



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102573918 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 11

(21) 申请号 201080037610. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 07. 21

A61K 47/48 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 25/04 (2006. 01)

61/227, 399 2009. 07. 21 US

A61P 25/36 (2006. 01)

12/558, 395 2009. 09. 11 US

61/350, 853 2010. 06. 02 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 02. 24

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/042792 2010. 07. 21

(87) PCT申请的公布数据

W02011/011543 EN 2011. 01. 27

(71) 申请人 尼克塔治疗公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 J·里吉斯-索希尔 邓波良

T·A·赖利

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 袁志明

权利要求书 1 页 说明书 85 页 附图 25 页

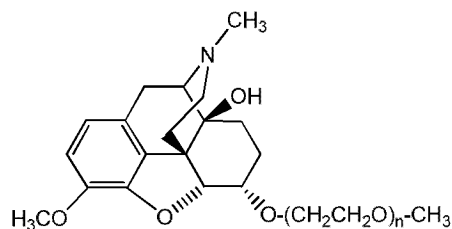
(54) 发明名称

低聚物-阿片样激动剂轭合物

(57) 摘要

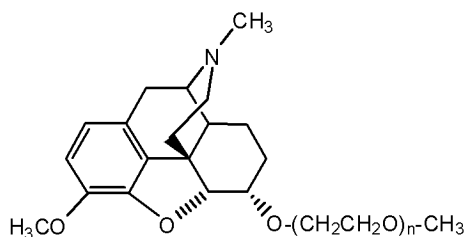
本发明提供其中阿片样激动剂、羟可酮(氧可酮)和氢可酮(dihydrocodeine)共价连接于聚(乙二醇)低聚物的轭合物。当通过多种施用途径中的任一种来施用时,本发明的轭合物显示出不同于没有与PEG低聚物连接的阿片样激动剂所具有的特征。

1. 一种具有下式的化合物：



其中 n 是值为 1 至 9 的整数, 及其药学上可接受的盐。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中 n 是 1。
3. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中 n 是 2。
4. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中 n 是 3。
5. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中 n 是 4。
6. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中 n 是 5。
7. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中 n 是 6。
8. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中 n 是 7。
9. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中 n 是 8。
10. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中 n 是 9。
11. 一种具有下式的化合物：



其中 n 是值为 1 至 9 的整数, 及其药学上可接受的盐。

12. 根据权利要求 11 所述的化合物, 其中 n 是 1。
13. 根据权利要求 11 所述的化合物, 其中 n 是 2。
14. 根据权利要求 11 所述的化合物, 其中 n 是 3。
15. 根据权利要求 11 所述的化合物, 其中 n 是 4。
16. 根据权利要求 11 所述的化合物, 其中 n 是 5。
17. 根据权利要求 11 所述的化合物, 其中 n 是 6。
18. 根据权利要求 11 所述的化合物, 其中 n 是 7。
19. 根据权利要求 11 所述的化合物, 其中 n 是 8。
20. 根据权利要求 11 所述的化合物, 其中 n 是 9。

低聚物 - 阿片样激动剂轭合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2009 年 9 月 11 日提交的美国非临时专利申请 No. 12/558, 395、2010 年 6 月 2 日提交的美国临时专利申请 No. 61/350, 853 和 2009 年 7 月 21 日提交的美国临时专利申请 No. 61/227, 399 的优先权的权益, 所有上述临时和非临时申请的公开内容通过引用并入本文。

[0003] 领域

[0004] 本发明提供 (除其它方面外) 化学修饰的阿片样激动剂 (opioid agonists), 其相比没有化学修饰的阿片样激动剂具有某些优点。本文描述的化学修饰的阿片样激动剂涉及和 / 或可应用于 (除其它以外) 药物发现、药物治疗、生理学、有机化学和高分子化学领域。

[0005] 背景

[0006] 阿片样激动剂 (如吗啡) 一直用于治疗疼痛患者。阿片样激动剂通过与阿片样受体 (阿片样受体) 相互作用而发挥其止痛和其它药理学作用, 阿片样受体中有三种主要类别: μ (μ) 受体、 κ (κ) 受体和 δ (δ) 受体。大多数临床使用的阿片样激动剂对 μ 受体来说是相对有选择性的, 然而阿片样激动剂通常对阿片样受体具有激动剂活性 (特别是在增大的浓度下)。

[0007] 阿片样物质通过选择性地抑制神经递质 (如乙酰胆碱、去甲肾上腺素、多巴胺、血清素和物质 P) 的释放而发挥作用。

[0008] 在药理学上, 阿片样激动剂代表了用于处理疼痛的一类重要的药剂。遗憾的是, 阿片样激动剂的使用可能会产生滥用。另外, 口服施用阿片样激动剂常常会导致显著的首过代谢。此外, 阿片样激动剂的施用导致显著的 CNS 介导的结果, 如呼吸减慢, 这是可以导致死亡的。因此, 这些或其它特征中的任一种的减少会提高它们作为治疗药物的可取性。

