

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 47/48 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880015901.0

[43] 公开日 2010 年 3 月 24 日

[11] 公开号 CN 101678124A

[22] 申请日 2008.3.13

[21] 申请号 200880015901.0

[30] 优先权

[32] 2007.3.14 [33] US [31] 60/894,901

[32] 2007.4.13 [33] US [31] 60/911,551

[86] 国际申请 PCT/US2008/056824 2008.3.13

[87] 国际公布 WO2008/112873 英 2008.9.18

[85] 进入国家阶段日期 2009.11.13

[71] 申请人 恩多塞特公司

地址 美国印第安那州

[72] 发明人 I·R·弗拉霍夫 C·P·利蒙
王 羽

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 张 萍 李连涛

权利要求书 7 页 说明书 69 页 附图 7 页

[54] 发明名称

结合配体连接的微管溶素递药缀合物

[57] 摘要

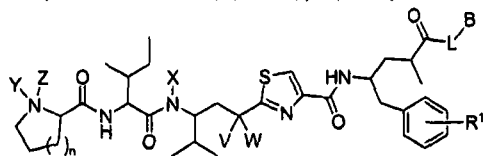
本申请描述了用于治疗致病细胞群体的化合物、药物组合物和方法。本申请所述化合物包括微管溶素和维生素受体结合配体的缀合物。所述缀合物还包括可释放的二价接头。

1. 一种递药缀合物, 其具有下式:

B-L-D

其中 B 为结合配体或靶向配体, L 为可释放接头, D 为微管溶素。

2. 如权利要求 1 的递药缀合物, 其具有下式或是下式的药物盐:



其中

n 为 1-3;

V 为 H、OR²、或卤素; W 为 H、OR²、或烷基, 其中 R² 每次出现时均独立选自 H、烷基和 C(O)R³, 其中 R³ 为烷基、环烷基、烯基、芳基或芳基烷基, 所述基团中的每一基团为任选取代的; 假如 V 和 W 均为 OR², 则 R² 不为 H; 或者 V 和 W 与所连接的碳一起形成羰基;

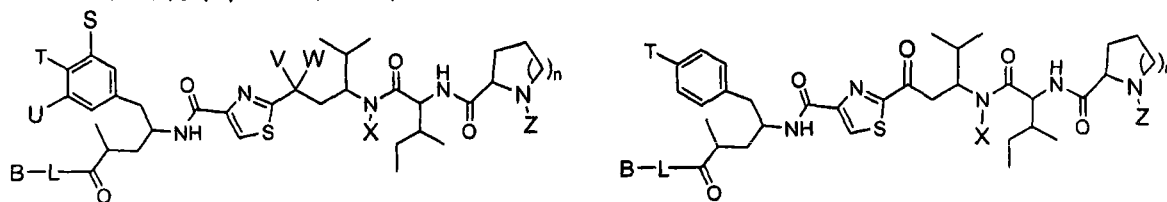
X=H、C₁₋₄ 烷基、烯基, 上述基团中的每一基团为任选取代的, 或是 CH₂QR⁹; 其中 Q 为 -N-、-O-或-S-; R⁹=H、C₁₋₄ 烷基、烯基、芳基或 C(O)R¹⁰; R¹⁰=C₁₋₆ 烷基、烯基、芳基或杂芳基, 上述基团中的每一基团为任选取代的;

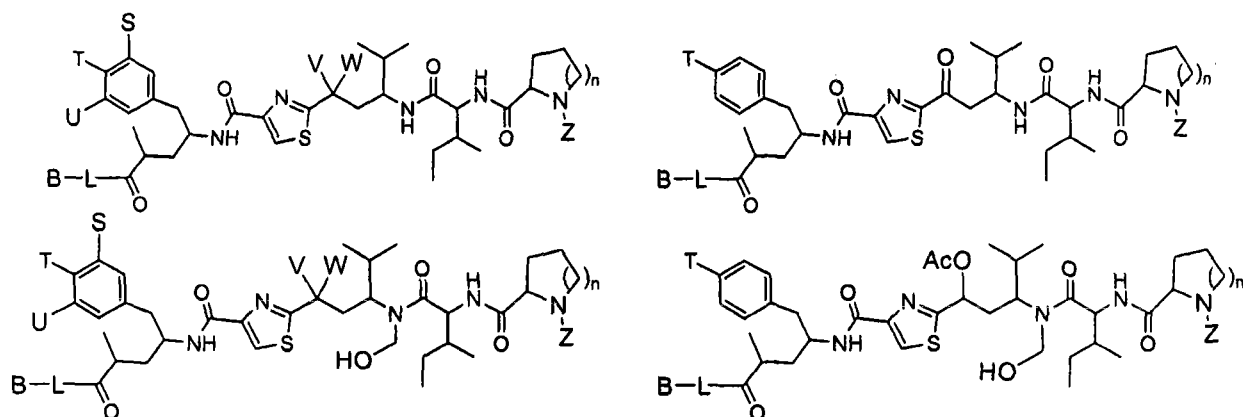
Z 为烷基, Y 为 O; 或 Z 为烷基或 C(O)R⁴, 而 Y 不存在, 其中 R⁴ 为烷基、CF₃ 或芳基;

R¹ 为 H, 或 R¹ 代表 1 至 3 个取代基, 所述取代基选自卤素、硝基、羧酸酯基或其衍生物、氰基、羟基、烷基、卤代烷基、烷氧基、卤代烷氧基、酚保护基、前药部分和 OR⁶, 其中 R⁶ 为任选取代的芳基、C(O)R⁷、P(O)(OR⁸)₂ 或 SO₃R⁸, 其中 R⁷ 和 R⁸ 每次出现时均独立选自 H、烷基、烯基、环烷基、杂环基、芳基和芳基烷基, 上述基团中的每一基团为任选取代的, 或 R⁸ 为金属阳离子; 以及

R 为 OH 或离去基, 或 R 形成羧酸衍生物。

3. 如权利要求 1 的递药缀合物, 其具有下式或是下式的药物盐:





其中

n 为 1-3;

V 为 H 、 OR^2 或卤素; W 为 H 、 OR^2 或烷基, 其中 R^2 每次出现时均独立选自 H 、烷基或 $C(O)R^3$, 其中 R^3 为烷基、烯基或芳基; 假如 V 和 W 均为 OR^2 , 则 R^2 不为 H ; 或者 V 和 W 与所连接的碳一起形成羰基;

$X=H$ 、 C_{1-4} 烷基、烯基, 上述基团中的每一基团为任选取代的, 或者是 CH_2QR^9 ; 其中 Q 为 $-N-$ 、 $-O-$ 或 $-S-$; $R^9=H$ 、 C_{1-4} 烷基、烯基、芳基或 $C(O)R^{10}$; $R^{10}=C_{1-6}$ 烷基、烯基、芳基或杂芳基, 上述基团中的每一基团为任选取代的;

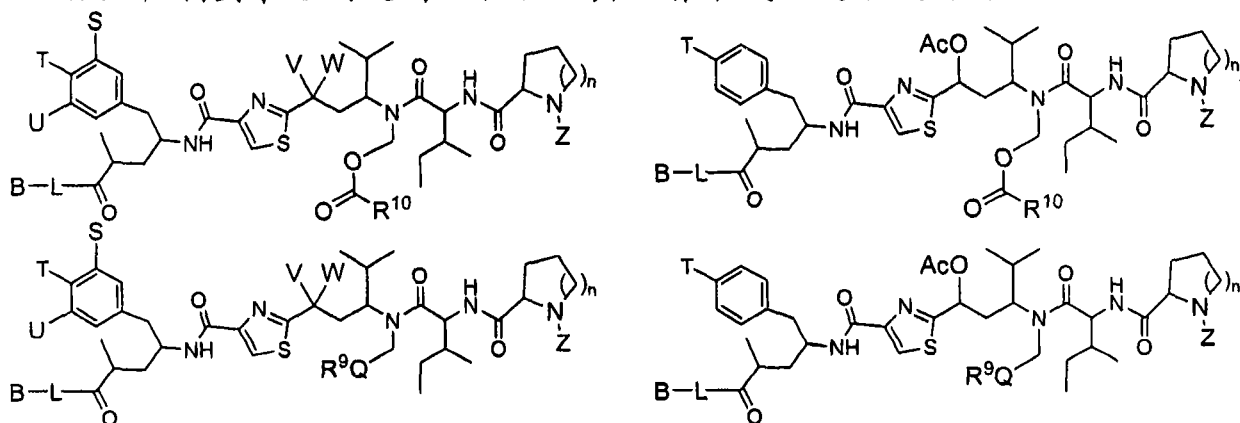
Z 为烷基或 $C(O)R^4$, 其中 R^4 为烷基、 CF_3 或芳基;

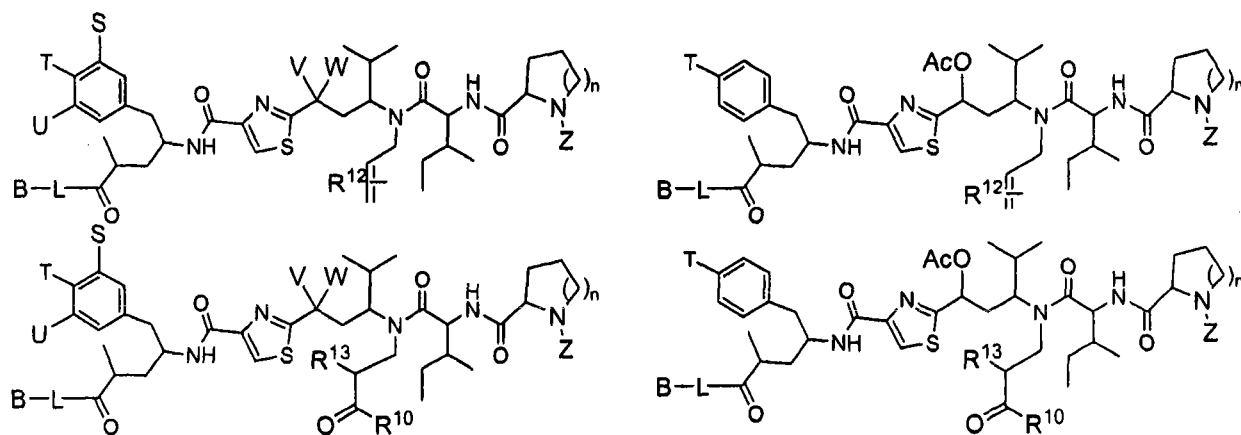
T 为 H 或 OR^6 , 其中 R^6 为 H 、烷基、芳基、 COR^7 、 $P(O)(OR^8)_2$ 或 SO_3R^8 , 其中 R^7 和 R^8 每次出现时均独立选自 H 、烷基、烯基、环烷基、杂环基、芳基和芳基烷基, 上述基团中的每一基团为任选取代的, 或 R^8 为金属阳离子, 或 R^6 为酚保护基或前药部分;

S 和 U 各自独立选自下组基团: H 、卤素、硝基、氰基、烷基、卤代烷基、烷氧基和卤代烷氧基; 以及

R 为 OH 或离去基, 或 R 形成羧酸衍生物。

4. 如权利要求 1 的递药缀合物, 其具有下式或是下式的药物盐:

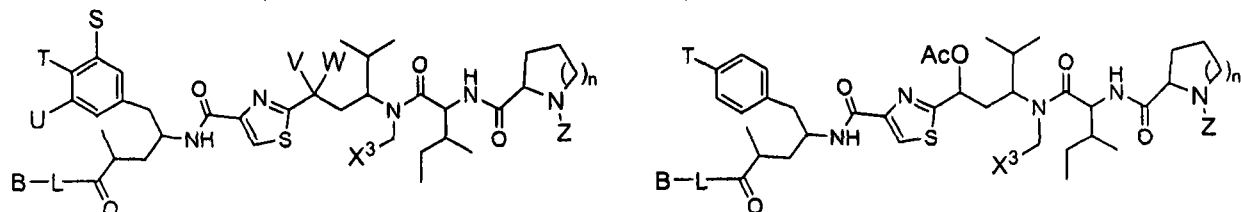




其中

R^{12} 代表 1 或多个选自烷基、烯基、环烷基、芳基和芳基烷基的取代基, 所述基团中的每一基团为任选取代的; R^{13} 为 $C(O)R^{10}$ 、 $C(O)OR^{10}$ 或 CN 。

5. 如权利要求 1 的递药缀合物, 其具有下式或是下式的药物盐:

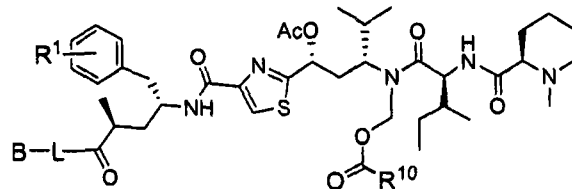


其中

X^3 为卤素、 $OS(O)_2R^{10}$ 、 $OP(O)(OR^{10a})R^{10}$ 或 $OP(O)(OR^{10a})_2$, 其中 R^{10} 和 R^{10a} 每次出现时均独立选自下组基团: H、烷基、烯基、环烷基、芳基和芳基烷基, 所述基团中的每一基团为任选取代的, 或 R^{10a} 为金属阳离子。

6. 如权利要求 1 的递药缀合物, 其特征在于, D 为天然存在的微管溶素或其类似物或衍生物。

7. 如权利要求 1 的递药缀合物, 其具有下式或是下式的药物盐:



其中

R 为 OH 或离去基, 或 R 形成羧酸衍生物;

R^1 为 H, 或 R^1 代表 1 至 3 个取代基, 所述取代基选自卤素、硝基、羧酸酯基或其衍生物、氰基、羟基、烷基、卤代烷基、烷氧基、卤代烷氧基、酚保护基、前药部分和 OR^6 , 其中 R^6 为任选取代的芳基、 $C(O)R^7$ 、 $P(O)(OR^8)_2$ 或 SO_3R^8 , 其中 R^7 和 R^8 每次出现时均独立选自 H、烷基、烯基、环烷基、杂环基、芳基和芳基烷基, 所述基团中的每一基团为任选取代的, 或 R^8 为金属阳离子; 以及

$R^{10} = C_{1-6}$ 烷基、烯基、芳基或杂芳基, 所述基团中的每一基团为任选取代的。

8. 如权利要求 1 至 5 中任一项的递药缀合物, 其特征在于, Z 为甲基。

9. 如权利要求 1 至 5 中任一项的递药缀合物, 其特征在于, R^1 为 H。

10. 如权利要求 1 至 5 中任一项的递药缀合物, 其特征在于, R^1 为位于 C(4) 的 OR^6 , 其中 R^6 为 H、烷基或 COR^7 。

11. 如权利要求 1 至 5 中任一项的递药缀合物, 其特征在于, V 为 H, W 为 $OC(O)R^3$ 。

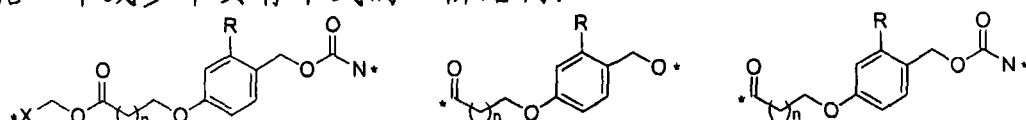
12. 如权利要求 1 至 5 中任一项的递药缀合物, 其特征在于, X 为 $CH_2OC(O)R^{10}$ 。

13. 如权利要求 1 至 7 中任一项的递药缀合物, 其特征在于, 所述可释放接头包括二硫化物。

14. 如权利要求 1 至 7 中任一项的递药缀合物, 其特征在于, 所述可释放接头包括碳酸酯。

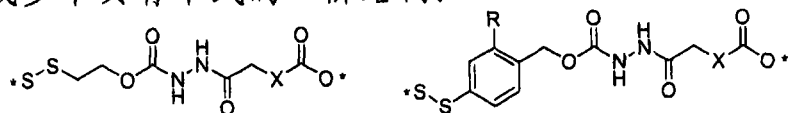
15. 如权利要求 1 至 7 中任一项的递药缀合物, 其特征在于, 所述可释放接头包括酰肼。

16. 如权利要求 1 至 7 中任一项的递药缀合物, 其特征在于, 所述可释放接头包括一个或多个具有下式的二价结构:

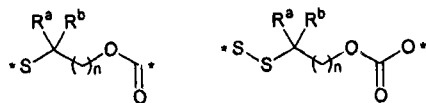


其中 X 为杂原子, 或羰基; n 为 0 至 4 的整数; R 为氢或烷氧基; * 表示开放价。

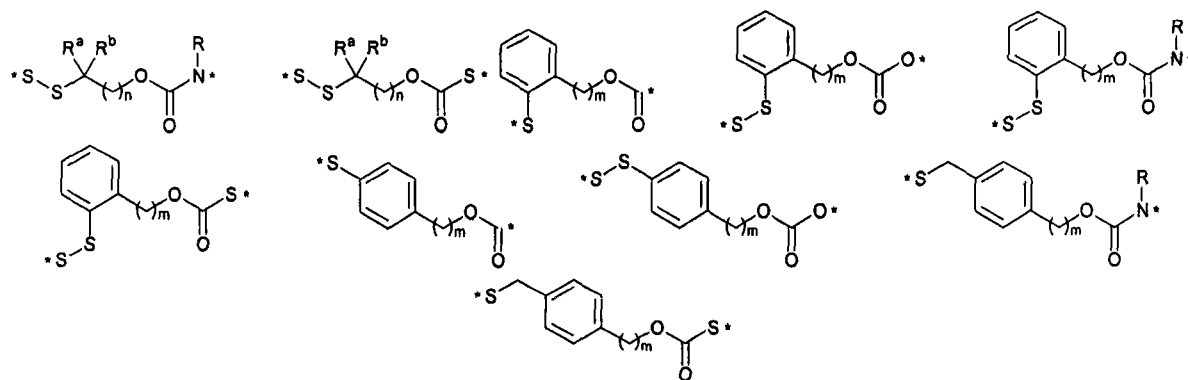
17. 如权利要求 1 至 7 中任一项的递药缀合物, 其特征在于, 所述可释放接头包括一个或多个具有下式的二价结构:



其中 X 为 NH、 CH_2 或 O; R 为氢或烷氧基; * 表示开放价。



18. 如权利要求 1 至 7 中任一项的递药缀合物, 其特征在于, 所述可释放接头包括一个或多个具有下式的二价结构:



其中 m 和 n 为独立选自 1 至约 4 的整数； R^a 和 R^b 各自独立选自下组基团：氢和烷基；或 R^a 和 R^b 与所连接的碳原子一起形成碳环； R 为任选取代的烷基、任选取代的酰基或氮保护基；*表示开放价。

19. 如权利要求 1 至 7 中任一项的递药缀合物，其特征在于，所述可释放接头包括含有 2 至约 20 个氨基酸的肽。

20. 如权利要求 1 至 7 中任一项的递药缀合物，其特征在于，所述可释放接头包括含有 4 至约 8 个氨基酸的肽。

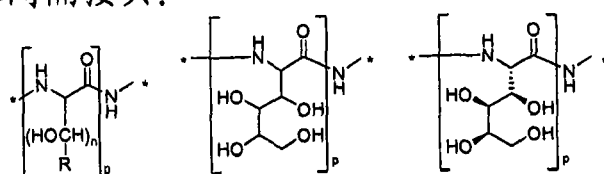
21. 如权利要求 1 至 7 中任一项的递药缀合物，其特征在于，所述可释放接头包括至少 2 个选自下组的氨基酸：天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、鸟氨酸和苏氨酸。

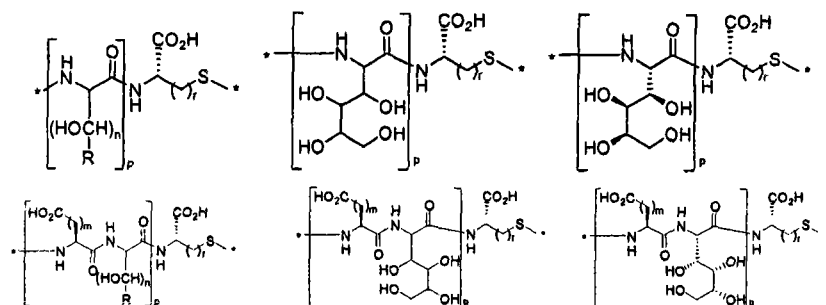
22. 如权利要求 1 至 7 中任一项的递药缀合物，其特征在于，所述可释放接头包括 2 至约 5 个选自下组的氨基酸：天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、鸟氨酸和苏氨酸。

23. 如权利要求 1 至 7 中任一项的递药缀合物，其特征在于，所述可释放接头包括由选自天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸和鸟氨酸及其组合的氨基酸组成的三肽、四肽、五肽、或六肽。

24. 如权利要求 1 至 7 中任一项的递药缀合物，其特征在于，所述可释放接头包括亲水间隔接头。

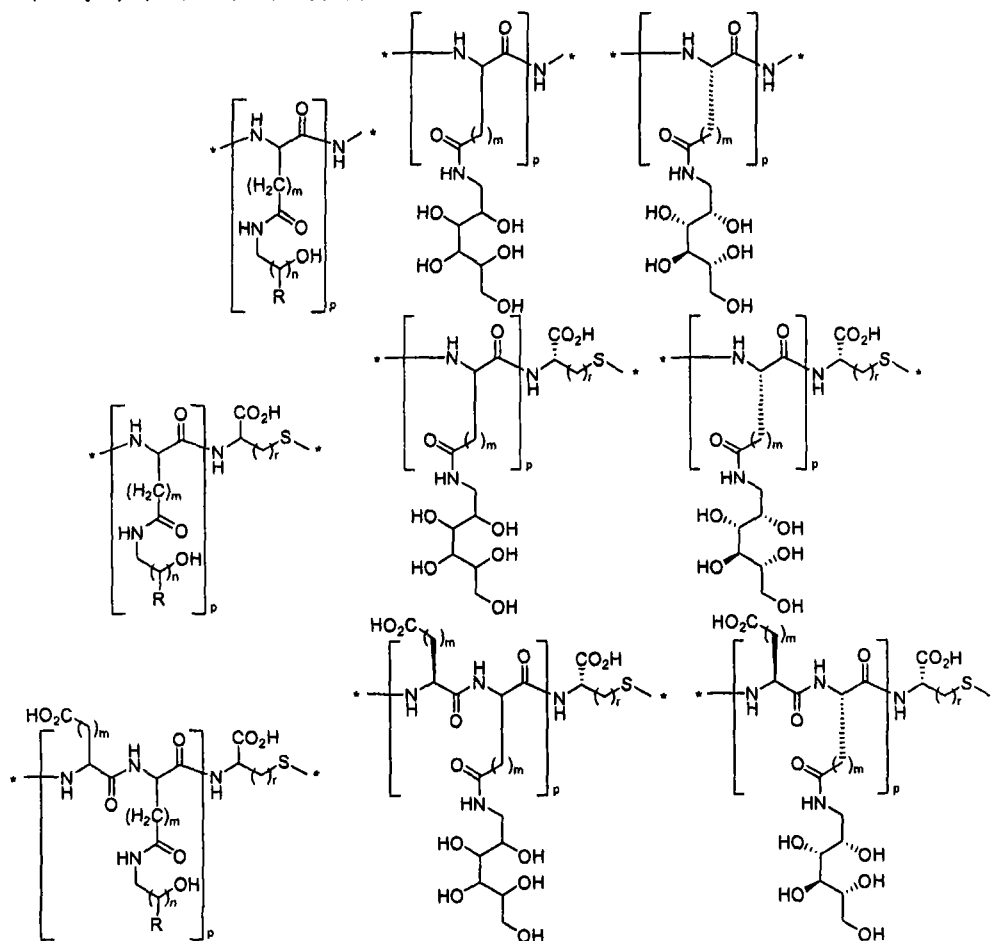
25. 如权利要求 1 至 7 中任一项的递药缀合物，其特征在于，所述可释放接头包括下式的亲水间隔接头：





其中 R 为 H、烷基、环烷基或芳基烷基；m 为 1 至约 3 的整数；n 为 1 至约 5 的整数；p 为 1 至约 5 的整数；r 为选自 1 至约 3 的整数。

26. 如权利要求 1 至 7 中任一项的递药缀合物，其特征在于，所述可释放接头包括下式的亲水间隔接头：



其中 R 为 H、烷基、环烷基或芳基烷基；m 为独立选自 1 至约 3 的整数；n 为 1 至约 6 的整数；p 为 1 至约 5 的整数；r 为 1 至约 3 的整数。

27. 如权利要求 26 的递药缀合物，其特征在于，n 为 3 或 4。

28. 如权利要求 26 的递药缀合物，其特征在于，p 为 3 或 4。

29. 如权利要求 26 的递药缀合物，其特征在于，r 为 1。

30. 如权利要求 1 至 7 中任一项的递药缀合物，其特征在于，所述结合配体 B 为维生素或其维生素受体结合类似物或衍生物。

31. 如权利要求 1 至 7 中任一项的递药缀合物, 其特征在于, 所述结合配体 B 为叶酸或其叶酸受体结合类似物或衍生物。

32. 一种药物组合物, 其包含治疗有效量的如权利要求 1 至 7 中任一项的递药缀合物, 和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂、或其组合。

33. 一种消除带有致病细胞群体的宿主上的致病细胞群体的方法, 其中所述致病细胞群体的成员具有维生素或其维生素受体结合类似物或衍生物可及的结合位点, 其中所述结合位点为所述致病细胞独特表达、过度表达或优先表达的, 所述方法包括给予该宿主治疗有效量的如权利要求 1 至 7 中任一项的递药缀合物或其药物组合物的步骤。

34. 一种递药缀合物, 其包括结合或靶向配体 B、多价可释放接头 L 和一种或多种药物 D, 其中至少一种药物 D 为第一微管溶素, B 和 D 各自共价结合于 L。

35. 如权利要求 34 的递药缀合物, 其具有两种或多种药物 D, 其中至少一种药物 D 不为第二微管溶素。

36. 如权利要求 34 的递药缀合物, 其具有两种或多种药物 D, 其中至少一种药物 D 具有不同于所述第一微管溶素的作用方式。

结合配体连接的微管溶素递药缀合物

相关申请的交叉参考

根据美国的 35 U.S.C. § 119(e), 本申请要求 2007 年 4 月 13 日提交的美国临时专利申请 60/911,551 和 2007 年 3 月 14 日提交的美国临时专利申请 60/894,901 的优先权, 在本申请中引入这些申请中每一项的公开内容整体作为参考。

技术领域

本发明涉及用于靶向递药的组合物和方法。更具体的是, 本发明涉及细胞表面受体结合递药缀合物在治疗由致病细胞群体引起的病症中的用途, 以及使用并包括所述缀合物的方法和药物组合物。

技术背景

哺乳动物的免疫系统提供了一种识别和清除肿瘤细胞、其它致病细胞和入侵的外来病原体的工具。尽管免疫系统通常提供强大的防护线, 但在许多情况下肿瘤细胞、其它致病细胞或感染因子逃避宿主的免疫应答并增殖, 或伴随着对宿主的致病性而持续存在。已经开发出许多化疗药和放射疗法用于清除例如复制中的肿瘤。然而, 许多目前可用的化疗药和放疗方案都具有不良副作用, 因为它们发挥作用不仅破坏致病细胞, 它们也影响正常的宿主细胞例如造血系统的细胞。这些抗癌药的不良副作用凸显出对开发具有致病细胞群体选择性和降低的宿主毒性的新疗法的需求。

研究者已经开发出通过使细胞毒化合物靶向所述细胞来破坏致病细胞的治疗方案。这些方案中的许多方案利用与抗体缀合的毒素, 所述抗体与只有致病细胞才有的或被该致病细胞过量表达的抗原结合, 从而试图最大程度减少毒素至正常细胞的递送。使用这种方案, 已经开发出由抗致病细胞上的特异性抗原的抗体组成的某些免疫毒素, 这些抗体连接于毒素例如蓖麻毒素、假单胞菌外毒素、白喉毒素和肿瘤坏死因子。这些免疫毒素靶向带有被所述抗体识别的特异性抗原的致病细胞, 例如肿瘤细胞(Olsnes, S., *Immunol. Today*, 10, pp. 291-295,

1989; Melby, E.L., *Cancer Res.*, 53(8), pp. 1755-1760, 1993; Better, M.D., PCT 公开号 WO 91/07418, 公开于 1991 年 5 月 30 日)。

另一种靶向宿主中致病细胞群体例如癌细胞或外来病原体的方法是, 增强宿主抵抗致病细胞的免疫应答以避免给予化合物, 所述化合物可能也表现独立的宿主毒性。一种已经报道的免疫疗法的策略是将抗体, 例如基因工程多聚体抗体, 结合至肿瘤细胞的表面, 从而使抗体的恒定区展示在所述细胞表面并因此诱导肿瘤细胞被多种免疫系统介导的过程杀伤(De Vita, V.T., *Biologic Therapy of Cancer*, 2d ed. Philadelphia, Lippincott, 1995; Soullillou, J.P., 美国专利 5,672,486)。然而, 由于定义肿瘤特异性抗原非常困难, 因此上述方法很复杂。

微管溶素(tubulysins)是微管蛋白聚合的一组强效抑制剂。微管溶素用于治疗包括致病细胞群体的疾病和疾病状态, 例如癌症。分枝杆菌的两个特定的种在发酵过程中合成高滴度的微管溶素。一个种即过渡原囊粘菌(*Archangium gephyra*), 产生微管溶素 A、B、C、G 和 I 作为主要组分因子, 其中每一种由其所包括的微管酪氨酸(tubutyrosine, Tut, 一种酪氨酸类似物)残基来表征。相比之下, 另一种物种, 即碟形囊球粘菌(*Angiococcus disciformis*), 产生微管溶素 D、E、F 和 H 作为主要组分因子, 其中每一种由其所包括的微管苯丙氨酸(tubuphenylalanine, Tup, 一种苯丙氨酸类似物)残基来表征。所述细菌发酵是微管溶素的便利的来源。

发明概述

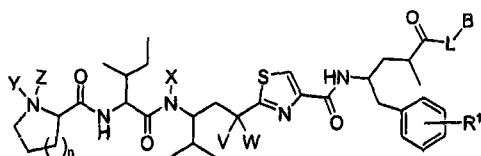
在本发明的一个说明性实施方式中, 描述了具有式

B-L-D

的微管溶素缀合物, 其中 B 为结合或靶向配体, L 为可释放的接头, D 为微管溶素或其类似物或衍生物。应当理解的是, 本申请所用的术语微管溶素是指单独的和/或全体的天然存在的微管溶素、合成制备的微管溶素, 以及这些化合物的类似物和衍生物。

在另一实施方式中, 微管溶素缀合物包含结合或靶向配体 B、多价的可释放接头 L 和一种或多种所述药物 D, 其中至少一种药物 D 为第一微管溶素, 并且 B 和 D 各自共价结合于 L。

在另一实施方式中, 描述了具有下式的微管溶素缀合物和其药物盐,



其中 B 为结合或靶向配体, L 为可释放接头,

n 为 1-3;

V 为 H、OR²、或卤素, W 为 H、OR²、或烷基, 其中 R² 每次出现时均独立选自 H、烷基和 C(O)R³, 其中 R³ 为烷基、环烷基、烯基、芳基或芳基烷基, 所述基团中的每一基团为任选取代的; 假如 V 和 W 均为 OR², 则 R² 不为 H; 或 V 和 W 与所连接的碳一起形成羰基;

X=H、C₁₋₄ 烷基、烯基, 上述基团中的每一基团为任选取代的, 或者是 CH₂QR⁹; 其中 Q 为 -N-、-O-或-S-; R⁹=H、C₁₋₄ 烷基、烯基、芳基或 C(O)R¹⁰, R¹⁰=C₁₋₆ 烷基、烯基、芳基或杂芳基, 上述基团中的每一基团为任选取代的;

Z 为烷基, Y 为 O; 或 Z 为烷基或 C(O)R⁴, 而 Y 不存在, 其中 R⁴ 为烷基、CF₃ 或芳基;

R¹ 为 H, 或 R¹ 代表 1 至 3 个取代基, 所述取代基选自卤素、硝基、羧酸酯基或其衍生物、氰基、羟基、烷基、卤代烷基、烷氧基、卤代烷氧基、酚保护基、前药部分和 OR⁶, 其中 R⁶ 为任选取代的芳基、C(O)R⁷、P(O)(OR⁸)₂ 或 SO₃R⁸, 其中 R⁷ 和 R⁸ 每次出现时均独立选自 H、烷基、烯基、环烷基、杂环基、芳基和芳基烷基, 所述基团中的每一基团为任选取代的, 或 R⁸ 为金属阳离子; 以及

R 为 OH 或离去基, 或 R 形成羧酸衍生物。

在另一实施方式中, 描述了天然存在的微管溶素的缀合物, 所述微管溶素通过任选的可释放接头 L 缀合于结合或靶向配体。

在另一实施方式中, 所述缀合物以治疗与致病细胞群体相关的疾病和疾病状态的有效量包含于药物组合物中。

在另一实施方式中, 所述缀合物以及包含所述缀合物的药物组合物用于治疗与致病细胞群体相关的疾病和疾病状态的方法中。

附图简述

图 1 显示 EC0305 在 2 小时脉冲和 72 小时追踪后表现出对 KB 细胞的剂量-响应行为和对叶酸受体的特异性: (●) EC0305 (IC₅₀ ~ 1.5 nM), (○) EC0305+过量的叶酸。

图 2 显示 EC0305 在多种物种上表现低的血清结合: (a)人、(b)犬、(c)Balb/c 小鼠、(d)大鼠、(e)兔和(f)胎牛血清。人血清结合为 67%。

图 3 显示测试 EC0305 在人血清中的稳定性, EC0305 表现约 20 小时的半衰期。

图 4 显示 EC0305 在 10%血清/FDRPMI 中的相对亲和力试验结果: (●)叶酸, 相对亲和力=1; (■) EC0305, 相对亲和力=0.96。

