



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104383553 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 04

(21) 申请号 201410643262. X

(22) 申请日 2008. 06. 25

(30) 优先权数据

60/946092 2007. 06. 25 US

61/036186 2008. 03. 13 US

(62) 分案原申请数据

200880104308. 3 2008. 06. 25

(71) 申请人 恩多塞特公司

地址 美国印第安那州

(72) 发明人 C. P. 利蒙 王羽 I. R. 弗拉霍夫

游飞 P. J. 克莱恩德尔

H. K. R. 桑塔普拉姆

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 梅黎 石克虎

(51) Int. Cl.

A61K 47/48(2006. 01)

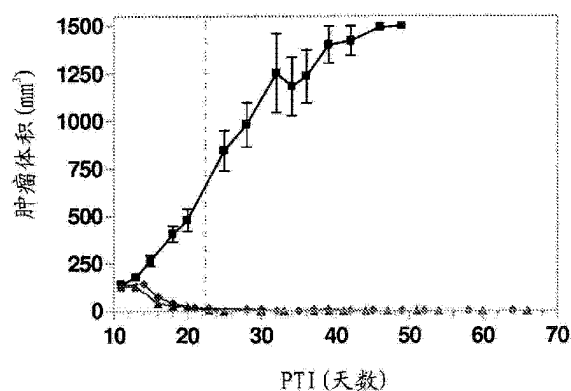
权利要求书4页 说明书108页 附图13页

(54) 发明名称

含有亲水性间隔区接头的共轭物

(57) 摘要

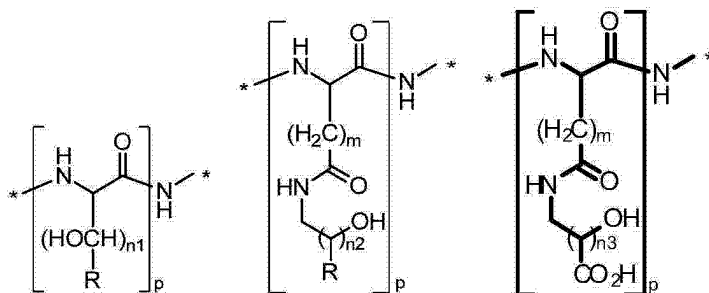
在此描述的是利用含有亲水性间隔区接头的细胞表面受体结合药物递送共轭物、用于靶向的药物递送的组合物和方法,用于治疗由病原性细胞群体引起的疾病状况。



1. 以下式子的化合物

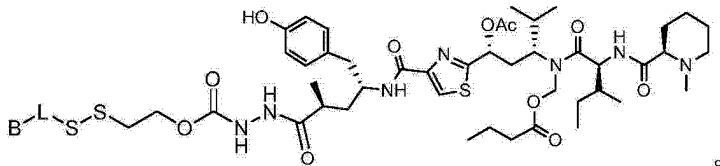
B-L-A

其中 B 代表一个或多个叶酸受体结合配体,其结合目标细胞上的叶酸受体,L 是包含至少一个亲水性间隔区接头的多价接头,所述亲水性间隔区接头选自下列:

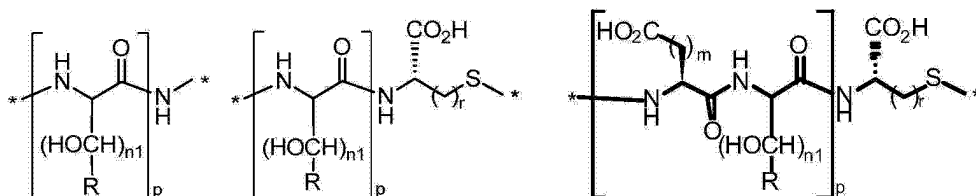


及其组合;其中 R 在每种情况下独立地选自 H、烷基、环烷基和芳烷基;m 是在每种情况下独立地选自 1 到 3 的整数;n1 是在每种情况下独立地选自 3 或 4 的整数;n2 是在每种情况下独立地选自 1 到 6 的整数;n3 是在每种情况下独立地选自 1 到 6 的整数;并且 p 是在每种情况下独立地选自 1 到 5 的整数,以及 A 代表一个或多个 tubulysin。

2. 权利要求 1 的化合物,其中 A 为一个 tubulysin。
3. 权利要求 1 的化合物,其中 A 为一个天然存在的 tubulysin。
4. 权利要求 1 的化合物,其中 A 是 tubulysin B。
5. 权利要求 1 的化合物,其为下式,

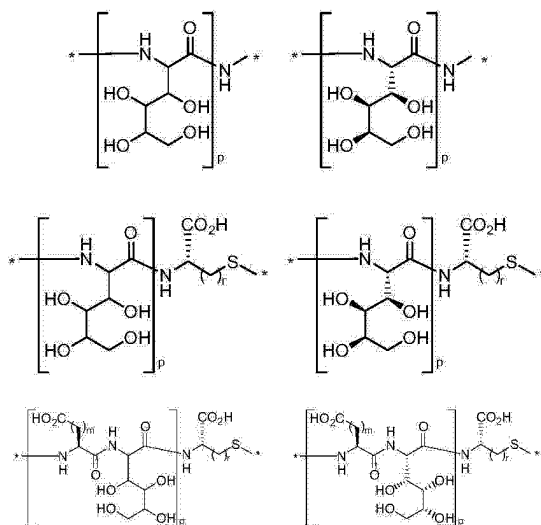


6. 权利要求 1 的化合物,其中所述结合配体 B 是叶酸盐。
7. 权利要求 1 到 6 的任一项的化合物,其中至少一个所述亲水性间隔区接头包含至少一个多羟基基团。
8. 权利要求 1 到 6 的任一项的化合物,其中至少一个所述亲水性间隔区接头包含至少三个多羟基基团。
9. 权利要求 1 至 6 的任一项的化合物,其中所述接头 L 还包含一个或多个天冬氨酸、一个或多个谷氨酸、一个或多个精氨酸、或一个或多个 β 氨基丙氨酸,或前述的组合。
10. 权利要求 1 至 6 的任一项的化合物,其中所述接头 L 还包含一个或多个 β 氨基丙氨酸。
11. 权利要求 1 到 6 的任一项的化合物,其中所述接头 L 还包含选自下列的式子中的一个或多个:



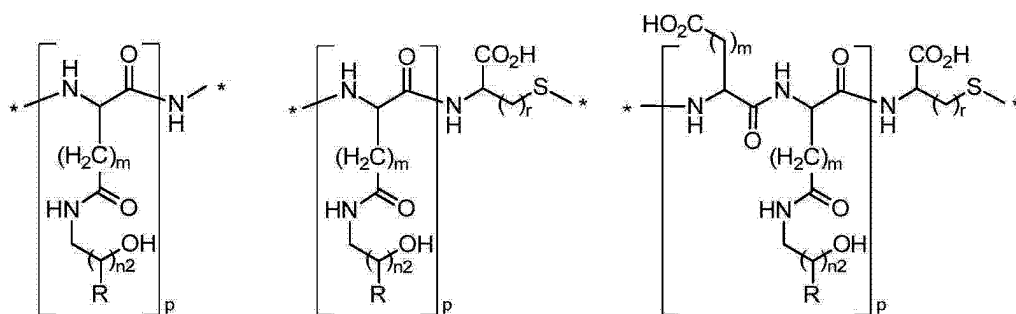
其中R在每种情况下独立地选自H、烷基、环烷基或芳烷基；m是在每种情况下独立地选自1到3的整数；n1是在每种情况下独立地选自1到6的整数；p是在每种情况下独立地选自1到5的整数；以及r是选自1到3的整数。

12. 权利要求1到5的任一项的化合物，其中所述接头L还包含一个或更多个选自以下构成的组的式子



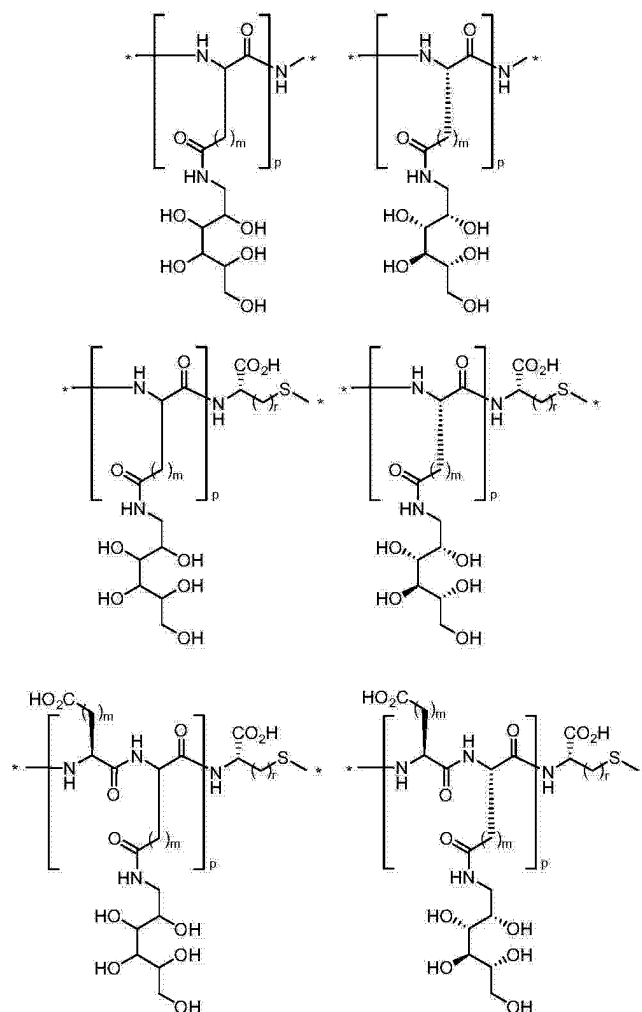
其中p是选自1到5的整数；m是在每种情况下独立地选自1到3的整数；r是选自1到3的整数。

13. 权利要求1到6的任一项的化合物，其中所述接头L还包含一个或更多个选自以下的式子：



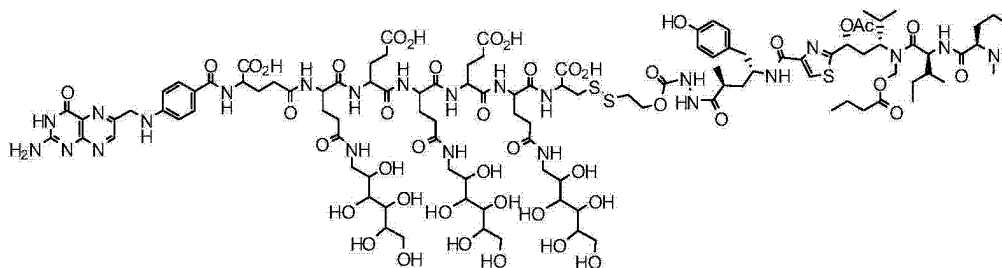
其中R在每种情况下独立地选自H、烷基、环烷基或芳烷基；m是在每种情况下独立地选自1到3的整数；n2是在每种情况下独立地选自1到6的整数；p是在每种情况下独立地选自1到5的整数；和r是选自1至3的整数。

14. 权利要求13的化合物，其中所述接头L还包含一个或更多个选自以下构成的组的式子



其中 p 是在每种情况下独立地选自 1 到 5 的整数 ;m 是在每种情况下独立地选自 1 到 3 的整数 ;和 r 是在每种情况下独立地选自 1 至 3 的整数。

15. 权利要求 13 的化合物,其为下式



16. 一种药物组合物,包含治疗有效量的权利要求 1 到 6 的任一项的一种或更多种化合物,和任选地其载体,稀释剂和 / 或赋形剂,或其组合。

17. 一种药物组合物,包含治疗有效量的权利要求 15 的化合物,和任选地其载体,稀释剂和 / 或赋形剂,或其组合。

18. 权利要求 1 到 6 的任一项的化合物、或包含所述化合物的药物组合物用于制备治疗疾病或状况的药物的用途,其中所述治疗包括靶向表达或过量表达能够结合至少一个叶酸盐受体结合配体 B 的受体的细胞。

19. 权利要求 15 的化合物、或包含所述化合物的药物组合物用于制备治疗疾病或状况

的药物的用途,其中所述治疗包括靶向表达或过量表达能够结合至少一个叶酸盐受体结合配体 B 的受体的细胞。

含有亲水性间隔区接头的共轭物

[0001] 本申请是 2008 年 6 月 25 日申请的发明名称为“含有亲水性间隔区接头的共轭物”、国家申请号为 200880104308.3 的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求分别于 2007 年 6 月 25 日和 2008 年 3 月 13 日提交的美国临时专利申请系列号 Nos. 60/946,092 和 61/036,186 的根据 35 U.S.C. § 119(e) 的优先权权益；它们的公开内容通过将它们引用来全部合并在此。

技术领域

[0004] 本发明涉及用于靶向的药物递送的组合物和方法。更特别地，本发明涉及含有亲水性间隔区接头的细胞表面受体结合药物递送共轭物，用于治疗由病原性细胞群体引起的疾病状况，以及涉及使用和包括这样的共轭物的方法和药物组合物。

[0005] 背景

[0006] 哺乳动物免疫系统提供了识别和消除肿瘤细胞、其他病原性细胞和侵入的外来病原体的方式。在免疫系统正常地提供强壮的防御线时，存在着许多情况癌细胞、其他病原性细胞或传染剂逃避宿主免疫应答，并伴随着宿主致病性而增殖或持续。已经开发了化学治疗剂和放射疗法来消除例如复制中的肿瘤。然而，许多当前可用的化学治疗剂和放射治疗方法具有不良副作用，因为它们不仅破坏病原性细胞，它们还影响正常宿主细胞，例如，造血系统的细胞。这些抗癌药物的不良副作用突出了对病原性细胞群体选择性的以及具有降低的宿主毒性的新的疗法的开发需求。

[0007] 研究人员已经开发了通过将细胞毒性化合物靶向这些细胞来破坏病原性细胞的治疗方案。许多这些方案利用了与抗体共轭的毒素以试图最小化毒素向正常细胞的递送，所述抗体结合病原性细胞独特的或过量表达的抗原。利用这种方法，已经开发了某些免疫毒素，其由针对病原性细胞上的特异性抗原的抗体组成，所述抗体被连接到毒素，例如蓖麻毒素、假单胞菌外毒素、白喉毒素和肿瘤坏死因子。这些免疫毒素靶向带有由所述抗体识别的特异性抗原的病原性细胞，例如，肿瘤细胞 (Olsnes, S., Immunol. Today, 10, pp. 291-295, 1989; Melby, E. L., Cancer Res., 53(8), pp. 1755-1760, 1993; Better, M. D., PCT 公开号 WO 91/07418, 1991 年 5 月 30 日公布)。

[0008] 靶向宿主中病原性细胞例如癌细胞或外来病原体的群体的另一种方法是增强针对所述病原性细胞的宿主免疫应答来避免施用可能也展现独立的宿主毒性的化合物的需要。免疫治疗的一种报道的策略是将抗体，例如，遗传工程化的多聚抗体结合到肿瘤细胞的表面，来在所述细胞表面展示所述抗体的恒定区，从而通过各种免疫系统介导的过程诱导肿瘤细胞杀伤。(De Vita, V. T., Biologic Therapy of Cancer, 2d ed. Philadelphia, Lippincott, 1995; Soullillou, J. P., U.S. 专利 5,672,486)。然而，这些方法由于在确定肿瘤特异性抗原方面的困难而是复杂的。因此，需要其他的化合物和方法来选择性地靶向病原性细胞群体。

[0009] 发明概述

[0010] 已经发现的是,治疗试剂、诊断试剂和成像试剂可以共轭到其他化合物来控制或改变它们的行为、生物分布、新陈代谢和 / 或体内清除。在本发明的一个例示性的实施方式中,描述了包括亲水性间隔区接头的化合物共轭物。在一个方面,描述了包括亲水性间隔区接头和靶向配体的化合物共轭物。这样的共轭物的例子是以下描述的式子的化合物

[0011] B-L-A

[0012] 其中 B 是受体结合配体,其结合目标细胞受体,L 是包含一个或更多个亲水性间隔区接头的接头,A 是希望被递送到细胞的诊断、治疗或成像试剂。

[0013] 在另一个实施方式中,在此描述了以下式子的非受体结合靶向化合物:

[0014] L-A

[0015] 其中 L 是包含一个或更多个亲水性间隔区接头的接头,A 是诊断、治疗或成像试剂。在一种变体中,接头 L 不包括可释放的接头。在另一种变体中,接头 L 包括可释放的接头。在另一个实施方式中,至少一个所述亲水性间隔区接头由至少一个碳水化物形成或包括至少一个碳水化物。在一种变体中,所述碳水化物形成连接 B 和 A 的接头链的部分。在另一种变体中,所述碳水化物形成附着于连接 B 和 A 的接头链的侧链的部分。

[0016] 要理解的是,在每种上述实施方式中,超过一个受体结合配体 B 可以附着于在此描述的接头。进一步理解的是,超过一种试剂 A 可以附着于在此描述的接头。在此还描述了这样的多配体和 / 或多药物共轭物,其中接头包含亲水性间隔区接头。

[0017] 在另一个实施方式中,在此描述了化合物,其具有降低的肝脏摄取以及较低可能地由肝脏清除。在一个方面,与肝脏过程相比,这样的化合物优先地由肾脏过程清除。

[0018] 单个试剂或复数个试剂 A 包括治疗药物、诊断试剂、成像试剂以及通过靶向细胞受体理想地或有益地被递送到细胞的任何其他化合物。例示性的药物包括细胞毒性药物、抗炎试剂,等等。例示性的诊断试剂和成像试剂包括 PET 成像试剂、荧光成像试剂、放射性配体、放射性配体络合试剂,等等。

[0019] 在此处描述的化合物、组合物和方法的实施方式中,可以用治疗、诊断和 / 或成像试剂 A 靶向的细胞包括各种各样的,例如但不限于癌细胞、细菌细胞、肿瘤细胞、单核细胞、活化的巨噬细胞、祖细胞,例如,内皮祖细胞,其他炎性细胞、动脉粥样硬化斑块、感染,等等。所述细胞的靶向通过细胞受体结合配体 B 的适当的选择来实现。要理解的是,在体内细胞的选择性或特异性靶向可以通过选择被所述目标细胞优先地表达或过量表达的受体来实现。例示性地,所述目标细胞优先地表达或过量表达维生素受体,例如叶酸盐受体。

[0020] 在另一个实施方式中,在此描述的共轭物以有效治疗与病原性细胞群体相关的疾病或疾病状况的数量被包括在药物组合物中。

[0021] 在另一个实施方式中,在此描述的共轭物以及含有它们的药物组合物被用于治疗与病原性细胞群体相关的疾病和疾病状况的方法中。

[0022] 附图的简要描述

[0023] 附图 1 显示了 EC234 的相对结合亲和力、叶酸 (●) 和 EC0234 (■) 的 DPM。

[0024] 附图 2 显示了 EC0258 针对 KB 细胞 (2h 脉冲 / 72h 追踪) 对 EC258 (●) 和 EC258+ 过量叶酸 (○) 的活性。

[0025] 附图 3A 显示了 EC0234 和 EC0246 在小鼠中针对 M109 肿瘤的效力,未治疗的对照 (■)、EC145 标准 (TIW 3 μmol/kg, 3 周) (●)、EC0234 (TIW 3 μmol/kg, 3 周) (▼) 和

EC0246(TIW 3 μ mol/kg, 3 周)(▲)。

[0026] 附图 3B 显示了 EC0234 和 EC0246 对体重变化百分比的影响, 未治疗的对照(■)、EC145 标准(TIW 3 μ mol/kg, 3 周)(●)、EC0234(TIW 3 μ mol/kg, 3 周)(▼)和 EC0246(TIW 3 μ mol/kg, 3 周)(▲); 表明在治疗期间没有观察到总体毒性。

[0027] 附图 4A 显示了以 2 μ mol/kg TIW 给药 2 周, 在小鼠中 EC0396(▼)、EC145(▲)和 PBS 对照(■)对 KB 肿瘤体积的影响(垂直线指示最后的给药日期)。

[0028] 附图 4B 显示了以 2 μ mol/kg TIW 给药 2 周, EC0396(▼)、EC145(▲)和 PBS 对照(■)对体重变化百分比的影响(垂直线指示最后的给药日期); 表明在治疗期间没有观察到总体毒性。

[0029] 附图 5A 显示了以 2 μ mol/kg TIW 给药 2 周, EC0400(●)、EC145(▲)和 PBS 对照(■)对 KB 肿瘤体积的影响(垂直线指示最后的给药日期)。

[0030] 附图 5B 显示了以 2 μ mol/kg TIW 给药 2 周, EC0400(●)、EC145(▲)和 PBS 对照(■)对体重变化百分比的影响(垂直线指示最后的给药日期); 表明在治疗期间没有观察到总体毒性。

[0031] 附图 6A 显示了以 2 μ mol/kg TIW 给药 2 周, 与未治疗的对照(●)相比, 对于 Balb/c 小鼠中 M109 肿瘤, EC0429(▽)和 EC145(▲)对肿瘤体积的影响(垂直线指示最后的给药日期)。

[0032] 附图 6B 显示了以 2 μ mol/kg TIW 给药 2 周, 与未治疗的对照(●)相比, EC0429(▽)和 EC145(▲)对体重变化百分比的影响(垂直线指示最后的给药日期); 表明在治疗期间没有观察到总体毒性。

[0033] 附图 7A 显示了以 2 μ mol/kg TIW 给药 2 周, 与未治疗的对照(●)相比, 对于 Balb/c 小鼠中 s. c. M109 肿瘤, EC0434(△)和 EC145(▲)对肿瘤体积的影响(垂直线指示最后的给药日期)。

[0034] 附图 7B 显示了以 2 μ mol/kg TIW 给药 2 周, 与未治疗的对照(●)相比, EC0434(△)和 EC145(▲)对体重变化百分比的影响(垂直线指示最后的给药日期); 表明在治疗期间没有观察到总体毒性。

[0035] 附图 8A 显示了以 2 μ mol/kg TIW 给药 2 周, EC0305(●)、EC0436(▼)和 PBS 对照(■)对 Balb/c 小鼠中 s. c. M109 肿瘤的肿瘤体积的影响(垂直线指示最后的给药日期)。

[0036] 附图 8B 显示了以 2 μ mol/kg TIW 给药 2 周, EC0305(●)、EC0436(▼)和 PBS 对照(■)对体重变化百分比的影响(垂直线指示最后的给药日期); 表明在治疗期间没有观察到总体毒性。

[0037] 附图 9 显示了静脉内地一周治疗三次进行一周, 具有 s. c. M109 肿瘤的 Balb/c 小鼠的体重变化百分比, PBS(未治疗的对照)(●)、EC0436(TIW 2 μ mol/kg)(▲)、EC0436(TIW 2.5 μ mol/kg)(▼)、EC0436(TIW 3 μ mol/kg)(■)、EC0305(TIW 2 μ mol/kg)(△)、EC0305(TIW 2.5 μ mol/kg)(▽)和 EC0305(TIW 3 μ mol/kg)(□)。

[0038] 附图 10A 显示了与 PBS 治疗的对照(■)相比, 3 μ mol/kg 的 EC0565(qdx5 两周)(●)对 nu/nu 小鼠中 s. c. KB 肿瘤的影响。根据该数据, 可以测定出 1.2 的 Log 细胞杀伤

(LCK) 值 (值大于约 0.7 是活性抗癌化合物的指示)。

[0039] 附图 10B 显示了与 PBS 治疗的对照 (■) 相比, $3 \mu\text{mol/kg}$ 的 EC0565 (qdx5 两周) (●) 对体重变化百分比的影响; 表明在治疗期间没有观察到总体毒性。

[0040] 附图 11 显示了在插管的大鼠中胆管分析中肝胆排泄方面, 以 $2 \mu\text{mol/kg i.v.}$ 快速浓注的各种 DAVLBH 共轭物的总体 DAVLBH 胆汁排泄。测量的胆汁中总剂量的百分比是 $\text{EC145} = 8.7\%$ (●)、 $\text{EC0409} = 7.9\%$ (◆)、 $\text{EC0429} = 8.6\%$ (■)、 $\text{EC0434} = 2.8\%$ (▼)。此外, EC145 显示了 $\text{AUC} = 1092$ (●); 最后的采集时点是 139 分钟; EC0434 显示了 $\text{AUC} = 260$ (■); 120、135 和 360 分钟时点都低于定量水平, 即, $< 0.65 \mu\text{M}$ 。

[0041] 附图 12 显示了基于核糖的间隔区对胆汁清除的影响以及扩大衍生化的影响。柱上方的数字相应于接头中亲水性间隔区的数目。

[0042] 附图 13 显示了, 使用 30 分钟照相机暴露, EC0565 诱导 KB 细胞中 RPS6 和 p70S6K 的剂量应答性抑制作用 (1h 脉冲 / 4h 追踪), 其中 C = 对照 (未处理的细胞); FAC = 叶酸对照 ($100 \mu\text{M}$)。

[0043] 附图 14 显示了 bortezomib 对比甲基巯基 bortezomib 衍生物 (EC0501) 的细胞毒性。 IC_{50} bortezomib, 20nM (●); EC0501, 240nM (■)。

[0044] 附图 15 显示了, 亲水性间隔区接头赋予了单-和二-thio-velcade 叶酸盐共轭物针对 RAW264.7 细胞的特异性活性。在 5h 脉冲、随后 72 小时追踪之后的细胞生存力 (MTT); bortezomib (■)、EC0501 (□)、EC0522 (▲)、EC0522 加过量的叶酸 (▽)。

[0045] 附图 16 显示了用 EC0595 (13nM IC_{50}) (▼)、EC0595 加过量叶酸 (▽)、bortezomib (■)、EC0525 (46nM IC_{50}) (●)、EC0525 加过量叶酸 (○) 处理之后的细胞生存力 (5h 脉冲 / 72h 追踪) (XTT)。

[0046] 附图 17 显示了在用 bortezomib (■)、EC0587 (●)、EC0587 加过量叶酸 (○) 24h 孵育之后的细胞生存力 (XTT)。

[0047] 附图 18 显示了在 RAW 264.7 细胞中 LPS 刺激的蛋白体活性的抑制作用 (5h 脉冲 / 24h 追踪), LPS 100ng/mL , 30m 20S 蛋白体 / 底物反应时间, 通过 bortezomib (■)、EC0522 (▼)、EC0522 加过量叶酸 (▽)、EC0525 (●)、EC0525 加过量叶酸 (○)、EC0595 (◆)、EC0595 加过量叶酸 (□); EC0595 和 EC0525 的 IC_{50} 是大约 30nM 。

[0048] 附图 19 显示了在用 α -amantin (■)、EC0592 ($\text{IC}_{50} 3.7\text{nM}$) (●)、EC0592 加过量叶酸 (○) 处理后针对 RAW 细胞 (5h 脉冲 / 72h 追踪) 的活性。

[0049] 详细说明

[0050] 在此描述了药物递送共轭物, 其由受体结合配体 (B)、包含一个或更多个亲水性间隔区接头的多价接头 (L)、以及希望被递送到细胞的诊断、治疗或成像试剂 (A) 组成。结合配体 (B) 共价附着于多价接头 (L), 诊断、治疗或成像试剂 (A) 或其类似物或衍生物也共价附着于所述多价接头 (L)。还要理解的是, 所述诊断、治疗或成像试剂 (A) 包括附着于所述接头 (L) 的其类似物和衍生物。多价接头 (L) 包含一个或更多个间隔区接头和 / 或可释放的接头, 以及它们的组合, 按照任何顺序。在一种变体中, 可释放的接头和任选的间隔区接头相互共价键合来形成接头。在另一种变体中, 可释放的接头直接附着于所述试剂 (A) 或其类似物或衍生物。在另一种变体中, 可释放的接头直接附着于所述结合配体。在另一种

变体中,结合配体和试剂(A)之一或两者或其类似物或衍生物,通过一个或更多个间隔区接头附着于可释放的接头。在另一种变体中,结合配体和试剂(A)的每一种或其类似物或衍生物附着于可释放的接头,它们的每一种可以直接地相互附着,或通过一个或更多个间隔区接头共价地附着。

[0051] 根据上述的,要理解的是,结合配体、和试剂(A),或其类似物或衍生物以及各种可释放的和任选的间隔区接头的排列可以广泛地变化。在一个方面,所述结合配体、和试剂(A),或其类似物或衍生物、以及各种可释放的和任选的间隔区接头通过杂原子,例如氮、氧、硫、磷、硅等等相互附着。在变体中,除了氧之外的杂原子可以处于各种氧化状态,例如N(OH)、S(O)、S(O)₂、P(O)、P(O)₂、P(O)₃,等等。在其他变体中,杂原子可以组合形成二价基,实例例如羟胺、肼、胂、磺酸酯、亚膦酸酯、膦酸酯等等,包括式-(NHR¹NHR²)-、-SO-、-(SO₂)-和-N(R³)O-的基团,其中R¹、R²和R³各自独立地选自氢、烷基、芳基、芳烷基、取代的芳基、取代的芳烷基、杂芳基、取代的杂芳基、和烷氧基烷基。在另一种变体中,超过一个结合配体附着到多价接头上。在另一种变体中,超过一个试剂(A)附着到多价接头上。在另一种变体中,超过一个结合配体和超过一个试剂(A)附着到多价接头上。

[0052] 在一个实施方式中,所述受体结合配体是维生素受体结合配体,例如,维生素,或能够结合维生素受体的其类似物或衍生物。在另一个实施方式中,所述结合配体是维生素或其类似物或衍生物,其附着于可释放的接头,所述可释放的接头通过接头附着到所述药物,所述接头由一个或更多个间隔区接头和/或可释放的接头和/或亲水性间隔区接头形成。在一种变体中,所述药物和所述维生素或其类似物或衍生物可以各自附着到间隔区接头,此时所述间隔区接头通过一个或更多个可释放的接头相互附着。此外,所述药物和所述维生素或其类似物或衍生物可以各自附着到一个或更多个可释放的接头,此时所述可释放的接头通过间隔区接头相互附着。这些基团的每一个可以通过结合配体、试剂A、或可释放的亲水性间隔区或另外的间隔区接头上现存的或另外的杂原子来连接。

[0053] 结合配体(B)的结合位点可以包括任何结合配体(B)或能够特异性结合受体的其衍生物或类似物的受体,其中所述受体或其他蛋白质被病原性细胞群体独特地表达、过量表达或优先地表达。所述病原性细胞独特地表达、过量表达或优先地表达的表面呈递的蛋白质一般是受体,所述受体不存在于或以更低浓度存在于非病原性细胞上,提供了选择性消灭、标记或诊断所述病原性细胞的手段。所述结合配体药物递送共轭物能够高亲和力结合癌细胞或其他类型的病原性细胞上的受体。所述高亲和力结合可以是所述结合配体固有的,或所述结合亲和力可以通过使用化学修饰的配体(例如,维生素的类似物或衍生物)来增强。

[0054] 在此描述的结合配体药物递送共轭物可以由,例如,各种各样的维生素或受体结合维生素类似物/衍生物、接头和药物形成。在此描述的结合配体药物递送共轭物能够选择性地靶向宿主动物中的病原性细胞的群体,由于所述结合配体的受体在病原性细胞上的优先表达,所述结合配体例如可用于配体结合的维生素。可以用作结合配体(B)的例示性的维生素部分包括肉碱、肌醇、硫辛酸、吡哆醛、抗坏血酸、烟酸、泛酸、叶酸、核黄素、硫胺、生物素、维生素B₁₂、其他水溶性维生素、B族维生素,以及脂溶性维生素A、D、E和K。这些维生素以及它们的受体结合类似物和衍生物,构成了例示性的靶向实体,其能够通过二价的接头(L)与药物偶联来形成在此描述的结合配体(B)药物递送共轭物。术语维生素被理解

为包括维生素类似物和 / 或衍生物, 除非另有陈述。例示性地, 叶酸盐的衍生物蝶酸、生物素类似物例如生物胞素、生物素亚砷、氧化生物素和其他生物素受体结合化合物, 等等, 被认为是维生素、维生素类似物和维生素衍生物。要理解的是, 在此描述的维生素类似物或衍生物是指包括杂原子的维生素, 通过所述杂原子, 维生素类似物或衍生物共价地结合到二价的接头 (L)。

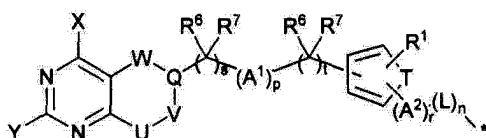
[0055] 例示性的维生素部分包括叶酸、生物素、核黄素、硫胺、维生素 B₁₂ 和这些维生素分子的受体结合类似物和衍生物, 以及其他相关的维生素受体结合分子。

[0056] 在另一个实施方式中, 细胞受体是叶酸盐受体 (folate receptor), 靶向配体 B 是叶酸盐受体结合配体。在另一个实施方式中, B 是叶酸盐, 例如叶酸, 或结合叶酸受体 (folic acid receptor) 的叶酸的类似物或衍生物。要理解的是, 在此使用的术语叶酸盐 (folate) 独立地和共同地指叶酸 (folic acid) 本身、和 / 或能够结合叶酸盐受体的叶酸的这样的类似物和衍生物。在另一个实施方式中, B 是能够选择性或特异性结合叶酸盐受体的化合物, 例如抗体。

[0057] 叶酸盐类似物和 / 或衍生物的例示性的实施方式包括亚叶酸、蝶聚谷氨酸 (pteropolylglutamic acid), 叶酸盐受体结合蝶啶类, 例如, 四氢蝶呤、二氢叶酸盐、四氢叶酸盐和它们的脱氮和双脱氮类似物。术语“脱氮”和“双脱氮”类似物是指本领域公认的类似物, 其具有代替天然存在的叶酸结构或其类似物或衍生物中的一个或两个氮原子的碳原子。例如, 脱氮类似物包括叶酸盐的 1-脱氮、3-脱氮、5-脱氮、8-脱氮和 10-脱氮类似物。双脱氮类似物包括, 例如, 叶酸盐的 1,5-双脱氮、5,10-双脱氮、8,10-双脱氮和 5,8-双脱氮类似物。作为络合物形成配体有用的其他叶酸盐包括叶酸盐受体结合类似物氨蝶呤、氨甲蝶呤 (甲氨蝶呤)、N¹⁰-甲基叶酸盐、2-脱氨基-羟基叶酸盐、脱氮类似物, 例如 1-脱氮甲氨蝶呤或 3-脱氮甲氨蝶呤, 以及 3',5'-二氯-4-氨基-4-脱氧-N¹⁰-甲基蝶酰谷氨酸 (二氯甲氨蝶呤)。上述叶酸类似物和 / 或衍生物通常被称为叶酸盐类, 反映了它们与叶酸盐受体结合的能力, 这些配体当与外源分子共轭时对于提高跨膜转运是有效的, 例如, 通过在此描述的叶酸盐介导的内吞作用。能够结合叶酸盐受体来启动络合物的受体介导的内吞转运的其他适合的结合配体包括针对叶酸盐受体的抗体。在与针对叶酸盐受体的抗体的络合物中的外源的分子被用于触发所述络合物的跨膜转运。

[0058] 在美国专利申请公开系列号 2005/0227985 和 2004/0242582 中描述了结合叶酸受体的其他叶酸类似物, 其公开内容通过引用合并在此。例示性地, 这样的叶酸盐类似物具有通式:

[0059]



[0060] 其中 X 和 Y 各自独立地选自自由卤素、R²、OR²、SR³ 和 NR⁴R⁵ 构成的组;

[0061] U、V 和 W 代表二价的部分, 各自独立地选自自由 -(R^{6a})C =、-N =、-(R^{6a})C(R^{7a})- 和 -N(R^{4a})- 构成的组; Q 选自自由 C 和 CH 构成的组; T 选自自由 S、O、N 和 -C = C- 构成的组;

[0062] A¹ 和 A² 各自独立地选自自由氧、硫、-C(Z)-、-C(Z)O-、-OC(Z)-、-N(R^{4b})-、-C(Z)

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

[0063] R^1 选自自由氢、卤素、 C_1-C_{12} 烷基、和 C_1-C_{12} 烷氧基构成的组； R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^{4a} 、 R^{4b} 、 R^5 、 R^{5b} 、 R^{6b} 和 R^{7b} 各自独立地选自自由氢、卤素、 C_1-C_{12} 烷基、 C_1-C_{12} 烷氧基、 C_1-C_{12} 烷酰基、 C_1-C_{12} 链烯基、 C_1-C_{12} 炔基、(C_1-C_{12} 烷氧基)羰基、和 (C_1-C_{12} 烷氨基)羰基构成的组；

[0064] R^6 和 R^7 各自独立地选自自由氢、卤素、 C_1-C_{12} 烷基和 C_1-C_{12} 烷氧基构成的组；或者， R^6 和 R^7 合起来形成羰基； R^{6a} 和 R^{7a} 各自独立地选自自由氢、卤素、 C_1-C_{12} 烷基和 C_1-C_{12} 烷氧基构成的组；或者 R^{6a} 和 R^{7a} 合起来形成羰基；

[0065] L 是在此描述的二价的接头；和

[0066] n、p、r、s 和 t 各自独立地是 0 或 1。

[0067] 如在此使用的，要理解的是，术语叶酸盐是独立地指代用于形成共轭物的叶酸，或作为选择指代能够与叶酸盐或叶酸受体结合的叶酸盐类似物或其衍生物。

[0068] 在这样的叶酸盐类似物的一个方面，当 s 是 1 时，t 是 0，和当 s 是 0 时，t 是 1。在这样的叶酸盐类似物的另一个方面，n 和 r 都是 1，接头 L^a 是在它的 α -氨基通过酰胺键共价连接到 A^2 的天然存在的氨基酸。例示性的氨基酸包括天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、半胱氨酸，等等。

[0069] 维生素可以是包括氮的叶酸盐，在这个实施方式中，间隔区接头可以是亚烷基羰基、环亚烷基羰基、羰基烷基羰基、1-亚烷基琥珀酰亚胺-3-基、1-(羰基烷基)琥珀酰亚胺-3-基，其中每个间隔区接头任选地被取代基 X^1 取代，并且所述间隔区接头键合到叶酸盐氮上来形成亚胺或烷基酰胺。在这个实施方式中，取代基 X^1 可以是烷基、羟基烷基、氨基、氨基烷基、烷基氨基烷基、二烷基氨基烷基、巯基烷基、烷基硫代烷基、芳基、取代的芳基、芳烷基、取代的芳烷基、羧基、羧基烷基、胍基烷基、 R^4 -羰基、 R^5 -羰基烷基、 R^6 -酰氨基、和 R^7 -酰基氨基烷基，其中 R^4 和 R^5 各自独立地选自氨基酸、氨基酸衍生物和肽，其中 R^6 和 R^7 各自独立地选自氨基酸、氨基酸衍生物和肽。

[0070] 维生素类似物和 / 或衍生物的例示性的实施方式还包括生物素的类似物和衍生物，例如生物胞素、生物素亚砷、氧化生物素和其他生物素受体结合化合物，等等。要理解的是，在此描述的其他维生素的类似物和衍生物也是此处期待的。在一个实施方式中，在此处描述的药物递送共轭物中可用作结合配体 (B) 的维生素包括，结合在活化的巨噬细胞上特异性表达的维生素受体例如，叶酸盐受体的那些，所述叶酸盐受体结合叶酸盐、或在此描述的其类似物或衍生物。

[0071] 除了在此描述的维生素之外，要理解的是，其他结合配体可以与在此描述和期待的药物和接头偶联来形成能够促进药物向期望的目标的递送的结合配体-接头-药物共轭物。这些其他的结合配体，除了所描述的维生素和它们的类似物和衍生物之外，可以用于形成能够结合目标细胞的药物递送共轭物。一般地，细胞表面受体的任何结合配体 (B) 可以有益地用作靶向配体，其上可以附着接头-药物共轭物。

[0072] 在此描述的例示性的其他配体包括从文库筛选鉴定的肽配体、肿瘤细胞特异性肽、肿瘤细胞特异性适体、肿瘤细胞特异性碳水化合物、肿瘤细胞特异性单克隆或多克隆抗体、抗体的 Fab 或 scFv (即，单链可变区) 片段，例如，举例来说，针对在转移性癌细胞上特

异性表达或独特地可接近的 EphA2 或其他蛋白质的抗体的 Fab 片段, 来自组合文库的小的有机分子、生长因子, 例如 EGF、FGF、胰岛素和胰岛素样生长因子, 以及同源多肽、生长抑素和它的类似物、转铁蛋白、脂蛋白络合物、胆汁盐、选择素、甾体激素、含有 Arg-Gly-Asp 的肽、类视黄醇、各种的半乳凝素、 δ -鸦片样物质受体配体、胆囊收缩素 A 受体配体、特异于血管紧张素 AT1 或 AT2 受体的配体、过氧化物酶体增殖物 (peroxisome proliferator)- 活化的受体 λ 配体、 β -内酰胺抗生素例如青霉素、包括抗微生物药物的小的有机分子、以及特异性地结合在肿瘤细胞表面或在传染性生物体的表面优先地表达的受体的其他分子, 根据受体或其他细胞表面蛋白的晶体结构被设计以装入特定受体的结合口袋中的抗微生物剂和其他药物, 在肿瘤细胞的表面优先地表达的肿瘤抗原或其他分子的结合配体, 或任何这些分子的片段。

[0073] 可以作为结合配体药物共轭物的结合位点的肿瘤特异性抗原的实例包括 Ephrin 家族蛋白质的成员例如 EphA2 的细胞外表位。EphA2 表达限于正常细胞中的细胞-细胞连接, 但是在转移性肿瘤细胞中 EphA2 分布在整个细胞表面。因而, 转移性细胞上的 EphA2 对于结合, 例如, 共轭到药物的抗体的 Fab 片段是可接近的, 而该蛋白质对于在正常细胞上与 Fab 片段结合将不是可接近的, 产生对转移性癌细胞特异性的结合配体药物共轭物。

[0074] 接头 L 包括一个或更多个亲水性间隔区接头。此外, 其他任选的间隔区接头和 / 或可释放的接头可以被包括在 L 中。要理解的是, 当选择预定的长度用于分离结合配体 B 和试剂 A 时, 可以包括其他的间隔区接头。还要理解的是, 在某些结构中, 可以包括可释放的接头。例如, 在此描述的一个实施方式中, 靶向配体共轭物可以用于递送药物来治疗癌症或其他涉及病原性细胞的疾病。在这样的实施方式中, 理解的是, 一旦被递送, 所述药物理想地从所述共轭物上释放。例如, 在靶向配体是叶酸盐或其类似物或衍生物的结构中, 共轭物可以结合到叶酸盐受体。一旦结合, 共轭物通常经历内吞作用的过程, 共轭物被递送到细胞的内部。细胞机制可以生物学地降解所述共轭物来释放药物“有效载荷”和释放叶酸盐化合物。

[0075] 在可选择结构中, 靶向共轭物可以用于免疫治疗。在这种结构中, 一般不包括可释放的接头。例如, 叶酸盐或其他维生素受体结合化合物与免疫原的共轭物, 一旦被递送, 将结合到合适的受体, 并以抗原性的有效载荷装饰或标记细胞。在另一个可选择结构中, 靶向共轭物可以用于诊断性疗法。在这种结构中, 可以包括或不包括可释放的接头。例如, 包括成像试剂的共轭物可以利用合适的细胞受体结合配体递送给目标细胞, 例如叶酸盐或其他维生素受体结合化合物。在一个方面, 所述共轭物可以保持在细胞的表面用于成像。在另一个结构中, 共轭物可以经历内吞作用进入细胞的内部。在后者的情况中, 可以包括可释放的接头。

[0076] 因此, 在其他方面, 在此描述的共轭物 B-L-A 还包括以下通式:

[0077] $B-L_S-L_H-A$

[0078] $B-L_H-L_S-A$

[0079] $B-L_S-L_H-L_S-A$

[0080] $B-L_R-L_H-A$

[0081] $B-L_H-L_R-A$

[0082] $B-L_R-L_H-L_R-A$

[0083] $B-L_S-L_R-L_H-A$

[0084] $B-L_R-L_H-L_S-A$

[0085] $B-L_R-L_S-L_H-L_R-A$

[0086] $B-L_H-L_S-L_H-L_R-A$

[0087] 其中 B、L 和 A 是在此描述的， L_R 是可释放的接头片段， L_S 是间隔区接头片段， L_H 是接头 L 的亲水性接头片段。要理解的是，上述式子仅仅是例示性的，亲水性间隔区接头片段、可释放的接头片段和间隔区接头片段的其他排列也被包括在此。此外，要理解的是，其他的共轭物是期待的，其包括复数个亲水性间隔区接头和 / 或复数个可释放的接头和 / 或复数个间隔区接头。

[0088] 类似地，在其他方面，在此描述的共轭物 L-A 还包括以下通式：

[0089] L_S-L_H-A

[0090] L_H-L_S-A

[0091] $L_S-L_H-L_S-A$

[0092] L_R-L_H-A

[0093] L_H-L_R-A

[0094] $L_R-L_H-L_R-A$

[0095] $L_S-L_R-L_H-A$

[0096] $L_R-L_H-L_S-A$

[0097] $L_R-L_S-L_H-L_R-A$

[0098] $L_H-L_S-L_H-L_R-A$

[0099] 其中 L 和 A 是在此描述的， L_R 是可释放的接头片段， L_S 是间隔区接头片段， L_H 是接头 L 的亲水性接头片段。要理解的是，上述式子仅仅是例示性的，亲水性间隔区接头片段、可释放的接头片段和间隔区接头片段的其他排列被包括在此。此外，要理解的是，其他的共轭物是期待的，其包括复数个亲水性间隔区接头和 / 或复数个可释放的接头和 / 或复数个间隔区接头。

[0100] 要理解的是，各种亲水性接头的排列和 / 或方向可以是线性或分支形式，或这两者。例如，亲水性接头可以形成在叶酸盐与药物、成像试剂或诊断试剂之间形成共轭物的接头的主链。做为选择，接头的亲水性部分可以悬垂于或附着于连接结合配体 B 和试剂 A 的原子的链的主链。在后者的排列中，亲水性部分可以是原子的主链的近端或远端的。

[0101] 在另一个实施方式中，所述接头是或多或少线性的，亲水性基团基本上串联地排列来形成共轭物中的链样接头。所述另一种方式，亲水性基团形成了这种线性实施方式中某些或全部的接头主链。

[0102] 在另一个实施方式中，接头是用亲水性基团分支的。在这种分支的实施方式中，亲水性基团可以是主链近端的或主链远端的。在这些排列的每一种中，接头在形状上是更为球形或圆柱形的。在一种变体中，接头的形状象瓶刷。在一个方面，接头的主链由线性系列的酰胺形成，接头的亲水性部分由分支的侧链的并联排列形成，例如，通过连接单糖、磷酸酯等等，以及其衍生物和类似物。

[0103] 要理解的是，所述接头在一定条件下，例如体内遭遇的生理条件下是中性的或可离子化的。对于可离子化的接头，在选定的条件下，接头可以被去质子化来形成阴离子，或

作为选择,被质子化来形成阳离子。要理解的是,可以发生超过一种去质子化或质子化事件。此外,要理解的是,同一接头可以去质子化和质子化来形成内盐或两性离子化合物。

[0104] 在另一个实施方式中,亲水性间隔区接头是中性的,例如,在生理条件下,所述接头不显著地质子化也不去质子化。在另一个实施方式中,亲水性间隔区接头可以被质子化来携带一个或更多个正电荷。要理解的是,质子化能力是条件依赖性的。在一个方面,所述条件是生理条件,所述接头在体内被质子化。在另一个实施方式中,间隔区包括中性的区域和可以被质子化来携带一个或更多个正电荷的区域。在另一个实施方式中,所述间隔区可以包括可被去质子化来携带一个或更多个负电荷的区域,以及可被质子化来携带一个或更多个正电荷的区域。要理解的是,在后者的实施方式中,可以形成两性离子或内盐。

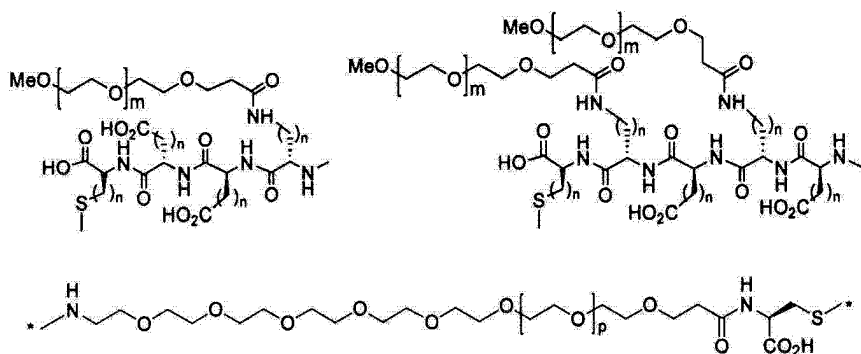
[0105] 在一个方面,可以被去质子化来携带负电荷的接头的区域包括羧酸类,例如,天冬氨酸、谷氨酸,以及更长链的羧酸基团和硫酸酯,例如硫酸的烷基酯。在另一个方面,可以被质子化来携带正电荷的接头的区域包括氨基基团,例如多氨基亚烷,包括乙二胺、丙二胺、丁二胺等等,和 / 或杂环,包括 pyrrolidines、哌啶、哌嗪和其他氨基基团,其每一种是被任选地取代的。在另一个实施方式中,中性的接头区域包括聚羟基,例如糖,碳水化合物、糖类、肌醇等等,和 / 或聚醚基团,例如聚氧化烯基团,包括聚氧乙烯、聚氧丙烯,等等。

[0106] 在一个实施方式中,在此描述的亲水性间隔区接头包括主要从碳、氢和氧形成的,并具有约 3 : 1 或更低,或约 2 : 1 或更低的碳 / 氧比例。在一个方面,在此描述的亲水性接头包括复数个醚官能团。在另一个方面,在此描述的亲水性接头包括复数个羟基官能团。可以用于形成这样的接头的例示性的片段包括多羟基化合物,例如碳水化合物、聚醚化合物,例如聚乙二醇单位,以及酸基,例如羧基和烷基硫酸。在一种变体中,酰胺低聚物间隔区等等也可以被包括在接头中。

[0107] 例示性的碳水化合物间隔区包括在此描述的糖肽,其包括肽特征和糖特征;葡萄糖苷酸,其可以通过 [2+3] Huisgen 环化,也称为 click 化学作用来被掺入; β -烷基糖苷,例如,2-脱氧吡喃己糖(2-脱氧葡萄糖,2-脱氧葡萄糖苷酸,等等)和 β -烷基吡喃甘露糖苷。例示性的 PEG 基团包括约 4 个到约 20 个 PEG 基团的指定长度的那些。例示性的烷基硫酸酯也可以用 click 化学作用直接引入主链中。例示性的酰胺低聚物间隔区包括 EDTA 和 DTPA 间隔区、 β -氨基酸,等等。

[0108] 在另一个实施方式中,在此描述的亲水性间隔区接头包括聚醚,例如下式的接头:

[0109]



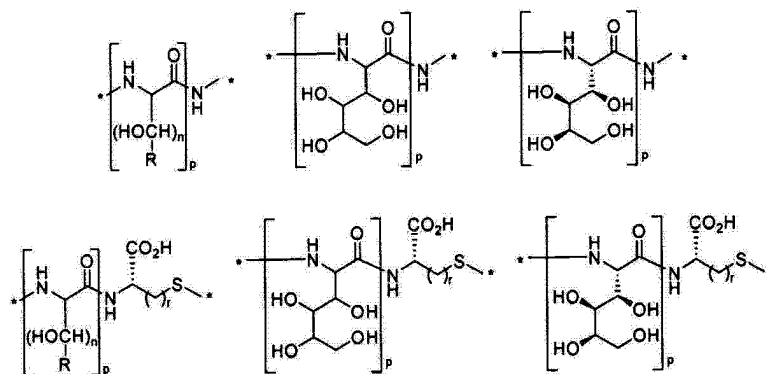
[0110] 其中 m 是在每种情况下独立地选自 1 到约 8 的整数;p 是选自 1 到约 10 的整数;n

是在每种情况下独立地选自 1 到约 3 的整数。在一个方面, m 在每种情况下独立地是 1 到约 3。在另一个方面, n 在每种情况下是 1。在另一个方面, p 在每种情况下独立地是约 4 到约 6。例示性地, 与上述的相应的相应聚丙烯聚醚是此处期待的, 可以被包括在共轭物中作为亲水性间隔区接头。此外, 理解的是, 混合的聚乙烯和聚丙烯聚醚可以被包括在共轭物中作为亲水性间隔区接头。进一步的, 上述聚醚化合物的环形变体, 例如, 包括四氢呋喃、1,3-二噁烷、1,4-二噁烷的那些, 等等, 是此处期待的。

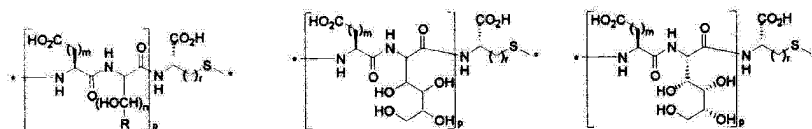
[0111] 在另一个例示性的实施方式中, 在此描述的亲水性间隔区接头包括复数个羟基官能团, 例如, 掺入单糖、低聚糖、多糖等等的接头。要理解的是, 含有多羟基的间隔区接头包括复数个 $-(CROH)-$ 基团, 其中 R 是氢或烷基。

[0112] 在另一个实施方式中, 所述间隔区接头包括一种或更多种以下片段:

[0113]



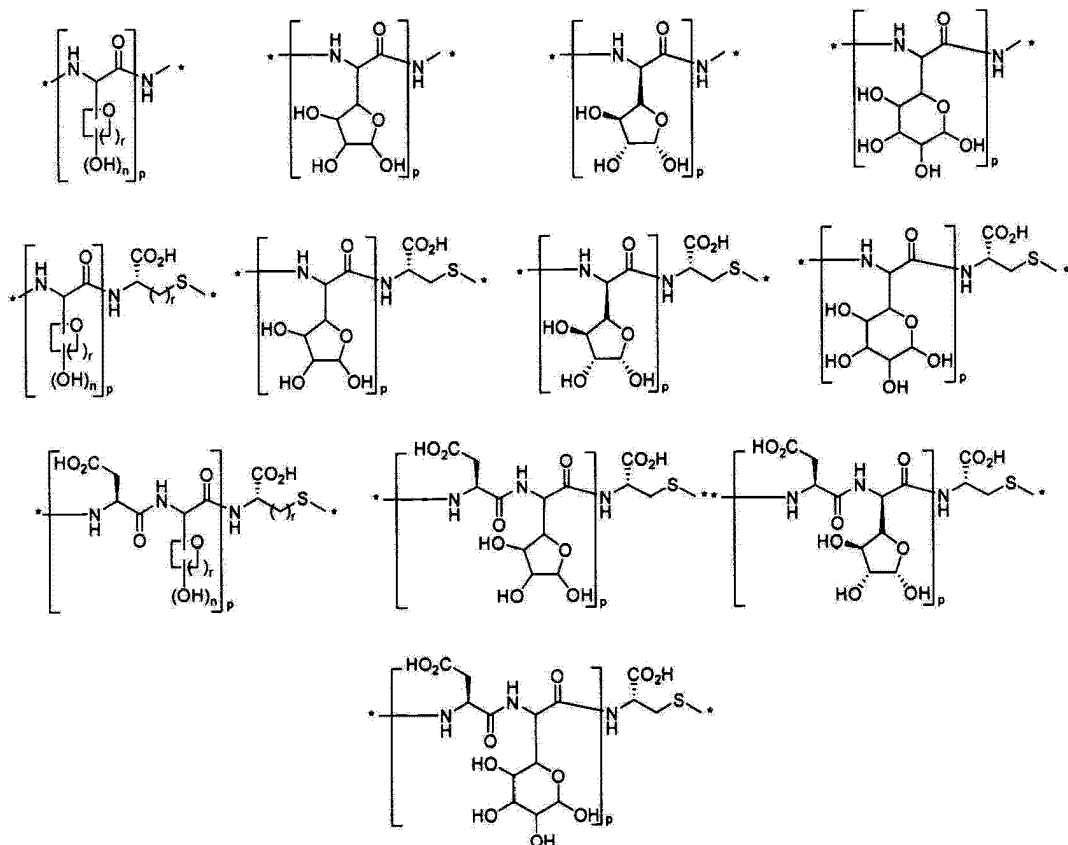
[0114]



[0115] 其中 R 是 H、烷基、环烷基或芳烷基; m 是 1 到约 3 的整数; n 是 1 到约 5 的整数, p 是 1 到约 5 的整数, 以及 r 是选自 1 到约 3 的整数。在一个方面, 所述整数 n 是 3 或 4。在另一个方面, 所述整数 p 是 3 或 4。在另一个方面, 整数 r 是 1。

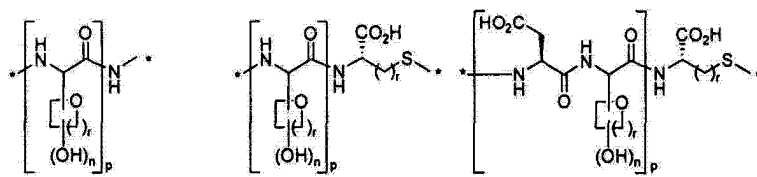
[0116] 在另一个实施方式中, 所述间隔区接头包括一种或更多种以下的环形多羟基基团:

[0117]



[0118] 其中 n 是 2 到约 5 的整数, p 是 1 到约 5 的整数, 以及 r 是 1 到约 4 的整数。在一个方面, 所述整数 n 是 3 或 4。在另一个方面, 所述整数 p 是 3 或 4。在另一个方面, 所述整数 r 是 2 或 3。要理解的是, 这样的接头片段的所有立体化学形式是此处期待的。例如, 在上述式子中, 片段可以来自核糖、木糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖或其他糖类, 并保持了在这些分子上悬垂的羟基和烷基基团的立体化学排列。此外, 要理解的是, 在上述式子中, 各种脱氧化合物也是期待的。例示性地, 以下式子的化合物是期待的:

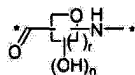
[0119]



[0120] 其中 n 等于或小于 r , 例如当 r 是 2 或 3 时, n 分别是 1 或 2, 或 1、2 或 3。

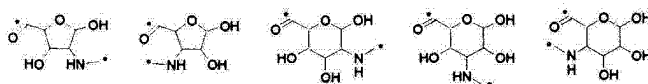
[0121] 在另一个实施方式中, 所述间隔区接头包括以下式子的多羟基化合物:

[0122]



[0123] 其中 n 和 r 各自是选自 1 到约 3 的整数。在一个方面, 间隔区接头包括以下式子的一个或更多个多羟基化合物:

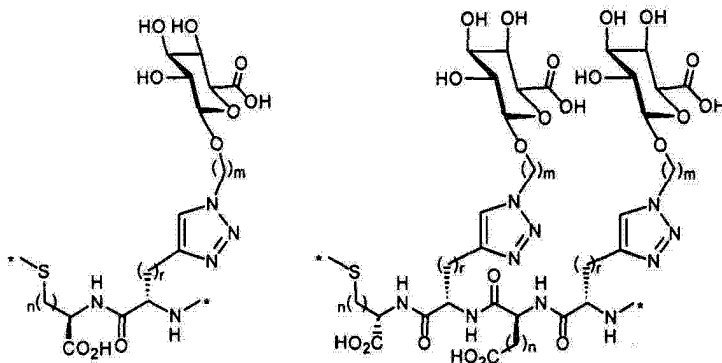
[0124]



