



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102076331 B

(45) 授权公告日 2013. 12. 18

(21) 申请号 200980123829. 8

(22) 申请日 2009. 06. 26

(30) 优先权数据

61/133, 148 2008. 06. 26 US

61/192, 050 2008. 09. 15 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 12. 24

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/048943 2009. 06. 26

(87) PCT申请的公布数据

W02009/158668 EN 2009. 12. 30

(73) 专利权人 普罗林科斯有限责任公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 D·V·桑迪 G·阿什利 B·赫恩

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所 11038

代理人 李华英

(51) Int. Cl.

A61K 9/22 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 6232318 B1, 2001. 05. 15, 第 11 栏, 第 26 栏.

US 2006/0171920 A1, 2006. 08. 03, 说明书第 [0013]–[0025], [0066]–[0080], [0125], [0163], [0165], SCHEME2, SCHEME3.

审查员 陈卫星

权利要求书3页 说明书89页 附图5页

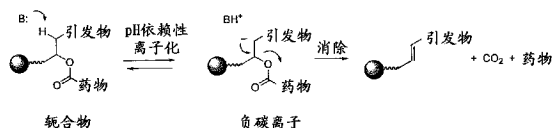
(54) 发明名称

具有可控的药物释放速率的前药和药物-大分子轭合物

(57) 摘要

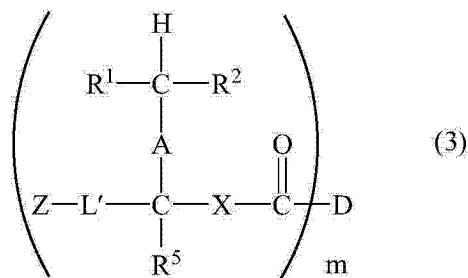
本发明提供允许控制和延长药物体内释放的方法和组合物。化合物是具有可调释放速率的前药,或者显示可调的控制释放速率的药物与大分子的轭合物。

药物释放速率取决于生理pH下的离子化程度



- 药物释放速率与轭合物在生理pH下离子化成负碳离子的份数成正比
- S更多离子化产生更快的药物释放速率
- 通过邻近引发物的质子的酸性来测定离子化的轭合物的份数
- S更多酸性 (更低pK_a) 产生更多离子化
- 通过引发物的性质测定pK_a

1. 下式的化合物



其中 m 是 1-10 的整数；

Z 表示大分子；

L' 表示连接子；

D 表示药物或前药, 所述药物或前药含有连接到式 (3) 分子的剩余部分的氨基和羟基；

X 是 O 或 S ；

A 是 C_2 烯基、芳基或不存在；

各 R^1 和 R^2 独立地是 H ； CN ；

NO_2 ；

任选取代的芳基；

任选取代的杂芳基, 所述杂芳基是包含 3-15 个碳且含有至少一个 N 、 O 或 S 原子的芳香环；

任选取代的烯基；

任选取代的炔基；或

各 R^1 和 R^2 独立地是 COR^3 或 SOR^3 或 SO_2R^3 , 其中

R^3 是 H 或任选取代的烷基；

任选取代的芳基；

任选取代的杂芳基, 所述杂芳基是包含 3-15 个碳且含有至少一个 N 、 O 或 S 原子的芳香环；

任选取代的烯基；

任选取代的炔基；或

OR 或 NR_2 , 其中各 R 独立地是 H 或任选取代的烷基；或

各 R^1 和 R^2 独立地是 SR^4 , 其中

R^4 是任选取代的烷基；

任选取代的芳基；

任选取代的杂芳基, 所述杂芳基是包含 3-15 个碳且含有至少一个 N 、 O 或 S 原子的芳香环；

任选取代的烯基；或

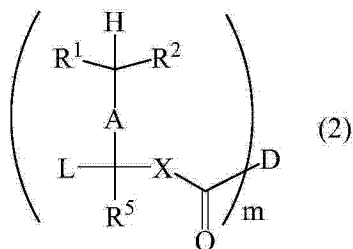
任选取代的炔基；

其中 R^1 和 R^2 任选地连接形成 3-8 元环；和

其中 R^1 和 R^2 不都是 H ；

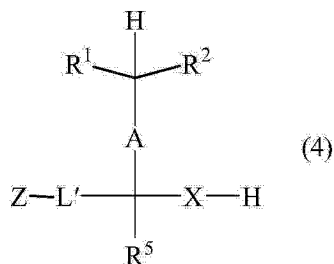
其中 R^5 是 H 或 C_{1-6} 烷基。

2. 权利要求 1 的化合物, 其中 m 是 1。
3. 权利要求 1 的化合物, 其中 R^5 是 H。
4. 权利要求 1 的化合物, 其中所述连接子是分子量 14Da–20kDa 的二价链, 其任选地包括不饱和键、选自 N、O 和 S 的杂原子、环结构、芳香部分和 / 或杂芳基部分, 所述杂芳基是包含 3–15 个碳且含有至少一个 N、O 或 S 原子的芳香环, 将 Z 共价连接到式 (3) 分子的剩余部分。
5. 权利要求 4 的化合物, 其中所述连接子是肽或假肽和 / 或包含三唑和 / 或亚苯基、和 / 或马来酰亚胺。
6. 权利要求 1 的化合物, 其中所述大分子是抗体、多糖、白蛋白或合成聚合物。
7. 权利要求 6 的化合物, 其中所述合成聚合物是聚乙二醇。
8. 权利要求 1 的化合物, 其中药物是肽、核酸或小分子。
9. 权利要求 1 的化合物, 其中所述 R^1 和 R^2 中的一个为 CN。
10. 权利要求 1 的化合物, 其中所述 R^1 和 R^2 中的至少一个包含苯基或亚苯基。
11. 权利要求 1 的化合物, 其中所述 R^1 和 R^2 中的一个为 SO_2R^3 且另一个是 H、烷基或苯基。
12. 权利要求 1 的化合物, 其中所述 A 不存在。
13. 下式的化合物



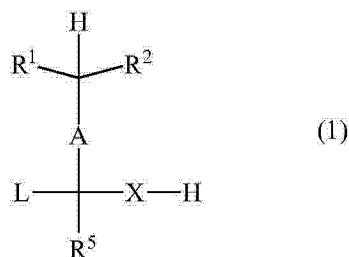
其中 m 、 R^1 、 R^2 、 R^5 、A、X 和 D 如权利要求 1 定义, 其中 L 是能与大分子结合的连接基团。

14. 下式的化合物



其中 R^1 、 R^2 、 R^5 、A、X、Z 和 L' 如权利要求 1 定义。

15. 下式的化合物



其中 R^1 、 R^2 、 R^5 、A 和 X 如权利要求 1 定义, 其中 L 是能与大分子结合的连接基团。

16. 药物组合物,包含权利要求 1-13 任一项的化合物。
17. 权利要求 1-13 任一项的化合物,用作药物。
18. 权利要求 1 的式 (3) 的化合物的制备方法,该方法包括将权利要求 13 的式 (2) 的化合物与大分子反应。
19. 权利要求 1 的式 (3) 的化合物的制备方法,该方法包括在药物与权利要求 14 的式 (4) 的化合物偶合的条件下将式 (4) 的化合物与所述药物反应。
20. 权利要求 13 的式 (2) 的化合物的制备方法,该方法包括在药物与权利要求 15 的式 (1) 的化合物偶合的条件下将权利要求 15 的式 (1) 的化合物与所述药物反应。

具有可控的药物释放速率的前药和药物 - 大分子轭合物

[0001] 与相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2008 年 9 月 15 日提交的美国临时申请序列号 61/192,050 和 2008 年 6 月 26 日提交的 61/133,148 的优先权,通过参考将它们以整体引入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及设计用于在递送药物中进行药物代谢动力学控制的化合物。特别地,本发明涉及具有期望的药物释放速率的前药和药物 - 大分子轭合物。

背景技术

[0004] 很多药物都具有不利的药物代谢动力学参数,这限制了它们的有效性。这些药物通过代谢或排泄从生理隔室中迅速清除导致持续时间缩短并减少了对靶点的暴露。例如,基于肽和蛋白质的治疗可能性很多,但是由于代谢不稳定性和肾清除,基于肽和蛋白质的药物通常都会发生快速的全身清除。类似地,核酸例如反义 DNA 和小的干扰 RNAs (siRNAs) 具有很大的治疗可能性,但是也会具有代谢不稳定性和细胞不可穿透性。最后,很多小有机分子也会具有快速清除,这限制了它们的治疗有效性。

[0005] 因此非常需要在体循环和 / 或生理隔室中延长半衰期并改善小分子,基于肽、蛋白质和核酸的治疗剂的利用率和细胞摄取的方法,以在疾病的治疗中提供改善的基于药物和基因的治疗。

[0006] 一种增加药物生理半衰期的方法是通过将它们与大分子相连来增加它们的流体大小 (hydrodynamic size)。大分子例如高分子量蛋白质、抗体、聚合物、聚(乙二醇) (PEG) 从体循环中的清除可以是极其缓慢的。mw > 5000 的 PEG 的代谢是不显著的, mw ~ 50kDa 的 PEG 的肾小球过滤和胆汁排泄均几乎无效。例如,已经报道了数种 PEG-超氧化物歧化酶 (PEG-SOD) 轭合物在大鼠或小鼠中的血浆半衰期从使用分子量 1900 的 PEG 的轭合物为 1.5 小时,至使用分子量 72,000 的 PEG 的轭合物为 36 小时不等,而未轭合的 SOD 的半衰期为 0.08 小时。参见 Veronese, "Peptide 和 protein PEGylation: a review of problems and solutions," *Biomaterials* (2001) 22:405-417。同样,单克隆抗体和血清白蛋白在全身和其他生理隔室中具有非常长的停留时间,极大地延长了与大分子轭合的药物的全身 / 隔室半衰期,这主要取决于轭合物的分子量。

[0007] 对于基于肽和蛋白质的药物,与聚合物残基例如 PEG 共价连接(称作“PEG 化”)已经有效地改善了药物代谢动力学参数,也可以使药物避开代谢和免疫系统,导致免疫原性降低。PEG 化已经产生了这样的修饰性药物,例如用于 X-染色体性中毒合并免疫原性综合征 (X-linked severe combined immunogenicity syndrome) 的 PEG-牛腺苷脱氨酶 (**ADAGEN®**, Enzon)、用于治疗丙型肝炎的 PEG- α 干扰素 (**PEGASYS®**, Hoffman-LaRoche ; PEG- **Intron®**, Schering-Plough/Enzon)、用于治疗急性成淋巴细胞性白血病的 PEG-L-天冬酰胺酶 (**Oncaspar®**, Enzon)、用于治疗嗜中性白细胞减少症的 PEG-重组人粒细胞集落刺激因子 (**Neulasta®**, Amgen)、用于治疗 Crohn's 病的 PEG-抗

肿瘤坏死因子 α (**Cimzia®**, Enzon)、用于治疗肢端肥大症的 PEG- 生长激素受体拮抗剂 (**Somavert®**, Pfizer) 和用于类风湿性关节炎的 PEG- 抗 -TNFFab(CD870, Pfizer)。

[0008] PEG 化也显示出对核酸向细胞递送的改善。例如,美国专利公开 2008/0064863 披露了其中一条链与聚(环氧乙烷)单元共价连接的双链核酸,它与多聚阳离子复合,用于核酸药物向细胞递送。PCT 公开 W02007/021142 披露了共价 PEG 化的 siRNA 分子。PEG- 抗 -VEGF 适体 (**Macugen®**, OSI/Pfizer) 已经批准用于与年龄有关的黄斑变性的眼内治疗。

[0009] 也已经报道了小分子的 PEG 化。EZN-2208 是 SN-38(伊立替康的活性代谢产物)的 PEG 衍合物,其在临床前肿瘤模型中显示出活性。在该情况下,PEG 化改善了小分子药物的溶解性。

[0010] 已经披露了肽和蛋白质药物与 PEG 以外的大分子的共价连接。例如,已经报道了与单克隆抗体的各种肽类药物例如凝血酶敏感素 -1 拟肽(mimetic peptide)、血管生成素 -2 拮抗剂、高血糖素样肽 -1(GLP-1) 和 exendins 的衍合物。

[0011] 但是,肽、蛋白质和小分子与 PEG 或其他大分子的共价修饰常常导致母体药物的生物活性有害地丧失。因此,一些近来的研究活动已经聚焦于研发可逆或暂时的 PEG 化,其中聚合物链通过可分裂的连接单元衍合到药物上。最终的 PEG 化的衍合物是具有足够的分子大小,以具有有利的全身保留。在生理条件下,通过酶或化学作用分裂连接单元会导致药物或迅速转化为活性药物的前药释放。根据连接单元分裂速率与前药或游离药物的清除速率的相互关系,可以用这种方法实现活性药物生物活性的充分稳态浓度。

[0012] 已经报道了使用这种方法的成功,例如使用通过赖氨酸残基与 PEG 可逆衍合的免疫毒素 SS1P。参见 Filpula 等人,“Releasable PEGylation of Mesothelin Targeted Immunotoxin SS1P Achieves Single Dosage Complete regression of a Human Carcinoma in Mice,”Bioconjugate Chemistry(2007) 18 :773-784。然而,未修饰的 SS1P 以约 26 分钟的半衰期从小鼠血浆中清除,可逆地 PEG 化将半衰期延长至 2.5-5 小时。在肾上腺素治疗的大鼠中,心房钠尿肽(血浆半衰期为 2-5 分钟)的可逆 PEG 化已经显示出对血压的拖延效果的延长(Nesher 等人,Bioconjugate Chem(2008) 19 :342-348)。

[0013] 可逆 PEG 化或其他衍合大分子和药物的大多数方法都有潜在的缺点。例如,一些需要通过血清蛋白酶或酯酶来酶水解,其他则需要还原环境来分裂二硫键,并且大多会释放“自杀性”前药,所述前药会自发分裂成活性药物和小的、可能有毒性的烷化剂。有利的是,设计不同类型的可逆 PEG 化或大分子-药物连接,它们不需要难控制的实体例如酶和氧化还原环境,也不会受到这些实体和环境的影响。

[0014] 美国专利 6,504,005 描述了通过 pH 的 β 消除部分在生理条件下释放活性药的前药分子。该方法的一个具体实施方案在 W02004/089279 中进行了描述。尽管受到范围和实施例的限制,在美国专利公开 2006/0171920 中还是描述了该方法:它利用了该衍合物暴露于生理 pH 下时引发的药物从 PEG 载体中分裂的自发性一级速率。提供在生理条件下具有各种可预测和可控的自发性一级释放速率的大分子-药物衍合物的一般策略将为疾病的治疗提供有价值的治疗工具。

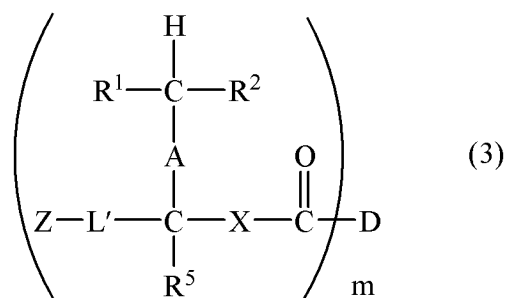
[0015] 发明内容

[0016] 本发明提供当施用于需要用该治疗剂治疗的患者时可以控制治疗剂(“药物”)的递送速率的前药和药物-大分子衍合物。本发明的前药和药物-大分子衍合物提供了一种

在延长的时间段递送治疗剂（即使对于从系统中快速清除的治疗剂）的手段，因此延长了治疗剂的治疗效果。

[0017] 在一个方面，本发明涉及化合物，其是下式的药物-大分子缀合物

[0018]



[0019] 其中 m 是 1-10 的整数；

[0020] Z 是大分子的残基；

[0021] L' 是连接子 (linker) 的残基；

[0022] D 是药物或前药的残基；

[0023] X 是 O 或 S；

[0024] A 是烯基 (C₂)、芳基或不存在；

[0025] 各 R¹ 和 R² 独立地是 H；CN；

[0026] NO₂；

[0027] 任选取代的芳基；

[0028] 任选取代的杂芳基；

[0029] 任选取代的烯基；

[0030] 任选取代的炔基；或

[0031] 各 R¹ 和 R² 独立地是 COR³ 或 SOR³ 或 SO₂R³，其中

[0032] R³ 是 H 或任选取代的烷基；

[0033] 任选取代的芳基；

[0034] 任选取代的杂芳基；

[0035] 任选取代的烯基；

[0036] 任选取代的炔基；或

[0037] OR 或 NR₂，其中各 R 独立地是 H 或任选取代的烷基；或

[0038] 各 R¹ 和 R² 独立地是 SR⁴，其中

[0039] R⁴ 是任选取代的烷基；

[0040] 任选取代的芳基；

[0041] 任选取代的杂芳基；

[0042] 任选取代的烯基；或

[0043] 任选取代的炔基；

[0044] 其中 R¹ 和 R² 可以连接形成 3-8 元环；和

[0045] 其中 R¹ 和 R² 不能都是 H；

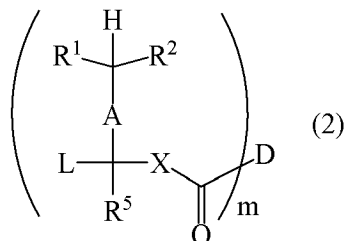
[0046] 其中 R⁵ 是 H 或烷基 (C₁₋₆)。

[0047] 典型地，连接子的残基是分子量为 14Da-20kDa 的二价链，其可以包括不饱和键、

杂原子、环结构、芳香部分和 / 或杂芳基部分, 将 Z 共价连接到分子的剩余部分。连接子可以包括肽骨架、假肽 (pseudopeptide) 骨架、三唑、亚苯基或马来酰亚胺 (maleimido) 残基或它们的组合。在一些实施方案中, 式 (3) 中所示的羰基是药物本身产生的。在一些实施方案中, m 是 1 和 / 或 R⁵ 是 H。m 的值也可以是 1-10 之间的任意中间整数; 因此 m 可以是 2、5、7 或任意之间的整数。

[0048] 在另一个方面, 本发明提供具有式 (2) 的前药

[0049]



[0050] 其中,

[0051] m、X、A、R¹、R² 和 R⁵ 如上述定义, L 是能与大分子结合的连接基团, 和

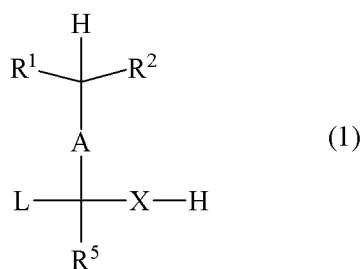
[0052] D 是药物或前药的残基。

[0053] 在一些实施方案中, m 是 1 和 / 或 R⁵ 是 H。

[0054] 在体内的生理条件下, 式 (3) 和式 (2) 的化合物通过非酶消除以可控速率释放药物或前药。通过适当选择基团 R¹ 和 R², 可以调节药物释放的速率。在一些实施方案中, 基团 R¹ 和 R² 之一可以分别独立地被改变插入 R¹-CH-R² 质子的酸性的给电子和 / 或吸电子取代基取代, 这样可以实现对药物消除速率的巨大灵活性和可控性。在本发明的一些实施方案中, 可以使用在生理条件下具有不同的药物释放速率的式 (3) 或式 (2) 的化合物的混合物, 以为需要治疗的患者提供特定的 (tailored) 药物递送特征。

[0055] 本发明也涉及制备式 (3) 和 (2) 的化合物以及在它们的形成中作为中间体的化合物的方法。因此, 在另一个方面, 本发明涉及下式的化合物

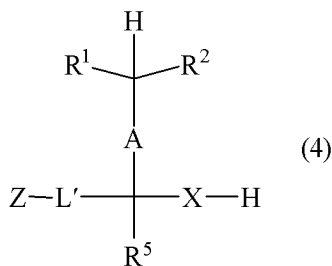
[0056]



[0057] 其中 A、X、L、R¹、R² 和 R⁵ 如上述定义。

[0058] 本发明也提供下式的化合物

[0059]



[0060] 其中

[0061] X 、 A 、 L' 、 Z 、 R^1 、 R^2 和 R^5 如上述定义。

[0062] 本发明也涉及包含式 (2) 或 (3) 的化合物的药物组合物以及这些前药或大分子轭合物的制备方法。一般地,起点是式 (1) 的化合物,它可以通过与药物化合物的适当反应直接转化为式 (2) 的前药。接着,式 (2) 的前药 可以通过 L 与大分子 Z 的反应转化为式 (3) 的大分子轭合物。可替代地,可以通过将式 (1) 的化合物转化为式 (4) 的化合物,然后与药物反应来制备式 (3) 的化合物。

[0063] 附图简述

[0064] 图 1 显示的是药物从本发明的大分子载体 - 药物轭合物中碱催化的消除。

[0065] 图 2 显示的是 R^1 和 R^2 的各种官能团以及它们对邻近质子酸性的作用。随着酸性的增强 (pK_a 降低),去质子化的速率以及因此药物从前药或药物 - 大分子轭合物中释放的速率如预期那样增加。

[0066] 图 3 显示的是在各种 2- 取代的茛中取代基对于 9- 质子的酸性的作用。如所示,该作用符合预期的 Hammett 线性自由能关系,这样任意给定的 2- 取代茛的酸性就非常接近于基于取代基的 σ 参数的评价。

[0067] 图 4 显示的是具有不同释放速率的一系列前药的经计算的药物释放特征,所述药物具有每日 0.5 的从系统中清除的固定速率,所述释放特征用所施用总药物的份数表示。相对快速的释放速率(例如,每日 5 的释放速率)会在较短的持续时间里得到所释放药物较高的最大浓度。相对缓慢的释放速率(例如,每日 0.1 的释放速率)会在较长的持续时间里得到所释放药物较低的最大浓度。

[0068] 图 5 显示的是具有不同释放速率的一系列前药的经计算的药物释放特征,所述药物具有每日 0.5 的从系统中清除的固定速率,所述释放特征用最大浓度(% C_{max}) 的百分比对时间来表示。随着药物从前药或药物 - 大分子轭合物中释放速率降低,其中游离药物浓度在最大浓度的特定百分比之上的给药后时间延长。

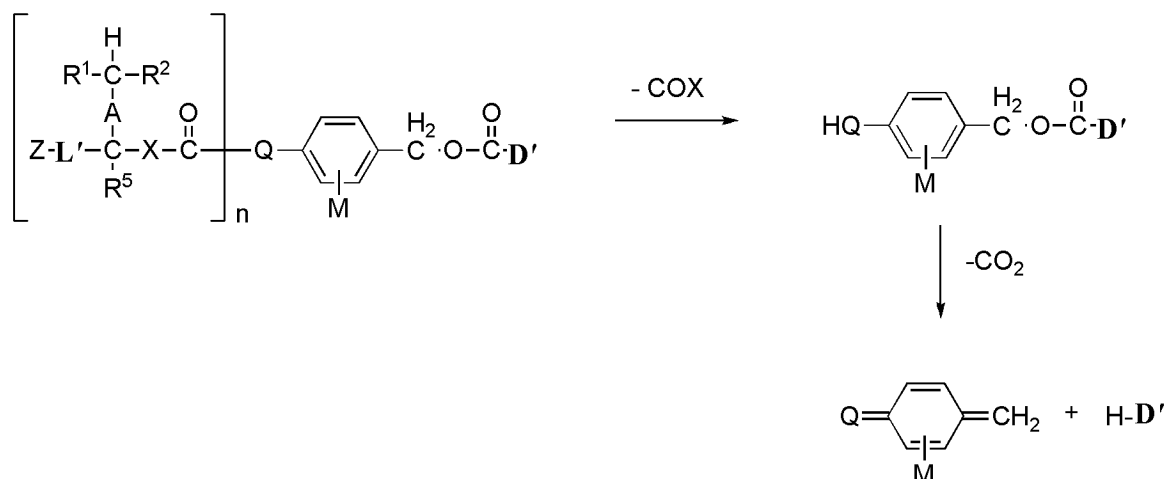
[0069] 发明的实施方式

[0070] 式 (2) 和 (3) 的化合物设计用于控制药物或前药(被定义为 D) 代谢动力学。使用式 (3) 用于说明,其药物或前药 D 通过如图 1 所示的机制释放。根据 pH 依赖性消除机制来控制速率。如图 2 部分所示,选择基团 R^1 和 R^2 ,以为插入质子 R^1-CH-R^2 提供适当的反应性,由此对药物或前药从前药或轭合物中的释放速率提供控制。连接基团和基团 A 的性质也会影响该过程,提供对药物从所得轭合物中释放速率的多点控制。如图 3 所示, R^1 和 R^2 的性质可以通过任选加入给电子或吸电子取代基来调节。

[0071] 本发明的特别优点是连接基团的连接位置。当它能将连接基团连接到基团 R^1 或 R^2 中的一个上时,这样会使 R^1 或 R^2 任何其他的取代化学变复杂,并会导致该连接基团与给电子或吸电子取代基之间的电子相互作用,因此限制了释放速率的可调节性。

[0072] 典型地,当在一些情况下药物的活性形式直接从本发明的轭合物中释放时,能够释放其前药形式的活性药物。这种系统的一个例子如下:

[0073]



[0074] 其中 Q = O 或 NH, D' 是药物的活性形式,

[0075] M = 常见的芳基取代基。

[0076] 如上所示,式(2)和(3)的化合物为药物或前药提供可调节的释放速率,以控制这些药物的药物代谢动力学。为了制备这些化合物,各种中间体是式(1)、(2)和(4)的化合物;如所示,式(2)的化合物也是具有可调节释放速率的前药。式(1)的化合物既没有药物/前药,也没有相连的大分子,可以认为是原料。

[0077] 由于取代基 R¹、R²、R⁵、A 和 X 是所有这些化合物共有的,因此与式(1)相关的以下列选择组合存在的这些取代基的各种实施方案可以推广至式(2)、(3)和(4)的化合物。此外,式(1)和(2)中 L 的性质决定了式(4)和(3)中 L' 的性质。因此,下述式(1)的选择也意味着是式(2)、(3)和(4)的选择。

[0078] 定义

[0079] 术语“给电子基团”是指导致苄基 H 基团的酸性降低的取代基。适当的给电子取代基的例子包括但不限于,低级烷基、低级烷氧基、低级烷硫基、氨基、烷氨基和二烷氨基。术语“吸电子基团”是指导致苄基 H 基团的酸性增强的取代基。适当的吸电子取代基的例子包括但不限于,卤素、二氟甲基、三氟甲基、硝基、氰基;C(=O)-R,其中 R 是 H、低级烷基、低级烷氧基或氨基;或者 SO₂R,其中 R 是低级烷基、芳基或杂芳基。非氢的给电子或吸电子取代基可以存在于其所连接的环的多个位置。为了方便,尽管在大多数例子中在单个环上仅显示一个非氢取代的发生,但也可以存在多个取代基,它们也在本发明的范围内。取代基可以相同或不同。

[0080] 术语“烷基”是指直链、支链或环状的饱和 1-8 个碳,在一些实施方案中 1-6 或 1-4 个碳原子的烃基。

[0081] 术语“烯基”是指具有碳-碳双键的非芳香不饱和烃。术语“烯基(C₂)”是指任意几何构型的单-、二-、三-或四-取代的碳-碳双键。

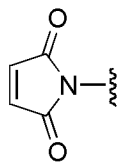
[0082] 术语“炔基”是指具有碳-碳叁键的非芳香不饱和烃。术语“炔基(C₂)”是指单-或二-取代的碳-碳叁键。

[0083] 术语“烷氧基”是指与氧连接的烷基,包括甲氧基、乙氧基、异丙氧基、环丙氧基、环丁氧基及类似基团。

[0084] 术语“芳基”是指 6-18 个碳,优选 6-10 个碳的芳香烃,包括基团例如苯基、萘基和蒽基。术语“杂芳基”是指包含 3-15 个碳且含有至少一个 N、O 或 S 原子,优选包含 3-7 个

碳且含有至少一个 N、O 或 S 原子的芳香环,包括基团例如吡咯基、吡啶基、嘧啶基、咪唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、异噻唑基、喹啉基、吲哚基、茚基及类似基团。术语“卤素”包括溴、氟、氯和碘。术语“马来酰亚胺”是指下式的基团

[0085]



[0086] 术语“蛋白质”和“肽”在本文中可互换使用而不论链长,这些术语还包括包含酰胺键 (linkage) 以外的键,例如 CH_2NH_2 键的假肽,以及肽拟似物 (peptidomimetics)。

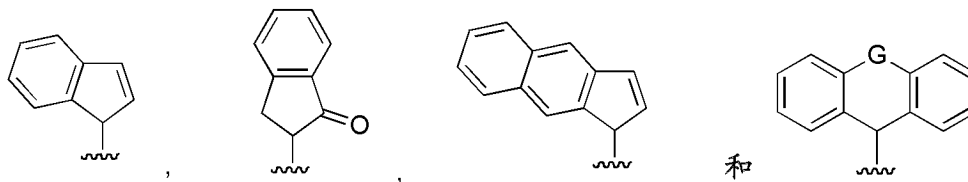
[0087] 术语“核酸”和“寡核苷酸”也可互换使用而不论链长。核酸或寡核苷酸可以是单链或双链,或者可以是 DNA、RNA 或具有改变后的键,例如磷酸二酯、氨基磷酸酯等的其修饰形式。对于在本发明中用作药物的蛋白质和核酸,这些术语也包括在自然界中未发现的具有侧链(在蛋白质的情况下)和在自然界中未发现的具有碱(在核酸的情况下)的那些。

[0088] 在药物的背景下,小分子是本领域共知的术语,是指蛋白质和核酸以外的化合物,它们是合成的或是从自然界分离的,一般而言与蛋白质或核酸不同。典型地,它们的分子量 $< 1,000$, 尽管还没有公认的具体截止点。无论如何,该术语是制药和医学领域公知的。

[0089] 术语“大分子”是指分子量约 10,000–100,000 的大分子,其本身基本上没有细胞毒性、激素或细胞信号活性,但是能够与活性药物分子辄合以用于在系统循环中负载活性药物分子,并为活性药物提供储备体以随时间逐渐释放。

[0090] 当 R^1 和 R^2 结合形成环状结构时,它包括其中 $\text{R}^1\text{-CH-R}^2$ 部分形成下述结构的基团,例如,

[0091]



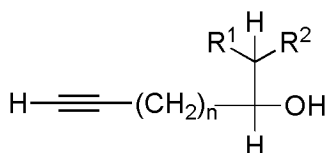
[0092] 并形成如上所述被吸电子和/或给电子基团任选取代的基团,其中 G 是键; $\text{C}=\text{O}$; SO 、 SO_2 、 CX_2 或 CX_2CX_2 , 其中各 X 独立地是 H 或 Cl。

[0093] 式 (1) 的变形

[0094] 在下述的例子中,应当注意,芳基例如典型地仅包含一个取代基。这仅是为了简单,应当理解也包括其中环系统包含多个非氢取代基的 R^1 和 R^2 的实施方案。优选一个单个环上取代基的数目是 1、2 或 3。

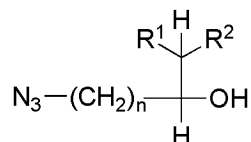
[0095] 在本发明的一些实施方案中,式 (1) 的化合物具有更具体的式:

[0096]



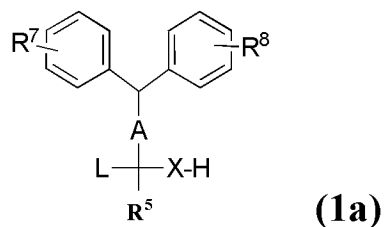
[0097] 或式:

[0098]

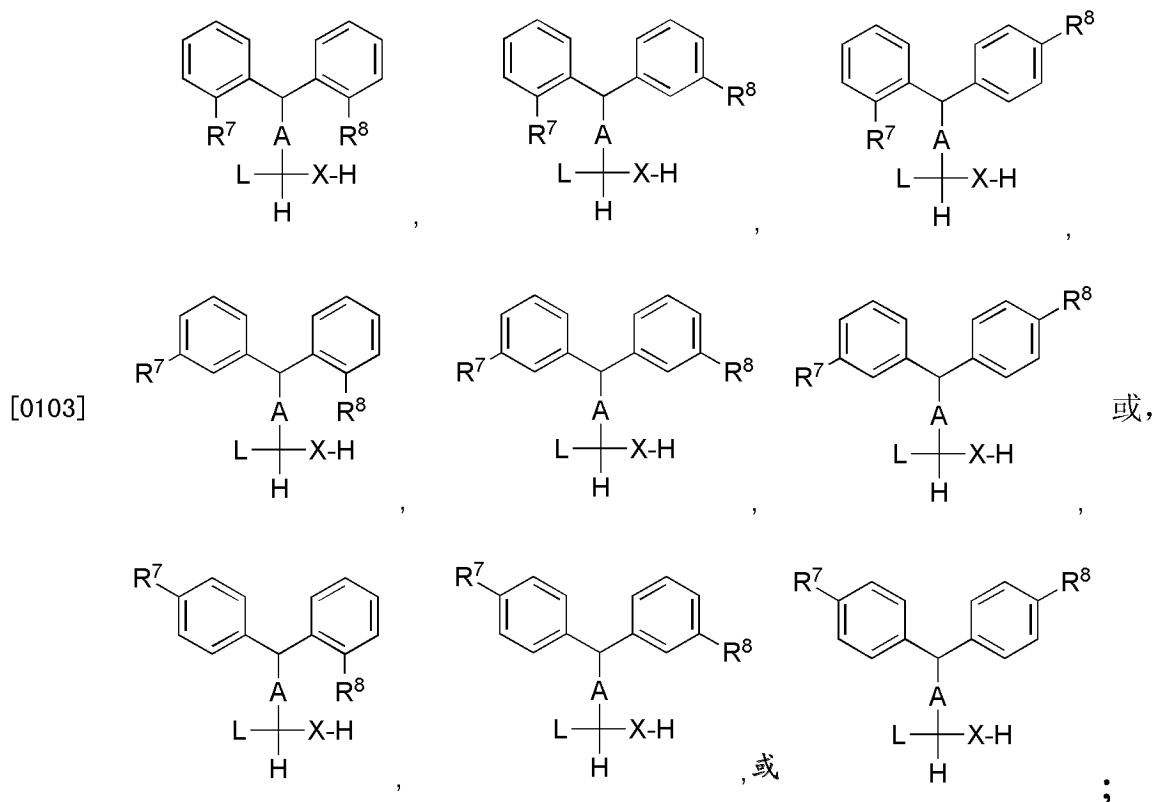
[0099] 其中 $n = 1-6$ 。

[0100] 在一些实施方案中,式(1)的分子具有更具体的式(1a)

[0101]

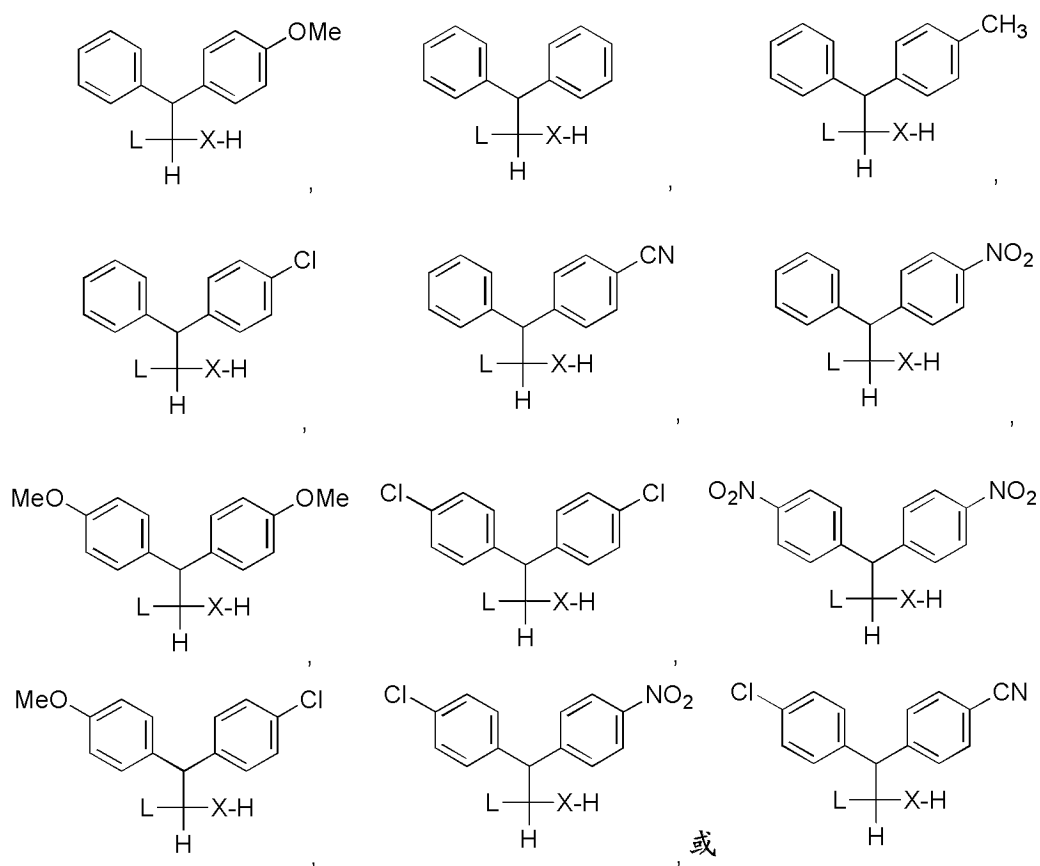
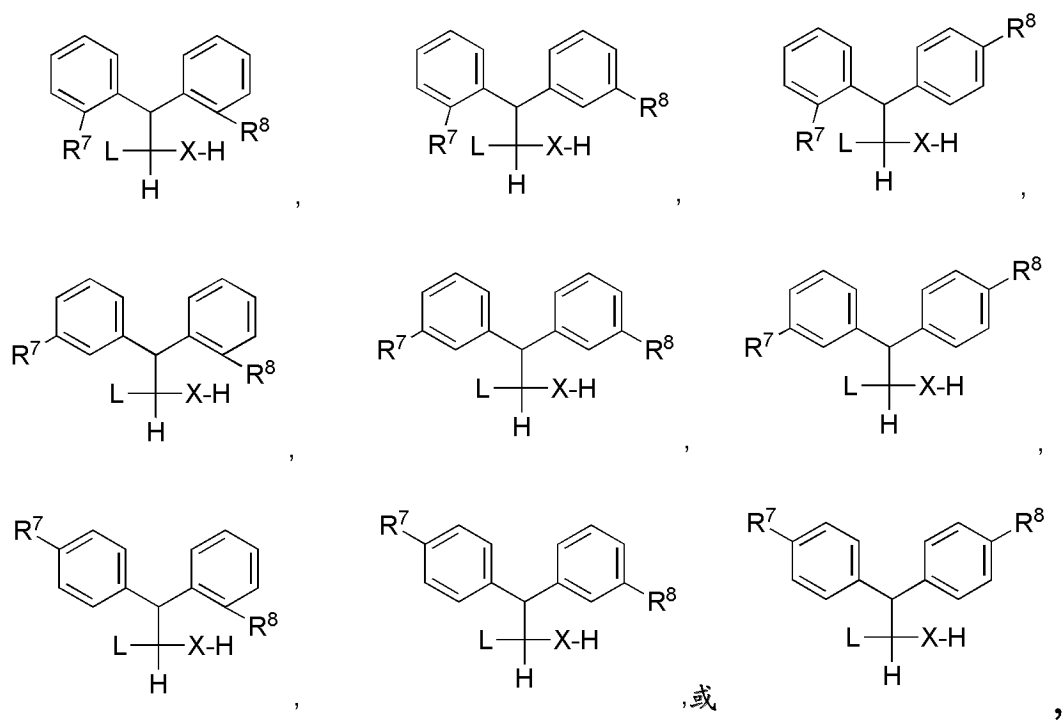


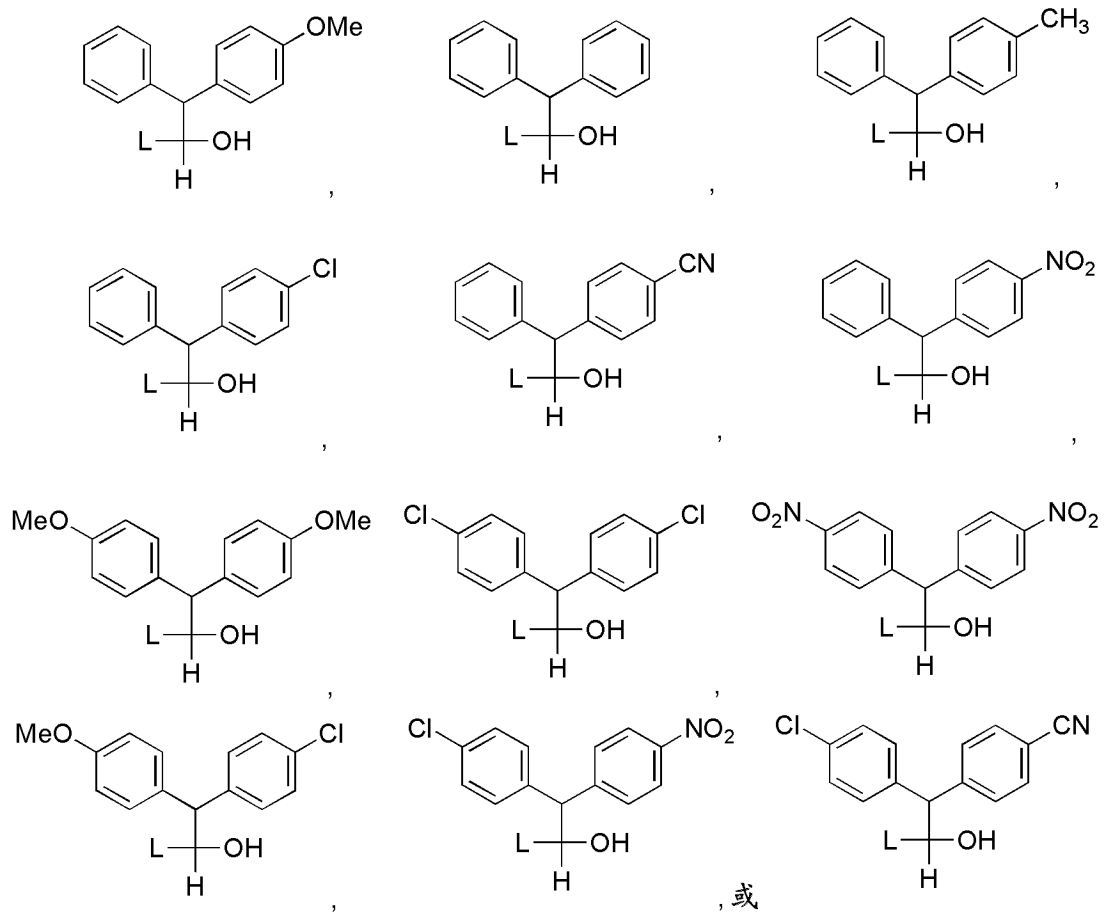
[0102] 其中 R^7 和 R^8 各自独立地是 H、给电子基团或吸电子基团,其中 R^7 和 R^8 的给电子和 / 或吸电子形式存在于苯基部分的 1-5 个位置,优选为 3 个或更少;X 是 O 或 S;A 是烯基 (C_2)、芳基或不存在;和 L 是能与大分子结合的连接基团, R^5 是 H 或烷基 (C_{1-6}),例如,



[0104] 例如

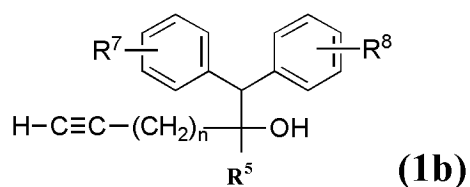
[0105]





[0109] 在本发明一个更特别的实施方案中,式(1)的分子具有更具体的结构(1b)

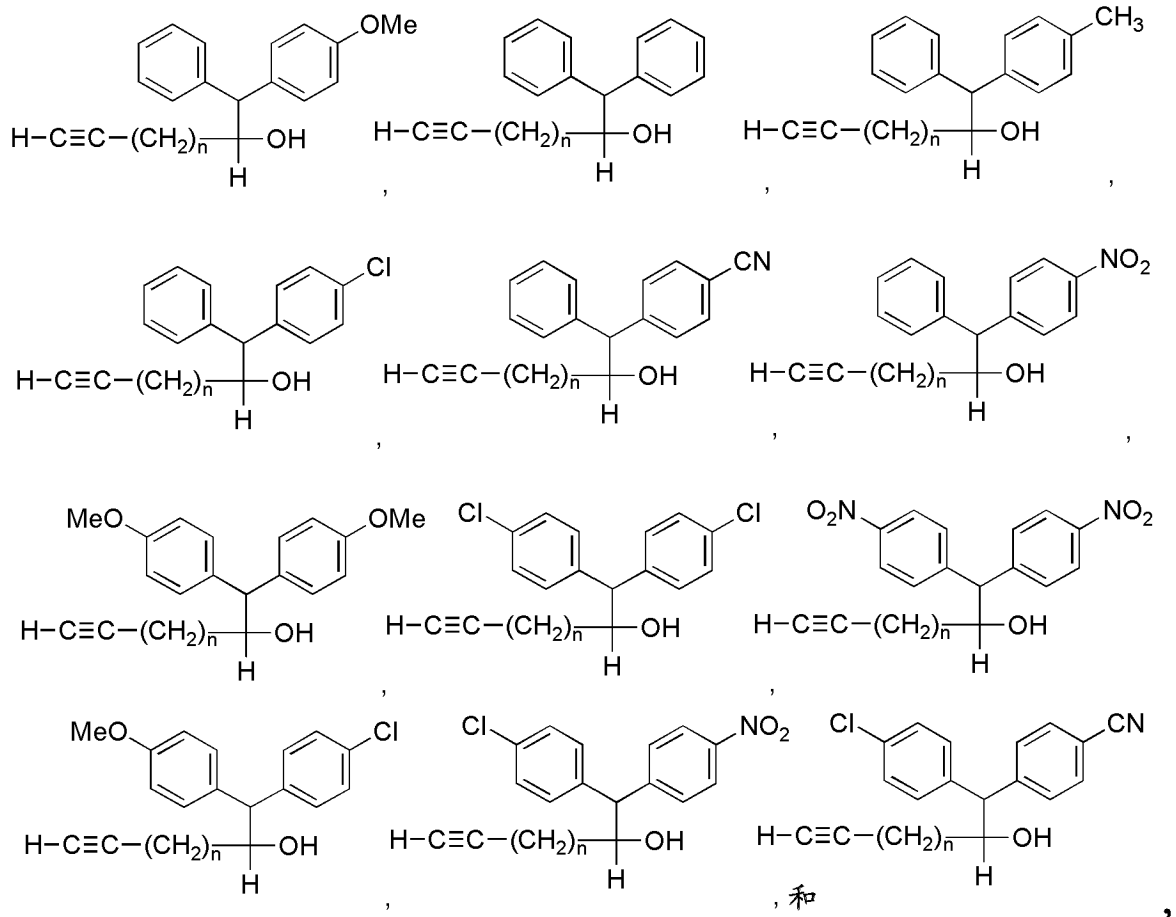
[0110]



