



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119970617 A

(43) 申请公布日 2025. 05. 13

(21) 申请号 202411655990.2 A61K 38/26 (2006.01)
(22) 申请日 2020.04.03 A61K 38/28 (2006.01)
(30) 优先权数据 A61K 47/60 (2017.01)
62/830,280 2019.04.05 US A61P 3/10 (2006.01)
A61K 47/54 (2017.01)

(62) 分案原申请数据
202080041310.1 2020.04.03

(71) 申请人 普罗林科斯有限责任公司
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 G·W·阿什利 B·赫恩 S·方丹
E·L·施奈德

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100
专利代理师 陶家蓉 杨昀

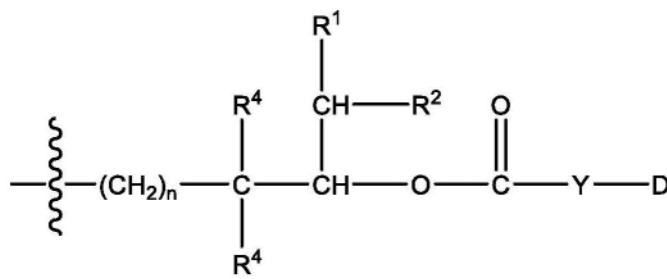
(51) Int. Cl.
A61K 9/06 (2006.01)

权利要求书4页 说明书37页
序列表 (电子公布) 附图10页

(54) 发明名称
改良偶联接头

(57) 摘要
本发明提供了适合于小分子、肽和蛋白质偶联的 β -消除接头以及包含该接头的化合物。

1. 一种水凝胶, 包含下式的接头-药物 (L-D):



其中:

n 是 0-6 的整数;

R^1 为 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{COR}^3$ 、 $-\text{SOR}^3$ 、或 $-\text{SO}_2\text{R}^3$, 其中 R^3 为 H、任选取代的烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、 $-\text{OR}^8$ 或 $-\text{NR}^8_2$, 其中每个 R^8 独立地为 H 或任选取代的烷基, 或者两个 R^8 基团与它们所连接的氮一起形成杂环; 或 SR^9 , 其中 R^9 为任选取代的烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基或任选取代的杂芳烷基;

R^2 是 H;

每个 R^4 独立地为 C_1 - C_3 烷基或两个 R^4 与它们连接的碳原子一起形成 3-6 元环;

Y 不存在或是 $-\text{N}(\text{R}^6)\text{CH}_2-$; 其中 R^6 是任选取代的 C_1 - C_6 烷基或任选取代的芳基或杂芳基;

$\text{}$ 是接头-药物与大分子载体的连接点。

2. 如权利要求 1 所述的水凝胶, 其中每个 R^4 独立地是 C_1 - C_3 烷基。

3. 如权利要求 1 所述的水凝胶, 其中每个 R^4 是甲基。

4. 如权利要求 1-3 任一所述的水凝胶, 其中 R^1 是 CN 或 $-\text{SO}_2\text{R}^3$ 。

5. 如权利要求 1-3 任一所述的水凝胶, 其中 R^1 是 $-\text{CN}$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{SO}_2\text{Ph}$ 、 $-\text{SO}_2\text{PhCl}$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}$ 、 $-\text{SO}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 或 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3)_2$ 。

6. 如权利要求 1 所述的水凝胶, 其中 n 是从 1 至 3 的整数。

7. 如权利要求 1 所述的水凝胶, 其中 D 是肽药物。

8. 如权利要求 7 所述的水凝胶, 其中所述肽药物是 [N28Q] 艾塞那肽、赖脯胰岛素或替度鲁肽。

9. 如权利要求 1 所述的水凝胶, 其中 D 是蛋白质药物。

10. 如权利要求 1 所述的水凝胶, 其中 Y 不存在。

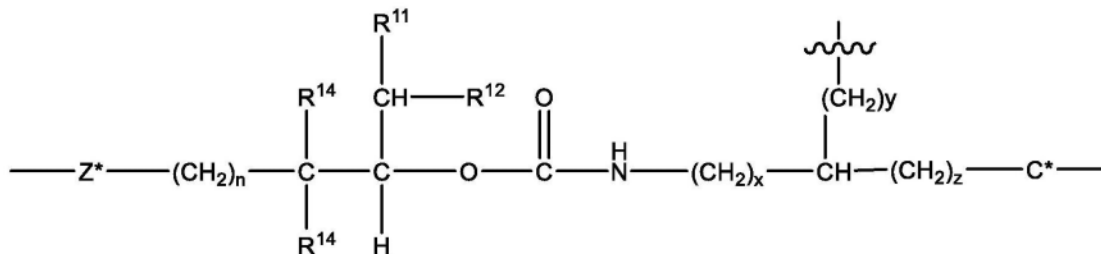
11. 如权利要求 1-3 或 6-10 任一所述的水凝胶, 其中接头-药物单元与大分子载体通过甲酰胺、脲、1,2,3-三唑、硫醚、硫代琥珀酰亚胺或醚基团连接。

12. 如权利要求 11 所述的水凝胶, 其中接头-药物单元与大分子载体通过 1,2,3-三唑基团连接。

13. 如权利要求 1-3 或 6-10 任一所述的水凝胶, 其中大分子载体包括具有多臂链的交联聚合物。

14. 如权利要求 13 所述的水凝胶, 其中大分子载体包括 r -臂聚合物, 其中 r 是 2 到 8 之间的整数。

15. 如权利要求13所述的水凝胶,其中r是4。
16. 如权利要求14或15所述的水凝胶,其中r-臂聚合物是聚乙二醇(PEG)化的聚合物。
17. 如权利要求16所述的水凝胶,其中r是4。
18. 如权利要求14-17任一所述的水凝胶,其中r-臂聚合物通过可裂解接头连接。
19. 如权利要求18所述的水凝胶,其中可裂解接头具有下式:



其中:

Z*和C*独立地为将可裂解接头与r-臂聚合物连接的连接性基团;

n是0-6的整数;

x、y、z独立的是0到6的整数;

R¹¹为-CN、-NO₂、-COR³、-SOR³、或-SO₂R¹³,其中R¹³为H、任选取代的烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、-OR¹⁸或-NR¹⁸,其中每个R¹⁸独立地为H或任选取代的烷基,或者两个R¹⁸基团与它们所连接的氮一起形成杂环;或SR¹⁹,其中R¹⁹为任选取代的烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基或任选取代的杂芳烷基;

R¹²是H;