[0125] 要理解的是,这样的接头片段的所有立体化学形式是此处期待的。例如,在上述式子中,片段可以来自核糖、木糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖或其他糖类,并保持了在这些分子上悬垂的羟基和烷基基团的立体化学排列。

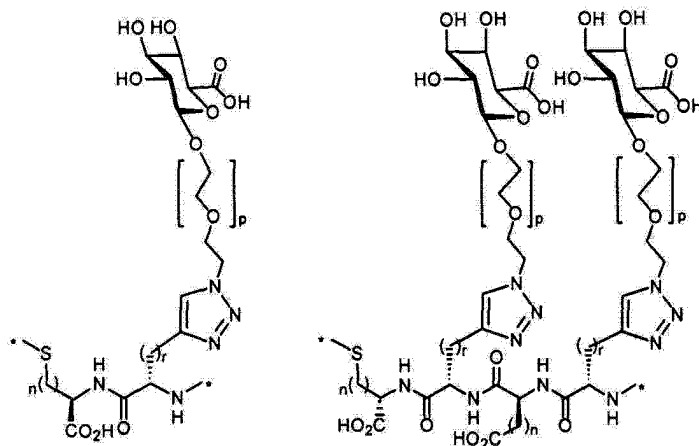
[0126] 在另一个结构中,在此描述的亲水性接头 L 包括被间隔远离接头主链的多羟基基团。在一个实施方式中,这样的碳水化合物基团或多羟基基团通过三唑基团连接到主链,形成三唑连接的亲水性间隔区接头。例示性地,这样的接头包括以下式子的片段:

[0127]



[0128] 其中 n 、 m 和 r 是整数,在每种情况下各自独立地选自 1 到约 5。在一个例示性的方面中, m 在每种情况下独立地是 2 或 3。在另一个方面, r 在每种情况下是 1。在另一个方面, n 在每种情况下是 1。在一种变体中,将多羟基基团连接到接头的主链的基团是不同的杂芳基基团,包括但不限于,吡咯、吡唑、1,2,4-三唑、呋喃、噁唑、异噁唑、噻吩基、噻唑、异噻唑、噻二唑,等等。类似地,二价的 6-元环杂芳基基团是期待的。上述例示性的亲水性间隔区接头的其他变体包括氧化烯基团,例如下式:

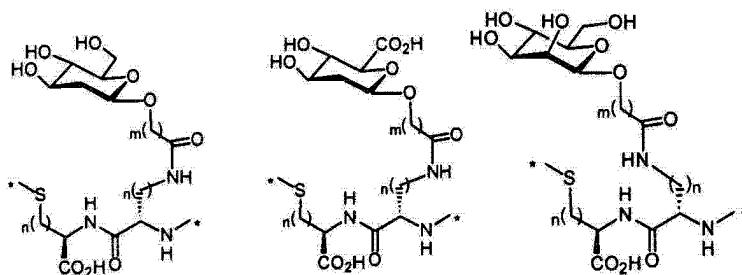
[0129]



[0130] 其中 n 和 r 是整数,在每种情况下各自独立地选自 1 到约 5;以及 p 是选自 1 到约 4 的整数。

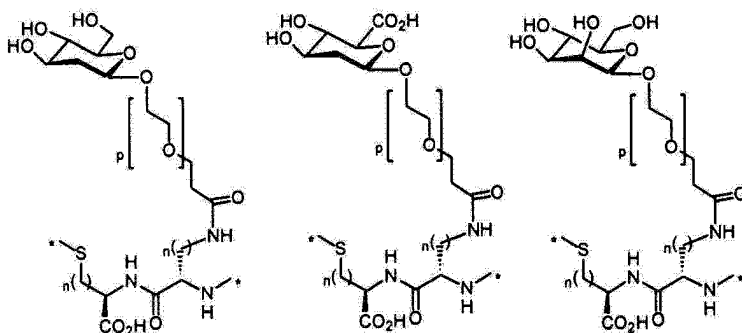
[0131] 在另一个实施方式中,这样的碳水化合物基团或多羟基基团通过酰胺基团连接到主链,形成酰胺连接的亲水性间隔区接头。例示性地,这样的接头包括以下式子的片段:

[0132]



[0133] 其中 n 是选自 1 到约 3 的整数, m 是选自由 1 到约 22 的整数。在一个例示性的方面中, n 是 1 或 2。在另一个例示性的方面中, m 选自约 6 到约 10, 例示性地是 8。在一种变体中, 将所述多羟基基团连接到接头的主链的基团是不同的官能团, 包括但不限于, 酯、脲、氨基甲酸酯、酰胺, 等等。类似地, 环形变体是期待的。上述例示性的亲水性间隔区接头的其他变体包括氧化烯基团, 例如下式:

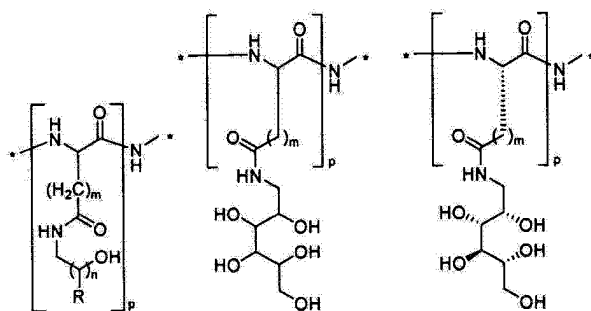
[0134]



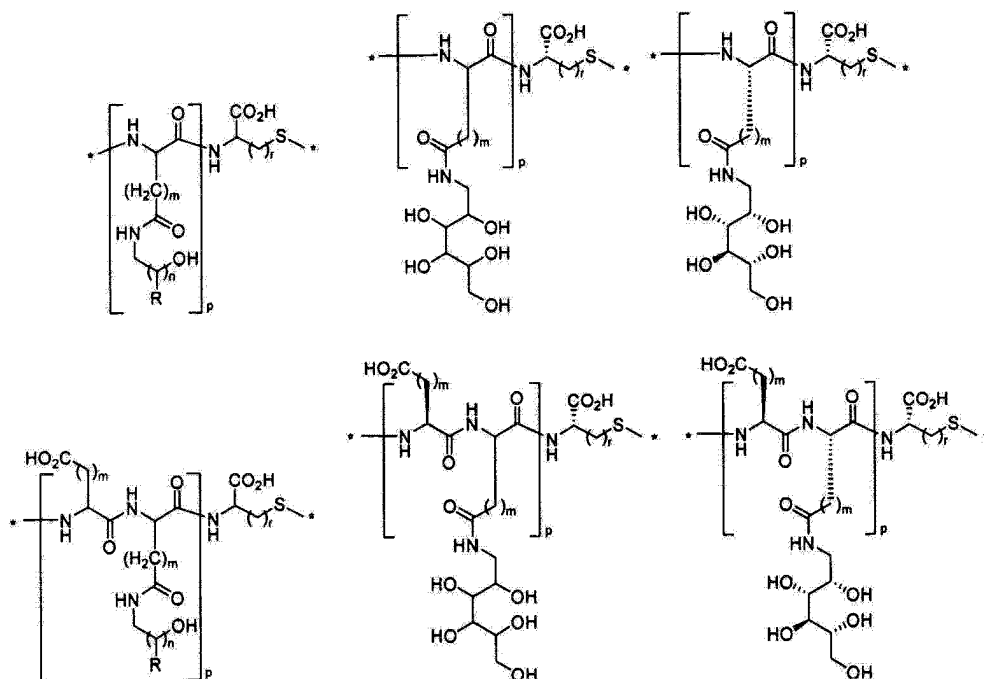
[0135] 其中 n 和 r 是整数, 在每种情况下各自独立地选自 1 到约 5; 以及 p 是选自 1 到约 4 的整数。

[0136] 在另一个实施方式中, 所述间隔区接头包括一种或更多种以下片段:

[0137]



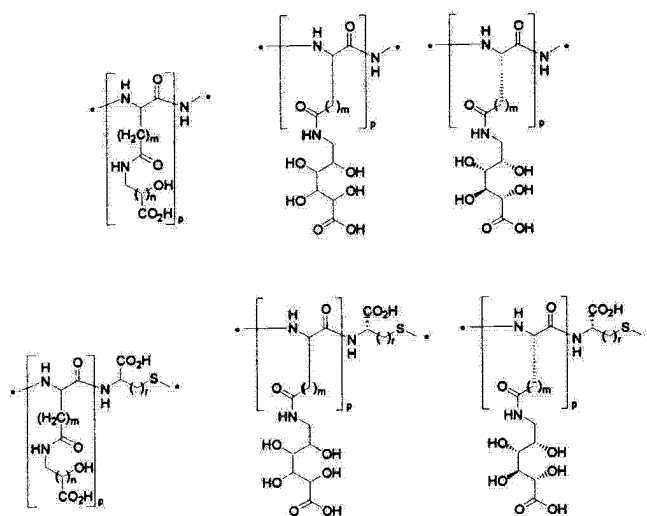
[0138]



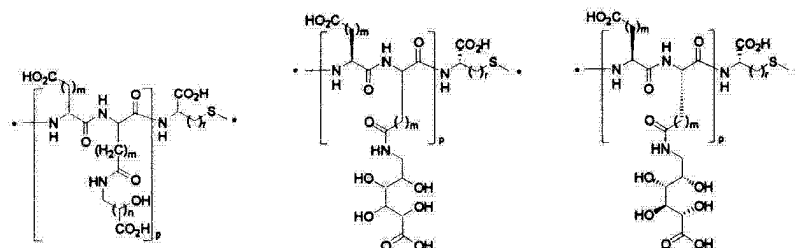
[0139] 其中 R 是 H 、烷基、环烷基或芳烷基； m 是独立地选自 1 到约 3 的整数； n 是 1 到约 6 的整数， p 是 1 到约 5 的整数，以及 r 是选自 1 到约 3 的整数。在一种变体中，所述整数 n 是 3 或 4。在另一种变体中，所述整数 p 是 3 或 4。在另一种变体中，所述整数 r 是 1。

[0140] 在另一个实施方式中，所述间隔区接头包括一种或更多种以下片段：

[0141]



[0142]

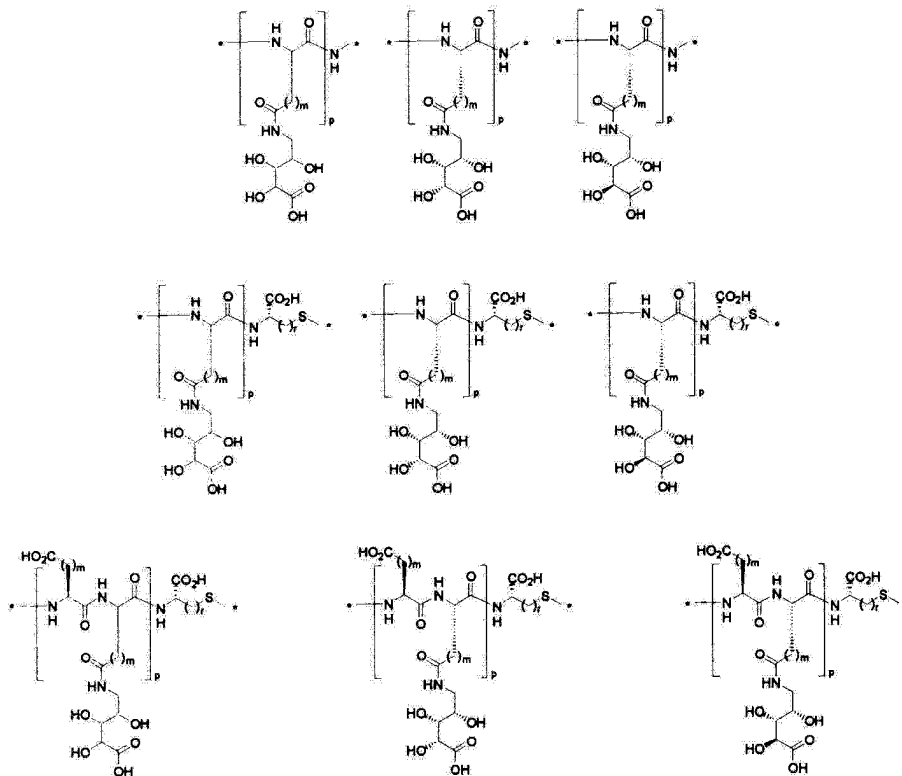


[0143] 其中 m 是独立地选自 1 到约 3 的整数； n 是 1 到约 6 的整数， p 是 1 到约 5 的整数，以及 r 是选自 1 到约 3 的整数。在一种变体中，所述整数 n 是 3 或 4。在另一种变体中，所

述整数 p 是 3 或 4。在另一种变体中,所述整数 r 是 1。

[0144] 在另一个实施方式中,所述间隔区接头包括一种或更多种以下片段:

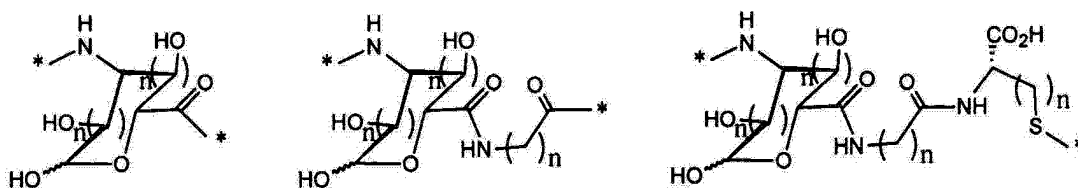
[0145]



[0146] 其中 m 是独立地选自 1 到约 3 的整数; n 是 1 到约 6 的整数, p 是 1 到约 5 的整数, 以及 r 是选自 1 到约 3 的整数。在一种变体中,所述整数 n 是 3 或 4。在另一种变体中,所述整数 p 是 3 或 4。在另一种变体中,所述整数 r 是 1。

[0147] 在另一个实施方式中,亲水性间隔区接头是主链和分支侧基序的组合,例如是下式例示的

[0148]



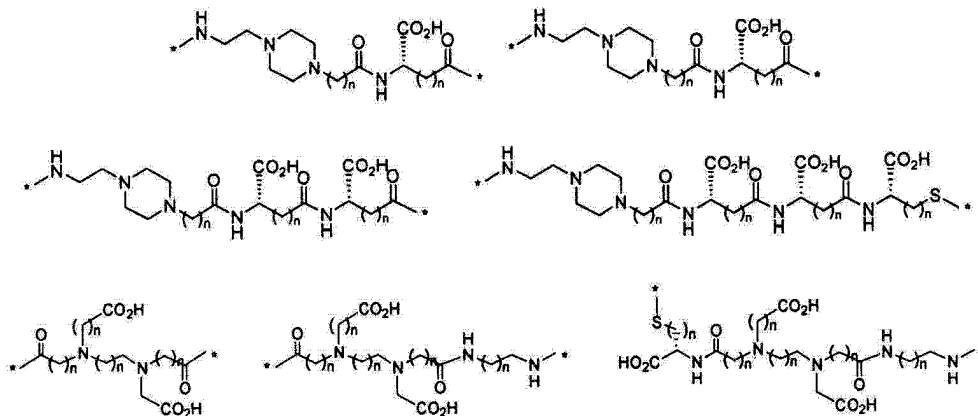
[0149] 其中 n 是在每种情况下独立地选自 0 到约 3 的整数。上述式子意图是代表 4、5、6 和甚至更多元的环状糖类。此外,要理解的是,上述式子可以被修饰来代表脱氧糖,其中存在于式子上的一个或更多个羟基被氢、烷基或氨基替代。此外,要理解的是,相应的羰基化合物是上述式子中期待的,其中一个或更多个羟基被氧化成相应的羰基。此外,在这个例示性的实施方式中,吡喃糖包括羧基和氨基官能团, (a) 可以被插入到主链中, (b) 可以提供在这个实施方式的变体中分支侧链的合成手段。任何悬垂的羟基基团可以用于附着其他化学片段,包括另外的糖类来制备相应的寡聚糖。这个实施方式的其他变体也是期待的,包括将吡喃糖或其他糖类插入到主链中的单个碳处,即,螺旋排列,在成对的碳对处,以及类似的排列。例如,接头或试剂 A 或结合配体 B 的一个或两个末端可以以 1,1;1,2;1,3;1,4;2,

3 或其他排列连接到要被插入到主链中的糖类上。

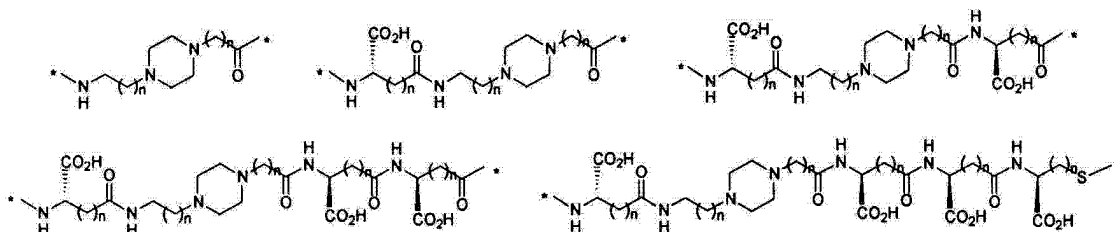
[0150] 在另一个实施方式中,在此描述的亲水性间隔区接头包括主要从碳、氢和氮形成的,并具有约 3 : 1 或更低、或约 2 : 1 或更低的碳 / 氮比例。在一个方面,在此描述的亲水性接头包括复数个氨基官能团。

[0151] 在另一个实施方式中,所述间隔区接头包括一种或更多种以下式子的氨基基团:

[0152]



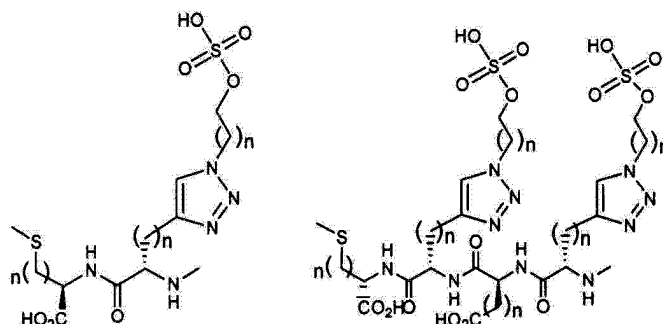
[0153]



[0154] 其中 n 是在每种情况下独立地选自 1 到约 3 的整数。在一个方面,所述整数 n 在每种情况下独立地是 1 或 2。在另一个方面,所述整数 n 在每种情况下是 1。

[0155] 在另一个实施方式中,所述亲水性间隔区接头是硫酸酯,例如硫酸的烷基酯。例示性地,所述间隔区接头具有以下式子:

[0156]



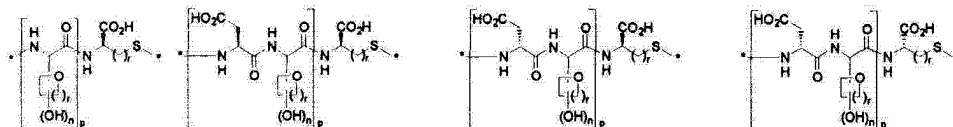
[0157] 其中 n 是在每种情况下独立地选自 1 到约 3 的整数。例示性地, n 在每种情况下独立地是 1 或 2。

[0158] 理解的是,在包括结合到杂原子的游离氢的这些多羟基、多氨基、羧酸、硫酸和类似接头中,一个或更多个那些游离氢原子可以分别用合适的羟基、氨基或酸保护基团来保护,或作为选择被封闭为相应的前体药物,后者被选择用于特定的用途,例如,在一般或特

定的生理条件下释放亲本药物的前体药物。

[0159] 在接头 L 的前述每一个例示性实例中,在某些情况下还包括了另外的间隔区接头 L_S , 和 / 或另外的可释放的接头 L_R 。这些间隔区接头和可释放的接头还可以包括不对称碳原子。进一步要理解的是,在此显示的立体化学结构仅仅是例示性的,其他的立体化学结构是期待的。例如在一种变体中,相应的非天然氨基酸结构可以被包括在此处如下描述的共轭物中:

[0160]



[0161] 其中 n 是 2 到约 5 的整数, p 是 1 到约 5 的整数,以及 r 是 1 到约 4 的整数,如上所述。

[0162] 进一步理解的是,在上述实施方式中,开放的位置,例如 (*) 原子是用于要被递送的结合配体 (B) 或试剂 (A) 的附着的位置。此外,要理解的是,B 和 A 之一或两者的这种附着可以是直接的或通过插入的接头的。插入的接头包括其他间隔区接头和 / 或可释放的接头。被包括在此处描述的共轭物中的例示性的其他间隔区接头和可释放的接头在美国专利申请系列号 10/765, 335 中描述,其公开内容通过引用合并在此。

[0163] 在一个实施方式中,所述亲水性间隔区接头包含一个或更多个含碳水化合物、或含多羟基基团的接头。在另一个实施方式中,所述亲水性间隔区接头包含至少三个含碳水化合物、或含多羟基基团的接头。在另一个实施方式中,所述亲水性间隔区接头包含一个或更多个含碳水化合物、或含多羟基基团的接头,以及一个或更多个天冬氨酸。在另一个实施方式中,所述亲水性间隔区接头包含一个或更多个含碳水化合物、或含多羟基基团的接头,以及一个或更多个谷氨酸。在另一个实施方式中,所述亲水性间隔区接头包含一个或更多个含碳水化合物或含多羟基基团的接头,一个或更多个谷氨酸,一个或更多个天冬氨酸以及一个或更多个 β 氨基丙氨酸。在一系列变体中,在每个上述实施方式中,所述亲水性间隔区接头还包括一个或更多个半胱氨酸。在另一个系列变体中,在每个上述实施方式中,所述亲水性间隔区接头还包括至少一个精氨酸。

[0164] 在另一个实施方式中,所述亲水性间隔区接头包含一个或更多个二价的 1,4- 哌嗪,其被包括在连接至少一个结合配体 (L) 与至少一个试剂 (A) 的原子链中。在一种变体中,所述亲水性间隔区接头包含一个或更多个含碳水化合物、或含多羟基基团的接头。在另一种变体中,所述亲水性间隔区接头包含一个或更多个含碳水化合物、或含多羟基基团的接头,以及一个或更多个天冬氨酸。在另一种变体中,所述亲水性间隔区接头包含一个或更多个含碳水化合物、或含多羟基基团的接头,以及一个或更多个谷氨酸。在一系列变体中,在每个上述实施方式中,所述亲水性间隔区接头还包括一个或更多个半胱氨酸。在另一个系列变体中,在每个上述实施方式中,所述亲水性间隔区接头还包括至少一个精氨酸。

[0165] 在另一个实施方式中,所述亲水性间隔区接头包含一个或更多个酰胺低聚物亲水性间隔区,例如但不限于氨基乙基哌嗪基乙酰胺。

[0166] 在另一个实施方式中,所述亲水性间隔区接头包含一个或更多个三唑连接的含碳水化合物、或含多羟基基团的接头。在另一个实施方式中,所述亲水性间隔区接头包含一个或

更多个酰胺连接的含碳水化物、或含多羟基基团的接头。在另一个实施方式中,所述亲水性间隔区接头包含一个或更多个 PEG 基团和一个或更多个半胱氨酸。在另一个实施方式中,所述亲水性间隔区接头包含一个或更多个 EDTE 衍生物。

[0167] 在另一个实施方式中,所述其他间隔区接头可以是 1- 亚烷基琥珀酰亚胺 -3- 基,任选地用下文定义的取代基 X^1 取代,以及所述可释放的接头可以是亚甲基、1- 烷氧基亚烷基、1- 烷氧基环亚烷基、1- 烷氧基亚烷基羰基、1- 烷氧基环亚烷基羰基,其中每个所述可释放的接头任选地用下文定义的取代基 X^2 取代,其中所述间隔区接头和所述可释放的接头各自键合到所述间隔区接头来形成琥珀酰亚胺 -1- 基烷基缩醛或缩酮。

[0168] 所述其他间隔区接头可以是羰基、硫羰基羰基、亚烷基、环亚烷基、亚烷基环烷基、亚烷基羰基、环亚烷基羰基、羰基烷基羰基、1- 亚烷基琥珀酰亚胺 -3- 基、1- (羰基烷基) 琥珀酰亚胺 -3- 基、亚烷基次硫酸基、磺酰基烷基、亚烷基次硫酸基烷基、亚烷基磺酰基烷基、羰基四氢 -2H- 吡喃基、羰基四氢呋喃基、1- (羰基四氢 -2H- 吡喃基) 琥珀酰亚胺 -3- 基,以及 1- (羰基四氢呋喃基) 琥珀酰亚胺 -3- 基,其中每个间隔区接头任选地用下文定义的取代基 X^1 取代。在这个实施方式中,所述间隔区接头可以包括另外的氮,所述间隔区接头可以是亚烷基羰基、环亚烷基羰基、羰基烷基羰基、1- (羰基烷基) 琥珀酰亚胺 -3- 基,其中每个间隔区接头任选地被下文定义的 X^1 取代,所述间隔区接头键合到所述氮来形成酰胺。做为选择,所述间隔区接头可以包括另外的硫,以及所述间隔区接头可以是亚烷基和环亚烷基,其中每个间隔区接头任选地被羧基取代,所述间隔区接头键合到硫来形成硫醇。在另一个实施方式中,所述间隔区接头可以包括硫,以及所述间隔区接头可以是 1- 亚烷基琥珀酰亚胺 -3- 基和 1- (羰基烷基) 琥珀酰亚胺 -3- 基,所述间隔区接头键合到所述硫来形成琥珀酰亚胺 -3- 基硫醇。

[0169] 在上述实施方式的替代物中,所述其他间隔区接头可以包括氮,所述可释放的接头可以是包含亚烷基吡丙啶 -1- 基、羰基烷基吡丙啶 -1- 基、次硫酸基烷基吡丙啶 -1- 基或磺酰基烷基吡丙啶 -1- 基的二价基团,其中每个可释放的接头任选地被下文定义的取代基 X^2 取代。在这个可选择的实施方式中,所述间隔区接头可以是羰基、硫羰基羰基、亚烷基羰基、环亚烷基羰基、羰基烷基羰基、1- (羰基烷基) 琥珀酰亚胺 -3- 基,其中每个间隔区接头任选地被下文定义的 X^1 取代,和其中所述间隔区接头键合到所述可释放的接头来形成氮丙啶酰胺。

[0170] 所述取代基 X^1 可以是烷基、烷氧基、烷氧基烷基、羟基、羟基烷基、氨基、氨基烷基、烷基氨基烷基、二烷基氨基烷基、卤素、卤代烷基、巯基烷基、烷基硫代烷基、芳基、取代的芳基、芳烷基、取代的芳烷基、杂芳基、取代的杂芳基、羧基、羧基烷基、烷基羧酸酯、烷基链烷酸酯、胍基烷基、 R^4 - 羰基、 R^5 - 羰基烷基、 R^6 - 酰氨基和 R^7 - 酰基氨基烷基,其中 R^4 和 R^5 各自独立地选自氨基酸、氨基酸衍生物和肽,以及其中 R^6 和 R^7 各自独立地选自氨基酸、氨基酸衍生物和肽。在这个实施方式中,间隔区接头可以包括氮,所述取代基 X^1 与它们结合的间隔区接头形成杂环。

[0171] 在另一个实施方式中,所述可释放的接头可以是包含亚烷基吡丙啶 -1- 基、亚烷基羰基吡丙啶 -1- 基、羰基烷基吡丙啶 -1- 基、亚烷基次硫酸基吡丙啶 -1- 基、次硫酸基烷基吡丙啶 -1- 基、磺酰基烷基吡丙啶 -1- 基或亚烷基磺酰基吡丙啶 -1- 基的二价基团,其中每个可释放的接头任选地用下文定义的取代基 X^2 取代。

[0172] 另外的例示性的可释放的接头包括亚甲基、1- 烷氧基亚烷基、1- 烷氧基环亚烷基、1- 烷氧基亚烷基羰基、1- 烷氧基环亚烷基羰基、羰基芳基羰基、羰基（羧基芳基）羰基、羰基（二羧基芳基）羰基、卤代亚烷基羰基、亚烷基（二烷基甲硅烷基）、亚烷基（烷基芳基甲硅烷基）、亚烷基（二芳基甲硅烷基）、（二烷基甲硅烷基）芳基、（烷基芳基甲硅烷基）芳基、（二芳基甲硅烷基）芳基、氧基羰氧基、氧基羰氧基烷基、磺酰氧基、氧基磺酰基烷基、亚氨基亚烷基、羰基亚烷基亚胺基、亚氨基环亚烷基、羰基环亚烷基亚胺基、亚烷基硫基、亚烷基芳基硫基和羰基烷基硫基，其中每个可释放的接头任选地用下文定义的取代基 X^2 取代。

[0173] 在前述实施方式中，所述可释放的接头可以包括氧，所述可释放的接头可以是亚甲基、1- 烷氧基亚烷基、1- 烷氧基环亚烷基、1- 烷氧基亚烷基羰基和 1- 烷氧基环亚烷基羰基，其中每个可释放的接头任选地用下文定义的取代基 X^2 取代，所述可释放的接头键合到所述氧来形成缩醛或缩酮。做为选择，所述可释放的接头可以包括氧，所述可释放的接头可以是亚甲基，其中所述亚甲基用任选地取代的芳基来取代，所述可释放的接头键合到所述氧来形成缩醛或缩酮。进一步的，所述可释放的接头可以包括氧，所述可释放的接头可以是磺酰基烷基，所述可释放的接头键合到所述氧来形成烷基磺酸酯。

[0174] 在上述可释放的接头实施方式的另一个实施方式中，所述可释放的接头可以包括氮，所述可释放的接头可以是亚氨基亚烷基、羰基亚烷基亚胺基、亚氨基环亚烷基和羰基环亚烷基亚胺基，其中每个可释放的接头任选地被下文定义的取代基 X^2 取代，所述可释放的接头键合到所述氮来形成脎。在可选择的结构中，所述脎可以用羧酸衍生物、原甲酸酯衍生物或氨甲酰基衍生物酰化来形成各种酰脎可释放的接头。

[0175] 做为选择，所述可释放的接头可以包括氧，所述可释放的接头可以是亚烷基（二烷基甲硅烷基）、亚烷基（烷基芳基甲硅烷基）、亚烷基（二芳基甲硅烷基）、（二烷基甲硅烷基）芳基、（烷基芳基甲硅烷基）芳基和（二芳基甲硅烷基）芳基，其中每个可释放的接头任选地被下文定义的取代基 X^2 取代，所述可释放的接头键合到所述氧来形成硅烷醇。

[0176] 在上述可释放的接头实施方式中，所述药物可以包括氮原子，所述可释放的接头可以包括氮，所述可释放的接头可以是羰基芳基羰基、羰基（羧基芳基）羰基、羰基（二羧基芳基）羰基，所述可释放的接头可以键合到杂原子氮来形成酰胺，以及也键合到所述药物氮来形成酰胺。

[0177] 在上述可释放的接头实施方式中，所述药物可以包括氧原子，所述可释放的接头可以包括氮，所述可释放的接头可以是羰基芳基羰基、羰基（羧基芳基）羰基、羰基（二羧基芳基）羰基，所述可释放的接头可以形成酰胺，以及键合到所述药物氧来形成酯。

[0178] 所述取代基 X^2 可以是烷基、烷氧基、烷氧基烷基、羟基、羟基烷基、氨基、氨基烷基、烷基氨基烷基、二烷基氨基烷基、卤素、卤代烷基、巯基烷基、烷基硫代烷基、芳基、取代的芳基、芳烷基、取代的芳烷基、杂芳基、取代的杂芳基、羧基、羧基烷基、烷基羧酸酯、烷基链烷酸酯、胍基烷基、 R^4 - 羰基、 R^5 - 羰基烷基、 R^6 - 酰氨基和 R^7 - 酰基氨基烷基，其中 R^4 和 R^5 各自独立地选自氨基酸、氨基酸衍生物和肽，以及其中 R^6 和 R^7 各自独立地选自氨基酸、氨基酸衍生物和肽。在这个实施方式中，可释放的接头可以包括氮，所述取代基 X^2 与可释放的接头可以形成杂环。

[0179] 所述杂环可以是吡咯烷、哌啶、噁唑烷、异噁唑烷、噻唑烷、异噻唑烷、吡咯烷酮、哌啶烷酮、噁唑烷酮、异噁唑烷酮、噻唑烷酮、异噻唑烷酮和琥珀酰亚胺。

[0180] 试剂 A 可以包括氮原子,所述可释放的接头可以是卤代亚烷基羰基,任选地用取代基 X^2 取代,所述可释放的接头键合到所述药物氮来形成酰胺。

[0181] 所述试剂 A 可以包括氧原子,所述可释放的接头可以是卤代亚烷基羰基,任选地用取代基 X^2 取代,所述可释放的接头键合到所述药物氧来形成酯。

[0182] 试剂 A 可以包括双键的氮原子,在这个实施方式中,所述可释放的接头可以是亚烷基羰基氨基和 1-(亚烷基羰基氨基)琥珀酰亚胺-3-基,所述可释放的接头可以键合到所述药物氮来形成脞。

[0183] 试剂 A 可以包括硫原子,在这个实施方式中,所述可释放的接头可以是亚烷基硫和羰基烷基硫,所述可释放的接头可以键合到所述药物硫来形成二硫化物。

[0184] 所述试剂 A 可以是丝裂霉素、丝裂霉素衍生物或丝裂霉素类似物,在这个实施方式中,所述可释放的接头可以是羰基烷基硫、羰基四氢-2H-吡喃基、羰基四氢呋喃基、1-(羰基四氢-2H-吡喃基)琥珀酰亚胺-3-基和 1-(羰基四氢呋喃基)琥珀酰亚胺-3-基,其中每个可释放的接头任选地用取代基 X^2 取代,其中所述丝裂霉素的氮丙啶被键合到可释放的接头来形成酰基氮丙啶。

[0185] 结合配体 B 可以是包括氮的叶酸盐,在这个实施方式中,间隔区接头可以是亚烷基羰基、环亚烷基羰基、羰基烷基羰基、1-亚烷基琥珀酰亚胺-3-基、1-(羰基烷基)琥珀酰亚胺-3-基,其中每个间隔区接头任选地被取代基 X^1 取代,所述间隔区接头键合到叶酸盐氮上来形成亚胺或烷基酰胺。在这个实施方式中,取代基 X^1 可以是烷基、羟基烷基、氨基、氨基烷基、烷基氨基烷基、二烷基氨基烷基、巯基烷基、烷基硫代烷基、芳基、取代的芳基、芳烷基、取代的芳烷基、羧基、羧基烷基、胍基烷基、 R^4 -羰基、 R^5 -羰基烷基、 R^6 -酰氨基、和 R^7 -酰基氨基烷基,其中 R^4 和 R^5 各自独立地选自氨基酸、氨基酸衍生物和肽,其中 R^6 和 R^7 各自独立地选自氨基酸、氨基酸衍生物和肽。

[0186] 在此使用的术语环亚烷基是指二价的碳原子链,其一部分形成了环,例如,环丙-1,1-二基,环丙-1,2-二基、环己-1,4-二基、3-乙基环戊-1,2-二基、1-亚甲基环己-4-基,等等。

[0187] 在此使用的术语杂环是指碳和杂原子的单价的链,其中所述杂原子选自氮、氧和硫,包括至少一个杂原子的其一部分形成了环,例如,氮丙啶、吡咯烷、噁唑烷、3-甲氧基吡咯烷、3-甲基哌嗪,等等。

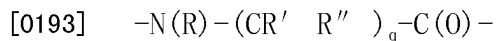
[0188] 在此使用的术语芳基是指碳原子的芳香族单环或多环,例如苯基、萘基,等等。此外,芳基还可以包括杂芳基。

[0189] 在此使用的术语杂芳基是指碳原子和选自氮、氧和硫的至少一种杂原子的芳香族单环或多环,例如吡啶基、嘧啶基、咪唑基、苯并噁唑基,等等。

[0190] 在此使用的术语任选地取代的是指用相应数量的取代基,例如卤素、羟基、氨基、烷基、二烷基氨基、烷氧基、烷基磺酰基、氰基、硝基等等,替换一般在碳上的一个或多个氢原子。此外,在同一个碳、相邻的碳或附近的碳上的两个氢可以用二价的取代基替代来形成相应的环状结构。

[0191] 在此使用的术语亚氨基亚烷基是指含有在此定义的亚烷基以及氮原子的二价基,其中亚烷基的末端碳原子双键键合到氮原子上,例如式 $-(CH)=N-$ 、 $-(CH_2)_2(CH)=N-$ 、 $-CH_2C(Me)=N-$,等等。

[0192] 在此使用的术语氨基酸一般是指氨基烷基羧酸盐,其中烷基基团是任选地取代的,例如,用烷基、羟基烷基、巯基烷基、氨基烷基、羧基烷基等等,包括与天然存在的氨基酸,例如,丝氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸、天冬氨酸、谷氨酸,等等相应的基团。要理解的是,这样的氨基酸可以是单一立体化学的,或是立体化学物的特定混合物,包括外消旋混合物。此外,氨基酸是指 β 、 γ 和更长的氨基酸,例如下式的氨基酸:



[0194] 其中 R 是氢、烷基、酰基或适合的氮保护基团, R' 和 R'' 是氢或取代基,它们的每一个在每种情况下独立地选择, q 是整数,例如 1、2、3、4 或 5。例示性地, R' 和 / 或 R'' 独立地相应于,但不限于,氢或天然存在的氨基酸上的侧链,例如,甲基、苯甲基、羟甲基、硫甲基、羧基、羧甲基、胍基丙基,等等,以及其衍生物和保护衍生物。上文描述的式子包括所有的立体异构化变体。例如,氨基酸可以选自天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、鸟氨酸、苏氨酸,等等。在此处描述的维生素受体结合药物递送共轭物中间物的另一个例示性的方面中,所述药物、或其类似物或衍生物,包括烷基巯基亲核试剂。

[0195] 要理解的是,上文描述的术语可以被组合来产生化学相关的基团,例如,烷氧基烷基指甲氧基甲基、乙氧基乙基,等等,卤代烷氧基烷基指三氟甲氧基乙基、1,2-二氟-2-氯乙-1-基氧基丙基,等等,芳烷基指苯甲基、苯乙基、 α -甲苯甲基,等等,及其他。

[0196] 在此使用的术语氨基酸衍生物一般是指任选地取代的氨基烷基羧酸盐,其中所述氨基基团和 / 或羧酸盐基团是各自任选地取代的,例如用烷基、羧基烷基、烷氨基,等等,或任选地被保护。此外,任选地取代的插入二价烷基片段可以包括另外的基团,例如保护基团,等等。

[0197] 在此使用的术语肽一般是指通过酰胺键相互共价连接的一系列氨基酸和 / 或氨基酸类似物和衍生物。

[0198] 在此使用的术语“可释放的接头”是指包括可在生理条件断裂的至少一个键(例如, pH- 不稳定的、酸不稳定的、氧化不稳定的、或酶不稳定的键)的接头。要理解的是,引起键断裂的这样的生理条件包括例如在生理学 pH 值下发生的标准的化学水解反应,或作为进入具有低于细胞质 pH 值的更低 pH 值的细胞的细胞器例如核内体的区室化的结果。

[0199] 可裂解的单个或复数个键可以存在于可裂解接头的内部,和 / 或处在可裂解的接头的一端或两端。要理解的是,可裂解的键的不稳定性可以通过在多价接头 L 内包括能够帮助或促进这种键断裂、也称为邻位协助的官能团或片段来调整。此外,要理解的是,其他的官能团或片段可以被包括在多价接头 L 内,它们能够帮助或促进在可释放的接头的键断裂之后受体结合配体试剂共轭物的另外的断裂。可裂解的键的不稳定性可以通过以下来调整,例如,在可裂解的键之处或附近的取代改变,例如在可裂解的二硫键附近包括 α 分支,在具有可被水解的硅-氧键的部分中提高硅上的取代基的疏水性,同系化形成可被水解的缩酮或缩醛的部分的烷氧基,等等。

[0200] 要理解的是,可裂解的键可以连接可释放的接头内的两个邻近的原子,和 / 或将在在此描述的其他接头或 V 和 / 或 D 连接在所述可释放的接头的任一或两个末端。在可裂解的键连接所述可释放的接头内的两个邻近的原子的情况下,在键的断裂之后,所述可释放的接头被断裂形成两个或更多个片段。做为选择,在可裂解的键处于可释放的接头和另一

个部分,例如另外的杂原子、另外的间隔区接头、另一个可释放的接头、试剂 A 或其类似物或衍生物、或结合配体 B 或其类似物或衍生物之间时,在所述键的断裂之后,所述可释放的接头与所述另一个部分分离。

[0201] 要理解的是,每个所述另外的间隔区和可释放的接头是二价的。应当进一步理解的是,每个所述各种另外的间隔区和可释放的接头本身之间、以及所述各种另外的间隔区和可释放的接头和在此定义的 A 和 / 或 B 之间的连接可以在所述各种另外的间隔区或可释放的接头中存在的任何原子处发生。

[0202] 在此处描述的各种的受体结合药物递送共轭物的一个方面中,多价的接头包含另外的间隔区接头和可释放的接头,一起形成 3- 巯基琥珀酰亚胺 -1- 基烷氧基甲氧基,其中所述甲基任选地被烷基或取代的芳基取代。

[0203] 在另一个方面,所述多价接头包括另外的间隔区接头和可释放的接头,一起形成 3- 巯基琥珀酰亚胺 -1- 基烷基羰基,其中所述羰基与试剂 A 或其类似物或衍生物形成酰基氮丙啶。

[0204] 在另一个方面,所述多价接头包含另外的间隔区接头和可释放的接头,一起形成 1- 烷氧基环亚烷氧基。

[0205] 在另一个方面,所述多价接头包含另外的间隔区接头和可释放的接头,一起形成亚烷基氨基羰基(二羧基亚芳基)羧酸酯。

[0206] 在另一个方面,所述多价接头包含可释放的接头、另外的间隔区接头和可释放的接头,一起形成二硫烷基羰基酰肼,其中所述酰肼与试剂 A 或其类似物或衍生物形成脎。

[0207] 在另一个方面,所述多价接头包括另外的间隔区接头和可释放的接头,一起形成 3- 巯基琥珀酰亚胺 -1- 基烷基羰基酰肼,其中所述酰肼与试剂 A 或其类似物或衍生物形成脎。

[0208] 在另一个方面,所述多价接头包含另外的间隔区接头和可释放的接头,一起形成 3- 巯基烷基磺酰基烷基(二基取代了的甲硅烷基)氧,其中所述二基取代了的甲硅烷基被烷基或任选地取代的芳基取代。

[0209] 在另一个方面,所述多价接头包含复数个选自由天然存在的氨基酸和其立体异构体构成的组的另外的间隔区接头。

[0210] 在另一个方面,所述多价接头包含可释放的接头、另外的间隔区接头和可释放的接头,一起形成 3- 二巯基烷氧基羰基,其中所述羰基与试剂 A 或其类似物或衍生物形成碳酸酯。

[0211] 在另一个方面,所述多价接头包含可释放的接头、另外的间隔区接头和可释放的接头,一起形成 3- 二巯基芳基烷氧基羰基,其中所述羰基与试剂 A 或其类似物或衍生物形成碳酸酯,以及所述芳基是任选地取代的。

[0212] 在另一个方面,所述多价接头包含另外的间隔区接头和可释放的接头,一起形成 3- 巯基琥珀酰亚胺 -1- 基烷氧基烷氧基亚烷基,其中所述亚烷基与试剂 A 或其类似物或衍生物形成脎,每个烷基是独立地选择的,所述氧基烷氧基是用烷基或任选地取代的芳基任选地取代的。

[0213] 在另一个方面,所述多价接头包含可释放的接头、另外的间隔区接头和可释放的接头,一起形成 3- 二巯基烷氧基羰基酰肼。

[0214] 在另一个方面,所述多价接头包含可释放的接头、另外的间隔区接头和可释放的接头,一起形成 3-二硫基烷基氨基,其中所述氨基与试剂 A 或其类似物或衍生物形成插烯酰胺(vinylogous amide)。

[0215] 在另一个方面,所述多价接头包含可释放的接头、另外的间隔区接头和可释放的接头,一起形成 3-二硫基烷基氨基,其中所述氨基与试剂 A 或其类似物或衍生物形成插烯酰胺,所述烷基是乙基。

[0216] 在另一个方面,所述多价接头包含可释放的接头、另外的间隔区接头和可释放的接头,一起形成 3-二硫基烷基氨基羰基,其中所述羰基与试剂 A 或其类似物或衍生物形成氨基甲酸酯。

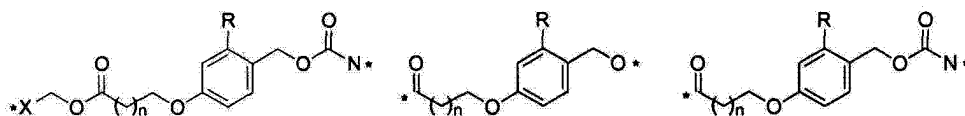
[0217] 在另一个方面,所述多价接头包含可释放的接头、另外的间隔区接头和可释放的接头,一起形成 3-二硫基烷基氨基羰基,其中所述羰基与试剂 A 或其类似物或衍生物形成氨基甲酸酯,所述烷基是乙基。

[0218] 在另一个方面,所述多价接头包含可释放的接头、另外的间隔区接头和可释放的接头,一起形成 3-二硫基芳基烷氧基羰基,其中所述羰基与试剂 A 或其类似物或衍生物形成氨基甲酸酯或氨甲酰基氮丙啶。

[0219] 在另一个实施方式中,所述多价接头(L)包括二硫化物可释放的接头。在另一个实施方式中,所述多价接头(L)包括不是二硫化物可释放的接头的至少一个可释放的接头。

[0220] 在一个方面,所述可释放的和间隔区接头可以这样排列,从而在多价接头中的键的裂解之后,释放的官能团化学地帮助另外的键的断裂或裂解,也称为邻位辅助的裂解或断裂。这样的多价接头或其部分的例示性的实施方式包括具有下式的化合物:

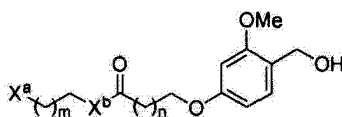
[0221]



[0222] 其中 X 是杂原子,例如,氮、氧或硫,或羰基基团;n 是选自 0 到 4 的整数,例示性地是 2;R 是氢或取代基,包括能够诱导性地或通过在芳基环上的共振稳定正电荷的取代基,例如烷氧基等等,包括甲氧基;符号(*)表示其他的间隔区、杂原子、或形成多价接头的可释放的接头的附着点,或作为选择用于药物或其类似物或衍生物、或维生素或其类似物或衍生物的附着。在一个实施方式中,n 是 2,R 是甲氧基。理解的是,其他的取代基可以存在于芳基环、苯甲基碳、链烷酸或亚甲基桥上,包括但不限于羟基、烷基、烷氧基、烷基硫基、卤素,等等。辅助的裂解可以包括涉及 benzylium 中间物、苯炔中间物、内酯环化、氧鎓中间物、 β -消除等等的机制。进一步理解的是,除了在可释放的接头的裂解之后的断裂之外,可释放的接头的起始的裂解可以通过邻位辅助的机制来促成。

[0223] 对于形成这样的接头有用的中间物的例示的实例包括:

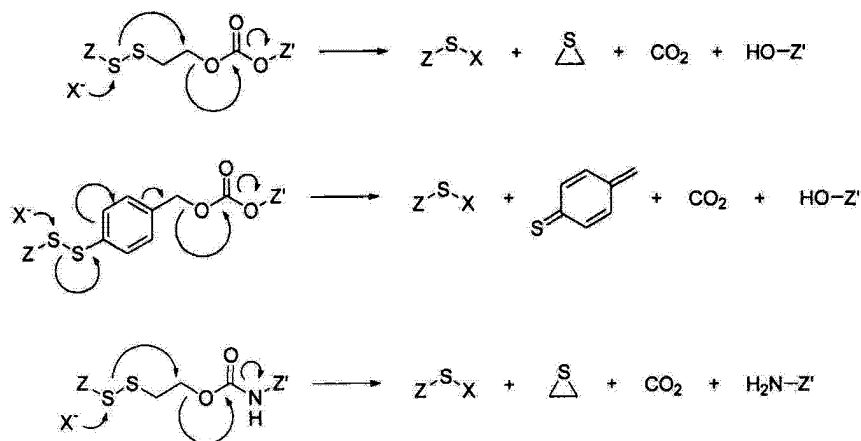
[0224]



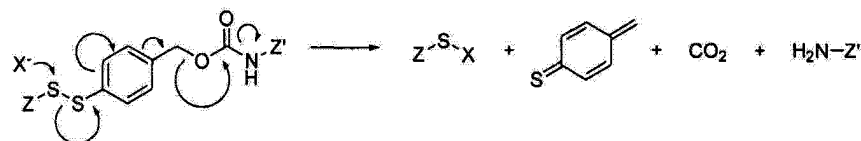
[0225] 其中 X^a 是亲电子基团,例如马来酰亚胺、乙烯砜、活化的羧酸衍生物等等, X^b 是 NH、O 或 S; m 和 n 是各自独立地选自 0-4 的整数。在一种变体中, m 和 n 是各自独立地选自 0-2 的整数。这样的中间物可以通过对亲电子基团 X^a 的亲核攻击,和 / 或通过形成醚或其羧酸衍生物来偶联到药物、结合配体或其他接头。在一个实施方式中, 苄基羟基基团被转变成相应的具有光气或光气等价物的活化的苄氧基羰基化合物。这个实施方式可以通过对活化的羰基的亲核攻击来偶联到药物、结合配体或其他接头。

[0226] 在此描述的二价接头的裂解的例示性的机制包括以下的 1,4 和 1,6 断裂机制

[0227]



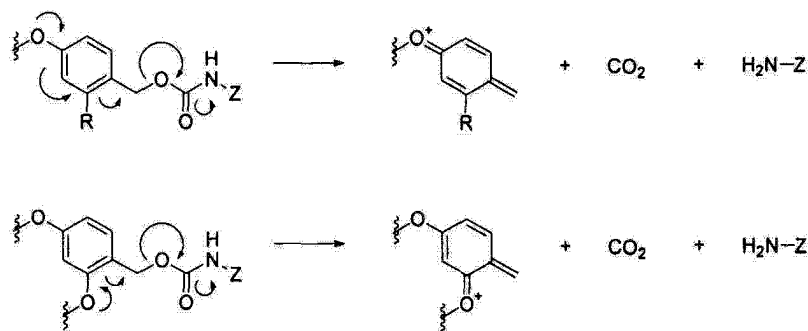
[0228]



[0229] 其中 X 是外源的或内源的亲核试剂、谷胱甘肽或生物还原试剂,等等, Z 或 Z' 的任一个是维生素或其类似物或衍生物、或药物或其类似物或衍生物、或连同多价接头的其他部分的维生素或药物部分。要理解的是,虽然上述断裂机制被描述为协调的机制,可以发生许多不连续的步骤来影响多价接头到显示的终产物的最终的断裂。例如,理解的是,键裂解还可以通过氨基甲酸酯部分的酸催化的消除来发生,其可以通过在上述实例中例示的 β -硫或二硫化物的芳基基团提供的稳定化来邻位辅助的。在这个实施方式的那些变体中,可释放的接头是氨基甲酸酯部分。做为选择,断裂可以起始于对二硫基团的亲核攻击,引起裂解来形成硫醇盐。硫醇盐可以分子间替换碳酸或氨基甲酸部分,并形成相应的硫基环丙烷。在含有苯甲基的多价接头的情况下,在二硫键的例示性的断裂之后,产生的苯基硫醇盐可以通过形成共振稳定的中间物来进一步断裂来释放碳酸或氨基甲酸部分。在这些情况的任一种中,在此描述的例示性的多价接头的可释放性质可以通过与存在的化学、代谢、生理学或生物学条件相关的任何机制来实现。

[0230] 可释放的接头的键裂解的其他例示性的机制包括氧鎓辅助的裂解,如下:

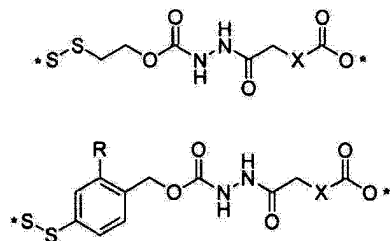
[0231]



[0232] 其中 Z 是维生素或其类似物或衍生物,或药物或其类似物或衍生物,或各自是连同多价接头的其他部分的维生素或药物部分,例如,包括一个或更多个间隔区接头和 / 或其他可释放的接头的药物或维生素部分。不受理论的限制,在这个实施方式中,酸催化,例如在核内体中,可以通过乌拉坦基团的质子化启动裂解。此外,氨基甲酸酯的酸催化的消除引起 CO₂ 和附着到 Z 的含氮部分的释放,以及苯甲基阳离子的形成,其可以通过水或任何其他路易斯碱来捕获。

[0233] 其他例示性的接头包括下式的化合物:

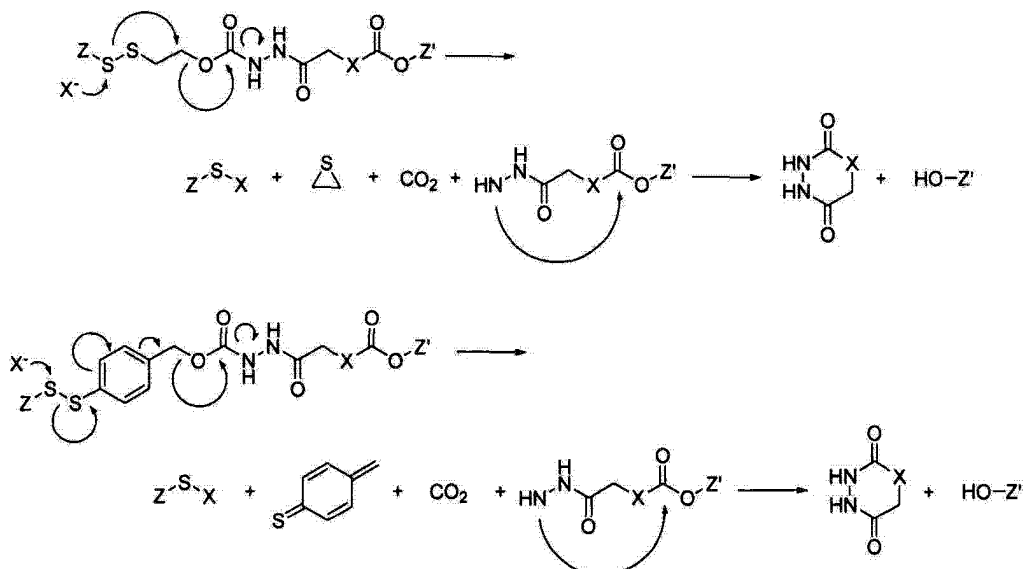
[0234]



[0235] 其中 X 是 NH、CH₂ 或 O; R 是氢或取代基,包括能够诱导性地或通过在芳基环上的共振稳定正电荷的取代基,例如烷氧基等等,包括甲氧基;符号 (*) 表示其他的间隔区、杂原子、或形成多价接头的可释放的接头的附着点,或作为选择用于药物或其类似物或衍生物、或维生素或其类似物或衍生物的附着。

[0236] 在此描述的这样的多价接头的裂解的例示性的机制包括以下的 1,4 和 1,6 断裂机制,随后是通过酰肼基团的环化的酰化的 Z' 的邻位辅助的裂解:

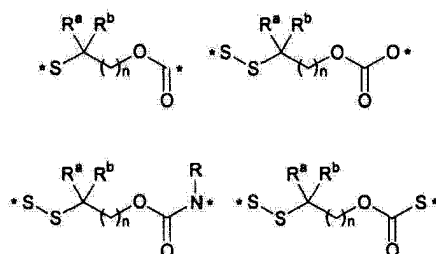
[0237]



[0238] 其中 X 是外源的或内源的亲核试剂、谷胱甘肽或生物还原试剂,等等, Z 或 Z' 的任一个是维生素或其类似物或衍生物、或药物或其类似物或衍生物、或连同多价接头的其他部分的维生素或药物部分。要理解的是,虽然上述断裂机制被描述为协调的机制,可以发生许多不连续的步骤来影响多价接头到显示的终产物的最终的断裂。例如,理解的是,键裂解还可以通过氨基甲酸酯部分的酸催化的消除来发生,其可以通过在上述实例中例示的 β -硫或二硫化物的芳基基团提供的稳定化来邻位辅助的。在这个实施方式的那些变体中,可释放的接头是氨基甲酸酯部分。做为选择,断裂可以起始于对二硫基团的亲核攻击,引起裂解来形成硫醇盐。硫醇盐可以分子间替换碳酸或氨基甲酸部分,并形成相应的硫基环丙烷。在含有苯甲基的多价接头的情况下,在二硫键的例示性的断裂之后,产生的苯基硫醇盐可以通过形成共振稳定的中间物来进一步断裂来释放碳酸或氨基甲酸部分。在这些情况的任一种中,在此描述的例示性的多价接头的可释放性质可以通过与存在的化学、代谢、生理学或生物学条件相关的任何机制来实现。不受理论的限制,在这个实施方式中,酸催化,例如在核内体中,也可以通过乌拉坦基团的质子化启动裂解。此外,氨基甲酸酯的酸催化的消除引起 CO_2 和附着到 Z 的含氮部分的释放,以及苯甲基阳离子的形成,其可以通过水或任何其他路易斯碱来捕获,如在此类似地描述的。

[0239] 在一个实施方式中,在此描述的多价接头是下式的化合物

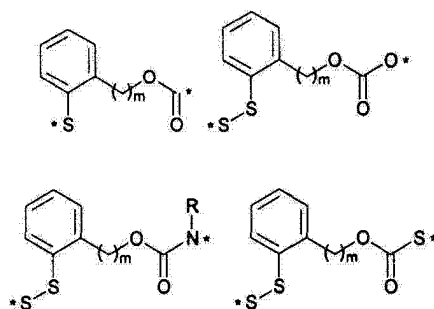
[0240]



[0241] 其中 n 是选自 1 到约 4 的整数; R^a 和 R^b 各自独立地选自由氢和烷基构成的组,包括任选地分支的低级烷基例如 C_1 - C_4 烷基;或 R^a 和 R^b 与附着碳原子一起形成碳环; R 是任选地取代的烷基基团、任选地取代的酰基基团或适当地选择的氮保护基团; (*) 表示药物、维生素、成像试剂、诊断试剂、其他多价接头、或共轭物的其他部分的附着点。

[0242] 在另一个实施方式中,在此描述的多价接头包括下式的化合物

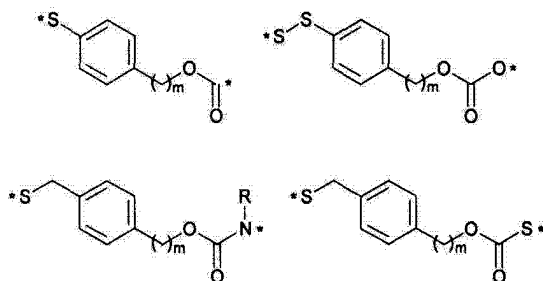
[0243]



[0244] 其中 m 是选自 1 到约 4 的整数 ;R 是任选地取代的烷基基团、任选地取代的酰基基团、或适当地选择的氮保护基团 ;(*) 表示药物、维生素、成像试剂、诊断试剂、其他多价接头、或共轭物的其他部分的附着点。

