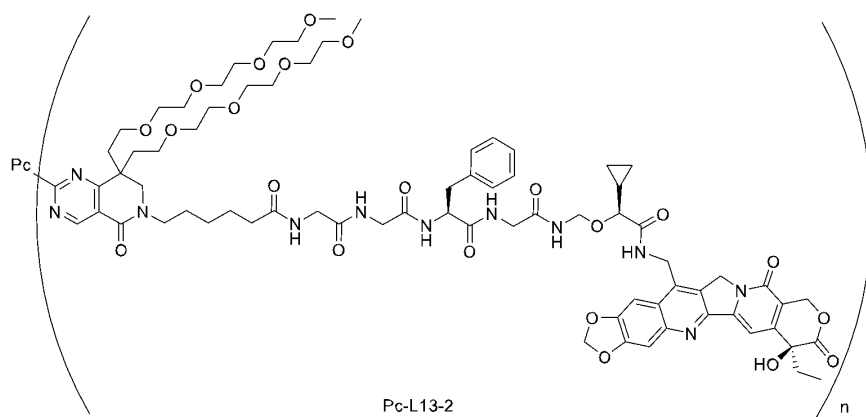
Pc-L9-2

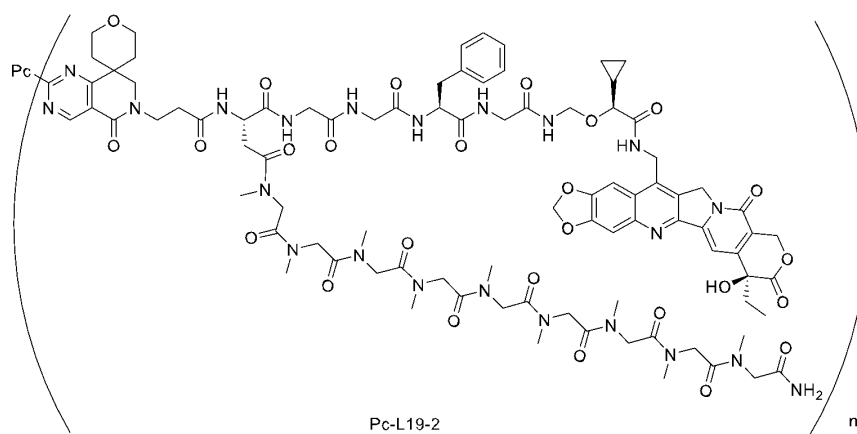
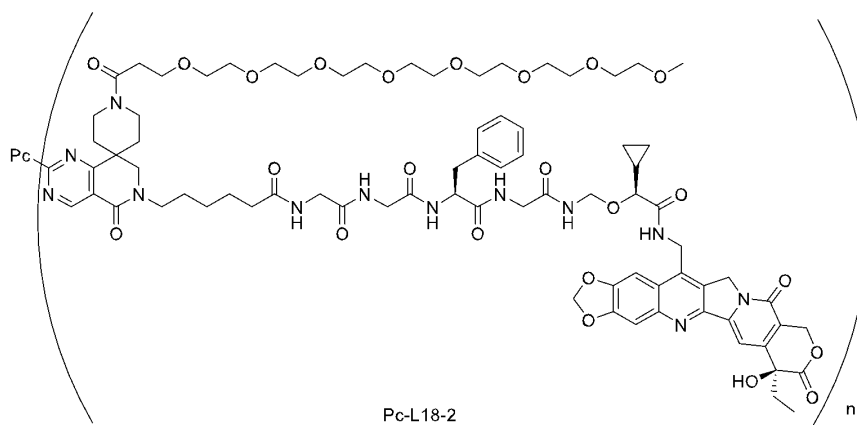
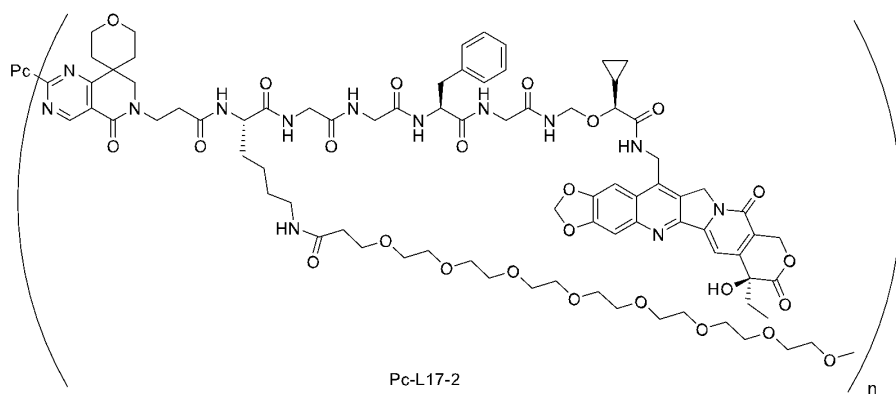


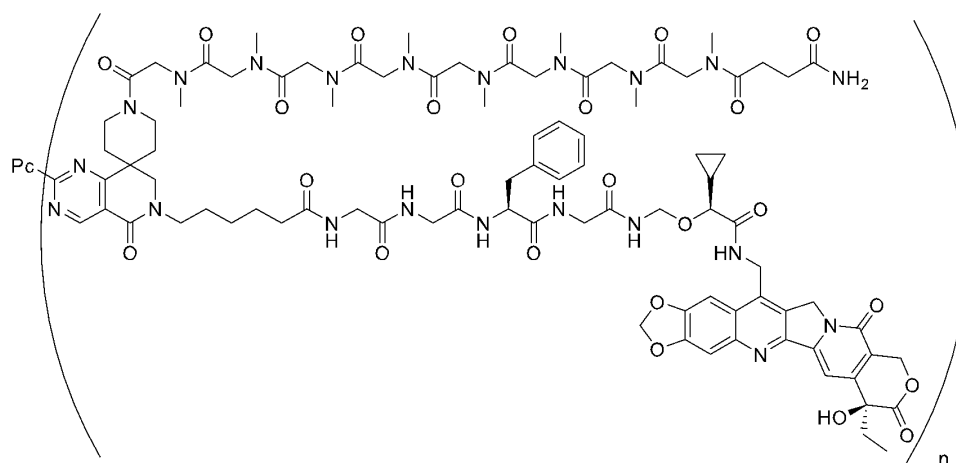
Pc-L10-2



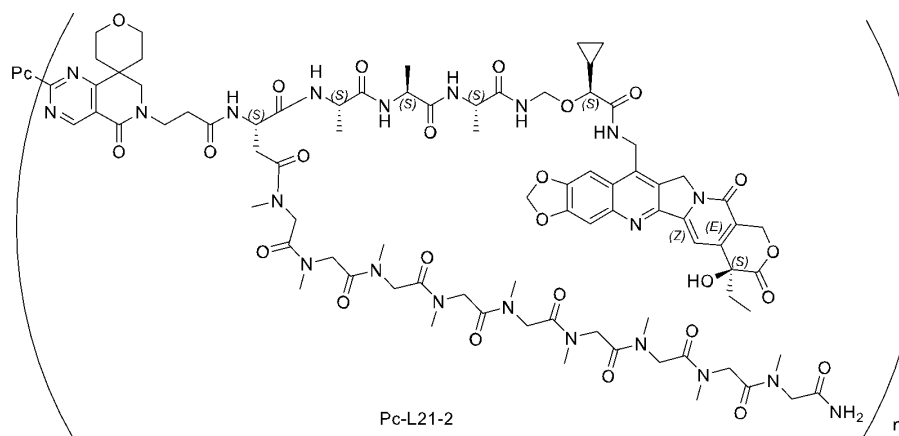
Pc-L12-2



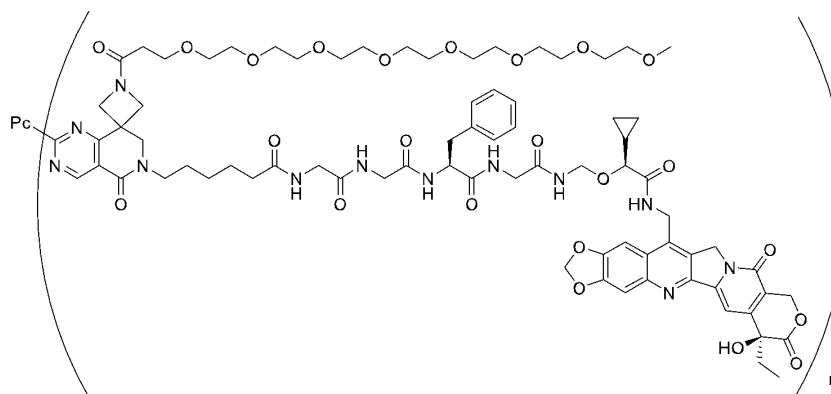




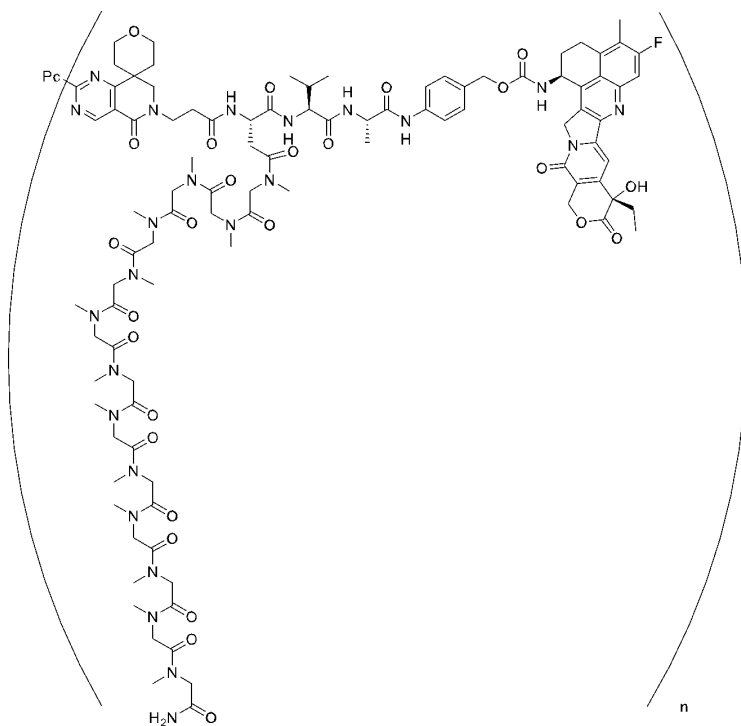
Pc-L20-2



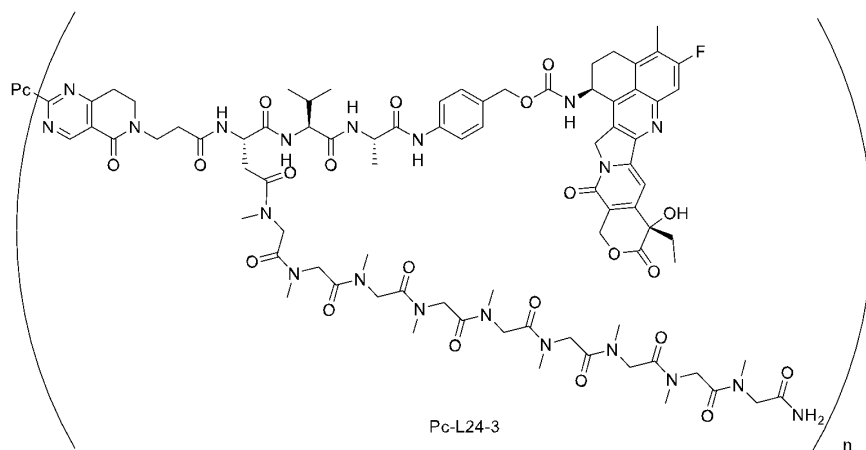
Pc-L21-2



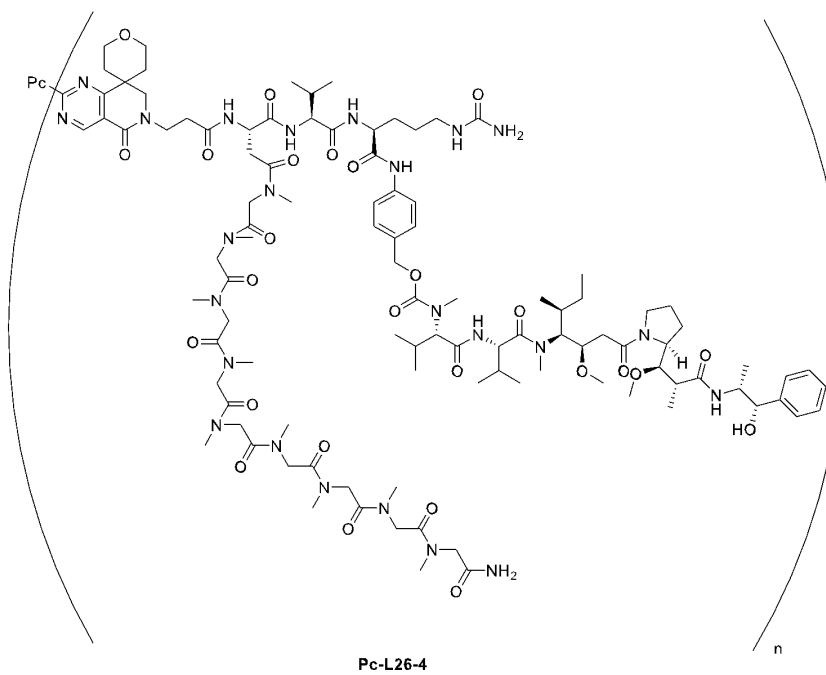
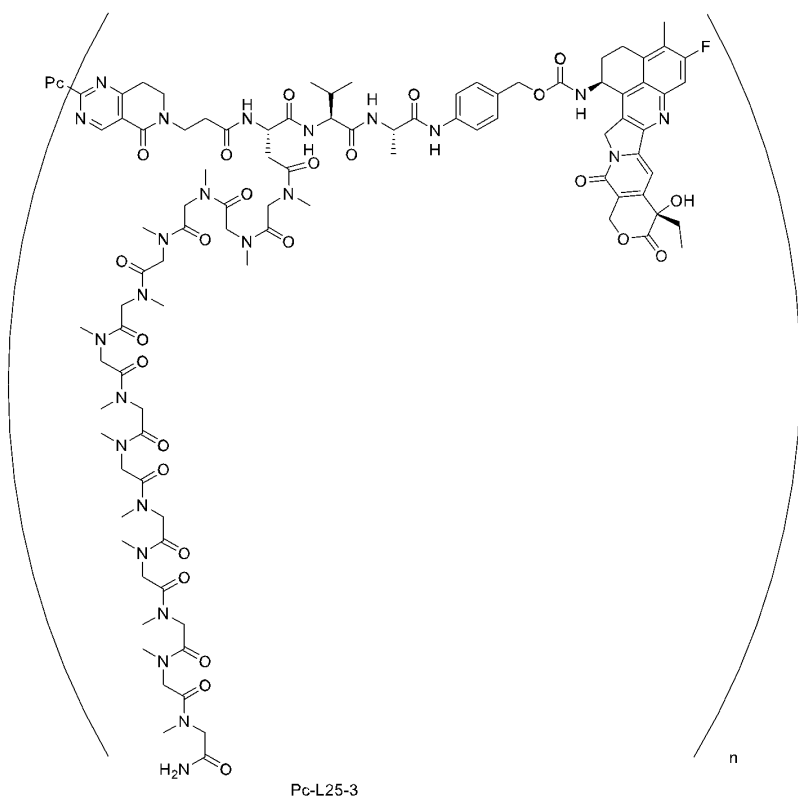




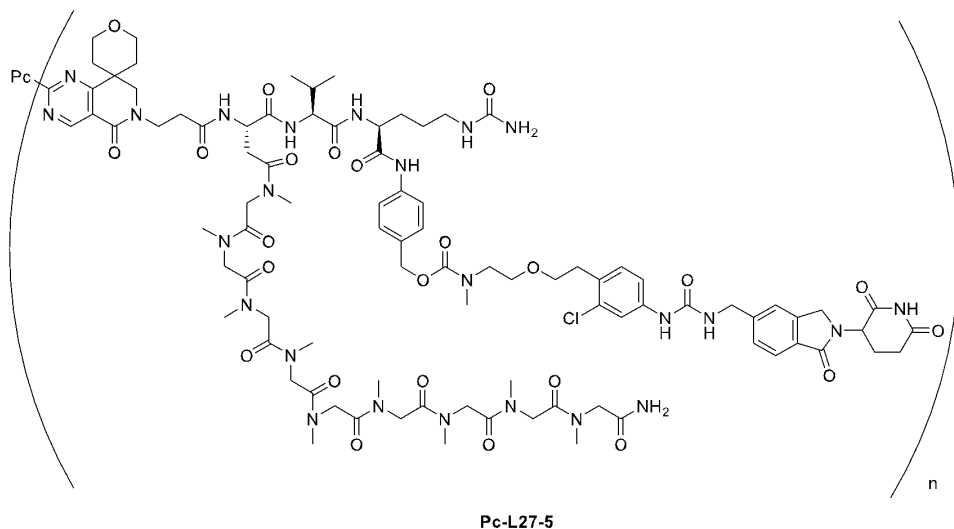
Pc-L23-3



Pc-L24-3



或



在一些实施方案中，所述配体单元 Pc 可选自多肽、抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，配体单元 Pc 可特异性结合选自以下组的一种或多种抗原：HER2 (ErbB2)、p95HER2、HER3(ErbB3)、CD3、CD16、ROR1、DLL3、CDH6、CD70、CD5、CD20、BCMA、EGFR、VEGF、Trop-2、Claudin6、Claudin18.2、c-MET、CD30、MUC1、Nectin-4、CD22、CD74、CD19、CD79b、MSLN、TOPO2、EpCAM、CEACAM-5、Mesothelin、PD-L1、PSMA、ROR1、ROR2、CD25、CD33、CD123、FLT3、CD174、CD166、CD326、CD71、LIV-1、MUC16、ENPP3、TDGF1、ETBR、TIM1、TIM3、LRRC15、CanAg/AFP、FAP、SLITRK6、KIT/CD117、STEAP1、SLAMF7/CS1、NaPi2B/SLC34A2、GPNMB、AXL、B7-H3(CD276)、PTK7/CCK4、PRLR、EFNA4、5T4、NOTCH3、CD142、CA6、GPR20、EphA2、LYPD3、FGFR2、FGFR3、FR α 、CEACAMs、GCC、IntegrinAv、CAIX、P-cadherin、GD3、cadherin6、LAMP1、CD56、CD37、CD47、CD138 或 CD352。

在一些实施方案中，所述配体单元 Pc 可特异性结合 HER2。

在一些实施方案中，所述 Pc 包含特异性结合 HER2 的抗体或其抗原结合片段；所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 (VH) 或/和轻链可变区 (VL)，其中：

(1) 重链可变区包括如 SEQ ID NO.5 所示序列的 HCDR1、如 SEQ ID NO.6 所示序列的 HCDR2 和如 SEQ ID NO.7 所示序列的 HCDR3，或/和所述轻链可变区包括如 SEQ ID NO.8 所示序列的 LCDR1、如 SEQ ID NO.9 所示序列的 LCDR2 和如 SEQ ID NO.10 所示序列的 LCDR3；或，

(2) 所述重链可变区包含与 (1) 相比每个 CDR 至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性，或至多发生 3 个、2 个、1 个插入、缺失或替换突变的氨基酸序列，和/或所述轻链可变区包含与 (1) 相比每个 CDR 至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性或至多发生 3 个、2 个、1 个插入、缺失或替换突变的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段包含重链可变区 (VH) 或/和轻链可变区 (VL)，其中：

(1) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO.1 所示序列，或/和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO.2 所示序列；或，

(2) 所述重链可变区或/和所述轻链可变区与上述第 (1) 组中任一所述重链可变区或/和轻链可变区相比，具有至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性的序列，或至多发生 3 个、2 个、1 个插入、缺失或替换突变的序列。

在一些实施方案中，所述配体单元 Pc 可特异性结合 CDH6。

在一些实施方案中，所述 Pc 包含特异性结合 CDH6 的抗体或其抗原结合片段；所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 (VH) 或/和轻链可变区 (VL)，其中：

(1) 重链可变区包括如 SEQ ID NO.17 所示序列的 HCDR1、如 SEQ ID NO.18 所示序列的 HCDR2 和

如 SEQ ID NO.19 所示序列的 HCDR3, 或/和所述轻链可变区包括如 SEQ ID NO.20 所示序列的 LCDR1、如 SEQ ID NO.21 所示序列的 LCDR2 和如 SEQ ID NO.22 所示序列的 LCDR3; 或,

(2) 所述重链可变区包含与 (1) 相比每个 CDR 至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性, 或至多发生 3 个、2 个、1 个插入、缺失或替换突变的氨基酸序列, 和/或所述轻链可变区包含与 (1) 相比每个 CDR 至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性或至多发生 3 个、2 个、1 个插入、缺失或替换突变的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 所述抗体或抗原结合片段包含重链可变区 (VH) 或/和轻链可变区 (VL), 其中:

(1) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO.15 所示序列, 或/和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO.16 所示序列; 或,

(2) 所述重链可变区或/和所述轻链可变区与上述第 (1) 组中任一所述重链可变区或/和轻链可变区相比, 具有至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性的序列, 或至多发生 3 个、2 个、1 个插入、缺失或替换突变的序列。

在一些实施方案中, 所述抗体或抗原结合片段包括重链恒定区序列和/或轻链恒定区序列; 可选的, 所述重链恒定区和/或轻链恒定区包含完整的恒定区序列或其片段, 所述恒定区片段包括 CH1, 铰链区, CH2, CH3 或 Fc; 可选的, 所述重链恒定区选自人或鼠 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 恒定区, 或/和, 所述轻链恒定区选自人或鼠 kappa 恒定区或 lamda 恒定区; 可选的, 所述抗体或抗原结合片段包括完整的重链和轻链, 所述重链由所述 VH 和重链恒定区组成, 所述重链恒定区包含如 SEQ ID NO.3 所示序列, 所述轻链由所述 VL 和轻链恒定区组成, 所述轻链恒定区包含如 SEQ ID NO.4 所示序列。

在一些实施方案中, 所述的抗体或抗原结合片段为:

- (1) 嵌合抗体或其片段;
- (2) 人源化抗体或其片段; 和/或,
- (3) 全人源抗体或其片段;

优选的, 所述抗体或抗原结合片段选自单克隆抗体、多克隆抗体、天然抗体、工程化抗体、单特异性抗体、多特异性抗体 (例如双特异性抗体)、单价抗体、多价抗体、全长抗体、抗体片段、裸抗体、缀合抗体、人源化抗体、全人抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、scFv、双抗体 (diabody) 或单域抗体 (sdAb)。

在一些实施方案中, 所述抗原结合片段选自 F(ab)₂、Fab'、Fab、Fv、scFv、双特异抗体、纳米抗体和抗体最小识别单位中的一种或多种。

在一些实施方案中, 所述配体单元 Pc 特异性结合 EGFR 和 c-Met。

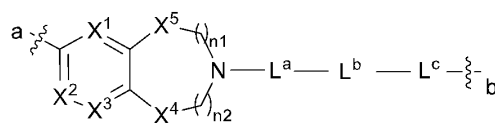
在一些实施方案中, 所述特异性结合 EGFR 和 c-Met 的配体单元 Pc 包含至少双特异性抗体; 优选地, 所述双特异性抗体至少为二价; 优选地, 所述双特异性抗体包含两条不同的 Fc 区, 所述 Fc 包含促异二聚化的突变, 例如 Knob-into-Hole 突变。

在一些实施方案中, 所述配体单元 Pc 包含第一、第二、第三和第四多肽链:

- (1) 第一多肽链包含靶向 EGFR 的抗体重链可变区结构域, 所述第一多肽链包含如 SEQ ID NO.11 所示氨基酸序列;
- (2) 第二多肽链包含靶向 c-Met 的抗体重链可变区结构域, 所述第一多肽链包含如 SEQ ID NO.12 所示氨基酸序列;
- (3) 第三多肽链包含靶向 EGFR 的抗体轻链可变区结构域, 所述第一多肽链包含如 SEQ ID NO.13 所示氨基酸序列; 和
- (4) 第四多肽链包含靶向 c-Met 的抗体轻链可变区结构域, 所述第一多肽链包含如 SEQ ID NO.14 所示氨基酸序列。

在一些实施方案中, n 选自 1-8 的实数, 例如 n 为 1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0; 优选地, n 选自 2-8 的实数, 更优选地, n 选自 6-8 的实数。

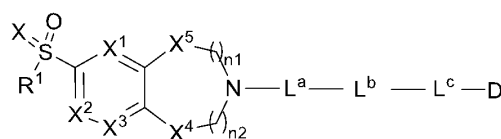
第二方面，本公开提供式 (L) 所示的连接子单元，用于连接配体单元和药物单元得到配体-药物偶联物，



(L)

其中， X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 、 X^5 、 L^a 、 L^b 、 L^c 、 n_1 和 n_2 如前文第一方面任一实施方案中所定义， L 的 a 端与配体单元连接， b 端与药物单元连接。

第三方面，本公开提供了一种式 (II) 所示的药物-连接子化合物或其药学上可接受的盐，



(II)

其中， X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 、 X^5 、 L^a 、 L^b 、 L^c 、 n_1 、 n_2 和药物单元 D 如前文第一方面任一项中所定义；

X 选自不存在、 O 或 NR^{e1} ；

R^1 选自 $N(R^{e2})(R^{e3})$ 、 C_1 - C_{10} 烷基、 C_3 - C_{10} 环烷基、4-14 元杂环基、 C_6 - C_{10} 芳基或 5-10 元杂芳基；所述 C_1 - C_{10} 烷基、 C_3 - C_{10} 环烷基、4-14 元杂环基、 C_6 - C_{10} 芳基或 5-10 元杂芳基任选被一个或多个 R^f 取代，每一个 R^f 独立地选自卤素、 CN 、 $=O$ 、 C_1 - C_3 烷基、 OH 、 $O(C_1$ - C_3 烷基)、 NH_2 、 $NH(C_1$ - C_3 烷基)或 $N(C_1$ - C_3 烷基) $_2$ ；

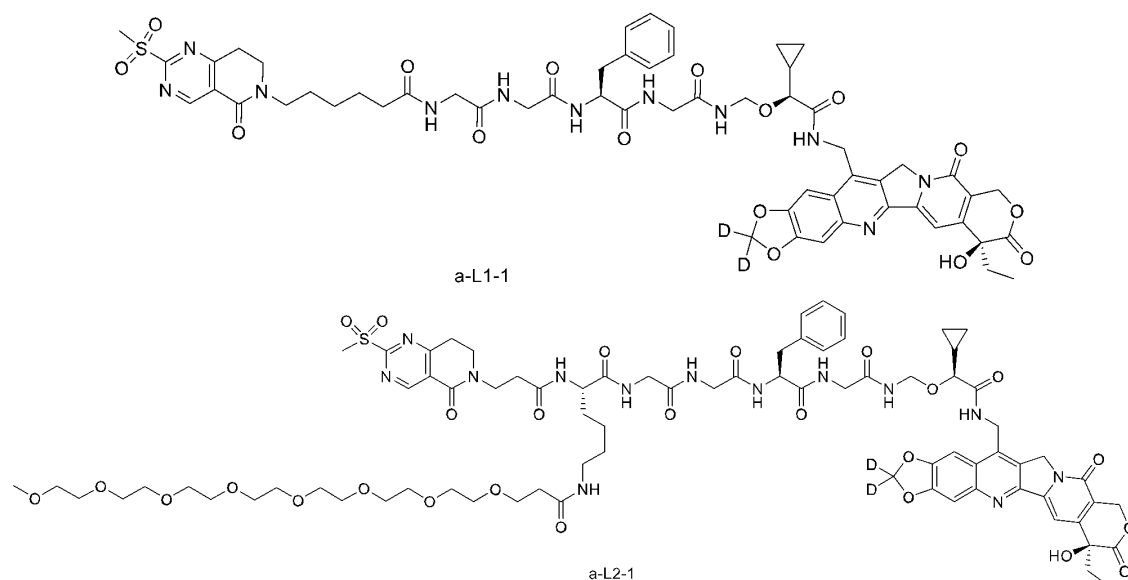
R^{e1} 、 R^{e2} 、 R^{e3} 各自独立地选自 H 、 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_6 环烷基或 4-7 元杂环基。

在一些实施方案中， X 选自 O 。

在一些实施方案中， R^1 选自 C_1 - C_6 烷基或 C_3 - C_6 环烷基，所述 C_1 - C_6 烷基或 C_3 - C_6 环烷基任选被一个或多个 R^f 取代。

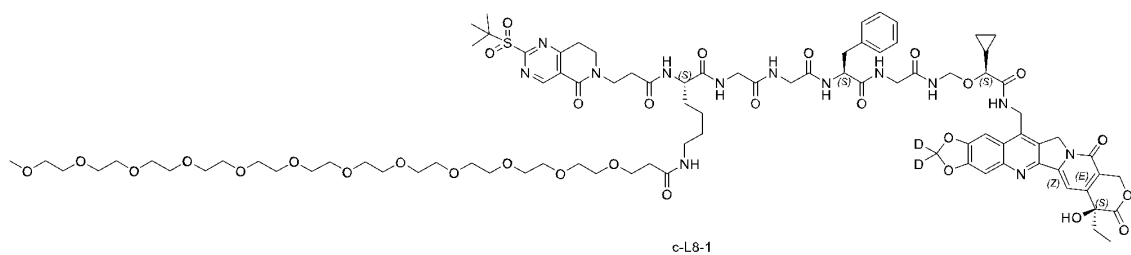
在一些实施方案中， R^1 选自甲基、叔丁基或环戊基。

在一些实施方案中，式 (II) 所示的药物-连接子化合物或其药学上可接受的盐选自以下化合物或其药学上可接受的盐：

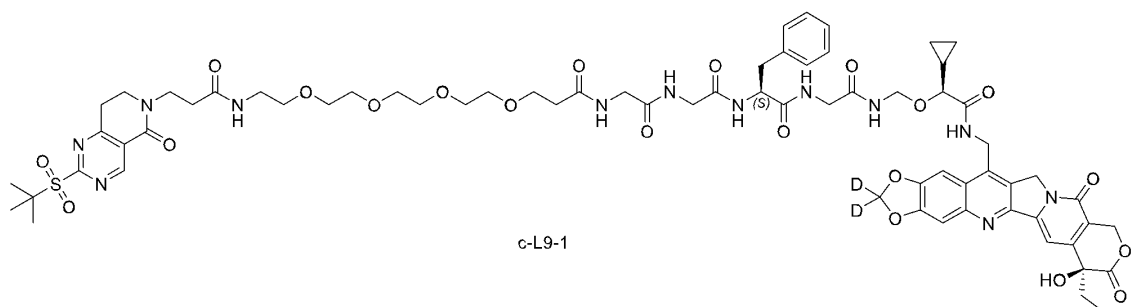




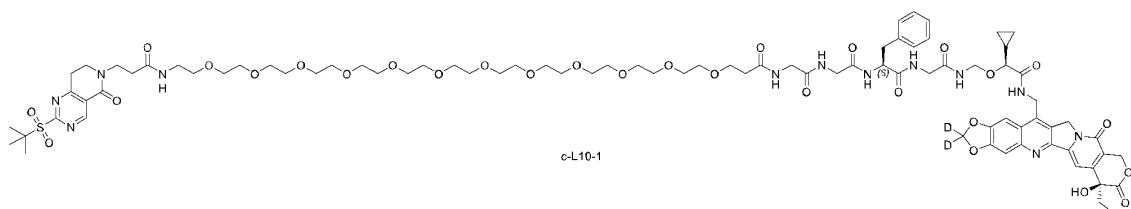
31



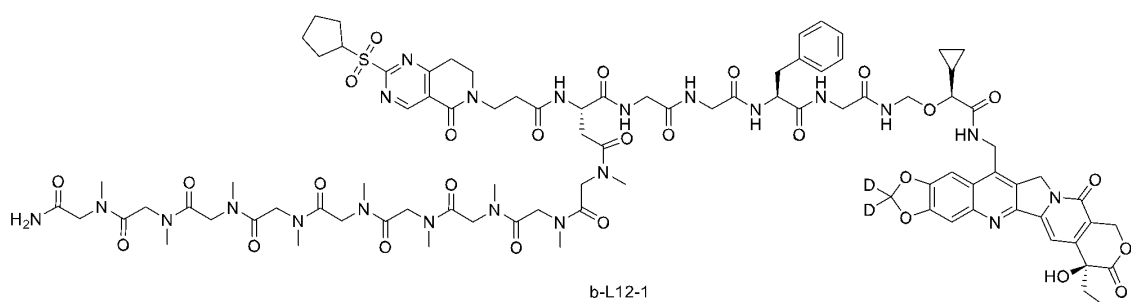
c-L8-1



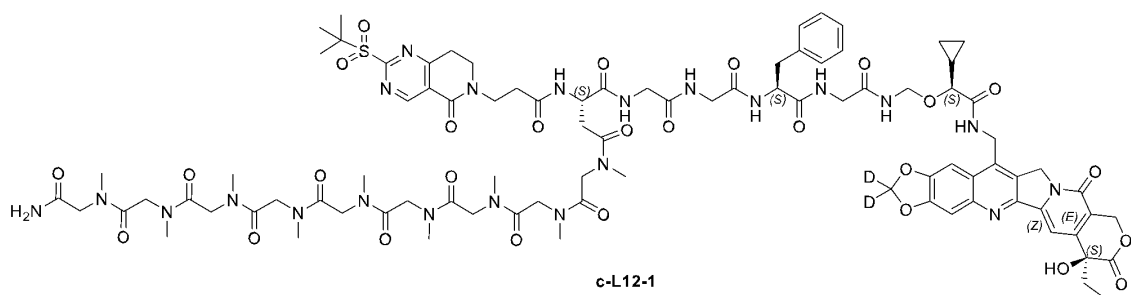
c-L9-1



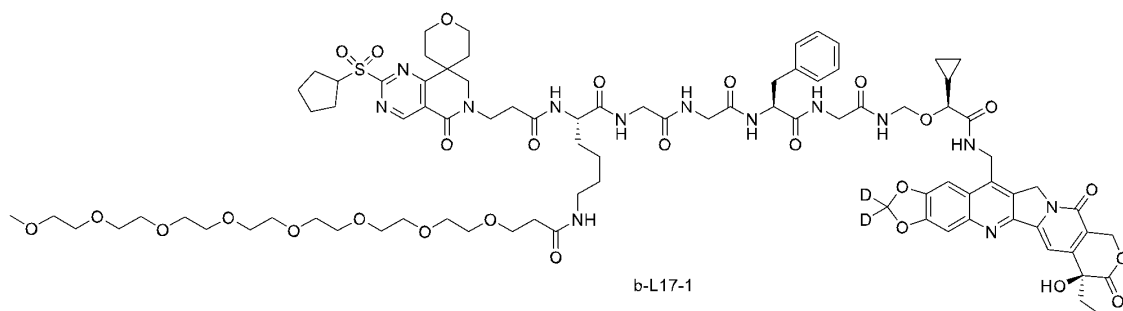
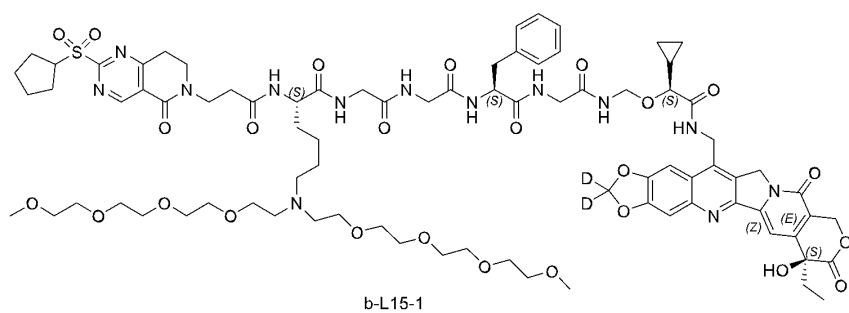
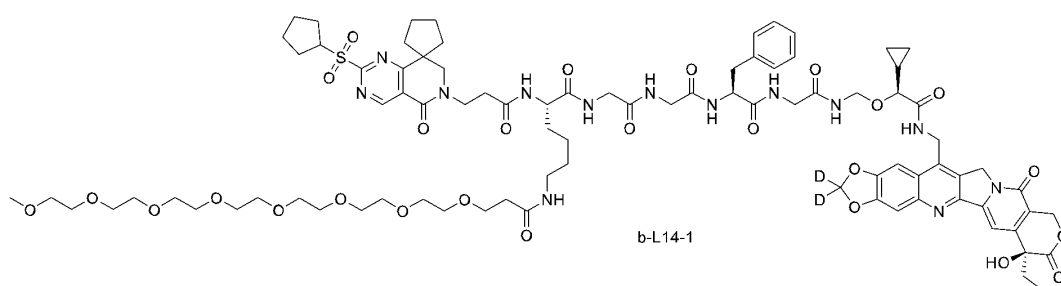
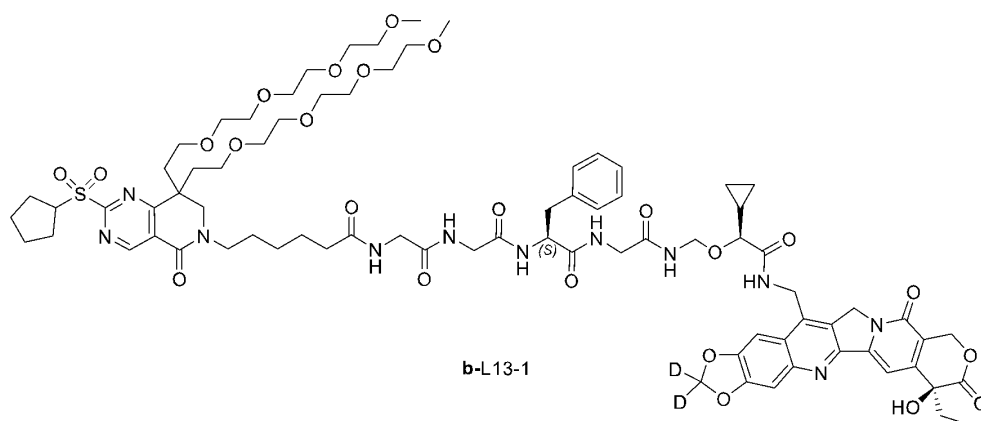
c-L10-1

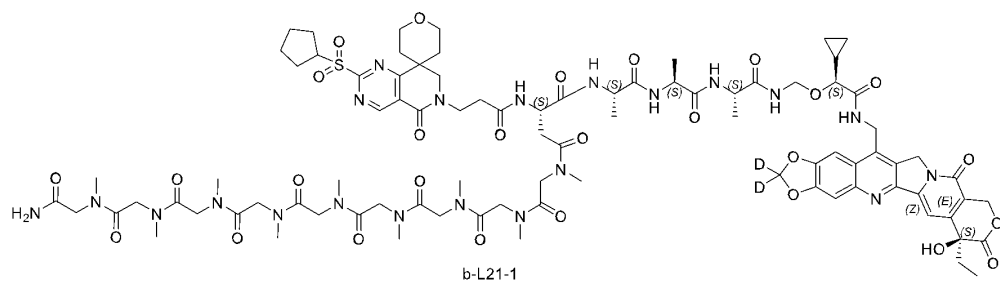
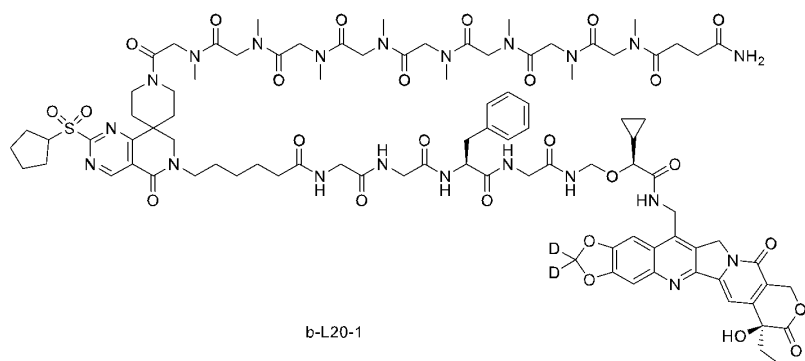
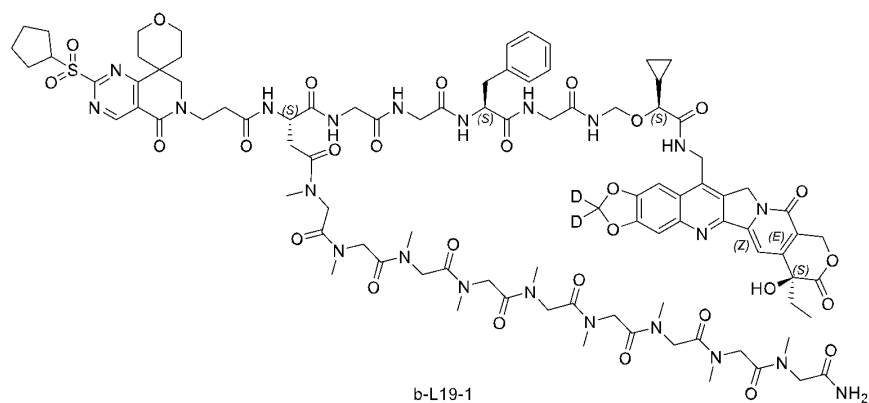
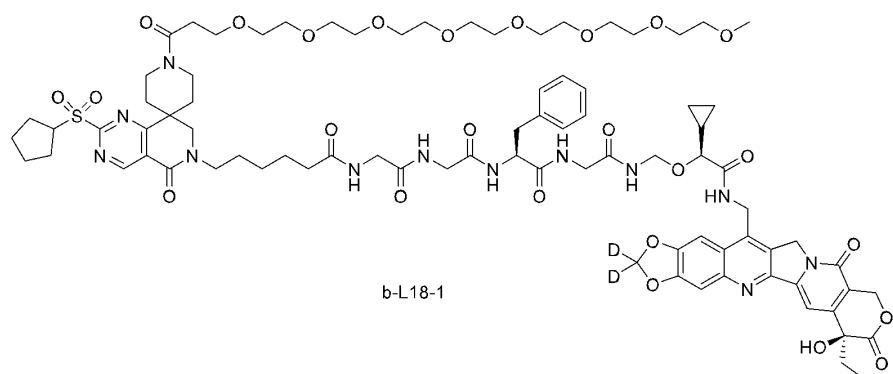


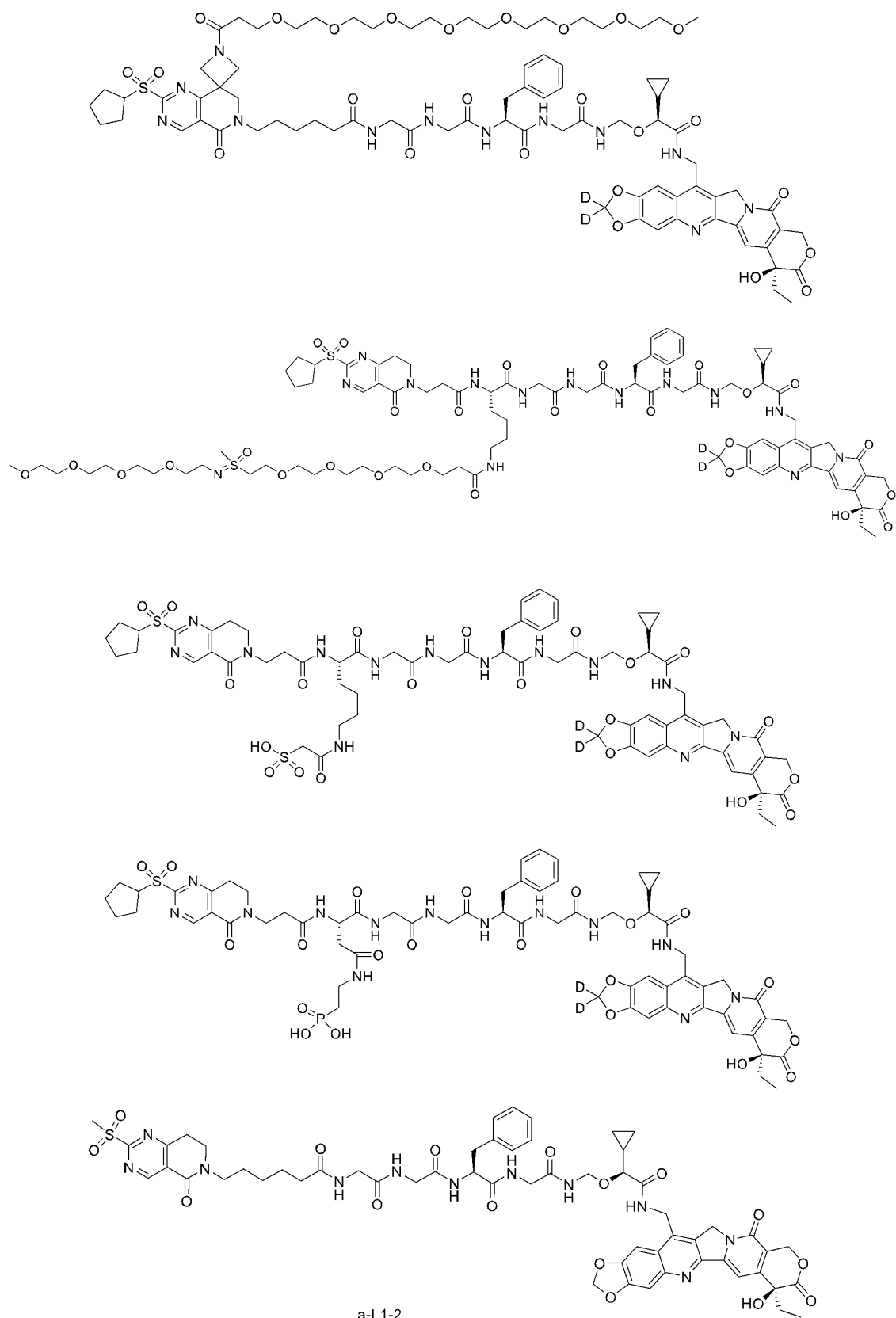
b-L12-1



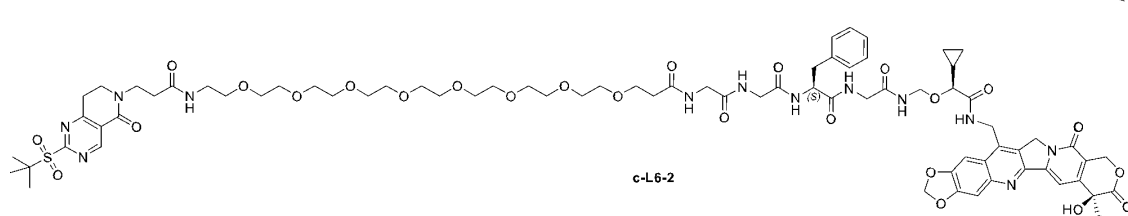
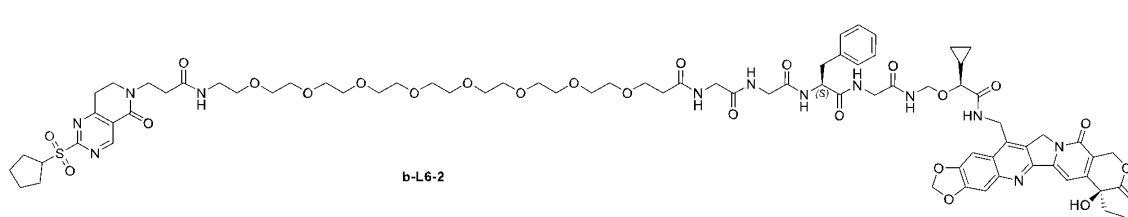
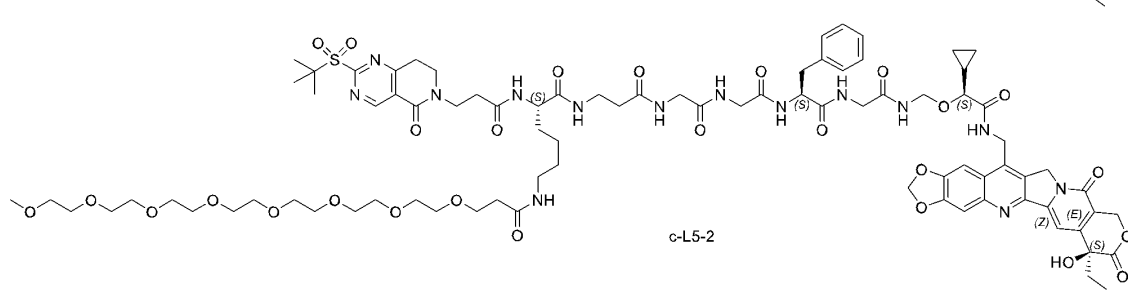
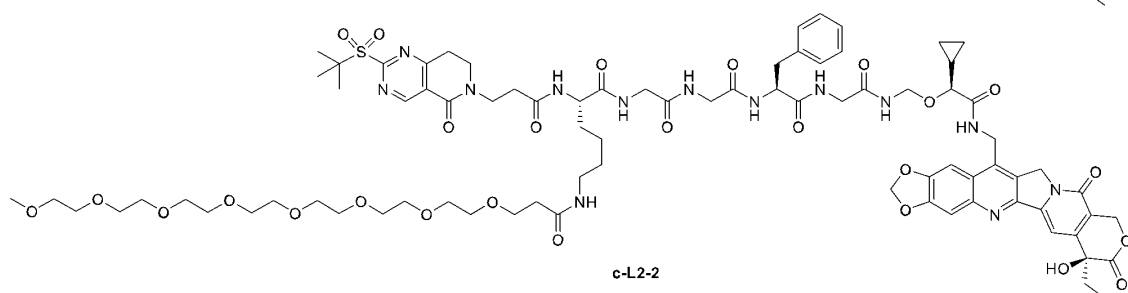
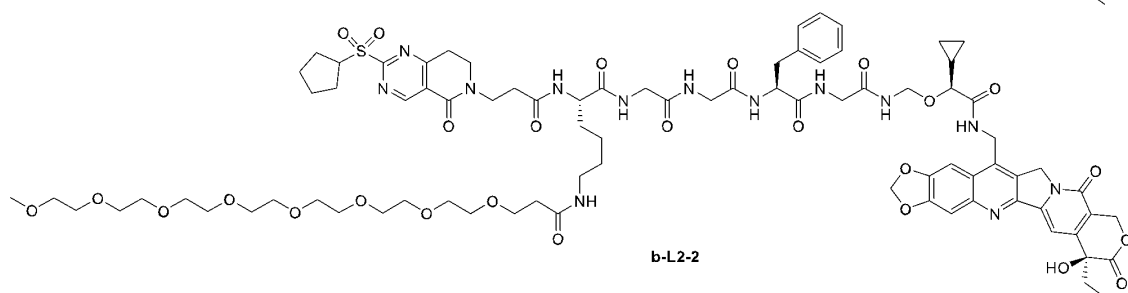
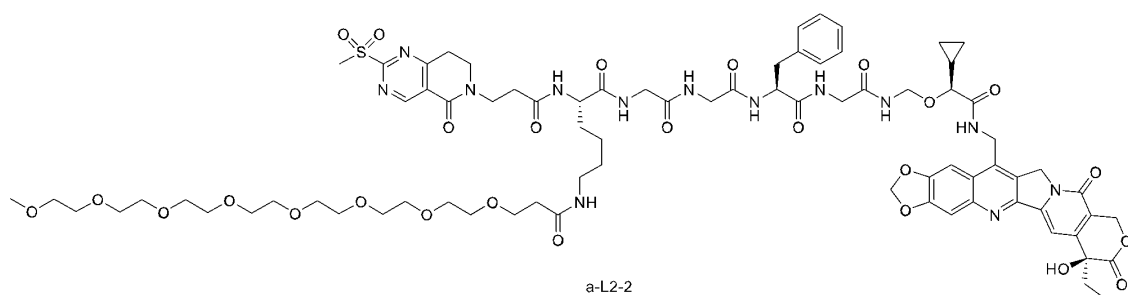
c-L12-1

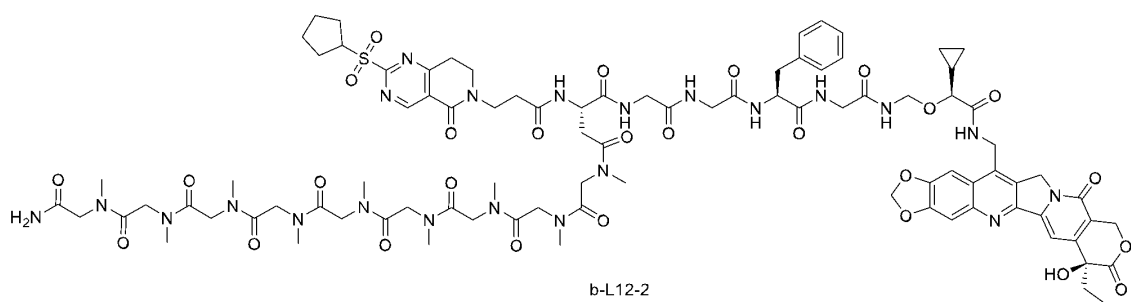
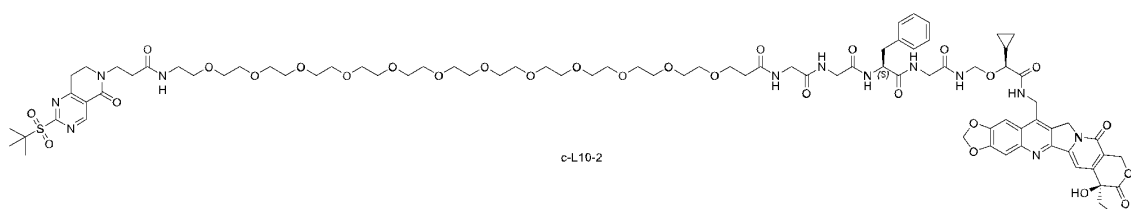
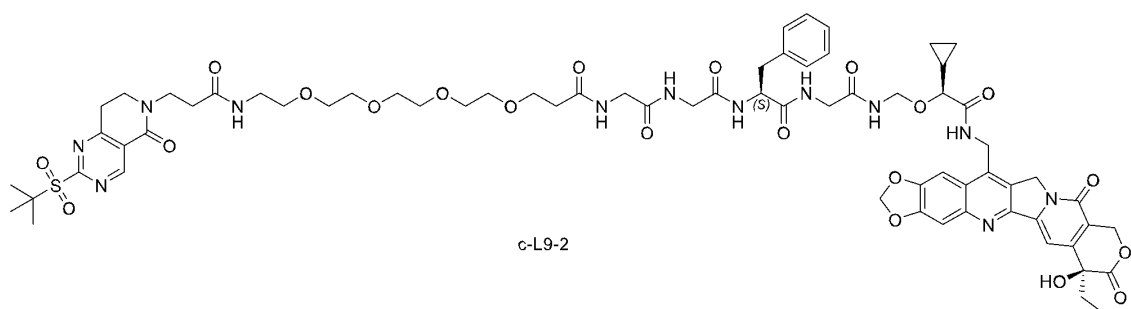
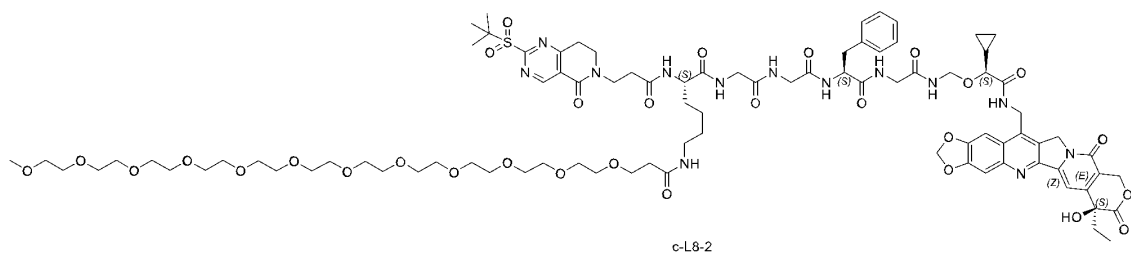
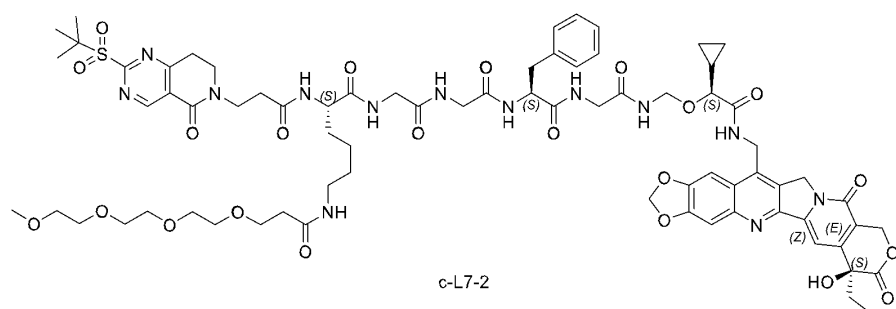


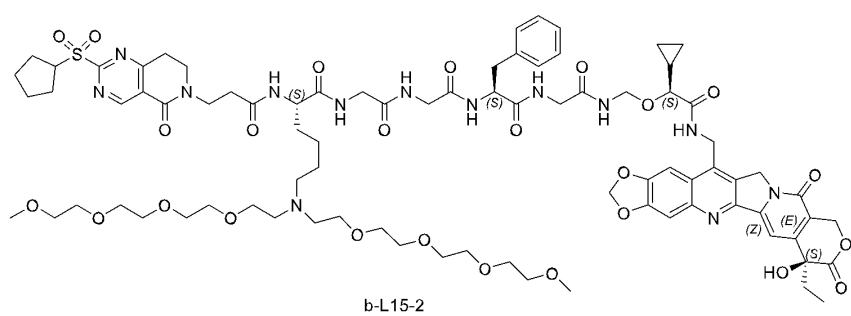
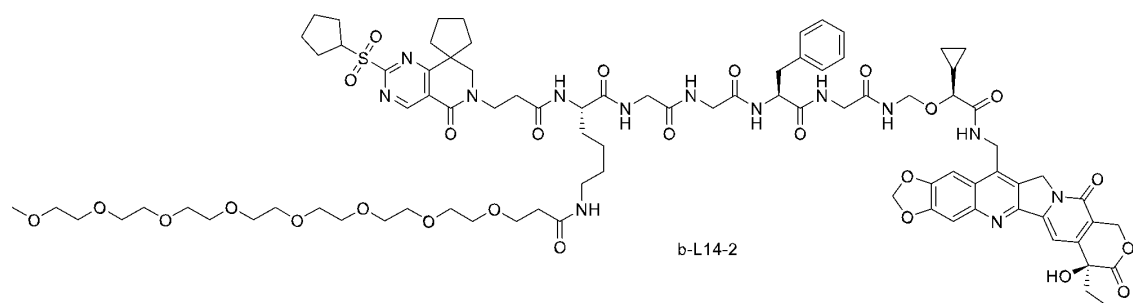
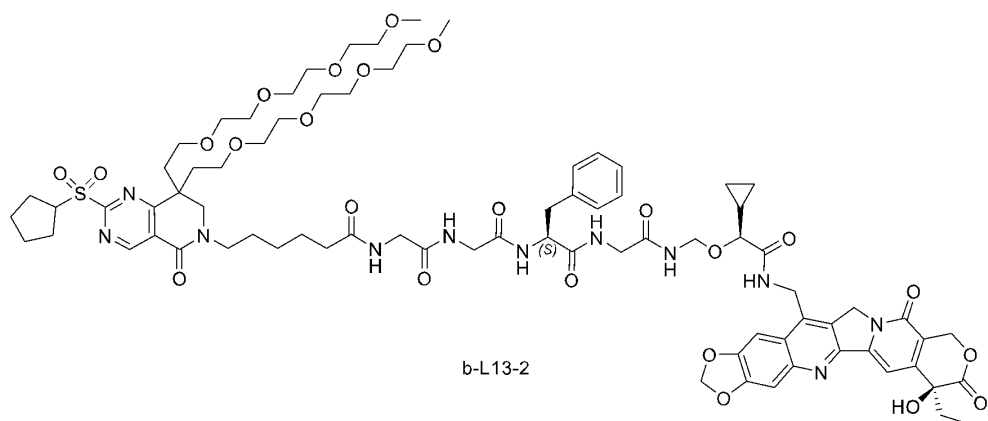
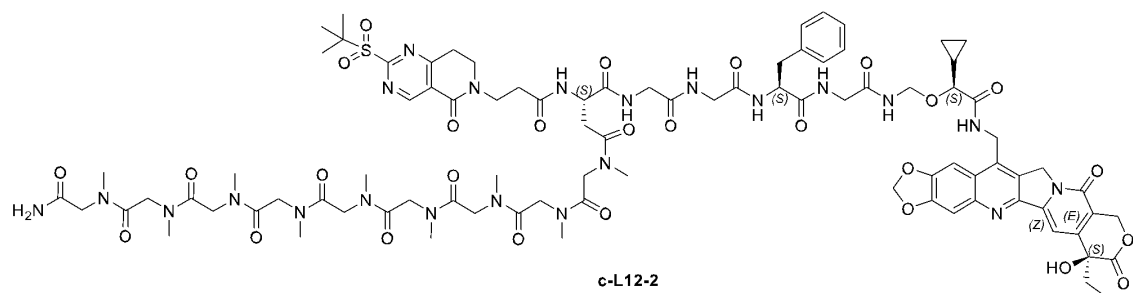




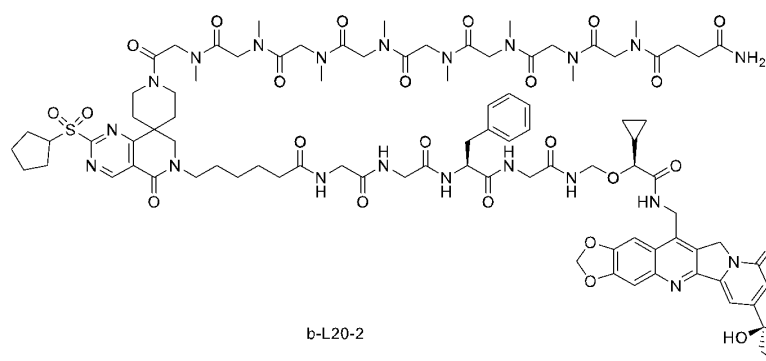
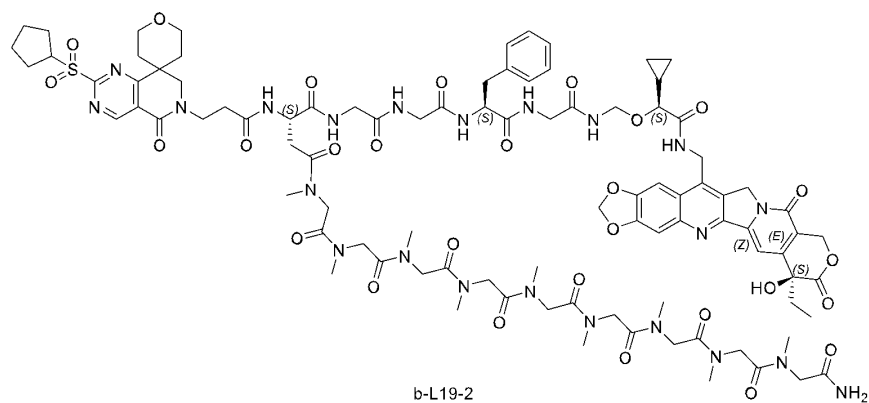
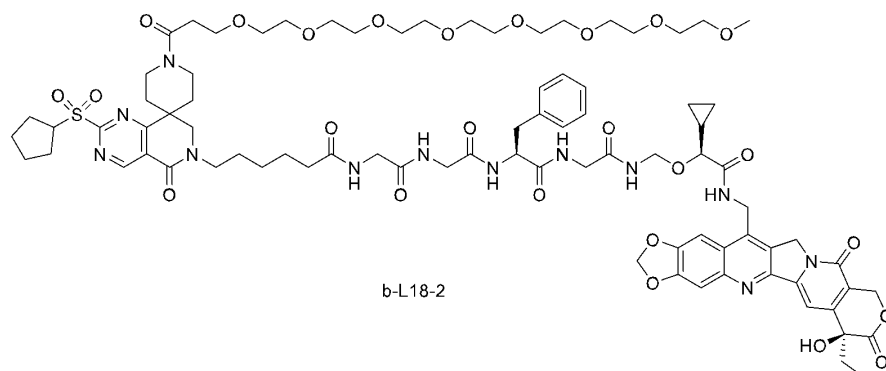
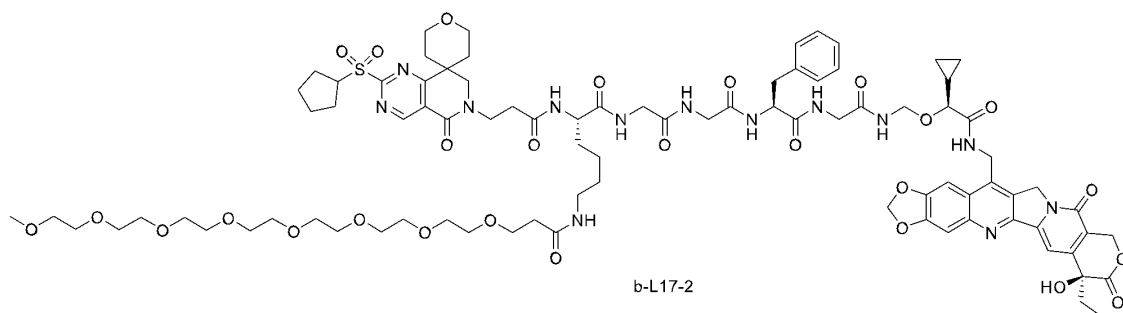
35

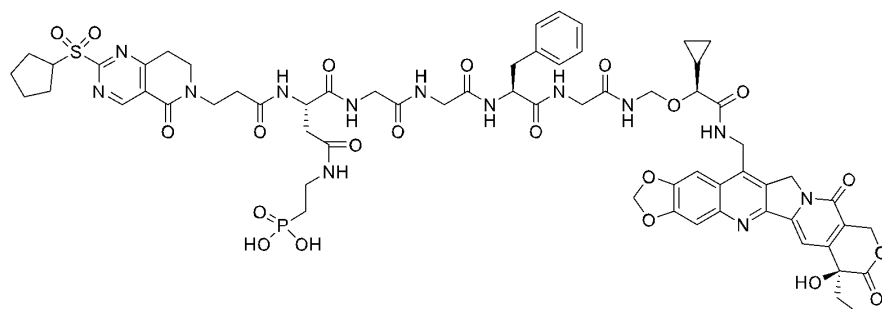
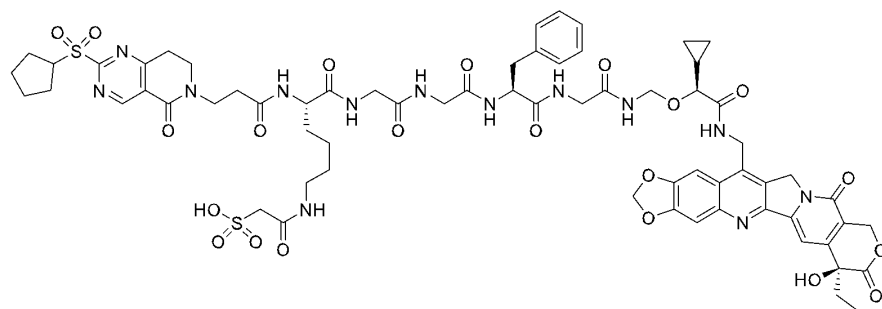
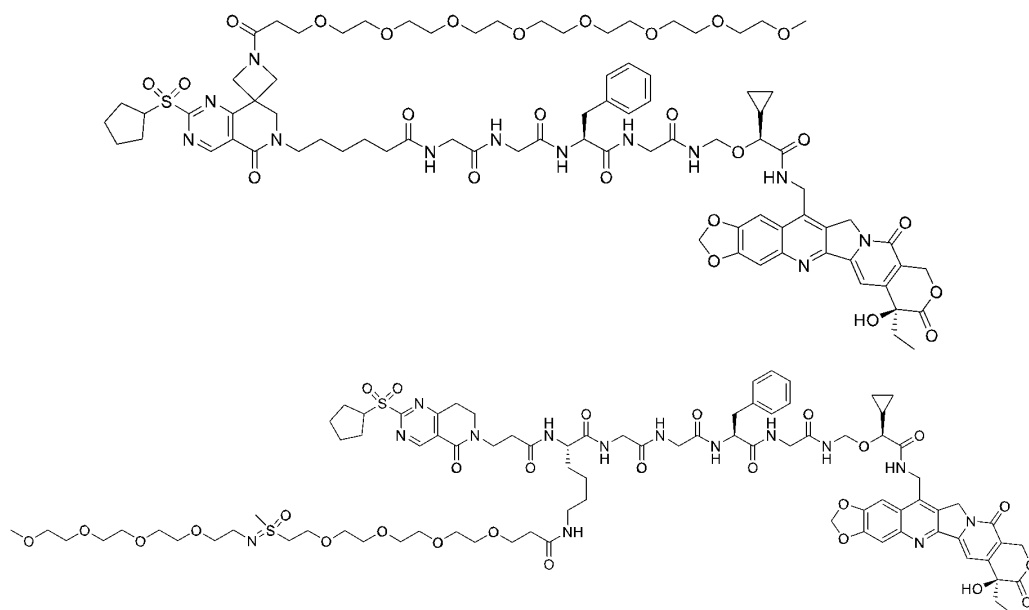
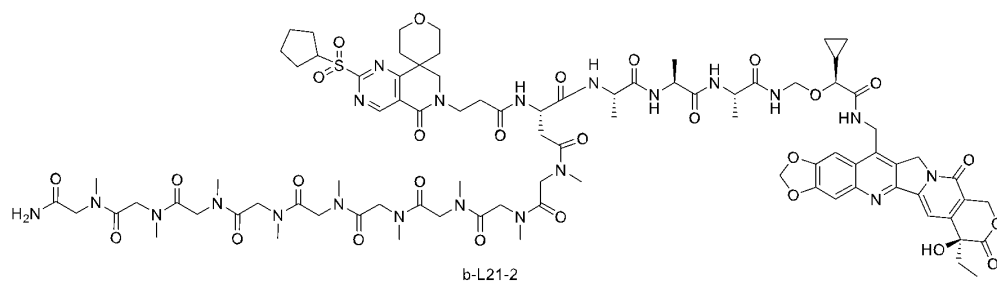


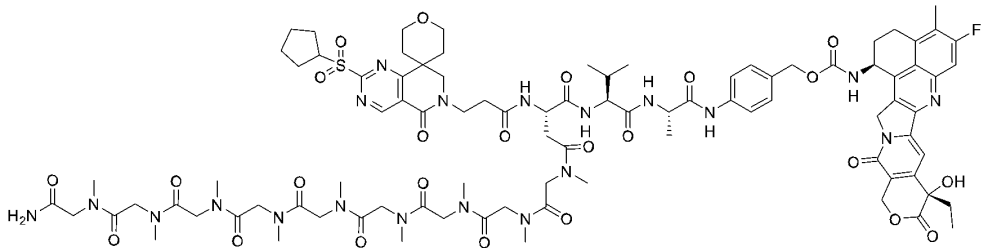




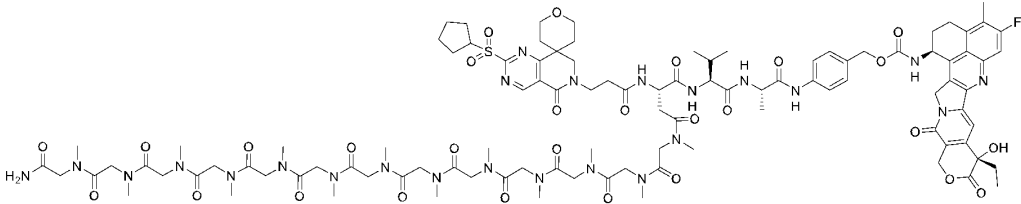
38



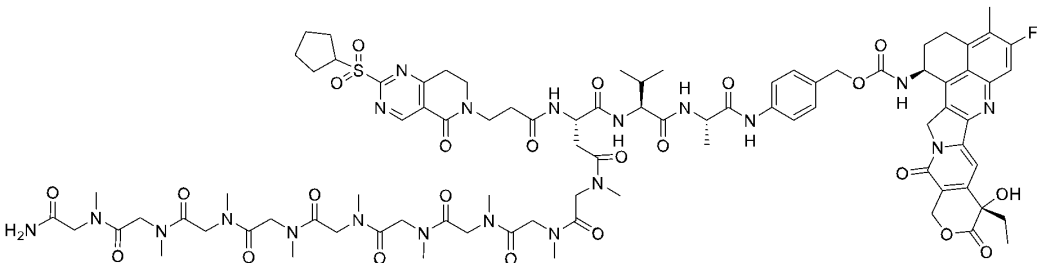




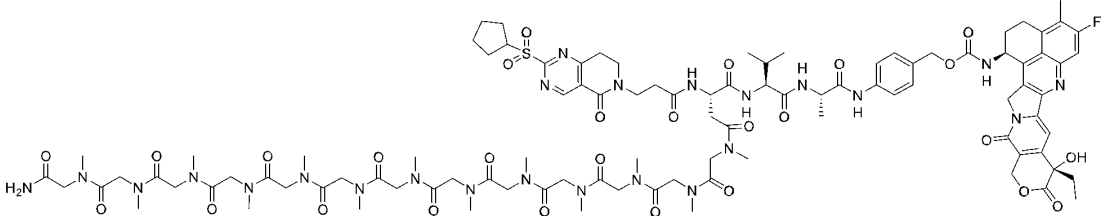
b-L22-3



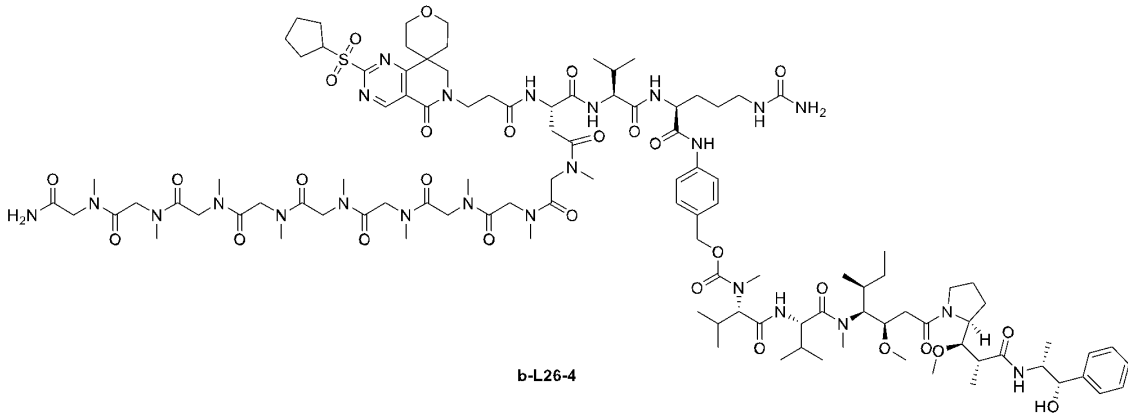
b-L23-3



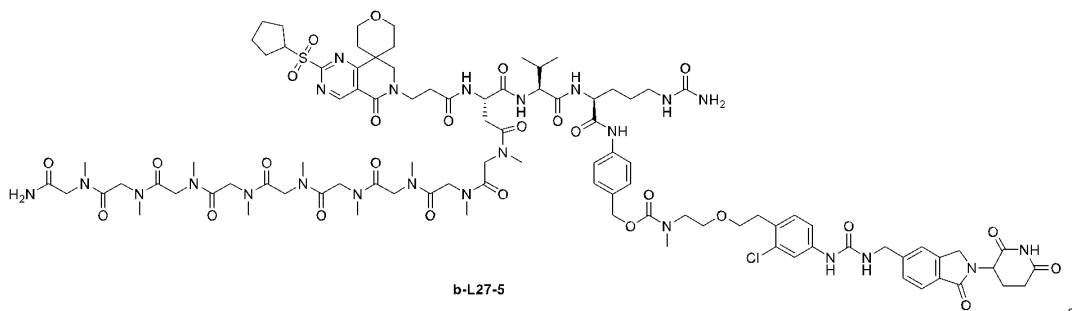
b-L24-3



b-L25-3



b-L26-4



另一方面, 本公开提供了一种药物组合物, 其包含本公开前述通式为 $\text{Pc}-(\text{L-D})_n$ 的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的辅料。

另一方面, 本公开提供了治疗哺乳动物肿瘤的方法, 包括对需要该治疗的哺乳动物, 优选人类, 给予治疗有效量的前述通式为 $\text{Pc}-(\text{L}-\text{D})_n$ 的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐、或其药物组合物。

另一方面，本公开提供了前述通式为 $\text{Pc}-(\text{L-D})_n$ 的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐、或其药物组合物在制备治疗肿瘤的药物中的用途。

另一方面, 本公开提供了前述通式为 $\text{Pc}-(\text{L-D})_n$ 的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐、或其药物组合物在治疗肿瘤中的用途。

另一方面, 本公开提供了用于治疗肿瘤的前述通式为 $\text{Pc}-(\text{L}-\text{D})_n$ 的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐、或其药物组合物。

另一方面，本公开提供了通式为 $\text{Pc}-(\text{L-D})_n$ 的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐的制备方法，包括将本公开前述通式为(II)的药物-连接子化合物与前述配体偶联的步骤，可选地，所述配体为抗体或其抗原结合片段。

另一方面，本公开提供了通式为 $\text{Pc}-(\text{L-D})_n$ 的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐的制备方法，包括将本公开前述药物单元 D 与前述配体单元 Pc 连接的步骤；可选地，前述药物单元 D 通过前述连接子单元 L 与前述配体单元 Pc 连接；可选地，配体单元 Pc 为抗体或其抗原结合片段。