每个R¹⁴独立地为C₁-C₃烷基或两个R¹⁴与它们连接的碳原子一起形成3-6元环;

~~~~~是与权利要求1的接头-药物的连接点。

20. 如权利要求19所述的水凝胶,其中每个R<sup>14</sup>独立地是C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基。

21. 如权利要求20所述的水凝胶,其中每个R<sup>14</sup>是甲基。

22. 如权利要求19-21任一所述的水凝胶,其中R<sup>11</sup>是CN或-SO<sub>2</sub>R<sup>13</sup>。

23. 如权利要求22所述的水凝胶,其中R<sup>11</sup>是-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>。

24. 如权利要求19-23任一所述的水凝胶,其中Z\*和C\*独立包含酰胺、甲酰胺、脒、1,2,3-三唑、硫代琥珀酰亚胺或硫醚基团。

25. 如权利要求24所述的水凝胶,其中Z\*包括1,2,3-三唑基团。

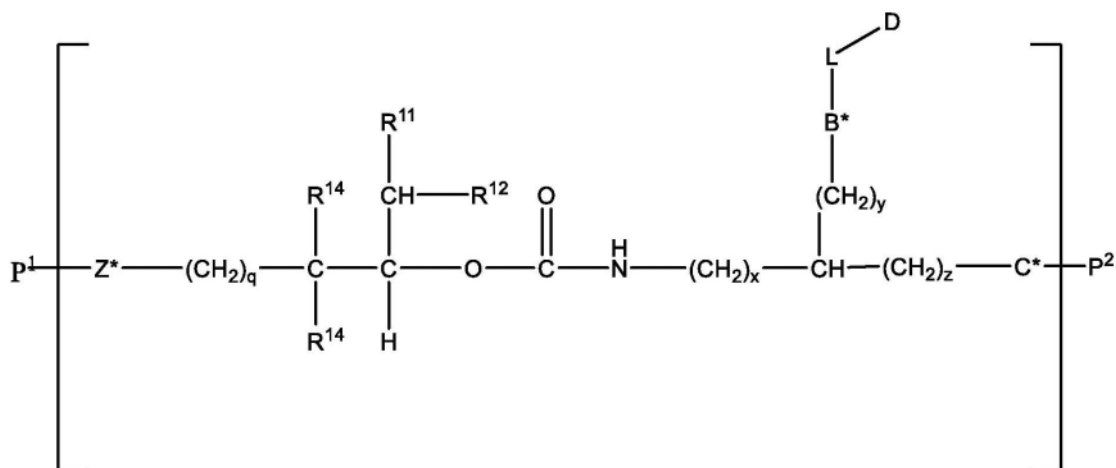
26. 如权利要求23或24所述的水凝胶,其中C\*包括酰胺基团。

27. 如权利要求26任一所述的水凝胶,其中Z\*通过包含叠氮基团的第一基团和包含环辛炔基团的第二基团之间的反应产生。

28. 如权利要求27所述的水凝胶,其中第二基团是双环壬炔基或环辛炔基。

29. 如权利要求19-21中任一项所述的水凝胶,其中x为0,z为0。

30. 一种水凝胶,其包括由可裂解交联剂交联的重复聚合单元(P<sup>1</sup>-P<sup>2</sup>),并进一步包括接头-药物(L-D),其中所述水凝胶具有以下式:



其中:

$\text{P}^1$ 和 $\text{P}^2$ 为独立的 $r$ 臂聚乙二醇化聚合物,其中 $r$ 为2至8的整数;

$\text{Z}^*$ 和 $\text{C}^*$ 独立地为将可裂解接头与 $r$ -臂聚合物连接的连接性基团;

$q$ 是0-6的整数;

$x$ 、 $y$ 、 $z$ 独立的是0到6的整数;

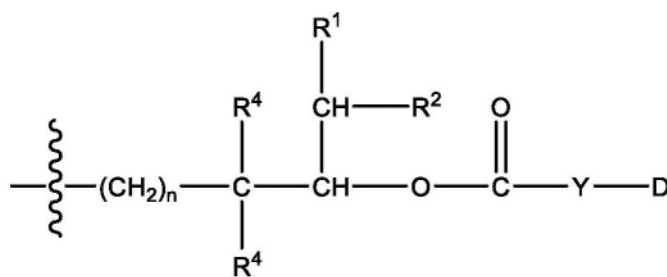
$\text{R}^{11}$ 为 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{COR}^{13}$ 、 $-\text{SOR}^{13}$ 、或 $-\text{SO}_2\text{R}^{13}$ ,其中 $\text{R}^{13}$ 为 $\text{H}$ 、任选取代的烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、 $-\text{OR}^{18}$ 或 $-\text{NR}_2^{18}$ ,其中每个 $\text{R}^{18}$ 独立地为 $\text{H}$ 或任选取代的烷基,或者两个 $\text{R}^{18}$ 基团与它们所连接的氮一起形成杂环;或 $\text{SR}^{19}$ ,其中 $\text{R}^{19}$ 为任选取代的烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基或任选取代的杂芳烷基;

$\text{R}^{12}$ 是 $\text{H}$ ;

每个 $\text{R}^{14}$ 独立地为 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基或两个 $\text{R}^{14}$ 与它们连接的碳原子一起形成3-6元环;

$\text{B}$ 是将可裂解交联剂与接头-药物( $\text{L-D}$ )接合的连接性基团,和

$\text{L-D}$ 具有下式:



其中:

$n$ 是0-6的整数;

$\text{R}^1$ 为 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{COR}^3$ 、 $-\text{SOR}^3$ 、或 $-\text{SO}_2\text{R}^3$ ,其中 $\text{R}^3$ 为 $\text{H}$ 、任选取代的烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、 $-\text{OR}^8$ 或 $-\text{NR}_2^8$ ,其中每个 $\text{R}^8$ 独立地为 $\text{H}$ 或任选取代的烷基,或者两个 $\text{R}^8$ 基团与它们所连接的氮一起形成杂环;或 $\text{SR}^9$ ,其中 $\text{R}^9$ 为任选取代的烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基或任选取代的杂芳烷基;

$\text{R}^2$ 是 $\text{H}$ ;

每个 $R^4$ 独立地为 $C_1-C_3$ 烷基或两个 $R^4$ 与它们连接的碳原子一起形成3-6元环；  
Y不存在或是 $-N(R^6)CH_2-$ ；其中 $R^6$ 是任选取代的 $C_1-C_6$ 烷基或任选取代的芳基或杂芳基；



是接头-药物(L-D)与B\*的连接点。

31. 如权利要求30所述的水凝胶,其中每个 $R^4$ 独立地是 $C_1-C_3$ 烷基。
32. 如权利要求30所述的水凝胶,其中每个 $R^4$ 是甲基。
33. 如权利要求30-32任一所述的水凝胶,其中 $R^1$ 是CN或 $-SO_2R^3$ 。
34. 如权利要求33所述的水凝胶,其中 $R^1$ 是 $-CN$ 、 $-SO_2N(CH_3)_2$ 、 $-SO_2CH_3$ 、 $-SO_2Ph$ 、 $-SO_2PhCl$ 、 $-SO_2N(CH_2CH_2)_2O$ 、 $-SO_2CH(CH_3)_2$ 、 $-SO_2N(CH_3)(CH_2CH_3)$ 或 $-SO_2N(CH_2CH_2OCH_3)_2$ 。
35. 如权利要求30-32任一所述的水凝胶,其中n是从1至3的整数。
36. 如权利要求30-32任一所述的水凝胶,其中D是肽药物。
37. 如权利要求36所述的水凝胶,其中所述肽药物是[N28Q]艾塞那肽、赖脯胰岛素或替度鲁肽。
38. 如权利要求30-32所述的水凝胶,其中D是蛋白质药物。
39. 如权利要求30-32任一所述的水凝胶,其中Y不存在。
40. 如权利要求30-32任一所述的水凝胶,其中B\*包括甲酰胺、酰胺、脞、1,2,3-三唑、硫醚、硫代琥珀酰亚胺或醚基团。
41. 如权利要求40所述的水凝胶,其中B\*包括1,2,3-三唑基团。
42. 如权利要求30-32任一所述的水凝胶,其中每个 $R^{14}$ 独立地是 $C_1-C_3$ 烷基。
43. 如权利要求42所述的水凝胶,其中每个 $R^{14}$ 是甲基。
44. 如权利要求30-32任一所述的水凝胶,其中 $R^{11}$ 是CN或 $-SO_2R^3$ 。
45. 如权利要求44所述的水凝胶,其中 $R^{11}$ 是 $-SO_2CH_3$ 。

## 改良偶联接头

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2019年4月5提交的美国临时申请第62/830,280号的优先权,其内容通过引用全文纳入本文。

通过引用纳入序列表

[0002] 电子格式的序列表随本申请一同提交。序列表以标题为670572002140SeqList.txt的文件提供,其创建2020年4月3日,,大小为2,112字节。序列表的电子格式的信息通过引用其全文方式纳入本文。

### 技术领域

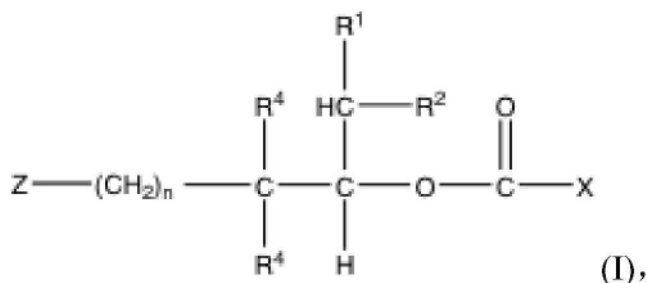
[0003] 本发明一般涉及适合于小分子、肽、寡核苷酸和蛋白质偶联的 $\beta$ -消除接头以及包含该接头的化合物。

### 背景技术

[0004] 药物分子与大分子载体共价结合,以提高药物的性质如半衰期、稳定性、可溶性、耐受性和安全性。美国专利号8,680,315、8,754,190和9,649,385公开了具有 $\beta$ -消除接头的药物偶联物系统,其允许通过速率受控的 $\beta$ -消除机制释放药物。然而,随着释放的药物或切断的交联, $\beta$ -消除过程产生结合到大分子载体的接头残基,该大分子载体包含可被激活以进行亲核加成的烯基。如图1所示,生理条件下此加成的潜在亲核剂包括硫醇和胺,例如,蛋白质上大量存在的硫醇和胺或更可能是从水凝胶中切断交联释放的胺。虽然预计胺会质子化而在生理pH值下不起反应,但出乎意料的发现,这种氮杂迈克尔加成至少在体外环境中发生。如图2所示,先前公开的接头(即,美国专利号8,680,315和8,754,190)通过在具有离去氧的碳上添加烷基(相当于美国专利号8680315的式(I)中的基团 $R^5$ )提供了解决该不期望反应的方法。需要可以更有效地抑制不期望的氮杂迈克尔加成的改良接头。

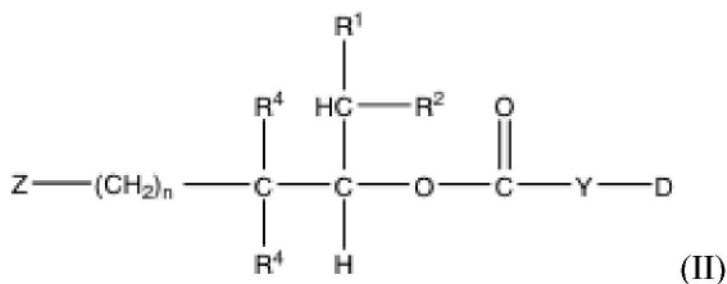
### 发明内容

[0005] 在一方面,提供式I的接头:



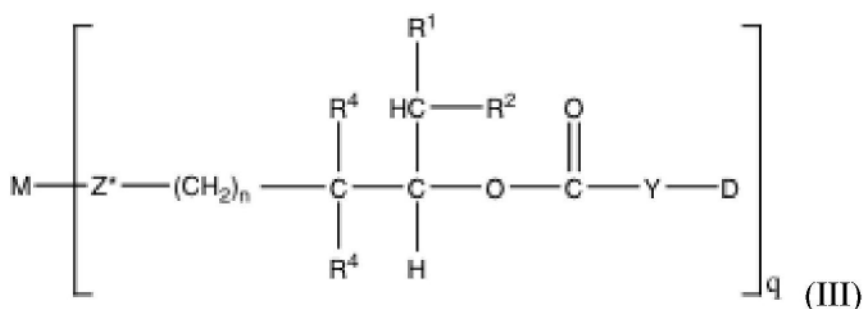
其中 $n$ ,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^4$ ,  $X$ , 和  $Z$  如本文公开。在一些实施方式中,接头是 $\beta$ -消除接头。在一些实施方式中, $\beta$ -消除接头适于小分子、肽和蛋白质治疗物的偶联。

[0006] 在另一方面,提供式(II)的接头-药物:



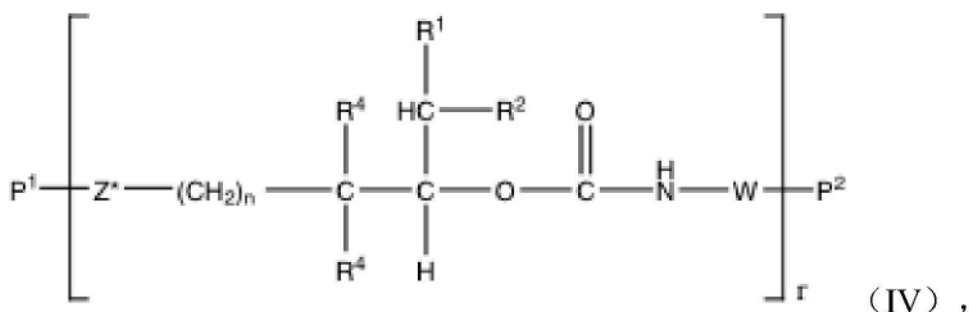
其中 $n, \text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^4, \text{Y}, \text{Z}$ 和 $\text{D}$ 如本文公开。在一些实施方式中,式(II)的接头-药物通过将式(I)的接头与诸如小分子、肽或蛋白质等药物混合来制备。

[0007] 在另一方面,提供式(III)的偶联物:



其中 $n, q, \text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^4, \text{M}, \text{Y}, \text{Z}^*$ 和 $\text{D}$ 如本文公开。在一些实施方式中,式(III)的偶联物是药物 $\text{D}$ 的偶联物,通过式(I)的接头可释放地连接到大分子载体 $\text{M}$ 。

[0008] 在另一方面,提供式(IV)的水凝胶:



其中 $n, r, \text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^4, \text{W}, \text{Z}^*, \text{P}^1$ ,和 $\text{P}^2$ 如本文公开。在一些实施方式中,式(IV)化合物为可降解的交联水凝胶。在一些实施方式中,可降解的交联水凝胶包含式(I)接头的残基。

[0009] 在另一方面,提供了制备式(I)、(II)、(III)和(IV)的化合物的方法及其使用方法。在另一方面,提供了含有式(III)偶联物或式(IV)水凝胶的药物组合物。

## 附图简要说明

[0010] 图1示出了美国专利号9,649,385中公开的偶联物中氨基甲酸酯接头的断裂。完整的偶联物1经历pH依赖的 $\beta$ -消除反应,导致接头断裂,并形成接头剩余物2和游离胺3。这些产物可能经历随后可逆的氮杂-迈克尔反应,形成相对稳定的再加成物4。当 $\text{R}$ 是含胺药物或前药时,接头是药物释放性接头。当 $\text{R}$ 是第二PEG预聚物时,该接头是PEG水凝胶中交联剂的一部分。

[0011] 图2示出了美国专利号9,649,385中公开的偶联物中氨基甲酸酯接头的断裂,其中两个 $\text{R}^5$ 基团都是烷基。 $\text{R}^5$ 处烷基的空间位阻预计会减缓再加成过程。

[0012] 图3示出了本文公开的偶联物中  $\gamma$ -二取代氨基甲酸酯接头的断裂。

[0013] 图4显示了在不同pH值下将甘氨酸氮杂迈克尔加成到接头乙烯基砜中的速率。Std、 $\beta$ -Me和gem diMe接头的甘氨酸加合物浓度(mM)与时间(h)的棱柱图:A) pH 7.4, 1.0M甘氨酸; B) pH 8.4, 1.0M甘氨酸; C) pH 9.5, 0.1M甘氨酸。每个实验的表格数据, 包括kf、kr和K<sub>eq</sub>, 按照方法部分的描述进行计算。

[0014] 图5显示了 $\beta$ -N-甘氨酸酰甲基砜中甘氨酸的反-氮杂迈克尔消除速率。A) 每个接头的反氮杂迈克尔反应示意图。B) 甘氨酸加合物浓度( $\mu$ M)与时间(h)的棱柱图。Std接头,  $k_{\text{obs}} = 0.0030\text{h}^{-1}$ ;  $\beta$ -Me接头,  $k_{\text{obs}} = 0.0050\text{h}^{-1}$ ; gem diMe接头 $k_{\text{obs}} = 0.0060\text{h}^{-1}$ 。对于每个接头, 计算的[Gly-加合物]<sub>平衡</sub>  $\leq 1\mu\text{M}$ 。

[0015] 图6显示了包含式(IV)交联的水凝胶的示意性结构。

[0016] 图7显示了包含式(IV)交联的药物释放性水凝胶的示意性结构。式(II)的接头-药物(L-D)通过反应基团B连接到水凝胶。

[0017] 图8显示从实施例18的艾塞那肽释放性水凝胶微球偶联物释放的艾塞那肽[N28Q]的血浆浓度。在第0天, 向大鼠(n=3)皮下注射含有 $9.2\mu\text{mol/kg}$ 艾塞那肽[N28Q]的偶联物悬液。获得血浆样品, 并通过LC/MS进行分析。该偶联物在注射后至少84天内提供艾塞那肽[N28Q]的持续接触, 显示释放 $t_{1/2}$ 为750小时(31天)。

[0018] 图9显示了在使用实施例17的赖脯胰岛素(insulin lispro)释放性水凝胶微球偶联物治疗的STZ诱导的糖尿病小鼠中测量的血糖。用链脲佐菌素处理小鼠以诱导糖尿病, 然后在第0天和第7天皮下注射含有 $1.2\mu\text{mol/kg}$ (低剂量, 正方形)或 $4.8\mu\text{mol/kg}$ (高剂量, 三角形)赖脯胰岛素的偶联物悬液。载体对照(圆圈)由不含肽的微球组成。抽取血样并分析血糖。低剂量组在注射后1天内抑制血糖, 而高剂量组在注射后5天内抑制血糖。在第二次给药时这些效果重复。

[0019] 图10显示了在使用实施例17的赖脯胰岛素释放性水凝胶微球偶联物治疗的STZ诱导的糖尿病小鼠测得的体重。用链脲佐菌素处理小鼠以诱导糖尿病, 然后在第0天和第7天皮下注射含有 $1.2\mu\text{mol/kg}$ (低剂量, 正方形)或 $4.8\mu\text{mol/kg}$ (高剂量, 三角形)赖脯胰岛素的偶联物悬液。载体对照(圆圈)由不含肽的微球组成。低剂量和高剂量的偶联物都能维持动物体重, 而载体对照在6天内减轻了17%。

## 具体实施方式

[0020] 与先前公开的 $\beta$ -消除接头相比, 已发现本文公开的接头可更有效地抑制非期望的氮杂迈克尔加成, 所述接头在具有离去性氧的碳相邻处, 即在伽马碳处掺入偕取代碳, 如图3所示。本文公开的所得式(I)接头提供偶联物, 其中亲核试剂加成到接头剩余物的速率被大大抑制, 并且所得平衡常数相应地相当低。

### 定义

[0021] 对于用于本文, 除非另有明确指示, 否则术语“一”、“一个”等指一个或多个。

[0022] 除非另有规定, 否则本文所用的术语“约”在与值相关时, 指在一定值15%以内、10%以内、5%以内、4%以内、3%以内、2%以内、1%以内或0.5%以内的数值。

[0023] 术语“烷基”包括1-20、1-12、1-8、1-6或14个碳原子的线性、支链或环状饱和烃基。在一些实施方式中, 烷基是直链或支链。直链或支链烷基的例子包括但不限于甲基、乙基、

正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、正戊基、正己基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基等。在一些实施方式中,烷基是环状的。环烷基的例子包括但不限于环丙基,环丁基,环戊基,环戊二烯基,环己基等。

[0024] 术语“烷氧基”包括与氧结合的烷基,包括甲氧基、乙氧基、异丙氧基、环丙氧基、环丁氧基等。

[0025] 术语“烯基”包括具有碳-碳双键和2-20、2-12、2-8、2-6或2-4个碳原子的非芳香不饱和和烃。

[0026] 术语“炔基”包括具有碳-碳三键和2-20、2-12、2-8、2-6或2-4个碳原子的非芳香不饱和和烃。

[0027] 术语“芳基”包括6-18个碳,优选6-10个碳的芳香烃基,包括诸如苯基、萘基和蒽基的基团。术语“杂芳基”包括包含3-15个碳(优选3-7个碳)的芳环,其中包含至少一个N、O或S原子,包括吡咯基、吡啶基、嘧啶基、咪唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、异噻唑基、喹啉基、吲哚基、茚基等基团。

[0028] 在一些情况下,烯基、炔基、芳基或杂芳基部分可通过烷基键与分子的其余部分偶联。在这些情况下,取代基被称为烯基烷基、炔基烷基、芳基烷基或杂芳基烷基,表明烯基部分位于烯基、炔基、芳基或杂芳基部分与偶联于烯基、炔基、芳基或杂芳基的分子之间。

[0029] 术语“卤素”或“卤代”包括溴代、氟代、氯代和碘代。

[0030] 术语“杂环”或“杂环基”指包含至少一个N、O或S原子的3-15元芳环或非芳环。示例包括但不限于哌啶基、哌嗪基、四氢吡喃基、吡咯烷和四氢呋喃基,以及为上述术语“杂芳基”提供的示例性基团。在一些实施方式中,杂环或杂环基为非芳族的。在一些实施方式中,杂环或杂环基为芳族的。

[0031] 术语“大分子”指分子量在5000和1,000,000道尔顿之间、优选在10,000和500,000道尔顿之间、更优选在10,000和250,000道尔顿之间的分子或分子残基。大分子的实例包括但不限于包括抗体、抗体片段和酶的蛋白质;包括聚(氨基酸)的多肽,如聚(赖氨酸)和聚(缬氨酸)以及混合序列的多肽;合成聚合物,包括聚乙二醇(PEG)、聚环氧乙烷(PEO)、聚亚乙基亚胺(PEI)及其共聚物;以及葡聚糖等多糖。在一些实施方式中,所述大分子包含至少一个适于天然或化学转化后偶联的官能团,例如如上所述的胺、羧酸、醇、硫醇、炔烃、叠氮化物或马来酰亚胺基团。在本发明的某些实施方式中,大分子是聚乙二醇。聚乙二醇可以是线性的或支链的,一个末端是适合偶联的官能团,另一末端是封端基团(例如甲基),或者可以包括多个臂,每个臂末端是适合偶联的官能团。在本发明的优选实施方式中,聚乙二醇为线性、分枝或多臂聚合物,其平均分子量在20,000至200,000道尔顿之间,优选在20,000至100,000道尔顿之间,且最优选约40,000道尔顿。此类聚乙二醇的实例在本领域中是已知的,并且可从商业上获得,例如从NOF公司(日本东京)获得。

[0032] 无论链长如何,术语“蛋白质”和“肽”均可互换使用,并且这些术语还包括假肽,其包含除酰胺键以外的键,例如 $\text{CH}_2\text{NH}_2$ 键以及肽模拟物。

[0033] 无论链长如何,术语“核酸”和“寡核苷酸”也可以互换使用。核酸或寡核苷酸可以是单链或双链的,或者可以是DNA、RNA或其具有改性的键的修饰形式,例如磷酸二酯、磷酸酰胺等。对于在本发明中用作药物的蛋白质和核酸,这些术语还包括在蛋白质的情况下具有在自然界中未发现的侧链的蛋白质,以及在核酸的情况下在自然界中未发现的假肽键和

碱基,以及诸如肽核酸之类的骨架变体。

[0034] 药物相关术语“小分子”是本领域中很好理解的术语,并且意指包括蛋白质和核酸以外的化合物,这些化合物或者是合成的,或者是从自然界分离获得的,并且通常不类似于蛋白质或核酸。通常,它们的分子量小于1000,但没有明确的下限值。尽管如此,该术语在药理学和医学领域还是很容易理解的。

[0035] 除非另有规定,否则“任选取代”表示一个基团可能未被取代或被一个或多个(例如,1、2、3、4或5)相同或不同的取代基取代。取代基的示例包括但不限于烷基、烯基、炔基、卤

素、-CN, -OR<sup>aa</sup>, -SR<sup>aa</sup>, -NR<sup>aa</sup>R<sup>bb</sup>, -NO<sub>2</sub>, -C=NH(OR<sup>aa</sup>), -C(O)R<sup>aa</sup>, -OC(O)R<sup>aa</sup>, -C(O)OR<sup>aa</sup>, -C(O)NR<sup>aa</sup>R<sup>bb</sup>, -OC(O)NR<sup>aa</sup>R<sup>bb</sup>, -NR<sup>aa</sup>C(O)R<sup>bb</sup>, -NR<sup>aa</sup>C(O)OR<sup>bb</sup>, -S(O)R<sup>aa</sup>, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -NR<sup>aa</sup>S(O)R<sup>bb</sup>, -C(O)NR<sup>aa</sup>S(O)R<sup>bb</sup>, -NR<sup>aa</sup>S(O)<sub>2</sub>R<sup>bb</sup>, -C(O)NR<sup>aa</sup>S(O)<sub>2</sub>R<sup>bb</sup>, -S(O)NR<sup>aa</sup>R<sup>bb</sup>, -S(O)<sub>2</sub>NR<sup>aa</sup>R<sup>bb</sup>, -P(O)(OR<sup>aa</sup>)(OR<sup>bb</sup>), 杂环基、杂芳基或芳基,其中,烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、杂芳基和芳基各自独立地任选地被R<sup>cc</sup>取代,其中

