

具有新颖结构的多肽药物偶联物及其应用

本发明主张如下的优先权：

CN2021109452856，申请日：2021 年 8 月 17 日；

CN2021109767108，申请日：2021 年 8 月 24 日；

CN2021112144653，申请日：2021 年 10 月 19 日；

CN2021112236320，申请日：2021 年 10 月 20 日；

CN2021114658736，申请日：2021 年 12 月 3 日；

CN2022100034604，申请日：2022 年 1 月 4 日。

技术领域

本发明涉及一种具有新颖结构的多肽药物偶联物及其应用。具体涉及式（V）所示化合物或其药学上可接受的盐。

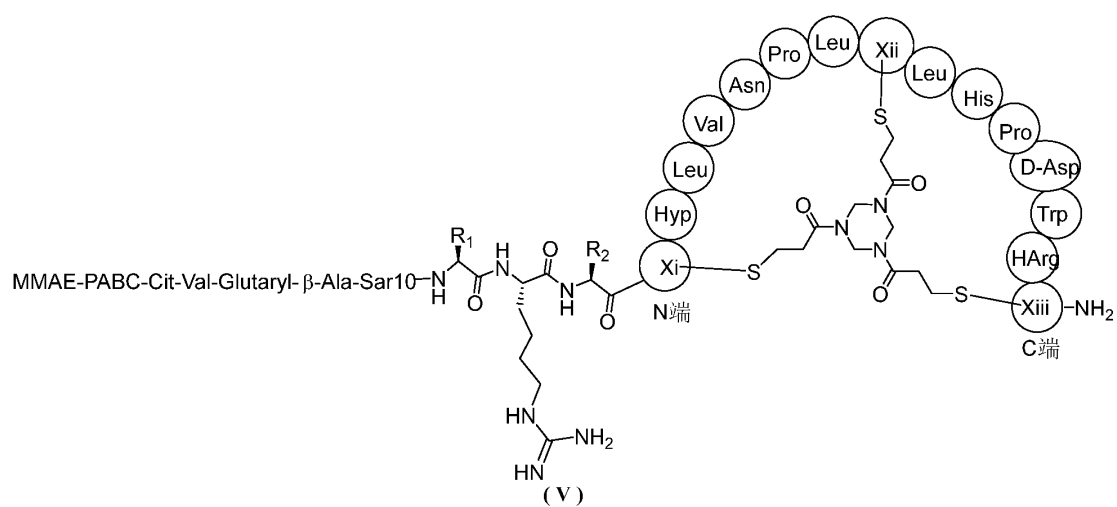
背景技术

2020 年全球癌症新发病例约有 1930 万例，死亡病例近 1000 万例。尽管对于大多数早期癌症患者目前已有标准化的治疗手段，但是随着疾病的进展以及对传统治疗方式的耐药或不敏感等原因，使得部分癌症患者尤其是晚期癌症患者的治疗手段有限且治疗效果并不理想。因此研究具有新靶点、新机制和新结构的肿瘤治疗药物始终是肿瘤治疗领域亟待解决的问题。

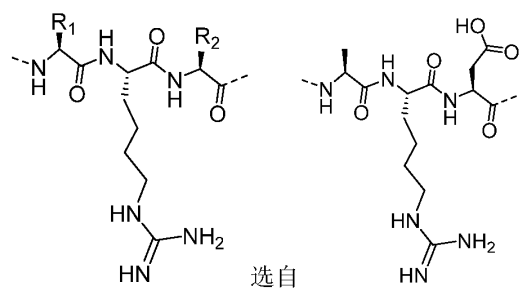
EphA2 是近年来备受关注的新兴肿瘤相关靶点，据报道控制癌变和肿瘤进展的调节过程。与大多数 Eph 激酶不同，EphA2 在成人中的分布主要局限于快速增殖的上皮细胞。研究表明，EphA2 在多种癌症中过度表达，如前列腺、肺、食道、结直肠、宫颈、卵巢、和皮肤癌。EphA2 在肿瘤中的高表达与癌症患者预后差，转移风险高，生存期缩短等临床表现直接相关。EphA2 与其配体 Ephrin A1 组成的信号通路诱导抑制 ERK，AKT 等多种下游激酶，对恶性细胞的迁移，活力和增殖起到调节作用。因此 EphA2 既可以作为肿瘤组织药物递送靶点，又可作为肿瘤治疗靶点发挥作用。

发明内容

本发明提供了式(V)所示化合物或其药学上可接受的盐，

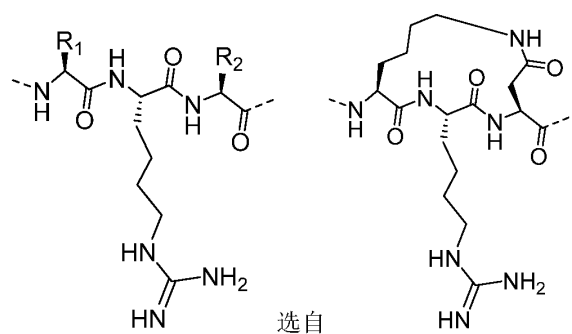


其中,



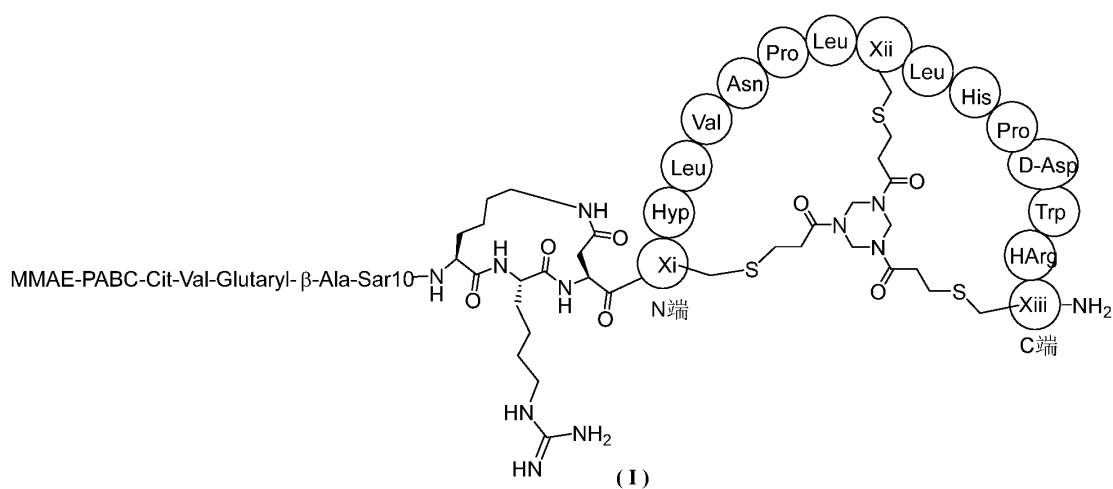
Xi、Xii 和 Xiii 分别独立地选自 Cys、hCys、 β Cys、Pen、Dap 和 N-methyl-Dap, 且 Xi、Xii 和 Xiii 不同时为 Cys;

或者,



且 Xi、Xii 和 Xiii 分别独立地选自 Cys、hCys、 β Cys、Pen、Dap 和 N-methyl-Dap。

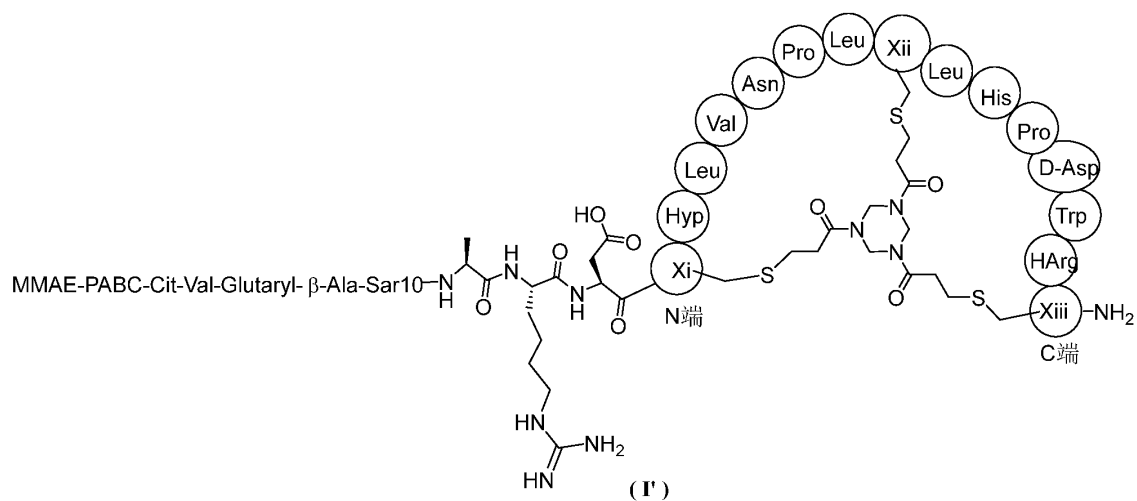
本发明提供了式(I)所示化合物或其药学上可接受的盐,



其中,

Xi、Xii 和 Xiii 分别独立地选自 Cys、hCys、βCys、Pen、Dap 和 N-methyl-Dap。

本发明还提供了式(I')所示化合物或其药学上可接受的盐,



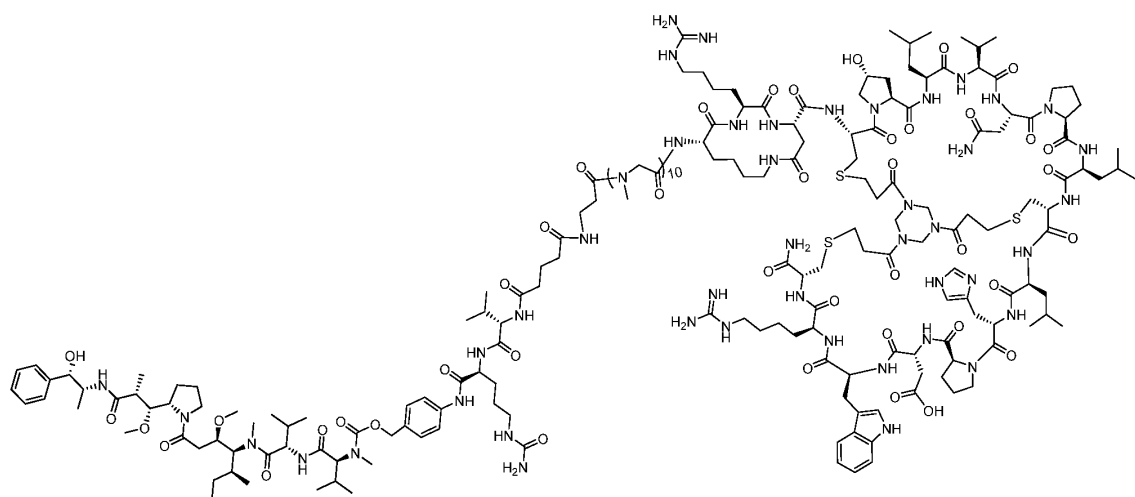
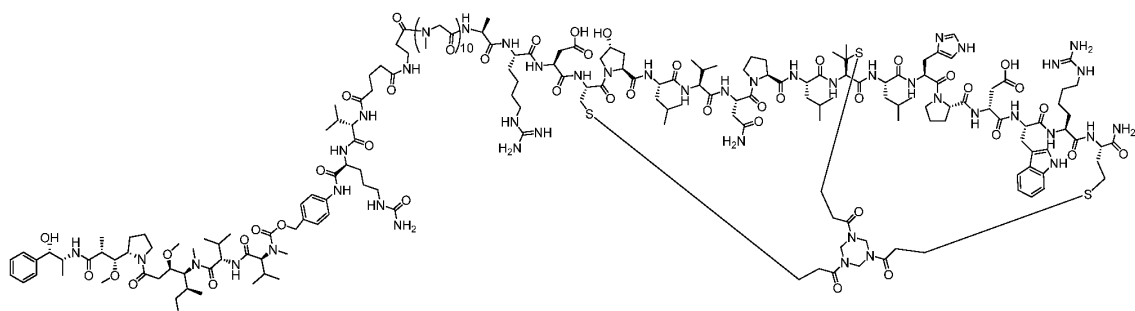
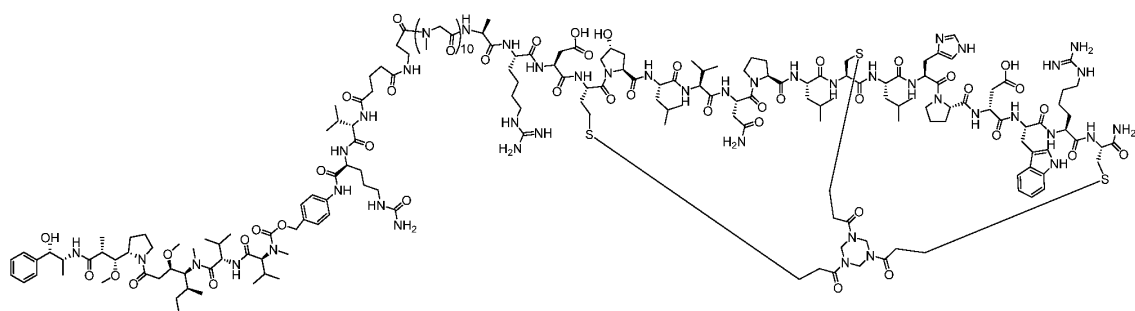
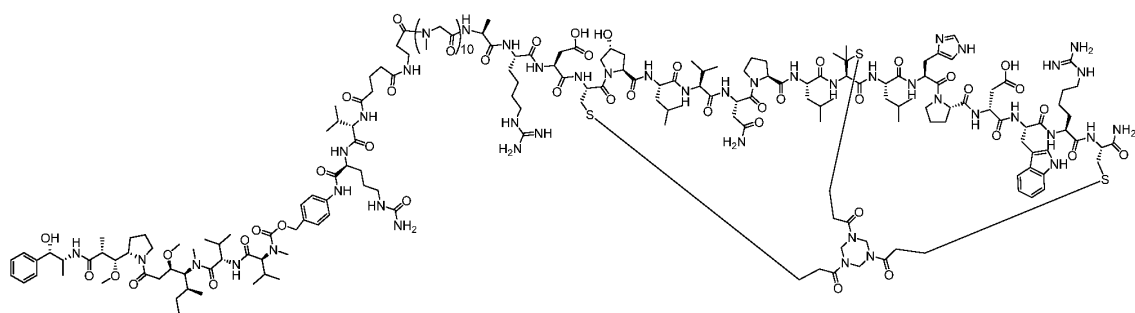
其中,

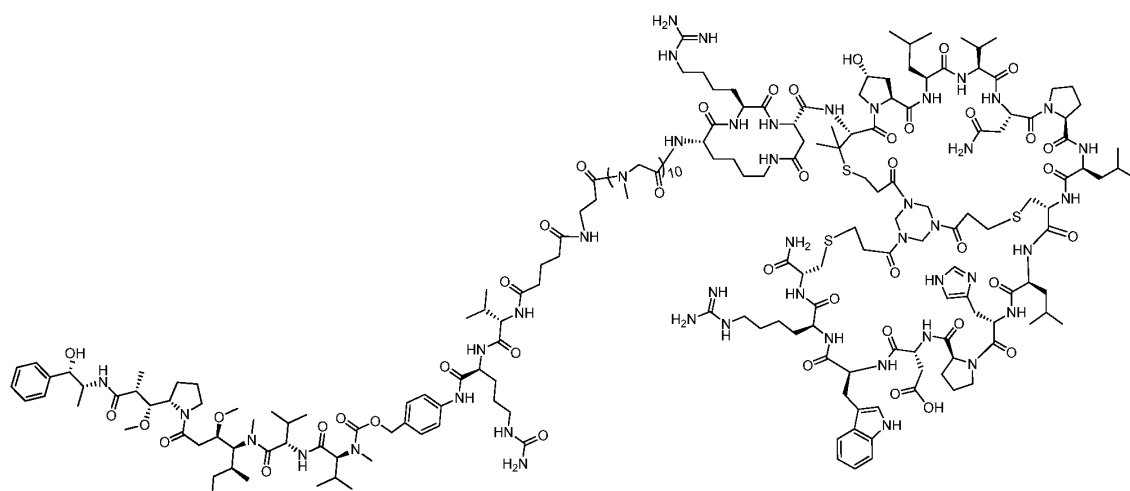
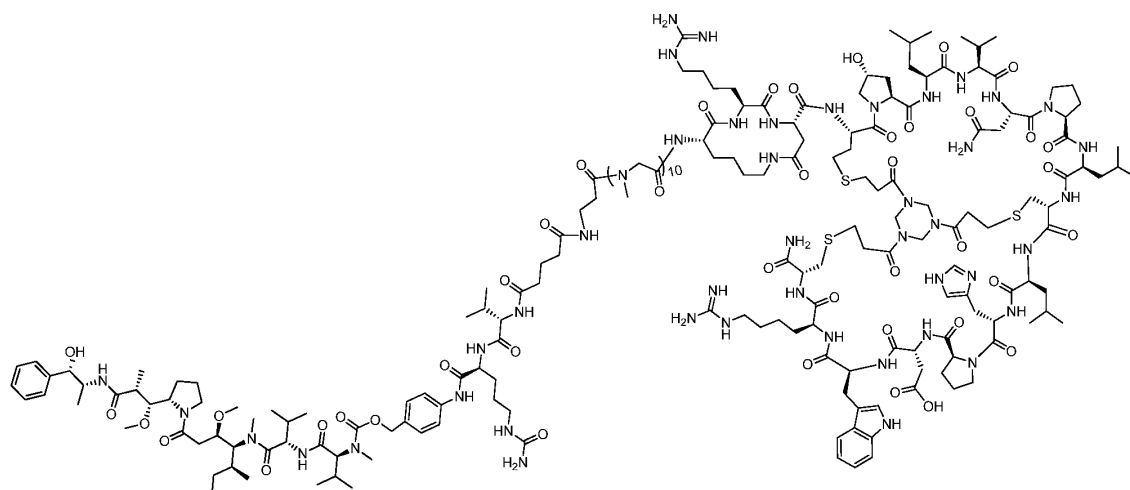
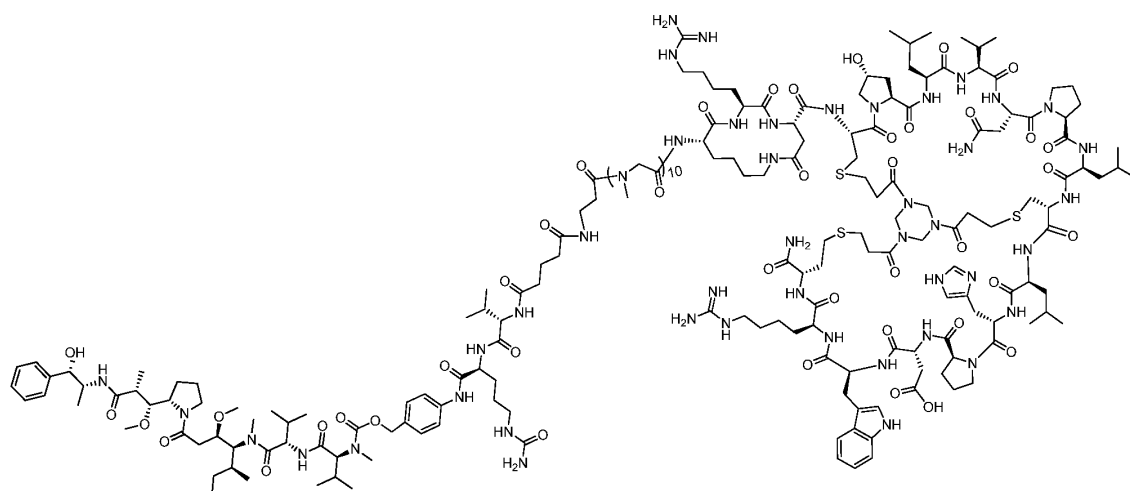
Xi、Xii 和 Xiii 分别独立地选自 Cys、hCys、βCys、Pen、Dap 和 N-methyl-Dap,