[0009] 本发明旨在通过提供 (除其它方面外) 水溶性非肽类低聚物与阿片样激动剂的轭合物来解决本领域中的这些及其它需求。

[0010] 发明概述

[0011] 在本发明的一个或多个实施方案中提供了一种化合物, 所述化合物包含 (优选经由稳定的键合) 共价连接于水溶性非肽类低聚物的阿片样激动剂的残基。

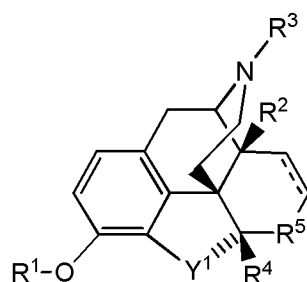
[0012] 在本发明的一个或多个实施方案中提供了一种化合物, 所述化合物包含 (优选经由稳定的键合) 共价连接于水溶性非肽类低聚物的 κ 阿片样激动剂的残基 [其中要理解的是, κ 阿片样激动剂 (i) 在相同的哺乳动物物种内优先选择 κ 阿片样受体 (与 μ 阿片样受体和 δ 阿片样受体相比), 且 (ii) 将对 κ 受体具有激动剂活性]。

[0013] 在本发明的一个或多个实施方案中提供了一种化合物, 所述化合物包含 (优选经由稳定的键合) 共价连接于水溶性非肽类低聚物的 μ 阿片样激动剂的残基 [其中要理解的是, κ 阿片样激动剂 (i) 在相同的哺乳动物物种内优先选择 μ 阿片样受体 (与 κ 阿片样受体和 δ 阿片样受体相比), 且 (ii) 将对 μ 受体具有激动剂活性]。

[0014] 在本发明的一个或多个实施方案中提供了一种化合物, 所述化合物包含经由稳定的键合共价连接于水溶性非肽类低聚物的阿片样激动剂的残基, 其中所述阿片样激动剂具

有由下式所涵盖的结构：

[0015]



[0016] 式 I

[0017] 其中：

[0018] R^1 是 H 或有机基 [如甲基、乙基和 $-C(O)CH_3$] ；

[0019] R^2 是 H 或 OH ；

[0020] R^3 是 H 或有机基 ；

[0021] R^4 是 H 或有机基 ；

[0022] 虚线 (“——”) 代表任选的双键 ；

[0023] Y^1 是 O (氧) 或 S ；并且

[0024] R^5 选自 $-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-$ 、 $-\overset{\overset{H}{\mid}}{C}-OH$ 和 $-\overset{\overset{H}{\mid}}{C}-OR^6$ (不考虑立体化学) ，其中 R^6 是有机基 [包括 $-C(O)CH_3$] 。

[0025] 在本发明的一个或多个实施方案中提供了一种化合物，所述化合物包含经由稳定或可降解的键合共价连接于水溶性非肽类低聚物的阿片样激动剂的残基，其中所述阿片样激动剂选自阿西马多林、布马佐辛、依那多林、乙基氧代环唑星 (ethylketocyclazocine)、GR89,696、ICI204448、ICI197067、PD117,302、纳布啡、喷他佐辛、夸达佐辛 (WIN 44,441-3)、丹酚 A (salvinorin A)、螺朵林、TRK-820、U50488 和 U69593。

[0026] 在本发明的一个或多个实施方案中提供了一种组合物，所述组合物包含：

[0027] (i) 化合物，其包含经由稳定的键合共价连接于水溶性非肽类低聚物的阿片样激动剂的残基；和

[0028] (ii) 任选的药学上可接受的赋形剂。

[0029] 在本发明的一个或多个实施方案中提供了一种剂型，所述剂型包含化合物，所述化合物包含经由稳定的键合共价连接于水溶性非肽类低聚物的阿片样激动剂的残基。

[0030] 在本发明的一个或多个实施方案中提供了一种方法，所述方法包括把水溶性非肽类低聚物共价连接于阿片样激动剂。

[0031] 在本发明的一个或多个实施方案中提供了一种方法，所述方法包括施用化合物，所述化合物包含经由稳定的键合共价连接于水溶性非肽类低聚物的阿片样激动剂的残基。

[0032] 在本发明的一个或多个实施方案中提供了一种方法，所述方法包括结合 (例如，选择性地结合) μ 阿片样受体，其中所述结合是通过施用化合物实现的，所述化合物包含共价连接于水溶性非肽类低聚物的阿片样激动剂的残基。在本发明的一个或多个实施方案中提供了一种方法，所述方法包括结合 (例如，选择性地结合) μ 阿片样受体，其中所述结合是通过对哺乳动物患者施用有效量的化合物实现的，所述化合物包含共价连接于水溶性非肽类低聚物的阿片样激动剂的残基。

[0033] 在本发明的一个或多个实施方案中提供了一种方法，所述方法包括结合 (例如，

选择性地结合)kappa 阿片样受体,其中所述结合是通过施用化合物实现的,所述化合物包含共价连接于水溶性非肽类低聚物的阿片样激动剂的残基。在本发明的一个或多个实施方案中提供了一种方法,所述方法包括结合(例如,选择性地结合)kappa 阿片样受体,其中所述结合是通过对哺乳动物患者施用有效量的化合物实现的,所述化合物包含共价连接于水溶性非肽类低聚物的阿片样激动剂的残基。

[0034] 当结合以下详细描述阅读时,本发明的这些及其它目的、方面、实施方案和特征将变得更显而易见。

附图说明

[0035] 图 1 的图形显示与母体分子纳布啡相比,对 mu、kappa 和 delta 受体的结合亲合力的倍数变化,其作图为随 PEG 长度的变化,针对的是 PEG- 纳布啡轭合物,如实施例 4 中更详细的描述。如图 1 所示,对 mu 和 kappa 阿片样受体,结合亲合力随 PEG 链长而减小,但对 delta 阿片样受体不是这样,从而表明 PEG 轭合以不同的方式影响对这些阿片样受体亚型的结合。