R<sup>aa</sup>和R<sup>bb</sup>各自独立地为H、烷基、烯基、炔基、杂环基、杂芳基或芳基,或

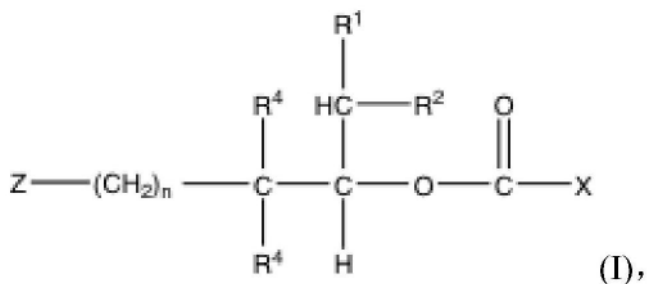
R<sup>aa</sup>和R<sup>bb</sup>与它们连接的氮原子一起形成杂环基,其任选地被烷基、烯基、炔基、卤素、羟基、烷氧基或CN取代,其中:

每个R<sup>cc</sup>独立地为烷基、烯基、炔基、卤素、杂环基、杂芳基、芳基、-CN或-NO<sub>2</sub>。

[0036] 通常,直接从本发明的偶联物中释放药物的活性形式,但在某些情况下,可以以其前药形式释放活性药物。

接头:

[0037] 在一个方面,提供式(I)的接头,



其中:

n是0-6的整数;

R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>独立地为吸电子基团、烷基或H,其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>中的至少一个为吸电子基团;

每个R<sup>4</sup>独立地为C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基或两个R<sup>4</sup>与它们连接的碳原子一起形成一个3-6元环;

X是离去基团;和

Z是用于将接头连接到大分子载体的官能团。

[0038] 在式(I)的接头的一些实施方式中,n=1-6,R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>独立地为吸电子基团、烷基或H,其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>中的至少一个为吸电子基团;每个R<sup>4</sup>独立地为C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基或一起可形成一个3-6元环;X为卤素、活性酯,例如N-琥珀酰亚胺氧基、硝基苯氧基或五卤代苯氧基,或咪唑基、三唑基、四唑基或N(R<sup>6</sup>)CH<sub>2</sub>Cl,其中R<sup>6</sup>为任选取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基;Z是用于将接头连接到大分子载体的官能团。

[0039] 在一些实施方式中,R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>的吸电子基团为

-CN;  
-NO<sub>2</sub>;  
任选取代的芳基;  
任选取代的杂芳基;  
任选取代的烯基;  
任选取代的炔基;  
-COR<sup>3</sup>, -SOR<sup>3</sup>, 或 -SO<sub>2</sub>R<sup>3</sup>,

其中R<sup>3</sup>为H、任选取代的烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、-OR<sup>8</sup>或-NR<sup>8</sup>, 其中每个R<sup>8</sup>独立地为H或任选取代的烷基, 或者两个R<sup>8</sup>基团与它们所连接的氮一起形成杂环; 或

SR<sup>9</sup>, 其中R<sup>9</sup>为任选取代的烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基或任选取代的杂芳烷基。

[0040] 在一些实施方式中, R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>的吸电子基团为-CN。在一些实施方式中, R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>的吸电子基团为-NO<sub>2</sub>。在一些实施方式中, R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>的吸电子基团是含有6-10个碳的任选取代的芳基。例如, 在一些实施方式中, R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>的吸电子基团是任选取代的苯基、萘基或蒽基。在一些实施方式中, R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>的吸电子基团是任选取代的杂芳基, 其包含3-7个碳并且包含至少一个N、O或S原子。例如, 在一些实施方式中, R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>的吸电子基团是任选取代的吡咯基、吡啶基、嘧啶基、咪唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、异噻唑基、喹啉基、吲哚基或茚基。在一些实施方式中, R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>的吸电子基团是含有2-20个碳原子的任选取代的烯基。在一些实施方式中, R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>的吸电子基团是含有2-20个碳原子的任选取代的炔基。在一些实施方式中, R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>的吸电子基团为-COR<sup>3</sup>、-SOR<sup>3</sup>或-SO<sub>2</sub>R<sup>3</sup>, 其中R<sup>3</sup>为H、含有1-20个碳原子的任选取代的烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、-OR<sup>8</sup>或-NR<sup>8</sup>, 其中每个R<sup>8</sup>独立地为H或含1-20个碳原子的任选取代的烷基, 或两个R<sup>8</sup>基团与它们所连接的氮一起形成杂环。在一些实施方式中, R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>的吸电子基团为-SR<sup>9</sup>, 其中R<sup>9</sup>为含有1-20个碳原子的任选取代的烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基或任选取代的杂芳烷基。

[0041] 在式(I)接头的一些实施方式中, R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>中的至少一个为-CN、-SOR<sup>3</sup>或-SO<sub>2</sub>R<sup>3</sup>。在一些实施方式中, R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>中的至少一个为-CN或-SO<sub>2</sub>R<sup>3</sup>。在一些实施方式中, R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>中的至少一个为-CN或-SO<sub>2</sub>R<sup>3</sup>, 其中R<sup>3</sup>为任选取代的烷基、任选取代的芳基或-NR<sup>8</sup>。在一些实施方式中, R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>中的至少一个为-CN、-SO<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-SO<sub>2</sub>Ph、-SO<sub>2</sub>PhCl、-SO<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O、-SO<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)或-SO<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>。

[0042] 在式(I)接头的一些实施方式中, 每个R<sup>4</sup>独立地为C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基。在一些实施方式中, R<sup>4</sup>都是甲基。

[0043] 在式(I)接头的一些实施方式中, n是从1到6的整数。在一些实施方式中, n是从1至3的整数。在一些实施方式中, n是从0至3的整数。在一些实施方式中, n是1。在一些实施方式中, n是2。在一些实施方式中, n是3。

[0044] 在式(I)接头的一些实施方式中, X为卤素、活性酯(例如, N-琥珀酰亚胺氧基、硝基苯氧基或五卤代苯氧基)、任选取代的杂芳基(例如咪唑基、三唑基或四唑基)或-N(R<sup>6</sup>)CH<sub>2</sub>Cl, 其中R<sup>6</sup>为任选取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基。在一些实施

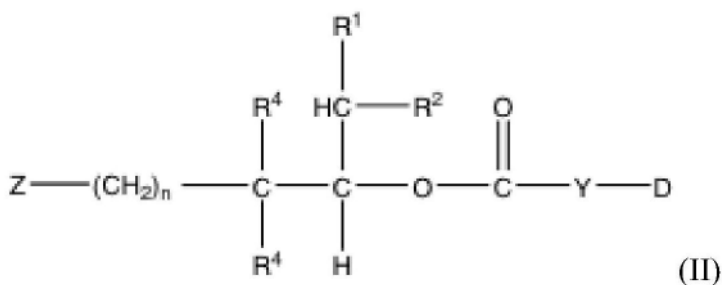
方式中,X是卤素。在一些实施方式中,X是活性酯,例如琥珀酰亚胺氧基。在一些实施方式中,X为-N(R<sup>6</sup>)CH<sub>2</sub>Cl,其中R<sup>6</sup>为任选取代的芳基。

[0045] 对于式(I)接头,Z可以是本领域已知的用于偶联的任何官能团。此类官能团的实例包括但不限于胺、氨基氧基、酮、醛、马来酰亚胺基、硫醇、醇、叠氮化物、1,2,4,5-四嗪基、反式环辛烯基、双环壬炔基、环辛炔基及其受保护的变体。在一些实施方式中,Z为受保护的胺、受保护的氨基氧基、酮或受保护的酮、醛或受保护的醛、马来酰亚胺基、受保护的硫醇、受保护的醇、叠氮化物、1,2,4,5-四嗪基、反式环辛烯基、双环壬炔基或环辛炔基。在一些实施方式中,Z为叠氮化物、酮或受保护的酮。

[0046] 在本说明书中应理解,一种部分的每一描述、变化、实施方式或方面可与其他部分的每一描述、变化、实施方式或方面相结合,如同描述的每一个和每一个组合被具体且单独地列出一样。例如,本文提供的关于式(I)的n的每个描述、变化、实施方式或方面可以与R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>4</sup>、X和Z的每个描述、变化、实施方式或方面相结合,这与如果每个和每个组合被具体地和单独地列出的情况相同。还应理解,任何通式(如式(I)、(II)、(III)、(IV)或(V))的所有描述、变化、实施方式或方面(如适用)同样适用于本文详述的其他通式,并且被同样描述,如同针对所有通式单独列出了每一个描述、变化、实施方式或方面。例如,式(I)的所有描述、变化、实施方式或方面(如适用)同样适用于本文详述的任何通式,如式(II)、(III)、(IV)和(V),并且被同样描述,如同针对所有通式单独列出了每一个描述、变化、实施方式或方面。

接头-药物

[0047] 在另一方面,提供式(II)的化合物:



其中n、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>4</sup>、X和Z如本文针对式(I)所公开;D是药物;当D是通过胺连接的药物时,Y不存在;或当D是通过苯酚、醇、硫醇、硫酚、咪唑或非碱性胺连接的药物时,Y为-N(R<sup>6</sup>)CH<sub>2</sub>;其中R<sup>6</sup>为任选取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基。在一些实施方式中,式(II)的化合物通过将式(I)的接头与诸如小分子、肽或蛋白质治疗剂等药物组合来制备。

[0048] 在式(II)化合物的一些实施方式中,Y不存在。在一些实施方式中,Y是-N(R<sup>6</sup>)CH<sub>2</sub>-。

[0049] 在式(II)化合物的一些实施方式中,合适的药物包括但不限于小分子、肽、蛋白质和核酸。合适药物的实例包括但不限于抗糖尿病药物、生长促进剂、抗菌剂,包括氨基糖苷类、青霉素类、头孢菌素类、大环内酯类和肽类、甲氧苄啶、吡罗米酸和磺胺二甲嘧啶;镇痛和抗炎药物、抗过敏和抗哮喘药物、抗高胆固醇药物、β-肾上腺素能阻滞剂和抗高血压药物、抗肿瘤药物和抗病毒药物。

[0050] 此类药物的进一步实例包括诸如紫杉醇和类似物的醇、埃坡霉素和类似物、喜树碱和诸如伊立替康的类似物以及诸如5-氟尿嘧啶和卡培他滨的核苷。在另一实施方式中,

药物是包含丝氨酸残基的肽。在另一实施方式中,药物是包含芳基酚(arylol)的小分子;这类药物的实例包括SN-38、依替福林、普瑞特罗和雌二醇。在另一实施方式中,药物是包含酪氨酸残基的肽。如果通过S偶联,则药物可以是包含巯基的小分子。此类药物包括青霉胺、卡托普利和依那普利。该药物可以是包含硫代芳基或硫代杂芳基的小分子;这类药物的例子包括6-巯基嘌呤。如果通过非碱性N偶联,则药物可为小分子或肽,其包含伯酰胺或仲酰胺(例如焦谷氨酸残基或其他酰胺)或磺酰胺,或杂芳基,例如吡啶(例如色氨酸)或嘌呤。例如促甲状腺素释放激素、蛙皮素、促黄体生成素释放激素、促卵泡释放激素、奥曲肽、5-氟尿嘧啶和别嘌呤醇。

[0051] 基于核酸的药物的实例包括来自动物,特别是来自哺乳动物的任何基因的正链和反义链。这类基因可以是已经是反义DNA或RNA的基因,或已被提供用于治疗各种疾病的小干扰RNA的基因,例如蛋白激酶C $\alpha$ 、BCL-2、ICAM-1、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 等的基因。还包括tol1样受体的CpG寡核苷酸激动剂。核酸可直接偶联至接头或通过核酸上的修饰基团偶联,例如包含5'-或3'-胺修饰或包含含胺碱基的寡核苷酸。

[0052] 在式(II)化合物的一些实施方式中,D是肽。合适肽的实例包括但不限于奥曲肽(SEQ ID NO:5)、艾塞那肽和包括以下的变体:[N28Q]艾塞那肽(SEQ ID NO:1)、赖脯胰岛素(A链:SEQ ID NO:2;B链:SEQ ID NO:3;二硫桥:A6-A11、A7-B7、A20-B19)或替度鲁肽([Gly<sup>2</sup>]GLP-2)(SEQ ID NO:4)及其序列变体。例如,对于本文公开的任何序列,均考虑酰胺化形式和非酰胺化形式。作为另一示例,对于任何氨基酸,均考虑L-形式和D-形式。在一些实施方式中,奥曲肽为D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-醇(Cys2-Cys7环二硫化物)。

SEQ ID NO:1 HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKQGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub> ([N28Q]艾塞那肽)

SEQ ID NO:2 GIVEQCCTSICSLYQLENYCN(赖脯胰岛素的A链)

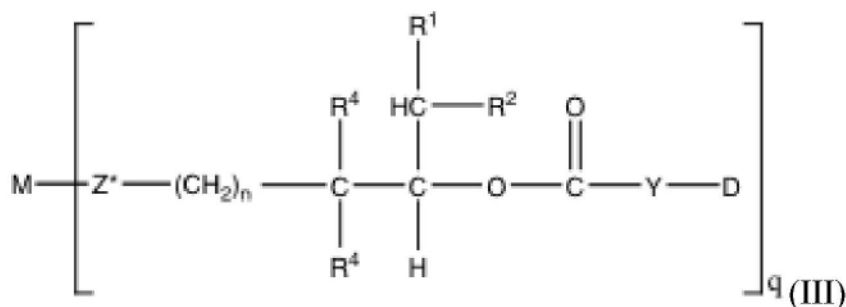
SEQ ID NO:3 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT(赖脯胰岛素的B链)

SEQ ID NO:4 HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD(替度鲁肽([Gly<sup>2</sup>]GLP-2))

SEQ ID NO:5 FCFWKTCT(奥曲肽;Cys2-Cys7环二硫化物)

偶联物

[0053] 在另一方面,提供式(III)的偶联物:



其中n、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>4</sup>、D和Y如本文对式(I)或(II)所公开;M为大分子载体;当M为可溶性大分子时,q为1到10之间的整数;当M为不溶性基质时,q为复数;Z\*表示与M偶联。在一些实施方式中,式(III)化合物是药物D的偶联物,通过式(I)接头可释放地连接到大分子载体M。应理解,当M为不溶性基质时,可将复数的接头-药物连接至M。例如,在一些实施方式中,当M

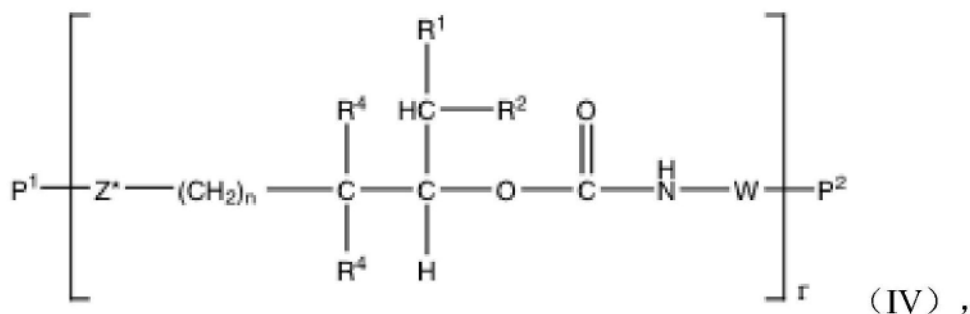
为式 (IV) 水凝胶时,其中 $P^1$ 和 $P^2$ 均为四臂聚合物,可将1、2、3或4个接头-药物连接至每个 $P^1$ - $P^2$ 单元。因此,可以通过使接头-药物与M以合适的比例反应来实现所需的复数。因此,可以在基质体积中获得合适的药物浓度。

[0054] 在式 (III) 偶联物的一些实施方式中,分子载体M为可溶性大分子,q为1到10之间的整数。在一些实施方式中,M是不溶性基质,q是复数。在一些实施方式中,当M为不溶性基质时,q为复数,使得可实现基质体积中的适当药物浓度。可溶性大分子的实例包括但不限于聚乙二醇或其它合成聚合物、葡聚糖、抗体、抗体片段、白蛋白或其它蛋白质,其分子大小足以抑制本领域所理解的有效肾滤过。对于聚乙二醇,M可以是平均分子量在1000到100,000道尔顿之间、优选在1000到40,000道尔顿之间,单链、多链或多臂的。不溶性基质的实例包括但不限于水凝胶、植入物或外科装置,其可以是块状的,也可以是微粒或纳米粒。在一些实施方式中,M是可溶性大分子。在一些实施方式中,M是不溶性基质。在一些实施方式中,M是如本文所公开的式 (IV) 水凝胶。

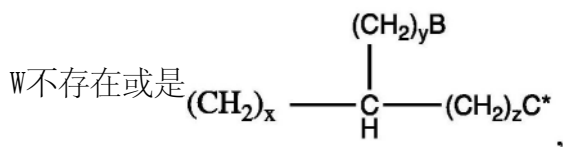
[0055] 在式 (III) 偶联物的一些实施方式中,分子载体M包括与允许偶联的Z相关的至少一个官能团 $Z'$ 。例如,当Z为胺时, $Z'$ 为羧酸、活性酯或活性碳酸酯以产生式 (III) 的偶联物,其中 $Z^*$ 为酰胺或氨基甲酸酯。作为另一实例,当Z为叠氮化物时, $Z'$ 为炔基、双环壬炔基或环辛炔基以产生式 (III) 的偶联物,其中 $Z^*$ 为1,2,3-三唑。作为另一实例,当Z为 $NH_2O$ 时, $Z'$ 为酮或醛以产生式 (III) 的偶联物,其中 $Z^*$ 为肟。作为另一实例,当Z为SH时, $Z'$ 为马来酰亚胺或卤代羰基以产生式 (III) 的偶联物,其中 $Z^*$ 为硫代琥珀酰亚胺基或硫代醚。类似地,Z和 $Z'$ 的这些作用可以逆转,以产生相反方向的 $Z^*$ 。在一些实施方式中, $Z^*$ 包含酰胺、肟、1,2,3-三唑、硫醚、硫代琥珀酰亚胺或醚。

水凝胶

[0056] 在另一方面,提供式 (IV) 的水凝胶:



其中n、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^4$ 和 $Z^*$ 如本文针对式 (I)、(II) 或 (III) 所公开;



其中x、y和z中的每一个独立地为0到6的整数,B为 $-NH_2$ 、 $-ONH_2$ 、酮、醛、 $-SH$ 、 $-OH$ 、 $-CO_2H$ 、羧酰胺基或包含环辛炔或双环壬炔的基团,且 $C^*$ 为羧酰胺、硫醚、硫代琥珀酰亚胺、三唑或肟;和

$P^1$ 和 $P^2$ 独立地是分子量为1-40kDa的r-臂聚合物,其中r是2到8之间的整数。可以理解, $(CH_2)_x$ 连接到NH, $C^*$ 连接到 $P^2$ 。在一些实施方式中,式 (IV) 的水凝胶是可降解的。

[0057] 在式 (IV) 水凝胶的一些实施方式中, $P^1$ 和 $P^2$ 为合成聚合物,例如聚乙二醇、葡聚糖、

透明质酸等。图6给出了此类水凝胶的说明性结构。在这些水凝胶中,式(I)的接头用于交联聚合物链以形成不溶性三维基质。交联通过非水解性 $\beta$ 消除以 $R^1$ 和 $R^2$ 基团控制的速率缓慢断裂,得到最终的可溶性聚合物片段。这些水凝胶能以多种方式连接接头-药物。当W存在时,在每个交联处引入官能团B。如图6所示,水凝胶的形成可以使得复数的B存在。如果B相当于上文讨论的关联基团Z',则B基团可直接用于接头-药物的连接,或者可衍生B基团以引入关联基团Z',用于接头-药物随后连接到预成型的水凝胶。当需要离体制备水凝胶时,这是有利的,例如通过制备成所需的形式,例如固定尺寸的微球或片材。或者,制备水凝胶时B基团可包含式(II)的接头-药物;当需要在凝胶形成之前通过注入组分的液体混合物进行原位凝胶化时,这是有利的。