[0111] 其中,如上, R^7 和 R^8 各自独立地是H、给电子基团或吸电子基团,其中 R^7 和 R^8 的给电子和/或吸电子形式存在于苯基部分的1-5个位置; R^5 是H或烷基(C_{1-6}),并且 $n = 1-6$ 。

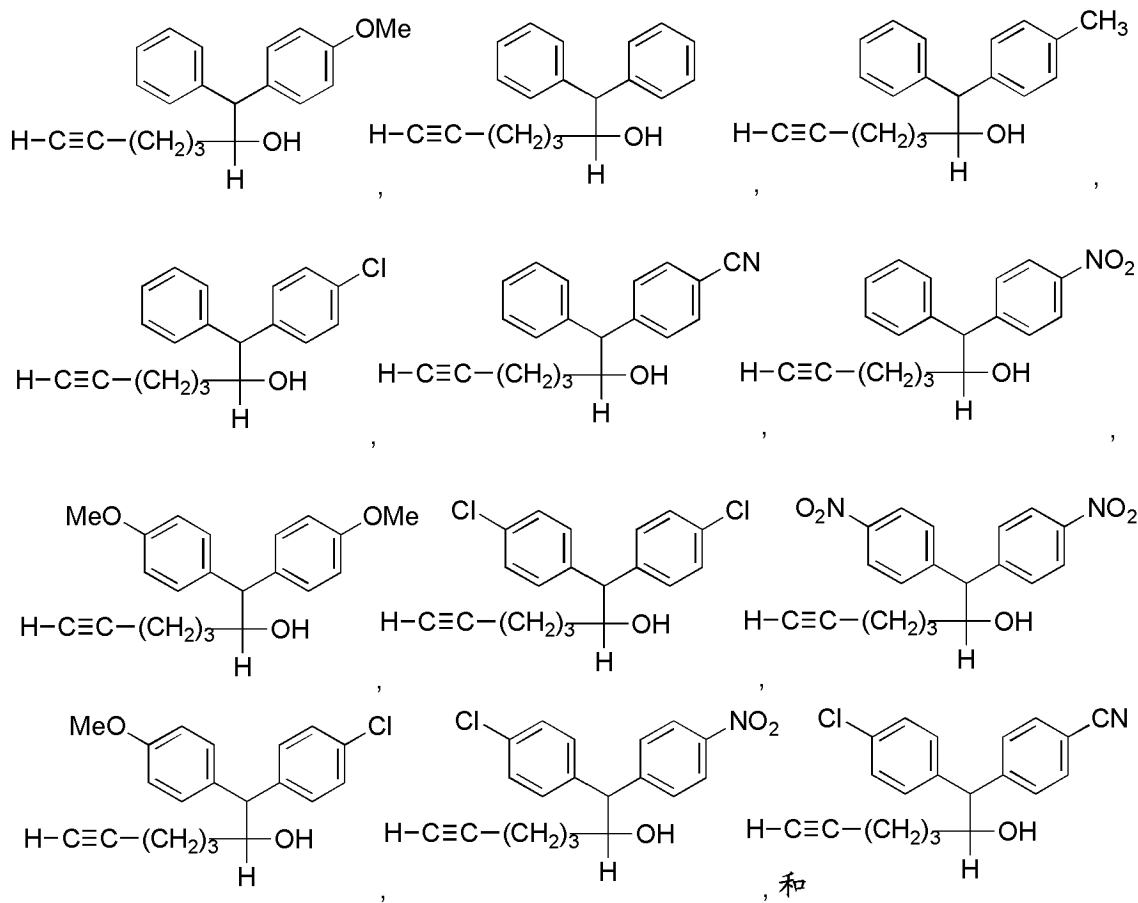
[0112] 例子包括

[0113]



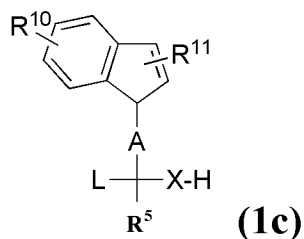
[0114] 以及

[0115]



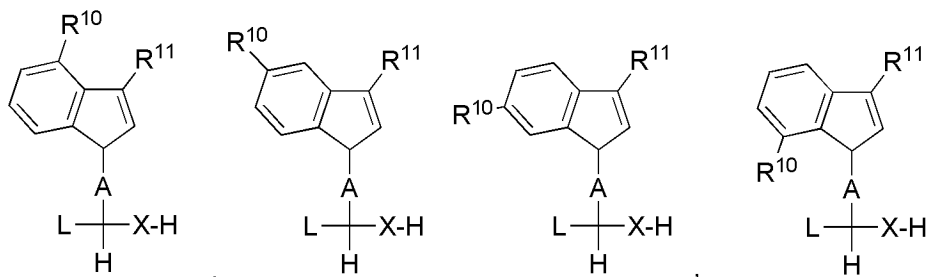
[0116] 在本发明的一些实施方案中,式(1)的分子具有更具体的式(1c)

[0117]

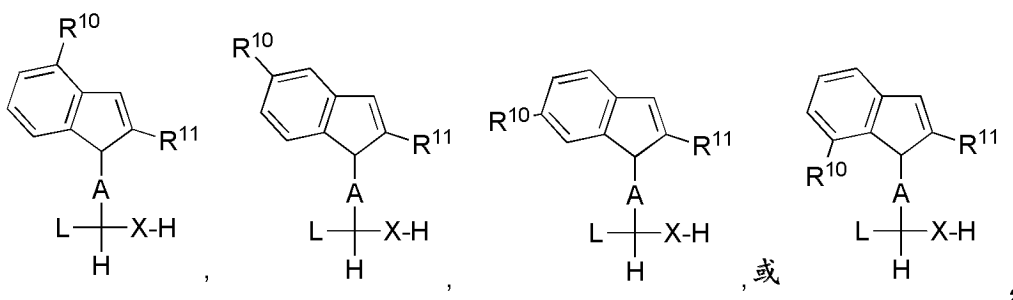


[0118] 其中 X 是 O 或 S; A 是烯基 (C_2)、芳基或不存在; L 是能与大分子结合的连接基团; 其中 R^5 是 H 或烷基 (C_{1-6}), R^{10} 和 R^{11} 各自独立地是 H、给电子基团或吸电子基团, 其中 R^{10} 和 R^{11} 可以作为它们各自环上 1-4 或 1-2 个位置上的非氢取代基。例子包括

[0119]

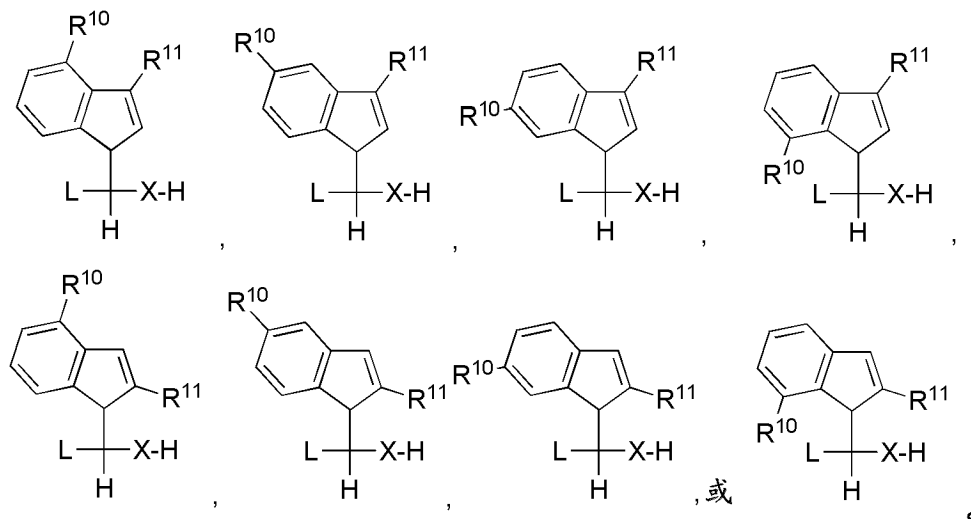


[0120]



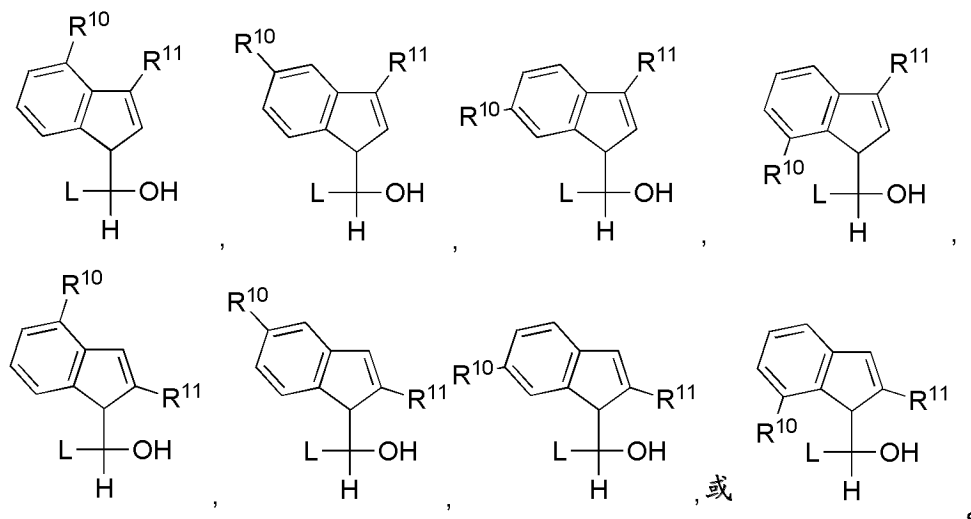
[0121] 以及

[0122]



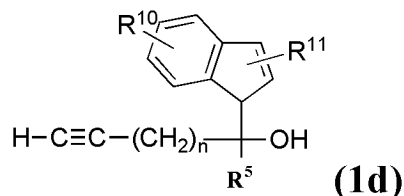
[0123] 在本发明更特别的实施方案中,式(1c)的分子包括

[0124]



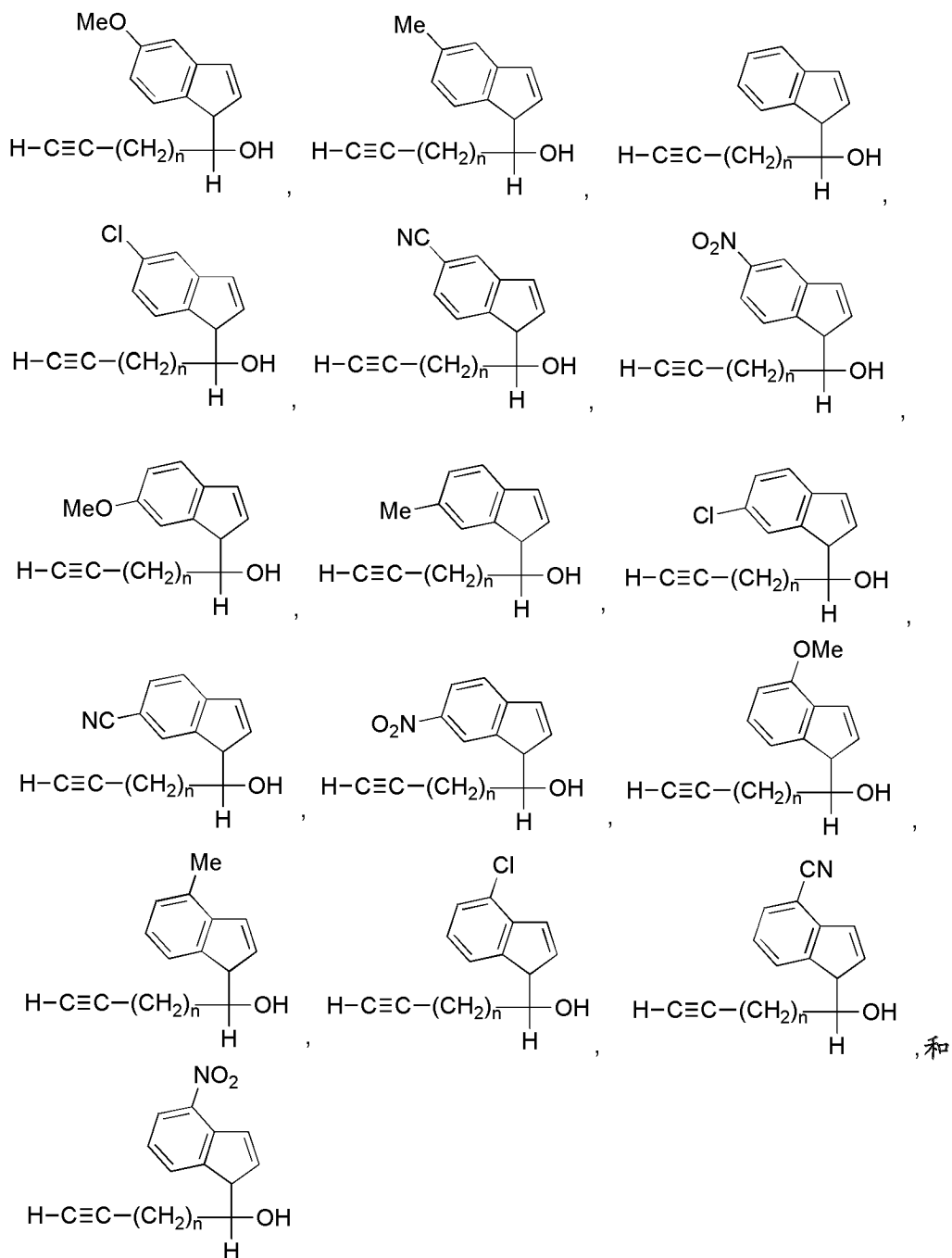
[0125] 在本发明一个特别的实施方案中,式(1)的分子具有更具体的式(1d)

[0126]

[0127] 其中 R^{10} 和 R^{11} 各自独立地是 H、给电子基团或吸电子基团,其中

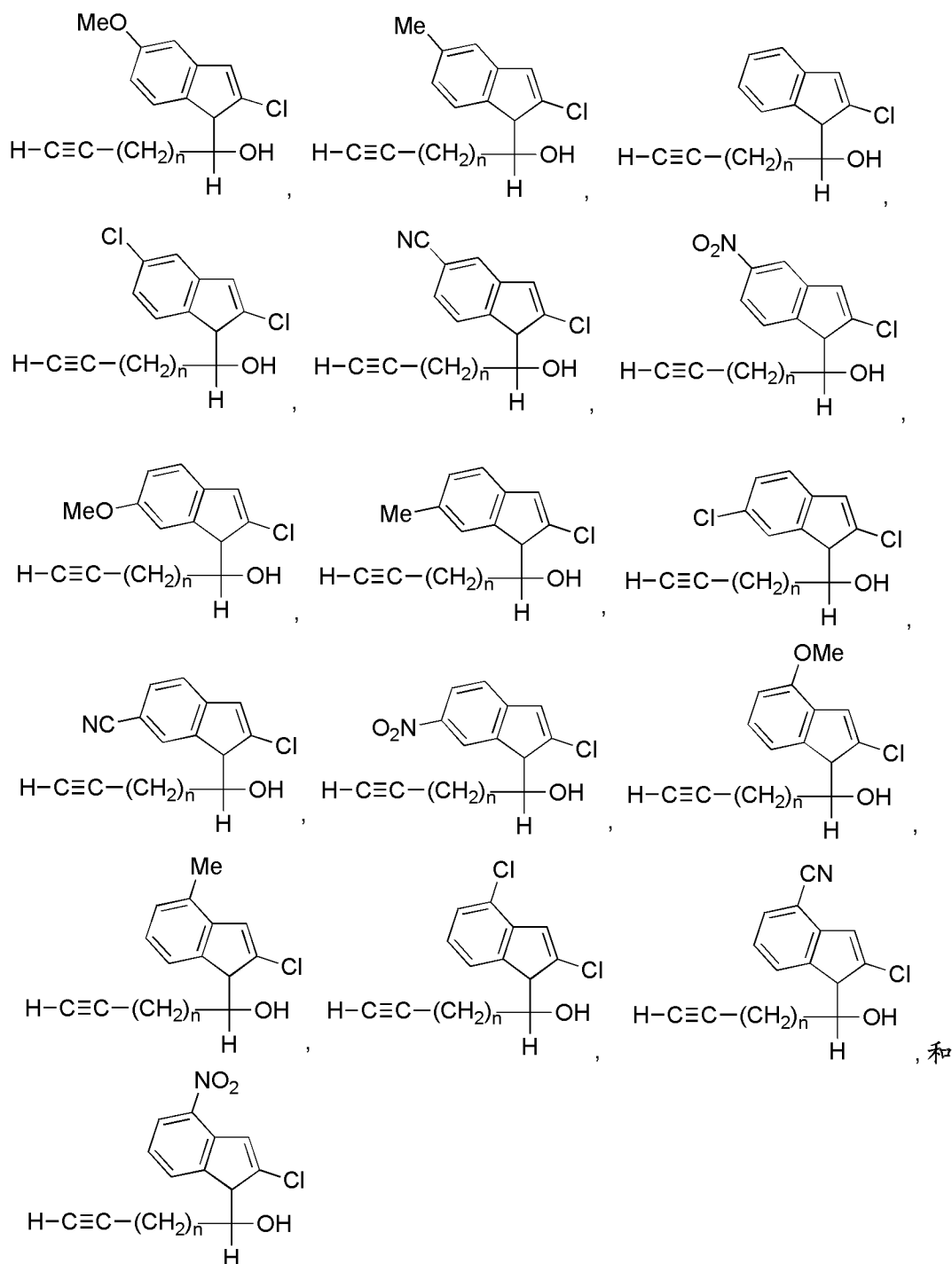
[0128] R^{10} 和 R^{11} 可以作为它们各自环上 1-4 或 1-2 个位置上的非氢取代基, $n = 1-6$, 并且 R^5 是 H 或烷基 (C_{1-6}), 例如,

[0129]



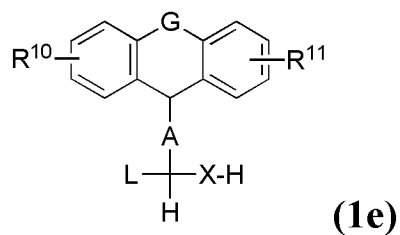
[0130] 以及

[0131]



[0132] 在某些实施方案中,本发明的分子具有式 (1e)

[0133]

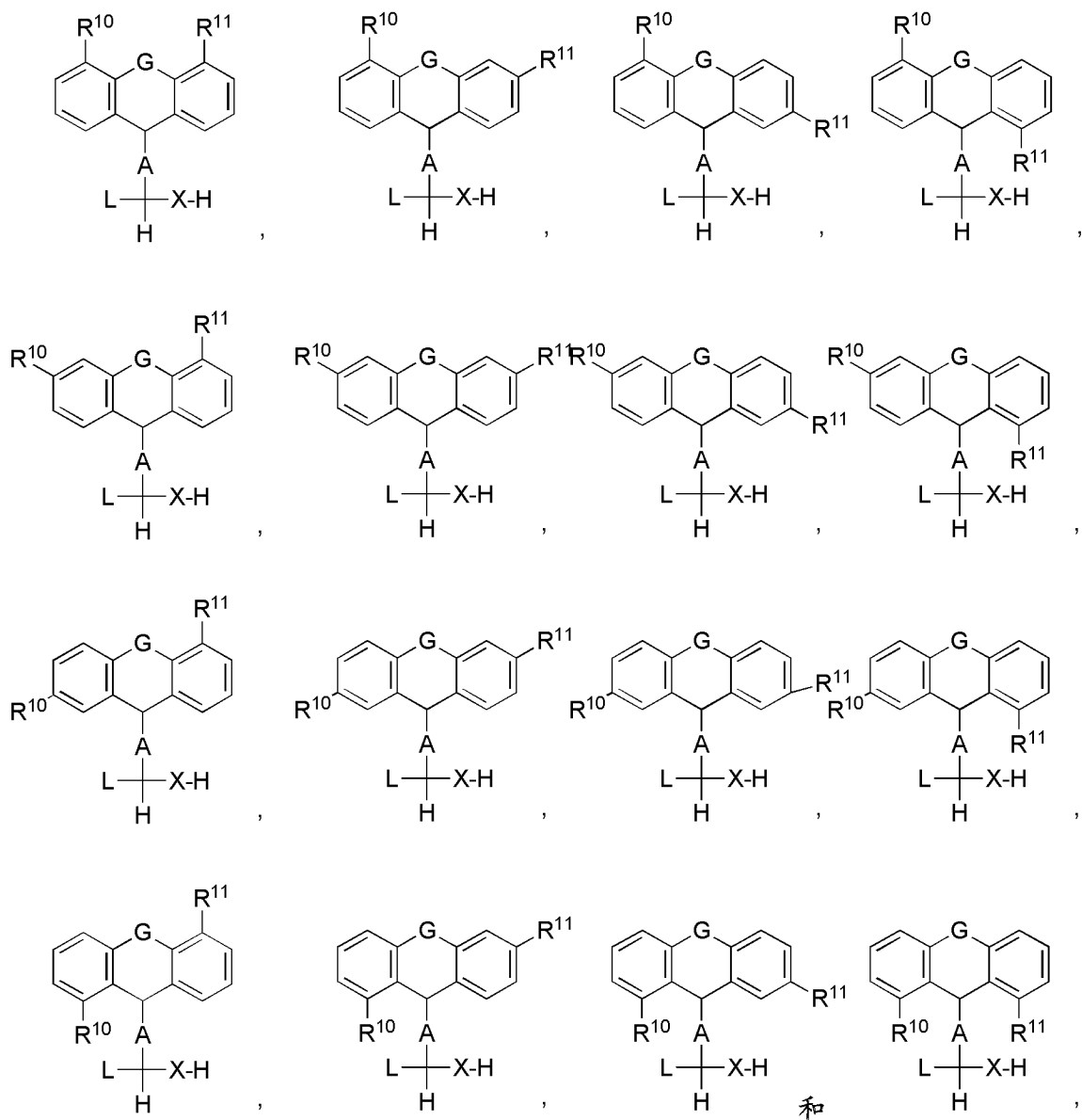


[0134] 其中 R^{10} 和 R^{11} 各自独立地是 H、给电子基团或吸电子基团, 其中 R^{10} 和 R^{11} 可以作为它们各自环上 1-4 个位置上的非氢取代基; X 是 O 或 S; A 是烯基 (C_2)、芳基或不存在; L 是

能与大分子结合的连接基团;G 是键、C=O、O、SO、SO₂、CX₂ 或 CX₂CX₂, 其中各 X 独立地是 H 或 Cl, 和 R⁵ 是 H 或烷基 (C₁₋₆)。

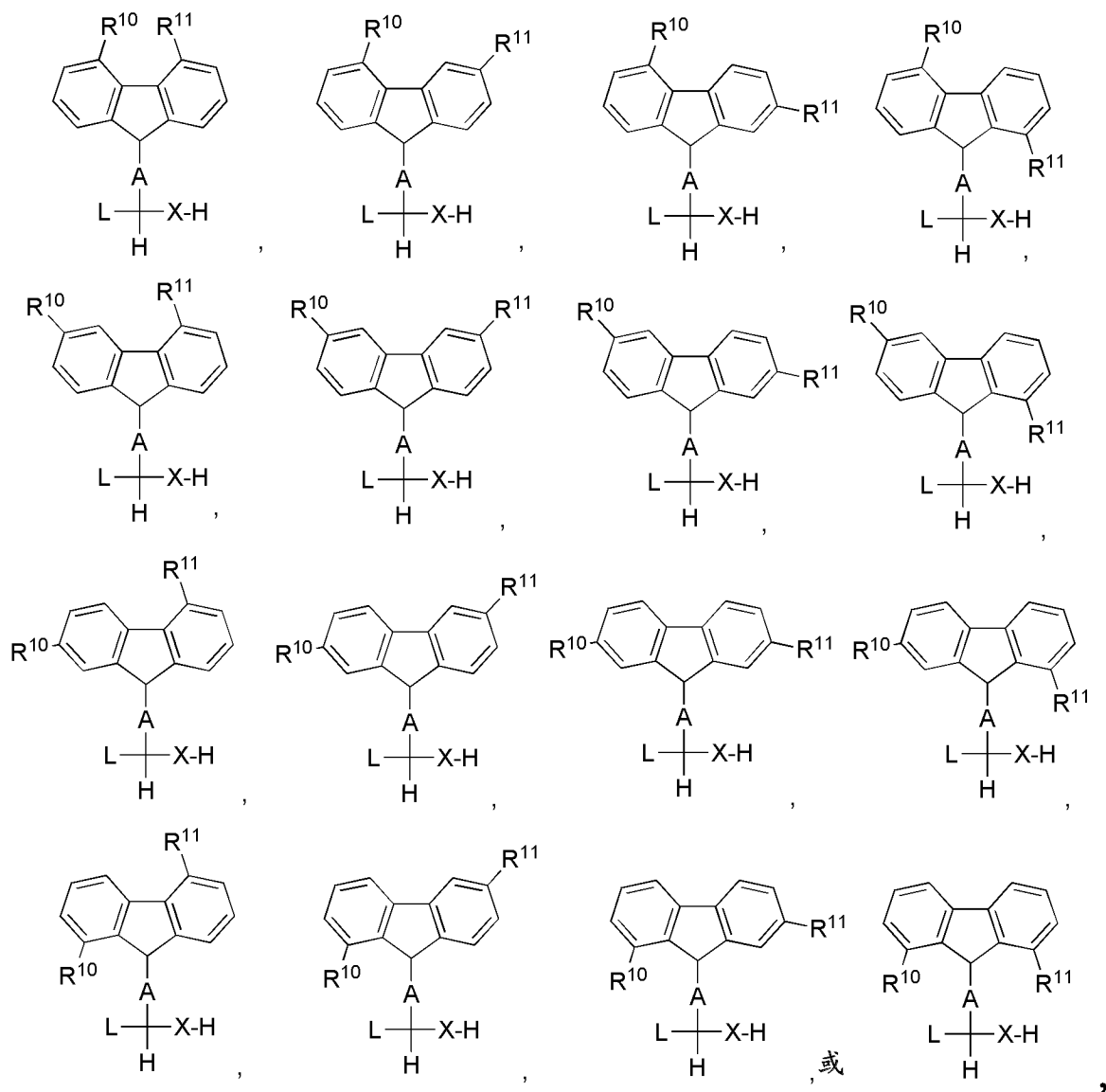
[0135] 例子包括

[0136]



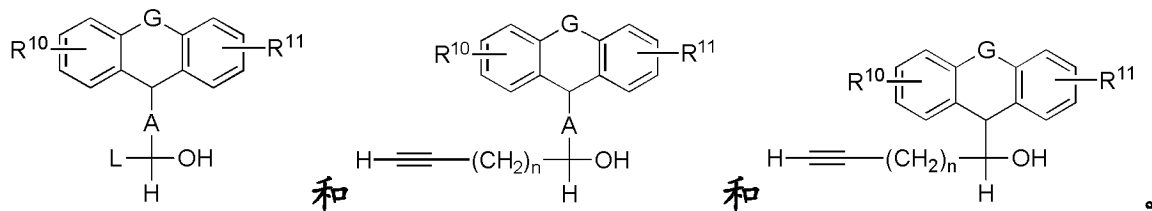
[0137] 以及

[0138]



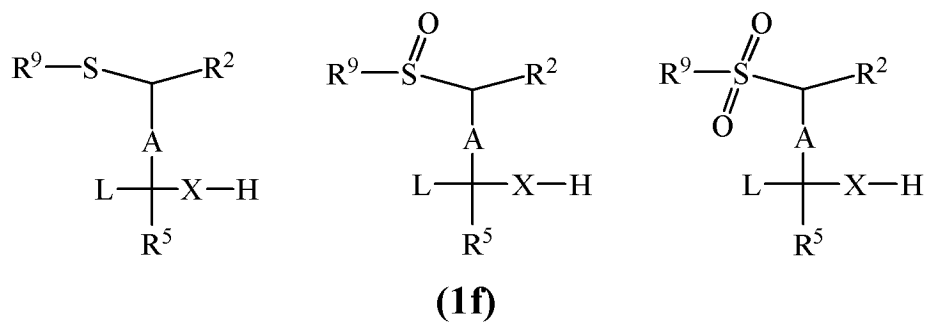
[0139] 包括

[0140]



[0141] 在本发明的一些实施方案中,式(1)的分子具有更具体的式(1f)

[0142]

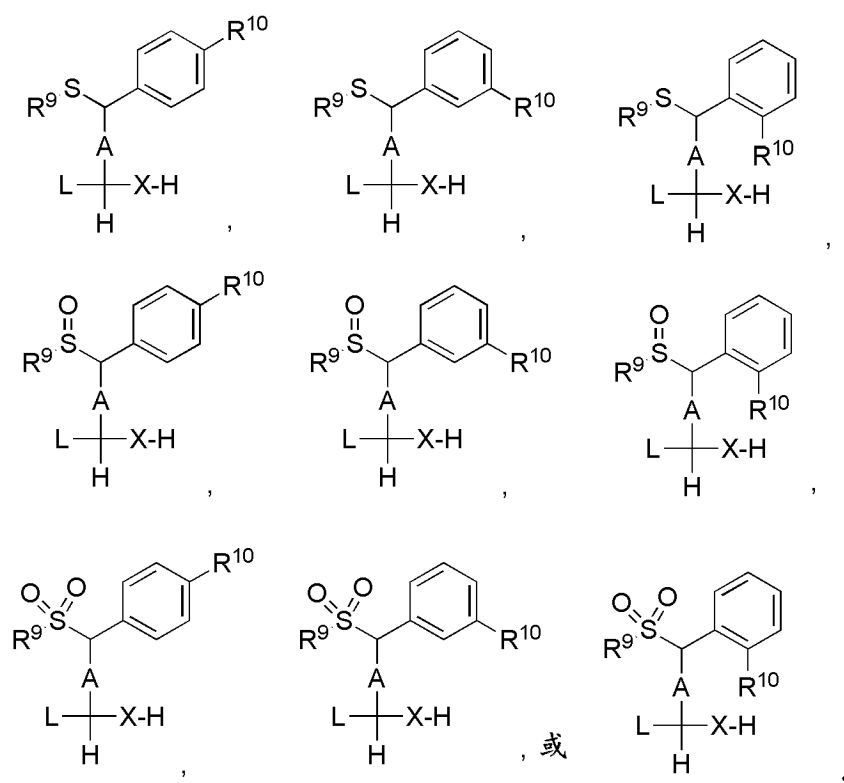


[0143] 其中 R^2 是 H、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、烯基、炔基、CN、 NO_2 、 $\text{C}(=\text{O})-\text{R}^3$ 、 SOR^3 、 SO_2R^3 、 SR^4 ，X 是 O 或 S；A 是烯基 (C_2)、芳基或不存在；L 是能与大分子结合的连接基团； R^9 是烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、烯基或炔基，并且 R^5 是 H 或烷基 (C_{1-6})。

[0144] 在一个实施方案中， R^2 是 H。在另一个实施方案中， R^2 是芳基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基。在另一个实施方案中， R^2 是 CN。

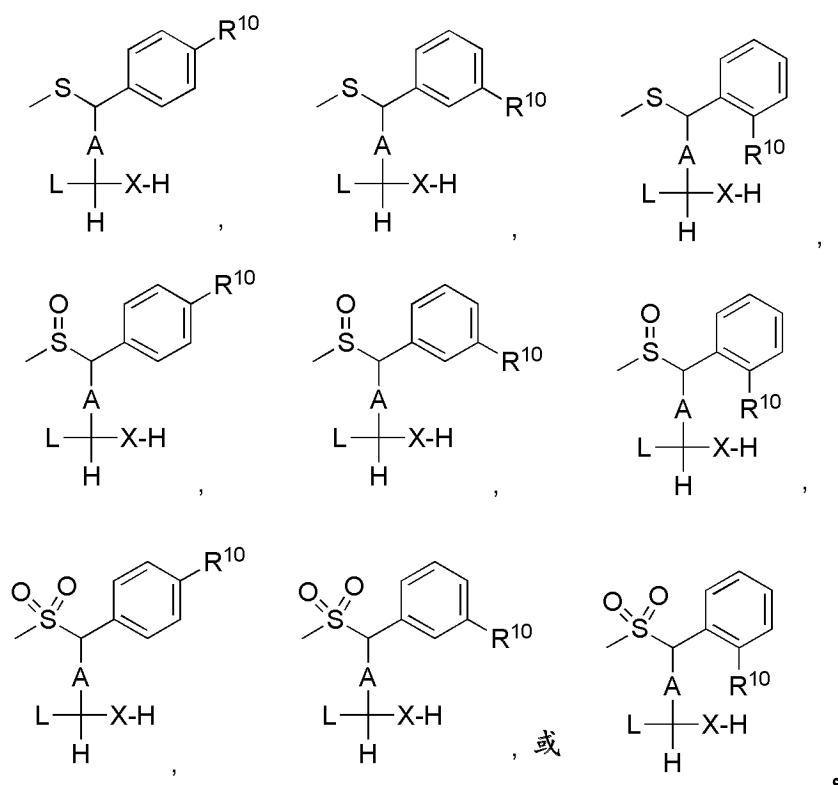
[0145] 其中 R^{10} 是 H、吸电子基团或给电子基团的式 (1f) 的例子包括

[0146]



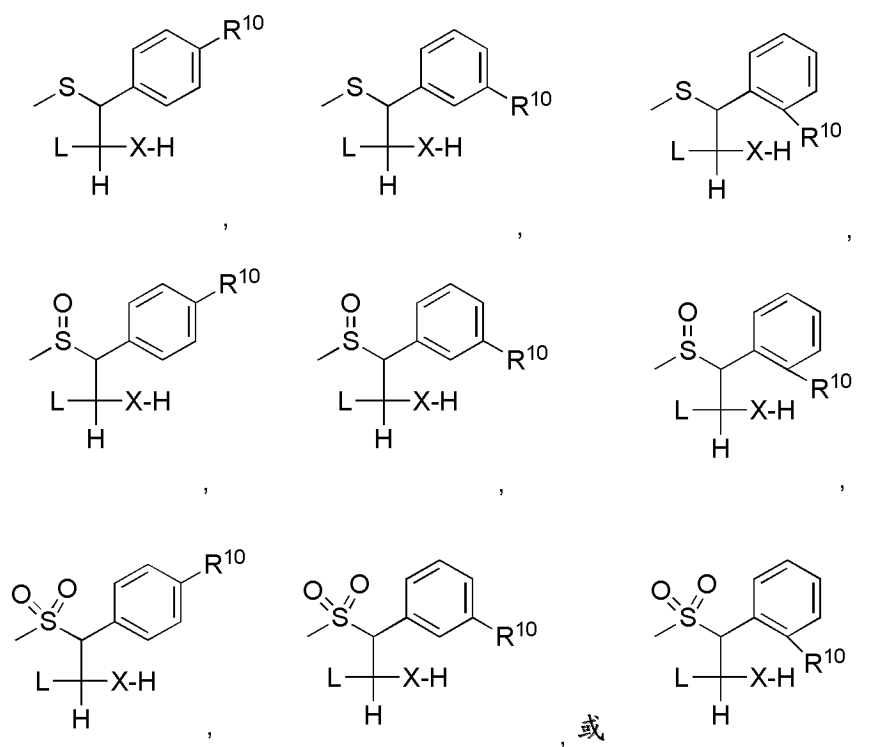
[0147] 以及

[0148]



[0149] 在本发明更特别的实施方案中,式(1f)的分子包括

[0150]

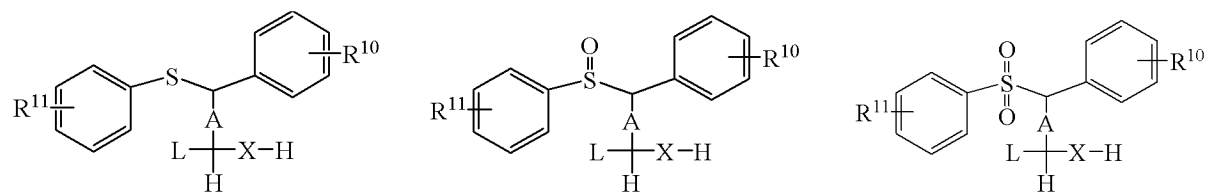


[0151] 尽管只显示了被一个 R¹⁰ 取代的例子,但是作为吸电子或给电子取代基, R¹⁰ 可以出现在与之相连的苯环的 1-5 个位置上。

[0152] 在本发明一个特别的实施方案中,其中 R¹⁰ 和 R¹¹ 各自独立地是 H、吸电子基团或给电子基团且其中 R¹⁰ 和 R¹¹ 作为非氢取代基可以存在于

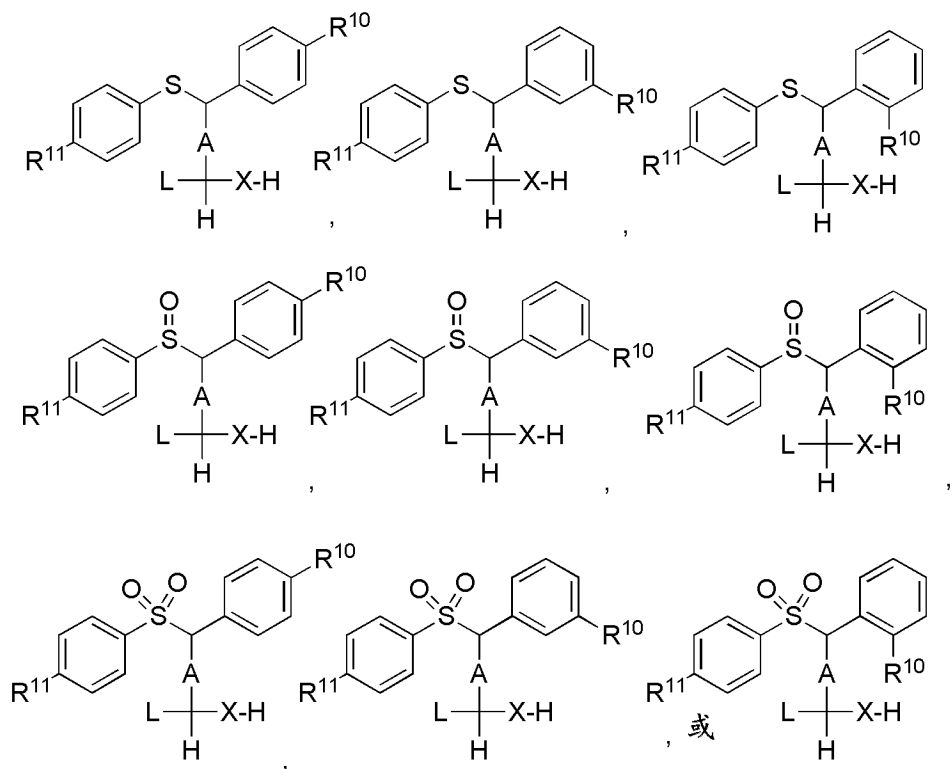
[0153] 它们各自苯环的 1-5 个位置上的式(1f)的分子具有式

[0154]



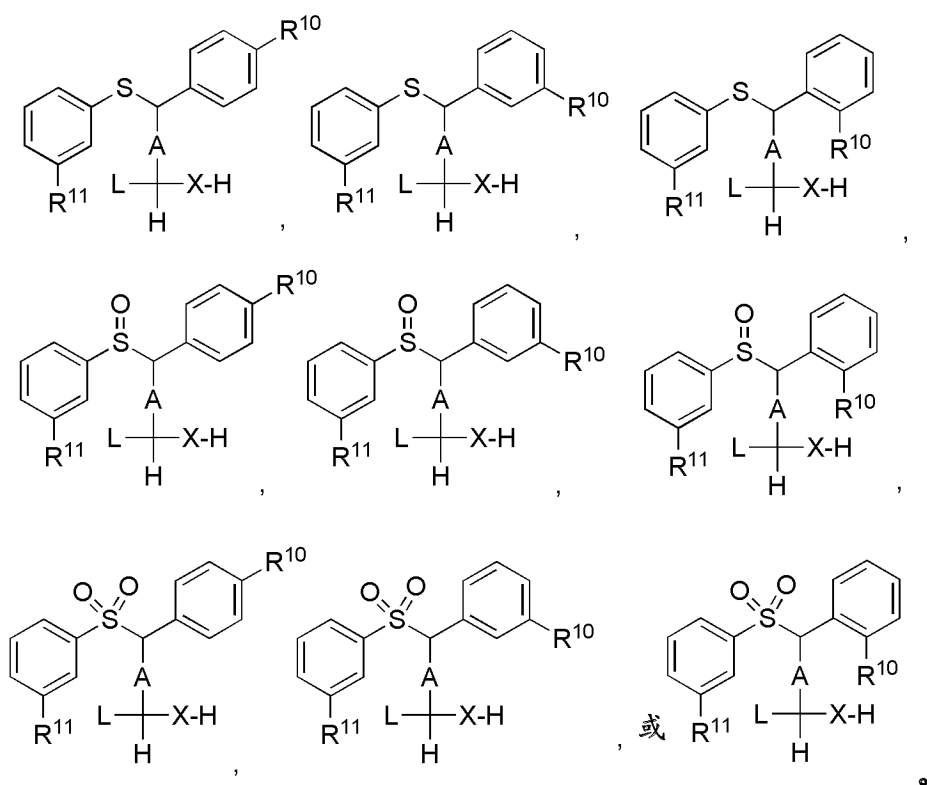
[0155] 包括

[0156]



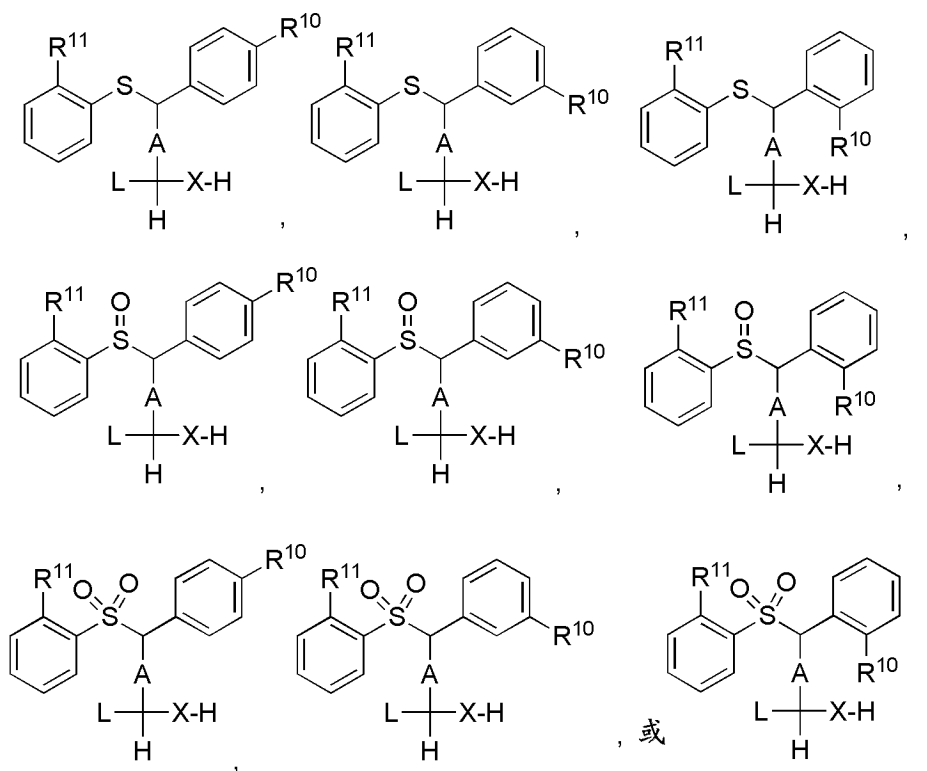
[0157] 和

[0158]



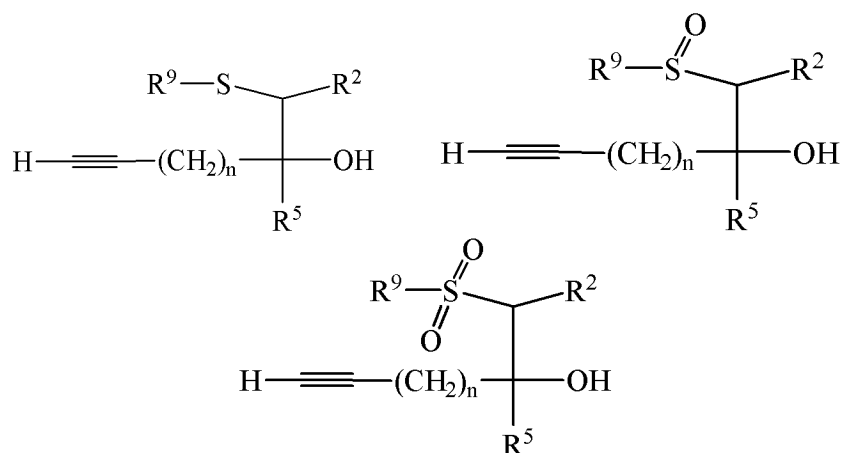
[0159] 在本发明另一个更特别的实施方案中,本发明的化合物具有式

[0160]



[0161] 在本发明的一些实施方案中,式 (1) 的分子具有更具体的式 (1g)

[0162]

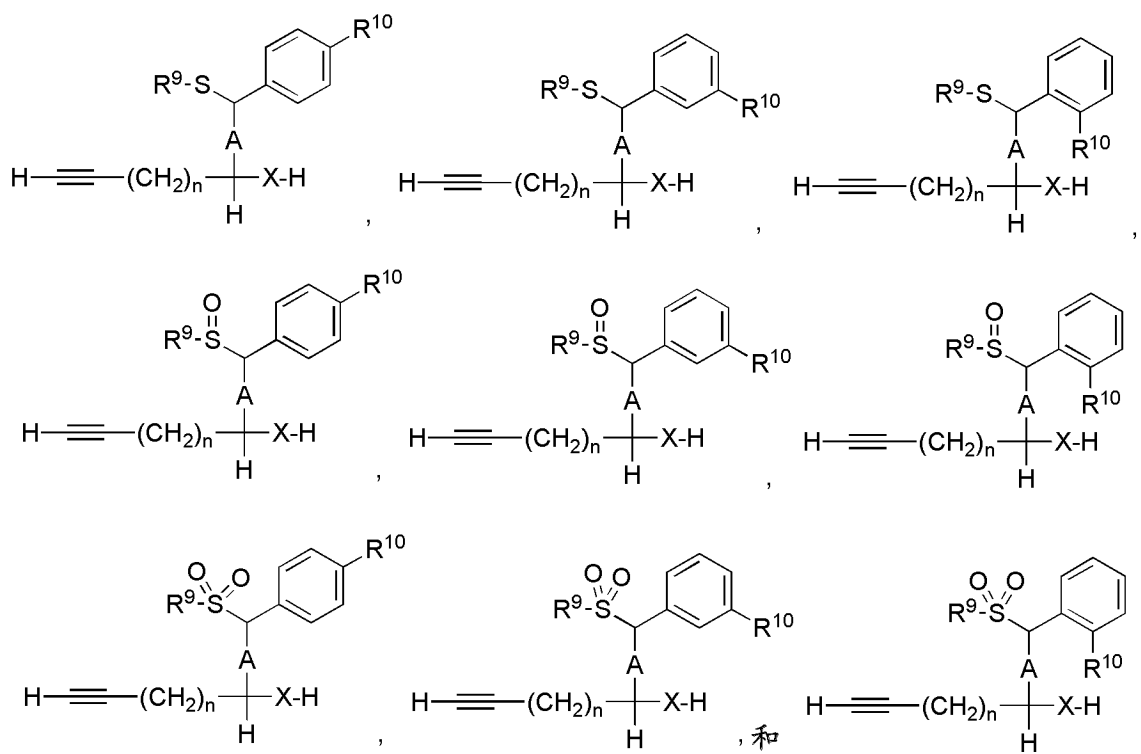


(1g)