[0036] 图 2A 和图 2B 的图形显示各种纳布啡轭合物的体外渗透度和外排比例 (efflux ratio),如实施例 9 中更详细的描述。这些图形显示 (i)PEG- 纳布啡轭合物在 Caco-2 细胞中的渗透度随 PEG 链长而减少(图 2A),和 (ii)PEG- 纳布啡轭合物可能是外排转运体的底物(图 2B)。

[0037] 图 3 的图形显示各种 PEG- 纳布啡轭合物的脑:血浆比例,如实施例 10 中更详细的描述。此图形显示 PEG 轭合导致纳布啡的脑:血浆比例减小。

[0038] 图 4 的图形显示在研究组中,按小鼠总数 n 计的扭体百分数与在止痛检测中施用的 mPEG_n-O- 吗啡轭合物的剂量关系,用于评估减少或预防小鼠内脏痛的程度,如实施例 18 中更详细的描述。使用吗啡为对照;还施用未轭合的母体分子硫酸吗啡以提供另外的参考点。评价了属于以下轭合物系列的轭合物:mPEG_{2-7,9}-O- 吗啡。

[0039] 图 5 的图形显示在研究组中,按小鼠总数 n 计的扭体百分数与在止痛检测中施用的 mPEG_n-O- 羟可酮轭合物的剂量关系,用于评估减少或预防小鼠内脏痛的程度,如实施例 18 中更详细的描述。使用吗啡为对照;还施用未轭合的母体分子氧可酮以提供另外的参考点。评价了属于以下轭合物系列的轭合物:mPEG_{1-4,6,7,9}-O- 羟可酮。

[0040] 图 6 的图形显示在研究组中,按小鼠总数 n 计的扭体百分数与在止痛检测中施用的 mPEG_n-O- 可待因轭合物的剂量关系,用于评估减少或预防小鼠内脏痛的程度,如实施例 18 中更详细的描述。使用吗啡为对照;还施用未轭合的母体分子可待因以提供另外的参考点。评价了属于以下轭合物系列的轭合物:mPEG_{3-7,9}-O- 可待因。

[0041] 图 7-9 的图中给出如实施例 19 中详述的小鼠热板潜伏期止痛检测的结果。具体来说,各图对应的图形显示以秒表示的潜伏期(舔后爪的时间)与化合物剂量的关系。图 7 提供对于 mPEG₁₋₅-O- 羟可酮轭合物以及对于未轭合的母体分子的结果;图 8 提供对于 mPEG₁₋₅-O- 吗啡轭合物以及对于未轭合的母体分子的结果;且图 9 提供对于 mPEG_{2-5,9}-O- 可待因轭合物以及对于母体分子的结果。存在星号的数据点表示与 ANOVA/Dunnett 的盐水对比, $p < 0.05$ 。

[0042] 图 10 显示在如实施例 21 中所述对大鼠进行 1.0mg/kg 的静脉注射施用后,化合物

氧可酮 (mPEG₀- 氧可酮)、mPEG₁-O- 羟可酮、mPEG₂-O- 羟可酮、mPEG₃-O- 羟可酮、mPEG₄-O- 羟可酮、mPEG₅-O- 羟可酮、mPEG₆-O- 羟可酮、mPEG₇-O- 羟可酮和 mPEG₉-O- 羟可酮的平均 (+SD) 血浆浓度 - 时间曲线。

[0043] 图 11 显示在如实施例 21 中所述对大鼠进行 5.0mg/kg 的口服施用后, 化合物氧可酮 (mPEG₀- 氧可酮)、mPEG₁-O- 羟可酮、mPEG₂-O- 羟可酮、mPEG₃-O- 羟可酮、mPEG₄-O- 羟可酮、mPEG₅-O- 羟可酮、mPEG₆-O- 羟可酮、mPEG₇-O- 羟可酮和 mPEG₉-O- 羟可酮的平均 (+SD) 血浆浓度 - 时间曲线。

[0044] 图 12 显示在如实施例 22 中详述的那样对大鼠进行 1.0mg/kg 的静脉注射施用后, 化合物吗啡 (mPEG₀- 吗啡) 和 mPEG_{1-7,9}-O- 吗啡衍生物的平均 (+SD) 血浆浓度 - 时间曲线。

[0045] 图 13 显示在如实施例 22 中所述对大鼠进行 5.0mg/kg 的口服施用后, 化合物吗啡 (mPEG₀- 吗啡) 和 mPEG_{1-7,9}-O- 吗啡衍生物的平均 (+SD) 血浆浓度 - 时间曲线。

[0046] 图 14 显示在如实施例 23 中详述的那样对大鼠进行 1.0mg/kg 的静脉注射施用后, 化合物可待因 (mPEG₀- 可待因) 和 mPEG_{1-7,9}-O- 可待因衍生物的平均 (+SD) 血浆浓度 - 时间曲线。

[0047] 图 15 显示在如实施例 23 中所述对大鼠进行 5.0mg/kg 的口服施用后, 化合物可待因 (mPEG₀- 可待因) 和 mPEG_{1-7,9}-O- 可待因衍生物的平均 (+SD) 血浆浓度 - 时间曲线。

[0048] 图 16A、16B 和 16C 分别示出在如实施例 26 中所述对大鼠进行 IV 施用后, 各种低聚 mPEG_n-O- 吗啡、mPEG_n-O- 可待因和 mPEG_n-O- 羟可酮衍生物的大脑: 血浆比例。每个图中提供了阿替洛尔的大脑: 血浆比例作为比较的基础。