图 5 显示与对照相比, 在两周方案中以多种剂量每周三次(TIW)给药的 EC305 对 KB 肿瘤的活性: (●) PBS 治疗的对照, (○) EC0305 2 $\mu\text{mol/kg}$ TIW (5/5 完全响应), (■) EC0305 1 $\mu\text{mol/kg}$ TIW (5/5 完全响应), (▲) EC0305 0.5 $\mu\text{mol/kg}$ TIW (1/5 完全响应), (□) EC0305 1 $\mu\text{mol/kg}$ TIW + EC-20 (铈) 40 $\mu\text{mol/kg}$ TIW (0/5 完全响应)。垂直点状线表示给药的最后天数。

图 6 显示与对照相比, 对经治疗动物的体重变化百分数的检测: (●) PBS 治疗的对照, (○) EC0305 2 $\mu\text{mol/kg}$ TIW, (■) EC0305 1 $\mu\text{mol/kg}$ TIW, (▲) EC0305 0.5 $\mu\text{mol/kg}$ TIW, (□) EC0305 1 $\mu\text{mol/kg}$ TIW + EC-20 (铈) 40 $\mu\text{mol/kg}$ TIW。垂直点状线表示给药的最后天数。

图 7 显示与对照相比, 在两周方案中以多种剂量给药 2 $\mu\text{mol/kg}$ TIW 的 EC305 对 M109 肿瘤的活性: (●) PBS 治疗的对照, (■) EC0305 (5/5 完全有效)。垂直点状线表示给药的最后天数。

图 8 显示与对照相比, 治疗的动物的体重变化百分数: (●) PBS 治疗的对照, (■) EC0305。垂直点状线表示给药的最后天数。

图 9 显示与对照相比, 未缀合的微管溶素 B 在可耐受的和高毒性剂量水平下均不存在有效性 (0/5 完全或部分响应): (●) PBS 治疗的对照, (○) 0.5 $\mu\text{mol/kg}$ TIW, (▲) 0.2 $\mu\text{mol/kg}$ TIW, (■) 0.1 $\mu\text{mol/kg}$ TIW。

图 10 显示与对照相比, 采用可耐受的和高毒性剂量水平的未缀合微管溶素 B 治疗的动物的体重变化百分数: (●) PBS 治疗的对照, (○) 0.5 $\mu\text{mol/kg}$ TIW, (▲) 0.2 $\mu\text{mol/kg}$ TIW, (■) 0.1 $\mu\text{mol/kg}$ TIW。

图 11 显示与长春花生物碱缀合物 EC145 相比以及与对照相比, 微管溶素缀合物 EC0305 的相对活性, 微管溶素缀合物 EC0305 和长春花生物碱缀合物 EC145 二者均在两周中以 2 $\mu\text{mol/kg}$ TIW 给药: (●) PBS 处理过的对照, (○) EC145 (2/5 完全响应), (■) EC0305 (5/5 完全响应)。垂直点状线表示给药的最后天数。

图 12 显示与对照相比,微管溶素缀合物 EC0305 和 EC0436 在 M109 肿瘤上的相对活性,二者均以 2 $\mu\text{mol/kg}$ 每周给药三次,持续 2 周:(a) PBS 处理过的对照,(b) EC0305 (4/5 完全响应),(c) EC0436 (5/5 完全响应)。垂直点状线表示给药的最后天数。

图 13 显示与对照相比,处理过的动物的体重变化百分数:(●) PBS 处理过的对照,(□)是 EC0305 (TIW 2 $\mu\text{mol/kg}$, 2 周),(■)是 EC0436 (TIW 2 $\mu\text{mol/kg}$, 2 周)。垂直点状线表示给药的最后天数。

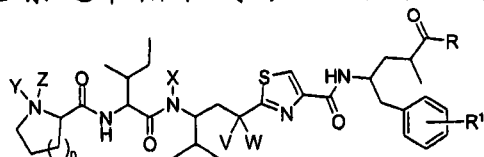
图 14 显示与对照相比,处理过的 Balb/c 小鼠的体重变化百分数,所述处理为一周三次静脉内给予多种剂量的 EC0436 和 EC0305 持续一周:(●) PBS 处理过的对照,(▲) 2 $\mu\text{mol/kg}$ TIW EC0436,(▼) 2.5 $\mu\text{mol/kg}$ TIW EC0436,(■) 3 $\mu\text{mol/kg}$ TIW EC0436,(△) 2 $\mu\text{mol/kg}$ TIW EC0305,(▽) 2.5 $\mu\text{mol/kg}$ TIW EC0305,(□) 3 $\mu\text{mol/kg}$ EC0305。垂直点状线表示给药的最后天数。

发明详述

本发明所述递药缀合物由结合配体(B)、二价接头(L)和微管溶素(D) (包括其类似物和衍生物)组成。结合配体(B)共价连接于二价接头(L),微管溶素或其类似物或衍生物也共价连接于二价接头(L)。二价接头(L)包括一个或多个间隔接头和/或可释放接头,及其以任何次序排列的组合。在一变化方式中,可释放接头和任选的间隔接头互相共价结合形成接头。在另一变化方式中,可释放接头直接连接于微管溶素或其类似物或衍生物。在另一变化方式中,可释放接头直接连接于结合配体。在另一变化方式中,结合配体和微管溶素或其类似物或衍生物中的一个或者二者均通过一个或多个间隔接头连接于可释放接头。在另一变化方式中,结合配体和微管溶素或其类似物或衍生物中的每一个都连接于可释放接头,其中的每一个也可直接互相连接,或通过一个或多个间隔接头共价连接。如前所述,应该理解的是,结合配体和微管溶素或其类似物或衍生物、以及多种可释放的和任选的间隔接头的排列的可变化性很大。一方面,结合配体和微管溶素或其类似物或衍生物、以及多种可释放的和任选的间隔接头通过杂原子互相连接,所述杂原子例如氮、氧、硫、磷、硅等。在变化方式中,所述杂原子除氧外,可为不同氧化状态,例如 N(OH)、S(O)、S(O)₂、P(O)、P(O)₂、P(O)₃ 等。在其它变化方式中,所述杂原子可化合形成二价基,例如羟胺、肼、胂、磺酸酯、亚磷酸酯、磷酸酯等。

一方面,受体结合配体(B)为维生素或其类似物或衍生物,或另一种维生素受体结合化合物。

本发明所用的微管溶素通常指下式的四肽化合物和其药物盐,



其中

n 为 1-3;

V 为 H、OR² 或卤素, W 为 H、OR² 或烷基, 其中 R² 每次出现时均独立选自 H、烷基和 C(O)R³, 其中 R³ 为烷基、环烷基、烯基、芳基或芳基烷基, 所述基团中的每一基团为任选取代的; 假如 V 和 W 均为 OR² 时, 则 R² 不为 H; 或者 V 和 W 与所连接的碳一起形成羰基

X=H、C₁₋₄ 烷基、烯基, 上述基团中的每一基团为任选取代的, 或者是 CH₂QR⁹, 其中 Q 为 -N-、-O- 或 -S-; R⁹=H、C₁₋₄ 烷基、烯基、芳基或 C(O)R¹⁰, R¹⁰=C₁₋₆ 烷基、烯基、芳基或杂芳基, 上述基团中的每一基团为任选取代的;

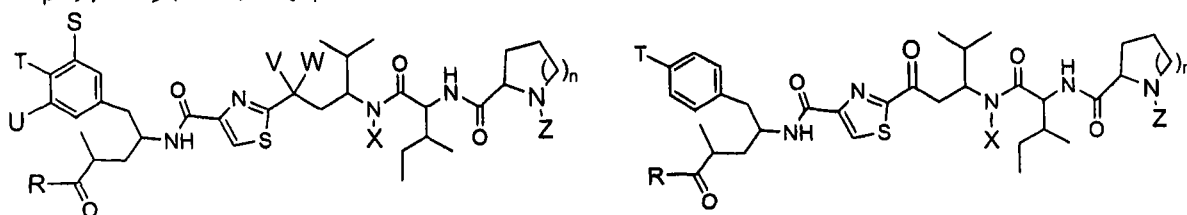
Z 为烷基, Y 为 O; 或 Z 为烷基或 C(O)R⁴, 而 Y 不存在, 其中 R⁴ 为烷基、CF₃ 或芳基;

R¹ 为 H, 或 R¹ 代表 1 至 3 个取代基, 所述取代基选自卤素、硝基、羧酸酯基或其衍生物、氰基、羟基、烷基、卤代烷基、烷氧基、卤代烷氧基、酚保护基、前药部分和 OR⁶, 其中 R⁶ 为任选取代的芳基、C(O)R⁷、P(O)(OR⁸)₂ 或 SO₃R⁸, 其中 R⁷ 和 R⁸ 每次出现时均独立选自 H、烷基、烯基、环烷基、杂环基、芳基和芳基烷基, 所述基团中的每一基团为任选取代的, 或 R⁸ 为金属阳离子; 以及

R 为 OH 或离去基, 或 R 形成羧酸衍生物。

本发明描述了前述的微管溶素中每一种的缀合物。在一变化方式中, Z 为甲基。在另一变化方式中, R¹ 为 H。在另一变化方式中, R¹ 为位于 C(4) 的 OR⁶, 其中 R⁶ 为 H、烷基或 COR⁷。在另一变化方式中, V 为 H, W 为 OC(O)R³。

在另一实施方式中, 描述了下列通式的微管溶素缀合物和其药物盐,



其中

n 为 1-3;

V 为 H、OR² 或卤素, W 是 H、OR² 或烷基, 其中 R² 每次出现时均独立选自 H、烷基或 C(O)R³, 其中 R³ 为烷基、烯基或芳基; 假如 V 和 W 均为 OR² 时, 则 R² 不为 H; 或 V 和 W 与所连接的碳一起形成羰基。

X=H、C₁₋₄ 烷基、烯基, 上述基团中的每一基团为任选取代的、或者是 CH₂QR⁹, 其中 Q 为 -N-、-O-、或 -S-, R⁹=H、C₁₋₄ 烷基、烯基、芳基或 C(O)R¹⁰, R¹⁰=C₁₋₆ 烷基、烯基、芳基或杂芳基, 上述基团中的每一基团为任选取代的;

Z 为烷基或 C(O)R⁴, 其中 R⁴ 为烷基、CF₃ 或芳基;

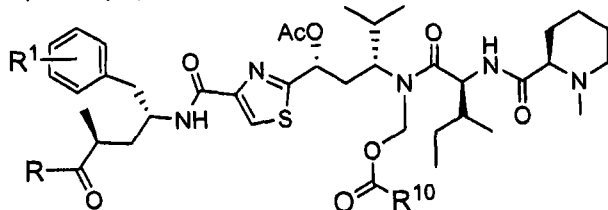
T 为 H 或 OR⁶, 其中 R⁶ 为 H、烷基、芳基、COR⁷、P(O)(OR⁸)₂ 或 SO₃R⁸, 其中 R⁷ 和 R⁸ 每次出现时均独立选自 H、烷基、烯基、环烷基、杂环基、芳基和芳基烷基, 所述基团中的每一基团为任选取代的, 或 R⁸ 为金属阳离子, 或 R⁶ 为酚保护基或前药部分;

S 和 U 各自独立选自下列基团: H、卤素、硝基、氰基、烷基、卤代烷基、烷氧基和卤代烷氧基; 以及

R 为 OH 或离去基, 或 R 形成羧酸衍生物。

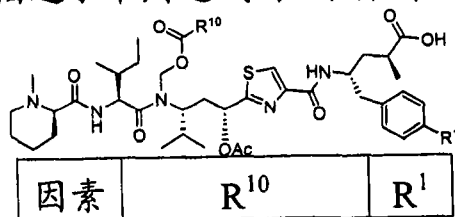
在一变化方式中, Z 为甲基或 C(O)R⁴。

天然微管溶素通常为线性四肽, 由 *N*-甲基-2-哌啶酸 (Mep)、异亮氨酸(Ile)、被称为微管缬氨酸(tubuvalin, Tuv)的非天然氨基酸、和被称为微管酪氨酸(tubutyrosine, Tut, 酪氨酸的类似物)的非天然氨基酸或被称为微管苯丙氨酸(tubuphenylalanine, Tup, 苯丙氨酸的类似物)的非天然氨基酸组成。在另一实施方式中, 描述了下列通式的天然微管溶素和其类似物及衍生物, 及其药物盐,



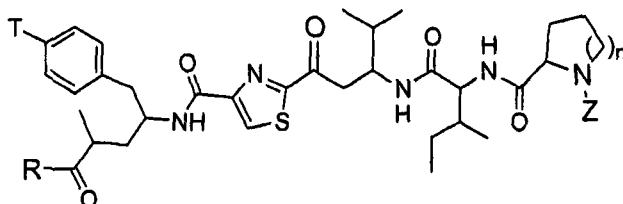
其中, R、R¹ 和 R¹⁰ 在本发明的多个实施方式中均有描述。本发明描述了前述的微管溶素中每一种的缀合物。

在另一实施方式中, 描述了下列通式的天然微管溶素的缀合物和其药物盐,



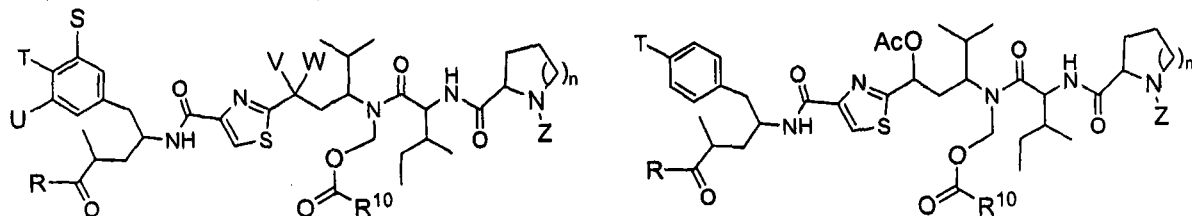
A	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$	OH
B	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2$	OH
C	CH_3CH_2	OH
D	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$	H
E	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2$	H
F	CH_2CH_3	H
G	$(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}$	OH
H	CH_3	H
I	CH_3	OH

在另一实施方式中，描述了下式微管溶素的缀合物和其药物盐：



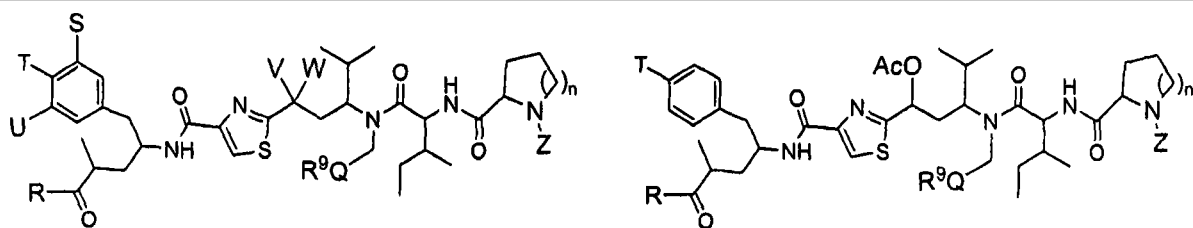
其中 n 为 1-3, T 为 H 或 OR^6 , 其中 R^6 为 H、烷基、芳基、 COR^7 、 $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^8)_2$ 、或 SO_3R^8 , 其中 R^7 和 R^8 每次出现时均独立选自 H、烷基、烯基、环烷基、杂环基、芳基和芳基烷基, 所述基团中的每一基团为任选取代的, 或 R^8 为金属阳离子, 或 R^6 为酚保护基或前药部分; Z 为烷基或 $\text{C}(\text{O})\text{R}^4$, 其中 R^4 为烷基、 CF_3 、或芳基; R 为 OH 或离去基, 或 R 形成羧酸衍生物。所述化合物的说明性实例以及它们的制备描述于 J. Med. Chem. 10.1021/jm701321p (2008) 中, 本发明以参考的方式引入所述出版物的公开内容。

在另一实施方式中，描述了下式的微管溶素的缀合物和其药物盐：



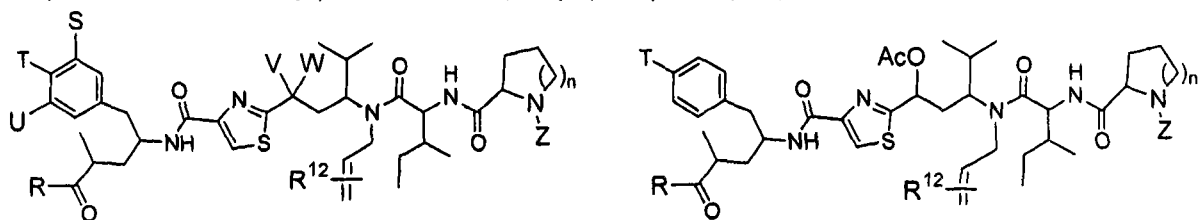
其中 n 、 S 、 T 、 U 、 V 、 W 、 Z 、 R 和 R^{10} 在本发明的多个实施方式中均有描述。

在另一实施方式中，描述了下式的微管溶素的缀合物和其药物盐：



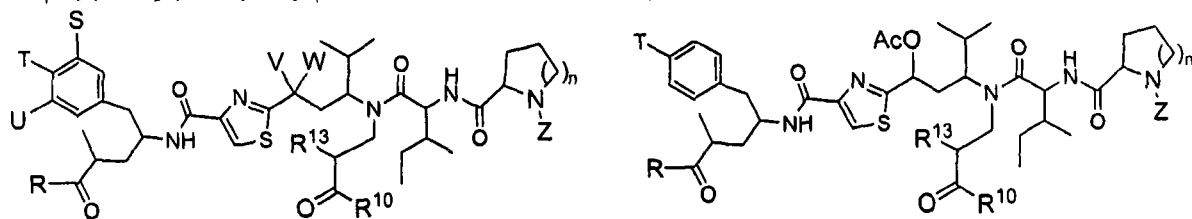
其中 n 、 S 、 T 、 U 、 V 、 W 、 Z 、 QR^9 和 R 在本发明的多个实施方式中均有描述。在一变化方式中， Q 为 $-N-$ 、 $-O-$ 、或 $-S-$ ； R^9 为 H 、烷基、烯基、环烷基、芳基或芳基烷基，所述基团中的每一基团为任选取代的。在另一变化方式中， QR^9 一起形成 $C(O)R^{10}$ 、 $S(O)_2R^{10}$ 、 $P(O)(OR^{10a})_2$ ，其中 R^{10} 和 OR^{10a} 每次出现时均独立选自下组基团： H 、烷基、烯基、环烷基、芳基和芳基烷基，所述基团中的每一基团为任选取代的，或 R^{10a} 为金属阳离子。

在另一实施方式中，描述了下式的微管溶素的缀合物和其药物盐：



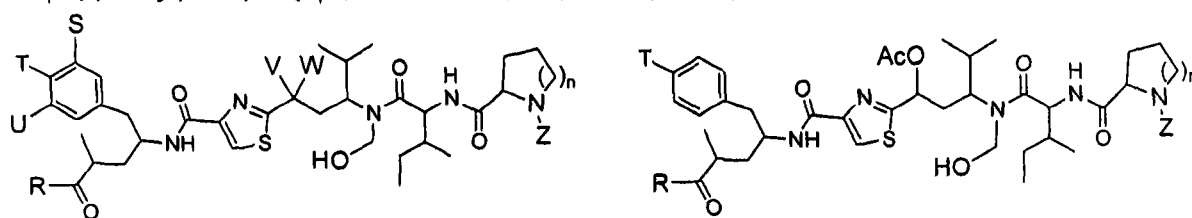
其中 R^{12} 代表 1 或多个取代基，所述取代基选自烷基、烯基、环烷基、芳基和芳基烷基、任选取代的所述基团的每一基团；其中 n 、 S 、 T 、 U 、 V 、 W 、 Z 和 R 在本发明的多个实施方式中均有描述。应当理解的是，其它烯烃可能通过异构化形成，取决于反应的条件和 R^1 的特性。例如，若 R^1 为烷基，应当理解的是，在反应条件下，双键可能沿着烯基链迁移至其它碳原子，包括形成末端或 ω -烯烃。

在另一实施方式中，描述了下式的微管溶素的缀合物和其药物盐：

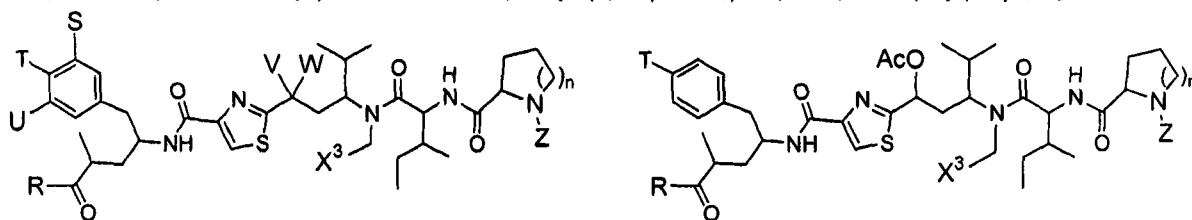


其中 R^{13} 为 $C(O)R^{10}$ 、 $C(O)OR^{10}$ 或 CN ；其中 n 、 S 、 T 、 U 、 V 、 W 、 Z 、 R 和 R^{10} 均在本发明的多个实施方式中有描述，其中 R^{10} 每次出现时均独立选择。

在另一实施方式中，描述了下式的微管溶素的缀合物和其药物盐：



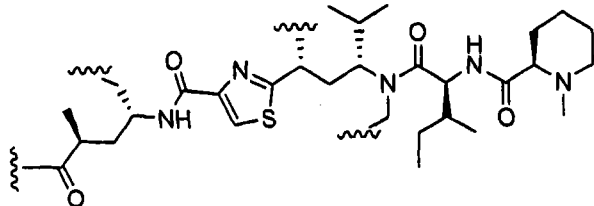
其中 n、S、T、U、V、W、Z 和 R 在本发明的多个实施方式中均有描述。
在另一实施方式中，描述了下式的微管溶素的缀合物和其药物盐：



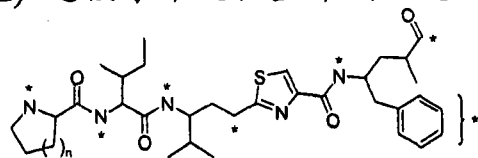
其中 X^3 为卤素、 $OS(O)_2R^{10}$ 、 $OP(O)(OR^{10a})R^{10}$ 或 $OP(O)(OR^{10a})_2$ ；其中 R^{10} 和 R^{10a} 每次出现时均独立选自下组基团：H、烷基、烯基、环烷基、芳基和芳基烷基，所述基团中的每一基团为任选取代的，或 R^{10a} 为金属阳离子；其中 n、S、T、U、V、W、Z 和 R 在本发明的多个实施方式中均有描述。

此外，本发明所述用于制备缀合物的微管溶素在美国专利申请 2006/0128754 和 2005/0239713 中有描述，本发明以参考方式引入所述专利申请的公开内容。此外，本发明所述用于制备缀合物的微管溶素在共同待批的美国临时申请系列号 60/982,595 和 61/036,176 中有描述，本发明以参考方式引入所述申请的公开内容。微管溶素也可按照 Peltier 等人在“*The Total Synthesis of Tubulysin D*,” J. Am. Chem. Soc. 128:16018-19 (2006) 中所述方法制备，本发明以参考方式引入所述文献的公开内容。

在如前所述每一个实施方式中，应当理解的是，在一变化方式中，多种结构式的化合物在所标明的不对称主链碳原子处具有下列的绝对构型：

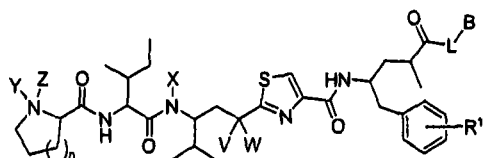


应当理解的是，微管溶素或其类似物或衍生物的缀合物可在任何位置形成。例如，记载了二价接头(L) 连接于下述位置中的任意位置的微管溶素缀合物：



其中符号(*) 表示任意的连接位置。

在另一实施方式中，缀合物从微管溶素或其类似物或衍生物的羧酸衍生物形成。微管溶素的说明性羧酸缀合物衍生物由下列通式和其药物盐来代表：



其中

B 为结合配体；

L 为接头，其中 L 包括共价连接于微管溶素的杂原子接头，例如氧、氮或硫杂原子；

n 为 1-3；

V 为 H、OR² 或卤素；W 为 H、OR² 或烷基，其中 R² 每次出现时均独立选自 H、烷基或 C(O)R³，其中 R³ 为烷基、烯基或芳基；假如 V 和 W 均为 OR² 时，则 R² 不为 H；或 V 和 W 与所连接的碳一起形成羰基；

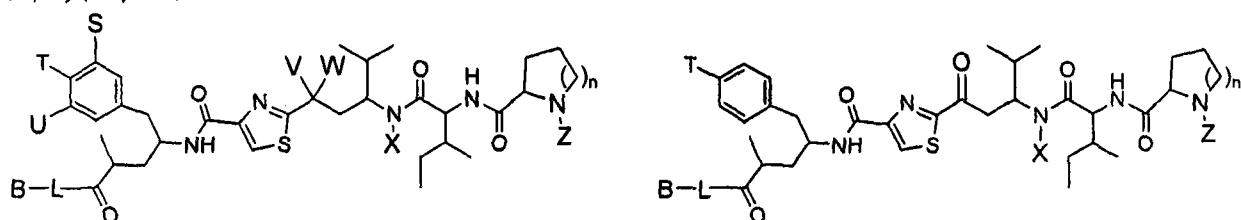
X=H、C₁₋₄ 烷基，烯基，所述基团中的每一基团为任选取代的、或者是 CH₂QR⁹，其中 Q 为 -N-、-O- 或 -S-，R⁹=H、C₁₋₄ 烷基、烯基、芳基或 C(O)R¹⁰，R¹⁰=C₁₋₆ 烷基、烯基、芳基或杂芳基，所述基团中的每一基团为任选取代的；

Z 为烷基，Y 为 O；或 Z 为烷基或 C(O)R⁴，Y 不存在，其中 R⁴ 为烷基、CF₃ 或芳基；

R¹ 为 H，或 R¹ 代表 1 至 3 个取代基，所述取代基选自卤素、硝基、羧酸酯基或其衍生物、氰基、羟基、烷基、卤代烷基、烷氧基、卤代烷氧基、酚保护基、前药部分和 OR⁶，其中 R⁶ 为任选取代的芳基、C(O)R⁷、P(O)(OR⁸)₂ 或 SO₃R⁸，其中 R⁷ 和 R⁸ 每次出现时均独立选自 H、烷基、烯基、环烷基、杂环基、芳基和芳基烷基，所述基团中的每一基团为任选取代的，或 R⁸ 为金属阳离子；以及

R 为 OH 或离去基，或 R 形成羧酸衍生物。

在另一实施方式中，描述了下列通式的微管溶素的说明性羧酸缀合物衍生物和其药物盐：



其中

B 为结合配体；

L 为接头，其中 L 包括共价连接于微管溶素的杂原子接头，例如氧、氮或硫杂原子；

n 为 1-3;

V 为 H 、 OR^2 或卤素; W 为 H 、 OR^2 或烷基, 其中 R^2 每次出现时均独立选自 H 、烷基或 $C(O)R^3$, 其中 R^3 是烷基、烯基或芳基; 假如 V 和 W 均为 OR^2 时, 则 R^2 不为 H ; 或 V 和 W 与所连接的碳一起形成羰基;

$X=H$ 、 C_{1-4} 烷基, 烯基, 所述基团中的每一基团为任选取代的、或者是 CH_2QR^9 , 其中 Q 为 $-N-$ 、 $-O-$ 或 $-S-$, $R^9=H$ 、 C_{1-4} 烷基、烯基、芳基或 $C(O)R^{10}$, $R^{10}=C_{1-6}$ 烷基、烯基、芳基或杂芳基, 所述基团中的每一基团为任选取代的;

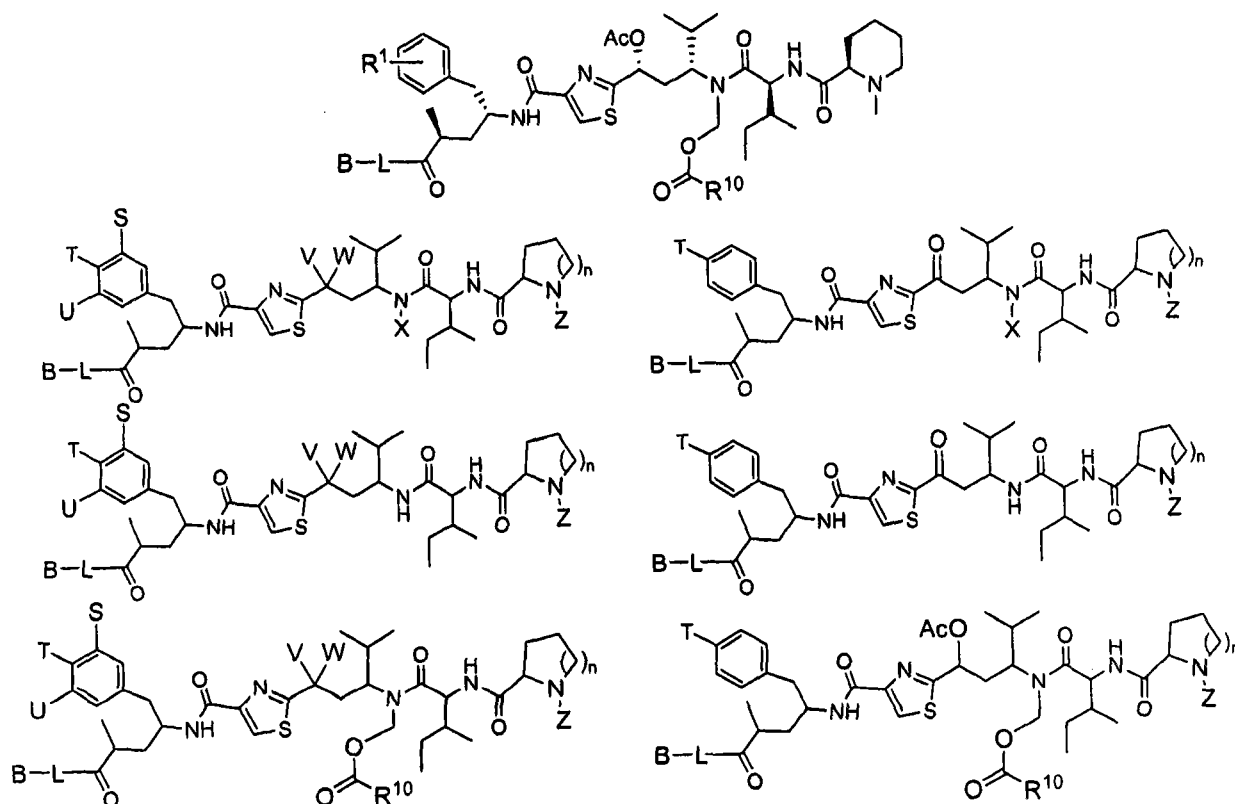
Z 为烷基或 $C(O)R^4$, 其中 R^4 为烷基、 CF_3 或芳基;

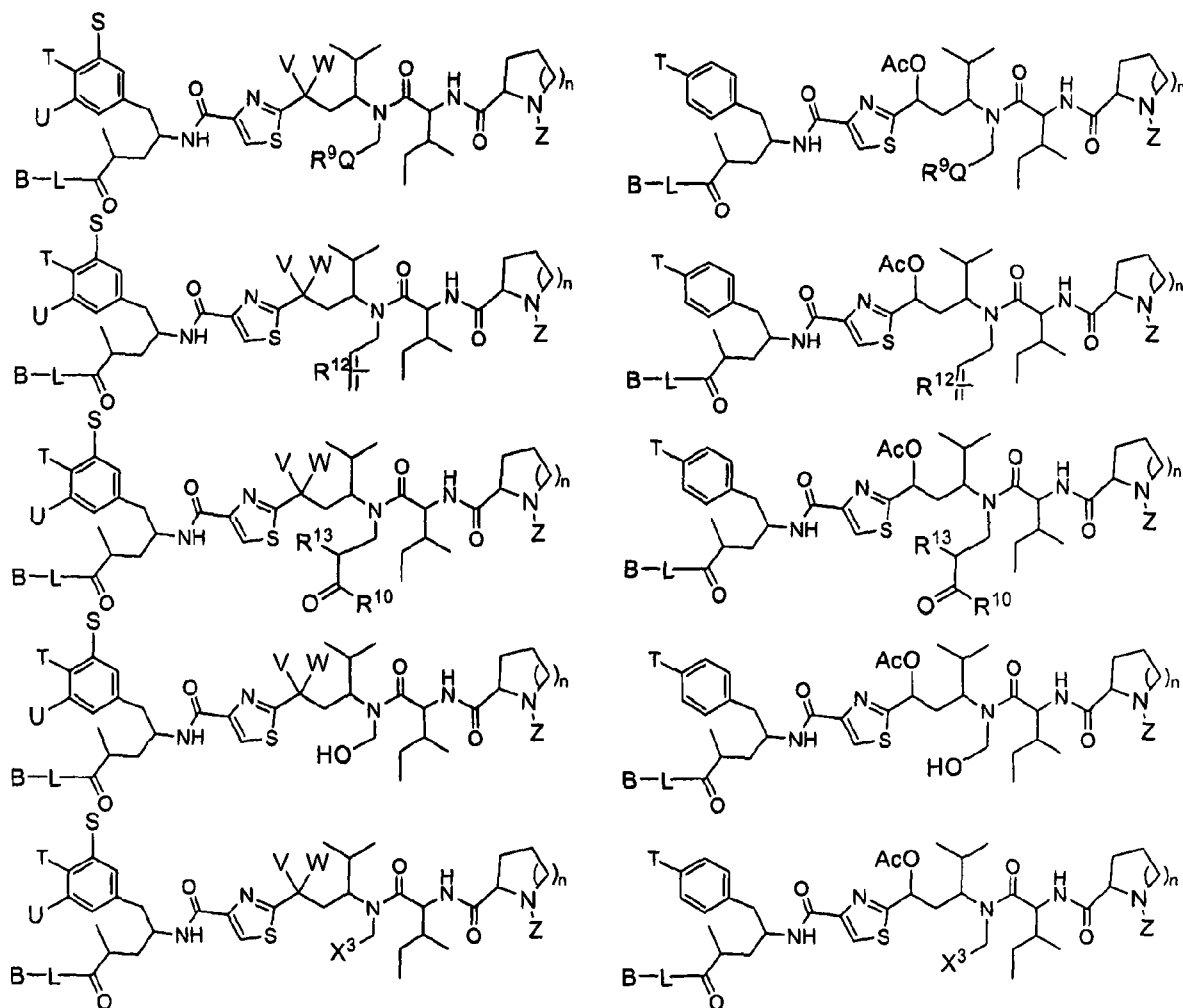
T 为 H 或 OR^6 , 其中 R^6 为 H 、烷基、芳基、 COR^7 、 $P(O)(OR^8)_2$ 或 SO_3R^8 , 其中 R^7 和 R^8 每次出现时均独立选自 H 、烷基、烯基、环烷基、杂环基、芳基和芳基烷基, 所述基团中的每一基团为任选取代的, 或 R^8 为金属阳离子, 或 R^6 为酚保护基或前药部分;