本公开提供的配体-药物偶联物具有显著的抗肿瘤活性和/或降低的毒副作用和/或提高的产品均一性和/或更高的稳定性。

附图说明

图 1 显示了本公开的示例性的 EGFR-cMet ADC 和对照 ADC 在 HCC827 皮下瘤模型中对肿瘤生长的抑制。

图 2 显示了本公开的示例性的 EGFR-cMet ADC 和对照 ADC 在 HCC827 皮下瘤模型中对小鼠体重的影响。

图 3 显示了本公开的示例性的 EGFR-cMet ADC 和对照 ADC 在 HCT116 皮下瘤模型中对肿瘤生长的抑制。

图 4 显示了本公开的示例性的 EGFR-cMet ADC 和对照 ADC 在 HCT116 皮下瘤模型中对小鼠体重的影响。

图 5 显示了本公开的示例性的 EGFR-cMet ADC 和对照 ADC 在 PC9-6 皮下瘤模型中对肿瘤生长的抑制。

图 6 显示了本公开的示例性的 EGFR-cMet ADC 和对照 ADC 在 PC9-6 皮下瘤模型中对小鼠体重的影响。

图 7 显示了本公开的示例性的 CDH-6 ADC 和对照 ADC 在 PA-1 皮下瘤模型中对肿瘤生长的抑制。

术语定义和说明

除非另有说明, 本公开中所用的术语具有下列含义, 本公开中记载的基团和术语定义, 包括其作为实例的定义、示例性的定义、优选的定义、表格中记载的定义、实施例中具体化合物的定义等, 可以彼此之间任意组合和结合。一个特定的术语在没有特别定义的情况下不应该被认为是不确定的或不清楚的, 而应该按照本领域普通的含义去理解。当本文中出現商品名时, 意在指代其对应的商品或其活性成分。

术语“配体”是指能识别和结合目标细胞相关的抗原或受体的大分子化合物。配体的作用是将药物呈递给与配体结合的目标细胞群，这些配体包括但不限于蛋白类激素、凝集素、生长因子、抗体或其他能与细胞结合的分子。在本公开的实施方案中，配体或配体单元表示为 Pc，配体可通过配体上的杂原子与连接子单元形成连接键。在本公开的一些实施方案中，配体单元 Pc 可包含配体上用于与连接子单元连接的杂原子基团（例如 S 原子或 N 原子），也可不包含上述用于与连接子单元连接的杂原子基团。在本公开的一些实施方案中，配体选自抗体或抗原结合片段，所述抗体选自嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体或鼠源抗体；在本公开的一些实施方案中，抗体为单克隆抗体。

术语“连接子”或“连接子单元”是指一端与配体连接而另一端与药物相连的化学结构片段或化学键。

术语“药物”指在生物体内具有生物活性的小分子化合物。在本公开的一些实施方案中，药物包括具有抗炎功能的糖皮质激素受体激动剂、具有杀死或抑制细胞生长的细胞毒性药物和促进目标蛋白质在细胞内降解的蛋白降解剂。在本公开的一些实施方案中，蛋白降解剂为小分子类蛋白降解剂。

术语“配体-药物偶联物”，指配体通过稳定的连接子单元与具有生物活性的药物相连。在本公开的一些实施方案中，“配体-药物偶联物”为抗体-药物偶联物(antibody drug conjugate, ADC)，ADC 指将单克隆抗体或者抗体片段通过稳定的连接子单元与具有生物活性的药物相连。

术语“DAR”或“药物抗体比率”是指每个抗体分子连接的小分子糖皮质激素受体激动剂药物的平均数目。在本公开的抗体-药物偶联物中，DAR 由变量“n”定义，n 既可以是整数，也可以是小数。

术语“抗体”按最广义使用，是指包含来自免疫球蛋白重链可变区的足够序列和/或来自免疫球蛋白轻链可变区的足够序列，从而能够特异性结合至抗原的多肽或多肽组合。本文“抗体”涵盖各种形式和各种结构，只要它们展现出期望的抗原结合活性。本文的“抗体”包括具有移植的互补决定区(CDR)或 CDR 衍生物的替代蛋白质支架或人工支架。此类支架包括抗体衍生的支架(其包含引入以例如稳定化抗体三维结构的突变)以及包含例如生物相容性聚合物的全合成支架。参见，例如 Korndorfer 等人, 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 53(1):121-129(2003); Roque 等人, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654 (2004)。此类支架还可以包括非抗体衍生的支架，例如本领域已知可用于移植 CDR 的支架蛋白，包括但不限于肌腱蛋白、纤连蛋白、肽适体等。

本文的“抗体”包括典型的“四链抗体”，其属于由两条重链(HC)和两条轻链(LC)组成的免疫球蛋白；重链是指这样的多肽链，其在 N 端到 C 端的方向上由重链可变区(VH)、重链恒定区 CH1 结构域、铰链区(HR)、重链恒定区 CH2 结构域、重链恒定区 CH3 结构域组成；并且，当所述全长抗体为 IgE 同种型时，任选地还包括重链恒定区 CH4 结构域；轻链是在 N 端到 C 端方向上由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成的多肽链；重链与重链之间、重链与轻链之间通过二硫键连接，形成“Y”字型结构。由于免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，故其抗原性也不同。据此，可将本文的“免疫球蛋白”分为五类，或称为免疫球蛋白的同种型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE，其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链和 ϵ 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别，又可分为不同的亚类，如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4，IgA 可分为 IgA1 和 IgA2。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。

本文的“抗体”还包括不包含轻链的抗体，例如，由单峰驼(Camelus dromedarius)、双峰驼(Camelus bactrianus)、大羊驼(Lama glama)、原驼(Lama guanicoe)和羊驼(Vicugna pacos)等产生的重链抗体(heavy-chain antibodies, HCAs)以及在鲨鱼等软骨鱼纲中发现的免疫球蛋白新抗原受体(Ig new antigen receptor, IgNAR)。

本文的“抗体”可以来源于任何动物，包括但不限于人和非人动物，所述非人动物可选自灵长类动物、哺乳动物、啮齿动物和脊椎动物，例如骆驼科动物、大羊驼、原驼、羊驼、羊、兔、小鼠、大鼠或软骨鱼纲（例如鲨鱼）。

本文的“抗体”包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、单特异性抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体）、单价抗体、多价抗体、完整抗体、完整抗体的片段、裸抗体、缀合抗体、嵌合抗体、人源化抗体或全人抗体。

术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体，即，除了可能的变异体(例如含有天然存在的突变或在制剂的生产过程中产生，此类变异体通常以少量存在)之外，包含所述群体的各个抗体是相同的和/或结合相同的表位。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反，单克隆抗体制剂中的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。本文修饰语“单克隆”不应解释为需要通过任何特定方法产生所述抗体或抗原结合分子。举例来说，单克隆抗体可通过多种技术制得，包括(但不限于)杂交瘤技术、重组 DNA 方法、噬菌体库展示技术和利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法和其它本领域已知的方法。

术语“天然抗体”是指通过多细胞生物体的免疫系统产生和配对的抗体。本文的术语“工程化抗体”是指通过基因工程、抗体工程等技术获得的非天然抗体，示例性地，“工程化抗体”包括人源化抗体、抗体片段（例如 scFv、sdAb 等）、双特异性抗体等。

本文术语“HER2”又称“人表皮生长因子受体 2”或 ErbB2，是一种细胞来源癌基因，是具有酪氨酸蛋白激酶活性的跨膜糖蛋白，能激活胞内酪氨酸激酶调控的信号转导系统。HER2 基因拷贝数扩增和蛋白过表达将导致信号过度激活，该信号的生物学功能与多种癌症的形成、恶性增殖、侵袭转移和化疗耐药性关系密切，在多种肿瘤中其癌基因及其蛋白产物(P185)均有过度表达和扩增。其阳性表达可见于各种癌症，如乳腺癌、卵巢癌、胃癌、食管癌、涎腺肿瘤、肺癌、胆管癌、膀胱癌、前列腺癌、结直肠癌等。

本文术语“CDH6”又称“钙粘蛋白 6”，是指细胞粘附分子，它是细胞-细胞粘附分子的钙粘蛋白家族的成员。CDH6 是由 790 个氨基酸构成的单次跨膜蛋白，其被分类为 II 型钙黏着蛋白家族，并且该蛋白具有 N-末端细胞外和 C-末端细胞内结构域。用于本公开的 CDH6 蛋白可以直接从人或非人哺乳动物(例如大鼠、小鼠或猴)的表达 CDH6 的细胞中纯化，并且随后可以使用，或者可以制备上述细胞的细胞膜级分并且可以作为 CDH6 蛋白使用。或者，CDH6 也可以通过在体外合成或通过遗传操作而允许宿主细胞产生 CDH6 而获得。根据这种遗传操作，可以获得 CDH6 蛋白，具体地，将 CDH6 cDNA 并入到能够表达 CDH6 cDNA 的载体中，并且随后在含有酶、底物和转录和翻译所需的能量材料的溶液中合成 CDH6，或者通过转化其他原核生物或真核生物的宿主细胞，从而允许其表达 CDH6。基于上述遗传操作的表达 CDH6 的细胞或表达 CDH6 的细胞系也可以用于呈递 CDH6 蛋白。或者，可以直接向待免疫的动物施用已并入 CDH6 cDNA 的表达载体，并且 CDH6 可以在如此免疫的动物体内表达。

本文术语“表皮生长因子受体”或“EGFR”是指具有以 GenBank 登录号 NP_005219 示出的氨基酸序列的人类 EGFR(也称为 HER1 或 ErbB1，以及其天然存在的变体。

本文术语“肝细胞生长因子受体”或“c-Met”是指具有以 GenBank 登录号 NP_001120972 示出的氨基酸序列的人类 c-Met 及其天然变体。

术语“单特异性”是指表示具有一个或多个结合位点，其中每个结合位点结合相同抗原的相同表位。

术语“多特异性抗体”是指具有至少两个抗原结合位点，所述至少两个抗原结合位点中的每一个抗原结合位点与相同抗原的不同表位或与不同抗原的不同表位结合。因此，诸如“双特异性”、“三特异性”、“四特异性”等术语是指抗体/抗原结合分子可以结合的不同表位的数目。

术语“价”表示抗体/抗原结合分子中规定数目的结合位点的存在。因此，术语“单价”、“二价”、“四价”和“六价”分别表示抗体/抗原结合分子中一个结合位点、两个结合位点、四个结合位点和六个结合位点的存在。

本文的“全长抗体”、“完好抗体”和“完整抗体”在本文中可互换使用，是指具有基本上与天然抗体结构相似的结构。

本文的“抗原结合片段”和“抗体片段”在本文中可互换使用，其不具备完整抗体的全部结构，仅包含完整抗体的局部或局部的变体，所述局部或局部的变体具备结合抗原的能力。本文“抗原结合片段”或“抗体片段”包括但不限于 Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、VHH 和 scFv。

完整抗体的木瓜蛋白酶消化生成两个同一的抗原结合片段，称作“Fab”片段，每个含有重和轻链可变域，还有轻链的恒定域和重链的第一恒定域(CH1)。如此，本文的术语“Fab 片段”指包含轻链的 VL 域和恒定域(CL)的轻链片段以及重链的 VH 域和第一恒定域(CH1)的抗体片段。Fab' 片段因在重链 CH1 域的羧基末端增加少数残基而与 Fab 片段不同，包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH 是其中恒定域的半胱氨酸残基携带游离巯基的 Fab' 片段。胃蛋白酶处理产生具有两个抗原结合位点(两个 Fab 片段)和 Fc 区的一部分的 F(ab')₂ 片段。

“Fv 片段”是由 IgG 和 IgM 产生的最小片段，包含完整的抗原结合位点，Fv 片段具有与 Fab 相同的结合特性和相似的三维结合特性，Fv 片段的 VH 和 VL 链通过非共价相互作用结合在一起。

术语“scFv”(single-chain variable fragment)是指包含 VL 和 VH 结构域的单个多肽链，其中所述 VL 和 VH 通过连接子(linker)相连(参见，例如，Bird 等人，Science 242:423-426 (1988)；Huston 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883(1988)；和 Pluckthun，The Pharmacology of Monoclonal Antibodies，第 113 卷，Roseburg 和 Moore 编，Springer-Verlag，纽约，第 269-315 页(1994))。此类 scFv 分子可具有一般结构：NH₂-VL-连接子-VH-COOH 或 NH₂-VH-连接子-VL-COOH。合适的现有技术连接子由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成。例如，可使用具有氨基酸序列(GGGGS)₄ 的连接子，但也可使用其变体(Holliger 等人(1993)，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448)。可用于本公开的其他连接子由 Alfthan 等人(1995)，Protein Eng. 8:725-731，Choi 等人(2001)，Eur. J. Immunol. 31:94-106，Hu 等人(1996)，Cancer Res. 56:3055-3061，Kipriyanov 等人(1999)，J. Mol. Biol. 293:41-56 和 Roovers 等人(2001)，Cancer Immunol. 描述。在一些情况下，scFv 的 VH 与 VL 之间还可以存在二硫键，形成二硫键连接的 Fv (dsFv)。

术语“双抗体 (diabody)”，其 VH 和 VL 结构域在单个多肽链上表达，但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对，从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合

部位(参见,例如, Holliger P.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448(1993), 和 Poljak R. J.等人, Structure 2:1121-1123(1994))。

术语“嵌合抗体(Chimeric antibody)”是指这样的抗体,其轻链或/和重链的一部分源自一个抗体(其可以源自某一特定物种或属于某一特定抗体类或亚类),且轻链或/和重链的另一部分源自另一个抗体(其可以源自相同或不同的物种或属于相同或不同的抗体类或亚类),但无论如何,其仍保留对目标抗原的结合活性(U.S.P 4,816,567 to Cabilly 等人; Morrison 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984))。例如,术语“嵌合抗体”可包括这样的抗体(例如人鼠嵌合抗体),其中抗体的重链和轻链可变区来自第一抗体(例如鼠源抗体),而抗体的重链和轻链恒定区来自第二抗体(例如人抗体)。

术语“人源化抗体”是指经基因工程改造的非人源抗体,其氨基酸序列经修饰以提高与人源抗体的序列的同源性。通常而言,人源化抗体的全部或部分 CDR 区来自于非人源抗体(供体抗体),全部或部分的非 CDR 区(例如,可变区中的 FR 和/或恒定区)来自于人源免疫球蛋白(受体抗体)。人源化抗体通常保留或部分保留了供体抗体的预期性质,包括但不限于,抗原特异性、亲和性、反应性、提高免疫细胞活性的能力、增强免疫应答的能力等。

术语“全人抗体”是指具有其中 FR 和 CDR 二者都源自人种系免疫球蛋白序列的可变区的抗体。此外,如果抗体包含恒定区,则恒定区也源自人种系免疫球蛋白序列。本文的“全人抗体”可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内细胞突变引入的突变)。然而,本文的“全人抗体”不包括其中来源于另一个哺乳动物物种(例如小鼠)的种系的 CDR 序列已被移植到人框架序列上的抗体。

术语“可变区”是指抗体重链或轻链中所包含的使抗体结合抗原的区域,“重链可变区”与“VH”、“HCVR”可互换使用,“轻链可变区”与“VL”、“LCVR”可互换使用。天然抗体的重链和轻链的可变域(分别是 VH 和 VL)一般具有相似的结构,每个域包含四个保守的框架区(FR)和三个高变区(HVR)。参见例如 Kindt 等人, Kuby Immunology, 第 6 版, W. H. Freeman and Co., p.91(2007)。单个 VH 或 VL 域可足以赋予抗原结合特异性。本文的术语“互补决定区”与“CDR”可互换使用,通常指重链可变区(VH)或轻链可变区(VL)的高变区(HVR),该部位因在空间结构上可与抗原表位形成精密的互补,故又称为互补决定区,其中,重链可变区 CDR 可缩写为 HCDR,轻链可变区 CDR 可缩写为 LCDR。本文的术语“框架区”或“FR 区”可互换,是指抗体重链可变区或轻链可变区中除 CDR 以外的那些氨基酸残基。通常典型的抗体可变区由 4 个 FR 区和 3 个 CDR 区按以下顺序组成: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

本文的“CDR”可由本领域公知的方式加以标注和定义,包括但不限于 Kabat 编号系统、Chothia 编号系统或 IMGT 编号系统,使用的工具网站包括但不限于 AbRSA 网站(<http://cao.labshare.cn/AbRSA/cdrs.php>)、abYsis 网站(www.abysis.org/abysis/sequence_input/key_annotation/key_annotation.cgi)和 IMGT 网站(<http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainGapAlign.cgi#results>)。本文的 CDR 包括不同定义方式的氨基酸残基的重叠(overlap)和子集。

本文的术语“重链恒定区”是指抗体重链的羧基端部分,其不直接参与抗体与抗原的结合,但是表现出效应子功能,诸如与 Fc 受体的相互作用,其相对于抗体的可变结构域具有更保守的氨基酸序列。“重链恒定区”至少包含: CH1 结构域,铰链区, CH2 结构域, CH3 结构域,或其变体或片段。“重链恒定区”包括“全长重链恒定区”和“重链恒定区片段”,前者具有基本上与天然抗体恒定区基本相似的结构,而后者仅包括“全长重链恒定区的一部分”。示例性地,典型的“全长抗体重链恒定区”由 CH1 结构域-铰链区-CH2 结构域-CH3 结构域组成;当抗体为 IgE 时,其还包括 CH4 结构域;当抗体为重链抗体时,则其不包括 CH1 结构域。示例性地,典型的“重链恒定区片段”可选自 CH1、Fc 或 CH3 结构域。

本文的术语“轻链恒定区”是指抗体轻链的羧基端部分,其不直接参与抗体与抗原的结合,所述轻链恒定区可选自恒定 κ 结构域或恒定 λ 结构域。

本文的术语“Fc”是指完整抗体经木瓜蛋白酶水解而成的抗体羧基端部分,典型地,其包含抗体的 CH3 和 CH2 结构域。Fc 区包括例如天然序列 Fc 区、重组 Fc 区和变体 Fc 区。尽管免疫球蛋白重链的 Fc 区的边界可以略微变化,但是人 IgG 重链的 Fc 区通常被定义为从 Cys226 位置的氨基酸残基或从 Pro230 延伸至其羧基末端。Fc 区的 C 末端赖氨酸(根据 Kabat 编号系统的残基 447)可以例如在抗体的产生或纯化过程中,或通过对编码抗体重链的核酸重组工程化而除去,因此, Fc 区可包括或不包括 Lys447。

本文的术语“同一性”可通过以下方式计算获得:为确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的“同一性”百分数,将所述序列出于最佳比较目的比对(例如,可以为最佳比对而在第一和第二氨基酸序列或核酸序列之一或二者中引入空位或可以为比较目的而抛弃非同源序列)。随后比较在对应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置由第二序列中对应位置处的相同氨基酸残基或核苷酸占据时,则所述分子在这个位置处是相同的。

考虑到为最佳比对这两个序列而需要引入的空位的数目和每个空位的长度,两个序列之间的同一性百分数随所述序列共有的相同位置变化而变化。

可以利用数学算法实现两个序列间的序列比较和同一性百分数的计算。例如,使用已经集成至 GCG 软件包的 GAP 程序中的 Needleman 和 Wunsch((1970) J. Mol. Biol. 48:444-453)算法(在 www.gcg.com 可获得),使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵和空位权重 16、14、12、10、8、6 或 4 和长度权重 1、2、3、4、5 或 6,确定两个氨基酸序列之间的同一性百分数。又例如,使用 GCG 软件包中的 GAP 程序(在 www.gcg.com 可获得),使用 NWSgapdna.CMP 矩阵和空位权重 40、50、60、70 或 80 和长度权重 1、2、3、4、5 或 6,确定两个核苷酸序列之间的同一性百分数。特别优选的参数集合(和除非另外说明否则应当使用的一个参数集合)是采用空位罚分 12、空位延伸罚分 4 和移码空位罚分 5 的 Blossum62 评分矩阵。

本文中“ n 为 1-8 的实数”指 n 为大于或等于 1 且小于或等于 8 的任意实数。

本文中“ x ~ y 的整数”指既包含该区间中的每一个整数(含 x 和 y)的情况,也包含以上述整数中的任意 2 个为端点的范围值。例如,“ m_4 选自 1~10 的整数”指 m_4 既包含选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 的情况,也包含 m_4 选自以上述 10 个整数中的任意 2 个为端点的范围值的情况,例如 m_4 选自 2~9、3~9、3~8、4~6 等。

本文中“”表示连接位点。

本文中消旋体或者对映体纯的化合物的图示法来自 Machr, J.Chem.Ed.1985, 62:114-120。除非另有说明,

用楔形键和虚楔键()表示一个立体中心的绝对构型,用黑实键和虚键()表示一个立体中心的相对构型(如脂环化合物的顺反构型)。

术语“互变异构体”是指因分子中某一原子在两个位置迅速移动而产生的官能团异构体。本公开化合物可表现出互变异构现象。互变异构的化合物可以存在两种或多种可相互转化的种类。互变异构体一般以平衡形式存在,尝试分离单一互变异构体时通常产生一种混合物,其理化性质与化合物的混合物是一致的。平衡的位置取决于分子内的化学特性。例如,在很多脂族醛和酮如乙醛中,酮型占优势;而在酚中,烯醇型占优势。本公开包含化合物的所有互变异构形式。

术语“立体异构体”是指由分子中原子在空间上排列方式不同所产生的异构体,包括顺反异构体、对映异构体和非对映异构体。

本公开的化合物可以具有不对称原子如碳原子、硫原子、氮原子、磷原子或不对称双键,因此本公开的化合物可以存在特定的几何或立体异构体形式。特定的几何或立体异构体形式可以是顺式和反式异构体、E 型和 Z 型几何异构体、(-)和(+)-对映体、(R)-和(S)-对映体、非对映异构体、(D)-异构体、(L)-异构体,以及其外消旋混合物或其它混合物,例如对映异构体或非对映体富集的混合物,以上所有这些异构体以及它们的混合物都属于本公开化合物的定义范围之内。烷基等取代基中可存在另外的不对称碳原子、不对称硫原子、不对称氮原子或不对称磷原子,所有取代基中涉及到的这些异构体以及它们的混合物,也均包括在本公开化合物的定义范围之内。本公开的含有不对称原子的化合物可以以光学活性纯的形式或外消旋形式被分离出来,光学活性纯的形式可以从外消旋混合物拆分,或通过使用手性原料或手性试剂合成。

术语“被取代”是指特定原子上的任意一个或多个氢原子被取代基取代,只要特定原子的价态是正常的并且取代后的化合物是稳定的。当取代基为氧代(即=O)时,意味着两个氢原子被取代,氧代不会发生在芳香基上。

术语“任选”或“任选地”是指随后描述的事件或情况可以发生或不发生,该描述包括发生所述事件或情况和不发生所述事件或情况。例如,乙基“任选”被卤素取代,是指乙基可以是未被取代的(CH_2CH_3)、单取代的($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{F}$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ 等)、多取代的(CHFCH_2F 、 CH_2CHF_2 、 CHFCH_2Cl 、 CH_2CHCl_2 等)或完全被取代的(CF_2CF_3 、 CF_2CCl_3 、 CCl_2CCl_3 等)。本领域技术人员可理解,对于包含一个或多个取代基的任何基团,不会引入任何在空间上不可能存在和/或不能合成的取代或取代模式。

当任何变量(例如 R^a 、 R^b)在化合物的组成或结构中出现一次以上时,其在每一种情况下的定义都是独立的。例如,如果一个基团被 2 个 R^b 所取代,则每个 R^b 都有独立的选项。

当一个连接基团的数量为 0 时,比如 $-(\text{CH}_2)_0-$,表示该连接基团为键。

当其中一个变量选自化学键或不存在时,表示其连接的两个基团直接相连,比如 A-L-Z 中 L 代表键时表示该结构实际上是 A-Z。

当本文中涉及到的连接基团若没有指明其连接方向,则其连接方向是任意的。例如当结构单元 W^3 - W^4 - W^5 中的 W^4 选自“ $[\text{A}-(\text{CR}^{\text{d1}}\text{R}^{\text{d2}})_{\text{m2}}-\text{NR}^{\text{d3}}]_{\text{m3}}-\text{B}$ ”时,此时 W^4 既可以按照与从左到右的方向连接 W^3 和 W^5 构成

“ $W^3-[A-(CR^{d1}R^{d2})_{m2}-NR^{d3}]_{m3}-B-W^5$ ”，也可以按照从右到左的方向连接 W^3 和 W^5 构成“ $W^3-B-[NR^{d3}-(CR^{d1}R^{d2})_{m2}-A]_{m3}-W^5$ ”。

本文中的 C_m-C_n ，是指具有 $m-n$ 范围中的整数个碳原子。

术语“烷基”是指通式为 C_nH_{2n+1} 的一价烃基，该烷基可以是直链或支链的。术语“ C_1-C_{10} 烷基”指具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个碳原子的直链或支链饱和烃基。所述烷基的具体实例包括但不限于甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、异丙基、异丁基、仲丁基、叔丁基、异戊基、2-甲基丁基、1-甲基丁基、1-乙基丙基、1, 2-二甲基丙基、新戊基、1, 1-二甲基丙基、4-甲基戊基、3-甲基戊基、2-甲基戊基、1-甲基戊基、2-乙基丁基、1-乙基丁基、3, 3-二甲基丁基、2, 2-二甲基丁基、1, 1-二甲基丁基、2, 3-二甲基丁基、1, 3-二甲基丁基或 1, 2-二甲基丁基等；术语“ C_1-C_6 烷基”指具有 1、2、3、4、5 或 6 个碳原子的直链或支链饱和烃基。本文所述“ C_1-C_{10} 烷基”可以包含“ C_1-C_6 烷基”、“ C_1-C_4 烷基”或“ C_1-C_3 烷基”等范围，所述“ C_1-C_6 烷基”可以进一步包含“ C_1-C_4 烷基”或“ C_1-C_3 烷基”。

术语“亚烷基”是指具有直链或支链的饱和二价烃基。“ C_1-C_{10} 亚烷基”是指具有直链或支链饱和二价烃基，其具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个碳原子，包含但不限于亚甲基、 CH_2CH_2 或 $CH_2CH_2CH_2$ 等。

术语“环烷基”指完全饱和的且以单环、并环、桥环或螺环等形式存在的一价碳环。术语“ C_3-C_6 环烷基”应理解为表示饱和的单环、并环、螺环或桥环，其具有 3、4、5、6 个碳原子，具体实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基等。

术语“ C_3-C_6 亚环烷基”指完全饱和的且以单环、并环、桥环或螺环等形式存在的二价碳环，其具有 3、4、5、6 个环碳原子。

术语“杂环基”是指完全饱和的或部分饱和的以单环、并环、螺环或桥环等形式存在的一价基团，其环原子中含有 1-5 个杂原子或杂原子团（即含有杂原子的原子团），所述“杂原子或杂原子团”包括但不限于氮原子(N)、氧原子(O)、硫原子(S)、磷原子(P)、硼原子(B)、 $-S(=O)_2-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-P(=O)_2-$ 、 $-P(=O)-$ 、 $-NH-$ 、 $-S(=O)(=NH)-$ 、 $-C(=O)NH-$ 或 $-NHC(=O)NH-$ 等。术语“4-7 元杂环基”指环原子数目为 4、5、6 或 7 的杂环基，且其环原子中含有 1-3 个独立选自上文所述的杂原子或杂原子团。其中，4 元杂环基的实例包括但不限于氮杂环丁烷基、氧杂环丁烷基；5 元杂环基的实例包括但不限于四氢呋喃基、二氧杂环戊烯基、吡咯烷基、咪唑烷基、吡啶烷基、吡咯啉基、4,5-二氢噁唑或 2,5-二氢-1H-吡咯基；6 元杂环基的实例包括但不限于四氢吡喃基、哌啶基、吗啉基、二噻烷基、硫代吗啉基、哌嗪基、三噻烷基、四氢吡啶基或 4H-[1,3,4]噻二嗪基；7 元杂环基的实例包括但不限于二氮杂环庚烷基。优选地，“4-7 元杂环基”可以包含“4-7 元杂环烷基”、“5-6 元杂环基”、“5-6 元杂环烷基”等范围。

术语“亚杂环基”是指完全饱和的或部分饱和的以单环、并环、螺环或桥环等形式存在的二价基团，其环原子中含有 1-5 个杂原子或杂原子团，所述“杂原子或杂原子团”包括但不限于氮原子(N)、氧原子(O)、硫原子(S)、磷原子(P)、硼原子(B)、 $-S(=O)_2-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-P(=O)_2-$ 、 $-P(=O)-$ 、 $-NH-$ 、 $-S(=O)(=NH)-$ 、 $-C(=O)NH-$ 或 $-NHC(=O)NH-$ 等。

术语“ C_2-C_3 烯基”是指直链或支链的不饱和烃基，其包含一个双键并且具有 2 或 3 个碳原子，具体实例包括但不限于乙烯基、烯丙基、(E)-2-甲基乙烯基、(Z)-2-甲基乙烯基。

术语“ C_2-C_3 炔基”是指直链或支链的不饱和烃基，其包含一个三键并且具有 2 或 3 个碳原子，具体实例包括但不限于乙炔基($-C\equiv CH$)、丙-1-炔基($-C\equiv CCH_3$)、丙-2-炔基($-CH_2C\equiv CH$)。

术语“卤”或“卤素”是指氟、氯、溴和碘。

术语“亲水性基团”是指能够溶解或电离到水中、容易与水亲和的基团。亲水性基团通常含有一个或多个 O、N、P、S、OH、NH、 NH_2 、 $C=O$ 、 $S(=O)_2$ 、 $P(=O)_2$ 以及它们的任意组合，例如含有聚醚、多羟基基、多胺、多糖、肽、羧酸、磺酸、磷酸等结构单元。

术语“治疗”是指外科手术或药物处理(surgical or therapeutic treatment)，其目的是预防、减缓(减少)治疗对象中不希望的生理变化或病变，如癌症、自身免疫性疾病和病毒感染的进展。有益的或所希望的临床结果包括但不限于症状的减轻、疾病程度减弱、疾病状态稳定(即，未恶化)、疾病进展的延迟或减慢、疾病状态的改善或缓和、以及缓解(无论是部分缓解或完全缓解)，无论是可检测的或不可检测的。需要治疗的对象包括已患有病症或疾病的对象以及易于患上病症或疾病的对象或打算预防病症或疾病的对象。

当提到减缓、减轻、减弱、缓和、缓解等术语时，其含义也包括消除、消失、不发生等情况。

术语“有效量”指单独给予或与另一治疗剂组合给予细胞、组织或对象时能有效防止或缓解疾病病症或该疾病进展的治疗剂用量。“有效量”还指足以缓解症状，例如治疗、治愈、防止或缓解相关医学病症，或治疗、治愈、防止或缓解这些病症的速度增加的化合物用量。当将活性成分单独给予个体时，治疗有效剂量单指该成分。当应用某一组合时，治疗有效剂量指产生治疗作用的活性成分的组合用量，而无论是组合、连续或同时给予。

术语“受试者”是指接受对如本公开所述的特定疾病或病症的治疗的生物体。对象和患者的实例包括接受疾病或病症治疗的哺乳动物，如人、灵长类动物（例如，猴）或非灵长类哺乳动物。

构成“治疗有效量”的本公开化合物的量取决于该化合物、疾病状态及其严重性、给药方式以及待治疗的哺乳动物的年龄而改变，但可例行性地由本领域技术人员根据其自身的知识及本公开内容而确定。

术语“药学上可接受的”，是针对那些化合物、材料、组合物和/或剂型而言，它们在可靠的医学判断的范围之内，适用于与人类和动物的组织接触使用，而没有过多的毒性、刺激性、过敏性反应或其它问题或并发症，与合理的利益/风险比相称。

术语“药学上可接受的盐”是指药学上可接受的酸或碱的盐，包括化合物与无机酸或有机酸形成的盐，以及化合物与无机碱或有机碱形成的盐。

术语“药物组合物”是指一种或多种本公开的化合物或其盐与药学上可接受的辅料组成的混合物。药物组合物的目的是有利于对有机体给予本公开的化合物。

术语“药学上可接受的辅料”是指对有机体无明显刺激作用，而且不会损害该活性化合物的生物活性及性能的那些辅料。合适的辅料是本领域技术人员熟知的，例如碳水化合物、蜡、水溶性和/或水可膨胀的聚合物、亲水性或疏水性材料、明胶、油、溶剂、水等。

词语“包括 (comprise)”或“包含 (comprise)”及其英文变体例如 comprises 或 comprising 可理解为开放的、非排他性的意义，即“包括但不限于”。

本公开还包括与本文中记载的那些相同的，但一个或多个原子被原子量或质量数不同于自然中通常发现的原子量或质量数的原子置换的同位素标记的本公开化合物。可结合到本公开化合物的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、硫、氟、碘和氯的同位素，诸如分别为 ^2H 、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{13}N 、 ^{15}N 、 ^{15}O 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{123}I 、 ^{125}I 和 ^{36}Cl 等。

某些同位素标记的本公开化合物（例如用 ^3H 及 ^{14}C 标记）可用于化合物和/或底物组织分布分析中。氟化（即 ^3H ）和碳-14（即 ^{14}C ）同位素对于由于它们易于制备和可检测性是尤其优选的。正电子发射同位素，诸如 ^{15}O 、 ^{13}N 、 ^{11}C 和 ^{18}F 可用于正电子发射断层扫描(PET)研究以测定底物占有率。通常可以通过与公开于下文的方案和/或实施例中的那些类似的下列程序，通过同位素标记试剂取代未经同位素标记的试剂来制备同位素标记的本公开化合物。

本公开的药物组合物可适用于肠胃外给药，如合适的单位剂型的无菌溶液剂、混悬剂或冻干产品。例如，本公开的药物组合物可以是用于肌肉或皮下给药的无菌注射水溶液形式。本公开的药物组合物在使用时可接受其它溶媒或溶剂，如水、林格氏液或等渗氯化钠溶液。

本文所述化合物的所有施用方法中，每天给药的剂量为 0.001mg/kg 到 600mg/kg 体重，优选为 0.05mg/kg 到 200mg/kg 体重，更优选 0.1mg/kg 到 100mg/kg 体重，以单独或分开剂量的形式。

本公开的化合物可以通过本领域技术人员所熟知的多种合成方法来制备，包括下面列举的具体实施方式、其与其它化学合成方法的结合所形成的实施方式以及本领域技术人员所熟知的等同替换方式，优选的实施方式包括但不限于本公开的实施例。

本公开具体实施方式的化学反应是在合适的溶剂中完成的，所述的溶剂须适合于本公开的化学变化及其所需的试剂和物料。为了获得本公开的化合物，有时需要本领域技术人员在已有实施方式的基础上对合成步骤或者反应流程进行修改或选择。

本领域合成路线规划中的一个重要考量因素是为反应性官能团（如本公开中的氨基、羧基）选择合适的保护基，例如，可参考 Greene's Protective Groups in Organic Synthesis (4th Ed). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 本公开引用的所有参考文献整体上并入本公开。

本公开采用下述缩略词：

缩写词	化学名称	缩写词	化学名称
BPin	4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼烷-2-基	B ₂ Pin ₂	4,4,5,5-四甲基-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼烷-2-基)-1,3,2-二氧杂硼烷
HATU	O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N,N-四甲基脒六氟磷酸盐	EDCI	1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺
DMAP	4-二甲氨基吡啶	2-Me-THF	2-甲基四氢呋喃
DCM	二氯甲烷	DMA	N,N-二甲基乙酰胺
EtOH	乙醇	AcOH	乙酸
KOAc	醋酸钾	DMSO	二甲亚砜
THF	四氢呋喃	TFA	三氟乙酸
TEA	三乙胺	MeCN	乙腈
M	摩尔/升	T ₃ P	三正丙基磷酸酐
mCPBA	间氯过氧苯甲酸	MeB(OH) ₂	甲基硼酸
DMF	N,N-二甲基甲酰胺	Cu(OAc) ₂	乙酸铜
TsOH	对甲苯磺酸	Ti(OiPr) ₄	四异丙氧化钛
(R)-(S)-cy ₂ PF-PtBu ₂	(R)-1-[(S)-2-(双环己基膦酰)二茂铁基]乙基-叔丁基三氯化磷	tBuONO	亚硝酸叔丁酯
Pd(PPh ₃) ₄	四(三苯基膦)钯	BrettPhos Pd G ₃	甲烷磺酸(2-二环己基膦)-3,6-二甲氧基-2,4,6-三异丙基-1,1-联苯)(2-氨基-1,1-联苯-2-基)钯(II)
Boc	叔丁基氧羰基	Et ₂ O	乙醚
DIEA	N,N-二异丙基乙基胺	NBS	N-溴代丁二酰亚胺
PhI(OAc) ₂	醋酸碘苯	DME	乙二醇二甲醚
MeOH	甲醇	LiHMDS	二(三甲基硅)氨基锂
MW	微波	THP	四氢吡喃基
Xphos-Pd G ₂	氯(2-二环己基膦基-2,4,6-三异丙基-1,1-联苯基)[2-(2-氨基-1,1-联苯)]钯(II)	Boc ₂ O	碳酸酐二叔丁酯
xantphos	4,5-双(二苯基膦)-9,9-二甲基氧杂蒽	t-BuBrettPhos-Pd G ₃	甲磺酸-2-(二叔丁基膦基)-3,6-二甲氧基-2,4,6-三异丙基-1,1-联苯(2-氨基-1,1-联苯-2-基)钯(II)
Pd ₂ (dba) ₃	三(二亚苄基丙酮)二钯	DMEDA	N,N-二甲基乙二胺
Xphos	2-二环己基膦-2,4,6-三异丙基联苯	NIS	N-碘琥珀酰亚胺
Pd(OAc) ₂	醋酸钯	Pd(AmPhos)Cl ₂	二氯双[二叔丁基-(4-二甲基氨基苯基)膦]钯(II)
EtOAc 或 EA	乙酸乙酯	n-BuOH	正丁醇
PE	石油醚	TFA	三氟乙酸
FA	甲酸	Pd/C	钯碳
ACN 或 MeCN	乙腈	DIPEA	N,N-二异丙基乙胺
SEM	2-(三甲基硅烷基)乙氧甲基	Pd ₂ (dba) ₃	三(二亚苄基丙酮)二钯
Boc	叔丁氧羰基	BINAP	1,1'-联萘-2,2'-双二苯膦
Cbz	苄氧羰基	CS ₂ CO ₃	碳酸铯
DMSO	二甲基亚砜	Pd(dppf)Cl ₂	[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯
Ti(OEt) ₄	钛酸乙酯	NaH	氢化钠
NH ₄ Cl	氯化铵	LiOH	氢氧化锂
SFC	超临界流体色谱	TLC	薄层层析色谱
DHP	3,4-二氢-2H-吡喃	DEA	二乙胺
Pd/C	钯碳	TsCl	对甲苯磺酰氯
Ph ₃ PMeBr	甲基三苯基溴化膦	iPrOH	异丙醇

BrettPhos Pd G3	甲烷磺酸(2-二环己基磷)-3,6-二甲氧基-2',4',6'-三异丙基-1,1'-联苯) (2'-氨基-1,1'-联苯-2-基)钯	9-BBN	9-硼双环[3.3.1]壬烷
DMF-DMA	N,N-二甲基甲酰胺二甲基缩醛	T ₃ P	三正丙基环磷酸酐
HOBt	1-羟基苯并三唑	HBTU	苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐
HFIP	1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇		

实施例

下面通过实施例对本公开进行详细描述，但并不意味着对本公开任何不利限制。本文已经详细地描述了本公开，其中也公开了其具体实施方式，对本领域的技术人员而言，在不脱离本公开精神和范围的情况下针对本公开具体实施方式进行各种改变将是显而易见的。本公开所使用的所有试剂是市售的，无需进一步纯化即可使用。

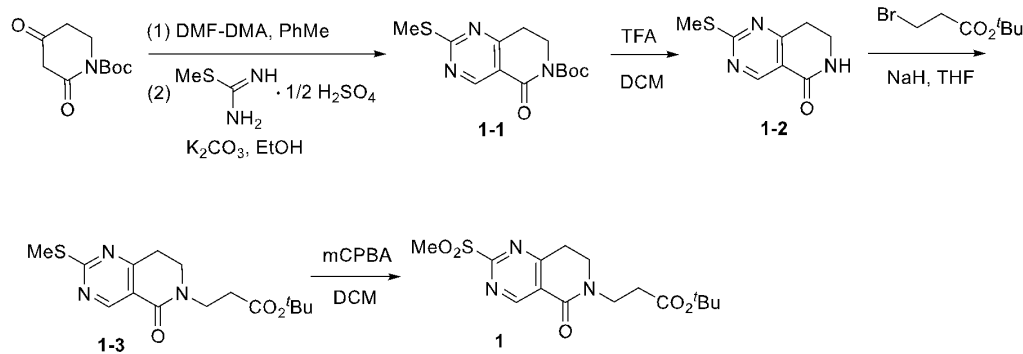
除非另作说明，混合溶剂表示的比例是体积混合比例。

除非另作说明，否则，%是指 wt%。

化合物经手工或 ChemDraw® 软件命名，市售化合物采用供应商目录名称。

化合物的结构是通过核磁共振 (NMR) 和/或质谱 (MS) 来确定的。NMR 位移的单位为 10⁻⁶ (ppm)。NMR 测定的溶剂为氘代二甲基亚砜、氘代氯仿、氘代甲醇等，内标为四甲基硅烷 (TMS)；“IC₅₀”指半数抑制浓度，指达到最大抑制效果一半时的浓度，“EC₅₀”指能半数最大效应浓度，引起 50% 最大效应的浓度。

实施例 1、3-(2-甲磺酰基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-6(5H)-基)丙酸叔丁酯(化合物 1)



步骤 1: 2-甲硫基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-6(5H)-甲酸叔丁酯(中间体 1-1)的合成

在室温及氮气气氛下，向 2,4-二氧代哌啶-1-甲酸叔丁酯(15 g)与 150 mL 甲苯的混合物中加入 N,N-二甲基甲酰胺二甲基缩醛 (DMF-DMA) (9.2 g)。将所得混合物在 25 °C 下搅拌反应 1 h。混合物经减压除去溶剂后，加入甲基异硫脲半硫酸盐(10.8 g)。碳酸钾(14.7 g)与无水乙醇(200 mL)，所得混合物在 25 °C 下搅拌反应 4 h。之后混合物经减压除去溶剂，柱层析分离(EA/PE, 0 – 30%)得标题化合物粗品，直接用于下一步反应。

LC-MS: m/z(ESI): 296.1 [M+H]⁺。

步骤 2: 2-甲硫基-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-5(6H)-酮(中间体 1-2)的合成

将上步所得中间体 1-1 溶于 100 mL 二氯甲烷中，加入 25 mL 三氟乙酸，在 25 °C 下搅拌反应 2 h。之后减压除去溶剂，加入 100 mL 乙酸乙酯打浆，经过滤，干燥得标题化合物(10.0 g)。

LC-MS: m/z(ESI): 196.1 [M+H]⁺。

步骤 3: 3-(2-甲硫基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-6(5H)-基)丙酸叔丁酯(中间体 1-3)的合成

在 0 °C 下，向中间体 1-2(9.75 g)与 THF(240 mL)的混合物中加入 NaH(5 g, 60% 质量分数于矿物油中)，所得混合物在 0 °C 下反应 30 min。接着向反应混合物中加入 3-溴丙酸叔丁酯(15.68 g)并将所得混合物升温至 70 °C 反应 2 h。之后向混合物中加入 2 mL 水，减压除去溶剂，经柱层析分离(EA/PE, 0 – 50%)得标题化合物(9.75 g)。

LC-MS: m/z(ESI): 324.4 [M+H]⁺。

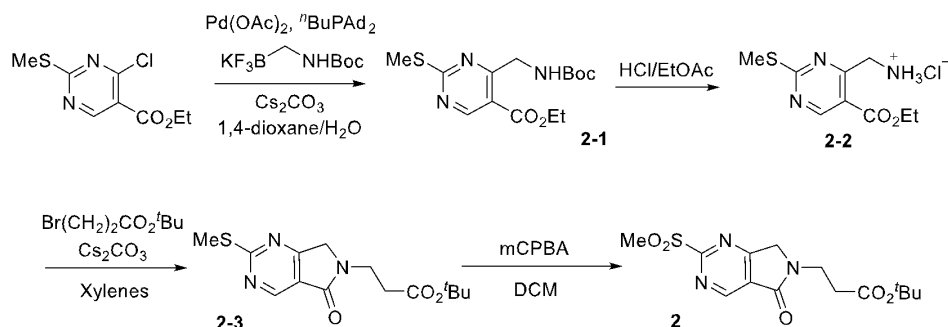
步骤 4: 3-(2-甲磺酰基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-6(5H)-基)丙酸叔丁酯(化合物 1)的合成

在 0℃ 下, 向中间体 **1-3** (5 g) 与 DCM (150 mL) 的混合物中加入 mCPBA (12.6 g, 85% 纯度), 所得混合物在室温下反应 30 min。之后混合物经减压, 残余物经柱层析分离(EA/PE, 0 – 100%)得标题化合物(5.2 g)。

LC-MS: m/z (ESI): 356.4 $[M+H]^+$ 。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.24(s, 1H), 3.76(t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.70(t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.43(s, 3H), 3.24(t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.57(t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.39(s, 9H)。

实施例 2、3-(2-甲磺酰基-5-氧代-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)丙酸叔丁酯(化合物 2)



步骤 1: 4-(((叔丁氧羰基)氨基)甲基)-2-甲硫基嘧啶-5-甲酸乙酯(中间体 2-1)的合成

在室温及氮气气氛下, 向 4-氯-2-甲硫基嘧啶-5-甲酸乙酯(5.82 g), [(叔丁氧羰基氨基)甲基]三氟硼酸钾(4.74 g), 碳酸铯(13.0 g), 醋酸铯(448 mg)及正丁基二(1-金刚烷基)膦(1.43 g)的混合物中加入 1,4-二氧六环(100 mL)及水(10 mL)。将所得混合物在 90℃ 下搅拌反应 6 h。之后减压除去溶剂, 经柱层析分离(EA/PE, 0 – 50%)得标题化合物(4147 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 328.1 $[M+H]^+$ 。

步骤 2: (5-乙氧羰基-2-甲硫基嘧啶-4-基)甲胺盐酸盐(中间体 2-2)的合成

在室温及氮气气氛下, 向中间体 **2-1** (1637 mg) 于 10 mL 乙酸乙酯的溶液中加入 4M 氯化氢乙酸乙酯溶液(10 mL), 将所得混合物在室温下搅拌反应 4 h。之后过滤混合物, 滤饼用乙酸乙酯洗涤, 得标题化合物(1231 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 228.3 $[M+H]^+$ 。

步骤 3: 3-(2-甲硫基-5-氧代-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)丙酸叔丁酯(中间体 2-3)的合成

在氮气气氛下, 将中间体 **2-2** (500 mg), 碳酸铯(2.14 g), 3-溴丙酸叔丁酯(916 mg)及二甲苯(10 mL)的混合物加热至 80℃ 反应 16 h。之后减压除去溶剂, 经柱层析分离(EA/PE, 0-30%)和薄层色谱分离(EA/PE=1/1)得标题化合物(28 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 310.0 $[M+H]^+$ 。

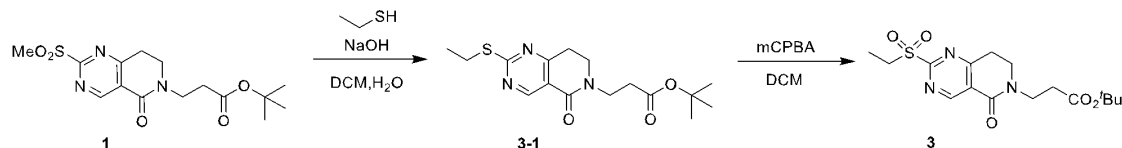
步骤 4: 3-(2-甲磺酰基-5-氧代-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)丙酸叔丁酯(化合物 2)的合成

在 0℃ 下, 将间氯过氧苯甲酸 (mCPBA) (78.74 mg, 85% 纯度)加入中间体 **2-3** (30 mg) 溶于 1 mL 二氯甲烷的溶液中, 所得混合物在室温下搅拌 1 h。之后混合物经柱层析分离(EA/PE, 0 – 66%)得标题化合物(14.0 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 342.2 $[M+H]^+$ 。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.37(s, 1H), 4.76(s, 2H), 3.78(t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.48(s, 3H), 2.64(t, J = 7.1 Hz, 2H), 1.39(s, 9H)。

实施例 3、3-(2-乙磺酰基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-6(5H)-基)丙酸叔丁酯(化合物 3)



步骤 1: 3-(2-乙硫基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(中间体 3-1)的合成

在室温下, 向化合物 **1**(50 mg)与乙硫醇(180 mg)的混合物中加入二氯甲烷(1 mL)及 2M 氢氧化钠溶液(0.5 mL)。将所得混合物在 25 °C 下搅拌反应 3 h。之后减压除去溶剂, 经柱层析分离(THF/PE, 0~30%)得标题化合物(45 mg)。

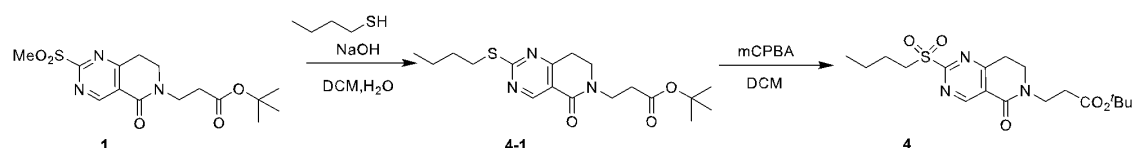
LC-MS: m/z (ESI): 338.1 $[M+H]^+$ 。

步骤 2: 3-(2-乙磺酰基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(化合物 3)的合成

在 0 °C 下, 将间氯过氧苯甲酸(92.05 mg)加入中间体 **3-1**(45 mg)溶于二氯甲烷(2 mL)的溶液中, 所得混合物在室温下搅拌 1 h。之后混合物经柱层析分离(EA/PE, 0 – 100%)得标题化合物(15.6 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 370.1 $[M+H]^+$ 。

^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.25(s, 1H), 3.77(t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.71(t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.62(q, J = 7.4 Hz, 2H), 3.25(t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.57(t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.40(s, 9H), 1.26(t, J = 7.3 Hz, 3H)

实施例 4、3-(2-丁磺酰基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(化合物 4)**步骤 1: 3-(2-丁硫基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(中间体 4-1)的合成**

在室温下, 向化合物 **1**(50 mg)与 1-丁硫醇(19 mg)的混合物中加入二氯甲烷(1 mL)及 2M 氢氧化钠溶液(0.5 mL)。将所得混合物在 25 °C 下搅拌反应 3 h。之后减压除去溶剂, 经柱层析分离(THF/PE, 0~18%)得标题化合物(47 mg)。

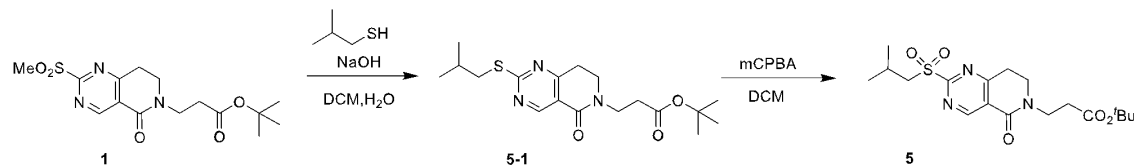
LC-MS: m/z (ESI): 366.4 $[M+H]^+$ 。

步骤 2: 3-(2-丁磺酰基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(化合物 4)的合成

在 0 °C 下, 将间氯过氧苯甲酸(88.76 mg)加入中间体 **4-1**(47 mg)溶于二氯甲烷(2 mL)的溶液中, 所得混合物在室温下搅拌 1 h。之后混合物经柱层析分离(EA/PE, 0-100%)得标题化合物(10.7 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 398.1 $[M+H]^+$ 。

^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.25(s, 1H), 3.77(t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.71(t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.63-3.58(m, 2H), 3.25(t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.57(t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.72-1.63(m, 2H), 1.45-1.41(m, 2H), 1.40(s, 9H), 0.89(t, J = 7.3 Hz, 3H)

实施例 5、3-(2-异丁磺酰基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(化合物 5)**步骤 1: 3-(2-异丁硫基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(中间体 5-1)的合成**

在室温下, 向化合物 **1**(50 mg)与 1-异丁硫醇(250 mg)的混合物中加入二氯甲烷(1 mL)及 2M 氢氧化钠溶液(0.5 mL)。将所得混合物在 25 °C 下搅拌反应 3 h。之后减压除去溶剂, 经柱层析分离(THF/PE, 0~18%)得标题化合物(47 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 366.4 $[M+H]^+$ 。

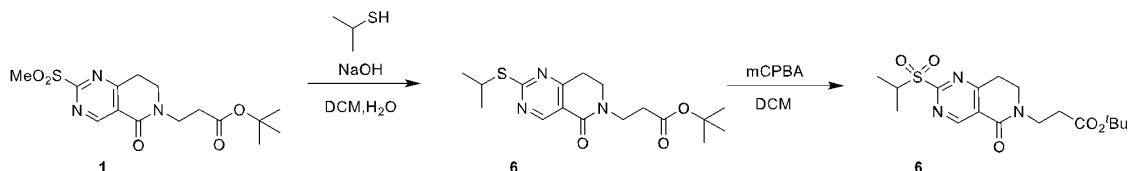
步骤 2: 3-(2-异丁磺酰基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(化合物 5)的合成

在 0 °C 下, 将间氯过氧苯甲酸(88.76 mg)加入中间体 **5-1**(47 mg)溶于二氯甲烷(2 mL)的溶液中, 所得混合物在室温下搅拌 1 h。之后混合物经柱层析分离(EA/PE, 0-100%)得标题化合物(7.6 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 398.1 $[M+H]^+$ 。

^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.25(s, 1H), 3.77(t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.71(t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.54(d, J = 6.6 Hz, 2H), 3.25(t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.57(t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.21(t, J = 6.7, 13.4 Hz, 1H), 1.40(s, 9H), 1.04(d, J = 6.7 Hz, 6H)

实施例 6、3-(2-异丙磺酰基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3- d]嘧啶-6(5H)-基)丙酸叔丁酯(化合物 6)



步骤 1: 3-(2-异丙硫基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3- d]嘧啶-6(5H)-基)丙酸叔丁酯(中间体 6-1)的合成

在室温下, 向化合物 1(50 mg)与异丙硫醇(500 mg)的混合物中加入二氯甲烷(1 mL)及 2M 氢氧化钠溶液(0.5 mL)。将所得混合物在 25 °C 下搅拌反应 3 h。之后减压除去溶剂, 经柱层析分离(THF/PE, 0~30%)得标题化合物(45 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 352.2 $[M+H]^+$ 。

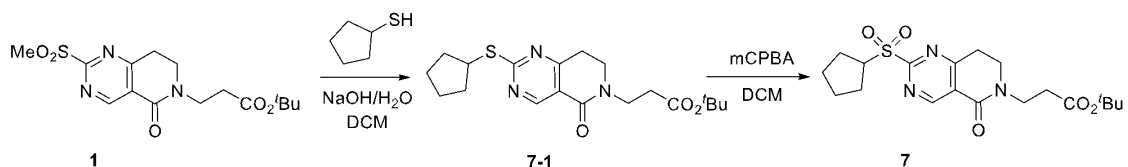
步骤 2: 3-(2-异丙磺酰基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3- d]嘧啶-6(5H)-基)丙酸叔丁酯(化合物 6)的合成

在 0 °C 下, 将间氯过氧苯甲酸(88 mg)加入中间体 6-1(45 mg)溶于二氯甲烷(2 mL)的溶液中, 所得混合物在室温下搅拌 1 h。之后混合物经柱层析分离(EA/PE, 0-100%)得标题化合物(18.5 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 384.1 $[M+H]^+$ 。

^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.25(s, 1H), 3.99 – 3.94(m, 1H), 3.77(t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.71(t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.25(t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.57(t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.40(s, 9H), 1.28(s, 3H), 1.27(s, 3H)

实施例 7、3-(2-环戊磺酰基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3- d]嘧啶-6(5H)-基)丙酸叔丁酯(化合物 7)



步骤 1: 3-(2-环戊硫基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3- d]嘧啶-6(5H)-基)丙酸叔丁酯(中间体 7-1)的合成

在室温下, 向化合物 1(1.066 g)溶于 DCM(10 mL)的溶液中依次加入环戊基硫醇(367 mg)与 2 M 氢氧化钠溶液(1.65 mL), 所得混合物在室温下搅拌反应 30 min。之后混合物经柱层析分离(EA/PE, 0 – 50%)得标题化合物粗品, 直接用于下一步反应。

LC-MS: m/z (ESI): 378.4 $[M+H]^+$ 。

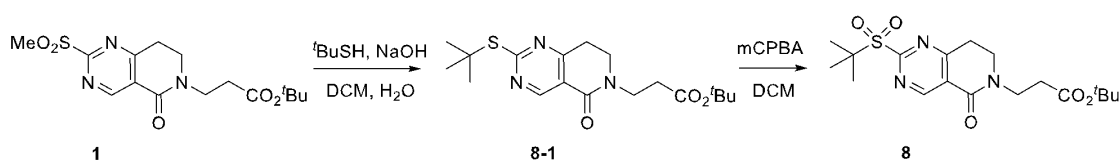
步骤 2: 3-(2-环戊磺酰基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3- d]嘧啶-6(5H)-基)丙酸叔丁酯(化合物 7)的合成

在 0 °C 下, 向上步所得化合物粗品与 DCM(50 mL)的混合物中加入 mCPBA(2.43 g, 85%纯度), 所得混合物在室温下反应 30 min。之后混合物减压浓缩, 残余物经柱层析分离(EA/PE, 0 – 100%)得标题化合物(890 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 410.5 $[M+H]^+$ 。

^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.23(s, 1H), 4.30 – 4.17(m, 1H), 3.76(t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.70(t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.24(t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.56(t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.04 – 1.85(m, 4H), 1.74 – 1.57(m, 4H), 1.39(s, 9H)。

实施例 8、3-(2-叔丁磺酰基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3- d]嘧啶-6(5H)-基)丙酸叔丁酯(化合物 8)



步骤 1: 3-(2-叔丁硫基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(中间体 8-1)的合成

在室温下, 向化合物 **1** (1.066 g) 溶于 DCM (10 mL) 的溶液中依次加入叔丁基硫醇 (324 mg) 与 2 M 氢氧化钠溶液 (1.65 mL), 所得混合物在室温下强烈搅拌反应 30 min。之后混合物经柱层析分离 (EA/PE, 0–50%) 得标题化合物粗品, 直接用于下一步反应。

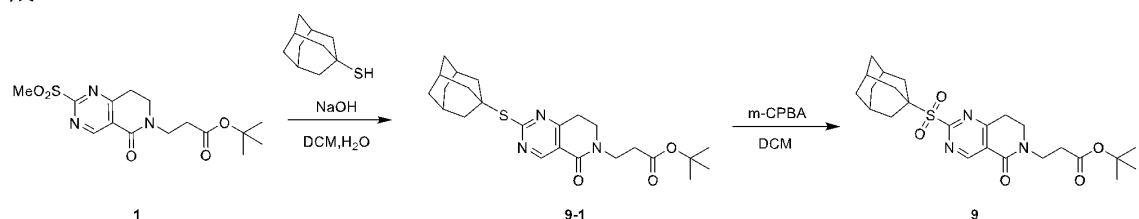
LC-MS: m/z (ESI): 366.4 $[M+H]^+$ 。

步骤 2: 3-(2-叔丁磺酰基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(化合物 8)的合成

在 0 °C 下, 向上步所得化合物粗品与 DCM (50 mL) 的混合物中加入 mCPBA (2.43 g, 85% 纯度), 所得混合物在室温下反应 30 min。之后混合物减压浓缩, 残余物经柱层析分离 (EA/PE, 0–100%) 得标题化合物 (831 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 398.4 $[M+H]^+$ 。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.25 (s, 1H), 3.76 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.70 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.23 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.57 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.40 (s, 9H), 1.37 (s, 9H)。

实施例 9、3-(2-(1-金刚烷基磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(化合物 9)的合成**步骤 1: 3-(2-(1-金刚烷基硫基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(中间体 9-1)的合成**

在室温下, 向化合物 **1** (410 mg) 的 DCM (10 mL) 溶液中加入 2M NaOH 水溶液 (0.692 mL) 和 1-金刚烷硫醇 (291 mg), 所得混合物在 25 °C 下搅拌 2 h。之后用水 (5 mL) 稀释反应液, DCM (3 mL $\times$ 3) 萃取, 合并有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩后经柱层析分离 (THF/PE, 0–60%) 得标题化合物 (351 mg)。

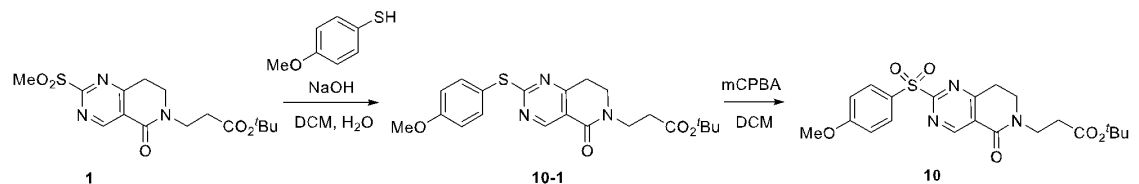
LC-MS: m/z (ESI): 444.0 $[M+H]^+$ 。

步骤 2: 3-(2-(1-金刚烷基磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(化合物 9)的合成

在室温下, 将 mCPBA (546 mg, 85% 纯度) 加入到中间体 **9-1** (351 mg) 的 DCM (5 mL) 溶液中, 在 25 °C 下搅拌 2 小时。之后减压浓缩除去溶剂, 混合物经柱层析分离 (THF/PE, 0–50%) 得标题化合物 (300 mg), 再用高效液相色谱法纯化 (柱子: C18 150 $\times$ 30 mm $\times$ 5 μ m; 流动相: [A 相: 水 (0.225% 甲酸), B 相: 乙腈]; B%: 43%–63%, 11 min) 得标题化合物 (24.7 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 476.1 $[M+H]^+$ 。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.26 (s, 1H), 3.77–3.75 (m, 2H), 3.71–3.69 (m, 2H), 3.24 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.60–2.55 (m, 2H), 2.08 (s, 3H), 2.00–1.92 (m, 6H), 1.68–1.58 (m, 6H), 1.41 (s, 9H)。

实施例 10、3-(2-(4-甲氧基苯磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(化合物 10)的合成**步骤 1: 3-(2-(4-甲氧基苯硫基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(中间体 10-1)的合成**

在室温及氮气气氛下, 向化合物 **1** (40.0 mg), 4-甲氧基苯硫酚 (23.7 mg), 氢氧化钠 (4.50 mg) 的混合物中加入二氯甲烷 (2 mL) 及水 (56 μ L)。将所得混合物在室温下搅拌反应 1 h。之后减压除去溶剂, 经柱层析分离

(EA/PE, 0-80%)得标题化合物(40.0 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 416.3 $[M+H]^+$ 。

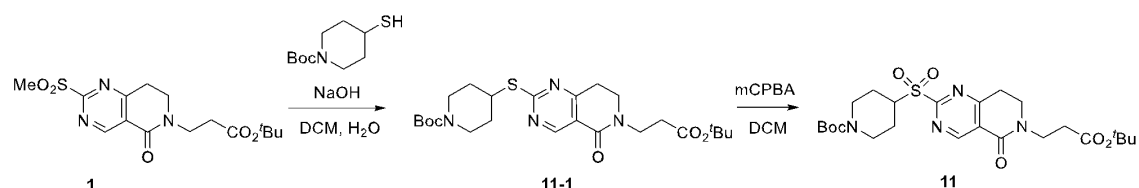
步骤 2: 3-(2-(4-甲氧基苯磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(化合物 10)的合成

在 0 °C 下, 将 mCPBA(117 mg, 85% 纯度)加入中间体 10-1(40 mg)溶于 1 mL 二氯甲烷的溶液中, 所得混合物在室温下搅拌 1 h。之后混合物经柱层析分离(THF/PE, 0-80%)和高效液相色谱法纯化(柱子: C18 150×30mm×5um; 流动相: [A 相: 水(0.225%甲酸), B 相: 乙腈]; B%: 45%-75%, 9 min)得标题化合物(5.0 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 448.2 $[M+H]^+$ 。

^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.14(s, 1H), 7.93(d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.20(d, J = 8.8 Hz, 2H), 3.87(s, 3H), 3.73 - 3.64(m, 4H), 3.18(t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.55 - 2.51(m, 2H), 1.38(s, 9H)。

实施例 11、4-((6-(3-叔丁氧基-3-氧代丙基)-5-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-2-基)磺酰基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物 11)



步骤 1: 4-((6-(3-叔丁氧基-3-氧代丙基)-5-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-2-基)磺基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(中间体 11-1)的合成

在室温下, 向化合物 1(50 mg)与 4-巯基哌啶-1-甲酸叔丁酯(30.57 mg)的混合物中加入二氯甲烷(1 mL)及 2M 氢氧化钠溶液(0.5 mL), 将所得混合物在 25 °C 下搅拌反应 3 h。之后减压除去溶剂, 混合物经柱层析分离(THF/PE, 0~30%)得标题化合物(50 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 515.1 $[M+Na]^+$ 。

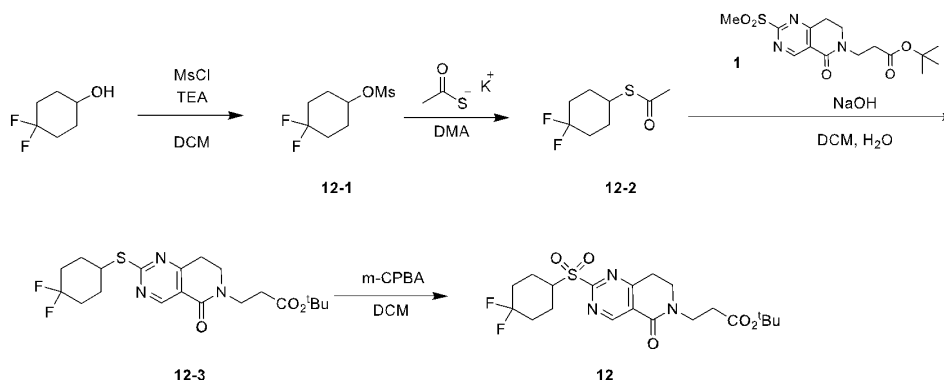
步骤 2: 4-((6-(3-叔丁氧基-3-氧代丙基)-5-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-2-基)磺酰基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(化合物 11)的合成

在 0 °C 下, 将 mCPBA(87.57 mg)加入中间体 11-1(50 mg)的二氯甲烷(1 mL)溶液中, 所得混合物在室温下搅拌反应 1 h。之后混合物经柱层析分离(EA/PE, 0 - 100%)得标题化合物(20.7 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 547.2 $[M+Na]^+$ 。

^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.25(s, 1H), 4.08 - 3.96(m, 3H), 3.77(t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.73 - 3.66(m, 2H), 3.25(t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.92 - 2.75(m, 2H), 2.61 - 2.55(m, 2H), 1.95(d, J = 12.1 Hz, 2H), 1.58 - 1.46(m, 2H), 1.41(s, 9H), 1.40(s, 9H)。

实施例 12、3-(2-(4,4-二氟环己基磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(化合物 12)



步骤 1: 4,4-二氟环己醇甲磺酸酯(中间体 12-1)的合成

在 0 °C 下, 向 4,4-二氟环己醇(1 g)与三乙胺(1.23 mL)的 DCM(36 mL)溶液中滴加甲磺酰氯(1.01 g), 所得混合物在 25 °C 下搅拌 16 h。反应结束后, 将混合物倒入水中(50 mL), 用乙酸乙酯(20 mL × 3)萃取, 合并有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩得标题化合物粗品(1.57 g), 无需进一步提纯, 直接用于下一步反应。

¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆)δ = 4.93-4.77(m, 1H), 3.22(s, 3H), 2.11-1.80(m, 8H)

步骤 2: S-(4,4-二氟环己基硫醇)乙酸酯(中间体 12-2)的合成

向中间体 12-1(785 mg)的 DMA(18 mL)溶液中加入硫代乙酸钾(1.26 g), 所得混合物在 80 °C 下加热反应 18 h。之后将混合物冷却至室温, 加入乙酸乙酯(50 mL)和水(50 mL), 用乙酸乙酯(3 × 20 mL)萃取, 合并有机相用无水硫酸钠干燥, 经减压浓缩后柱层析(THF/PE, 0-6%)纯化得标题化合物(368 mg)。

¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆)δ = 3.58-3.46(m, 1H), 2.32(s, 3H), 2.08-1.85(m, 8H)。

步骤 3: 3-(2-(4,4-二氟环己基硫基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(中间体 12-3)的合成

向中间体 12-2(100 mg)的 THF(1 mL)溶液中加入 NaOH(2 M, 1.54 mL), 反应液在 25 °C 下搅拌 2 小时。之后加入化合物 1(90 mg), 在 25 °C 下搅拌 1 h, 之后将混合物倒入 5 mL 水中, 用乙酸乙酯(2 mL × 3)萃取, 合并有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 经柱层析分离(EA/PE, 0-31%)得标题化合物(80 mg)。

LC-MS: *m/z*(ESI): 428.1[M+H]⁺

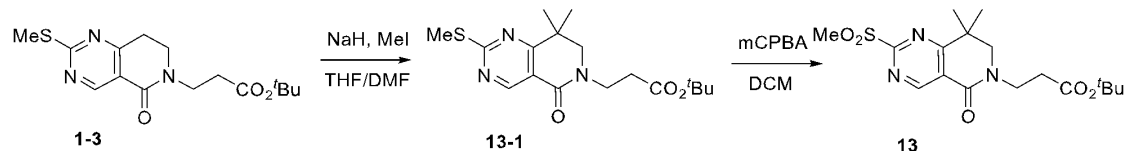
步骤 4: 3-(2-(4,4-二氟环己基硫磺基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(化合物 12)的合成

将 mCPBA(151.96 mg, 85%纯度)加入到中间体 12-3(80 mg)的 DCM(1 mL)溶液中, 在 25 °C 下搅拌 2 h。之后将混合物倒入 5 mL 水中, 用乙酸乙酯(2 mL × 3)萃取, 合并有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 经柱层析分离(EA/PE, 0-40%), 再以薄层制备色谱纯化(PE/EA=1/2)得标题化合物(9.3 mg)。

LC-MS: *m/z*(ESI): 460.2[M+H]⁺

¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆)δ = 9.25(s, 1H), 4.05-3.95(m, 1H), 3.82-3.73(m, 2H), 3.70(t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.24(t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.64-2.54(m, 2H), 2.19-1.93(m, 6H), 1.71(d, *J* = 12.4 Hz, 2H), 1.39(s, 9H)。

¹⁹F NMR(376 MHz, DMSO-*d*₆)δ = -91.16(d, *J* = 235.6 Hz), -100.27(d, *J* = 235.6 Hz)。

实施例 13: 3-(2-甲磺酰基-5-氧代-8,8-二甲基-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(化合物 13)**步骤 1: 3-(2-甲硫基-5-氧代-8,8-二甲基-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(中间体 13-1)的合成**

在 0 °C 下, 向中间体 1-3(4.75 g)与 THF(100 mL)的混合物中加入 NaH(1.76 g, 60% 质量分数于矿物油中), 所得混合物在 0 °C 下反应 30 min。接着向反应所得混合物中加入碘甲烷(6.24 g)与 DMF(20 mL), 将所得混合物在室温下继续反应 4 h。之后向混合物中加入 2 mL 水, 减压除去溶剂, 经柱层析分离(EA/PE, 0-50%)得标题化合物(2.77 g)。

LC-MS: *m/z*(ESI): 352.4 [M+H]⁺

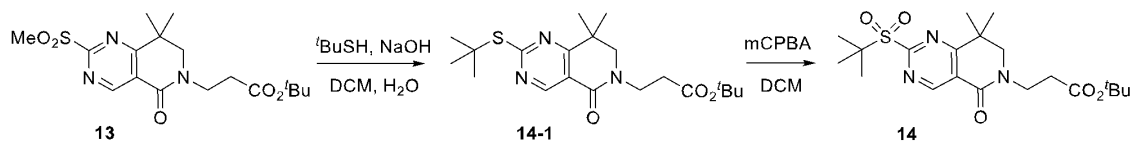
步骤 2: 3-(2-甲磺基-5-氧代-8,8-二甲基-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(化合物 13)的合成

在 0 °C 下, 向上步所得化合物粗品与 DCM(100 mL)的混合物中加入 mCPBA(6.38 g, 85%纯度), 所得混合物在室温下反应 30 min。之后减压浓缩, 残余物经柱层析分离(EA/PE, 0-100%)得标题化合物(2.87 g)。

LC-MS: *m/z*(ESI): 384.4 [M+H]⁺

¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆)δ 9.27(s, 1H), 3.70(t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.60(s, 2H), 3.45(s, 3H), 2.58(t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.39(s, 9H), 1.33(s, 6H)。

实施例 14、3-(2-叔丁磺酰基-5-氧代-8,8-二甲基-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(化合物 14)



步骤 1: 3-(2-叔丁硫基-5-氧代-8,8-二甲基-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(中间体 14-1)的合成

在室温下,向化合物 13(600 mg)溶于 DCM(10 mL)的溶液中依次加入叔丁基硫醇(212 mg)与 2 M 氢氧化钠溶液(0.94 mL),所得混合物在室温下搅拌反应 30 min。之后混合物经柱层析分离(EA/PE, 0 – 50%)得标题化合物粗品,直接用于下一步反应。

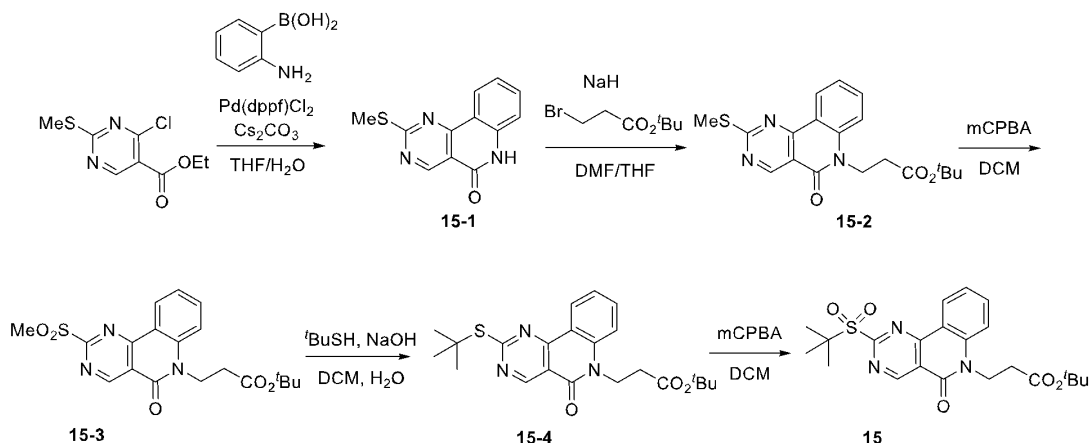
LC-MS: m/z (ESI): 394.4 $[M+H]^+$ 。

步骤 2: 3-(2-叔丁磺酰基-5-氧代-8,8-二甲基-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(化合物 14)的合成

在 0 °C 下,向上步所得化合物粗品与 DCM(30 mL)的混合物中加入 mCPBA(1.27 g, 85%纯度),所得混合物在室温下反应 30 min。之后混合物减压浓缩,残余物经柱层析分离(EA/PE, 0 – 100%)得标题化合物。

LC-MS: m/z (ESI): 426.5 $[M+H]^+$ 。

实施例 15、3-(2-叔丁磺酰基-5-氧代嘧啶并[5,4-*c*]喹啉-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(化合物 15)



步骤 1: 2-甲硫基嘧啶并[5,4-*c*]喹啉-5(6*H*)-酮(中间体 15-1)的合成

在氮气气氛下,向 2-甲硫基-4-氯嘧啶-5-羧酸乙酯(1.86 g), 2-氨基苯硼酸(1.096 g), Pd(dppf)Cl₂(585 mg), Cs₂CO₃(5.2 g)的混合物中加入 THF(40 mL)与水(6 mL),将所得混合物在 70 °C 下搅拌反应 4 h。之后将混合物冷却至室温过夜,过滤,滤饼用水与石油醚洗涤,得标题化合物(400 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 244.3 $[M+H]^+$ 。

步骤 2: 3-(2-甲硫基-5-氧代嘧啶并[5,4-*c*]喹啉-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(中间体 15-2)的合成

在氮气气氛下,向中间体 15-1(90 mg)溶于 DMF(3 mL)与 THF(3 mL)的混合物中加入 NaH(59 mg, 60%质量分数于矿物油中),所得混合物在室温下搅拌反应 30 min。之后加入 3-溴丙酸叔丁酯(309 mg),所得混合物在 70 °C 下反应 16 h。之后向混合物中加入 0.5 mL 水,减压除去溶剂后柱层析分离,得标题化合物粗品,直接用于下一步反应。

LC-MS: m/z (ESI): 372.4 $[M+H]^+$ 。

步骤 3: 3-(2-甲磺酰基-5-氧代嘧啶并[5,4-*c*]喹啉-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(中间体 15-3)的合成

在 0 °C 下,向上步所得化合物粗品与 DCM(10 mL)的混合物中加入 mCPBA(200 mg, 85%纯度),所得混合物在室温下反应 30 min。之后混合物减压浓缩,残余物经柱层析分离(EA/PE, 0 – 100%)得标题化合物粗品,直接用于下一步反应。

LC-MS: m/z (ESI): 404.4 $[M+H]^+$.

步骤 4: 3-(2-叔丁硫基-5-氧代噻唑并[5,4-*c*]喹啉-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(中间体 15-4)的合成

在室温下, 向上步所得化合物粗品溶于 DCM(10 mL)的溶液中依次加入叔丁基硫醇(200 mg)与 2 M 氢氧化钠溶液(0.5 mL), 所得混合物在室温下强烈搅拌反应 30 min。之后混合物经柱层析分离(EA/PE, 0–50%)得标题化合物粗品。

LC-MS: m/z (ESI): 414.4 $[M+H]^+$.