[0049] 图 17A-H 示出在如实施例 27 中所述对大鼠进行 IV 施用后, 随着时间推移的吗啡及各种 mPEG_n-O- 吗啡衍生物的大脑和血浆浓度。图 17A (吗啡, n = 0); 图 17B (n = 1); 图 17C (n = 2); 图 17D (n = 3); 图 17E (n = 4); 图 17F (n = 5); 图 17G (n = 6); 图 17H (n = 7)。

[0050] 图 18A-H 示出在如实施例 27 中所述对大鼠进行 IV 施用后, 随着时间推移的可待因及各种 mPEG_n-O- 可待因衍生物的大脑和血浆浓度。图 18A (可待因, n = 0); 图 18B (n = 1); 图 18C (n = 2); 图 18D (n = 3); 图 18E (n = 4); 图 18F (n = 5); 图 18G (n = 6); 图 18H (n = 7)。

[0051] 图 19A-H 示出在如实施例 27 中所述对大鼠进行 IV 施用后, 随着时间推移的氧可酮及各种 mPEG_n-O- 羟可酮衍生物的大脑和血浆浓度。图 19A (氧可酮, n = 0); 图 19B (n = 1); 图 19C (n = 2); 图 19D (n = 3); 图 19E (n = 4); 图 19F (n = 5); 图 19G (n = 6); 图 19H (n = 7)。

[0052] 详细描述

[0053] 除上下文文明确另有规定外, 本说明书中所使用的单数形式“一 (a)”、“一个 (an)”和“所述 (the)”包括多个所指对象。

[0054] 在描述和要求保护本发明时, 将根据下面描述的定义使用以下术语。

[0055] “水溶性非肽类低聚物”指室温下在水中为至少 35% (按重量计) 可溶、优选超过 70% (按重量计) 且更优选超过 95% (按重量计) 可溶的低聚物。通常情况下, “水溶性”低聚物的未过滤的含水制剂透射由相同溶液经过滤后所透射的光量的至少 75%、更优选至少 95%。然而, 最优选的是, 水溶性低聚物在水中至少 95% (按重量计) 可溶或完全可溶。

关于“非肽类”，当低聚物具有少于 35%（按重量计）的氨基酸残基时即是非肽类。

[0056] 术语“单体”、“单体亚单元”和“单体单元”在本文中可互换使用，指的是聚合物或低聚物的基本结构单元之一。在同-低聚物的情况下，单一的重复结构单元形成低聚物。在共-低聚物的情况下，两种或更多种结构单元——以按照模式或随机的方式——重复以形成低聚物。有关本发明使用的优选低聚物是同-低聚物。水溶性非肽类低聚物通常包含一种或多种单体，它们按顺序连接以形成单体链。低聚物可以是由单一的单体类型（即为同-低聚）或者由两个或三个单体类型（即为共-低聚）形成的。

[0057] “低聚物”是具有约 2 个至约 50 个单体、优选约 2 个至约 30 个单体的分子。低聚物的结构可有所不同。具体用于本发明中的低聚物包括具有诸如直链、支链或叉状之类的多种几何形状的低聚物，这在下面要更详细地描述。

[0058] 如本文所用，“PEG”或“聚乙二醇”旨在涵盖任何水溶性聚（环氧乙烷）。除另指出外，“PEG 低聚物”（也称为低聚乙二醇）是其中基本上所有（且更优选所有）单体亚单元均为环氧乙烷亚单元的低聚物。然而，低聚物可含有不同的封端部分或官能团，例如用于耦合。通常，本发明中使用的 PEG 低聚物将包括以下两种结构之一：“ $-(CH_2CH_2O)_n-$ ”或“ $-(CH_2CH_2O)_n-1CH_2CH_2-$ ”，这取决于例如在合成转化期间末端氧是否已经被置换。对于 PEG 低聚物，“n”从约 2 到 50、优选从约 2 到约 30 变化，并且整体 PEG 的末端基团和结构可变。当 PEG 进一步包含用于连接到例如小分子药物的官能团 A 时，该官能团在共价连接于 PEG 低聚物时不会导致形成 (i) 氧-氧键（ $-O-O-$ ，过氧化物键合）或 (ii) 氮-氧键（ $N-O$ 、 $O-N$ ）。

[0059] “封端基团”通常是连接于 PEG 低聚物的末端氧的非反应性含碳基团。示例性封端基团包括 C_{1-5} 烷基（如甲基、乙基和苄基）以及芳基、杂芳基、环、杂环等。就本发明而言，优选的封端基团具有相对低的分子量，如甲基或乙基。封端基团还可包含可检测的标记物。这种标记物包括但不限于荧光剂、化学发光剂、酶标记中使用的部分、比色标记物（例如染料）、金属离子和放射性部分。

[0060] 涉及低聚物的几何形状或总体结构时的“支链”指具有代表从支化点延伸的不同“臂”的两种或更多种聚合物的低聚物。

[0061] 涉及低聚物的几何形状或总体结构时的“叉状”指具有从支化点延伸的两种或更多种官能团（通常通过一个或多个原子）的低聚物。

[0062] “支化点”指包含一个或多个原子的分支点，低聚物在该点由直链结构分支或分叉成一个或多个另外的臂。

[0063] 术语“反应性的”或“活化的”指在有机合成的常规条件下易于反应或以实用的速率反应的官能团。这不同于不反应或需要强催化剂或不切实际的反应条件才能反应的基团（即“非反应性”或“惰性”基团）。