S 和 U 各自独立选自下组基团: H 、卤素、硝基、氰基、烷基、卤代烷基、烷氧基和卤代烷氧基; 以及

R 为 OH 或离去基, 或 R 形成羧酸衍生物。

在另一实施方式中, 描述了下列通式的说明性羧酸缀合物衍生物和其药物盐:



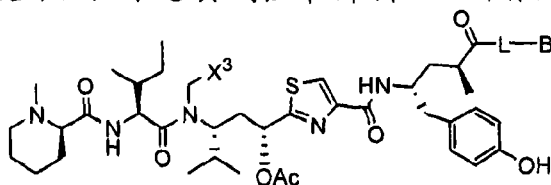


其中 B、L、n、S、T、U、V、W、X、Z、Q、R¹、R⁹、R¹⁰、R¹²、R¹³ 和 X³ 在本发明的多个实施方式和多个方面均有描述。

在另一实施方式中，描述了天然存在的微管溶素例如微管溶素 A、微管溶素 B 和微管溶素 I 的说明性羧酸缀合物衍生物及其药物盐。

在另一实施方式中，描述了下列微管溶素类似物和衍生物的说明性羧酸缀合物衍生物。

此外，本发明所述可用于缀合物的另外的微管溶素包括下列化合物和其药物盐，包括在 KB 细胞 72 小时连续试验中抑制 3H 胸苷更新的 IC₅₀：



缀合物	X ³
B-L-EC0313	-O-CH ₃

B-L-EC0346	-O-(CH ₂) ₂ -OH
B-L-EC0356	-O-(CH ₂) ₂ CH(CH ₃) ₂
B-L-EC0374	-S-(CH ₂) ₂ -SH
B-L-EC0386	-OH
B-L-EC0550	-(CH ₂) ₂ -CH=CH ₂
B-L-EC0560	-S-(CH ₂) ₂ -OH
B-L-EC0575	-O-C(O)-(CH=CH)-CH ₂ -Cl
B-L-EC0585	-NH-C(O)-CH ₂ CH(CH ₃) ₂
B-L-EC0611	-O-(CH ₂) ₂ CH ₃
B-L-EC0623	-S-(CH ₂) ₂ CH ₃

如本发明所述，微管溶素化合物可以是微管蛋白聚合的抑制剂，也可以是DNA-烷化剂。因此，本发明考虑到治疗包括致病细胞群体的疾病和疾病状态例如癌症的方法。

在另一实施方式中，二价接头(L)为选自C、N、O、S、Si和P的原子的链，所述接头将结合配体(B)和微管溶素(D)共价连接。接头可有宽泛变化的长度，例如在约2至约100个原子的范围内。用于形成接头的原子可以所有化学相关的方式结合，所述化学相关的方式例如形成亚烷基、亚链烯基(alkenylene)和亚炔基(alkynylene)等的碳原子链；形成醚、聚氧化烯(polyoxyalkylene)的碳和氧原子链，或当与羰基结合时形成酯和碳酸酯等；形成胺、亚胺、聚胺、胍、脲的碳和氮原子链，或当与羰基结合时形成酰胺、脲、氨基脲(semicarbazides)、卡巴胍等；形成烷氧基胺(alkoxyamines)、烷氧基胺(alkoxylamines)的碳、氮和氧原子链，或当与羰基结合时形成聚氨酯(urethanes)、氨基酸、酰氧基胺、异羟肟酸等的；以及很多其它(方式)。此外，应当理解的是，形成前述说明性实施方式中每一个实施方式所述的链的原子可以是饱和的或不饱和的，例如烷烃、烯烃、炔烃、亚胺等可以是包括于接头中的基团。此外，应当理解的是，形成接头的原子也可互相环化从而形成组成接头的二价环状结构，其包括位于接头中的环烷烃、环醚、环胺、亚芳基、亚杂芳基等。

在另一实施方式中，接头包括形成至少一个可释放接头的基团，和任选一个或多个间隔接头。本发明所用的术语“可释放接头”是指包含至少一个可在生理条件下断裂的键的接头，例如pH-不稳定键、酸-不稳定键、碱-不稳定键、氧化-不稳定键、代谢不稳定键、生化不稳定键或酶不稳定键。应当理解的是，

导致键断裂的生理条件不一定包括生物的或代谢的过程，而可包括标准的化学反应，例如水解反应，举例来说，在生理 pH 下，或作为区室化进入某细胞器例如 pH 低于细胞溶质 pH 的核内体的结果。

应当理解的是，可断裂的键可连接可释放接头内的两个相邻原子，和/或在可释放接头的一端或两端连接其它接头或 V 和/或 D，如本发明所述。在可断裂的键连接可释放接头内的两个相邻原子的情况中，继该键断裂后，可释放接头被断裂为两个或更多个片段。或者，在可断裂的键位于可释放接头和另一部分之间的情况中，所述另一部分例如另外的杂原子、间隔接头、另一个可释放接头、微管溶素或其类似物或衍生物、或结合配体，继该键断裂后，可释放接头与另一部分分离。因此，还应当理解的是，间隔和可释放接头中的每一个均是多价的，例如二价。

说明性可释放接头包括亚甲基、1-烷氧基亚烷基、1-烷氧基环亚烷基、1-烷氧基亚烷基羰基、1-烷氧基环亚烷基羰基、羰基芳基羰基、羰基(羧基芳基)羰基、羰基(双羧基芳基)羰基、卤代亚烷基羰基、亚烷基(二烷基甲硅烷基)、亚烷基(烷基芳基甲硅烷基)、亚烷基(二芳基甲硅烷基)、(二烷基甲硅烷基)芳基、(烷基芳基甲硅烷基)芳基、(二芳基甲硅烷基)芳基、氧代羰氧基、氧代羰氧基烷基、磺酰氧基、氧代磺酰基烷基、亚氨基亚烷基(iminoalkylidenyl)、羰基亚烷基亚氨基(carbonylalkylideniminyl)、亚氨基环亚烷基、羰基环亚烷基亚氨基、亚烷基硫基、亚烷基芳硫基和羰基烷硫基，其中可释放接头中的每一个任选被如下定义的取代基 X^2 取代。

在前面的实施方式中，可释放接头可包括氧，可释放接头可以是亚甲基、1-烷氧基亚烷基、1-烷氧基环亚烷基、1-烷氧基亚烷基羰基和 1-烷氧基环亚烷基羰基，其中可释放接头中的每一个任选被如下定义的取代基 X^2 取代，可释放接头与氧键合形成缩醛或缩酮。可选择地，可释放接头可包括氧，可释放接头可是亚甲基，其中亚甲基可被任选取代的芳基取代，可释放接头与氧键合形成缩醛或缩酮。此外，可释放接头可包括氧，可释放接头可是磺酰基烷基，可释放接头与氧成键形成烷基磺酸酯。

在上述可释放接头实施方式的另一实施方式中，可释放接头可包括氮，可释放接头可以为亚氨基亚烷基、羰基亚烷基亚氨基、亚氨基环亚烷基和羰基环亚烷基亚氨基，其中可释放接头中的每一个是任选被如下定义的取代基 X^2 取代。

的，可释放接头与氮键合形成脞。在替代构型中，脞可被羧酸衍生物、原甲酸衍生物或氨基甲酰衍生物酰化，从而形成多种酰基脞可释放接头。

可选择地，可释放接头可包括氧，可释放接头可以为亚烷基(二烷基甲硅烷基)、亚烷基(烷基芳基甲硅烷基)、亚烷基(二芳基甲硅烷基)、(二烷基甲硅烷基)芳基、(烷基芳基甲硅烷基)芳基和(二芳基甲硅烷基)芳基，其中可释放接头中的每一个任选被如下定义的取代基 X^2 取代，可释放接头与氧键合形成硅烷醇。在另一变化方式中，药物可包括氧原子，可释放接头可为任选被取代基 X^2 取代的卤代亚烷基羰基，可释放接头与药物中的氧键合形成酯。

在上述的可释放接头实施方式中，药物可包括氮原子，可释放接头可包括氮，可释放接头可为羰基芳基羰基、羰基(羧基芳基)羰基、羰基(双羧基芳基)羰基，可释放接头可与杂原子氮键合形成酰胺，也可与药物中的氮键合形成酰胺。在一变化方式中，药物可包括氮原子，可释放接头可以是任选被取代基 X^2 取代的卤代亚烷基羰基，可释放接头与药物中的氮键合形成酰胺。在另一变化方式中，药物可包括成双键的氮原子，在该实施方式中，可释放接头可为亚烷基羰基氨基和 1-(亚烷基羰基氨基)琥珀酰亚胺-3-基，可释放接头可与药物中的氮键合形成脞。

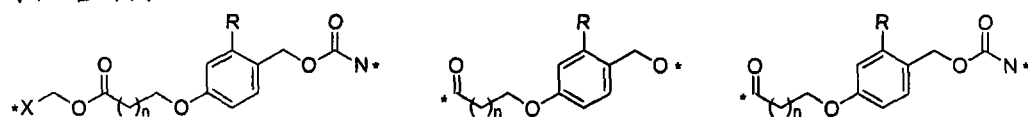
在另一变化方式中，药物可包括硫原子，在该实施方式中，可释放接头可为亚烷基硫基和羰基烷基硫基，可释放接头可与药物中的硫键合形成二硫化物。可选择地，药物可包括氧原子，可释放接头可包括氮，可释放接头可以是羰基芳基羰基、羰基(羧基芳基)羰基、羰基(双羧基芳基)羰基，可释放接头可形成酰胺，也可与药物中的氧键合形成酯。

取代基 X^2 可为烷基、烷氧基、烷氧基烷基、羟基、羟基烷基、氨基、氨基烷基、烷基氨基烷基、二烷基氨基烷基、卤素、卤代烷基、巯基烷基、烷硫基烷基、芳基、取代的芳基、芳基烷基、取代的芳基烷基、杂芳基、取代的杂芳基、羰基、羰基烷基、烷基羧酸酯基、烷基链烷酸酯基、胍基烷基、 R^4 -羰基、 R^5 -羰基烷基、 R^6 -酰基氨基和 R^7 -酰基氨基烷基，其中 R^4 和 R^5 均独立选自氨基酸、氨基酸衍生物和肽，其中 R^6 和 R^7 各自独立选自氨基酸、氨基酸衍生物和肽。在该实施方式中，可释放接头可包括氮，取代基 X^2 和可释放接头可形成杂环。

所述杂环可为吡咯烷、哌啶、噁唑烷、异噁唑烷、噻唑烷、异噻唑烷、吡咯烷酮、哌啶酮、噁唑烷酮、异噁唑烷酮、噻唑烷酮、异噻唑烷酮和琥珀酰亚胺。

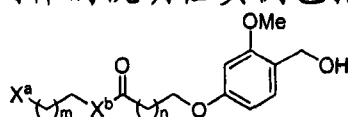
在另一实施方式中，二价接头(L)包括二硫可释放接头。在另一实施方式中，二价接头(L)包括至少一个不为二硫可释放接头的可释放接头。

一方面，可释放接头和间隔接头可以这样一种方式排列，使得继二价接头中的键断裂之后，所释放的官能团以化学方式辅助另外的键的破坏或断裂，也可称为邻位辅助断裂或破坏。所述二价接头或其部分的说明性实施方式包括具有下式的化合物：



其中 X 为杂原子，例如氮、氧或硫、或羰基；n 为选自 0 至 4 的整数，例如 2；R 为氢、或取代基，包括能够通过电感应稳定正电荷或通过芳环共振稳定正电荷的取代基，例如烷氧基等，包括甲氧基；符号(*)表示形成二价接头的另外的间隔、杂原子或可释放接头的连接点，或可选择地，是药物或其类似物或衍生物，或维生素或其类似物或衍生物的连接点。在一实施方式中，n 为 2，R 为甲氧基。应当理解的是，其它取代基可存在于芳环、苄基碳、链烷酸或亚甲基桥上，包括但不限于羟基、烷基、烷氧基、烷硫基、卤素等。辅助的断裂可包括涉及苄鎓中间体、苯炔中间体、内酯环化作用、氧鎓中间体、 β -消除等的机理。还应当理解的是，除继可释放接头断裂之后的片段化外，可释放接头的初始断裂可通过邻位辅助机理被促进。

用于形成所述接头的中间体的说明性实例包括：

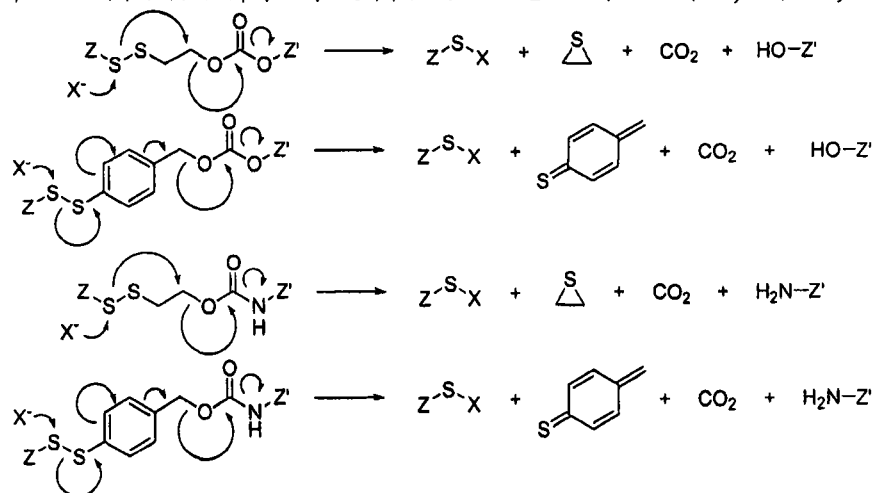


其中 X^a 为亲电子基团例如马来酰亚胺、乙烯砜、活化的羧酸衍生物等； X^b 为 NH、O 或 S；m 和 n 为各自独立选自 0-4 的整数。在一个变化方式中，m 和 n 为各自独立选自 0-2 的整数。所述中间体可通过对亲电子基团 X^a 进行的亲核进攻和/或通过形成醚或其羧酸衍生物来连接于药物、结合配体或其它接头。在一个实施方式中，苄基羟基被转变为相应的用光气或光气等同物活化的苄氧基羰基化合物。该实施方式可通过对活化羰基进行亲核进攻来连接于药物、结合配体或其它接头。

可释放接头包括至少一个可在生理条件下被破坏或断裂的键(例如, pH-不稳定键、酸-不稳定键、氧化-不稳定键或酶不稳定键)。一个或多个可断裂键可存在于可断裂接头的内部和/或在可断裂接头的一端或两端。应当理解的是, 可断裂键的不稳定性可通过在二价接头 I 内包括的官能团或片段来调整, 所述官能团或片段可辅助或促进所述键的破坏, 也可称为邻位辅助。此外, 应当理解的是, 在二价接头 I 中还可包括另外的官能团或片段, 用以辅助或促进维生素受体结合药物缀合物在可释放接头的键断裂后进一步片段化。

可断裂键的不稳定性可进行调整, 例如, 通过在可断裂键位置或邻近可断裂键的位置进行取代改变, 例如在邻近可断裂的二硫键处包括 α 支链, 在具有可被水解的硅-氧键的部分中增加硅原子上取代基的疏水性, 同系化形成可水解的缩酮或缩醛的一部分的烷氧基等。

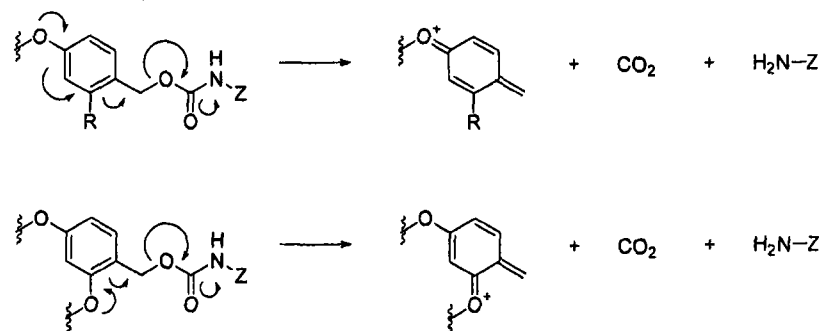
本发明所述二价接头断裂的说明性机理包括下述的 1,4 和 1,6 片段化机理:



其中 X 为外源的或内源的亲核试剂、谷胱甘肽或生物还原剂等; Z 或 Z' 其中之一为维生素或其类似物或衍生物、或药物或其类似物或衍生物、或与多价接头的其它部分连接的维生素或药物部分。应当理解的是, 尽管上述的片段化机理被描述为协调机理, 但是可能发生任何数目的不连续的步骤, 从而使多价接头最终片段化为所述终产物。举例来说, 应当理解的是, 键的断裂也可能通过氨基甲酸酯部分的酸催化消除而发生, 可通过在上述实例中有说明的 β 硫 (beta sulfur) 的芳基或二硫基提供的稳定性邻位辅助所述键的断裂。在该实施方式的那些变化方式中, 可释放接头是氨基甲酸酯部分。可选择地, 片段化可通过对二硫基的亲核进攻开始, 导致断裂形成硫醇盐(thiolate)。所述硫醇盐可分子间置换碳酸或氨基甲酸部分并形成相应的硫杂环丙烷。在含有苄基的多价接头的情况中, 在二硫键发生所述断裂之后, 所得的苯基硫醇盐可通过形成共振

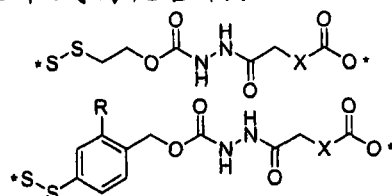
稳定的中间体进一步片段化，释放出碳酸或氨基甲酸部分。在这些情况中的任意一种中，本发明所述说明性多价接头的可释放性质可通过与所存在的化学、代谢、生理或生物条件相关的任何机理来得到。

可释放接头的键断裂的其它说明性机理包括如下的氧鎓辅助的断裂：



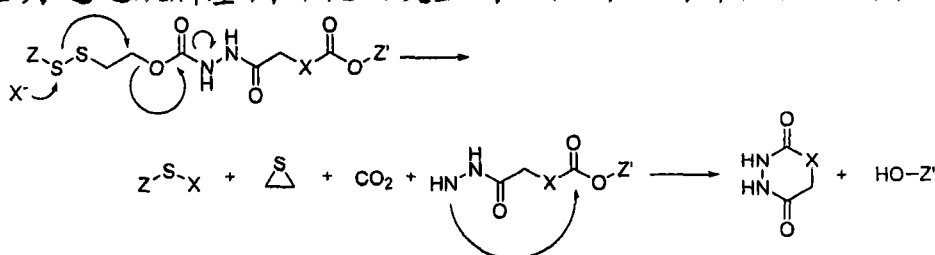
其中 Z 为维生素或其类似物或衍生物，或药物或其类似物或衍生物，或各自是与多价接头的其它部分连接的维生素或药物的部分，例如包括一个或多个间隔接头和/或其它可释放接头的药物或维生素的部分。没有被理论所限制，在该实施方式中，酸催化作用(例如在核内体中)还可通过质子化尿烷基团启动断裂。此外，酸催化的氨基甲酸酯的消除导致 CO₂ 和连接于 Z 的含氮部分的释放，并形成苄基阳离子，所述苄基阳离子可被水或任何其它的 Lewis 碱捕获。

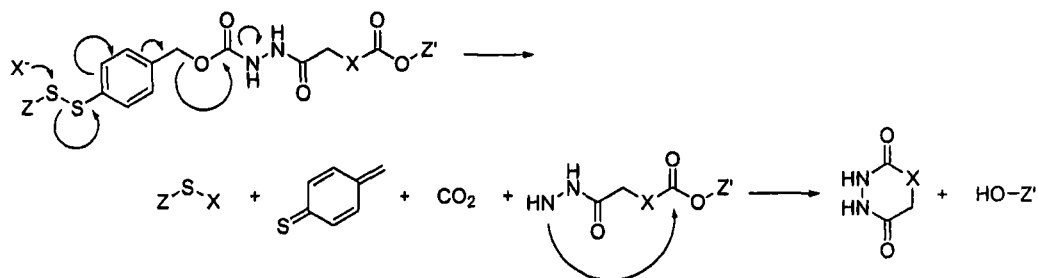
其它的说明性接头包括下式的化合物：



其中 X 为 NH、CH₂ 或 O；R 为氢，或取代基，包括能够通过电感应稳定正电荷或通过芳环共振稳定正电荷的取代基，例如烷氧基等，包括甲氧基；符号(*)表示形成二价接头的另外的间隔、杂原子或可释放接头的连接点，或可选择地，是药物或其类似物或衍生物的连接点或维生素或其类似物或衍生物的连接点。

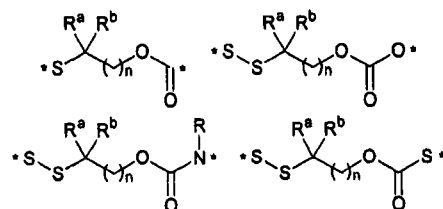
本发明所述的所述二价接头断裂的说明性机理包括下列的 1,4 和 1,6 片段化机理，之后为通过酰肼基团环化而发生的酰化的 Z' 的邻位辅助断裂：





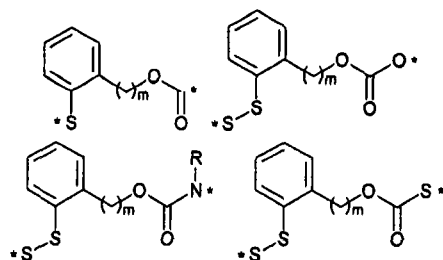
其中 X 为外源的或内源的亲核试剂、谷胱甘肽或生物还原剂等；Z 或 Z' 其中之一为维生素或其类似物或衍生物，或药物或其类似物或衍生物，或与多价接头的其它部分连接的维生素或药物部分。应当理解的是，尽管上述的片段化机理被描述为协调机理，但是可能发生任何数目的不连续的步骤，从而使多价接头最终片段化为所述终产物。举例来说，应当理解的是，键的断裂也可能通过氨基甲酸酯部分的酸催化消除而发生，可通过在上述实例中有说明的 β 硫的芳基或二硫基提供的稳定性来邻位辅助所述键的断裂。在该实施方式的那些变化方式中，可释放接头是氨基甲酸酯部分。可选择地，片段化可通过对二硫基的亲核进攻开始，导致断裂形成硫醇盐。所述硫醇盐可分子间置换碳酸或氨基甲酸部分并形成相应的硫杂环丙烷。在含有苄基的多价接头的情况中，在二硫键发生所述断裂之后，所得的苄基硫醇盐可通过形成共振稳定的中间体进一步片段化，释放出碳酸或氨基甲酸部分。在这些情况中的任意一种中，本发明所述说明性多价接头的可释放性质可通过与所存在的化学、代谢、生理或生物条件相关的任何机理来得到。没有被理论所限制，在该实施方式中，酸催化作用(例如在核内体中)还可通过质子化尿烷基团启动断裂。此外，酸催化的氨基甲酸酯的消除导致 CO_2 和连接于 Z 的含氮部分的释放，并形成苄基阳离子，所述苄基阳离子可被水或任何其它的 Lewis 碱捕获，本发明有类似的描述。

在一实施方式中，本发明所述的多价接头是下式的化合物：



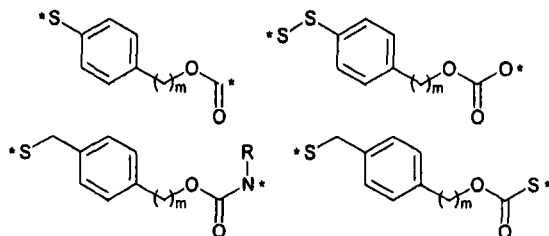
其中 n 为选自 1 至约 4 的整数； R^a 和 R^b 各自独立选自下组基团：氢和烷基，包括低级烷基例如任选分支的 C_1 - C_4 烷基；或 R^a 和 R^b 与所连接的碳原子一起形成碳环；R 为任选取代的烷基、任选取代的酰基或合适选择的氮保护基；(*) 表示药物、维生素、显像剂、诊断剂、其它多价接头或缀合物的其它部分的连接点。

在另一实施方式中，本发明所述的多价接头包括下式的化合物：



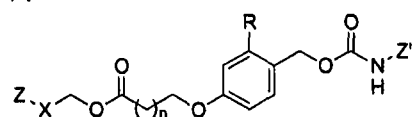
其中 m 为选自 1 至约 4 的整数； R 为任选取代的烷基、任选取代的酰基或合适选择的氮保护基；(*)表示药物、维生素、显像剂、诊断剂、其它多价接头或缀合物的其它部分的连接点。

在另一实施方式中，本发明所述的多价接头包括下式的化合物：



其中 m 为选自 1 至约 4 的整数； R 为任选取代的烷基、任选取代的酰基或合适选择的氮保护基；(*)表示药物、维生素、显像剂、诊断剂、其它多价接头或缀合物的其它部分的连接点。

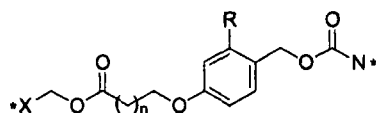
另一说明性机理涉及可释放的接头和间隔接头以这样一种方式排列，使得继二价接头中的键断裂之后，所释放的官能团以化学方式辅助另外的键的破坏或断裂，也可称为邻位辅助断裂或破坏。所述二价接头或其部分的说明性实施方式包括具有下式的化合物：



其中 X 为杂原子，例如氮、氧或硫； n 为选自 0、1、2 和 3 的整数； R 为氢、或取代基，包括能够通过电感应稳定正电荷或通过芳环共振稳定正电荷的取代基，例如烷氧基等，包括甲氧基； Z 或 Z' 其中之一为维生素或其类似物或衍生物，或药物或其类似物或衍生物，或与二价接头的其它部分连接的维生素或药物部分。应当理解的是，其它取代基可存在于芳环、苄基碳、氨基甲酸酯 (carbamate) 氮、链烷酸或亚甲基桥上，包括但不限于羟基、烷基、烷氧基、烷硫基、卤素等。辅助的断裂可包括涉及苄基中间体、苯炔中间体、内酯环化作用、氧鎓中间体、 β -消除等的机理。还应当理解的是，除继可释放接头断裂之后的片段化外，可释放接头的初始断裂可通过邻位辅助机理被促进。

在该实施方式中,羟基链烷酸(可环化),通过例如氧鎓离子促进亚甲基桥的断裂,并在可释放接头的键断裂之后促进键的断裂或片段化。可选择地,酸催化的氧鎓离子辅助的亚甲基桥的断裂可启动该说明性二价接头或其片段的一连串片段化。可选择地,酸-催化的氨基甲酸酯的水解可促进羟基链烷酸(可环化)的 β 消除,并通过例如氧鎓离子促进亚甲基桥的断裂。应当理解的是,在本发明所述的代谢、生理或细胞条件下键的破坏或断裂的其它化学机理可触发所述的一连串片段化。应当理解的是,在本发明所述的代谢、生理或细胞条件下键的破坏或断裂的其它化学机理可触发所述的一连串片段化。

在另一实施方式中,可释放的接头和间隔接头以这样一种方式排列,使得继二价接头中的键断裂之后,所释放的官能团以化学方式辅助另外的键的破坏或断裂,也可称为邻位辅助断裂或破坏。所述二价接头或其部分的说明性实施方式包括具有下式的化合物:



其中X为杂原子,例如氮、氧或硫;n为选自0、1、2和3的整数;R为氢、或取代基,包括能够通过电感应稳定正电荷或通过芳环共振稳定正电荷的取代基,例如烷氧基等,包括甲氧基;符号(*)表示形成二价接头的另外的间隔、杂原子或可释放接头的连接点,或可选择地,是药物或其类似物或衍生物,或维生素或其类似物或衍生物的连接点。应当理解的是,其它取代基可存在于芳环、苄基碳、链烷酸或亚甲基桥上,包括但不限于羟基、烷基、烷氧基、烷硫基、卤素等。辅助的断裂可包括涉及苄鎓中间体、苯炔中间体、内酯环化作用、氧鎓中间体、 β -消除等的机理。还应当理解的是,除继可释放接头断裂之后的片段化外,可释放接头的初始断裂可通过邻位辅助机理被促进。

本发明所述接头的另一说明性实施方式,包括在本发明所述的条件下通过涉及 β 消除的化学机理断裂的可释放接头。一方面,所述可释放接头包括 β -硫基、 β -羟基、和 β -氨基取代的羧酸和其衍生物,例如酯、酰胺、碳酸酯、氨基甲酸酯和脲。另一方面,所述可释放接头包括2-和4-硫代芳基酯、氨基甲酸酯和碳酸酯。

在另一说明性实施方式中,接头包括一个或多个氨基酸。在一变化方式中,接头包括单一的氨基酸。在另一变化方式中,接头包括具有2至约50、2至约30或2至约20个氨基酸的肽。在另一变化方式中,接头包括具有约4至约8

个氨基酸的肽。所述氨基酸说明性选自天然存在的氨基酸或其立体异构体。所述氨基酸也可以的任何其它的氨基酸，例如具有下列通式的氨基酸：



其中 R 为氢、烷基、酰基，或合适的氮保护基；R'和 R''为氢或取代基，两基团中的每一基团每次出现时均独立选择；q 为整数例如 1、2、3、4 或 5。说明性，R'和/或 R''独立对应于，但不限于，氢或出现在天然存在的氨基酸上的侧链，例如甲基、苄基、羟甲基、硫代甲基、羧基、羧甲基、胍基丙基等，及其衍生物和保护的衍生物。上述的结构式包括所有的立体异构变化方式。举例来说，所述氨基酸可选自天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、鸟氨酸、苏氨酸等。在一变化方式中，可释放接头包括至少 2 个选自天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、鸟氨酸和苏氨酸的氨基酸。在另一变化方式中，可释放接头包括 2 至约 5 个选自天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、鸟氨酸和苏氨酸的氨基酸。在另一变化方式中，可释放接头包括由选自天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸和鸟氨酸及其组合的氨基酸组成的三肽、四肽、五肽或六肽。

在本发明所述的维生素受体结合递药缀合物的另一说明性方面，药物或其类似物或衍生物，包括烷基硫醇亲核试剂。

在另一实施方式中，间隔接头可为 1-亚烷基琥珀酰亚胺-3-基，任选被如下定义的取代基 X¹ 取代，可释放接头可为亚甲基、1-烷氧基亚烷基、1-烷氧基环亚烷基、1-烷氧基亚烷基羰基、1-烷氧基环亚烷基羰基，其中所述可释放接头中的每一个任选被如下定义的取代基 X² 取代，其中间隔接头和可释放接头各自键合于间隔接头，从而形成琥珀酰亚胺-1-基烷基缩醛或缩酮。

所述间隔接头可为羰基、硫代羰基、亚烷基、环亚烷基、亚烷基环烷基、亚烷基羰基、环亚烷基羰基、羰基烷基羰基、1-亚烷基琥珀酰亚胺-3-基、1-(羰基烷基)琥珀酰亚胺-3-基、亚烷基磺酰基(alkylenesulfoxyl)、磺酰基烷基、亚烷基磺酰基烷基、亚烷基磺酰基烷基、羰基四氢-2H-吡喃基、羰基四氢呋喃基、1-(羰基四氢-2H-吡喃基)琥珀酰亚胺-3-基和 1-(羰基四氢呋喃基)琥珀酰亚胺-3-基，其中间隔接头中的每一个任选被如下定义的取代基 X¹ 取代。在该实施方式中，间隔接头可包括另外的氮，间隔接头可为亚烷基羰基、环亚烷基羰基、羰基烷基羰基、1-(羰基烷基)琥珀酰亚胺-3-基，其中间隔接头中的每一个任选被

如下定义的取代基 X^1 取代, 间隔接头与氮键合形成酰胺。可选择地, 间隔接头可包括另外的硫, 间隔接头可为亚烷基和环亚烷基, 其中间隔接头中的每一个被羧基任选取代, 间隔接头可与硫键合形成硫醇。在另一实施方式中, 间隔接头可包括硫, 间隔接头可为 1-亚烷基琥珀酰亚胺-3-基和 1-(羧基烷基)琥珀酰亚胺-3-基, 间隔接头与硫键合形成琥珀酰亚胺 3-基硫醇。

在上述实施方式的替代实施方式中, 间隔接头可包括氮, 可释放接头可为二价基, 所述二价基包括亚烷基氮丙啶-1-基、羧基烷基氮丙啶-1-基、磺酰基烷基氮丙啶-1-基(sulfoxylalkylaziridin-1-yl)或磺酰基烷基氮丙啶-1-基, 其中所述可释放接头中的每一个任选被如下定义的取代基 X^2 取代。在该替代实施方式中, 间隔接头可为羰基、硫代羰基、亚烷基羰基、环亚烷基羰基、羧基烷基羰基、1-(羧基烷基)琥珀酰亚胺-3-基, 其中所述间隔接头中的每一个被如下定义的取代基 X^1 任选取代, 其中所述间隔接头与可释放接头结合形成氮丙啶酰胺。

取代基 X^1 可为烷基、烷氧基、烷氧基烷基、羟基、羟基烷基、氨基、氨基烷基、烷基氨基烷基、二烷基氨基烷基、卤素、卤代烷基、巯基烷基、烷硫基烷基、芳基、取代的芳基、芳基烷基、取代的芳基烷基、杂芳基、取代的杂芳基、羧基、羧基烷基、烷基羧酸酯基、烷基链烷酸酯基、胍基烷基、 R^4 -羰基、 R^5 -羧基烷基、 R^6 -酰胺基、 R^7 -酰胺基烷基, 其中 R^4 和 R^5 均独立选自氨基酸、氨基酸衍生物和肽, 其中 R^6 和 R^7 均独立选自氨基酸、氨基酸衍生物和肽。在该实施方式中, 间隔接头可包括氮, 取代基 X^1 和它们结合的间隔接头形成杂环。