#### 药物组合物

[0058] 在另一方面中,本文提供了包含大分子载体-药物偶联物或其医药上可接受的盐以及医药上可接受的缓冲液和/或赋形剂的药物组合物。缓冲液的选择应确保在储存期间和必要时在重建时保持接头的稳定性,并且通常pH值在2和7之间,优选在2和6之间,更优选在2和5之间。可接受的缓冲液包括乙酸、柠檬酸、磷酸、组氨酸、葡萄糖酸、天冬氨酸、谷氨酸、乳酸、酒石酸、琥珀酸、苹果酸、富马酸、 $\alpha$ -酮戊二酸等。赋形剂可包括张力剂和等渗剂,如氯化钠;防腐剂,如柠檬酸或柠檬酸盐和对羟基苯甲酸酯;抗菌剂,如苯酚和甲酚;抗氧化剂,如丁基羟基甲苯、维生素A、C或E、半胱氨酸和甲硫氨酸;密度调节剂,如蔗糖、多元醇、透明质酸和羧甲基纤维素。这些制剂可通过本领域技术人员已知的常规方法制备,例如如“《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Science),”A.R.Gennaro,编,第17版,1985,Mack Publishing Company,Easton,PA,USA中所述。药物组合物可以液体溶液或悬浮液形式提供,或者可以固体形式提供,例如通过液体组合物冷冻干燥提供。此类冻干物还可包含填充剂,以确保在使用前快速且有效地重建。

#### 使用方法

[0059] 在另一方面,本发明所述的大分子载体-药物偶联物和包含它们的药物组合物可用于治疗或预防个体中的疾病或病症。在一些实施方式中,提供治疗疾病或病症的方法,包括向需要的对象施用本文所述的大分子载体-药物偶联物或包含本文所述大分子载体-药物偶联物的药物组合物。“个体”可以是人,也可以是动物,如猫、狗、牛、大鼠、小鼠、马、兔或其他饲养动物。

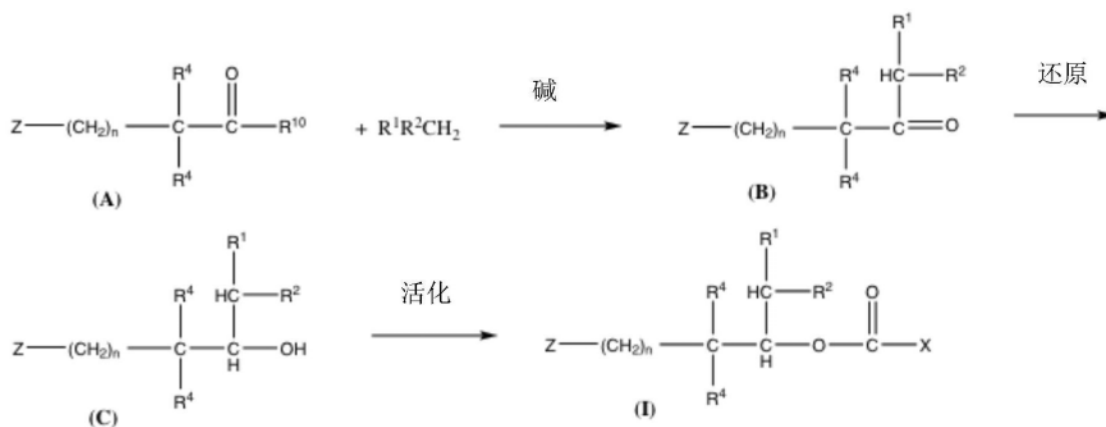
[0060] 还提供含有本文所述的大分子载体-药物偶联物的组合物,用于治疗疾病或病症。本文还提供了本文所述的大分子载体-药物偶联物在制备用于治疗疾病或病症的药物中的用途。

[0061] 本领域技术人员将从偶联药物的性质知道需要治疗的适应疾病或病症。例如,艾塞那肽和胰岛素可用于治疗糖尿病,奥曲肽可用于治疗肢端肥大症和各种癌症,替度鲁肽可用于治疗短肠综合征,SN-38和TLR9激动剂可用于治疗癌症。本发明考虑任何适用于人类和动物的给药途径,例如通过静脉内、鞘内、眼内、皮下、关节内、腹膜内或其他局部注射,或通过口服给药。

#### 接头的制备

[0062] 式(I)的接头可通过以下工作实施例中的所示的几种途径中的任何一种来制备。

在一种方法中,偕-二烷基羰基化合物(A)通过碱的作用与 $R^1R^2CH_2$ 缩合。



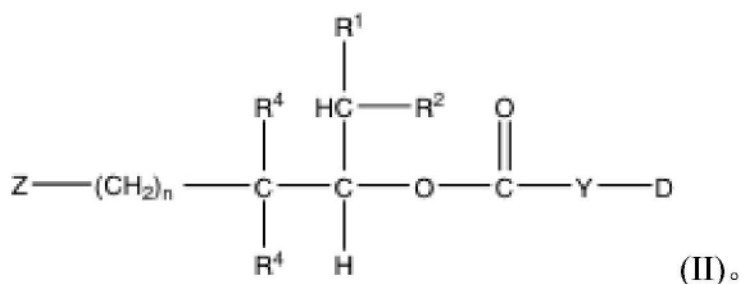
[0063] 合适的碱是能够使 $\text{R}^1\text{R}^2\text{CH}_2$ 脱质子的碱,例如叔丁醇钾或叔戊醇钾、丁基锂、二异丙胺锂、NaH和硅基胺基碱,例如LiHMDS、NaHMDS或KHMDS。 $\text{R}^{10}$ 可以是H, $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ 烷氧基,或N(Me)OMe。当 $\text{R}^{10}$ 为H时,直接生成醇(C)。当 $\text{R}^{10}$ 不是H时,生成酮(B),随后将其还原为醇(C)。合适的还原剂包括硼氢化物,例如 $\text{LiBH}_4$ 和 $\text{NaBH}_4$ ,尽管根据基团Z的性质可以使用本领域众所周知的其他还原剂。然后,活化醇(C)以产生式(I)的接头。典型的活化条件包括通过光气或光气等价物(如双光气或三光气)的作用转化为氯甲酸盐( $\text{X}=\text{Cl}$ );使用N,N'-二琥珀酰亚胺碳酸酯和4-(二甲基氨基)吡啶或通过使用N-羟基琥珀酰亚胺和吡啶处理氯甲酸酯转化为琥珀酰亚胺碳酸酯( $\text{X}=\text{OSu}$ );以及转化为活性碳酸酯,例如通过在弱碱(例如吡啶)存在下与氯甲酸硝基苯酯反应。

[0064] 式(I)中X为 $-\text{N}(\text{R}^6)\text{CH}_2\text{Cl}$ 的接头可如美国专利号8,754,190中制备。

[0065] Z可以是本领域中已知的任何用于偶联的官能团,例如胺、氨基氧基、酮、醛、马来酰亚胺基、硫醇、醇、叠氮化物、1,2,4,5-四嗪基、反式环辛烯基、双环壬炔基、环辛炔基及其受保护的变体。在一些实施方式中,Z为受保护的胺、受保护的氨基氧基、酮或受保护的酮、醛或受保护的醛、马来酰亚胺基、受保护的硫醇、受保护的醇、叠氮化物、1,2,4,5-四嗪基、反式环辛烯基、双环壬炔基或环辛炔基。在一些实施方式中,Z为叠氮化物、酮或受保护的酮。

#### 接头-药物的制备

[0066] 式(I)的接头可与药物D反应以产生式(II)的接头-药物,



[0067] 适用于本发明的药物包括小分子、肽、蛋白质和核酸。对于包含碱性胺基的药物,式(I)的接头(其中X为卤化物或活性酯)在有机溶剂或缓冲水溶液中的碱存在下与药物反应,以产生式(II)的接头-药物。此类碱性胺可以是小分子药物的一部分,或者可以是肽和蛋白质的N-末端胺或赖氨酸ε-胺。对于含有多个碱性胺(例如肽和蛋白质)的药物,可连接多个接头。对于合成肽,可在合成期间将接头接到特定位置,例如,通过在最终偶联步骤中

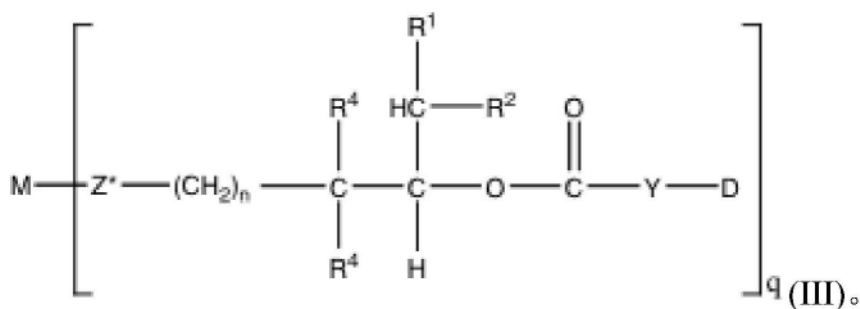
使用接头,或通过在可选择性去除的内部氨基酸残基上使用临时封闭基团,可在N端连接接头;然后用接头酰化,接头-肽全局去保护和纯化。适于促进接头与药物的连接的碱包括叔胺,例如三乙胺或N,N-二异丙基乙胺,以及胍,例如N,N-二甲基胍和7-甲基-1,5,7-三氮杂二环[4.4.0]十二碳-5-烯,以及本领域已知的其他碱。当在水溶液中进行时,反应通常在pH值介于7和10之间时进行。

[0068] 式(I)中 $X=N(R^6)CH_2Cl$ 的接头可用于通过醇、酚、硫醇、硫酚、咪唑和非碱性氮原子与药物连接,类似于美国专利号8,754,190中公开的方法。

[0069] 一旦制备了接头-药物,可使用本领域众所周知的方法在偶联前去除Z或药物的任何保护基团。

#### 偶联物的制备

[0070] 式(II)的接头-药物可用于通过去保护的官能团Z与结合到大分子载体M的关联反应基团反应,以制备式(III)的偶联物,

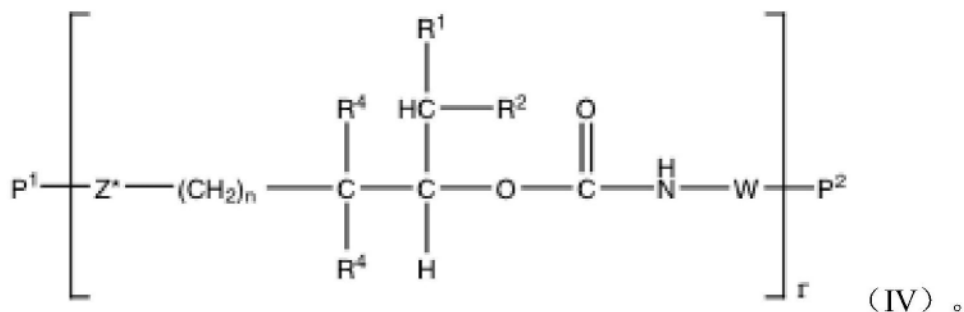


[0071] Z可以是本领域中已知的任何用于偶联的官能团,包括胺、氨基氧基、酮、醛、马来酰亚胺基、硫醇、醇、叠氮化物、1,2,4,5-四嗪基、反式环辛烯基、双环壬炔基、或环辛炔基。连接官能团的选择将取决于药物D中存在的其他官能团,但对于本领域技术人员是清楚的。M可以是水溶性聚合物,例如聚乙二醇或其它合成聚合物、葡聚糖、抗体、抗体片段、白蛋白或其它蛋白质,其分子大小足以抑制本领域所理解的有效肾滤过。对于聚乙二醇,M可以是平均分子量在1000到100,000道尔顿之间、优选在1000到40,000道尔顿之间的单链、多链或多臂。聚乙二醇包含至少一个与实现偶联的Z关联的官能团Z'。例如,当Z为胺时,Z'为羧酸、活性酯或活性碳酸酯以产生式(III)的偶联物,其中Z\*为酰胺或氨基甲酸酯。作为另一实例,当Z为叠氮化物时,Z'为炔基、双环壬炔基或环辛炔基以产生式(III)的偶联物,其中Z\*为1,2,3-三唑。作为另一实例,当Z为 $NH_2O$ 时,Z'为酮或醛以产生式(III)的偶联物,其中Z\*为肟。作为另一实例,当Z为SH时,Z'为马来酰亚胺或卤代羰基以产生式(III)的偶联物,其中Z\*为硫代琥珀酰亚胺基或硫代醚。类似地,Z和Z'的这些作用可以逆转,以产生相反方向的Z\*。这些偶联反应可在本领域已知的条件下进行,例如,当Z=叠氮化物和Z'=环辛炔时,在两种组分均显示出足够溶解度的任何溶剂中发生偶联,尽管已知水溶液显示出更有利的反应速率。

[0072] 类似地,M可以是水不溶性基质,例如水凝胶、植入物或外科装置,可以是块状的,也可以是微粒或纳米粒。在这种情况下,M包括如上所述的复数基团Z,允许连接多个接头-药物。虽然基质不溶,但与包含药物-接头的溶液的反应足够发生偶联。例如,当不溶性基质为水凝胶(块状或制成微球或其他颗粒形式)时,将接头-药物溶液与水凝胶悬浮液混合足够时间,以允许接头-药物穿透多孔水凝胶基质并发生偶联反应。

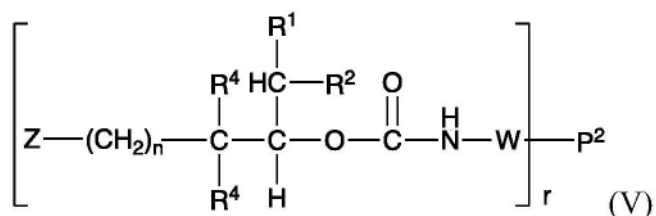
## 水凝胶的制备

[0073] 在一些实施方式中, M是式 (IV) 的可生物降解水凝胶, 其中 $P^1$ 、 $P^2$ 、 $Z^*$ 、 $n$ 、 $r$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^4$ 和W如本文所公开,



[0074] 图6给出了此类包含式 (IV) 交联的水凝胶的说明性结构。在这些水凝胶中, 式 (I) 的接头用于交联聚合物链以形成不溶性三维基质。交联通过非水解性 $\beta$ 消除以 $R^1$ 和 $R^2$ 基团控制的速率缓慢断裂, 得到最终的可溶性聚合物片段。这些水凝胶能以多种方式连接接头-药物。当W存在时, 在每个交联处引入官能团B。如图6所示, 可首先形成水凝胶以提供其中存在多个B的水凝胶聚合物, 以提供不进一步包含式 (II) 接头-药物的可降解聚合物。如果B相当于上文讨论的关联基团 $Z'$ , 则B基团可直接用于接头-药物的连接, 或者可衍生B基团以引入关联基团 $Z'$ , 用于接头-药物随后连接到预成型的水凝胶。当需要体外制备水凝胶时, 这是有利的, 例如通过制备成所需的形式, 例如固定尺寸的微球或片材。或者, 制备水凝胶时B基团可包含式 (II) 的接头-药物; 当需要在凝胶形成之前通过注入组分的液体混合物进行原位凝胶化时, 这是有利的。

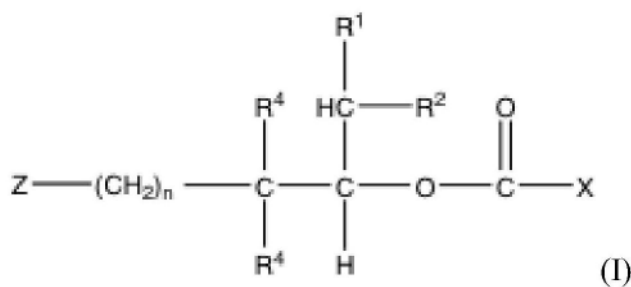
[0075] 这些水凝胶可通过混合两种多臂预聚物形成, 其中一种具有臂, 该臂末端是包含式 (I) 接头残基和反应性端基Z的基团, 另一种末端是包含关联反应性端基 $Z'$ 的基团的臂。在一个实施方式中, 一种预聚物具有式 (V)



其中所述基团如上文所定义, 且另一预聚物具有式 $P^1 - (Z')_r$ 。当在适当溶剂 (通常是pH为2-7 (当Z和 $Z'$ 为叠氮化物/环戊炔时) 或pH为6-9 (当Z和 $Z'$ 为活化酯和胺时) 的水性缓冲液) 中混合时, Z和 $Z'$ 基团反应形成包含式 (IV) 交联的不溶性水凝胶基质。该方法可在块状相中进行, 或在混合有机/水系统中的乳化条件下进行, 以形成适于注射的微粒悬液, 例如微球。

[0076] 以下提供某些代表性实施方式:

实施方式1: 一种式 (I) 的接头:



其中 $n=1-6$ ,

$\text{R}^1$ 和 $\text{R}^2$ 都是独立的吸电子基团,或者 $\text{R}^1$ 和 $\text{R}^2$ 中的一个为吸电子基团,另一个为烷基,或H;

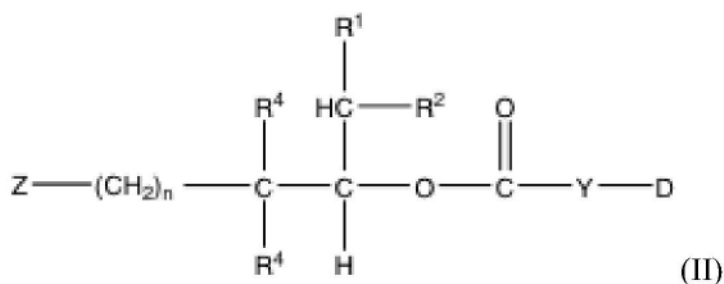
每个 $\text{R}^4$ 独立地为 $\text{C}_1-\text{C}_3$ 烷基或合起来可形成一个3-6元环;

Z是用于将接头连接到偶联载体的基团;X是一个离去基团。

实施方式2:实施方式1所述的接头,其中X为卤素、N-琥珀酰亚胺氧基、硝基苯氧基、五卤代苯氧基、咪唑基、三唑基或四唑基。

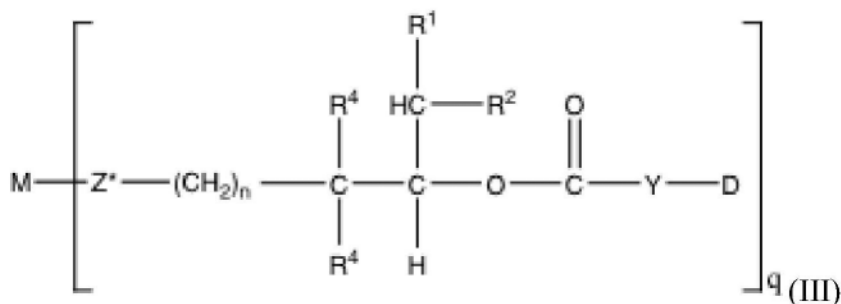
实施方式3:实施方式1所述的接头,其中Z为受保护的胺、受保护的氨基氧基、酮或受保护的酮、醛或受保护的醛、马来酰亚胺基、受保护的硫醇、受保护的醇、叠氮化物、1,2,4,5-四嗪基、反式环辛烯基、双环壬炔基或环辛炔基。

实施方式4:一种式(II)的接头-药物:



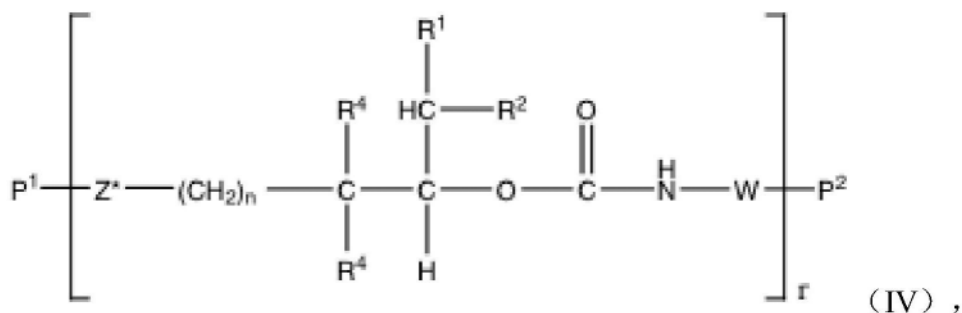
其中,当D是通过胺连接的药物时,Y不存在;或当D是通过苯酚、醇、硫醇、硫酚、咪唑或非碱性胺连接的药物时,Y是 $\text{N}(\text{R}^6)\text{CH}_2$ ,其中 $\text{R}^6$ 是任选取代的 $\text{C}_1-\text{C}_6$ 烷基或任选取代的芳基或杂芳基。

实施方式5:一种式(III)的偶联物

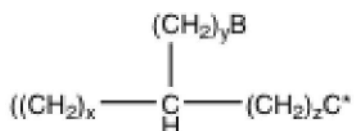


其中M为大分子载体,Z\*包含羧基酰胺、脞、1,2,3-三唑、硫醚、硫代琥珀酰亚胺或醚,且 $q=1$ -复数。

实施方式6:一种式(IV)的水凝胶



其中 $P^1$ 和 $P^2$ 独立地为 $r$ -臂聚合物,其中 $r=2-8$ ,且 $W$ 不存在或是:

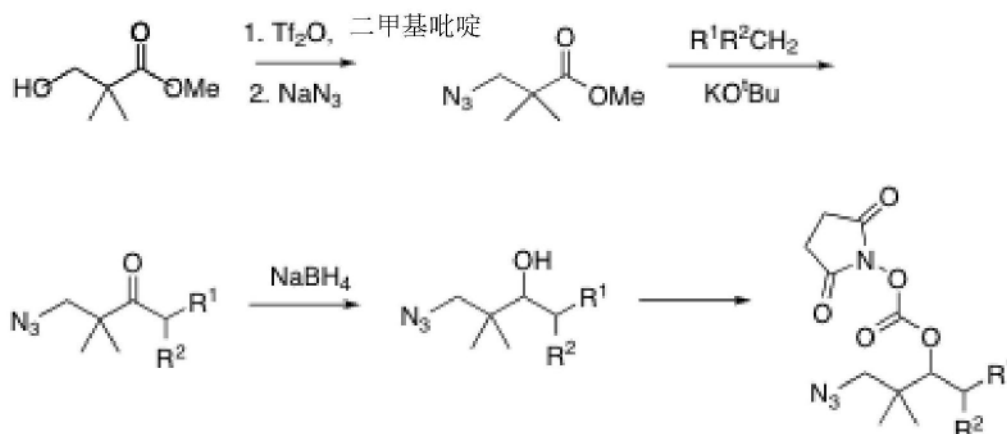


其中 $x$ 、 $y$ 和 $z$ 各自独立地为 $0-6$ ;  $B$ 是 $NH_2$ 、 $ONH_2$ 、酮、醛、 $SH$ 、 $OH$ 、 $CO_2H$ 或甲酰胺基,  $C^*$ 是甲酰胺、硫醚、硫代琥珀酰亚胺、三唑或肟。

[0077] 提供以下实施例以说明而非限制公开。

#### 实施例1

式(I)接头的制备,其中 $Z$ =叠氮化物



(1) 4-叠氮-1-氰基-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯(式(I),其中 $n=1$ ,  $R^1=CN$ ,  $R^2=H$ ,  $R^4=CH_3$ ,  $Z=N_3$ ,  $X$ =琥珀酰亚胺氧基)。

[0078] 将1M叔丁醇钾THF溶液(3.5mL, 3.5mmol)添加到3-叠氮-2,2-二甲基丙酸酯(根据Kim, Synthetic Communications制备; 300mg, 1.9mmol)和乙腈(0.365mL, 7.0mmol)的7ml THF溶液中, 温度为 $-30^\circ C$ 。将混合物在 $-30^\circ C$ 下搅拌30分钟, 然后经1小时将其升温至环境温度, 再搅拌30分钟。混合物在冰上冷却, 并通过添加6N HCl(0.62mL, 3.7mmol)进行淬灭, 然后在EtOAc和水之间分配。水相用EtOAc萃取2次, 合并的有机物用盐水洗涤, 用 $MgSO_4$ 干燥, 过滤并浓缩以提供粗制的酮。

[0079] 将硼氢化钠(33mg, 0.88mmol)添加到7mL甲醇中的粗制酮(300mg, 约1.75mmol)溶液中。搅拌混合物15分钟, 并通过添加6N HCl(0.7mL)淬灭, 然后在EtOAc和水之间分配。水相用EtOAc萃取2次, 合并的有机物用盐水洗涤, 用 $MgSO_4$ 干燥, 过滤并浓缩以提供粗制的醇。在 $SiO_2$ (20-40%乙酸乙酯/己烷)上纯化, 提供4-叠氮-1-氰基-3,3-二甲基-2-丁醇(142mg, 0.85mmol)。 $^1H$ -NMR( $CDCl_3$ , 300MHz)  $\delta$  3.83-3.92(m, 1H), 3.43(d,  $J=12.1$ Hz, 1H), 3.21(d,  $J$

=12.1Hz, 1H), 2.41-2.62 (m, 3H), 0.97 (s, 3H), 和 0.96 (s, 3H)。

[0080] 将吡啶 (136 $\mu$ L, 1.7mmol) 逐滴添加到冰上冷却的 8mL THF 中的 4-叠氮-1-氰基-3,3-二甲基-2-丁醇 (142mg, 0.85mmol) 和三光气 (425mg, 1.44mmol) 溶液中。将所得悬液升温至环境温度并搅拌 15 分钟, 然后过滤并浓缩以提供粗制的氯甲酸酯。将其溶解于 8mL THF 中, 在冰上冷却, 并用 N-羟基琥珀酰亚胺 (291mg, 2.5mmol) 和吡啶 (204 $\mu$ L, 2.53mmol) 处理。将所得悬液升温至环境温度并搅拌 15 分钟, 然后在 EtOAc 和 5% KHSO<sub>4</sub> 之间进行分配。水相用 EtOAc 萃取 2 次, 合并的有机物用盐水洗涤, 用 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 过滤并浓缩以提供粗制的琥珀酰亚胺碳酸酯。在 SiO<sub>2</sub> (20-40% 乙酸乙酯/己烷) 上纯化, 提供 4-叠氮-1-氰基-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯 (174mg, 0.56mmol)。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz)  $\delta$  5.03 (dd, J=7.0, 5.1, 1H), 3.27-3.41 (m, 6H), 3.43 (d, J=12.1Hz, 1H), 3.21 (d, J=12.1Hz, 1H), 2.41-2.62 (m, 3H), 0.97 (s, 3H), 和 0.96 (s, 3H)。

(2) 4-叠氮-1-((N,N-二甲基氨基)磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯 (式 (I), 其中  $n=1$ ,  $R^1=SO_2N(CH_3)_2$ ,  $R^2=H$ ,  $R^4=CH_3$ ,  $Z=N_3$ , 和  $X=$  琥珀酰亚胺氧基)。

[0081] 将正丁基锂在己烷 (70mL, 100mmol) 中的 1.43M 溶液添加到在惰性气氛下保持在 -50 $^{\circ}$ C 的 200mL 无水 THF 中的 N,N-二甲基甲磺酰胺 (12.33g, 100mmol) 的搅拌溶液中。使混合物在 1 小时内升温至 -20 $^{\circ}$ C, 然后在添加 3-叠氮-2,2-二甲基丙酸酯 (根据 Kim, Synthetic Communications 制备; 7.70g, 50mmol) 之前重新冷却至 -50 $^{\circ}$ C。让混合物在 2 小时内升温至 +10 $^{\circ}$ C, 然后用 20 毫升 6N HCl 淬灭。用甲基叔丁基醚 (MTBE, 200mL) 稀释混合物, 用 100mL 水洗涤 2 次, 用 100mL 盐水洗涤 1 次, 在 MgSO<sub>4</sub> 上干燥, 过滤并浓缩, 得到 14.05g 粗制的酮产物。在 SiO<sub>2</sub> (220g) 上使用 0、20、30、40 和 50% EtOAc/己烷的步进梯度进行色谱, 得到纯化的 4-叠氮-1-((N,N-二甲基氨基)磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁酮 (10.65g, 86%) 结晶固体。

[0082] 将上述酮溶于 200mL 甲醇中, 在冰上冷却, 并用硼氢化钠 (0.96g, 25mmol) 处理 15min, 然后用 4mL 6N HCl 淬灭并浓缩。用甲基叔丁基醚 (MTBE, 200mL) 稀释得到的浆液, 用 100mL 水洗涤 1 次, 用 100mL 盐水洗涤 1 次, 在 MgSO<sub>4</sub> 上干燥, 过滤并浓缩, 得到 10.0g 4-叠氮-1-((N,N-二甲基氨基)磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁醇结晶。

[0083] 经 10 分钟, 将吡啶 (10.6mL, 132mmol) 添加到在冰上冷却的 250mL 二氯甲烷中的 N-羟基琥珀酰亚胺 (6.90g, 60mmol) 和三光气 (5.93g, 20mmol) 的搅拌混合物中。将混合物在冰上搅拌 15 分钟, 然后经 30 分钟升温至环境温度。添加 4-叠氮-1-((N,N-二甲氨基)磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁醇 (10.0g, 40mmol) 在 20mL 二氯甲烷中的溶液, 并在环境温度下再搅拌混合物 1h。在冰上冷却后, 用 100 毫升水处理混合物并分离相。有机相用水洗涤 2 次, 用 5% KHSO<sub>4</sub> 洗涤 1 次, 用盐水洗涤 1 次, 用 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 过滤并浓缩。粗产物由 100mL 30% EtOAc/己烷结晶, 得到 4-叠氮-1-((N,N-二甲氨基)磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯的白色结晶固体 (11.1g, 71%)。

(3) 根据这些方法制备的式 (I) 的其他化合物包括:

4-叠氮-1-(甲基磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯 (式 (I), 其中  $n=1$ ,  $R^1=SO_2CH_3$ ,  $R^2=H$ ,  $R^4=CH_3$ ,  $Z=N_3$ , 和  $X=$  琥珀酰亚胺氧基)。

4-叠氮-1-((4-甲基哌啶基)磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯 (式 (I), 其中  $n=1$ ,  $R^1=SO_2N(CH_2CH_2)_2CHCH_3$ ,  $R^2=H$ ,  $R^4=CH_3$ ,  $Z=N_3$ , 和  $X=$  琥珀酰亚胺氧基)。LC/MS 显示  $[M+H]^+=446.15$ 。

4-叠氮-1-(苯基磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯(式(I),其中 $n=1$ ,  $R^1=SO_2Ph$ ,  $R^2=H$ ,  $R^4=CH_3$ ,  $Z=N_3$ ,和 $X=$ 琥珀酰亚胺氧基)。