[0163] 其中 R^2 是 H、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、烯基、炔基、CN、 NO_2 、 $\text{C}(\text{O})-\text{R}^3$ 、 SOR^3 、 SO_2R^3 或 SR^4 ； R^9 是烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、烯基或炔基； $n = 1-6$ ，并且 R^5 是 H 或烷基 (C_{1-6})。

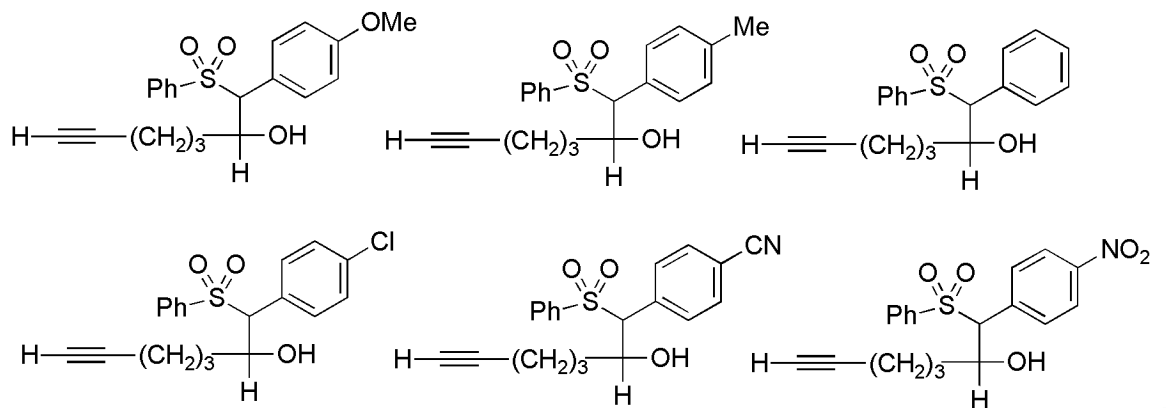
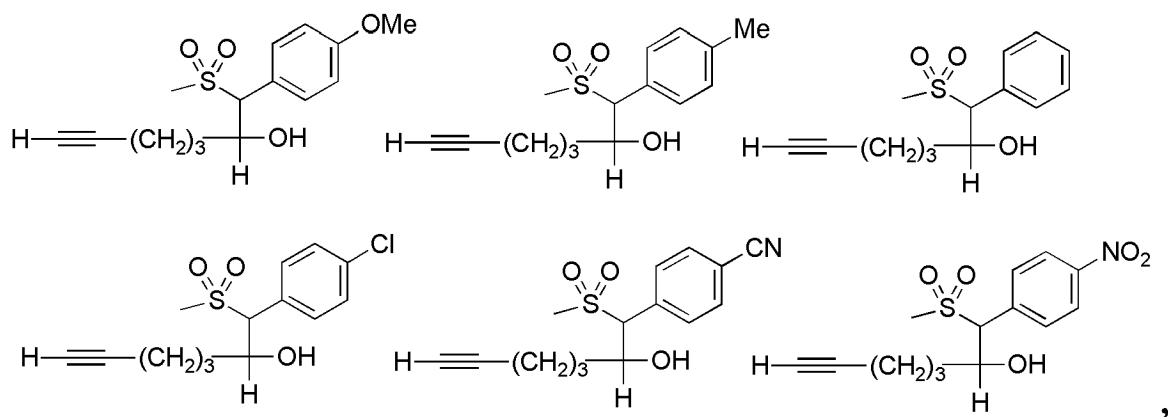
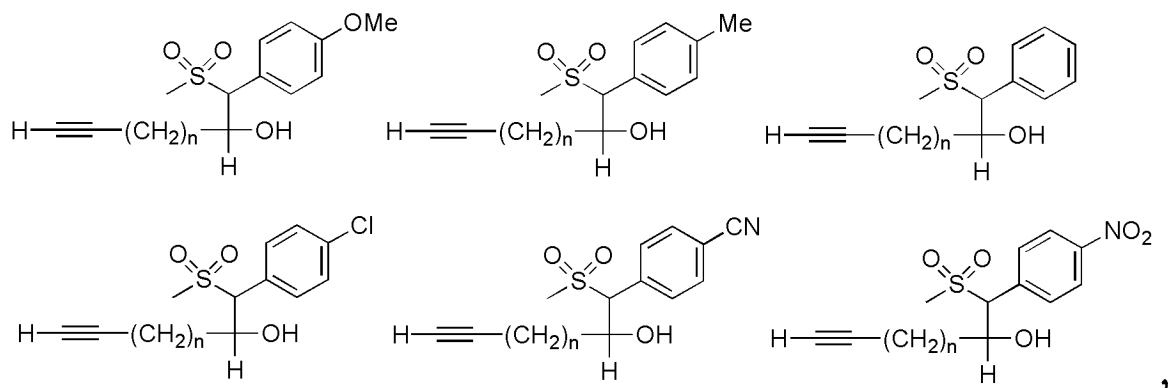
[0164] 其中 R^{10} 是 H、吸电子基团或给电子基团的式 (1g) 的分子包括

[0165]



[0166] 以及

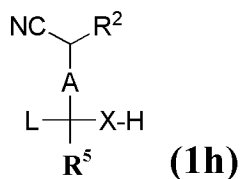
[0167]



[0172] 尽管 R^{10} 作为非氢取代基已经仅显示于一个位置,但是该非氢取代基可以存在于所示苯基部分的 1-5 个位置上。

[0173] 在本发明的一些实施方案中,式 (1) 的分子具有更具体的式 (1h)

[0174]



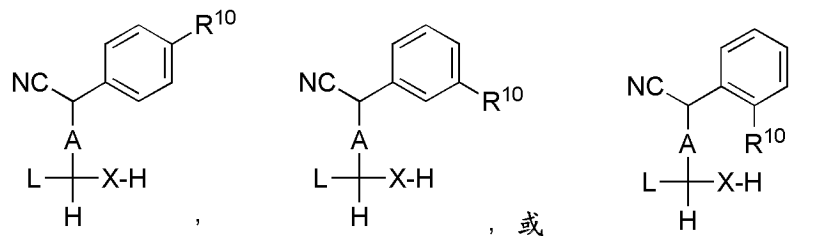
[0175] 其中 R^2 是 H、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、烯基、炔基、CN、 NO_2 、 $\text{C}(=\text{O})-\text{R}^3$ 、 SOR^3 、 SO_2R^3 或 SR^4 ; X 是 O 或 S; A 是 烯基 (C_2)、芳基或不存在; L 是能与大分子结合的

连接基团,并且 R^5 是 H 或烷基 (C_{1-6})。

[0176] 在一个实施方案中, R^2 是 H。在另一个实施方案中, R^2 是芳基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基。

[0177] 式 (1h) 的分子包括

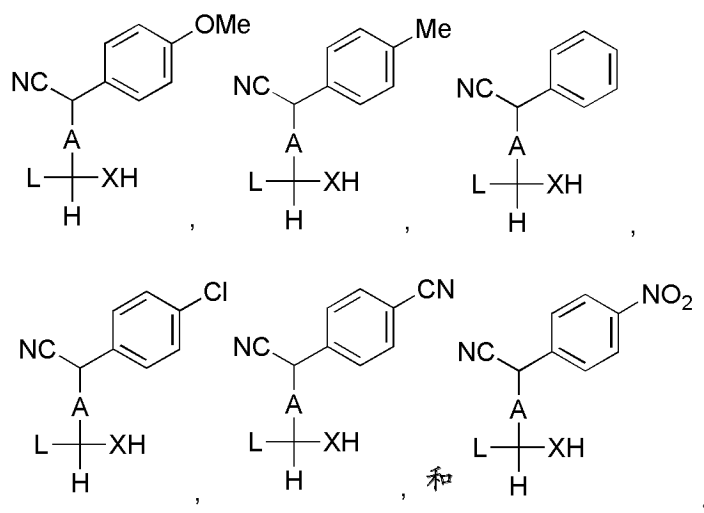
[0178]



[0179] 其中 R^{10} 是 H、吸电子基团或给电子基团。尽管 R^{10} 是仅具体显示于上述苯环的一个位置,但是 R^{10} 的非氢实施方案可以存在于苯环的 1-5 个位置上,优选 3 个或更少个位置。

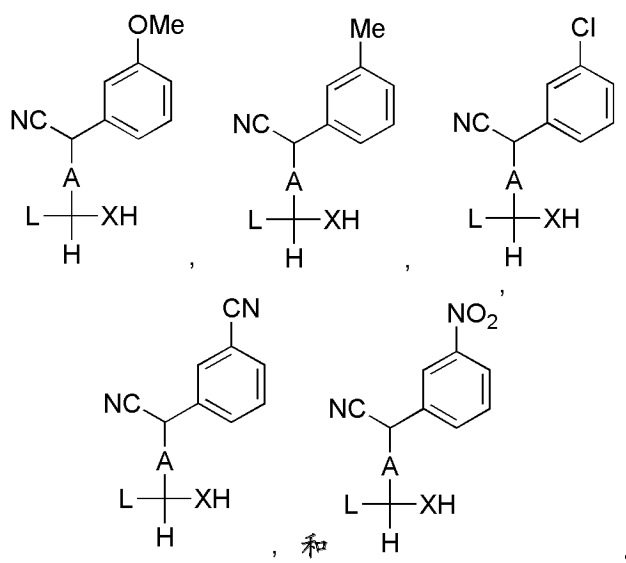
[0180] 式 (1h) 的分子也包括

[0181]



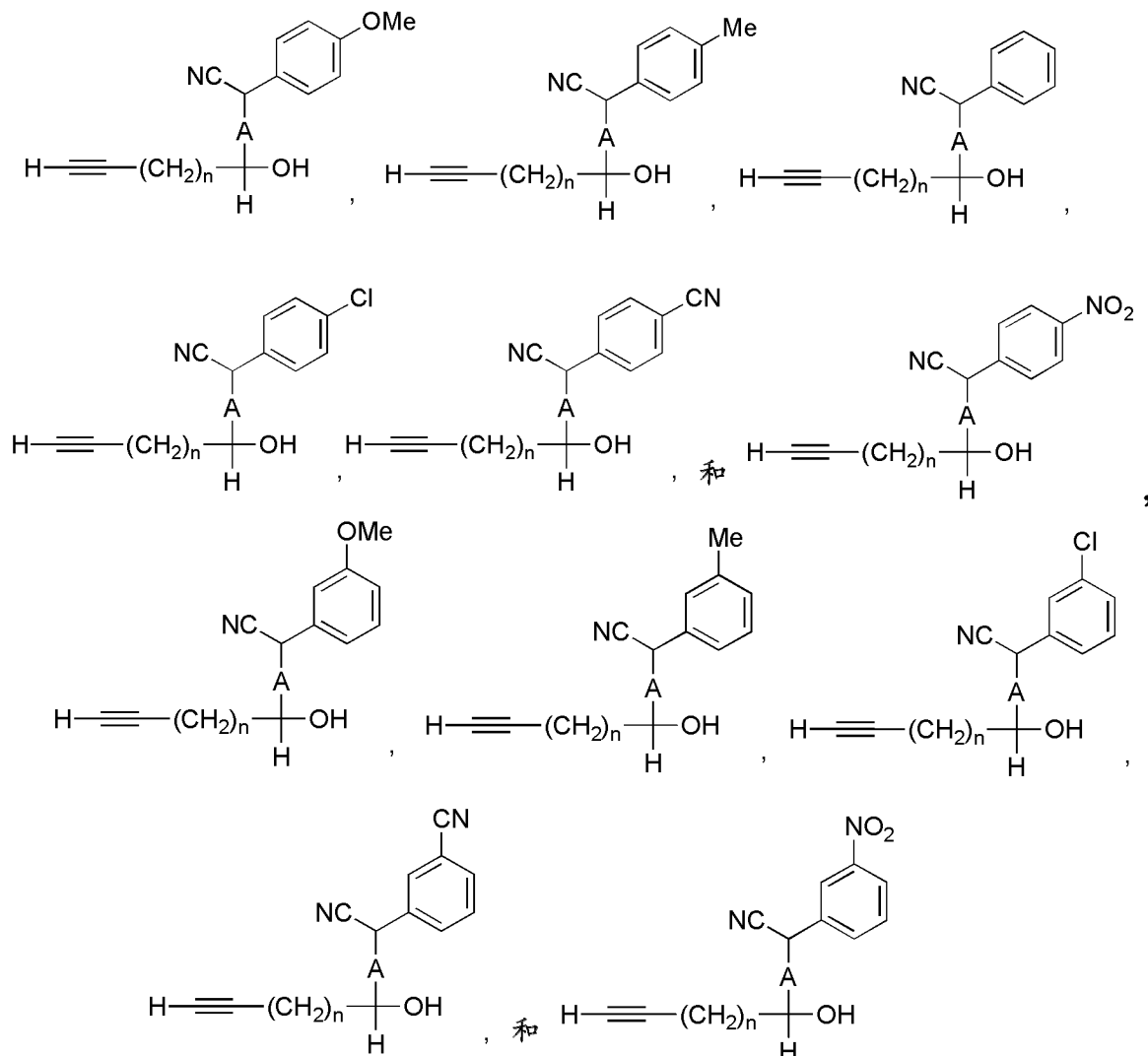
[0182] 和

[0183]



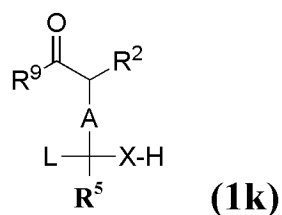
[0184] 以及

[0185]

[0186] 其中 $n = 1-6$ 。

[0187] 在本发明的一些实施方案中,式(1)的分子具有更具体的式(1k)

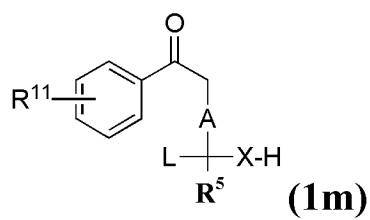
[0188]



[0189] 其中 R^2 是 H、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、烯基、炔基、CN、 NO_2 、 $\text{C}(=\text{O})-\text{R}^3$ 、 SOR^3 、 SO_2R^3 或 SR^4 ; X 是 O 或 S; A 是烯基 (C_2)、芳基或不存在; L 是能与大分子结合的连接基团,并且 R^5 是 H 或烷基 (C_{1-6})。

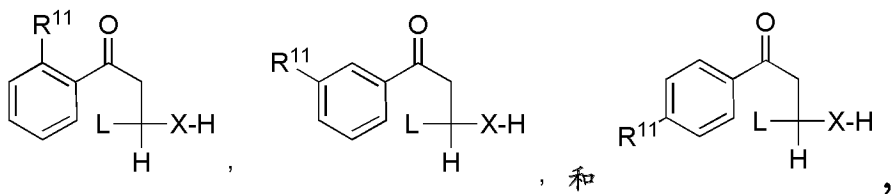
[0190] 在本发明一个特别的实施方案中,式(1k)的分子具有 $\text{R}^2 = \text{H}$,成为式(1m)的分子,其中 R^{11} 是 H、吸电子基团或给电子基团,其中 R^{11} 作为非氢取代基可以存在于苯基部分的 1-5 个位置上,优选少于 3 个。

[0191]



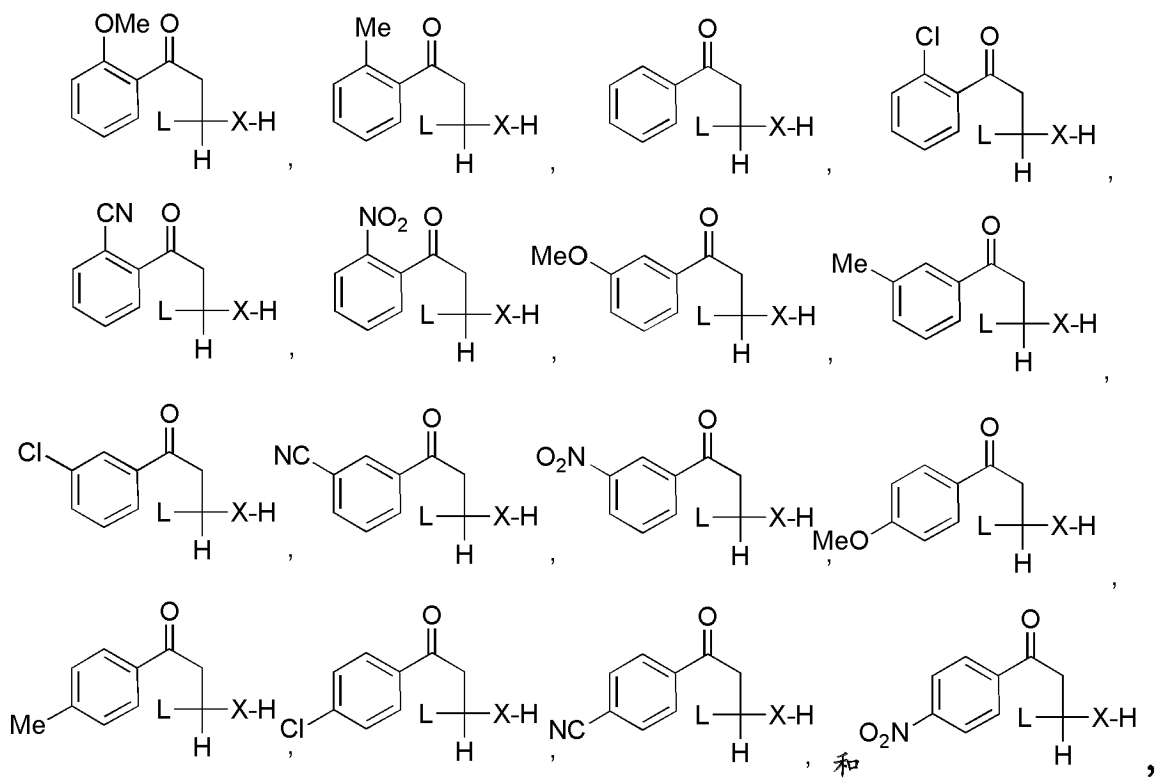
[0192] 式 (1m) 的分子包括

[0193]



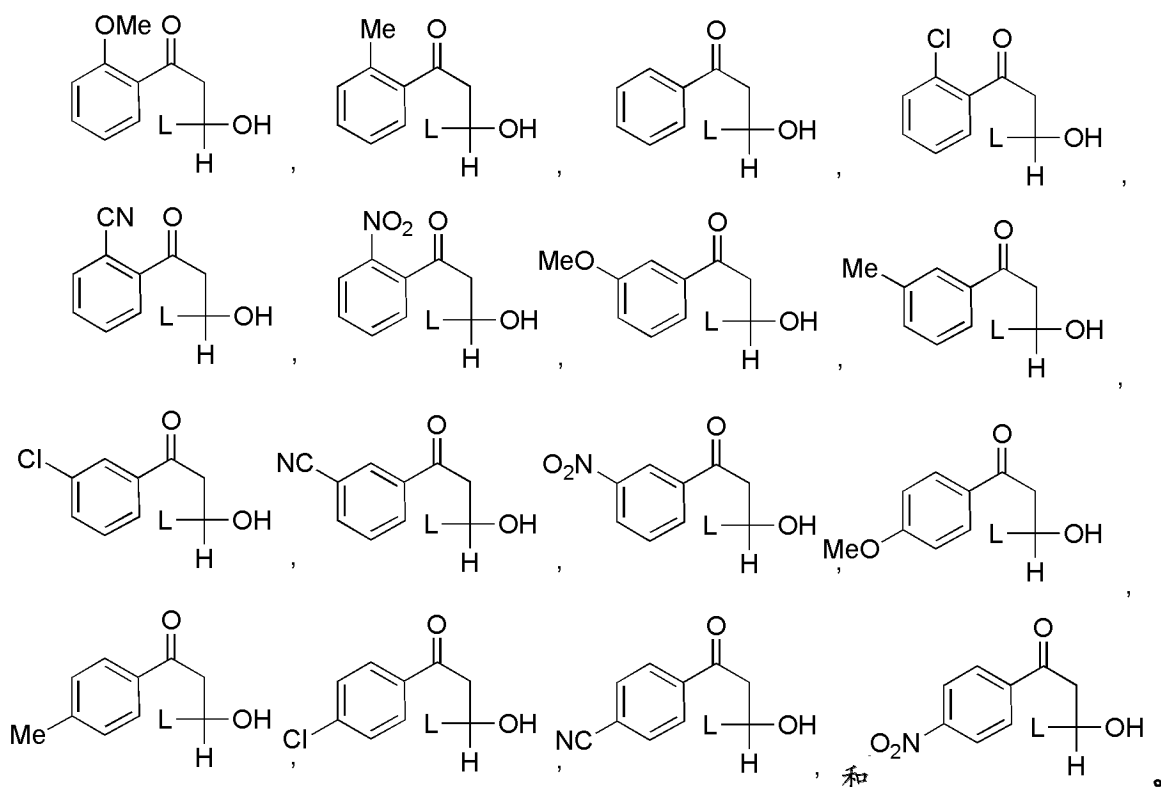
[0194] 以及

[0195]



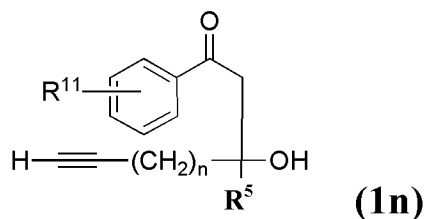
[0196] 和

[0197]



[0198] 在本发明一个特别的实施方案中,式(1m)的分子具有式(1n)

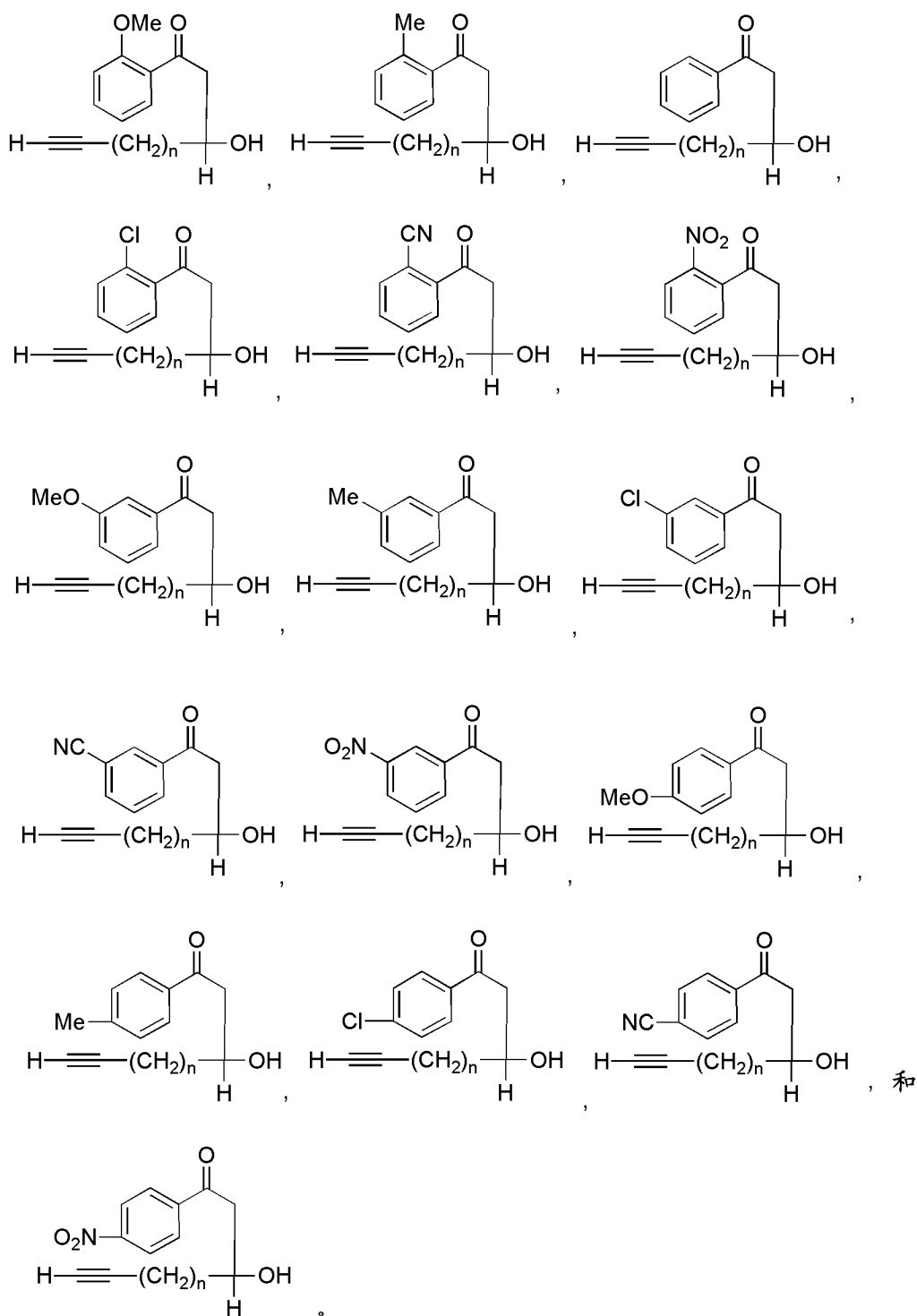
[0199]



[0200] 其中 $n = 1-6$; R^{11} 是 H、吸电子基团或给电子基团,其中 R^{11} 作为非氢取代基可以存在于苯基部分的 1-5 个位置上,优选少于 3 个位置,并且 R^5 是 H 或烷基 (C_{1-6})。

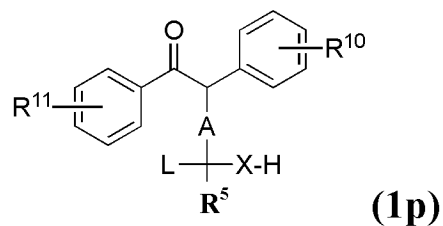
[0201] 式(1n)的分子包括

[0202]



[0203] 在本发明一个特别的实施方案中,式(1k)的分子具有 $\text{R}^2 = \text{芳基}$,并且具有式(1p)

[0204]



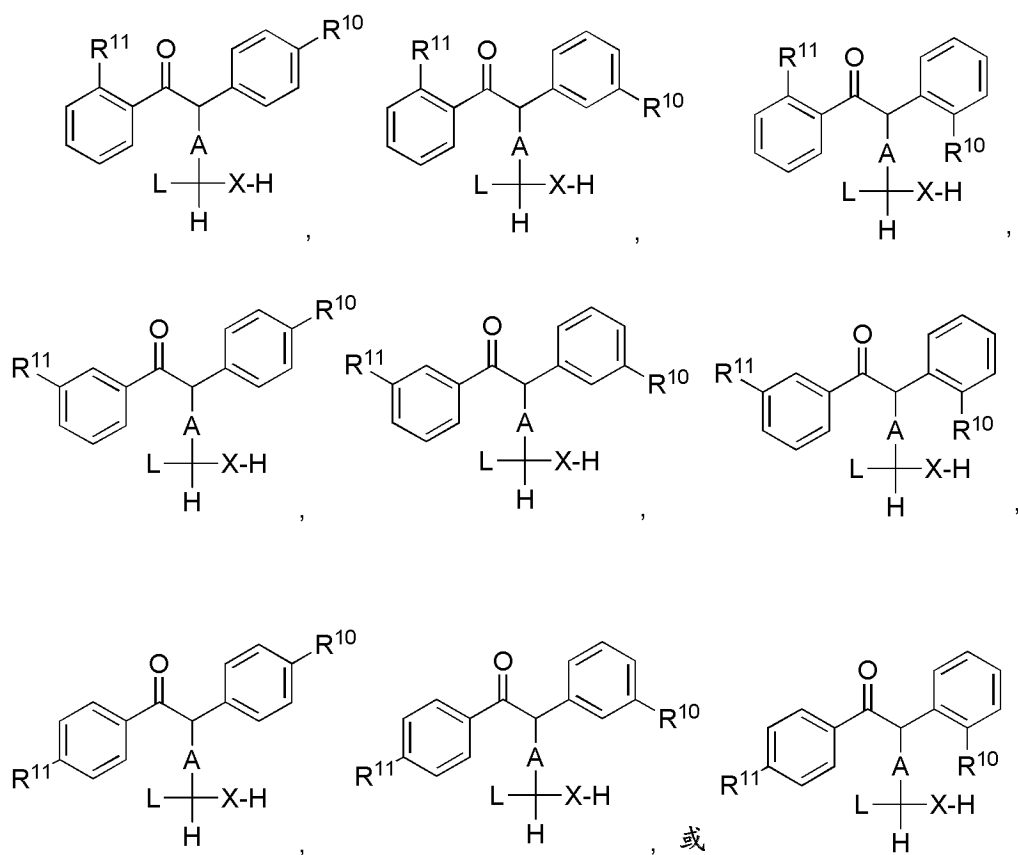
[0205] 其中 X 是 O 或 S ;A 是烯基 (C₂)、芳基或不存在 ;L 是能与大分子

[0206] 结合的连接基团 ;R¹⁰ 和 R¹¹ 各自独立地是 H、吸电子基团或给电子基团,其中 R¹⁰ 和

R¹¹ 的非氢形式可以存在于苯基部分的 1-5 个位置上, 优选 3 或更少个位置, 并且 R⁵ 是 H 或烷基 (C₁₋₆)。

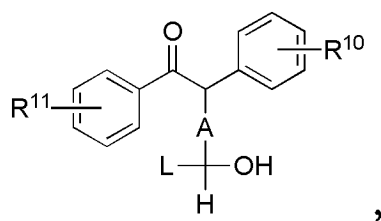
[0207] 式 (1p) 的分子包括

[0208]



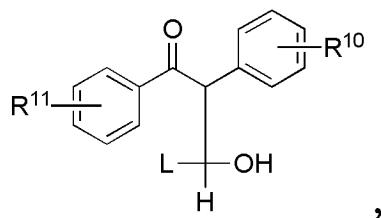
[0209] 以及

[0210]



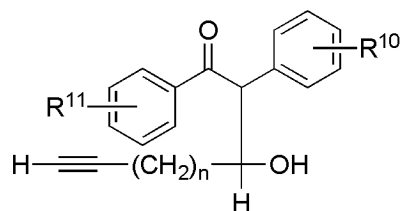
[0211] 和

[0212]



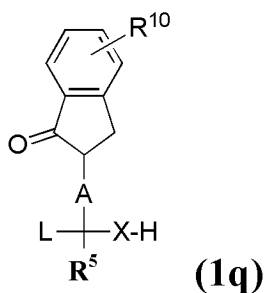
[0213] 和

[0214]



[0215] 在本发明一个特别的实施方案中,式(1)的分子具有更具体的式(1q)

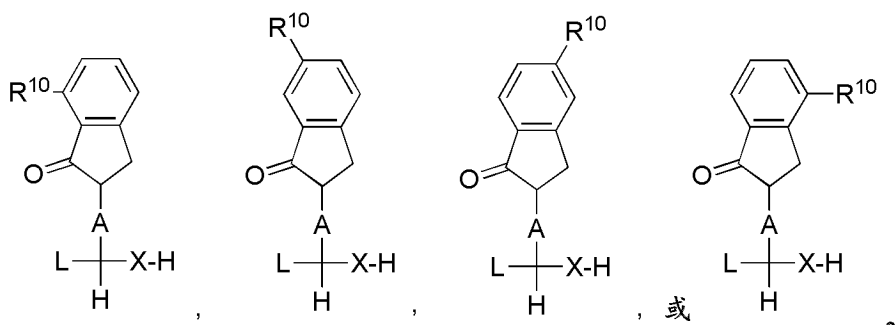
[0216]



[0217] 其中 X 是 O 或 S ;A 是烯基 (C₂)、芳基或不存在 ;L 是能与大分子结合的连接基团 ; R¹⁰ 是 H、吸电子基团或给电子基团,其中 R¹⁰ 的非氢形式可以存在于与之相连的环的 1-4 个位置上,优选 2 个或更少个位置,并且 R⁵ 是 H 或烷基 (C₁₋₆)。

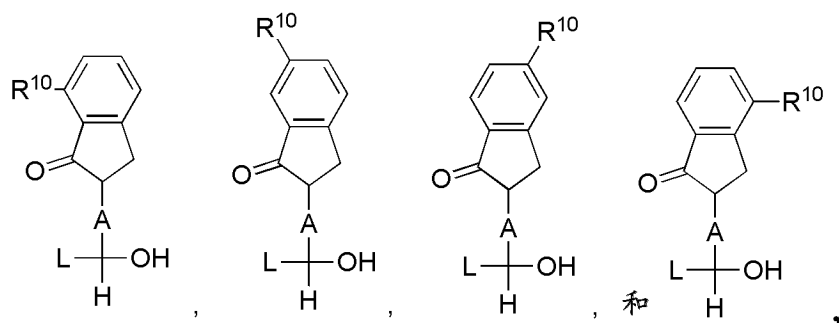
[0218] 式(1q)的分子包括

[0219]



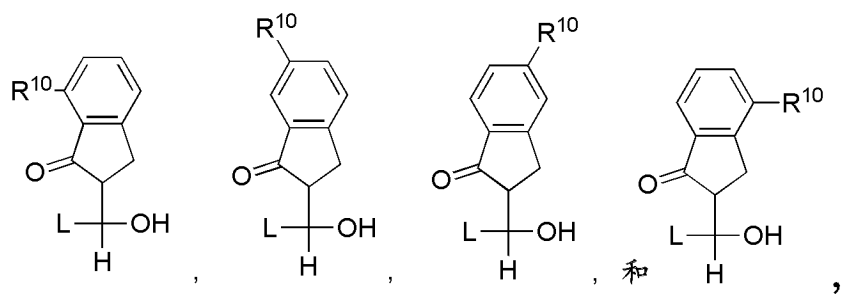
[0220] 式(1q)的分子包括

[0221]



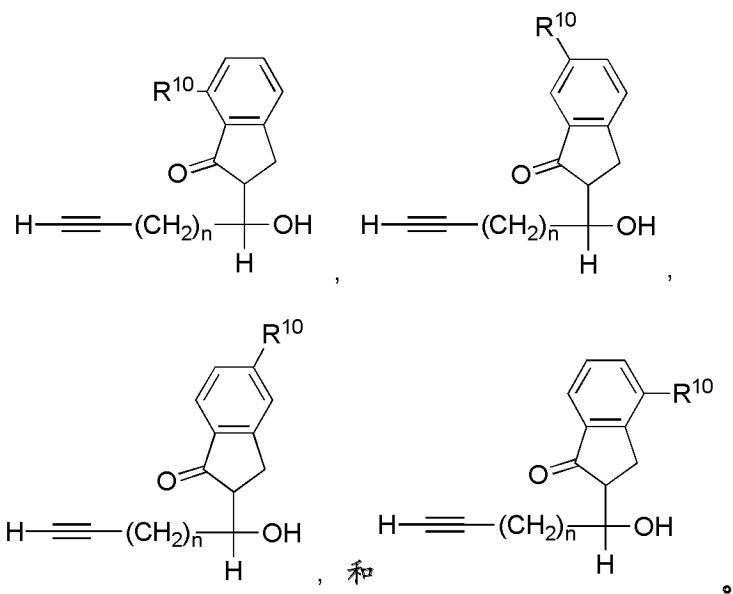
[0222] 和

[0223]



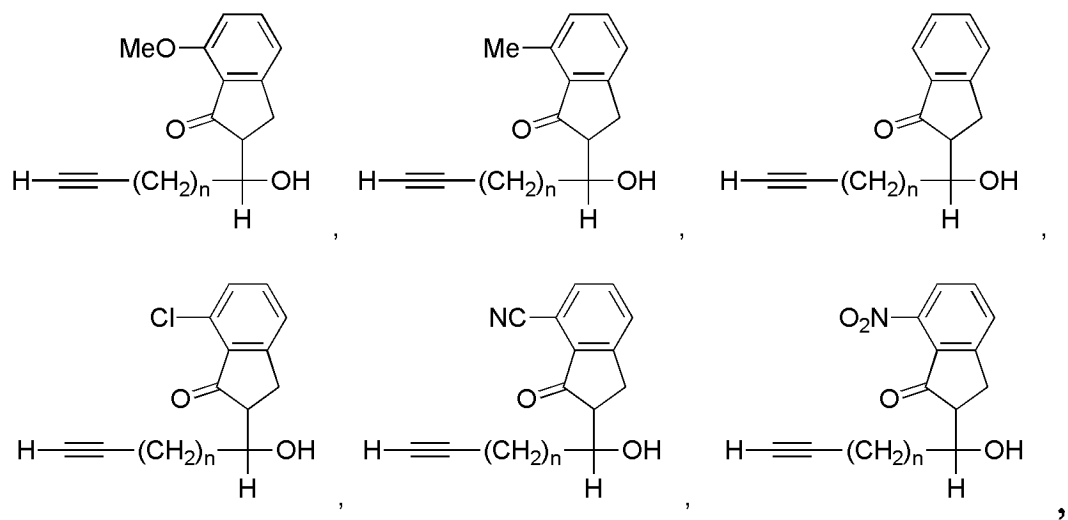
[0224] 和

[0225]

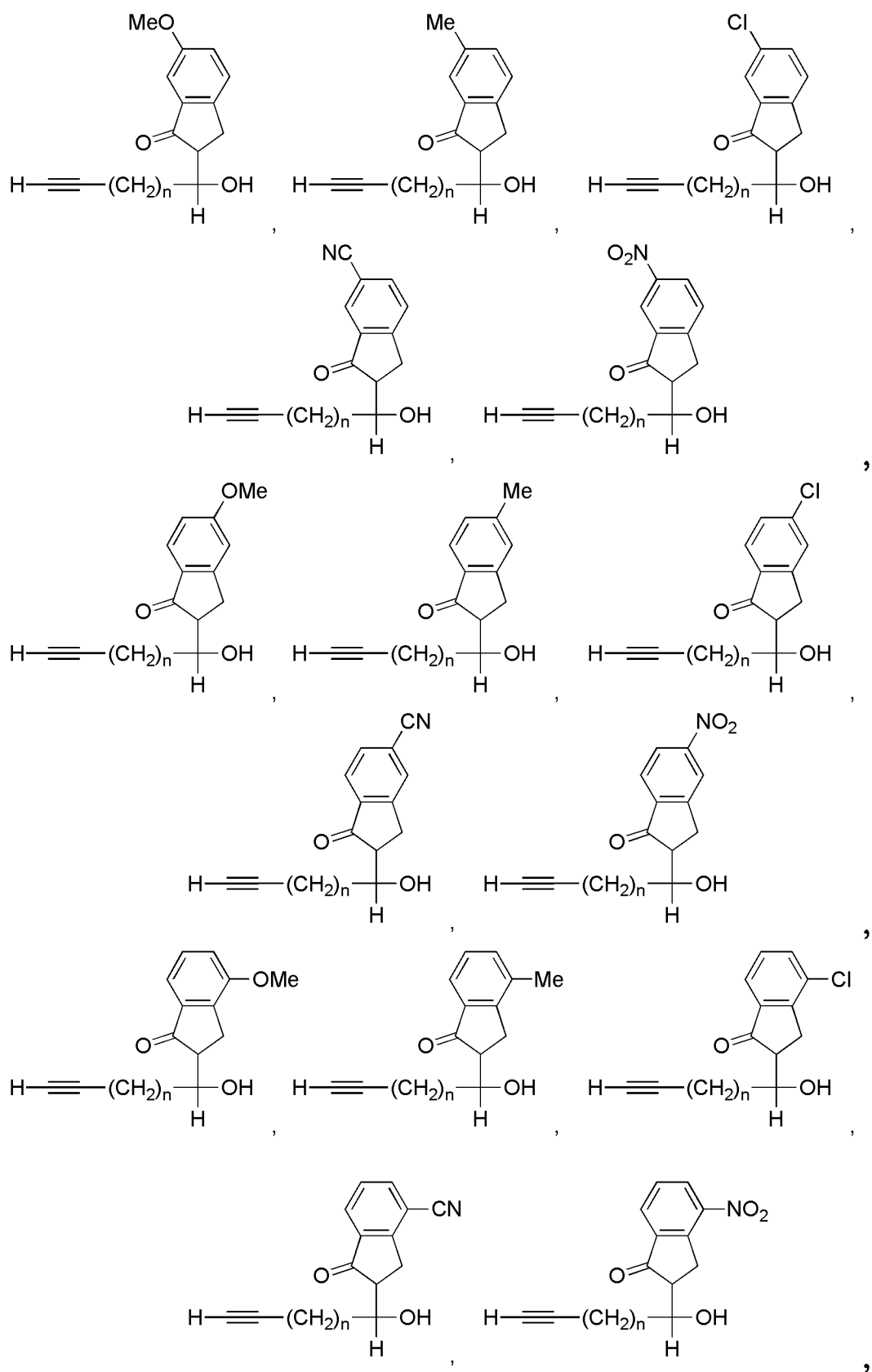


[0226] 式 (1q) 的分子也包括

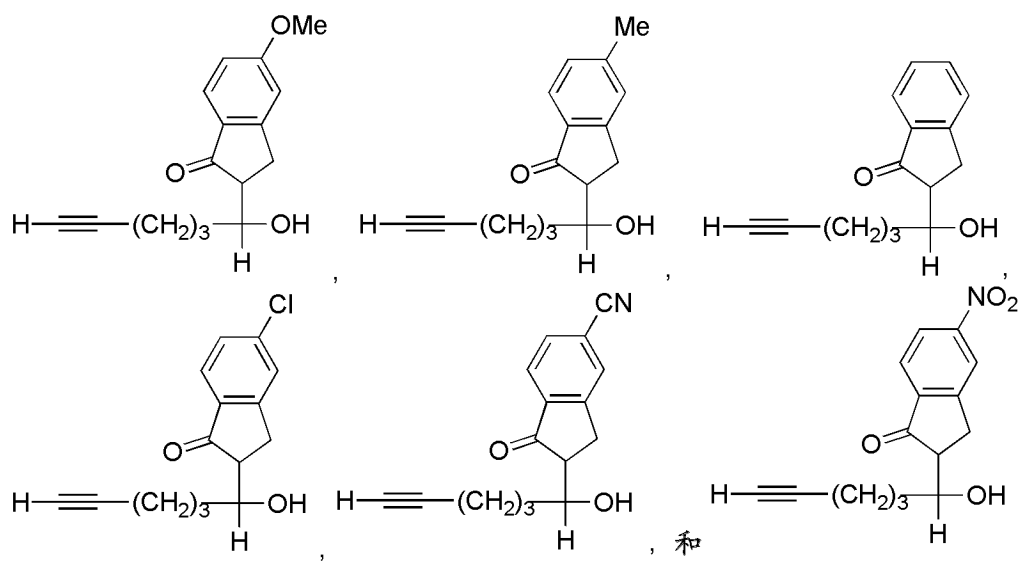
[0227]



[0228]

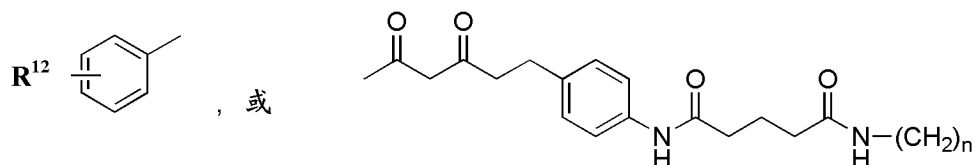


[0229]



[0230] L 是能与大分子结合的连接基团。术语“能与大分子结合的连接基团”是指包含能通过 L 与大分子化学结合的官能团的基团 (functionality)。适当的官能团的例子包括但不限于, 胺、醇、硫醇、氯化物、碘化物、溴化物、叠氮化物、马来酰亚胺类、烯烃、炔烃、醛、羧酸化物 and 磷酸盐。因此, 在一个实施方案中, L 是 $(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$,

[0231]

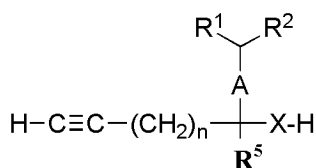


[0232] 其中 $n = 1-6$, 并且 R^{12} 是 NH_2 、 N_3 、 Cl 、 Br 、 I 、 SH 、 COOH 、 CHO 、 $\text{CH} = \text{CH}_2$ 、 CCH 、或马来酰亚胺。

[0233] 在一个特别的实施方案中, L 是 $(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$, 其中 $n = 1-6$, 并且 R^{12} 是 NH_2 、 N_3 、 I 、 SH 、 COOH 、 CHO 、 CCH 或马来酰亚胺, 或者 R^{12} 是 N_3 、 SH 、 CHO 、 CCH 或马来酰亚胺, 或者 R^{12} 是 N_3 或 CCH 。