本发明所述的维生素受体结合递药缀合物的一方面, 二价接头包括一起形成 3-硫代琥珀酰亚胺-1 基烷氧基甲氧基的间隔接头和可释放接头, 其中所述甲基任选被烷基或取代的芳基取代。

另一方面, 二价接头包括一起形成 3-硫代琥珀酰亚胺-1-基烷基羰基的间隔接头和可释放接头, 其中所述羰基与药物或其类似物或衍生物形成酰基氮丙啶。

另一方面, 二价接头包括一起形成 1-烷氧基环亚烷氧基(alkoxycycloalkylenoxy)的间隔接头和可释放接头。

另一方面, 二价接头包括一起形成亚烷基氨基羰基(二羧基亚芳基)羧酸酯的间隔接头和可释放接头。

另一方面, 二价接头包括一起形成 2-或 3-二硫代烷基羰基酰肼的可释放接头、间隔接头和可释放接头, 其中所述酰肼与药物或其类似物或衍生物形成脎。

另一方面，二价接头包括一起形成 3-硫代琥珀酰亚胺-1-基烷基羰基酰肼的间隔接头和可释放接头，其中所述酰肼与药物或其类似物或衍生物形成脎。

另一方面，二价接头包括一起形成 2-或 3-硫代烷基磺酰基烷基(二取代甲硅烷基)氧基的间隔接头和可释放接头，其中二取代的甲硅烷基被烷基或任选取代的芳基取代。

另一方面，二价接头包括许多选自天然存在的氨基酸和其立体异构体的间隔接头。

另一方面，二价接头包括一起形成 3-二硫代烷氧基羰基的可释放接头、间隔接头和可释放接头，其中所述羰基与药物或其类似物或衍生物形成碳酸酯。

另一方面，二价接头包括一起形成 3-二硫代芳基烷氧基羰基的可释放接头、间隔接头和可释放接头，其中所述羰基与药物或其类似物或衍生物形成碳酸酯，所述芳基是任选被取代的。

另一方面，二价接头包括一起形成 3-硫代琥珀酰亚胺-1-基烷氧基烷氧基亚烷基的间隔接头和可释放接头，其中所述亚烷基与药物或其类似物或衍生物形成脎，每一个烷基均独立选择，所述氧基烷氧基任选被烷基或任选取代的芳基取代。

另一方面，间隔接头包括一起形成 2-或 3-二硫代烷氧基羰基酰肼的可释放接头、间隔接头和可释放接头

另一方面，二价接头包括一起形成 2-或 3-二硫代烷基氨基的可释放接头、间隔接头和可释放接头，其中所述氨基与药物或其类似物或衍生物形成联乙烯酰胺(vinylogous amide)。

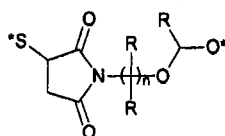
另一方面，二价接头包括一起形成 2-或 3-二硫代烷基氨基的可释放接头、间隔接头和可释放接头，其中所述氨基与药物或其类似物或衍生物形成联乙烯酰胺，所述烷基是乙基。

另一方面，二价接头包括一起形成 2-或 3-二硫代烷基氨基羰基的可释放接头、间隔接头和可释放接头，其中所述羰基与药物或其类似物或衍生物形成氨基甲酸酯。

另一方面，二价接头包括一起形成 2-或 3-二硫代烷基氨基羰基的可释放接头、间隔接头和可释放接头，其中所述羰基与药物或其类似物或衍生物形成氨基甲酸酯，所述烷基是乙基。

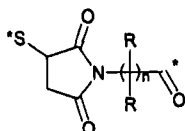
另一方面，二价接头包括一起形成 2-或 3-二硫代芳基烷氧基羰基的可释放接头、间隔接头和可释放接头，其中所述羰基与药物或其类似物或衍生物形成氨基甲酸酯或氨基甲酰基氮丙啶。

在另一实施方式中，多价接头包括连接形成由下式说明的多价 3-硫代琥珀酰亚胺-1-基烷氧基甲氧基的间隔接头和可释放接头：



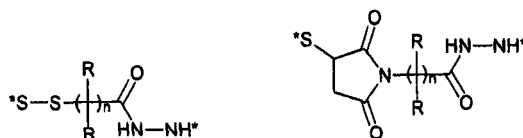
其中 n 为 1 至 6 的整数，烷基任选被取代，甲基任选被另外的烷基或任选取代的芳基取代，所述基团中的每一基团均用独立选择的基团 R 来代表。符号 (*) 表示多价接头片段与本发明所述的缀合物的其它部分的连接点。

在另一实施方式中，多价接头包括连接形成由下式说明的多价 3-硫代琥珀酰亚胺-1-基烷基羰基的间隔接头和可释放接头：



其中 n 为 1 至 6 的整数，烷基任选被取代。符号 (*) 表示多价接头片段与本发明所述的缀合物的其它部分的连接点。在另一实施方式中，多价接头包括连接形成多价 3-硫代烷基磺酰基烷基(二取代甲硅烷基)氧基的间隔接头和可释放接头，其中所述二取代的甲硅烷基被烷基和/或任选取代的芳基取代。

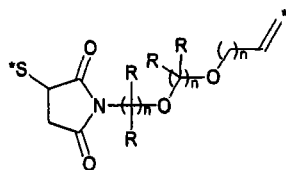
在另一实施方式中，多价接头包括连接形成由下式说明的多价二硫代烷基羰基酰肼基或多价 3-硫代琥珀酰亚胺-1-基羰基酰肼的间隔接头和可释放接头：



其中 n 为 1 至 6 的整数，烷基任选被取代，酰肼与 (B)、(D) 或多价接头 (L) 的另一部分形成脎。符号 (*) 表示多价接头片段与本发明所述的缀合物的其它部分的连接点。

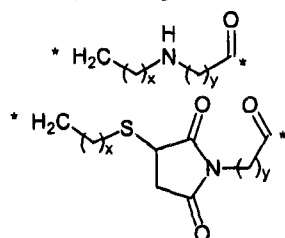
在另一实施方式中，多价接头包括连接形成由下式说明的多价 3-硫代琥珀酰亚胺-1-基烷氧基烷氧基亚烷基

(3-thiosuccinimid-1-ylalkyloxyalkyloxyalkylidene) 的间隔接头和可释放接头：



其中每一个 n 为独立选自 1 至 6 的整数，每一个烷基独立选择并任选被例如烷基或任选取代的芳基取代，其中所述亚烷基与(B)、(D)或多价接头(L)的另一部分形成脞。符号(*)表示多价接头片段与本发明所述的缀合物的其它部分的连接点。

另外的说明性间隔接头包括亚烷基--氨基--亚烷基羰基、亚烷基--硫代--羰基烷基琥珀酰亚胺-3-基等，由下式进一步说明：



其中整数 x 和 y 为 1、2、3、4 或 5；

本发明所用的术语“环亚烷基 (cycloalkylene)”是指其中一部分形成环的二价碳原子链，例如环丙-1,1-二基、环丙-1,2-二基、环己-1,4-二基、3-乙基环戊1,2-二基、1-亚甲基环己-4-基等。

本发明所用的术语“杂环”是指碳和杂原子单价链，其中所述杂原子选自氮、氧和硫，其中包括至少一个杂原子的一部分形成环，例如氮丙啶、吡咯烷、噁唑烷、3-甲氧基吡咯烷、3-甲基哌嗪等。

本发明所用的术语“芳基”是指碳原子的芳族单环或多环，例如苯基、萘基等。此外，芳基也可包括杂芳基。

本发明所用的术语“杂芳基”是指碳原子和至少一个杂原子的芳族单环或多环，所述杂原子选自氮、氧和硫，例如吡啶基、嘧啶基、咪唑基、苯并噁唑基等。

本发明所用的术语“任选取代”是指用相应数目的取代基置换通常位于碳上的一个或多个氢原子，所述取代基例如卤素、羟基、氨基、烷基或二烷基氨基、烷氧基、烷基磺酰基、氰基、硝基等。此外，位于同一碳原子、相邻碳原子或附近碳原子上的两个氢可被二价取代基置换，从而形成相应的环状结构。

本发明所用的术语“亚氨基亚烷基(iminoalkylidenyl)”是指含有本发明定义的亚烷基和氮原子的二价基,其中所述亚烷基的端基碳双价键合到氮原子上,例如式 $-(CH)=N-$ 、 $-(CH_2)_2(CH)=N-$ 、 $-CH_2C(Me)=N-$ 等。

本发明所用的术语“氨基酸”通常是指氨基烷基羧酸酯,其中所述烷基任选被烷基、羟基烷基、巯基烷基、氨基烷基、羧基烷基等取代,包括对应于天然存在的氨基酸例如丝氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸、天冬氨酸、谷氨酸等的基团。应当理解的是,所述氨基酸可具有单一的立体化学或是多种立体化学的特定混合物,包括外消旋混合物。此外,氨基酸是指 β 、 γ 和更长的氨基酸,例如下式的氨基酸:



其中R为氢、烷基、酰基或合适的氮保护基;R'和R''为氢或取代基,其中每一基团每次出现时均独立选择;q为整数例如1、2、3、4或5。说明性地,R'和/或R''独立对应于,但不限于,氢或出现在天然存在的氨基酸上的侧链,例如甲基、苄基、羟甲基、硫代甲基、羧基、羧甲基、胍基丙基等,及其衍生物和保护的衍生物。上式包括所有立体异构形式。举例来说,所述氨基酸可选自天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、鸟氨酸、苏氨酸等。在本发明所述的维生素受体结合递药缀合物中间体的另一说明性方面,药物或其类似物或衍生物包括烷基硫醇亲核试剂。

应当理解的是,上述术语可组合产生化学上相关的基团,例如是指甲氧基甲基、乙氧基乙基等的烷氧基烷基,是指三氟甲氧基甲基、1,2-二氟-2-氯乙-1-基氧基丙基等的卤代烷氧基烷基,是指苄基、苪乙基、 α -甲基苄基等的芳基烷基,及其它。

本发明所用的术语“氨基酸衍生物”一般是指任选取代的氨基烷基羧酸酯,其中氨基和/或羧酸酯基各自任选被烷基、羧基烷基、烷基氨基等取代或任选被保护。此外,任选取代的中间的二价烷基片段可包括另外的基团,例如保护基等。

本发明说用的术语“肽”一般是指通过酰胺键相互共价连接的一系列氨基酸和/或氨基酸类似物和衍生物。

另外的接头在美国专利申请2005/0002942(以参考的方式将上述专利申请的公开内容引入本文)、以及下述表1和表2中有描述,表1和表2中的(*)原子是另外的间隔或可释放接头、药物、和/或结合配体的连接点。

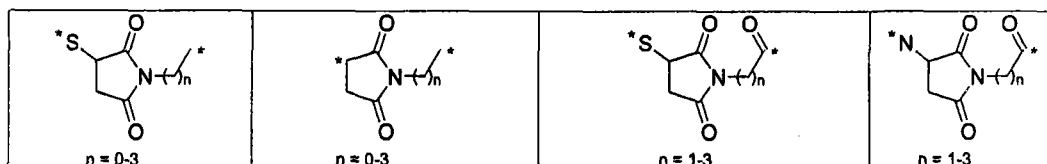
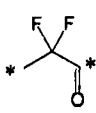
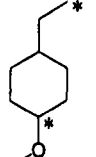
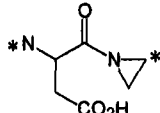
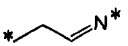
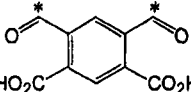
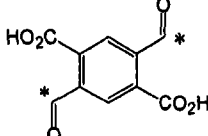
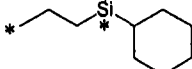
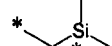
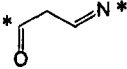
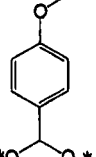
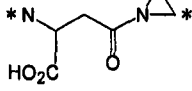
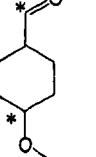
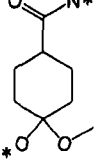
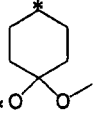
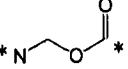
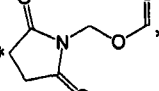
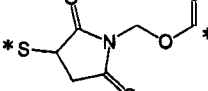
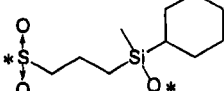
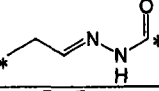
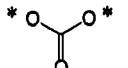
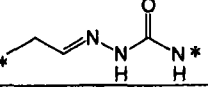
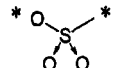
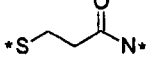
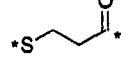
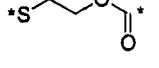
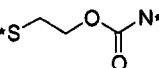
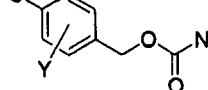
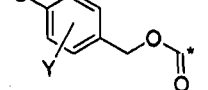
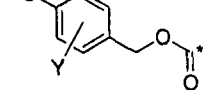
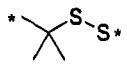
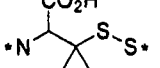
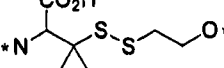
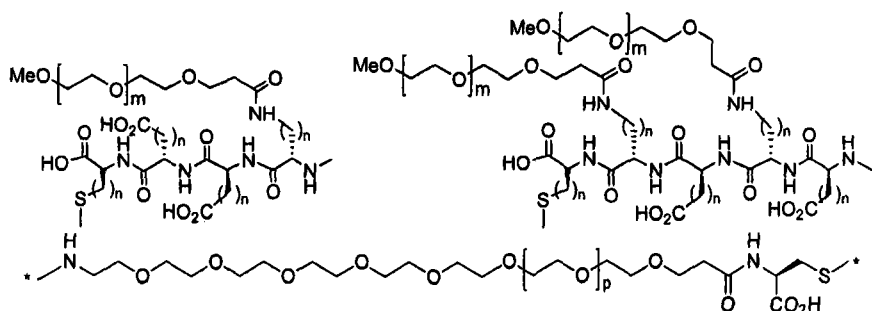


表 2. 说明性的可释放接头

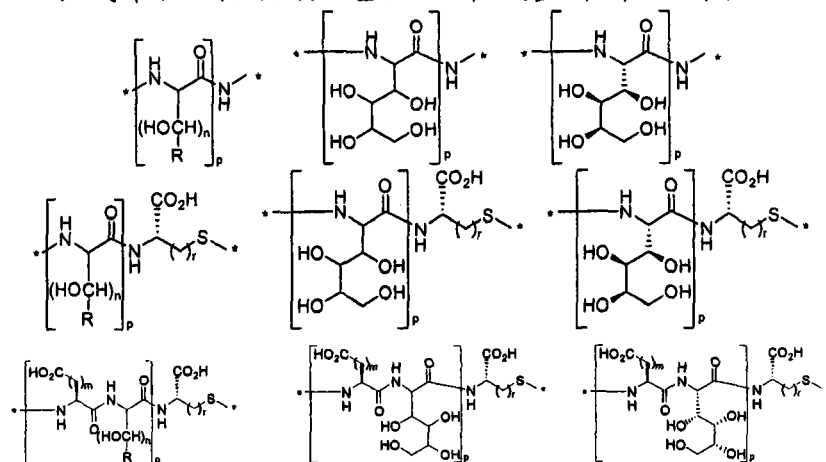
在另一说明性实施方式中，本文所述的二价接头(L)包括显著改善本发明所述缀合物的水溶解性、生物转运、优先的肾清除、摄取、吸收、生物分布和/或生物利用度的间隔接头。描述了包括亲水基团的说明性的间隔接头，例如下式的化合物：



其中 m 为每次出现时独立选自 1 至约 8 的整数; p 为选自 1 至约 10 的整数; n 为每次出现时独立选自 1 至约 3 的整数。一方面, m 每次出现时独立地是 1 至约 3。另一方面, n 每次出现时为 1。另一方面, p 每次出现时独立的为约 4 至约 6。说明性地, 本发明考虑到对应于前面所述的聚丙烯聚醚, 所述的聚丙烯聚醚可作为亲水间隔接头包括在缀合物中。此外, 应当理解的是, 混合的聚乙烯和聚丙烯聚醚可作为亲水间隔接头包括在缀合物中。更进一步地, 本发明考虑到前述聚醚化合物的环状变化方式, 例如包括四氢呋喃、1,3-二噁烷、1,4-二噁烷等的那些(环状变化方式)。

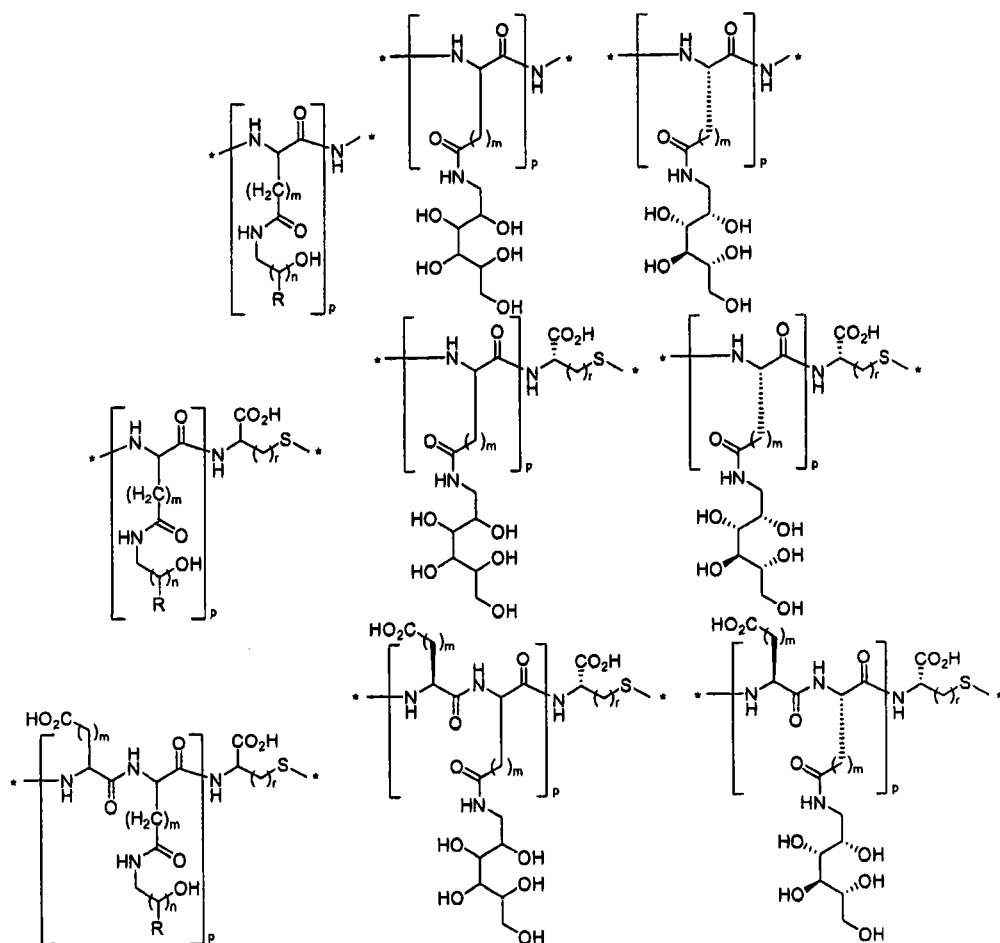
在另一说明性实施方式中, 本发明所述的亲水间隔接头包括多个羟基官能团, 例如包含单糖、寡糖、多糖等的接头。应当理解的是, 含有多羟基的间隔接头包括许多 $-(CROH)-$ 基团, 其中 R 是氢或烷基。

在另一实施方式中, 间隔接头包括一个或多个下述片段:



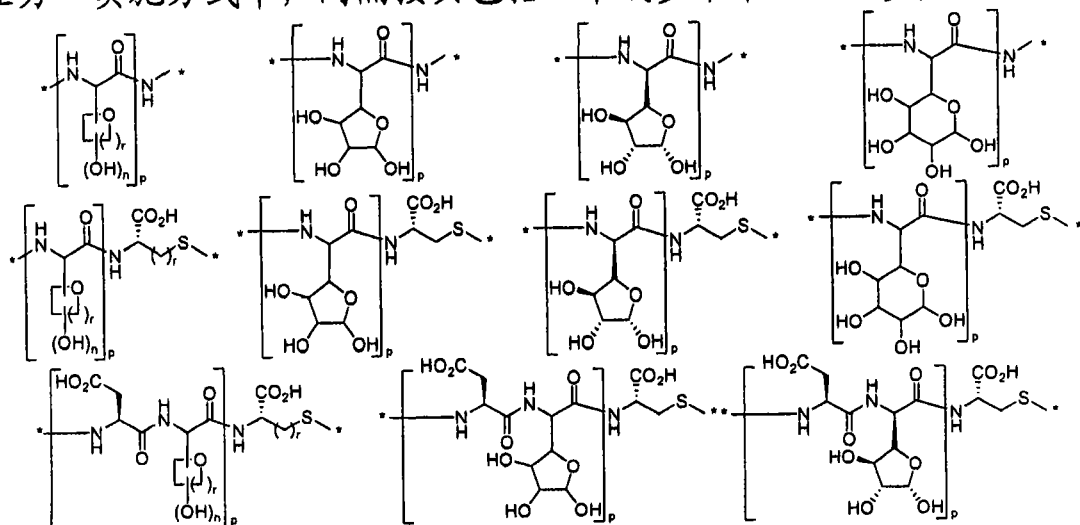
其中 R 为 H、烷基、环烷基或芳基烷基; m 为 1 至约 3 的整数; n 为 1 至约 5 的整数; p 为 1 至约 5 的整数; r 为选自 1 至约 3 的整数。一方面, 整数 n 为 3 或 4。另一方面, 整数 p 为 3 或 4。另一方面, 整数 r 为 1。

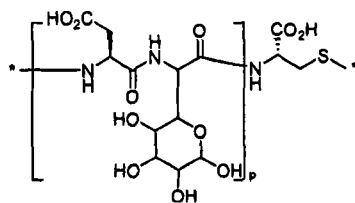
在另一实施方式中, 间隔接头包括一个或多个下述片段:



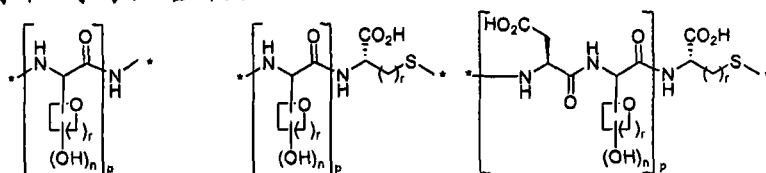
其中 R 为 H、烷基、环烷基或芳基烷；m 为独立选自 1 至约 3 的整数；n 为 1 至约 6 的整数；p 为 1 至约 5 的整数；r 为选自 1 至约 3 的整数。在一变化方式中，整数 n 为 3 或 4。在另一变化方式中，整数 p 为 3 或 4。在另一变化方式中，整数 r 为 1。

在另一实施方式中，间隔接头包括一个或多个下述环状多羟基基团：



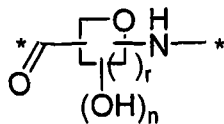


其中 n 为 2 至约 5 的整数; p 为 1 至约 5 的整数; r 为选自 1 至约 4 的整数一方面, 整数 n 为 3 或 4。另一方面, 整数 p 为 3 或 4。另一方面, 整数 r 为: 或 3。应当理解的是, 本发明考虑到接头的所述部分的所有立体化学形式。举例来说, 在上述结构式中, 所述部分可由核糖、木糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖或其它糖衍生而来, 并保留存在于这些分子中的侧羟基和烷基的立体化学排列。此外, 应当理解的是, 在前述的结构式中, 也考虑到多种脱氧化合物。说明性地, 考虑到下式的化合物:

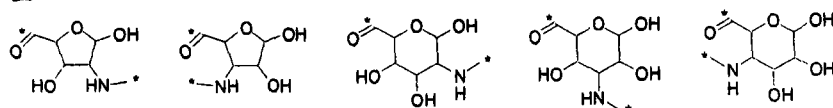


其中 n 等于或小于 r , 例如 r 为 2 或 3 时, n 分别为 1 或 2, 或 1、2 或 3。

在另一实施方式中, 间隔接头包括下式的多羟基化合物:

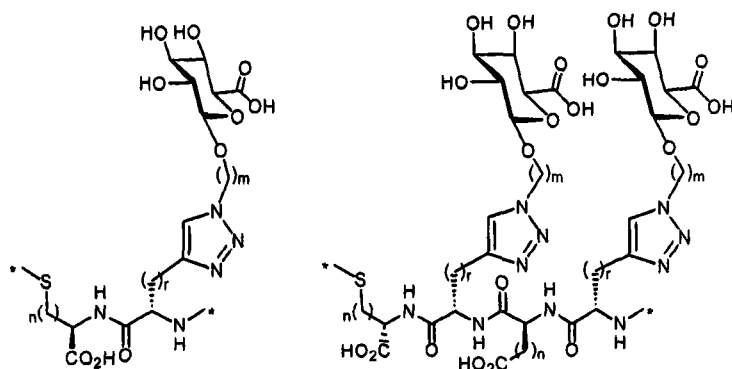


其中 n 和 r 各自为选自 1 至约 3 的整数。一方面, 间隔接头包括一个或多个下式的多羟基化合物:

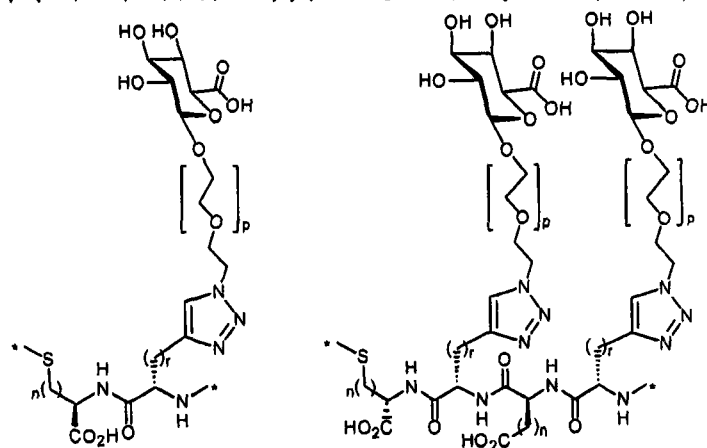


应当理解的是, 本发明考虑到所述接头的所述部分的所有立体化学形式。举例来说, 在上述结构式中, 所述部分可由核糖、木糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖或其它糖衍生而来, 并保留存在于这些分子中的羟基和烷基的立体化学排列。

在另一构型中, 本发明所述的亲水接头 L 包括与接头主链间隔开的多羟基基团。说明性地, 所述接头包括下式的片段:

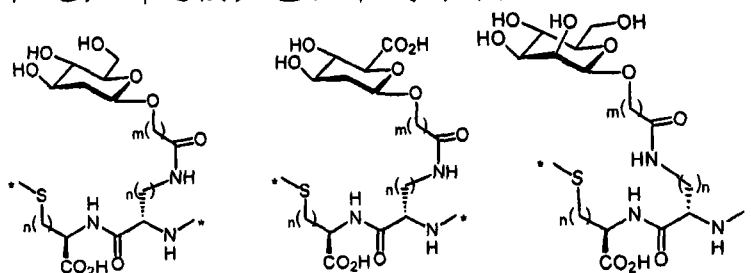


其中 n 、 m 和 r 为整数，并在每次出现时各自独立选自 1 至约 5。在一说明性方面， m 每次出现时独立的是 2 或 3。另一方面， r 每次出现时为 1。另一方面， n 每次出现时为 1。在一变化方式中，将多羟基基团连接至接头的主链的基团是不同的杂芳基，包括但不限于，吡咯、吡唑、1,2,4-三唑、咪唑、噁唑、异噁唑、噻吩基、噻唑、异噻唑、噁二唑等。同样地，考虑到二价 6-元环杂芳基。上述说明性的亲水间隔接头的其它变化方式包括氧化烯基团，如下式：



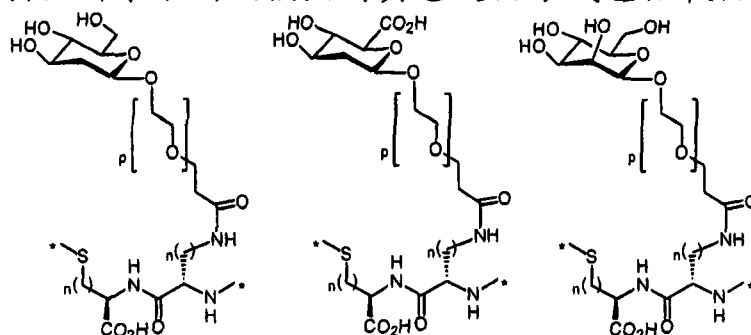
其中 n 和 r 为整数，并在每次出现时各自独立选自 1 至约 5； p 为选自 1 至约 4 的整数。

在另一实施方式中，本发明所述的亲水接头 L 包括与接头主链间隔开的多羟基基团。说明性地，所述接头包括下式的片段：



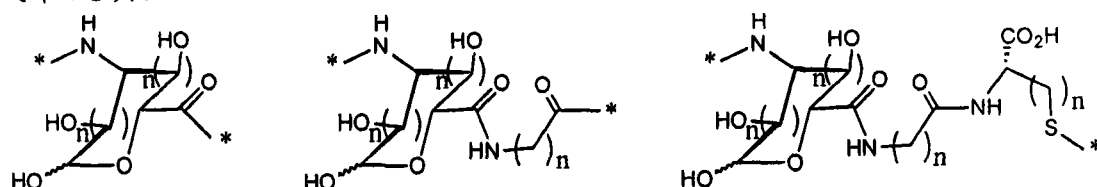
其中 n 为选自 1 至约 3 的整数， m 为选自 1 至约 22 的整数。在一说明性方面， n 为 1 或 2。在另一说明性方面， m 选自约 6 至约 10，说明性地如 8。在一变化方式中，将多羟基基团连接至接头主链的基团是不同的官能团，包括但不

限于，酯、脲、氨基甲酸酯、酰基胂(acylhydrazone)等。同样地，考虑到环状变化方式。上述说明性的亲水间隔接头的其它变化方式包括氧化烯基团，如下式：



其中 n 和 r 为整数，并在每次出现时各自独立选自 1 至约 5； p 为选自 1 至约 4 的整数。

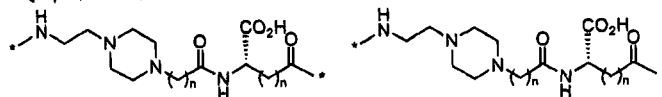
在另一实施方式中，亲水间隔接头是主链和支侧基序(motifs)的组合，例如由下式来说明：

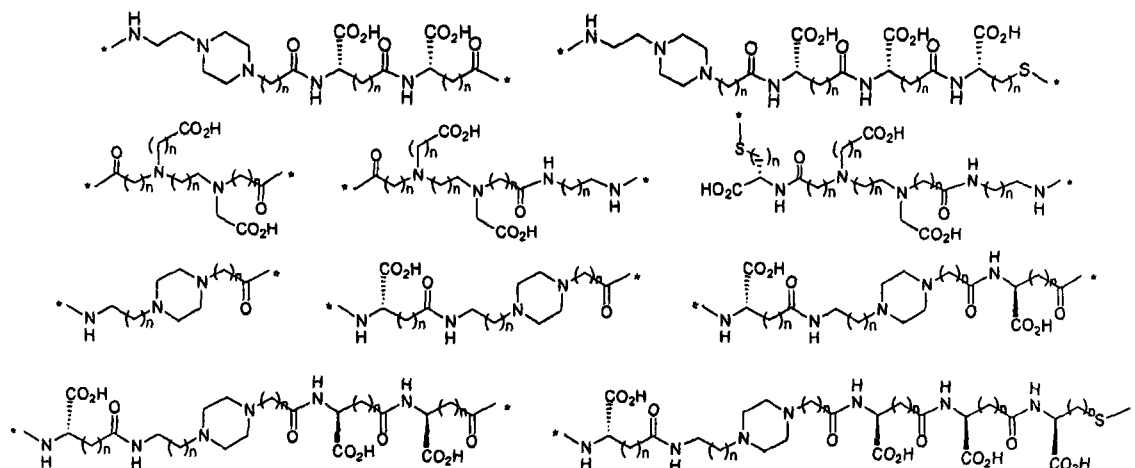


其中 n 为每次出现时独立选自 0 至约 3 的整数。上述结构式意图代表包含 4、5、6 和更多成员的环状糖。此外，应当理解的是，上述结构式可被修改从而代表结构式中的一个或多个羟基被氢、烷基或氨基置换的脱氧糖。此外，应当理解的是，通过上述结构式也包括一个或多个羟基被氧化为相应羰基的相应的羰基化合物，其中。此外，在该说明性实施方式中，吡喃糖包括羧基和氨基官能团，并且(a)可被插入主链中和(b)可提供用于该实施方式的变化方式中的支侧链的合成柄。任何的侧羟基可用于连接其它的化学片段，包括另外的糖，以制备相应的寡糖。也考虑到该实施方式的其它变化方式，包括将吡喃糖或其它糖插入到主链的单个碳上(即螺状排列)、偕碳对处(geminal pair of carbons)等排列。举例来说，接头的一端或两端，或试剂 A，或结合配体 B 可连接于糖，从而以 1,1、1,2、1,3、1,4、2,3 或其它排列被插入到主链中。

在另一实施方式中，本发明所述的亲水接头包括主要由碳、氢和氮形成并具有约 3:1 或更低、或约 2:1 或更低的碳/氮比的亲水接头。一方面，本发明所述的亲水接头包括多个氨基官能团。