4-叠氮-1-(4-氯苯基磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯(式(I),其中 $n=1$ ,  $R^1=SO_2PhCl$ ,  $R^2=H$ ,  $R^4=CH_3$ ,  $Z=N_3$ ,和 $X=$ 琥珀酰亚胺氧基)。

4-叠氮-1-(4-吗啉代磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯(式(I),其中 $n=1$ ,  $R^1=SO_2N(CH_2CH_2)_2O$ ,  $R^2=H$ ,  $R^4=CH_3$ ,  $Z=N_3$ ,和 $X=$ 琥珀酰亚胺氧基)。

4-叠氮-1-(异丙基磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯(式(I),其中 $n=1$ ,  $R^1=SO_2CH(CH_3)_2$ ,  $R^2=H$ ,  $R^4=CH_3$ ,  $Z=N_3$ ,和 $X=$ 琥珀酰亚胺氧基)。

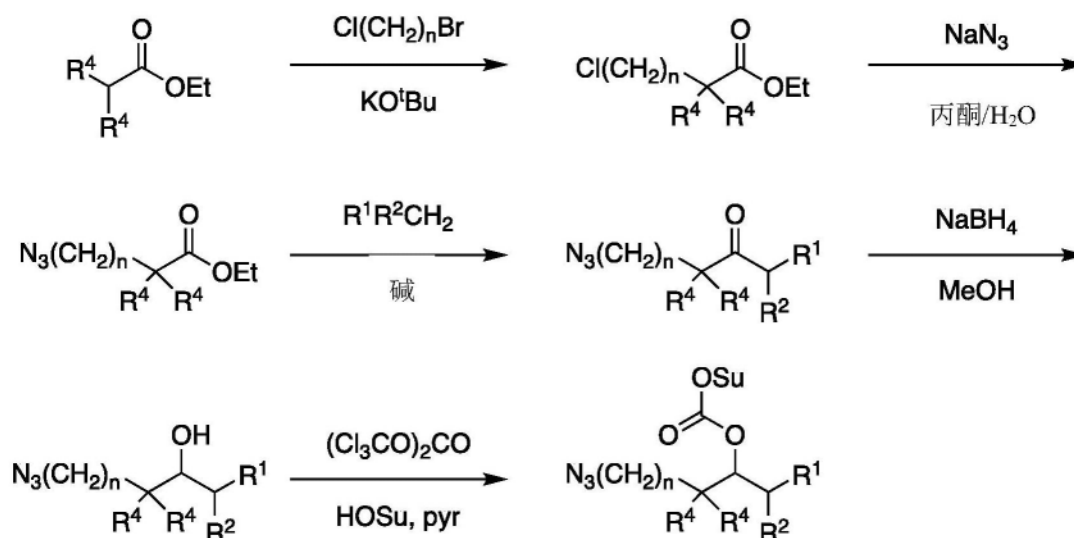
4-叠氮-1-((N-乙基-N-4-甲基氨基)磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯(式(I),其中 $n=1$ ,  $R^1=SO_2N(CH_3)(CH_2CH_3)$ ,  $R^2=H$ ,  $R^4=CH_3$ ,  $Z=N_3$ ,和 $X=$ 琥珀酰亚胺氧基)。

4-叠氮-1-((N,N-二(2-甲氧基乙基)氨基磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯(式I,其中 $n=1$ ,  $R^1=SO_2N(CH_2CH_2OCH_3)_2$ ,  $R^2=H$ ,  $R^4=CH_3$ ,  $Z=N_3$ ,和 $X=$ 琥珀酰亚胺氧基)。

4-叠氮-1-(4-甲基苯基磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯(式I,其中 $n=1$ ,  $R^1=SO_2PhCH_3$ ,  $R^2=H$ ,  $R^4=CH_3$ ,  $Z=N_3$ ,和 $X=$ 琥珀酰亚胺氧基)。

### 实施例2

#### 式(I)接头的制备



[0084] 对于其中 $n=2$ 或 $3$ 、 $R^1=CN$ 、 $R^2=H$ 、两个 $R^4=CH_3$ 、 $Z=N_3$ 和 $X=N$ -琥珀酰亚胺氧基的式(I)化合物说明了另一种通用制备方法。

(1) 5-叠氮-1-氰基-3,3-二甲基-2-戊基琥珀酰亚胺碳酸酯(式(I),其中 $n=2$ ,  $R^1=CN$ ,  $R^2=H$ ,  $R^4=CH_3$ ,  $Z=N_3$ ,和 $X=$ 琥珀酰亚胺氧基)。

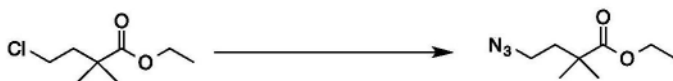
(a) 4-氯-2,2-二甲基丁酸乙酯。

[0085] 将 $iPr_2NH$ (5.30mL, 37.4mmol, 1.1当量, 0.27M最终浓度)和THF(100mL)装填到配有搅棒、橡胶隔膜、氮气入口和热电偶探针的加热枪干燥的500mL圆底烧瓶中。反应混合物在 $0^\circ C$ 冷却,同时通过注射器逐滴添加 $nBuLi$ 溶液(1.28M的己烷溶液, 27.8mL, 35.7mmol, 1.05当量, 0.26M最终浓度),以确保内部温度不超过 $+10^\circ C$ (~10分钟)。将反应混合物在 $0^\circ C$ 搅拌15

分钟,冷却至 $-78^{\circ}\text{C}$ ,并通过注射器以内部温度不超过 $-65^{\circ}\text{C}$ ( $\sim 5$ 分钟)的速率逐滴添加THF(5mL)中的异丁酸乙酯溶液(4.6mL,4.0g,34mmol,1.0当量,0.24M最终浓度)。将反应混合物在 $78^{\circ}\text{C}$ 搅拌45分钟,并以内部温度不超过 $-68^{\circ}\text{C}$ 的速率添加THF(5mL)中的1-溴-2-氯乙烷溶液(2.8mL,34mmol,1.0当量,0.24M最终浓度)。将反应混合物在 $-78^{\circ}\text{C}$ 搅拌15分钟,使其升温至 $0^{\circ}\text{C}$ ,并在 $0^{\circ}\text{C}$ 搅拌15分钟。反应混合物用EtOAc(100mL)和5%KHSO<sub>4</sub>(100mL)稀释。用EtOAc( $3\times 50\text{mL}$ )分离和萃取水相。用EtOAc( $3\times 50\text{mL}$ )分离和萃取水相。用盐水洗涤合并的有机相,在MgSO<sub>4</sub>上干燥,过滤,并用甲苯( $10\text{mL}\times 2$ )浓缩,以提供4.85g(27mmol,79%)的淡黄色油状所需氯化物:

$^1\text{H}$  NMR(CDC13,300MHz)  $\delta$ 4.14(q,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H), 3.43-3.57(m, 2H), 1.94-2.19(m, 2H), 1.27(t,  $J=7.1\text{Hz}$ , 3H), 1.22(s, 6H)

(b) 4-叠氮-2,2-二甲基丁酸乙酯。



[0086] 向装有搅棒、橡胶隔垫和氮气入口的100mL圆底烧瓶中加入4-氯-2,2-二甲基丁酸乙酯(2-1)(4.85g,27mmol,1.0当量,0.54M最终浓度)、DMSO(50mL)和叠氮化钠(2.28g,35mmol,1.3当量,0.70M)。反应混合物在 $70^{\circ}\text{C}$ 下在防焰套后搅拌18小时。将反应混合物冷却至环境温度,并用EtOAc(200mL)和H<sub>2</sub>O(100mL)稀释。分离有机相,用H<sub>2</sub>O( $3\times 100\text{mL}$ )和盐水(100mL)洗涤,用MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。通过柱层析(40g硅胶柱;分步梯度洗脱:0%、5%、10%、20%EtOAc/己烷)纯化,得到4.33g(23.3mmol,87%)的淡黄色油状的所需叠氮化物。

$^1\text{H}$  NMR(CDC13,300MHz)  $\delta$ 4.15(q,  $J=7.1\text{Hz}$ , 2H), 3.22-3.35(m, 2H), 1.81-1.96(m, 2H), 1.27(t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 3H), 1.15-1.24(m, 6H)

(c) 5-叠氮-1-氰基-3,3-二甲基-2-戊酮。



[0087] 将THF(20mL)和iPr<sub>2</sub>NH(1.59mL,11.3mmol,2.1当量,0.36M最终浓度)装填到配有搅棒、橡胶隔膜、氮气入口和热电偶探针的加热枪干燥的100mL圆底烧瓶中。溶液在 $0^{\circ}\text{C}$ 冷却,同时以内部温度不超过 $+10^{\circ}\text{C}$ ( $\sim 5$ 分钟)的速率逐滴添加nBuLi溶液(1.28M的己烷溶液,8.64mL,10.8mmol,2.0当量,0.34M最终浓度),在 $0^{\circ}\text{C}$ 搅拌10分钟,并在 $-78^{\circ}\text{C}$ 冷却。通过注射器逐滴添加乙腈(0.59mL,11.3mmol,2.1当量,0.36M最终浓度),添加速率应确保内部温度不超过( $-65^{\circ}\text{C}$ )。反应混合物在 $-78^{\circ}\text{C}$ 搅拌15分钟,并以内部温度不超过 $-65^{\circ}\text{C}$ 的速率以注射器添加THF(5mL)中的4-叠氮-2,2-二甲基丁酸乙酯溶液(1.0g,5.4mmol,1.0当量,0.17M最终浓度)。将反应混合物在 $-78^{\circ}\text{C}$ 搅拌10分钟,使其升温至 $0^{\circ}\text{C}$ ,并在 $0^{\circ}\text{C}$ 搅拌15分钟。反应混合物用EtOAc(50mL)和5%KHSO<sub>4</sub>(50mL)稀释。用EtOAc( $3\times 50\text{mL}$ )分离和萃取水相。用盐水(50mL)洗涤合并的有机相,在MgSO<sub>4</sub>上干燥,过滤并浓缩。通过柱层析(40g硅胶柱;分步梯度洗脱:20%、30%、50%EtOAc/己烷)纯化,得到537mg(2.98mmol,55%)的淡黄色油状的所需酮。

$^1\text{H}$  NMR(CDC13,300MHz)  $\delta$ 3.66(s, 2H), 3.37(t,  $J=6.7\text{Hz}$ , 2H), 1.86(t,  $J=6.8\text{Hz}$ , 2H), 1.16-1.27(m, 6H)

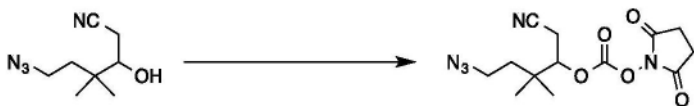
(d) 5-叠氮-1-氰基-3,3-二甲基-2-戊醇。



[0088] 将装有搅棒、橡胶隔膜和氮气入口的25mL圆底烧瓶装入5-叠氮-1-氰基-3,3-二甲基-2-戊酮(537mg, 2.98mmol, 1.0当量, 0.25M最终浓度)和MeOH(12mL)中,并在0℃下冷却。将NaBH<sub>4</sub> 56mg, 1.49mmol, 0.5当量, 0.13M最终浓度)作为固体添加到单个部分中。反应混合物在0℃搅拌30分钟。反应混合物用EtOAc(50mL)和5%KHSO<sub>4</sub>水溶液(50mL)稀释。用EtOAc(3x50mL)分离和萃取水相。用盐水(40mL)洗涤合并的有机相,在MgSO<sub>4</sub>上干燥,过滤并浓缩。通过柱层析(40g硅胶柱;分步梯度洗脱:20%、30%、40%、50%EtOAc/己烷)纯化,得到482mg(2.64mmol, 89%)的淡黄色油状的所需醇。

<sup>1</sup>H NMR(CDC13, 300MHz) δ3.76(ddd, J=9.1, 5.4, 3.4Hz, 1H), 3.34-3.50(m, 2H), 2.38-2.64(m, 3H), 1.68-1.82(m, 1H), 1.50(ddd, J=14.1, 7.4, 6.6Hz, 1H), 0.96(s, 3H), 0.94(s, 3H)

(e) 5-叠氮-1-氰基-3,3-二甲基-2-戊基琥珀酰亚胺碳酸酯。



[0089] 在装有搅棒、橡胶隔膜和氮气入口的50mL热枪干燥圆底烧瓶中装入NHS(455mg、3.96mmol、1.5当量、211mM最终浓度)、DCM(17mL)和三光气(392mg、1.32mmol、0.5当量、70.4mM最终浓度),并在0℃冷却。反应混合物在0℃下冷却,同时通过注射器逐滴添加吡啶(0.774mL, 8.71mmol, 3.3当量, 464mM最终浓度)。将反应混合物升温至环境温度,并在环境温度下搅拌30分钟。通过注射器逐滴添加5-叠氮-1-氰基-3,3-二甲基-2-戊醇(482mg, 2.64mmol, 1.0当量, 150mM最终浓度)的THF(1mL)溶液。反应混合物在环境温度下搅拌1h, 0℃冷却,并通过添加H<sub>2</sub>O(10mL)使其淬灭。反应混合物用EtOAc(50mL)和H<sub>2</sub>O(50mL)进一步稀释。分离有机相,用水(50mL)、5%KHSO<sub>4</sub>水溶液和盐水(50mL)洗涤,用MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。通过柱层析(40g硅胶柱;分步梯度洗脱:25%、30%、35%、40%丙酮/己烷)纯化,得到636mg(1.96mmol, 75%)的白色固体的所需活化接头。

<sup>1</sup>H NMR(CDC13, 300MHz) δ4.90-4.99(m, 1H), 3.32-3.50(m, 2H), 2.84-2.88(m, 4H), 2.66-2.82(m, 2H), 1.58-1.80(m, 2H), 1.08(s, 6H)。

(2) 6-叠氮-1-氰基-3,3-二甲基-2-己基琥珀酰亚胺碳酸酯(式(I), 其中n=1, R<sup>1</sup>=CN, R<sup>2</sup>=H, R<sup>4</sup>=CH<sub>3</sub>, Z=N<sub>3</sub>, 和X=琥珀酰亚胺氧基)。

(a) 5-氯-2,2-二甲基戊酸乙酯。

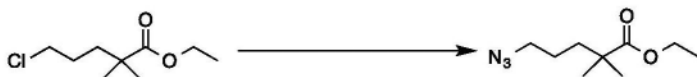


[0090] 将iPr<sub>2</sub>NH(5.30mL, 37.4mmol, 1.1当量, 266mM最终浓度)和THF(100mL)装填到配有搅棒、橡胶隔膜、氮气入口和热电偶探针的加热枪干燥的500mL圆底烧瓶中。反应混合物在0℃冷却,同时通过注射器逐滴添加nBuLi溶液(1.28M的己烷溶液, 27.8mL, 35.7mmol, 1.05当量, 254mM最终浓度),以确保内部温度不超过+10℃(~10min)。将反应混合物在0℃搅拌15分钟,冷却至-78℃,并通过注射器以内部温度不超过-65℃(~5分钟)的速率逐滴添加THF(5mL)中的异丁酸乙酯溶液(4.60mL, 4.0g, 34.0mmol, 1.0当量, 242mM最终浓度)。将反应混

合物在-78℃搅拌45分钟,并以内部温度不超过-68℃的速率添加THF (5mL) 中的1-溴-3-氯丙烷溶液 (3.37mL, 34.0mmol, 1.0当量, 242mM最终浓度)。将反应混合物在-78℃搅拌15分钟,使其升温至0℃,并在0℃搅拌15分钟。反应混合物用EtOAc (100mL) 和5% KHSO<sub>4</sub> (100mL) 稀释。用EtOAc (3x50mL) 分离和萃取水相。用盐水洗涤合并的有机相,在MgSO<sub>4</sub>上干燥,过滤,并用甲苯 (10mL x 2) 浓缩,以提供6.17g (32.0mmol, 90%) 的淡黄色油状所需氯化物:

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ 4.13 (q, J=7.2Hz, 2H), 3.49-3.56 (m, 2H), 1.62-1.83 (m, 4H), 1.26 (t, J=7.1Hz, 3H), 1.17-1.22 (m, 6H)

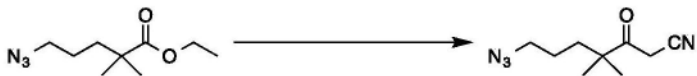
(b) 5-叠氮-2,2-二甲基戊酸乙酯。



[0091] 向装有搅棒、橡胶隔垫和氮气入口的100mL圆底烧瓶中加入5-氯-2,2-二甲基戊酸乙酯 (2-1) (6.17g, 32.0mmol, 1.0当量, 533mM最终浓度)、DMSO (60mL) 和叠氮化钠 (2.7g, 42mmol, 1.3当量, 690mM)。反应混合物在70℃下在防焰套后搅拌18小时。将反应混合物冷却至环境温度,并用EtOAc (200mL) 和H<sub>2</sub>O (100mL) 稀释。分离有机相,用H<sub>2</sub>O (3x100mL) 和盐水 (100mL) 洗涤,用MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。通过柱层析 (40g硅胶柱;分步梯度洗脱:0%、5%、10%、20% EtOAc/己烷) 纯化,得到5.40g (27.1mmol, 85%) 的淡黄色油状的所需叠氮化物。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ 4.13 (q, J=7.0Hz, 2H), 3.26 (t, J=5.9Hz, 2H), 1.46-1.65 (m, 4H), 1.26 (t, J=7.2Hz, 3H), 1.19 (s, 6H) .

(c) 6-叠氮-1-氰基-3,3-二甲基-2-己酮。



[0092] 将THF (40mL) 和iPr<sub>2</sub>NH (3.0mL, 21mmol, 2.1当量, 320mM最终浓度) 装填到配有搅棒、橡胶隔膜、氮气入口和热电偶探针的加热枪干燥的100mL圆底烧瓶中。溶液在0℃冷却,同时以内部温度不超过+10℃ (~5分钟) 的速率逐滴添加nBuLi溶液 (1.28M的己烷溶液, 15.4mL, 20.0mmol, 2.0当量, 305mM最终浓度),在0℃搅拌10分钟,并在-78℃下冷却。通过注射器逐滴添加乙腈 (1.10mL, 21.0mmol, 2.1当量, 322mM最终浓度),添加速率应确保内部温度不超过(-65℃)。反应混合物在-78℃搅拌15分钟,并以内部温度不超过-65℃的速率(约3分钟)以注射器添加THF (5mL) 中的5-叠氮-2,2-二甲基戊酸乙酯溶液 (2.04g, 10.0mmol, 1.0当量, 153mM最终浓度)。将反应混合物在-78℃搅拌10分钟,使其升温至0℃,并在0℃搅拌15分钟。反应混合物用EtOAc (50mL) 和5% KHSO<sub>4</sub> (50mL) 稀释。用EtOAc (3x50mL) 分离和萃取水相。用盐水 (50mL) 洗涤合并的有机相,在MgSO<sub>4</sub>上干燥,过滤并浓缩。通过柱层析 (40g硅胶柱;分步梯度洗脱:15%、20%、30%、40% EtOAc/己烷) 纯化,得到1.18g (6.07mmol, 59%) 的淡黄色油状的所需酮。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ 3.61 (d, J=0.4Hz, 2H), 3.32 (t, J=6.3Hz, 2H), 1.42-1.68 (m, 5H), 1.17-1.24 (m, 6H) .

(d) 6-叠氮-1-氰基-3,3-二甲基-2-己醇。



[0093] 将装有搅棒、橡胶隔膜和氮气入口的25mL圆底烧瓶装入6-叠氮-1-氰基-3,3-二甲

基-2-己酮(1.18g, 6.08mmol, 1.0当量, 243mM最终浓度)和MeOH(25mL)中,并在0℃下冷却。将NaBH<sub>4</sub>(114mg, 3.04mmol, 0.5当量, 122mM最终浓度)作为固体添加到单个部分中。反应混合物在0℃搅拌30分钟。反应混合物用EtOAc(50mL)和5%KHSO<sub>4</sub>水溶液(50mL)稀释。用EtOAc(3x50mL)分离和萃取水相。用盐水(40mL)洗涤合并的有机相,在MgSO<sub>4</sub>上干燥,过滤并浓缩。通过柱层析(40g硅胶柱;分步梯度洗脱:20%、30%、40%、50%EtOAc/己烷)纯化,得到1.1g(5.61mmol, 97%)的淡黄色油状的所需接头醇。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ3.68-3.79(m, 1H), 3.30(t, J=6.6Hz, 2H), 2.39-2.60(m, 2H), 2.23-2.29(m, 1H), 1.20-1.68(m, 4H), 0.93(s, 3H), 0.92(s, 3H)

(e) 6-叠氮-1-氰基-3,3-二甲基-2-己基琥珀酰亚胺碳酸酯。

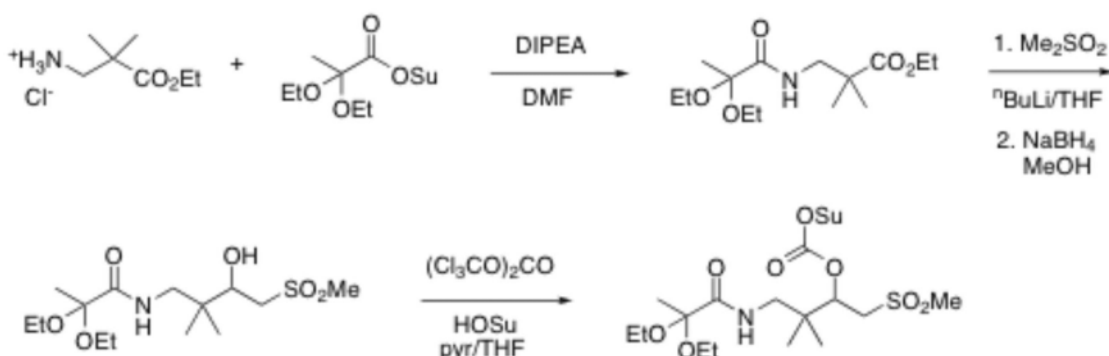


[0094] 在装有搅棒、橡胶隔膜和氮气入口的50mL热枪干燥圆底烧瓶中装入NHS(440mg、3.83mmol、1.5当量、217mM最终浓度)、DCM(17mL)和三光气(378mg、1.28mmol、0.5当量、72mM最终浓度),并在0℃冷却。反应混合物在0℃下冷却,同时通过注射器逐滴添加吡啶(0.68mL, 8.4mmol, 3.3当量, 48mM最终浓度)。将反应混合物升温至环境温度,并在环境温度下搅拌30分钟。通过注射器逐滴添加6-叠氮-1-氰基-3,3-二甲基-2-己醇(500mg, 2.55mmol, 1.0当量, 144mM最终浓度)的THF(1mL)溶液。反应混合物在环境温度下搅拌1h, 0℃冷却,并通过添加H<sub>2</sub>O(10mL)使其淬灭。反应混合物用EtOAc(50mL)和H<sub>2</sub>O(50mL)进一步稀释。分离有机相,用水(50mL)、5%KHSO<sub>4</sub>水溶液和盐水(50mL)洗涤,用MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。通过柱层析(40g硅胶柱;分步梯度洗脱:25%、30%、35%、40%丙酮/己烷)纯化,得到638mg(1.89mmol, 74%)的白色固体的所需活化接头。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ4.93(dd, J=7.1, 5.3Hz, 1H), 3.32(s, 2H), 2.86(s, 4H), 2.71-2.79(m, 2H), 1.29-1.72(m, 4H), 1.05(s, 3H), 1.04(s, 3H)。

### 实施例3

式(I)接头的制备,其中Z=受保护的酮