[0245] 在另一个实施方式中,在此描述的多价接头包括下式的化合物

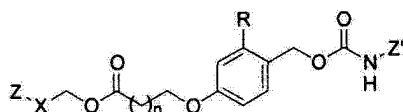
[0246]



[0247] 其中 m 是选自 1 到约 4 的整数 ;R 是任选地取代的烷基基团、任选地取代的酰基基团、或适当地选择的氮保护基团 ;(*) 表示药物、维生素、成像试剂、诊断试剂、其他多价接头、或共轭物的其他部分的附着点。

[0248] 另一种例示性的机制涉及可释放的和间隔区接头的排列,从而在多价接头中的键的裂解之后,释放的官能团化学地帮助另外的键的断裂或裂解,也称为邻位辅助的裂解或断裂。这样的多价接头或其部分的例示性的实施方式包括具有下式的化合物 :

[0249]



[0250] 其中 X 是杂原子,例如,氮、氧或硫, n 是选自 0、1、2 和 3 的整数, R 是氢或取代基,包括能够诱导性地或通过在芳基环上的共振稳定正电荷的取代基,例如烷氧基等等 ;Z 或 Z' 的任一个是维生素或其类似物或衍生物、或药物或其类似物或衍生物、或连同多价接头的其他部分的维生素或药物部分。理解的是,其他的取代基可以存在于芳基环、苯甲基碳、氨基甲酸酯氮、链烷酸或亚甲基桥上,包括但不限于羟基、烷基、烷氧基、烷基硫基、卤素,等等。辅助的裂解可以包括涉及 benzylium 中间物、苯炔中间物、内酯环化、氧鎓离子中间物、 β -消除等等的机制。进一步理解的是,除了在可释放的接头的裂解之后的断裂之外,可释放的接头的起始的裂解可以通过邻位辅助的机制来促成。

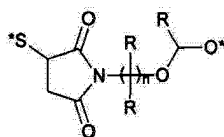
[0251] 在这个实施方式中,可以环化的羟基链烷酸,通过例如氧鎓离子促进了亚甲基桥

的裂解,在所述可释放的接头的键裂解之后促进了键裂解或随后的断裂。做为选择,亚甲基桥的酸催化的氧鎓离子辅助的裂解可以开始这种例示性的多价接头或其片段的断裂的级联。做为选择,氨基甲酸酯的酸催化的水解作用可以促进可环化的羟基链烷酸的 β -消除,并通过例如氧鎓离子促进亚甲基桥的裂解。理解的是,在此处描述的代谢、生理学或细胞条件下键断裂或裂解的其他化学机制可以启动这样的断裂的级联。理解的是,在此处描述的代谢、生理学或细胞条件下键断裂或裂解的其他化学机制可以启动这样的断裂的级联。

[0252] 在此描述的接头的另一个例示性的实施方式,包括通过涉及 β 消除的化学机制在此处描述的条件裂解的可释放的接头。在一个方面,这样的可释放的接头包括 β -巯基、 β -羟基和 β -氨基取代的羧酸类和其衍生物,例如酯、酰胺、碳酸酯、氨基甲酸酯和脲。在另一个方面,这样的可释放的接头包括 2- 和 4- 巯基芳基酯、氨基甲酸酯和碳酸酯。

[0253] 在另一个实施方式中,所述多价接头包括另外的间隔区接头和可释放的接头,连接以形成多价的 3- 巯基琥珀酰亚胺-1- 基烷氧基甲氧基基团,通过下式说明

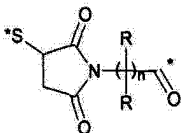
[0254]



[0255] 其中 n 是 1 到 6 的整数,烷基基团是任选地取代的,甲基是用另外的烷基或任选地取代的芳基基团任选地取代的,它们的每一个由独立地选择的基团 R 代表。(*) 符号表示多价接头片段与在此描述的共轭物的其他部分的附着点。

[0256] 在另一个实施方式中,所述多价接头包括另外的间隔区接头和可释放的接头,连接以形成多价的 3- 巯基琥珀酰亚胺-1- 基烷基羰基基团,通过下式说明

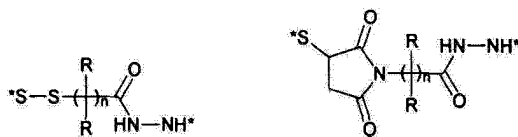
[0257]



[0258] 其中 n 是 1 到 6 的整数,烷基基团是任选地取代的。(*) 符号表示多价接头片段与在此描述的共轭物的其他部分的附着点。在另一个实施方式中,所述多价接头包含间隔区接头和可释放的接头,连接以形成多价的 3- 巯基烷基磺酰基烷基(二基取代了的甲硅烷基)氧基团,其中所述二基取代了的甲硅烷基被烷基和 / 或任选地取代的芳基基团取代。

[0259] 在另一个实施方式中,所述多价接头包括另外的间隔区接头和可释放的接头,连接以形成多价的二巯基烷基羰基酰肼基团、或多价的 3- 巯基琥珀酰亚胺-1- 基烷基羰基酰肼,通过下式说明

[0260]

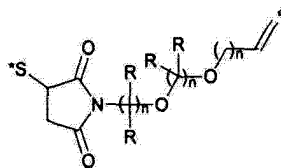


[0261] 其中 n 是 1 到 6 的整数,烷基基团是任选地取代的,酰肼与 (B)、(D) 或多价接头 (L) 的另一个部分形成脎。(*) 符号表示多价接头片段与在此描述的共轭物的其他部分的

附着点。

[0262] 在另一个实施方式中,所述多价接头包括另外的间隔区接头和可释放的接头,连接以形成多价的 3- 硫基琥珀酰亚胺 -1- 基烷氧基烷氧基亚烷基基团,通过下式说明

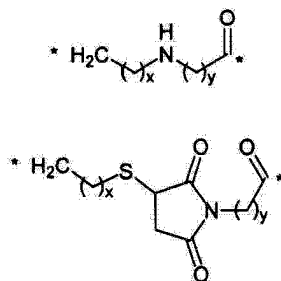
[0263]



[0264] 其中每个 n 是独立地选自 1 到 6 的整数,每个烷基基团独立地选择并是任选地取代的,例如,用烷基或任选地取代的芳基取代,其中亚烷基与 (B)、(D) 或多价接头 (L) 的另一个部分形成脞。(*) 符号表示多价接头片段与在此描述的共轭物的其他部分的附着点。

[0265] 另外的例示性的其他间隔区接头包括亚烷基 - 氨基 - 亚烷基羰基、亚烷基 - 硫基 - 羰基烷基琥珀酰亚胺 -3 基,等等,如下式进一步说明的:

[0266]



[0267] 其中整数 x 和 y 是 1、2、3、4 或 5:

[0268] 在另一个例示性的实施方式中,所述接头包括一个或更多个氨基酸。在一种变体中,所述接头包括单个氨基酸。在另一种变体中,所述接头包括具有 2 到约 50 个、2 到约 30 个、或 2 到约 20 个氨基酸的肽。在另一种变体中,所述接头包括具有约 4 到约 8 个氨基酸的肽。这样的氨基酸例示性地选自天然存在的氨基酸或其立体异构体。所述氨基酸还可以是任何其他氨基酸,例如具有以下通式的任何氨基酸:

[0269] $-N(R)-(CR'R'')_q-C(O)-$

[0270] 其中 R 是氢、烷基、酰基或适合的氮保护基团, R' 和 R'' 是氢或取代基,它们的每一个在每种情况下独立地选择, q 是整数,例如 1、2、3、4 或 5。例示性地, R' 和 / 或 R'' 独立地相应于,但不限于,氢或天然存在的氨基酸上的侧链,例如,甲基、苯甲基、羟甲基、硫甲基、羧基、羧甲基、胍基丙基,等等,以及其衍生物和保护的衍生物。上文描述的式子包括所有的立体异构化变体。例如,氨基酸可以选自天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、鸟氨酸、苏氨酸,等等。在一种变体中,所述可释放的接头包括至少 2 个选自天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、鸟氨酸和苏氨酸的氨基酸。在另一种变体中,所述可释放的接头包括 2 到约 5 个之间的氨基酸,所述氨基酸选自天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、鸟氨酸和苏氨酸。在另一种变体中,所述可释放的接头包括三肽、四肽、五肽或六肽,其由选自天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸和鸟氨酸以及其组合的氨基酸构成。

[0271] 在此处描述的维生素受体结合药物递送共轭物中间物的另一个例示性的方面中，所述药物、或其类似物或衍生物，包括烷基巯基亲核试剂

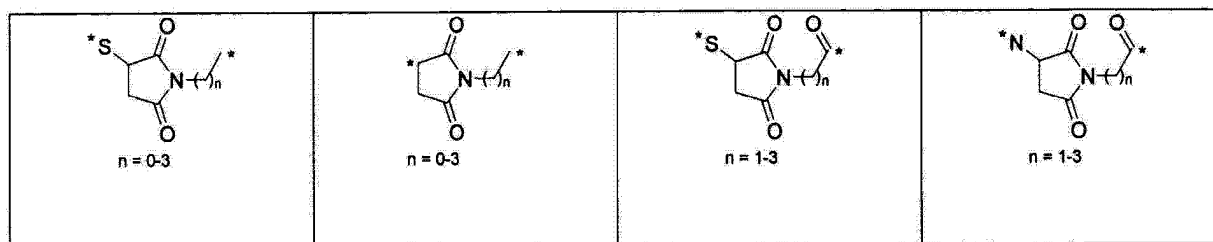
[0272] 在下表中描述了另外的接头，其中 (*) 原子是另外的间隔区或可释放接头、药物和 / 或结合配体的附着点。

[0273] 描述了以下的例示性的间隔区接头。

[0274]

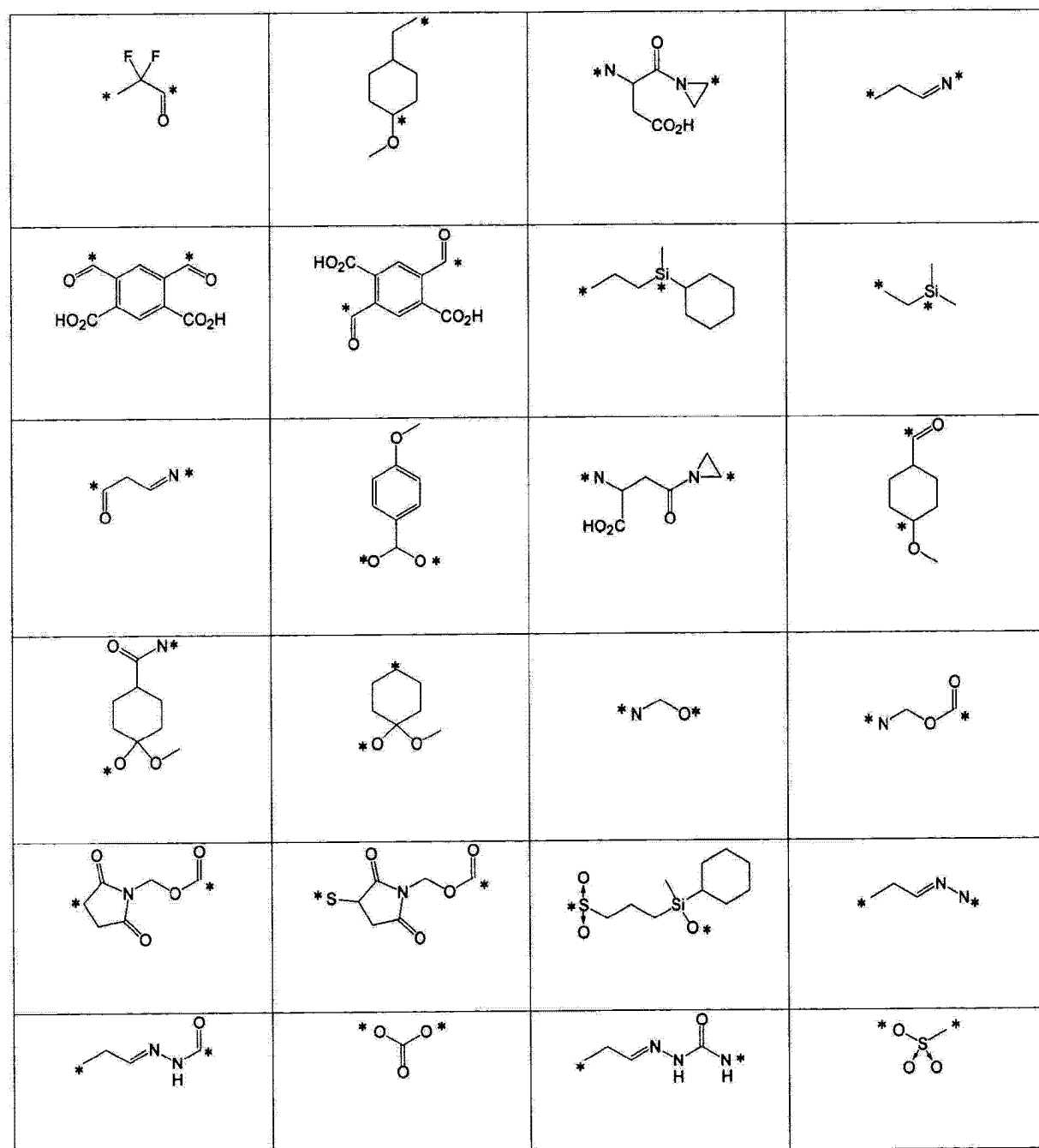
[0275]

[0276]

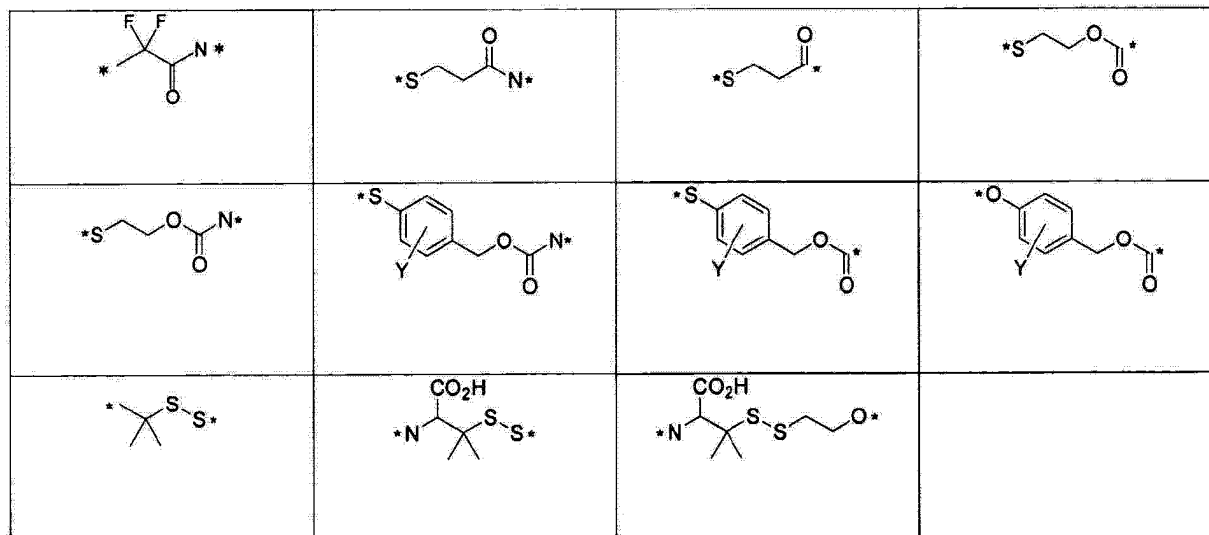


[0277] 描述了以下的例示性的可释放的接头。

[0278]



[0279]



[0280] 要理解的是,这样的亲水性接头可以改变共轭物的稳定性、新陈代谢和组织分布,特别是与其他的共轭物形式相比,例如在美国专利申请系列号 10/765,336 中描述的基于肽的形式。例如,要理解的是,在某些情况下,碳水化合物-蛋白质相互作用弱于肽-蛋白质相互作用。因而,理解的是,在此处描述的各种实施方式中,所述共轭物可以导致更低的血清蛋白结合。在此处描述的共轭物与其他已经报道的共轭物之间的这些和其他物理化学的差异可以包括增强的对目标细胞的靶向,以及改善的,即,更为选择性的或差异选择性的生物分布型。提高的细胞毒性可以是降低的血清蛋白结合、或更好的或差异化的生物分布(即,更少的药物在非特异性区室中浪费)的天然结果。对于施用亲水性的而非中性的间隔区,这是特别真实的。不受理论的限制,还建议的是,此处描述的亲水性间隔区接头可以降低可能至少部分由于非特异性结合相互作用的毒性。

[0281] 在可替换的实施方式中,药物直接或间接地连接到亲水性间隔区接头,来实现降低肝脏清除的目标。在此发现的是,亲水性基团的附着,可释放的或非可释放的、以及更特别地亲水性的中性基团,提高了肾脏的特异性递送。

[0282] 已经注意的是,具有二硫化物接头和肽间隔区的叶酸盐-药物共轭物的肝脏清除保留了残余的、有时是相当不利的毒性分布型。包括此处描述的亲水性间隔区还引入了用于肾脏特异性递送的载体。因而理解的是,在靶向药物共轭物中包括这样的接头可以降低总体的肝脏摄取,结果降低总体毒性。不受理论的限制,要理解的是,在 MTD 的毒性,例如施用长春花生物碱共轭物,可以由非特异性肝脏清除引起,产生新陈代谢、游离药物例如 DAVLBH 释放到胆汁、然后是肠道中。然后可能发生局部毒性以及全身性毒性(由于重新吸收)。通过在此处描述的靶向和非靶向共轭物中包括亲水性的接头,相信的是,通过肾脏的清除可以优先地发生,因而降低和/或避免伴随的基于肝脏新陈代谢的毒性。因而,测量药物成分例如 DAVLBH 的来自药物-叶酸盐共轭物系列的总胆汁清除,可以用于预测哪些试剂是最小毒性的。

[0283] 如上所述,在此描述的共轭物可以用于以选择性或特异性的方式将目标试剂 A 递送到细胞。在这样的递送的一个方面,不需要的清除机制也可以被避免。已经发现的是,在此描述的亲水性间隔区接头当用于形成受体结合配体 B 和试剂 A 的共轭物时,可以降低通过肝脏的清除的数量。进一步发现的是,这些亲水性间隔区接头倾向于偏向沿着肾脏途径,

例如肾脏来清除。进一步发现的是,当以相同的方式施用,在此描述的共轭物展现了比亲本试剂 A 本身更低的毒性。不受理论的限制,提出的是,更低的毒性来自所观察到的偏爱肾清除机制的肝脏清除机制方面的降低。

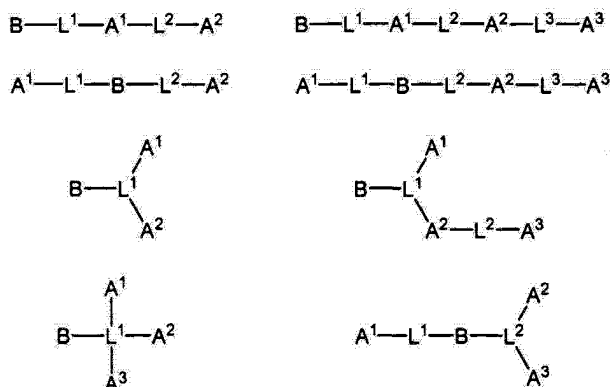
[0284] 在另一个实施方式中,在此描述了化合物,其具有降低的肝脏摄取以及较低可能地由肝脏清除。在一个方面,与肝脏过程相比,这样的化合物优先地由肾脏过程清除。因此,在另一个实施方式中,在此描述了以下式子的非靶向化合物:

[0285] L-A

[0286] 其中 L 是亲水性的间隔区, A 是诊断、治疗或成像试剂。要理解的是,这样的非靶向化合物,虽然不是利用受体结合配体 B 靶向的,尽管如此,当以相同的方式递送时与亲本试剂 A 相比可能展现降低的毒性。非靶向化合物,如上文描述的靶向共轭物,包括亲水性间隔区 L。因而,不到达希望治疗的细胞的试剂将被正常的代谢和生物学途径清除。然而,要理解的是,亲水性间隔区 L 的存在将指导通过肾途径而不是通过肝脏途径的清除。

[0287] 在另一个实施方式中,在此描述了多药物共轭物。这样的多药物共轭物的几种例示性的结构是此处期待的,包括在 PCT 国际公开 No. WO 2007/022494 中描述的化合物和组合物,其公开内容通过引用合并在此。例示性地,多价接头可以以各种结构构型将受体结合配体 B 连接到两个或更多个试剂 A,包括但不限于以下例示性的通式:

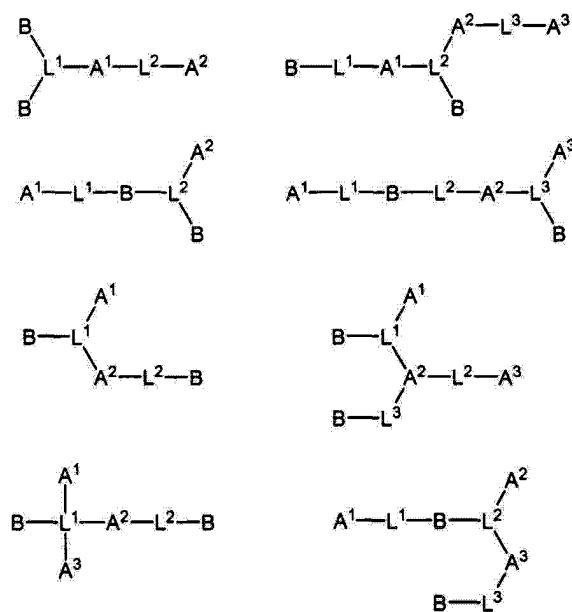
[0288]



[0289] 其中 B 是受体结合配体,每个 (L¹)、(L²) 和 (L³) 是在此描述的多价接头,其包含亲水性间隔区接头以及任选地包括一个或更多个可释放的接头和 / 或另外的间隔区接头,每个 (A¹)、(A²) 和 (A³) 是试剂 A 或其类似物或衍生物。其他变体,包括另外的试剂 A 或其类似物或衍生物、另外的接头、以及另外的每种 (B)、(L) 和 (A) 的排列的结构,也是此处期待的。

[0290] 在一种变体中,超过一个受体结合配体 B 被包括在此处描述的递送共轭物中,包括但不限于以下例示性的通式:

[0291]



[0292] 其中 B 是受体结合配体,每个 (L¹)、(L²) 和 (L³) 是在此描述的多价接头,其包含亲水性间隔区接头以及任选地包括一个或更多可释放的接头和 / 或另外的间隔区接头,每个 (A¹)、(A²) 和 (A³) 是试剂 A 或其类似物或衍生物。其他变体,包括另外的试剂 A 或其类似物或衍生物、另外的接头、以及另外的每种 (B)、(L) 和 (A) 的排列的结构,也是此处期待的。在一种变体中,受体结合配体 B 是相同的受体的配体,在另一种变体中,受体结合配体 B 是不同受体的配体。

[0293] 在另一个例示性的实施方式中,根据具有特定作用机制的、针对一个或更多个病理性细胞群体的活性来选择药物。例示性的作用机制包括烷化试剂、微管抑制物,包括稳定化和 / 或去稳定化微管形成的那些,包括 β -微管蛋白试剂、周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 抑制物、拓扑异构酶抑制物、蛋白质合成抑制物、蛋白激酶抑制物,包括 Ras、Raf、PKC、PI3K 和类似抑制物,转录抑制物、抗叶酸物、热激蛋白阻断剂,等等。

[0294] 例示性的烷化剂包括,但不限于,丝裂霉素 CBI,等等。例示性的周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 抑制物包括,包括但不限于,CYC202、seliciclib、R-roscovitine、AGM-1470,等等。例示性的拓扑异构酶抑制物包括,但不限于,多柔比星、其他蒽环类,等等。例示性的蛋白质合成抑制物包括,但不限于,鸦胆丁 (bruceantin),等等。例示性的蛋白激酶抑制物,包括 Ras、Raf、PKC、PI3K 和类似抑制物,包括但不限于 L-779, 450、R115777,等等。例示性的转录抑制物包括,但不限于, α -amanatin、放线菌素,等等。例示性的抗叶酸物包括,但不限于,甲氨蝶呤,等等。例示性的热激蛋白阻断剂包括,但不限于,格尔德霉素,等等。

[0295] 例示性的微管抑制物,包括稳定化和 / 或去稳定化微管形成的那些,包括 β -微管蛋白试剂,微管毒物,等等。结合选定的受体的例示性的微管毒物包括,但不限于,结合长春花结合位点的抑制物,例如 arenastatin、多拉司他汀、halichondrin B、美登素、拟茎点霉毒素 A (phomopsin A)、根霉素 (rhizoxin)、黑粉菌素 (ustiloxin)、长春碱、长春新碱,等等,结合紫杉酚结合位点的稳定剂,例如, discodermalide、epothilone、紫杉酚 (taxol)、紫杉醇 (paclitaxol),等等,结合秋水仙碱结合位点的抑制物,例如,秋水仙碱、考布他汀 (combretastatin)、库拉素 A (curacin A)、鬼臼毒素、steganacine,等等,以及结合未定义的位点的其他物质,例如 cryptophycin、tubulysins,等等。

[0296] 在一个实施方式中,所述 tubulysin 是天然存在的 tubulysin。在另一个实施方式中,所述 tubulysin 是合成的或半合成的 tubulysin。可以被包括在此处描述的共轭物中的其他的 tubulysin 在 PCT 国际申请系列号 NO. PCT/US2008/056824 中描述了,其公开内容通过引用合并在此。

[0297] 在此处描述的药物递送共轭物的一个实施方式中,所述至少一个药物是微管抑制物,或其类似物或衍生物。在另一个实施方式中,至少一个所述药物是 DNA 烷化剂。在另一个实施方式中,至少一种所述药物是 DNA 烷化剂,至少一种其他药物是微管抑制物。

[0298] 在此处描述的药物递送共轭物的另一个实施方式中,至少一种所述药物是 P-糖蛋白 (PGP) 抑制物。在另一个实施方式中,被包括在此处描述的药物递送共轭物上的至少一种药物是 PGP 抑制物,包括在药物递送共轭物上的至少一种其他药物是 PGP 底物。在这种后者的实施方式中例示性地,PGP 底物是 DNA 烷化试剂。关于这个实施方式,要理解的是,配对 PGP 抑制物和 PGP 底物,例如 DNA 烷化剂,包括但不限于,任何丝裂霉素,如丝裂霉素 C、丝裂霉素 A 等等,可以改善药物的总体性能,所述药物否则是 PGP 底物。在此处描述的可释放共轭物中,PGP 抑制物药物和 PGP 底物药物都在内吞作用之后在细胞中被释放。照这样,PGP 抑制物药物可以改善 PGP 底物药物的总体效率和 / 或效价。此外,PGP 抑制物可以降低 PGP 表达,其随后将降低被包括在此处描述的多药物共轭物上的一种或更多种药物从病原性细胞中的流出。要理解的是,丝裂霉素或其类似物或衍生物,例如丝裂霉素 C 可以作为 PGP 抑制物、或 PGP 的减量调节物起作用。进一步理解的是,长春花生物碱或其类似物或衍生物,例如长春碱类似物和衍生物,可以是通过 PGP 抑制物或减量调节物来保护不从病原性细胞中流出的 PGP 底物。

[0299] 在此处描述的药物递送共轭物的另一个实施方式中,所述至少一种药物是长春花生物碱,或其类似物或衍生物。此处描述的长春花生物碱包括生物碱的长春花吲哚 - 二氢吲哚家族的全部成员,例如但不限于长春地辛、长春碱、长春新碱、长春花碱、温都林、环氧长春碱、长春瑞滨、咪多卡、西布曲明、托曲珠利、vinblastinoic acid 等等,以及其类似物和衍生物。

[0300] 在另一个实施方式中,在此描述了治疗由病原性细胞群体引起或证明的疾病的方法。结合配体 (B) 药物递送共轭物可以用于治疗疾病状况,所述疾病状况的特征在于宿主中病原性细胞群体的存在,其中所述病原性细胞群体的成员具有结合配体 (B) 或其类似物或衍生物的可接近的结合位点,其中所述结合位点由所述病原性细胞独特地表达、过量表达或优先地表达。病原性细胞的选择性消灭是由结合配体 (B) 药物递送共轭物的配体部分与配体受体、转运蛋白或其他表面呈递的蛋白质的结合所介导的,所述配体受体、转运蛋白或其他表面呈递的蛋白质特异性地结合所述结合配体 (B) 或其类似物或衍生物,并且是由所述病原性细胞独特地表达、过量表达或优先地表达的。所述病原性细胞独特地表达、过量表达或优先地表达的表面呈递的蛋白质一般是不存在于或以更低浓度存在于非病原性细胞上的受体,提供了选择性消灭所述病原性细胞的手段。

[0301] 例如,表面表达的维生素受体,例如,高亲和力叶酸盐受体,是在癌细胞上过量表达的。卵巢、乳腺、结肠、肺、鼻、喉和脑的上皮癌症都被报道表达提高水平的叶酸盐受体。实际上,大于 90% 的所有人类卵巢肿瘤已知表达大量的这种受体。因此,此处描述的的结合配体 (B) 药物递送共轭物可以用于治疗多种的肿瘤细胞类型,以及其他类型的病原性细

胞,例如传染原,其优先地表达配体受体,例如维生素受体,因而,具有对配体例如维生素或维生素类似物或衍生物的表面可接近的结合位点。在一个方面,在此描述的方法用于靶向结合配体-接头-药物共轭物来最大化病原性细胞的靶向用于消除。

[0302] 本发明进一步期待结合配体-接头-药物共轭物的组合的用途,来最大化病原性细胞的靶向用于消除。

[0303] 此处描述的结合配体(B)药物递送共轭物可以用于人类临床医学和兽医学应用。因而,携带病原性细胞的群体、并用所述结合配体(例如,维生素)药物递送共轭物治疗的宿主动物可以是人类,或对于兽医学应用来说,可以是实验室的、农业的、家养的或野生动物。此处描述的方法可以应用于宿主动物,包括但不限于,人类、实验动物,例如啮齿动物(例如,小鼠、大鼠、仓鼠,等等)、兔、猴、黑猩猩、家养动物,例如犬、猫和兔,农用动物,例如牛、马、猪、绵羊、山羊和关养的野生动物,例如熊、熊猫、狮子、虎、豹、象、斑马、长颈鹿、大猩猩、海豚和鲸。

[0304] 所述方法适合于在这些宿主动物中引起多种的病理的病原性细胞的群体。术语病原性细胞是指例如癌细胞,传染剂,例如细菌和病毒,细菌或病毒感染的细胞,能够引起疾病状况的活化的巨噬细胞,和任何其他类型的病原性细胞,其独特地表达、优先地表达或过量表达结合配体受体,例如维生素受体或结合维生素的类似物或衍生物的受体。病原性细胞还可以包括引起疾病状况的任何细胞,所述疾病状况用此处描述的结合配体药物递送共轭物治疗产生所述疾病的症状的降低。例如,病原性细胞可以是在某些情况下病原性的,例如对移植物抗宿主疾病负责的免疫系统的细胞,但在其他情况下不是病原性的宿主细胞。

[0305] 因而,病原性细胞的群体可以是致瘤的癌细胞群体,包括良性肿瘤和恶性肿瘤,或者它可以是非致瘤的。癌细胞群体可以自发地出现,或通过如宿主动物的种系中存在的突变或体细胞突变的这些过程出现,或者它可以是化学地、病毒地或辐射诱导的。所述方法可以用于治疗这样的癌症,例如,癌、肉瘤、淋巴瘤、Hodgkin's病、黑素瘤、间皮瘤、Burkitt's淋巴瘤、鼻咽癌、白血病和骨髓瘤。癌细胞群体可以包括,但不限于,口腔、甲状腺、内分泌、皮肤、胃、食道、喉、胰、结肠、膀胱、骨骼、卵巢、子宫颈、子宫、乳房、睾丸、前列腺、直肠、肾脏、肝脏和肺癌。

[0306] 在病原性细胞群体是癌细胞群体的实施方式中,共轭物施用的效果是通过肿瘤块的降低或消除、或肿瘤细胞增殖的抑制作用所测量的治疗反应。在肿瘤的情况下,所述消除可以是原发肿瘤的细胞的消除,或已经转移,或是在从原发肿瘤脱离的过程中的细胞的消除。还描述了,在通过任何治疗手段,包括肿瘤的外科去除、放射治疗、化学治疗或生物学疗法去除肿瘤之后,使用结合配体(B)药物递送共轭物(例如,用作结合配体的维生素)来预防肿瘤复发的预防性治疗。预防性治疗可以用结合配体(B)药物递送共轭物的初步治疗,例如,以每日的多剂量方案的治疗,和/或可以是在初步治疗之后数天或数月的间隔之后的附加治疗或系列治疗。因此,使用所描述的方法治疗的任何病原性细胞群体的消除包括病原性细胞数目的降低、病原性细胞的增殖的抑制作用、防止病原性细胞返回的预防性治疗,或引起疾病症状的降低的病原性细胞的处理。

[0307] 在癌细胞被消除的情况下,所述方法可以与以下组合使用:肿瘤的外科去除、放射治疗、化学治疗或生物学疗法,例如其他免疫治疗,包括但不限于单克隆抗体疗法、用免疫调节剂治疗、免疫效应细胞的继承转移、用造血生长因子、细胞因子和疫苗接种治疗。

[0308] 所述方法还适合于引起多种传染性疾病的病原性细胞的群体。例如,所述方法适合于这样的病原性细胞群体,如细菌,真菌,包括酵母,病毒,病毒感染的细胞,支原体和寄生虫。可以用此处描述的结合配体(B)药物递送共轭物治疗的传染性的生物体是任何本领域公认的在动物中引起病理的传染性生物体,包括这样的生物体,如革兰氏阴性或格兰氏阳性球菌或杆菌的细菌。例如,变形杆菌属(*Proteus*)物种,克氏杆菌属(*Klebsiella*)物种,普罗威登斯菌属(*Providencia*)物种,耶尔森氏菌属(*Yersinia*)物种,欧文氏菌属(*Erwinia*)物种,肠杆菌属(*Enterobacter*)物种,沙门氏菌属(*Salmonella*)物种,沙雷氏菌属(*Serratia*)物种,气杆菌属(*Aerobacter*)物种,埃希杆菌属(*Escherichia*)物种,假单胞菌属(*Pseudomonas*)物种,志贺氏菌属(*Shigella*)物种,弧菌属(*Vibrio*)物种,气单胞菌属(*Aeromonas*)物种,弯曲杆菌属(*Campylobacter*)物种,链球菌属(*Streptococcus*)物种,葡萄球菌属(*Staphylococcus*)物种,乳杆菌属(*Lactobacillus*)物种,微球菌属(*Micrococcus*)物种,摩拉克氏菌属(*Moraxella*)物种,芽胞杆菌属(*Bacillus*)物种,梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)物种,棒状杆菌属(*Corynebacterium*)物种,埃伯泽氏菌属(*Eberthella*)物种,微球菌属(*Micrococcus*)物种,分枝杆菌属(*Mycobacterium*)物种,奈瑟氏菌属(*Neisseria*)物种,嗜血杆菌属(*Haemophilus*)物种,拟杆菌属(*Bacteroides*)物种,李司忒氏菌属(*Listeria*)物种,丹毒丝菌属(*Erysipelothrix*)物种,不动杆菌属(*Acinetobacter*)物种,布鲁氏菌属(*Brucella*)物种,巴斯德氏菌属(*Pasteurella*)物种,弧菌属(*Vibrio*)物种,黄杆菌属(*Flavobacterium*)物种,梭杆菌属(*Fusobacterium*)物种,链杆菌属(*Streptobacillus*)物种,鞘杆菌属(*Calymmatobacterium*)物种,军团菌属(*Legionella*)物种,密螺旋体属(*Treponema*)物种,疏螺旋体属(*Borrelia*)物种,钩端螺旋体属(*Leptospira*)物种,放线菌属(*Actinomyces*)物种,诺卡氏菌属(*Nocardia*)物种,立克次氏体属(*Rickettsia*)物种,和在宿主中引起疾病的任何其他细菌物种,可以用此处描述的结合配体药物递送共轭物治疗。

[0309] 特别感兴趣的是对抗生素有抗性的细菌,例如抗生素抗性链球菌属物种和葡萄球菌属物种,或对抗生素敏感的、但用抗生素治疗引起复发性感染从而最终发展出抗性生物体的细菌。对抗生素敏感的、但用抗生素治疗引起复发性感染从而最终发展出抗性生物体的细菌,可以在不存在抗生素的情况下、或与比正常施用给患者更低剂量的抗生素组合地,用此处描述的结合配体(B)药物递送共轭物来治疗,以避免抗生素抗性细菌菌株的发展。

[0310] 病毒,例如DNA和RNA病毒,也可以用所描述的方法处理。这样的病毒包括但不限于,DNA病毒,例如乳头状瘤病毒、细小病毒、腺病毒、疱疹病毒和牛痘病毒,以及RNA病毒,例如沙粒病毒、冠状病毒、鼻病毒、呼吸道合胞体病毒、流感病毒、微小RNA病毒、副粘病毒、呼肠孤病毒、逆转录病毒、慢病毒和棒状病毒。

[0311] 所述方法还适合于任何真菌,包括酵母、支原体物种、寄生虫或其他在动物中引起疾病的传染性的生物体。可以用所述方法和组合物治疗的真菌的实例包括作为霉菌生长的真菌或是酵母样的真菌,包括,例如,引起一些疾病的真菌,所述疾病例如癣,组织胞浆菌病,芽生菌病,曲霉病,隐球菌病,孢子丝菌病,球孢子菌病,巴西芽生菌病,毛霉菌病,着色芽生菌病,肤癣病,原壁菌病,镰刀菌病,糠疹,足分枝菌病,巴西芽生菌病,暗色丝孢霉病,假性阿利什利菌病,孢子丝菌病,毛孢子菌病,肺囊虫感染,和念珠菌病。

[0312] 所述方法也可以用于治疗寄生虫感染,包括但不限于,由以下引起的感染:绦虫,

例如绦虫属 (*Taenia*)、膜壳绦虫属 (*Hymenolepsis*)、裂头绦虫属 (*Diphyllobothrium*) 和棘球绦虫属 (*Echinococcus*) 物种, 吸虫, 例如姜片虫属 (*Fasciolopsis*)、异形吸虫属 (*Heterophyes*)、后殖吸虫属 (*Metagonimus*)、支睾吸虫属 (*Clonorchis*)、片吸虫属 (*Fasciola*)、并殖吸虫属 (*Paragonimus*) 和 *Schistosoma* 物种, 蛔虫, 例如蛲虫属 (*Enterobius*)、鞭虫属 (*Trichuris*)、蛔虫属 (*Ascaris*)、钩虫属 (*Ancylostoma*)、板口线虫属 (*Necator*)、类圆线虫 (*Strongyloides*)、毛线虫属 (*Trichinella*)、吴策线虫属 (*Wuchereria*)、布鲁格丝虫属 (*Brugia*)、罗阿属 (*Loa*)、盘尾属 (*Onchocerca*)、和龙线属 (*Dracunculus*) 物种, 变形虫, 例如耐格里属 (*Naegleria*) 和棘阿米巴属 (*Acanthamoeba*) 物种, 和原生动物, 例如疟原虫属 (*Plasmodium*)、锥虫属 (*Trypanosoma*)、利什曼虫属 (*Leishmania*)、弓形体属 (*Toxoplasma*)、内阿米巴属 (*Entamoeba*)、贾第鞭毛虫属 (*Giardia*)、等孢子球虫属 (*Isospora*)、隐孢子虫属 (*Cryptosporidium*) 和肠胞虫属 (*Enterocytozoon*) 物种。

[0313] 此处描述的结合配体药物递送共轭物针对的病原性细胞也可以是携带内源病原体的细胞, 例如病毒、支原体、寄生虫、细菌感染的细胞, 如果这些细胞优先地表达配体受体, 例如维生素受体。

[0314] 在一个实施方式中, 所述结合配体药物递送共轭物可以在结合配体部分与受体、转运蛋白或其他表面呈递的蛋白质的结合时内在化到靶向的病原性细胞中, 所述受体、转运蛋白或其他表面呈递的蛋白质特异性地结合所述配体并且优先地在病原性细胞上表达。例如, 这样的内在化可以通过受体介导的内吞作用发生。如果结合配体 (B) 药物递送共轭物含有可释放的接头, 所述结合配体部分和药物可以在细胞内地离解, 所述药物可以作用于它的细胞内目标。

[0315] 在可选择的实施方式中, 所述药物递送共轭物的结合配体部分可以结合到病原性细胞, 将所述药物置于与所述病原性细胞的表面紧密相关。因而所述药物可以通过可释放的接头的裂解来释放。例如, 如果所述可释放的接头是二硫基团, 所述药物可以通过蛋白质二硫化物异构酶来释放。然后所述药物可以被结合配体 (B) 药物递送共轭物结合的病原性细胞吸收, 或所述药物可以被与之紧密接近的另一个病原性细胞吸收。做为选择, 当所述可释放的接头是二硫基团时, 所述药物可以通过细胞内部的蛋白质二硫化物异构酶来释放。所述药物还可以通过水解机制释放, 例如, 酸催化的水解作用, 如上文对于某些 β 消除机制所描述的, 或通过氧鎓离子或 lactonium 离子产生机制的邻位辅助的裂解。可释放的单个接头或复数个接头的选择将支配药物从共轭物上释放的机制。要理解的是, 这样的选择可以通过将要使用药物共轭物的条件来预先确定。做为选择, 药物递送共轭物可以在结合时被内在化到靶向细胞中, 所述结合配体和药物可以在细胞内保持缔合, 药物展现它的效力而不与维生素部分解离。

[0316] 在又一个实施方式中, 在所述结合配体是维生素时, 维生素 - 药物递送共轭物可以通过独立于细胞的维生素受体的机制起作用。例如, 所述药物递送共轭物可以结合于血清中存在的可溶的维生素受体, 或结合于血清蛋白, 例如白蛋白, 引起相对于未共轭的药物的所述共轭物的延长的循环, 以及相对于未共轭的药物, 所述共轭物针对病原性细胞群体的提高的活性。

[0317] 在另一个实施方式中, 当所述接头不包含可释放的接头时, 药物递送共轭物的维

生素部分可以结合于病原性细胞,将所述药物置于病原性细胞的表面,来靶向所述病原性细胞用于能够结合所述药物的其他分子的攻击。做为选择,在这个实施方式中,药物递送共轭物可以在结合时被内在化到靶向细胞中,所述维生素部分和药物可以在细胞内保持缔合,药物展现它的效力而不与维生素部分解离。

[0318] 在本发明的另一个实施方式中,提供了通式 B-L-A 的细胞受体结合递送共轭物,其中 L 是在此定义的,A 是药物例如免疫原。所述免疫原可以是半抗原,例如,荧光素、二硝基苯基,等等。在这个实施方式中,所述维生素受体结合药物递送共轭物结合到病原性细胞的表面,用免疫原“标记”所述细胞,从而触发针对被标记的病原性细胞群体的免疫反应。在被动免疫中被施用给宿主的抗体,或宿主系统中存在的来自先存的先天或获得性免疫的抗体,结合所述免疫原并触发内源的免疫反应。与结合了细胞的维生素-免疫原共轭物结合的抗体引起补体介导的细胞毒性、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性、抗体调理作用和吞噬作用、抗体诱导的受体聚簇信号传导细胞死亡或休眠,或由结合到结合了细胞的配体-免疫原共轭物的抗体刺激的任何其他体液的或细胞的免疫反应。在没有先前的抗体调理作用免疫原就可以直接被免疫细胞识别的情况下,可以发生病原性细胞的直接杀伤。这个实施方式在美国专利申请系列号 NO. 09/822, 379 中更详细地描述了,通过引用合并在此。要理解的是,在这个实施方式的某些变体中,当药物是免疫原时,多价接头还可以包括如上所述的可释放的接头,例如通式 B-L-A 的维生素受体结合药物递送共轭物,其中 L 是包含一个或更多个亲水性间隔区接头和可释放的接头的接头。

[0319] 此处描述的结合配体 (B) 药物递送共轭物包括结合配体、多价接头 (L)、药物,和任选地,将结合配体和药物连接到多价接头 (L) 的杂原子接头。多价接头 (L) 可以包含间隔区接头、可释放的 (即,可裂解的) 接头,以及杂原子接头,或其组合。

[0320] 所述药物可以是能够调节或另外地修饰细胞功能的任何分子,包括药学上活性的化合物。适合的分子可以包括,但不限于:肽、寡肽、retro-inverso 寡肽、蛋白质、其中至少一个非肽键替换肽键的蛋白质类似物、载脂蛋白、糖蛋白、酶、辅酶、酶抑制物、氨基酸和它们的衍生物、受体和其他膜蛋白;抗原和其抗体;半抗原和其抗体;激素、脂质、磷脂、脂质体;毒素;抗生素;镇痛药;支气管扩张剂; β -阻断剂;抗微生物剂;抗高血压试剂;心血管试剂,包括抗心律不齐药、强心苷、抗心绞痛剂和血管扩张剂;中枢神经系统试剂,包括刺激剂、精神病治疗剂、抗躁狂药和抑制剂;抗病毒剂;抗组胺剂;癌症药物,包括化学治疗剂;镇静剂;抗抑郁剂;H-2 拮抗剂;抗惊厥剂;止恶心剂;前列腺素和前列腺素类似物;肌肉松弛药;抗炎性物质;刺激剂;解除充血剂;抗呕剂;利尿剂;镇痉剂;平喘药;抗 Parkinson 试剂;祛痰剂;咳嗽抑制剂;粘液溶解剂;和矿物质和营养添加剂。

[0321] 进一步的,所述药物可以是本领域已知的任何药物,其是细胞毒性的、提高肿瘤透过性、抑制肿瘤细胞增殖、促进细胞凋亡、降低目标细胞中的抗细胞凋亡活性,被用于治疗由传染剂引起的疾病,提高针对病原性细胞的内源免疫反应,或对于治疗由各种类型的病原性细胞引起的疾病状况是有用的。适合根据本发明使用的药物包括肾上腺类皮质激素和皮质类固醇,烷化剂,抗雄激素,抗雌激素药,雄激素、aclamycin 和 aclamycin 衍生物,雌激素、抗代谢物,例如阿糖胞苷、嘌呤类似物、嘧啶类似物和甲氨蝶呤、白消安、卡铂、苯丁酸氮芥、顺铂和其他铂化合物,tamoxiphen、紫杉酚 (taxol)、紫杉醇 (paclitaxel)、紫杉醇衍生物、Taxotere®、环磷酰胺、道诺霉素、柔红霉素、多柔比星、根霉素、T2 毒素、植物

生物碱、泼尼松、羟基脲、替尼泊苷、丝裂霉素、discodermolides、微管抑制物、埃博霉素、tubulysin、环丙基苯基 [e] 吡啶酮、seco- 环丙基苯基 [e] 吡啶酮、O-Ac-seco- 环丙基苯基 [e] 吡啶酮、博来霉素和任何其他抗生素、氮芥、亚硝基脲、长春新碱、长春碱，其类似物和衍生物，例如脱乙酰基长春碱单酰胺，和其他长春花生物碱，包括在 PCT 国际公开 No. WO 2007/022493 中描述的那些，其公开内容通过引用合并在此，秋水仙碱、秋水仙碱衍生物、allicolchicine、硫秋水仙素、三苯甲基半胱氨酸、Halicondrin B、多拉司他汀例如多拉司他汀 10、鹅膏菌素 (amanitin) 例如 α -鹅膏菌素、喜树碱、伊立替康和其他喜树碱衍生物、美登素、格尔德霉素 (geldanamycin) 和格尔德霉素衍生物、雌莫司汀、诺考达唑、MAP4、秋水仙酰胺、炎性的和促炎性的试剂、肽和肽模拟信号转导抑制物，以及任何其他本领域认可的药物或毒素。可以根据本发明使用的其他药物包括青霉素、头孢菌素、万古霉素、红霉素、克林霉素、利福平、氯霉素、氨基糖苷类抗生素、庆大霉素、两性霉素 B、无环鸟苷、曲氟尿苷、更昔洛韦、齐多夫定、金刚烷胺、利巴韦林，和任何其他本领域认可的抗微生物化合物。

[0322] 在另一个实施方式中，试剂 (A) 是选自长春花生物碱，例如 DAVLBH、cryptophycin、bortezomib、thiobortezomib、tubulysin、氨蝶呤、雷帕霉素、紫杉醇、多西他赛 (docetaxel)、多柔比星、柔红霉素、依维莫司、 α -amanatin、verucarin、didemnin B、geldanamycin、purvalanol A、依维莫司、ispinesib、布地缩松、dasatinib、epothilone、美登素和酪氨酸激酶抑制剂，包括上述的类似物和衍生物。在另一个实施方式中，所述共轭物包括至少两个试剂 (A)，选自长春花生物碱，例如 DAVLBH、cryptophycin、bortezomib、thiobortezomib、tubulysin、氨蝶呤、雷帕霉素、紫杉醇、多西他赛、多柔比星、柔红霉素、依维莫司、 α -amanatin、verucarin、didemnin B、geldanamycin、purvalanol A、依维莫司、ispinesib、布地缩松、dasatinib、epothilone、美登素和酪氨酸激酶抑制剂，包括上述的类似物和衍生物。在一种变体中，试剂 (A) 是相同的。在另一种变体中，试剂 (A) 是不同的。

[0323] 在一个实施方式中，在此处描述的方法中使用的药物在血清中保持稳定至少 4 小时。在另一个实施方式中，所述药物具有在纳摩尔范围内的 IC_{50} ，在另一个实施方式中，所述药物是水溶性的。如果药物不是水溶性的，多价接头 (L) 可以被衍生化来提高水溶性。术语“药物”还指在上文描述的任何药物类似物或衍生物。要理解的是，根据本发明，药物类似物或衍生物可以指掺入杂原子的药物，通过所述杂原子所述药物类似物或衍生物共价地结合到多价接头 (L)。

[0324] 结合配体药物递送共轭物可以包含结合配体 (B)、二价的接头 (L)、药物，和任选地，杂原子接头，来将结合配体 (B) 受体结合部分和药物连接到二价的接头 (L)。在一个例示性的实施方式中，要理解的是，维生素类似物或衍生物可以指掺入杂原子的维生素，通过所述杂原子，维生素类似物或衍生物共价地结合到二价的接头 (L)。因而，在这个例示性的实施方式中，所述维生素可以通过杂原子接头共价地结合到二价的接头 (L)，或维生素类似物或衍生物（即，掺入杂原子的）可以直接结合到二价的接头 (L)。在类似的例示性的实施方式中，药物类似物或衍生物是药物，药物类似物或衍生物可以指掺入杂原子的药物，通过所述杂原子所述药物类似物或衍生物共价地结合到二价的接头 (L)。因而，在这个例示性的方面中，所述药物可以通过杂原子接头共价地结合到二价的接头 (L)，或药物类似物或衍生物（即，掺入杂原子的）可以直接结合到二价的接头 (L)。二价的接头 (L) 可以包含间隔区接头、可释放的（即，可裂解的）接头，以及来将含有这两种类型接头的共轭物中的间隔区

接头连接到可释放的接头的杂原子接头。

[0325] 一般地,可以利用在二价的接头(L)和结合配体(B)或其类似物或衍生物之间、在二价的接头(L)和包括任何插入的杂原子接头的药物或其类似物或衍生物之间形成共轭物的任何方式。并且,可以使用形成间隔区接头、可释放的接头和杂原子接头之间的共轭物来形成二价的接头(L)的任何认可的方法。共轭物可以通过例如络合、或通过氢、离子或共价键,通过直接共轭任何这些分子来形成共轭物。例如,可以通过在酸、醛、羟基、氨基、巯基、或肼撑基团之间形成酰胺、酯、二硫化物、或亚氨基键来发生共价结合。

[0326] 在另一个实施方式中,二价的接头(L)包括一系列选自C、N、O、S、Si和P的原子的链,它们共价地连接结合配体(B)、亲水性的接头和/或试剂(A)。接头可以具有各种各样的长度,例如约2个到约100个原子。用于形成接头的原子可以以所有化学相关的方式组合,例如,形成亚烷基、亚烯基和亚炔基基团等等的碳原子的链;形成醚、聚氧化烯基团,或当与羰基组合时形成酯和碳酸酯等等的碳和氧原子的链;形成胺、亚胺、聚胺、肼、脲,或当与羰基组合时形成酰胺、脲、氨基脲、卡巴肼等等的碳和氮原子的链;形成烷氧基胺、烷氧基胺,或当与羰基组合时形成乌拉坦、氨基酸、酰基氧基胺、异羟肟酸等等的碳、氮和氧原子的链;以及许多其他的。此外,要理解的是,在每个前述例示性实施方式中形成链的原子可以是饱和的或不饱和的,从而,例如,烷、烯、炔、亚胺等等可以是被包括在所述接头中的基团。此外,要理解的是,形成接头的原子还可以相互环化来形成二价的环状结构,它们形成接头,包括接头中的环烷、环醚、环胺、亚芳基、杂亚芳基,等等。

[0327] 在另一个实施方式中,描述了药物组合物,其包含当以一个或多个剂量施用时有有效消除宿主动物中的病原性细胞群体的数量的结合配体(B)药物递送共轭物。结合配体药物递送共轭物优选地胃肠外地,例如,皮内地、皮下地、肌内地、腹膜内地、静脉内地或阴道内地施用给宿主动物。做为选择,结合配体药物递送共轭物可以通过其他医学上有用的过程施用给宿主动物,例如,口服地,可以使用任何有效剂量和适合的治疗剂型,包括延长释放的剂型。

[0328] 胃肠外的剂型的实例包括在等渗盐水、5%葡萄糖或其他公知的药学上可接受的液体载体,例如液体醇类、乙二醇、酯和酰胺中的活性试剂的水溶液。胃肠外的剂型可以是包含药物递送共轭物的剂量的可重构的冻干物的形式。在当前实施方式的一个方面,本领域已知的许多延长释放的剂型的任一种可以被施用,例如,在美国专利NO. 4, 713, 249、5, 266, 333和5, 417, 982中描述的生物可降解的碳水化合物基质,其公开内容通过引用合并在此,或作为选择,可以使用慢速的泵(例如,渗透泵)。

[0329] 在一个例示性的方面,包含治疗因子的至少一种另外的组合物可以被组合施用给宿主,或作为以上详述方法的佐剂,来提高病原性细胞群体的结合配体药物递送共轭物介导的消除,或可以施用超过一种的其他治疗因子。所述治疗因子可以选自化学治疗剂,或能够补充所施用的结合配体药物递送共轭物的效力的另一种治疗因子。

[0330] 在一个例示性的方面中,可以使用这些因子的治疗有效的组合。在一个实施方式中,例如,治疗有效量的治疗因子,例如,数量从约0.1MIU/m²/剂/天到约15MIU/m²/剂/天的每日多次剂量方案,或例如,数量从约0.1MIU/m²/剂/天到约7.5MIU/m²/剂/天的每日多次剂量方案,可以与所述结合配体药物递送共轭物一起使用来消除、降低或中和携带病原性细胞的宿主动物中的病原性细胞(MIU = 百万国际单位;m² = 人类平均的大约体表面

积)。

[0331] 在另一个实施方式中,例如,本身是细胞毒性的或可以起作用来提高肿瘤透过性的化学治疗剂,也适合于所描述的方法与所述结合配体药物递送共轭物组合。这样的化学治疗剂包括肾上腺类皮质激素和皮质类固醇,烷化剂,抗雄激素,抗雌激素药,雄激素, aclamycin 和 aclamycin 衍生物,雌激素、抗代谢物,例如阿糖胞苷,嘌呤类似物、嘧啶类似物和甲氨蝶呤、白消安、卡铂、苯丁酸氮芥、顺铂和其他铂化合物, tamoxiphen、紫杉酚 (taxol)、紫杉醇 (paclitaxel)、紫杉醇衍生物、**Taxotere®**、环磷酰胺、道诺霉素、柔红霉素、多柔比星、根霉素、T2 毒素、植物生物碱、泼尼松、羟基脲、替尼泊苷、丝裂霉素、discodermolides、微管抑制物、埃博霉素、tubulysin、环丙基苯基 [e] 吲哚酮、seco- 环丙基苯基 [e] 吲哚酮、0-Ac-seco- 环丙基苯基 [e] 吲哚酮、博来霉素和任何其他抗生素、氮芥、亚硝基脲、长春新碱、长春碱,其类似物和衍生物,例如脱乙酰基长春碱单酰胺,秋水仙碱、秋水仙碱衍生物、allicolchicine、硫秋水仙素、三苯甲基半胱氨酸、Halicondrin B、多拉司他汀例如多拉司他汀 10、鹅膏菌素例如 α - 鹅膏菌素、喜树碱、伊立替康和其他喜树碱衍生物、格尔德霉素和格尔德霉素衍生物、雌莫司汀、诺考达唑、MAP4、秋水仙酰胺、炎性的和促炎性的试剂、肽和肽模拟信号转导抑制物,以及任何其他本领域认可的药物或毒素。可以根据本发明使用的其他药物包括青霉素、头孢菌素、万古霉素、红霉素、克林霉素、利福平、氯霉素、氨基糖苷类抗生素、庆大霉素、两性霉素 B、无环鸟苷、曲氟尿苷、更昔洛韦、齐多夫定、金刚烷胺、利巴韦林,美登素和其类似物和衍生物、吉西他滨和任何其他本领域认可的抗微生物化合物。

[0332] 在结合配体药物递送共轭物之前、之后或同时,治疗因子可以施用给宿主动物,以及所述治疗因子可以作为含有结合配体药物递送共轭物的同一组合物的部分,或作为不同于结合配体药物递送共轭物的组合物的部分来施用。可以使用含有治疗有效剂量的治疗因子的任何这样的治疗组合物。

[0333] 另外,可以使用超过一种结合配体药物递送共轭物。例示性地,例如,宿主动物可以用具有不同维生素、但相同的药物的共轭物在共同给药方案中治疗。在其他实施方式中,宿主动物可以用包含连接到不同药物的同一结合配体、或连接到各种药物的各种结合配体的共轭物来治疗。在另一个例示性的实施方式中,可以使用具有相同或不同维生素和相同的或不同的药物、包含多种维生素和多种药物作为同一药物递送共轭物的部分的结合配体药物递送共轭物。

[0334] 结合配体药物递送共轭物的不可分的每日剂量可以取决于宿主状况、要治疗的疾病状况、共轭物的分子量、给药途径和组织分布、其他治疗例如放射治疗的共同使用的可能性而显著不同。要施用给患者的有效数量基于体表面积、患者体重以及患者状况的医师判断。在例示性的实施方式中,有效剂量可以是例如,约 1ng/kg 到约 1mg/kg,约 1 μ g/kg 到约 500 μ g/kg,约 1 μ g/kg 到约 100 μ g/kg,约 1 μ g/kg 到约 50 μ g/kg,以及约 1 μ g/kg 到约 10 μ g/kg。

[0335] 在另一个例示性的方面,可以使用施用所述结合配体药物递送共轭物的任何有效的方案。例如,所述结合配体药物递送共轭物可以作为单剂量来施用,或可以分开并作为每日多剂量方案施用。在其他实施方式中,交错的方案,例如,每周一到三天可以用作每日治疗的替代,这样间歇的或交错的每日方案被认为等效于每天的治疗,并处于此处描述的

方法的范围内。在一个实施方式中,所述宿主用结合配体药物递送共轭物的多次注射来消除病原性细胞群体。在另一个实施方式中,所述宿主用结合配体药物递送共轭物注射多次(优选的约 2 次直到约 50 次),例如,以 12-72 小时的间隔,或 48-72 小时的间隔。在其他实施方式中,结合配体药物递送共轭物的另外的注射可以在初次注射之后数天或数月的间隔施用给患者,另外的注射防止由病原性细胞引起的疾病状况的复发。

[0336] 在一个实施方式中,可用于所述结合配体药物递送共轭物的维生素或其类似物或衍生物包括结合活化的巨噬细胞上特异性表达的受体的那些,例如叶酸盐受体,其结合叶酸盐其类似物或衍生物。例如,叶酸盐连接的共轭物可以用于杀伤或抑制在宿主中引起疾病状况的活化的巨噬细胞的活性。这样的巨噬细胞靶向共轭物,当施用给患有活化的巨噬细胞介导的疾病状况的患者时,起作用来在活化的巨噬细胞的群体中浓缩和缔合共轭的药物,来杀伤活化的巨噬细胞或抑制巨噬细胞功能。活化的巨噬细胞群体的消除、降低或灭活起作用来停止或降低作为要治疗的疾病状况的特征的活化的巨噬细胞介导的病理。已知由活化的巨噬细胞介导的疾病的范例包括类风湿性关节炎、溃疡性结肠炎、Crohn's 病、银屑病、骨髓炎、多发性硬化、动脉粥样硬化、肺纤维化、结节病、全身性硬化、器官移植排斥(GVHD) 和慢性炎症。药物递送共轭物的施用一般继续直到疾病状况的症状被降低或消除。

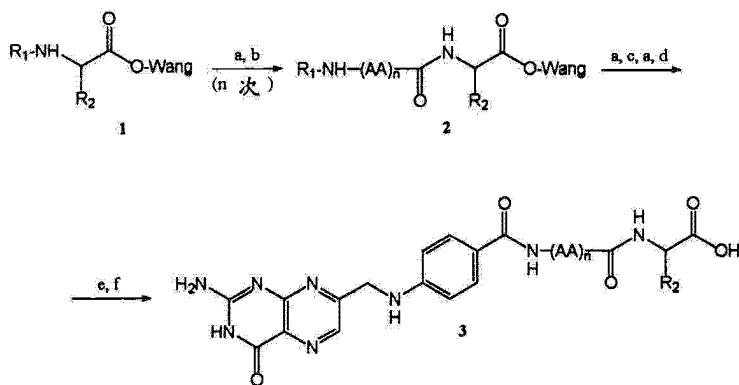
[0337] 例示性地,被施用来杀伤活化的巨噬细胞或抑制活化的巨噬细胞的功能的结合配体药物递送共轭物可以与药学上可接受的载体组合胃肠外地施用给患有疾病状况的动物或患者,例如,皮内地、皮下地、肌内地、腹膜内地或静脉内地。在另一个实施方式中,所述结合配体药物递送共轭物可以通过其他医学上有用的操作施用给动物或患者,有效剂量可以在标准的或延长释放的剂型中施用。在另一个方面,治疗方法可以单独地,或与公认用于活化的巨噬细胞介导的疾病状况的治疗的其他治疗方法组合地使用。

[0338] 此处描述的药物递送共轭物可以通过本领域公知的合成方法来制备。取决于任选地添加的杂原子、或已经存在于间隔区接头、可释放接头、药物和 / 或结合配体上的杂原子的结合配体选择,来选择合成方法。一般地,在 Richard C. Larock, "Comprehensive Organic Transformations, a guide to functional group preparations," VCH Publishers, Inc. New York (1989) 和 Theodora E. Greene & Peter G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis," 2d edition, John Wiley & Sons, Inc. New York (1991) 中描述了有关的键形成反应,其公开内容通过引用合并在此。制备接头包括可释放的接头中含有的官能团,包括酰胺和酯、缩酮和缩醛、琥珀酰亚胺、甲硅氧基、胺、酰基肼、半卡巴胺、二硫化物、碳酸酯、磺酸酯等等的其他细节在美国专利申请 NO. US 2005/0002942 A1 中描述了,通过引用将其全部合并在此。

[0339] 叶酸盐-肽的一般形成。含有叶酸盐的肽基片段 $\text{Pte-Glu-(AA)}_n\text{-NH(CHR}_2\text{)CO}_2\text{H}$ (3) 通过利用标准方法的聚合物支持的连续方法来制备,例如在酸敏感性 Fmoc-AA-Wang 树脂 (1) 上的 Fmoc 策略,例如方案 1 中显示的。

[0340] 方案 1

[0341]



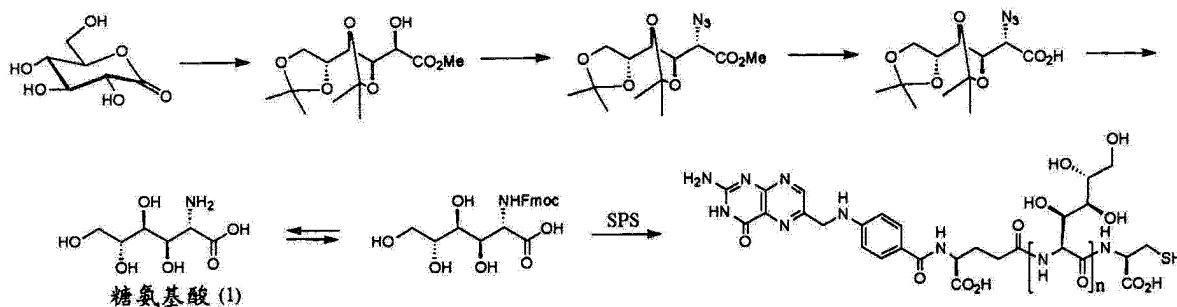
[0342] (a) 20 % 哌啶 /DMF ; (b) Fmoc-AA-OH, PyBop, DIPEA, DMF ; (c) Fmoc-Glu(O-t-Bu)-OH, PyBop, DIPEA, DMF ; (d) 1. N^{10} -(TFA)-Pte-OH ; PyBop, DIPEA, DMSO ; (e) TFAA, $(CH_2SH)_2$, $i-Pr_3SiH$; (f) NH_4OH , pH 10.3.