[0064] 涉及存在于反应混合物中的分子上的官能团时，“不容易反应的”指的是在能有效地在反应混合物中产生所需反应的条件下仍基本上保持完整的基团。

[0065] “保护基”是防止或阻断分子中的特定化学反应性官能团在某些反应条件下反应的部分。保护基可有所不同，这取决于被保护的化学反应性基团的类型以及所采用的反应条件和分子中另外的反应性基团或保护基的存在与否。作为例子，可被保护的官能团包括羧酸基团、氨基、羟基、巯基、羰基等。羧酸的代表性保护基包括酯（如对甲氧基苄酯）、酰胺和酰肼；氨基的代表性保护基包括氨基甲酸酯（如叔丁氧羰基）和酰胺；羟基的代表性保

护基包括醚和酯；巯基的代表性保护基包括硫醚和硫酯；羰基的代表性保护基包括缩醛和缩酮；等等。这种保护基对本领域技术人员来说是公知的，并且描述于例如 T. W. Greene 和 G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis* (有机合成中的保护基)，第三版，Wiley, New York, 1999 及其中所引用的参考文献中。

[0066] “受保护形式”的官能团指带有保护基的官能团。如本文所用，术语“官能团”或其任何同义词涵盖其受保护的形式。

[0067] “生理学上可裂解的”或“可水解的”或“可降解的”键是相对不稳定的键，其在普通生理条件下与水反应（即水解）。在普通生理条件下，键在水中水解的倾向不仅取决于连接两个中心原子的键合的一般类型，还取决于连接到这些中心原子的取代基。本领域普通技术人员一般可识别这些键。适当的水解不稳定的或弱的键合包括但不限于羧酸酯、磷酸酯、酸酐、缩醛、缩酮、酰氧基烷基醚、亚胺、原酸酯、肽、寡核苷酸、硫酯和碳酸酯。

[0068] “可酶降解的键合”指在普通生理条件下经受一种或多种酶降解的键合。

[0069] “稳定的”键合或键指化学部分或键，通常指共价键，其在水中是基本稳定的，就是说在普通生理条件下，在长时间段内不发生任何可察觉程度的水解。水解稳定的键合的例子包括但不限于以下：碳-碳键（例如在脂族链中）、醚、酰胺、脲烷、胺等。一般来说，稳定的键合是在普通生理条件下表现出每天不到约 1-2% 的水解速率的键合。代表性的化学键的水解速率可见于大多数标准的化学教科书。

[0070] 在描述给定组合物中的低聚物的一致性的上下文中，“基本上”或“大体上”表示几乎全部或完全地，例如某一给定量的 95% 或更多、更优选 97% 或更多、还更优选 98% 或更多、甚至更优选 99% 或更多、再更优选 99.9% 或更多、最优选 99.99% 或更多。

[0071] “单分散”指这样的低聚物组合物，其中按色谱法或质谱法所确定，该组合物中基本上所有的低聚物具有明确的单一分子量和确定数目的单体。单分散低聚物组合物在某种意义上是纯的，就是说基本上包含具有单一且可确定数目的单体而不是几种不同数目的单体（即具有三种或更多种不同低聚物尺寸的低聚物组合物）的分子。单分散低聚物组合物具有的 MW/Mn 值为 1.0005 或更小， MW/Mn 值更优选为 1.0000。推而广之，由单分散低聚物组成的组合物表示该组合物中基本上所有低聚物的所有低聚物具有单一且可确定数目（作为总数）的单体而不是分布，并且如果低聚物不连接于阿片样激动剂的残基，则将具有 1.0005 的 MW/Mn 值，更优选 MW/Mn 值为 1.0000。然而，由单分散低聚物组成的组合物可包含一种或多种非低聚物质，如溶剂、试剂、赋形剂等。

[0072] 涉及低聚物组合物时的“双峰”指这样的低聚物组合物，其中该组合物中基本上所有的低聚物具有两种可确定且不同数目（作为总数）的单体之一而不是分布，并且其分子量分布（当用数量分数对分子量作图时）显示出两个分离的可辨峰。优选地，对于本文描述的双峰低聚物组合物，每个峰通常是相对其平均值对称的，虽然两个峰的尺寸可不同。理想地，双峰分布中每个峰的多分散性指数 Mw/Mn 为 1.01 或更小，更优选为 1.001 或更小，且甚至更优选为 1.0005 或更小，并且最优选 MW/Mn 值为 1.0000。推而广之，由双峰低聚物组成的组合物表示该组合物中基本上所有低聚物的所有低聚物具有两种可确定的且不同数目（作为总数）的单体之一而不是大分布，并且如果低聚物不连接于阿片样激动剂的残基，则将具有 1.01 或更小、更优选 1.001 或更小、甚至更优选 1.0005 或更小的 MW/Mn 值，且最优选 MW/Mn 值为 1.0000。然而，由双峰低聚物组成的组合物可包含一种或多种非低聚物质，

如溶剂、试剂、赋形剂等。

[0073] 本文中广泛使用“阿片样激动剂”来指通常具有小于约 1000 道尔顿（且通常小于 500 道尔顿）的分子量且作为 μ 和 / 或 κ 激动剂具有一定程度活性的有机、无机或有机金属化合物。阿片样激动剂涵盖分子量小于约 1000 的寡肽和其它生物分子。