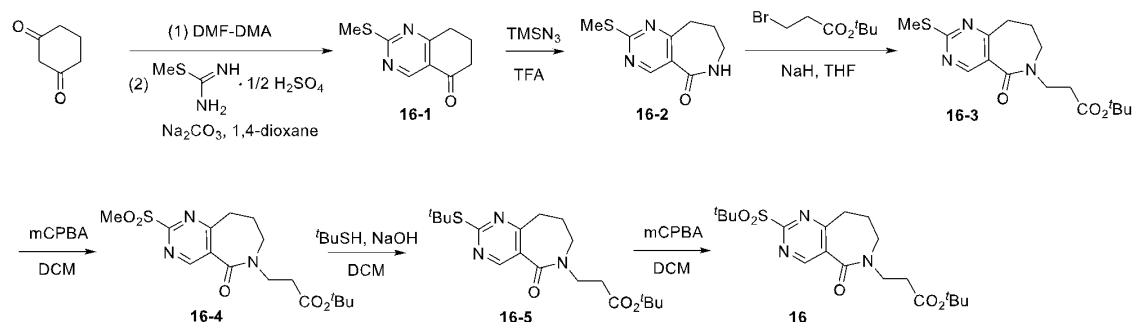
步骤 5: 3-(2-叔丁磺酰基-5-氧代噻唑并[5,4-*c*]喹啉-6(5*H*)-基)丙酸叔丁酯(化合物 15)的合成

在 0 °C 下, 向上步所得化合物粗品与 DCM(10 mL)的混合物中加入 mCPBA(200 mg, 85%纯度), 所得混合物在室温下反应 30 min。之后混合物减压浓缩, 残余物经柱层析分离(EA/PE, 0–100%)得标题化合物(28.9 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 446.5 $[M+H]^+$.

^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.78(s, 1H), 8.73–8.67(m, 1H), 7.96–7.89(m, 1H), 7.81(d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.55(t, J = 7.5 Hz, 1H), 4.62–4.55(m, 2H), 2.70–2.62(m, 2H), 1.45(s, 9H), 1.38(s, 9H).

实施例 16: 3-(2-叔丁磺酰基-5-氧代-5,7,8,9-四氢-6*H*-噻唑并[5,4-*c*]氮杂草-6-基)丙酸叔丁酯(化合物 16)



步骤 1: 2-甲硫基-7,8-二氢喹啉-5(6*H*)-酮(中间体 16-1)的合成

在室温及氮气气氛下, 将 1,3-环己二酮(11.2 g)与 DMF-DMA(35.7 g)的混合物搅拌反应 1 h, 再升至 50 °C 反应 1 h。混合物经减压除去溶剂后, 加入甲基异硫脲半硫酸盐(13.9 g), 碳酸钠(12.7 g)与 1,4-二氧六环(200 mL), 所得混合物在 100 °C 下搅拌反应 16 h。之后混合物经减压除去溶剂, 柱层析分离(EA/PE, 0–30%)得标题化合物(5 g)。

LC-MS: m/z (ESI): 195.4 $[M+H]^+$.

步骤 2: 2-甲硫基-6,7,8,9-四氢-5*H*-噻唑并[5,4-*c*]氮杂草-5-酮(中间体 16-2)的合成

在 0 °C 及氮气气氛下, 向中间体 16-1(1.94 g)溶于 20 mL 三氟乙酸的溶液中加入三甲基叠氮基硅烷(2.3 g), 将所得混合物在 25 °C 下搅拌反应 10 天。之后将混合物倒入 200 mL 水中并用二氯甲烷萃取(50 mL $\times$ 3), 合并有机相以无水硫酸钠干燥后柱层析分离(EA/PE, 0–100%), 得标题化合物(210 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 210.5 $[M+H]^+$.

步骤 3: 3-(2-甲硫基-5-氧代-5,7,8,9-四氢-6*H*-噻唑并[5,4-*c*]氮杂草-6-基)丙酸叔丁酯(中间体 16-3)的合成

在 0 °C 下, 向中间体 16-2(210 mg)与 THF(5 mL)的混合物中加入 NaH(80 mg, 60% 质量分数于矿物油中), 所得混合物在 0 °C 下反应 30 min。接着向反应所得混合物中加入 3-溴丙酸叔丁酯(418 mg)并将所得混合物升温至 70 °C 反应 16 h。之后减压除去溶剂, 经柱层析分离(EA/PE, 0–70%)得标题化合物粗品, 直接用于下一步反应。

LC-MS: m/z (ESI): 338.4 $[M+H]^+$.

步骤 4: 3-(2-甲磺酰基-5-氧代-5,7,8,9-四氢-6*H*-噻唑并[5,4-*c*]氮杂草-6-基)丙酸叔丁酯(中间体 16-4)的合成

在 0 °C 下, 向上步所得化合物粗品与 DCM(5 mL)的混合物中加入 mCPBA(200 mg), 所得混合物在室温下反应 30 min。之后混合物经柱层析分离(EA/PE, 0–100%)得标题化合物粗品, 直接用于下一步反应。

LC-MS: m/z (ESI): 370.4 $[M+H]^+$.

步骤 5: 3-(2-叔丁硫基-5-氧代-5,7,8,9-四氢-6*H*-噻唑并[5,4-*c*]氮杂草-6-基)丙酸叔丁酯(中间体 16-5)的合成

在强烈搅拌下，向上步所得化合物粗品与 DCM(5 mL)的混合物中加入叔丁基硫醇(0.5 mL)及 2M 氢氧化钠溶液(1 mL)，所得混合物在室温下反应 1 h。之后混合物经柱层析分离(EA/PE, 0 – 100%)得标题化合物粗品，直接用于下一步反应。

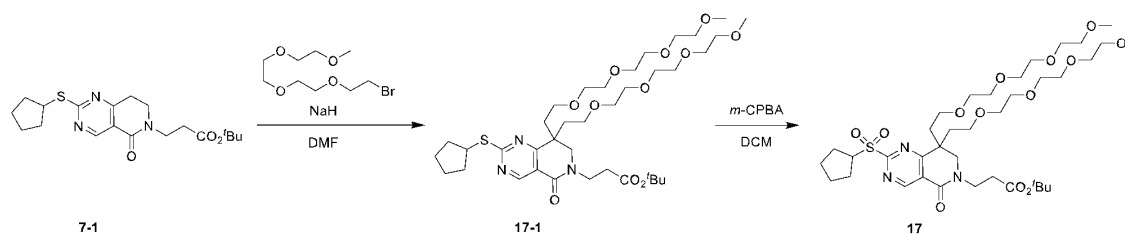
LC-MS: m/z (ESI): 380.4 $[M+H]^+$ 。

步骤 6: 3-(2-叔丁磺酰基-5-氧代-5,7,8,9-四氢-6H-嘧啶并[5,4-c]氮杂草-6-基)丙酸叔丁酯(化合物 16)的合成
在 0 °C 下，向上步所得化合物粗品与 DCM(5 mL)的混合物中加入 mCPBA(200 mg)，所得混合物在室温下反应 30 min。之后混合物经柱层析分离(EA/PE, 0 – 100%)得标题化合物 (14.2 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 412.5 $[M+H]^+$ 。

1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.04(s, 1H), 3.75(t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.37 – 3.34(m, 2H), 2.99(t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.61(t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.21 – 2.11(m, 2H), 1.42(s, 9H), 1.38(s, 9H)。

实施例 17、3-(2-(环戊磺酰基)-5-氧代-8,8-二(2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基)-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5H)-基)丙酸叔丁酯(化合物 17)



步骤 1: 3-(2-环戊硫基-5-氧代-8,8-二(2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基)-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5H)-基)丙酸叔丁酯(中间体 17-1)的合成

在 0 °C 及氮气气氛下，将中间体 7-1(50 mg)溶于 DMF (1 mL) 中，向其中加入 NaH (26.5 mg, 60% 有效含量)，反应在 25 °C 下搅拌 30 min，向其中加入 13-溴-2,5,8,11-四氧杂十三烷 (179.57 mg)。反应液在氮气保护下于 25 °C 搅拌 3 小时。之后混合物倒入 30 mL 水中，经乙酸乙酯萃取(20 mL $\times$ 3)，合并有机相以无水硫酸钠干燥，减压浓缩后经柱层析分离(THF/PE, 0-100%)得标题化合物(25 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 758.5 $[M+H]^+$ 。

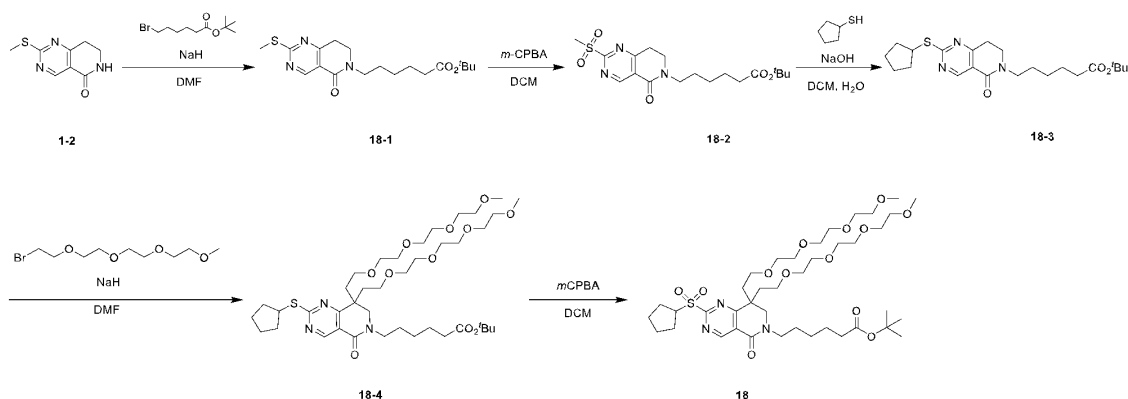
步骤 2: 3-(2-环戊磺酰基-5-氧代-8,8-二(2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基)-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5H)-基)丙酸叔丁酯(化合物 17)的合成

在 0 °C 下将中间体 17-1 (25 mg)溶于无水二氯甲烷 (1 mL) 中，向其中加入间氯过氧苯甲酸(22.77 mg, 85% 纯度)。反应液于 25 °C 搅拌 1 h。之后混合物经反相高效液相色谱法纯化(柱子: Boston Green ODS 150*30mm*5um; 流动相: [A 相: 水(0.225% 甲酸), B 相: 乙腈]; B%: 50%-80%, 10min)得标题化合物(2.2 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 790.4 $[M+H]^+$ 。

1H NMR(400 MHz, D $_2$ O) δ = 9.28(s, 1H), 4.36-4.24(m, 1H), 3.84(t, J = 6.3 Hz, 2H), 3.80(s, 2H), 3.63-3.49(m, 20H), 3.47-3.36(m, 8H), 3.32(s, 6H), 2.67(t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.33-2.22(m, 2H), 2.20-2.10(m, 2H), 2.09-1.97(m, 4H), 1.70 – 1.62(m, 4H), 1.39(s, 9H)。

实施例 18、6-(2-(环戊磺酰基)-5-氧代-8,8-二(2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基)-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5H)-基)己酸叔丁酯(化合物 18)



步骤 1: 6-(2-甲硫基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)己酸叔丁酯(中间体 18-1)的合成

在 0 °C 及氮气气氛下, 将中间体 1-2(1.0 g) 与 DMF(20 mL)的混合物中加入 NaH(307.28 mg, 60% 质量分数于矿物油中), 反应在 25 °C 下搅拌 30 min 后向其中加入 6-溴己酸叔丁酯(1.93 g)。反应液在氮气保护下于 25 °C 搅拌 1 h。之后混合物倒入 50 mL 水中, 经乙酸乙酯萃取(30 mL × 3), 合并有机相以无水硫酸钠干燥, 减压浓缩后经柱层析分离(THF/PE, 0-50%)得标题化合物(500 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 366.2 $[M+H]^+$ 。

步骤 2: 6-(2-甲磺酰基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)己酸叔丁酯(中间体 18-2)的合成

在 0 °C 下将中间体 18-1 (500 mg) 溶于无水二氯甲烷 (10 mL) 中, 向其中加入间氯过氧苯甲酸(944.30 mg, 85% 纯度)。反应液于 25 °C 搅拌 1 h。之后混合物经柱层析分离(THF/PE, 0 - 50%)得标题化合物(500 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 342.0 $[M-56]^+$ 。

步骤 3: 6-(2-环戊硫基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)己酸叔丁酯(中间体 18-3)的合成

在室温下, 将中间体 18-2(500 mg)和环戊硫醇(193 mg)溶于二氯甲烷(10 mL)和 2M 氢氧化钠溶液(5 mL)。将所得混合物在 25 °C 下搅拌反应 3 h。之后减压除去溶剂, 经柱层析分离(THF/PE, 0-30%)得标题化合物(460 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 442.1 $[M+Na]^+$ 。

步骤 4: 6-(2-(环戊硫基)-5-氧代-8,8-二(2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基)-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)己酸叔丁酯(中间体 18-4)的合成

在 0 °C 及氮气气氛下, 将中间体 18-3(350 mg) 溶于 DMF (5 mL) 中, 向其中加入 NaH (167 mg, 60% 有效含量), 反应在 25 °C 下搅拌 30 min, 向其中加入 13-溴-2,5,8,11-四氧杂十三烷 (1.13 g)。反应液在氮气保护下于 25 °C 搅拌 3 h。之后混合物倒入 30 mL 水中, 经乙酸乙酯萃取(20 mL × 3), 合并有机相以无水硫酸钠干燥, 减压浓缩后经柱层析分离(THF/PE, 0 - 100%)得标题化合物(300 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 800.6 $[M+H]^+$ 。

步骤 5: 6-(2-(环戊磺酰基)-5-氧代-8,8-二(2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基)-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)己酸叔丁酯(化合物 18)的合成

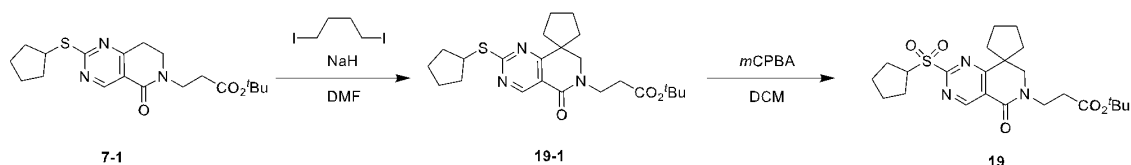
在 0 °C 下将中间体 18-4 (450 mg) 溶于无水二氯甲烷 (5 mL) 中, 向其中加入间氯过氧苯甲酸(388.25 mg, 85% 纯度)。反应液于 25 °C 搅拌 1 h。之后混合物经柱层析分离(EA/PE, 0 - 100%)得标题化合物(300 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 832.3 $[M+H]^+$ 。

1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.26(s, 1H), 4.31 - 4.28(m, 1H), 3.70(s, 2H), 3.53-3.39(m, 24H), 3.38-3.34(m, 4H), 3.32 - 3.30(m, 1H), 3.23(s, 6H), 2.20(t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.13 - 1.93(m, 8H), 1.73 - 1.63(m, 4H), 1.59 - 1.55(m, 4H), 1.39(s, 9H), 1.33 - 1.29(m, 2H)

实施例 19: 3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-5'-*H*-螺[环戊并-1,8'-吡啶并[4,3-*d*]嘧啶]-6'(7'*H*)-基)丙酸叔丁酯(化合物 19)

60



步骤 1: 3-(2'-(环戊硫基)-5'-氧代-5'H-螺[环戊烷-1,8'-吡啶并[4,3-*d*]嘧啶]-6'(7'*H*)-基)丙酸叔丁酯(中间体 19-1)的合成

在 0 °C 及氮气气氛下, 将中间体 7-1 (1 g) 溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺 (10 mL) 中, 向其中加入 NaH (635.7 mg, 60% 纯度), 反应在 0 °C 下搅拌 15 min, 向其中加入 1,4-二碘丁烷 (2.46 g)。反应液在氮气保护 0 °C 搅拌 1 h。之后混合物倒入 20 mL 冰水中, 经乙酸乙酯萃取 (10 mL × 3), 合并有机相以无水硫酸钠干燥, 减压浓缩后经柱层析分离 (乙酸乙酯/石油醚, 0-25%) 得标题化合物 (620 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 432.1 $[M+H]^+$

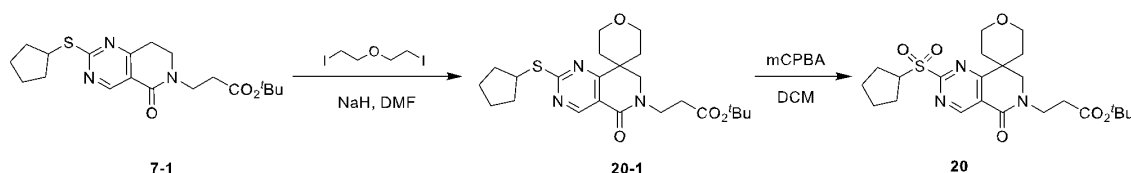
步骤 2: 3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-5'H-螺[环戊烷-1,8'-吡啶并[4,3-*d*]嘧啶]-6'(7'*H*)-基)丙酸叔丁酯(化合物 19)的合成

在 0 °C 下将中间体 19-1 (100 mg) 溶于无水二氯甲烷 (2 mL) 中, 向其中加入间氯过氧苯甲酸 (188.16 mg, 85% 纯度)。反应液于 0 °C 搅拌 1 h。混合物经减压浓缩后经柱层析分离 (乙酸乙酯/石油醚, 0-50%) 得标题化合物 (49.2 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 464.3 $[M+H]^+$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ = 9.35 (s, 1H), 4.34-4.13 (m, 1H), 3.80 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.61 (s, 2H), 2.66 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.24-2.11 (m, 4H), 2.05 (m, 2H), 1.99-1.90 (m, 2H), 1.89-1.75 (m, 6H), 1.73-1.65 (m, 2H), 1.45 (s, 9H)

实施例 20、3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-2,3,5,6-四氢-5'H-螺[吡喃并-4,8'-吡啶并[4,3-*d*]嘧啶]-6'(7'*H*)-基)丙酸叔丁酯(化合物 20)



步骤 1: 3-(2'-(环戊硫基)-5'-氧代-2,3,5,6-四氢-5'H-螺[吡喃并-4,8'-吡啶并[4,3-*d*]嘧啶]-6'(7'*H*)-基)丙酸叔丁酯(中间体 20-1)的合成

在 0 °C 及氮气气氛下, 将中间体 7-1 (200 mg) 溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺 (2 mL) 中, 向其中加入 NaH (127.15 mg, 60% 有效含量), 向其中加入 1-碘-2-(2-乙氧基)乙烷 (518.01 mg)。反应液于氮气保护下 0 °C 搅拌 1 h。之后向反应液中加入冰水 (2 mL), 经乙酸乙酯萃取 (1 mL × 3), 合并有机相以无水硫酸钠干燥, 减压浓缩后经柱层析分离 (乙酸乙酯/石油醚, 0-60%) 得标题化合物 (110 mg)。

MS m/z (ESI): 448.2 $[M+H]^+$

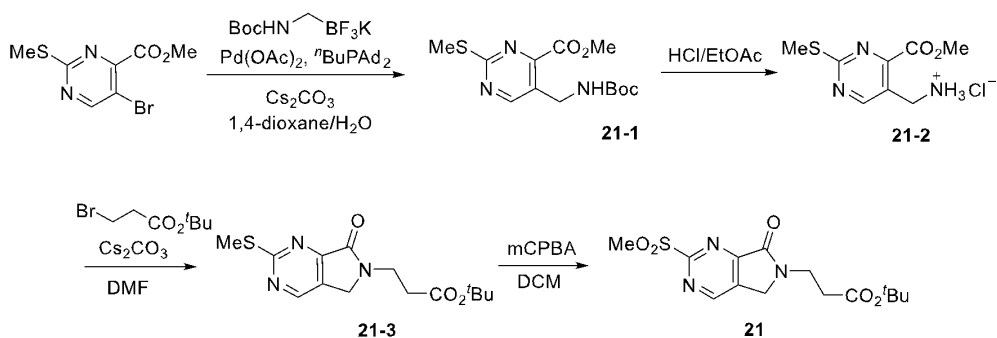
步骤 2: 3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-2,3,5,6-四氢-5'H-螺[吡喃并-4,8'-吡啶并[4,3-*d*]嘧啶]-6'(7'*H*)-基)丙酸叔丁酯(化合物 20)的合成

在 0 °C 下将中间体 20-1 (60 mg) 溶于无水二氯甲烷 (1 mL) 中, 向其中加入间氯过氧苯甲酸 (108.86 mg, 85% 纯度)。反应液于 25 °C 搅拌 1 h。反应结束经减压浓缩后经柱层析分离 (乙酸乙酯/石油醚, 0-55%) 得标题化合物 (9.8 mg)

MS m/z (ESI): 480.3 $[M+H]^+$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ = 9.40 (s, 1H), 4.35-4.18 (m, 1H), 4.00 (m, 2H), 3.86-3.72 (m, 6H), 2.68 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.31-2.23 (m, 2H), 2.18 (m, 2H), 2.06 (m, 2H), 1.93-1.81 (m, 2H), 1.77-1.65 (m, 4H), 1.45 (s, 9H)

实施例 21、3-(2-甲磺酰基-7-氧代-5,7-二氢-6*H*-吡咯并[3,4-*d*]嘧啶-6-基)丙酸叔丁酯(化合物 21)



步骤 1: 5-(((叔丁氧羰基)氨基)甲基)-2-甲硫基嘧啶-4-甲酸甲酯(中间体 21-1)的合成

在室温及氮气气氛下,向 5-溴-2-甲硫基嘧啶-4-甲酸甲酯(4 g), [(叔丁氧羰基氨基)甲基]三氟硼酸钾(5.41 g), 碳酸铯(9.91 g), 醋酸铯(341.34 mg)及正丁基二(1-金刚烷基)膦(817.62 mg)的混合物中加入 1,4-二氧六环(50 mL)及水(5 mL)。将所得混合物在 80 °C 下搅拌反应 5 h。之后减压除去溶剂,经柱层析分离(四氢呋喃/石油醚, 0-30%)得标题化合物(1300 mg)。

LC-MS: m/z(ESI): 314.0 [M+H]⁺。

步骤 2: (4-甲氧羰基-2-甲硫基嘧啶-4-基)甲胺盐酸盐(中间体 21-2)的合成

在室温及氮气气氛下,向中间体 21-1(1300 mg)于 20 mL 乙酸乙酯的溶液中加入 4M 氯化氢乙酸乙酯溶液(20 mL),将所得混合物在室温下搅拌反应 4 h。LCMS 检测反应完毕后,过滤混合物,滤饼用乙酸乙酯洗涤,得标题化合物(750 mg)。

LC-MS: m/z(ESI): 214.0 [M+H]⁺。

步骤 3: 3-(2-甲硫基-7-氧代-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)丙酸叔丁酯(中间体 21-3)的合成

在氮气气氛下,中间体 21-2(100 mg), 碳酸铯(195.71 mg), 3-溴丙酸叔丁酯(83.73 mg)及 N,N-二甲基甲酰胺(4 mL)的混合物加热至 80 °C 反应 16 h。之后减压除去溶剂,经柱层析分离(四氢呋喃/石油醚, 0-50%)得标题化合物(20 mg)。

LC-MS: m/z(ESI): 310.0 [M+H]⁺。

步骤 4: 3-(2-甲磺酰基-7-氧代-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)丙酸叔丁酯(化合物 21)的合成

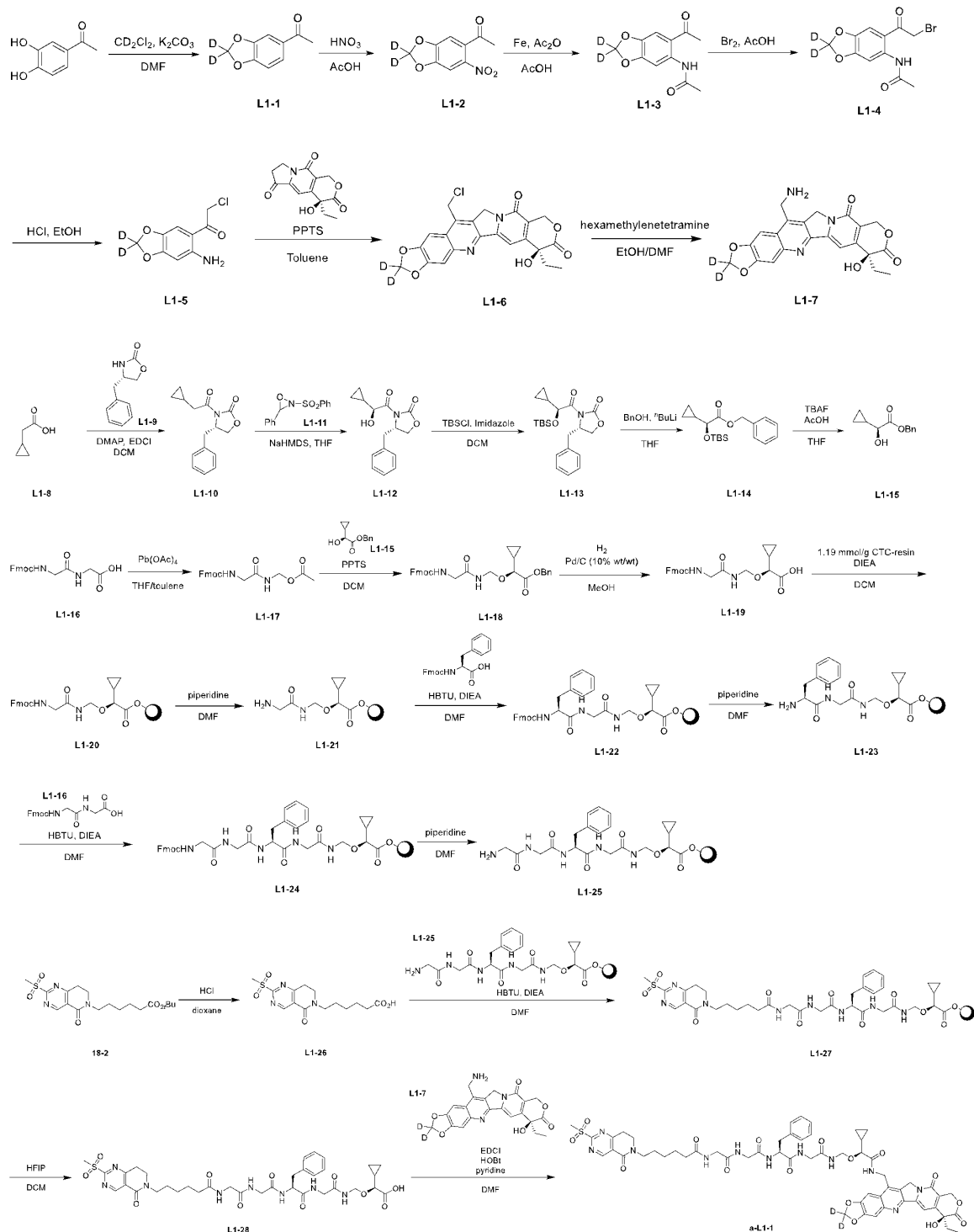
在 0 °C 下,将间氯过氧苯甲酸(33.47 mg)加入中间体 21-3(20 mg)溶于二氯甲烷(4 mL)的溶液中,所得混合物在室温下搅拌 2 h。反应液直接经高效液相色谱法纯化(柱子: Phenomenex Gemini NX 150×30mm, 5μm; 流动相: [A: 水(碳酸氢铵), B: 乙腈]; B%: 13%-43%, 11min)得标题化合物(2.9 mg)。

(流动相 A 配制: 30L 纯水 + 24 g 碳酸氢铵)

¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆)δ = 9.44(s, 1H), 4.77-4.66(m, 2H), 3.90-3.78(m, 2H), 3.50-3.45(m, 3H), 2.69-2.63(m, 2H), 1.41-1.38(m, 9H)。

药物-连接子的制备实施例 (实施例 22-40)

实施例 22、N-((4S,12S)-12-苄基-4-环丙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二噻戊环并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]呋喃并[1,2-b]喹啉-14-基-2,2-d₂)-3,8,11,14,17-五氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16-五氮杂十八烷-18-基)-6-(2-甲磺酰基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-6(5H)-基)己酰胺(a-L1-1)



步骤 1: 1-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基-2,2- d_2)乙烷-1-酮(中间体 L1-1)的合成

将 3',4'-二羟基苯乙酮(3 g)溶于无水 DMF(25 mL)中, 加入氘代二氯甲烷(8.57 g)和碳酸钾(8.18 g), 加毕, 升温至 90 °C 搅拌 16 h。随后将反应液加入到水(100 mL)中, 并用乙酸乙酯(200 mL*2)萃取, 合并有机相用饱和食盐水(100 mL)洗涤, 并用无水硫酸钠干燥。过滤后, 滤液减压浓缩至干, 残余物通过柱层析色谱法纯化(乙酸乙酯/石油醚 = 5:1), 得到标题化合物(2.4 g)。

MS m/z(ESI): 167.1[M+H]⁺.

步骤 2: 1-(6-硝基苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基-2,2-*d*₂)乙烷-1-酮(中间体 L1-2)的合成

将中间体 L1-1(2.4 g)溶于无水醋酸(10 mL)中, 在 0 °C 滴加浓硝酸(32.50 g, 70%含量), 之后 0 °C 搅拌 10 min。随后升温至室温, 搅拌 1h。反应完毕后, 将反应液滴加入到冰水(200 mL)中, 过滤后, 滤饼干燥得到标题化合物(1.9 g)。

MS m/z(ESI): 212.0 [M+H]⁺.

¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆)δ 7.69(s, 1H), 7.30(s, 1H), 2.49(s, 3H).

步骤 3: N-(6-乙酰苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基-2,2-*d*₂)乙酰胺(中间体 L1-3)的合成

将中间体 L1-2(1.8 g)溶于醋酸(25 mL)中, 加入醋酸酐(1.84 g)和还原铁粉(4.76 g), 室温搅拌 1 h。反应完毕后, 过滤, 滤液减压浓缩至干, 残余物通过柱层析色谱法纯化(乙酸乙酯/石油醚 = 5:1), 得到标题化合物(1.5 g)。

MS m/z(ESI): 224.1 [M+H]⁺.

步骤 4: N-(6-(2-溴乙酰基)苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基-2,2-*d*₂)乙酰胺(中间体 L1-4)的合成

将 HBr 的乙酸溶液(2.39 g, 33%含量)滴加到中间体 L1-3(1.45 g)的无水醋酸(25 mL)溶液中, 然后再滴加 Br₂(1.07 g), 滴加完, 室温搅拌 1 h。反应完毕后, 反应液减压浓缩至干, 残余物加入到水(50 mL)中, 用乙酸乙酯(50 mL*2)萃取, 有机相用饱和食盐水(50 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤后, 残余物通过柱层析色谱法纯化(乙酸乙酯/石油醚 = 5:1), 得到标题化合物(1.3 g)。

MS m/z(ESI): 302.1 [M+H]⁺.

步骤 5: 1-(6-氨基苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基-2,2-*d*₂)-2-氯乙烷-1-酮(中间体 L1-5)的合成

将中间体 L1-4(1.2 g)和浓盐酸(144.82 mg)溶于乙醇(15 mL)中, 反应液在 60°C 下搅拌 16 h。反应完毕后, 反应液减压浓缩至干, 残余物通过高效液相色谱法纯化(YMC-Actus Triart C18 柱 5μm 二氧化硅, 30 mm 直径, 150 mm 长度; 用水(含有 0.05%NH₄HCO₃)和乙腈的极性递减的混合物作为洗脱液(乙腈梯度比例 40%-50%), 得到标题化合物(577 mg)。

MS m/z(ESI): 216.0 [M+H]⁺.

步骤 6: (S)-14-(氯甲基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11*H*-[1,3]二氧杂环戊烯并[4,5-*g*]吡喃并[3',4':6,7]喹啉并[1,2-*b*]喹啉-8,11(7*H*)-二酮-2,2-*d*₂(中间体 L1-6)的合成

将中间体 L1-5(100.0 mg)和(S)-4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1*H*-吡喃并[3,4-*f*]喹啉-3,6,10(4*H*)-三酮(109.87 mg)溶于甲苯(1 mL)和乙酸(1 mL)中, 向其中加入对甲苯磺酸吡啶盐(5.24 mg)。反应液在 100 °C 搅拌 16 h。反应结束后, 待反应冷却至室温, 直接将反应液经减压浓缩至干。加入乙醇(5 mL), 反应液于 25°C 搅拌 0.5 h。反应液过滤, 滤饼用乙醇(5mL*2)洗涤得到标题化合物(100.0 mg)。

MS m/z(ESI): 443.0 [M+H]⁺.

步骤 7: (S)-14-(氨基甲基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11*H*-[1,3]二氧杂环戊烯并[4,5-*g*]吡喃并[3',4':6,7]喹啉并[1,2-*b*]喹啉-8,11(7*H*)-二酮-2,2-*d*₂(中间体 L1-7)的合成

将中间体 L1-6(100.00 mg)溶于无水乙醇(1.5 mL)和无水 DMF(1.5 mL)中, 向其中加入六次甲基四胺(94.97 mg)。反应液在 50 °C 搅拌 6 h。反应结束后, 反应液经减压浓缩至干, 残余物经高效液相色谱法纯化(柱子: Boston Green ODS 150*30mm*5μm; 流动相: [A: 水(甲酸), B: 乙腈]; B%: 0%-30%, 12min)得标题化合物(25.0 mg)。

MS m/z(ESI): 424.0 [M+H]⁺.

步骤 8: (S)-4-苄基-3-(2-环丙基乙酰基)噁唑烷-2-酮(中间体 L1-10)的合成

称取化合物 L1-8(150.0 g), DMAP(160.15 g), 和化合物 L1-9(221.2 g), 溶解于 1500 mL 二氯甲烷中, 并在室温下搅拌 15 min。称取 EDCI(359.0 g), 分批加入反应液, 加毕, 在室温下搅拌约 5 h。反应结束后, 向反应液中加入二氯甲烷(1500 mL)稀释, 然后依次用水(500 mL)洗涤 2 次, 2 N HCl(500 mL)洗涤一次, 饱和碳酸氢钠溶液(500 mL)洗涤一次, 饱和食盐水溶液(500 mL)洗涤一次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤后滤液减压浓缩至干, 得标题化合物(302 g)。

¹H NMR(400 MHz, CDCl₃)δ 7.32-7.35(m, 2H), 7.26-7.29(m, 1H), 7.21-7.23(m, 2H), 4.68-4.71(m, 1H), 4.17-4.23(m, 2H), 3.30-3.33(dd, 1H), 2.91-2.95(dd, 1H), 2.78-2.82(m, 2H), 1.14-1.18(m, 1H), 0.59-0.63(m, 2H), 0.21-

0.26(m, 2H).

步骤 9: (S)-4-苄基-3-((S)-2-环丙基-2-羟基乙酰基)噁唑烷-2-酮(中间体 L1-12)的合成

称取中间体 L1-10(200 g), 溶解于 2000 mL 无水 THF 中, 在氮气保护下, -78℃下搅拌 15 min。随后, 向反应液中滴加二(三甲基硅基)氨基钠(443.5 mL, 2 M in THF)。滴加结束, 反应反应液在-78℃下搅拌 30 min。将中间体 L1-11(201.5 g)溶解于 700 mL THF 中溶清, 并缓慢滴加入反应液。滴加结束, -78℃下搅拌 2 h。随后, 向反应液中加入冰醋酸 220 mL, 淬灭反应。滴毕后逐渐升温至室温, 并向反应液中加入 2 N HCl 600 mL, 室温(20-25℃)搅拌 10 h。随后, 反应液减压浓缩, 并向残留物中加入乙酸乙酯(1000 mL)和水(200 mL), 搅拌 20 min。分离水相用乙酸乙酯(500 mL x2)萃取两次, 合并有机相, 依次用饱和 NaHCO₃ 溶液 400 mL, 饱和 Na₂S₂O₃ 溶液 400 mL 和饱和食盐水各洗涤两次, 所得有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤后, 滤液减压浓缩至干, 残留物用硅胶柱色谱纯化(石油醚:乙酸乙酯=1/30)得标题化合物(128.7 g)

¹H NMR(400 MHz, CDCl₃)δ 7.37(dd, J = 8.1, 6.8 Hz, 2H), 7.33-7.29(m, 1H), 7.27-7.23(m, 2H), 4.81(dd, J = 7.9, 5.9 Hz, 1H), 4.72(ddt, J = 10.0, 7.5, 2.9 Hz, 1H), 4.33(t, J = 8.3Hz, 1H), 4.28(dd, J = 9.1, 2.5 Hz, 1H), 3.48(dd, J = 8.2, 3.9 Hz, 1H), 3.35(dd, J = 13.5, 3.4 Hz, 1H), 2.88(dd, J = 13.5, 9.4 Hz, 1H), 1.36-1.29(m, 1H), 0.62-0.44(m, 4H).

步骤 10: (S)-4-苄基-3-((S)-2-((叔丁基二甲基硅基)氧基)-2-环丙基乙酰基)噁唑烷-2-酮(中间体 L1-13)的合成

称取中间体 L1-12(128.7 g), 溶解于 1300 mL DCM 中, 并加入咪唑(56.17 g), 在冰浴下搅拌 15 min。随后分批向反应液中加入 TBSCl(107.3 g), 并在室温下搅拌 3 h。向反应液中加入 200 mL 2N HCl 搅拌 20 min, 分液。有机相依次用饱和 NaHCO₃ 溶液 200 mL 和饱和食盐水各洗涤两次。有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤后, 滤液减压浓缩至干, 残留物用硅胶柱色谱纯化(石油醚:乙酸乙酯=80: 1)得标题化合物(160 g)。

¹H NMR(400 MHz, CDCl₃)δ 7.35-7.37(m, 2H), 7.30-7.32(m, 1H), 7.26-7.29(m, 2H), 5.26-5.31(m, 1H), 4.67-4.71(m, 1H), 4.20-4.26(m, 2H), 3.41-3.44(dd, 1H), 2.72-2.76(dd, 1H), 1.25-1.31(m, 1H), 0.94(s, 9H), 0.54-0.56(m, 2H), 0.46-0.48(m, 2H), 0.12(s, 6H).

步骤 11: (S)-2-((叔丁基二甲基硅基)氧基)-2-环丙基乙酸苄酯(中间体 L1-14)的合成

称取苄醇(62.18 g), 溶解于 500 mL THF 中, 并在-25℃下搅拌。量取正丁基锂(213.6 mL, 2.5 M in THF), 缓慢滴加入反应液。滴毕, 在-25℃下搅拌 1 h。称取中间体 L1-13(160 g), 溶于 320 mL THF 中, 并在-25℃下缓慢滴加入反应液中。滴毕, 在-15℃下搅拌 3 h。向反应液中加入饱和 NH₄Cl(200 mL)溶液淬灭反应。随后减压浓缩, 并向反应液中加入甲基叔丁基醚 400 mL 和水(150 mL), 搅拌 30 min, 分液, 水相用甲基叔丁基醚(200 mL x2)萃取两次, 合并有机相, 饱和食盐水(250 mL)洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤后, 滤液经减压浓缩, 残留物经硅胶柱色谱纯化(石油醚:乙酸乙酯=100:1), 得标题化合物(125 g)。

¹H NMR(400 MHz, CDCl₃)δ 7.28-7.40(m, 5H), 5.17-5.26(m, 2H), 3.86-3.89(m, 1H), 1.21-1.46(m, 1H), 0.90(s, 9H), 0.45-0.51(m, 4H), 0.05(s, 6H).

步骤 12: (S)-2-环丙基-2-羟基乙酸苄酯(中间体 L1-15)的合成

称取中间体 L1-14(125 g), 溶于 1200 mL THF 中, 并加入冰醋酸(35.1 g), 在室温下搅拌 5 min。随后向反应液中加入 TBAF(585 mL, 1 M in THF), 并将反应液置于 45 °C下反应 4 h。反应液减压浓缩除去溶剂, 并向残余物中加入 300 mL 水和 400 mL 甲基叔丁基醚, 搅拌 20 min, 分液, 水相用甲基叔丁基醚(200 mL)萃取两次, 合并有机相, 依次用饱和 NaHCO₃ 溶液 200 mL 和饱和食盐水各洗涤两次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤后, 滤液减压浓缩至干, 残留物硅胶柱色谱纯化(石油醚:乙酸乙酯=60:1), 得标题化合物(68.9 g)。

¹H NMR(400 MHz, CDCl₃)δ 7.27-7.39(m, 5H), 5.22-5.28(m, 2H), 3.82(d, 1H), 2.7(brs, 1H), 1.11-1.15(m, 1H), 0.41-0.56(m, 4H).

通过以下手性超临界流体色谱条件对中间体 L1-15 进一步分析。

柱子	Chiralpak AD-3 150*4.6mm I.D., 3um	
流动相	A:二氧化碳	
	B:甲醇(0.05% 二乙胺)	
	时间(分钟)	B 相%
	0	5

	4	40
	0.2	5
	1.8	5
流速	2.5 毫升/分钟	
波长	PDA 220nm	
柱温	35°C	
柱压	1500 Psi	
仪器型号	Waters UPCC with PDA Detector	

中间体 L1-15 在上述手性超临界流体色谱条件下，其保留时间为 3.013 分钟。

步骤 13: 乙酸(2-((((9H-茛-9-基)甲氧基)羰基)氨基)乙酰氨基)甲酯(中间体 L1-17)的合成

将化合物 L1-16(25 g)，醋酸铅(43.79 g)和吡啶(6.98 g)溶于四氢呋喃(600 mL)和甲苯(200 mL)的混合溶剂，氮气置换 3 次，反应在氮气保护下加热到 85 °C，搅拌反应 18 h。之后冷却至室温，过滤反应液，滤液减压浓缩至干，粗品经快速硅胶柱纯化(ISCO®; 330 g SepaFlash® Silica Flash Column, 流动相梯度 0~75% 乙酸乙酯/石油醚，流速 100 mL/min)得标题化合物(18 g)。

((MS m/z(ESI): 391.1 [M+Na]⁺。

步骤 14: (S)-10-环丙基-1-(9H-茛-9-基)-3,6-二氧化代-2,9-二氧杂-4,7-二氮杂十一烷-11-羧酸苄酯(中间体 L1-18)的合成

将中间体 L1-17(5 g)，中间体 L1-15(8.40 g)，对甲基苯磺酸吡啶盐(341.09 mg)溶于二氯甲烷(150 mL)，氮气置换 3 次，反应液在氮气保护下加热到 65 °C，搅拌反应 48 h。之后冷却至室温，过滤反应液，滤液减压浓缩至干，粗品经快速硅胶柱纯化(ISCO®; 120 g SepaFlash® Silica Flash Column, 流动相梯度 0~45% 乙酸乙酯/石油醚，流速 80 mL/min)，再进一步由高效液相色谱纯化(柱子: Boston Prime C18 150*30mm*5um; 流动相: [A: 水(甲酸)，B: 乙腈]; B%: 42%-82%, 13min)得标题化合物(1.4 g)。

MS m/z(ESI): 537.2 [M+Na]⁺。

步骤 15: (S)-10-环丙基-1-(9H-茛-9-基)-3,6-二氧化代-2,9-二氧杂-4,7-二氮杂十一烷-11-羧酸(中间体 L1-19)的合成

将中间体 L1-18(1.4 g)溶于混合溶剂甲醇(15 mL)和水(15 mL)，氮气氛围下加入湿钨碳(10%质量含量, 0.15 g)，氢气置换 3 次后，反应液在 25 °C 氢气氛围中(15Psi)搅拌反应 16 h。反应结束后，过滤反应液，滤液减压浓缩至干，粗品经高效液相色谱法纯化(柱子: Boston Prime C18 150*30mm*5um; 流动相: [A: 水(甲酸)，B: 乙腈]; B%: 24%-64%, 13min)得标题化合物。

LCMS m/z(ESI): 447.5 [M+Na]⁺。

步骤 16: 树脂负载的(S)-10-环丙基-1-(9H-茛-9-基)-3,6-二氧化代-2,9-二氧杂-4,7-二氮杂十一烷-11-羧酸(中间体 L1-20)的合成

将 CTC 树脂(规格: 约 1.19mmol/g) (257 mg)加入二氯甲烷(3 mL)中，再加入中间体 L1-19(130 mg)和二异丙基乙基胺(59.37 mg)。反应液氮气置换 3 次后，在 25 °C 摇床摇晃反应 16 h。反应结束后，树脂用甲醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)依次洗，重复 3 次后树脂抽滤至干，并在真空下干燥后得标题化合物(330 mg)。

步骤 17: 树脂负载的(S)-2-((2-氨基乙酰氨基)甲氧基)-2-环丙基乙酸(中间体 L1-21)的合成

将中间体 L1-20(330 mg)溶于 N,N-二甲基甲酰胺(5 mL)中，加入哌啶(1.08 g)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后，树脂用甲醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)依次洗，重复 3 次后树脂抽滤至干，并在真空下干燥后得标题化合物(220 mg)。

步骤 18: 树脂负载的 (5S) -5-苄基-13-环丙基-1- (9H-茛-9-基) -3,6,9-三氧基-2,12-二氧杂-4,7,10-三氮杂十四烷-14-酸(中间体 L1-22)的合成

将中间体 L1-21(220 mg)和(((9H-茛-9-基)甲氧基)羰基)-L-苯丙氨酸(230.17 mg)溶于 N,N-二甲基甲酰胺(5 mL)中，加入 O-苄基三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐(225.31 mg)和二异丙基乙基胺(99.96 mg)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后，树脂用甲醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)依次洗，重复 3 次后树脂抽滤至干，并在真空下干燥后得标题化合物(377 mg)。

步骤 19: 树脂负载的(S)-2-((2-((S)-2-氨基-3-苯基丙酰胺基))乙酰胺基)甲氧基)-2-环丙基乙酸(中间体 L1-23)的合成

将中间体 L1-22(377 mg)溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺(5 mL)中,加入哌啶(37.22 mg, 437.15 μ mol, 43.17 μ L)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后,树脂用甲醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)依次洗,重复 3 次后树脂抽滤至干,并在真空下干燥后得标题化合物(270 mg)。

步骤 20: 树脂负载的(11*S*,19*S*)-11-苄基-19-环丙基-1-(9*H*-茚-9-基)-3,6,9,12,15-五氧代-2,18-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂二十烷-20-羧酸(中间体 L1-24)的合成

将中间体 L1-23(270 mg)溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺(5 mL)中,依次加入中间体 L1-16(209.58 mg)和 *O*-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐(224.29 mg),二异丙基乙基胺(99.51 mg)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后,树脂用甲醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)依次洗,重复 3 次后树脂抽滤至干,并在真空下干燥后得标题化合物(403 mg)。

步骤 21: 树脂负载的(10*S*)-16-氨基-10-苄基-2-环丙基-6,9,12,15-四氧基-3-氧基-5,8,11,14-四氮杂十六烷-1-甲酸(中间体 L1-25)的合成

将中间体 L1-24(403 mg)溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺(5 mL)中,加入哌啶(1.08 g)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后,树脂用甲醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)依次洗,重复 3 次后树脂抽滤至干,并在真空下干燥后得标题化合物(300 mg)。

步骤 22: 6-(2-甲磺酰基-5-氧代-5*H*,6*H*,7*H*,8*H*-吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6-基)己酸(中间体 L1-26)的合成

将中间体 18-2(2.4 g)溶于二氯甲烷(50 mL)中后加入三氟乙酸(10 mL)。反应液在 25 °C 下搅拌反应 1 h。之后反应液经减压浓缩()除去溶剂后,加入水(20 mL)室温搅拌 5 分钟后过滤得标题化合物(1.5 g)。

(MS m/z (ESI): 342.1 $[M+H]^+$ 。

步骤 23: 树脂负载的(2*S*,10*S*)-10-苄基-2-环丙基-23-(2-甲磺酰基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)-6,9,12,15,18-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14,17-五氮杂二十三烷酸(中间体 L1-27)的合成

将中间体 L1-25(200 mg)加入 DMF(3 mL)中,依次加入中间体 L1-26(127 mg)和 *O*-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐(141 mg),二异丙基乙基胺(69 mg)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后,树脂用甲醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)依次洗,重复 3 次后树脂抽滤至干,并在真空下干燥后得标题化合物(220 mg)。

步骤 24: (2*S*,10*S*)-10-苄基-2-环丙基-23-(2-甲磺酰基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)-6,9,12,15,18-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14,17-五氮杂二十三烷酸(中间体 L1-28)的合成

将中间体 L1-27(220 mg)加入二氯甲烷(4 mL)和 1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇(1 mL)的混合物中,在 25 °C 摇晃 1 h。反应结束后,过滤反应液去除树脂,滤液减压浓缩至干,得标题化合物(17 mg)。

步骤 25: *N*-((4*S*,12*S*)-12-苄基-4-环丙基-1-((*S*)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10*H*-[1,3]二噁戊环并[4,5-*g*]吡喃并[3',4':6,7]吡嗪并[1,2-*b*]喹啉-14-基-2,2-*d*₂)-3,8,11,14,17-五氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16-五氮杂十八烷-18-基)-6-(2-甲磺酰基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)己酰胺(a-L1-1)的合成

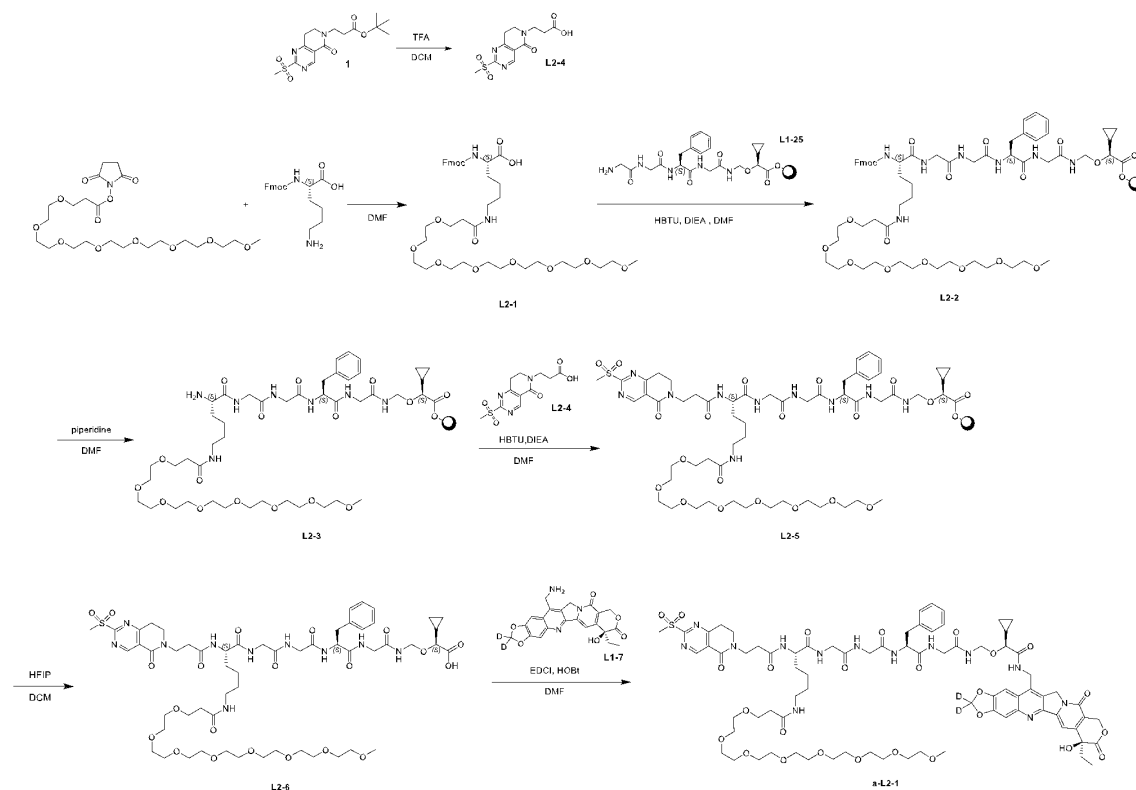
将中间体 L1-28(17 mg),中间体 L1-7(10.06 mg),1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(8.28 mg),吡啶(5.13 mg)和 1-羟基苯并三唑(5.84 mg)溶解于 DMF(0.7 mL),氮气置换 3 次,反应液在 25 °C 氮气保护下,搅拌反应 1 h。反应结束后,反应液直接经高效液相色谱法纯化(柱子: Welch Xtimate C18 150*25mm*5 μ m;流动相: [A: 水(0.225%甲酸), B: 乙腈]; B%: 25%-55%, 11min)得标题化合物(2.1 mg)。

¹H NMR(400MHz, DMSO-*d*₆) δ = 9.22(s, 1H), 8.67(t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 8.60(t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 8.30(t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.17-8.05(m, 2H), 8.05-7.97(m, 1H), 7.80(s, 1H), 7.52(s, 1H), 7.29-7.20(m, 5H), 7.18-7.16(m, 1H), 6.54-6.46(m, 1H), 5.44(d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 4.85-4.71(m, 2H), 4.68-4.66(m, 1H), 4.55-4.45(m, 1H), 4.42-4.39(m, 1H), 3.77-3.63(m, 7H), 3.62-3.53(m, 1H), 3.51-3.45(m, 3H), 3.43(s, 3H), 3.25(t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.05-3.03(m, 1H), 2.80-2.78(m, 1H), 2.13(t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.94-1.79(m, 2H), 1.61-1.46(m, 4H), 1.33-1.21(m, 2H), 1.01-0.92(m, 1H), 0.87(t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.43-0.26(m, 4H)

MS m/z (ESI): 1192.6 $[M+H]^+$ 。

实施例 23: *N*-((4*S*,12*S*,21*S*)-12-苄基-4-环丙基-1-((*S*)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10*H*-[1,3]二噁戊环并[4,5-*g*]吡喃并[3',4':6,7]吡嗪并[1,2-*b*]喹啉-14-基-2,2-*d*₂)-21-(3-(2-(甲磺酰

基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-3,8,11,14,17,20-六氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16,19-六氮杂二十五烷-25-基)-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂二十六烷-26-酰胺(a-L2-1)



步骤 1: (S)-32-(((9*H*-苄-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-26-氧代-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂-27-氮杂三十三烷-33-酸(中间体 L2-1)的合成

将 2,5-二氧代吡咯烷-1-基 2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂二十六烷-26 酸酯(4.5 g)溶于 DMF(70 mL)中, 加入(((9*H*-苄-9-基)甲氧基)羰基)-*L*-赖氨酸(3.25 g)。反应液在 25 °C 搅拌 16 h。反应结束后, 向反应液加入水(300 mL), 使用乙酸乙酯萃取(50 mL*3 次), 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥。过滤后, 有机相经减压浓缩除去溶剂, 残留物经快速硅胶柱纯化(ISCO®; 40 g SepaFlash® Silica Flash 色谱柱, 梯度 0-4% 甲醇/二氯甲烷 @60 mL/分钟)得标题化合物(4.1 g)

MS *m/z*(ESI): 763.3 [M+H]⁺。

步骤 2: 树脂负载的(32*S*,41*S*,49*S*)-32-(((9*H*-苄-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-41-苄基-49-环丙基-26,33,36,39,42,45-六氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,48-九氧杂-27,34,37,40,43,46-六氮杂五十烷-50-酸(中间体 L2-2)的合成

将中间体 **L1-25**(1.5 g)溶于 DMF(15 mL)中, 依次加入中间体 **L2-1**(2.02 g)和 *O*-苄基三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐(1.01 g), 二异丙基乙基胺(771.05 mg)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后, 树脂用甲醇(20 mL)和二氯甲烷(20 mL)依次洗, 重复 3 次后树脂抽滤至干, 并在真空下干燥后得标题化合物(1.67 g)。

MS *m/z*(ESI): 1230.5 [M+Na]⁺

步骤 3: 树脂负载的(32*S*,41*S*,49*S*)-32-氨基-41-苄基-49-环丙基-26,33,36,39,42,45-六氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,48-九氧杂-27,34,37,40,43,46-六氮杂五十烷-50-酸(中间体 L2-3)的合成

将中间体 **L2-2**(1.67 g)溶于 DMF(10 mL)中, 加入哌啶(2.5 mL)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后, 树脂用甲醇(20 mL)和二氯甲烷(20 mL)依次洗, 重复 3 次后树脂抽滤至干, 并在真空下干燥后得标题化合物(1.5 g)。

MS *m/z*(ESI): 986.5 [M+H]⁺。

步骤 4: 3-(2-(甲磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)-丙酸(中间体 L2-4)的合成

在氮气气氛下,将化合物 1(400 mg)溶于 20 mL 无水二氯甲烷中并冷却至-78 °C。在该温度下加入 5 mL 三氟乙酸,将混合物缓慢自然升温至室温。之后以氮气气流除去溶剂,残留物中加入 5 mL 无水乙腈,过滤,滤饼以 1:1 石油醚与乙酸乙酯的混合物洗涤,得标题化合物(220 mg)。

步骤 5: 树脂负载的(3*S*,4*S*,4*S*)-41-苄基-49-环丙基-32-(3-(2-(甲磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-26,33,36,39,42,45-六氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,48-九氧杂-27,34,37,40,43,46-六氮杂五十烷-50-酸(中间体 L2-5)的合成

将中间体 L2-3(300 mg)溶于 DMF(5 mL)中,依次加入中间体 L2-4(93.52 mg)和 *O*-苄并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐(119.29 mg),二异丙基乙基胺(91.09 mg)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后,树脂用甲醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)依次洗,重复 3 次后树脂抽滤至干,并在真空下干燥后得标题化合物(325 mg)。

步骤 6: (3*S*,4*S*,4*S*)-41-苄基-49-环丙基-32-(3-(2-(甲磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-26,33,36,39,42,45-六氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,48-九氧杂-27,34,37,40,43,46-六氮杂五十烷-50-酸(中间体 L2-6)的合成

将中间体 L2-5(325 mg)加入混合溶剂二氯甲烷(10 mL)和 1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇(2.5 mL)中,在 25 °C 摇晃 0.5 h。反应结束后,过滤反应液去除树脂,滤液减压浓缩至干,得标题化合物(75 mg)。

MS *m/z*(ESI): 562.0 [(M+H⁺)/2]⁺。

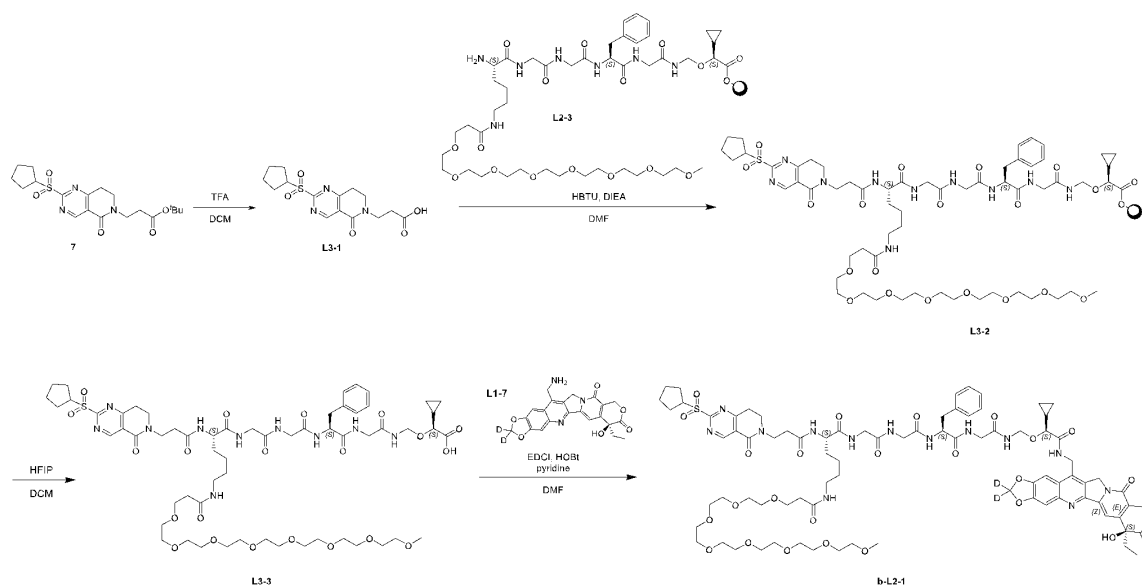
步骤 7: *N*-((4*S*,12*S*,21*S*)-12-苄基-4-环丙基-1-((*S*)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10*H*-[1,3]二噁戊环并[4,5-*g*]吡喃并[3',4':6,7]吡嗪并[1,2-*b*]喹啉-14-基-2,2-*d*₂)-21-(3-(2-(甲磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-3,8,11,14,17,20-六氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16,19-六氮杂二十五烷-25-基)-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂二十六烷-26-酰胺(a-L2-1)的合成

将中间体 L2-6(70 mg),中间体 L1-7(28.06 mg),1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(21.18 mg),1-羟基苄并三唑(14.93 mg)和吡啶(13.11 mg)溶解于 DMF(0.5 mL),氮气置换 3 次,反应液在 25 °C 氮气保护下,搅拌反应 1 h。反应结束后,反应液直接经高效液相色谱法纯化(柱子: C18 100×10mm; 流动相: [A: 水(三氟乙酸), B: 乙腈]; B%: 16%-46%, 8 min)得标题化合物(4.4 mg)。

¹H NMR(400MHz, DMSO-*d*₆)δ = 9.22(s, 1H), 8.67(t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.60(t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 8.32(s, 1H), 8.26-8.16(m, 2H), 8.11(d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.97(t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.83-7.74(m, 2H), 7.54-7.49(m, 1H), 7.28-7.20(m, 5H), 7.19-7.14(m, 1H), 7.12(s, 1H), 6.50(s, 1H), 5.43(d, *J* = 5.3 Hz, 4H), 4.84-4.62(m, 3H), 4.55-4.47(m, 1H), 4.42-4.39(m, 1H), 4.26-4.13(m, 1H), 3.78-3.61(m, 10H), 3.57(t, *J* = 6.6 Hz, 3H), 3.53-3.45(m, 23H), 3.45-3.40(m, 6H), 3.24(s, 4H), 3.14-3.01(m, 3H), 2.96(d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.84-2.74(m, 1H), 2.28(t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.95-1.80(m, 2H), 1.62(s, 1H), 1.48(d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 1.33(s, 2H), 1.24(s, 1H), 1.18(t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.02-0.93(m, 1H), 0.88(t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.41-0.29(m, 4H)

MS *m/z*(ESI): 837.4 [(M+2H)/2]⁺。

实施例 24、*N*-((4*S*,12*S*,21*S*)-12-苄基-21-(3-(2-(环戊磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-4-环丙基-1-((*S*)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10*H*-[1,3]二噁戊环并[4,5-*g*]吡喃并[3',4':6,7]吡嗪并[1,2-*b*]喹啉-14-基-2,2-*d*₂)-3,8,11,14,17,20-六氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16,19-六氮杂二十五烷-25-基)-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂二十六烷-26-酰胺(b-L2-1)



步骤 1: 3-(2-环戊磺酰基-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-6(5H)-基)丙酸(中间体 L3-1)的合成

在 0°C 下, 向化合物 7(135 mg)与 DCM(10 mL)的混合物中加入三氟乙酸(2 mL), 所得混合物升至室温反应 2 h。之后减压除去溶剂, 混合物经柱层析分离(EA/PE, 0 – 100%)得标题化合物(80 mg)。。

LC-MS: m/z(ESI): 354.4 [M+H]⁺。

步骤 2: 树脂负载的(32S,41S,49S)-41-苄基-32-(3-(2-(环戊磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-6(5H)-基)丙酰氨基)-49-环丙基-26,33,36,39,42,45-六氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,48-九氧杂-27,34,37,40,43,46-六氮杂五十烷-50-酸(中间体 L3-2)的合成

将中间体 L2-3(200 mg)溶于 DMF(5 mL)中, 依次加入中间体 L3-1(73.62 mg)和 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐(79.53 mg), 二异丙基乙基胺(60.73 mg)。。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后, 树脂用甲醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)依次洗, 重复 3 次后树脂抽滤至干, 并在真空下干燥后得标题化合物(285 mg)。

MS m/z(ESI): 1344.7 [M+Na]⁺。

步骤 3: (32S,41S,49S)-41-苄基-32-(3-(2-(环戊磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-6(5H)-基)丙酰氨基)-49-环丙基-26,33,36,39,42,45-六氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,48-九氧杂-27,34,37,40,43,46-六氮杂五十烷-50-酸(中间体 L3-3)的合成

将中间体 L3-2(200 mg)加入混合溶剂二氯甲烷(10 mL)和 1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇(2.5 mL)中, 在 25 °C 摇晃 0.5 h。反应结束后, 过滤反应液去除树脂, 滤液减压浓缩至干, 得标题化合物(55 mg)。

MS m/z(ESI): 1344.7 [M+Na]⁺。

步骤 4: N-((4S,12S,21S)-12-苄基-21-(3-(2-(环戊磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-6(5H)-基)丙酰氨基)-4-环丙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二噁戊环并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]呋喃并[1,2-b]喹啉-14-基-2,2-d₂)-3,8,11,14,17,20-六氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16,19-六氮杂二十五烷-25-基)-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂二十六烷-26-酰胺(b-L2-1)的合成

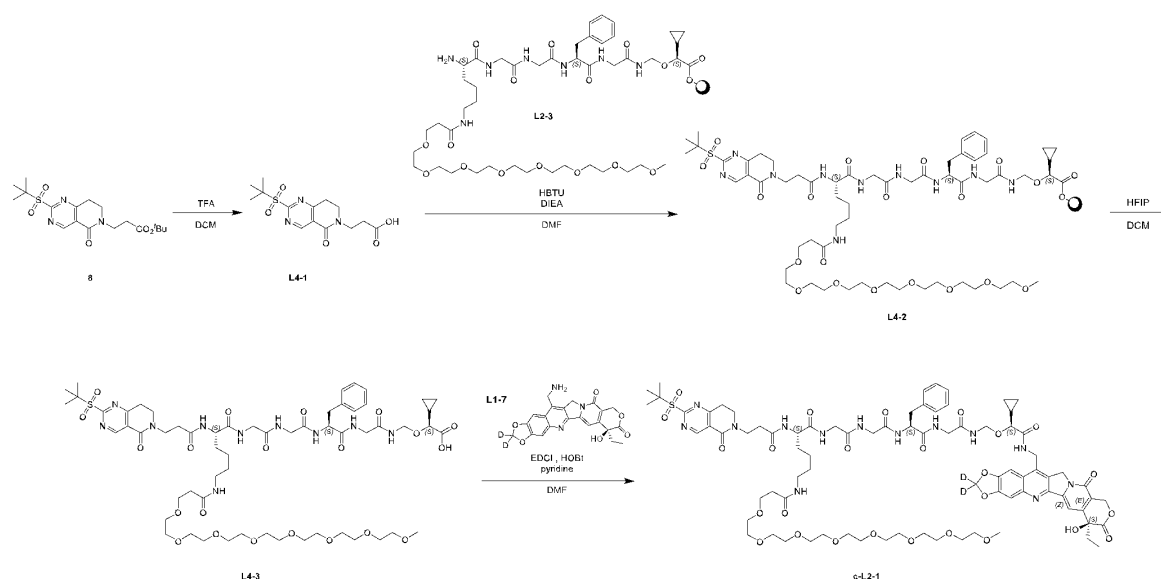
将中间体 L3-3(55 mg), 中间体 L1-7(21.15 mg), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(15.96 mg), 1-羟基苯并三唑(11.25 mg)和吡啶(9.88 mg)溶解于 DMF(0.5 mL), 氮气置换 3 次, 反应液在 25 °C 氮气保护下, 搅拌反应 1 h。反应结束后, 反应液直接经高效液相色谱法纯化(柱子: C18 150×30mm×5μm; 流动相: [A: 水(三氟乙酸), B: 乙腈]; B%: 27%-67%, 11 min)得标题化合物(6.45 mg)。

¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆)δ = 9.23(s, 1H), 8.70-8.64(m, 1H), 8.63-8.55(m, 1H), 8.36-8.28(m, 1H), 8.26-8.15(m, 2H), 8.14-8.08(m, 1H), 8.00-7.94(m, 1H), 7.82-7.74(m, 2H), 7.54-7.48(m, 1H), 7.27-7.21(m, 6H), 7.19-7.13(m, 1H), 6.51-6.47(m, 1H), 5.48-5.39(m, 4H), 4.84-4.72(m, 2H), 4.71-4.64(m, 1H), 4.55-4.49(m, 1H), 4.41-

4.39(m, 1H), 4.27-4.16(m, 2H), 3.76-3.63(m, 11H), 3.57(t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.51-3.47(m, 26H), 3.43(d, $J = 5.3$ Hz, 3H), 3.24(s, 3H), 3.22-3.17(m, 1H), 3.07-2.96(m, 3H), 2.84-2.76(m, 1H), 2.31-2.26(m, 2H), 2.01-1.84(m, 6H), 1.71-1.59(m, 5H), 1.53-1.44(m, 1H), 1.38-1.21(m, 4H), 1.01-0.94(m, 1H), 0.88(t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 0.39-0.32(m, 4H)

MS m/z (ESI): 864.0 $[(M+2H)/2]^+$ 。

实施例 25、*N*-((4*S*,12*S*,21*S*)-12-苄基-21-(3-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-4-环丙基-1-((*S*)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10*H*-[1,3]二噁戊环并[4,5-*g*]吡喃并[3',4':6,7]吡嗪并[1,2-*b*]喹啉-14-基-2,2-*d*₂)-3,8,11,14,17,20-六氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16,19-六氮杂二十五烷-25-基)-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂二十六烷-26-酰胺(c-L2-1)



步骤 1: 3-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酸(中间体 L4-1)的合成

在氮气气氛下,将化合物 8(200 mg)溶于无水二氯甲烷(10 mL)中并冷却至-78 °C,在该温度下加入三氟乙酸(2.5 mL),将混合物缓慢升温至室温搅拌 2 h。反应结束后,以氮气流除去溶剂,残留物以 5: 1 石油醚与乙酸乙酯的混合物洗涤,过滤得标题化合物(150 mg)。

MS m/z (ESI): 342.1 $[M+H]^+$ 。

步骤 2: 树脂负载的(32*S*,41*S*,49*S*)-41-苄基-32-(3-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-49-环丙基-26,33,36,39,42,45-六氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,48-九氧杂-27,34,37,40,43,46-六氮杂五十烷-50-酸(中间体 L4-2)的合成

将中间体 L2-3(300 mg)溶于 DMF(5 mL)中,依次加入中间体 L4-1(106.67 mg)和 *O*-苄并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐(178.20 mg),二异丙基乙基胺(91.09 mg)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后,树脂用甲醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)依次洗,重复 3 次后树脂抽滤至干,并在真空下干燥后得标题化合物(300 mg)。

MS m/z (ESI): 583.0 $[(M+H)/2]^+$ 。

步骤 3: (32*S*,41*S*,49*S*)-41-苄基-32-(3-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-49-环丙基-26,33,36,39,42,45-六氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,48-九氧杂-27,34,37,40,43,46-六氮杂五十烷-50-酸(中间体 L4-3)的合成

将中间体 L4-2(300 mg)加入混合溶剂二氯甲烷(10 mL)和 1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇(2.5 mL)中,在 25 °C 摇晃 0.5 h。反应结束后,过滤反应液去除树脂,滤液减压浓缩至干,粗品用冻干机冻干得标题化合物(80 mg)。

MS m/z (ESI): 583.0 $[(M+H)/2]^+$ 。

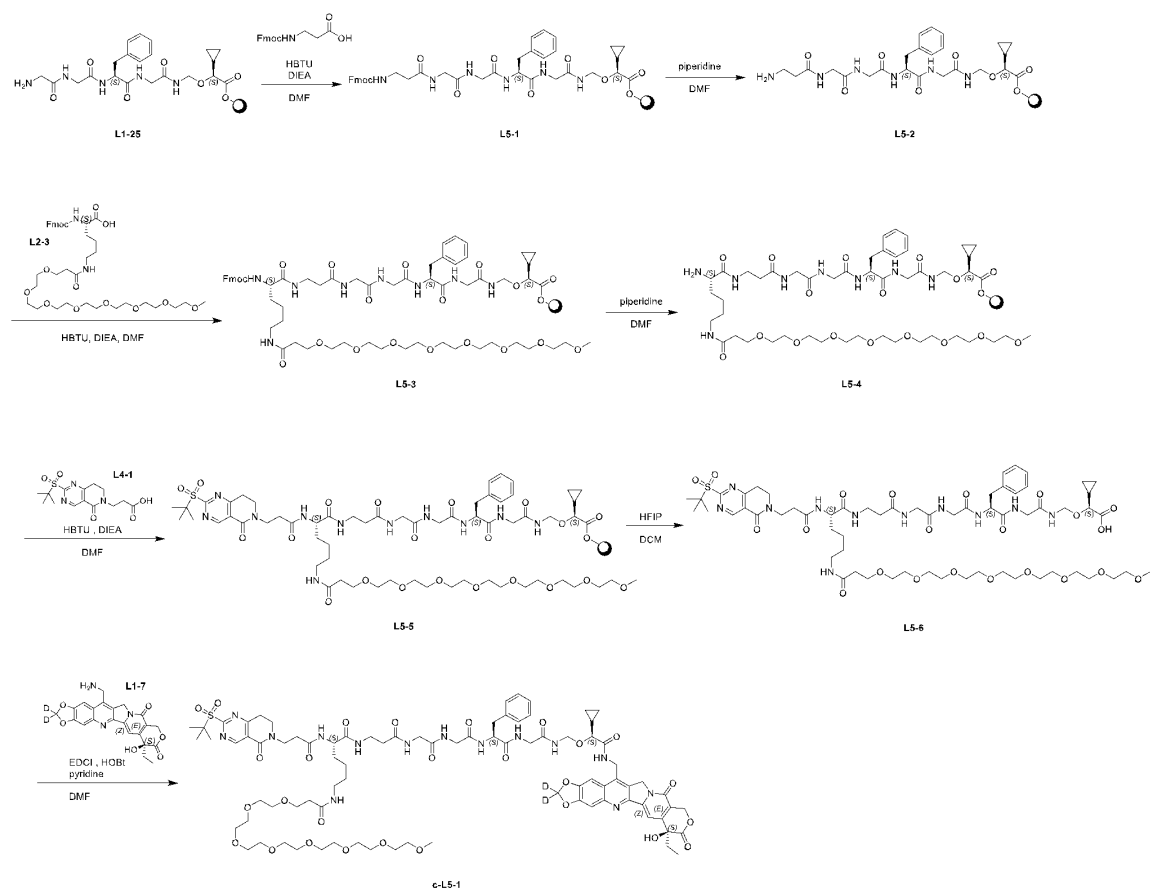
步骤4: *N*-((4*S*,12*S*,21*S*)-12-苄基-21-(3-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-4-环丙基-1-((*S*)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10*H*-[1,3]二噁戊环并[4,5-*g*]吡喃并[3',4':6,7]呋喃并[1,2-*b*]喹啉-14-基-2,2-*d*₂)-3,8,11,14,17,20-六氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16,19-六氮杂二十五烷-25-基)-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂二十六烷-26-酰胺(c-L2-1)的合成

将中间体 L4-3(70 mg), 中间体 L1-7(24.57 mg), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(20.5 mg), 1-羟基苯并三唑(14.44 mg)和吡啶(12.68 mg)溶解于 DMF(0.5 mL), 氮气置换 3 次, 反应液在 25 °C 氮气保护下, 搅拌反应 1 h。反应结束后, 反应液直接经高效液相色谱法纯化(柱子: C18 100×10mm; 流动相: [A: 水(三氟乙酸), B: 乙腈]; B%: 18%-48%, 8 min)得标题化合物(6.3 mg)。

¹H NMR(400MHz, DMSO-*d*₆)δ = 9.25(s, 1H), 8.69-8.64(m, 1H), 8.60(t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.32(t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.25-8.16(m, 1H), 8.11(d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.96(t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.82-7.75(m, 1H), 7.52(s, 1H), 7.29-7.19(m, 5H), 7.19-7.12(m, 1H), 6.50(s, 1H), 5.44(d, *J* = 8.8 Hz, 4H), 4.86-4.71(m, 2H), 4.71-4.63(m, 1H), 4.55-4.47(m, 1H), 4.41-4.39(m, 1H), 4.22-4.15(m, 1H), 3.81-3.60(m, 9H), 3.57(t, *J* = 6.6 Hz, 3H), 3.53-3.44(m, 24H), 3.43-3.40(m, 12H), 3.24-3.20(m, 4H), 3.08-3.08(m, 1H), 3.08-2.94(m, 2H), 2.79-2.77(m, 1H), 2.28(t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.93-1.79(m, 2H), 1.62(s, 1H), 1.48(d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 1.37(s, 9H), 1.24(s, 2H), 1.02-0.93(m, 1H), 0.88(t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.40-0.28(m, 4H)

MS *m/z*(ESI): 858.4 [(M+2H)/2]⁺。

实施例 26、*N*-((4*S*,12*S*,25*S*)-12-苄基-25-(3-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-4-环丙基-1-((*S*)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10*H*-[1,3]二噁戊环并[4,5-*g*]吡喃并[3',4':6,7]呋喃并[1,2-*b*]喹啉-14-基-2,2-*d*₂)-3,8,11,14,17,20,24-七氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16,19,23-七氮杂二十九烷-29-基)-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂二十六烷-26-酰胺(c-L5-1)



步骤 1: 树脂负载的(15*S*,23*S*)-15-苄基-23-环丙基-1-(9*H*-苄-9-基)-3,7,10,13,16,19-六氧代-2,22-二氧杂-4,8,11,14,17,20-六氮杂二十四烷-24-酸(中间体 L5-1)的合成

将 3-(9*H*-苄-9-基)甲氧基)羰基)氨基)丙酸(274.48 mg)溶于 DMF(5 mL)中,依次加入 L1-25(底物加树脂总重 500 mg,含量约 0.22 mmol)和 *O*-苄并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐(336.58 mg),二异丙基乙基胺(257.02 mg)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后,树脂用甲醇(15 mL)和二氯甲烷(15 mL)依次洗,重复 3 次后树脂抽滤至干,并在真空下干燥后得标题化合物(528.4 mg)。