[0234] 在一些实施方案中, L 是 $(\text{CH}_2)_n\text{CCH}$, 得到具有下式的本发明的化合物

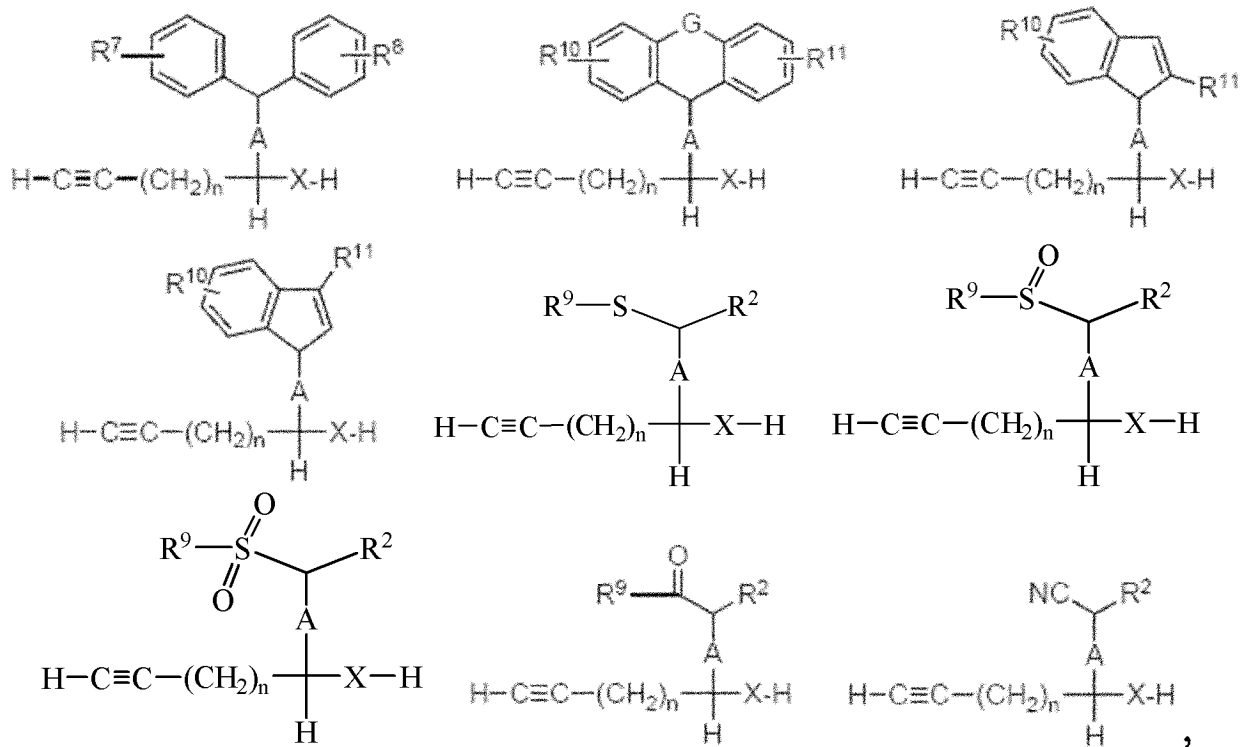
[0235]



[0236] 其中 X、 R^1 、 R^2 、 R^5 、A 和 X 如上述定义。

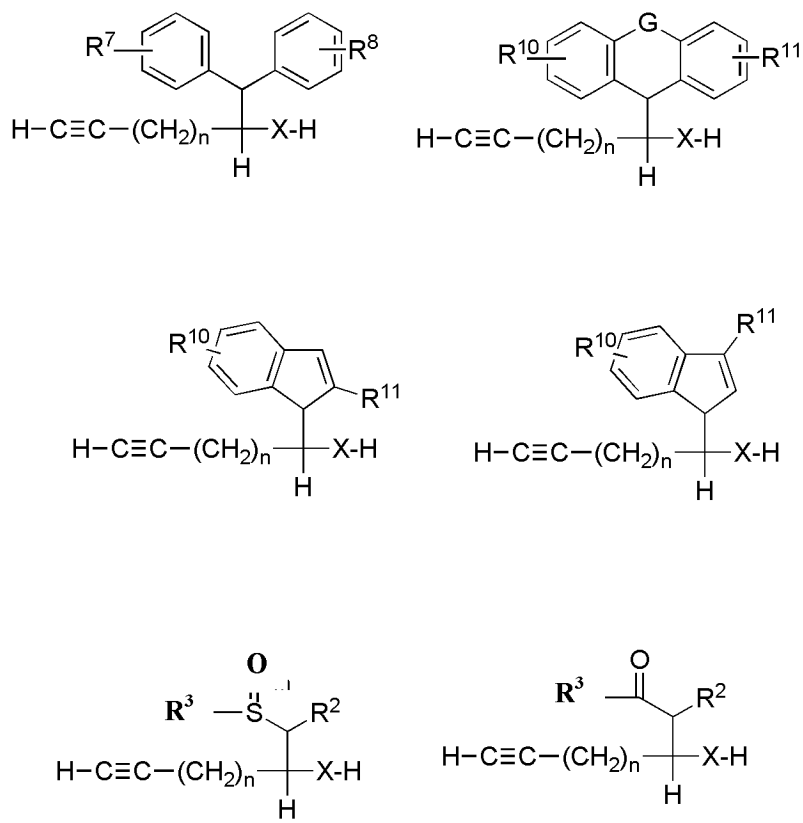
[0237] 因此式 (1) 的示例性分子具有式

[0238]



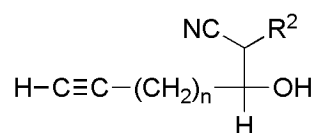
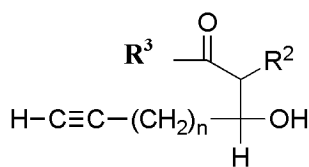
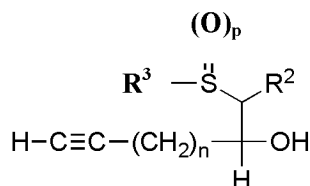
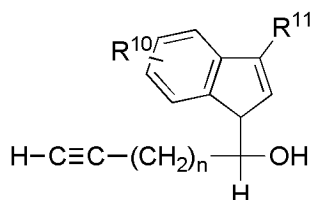
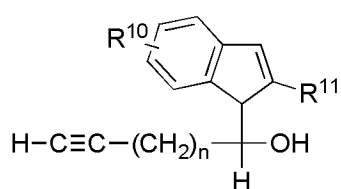
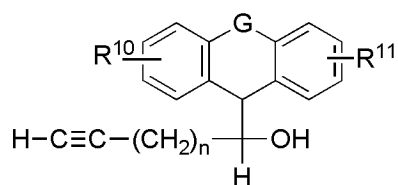
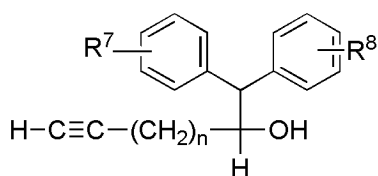
[0239] 例如

[0240]



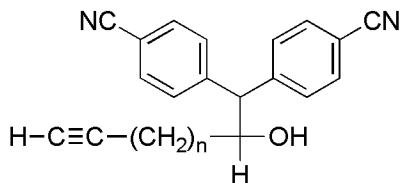
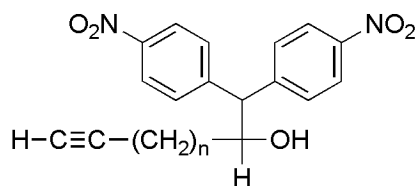
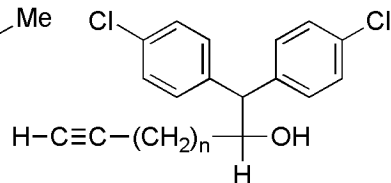
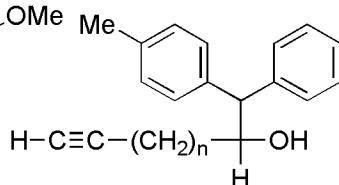
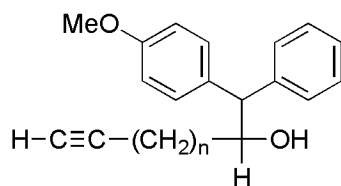
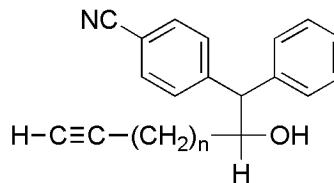
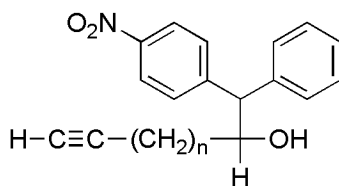
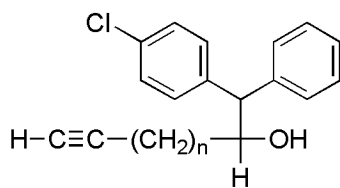
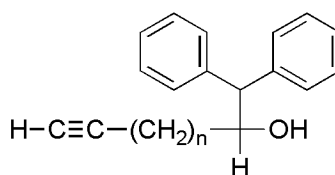
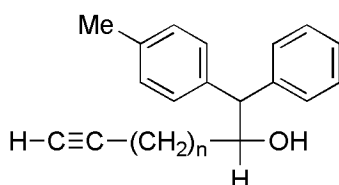
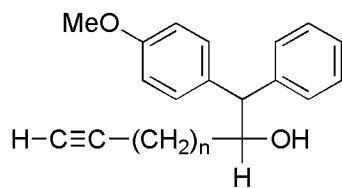
[0241] 和

[0242]

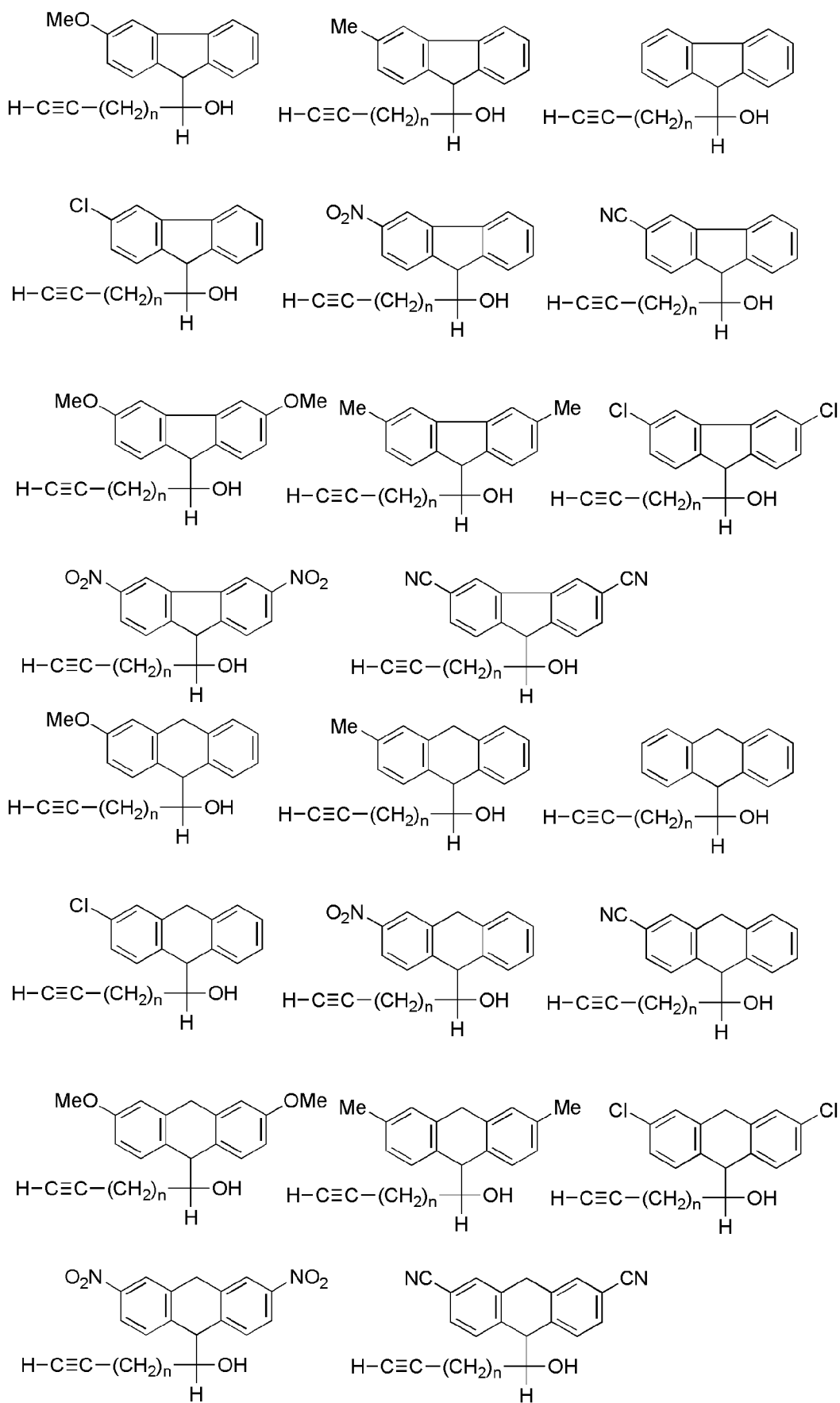


[0243] 在更特别的实施方案中, 式 (1) 的分子包括

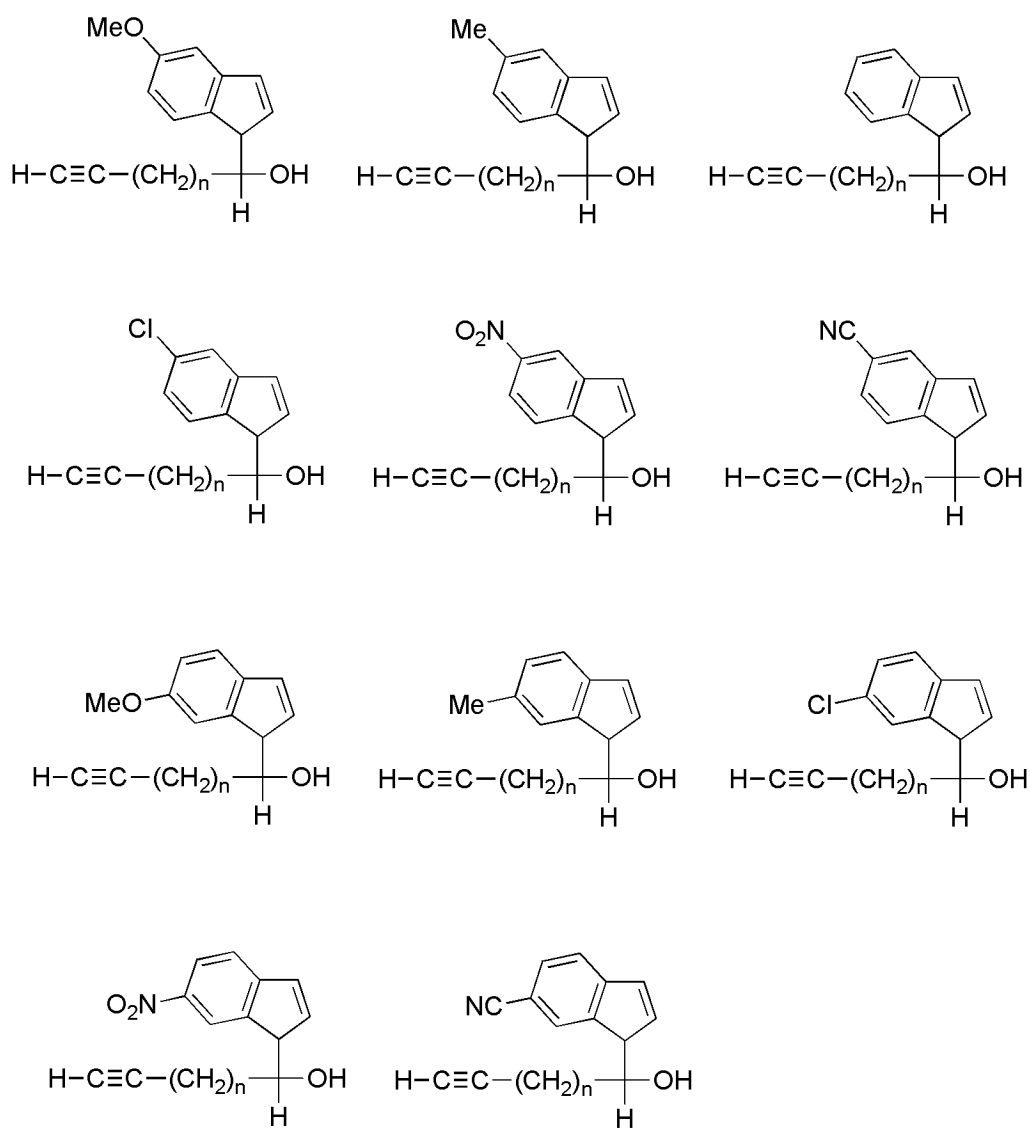
[0244]



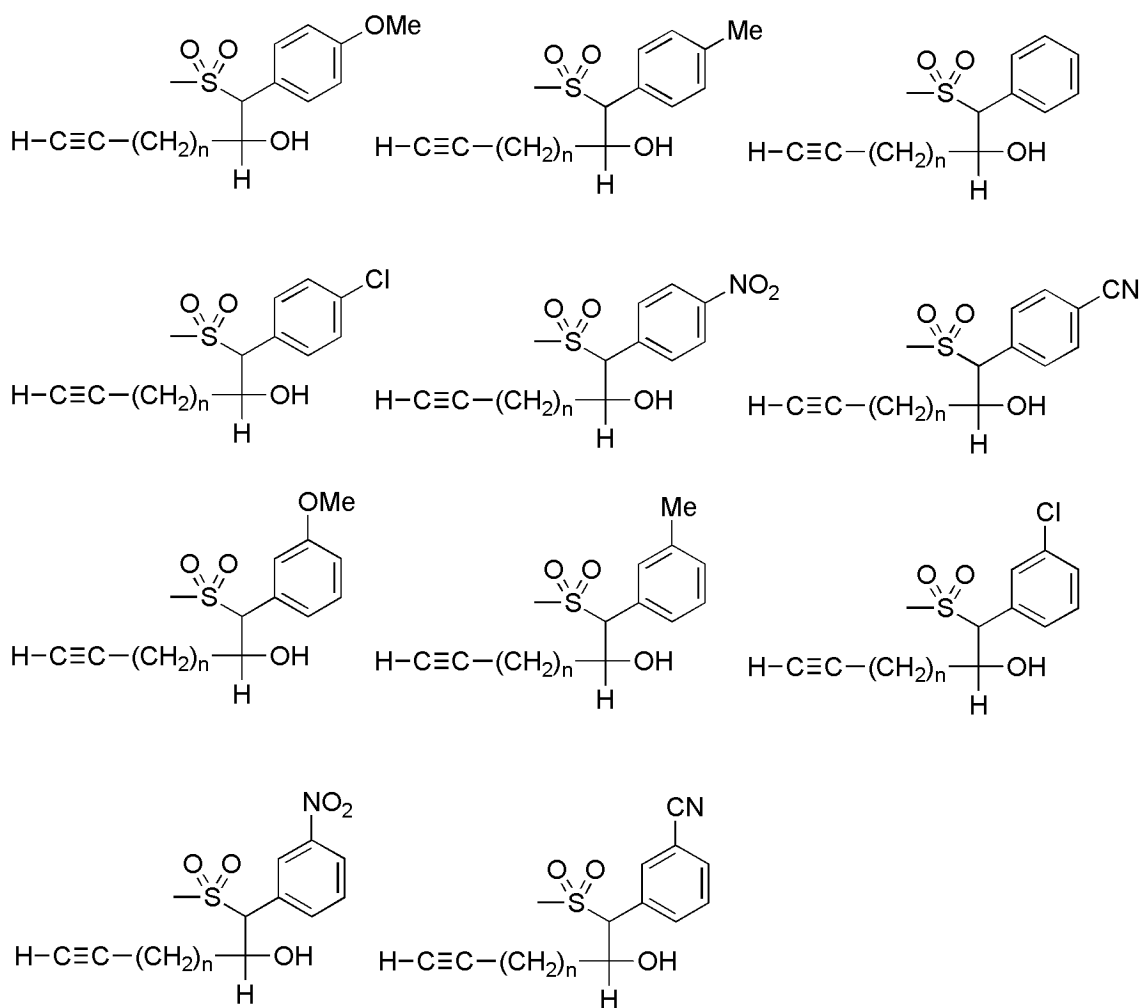
[0245]



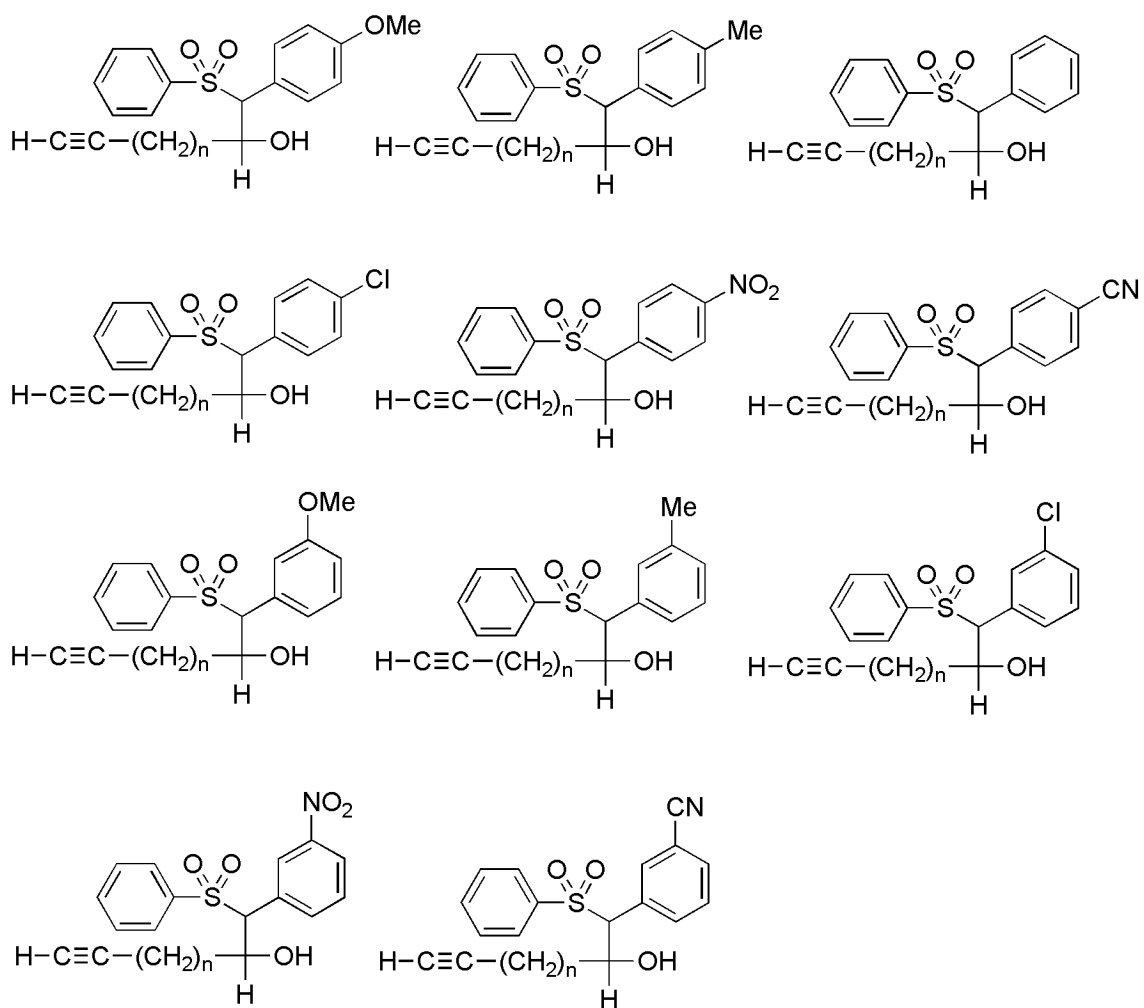
[0246]



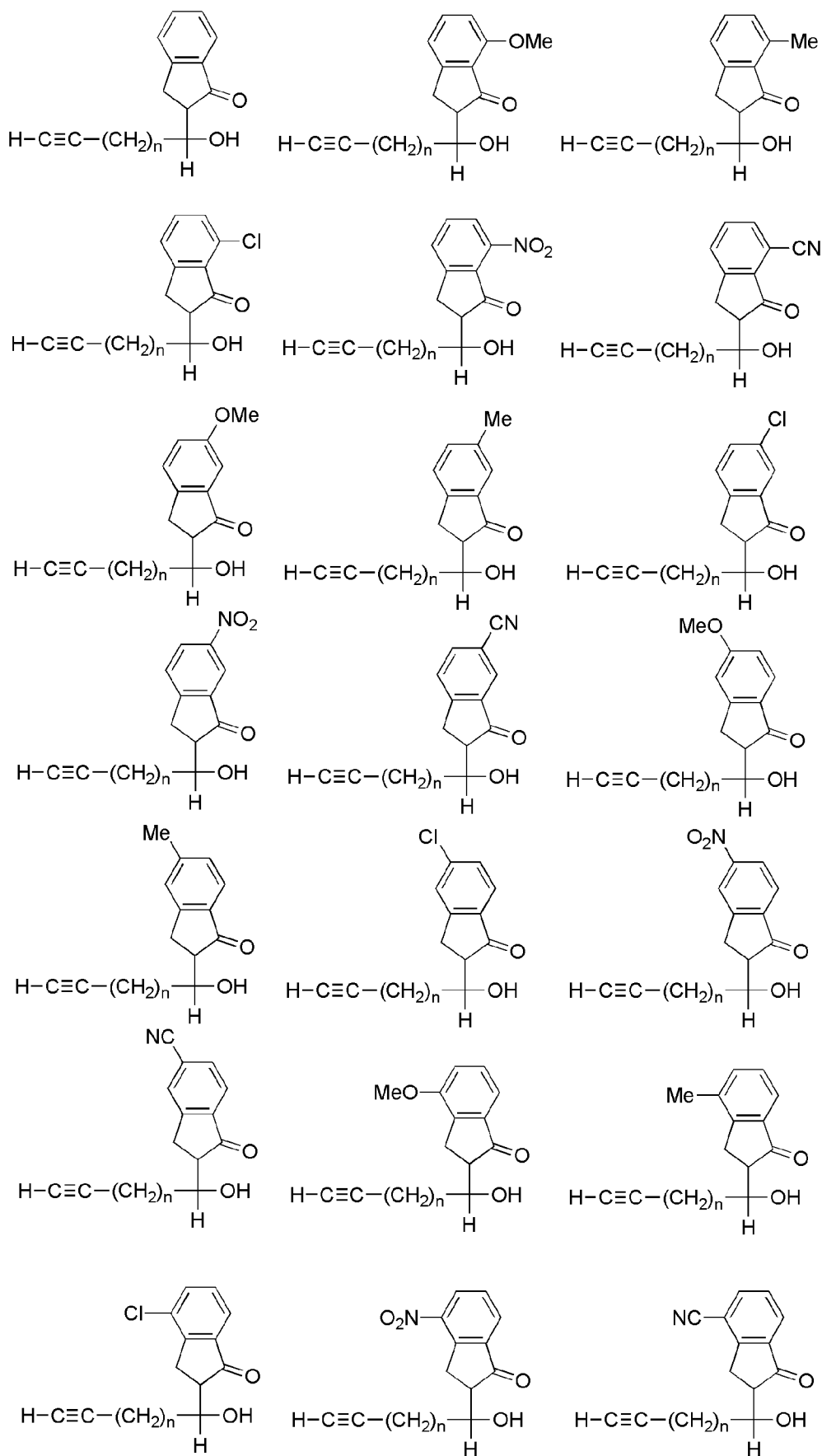
[0247]



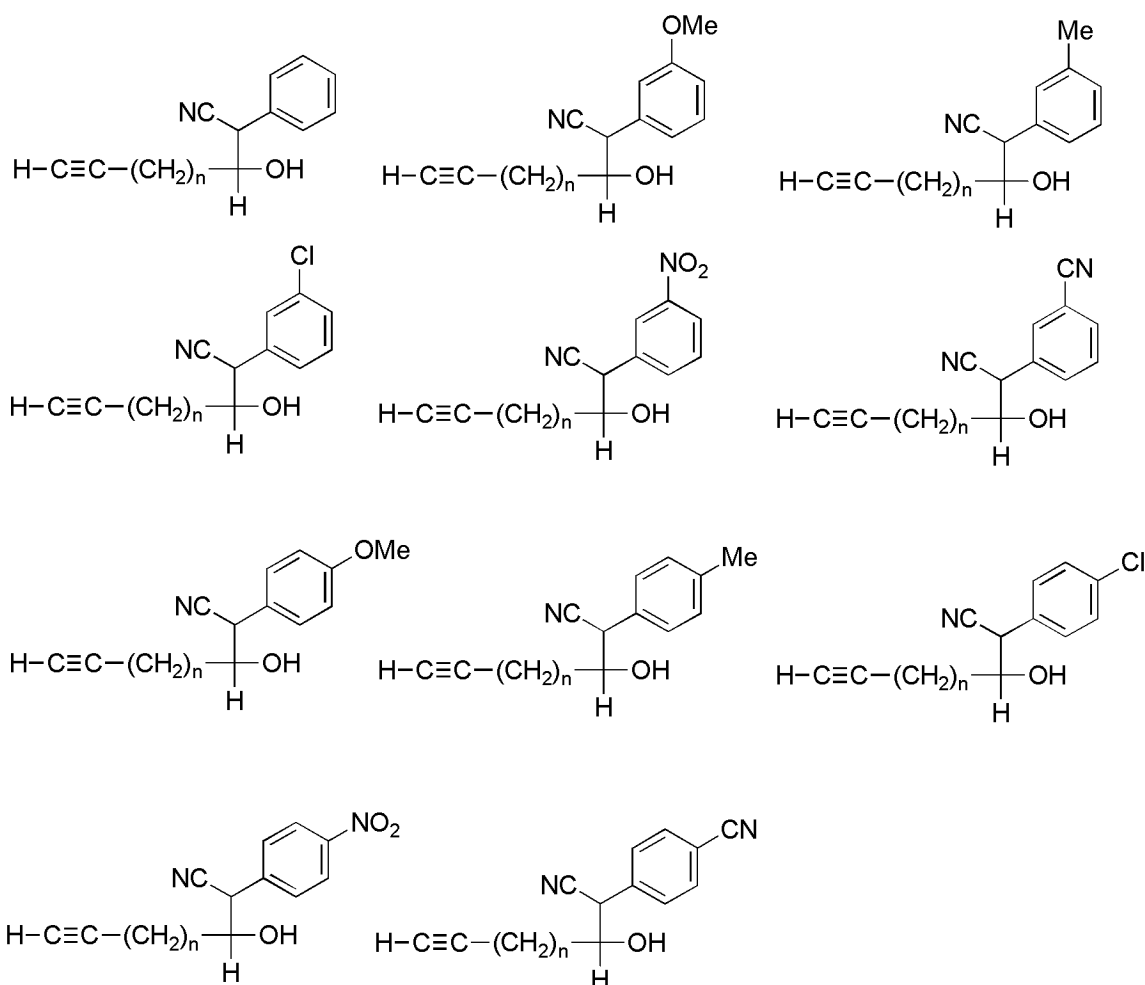
[0248]



[0249]



[0250]

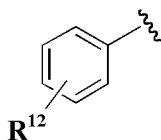


[0251] 其中 $n = 1-6$ 。在更特别的实施方案中, $n = 3$ 。

[0252] 在化合物 (1a)-(1q) 的上述所有例子中, 环系统上取代基的非氢形式可以存在于多个位置, 优选不超过 2 或 3 个位置。单个环上的非氢取代基可以相同或不同。

[0253] 在另一个实施方案中, L 是

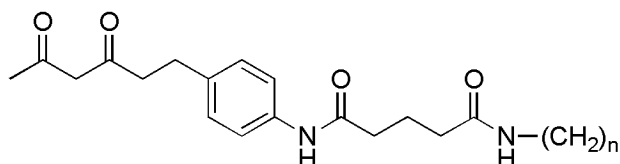
[0254]



[0255] 其中 R^{12} 是 NH_2 、 N_3 、Cl、Br、I、SH、OH、COOH、CHO、 $CH = CH_2$ 、CCH 或马来酰亚胺。

[0256] 在另一个实施方案中, L 是下式的基团。

[0257]



[0258] 其中 $n = 1-6$ 。这些化合物可以由其中 $L = (CH_2)_nNH_2$ 的化合物开始, 通过在冷凝剂, 例如碳二亚胺 (DCC、EDCI) 或脲试剂 (例如, HATC、HBTA、TATU) 存在下与 4-[4-(3,5-二氧代-己基)-苯基氨基甲酰基]-丁酸反应来制备。

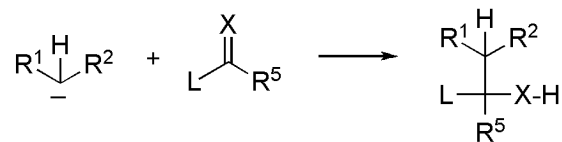
[0259] 通过 L 的上述实施方案的性质来确定 L' 的性质, 因此这些实施方案也可用于说

明式 (3) 和 (4)。

[0260] 式 (1) 的化合物的制备

[0261] 制备其中 A 不存在的式 (1) 的化合物, 包括通过 $R^1R^2CH_2$ 与强碱例如丁基锂、NaH、二异丙氨基锂、双(三甲硅基氨基)锂或类似物质反应形成负碳离子 $R^1R^2CH^-$, 将其加入与分子 $L-C(=X)R^5$ 反应, 生成式 (1x) 的化合物。

[0262]



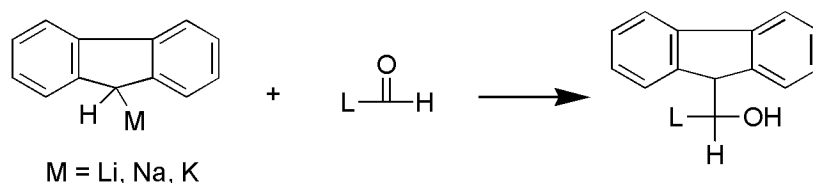
(1x)

[0263] 可替代地, 可以通过两步法来制备其中 A 不存在且 $X = O$ 的式 (1x) 的化合物。在第一步中, 通过 $R^1R^2CH_2$ 与强碱例如丁基锂、NaH、二异丙氨基锂、双(三甲硅基氨基)锂或类似物质反应形成负碳离子 $R^1R^2CH^-$, 将其加入与其中 R^* 是低级烷基的酯 $L-C(=O)OR^*$ 反应, 生成中间体酮 $R^1R^2CH-C(=O)-L$, 其可以在第二步中与适当的还原剂例如 $NaBH_4$ 或 $NaBH_3CN$ 反应, 生成式 (1) 的化合物, 其中 $X = O$ 。

[0264] 例如, 当 $L-CHO$ 是 5-己烯醛时, 得到其中 $X = O$ 且 L 是 $(CH_2)_3CH=CH_2$ 的式 (1a) 的化合物。当 $L-CHO$ 是 5-己炔醛, 得到其中 $X = O$ 且 L 是 $(CH_2)_3CCH$ 的式 (1a) 的化合物。当 L 是 6-叠氮己醛时, 得到其中 $X = O$ 且 L 是 $(CH_2)_5N_3$ 的式 (1a) 的化合物。当 L 是 3-叠氮苯甲醛时, 得到其中 $X = O$ 且 L 是 3-叠氮苯基的式 (1a) 的化合物。当 $L = 4$ -溴苯甲醛时, 得到其中 $X = O$ 且 L 是 4-溴苯基的式 (1a) 的化合物。

[0265] 例如, 当 $R^1R^2CH_2$ 是苄与强碱例如丁基锂、NaH 或二异丙氨基锂反应形成苄基负碳离子, 然后当其于 $L-CHO$ 反应时, 反应如下:

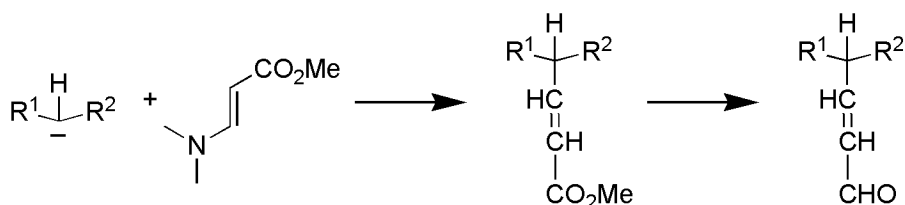
[0266]



[0267] 可以用适当的类似物 $Z-C(=S)R^5$ 类似地制备其中 $X = S$ 的相应化合物, 或者可代替地使用本领域已知的方法通过之后化合物 (1a) 的化学转化来制备, 例如通过用 PBr_3 或 Ph_3PBr_2 转化为溴化物或者通过转化为甲苯磺酸酯或三氟甲磺酸酯来活化 (1a) 的醇基, 并用适当的亲核基团例如硫脲基或硫代硫酸基 (thiosulfate) 置换来生成式 (1b) 的化合物。在一个优选的实施方案中, 硫代硫酸基用于形成中间体, 通过酸处理来使该中间体水解, 形成硫醇。

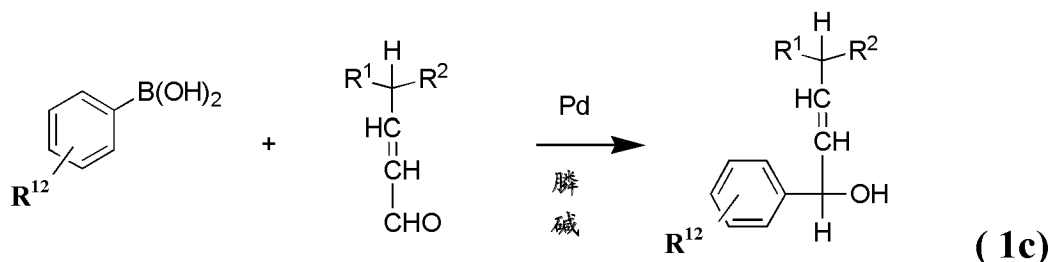
[0268] 在本发明的一些实施方案中, $A =$ 烯基 (C_2)。制备其中 $A =$ 烯基 (C_2) 的化合物, 包括通过用强碱例如 NaH、丁基锂、双(三甲硅基氨基)锂或类似物质锂化 $R^1R^2CH_2$ 衍生的负碳离子, 将其加入到不饱和化合物例如 3-(二甲基氨基)-丙烯酸甲酯中生成中间体酯, 该酯可以通过一步或通过多步来还原成相应的不饱和醛:

[0269]



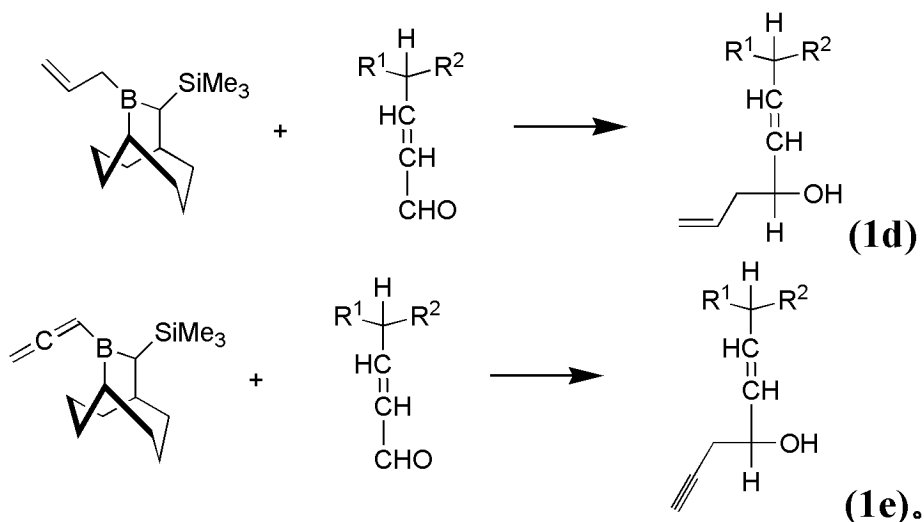
[0270] 例如如 Org. Letts. (2005) 7 :4153-5 所述,在钯催化剂存在下,将该不饱和醛与芳基硼酸 $R^{12}-B(OH)_2$ 反应,提供式 (1c) 的化合物,其中 A = 烯基 (C_2), L = 取代的芳基且 X = 0。

[0271]



[0272] 可替代地,根据 Soderquist 的方法,该不饱和醛与烯丙基甲硼烷的反应产生了式 (1d) 的化合物,其中 A = 烯基 (C_2), X = 0 且 L = $CH_2CH=CH_2$, 和式 (1e), 其中 A = 烯基 (C_2), X = 0 且 L = CH_2CCH 。参见 Burgos, C. H. 等人, J. Am. Chem. Soc. (2005) 127 :8044。

[0273]

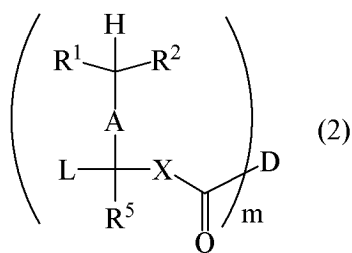


[0274] 式 (2)、(3) 和 (4) 的化合物的制备

[0275] 然后式 (1) 的原料或首先与药物衍生或首先与大分子衍生,得到形成式 (3) 的化合物中的中间体。在这些中间体和式 (3) 的产物中,由式 (1) 的图示形式产生的所有实施方案以及 L、A、X、 R^1 、 R^2 和 R^5 的具体实施方案都保留在中间体和式 (3) 的最终产物中,除了在与大分子反应时,作为反应的结果 L 变成了 L' 。

[0276] 因此,在中间体的下列图示中,其中首先加入药物,式 (1) 的上述 R^1 、 R^2 、 R^5 、A、X 和 L 的所有实施方案都作为式 (2) 的化合物的图示:

[0277]



[0278] 其中 m 是 1-10 的整数；

[0279] Z 是大分子的残基；

[0280] L 是能反应结合大分子的连接部分；

[0281] D 是药物或前药的残基；

[0282] X 是 O 或 S；

[0283] A 是烯基 (C₂)、芳基或不存在；

[0284] 各 R¹ 和 R² 独立地是 H；CN；

[0285] NO₂；

[0286] 任选取代的芳基；

[0287] 任选取代的杂芳基；

[0288] 任选取代的烯基；

[0289] 任选取代的炔基；或

[0290] 各 R¹ 和 R² 独立地是 COR³、SOR³ 或 SO₂R³，其中

[0291] R³ 是 H 或任选取代的烷基；

[0292] 任选取代的芳基；

[0293] 任选取代的杂芳基；

[0294] 任选取代的烯基；

[0295] 任选取代的炔基；或

[0296] OR 或 NR₂，其中各 R 独立地是 H 或任选取代的烷基；或

[0297] 各 R¹ 和 R² 独立地是 SR⁴，其中

[0298] R⁴ 是任选取代的烷基；

[0299] 任选取代的芳基；

[0300] 任选取代的杂芳基；

[0301] 任选取代的烯基；或

[0302] 任选取代的炔基；

[0303] 其中 R¹ 和 R² 可以连接形成 3-8 元环；和

[0304] 其中 R¹ 和 R² 不能都是 H；

[0305] 其中 R⁵ 是 H 或烷基 (C₁₋₆)。

[0306] 因此，式 (1) 的化合物的 L、A、R¹、R² 和 R⁵ 以及 X 一般都如上定义，式 (1) 的上述这些取代基的具体实施方案都由此通过参考引入，作为式 (2) 的化合物的例子。

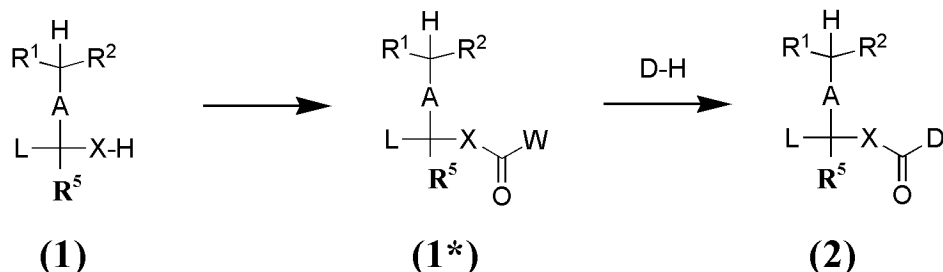
[0307] 式 (2) 的化合物可以自己以可控速率释放治疗剂或者它们可以用作中间体来连接治疗剂和大分子。根据 pH 依赖性消除机制，式 (2) 和 (3) 都以可控速率释放治疗剂。

[0308] 如上所述，R¹、R²、A 和 L 的性质都会影响释放的速率。

[0309] 一般可以通过将如上所述的式 (1) 的分子与药物分子 D 缩合来制备式 (2) 的化

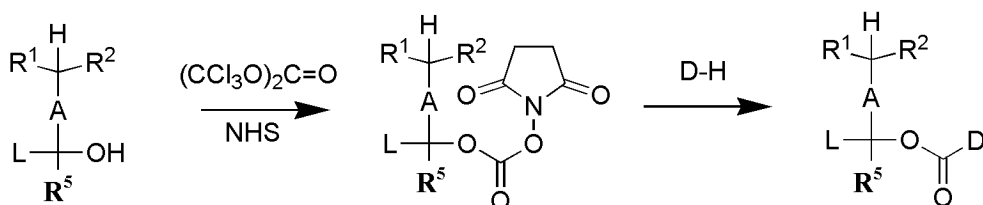
合物。在本发明的一个实施方案中,首先任选在N-羟基琥珀酰亚胺、1,1-羰二咪唑、1,1-羰基二三唑(carbonylditriazole)存在下通过与适当的试剂例如光气或三光气反应来缩合,以活化式(1)的化合物,或者用类似的试剂将式(1)的化合物缩合成式(1*)的活化化合物,其中W = F、Cl、咪唑基、三唑基或O-琥珀酰亚胺基:

[0310]



[0311] 例如,其中X = O的式(1)的化合物与三光气和N-羟基琥珀酰亚胺反应,得到式(1*)的化合物,其中X = O和W = O-琥珀酰亚胺基。

[0312]



[0313] 当要耦合的药物分子D-H具有氨基时,其中X = O且W = O-琥珀酰亚胺基的式(1*)的化合物是特别优选的。在这种情况下,所得式(2)的前药包含氨基甲酸键。对于其中D-H是肽或蛋白质药物的情况,与式(1*)的化合物反应的氨基可以是末端α-氨基或侧链的氨基,例如赖氨酸、鸟氨酸或不饱和氨基酸残基的氨基。

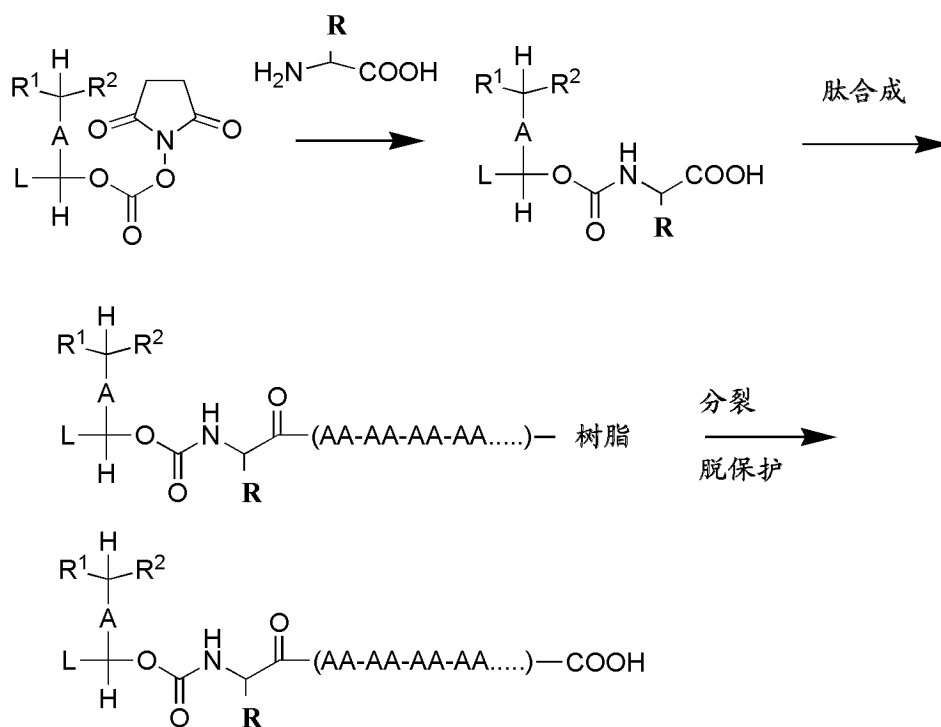
[0314] 可替代地,活化试剂可以是取代苯基的氯甲酸酯,例如4-硝基苯基氯甲酸酯、2,4-二硝基苯基氯甲酸酯或全氟苯基氯甲酸酯,导致形成了中间体取代苯基的碳酸酯。