[0074] “生物膜”是充当对至少一些外源实体或另外的不利物质的屏障的任何膜，通常由专门的细胞或组织构成。如本文所用，“生物膜”包括与生理保护性屏障相关的膜，所述生理保护性屏障包括例如：血 - 脑屏障 (BBB)；血 - 脑脊液屏障；血 - 胎盘屏障；血 - 乳屏障；血 - 睾丸屏障；以及粘膜屏障，包括阴道粘膜、尿道粘膜、肛门粘膜、颊粘膜、舌下粘膜、直肠粘膜等。除上下文明确另指出外，术语“生物膜”不包括与中间胃肠道（例如胃和小肠）相关的膜。

[0075] 如本文所用，“生物膜穿过率”提供对化合物穿过生物膜（如与血 - 脑屏障相关的膜）的能力的度量。多种方法可用于评价分子穿过任何给定生物膜的运输。评价与任何给定的生物屏障（例如血 - 脑脊液屏障、血 - 胎盘屏障、血 - 乳屏障、肠屏障等）相关的生物膜穿过率的方法在本领域中是已知的，在本文和 / 或在相关文献中有描述，和 / 或可由本领域普通技术人员确定。

[0076] 涉及本发明时的“降低的代谢率”指与没有连接于水溶性低聚物的小分子药物（即小分子药物本身）或参考标准物的代谢率相比，水溶性低聚物 - 小分子药物轭合物的代谢率的可测量程度的降低。在“降低的首过代谢率”的特定情况下，除了口服施用小分子药物（或参考标准物）之外，需要相同的“降低的代谢率”。口服施用的药物由胃肠道吸收进入门脉循环，并且在到达体循环之前必须通过肝脏。因为肝脏是药物代谢或生物转化的首要部位，大量的药物在到达体循环之前可能被代谢。可以通过许多不同的方法测量首过代谢的程度以及由此其任何的降低。例如，可以按设定的时间间隔收集动物血液样本，并通过液相色谱 / 质谱法分析血浆或血清以确定代谢水平。测量与首过代谢及其它代谢过程相关的“降低的代谢率”的其它技术在本领域中是已知的，在本文和 / 或在相关文献中有描述，和 / 或可由本领域普通技术人员确定。优选地，本发明的轭合物可提供满足以下值中的至少一个的降低的代谢率降低：至少约 30%；至少约 40%；至少约 50%；至少约 60%；至少约 70%；至少约 80%；以及至少约 90%。“口服生物可利用的”化合物（如小分子药物或其轭合物）是当口服施用优选具有超过 25%、优选超过 70% 的生物利用度的化合物，其中化合物的生物利用度是以未代谢形式到达体循环的所施用的药物的分数。

[0077] “烷基”指通常长度范围在约 1 至 20 个原子的烃链。这种烃链优选但不一定是饱和的，并且可以是支链或直链，虽然通常直链是优选的。示例性烷基包括甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、1-甲基丁基、1-乙基丙基、3-甲基戊基等。如本文所用，当涉及三个或更多碳原子时，“烷基”包括环烷基。“烯基”是具有至少一个碳 - 碳双键的 2 至 20 个碳原子的烷基。

[0078] 术语“取代的烷基”或“取代的 C_{q-r} 烷基”（其中 q 和 r 是标识烷基中含有的碳原子范围的整数）表示由一、二或三个以下基团取代的上述烷基：卤基（例如 F、Cl、Br、I）、三氟甲基、羟基、 C_{1-7} 烷基（例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、丁基、叔丁基等）、 C_{1-7} 烷氧基、 C_{1-7} 酰氧基、 C_{3-7} 杂环、氨基、苯氧基、硝基、羧基、羰基、酰基、氰基。取代的烷基可以用相同或用不同的取代基取代一次、两次或三次。

[0079] “低级烷基”指含有 1 个至 6 个碳原子的烷基，并且可以是直链或支链的，如由甲

基、乙基、正丁基、异丁基、叔丁基所示例。“低级烯基”指具有至少一个碳-碳双键的 2 至 6 个碳原子的低级烷基。

[0080] “非干扰取代基”指当存在于分子中时通常不与该分子内含有的其它官能团反应的基团。

[0081] “烷氧基”指 -O-R 基团, 其中 R 是烷基或取代的烷基, 优选 C_{1-C20} 烷基 (例如甲氧基、乙氧基、丙氧基、苄基等), 优选 C_1-C_7 。

[0082] “药学上可接受的赋形剂”或“药学上可接受的载体”指这样的组分, 其可包含于本发明的组合物中, 从而使所提供的组合物相比没有该组分的组合物具有优点 (例如更适合于对患者施用), 并且被认为不会对患者有显著的不良毒理作用。

[0083] 术语“芳基”指具有多达 14 个碳原子的芳族基团。芳基包括苯基、萘基、联苯基、菲基、萘并萘基 (naphthacenyl) 等。“取代的苯基”和“取代的芳基”分别表示用一、二、三、四或五个 (例如 1-2、1-3 或 1-4 个) 选自卤基 (F、Cl、Br、I)、羟基、羧基、氰基、硝基、烷基 (例如 C_{1-6} 烷基)、烷氧基 (例如 C_{1-6} 烷氧基)、苄氧基、羧基、芳基等的取代基取代的苯基和芳基。