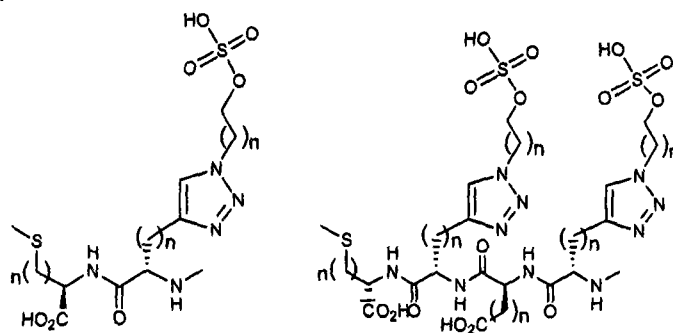
在另一实施方式中，间隔接头包括一个或多个下式的氨基基团：





其中 n 为每次出现时独立选自 1 至约 3 的整数。一方面，整数 n 每次出现时独立地为 1 或 2。另一方面，整数 n 每次出现时为 1。

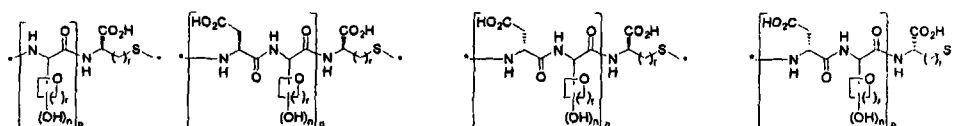
在另一实施方式中，亲水间隔接头是硫酸酯，例如硫酸烷基酯。说明性地，间隔接头具有下式：



其中 n 为每次出现时独立选自 1 至约 3 的整数。说明性地， n 每次出现时独立地是 1 或 2。

应当理解的是，在包含结合于杂原子的游离氢的多羟基、多氨基、羧酸、硫酸等接头中，一个或多个所述游离氢原子可分别被合适的羟基、氨基或酸保护基保护，或可选择地，可被封闭成相应的前药，其中后者被选择用于特别的用途，例如在一般的或特殊的生理条件下释放母体药物的前药。

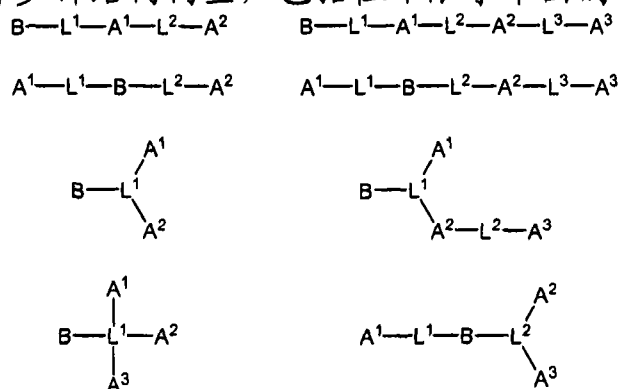
在前述的接头 L 的说明性实例中的每一个实例中，在某些情况下也可包括另外的间隔接头 L_S ，和/或另外的可释放接头 L_R 。所述的间隔接头和可释放接头也可包括不对称碳原子。还应当理解的是，本发明所给的立体化学构型仅仅是说明性的，也考虑到其它的立体化学构型。例如在一变化方式中，相应的非天然氨基酸构型可包括在本发明如下所述的缀合物中：



其中 n 为 2 至约 5 的整数, p 为 1 至约 5 的整数, r 为 1 至约 4 的整数, 如上所述。

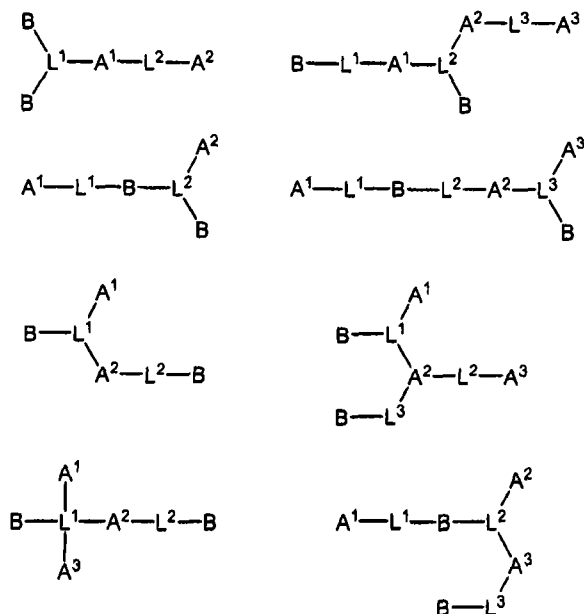
包括用于制备本发明所述缀合物的亲水基团的另外的接头在共同待批的美国临时申请系列号 60/946,092 和 61/036,186 中有描述, 本发明引入所述专利申请的公开内容作为参考。

在另一实施方式中, 本发明描述了多药缀合物。本发明考虑到所述多药缀合物的几种说明性构型, 包括在 PCT 国际申请 WO 2007/022494 中有描述的化合物和组合物, 本发明引入所述申请的公开内容作为参考。说明性地, 多价接头可将受体结合配体 B 连接于两个或多个物质 A, 条件是一种物质是微管溶素。所述多价缀合物可有多种结构构型, 包括但不限于下面的说明性的通式:



其中 B 为受体结合配体, (L^1) 、 (L^2) 和 (L^3) 中的每一个均为本发明所述的多价接头, 其包括亲水间隔接头, 任选包括一个或多个可释放接头和/或另外的间隔接头; (A^1) 、 (A^2) 和 (A^3) 中的每一个均为物质 A 或其类似物或衍生物。本发明也考虑到其它的变化方式, 包括另外的物质 A 或其类似物或衍生物, 另外的接头, 以及(B)、(L)和(A)各自的其它排布构型。

在一变化方式中, 一个以上受体结合配体 B 包括在本发明所述的递药缀合物中, 包括但不限于下面的说明性的通式:



其中 B 各自为受体结合配体, (L¹)、(L²)和(L³)中的每一个均为本发明所述的多价接头, 其包括亲水间隔接头, 任选包括一个或多个可释放接头和/或另外的间隔接头; (A¹)、(A²)和(A³)中的每一个均为物质 A 或其类似物或衍生物。本发明也考虑到其它的变化方式, 包括另外的物质 A 或其类似物或衍生物, 另外的接头, 以及(B)、(L)和(A)中各自的其它排布构型。在一变化方式中, 受体结合配体 B 为相同受体的配体, 在另一变化方式中, 受体结合配体 B 为不同受体的配体。

在另一说明性实施方式中, 另外的试剂是基于以特殊作用机理对抗一种或多种致病细胞群体的活性来选择的。说明性的作用机理包括烷化剂、其它微管抑制剂, 包括那些稳定微管形成和/或使微管形成不稳定的物质, 包括 β -微管蛋白剂、细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)抑制剂、拓扑异构酶抑制剂、蛋白质合成抑制剂, 蛋白激酶抑制剂 (包括 Ras、Raf、PKC、PI3K 等抑制剂)、转录抑制剂、抗叶酸剂、热休克蛋白阻断剂等。

说明性的烷化剂包括但不限于, 丝裂霉素 CBI 等。说明性的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂包括但不限于, CYC202、西里西里(seliciclib)、R-罗斯科维汀(R-roscovitine)、AGM-1470 等。说明性的拓扑异构酶抑制剂包括但不限于, 阿霉素、其它蒽环类抗生素等。说明性的蛋白质合成抑制剂包括但不限于, 鸦胆丁等。说明性的蛋白激酶抑制剂包括 Ras、Raf、PKC、PI3K 等抑制剂, 包括但不限于 L-779,450、R115777 等。说明性的转录抑制剂包括但不限于 α -鹅膏蕈毒肽(α -amanatin)等。说明性的抗叶酸剂包括但不限于氨甲喋呤等。说明性的热休克蛋白阻断剂包括但不限于格尔德霉素等。

说明性的微管抑制剂,包括那些稳定微管形成和/或使微管形成不稳定的物质,包括 β -微管蛋白剂、微管毒素等。说明性的结合于所选择的受体的微管毒素包括但不限于:结合于长春花结合位点的抑制剂,例如阿里那抑素(arenastatin)、海兔毒素(dolastatin)、软海绵素 B(halichondrin B)、美登素、基点菌素 A、根瘤菌素、稻曲病菌毒素、长春碱、长春新碱等;结合于紫杉醇结合位点的稳定剂,例如盘皮海绵内酯(discodermolide)、埃博霉素、紫杉醇(taxol)、泰素(paclitaxol)等;结合于秋水仙碱结合位点的抑制剂,例如秋水仙碱、风车子抑素(combretastatin)、麻疯树毒蛋白 A、鬼臼毒素、五加前胡脂素(steganacin)等,和结合于未定义的位点的其它抑制剂例如自念珠藻环肽(cryptophycin)、微管溶素等。

在一实施方式中,一种物质是微管溶素或其类似物或衍生物,至少一种其它物质是 DNA 烷化剂。在一变化方式中,至少一种其它物质是烷化剂。在另一变化方式中,药物中的至少一种其它药物是 P-糖蛋白(PGP)抑制剂。在另一变化方式中,至少一种其它物质是长春花生物碱或其类似物或衍生物。本发明所述长春花生物碱包括长春花吲哚-二氢吲哚家族生物碱的所有成员,例如但不限于长春地辛、长春碱、长春新碱、长春花碱、文朵灵、环氧长春碱、长春瑞滨、咪多卡、西布曲明、托曲珠利、长春碱酸(vinblastinoic acid)等和其类似物和衍生物。

所述结合配体(B)例如维生素的结合位点可包括能够特异结合于受体的任何结合配体(B)的受体或其衍生物或类似物,其中所述受体或其它蛋白质是由致病细胞群体独特表达、过度表达或优先表达的。由致病细胞群体独特表达、过度表达或优先表达的表面存在的蛋白质通常是因为在非致病细胞上不存在或以低浓度存在而提供选择性清除致病细胞的方法的受体。结合配体递药缀合物能够高亲和力的结合于癌细胞或其它类型致病细胞上的受体。所述高亲和力结合可以是结合配体固有的或结合亲和力可通过使用化学修饰配体(例如,维生素的类似物或衍生物)来增强。

本发明所述结合配体递药缀合物可由,例如,多种多样的维生素或受体-结合维生素类似物/衍生物、接头和药物构成。本发明所述结合配体递药缀合物能够选择性的靶向宿主动物上的致病细胞群体,由于在致病细胞上结合配体例如维生素的受体的优先表达,有利于配体结合。说明性的可用作结合配体(B)的维生素部分包括肉碱、肌醇、硫辛酸、吡哆醛、抗坏血酸、烟酸、泛酸、叶

酸、核黄素、硫胺、生物素、维生素 B₁₂ 和脂溶性维生素 A、D、E 和 K。这些维生素和它们的受体-结合类似物和衍生物构成说明性的靶向实体,所述靶向实体可通过二价接头(L)与药物偶联形成本发明所述的结合配体(B)递药缀合物。

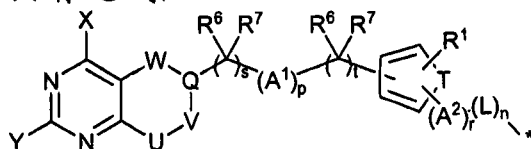
术语“维生素”应当理解为包括维生素类似物和/或衍生物,除非另有说明。说明性地,蝶酸(叶酸的衍生物)、生物素类似物例如生物胞素、氧硫生物素、氧代生物素和其它的生物素受体-结合化合物等被认为是维生素、维生素类似物和维生素衍生物。应当理解的是,本发明所述维生素类似物或衍生物是指包含杂原子的维生素,通过所述杂原子使维生素类似物或衍生物共价连接于二价接头(L)。

说明性的维生素部分包括叶酸、生物素、核黄素、硫胺、维生素 B₁₂ 和这些维生素分子的受体-结合类似物和衍生物,以及其它相关的维生素受体结合分子。

在一实施方式中,靶向配体 B 是叶酸、叶酸类似物或叶酸衍生物。应当理解的是,本发明所用的术语“叶酸”单独使用和共同使用时均是指叶酸本身、和/或那些能够结合于叶酸受体的叶酸的类似物和衍生物。

叶酸类似物和/或衍生物的说明性实施方式包括亚叶酸、蝶聚谷氨酸(pteropolyglutamic acid)和叶酸受体-结合蝶啶例如四氢蝶呤、二氢叶酸、四氢叶酸、及其脱氮(deaza)和二脱氮(dideaza)类似物。术语“脱氮”和“二脱氮”类似物是指本领域公认的用碳原子取代天然存在的叶酸结构或其类似物或衍生物上一个或两个氮原子的类似物。举例来说,所述脱氮类似物包括 1-脱氮、3-脱氮、5-脱氮、8-脱氮和 10-脱氮叶酸类似物。所述二脱氮类似物包括,举例来说,1,5-二脱氮、5,10-二脱氮、8,10-二脱氮和 5,8-二脱氮叶酸类似物。用作复合体形成配体的其它叶酸类包括叶酸受体-结合类似物氨蝶呤、氨甲喋呤(甲氨蝶呤)、N¹⁰-甲基叶酸、2-脱氨基-羟基叶酸、脱氮类似物例如 1-脱氮甲蝶呤或 3-脱氮甲蝶呤和 3',5'-二氯-4-氨基-4-脱氧-N¹⁰-甲基蝶酰谷氨酸(二氯甲氨蝶呤)。前述的叶酸类似物和/或衍生物通常称为叶酸类,反映它们与叶酸-受体结合的能力,所述配体与外源分子缀合后,可有效的增强跨膜转运,例如通过本发明所述的叶酸-介导的胞吞作用。其它能够结合于叶酸受体从而开始受体介导的复合体胞吞转运的合适的结合配体包括抗叶酸受体的抗体。在具有抗叶酸受体的抗体的复合体中外源分子用于引发复合体的跨膜转运。

结合于叶酸受体的另外的叶酸类似物在美国专利申请 2005/0227985 和 2004/0242582 中有描述, 本发明引入所述专利申请的公开内容作为参考。说明性地, 所述叶酸类似物具有通式:



其中 X 和 Y 各自独立选自由卤素、 R^2 、 OR^2 、 SR^3 和 NR^4R^5 组成的组;

U、V 和 W 代表各自独立选自由 $-(R^{6a})C=$ 、 $-N=$ 、 $-(R^{6a})C(R^{7a})-$ 和 $-N(R^{4a})-$ 组成的组的二价部分; Q 选自由 C 和 CH 组成的组; T 选自由 S、O、N 和 $-C=C-$ 组成的组;

A^1 和 A^2 各自独立选自由下组基团: 氧、

硫、 $-C(Z)-$ 、 $-C(Z)O-$ 、 $-OC(Z)-$ 、 $-N(R^{4b})-$ 、 $-C(Z)N(R^{4b})-$ 、 $-N(R^{4b})C(Z)-$ 、 $-OC(Z)N(R^{4b})-$ 、 $-N(R^{4b})C(Z)O-$ 、 $-N(R^{4b})C(Z)N(R^{5b})-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-N(R^{4a})S(O)_2-$ 、 $-C(R^{6b})(R^{7b})-$ 、 $-N(C\equiv CH)-$ 、 $-N(CH_2C\equiv CH)-$ 、 C_1-C_{12} 亚烷基和 C_1-C_{12} 亚烷基氧基, 其中 Z 是氧或硫;

R^1 选自由氢、卤素、 C_1-C_{12} 烷基和 C_1-C_{12} 烷氧基组成的组; R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^{4a} 、 R^{4b} 、 R^5 、 R^{5b} 、 R^{6b} 和 R^{7b} 各自独立选自下组基团: 氢、卤素、 C_1-C_{12} 烷基、 C_1-C_{12} 烷氧基、 C_1-C_{12} 烷酰基、 C_1-C_{12} 烯基、 C_1-C_{12} 炔基、 $(C_1-C_{12}$ 烷氧基)羰基和 $(C_1-C_{12}$ 烷基氨基)羰基;

R^6 和 R^7 各自独立选自由氢、卤素、 C_1-C_{12} 烷基和 C_1-C_{12} 烷氧基组成的组; 或 R^6 和 R^7 一起形成羰基; R^{6a} 和 R^{7a} 各自独立选自由氢、卤素、 C_1-C_{12} 烷基和 C_1-C_{12} 烷氧基组成的组; 或 R^{6a} 和 R^{7a} 一起形成羰基;

L 是如本发明所述的二价接头; 以及

n、p、r、s 和 t 各自独立为 0 或 1。

应当理解的是, 本发明所用的术语“叶酸”单独使用或共同使用时均是指用于形成缀合物的叶酸, 或可选择地指能够结合于叶酸或叶酸受体的叶酸类似物或其衍生物。

维生素可为包括氮的叶酸, 在该实施方式中, 间隔接头可为亚烷基羰基、环亚烷基羰基、羰基烷基羰基、1-亚烷基琥珀酰亚胺-3-基、1-(羰基烷基)琥珀酰亚胺-3-基, 其中所述接头中的每一个被取代基 X^1 任选取代, 所述间隔接头与叶酸氮结合形成酰亚胺或烷基酰胺。在该实施方式中, 所述取代基 X^1 可为烷基、羟基烷基、氨基、氨基烷基、烷基氨基烷基、二烷基氨基烷基、巯基烷基、烷

巯基烷基、芳基、取代的芳基、芳基烷基、取代的芳基烷基、羧基、羧基烷基、胍基烷基、 R^4 -羰基、 R^5 -羰基烷基、 R^6 -酰氨基和 R^7 -酰氨基烷基，其中 R^4 和 R^5 各自独立选自氨基酸、氨基酸衍生物和肽，其中 R^6 和 R^7 各自独立选自氨基酸、氨基酸衍生物和肽。

维生素类似物和/或衍生物的说明性的实施方式也包括生物素的类似物和衍生物例如生物胞素、氧硫生物素、氧代生物素和其它的生物素受体-结合化合物等。应当理解的是，本发明也考虑到本发明所述其它维生素的类似物和衍生物。在一实施方式中，可用作本发明所述递药缀合物中的结合配体(B)的维生素包括那些结合于在活化的巨噬细胞上特异表达的维生素受体的维生素，所述维生素受体例如结合本发明所述的叶酸或其类似物或衍生物的叶酸受体。

应当理解的是，除本发明所述维生素外，其它结合配体可与本发明所述的药物和接头偶联并预期形成结合配体-接头-药物缀合物，所述缀合物能够利于药物至期望靶标的递送。这些其它结合配体，除所述维生素及其类似物和衍生物外，还可用于形成能够结合于靶细胞的递药缀合物。通常来说，细胞表面受体的任何结合配体(B)可被有利地用作接头-药物缀合物可连接的靶向配体。本发明预期的说明性的其它配体包括由文库筛选鉴别的肽配体、肿瘤细胞-特异性肽、肿瘤细胞-特异性适体、肿瘤细胞-特异性糖类、肿瘤细胞-特异性单克隆或多克隆抗体、抗体的 Fab 或 scFv (即单链可变区)片段(例如抗 EphA2 或其它转移癌细胞特异性表达的或转移癌细胞独有的蛋白质的抗体的 Fab 片段)、来自组合文库的小有机分子、生长因子(例如 EGF、FGF)、胰岛素、胰岛素样生长因子和同源多肽、生长抑素和其类似物、转铁蛋白、脂蛋白复合物、胆盐、选择素、类固醇激素、含有 Arg-Gly-Asp 的肽、类视黄醇、多种半乳凝素(Galectins)、 δ -阿片样受体配体、缩胆囊肽 A 受体配体、血管紧张素 AT1 或 AT2 受体特异性配体、过氧化物酶体增殖因子-活化的受体 λ 配体、 β -内酰胺抗生素例如青霉素、包含小有机分子的抗菌药物、以及特异结合于在肿瘤细胞表面或感染性微生物上优先表达的受体的其它分子，基于受体或其它细胞表面蛋白质的晶体结构而设计的适合特定受体的结合口袋的抗菌剂和其它药物，在肿瘤细胞表面优先表达的肿瘤抗原或其它分子或这些分子中任何分子的片段的结合配体。可作为结合配体-药物缀合物的结合位点的肿瘤-特异性抗原的实例包括 Ephrin 蛋白质家族中的一员例如 EphA2 的细胞外表位。在正常细胞中，EphA2 表达被限制在细胞-细胞联结，但是在转移性肿瘤细胞中，EphA2 分布于整个细胞表面。因此，

例如，缀合于药物的抗体的 Fab 片段可结合转移性细胞上的 EphA2，但是所述蛋白质不大可能结合于正常细胞上的 Fab 片段，导致结合配体-药物缀合物特异的结合于转移性癌细胞。

在另一实施方式中，本发明描述了用于治疗由致病细胞群体引起的或证明的疾病的方法。所述结合配体(B)递药缀合物可用于治疗由宿主上存在致病细胞群体来表征的病症，其中所述致病细胞群体的成员具有结合配体(B)或其类似物或衍生物可及的位点，其中所述结合位点是由致病细胞独特表达、过度表达或优先表达的。选择性的清除致病细胞是通过将结合配体(B)递药缀合物的配体部分结合于配体受体、转运蛋白或其它与结合配体(B)或其类似物或衍生物特异结合的存在于表面的蛋白质来介导的，所述存在于表面的蛋白质是由致病细胞独特表达、过度表达或优先表达的。由致病细胞独特表达、过度表达或优先表达的存在于表面的蛋白质是非致病细胞上不存在或以低浓度存在的受体，从而提供选择性清除致病细胞的方法。

举例来说，表面表达的维生素受体，例如高亲和力叶酸受体，在癌细胞上过度表达。据报道，卵巢、乳腺、结肠、肺、鼻、咽喉和脑的上皮癌均表达抬高的水平的叶酸受体。事实上，已知超过 90% 的人类卵巢癌表达大量的这种受体。因此，本发明所述结合配体(B)递药缀合物可用于治疗优先表达配体受体(例如维生素受体)并因此具有配体(例如维生素或其类似物或衍生物)表面可及的结合位点的多种肿瘤细胞类型，以及其它致病细胞类型，例如感染性物质。一方面，本发明描述了用于靶向结合配体-接头-药物缀合物从而最大程度靶向要清除的致病细胞的方法。

本发明所述结合配体(B)递药缀合物可用于人临床医学和兽医应用。因此，带有所述致病细胞群体并使用所述结合配体(例如维生素)递药缀合物治疗的宿主动物可是人，或在兽医应用的情况中，可为实验室的、农牧的、驯养的或野生的动物。本发明所述的方法可应用于宿主动物包括但不限于人，实验室动物例如啮齿类动物(例如小鼠、大鼠、仓鼠等)、兔、猴、黑猩猩，驯养动物例如狗、猫和兔，农牧动物例如牛、马、猪、绵羊、山羊，以及被圈养的野生动物例如熊、熊猫、狮、虎、豹、象、斑马、长颈鹿、大猩猩、海豚和鲸。

所述方法适用于在这些宿主动物上引起多种病状的致病细胞群体。术语“致病细胞”是指，举例来说，癌细胞、感染性物质例如细菌和病毒、被细菌或病毒感染感染的细胞、能够引起病症的活化的巨噬细胞，以及任何独特表达、优先表

达或过度表达结合配体受体(例如维生素受体或结合维生素类似物或衍生物的受体)的其它类型的致病细胞。致病细胞也可包括引起病症的任何细胞,所述病症是采用本发明所述的结合配体递药缀合物治疗导致症状减轻的病症。举例来说,所述致病细胞可为在某些情况下致病但在其它情况下不致病的宿主细胞,例如引起移植物抗宿主病的免疫系统细胞。

因此,所述致病细胞群体可为致癌(包括良性肿瘤和恶性肿瘤)的癌细胞群体,或可为不致癌的。所述癌细胞群体可自发产生或由例如存在于宿主动物生殖细胞的突变或体细胞突变之类的过程引起的,或其可为化学诱导、病毒诱导或辐射诱导的。所述方法可用于治疗例如癌、肉瘤、淋巴瘤、霍奇金病、黑素瘤、间皮瘤、伯基特淋巴瘤、鼻咽癌、白血病和骨髓瘤。所述癌细胞群体可包括但不限于,口腔癌、甲状腺癌、内分泌腺癌、皮肤癌、胃癌、食道癌、喉癌、胰腺癌、结肠癌、膀胱癌、骨癌、卵巢癌、子宫癌、乳腺癌、睾丸癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、肝癌和肺癌

在致病细胞群体为癌细胞群体的实施方式中,缀合物给药的作用是通过瘤重降低或消除或肿瘤细胞增殖抑制来衡量的治疗反应。在肿瘤的情况中,所述消除可为原发瘤细胞的消除或为已经转移或正在从原发瘤分离过程中的细胞的消除。也描述了在通过任何治疗方法包括手术切除肿瘤、放疗、化疗或生物疗法移除肿瘤后,为了防止肿瘤的复发而采用结合配体(B)递药缀合物(例如维生素用作结合配体)作为预防性治疗。所述预防性治疗可为用结合配体(B)递药缀合物的初期治疗,例如每日多剂量方案的治疗,和/或可是在初期治疗后数天或数月的间隔后的附加治疗和系列治疗。因此,采用所述方法治疗的任何致病细胞群体的消除包括致病细胞数量的降低、致病细胞增殖的抑制、防止致病细胞复发的预防性治疗、或引起疾病症状减轻的对致病细胞的治疗。

在癌细胞正在被消除的情况中,所述方法可与手术切除肿瘤、放疗、化疗或生物疗法联合使用,所述生物疗法例如其它免疫疗法包括但不限于单克隆抗体疗法、采用免疫调节剂的治疗,过继转移免疫效应细胞,采用造血生长因子、细胞因子和接种疫苗的治疗。

所述方法也适用于引起多种感染性疾病的致病细胞群体。举例来说,所述方法适用于例如细菌、真菌(包括酵母)、病毒、被病毒感染的细胞、支原体和寄生虫之类的致病细胞群体。可使用本发明所述的结合配体(B)递药缀合物治疗

的感染性微生物是任何本领域公认的在动物上导致发病的感染性微生物，包括例如革兰氏-阴性或革兰氏-阳性球菌或杆菌这样的微生物。举例来说，变形杆菌(*Proteus* sp.)、克雷伯氏菌(*Klebsiella* sp.)、普罗威登斯菌(*Providencia* sp.)、耶尔森菌(*Yersinia* sp.)、欧文氏菌(*Erwinia* sp.)、肠杆菌(*Enterobacter* sp.)、沙门菌(*Salmonella* sp.)、沙雷菌(*Serratia* sp.)、气杆菌(*Aerobacter* sp.)、埃希氏菌(*Escherichia* sp.)、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、志贺菌(*Shigella* sp.)、弧菌(*Vibrio* sp.)、气单胞菌(*Aeromonas* sp.)、弯曲杆菌(*Campylobacter* sp.)、链球菌(*Streptococcus* sp.)、葡萄球菌(*Staphylococcus* sp.)、乳杆菌(*Lactobacillus* sp.)、微球菌(*Micrococcus* sp.)、莫拉菌(*Moraxella* sp.)、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)、梭菌(*Clostridium* sp.)、棒杆菌(*Corynebacterium* sp.)、埃伯特菌(*Eberthella* sp.)、微球菌(*Micrococcus* sp.)、分枝杆菌(*Mycobacterium* sp.)、奈瑟球菌(*Neisseria* sp.)、嗜血菌(*Haemophilus* sp.)、拟杆菌(*Bacteroides* sp.)、利斯特菌(*Listeria* sp.)、丹毒丝菌(*Erysipelothrix* sp.)、不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)、布鲁杆菌(*Brucella* sp.)、巴斯德菌(*Pasteurella* sp.)、弧菌(*Vibrio* sp.)、黄杆菌(*Flavobacterium* sp.)、梭杆菌(*Fusobacterium*)、链杆菌(*Streptobacillus*)、鞘杆菌(*Calymmatobacterium*)、军团菌(*Legionella* sp.)、密螺旋体(*Treponema* sp.)、疏螺旋体(*Borrelia* sp.)、钩端螺旋体(*Leptospira* sp.)、放线菌(*Actinomyces* sp.)、诺卡菌(*Nocardia* sp.)、立克次体(*Rickettsia* sp.)和在宿主上致病的任何其它细菌可采用本发明所述的结合配体递药缀合物治疗。

特别关注的是，具有抗生素抗性的细菌例如抗生素抗性链球菌和葡萄球菌(*Staphylococcus*)，或对抗生素敏感但用抗生素治疗后导致复发感染以致最终发展成耐药生物体的细菌。对抗生素敏感但用抗生素治疗后导致复发感染以致最终发展成耐药生物体的细菌，可用本发明所述的结合配体(B)递药缀合物在不使用抗生素的情况下治疗，或者与低于正常给予患者的剂量的抗生素联合使用，从而避免这些抗生素耐药细菌菌株的发展。

病毒例如 DNA 和 RNA 病毒，也可使用所述的方法治疗。所述病毒包括但不限于，DNA 病毒例如乳头状瘤病毒、细小病毒、腺病毒、疱疹病毒和牛痘病毒，以及 RNA 病毒例如沙粒病毒、冠状病毒、鼻病毒、呼吸道合胞体(病毒)、流感病毒、微小核糖核酸病毒、副粘病毒、呼肠孤病毒、逆转录病毒、慢病毒和棒状病毒。

所述方法也适用于任何真菌，包括酵母、支原体、寄生虫或在动物上致病

的其它感染性生物体。可用所述方法和组合物治疗的真菌的实例包括如霉菌科生长或似酵母菌的真菌, 包括, 举例来说, 导致疾病的真菌, 所述疾病例如癣组织胞浆菌病、芽生菌病、曲霉菌病、隐球菌病、孢子丝菌病、球孢子菌病、副球孢子菌病(paracoccidio- idomycosis)、毛霉菌病、着色芽生菌病、皮真菌病原藻病、镰刀菌病(fusariosis)、糠疹、足分枝菌病、副球孢子菌病、暗色丝孢霉病、假性阿利什利菌病、孢子丝菌病、毛孢子菌病、肺囊虫(pneumocystis)感染和念珠菌病。

所述方法也可用于治疗寄生性感染, 包括但不限于, 由下述寄生虫引起的感染: 绦虫例如带绦虫(*Taenia* sp.)、膜壳绦虫(*Hymenolepsis* sp.)、裂头绦虫(*Diphyllobothrium* sp.)和棘球绦虫(*Echinococcus* sp.), 吸虫例如姜片虫(*Fasciolopsis* sp.)、异形吸虫(*Heterophyes* sp.)、后殖吸虫(*Metagonimus* sp.)、支睾吸虫(*Clonorchis* sp.)、片吸虫(*Fasciola* sp.)、并殖吸虫(*Paragonimus* sp.)和血吸虫(*Schistosoma* sp.), 蛔虫例如蛲虫(*Enterobius* sp.)、鞭虫(*Trichuris* sp.)、蛔虫(*Ascaris* sp.)、钩口线虫(*Ancylostoma* sp.)、板口线虫(*Necator* sp.)、类圆线虫(*Strongyloides* sp.)、毛线虫(*Trichinella* sp.)、吴策线虫(*Wuchereria* sp.)、布鲁丝虫(*Brugia* sp.)、罗阿丝虫盘尾属(*Loa Onchocerca* sp.)和龙线虫(*Dracunculus* sp.), 阿米巴例如纳氏虫(*Naegleria* sp.)和棘阿米巴(*Acanthamoeba* sp.)以及原虫例如疟原虫(*Plasmodium* sp.)、锥虫(*Trypanosoma* sp.)、利什曼原虫(*Leishmania* sp.)、弓形虫(*Toxoplasma* sp.)、内阿米巴(*Entamoeba* sp.)、贾第虫(*Giardia* sp.)、等孢子球虫(*Isospora* sp.)、隐孢子虫(*Cryptosporidium* sp.)和肠孢虫(*Enterocytozoon* sp.)。

本发明所述结合配体递药缀合物所针对的致病细胞也可以是带有内源性病原体的细胞, 例如被病毒、支原体、寄生虫或细菌感染的细胞, 条件是这些细胞优先表达配体受体例如维生素受体。

在一实施方式中, 所述结合配体递药缀合物可通过将结合配体部分结合于特异性结合该配体并且在致病细胞上优先表达的受体、转运蛋白或其它存在于表面的蛋白质而被内化至所靶向的致病细胞中。举例来说, 可通过受体-介导的胞吞作用进行所述内化。如果结合配体(B)递药缀合物含有可释放接头, 则结合配体部分和药物可在细胞内分离, 药物可作用于其细胞内靶标。

在替代实施方式中, 递药缀合物的结合配体部分可结合于致病细胞上, 使得药物与致病细胞表面紧密结合。所述药物随后可通过可释放接头的断裂被释放。举例来说, 如果所述可释放接头为二硫基, 则所述药物可被蛋白质二硫化

物异构酶释放。所述药物随后可被结合配体(B)递药缀合物所结合的致病细胞摄取,或者所述药物被紧邻该细胞的另一致病细胞摄取。可选择地,如果所述可释放接头为二硫基,所述药物可被细胞内的蛋白质二硫化物异构酶释放。所述药物也可通过水解机理,例如酸催化的水解,如上所述的某些 β 消除机理,或经由产生氧鎓离子或内酯鎓离子的机理的邻位辅助断裂释放。一个或多个可释放接头的选择将决定药物通过哪种机理从缀合物释放。应当理解的是,所述选择可通过药物缀合物将被使用的条件来预先确定。可选择地,所述递药缀合物可在结合状态下被靶细胞内化,所述结合配体和所述药物可在细胞内保持连接,所述药物在没有与维生素部分分离的情况下发挥其作用。

在又一实施方式中,所述结合配体为维生素,维生素-递药缀合物可通过不依赖于细胞维生素受体的机理起作用。举例来说,所述递药缀合物可结合于存在于血清或血清蛋白质例如白蛋白上的可溶的维生素受体,导致所述缀合物相对于未缀合的药物来说其循环时间延长,并导致所述缀合物相对于未缀合的药物来说其对致病细胞群体的活性增加。

在一实施方式中,用于本发明所述方法的药物在血清中保持稳定至少4小时。在另一实施方式中,所述药物具有纳摩尔范围内的 IC_{50} ,在另一实施方式中,所述药物是水溶性的。如果所述药物不是水溶性的,二价接头(L)可被衍生化以增加水溶性。术语“药物”也指本发明上述的任何的药物类似物或衍生物。应当理解的是,药物类似物或衍生物也指包含杂原子的药物,通过所述杂原子所述药物类似物或衍生物共价连接于二价接头(L)。