[0343] 在此处描述的过程的这个例示性实施方式中, R_1 是 Fmoc, R_2 是期望的适当地保护的氨基酸侧链, DIPEA 是二异丙基乙胺。使用标准的偶联过程, 例如, PyBOP 和其他此处描述的或本领域已知的, 其中偶联剂例示性地用作活化试剂来确保有效的偶联。Fmoc 保护基团在标准条件下在每个偶联步骤之后被除去, 例如, 在用哌啶、四丁铵氟化物 (TBAF) 等等处理时。使用适当地保护的氨基酸结构单元, 例如 Fmoc-Glu-OtBu、 N^{10} -TFA-Pte-OH 等等, 如在方案 1 中描述的, 在步骤 (b) 中由 Fmoc-AA-OH 表示。因而, AA 是指被适当地保护的氨基酸起始材料。要理解的是, 在此使用的术语氨基酸意图指具有由一个或更多个碳分隔的胺和羧酸官能团的任何试剂, 包括天然存在的 α 和 β 氨基酸, 以及这些氨基酸的氨基酸衍生物和类似物。特别是, 具有被保护的侧链的氨基酸, 例如保护的丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸盐等等, 也可以用于在此描述的叶酸盐-肽合成。进一步的, γ 、 Δ 或更长的同源氨基酸也可以被包括作为此处描述的叶酸盐-肽合成的起始材料。进一步的, 具有同源的侧链、或交替的分支结构的氨基酸类似物, 例如正亮氨酸、异缬氨酸、 β -甲基苏氨酸、 β -甲基半胱氨酸、 β , β -二甲基半胱氨酸等等, 也可以被包括作为此处描述的叶酸盐-肽合成中的起始材料。

[0344] 涉及 Fmoc-AA-OH 的偶联顺序 (步骤 (a)&(b)) 进行“n”次来制备固相支持的肽 2, 其中 n 是整数, 可以是 0 到约 100。在最后的偶联步骤之后, 残余的 Fmoc 基团被除去 (步骤 (a)), 肽被连续地偶联到谷氨酸衍生物 (步骤 (c))、脱保护、偶联到 TFA 保护的蝶酸 (步骤 (d))。随后, 肽在用三氟乙酸、乙二硫醇和三异丙基硅烷 (步骤 (e)) 处理时从聚合的支持物上裂解。这些反应条件引起可能构成适当地保护的氨基酸侧链的部分的 t-Bu、t-Boc 和 Trt 保护基团的同时除去。在用碱处理 (步骤 (f)) 时除去 TFA 保护基团来提供含有叶酸盐的肽基片段 3。

[0345] 此外, 以下例示性的过程可以用来制备此处描述的化合物, 其中是整数例如 1 到约 10。

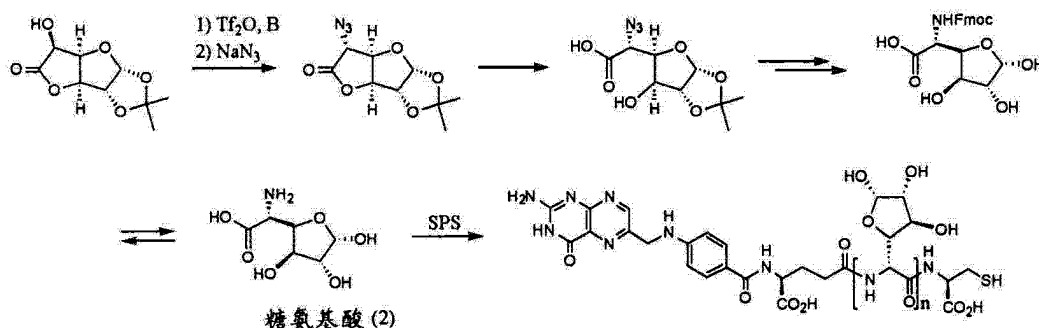
[0346]



[0347] 要理解的是,虽然对选定的化合物,例如所显示的特定的糖肽例示了上述合成过程,其他的类似化合物可以使用相同的或类似的过程通过起始材料的常规选择和反应条件的常规优化来制备。

[0348] 此处描述的化合物可以使用常规的合成有机化学来制备。此外,以下例示性的过程可以用来制备此处描述的化合物,其中是整数例如 1 到约 10。

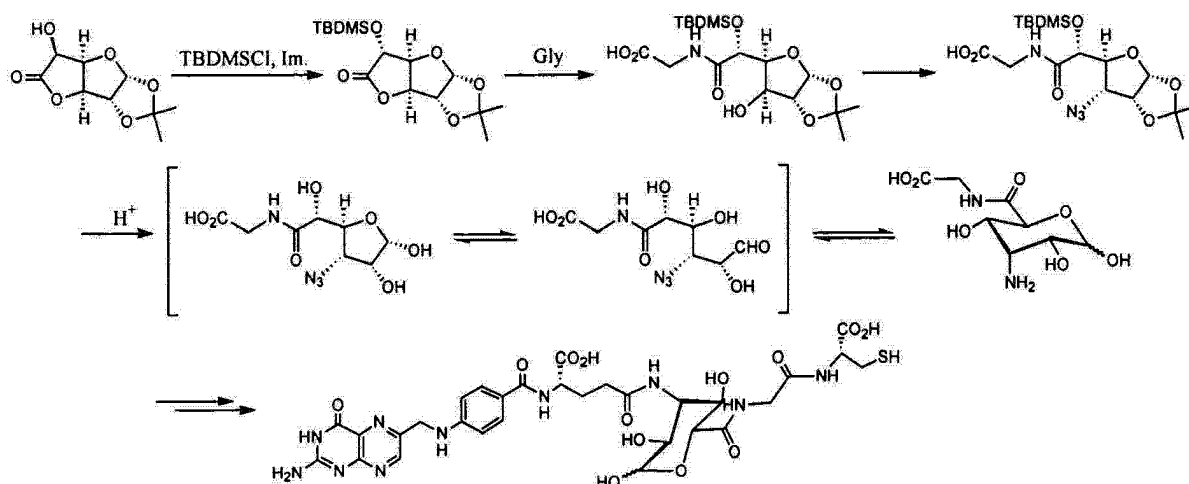
[0349]



[0350] 要理解的是,虽然对选定的化合物,例如所显示的特定的糖肽例示了上述合成过程,其他的类似化合物可以使用相同的或类似的过程通过起始材料的常规选择和反应条件的常规优化来制备。

[0351] 此外,以下例示性的过程可以用于制备此处描述的化合物。

[0352]



[0353] 要理解的是,虽然对选定的化合物说明了上述合成过程,其他的类似化合物可以使用相同的或类似的过程通过起始材料的常规选择和反应条件的常规优化来制备。

[0354] 在每个前述合成过程中,中间物可以与任何其他的亲水性间隔区接头、其他的间

隔区接头、可释放的接头或试剂 A 偶联。在每个前述过程的变体中,另外的亲水性间隔区接头、其他的间隔区接头、或可释放的接头可以被插入结合配体 B 和指定的亲水性间隔区接头之间。此外,要理解的是,二价亲水性间隔区接头的从左到右的排列不是限制性的,因而,试剂 A、结合配体 B、另外的亲水性间隔区接头、其他间隔区接头和 / 或可释放的接头可以附着于此处描述的亲水性间隔区接头的任一末端。

[0355] 方法实施例

[0356] 相对亲和力分析。叶酸盐受体 (FR) 相对于叶酸盐的亲和力根据具有略微改变的早先描述的方法来测定 (Westerhof, G. R., J. H. Schornagel, et al. (1995) Mol. Pharm. 48 : 459-471)。简要地,FR- 阳性 KB 细胞大量地接种到 24 孔细胞培养物平板中,容许附着于塑料 18 小时。在存在或不存在提高浓度的测试物或叶酸的情况下,在指定的孔中用补充有 100nM ^3H - 叶酸的无叶酸盐的 RPMI (FFRPMI) 替换耗费的培养基。细胞在 37°C 孵育 60 分钟,然后用 PBS、pH 7.4 清洗 3 次。每孔添加五百微升含 1% SDS 的 PBS、pH 7.4。然后采集细胞胞产物,添加到含有 5mL 闪烁混合物的单独小瓶中,然后对放射性计数。阴性对照试管仅含有 FFRPMI 中的 ^3H - 叶酸 (无竞争剂)。阳性对照试管含有终浓度 1mM 的叶酸,在这些样品中测量的 CPM (代表标记物的非特异性结合) 从所有样品中减去。值得注意地,相对亲和力被定义为替换结合在 KB 细胞上 FR 的 50% ^3H - 叶酸所需的化合物的摩尔比的倒数,叶酸对 FR 的相对亲和力被设为 1。

[0357] 细胞 DNA 合成的抑制作用。此处描述的化合物利用体外细胞毒性分析来评估,其预测了药物抑制叶酸盐受体阳性 KB 细胞生长的能力。所述化合物由与相应的化学治疗药物连接的叶酸盐组成,如根据此处描述的方案所制备的。在不存在或存在至少 100 倍过量的叶酸的情况下,KB 细胞在 37°C 暴露于指定浓度的叶酸盐 - 药物共轭物直到 7 小时。细胞然后用新鲜的培养基清洗一次,在 37°C 在新鲜的培养基中孵育 72 小时。使用 ^3H - 胸腺嘧啶核苷掺入分析来评估细胞生存力。

[0358] 体外浓度依赖性细胞毒性活性。细胞大量接种到 24 孔 Falcon 平板中,容许形成近乎汇合的单层过夜。在添加测试物质之前三十分钟,从所有孔中吸出耗费的培养基,用新鲜的无叶酸盐 RPMI (FFRPMI) 替换。注意,指定的孔接受含有 100 μM 叶酸的培养基;以及后者的孔内的细胞被用于测定靶向特异性,因为在存在过量叶酸 (允许 FR 结合的竞争) 的情况下产生的细胞毒性活性将意味着与 FR 特异性递送不相关的总体活性的部分。在用 1mL 含 10% 热灭活胎牛血清的新鲜 FFRPMI 清洗一次之后,在存在或不存在 100 μM 游离叶酸 (结合位点竞争剂) 的情况下,每个孔接受 1mL 的培养基,其含有提高浓度的测试物质 (每个样品 4 个孔)。处理的细胞在 37°C 脉冲 2h,用 0.5mL 培养基清洗 4 次,然后在 1mL 新鲜培养基中追踪直到 70 小时。耗费的培养基从所有孔中吸出,用含有 5 $\mu\text{Ci/mL}$ ^3H - 胸腺嘧啶核苷的新鲜培养基替换。在进一步的 2 小时 37°C 孵育之后,细胞用 0.5mL PBS 洗涤 3 次,然后用每孔 0.5mL 冰冷的 5% 三氯乙酸处理。在 15 分钟之后,吸出三氯乙酸,通过添加 0.5mL 0.25N 氢氧化钠来溶解细胞材料 15 分钟。450 μL 的每种溶解的样品转移到含有 3mL Ecolume 闪烁混合物的闪烁管中,然后自液体闪烁计数器中计数。最终制表的结果表示为相对于未处理的对照的 ^3H - 胸腺嘧啶核苷掺入的百分比。

[0359] 如此处的附图中所示,剂量依赖性细胞毒性是可测量的,大多数情况下, IC_{50} 值 (降低掺入到新合成 DNA 中的 ^3H - 胸腺嘧啶核苷 50% 所需的药物共轭物的浓度) 处于低的

纳摩尔范围内。此外,这些共轭物的细胞毒性在存在过量的游离叶酸时降低了,表明观察到的细胞杀伤是由与叶酸盐受体的结合介导的。以下表格说明了选定的化合物针对 KB 细胞和针对 RAW264.7 细胞的数据。

[0360]

共轭物 编号	基础药物 (s)	KB 细胞		RAW264.7 细胞	
		IC50 (nM)	可与 xs 叶酸盐 竞争	IC50 (nM)	可与 xs 叶酸盐 竞争
EC0234	DAVLBH	56	是		
EC0246	DAVLBH		是		
EC0258	DAVLBH	8.4	是		
EC0262	cryptophycin	4	是		
EC0263	DAVLBH	11	是		
EC0409	DAVLBH	7	是		
EC0525	Thio-bortezomib			68	是
EC0543	Tubulysin A	1.6	是		
EC0551	氯蝶呤			1	是
EC0552	雷帕霉素			100	是
EC0561	紫杉醇	53	是		
EC0563	Thiobortezomib + 雷帕霉素			387	是

[0361]

EC0582	Thio-bortezomib + 依维莫司			51	是
EC0592	α -amanatin	~ 3	是	5	是
EC0595	Bis-Thio-bortezomib			4	是
EC0598	Verucarin			33	是
EC0605	Bis-Verucarin			14	是
EC0610	Didemnin B			4	是
EC0647	二-氯蝶呤			0.3	是

[0362] 针对各种癌细胞系的体外测试。细胞大量接种到 24 孔 Falcon 平板中,容许形成近乎汇合的单层过夜。在添加测试化合物之前三十分钟,从所有孔中吸出耗费的培养基,用新鲜的叶酸盐不足的 RPMI 培养基 (FFRPMI) 替换。孔的亚组被指定接受含有 100 μ M 叶酸的培养基。指定孔中的细胞用于确定靶向特异性。不受理论的限制,提出的是,在存在过量叶

酸的情况下测试化合物产生的细胞毒性活性,即,存在着对 FR 结合的竞争时,相应于与 FR 特异性递送不相关的总活性的部分。在用 1mL 含 10% 热灭活胎牛血清的新鲜 FFRPMI 清洗一次之后,在存在或不存在所标明的 $100\ \mu\text{M}$ 游离叶酸的情况下,每个孔接受 1mL 的培养基,其含有提高浓度的测试化合物(每个样品 4 个孔)。处理的细胞在 37°C 脉冲 2h,用 0.5mL 培养基清洗 4 次,然后在 1mL 新鲜培养基中追踪直到 70 小时。耗费的培养基从所有孔中吸出,用含有 $5\ \mu\text{Ci/mL}$ ^3H - 胸腺嘧啶核苷的新鲜培养基替换。在进一步的 2 小时 37°C 孵育之后,细胞用 0.5mL PBS 洗涤 3 次,然后用每孔 0.5mL 冰冷的 5% 三氯乙酸处理。在 15 分钟之后,吸出三氯乙酸,通过添加 0.5mL 0.25N 氢氧化钠来溶解细胞材料 15 分钟。每个溶解的样品的 $450\ \mu\text{l}$ 等分量转移到含有 3mL Ecolume 闪烁混合物的闪烁管中,在液体闪烁计数器中计数。最终制表的结果表示为相对于未处理的对照的 ^3H - 胸腺嘧啶核苷掺入的百分比。

[0363] 小鼠中肿瘤生长的抑制作用。四到七周龄小鼠(BALB/c 或 nu/nu 系)购自 Harlan Sprague Dawley, Inc. (Indianapolis, IN)。正常的啮齿动物食物含有高浓度的叶酸(6mg/kg 食物);因而,在肿瘤植入之前所使用的小鼠维持无叶酸盐的日粮(Harlan 日粮 #TD00434)1 周,来实现接近正常人血清范围的血清叶酸盐浓度。对于肿瘤细胞接种, $100\ \mu\text{l}$ 中的 1×10^6 个 M109 细胞(Balb/c 系)或 1×10^6 个 KB 细胞(nu/nu 系)注射到背部中间区域的皮下组织中。每 2-3 天使用卡尺在两个正交方向上测量肿瘤,它们的体积计算为 $0.5\times L\times W^2$,其中 L = 最长轴按照 mm 的测量值, W = 垂直于 L 的轴按照 mm 的测量值。然后,Log 细胞杀伤(LCK)和治疗的对比对照(T/C)值根据公开的过程(参见,例如 Lee et al., “BMS-247550: a novel epothilone analog with a mode of action similar to paclitaxel but possessing superior antitumor efficacy” Clin Cancer Res 7:1429-1437(2001); Rose, “Taxol-based combination chemotherapy and other in vivo preclinical antitumor studies” J Natl Cancer Inst Monogr 47-53(1993))来计算。每天新制备 PBS 中的给药溶液,通过小鼠的侧面的尾部静脉施用。当 s.c. 肿瘤具有 $50\text{--}100\text{mm}^3(t_0)$ 的平均体积时启动给药,一般地 KB 肿瘤是肿瘤接种后 (PTI) 8 天, M109 肿瘤是 11 天 PTI。

[0364] 一般的 KB 肿瘤分析。当静脉内地(i.v.)向带有肿瘤的动物施用时,在带有皮下的 KB 肿瘤的 nu/nu 小鼠中评估了此处描述的化合物的抗肿瘤活性。在右侧腋窝的皮下组织中用 1×10^6 KB 细胞肿瘤接种后大约 8 天 (t_0 的平均肿瘤体积 = $50\text{--}100\text{mm}^3$), 小鼠(5 只/组)用 $5\ \mu\text{mol/kg}$ 的药物递送共轭物或用等效剂量体积的 PBS(对照),每周三次(TIW) i.v. 注射 3 周,除非此处另有陈述。使用卡尺以 2 天或 3 天的间隔在每个治疗的组中测量肿瘤生长。使用公式 $V = a\times b^2/2$ 计算肿瘤体积,其中按毫米表示,“a”是肿瘤的长度,“b”是宽度。

[0365] 一般的 M109 肿瘤分析。当静脉内地(i.v.)向带有肿瘤的动物施用时,在带有皮下的 M109 肿瘤(同系基因的肺癌)的 BALB/c 小鼠中评估了此处描述的化合物的抗肿瘤活性。在右侧腋窝的皮下组织中用 1×10^6 M109 细胞肿瘤接种后大约 11 天 (t_0 的平均肿瘤体积 = 60mm^3), 小鼠(5 只/组)用 1500nmol/kg 的药物递送共轭物或用等效剂量体积的 PBS(对照)每周三次(TIW) i.v. 注射 3 周。使用卡尺以 2 天或 3 天的间隔在每个处理的组中测量肿瘤生长。使用公式 $V = a\times b^2/2$ 计算肿瘤体积,其中按毫米表示,“a”是肿瘤的长度,“b”是宽度。

[0366] 一般的 4T-1 肿瘤分析。六到七周龄小鼠（雌性 Balb/c 系）获自 Harlan Sprague Dawley, Inc. Indianapolis, IN。在这个实验的开始和期间,小鼠维持 Harlan's 无叶酸盐食物总共三周。叶酸盐受体-阴性 4T-1 肿瘤细胞 (1×10^6 细胞每个动物) 接种在右侧腋窝皮下组织中。肿瘤接种后大约 5 天,此时 4T-1 肿瘤平均体积是 $\sim 100\text{mm}^3$,小鼠 (5 只 / 组) 用 $3 \mu\text{mol/kg}$ 的药物递送共轭物或用等效剂量体积的 PBS (对照),每周三次 (TIW) i. v. 注射 3 周,除非此处另有陈述。使用卡尺以 2 天或 3 天的间隔在每个治疗的组中测量肿瘤生长。使用公式 $V = a \times b^2 / 2$ 计算肿瘤体积,其中按毫米表示,“a”是肿瘤的长度,“b”是宽度。

[0367] 附图 3A、4A、5A、6A、7A、8A 和 10A 中显示的数据表明,此处描述的共轭物在肿瘤的治疗方面展现了比相应的非共轭的化合物优越的效力。用 EC0396 和 EC145 治疗带有 s. c. M109 肿瘤的 Balb/c 小鼠 (附图 4A) 在所有治疗的动物 (EC0396 3/3, EC145 5/5) 中产生完全的反应。此外,在几乎 70 天后,没有观察到疾病的复发。类似地,用 EC0400 治疗 (附图 5A) 产生完全的反应,在几乎 70 天后没有疾病的复发。用包括亲水性间隔区接头的此处描述的共轭化合物 (例如,EC0436) 治疗,优于显示了优越的效力的缺乏亲水性间隔区接头的比较共轭物 (例如 EC0305) (附图 8A)。EC0436 在 5/5 只动物中显示了完全的反应,在 90 天后没有疾病的复发。

[0368] 药物毒性测定。通过经由心脏穿刺采集血液,血清在 Ani-Lytics, Inc. (Gaithersburg, MD) 进行血尿素氮 (BUN)、肌酐、总蛋白、AST-SGOT、ALT-SGPT 加标准血液学细胞组的独立分析,评估了持续的药物毒性。此外,福尔马林固定的心脏、肺、肝脏、脾脏、肾脏、肠、骨骼肌和骨骼 (胫骨 / 腓骨) 的组织病理学评估由动物参考病理实验室 (ARUP ; Salt Lake City, Utah) 的委员会认证的病理学家进行。

[0369] 通过体重损失测量的毒性。在肿瘤接种后 (PTI) 选定的天数在小鼠 (5 只小鼠 / 组) 中测量体重变化百分比,与对照比较,并作图。如附图 3B、4B、5B、6B、7B、8B 和 10B 中所示,此处描述的共轭化合物显示了与非共轭的化合物相等的或降低的毒性,如通过体重损失百分比所测定的。

[0370] 对小鼠的单剂量和多剂量 MTD_{app} 。此处描述的化合物可能显示了共轭物中包括的亲水性间隔区接头的数量与单剂量的小鼠最大耐受剂量之间的正相关。举例来说,与对照共轭物相比的,此处描述的以下长春碱共轭物在下表中显示。

[0371]

化合物	亲水性接头的数量	单剂量 MTD_{app} ($\mu\text{mol/kg}$)
EC145	0	15
EC0234	1	12*
EC0246	2	<20**
EC0263	3	>20

[0372] * 溶解度限制的剂量 ; **1/3 在 $20 \mu\text{mol/kg}$ 1/3 小鼠死亡。

[0373] 还向 Balb/c 小鼠 TIW i. v. 施用 EC0436 和比较的实例 EC0305 1 周。多次剂量产生的 MTD 是 EC0305 (6mmol/kg) 和 EC0436 (9mmol/kg)。数据表明,EC0436 可以以大于

EC030550%的水平给药。

[0374] 血清结合。含有亲水性间隔区接头的叶酸盐-DAVLBH 共轭物的血清结合,与缺乏亲水性间隔区接头的比较实施例 EC145 比较,血清中 50 μ M 化合物具有 30K NMWL 过滤,通过 HPLC-UV 检查来评估 (n = 3)。

[0375]

化合物	人类血清 (% 结合)	SD	小鼠血清 (% 结合)	SD
EC145	54.3	1.6	67.3	2.6
EC0396	42.7	4.4	72.2	5.2
EC0400	61.1	1.9	75.5	1.4

[0376] 胆汁清除。未共轭的药物、缺乏亲水性间隔区接头的药物共轭物以及此处描述的共轭物的胆汁清除 (% ID) 的比较。

[0377]

化合物	间隔区	胆汁清除 (%ID)
DAVLBH	无	58.0
EC145	无亲水性间隔区	8.7
EC0234	单-核糖基	10.6
EC0246	二-核糖基	4.7

[0378]

化合物	间隔区	胆汁清除 (%ID)
EC0258	三-核糖基	3.2
EC0434	四-核糖基	2.8
EC0400	单-葡萄糖苷酸	6.3
EC0423	二-葡萄糖苷酸	3.9
EC0409	PEG ₁₂	7.9
EC0429	哌嗪/Asp	8.6

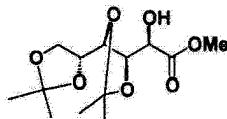
[0379] 附图 11 和 13 中显示的结果表明,与标准的 EC145 相比,在 EC0434 的肝脏清除中 76% 的降低,其包括了此处描述的亲水性间隔区接头。不受理论的限制,这些结果被认为相应于非特异性肝脏清除,因此,表明的是,与不包括这样的接头的相应共轭物相比,可以施用包括此处描述的亲水性间隔区接头的那些共轭物的显著更低的剂量。进一步的,不受

理论的限制,提出的是,肝脏清除导致了使用某些共轭物观察到的剂量限制性 GI 相关的毒性。

[0380] Western 印迹分析。附图 13 中显示的数据表明, EC0565 (叶酸盐-糖类-依维莫司) 可以引起 mTOR 的下游靶点 (依维莫司的细胞内靶点) 的剂量依赖性和特异性敲除。不受理论的限制,相信的是,叶酸盐将依维莫司递送到细胞内部,在其中依维莫司抑制 mTOR, mTOR 是雷帕霉素和 ser/thr 激酶的哺乳动物靶点。产生 mTOR 的下游靶点 (P70 S6-激酶和核糖体 S6) 的抑制作用,如在 Western 印迹上所显示的。

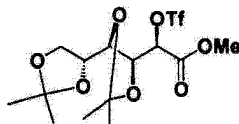
[0381] 化合物实施例

[0382]



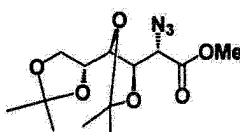
[0383] 实施例。(3,4), (5,6)-双丙酮化合物 (bisacetone)-D-葡萄糖酸甲酯。在干燥的 250mL 圆底烧瓶中,在氩气下, δ -葡萄糖酸内酯 (4.14g, 23.24mmol) 悬浮在丙酮-甲醇 (50mL) 中。向这个悬浮液中添加二甲氧基丙烷 (17.15mL, 139.44mmol), 随后添加催化数量的 p-toulenesulfonic acid (200mg)。这个溶液在室温下搅动 16 小时。TLC (石油醚中的 50% EtOAc) 显示了所有起始材料已经被消耗,形成了产物。在减压下除去丙酮-甲醇。反应的残余物溶于 EtOAc 中,用水洗涤。有机层用盐水洗涤,在 Na_2SO_4 上干燥,浓缩到干燥。这个材料然后加载到 SiO_2 柱上并层析 (石油醚中的 30% EtOAc) 来产生纯的 (3,4), (5,6)-双丙酮化合物-D-葡萄糖酸甲酯 (3.8g, 56%) 和区域异构体 (regio-isomer) (2,3), (5,6)-双丙酮化合物-D-葡萄糖酸甲酯 (0.71g, 10%)。 ^1H NMR 数据符合需要的产物。 $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_7$; MW 290.31; 精确质量: 290.14。

[0384]



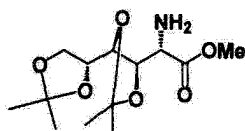
[0385] 实施例。(3,4), (5,6)-双丙酮化合物-2-OTf-D-葡萄糖酸甲酯。在干燥的 100mL 圆底烧瓶中,在氩气下, (3,4), (5,6)-双丙酮化合物-D-葡萄糖酸甲酯 (3.9g, 13.43mmol) 溶于二氯甲烷 (40mL) 中并冷却到 -20°C 到 -25°C 。向该溶液中添加吡啶 (3.26mL, 40.29mmol), 随后是三氟甲磺酸酐 (triflic anhydride) (3.39mL, 20.15mmol)。这种白色混浊的溶液在 -20°C 搅动 1 小时。TLC (石油醚中的 25% EtOAc) 显示了所有起始材料已经被消耗,形成了产物。反应混合物倒入压碎的冰中,用二乙醚提取。有机层用水、盐水洗涤,在 Na_2SO_4 上干燥,浓缩产生 (3,4), (5,6)-双丙酮化合物-2-OTf-D-葡萄糖酸甲酯 (5.5g, 97%)。这个材料用于接下来的反应而不进一步纯化。 $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{O}_9\text{S}$; MW 422.37; 精确质量: 422.09。

[0386]

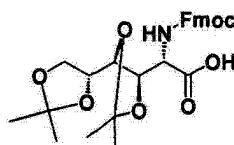


[0387] 实施例。(3,4), (5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-叠氮-D-甘露糖酸甲酯在干

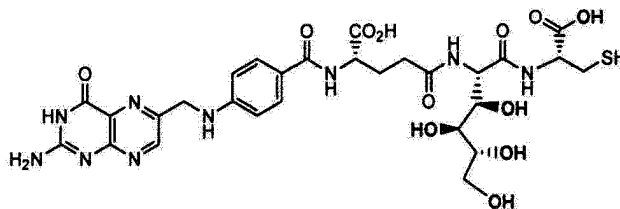
燥的 100mL 圆底烧瓶中,在氩气之下, (3,4), (5,6)-双丙酮化合物-2-OTf-D-葡萄糖酸甲酯 (5.5g, 13.02mmol) 溶于 DMF (20mL) 中。向该溶液中,添加 NaN₃ (0.93g, 14.32mmol)。这个溶液在室温下搅动 1 小时。TLC (石油醚中的 8% EtOAc, 三次运行) 显示了所有起始材料已经被消耗,形成了产物。在减压下除去 DMF。反应混合物用盐水稀释并用 EtOAc 提取。有机层用水、盐水洗涤,在 Na₂SO₄ 上干燥,浓缩到干燥。这个粗材料然后加载在 SiO₂ 柱上,层析 (石油醚中 20% EtOAc) 产生纯的 (3,4), (5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-叠氮-D-甘露糖酸甲酯 (3.8g, 93%)。¹H NMR 数据符合产物。C₁₃H₂₁N₃O₆; MW 315.32; 精确质量: 315.14。
[0388]



[0389] 实施例。(3,4), (5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-氨基-D-甘露糖酸甲酯。在 Parr 氢化作用烧瓶中, (3,4), (5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-叠氮-D-甘露糖酸甲酯 (3.5g, 11.10mmol) 溶于甲醇 (170mL) 中。向该溶液中添加碳上的 10% Pd (800mg, 5mol%)。使用 Parr-氢化器在 25PSI 进行氢化作用 1 小时。TLC (二氯甲烷中的 10% 甲醇) 显示了所有起始材料已经被消耗,形成了产物。反应混合物通过硅藻土片过滤,浓缩到干燥。这个粗材料然后加载在 SiO₂ 柱上,层析 (二氯甲烷中 2% 甲醇) 产生纯的 (3,4), (5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-氨基-D-甘露糖酸甲酯 (2.61g, 81%)。¹H NMR 数据符合产物。C₁₃H₂₃N₂O₆S; MW 289.32; 精确质量: 289.15。
[0390]



[0391] 实施例。(3,4), (5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖酸甲酯。在干燥的 100mL 圆底烧瓶中, (3,4), (5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-氨基-D-甘露糖酸甲酯 (1.24g, 4.29mmol) 溶于 THF/MeOH (20mL/5mL) 中。向该溶液中,添加水 (5mL) 中的 LiOH·H₂O (215.8mg, 5.14mmol)。这个淡黄色溶液在室温下搅动 2 小时。TLC (二氯甲烷中的 10% 甲醇) 显示了所有起始材料已经被消耗,形成了产物。在减压下除去 THF/MeOH。水相重新悬浮在饱和 NaHCO₃ (10mL) 中。向该悬浮液中添加 1,4-二噁烷 (10mL) 中的 Fmoc-OSu (1.74g, 5.14mmol)。这个杂合的溶液在室温下搅动 18 小时。TLC (二氯甲烷中的 10% 甲醇) 显示了大多数起始材料已经被消耗,形成了产物。在减压下除去二噁烷。用二乙醚提取水层来除去较低极性的杂质。然后使用 0.2N HCl 将水层酸化到 pH 6,用 EtOAc 重新提取。EtOAc 层用盐水洗涤,在 Na₂SO₄ 上干燥,浓缩产生 (3,4), (5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖酸 (1.6g, 76%)。这个材料用于接下来的反应而不进一步纯化。¹H NMR 数据符合产物。C₂₇H₃₁N₂O₈; MW 497.54; 精确质量: 497.20。
[0392]



[0393] 实施例。根据此处描述的的一般的肽合成操作在三个步骤中通过 SPPS 合成 EC0233, 从 H-Cys (4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂, 以及下列的 SPPS 试剂开始:

[0394]

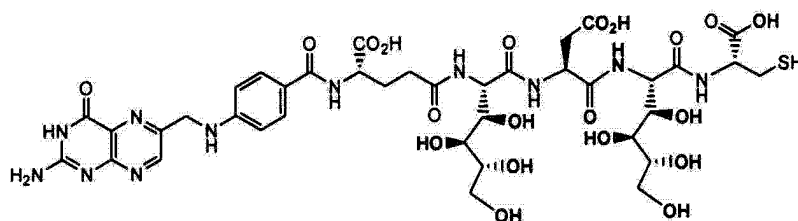
试剂	mmol	当量	MW	数量
H-Cys (4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂 (加载 0.56mmol/g)	0.56			1.0g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧 -2-Fmoc-氨基-D-甘露糖酸	0.7	1.25	497.54	0.348g
Fmoc-Glu-OtBu	1.12	2	425.5	0.477g
N ¹⁰ TFA-蝶酸 (溶于 10ml DMSO)	0.70	1.25	408	0.286g
DIPEA	2.24	4	129.25 (d = 0.742)	0.390mL
PyBOP	1.12	2	520	0.583g

[0395] 偶联步骤。在肽合成容器中, 添加树脂、添加氨基酸溶液、DIPEA 和 PyBOP。氩气鼓泡 1 小时, 用 DMF 和 IPA 洗涤 3×。使用 DMF 中的 20% 哌啶用于 Fmoc 脱保护, 3× (10 分钟), 之后偶联每种氨基酸。继续完成所有 3 个偶联步骤。最后, 用 DMF 中的 2% 胍洗涤树脂 3× (5 分钟) 来裂解蝶酸上的 TFA 保护基团。

[0396] 裂解步骤。裂解试剂: 92.5% (50ml) TFA、2.5% (1.34ml) H₂O、2.5% (1.34ml) 三异丙基硅烷、2.5% (1.34ml) 乙二硫醇。添加 25mL 裂解试剂并氩气鼓泡 20 分钟, 导液, 用残余试剂洗涤 3×。Rotavap 直到保留 5ml, 在乙醚中沉淀。离心和干燥。

[0397] HPLC 纯化步骤。柱: Waters NovaPak C₁₈300x19mm; 缓冲液 A = 10mM 乙酸铵, pH 5; B = ACN; 方法: 以 15mL/分钟在 40 分钟内 1% B 到 20% B; 产量 ~ 202mg, 50%。C₂₈H₃₅N₉O₁₂S; MW 721.70; 精确质量: 721.21。

[0398]



[0399] 实施例。二-糖-叶酸盐接头 EC0244。根据此处描述的的一般的肽合成操作在五

个步骤中通过 SPPS 合成 EC0244, 从 H-Cys(4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂, 以及下列的 SPPS 试剂开始:

[0400]

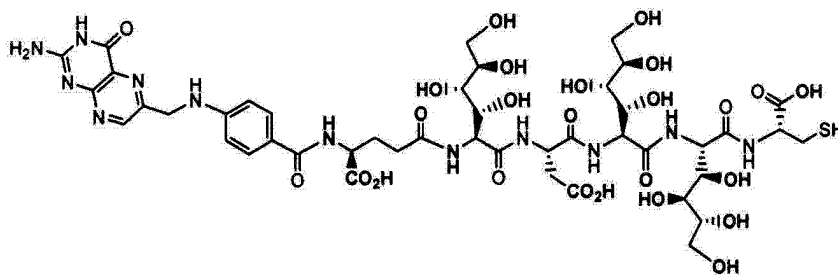
试剂	mmol	当量	MW	数量
H-Cys(4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂 (加载 0.56mmol/g)	0.56			1.0g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖酸	0.7	1.25	497.54	0.348g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	1.12	2	411.5	0.461g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖酸	0.7	1.25	497.54	0.348g
Fmoc-Glu-OtBu	1.12	2	425.5	0.477g

[0401]

N ¹⁰ TFA-蝶酸 (溶于 10ml DMSO)	0.70	1.25	408	0.286g
DIPEA	2.24	4	129.25 (d=0.742)	0.390mL
PyBOP	1.12	2	520	0.583g

[0402] 偶联步骤、裂解步骤、裂解试剂和 HPLC 纯化步骤与上文描述的相同; 产量~284mg, 50%。C₃₈H₅₁N₁₁O₂₀S; MW 1013.94; 精确质量: 1013.30。

[0403]



[0404] 实施例。根据此处描述的的一般的肽合成操作在六个步骤中通过 SPPS 合成 EC0257, 从 H-Cys(4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂, 以及下列的 SPPS 试剂开始:

[0405]

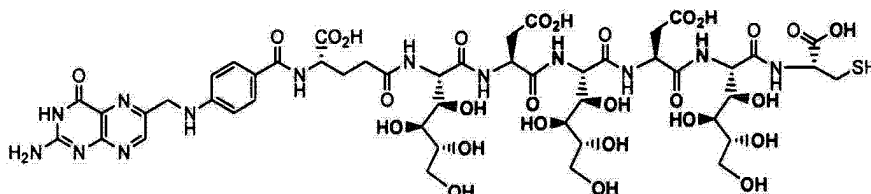
试剂	mmo l	当量	MW	数量
H-Cys (4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂 (加载 0.56mmol/g)	0.2			0.333g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.4	2	411.5	0.165g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Glu-OtBu	0.4	2	425.5	0.170g
N ¹⁰ TFA-蝶酸 (溶于 10ml DMSO)	0.25	1.25	408	0.119g

[0406]

DIPEA	0.8	4	129.25 (d=0.742)	0.139mL
PyBOP	0.4	2	520	0.208g

[0407] 偶联步骤、裂解步骤、裂解试剂和 HPLC 纯化步骤与上文描述的相同；产量～170mg, 71%。C₄₄H₆₂N₁₂O₂₅S；MW 1191.09；精确质量：1190.37。

[0408]



[0409] 实施例。根据此处描述的的一般的肽合成操作在七个步骤中通过 SPPS 合成 EC0261, 从 H-Cys (4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂, 以及下列的 SPPS 试剂开始：

[0410]

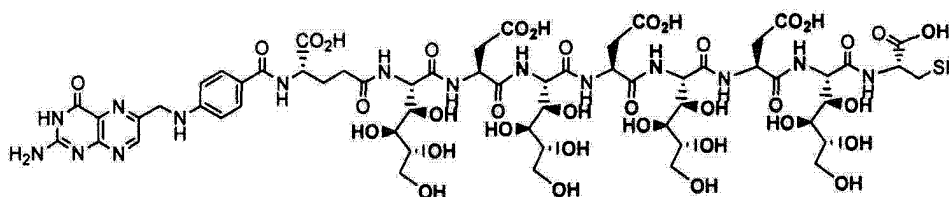
试剂	mmol	当量	MW	数量
H-Cys (4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂 (加载 0.56mmol/g)	0.2			0.333g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖 酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.4	2	411.5	0.165g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖 酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.4	2	411.5	0.165g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖 酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Glu-OtBu	0.4	2	425.5	0.170g
N ¹⁰ TFA-蝶酸 (溶于 10ml DMSO)	0.25	1.25	408	0.119g

[0411]

DIPEA	0.8	4	129.25 (d=0.742)	0.139mL
PyBOP	0.4	2	520	0.208g

[0412] 偶联步骤、裂解步骤、裂解试剂和 HPLC 纯化步骤与上文描述的相同;产量~170mg, 65%。 $C_{48}H_{67}N_{13}O_{28}S$; MW 1306.18; 精确质量: 1305.39。

[0413]



[0414] 实施例。四-糖-三-Asp-叶酸盐接头 EC0268。根据此处描述的的一般的肽合成操作在九个步骤中通过 SPPS 合成 EC0268, 从 H-Cys(4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂, 以及下列的 SPPS 试剂开始:

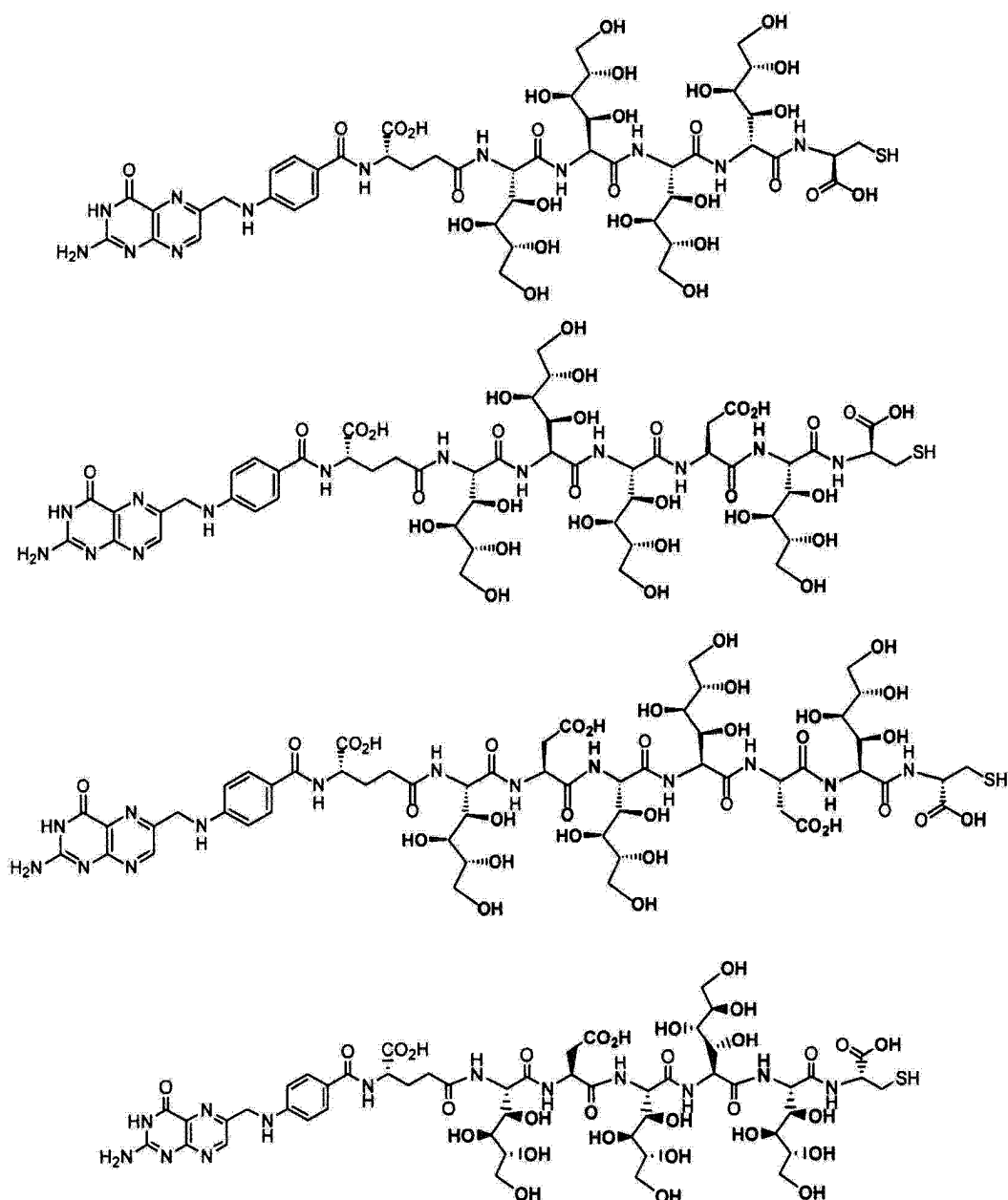
[0415]

试剂	mmol	当量	MW	数量
H-Cys (4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂 (加载 0.56mmol/g)	0.1			0.167g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖 酸	0.125	1.25	497.54	0.062g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.2	2	411.5	0.082g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖 酸	0.125	1.25	497.54	0.062g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.2	2	411.5	0.082g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖 酸	0.125	1.25	497.54	0.062g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.2	2	411.5	0.082g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖 酸	0.125	1.25	497.54	0.062g
Fmoc-Glu-OtBu	0.2	2	425.5	0.085g
N ¹⁰ TFA-蝶酸 (溶于 10ml DMSO)	0.125	1.25	408	0.059g
DIPEA	0.4	4	129.25 (d=0.742)	0.070m L
PyBOP	0.2	2	520	0.104g

[0416] 偶联步骤、裂解步骤、裂解试剂和 HPLC 纯化步骤与上文描述的相同；产量～100mg, 63%。C₉₄H₁₂₅N₁₉O₃₇S₂；MW 2177.24；精确质量：2175.79。

[0417] 以下例示性实施例可以根据用于 EC0268 的操作来制备：

[0418]



[0419] 实施例。四-糖-Asp-叶酸盐接头 EC0463。根据此处描述的的一般的肽合成操作在七个步骤中通过 SPPS 合成 EC0463, 从 H-Cys (4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂, 以及下列的 SPPS 试剂开始:

[0420]

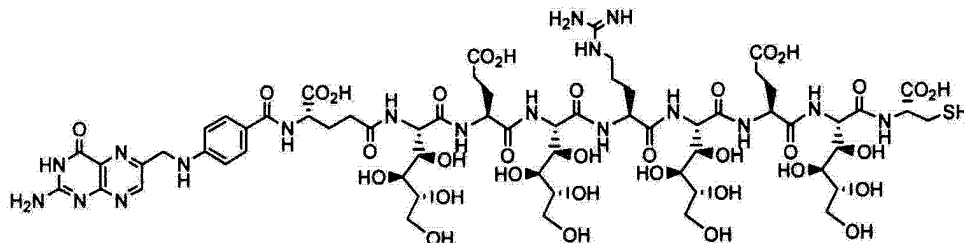
试剂	mmol	当量	MW	数量
H-Cys (4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂 (加载 0.56mmol/g)	0.1			0.167g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖 酸	0.125	1.25	497.54	0.062g

[0421]

(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖 酸	0.125	1.25	497.54	0.062g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖 酸	0.125	1.25	497.54	0.062g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.2	2	411.5	0.082g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖 酸	0.125	1.25	497.54	0.062g
Fmoc-Glu-OtBu	0.2	2	425.5	0.085g
N ¹⁰ TFA-蝶酸 (溶于 10ml DMSO)	0.125	1.25	408	0.059g
DIPEA	0.4	4	129.25 (d=0.742)	0.070m L
PyBOP	0.2	2	520	0.104g

[0422] 偶联步骤、裂解步骤、裂解试剂和 HPLC 纯化步骤与上文描述的相同；产量～63mg，46%。C₅₀H₇₃N₁₃O₃₀S；MW 1368.25；精确质量：1367.43。

[0423]



[0424] 实施例。四-糖-二-α-Glu-Arg-叶酸盐接头 EC0480。根据此处描述的的一般的肽合成操作在九个步骤中通过 SPPS 合成 EC0480，从 H-Cys(4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂，以及下列的 SPPS 试剂开始：

[0425]

试剂	mmol	当量	MW	数量
H-Cys(4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂 (加载 0.56mmol/g)	0.2			0.333g

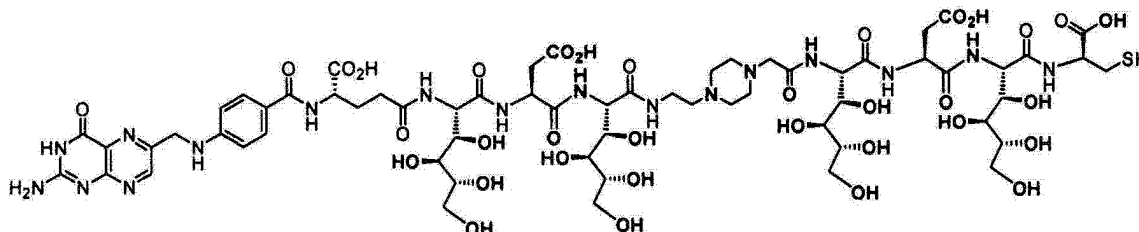
[0426]

(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖酸	0.250	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.4	2	425.5	0.170g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖酸	0.250	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Arg (Pbf) -OH	0.4	2	648.78	0.260g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖酸	0.250	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.4	2	425.5	0.170g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖酸	0.250	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Glu-OtBu	0.4	2	425.5	0.170g
N ¹⁰ TFA-蝶酸 (溶于 10ml DMSO)	0.250	1.25	408	0.119g
DIPEA	0.8	4	129.25 (d=0.742)	0.139mL
PyBOP	0.4	2	520	0.208g

[0427] 偶联步骤、裂解步骤、裂解试剂和 HPLC 纯化步骤与上文描述的相同；产量～100mg, 33%。 $C_{62}H_{94}N_{18}O_{20}S$ ；MW 1667.58；精确质量：1666.59。

[0428] 实施例。四-糖-二-Asp-叶酸盐接头 EC0452：

[0429]



[0430] 实施例。四-糖-二-Asp-叶酸盐接头 EC0452。根据此处描述的的一般的肽合成操作在九个步骤中通过 SPPS 合成 EC0452, 从 H-Cys(4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂, 以及下列的 SPPS 试剂开始：

[0431]

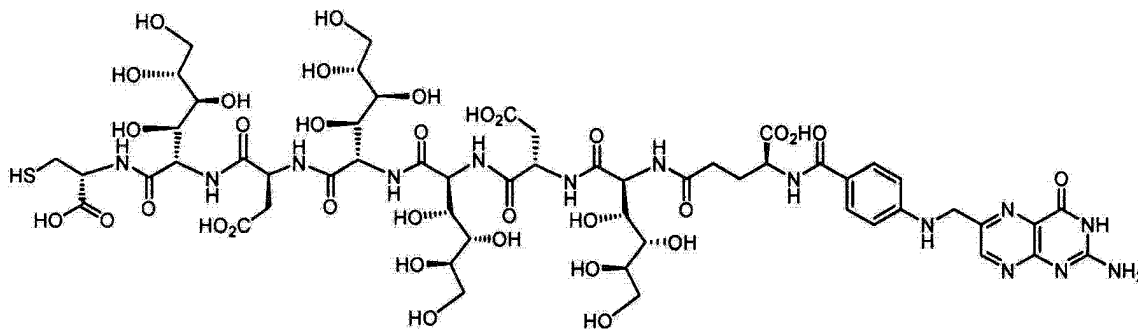
试剂	mmol	当量	MW	数量
H-Cys(4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂 (加载 0.6mmol/g)	0.15			0.250g

[0432]

(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖 酸	0.188	1.25	497.54	0.094g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.3	2	411.5	0.123g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖 酸	0.188	1.25	497.54	0.094g
Fmoc-4-(2-氨基乙基)-1-羧基甲基-哌嗪二盐酸盐	0.3	2	482.42	0.145g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖 酸	0.188	1.25	497.54	0.094g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.3	2	411.5	0.123g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖 酸	0.188	1.25	497.54	0.094g
Fmoc-Glu-OtBu	0.3	2	425.5	0.128g
N ¹⁰ TFA-蝶酸 (溶于 10ml DMSO)	0.188	1.25	408	0.077g
DIPEA	0.6	4	129.25 (d=0.742)	0.105m L
PyBOP	0.3	2	520	0.156g

[0433] 偶联步骤、裂解步骤和裂解试剂与上文描述的相同。HPLC 纯化步骤。柱: Waters NovaPak C₁₈300x19mm; 缓冲液 A = 10mM 乙酸铵, pH 5; B = ACN; 方法: 以 25mL/ 分钟在 40 分钟内 1% B 到 20% B; 产量 ~ 98mg, 40%。C₆₂H₉₃N₁₇O₃₄S; MW 1652.56; 精确质量: 1651.58。

[0434]



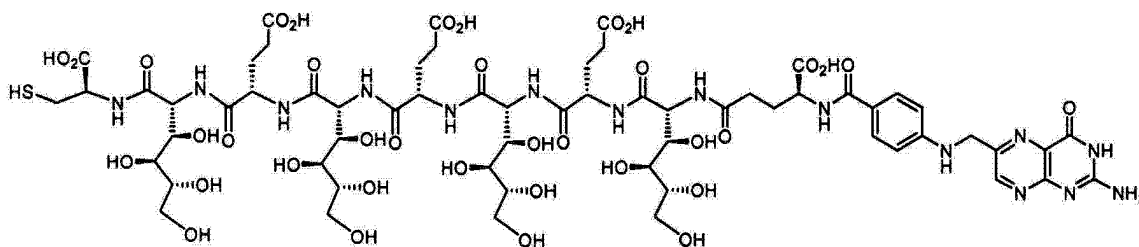
[0435] 实施例。四-糖-二-Asp-叶酸盐接头 EC0457。根据此处描述的的一般的肽合成操作在八个步骤中通过 SPPS 合成 EC0457, 从 H-Cys(4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂, 以及下列的 SPPS 试剂开始:

[0436]

试剂	mmol	当量	MW	数量
H-Cys (4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂 (加载 0.6mmol/g)	0.20			0.333g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.30	1.5	411.5	0.123g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.30	1.5	411.5	0.123g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Glu-OtBu	0.30	1.5	425.5	0.128g
N ¹⁰ TFA-蝶酸 (溶于 10ml DMSO)	0.25	1.25	408	0.102g
DIPEA		2 eq. 的 氨基酸	129.25 (d=0.742)	87μL 或 105 μL
PyBOP		2 eq. 的 氨基酸	520	260 mg 或 312mg

[0437] 偶联步骤、裂解步骤和裂解试剂与上文描述的相同。HPLC 纯化步骤。柱: Waters NovaPak C₁₈300x19mm; 缓冲液 A = 10mM 乙酸铵, pH 5; B = ACN; 方法: 以 25mL/ 分钟在 40 分钟内 0% B 到 20% B; 产量~210mg, 71%。C₅₄H₇₈N₁₄O₃₃S; MW 1483.34; 精确质量: 1482.46。

[0438]