[0315] 当要耦合的药物分子D-H没有氨基但具有羟基时,例如当D-H是来自侧链酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸残基的肽或蛋白质药物时,或者例如当D-H是基于核酸的药物例如脱氧核酸或核糖核酸时,其中X = O且W = F或Cl的式(1*)的化合物是特别优选的。

[0316] 在基于肽-、蛋白质-或核酸-的药物的情况下,可以存在多个反应基团,产生与式(1*)的化合物的多重反应。多重反应的程度可以用本领域已知的标准条件例如通过反应温度、浓度和化学计量学来控制,以得到所需的反应产物。

[0317] 在本发明的一个实施方案中,D是肽药物,其中D与式(1)的分子耦合,以生成式(2)的分子。在本发明的另一个实施方案中,D是肽药物,其中式(2)的分子是通过其中在合成D的期间连接式(1)的分子的方法来制备。例如,通过本领域公知的固相肽合成方法合成D的最后一步包括连接受保护形式的肽D的序列的N-末端氨基。在该实施方案中,该最后一步使用下列形式的N-末端氨基酸,使用式(1)的化合物作为保护基。

[0318]



[0319] 其中 R 是氨基酸的侧链。

[0320] 在那个位置该实施方案是有利的, 衍生的化学计量学是完全可控的。

[0321] 如上所述, 该药物是通过 XH 基辄合的, 其中 XH 基是 OH 或 SH。该药物将包含相容性的官能团, 例如羧基、OH、NH₂; 烷基 -NH 例如 MeNH、EtNH 和 ⁱPrNH; 芳基 -NH 例如苯基 -NH 或取代的苯基 -NH 和 SH。载体和药物上的官能团用羰基 (C = O) 来辄合。

[0322] 一般而言, 感兴趣的药物是肽、蛋白质或核酸, 例如适体或反义低聚物, 或小分子。

[0323] 适当的药物的例子包括用于人或兽医学用途的那些, 包括但不限于, 抗糖尿病药 (例如, 胰岛素); 生长促进剂 (例如, 人或牛生长激素); 抗菌素包括氨基糖苷类 (例如, 庆大霉素、新霉素和链霉素), 青霉素 (阿莫西林、氨苄西林、哌拉西林), 头孢菌素类 (例如, 头孢克洛、头孢米诺和头孢氨苄), 大环内酯类 (例如, 卡波霉素、红霉素、泰利霉素) 和肽 (例如, 杆菌肽、短杆菌肽和多粘菌素类), 甲氧苄啶、吡咯米酸和磺胺甲噁唑; 止痛和消炎药 (例如, 对乙酰氨基酚、阿司匹林、异丁芬酸、吲哚美辛), 抗过敏和平喘药 (例如, 氨来咕诺和色甘酸钠), 抗高胆甾醇血药 (例如, 氯贝酸、氧烟酸和曲帕拉醇), β-肾上腺素受体阻滞剂和抗高血压药 (例如, 布洛洛尔、卡托普利、茚诺洛尔、普萘洛尔和 4-氨基丁酸), 抗肿瘤药 (例如, 柔红霉素、氮胞苷、6-巯基嘌呤、干扰素、白介素-2、甲氨蝶呤、紫杉醇、5-氟尿苷、5-氟尿嘧啶、卡培他滨 (capecitabine) 和长春碱), 抗病毒药 (例如, 阿昔洛韦、更昔洛韦、金刚烷胺、干扰素、AZT 和利巴韦林等)。

[0324] 特别优选的是肽、蛋白质和核酸类药物。适用于本发明的肽药物的例子包括但不限于: 胰高血糖素样肽 1 (GLP-1)、exendin-2、exendin-3、exendin-4、心房利钠因子 (ANF)、脑肠肽 (ghrelin)、加压素、生长激素、生长激素释放激素 (GHRH)、RC-3095, 生长抑素、蛙皮素、PCK-3145、Phe-His-Ser-Cys-Asn (PHSCN)、IGF1、B 型利钠肽、肽 YY (PYY)、干扰素、血小板反应素、血管生成素、降钙素、促性腺激素释放激素、水蛭素、高血糖素、抗-TNF-α、成纤维细胞生长因子、粒细胞集落刺激因子, 奥尼匹肽 (obinipitide)、垂体甲状腺激素 (PTH)、亮丙瑞林、舍莫瑞林、普拉莫瑞林、奈西立肽、rotigaptide、西仑吉肽、MBP-8298、

AL-108、恩夫韦地、胸腺法新、达托霉素、HLF1-I 1、乳铁蛋白、Delmitide、谷胱甘肽、T- 细胞表位 PR1、蛋白酶 -3- 肽类 1-11、B- 细胞表位 P3、促黄体激素释放激素 (LHRH)、P 物质、神经激肽 A、神经激肽 B、CCK-8、脑啡肽 (包括亮氨酸脑啡肽和蛋氨酸脑啡肽)、皮抑菌肽、[des-Ala20, Gln34]- 皮抑菌肽、与表面活性物质有关的阴离子抗菌肽、Apidaecin IA; Apidaecin IB; OV-2; 1025, 乙酰粘附肽 (1025-1044) 酰胺; Theromacin (49-63); 培西加南 (MSI-78); Indolicidin; Apelin-15 (63-77); CFP10 (71-85); 与炭疽热有关的致死因子 (LF) 的抑制剂; 牛抗菌肽; 丙型肝炎病毒 NS3 蛋白酶抑制剂 2; 丙型肝炎病毒 NS3 蛋白酶抑制剂 3; 丙型肝炎病毒 NS3 蛋白酶抑制剂 4; NS4A-NS4B 丙型肝炎病毒 (NS3 蛋白酶抑制剂 1); HIV-I, HIV-2 蛋白酶基质; 抗 -Flt1 肽; Bak-BH3; BaxBH3 肽 (55-74) (野生型); Bid BH3-r8; CTT (明胶酶抑制剂); E75 (Her-2/neu) (369-377); GRP78 结合嵌合肽基序; p53 (17-26); E GFR2/KDR 拮抗剂; Colivelin AGA- (C8R) HNG1 7 (Humanin 衍生物); 活性依赖性神经营养因子 (ADNF); β 分泌酶抑制剂 1; β 分泌酶抑制剂 2; ch[β] 淀粉样蛋白 (30-16); Humanun (HN) sHNG、[Gly14]-HN、[Gly14]-Humanin; 血管紧张素转换酶抑制剂 (BPP); 肾素抑制剂 III; 膜联蛋白 1 (ANXA-1; Ac2-12); 抗炎肽 1; 抗炎肽 2; 抗炎 Apelin 12; [D-Phe12, Leu14]- 蛙皮素; 触角肽 (酸) (穿透蛋白); 触角肽前导肽 (CT); 黄蜂毒素; 硫酸化 [Thr28, Nle31]- 胆囊收缩素 (25-33); 痛敏肽 (1-13) (酰胺); 纤溶抑制因子; γ 纤维蛋白原 (377-395); Xenin; 肥胖抑制素 (人); [His1, Lys6]-GHRP (GHRP-6); [Ala5, [β]-Ala8]- 神经激肽 A (4-10); 神经介素 B; 神经介素 C; 神经介素 N; 活性依赖性神经营养因子 (ADNF-14); Acetalin1 (阿片受体拮抗剂 1); Acetalin 2 (阿片受体拮抗剂 2); Acetalin 3 (阿片受体拮抗剂 3); ACTH (1-39) (人); ACTH (7-38) (人); 蛙皮降压肽; 脂肪动员激素 (飞蝗); 肉豆蔻化 ADP- 核糖基化因子 6、myr-ARF6 (2-13); PAMP (1-20) (肾上腺髓质素原 (1-20) 人); AGRP (25-51); Amylin (8-37) (人); 血管紧张素 I (人); 血管紧张素 II (人); Apstatin (氨肽酶 P 抑制剂); Brevinin-1; 滑爪蟾素 1; RL-37; LL-37 (抗微生物肽) (人); 天蚕抗菌肽 A; 抗氧化肽 A; 抗氧化肽 B; L- 肌肽; BcI 9-2; NPVF; 神经肽 AF (hNPAF) (人); Bax BH3 肽 (55-74); bFGF 抑制肽; bFGF 抑制肽 II; 卡里定; [Des-Arg1 0]-HOE 140; 半胱天冬酶 1 抑制剂 II; 半胱天冬酶 1 抑制剂 VIII; Smac N7 蛋白 (MEK1 衍生的肽抑制剂 1); hBD-1 ([β]- 防卫素 -1) (人); hBD-3 ([β]- 防卫素 -3) (人); hBD-4 ([β]- 防卫素 -4) (人); HNP-I (人防卫素中性粒细胞肽 1); HNP-2 (人防卫素中性粒细胞肽 -2 强啡肽 A (1-17)); 内啡肽 -1; [β]- 内啡肽 (人、猪); 内皮素 2 (人); 纤维蛋白原结合抑制肽; Cyclo (-GRGDSP); TP508 (凝血酶衍生的肽); 促生长激素神经肽 (人); GIP (人); 胃泌素释放肽 (人); 胃泌素 -1 (人); Ghrelin (人); PDGF-BB 肽; [D-Lys3]-GHRP-6; HCV 核心蛋白 (1-20); a3B1 整联蛋白肽片段 (325) (酰胺); 层粘连蛋白胸腺喷丁 (酰胺); 促黑激素 - 强化因子 (MPF); VA-[β]-MSH、促脂解激素 -Y (阿黑皮素衍生的); 心房利钠肽 (1-28) (人); 血管钠素肽 (1-27); [Ala5, B-Ala8]- 神经激肽 A (4-10); 神经介素 L (NKA); Ac- (Leu28, 31)- 神经肽 Y (24-26); 阿利特新; 脑神经肽 II; [D-tyr11]- 神经降压肽; IKKy NEMO 结合区域 (NBD) 抑制肽; PTD-p50 (NLS) 抑制肽; 阿立新 A (牛、人、小鼠、大鼠); 阿立新 B (人); 水通道蛋白 -2 (254-267) (人胰抑素) (37-52); 胰多肽 (人); 神经肽; 肽 YY (3-36) (人); 羟甲基 - 植物螯合肽 2; PACAP (1-27) (酰胺, 人、牛、大鼠); 催乳素释放肽 (1-31) (人); Salusin- α ; Salusin- β ; 皂化蛋白

C22;胰泌素(人);L-选择蛋白;Endokin A/B;Endokin C(人);EndokinD(人);凝血酶受体(42-48)激动剂(人);LSKL(凝血酶敏感素的抑制剂);促甲状腺激素释放激素(TRH);P55-TNFR片段;乌洛滕生 II(人);VIP(人、猪、大鼠);VIP拮抗剂;毒蜥素;艾塞那肽;ZP10(AVE00100);普兰林肽;AC162352(PYY)(3-36);PYY;奥尼匹肽;高血糖素;GRP;葛瑞林(GHRP6);亮丙瑞林;组氨瑞林;缩宫素;阿托西班(RWJ22164);舍莫瑞林;奈西立肽;比伐卢定(Hirulog);艾替班特;Aviptadin;Rotigaptide(ZP123, GAP486);西仑吉肽(EMD-121924, RGD肽);AlbuBNP;BN-054;血管紧张素 II;MBP-8298;肽亮氨酸精氨酸;齐考诺肽;AL-208;AL-108;Carbeticon;三肽;SAL;Coliven;Humanin;ADNF-14;VIP(肠道血管活性肽);胸腺法新;杆菌肽;短杆菌肽;培西加南(MSI-78);P113;PAC-113;SCV-07;HLF1-I1(乳铁蛋白);DAPTA;TRI-1144;Tritrptcin;Antiflammin 2;Gattex(Teduglutide, ALX-0600);Stimuvax(L-BLP25);Chrysalin(TP508);Melanonan II;Spantide II;蛙皮素;辛卡利特;五肽胃泌素;胰泌素;内皮他丁肽;E-选择蛋白;HER2;IL-6;IL-8;IL-10;PDGF;凝血酶敏感素;uPA(1);uPA(2);VEGF;VEGF(2);胸腺喷丁-3;XXLRR; β -淀粉样蛋白微纤维生成素;内啡肽-2;TIP-39(节状漏斗形神经肽);PACAP(1-38)(酰胺,人、牛、大鼠);TGFB活化肽;胰岛素致敏因子(ISF402);转化生长因子B1肽(TGF-B1);蛙皮素释放因子;IELLQAR(8-branch MAPS);替加泊肽 PK3145;戈舍瑞林;阿巴瑞克;西曲瑞克;加尼瑞克;Degarelix(曲普瑞林);Barusiban(FE 200440);普拉莫瑞林;奥曲肽;依替巴肽;Netamiftide(INN-00835);达托霉素;Spantide II;Delmitide(RDP-58);AL-209;恩夫韦地;IDR-I;六肽-6;胰岛素-A链;兰瑞肽;六[rho]eptide-3;胰岛素-B链;甘精胰岛素-A链;甘精胰岛素-B链;胰岛素-LisPro B-链类似物;胰岛素-门冬B-链类似物;胰岛素-格鲁辛胰岛素B链类似物;胰岛素-地特胰岛素B链类似物;生长抑素肿瘤抑制类似物;胰抑素(37-52);血管活性肠肽片段(KKYL-NH₂)和强啡肽A。所列这些和例如在PCT公开W02008/058016A1(关于鉴定和序列,通过参考引入本文)中的其他肽都适用于本发明。

[0325] 适用于本发明的蛋白质药物包括但不限于:免疫毒素 SS1P、腺苷脱氨酶、精氨酸酶及其他物质。

[0326] 适用于本发明的基于核酸的药物的例子包括但不限于,来源于动物,特别是哺乳动物的任何基因的正链和反义链。这些基因可以是已经是反义 DNAs 的主体的那些,所述反义 DNAs 已经出于治疗各种疾病的目的而提供,例如用于蛋白激酶 C- α 的基因(Aprinocarsen, 非小细胞肺癌)、BCL-2(Oblimersen, 恶性黑色素瘤, 肺癌)、ICAM-1(ISIS-3082, 克罗恩病, 与 HCV- 有关的丙型肝炎, 移植中的缺血/再灌注损伤)、肿瘤坏死因子(类风湿性关节炎, SARS 和牛皮癣)、腺苷 A1 受体(哮喘)和 c-raf 激酶(卵巢癌)、H-ras(胰腺癌)、c-myc(冠心病)、蛋白激酶 A RI α (结肠癌, AIDS), DNA 甲基转移酶(实体癌)、VEGF 受体(癌症)、核糖核苷酸还原酶(肾癌)、巨细胞病毒 IE2(CMV 性视网膜炎)、基质金属蛋白酶-9(前列腺癌)、TGF β 2(恶性胶质瘤)、CD49d(多发性硬化症)、PTP-1B(糖尿病)、c-myc(癌症)、EGFR(乳腺癌)、mdr1(癌症)、自分泌运动因子(癌症)、磷脂酰肌醇聚糖锚 F 类(PIGF, 癌症)和 GLUT-1(癌症)。核酸药物可以是 DNA、修饰的 DNA 例如硫代硫酸制-DNA、RNA、修饰的 RNA 例如 2'-OMe-RNA、锁核酸、肽核酸或杂化物。

[0327] 在本发明的一个实施方案中,D 是寡核苷酸药物。其中 D 是寡核苷酸的式(2)的化

合物可以通过寡核苷酸药物的化学合成来制备,该合成包括 5'-末端修饰,以与式 (1) 的分子铰合。例如,可以化学合成该寡核苷酸,以在合成的最后一轮时加入的 5'-末端核苷酸单元包含修饰的磷酸基团,以包含氨基-烷基。然后将所得胺-修饰的寡核苷酸与式 (1) 的分子铰合,形成式 (2) 的分子,其中 D 是寡核苷酸药物。参见,例如,Zhao 等人,Bioconjugate Chemistry (2005) 16 (4) :758-766。

[0328] 图 4 和 5 所示的是改变药物从式 (2) 的前药中的释放速率的预测效果。图 4 显示的是具有不同释放速率的一系列前药经计算的药物释放特征,所述药物具有每日 0.5 的从系统中清除的固定速率,所述释放特征用所施用总药物的份数表示,假定前药缓慢清除。相对快速的释放速率(例如,每日 5 的释放速率)会在较短的持续时间里得到所释放药物较高的最大浓度。相对缓慢的释放速率(例如,每日 0.1 的释放速率)会在较长的持续时间里得到所释放药物较低的最大浓度。

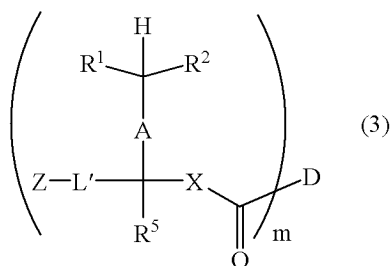
[0329] 由于根据需要可以改变所施用药物的总量,因此相对于所实现的游离药物的最大水平考虑药物从式 (2) 的化合物中的释放是有用的。图 5 显示的是具有不同释放速率的一系列前药经计算的药物释放特征,所述药物具有每日 0.5 的从系统中清除的固定速率,所述释放特征用最大浓度(% C_{max})的百分比对时间来表示。随着药物从前药或药物-大分子铰合物中释放速率降低,其中游离药物浓度在最大浓度的特定百分比之上的给药后时间延长。

[0330] 图 4 和 5 所示的模型用于解释相对于药物从系统中的清除速率,选择药物从式 (2) 的前药中适当的释放速率可以实现不同的药物时间-浓度特征。

[0331] 本发明也包括含有混合物的组合物,该混合物包含两种或多种式 (2) 的前药,其中药物 D 相同或不同。在这种混合物的一个实施方案中,式 (2) 的各前药在生理条件下具有不同的药物释放速率。

[0332] 也可以通过包括在下式的化合物上的大分子来进一步控制药物代谢动力学

[0333]



[0334] 其中 m 是 1-10 的整数;

[0335] Z 是大分子的残基;

[0336] L' 是连接子的残基;

[0337] D 是药物或前药的残基;

[0338] X 是 O 或 S;

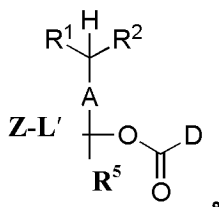
[0339] A 是烯基 (C₂)、芳基或不存在;

[0340] 各 R¹ 和 R² 独立地是 H;CN;

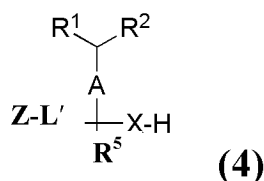
[0341] NO₂;

[0342] 任选取代的芳基;

- [0343] 任选取代的杂芳基；
 [0344] 任选取代的烯基；
 [0345] 任选取代的炔基；或
 [0346] 各 R^1 和 R^2 独立地是 COR^3 、 SOR^3 或 SO_2R^3 ，其中
 [0347] R^3 是 H 或任选取代的烷基；
 [0348] 任选取代的芳基；
 [0349] 任选取代的杂芳基；
 [0350] 任选取代的烯基；
 [0351] 任选取代的炔基；或
 [0352] OR 或 NR_2 ，其中各 R 独立地是 H 或任选取代的烷基；或
 [0353] 各 R^1 和 R^2 独立地是 SR^4 ，其中
 [0354] R^4 是任选取代的烷基；
 [0355] 任选取代的芳基；
 [0356] 任选取代的杂芳基；
 [0357] 任选取代的烯基；或
 [0358] 任选取代的炔基；
 [0359] 其中 R^1 和 R^2 可以连接形成 3-8 元环；和
 [0360] 其中 R^1 和 R^2 不都是 H；和
 [0361] 其中 R^5 是 H 或烷基 (C_{1-6})。
 [0362] 当 $m = 1$ 时，式 (3) 的药物-大分子轭合物具有更具体的式：
 [0363]



- [0364] 在很多实施方案中， R^5 是 H。
 [0365] 如在式 (2) 的化合物的情况中， R^1 、 R^2 、A、X、 R^5 和 L 所述的实施方案适用于在式 (1) 的情况中所示，因此这些实施方案通过参考引入，作为式 (3) 的适当取代基。在 L' 的情况中，L 的性质决定了它的结构，因此在式 (1) 和 (2) 中所述的变形也适用于此。
 [0366] 上文与式 (2) 有关的所示和所列的药物也适用于式 (3)。
 [0367] 当药物通过非酶消除从式 (3) 中释放时，连接基团保持与大分子的连接。已经证明，大分子从体内的清除速率取决于它们的流体半径，因此也取决于它们的分子量。参见例如，Veronese, Biomaterials(2001)22:405-417，它表明，在小鼠中超氧化物歧化酶 (SOD) 的半衰期从游离 SOD 的 0.08 小时，增加到与分子量 1,900Da 的 PEG 轭合的 SOD 的 1.5 小时，与分子量 72,000Da 的 PEG 轭合的 SOD 的 36 小时。因此，式 (2) 的前药与大分子的轭合而得到式 (3) 的分子，可以用于增加该前药的循环时间。
 [0368] 用于递送药物的大分子载体也可以是在形成式 (3) 的化合物中的可替代中间体。
 [0369]



[0370] 如在式 (2) 和 (3) 的化合物的情况中,式 (1) 的 R^1 、 R^2 、 R^5 、X 和 L 的具体所述的所有变形都合并到式 (4) 的化合物的具体实施方案中。

[0371] 在一些实施方案中,Z 是分子量 10,000–250,000 的蛋白质、寡糖或合成聚合物。

[0372] 在一些实施方案中,大分子 Z 是分子量 10,000–250,000 的合成聚合物。在更特别的实施方案中,大分子 Z 是分子量 10,000–100,000 的合成聚合物。在本发明的一些实施方案中,Z 是衍生的直链、支链或树枝状 (dendrimeric) 聚(乙二醇)(PEG)、单甲氧基-PEG (mPEG)、聚(乙烯亚胺)(PEI) 或 PEG-PEI 共聚物。各种大小的衍生型合成聚合物例如 PEG 和 mPEG 都是商业可购得的,它们具有各种末端官能团,产生了包含羟基、胺、叠氮 (azide)、羧基、醛、N- 羟基琥珀酰亚胺基酯、咪唑羧氨基 (imidazolylcarboxamino)、咪唑羧基、硝基苯基碳酸酯、异氰酸酯、马来酰亚胺、硫醇或环氧基 (epoxide) 官能团的分子。其他合成聚合物的衍生物可以用本领域已知的方法来制备,例如通过用溴甲基取代的芳香或杂芳香醛或者烯丙基或炔丙基卤化物来衍生化。

[0373] 在另一个实施方案中,大分子 Z 是分子量 10,000–250,000 的蛋白质。在本发明一个更特别的实施方案中,Z 是单克隆或多克隆的抗体或抗体片段。根据蛋白质的序列,将存在各种反应性官能团例如胺和硫醇。可替代地,可以用本领域已知的方法加入基团例如硫醇和马来酰亚胺将蛋白质化学衍生化。

[0374] 在另一个实施方案中,Z 是分子量 10,000–250,000 的寡糖。在一些实施方案中,Z 是分子量 10,000–250,000 的右旋糖酐。在更特别的实施方案中,Z 是分子量 10,000–100,000 的右旋糖酐。

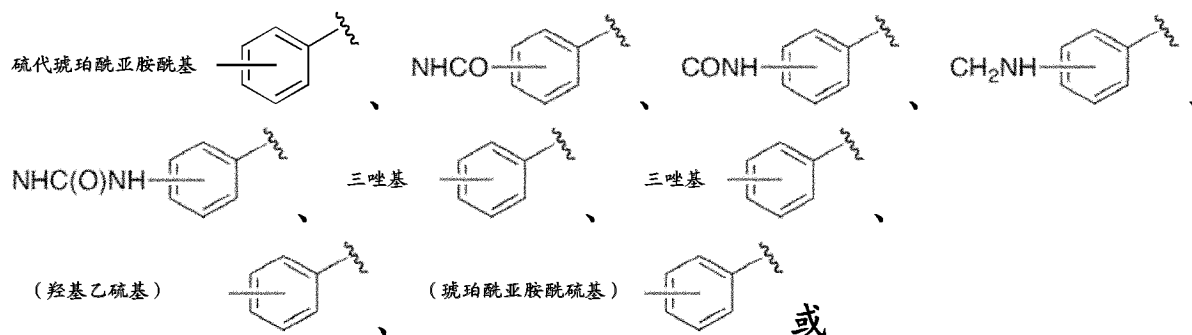
[0375] 大分子 Z 包含至少一个适于和式 (1) 或 (2) 的分子反应的官能团 R^{13} 。对于本发明的化合物,适当的 R^{13} 基包括但不限于:羟基、胺、叠氮、羧基、醛、N- 羟基琥珀酰亚胺基酯、咪唑羧氨基、咪唑羧基、硝基苯基碳酸酯、异氰酸酯、马来酰亚胺、硫醇、环氧基、CCH(末端炔基) 和胍基。

[0376] 在本发明一个特别的实施方案中,Z 是抗体 m38c2 或其人化版(美国专利申请 2006/0205670,通过参考引入本文)。

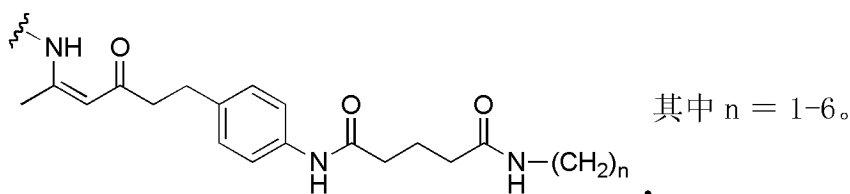
[0377] 在式 (3) 或 (4) 的化合物的某些实施方案中,Z 选自抗体;白蛋白;直链、支链或树枝状聚乙二醇 (PEG);直链、支链或树枝状单甲氧基聚乙二醇 (mPEG);直链、支链或树枝状聚乙烯亚胺 (PEI);直链、支链或树枝状 PEG-PEI 共聚物;直链、支链或树枝状右旋糖酐;和毫微粒。在其他特别的实施方案中,该药物-大分子缀合物具有式 (3a),其中 Z 是抗体。在本发明的其他特别的实施方案中,该药物-大分子缀合物具有式 (3a),其中 Z 是直链、支链或树枝状聚乙二醇 (PEG)。在本发明的其他特别的实施方案中,该药物-大分子缀合物具有式 (3a),其中 Z 是直链、支链或树枝状单甲氧基聚乙二醇 (mPEG)。

[0378] 在本发明的式 (3) 和 (4) 的化合物中, L' 可以是 $(\text{CH}_2)_n\text{NHCO}$ 、 $(\text{CH}_2)_n\text{NHCH}_2$ 、 $(\text{CH}_2)_n\text{NHCONH}$ 、 $(\text{CH}_2)_n$ 三唑基、 $(\text{CH}_2)_n$ 硫代琥珀酰亚胺酰基 (thiosuccinimidoyl)、 $(\text{CH}_2)_n$ (羟基乙硫基 (hydroxyethylthio))、 $(\text{CH}_2)_n$ 琥珀酰亚胺酰硫基 (succinimidoylthio)、 $(\text{CH}_2)_n\text{CONH}$ 、

[0379]



[0380]

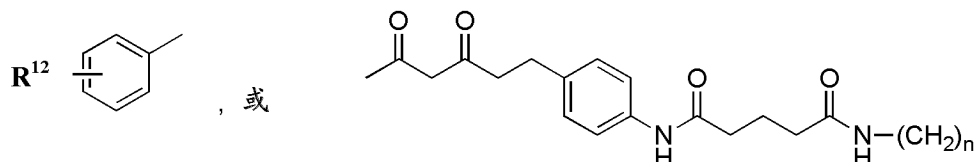


[0381] 结合到大分子上

[0382] 如下所述制备式 (4) 的化合物, 其中结合到大分子 Z 上的反应物是式 (1) 的化合物; 如果使用式 (2) 的化合物, 结果产生的就是式 (3) 的化合物。类似地, 如上所述可以通过与如上所述的适当药物反应, 将式 (4) 的化合物转化为式 (3) 的化合物。

[0383] 在各情况下, 连接基团 L' 是在耦合过程中通过大分子 Z 上的官能团 R¹³ 与式 (1) 或 (2) 的分子的连接基团 L 上的官能团 R¹² 反应形成的。如上所述, 在式 (1) 和 (2) 的化合物中, L 是 (CH₂)_nR¹²、

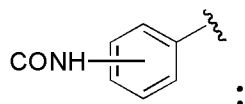
[0384]



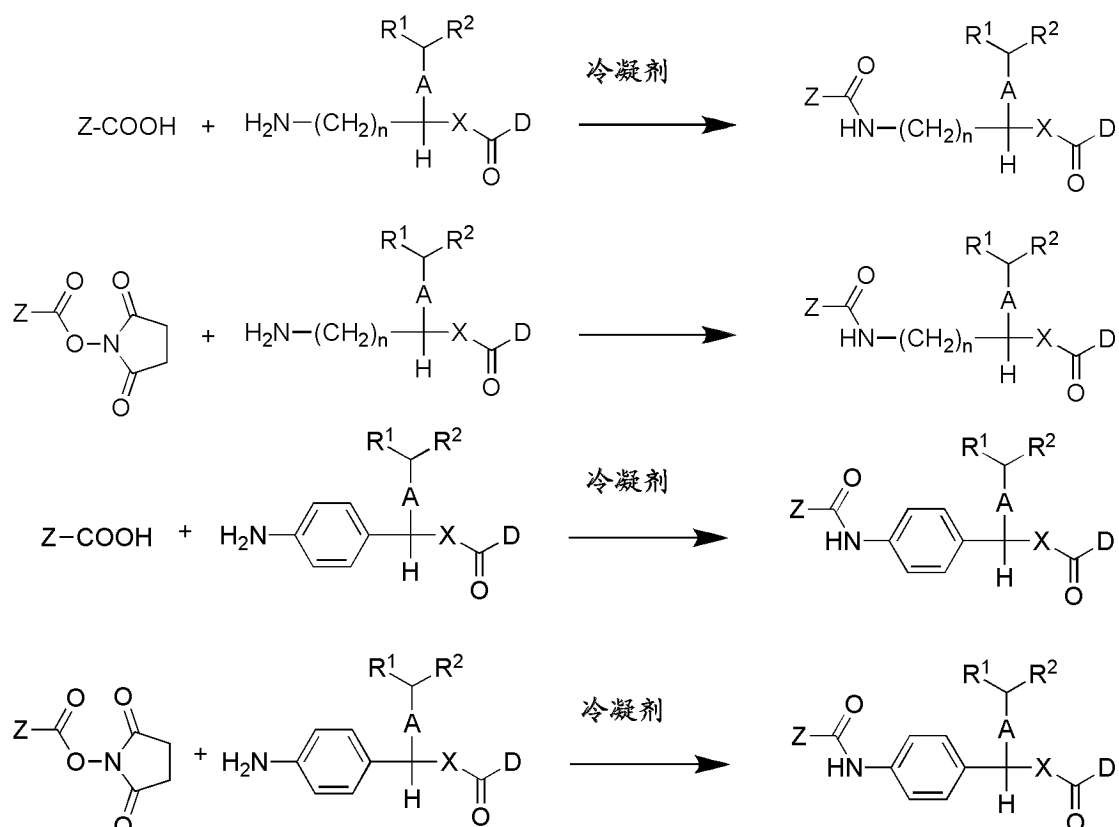
[0385] 其中 $n = 1-6$, R¹² 是 NH₂、N₃、Cl、Br、I、SH、COOH、CHO、CH = CH₂、CCH 或马来酰亚胺。

[0386] 式 (3) 或 (4) 的化合物可以通过数种途径中的任一种来制备, 最适当的途径主要取决于于基团 L 上的基团 R¹² 的性质。如所示, 如下选择官能团, 当 $m = 1$ 时使用与式 (2) 的化合物的反应来确定适当的方法和所得连接基团 L' 的性质。

[0387] 当 R¹² 是 NH₂ 时, 使用冷凝剂例如碳二亚胺, 通过 R¹³ = COOH, 或直接使用 R¹³ = CO-O-琥珀酰亚胺酰基 (N-羟基琥珀酰亚胺酰基酯)、CO-咪唑基或 CO-O-(硝基苯基), 将衍生的大分子 Z-R¹³ 耦合到式 (1) 或 (2) 的化合物上, 得到酰胺键 L' = (CH₂)_nNHCO 或

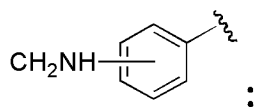


[0388]

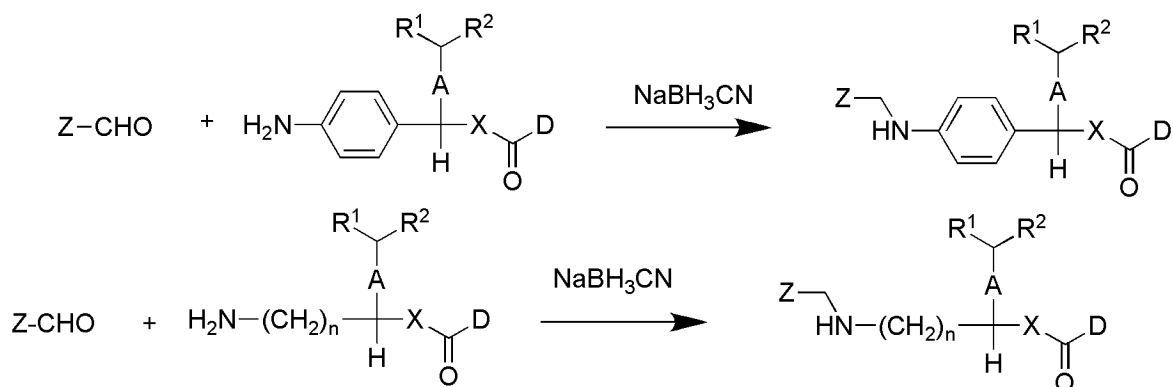


[0389] 其中 Z、X、A、D、R¹ 和 R² 如上述定义。

[0390] 可替代地, 当 R¹² 是 NH₂ 时, 使用还原氨化作用, 例如用 NaBH₃CN, 通过 R¹³ = CHO 将衍生的大分子 Z-R¹³ 耦合到式 (1) 或 (4) 的化合物上, 得到胺键 L' = (CH₂)_nNH-CH₂ 或



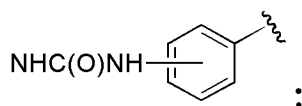
[0391]



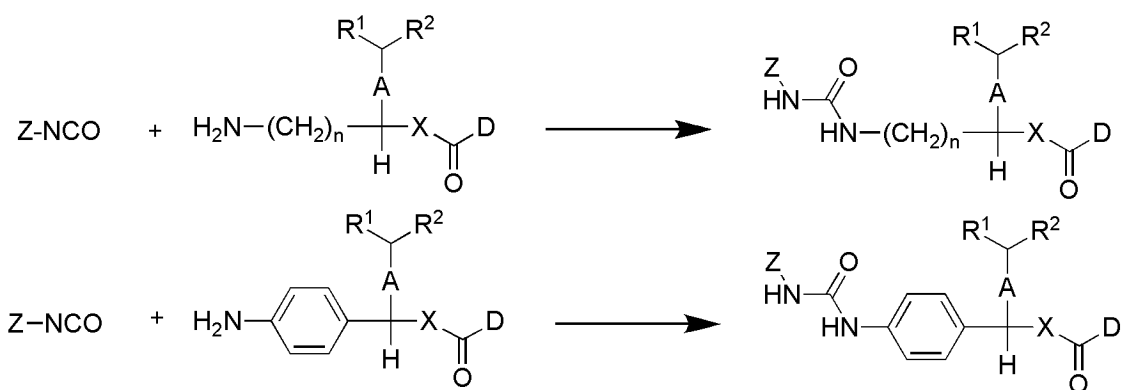
[0392] 其中 Z、X、A、D、R¹ 和 R² 如上述定义。

[0393] 可替代地, 当 R¹² 是 NH₂ 时, 通过 R¹³ = 异氰酸基将衍生的大分子 Z-R¹³ 耦合到式 (1) 或 (2) 的化合物上, 得到脲键 L' = (CH₂)_nNH-CO-NH- 或

[0394]

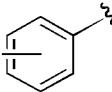


[0395]

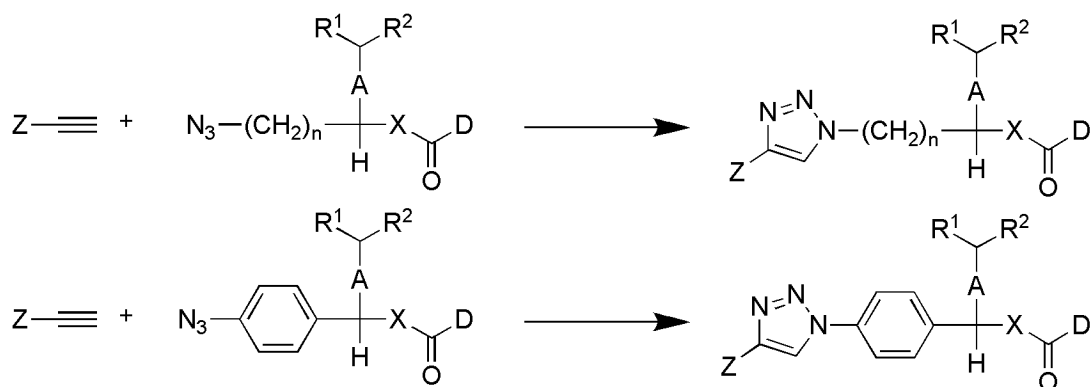


[0396] 其中 Z、X、A、D、R¹ 和 R² 如上述定义。

[0397] 当 R¹² 是 N₃ 时, 使用用于“点击化学”即 1,3- 二极性环加成反应的条件, 通过 R¹³ = CCH 将衍生的大分子 Z-R¹³ 辄合到式 (2) 的化合物上, 以在 W = (CH₂)_n- 三唑基或

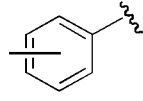
三唑基  中形成 1,2,3- 三唑键:

[0398]



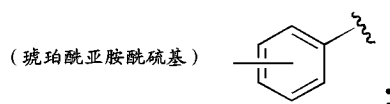
[0399] 其中 Z、X、A、D、R¹ 和 R² 如上述定义。

[0400] 当 R¹² 是 SH 时, 通过 R¹³ = 马来酰亚胺或环氧基将衍生的大分子 Z-R¹³ 辄合到式 (1)

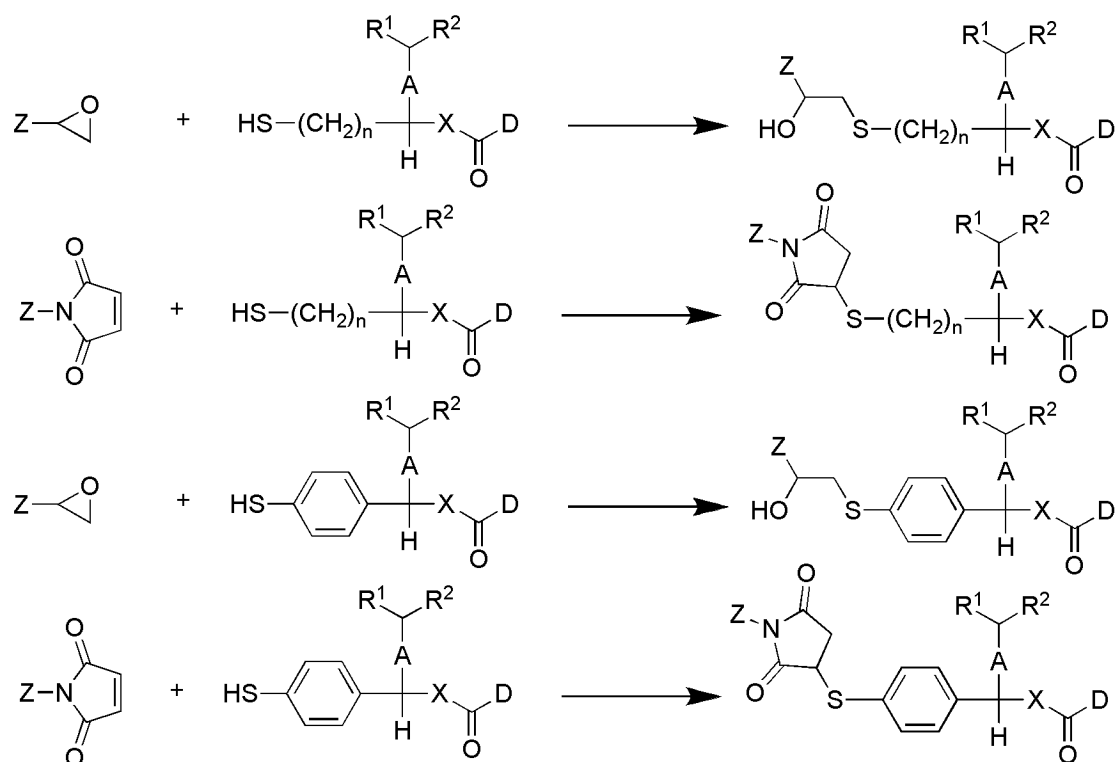
或 (2) 的化合物上, 以形成 L' = (CH₂)_n-(羟基乙硫基), (羟基乙硫基)  (CH₂)

_n-(琥珀酰亚胺酰硫基), 或

[0401]

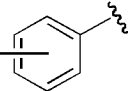


[0402]

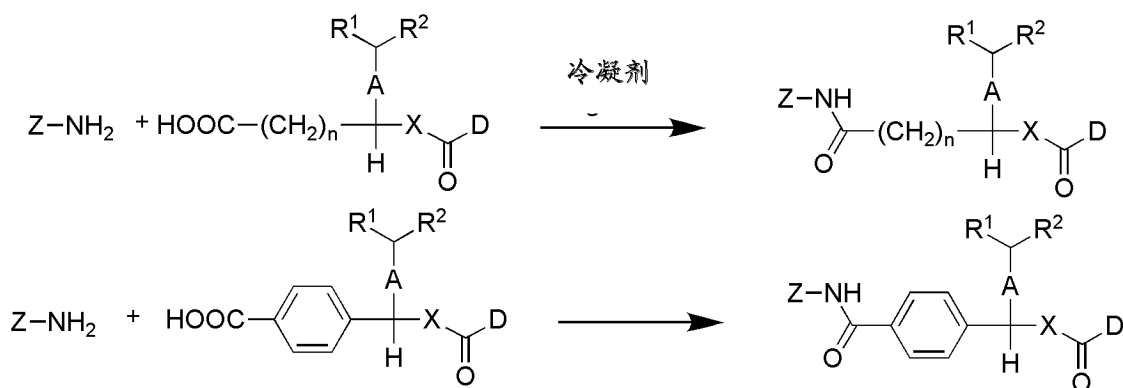


[0403] 其中 Z、X、A、D、R¹ 和 R² 如上述定义。

[0404] 当 R¹² 是 COOH 时, 使用冷凝剂例如碳二亚胺, 通过 R¹³ = 胺将衍生的大分子 Z-R¹³ 耦

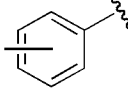
合到式 (1) 或 (2) 的化合物上, 得到 L' = (CH₂)_n-CONH 或 NHCO-:

[0405]



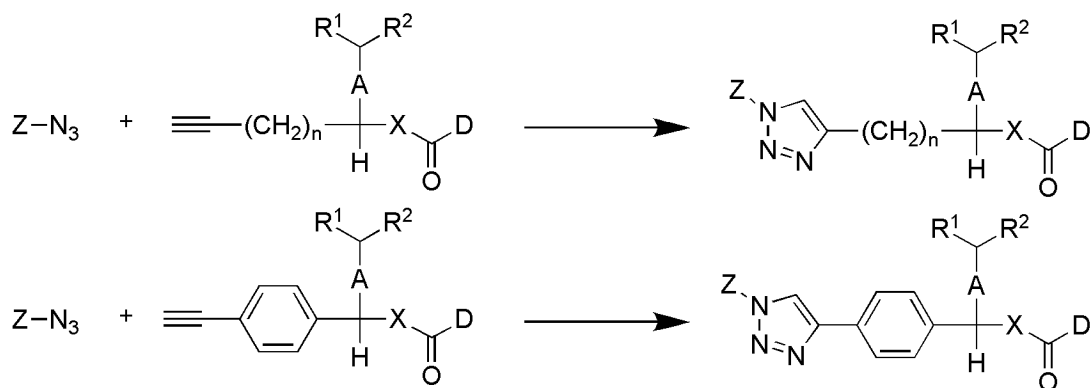
[0406] 其中 Z、X、A、D、R¹ 和 R² 如上述定义。

[0407] 当 R¹² 是 CCH 时, 使用“点击化学”, 通过 R¹³ = N₃ 将衍生的大分子 Z-R¹³ 耦

(1) 或 (2) 的化合物上, 以在 L' = (CH₂)_n-三唑基或  中形成 1,2,3-三唑

键:

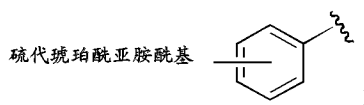
[0408]



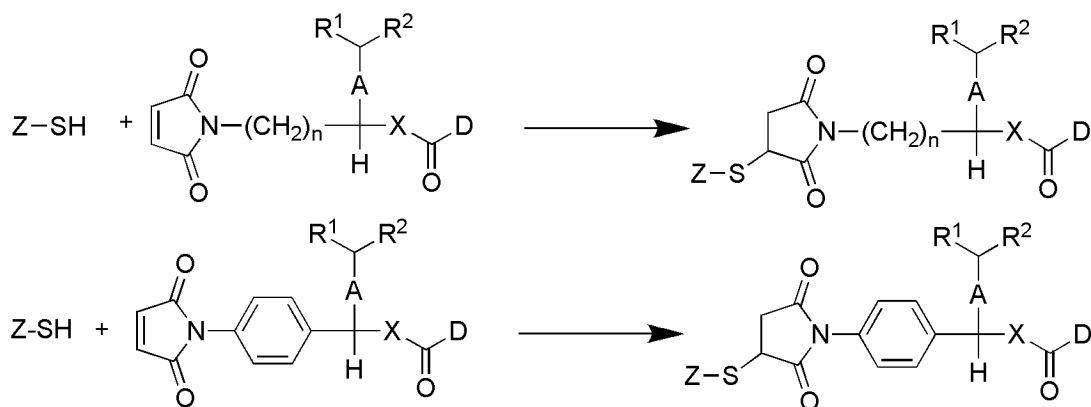
[0409] 其中 Z、X、A、D、R¹ 和 R² 如上述定义。

[0410] 当 R¹² 是马来酰亚胺时,通过 R¹³ = SH 将衍生的大分子 Z-R¹³ 耦合到式 (2) 的化合物上,得到 L' = (CH₂)_n-琥珀酰亚胺酰硫基或