[0095] 2,2-二乙氧基丙酸琥珀酰亚胺酯:向丙酮酸(8.8g, 100mmol)和原甲酸三乙酯(40mL, 240mmol)的冰冷混合物中添加浓H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(0.5mL)。混合物在冰上搅拌30分钟,然后用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>稀释,然后用冷水再用盐水洗涤两次,在MgSO<sub>4</sub>上干燥,过滤,并浓缩,以产生粗制的2,2-二乙氧基丙酸(11.16g, 69mmol)。将其溶解于250mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中,然后用N-羟基琥珀酰亚胺(8.7g, 76mmol)和二环己基碳二亚胺(15.6g, 76mmol)处理2h。过滤白色浓稠浆液以去除二

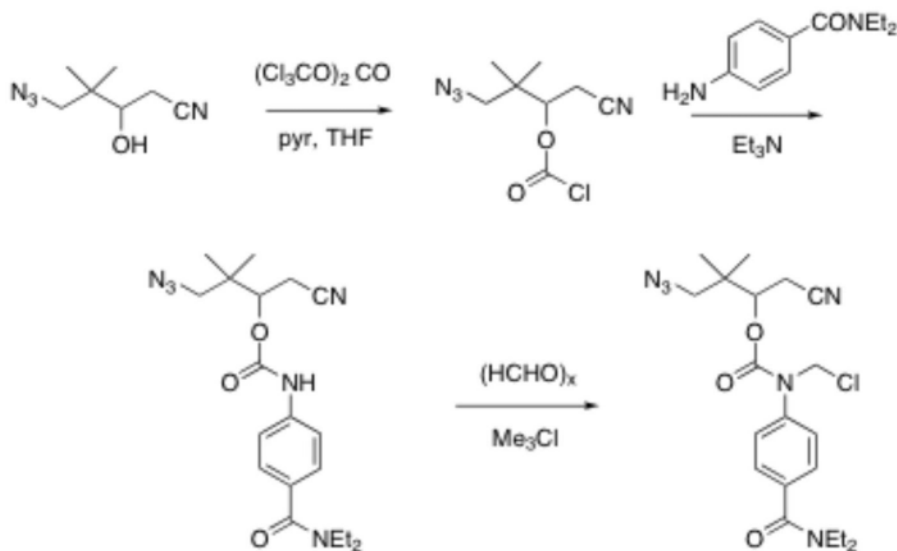
环己基脲,然后通过硅胶垫去除大部分黄色。用1:1EtOAc/己烷漂洗硅胶,并浓缩合并的洗脱液。剩余物用热的20%EtOAc/己烷结晶,以提供第一批白色晶体状琥珀酰亚胺酯(11.73g,45mmol)。在SiO<sub>2</sub>(0-60%EtOAc/己烷)上对母液进行层析,然后进行结晶,得到额外批量的产物,获得总共13.0g产物(其中总共50%来自丙酮酸)。

[0096] 3-[(2,2-二乙氧基丙酰基)氨基]-2,2-二甲基丙酸乙酯:在环境温度下,用N,N-二异丙基乙胺(3.5mL,20mmol)处理10mL DMF中的3-氨基-2,2-二甲基丙酸乙酯(CombiBlocks;1.82g,10mmol)和2,2-二乙氧基丙酸琥珀酰亚胺酯(2.6g,10mmol)溶液1h。用EtOAc稀释混合物,然后依次用水,5%KHSO<sub>4</sub>,饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶性和盐水洗涤,然后在MgSO<sub>4</sub>上干燥,过滤并浓缩。在SiO<sub>2</sub>(0-70%MTBE/己烷)上进行层析,得到无色油状的产物酯(2.48g,86%)。

[0097] 转化为碳酸琥珀酰亚胺酯遵循上述其他接头所述的方法。

#### 实施例4

式(I)接头的制备,其中X=N(R<sup>6</sup>)CH<sub>2</sub>Cl

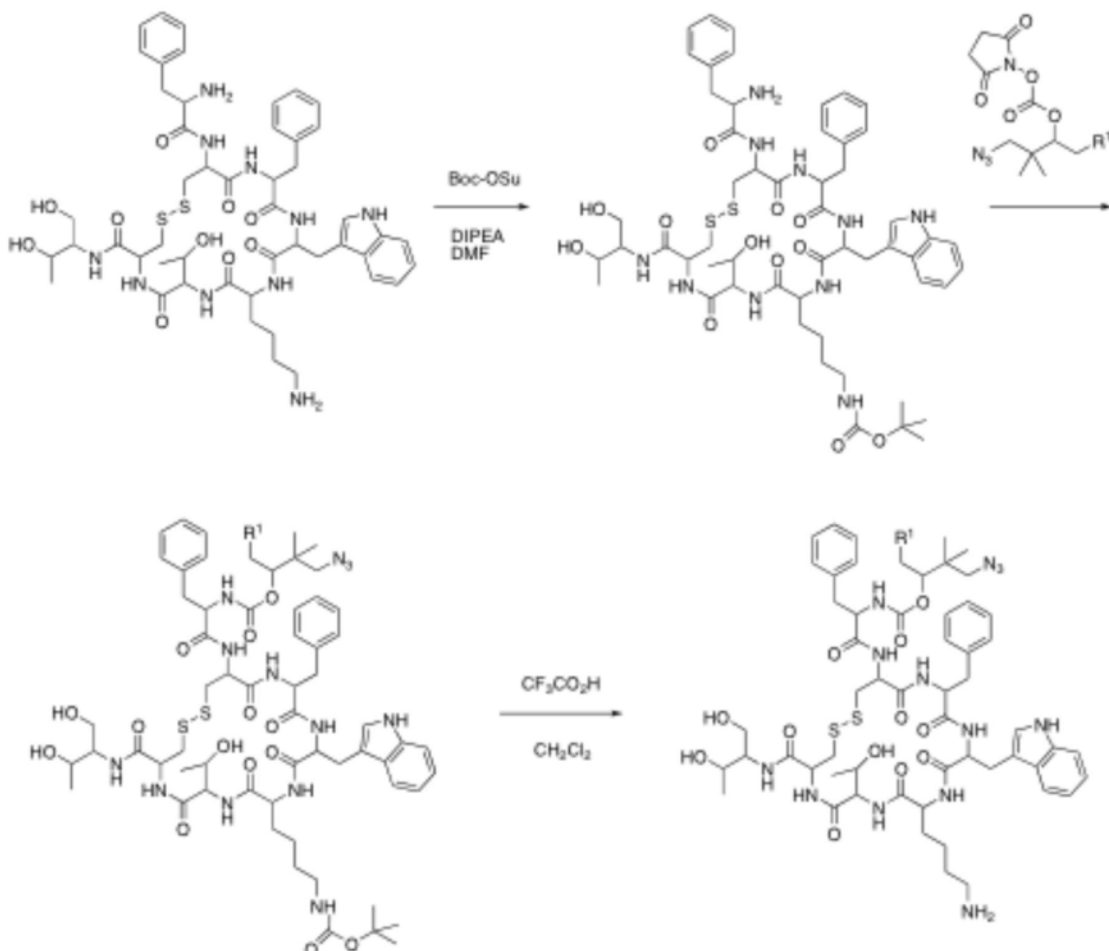


[0098] 步骤1.4-叠氮-1-氰基-3,3-二甲基-2-丁基4-(N,N-二乙基甲酰胺基)苯基氨基甲酸酯。将吡啶添加到4-叠氮-1-氰基-3,3-二甲基-2-丁醇和三光气的THF溶液中。15分钟后,过滤并浓缩混合物。剩余物溶于CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中,并用N,N-二乙基4-氨基苯甲酰胺和三乙胺处理。1小时后,用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>稀释混合物,并用5%KHSO<sub>4</sub>、水和盐水洗涤,然后用MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤并蒸发。产物结晶。

[0099] 步骤2.4-叠氮-1-氰基-3,3-二甲基-2-丁基4-(N,N-二乙基甲酰胺基)苯基氨基甲酸N-氯甲酯。将步骤1的氨基甲酸酯(1mmol)、多聚甲醛(120mg)、氯代三甲基硅烷(0.5mL)和1,2-二氯乙烷(4mL)的混合物密封在螺旋盖小瓶中,并在50℃下加热12h。冷却后,浓缩混合物,将剩余物重新溶解在10mL MTBE中,过滤并重新浓缩,得到无色油状的氨基甲酸N-氯甲酯。

#### 实施例5

式(II)化合物的制备,其中Z=叠氮化物



[0100] 示出了一种制备式 (II) 化合物的方法, 其中  $n=1$ ,  $R^4=CH_3$ ,  $Z=N_3$ , D 是通过 Phe<sup>1</sup> 的  $\alpha$ -氨基连接的奥曲肽。

[0101] Boc-奥曲肽: 将 58.4mg/mL 叔丁基琥珀酰亚胺碳酸酯 (385 $\mu$ L) 溶液添加到 2mL 无胺的 N,N-二甲基甲酰胺中的奥曲肽乙酸盐 (128mg) 和 N,N-二异丙基乙胺 (0.2mL) 的混合物中。4 小时后, HPLC 分析表明存在 91.6% 单 Boc-奥曲肽、3.0% 双-Boc 奥曲肽和 5.4% 奥曲肽。紫外分光光度分析表明奥曲肽的总浓度为 43.5mM。溶液不经纯化使用。

[0102] 一般方法: 将式 (I) 化合物溶于 40mM 无胺 DMF 中。将上述 Boc 奥曲肽的等份 (500 $\mu$ L, 21.8 $\mu$ mol 总奥曲肽) 与式 (I) 化合物的溶液 (540 $\mu$ L, 21.6 $\mu$ mol) 混合, 并在环境温度下保持 16h。将反应物稀释至 5mL 冰冷的 0.1M 乙酸中, 通过离心收集沉淀的接头-肽。将沉淀的物质溶解在 4mL 甲醇中, 并通过制备级 HPLC ( $C_{18}$ , 20-80% MeCN/ $H_2O$ /0.1% TFA) 进行纯化。干燥后, 将纯化的物质溶于 1mL 冰冷的 95:5 三氟乙酸/水中以去除 Boc 基团, 保持 10 分钟, 然后通过添加 10mL 冷乙醚沉淀并干燥。

[0103] 根据该方法制备的式 (II) 化合物包括:

$N\alpha$ -[(4-叠氮-1-((N,N-二甲基胺基)磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁氧基)羰基]奥曲肽 ( $n=1$ ,  $R^1=SO_2N(CH_3)_2$ ,  $R^2=H$ ,  $R^4=CH_3$ ,  $Z=N_3$ , D=通过  $\alpha$ -氨基连接的奥曲肽)。产率 23.6mg (84%), LC-MS 显示  $[M+H]^+=1295.75$  (预期值 1295.6)。

$N\alpha$ -[(4-叠氮-1-((N-乙基-N-甲基胺基)磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁氧基)羰基]奥曲肽 ( $n=1$ ,  $R^1=SO_2N(CH_3)(CH_2CH_3)$ ,  $R^2=H$ ,  $R^4=CH_3$ ,  $Z=N_3$ , D=通过  $\alpha$ -氨基连接的奥曲肽)。产率 21.6mg (84%), LC-MS 显示  $[M+H]^+=1309.75$  (预期值 1309.6)。

$\text{N}^\alpha$ -[4-叠氮-1-((吗啉代磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁氧基)羰基]奥曲肽 ( $n=1, R^1$  =

$\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}, R^2=\text{H}, R^4=\text{CH}_3, Z=\text{N}_3, \text{D}=\text{通过}\alpha\text{-氨基连接的奥曲肽}$ )。产率19.9mg (84%), LC-MS显示  $[\text{M}+\text{H}]^+=1337.7$  (预期值1337.6)。

$\text{N}^\alpha$ -[4-叠氮-1-((N,N-二(2-甲氧基乙基)氨基磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁氧基)羰基]奥曲肽 ( $n=1, R^1=\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3)_2, R^2=\text{H}, R^4=\text{CH}_3, Z=\text{N}_3, \text{D}=\text{通过}\alpha\text{-氨基连接的奥曲肽}$ )。产率35.4mg, LC-MS显示  $[\text{M}+\text{H}]^+=1383.8$  (预期值1383.7)。

$\text{N}^\alpha$ -[4-叠氮-1-((异丙基磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁氧基)羰基]奥曲肽 ( $n=1, R^1$  =

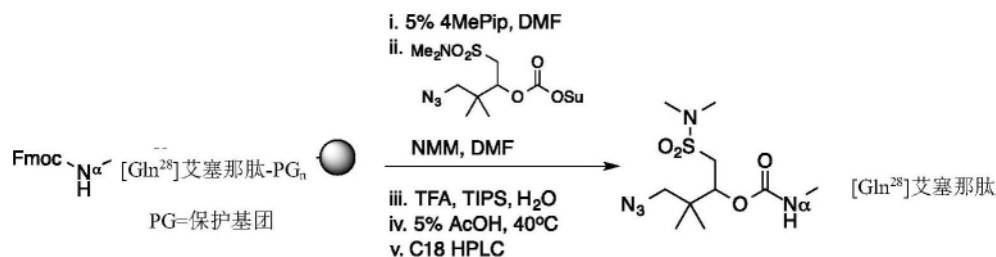
$\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}, R^2=\text{H}, R^4=\text{CH}_3, Z=\text{N}_3, \text{D}=\text{通过}\alpha\text{-氨基连接的奥曲肽}$ )。产率16.8mg, LC-MS显示  $[\text{M}+\text{H}]^+=1294.7$  (预期值1294.6)。

$\text{N}^\alpha$ -[4-叠氮-1-(1-氰基-3,3-二甲基-2-丁氧基)羰基]奥曲肽 ( $n=1, R^1=\text{CN}, R^2=\text{H}, R^4=\text{CH}_3, Z=\text{N}_3, \text{D}=\text{通过}\alpha\text{-氨基连接的奥曲肽}$ )。

$\text{N}^\alpha$ -[4-叠氮-1-(1-(甲基磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁氧基)羰基]奥曲肽 ( $n=1, R^1$  =

$\text{SO}_2\text{CH}_3, R^2=\text{H}, R^4=\text{CH}_3, Z=\text{N}_3, \text{D}=\text{通过}\alpha\text{-氨基连接的奥曲肽}$ )。

$\text{N}^\alpha$ -接头-[Gln<sup>28</sup>]-艾塞那肽



[0104]  $\text{N}^\alpha$ -{4-叠氮基-3,3-二甲基-1-[(N,N-二甲基)氨基磺酰基]-2-丁氧基羰基}-[Gln<sup>28</sup>]艾塞那肽。在25mL烧结SPE柱中,环境温度下在10mL DMF中溶胀在Rink酰胺树脂上的经保护的[Gln<sup>28</sup>]艾塞那肽(Fmoc $\alpha$ -胺)(0.63meq/g置换,0.12mmol肽/g肽-树脂,1.00g肽-树脂,0.12mmol肽)30分钟。使用F/F Luer接合器和12mL注射器通过注射器过滤去除DMF,并使用DMF中的5%4-甲基哌啶处理溶胀的树脂(2x10mL,各5分钟;然后2x10mL,各20分钟)。然后用DMF(10x10mL)清洗Fmoc-去保护树脂,并通过注射器过滤去除上清液。将洗涤后的树脂悬浮在8.4mL DMF中,并用3.6mL 0-{4-叠氮-3,3-二甲基-1-[(N,N-二甲基)氨基磺酰基]-2-丁基}-O'-琥珀酰亚胺碳酸酯(0.10M于DMF中,0.36mmol,30mM最终浓度)和4-甲基吗啉(40 $\mu$ L,0.36mmol,30mM最终浓度)处理。使用定轨振荡器搅动反应混合物。20小时后,通过注射器过滤去除上清液,然后依次用DMF(5x15mL)和 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (5x15mL)洗涤树脂。Kaiser试验对中间物接头-改性树脂中的游离胺呈阴性。然后用10毫升预冷(0 $^\circ\text{C}$ )90:5:5TFA:TIPS:H<sub>2</sub>O处理树脂,同时在轨道振荡器上轻轻搅拌。2小时后,对树脂进行真空过滤,并用TFA(2x1.5mL)清洗。滤液通过旋转蒸发浓缩至~6mL。将TFA浓缩液滴加至已配衡的50mL Falcon管中的40mL-20 $^\circ\text{C}$ 的MTBE中,以沉淀粗接头-肽。在-20 $^\circ\text{C}$ 下温育10分钟后,通过离心(3000x g,2分钟,4 $^\circ\text{C}$ )沉淀粗接头-肽悬液,并倾析上清液。将所得沉淀悬浮在40mL-20 $^\circ\text{C}$ 的MTBE中,旋转混合,离心,并如上所述倾析。在高真空下干燥后,分离灰白色固态沉淀(575mg),然后将其

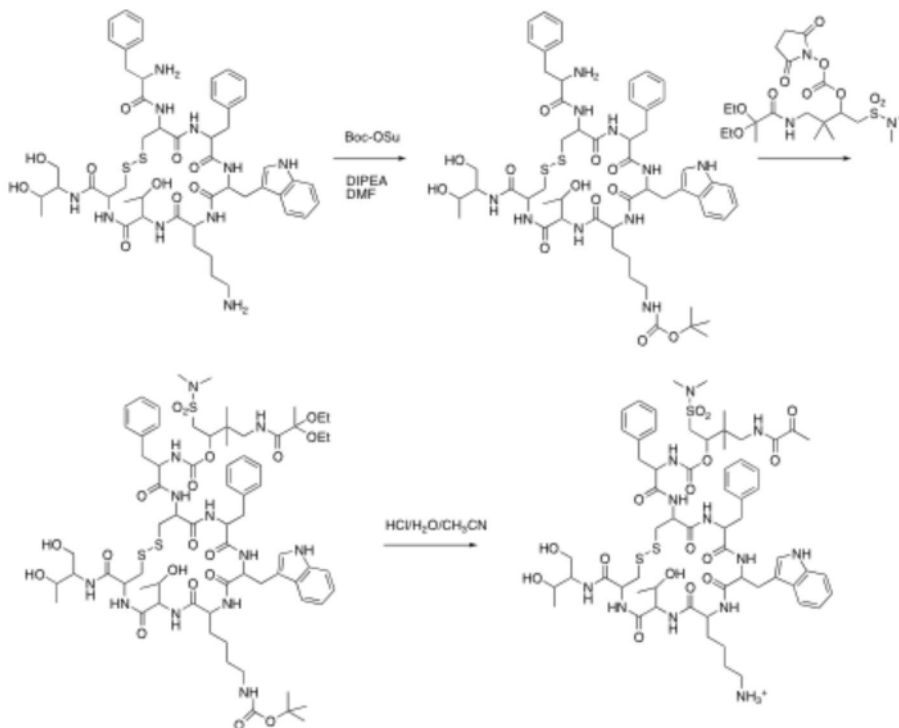
溶解在8mL 5%AcOH中( $\sim 70\text{mg/mL}$ )。在50℃水浴中加热45分钟后,通过制备级C18 HPLC纯化溶液,以提供13mL标题化合物水溶液( $3.33\text{mM}$ ,  $43\mu\text{mol}$ ,  $A_{280}$ 测定)。冻干提供235mg白色固体。

在280nm处测定C18 HPLC纯度:90.0% ( $RV=11.47\text{mL}$ )

$M_{\text{平均}}$ :4476.9计算值;4476观测值

#### 实施例6

式(II)化合物的制备,其中Z=酮

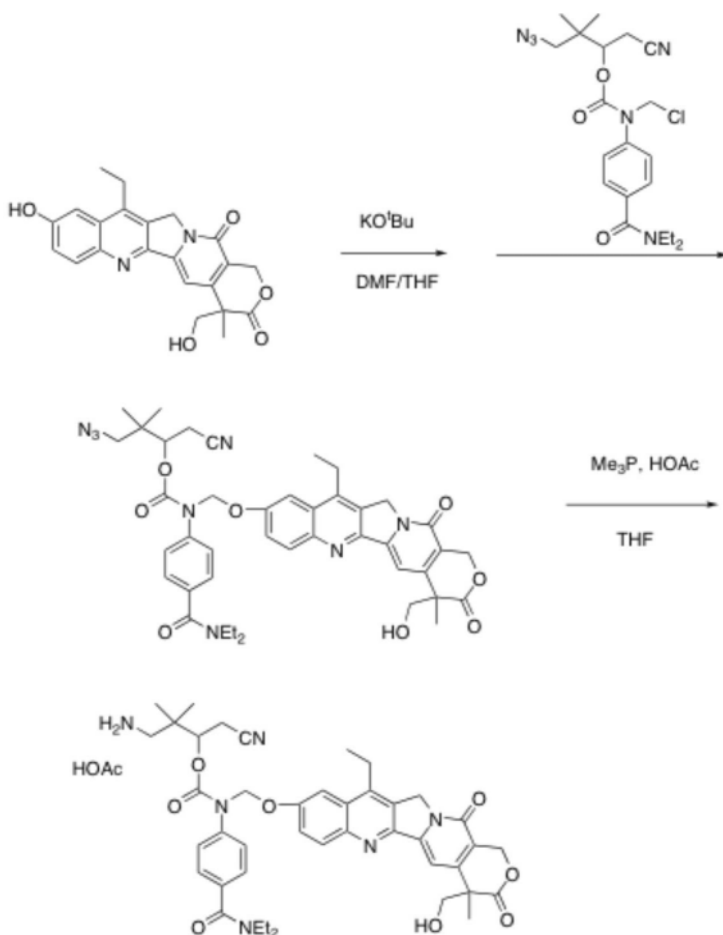


[0105] 实施例说明了Z=酮的式(II)化合物的制备,其中 $n=1$ 、 $R^1=\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $R^2=\text{H}$ 、每个 $R^4=\text{CH}_3$ 、Z=NH-丙酮酰基和D=N $\alpha$ -连接的奥曲肽。

[0106] 将250mM的叔丁基琥珀酰亚胺碳酸酯的DMF溶液( $440\mu\text{L}$ )添加到2mL无胺DMF中的奥曲肽乙酸盐(128mg)和N,N-二异丙基乙胺(0.2mL)的混合物中。1小时后,HPLC分析表明存在90%单Boc-奥曲肽、2.5%双-Boc奥曲肽和7%奥曲肽。添加4-(2-二乙氧基丙酰胺基)-1-(N,N-二甲氨基)磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯(实施例3;54mg)在 $100\mu\text{L}$  DMF中的溶液。将混合物在环境温度下保持16小时,然后用EtOAc稀释,然后用5% $\text{KHSO}_4$ ,再用盐水冲洗。在 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 上干燥后,对混合物进行过滤和浓缩,以产生作为泡沫的完全保护的中间物。将其溶解于1mL  $\text{CH}_3\text{CN}$ 中,并在50℃用1mL 2N HCl处理30分钟。将溶液冷却至环境温度,用2mL水稀释,并小心地添加至5mL 1M  $\text{NaHCO}_3$ 。通过离心收集沉淀产物,用水和二氯甲烷洗涤,并溶解在5mL甲醇中。

#### 实施例7

式(II)接头-药物的制备,其中 $Y=\text{N}(\text{R}^6)\text{CH}_2$



[0107] 冰上冷却SN-38(100mg)在10mL 1:1DMF/THF中的溶液,并用1M叔丁醇钾(0.26mL,1当量)逐滴处理。搅拌所得橙色悬液30分钟,然后添加N-(氯甲基)氨基甲酸酯接头(实施例4,1mmol)在1mL THF中的溶液。橙色逐渐变淡,悬液变清。混合物用10%柠檬酸水溶液淬灭,然后用乙酸乙酯萃取。用水和盐水洗涤有机提取物,然后在MgSO<sub>4</sub>上干燥,过滤并蒸发。使用0-100%丙酮在己烷中的梯度在SiO<sub>2</sub>上层析纯化,提供式(II)的接头-药物,其中n=1,R<sup>1</sup>=CN,R<sup>2</sup>=H,每个R<sup>4</sup>=Me,D=SN-38,Y=N(R<sup>6</sup>)CH<sub>2</sub>(R<sup>6</sup>=4-(N,N-二乙基甲酰胺基苯基))和Z=叠氮化物。

[0108] 其中Z=胺的相应化合物制备如下。将其中Z=叠氮化物的化合物在THF中的溶液添加到1M三甲基膦在THF和乙酸中的混合物里。停止析气后,加入水,搅拌混合物1小时,然后浓缩至干燥。剩余物在水和乙酸乙酯之间分配,收集水相并干燥。通过制备级HPLC进行最终纯化,使用0-100%乙腈/水/0.1%TFA的梯度。

#### 实施例8

式(III)偶联物的形成,其中M为可溶性PEG且Z\*=1,2,3-三唑

[0109] 将20kD四臂PEG-四(环辛炔)(根据下面的实施例14制备,预聚物B)和接头-药物(其中Z=实施例5的叠氮化物,在乙腈中)的混合物50℃维持16h。先用水然后用甲醇透析(12kDa SpectraPor 2),提供式(III)的纯化偶联物,其中M为可溶性四臂PEG,Z\*为1,2,3-三唑。

#### 实施例9

式(III)偶联物的形成,其中M为可溶性PEG且Z\*=肟

[0110] 在DMF中,在HATU和N,N-二异丙基乙胺存在下,将20kDa四臂PEG-四胺(100mg,NOF America)与过量(Boc-氨基氧基)乙酸反应,制备20kDa四臂PEG-四(氨基氧基乙酰胺)。1小时后,通过缓慢添加到搅拌的MTBE中沉淀PEG,离心收集,并在真空下干燥。将其溶于2mL 1:1CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H中,保持1h,并蒸发至干燥。将剩余物溶解在2mL THF中,缓慢添加到搅拌的MTBE中沉淀产物,离心收集,并在真空下干燥。

[0111] 将20kDa四臂PEG-四(氨基氧基乙酰胺)和接头-药物(其中Z=实施例6的酮,在1:1DMSO/0.1M乙酸中)的混合物维持在50℃持续16h。先用水然后用甲醇透析(12kDa SpectraPor 2),提供式(III)的纯化偶联物,其中M为可溶性4-臂PEG,Z\*为肟。

#### 实施例10

式(III)偶联物的形成,其中M为可溶性PEG且Z\*=甲酰胺

[0112] 将20kDa四臂PEG四(琥珀酰亚胺酯)(JenKem)、N,N-二异丙基乙胺和接头-药物(其中Z=实施例7的胺,在THF中)的混合物搅拌1h。先用水然后用甲醇透析(12kDa SpectraPor 2),提供式(III)的纯化偶联物,其中M为可溶性四臂PEG,Z\*为甲酰胺。

#### 实施例11

式(III)偶联物的形成,其中M为不溶性可降解的PEG微球

[0113] 式(IV)((其中P<sup>1</sup>和P<sup>2</sup>均为10kDa四臂PEG,Z\*=1,2,3-三唑,n=1,每个R<sup>4</sup>=CH<sub>3</sub>,R<sup>1</sup>=SO<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,R<sup>2</sup>=H,和W=CH((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>)C(=O)NH(即,x=0,y=4,Z=0,B=NH<sub>2</sub>,和C\*=甲酰胺)(根据下面的实施例14制备))PEG微球(100mL)的悬浮液在乙腈中与4-环辛炔基琥珀酰亚胺碳酸酯和N,N-二异丙基乙胺反应活化。然后将包含多个反应基团Z'=环辛炔基得到的水凝胶悬浮在50mM乙酸盐缓冲液(pH 5)中,并与式(II)接头-药物溶液反应,其中Z=叠氮化物,n=1,每个R<sup>4</sup>=CH<sub>3</sub>,R<sup>1</sup>=SO<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,R<sup>2</sup>=H,和D=-HGEFTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLK QGGPSSGAP-NH<sub>2</sub>(艾塞那肽-[N28Q])(实施例5)。在50℃下48小时后,用乙酸盐缓冲液充分洗涤微球以去除未偶联的肽。分析表明,填充微球浆料含有2.1μmol连接肽/mL浆料。

#### 实施例12

释放动力学

[0114] 将偶联物溶解在0.25-2mM的100mM缓冲液中,并在恒温HPLC自动进样器中保持37℃。定期除去样品(5-10μL)并将其注入HPLC(Phenomenex Jupiter 5μm 4.6x150mm C<sub>18</sub>反相),并以1mL/分钟的速度以0-100%MeCN/H<sub>2</sub>O/0.1%TFA的线性梯度进行洗脱。在280nm(肽)或350nm(二硝基苯基-Lys)处检测到峰,并积分以提供偶联物和释放肽的峰面积。药物释放程度计算为(释放药物面积)/[(释放药物面积)+(偶联物面积)]。如上文实施例5所述,在α-胺处连接的奥曲肽与如实施例8所述的20kDa MeO-PEG环辛炔偶联。根据在给定pH值下从以下方程式计算得到结果获得pH值为7.4时的释放半衰期。

$$t_{1/2}(\text{pH } 7.4) = \ln(2) \cdot 10^{(X-7.4)} / k_{\text{obs}}$$

表1

| R <sup>1</sup>                   | pH   | 温度 (°C) | k <sub>obs</sub> (h <sup>-1</sup> ) | pH 7.4, 37 °C 计算得到的 t <sub>1/2</sub> (h) |
|----------------------------------|------|---------|-------------------------------------|------------------------------------------|