所述结合配体递药缀合物可包括结合配体(B)、二价接头(L)、药物、和任选地将结合配体(B)受体结合部分和药物连接于二价接头(L)的杂原子接头。在一说明性实施方式中,应当理解的是维生素类似物或衍生物可指包含杂原子的维生素,通过所述杂原子将所述维生素类似物或衍生物共价连接于二价接头(L)。因此,在该说明性实施方式中,维生素可通过杂原子接头共价连接于二价接头(L),或维生素类似物或衍生物(即含有杂原子的)可直接连接于二价接头(L)。在类似的说明性实施方式中,药物类似物或衍生物是药物,药物类似物或衍生物可指含有杂原子的药物,通过所述杂原子将药物类似物或衍生物共价连接于二价接头(L)。因此,在这些说明性方面,药物可通过杂原子接头共价连接于二价接头(L),或药物类似物或衍生物(即含有杂原子的)可直接连接于二价接头(L)。所述二价接头(L)可包括间隔接头、可释放(即可断裂)接头和杂原子接头,

所述杂原子接头将间隔接头连接到含有这两种类型接头的缀合物中的可释放接头上。

通常，在二价接头(L)和结合配体(B)或其类似物或衍生物之间和在二价接头(L)和药物或其类似物之间(包括任何介入的杂原子接头)形成缀合物的任何方式，均可被使用。同样地，任何本领域公认的在间隔接头、可释放接头和杂原子接头之间二价接头(L)，从而形成缀合物的方法均可被使用。所述缀合物可通过这些分子直接缀合形成，举例来说，通过络合作用，或通过氢键、离子键或共价键缀合。举例来说，可通过在酸、醛、羟基、氨基、巯基或联亚氨基(hydrazo)之间形成酰胺、酯、二硫键或亚氨键进行共价键合。

在另一实施方式中，描述了给予一个或多个剂量时，包含对消除宿主动物致病细胞群体有效量的结合配体(B)递药缀合物的药物组合物。所述结合配体递药缀合物优选经肠胃外例如皮内、皮下、肌肉、腹膜内、静脉或鞘内途径给予宿主动物。可选择地，所述结合配体递药缀合物可通过其它医学上有用的途径例如口服给予宿主动物，并可使用任何有效的剂量和适合的治疗剂型，包括缓释剂型。

肠胃外剂型的实例包括活性药物在等渗盐水、5%葡萄糖或其它众所周知的药用液体载体例如液态醇、二元醇、酯和酰胺中的水溶液。所述肠胃外剂型可为包含所述剂量的递药缀合物的可重建冻干物(reconstitutable lyophilizate)形式。在该实施方式的一方面，可给予本领域已知的许多缓释剂型中的任何一种例如，美国专利 4,713,249、5,266,333 和 5,417,982 中描述的可生物降解的碳水化合物基质，本发明引入所述专利的公开内容作为参考，或者可选择地，可使用缓释泵(例如渗透泵)。

在一说明性方面，至少一种包含治疗因子的额外组合物可给予宿主，与上面详述的方法学联用或作为其佐剂，以增强结合配体递药缀合物-介导的致病细胞群体的消除，或者可给予不止一种的额外治疗因子。所述治疗因子可选自化疗药物，或能够补充所给予的结合配体递药缀合物的有效性的另一种治疗因子。

在一说明性方面，可使用这些因子的治疗有效的组合。在一实施方式中，举例来说，治疗有效量，例如在每日多剂量方案中约 0.1 MIU/m²/剂量/天至约 15 MIU/m²/剂量/天的量，或者例如在每日多剂量方案中约 0.1 MIU/m²/剂量/天至约 7.5 MIU/m²/剂量/天的量的治疗因子，可与所述结合配体递药缀合物一起使用以消除、减少或抵消带有致病细胞的宿主动物上的致病细胞(MIU = 百万国

际单位, m^2 = 普通人的大概体表面积)。

在另一实施方式中, 举例来说, 本身是细胞毒素或可用于增强肿瘤的渗透性的化疗药物, 也适合用于本发明所述方法中与结合配体递药缀合物联合使用。所述化疗药物包括肾上腺类皮质激素和皮质类甾醇、烷化剂、抗雄激素药、抗雌激素药、雄激素、阿克拉霉素和阿克拉霉素衍生物、雌激素、抗代谢药(例如胞嘧啶阿糖核苷、嘌呤类似物、嘧啶类似物和甲氨蝶呤)、白消安、卡铂、苯丁酸氮芥、顺铂和其它铂化合物、他莫昔芬、紫杉醇(taxol)、泰素(paclitaxel)、泰素衍生物、Taxotere[®]、环磷酰胺、道诺霉素、根霉素、T2 毒素、植物碱、泼尼松、羟基脲、替尼泊苷、丝裂霉素、盘皮海绵内酯(discodermolides)、微管抑制剂、埃博霉素(epothilones)、微管溶素、环丙基苯并[e]吲哚酮、闭联(seco)-环丙基苯并[e]吲哚酮、O-Ac-闭联-环丙基苯并[e]吲哚酮、博来霉素和任何其它的抗生素、氮芥、亚硝基脲(nitrosureas)、长春新碱、长春碱和其类似物和衍生物例如脱乙酰长春碱一酰胺、秋水仙碱、秋水仙碱衍生物、异秋水仙碱、硫代秋水仙碱、三苯甲基半胱氨酸、软海绵素 B、多拉司他汀类例如多拉司他汀 10、鹅膏菌素类例如 α -鹅膏菌素、喜树碱、伊立替康以及其它的喜树碱衍生物、格尔德霉素和格尔德霉素衍生物、雌莫司汀、诺考达唑、MAP4、秋水仙胺、炎性的和促炎的药物、肽和肽模拟物信号转导抑制剂以及任何其它的本领域公知的药物或毒素。可用的其它药物包括青霉素类、头孢菌素类、万古霉素、红霉素、克林霉素、利福平、氯霉素、氨基糖苷类抗生素、庆大霉素、两性霉素 B、阿昔洛韦、曲氟尿苷、更昔洛韦、齐多夫定、金刚烷胺、利巴韦林、美登素类和其类似物和衍生物、吉西他滨、以及任何其它的本领域公知的抗微生物化合物。

所述治疗因子可在所述结合配体递药缀合物之前、之后或同时给予宿主动物, 所述治疗因子可作为含有结合配体递药缀合物的同一组合物的一部分或不同于结合配体递药缀合物的组合物的部分给予。任何含有治疗有效剂量的治疗因子的所述治疗组合物均可使用。

此外, 可使用不止一种类型的结合配体递药缀合物。说明性地, 举例来说, 宿主动物可使用具有不同维生素的缀合物治疗, 但是在共同给药方案中使用相同的药物。在另一实施方式中, 宿主动物可使用含有连接于不同药物的相同结合配体或连接于多种药物的多种结合配体的缀合物治疗。在另一说明性实施方式中, 可以使用具有相同或不同维生素的结合配体递药缀合物, 或包含作为同

一递药缀合物组成部分的多种维生素和多种药物的相同或不同药物。

所述结合配体递药缀合物的单一每日剂量可显著的变动,取决于宿主条件、正在治疗的病症、所述缀合物的分子量、其给药途径和组织分布、以及共同使用其它治疗方法例如放疗的可能性。给予患者的有效剂量取决于患者的体表面积、体重和医师对患者条件的评估。在说明性实施方式中,有效剂量可位于,举例来说,约 1 ng/kg 至约 1 mg/kg、约 1 μ g/kg 至约 500 μ g/kg 和约 1 μ g/kg 至约 100 μ g/kg 的范围内。

另一说明性方面,给予所述结合配体递药缀合物的任何有效方案均可使用。举例来说,所述结合配体递药缀合物可作为单一剂量给予,或可分开并以每日多剂量方案给予。在另一实施方式中,交错的方案,举例来说,每周一至三天可用作每日治疗的选择性的方案,所述间歇的或交错的每日方案被认为与每天治疗等效,并且在本发明所述方法的范围内。在一实施方式中,宿主通过采用所述结合配体递药缀合物的多次注射进行治疗,以消除致病细胞群体。在另一实施方式中,宿主多次注射(优选约 2 至高达约 50 次)所述结合配体递药缀合物,举例来说,采用 12-72 小时的间隔或 48-72 小时的间隔注射。在另一实施方式中,所述结合配体递药缀合物的额外注射可在初始注射后间隔数天或数月给予患者,所述额外注射防止由致病细胞所引起的病症复发。

在一实施方式中,可用于结合配体递药缀合物中的维生素或其类似物或衍生物包括那些结合于在活化的巨噬细胞上特异表达的受体的维生素或其类似物或衍生物,所述受体例如结合叶酸或其类似物或衍生物的叶酸受体。举例来说,叶酸-连接的缀合物可用于消灭或抑制在宿主上引起病症的活化的巨噬细胞的活性。给予患有活化巨噬细胞-介导的病症的患者时,所述靶向巨噬细胞的缀合物用以浓缩和联合位于活化巨噬细胞群体中的缀合药物,从而杀死活化的巨噬细胞或抑制巨噬细胞的功能。活化巨噬细胞群体的消除、减少或灭活用于停止或减轻正在治疗的病症特有的活化巨噬细胞-介导的发病机制。已知的通过活化巨噬细胞介导的示例性疾病包括风湿性关节炎、溃疡性结肠炎、克劳恩病、牛皮癣、骨髓炎、多发性硬化、动脉粥样硬化、肺纤维化、结节病、系统性硬化症、器官移植排斥(GVHD)和慢性炎症。所述递药缀合物的给予通常持续直至所述病症的症状减轻或消失。

说明性地,为了杀死活化的巨噬细胞或抑制活化的巨噬细胞的功能而给予的所述结合配体递药缀合物可肠胃外给予患有所述病症的动物或患者,所述肠

胃外给药可以是例如皮内、皮下、肌肉、腹膜内或静脉内与药用载体结合给药。在另一实施方式中，所述结合配体递药缀合物可通过其它医学适用的方法给予动物或患者，可以标准或缓释剂型给予有效剂量。另一方面，所述治疗方法可单独使用或与其它公认的用于治疗由活化的巨噬细胞介导的病症的治疗方法联合使用。

本发明所述递药缀合物可通过本领域公知的合成方法制备。所述合成方法的选择取决于对任选添加杂原子或已经存在于间隔接头、可释放接头、药物和/或结合配体上的杂原子的选择。一般而言，相关键形成反应在“有机转化概览，官能团制备指南”(Comprehensive Organic Transformations, a guide to functional group preparations), VCH 出版公司(VCH Publishers, Inc.), 纽约(1989)以及 Theodora E. Greene 和 Peter G.M. Wuts, “有机合成中的保护基”(Protective Groups in Organic Synthesis), 第2版, 约翰韦利森公司(John Wiley & Sons, Inc.), 纽约(1991)中有描述, 本发明通过参考引入所述文献的公开内容。

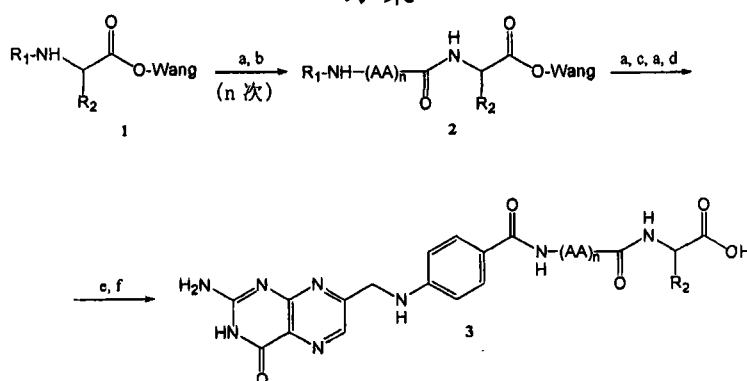
实施例

化合物实施例

本发明所述化合物可用本发明所述方法和合成以及用常规有机合成方法制备。更具体而言，制备所述化合物的方法在美国专利申请 2005/0002942 中有描述，本发明引入所述专利申请的公开内容作为参考。

常规叶酸-肽的形成。含叶酸的肽基片段 Pte-Glu-(AA)_n-NH(CHR₂)CO₂H (3) 通过聚合物支持的连续方法，用标准方法例如 Fmoc-策略，在酸敏感 Fmoc-AA-Wang 树脂(1)上制备，如下列方案所示：

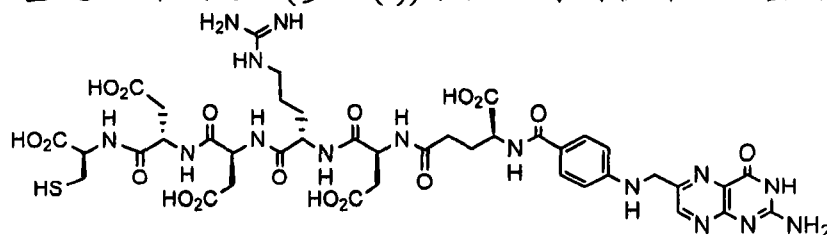
方案



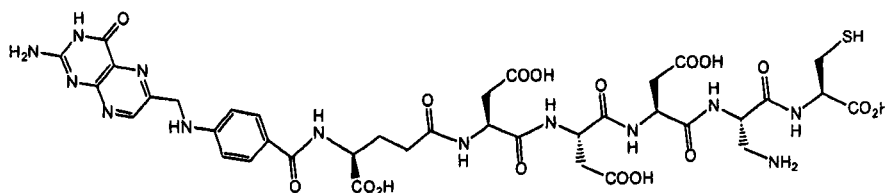
(a) 20% 哌啶/DMF; (b) Fmoc-AA-OH, PyBop, DIPEA, DMF; (c) Fmoc-Glu(O-*t*-Bu)-OH, PyBop, DIPEA, DMF; (d) 1. N^{10} (TFA)-Pte-OH; PyBop, DIPEA, DMSO; (e) TFAA, (CH₂SH)₂, *i*-Pr₃SiH; (f) NH₄OH, pH 10.3.

在本发明所述方法的说明性实施方式中, R₁ 为 Fmoc, R₂ 为所需的适当保护的氨基酸侧链, DIPEA 为二异丙基乙胺。可用标准偶联方法, 例如 PyBOP 和其它本领域已知的方法, 其中偶联剂说明性地用作活化试剂以确保有效偶联。Fmoc 保护基在每次偶联步骤之后, 在标准条件下除去, 所述标准条件例如用哌啶、氟化四丁基铵 (TBAF) 等处理。如方案所述, 可使用适当保护的氨基酸构件(building block), 例如 Fmoc-Glu-O*t*Bu、 N^{10} -TFA-Pte-OH 等, 并以步骤(b)中 Fmoc-AA-OH 为代表。因此, AA 是指任何适当保护的氨基酸原料。应当理解的是, 本发明所用的术语“氨基酸”是指任何具有被一个或多个碳分隔的胺或羧酸官能团, 并包括天然存在的 α 和 β 氨基酸, 以及这些氨基酸的衍生物和类似物。具体而言, 具有侧链的被保护氨基酸例如被保护的丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸酯等也可用于本发明所述叶酸-肽的合成。此外, γ 、 δ 或更长的同源氨基酸, 也可作为原料包括在本发明所述叶酸-肽的合成中。此外, 具有同源侧链或替代的分支结构的氨基酸类似物, 例如正亮氨酸、异缬氨酸、 β -甲基苏氨酸、 β -甲基半胱氨酸、 β , β -二甲基半胱氨酸等也可作为原料包括在本发明所述叶酸-肽的合成中。

涉及 Fmoc-AA-OH 的偶联序列(步骤(a)和(b))进行“n”次, 以制备固体支持肽(2), 其中 n 为整数并可为 0 至约 100。最后的偶联步骤之后, 除去剩余的 Fmoc 基(步骤(a)), 所述肽随后被偶联至谷氨酸衍生物(步骤(c)), 脱保护, 并偶联至 TFA-保护的蝶酸(步骤(d))。随后, 所述肽通过用三氟乙酸、乙二硫酚和三异丙基硅烷处理, 从聚合物载体上切下(步骤(e))。这些反应条件导致同时去除 *t*-Bu、*t*-Boc 和 Trt 保护基, 所述保护基可形成适当保护的氨基酸侧链的部分。所述 TFA 保护基通过用碱处理(步骤(f))除去, 得到含叶酸肽基片段(3)。



根据本发明所述的常规步骤, 将 Wang 树脂结合的 4-甲氧基三苯甲基 (MTT)-保护的 Cys-NH₂ 按下列顺序反应: 1) a. Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBOP, DIPEA; b. 20% 哌啶/DMF; 2) a. Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBOP, DIPEA; b. 20% 哌啶/DMF; 3) a. Fmoc-Arg(Pbf)-OH, PyBOP, DIPEA; b. 20% 哌啶/DMF; 4) a. Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBOP, DIPEA; b. 20% 哌啶/DMF; 5) a. Fmoc-Glu-OtBu, PyBOP, DIPEA; b. 20% 哌啶/DMF; 6) N¹⁰-TFA-蝶酸, PyBOP, DIPEA。所述 MTT、tBu 和 Pbf 保护基用 TFA/H₂O/TIPS/EDT (92.5:2.5:2.5:2.5) 去除, 所述 TFA 保护基用 pH = 9.3 的 NH₄OH 水溶液去除。所选的 ¹H NMR (D₂O) δ (ppm) 8.68 (s, 1H, FA H-7), 7.57 (d, 2H, J = 8.4 Hz, FA H-12 & 16), 6.67 (d, 2H, J = 9 Hz, FA H-13 & 15), 4.40-4.75 (m, 5H), 4.35 (m, 2H), 4.16 (m, 1H), 3.02 (m, 2H), 2.55-2.95 (m, 8H), 2.42 (m, 2H), 2.00-2.30 (m, 2H), 1.55-1.90 (m, 2H), 1.48 (m, 2H); MS (ESI, m+H⁺) 1046。



根据本发明所述的常规步骤, 将 Wang 树脂结合的 4-甲氧基三苯甲基 (MTT)-保护的 Cys-NH₂ 按下列顺序反应: 1) a. Fmoc-β-氨基丙氨酸 (NH-MTT)-OH, PyBOP, DIPEA; b. 20% 哌啶/DMF; 2) a. Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBOP, DIPEA; b. 20% 哌啶/DMF; 3) a. Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBOP, DIPEA; b. 20% 哌啶/DMF; 4) a. Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBOP, DIPEA; b. 20% 哌啶/DMF; 5) a. Fmoc-Glu-OtBu, PyBOP, DIPEA; b. 20% 哌啶/DMF; 6) N¹⁰-TFA-蝶酸, PyBOP, DIPEA。所述 MTT、tBu 和 TFA 保护基用 a. 2% 脒/DMF、b. TFA/H₂O/TIPS/EDT (92.5:2.5:2.5:2.5) 除去。

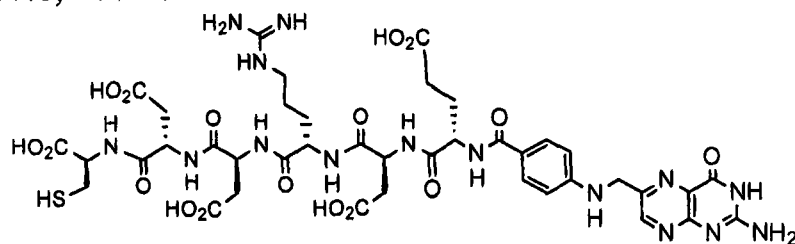
下表中给出的试剂用于所述制备中:

试剂	(mmol)	当量	量
H-Cys(4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂 (加载 0.56 mmol/g)	0.56	1	1.0 g
Fmoc-β-氨基丙氨酸(NH-MTT)-OH	1.12	2	0.653 g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	1.12	2	0.461 g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	1.12	2	0.461 g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	1.12	2	0.461 g

试剂	(mmol)	当量	量
Fmoc-Glu-OtBu	1.12	2	0.477 g
N ¹⁰ TFA-蝶酸 (溶于 10 ml DMSO 中)	0.70	1.25	0.286 g
DIPEA	2.24	4	0.390 mL
PyBOP	1.12	2	0.583 g

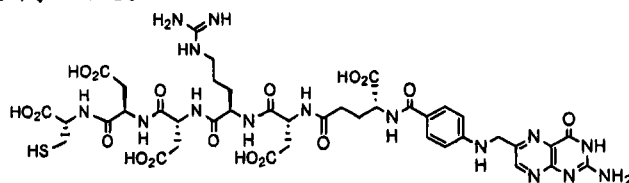
所述偶联步骤如下进行：在肽合成容器中加入所述树脂，加入氨基酸溶液、DIPEA 和 PyBOP。吹氩 1 小时，并用 DMF 和 IPA 洗涤 3 次。在各个氨基酸偶联之前，用 20% 哌啶的 DMF 溶液对 Fmoc 脱保护，3 次(10 分钟)。继续以完成所有的 6 个偶联步骤。在结束时，用 2% 胍的 DMF 溶液洗涤树脂 3 次(5 分钟)，以断裂蝶酸上的 TFA 保护基。

用下列试剂将肽类似物从树脂断裂下来：92.5%(50 ml) TFA、2.5%(1.34 ml) H₂O、2.5%(1.34 ml)三异丙基硅烷、2.5%(1.34 ml)乙二硫酚，断裂步骤如下进行：加入 25 ml 断裂试剂并鼓泡 1.5 小时，排干，用剩余试剂洗涤 3 次。蒸发至约 5 mL，并在乙醚中沉淀。离心并干燥。纯化如下进行：色谱柱：Waters NovaPak C₁₈ 300x19mm；缓冲液 A= 10 mM 醋酸铵，pH 5；B= CAN；以 15 ml/min 的流速，在 40 分钟内 1%B 至 20%B，得到 350 mg (64%)；HPLC-RT 10.307 min., 100% 纯，¹H HMR 谱与指定结构一致，MS (ES⁻): 1624.8, 1463.2, 1462.3, 977.1, 976.2, 975.1, 974.1, 486.8, 477.8。

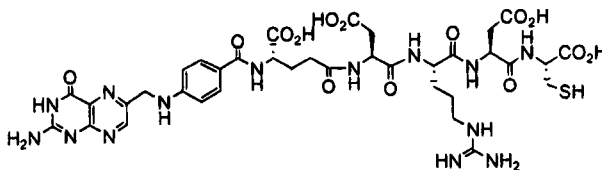


根据本发明所述的常规步骤，将 Wang 树脂结合的 MTT-保护的 D-Cys-NH₂ 按下列顺序反应：1) a. Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBOP, DIPEA; b. 20% 哌啶/DMF; 2) a. Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBOP, DIPEA; b. 20% 哌啶/DMF; 3) a. Fmoc-Arg(Pbf)-OH, PyBOP, DIPEA; b. 20% 哌啶/DMF; 4) a. Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBOP, DIPEA; b. 20% 哌啶/DMF; 5) a. Fmoc-Glu(γ-OtBu)-OH, PyBOP, DIPEA; b. 20% 哌啶/DMF; 6) N¹⁰-TFA-蝶酸, PyBOP, DIPEA。所述 MTT、tBu 和 Pbf 保护基用 TFA/H₂O/TIPS/EDT

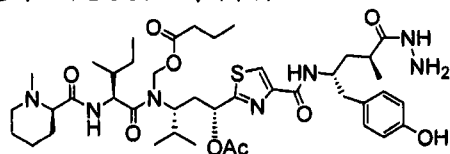
(92.5:2.5:2.5:2.5)去除, 所述 TFA 保护基用 pH=9.3 的 NH_4OH 水溶液去除。其 ^1H NMR 谱与指定结构一致。



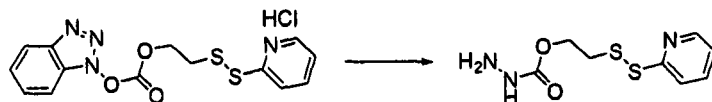
根据本发明所述的常规步骤, 将 Wang 树脂结合的 MTT-保护的 D-Cys-NH₂ 按下列顺序反应: 1) a. Fmoc-D-Asp(OtBu)-OH, PyBOP, DIPEA; b. 20% 哌啶/DMF; 2) a. Fmoc-D-Asp(OtBu)-OH, PyBOP, DIPEA; b. 20% 哌啶/DMF; 3) a. Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, PyBOP, DIPEA; b. 20% 哌啶/DMF; 4) a. Fmoc-D-Asp(OtBu)-OH, PyBOP, DIPEA; b. 20% 哌啶/DMF; 5) a. Fmoc-D-Glu-OtBu, PyBOP, DIPEA; b. 20% 哌啶/DMF; 6) N¹⁰-TFA-蝶酸, PyBOI DIPEA。所述 MTT、tBu 和 Pbf 保护基用 TFA/ H_2O /TIPS/EDT (92.5:2.5:2.5:2.5) 去除, 所述 TFA 保护基用 pH=9.3 的 NH_4OH 水溶液去除。其 ^1H NMR 谱与指定结构一致。



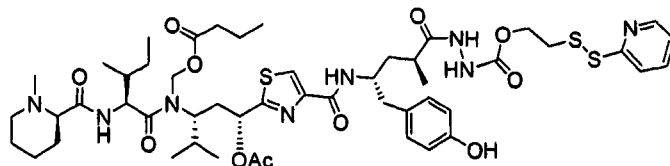
同样地, 本发明描述了 EC089 的制备。



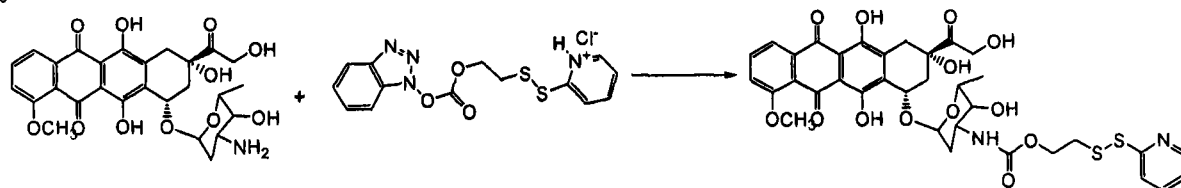
微管溶素酰肼的制备。通过制备 EC0347 来说明。在 $-15\text{ }^\circ\text{C}$, 用注射器先后将 *N,N*-二异丙基乙胺(DIPEA, 6.1 μL)和氯甲酸异丁酯(3.0 μL)加入到微管溶素 E (0.15 mg)于无水 EtOAc (2.0 mL)的溶液中。将反应混合物在 $-15\text{ }^\circ\text{C}$ 在氩气下搅拌 45 分钟后, 降温至 $-20\text{ }^\circ\text{C}$, 并向其中加入无水肼(5.0 μL)。将该反应混合物在 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 在氩气下搅拌 3 小时, 用 1.0 mM 磷酸钠缓冲液(pH 7.0, 1.0 mL)来终止, 并注入制备型 HPLC 进行纯化。色谱柱: Waters XTerra Prep MS C₁₈ 10 μm , 19×250 mm; 流动相 A: 1.0 mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.0; 流动相 B: 乙腈; 方法: 在 20 分钟内 10%B 至 80%B, 流速 = 25mL/min。收集 15.14-15.54 分钟的组分, 并冻干得到 EC0347, 其为白色固体(2.7 mg)。通过适当的选择微管溶素起始化合物, 前述方法同样适用于制备其它的微管溶素酰肼。



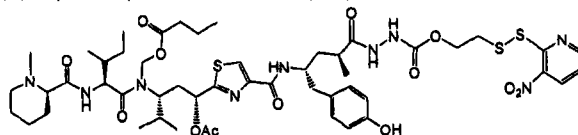
偶联试剂 EC0311 的合成。在 0 °C，将 DIPEA (0.60 mL) 加入到 HOBt-OCO₂-(CH₂)₂-SS-2-嘧啶 HCl (685 mg, 91%) 于无水 DCM (5.0 mL) 中的混悬液中，在氩气下搅拌 2 分钟，并向其中加入无水胍(0.10 mL)。在 0 °C，将该反应混合物在氩气下搅拌 10 分钟，并在室温再搅拌 30 分钟，过滤，滤液通过快速 (flash) 色谱(硅胶，配制在 DCM 中的 2% MeOH) 纯化，得到 EC0311，其为澄清稠油(371 mg)，放置后固化。



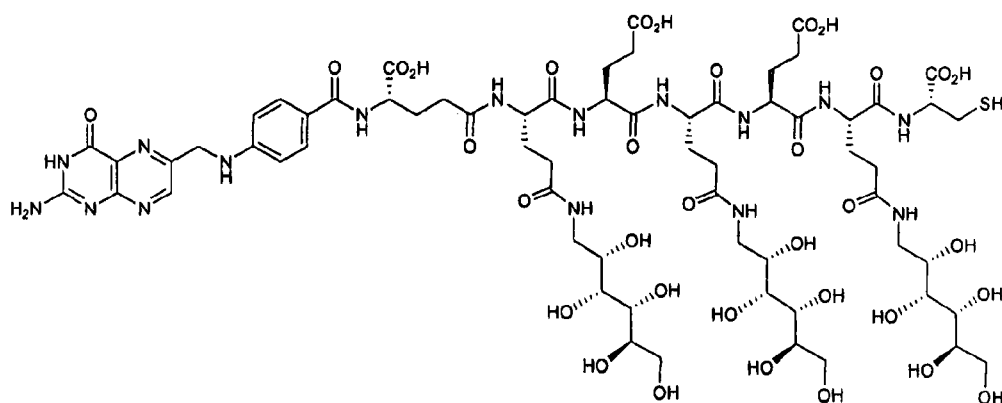
微管溶素二硫化物的制备(逐步法)。通过 EC0312 来说明。在 -15 °C，用注射器先后将 DIPEA (36 μL) 和氯甲酸异丁酯 (13 μL) 加入到微管溶素 B (82 mg) 的无水 EtOAc (2.0 mL) 溶液中。在 -15 °C 和氩气下将该反应混合物搅拌 45 分钟后，向其中加入 EC0311 的无水 EtOAc (1.0 mL) 溶液。将所得溶液在 -15 °C 在氩气下搅拌 15 分钟，并在室温再搅拌 45 分钟，浓缩，残渣通过快速色谱(硅胶，2-8% MeOH 的 DCM 溶液) 纯化，得到 EC0312，其为白色固体(98 mg)。通过适当的选择微管溶素起始化合物，前述方法同样适用于制备其它的微管溶素衍生物。



羟基柔红霉素吡啶基二硫化物(Hydroxydaunorubicin pyridyldisulfide)。同样地，该化合物如本发明所述并按前述方案来制备，产率为 65%。



微管溶素 B 吡啶基二硫化物。同样地，该化合物如本发明所述来制备。



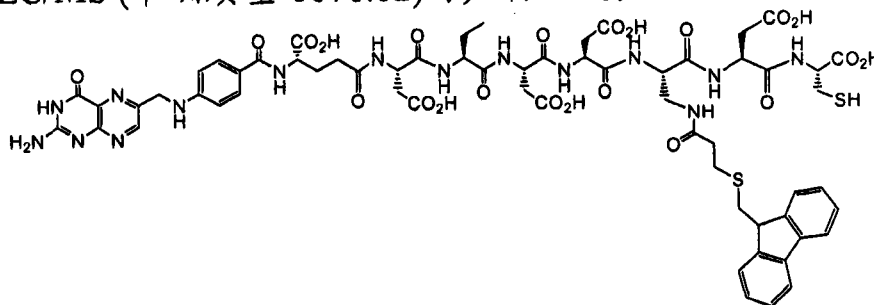
EC0488。该化合物由 SPPS 按本发明所述的常规肽合成步骤，从 H-Cys(4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂和下列 SPPS 试剂开始制备：

试剂	mmol	当量	MW	量
H-Cys(4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂 (加载 0.6mmol/g)	0.10			0.17 g
EC0475	0.13	1.3	612.67	0.082 g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.19	1.9	425.47	0.080 g
EC0475	0.13	1.3	612.67	0.082 g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.19	1.9	425.47	0.080 g
EC0475	0.13	1.3	612.67	0.082 g
Fmoc-Glu-OtBu	0.19	1.9	425.47	0.080 g
N ¹⁰ TFA-Pterioic Acid (溶于 10ml DMSO 中)	0.16	1.6	408.29	0.066 g
DIPEA		2.0 当量 AA		
PyBOP		1.0 当量 AA		

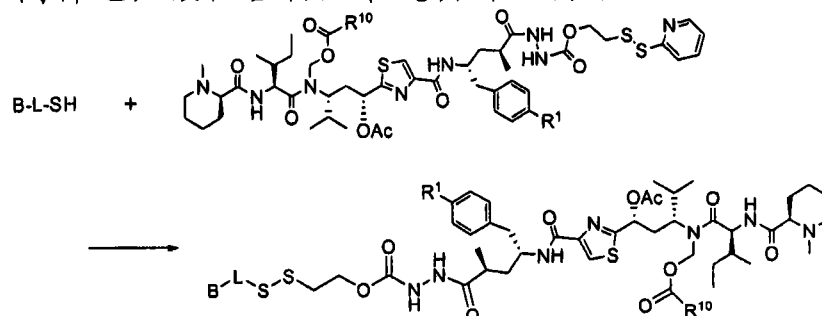
偶联步骤。在肽合成容器中加入所述树脂，加入氨基酸溶液、DIPEA 和 PyBOP。吹氩 1 小时，并用 DMF 和 IPA 洗涤 3 次。在各个氨基酸偶联之前，用 20%哌啶的 DMF 溶液对 Fmoc 脱保护，3 次(10 分钟)。继续以完成所有的 9 个偶联步骤。在结束时，用 2%胍的 DMF 溶液处理树脂 3 次(5 分钟)，以断裂蝶酸上的 TFA 保护基，用 DMF (3 次)、IPA (3 次)、MeOH (3 次)洗涤树脂，并对树脂吹氩 30 分钟。

断裂步骤。试剂：92.5% TFA、2.5% H₂O、2.5%三异丙基硅烷、2.5%乙二硫酚。用断裂试剂在吹氦中处理树脂3次(10 min、5 min、5 min)，排干，用断裂试剂洗涤树脂一次，并合并所述溶液。旋转蒸发直至残留5ml，并在二乙醚(35 mL)中沉淀。离心，用二乙醚洗涤，并干燥。约一半的粗固体(~100 mg)用HPLC纯化。