[0439] 实施例。四-糖-三-Glu-叶酸盐接头 EC0477。根据此处描述的的一般的肽合成操作在九个步骤中通过 SPPS 合成 EC0477, 从 H-Cys (4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲

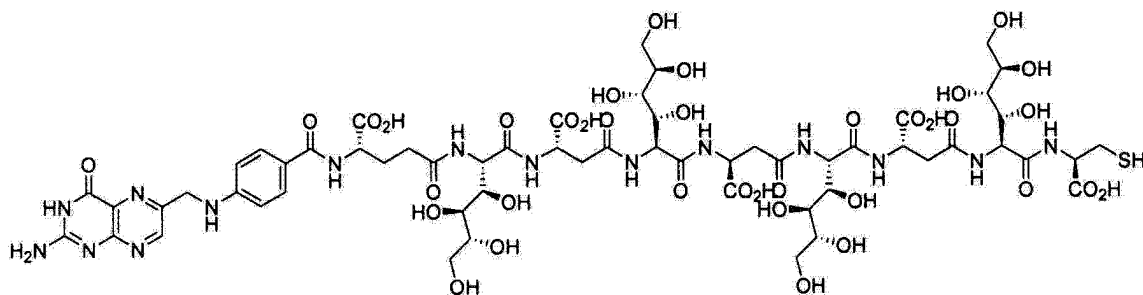
基-树脂,以及下列的 SPPS 试剂开始:

[0440]

试剂	mmol	当量	MW	数量
H-Cys (4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂 (加载 0.6mmol/g)	0.20			0.333g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.30	1.5	425.5	0.128g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.30	1.5	425.5	0.128g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.30	1.5	425.5	0.128g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖酸	0.25	1.25	497.54	0.124g
Fmoc-Glu-OtBu	0.30	1.5	425.5	0.128g
N ¹⁰ TFA-蝶酸 (溶于 10ml DMSO)	0.25	1.25	408	0.102g
DIPEA		2 eq. 的 氨基酸	129.25 (d=0.742)	87μL 或 105 μL
PyBOP		1 eq. 的 氨基酸	520	130 mg 或 156mg

[0441] 偶联步骤、裂解步骤和裂解试剂与上文描述的相同。HPLC 纯化步骤。柱:Waters NovaPak C₁₈300x19mm;缓冲液 A = 10mM 乙酸铵, pH 5;B = ACN;方法:以 25mL/ 分钟在 40 分钟内 0% B 到 20% B;产量~ 220mg, 67%。C₆₁H₈₉N₁₅O₃₆S;MW 1640.50;精确质量:1639.53。

[0442]



[0443] 实施例。根据此处描述的的一般的肽合成操作通过 SPPS 合成 EC0453, 从 H-Cys (4- 甲氧基三苯甲基) -2- 氯三苯甲基 - 树脂, 以及下列的 SPPS 试剂开始:

[0444]

试剂	mmol	当量	MW	数量
H-Cys (4-甲氧基三苯甲基) -2-氯三苯甲基-树脂 (加载 0.56mmol/g)	0.162			0.290 g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基 -D-甘露糖酸	0.203	1.25	497.54	0.101 g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.324	2	411.5	0.133 g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基 -D-甘露糖酸	0.203	1.25	497.54	0.101 g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.324	2	411.5	0.133 g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基 -D-甘露糖酸	0.203	1.25	497.54	0.101 g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.324	2	411.5	0.133 g
(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基 -D-甘露糖酸	0.203	1.25	497.54	0.101 g
Fmoc-Glu-OtBu	0.324	2	425.5	0.138 g
N ¹⁰ TFA-蝶酸 (溶于 10ml DMSO)	0.203	1.25	408	0.083 g
DIPEA		2 eq 的 AA		71 μ L 或 85 μ L
PyBOP		1 eq 的 AA		211mg 或 253 mg

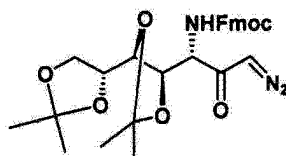
[0445] 偶联步骤。在肽合成容器中, 添加树脂、添加氨基酸溶液、DIPEA 和 PyBOP。氩气鼓泡 1 小时, 用 DMF 和 IPA 洗涤 3 $\times$ 。使用 DMF 中的 20% 哌啶用于 Fmoc 脱保护, 3 $\times$ (10 分

钟),之后偶联每种氨基酸。继续完成所有 9 个偶联步骤。最后,用 DMF 中的 2% 胍处理树脂 3×(5 分钟)来裂解蝶酸上的 TFA 保护基团,用 DMF(3×)、IPA(3×)、MeOH(3×)洗涤树脂,用氩气鼓泡树脂 30 分钟。

[0446] 裂解步骤。裂解试剂:92.5% TFA,2.5% H₂O,2.5% 三异丙基硅烷,2.5% 乙二硫醇。氩气鼓泡下用裂解试剂处理树脂 3 次(15 分钟、5 分钟、5 分钟)、导液、采集,组合溶液。Rotavap 直到保留 5ml,在二乙醚(35mL)中沉淀。离心,用二乙醚洗涤,和干燥。通过 HPLC 纯化粗的固体。

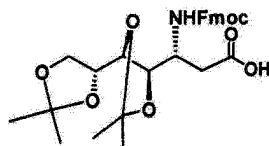
[0447] HPLC 纯化步骤。柱:Waters Xterra Prep MS C₁₈10 μm 19x250mm;溶剂 A:10mM 乙酸铵,pH 5;溶剂 B:ACN;方法:5 分钟 0% B 到 40 分钟 20% B 25mL/分钟;采集含有产物的级分并冻干来得到~60mgEC0453(23%产率)。¹H NMR 和 LC/MS 符合产物。C₅₈H₈₃N₁₅O₃₆S;MW 1598.43;精确质量:1597.48。C,43.58;H,5.23;N,13.14;O,36.03;S,2.01。

[0448]



[0449] 实施例。(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖酸-重氮-酮在干燥的 100mL 圆底烧瓶中,(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖酸(1.0g,2.01mmol)在氩气氛下溶于 THF(10mL,不完全溶解)中。反应混合物冷却到-25℃。向该溶液中,添加 NMM(0.23mL,2.11mmol)和氯甲酸乙酯(228.98mg,2.11mmol)。该溶液在-20℃搅动 30 分钟。产生的白色悬浮液容许加热到 0℃,添加乙醚中的重氮甲烷溶液直到黄色持续。继续搅动,同时容许混合物温热到室温。搅动 2 小时,通过添加几滴乙酸和强烈搅拌来破坏过量的重氮甲烷。用乙醚稀释混合物,用饱和 NaHCO₃ 水溶液、饱和 NH₄Cl 水溶液、盐水洗涤,在 Na₂SO₄ 上干燥,并浓缩到干燥。这个粗材料然后加载在 SiO₂ 柱上,层析(石油醚中 30% EtOAc)产生纯的(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖酸-重氮-酮(0.6g,57%)。¹H NMR 数据符合产物。C₂₈H₃₁N₃O₇;MW 521.56;精确质量:521.22。

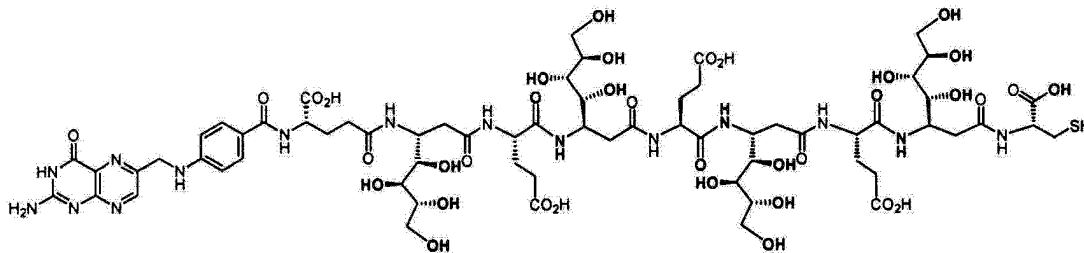
[0450]



[0451] 实施例。(3R,4R,5S,6R)-(4,5),(6,7)-双丙酮化合物-3-Fmoc-氨基-庚酸。在干燥的 25mL 圆底烧瓶中,(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-2-脱氧-2-Fmoc-氨基-D-甘露糖酸-重氮-酮(0.15g,0.29mmol)在氩气氛下溶于 THF(1.6mL)中。在暗处向该溶液中添加水中(0.4mL)的三氟醋酸银(6.6mg,0.03mmol)。产生的混合物在室温下搅动 16 小时。TLC(二氯甲烷中的 10% MeOH)显示了所有起始材料已经被消耗,形成了产物。溶剂(THF)在减压下除去,残余物用水稀释(pH 为 3.5-4.0),并用 EtOAc 提取。有机层用盐水洗涤,在 Na₂SO₄ 上干燥,浓缩到干燥。这个粗材料然后加载到 SiO₂ 柱上并层析(从二氯甲烷中 1% MeOH 到二氯甲烷中 5% MeOH 的梯度洗脱)来产生纯的(3R,4R,5S,6R)-(4,5),(6,7)-双丙

酮化合物-3-Fmoc-氨基-庚酸 (0.10g, 68%)。¹H NMR 数据符合产物。C₂₈H₃₃N₃O₈; MW 511.56; 精确质量: 511.22。

[0452]



[0453] 实施例。四-同型糖 (Homosaccharo)-三-α Glu-叶酸盐间隔区 EC0478。根据此处描述的的一般的肽合成操作在九个步骤中通过 SPPS 合成 EC0478, 从 H-Cys (4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂, 以及下列的 SPPS 试剂开始:

[0454]

试剂	mmol	当量	MW	数量
H-Cys (4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂 (加载 0.56mmol/g)	0.1			0.167g
同型糖	0.12	1.2	511.56	0.061g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.2	2	425.5	0.085g
同型糖	0.12	1.2	511.56	0.061g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.2	2	425.5	0.085g
同型糖	0.12	1.2	511.56	0.061g

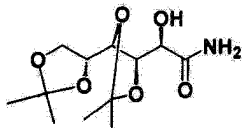
[0455]

Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.2	2	425.5	0.085g
同型糖	0.12	1.2	511.56	0.061g
Fmoc-Glu-OtBu	0.2	2	425.5	0.085g
N ¹⁰ TFA-蝶酸•TFA (溶于 10ml DMSO)	0.12	1.2	408	0.049g
DIPEA	0.4	4	129.25 (d=0.742)	0.070mL
PyBOP	0.2	2	520	0.104g

[0456] 偶联步骤、裂解步骤和裂解试剂与上文描述的相同。HPLC 纯化步骤。柱: Waters NovaPak C₁₈300x19mm; 缓冲液 A = 10mM 乙酸铵, pH 5; B = ACN; 方法: 100% A 5 分钟然后

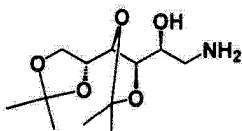
以 26ml/分钟在 20 分钟内从 0% B 到 20% B ;产量~ 88mg, 52%。 $C_{65}H_{97}N_{15}O_{36}$; MW 1696.61 ; 精确质量 :1695.59。

[0457]



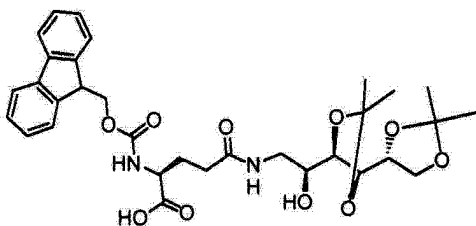
[0458] 实施例。(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-D-葡萄糖酸酰胺。20g 的甲酯溶于 100mL 甲醇中,用干冰/丙酮冷却高压反应容器,充入 100ml 液氨,温热到室温,加热到 160℃/850 PSI 2 小时。反应容器冷却到室温并释放压力。溶剂蒸发得到褐色浆液,添加最低量的异丙醇,利用回流来产生匀质溶液。溶液冷却到 -20℃,产生的固体过滤来得到 8.3g 的固体。蒸发母液,向产生的残余物中添加乙醚,回流直到得到匀质溶液。溶液然后冷却到 -20℃,产生的固体过滤得到 4.0g 产物。组合固体,在异丙醇中重结晶得到 11.2g (59%) 白色酰胺产物。 $C_{12}H_{21}NO_6$; MW275.30 ;精确质量 :275.14。

[0459]



[0460] 实施例。(3,4),(5,6)-双丙酮化合物-1-脱氧-1-氨基-D-山梨醇在干燥的 100mL 圆底烧瓶中,在氩气之下, $LiAlH_4$ (450mg, 11.86mmol) 溶于 THF (10mL) 并冷却到 0℃。在 15 分钟间非常慢地向该悬浮液中添加 THF (30mL) 中的 (3,4),(5,6)-双丙酮化合物-D-葡萄糖酸酰胺 (1.09g, 3.96mmol)。这个混合物回流 5 小时。TLC (二氯甲烷中的 10% MeOH) 显示了所有起始材料已经被消耗,形成了产物。反应混合物冷却到室温,然后冷却到冰浴温度,用二乙醚 (40mL) 稀释,慢慢地添加 0.5mL 的水,0.5mL 的 15% NaOH 水溶液,然后添加 1.5mL 的水。反应混合物温热到室温,搅动 30 分钟。添加 $MgSO_4$, 另外搅动 15 分钟并过滤。浓缩有机层至干燥,产生 (3,4),(5,6)-双丙酮化合物-1-脱氧-1-氨基-D-山梨醇。 1H NMR 数据符合产物。 $C_{12}H_{23}NO_5$; MW261.31 ;精确质量 :261.16。

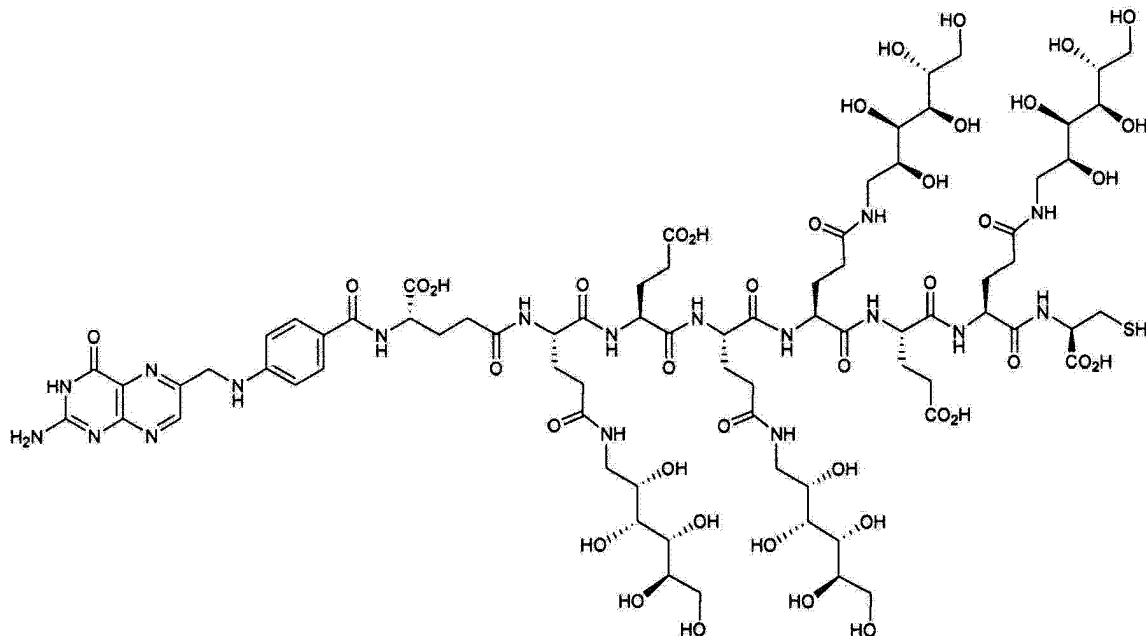
[0461]



[0462] 实施例。EC0475. 将 O-烯丙基保护的 Fmoc-Glu (2.17g, 1eq)、PyBOP (2.88g, 1eq) 和 DIPEA (1.83mL, 2eq) 添加到含 (3,4),(5,6)-双丙酮化合物-1-脱氧-1-氨基-D-山梨醇 (1.4g, 5.3mmol) 的无水 DMF (6mL) 的溶液中,在 Ar 下在 RT 搅动混合物 2 小时。溶液用 EtOAc (50mL) 稀释,用盐水洗涤 (10mL×3),分离有机层,干燥 ($MgSO_4$),过滤并浓缩得到残余物,通过闪蒸塔 (flash column) 纯化它 (硅胶, 60% EtOAc/石油醚) 来提供作为固体的 1.72g (50%) 烯丙基-保护的 EC0475。Pd(Ph_3)₄ (300mg, 0.1eq) 添加到含烯丙基-保护的 EC0475 (1.72g, 2.81mmol) 的 NMM/AcOH/ $CHCl_3$ (2mL/4mL/74mL) 的溶液中。产生的黄色溶液在

Ar 下在 RT 搅动 1 小时,向其中添加第二部分的 $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$ (300mg, 0.1eq)。在另外搅动 1 小时之后,混合物用 1N HCl (50mL×3) 和盐水 (50mL) 洗涤,分离有机层,干燥 (MgSO_4),过滤,浓缩得到黄色泡沫的固体,其进行层析(硅胶,1% MeOH/ CHCl_3 ,随后 3.5% MeOH/ CHCl_3) 得到 1.3g (81%) EC0475 固体材料。MW 612.67 ;精确质量 :612.27。

[0463]



[0464] 实施例。四-糖谷氨酸盐-二- α Glu-叶酸盐间隔区 EC0491。根据此处描述的的一般的肽合成操作在八个步骤中通过 SPPS 合成 EC0491,从 H-Cys (4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂,以及下列的 SPPS 试剂开始:

[0465]

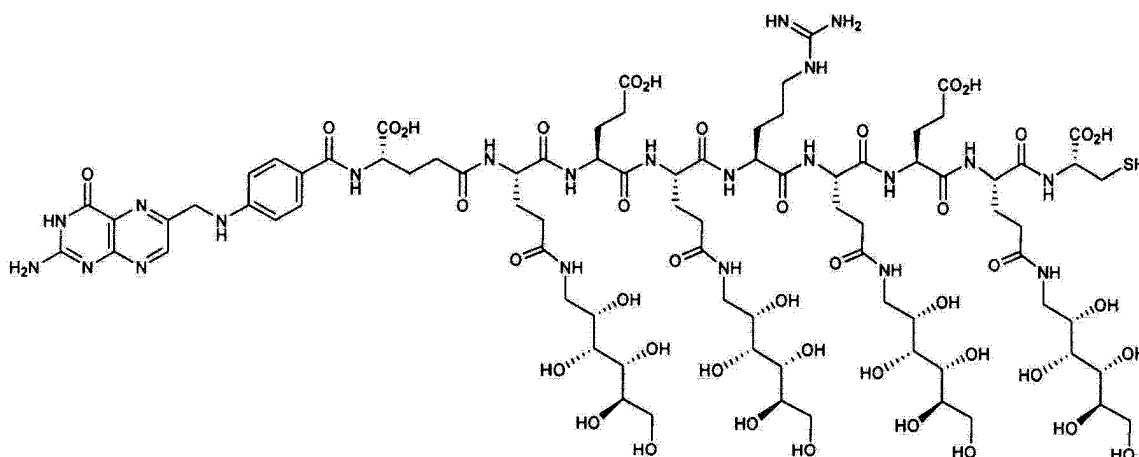
试剂	mmol	当量	MW	数量
H-Cys (4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂 (加载 0.56mmol/g)	0.1			0.167g
EC0475	0.13	1.3	612.67	0.080g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.2	2	425.5	0.085g
EC0475	0.13	1.3	612.67	0.080g
EC0475	0.13	1.3	612.67	0.080g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.2	2	425.5	0.085g
EC0475	0.13	1.3	612.67	0.080g
Fmoc-Glu-OtBu	0.2	2	425.5	0.085g
N^{10} TFA-蝶酸·TFA (溶于 10ml DMSO)	0.2	2	408	0.105g

[0466]

DIPEA	0.4	4	129.25 (d=0.742)	0.070mL
PyBOP	0.2	2	520	0.104g

[0467] 偶联步骤、裂解步骤和裂解试剂与上文描述的相同。HPLC 纯化步骤。柱:Waters NovaPak C₁₈,300x19mm;缓冲液 A = 10mM 乙酸铵, pH 5;B = ACN;方法:100% A 5 分钟然后以 26ml/ 分钟在 20 分钟内从 0% B 到 20% B;产量~ 100mg, 51%。C₇₆H₁₁₈N₁₈O₄₁S;MW 1971. 91;精确质量:1970. 74。

[0468]



[0469] 实施例。根据此处描述的的一般的肽合成操作通过 SPPS 合成 EC0479, 从 H-Cys(4- 甲氧基三苯甲基) -2- 氯三苯甲基 - 树脂, 以及下列的 SPPS 试剂开始:

[0470]

试剂	mmol	当量	MW	数量
H-Cys (4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂 (加载 0.6mmol/g)	0.094			0.16 g
EC0475	0.13	1.4	612.67	0.082 g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.19	2.0	425.47	0.080 g
EC0475	0.13	1.4	612.67	0.082 g
Fmoc-Arg (Pbf) -OH	0.19	2.0	648.77	0.12 g
EC0475	0.13	1.4	612.67	0.082 g

[0471]

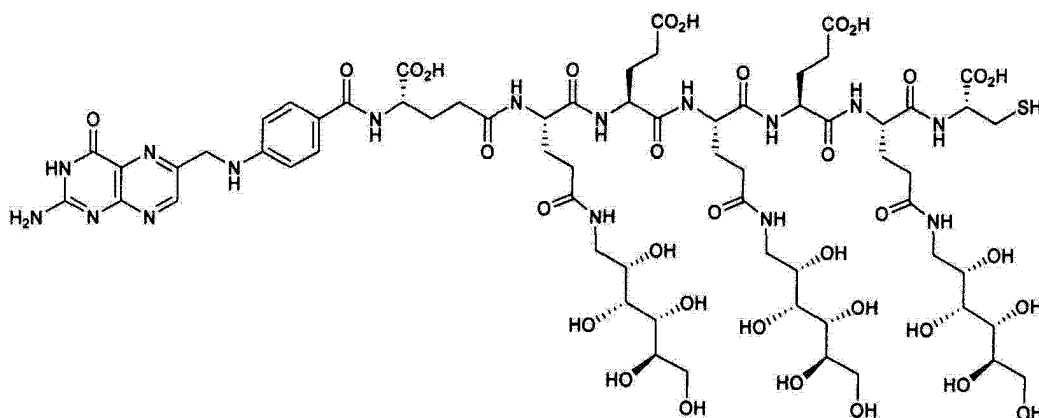
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.19	2.0	425.47	0.080 g
EC0475	0.13	1.4	612.67	0.082 g
Fmoc-Glu-OtBu	0.19	2.0	425.47	0.080 g
N ¹⁰ TFA-蝶酸 (溶于 10ml DMSO)	0.16	1.7	408.29	0.066 g
DIPEA		2.0 eq 的 AA		41μL 或 49 μL
PyBOP		1.0 eq 的 AA		122 mg 或 147mg

[0472] 偶联步骤。在肽合成容器中,添加树脂、添加氨基酸溶液、DIPEA 和 PyBOP。氩气鼓泡 1 小时,用 DMF 和 IPA 洗涤 3×。使用 DMF 中的 20%哌啶用于 Fmoc 脱保护,3×(10 分钟),之后偶联每种氨基酸。继续完成所有 9 个偶联步骤。最后,用 DMF 中的 2%胍处理树脂 3×(5 分钟)来裂解蝶酸上的 TFA 保护基团,用 DMF(3×)、IPA(3×)、MeOH(3×)洗涤树脂,用氩气鼓泡树脂 30 分钟。

[0473] 裂解步骤。试剂:92.5% TFA,2.5% H₂O,2.5%三异丙基硅烷,2.5%乙二硫醇。用裂解试剂处理树脂 15 分钟,氩气鼓泡,导液,用裂解试剂洗涤树脂一次,组合溶液。Rotavap 直到保留 5ml,在二乙醚(35mL)中沉淀。离心,用二乙醚洗涤,和干燥。通过 HPLC 纯化粗的固体。

[0474] HPLC 纯化步骤。柱:Waters Atlantis Prep T3 10 μm OBD 19x250mm;溶剂 A:10mM 乙酸铵,pH 5;溶剂 B:ACN;方法:5 分钟 0% B 到 20 分钟 20% B 26mL/分钟。采集含有产物的级分并冻干来得到~70mg EC0479(35%产率)。¹H NMR 和 LC/MS 符合产物。MW 2128.10;精确质量:2126.84。

[0475]



[0476] EC0488. 根据此处描述的的一般的肽合成操作通过 SPPS 制备这个化合物,从 H-Cys(4-甲氧基三苯甲基)-2-氯三苯甲基-树脂,以及下列的 SPPS 试剂开始:

[0477]

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

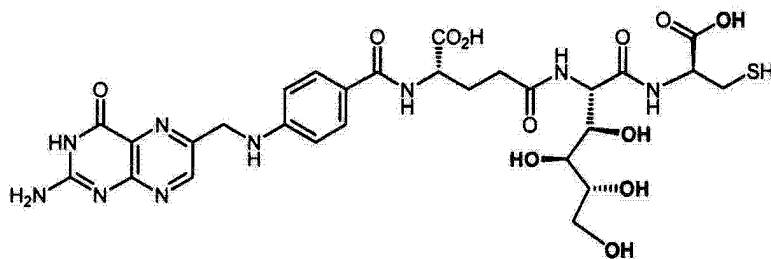
[0478] 偶联步骤。在肽合成容器中,添加树脂、添加氨基酸溶液、DIPEA 和 PyBOP。氩气鼓泡 1 小时,用 DMF 和 IPA 洗涤 3×。使用 DMF 中的 20%哌啶用于 Fmoc 脱保护,3×(10 分钟),之后偶联每种氨基酸。继续完成所有 9 个偶联步骤。最后,用含 2%胍的 DMF 处理树脂 3×(5 分钟)来裂解蝶酸上的 TFA 保护基团,用 DMF(3×)、IPA(3×)、MeOH(3×)洗涤树脂,用氩气鼓泡树脂 30 分钟。

[0479] 裂解步骤。试剂:92.5% TFA,2.5% H₂O,2.5%三异丙基硅烷,2.5%乙二硫醇。用裂解试剂处理树脂 3×(10 分钟、5 分钟、5 分钟)、氩气鼓泡、导液、用裂解试剂洗涤树脂一次,组合溶液。Rotavap 直到保留 5ml,在二乙醚(35mL)中沉淀。离心,用二乙醚洗涤,和干燥。约一半的粗的固体(~100mg)通过 HPLC 纯化。

[0480] HPLC 纯化步骤。柱:Waters Xterra Prep MS C18 10 μm 19x250mm;溶剂 A:10mM 乙酸铵, pH 5;溶剂 B:ACN;方法:5 分钟 0% B 到 25 分钟 20% B 26mL/分钟。采集含有产物的级分并冻干来得到 43mg EC0488(51%产率)。¹H NMR 和 LC/MS(精确质量 1678.62)符合产物。MW 1679.63;精确质量:1678.62。

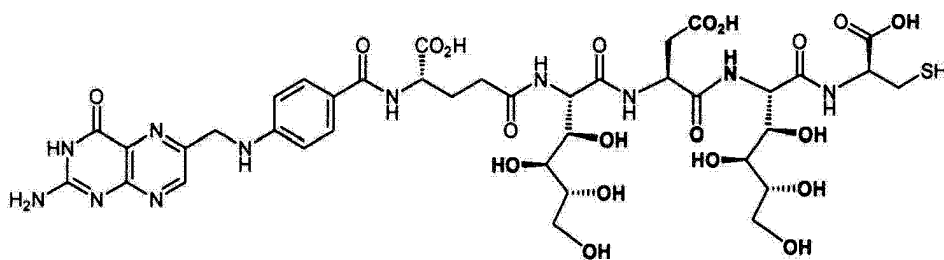
[0481] 结合配体-接头中间物 EC0233、EC0244、EC0257 和 EC0261 的以下实施例如此处描述的制备。

[0482]



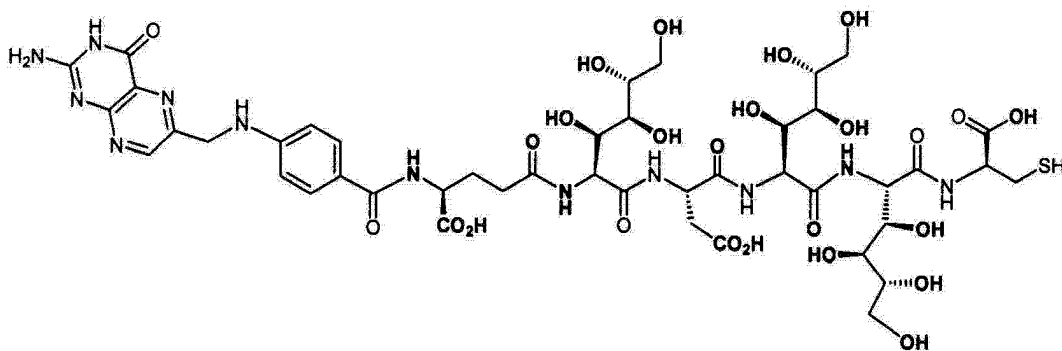
[0483] EC0233 : $C_{28}H_{35}N_9O_{12}S$; MW 721.70 ; 精确质量 : 721.21

[0484]



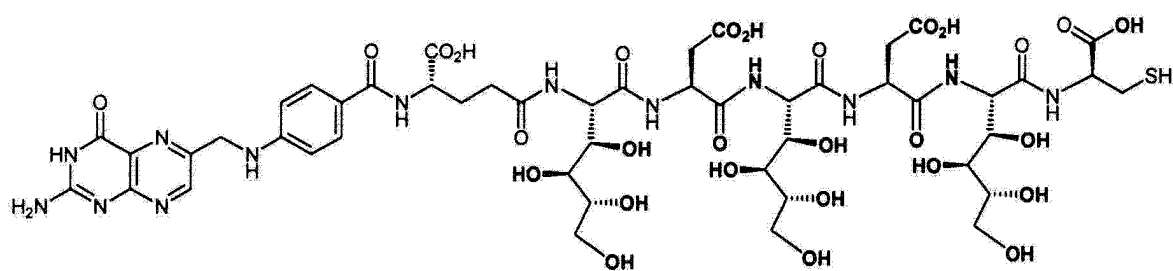
[0485] EC0244 : $C_{38}H_{51}N_{11}O_{20}S$; MW 1013.94 ; 精确质量 : 1013.30

[0486]



[0487] EC0257 : $C_{44}H_{62}N_{12}O_{25}S$; MW 1191.09 ; 精确质量 : 1190.37

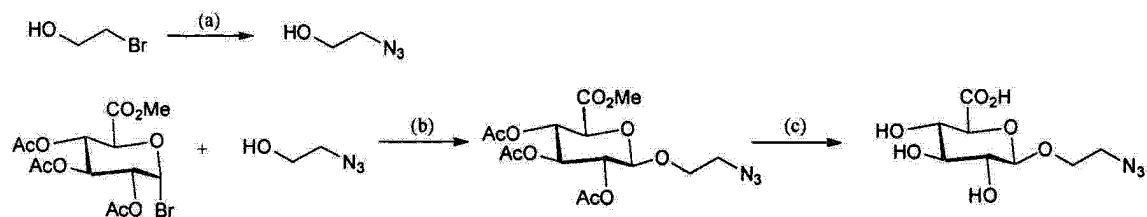
[0488]



[0489] EC0261 : $C_{48}H_{67}N_{13}O_{28}S$; MW 1306.18 ; 精确质量 : 1305.39

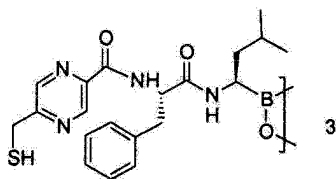
[0490] 例示性中间物的以下实施例如此处描述的制备。

[0491]



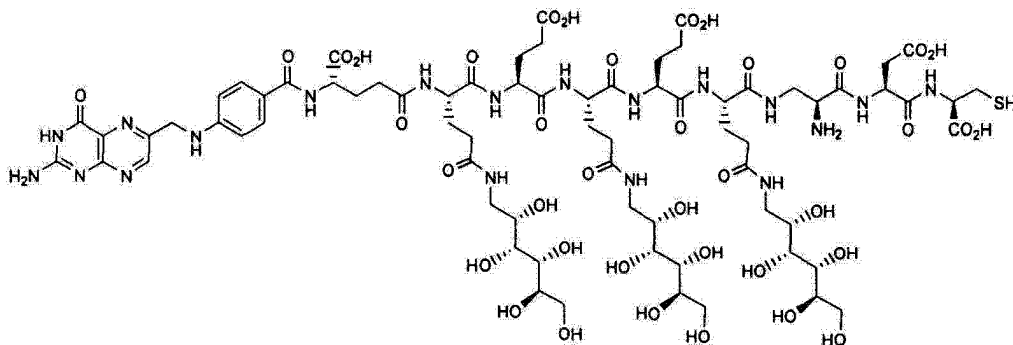
[0492] 用于形成 1,2,3- 三唑的 Huisgen 叠氮化物 ;(a) NaN_3 ;(b) Ag_2CO_3 , DCM, 分子筛 ;(c) LiOH , MeOH , H_2O 。

[0493]



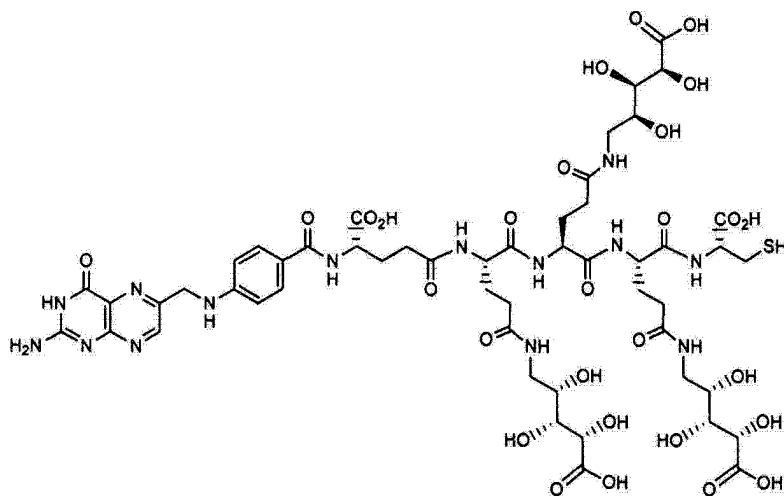
[0494] EC0501 Thio bortezomib

[0495]



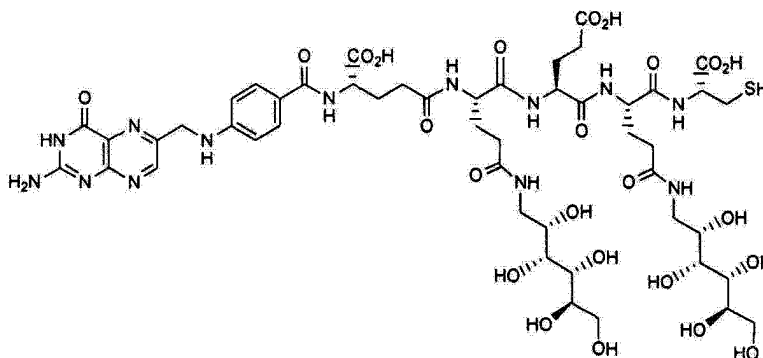
[0496] EC0536 共轭物中间物

[0497]



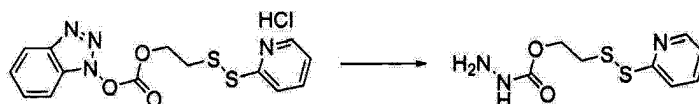
[0498] EC0632 共轭物中间物。 $\text{C}_{52}\text{H}_{72}\text{N}_{14}\text{O}_{28}\text{S}$, MW 1373. 27, 精确质量 :1372. 44, 从相应的叔丁基保护的羧酸盐制备。

[0499]



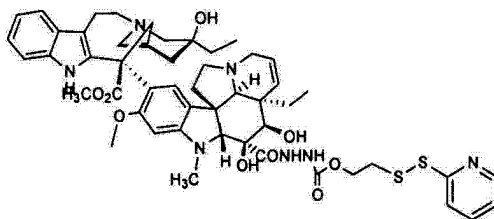
[0500] EC0669 共轭物中间物。C₄₉H₇₁N₁₃O₂₄S, MW 1258.23, 精确质量 :1257.45

[0501]



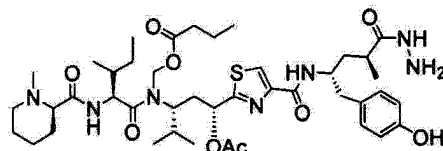
[0502] 实施例。偶联试剂 EC0311 的合成。DIPEA (0.60mL) 在 0 °C 添加到含 HOBT-OCO₂-(CH₂)₂-SS-2-吡啶 HCl (685mg, 91%) 的无水 DCM (5.0mL) 的悬浮液中, 在氩气下搅动 2 分钟, 向其中添加无水肼 (0.10mL)。反应混合物在 0 °C 在氩气下搅动 10 分钟, 室温下搅动另外 30 分钟, 过滤, 滤液通过急骤层析 (硅胶, DCM 中 2% MeOH) 纯化来提供作为澄清稠油的 EC0311 (371mg), 放置固化。

[0503]



[0504] 实施例。长春碱吡啶基二硫化物. 2-[(苯并三唑 -1-基 -(氧基羰氧基)- 乙基二硫烷基]- 吡啶 HCl (601mg) 和 378 μL 的 DIPEA 在 0 °C 连续地添加到含去乙酰长春碱酰肼 (668mg) 的 5mL DCM 的溶液中。容许反应温热到室温, 搅动 3 小时。TLC (DCM 中 15% MeOH) 显示了完全的转化。混合物通过硅胶层析 (1 : 9MeOH/DCM) 纯化。蒸发组合的级分, 在 DCM 中再溶解, 用 10% Na₂CO₃、盐水洗涤, 干燥 (MgSO₄), 蒸发到 550mg (80%) ; HPLC-RT 12.651min., 91% 纯度, ¹H NMR 光谱与指定的结构一致, MS (ESI+) : 984.3, 983.3, 982.4, 492.4, 491.9, 141.8。这个操作的其他细节在美国专利申请公开 NO. US 2005/0002942 A1 中描述。

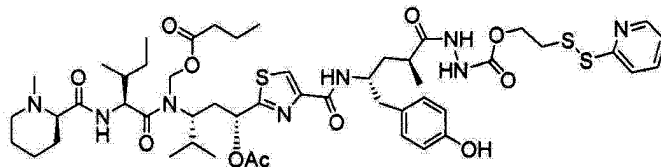
[0505]



[0506] 实施例。Tubulysin 酰肼的制备。通过制备 EC0347 来例示。N, N-二异丙基乙胺 (DIPEA, 6.1 μL) 和氯甲酸异丁酯 (3.0 μL) 通过串联的注射器在 -15 °C 添加到含 tubulysin B (0.15mg) 的无水 EtOAc (2.0mL) 的溶液中。在氩气下在 -15 °C 搅动 45 分钟之后, 反应混合

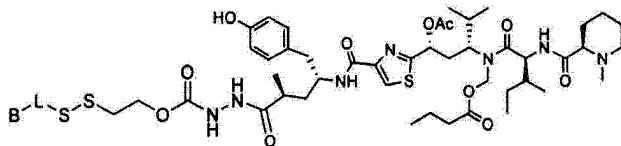
物冷却到 -20°C , 向其中添加无水脒 ($5.0\ \mu\text{L}$)。反应混合物在 -20°C 在氩气下搅动 3 小时, 用 1.0mM 磷酸钠缓冲液 ($\text{pH}\ 7.0, 1.0\text{mL}$) 猝灭, 注入制备型 HPLC 中用于纯化。柱: Waters XTerra Prep MS C_{18} $10\ \mu\text{m}, 19 \times 250\text{mm}$; 移动相 A: 1.0mM 磷酸钠缓冲液, $\text{pH}\ 7.0$; 移动相 B: 乙腈; 方法: 20 分钟内 10% B 到 80% B, 流动速度 = $25\text{mL}/\text{分钟}$ 。采集来自 $15.14\text{--}15.54$ 分钟的级分, 冻干产生白色固体的 EC0347 (2.7mg)。通过 tubulysin 起始化合物的适当选择, 上述方法同样适合制备其他 tubulysin 酰肼。

[0507]



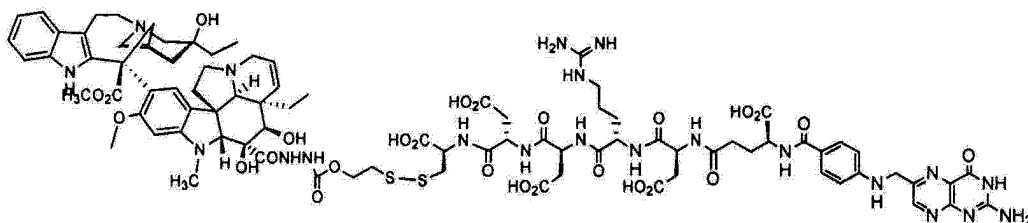
[0508] 实施例。Tubulysin 二硫化物的制备 (逐步的过程)。对 EC0312 例示的。DIPEA ($36\ \mu\text{L}$) 和氯甲酸异丁酯 ($13\ \mu\text{L}$) 借助串联的注射器在 -15°C 添加到含 tubulysin B (82mg) 的无水 EtOAc (2.0mL) 的溶液中。在氩气下在 -15°C 搅动 45 分钟之后, 向反应混合物添加含 EC0311 的无水 EtOAc (1.0mL) 的溶液。产生的溶液在 -15°C 在氩气下搅动 15 分钟, 室温下搅动另外 45 分钟, 浓缩, 残余物通过急骤层析 (硅胶, DCM 中 2 到 8% MeOH) 纯化来得到白色固体的 EC0312 (98mg)。通过 tubulysin 起始化合物的适当选择, 上述方法同样适合制备其他 tubulysin 衍生物。

[0509]



[0510] 实施例。含有二硫化物的 Tubulysin 共轭物的一般的合成。用 EC0312 例示。含有巯基基团的结合配体-接头中间物吸收在去离子水中 (大约 $20\text{mg}/\text{mL}$, 使用前用氩气鼓泡 10 分钟), 悬浮液的 pH 值通过饱和 NaHCO_3 (使用前用氩气鼓泡 10 分钟) 调整到约 6.9 (当 pH 值提高时, 悬浮液可以变成溶液)。按需要向溶液中添加另外的去离子水 (约 $20\text{--}25\%$), 向水溶液中立即添加含 EC0312 的 THF 的溶液 (大约 $20\text{mg}/\text{mL}$)。反应混合物很快地变得匀质。在氩气下搅动例如 45 分钟之后, 反应混合物用 2.0mM 磷酸钠缓冲液稀释 ($\text{pH}\ 7.0$, 约 150 容积百分比), 通过抽真空除去 THF。过滤产生的悬浮液, 滤液可以通过制备型 HPLC 来纯化 (如此处描述的)。冻干级分来分离共轭物。通过 tubulysin 起始化合物的适当选择, 上述方法同样适合制备其他 tubulysin 共轭物。

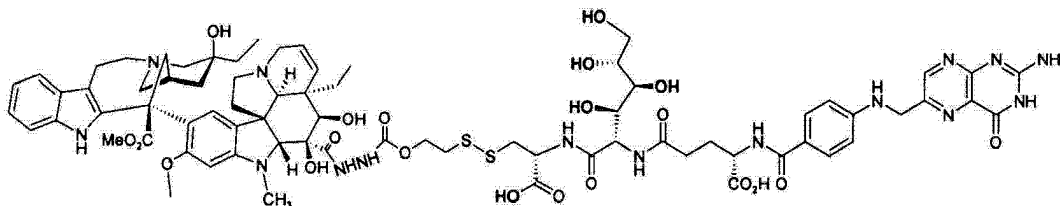
[0511]



[0512] 比较性的长春碱实施例。缺乏亲水性间隔区接头的 EC145。THF 中的肽基片段 Pte-Glu-Asp-Arg-Asp-Asp-Cys-OH (实施例 13) 用硫代磺酸盐活化的长春碱或长春碱吡啶

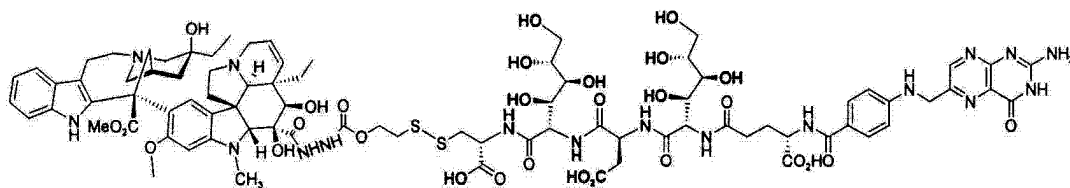
基二硫化物处理,在氩气下在 $\text{pH} > 6.5$ 时在 0.1M NaHCO_3 中溶解产生黄色溶液。冻干和 HPLC 得到 70% 产率;选择的 $^1\text{H NMR}(\text{D}_2\text{O})$ δ 8.67(s, 1H, FA H-7), 7.50(br s, 1H, VLB H-11'), 7.30-7.40(br s, 1H, VLB H-14'), 7.35(d, 2H, $J = 7.8\text{Hz}$, FA H-12&16), 7.25(m, 1H, VLB H-13'), 7.05(br s, 1H, VLB H-12'), 6.51(d, 2H, $J = 8.7\text{Hz}$, FA H-13&15), 6.4(s, 2H, VLB H-14&17), 5.7(m, 1H, VLB olefin), 5.65(m, 1H, VLB H-7), 5.5(d, 1H, VLB olefin), 5.5(m, 1H, VLB H-6), 4.15(m, 1H, VLB H-8'), 3.82(s, 3H, VLB C_{18} - CO_2CH_3), 3.69(s, 3H, VLB C_{16} - OCH_3), 2.8(s, 3H, VLB N- CH_3), 1.35(br s, 1H, VLB H-3'), 1.15(m, 1H, VLB H-2'), 0.9(t, 3H, $J = 7\text{Hz}$, VLB H-21'), 0.55(t, 3H, $J = 6.9\text{Hz}$, VLB H-21); LCMS (ESI, $m+\text{H}^+$) 1918。

[0513]



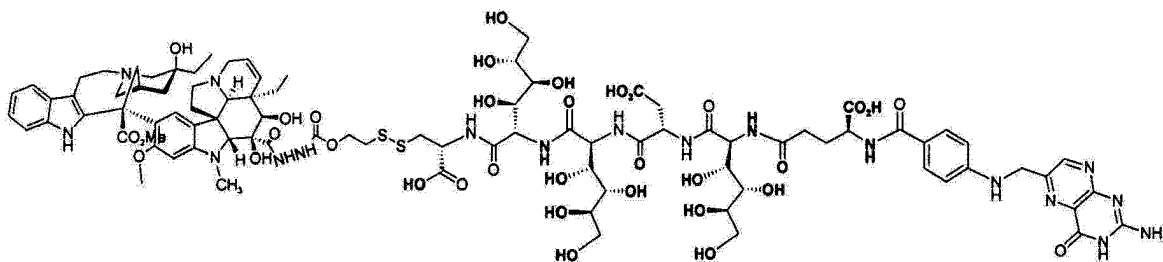
[0514] 实施例。包括亲水性间隔区接头的 EC0234(单-糖-叶酸盐长春碱共轭物)。在聚丙烯离心瓶中,叶酸盐接头 (EC0233, 22mg, 0.030mmol) 溶于 2mL 的水中,用氩气鼓泡 10 分钟。在另一个烧瓶中, 0.1N NaHCO_3 溶液用氩气鼓泡 10 分钟。接头溶液的 pH 值使用 0.1N NaHCO_3 溶液小心地调节到 6.9。2mL 四氢呋喃 (THF) 中的长春碱吡啶基二硫化物 (27mg, 0.028mmol) 慢慢地添加到上述溶液中。产生的澄清溶液在氩气下搅动 15 分钟到 1 小时。反应的进展通过分析性 HPLC 来监测 (10mM 乙酸铵, $\text{pH} = 7.0$ 和乙腈)。THF 在减压下除去,过滤水溶液,注射到制备型 HPLC 柱上 (X-terra 柱 C_{18} , 19X300mm)。用 1mM 磷酸钠 $\text{pH} = 7.0$ 和乙腈洗脱,产生含有产物的纯的级分。在冻干 48 小时后,分离长春碱-糖-叶酸盐共轭物 (EC0234) (34mg, 76%)。 $^1\text{H NMR}$ 数据与叶酸盐共轭物一致。 $\text{C}_{74}\text{H}_{93}\text{N}_{15}\text{O}_{21}\text{S}_2$; MW 1592.75; 精确质量: 1591.61。

[0515]



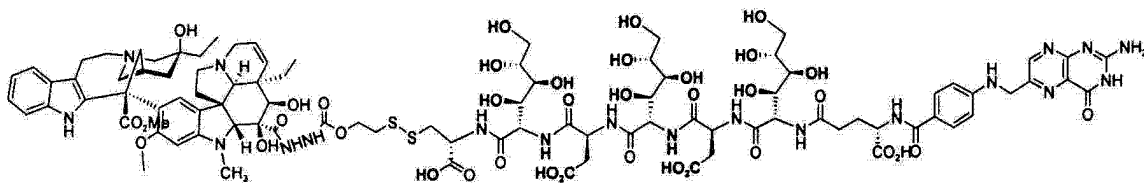
[0516] 实施例。EC0246(二-糖-叶酸盐长春碱共轭物)。在聚丙烯离心瓶中,叶酸盐接头 (EC0244, 30mg, 0.030mmol) 溶于 5mL 的水中,用氩气鼓泡 10 分钟。在另一个烧瓶中, 0.1N NaHCO_3 溶液用氩气鼓泡 10 分钟。接头溶液的 pH 值使用 0.1N NaHCO_3 溶液小心地调节到 6.9。5mL 四氢呋喃 (THF) 中的长春碱吡啶基二硫化物 (27mg, 0.028mmol) 慢慢地添加到上述溶液中。产生的澄清溶液在氩气下搅动 15 分钟到 1 小时。反应的进展通过分析性 HPLC 来监测 (10mM 乙酸铵, $\text{pH} = 7.0$ 和乙腈)。THF 在减压下除去,过滤水溶液,注射到制备型 HPLC 柱上 (X-terra 柱 C_{18} , 19X300mm)。用 1mM 磷酸钠 $\text{pH} = 7.0$ 和乙腈洗脱,产生含有产物的纯的级分。在冻干 48 小时后,分离长春碱-二-糖-叶酸盐共轭物 (EC0246) (34mg, 66%)。 $^1\text{H NMR}$ 数据与叶酸盐共轭物一致。 $\text{C}_{84}\text{H}_{109}\text{N}_{17}\text{O}_{29}\text{S}_2$; MW 1884.99; 精确质量: 1883.70。

[0517]



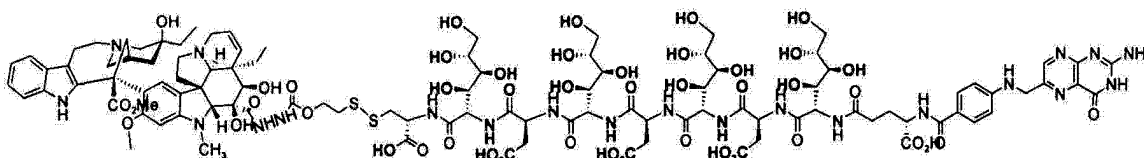
[0518] 实施例。EC0258(三-糖-Asp-叶酸盐长春碱共轭物)。在聚丙烯离心瓶中,叶酸盐接头(EC0257, 37mg, 0.031mmol)溶于5mL的水中,用氩气鼓泡10分钟。在另一个烧瓶中,0.1N NaHCO₃溶液用氩气鼓泡10分钟。接头溶液的pH值使用0.1N NaHCO₃溶液小心地调节到6.9。5mL 四氢呋喃(THF)中的长春碱吡啶基二硫化物(27.5mg, 0.028mmol)慢慢地添加到上述溶液中。产生的澄清溶液在氩气下搅动15分钟到1小时。反应的进展通过分析性HPLC来监测(10mM 乙酸铵, pH = 7.0 和乙腈)。THF在减压下除去,过滤水溶液,注射到制备型HPLC柱上(X-terra柱 C₁₈, 19X300mm)。用1mM 磷酸钠 pH = 7.0 和乙腈洗脱,产生含有产物的纯的级分。在冻干48小时后,分离长春碱-三-糖-Asp-叶酸盐共轭物(EC0258)(36mg, 62%)。¹H NMR数据与叶酸盐共轭物一致。C₉₀H₁₂₀N₁₈O₃₄S₂; MW 2062.15; 精确质量: 2060.77。

[0519]



[0520] 实施例。EC0263(三-糖-二-Asp-叶酸盐长春碱共轭物)。在聚丙烯离心瓶中,叶酸盐接头(EC0261, 37mg, 0.029mmol)溶于5mL的水中,用氩气鼓泡10分钟。在另一个烧瓶中,0.1N NaHCO₃溶液用氩气鼓泡10分钟。接头溶液的pH值使用0.1N NaHCO₃溶液小心地调节到6.9。5mL 四氢呋喃(THF)中的长春碱吡啶基二硫化物(25.5mg, 0.026mmol)慢慢地添加到上述溶液中。产生的澄清溶液在氩气下搅动15分钟到1小时。反应的进展通过分析性HPLC来监测(10mM 乙酸铵, pH = 7.0 和乙腈)。THF在减压下除去,过滤水溶液,注射到制备型HPLC柱上(X-terra柱 C₁₈, 19X300mm)。用1mM 磷酸钠 pH = 7.0 和乙腈洗脱,产生含有产物的纯的级分。在冻干48小时后,分离长春碱-三-糖-二-Asp-叶酸盐共轭物(EC0263)(36mg, 64%)。¹H NMR数据与叶酸盐共轭物一致。C₉₄H₁₂₅N₁₉O₃₇S₂; MW 2177.24; 精确质量: 2175.79。

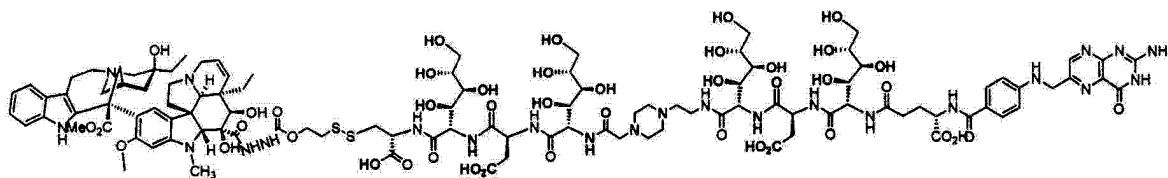
[0521]



[0522] 实施例。EC0434(四-糖-三-Asp-叶酸盐长春碱共轭物)。在聚丙烯离心瓶中,叶酸盐接头(EC0268, 20mg, 0.012mmol)溶于3mL的水中,用氩气鼓泡10分钟。在另一个烧瓶中,0.1N NaHCO₃溶液用氩气鼓泡10分钟。接头溶液的pH值使用0.1N NaHCO₃溶液小心

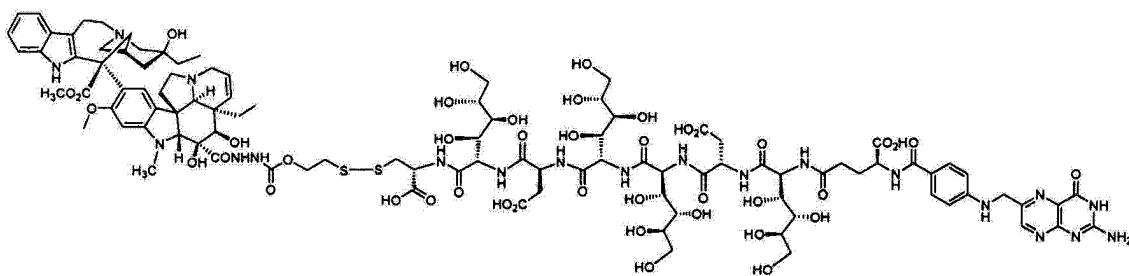
地调节到 6.9。3mL 四氢呋喃 (THF) 中的长春碱吡啶基二硫化物 (12mg, 0.012mmol) 慢慢地添加到上述溶液中。产生的澄清溶液在氩气下搅动 15 分钟到 1 小时。反应的进展通过分析性 HPLC 来监测 (10mM 乙酸铵, pH = 7.0 和乙腈)。THF 在减压下除去, 过滤水溶液, 注射到制备型 HPLC 柱上 (X-terra 柱 C_{18} , 19X300mm)。用 1mM 磷酸钠 pH = 7.0 和乙腈洗脱, 产生含有产物的纯的级分。在冻干 48 小时后, 分离长春碱-四-糖-三-Asp-叶酸盐共轭物 (EC0434) (26mg, 62%)。 ^1H NMR 数据与叶酸盐共轭物一致。 $C_{104}H_{141}N_{21}O_{45}S_2$; MW 2469.48; 精确质量: 2467.88。

[0523]



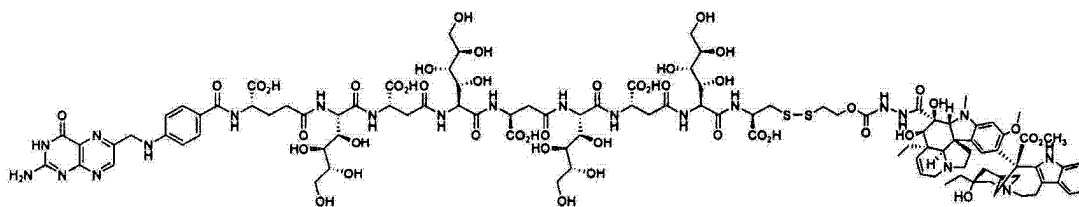
[0524] 实施例。EC0454 (四-糖-二-Asp-叶酸盐长春碱共轭物)。在聚丙烯离心瓶中, 叶酸盐接头 (EC0452, 34mg, 0.02mmol) 溶于 3mL 的水中, 用氩气鼓泡 10 分钟。在另一个烧瓶中, 0.1N NaHCO_3 溶液用氩气鼓泡 10 分钟。接头溶液的 pH 值使用 0.1N NaHCO_3 溶液小心地调节到 6.9。3mL 四氢呋喃 (THF) 中的长春碱吡啶基二硫化物 (20mg, 0.02mmol) 慢慢地添加到上述溶液中。产生的澄清溶液在氩气下搅动 15 分钟到 1 小时。反应的进展通过分析性 HPLC 来监测 (10mM 乙酸铵, pH = 7.0 和乙腈)。THF 在减压下除去, 过滤水溶液, 注射到制备型 HPLC 柱上 (X-terra 柱 C_{18} , 19X300mm)。用 1mM 磷酸钠 pH = 7.0 和乙腈洗脱, 产生含有产物的纯的级分。在冻干 48 小时后, 分离长春碱-四-糖-二-Asp-叶酸盐共轭物 (EC0454) (35mg, 70%)。 ^1H NMR 数据与叶酸盐共轭物一致。 $C_{108}H_{151}N_{23}O_{43}S_2$; MW 2523.62; 精确质量: 2521.98。

[0525]