| CN                               | 9.29 | 37      | 0.1283                              | 419                                      |
| CN                               | 9.29 | 38      | 0.1616                              | 380 <sup>a</sup>                         |
| SO <sub>2</sub> Me               | 9.29 | 38      | 0.4798                              | 128 <sup>a</sup>                         |
| SO <sub>2</sub> iPr              | 9.29 | 38      | 0.3985                              | 154 <sup>a</sup>                         |
| SO <sub>2</sub> NMe <sub>2</sub> | 9.29 | 37      | 0.08548                             | 629                                      |
| SO <sub>2</sub> NMe <sub>2</sub> | 9.40 | 37      | 0.09602                             | 722                                      |
| SO <sub>2</sub> N(Et)Me          | 9.29 | 37      | 0.043                               | 1251                                     |
| SO <sub>2</sub> (吗啉代)            | 9.29 | 38      | 0.3148                              | 195 <sup>a</sup>                         |
| SO <sub>2</sub> (4-甲基哌啶基)        | 9.29 | 37      | 0.04896                             | 1099                                     |
| SO <sub>2</sub> (4-甲基哌啶基)        | 9.29 | 38      | 0.06448                             | 954 <sup>a</sup>                         |
| SO <sub>2</sub> (4-甲基哌啶基)        | 9.40 | 37      | 0.05947                             | 1166                                     |

表1. 在不同pH值和温度下, 硼酸盐缓冲液中可溶性PEG偶联物释放 $\alpha$ -连接奥曲肽的动力学。<sup>a</sup>t<sub>1/2, 37°C</sub> = (t<sub>1/2, 38°C</sub>) \* 1.143 (见Santi PNAS 2012, SI中的阿雷尼乌斯(Arrhenius)公式)。在所有情况下, n=1, R<sup>2</sup>=H, 每个R<sup>4</sup>=Me, Z=N<sub>3</sub>, Y不存在, D=N $\alpha$ -连接的奥曲肽。

### 实施例13

#### 氮杂-迈克尔反应的动力学

[0115] 正向反应的动力学: 在三个1.5mL的玻璃HPLC小瓶中, 向0.9mL预热的甘氨酸裂解缓冲液A、B或C中添加标准、 $\beta$ -甲基或gem-二甲基乙烯基砒(0.1mL, 0.5 $\mu$ mol, 0.5mM最终浓度)的5mM DMSO溶液。将小瓶保存在加热的(37°C)HPLC自动进样器中, 并通过C18 HPLC定期监测氮杂-迈克尔反应。

裂解缓冲液A: 1.1M甘氨酸(1.0M最终浓度), 0.11M HEPES, 37°C时pH值7.4。

裂解缓冲液B:1.1M甘氨酸(1.0M最终浓度),0.11M HEPES,37℃时pH值8.4。

裂解缓冲液C:0.11M甘氨酸(0.10M最终浓度),37℃时pH值9.5。

用以下公式计算 $K_{eq}$ :

$$K_{eq} = K_{eq\ app} / [Gly]$$

$$K_{eq\ app} = [GA]_{eq} / [VS]_{eq} = \text{平台} (0.5\text{mM} - \text{平台})$$

[Gly]=甘氨酸浓度,单位为M

[GA]=甘氨酸加合物浓度,单位为mM

[VS]=乙烯基砒浓度,单位为mM

用Prism确定平台(mM)。

[0116] 两个未知数 $k_f$ (结合)和 $k_r$ (解离)由以下两个公式计算得出, $K_{obs}$ 由Prism fit和 $K_{eq\ app}$ 确定,上述定义如下:

$$k_{obs} = k_f [Gly] + k_r$$

$$k_f [Gly] / k_r = K_{eq\ app}$$

[0117] 反向反应的动力学:直接从分离的甘氨酸加合物测量解离性反向-氮杂-迈克尔反应的速率。在没有添加甘氨酸的情况下,在37℃下将每种纯化的甘氨酸加合物稀释到pH 7.4的HEPES缓冲液中。起始甘氨酸加合物的浓度对时间作图,并将每条曲线拟合为Prism中的一阶衰减。对于每个反应,计算的无穷大值小于1 $\mu\text{M}$ ,表明反应进行到完成,因此 $k_r$ 本质上等同于 $K_{obs}$ 。向三个0.3mL塑料锥形HPLC小瓶中的每一个小瓶中,将0.7-3.8mM的标准、 $\beta$ -甲基或gem-二甲基砒-DIBO甘氨酸加合物(11nmol,50 $\mu\text{M}$ 最终浓度)的DMSO溶液添加到0.2mL预热的0.1M HEPES(pH 7.0)中,其含有足够的水,以将最终体积调节至0.22mL。将反应小瓶保存在加热的(37℃)HPLC自动进样器中,并通过C18 HPLC定期监测反向-氮杂-迈克尔反应。使用下式计算起始甘氨酸加合物[GA]的浓度( $\mu\text{M}$ ),并使用Prism绘制时间曲线:

$$[GA] = ga / (ga + vs) * 50\mu\text{M}$$

[GA]=甘氨酸加合物浓度,单位为 $\mu\text{M}$

ga=甘氨酸加合物积分的HPLC峰面积(254nm)

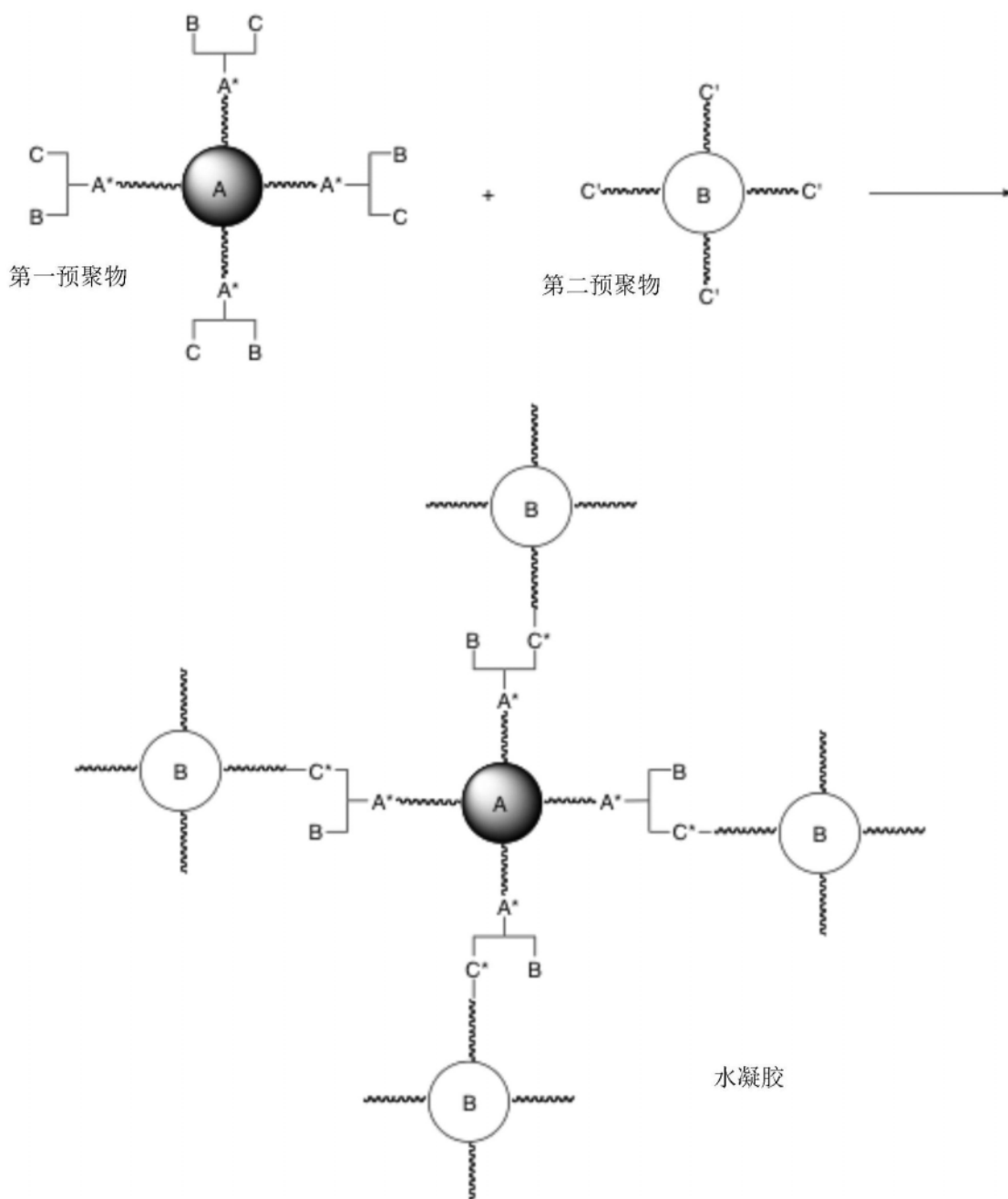
vs=乙烯基砒积分的HPLC峰面积(254nm)

50 $\mu\text{M}$ =[GA]<sub>i</sub>和最大可能[VS]

通过将数据拟合到Prism中的一阶衰减来确定 $k_r$ (解离)。

#### 实施例14

#### 可降解PEG-水凝胶的制备

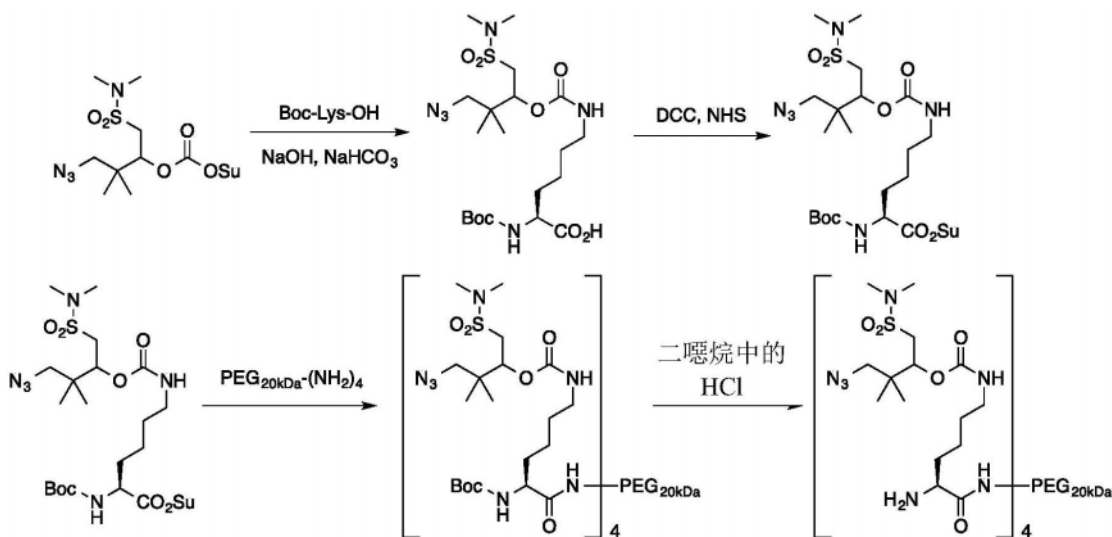


[0118] 本发明的水凝胶通过两种包含基团C和C'的预聚物的聚合制备,所述基团C和C'反应形成连接官能团C\*。连接到C或C'之一的预聚物还包括通过与式(I)分子反应引入的可裂解接头,以便将可裂解接头引入水凝胶的每个交联中。

[0119] 在一个实施方式中,第一预聚物包含四臂PEG,其中每个臂末端是具有两个相互不反应(“正交”)的官能团B和C的衔接子单元。B和C最初可以受保护形式存在,以允许在后续步骤中的选择性化学反应。在某些实施方式中,衔接子单元是氨基酸,特别是赖氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸或谷氨酸的衍生物,包括其中 $\alpha$ 胺基已转化为叠氮化物的衍生物,例如2-叠氮谷氨酸单酯。衔接子单元通过连接官能团A\*连接到每个第一预聚物臂,连接官能团A\*由每个预聚物臂上的官能团A与衔接子单元上的关联官能团A'缩合形成。第二预聚物包含四臂PEG,其中每个臂末端是与第一预聚物的基团C具有互补反应性的官能团C',使得当C和C'反应形成C\*时,两个预聚物之间发生交联。

[0120] 作为说明性实施例,如下制备第一预聚物。H-Lys (Boc) -OH与式(I)的接头(其中Z=叠氮化物)酰化,以得到衔接子单元,其中A=COOH,B=Boc保护的NH<sub>2</sub>,C=叠氮化物。将其偶联至20kDa四臂PEG-四胺,并且去除Boc基团以提供第一预聚物,其中A\*=酰胺,B=NH<sub>2</sub>,C=叠氮化物,并且其中式(I)的可裂解接头掺入第一预聚物的每个臂和C基团之间的连接中。通过20kDa四臂PEG-四胺与5-环辛炔基琥珀酰亚胺碳酸酯酰化制备相应的第二预聚物,以得到第二预聚物,其中C'=环辛炔。在混合第一和第二预聚物时,C=叠氮化物和C'=环辛炔基团的反应形成相应的三唑基团,从而将两种预聚物交联成三维网络,其中每个交联包含由掺入式(I)化合物产生的裂解接头,并且其中通过掺入第一预聚物而产生的每个节点包括剩余的官能团B=NH<sub>2</sub>,其可衍生以连接其它其它接头、药物、荧光团、金属螯合剂等。

预聚物A,其中A\*=酰胺,B=胺,C=叠氮化物



(1) N<sup>α</sup>-Boc-N<sup>ε</sup>-{4-叠氮基-3,3-二甲基-1-[(N,N-二甲基)氨基磺酰基]-2-丁氧基羰基}-Lys-OH。

[0121] 用1M NaOH水溶液(12.0ml,12.0mmol)、1M NaHCO<sub>3</sub>水溶液(10.0ml,10.0mmol)和50ml MeCN中的0- {4-叠氮-3,3-二甲基-1-[(N,N-二甲基)氨基磺酰基]-2-丁基}-O'-琥珀酰亚胺碳酸酯(3.91g,10.0mmol,0.1M最终浓度)溶液处理28mL H<sub>2</sub>O中的Boc-Lys OH(2.96g,12.0mmol)溶液。在室温下搅拌2小时后,通过C18 HPLC(ELSD)判断反应完成。用30毫升1MKHSO<sub>4</sub>(水溶液)淬灭反应。将混合物在500mL 1:1EtOAc:H<sub>2</sub>O之间分配。用100mLEtOAc萃取水相。用H<sub>2</sub>O和盐水(各100mL)洗涤合并的有机相,然后在MgSO<sub>4</sub>上干燥,过滤,并通过旋转蒸发浓缩,以得到作为白色泡沫的粗标题化合物(5.22g,9.99mmol,99.9%粗产率)。

C18 HPLC,通过ELSD测定纯度:99.1%(RV=9.29mL)。

LC-MS(m/z):计算值521.2;观测值521.3[M-H]<sup>-</sup>。

(2) N<sup>α</sup>-Boc-N<sup>ε</sup>-{4-叠氮基-3,3-二甲基-1-[(N,N-二甲基)氨基磺酰基]-2-丁氧基羰基}-Lys-OSu。将二环己基碳二亚胺(二甲苯中60%,2.6M,4.90mL,12.7mmol)添加到98mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中的N<sup>α</sup>-Boc-N<sup>ε</sup>-{4-叠氮基-3,3-二甲基-1-[(N,N-二甲基)氨基磺酰基]-2-丁氧基羰基}-Lys-OH(5.11g,9.79mmol,0.1M最终浓度)和N-羟基琥珀酰亚胺(1.46g,12.7mmol)溶液中。在环境温度搅拌反应悬液,并通过C18 HPLC(ELSD)进行监测。2.5小时后,过滤反应混合物,并将滤液加到Siliasep 120g柱上。产物用丙酮在己烷中的分步梯度洗脱(0%、20%、

30%、40%、50%、60%，各240mL)。合并并浓缩澄清的含有产品的级分，提供白色泡沫状标题化合物(4.95g, 7.99mmol, 81.6%产率)。

C18 HPLC, 通过ELSD测定纯度: 99.7% (RV=10.23mL)。

LC-MS (m/z): 计算值520.2; 实测值520.2 [M+H-Boc]<sup>+</sup>。

(3) (N<sup>α</sup>-Boc-N<sup>ε</sup>-{4-叠氮基-3,3-二甲基-1-[(N,N-二甲基)氨基磺酰基]-2-丁氧基羰基}-Lys)<sub>4</sub>-PEG<sub>20kDa</sub>。

[0122] 将PEG<sub>20kDa</sub>-(NH)<sub>4</sub> (20.08g, 0.9996mmol, 3.998mmol NH<sub>2</sub>, 0.02M NH<sub>2</sub>最终浓度) 溶解于145mL MeCN中。添加N<sup>α</sup>-Boc-N<sup>ε</sup>-{4-叠氮基-3,3-二甲基-1-[(N,N-二甲基)氨基磺酰基]-2-丁氧基羰基}-Lys-OSu在50mL MeCN中的溶液。在环境温度搅拌反应，并通过C18 HPLC (ELSD) 进行分析。起始物质通过三个较慢的洗脱中间物峰转化为单个产物峰。1小时后，添加Ac<sub>2</sub>O (0.37mL, 4.0mmol)。反应混合物搅拌30分钟，然后通过旋转蒸发浓缩至约50mL。将反应浓缩物添加到400mL经搅拌的MTBE中。混合物在环境温度下搅拌30分钟，然后倾析。将MTBE (400mL) 添加到湿固体中，悬液搅拌5分钟并倾析。将固体转移至真空滤器，并用3x 100mL MTBE洗涤/研磨。在滤器上干燥10分钟后，将固体转移到已配衡的250mL HDPE包装瓶中。在高真空下去除剩余挥发物，直到重量稳定，提供白色固体状标题化合物 (21.23g, 0.9602mmol, 96.1%产率)。

C18 HPLC, 通过ELSD测定纯度: 89.1% (RV=10.38mL)，杂质含量为10.6% (RV=10.08)。

(4) (N<sup>ε</sup>-{4-叠氮基-3,3-二甲基-1-[(N,N-二甲基)氨基磺酰基]-2-丁氧基羰基}-Lys)<sub>4</sub>-PEG<sub>20kDa</sub>。

[0123] (N<sup>ε</sup>-{4-叠氮基-3,3-二甲基-1-[(N,N-二甲基)氨基磺酰基]-2-丁氧基羰基}-Lys)<sub>4</sub>-PEG<sub>20kDa</sub> (19.00g, 0.8594mmol, 3.438mmol Boc, 0.02M Boc最终浓度) 溶于86mL的1,4-二噁烷中。搅拌5分钟以完全溶解PEG后，添加4M HCl的二噁烷溶液 (86mL, 344mmol HCl)。在环境温度搅拌反应悬液，并通过C18 HPLC (ELSD) 进行分析。起始物质通过三个较快的洗脱中间物峰转化为单个产物峰。2小时后，浓缩反应混合物至约40mL。向浓缩液中添加THF (10mL)，并再次将溶液浓缩至约40mL。将粘稠的油倒入400mL搅拌过的Et<sub>2</sub>O中。在环境温度搅拌20分钟后，从沉淀物中滗出上清液。在200mL Et<sub>2</sub>O的帮助下，将湿固体转移到真空滤器中，并用Et<sub>2</sub>O (3x 75mL) 洗涤。固体在滤器上干燥10分钟后，转移到已配衡的250mL HDPE包装瓶中。在高真空下去除剩余挥发物过夜，提供白色固体状标题化合物 (17.52g, 0.8019mmol, 93.3%产率@4HCl)。

C18 HPLC, 通过ELSD测定纯度: 99.2% (RV=9.34mL)。

预聚物B, 其中C' = 环辛炔基。

[0124] 向一个4-mL螺旋盖小瓶中加入PEG<sub>20kDa</sub>-[NH<sub>2</sub>]<sub>4</sub> (SunBright PTE-200PA; 150mg, 7.6 μmol PEG, 30.2 μmol NH<sub>2</sub>, 1.0当量, 20mM最终胺浓度)、MeCN (1.5mL) 和iPr<sub>2</sub>NEt (7 μL, 40 μmol, 1.3当量, 27mM最终浓度)。添加活化的酯-环辛炔溶液 (39 μmol, 1.3当量, 27mM最终浓度)，并在环境温度下搅拌反应混合物。通过ELSD的C18HPLC (20-80%B, 经11分钟) 监测反应。完成后，向反应混合物中添加Ac<sub>2</sub>O (3 μL, 30 μmol, 1当量/起始NH<sub>2</sub>)，并搅拌混合物30分钟。然后将反应混合物浓缩成浓稠的油并悬浮在MTBE (20mL) 中。所得悬液剧烈搅拌10分钟。通过在离心机 (2800rpm, 4°C, 10分钟) 中通过剧烈混合、沉淀，用MTBE (20mL) 将所得固体研磨

三次,并通过移液管除去上清液。所得固体在环境温度下真空干燥不超过30分钟。在20mM NaOAc (pH 5)中制备储液,目标胺浓度为20mM。然后用PEG<sub>7</sub>-N<sub>3</sub> (2当量)处理并用DBCO-CO<sub>2</sub>H反滴定未反应的PEG<sub>7</sub>-N<sub>3</sub>,验证环辛炔浓度。

[0125] 使用该方法制备的大分子单体包括其中环辛炔基团为MFCO、5-羟基环辛炔、3-羟基环辛炔、BCN、DIBO、3-(羧基甲氧基)环辛炔和3-(2-羟基乙氧基)环辛炔的那些,分别使用MFCO五氟苯基酯、5-((4-硝基苯氧基羰基)氧基)环辛炔、3-(4-硝基苯氧基羰基)氧基环辛炔、BCN羟基琥珀酰亚胺碳酸酯、DIBO4-硝基苯基碳酸酯、3-(羧基甲氧基)环辛炔琥珀酰亚胺酯和3-(羟基乙氧基)环辛炔-4-硝基苯碳酸酯制备。

[0126] 水凝胶微球制备。如Schneider等人(2016)Bioconjugate Chemistry 27:1210-15所述,制备并活化水凝胶微球。

#### 实施例15

式(II)化合物,其中Z=N<sub>3</sub>,n=1,R<sup>1</sup>=(4-甲基苯基)SO<sub>2</sub>,R<sup>2</sup>=H,每个R<sup>4</sup>=Me,Y=不存在,D=通过Lys<sup>B28</sup>连接的赖脯胰岛素

[0127] 作为通过固相肽合成(参见实施例5)制备式(II)化合物的替代方法,其中D为肽的式(II)化合物可通过预先形成的肽与式(I)活化接头在肽上至少一个胺基自由反应条件下反应形成。当肽同时包含N端α胺和一个或多个赖氨酸ε胺时,可通过在高pH下或在存在过量叔胺的有机溶剂中进行反应来获得接头与赖氨酸ε胺的优先连接。

[0128] 使用0.1N HCl将一个10mL小瓶的Humalog (100U/mL)调节至pH 5.4,通过离心收集产生的沉淀,并用2x15 mL乙醇、1x15 mL甲基叔丁基醚(MTBE)洗涤沉淀,并在真空下干燥。将干燥的赖脯胰岛素(35mg,6μmol)溶解于3mL二甲基甲酰胺(DMF)和30μL(170μmol)N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)中。添加100mM 4-叠氮基-3,3-二甲基-1-(4-甲基苯基磺酰基)-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯在DMF(84μL,8.4μmol)中的溶液,并在环境温度下搅拌该混合物1小时。在真空下将混合物蒸发至干燥,并将剩余物溶解在10mL 3:1水/乙腈/0.1%三氟乙酸中。使用21.2x150 mm Jupiter 5um 300A C<sub>18</sub>反相柱,使用30-50%乙腈/水/0.1%TFA的梯度,以15mL/分钟的速度在20分钟内进行制备级HPLC纯化,提供纯叠氮化物-接头-赖脯,其中接头通过B-链Lys<sup>28</sup>的胺连接(式(II)化合物,其中Z=N<sub>3</sub>,n=1,R<sup>1</sup>=(4-甲基苯基)SO<sub>2</sub>,R<sup>2</sup>=H,每个R<sup>3</sup>=Me,Y=不存在,D=通过Lys<sup>B28</sup>连接的赖脯胰岛素)。

[0129] 使用肽替度鲁肽、[Gly<sup>2</sup>]GLP-2制备式(II)的类似接头-肽。

#### 实施例16

##### PEG偶联物释放性赖脯胰岛素

式(III)化合物,其中M=20-kDa MeO-PEG,Z\*=三唑,n=1,R<sup>1</sup>=(4-甲基苯基)SO<sub>2</sub>,R<sup>2</sup>=H,

每个R<sup>4</sup>=Me,Y=不存在,D=通过Lys<sup>B28</sup>连接的赖脯胰岛素,和q=1。

[0130] 将20kDa的甲氧基-PEG-胺(BroadPharm,100mg,5μmol)、DIPEA(3μL,17μmol)和(1R,8S,9S)-双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基琥珀酰亚胺碳酸酯(BCN-OSu,Sigma,2mg,7μmol)在1mL乙腈中的溶液在环境温度下搅拌1小时,然后蒸发至干燥。将剩余物溶解在1mL THF中,并在搅拌下将溶液添加到10mL MTBE中。收集沉淀的PEG-环辛炔,用MTBE洗涤,并在真空下干燥。