[0084] “含芳族部分”是至少含芳基和任选一个或多个原子的原子集合。本文中描述了合适的含芳族部分。

[0085] 为简单起见, 通篇中将化学部分定义为或称为单价化学部分 (例如, 烷基、芳基等)。然而, 在本领域技术人员清楚的适当结构环境下, 这种术语也用于表达相应的多价部分。例如, 虽然“烷基”部分通常指单价基 (例如 CH_3-CH_2-), 但在某些情况下, 二价连接部分也可以是“烷基”, 在这种情况下, 本领域技术人员将烷基理解为二价基 (例如 $-CH_2-CH_2-$), 其等同于术语“亚烷基”。(类似地, 在其中需要二价部分并将其陈述为“芳基”的情况下, 本领域技术人员应理解, 术语“芳基”指相应的二价部分, 亚芳基)。所有的原子应被理解为具有用于成键的正常价数 (即碳为 4, N 为 3, O 为 2, S 为 2、4 或 6, 这取决于 S 的氧化态)。

[0086] “药理学上有效量”、“生理学上有效量”和“治疗有效量”在本文中可互换使用, 表示存在于组合物中用以提供血流或靶组织中的阈值水平的活性剂和 / 或轭合物所需的水溶性低聚物-小分子药物轭合物的量。精确的量取决于许多因素, 例如具体的活性剂、组合物的组分及物理特性、针对的患者群体、患者的意见等, 本领域技术人员根据本文中提供的信息以及在相关文献中可得到的信息可以很容易地对此进行确定。

[0087] “双官能”低聚物是其中含有 (通常在其末端) 两种官能团的低聚物。当官能团相同时, 低聚物被称为是同双官能的 (homodifunctional)。当官能团不同时, 低聚物被称为是异双官能的 (heterobifunctional)。

[0088] 本文描述的碱性反应物或酸性反应物包括中性的、带电的及其任何相应的盐形式。

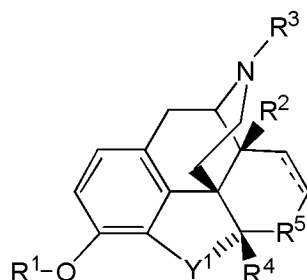
[0089] 术语“患者”指患有或易患可通过施用本文描述的轭合物 (通常但不一定是水溶性低聚物-小分子药物轭合物形式的) 预防或治疗的病症的活体, 包括人和动物。

[0090] “任选的”或“任选地”表示随后描述的情况可能但不一定必须发生, 所以该描述包括其中该情况发生的例子和其中该情况不发生的例子。

[0091] 如上文所述, 本发明涉及 (除其它方面外) 包含经由稳定的或可降解的键合共价连接于水溶性非肽类低聚物的阿片样激动剂的残基的化合物。

[0092] 在本发明的一个或多个实施方案中提供了一种化合物,所述化合物包含经由稳定的或可降解的键合共价连接于水溶性非肽类低聚物的阿片样激动剂的残基,其中所述阿片样激动剂具有由下式涵盖的结构:

[0093]



[0094] 式 I

[0095] 其中:

[0096] R¹ 是 H 或有机基 [如甲基、乙基和 -C(O)CH₃];

[0097] R² 是 H 或 OH;

[0098] R³ 是 H 或有机基;

[0099] R⁴ 是 H 或有机基;

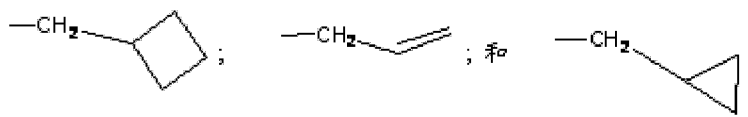
[0100] 虚线 (“—”) 代表任选的双键;

[0101] Y¹ 是 O 或 S;且

[0102] R⁵ 选自 $\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}\text{—}$ 、 $\text{—}\overset{\text{H}}{\underset{\text{|}}{\text{C}}}\text{—OH}$ 和 $\text{—}\overset{\text{H}}{\underset{\text{|}}{\text{C}}}\text{—OR}^6$ (不考虑立体化学), 其中 R⁶ 是有机基 [包括 C(O)CH₃]。

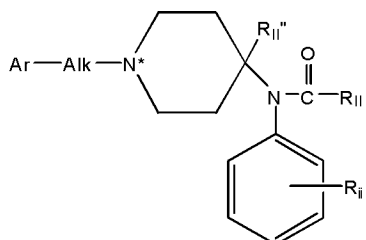
示例的 R³ 基团包括低级烷基 (如甲基、乙基、异丙基等) 以及以下基团:

[0103]



[0104] 在本发明的一个或多个实施方案中提供了一种化合物,所述化合物包含经由稳定的或可降解的键合共价连接于水溶性非肽类低聚物的阿片样激动剂的残基,其中所述阿片样激动剂具有由下式涵盖的结构:

[0105]



[0106] 式 II

[0107] 其中:

[0108] N* 是氮;

[0109] Ar 选自环己基、苯基、卤代苯基、甲氧基苯基、氨苯基、吡啶基、呋喃基和噻吩基;

[0110] Alk 选自亚乙基和亚丙基;

[0111] R_II 选自低级烷基、低级烷氧基、二甲基氨基、环丙基、1-吡咯烷基、吗啉代 (优选低

级烷基,如乙基);