HPLC 纯化步骤。色谱柱: Waters Xterra Prep MS C18 10 μ m 19x250 mm; 溶剂 A: 10mM 醋酸铵, pH 5; 溶剂 B: CAN; 方法: 5 分钟 0% B 至 25 分钟 20% B, 26mL/min。收集含有产物的组分并冻干得到 43 mg EC0488 (51% 产率)。¹H NMR 和 LC/MS (准确质量 1678.62) 与产物一致。

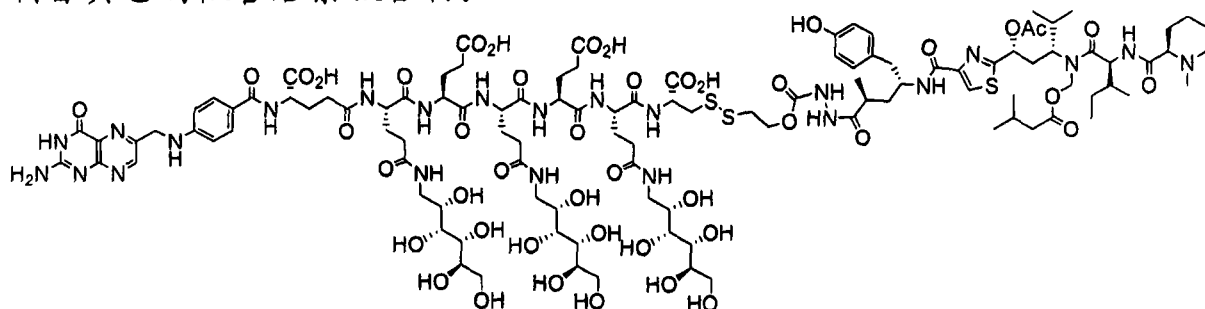


EC0351。同样地，该化合物如本发明所述制备。

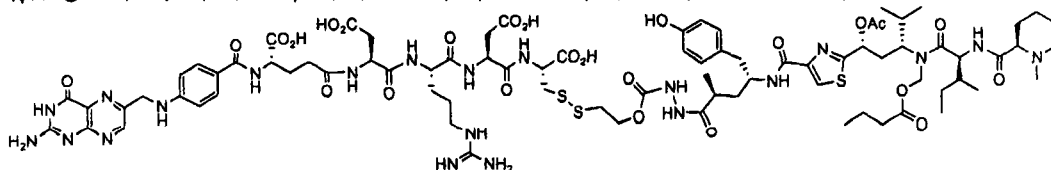


含有二硫基的微管溶素的缀合物的常规合成。通过某些天然存在的微管溶素的吡啶基二硫化物衍生物来说明，其中 R^1 为 H 或 OH， R^{10} 为烷基或烯基。将含有巯基的结合配体-接头中间体置于去离子水中(约 20 mg/mL，用前吹氩 10 分钟)，并用饱和 NaHCO_3 (用前吹氩 10 分钟)调节该混悬液的 pH 至约 6.9 (pH

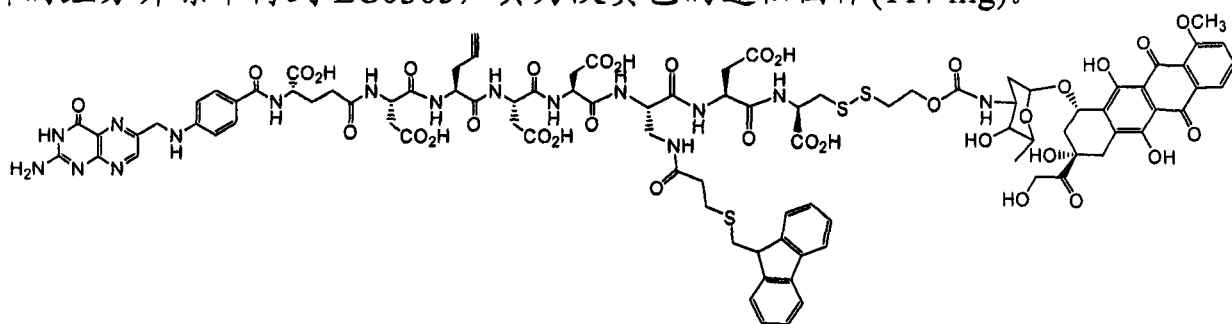
增加时该混悬液可能变成溶液)。如需要可再向该溶液中加入去离子水(约20-25%), 并立即向该水溶液中加入 EC0312 的 THF 溶液(约 20 mg/mL)。所述反应混合物迅速变成均质的。在氩气下搅拌例如 45 分钟后, 将所述反应混合物用 2.0 mM 磷酸钠缓冲液(pH 7.0, 约 150 体积百分比)稀释, 并通过抽空除去 THF。过滤所得的混悬液, 滤液可用制备型 HPLC 纯化(如本发明所述)。冻干组分以分离缀合物。通过适当的选择微管溶素起始化合物, 前述方法同样适用于制备其它的微管溶素缀合物。



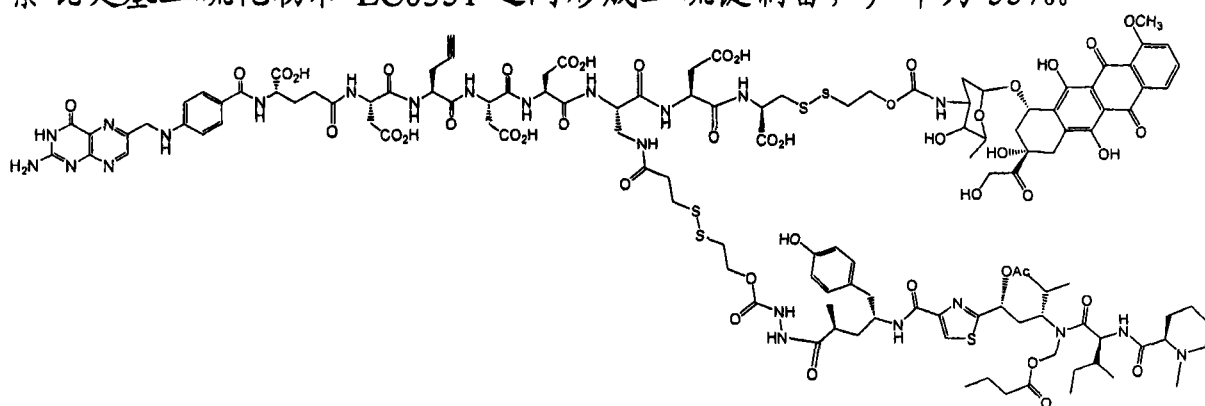
制备缀合物的常规方法 2(一锅法)。通过 EC0543 的制备来说明。在 -15°C , 用注射器先后将 DIPEA (7.8 μL)和氯甲酸异丁酯(3.1 μL)加入到微管溶素 A (18 mg)的无水 EtOAc (0.50 mL)溶液中。在 -15°C 和氩气下搅拌 35 分钟后, 向该反应混合物加入 EC0311 (5.8 mg)的无水 EtOAc (0.50 mL)溶液。移去冷却并在氩气下将该反应混合物再搅拌 45 分钟, 浓缩, 抽真空, 并将残渣溶于 THF (2.0 mL)中。同时, 将 EC0488 (40 mg)溶于去离子水中(用前吹氩 10 分钟), 并用饱和 NaHCO_3 调节该水溶液的 pH 至 6.9。向所述 EC0488 溶液中再加入去离子水使得总体积为 2.0 mL, 并立即向该溶液中加入含有活化的微管溶素的 THF 溶液。该反应混合物迅速变成均质的, 将其在氩气下搅拌 50 分钟, 并用 2.0 mM 磷酸钠缓冲液(pH 7.0, 15 mL)终止。过滤所得絮状溶液, 并将滤液注入制备型 HPLC 进行纯化。色谱柱: Waters XTerra Prep MS C_{18} 10 μm , 19 $\times$ 250 mm; 流动相 A: 2.0 mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.0; 流动相 B: 乙腈; 方法: 5 分钟内 1%B, 然后在接下来的 30 分钟内 1%B 至 60%B, 流速 = 26mL/min。收集 20.75-24.50 分钟的组分并冻干得到 EC0543, 其为黄色的蓬松固体(26 mg)。通过适当的选择微管溶素起始化合物, 前述方法同样适用于制备其它的微管溶素缀合物。



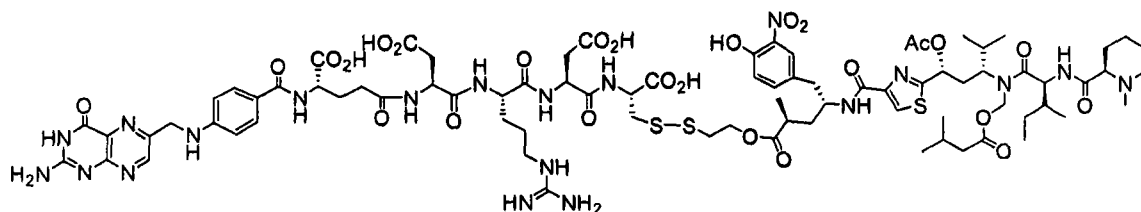
EC0305。将 EC089 (86 mg) 悬浮于去离子水中 (4.0 mL, 用前吹氩 10 分钟), 并用饱和 NaHCO_3 (用前吹氩 10 分钟) 调节该混悬液的 pH 至约 6.9 (pH 增加时该混悬液变成溶液)。向所述溶液中再加入去离子水使得总体积为 5.0 mL, 并立即向该水溶液中加入 EC0312 (97 mg) 的 THF (5.0 mL) 溶液。该反应混合物迅速变成均质的。将该反应混合物在氩气下搅拌 45 分钟后, 用 2.0 mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0, 15 mL) 稀释该反应混合物, 在旋转蒸发仪上除去 THF。过滤所得的混悬液, 并将滤液注入制备型 HPLC 进行纯化 (色谱柱: Waters XTerra Prep MS C₁₈ 10 μm , 19×250 mm; 流动相 A: 2.0 mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.0; 流动相 B: 乙腈; 方法: 25 分钟内 5%B 至 80%B, 流速 = 25 mL/min)。收集 10.04-11.90 分钟的组分并冻干得到 EC0305, 其为淡黄色的蓬松固体 (117 mg)。



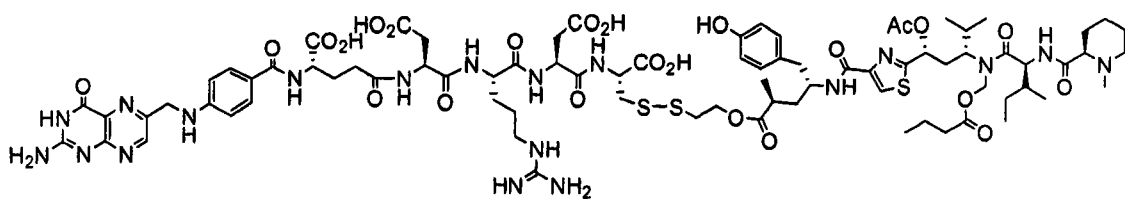
EC0352。同样地, 该化合物如本发明所述制备。EC0352 通过在羟基柔红霉素吡啶基二硫化物和 EC0351 之间形成二硫键制备, 产率为 55%。



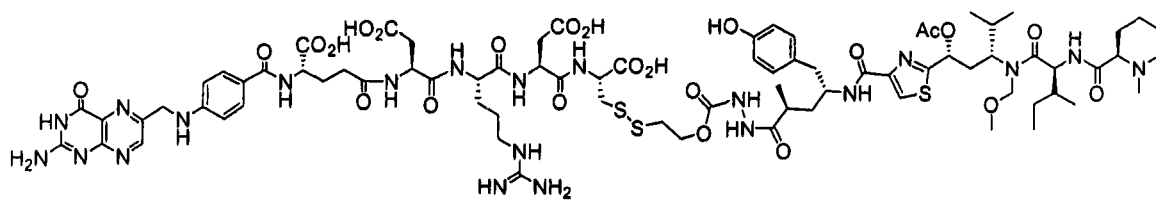
EC0358。同样地, 该化合物如本发明所述制备。EC0358 通过在 DMF/DBU 中在 EC0352 和微管溶素 B 吡啶基二硫化物之间形成二硫键制备, 产率为 40%。下列的说明性实例也是用本发明所述的方法、合成和微管溶素制备的。



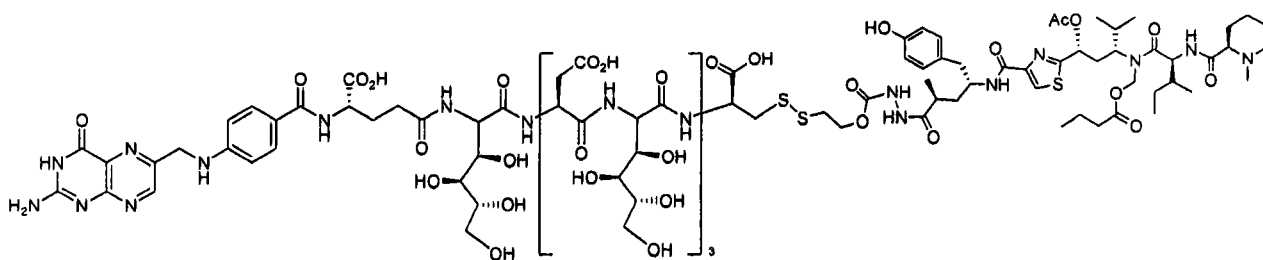
EC0247



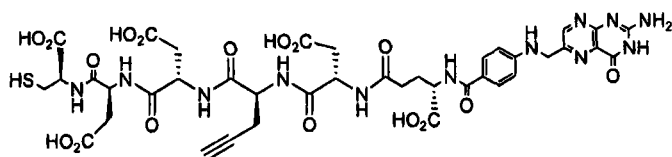
EC0302



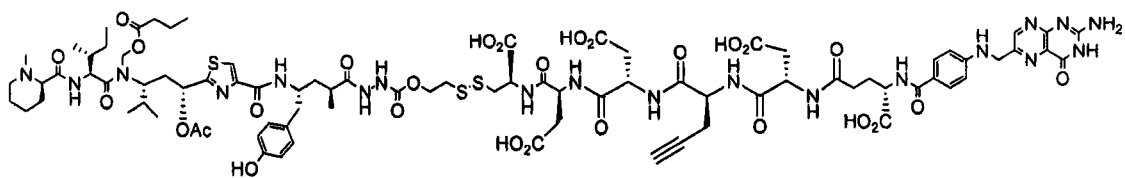
EC0317



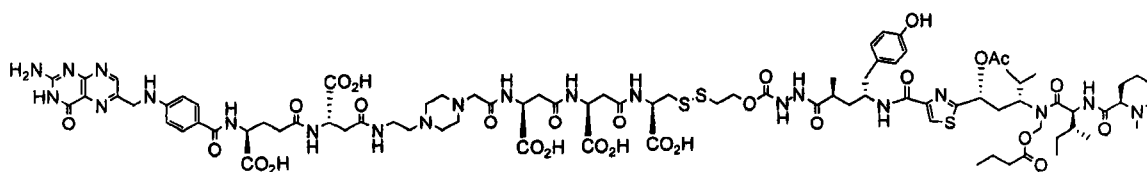
EC0436



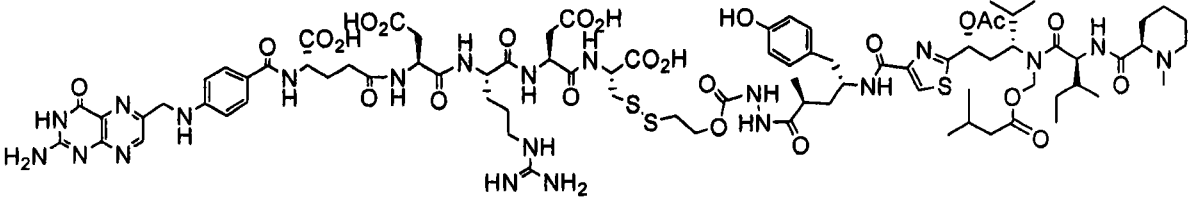
EC0333



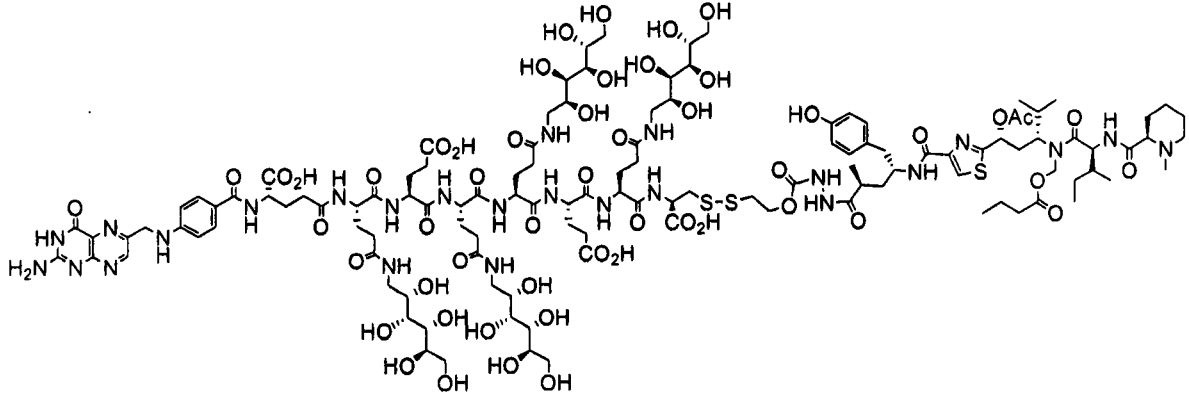
EC0334



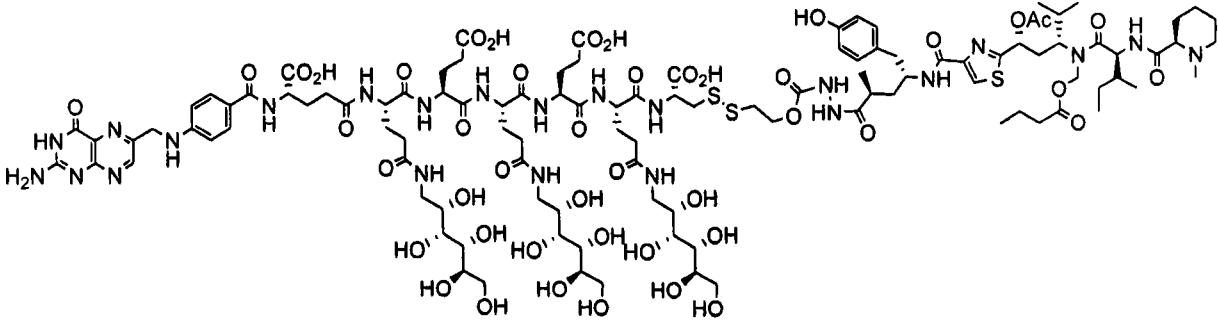
EC0444



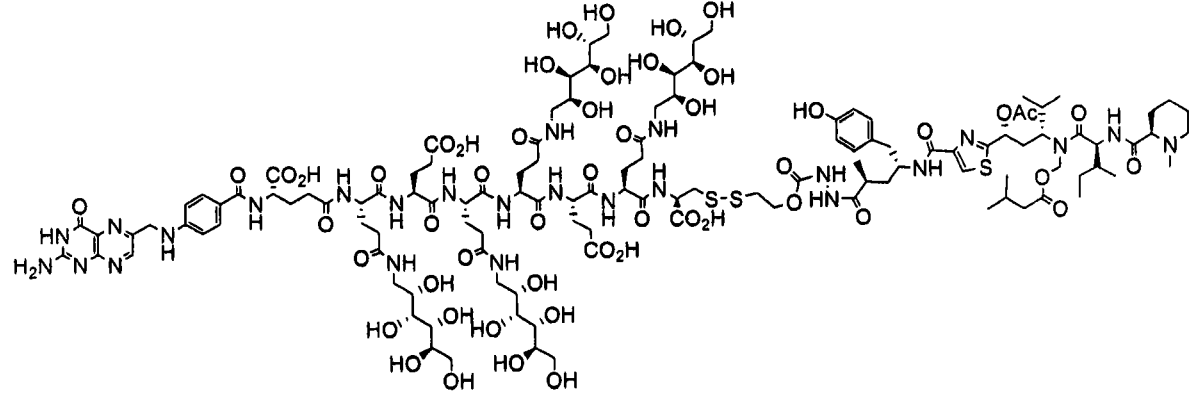
EC0510



EC0530



EC0531



EC0533

方法实施例

方法：相对亲和力试验。与叶酸相比对叶酸受体(FRs)的亲和力按之前所描述的方法(Westerhof, G. R., J. H. Schornagel 等(1995) Mol. Pharm. 48: 459-471)进行略加修改后测定。简单的说，将FR-阳性KB细胞密集种植在20-孔细胞培养板上，并允许所述细胞粘附于塑料持续18小时。将消耗过的培养基置于指定的孔中，在提高和不提高受试品或叶酸浓度的情况下用100 nM ^3H -叶酸来补充不含叶酸的RPMI (FFRPMI)。将细胞在37°C培养60分钟，然后用pH 7.4的PBS漂洗3次。向每孔加入500微升的1% SDS于pH 7.4的PBS中的溶液。然后，收集细胞裂解液并将其加入至含有5 mL 闪烁混合物的单独管中，然后计数其放射性。阴性对照管只含有溶于FFRPMI中的叶酸(不含竞争者)。阳性对照管含有终浓度为1 mM的叶酸，并且这些样品中测得的CPM(代表标记的非特异结合)从所有样品中扣除。显而易见地，相对亲和力被定义为置换50%的结合于KB细胞上FR的 ^3H -叶酸所需化合物的反摩尔比(inverse molar ratio)，叶酸对FR的相对亲和力被设为1。

EC0305在10%血清/FDRPMI中的相对亲和力试验结果在图4中给出。与叶酸相比，EC0305表现出96%的叶酸受体相对亲和力。

方法：对细胞DNA合成的抑制。用体外细胞毒试验评价了本发明所述化合物，所述试验预测药物抑制叶酸受体阳性的KB细胞的能力。所述化合物包括按本发明所述的方案制备的连接于各个化疗药物的叶酸。在存在或不存在至少100倍过量的叶酸的情况下将所述KB细胞在37°C暴露于指定浓度的叶酸-药物缀合物长达7小时。然后将所述细胞用新鲜培养基漂洗一次，并在新鲜培养基中在37°C培养72小时。细胞存活率用 ^3H -胸苷掺入试验来评价。对本发明所述化合物而言，剂量依赖的细胞毒性是普遍可测量的，在多数情况中， IC_{50} 数值(使掺入新合成DNA的 ^3H -胸苷降低50%所需的药物缀合物的浓度)在低的纳摩尔范围内。此外，在过量游离叶酸的存在下，所述缀合物的细胞毒性降低，表明所观察到的细胞杀伤是通过结合于叶酸受体介导的。

举例来说，EC0305在2小时脉冲和72小时追踪后表现出剂量-反应行为和对叶酸受体的特异性，如图1所示。EC0305的 IC_{50} 约为1.5 nM。此外，EC0305的细胞毒活性在过量叶酸存在下被阻断，也如图1所示。最后，EC0305显示对FR-阴性细胞没有活性。这些结果表明EC0305通过叶酸选择性的或叶酸特异性的机理发挥作用。

方法：抗多种癌细胞系的体外试验。产生对多种细胞系的 IC₅₀，其结果在下表中给出。将细胞密集种植于 24-孔 Falcon 板上，并允许其过夜形成几乎汇合的单层。在加入试验化合物之前三十分钟，将消耗过的培养基从所有孔中吸出，并用新鲜的叶酸-缺乏的 RPMI 培养基(FFRPMI)替代。指定一部分孔接收含有 100 μM 叶酸的培养基。指定孔中的所述细胞用于测定靶向特异性。没有被理论所限制，表明在过量叶酸的存在下试验化合物产生细胞毒性，即存在 FR 结合的竞争时，相当于总活性中与 FR-特异性递送不相关的那一部分。在用 1 mL 含有 10%热-灭活的胎牛血清的新鲜 FFRPMI 漂洗一次后，每孔接收 1 mL 含有递增浓度的试验化合物(每个样品 4 个孔)的培养基，如图所示的存在或不存在 100 μM 游离叶酸的情况下。处理过的细胞在 37℃脉冲 2 小时，用 0.5 mL 培养基漂洗 4 次，然后在 1 mL 新鲜培养基中追踪长达 70 小时。将消耗过的培养基从所有孔中吸出，并用含有 5 μCi/mL ³H-胸苷的新鲜培养基替代。在 37 °C 进一步培养 2 小时后，将细胞用 0.5 mL 的 PBS 洗涤 3 次，然后对每孔用 0.5 mL 的冰冷的 5%三氯乙酸处理。15 分钟后，将三氯乙酸吸出，然后将细胞材料通过加入 0.5 mL 的 0.25 N 氢氧化钠溶解 15 分钟。将 450 μL 等份的溶解的样品转移至含有 3 mL Ecolume 闪烁混合物的闪烁管中，然后在液体闪烁计数器上计数。最终列表显示的结果以相对于未处理的对照而言 ³H-胸苷掺入的百分数来表达。

EC305 的结果在下表中给出：

细胞模型	物种	癌症类型	FR 状态	IC ₅₀ (nM)	用过量 FA 阻断活性
KB	人	鼻咽癌	阳性	1.5	是
OVCAR-3	人	卵巢癌	阳性	1	是
IGROV	人	卵巢癌	阳性	2	是
RAW	小鼠	CML	阳性	2.6	是
4T-1-FR	小鼠	乳腺癌	阳性	10	是
4T-1 亲本	小鼠	乳腺癌	阴性	>1000	n/a

除 4T-1 亲本细胞和 4T-1-FR 来自 Rhone Poulenc Rorer 外,每一种细胞系均可商购。

方法：对不同物种的血清结合。用 30K NMWL 测试了化合物，将所述化合物进行 Microcon 过滤(10,000 g, 30 分钟)并用 HPLC 检测。用多种动物血清测试了 EC0305，其在多种物种上表现低的血清结合，如图 2 所示。具体而言，EC0305 在人血清中表现出 67%的低结合。

方法：人血清稳定性。测试了 EC0305 在人血清中的稳定性，其表现出约 20 小时的半衰期，如图 3 所示。

方法：对小鼠肿瘤生长的抑制。四至七周龄的小鼠(Balb/c 或 *nu/nu* 系)购自 HSD 公司(Harlan Sprague Dawley, Inc.) (印第安纳州印第安纳波利斯(Indianapolis, IN))。普通的啮齿类动物食物(chow)含有高浓度的叶酸(6 mg/kg 食物)，因此，所用小鼠在肿瘤移植前维持无叶酸饮食(Harlan 饮食#TD00434)1 周，从而达到接近正常人血清范围的血清叶酸浓度。对肿瘤细胞接种而言，将 100 μ L 1×10^6 M109 细胞(Balb/c 系)或 1×10^6 KB 细胞(*nu/nu* 系)注射于背内侧区的皮下组织。每 2-3 天用测径规在两个垂直方向测量肿瘤，并按 $0.5 \times L \times W^2$ 计算肿瘤体积，其中 L = 长轴的测量值(mm)，W = 垂直于 L 的轴的测量值(mm)。然后按已经发表的步骤(参见例如 Lee 等人，“BMS-247550：作用模式类似于泰素但具有优良抗肿瘤功效的新型埃博霉素类似物”(BMS-247550: a novel epothilone analog with a mode of action similar to paclitaxel but possessing superior antitumor efficacy) *Clin Cancer Res* 7:1429-1437 (2001); Rose, “基于泰素的联合化疗和其他体内临床前抗肿瘤研究”(Taxol-based combination chemotherapy and other in vivo preclinical antitumor studies) *J Natl Cancer Inst Monogr* 47-53 (1993))计算对数细胞杀伤(LCK)和治疗/对照比值(T/C)。用 PBS 每天新鲜配制给药溶液，并通过小鼠侧尾静脉给药。当 s.c.肿瘤具有 50-100 mm³ 的平均体积时开始给药(t_0)，通常 KB 肿瘤为肿瘤接种后(PTI)8 天，M109 肿瘤为 PTI 11 天。

方法：药物毒性测定。持久性药物毒性通过经由心脏穿刺收集血液并独立分析血清的血液尿素氮(BUN)、肌酐、总蛋白、AST-SGOT、ALT-SGPT 加上在 AL 公司(Ani-Lytics, Inc.)(马里兰州盖瑟斯堡(Gaithersburg, MD))进行的标准血细胞分析来评价。此外，福尔马林固定的心脏、肺、肝、脾、肾、小肠、骨骼肌和骨(胫骨/腓骨)的组织病理学评价由经过资质认证的病理学者在动物参照病理学实验室(Animal Reference Pathology Laboratories)(ARUP; 犹他州盐湖城(Salt Lake City, Utah))进行。

方法：常规的 KB 肿瘤试验。本发明所述化合物静脉内(i.v.)给予荷瘤动物时，在带有皮下 KB 肿瘤的 *nu/nu* 小鼠上评价了其抗肿瘤活性。在右腋皮下组织用 1×10^6 KB 细胞肿瘤接种后约 8 天(t_0 时平均肿瘤体积 = $50-100 \text{ mm}^3$)，对小鼠(5 只/组)静脉内注射给予 $5 \mu\text{mol/kg}$ 的递药缀合物或相当剂量体积的 PBS (对照)，每周三次(TIW)，持续三周，除另有说明外。每个治疗组每隔 2 天或 3 天，用测径规测量肿瘤生长。用方程 $V = a \times b^2/2$ 计算肿瘤体积，其中“a”为肿瘤长度，“b”为宽度，单位为毫米。

方法：常规的 M109 肿瘤试验。本发明所述化合物静脉内(i.v.)给予荷瘤动物时，在带有皮下 M109 肿瘤(一种同系肺癌)的 Balb/c 小鼠上评价了其抗肿瘤活性。在右腋皮下组织用 1×10^6 M109 细胞肿瘤接种后约 11 天(t_0 时平均肿瘤体积 = 60 mm^3)，对小鼠(5 只/组)静脉内注射给予 1500 nmol/kg 的递药缀合物或相当剂量体积的 PBS (对照)，每周三次(TIW)，持续三周。每个治疗组每隔 2 天或 3 天，用测径规测量肿瘤生长。用方程 $V = a \times b^2/2$ 计算肿瘤体积，其中“a”为肿瘤长度，“b”为宽度，单位为毫米。

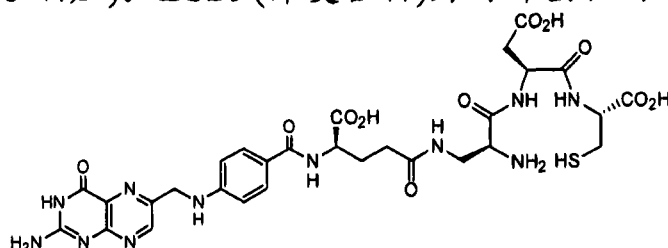
方法：常规的 4T-1 肿瘤试验。六至七周龄的小鼠(雌性 Balb/c 系)购自印第安纳州印第安纳波利斯的哈兰公司(Harlan, Inc., Indianapolis, IN)。所述小鼠在本试验开始时和试验期间前维持哈兰无叶酸饮食共三周。将叶酸受体-阴性的 4T-1 肿瘤细胞(每只动物 1×10^6 细胞)接种于右腋皮下组织。肿瘤接种后约 5 天当 4T-1 肿瘤平均体积为 $\sim 100 \text{ mm}^3$ 时，对小鼠(5 只/组)静脉内注射给予 $3 \mu\text{mol/kg}$ 的递药缀合物或相当剂量体积的 PBS (对照)，每周三次(TIW)，持续三周，除本发明另有说明外。每个治疗组每隔 2 天或 3 天，用测径规测量肿瘤生长。用方程 $V = a \times b^2/2$ 计算肿瘤体积，其中“a”为肿瘤长度，“b”为宽度，单位为毫米。

方法：通过体重降低测定的毒性。小鼠的体重变化百分数是在肿瘤接种后(PTI)所选择的天数在小鼠(5 只小鼠/组)上测定的，并对其绘图。

方法：替代给药安排。前述试验中的每一种可如下改变：在右腋皮下组织用 1×10^6 KB 细胞肿瘤接种后约 8 天(t_0 时平均肿瘤体积 = $50-100 \text{ mm}^3$)，对小鼠(5 只/组)静脉内注射给予本发明所述的递药缀合物或相当剂量体积的 PBS 作为对照，每周三次(TIW)，持续三周。每个治疗组每隔 2 天或 3 天，用测径规测量肿瘤生长。用方程 $V = a \times b^2/2$ 计算肿瘤体积，其中“a”为肿瘤长度，“b”为宽度，单位为毫米。

方法：替代给药安排。前述试验中的每一种可如下改变：在右腋皮下组织用 1×10^6 KB 细胞肿瘤接种后约 8 天(t_0 时平均肿瘤体积 = $50-100 \text{ mm}^3$)，对小鼠(5 只/组)静脉内注射给予本发明所述的递药缀合物或相当剂量体积的 PBS 作为对照，每周五次从周一到周五，持续 2 周或 3 周。每个治疗组每隔 2 天或 3 天，用测径规测量肿瘤生长。用方程 $V = a \times b^2/2$ 计算肿瘤体积，其中“a”为肿瘤长度，“b”为宽度，单位为毫米。

在两周安排中以 TIW 测试多种剂量的 EC305，其在等于或高于 $1 \mu\text{mol/kg}$ 的剂量下在 5/5 试验动物上表现完全响应，如图 5 所示。在图 5 中，垂直点状线表示最后的给药天数。此外，在整个观察期内对这些剂量在 5/5 动物上未观察到肿瘤的复发或再生长，尽管最后给予缀合物的时间在超过 70 天之前，也如图 5 所示。相反地，也如图 5 所示，在同时给予含有竞争性但对肿瘤无活性的叶酸的类似物 EC20 (铈复合物)的 EC0305 处理过的动物上，EC0305 的抗肿瘤活性被完全废除(0/5 响应)。EC20 (铈复合物)为与铈螯合的具有下式的化合物：