MS *m/z*(ESI): 779.5([M+Na])⁺。

步骤 2: 树脂负载的(2*S*,10*S*)-20-氨基-10-苄基-2-环丙基-6,9,12,15,18-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14,17-五氮杂二十烷-1-羧酸(中间体 L5-2)的合成

将中间体 L5-1(528.4 mg)溶于 DMF(5 mL)和哌啶(42.97 mg)中。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后,树脂用甲醇(15 mL)和二氯甲烷(15 mL)依次洗,重复 3 次后树脂抽滤至干,并在真空下干燥后得标题化合物(480.6 mg)。

MS *m/z*(ESI): 535.1([M+H])⁺。

步骤 3: 树脂负载的(32*S*,45*S*,53*S*)-32-((((9*H*-苄-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-45-苄基-53-环丙基-26,33,37,40,43,46,49-七氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,52-九氧杂-27,34,38,41,44,47,50-七氮杂五十四烷-54-羧酸(中间体 L5-3)的合成

将中间体 L2-3(590.82 mg)溶于 DMF(5 mL)中,依次加入化合物 L5-2(480.6 mg)和 *O*-苄并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐(295.66 mg),二异丙基乙基胺(225.77 mg)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后,树脂用甲醇(15 mL)和二氯甲烷(15 mL)依次洗,重复 3 次后树脂抽滤至干,并在真空下干燥后得标题化合物(502 mg)。

步骤 4: 树脂负载的(32*S*,45*S*,53*S*)-32-氨基-45-苄基-53-环丙基-26,33,37,40,43,46,49-七氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,52-九氧杂-27,34,38,41,44,47,50-七氮杂五十四烷-54-羧酸(中间体 L5-4)的合成

将中间体 L5-3(502 mg)溶于 DMF(5 mL)和哌啶(26.98 mg)中。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后,树脂用甲醇(15 mL)和二氯甲烷(15 mL)依次洗,重复 3 次后树脂抽滤至干,并在真空下干燥后得标题化合物(468.5 mg)。

步骤 5: 树脂负载的甲基(32*S*,45*S*,53*S*)-45-苄基-32-(3-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-53-环丙基-26,33,37,40,43,46,49-七氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,52-九氧杂-27,34,38,41,44,47,50-七氮杂五十四烷-54-羧酸(中间体 L5-5)的合成

将中间体 L5-4(220.0 mg)溶于 DMF(5 mL)中,依次加入中间体 L4-1(74.10 mg)和 *O*-苄并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐(82.87 mg),二异丙基乙基胺(63.28 mg)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后,树脂用甲醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)依次洗,重复 3 次后树脂抽滤至干,并在真空下干燥后得标题化合物(220 mg)。

MS *m/z*(ESI): 713.0([M+Na])⁺。

步骤 6: (32*S*,45*S*,53*S*)-45-苄基-32-(3-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-53-环丙基-26,33,37,40,43,46,49-七氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,52-九氧杂-27,34,38,41,44,47,50-七氮杂五十四烷-54-羧酸(中间体 L5-6)的合成

将中间体 L5-5(220.00 mg)加入混合溶剂二氯甲烷(16 mL)和 1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇(4 mL)中,在 25 °C 摇晃 15 分钟。反应结束后,过滤反应液去除树脂,滤液减压浓缩至干,得标题化合物(30 mg)。

MS *m/z*(ESI): 691.0 [(M+2H)/2]⁺。

步骤 7: *N*-((4*S*,12*S*,25*S*)-12-苄基-25-(3-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-4-环丙基-1-((*S*)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10*H*-[1,3]二噁戊环并[4,5-*g*]吡喃并[3',4':6,7]吡嗪并[1,2-*b*]喹啉-14-基-2,2-*d*₂)-3,8,11,14,17,20,24-七氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16,19,23-七氮杂二十九烷-29-基)-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂二十六烷-26-酰胺(c-L5-1)的合成

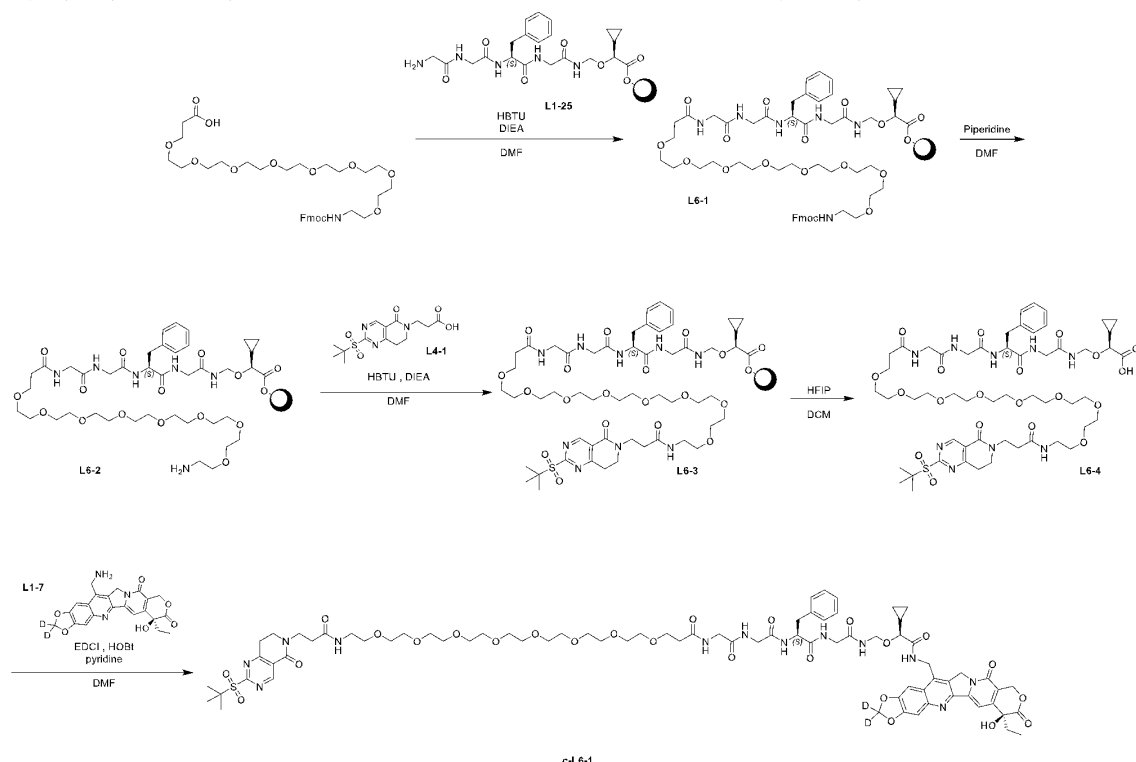
将中间体 L5-5(30 mg), 中间体 L1-7(17.49 mg), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(8.33 mg), 1-羟基苄并三唑(5.87 mg)和吡啶(5.16 mg)溶解于 DMF(0.5 mL), 氮气置换 3 次, 反应液在 25 °C 氮气保护

下, 搅拌反应 1 h。反应结束后, 反应液直接经高效液相色谱法纯化(柱子: C18 150×30mm×5μm; 流动相: [A: 水(0.225%甲酸), B: 乙腈]; B%: 25%-55%, 11 min)得标题化合物(7.1 mg)。

MS m/z (ESI): 893.7 [(M+2H)/2]⁺。

¹H NMR(400MHz, DMSO-*d*₆)δ= 9.25(s, 1H), 8.67(s, 1H), 8.63-8.57(m, 1H), 8.30(s, 1H), 8.22-8.09(m, 2H), 8.03(s, 1H), 7.96(s, 1H), 7.83-7.75(m, 2H), 7.52(s, 1H), 7.28-7.19(m, 5H), 7.17(d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 6.50(s, 1H), 5.44(d, *J* = 9.0 Hz, 4H), 4.85-4.71(m, 2H), 4.68-4.66(m, 1H), 4.51(s, 1H), 4.41-4.39(m, 1H), 4.18-4.09(m, 1H), 4.06(s, 1H), 3.77-3.65(m, 12H), 3.61-3.55(m, 9H), 3.51-3.49(m, 22H), 3.24(s, 5H), 3.04(d, *J* = 9.8 Hz, 1H), 2.97(d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.79-2.77(m, 1H), 2.32-2.24(m, 3H), 1.93-1.80(m, 2H), 1.56(s, 2H), 1.45(d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 1.37(s, 9H), 1.34-1.28(m, 2H), 1.22(d, *J* = 15.6 Hz, 3H), 0.96(d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 0.87(t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.40-0.30(m, 4H)

实施例 27、*N*-((4*S*,12*S*)-12-苄基-4-环丙基-1-((*S*)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10*H*-[1,3]二噁环戊并[4,5-*g*]吡喃并[3',4':6,7]喹啉并[1,2-*b*]喹啉-14-基-2,2-*d*₂)-3,8,11,14,17-五氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16-五氮杂十八烷-18-基)-1-(3-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂二十七烷-27-酰胺(c-L6-1)



步骤 1: 树脂负载的(39*S*,47*S*)-39-苄基-47-环丙基-1-(9*H*-苄-9-基)-3,31,34,37,40,43-六氧代-2,7,10,13,16,19,22,25,28,46-十氧杂-4,32,35,38,41,44-六氮杂四十八烷-48-酸(中间体 L6-1)的合成

将 1-(9*H*-苄-9-基)-3-氧代-2,7,10,13,16,19,22,25,28-九氧杂-4-氮杂三十一烷-31-羧酸(468.16 mg)溶于 DMF(5 mL)中, 依次加入中间体 L1-25(400.0 mg)和 *O*-苄并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐(269.26 mg), 二异丙基乙基胺(205.61 mg)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后, 树脂用甲醇(15 mL)和二氯甲烷(15 mL)依次洗, 重复 3 次后树脂抽滤至干, 并在真空下干燥后得标题化合物(450 mg)。

MS m/z (ESI): 1109.4[(M+H)]⁺。

步骤 2: 树脂负载的(2*S*,10*S*)-44-氨基-10-苄基-2-环丙基-6,9,12,15,18-五氧代-3,21,24,27,30,33,36,39,42-九氧杂-5,8,11,14,17-五氮杂四十四烷酸(化合物 L6-2)的合成

将中间体 L6-1(440 mg)溶于 DMF(10 mL)和哌啶(2 mL)中。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后, 树脂用甲醇(15 mL)和二氯甲烷(15 mL)依次洗, 重复 3 次后树脂抽滤至干, 并在真空下干燥后得

标题化合物(365 mg)。

MS m/z (ESI): 887.5([M+H])⁺。

步骤 3: 树脂负载的(2*S*,10*S*)-10-苄基-48-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)-2-环丙基-6,9,12,15,18,46-六氧代-3,21,24,27,30,33,36,39,42-九氧杂-5,8,11,14,17,45-六氮杂四十八烷酸(中间体 L6-3)的合成

将中间体 L6-2(365.0 mg)溶于 DMF(5 mL)中, 依次加入中间体 L4-1(140.71 mg)和 *O*-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐(157.35 mg), 二异丙基乙基胺(120.16 mg)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后, 树脂用甲醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)依次洗, 重复 3 次后树脂抽滤至干, 并在真空下干燥后得标题化合物(285 mg)。

MS m/z (ESI): 1210.4([M+H])⁺。

步骤 4: (2*S*,10*S*)-10-苄基-48-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)-2-环丙基-6,9,12,15,18,46-六氧代-3,21,24,27,30,33,36,39,42-九氧杂-5,8,11,14,17,45-六氮杂四十八烷酸(中间体 L6-4)的合成

将中间体 L6-3(380.00 mg)加入混合溶剂二氯甲烷(8 mL)和 1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇(2 mL)中, 在 25 °C 摇晃 15 分钟。反应结束后, 过滤反应液去除树脂, 滤液减压浓缩至干, 得标题化合物(110 mg)。

MS m/z (ESI): 606.0 [(M+2H)/2]⁺。

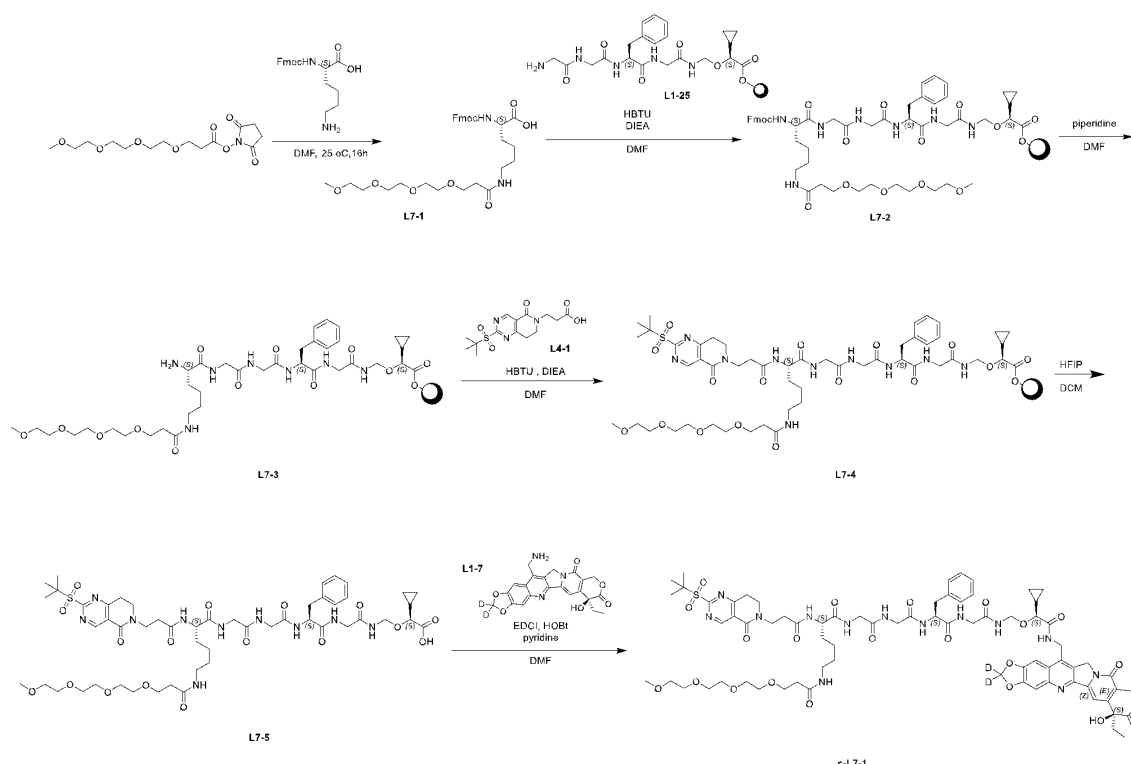
步骤 5: *N*-((4*S*,12*S*)-12-苄基-4-环丙基-1-((*S*)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10*H*-[1,3]二噁戊环并[4,5-*g*]吡喃并[3',4':6,7]呋喃并[1,2-*b*]喹啉-14-基-2,2-*d*₂)-3,8,11,14,17-五氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16-五氮杂十八烷-18-基)-1-(3-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂二十七烷-27-酰胺(c-L6-1)的合成

将中间体 L6-4(50 mg), 中间体 L1-7(17.49 mg), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(15.84 mg), 1-羟基苯并三唑(11.16 mg)和吡啶(9.80 mg)溶解于 DMF(0.5 mL), 氮气置换 3 次, 反应液在 25 °C 氮气保护下, 搅拌反应 1 h。反应结束后, 反应液直接经高效液相色谱法纯化(柱子: C18 150×30mm×5μm; 流动相: [A 相: 水(0.225%甲酸), B 相: 乙腈]; B%: 25%-55%, 9 min)得标题化合物(14.1 mg)。

MS m/z (ESI): 808.6 [(M+2H)/2]⁺。

¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆)δ= 9.26(s, 1H), 8.69-8.56(m, 2H), 8.32-8.25(m, 1H), 8.19-8.14(m, 1H), 8.13-8.04(m, 2H), 8.02-7.97(m, 1H), 7.80(s, 1H), 7.52(s, 1H), 7.28-7.21(m, 5H), 7.19-7.17(m, 1H), 6.50(s, 1H), 5.44(d, *J* = 8.3 Hz, 4H), 4.79(d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 4.68-4.66(m, 1H), 4.54-4.46(m, 1H), 4.41-4.39(m, 1H), 3.77-3.66(m, 10H), 3.62-3.57(m, 3H), 3.51-3.46(m, 30H), 3.22(d, *J* = 6.8 Hz, 4H), 3.09-3.01(m, 1H), 2.80-2.78(m, 1H), 2.46-2.37(m, 4H), 1.93-1.80(m, 2H), 1.37(s, 9H), 1.01-0.94(m, 1H), 0.88(t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.39-0.31(m, 4H)。

实施例 28: *N*-((4*S*,12*S*,21*S*)-12-苄基-21-(3-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-4-环丙基-1-((*S*)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-8,10,11,13-四氢-7*H*-代[1,3]二噁戊环并[4,5-*g*]吡喃并[3',4':6,7]呋喃并[1,2-*b*]喹啉-14-基-2,2-*d*₂)-3,8,11,14,17,20-六氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16,19-六氮杂二十五烷-25-基)-2,5,8,11-四氧杂十四烷-14-酰胺(c-L7-1)



步骤 1: (S)-20-(((9H-苄-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-14-氧代-2,5,8,11-四氧杂-15-氮杂二十一烷-21-酸(中间体 L7-1)的合成

将(((9H-苄-9-基)甲氧基)羰基)-L-赖氨酸(2.1 g)和 *O*-(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-2,5,8,11-四氧杂十四烷-14-酸酯(1.9 g)溶于 DMF(40 mL), 氮气置换 3 次, 反应在 25 °C 下搅拌 16 h。反应结束后, 粗品经混合物经柱层析分离(乙酸乙酯/石油醚, 0-80%)得标题化合物(2.3 g)。

MS m/z (ESI): 587.1 $[M+H]^+$ 。

步骤 2: 树脂负载的 (20S,29S,37S)-20-(((9H-苄-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-29-苄基-37-环丙基-14,21,24,27,30,33-六氧代-2,5,8,11,36-五氧杂-15,22,25,28,31,34-六氮杂三十八烷-38-酸(中间体 L7-2)的合成

将中间体 L7-1(517.24 mg)溶于 DMF(5 mL)中, 依次加入中间体 L1-25(负载底物加树脂总重 500 mg, 含量约 0.22 mmol)和 *O*-苄并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐(336.58 mg), 二异丙基乙基胺(257.02 mg)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后, 树脂用甲醇(15 mL)和二氯甲烷(15 mL)依次洗, 重复 3 次后树脂抽滤至干, 并在真空下干燥后得标题化合物(555 mg)。

MS m/z (ESI): 1032.3 $[M+H]^+$ 。

步骤 3: 树脂负载的 (20S,29S,37S)-20-氨基-29-苄基-37-环丙基-14,21,24,27,30,33-六氧代-2,5,8,11,36-五氧杂-15,22,25,28,31,34-六氮杂三十八烷-38-酸(中间体 L7-3)的合成

将中间体 L7-2(555 mg)溶于 DMF(5 mL)和哌啶(35.72 mg)中。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后, 树脂用甲醇(15 mL)和二氯甲烷(15 mL)依次洗, 重复 3 次后树脂抽滤至干, 并在真空下干燥后得标题化合物(428 mg)。

MS m/z (ESI): 810.2 $[M+H]^+$ 。

步骤 4: 树脂负载的 (20S,29S,37S)-29-苄基-20-(3-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5H)-基)丙酰氨基)-37-环丙基-14,21,24,27,30,33-六氧代-2,5,8,11,36-五氧杂-15,22,25,28,31,34-六氮杂三十八烷-38-酸(中间体 L7-4)的合成

将中间体 L7-3(428 mg)溶于 DMF(5 mL)中, 依次加入中间体 L4-1(176.55 mg)和 *O*-苄并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐(197.43 mg), 二异丙基乙基胺(150.76 mg)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后, 树脂用甲醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)依次洗, 重复 3 次后树脂抽滤至干, 并在真空下干燥后得标题

化合物(438 mg)。

MS m/z (ESI): 1155.3([M+Na])⁺。

步骤 5: (2*S*,2*S*,3*S*)-29-苄基-20-(3-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-37-环丙基-14,21,24,27,30,33-六氧代-2,5,8,11,36-五氧杂-15,22,25,28,31,34-六氮杂三十八烷-38-酸(中间体 L7-5)的合成

将中间体 L7-4(438 mg)加入混合溶剂二氯甲烷(8 mL)和 1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇(2 mL)中,在 25 °C 摇晃 15 分钟。反应结束后,过滤反应液去除树脂,滤液减压浓缩至干,得标题化合物(50 mg)。

MS m/z (ESI): 1155.3([M+Na])⁺。

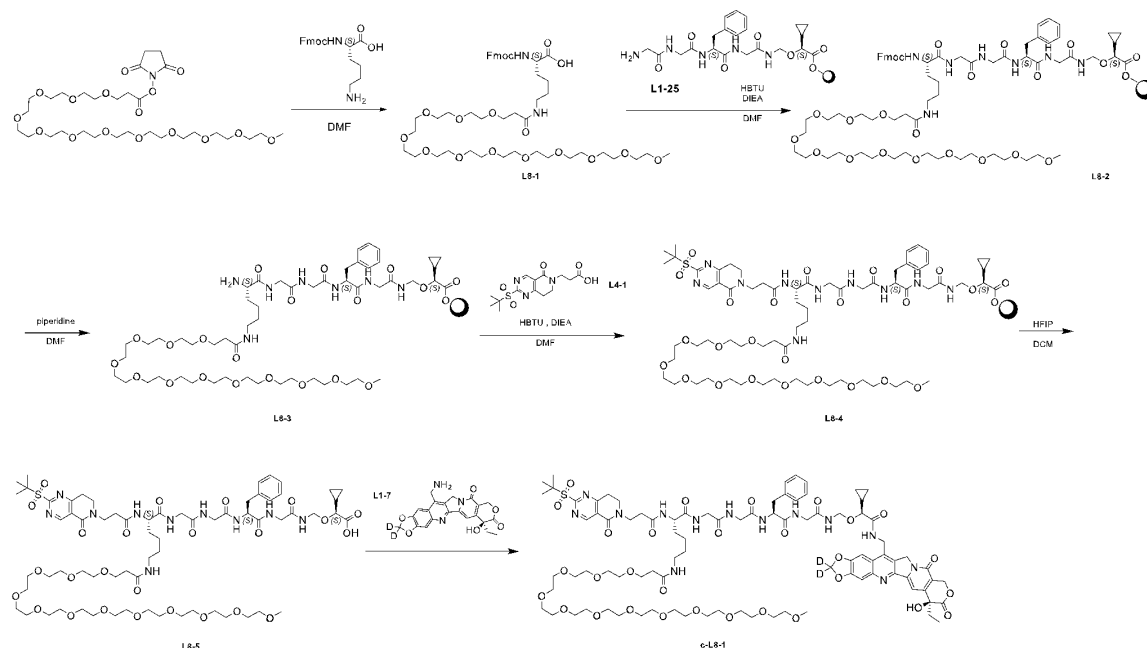
步骤 6: *N*-((4*S*,12*S*,21*S*)-12-苄基-21-(3-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-4-环丙基-1-((*S*)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-8,10,11,13-四氢-7*H*-代[1,3]二噁戊环并[4,5-*g*]吡喃并[3',4':6,7]呋喃并[1,2-*b*]喹啉-14-基-2,2-*d*₂)-3,8,11,14,17,20-六氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16,19-六氮杂二十五烷-25-基)-2,5,8,11-四氧杂十四烷-14-酰胺(c-L7-1)的合成

将中间体 L7-5(50 mg), 中间体 L1-7(18.68 mg), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(16.92 mg), 1-羟基苯并三唑(11.92 mg)和吡啶(10.47 mg)溶解于 DMF(1 mL), 氮气置换 3 次, 反应液在 25 °C 氮气保护下, 搅拌反应 1 h。反应结束后, 反应液直接经高效液相色谱法纯化(柱子: Boston Prime C18 100*10mm; 流动相: [A 相: 水(0.225%甲酸), B 相: 乙腈]; B%: 20%-42%, 15 min)得标题化合物(5.7 mg)。

MS m/z (ESI): 770.0 [(M+2H)/2]⁺。

¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 9.23(s, 1H), 8.76-8.64(m, 1H), 8.59(t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.31(t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.28-8.14(m, 2H), 8.14-8.04(m, 1H), 7.96(t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 7.86-7.69(m, 2H), 7.51(s, 1H), 7.28 - 7.19(m, 4H), 7.16(*J* = 2.6, 5.7 Hz, 1H), 6.63-6.51(m, 1H), 6.50(s, 1H), 5.43(d, *J* = 7.5 Hz, 3H), 4.90-4.57(m, 3H), 4.50(*J* = 5.1, 8.5 Hz, 1H), 4.39(*J* = 6.5, 9.9 Hz, 1H), 4.23-4.12(m, 1H), 3.81-3.44(m, 27H), 3.22(s, 3H), 3.08 - 2.91(m, 4H), 2.86-2.72(m, 2H), 2.27(t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.96-1.78(m, 2H), 1.67-1.56(m, 1H), 1.53-1.44(m, 1H), 1.43-1.27(m, 9H), 1.23(s, 3H), 0.99-0.91(m, 1H), 0.91-0.81(m, 3H), 0.43-0.26(m, 4H)

实施例 29: *N*-((4*S*,12*S*,21*S*)-12-苄基-21-(3-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-4-环丙基-1-((*S*)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10*H*-[1,3]二噁戊环并[4,5-*g*]吡喃并[3',4':6,7]呋喃并[1,2-*b*]喹啉-14-基-2,2-*d*₂)-3,8,11,14,17,20-六氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16,19-六氮杂二十五烷-25-基)-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-十二氧杂三十八烷-38-酰胺(c-L8-1)



步骤 1: (S)-44-(((9H-苄-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-38-氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-十二氧杂-39-氮杂四十五烷-45-酸(中间体 L8-1)的合成

将(((9H-苄-9-基)甲氧基)羰基)-L-赖氨酸(800 mg)和 O-(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-十二氧杂三十八烷酸酯(429 mg)溶于 DMF(4 mL), 氮气置换 3 次, 反应在 25 °C 下搅拌 16 h。反应结束后, 粗品经反相高效液相制备色谱纯化(ISCO®; 80 g C18 柱, 流动相梯度 0~50% 乙腈/水, 流速 40 mL/min)得标题化合物(650 mg)。

MS m/z(ESI): 940.0 [M+H]⁺。

步骤 2: 树脂负载的 (44S,53S,61S)-44-(((9H-苄-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-53-苄基-61-环丙基-38,45,48,51,54,57-六氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,60-十三氧杂-39,46,49,52,55,58-六氮杂六十二烷-62-酸(中间体 L8-2)的合成

将中间体 L8-1(650 mg)加入 DMF(10 mL)中, 再加入中间体 L1-25(400 mg), O-苄并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐(336.58 mg)和二异丙基乙基胺(205.62 mg)。反应液氮气置换 3 次后, 在 25 °C 摇床摇晃反应 1 h。反应结束后, 树脂用甲醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)依次洗, 重复 3 次后树脂抽滤至干, 并在真空下干燥后得标题化合物(430 mg)。

步骤 3: 树脂负载的 (44S,53S,61S)-44-氨基-53-苄基-61-环丙基-38,45,48,51,54,57-六氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,60-十三氧杂-39,46,49,52,55,58-六氮杂六十二烷-62-酸(中间体 L8-3)的合成

将中间体 L8-2(430 mg)溶于 DMF(5 mL)中, 加入哌啶(1.08 g, 1.25 mL)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后, 树脂用甲醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)依次洗, 重复 3 次后树脂抽滤至干, 并在真空下干燥后得标题化合物(410 mg)。

步骤 4: 树脂负载的 (44S,53S,61S)-53-苄基-44-(3-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-6(5H)-基)丙酰氨基)-61-环丙基-38,45,48,51,54,57-六氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,60-十三氧杂-39,46,49,52,55,58-六氮杂六十二烷-62-酸(中间体 L8-4)的合成

将中间体 L8-3(410 mg)和中间体 L4-1(144.48 mg)溶于 DMF(10 mL)中, 加入 O-苄并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐(214.89 mg)和二异丙基乙基胺(182.33 mg)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后, 树脂用甲醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)依次洗, 重复 3 次后树脂抽滤至干, 并在真空下干燥后得标题化合物(420 mg)。

步骤 5: (44S,53S,61S)-53-苄基-44-(3-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-6(5H)-基)丙酰氨基)-61-环丙基-38,45,48,51,54,57-六氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,60-十三氧杂-39,46,49,52,55,58-六氮杂六十二烷-62-酸(中间体 L8-5)的合成

将中间体 L8-4(420 mg)加入混合溶剂二氯甲烷(8 mL)和 1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇(2 mL)中, 在 25 °C 摇晃 0.5 h。反应结束后, 过滤反应液去除树脂, 滤液减压浓缩至干, 得标题化合物(130 mg)。

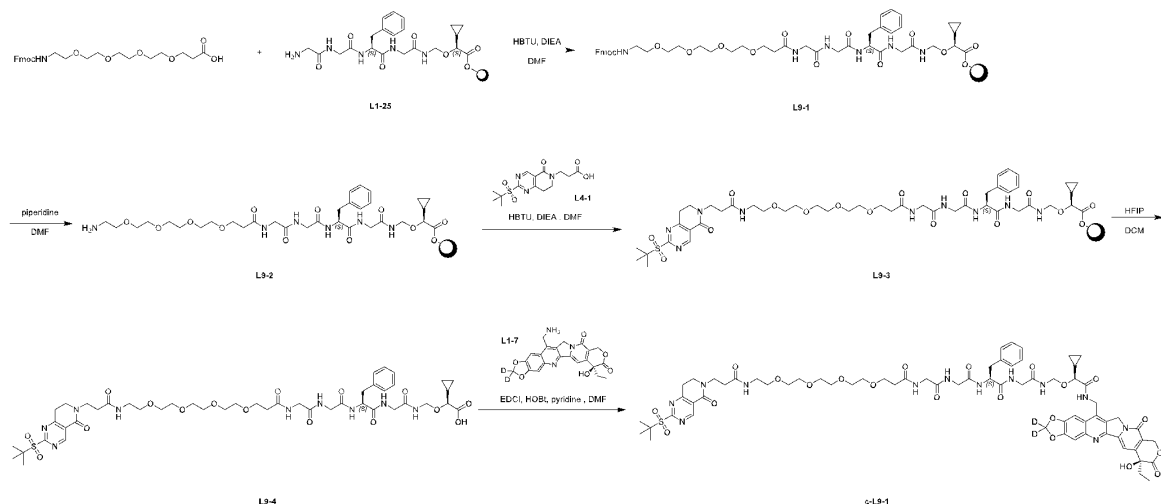
步骤 6: N-((4S,12S,21S)-12-苄基-21-(3-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-6(5H)-基)丙酰氨基)-4-环丙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二噁戊环并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡嗪并[1,2-b]喹啉-14-基-2,2-d₂)-3,8,11,14,17,20-六氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16,19-六氮杂二十五烷-25-基)-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-十二氧杂三十八烷-38-酰胺(c-L8-1)的合成

将中间体 L8-5(70 mg), 中间体 L1-7(21.94 mg), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(18.20 mg), 吡啶(11.26 mg)和 1-羟基苄并三唑(12.83 mg)溶解于 DMF(2 mL), 氮气置换 3 次, 反应液在 25 °C 氮气保护下, 搅拌反应 2 h。反应结束后, 反应液直接经高效液相色谱法纯化(柱子: C18 100*10mm; 流动相: [A 相: 水(0.225%甲酸), B 相: 乙腈]; B%: 28%-35%, 20min)得标题化合物(5.1 mg)。

¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆)δ = 9.27-9.23(m, 1H), 8.70(d, J = 5.3 Hz, 1H), 8.68-8.61(m, 1H), 8.40(s, 2H), 8.28-8.23(m, 1H), 8.22-8.13(m, 1H), 8.04-7.97(m, 1H), 7.84-7.76(m, 2H), 7.54-7.50(m, 1H), 7.26(s, 1H), 7.23-7.21(m, 4H), 7.19-7.12(m, 1H), 6.61-6.44(m, 1H), 5.46-5.40(m, 4H), 4.86-4.72(m, 2H), 4.71-4.63(m, 2H), 4.57-4.46(m, 2H), 4.46-4.35(m, 2H), 4.25-4.14(m, 2H), 3.82-3.55(m, 28H), 3.49-3.37(m, 22H), 3.28-3.18(m, 9H), 3.10-2.95(m, 5H), 2.85-2.74(m, 2H), 2.28(t, J = 6.5 Hz, 2H), 1.92-1.80(m, 2H), 1.66-1.59(m, 1H), 1.51-1.42(m, 1H), 1.42-1.30(m, 9H), 1.28-1.16(m, 2H), 1.00-0.95(m, 1H), 0.89-0.85(m, 3H), 0.38-0.32(m, 4H)

MS m/z(ESI): 946.5 [M/2+H]⁺。

实施例 30、*N*-((4*S*,12*S*)-12-苄基-4-环丙基-1-((*S*)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10*H*-[1,3]二噻戊环并[4,5-*g*]吡喃并[3',4':6,7]喹啉并[1,2-*b*]喹啉-14-基-2,2-*d*₂)-3,8,11,14,17-五氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16-五氮杂十八烷-18-基)-1-(3-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰肼(c-L9-1)



步骤1: 树脂负载的(27*S*,35*S*)-27-苄基-35-环丙基-1-(9*H*-芴-9-基)-3,19,22,25,28,31-六氧代-2,7,10,13,16,34-六氧杂-4,20,23,26,29,32-六氮杂三十六烷-36-酸(中间体 L9-1)的合成

在室温及氮气气氛下, 向 1-(9*H*-芴-9-基)-3-氧代-2,7,10,13,16-五氧杂-4-氮杂十九烷-19-羧酸(420 mg), 中间体 **L1-25**(负载的底物与树脂的总重 500 mg, 含量约 0.22 mmol), *N,N*-二异丙基乙胺(257 mg), 苯并三氮唑-*N,N,N,N*-四甲基脲六氟磷酸盐(497 mg)的混合物中加入 DMF(5 mL)。将所得混合物在 20 °C 下摇床摇晃 1 h。之后树脂用甲醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)依次洗, 重复 3 次后树脂抽滤至干, 并在真空下干燥后得标题化合物(550 mg)。

步骤 2: 树脂负载的(2*S*,10*S*)-32-氨基-10-苄基-2-环丙基-6,9,12,15,18-五氧代-3,21,24,27,30-五氧杂-5,8,11,14,17-五氮杂三十二烷酸(中间体 L9-2)的合成

在室温及氮气气氛下,向中间体 **L9-1**(550 mg)于 DMF(5 mL)的溶液中加入哌啶(500 μ L),将所得混合物在 20 $^{\circ}$ C 下摇床摇晃 1 h。之后树脂用甲醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)依次洗,重复 3 次后树脂抽滤至干,并在真空下干燥后得标题化合物(500 mg)。

LC-MS: m/z(ESI): 733.2 [M+Na]⁺。

步骤 3: 树脂负载的(2*S*,10*S*)-10-苄基-36-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)-2-环丙基-6,9,12,15,18,34-六氧代-3,21,24,27,30-五氧杂-5,8,11,14,17,33-六氮杂三十六烷酸(中间体 L9-3)的合成

在氮气气氛下, 中间体 **L9-2**(500 mg), 中间体 **L4-1**(187 mg), *N,N*-二异丙基乙胺(193 mg), 苯并三氮唑-*N,N,N,N*-四甲基脲六氟磷酸盐(253 mg)的混合物中加入 DMF(5 mL)。将所得混合物在 20 °C 下摇床摇晃 1 h。之后树脂用甲醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)依次洗, 重复 3 次后树脂抽滤至干, 并在真空下干燥后得标题化合物(500 mg)。

步骤 4: (2*S*,10*S*)-10-苄基-36-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)-2-环丙基-6,9,12,15,18,34-六氧代-3,21,24,27,30-五氧杂-5,8,11,14,17,33-六氮杂三十六烷酸(中间体 L9-4)的合成

在氮气气氛下, 中间体 **L9-3** (500 mg) 溶于二氯甲烷 (16 mL) 和 1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇 (4 mL)。将所得混合物在 20 °C 下摇床摇晃 1 h。之后过滤反应液去除树脂, 滤液减压浓缩至干, 加入乙腈 (4 mL) 和纯水 (8 mL) 冻干机冻干得标题化合物 (150 mg)。

步骤 5: *N*-((4*S*,12*S*)-12-苄基-4-环丙基-1-((*S*)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10*H*-[1,3]二噻戊环并[4,5-*g*]吡喃并[3',4':6,7]喹啉并[1,2-*b*]喹啉-14-基-2,2-*d*₂)-3,8,11,14,17-五氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16-五氮杂十八烷-18-基)-1-(3-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-3,6,9,12-四氧杂十

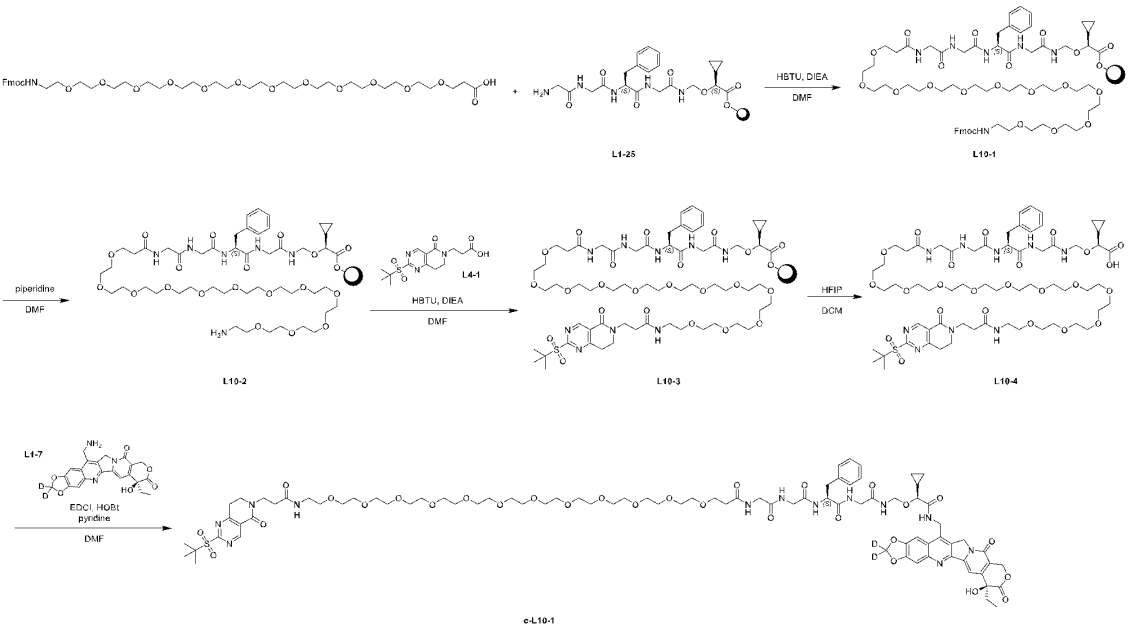
五烷-15-酰胺(c-L9-1)的合成

在氮气气氛下，中间体 L9-4(100 mg)中间体 L1-7(45.0 mg)，1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(37.1 mg)，1-羟基苯并三唑(26.1 mg)和吡啶(23.0 mg)的混合物中加入 DMF(2 mL)。将所得混合物在室温下搅拌 1 h。之后混合物反应液直接经高效液相色谱法纯化(柱子: C18 100×10mm; 流动相: [A: 水(0.225% 甲酸), B: 乙腈]; B%: 15%-40%, 18min)得标题化合物(10.6 mg)。

LC-MS: m/z(ESI): 1439.4 [M+H]⁺

¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆)δ 9.29-9.24(m, 1H), 8.60(t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 8.33-8.26(m, 1H), 8.21-8.13(m, 1H), 8.13-8.04(m, 2H), 8.00(t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.80(s, 1H), 7.52(s, 1H), 7.26-7.22(m, 5H), 7.19-7.14(m, 1H), 6.50(s, 1H), 5.44(d, *J* = 8.4 Hz, 4H), 4.83-4.72(m, 2H), 4.70-4.63(m, 1H), 4.55-4.47(m, 1H), 4.45-4.37(m, 1H), 3.77-3.67(m, 10H), 3.61-3.55(m, 3H), 3.50-3.45(m, 14H), 3.26-3.18(m, 4H), 3.05-3.03(m, 1H), 2.84-2.74(m, 1H), 2.46-2.35(m, 4H), 1.92-1.81(m, 2H), 1.41-1.33(m, 9H), 1.00-0.94(m, 1H), 0.90-0.86(m, 3H), 0.39-0.36(m, 2H), 0.34-0.30(m, 2H)。

实施例 31、*N*-((4*S*,12*S*)-12-苄基-4-环丙基-1-((*S*)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-[1,3]二噁戊环并[4,5-*g*]吡喃并[3',4':6,7]吡嗪并[1,2-*b*]喹啉-14-基-2,2-*d*₂)-3,8,11,14,17-五氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16-五氮杂十八烷-18-基)-1-(3-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-十二氧杂三十九烷-39-酰胺(c-L10-1)



步骤 1：(51*S*,59*S*)-51-苄基-59-环丙基-1-(9*H*-茛-9-基)-3,43,46,49,52,55-六氧代-2,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,58-十四氧杂-4,44,47,50,53,56-六氮杂六十烷酸(中间体 L10-1)的合成

将中间体 L1-25(负载底物加树脂总重 500 mg，含量约 0.22 mmol)溶于 DMF(5 mL)中，依次加入 1-(9*H*-茛-9-基)-3-氧代-2,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-十三氧杂-4-氮杂四十三烷酸(723.85 mg)和 *O*-苄并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐(336.58 mg)，二异丙基乙基胺(257.02 mg)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后，树脂用甲醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)依次洗，重复 3 次后树脂抽滤至干，并在真空下干燥后得标题化合物(500 mg)。

MS m/z(ESI): 1307.4 [M+Na]⁺。

步骤 2：树脂负载的 (2*S*,10*S*)-56-氨基-10-苄基-2-环丙基-6,9,12,15,18-五氧代-3,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54-十三氧杂-5,8,11,14,17-五氮杂五十六烷酸(中间体 L10-2)的

合成

将中间体 L10-1(500 mg)溶于 DMF(2 mL)中,加入哌啶(0.5 mL)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后,树脂用甲醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)依次洗,重复 3 次后树脂抽滤至干,并在真空下干燥后得标题化合物(470 mg)。

步骤 3: 树脂负载的(2*S*,10*S*)-10-苄基-60-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)-2-环丙基-6,9,12,15,18,58-六氧代-3,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54-十三氧杂-5,8,11,14,17,57-六氮杂六十烷酸(中间体 L10-3)的合成

将中间体 L10-2(470 mg)溶于 DMF(5 mL)中,依次加入中间体 L4-1(192.54 mg), *O*-苄并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐(176.25 mg)和二异丙基乙基胺(134.59 mg)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后,树脂用甲醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)依次洗,重复 3 次后树脂抽滤至干,并在真空下干燥后得标题化合物(460 mg)。

步骤 4: (2*S*,10*S*)-10-苄基-60-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)-2-环丙基-6,9,12,15,18,58-六氧代-3,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54-十三氧杂-5,8,11,14,17,57-六氮杂六十烷酸(中间体 L10-4)的合成

将中间体 L10-3(460 mg)加入混合溶剂二氯甲烷(4 mL)和 1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇(1 mL)中,在 25 °C 摇晃 0.5 h。反应结束后,过滤反应液去除树脂,滤液减压浓缩,冻干后得标题化合物(130 mg)。

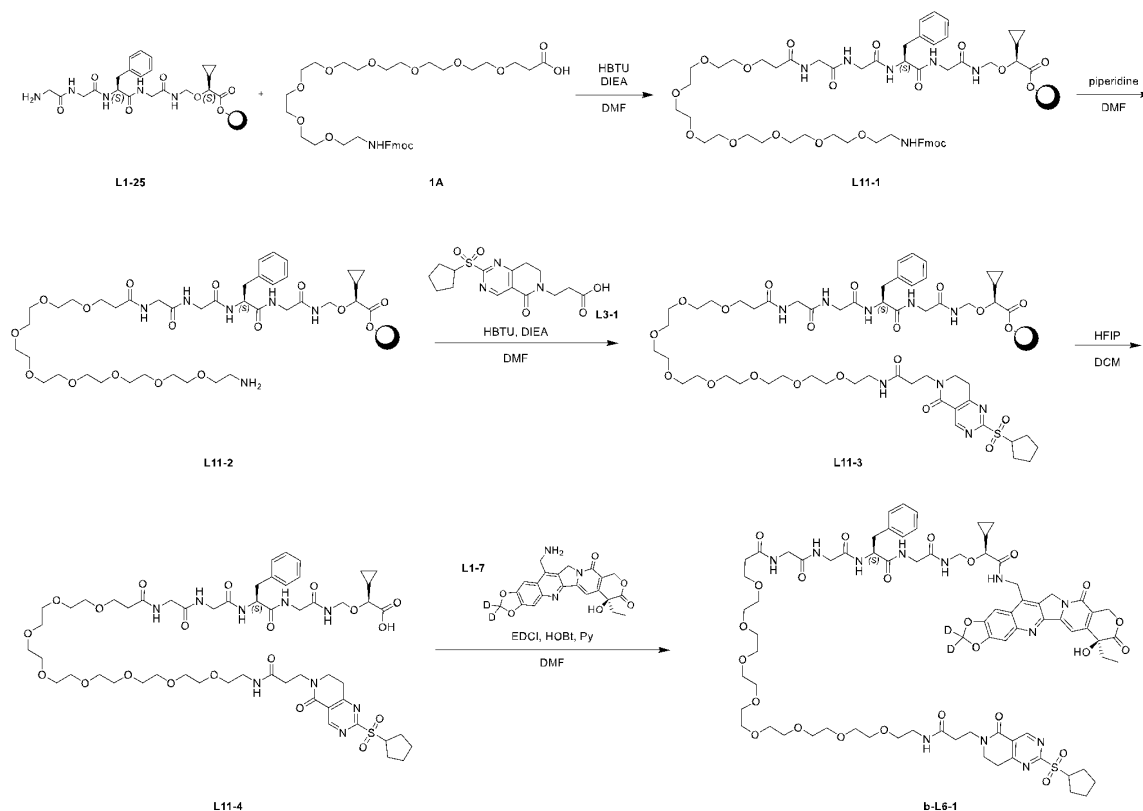
步骤 5: *N*-((4*S*,12*S*)-12-苄基-4-环丙基-1-((*S*)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-[1,3]二噁戊环并[4,5-*g*]吡喃并[3',4':6,7]咪唑并[1,2-*b*]喹啉-14-基-2,2-*d*₂)-3,8,11,14,17-五氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16-五氮杂十八烷-18-基)-1-(3-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-十二氧杂三十九烷-39-酰胺(c-L10-1)的合成

将中间体 L10-4(50 mg), 中间体 L1-7(16.80 mg), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(13.83 mg), 吡啶(8.56 mg)和 1-羟基苄并三唑(9.75 mg)溶解于 DMF(1 mL), 氮气置换 3 次, 反应液在 25 °C 氮气保护下, 搅拌反应 2 h。反应结束后, 反应液直接经高效液相色谱法纯化(柱子: Boston Prime100*10mm; 流动相: [A: 水(0.225%甲酸), B: 乙腈]; B%: 20%-42%, 15min)得标题化合物(3.3 mg)。

¹H NMR(400MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.25(s, 1H), 8.70-8.58(m, 2H), 8.34-8.26(m, 1H), 8.19-8.15(m, 1H), 8.15-8.04(m, 2H), 8.03-7.97(m, 1H), 7.79(s, 1H), 7.51(s, 1H), 7.27-7.21(m, 5H), 7.19-7.15(m, 1H), 6.82-6.73(m, 1H), 6.50(s, 1H), 5.50-5.37(m, 4H), 4.84-4.70(m, 2H), 4.67-4.65(m, 1H), 4.51-4.45(m, 1H), 4.42-4.36(m, 1H), 3.76-3.66(m, 10H), 3.59(s, 3H), 3.50-3.46(m, 45H), 3.24-3.17(m, 4H), 3.06-3.01(m, 1H), 2.82-2.75(m, 1H), 2.45-2.35(m, 4H), 1.92-1.80(m, 2H), 1.36(s, 9H), 0.93(s, 1H), 0.87(t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.38-0.30(m, 4H)。

MS *m/z*(ESI): 896.6 [*M*/2+*H*]⁺。

实施例 32: *N*-((4*S*,12*S*)-12-苄基-4-环丙基-1-((*S*)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10*H*-[1,3]二噁戊环并[4,5-*g*]吡喃并[3',4':6,7]咪唑并[1,2-*b*]喹啉-14-基-2,2-*d*₂)-3,8,11,14,17-五氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16-五氮杂十八烷-18-基)-1-(3-(2-(环戊磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂二十七烷-27-酰胺(b-L6-1)



步骤 1: 树脂负载的 (39*S*,47*S*)-39-苄基-47-环丙基-1-(9*H*-芴-9-基)-3,31,34,37,40,43-六氧代-2,7,10,13,16,19,22,25,28,46-十氧杂-4,32,35,38,41,44-六氮杂四十八烷-48-羧酸(中间体 2)的合成

在室温及氮气气氛下,向中间体 **1A**(1.17 g), 中间体 **L1-25**(负载的底物与树脂的总重 1 g, 含量约 0.43 mmol), *N,N*-二异丙基乙胺(514.05 mg), 苯并三氮唑-*N,N,N,N*-四甲基脲六氟磷酸盐(1.01 g)的混合物中加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(10 mL)。将所得混合物在 20 °C 下摇床摇晃 1 h。反应结束后,树脂用甲醇(20 mL)和二氯甲烷(20 mL)依次洗,重复 3 次后树脂抽滤至干,并在真空下干燥后得标题化合物(1.03 g)。

步骤 2: 树脂负载的 (2*S*,10*S*)-44-氨基-10-苄基-2-环丙基-6,9,12,15,18-五氧代-3,21,24,27,30,33,36,39,42-九氧杂-5,8,11,14,17-五氮杂四十四烷酸(L11-2)的合成

在室温及氮气气氛下,向中间体 **L11-1**(1.03 g)于 *N,N*-二甲基甲酰胺(10 mL)的溶液中加入哌啶(2.5 mL),将所得混合物在 20 °C 下摇床摇晃 1 h。反应结束后,树脂用甲醇(20 mL)和二氯甲烷(20 mL)依次洗,重复 3 次后树脂抽滤至干,并在真空下干燥后得标题化合物(993 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 887.6 $[M+H]^+$ 。

步骤 3: 树脂负载的 (2*S*,10*S*)-10-苄基-48-(2-(环戊磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)-2-环丙基-6,9,12,15,18,46-六氧代-3,21,24,27,30,33,36,39,42-九氧杂-5,8,11,14,17,45-六氮杂四十八烷酸(中间体 L11-3)的合成

在氮气气氛下,中间体 **L11-2**(993 mg), 中间体 **L3-1**(396.28 mg), *N,N*-二异丙基乙胺(326.90 mg), 苯并三氮唑-*N,N,N,N*-四甲基脲六氟磷酸盐(639.49 mg)的混合物中加入 *N,N*-二甲基甲酰胺(15 mL)。将所得混合物在 20 °C 下摇床摇晃 1 h。LCMS 检测原料反应完毕后,反应结束后,树脂用甲醇(20 mL)和二氯甲烷(20 mL)依次洗,重复 3 次后树脂抽滤至干,并在真空下干燥后得标题化合物(1.02 g)。

LC-MS: m/z (ESI): 1245.2 $[M+Na]^+$

步骤 4: (2*S*,10*S*)-10-苄基-48-(2-(环戊磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)-2-环丙基-6,9,12,15,18,46-六氧代-3,21,24,27,30,33,36,39,42-九氧杂-5,8,11,14,17,45-六氮杂四十八烷酸(中间体 L11-4)的合成

在氮气气氛下，中间体 **L11-3** (1.02 g) 溶于二氯甲烷 (16 mL) 和 1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇 (4 mL)。将所得混合物在 20 °C 下摇床摇晃 1 h。反应结束后，过滤反应液去除树脂，滤液减压浓缩至干，加入乙腈 (4 mL) 和纯水 (8 mL) 冻干机冻干得标题化合物 (230 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 1244.7 $[M+Na]^+$

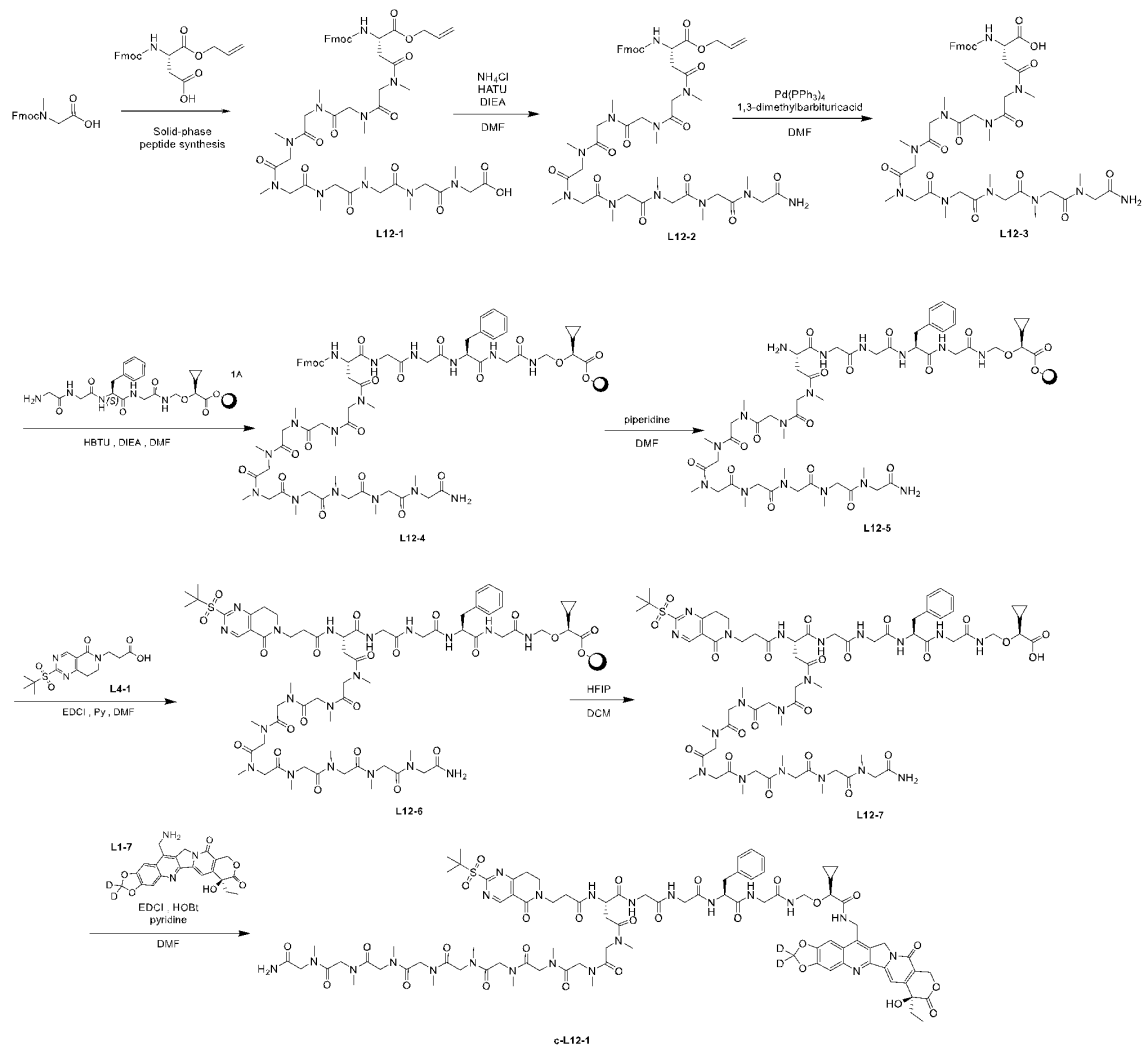
步骤 5: *N*-((4*S*,12*S*)-12-苄基-4-环丙基-1-((*S*)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10*H*-[1,3]二噁戊环并[4,5-*g*]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-*b*]喹啉-14-基-2,2-*d*₂)-3,8,11,14,17-五氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16-五氮杂十八烷-18-基)-1-(3-(2-(环戊磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂二十七烷-27-酰胺(b-L6-1)的合成

在氮气气氛下，中间体 **L11-4** (230 mg) 中间体 **L1-7** (87.64 mg)，1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (72.14 mg)，1-羟基苯并三唑 (50.85 mg) 和吡啶 (44.65 mg) 的混合物中加入 *N,N*-二甲基甲酰胺 (2 mL)。将所得混合物在室温下搅拌 1 h。LCMS 检测原料反应完毕后，混合物反应液直接经高效液相色谱法纯化 (柱子: C18 Welch Xtimate C18 150*30mm*5um; 流动相: [A: 水(0.225%甲酸), B: 乙腈]; B%: 27%-47%, 22 min) 得标题化合物 (41.4 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 814.8 $[(M+2H)/2]^+$

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 9.24(s, 1H), 8.70-8.64(m, 1H), 8.60(t, J = 6.6 Hz, 1H), 8.29(t, J = 5.9 Hz, 1H), 8.17(t, J = 5.6 Hz, 1H), 8.11(d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.07(t, J = 5.5 Hz, 1H), 8.00(t, J = 5.6 Hz, 1H), 7.79(s, 1H), 7.52(s, 1H), 7.27-7.21(m, 6H), 7.16(s, 1H), 6.51(s, 1H), 5.43(s, 4H), 4.84-4.71(m, 2H), 4.68-4.66(m, 1H), 4.54-4.46(m, 1H), 4.43-4.37(m, 1H), 4.28-4.19(m, 1H), 3.76-3.66(m, 11H), 3.59(t, J = 6.4 Hz, 3H), 3.50-3.46(m, 25H), 3.26-3.18(m, 5H), 3.05-3.03(m, 1H), 2.80-2.78(m, 1H), 2.42-2.40(m, 5H), 2.00-1.85(m, 6H), 1.74-1.58(m, 5H), 0.99-0.96(m, 1H), 0.88(t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.38-0.31(m, 4H)

实施例 33、(*S*)-*N*⁴-(26-氨基-3,6,9,12,15,18,21,24-八甲基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧代-3,6,9,12,15,18,21,24-八氮杂二十六烷基)-*N*¹-((4*S*,12*S*)-12-苄基-4-环丙基-1-((*S*)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-8,10,11,13-四氢-10*H*-[1,3]二噁戊环并[4,5-*g*]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-*b*]喹啉-14-基-2,2-*d*₂)-3,8,11,14,17-五氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16-五氮杂十八烷-18-基)-2-(3-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶-6(5*H*)-基)丙酰氨基)-*N*⁴-甲基丁二酰胺(c-L12-1)



步骤 1: (S)-5-烯丙氧羰基-1-(9H-芴-9-基)-8,11,14,17,20,23,26,29,32-九甲基-3,7,10,13,16,19,22,25,28,31-十氧代-2-氧杂-4,8,11,14,17,20,23,26,29,32-十氮杂三十四烷-34-羧酸(中间体 L12-1)的合成

该化合物由多肽固相合成法合成，步骤如下：

- 1) 在氮气保护下向 CTC 树脂(0.64 mmol/g, 12.5 g)与 N-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)-N-甲基甘氨酸(2.50 g)的混合物中加入二氯甲烷；
- 2) 滴加二异丙基乙胺 DIEA(6.2 g)并混合搅拌 2 h；
- 3) 加入甲醇(13 mL)并混合搅拌 0.5 h；
- 4) 过滤并用 DMF 洗涤三次；
- 5) 加入 20%哌啶/DMF 溶液并反应 30 min；
- 6) 过滤并用 DMF 洗涤五次；
- 7) 加入下表中“原料”列的物质并混合 30 s, 之后加入下表中“试剂”列的物质。反应在氮气鼓泡条件下进行 1 h；
- 8) 重复步骤 4-7 以完成所需多肽合成。

Note:

#	原料	试剂
1	Fmoc-Sar-OH(1.0 eq.)	DIEA(6.0 eq.)
2	Fmoc-Sar-OH(3.0 eq.)	HBTU(2.85 eq.)+ DIEA(6.0 eq.)
3	Fmoc-Sar-OH(3.0 eq.)	HBTU(2.85 eq.)+ DIEA(6.0 eq.)

4	Fmoc-Sar-OH(3.0 eq.)	HBTU(2.85 eq.)+ DIEA(6.0 eq.)
5	Fmoc-Sar-OH(3.0 eq.)	HBTU(2.85 eq.)+ DIEA(6.0 eq.)
6	Fmoc-Sar-OH(3.0 eq.)	HBTU(2.85 eq.)+ DIEA(6.0 eq.)
7	Fmoc-Sar-OH(3.0 eq.)	HATU(2.85 eq.)+ DIEA(6.0 eq.)
8	Fmoc-Sar-OH(3.0 eq.)	HATU(2.85 eq.)+ DIEA(6.0 eq.)
9	Fmoc-Sar-OH(3.0 eq.)	HATU(2.85 eq.)+ DIEA(6.0 eq.)
10	Fmoc-Asp-OAll-OH(2.0 eq.)	HATU(1.90 eq.)+ DIEA(4.0 eq.)

固相制备完毕后，向所得混合物中加入 20% HFIP/DCM 溶液并搅拌反应 1.5 h。之后过滤，收集滤液后浓缩，所得混合物以制备液相色谱纯化(A: 0.075% TFA in H₂O, B: 乙腈)得标题化合物(2.15 g)。

MS m/z(ESI): 1035.6 [M+H]⁺。

步骤 2： (S)-30-(((9H- 苈 -9- 基) 甲 氧 基) 羰 基) 氨 基)-1- 氨 基 -3,6,9,12,15,18,21,24,27- 九 甲 基 -1,4,7,10,13,16,19,22,25,28-十氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氮杂三十一烷-31-羧酸烯丙酯(中间体 L12-2)的合成

将中间体 L12-1(1 g)，氯化铵(155.09 mg)，二异丙基乙基胺(499.44 mg)，HATU(728.95 mg)于 DMF(5 mL)，氮气置换 3 次，反应在 25 °C 下搅拌 3 h。反应结束后，粗品经反相高效液相制备色谱纯化(ISCO®; 80 g C 18 Column, 流动相梯度 0~40% 乙腈/水，流速 40 mL/min)得标题化合物(800 mg)。

MS m/z(ESI): 1034.6 [M+H]⁺。

步骤 3： (S)-30-(((9H- 苈 -9- 基) 甲 氧 基) 羰 基) 氨 基)-1- 氨 基 -3,6,9,12,15,18,21,24,27- 九 甲 基 -1,4,7,10,13,16,19,22,25,28-十氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氮杂三十一烷-31-羧酸(中间体 L12-3)的合成

将中间体 L12-2(800 mg)和四三苯基磷钨(201.84 mg)，1,3-二甲基巴比妥酸(108.71 mg)于 DMF(5 mL)，氮气置换 3 次，反应在 25 °C 下搅拌 4 h。反应结束后，粗品经反相高效液相制备色谱纯化(ISCO®; 80 g C 18 Column, 流动相梯度 0~40% 乙腈/水，流速 40 mL/min)得标题化合物(700 mg)。

MS m/z(ESI): 994.9 [M+H]⁺。

步骤 4： 树脂负载的(2S,10S,19S)-19-(((9H- 苈 -9- 基) 甲 氧 基) 羰 基) 氨 基)-48- 氨 基 -10- 苈 基 -2- 环 丙 基 -22,25,28,31,34,37,40,43,46- 九 甲 基 -6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48- 十 五 氧 代 -3- 氧 杂 -5,8,11,14,17,22,25,28,31,34,37,40,43,46-十四氮杂四十八烷酸(中间体 L12-4)的合成

将中间体 L12-3(700 mg)加入 DMF(10 mL)中，再加入中间体 L1-25(树脂加底物总重 400 mg，含量约 0.18 mmol)，O-苈并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐(336.58 mg)和二异丙基乙基胺(205.62 mg)。反应液氮气置换 3 次后，在 25 °C 摇床摇晃反应 1h。反应结束后，树脂用甲醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)依次洗，重复 3 次后树脂抽滤至干，并在真空下干燥后得标题化合物(420 mg)。

MS m/z(ESI): 1461.4 [M+Na]⁺。

步骤 5： 树脂负载的(2S,10S,19S)-19,48- 二 氨 基 -10- 苈 基 -2- 环 丙 基 -22,25,28,31,34,37,40,43,46- 九 甲 基 -6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48- 十 五 氧 代 -3- 氧 杂 -5,8,11,14,17,22,25,28,31,34,37,40,43,46- 十 四 氮 杂 四 十 八 烷 酸 (中 间 体 L12-5) 的 合 成

将中间体 L12-4(420 mg)溶于 DMF(5 mL)中，加入哌啶(1.25 mL)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后，树脂用甲醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)依次洗，重复 3 次后树脂抽滤至干，并在真空下干燥后得标题化合物(400 mg)。

MS m/z(ESI): 1217.4 [M+H]⁺。

步骤 6： 树脂负载的(2S,10S,19S)-48- 氨 基 -10- 苈 基 -19- (3- (2- (叔 丁 磺 酰 基)-5- 氧 代 -7,8- 二 氢 吡 啶 并 [4,3-*d*] 嘧 啶 -6(5*H*)- 基) 丙 酰 氨 基)-2- 环 丙 基 -22,25,28,31,34,37,40,43,46- 九 甲 基 -6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48- 十 五 氧 代 -3- 氧 杂 -5,8,11,14,17,22,25,28,31,34,37,40,43,46- 十 四 氮 杂 四 十 八 烷 -1- 羧 酸 (中 间 体 L12-6) 的 合 成

将中间体 L12-5(360 mg)和中间体 L4-1(108.39 mg)溶于 DMF(10 mL)中，加入 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(114 mg)，吡啶(108 mg)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后，树脂用甲醇(10 mL)和二氯甲烷(10 mL)依次洗，重复 3 次后树脂抽滤至干，并在真空下干燥后得标题化合物(390 mg)。

步骤 7： (2S,10S,19S)-48- 氨 基 -10- 苈 基 -19- (3- (2- (叔 丁 磺 酰 基)-5- 氧 代 -7,8- 二 氢 吡 啶 并 [4,3-*d*] 嘧 啶 -6(5*H*)- 基) 丙 酰 氨 基)-2- 环 丙 基 -22,25,28,31,34,37,40,43,46- 九 甲 基 -6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48- 十 五 氧 代 -3- 氧 杂 -5,8,11,14,17,22,25,28,31,34,37,40,43,46- 十 四 氮 杂 四 十 八 烷 -1- 羧 酸 (中 间 体 L12-7) 的 合 成

将中间体 L12-6(390 mg)加入混合溶剂二氯甲烷(8 mL)和 1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇(2 mL)中, 在 25 °C 摇晃 0.5 h。反应结束后, 过滤反应液去除树脂, 滤液减压浓缩至干, 粗品直接经高效液相色谱法纯化(柱子: Boston Green ODS 150*30mm*5um; 流动相: [A: 水(0.225%甲酸), B: 乙腈]; B%: 10%-50%, 10min)得标题化合物(25 mg)。

步骤 8 : (S)-N⁴-(26-氨基-3,6,9,12,15,18,21,24-八甲基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧代-3,6,9,12,15,18,21,24-八氮杂二十六烷基)-N¹-((4S,12S)-12-苄基-4-环丙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-8,10,11,13-四氢-10H-[1,3]二噁戊环并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-14-基-2,2-d₂)-3,8,11,14,17-五氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16-五氮杂十八烷-18-基)-2-(3-(2-(叔丁磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-6(5H)-基)丙酰氨基)-N⁴-甲基丁二酰胺(c-L12-1)的合成

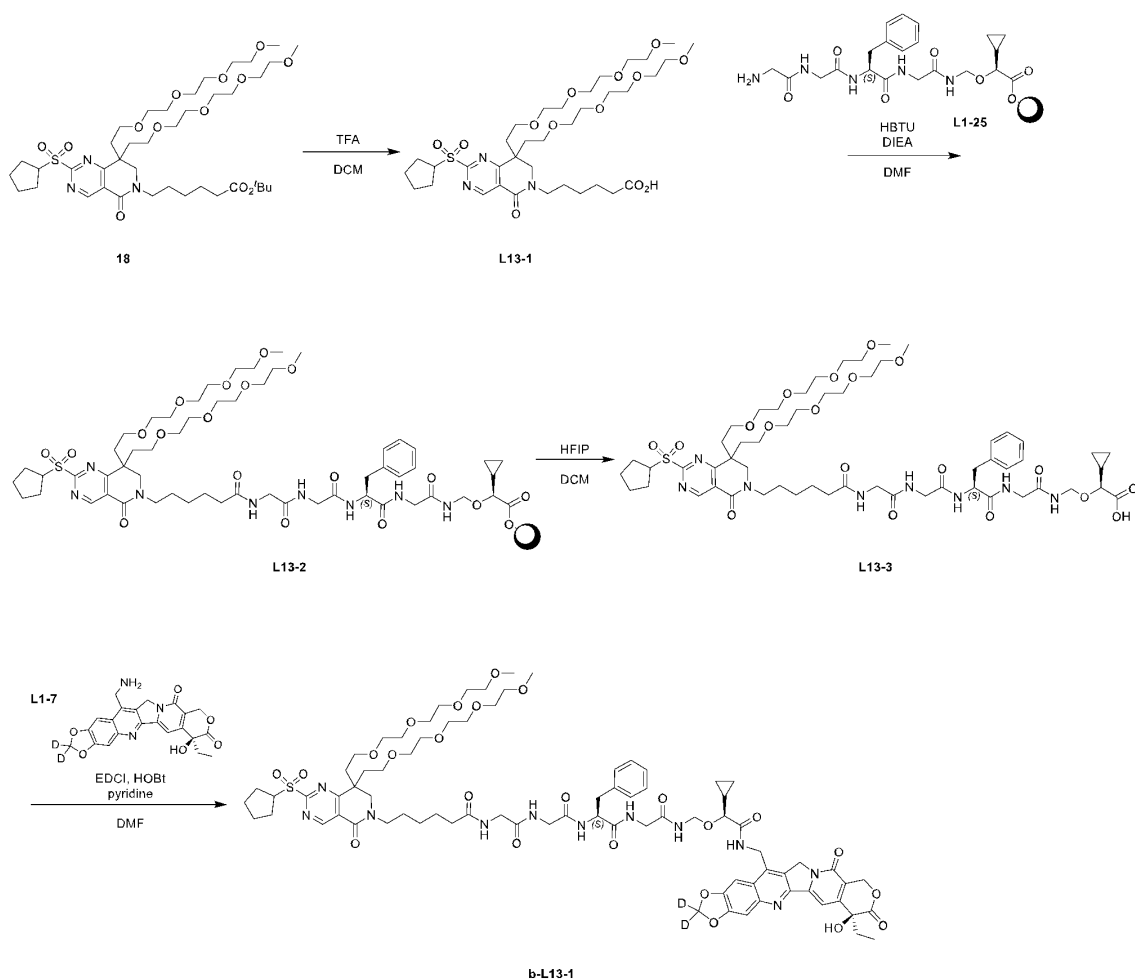
将中间体 L7-7(16 mg), 中间体 L1-7(4.4 mg), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(3.98 mg), 吡啶(2.46 mg)和 1-羟基苯并三唑(2.81 mg)溶解于 DMF(2 mL), 氮气置换 3 次, 反应液在 25 °C 氮气保护下, 搅拌反应 2 h。反应结束后, 反应液直接经高效液相色谱法纯化(柱子: C18 100*10mm; 流动相: [A: 水(碳酸氢铵), B: 乙腈]; B%: 10%-38%, 16min)得标题化合物(4.5 mg)。

(流动相 A 配制: 30L 纯水+24g 碳酸氢铵)

¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆)δ = 9.24(s, 1H), 8.66(d, J = 6.4 Hz, 1H), 8.59(s, 1H), 8.27(s, 2H), 8.01(d, J = 16.5 Hz, 2H), 7.81(s, 1H), 7.52(s, 1H), 7.26(s, 1H), 7.22(s, 5H), 7.16(s, 1H), 6.50(s, 1H), 5.44(d, J = 9.9 Hz, 4H), 4.85-4.71(m, 3H), 4.70-4.63(m, 1H), 4.57(s, 1H), 4.49(s, 1H), 4.43-4.27(m, 6H), 4.23(d, J = 16.1 Hz, 3H), 4.16(s, 1H), 4.13-3.99(m, 5H), 3.92(s, 4H), 3.86(d, J = 13.0 Hz, 2H), 3.75-3.64(m, 10H), 3.59(s, 2H), 3.49(d, J = 7.0 Hz, 1H), 3.22(t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.99-2.84(m, 14H), 2.84-2.71(m, 14H), 1.92-1.79(m, 2H), 1.37(s, 9H), 1.24(s, 2H), 0.96(d, J = 7.7 Hz, 1H), 0.91-0.84(m, 3H), 0.39-0.30(m, 4H)

MS m/z(ESI): 973.9 [M/2+H]⁺。

实施例 34、N-((4S,12S)-12-苄基-4-环丙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二噁戊环并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-14-基-2,2-d₂)-3,8,11,14,17-五氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16-五氮杂十八烷-18-基)-6-(2-(环戊基磺酰)-5-氧代-8,8-二(2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基)-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-6(5H)-基)己酰胺(b-L13-1)



步骤 1: 6-(2-环戊磺酰基-5-氧代-8,8-二(2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基)-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-6(5H)-基)己酸 (中间体 L13-1) 的合成

将化合物 **18** (800 mg) 溶于二氯甲烷 (8 mL) 中, 加入三氟乙酸 (1.5 mL)。反应液在 25 °C 氮气保护下, 搅拌反应 2 h。反应结束后, 经减压浓缩除去溶剂。残留物以快速硅胶柱层析法纯化 (ISCO®; 12 g SepaFlash® 快速硅胶柱, 梯度 0~30% 四氢呋喃/石油醚, 流速 50 mL/min) 得标题化合物 (280 mg)。

MS m/z (ESI): 776.6 (M+H)⁺。

步骤 2: 树脂负载的(2S,10S)-10-苄基-23-(2-环戊磺酰基-5-氧代-8,8-二(2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基)-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-6(5H)-基)-2-环丙基-6,9,12,15,18-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14,17-五氮杂二十三烷酸 (中间体 L13-2) 的合成

将中间体 **L13-1** (280 mg) 和中间体 **L1-25** (440 mg) 溶解于 N,N-二甲基甲酰胺 (5 mL) 中, 依次加入 O-苄并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (183.22 mg) 和 N,N-二异丙基乙胺 (139.91 mg), 反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后, 树脂用甲醇 (10 mL) 和二氯甲烷 (10 mL) 依次洗, 重复 3 次后树脂抽滤至干, 并在真空下干燥后得标题化合物 (470 mg)。

MS m/z (ESI): 1221.1 (M+H)⁺。

步骤 3: (2S,10S)-10-苄基-23-(2-环戊磺酰基-5-氧代-8,8-二(2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基)-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-6(5H)-基)-2-环丙基-6,9,12,15,18-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14,17-五氮杂二十三烷酸 (中间体 L13-3) 的合成

将中间体 **L13-2** (450 mg) 溶解于二氯甲烷 (8 mL) 和 1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇 (2 mL), 反应液在 25 °C 摇床中反应 0.5 h。反应结束后, 过滤, 滤液经减压浓缩除去溶剂。残余物经制备高效液相色谱纯化 (C18 柱

5 μ m 粒径, 30 mm 直径, 150 mm 长度; 用水 (含有 0.225% 甲酸) 和乙腈的极性递减的混合物作为洗脱液; 乙腈梯度比例 25%-45%, 洗脱时间 22 分钟) 得标题化合物 (34 mg)。

MS m/z (ESI): 1221.4 (M+H)⁺。

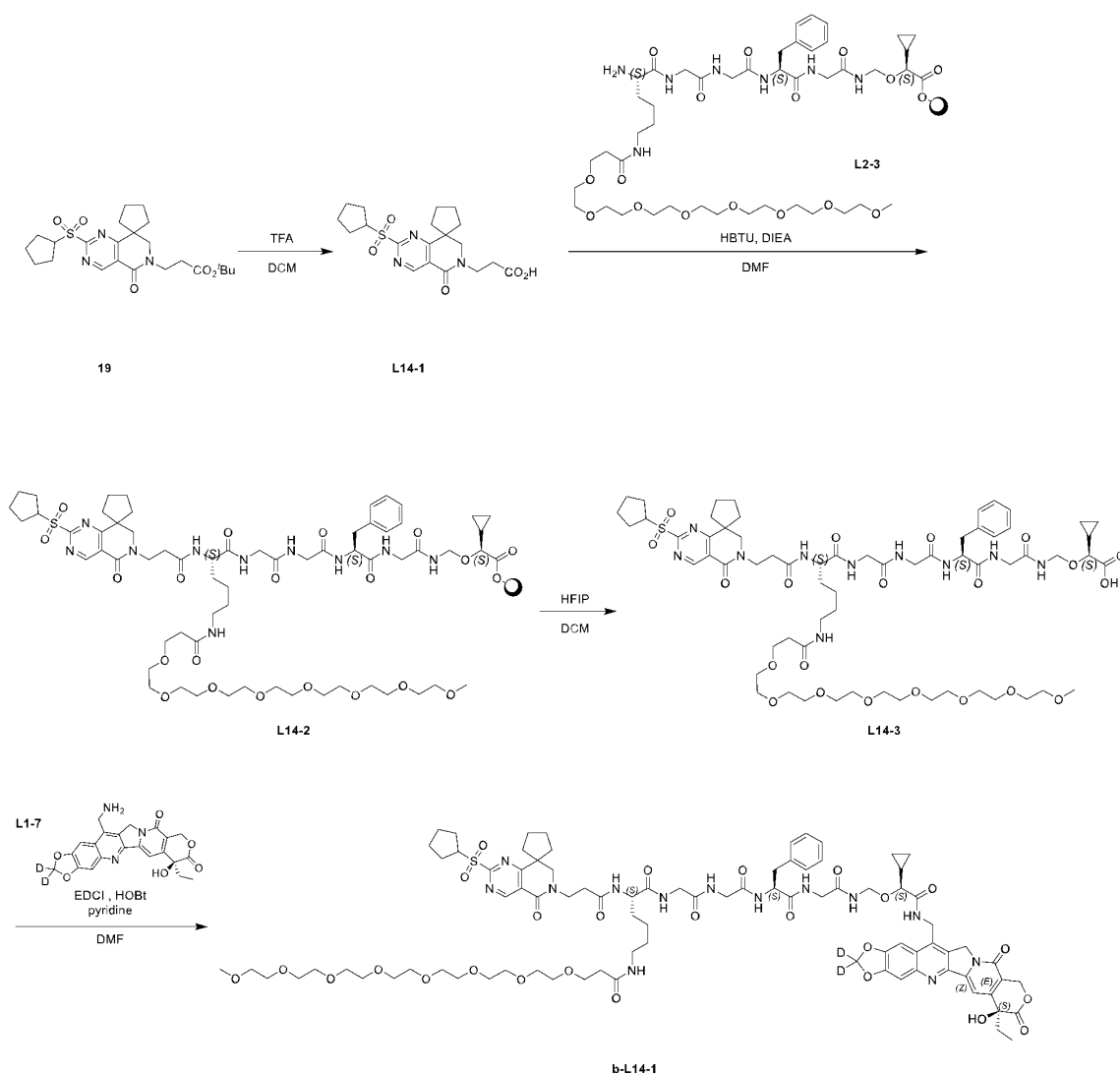
步骤 4: N-((4S,12S)-12-苄基-4-环丙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二噁戊环并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基-2,2-d₂)-3,8,11,14,17-五氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16-五氮杂十八烷-18-基)-6-(2-(环戊基磺酰)-5-氧代-8,8-二(2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基)-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-6(5H)-基)己酰胺(b-L13-1) 的合成