[0131] 将来自实施例15的叠氮化物-接头-赖脯胰岛素(1.1μmol)和PEG-环辛炔(20mg,1μ

mol) 在 1mL 1:1 异丙醇:柠檬酸盐缓冲液 (pH 4) 中的混合物在环境温度下保持 4 小时, 然后使用 12-14kDa 截留膜对水, 然后对甲醇透析。蒸发透析产物至干, 以提供式 (III) 化合物, 其中  $M=20\text{-kDa}$  MeO-PEG,  $Z^*=$  三唑,  $n=1$ ,  $R^1=(4\text{-甲基苯基})\text{SO}_2$ ,  $R^2=H$ ,  $Y=$  不存在,  $D=$  通过  $\text{Lys}^{\text{B28}}$  连接的赖脯胰岛素, 和  $q=1$ 。

[0132] 当溶解在 0.1M 硼酸盐缓冲液 (pH 9.4, 37°C) 中, 该偶联物释放出游离的赖脯胰岛素,  $t_{1/2}=2.08$  小时。在 pH 值为 7.4, 37°C 的条件下, 可外推出  $t_{1/2}=208$  小时。

[0133] 类似地制备  $R^1=$  苯基- $\text{SO}_2$  的相关偶联物, 并在 0.1M 硼酸盐缓冲液 (pH 9.4, 37°C) 中溶解时释放出游离赖脯胰岛素,  $t_{1/2}=0.8$  小时。可外推出在 pH 值为 7.4, 37°C 时  $t_{1/2}=80$  小时。

### 实施例 17

#### 包含可释放赖脯胰岛素的水凝胶

[0134] 将实施例 15 的叠氮化物-接头-赖脯胰岛素连接至实施例 14 的可降解 PEG-水凝胶, 以提供赖脯胰岛素的缓释库。对于 PEG 水凝胶, 预聚物 A 为  $(N\alpha\text{-Boc-N}\epsilon\text{-}\{4\text{-叠氮基-3,3-二甲基-1}[(N,N\text{-二甲基})\text{氨基磺酰基}]\text{-2-丁氧基羰基}\}\text{-Lys})_4\text{-PEG}_{10\text{kDa}}$ , 预聚物 B 为  $((4\text{-环辛炔氧基-羰基})\text{氨基})_4\text{-PEG}_{10\text{kDa}}$ , 其提供了式 (IV) 的 PEG-水凝胶, 其中  $P^1$  和  $P^2$  均为 10kDa 的四臂聚乙二醇,  $Z^*=$  三唑,  $n=1$ ,  $R^1=(N,N\text{-二甲基氨基})\text{SO}_2$ ,  $R^2=H$ , 每个  $R^4=CH_3$ ,  $W=(CH_2)_x\text{-CH}[(CH_2)_yB]\text{-(CH}_2)_zC$ , 其中  $x=4$ ,  $y=0$ ,  $Z=0$ ,  $B=NH_2$ ,  $C^*=$  甲酰胺。如 PCT 公开 W02019/152672 所述形成作为微球的该 PEG 水凝胶, 其通过引用并入本文。

[0135] 通过与 BCN-OSu (16.2 $\mu\text{mol}$ ) 和三乙胺 (43.1 $\mu\text{mol}$ ) 反应 4.5 小时, 将这些水凝胶微球 ( $B=NH_2$ ) 在乙腈 (3.5g, 通过 TNBS 测定含有 10.8 $\mu\text{mol}$   $NH_2$ ) 中的填充悬液活化以用于接头-药物连接。添加乙酸酐 (10.8 $\mu\text{mol}$ ) 以覆盖任何未反应的胺基团, 2 小时后, 用 11mL 乙腈洗涤浆液 5 次, 然后用 11mL 载药溶剂 (pH 3.0 的 1:1 iPrOH:H<sub>2</sub>O 中的 100mM 柠檬酸盐) 洗涤浆液 5 次。最终填充的浆液约为 5.6mL, 含有 7.3 $\mu\text{mol}$  环辛炔 ( $B=[(1R,8S,9S)\text{-双环}[6.1.0]\text{壬-4-炔-9-基甲氧基羰基}]\text{氨基}$ )。

[0136] 将活化水凝胶微球和叠氮化物-接头-赖脯胰岛素在载药溶剂中的混合物轻柔混合 24 小时, 然后用反应缓冲液反复洗涤悬液, 以去除任何未反应的叠氮化物-接头-赖脯胰岛素和反应副产物。最终的微球制剂包含 1.5 $\mu\text{mol/mL}$  的赖脯胰岛素, 在 pH 7.4, 37°C 下以  $t_{1/2}=350$  小时释放。

### 实施例 18

#### 包含可释放艾塞那肽的水凝胶

[0137] 实施例 14 中的可降解水凝胶 (其中  $P^1$  和  $P^2$  均为 10kDa 四臂聚乙二醇,  $Z^*=$  三唑,  $n=1$ ,  $R^1=(N,N\text{-二甲基氨基})\text{SO}_2$ ,  $R^2=H$ , 每个  $R^4=CH_3$ ,  $W=(CH_2)_x\text{-CH}[(CH_2)_yB]\text{-(CH}_2)_zC$ , 其中  $x=4$ ,  $y=0$ ,  $Z=0$ ,  $B=NH_2$ , 和  $C^*=$  甲酰胺) 通过与环辛炔基琥珀酰亚胺碳酸酯 (5HCO-OSu) 反应活化, 然后连接实施例 5 的叠氮化物-接头-艾塞那肽 [N28Q]。将含有 10.3 $\mu\text{mol}$  胺的 MeCN 中的填充氨基微球浆料 (1.2mL) 与纯三乙胺 (41.1 $\mu\text{mol}$ ) 和 5HCO-NHS (15.4 $\mu\text{mol}$ ) 混合。反应竖转混合 18 小时, 定性 TNBS 试验确认了胺的加载 (在一般方法中描述)。添加乙酸酐 (1 当量, 10.3 $\mu\text{mol}$ ) 以覆盖任何残余的游离胺, 反应 2 小时后, 用 6mL 乙腈洗涤浆液 5 次。最终填充的浆液为 1.4mL, 含有 10.3 $\mu\text{mol}$  5HCO。在两个已配衡的 10mL 注射器中加入约 1g 5HCO-微球浆液 (在 MeCN 中), 其中含有约 9 $\mu\text{mol}$  5HCO。使用 6.5mL 反应溶剂 (100mM 柠檬酸盐于 1:1 DMSO:H<sub>2</sub>O 中,

pH3.0) 洗涤浆液4次。将N<sub>3</sub>-肽以相对于5HC0 (11μmol N<sub>3</sub>) 1.2当量添加到填充浆液中,并在37℃下搅拌温育18小时。

[0138] 用6.5mL反应溶剂(最终洗涤的OD<sub>280</sub>低于检测值)洗涤负载的微球5次,然后用等渗乙酸盐缓冲液(10mM醋酸钠、143mMNaCl、0.05%聚山梨酯20 (w/v) pH 5.0)洗涤3次,用含有0.8%羧甲基纤维素钠的等渗乙酸盐缓冲液洗涤2次。通过在环境温度下将约50μL的填充浆料(~50mg)溶解在9体积(~450μL)的50mM NaOH中1小时来确定荷载浓度和负载的级分。荷载含量通过[Gln<sub>28</sub>]艾塞那肽(E=5500M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) 在280nm处的吸光度测定。在相同的NaOH溶解样品上进行PEG分析,以测量每个构建物的PEG浓度,并通过与肽浓度比较来确定级分负载。

[0139] 将负载的微球样品(~50mg)置于1.5mL螺旋盖微量离心管中,通过在37℃下添加19体积(0.95mL)的pH9.4的100mM硼酸钠缓冲液开始释放动力学/脱胶反应。为了捕获尽可能多的时间点,每个偶联物进行两个反应,起始间隔18小时。在水浴中37℃反应振摇温育。在t=0和不同时间点,微球浆液在20000x g下沉淀,记录目测是否存在微球沉淀,移除20μL反应上清液,并通过添加4μL 4M乙酸淬灭,样品储存在-20℃。反应上清液中艾塞那肽[N28Q]的浓度通过Nanodrop UV-Vis在280nm处的吸光度测定。还在每个时间点目视观察微球的状态(固体/存在或溶解/消失)。绘制上清液时间点的A<sub>280</sub>,并将其拟合为单指数,以确定每种肽的释放速率。对上清液样品进行PEG分析,以测量每个时间点的可溶性PEG浓度,从而生成溶解/反向胶凝曲线。微球分析显示肽含量为5.19μmol/mL,对应于95%的可用B位点负载。在pH 9.4,37℃下,这些水凝胶微球释放艾塞那肽[N28Q]的t<sub>1/2</sub>=17.5小时,并溶解,脱胶时间为32小时。

[0140] 通过用BCN-OSu替换活化步骤中使用的环辛炔基琥珀酰亚胺碳酸酯制备类似的艾塞那肽-释放性水凝胶,如实施例17所示。

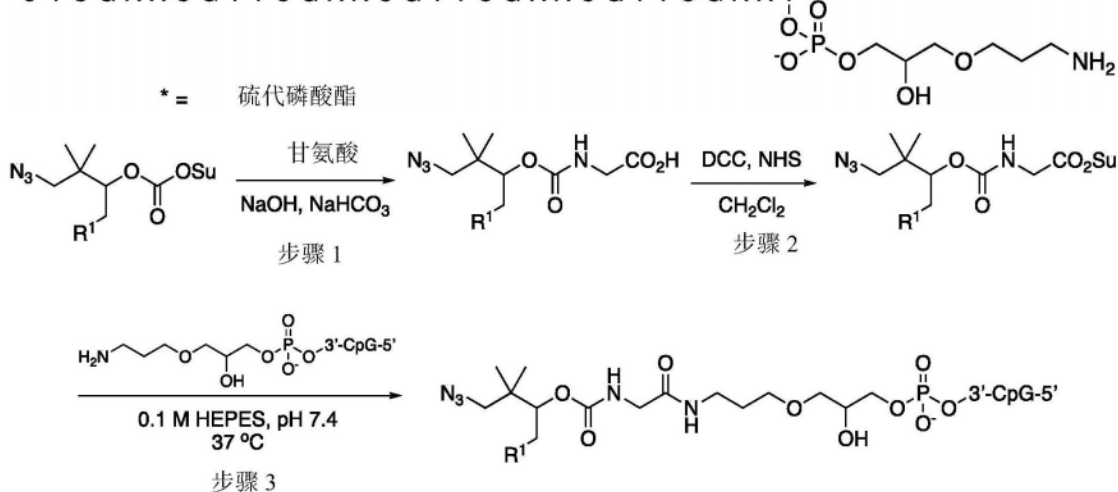
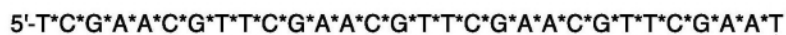
[0141] 这些艾塞那肽-释放性水凝胶微球具有图7所示的通式,其中P<sup>1</sup>和P<sup>2</sup>分别为四臂聚乙二醇,Z\*为三唑,C\*为甲酰胺,B\*为三唑,L-D为式(II)的接头-药物的残基。

#### 实施例19

##### 接头-寡核苷酸的制备

[0142] 硫代磷酸酯CpG寡核苷酸TLR9受体激动剂的偶联物制备如下。

##### 5'-CpG-3'-NH<sub>2</sub>



[0143] 步骤1.N-[4-叠氮-3,3-二甲基-1-(4-氯苯基)磺酰基-2-丁氧基羰基]-Gly-OH。用

1M NaOH水溶液(0.24mL, 0.24mmol)、1M NaHCO<sub>3</sub>水溶液(0.20mL, 0.20mmol)和1.0mL MeCN中的4-叠氮-3,3-二甲基-1-(4-氯苯基)磺酰基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯(92mg, 0.20mmol, 0.1M最终浓度)连续处理0.56mL H<sub>2</sub>O中的甘氨酸(18mg, 0.24mmol)溶液。在环境温度下搅拌45分钟后,通过C18 HPLC(ELSD)判断反应完成。用5毫升1M KHSO<sub>4</sub>水溶液淬灭反应,然后在20毫升1:1EtOAc:H<sub>2</sub>O之间分配。用5mL EtOAc萃取水相。用H<sub>2</sub>O和盐水(各10mL)洗涤合并的有机相,然后在MgSO<sub>4</sub>上干燥,过滤,并通过旋转蒸发浓缩,以得到作为雾状膜的粗标题化合物(85mg, 0.20mmol, 当量粗产率)。C18 HPLC,通过ELSD测定纯度:98.6% (RV=9.42mL)。nLC-MS(m/z):<sup>35</sup>Cl的计算值为417.1;观测值417.0[M-H]<sup>-</sup>; <sup>37</sup>Cl的计算值为419.1;观测值为419.1[M-H]<sup>-</sup>。

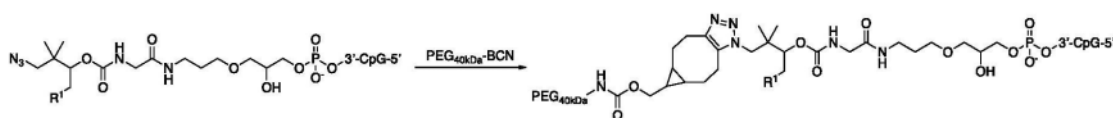
[0144] 步骤2.N-[4-叠氮-3,3-二甲基-1-(4-氯苯基)磺酰基-2-丁氧基羰基]-Gly-OSu。将二环己基碳二亚胺(二甲苯中60%, 2.6M, 100μL, 0.26mmol)添加到1.9mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中的N-[4-叠氮-3,3-二甲基-1-(4-氯苯基)磺酰基-2-丁氧基羰基]-Gly-OH(85mg, 0.20mmol, 0.1M最终浓度)和N-羟基琥珀酰亚胺(30mg, 0.26mmol)的溶液中。在环境温度搅拌反应悬液,并通过C18 HPLC(ELSD)进行监测。1小时后,反应混合物滤过棉塞,并将滤液加到Siliasep 4g柱上。产物用丙酮在己烷中的分步梯度洗脱(0%、20%、30%、40%、50%、60%、70%, 各25mL)。合并并浓缩澄清的含有产物的级分,提供雾状薄膜状标题化合物(74mg, 0.14mmol, 70%产率)。然后将产物溶解在1.4mL MeCN中,并在-20℃下储存。C18 HPLC,通过ELSD测定纯度:92.7% (RV=10.00mL)。主要杂质为水解产物(7.3%@9.42mL RV),可能在HPLC层析过程中产生。

[0145] 步骤3.3'-{N-[4-叠氮-3,3-二甲基-1-(4-氯苯基)磺酰基-2-丁氧基羰基]-Gly-氨基烷基}-CpG-5'。在15mL Falcon管中,在22℃下用340μL 0.11M HEPES(100mM HEPES最终浓度,pH值7.4,在37℃)稀释0.11M HEPES(pH值7.65)中0.78mM CpG-3'-NH<sub>2</sub>(900μL, 0.70μmol, 0.5mM最终浓度)溶液。溶液在37℃水浴中升温30分钟,然后用100mM N-[4-叠氮-3,3-二甲基-1-(4-氯苯基)磺酰基-2-丁氧基羰基]-Gly OSu(140μL, 14μmol, 10mM最终浓度)的DMF溶液处理。反应温度保持在37℃,并通过C18 HPLC定期监测。在30分钟内,起始物质的约90%转化为单一产物峰。用Milli-Q水将反应稀释至10mL,并将2.5mL溶液加到四个NAP-25柱中的每一个柱上。按照制造商的方案,用3.5mL的Milli-Q水从每个柱中洗脱寡核苷酸,合并洗脱液以提供45μM的总寡核苷酸溶液(14.0mL, 0.63μmol总寡核苷酸;通过C18 HPLC测定91%接头-寡核苷酸),根据A260<sub>H2O</sub>[浓度=0.65/(290300)\*100/5]判断。然后使用两个Amicon Ultra-4, 10kDa自旋滤器将寡核苷酸溶液浓缩至1.4mL,以提供含有0.44mM总寡核苷酸(1.4mL, 0.62μmol总寡核苷酸)的溶液,根据A260<sub>H2O</sub>[浓度=0.64/(290300)\*1000/5]判断。在260nm处测定C18 HPLC纯度:90.9% (RV=5.98mL)。M<sub>av</sub>, 10284(计算值);观测值, 10282Da(ESI)。

[0146] 类似地制备其中R<sup>1</sup>=甲基磺酰基和R<sup>1</sup>=苯磺酰基的相应接头-寡核苷酸。

## 实施例20

### 偶联的接头-寡核苷酸的制备



[0147] 3'-[4-支化-PEG<sub>40kDa</sub>-BCN/N<sub>3</sub>-(GDM 4-C1PhSO<sub>2</sub>)-Gly-氨基烷基]-CpG-5', 134BH32。在1.5mL螺旋盖Eppendorf管中,用121μL pH值为6.0的0.3M MES缓冲液(30mM最终缓冲液浓度)稀释3'-{N-[4-叠氮-3,3-二甲基-1-(4-氯苯基)-磺酰基-2-丁氧基羰基]-Gly-氨基烷基}-CpG-5' (0.44mM总寡核苷酸,1.00mL,0.44μmol总寡核苷酸)溶液。接下来,添加5mM的4-支化-PEG<sub>40kDa</sub>-BCN(88μL,0.44μmol,0.36mM最终浓度)的MeCN溶液。反应保持在环境温度,并通过C18 HPLC定期监测。起始物质转化为单个较慢的洗脱产物峰。18小时后,反应混合物含有约60%的产物。将反应管置于32℃的加热模块中并搅拌24小时,之后反应混合物含有约67%的产物。将混合物装载到Phenomenex Jupiter C18制备级柱(150x 21.2mm)上,并在50mm Et3N·HOAc中用20%-95%的MeCN(pH7.0)在20分钟(8mL/分钟)内洗脱产物。合并含有产物的澄清级分,并通过旋转蒸发去除MeCN,以提供含有14μM总寡核苷酸(15mL,0.21μmol)的水溶液,根据A260<sub>H2O</sub>[浓度=0.80/290300)/0.2cm光程]判断。然后使用两个Amicon Ultra-15,10kDa自旋滤器进一步浓缩寡核苷酸溶液,以提供含有0.18mM总寡核苷酸(1.4mL,0.25μmol,71%产率)的溶液,根据A260<sub>H2O</sub>[浓度=0.26/(290300)\*1000/5]判断。在260nm处测定C18 HPLC纯度:97.2% (RV=8.26mL)。

#### 实施例21

##### 偶联物释放寡核苷酸的动力学

[0148] 在一个37℃的自动进样器中,在两个盖有隔垫的1.5mL玻璃HPLC小瓶中温热800μL 125mM硼酸盐缓冲液(37℃pH值为9.0)和182μL H<sub>2</sub>O≥30分钟。将R<sup>1</sup>=(4-氯苯基)磺酰基(总寡核苷酸浓度110μM,18μL,总寡核苷酸最终浓度2μM)的实施例19的偶联物水溶液添加到各小瓶中,并通过C18 HPLC定期监测裂解反应。产物形成,即CpG-3'-NH<sub>2</sub> HPLC峰面积(260nm)作为总260nm面积的分数的分数,绘制时间曲线,给出平均t<sub>1/2</sub>=1.2小时,外推至pH 7.4为48小时。

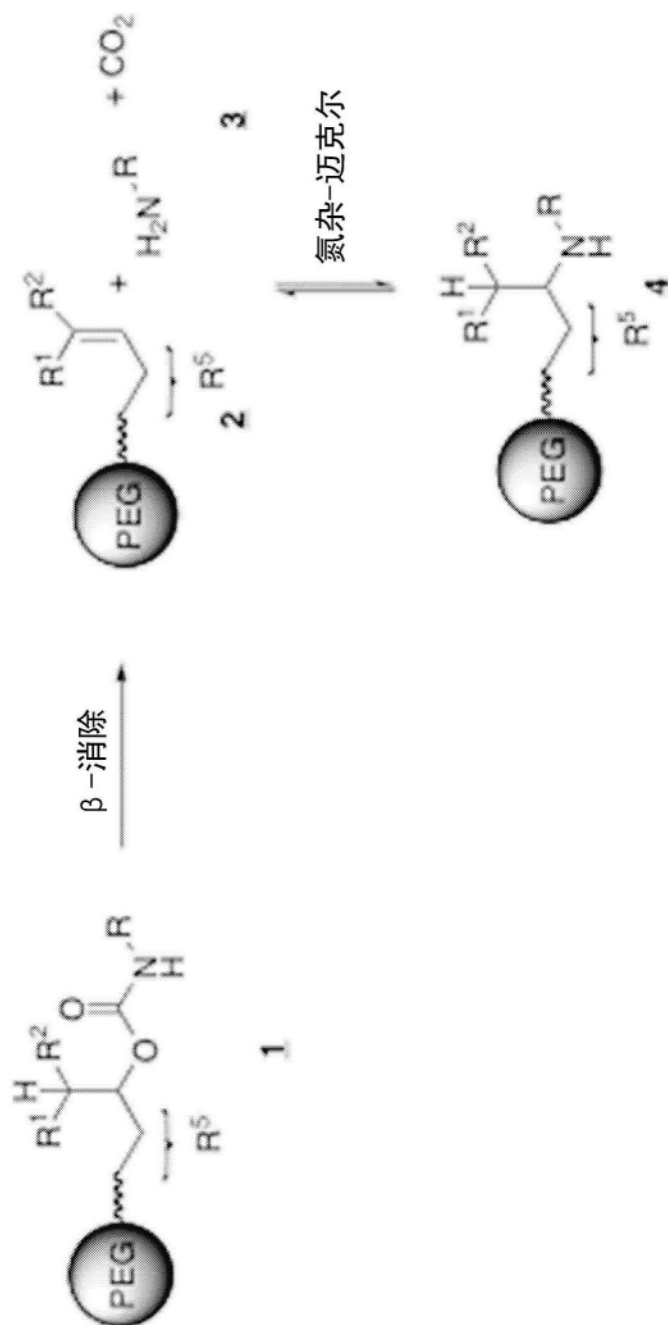


图1

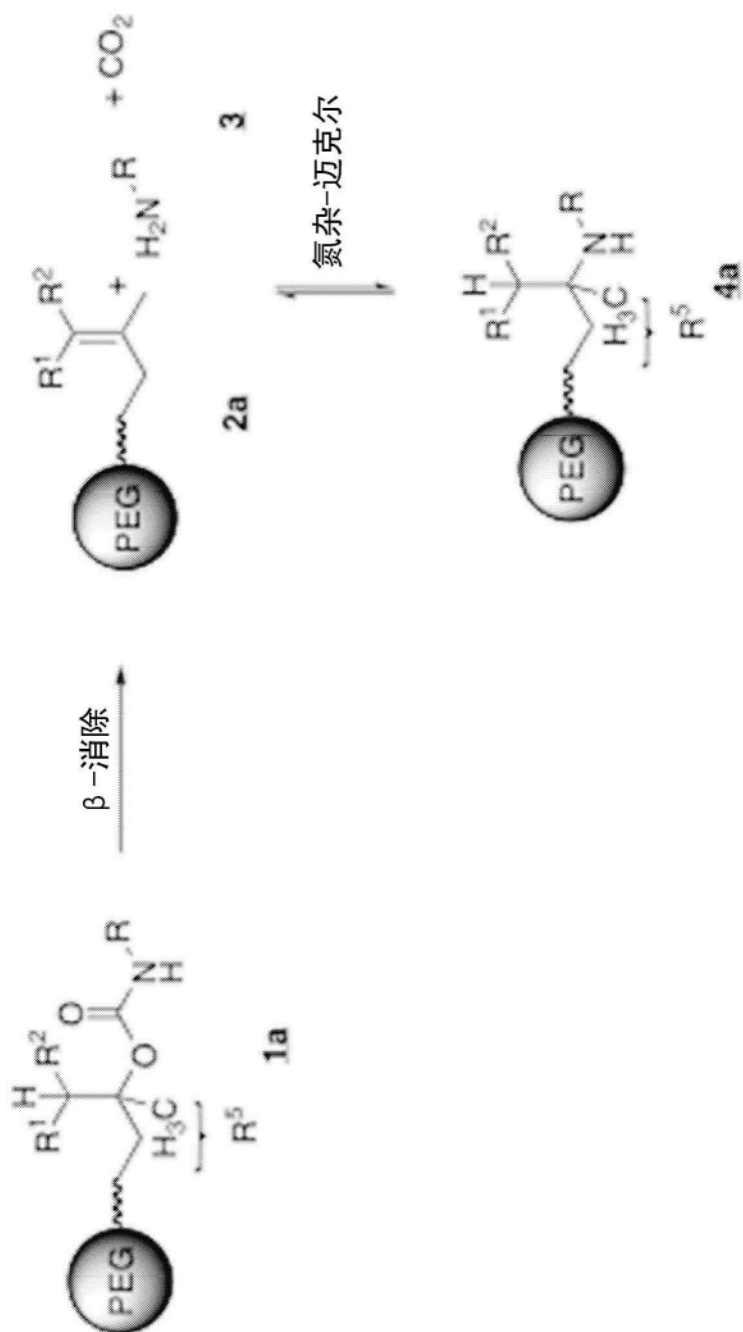


图2

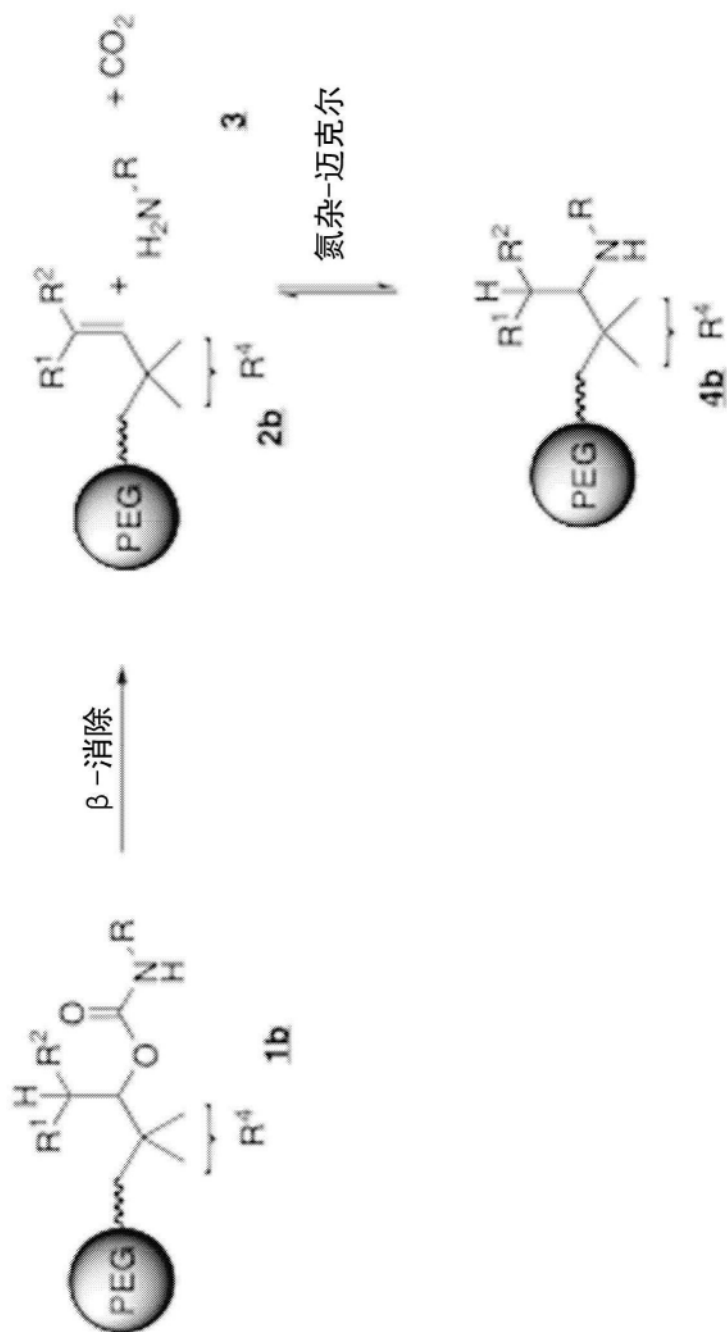
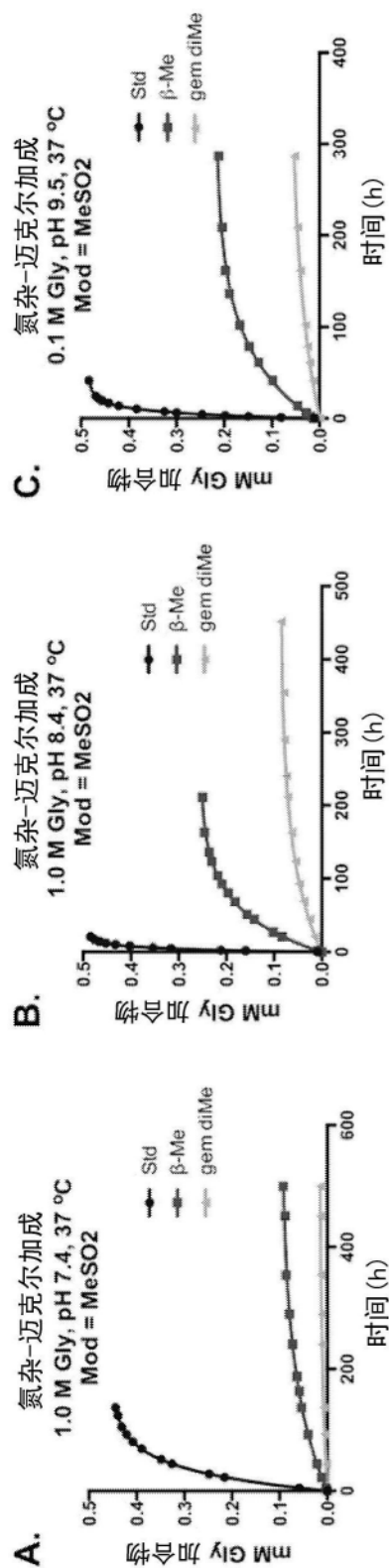


图3



| pH  | 接头       | [Gly] (M) | $k_f$ (M <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) | $k_r$ (h <sup>-1</sup> ) | $K_{eq}$ (M <sup>-1</sup> ) | $K_{eq-Std}/K_{eq}$ |
|-----|----------|-----------|------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------|
| 7.4 | Std      | 1.0       | 0.0263                                   | 0.0027                   | 9.64                        | 1                   |
|     | β-Me     | 1.0       | 0.00113                                  | 0.0046                   | 0.243                       | 40                  |
|     | gem diMe | 1.0       | 0.00015                                  | 0.0044                   | 0.0348                      | 277                 |
| 8.4 | Std      | 1.0       | 0.216                                    | 0.0053                   | 40.7                        | 1                   |
|     | β-Me     | 1.0       | 0.0094                                   | 0.0090                   | 1.05                        | 39                  |
|     | gem diMe | 1.0       | 0.00143                                  | 0.0068                   | 0.209                       | 195                 |
| 9.5 | Std      | 0.1       | 1.45                                     | 0.0051                   | 284                         | 1                   |
|     | β-Me     | 0.1       | 0.0602                                   | 0.0078                   | 7.73                        | 37                  |
|     | gem diMe | 0.1       | 0.00833                                  | 0.0057                   | 1.45                        | 196                 |

图4



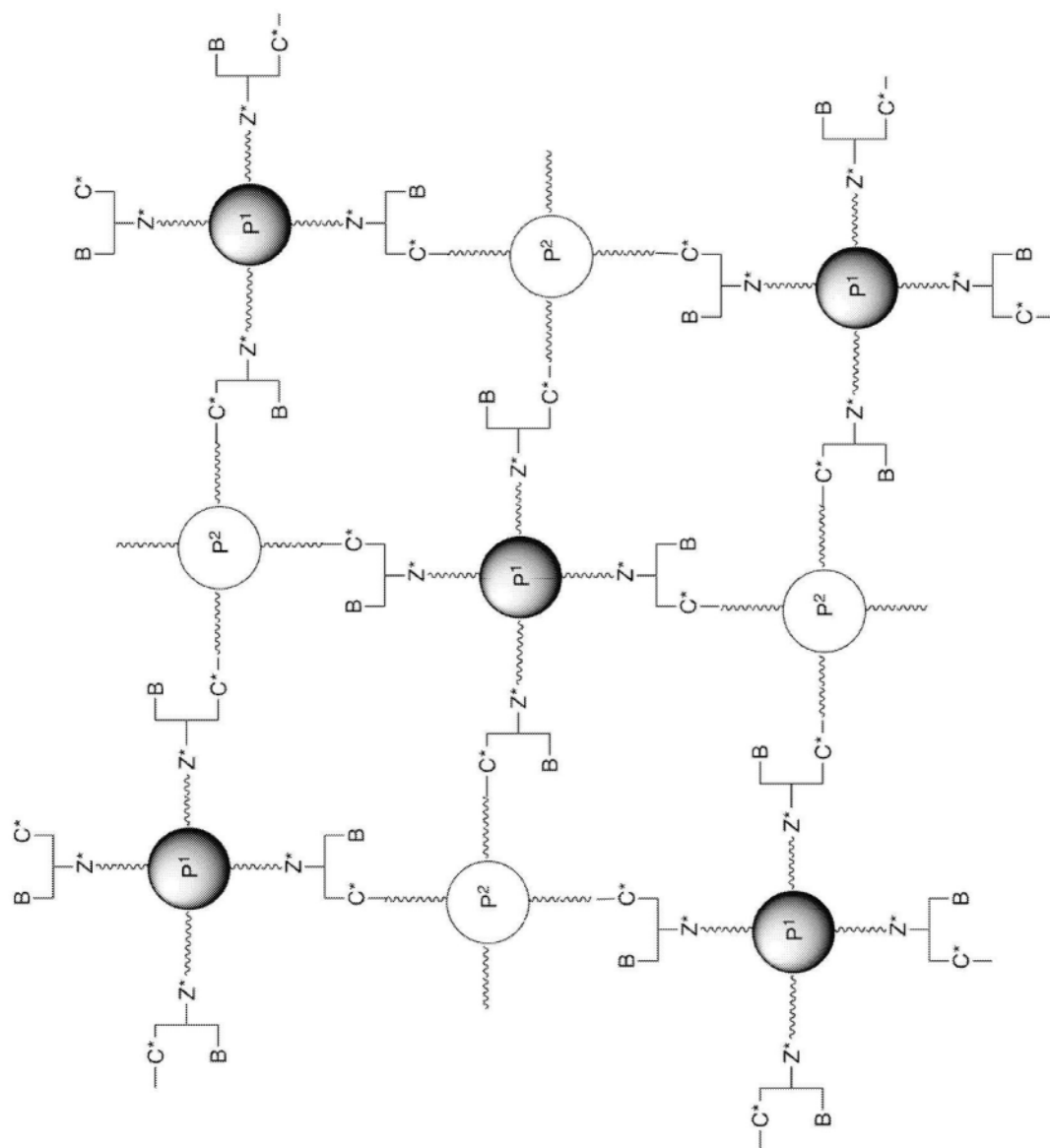


图6

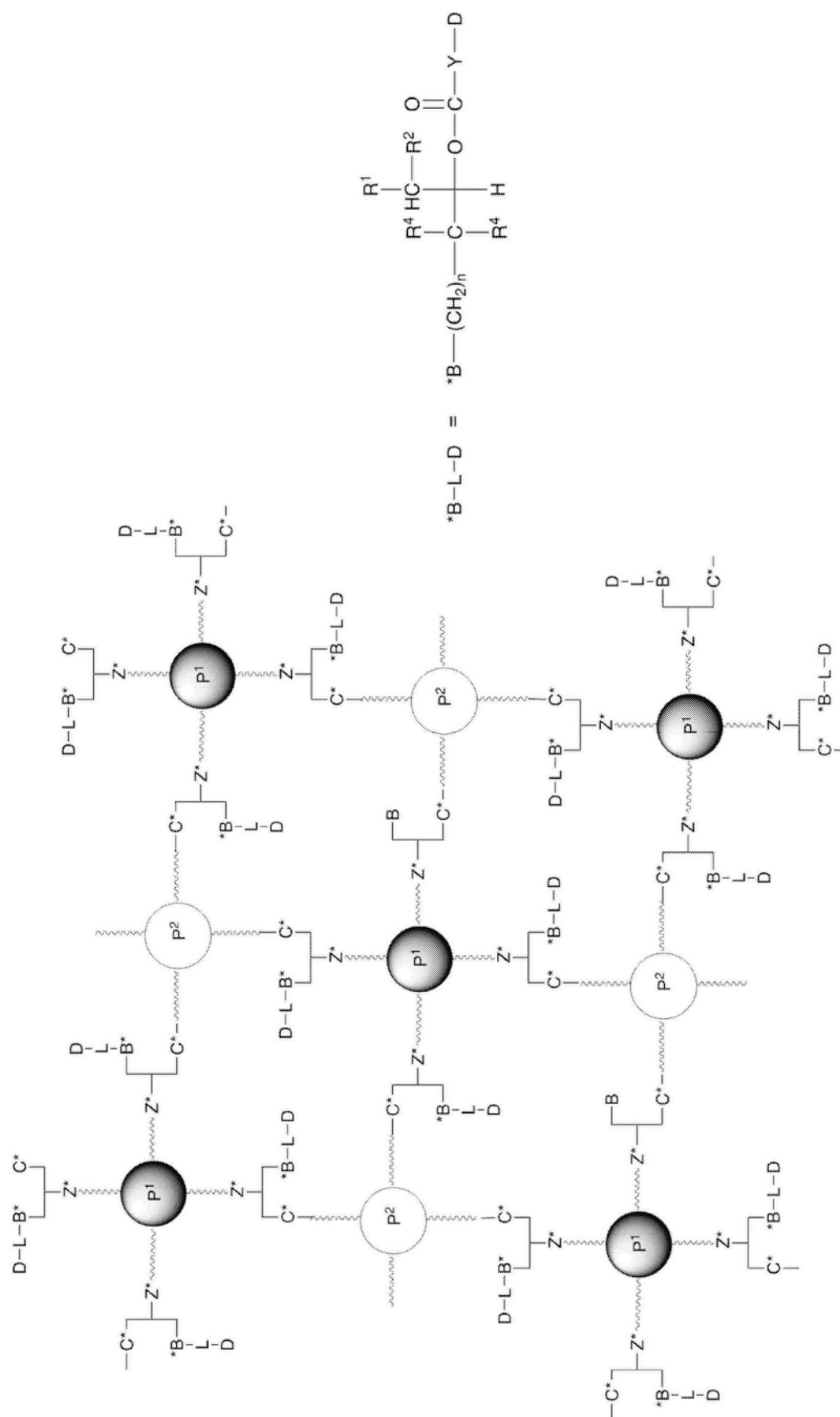


图7

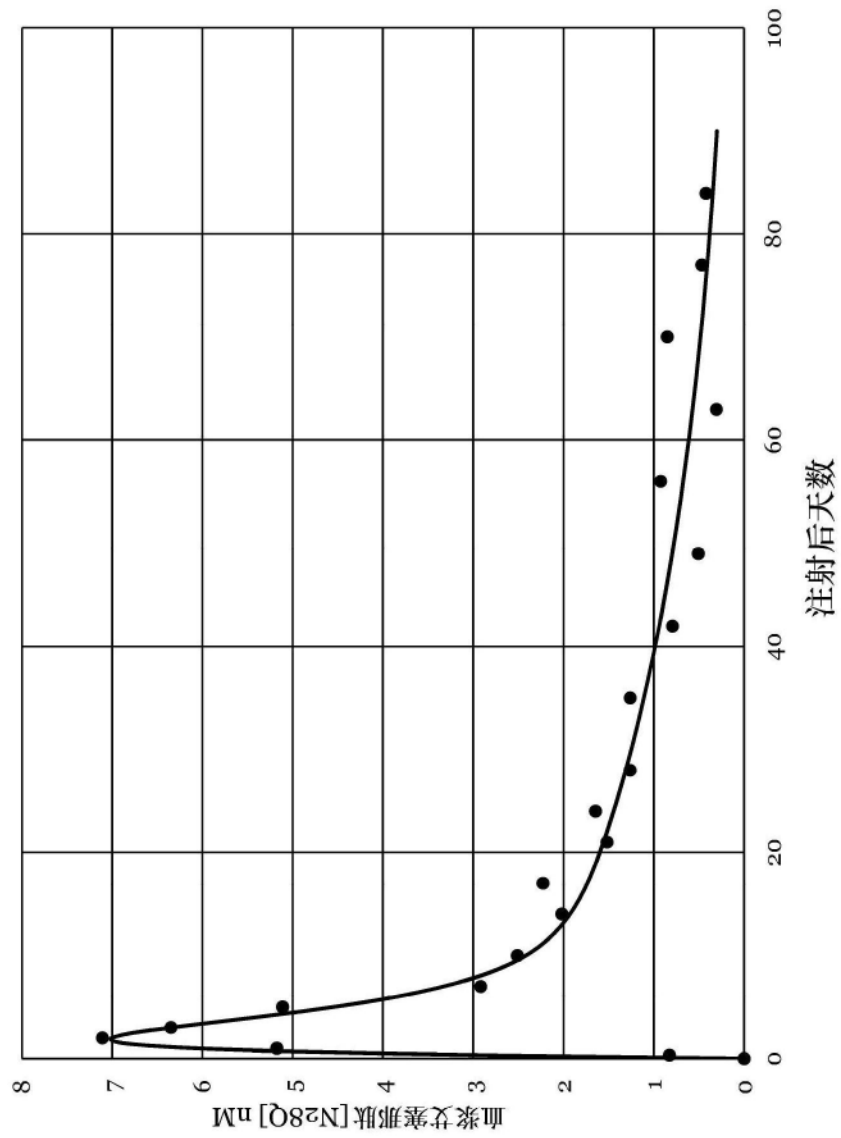


图8

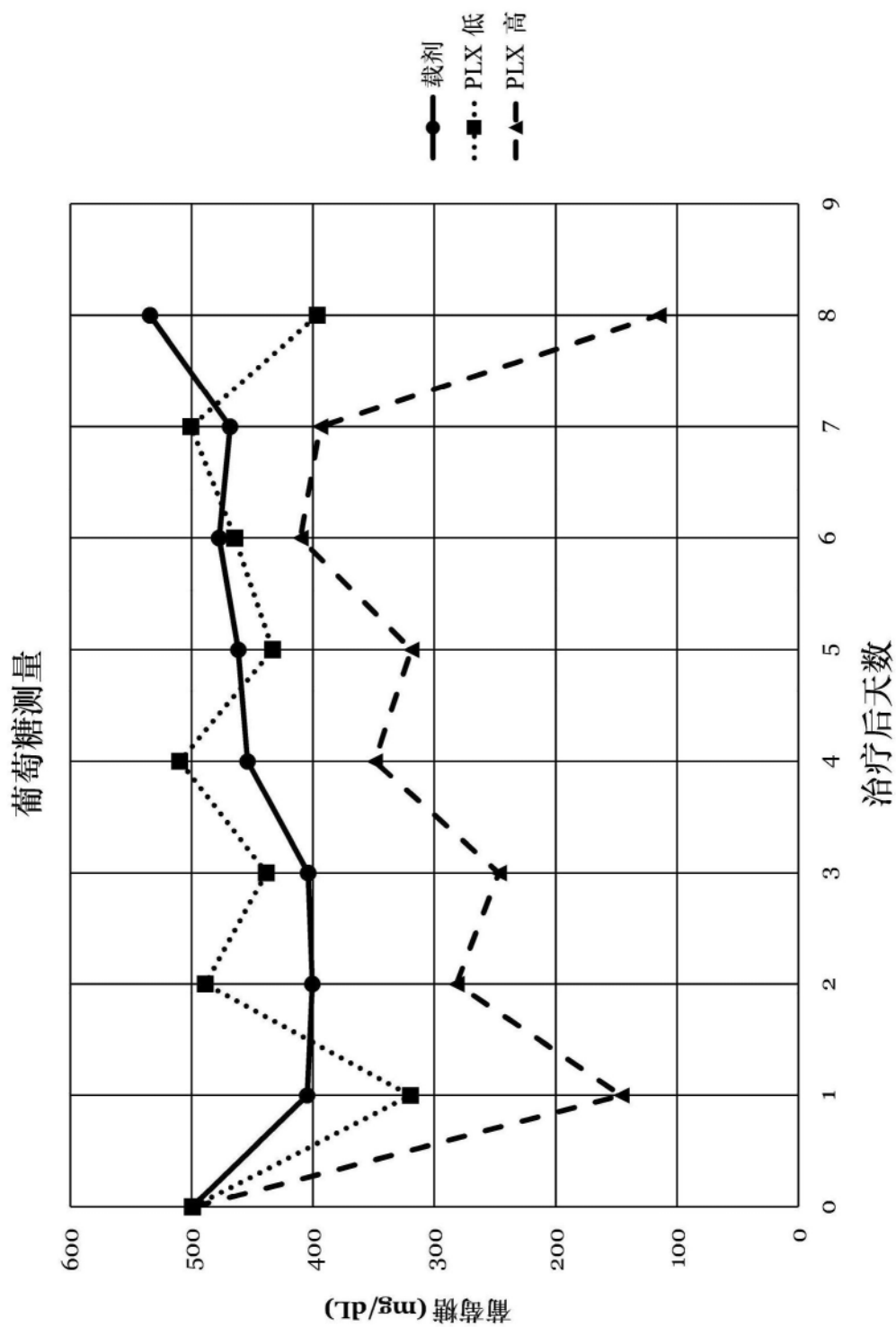


图9

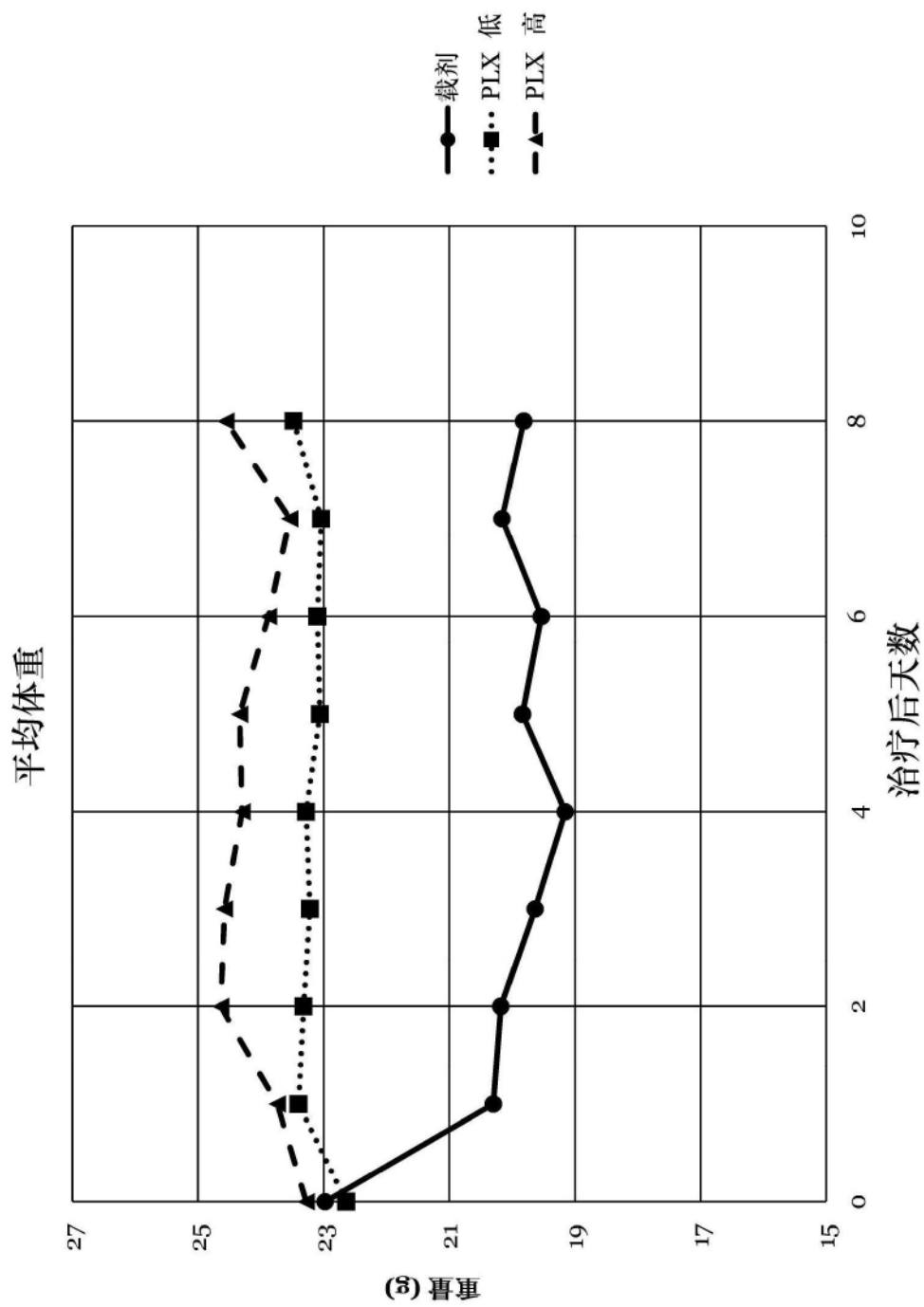


图10