EC20 的制备在美国专利申请 US 2004/0033195 A1 中有描述，本发明引入其合成步骤描述作为参考。应当相信的是，EC20 起叶酸靶向缀合物的竞争者的作用，所述缀合物是例如针对叶酸受体的 EC0305，因此结果表明 EC0305 靶向叶酸受体作用的特异性。

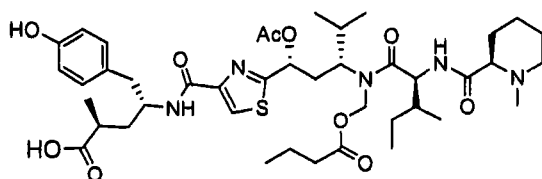
此外，所观察到的活性发生在明显不存在体重降低或主要器官组织恶化的情况下，如图 6 所示，其中垂直点状线表示给药的最后天数。

在两周安排中以 $2 \mu\text{mol/kg}$ TIW 重复测试 EC305，其再次在 5/5 试验动物上表现完全响应。此外，在整个超过 90 天的观察期内在 5/5 动物上未观察到肿瘤的复发或再生长，如图 7 所示。此外，所观察到的活性发生在明显不存在体重降低或主要器官组织恶化的情况下，如图 8 所示。

在小鼠上评价了 EC0305 抗 FR-阳性肿瘤的活性。对带有皮下 M109 肿瘤的 Balb/c 小鼠静脉内给予 EC0305 治疗，在该疗法中，在 5/5 试验动物上观察到了完全响应。此外，即使在肿瘤植入后超过 90 天后以及治疗中断后超过 70 天后，5/5 试验动物保持没有任何可检测量的肿瘤的状态。在 5/5 动物上未观察到肿瘤

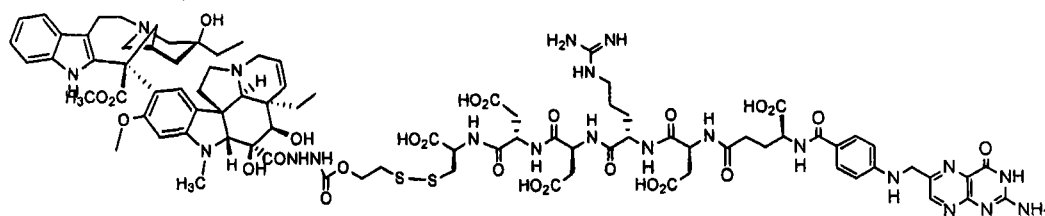
的复发或再生长。此外，所观察到的完全有效的活性和疾病的不复发，发生在明显没有体重降低或主要器官组织恶化的情况下。EC0305 在多种肿瘤类型上的效力在人 KB 异种移植-*nu/nu* 小鼠癌症模型上被证实，如本发明所述。EC0305 再次表现出在明显不存在体重降低或主要器官组织恶化的情况下有显著的抗肿瘤活性(5/5 完全响应)。

与对本发明所述缀合物观察到的结果相反的是，发现未缀合的微管溶素 B 游离药物



在可耐受的和高毒性剂量水平下均完全没有活性(0/5 响应)，如图 9 所示(由于未缀合药物的毒性过高，每组均提前终止给药)。图 10 显示，与对照相比，用未缀合的微管溶素 B 处理的动物体重百分数发生显著变化。如图 9 和图 10 所说明的，由于未缀合药物的毒性过高，每组均提前终止给药。

此外，发现微管溶素缀合物 EC0305 较另一种叶酸靶向化合物即具有下列结构的 EC145 更有效，



在后者中药物有效载荷为长春花生物碱。每种药物均在两周安排中以 2 $\mu\text{mol/kg}$ TIW 给药，如图 11 所示，其中垂直线表示给药的最后天数。长春花缀合物 EC145 在所处理的动物上表现 2/5 完全响应，而微管溶素缀合物 EC0305 表现 5/5 完全响应。此外，在整个 90 多天的观察期内，在 5/5 用 EC0305 处理的动物上未观察到肿瘤的复发或再生长。

图 12 显示两种不同的微管溶素缀合物，EC0305 和 EC0436，与对照相比在 M109 肿瘤上的相对活性。在肿瘤植入后约 11 天开始治疗，每一种试验动物接受 2 $\mu\text{mol/kg}$ 的 EC0305 或 EC0436，每周三次持续两周。图 12 中的垂直点状线表示给药的最后天数为第 20 天。如图 12 所示，EC0305 和 EC0436 在所有动物上均表现完全有效。然而，接近约第 35 天 PTI 时，EC0305 治疗的动物开始表现出肿瘤的再生长。相反地，EC0436 治疗的动物不仅表现出 5/5 完全响应，而

且在整个 60 多天的观察时间内也未出现肿瘤复发或再生长。图 13 显示与对照相比，治疗动物的体重变化百分数。在所有治疗动物中，所观察到的疗效不伴随有任何可观察的显而易见的毒性(如由试验动物的体重变化所测定)。

图 14 显示两种不同的微管溶素缀合物，EC0305 和 EC0436，在高于其治疗剂量下与 PBS 处理的对照(●)相比的相对毒性。每一剂量每隔一天给药三次，如箭头所示。EC0305 以(Δ) 2 $\mu\text{mol/kg}$ TIW、(∇) 2.5 $\mu\text{mol/kg}$ TIW 和($\square$) 3 $\mu\text{mol/kg}$ 给药。EC0436 以($\blacktriangle$) 2 $\mu\text{mol/kg}$ TIW、($\blacktriangledown$) 2.5 $\mu\text{mol/kg}$ TIW 和($\blacksquare$) 3 $\mu\text{mol/kg}$ TIW 给药。数据表明，EC0436 可能具有较 EC0305 更高的治疗指数，如图 12 所示，EC0305 在 2 $\mu\text{mol/kg}$ 下给出 4/5 完全响应，而 EC0436 在相同剂量下给出 5/5 完全响应。然而，在等于或高于 2.5 $\mu\text{mol/kg}$ 的剂量下，EC0305 开始表现毒性，如由试验动物的体重变化所测定的并如图 14 所示。相反地，EC0436 在 3 $\mu\text{mol/kg}$ 的最高剂量下也未观察到由试验动物的体重变化所测定的毒性。

为了提供本发明某些方面更详细的描述，给出了前述的示例性实施方式。然而，前述的实施方式意图为说明，因此不应当理解为其以任何方式限制本发明。

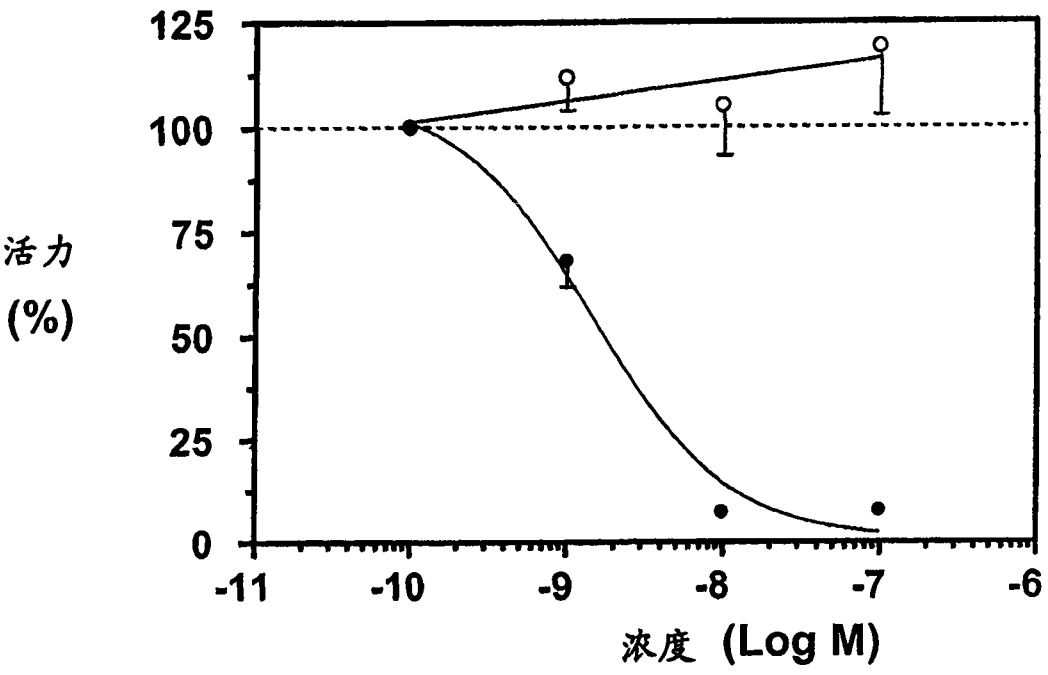


图 1

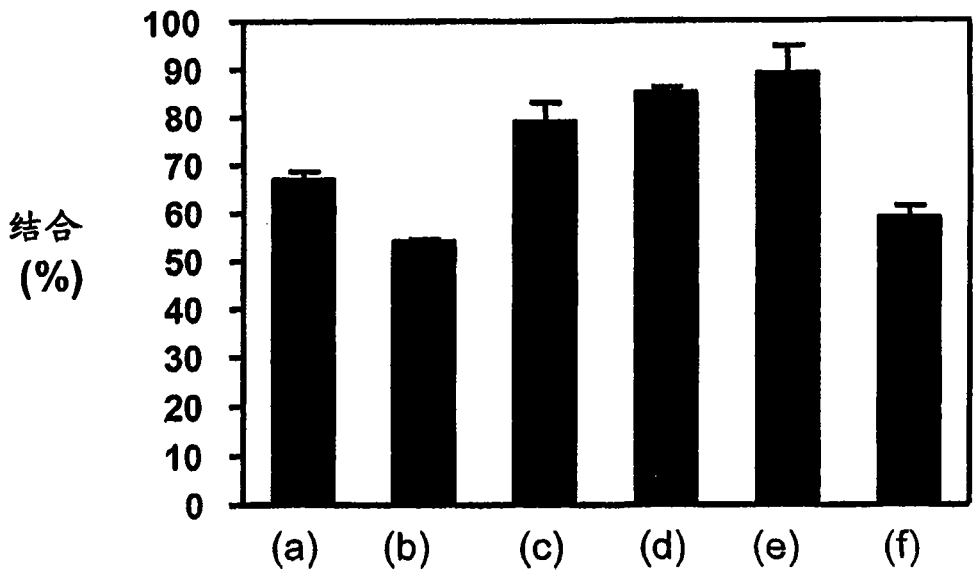


图 2

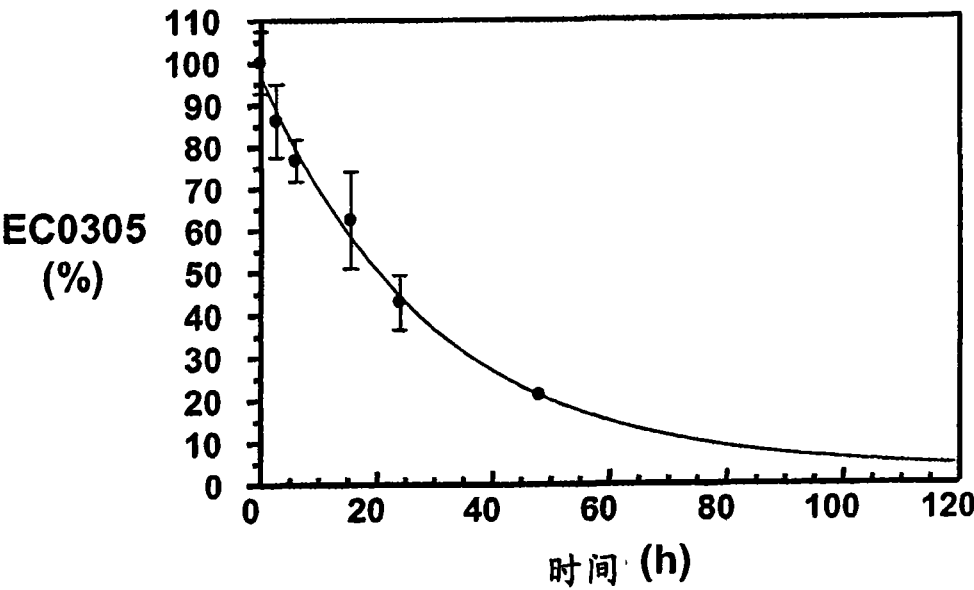


图 3

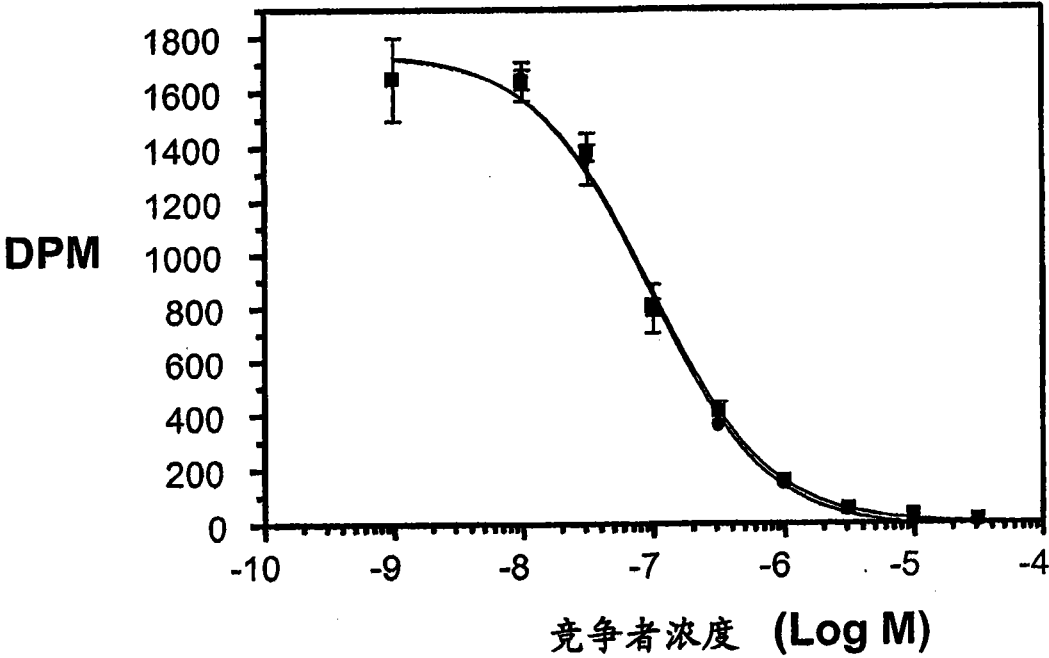


图 4

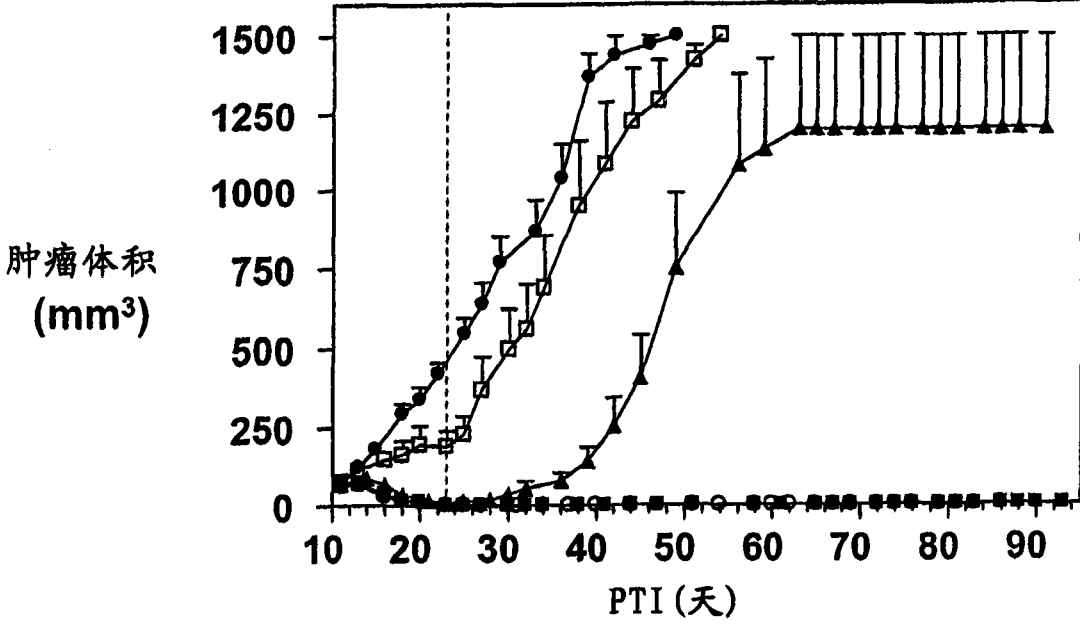


图 5

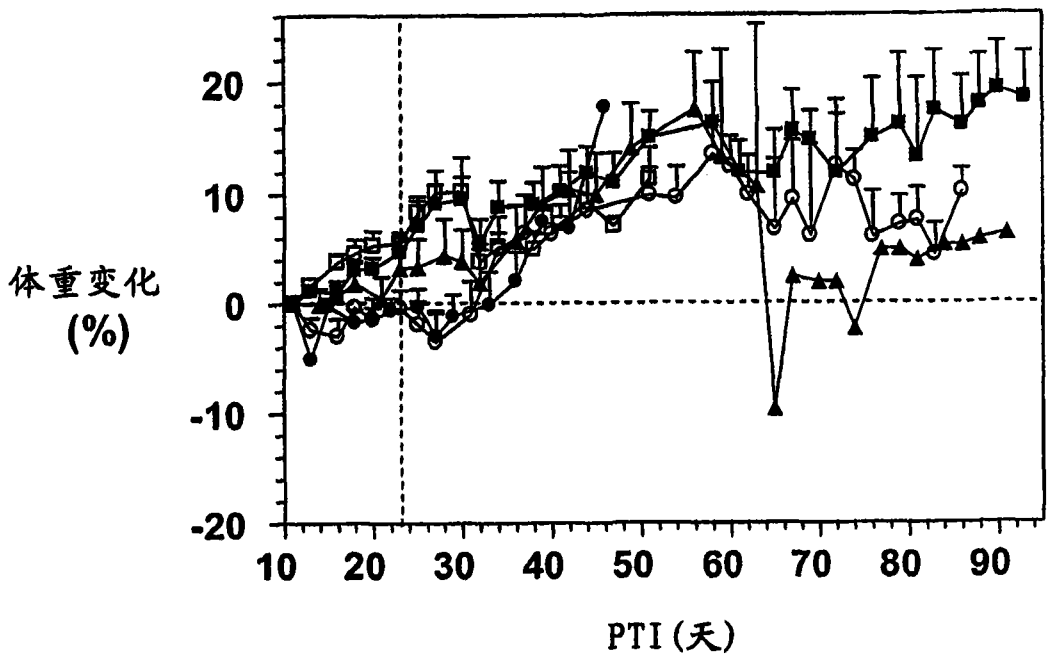


图 6

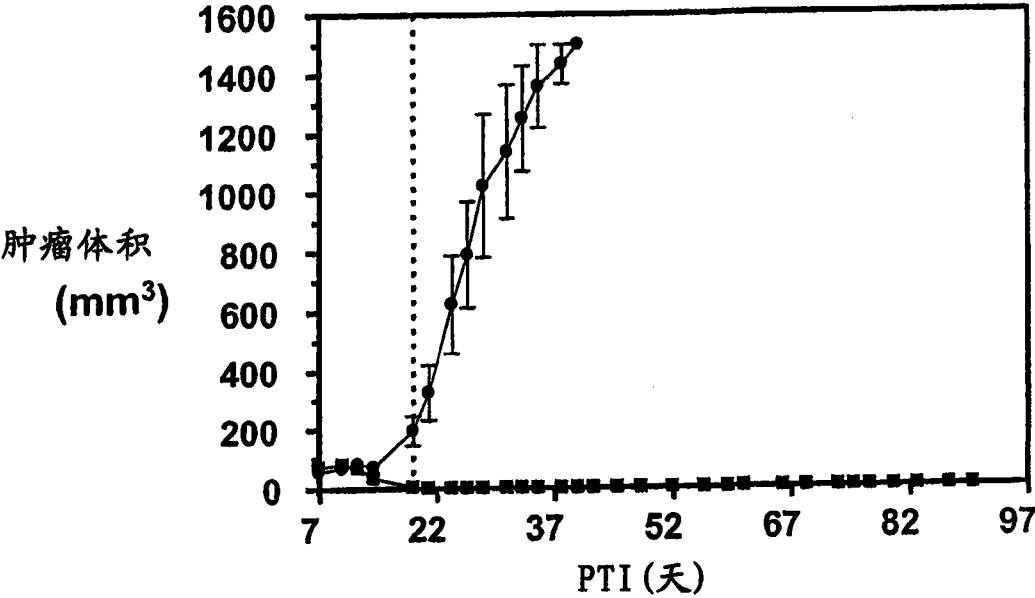


图 7

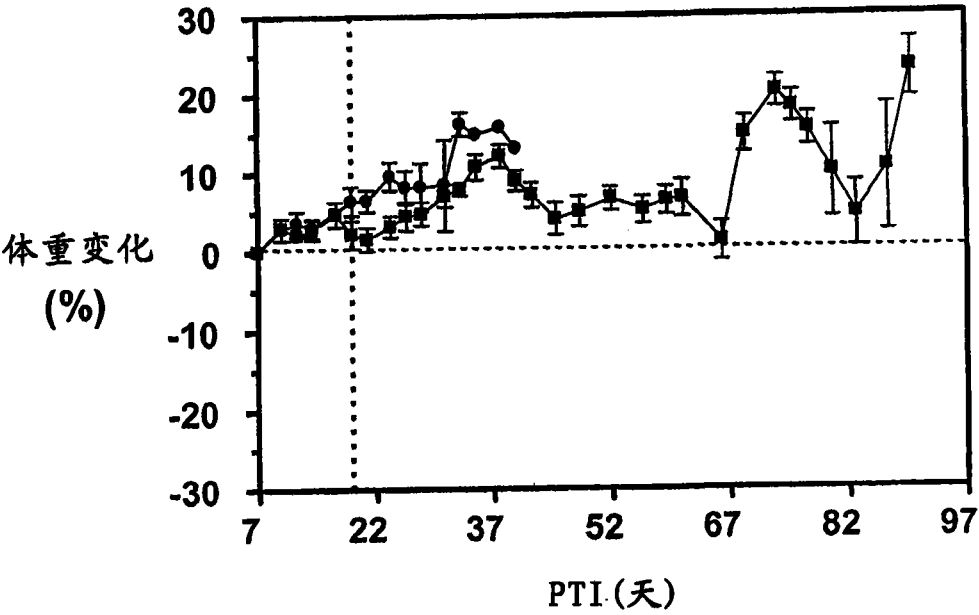


图 8

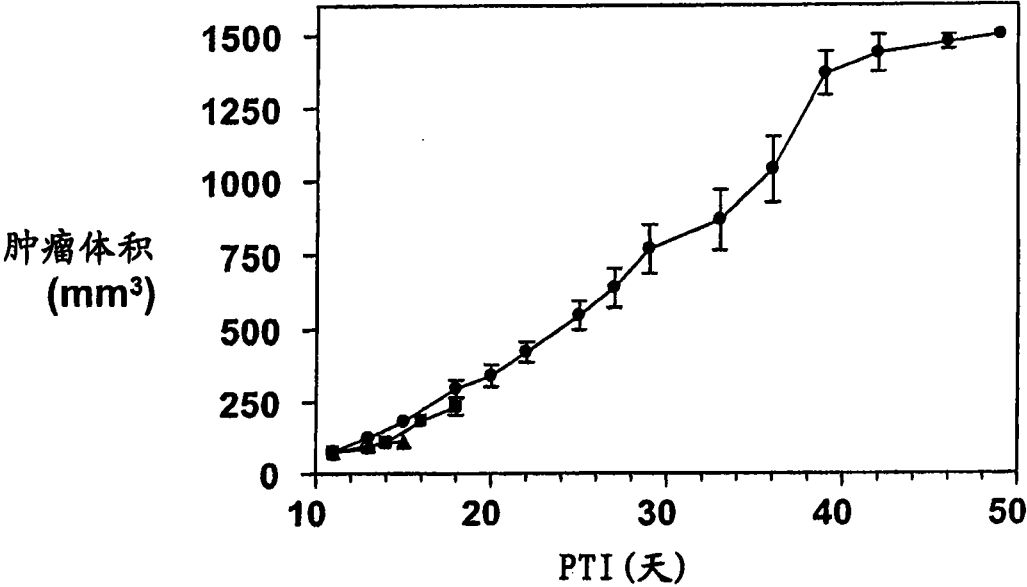


图 9

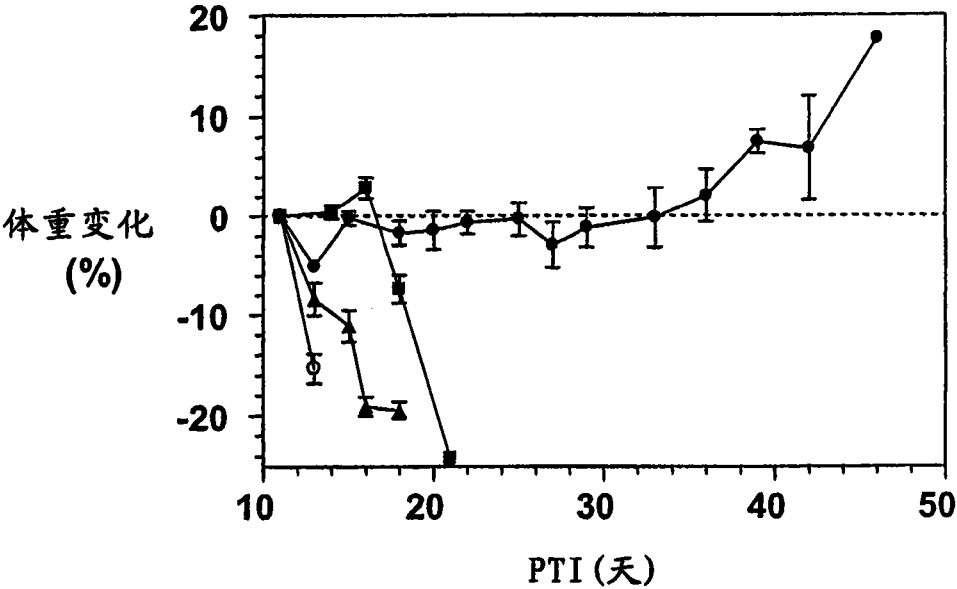


图 10

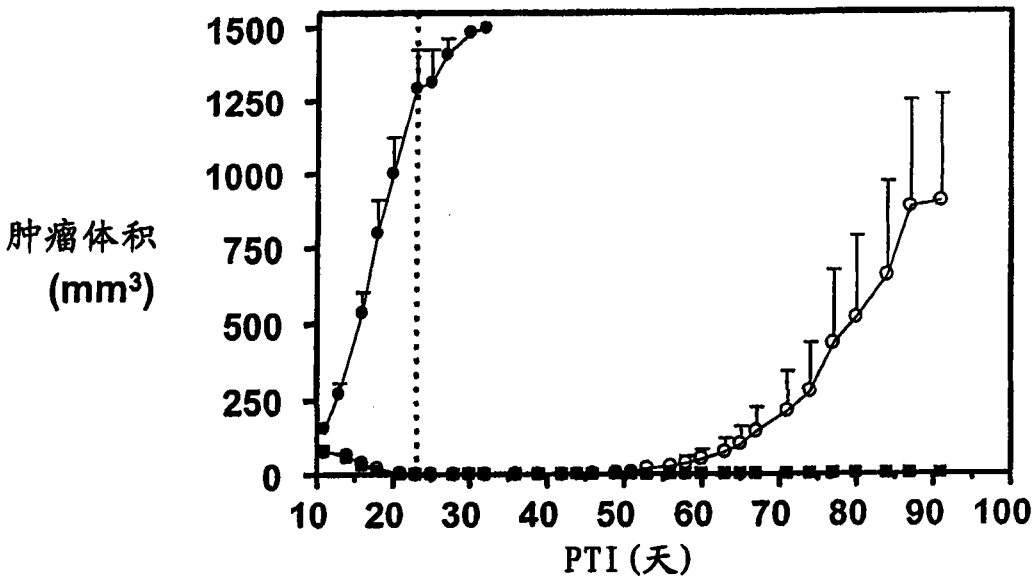


图 11

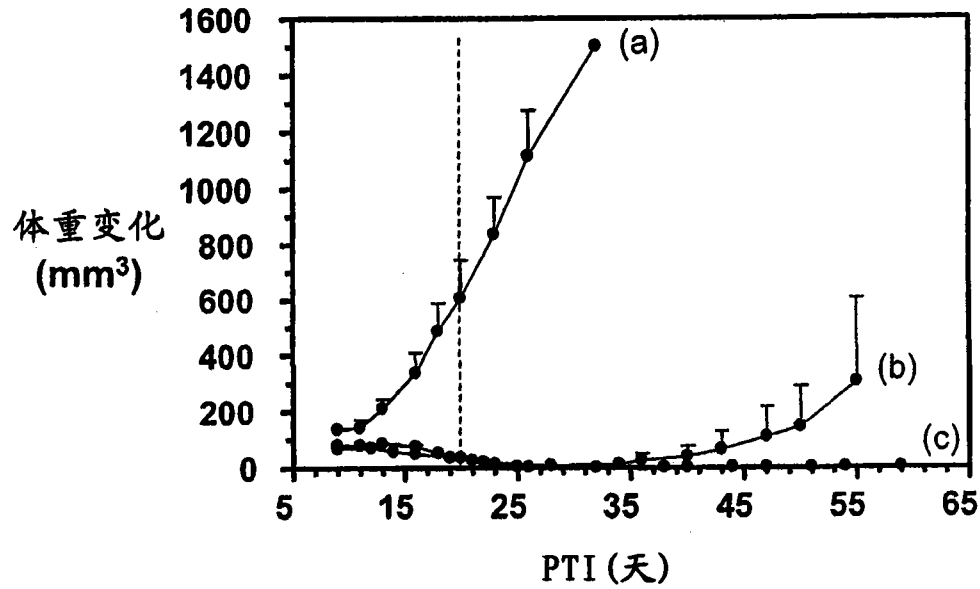


图 12

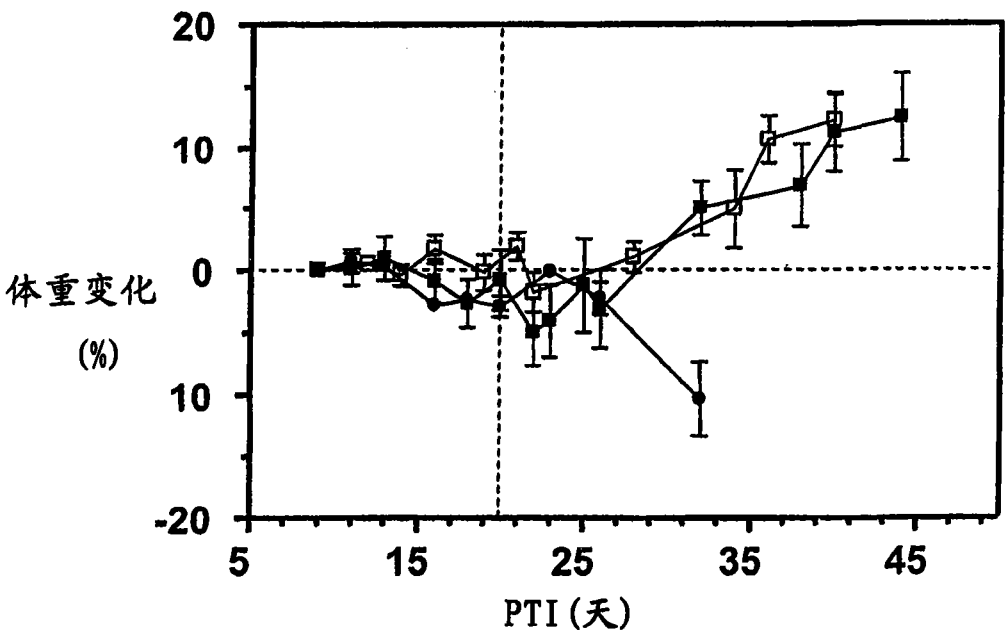


图 13

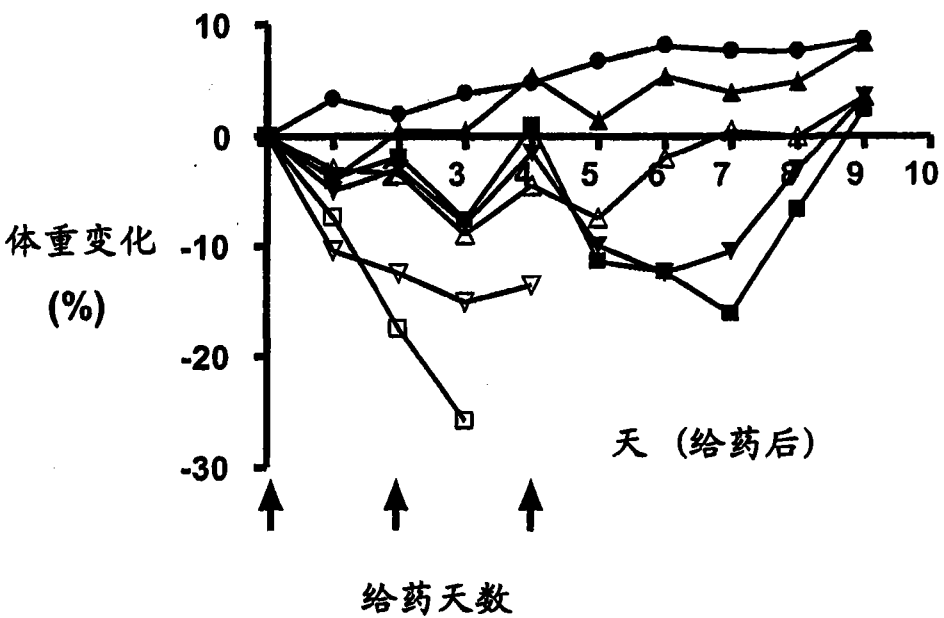


图 14