将中间体 L13-3 (34 mg) 和中间体 L1-7 (12.38 mg) 溶解于 N,N-二甲基甲酰胺 (0.5 mL) 中, 依次加入 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (10.67 mg), 1-羟基苯并三唑 (7.52 mg) 和吡啶 (6.61 mg), 氮气置换 3 次。反应液在 25 °C 氮气保护下, 搅拌反应 1 h。反应结束后, 反应液直接经高效液相色谱法纯化 (C18 柱 5 μ m 粒径, 30 mm 直径, 150 mm 长度; 用水 (含有 0.225% 甲酸) 和乙腈的极性递减的混合物作为洗脱液; 乙腈梯度比例 32%-52%, 洗脱时间 22 分钟) 得标题化合物 (26.8 mg)。

MS m/z (ESI): 814.1 [(M+2H)/2]⁺。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ =9.24 (s, 1H), 8.71-8.64 (m, 1H), 8.62-8.57 (m, 1H), 8.33-8.25 (m, 1H), 8.12 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.09-8.04 (m, 1H), 8.04-7.98 (m, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.26-7.23 (m, 5H), 7.19-7.12 (m, 1H), 6.49 (s, 1H), 5.44 (d, J = 8.3 Hz, 4H), 4.84-4.71 (m, 2H), 4.70-4.63 (m, 1H), 4.54-4.45 (m, 1H), 4.44-4.37 (m, 1H), 4.31-4.21 (m, 1H), 3.80-3.63 (m, 8H), 3.63-3.57 (m, 1H), 3.53-3.36 (m, 30H), 3.22 (s, 6H), 3.09-3.00 (m, 1H), 2.84-2.75 (m, 1H), 2.13 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 2.11-1.93 (m, 8H), 1.90 (s, 2H), 1.68 (m, 4H), 1.55 (d, J = 7.7 Hz, 4H), 1.33-1.25 (m, 2H), 1.01-0.93 (m, 1H), 0.90-0.85 (m, 3H), 0.39-0.28 (m, 4H)

实施例 35、N-((4S,12S,21S)-12-苄基-21-(3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-5'H-螺[环戊并-1,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)丙酰氨基)-4-环丙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二噁戊环并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基-2,2-d₂)-3,8,11,14,17,20-六氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16,19-六氮杂二十五烷-25-基)-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂二十六烷-26-酰胺 (b-L14-1)



步骤 1: 3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-5'H-螺[环戊烷-1,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)丙酸 (中间体 L14-1) 的合成

将化合物 **19** (630 mg) 溶于二氯甲烷(3 mL)中, 加入三氟乙酸(0.6 mL), 反应液在 25 °C 搅拌 1 hr。反应结束后, 减压浓缩, 残余物经石油醚(1 mL)和乙酸乙酯(1 mL)打浆, 并在真空下干燥后得标题化合物 (380 mg)。

MS m/z (ESI): 408.2 $[M+H]^+$ 。

步骤 2: 树脂负载的(32S,41S,49S)-41-苄基-32-(3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-5'H-螺[环戊烷-1,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)丙酰氨基)-49-环丙基-26,33,36,39,42,45-六氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,48-九氧杂-27,34,37,40,43,46-六氮杂五十烷-50-羧酸 (中间体 L14-2) 的合成

将中间体 **L14-1** 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (3 mL) 中, 依次加入中间体 **L2-3**(195.59 mg), O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (243.72 mg) 和 N,N-二异丙基乙胺 (250.82 μ L)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 hr。反应结束后, 树脂用甲醇(5 mL)和二氯甲烷(5 mL)依次洗涤, 重复 3 次后树脂抽滤至干, 并在真空下干燥后得标题化合物(430 mg)。

步骤 3: (32S,41S,49S)-41-苄基-32-(3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-5'H-螺[环戊烷-1,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)丙酰氨基)-49-环丙基-26,33,36,39,42,45-六氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,48-九氧杂-27,34,37,40,43,46-六氮杂五十烷-50-羧酸(中间体 L14-3)的合成

将中间体 **L14-2** (430 mg) 加入混合溶剂二氯甲烷 (4 mL) 和 1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇 (1 mL) 中, 反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 hr。反应结束后, 过滤反应液去除树脂, 滤液减压浓缩, 经高效液相色谱法纯化 (柱子: Welch Xtimate C18 150*30mm*5um; 流动相: [A: 水(0.225%甲酸), B: 乙腈]; B%: 25%-45%, 15min) 得标题化合物 (17 mg)。

步骤 4: N-((4S,12S,21S)-12-苄基-21-(3-(2'-环戊磺酰基-5'-氧代-5'H-螺[环戊烷-1,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)丙酰氨基)-4-环丙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二噁二氧代戊环并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基-2,2-d₂)-3,8,11,14,17,20-六氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16,19-六氮杂二十五烷-25-基)-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂二十六烷-26-酰胺 (b-L14-1) 的合成

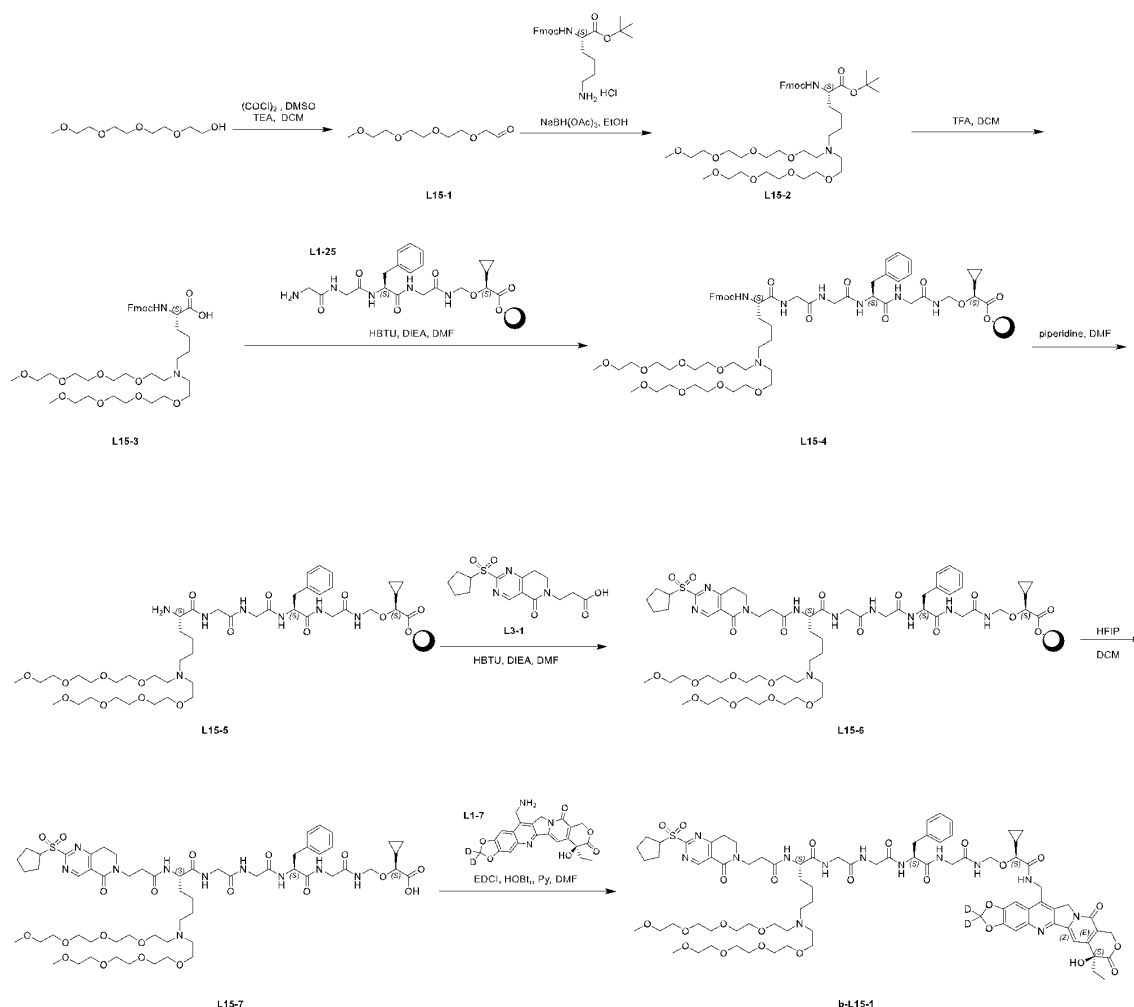
将中间体 **L14-3** (17 mg), 中间体 **L1-7** (5.76 mg), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(4.74 mg), 吡啶 (8.56 mg) 和 1-羟基苯并三唑 (3.34 mg) 溶解于 N,N-二甲基甲酰胺 (0.5 mL), 氮气置换 3 次, 反应液在 25 °C 氮气保护下, 搅拌反应 2 hr。反应结束后, 反应液直接经高效液相色谱法纯化 (柱子: Welch Xtimate C18 150*30mm*5um; 流动相: [A: 水(0.225%甲酸), B: 乙腈]; B%: 32%-52%, 22min) 得标题化合物 (9.8 mg)。

MS m/z (ESI): 891.2 [M/2+H]⁺。

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 9.23 (s, 1H), 8.73-8.55 (m, 2H), 8.36-8.29 (m, 1H), 8.25-8.16 (m, 2H), 8.13 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.99 (t, J = 5.1 Hz, 1H), 7.81-7.74 (m, 2H), 7.50 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.23-7.19 (m, 4H), 7.18-7.12 (m, 1H), 6.49 (s, 1H), 5.42 (s, 4H), 4.84-4.71 (m, 2H), 4.66 (m, J = 6.7, 9.8 Hz, 1H), 4.55-4.45 (m, 1H), 4.39 (m, J = 6.5, 10.1 Hz, 1H), 4.31-4.16 (m, 2H), 3.70-3.66 (m, 7H), 3.60-3.53 (m, 5H), 3.51-3.47 (m, 25H), 3.40 (s, 3H), 3.23 (s, 3H), 3.08-2.90 (m, 4H), 2.78 (m, 1H), 2.27 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.07-1.91 (m, 7H), 1.90-1.82 (m, 2H), 1.76 (s, 6H), 1.71-1.57 (m, 6H), 1.54-1.43 (m, 1H), 1.36-1.30 (m, 2H), 1.28-1.23 (m, 2H), 1.00-0.92 (m, 1H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.38-0.34 (m, 2H), 0.31 (d, J = 4.5 Hz, 2H)。

实施例 36、(S)-N-((4S,12S)-12-苄基-4-环丙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二噁戊环并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基-2,2-d₂)-3,8,11,14,17-五氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16-五氮杂十八烷-18-基)-19-(3-(2'-环戊磺酰基-5'-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6(5H)-基)丙酰氨基)-14-(2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基)-2,5,8,11-四氧杂-14-氮杂二十烷-20-酰胺 (b-L15-1)

90



步骤 1: 2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-醛(中间体 L15-1)的合成

在 -70°C 及氮气气氛下, 向草酰氯(914 mg)的二氯甲烷(25 mL)溶液中缓慢滴加二甲基亚砜(1.02 mL), 反应液在 -70°C 下搅拌 10 分钟, 在 -70°C 下滴加 2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-醇(1.00 g)的二氯甲烷(5 mL)溶液, 反应液在 -70°C 下搅拌 10 分钟, 在 -70°C 下滴加三乙胺(4.02 mL), 反应升温至室温, 将反应液在 20°C 下搅拌反应 0.5 h。反应完毕后, 得到标题化合物的二氯甲烷(30 mL)溶液, 过滤后直接用于下一步反应。

步骤 2: (S)-19-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-14-(2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基)-2,5,8,11-四氧杂-14-氮杂二十烷-20-羧酸叔丁酯(中间体 L15-2)的合成

在室温及氮气气氛下, 向 Fmoc-赖氨酸叔丁酯盐酸盐(407.58 mg)的乙醇(20 mL)溶液中加入三乙氧基硼氢化钠(4.07 g), 滴加上步所得中间体 **L15-1** 的二氯甲烷 (30 mL) 溶液, 将所得混合物在 20°C 下搅拌反应 3 h。反应完毕后, 减压除去溶剂, 残留物以快速硅胶柱层析法纯化(ISCO®; 20g SepaFlash® 快速硅胶柱, 梯度 0~15% 甲醇/二氯甲烷, 流速 60 mL/min)得标题化合物(1.00 g)。

LC-MS: m/z (ESI): 805.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

步骤 3: (S)-19-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-14-(2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基)-2,5,8,11-四氧杂-14-氮杂二十烷-20-羧酸(中间体 L15-3)的合成

在氮气气氛下, 中间体 **L15-2** (1.00 g) 溶于二氯甲烷 (5 mL) 中, 室温下加入三氟乙酸 (5 mL), 反应液在 20°C 反应 2 h。反应完毕后, 减压除去溶剂, 残留物以快速硅胶柱层析法纯化 (ISCO®; 12g SepaFlash® 快速硅胶柱, 梯度 0~15% 甲醇/二氯甲烷, 流速 60 mL/min) 得标题化合物(330 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 749.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

步骤 4: 树脂负载的(19S,28S,36S)-19-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-28-苄基-36-环丙基-20,23,26,29,32-五氧代-14-(2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基)-2,5,8,11,35-五氧杂-14,21,24,27,30,33-六氮杂三十七烷-37-羧酸(中间体 L15-4)的合成

将中间体 L15-3 (301.44 mg)和中间体 L1-25 (400 mg)溶解于无水 N,N-二甲基甲酰胺(8 mL), 依次加入 O-苄并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐(88.86 mg)和 N,N-二异丙基乙胺(113.09 mg), 反应液在 25 °C 摇床中反应 1 hr. 反应结束后, 树脂用甲醇(20 mL)和二氯甲烷(20 mL)依次洗, 重复 3 次后树脂抽滤至干, 并在真空下干燥后得标题化合物(500 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 1194.6 [M+H]⁺.

步骤 5: 树脂负载的(19S,28S,36S)-19-氨基-28-苄基-36-环丙基-20,23,26,29,32-五氧代-14-(2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基)-2,5,8,11,35-五氧杂-14,21,24,27,30,33-六氮杂三十七烷-37-羧酸(中间体 L15-5)的合成

将中间体 L15-4 (0.55 g) 溶解于无水 N,N-二甲基甲酰胺(2.5 mL), 加入哌啶(0.5 mL), 反应液在 25 °C 摇床中反应 1 hr. 反应结束后, 树脂用甲醇(20 mL) 和二氯甲烷(20 mL)依次洗涤, 重复 3 次后树脂抽滤至干, 并在真空下干燥后得标题化合物(440 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 972.6 [M+H]⁺.

步骤 6: 树脂负载的(19S,28S,36S)-28-苄基-19-(3-(2-环戊磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6(5H)-基)丙酰氨基)-36-环丙基-20,23,26,29,32-五氧代-14-(2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基)-2,5,8,11,35-五氧杂-14,21,24,27,30,33-六氮杂三十七烷-37-羧酸(中间体 L15-6)的合成

将中间体 L15-5 (400 mg) 和中间体 L3-1 (100.74 mg) 溶解于无水 N,N-二甲基甲酰胺 (8 mL), 依次加入 O-苄并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (48.25 mg) 和 N,N-二异丙基乙胺 (122.80 mg), 反应液在 25 °C 摇床中反应 1 hr. 反应结束后, 树脂用甲醇(20 mL) 和二氯甲烷 (20 mL) 依次洗, 重复 3 次后树脂抽滤至干, 并在真空下干燥后得标题化合物(458 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 1307.5 [M+H]⁺.

步骤 7: (19S,28S,36S)-28-苄基-19-(3-(2-环戊磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6(5H)-基)丙酰氨基)-36-环丙基-20,23,26,29,32-五氧代-14-(2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基)-2,5,8,11,35-五氧杂-14,21,24,27,30,33-六氮杂三十七烷-37-羧酸(中间体 L15-7)的合成

将中间体 L15-6 (458.00 mg) 溶解于无水二氯甲烷 (4 mL), 加入 1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇 (1 mL), 反应液在 25 °C 搅拌下反应 1 hr. 反应结束后, 过滤并用二氯甲烷 (10 mL) 洗涤三次, 滤液减压浓缩, 经制备高效液相色谱纯化(C18 柱 5μm 粒径, 30 mm 直径, 150 mm 长度; 用水 (含有 0.225%甲酸) 和乙腈的极性递减的混合物作为洗脱液; 乙腈梯度比例 20%-37%, 洗脱时间 19 分钟), 得标题化合物 (25 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 1307.5 [M+H]⁺.

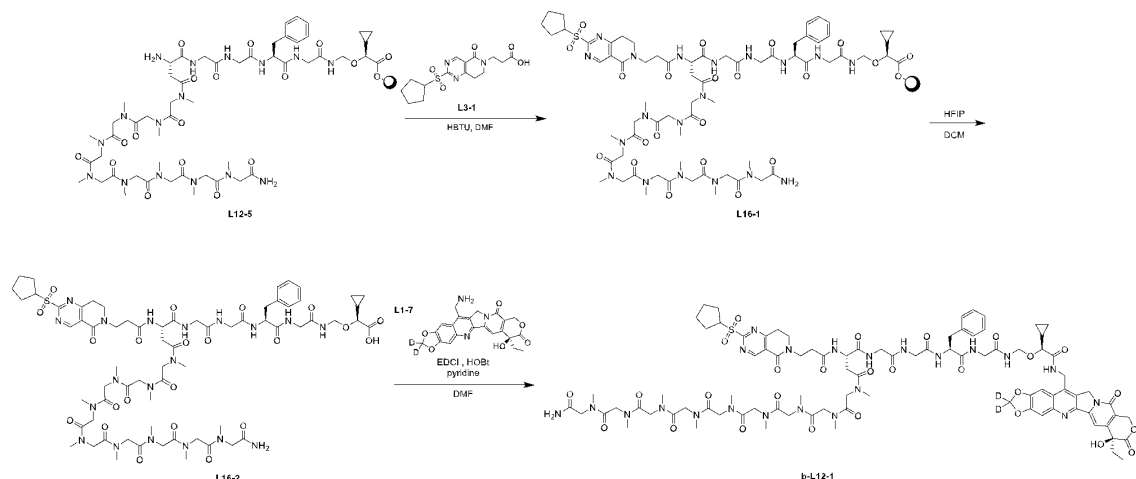
步骤 8: (S)-N-((4S,12S)-12-苄基-4-环丙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二噻戊环并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡嗪并[1,2-b]喹啉-14-基-2,2-d₂)-3,8,11,14,17-五氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16-五氮杂十八烷-18-基)-19-(3-(2-环戊磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6(5H)-基)丙酰氨基)-14-(2,5,8,11-四氧杂十三烷-13-基)-2,5,8,11-四氧杂-14-氮杂二十烷-20-酰胺 (b-L15-1)的合成

将中间体 L15-7 (20.00 mg) 和中间体 L1-7 (14.25 mg)溶解于无水 N,N-二甲基甲酰胺 (0.8 mL), 依次加入 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(11.73 mg), 1-羟基苄并三唑 (8.27 mg) 和吡啶 (7.26 mg), 氮气置换 3 次。反应液在 25 °C 氮气保护下, 搅拌反应 1 h. 反应结束后, 反应液直接经高效液相色谱法纯化 (C18 柱 5μm 粒径, 30 mm 直径, 150 mm 长度; 用水 (含有 0.225%甲酸) 和乙腈的极性递减的混合物作为洗脱液; 乙腈梯度比例 28%-38.5%, 洗脱时间 15 分钟)得标题化合物(7.8 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 857.4 [(M+2H)/2]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 9.29-9.17 (m, 1H), 8.73-8.59 (m, 2H), 8.34 (s, 2H), 8.30-8.18 (m, 2H), 8.17-8.10 (m, 1H), 8.04-7.96 (m, 1H), 7.82-7.75 (m, 1H), 7.54-7.46 (m, 1H), 7.29-7.18 (m, 5H), 7.18-7.12 (m, 1H), 6.68-6.41 (m, 1H), 5.46-5.40 (m, 3H), 4.87-4.71 (m, 2H), 4.70-4.62 (m, 1H), 4.56-4.34 (m, 2H), 4.29-4.14 (m, 2H), 3.78-3.60 (m, 11H), 3.53-3.44 (m, 32H), 3.23-3.21 (m, 6H), 3.07-3.00 (m, 1H), 2.84-2.74 (m, 1H), 2.58-2.53 (m, 4H), 2.40-2.32 (m, 2H), 1.80 (m, 6H), 1.75-1.56 (m, 5H), 1.53-1.39 (m, 1H), 1.37-1.13 (m, 4H), 1.00-0.93 (m, 1H), 0.91-0.83 (m, 3H), 0.41-0.26 (m, 4H)

实施例 37、(S)-N⁴-(26-氨基-3,6,9,12,15,18,21,24-八甲基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧代-3,6,9,12,15,18,21,24-八氮杂二十六烷-1-基)-N¹-((4S,12S)-12-苄基-4-环丙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二噻二氧代戊环并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]呋喃并[1,2-b]喹啉-14-基-2,2-d₂)-3,8,11,14,17-五氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16-五氮杂十八烷-18-基)-2-(3-(2-(环戊磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-6(5H)-基)丙酰氨基)-N⁴-甲基丁二酰胺(b-L12-1)



步骤 1：树脂负载的(2S,10S,19S)-48-氨基-10-苄基-19-(3-(2-(环戊磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-6(5H)-基)丙酰氨基)-2-环丙基-22,25,28,31,34,37,40,43,46-九甲基-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48-十五氧代-3-氧杂-5,8,11,14,17,22,25,28,31,34,37,40,43,46-十四氮杂四十八烷-1-羧酸 (中间体 L16-1) 的合成

将中间体 L12-5 (535 mg) 和中间体 L3-1 (187.41 mg) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (10 mL) 中，加入 O-苯并三氮唑-四甲基脒六氟磷酸盐 (270 mg) 和二异丙基乙基胺 (309 μ L)。反应液在 25 $^{\circ}$ C 放置于摇床摇晃 1 hr。反应结束后，树脂用甲醇 (10 mL) 和二氯甲烷 (10 mL) 依次洗，重复 3 次后树脂抽滤至干，并在真空下干燥后得标题化合物 (550 mg)。

步骤 2：(2S,10S,19S)-48-氨基-10-苄基-19-(3-(2-(环戊磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-6(5H)-基)丙酰氨基)-2-环丙基-22,25,28,31,34,37,40,43,46-九甲基-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48-十五氧代-3-氧杂-5,8,11,14,17,22,25,28,31,34,37,40,43,46-十四氮杂四十八烷-1-羧酸 (中间体 L16-2) 的合成

将中间体 L16-1 (550 mg) 加入混合溶剂二氯甲烷 (8 mL) 和 1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇 (2 mL) 中，在 25 $^{\circ}$ C 摇晃 0.5 hr。反应结束后，过滤反应液去除树脂，滤液减压浓缩至干，残余物直接经高效液相色谱法纯化 (柱子: Welch Xtimate C18 150*30mm*5 μ m; 流动相: [A: 水(0.225%甲酸), B: 乙腈]; B%: 18%-38%, 20min) 得标题化合物 (35 mg)。

步骤 3：(S)-N⁴-(26-氨基-3,6,9,12,15,18,21,24-八甲基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧代-3,6,9,12,15,18,21,24-八氮杂二十六烷-1-基)-N¹-((4S,12S)-12-苄基-4-环丙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二噻二氧代戊环并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]呋喃并[1,2-b]喹啉-14-基-2,2-d₂)-3,8,11,14,17-五氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16-五氮杂十八烷-18-基)-2-(3-(2-(环戊磺酰基)-5-氧代-7,8-二氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-6(5H)-基)丙酰氨基)-N⁴-甲基丁二酰胺(b-L12-1) 的合成

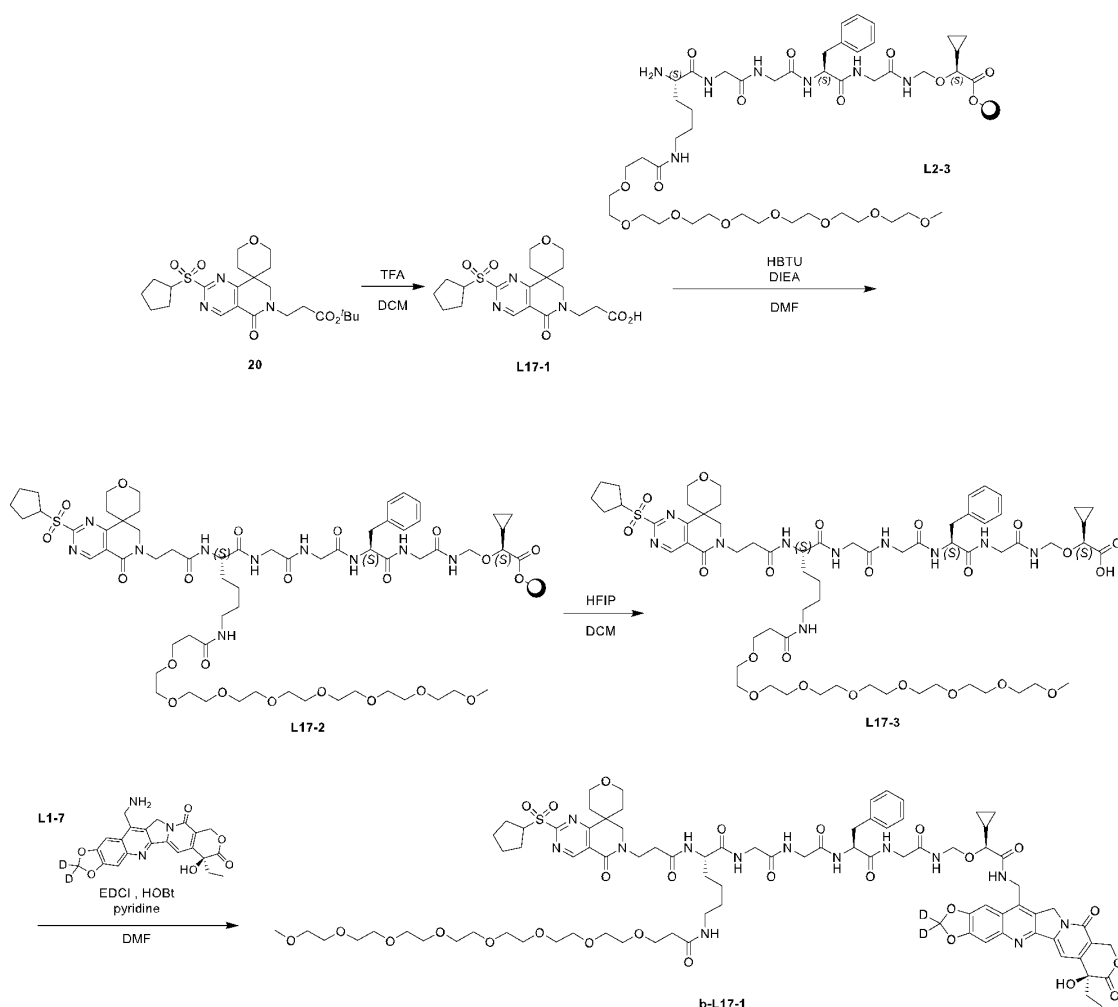
将中间体 L16-2 (35 mg)，中间体 L1-7 (9.54 mg)，1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(8.64 mg)，吡啶 (5.35 mg) 和 1-羟基苯并三唑 (6.09 mg) 溶解于 N,N-二甲基甲酰胺 (1 mL)，氮气置换 3 次，反应液在 25 $^{\circ}$ C 氮气保护下，搅拌反应 2 hr。反应结束后，反应液直接经高效液相色谱法纯化 (柱子: Welch Xtimate C18 150*30mm*5 μ m; 流动相: [A: 水(0.225%甲酸), B: 乙腈]; B%: 25%-45%, 20min) 得标题化合物 (8.2 mg)。

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 9.22 (s, 1H), 8.72-8.64 (m, 1H), 8.59 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 8.35-8.21 (m, 2H), 8.09-7.91 (m, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.35-7.19 (m, 5H), 7.18-7.15 (m, 1H), 7.11-7.04 (m, 1H), 6.53-

6.49 (m, 1H), 5.44 (d, $J = 9.8$ Hz, 3H), 4.83-4.30 (m, 9H), 4.28-3.82 (m, 13H), 3.78-3.48 (m, 18H), 3.08-2.64 (m, 30H), 2.04-1.80 (m, 6H), 1.73-1.56 (m, 4H), 1.53-1.39 (m, 1H), 1.24 (s, 3H), 1.01-0.92 (m, 1H), 0.87 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.43-0.26 (m, 4H)

MS m/z (ESI): 979.6 $[(M+2H)/2]^+$.

实施例 38、N-((4S,12S,21S)-12-苄基-21-(3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-2,3,5,6-四氢-5'H-螺[吡喃-4,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)丙酰氨基)-4-环丙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二噁戊环并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]呋喃并[1,2-b]喹啉-14-基-2,2-d₂)-3,8,11,14,17,20-六氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16,19-六氮杂二十五烷-25-基)-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂二十六烷-26-酰胺(b-L17-1)



步骤 1: 3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-2,3,5,6-四氢-5'H-螺[吡喃-4,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)丙酸(中间体 L17-1) 的合成

将化合物 **20** (680 mg) 溶解于二氯甲烷(10 mL), 再向反应液中加入三氟乙酸(0.68 mL), 反应液在 25 °C 下搅拌反应 1 hr。反应完毕后, 直接减压浓缩除去溶剂。残留物以快速硅胶柱层析法纯化 (ISCO®; 12g SepaFlash® 快速硅胶柱, 梯度 0~53% 四氢呋喃/石油醚, 流速 40 mL/min) 得标题化合物(200 mg)

MS m/z (ESI): 423.8 $[M+H]^+$

步骤 2: 树脂负载的(32S,41S,49S)-41-苄基-32-(3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-2,3,5,6-四氢-5'H-螺[吡喃-4,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)丙酰氨基)-49-环丙基-26,33,36,39,42,45-六氧代-

2,5,8,11,14,17,20,23,48-九氧杂-27,34,37,40,43,46-六氮杂五十烷-50-羧酸(中间体 L17-2) 的合成

将中间体 L2-3 (400 mg) 和中间体 L17-1 (106.13 mg) 溶解于 N,N-二甲基甲酰胺 (10 mL) 中。依次加入 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (159.06 mg) 和 N,N-二异丙基乙胺 (121.46 mg), 反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 h。反应结束后, 树脂用甲醇 (10 mL) 和二氯甲烷 (10 mL) 依次洗涤, 重复 3 次后树脂抽滤至干, 并在真空下干燥后得标题化合物(420 mg)。

MS m/z (ESI): 1391.5 [M+H]⁺。

步骤 3: (32S,41S,49S)-41-苄基-32-(3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-2,3,5,6-四氢-5'H-螺[吡喃-4,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)丙酰氨基)-49-环丙基-26,33,36,39,42,45-六氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,48-九氧杂-27,34,37,40,43,46-六氮杂五十烷-50-羧酸(中间体 L17-3)的合成

将中间体 L17-2 (400 mg) 溶解于二氯甲烷 (8 mL) 和 1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇(2 mL), 反应液在 25 °C 摇床中反应 0.25 h。反应完毕后, 反应液过滤经减压浓缩除去溶剂。残余物经制备高效液相色谱纯化(C18 柱 5μm 粒径, 30 mm 直径, 150 mm 长度; 用水(含有 0.225%甲酸)和乙腈的极性递减的混合物作为洗脱液; 乙腈梯度比例 20%-40%, 洗脱时间 22 分钟), 得标题化合物(15 mg)。

MS m/z (ESI): 1413.4 [M+Na]⁺。

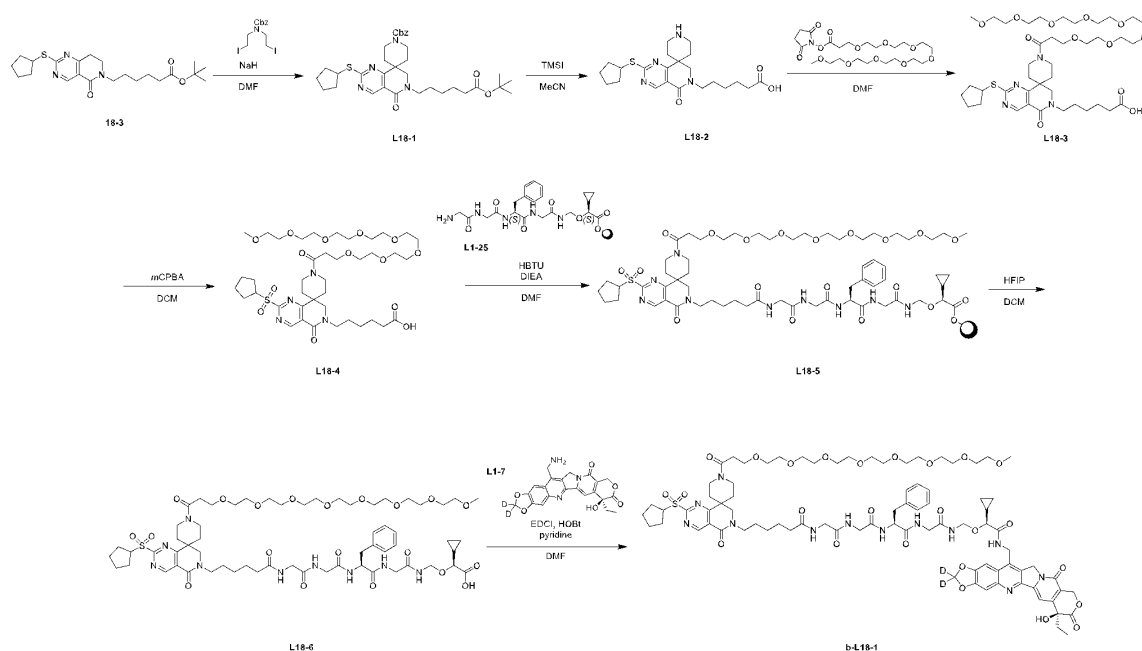
步骤 4: N-((4S,12S,21S)-12-苄基-21-(3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-2,3,5,6-四氢-5'H-螺[吡喃-4,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)丙酰氨基)-4-环丙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二噁戊环并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基-2,2-d₂)-3,8,11,14,17,20-六氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16,19-六氮杂二十五烷-25-基)-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂二十六烷-26-酰胺(b-L17-1) 的合成

将中间体 L17-3 (15 mg)和中间体 L1-7 (4.79 mg)溶解于 N,N-二甲基甲酰胺 (0.5 mL)中, 依次加入 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(4.13 mg), 1-羟基苯并三唑(2.91 mg)和吡啶(2.56 mg), 氮气置换 3 次。反应液在 25 °C 氮气保护下, 搅拌反应 1 h。反应结束后, 反应液直接经高效液相色谱法纯化(C18 柱 5μm 粒径, 30 mm 直径, 150 mm 长度; 用水 (含有 0.225%甲酸)和乙腈的极性递减的混合物作为洗脱液; 乙腈梯度比例 28%-48%, 洗脱时间 22 分钟)得标题化合物(9 mg)。

MS m/z (ESI): 899.1 [(M+2H)/2]⁺。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 9.28 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.62-8.56 (m, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.17-8.13 (m, 1H), 8.13-8.08 (m, 1H), 8.01-7.95 (m, 1H), 7.82-7.75 (m, 2H), 7.53-7.50 (m, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.24-7.21 (m, 4H), 7.19-7.13 (m, 1H), 6.48 (s, 1H), 5.44 (d, J = 8.9 Hz, 4H), 4.86-4.73 (m, 2H), 4.70-4.64 (m, 1H), 4.52-4.48 (m, 1H), 4.44-4.36 (m, 1H), 4.29 (s, 1H), 4.24-4.17 (m, 1H), 3.83-3.80 (m, 3H), 3.74-3.67 (m, 10H), 3.58-3.55 (m, 3H), 3.52-3.48 (m, 28H), 3.43-3.42 (m, 3H), 3.24 (s, 3H), 3.06-2.97 (m, 3H), 2.83-2.75 (m, 1H), 2.31-2.26 (m, 2H), 2.08-1.94 (m, 6H), 1.90-1.81 (m, 2H), 1.70-1.60 (m, 7H), 1.53-1.45 (m, 1H), 1.38-1.31 (m, 2H), 1.24 (s, 2H), 0.96 (s, 1H), 0.88 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 0.36 (s, 4H)

实施例 39、N-((4S,12S)-12-苄基-4-环丙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二噁戊环并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基-2,2-d₂)-3,8,11,14,17-五氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16-五氮杂十八烷-18-基)-6-(2'-(环戊磺酰基)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂-26-氧代二十六烷-26-基)-5'-氧代-5'H-螺[吡喃-4,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)己酰胺 (b-L18-1)



步骤 1: 6'-(6-叔丁氧基-6-氧代己基)-2'-(环戊硫基)-5'-氧代-6',7'-二氢-5'H-螺[哌啶并-4,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-1-甲酸苄酯 (中间体 L18-1) 的合成

在 0℃及氮气气氛下, 将中间体 **18-3** (3 g) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺(40 mL)中, 向其中加入 NaH (1.72 g, 60%有效含量), 反应在 0℃下搅拌 15 min, 向其中加入双(2-碘乙基)氨基甲酸苄酯 (9.85 g)。反应液在氮气保护 0℃搅拌 1 小时。反应完毕后, 混合物倒入 50 mL 冰水中, 经乙酸乙酯萃取 (20 mL×2), 合并有机相以无水硫酸钠干燥, 减压浓缩后经柱层析分离 (四氢呋喃/石油醚, 0-18%) 得标题化合物(2.7 g)。

LC-MS: m/z (ESI): 623.2 [M+H]⁺。

步骤 2: 6-(2'-(环戊硫基)-5'-氧代-5'H-螺[哌啶并-4,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)己酸 (中间体 L18-2) 的合成

将中间体 **L18-1** (2.7 g) 溶于乙腈 (5 mL), 向其中加入三甲基碘硅烷(1.23 mL), 反应液于 25℃搅拌 0.5 h。反应液经柱层析纯化 (柱子: Spherical C18 20-35 um 100 A 40 g; 流动相: [A: 水, B: 乙腈]; B%: 10%-30%, 60 min) 得标题化合物 (1.4 g)。

LC-MS: m/z (ESI): 433.3 [M+H]⁺。

步骤 3: 6-(2'-(环戊硫基)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂-26-氧代二十六烷-26-基)-5'-氧代-5'H-螺[哌啶并-4,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)己酸 (中间体 L18-3) 的合成

将中间体 **L18-2** (500 mg) 与 2,5-二氧代吡咯烷-1-基 2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂二十六烷-26 酸酯 (647.86 mg)溶于无水 N,N-二甲基甲酰胺 (2 mL), 向其中加入 N,N-二异丙基乙胺(302 μL), 反应液于 25℃搅拌 1 h。反应液经柱层析纯化 (柱子: Spherical C18 20-35 um 100 A 40 g; 流动相: [A: 水, B: 乙腈]; B%: 10%-30%, 60 min) 得标题化合物 (900 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 827.6 [M+H]⁺。

步骤 4: 6-(2'-(环戊磺酰基)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂-26-氧代二十六烷-26-基)-5'-氧代-5'H-螺[哌啶并-4,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)己酸(中间体 L18-4)的合成

在 0℃下, 将中间体 **L18-3** (0.9 g) 溶于无水二氯甲烷 (10 mL), 向其中加入间氯过氧苯甲酸 (375.58 mg), 反应液于 25℃搅拌 1 h。反应完毕后, 混合物经低温减压浓缩, 残余物经柱层析纯化 (柱子: Spherical C18 20-35 um 100 A 40 g; 流动相: [A: 水, B: 乙腈]; B%: 10%-24%, 60 min) 得标题化合物(472 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 859.5 [M+H]⁺。

步骤 5: 树脂负载的(2S,10S)-10-苄基-23-(2'-(环戊磺酰基)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂-26-氧代二十六烷-26-基)-5'-氧代-5'H-螺[哌啶并-4,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)-2-环丙基-6,9,12,15,18-五氧代-3-氧杂-

5,8,11,14,17-五氮杂二十三烷-1-羧酸(中间体 L18-5)的合成

在氮气气氛下, 中间体 L1-25 (308 mg), 中间体 L18-4 (466 mg), 苯并三氮唑-N,N,N,N-四甲基脲六氟磷酸盐 (309.72 mg) 的混合物中加入 N,N-二甲基甲酰胺 (6 mL) 和 N,N-二异丙基乙胺 (213.38 μ L), 将所得混合物在 20 °C 下摇床摇晃 1 hr。反应结束后, 树脂用甲醇 (20 mL) 和二氯甲烷 (20 mL) 依次洗涤, 重复 3 次后树脂抽滤至干, 并在真空下干燥后得标题化合物 (350 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 653.0 [(M+2H)/2]⁺

步骤 6: (2S,10S)-10-苄基-23-(2'-(环戊磺酰基)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂-26-氧代二十六烷-26-基)-5'-氧代-5'H-螺[哌啶-4,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)-2-环丙基-6,9,12,15,18-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14,17-五氮杂二十三烷-1-羧酸 (中间体 L18-6)的合成

在氮气气氛下, 中间体 L18-5 (350 mg) 溶于二氯甲烷 (10 mL) 和 1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇 (2.5 mL)。将所得混合物在 25 °C 下摇床摇晃 0.5 hr。反应结束后, 过滤反应液去除树脂, 滤液减压浓缩至干, 经高效液相色谱法纯化 (柱子: C18 Welch Xtimate C18 150*30mm*5 μ m; 流动相: [A: 水(0.225%甲酸), B: 乙腈]; B%: 22%-52%, 11 min) 得标题化合物(10 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 653.1 [(M+2H)/2]⁺

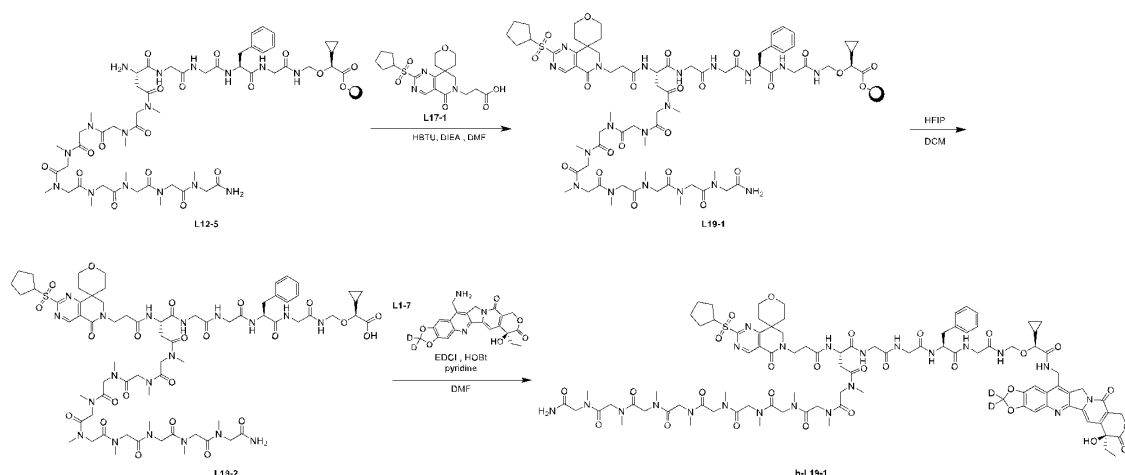
步骤 7: N-((4S,12S)-12-苄基-4-环丙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二噁戊环并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基-2,2-d₂)-3,8,11,14,17-五氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16-五氮杂十八烷-18-基)-6-(2'-(环戊磺酰基)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23-八氧杂-26-氧代二十六烷-26-基)-5'-氧代-5'H-螺[哌啶-4,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)己酰胺 (b-L18-1)的合成

在氮气气氛下, 中间体 L18-6 (10 mg) 中间体 L1-7 (3.25 mg), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (2.94 mg), 1-羟基苯并三唑 (2.07 mg) 和吡啶 (1.85 μ L) 的混合物中加入 N,N-二甲基甲酰胺 (2 mL)。将所得混合物在室温下搅拌 1 hr。LCMS 检测原料反应完毕后, 混合物反应液直接经高效液相色谱法纯化 (柱子: C18 Welch Xtimate C18 150*30mm*5 μ m; 流动相: [A: 水(0.225%甲酸), B: 乙腈]; B%: 28%-48%, 20 min) 得标题化合物 (7.3 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 855.9 [(M+2H)/2]⁺

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 9.28 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.15-8.06 (m, 2H), 8.04-7.99 (m, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.28-7.19 (m, 5H), 7.16 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 5.44 (d, J = 9.9 Hz, 4H), 4.77 (s, 2H), 4.71-4.63 (m, 1H), 4.49 (s, 1H), 4.39 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 4.26 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 3.95 (s, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.71-3.61 (m, 6H), 3.54-3.45 (m, 32H), 3.44-3.40 (m, 6H), 3.04 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 2.84-2.75 (m, 1H), 2.65-2.56 (m, 2H), 2.14 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.03-1.83 (m, 8H), 1.73-1.50 (m, 10H), 1.26 (d, J = 11.8 Hz, 2H), 0.95 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 0.87 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 0.40-0.28 (m, 4H)

实施例 40、(S)-N⁴-(26-氨基-3,6,9,12,15,18,21,24-八甲基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧代-3,6,9,12,15,18,21,24-八氮杂二十六烷-1-基)-N¹-((4S,12S)-12-苄基-4-环丙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二噁二氧代戊环并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-14-基-2,2-d₂)-3,8,11,14,17-五氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16-五氮杂十八烷-18-基)-2-(3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-2,3,5,6-四氢-5'H-螺[哌啶-4,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)丙酰氨基)-N⁴-甲基丁二酰胺 (b-L19-1)



步骤 1: 树脂负载的(2S,10S,19S)-48-氨基-10-苄基-19-(3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-2,3,5,6-四氢-5'H-螺[吡喃-4,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)丙酰氨基)-2-环丙基-22,25,28,31,34,37,40,43,46-九甲基-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48-十五氧代-3-氧杂-5,8,11,14,17,22,25,28,31,34,37,40,43,46-十四氮杂四十八烷-1-羧酸 (中间体 L19-1) 的合成

将中间体 L12-5 (880 mg) 和中间体 L17-1 (393.14 mg) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (15 mL) 中, 加入 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (453.65 mg) 和 N,N-二异丙基乙基胺 (313.82 uL)。反应液在 25 °C 放置于摇床摇晃 1 hr。反应结束后, 树脂用甲醇 (10 mL) 和二氯甲烷 (10 mL) 依次洗, 重复 3 次后树脂抽滤至干, 并在真空下干燥后得标题化合物 (920 mg)。

步骤 2: (2S,10S,19S)-48-氨基-10-苄基-19-(3-(2-(环戊磺酰基)-5'-氧代-2,3,5,6-四氢-5'H-螺[吡喃-4,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)丙酰氨基)-2-环丙基-22,25,28,31,34,37,40,43,46-九甲基-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48-十五氧代-3-氧杂-5,8,11,14,17,22,25,28,31,34,37,40,43,46-十四氮杂四十八烷-1-羧酸 (中间体 L19-2) 的合成

将中间体 L19-1 (920 mg) 加入混合溶剂二氯甲烷 (8 mL) 和 1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇 (2 mL) 中, 在 25 °C 摇晃 0.5 hr。反应结束后, 过滤反应液去除树脂, 滤液减压浓缩至干, 残余物直接经高效液相色谱法纯化 (柱子: Welch Xtimate C18 150*30mm*5um; 流动相: [A 相: 水(0.225%甲酸), B 相: 乙腈]; B%: 18%-38%, 20min) 得标题化合物 (65 mg)。

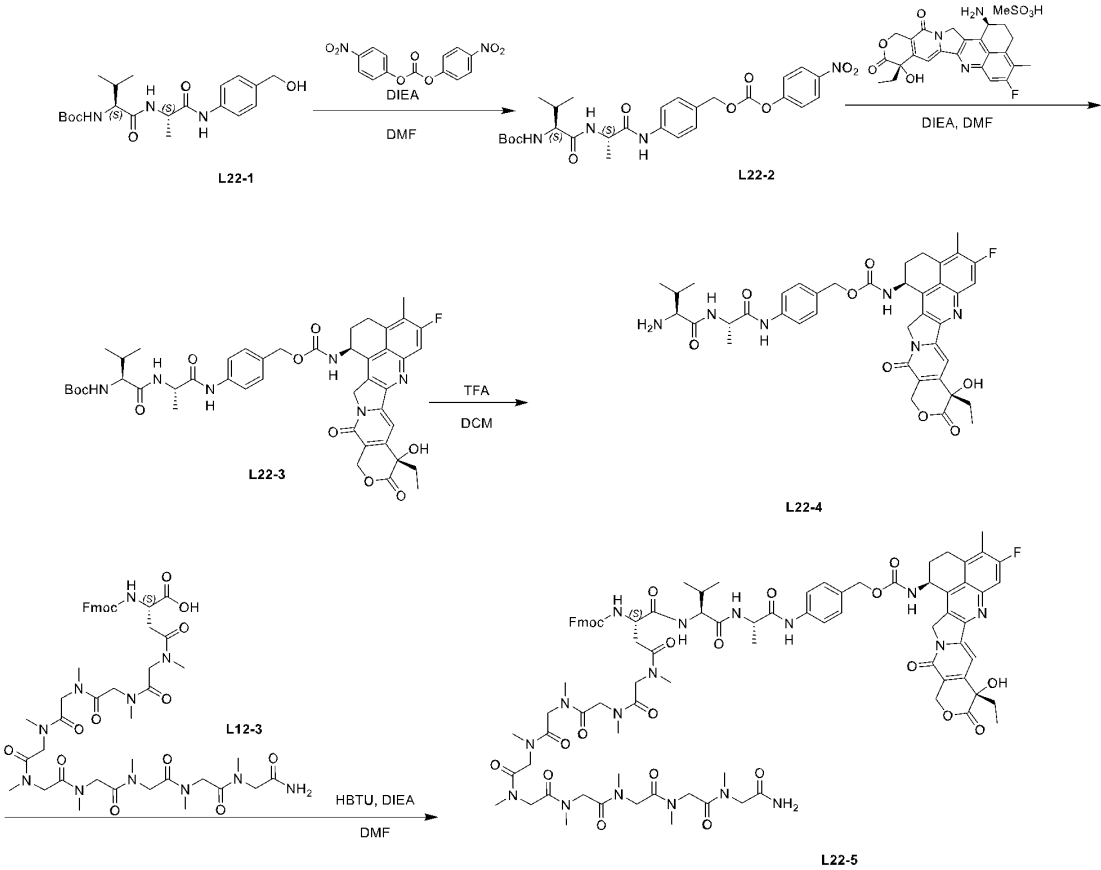
步骤 3: (S)-N⁴-(26-氨基-3,6,9,12,15,18,21,24-八甲基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧代-3,6,9,12,15,18,21,24-八氮杂二十六烷)-N¹-((4S,12S)-12-苄基-4-环丙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二噻戊环并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]呋喃并[1,2-b]喹啉-14-基-2,2-d₂)-3,8,11,14,17-五氧代-5-氧杂-2,7,10,13,16-五氮杂十八烷-18-基)-2-(3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-2,3,5,6-四氢-5'H-螺[吡喃-4,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)丙酰氨基)-N⁴-甲基丁二酰胺 (b-L19-1) 的合成

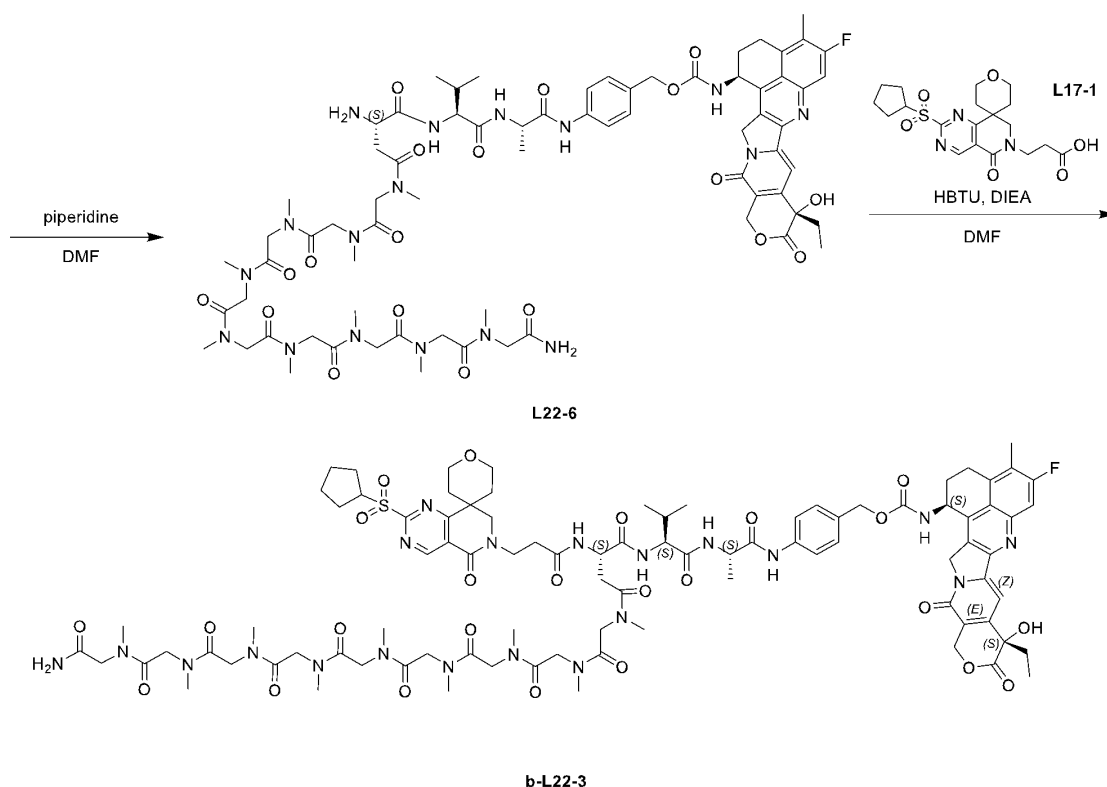
将中间体 L19-2 (65 mg)、中间体 L1-7 (22.10 mg)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (15.36 mg)、吡啶 (9.51 mg) 和 1-羟基苯并三唑 (10.82 mg) 溶解于 N,N-二甲基甲酰胺 (3 mL), 氮气置换 3 次, 反应液在 25 °C 氮气保护下, 搅拌反应 2 hr。反应结束后, 反应液直接经高效液相色谱法纯化 (柱子: Welch Xtimate C18 150*30mm*5um; 流动相: [A 相: 水(0.225%甲酸), B 相: 乙腈]; B%: 21%-51%, 11min) 得标题化合物 (35 mg)。

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 9.28 (s, 1H), 8.69-8.55 (m, 2H), 8.30-8.21 (m, 2H), 8.01 (m, 2H), 7.79 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.39-7.27 (m, 1H), 7.26-7.21 (m, 5H), 7.15 (s, 1H), 7.11-7.00 (m, 1H), 6.49 (s, 1H), 5.43 (d, J = 5.8 Hz, 4H), 4.86-4.70 (m, 2H), 4.70-4.63 (m, 1H), 4.62-4.53 (m, 1H), 4.52-4.44 (m, 1H), 4.40-4.17 (m, 10H), 4.12-3.89 (m, 9H), 3.86-3.76 (m, 5H), 3.75-3.65 (m, 9H), 3.63-3.52 (m, 2H), 3.51-3.43 (m, 2H), 3.00-2.68 (m, 32H), 2.07-1.92 (m, 6H), 1.91-1.80 (m, 2H), 1.71-1.59 (m, 6H), 1.01-0.92 (m, 1H), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.38-0.27 (m, 4H)

MS m/z (ESI): 1014.8 [(M+2)/2]⁺。

实施例 41、((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧化-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基甲酸 4-((30S,33S,36S)-1-氨基-30-(3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-2,3,5,6-四氢-5'H-螺[吡喃-4,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)丙酰胺基)-33-异丙基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,36-十甲基-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34-十二氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27,32,35-十一氮杂三十七烷-37-甲酰胺基)苄基酯(化合物 b-L22-3)





步骤 1: ((S)-3-甲基-1-(((S)-1-((4-((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基)-1-氧代丁酸-2-基)氨基甲酸叔丁酯(中间体 L22-2)的合成

将中间体 L22-1(1.9 g)和二(4-硝基苯基)碳酸酯(1.76 g)溶于 DMF(20 mL), 氮气氛围下加入 DIEA(2.5 g), 反应液在 25 °C 下搅拌 3 h。之后反应液直接浓缩除去溶剂, 粗产品经快速硅胶柱(ISCO®; 20 g SepaFlash® 快速硅胶柱, 洗脱剂 0~45% 四氢呋喃/石油醚, 梯度@ 65 mL/min)纯化得标题化合物(2.5 g)。

MS m/z (ESI): 559.2 [M+H]⁺

步骤 2: ((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基甲酸 4-((S)-2-((S)-2-((叔丁氧羰基)氨基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基酯 (中间体 L22-3)的合成

将中间体 L22-2(1 g)和依喜替康甲磺酸盐(999.20 mg)溶于 DMF(17 mL)和吡啶(3 mL), 氮气氛围下加入 HOBT(266.10 mg)和 DIEA(277.65 mg, 374.19 uL), 反应液在 25 °C 下搅拌 3 h。之后反应液直接经高效液相色谱法纯化得标题化合物(1.1 g)。

MS m/z (ESI): 855.2 [M+H]⁺。

步骤 3: ((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基甲酸 4-((S)-2-((S)-2-氨基-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基酯(中间体 L22-4)的合成

室温下, 向中间体 L22-3(1.1 g)的二氯甲烷(20 mL)溶液中加入三氟乙酸(5 mL), 反应液在 25 °C 搅拌 1 h。之后将反应液直接浓缩后真空干燥得标题化合物 (0.9 g)。

MS m/z (ESI): 755.5 [M+H]⁺

步骤 4: ((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基甲酸 4-((30S,33S,36S)-30-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-1-氨基-33-异丙基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,36-十甲基-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34-十二氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27,32,35-十一氮杂三十七烷-37-氨基)苄基酯(中间体 L22-5)的合成

将中间体 L22-4(135 mg)和中间体 L12-3(97.79 mg)溶于 DMF(2 mL), 氮气氛围下加入 HBTU(74.61 mg)

和 DIEA(38.14 mg), 反应液在 25 °C 下搅拌 3 h。之后反应液直接经 C18 反相柱(乙腈: 水 = 0-50%)纯化得标题化合物(120 mg)。

MS m/z (ESI): 1732.1 [M+H]⁺

步骤 5: ((1*S*,9*S*)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1*H*,12*H*-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-*b*]喹啉-1-基)氨基甲酸 4-((30*S*,33*S*,36*S*)-1,30-二氨基-33-异丙基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,36-十甲基-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34-十二氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27,32,35-十一氮杂三十七烷-37-氨基)苄基酯 (中间体 L22-6)的合成

将中间体 L22-5(60 mg)溶于 DMF(0.5 mL), 氮气氛围下加入哌啶(0.1 mL), 反应液在 25 °C 下搅拌 1 h。之后反应液直接经 C18 反相柱(乙腈: 水 = 0-50%)纯化标题化合物(50 mg)。

MS m/z (ESI): 1508.8 [M+H]⁺

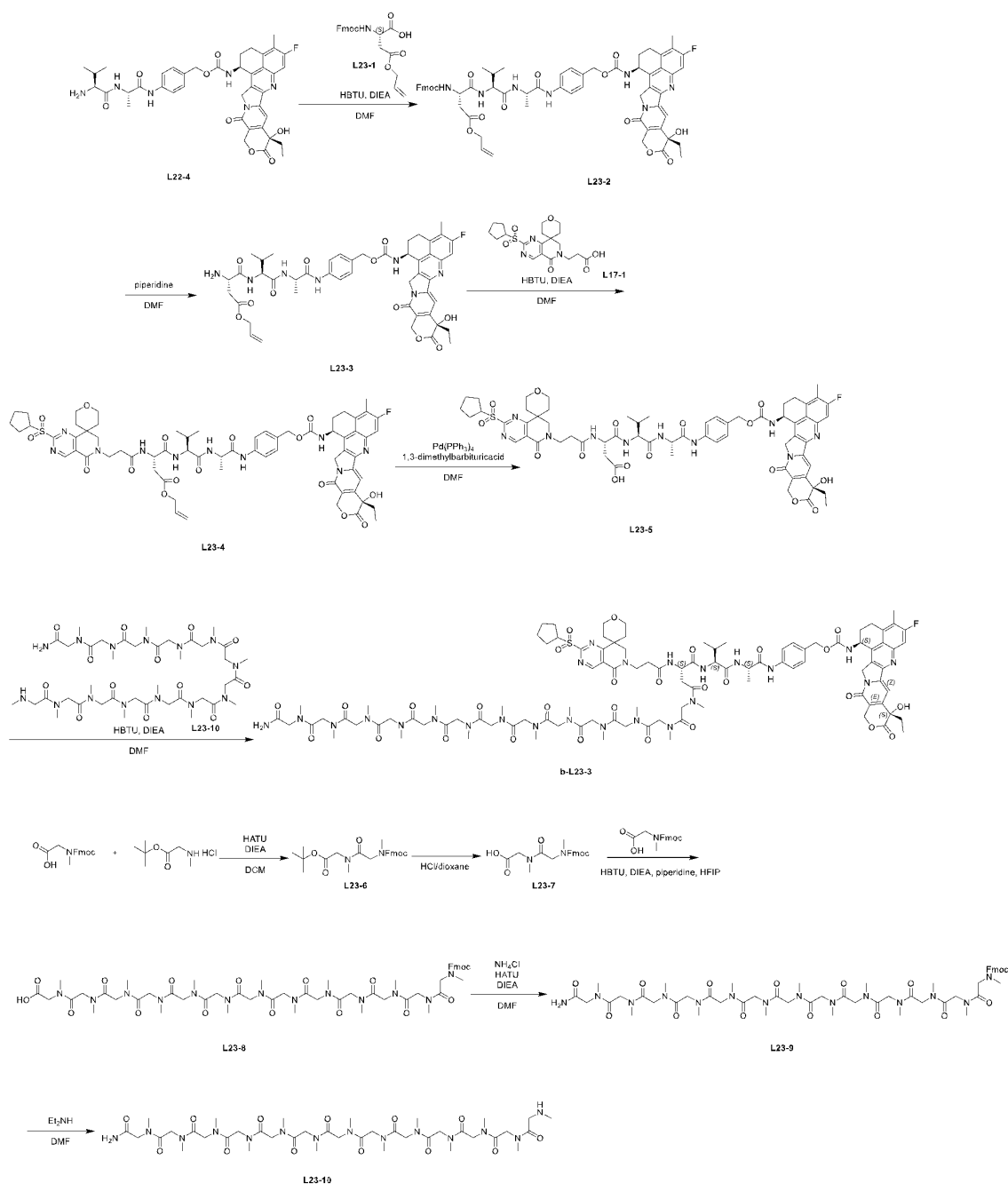
步骤 6: ((1*S*,9*S*)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1*H*,12*H*-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-*b*]喹啉-1-基)氨基甲酸 4-((30*S*,33*S*,36*S*)-1-氨基-30-(3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-2,3,5,6-四氢-5'*H*-螺[吡喃-4,8'-吡啶并[4,3-*d*]嘧啶]-6'(7'*H*)-基)丙酰胺基)-33-异丙基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,36-十甲基-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34-十二氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27,32,35-十一氮杂三十七烷-37-甲酰胺基)苄基酯(化合物 b-L22-3)的合成

室温下, 向中间体 L22-6(40 mg)和中间体 L17-1(13.47 mg)的 DMF(1 mL)溶液中加入 HBTU(20.11 mg)和 DIEA(10.28 mg, 13.86 μ L), 反应液在 25 °C 搅拌 1 h。之后反应液直接经高效液相色谱法纯化(柱子: C18 150 $\times$ 30mm $\times$ 5 μ m; 流动相: [A: 水(0.225%甲酸), B: 乙腈]; B%: 26%-56%, 20min)得标题化合物(18.6 mg)。

MS m/z (ESI): 1915.5[M+H]⁺。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 9.68-9.42 (m, 1H), 9.35-8.93 (m, 1H), 8.21-8.17 (m, 2H), 8.06-8.02 (m, 2H), 7.78 (d, *J* = 10.8 Hz, 2H), 7.66-7.62 (m, 3H), 7.37 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.32 (s, 1H), 5.45 (s, 2H), 5.29 (s, 3H), 5.08 (s, 2H), 4.79-4.63 (m, 1H), 4.41-4.16 (m, 10H), 4.13-3.90 (m, 10H), 3.84 (s, 4H), 3.75-3.62 (m, 5H), 3.01-2.72 (m, 32H), 2.38 (s, 3H), 2.26-2.14 (m, 4H), 2.09-1.85 (m, 8H), 1.72-1.60 (m, 5H), 1.550-1.46 (m, 2H), 1.38-1.30 (m, 3H), 0.91-0.81 (m, 9H)。

实施例 42、((1*S*,9*S*)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1*H*,12*H*-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-*b*]喹啉-1-基)氨基甲酸 4-((42*S*,45*S*,48*S*)-1-氨基-42-(3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-2,3,5,6-四氢-5'*H*-螺[吡喃并-4,8'-吡啶并[4,3-*d*]嘧啶]-6'(7'*H*)-基)丙酰胺基)-45-异丙基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,48-十四甲基-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46-十六氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,44,47-十五氮杂四十九烷-49-酰胺基)苄基酯(化合物 b-L23-3)



步骤 1: (S)-3-((((9H-苄-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(((S)-1-(((S)-1-((4-((((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1*H*,12*H*-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-*b*]喹啉-1-基)氨基)羰基)氨基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-4-氧代丁酸烯丙酯(中间体 L23-2)的合成

将中间体 L22-4(300 mg)和化合物 L23-1(86.44 mg)溶于 DMF(4 mL)中, 向其中加入 HBTU(110.99 mg)和 DIEA(84.76 mg)。反应液于氮气氛围下 25 °C 搅拌 1 h。之后混合物直接经反相纯化(柱子: C18(12 g); 流动相: [A: 水, B: 乙腈]; B%: 0%-100%, 60 mL/min)得标题化合物(180 mg)。

MS *m/z* (ESI): 1132.6 [M+H]⁺。

步骤 2: (S)-3-氨基-4-(((S)-1-(((S)-1-((4-((((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六

氢-1*H*,12*H*-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-*b*]喹啉-1-基)氨基羰基(氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-4-氧代丁酸烯丙酯(中间体 L23-3)的合成

将中间体 L23-2(170 mg)溶于 DMF(1.5 mL)和哌啶(0.3 mL)中,于氮气保护下 25°C 搅拌 1h。之后直接经反相纯化(柱子: C18(40 g); 流动相: [A: 水, B: 乙腈]; B%: 0%-40%, 60 mL/min)得标题化合物(100 mg)。

MS *m/z* (ESI): 910.4 [M+H]⁺。

步骤 3: (S)-3-(3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-2,3,5,6-四氢-5'*H*-螺[吡喃-4,8'-吡啶并[4,3-*d*]嘧啶]-6'(7'*H*)-基)丙酰氨基)-4-(((S)-1-(((S)-1-(((S)-1-(((1*S*,9*S*)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1*H*,12*H*-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-*b*]喹啉-1-基)氨基甲酰基(氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-4-氧代丁酸烯丙酯(中间体 L23-4)的合成

将中间体 L23-3(30 mg)和中间体 L17-1(15.36 mg)溶于 DMF(1 mL)中,向其中加入 HBTU(25.01 mg)和 DIEA(12.78 mg)。反应液于氮气中 25°C 搅拌 1h。之后混合物直接经反相纯化(柱子: C18(12 g); 流动相: [A: 水, B: 乙腈]; B%: 0%-100%, 40 mL/min)得标题化合物(15 mg)。

MS *m/z* (ESI): 1315.5 [M+H]⁺。

步骤 4: (S)-3-(3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-2,3,5,6-四氢-5'*H*-螺[吡喃-4,8'-吡啶并[4,3-*d*]嘧啶]-6'(7'*H*)-基)丙酰氨基)-4-(((S)-1-(((S)-1-(((S)-1-(((1*S*,9*S*)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1*H*,12*H*-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-*b*]喹啉-1-基)氨基甲酰基(氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-4-氧代丁酸(中间体 L23-5)的合成

将中间体 L23-4(14 mg)溶于 DMF(0.5 mL)中,向其中加入四三苯基磷钨(3.69 mg)和 1,3-巴比妥酸(2.49 mg)。反应液于氮气保护下 25°C 搅拌 1h。之后混合物直接经反相纯化(柱子: C18(12 g); 流动相: [A: 水, B: 乙腈]; B%: 0%-90%, 40 mL/min)得标题化合物(13 mg)。

MS *m/z* (ESI): 1275.2 [M+H]⁺。

步骤 5: *N*-(*N*-(((9*H*-苄-9-基)甲氧基)羰基)-*N*-甲基甘氨酸基)-*N*-甲基甘氨酸叔丁酯(中间体 L23-6)的合成

将 Fmoc-肌氨酸(50 g)溶于二氯甲烷(500 mL),向反应液加入 HATU(66.65 g)和 DIEA(83.92 mL),将所得混合物在 25 °C 下搅拌 1 hr,向反应液加入 *N*-甲基甘氨酸叔丁酯盐酸盐(29.17 g)。反应液在 25 °C 搅拌 2 h。之后混合物用 200 mL 水稀释,经二氯甲烷萃取(100 mL×3),合并有机相以无水硫酸钠干燥,减压浓缩后得标题化合物(115 g)。

LC-MS: *m/z* (ESI): 439.2 [M+H]⁺

步骤 6: *N*-(*N*-(((9*H*-苄-9-基)甲氧基)羰基)-*N*-甲基甘氨酸基)-*N*-甲基甘氨酸(中间体 L23-7)的合成

将中间体 L23-6(110 g)溶于盐酸二氧六环(400 mL),反应液在 25 °C 搅拌 16 h。反应完毕后,减压浓缩后经柱层析分离(甲醇/二氯甲烷, 0-9%)得标题化合物(40 g)。

LC-MS: *m/z* (ESI): 383.2 [M+H]⁺

步骤 7: 1-(9*H*-苄-9-基)-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-十三甲基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39-十三氧代-2-氧杂-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-十三氮杂四十二烷-42-酸(中间体 L23-8)的合成

该化合物由多肽固相合成法合成,步骤如下:

- 9) 在氮气保护下向 CTC 树脂(1.17 mmol/g, 15 g)与 *N*-(((9*H*-苄-9-基)甲氧基)羰基)-*N*-甲基甘氨酸(5.5 g)的混合物中加入二氯甲烷;
- 10) 滴加二异丙基乙胺 DIEA(40 mL)并混合搅拌 16 h;
- 11) 过滤树脂并用甲醇(100 mL)和 DCM(100 mL)洗涤三次;
- 12) 加入 20%哌啶/DMF 溶液并反应 1 h;
- 13) 过滤树脂并用甲醇(100 mL)和 DCM(100 mL)洗涤三次;
- 14) 根据树脂重量,加入中间体 L23-7(2.0 eq.),之后加入 HBTU(3 eq.)与 DIEA(6.0 eq.)。反应在氮气鼓泡条件下进行 1 h;
- 15) 重复步骤 3-6 五次。

固相制备完毕后,向所得混合物中加入 20% HFIP/DCM 溶液(12.5 mL)并搅拌反应 1 h。之后过滤,收集滤液后浓缩,得标题化合物(150 mg)。

MS *m/z* (ESI): 1164.8 [M+H]⁺。

步骤 8: (38-氨基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-十二甲基-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-十三氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-十二氮杂三十八烷基)(甲基)氨基甲酸 (9H-茚-9-基)甲酯(中间体 L23-9)的合成

将中间体 L23-8(130 mg)溶于 DMF(2 mL)中,依次加入氯化铵(17.92 mg)和 HATU(84.25 mg), DIEA(11.97 μ L)。反应液在 25 °C 搅拌 1 h。反应结束后,经反相柱纯化(柱子: Spherical C18 20-35 μ m 100 A 20 g; 流动相: [A: 水, B: 乙腈]; B%: 10%-30%, 60 min)得标题化合物(80 mg)。

MS m/z (ESI): 1163.6 [M+H]⁺。

步骤 9: N-(2-氨基-2-氧代乙基)-N-甲基-2-(N,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-十一烷甲基-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-十氧代-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-十一氮杂三十四烷-34-甲酰氨基)乙酰胺(中间体 L23-10)的合成

将中间体 L23-9(70 mg)溶于 DMF(0.5 mL)中,加入二乙胺(30.99 μ L)。反应液在 25 °C 搅拌 2 h。反应结束后,经反相柱纯化(柱子: Spherical C18 20-35 μ m 100 A 20 g; 流动相: [A: 水, B: 乙腈]; B%: 10%-30%, 60 min)得标题化合物(32 mg)。

LC-MS: m/z (ESI): 941.3 [M+H]⁺

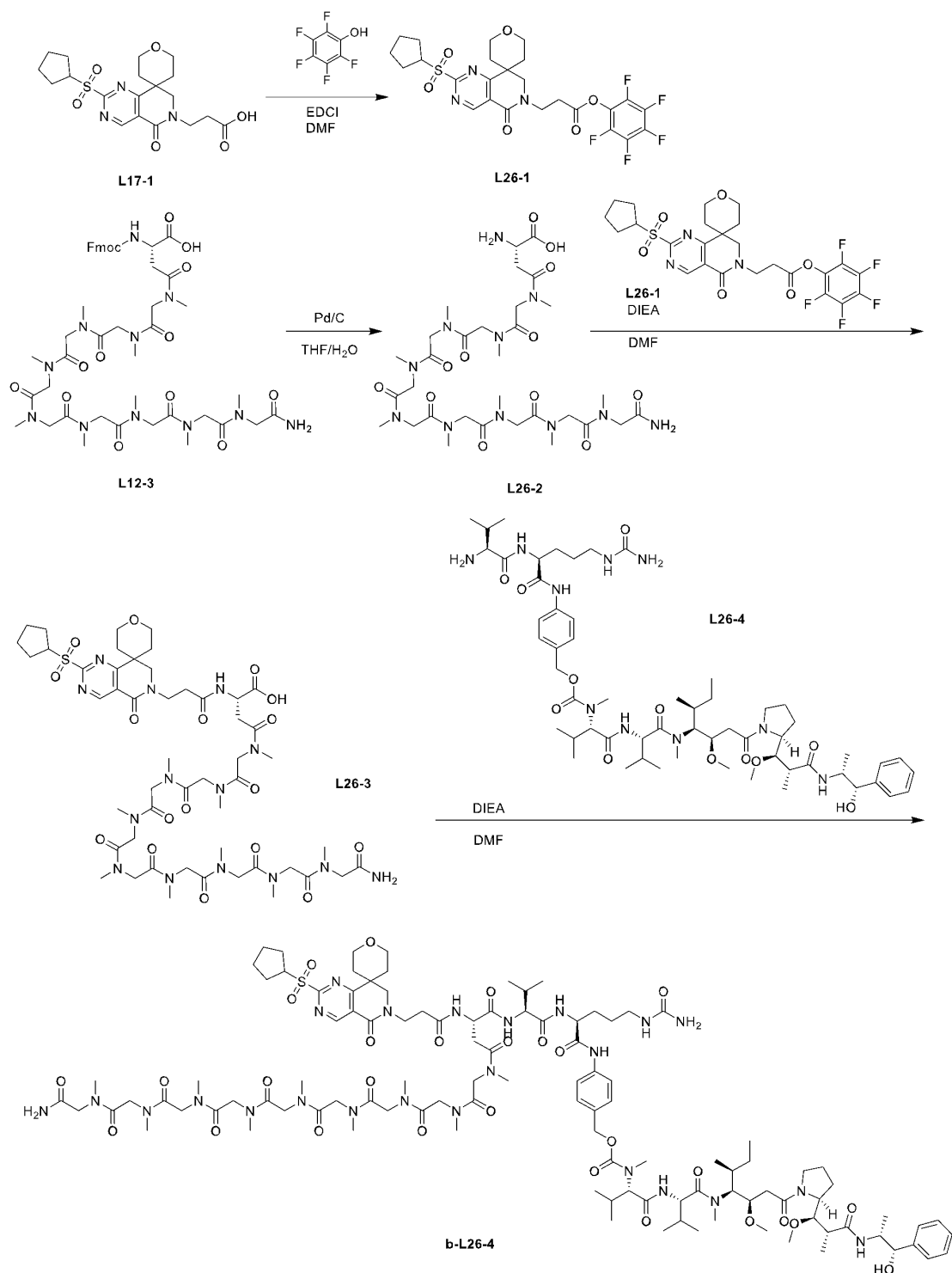
步骤 10: ((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基甲酸 4-((42S,45S,48S)-1-氨基-42-(3-(2'-(环戊基磺酰)-5'-氧代-2,3,5,6-四氢-5'H-螺[吡喃并-4,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)丙酰氨基)-45-异丙基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,48-十四甲基-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46-十六氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,44,47-十五氮杂四十九烷-49-酰胺基)苄基酯(化合物 b-L23-3)的合成