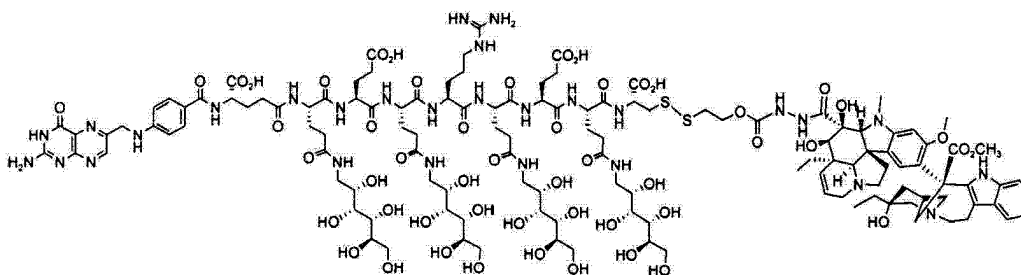
[0526] 实施例。EC0455 (四-糖-二-Asp-叶酸盐长春碱共轭物)。在聚丙烯离心瓶中, 叶酸盐接头 (EC0457, 20mg, 0.013mmol) 溶于 1.5mL 的水中, 用氩气鼓泡 10 分钟。在另一个烧瓶中, 0.1N NaHCO_3 溶液用氩气鼓泡 10 分钟。接头溶液的 pH 值使用 0.1N NaHCO_3 溶液小心地调节到 6.9。1.5mL 四氢呋喃 (THF) 中的长春碱吡啶基二硫化物 (18mg, 0.018mmol) 慢慢地添加到上述溶液中。产生的澄清溶液在氩气下搅动 30 分钟。反应的进展通过分析性 HPLC 来监测 (10mM 乙酸铵, pH = 7.0 和乙腈)。THF 在减压下除去, 过滤水溶液, 注射到制备型 HPLC 柱上 (X-terra 柱 C_{18} , 19X300mm)。用 1mM 磷酸钠 pH = 7.0 和乙腈洗脱, 产生含有产物的纯的级分。在冻干 48 小时后, 分离长春碱-四-糖-二-Asp-叶酸盐共轭物 (EC0455) (19mg, 62%)。 ^1H NMR 数据与叶酸盐共轭物一致。 $C_{100}H_{136}N_{20}O_{42}S_2$; MW 2354.39。

[0527]



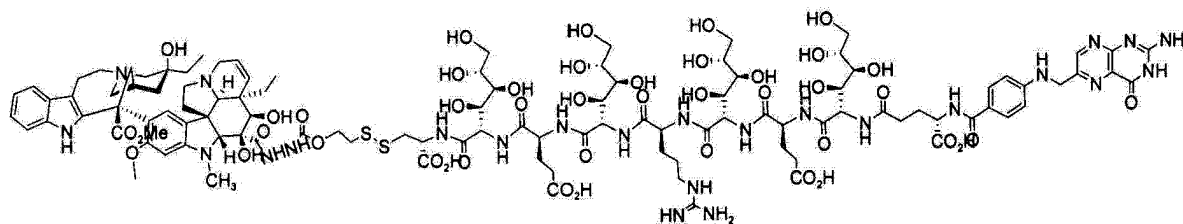
[0528] 实施例。EC0456。在聚丙烯离心瓶中，叶酸盐接头 (EC0453, 46mg, 0.029mmol) 溶于用氩气鼓泡 10 分钟的 3mL 的水中。在另一个烧瓶中，饱和的 NaHCO_3 溶液用氩气鼓泡 10 分钟。使用 NaHCO_3 溶液，氩气鼓泡，小心地调整接头溶液的 pH 值到 6.9。3mL 四氢呋喃 (THF) 中的长春碱吡啶基二硫化物 (32mg, 1.1eq) 很快地添加到上述溶液中。产生的澄清溶液在氩气下搅动。反应的进展通过分析性 HPLC 来监测 (2mM 磷酸盐缓冲液, pH = 7.0 和乙腈)。30 分钟后，向反应中添加 12mL 2mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7)，过滤产生的浑浊溶液，滤液注射到制备型 HPLC 上：柱：Waters Xterra Prep MS C_{18} 10 μm 19x250mm；溶剂 A：2mM 磷酸钠，pH 7；溶剂 B：ACN；方法：5 分钟 1% B 到 40 分钟 80% B, 25mL/分钟。采集含有 EC0456 的级分，冻干提供 41.6mg 蓬松的黄色固体，由 30mg EC0456 (42% 产率) 和 11.6mg 磷酸钠盐组成。 ^1H NMR 和 LC/MS 符合产物。 $\text{C}_{104}\text{H}_{141}\text{N}_{21}\text{O}_{45}\text{S}_2$ ；MW 2469.48；精确质量：2467.88。C, 50.58；H, 5.76；N, 11.91；O, 29.15；S, 2.60。

[0529]



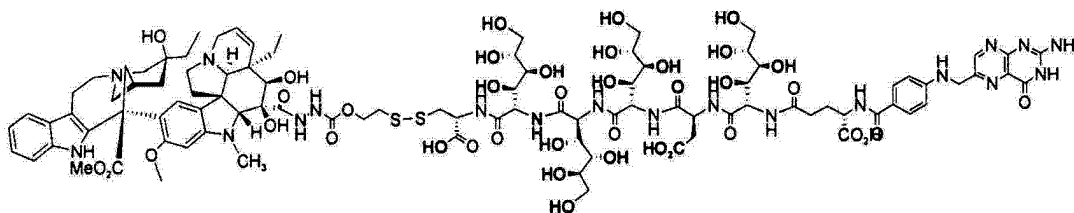
[0530] 实施例。EC0481。在聚丙烯离心瓶中，叶酸盐接头 (EC0479, 12mg, 0.0058mmol) 溶于用氩气鼓泡 10 分钟的 2.5mL 的水中。在另一个烧瓶中，饱和的 NaHCO_3 溶液用氩气鼓泡 10 分钟。使用 NaHCO_3 溶液，氩气鼓泡，小心地调整接头溶液的 pH 值到 6.9。2.5mL 四氢呋喃 (THF) 中的长春碱吡啶基二硫化物 (5.7mg, 1.0eq) 很快地添加到上述溶液中。产生的澄清溶液在氩气下搅动。反应的进展通过分析性 HPLC 来监测 (2mM 磷酸盐缓冲液, pH = 7.0 和乙腈)。20 分钟后，向反应中添加 12mL 2mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7)，过滤产生的浑浊溶液，滤液注射到制备型 HPLC 上：柱：Waters Atlantis Prep T3 10 μm OBD 19x250mm；溶剂 A：2mM 磷酸钠，pH 7；溶剂 B：ACN；方法：5 分钟 1% B 到 25 分钟 50% B, 26mL/分钟。采集含有 EC0481 的级分，冻干提供 15.5mg 蓬松的黄色固体，由 10.5mg EC0481 (60% 产率) 和 5.0 磷酸钠盐组成。 ^1H NMR 和 LC/MS 符合产物。MW 2999.15；精确质量：2997.24。

[0531]



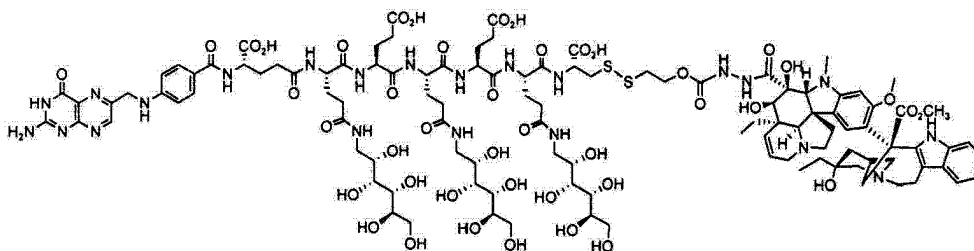
[0532] 实施例。EC0484(四-糖-二- α -Glu-Arg-叶酸盐长春碱共轭物)。在聚丙烯离心瓶中,叶酸盐接头(EC0480,15mg,0.009mmol)溶于3mL的水中,用氩气鼓泡10分钟。在另一个烧瓶中,0.1N NaHCO_3 溶液用氩气鼓泡10分钟。接头溶液的pH值使用0.1N NaHCO_3 溶液小心地调节到6.9。3mL 四氢呋喃(THF)中的长春碱吡啶基二硫化物(8.8mg,0.009mmol)慢慢地添加到上述溶液中。产生的澄清溶液在氩气下搅动15分钟到1小时。反应的进展通过分析性HPLC来监测(10mM 乙酸铵,pH = 7.0和乙腈)。THF在减压下除去,过滤水溶液,注射到制备型HPLC柱上(X-terra柱 C_{18} ,19X300mm)。用1mM 磷酸钠 pH = 7.0和乙腈洗脱,产生含有产物的纯的级分。在冻干48小时后,分离长春碱-四-糖-二- α -Glu-Arg-叶酸盐共轭物(EC0484)(16mg,70%)。 ^1H NMR数据与叶酸盐共轭物一致。 $\text{C}_{108}\text{H}_{152}\text{N}_{24}\text{O}_{43}\text{S}_2$;MW 2538.63;精确质量:2536.99。

[0533]



[0534] 实施例。EC0487(四-糖-Asp-叶酸盐长春碱共轭物)。在聚丙烯离心瓶中,叶酸盐接头(EC0463,21mg,0.015mmol)溶于3mL的水中,用氩气鼓泡10分钟。在另一个烧瓶中,0.1N NaHCO_3 溶液用氩气鼓泡10分钟。接头溶液的pH值使用0.1N NaHCO_3 溶液小心地调节到6.9。3mL 四氢呋喃(THF)中的长春碱吡啶基二硫化物(15mg,0.015mmol)慢慢地添加到上述溶液中。产生的澄清溶液在氩气下搅动15分钟到1小时。反应的进展通过分析性HPLC来监测(10mM 乙酸铵,pH = 7.0和乙腈)。THF在减压下除去,过滤水溶液,注射到制备型HPLC柱上(Atlantis柱 C_{18} ,19X300mm)。用1mM 磷酸钠 pH = 7.0和乙腈洗脱,产生含有产物的纯的级分。在冻干48小时后,分离长春碱-四-糖-Asp-叶酸盐共轭物(EC0487)(28mg,84%)。 ^1H NMR数据与叶酸盐共轭物一致。 $\text{C}_{96}\text{H}_{131}\text{N}_{19}\text{O}_{39}\text{S}_2$;MW 2239.30;精确质量:2237.83。

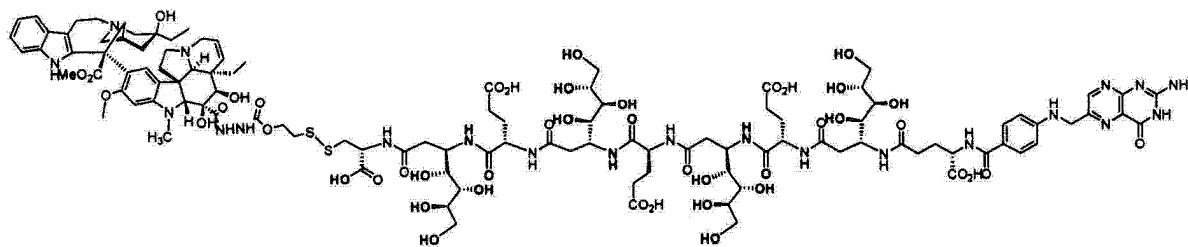
[0535]



[0536] 实施例。EC0489。在聚丙烯离心瓶中,叶酸盐接头(EC0488,26mg,0.015mmol)溶于用氩气鼓泡10分钟的2.5mL的水中。在另一个烧瓶中,饱和的 NaHCO_3 溶液用氩气鼓泡10分钟。使用 NaHCO_3 溶液,氩气鼓泡,小心地调整接头溶液的pH值到6.9。2.5mL 四氢呋喃(THF)中的长春碱吡啶基二硫化物(15mg,1.0eq)很快地添加到上述溶液中。产生的澄清溶液在氩气下搅动。反应的进展通过分析性HPLC来监测(2mM 磷酸盐缓冲液,pH = 7.0和乙腈)。20分钟后,向反应中添加12mL 2mM 磷酸盐缓冲液(pH 7),过滤产生的浑浊溶液,滤液注射到制备型HPLC上:柱:Waters Xterra Prep MS C_{18} 10 μm 19x250mm;溶剂A:2mM 磷酸

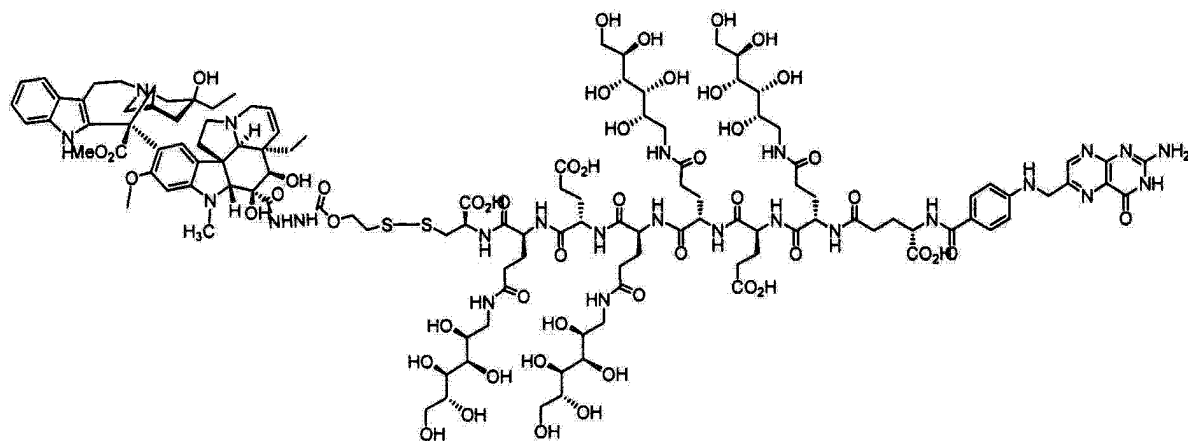
钠, pH 7; 溶剂 B: ACN; 方法: 5 分钟 1% B 到 25 分钟 50% B, 26mL/ 分钟。采集含有 EC0489 的级分, 冻干提供 35mg 蓬松的黄色固体, 由 27.5mg EC0489 (71% 产率) 和 7.5 磷酸钠盐组成。¹H NMR 和 LC/MS 符合产物。MW 2550.68; 精确质量: 2549.01。

[0537]



[0538] 实施例。EC0490 (四-同型糖-三- α Glu-叶酸盐长春碱共轭物)。在聚丙烯离心瓶中, 叶酸盐接头 (EC0478, 22mg, 0.013mmol) 溶于 3mL 的水中, 用氩气鼓泡 10 分钟。在另一个烧瓶中, 0.1N NaHCO₃ 溶液用氩气鼓泡 10 分钟。接头溶液的 pH 值使用 0.1N NaHCO₃ 溶液小心地调节到 6.9。3mL 四氢呋喃 (THF) 中的长春碱吡啶基二硫化物 (mg, mmol) 慢慢地添加到上述溶液中。产生的澄清溶液在氩气下搅动 15 分钟到 1 小时。反应的进展通过分析性 HPLC 来监测 (10mM 乙酸铵, pH = 7.0 和乙腈)。THF 在减压下除去, 过滤水溶液, 注射到制备型 HPLC 柱上 (X-terra 柱 C₁₈, 19X300mm)。用 1mM 磷酸钠 pH = 7.0 和乙腈洗脱, 产生含有产物的纯的级分。在冻干 48 小时后, 分离长春碱-四-同型糖-三-Glu-叶酸盐共轭物 (EC0490) (15mg, 45%)。¹H NMR 数据与叶酸盐共轭物一致。C₁₁₁H₁₅₅N₂₁O₄₅S₂; MW 2567.66; 精确质量: 2565.99。

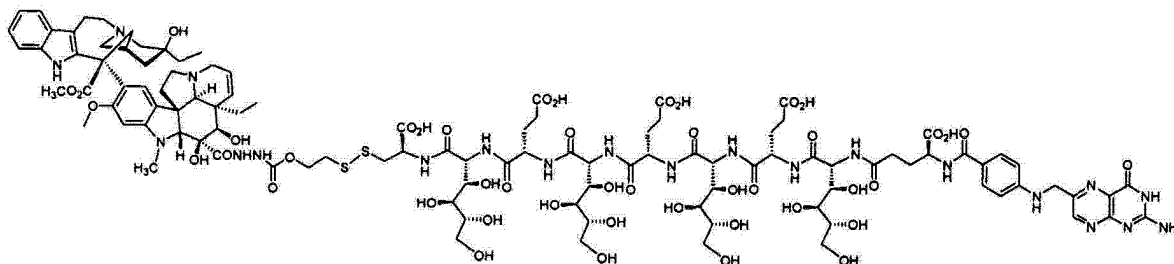
[0539]



[0540] 实施例。EC0492 (四-同型糖-三- α Glu-叶酸盐长春碱共轭物)。在聚丙烯离心瓶中, 叶酸盐接头 (EC0491, 26mg, 0.013mmol) 溶于 3mL 的水中, 用氩气鼓泡 10 分钟。在另一个烧瓶中, 0.1N NaHCO₃ 溶液用氩气鼓泡 10 分钟。接头溶液的 pH 值使用 0.1N NaHCO₃ 溶液小心地调节到 6.9。3mL 四氢呋喃 (THF) 中的长春碱吡啶基二硫化物 (13mg, 0.013mmol) 添加到上述溶液中。产生的澄清溶液在氩气下搅动 15 分钟到 1 小时。反应的进展通过分析性 HPLC 来监测 (10mM 乙酸铵, pH = 7.0 和乙腈)。THF 在减压下除去, 过滤水溶液, 注射到制备型 HPLC 柱上 (X-terra 柱 C₁₈, 19X300mm)。用 1mM 磷酸钠 pH = 7.0 和乙腈洗脱, 产生含有产物的纯的级分。在冻干 48 小时后, 分离长春碱-四-同型糖-三-Glu-叶酸盐共轭物 (EC0492) (22mg, 60%)。¹H NMR 数据与叶酸盐共轭物一致。C₁₂₂H₁₇₆N₂₄O₅₀S₂; MW 2842.97;

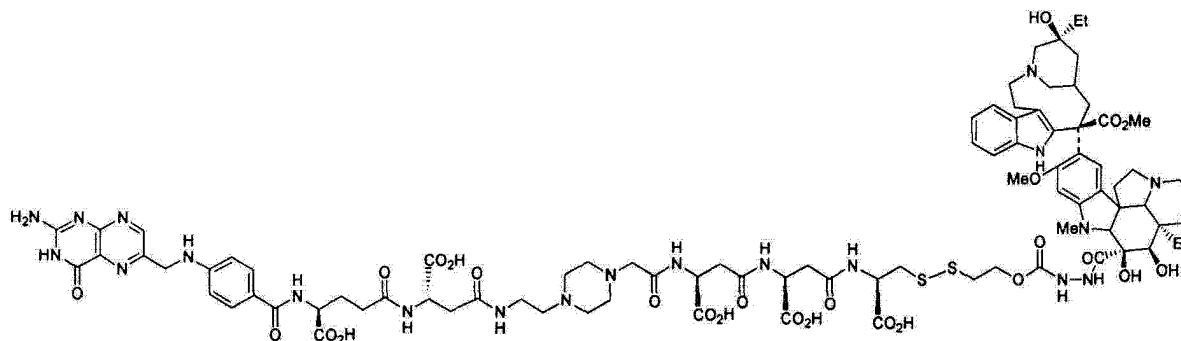
精确质量 :2841. 14。

[0541]



[0542] 实施例。EC0493(四-糖-三-Glu-叶酸盐长春碱共轭物)。在聚丙烯离心瓶中,叶酸盐接头(EC0477, 25mg, 0.015mmol)溶于1.5mL的水中,用氩气鼓泡10分钟。在另一个烧瓶中,0.1N NaHCO₃溶液用氩气鼓泡10分钟。接头溶液的pH值使用0.1N NaHCO₃溶液小心地调节到6.9。1.5mL四氢呋喃(THF)中的长春碱吡啶基二硫化物(20mg, 0.020mmol)慢慢地添加到上述溶液中。产生的澄清溶液在氩气下搅动30分钟。反应的进展通过分析性HPLC来监测(10mM乙酸铵, pH = 7.0和乙腈)。THF在减压下除去,过滤水溶液,注射到制备型HPLC柱上(X-terra柱C₁₈, 19X300mm)。用1mM磷酸钠pH = 7.0和乙腈洗脱,产生含有产物的纯的级分。在冻干48小时后,分离长春碱-四-糖-三-Glu-叶酸盐共轭物(EC0493)(23mg, 61%)。¹H NMR数据与叶酸盐共轭物一致。C₁₀₇H₁₄₇N₂₁O₄₅S₂; MW 2511.56; 精确质量 :2509.93。

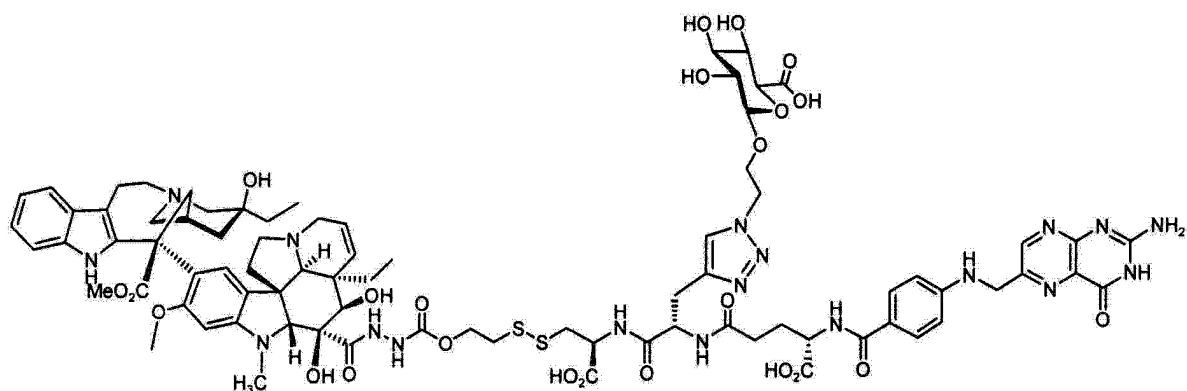
[0543]



[0544] 实施例。EC0429。该实施例包括酰胺低聚物亲水性间隔区,其由Asp-Asp-Cys的氨基乙基哌嗪乙酰胺代表,使用此处描述的过程来制备。

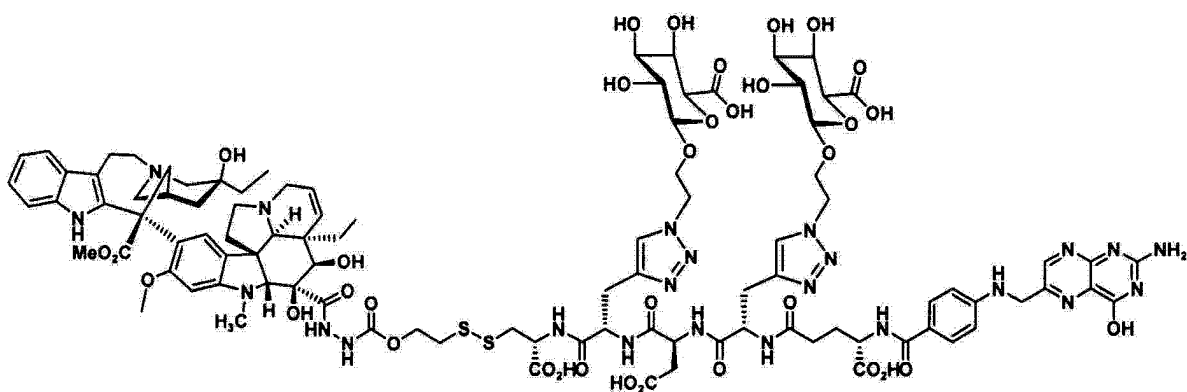
[0545] 还如此处描述的制备以下葡萄糖苷酸化合物的例示性的实例EC0400和EC0423,其中基于糖类的基团利用click化学作用例示性地引入。

[0546]



[0547] EC0400

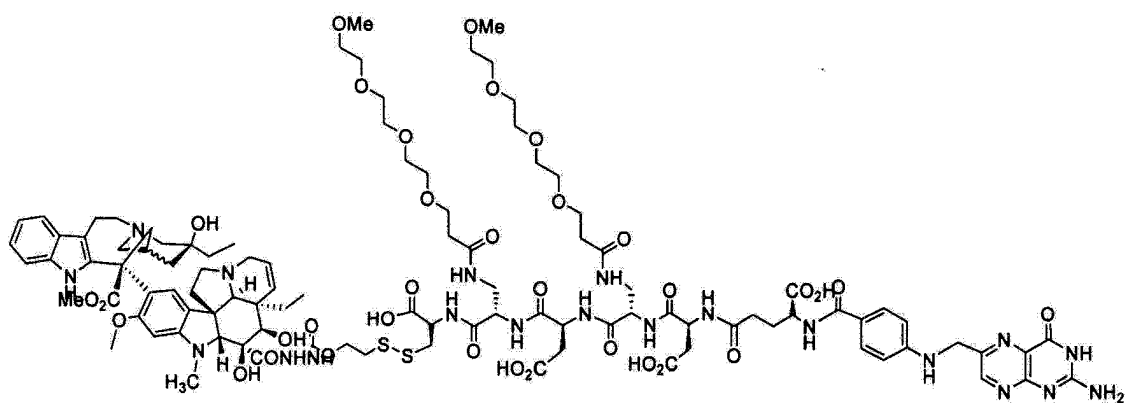
[0548]



[0549] EC0423

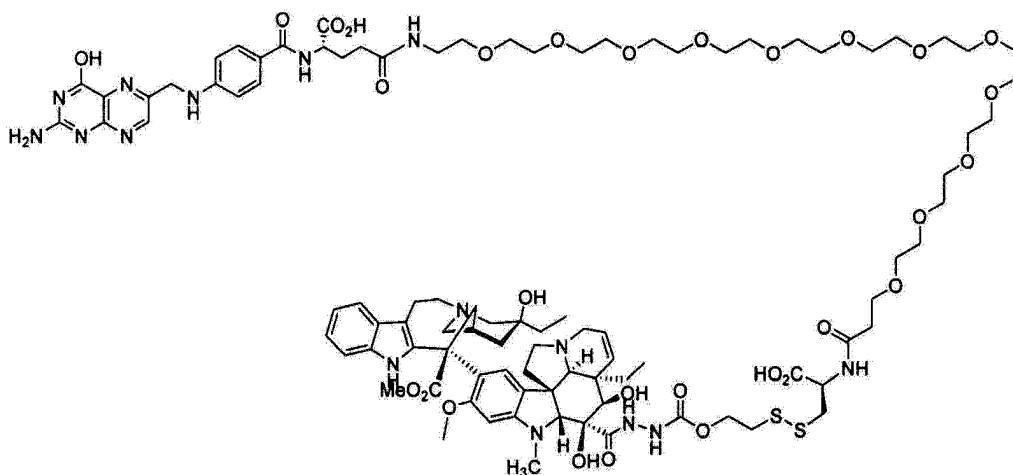
[0550] 还如此处描述的制备 PEG 间隔区化合物的以下例示性的实例 EC0367 和 EC0409。

[0551]



[0552] EC0367

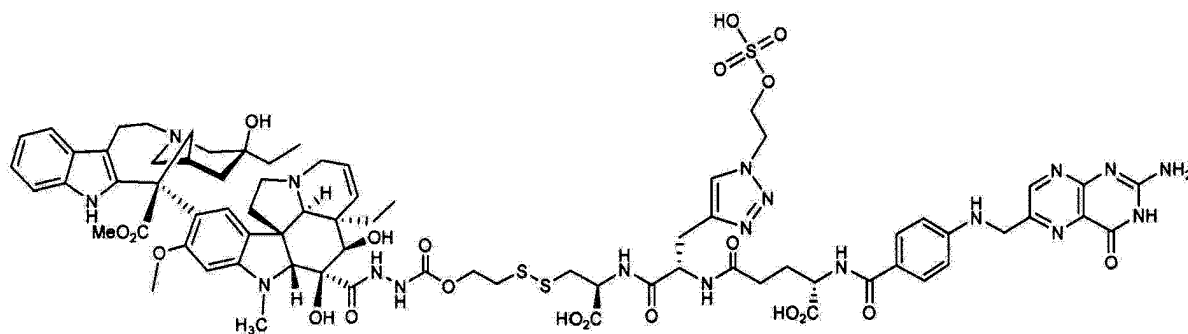
[0553]



[0554] EC0409

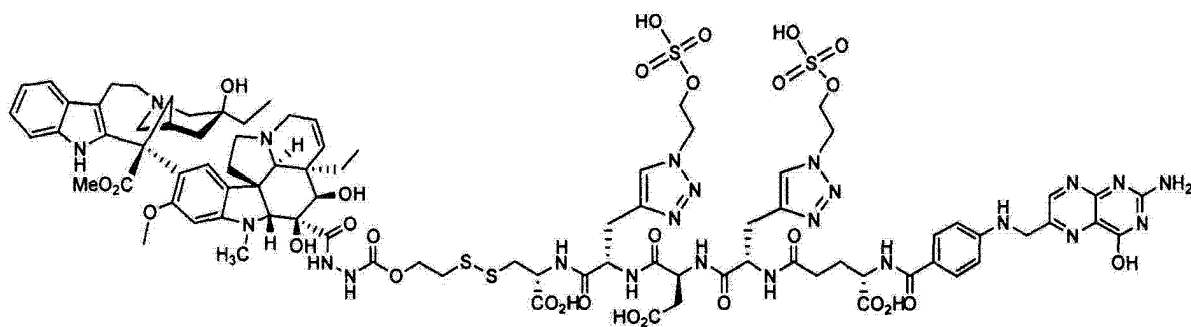
[0555] 还如此处描述的制备以下硫酸烷基酯化合物的例示性的实例 EC0418 和 EC0428, 其中硫酸片段经由 click 化学作用例示性地引入。

[0556]



[0557] EC0418 DAVLBH 的共轭物

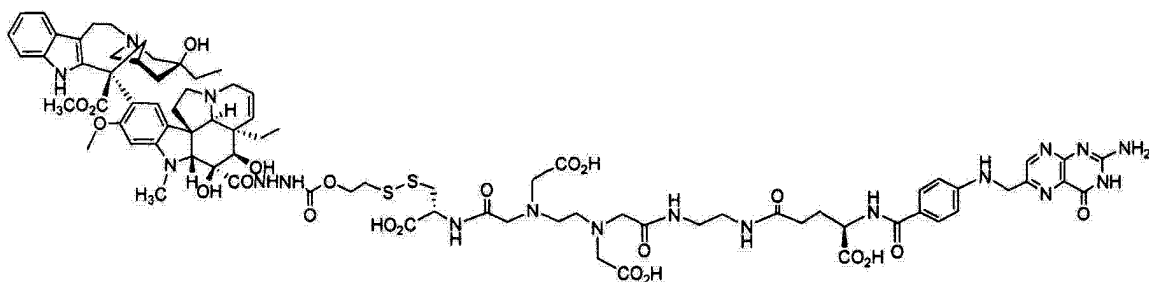
[0558]



[0559] EC0428 DAVLBH 的共轭物

[0560] 还如此处描述的制备另外的酰胺低聚物间隔区化合物的以下例示性实例, 其中酰胺低聚物包括 EDTE 衍生物。

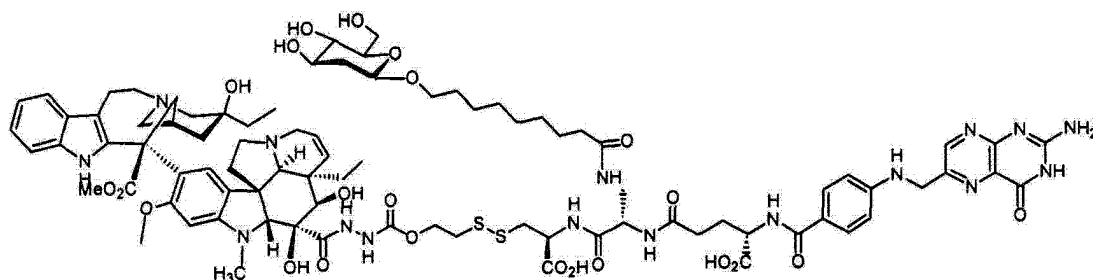
[0561]



[0562] EC0396 DAVLBH 的共轭物

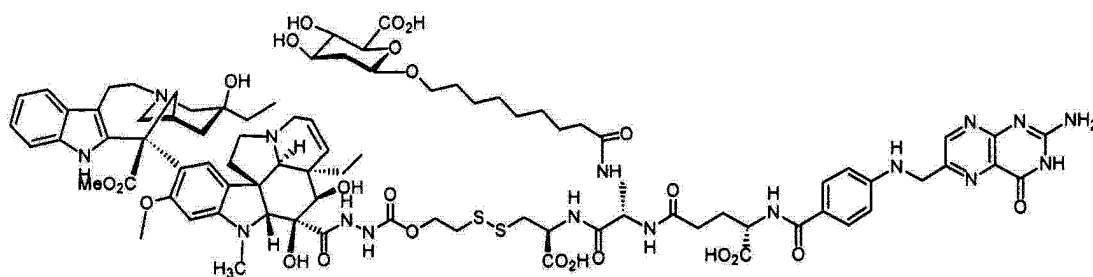
[0563] 如此处描述的制备 2-脱氧吡喃己糖化合物以及 PEG 连接的化合物的 β -烷基糖苷的下列例示性实例,利用 click 化学作用来将亲水性基团附着到间隔区接头上。

[0564]



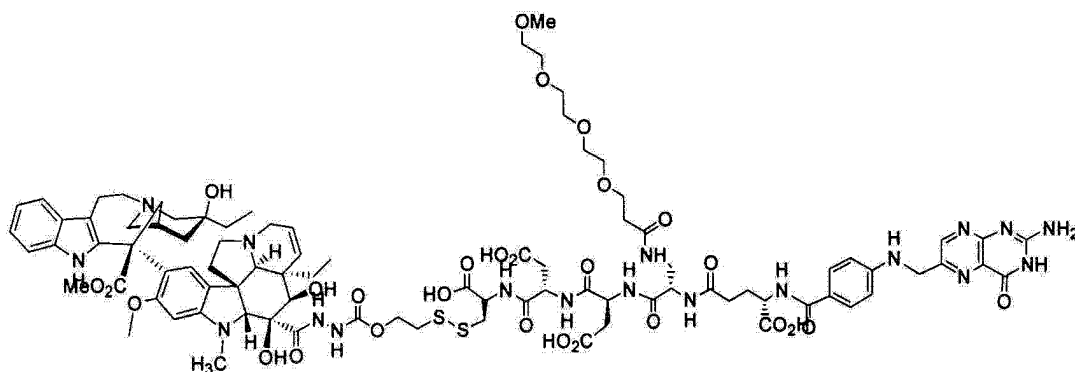
[0565] 包括 β -烷基 2-脱氧葡萄糖的 DAVLBH 的共轭物

[0566]



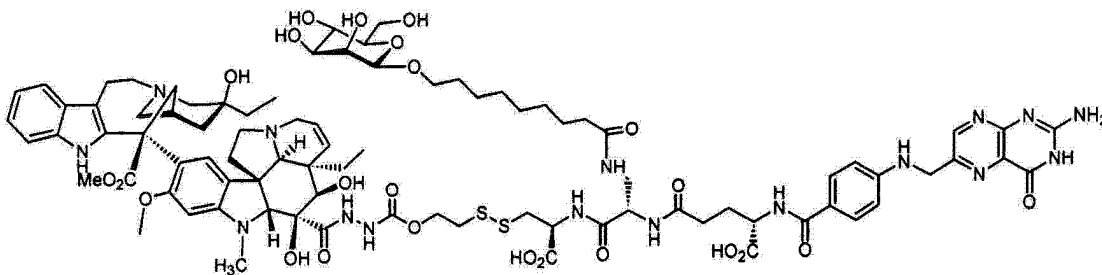
[0567] 包括 β -烷基 2-脱氧葡萄糖苷酸的 DAVLBH 的共轭物。

[0568]



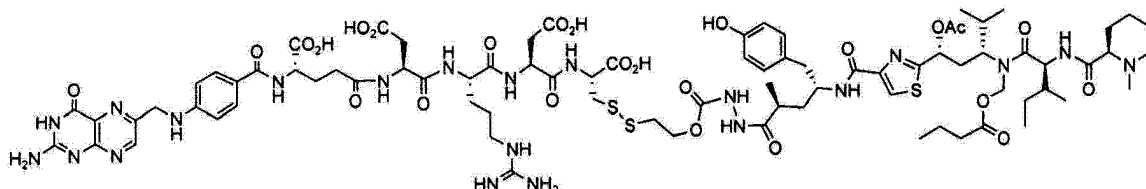
[0569] 包括 PEG 的 DAVLBH 的共轭物。

[0570]



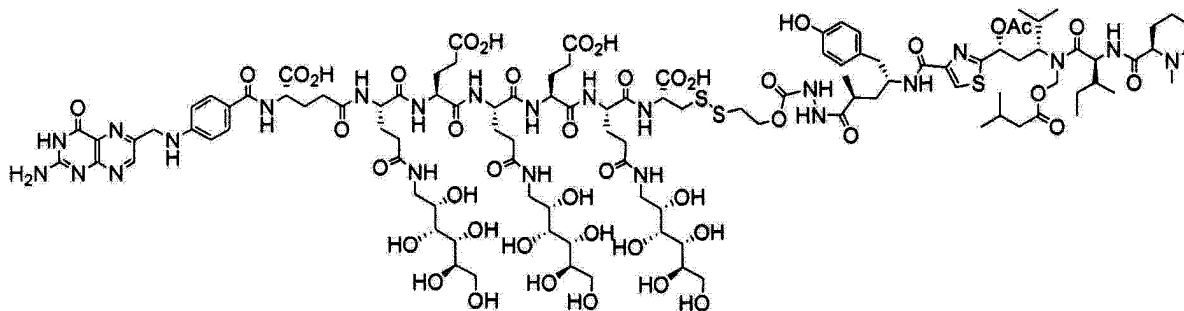
[0571] 包括 β -烷基甘露吡喃糖苷的 DAVLBH 的共轭物。

[0572]



[0573] 比较性的 TUBULYSIN 实施例。缺乏亲水性间隔区接头的 EC0305。EC89 (86mg) 吸收到去离子水中 (4.0mL, 使用前用氩气鼓泡 10 分钟), 悬浮液的 pH 值通过饱和 NaHCO_3 (使用之前用氩气鼓泡 10 分钟) 调整到约 6.9 (当 pH 值提高时悬浮液变成溶液)。另外的去离子水添加到溶液中, 来得到 5.0mL 的总体积, 水溶液中立即添加含 EC0312 (97mg) 的 THF (5.0mL) 的溶液。反应混合物很快地变得匀质。在氩气下搅动 45 分钟之后, 反应混合物用 2.0mM 磷酸钠缓冲液稀释 (pH 7.0, 15mL), 在 Rotavapor 上除去 THF。过滤产生的悬浮液, 滤液注入制备型 HPLC 中用于纯化 (柱: Waters XTerra Prep MS C_{18} 10 μm , 19 $\times$ 250mm; 移动相 A: 2.0mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.0; 移动相 B: 乙腈; 方法: 25 分钟内 5% B 到 80% B, 流动速度 = 25mL/分钟)。采集来自 10.04-11.90 分钟的级分, 冻干得到作为浅黄蓬松的固体的 EC0305 (117mg)。

[0574]

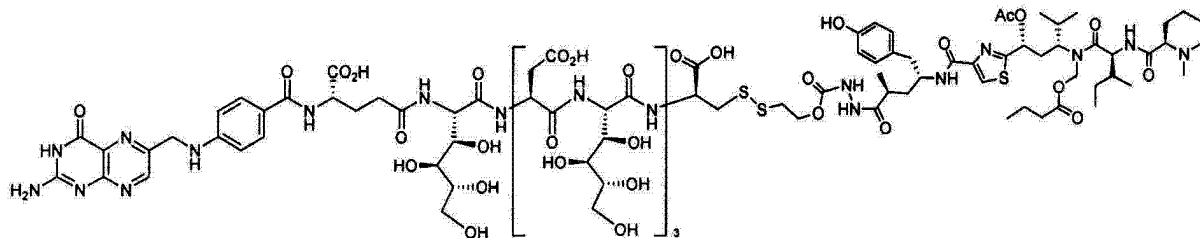


[0575] 实施例。制备具有亲水性间隔区接头的共轭物的一般方法 2 (单罐)。用 EC0543 的制备来例示。DIPEA (7.8 μL) 和氯甲酸异丁酯 (3.1 μL) 借助串联的注射器在 -15°C 添加到含 TUBULYSIN A (18mg) 的无水 EtOAc (0.50mL) 的溶液中。在氩气下在 -15°C 搅动 35 分钟之后, 向反应混合物添加含 EC0311 (5.8mg) 的无水 EtOAc (0.50mL) 的溶液。除去冷却, 反应混合物在氩气下搅动另外 45 分钟, 浓缩, 抽真空, 残余物溶于 THF (2.0mL) 中。同时, EC0488 (40mg) 溶于去离子水中 (使用前用氩气鼓泡 10 分钟), 水溶液的 pH 值通过饱和 NaHCO_3 调节到 6.9。另外的去离子水添加到 EC0488 溶液中, 来构造 2.0mL 的总体积, 向其中立即添加含有活化的 tubulysin 的 THF 溶液。很快地变得匀质的反应混合物在氩气下搅

动 50 分钟,用 2.0mM 磷酸钠缓冲液猝灭 (pH 7.0, 15mL)。过滤产生的浑浊溶液,滤液注入制备型 HPLC 中用于纯化。柱:Waters XTerra Prep MS C₁₈ 10 μm, 19×250mm;移动相 A:2.0mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.0;移动相 B:乙腈;方法:1% B 5 分钟,然后在接下来 30 分钟内 1% B 到 60% B,流动速度=26mL/分钟。采集来自 20.75-24.50 分钟的级分,冻干提供作为浅黄蓬松的固体的 EC0543 (26mg)。通过 tubulysin 起始化合物的适当选择,上述方法同样适合制备其他 tubulysin 共轭物。

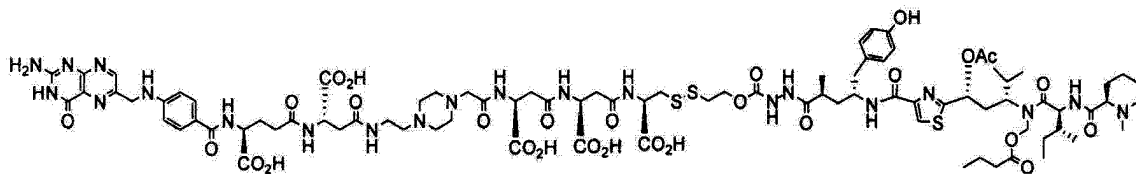
[0576] 包括亲水性间隔区接头的 tubulysin 共轭物的以下其他例示性实例,利用此处描述的加工和合成从 tubulysins 制备。

[0577]



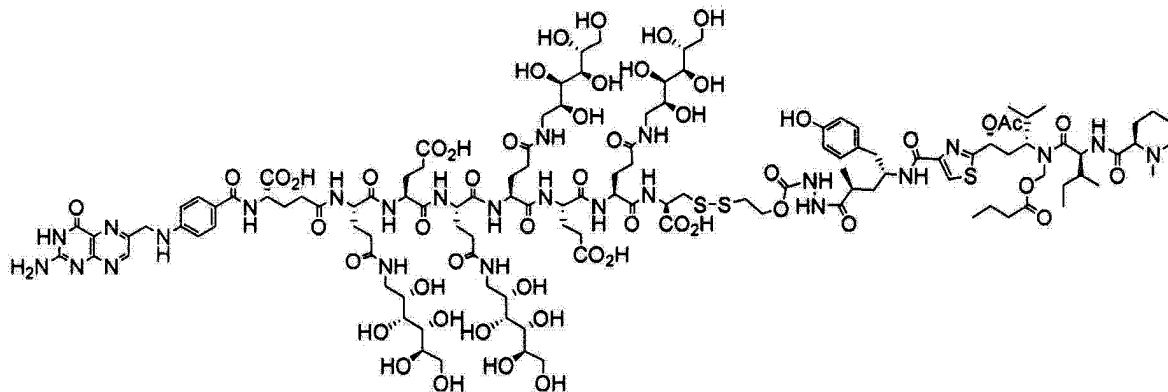
[0578] EC0436 Tubulysin 的共轭物

[0579]



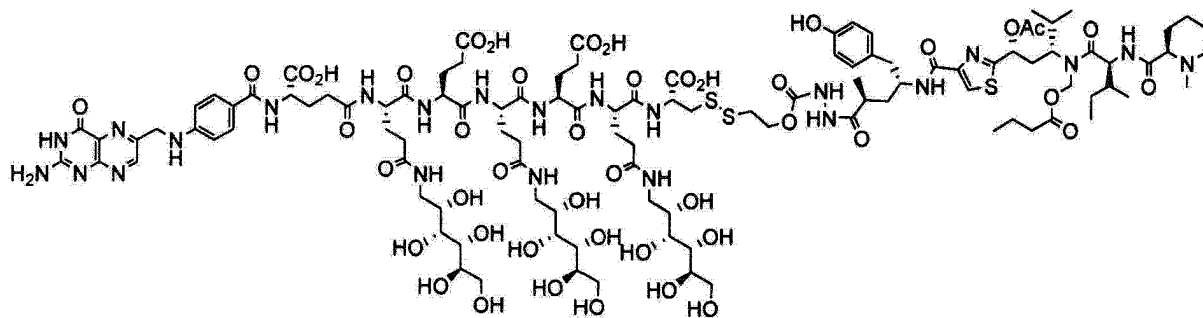
[0580] EC0444 Tubulysin 的共轭物

[0581]



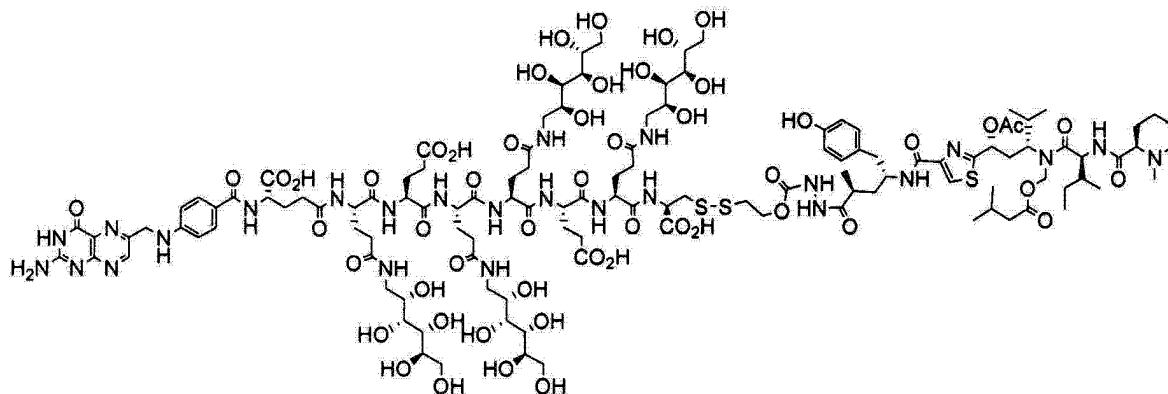
[0582] EC0530 Tubulysin 的共轭物

[0583]



[0584] EC0531 Tubulysin 的共轭物

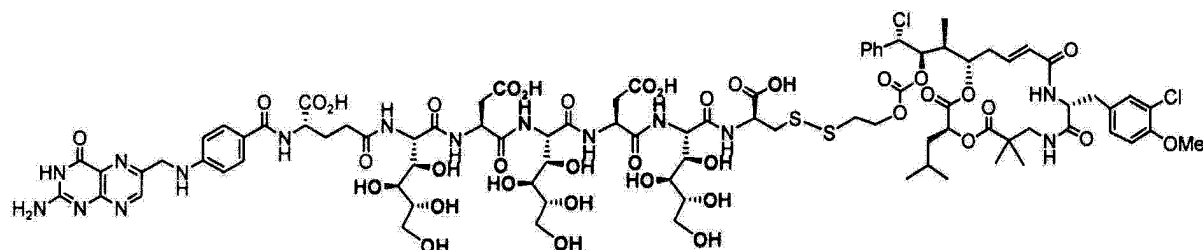
[0585]



[0586] EC0533 Tubulysin 的共轭物

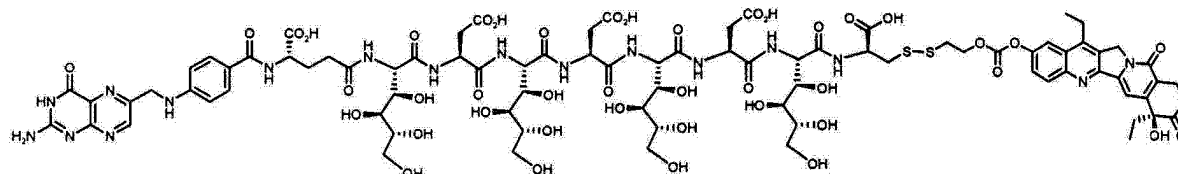
[0587] 还如此处描述的制备了以下实例。

[0588]



[0589] EC0262 Cryptophycin- 碳酸酯- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-SS-Cys-糖-Asp-糖-Asp-糖-叶酸盐共轭物}$ 。 $\text{C}_{87}\text{H}_{115}\text{Cl}_2\text{N}_{15}\text{O}_{38}\text{S}_2$; MW 2113.96 ;精确质量 :2111.63

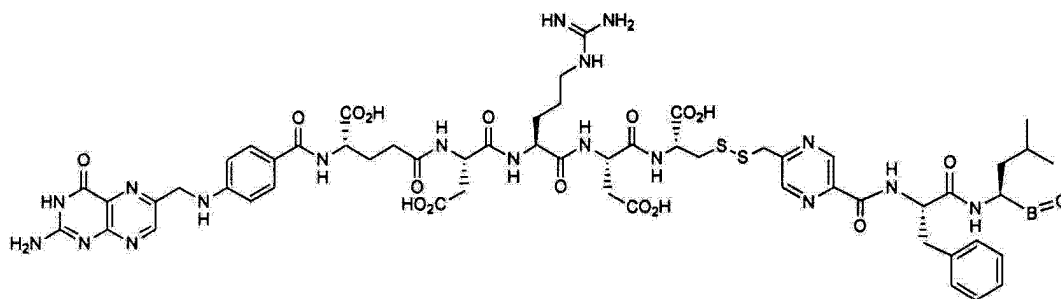
[0590]



[0591] EC0278

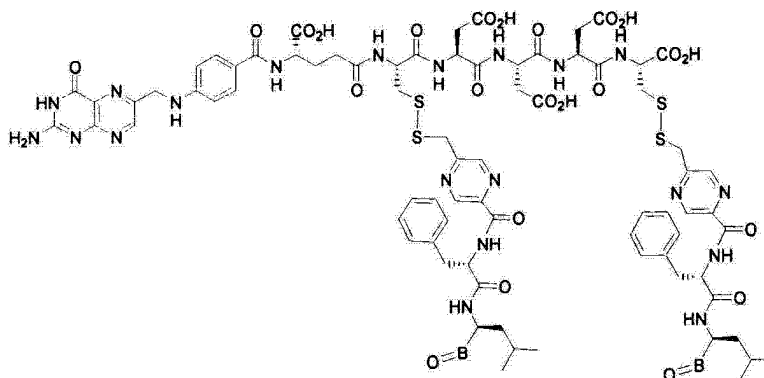
[0592] 比较性的 BORTEZOMIB 实施例。还如在此和在美国专利申请公开系列号 2005/0002942 中描述的制备了缺乏亲水性间隔区接头的 bortezomib (Velcade) 共轭物的以下比较性实例 (EC0522 和 EC0587)。

[0593]



[0594] EC0522 C₅₆H₆₉BN₁₈O₁₇S₂, C, 50.15 ;H, 5.19 ;B, 0.81 ;N, 18.80 ;O, 20.28 ;S, 4.78, MW 1341.20, 精确质量 :1340.46

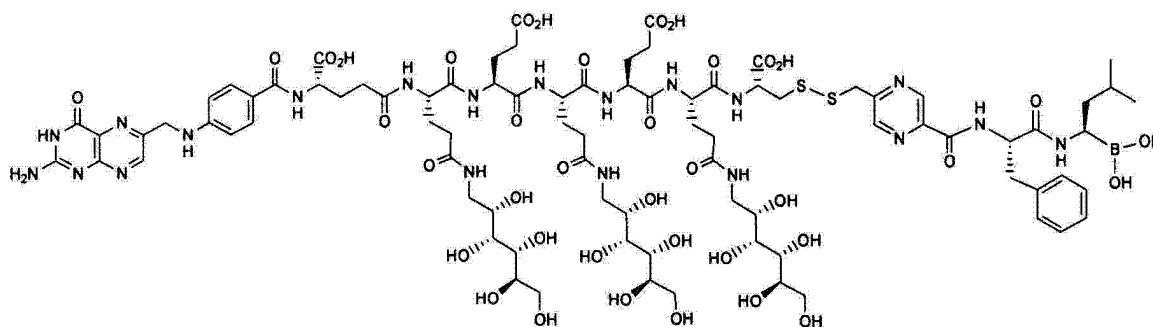
[0595]



[0596] EC0587 C₇₇H₉₀B₂N₂₀O₂₃S₄, MW 1813.55, 精确质量 :1812.56

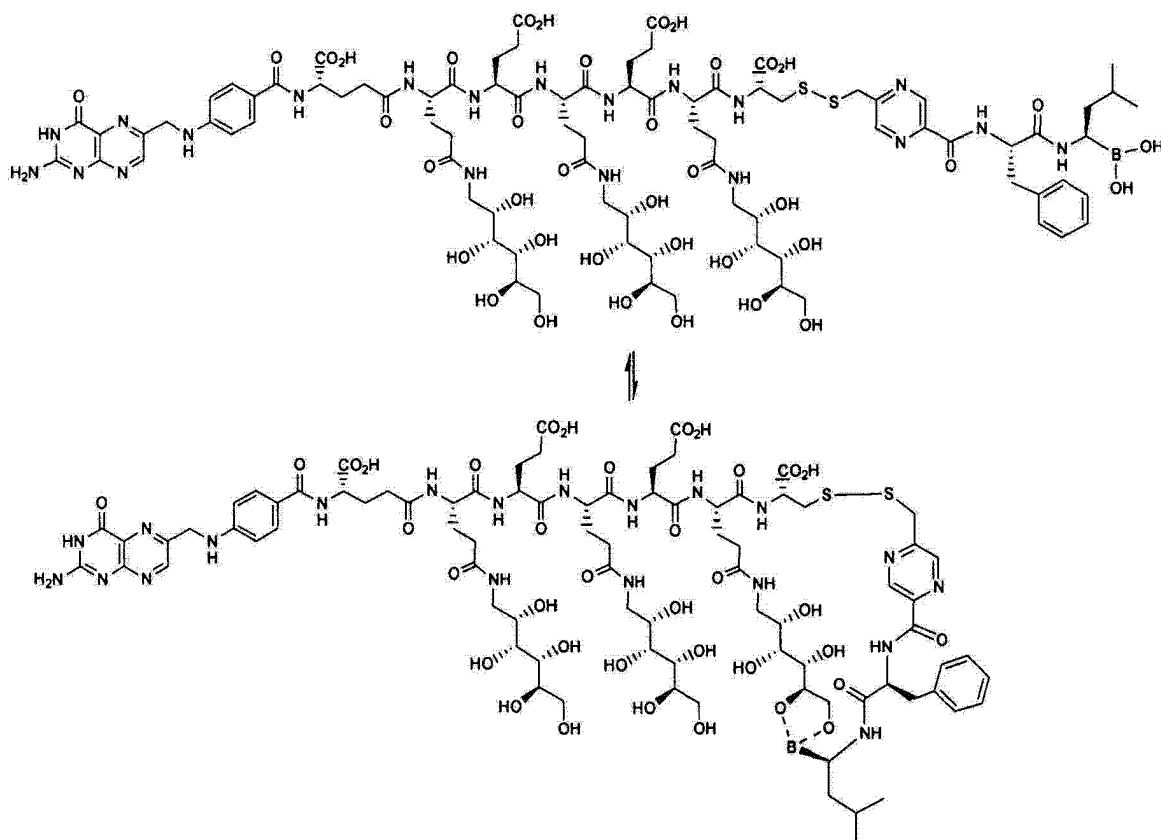
[0597] 还如此处描述的制备了包括亲水性间隔区接头的 bortezomib 共轭物的以下实例。

[0598]



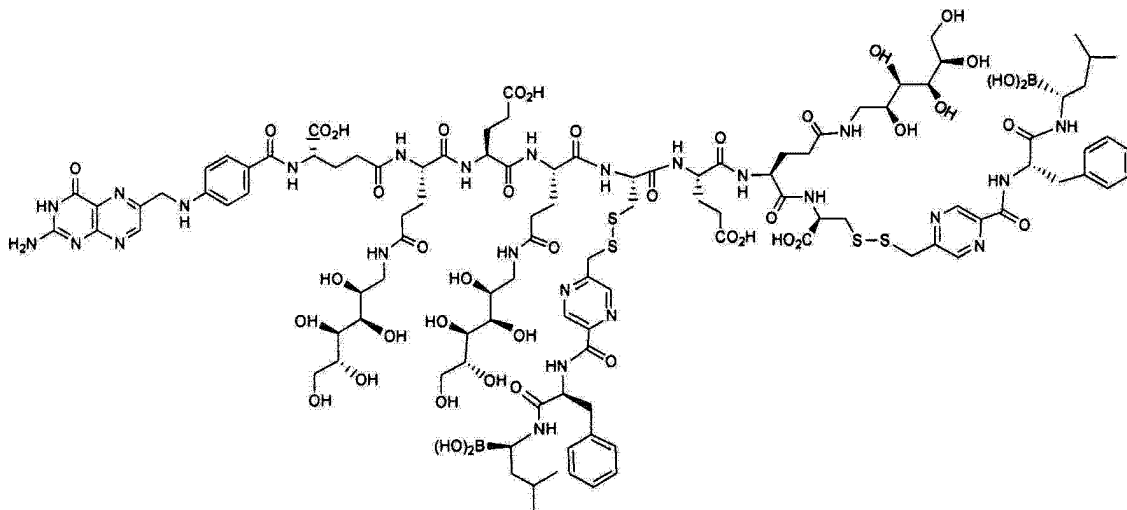
[0599] EC0525 bortezomib(Velcade) 的共轭物。C₈₅H₁₁₉BN₂₀O₃₆S₂, MW 2071.91, 精确质量 :2070.76. 不受理论的限制, 理解的是, 在 velcade 共轭物中, 硼酸和接头可以与碳水化合物侧链形成分子间相互作用。例示性地, 硼酸与一个或两个羟基基团形成硼酸酯络合物。这样的酯络合物可以与附近的羟基以及与 1,3- 羟基形成。理解的是, 硼酸酯络合物可以在碳水化合物片段的末端, 或在碳水化合物片段的内部形成。进一步理解的是, 在水溶液中, 硼酸酯络合物可以与硼酸平衡。