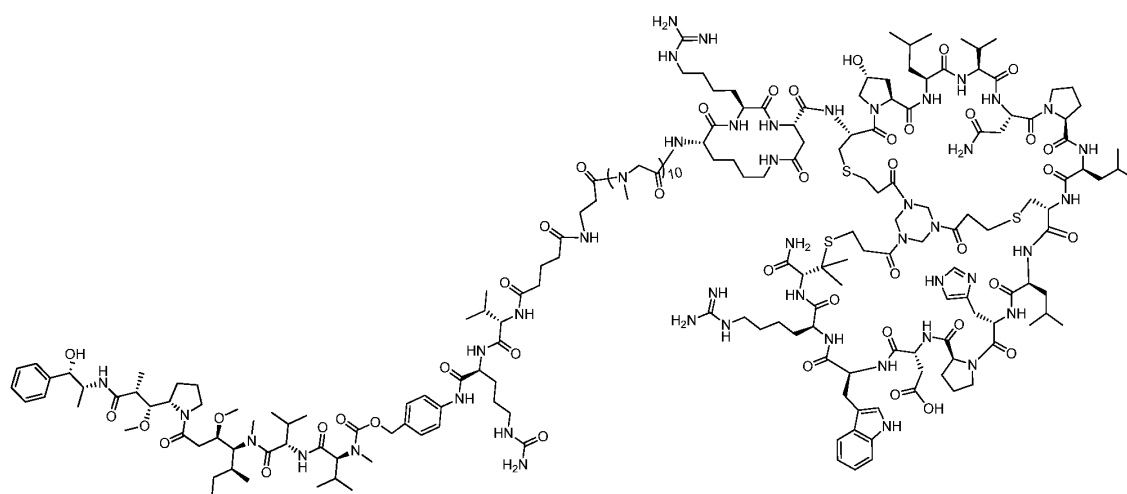
条件是 Xi、Xii 和 Xiii 不同时为 Cys。

本发明还有一些变量由上述各变量任意组合而来。

本发明还提供了下式所示化合物或其药学上可接受的盐,



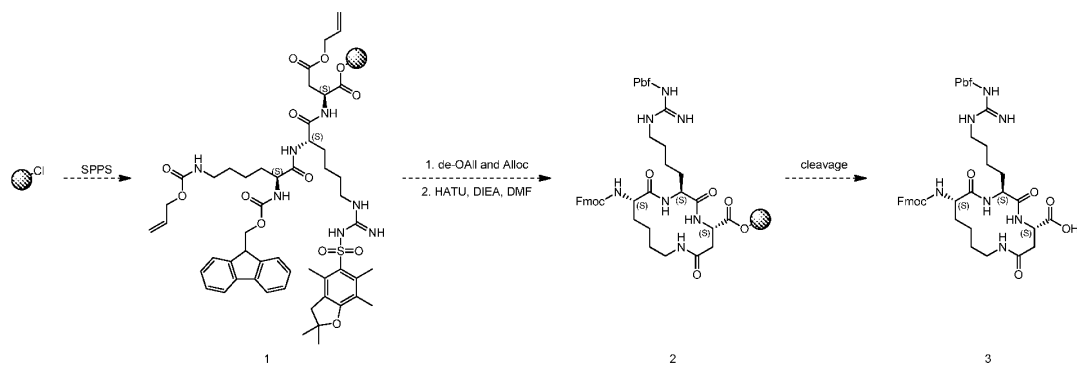


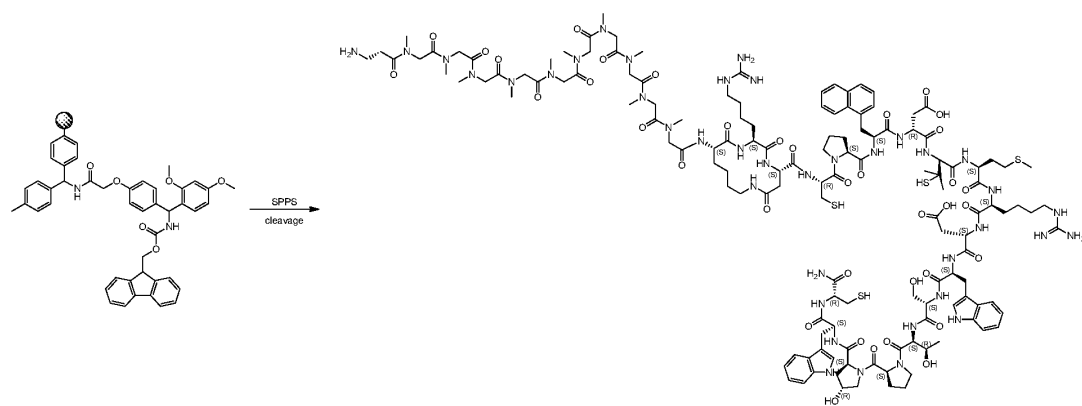


本发明还提供了上述化合物或其药学上可接受的盐在制备治疗 EphA2 过表达的实体瘤的药物上的应用。

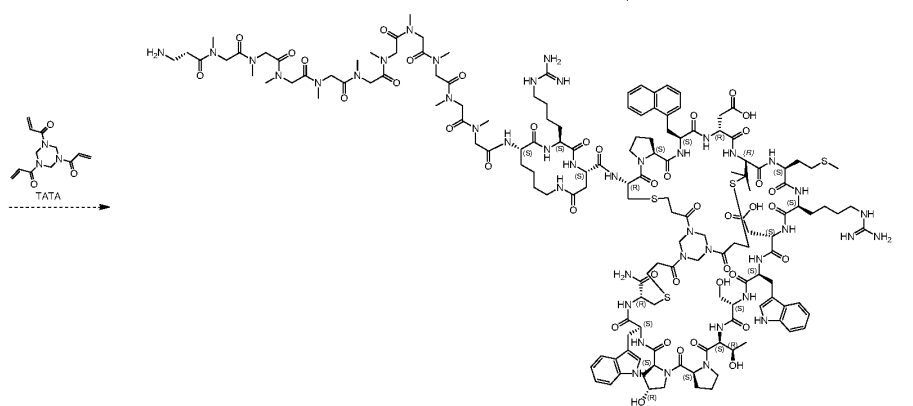
本发明还提供了一种在需要的受试者中治疗 EphA2 过表达的实体瘤的方法，包括向受试者提供治疗有效量的上述化合物或其药学上可接受的盐。

本发明参考如下的制备方法：

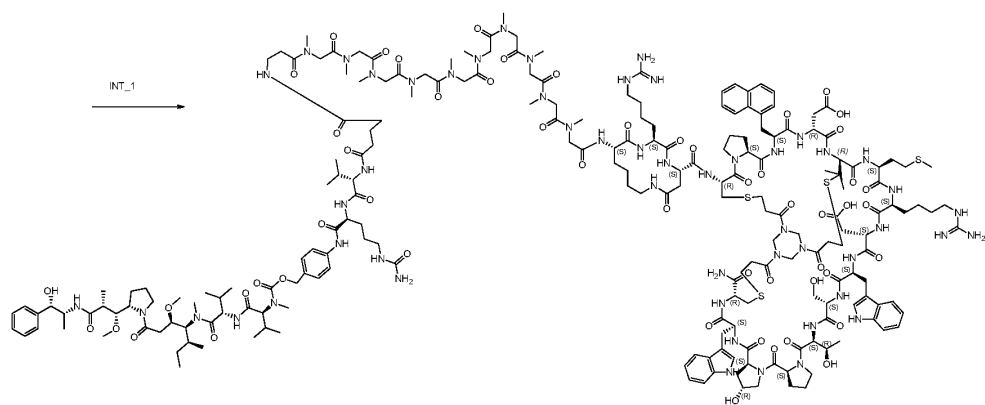


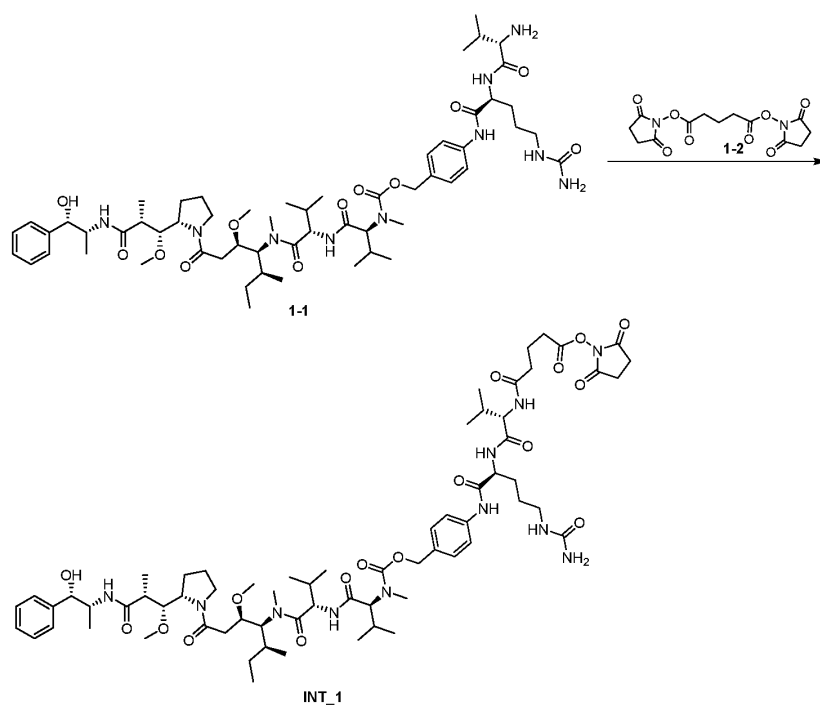


4



5





本发明还提供了如下的测试方法：

测试方法 1 本发明化合物与 EphA2 蛋白的结合能力测试

1. 实验目的

用SPR法检测待测物与靶蛋白EphA2的亲和力。

2. 材料和仪器

- Biacore 8K(GE Healthcare)
- 96-well Plate(Cat# 650101, greiner bio-one)
- CM5芯片(Cat # BR-1005-30, GE Healthcare)
- Amine Coupling Kit(Cat # BR-1000-50, GE Healthcare)

EDC

NHS

1 M 乙醇胺

- 10 mM 醋酸钠 pH4.5(Cat # BR-1003-50, GE Healthcare)
- DMSO(Cat # D4540, Sigma)
- P20(Cat # BR-1000-54, GE Healthcare)
- PBS(Cat # BR-1006-72, GE Healthcare)

- EphA2(Cat# 13926-H08HD, Sino Biological)

3. 实验方案

本实验采用氨基偶联法,即利用 Biacore 8K 将靶蛋白 EphA2 直接固定在 CM5 芯片上,然后将待测物作为分析物,用缓冲液(10mM PBS, pH7.4, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 5% DMSO, 0.05% P20)将待测物稀释到所需的浓度梯度,进行多循环动力学检测,每个循环进样 180 秒,解离 180 秒,然后再进行下一循环,获得靶蛋白 EphA2 与待测物的亲和力动力学分析数据。最终的数据用 Biacore Insight Evaluation Software (V 2.0.15.12933)按 1:1 模型进行 Kinetics 拟合分析。

4. 实验方法及流程

- 1) 配制缓冲液: 10mM PBS, pH7.4, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 5% DMSO, 0.05% P20。
- 2) CM5 芯片活化: 用 400 mM EDC 和 100 mM NHS 以 10 μ L/min 的流速活化 420 秒。
- 3) 靶蛋白偶联: 用 10 mM 醋酸钠(pH4.5)将靶蛋白稀释到 10 μ g/mL,以 10 μ L/min 的流速偶联 284 s。实验使用了芯片上的 1#, 2#和 3# 通道,偶联结果分别为 1639.9RU, 1747.8RU 和 1702.2RU。
- 4) CM5 芯片封闭: 用 1 M 乙醇胺以 10 μ L/min 的流速封闭 420 秒。
- 5) 分析物浓度: 使用缓冲液稀释待测物。待测物从 100nM 开始 2 倍梯度稀释至 0.78 nM。
- 6) 进样分析: 待测物工作液每个浓度为一个循环,以 30 μ L/min 的流速结合 180 秒,解离 180 秒。最后一个循环为 5% DMSO 溶剂校正循环。
- 7) 所有结果按 1:1 模型进行 kinetics 拟合分析。

技术效果

本发明化合物与 EphA2 具有很强的结合作用,在肿瘤细胞系 NCI-H1975 和 SK-OV-3 中对体外培养的细胞有明显增殖抑制作用。在人卵巢癌 SK-OV-3 细胞皮下异种移植肿瘤模型和人前列腺癌 PC-3 皮下异种移植肿瘤模型上表现出明显的抑制肿瘤生长作用,并且均呈现出明显剂量相关性。本发明化合物展现出良好的药代动力学性质,血浆中清除快,蓄积少,MMAE 释放量少,体外肝微粒体、血浆和全血稳定性佳,具有良好的成药性。

附图说明:

图 1: 本发明化合物在人前列腺癌细胞皮下异种移植肿瘤模型上的肿瘤增长曲线;

图 2: 本发明化合物在人前列腺癌细胞皮下异种移植肿瘤模型上的动物体重变化曲线;

图 3: 本发明化合物对人卵巢癌 SK-OV-3 细胞皮下异种移植肿瘤 BALB/c 裸小鼠模型上肿瘤增长曲线;

图 4: 本发明化合物对人卵巢癌 SK-OV-3 细胞皮下异种移植肿瘤 BALB/c 裸小鼠模型上动物体重变化率。

定义和说明

除非另有说明，本文所用的下列术语和短语旨在具有下列含义。一个特定的术语或短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。

这里所采用的术语“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”是指本发明化合物的盐，由本发明发现的具有特定取代基的化合物与相对无毒的酸或碱制备。当本发明的化合物中含有相对酸性的功能团时，可以通过在纯的溶液或合适的惰性溶剂中用足够量的碱与这类化合物接触的方式获得碱加成盐。药学上可接受的碱加成盐包括钠、钾、钙、铵、有机胺或镁盐或类似的盐。当本发明的化合物中含有相对碱性的官能团时，可以通过在纯的溶液或合适的惰性溶剂中用足够量的酸与这类化合物接触的方式获得酸加成盐。本发明的某些特定的化合物含有碱性和酸性的官能团，从而可以被转换成任一碱或酸加成盐。

本发明的药学上可接受的盐可由含有酸根或碱基的母体化合物通过常规化学方法合成。一般情况下，这样的盐的制备方法是：在水或有机溶剂或两者的混合物中，经由游离酸或碱形式的这些化合物与化学计量的适当的碱或酸反应来制备。

“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸，以及起到与天然存在的氨基酸类似的作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸，以及后来修饰的那些氨基酸，例如，羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和 O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构(例如与氢、羧基基团、氨基基团和 R 基团结合的 α 碳)的化合物，例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。这样的类似物可以具有修饰的 R 基团(例如，正亮氨酸)或修饰的肽骨架，但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指其结构不同于一般的氨基酸化学结构，但起到与天然存在的氨基酸相似的作用的化学化合物。

本发明化合物的治疗剂量可根据例如以下而定：治疗的具体用途、给予化合物的方式、患者的健康和状态，以及签处方医师的判断。本发明化合物在药用组合物中的比例或浓度可不固定，取决于多种因素，它们包括剂量、化学特性(例如疏水性)和给药途径。