将中间体 L23-5(13 mg)和中间体 L23-10(9.59 mg)溶于 DMF(0.5 mL)中,向其中加入 HBTU(7.73 mg)和 DIEA(3.95 mg)。反应液于氮气中 25°C 搅拌 1 h。反应结束后,反应液过滤,经制备高效液相色谱纯化(Welch Xtimate C18 柱 5 μ m 二氧化硅, 30 mm 直径, 150 mm 长度; 用水(含 0.225% 甲酸)和乙腈的极性递减的混合物作为洗脱液; 乙腈梯度比例 26%-56%, 洗脱时间 11 分钟)得标题化合物(2.7 mg)。

MS m/z (ESI): 1099.9 [(M+2H)/2]⁺

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 9.67-9.42 (m, 1H), 9.29 (s, 1H), 8.46-8.24 (m, 1H), 8.16-8.02 (m, 2H), 7.78 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 7.69-7.61 (m, 2H), 7.37 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.31 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.45 (s, 2H), 5.29 (s, 3H), 5.08 (s, 2H), 4.78-4.64 (m, 1H), 4.42-4.19 (m, 14H), 4.12-3.89 (m, 14H), 3.84 (s, 5H), 3.74-3.62 (m, 4H), 3.18-3.05 (m, 2H), 3.00-2.65 (m, 45H), 2.38 (s, 3H), 2.25-2.14 (m, 2H), 2.11-1.76 (m, 9H), 1.72-1.61 (m, 5H), 1.54-1.40 (m, 1H), 1.37-1.29 (m, 3H), 0.93-0.80 (m, 10H)。

实施例 43: ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羟基-1-苯基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基)吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基)(甲基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)(甲基)氨基甲酸 4-((30S,33S,36S)-1-氨基-30-(3-(2'-(环戊基磺酰)-5'-氧代-2,3,5,6-四氢-5'H-螺[吡喃并-4,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)丙酰氨基)-33-异丙基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九甲基-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34-十二氧代-36-(3-脲基丙基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27,32,35-十一氮杂三十七烷-37-酰胺基)苄基酯 (化合物 b-L26-4)



步骤 1: 3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-2,3,5,6-四氢-5'H-螺[吡喃-4,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)丙酸五氟苯酯(中间体 L26-1)的合成

将中间体 **L17-1**(0.5 g)和五氟苯酯(325.98 mg)溶于 DMF(5 mL), 氮气氛围下加入 EDCI(425.68 mg), 反应液在 25 °C 下搅拌 1 h。之后反应液直接经 C18 反相柱(100%乙腈)纯化得标题化合物(600 mg)。

MS m/z (ESI): 590.3 [M+H]⁺

步骤 2: (S)-1,30-二氨基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九甲基-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28-十氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氮杂三十一烷-31-酸(中间体 L26-2)的合成

将中间体 L12-3(1 g)溶于四氢呋喃(10 mL)和水(5 mL)中,加入湿钨碳(244.36 mg),随后在氢气氛围下反应液在 25 °C 下搅拌 16 h。之后反应液直接过滤浓缩后得标题化合物 (0.7 g)。

MS m/z (ESI): 772.3[M+H]⁺。

步骤 3: (S)-1-氨基-30-(3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-2,3,5,6-四氢-5'H-螺[吡喃并-4,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)丙酰氨基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九甲基-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28-十氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氮杂三十一烷-31-酸(中间体 L26-3)的合成

将中间体 L26-2(300 mg)和中间体 L26-1(206.23 mg)溶于 DMF(3 mL),氮气氛围下加入 DIEA(150.71 mg),反应液在 25 °C 下搅拌 1 h。之后反应液直接经高效液相色谱法纯化(柱子: C18 150×30mm×5um; 流动相: [A: 水(0.225%甲酸), B: 乙腈]; B%: 13%-33%, 10min)得标题化合物(100 mg)。

MS m/z (ESI): 1177.5[M+H]⁺

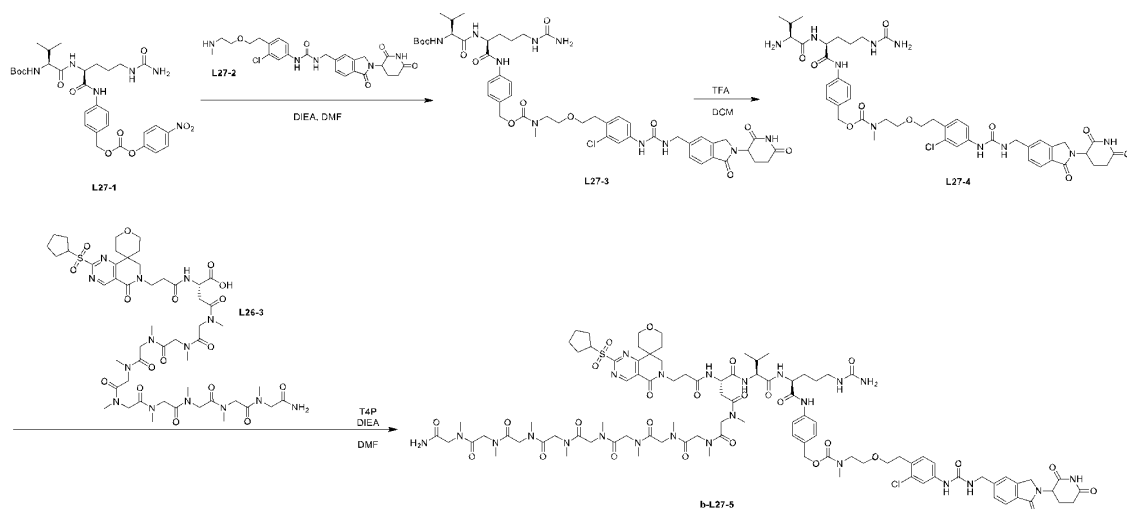
步骤 4: ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羟基-1-苯基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基)吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基)(甲基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)(甲基)氨基甲酸 4-((30S,33S,36S)-1-氨基-30-(3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-2,3,5,6-四氢-5'H-螺[吡喃并-4,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)丙酰氨基)-33-异丙基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九甲基-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34-十二氧代-36-(3-脲基丙基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27,32,35-十一氮杂三十七烷-37-酰胺基)苄基酯(化合物 b-L26-4)的合成

室温下,将中间体 L26-3(20 mg)和化合物 L26-4(19.08 mg)溶于 DMF(0.5 mL),氮气氛围下加入正丁基磷酸三酐(T4P)(24.48 mg, 50%有效含量)和 DIEA(8.78 mg, 11.84 uL),反应液在 25 °C 搅拌 1 h。之后反应液直接经高效液相色谱法纯化(柱子: C18 150×40mm; 流动相: [A: 水(0.225%甲酸), B: 乙腈]; B%: 20%-60%, 9min)得标题化合物(11 mg)。

MS m/z (ESI): 1142.6 [(M+2H)/2]⁺

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 9.80-9.51 (m, 1H), 9.32-9.23 (m, 1H), 8.40-8.27 (m, 1H), 8.18-7.95 (m, 2H), 7.89 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.62 (s, 2H), 7.33-7.23 (m, 6H), 7.17 (s, 2H), 5.97 (s, 1H), 5.40 (s, 3H), 5.15-4.91 (m, 2H), 4.79-4.57 (m, 2H), 4.49 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 4.37-4.19 (m, 10H), 4.13-3.66 (m, 22H), 3.61-3.54 (m, 1H), 3.25-3.17 (m, 9H), 3.12 (s, 2H), 3.02-2.71 (m, 34H), 2.31-2.23 (m, 1H), 2.16-1.90 (m, 11H), 1.84-1.57 (m, 12H), 1.56-1.20 (m, 8H), 1.06-0.97 (m, 6H), 0.91-0.72 (m, 26H)。

实施例 44: (2-(2-氯-4-(3-((2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异喹啉啉-5-基)甲基)脲基)苄氧基)乙基)(甲基)氨基甲酸 4-((30S,33S,36S)-1-氨基-30-(3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-2,3,5,6-四氢-5'H-螺[吡喃并-4,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'(7'H)-基)丙酰氨基)-33-异丙基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九甲基-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34-十二氧代-36-(3-脲基丙基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27,32,35-十一氮杂三十七烷-37-酰胺基)苄基酯(化合物 b-L27-5)



步骤 1: (2-(2-氯-4-(3-((2-(2,6-二氧代嘧啶-3-基)-1-氧代异吡咯啉-5-基)甲基)脲基)苯乙氧基)乙基)(甲基)氨基甲酸 4-((S)-2-((S)-2-((叔丁氧羰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)-5-脲基戊酰氨基)苄基酯(中间体 L27-3)的合成

将化合物 **L27-1** (100 mg) 和化合物 **L27-2** (90 mg, 参考专利 WO2021198965 报道方法合成) 溶于 DMF (1 mL), 氮气氛围下加入 DIEA (60.08 mg), 反应液在 25 °C 下搅拌 1 h。之后反应液用乙酸乙酯 (30 mL) 稀释, 并水洗 (30 mL × 3), 合并有机相用无水硫酸钠干燥。过滤后滤液减压浓缩, 残余物经快速硅胶柱 (ISCO®; 20 g SepaFlash® 快速硅胶柱, 洗脱剂 0~100% 四氢呋喃/石油醚, 梯度 @ 40 mL/min) 纯化得标题化合物 (100 mg)。

MS m/z (ESI): 1033.3 [M+H]⁺。

步骤 2: (2-(2-氯-4-(3-((2-(2,6-二氧代嘧啶-3-基)-1-氧代异吡咯啉-5-基)甲基)脲基)苯乙氧基)乙基)(甲基)氨基甲酸 4-((S)-2-((S)-2-氨基-3-甲基丁酰氨基)-5-脲基戊酰氨基)苄基酯(中间体 L27-4)的合成

0 °C 下, 向中间体 **L27-3** (100 mg) 的二氯甲烷 (1 mL) 溶液中加入三氟乙酸 (0.2 mL), 反应液在 25 °C 搅拌 1 h。之后将反应液直接浓缩后真空干燥后直接经高效液相色谱法纯化 (柱子: C18 150×30mm; 流动相: [A: 水 (0.0025% 盐酸), B: 乙腈]; B%: 12%-52%, 9min) 得标题化合物 (13 mg)。

MS m/z (ESI): 933.6 [M+H]⁺

步骤 3: (2-(2-氯-4-(3-((2-(2,6-二氧代嘧啶-3-基)-1-氧代异吡咯啉-5-基)甲基)脲基)苯乙氧基)乙基)(甲基)氨基甲酸 4-((3S,3'S,36S)-1-氨基-30-(3-(2'-(环戊磺酰基)-5'-氧代-2,3,5,6-四氢-5'-H-螺[吡喃-4,8'-吡啶并[4,3-d]嘧啶]-6'-(7'H)-基)丙酰氨基)-33-异丙基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九甲基-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34-十二氧代-36-(3-脲基丙基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27,32,35-十一氮杂三十七烷-37-酰胺基)苄基酯(化合物 b-L27-5)的合成

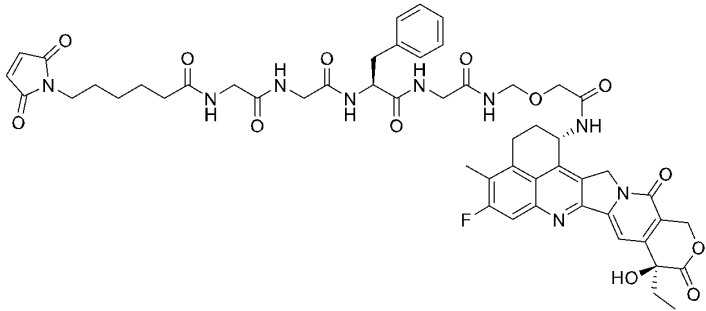
室温下, 向中间体 **L27-4** (11 mg) 和化合物 **L26-3** (13.87 mg) 的 DMF (0.5 mL) 溶液中加入正丁基磷酸三酐 (12.73 mg, 50% 含量) 和 DIEA (4.57 mg, 6.16 μL), 反应液在 25 °C 搅拌 1 h。之后反应液直接经高效液相色谱法纯化 (柱子: C18 150×30mm; 流动相: [A: 水 (0.225% 甲酸), B: 乙腈]; B%: 22%-62%, 9min) 得标题化合物 (6.5 mg)。

MS m/z (ESI): 1046.9 [(M+2H)/2]⁺

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.99 (s, 1H), 9.79-9.52 (m, 1H), 9.29 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.41-8.21 (m, 1H), 8.10-7.90 (m, 2H), 7.73-7.58 (m, 4H), 7.52 (s, 1H), 7.44 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.30 (s, 2H), 7.23-7.05 (m, 3H), 6.81 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 5.98 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.13-5.09 (m, 1H), 4.98 (s, 2H), 4.81-4.65 (m, 1H), 4.41 (d, J = 8.0 Hz, 3H), 4.37-4.19 (m, 10H), 4.14-3.99 (m, 6H), 3.97-3.86 (m, 4H), 3.85-3.74 (m, 6H), 3.73-3.65 (m, 3H), 3.59-3.45 (m, 8H), 3.02-2.89 (m, 12H), 2.89-2.73 (m, 22H), 2.64-2.57 (m, 2H), 2.41-2.37 (m, 1H), 2.09-1.91 (m, 8H), 1.84-1.75 (m, 1H), 1.70-1.61 (m, 6H), 1.48-1.44 (m, 3H), 1.39-1.31 (m, 2H), 0.89-0.78 (m, 8H)。

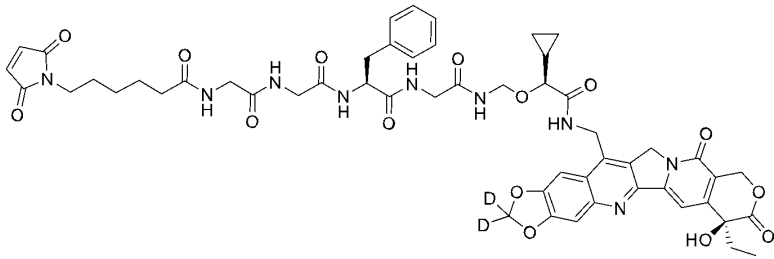
实施例 45、药物-连接器对照 1~5 的制备或来源

药物-连接子对照 1 的制备参考专利文献 CN111065621A，



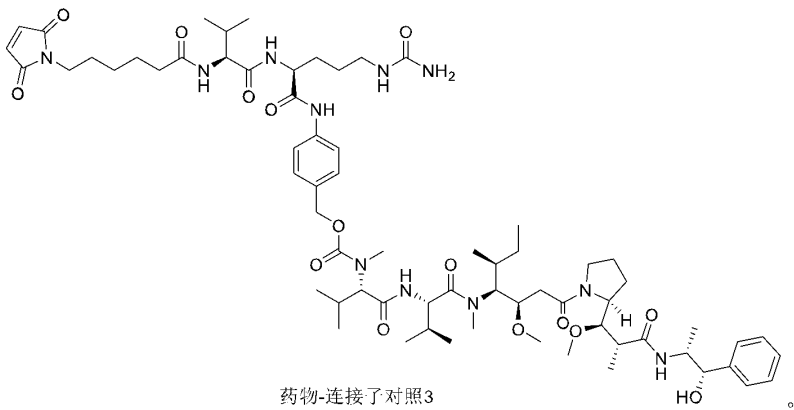
药物-连接子对照 1

药物-连接子对照 2 参考实施例 22 和专利文献 CN111065621A 报道的方法制备得到，



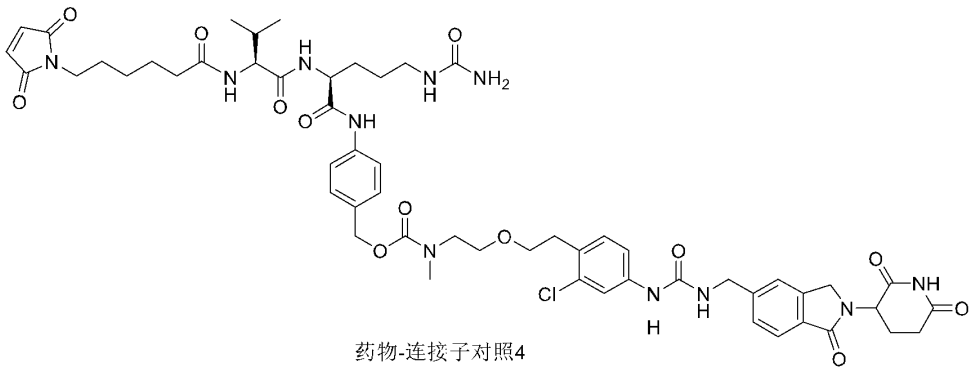
药物-连接子对照 2

药物-连接子对照 3 购买于 MCE（货号：HY-15575），



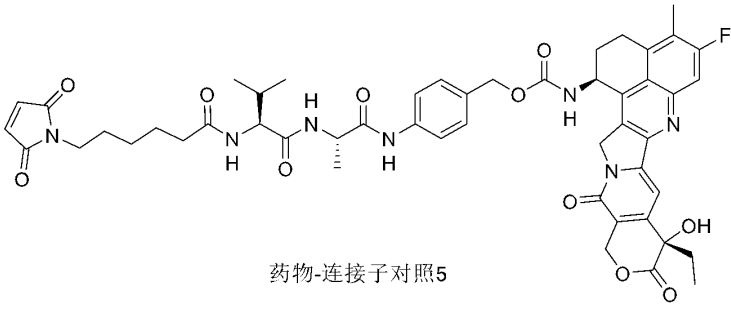
药物-连接子对照 3

药物-连接子对照 4 的制备参考专利文献 WO2021198965A1，



药物-连接子对照 4

药物-连接子对照 5 购买于 MCE（货号：HY-147270），



测试例 1 抗体偶联物的理化性质测试

1.1 抗体：

1.1.1 抗人 HER2 单克隆抗体的构建和生产

抗人 HER2 单克隆抗体的序列如下表 1 所示，将重链和轻链核苷酸序列分别克隆到 pTT5 载体（购自优宝生物）中，并按已建立的常规的标准分子生物学方法制备质粒。将表达载体和转染试剂 PEI（Polysciences，货号：24765-1）加入 OPTI-MEM（Gibco，货号：11058021）中混匀后静置 15min，加入 Expi293F 细胞（厂家：Thermofisher，货号：A14527）中，放入 5% CO₂，120rpm，37℃ 摇床培养。转染第二天，加入 OPM-293 ProFeed（上海奥浦迈，货号：F081918-001）和 6g/L 葡萄糖（厂家：Sigma，货号：G7528）。转染第六天，收集细胞上清。

表 1 抗人 HER2 抗体 Trastuzumab 氨基酸序列信息及其 CDR 分析（根据 Kabat 划分）

抗体名称	编号	序列信息		
Trastuzumab-VH	SEQ ID NO:1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY CSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSS		
Trastuzumab-VL	SEQ ID NO:2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYYTTPPTF GQGTKVEIK		
human CH1-Fc	SEQ ID NO:3	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK		
human CL	SEQ ID NO:4	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC		
抗体名称	CDR1	CDR2	CDR3	
Trastuzumab-VH	DTYIH (SEQ ID NO:5)	RIYPTNGYTRYADSVKG (SEQ ID NO:6)	WGGDGFYAMDY (SEQ ID NO:7)	
Trastuzumab-VL	RASQDVNTAVA (SEQ ID NO:8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQHYTTPPT (SEQ ID NO:10)	

1.1.2 抗人 EGFR 和 cMet 双特异抗体的构建和生产

参照实施例 1.1.1 方法，将编码所述抗体 VH 和 VL 的核酸序列构建质粒（序列来源 WO2024002938A1，参照表 2），并在 Expi293F 细胞中进行转染，获得表达上清。

表 2 抗人 EGFR-cMet 双特异性抗体 EGFR-cMet-Ab 序列信息

抗体名称	编号	序列信息
------	----	------

EGFR-cMet-Ab-EGFR HC	SEQ ID NO:11	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNDNFSWVRQ APGQGLEWMGAIVAVFRITETYAQKFQDRVKITADISTRIT YMEISSLRSEDTAVYYCARRLMSAISGPGAPLLMWGQGT LVTVSSASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSVDKTHTCPPCPAPE FEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVY LPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
EGFR-cMet-Ab-cMet HC	SEQ ID NO:12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYIHWVR QATGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTDRDTSI STAYMEISSLRSEDTAVYYCARGQGYTHSWGQGTMTVTS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
EGFR-cMet-Ab-EGFR LC	SEQ ID NO:13	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQ HPGKAPKLMYDVSQRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQ AEDEADYYCSSYTSSDTLEIFGGGTKLTVLGQPKAAPSVT LPPCSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTEVS
EGFR-cMet-Ab-cMet LC	SEQ ID NO:14	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASEGIYHWLAWYQQKP GKAPKLLIYKASSLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPD FATYYCQQYSNYPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQSE SVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

1.1.3 抗人 CDH6 抗体的构建和生产

抗人 CDH6 抗体 CDH6-Ab-1 通过免疫小鼠产生。免疫原为人 CDH6-hFc 蛋白和过表达人 CDH6 的 HEK293T 细胞，选择血清中抗体滴度高的小鼠的脾淋巴细胞制备杂交瘤细胞，通过 ELISA、FACS 等本领域常规方法筛选得到阳性杂交瘤克隆，用无血清细胞培养法进一步制备抗体，并纯化抗体和测序，得到鼠源抗人 CDH6 抗体及其可变区序列。通过比对 IMGT (<http://imgt.cines.fr>) 人类抗体重轻链可变区种系基因数据库和 MOE (Molecular Operating Environment) 软件，分别挑选与鼠源抗体同源性高的重链和轻链可变区种系基因作为模板，将鼠源抗体的 CDR 分别移植到相应的人源模板中，形成次序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的可变区序列，在此基础上，根据需要，进行回复突变以保证原有的亲和力和/或进行热点突变以消除分子修饰风险。最终优化的人源化抗体 CDH6-Ab-1 对应的 VH 和 VL 以及根据 Kabat 形式划分的 CDR 序列如表 3 所示。

表 3 抗人 CDH6 抗体 CDH6-Ab-1 序列信息及其 CDR 序列 (根据 Kabat 划分)

抗体名称	编号	序列信息
CDH6-Ab-1-VH	SEQ ID NO:15	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYWMHW VRQAPGQGLEWMGDIDPSHSEHYTQKFKDRVITITVD KSTSTAYMEISSLRSEDTAVYYCARGDLGRFDYWGQG TTVTVSS

CDH6-Ab-1-VL	SEQ ID NO:16	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASESVSIHGTHLMHW YQQKPGKPPKLLIYAASNLESGVPSRFGSGSETDFTFI SSLQPEDIATYYCQQSFEDPWTFGGGKVEIK	
抗体名称	CDR1	CDR2	CDR3
CDH6-Ab-1-VH	NYWMH (SEQ ID NO: 17)	DIDPSHSETHYTQKF KD (SEQ ID NO:18)	GDLGRFDY (SEQ ID NO:19)
CDH6-Ab-1-VL	RASESVSIHGTHLMH (SEQ ID NO: 20)	AASNLES (SEQ ID NO: 21)	QQSFEDPWT (SEQ ID NO: 22)

参照实施例 1.1.1 方法，将编码所述抗体 VH 和 VL 的核酸序列构建质粒，并在 Expi293F 细胞中进行转染，获得表达上清。

1.2 抗体纯化

利用 ProteinA 亲和层析（Cytiva，货号 17549802），从细胞培养上清中纯化上述抗体。Protein A 亲和柱利用 0.5 M NaOH 洗 3-5 倍柱体积，然后利用清水清洗 3-5 倍柱体积。利用如 1×PBS（pH 7.4）缓冲体系作为平衡缓冲液对层析柱平衡 3-5 倍柱体积。细胞上清利用低流速上样结合，结合完毕后用 1×PBS（pH 7.4）洗涤层析柱 3-5 倍柱体积至紫外吸收回落至基线。利用洗脱液（50 mM 醋酸缓冲液，pH 3.5）进行样品洗脱，根据紫外监测收集洗脱峰，洗脱产物利用 1M Tris-HCl pH 8.0 快速调节 pH 至 5-6 暂存。采用超滤、透析或脱盐柱等置换缓冲液体系，或者利用如分子筛等去除洗脱产物中的聚体成分以提高样品纯度。纯化后符合纯度要求的蛋白，用 0.22 μm 的滤器（Millipore，货号 SLGVR13SL）进行无菌过滤，SEC-HPLC 纯度检测合格后分装，于 -80℃ 保存备用。

1.3.1 抗体药物偶联物的制备方法 1

将 10 倍摩尔当量的 TCEP（Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride，三(2-羧乙基)膦盐酸盐）加入 2-10mg/ml 的抗体溶液（1×PBS，1 mM EDTA，pH 7.4）中，37℃混匀孵育 2 小时，再加入 15 倍摩尔当量的药物-连接子化合物（由实施例 22-45 制备或购买获得），25℃混匀反应 4 小时。反应结束后，用 20 mM 组氨酸 pH 6.0 缓冲液超滤换液 3 次，除去残留未反应的游离小分子，利用 SEC-HPLC 检测样品纯度，利用 LC-MS 质谱检测偶联情况。

1.3.2 抗体药物偶联物的制备方法 2（适用于制备 DAR 约为 4 的 ADC 分子）

将 2.5 倍摩尔当量的 TCEP（Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride，三(2-羧乙基)膦盐酸盐）加入 2-10mg/ml 的抗体溶液（1×PBS，1 mM EDTA，pH 7.4）中，37℃混匀孵育 2 小时，再加入 8 倍摩尔当量的药物-连接子化合物（由实施例 22-45 制备或购买获得），25℃混匀反应 4 小时。反应结束后，用 20 mM 组氨酸、pH 为 6.0 的缓冲液超滤换液 3 次，除去残留未反应的游离小分子，利用 SEC-HPLC 检测样品纯度，利用 LC-MS 质谱检测偶联情况。

1.4 抗体药物偶联物纯度检测（SEC-HPLC）

应用 SEC-HPLC 法分析待测蛋白样品，表征重组蛋白的分子大小均一性，测定重组蛋白的纯度。本法所用的 HPLC 为 Agilent 1260，色谱柱为 TSKgel G3000SWXL 来自 Tosoh Bioscience，流动相为 200 mM 磷酸缓冲液 pH 7.0 包含 10%异丙醇，检测温度为 25℃，流速为 0.5 mL/min，检测波长为 280 nm，目标蛋白上样量为 50 μg，分析时间为 40 分钟。对 SEC-HPLC 数据，应用手动积分法分析色谱图，按照面积归一法计算蛋白纯度，主峰认为是单体，主峰前的色谱峰称为聚集峰，主峰后的色谱峰称为碎裂峰。检测结果如表 4 所示，相较于对照 ADC7、对照 ADC8 和对照 ADC9，ADC-L26-4(DAR8)、ADC-L27-5(DAR8)、ADC-L22-3(DAR8)和 ADC-L23-3 的 SEC 纯度显著改善。

表 4 SEC-HPLC 法分析抗体药物偶联物纯度

偶联物编号	偶联反应底物		单体(%)
	抗体	药物-连接子	
ADC-L1-1	Trastuzumab	实施例 22	97.37

偶联物编号	偶联反应底物		单体(%)
	抗体	药物-连接子	
ADC-L2-1	Trastuzumab	实施例 23	98.58
ADC-L2-1 ^a	Trastuzumab	实施例 24	98.75
ADC-L2-1 ^b	Trastuzumab	实施例 25	98.85
ADC-L5-1	Trastuzumab	实施例 26	98.73
ADC-L6-1	Trastuzumab	实施例 27	98.50
ADC-L7-1	Trastuzumab	实施例 28	98.63
ADC-L8-1	Trastuzumab	实施例 29	98.77
ADC-L9-1	Trastuzumab	实施例 30	98.45
ADC-L10-1	Trastuzumab	实施例 31	98.83
ADC-L6-1 ^a	Trastuzumab	实施例 32	98.70
ADC-L12-1	Trastuzumab	实施例 33	98.70
ADC-L13-1	Trastuzumab	实施例 34	98.04
ADC-L14-1	Trastuzumab	实施例 35	98.40
ADC-L15-1	Trastuzumab	实施例 36	95.98
ADC- L12-1 ^a	Trastuzumab	实施例 37	98.81
ADC-L17-1	Trastuzumab	实施例 38	98.86
ADC-L18-1	Trastuzumab	实施例 39	98.83
ADC-L19-1	Trastuzumab	实施例 40	99.10
对照 ADC1	Trastuzumab	药物-连接子对照 1	97.76
对照 ADC2	Trastuzumab	药物-连接子对照 2	97.44
对照 ADC-ISO-1	Anti-FITC	药物-连接子对照 2	95.98
对照 ADC-ISO-2	Anti-FITC	实施例 40	98.76
对照 ADC3	Trastuzumab	药物-连接子对照 3	99.88
对照 ADC4	Trastuzumab	药物-连接子对照 4	90.48
对照 ADC5	Trastuzumab	药物-连接子对照 5	95.87
对照 ADC6	Trastuzumab	药物-连接子对照 2	99.93
对照 ADC7	Trastuzumab	药物-连接子对照 3	65.30

偶联物编号	偶联反应底物		单体(%)
	抗体	药物-连接子	
对照 ADC8	Trastuzumab	药物-连接子对照 4	21.52
对照 ADC9	Trastuzumab	药物-连接子对照 5	37.03
ADC-L26-4(DAR4)	Trastuzumab	实施例 43	99.86
ADC-L27-5(DAR4)	Trastuzumab	实施例 44	99.88
ADC-L22-3(DAR4)	Trastuzumab	实施例 41	99.86
ADC-L19-1(DAR4)	Trastuzumab	实施例 40	99.91
ADC-L26-4(DAR8)	Trastuzumab	实施例 43	99.85
ADC-L27-5(DAR8)	Trastuzumab	实施例 44	99.84
ADC-L22-3(DAR8)	Trastuzumab	实施例 41	99.81
ADC-L23-3	Trastuzumab	实施例 42	99.87
对照 ADC10	EGFR-cMet-Ab	药物-连接子对照 2	96.42
ADC2-L19-1	EGFR-cMet-Ab	实施例 40	96.42
对照 ADC11	CDH6-Ab-1	药物-连接子对照 2	96.2
ADC3-L19-1	CDH6-Ab-1	实施例 40	98.23
ADC3-L12-1	CDH6-Ab-1	实施例 37	98.51

1.5 抗体药物偶联物 DAR 值检测 (LC-MS 质谱)

应用 LC-MS 质谱分析待测 ADC 样品，表征其 DAR 值。取~50 μg ADC 样品，加入 PNGase F 1 μl，37°C 孵育 4 h，加入终浓度 20 mM DTT，37°C 孵育 1 小时，样品离心待测。本法所用的 HPLC 为 Thermo Vanquish，色谱柱为 Protein BEH SEC (Waters)，流动相为 25% 乙腈溶液 (含 0.1% 甲酸 0.05% TFA)，流速为 0.2 mL/min，检测波长为 280 nm，分析时间为 30 分钟。本法所用的高分辨质谱为 Q Exactive Plus。质谱参数为 Spray Voltage (喷雾电压)：3.8 kV；Capillary Temp (毛细管加热温度)：300 °C；S-lens：50；Sheath Gas (鞘气流速)：35arb；Aux Gas (辅助气流速)：10arb，Probe Heater Temp (辅助气加热温度)：300 °C；Full MS Scan range (母离子扫描范围)：810-3500 m/z，Resolution (分辨率)：17500；AGC (目标离子注入数量)：3e⁶；Maximum IT (最大离子注入时间)：200 ms；Microscans:10；In-source CID:20eV。应用质

谱数据分析软件 Biopharma Finder 4.1 分析质谱原始数据，通用 Respect 算法去卷积处理，分别计算出轻重链质谱峰的分子量信息和各组分的质谱响应信号，根据样品偶联小分子的相应质谱响应值计算样品的 DAR 值。

经计算，各 ADC 样品检测结果如表 5 所示：

表 5 LC-MS 质谱法检测抗体药物偶联物 DAR 值

偶联物编号	DAR
ADC-L1-1	7.90
ADC-L2-1 ^b	7.94
ADC-L5-1	7.68
ADC-L6-1 ^a	7.70
ADC-L7-1	7.92
ADC-L8-1	7.78
ADC-L9-1	7.78
ADC-L10-1	7.26
ADC-L12-1	7.78
ADC-L13-1	7.86
ADC-L14-1	8.2
ADC-L15-1	7.92
ADC-L12-1 ^a	7.82
ADC-L17-1	8.04
ADC-L18-1	8.12
ADC-L19-1	8.04
对照 ADC1	8.00
对照 ADC2	7.90
对照 ADC-ISO-1	8.48
对照 ADC-ISO-2	7.92
对照 ADC3	3.74
对照 ADC4	3.66
对照 ADC5	3.92
对照 ADC6	3.66
对照 ADC7	7.00
对照 ADC8	8.00
对照 ADC9	8.00
ADC-L26-4(DAR4)	3.52
ADC-L27-5(DAR4)	3.66
ADC-L22-3(DAR4)	3.92
ADC-L19-1(DAR4)	3.56
ADC-L26-4(DAR8)	7.94

偶联物编号	DAR
ADC-L27-5(DAR8)	8.00
ADC-L22-3(DAR8)	8.16
ADC-L23-3	7.85
对照 ADC10	6.00
ADC2-L19-1	6.00
对照 ADC11	7.84
ADC3-L19-1	8.06
ADC3-L12-1	7.98

ADC-L2-1^b是根据 Trastuzumab 与实施例 25 偶联制备获得的 ADC 样品。

ADC-L6-1^a是根据 Trastuzumab 与实施例 32 偶联制备获得的 ADC 样品。

ADC-L12-1^a是根据 Trastuzumab 与实施例 37 偶联制备获得的 ADC 样品。

1.6 抗体-药物偶联物疏水性检测（HIC-HPLC）

应用 HIC-HPLC 法分析待测样品,表征其 DAR 值。本法所用的 HPLC 为 Agilent 1260, 色谱柱为 TSKgel Butyl-NPR 来自 Tosoh Bioscience, 流动相 A 为 1.5 M 硫酸铵、50 mM 磷酸缓冲液 pH 7.0, 流动相 B 为 25 mM 磷酸缓冲液 pH 7.0 包含 20%异丙醇, 检测温度为 25 °C, 流速为 0.5 mL/min, 检测波长为 280 nm。待测样品先浓缩到 1 mg/mL, 然后加入 2 M 硫酸铵、100 mM 磷酸缓冲液 pH 7.0 溶液, 最终使硫酸铵的浓度为 0.8M, 混合均匀, 取上清, 上样量为 40 μg, 流动相梯度为在 35 分钟时间内, 流动相 B 从 0%增加至 70%, 分析时间为 50 分钟。对 HIC-HPLC 数据, 应用手动积分法分析色谱图, 依据抗体的出峰时间判断疏水性。检测结果如表 6 所示:

表 6 HIC-HPLC 检测抗体药物偶联物疏水性

偶联物编号	洗脱时间 (min)
Trastuzumab	16.891
ADC-L1-1	23.389
ADC-L2-1	23.352
ADC-L2-1a	23.402
ADC-L2-1b	23.321
ADC-L5-1	23.577
ADC-L6-1	24.328
ADC-L7-1	23.604
ADC-L8-1	23.282
ADC-L9-1	23.403
ADC-L10-1	24.862
ADC-L6-1a	24.186
ADC-L12-1	20.083
ADC-L13-1	27.197
ADC-L14-1	24.409
ADC-L15-1	21.399
ADC- L12-1a	20.155
ADC-L17-1	24.155
ADC-L18-1	23.241

ADC-L19-1	20.365
对照 ADC1	24.171
对照 ADC2	23.443
ADC-L26-4(DAR8)	33.502
ADC-L27-5(DAR8)	24.244
ADC-L22-3(DAR8)	21.788
ADC-L23-3	20.389
EGFR-cMet-Ab	19.566
对照 ADC10	24.509
ADC2-L19-1	22.264

测试例 2 抗体偶联物的血浆稳定性测试

2.1 抗体偶联物的血浆稳定性测试 1

取一定量的 ADC 样品，加入到已去除 IgG 的无菌人血浆中，使得 ADC 的终浓度是 0.5 mg/ml，置于 37℃培养箱孵育 0d、3d、7d，孵育结束后储存于-80℃冰箱中。每管加入 50 μL ProteinA 填料(MabSelect SuRe)，混匀仪晃动吸附 1 h，经过洗涤、洗脱和 Tris-HCl 中和步骤，获得孵育后的 ADC 样品，通过 LC-MS 检测其 DAR 值变化，以判定样品的血浆稳定性，测试结果如表 7 所示。

表 7 抗体偶联药物的体外血浆稳定性

偶联物编号	孵育条件	DAR 值（LC-MS）
对照 ADC1	血浆孵育 0d	7.92
	血浆孵育 3d	5.00
	血浆孵育 7d	3.50
对照 ADC3	血浆孵育 0d	3.3
	血浆孵育 3d	1.48
	血浆孵育 7d	0.96
对照 ADC4	血浆孵育 0d	3.3
	血浆孵育 3d	1.62
	血浆孵育 7d	1.02
ADC-L19-1	血浆孵育 0d	8.00
	血浆孵育 3d	8.00
	血浆孵育 7d	7.96
ADC-L26-4(DAR4)	血浆孵育 0d	3.72
	血浆孵育 3d	3.5
	血浆孵育 7d	3.4
ADC-L27-5(DAR4)	血浆孵育 0d	3.84
	血浆孵育 3d	2.96
	血浆孵育 7d	3.28
ADC2-L19-1	血浆孵育 0d	6.00
	血浆孵育 3d	6.00
	血浆孵育 7d	5.98

实验结果表明，相较于对照 ADC，本公开的 ADC 在血浆孵育过程中 DAR 值未见明显变化，在血浆中具有更好的稳定性。

2.2 抗体药物偶联物的血浆稳定性测试 2

取一定量的 ADC 样品，加入到已去除 IgG 的无菌人血浆中，使得 ADC 的终浓度是 0.5 mg/ml，置于 37℃培养箱孵育 0d、3d、7d，孵育结束后储存于-80℃冰箱中。每管加入 50 μL ProteinA 填料(MabSelect SuRe)，混匀仪晃动吸附 1 h，经过洗涤、洗脱和 Tris-HCl 中和步骤，获得孵育后的 ADC 样品，通过 SEC-HPLC 检测纯度变化，测试结果如表 8 所示。

表 8 抗体药物偶联物的体外血浆稳定性

偶联物编号	孵育条件	单体 (%)	聚集体 (%)	碎裂体 (%)
对照 ADC1	血浆孵育 0d	94.114	4.375	1.511
	血浆孵育 3d	53.911	45.218	0.871
	血浆孵育 7d	37.382	61.814	0.904
对照 ADC3	血浆孵育 0d	92.168	2.513	5.319
	血浆孵育 3d	68.161	29.098	2.741
	血浆孵育 7d	70.437	26.506	3.057
对照 ADC4	血浆孵育 0d	95.729	4.271	-
	血浆孵育 3d	83.623	15.033	1.345
	血浆孵育 7d	76.876	23.124	-
ADC-L19-1	血浆孵育 0d	99.317	0.683	-
	血浆孵育 3d	98.827	1.173	-
	血浆孵育 7d	98.12	1.88	-
ADC-L26-4(DAR4)	血浆孵育 0d	97.293	2.707	-
	血浆孵育 3d	94.61	5.39	-
	血浆孵育 7d	92.281	5.953	1.766
ADC-L27-5(DAR4)	血浆孵育 0d	97.75	1.935	0.316
	血浆孵育 3d	97.692	2.096	0.212
	血浆孵育 7d	97.644	2.2	0.156

“-”表示未检测到。

实验结果表明，与对照组相比，本公开的 ADC 在血浆孵育过程中 SEC 单体纯度未见明显变化，在血浆中具有更好的稳定性。

测试例 3：抗体偶联物的生物学活性及相关性质测试

3.1 抗体药物偶联物对肿瘤细胞抗增殖活性测试

3.1.1、抗 Her2-ADC 对肿瘤细胞抗增殖活性测试

细胞与材料：HER2 高表达的人乳腺癌细胞系 SKBR3 购于 ATCC，EMEM 培养基(ATCC#30-2003)购于 ATCC，McCoy's 5a 培养基(Gibco#16600-082)，1640 培养基(Gibco#A10491-01)，青霉素-链霉素(Gibco#15140-122)，和 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco#25200-056)购于 Gibco 公司(美国)，人胰岛素(Solarbio#40112ES25)购于 Solarbio 公司，96 孔板 (Greiner Bio-one#655098) 购于康宁公司(美国)，Cell-Titer Glo 试剂(Promega#G7568) 购于普洛麦格公司(美国)。

细胞培养：SKBR3 细胞用含 10%胎牛血清+1%青霉素-链霉素的 McCoy's 5a 培养液，在 37℃、5%CO₂ 条件下培养，处于对数生长期细胞方可用于实验。

细胞增殖活性检测：利用 Cell-Titer Glo 试剂检测 ADC 对 SKBR3 细胞株增殖的抑制活性。将 SKBR3 细胞从细胞培养瓶内消化吹散处理，用对应的新鲜培养基重悬，调整细胞密度。SKBR3 细胞为 5000 个细胞/90 μL/孔，接种于 96 孔板中，置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养过夜。用完全培养基稀释 ADC 浓度至 5000 nM，并进行 5 倍梯度稀释，共 8 个浓度梯度，然后转移 10 μL ADC 稀释溶液至 96 孔板中，即 ADC 起始浓度为 500 nM。96 孔板置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 3 天。加入 Cell-Titer Glo 试剂，检测细胞活性。

另设阴性对照组和阳性对照组分别作为 Bottom 和 Top。阴性对照组为不加细胞，仅加同体积的培养基，其他操作与实验组一致；阳性对照组为不加受试抗体，其他操作与实验组一致。

数据分析：

计算抑制百分数 (% Inhibition) 并拟合得到化合物的 IC₅₀。

抑制百分数 (% Inhibition) =1-100% * (Signal-Bottom) / (Top-Bottom)。

Signal 指实验组的信号值，Bottom 指阴性对照组的平均信号值，Top 指阳性对照组的平均信号值。

实验结果：

在本实验条件下，本公开 ADC 对 Her2 高表达的人乳腺癌细胞系 SKBR3 展现出了较强的增殖抑制活

性。

表 9 ADC 抗肿瘤细胞增殖活性（SKBR3 细胞株）

偶联物编号	SKBR3	
	IC ₅₀ (nM)	最大抑制率 (%)
ADC-L1-1	0.597	75.71
ADC-L2-1 ^b	0.353	76.58
ADC-L5-1	0.5208	76.68
ADC-L6-1 ^a	0.3033	74.55
ADC-L7-1	0.4223	76.91
ADC-L8-1	0.6384	74.29
ADC-L9-1	0.5258	76.45
ADC-L10-1	0.2266	77.88
ADC-L12-1	0.2877	73.65
对照 ADC1	3.424	68.49
对照 ADC2	1.275	71.94

ADC-L2-1^b 是根据 Trastuzumab 与实施例 25 偶联制备获得的 ADC 样品。
ADC-L6-1^a 是根据 Trastuzumab 与实施例 32 偶联制备获得的 ADC 样品。

3.1.2、抗 Her2-ADC 对肿瘤细胞 NCI-N87 抗增殖活性测试

细胞与材料：HER2 高表达的人胃癌细胞系 NCI-N87 购于中国科学院细胞库，1640 培养基 (Gibco#A10491-01)，青霉素-链霉素(Gibco#15140-122)，和 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco#25200-056) 购于 Gibco 公司(美国)，96 孔板 (Greiner Bio-one#655098) 购于康宁公司(美国)，Cell-Titer Glo 试剂 (Promega#G7568) 购于普洛麦格公司(美国)。

细胞培养：NCI-N87 细胞用含 10%胎牛血清+1%青霉素-链霉素的 1640 培养液。细胞在 37℃、5%CO₂ 条件下培养，处于对数生长期细胞方可用于实验。

细胞增殖活性检测：利用 Cell-Titer Glo 试剂检测 ADC 对 NCI-N87 细胞株增殖的抑制活性。将 NCI-N87 细胞从细胞培养瓶内消化吹散处理，用对应的新鲜培养基重悬，调整细胞密度。NCI-N87 细胞为 6000 个细胞/90 μL/孔，接种于 96 孔板中，置于 37℃、5% CO₂ 条件下培养过夜。用完全培养基稀释 ADC 浓度至 5000 nM，并进行 5 倍梯度稀释，共 8 个浓度梯度，然后转移 10 μL ADC 稀释溶液至 96 孔板中，即 ADC 起始浓度为 500 nM。96 孔板置于 37℃、5% CO₂ 条件下培养 3 天。加入 Cell-Titer Glo 试剂，检测细胞活性。

另设阴性对照组和阳性对照组分别作为 Bottom 和 Top。阴性对照组为不加细胞，仅加同体积的培养基，其他操作与实验组一致；阳性对照组为不加受试抗体，其他操作与实验组一致。

数据分析：

计算抑制百分数（% Inhibition）并拟合得到化合物的 IC₅₀。
抑制百分数（% Inhibition）=1-100% * (Signal-Bottom) / (Top-Bottom)。
Signal 指实验组的信号值，Bottom 指阴性对照组的平均信号值，Top 指阳性对照组的平均信号值。
Graphpad 曲线拟合，计算抑制分数为 50%时的药物浓度，作为绝对 IC₅₀。

实验结果：

在本实验条件下，本公开 ADC 对 Her2 高表达的人胃癌细胞系 NCI-N87 展现出了较强的增殖抑制活性。

表 10 ADC 抗肿瘤细胞增殖活性（NCI-N87 细胞株）

偶联物编号	NCI-N87	
	IC ₅₀ (nM)	最大抑制率 (%)
ADC-L1-1	1.57	70.9
ADC-L2-1 ^b	2.56	67.9

ADC-L5-1	1.74	65.8
ADC-L6-1	1.30	72.5
ADC-L7-1	2.30	66.1
ADC-L8-1	3.19	63.9
ADC-L9-1	1.82	72.3
ADC-L10-1	2.09	68.0
ADC-L13-1	1.34	71.8
ADC-L14-1	2.94	70.1
ADC-L15-1	2.85	68.4
ADC-L12-1 ^a	1.18	72.3
ADC-L17-1	1.82	68.7
ADC-L18-1	2.09	65.5
ADC-L19-1	1.95	79.1
对照 ADC1	39.06	56.3
对照 ADC2	7.19	65.4

ADC-L2-1^b 是根据 Trastuzumab 与实施例 25 偶联制备获得的 ADC 样品。

ADC-L12-1^a 是根据 Trastuzumab 与实施例 37 偶联制备获得的 ADC 样品。

3.1.3 抗 Her2-ADC 对肿瘤细胞 SKBR3 抗增殖活性测试

细胞与材料：Her2 高表达的人乳腺癌细胞系 SKBR3 购于 ATCC，McCoy's 5a 培养基(Gibco#16600-082)，青霉素-链霉素(Gibco#15140-122)，和 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco#25200-056)购于 Gibco 公司(美国)，96 孔板 (Greiner Bio-one#655098) 购于康宁公司(美国)，Cell-Titer Glo 试剂 (Promega#G7568) 购于普洛麦格公司(美国)。

细胞培养：SKBR3 细胞用含 10%胎牛血清+1%青霉素-链霉素的 McCoy's 5a 培养液，在 37℃、5%CO₂ 条件下培养，处于对数生长期细胞方可用于实验。

细胞增殖活性检测：利用 Cell-Titer Glo 试剂检测 ADC 对 SKBR3 细胞株增殖的抑制活性。将 SKBR3 细胞从细胞培养瓶内消化吹散处理，用对应的新鲜培养基重悬，调整细胞密度。SKBR3 细胞为 5000 个细胞/90 μL/孔，接种于 96 孔板中，置于 37℃、5% CO₂ 条件下培养过夜。用完全培养基稀释 ADC 浓度至 100 nM，并进行 3 倍梯度稀释，共 8 个浓度梯度，然后转移 10 μL ADC 稀释溶液至 96 孔板中，即 ADC 起始浓度为 10 nM。96 孔板置于 37℃、5% CO₂ 条件下培养 3 天。加入 Cell-Titer Glo 试剂，检测细胞活性。

另设阴性对照组和阳性对照组分别作为 Bottom 和 Top。阴性对照组为不加细胞，仅加同体积的培养基，其他操作与实验组一致；阳性对照组为不加受试抗体，其他操作与实验组一致。

数据分析：

计算抑制百分数 (% Inhibition) 并拟合得到化合物的 IC₅₀。

抑制百分数 (% Inhibition) = 1-100% * (Signal-Bottom) / (Top-Bottom)。

Signal 指实验组的信号值，Bottom 指阴性对照组的平均信号值，Top 指阳性对照组的平均信号值。

实验结果：

在本实验条件下，本公开 ADC 对 Her2 高表达的人乳腺癌细胞系 SKBR3 展现出了较强的增殖抑制活性。

表 11 ADC 抗肿瘤细胞增殖活性 (SKBR3 细胞株)

偶联物编号	SKBR3	
	IC ₅₀ (nM)	最大抑制率 (%)
ADC-L26-4(DAR4)	0.025	83.6
ADC-L26-4(DAR8)	0.01	83.4
ADC-L27-5(DAR4)	0.042	83.9
ADC-L27-5(DAR8)	0.021	87.4

3.1.4、抗 Her2-ADC 对肿瘤细胞 NCI-N87 抗增殖活性测试

细胞与材料：Her2 高表达的人胃癌细胞系 NCI-N87 购于中国科学院细胞库，1640 培养基

(Gibco#A10491-01), 青霉素-链霉素(Gibco#15140-122), 和 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco#25200-056) 购于 Gibco 公司(美国), 96 孔板 (Greiner Bio-one#655098) 购于康宁公司(美国), Cell-Titer Glo 试剂 (Promega#G7568) 购于普洛麦格公司(美国)。

细胞培养: NCI-N87 细胞用含 10%胎牛血清+1%青霉素-链霉素的 1640 培养液。细胞在 37°C、5%CO₂ 条件下培养, 处于对数生长期细胞方可用于实验。

细胞增殖活性检测: 利用 Cell-Titer Glo 试剂检测 ADC 对 NCI-N87 细胞株增殖的抑制活性。将 NCI-N87 细胞从细胞培养瓶内消化吹散处理, 用对应的新鲜培养基重悬, 调整细胞密度。NCI-N87 细胞为 3000 个细胞/90 μL/孔, 接种于 96 孔板中, 置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养过夜。用完全培养基稀释 ADC 浓度至 250 nM, 并进行 4 倍梯度稀释, 每个 ADC 共 8 个浓度梯度, 然后转移 10 μL ADC 稀释溶液至 96 孔板中, 即 ADC 起始浓度为 25 nM。96 孔板置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 5 天。加入 Cell-Titer Glo 试剂, 检测细胞活性。

另设阴性对照组和阳性对照组分别作为 Bottom 和 Top。阴性对照组为不加细胞, 仅加同体积的培养基, 其他操作与实验组一致; 阳性对照组为不加受试抗体, 其他操作与实验组一致。

数据分析:

计算抑制百分数 (% Inhibition) 并拟合得到化合物的 IC₅₀。

抑制百分数 (% Inhibition) = 1-100% * (Signal-Bottom) / (Top-Bottom)。

Signal 指实验组的信号值, Bottom 指阴性对照组的平均信号值, Top 指阳性对照组的平均信号值。

Graphpad 曲线拟合, 计算抑制分数为 50%时的药物浓度, 作为绝对 IC₅₀。

实验结果:

在本实验条件下, 本公开 ADC 对 Her2 高表达的人胃癌细胞系 NCI-N87 展现出了较强的增殖抑制活性。

表 12 ADC 抗肿瘤细胞增殖活性 (NCI-N87 细胞株)

偶联物编号	NCI-N87	
	IC ₅₀ (nM)	最大抑制率 (%)
ADC-L26-4(DAR4)	0.03	86
ADC-L26-4(DAR8)	0.012	88.9
ADC-L27-5(DAR4)	0.098	91.6
ADC-L27-5(DAR8)	0.053	92.7
对照 ADC5	>25	46.7
ADC-L22-3(DAR4)	1.846	54.6
ADC-L22-3(DAR8)	0.45	70.5

3.1.5、抗 EGFR-cMet-ADC 对肿瘤细胞抗增殖活性测试

细胞与材料: EGFR 中表达、cMet 中表达的 HCT116 细胞购自 ATCC, 货号 CCL-247, 培养基为含 10%FBS 的 McCoy's 5a 培养基。EGFR 低表达、cMet 低表达的 Capan-1 细胞购自南京科佰生物科技有限公司, 货号 CBP60543, 培养基为含 20%FBS 的 IMDM 培养基, EGFR 高表达、cMet 高表达的 PC9-hEGFR-Del19-T790M-C797S (PC9-DTC)细胞由中美冠科生物技术(太仓)有限公司构建, 培养基为含 10%FBS 和 0.5 μg/ml 嘌呤霉素的 RPMI1640 培养基。EGFR 高表达 cMet 中表达的 HCC827 细胞购自 ATCC, 货号 CRL-2868, 培养基为含 10%FBS 的 RPMI 1640 培养基。

细胞增殖活性检测: 将 HCT116、Capan-1、PC9-DTC 和 HCC827 细胞用胰酶(购自 Gibco, 货号 25200072) 消化后, 用各自对应培养基重悬, 调整细胞密度。将细胞分别接种于 96 孔板(购自 coming, 货号 3610) 中, 细胞密度如下: HCT116 细胞 0.6×10³ 个细胞 / 90 μL、Capan-1 细胞 4.0×10³ 个细胞 / 90 μL, PC9-DTC 细胞 1.8×10³ 个细胞 / 90 μL, HCC827 细胞 3.0×10³ 个细胞 / 90 μL, 并置于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养过夜。第二天, 按照实验设计用完全培养基梯度稀释抗体偶联药物, 转移 10 μL 稀释后的抗体偶联药物至对应孔板中。细胞板置于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养 5 天。5 天后, 每孔中加入 50 μL KeyTec®Luminescent Cell Viability Detection Kit 检测试剂(购自 vkey-bio, 货号 A2010003N, 使用方法参照产品说明书), 在 Envision 仪器(购自 PerkinElmer, 型号 Envision 2105) 上读取荧光值检测细胞活力。

另设阳性对照组和阴性对照组作为杀伤 0%和 100%对照。阳性对照组为不加受试药物, 其他操作与实

验组一致结果，阴性对照组为不加细胞，仅加同体积的培养基，其他操作与实验组一致。细胞增殖抑制率计算公式：抑制率=（（阳性对照-样品孔读值）/（阳性对照-阴性孔读值））×100%，通过该公式获得对应药物在不同细胞的抑制率，其中最大抑制率用 Emax 表示。采用 GraphPad Prism 9.0 软件制图并计算 IC₅₀。

结果如表 13 所示。抗 EGFR-cMet-ADC 药物在体外对表达 EGFR 和 cMET 的肿瘤细胞具有较好的增殖抑制活性。

表 13 对具有不同 EGFR 和 cMET 表达水平的肿瘤细胞增殖的抑制作用

偶联物编号	HCT116		Capan-1		PC9-DTC		HCC827	
	IC ₅₀ (nM)	Emax (%)	IC ₅₀ (nM)	Emax (%)	IC ₅₀ (nM)	Emax (%)	IC ₅₀ (nM)	Emax (%)
ADC2-L19-1	6.25	80.10	16.72	69.27	12.98	68.32	>100	47.51
对照 ADC-ISO-2	>100	30.98	>100	12.03	>100	2.51	>100	1.76

3.2 抗 EGFR-cMet-ADC 对体内药效评价

3.2.1. 抗 EGFR-cMet-ADC 在 HCC827 皮下瘤模型的药效评价

实验试剂：

肺癌 HCC827 细胞：上海中科院，EGFR，cMet 高表达
RPMI-1640 培养液：Gbico; Cat No.: A104910
胎牛血清：Gibco; Cat No.:10099-141C
0.25%胰酶-EDTA：Gibco, Cat No.: 25200-072
D-PBS(无钙镁离子磷酸盐缓冲液)：Hyclone, Cat. No.: SH30256.01
Matrigel: Corning, Cat. No.: 356237

实验方法：

动物信息：Balb/c nude 小鼠，雌性，5-6 周，体重约 14-20 克，动物购自北京维通利华生物技术有限公司，将小鼠饲养在 SPF 级的环境中，每个笼位单独送排风，所有动物都可以自由获取标准认证的商业实验室饮食和自由饮水。

细胞培养：肺癌 HCC827 细胞株体外培养，培养条件为 RPMI-1640（细胞培养液）中加入 10%胎牛血清，1% Pen Strep，37℃、5%CO₂ 孵箱。一周两次用 0.25%胰酶-EDTA 消化液进行常规消化处理传代。当细胞饱和度为 80%-90%，数量达到要求时，收取细胞，计数。

细胞接种：将 0.2ml/（含 1×10⁷）HCC827 细胞悬液（RPMI-1640：Matrigel，体积比为 1:1）皮下接种于每只小鼠的腰背部。在接种细胞后第 8 天，依据肿瘤体积随机分组给药，分组当天为 Day 0（第 0 天）。

给药：ADC2-L19-1、对照 ADC10 和对照 ADC-ISO-2 给药剂量均为 1.5 mg/kg，尾静脉（Intravenous Injections，IV）单次给药。每组 6 只小鼠。

肿瘤测量和实验指标：

每周两次用游标卡尺测量肿瘤直径。肿瘤体积的计算公式为：V = 0.5a x b²，a 和 b 分别表示肿瘤的长径和短径。每周两次测量小鼠体重。

化合物的抑瘤疗效用肿瘤生长抑制率 TGI（%）来评价。TGI（%）=[(1-(某处理组给药结束时平均瘤体积-该处理组开始给药时平均瘤体积)/(溶剂对照组治疗结束时平均瘤体积-溶剂对照组开始治疗时平均瘤体积)]x100%。

实验结果：

见表 14，图 1 和图 2。

表 14. HCC827 皮下瘤模型肿瘤体积

受试化合物	剂量	给药方式	给药频率	平均肿瘤体积（mm ³ ）							TGI（%）
	mg/kg			0 天	4 天	7 天	11 天	14 天	18 天	21 天	25 天

溶剂对照	/	IV	单次给药	234.8	388.72	473.72	664.44	816.91	1046.12	1189.86	1277.59	/
对照ADC10	1.5	IV	单次给药	234.53	407.07	457.99	499.45	557.04	661.94	810.87	950.58	31.33
ADC2-L19-1	1.5	IV	单次给药	234.75	281.03	284.44	262.16	298.64	330.3	415.69	489.11	75.61
对照ADC-ISO-2	1.5	IV	单次给药	234.89	411.47	476.73	665.26	788.1	958.04	1105.85	1189.11	8.49

实验结论：

在小鼠皮下移植瘤 HCC827 模型中，本公开化合物 ADC2-L19-1 在 1.5 mg/kg 尾静脉单次给药对肿瘤生长具有显著抑制作用（P<0.0001）；且显著优于等剂量的对照 ADC10 和对照 ADC-ISO-2（P<0.05，P<0.0001）。本公开 ADC 分子在上述试剂量下未发现影响小鼠体重，也未引起任何小鼠死亡，小鼠可以耐受。

3.2.2. 抗 EGFR-cMet-ADC 在 HCT116 皮下瘤模型药效评价

实验试剂：

- 肠癌 HCT116 细胞：ATCC
- McCoy's5A 培养液：Gibco; Cat No.: 16600-082
- 胎牛血清：Gibco; Cat No.:10099-141C
- 0.25%胰酶-EDTA：Gibco, Cat No.: 25200-072
- D-PBS(无钙镁离子磷酸盐缓冲液)：Hyclone, Cat. No.: SH30256.01
- Matrigel: Corning, Cat. No.: 356237

实验方法：

动物信息：Balb/c nude 小鼠，雌性，5-6 周，体重约 14-20 克，动物购自北京维通利华生物技术有限公司，将小鼠饲养在 SPF 级的环境中，每个笼位单独送排风，所有动物都可以自由获取标准认证的实验室饮食和自由饮水。

细胞培养：肠癌 HCT116 细胞株体外培养，培养条件为 McCoy's5A（细胞培养液）中加入 10%胎牛血清，1% Pen Strep，37℃、5%CO₂ 孵箱。一周两次用 0.25%胰酶-EDTA 消化液进行常规消化处理传代。当细胞饱和度为 80%-90%，数量达到要求时，收取细胞，计数。

细胞接种：将 0.1ml/（含 2.5×10⁶）HCT116 细胞悬液（RPMI-1640：Matrigel，体积比为 1:1）皮下接种于每只小鼠的腰背部。在接种细胞后第 7 天，依据肿瘤体积随机分组给药，分组当天为 Day 0（第 0 天）。

给药：对照 ADC10 和 ADC2-L19-1 的给药剂量选用 1.5 mg/kg，在 day0（第 0 天），day14（第 14 天）尾静脉（Intravenous Injections，IV）给药。每组 6 只小鼠。

肿瘤测量和实验指标：

每周两次用游标卡尺测量肿瘤直径。肿瘤体积的计算公式为：V = 0.5a x b²，a 和 b 分别表示肿瘤的长径和短径。每周两次测量小鼠体重。

化合物的抑瘤疗效用肿瘤生长抑制率 TGI（%）来评价。TGI（%）=[(1-(某处理组给药结束时平均瘤体积-该处理组开始给药时平均瘤体积)/(溶剂对照组治疗结束时平均瘤体积-溶剂对照组开始治疗时平均瘤体积)]x100%。

实验结果：

见表 15，图 3 和图 4。

表 15. HCT116 皮下瘤模型肿瘤体积

受试化合物	剂量	给药方式	给药频率	平均肿瘤体积 (mm³)								TGI (%)
	m g/kg			0 天	5 天	8 天	13 天	16 天	19 天	22 天	26 天	
溶剂对照	/	IV	第 0 天 第 14 天	117.08	276.22	443.94	684.13	862.17	1067.97	1313.03	1656.76	/
对照 ADC10	1.5	IV	第 0 天 第 14 天	117.55	186.54	278.4	440.64	607.89	669.18	855.5	1139.44	33.63
ADC2-L19-1	1.5	IV	第 0 天 第 14 天	117.67	142.23	196.75	302.96	348.11	433.9	536.37	719.61	60.9

实验结论:

在小鼠皮下移植瘤 HCT116 模型中,对照 ADC10 和 ADC2-L19-1 在 1.5 mg/kg 尾静脉给药两次(day0, day14)对肿瘤生长均具有显著抑制作用(P<0.01, P<0.0001);且 ADC2-L19-1 显著优于对照 ADC10(P<0.05)。本公开 ADC 分子在上述试剂量下未发现影响小鼠体重,也未引起任何小鼠死亡,小鼠可以耐受。

3.2.3. 抗 EGFR-cMet-ADC 在 PC9-6 皮下瘤模型药效评价

实验试剂:

人肺癌 PC9-6 细胞: (PC9-6 为中美冠科由 PC9 母细胞改造, hEGFR-Del19-T790M-C797S)
RPMI-1640 培养液: Gibco; Cat No.: A104910
胎牛血清: Gibco; Cat No.:10099-141C
0.25%胰酶-EDTA: Gibco, Cat No.: 25200-072
D-PBS(无钙镁离子磷酸盐缓冲液): Hyclone, Cat. No.: SH30256.01
Matrigel: Corning, Cat. No.: 356237

实验方法:

动物信息: Balb/c nude 小鼠, 雌性, 5-6 周, 体重约 14-20 克, 动物购自北京维通利华生物技术有限公司, 将小鼠饲养在 SPF 级的环境中, 每个笼位单独送排风, 所有动物都可以自由获取标准认证的商业实验室饮食和自由饮水。

细胞培养: 人肺癌 PC9-6 细胞株体外培养, 培养条件为 RPMI-1640 (细胞培养液) 中加入 10%胎牛血清, 1% Pen Strep, 0.5 µg/ml Puromycin, 37°C、5%CO2 孵箱。一周两次用 0.25%胰酶-EDTA 消化液进行常规消化处理传代。当细胞饱和度为 80%-90%, 数量达到要求时, 收取细胞, 计数。

细胞接种: 将 0.1ml/ (含 5×10⁶) PC9-6 细胞悬液 (RPMI-1640; Matrigel, 体积比为 1:1) 皮下接种于每只小鼠的腰背部。在接种细胞后第 7 天, 依据肿瘤体积随机分组给药, 分组当天为 Day0 (第 0 天)。

给药: 对照 ADC10 和 ADC2-L19-1 的给药剂量选用 1.5 mg/kg, 在分组后 day0 (第 0 天), day8 (第 8 天), day14 (第 14 天) 尾静脉 (Intravenous Injections, IV) 给药。每组 6 只小鼠。

肿瘤测量和实验指标:

每周两次用游标卡尺测量肿瘤直径。肿瘤体积的计算公式为: V = 0.5a x b², a 和 b 分别表示肿瘤的长径和短径。每周两次测量小鼠体重。

化合物的抑瘤疗效用肿瘤生长抑制率 TGI (%) 来评价。TGI (%) = [(1-(某处理组给药结束时平均瘤体积-该处理组开始给药时平均瘤体积)/(溶剂对照组治疗结束时平均瘤体积-溶剂对照组开始治疗时平均瘤体积)]x100%。

实验结果:

见表 16, 图 5 和图 6。

表 16. PC9-6 皮下瘤模型肿瘤体积

受试化合物	剂量	给药方式	给药频率	平均肿瘤体积 (mm³)								TGI (%)
	mg/kg			0 天	3 天	7 天	10 天	13 天	16 天	20 天	23 天	
溶剂对照	/	IV	第 0 天 第 8 天	123.42	204.26	309.64	415.86	618.84	890.55	1184.74	1418.07	/

			第 14 天									
对照 ADC10	1.5	IV	第 0 天 第 8 天 第 14 天	123.44	170.94	230.02	263.57	327.76	442.77	555.2	718.84	54.01
ADC2- L19-1	1.5	IV	第 0 天 第 8 天 第 14 天	123.56	167.92	195.17	202.49	234.8	309.01	432.97	511.13	70.06

实验结论：

小鼠皮下移植瘤 PC9-6 模型中，在 1.5 mg/kg 尾静脉给药 3 次（day0，day8，day14）的情况下，本公开化合物 ADC2-L19-1 和对照 ADC10 对肿瘤生长均具有显著抑制作用（P<0.0001，P<0.0001）；且 ADC2-L19-1 显著优于对照 ADC10（P<0.05）。本公开 ADC 分子在上述给药试剂量下未发现影响小鼠体重，也未引起任何小鼠死亡，小鼠可以耐受。

3.3 CDH-6 ADC 对 PA-1 皮下瘤模型药效评价

动物信息：BALB/c nude 小鼠，雌性，6-8 周，体重约 16-22 克，动物购自北京维通利华生物技术有限公司，将小鼠饲养在 SPF 级的环境中，每个笼位单独送排风，所有动物都可以自由获取标准认证的商业实验室饮食和自由饮水。

细胞信息：中表达人 CDH6 的人卵巢癌 PA-1 细胞株(来自南京科佰)体外培养，培养条件为 MEM(Gbico; Cat No.: 32561-037) 中加入 10%胎牛血清（Gbico; Cat No.: 10091-148），1% Pen Strep，1% NEAA，1mM 丙酮酸钠（Gbico; Cat No.: 11360-070），37℃、5%CO₂ 孵箱。一周一次用 versene 消化液（Gbico; Cat No.: 15040-066）进行常规消化处理传代。当细胞饱和度为 80%-90%，数量达到要求时，收取细胞，计数。

细胞接种：将 0.2ml/（含 1×10⁷）PA-1 细胞悬液（MEM：Matrigel，体积比为 1:1）皮下接种于每只小鼠的腋下。接种细胞后第 14 天，依据肿瘤体积随机分组给药，分组当天为 Day0（第 0 天）。

给药：ADC3-L19-1、ADC3-L12-1、对照 ADC11、对照 ADC-ISO-1 和对照 ADC-ISO-2 的给药剂量为 1 mg/kg，在 Day0 进行尾静脉单次给药，每组 6 只小鼠。

肿瘤测量和实验指标：每周两次用游标卡尺测量肿瘤直径。肿瘤体积的计算公式为：V = 0.5a × b²，a 和 b 分别表示肿瘤的长径和短径。每周两次测量小鼠体重。

化合物的抑瘤疗效用肿瘤生长抑制率 TGI（%）来评价。TGI（%）=[(1-(某处理组给药结束时平均瘤体积-该处理组开始给药时平均瘤体积)/(溶剂对照组治疗结束时平均瘤体积-溶剂对照组开始治疗时平均瘤体积)]x100%。

实验结果：如表 17 和图 7 所示，在小鼠皮下移植瘤 PA-1 模型中，与溶剂对照组相比，对照 ADC11，ADC3-L19-1，ADC3-L12-1 在 1 mg/kg 剂量单次尾静脉给药对肿瘤生长均具有显著抑制作用（P<0.0001，P<0.0001，P<0.0001）；相比于对照 ADC11，ADC3-L19-1 和 ADC3-L12-1 的 Day 30（第 30 天）的 TGI 更优，显现出更大的抑瘤潜力。本公开 ADC 分子在上述给药试剂量下未发现影响小鼠体重，也未引起任何小鼠死亡，小鼠可以耐受。

表 17. PA-1 皮下瘤模型肿瘤体积

给药组	给药剂量及频率	第 30 天			
		平均肿瘤大小 (毫米 ³)	TGI(%)	P 值	实验动物体重变化 (%)
溶剂对照	NA	1412.80	NA	NA	12.95
对照 ADC-ISO-1	1mpk, 单次给药	1890.13	-36.59	****	18.52
对照 ADC-ISO-2	1mpk, 单次给药	1704.16	-22.32	****	20.02
对照 ADC11	1mpk, 单次给药	451.20	73.71	****	9.81
ADC3-L12-1	1mpk, 单次给药	186.38	94.06	****	12.72
ADC3-L19-1	1mpk, 单次给药	241.50	89.79	****	10.40

权利要求书

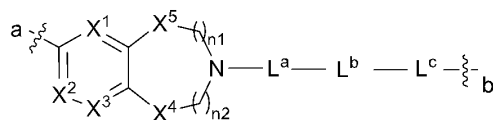
1、一种配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其结构通式为 $Pc-(L-D)_n$ ，

其中,

Pc 为配体单元;

D 为药物单元:

L 为以下结构的连接子单元, a 端与配体单元连接,



(L)

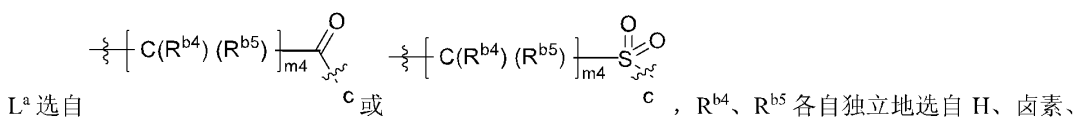
其中,

X^1 、 X^2 、 X^3 各自独立地选自N或 CR^{a1} ，且 X^1 、 X^2 、 X^3 中的至少一个选自N，所述 R^{a1} 选自H、卤素、CN、 C_1 - C_3 烷基、 C_2 - C_3 烯基、 C_2 - C_3 炔基、 C_3 - C_6 环烷基或4-7元杂环基；

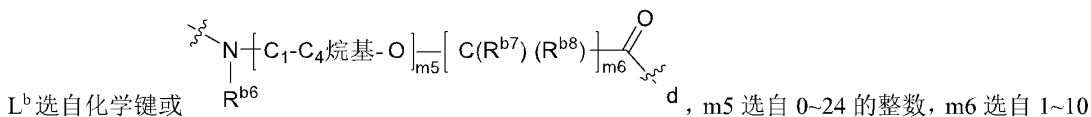
n_1 、 n_2 各自独立地选自 0、1、2:

X⁴、X⁵各自独立地选自C(=O)、C(R^{b1})(R^{b2})、O、S、S(=O)、S(=O)₂、NR^{b3}或它们的任意组合,所述R^{b1}、R^{b2}、R^{b3}各自独立地选自H或R^{c1},或者R^{b1}、R^{b2}与它们连接的碳原子共同形成C₃-C₆环烷基或4-7元杂环基,所述C₃-C₆环烷基或4-7元杂环基任选地被一个或多个R^{c1}取代;

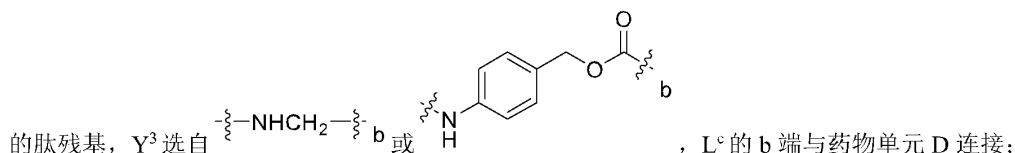
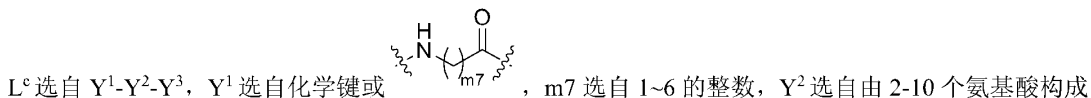
每一个 R^{c1} 独立地选自卤素、CN、 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_6 环烷基或者亲水性基团；



CN、C₁-C₃烷基、OH、O(C₁-C₃烷基)、NH₂、NH(C₁-C₃烷基)或N(C₁-C₃烷基)₂，或者R^{b4}、R^{b5}与它们连接的碳原子共同形成C₃-C₆环烷基或4-7元杂环基，m4选自1~10的整数，L^a的c端与L^b连接；



的整数，每一个 R^{b6} 、 R^{b7} 、 R^{b8} 各自独立地选自 H 或 R^{c6} ，所述 R^{c6} 选自卤素、CN、 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_6 环烷基或者亲水性基团， L^b 的 d 端与 L^c 连接；



n 为 1~16 的实数。

2、根据权利要求 1 所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中 X^1 、 X^2 均选自 N， X^3 选自 CH。

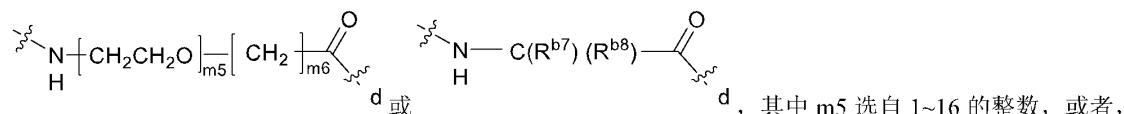
3、根据权利要求 1 或 2 所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中 n1、n2 各自独立地选自 0 或 1；或者，n1 选自 1，n2 选自 0。

4、根据权利要求1-3中任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中 X^4 、 X^5 各自独立地选自 $C(=O)$ 或 $C(R^{b1})(R^{b2})$ ，所述 R^{b1} 、 R^{b2} 各自独立地选自H或 R^{c1} ，或者 R^{b1} 、 R^{b2} 与它们连接的碳原子共同形成 C_3 - C_6 环烷基或4-7元杂环基，所述 C_3 - C_6 环烷基或4-7元杂环基任选地被一个或多个 R^{c1} 取代；或者，

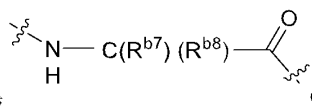
X^4 选自 $C(=O)$ ， X^5 选自 $C(R^{b1})(R^{b2})$ ，所述 R^{b1} 、 R^{b2} 各自独立地选自H或 R^{c1} ，或者 R^{b1} 、 R^{b2} 与它们连接的碳原子共同形成 C_3 - C_6 环烷基或4-7元杂环基，所述 C_3 - C_6 环烷基或4-7元杂环基任选地被一个或多个 R^{c1} 取代；或者，

X^4 选自 $C(=O)$ ， X^5 选自 $C(R^{b1})(R^{b2})$ ，所述 R^{b1} 、 R^{b2} 各自独立地选自H或 R^{c1} ，或者 R^{b1} 、 R^{b2} 与它们连接的碳原子共同形成 C_4 - C_6 环烷基或4-6元含有1个O原子或1个N原子的杂环基，所述4-6元含有1个O原子或1个N原子的杂环基任选地被一个 R^{c1} 取代。

5、根据权利要求1-4中任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中 L^b 选自化学键、

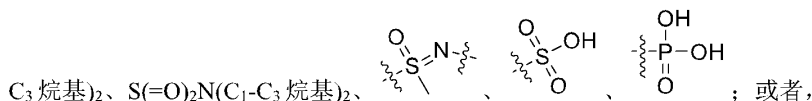


其中 $m5$ 选自1~16的整数，或者， $m5$ 选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16， $m6$ 选自1~6的整数，或者， $m6$ 选自1、2、3、4、5或6，或者， $m6$ 为2， R^{b7} 、 R^{b8} 各自独立地选自H或 R^{c6} ， L^b 的d端与 L^c 连接；或者，



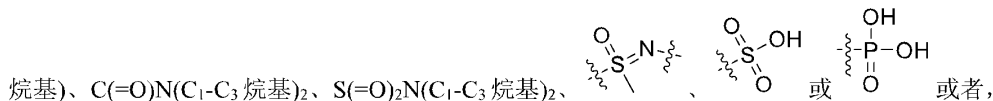
L^b 选自化学键或 d ，其中 R^{b7} 为H，且 R^{b8} 为 R^{c6} ， L^b 的d端与 L^c 连接。