[0411]



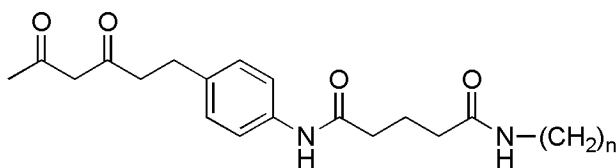
[0412]



[0413] 其中 Z、X、A、D、R¹ 和 R² 如上述定义。

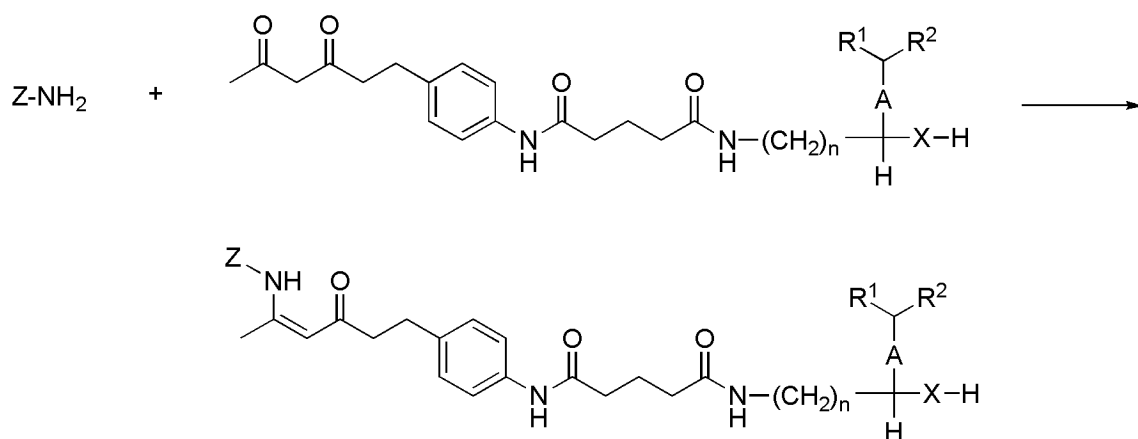
[0414] 在本发明的一个实施方案中,L 是具有下式的基团

[0415]



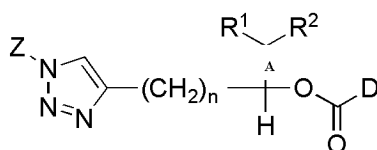
[0416] 其中 n = 1-6, Z 是包含反应性赖氨酸残基的抗体,以使 R¹³ = NH₂。在这个实施方案中,前药与大分子的耦合产生了烯胺-酮(enamino-ketone)键:

[0417]



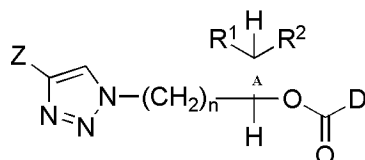
[0418] 在一些实施方案中,式(3)的药物-大分子缀合物具有式:

[0419]



[0420] 或

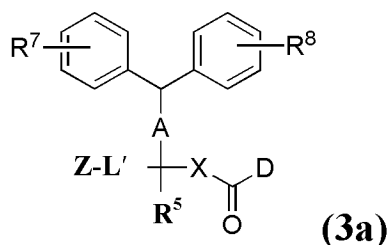
[0421]



[0422] 其中 R^1 、 R^2 、 Z 、 A 和 D 如上述定义, n 是 1-6。

[0423] 在一个实施方案中,式(3)的缀合物具有更具体的式(3a)

[0424]



[0425] 其中

[0426] Z 是大分子的残基;

[0427] D 是药物分子的残基;

[0428] X 是 O 或 S ;

[0429] L' 是连接基团的残基;

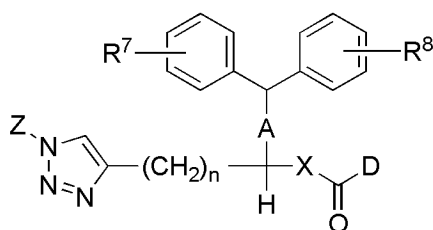
[0430] A 是烯基 (C_2)、芳基或不存在;和

[0431] R^7 和 R^8 各自独立地是 H 、给电子基团或吸电子基团,其中非氢取代基形式的 R^7 和 R^8 可以存在于它们所结合的环的 1-5 个位置上,优选 3 或更少个位置,并且 R^5 是 H 或烷基 (C_{1-6})。

[0432] 在式(3a)的一些实施方案中, Z 和 L' 如上所述,和 / 或 X 是 O ,和 / 或 A 不存在或是烯基 (C_2)。

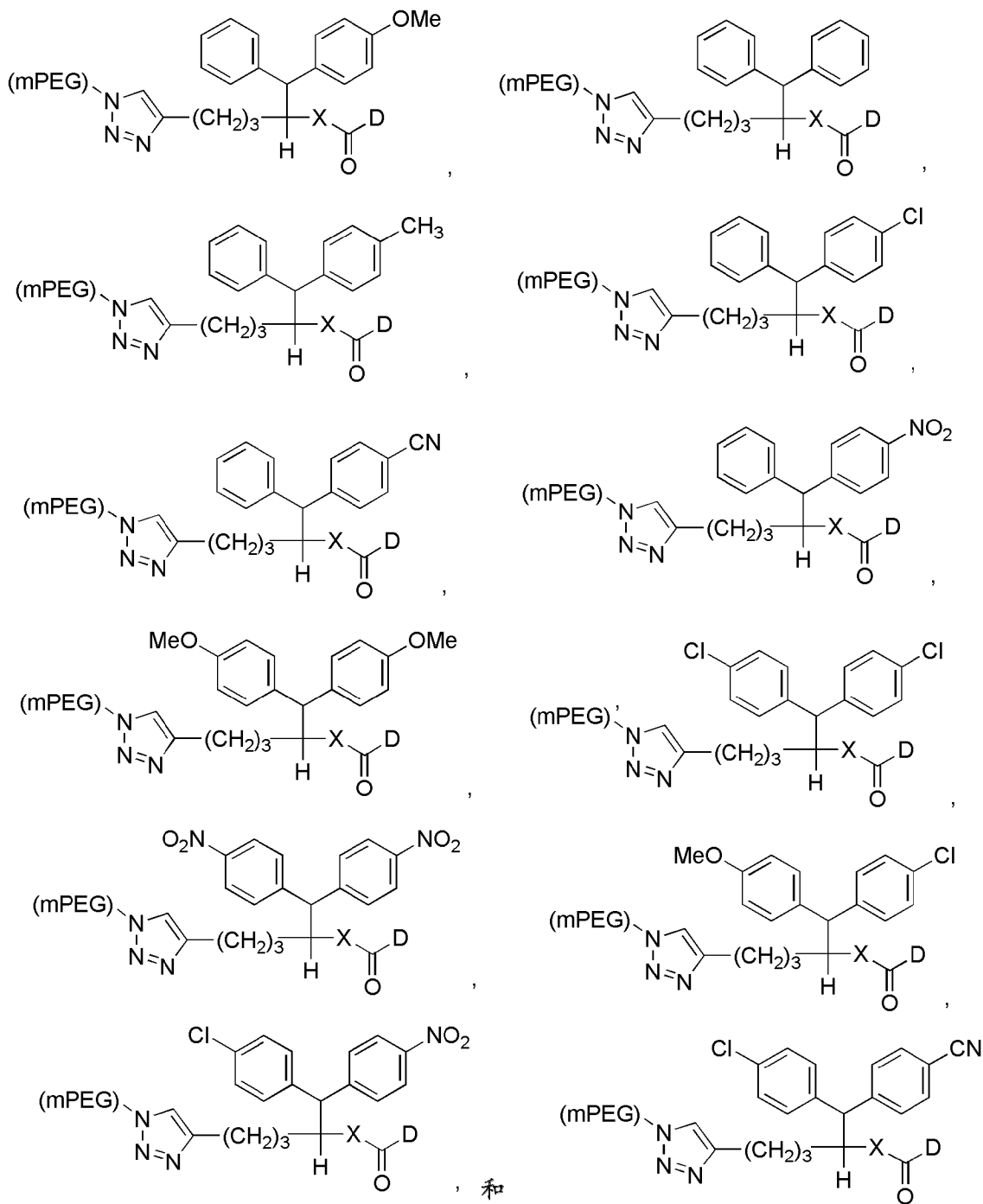
[0433] 式 (3a) 的化合物如下所示：

[0434]



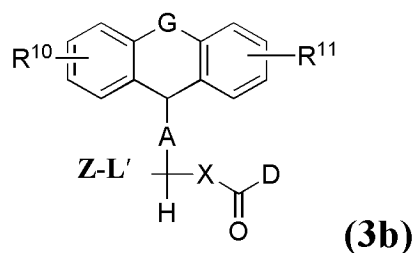
[0435] 其所包括的例子,包括：

[0436]



[0437] 在另一个实施方案中,式(3)的药物-大分子缀合物具有更具体的式(3b)

[0438]



[0439] 其中

[0440] Z 是大分子的残基；

[0441] D 是药物分子的残基；

[0442] X 是 O 或 S；

[0443] L' 是连接基团的残基；

[0444] A 是烯基 (C₂)、芳基或不存在；

[0445] G 是键、C=O、O、S、SO、SO₂、CX₂ 或 CX₂CX₂, 其中各 X 独立地是 H 或 Cl, 和

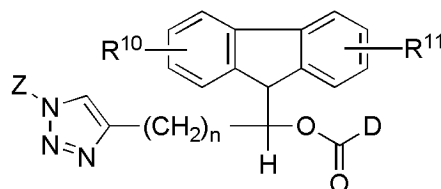
[0446] R¹⁰ 和 R¹¹ 各自独立地是 H、给电子基团或吸电子基团, 其中各 R¹⁰ 和 R¹¹ 可以存在于它们所结合的环的 1-4 个位置上, 优选 2 或更少个位置。

[0447] 在本发明的一些实施方案中,该药物-大分子缀合物具有式(3b),其中 Z 和 L' 如上述例举。

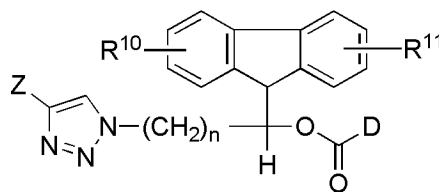
[0448] 在式(3b)中 X 可以是 O, 和 / 或其中 A 不存在或是烯基 (C₂)。

[0449] 在本发明特别的实施方案中,式(3b)的药物-大分子缀合物具有更具体的式：

[0450]

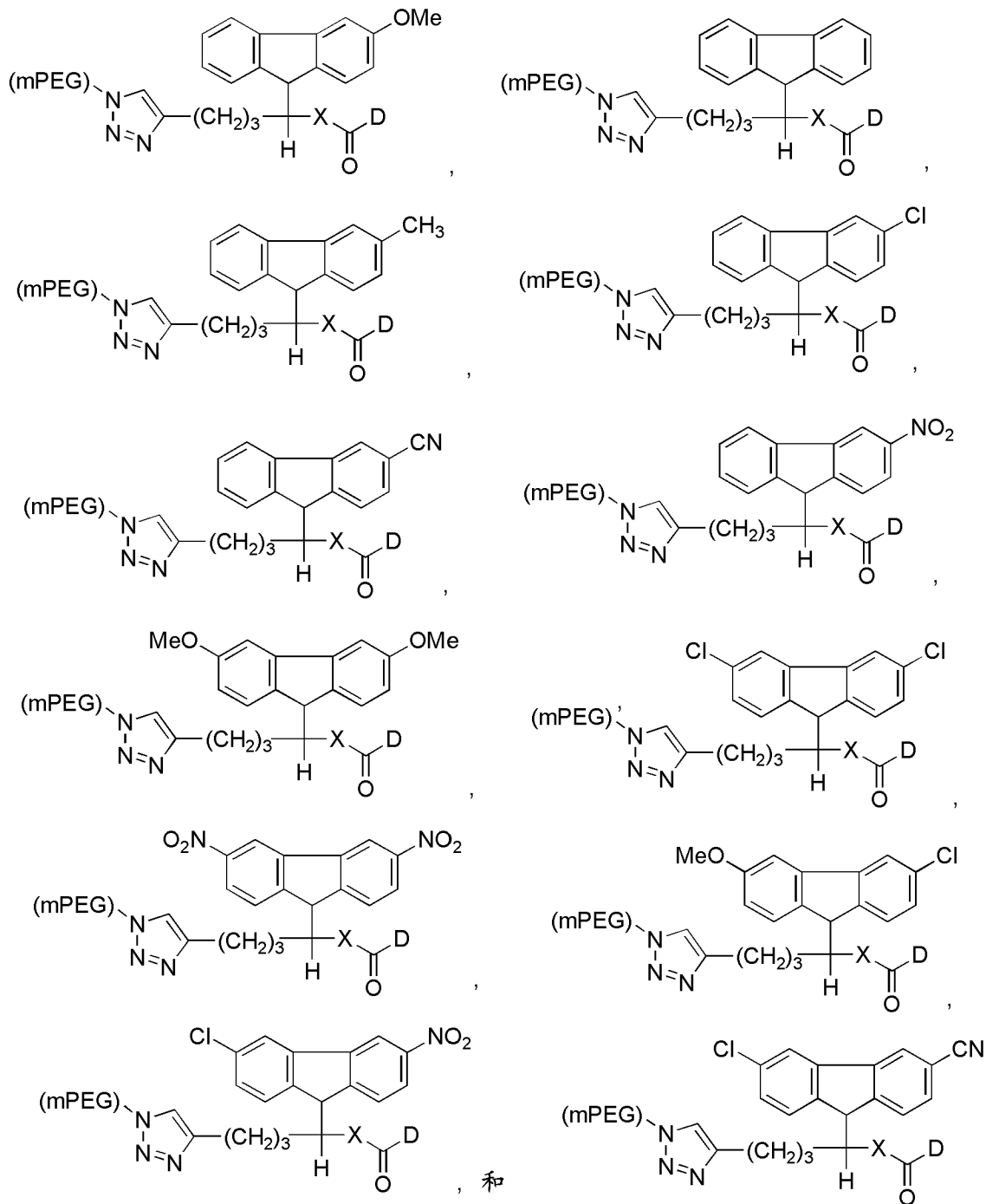


或



[0451] 在本发明的说明性实施方案中,式(3b)的药物-大分子缀合物包括

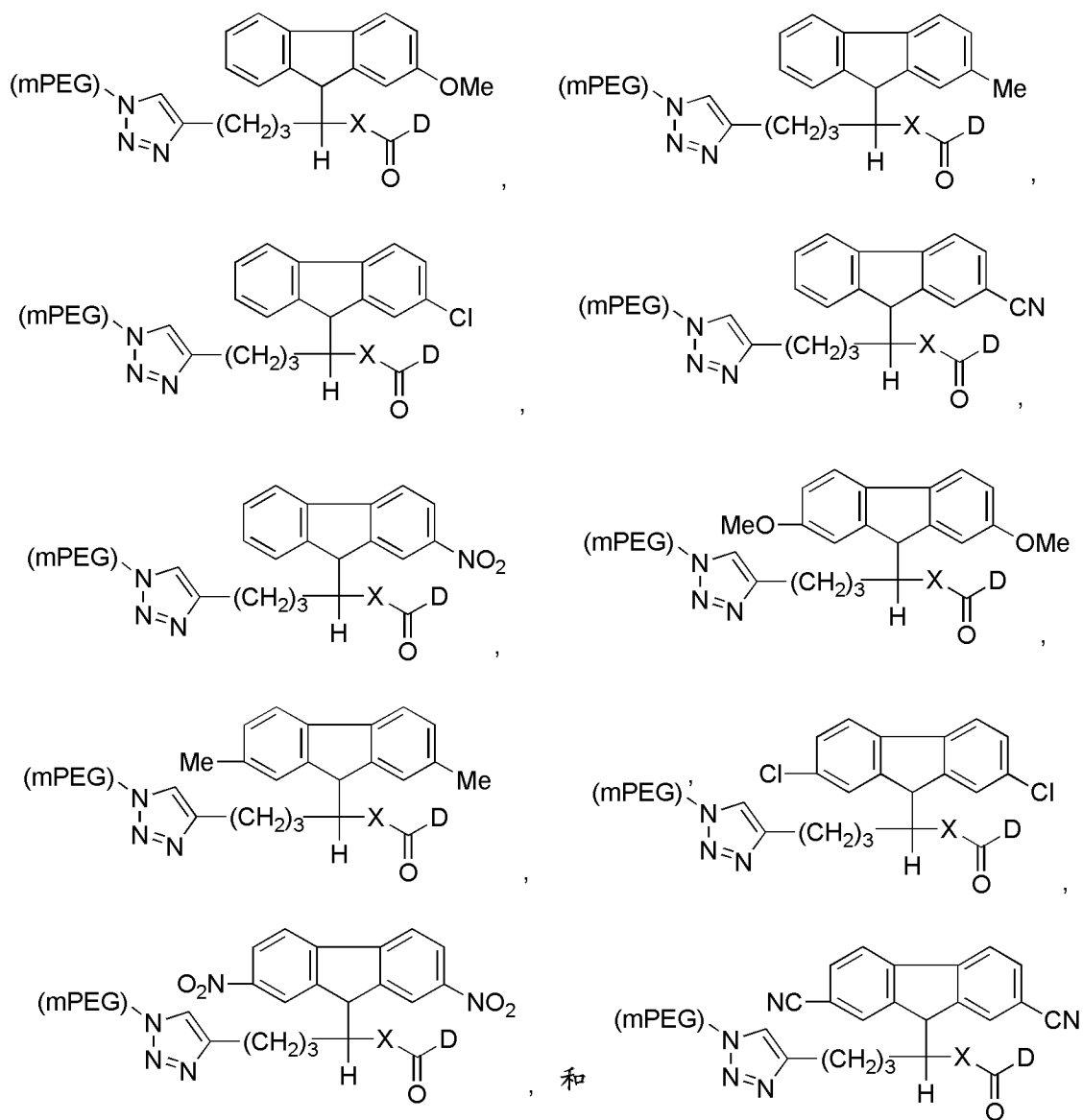
[0452]



,

[0453] 以及

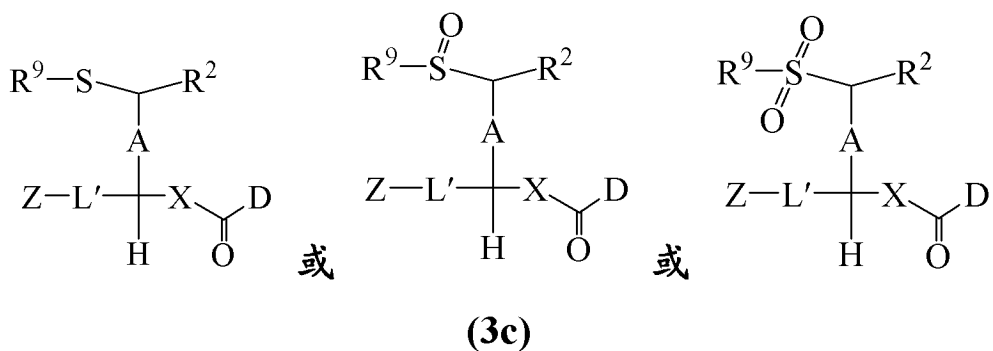
[0454]



•

[0455] 在本发明的另一个实施方案中,式(3)的轭合物具有式(3c)

[0456]



[0457] 其中,如上

[0458] Z是大分子的残基;

[0459] D是药物分子的残基;

[0460] X是O或S;

[0461] L' 是连接基团的残基；

[0462] A 是烯基 (C_2)、芳基或不存在；

[0463] R^2 是 H、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、烯基、炔基、CN、 NO_2 、 COR^3 、 SOR^3 或 SO_2R^3 ；和

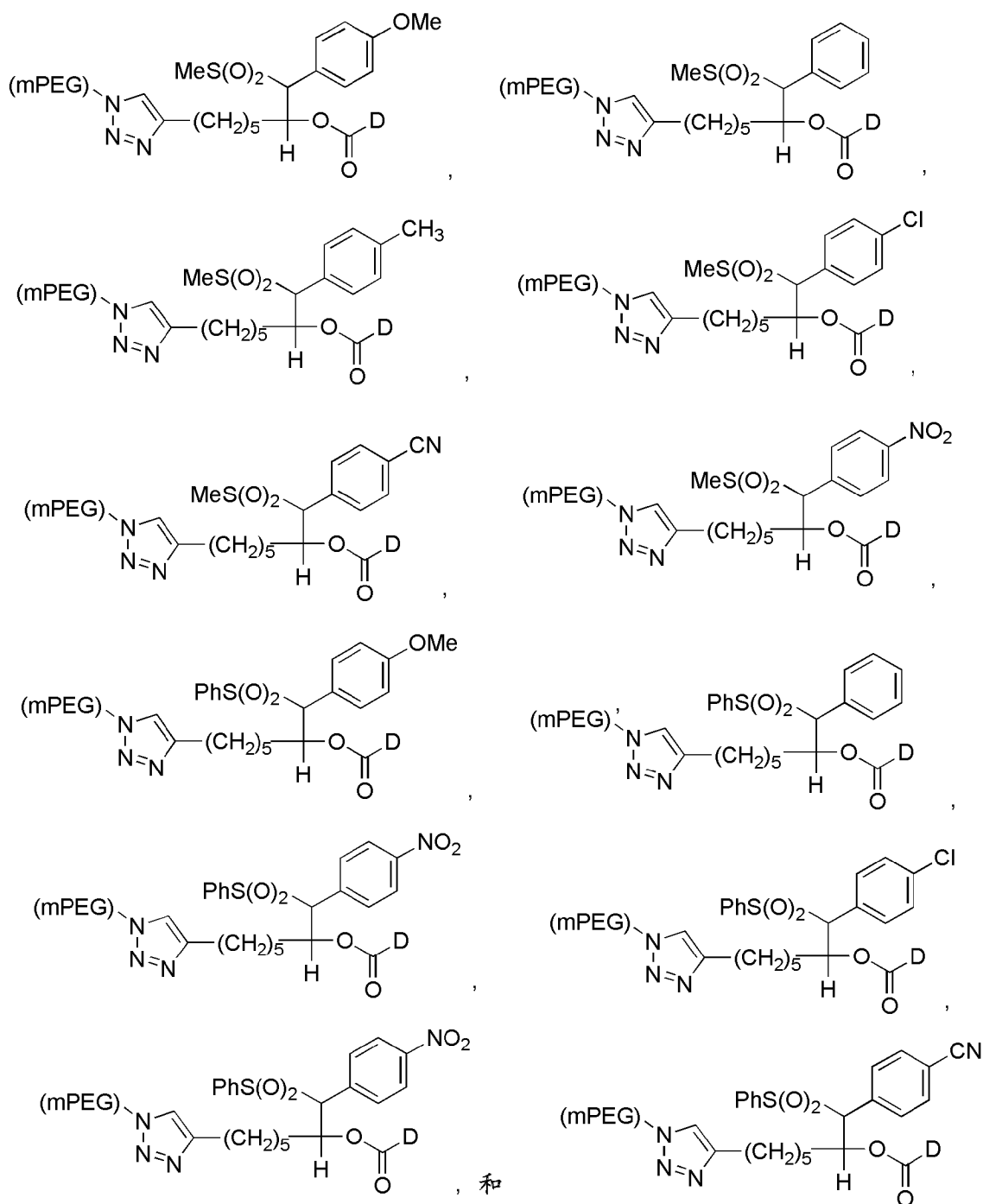
[0464] R^9 是烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、烯基或炔基，其中 R^2 和 R^9 可以连接形成环结构。

[0465] 式 (3c) 的辄合物可以包含如上所示的 Z 和 L' 的实施方案。

[0466] 在式 (3c) 的一些实施方案中， X 是 O，和 / 或 A 不存在或是烯基 (C_2)。

[0467] 式 (3c) 的药物 - 大分子辄合物可以包括

[0468]

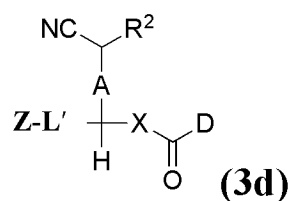


。

[0469] 在示例性的各分子中,非氢取代基可以存在于所示苯环的1-5个位置上,优选3或更少个位置。

[0470] 在另一个实施方案中,式(3)的钆合物具有更具体的式(3d)

[0471]



[0472] 其中

[0473] Z 是大分子的残基；

[0474] D 是药物分子的残基；

[0475] X 是 O 或 S；

[0476] L' 是连接基团的残基；

[0477] A 是烯基 (C₂)、芳基或不存在；和

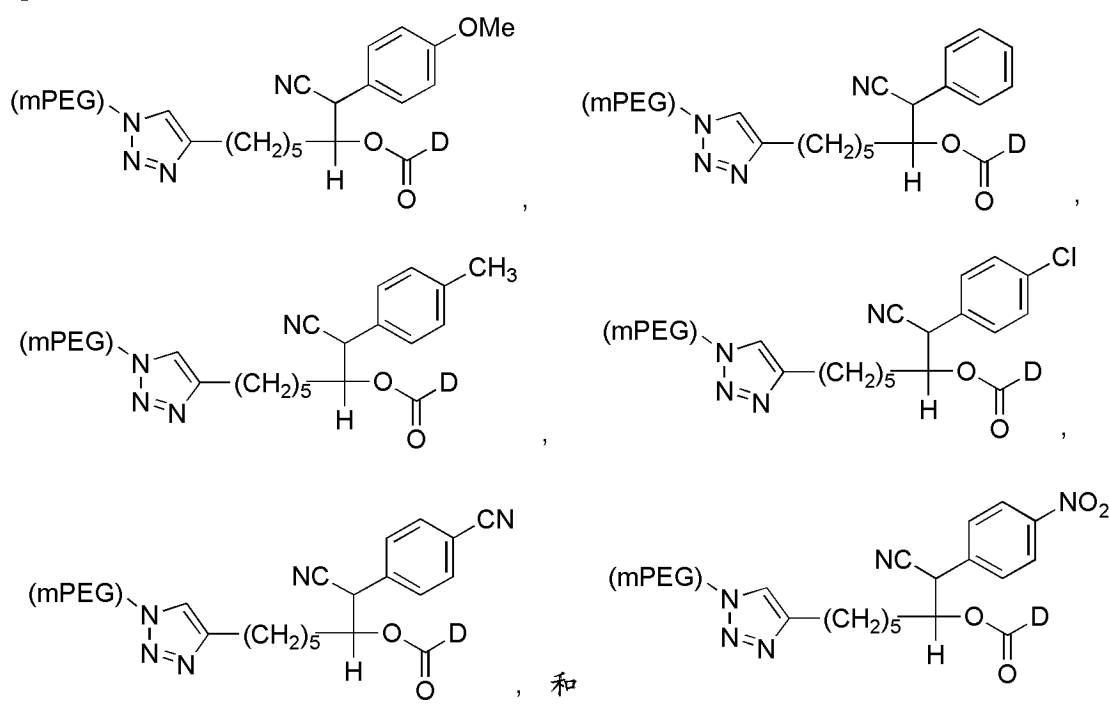
[0478] R² 是 H、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、烯基、炔基、CN、NO₂、COR³、SOR³ 或 SO₂R³。

[0479] 具有式 (3d) 药物 - 大分子缀合物可以包括如上所列的 Z 和 L' 的实施方案。

[0480] 式 (3d) 包括下列实施方案：其中 X 是 O，和 / 或其中 A 不存在或是烯基 (C₂)。

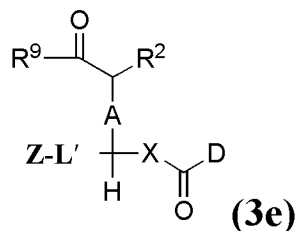
[0481] 在本发明一些特别的实施方案中，式 (3d) 的药物 - 大分子缀合物包括

[0482]



[0483] 在另一个实施方案中，式 (3) 的缀合物具有更具体的式 (3e)

[0484]



[0485] 其中

[0486] Z 是大分子的残基；

[0487] D 是药物分子的残基；

[0488] X 是 O 或 S；

[0489] L' 是连接基团的残基；

[0490] A 是烯基 (C₂)、芳基或不存在；

[0491] R^2 是 H、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、烯基、炔基、CN、 NO_2COR^3 、 SOR^3 或 SO_2R^3 ; 和

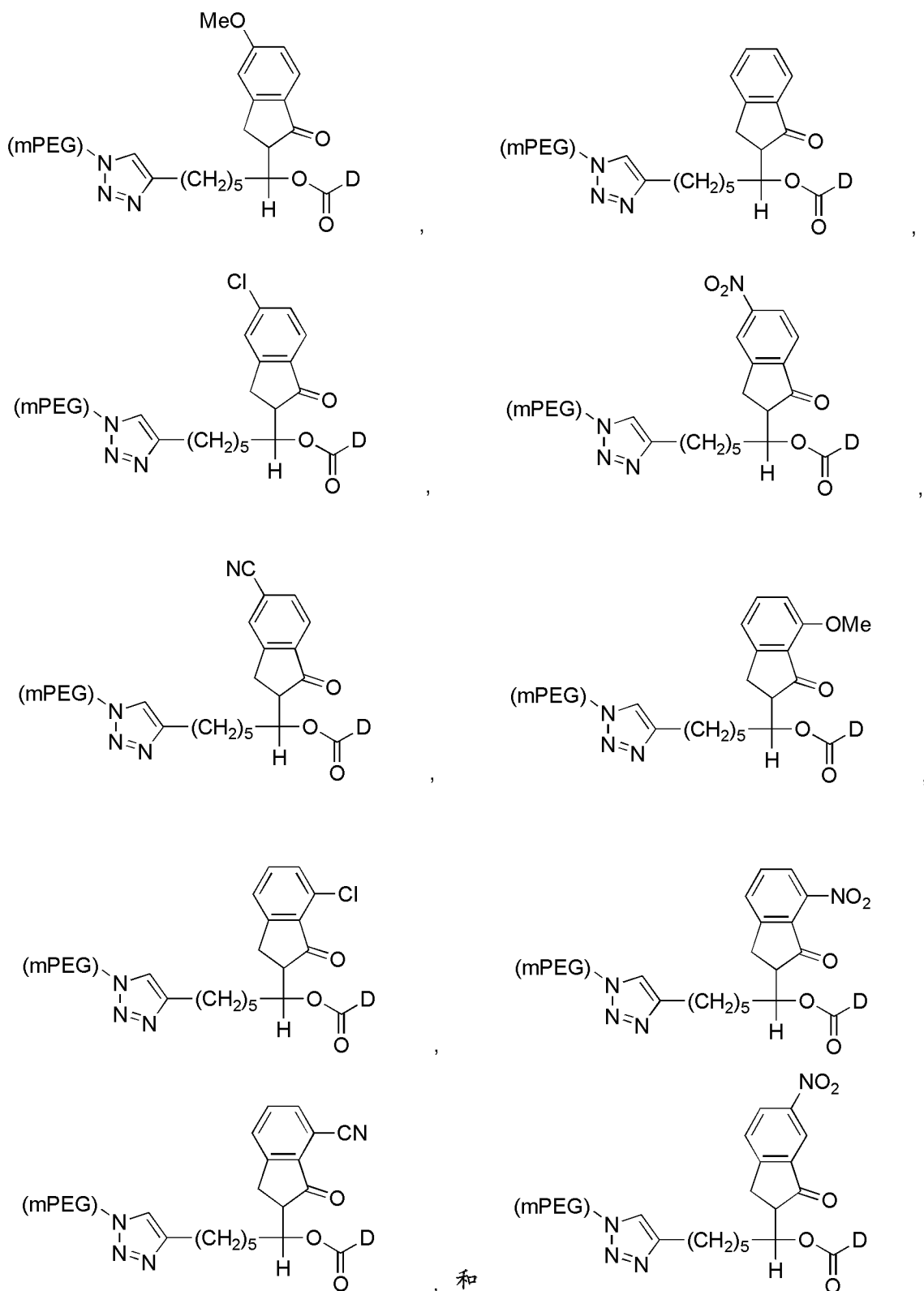
[0492] R^9 是烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、烯基或炔基, 并且其中 R^2 和 R^9 可以连接形成环结构。

[0493] 式 (3e) 的辄合物包含如上所列的 Z 和 L' 的实施方案。

[0494] 在式 (3e) 中 X 可以是 O, 和 / 或 A 不存在或是烯基 (C_2)。

[0495] 在本发明一些特别的实施方案中, 式 (3e) 的药物 - 大分子辄合物包括

[0496]



[0497] 式 (3a)-(3e) 的前述图示还包括下列实施方案:其中式 (3) 中 m 是 2-10, 包括所有之间的整数, 和显示在其多个位置可以被非氢取代基取代的任意环。这些取代基可以相同或不同,

[0498] 药物组合物

[0499] 本发明提供药物和兽医学组合物, 包含式 (2) 或 (3) 的化合物或其药学可接受的盐或其混合物, 和药学可接受的载体。本发明也关注将药物施用于人和动物的任何适当途

径,例如通过常规的注射、植入、口服、眼内、鞘内、直肠或局部施用。这些制剂可以通过本领域已知的常规方法制备,例如如 Remington's Pharmaceutical Science, A. R. Gennaro, ed., 17th edition, 1985, Mack Publishing Company, Easton, Penn., USA 所述。

[0500] 可以用式 (2) 或 (3) 的化合物及其组合物治疗的受试者包括人、兽医学动物、家畜和实验室动物例如小鼠和大鼠。

[0501] 该组合物可以包含混合物,该混合物包含式 (3) 或式 (2) 的两种或多种化合物。在一个实施方案中,该混合物包含式 (2) 或 (3) 的两种或多种化合物,其中式 (2) 或 (3) 的各化合物可以具有相同的药物 D,但是在生理条件下药物释放的速率不同,因此为药物 D 提供了特别的药物释放特征。

[0502] 在另一个实施方案中,该混合物包含式 (2) 或 (3) 的两种或多种化合物,其中式 (2) 或 (3) 的各化合物可以具有不同的药物 D,任选在生理条件下各药物 D 具有不同的药物释放速率,因此提供了特别的联合治疗。因此除了控制单种药物的释放,本发明可以用于控制两种或多种药物的释放速率 – 并由此控制稳态浓度和作用的持续时间。因此,对于两种药物的组合,人们可以优化这两种药物的浓度和持续时间。在一个实施方案中,通过实验确定第一药物 A 的最佳轭合物。这种最佳轭合物的特征在于具有最佳的浓度对时间的特征 (即,最佳的药物浓度和暴露的长度)。一起使用第一药物 A 的最佳轭合物和第二药物 B 的轭合物,药物 B 的各轭合物具有不同的药物释放特征,然后通过实验确定最有效的组合。然后一起使用药物 B 的最佳轭合物和第二药物 A 的多种轭合物进行相反的实验,以证明已确定出最佳混合物。

[0503] 在另一个实施方案中,各药物 A 和 B 制成轭合物,该轭合物具有药物从轭合物中释放的一系列半衰期 (例如:1、2、4 和 8 小时的半衰期)。这些轭合物的组合涵盖了药物 A 和 B 所有可能的变换,然后测定这些组合。

[0504] 在本发明一个特别的实施方案中,将 GLP-1 或其类似物例如 exendin 轭合,形成式 (3) 的第一药物 – 大分子轭合物;将胃泌素轭合,形成式 (3) 的第二药物 – 大分子轭合物。在本发明另一个特别的实施方案中,将胰岛素轭合,形成式 (3) 的第一药物 – 大分子轭合物;将胰岛素 C-肽轭合,形成式 (3) 的第二药物 – 大分子轭合物。

[0505] 通过下文的实施例解释本发明,而非进行限制。

[0506] 实施例 1

[0507] 一般方法,式 (1), A = 不存在, X = 0

[0508] 将 $R^1R^2CH_2$ (1.0 当量) 的四氢呋喃 (THF) 溶液加入到 -78°C 的二异丙氨基锂 (LDA) 或丁基锂 (1.0 当量) 的溶液中。将该混合物缓慢加热至 0°C , 然后冷却至 -78°C , 再加入醛 $L-CHO$ (1.0 当量)。30 分钟后,将该混合物缓慢加热至环境温度,加入 NH_4Cl 饱和水溶液使反应淬灭,用醚萃取。依次用 1N HCl 、 $NaHCO_3$ 饱和水溶液和盐水洗涤萃取液,然后用 $MgSO_4$ 干燥,过滤并蒸发。如果必要,在硅胶上通过色谱纯化产物。

[0509] 实施例 2

[0510] 一般方法,式 (1), A = 不存在, X = S

[0511] 将其中 A 不存在且 X = 0 的式 (1) 的化合物 (1.0 当量) 的 THF 溶液加入到 -78°C 的 1M 双 (三甲硅基氨基) 锂 ($LiHMDS$) (1.0 当量) 的溶液中。15 分钟后,加入对甲苯磺酰氯 (1.0 当量) 的溶液,将该混合物缓慢加热至环境温度,加入 NH_4Cl 饱和水溶液使反应淬

灭,用醚萃取。依次用 1N HCl、NaHCO₃ 饱和水溶液和盐水洗涤萃取液,然后用 MgSO₄ 干燥,过滤并蒸发。将所得粗甲苯磺酸盐溶于异丙醇,并在 50℃ 下与硫代硫酸钠水溶液反应,形成 Bunte 盐,通过用 HCl 水溶液处理使之水解。在硅胶上通过色谱纯化该硫醇产物。

[0512] 实施例 3

[0513] 一般方法,式 (1), A = 烯基 (C₂), X = O, L = 取代的芳基

[0514] 将 R¹R²CH₂ (1.0 当量) 的四氢呋喃 (THF) 溶液加入到 -78℃ 的二异丙氨基锂 (LDA) 或丁基锂 (1.0 当量) 的水溶液中。将该混合物缓慢加热至 0℃, 然后再冷却至 -78℃, 再加入 3-(二甲氨基) 丙烯酸甲酯 (1.0 当量)。将该混合物缓慢加热至环境温度, 加入 1N HCl 使反应淬灭, 用醚萃取。依次用 1N HCl、NaHCO₃ 饱和水溶液和盐水洗涤萃取液, 然后用 MgSO₄ 干燥, 过滤并蒸发。在硅胶上通过色谱纯化产物酯。

[0515] 用过量的氢化锂铝处理该酯 (1.0 当量) 的 THF 溶液, 然后加入草酸使反应淬灭, 用醚萃取。依次用 1N HCl、NaHCO₃ 饱和水溶液和盐水洗涤萃取液, 然后用 MgSO₄ 干燥, 过滤并蒸发。在硅胶上通过色谱纯化产物醇。

[0516] 通过在二氯甲烷溶液中与戴斯-马丁氧化剂 (Dess-Martin periodinane) (1.5 当量) 反应, 将上述醇 (1.0 当量) 氧化成醛。过滤该溶液, 并依次用 1N HCl、NaHCO₃ 饱和水溶液和盐水洗涤萃取液, 然后用 MgSO₄ 干燥, 过滤并蒸发。在硅胶上通过色谱纯化产物醛。

[0517] 如 Organic Letters (2005) 7 : 4153-4155 (通过参考引入本文) 所述, 将上述醛与取代芳基的硼酸反应。在甲苯中将包含醛 (1.0 当量)、芳基硼酸 (2.0 当量)、Cs₂CO₃ (2.0 当量)、Pd₂(dba)₃·CHCl₃ (0.025 当量) 和 Ph₃P (0.05 当量) 的混合物在 80℃ 下加热 24 小时。在冷却至环境温度后, 浓缩该混合物, 在硅胶上通过色谱纯化产物。

[0518] 实施例 4

[0519] 一般方法, 式 (1), A = 烯基 (C₂), X = S, L = 取代的芳基

[0520] 使用实施例 2 的方法, 将实施例 3 的化合物转化为其中 X = S 的相应化合物。

[0521] 实施例 5

[0522] 一般方法, 将其中 X = O 的式 (1) 的化合物活化为 4-硝基苯基碳酸酯

[0523] 将式 (1) 的化合物 (1.0 当量) 的 THF 溶液加入到 -78℃ 的 1.0M LiHMDS (1.0 当量) 的 THF 溶液中。15 分钟后, 加入二 (4-硝基苯基) 碳酸酯 (1.5 当量)。将该混合物缓慢加热至环境温度, 加入 1N HCl 使反应淬灭, 用醚萃取。依次用 1N HCl、水和盐水洗涤萃取液, 然后用 MgSO₄ 干燥, 过滤并蒸发。在硅胶上通过色谱纯化产物 4-硝基苯基碳酸酯。

[0524] 实施例 6

[0525] 一般方法, 通过中间体氯甲酸酯将其中 X = O 的式 (1) 的化合物活

[0526] 化为 N-羟基琥珀酰亚胺酰基碳酸酯

[0527] 在环境温度下, 用三光气 (5 当量) 处理式 (1) 的化合物 (1 当量) 的氯仿溶液 24 小时。蒸发除去溶剂, 得到粗氯甲酸酯。

[0528] 将该氯甲酸酯溶于 THF, 并在环境温度下用 N-羟基琥珀酰亚胺 (4 当量) 和 2,6-二甲基吡啶 (6 当量) 处理。当通过 HPLC 分析判断完成时, 用乙酸乙酯稀释该混合物, 依次用 1N HCl、水和盐水洗涤, 用 MgSO₄ 干燥, 过滤并蒸发。通过 HPLC 色谱纯化产物 N-羟基琥珀酰亚胺酰基碳酸酯 (N-hydroxysuccinimoyl carbonate)。

[0529] 实施例 7

[0530] 一般方法,式(2), $X = O$, $D = \text{肽}$,通过耦合

[0531] 用实施例 5 或实施例 6 的活化化合物(1 当量)的 DMSO 溶液处理肽的缓冲水溶液($\text{pH } 7.5$)。必要时加入 1N NaOH 维持 pH。通过 HPLC 监测反应进程。当判断反应完成时,通过制备型 HPLC 纯化该混合物。

[0532] 实施例 8

[0533] 一般方法,式(2), $X = O$, $D = \text{核酸}$,通过耦合

[0534] 用实施例 5 或实施例 6 的活化化合物(1 当量)的 DMSO 溶液处理核酸的缓冲水溶液($\text{pH } 7.5$)。必要时加入 1N NaOH 维持 pH。通过 HPLC 监测反应进程。当判断反应完成时,通过制备型 HPLC 纯化该混合物

[0535] 实施例 9

[0536] 一般方法,式(2), $X = O$, $D = \text{肽}$,通过合成

[0537] 使用本领域已知的标准条件合成肽,例如使用 FMOC 化学。当与最后的氨基酸结合后,通过在标准条件下处理来除去 FMOC 的末端保护基。然后将结合树脂的肽与过量的实施例 5 或实施例 6 的化合物反应,以覆盖 N-末端。然后将肽去保护,用 TFA/三乙基硅烷从树脂中分离,并通过反相 HPLC 纯化。

[0538] 实施例 10

[0539] 一般方法,式(3), $X = OH$, $D = \text{肽}$, $Z = \text{mPEG}$

[0540] 根据实施例 1 的方法,使用适当的末端为炔基的醛 $\text{HCC}-(\text{CH}_2)_n\text{CHO}$ 来制备式(1)的化合物,其中 $X = O$,A 不存在且 $L = \text{HCC}-(\text{CH}_2)_n$,其中 $n = 0-6$ 。根据实施例 5 或实施例 6 的方法活化该化合物,并根据实施例 7 或实施例 9 的方法将其与肽 D 偶合,得到式(2)的化合物,其中 $X = O$, $D = \text{肽}$ 且 $L = \text{HCC}-(\text{CH}_2)_n$ 。

[0541] 可替代地,根据实施例 1 的方法,使用适当的炔基苯甲醛来制备式(1)的化合物,其中 $X = O$,A 不存在且 $L = \text{乙炔基苯基}$ 。根据实施例 5 或实施例 6 的方法活化该化合物,并根据实施例 7 或实施例 9 的方法将其与肽 D 偶合,得到式(2)的化合物,其中 $X = O$, $D = \text{肽}$ 且 $L = \text{炔基苯基}$ 。

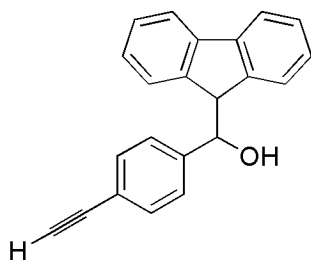
[0542] 用 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.1 当量)和抗坏血酸钠(0.5 当量)水溶液处理 mPEG-N_3 (1 当量)和上述炔基式(2)的化合物(1 当量)的 THF 溶液,在环境温度下搅拌 24 小时。低压冻干该混合物,然后通过制备型反相 HPLC 纯化。

[0543] 实施例 11

[0544] (4-乙炔基苯基)(9H-芴-9-基)甲醇

[0545] 式(1):A = 不存在; $X = O$; $R^1R^2\text{CH} = 9\text{-芴基}$; $L = 4\text{-乙炔基苯基}$

[0546]



[0547] 将芴(1.0 当量)的四氢呋喃(THF)溶液加入到 -78°C 的二异丙氨基锂(LDA)(1.0 当量)溶液中。将该混合物缓慢加热至 0°C ,然后再冷却至 -78°C ,再加入 4-乙炔基-苯甲

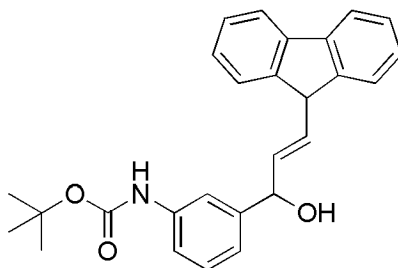
醛 (1.0 当量)。30 分钟后,将该混合物缓慢加热至环境温度,加入 NH_4Cl 饱和水溶液使反应淬灭,用醚萃取。依次用 1N HCl 、 NaHCO_3 饱和水溶液和盐水洗涤萃取液,然后用 MgSO_4 干燥,过滤并蒸发。在硅胶上通过色谱纯化产物。

[0548] 实施例 12

[0549] 1-(3-(叔丁氧基羰基氨基)苯基)-3-(9H-芴-9-基)烯丙醇

[0550] 式 (1): $\text{A} = \text{CH} = \text{CH}$; $\text{X} = \text{O}$; $\text{R}^1\text{R}^2\text{CH} = 9\text{-芴基}$; $\text{L} = 3\text{-(N-BOC-氨基)苯基}$

[0551]



[0552] 将芴 (1.0 当量) 的四氢呋喃 (THF) 溶液加入到 -78°C 的二异丙氨基锂 (LDA) (1.0 当量) 溶液中。将该混合物缓慢加热至 0°C , 然后再冷却至 -78°C , 再加入 3-(二甲氨基)丙烯酸甲酯 (1.0 当量)。将该混合物缓慢加热至环境温度, 加入 1N HCl 使反应淬灭, 用醚萃取。依次用 1N HCl 、 NaHCO_3 饱和水溶液和盐水洗涤萃取液, 然后用 MgSO_4 干燥, 过滤并蒸发。在硅胶上通过色谱纯化产物酯。