术语“治疗”意为将本发明所述化合物或制剂进行给药以改善或消除疾病或与所述疾病相关的一个或多个症状，且包括：

- (i) 抑制疾病或疾病状态，即遏制其发展；
- (ii) 缓解疾病或疾病状态，即使该疾病或疾病状态消退。

术语“治疗有效量”意指(i)治疗特定疾病、病况或障碍，(ii)减轻、改善或消除特定疾病、病况或障碍的

一种或多种症状，或(iii)预防或延迟本文中所述的特定疾病、病况或障碍的一种或多种症状发作的本发明化合物的用量。构成“治疗有效量”的本发明化合物的量取决于该化合物、疾病状态及其严重性、给药方式以及待被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。

除非本发明中另外要求，在整个说明书和其后的权利要求书中，词语“包括(comprise)”及其英文变体例如“包括(comprises)”和“包括(comprising)”应解释为开放式的、含括式的意义，即“包括但不限于”。

在整个本说明书中提到的“一实施方案”或“实施方案”或“在另一实施方案中”或“在某些实施方案中”意指在至少一实施方案中包括与该实施方案所述的相关的具体参考要素、结构或特征。因此，在整个说明书中不同位置出现的短语“在一实施方案中”或“在实施方案中”或“在另一实施方案中”或“在某些实施方案中”不必全部指同一实施方案。此外，具体要素、结构或特征可以任何适当的方式在一个或多个实施方案中结合。

除非另有说明，术语“异构体”意在包括几何异构体、顺反异构体、立体异构体、对映异构体、旋光异构体、非对映异构体和互变异构体。

本发明的化合物可以存在特定的几何或立体异构体形式。本发明设想所有的这类化合物，包括顺式和反式异构体、(-)-和(+)-对映体、(R)-和(S)-对映体、非对映异构体、(D)-异构体、(L)-异构体，及其外消旋混合物和其他混合物，例如对映异构体或非对映体富集的混合物，所有这些混合物都属于本发明的范围之内。烷基等取代基中可存在另外的不对称碳原子。所有这些异构体以及它们的混合物，均包括在本发明的范围之内。

除非另有说明，术语“对映异构体”或者“旋光异构体”是指互为镜像关系的立体异构体。

除非另有说明，术语“顺反异构体”或者“几何异构体”系由因双键或者成环碳原子单键不能自由旋转而引起。

除非另有说明，术语“非对映异构体”是指分子具有两个或多个手性中心，并且分子间为非镜像的关系的立体异构体。

除非另有说明，“(+)”表示右旋，“(-)”表示左旋，“(±)”表示外消旋。

除非另有说明，用楔形实线键 () 和楔形虚线键 () 表示一个立体中心的绝对构型，用直形实线键 () 和直形虚线键 () 表示立体中心的相对构型，用波浪线 () 表示楔形实线键 () 或楔形虚线键 ()，或用波浪线 () 表示直形实线键 () 或直形虚线键 ()。

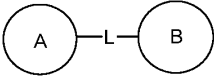
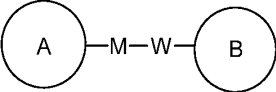
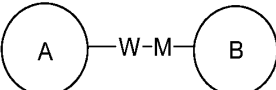
除非另有说明，术语“富含一种异构体”、“异构体富集”、“富含一种对映体”或者“对映体富集”指其中一种异构体或对映体的含量小于 100%，并且，该异构体或对映体的含量大于等于 60%，或者大于等于 70%，

或者大于等于 80%，或者大于等于 90%，或者大于等于 95%，或者大于等于 96%，或者大于等于 97%，或者大于等于 98%，或者大于等于 99%，或者大于等于 99.5%，或者大于等于 99.6%，或者大于等于 99.7%，或者大于等于 99.8%，或者大于等于 99.9%。

除非另有说明，术语“异构体过量”或“对映体过量”指两种异构体或两种对映体相对百分数之间的差值。例如，其中一种异构体或对映体的含量为 90%，另一种异构体或对映体的含量为 10%，则异构体或对映体过量 (ee 值) 为 80%。

可以通过的手性合成或手性试剂或者其他常规技术制备光学活性的 (*R*)-和 (*S*)-异构体以及 *D* 和 *L* 异构体。如果想得到本发明某化合物的一种对映体，可以通过不对称合成或者具有手性助剂的衍生作用来制备，其中将所得非对映体混合物分离，并且辅助基团裂开以提供纯的所需对映异构体。或者，当分子中含有碱性官能团（如氨基）或酸性官能团（如羧基）时，与适当的光学活性的酸或碱形成非对映异构体的盐，然后通过本领域所公知的常规方法进行非对映异构体拆分，然后回收得到纯的对映体。此外，对映异构体和非对映异构体的分离通常是通过使用色谱法完成的，所述色谱法采用手性固定相，并任选地与化学衍生法相结合（例如由胺生成氨基甲酸盐）。

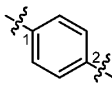
本发明的化合物可以在一个或多个构成该化合物的原子上包含非天然比例的原子同位素。例如，可用放射性同位素标记化合物，比如氚 (^3H)，碘-125 (^{125}I) 或 C-14 (^{14}C)。又例如，可用重氢取代氢形成氘代药物，氘与碳构成的键比普通氢与碳构成的键更坚固，相比于未氘代药物，氘代药物有降低毒副作用、增加药物稳定性、增强疗效、延长药物生物半衰期等优势。本发明的化合物的所有同位素组成的变换，无论放射性与否，都包括在本发明的范围之内。

当所列举的连接基团没有指明其连接方向，其连接方向是任意的，例如， 中连接基团 L 为 -M-W-，此时 -M-W- 既可以按与从左往右的读取顺序相同的方向连接环 A 和环 B 构成 ，也可以按照与从左往右的读取顺序相反的方向连接环 A 和环 B 构成 。所述连接基团、取代基和/或其变体的组合只有在这样的组合会产生稳定的化合物的情况下才是被允许的。

除非另有规定，当某一基团具有一个或多个可连接位点时，该基团的任意一个或多个位点可以通过化学键与其他基团相连。当该化学键的连接方式是不定位的，且可连接位点存在 H 原子时，则连接化学键时，该位点的 H 原子的个数会随所连接化学键的个数而对应减少变成相应价数的基团。所述位点与其他基团连

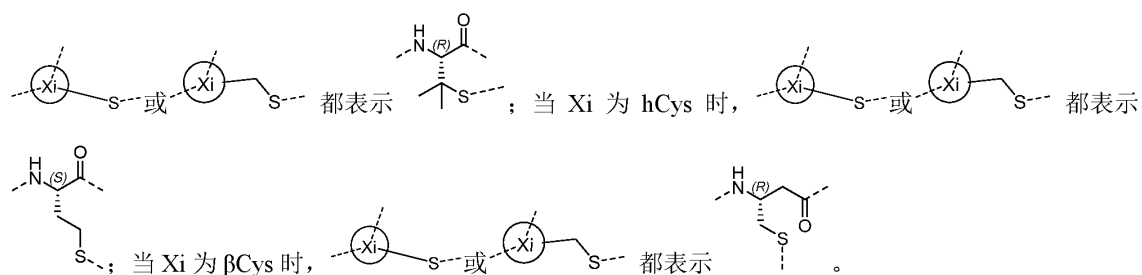
接的化学键可以用直形实线键 (—)、直形虚线键 (---)、或波浪线 (~~~~) 表示。例如-OCH₃ 中的直形

实线键表示通过该基团中的氧原子与其他基团相连； 中的直形虚线键表示通过该基团中的氮原子的

两端与其他基团相连； 中的波浪线表示通过该苯基基团中的 1 和 2 位碳原子与其他基团相连。

除非另有规定，术语“C₁₋₄ 烷基”用于表示直链或支链的由 1 至 4 个碳原子组成的饱和碳氢基团。所述 C₁₋₄ 烷基包括 C₁₋₂、C₁₋₃ 和 C₂₋₃ 烷基等；其可以是一价（如甲基）、二价（如亚甲基）或者多价（如次甲基）。C₁₋₄ 烷基的实例包括但不限于甲基 (Me)、乙基 (Et)、丙基（包括 n-丙基和异丙基）、丁基（包括 n-丁基，异丁基，s-丁基和 t-丁基）等。

除非另有说明，本发明中氨基酸 X 与 TATA 通过氨基酸残基上的巯基相连；例如，当 Xi 为 Pen 时，



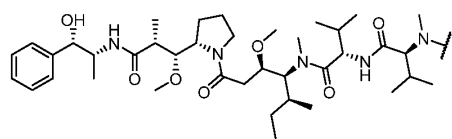
本发明的化合物可以通过本领域技术人员所熟知的常规方法来确认结构，如果本发明涉及化合物的绝对构型，则该绝对构型可以通过本领域常规技术手段予以确证。例如单晶X射线衍射法 (SXRD)，把培养出的单晶用Bruker D8 venture衍射仪收集衍射强度数据，光源为CuKα辐射，扫描方式：φ/ω扫描，收集相关数据后，进一步采用直接法(Shelxs97)解析晶体结构，便可以确证绝对构型。

本发明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、其与其他化学合成方法的结合所形成的实施方式以及本领域技术上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发明的实施例。

化合物依据本领域常规命名原则或者使用 ChemDraw®软件命名，市售化合物采用供应商目录名称。

本发明所使用的溶剂可经市售获得。

本发明采用下述缩略词：eq.代表当量、等量；SPPS 代表多肽固相合成法；TFA 代表三氟乙酸；DIEA 代表二异丙基乙基胺；DMF 代表 N,N-二甲基甲酰胺；HATU 代表 2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯；EDC 代表 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐；NHS 代表 N-羟基琥珀酰亚胺；TIS 代表三异丙基硅烷；DTT 代表 DL-1,4-二硫代苏糖醇；MMAE 代表单甲基奥瑞他汀 E，具体结构为：



; PABC 代表 ; Cit 代表 L-瓜氨酸; Val 代表 L-缬氨酸;

酸; Glutaryl 代表 ; β -Ala 代表 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$; Sar 代表 ; Sar10 代表 ; Cys 代表 L-半胱氨酸;

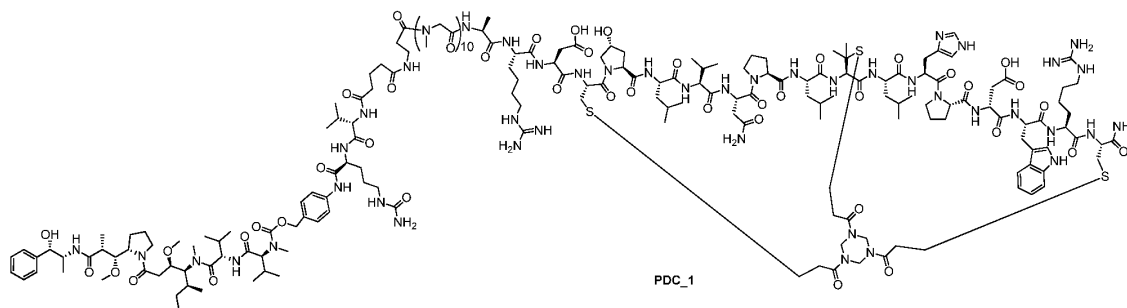
氨酸; hCys 代表 ; β Cys 代表 ; Pen 代表 ; N-methyl-Dap 代表 ; lNal 代表

1-萘丙氨酸; hArg 或 HArg 代表 L-高精氨酸; Hyp 代表 L-羟脯氨酸; Trp 代表 L-色氨酸; Pro 代表 L-脯氨酸; Thr 代表 L-苏氨酸; Ser 代表 L-丝氨酸; Asp 代表 L-天门冬氨酸; dAsp 或 D-Asp 代表 D-天门冬氨酸; Fmoc 代表 9-芴甲氧羰基; Boc 代表叔丁氧基羰基; Trt 代表三苯甲基; Pbf 代表 2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基; PBS 代表磷酸盐缓冲液。

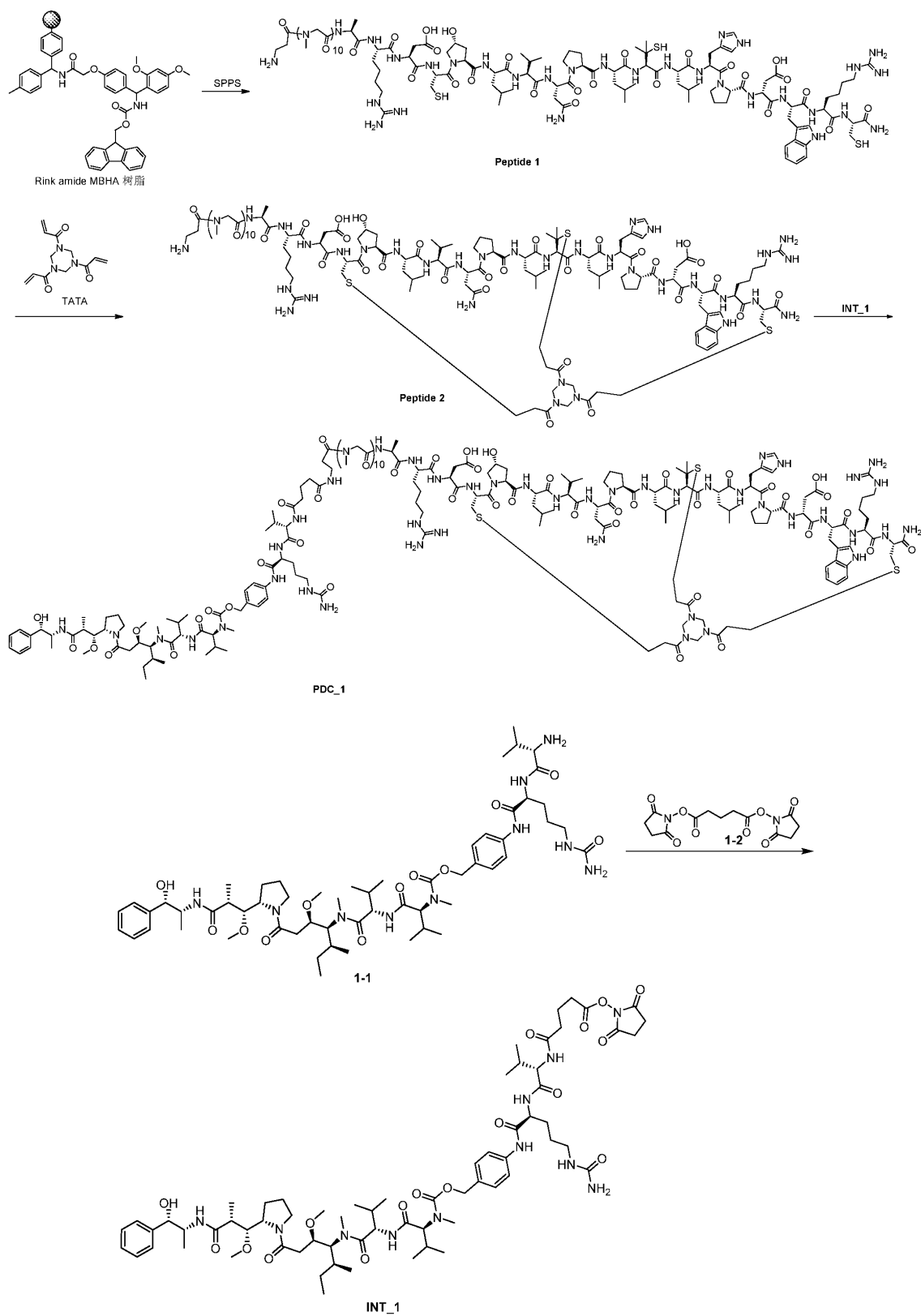
具体实施方式

下面通过实施例对本发明进行详细描述,但并不意味着对本发明任何不利限制。本文已经详细地描述了本发明,其中也公开了其具体实施方式,对本领域的技术人员而言,在不脱离本发明精神和范围的情况下针对本发明具体实施方式进行各种变化和改进行将是显而易见的。

实施例 1



合成路线:



步骤一：Peptide 1 的 TFA 盐的合成

该多肽使用标准的逐步合成方法合成。

- 1) 将 DMF (20 mL) 加入到含有 Rink amide MBHA 树脂 (0.5 mmol, 1.85 g, 底物: 0.27 mmol/g) 的容器中并且让树脂溶胀 2 小时。
- 2) 抽干, 然后用 DMF 冲洗三次, 每次氮气鼓动 30 秒。
- 3) 加入 20% 哌啶/DMF, 然后反应 30 分钟。
- 4) 抽干, 然后用 DMF 冲洗五次, 每次氮气鼓动 30 秒。
- 5) 加入 Fmoc 保护的氨基酸的溶液, 鼓氮气 30 秒, 然后加入缩合剂, N₂ 鼓吹反应将近 1 小时。
- 6) 重复步骤 2 到步骤 5 缩合下一个氨基酸。

表 1 加料顺序

#	原料	缩合试剂
1	Fmoc-Cys(Trt)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.) 和 DIEA (6.0 eq.)
2	Fmoc-hArg(Pbf)-OH (2.0 eq.)	HATU (1.90 eq.) 和 DIEA (4.0 eq.)
3	Fmoc-Trp(Boc)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.) 和 DIEA (6.0 eq.)
4	Fmoc-dAsp(OtBu)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.) 和 DIEA (6.0 eq.)
5	Fmoc-Pro-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.) 和 DIEA (6.0 eq.)
6	Fmoc-His(Trt)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.) 和 DIEA (6.0 eq.)
7	Fmoc-Leu-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.) 和 DIEA (6.0 eq.)
8	Fmoc-Pen(Trt)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.) 和 DIEA (6.0 eq.)
9	Fmoc-Leu-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.) 和 DIEA (6.0 eq.)
10	Fmoc-Pro-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.) 和 DIEA (6.0 eq.)
11	Fmoc-Asn(Trt)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.) 和 DIEA (6.0 eq.)
12	Fmoc-Val-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.) 和 DIEA (6.0 eq.)
13	Fmoc-Leu-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.) 和 DIEA (6.0 eq.)
14	Fmoc-Hyp(tBu)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.) 和 DIEA (6.0 eq.)
15	Fmoc-Cys(Trt)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.) 和 DIEA (6.0 eq.)
16	Fmoc-Asp(OtBu)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.) 和 DIEA (6.0 eq.)
17	Fmoc-hArg(Pbf)-OH (2.0 eq.)	HATU (1.90 eq.) 和 DIEA (4.0 eq.)
18	Fmoc-Ala-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.) 和 DIEA (6.0 eq.)