6、根据权利要求1-5中任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中每一个 R^{c1} 和 R^{c6} 各自独立地选自卤素、CN、 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_6 环烷基或者亲水性基团，所述亲水性基团包含一个或多个以下原子团或结构片段： $C(=O)$ 、OH、 $O(C_1$ - C_3 烷基)、 NH_2 、 $NH(C_1$ - C_3 烷基)、 $N(C_1$ - C_3 烷基) $_2$ 、 C_1 - C_4 烷基-O、 $NHC(=O)$ 、 $N(CH_3)C(=O)$ 、 $C(=O)NH_2$ 、 $S(=O)_2NH_2$ 、 $C(=O)NH(C_1$ - C_3 烷基)、 $S(=O)_2NH(C_1$ - C_3 烷基)、 $C(=O)N(C_1$ -



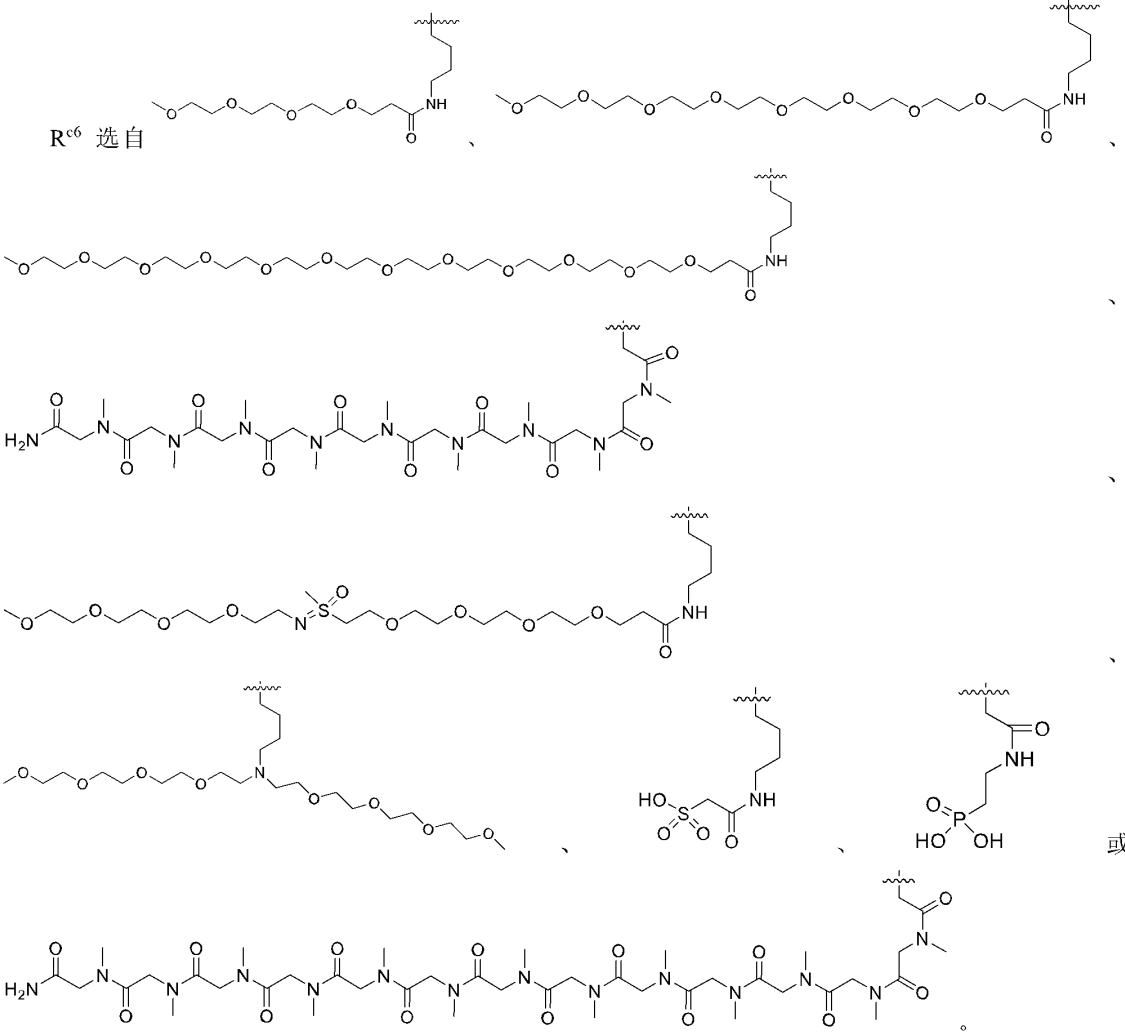
每一个 R^{c1} 和 R^{c6} 独立地选自卤素、CN、 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_6 环烷基或者 W^1 - W^2 - W^3 - W^4 - W^5 ，每一个 W^1 、 W^2 、 W^3 、 W^4 各自独立地选自化学键、 $A-(C_1$ - C_4 烷基-O) $_{m1}$ 或 $[A-(CR^{d1}R^{d2})_{m2}-NR^{d3}]_{m3}$ -B，每一个A和B独立地选自化学键、 C_1 - C_{10} 亚烷基、 C_3 - C_6 亚环烷基、4-7元亚杂环基、O、S、 NR^{d4} 、 $C=O$ 、 $C(=O)NR^{d5}$ 、 $S(=O)_2$ 、

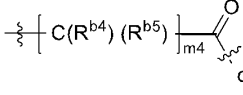
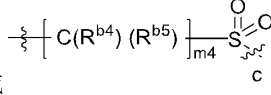
$S(=O)_2NR^{d6}$ 、 $S(=O)(=NR^{d7})$ 、 $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{S} \text{---} \text{N} \text{---} \text{---} \\ \diagup \quad \diagdown \end{array}$ 或它们的任意组合，所述 R^{d1} 、 R^{d2} 、 R^{d3} 、 R^{d4} 、 R^{d5} 、 R^{d6} 、 R^{d7} 、 R^{d8} 各自独立地选自H、 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_6 环烷基、4-7元杂环基或 $(C_1$ - C_4 烷基-O) $_{k1}$ - C_1 - C_6 烷基，所述 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_6 环烷基或4-7元杂环基任选地被卤素、CN、OH、 $O(C_1$ - C_3 烷基)、 NH_2 、 $NH(C_1$ - C_3 烷基)、 $N(C_1$ - C_3 烷基) $_2$ 、 $C(=O)NH_2$ 、 $NHC(=O)NH_2$ 或COOH取代， $m1$ 选自0~30的整数， $m2$ 选自1~5的整数， $m3$ 、 $k1$ 各自独立地选自1~30的整数， W^5 选自H、 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_6 环烷基、4-7元杂环基、OH、 $O(C_1$ - C_3 烷基)、 NH_2 、 $NH(C_1$ - C_3 烷基)、 $N(C_1$ - C_3 烷基) $_2$ 、 $C(=O)NH_2$ 、 $S(=O)_2NH_2$ 、 $C(=O)NH(C_1$ - C_3 烷基)、 $S(=O)_2NH(C_1$ - C_3

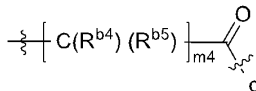


每一个 R^{c1} 和 R^{c6} 独立地选自 W^1 - W^2 - W^3 - W^4 - W^5 ， W^1 、 W^2 均选自化学键， W^3 选自化学键或 $A-(C_1$ - C_4 烷基-O) $_{m1}$ ， W^4 选自 $A-(C_1$ - C_4 烷基-O) $_{m1}$ 或 $[A-(CR^{d1}R^{d2})_{m2}-NR^{d3}]_{m3}$ -B，每一个A和B独立地选自化学键、

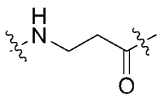
的整数，m2 选自 1~5 的整数，m3、k1 各自独立地选自 1~24 的整数，W⁵ 选自 C₁-C₆ 烷基、NH₂、、 或  ；或者，

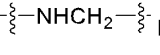
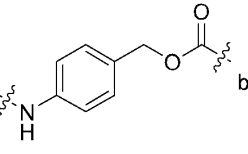


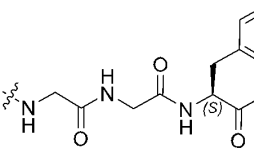
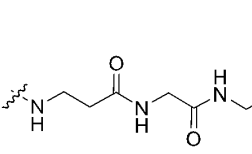
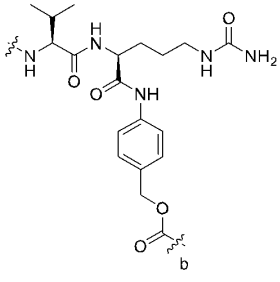
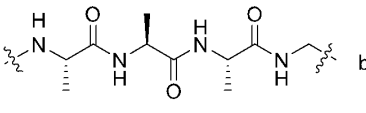
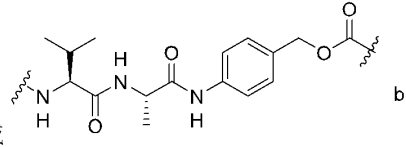
7、根据权利要求 1-6 中任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中 L^a 选自  或  ， R^{b4}、R^{b5} 各自独立地选自 H，m4 选自 1~6 的整数，L^a 的 c 端与 L^b 连接；或者，

L^a 选自  ， R^{b4}、R^{b5} 各自独立地选自 H，m4 选自 1~6 的整数，L^a 的 c 端与 L^b 连接。

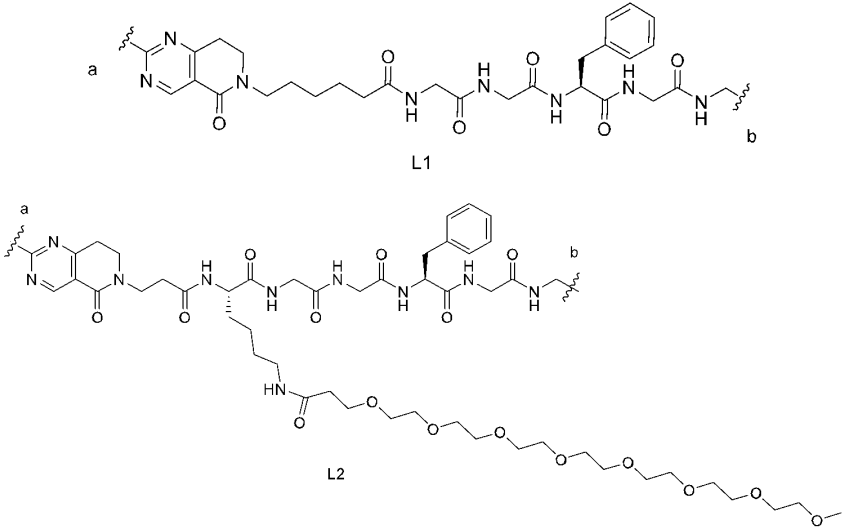
8、根据权利要求 1-7 中任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中 L^c 选自 Y¹-Y²-Y³，

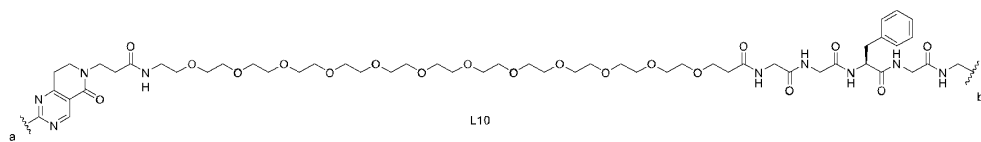
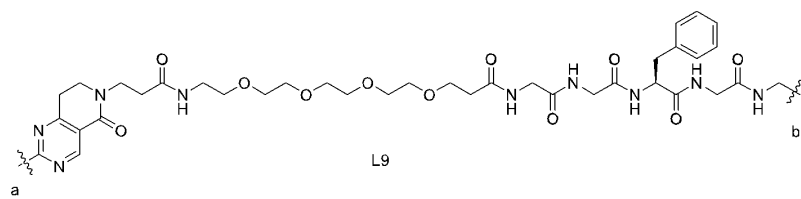
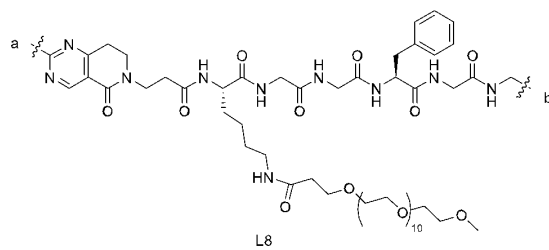
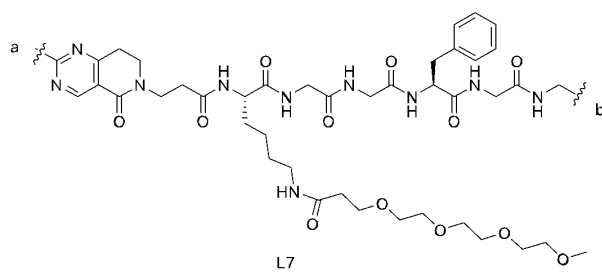
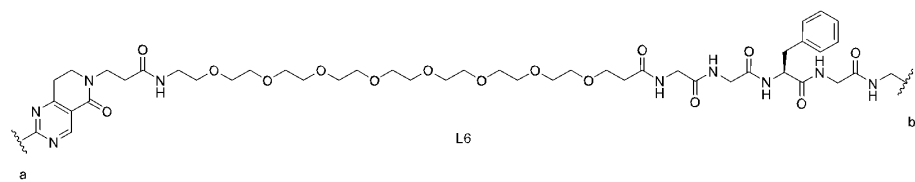
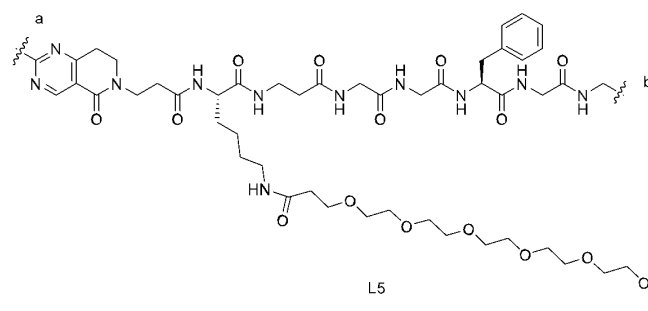
 Y¹选自化学键或

或四肽残基, Y³选自  b 或  b, L^c的b端与药物单元D连接; 或者,

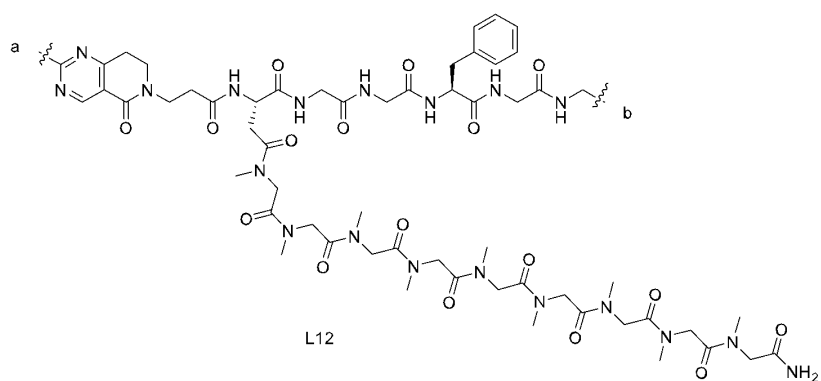
L^c选自  ,  ,  ,  b 或  b ,

L^c的b端与药物单元D连接。
9、根据权利要求1所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,其中连接子单元L选自以下结构:

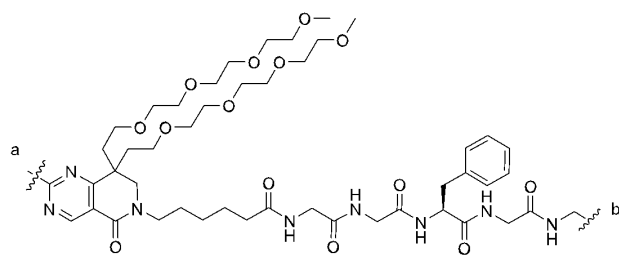




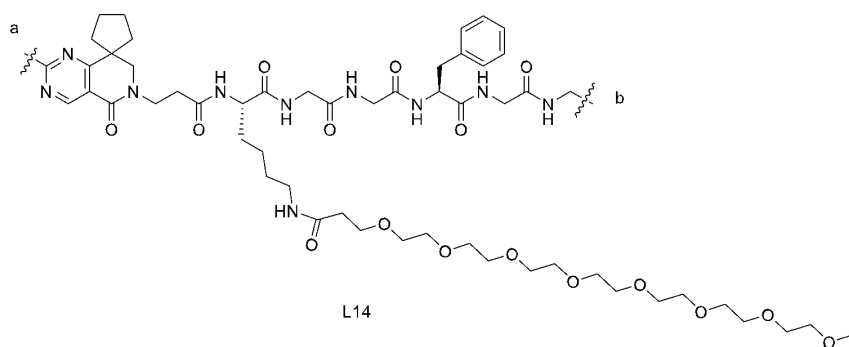
130



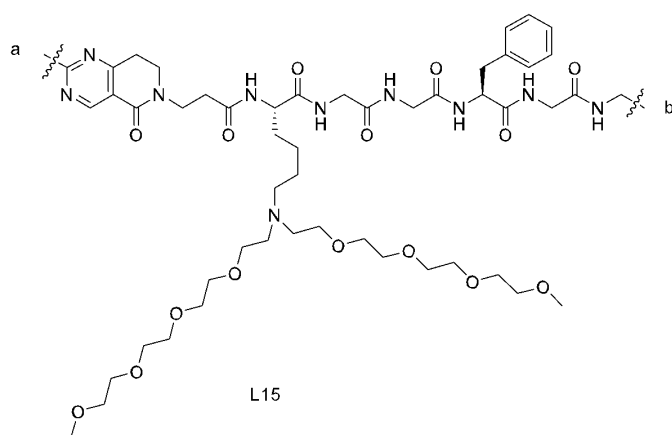
L12



L13



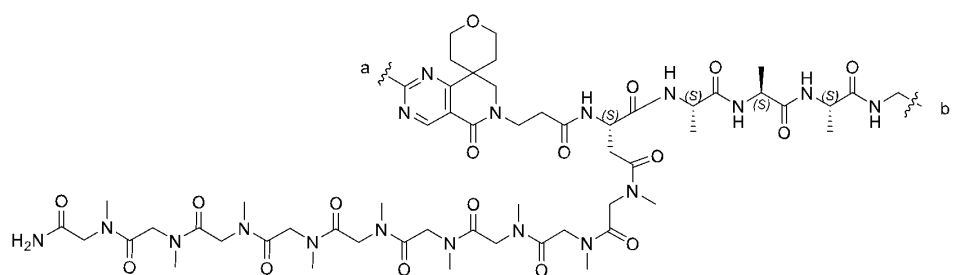
L14



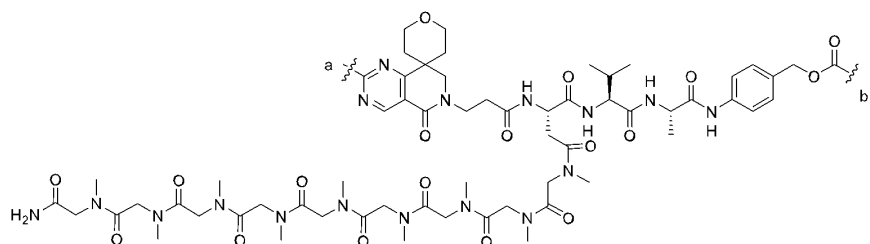
L15



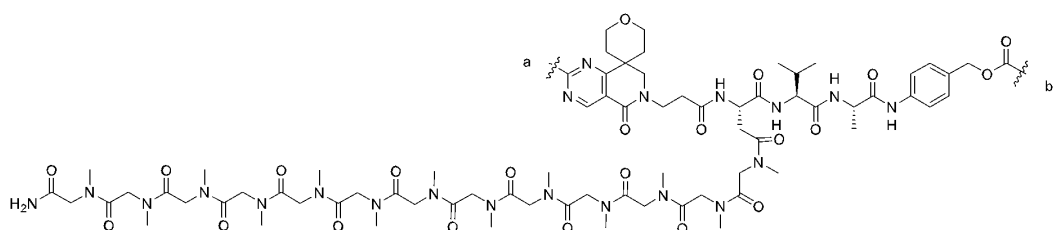
L21



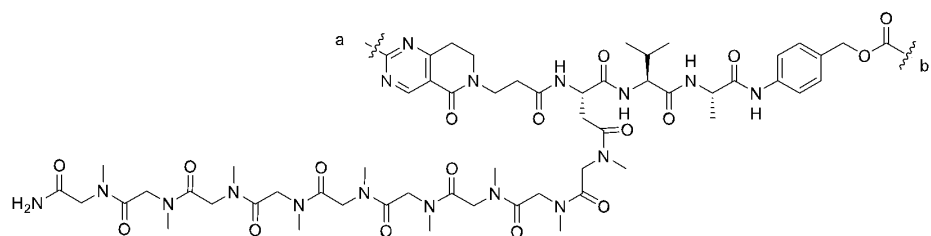
L22



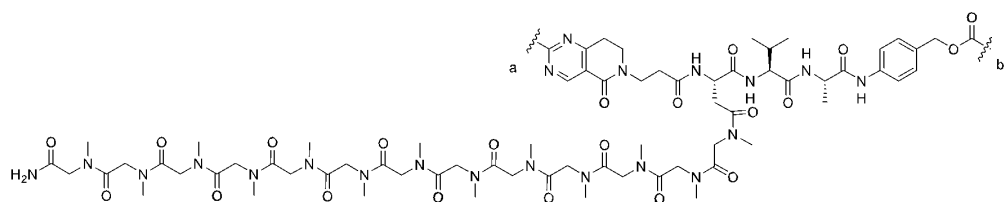
L23

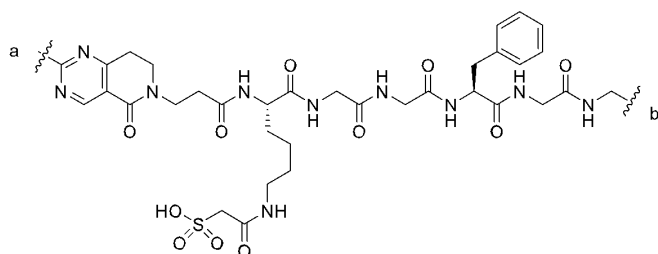
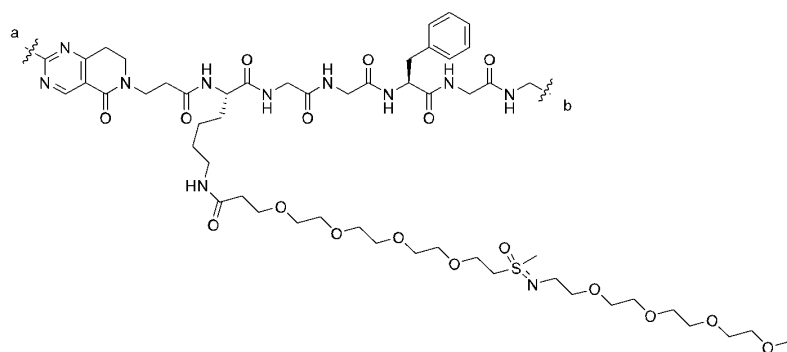
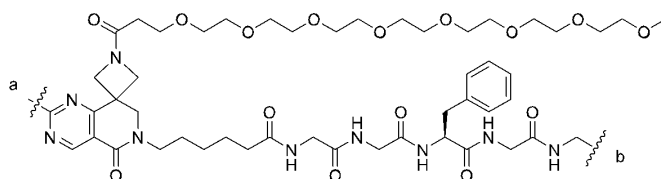
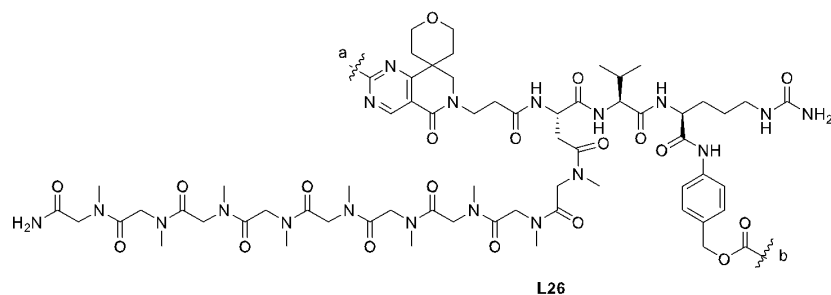


L24

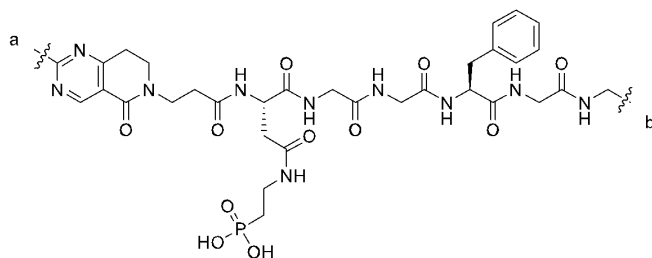


L25





或



10、根据权利要求 1-9 中任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述药物单元 D 选自细胞毒性药物和蛋白降解剂。

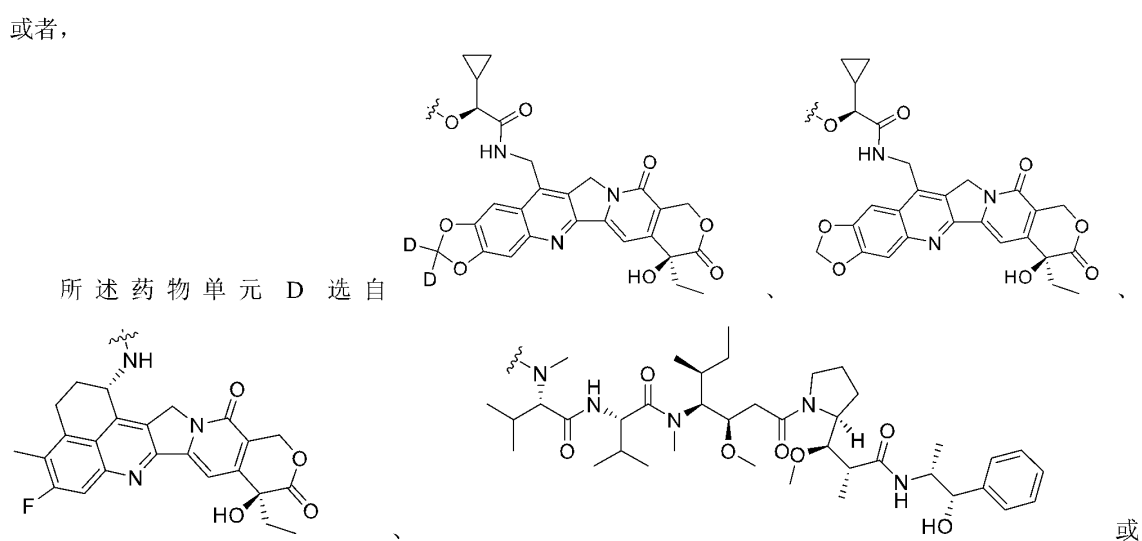
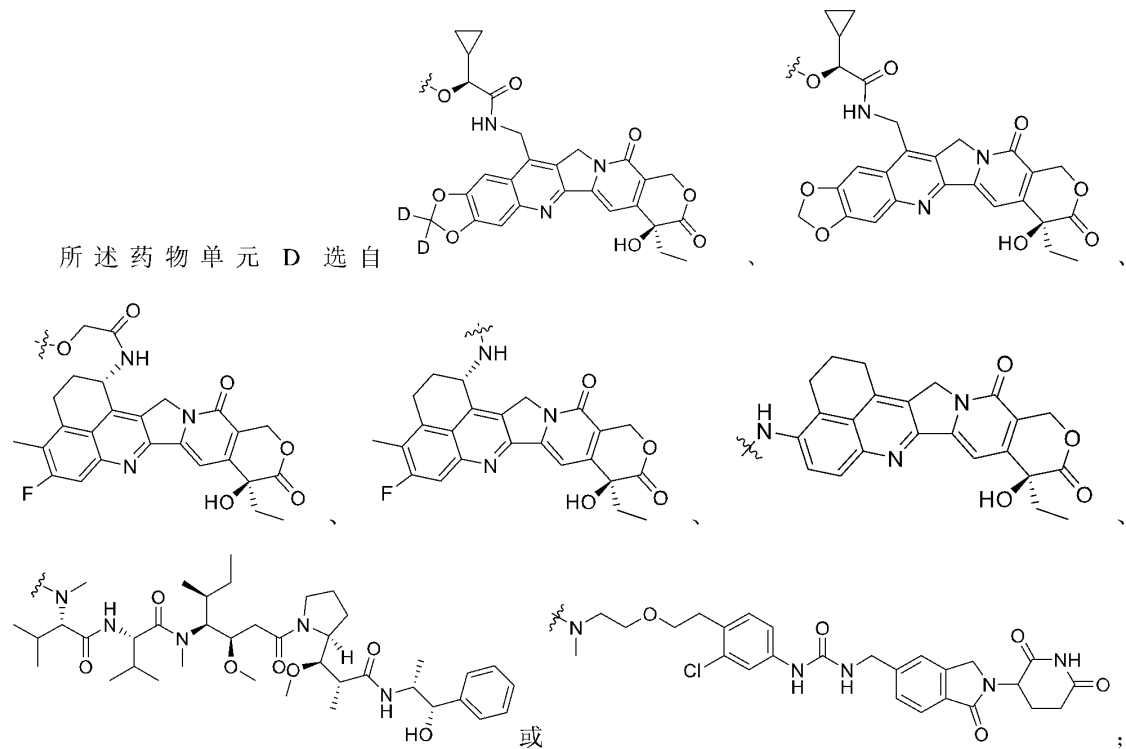
11、根据权利要求 10 所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述细胞毒性药物选自微管蛋白抑制剂、DNA 损伤剂或拓扑异构酶抑制剂，所述微管蛋白抑制剂例如为海兔毒素(dolastatin)类、澳

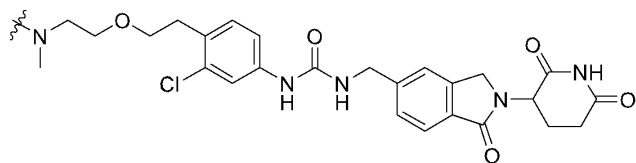
瑞他汀(auristatin)类、美登素(maytansine)类、微管溶素(Tubulysins)类或隐粘菌素(cryptomycins)类药物, 所述 DNA 损伤剂例如为 PBD 类、杜卡霉素(duocarmycin)类或卡齐霉素(calicheamicin)类药物, 所述拓扑异构酶抑制剂例如为喜树碱类药物; 或者,

所述细胞毒性药物选自喜树碱、羟基喜树碱、9-氨基喜树碱、SN-38、伊立替康、拓扑替康、贝洛替康、卢比替康、放线菌素 D、多柔比星、多卡米星、柔红霉素、米托蒽醌、鬼臼毒素、依托泊苷、长春新碱、长春碱、紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛、美登素、类美登素、DM1、DM3、DM4、卡齐霉素、MMAE、MMAF 和 Tubulysin D; 或者,

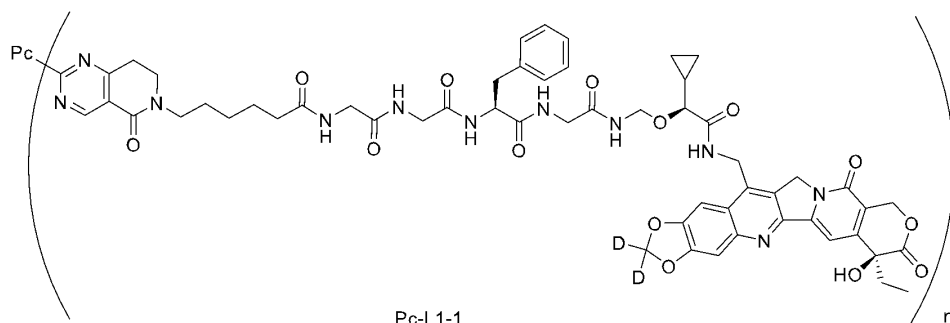
所述细胞毒性药物选自拓扑异构酶 I 抑制剂或溴瑞他汀类药物; 或者,

所述蛋白降解剂选自 GSPT1 蛋白降解剂; 或者,

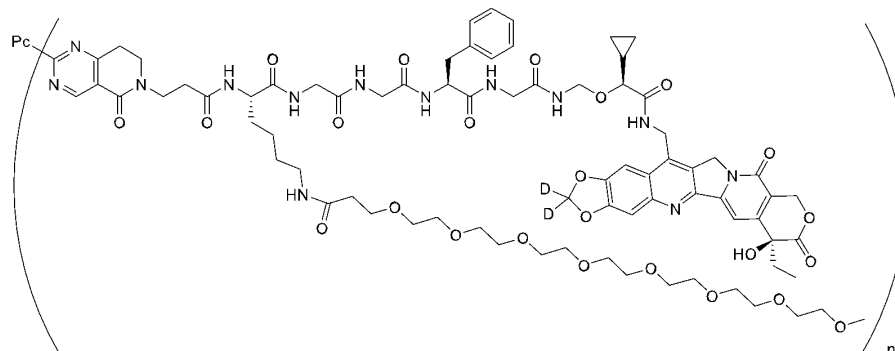




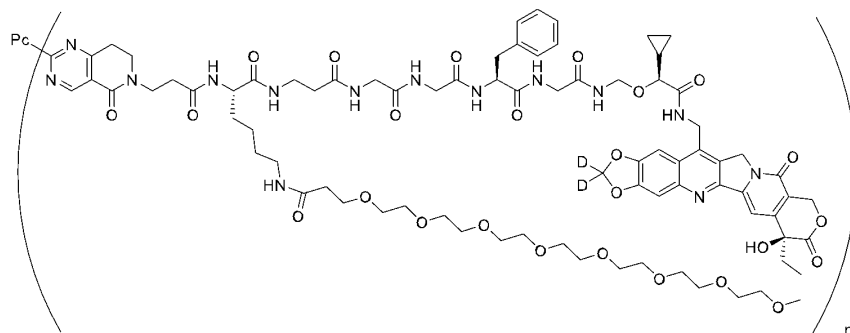
12、根据权利要求1所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，所述通式为 $Pc-(L-D)_n$ 的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐选自以下化合物或其药学上可接受的盐：



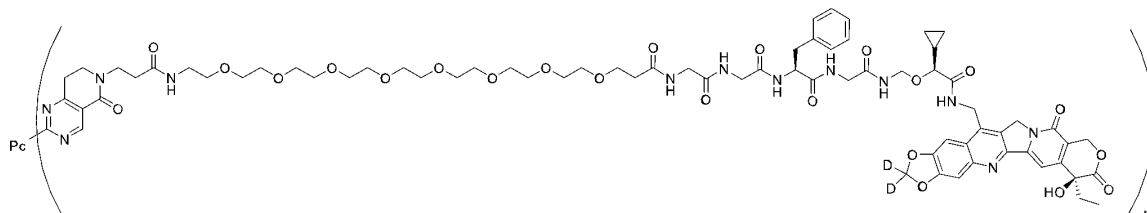
Pc-L1-1



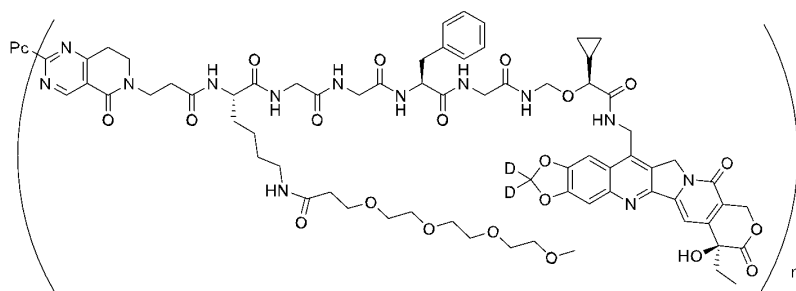
Pc-L2-1



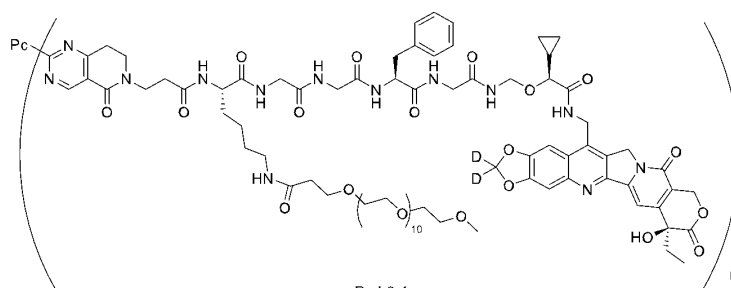
Pc-L5-1



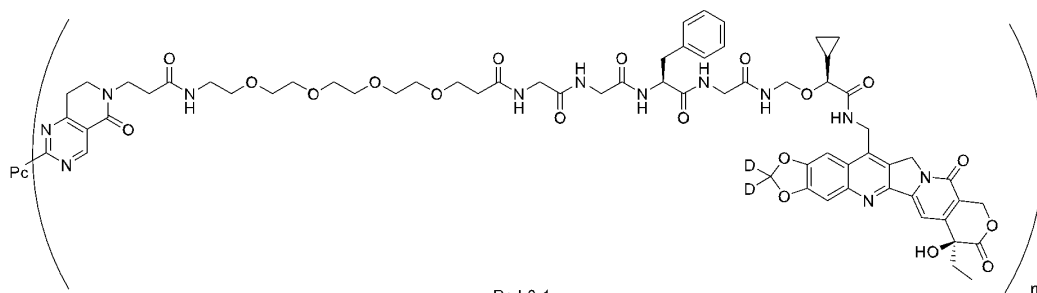
Pc-L6-1



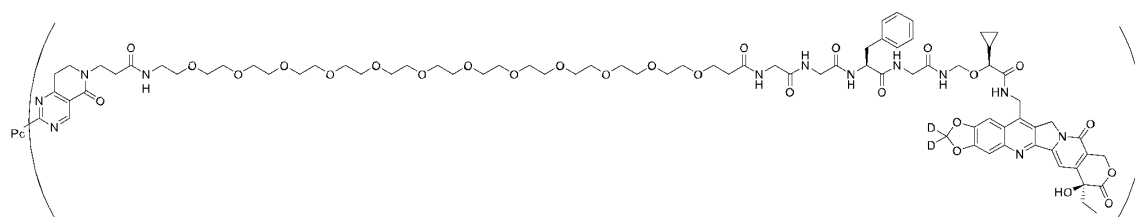
Pc-L7-1



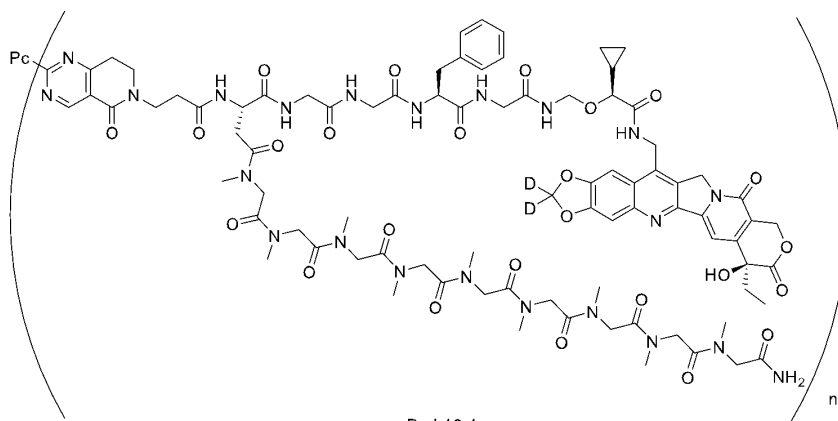
Pc-L8-1



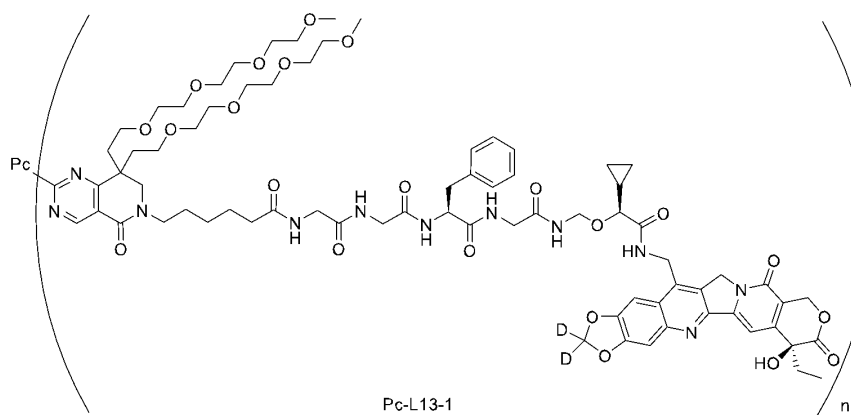
Pc-L9-1



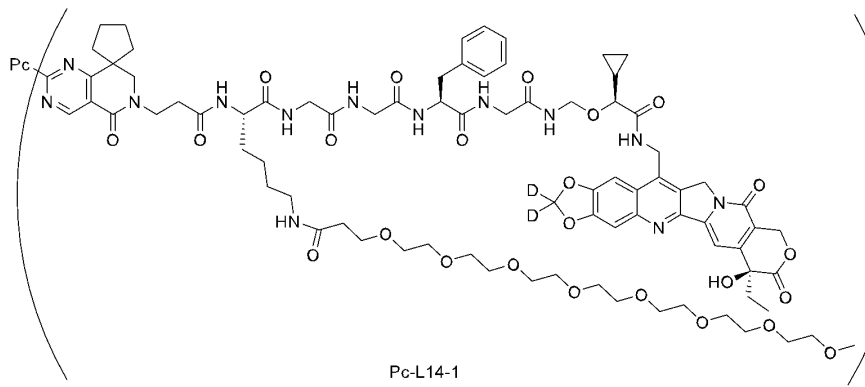
Pc-L10-1



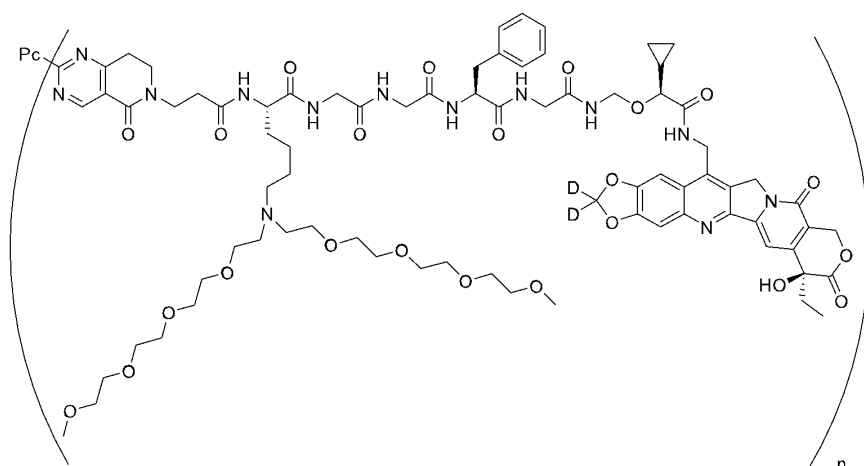
Pc-L12-1



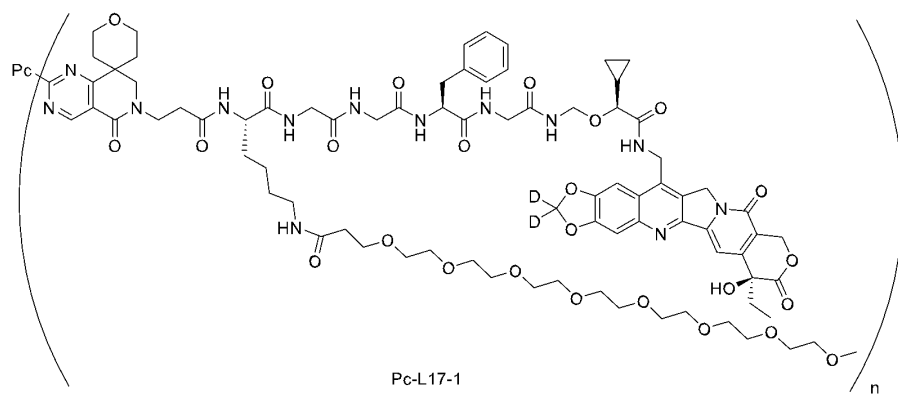
Pc-L13-1



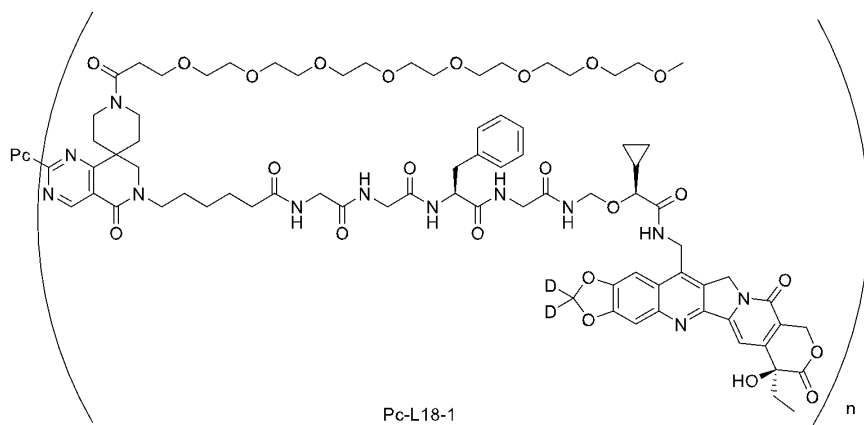
Pc-L14-1



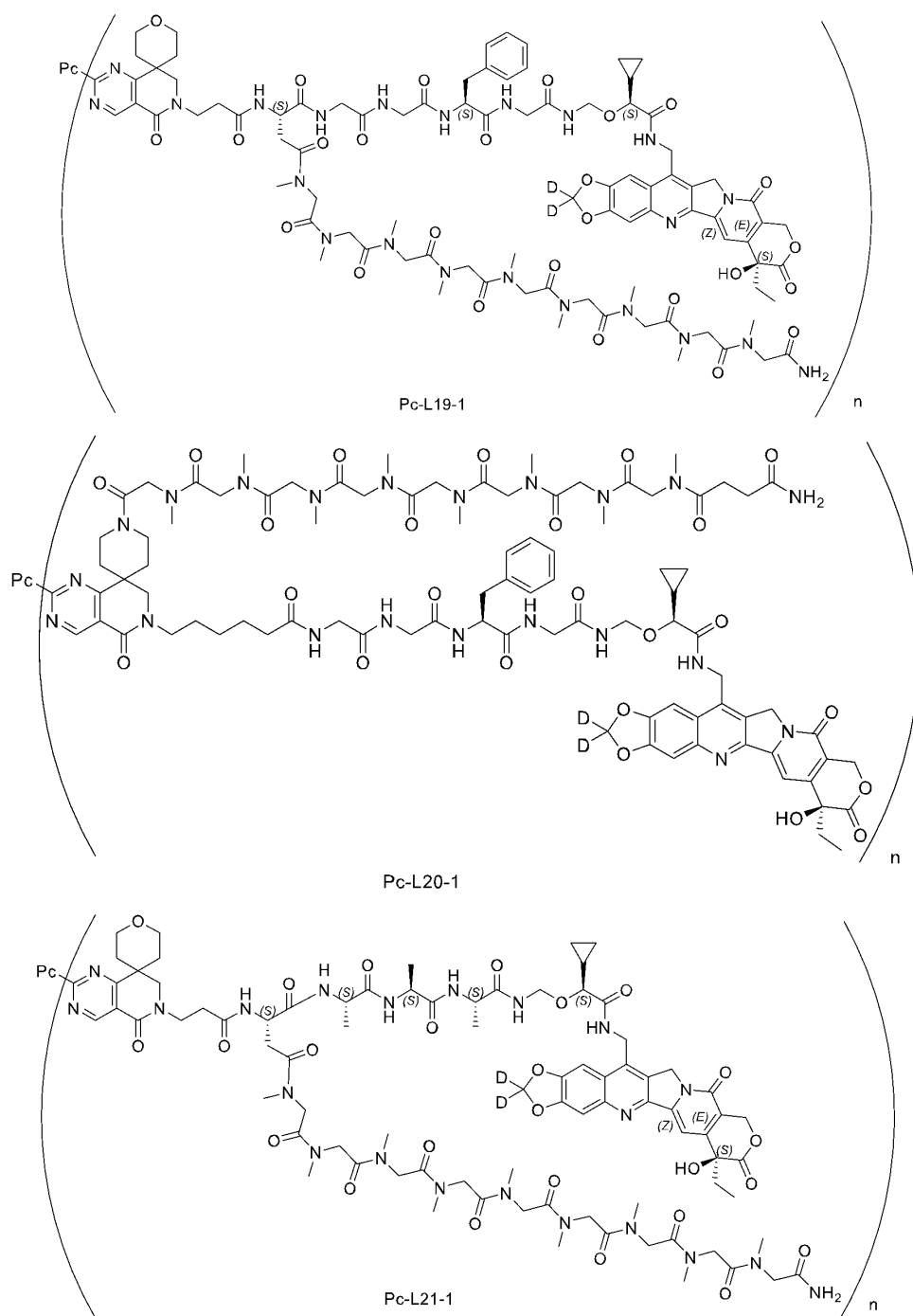
Pc-L15-1

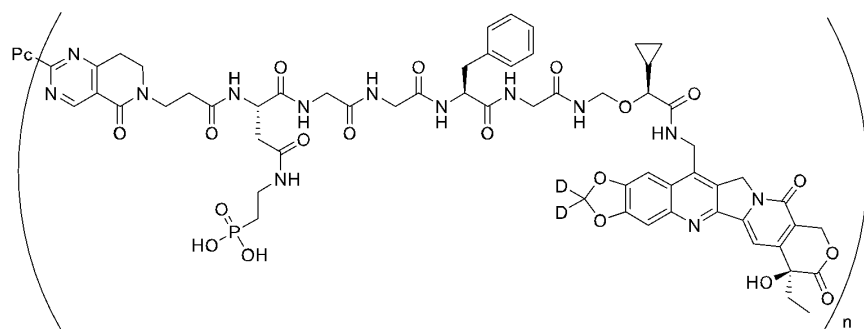
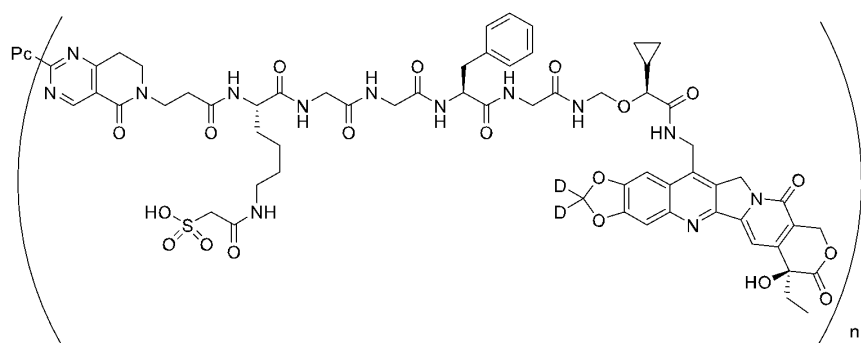
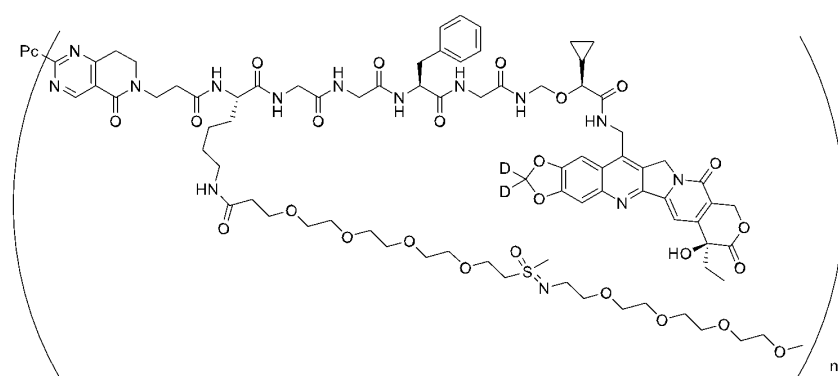
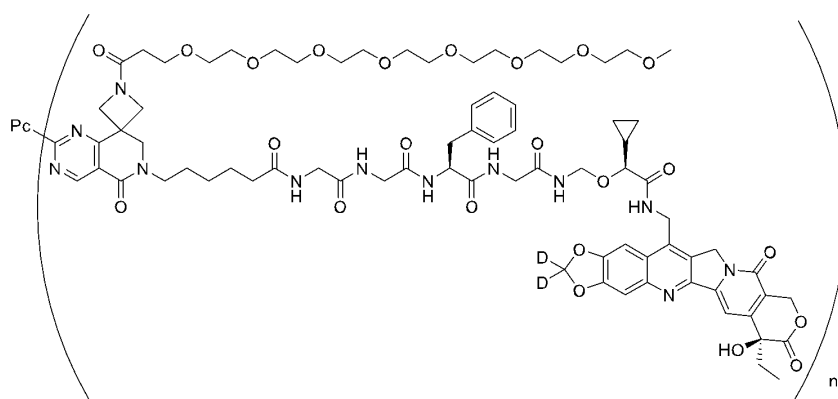


Pc-L17-1

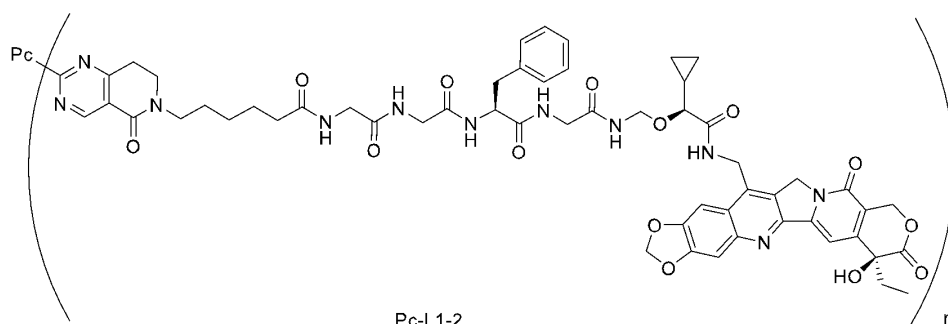


Pc-L18-1

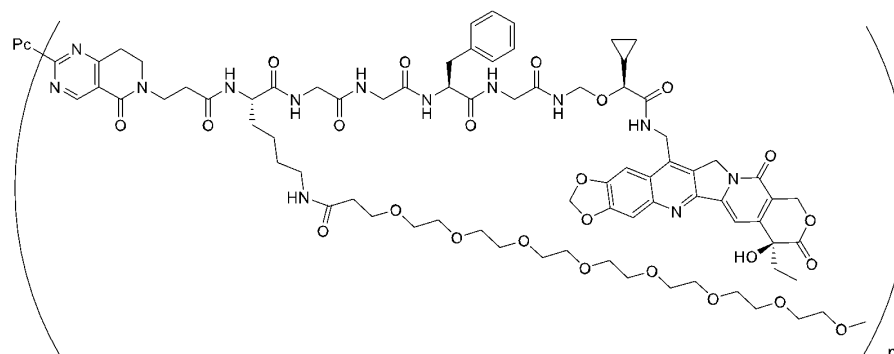




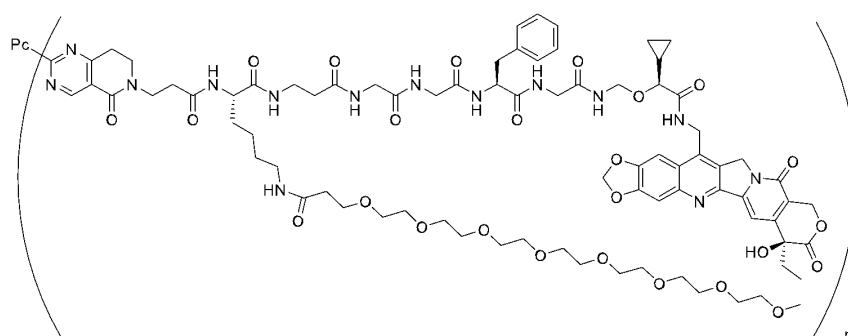
141



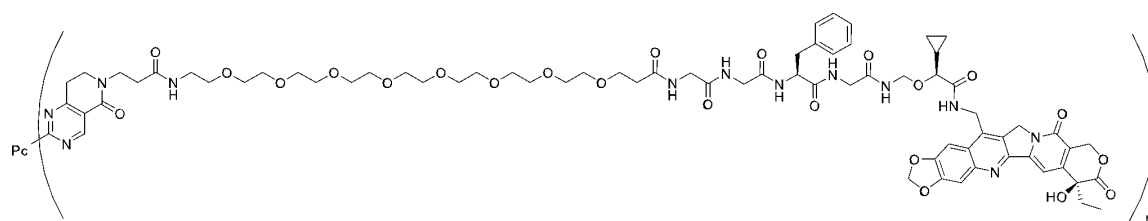
Pc-L1-2



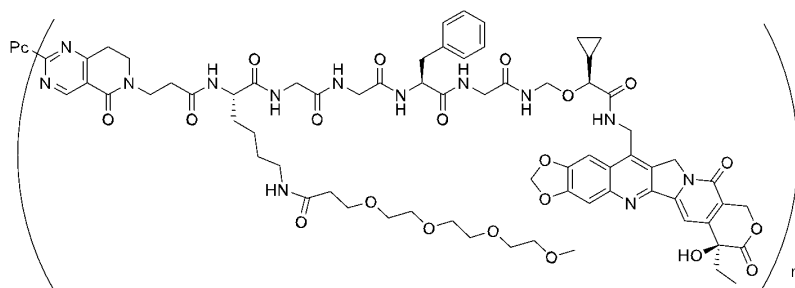
Pc-L2-2



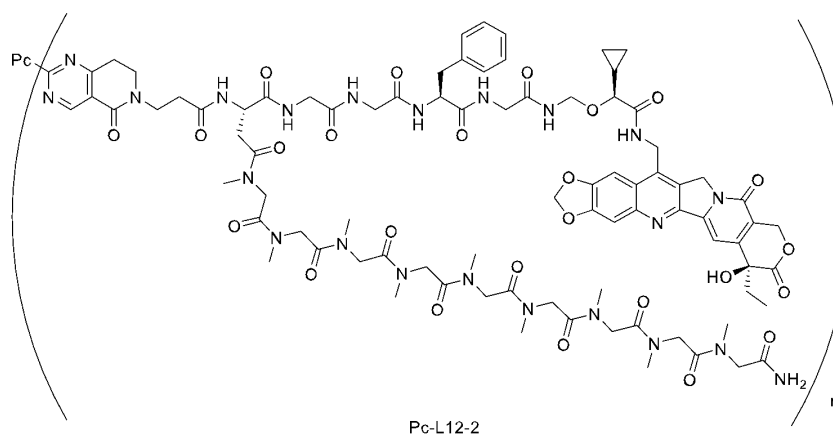
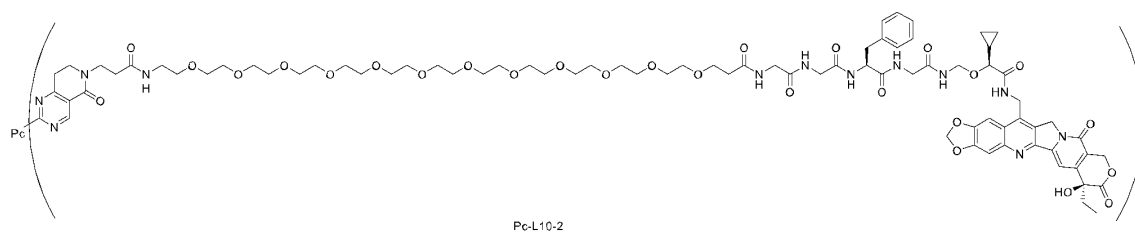
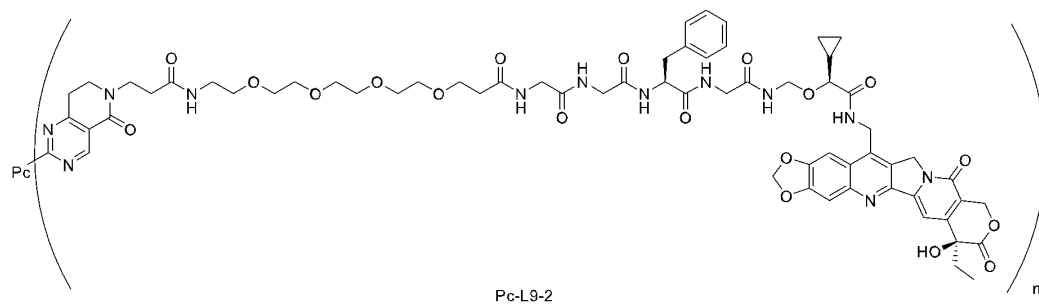
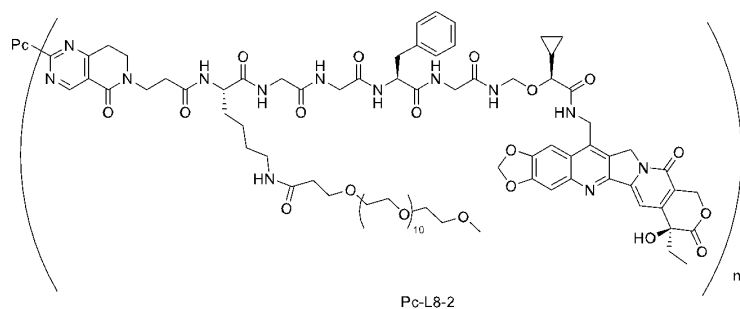
Pc-L5-2

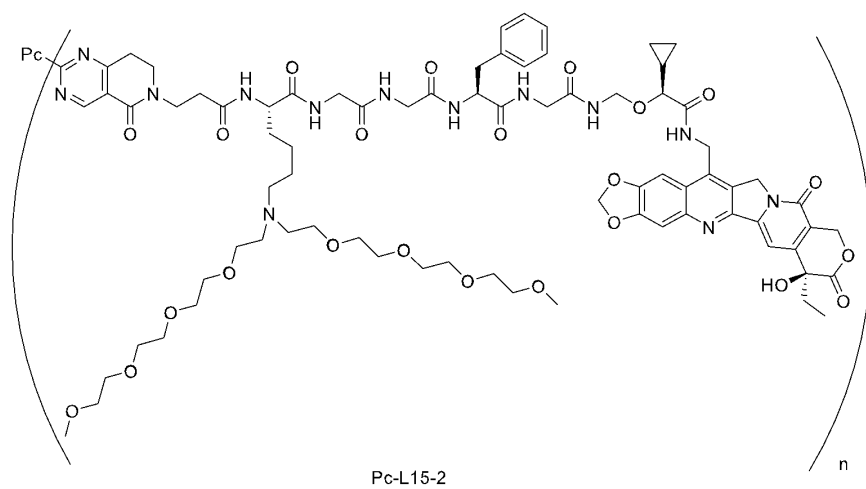
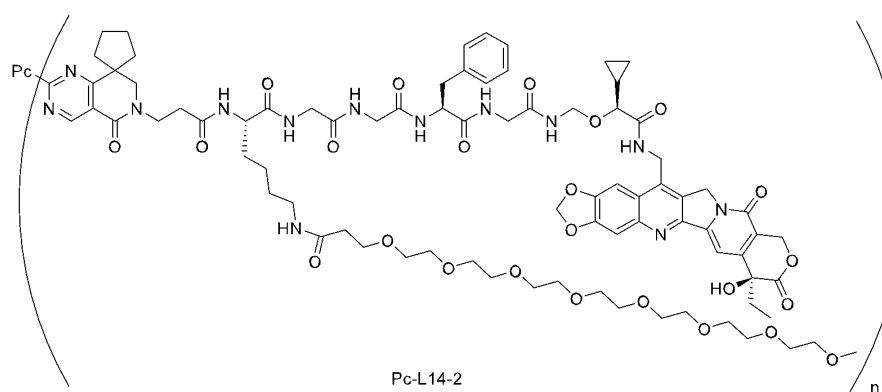
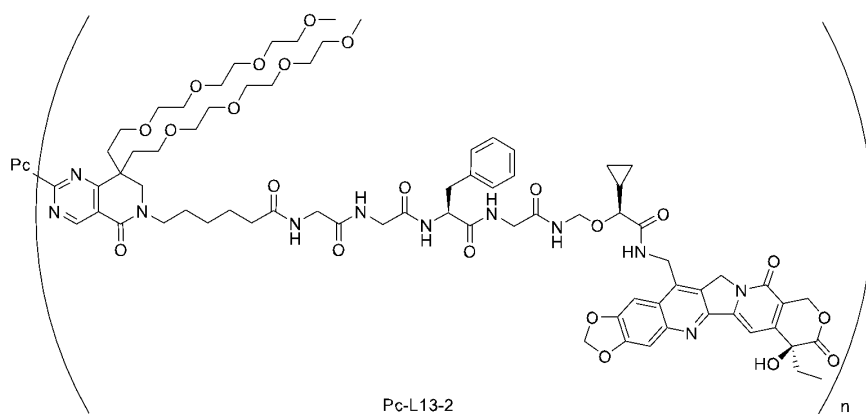


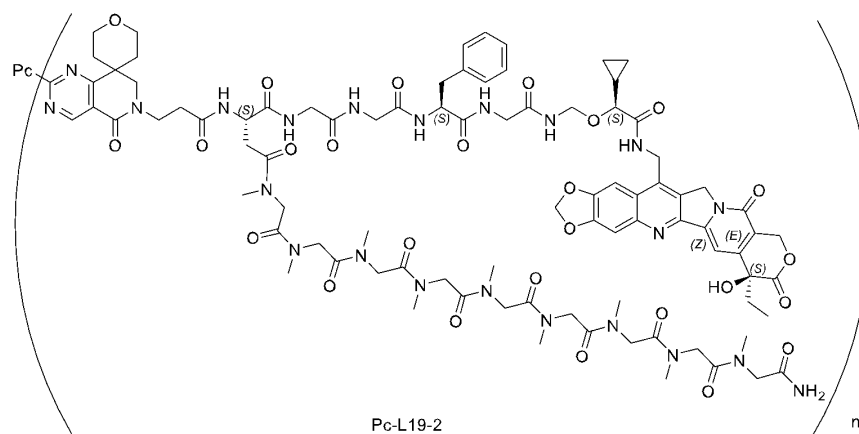
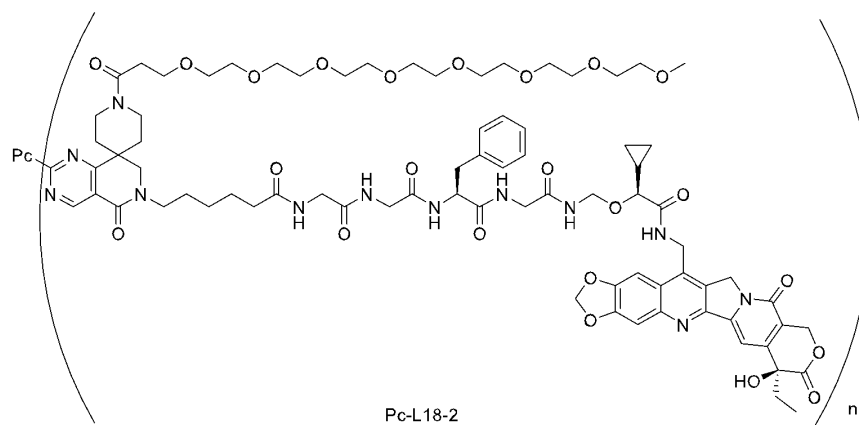
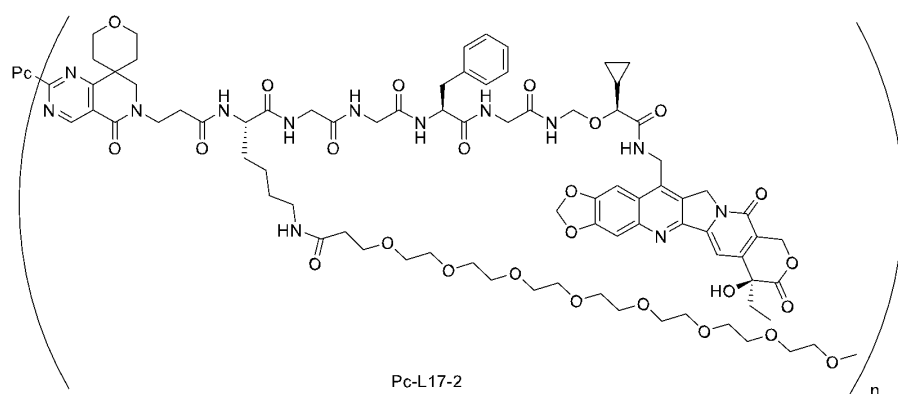
Pc-L6-2

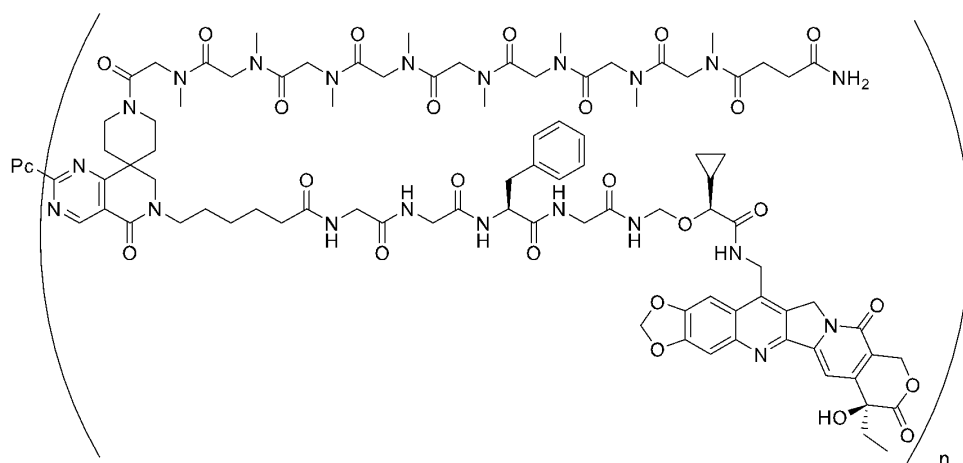


Pc-L7-2

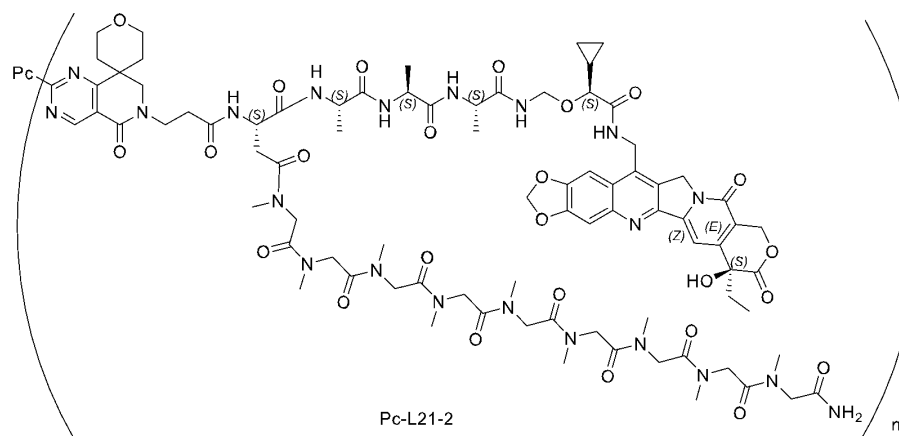




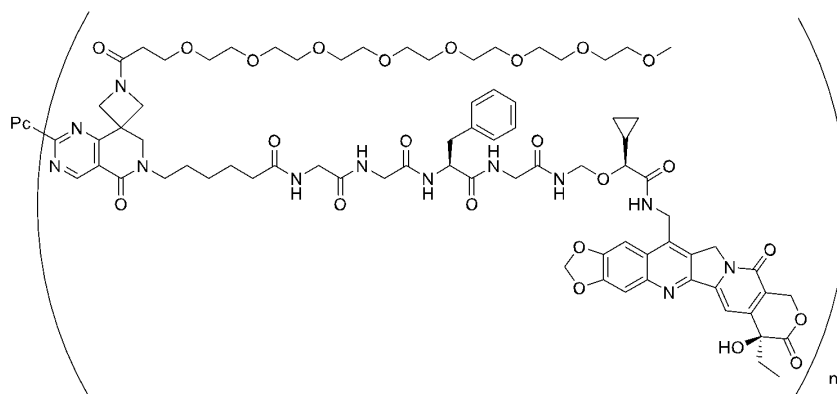


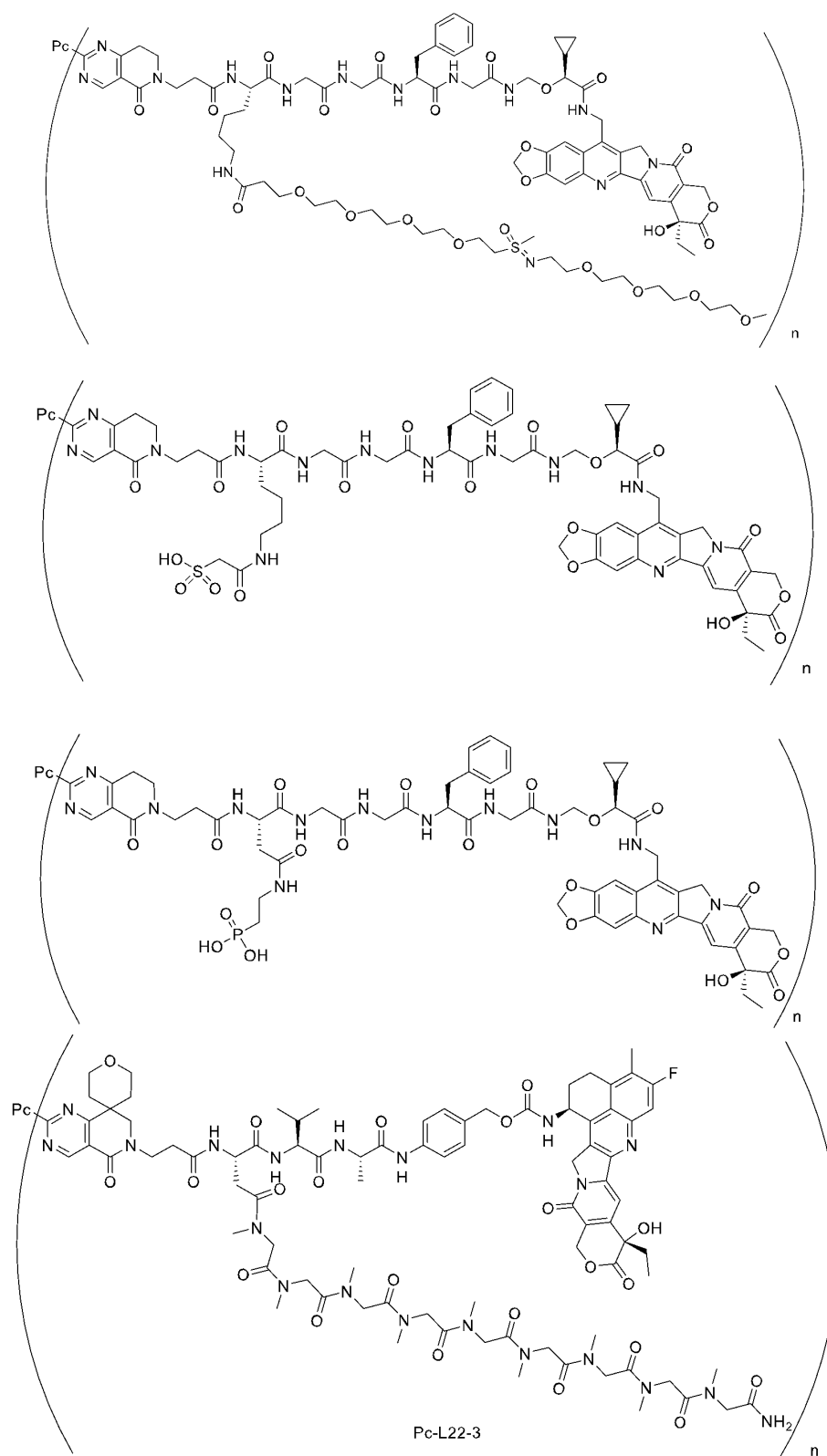


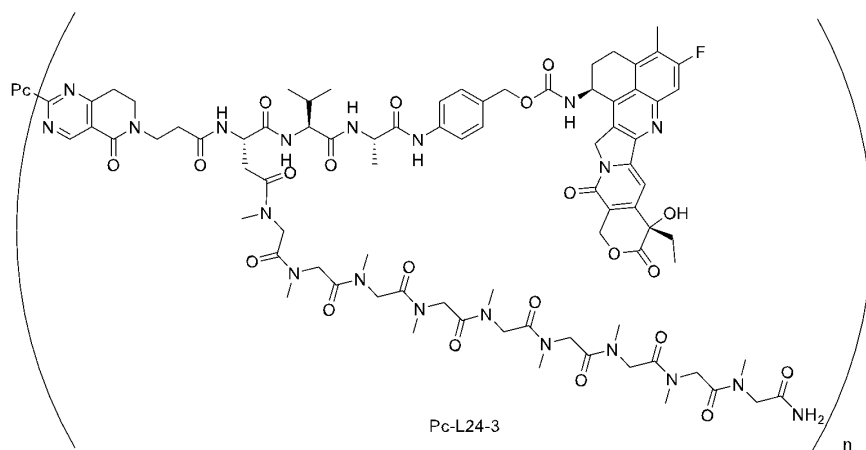
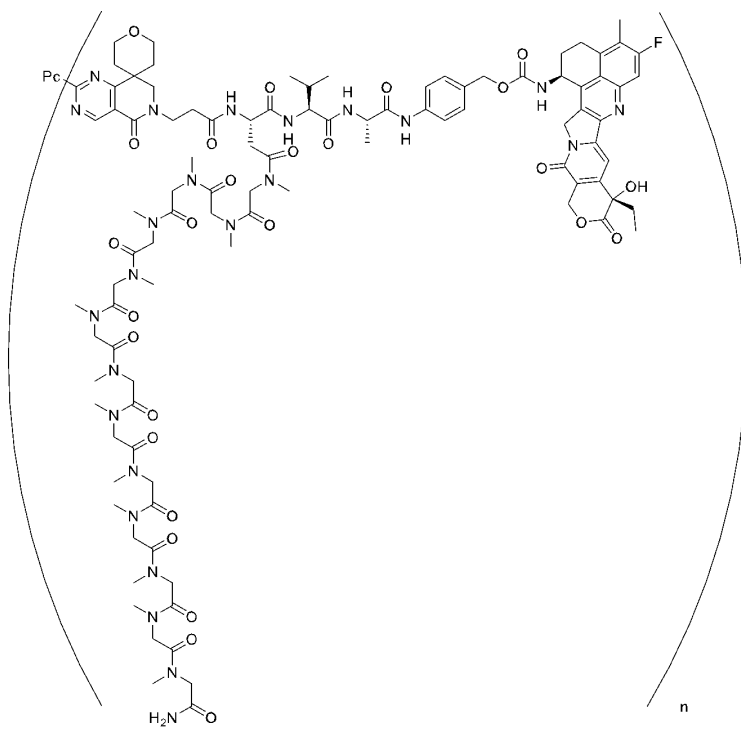
Pc-L20-2