[0553] 用过量的氢化锂铝处理该酯 (1.0 当量) 的 THF 溶液, 然后加入草酸使反应淬灭, 用醚萃取。依次用 1N HCl 、 NaHCO_3 饱和水溶液和盐水洗涤萃取液, 然后用 MgSO_4 干燥, 过滤并蒸发。在硅胶上通过色谱纯化产物醇。

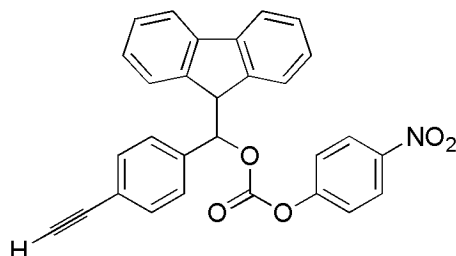
[0554] 通过在二氯甲烷溶液中与戴斯-马丁氧化剂 (1.5 当量) 反应, 将上述醇 (1.0 当量) 氧化成醛。过滤该溶液, 并依次用 1N HCl 、 NaHCO_3 饱和水溶液和盐水洗涤, 然后用 MgSO_4 干燥, 过滤并蒸发。在硅胶上通过色谱纯化产物醛。

[0555] 在甲苯中将包含上述醛 (1.0 当量)、3-(N-BOC-氨基)苯基硼酸 (2.0 当量)、 Cs_2CO_3 (2.0 当量)、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3 \cdot \text{CHCl}_3$ (0.025 当量) 和 Ph_3P (0.05 当量) 的混合物在 80°C 下加热 24 小时。在冷却至环境温度后, 浓缩该混合物, 在硅胶上通过色谱纯化产物。

[0556] 实施例 13

[0557] (4-乙炔基苯基)(9H-芴-9-基)甲基 4-硝基苯基碳酸酯

[0558]



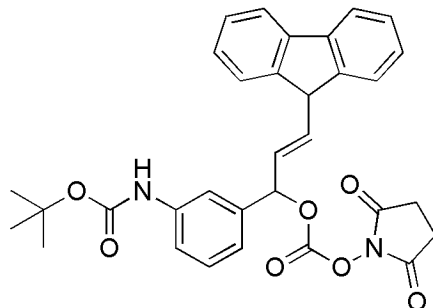
[0559] 将 (4-乙炔基苯基)(9H-芴-9-基)甲醇 (1.0 当量) 的 THF 溶液加入到 -78°C 的 1.0M LiHMDS (1.0 当量) 的 THF 溶液中。15 分钟后, 加入二 (4-硝基苯基) 碳酸酯 (1.5 当量) 的溶液。将该混合物缓慢加热至环境温度, 加入 1N HCl 使反应淬灭, 用醚萃取。依次用 1N HCl 、水和盐水洗涤萃取液, 然后用 MgSO_4 干燥, 过滤并蒸发。在硅胶上通过色谱纯

化产物 4-硝基苯基碳酸酯。

[0560] 实施例 14

[0561] 1-(3-(叔丁氧基羰基氨基)苯基)-3-(9H-芴-9-基)烯丙基 N-羟基琥珀酰亚胺酰基碳酸酯

[0562]



[0563] 在环境温度下,用三光气(5当量)和吡啶(2当量)将1-(3-(叔丁氧基羰基氨基)苯基)-3-(9H-芴-9-基)烯丙醇(1当量)的氯仿溶液处理24小时。蒸发除去溶剂,得到粗氯甲酸酯。

[0564] 将该氯甲酸酯溶于THF,并在环境温度下用N-羟基琥珀酰亚胺(4当量)和2,6-二甲基吡啶(6当量)处理。当通过HPLC分析判断完成时,用乙酸乙酯稀释该混合物,并依次用1N HCl、水和盐水洗涤,然后用MgSO₄干燥,过滤并蒸发。通过HPLC色谱纯化产物N-羟基琥珀酰亚胺酰基碳酸酯。

[0565] 实施例 15

[0566] [(4-乙炔基苯基)(9H-芴-9-基)甲氧基羰基]-衍生的 exendin-4

[0567] 用实施例 13 的活化化合物(1当量)的DMSO溶液处理 exendin-4(HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS)的缓冲水溶液(pH 7.5)。必要时加入1N NaOH维持pH。通过HPLC监测反应进程。当判断反应完成时,通过制备型HPLC纯化该混合物。

[0568] 实施例 16

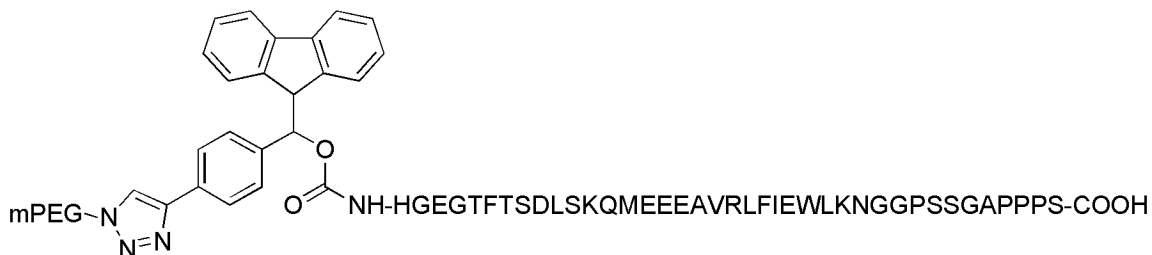
[0569] N-[(4-乙炔基苯基)(9H-芴-9-基)甲氧基羰基]-exendin-4

[0570] 使用标准Fmoc化学合成 exendin-4(HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWL KNGG PSSGAPPPS)的肽序列。当与最后的组氨酸氨基酸偶合后,通过在标准条件下处理来除去Fmoc的末端保护基。然后将结合树脂的肽与过量的实施例 13 的化合物反应,以覆盖N-末端。然后将肽去保护,用TFA/三乙基硅烷从树脂中分离,并用标准方法通过反相HPLC纯化。

[0571] 实施例 17

[0572] N-[(4-(mPEG-三唑基)苯基)(9H-芴-9-基)甲氧基羰基]-exendin-4

[0573]



[0574] 用 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.1 当量) 和抗坏血酸钠 (0.5 当量) 水溶液处理 mPEG- N_3 (1 当量) 和实施例 16 的炔基化合物 (1 当量) 的 THF 溶液, 在环境温度下搅拌 24 小时。干燥该混合物, 然后通过制备型反相 HPLC 纯化。

[0575] 实施例 18

[0576] 1-(3-(叔丁氧基羰基氨基)苯基)-3-(9H-芴-9-基)烯丙氧基羰基-衍生的 exendin-4

[0577] 用实施例 14 的活化化合物 (1 当量) 的 DMSO 溶液处理 exendin-4 (HGEGTFTSDLSK QMEEEAVRLFIEWLKNGGPSS-GAPPPS) 的缓冲水溶液 (pH 7.5)。必要时加入 1N NaOH 维持 pH。通过 HPLC 监测反应进程。当判断反应完成时, 通过制备型 HPLC 纯化该混合物。

[0578] 实施例 19

[0579] N-[1-(3-(叔丁氧基羰基氨基)苯基)-3-(9H-芴-9-基)烯丙氧基羰基]-exendin-4

[0580]



[0581] 使用标准 Fmoc 化学合成 exendin-4 (HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS) 的肽序列。当与最后的组氨酸氨基酸偶合后, 通过在标准条件下处理来除去 Fmoc 的末端保护基。然后将结合树脂的肽与过量的实施例 14 的化合物反应, 以覆盖 N-末端。然后将肽去保护, 用 TFA/三乙基硅烷从树脂中分离, 并用标准方法通过反相 HPLC 纯化。

[0582] 实施例 20

[0583] N-[1-(3-(mPEG-羧氨基)苯基)-3-(9H-芴-9-基)烯丙氧基羰基]-exendin-4

[0584]



[0585] 将实施例 19 的化合物溶于 TFA/三乙基硅烷, 以除去叔丁氧基羰基, 然后蒸发至干燥。将所得化合物溶于乙腈, 并在 pH 6 缓冲液存在下与 mPEG-羧酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯反应。将该混合物在环境温度下搅拌过夜, 然后干燥。通过反相 HPLC 纯化产物。

[0586] 实施例 21

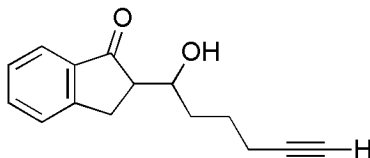
[0587] 5-己炔醛 (hexynal)

[0588] 在氮气大气下, 将 5-己炔-1-醇 (3mL, 27.5mmol, 1.0 当量) 加入到在 CH_2Cl_2 (50mL) 中的乙酸钠 (4.5g, 27.4mmol, 2.0 当量) 和 MgSO_4 (1.48g) 的 0℃ 混合物中, 然后加入科里试

剂 (PCC) (11.85g, 27.5mmol, 2.0 当量)。反应混合物在室温下搅拌 3 小时, 加入乙醚 (Et_2O) (20mL)。通过硅胶的短盒过滤所得混合物, 用 40mL 的 Et_2O / 石油醚 (1 : 1) 洗涤残渣。浓缩澄清的滤液至其原体积的一半, 然后用分子筛干燥, 贮存于冰箱中用于下一步。

[0589] 实施例 22

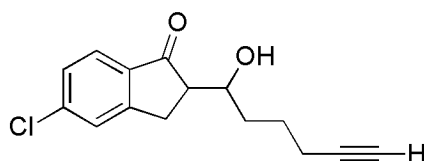
[0590]



[0591] 在 N_2 的保护下, 将正丁基锂 (2.7mL, 7.8mmol) 加入到 55℃ 的 N, N-二异丙胺 (1.1mL, 7.8mmol) 的 20mL 无水四氢呋喃 (THF) 溶液中。将该反应混合物搅拌 15 分钟, 并冷却至 -78℃。通过插管将茚满酮 (0.95g, 7.2mmol) 的 THF (10mL) 溶液加入到上述混合物中。在相同温度下搅拌 30 分钟后, 将 5-己炔醛的溶液加入到烧瓶中并搅拌 3 小时。加入 NaHSO_4 (1g, 在 10mL 水中) 使反应淬灭, 将反应混合物加热至室温。用乙酸乙酯 (EtOAc) (15mL $\times$ 2) 萃取水层, 用 MgSO_4 干燥合并的有机溶液并减压浓缩。在硅胶上通过快速色谱法纯化残渣, 得到呈红色固体状的产物 (0.52g, 收率 38.3%)。

[0592] 实施例 23

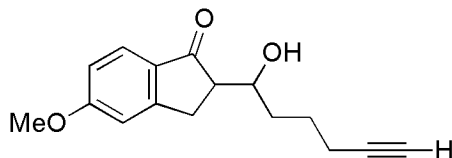
[0593]



[0594] 在氮气大气下, 将正丁基锂 (2.5M, 在己烷中, 1.0mL, 3.0mmol) 加入到 0℃ 的 N, N-二异丙胺 (0.42mL, 3.0mmol) 的无水四氢呋喃 (THF) (6mL) 溶液中。将所得混合物在相同温度下搅拌 15 分钟, 然后冷却至 -78℃。加入 5-氯-2,3-二氢茚-1-酮 (0.5g, 3.0mmol) 的 THF (3mL) 溶液。在 -78℃ 下搅拌 30 分钟后, 加入 5-己炔醛的溶液。然后将该反应混合物在 -78℃ 下搅拌 2 小时, 加入 NH_4Cl 饱和水溶液使反应淬灭, 并加热至室温。用乙酸乙酯 (EtOAc) 萃取水相, 用盐水洗涤合并的有机溶液, 用无水 MgSO_4 干燥, 过滤并减压浓缩。在硅胶上通过柱色谱纯化残渣, 得到呈淡黄色固体状的所需产物 (0.29g, 收率 41.3%)。

[0595] 实施例 24

[0596]

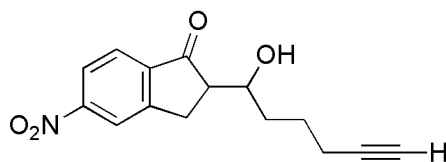


[0597] 在氮气保护下, 将正丁基锂 (2.5M, 在己烷中, 2.7mL, 7.8mmol) 加入到 0℃ 的 N, N-二异丙胺 (1.1mL, 7.8mmol) 的无水 THF (20mL) 溶液中。将所得混合物搅拌 15 分钟, 然后冷却至 -78℃。通过插管向上述混合物中加入 5-甲氧基-2,3-二氢茚-1-酮 (1.17g, 7.2mmol) 的 THF (10mL) 溶液。在相同温度下搅拌 30 分钟后, 将 5-己炔醛 (约 6mmol) 的溶液加入到该烧瓶中, 将该反应混合物在 -78℃ 下搅拌 3 小时。加入 NH_4Cl 的饱和溶液 (10mL) 使反应淬灭, 然后加热至室温。用 EtOAc (15mL $\times$ 2) 萃取该混合物, 用无水 MgSO_4 干燥合并

的有机溶液,并减压浓缩。在硅胶上通过快速色谱法纯化残渣,得到呈白色固体状的产物(0.58g,收率 31.2%)。

[0598] 实施例 25

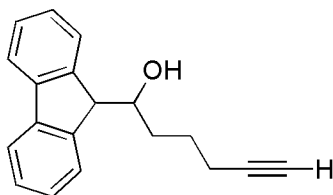
[0599]



[0600] 在氮气保护下,将正丁基锂(2.5M,在己烷中,0.39mL,1.13mmol)加入到 0℃的 N,N-二异丙胺(0.17mL,1.13mmol)的无水 THF(4mL)溶液中。将反应混合物在 0℃下搅拌 20 分钟,冷却至 -78℃,通过针头加入 5-硝基-2,3-二氢茚-1-酮(0.2g,1.13mmol)的 THF(4mL)溶液。在相同温度下搅拌 30 分钟后,加入 5-己炔醛(约 1mmol)的溶液,然后在 -78℃下搅拌 3 小时。加入 NaHSO₄(0.24g,在 5mL 的水中)使反应淬灭,然后加热至室温。用 EtOAc(15mL×2)萃取水层,用无水 MgSO₄干燥合并的有机溶液,过滤,浓缩。在硅胶上通过柱色谱纯化残渣,得到呈淡黄色固体状的产物(0.117g 收率 38%)。

[0601] 实施例 26

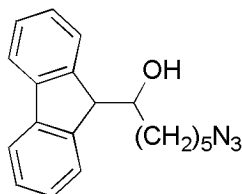
[0602]



[0603] 在氮气保护下,将正丁基锂(2.5M,在己烷中,0.47mL,1.35mmol)加入到 -78℃的茚(0.24g,1.48mmol)的无水 THF(2mL)溶液中,将反应混合物在相同温度下搅拌 2.5 小时。加入 5-己炔醛的溶液,然后在 -78℃下搅拌 3 小时。加入 NH₄Cl 饱和水溶液使反应淬灭,并加热至室温。用 EtOAc 萃取该混合物,然后用盐水洗涤合并的有机相,用无水 MgSO₄干燥,过滤,并减压浓缩。在硅胶上通过柱色谱纯化粗产物,得到呈淡黄色固体状的所需产物(0.040g,收率 11.9%)。

[0604] 实施例 27

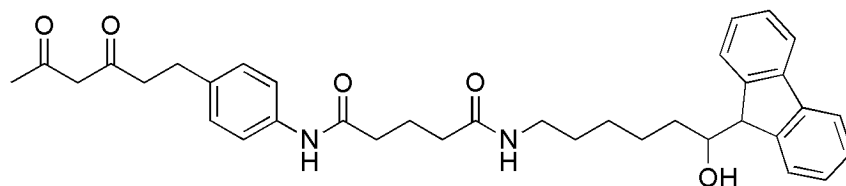
[0605]



[0606] 在氮气保护下,将正丁基锂(2.5M,在己烷中,0.47mL,1.35mmol)加入到 -78℃的茚(0.24g,1.48mmol)的无水 THF(2mL)溶液中,将反应混合物在相同温度下搅拌 2.5 小时。加入 6-叠氮己醛的溶液,然后在 -78℃下搅拌 3 小时。加入 NH₄Cl 饱和水溶液使反应淬灭,并加热至室温。用 EtOAc 萃取该混合物,然后用盐水洗涤合并的有机相,用无水 MgSO₄干燥,过滤,并减压浓缩。在硅胶上通过柱色谱纯化粗产物,得到所需产物。

[0607] 实施例 28

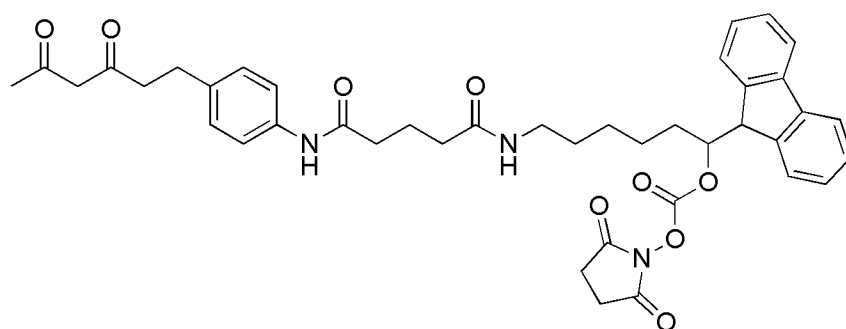
[0608]



[0609] 在环境温度下,用三甲基磷(10 当量)将 9-(6-叠氮-1-羟基己基)芴(1 当量)的 9 : 1 的二甲基甲酰胺 / 水溶液处理 1 小时。向所得溶液中加入 4-[4-(3,5-二氧代-己基)-苯基氨基甲酰基]-丁酸(1 当量)和二甲氨基丙基-乙基-碳二亚胺(EDCI)(5 当量)。在搅拌过夜后,用乙酸乙酯稀释该混合物,并依次用水、1N HCl、饱和 NaHCO₃ 水溶液和盐水洗涤,然后用 MgSO₄ 干燥,过滤并蒸发。在硅胶上通过色谱分离产物。

[0610] 实施例 29

[0611]

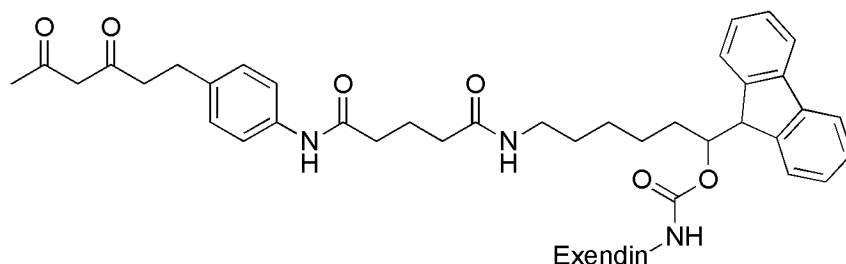


[0612] 在环境温度下,用三光气(5 当量)处理实施例 28 的化合物(1 当量)的氯仿溶液 24 小时。蒸发除去溶剂,得到粗氯甲酸酯。

[0613] 将该氯甲酸酯溶于 THF,并在环境温度下用 N-羟基琥珀酰亚胺(4 当量)和 2,6-二甲基吡啶(6 当量)处理。当通过 HPLC 分析判断完成时,用乙酸乙酯稀释该混合物,依次用 1N HCl、水和盐水洗涤,用 MgSO₄ 干燥,过滤并蒸发。通过 HPLC 色谱纯化产物 N-羟基琥珀酰亚胺酰基碳酸酯。

[0614] 实施例 30

[0615]



[0616] 用实施例 29 的活化化合物(1 当量)的 DMSO 溶液处理 exendin-4(HGEGTFTSDL SKQMEEEA VR LFIEWLKN GG PSSGAPPPS)的缓冲水溶液(pH 7.5)。必要时加入 1N NaOH 维持 pH。通过 HPLC 监测反应进程。当判断反应完成时,通过制备型 HPLC 纯化该混合物。

[0617] 实施例 31

[0618] 抗体-Exendin 轭合物的形成

[0619] 将(例如, h38C2IgG1 或 b12IgG1;参见美国专利公开 2006/0205670A1)加入到实施例 30 的化合物的溶液中,至最终浓度为 25nM 抗体结合位点和 125nM(2)。将该混合物在

室温下培养 10 分钟。通过在 318nm 处 UV 吸收的形成来确定轭合物的形成。

[0620] 实施例 32

[0621] 轭合物混合物的用途

[0622] 除了控制单个药物的释放,本发明的技术可以用于控制两种或多种药物的释放速率,并由此控制它们的稳态浓度和活性持续时间。因此,对于两种药物的组合,人们可以优化这两种药物的浓度和持续时间。在一个实施方案中,通过实验确定第一药物 A 的最佳药物-大分子轭合物。这种最佳药物-大分子轭合物的特征在于具有最佳的浓度对时间的特征(即,最佳的药物浓度和暴露的长度)。一起使用第一药物 A 的最佳药物-大分子轭合物和第二药物 B 的多种药物-大分子轭合物,药物 B 的各轭合物具有不同的药物释放特征,然后通过实验确定最有效的组合。然后一起使用药物 B 的最佳轭合物和第二药物 A 的多种药物-大分子轭合物进行相反的实验,以证明已确定出最佳混合物。

[0623] 在本发明的另一个实施方案中,各药物 A 和 B 制成轭合物,该轭合物具有药物从药物-大分子轭合物中释放的一系列半衰期(例如:1、2、4 和 8 小时的半衰期)。这些轭合物的组合涵盖了药物 A 和 B 所有可能的变换,然后测定这些组合(表 1)。

[0624] 表 1:测定药物组合轭合物的示例性变换,以确定最佳组合。第一药物 A 从轭合物中释放的半衰期 = w、x、y 和 z 小时。第二药物 B 从轭合物中释放的半衰期 = a、b、c 和 d 小时

[0625]

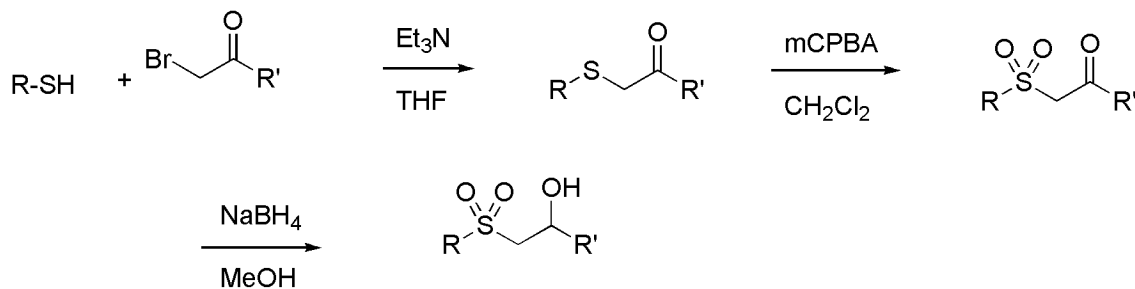
B 轭合物的 T1/2	A-轭合物的 T1/2			
	w	x	y	z
a	w、a	x、a	y、a	z、a
b	w、b	x、b	y、b	z、b
c	w、c	x、c	y、c	z、c
d	w、d	x、d	y、d	z、d

[0626] 实施例 33

[0627] 制备砜连接子的一般方法

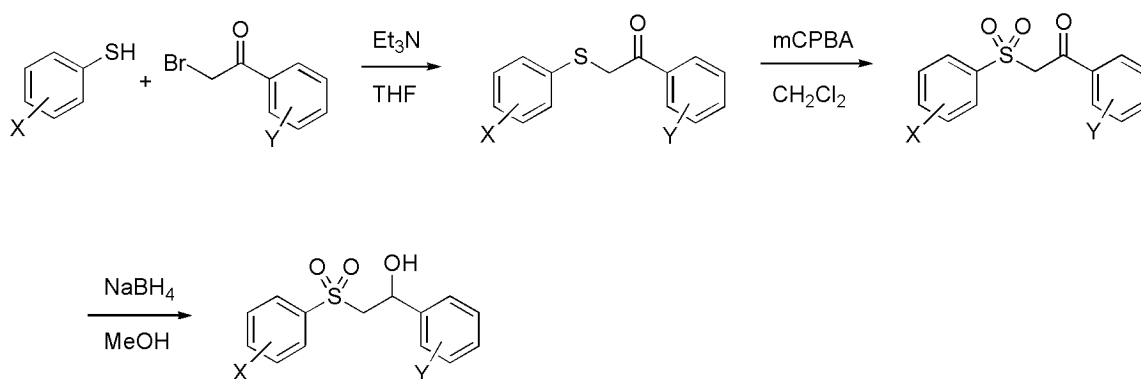
[0628] 制备砜连接子,一般包括首先将适当的硫醇与溴代酮反应,产生 β -酮硫化物,然后将其氧化成 β -酮砜;然后还原羰基,得到 β -羟基砜。

[0629]



[0630] 在一个例子中,通过如下的苯硫酚和溴-苯乙酮的反应来说明这一点。

[0631]



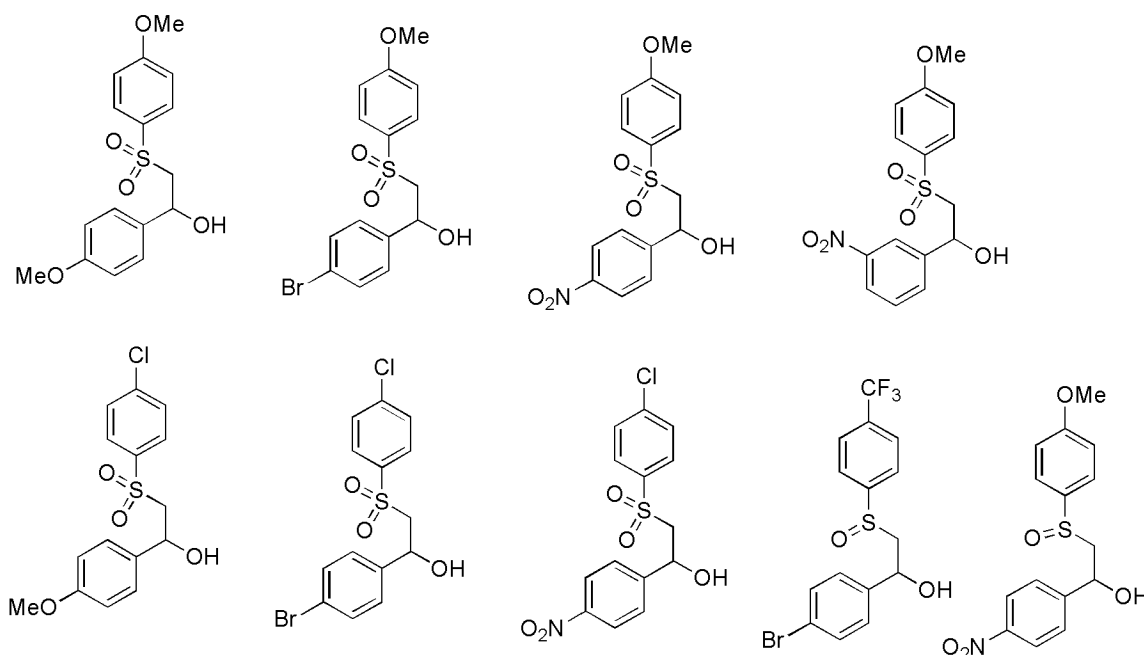
[0632] 向适当的苯硫酚 (1 当量) 和适当的 2- 溴苯乙酮 (1 当量) 的四氢呋喃 (THF) 溶液中加入三乙胺 (Et_3N) (1.2 当量)。反应在环境温度下搅拌 1 小时。在用乙酸乙酯 (EtOAc) 稀释后,用饱和 NH_4Cl (水溶液) 使反应淬灭。分离各层,用 EtOAc (2x) 萃取水相。用 MgSO_4 干燥合并的有机层,过滤并通过旋转蒸发浓缩,得到粗巯基酮。

[0633] 向该巯基酮 (1 当量) 的溶液中分份加入 3- 氯过氧苯甲酸 (mCPBA) (3 当量)。为了在接下来产生亚砷,使用足量的 1 当量的 mCPBA。反应在环境温度下搅拌,直至 TLC 分析表明反应进程已经完成。在用 EtOAc 稀释后,用 NaHCO_3 (aq) 洗涤反应液,分离各层,用 EtOAc (2x) 萃取水相。用 MgSO_4 干燥合并的有机层,过滤并浓缩,得到粗酮砷。通过硅胶色谱 (用 EtOAc 的己烷液洗脱) 纯化,得到所需的酮砷。

[0634] 向酮砷 (1 当量) 的 MeOH 悬浮液中分份加入固体 NaBH_4 (1 当量)。反应在环境温度下搅拌,直至 TLC 分析表明反应进程完成,典型地为 30 分钟。用 NH_4Cl (aq) 小心地使反应淬灭,然后用 EtOAc 稀释。分离各层,用 EtOAc (2x) 萃取水相。用 MgSO_4 干燥合并的有机层,过滤并浓缩,得到粗羟基砷,羟基砷可以通过硅胶色谱 (用 EtOAc 的己烷洗脱) 或结晶 (EtOAc / 己烷) 来纯化。

[0635] 使用该方法制备的化合物:

[0636]



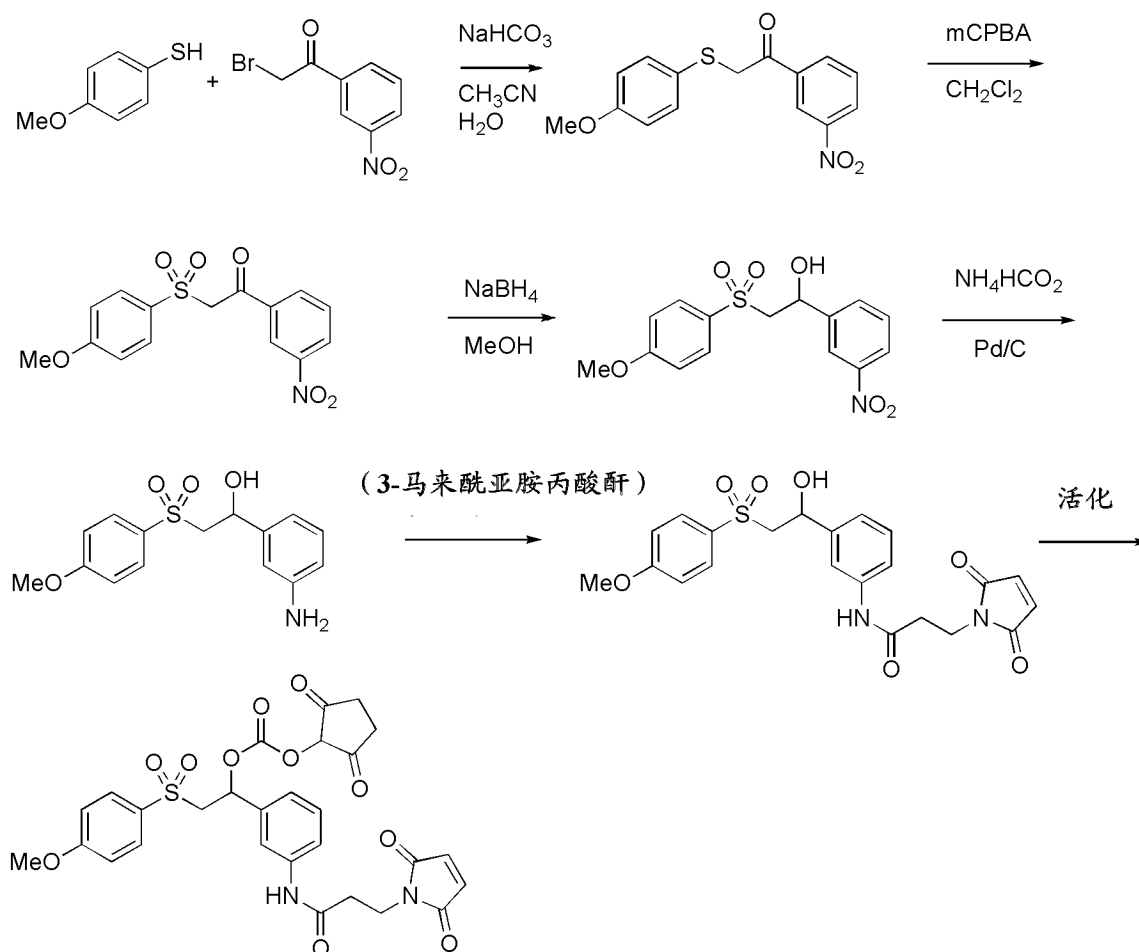
[0637] 用适当的脂肪族溴代酮替代溴代苯乙酮,可以制备具有相应的脂肪族片段的连接

子。

[0638] 实施例 34

[0639] 双功能砜连接子的制备

[0640]



[0641] 步骤 1. 将 4-甲氧基苯硫酚 (615 μL) 加入到在含有碳酸氢钠 (0.84g) 的 10mL 的 1 : 1 的乙腈 / 水中的 2-溴-3'-硝基苯乙酮 (1.22g) 混合物中。1 小时后,用水稀释所得混合物,并用乙酸乙酯萃取。用 MgSO_4 干燥萃取液,过滤并蒸发成橘黄色油,加入 3 : 1 的己烷 / 乙酸乙酯结晶。收集橘黄色结晶并干燥,得到 β -酮硫化物,1.1g。

[0642] 步骤 2. 向该酮硫化物 (670mg) 的 10mL 二氯甲烷溶液中分小份小心加入湿润的 3-氯过氧苯甲酸 (2.0g, $\sim 50\%$)。加热该混合物。在搅拌 2 小时后,用乙酸乙酯稀释该悬浮液,用饱和 NaHCO_3 、水和盐水小心洗涤,然后用 MgSO_4 干燥,过滤并蒸发得到 630mg 的固体酮砜,在乙酸乙酯中结晶。

[0643] 步骤 3. 向酮砜 (400mg) 的 5mL 甲醇的悬浮液中加入硼氢化钠 (100mg)。30 分钟后,加入 NH_4Cl 饱和水溶液,浓缩该混合物。残渣在乙酸乙酯和水中分配,然后用盐水洗涤有机相,用 MgSO_4 干燥,过滤并蒸发得到粗产物,在乙酸乙酯 / 己烷中结晶,得到 360mg 的硝基醇。

[0644] 步骤 4. 向在 5mL 甲醇中的硝基醇 (217mg) 和 10% 炭载钯 (50mg) 的混合物中加入固体甲酸铵 (200mg)。将该化合物剧烈搅拌 1 小时,然后再加入 50mg 的催化剂。加入 30 分钟后,过滤该混合物并蒸发。将残渣溶于乙酸乙酯,并用饱和 NaHCO_3 、水和盐水小心地洗

涤,然后用 MgSO_4 干燥,通过硅胶塞过滤,蒸发,得到 180mg 呈透明玻璃状的氨基醇。

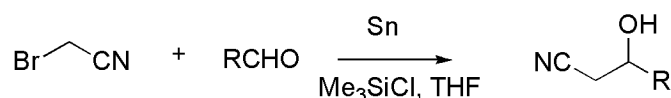
[0645] 步骤 5. 可用本领域已知的方法在胺上酰化该氨基醇,得到更易于大分子载体连接的物质。例如,可以如所述用于 2-氨基苄 (Tsubery, H. 等人, J. Biological Chem. (2004) 279 :38118-38124) 的方法,将该氨基醇的溶液与 3-马来酰亚胺丙酸酐反应。可替代地,可以用叠氮-酸衍生物例如 6-叠氮己酰氯或 6-叠氮己酸酐在胺上酰化氨基醇。可替代地,可以用炔基-酸衍生物例如 5-己炔酰氯或 5-己炔酸酐在胺上酰化氨基醇。

[0646] 步骤 6. 用上述或本领域已知的方法,活化酰化后的氨基醇,用于与药物连接成为 N-羟基琥珀酰亚胺基碳酸酯。

[0647] 实施例 35

[0648] 制备腈连接子的一般方法

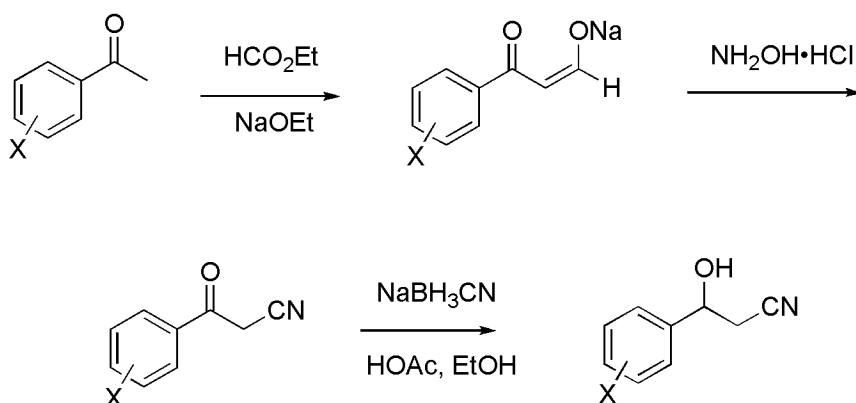
[0649]



[0650] 在一种方法中,可以根据 Sun 和 Shi, J. Chem. Research (S) (1999), 318-319 (通过参考引入本文) 的方法,根据溴代乙腈和醛的锡介导的反应来制备腈连接子。

[0651] 在另一种方法,制备腈连接子,包括还原 β -酮腈,接着通过 β -酮醛烯醇化物与羟基胺的盐酸化物的反应,由适当的酮制备:

[0652]

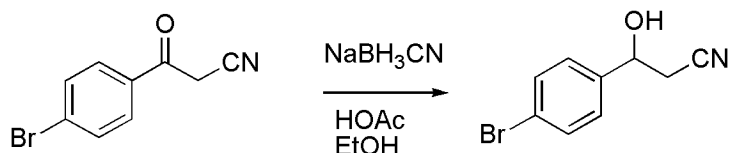


[0653] 例如,在美国专利 6,861,162 中提供的苯甲酰乙腈的制备。

[0654] 实施例 36

[0655] 3-(4-溴苯基)-3-羟基丙腈的制备

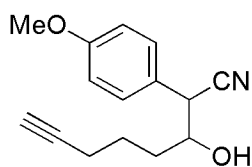
[0656]



[0657] 用 80°C 的热板将 4-溴苯甲酰乙腈 (500mg) 的乙醇 (5mL) 和乙酸 (300 μ L) 悬浮液和氰基硼氢化钠 (280mg) 加热 2 小时。在冷却至环境温度后,用水稀释该混合物,并浓缩成浆体,用乙酸乙酯稀释该浆体,并用水、饱和 NaHCO_3 和盐水洗涤。用 MgSO_4 干燥萃取液,过滤并蒸发,得到 510mg 的不澄清油,使用 1:1 的乙酸乙酯/己烷通过硅胶过滤,得到粘稠油状的产物 (496mg)。

[0658] 实施例 37

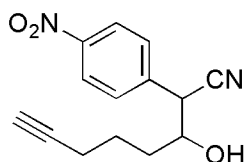
[0659]



[0660] 在氮气保护下,将正丁基锂 (1.8mL,5.2mmol) 加入到 0℃ 的 N,N-二异丙胺 (0.75mL,5.2mmol) 的无水 THF (10mL) 的溶液中。将反应混合物搅拌 30 分钟,然后冷却至 -78℃。通过注射器将 2-(4-甲氧基苯基)乙腈 (0.6mL,4.34mmol) 加入到上述的混合物中。在相同温度下搅拌 30 分钟后,通过注射器将 5-己炔醛 (约 4mmol) 的溶液加入到该烧瓶中,然后将反应混合物在 -78℃ 下搅拌 1.5 小时。加入 NH_4Cl 的饱和溶液使反应淬灭,然后加热至室温。用 EtOAc (3x30mL) 萃取该混合物,用无水 MgSO_4 干燥合并的有机相,并减压浓缩。通过硅胶柱色谱纯化产物。 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.18 (d, 2H, $J = 5.4\text{Hz}$), 6.83 (d, 2H, $J = 5.4\text{Hz}$), 3.72-3.76 (s+m, 5H), 2.47 (1H, s), 2.13 (m, 2H), 1.88 (t, 1H), 1.51-1.68 (m, 4H)。

[0661] 实施例 38

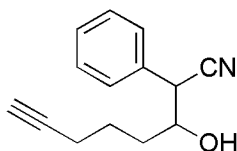
[0662]



[0663] 根据实施例 33 的方法制备该产物,用 2-(4-硝基苯基)乙腈替代 2-(4-甲氧基苯基)乙腈。 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 8.20 (d, 2H, $J = 5.6\text{Hz}$), 7.51 (d, 2H, $J = 5.6\text{Hz}$), 3.99 (m, 2H), 2.17 (m, 2H), 1.89 (br s, 1H), 1.65 (m, 2H), 1.55 (m, 2H)。

[0664] 实施例 39

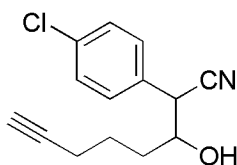
[0665]



[0666] 根据实施例 37 的方法制备该产物,用 2-苯基乙腈替代 2-(4-甲氧基苯基)乙腈。 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.3 (m, 5H), 3.9 (m, 2H), 2.23 (m, 2H), 1.96 (br s, 1H), 1.77 (m, 2H), 1.60 (m, 2H)。

[0667] 实施例 40

[0668]



[0669] 根据实施例 37 的方法制备该产物,用 2-(4-氯苯基)-乙腈替代 2-(4-甲氧基苯基)乙腈。 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.2-7.3 (m, 4H), 3.8 (m, 2H), 2.23 (m, 2H), 1.96 (br s, 1H), 1.8-1.5 (m, 4H)。

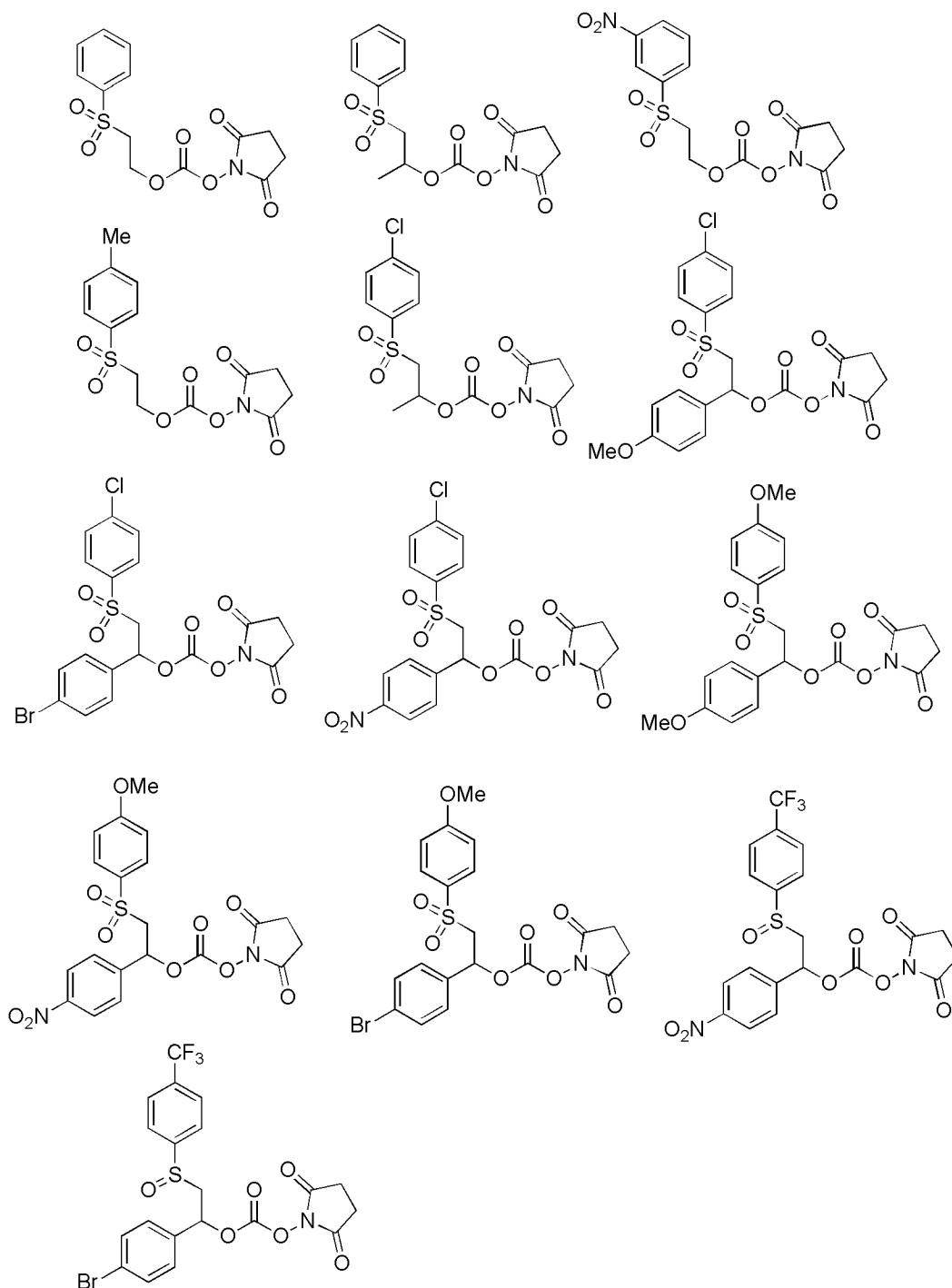
[0670] 实施例 41

[0671] 使用 N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯活化的一般方法

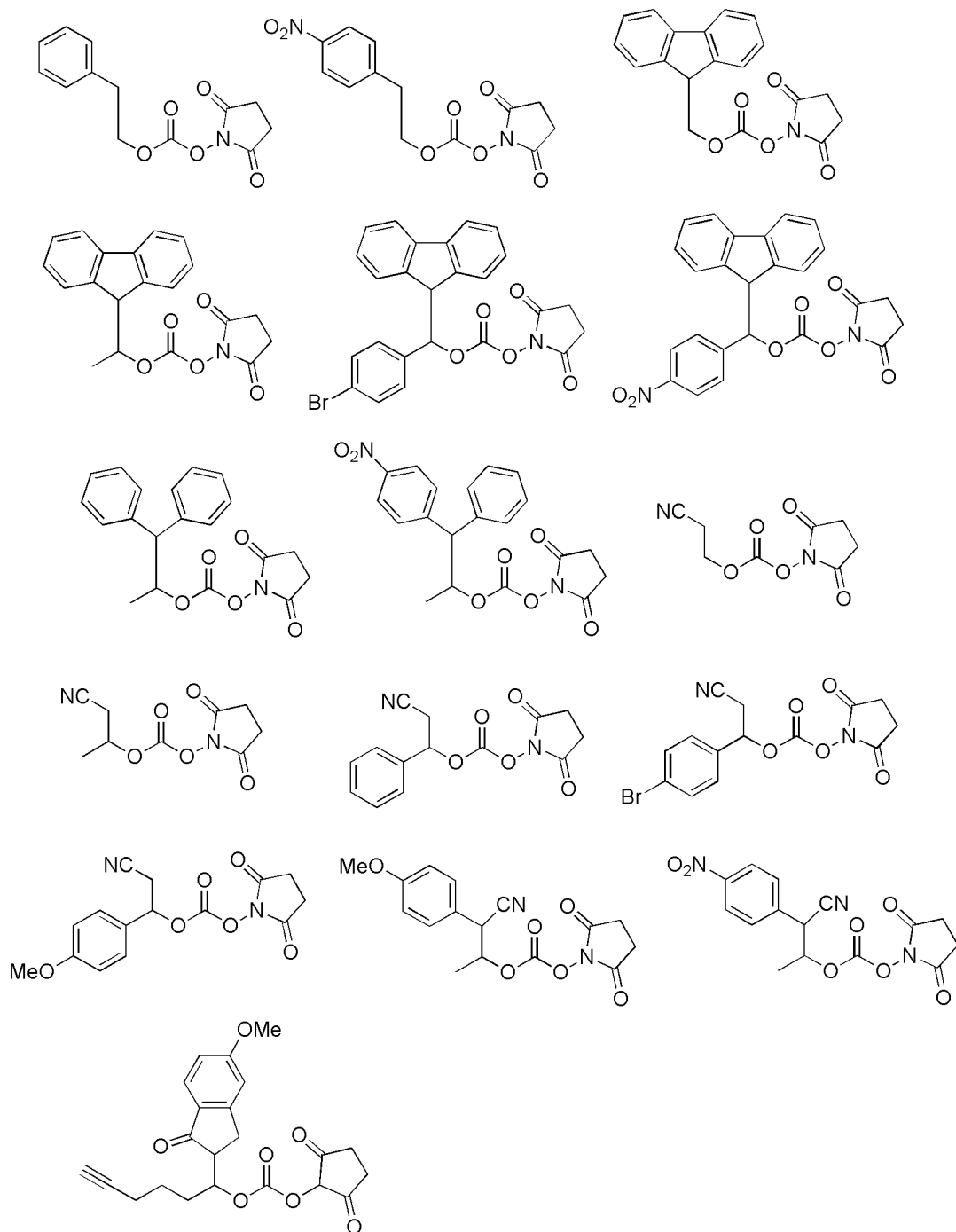
[0672] 将在 2mL 干燥乙腈中的实施例 33 制备的化合物 (1mmol)、N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯 (2mmol) 和 4-(二甲氨基)吡啶 (0.1mmol) 的混合物搅拌 1 小时 (适用于伯醇) 或 16 小时 (适用于仲醇), 然后用包含 0.2mL 1N HCl 的 5mL 水稀释, 并用乙酸乙酯萃取。用水和盐水洗涤有机相, 然后用 MgSO_4 干燥, 过滤并浓缩, 得到适合进一步使用的粗制的混合碳酸酯。任选用乙酸乙酯/己烷通过硅胶色谱进一步纯化该混合碳酸酯。