[0600]



[0601] EC0525(水合的)。C₈₅H₁₁₉BN₂O₀₃₆S₂, MW 2071.91, 精确质量:2070.76;
EC0525(配位的)。C₈₅H₁₂₃BN₂O₀₃₈S₂, MW 2107.94, 精确质量:2106.78。

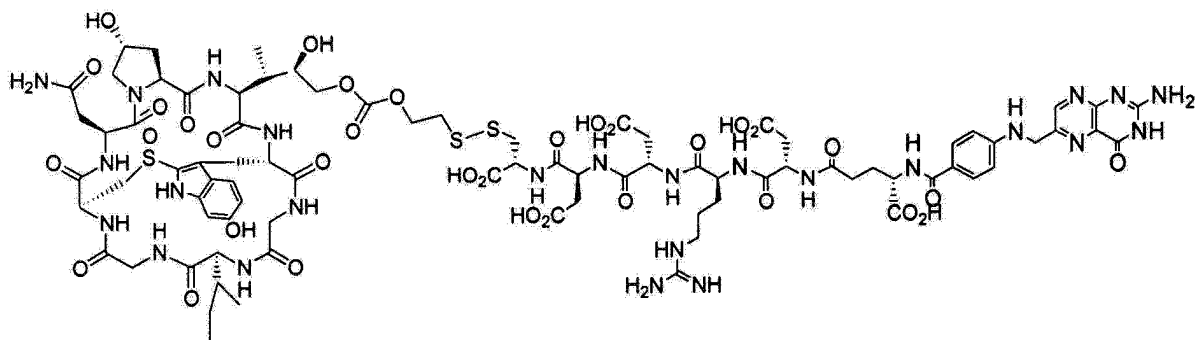
[0602]



[0603] EC0595 二-bortezomib 共轭物。C₁₀₈H₁₄₅B₂N₂₅O₃₉S₄, MW 2567.34, 精确质量:2565.92

[0604] 比较性的 α -AMANTIN 实施例。还如在此和在美国专利申请公开系列号 2005/0002942 中描述的制备了缺乏亲水性间隔区接头的 α -amantin 共轭物的以下比较性实例。

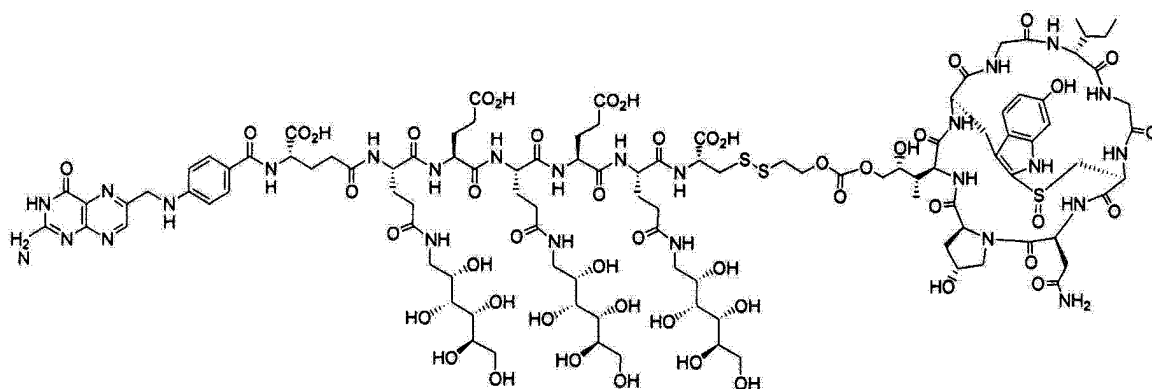
[0605]



[0606] EC0323 不与叶酸竞争,在有或没有过量叶酸存在的情况下展现了相同的 IC_{50} 。

[0607] 还如此处描述的制备了包括亲水性间隔区接头的 α -amantin 共轭物的以下实例。

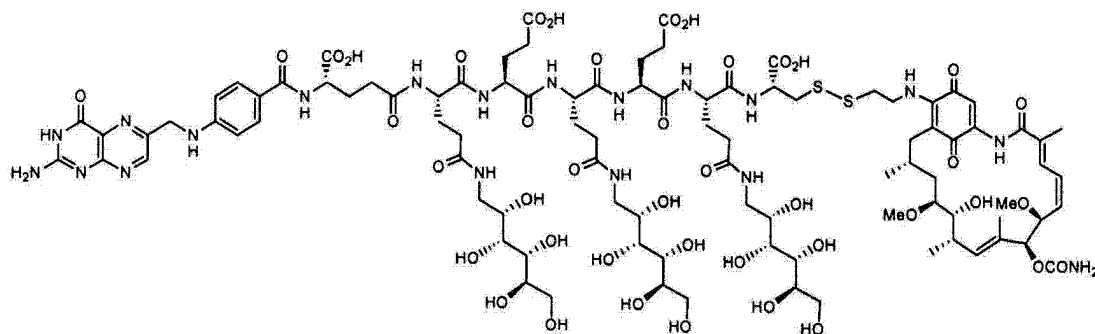
[0608]



[0609] EC0592 α -鹅膏菌素的共轭物。C107H154N26O50S3, MW2700.71, 精确质量: 2698.95. 可以与过量的叶酸竞争的 EC0592 显示了在 3H -胸腺嘧啶核苷掺入分析中针对 KB 细胞的 $\sim 3nM$ 的 IC_{50} 。

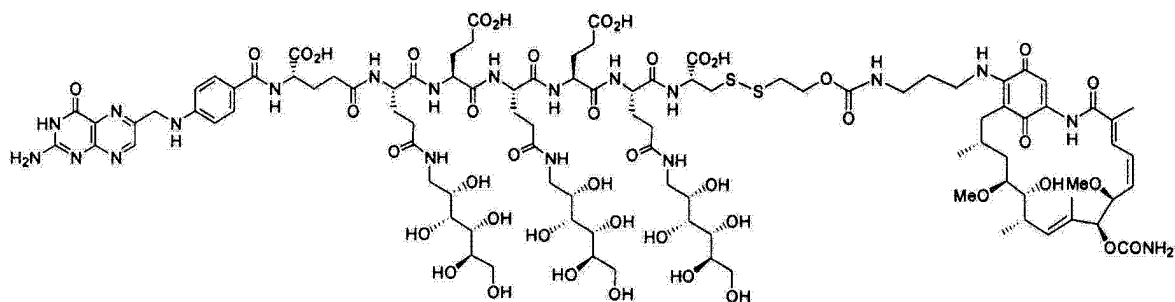
[0610] 例示性共轭物的以下实施例如此处描述的制备。

[0611]



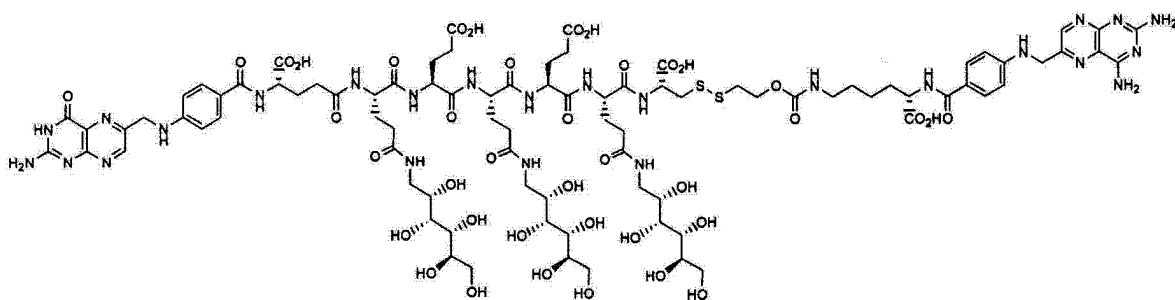
[0612] EC0535 geldanamycin 的共轭物。C95H139N19O42S2, MW 2283.35, 精确质量: 2281.88

[0613]



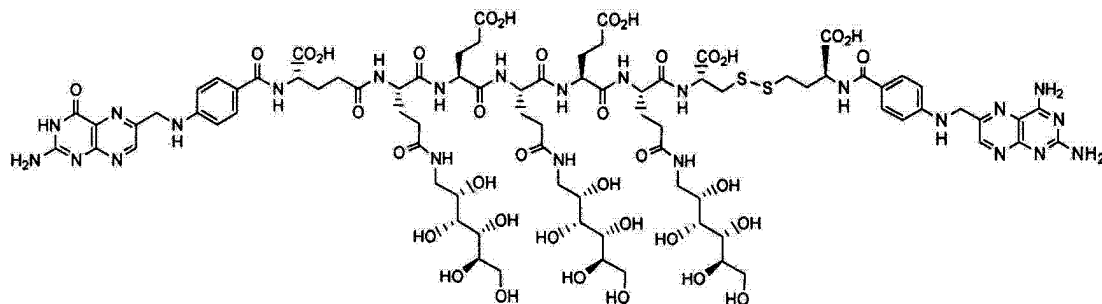
[0614] EC0568 geldanomycin 的共轭物。C99H146N20O44S2, MW 2384.46, 精确质量: 2382.92

[0615]



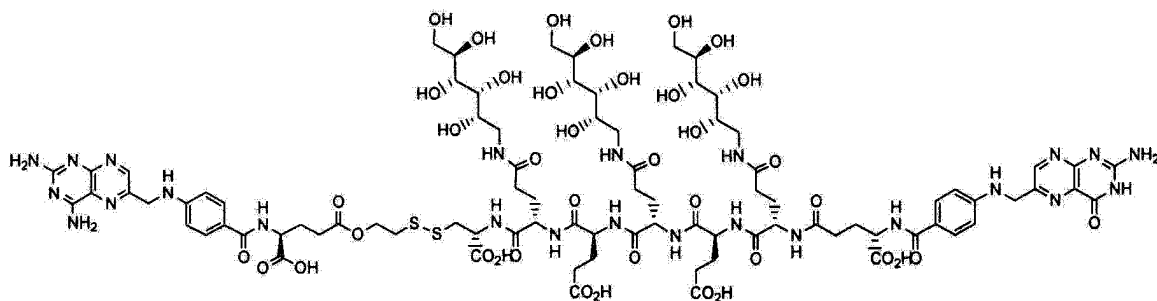
[0616] EC0539 氨蝶呤的赖氨酸类似物的共轭物

[0617]



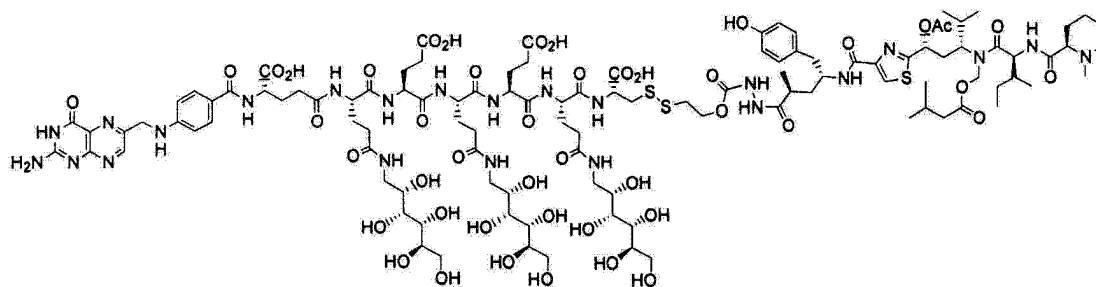
[0618] EC0544 氨蝶呤的半胱氨酸类似物的共轭物。C₈₃H₁₁₆N₂₄O₃₇S₂, C, 47.33 ;H, 5.55 ; N, 15.96 ;O, 28.11 ;S, 3.05, MW 2106.08, 精确质量 :2104.74

[0619]



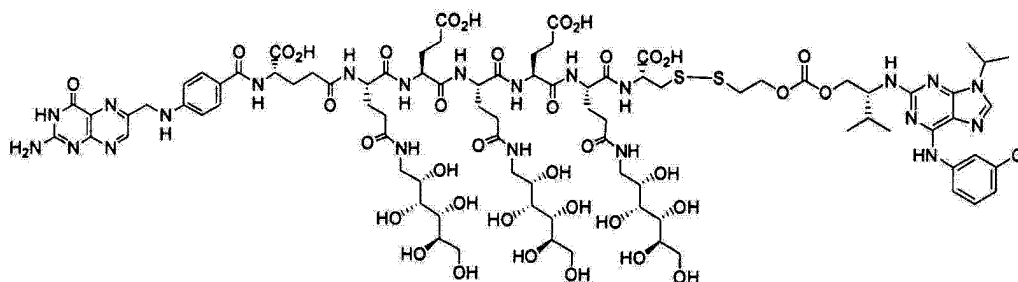
[0620] EC0551 氨蝶呤的共轭物。C₈₆H₁₂₀N₂₄O₃₉S₂, C, 47.42 ;H, 5.55 ;N, 15.43 ;O, 28.65 ;S, 2.94, MW 2178.14, 精确质量 :2176.76

[0621]



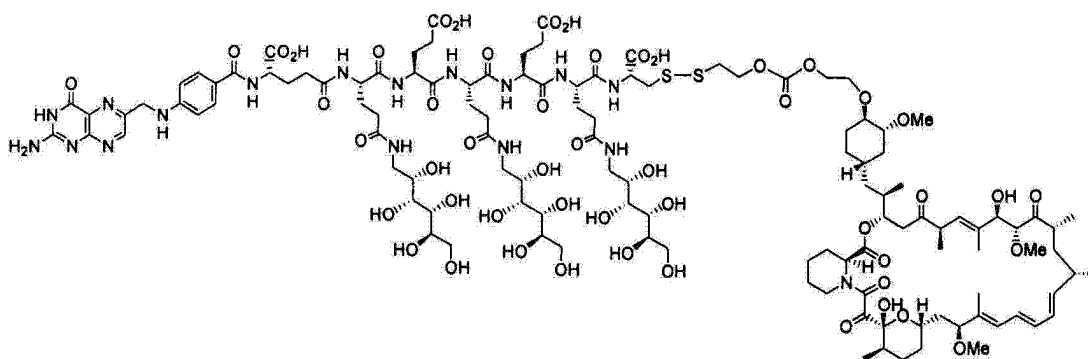
[0622] EC0543 tubulysin A 的共轭物。C₁₁₁H₁₆₇N₂₃O₄₅S₃, C, 50.50 ;H, 6.38 ;N, 12.20 ;O, 27.27 ;S, 3.64, MW 2639.84, m/z :2639.07 (100.0 %), 2638.06 (80.8 %), 2640.07 (79.6 %)

[0623]



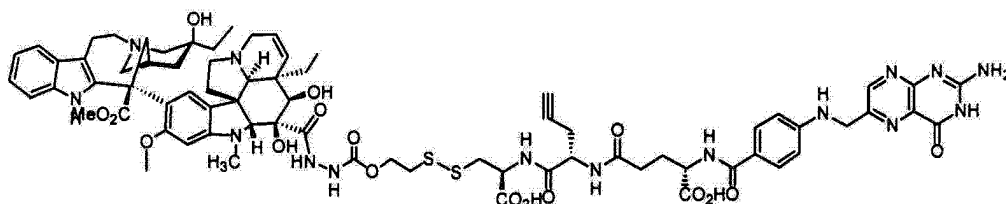
[0624] EC0545 purvalanol A 的共轭物。C₈₇H₁₂₅ClN₂₂O₃₇S₂;MW 2170.63, 精确质量 : 2168.77

[0625]



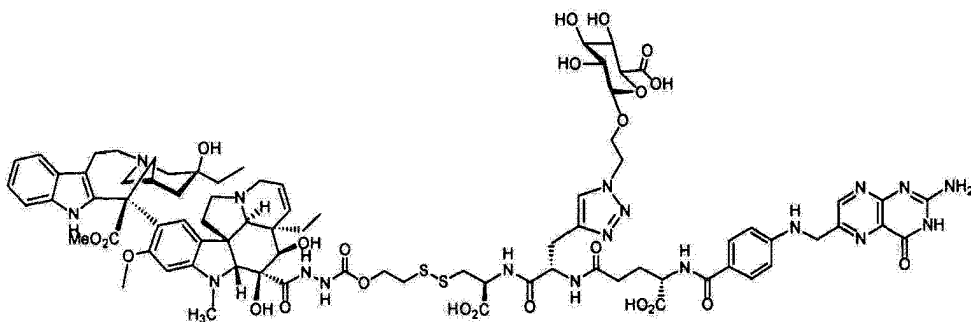
[0626] EC0565 依维莫司的共轭物。C₁₂₁H₁₈₃N₁₇O₅₀S₂, MW 2739.96, 精确质量 :2738.17

[0627]



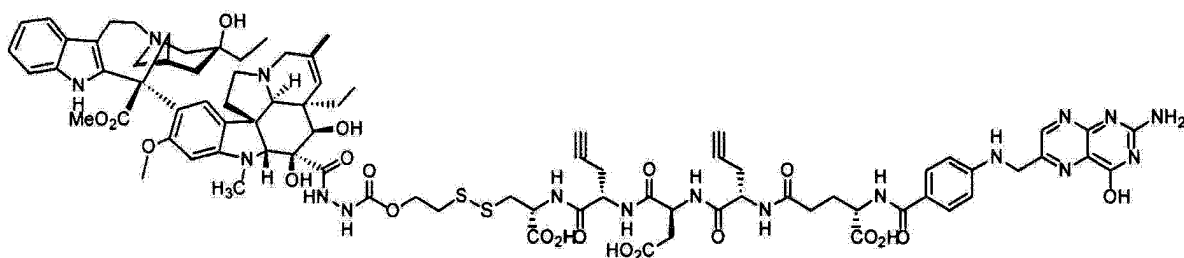
[0628] DAVLBH 的共轭物

[0629]



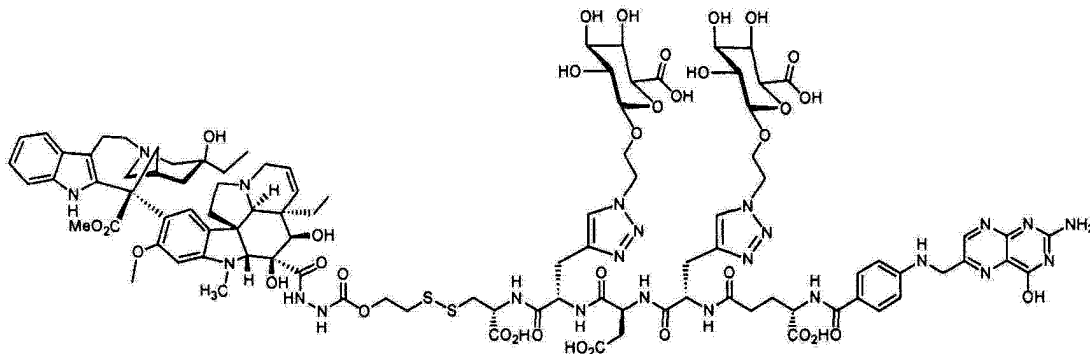
[0630] EC0400 DAVLBH 的共轭物。通过相应的炔和叠氮乙基碳水化合物的 Huisgen 环化制备的 ;2eq. 抗坏血酸钠,1eq. CuSO₄·5H₂O, THF/ 水 (1 : 1) ;5eq. Na aAscorbate,2.5eq. CuSO₄·5H₂O, THF/ 水 (9 : 1) ;(10mg)。C₈₁H₁₀₀N₁₈O₂₄S₂, C,54.84 ;H,5.68 ;N,14.21 ;O,21.65 ;S,3.62,MW 1773.90,精确质量 :1772.66

[0631]



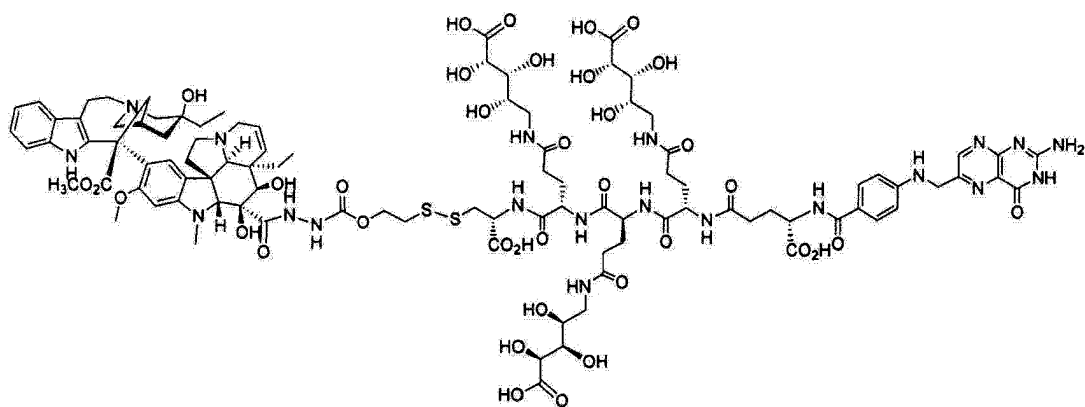
[0632] DAVLBH 的共轭物。从 EC0419 制备的。C₈₂H₉₇N₁₇O₂₁S₂, MW 1720.88,精确质量 :1719.65(90mg)。

[0633]



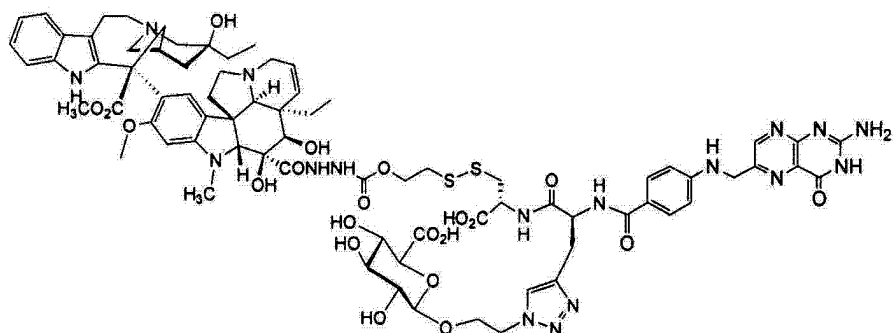
[0634] EC0423 DAVLBH 的共轭物。通过 Huisgen 环化制备的 ;C₉₈H₁₂₃N₂₃O₃₅S₂, C,52.38 ;H,5.52 ;N,14.34 ;O,24.92 ;S,2.85,MW 2247.29,精确质量 :2245.80

[0635]



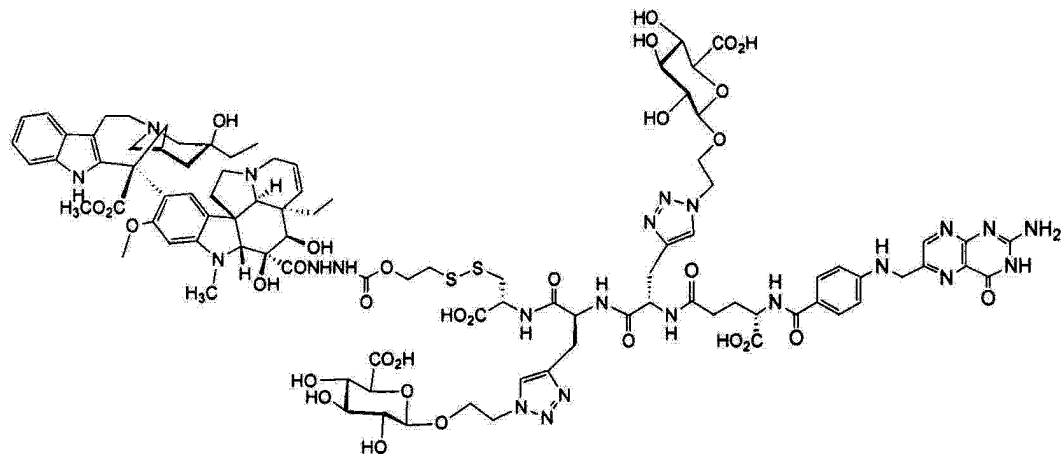
[0636] EC0637 DAVLBH 的共轭物。C98H130N20O37S2, MW 2244.32, 精确质量 :2242.83

[0637]



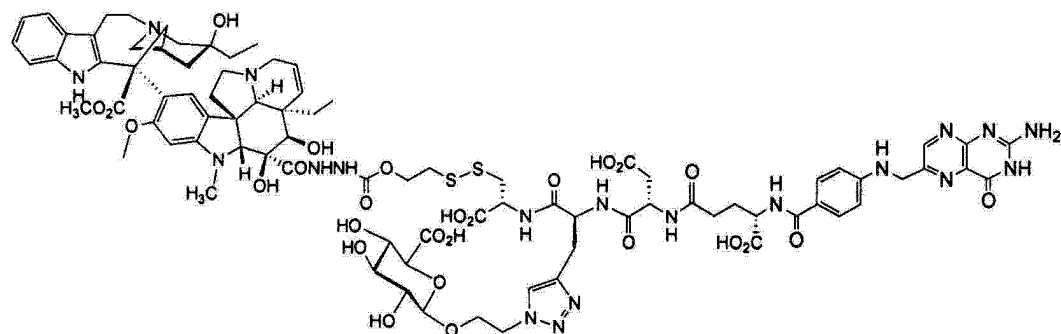
[0638] DAVLBH 的共轭物。

[0639]



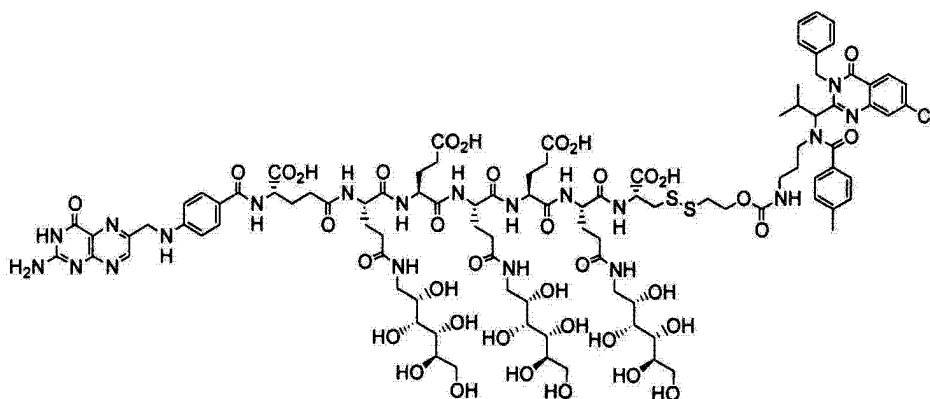
[0640] DAVLBH 的共轭物。

[0641]



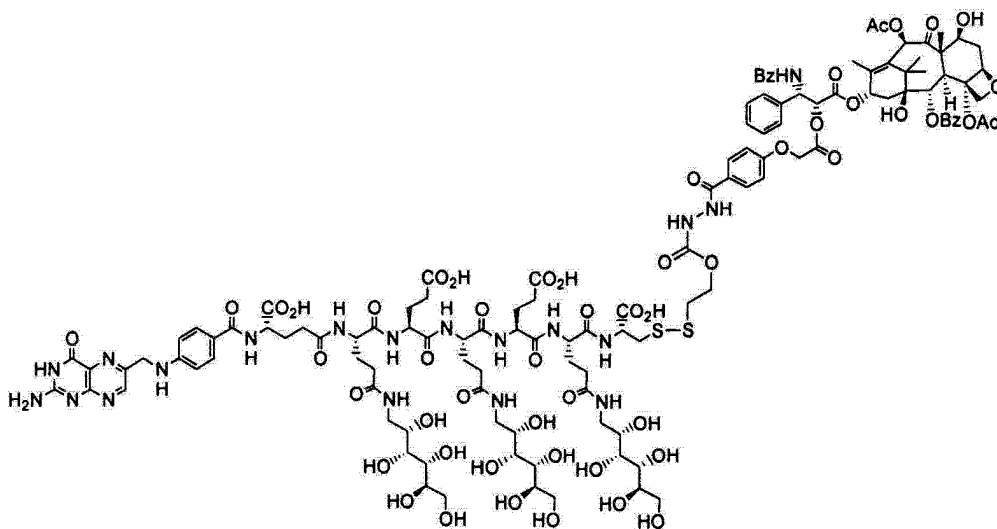
[0642] DAVLBH 的共轭物。

[0643]



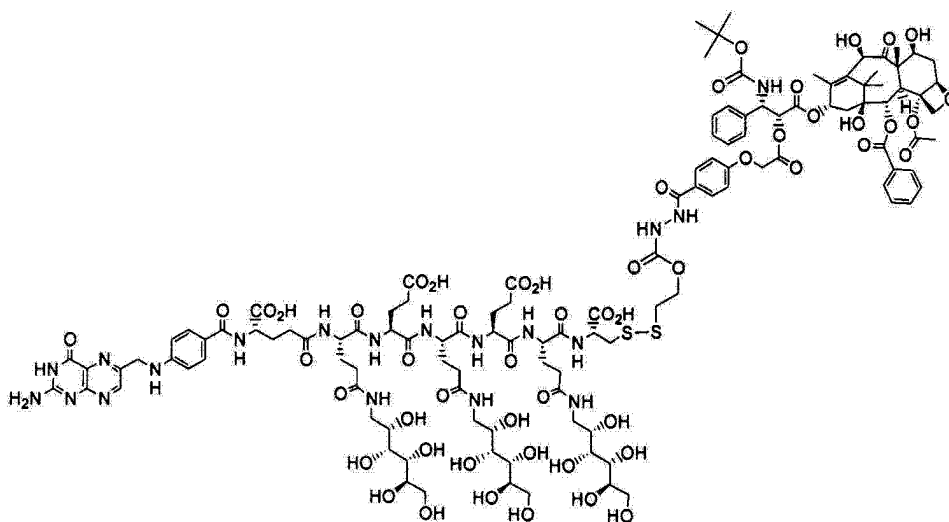
[0644] EC0581 ispinosib 的共轭物。C₉₈H₁₃₃C₁N₂₀O₃₈S₂, MW 2298.80, 精确质量: 2296.82

[0645]



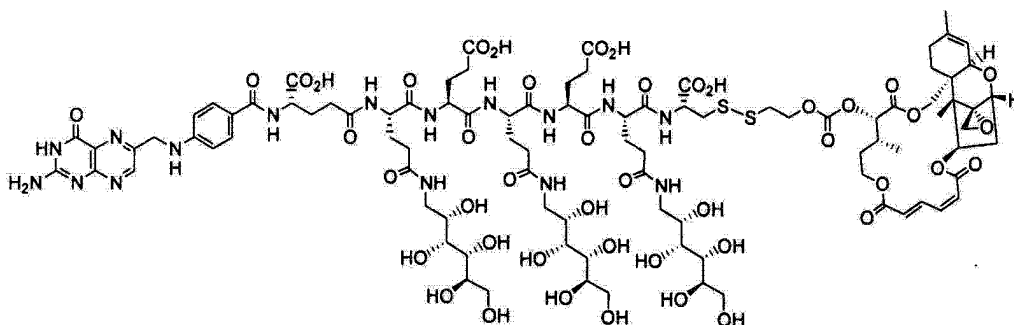
[0646] EC0561 紫杉醇的共轭物。C₁₂₄H₁₅₉N₁₉O₅₃S₂, MW 2827.82, 精确质量: 2825.98

[0647]

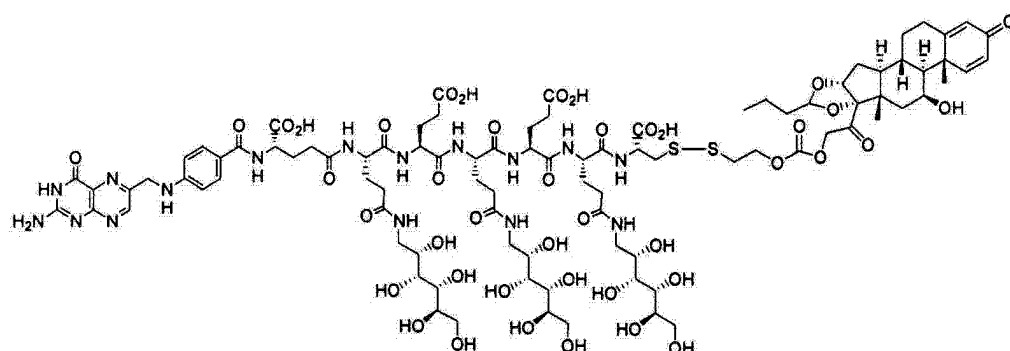


[0648] EC0594 多西他赛的共轭物。C₁₂₀H₁₆₁N₁₉O₅₃S₂, MW 2781.79, 精确质量: 2779.99

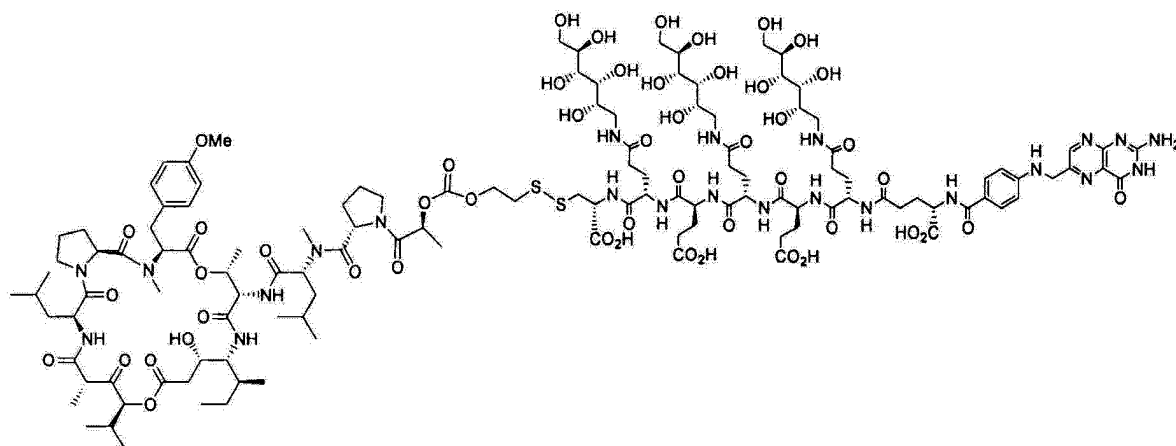
[0649]

[0650] EC0598 Verucarín 的共轭物。C₉₅H₁₃₄N₁₆O₄₅S₂, MW 2284.29, 精确质量 :2282.81

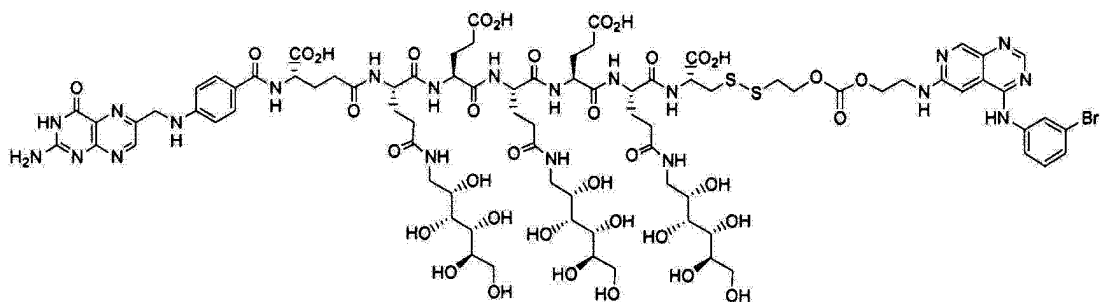
[0651]

[0652] EC0600 布地缩松的共轭物。C₉₃H₁₃₄N₁₆O₄₂S₂, C, 50.49 ;H, 6.11 ;N, 10.13 ;O, 30.37 ;S, 2.90, MW 2212.27, 精确质量 :2210.83

[0653]

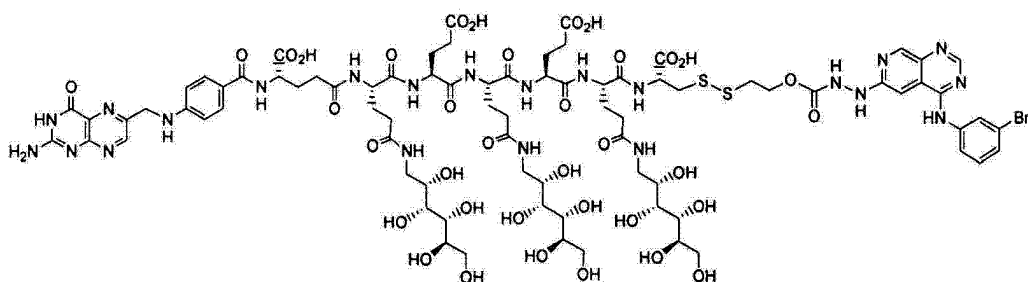
[0654] EC0610 Didemnin B 的共轭物。C₁₂₅H₁₈₉N₂₃O₅₁S₂, MW 2894.09, 精确质量 :2892.23

[0655]



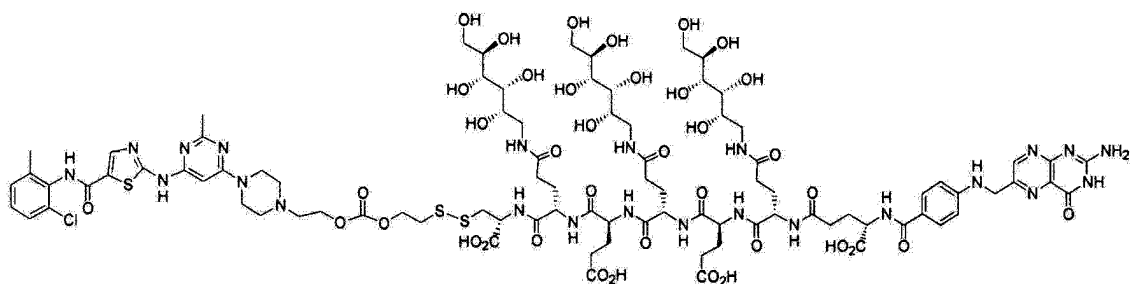
[0656] EC0631 酪氨酸激酶抑制剂 4-[(3-溴苯基)氨基]-6-[(2-羟乙基-氨基)-吡啶并[3,4-d]嘧啶的共轭物, C83H114BrN21O37S2, MW 2141.95, 精确质量: 2139.63

[0657]



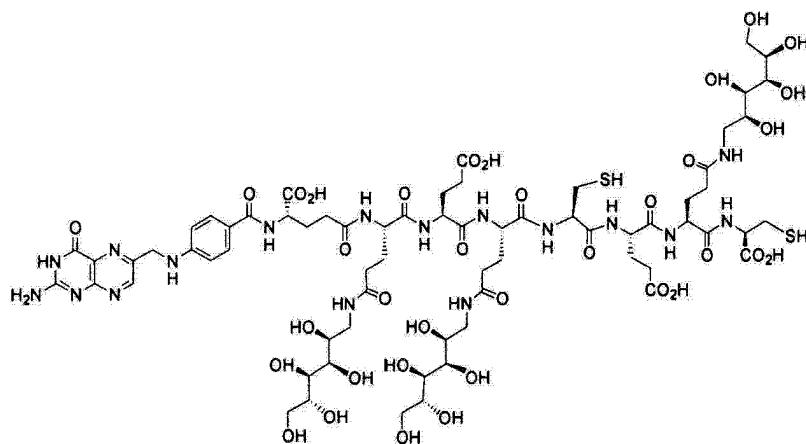
[0658] EC0640 :4-[(3-溴苯基)氨基]-6-胍基-吡啶并[3,4-d]嘧啶的共轭物

[0659]



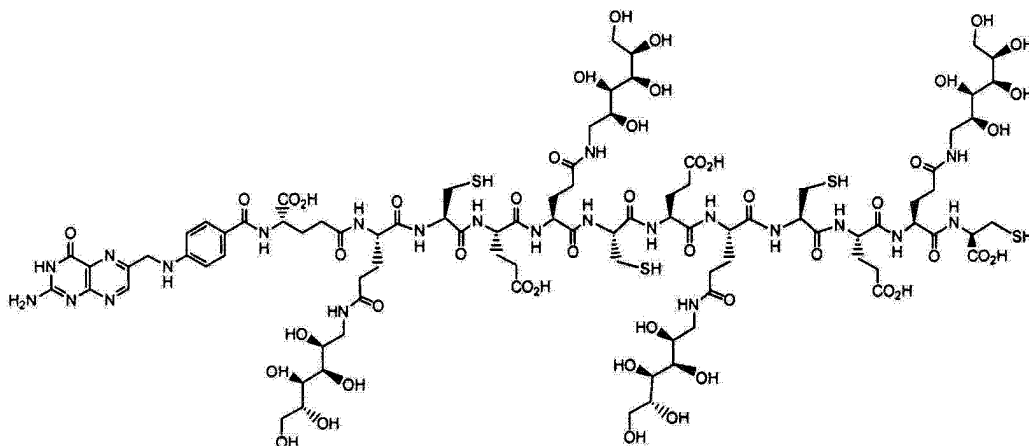
[0660] EC0663 Dasatinib 的共轭物。C90H126ClN23O38S3, MW 2269.74, 精确质量: 2267.75

[0661]



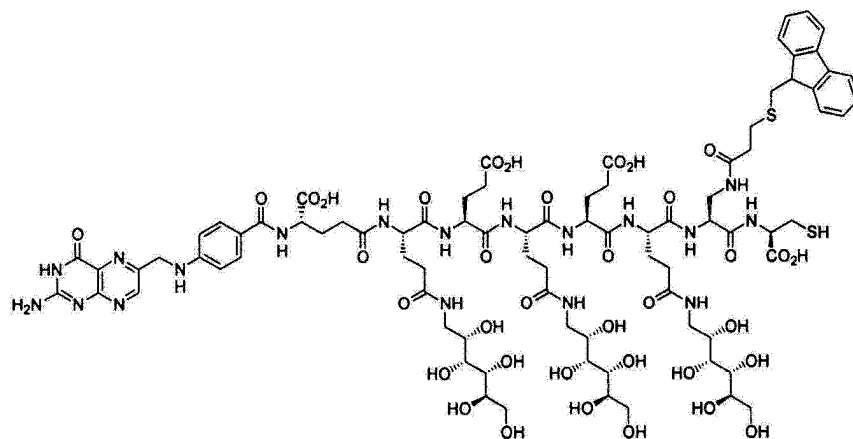
[0662] EC0593 两种药物的多药物中间物。C68H103N17O35S2, MW 1782.77, 精确质量: 1781.62

[0663]



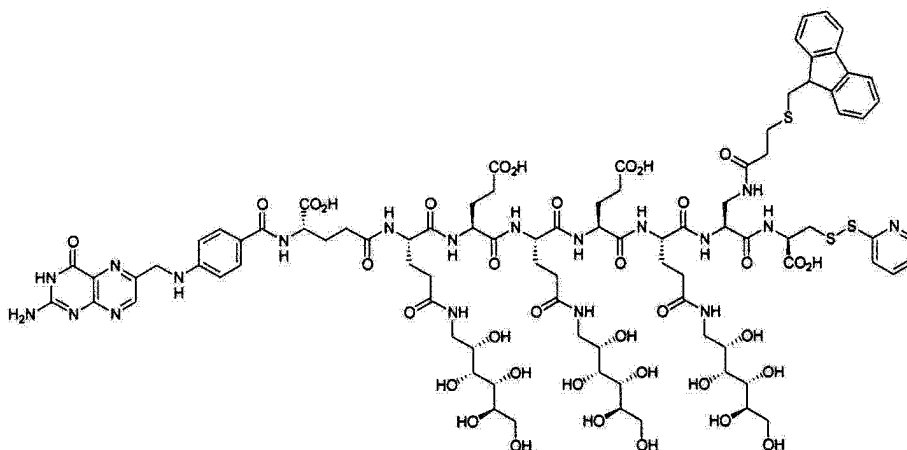
[0664] EC0613 三种药物的多药物中间物。C90H140N22O47S4, MW 2410.45, 精确质量: 2408.81

[0665]



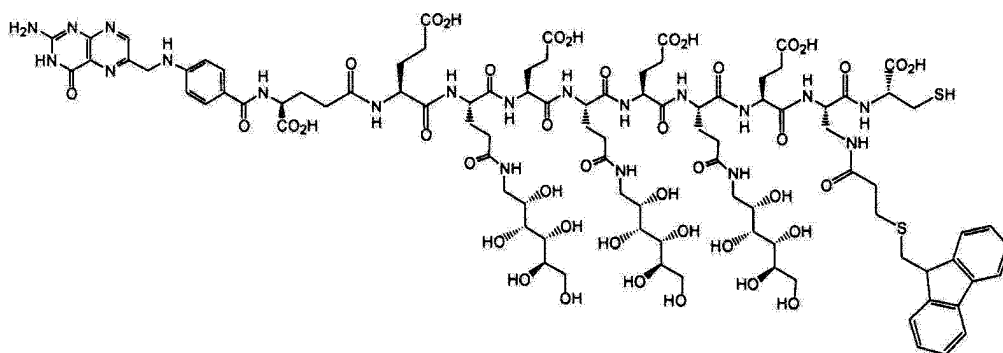
[0666] EC0542 两种药物的任选地选择性多药物中间物。C85H118N18O36S2, C, 50.24 %; H, 5.85 %; N, 12.41 %; O, 28.34 %; S, 3.16, MW 2032.08, 精确质量 :2030.74

[0667]



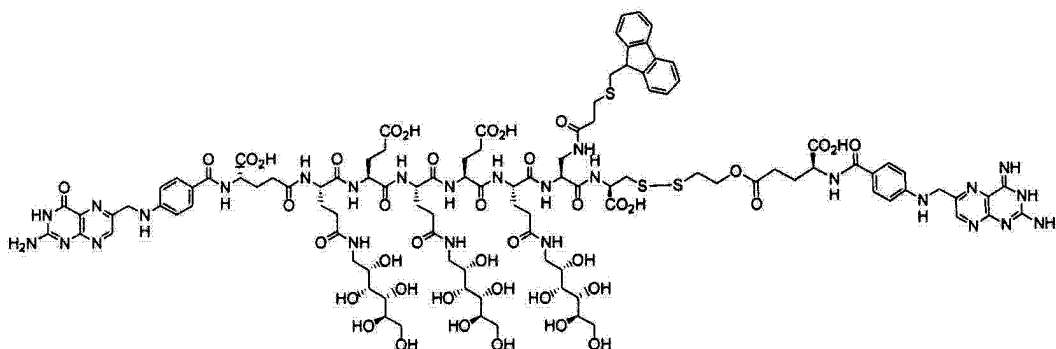
[0668] EC0559 两种药物的任选地选择性多药物中间物。C90H121N19O36S3, MW 2141.22, 精确质量 :2139.74

[0669]



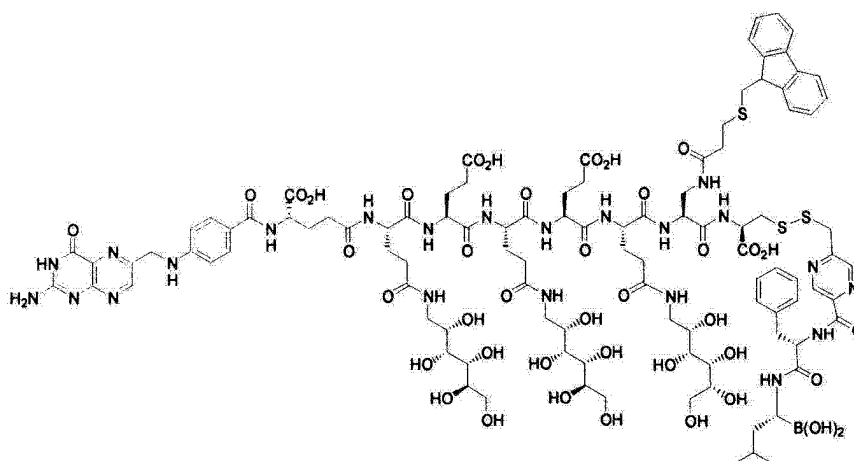
[0670] EC0682 两种药物的任选地选择性多药物中间物。C₉₅H₁₃₂N₂₀O₄₂S₂, MW 2290.30, 精确质量 :2288.82

[0671]



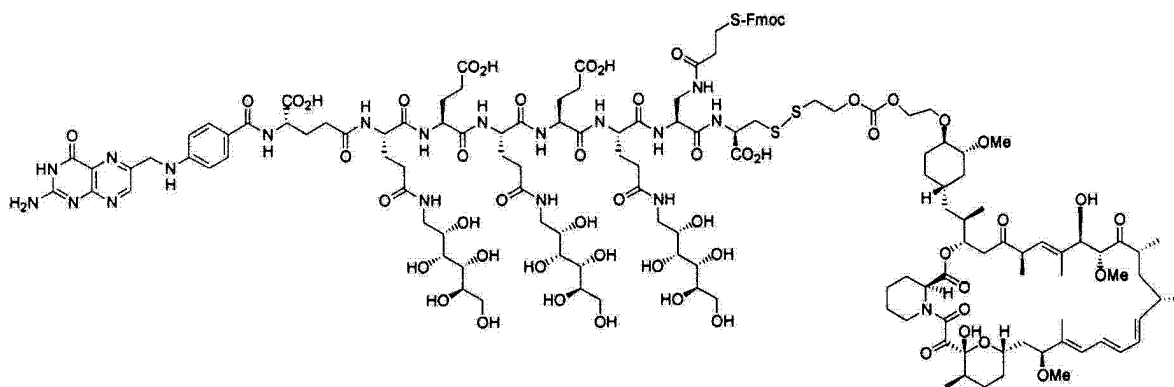
[0672] EC0646 氨蝶呤和多药物共轭物的中间物的共轭物。C₁₀₆H₁₄₀N₂₆O₄₁S₃, MW 2530.59, 精确质量 :2528.88

[0673]



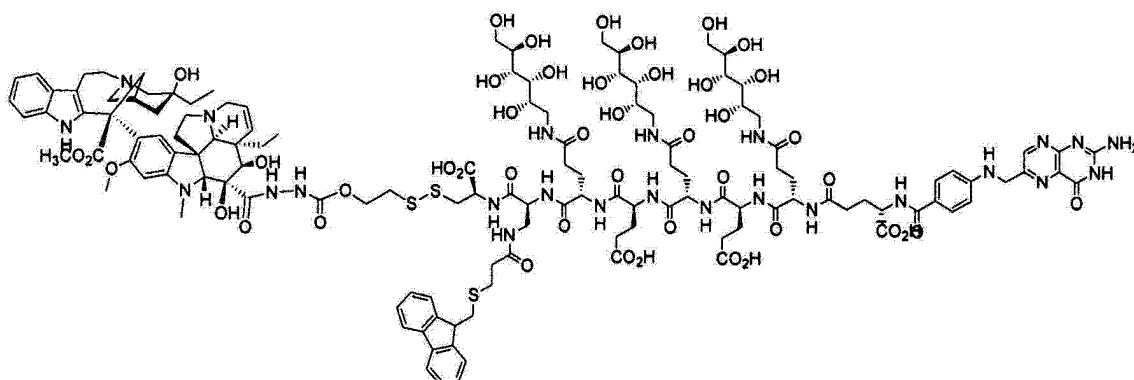
[0674] EC0555 Bortezomib(Velcade) 和多药物共轭物的中间物的共轭物。C₁₀₅H₁₃₉BN₂₂O₃₈S₃, C, 52.02 ;H, 5.78 ;B, 0.45 ;N, 12.71 ;O, 25.08 ;S, 3.97, MW 2424.36, 精确质量 :2422.89

[0675]



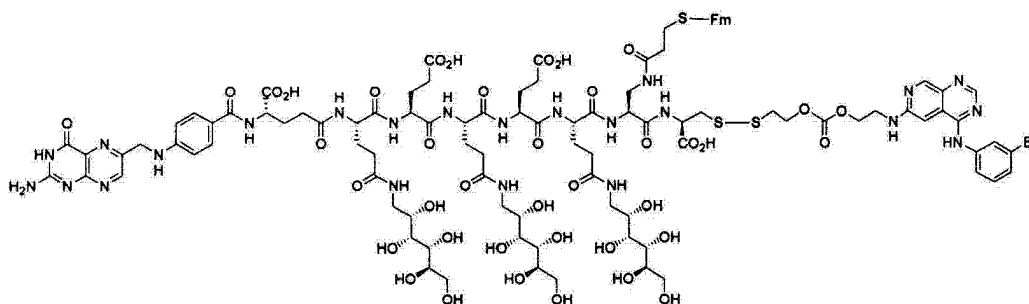
[0676] EC0606 依维莫司和多药物共轭物的中间物的共轭物。C₁₄₁H₂₀₃N₁₉O₅₂S₃, C, 54.76 ;H,6.62 ;N,8.61 ;O,26.90 ;S,3.11, MW 3092.42, 精确质量 :3090.30

[0677]



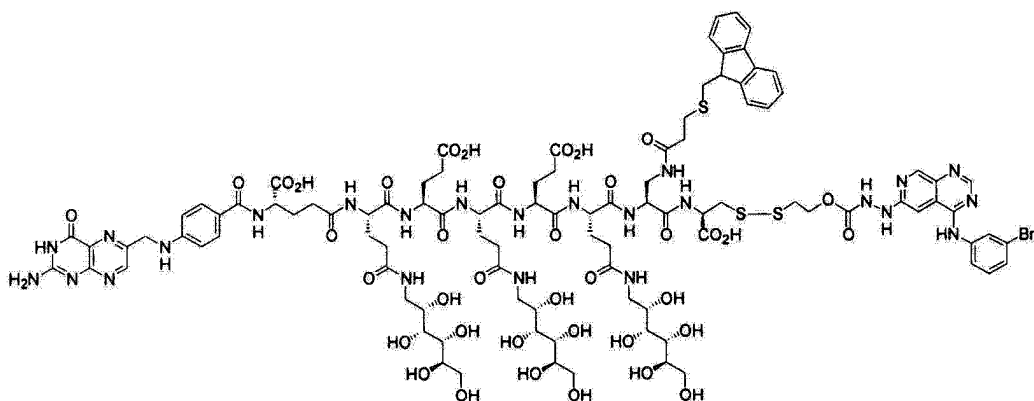
[0678] EC0633 DAVLBH 和多药物共轭物的中间物的共轭物。C131H176N24O45S3, MW 2903.13, 精确质量 :2901.14

[0679]



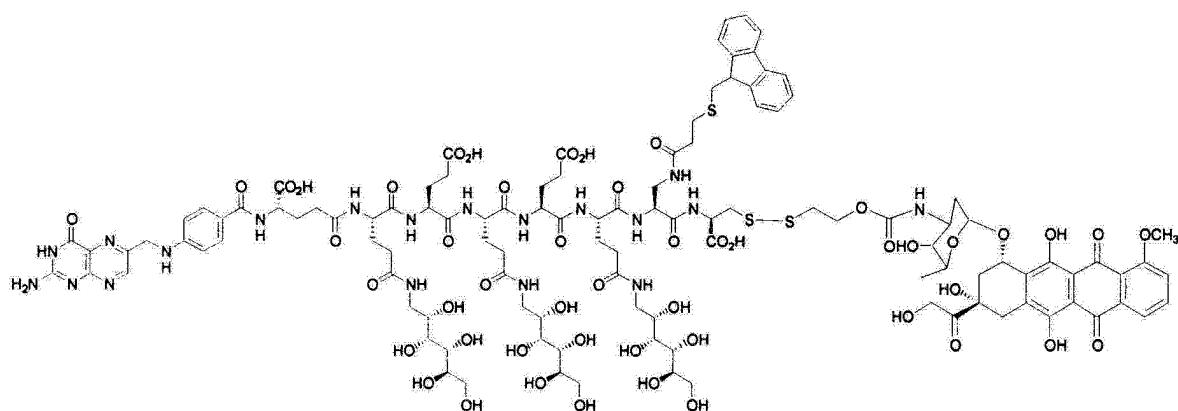
[0680] EC0661 4-[(3-溴苯基)氨基]-6-氨基-吡啶并[3,4-d]嘧啶和多药物共轭物的中间物的共轭物 C145H209BrN24O55S4, MW 3376.51, 精确质量:3373.24

[0681]



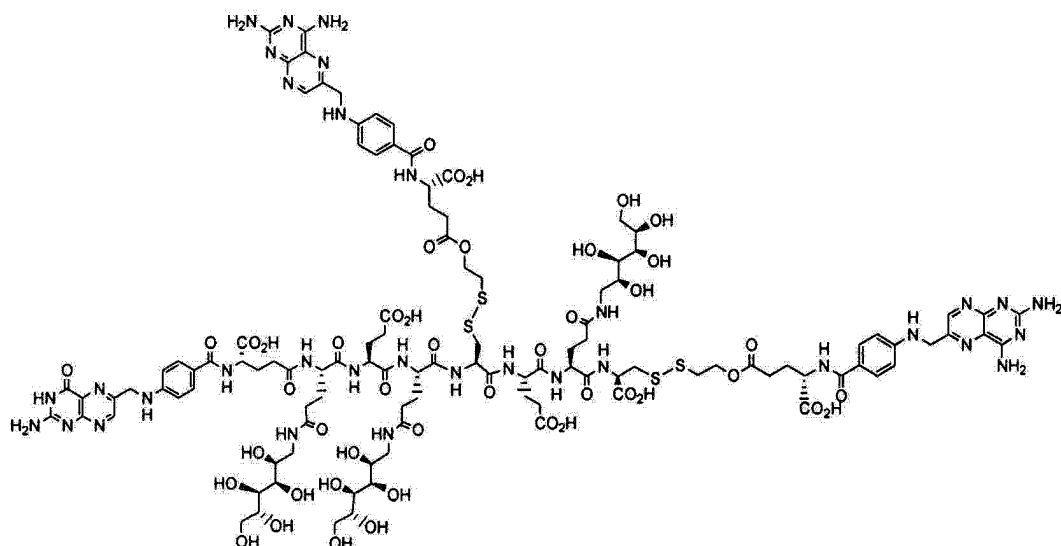
[0682] EC0679 4-[(3-溴苯基)氨基]-6-胍基-吡啶并[3,4-d]嘧啶和多药物共轭物的中间物的共轭物 C101H131BrN24O38S3, MW 2465.36, 精确质量 :2462.74

[0683]



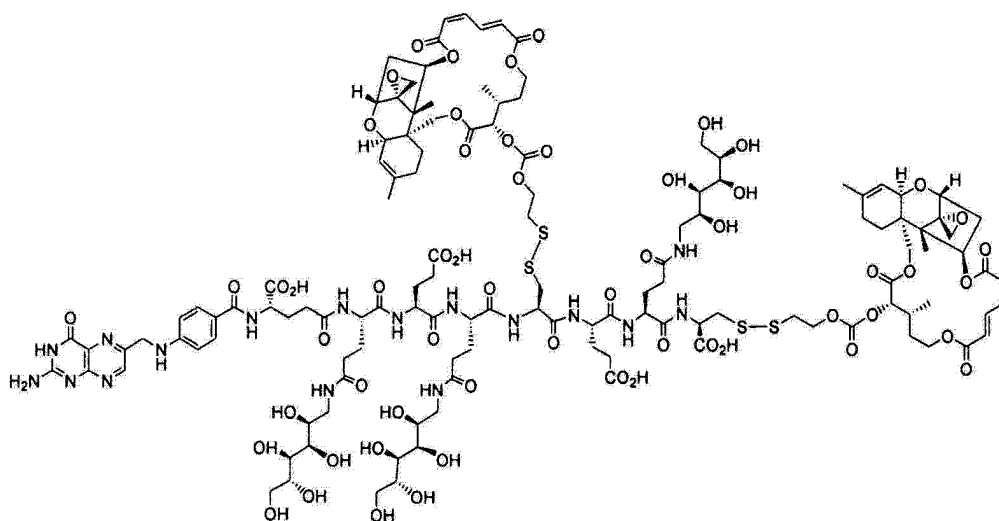
[0684] EC0693 多柔比星和多药物共轭物的中间物的共轭物。C115H149N19O49S3, MW 2677.71, 精确质量 :2675.89