19	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.) 和 DIEA (10.0 eq.)
20	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.) 和 DIEA (10.0 eq.)
21	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.) 和 DIEA (10.0 eq.)
22	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.) 和 DIEA (10.0 eq.)
23	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.) 和 DIEA (10.0 eq.)
24	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.) 和 DIEA (10.0 eq.)
25	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.) 和 DIEA (10.0 eq.)
26	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.) 和 DIEA (10.0 eq.)
27	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.) 和 DIEA (10.0 eq.)
28	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.) 和 DIEA (10.0 eq.)
29	Fmoc-β-Ala-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.) 和 DIEA (6.0 eq.)

多肽切割和纯化:

- 1) 向含有侧链保护的多肽的烧瓶中加入切割缓冲溶液(90% TFA /2.5% TIS /2.5% H₂O/5.0% DTT), 置于室温下搅拌 2 小时。
- 2) 用冰的异丙醚将该多肽沉降出来, 并用离心机(3000 rpms, 3 mins)离心分离。
- 3) 用异丙醚再洗两次。
- 4) 干燥得到化合物 **Peptide 1** 的 TFA 盐。

步骤二: **Peptide 2** 的乙酸盐的合成

粗品 **Peptide 1** 的 TFA 盐(1.40 g, 470 μmol) 溶解在 50% MeCN/H₂O (500 mL)中, 在室温下向搅拌着的溶液中缓慢加入 TATA (140 mg, 560 μmol), 反应混合物在室温下搅拌 30 分钟, 然后用 NH₄HCO₃ 调节 pH 值到 8, 反应继续在室温搅拌 12 小时。LCMS 显示反应完全, 停止搅拌, 通过反相制备 (A: 0.075% TFA in H₂O, B: CH₃CN) 进行纯化得到 **Peptide 2** 的乙酸盐。

表 2 纯化条件

分离条件	
溶解条件	溶于 20% MeCN/H ₂ O
机器型号	SHIMADZU LC-8A

流动相	A: H ₂ O (0.075% TFA/H ₂ O)	
	B: CH ₃ CN	
分离梯度	19-39%-40 min. 保留时间: 20 min	
柱子型号	Welch Ultimate® XB-C18, 250*50 mm, 10 μm, 120Å + Welch Xtimate®C18, 250*50 mm, 10 μm, 120Å	
流速	80 mL/min	
波长	214/254 nm	
温度	25 °C	
二次纯化分离条件		
溶解条件	溶于 20% MeCN/H ₂ O	
机器型号	Gilson GX-281A	
流动相	A: H ₂ O (0.5%AcOH/H ₂ O)	
	B: CH ₃ CN	
分离梯度	13-33%-40 min. 保留时间: 22 min	
柱子型号	YMC-Actus Triart C18, 250*30 mm, 5 μm, 120Å	
流速	20 mL/min	
波长	214/254 nm	
温度	25 °C	

其他 2 条多肽 **Peptide 3, 4** 的乙酸盐的合成方法与 **Peptide 2** 的乙酸盐的合成方法相似。

表 3 多肽序列 2~4

Comp. No.	多肽序列
Peptide 2	H-β-Ala-Sar10-Ala-hArg-Asp-Cys-Hyp-Leu-Val-Asn-Pro-Leu-Pen-Leu-His-Pro-dAsp-Trp-hArg-Cys-NH ₂ ,TATA

Peptide 3	H-β-Ala-Sar10-Ala-hArg-Asp-hCys-Hyp-Leu-Val-Asn-Pro-Leu-Cys-Leu-His-Pro-dAsp-Trp-hArg-Cys-NH ₂ ,TATA
Peptide 4	H-β-Ala-Sar10-Ala-hArg-Asp-Cys-Hyp-Leu-Val-Asn-Pro-Leu-Pen-Leu-His-Pro-dAsp-Trp-hArg-hCys-NH ₂ ,TATA

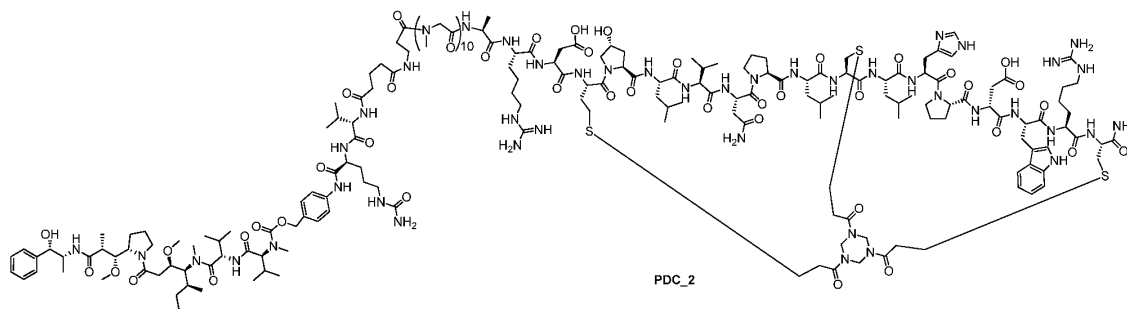
步骤三：中间体 INT_1 的 TFA 盐的合成

化合物 **1-1** (200.0 mg, 178.0 μmol) 溶于 DMF (5 mL) 中，在 0°C 下加入 DIEA (31.0 μL, 178.0 μmol)，搅拌 10 mins，同时将化合物 **1-2** (290.4 mg, 890.1 μmol) 用另外一个反应瓶，也溶于 DMF (5 mL)，在 0°C 下搅拌 10 mins，然后在 0°C 下将化合物 **1-1** 的反应液滴加到搅拌着的化合物 **1-2** 的反应液中，此反应液在 0°C 下搅拌 30 mins，将反应液过滤除去不溶的残渣，滤液直接用反相制备进行 (TFA 体系) 纯化，得到化合物 **INT_1** 的 TFA 盐。

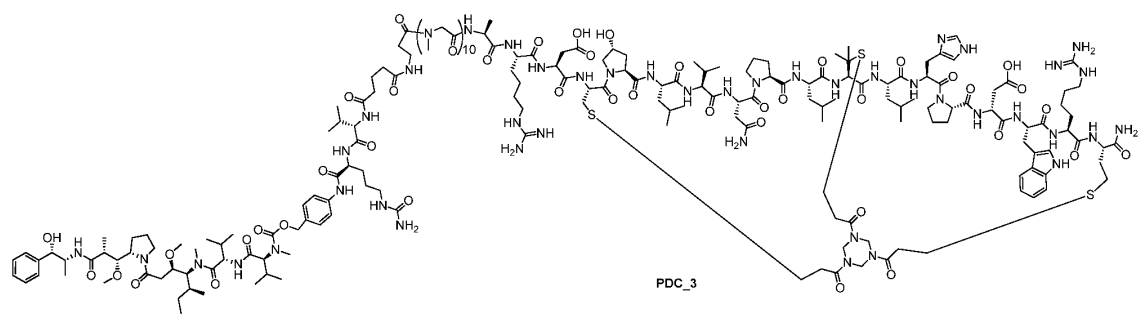
步骤四：PDC_1 的乙酸盐的合成

将多肽化合物 **peptide 2** 的 TFA 盐 (87.0 mg, 27.1 μmol) 溶于 DMF (0.5 mL) 中，然后加入 DIEA (12.9 μL, 74.4 μmol)，在室温下搅拌 10 mins。接着将化合物 **INT_1** 的 TFA 盐 (36.2 mg, 27.1 μmol) 溶于 DMF (0.3 mL) 中，滴加到上述多肽化合物 **peptide 2** 的 TFA 盐的反应液中，然后在室温下搅拌 2 小时。LC-MS 显示反应完全，停止反应，将反应液过滤除去不溶的残渣，滤液直接用反相制备 (TFA 体系) 纯化，冻干，然后再通过制备转化成 AcOH 盐，得到 **PDC_1** 的乙酸盐。

实施例 2



实施例 3

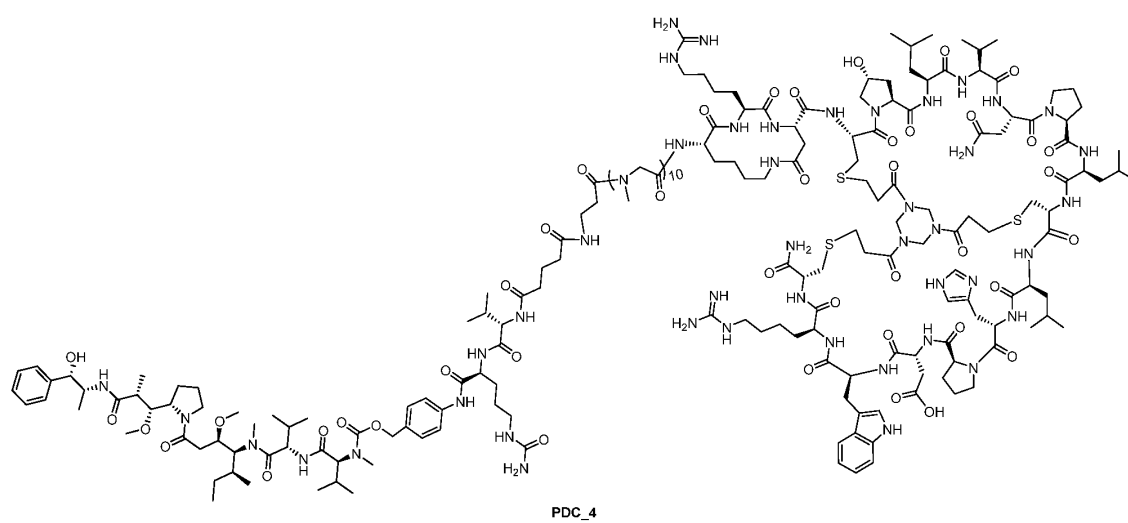


PDC_2, PDC_3 的乙酸盐制备方式与 PDC_1 的乙酸盐相同：

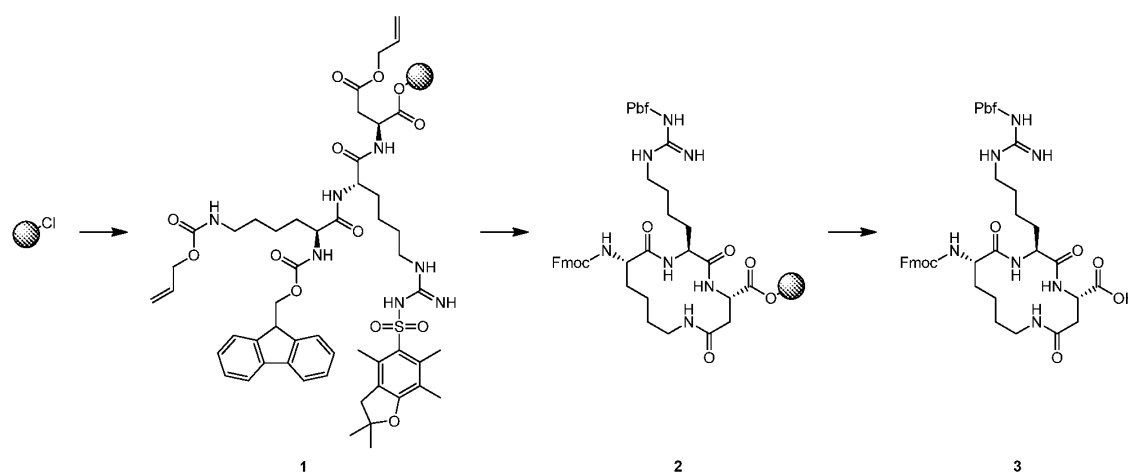
表 4 PDC_1~3 的结构和质谱数据

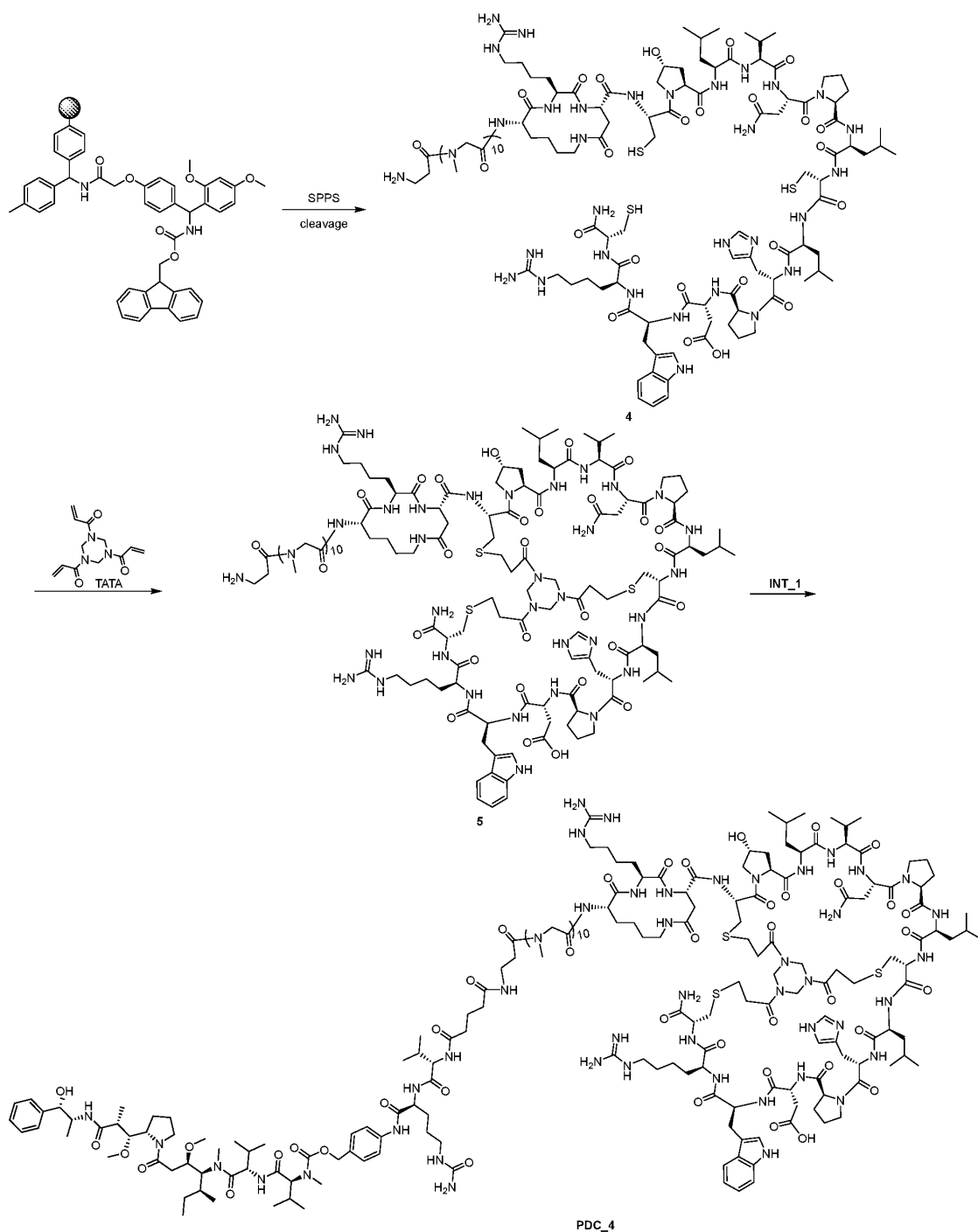
实施例	化合物 编号	原料	PDC 化合物结构	Mass (实验值)测 量值)	分子量 (计算值)
1	PDC_1	Peptide 2	MMAE-PABC-Cit-Val-Glutaryl-β-Ala-Sar10-Ala-hArg-Asp-Cys-Hyp-Leu-Val-Asn-Pro-Leu-Pen-Leu-His-Pro-dAsp-Trp-hArg-Cys-NH ₂ ,TATA	1477.6 (M+3H ⁺)/3	4429.8
2	PDC_2	Peptide 3	MMAE-PABC-Cit-Val-Glutaryl-β-Ala-Sar10-Ala-hArg-Asp-hCys-Hyp-Leu-Val-Asn-Pro-Leu-Cys-Leu-His-Pro-dAsp-Trp-hArg-Cys-NH ₂ ,TATA	1104.9 (M+4H ⁺)/4	4415.6
3	PDC_3	Peptide 4	MMAE-PABC-Cit-Val-Glutaryl-β-Ala-Sar10-Ala-hArg-Asp-Cys-Hyp-Leu-Val-Asn-Pro-Leu-Pen-Leu-His-Pro-dAsp-Trp-hArg-hCys-NH ₂ ,TATA	1112.1 (M+4H ⁺)/4	4444.4

实施例 4



合成路线:





1. 中间体 3 的合成:

多肽合成:

该多肽使用标准的逐步合成方法合成。

- 1) 将 DCM 加入到含有 CTC Resin 树脂 (10.0 mmol, 10.0 g) 和 Fmoc-Asp(OAll)-OH 的容器中。

- 2) 加入 DIEA (4.00 eq) 然后搅拌 2 小时。
- 3) 加入 MeOH (10.0 mL), 搅拌 30 分钟。
- 4) 抽干, 然后用 DMF 冲洗三次, 每次氮气鼓动 30 秒。
- 5) 加入 20% 哌啶/DMF, 然后反应 30 分钟。
- 6) 抽干, 然后用 DMF 冲洗五次, 每次氮气鼓动 30 秒。
- 7) 加入 Fmoc 保护的氨基酸的溶液, 氮气鼓动 30 秒, 然后加入缩合剂, N₂ 鼓吹反应将近 1 小时。
- 8) 重复步骤 4 到步骤 7 缩合下一个氨基酸, 至完成 Fmoc-Lys(Alloc)-OH 的连接。
- 9) 抽干, 然后用 DMF 冲洗三次, DCM 冲洗三次, 每次氮气鼓动 30 秒。
- 10) 脱 OAll 和 Alloc: 在 DCM 树脂溶液中加入 Pd(PPh₃)₄ (0.1 eq) 和 PhSiH₃ (10.0 eq), N₂ 鼓吹反应将近 15 分钟, 抽干, 重复本步骤三次。
- 11) 抽干, 然后用 DMF 冲洗五次, 每次氮气鼓动 30 秒。
- 12) 关环: 加入缩合剂溶液 HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.), N₂ 鼓吹反应将近 1 小时。
- 13) 抽干, 然后用 DMF 冲洗三次, 甲醇洗三次。每次氮气鼓动 30 秒, 抽干后干燥。

表 5 加料顺序

#	反应顺序	反应试剂
1	Fmoc-Asp (OAll)-OH (1.0 eq.)	DIEA (4.0 eq.)
2	Fmoc-hArg (Pbf)-OH (3.0 eq.)	HBTU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
3	Fmoc-Lys (Alloc)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)

切割和纯化:

- 5) 向含有侧链保护的多肽的烧瓶中加入切割缓冲溶液(20% HFIP/DCM), 置于室温下搅拌 30 分钟 2 次。
- 收集溶液并旋干, 制备反相分离得到中间体 **3**。

表 6 纯化条件

分离条件	
溶解条件	溶于 20% CH ₃ CN/H ₂ O
机器型号	SHIMADZU LC-8A Waters
流动相	A: H ₂ O (含 0.075% TFA)
	B: CH ₃ CN
分离梯度	30-70%-60 min. 保留时间: 22 min
柱子型号	Welch Xtimate®C18, 250*50 mm, 10 μm, 120Å

流速	80 mL/min
波长	214/254 nm
温度	25 °C

2. 中间体 4 的合成

多肽合成:

该多肽使用标准的逐步合成方法合成。

- 1) 将 DMF (20 mL) 加入到含有 Rink amide MBHA 树脂 (0.5 mmol, 1.85 g) 的容器中并且让树脂溶胀 2 小时。
- 2) 抽干, 然后用 DMF 冲洗三次, 每次氮气鼓动 30 秒。
- 3) 加入 20% 哌啶/DMF, 然后反应 30 分钟。
- 4) 抽干, 然后用 DMF 冲洗五次, 每次氮气鼓动 30 秒。
- 5) 加入 Fmoc-氨基酸的溶液, 氮气鼓动 30 秒, 然后加入缩合剂, N₂ 鼓吹反应将近 1 小时。
- 6) 重复步骤 2 到步骤 5 缩合下一个氨基酸。

表 7 加料顺序

#	原料	缩合试剂
1	Fmoc-Cys (Trt)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
2	Fmoc-hArg (Pbf)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
3	Fmoc-Trp (Boc)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
4	Fmoc-dAsp (OtBu)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
5	Fmoc-Pro-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
6	Fmoc-His (Trt)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
7	Fmoc-Leu-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
8	Fmoc-Cys (Trt)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
8	Fmoc-Leu-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
9	Fmoc-Pro-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
10	Fmoc-Asn (Trt)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
11	Fmoc-Val-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
12	Fmoc-Leu-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
14	Fmoc-Hyp(tBu)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)

15	Fmoc-Cys(Trt)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
16	化合物 3 (2.0 eq.)	HATU (1.90 eq.)、DIEA (4.0 eq.)
17	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
18	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
19	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
20	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
21	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
22	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
23	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
24	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
25	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
26	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
27	Fmoc-β-Ala-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)

多肽切割和纯化:

- 1) 向含有侧链保护的多肽的烧瓶中加入切割缓冲溶液(90% TFA /2.5% TIS /2.5% H₂O/5.0% DTT), 置于室温下搅拌 2 小时。
- 2) 用冰的异丙醚将该多肽沉降出来, 并用离心机(3000 rpms, 3 mins)离心分离。
- 3) 用异丙醚再洗两次。
- 4) 干燥粗品多肽得到中间体 4 的 TFA 盐(粗品)。

3. 中间体 5 的 TFA 盐的合成

粗品中间体 4 的 TFA 盐(1.40 g, 470 μmol) 溶解在 50% MeCN/H₂O (500 mL)中, 在室温下向搅拌着的溶液中缓慢加入 TATA (140 mg, 560 μmol), 反应混合物在室温下搅拌 30 分钟, 然后用 NH₄HCO₃ 调节 pH 值到 8, 反应继续在室温搅拌 12 小时。LCMS 显示反应完全, 停止搅拌, 通过反相制备 (A: 0.075% TFA/H₂O, B: CH₃CN) 进行纯化得到中间体 5 的 TFA 盐(粗品)。

表 8 纯化条件

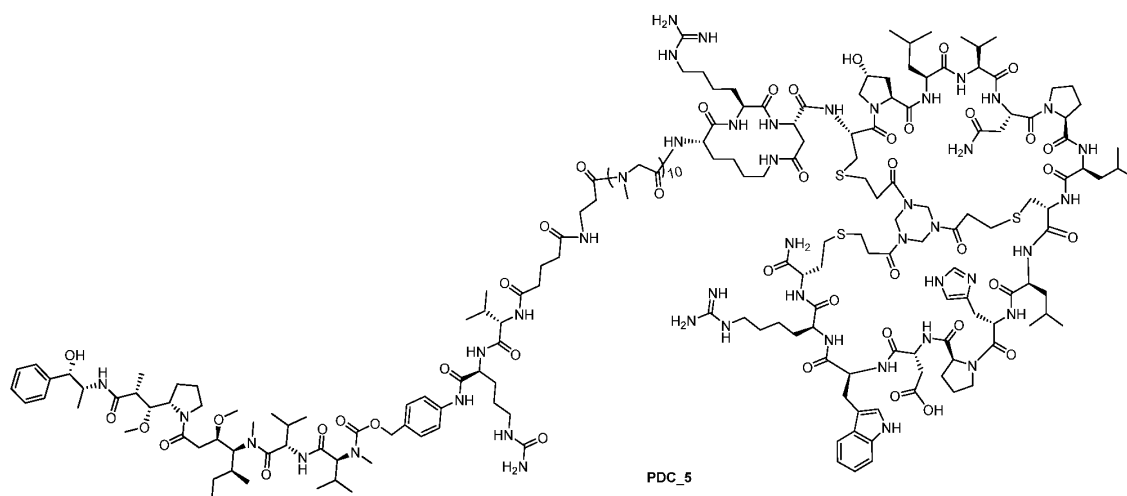
分离条件	
溶解条件	溶于 20% MeCN/H ₂ O
机器型号	SHIMADZU LC-8A Waters

流动相	A: H ₂ O (0.075% TFA)
	B: CH ₃ CN
分离梯度	14-34%-60 min. 保留时间: 20 min
柱子型号	Welch Xtimate®C18, 250*50 mm, 10 μm, 120Å
流速	80 mL/min
波长	214/254 nm
温度	25 °C

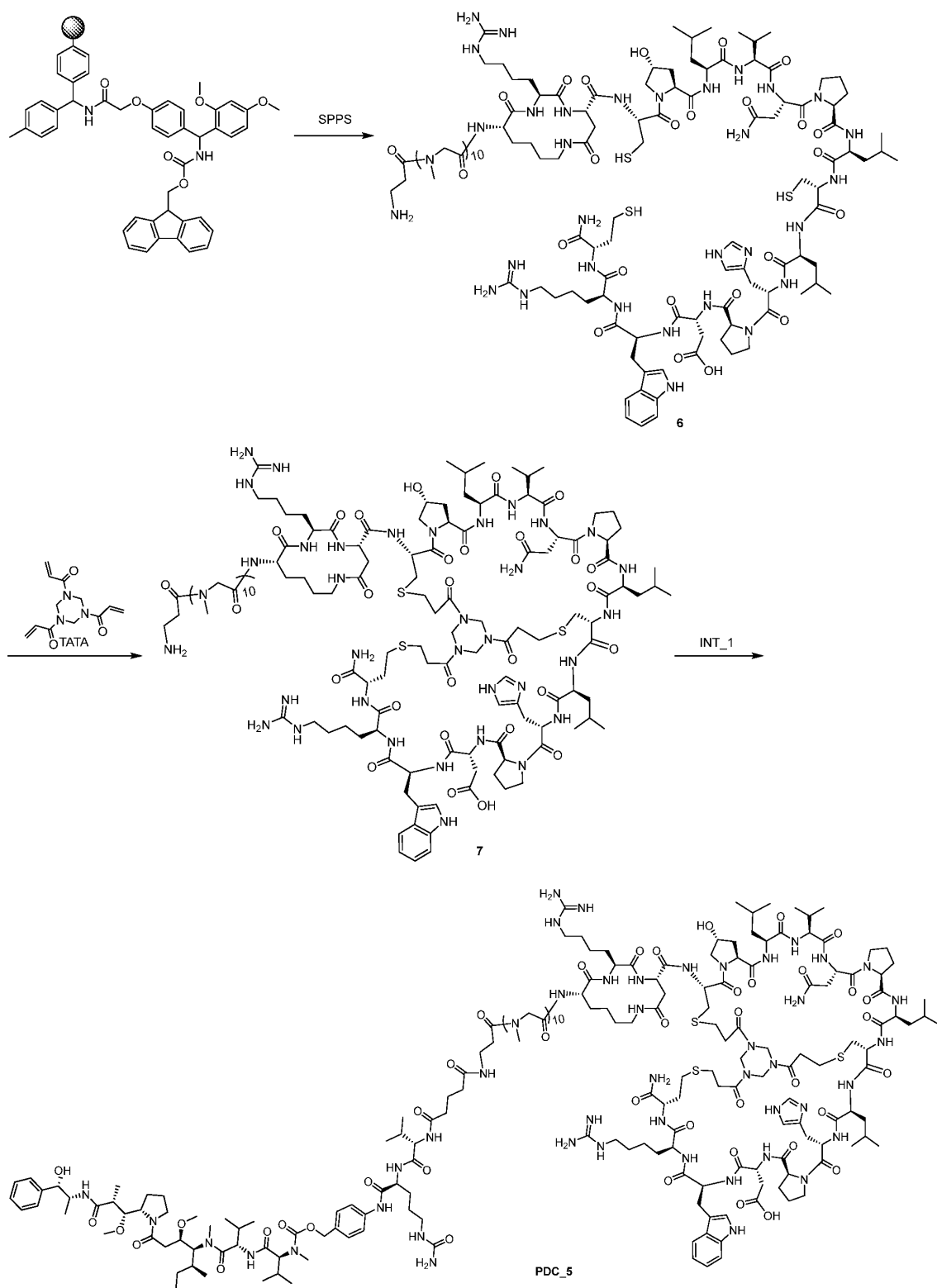
4. 化合物 PDC_4 的乙酸盐的合成

将中间体 **5** 的 TFA 盐(60.0 mg, 18.6 μmol)溶于 DMF (0.3 mL)中, 然后加入 DIEA (12.9 μL, 74.4 μmol), 在室温下搅拌 10 分钟。接着将化合物 **INT_1** 的 TFA 盐(24.8 mg, 18.6 μmol) 溶于 DMF (0.2 mL)中, 滴加到上述中间体 **5** 的反应液中, 然后在室温下搅拌 2 小时, 将反应液过滤除去不溶的残渣, 滤液直接用反相制备(TFA 体系)纯化, 冻干, 然后再通过制备转化成乙酸盐, 得到化合物 **PDC_4** 的乙酸盐。

实施例 5



合成路线



中间体 6 的合成:

该多肽使用标准的逐步合成方法合成。

- 1) 将 DMF (30 mL) 加入到含有 Rink amide MBHA 树脂 (0.5 mmol, 1.8 g, 底物: 0.28 mmol/g) 的容器中并且让树脂溶胀 2 小时。
- 2) 抽干, 然后用 DMF 冲洗三次, 每次氮气鼓动 30 秒。
- 3) 加入 20% 哌啶/DMF, 然后反应 30 分钟。
- 4) 抽干, 然后用 DMF 冲洗五次, 每次氮气鼓动 30 秒。
- 5) 加入 Fmoc 保护的氨基酸溶液 30 秒, 然后加入缩合剂, N₂ 鼓吹反应将近 1 小时。
- 6) 重复步骤 2 到步骤 5 缩合下一个氨基酸。

表 9 加料顺序

#	原料	缩合试剂
1	Fmoc-hCys (Trt)-OH (2.0 eq.)	HATU (1.90 eq.)、DIEA (4.0 eq.)
2	Fmoc-hArg (Pbf)-OH (2.0 eq.)	HATU (1.90 eq.)、DIEA (4.0 eq.)
3	Fmoc-Trp (Boc)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
4	Fmoc-d-Asp (OtBu)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
5	Fmoc-Pro-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
6	Fmoc-His (Trt)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
7	Fmoc-Leu-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
8	Fmoc-Cys (Trt)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
9	Fmoc-Leu-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
10	Fmoc-Pro-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
11	Fmoc-Asn (Trt)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
12	Fmoc-Val-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
13	Fmoc-Leu-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
14	Fmoc-Hyp-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
15	Fmoc-Cys (Trt)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
16	Fmoc-Asp (OAll)-OH (2.0 eq.)	HATU (1.90 eq.)、DIEA (4.0 eq.)
17	Fmoc-HArg (Pbf)-OH (2.0 eq.)	HATU (1.90 eq.)、DIEA (4.0 eq.)
18	Fmoc-Lys (Alloc)-OH (2.0 eq.)	HATU (1.90 eq.)、DIEA (4.0 eq.)
-	Pd(PPh ₃) ₄ (0.1 eq.), PhSiH ₃ (10.0 eq.)	15 mins, 3 次

-	-	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
19	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
20	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
21	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
22	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
23	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
24	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
25	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
26	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
27	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
28	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
29	Fmoc-β-Ala-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)

用 20% 哌啶/DMF 脱除 Fmoc 保护基，反应时间 30 分钟。缩合反应用显色反应进行检测，每次反应后都得用 DMF 冲洗树脂 3~5 次。

多肽切割和纯化：

- 1) 向含有侧链保护的多肽的烧瓶中加入切割缓冲溶液(90% TFA /2.5% TIS /2.5% H₂O/5.0% DTT)，置于室温下搅拌 2 小时。
- 2) 用冰的异丙醚将该多肽沉降出来，并用离心机(3000 rpms, 3 mins)离心分离。
- 3) 用异丙醚再洗两次。
- 4) 干燥粗品得到中间体 6。

中间体 7 的 TFA 盐的合成：

粗品多肽中间体 6 (1.20 g, 418 μmol) 溶解在 50% MeCN/H₂O (500 mL)中，在室温下向搅拌着的溶液中缓慢加入 TATA (150 mg, 600 μmol)，反应混合物在室温下搅拌 30 分钟，然后用 NH₄HCO₃ 调节 pH 值到 8，反应继续在室温搅拌 12 小时。LCMS 显示反应完全，停止搅拌，通过反相制备 (TFA 体系) 进行纯化得到中间体 7 的 TFA 盐。

表 10 纯化条件

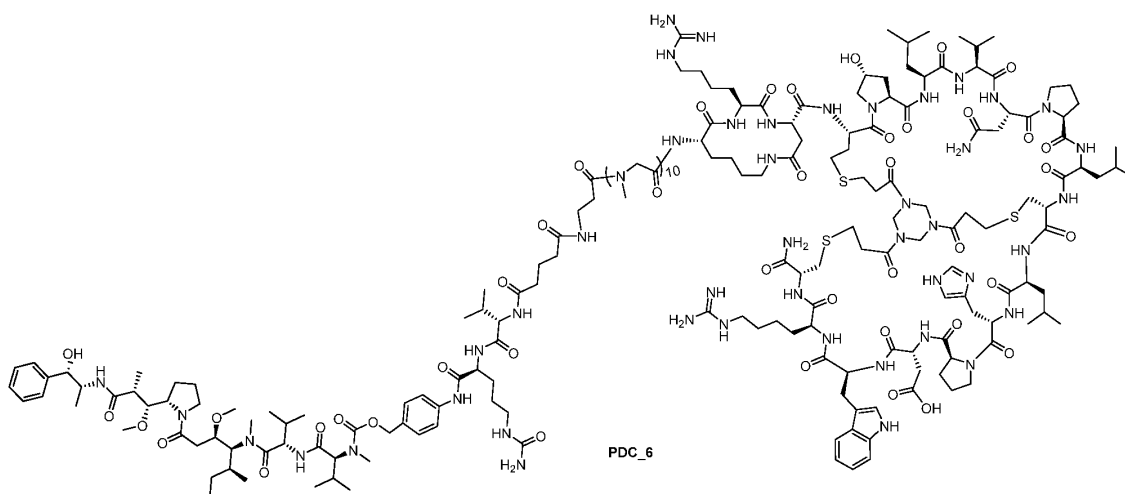
分离条件	
溶解条件	溶于 20% MeCN/H ₂ O

机器型号	SHIMADZU LC-8A Waters
流动相	A: H ₂ O (含 0.075% TFA)
	B: CH ₃ CN
分离梯度	20-40%-60 min. 保留时间: 18 min
柱子型号	Welch Ultimate® XB-C18, 250*50 mm, 10 μm, 120Å + Welch Xtimate® C18, 250*50 mm, 10 μm, 120Å
流速	80 mL/min
波长	214/254 nm
温度	25°C

PDC₅ 的乙酸盐合成:

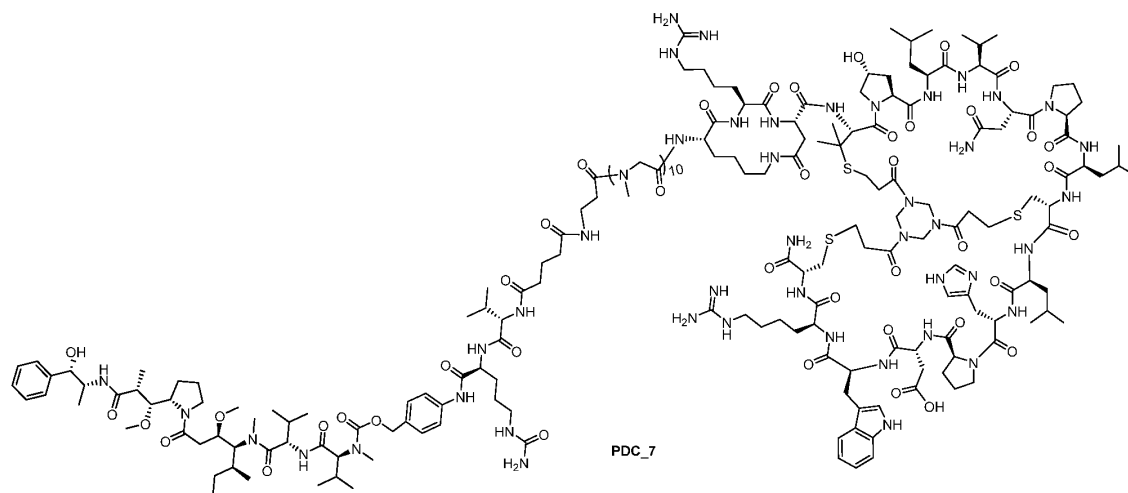
将多肽中间体 7 的 TFA 盐(60.6 mg)和化合物 INT₁ 的 TFA 盐 (25.0 mg) 溶于 DMF (0.7 mL)中, 加入 DIEA (9.68 mg, 74.9 μmol, 13.0 μL)。室温下搅拌 2 小时, LC-MS 显示反应完全, 停止反应, 将反应液过滤除去不溶的残渣, 滤液直接用反相制备(TFA 体系)纯化, 冻干, 然后再通过制备转乙酸盐, 得到 PDC₅ 的乙酸盐。

实施例 6

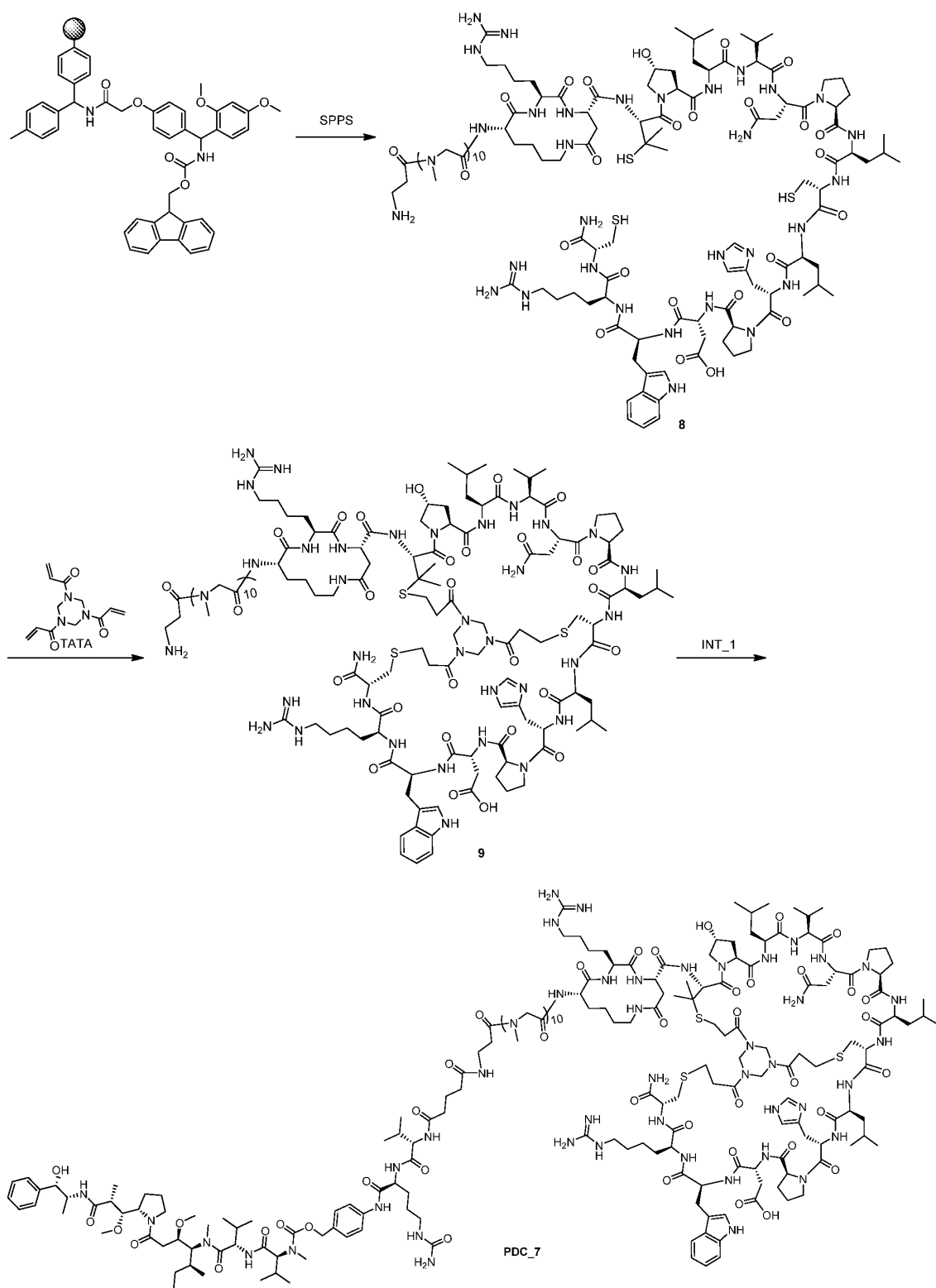


PDC₆ 的乙酸盐参考实施例 5 的合成方法, 将实施例 5 加料顺序表 9 中原料 1 替换为 Fmoc-Cys(Trt)-OH (2.0 eq.), 原料 15 替换为 Fmoc-hCys(Trt)-OH (3.0 eq.)。

实施例 7



合成路线



中间体 8 的合成:

该多肽使用标准的逐步合成方法合成。

- 1) 将 DMF (30 mL) 加入到含有 Rink amide MBHA 树脂 (0.5 mmol, 1.5 g, 底物: 0.33 mmol/g) 的容器中并且让树脂溶胀 2 小时。
- 2) 抽干, 然后用 DMF 冲洗三次, 每次氮气鼓动 30 秒。
- 3) 加入 20% 哌啶/DMF, 然后反应 30 分钟。
- 4) 抽干, 然后用 DMF 冲洗五次, 每次氮气鼓动 30 秒。
- 5) 加入 Fmoc 保护的氨基酸溶液 30 秒, 然后加入缩合剂, N₂ 鼓吹反应将近 1 小时。
- 6) 重复步骤 2 到步骤 5 缩合下一个氨基酸。

表 11 加料顺序

#	原料	缩合试剂
1	Fmoc-Cys (Trt)-OH (2.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (4.0 eq.)
2	Fmoc-hArg (Pbf)-OH (2.0 eq.)	HATU (1.90 eq.)、DIEA (4.0 eq.)
3	Fmoc-Trp (Boc)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
4	Fmoc-d-Asp (OtBu)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
5	Fmoc-Pro-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
6	Fmoc-His (Trt)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
7	Fmoc-Leu-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
8	Fmoc-Cys (Trt)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
9	Fmoc-Leu-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
10	Fmoc-Pro-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
11	Fmoc-Asn (Trt)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
12	Fmoc-Val-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
13	Fmoc-Leu-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
14	Fmoc-Hyp-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
15	Fmoc-Pen (Trt)-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)
16	Fmoc-Asp (OAll)-OH (2.0 eq.)	HATU (1.90 eq.)、DIEA (4.0 eq.)
17	Fmoc-HArg (Pbf)-OH (2.0 eq.)	HATU (1.90 eq.)、DIEA (4.0 eq.)
18	Fmoc-Lys (Alloc)-OH (2.0 eq.)	HATU (1.90 eq.)、DIEA (4.0 eq.)
-	Pd(PPh ₃) ₄ (0.1 eq.), PhSiH ₃ (10.0 eq.)	15 mins, 3 次

-	-	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
19	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
20	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
21	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
22	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
23	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
24	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
25	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
26	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
27	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
28	Fmoc-Sar-OH (5.0 eq.)	HATU (4.75 eq.)、DIEA (10.0 eq.)
29	Fmoc-β-Ala-OH (3.0 eq.)	HATU (2.85 eq.)、DIEA (6.0 eq.)

用 20% 哌啶/DMF 脱除 Fmoc 保护基，反应时间 30 分钟。缩合反应用显色反应进行检测，每次反应后都得用 DMF 冲洗树脂 3~5 次。

多肽切割和纯化：

- 1) 向含有侧链保护的多肽的烧瓶中加入切割缓冲溶液(90% TFA /2.5% TIS /2.5% H₂O/5.0% DTT)，置于室温下搅拌 2 小时。
- 2) 用冰的异丙醚将该多肽沉降出来，并用离心机(3000 rpms, 3 mins)离心分离。
- 3) 用异丙醚再洗两次。
- 4) 干燥粗品得到中间体 8。

中间体 9 的 TFA 盐的合成：

粗品多肽中间体 8 (1.50 g, 500 μmol) 溶解在 50% MeCN/H₂O (500 mL)中，在室温下向搅拌着的溶液中缓慢加入 TATA (186 mg, 750 μmol)，反应混合物在室温下搅拌 30 分钟，然后用 NH₄HCO₃ 调节 pH 值到 8，反应继续在室温搅拌 12 小时。LCMS 显示反应完全，停止搅拌，通过反相制备 (TFA 体系) 进行纯化得到中间体 9 的 TFA 盐。

表 12 纯化条件

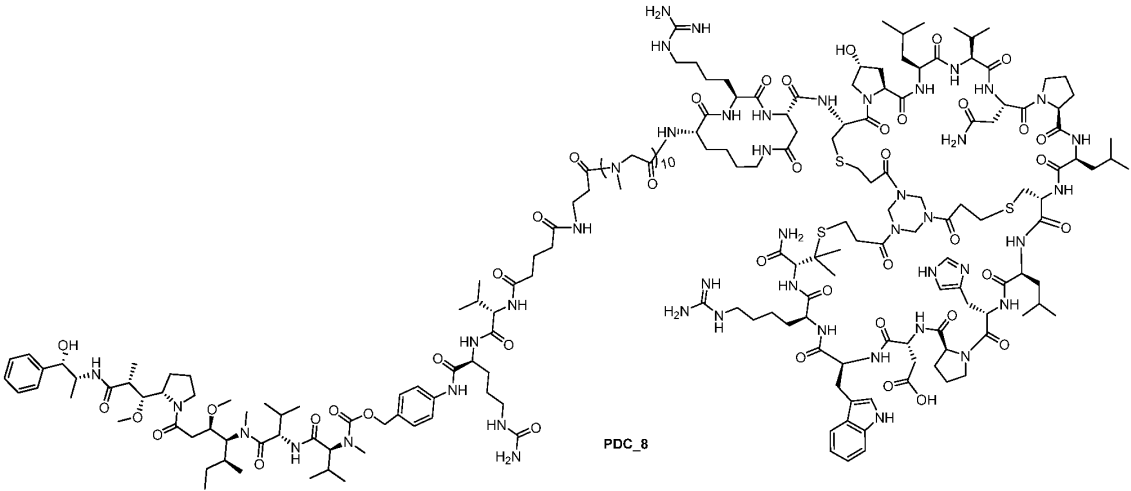
分离条件	
溶解条件	溶于 20% MeCN/H ₂ O
机器型号	SHIMADZU LC-8A Waters

流动相	A: H ₂ O (含 0.075% TFA)
	B: CH ₃ CN
分离梯度	20-40%-60 min. 保留时间: 18 min
柱子型号	Welch Ultimate® XB-C18, 250*50 mm, 10 μm, 120Å + Welch Xtimate®C18, 250*50 mm, 10 μm, 120Å
流速	80 mL/min
波长	214/254 nm
温度	25°C

PDC_7 的乙酸盐合成:

将多肽中间体 **9** 的 TFA 盐(40.0 mg)和化合物 **INT_1** 的 TFA 盐 (17.2 mg) 溶于 DMF (0.5 mL)中, 加入 DIEA (6.36 mg, 49.2 μmol)。室温下搅拌 5 小时, LC-MS 显示反应完全, 停止反应, 将反应液过滤除去不溶的残渣, 滤液直接用反相制备(TFA 体系)纯化, 冻干, 然后再通过制备转乙酸盐, 得到 **PDC_7** 的乙酸盐。

实施例 8



PDC_8 的乙酸盐参考实施例 7 的合成方法, 将实施例 7 加料顺序表 11 中原料 1 替换为 Fmoc-Pen(Trt)-OH (2.85 eq.), 原料 15 替换为 Fmoc-Cys(Trt)-OH (2.85 eq.)。

表 13 PDC_4~8 的结构序列和质谱数据

Comp. No.	PDC structure	Mass (Found)	Molecular Weight(M)
-----------	---------------	-----------------	------------------------

PDC_4	MMAE-PABC-Cit-Val-Glutaryl-β-Ala-Sar10-Lys-hArg-Asp-Cys-Hyp-Leu-Val-Asn-Pro-Leu-Cys-Leu-His-Pro-dAsp-Trp-hArg-Cys-NH ₂ ,TATA	1111.3 (M+4H ⁺)/4	4441.2
PDC_5	MMAE-PABC-Cit-Val-Glutaryl-β-Ala-Sar10-Lys-hArg-Asp-Cys-Hyp-Leu-Val-Asn-Pro-Leu-Cys-Leu-His-Pro-dAsp-Trp-hArg-hCys-NH ₂ ,TATA	1486.3 (M+3H ⁺)/3	4455.9
PDC_6	MMAE-PABC-Cit-Val-Glutaryl-β-Ala-Sar10-Lys-hArg-Asp-hCys-Hyp-Leu-Val-Asn-Pro-Leu-Cys-Leu-His-Pro-dAsp-Trp-hArg-Cys-NH ₂ ,TATA	1486.0 (M+3H ⁺)/3	4455.0
PDC_7	MMAE-PABC-Cit-Val-Glutaryl-β-Ala-Sar10-Lys-hArg-Asp-Pen-Hyp-Leu-Val-Asn-Pro-Leu-Cys-Leu-His-Pro-dAsp-Trp-hArg-Cys-NH ₂ ,TATA	1490.8 (M+3H ⁺)/3	4469.4
PDC_8	MMAE-PABC-Cit-Val-Glutaryl-β-Ala-Sar10-Lys-hArg-Asp-Cys-Hyp-Leu-Val-Asn-Pro-Leu-Cys-Leu-His-Pro-dAsp-Trp-hArg-Pen-NH ₂ ,TATA	1118.3 (M+4H ⁺)/4	4469.2

生物测试

测试例 1 本发明化合物与 EphA2 蛋白的结合能力测试

1. 实验目的

用SPR法检测待测物与靶蛋白EphA2的亲和力。

2. 材料和仪器

- Biacore 8K (GE Healthcare)
- 96-well Plate (Cat# 650101, greiner bio-one)
- CM5芯片 (Cat # BR-1005-30, GE Healthcare)
- Amine Coupling Kit (Cat # BR-1000-50, GE Healthcare)

EDC

NHS

1 M 乙醇胺

- 10 mM 醋酸钠 pH 4.5 (Cat # BR-1003-50, GE Healthcare)
- DMSO (Cat # D4540, Sigma)
- P20 (Cat # BR-1000-54, GE Healthcare)
- PBS (Cat # BR-1006-72, GE Healthcare)
- EphA2 (Cat# 13926-H08HD, Sino Biological)

3. 实验方案

本实验采用氨基偶联法，即利用 Biacore 8K 将靶蛋白 EphA2 直接固定在 CM5 芯片上，然后将待测物作为分析物，用缓冲液（10 mM PBS, pH 7.4, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 5% DMSO, 0.05% P20）将待

测物稀释到所需的浓度梯度，进行多循环动力学检测，每个循环进样 180 秒，解离 180 秒，然后再进行下一循环，获得靶蛋白 EphA2 与待测物的亲和力动力学分析数据。最终的数据用 Biacore Insight Evaluation Software（V 2.0.15.12933）按 1: 1 模型进行 Kinetics 拟合分析。

4. 实验方法及流程

- 1) 配制缓冲液：10 mM PBS，pH 7.4，137 mM NaCl，2.7 mM KCl，5% DMSO，0.05% P20。
- 2) CM5 芯片活化：用 400 mM EDC 和 100 mM NHS 以 10 μ L/min 的流速活化 420 秒。
- 3) 靶蛋白偶联：用 10 mM 醋酸钠（pH 4.5）将靶蛋白稀释到 10 μ g/mL，以 10 μ L/min 的流速偶联 284 s。实验使用了芯片上的 1#，2#和 3# 通道，偶联结果分别为 1639.9RU，1747.8RU 和 1702.2RU。
- 4) CM5 芯片封闭：用 1 M 乙醇胺以 10 μ L/min 的流速封闭 420 秒。
- 5) 分析物浓度：使用缓冲液稀释待测物。待测物从 100 nM 开始 2 倍梯度稀释至 0.78 nM。
- 6) 进样分析：待测物工作液每个浓度为一个循环，以 30 μ L/min 的流速结合 180 秒，解离 180 秒。最后一个循环为 5% DMSO 溶剂校正循环。
- 7) 所有结果按 1:1 模型进行 kinetics 拟合分析。