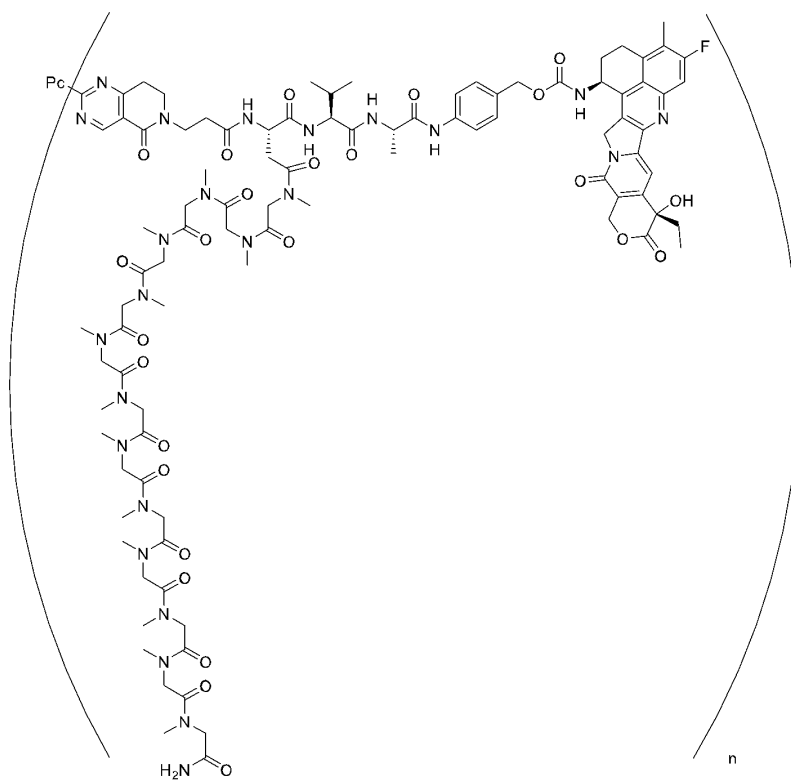


Pc-L21-2

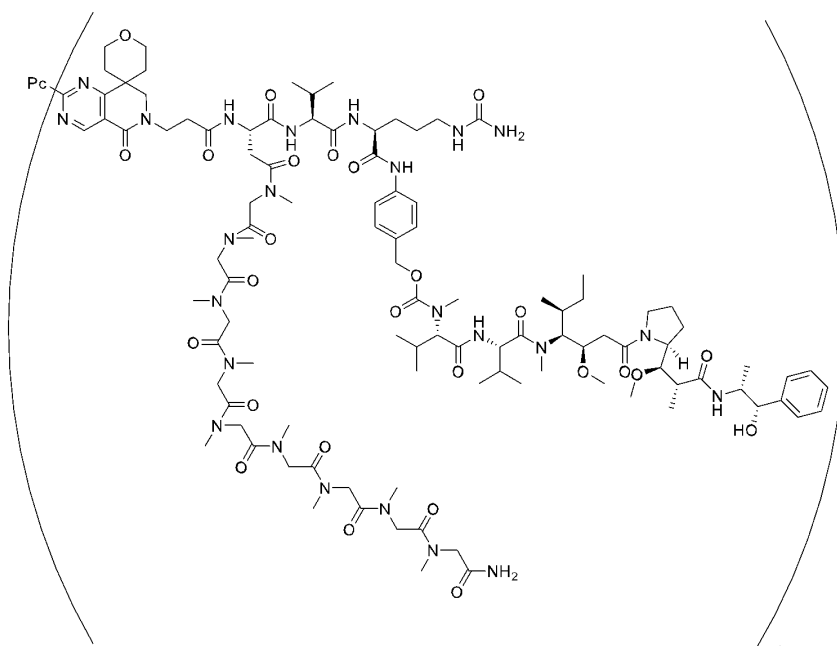






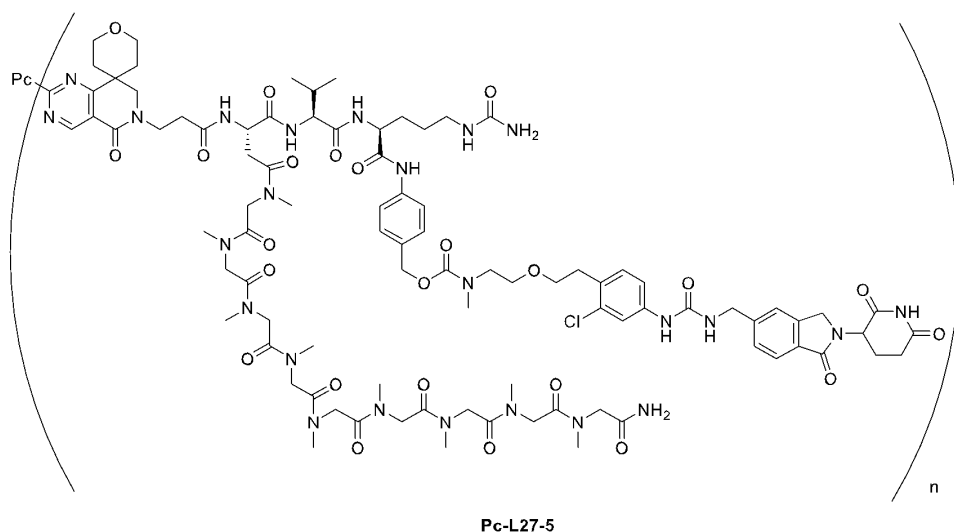


Pc-L25-3



Pc-L26-4

或

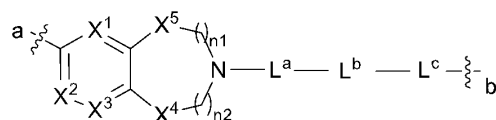


13、根据权利要求 1-12 中任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述配体单元 Pc 选自多肽、抗体或其抗原结合片段；或者，

所述配体单元 Pc 特异性结合选自以下组的一种或多种抗原：HER2 (ErbB2)、p95HER2、HER3 (ErbB3)、CD3、CD16、ROR1、DLL3、CDH6、CD70、CD5、CD20、BCMA、EGFR、VEGF、Trop-2、Claudin6、Claudin18.2、c-MET、CD30、MUC1、Nectin-4、CD22、CD74、CD19、CD79b、MSLN、TOPO2、EpCAM、CEACAM-5、Mesothelin、PD-L1、PSMA、ROR1、ROR2、CD25、CD33、CD123、FLT3、CD174、CD166、CD326、CD71、LIV-1、MUC16、ENPP3、TDGF1、ETBR、TIM1、TIM3、LRRC15、CanAg/AFP、FAP、SLITRK6、KIT/CD117、STEAP1、SLAMF7/CS1、NaPi2B/SLC34A2、GPNMB、AXL、B7-H3(CD276)、PTK7/CKK4、PRLR、EFNA4、5T4、NOTCH3、CD142、CA6、GPR20、EphA2、LYPD3、FGFR2、FGFR3、FR α 、CEACAMs、GCC、IntegrinAv、CAIX、P-cadherin、GD3、cadherin6、LAMP1、CD56、CD37、CD47、CD138 或 CD352。

14、根据权利要求 1-13 中任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中 n 选自 1-8 的实数；或者，n 选自 2-8 的实数；或者，n 选自 6-8 的实数。

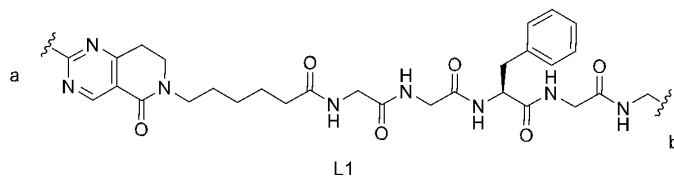
15、式 (L) 所示的连接子单元，用于连接配体单元和药物单元得到配体-药物偶联物，

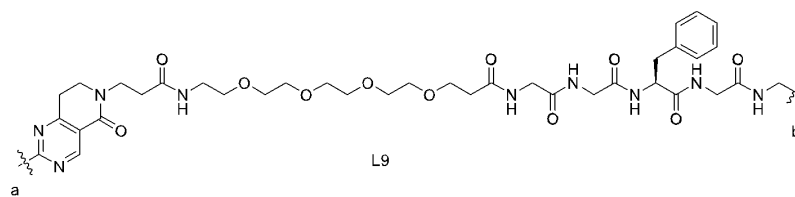
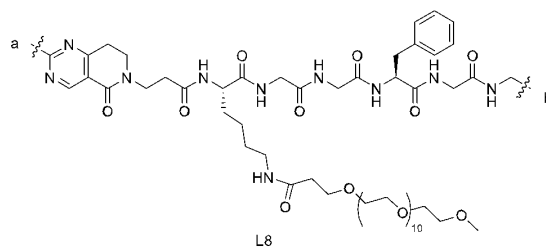
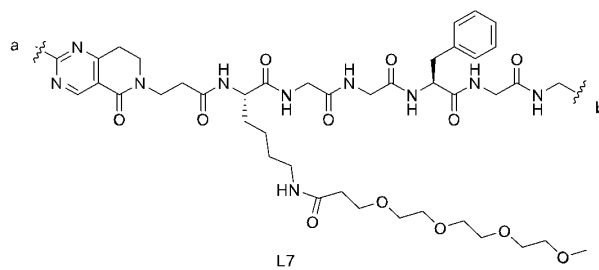
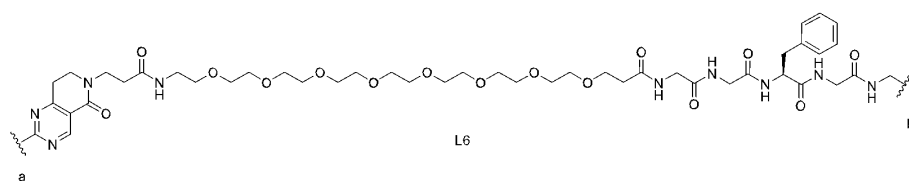
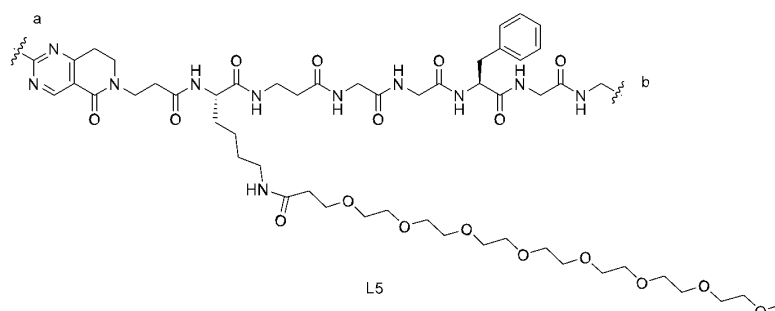
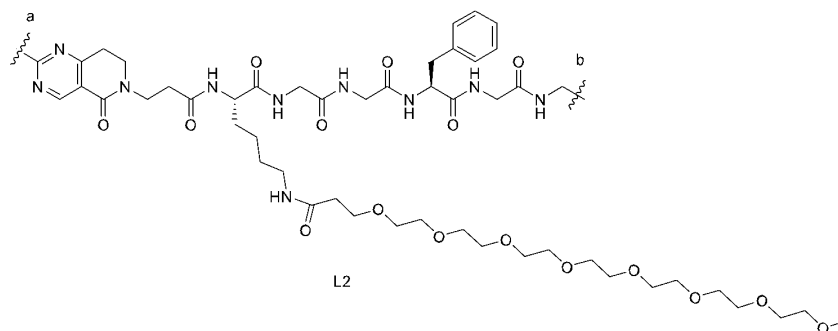


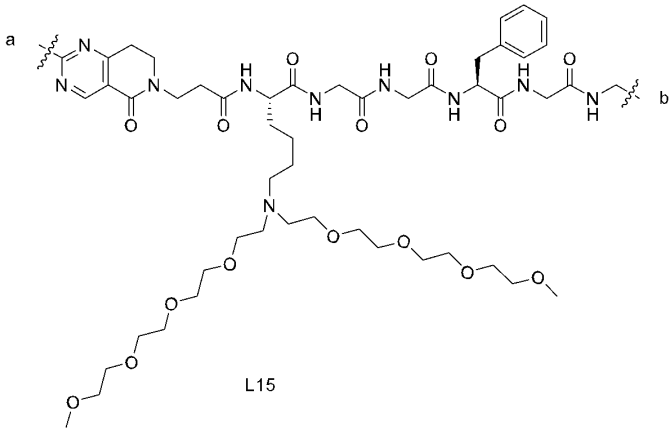
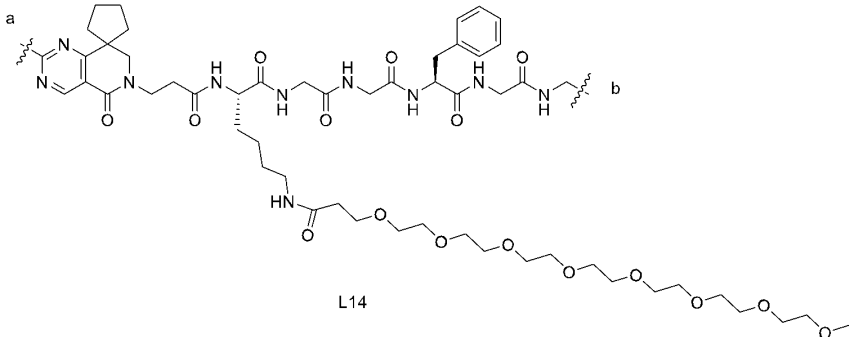
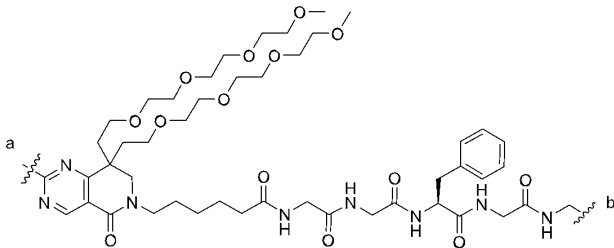
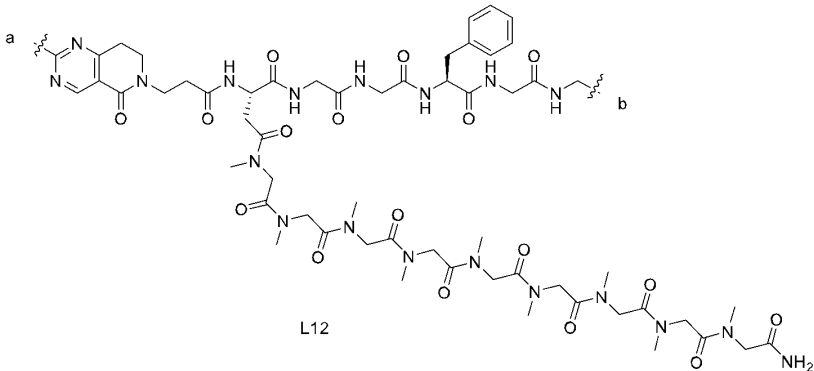
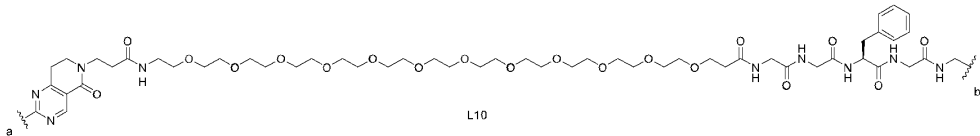
(L)

其中，X¹、X²、X³、X⁴、X⁵、L^a、L^b、L^c、n₁ 和 n₂ 如权利要求 1-8 中任一项权利要求所定义，L 的 a 端与配体单元连接，b 端与药物单元连接。

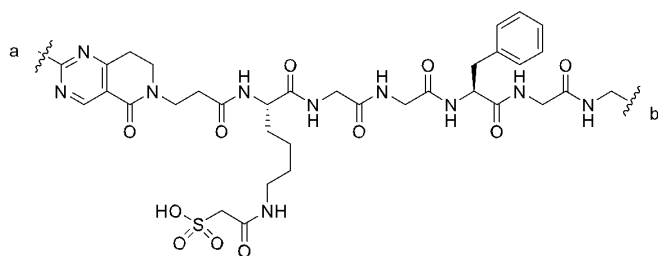
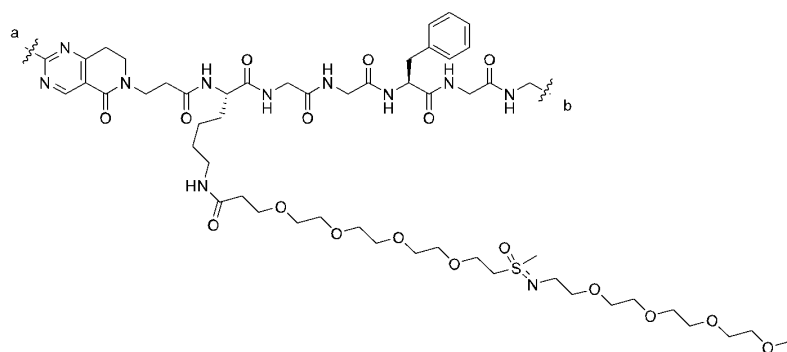
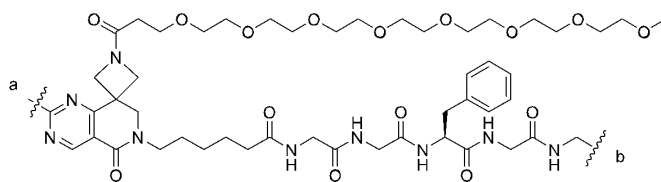
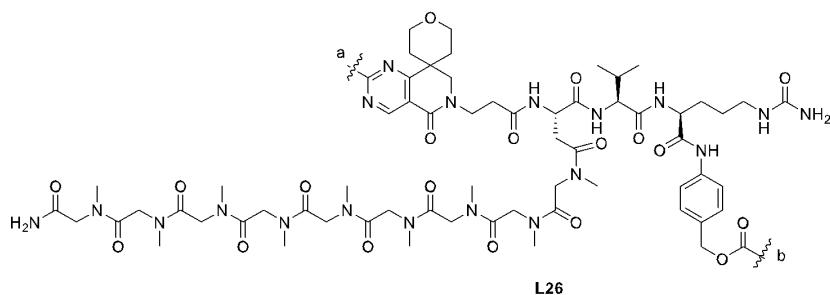
16、根据权利要求 15 所述的连接子单元，所述式 (L) 所示的连接子单元选自以下结构单元：



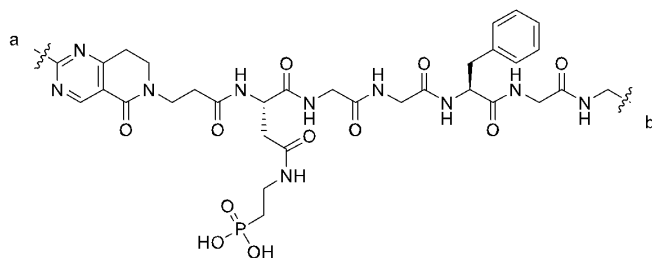




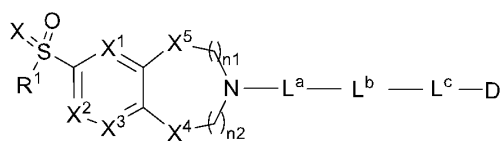




或



17、一种式(II)所示的药物-连接子化合物或其药学上可接受的盐，



(II)

其中, X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 、 X^5 、 L^a 、 L^b 、 L^c 、 n_1 、 n_2 如权利要求 1-8 中任一项权利要求所定义, 以及所述药物单元 D 如权利要求 10-11 中任一项权利要求所定义;

X 选自不存在、O 或 NR^{e1} ;

R^1 选自 $N(R^{e2})(R^{e3})$ 、 C_1 - C_{10} 烷基、 C_3 - C_{10} 环烷基、4-14 元杂环基、 C_6 - C_{10} 芳基或 5-10 元杂芳基; 所述 C_1 - C_{10} 烷基、 C_3 - C_{10} 环烷基、4-14 元杂环基、 C_6 - C_{10} 芳基或 5-10 元杂芳基任选被一个或多个 R^f 取代, 每一个 R^f 独立地选自卤素、CN、 $=O$ 、 C_1 - C_3 烷基、OH、O(C_1 - C_3 烷基)、 NH_2 、NH(C_1 - C_3 烷基)或 N(C_1 - C_3 烷基)₂;

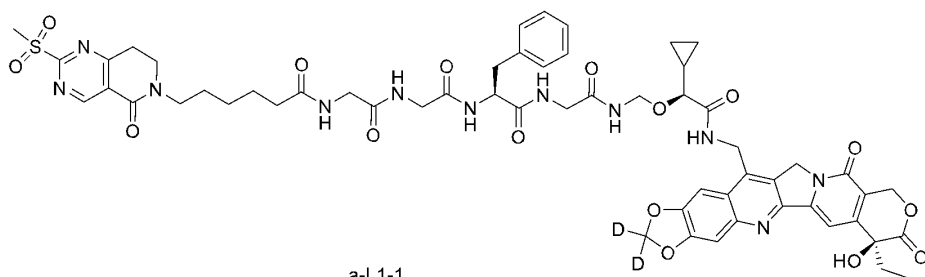
R^{e1} 、 R^{e2} 、 R^{e3} 各自独立地选自 H、 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_6 环烷基或 4-7 元杂环基。

18、根据权利要求 17 所述的药物-连接子化合物或其药学上可接受的盐, 其中

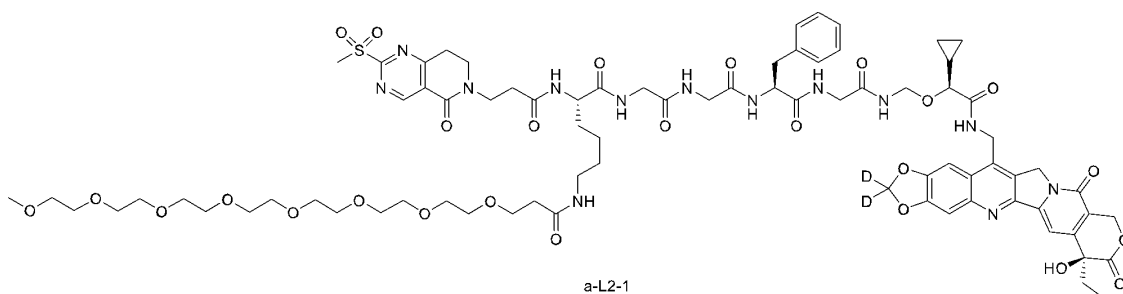
X 选自 O; 和/或

R^1 选自 C_1 - C_6 烷基或 C_3 - C_6 环烷基, 所述 C_1 - C_6 烷基或 C_3 - C_6 环烷基任选被一个或多个 R^f 取代; 或者, R^1 选自甲基、叔丁基或环戊基。

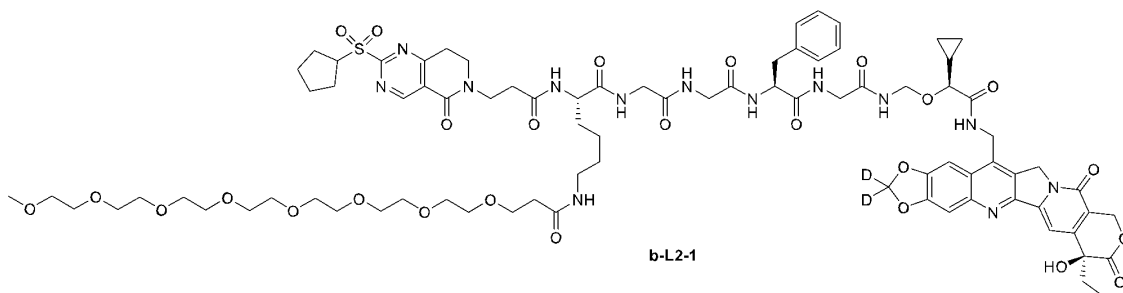
19、根据权利要求 17 所述的药物-连接子化合物或其药学上可接受的盐, 其中所述式 (II) 所示的药物-连接子化合物或其药学上可接受的盐选自以下化合物或其药学上可接受的盐:



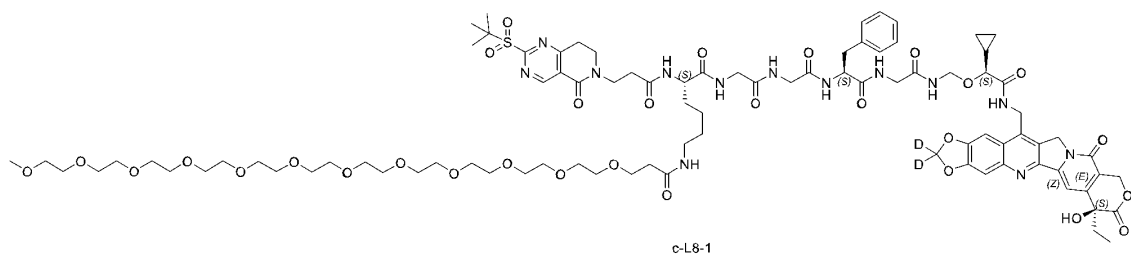
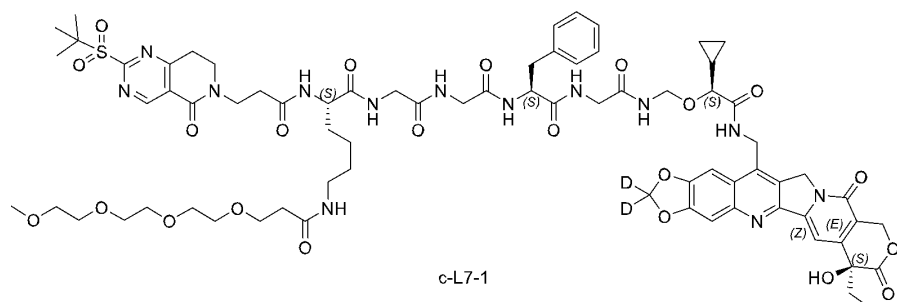
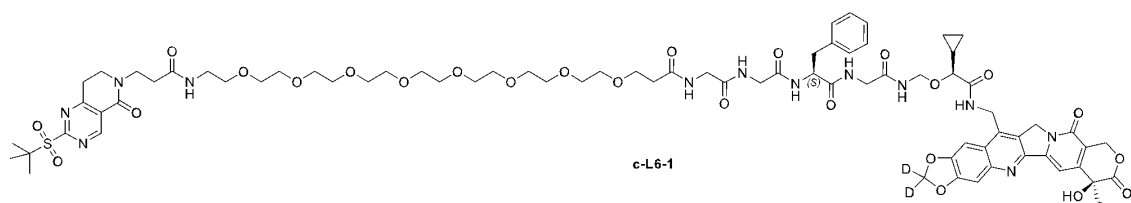
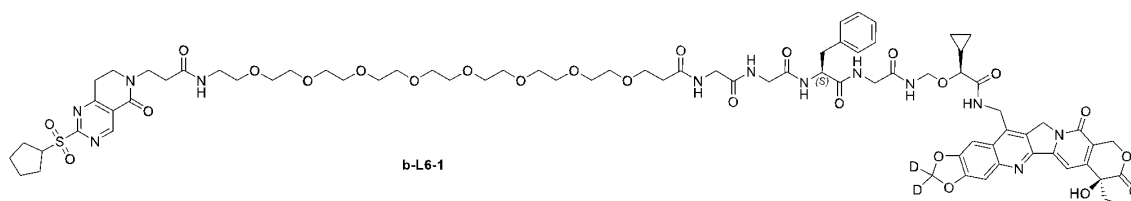
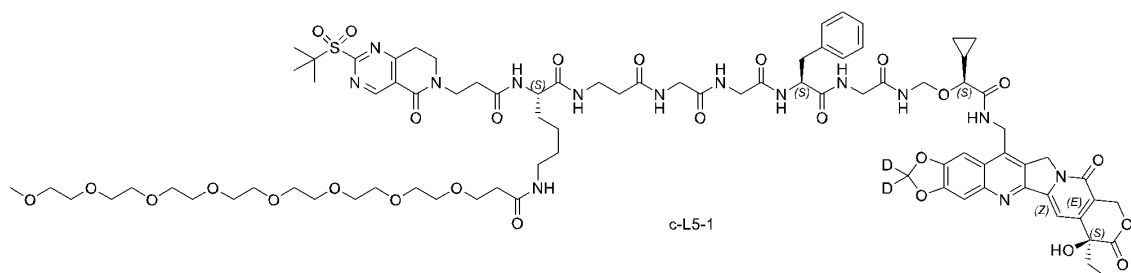
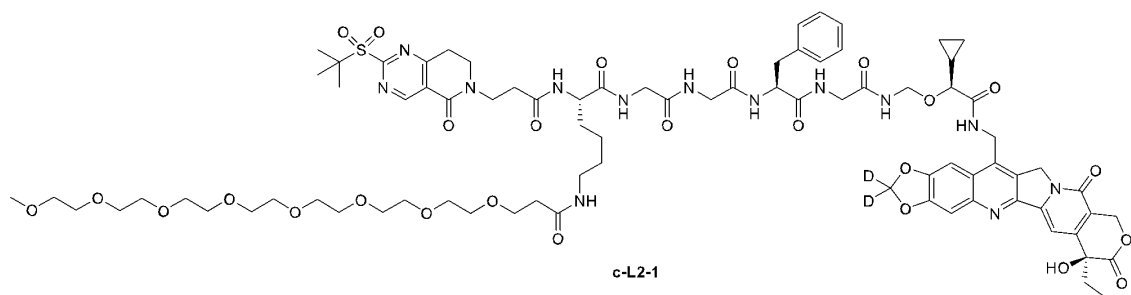
a-L1-1

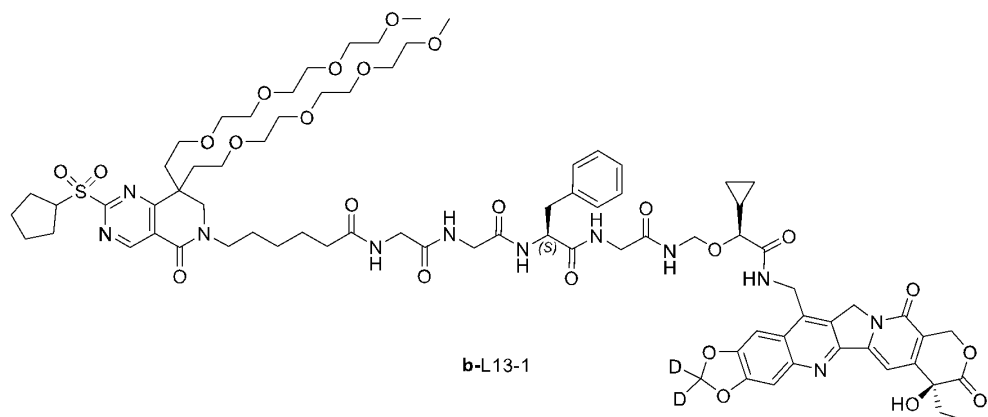
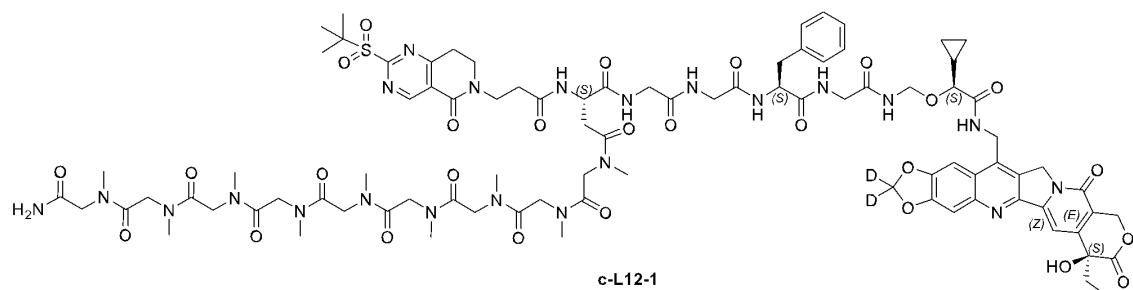
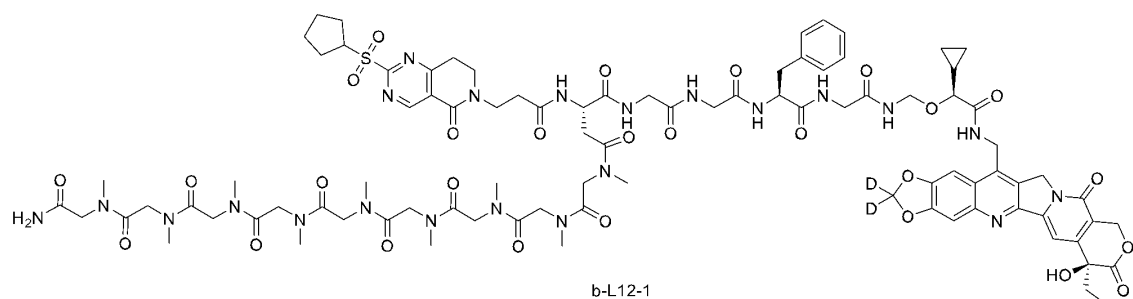
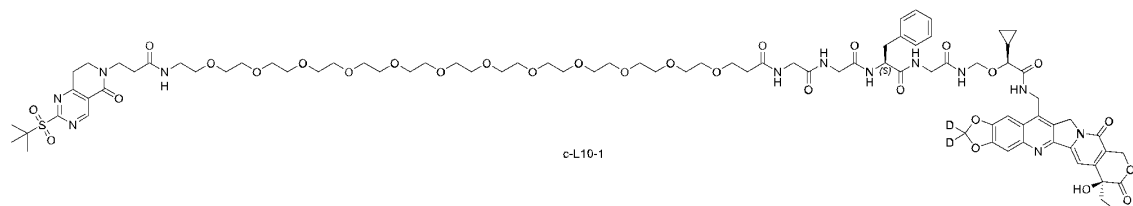
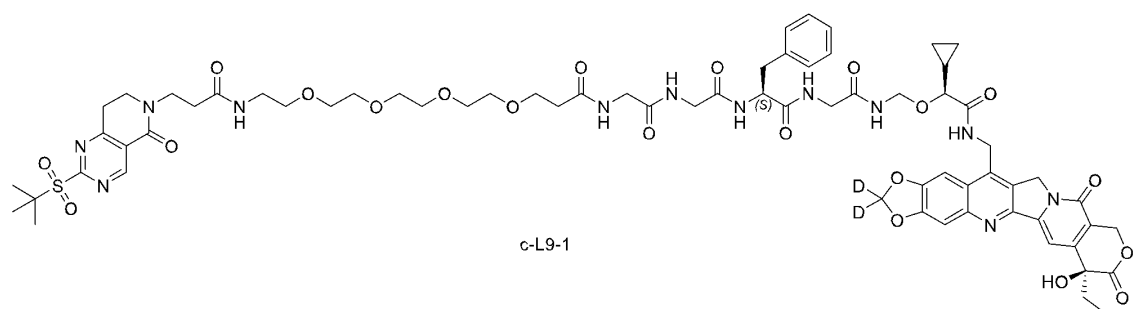


a-L2-1

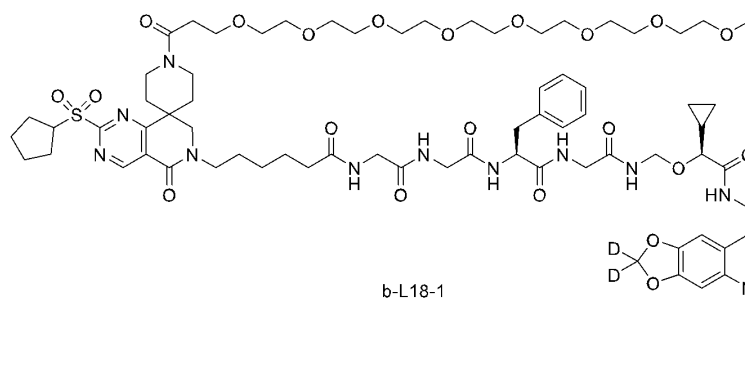
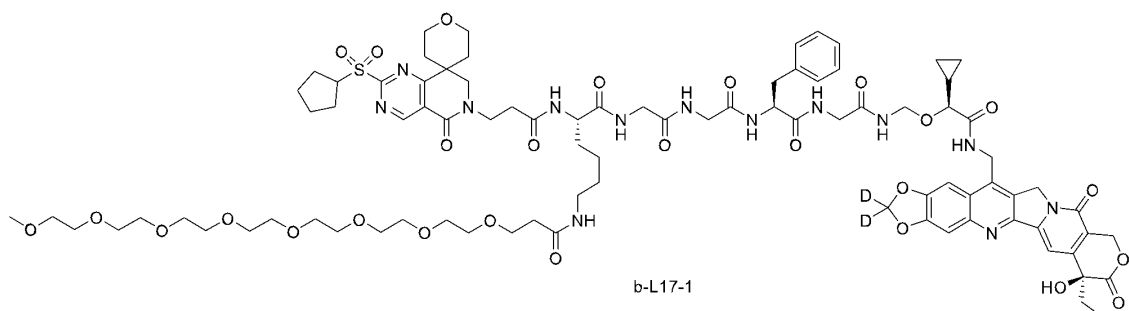
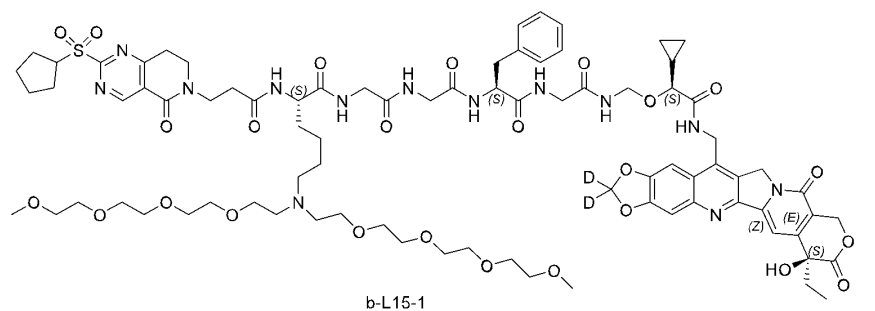
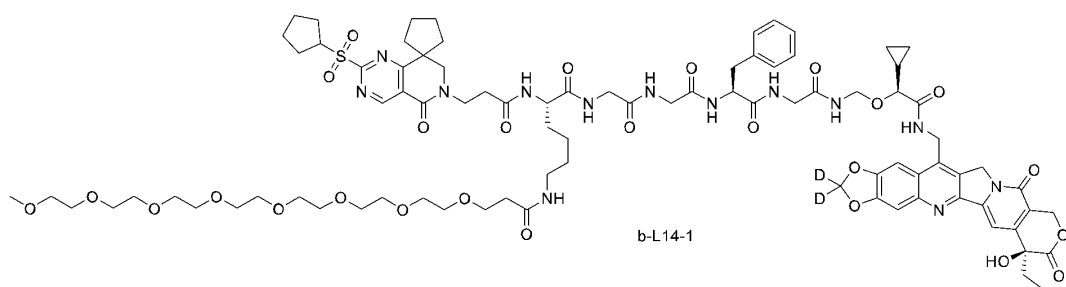


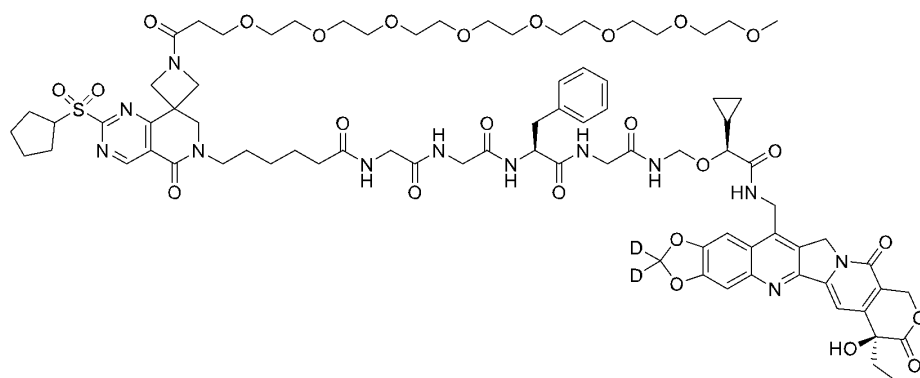
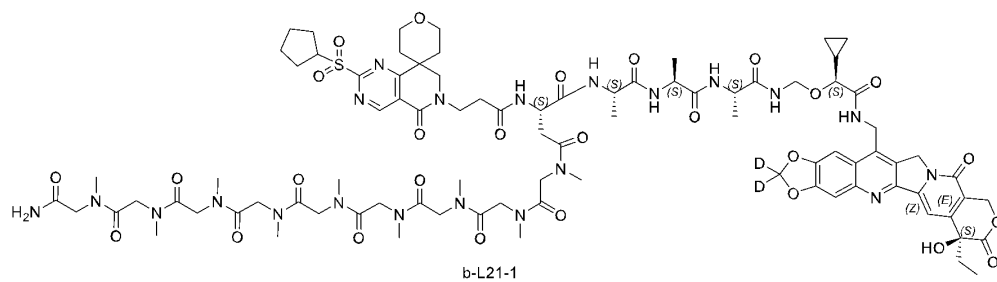
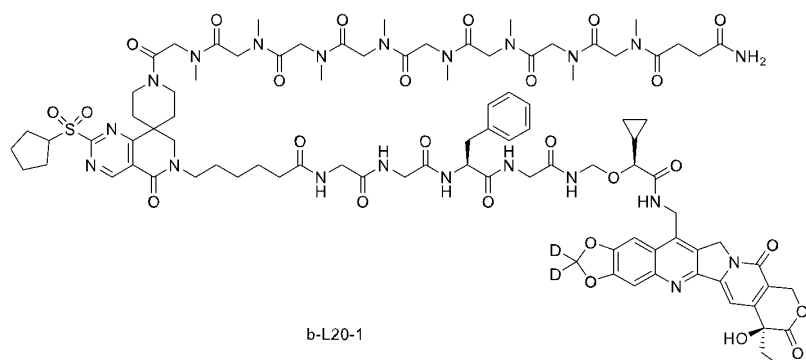
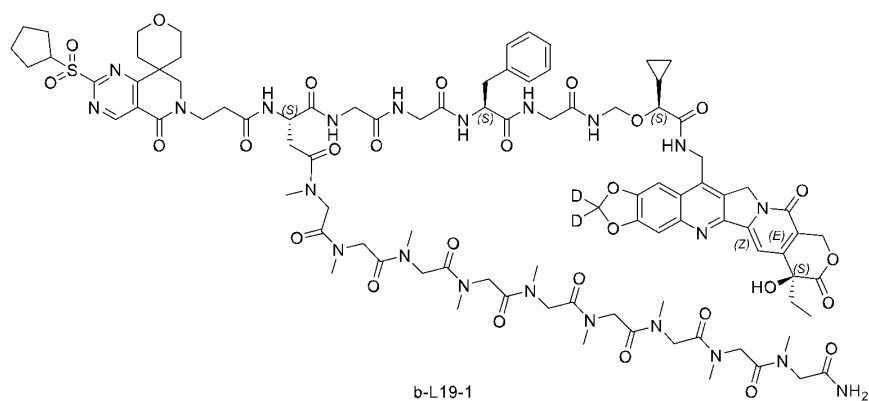
b-L2-1

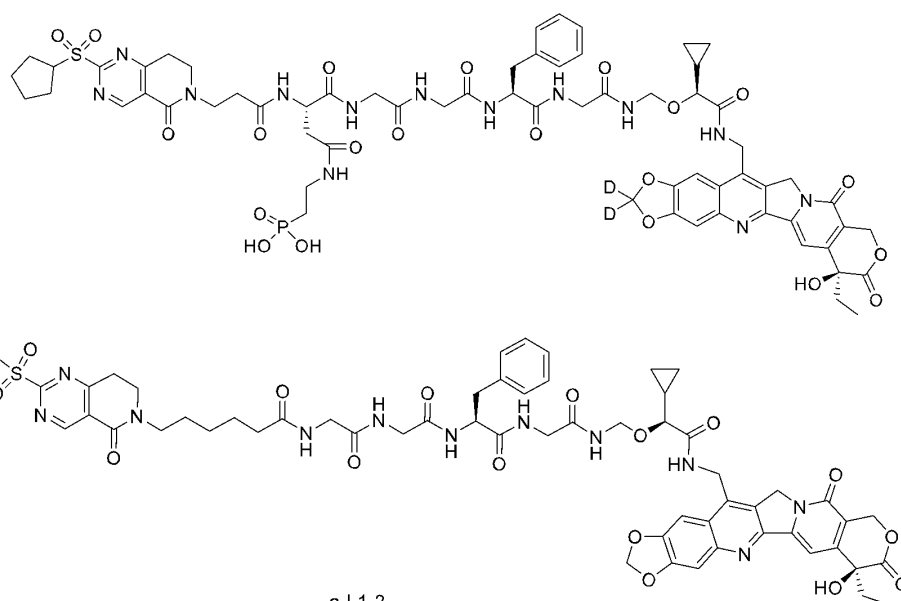
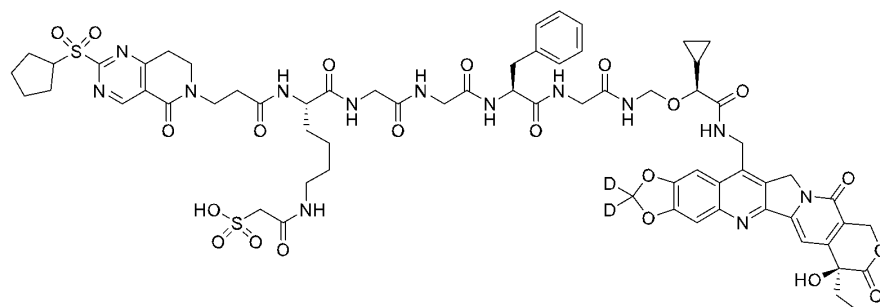
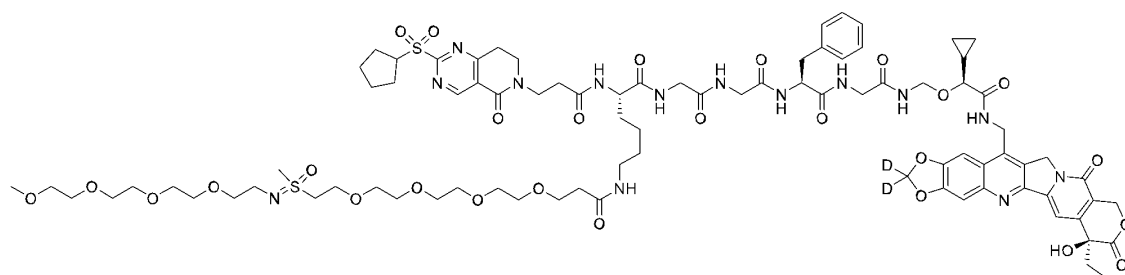




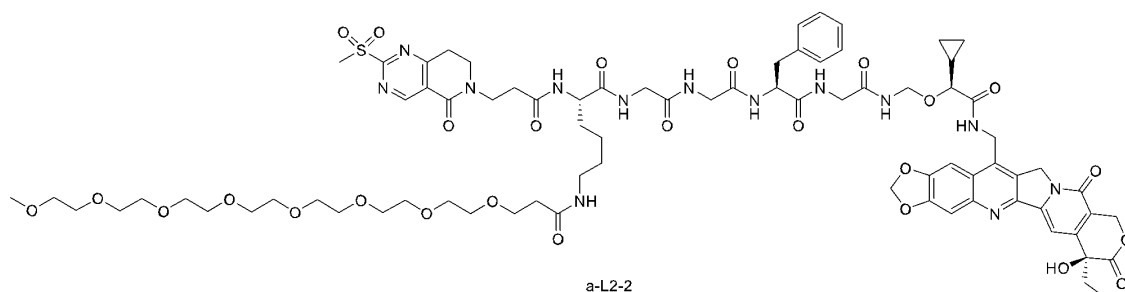
158



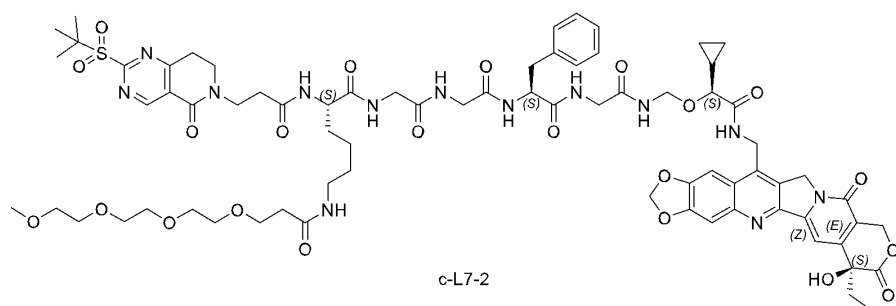
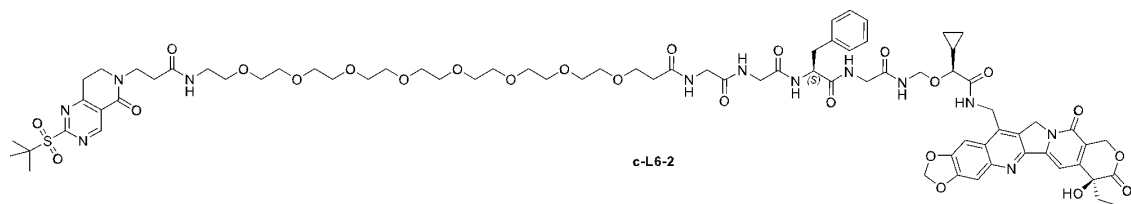
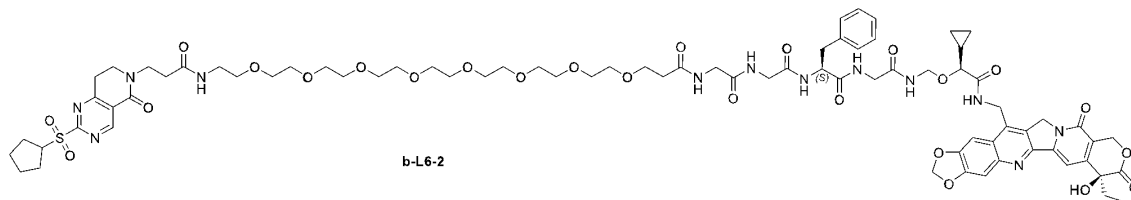
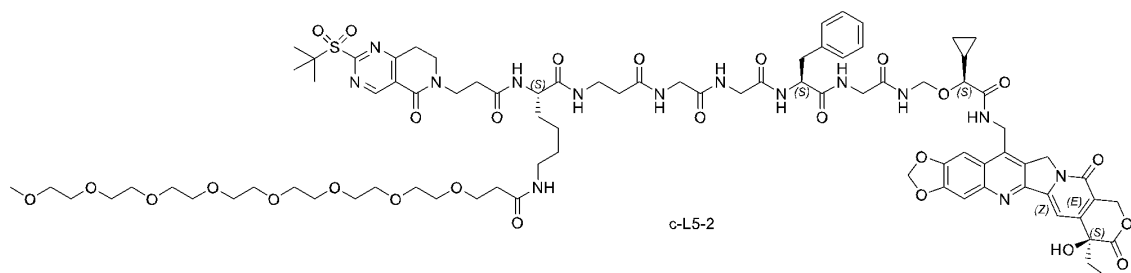
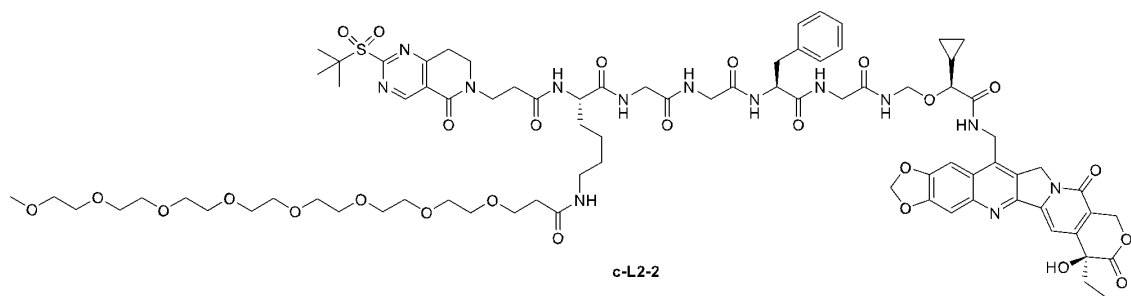
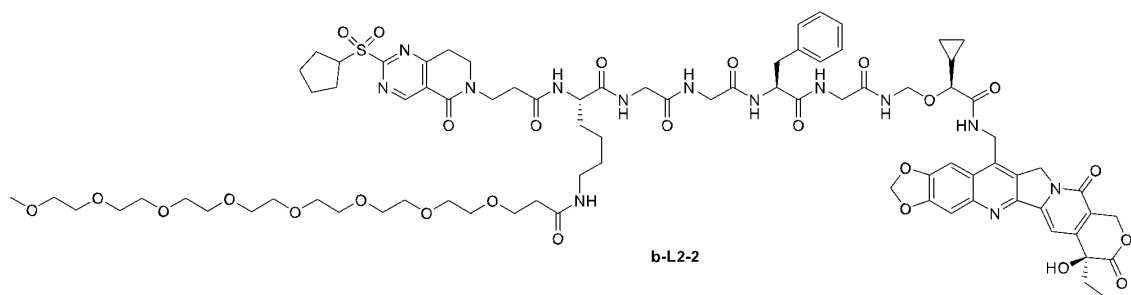


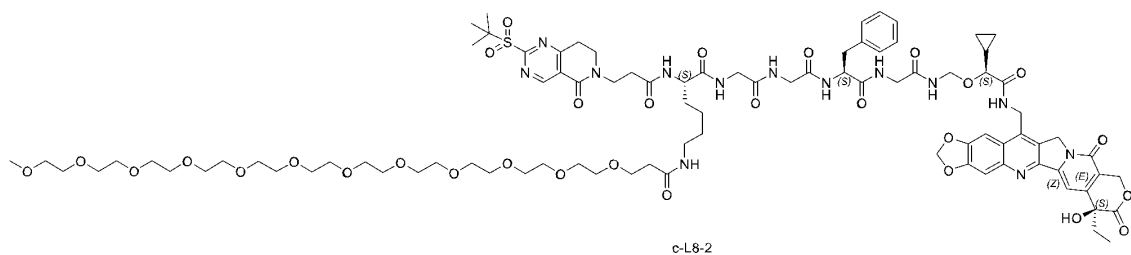


a-L1-2

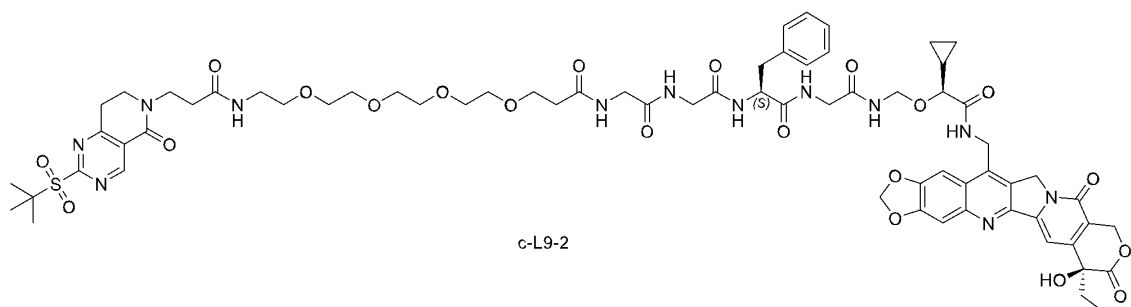


a-L2-2

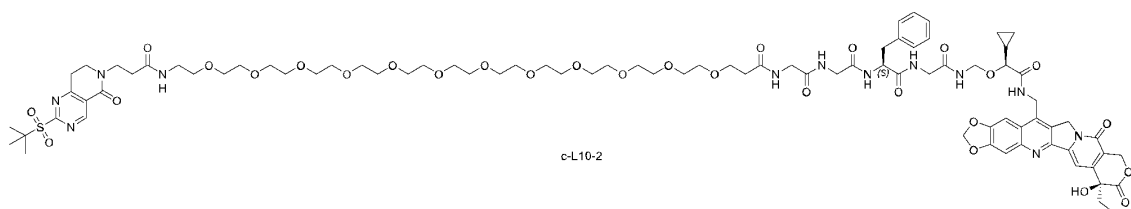




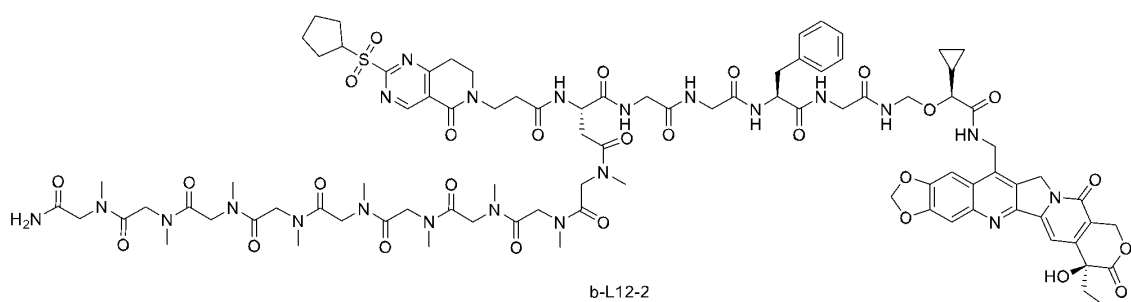
c-L8-2



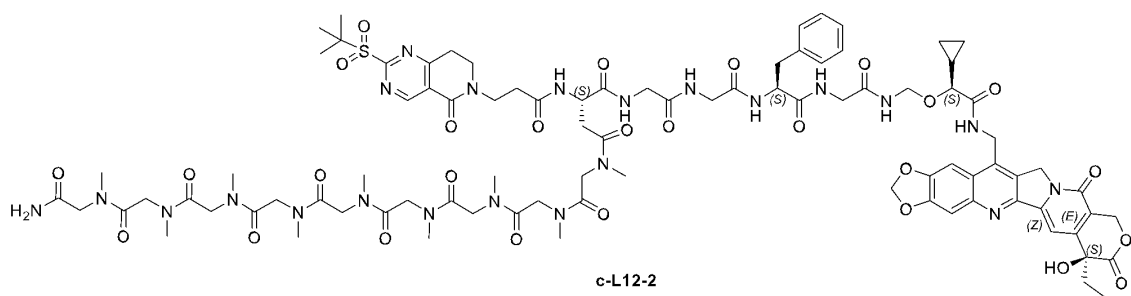
c-L9-2



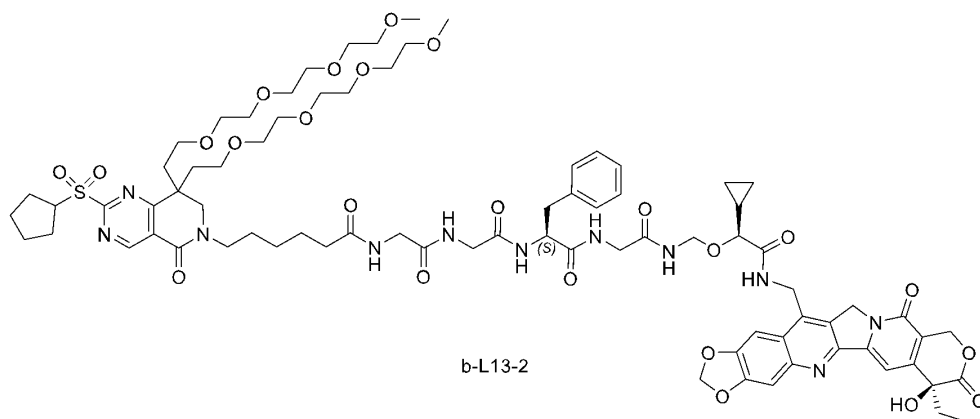
c-L10-2



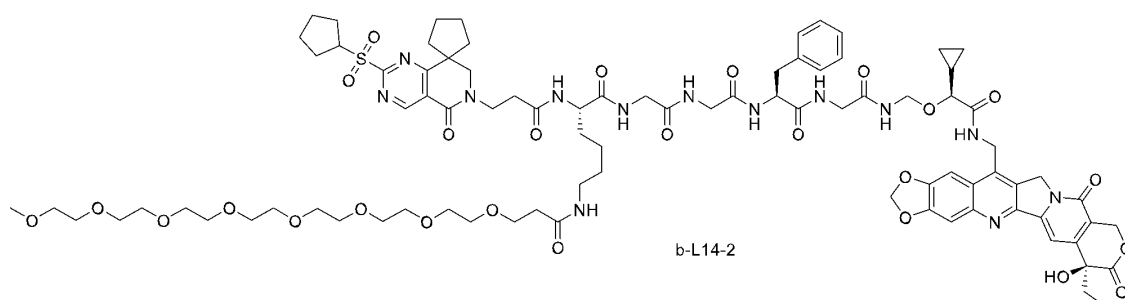
b-L12-2



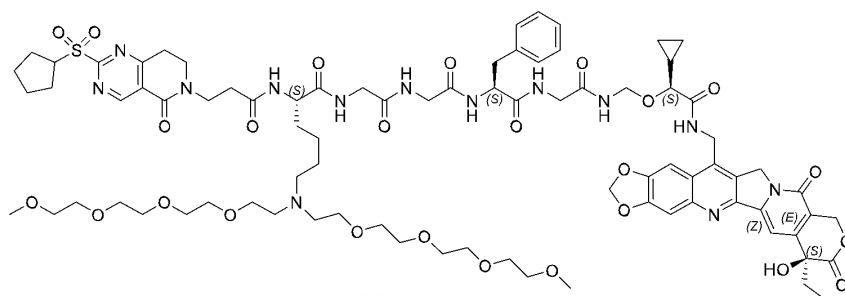
c-L12-2



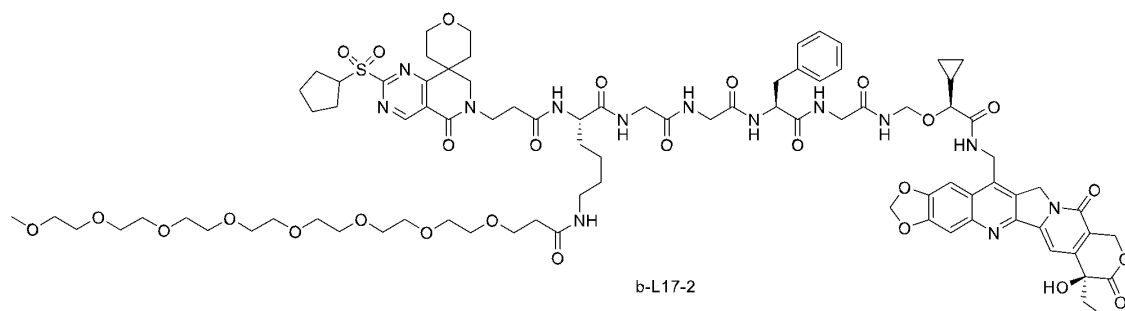
b-L13-2



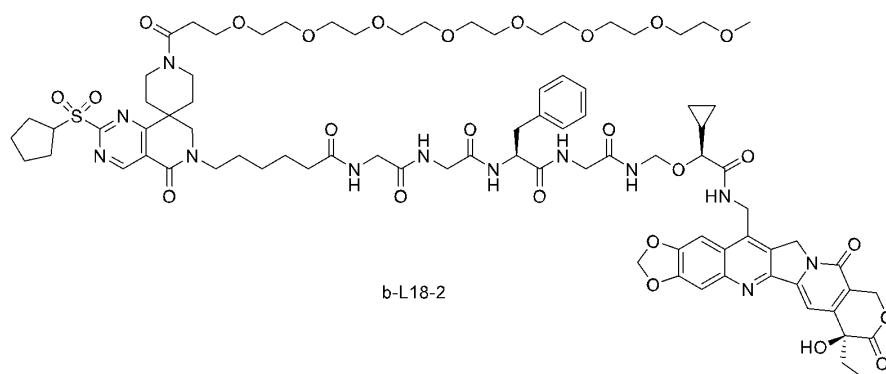
b-L14-2



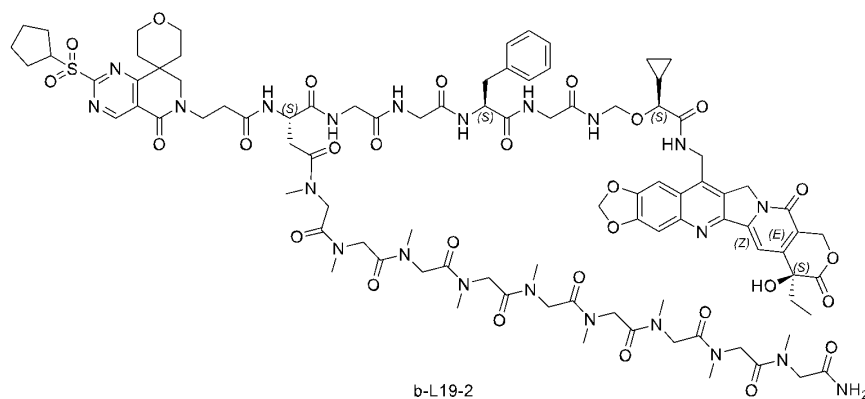
b-L15-2



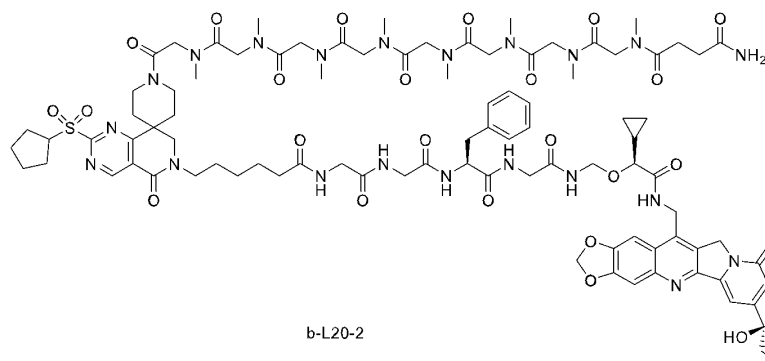
b-L17-2



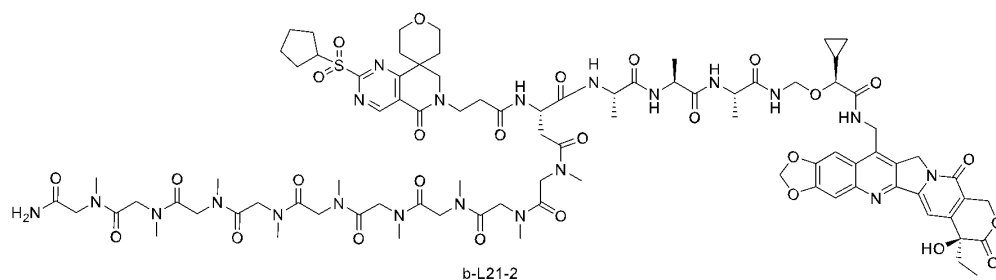
b-L18-2



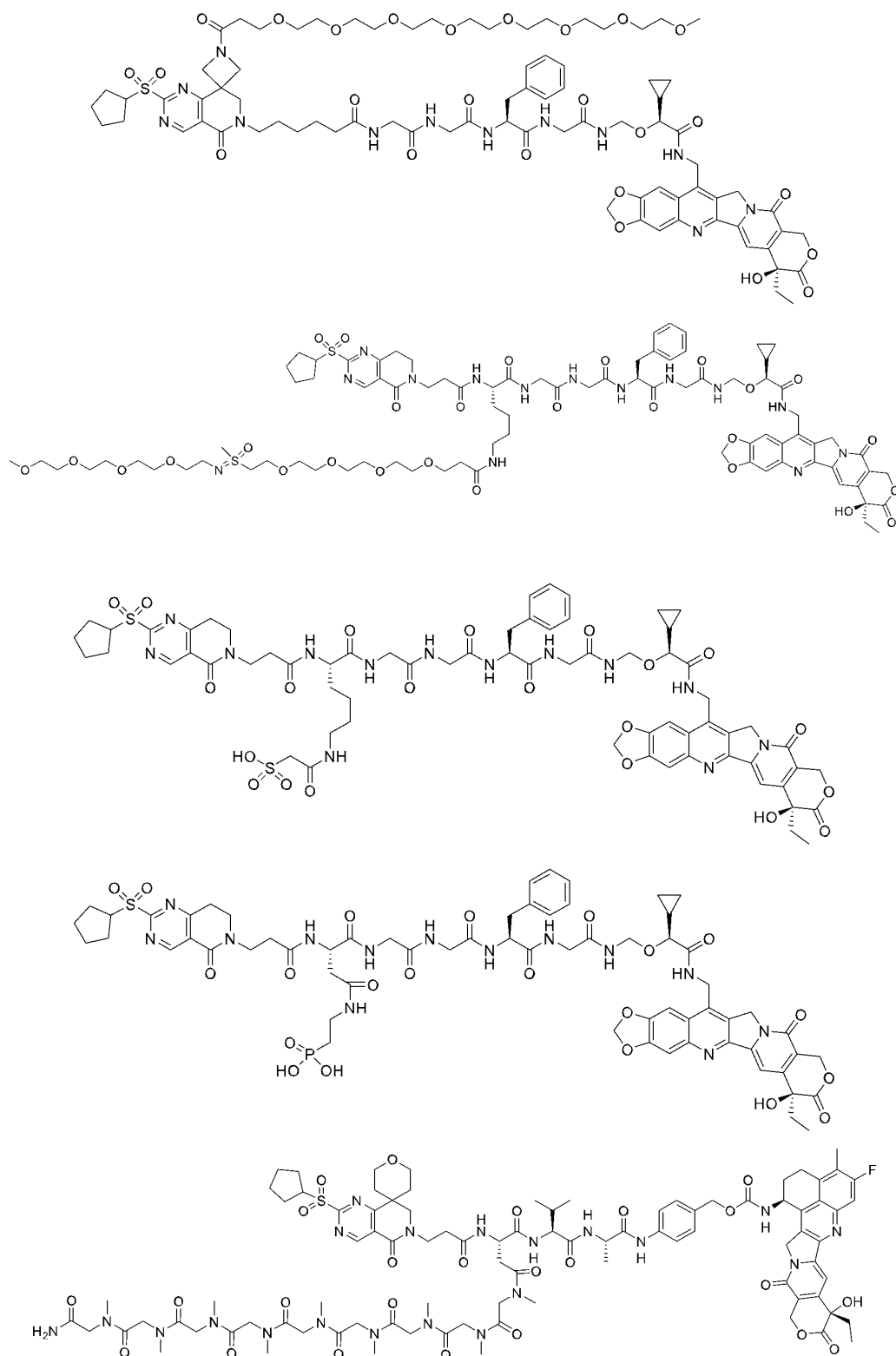
b-L19-2



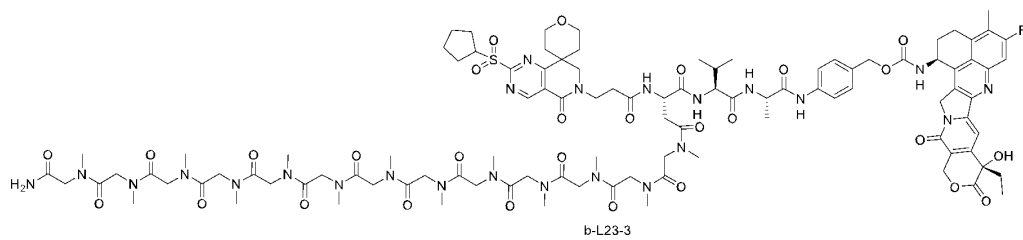
b-L20-2



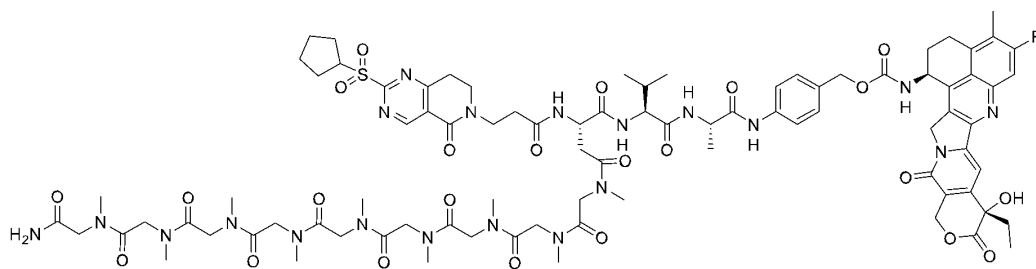
b-L21-2



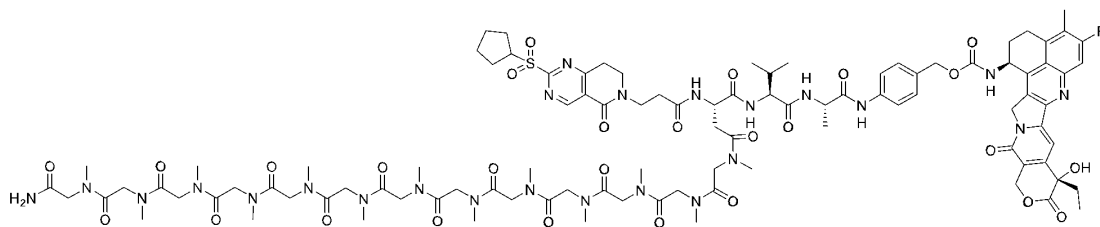
166



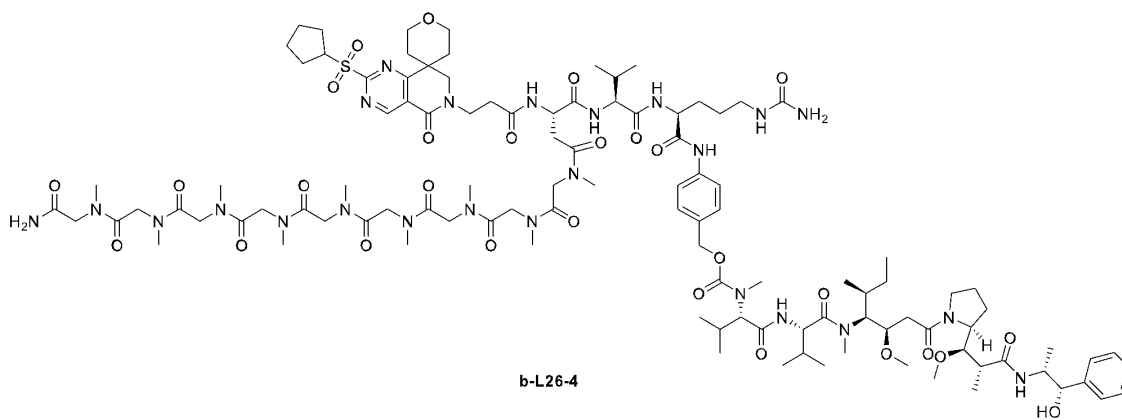
b-L23-3



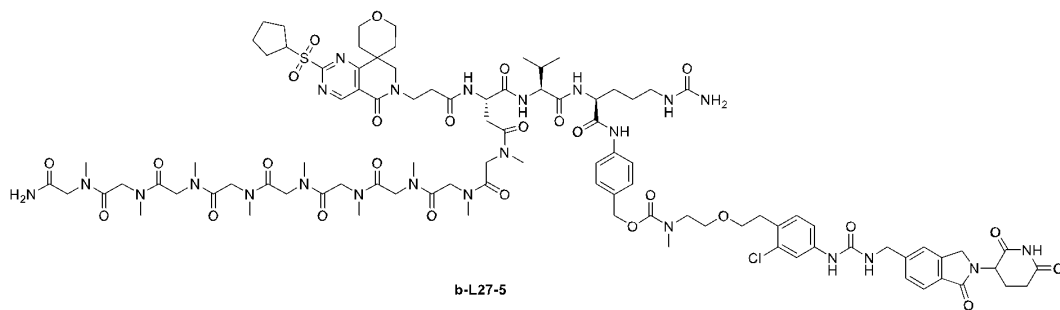
b-L24-3



b-L25-3



b-L26-4



b-L27-5

20、一种药物组合物，其包含如权利要求 1-14 中任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的辅料。

21、一种治疗哺乳动物肿瘤的方法，包括对需要该治疗的哺乳动物，优选人类，给予治疗有效量的如权利要求 1-14 任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，或给予治疗有效量的如权利要求 20 所述的药物组合物。

22、权利要求 1-14 任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或如权利要求 20 所述的药物组合物在制备治疗肿瘤的药物中的用途。

23、用于治疗肿瘤的如权利要求 1-14 任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或如权利要求 20 所述的药物组合物。