[0685]



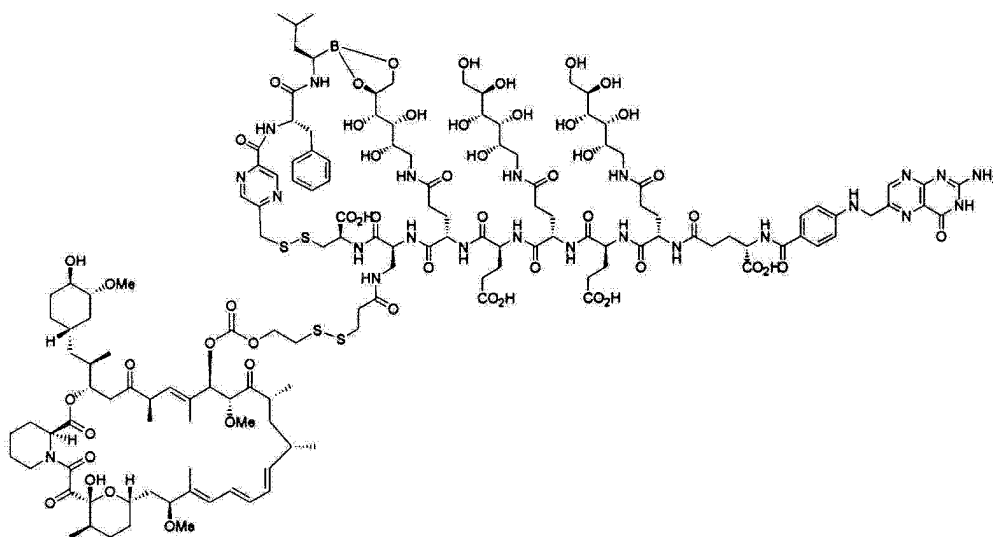
[0686] EC0647 二氢蝶呤共轭物。C110H147N33O45S4, MW, 2779.80, 精确质量 :2777.9112, m/z :2778.91 (100.0%), 2777.91 (74.4%), 2779.92 (62.2%)

[0687]



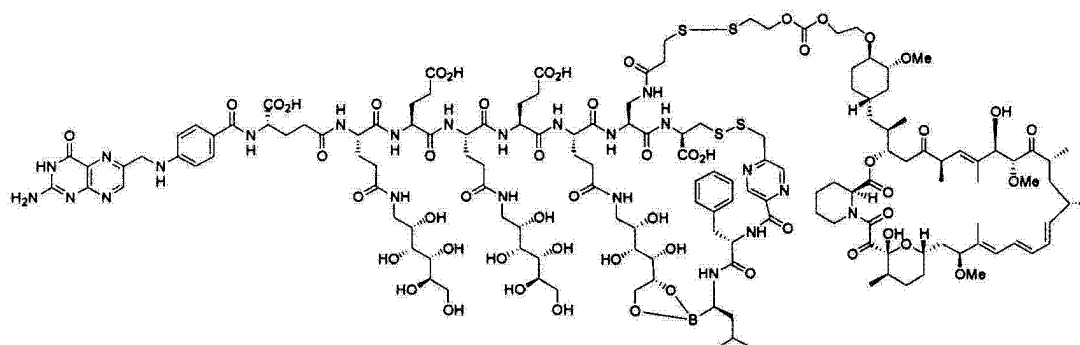
[0688] EC0605 二-verucarin 共轭物。

[0689]



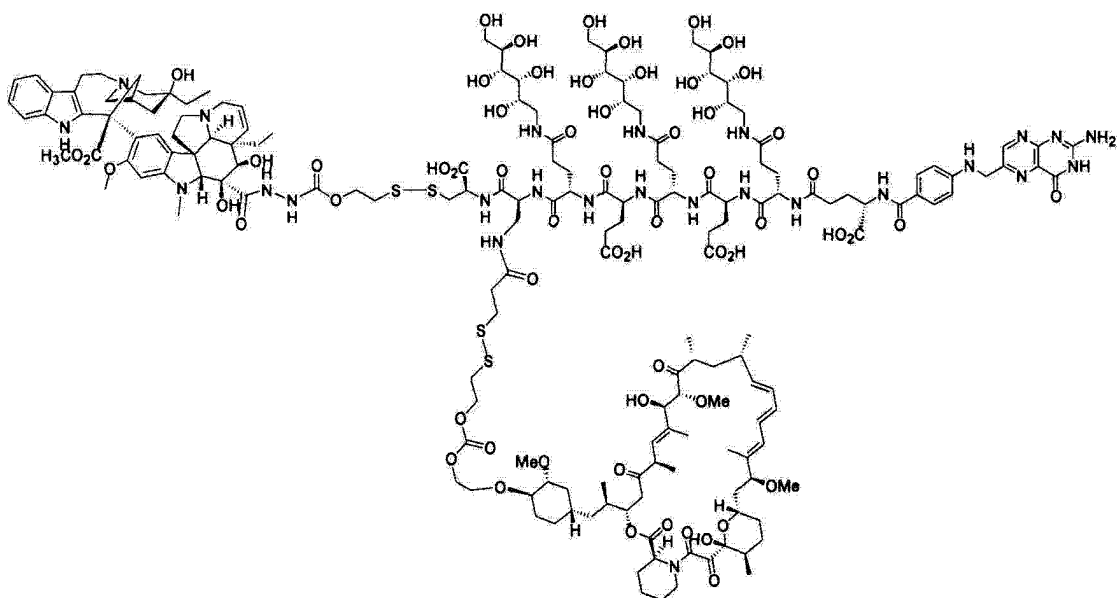
[0690] EC0563 Bortezomib 和雷帕霉素的共轭物。

[0691]



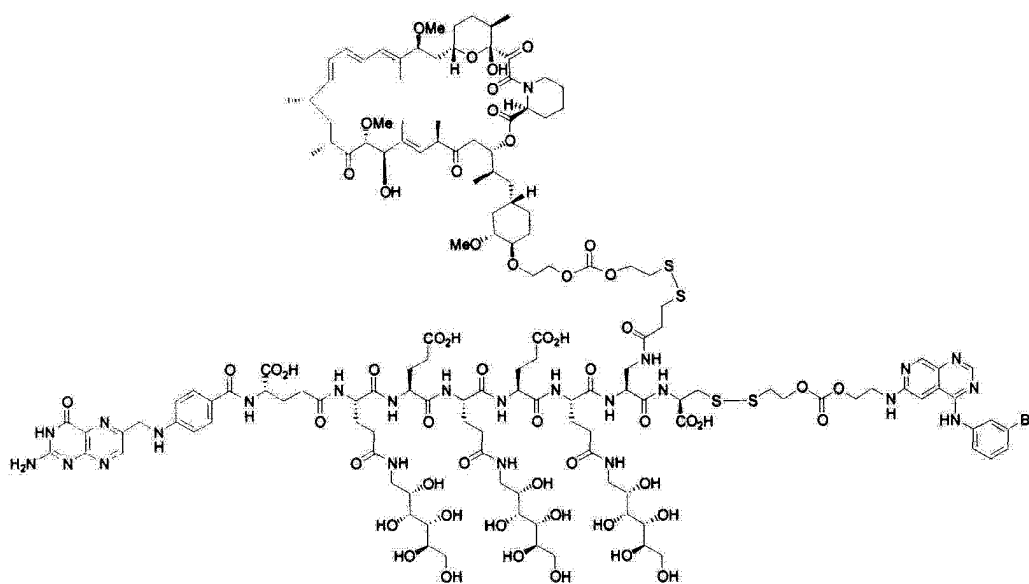
[0692] EC0582 Bortezomib 和依维莫司的共轭物。C₁₄₇H₂₁₄BN₂₃O₅₄S₄, C, 53.40 ;H, 6.52 ;
B, 0.33 ;N, 9.74 ;O, 26.13 ;S, 3.88, MW 3306.47, 精确质量 :3304.37

[0693]



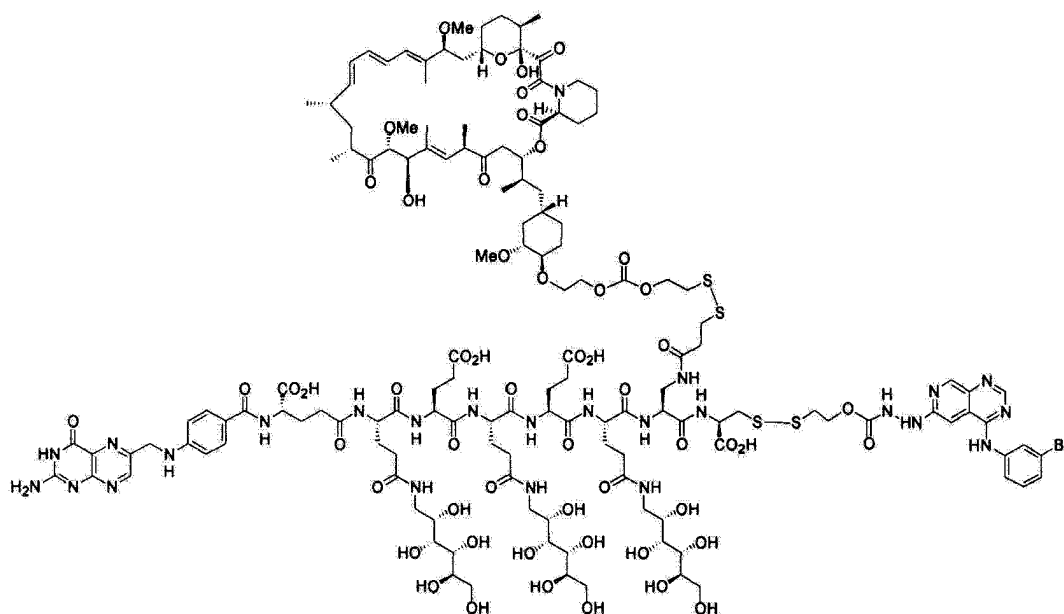
[0694] EC0636 DAVLBH和依维莫司的共轭物。C173H251N25O61S4, MW 3785.23, 精确质量: 3782.62

[0695]



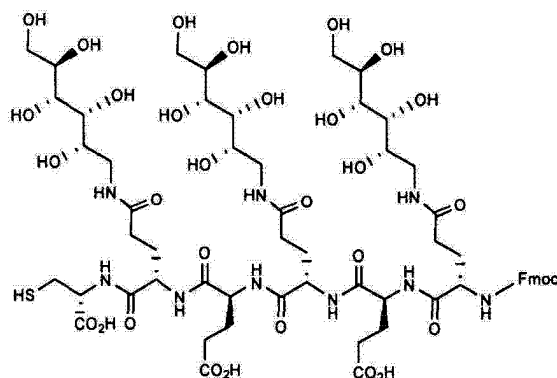
[0696] EC0664 依维莫司和 4-[(3-溴苯基)氨基]-6-氨基-吡啶并[3,4-d]嘧啶的共轭物。C145H209BrN24O55S4, MW 3376.51, 精确质量: 3373.24

[0697]



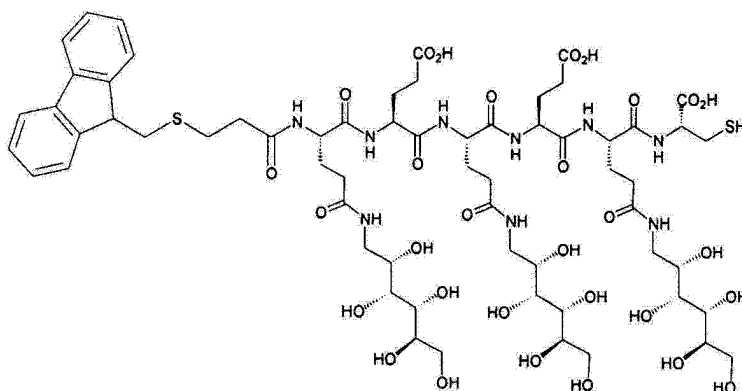
[0698] EC0680 依维莫司和 4-[(3-溴苯基)氨基]-6-胍基-吡啶并[3,4-d]嘧啶的共轭物。C143H206BrN25O54S4, MW 3347.47, 精确质量: 3344.22

[0699]



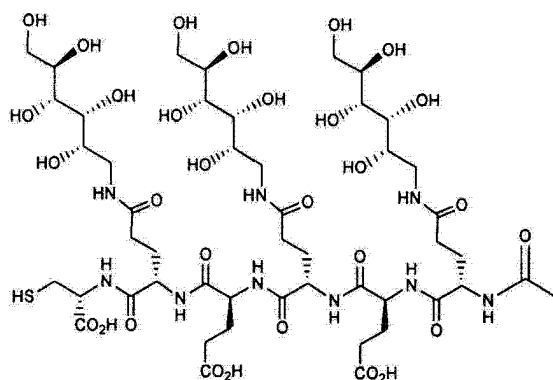
[0700] EC0584 任选的非靶向递送的中间物。C61H91N9O31S, MW 1478.48, 精确质量: 1477.55

[0701]



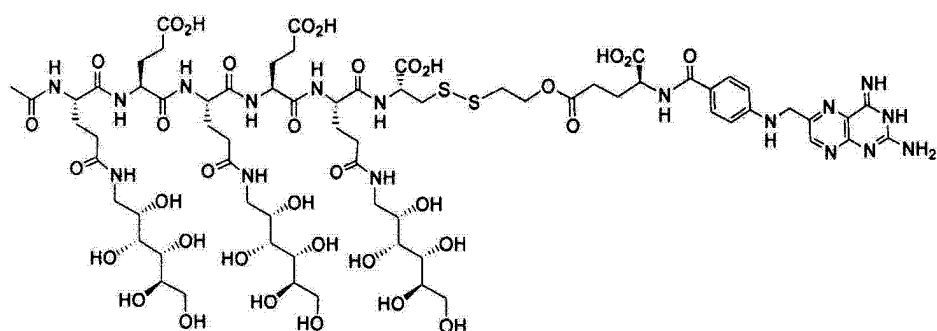
[0702] EC0634 任选的非靶向递送的中间物。C63H95N9O30S2, MW 1522.60, 精确质量: 1521.56

[0703]



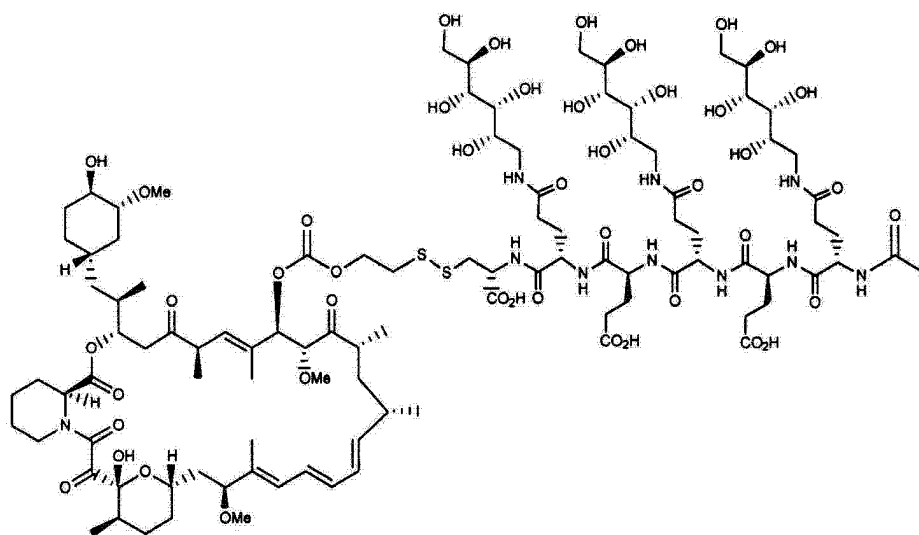
[0704] EC0586 任选的非靶向递送的中间物。C₄₈H₈₃N₉O₃₀S, MW 1298.28, 精确质量: 1297.50

[0705]



[0706] EC0588 任选的非靶向递送的氨蝶呤共轭物中间物。C₆₉H₁₀₅N₁₇O₃₅S₂, MW 1796.79, 精确质量: 1795.64

[0707]



[0708] EC0591 任选的非靶向递送的雷帕霉素共轭物中间物。C₁₀₂H₁₆₄N₁₀O₄₅S₂, C, 52.93 ;H, 7.14 ;N, 6.05 ;O, 31.11 ;S, 2.77, MW 2314.57, 精确质量: 2313.03。

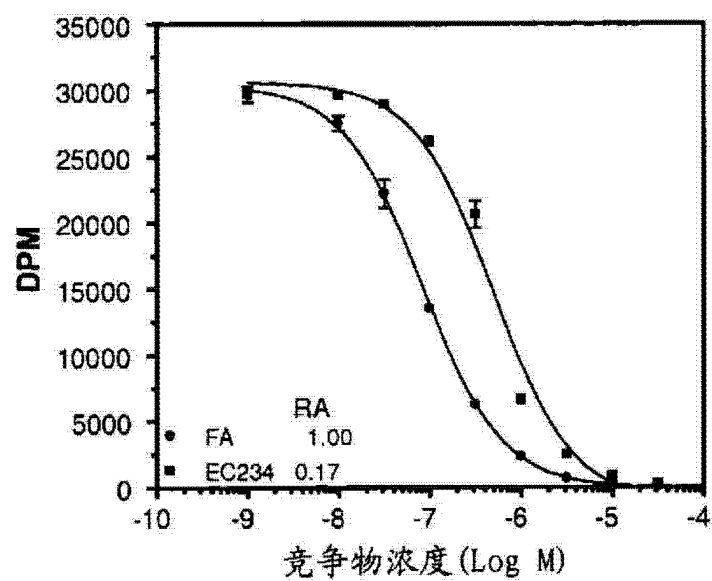


图 1

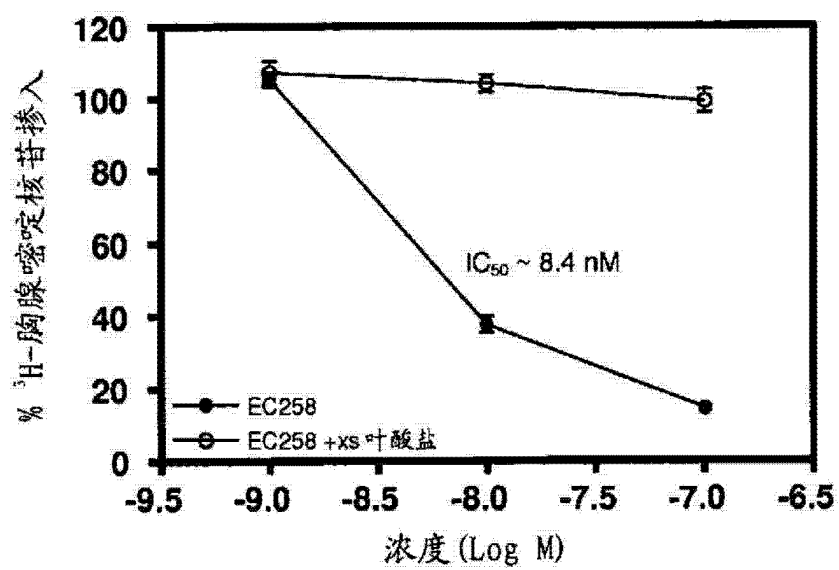


图 2

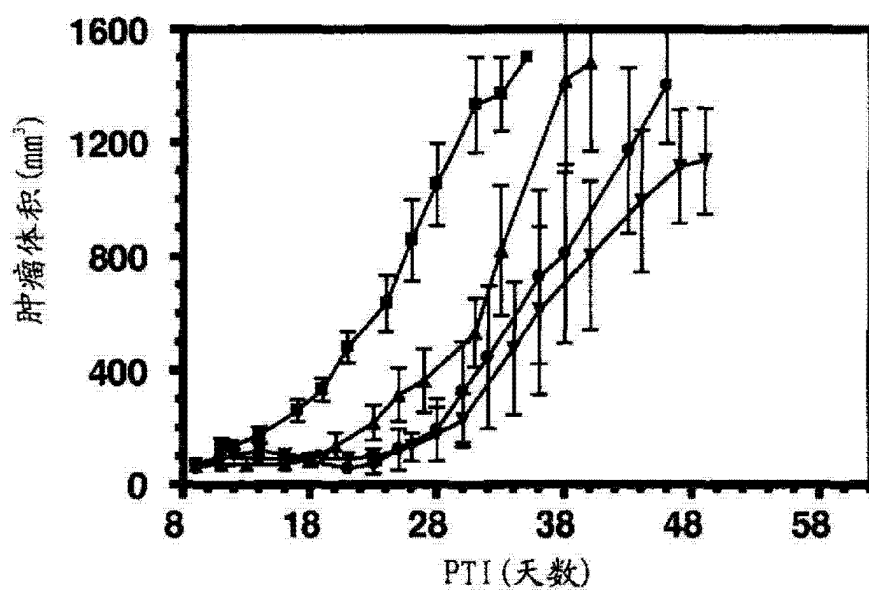


图 3A

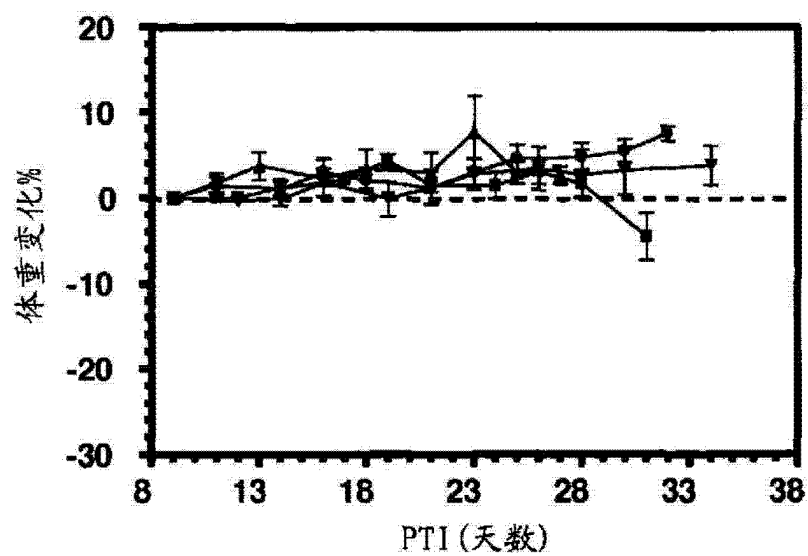


图 3B

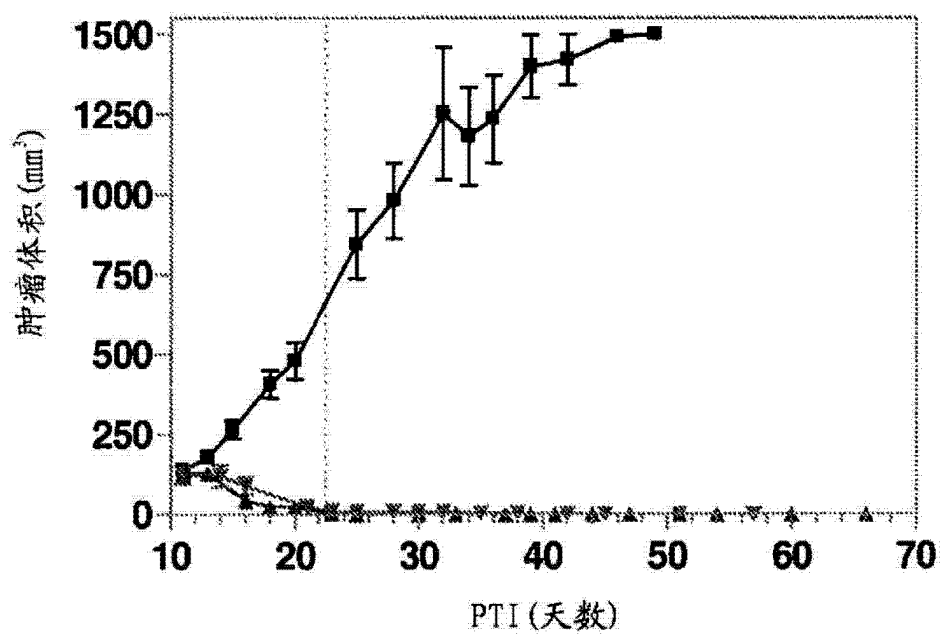


图 4A

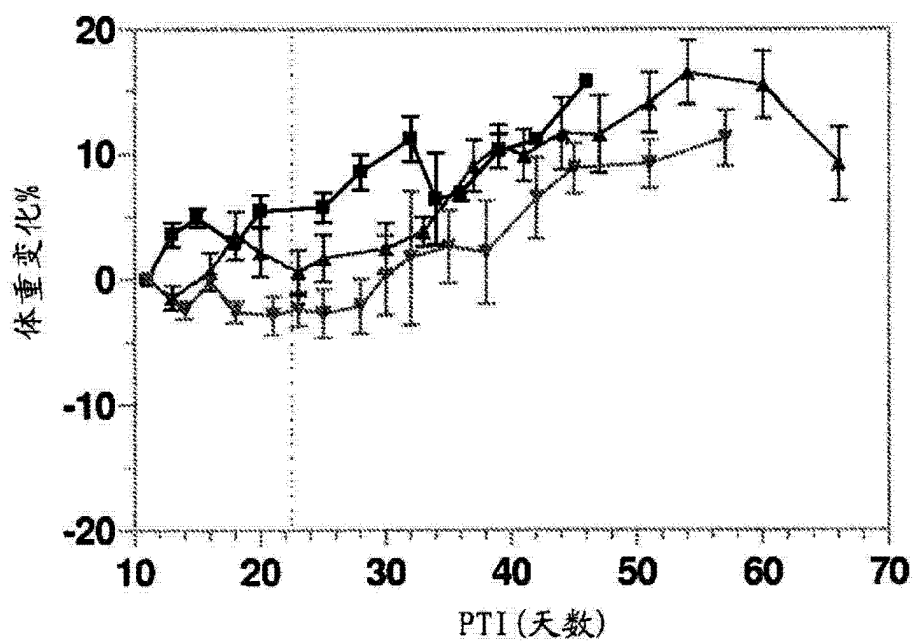


图 4B

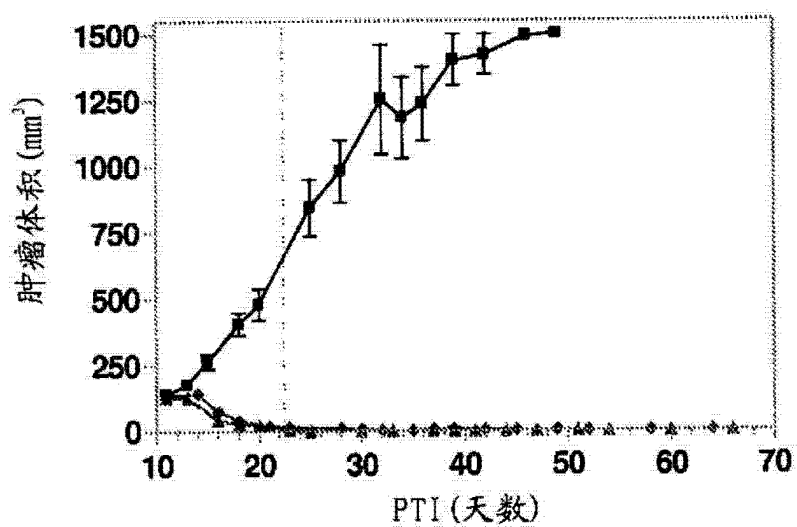


图 5A

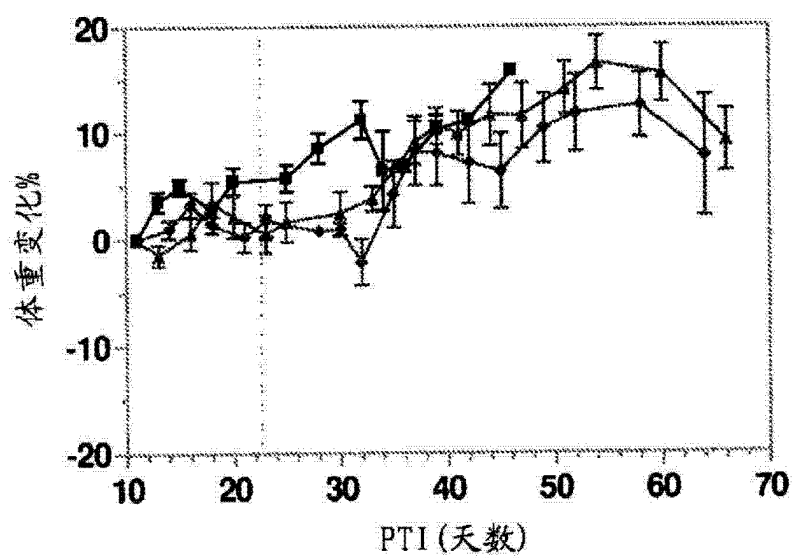


图 5B

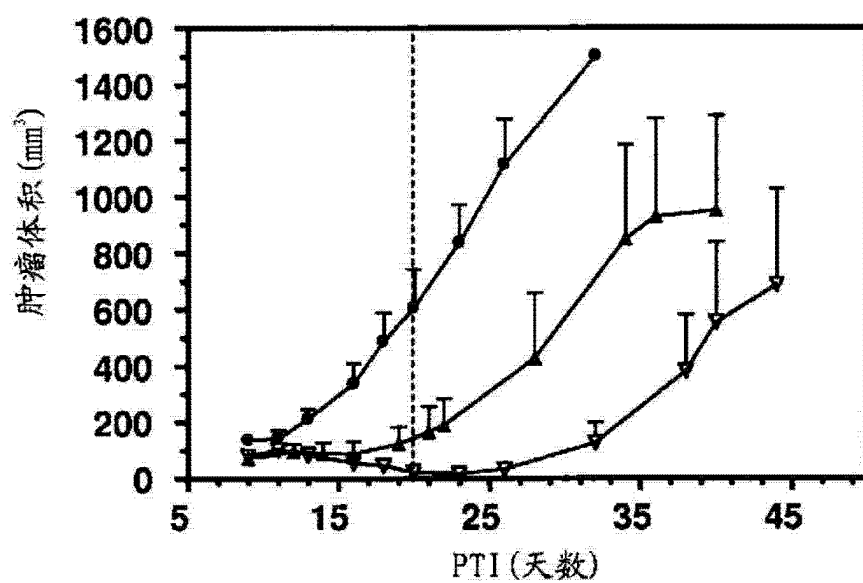


图 6A

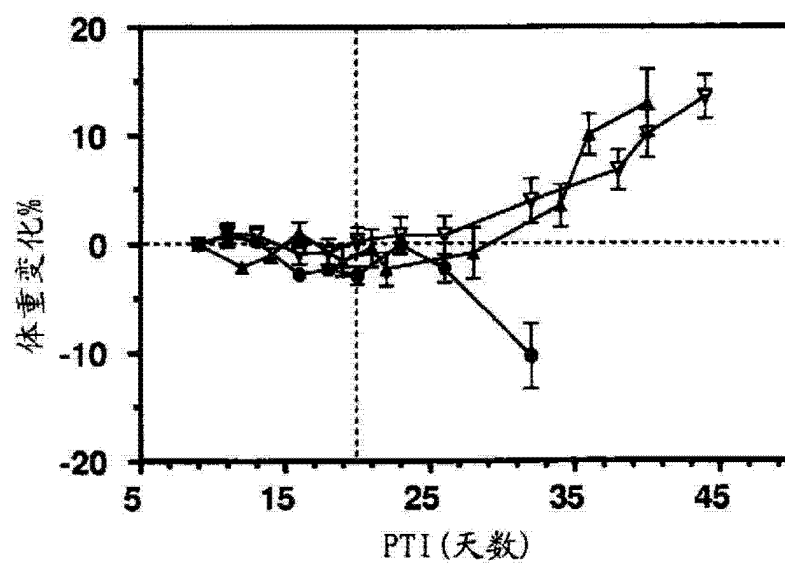


图 6B

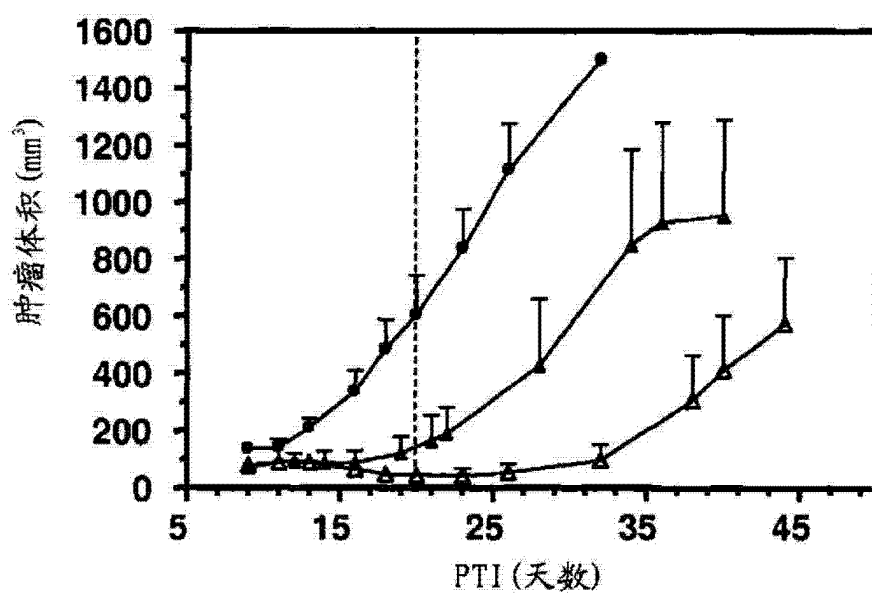


图 7A

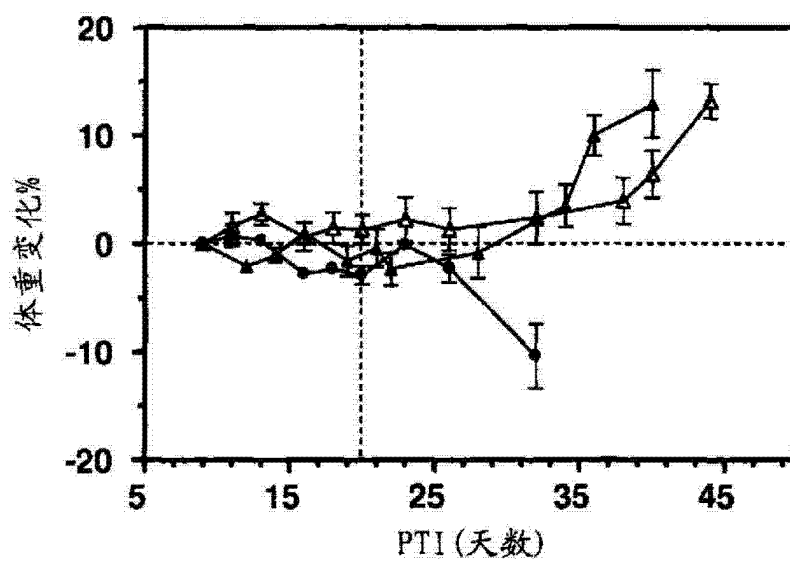


图 7B

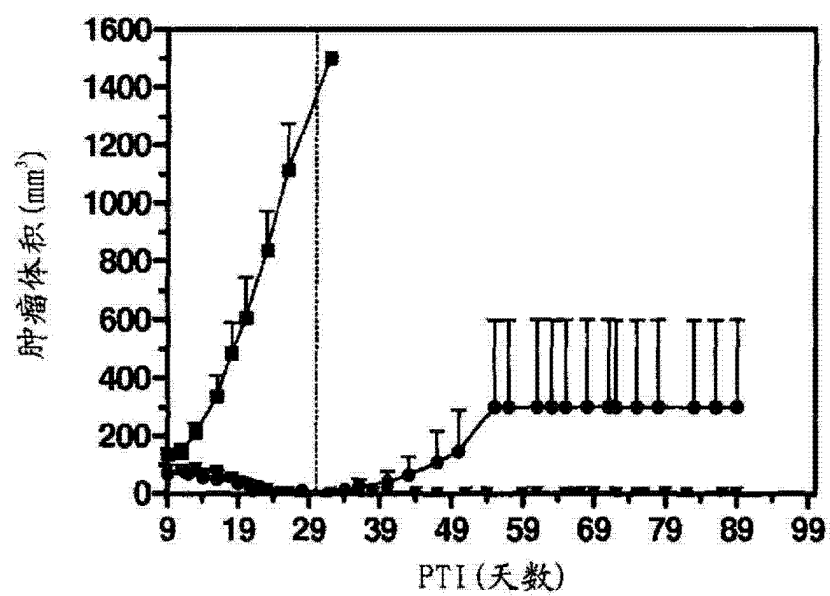


图 8A

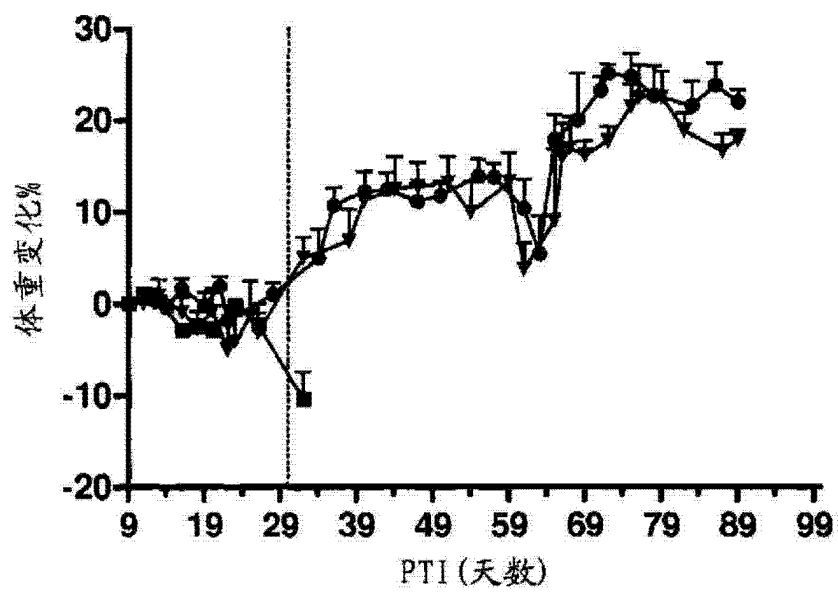


图 8B

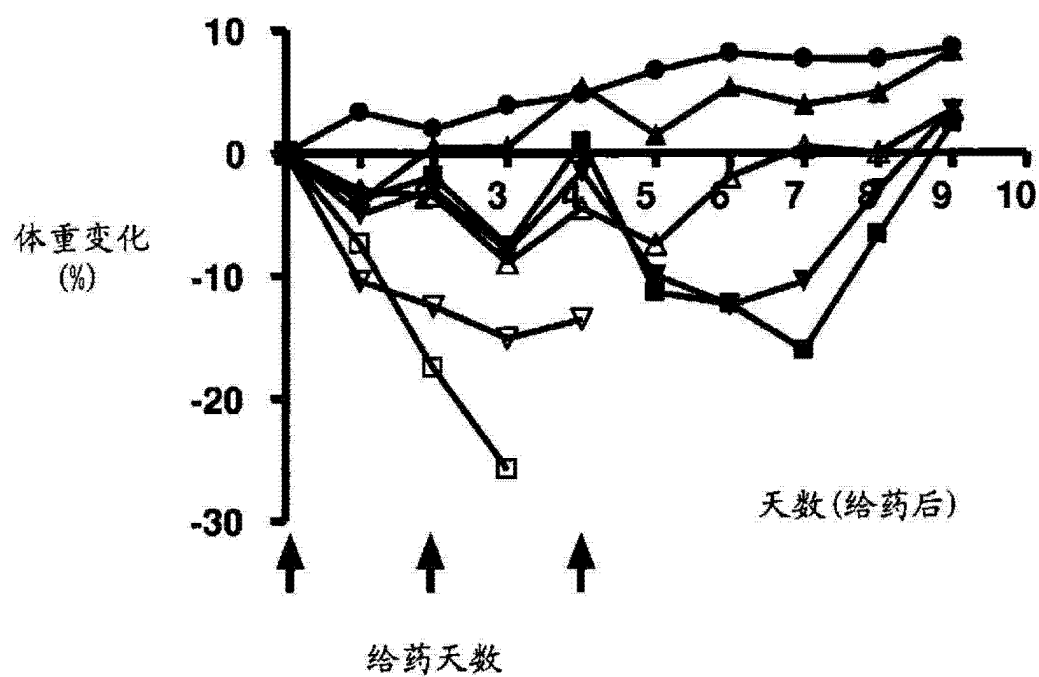


图 9

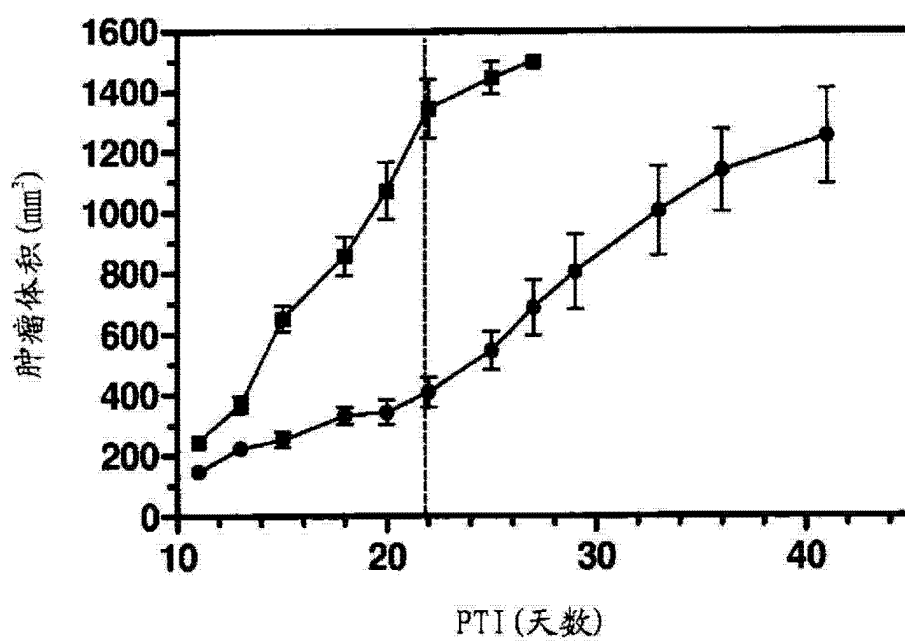


图 10A

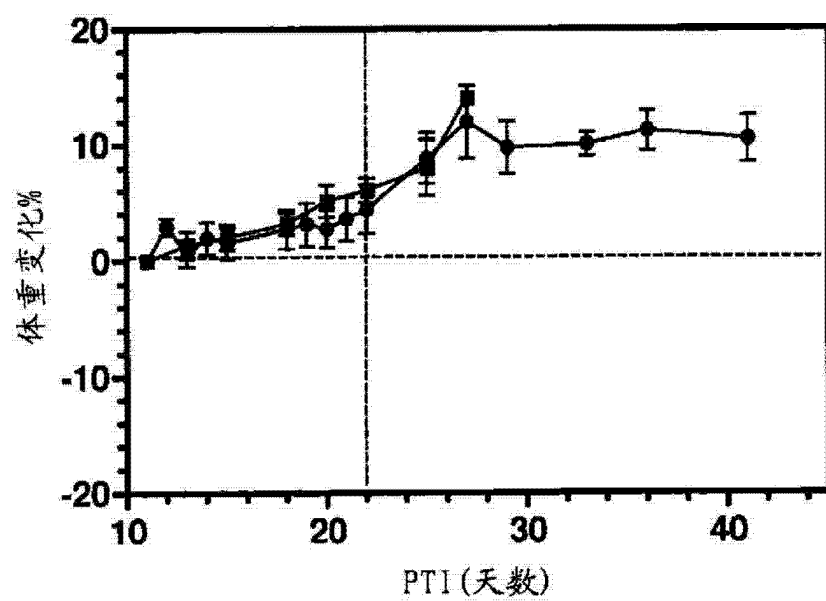


图 10B

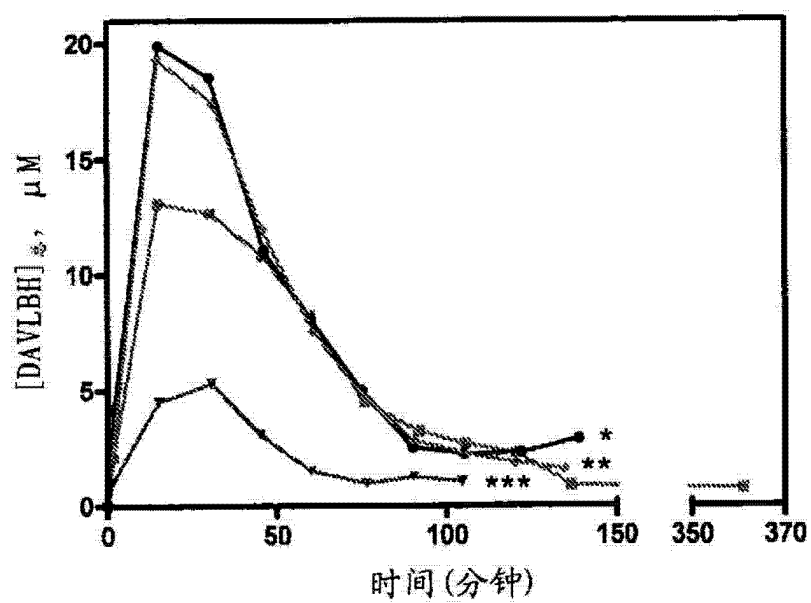


图 11

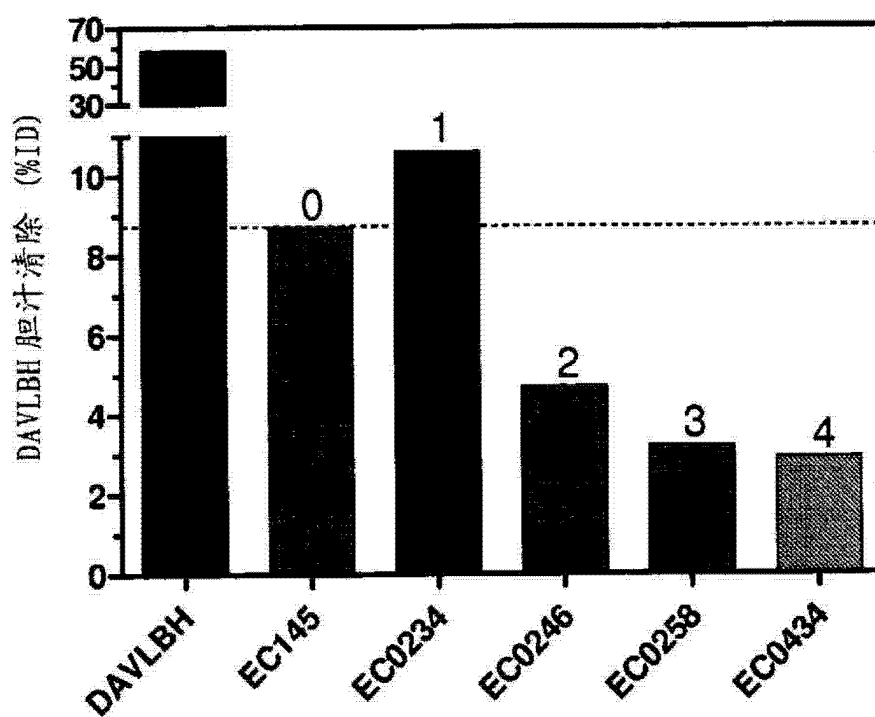


图 12

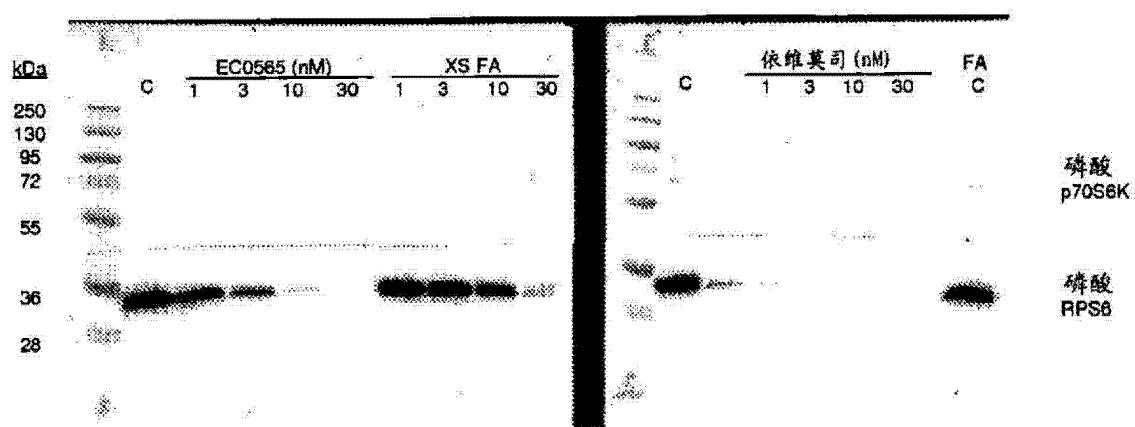


图 13

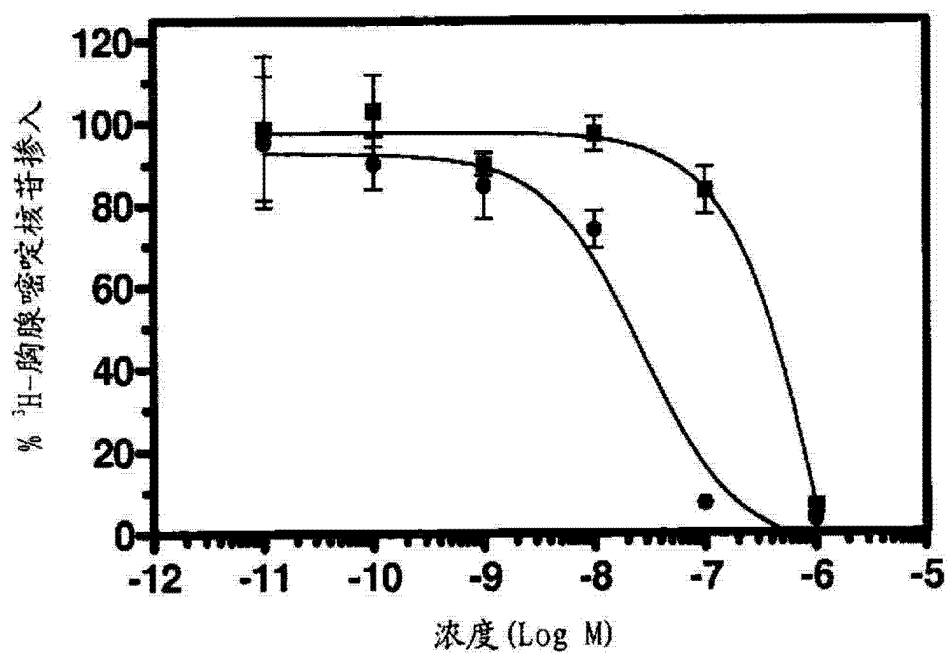


图 14

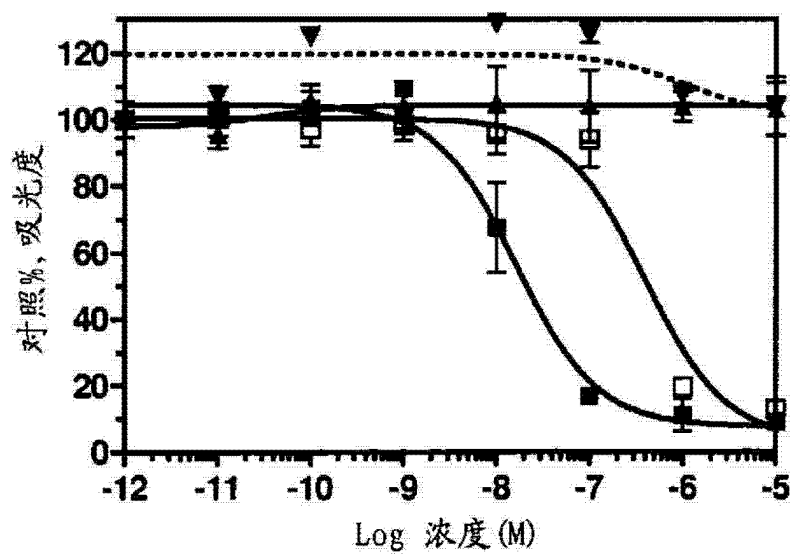


图 15

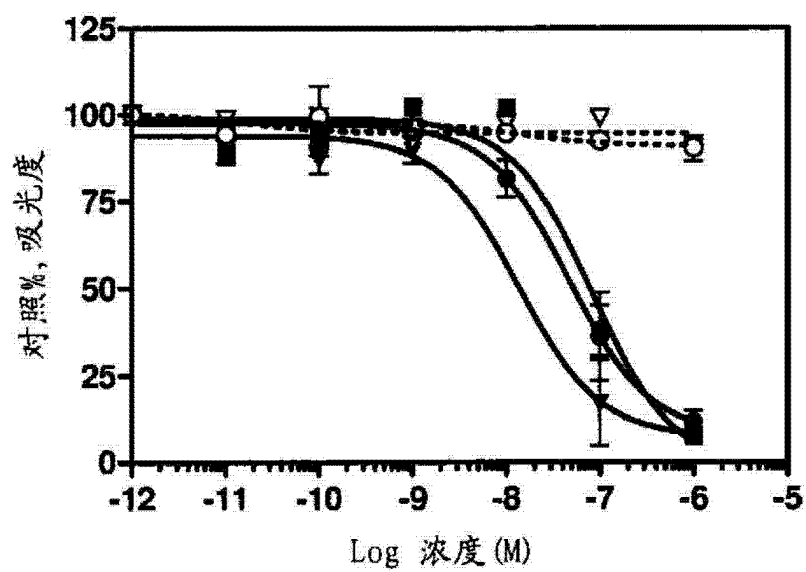


图 16

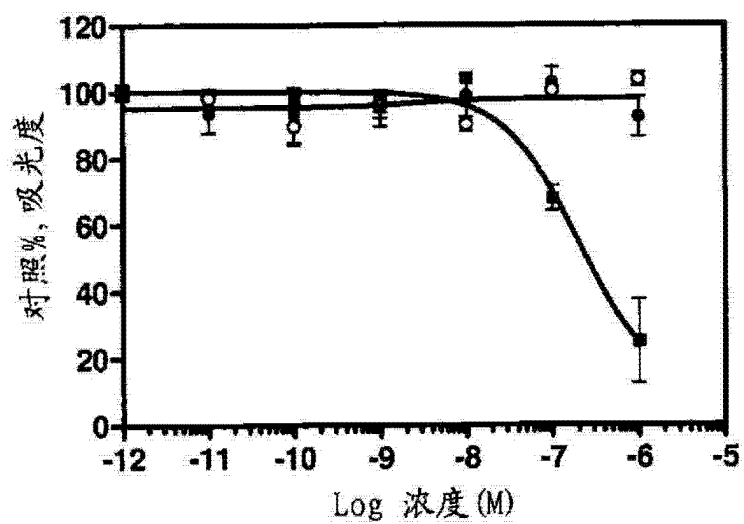


图 17

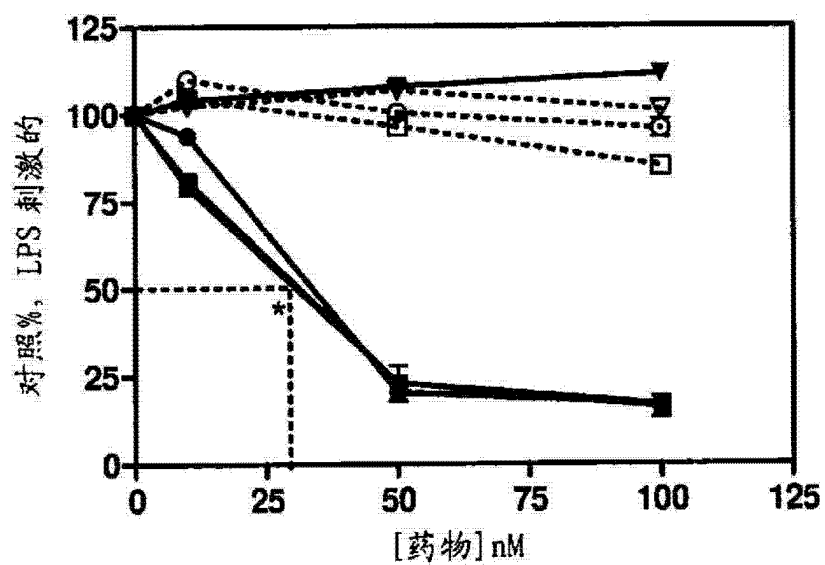


图 18

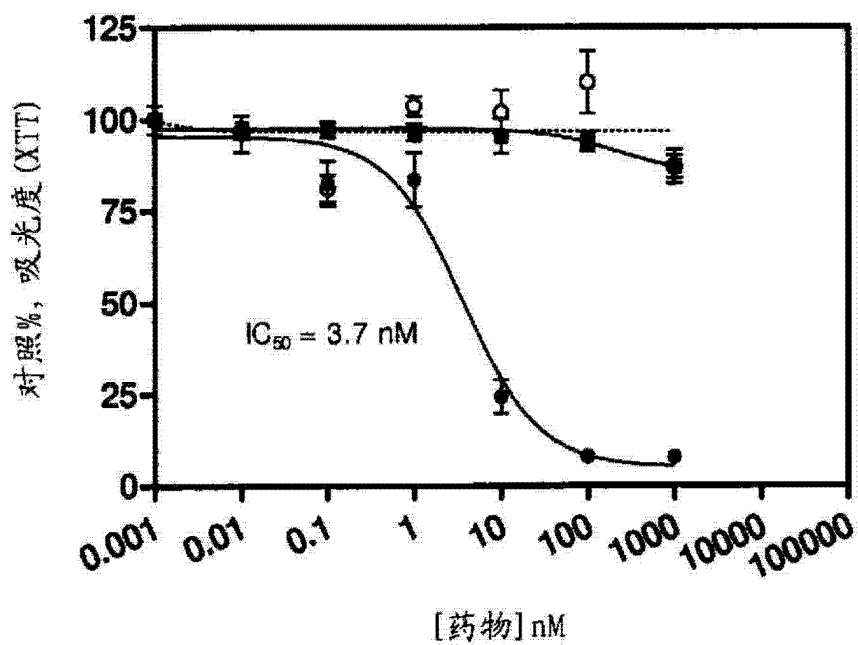


图 19

Abstract

Described herein are compositions and methods for use in targeted drug delivery using cell-surface receptor binding drug delivery conjugates containing hydrophilic spacer linkers for use in treating disease states caused by pathogenic cell populations.

FIGURE 5A