5. 实验结果

选取 5 个有效浓度的实验数据本发明化合物用 Biacore Insight Evaluation Software（V 2.0.15.12933）按 1: 1 模型进行 Kinetics 拟合分析，结果见表 14：

表14 本发明化合物与Human EphA2 SPR结合结果

化合物	Human EphA2 SPR k_D (nM)
PDC_2 的乙酸盐	33
PDC_4 的乙酸盐	13.30
PDC_5 的乙酸盐	6.73
PDC_6 的乙酸盐	5.67
PDC_7 的乙酸盐	8.39
PDC_8 的乙酸盐	3.46

结论：本发明化合物与 EphA2 具有很强的结合作用。

测试例 2：本发明化合物对 NCI-H1975 和 SK-OV-3 细胞体外抗增殖活性

1. 实验目的

通过检测本发明化合物在肿瘤细胞系 NCI-H1975 和 SK-OV-3 中对体外细胞活性的影响而研究化合物抑制细胞增殖的作用。

2. 实验设计：

细胞培养

将肿瘤细胞系按表 15 所示的培养条件分别放在 37 °C，无 CO₂ 和 37 °C，5% CO₂ 的培养箱中进行培养。定期传代，取处于对数生长期的细胞用于铺板。

表 15 细胞培养条件

细胞系	肿瘤类型	生长特点	细胞来源	货号	培养方法
NCI-H1975	人肺癌细胞	贴壁生长	ATCC	CRL-5908	RPMI 1640 + 10% FBS
SK-OV-3	人卵巢癌细胞	贴壁生长	ECACC	91091004	McCoy's 5a + 10% FBS

细胞铺板

收集处于对数生长期的细胞，室温，1000 rpm 离心 3min。吸弃上清，5 mL 培养基重悬细胞，吸取 20 ul 细胞悬液与台盼兰 1:1 混合，染色 3 min 检测细胞活率，并计数活细胞。将细胞密度调整至 NCI-H1975 4000 个/孔或 SK-OV-3 5000/孔。培养板中每孔加入 90 μL 细胞悬液，在空白对照孔中加入不含细胞的培养液。将培养板分别放在 37 °C，无 CO₂ 和 37 °C, 5% CO₂, 及 100% 相对湿度的培养箱中培养过夜。

化合物存储板制备

制备 400X 化合物存储板：将测试化合物用 DMSO 从最高浓度梯度稀释至最低浓度。

表 16 400X 存储板稀释浓度

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A (μM)	4000	1333.3	444.44	148.15	49.383	16.461	5.487	1.829	0.610

10X 化合物工作液的配制及化合物处理细胞

10X 化合物工作液的配制：在 V 形底的 96 孔板中加入 78 μL 细胞培养液，从 400X 化合物存储板中吸取 2 μL 化合物加入 96 孔板的细胞培养液中。在溶媒对照和空白对照中加入 2 μL DMSO。加入化合物或 DMSO 后用排枪吹打混匀。加药：取 10 μL 的 10X 化合物工作液按表 1 所示加入到细胞培养板中。在溶媒对照和空白对照中加入 10 μL DMSO-细胞培养液混合液。DMSO 终浓度为 0.25%。将 96 孔细胞板放回培养箱中培养 72 h。

CellTiter-Glo 发光法细胞活性检测

按照 Promega CellTiter-Glo 发光法细胞活性检测试剂盒 (Promega-G7573) 的说明书来进行。在 EnVision® Multi-mode Plate Reader (EnVision 2104-10) 读板器上检测发光信号。

数据分析

用下列公式来计算检测化合物的抑制率 (Inhibition rate, IR): $IR(\%) = (1 - (RLU_{\text{化合物}} - RLU_{\text{空白对照}}) / (RLU_{\text{溶媒对照}} - RLU_{\text{空白对照}})) * 100\%$ 。在 Excel 中计算不同浓度化合物的抑制率, 然后用 GraphPad Prism 6.02 软件作抑制曲线图和计算相关参数, 包括最小抑制率, 最大抑制率及 IC₅₀。

实验结果见表 17。

表 17 抗肿瘤细胞增殖结果

待测物	肿瘤细胞系	IC ₅₀ (μM)	最小抑制率 (%)	最大抑制率 (%)
PDC_8 的乙酸盐	NCI-H1975	0.079	-0.51	52.07
PDC_8 的乙酸盐	SK-OV-3	0.586	5.71	58.46

结论: 本发明化合物在肿瘤细胞系 NCI-H1975 和 SK-OV-3 中对体外培养的细胞有明显增殖抑制作用。

测试例 3: 本发明化合物对人前列腺癌 PC-3 细胞皮下异种移植肿瘤 BALB/c 裸小鼠模型的体内药效学研究

实验目的: 本发明化合物在人前列腺癌 PC-3 细胞皮下异种移植肿瘤模型上的体内药效。

细胞培养: 人前列腺癌 PC-3 细胞 (ATCC-CRL-1435) 体外贴壁培养, 培养条件为 F-12K 培养基中加 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素, 37 °C, 5% CO₂ 孵箱培养。一周两次用胰酶-EDTA 进行常规消化处理传代。当细胞饱和度为 80% - 90%, 数量到达要求时, 收取细胞, 计数, 接种。

动物: BALB/c nude 小鼠, 雄性, 6-8 周龄, 体重 22-27 克。共接种 70 只小鼠用于药效实验, 入组 40 只药效小鼠。由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。

肿瘤接种: 将 0.1 mL (10×10⁶ 个) PC-3 细胞皮下接种于每只小鼠的右后背。肿瘤平均体积达到 150-200 mm³ 时开始分组给药, 每组 8 只动物 (n = 8)。

给药体积: 根据动物体重调整给药体积 (给药体积 = 10 μL/g)。

药物配制: 化合物以 50 mM 醋酸盐缓冲液 (pH=5), 10%蔗糖为溶媒配成 1 mg/mL 均一溶液, 储存在 -80 °C 冰箱中。给药当天, 稀释成相应浓度, 用于 IV(静注)给药。

药效研究: 肿瘤平均体积达到 150-200 mm³ 时开始分组给药。给药剂量为: 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1.5 mg/kg。
给药频次: QW×3 周。

实验结果: 见图 1 和图 2。

实验结论: 本次试验中, 本发明化合物的 3 个剂量组在人前列腺癌 PC-3 细胞皮下异种移植肿瘤模型上表现出明显的抑制肿瘤生长作用, 并且在 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1.5 mg/kg 组呈现出剂量相关性。

测试例 4: 本发明化合物对人卵巢癌 SK-OV-3 细胞皮下异种移植肿瘤 BALB/c 裸小鼠模型的体内药效学研究

实验目的: 评价受试药在人卵巢癌 SK-OV-3 细胞皮下移植肿瘤模型上的体内药效。

细胞培养: 人卵巢癌 SK-OV-3 细胞 (ECACC-91091004) 体外单层培养, 培养条件为 McCoy's 5a 培养基中加 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素, 37 °C, 5% CO₂ 孵箱培养。一周两次用胰酶-EDTA 进行常规消化处理传代。当细胞饱和度为 80% - 90%, 数量到达要求时, 收取细胞, 计数, 接种。

动物: BALB/c 裸小鼠, 雌性, 6-8 周龄, 体重 18-21 克。由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。

肿瘤接种: 将 0.2 mL (10×10⁶ 个) SK-OV-3 细胞皮下接种于每只小鼠的右后背。

给药体积: 根据动物体重调整给药体积 (给药体积 = 10 μL/g)

药物配制: 待测化合物以 50 mM 醋酸盐缓冲液 (pH=5), 10% 蔗糖为溶媒配成 1 mg/mL 均一溶液, 储存在 -80°C 冰箱中。给药当天, 稀释成相应浓度, 用于 IV(静注)给药。

药效研究: 肿瘤平均体积达到 150-200 mm³ 时开始分组给药, 每组 8 只动物 (n=8)。药剂量为: 1 mg/kg, 3 mg/kg。给药频次: QW×6 周。

实验结果: 见图 3 和图 4。

实验结论: 本次试验中, 本发明化合物的 2 个剂量组在人卵巢癌 SK-OV-3 细胞皮下异种移植肿瘤模型上表现出明显的抑制肿瘤生长作用, 并且在 1 mg/kg 和 3 mg/kg 组呈现出剂量相关性。

测试例 5: 本发明化合物在小鼠体内药代动力学分析

A. 实验目的

测试本发明化合物在 CD-1 小鼠体内药代动力学

B. 实验操作

以标准方案测试化合物静脉注射及口服给药后 CD-1 小鼠药代特征，本发明化合物配成澄清溶液，溶媒：50 mM 醋酸盐缓冲液（pH=5），10%蔗糖，给予 2 只小鼠单次静脉注射 2 mg/kg 待测化合物。按照给药后 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 小时为时间点，收集全血，制备得到血浆，以 LC-MS/MS 方法分析待测化合物和其潜在代谢产物 MMAE 的浓度，并用 Phoenix WinNonlin 软件计算药代参数，如达峰浓度(C_{max})，清除率 (Cl)，半衰期 (T_{1/2})，组织分布 (V_{dss})，药时曲线下面积 (AUC_{0-last}) 等。

C. 实验结果

实验结果如表 18 所示。

表18 小鼠药代动力学测试结果

待测化合物	参数	值
PDC_8的乙酸盐	给药剂量(mg/kg)	2
	C ₀ (nM)	2635
	T _{1/2} (hr)	0.20
	V _{dss} (L/kg)	0.19
	Cl (mL/min/kg)	13.0
	AUC _{0-last} (nM.h)	560
MMAE	C _{max} (nM)	55
	AUC _{0-last} (nM.h)	51.5

结论：本发明化合物在 CD-1 小鼠血液中半衰期短，清除快，MMAE 在 CD-1 小鼠血浆中的释放量极少。

测试例 6：本发明化合物大鼠血浆药代动力学分析

实验目的：测试本发明化合物在 SD 大鼠体内药代动力学

6.1 以标准方案测试化合物静脉注射及口服给药后大鼠药代特征，待测化合物配成澄清溶液，溶媒：50 mM 醋酸盐缓冲液（pH=5），10%蔗糖，给予 2 只 SD 大鼠单次静脉注射 2 mg/kg 待测化合物。按照给药后 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 小时为时间点，收集全血，制备得到血浆，以 LC-MS/MS 方法分析待测化合物和其潜在代谢产物 MMAE 的浓度，并用 Phoenix WinNonlin 软件计算药代参数。

实验结果如表 19 所示。

表 19 大鼠药代动力学测试结果

待测化合物	参数	值
-------	----	---

PDC_8的乙酸盐	给药剂量(mg/kg)	2
	C ₀ (nM)	1670
	T _{1/2} (hr)	0.29
	Vd _{ss} (L/kg)	0.28
	Cl (mL/min/kg)	14.4
	AUC _{0-last} (nM.h)	518
MMAE	C _{max} (nM)	23.5
	AUC _{0-last} (nM.h)	37.4

6.2 以标准方案测试化合物静脉注射及口服给药后大鼠药代特征，待测化合物配成澄清溶液，溶媒：50 mM 醋酸盐缓冲液（pH=5），10%蔗糖，给予 3 只雄性 SD 大鼠单次静脉注射 2.5 mg/kg 或 3.75 mg/kg 或 5 mg/kg 待测化合物。按照给药后 0.083, 0.25, 0.5, 1, 4, 24 小时为时间点，收集全血，制备得到血浆，以 LC-MS/MS 方法分析待测化合物和其潜在代谢产物 MMAE 的浓度，并计算药代参数。

实验结果如表 20 所示。

表 20 不同剂量大鼠药代动力学测试结果

PDC_8的乙酸盐	给药剂量(mg/kg)	2.5	3.75	5
	C _{max} (nM)	1955	2748	4591
	AUC _{0-last} (nM.h)	765	3087	5654
MMAE	C _{max} (nM)	29	39	52
	AUC _{0-last} (nM.h)	58	185	435

结论：本发明化合物在大鼠血液半衰期短，清除快，PDC 的暴露量随剂量的增加而增加，代谢稳定性佳；MMAE 在大鼠血浆中的释放量少，且呈现一定的剂量相关性。

测试例 7：本发明化合物食蟹猴血浆药代动力学分析

A. 实验目的

测试本发明化合物在食蟹猴体内药代动力学

B. 实验操作

以标准方案测试化合物静脉注射及口服给药后食蟹猴药代特征，本发明化合物配成澄清溶液，溶媒：50 mM 醋酸盐缓冲液（pH=5），10%蔗糖，给予 2 只食蟹猴单次静脉注射 1 mg/kg 待测化合物。按照给药后 0.083,

0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 小时为时间点, 收集全血, 制备得到血浆, 以 LC-MS/MS 方法分析待测化合物和其潜在代谢产物 MMAE 的浓度, 并用 Phoenix WinNonlin 软件计算药代参数。

C. 实验结果如表 20 所示。

表 21 食蟹猴药代动力学测试结果

待测化合物	参数	值
PDC_8的乙酸盐	给药剂量 (mg/kg)	1
	C ₀ (nM)	2473
	T _{1/2} (hr)	0.31
	V _{dss} (L/kg)	0.12
	Cl (mL/min/kg)	5.72
	AUC _{0-last} (nM.h)	651
MMAE	C _{max} (nM)	5.6
	AUC _{0-last} (nM.h)	28.8

结论: 静脉注射本发明化合物在食蟹猴血液中半衰期短, 清除快, MMAE 在食蟹猴血浆中的释放量极少。

测试例 8: 本发明化合物不同种属血浆稳定性分析

A. 实验目的

测试本发明化合物在大鼠、食蟹猴和人血浆中的稳定性

B. 实验操作

将 2 μL 待测化合物 (100 μM) 的工作液加入到对应的孵育板中, 包括 T0、T10、T30、T60、T120 和 T240 孵育板, 每个样品准备三个平行孔。然后在已经加入工作液的孵育板中对应的加入 98 μL 的 SD 大鼠、食蟹猴和人空白血浆。所有的样品在 37°C 水浴锅中进行孵育。待测化合物的最终孵育浓度为 2 μM。每一个孵育时间点结束时, 取出相应的孵育板, 加入终止液, 沉淀蛋白, 离心 20 分钟, 取 150 μL 上清液用 LC-MS/MS 的方法分析。样品中待测化合物的浓度采用液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 方法进行半定量测定。

C. 实验结果

实验结果如表 21 所示。

表 22 本发明化合物在 SD 大鼠、食蟹猴和人血浆中稳定性结果

化合物编号	种属	T _{1/2} (min)
PDC_8 的乙酸盐	SD 大鼠	>578.1
PDC_8 的乙酸盐	食蟹猴	>578.1
PDC_8 的乙酸盐	人	>578.1

用上述方法，延长待测化合物与人血浆孵育时间至 72 小时，实验结果如表 22 所示。

表 23 本发明化合物在人血浆中孵育 72 小时稳定性

测试时间点	PDC_8 剩余%	MMAE 生成%
0	100.0	0.1
0.5	96.3	0.2
1	103.2	0.5
2	86.6	0.5
4	100.8	0.6
24	89.9	0.6
48	96.0	0.0
72	78.0	3.2

结论：本发明化合物在 SD 大鼠，食蟹猴和人三个种属血浆中具有优异的稳定性。

测试例 9：本发明化合物不同种属全血稳定性分析

A. 实验目的

测试本发明化合物在 SD 大鼠和食蟹猴全血中的稳定性

B. 实验操作

将 2 μL 待测化合物（100 μM）的工作液加入到对应的孵育板中，包括 T0、T10、T30、T60、T120 和 T240 孵育板，每个样品准备三个平行孔。然后在已经加入工作液的孵育板中对应的加入 98 μL 的 SD 大鼠

和食蟹猴空白全血。所有的样品在 37°C 水浴锅中进行孵育。待测化合物的最终孵育浓度为 2 μM。每一个孵育时间点结束时，取出相应的孵育板，加入终止液，沉淀蛋白，离心 20 分钟，取 100 μL 上清液用 300 μL 超纯水稀释，混匀后 LC-MS/MS 的方法分析。样品中待测化合物的浓度采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)方法进行半定量测定。

C. 实验结果

实验结果如表 23 所示。

表 24 本发明化合物在 SD 大鼠和食蟹猴全血中稳定性结果

化合物编号	种属	T _{1/2} (min)
PDC_8 的乙酸盐	SD 大鼠	558.6
PDC_8 的乙酸盐	食蟹猴	>578.1

结论：本发明化合物在 SD 大鼠和食蟹猴血浆中具有优异的稳定性。

测试例 10：本发明化合物在食蟹猴和人肝细胞中的代谢稳定性

A. 实验目的

考察本发明化合物在食蟹猴和人肝细胞中的代谢稳定性

B. 实验操作

孵育在 96 孔板中完成，采用外取法。准备若干 96 孔样品沉淀板，分别命名为 T0、T15、T30、T60、T90、T0-MC、T90-MC 和空白基质。提前取出复苏培养液和孵育培养液，放置在 37°C 水浴锅中预热。从液氮罐中取出冻存的食蟹猴和人的肝细胞复苏，用孵育培养液将细胞稀释至 0.51×10⁶ cells/mL。将 198 μL 的肝细胞混悬液(0.5×10⁶ cells/mL)加入到已预热的孵育板中，培养液对照组加入 198 μL 不含肝细胞的孵育培养液至 T0-MC 和 T90-MC 孵育板中，所有孵育板在 37°C 培养箱中预孵育 10 分钟。然后加入 2 μL 供试品工作液，混匀，放入培养箱内的摇板机中孵育。每个时间点准备 3 个重复样本。孵育条件为 37°C、饱和湿度、含 5%CO₂。测试体系中，供试品的终浓度为 1 μM，对照品的终浓度为 3 μM，肝细胞的终浓度为 0.5×10⁶ cells /mL，总有机溶剂的终浓度为 1.0%，其中 DMSO 的终浓度为 0.1%。