[0673] 根据该方法制备的化合物包括:

[0674]



[0675]



[0676] 实施例 42

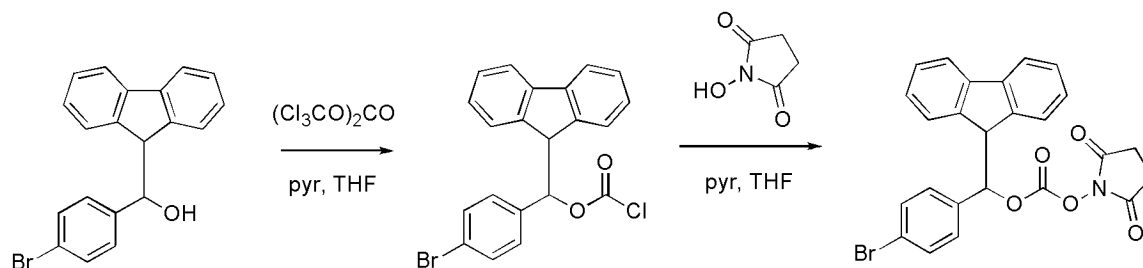
[0677] 使用三光气和 N-羟基琥珀酰亚胺活化的一般方法

[0678] 在惰性大气下搅拌在 5mL 无水四氢呋喃 (THF) 中的式 (1) 的醇 (0.5mmol) 和三光气 (0.72mmol) 的混合物, 滴加吡啶 (84 μ L), 得到白色沉淀。10 分钟后, 用氮气压过滤该混合物, 浓缩除去过量光气。将残渣再溶于 5mL 的 THF 中, 并用 N-羟基琥珀酰亚胺 (2.65mmol) 和吡啶 (130 μ L) 处理 20 分钟, 然后蒸发至干燥。将残渣溶于乙酸乙酯, 用水、0.1N HCl、饱和 NaHCO_3 和盐水充分洗涤, 然后用 MgSO_4 干燥, 过滤并蒸发, 得到粗碳酸酯。在硅胶上通过色谱 (乙酸乙酯 / 己烷) 纯化, 得到产物。

[0679] 实施例 43

[0680] 使用三光气和 N- 羟基琥珀酰亚胺活化 (4- 溴苯基)-(9- 苄基) 甲醇

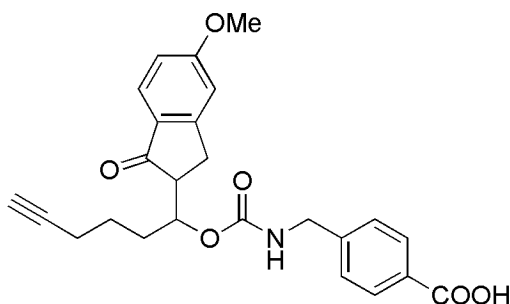
[0681]



[0682] 在惰性大气下,用吡啶 (84 μ L) 处理 (4-溴苯基)-(9-苊基) 甲醇 (175mg, 0.5mmol) 和三光气 (212mg, 0.72mmol) 的 5mL 无水 THF 溶液 10 分钟,然后过滤并蒸发。将残渣溶于 5mL 的 THF,并用 N-羟基琥珀酰亚胺 (310mg, 2.65mmol) 和吡啶 (130 μ L) 处理 209 分钟,然后蒸发至干燥。将残渣溶于乙酸乙酯,用水、0.1N HCl、饱和 NaHCO_3 和盐水充分洗涤,然后用 MgSO_4 干燥,过滤并蒸发,得到粗碳酸酯。将该粗产物溶于 1mL 的二氯甲烷,并负载到在己烷中平衡的 5-mL 硅胶柱上。开始时用己烷洗脱,除去某些有色物质。然后用 3 : 1 的己烷 / 乙酸乙酯洗脱该柱,最后用 1 : 1 的己烷 / 乙酸乙酯,洗脱出纯净产物 (206mg, 92%)。

[0683] 实施例 44

[0684]

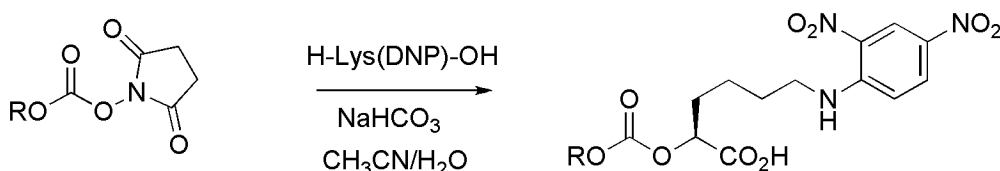


[0685] 将实施例的粗制的混合碳酸酯溶于 DMSO (0.5mL), 并与 4-(氨基甲基) 苯甲酸钠 (0.1mL 的 1.0M 水溶液)。5 分钟后,用 5mL 水稀释该混合物,用二氯甲烷洗涤该乳状溶液 3 次。用 1N HCl 酸化水相,然后用乙酸乙酯萃取 3 次。合并乙酸乙酯萃取液,用水洗涤,用 MgSO_4 干燥,过滤并蒸发至干燥。残渣用 1 : 1 的 EtOAc / 己烷洗涤 1 次,然后溶于 EtOAc 并再浓缩,得到纯净产物 (7mg)。

[0686] 实施例 45

[0687] 制备 N_ϵ -(2,4-二硝基苯基)-L-赖氨酸衍生物的一般方法

[0688]



[0689] 用 200 μ L 的 1.0M NaHCO_3 和 0.1mmol N-羟基琥珀酰亚胺碳酸酯的 1.0mL 乙腈溶液充分处理盐酸 N_ϵ -(2,4-二硝基苯基)-L-赖氨酸 (35mg) 的 600 μ L 水和 200 μ L 1.0N NaOH 溶液。将所得黄色溶液在环境温度下搅拌 1 小时,然后加入 10mL 水稀释,并负载到 C18 固相萃取柱 (Varian BondElut, 1g) 上。用 3mL 的水,1mL 1% $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ 的水溶液,3mL 的水洗涤该柱,然后用 3mL 50% 甲醇水溶液洗涤,以洗脱任何未反应的赖氨酸类似物。用 100% 甲

醇洗脱产物,将该黄色溶液蒸发至干燥。

[0690] 实施例 46

[0691] 测定药物从式 (2) 的化合物中的释放速率的一般方法

[0692] 说明了一种测定药物从式 (2) 的化合物中的释放速率的方法的实例。通过将化合物溶于适当的与水可混溶的溶剂例如 DMSO 或乙腈中来制备式 (2) 的化合物的母液。然后将适当体积的该母液稀释成缓冲水溶液,该溶液任选包含用于 HPLC 分析的内标物例如苯甲酸钠,得到澄清溶液,将其保持在设定的温度下。溶解性差的化合物可能需要加入助溶剂例如 DMSO。定期移出等分部分,并立即通过 HPLC 分析或加入等体积的 1% 三氟乙酸 (TFA) 的乙腈溶液使反应淬灭并储藏用于后续分析。将等分部分的一部分注射到 HPLC 柱上用于分析。然后测定剩余式 (2) 的化合物和 (如果可能) 药物本身的峰面积,并与内标物的峰面积进行比较。在一些情况中,例如当使用没有足够强的 UV 光吸收的药物用于 HPLC 检测时,可以通过质谱分析来测定游离药物的浓度。

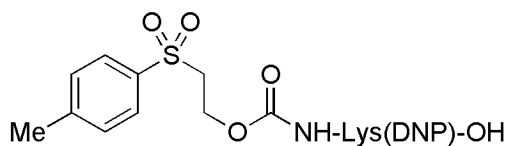
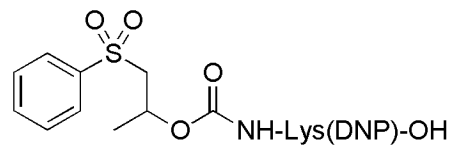
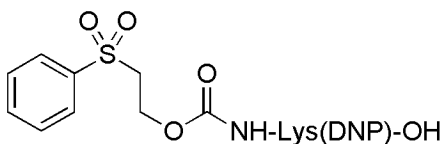
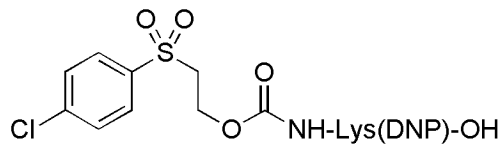
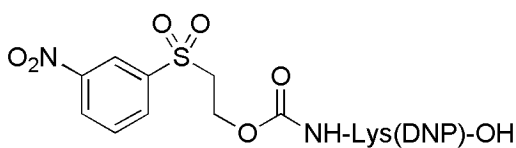
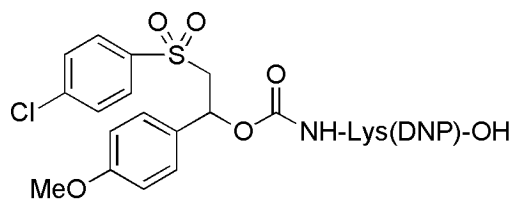
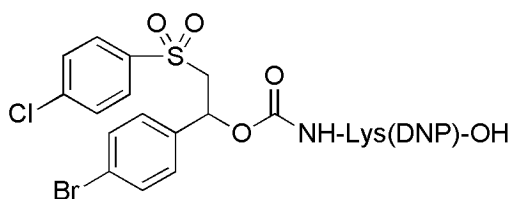
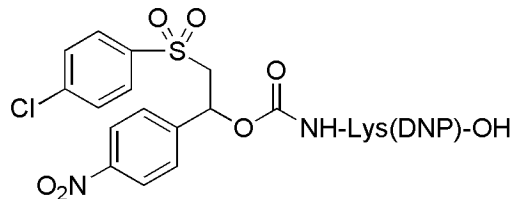
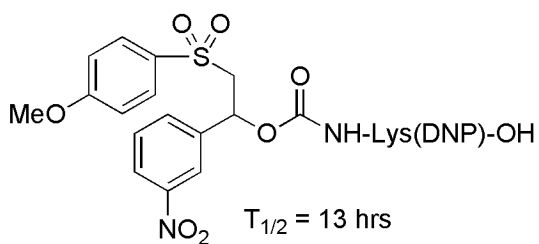
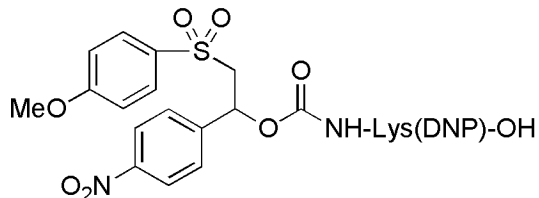
[0693] 作为一个例子,如下确定 N_ϵ -(2,4-二硝基苯基)-L-赖氨酸,“H-Lys (DNP)-OH”从各化合物中释放的速率。制备反应混合物,包含 0.1M 缓冲液,0.05% NaN_3 和约 0.1mg/mL 的起始化合物,并保持在 37°C。定期移出等分部分,并通过注射到 Varian Polaris 3 μm C18-A 反相 HPLC 柱 (150x 4.6mm) 中来分析,所述柱用流速 0.8mL/分钟的 50 : 50 的水 / 甲醇 (各包含 0.5% 乙酸) 平衡。用 100% 甲醇 +0.5% 乙酸的梯度从柱中洗脱化合物,并在 350nm 处通过吸光度检测。峰的积分得到剩余起始物质的面积 (A_s) 和释放的 H-Lys (DNP)-OH (A_p) 的面积 (A_p),根据下式计算反应百分比

[0694] $\% \text{反应} = A_p / (A_p + A_s) * 100$

[0695] 然后由 $\ln(100 - \% \text{反应})$ 对时间的曲线斜率计算释放速率,半衰期计算为 $T_{1/2} = \ln(2) / \text{速率}$ 。

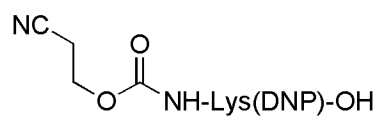
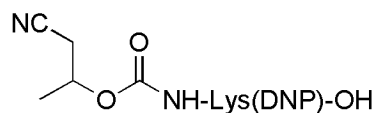
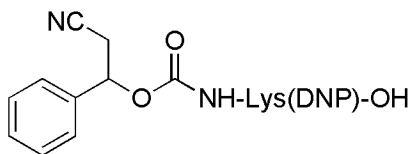
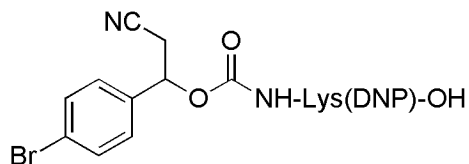
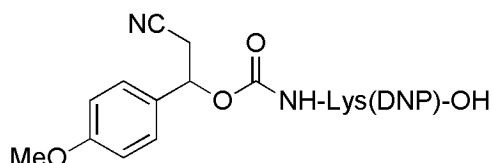
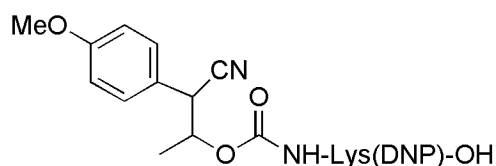
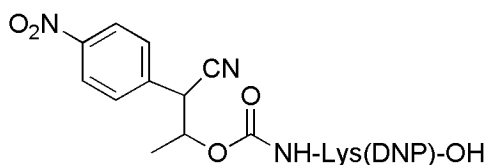
[0696] 作为药物释放的模型, N_ϵ -(2,4-二硝基苯基)-L-赖氨酸 (H-Lys (DNP)-OH) 释放的半衰期是在 PBS, pH 7.4, 37°C 下确定的,下列化合物的结果如所示。显然, R^1 和 R^2 及其上取代基的性质提供了范围广泛的释放速率。

[0697]


 $T_{1/2} = 56 \text{ hrs}$

 $T_{1/2} = 72 \text{ hrs}$

 $T_{1/2} = 30 \text{ hrs}$

 $T_{1/2} = 46 \text{ hrs}$

 $T_{1/2} = 2 \text{ hrs}$

 $T_{1/2} = 18 \text{ hrs}$

 $T_{1/2} = 17 \text{ hrs}$

 $T_{1/2} = 2 \text{ hrs}$

 $T_{1/2} = 13 \text{ hrs}$

 $T_{1/2} = 10 \text{ hrs}$

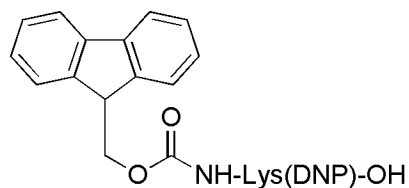
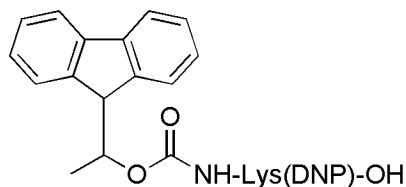
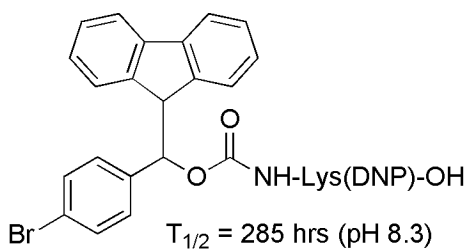
[0698] 在 PBS, pH 7.4, 37°C 下, N_ε-(2,4-二硝基苯基)-L-赖氨酸 (H-Lys(DNP)-OH) 从磺酰基连接子中释放的半衰期。

[0699]


 $T_{1/2} = 160 \text{ hrs (pH 8.3)}$

 $T_{1/2} = 320 \text{ hrs (pH 8.3)}$

 $T_{1/2} = 98 \text{ hrs (pH 8.3)}$

 $T_{1/2} = 270 \text{ hrs (pH 7.4)}$

 $T_{1/2} = 22 \text{ hrs (pH 7.4)}$

 $T_{1/2} = 125 \text{ hrs (pH 7.4)}$

 $T_{1/2} \sim 80 \text{ hrs (双相 ; pH 7.4)}$

[0700] 在 PBS, pH 7.4 或 0.1M Tris • HCl, pH 8.3, 37°C 下, N_{ϵ} -(2,4-二硝基苯基)-L-赖氨酸 (H-Lys(DNP)-OH) 从脘连接子中释放的半衰期。

[0701]

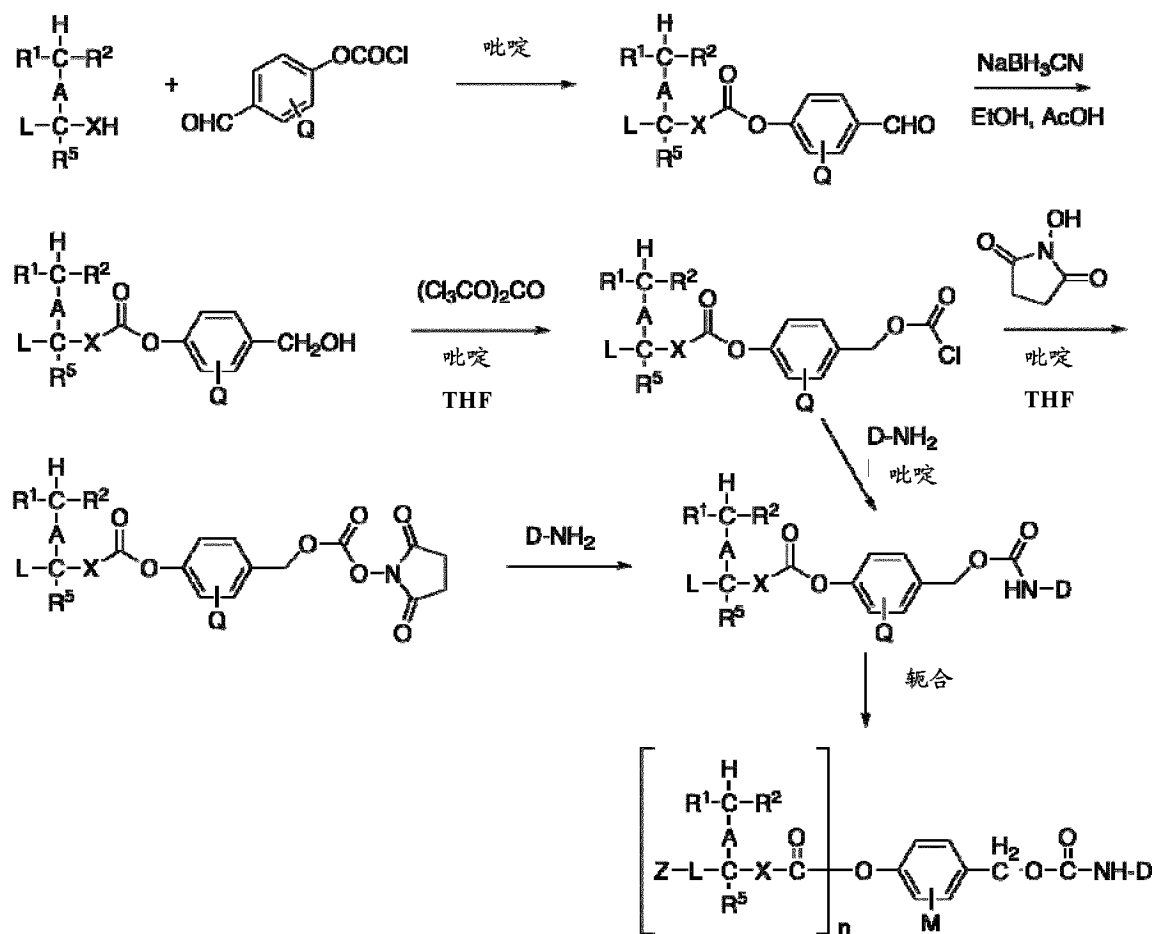

 $T_{1/2} = 200 \text{ hrs (pH 8.3)}$
 $\sim 1650 \text{ hrs (pH 7.4)}$

 $T_{1/2} \sim 1800 \text{ hrs (pH 8.3)}$

 $T_{1/2} = 285 \text{ hrs (pH 8.3)}$

[0702] 在 PBS, pH 7.4 或 0.1M Tris • HCl, pH 8.3, 37°C 下, N_{ϵ} -(2,4-二硝基苯基)-L-赖氨酸 (H-Lys(DNP)-OH) 从苄基连接子中释放的半衰期。

[0703] 实施例 47

[0704] 连接 4- 羟基苄基的前药的制备

[0705]



[0706] 步骤 1. 将吡啶 (1.5mmol) 加入到连接子 (1.0mmol) 和 4- 甲酰基苄基氯甲酸酯 (1.2mmol) 的干燥四氢呋喃液中, 通过薄层色谱监测反应。当完成后, 用乙酸乙酯稀释该混合物, 并用水和盐水洗涤, 干燥并浓缩。在硅胶上通过色谱纯化粗醛产物。

[0707] 步骤 2. 将氰基硼氢化钠 (2mmol) 加入到步骤 1 的醛 (1mmol) 的 5% 乙酸和乙醇 (2mL) 液中。将该混合物加热至 $\sim 75^\circ C$ 2 小时, 然后冷却并浓缩。将残渣溶于乙酸乙酯, 用水和盐水洗涤, 然后干燥并蒸发, 得到粗苄型醇, 将其在硅胶上通过色谱纯化。

[0708] 步骤 3. 将吡啶 (2mmol) 滴加到在干燥四氢呋喃中的步骤 2 的苄型醇 (1mmol) 和三光气 (3mmol) 的混合物中。在搅拌 1 小时后, 过滤该混合物并蒸发至干燥, 得到粗氯甲酸酯, 其无需进一步纯化即可使用。

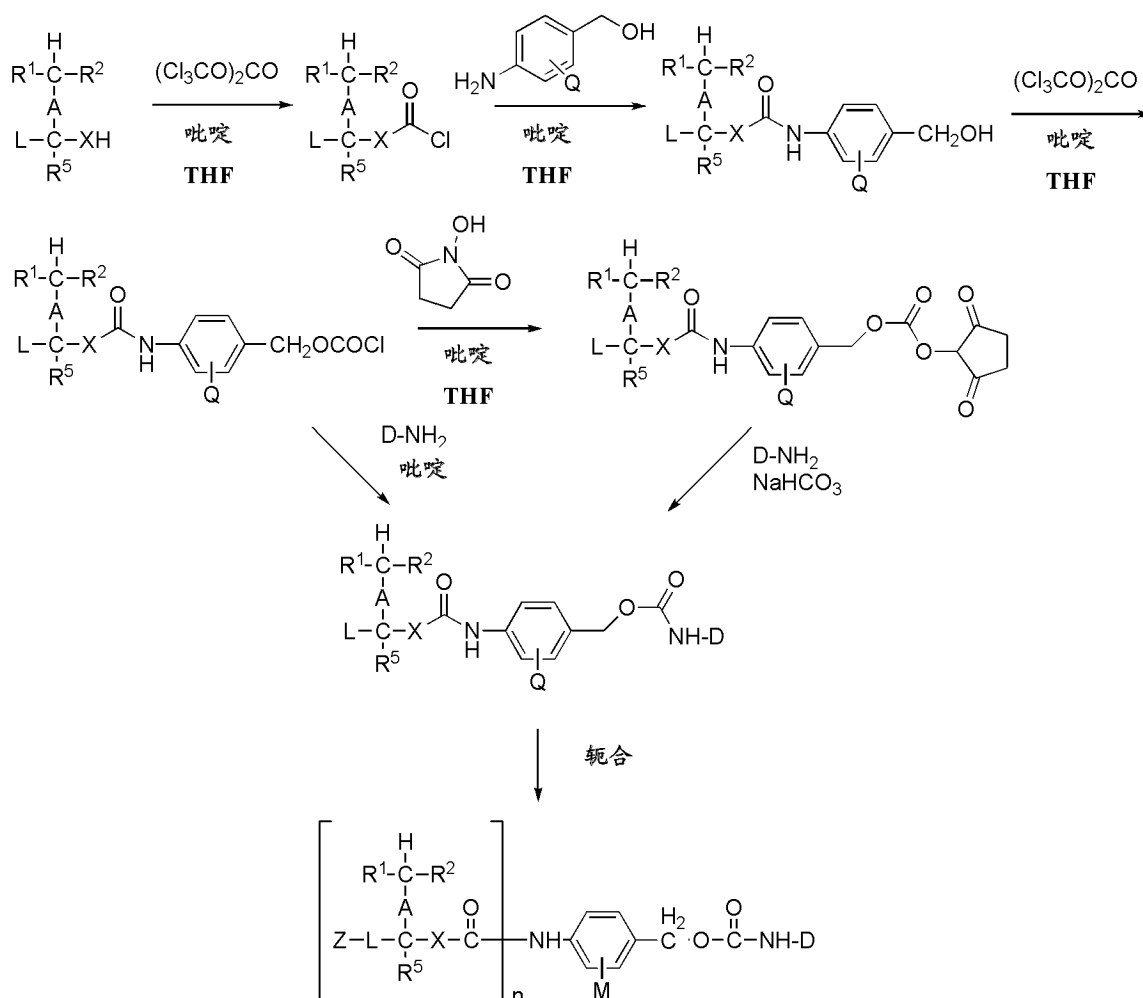
[0709] 步骤 4. 将吡啶 (2mmol) 加入到步骤 3 的粗氯甲酸酯和 N- 羟基琥珀酰亚胺 (5mmol) 的混合物中。搅拌 30 分钟后, 过滤并浓缩该混合物。将残渣溶于乙酸乙酯, 用水和盐水洗涤, 然后干燥并蒸发, 得到粗琥珀酰亚胺基碳酸酯, 将其在硅胶上通过色谱纯化。

[0710] 步骤 5. 将步骤 4 的琥珀酰亚胺基碳酸酯的乙腈溶液 (1 当量) 加入到包含胺的药物的 0.1M $NaHCO_3$ 溶液中。1 小时后, 用水稀释该混合物, 并负载到 C18 固相萃取柱上。用水洗涤该柱, 然后用水和乙腈的不连续梯度洗脱。合并包含产物的级分并蒸发至干燥, 任选制备型 HPLC 进一步纯化。

[0711] 实施例 48

[0712] 连接 4-氨基苄基的前药的制备

[0713]



[0714] 步骤 1. 将吡啶 (1.5mmol) 加入到连接子 (1.0mmol) 和三光气 (3mmol) 的干燥四氢呋喃液中。搅拌 1 小时后, 过滤该混合物并蒸发至干燥, 得到粗氯甲酸酯, 其无需进一步纯化即可使用。

[0715] 步骤 2. 在环境温度下搅拌在干燥四氢呋喃 (5mL) 中的步骤 1 的粗氯甲酸酯、4-氨基苄基醇 (1mmol) 和吡啶 (2mmol) 的混合物。当完成时, 蒸发该混合物, 将残渣溶于乙酸乙酯并用水和盐水洗涤, 然后干燥并蒸发, 得到粗氨基甲酸酯, 将其在硅胶上通过色谱纯化。

[0716] 步骤 3. 将吡啶 (2mmol) 滴加到在干燥四氢呋喃中的步骤 2 的氨基甲酸酯 (1mmol) 和三光气 (3mmol) 的混合物中。在搅拌 1 小时后, 过滤该混合物并蒸发至干燥, 得到粗氯甲酸酯, 其无需进一步纯化即可使用。

[0717] 步骤 4. 将吡啶 (2mmol) 加入到步骤 3 的粗氯甲酸酯和 N-羟基琥珀酰亚胺 (5mmol) 的混合物中。搅拌 30 分钟后, 过滤并浓缩该混合物。将残渣溶于乙酸乙酯, 用水和盐水洗涤, 然后干燥并蒸发, 得到粗琥珀酰亚胺基碳酸酯, 将其在硅胶上通过色谱纯化。

[0718] 步骤 5. 将步骤 4 的琥珀酰亚胺基碳酸酯的乙腈溶液 (1 当量) 加入到包含胺的药物的 0.1M NaHCO_3 溶液中。1 小时后, 用水稀释该混合物, 并负载到 C18 固相萃取柱上。用水洗涤该柱, 然后用水和乙腈的不连续梯度洗脱。合并包含产物的部分并蒸发至干燥, 任选用制备型 HPLC 进一步纯化。

[0719] 如果没有其他特别的说明,上文引用的所有参考文献都以其整体通过参考引入。

药物释放速率取决于生理pH下的离子化程度

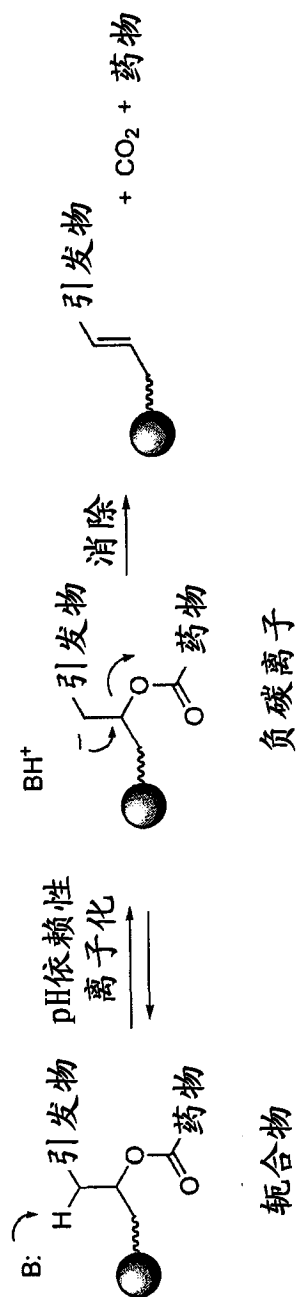


图 1

- 药物释放速率与轭合物在生理pH下离子化成负碳离子的份数成正比
- § 更多离子化产生更快的药物释放速率
- 通过邻近引发物的质子的酸性来测定离子化的轭合物的份数
- § 更多酸性 (更低 pK_a) 产生更多离子化
- 通过引发物的性质测定 pK_a

不同引发物基团提供宽范围的酸性来控制速率

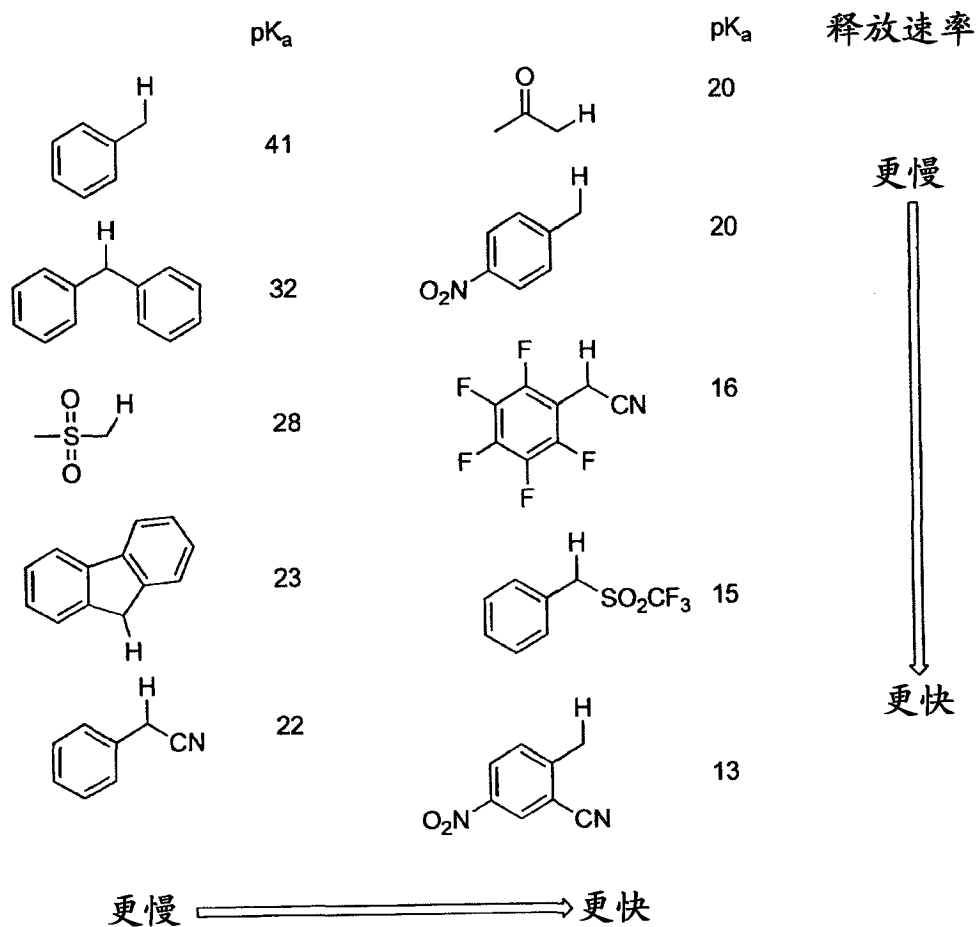


图 2

测量2-取代的苯的pKa
(Bowden & Cockerill, *J. Chem. Soc. B* (1970)173-9).

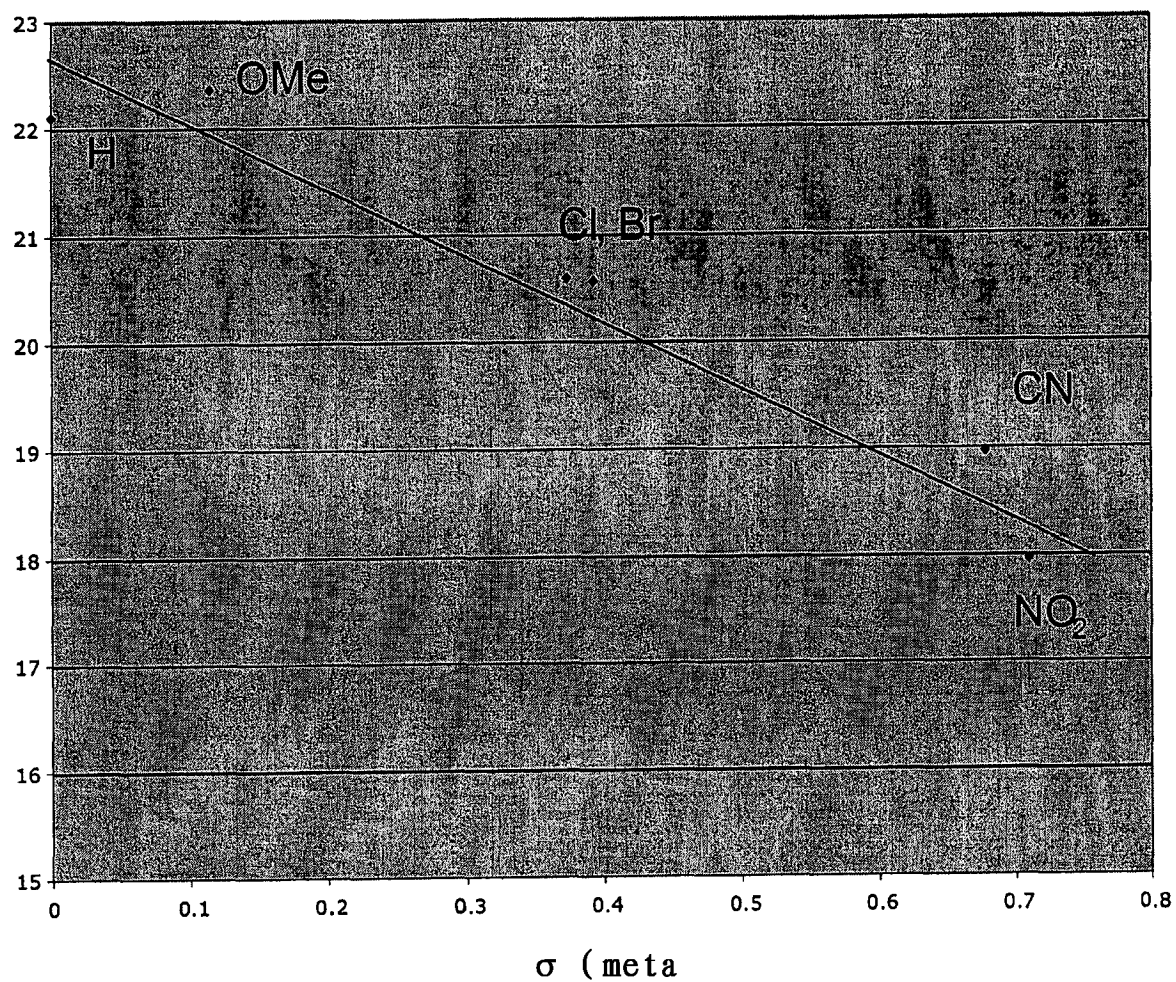


图 3

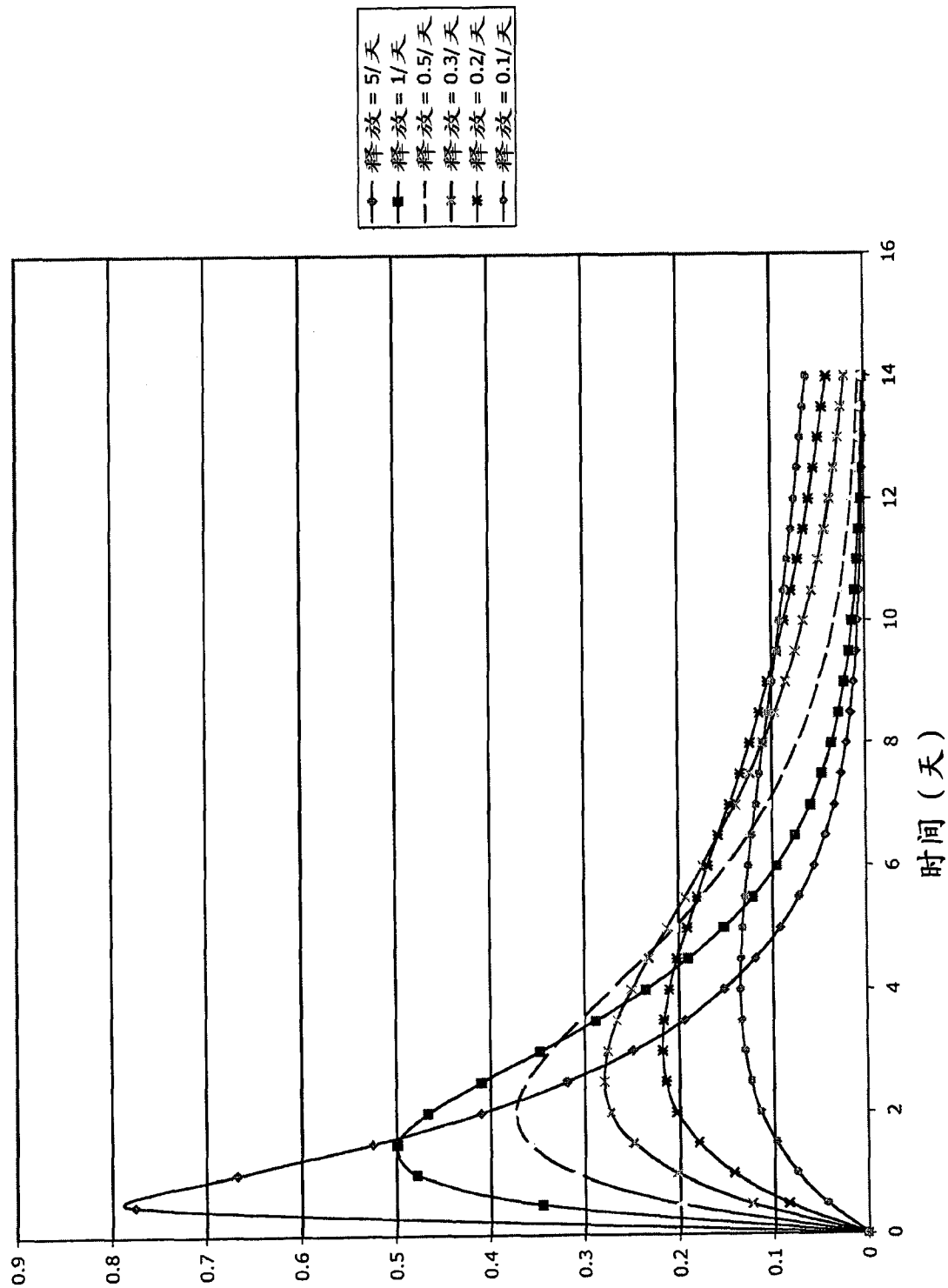


图 4

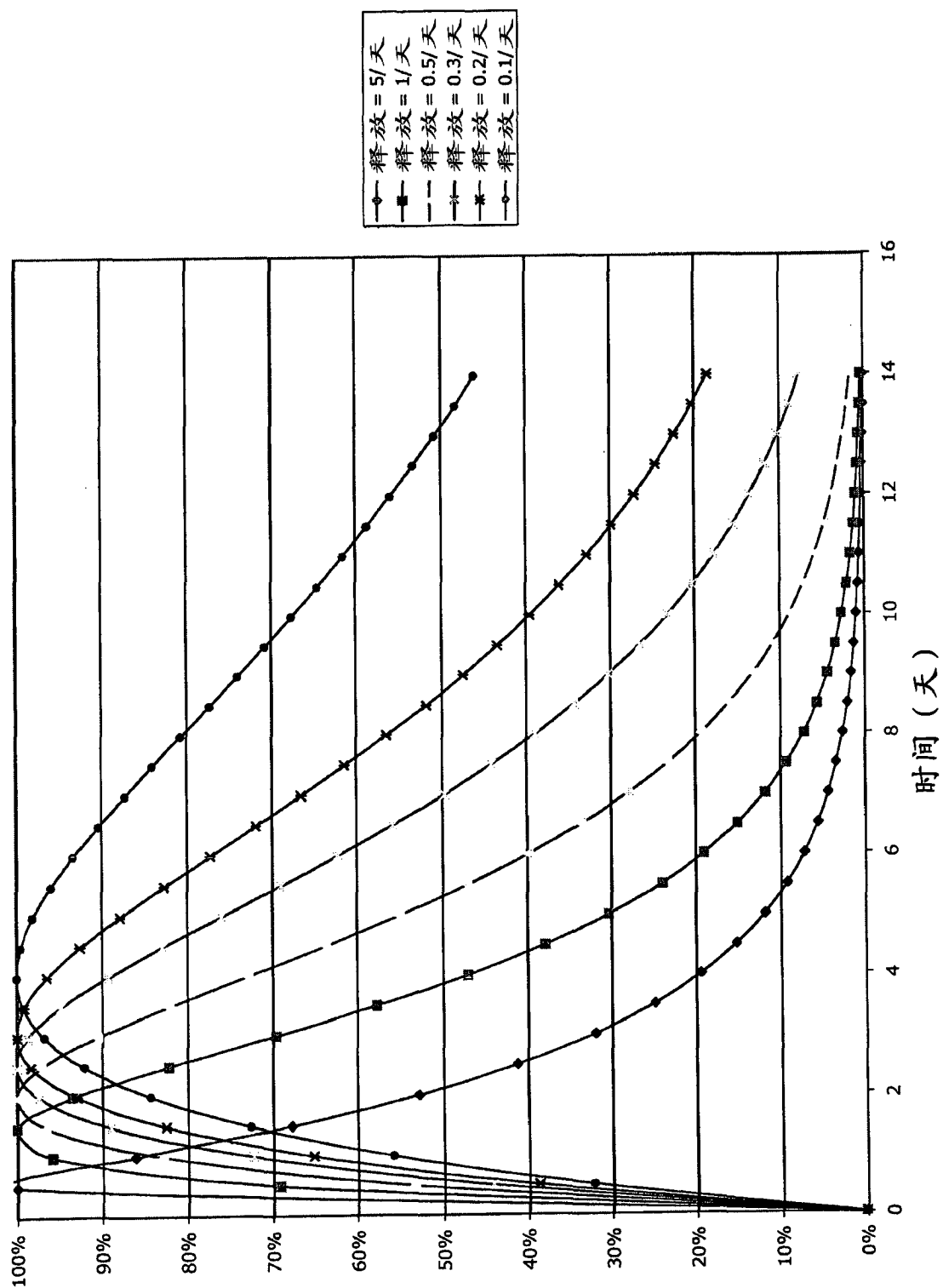


图 5