相应时间点孵育结束时，取出孵育板，取出 25 μL 化合物与细胞的混合液分别加入到含有 125 μL 终止液的样品板中。对于空白样品板，直接加入 25 μL 不含肝细胞的孵育培养液。所有样品板封膜后在摇板机

上以 600 rpm 摇 10 分钟后，3220 ×g 离心 20 分钟。供试品上清液用纯水以 1:3 的比例稀释。所有样品混匀后用 LC-MS/MS 的方法进行分析。

样品中本发明化合物和的浓度采用液相色谱-串联质谱（LC-MS/MS）方法进行半定量测定，不含标准曲线和质控样品。使用分析物峰面积与内标峰面积的比值来表示样品中的浓度。分析物和内标的保留时间、色谱图采集和色谱图的积分采用软件 Analyst（Sciex, Framingham, Massachusetts, USA）进行处理。

C. 实验结果

实验结果如表 24 所示。

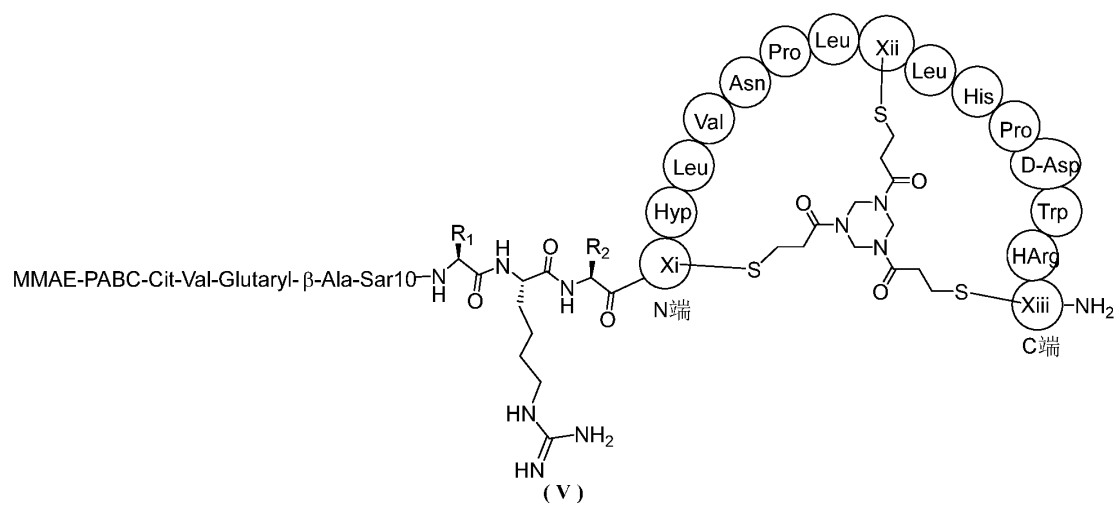
表 25 本发明化合物在食蟹猴和人肝细胞中的代谢稳定性结果

化合物编号	种属	T _{1/2} (min)	CL _{int(肝)} (mL/min/kg)
PDC_8 的乙酸盐	食蟹猴	> 216.8	< 23
PDC_8 的乙酸盐	人	> 216.8	< 17.8

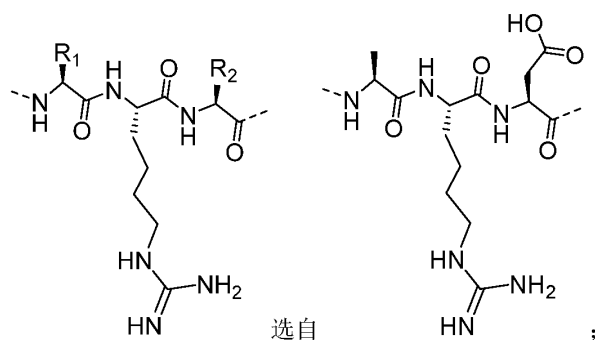
结论：本发明化合物在食蟹猴和人肝微粒体中具有优异的代谢稳定性。

权利要求

1. 式(V)所示化合物或其药学上可接受的盐,

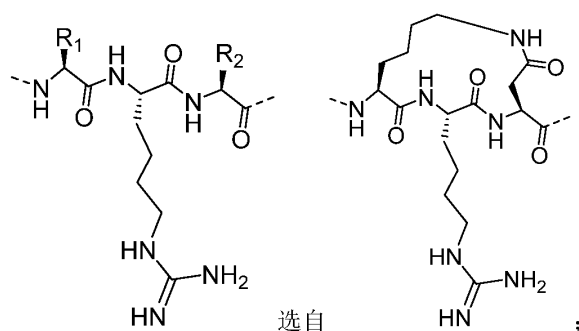


其中,



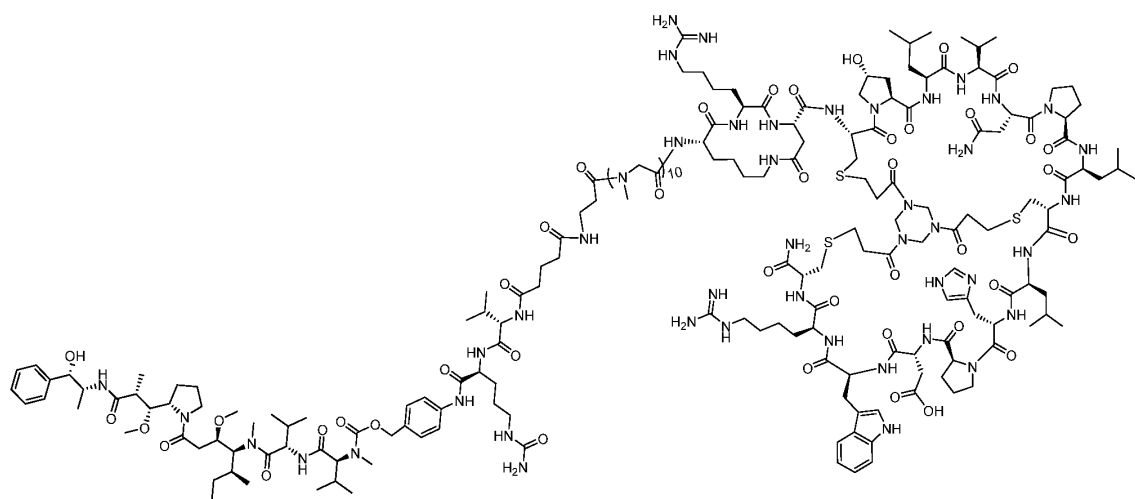
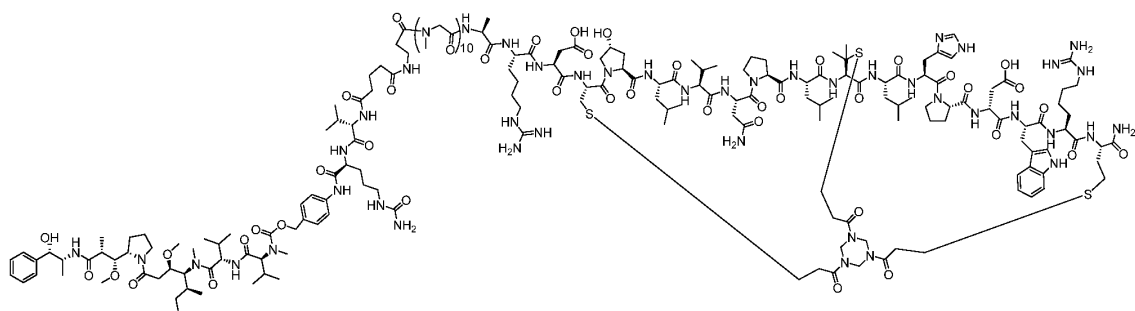
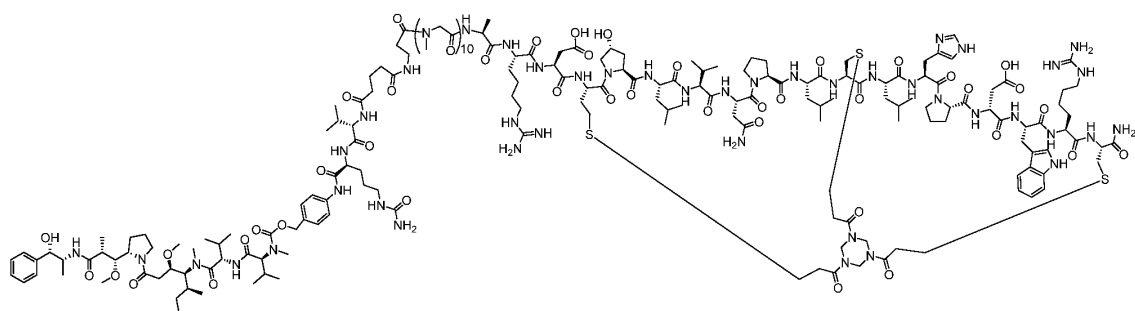
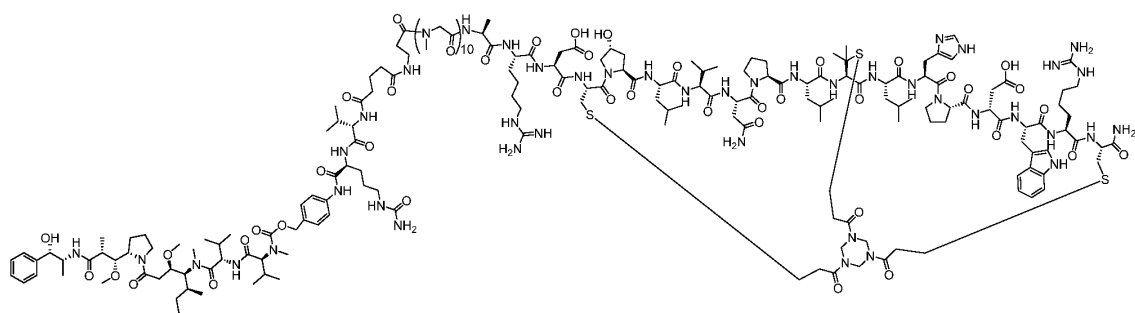
Xi、Xii 和 Xiii 分别独立地选自 Cys、hCys、βCys 和 Pen, 且 Xi、Xii 和 Xiii 不同时为 Cys;

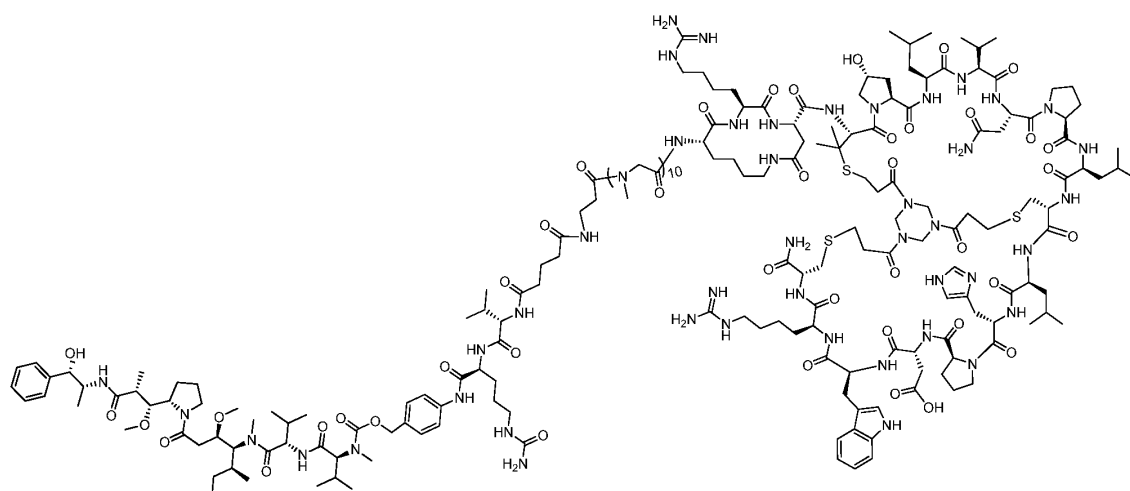
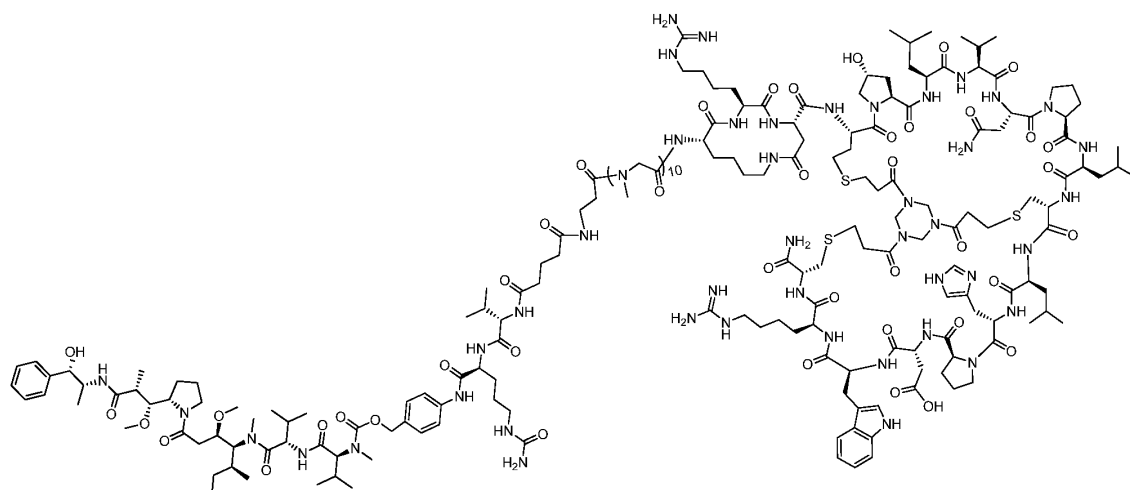
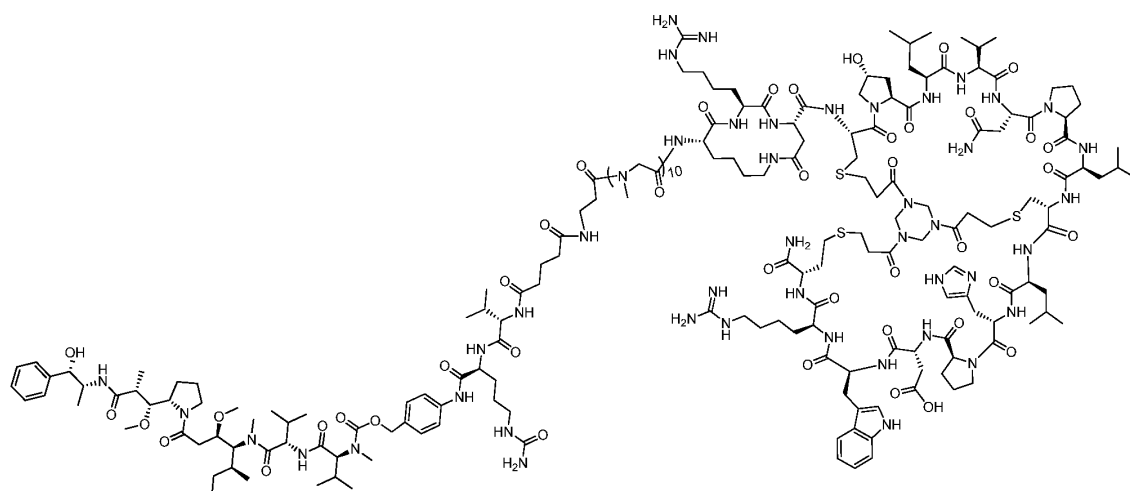
或者,

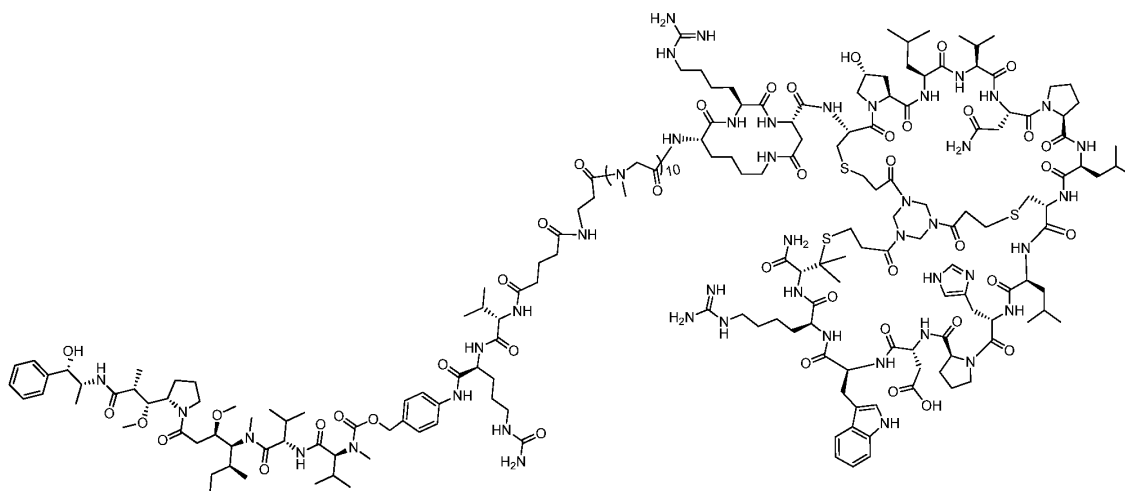


Xi、Xii 和 Xiii 分别独立地选自 Cys、hCys、βCys 和 Pen。

2. 下式所示化合物或其药学上可接受的盐,







3. 根据权利要求 1 或 2 任意一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备治疗 EphA2 过表达的实体瘤的药物上的应用。
4. 一种在需要的受试者中治疗 EphA2 过表达的实体瘤的方法，包括向受试者提供治疗有效量的权利要求 1 或 2 任意一项所述的化合物或其药学上可接受的盐。