[0112] R_{II}' 选自氢、甲基和甲氧基;且

[0113] R_{II}'' 选自氢和有机基(优选低级烷基)。

[0114] 关于式 II 要理解的是,根据条件,式 II 中的一个或两个胺——但更通常的是标以星号的胺(“N*”)可以被质子化。

[0115] 具体的阿片样激动剂的例子包括选自以下的阿片样激动剂:乙酰氧戊甲吗啡(acetorphine)、醋氢可待因、乙酰二氢可待因酮、乙酰吗啡酮、阿芬他尼、烯丙罗定、阿法罗定、阿尼利定、苄吗啡、苯胍米特、丁丙诺啡、布托啡诺、氯尼他秦、可待因、二氢去氧吗啡(deso 吗啡)、右旋吗啡胺、地佐辛、地恩丙胺、diamorphone、二氢可待因、二氢吗啡、二氢可待因、二氢吗啡、地美沙多、地美庚醇(dimepheptanol)、二甲噻丁、吗苯丁酯、地匹哌酮、依他佐辛、乙庚嗪、乙甲噻丁烯、乙基吗啡、依托尼秦、埃托啡、二氢埃托啡、芬太尼及衍生物、海洛因、氢可酮、羟可酮、氢吗啡酮、羟哌替啶、异美沙酮、凯托米酮、左啡诺、左芬啡烷、洛芬太尼、度冷丁、美普他酚、美他佐辛、美沙酮、美托酮、吗啡、麦罗啡、罂粟碱、尼可吗啡、去甲左啡醇、去甲美沙酮、纳洛芬、纳布啡、去甲吗啡、诺匹哌酮、鸦片、氧可酮、氧吗啡酮、阿片全碱、喷他佐辛、苯吗庚酮、非诺吗烷、非那佐辛、苯哌利定、匹米诺定、哌胍米特、普罗庚嗪、二甲哌替啶、异丙哌替啶、丙氧芬、舒芬太尼、替利定和曲马多。在某些实施方案中,阿片样激动剂选自氢可酮、吗啡、氢吗啡酮、氧可酮、可待因、左啡诺、度冷丁、美沙酮、氧吗啡酮、丁丙诺啡、芬太尼、地匹哌酮、海洛因、曲马多、纳布啡、埃托啡、二氢埃托啡、布托啡诺、左啡诺。

[0116] 据信本发明化合物的优点是它们能够保留一些程度的阿片样激动剂活性,同时还表现出代谢的降低和/或导致与未轭合形式的相应阿片样激动剂相关的 CNS 介导的作用降低。虽然不希望受理论的约束,但据信本文描述的含低聚物的轭合物——与未轭合的“初始”阿片样激动剂相反——并不那么容易代谢,因为低聚物起到降低化合物对可代谢阿片样激动剂的底物的总亲和力的作用。此外(且再次不希望受理论的约束),由低聚物引入的额外尺寸——与未轭合的“初始”阿片样激动剂相反——降低化合物穿过血脑屏障的能力。

[0117] 使用低聚物(例如,来自低聚物的单分散或双峰组合物,与相对不纯的组合物相反)来形成本发明的轭合物可有利地改变与相应的小分子药物相关的某些特性。例如,当通过许多合适的施用途径中的任一种(如胃肠外、口服、经皮、口腔、肺部或鼻部)施用本发明的轭合物时,其表现出穿过血脑屏障的渗透减少。如果打算口服递送,则优选的是轭合物表现出穿过血脑屏障的放缓、最少或实际上没有穿过血脑屏障,同时仍然穿过胃肠(GI)壁并进入体循环。此外,与完全不含低聚物的化合物的生物活性和生物利用度相比,本发明的轭合物以其轭合形式保持一定程度的生物活性以及生物利用度。

[0118] 关于血-脑屏障(“BBB”),这一屏障限制药物从血液向脑部的运输。这一屏障由通过紧密连接结合的独特内皮细胞的连续层组成。占 BBB 总表面积的 95% 以上的脑部毛细血管代表大多数溶质和药物进入中枢神经系统的主要途径。

[0119] 对于不容易知道其血-脑屏障穿过能力的程度的化合物,可以使用合适的动物模型来确定这种能力,如本文所描述的原位大鼠脑灌注(“RBP”)模型。简言之,RBP 技术涉及颈动脉的套管插入,接着在受控条件下用化合物溶液灌注,接着是冲洗阶段,以除去留在血管空间中的化合物。(这种分析可例如由合同研究组织(如 Absorption Systems, Exton, PA)来进行)。更具体地说,在 RBP 模型中,将插管置入左侧颈动脉并将侧枝结扎。在单向

灌注实验中,以约 10 毫升 / 分钟的流速灌注含分析物 (通常但不一定在 5 微摩尔的浓度水平) 的生理缓冲液。30 秒之后停止灌注,并用不含化合物的缓冲液将脑血管内的物质再冲洗 30 秒。然后取出脑组织并通过液相色谱仪串联质谱检测 (LC/MS/MS) 分析化合物浓度。作为另外的选择,可基于化合物的分子极性表面积 (“PSA”) 的计算来估计血 - 脑屏障通透性,分子极性表面积被定义为分子中的极性原子 (通常是氧、氮和连接的氢) 的表面贡献 (surface contribution) 的总和。已经表明 PSA 与化合物的运输特性 (如血 - 脑屏障运输) 相关联。确定化合物的 PSA 的方法可见于 Ertl, P. 等人, J. Med. Chem. 2000 年, 43, 3714-3717 ; 和 Kelder, J. 等人, Pharm. Res., 1999, 16, 1514-1519。

[0120] 关于血 - 脑屏障,与未连接于水溶性非肽类低聚物的小分子药物的穿过率相比,水溶性非肽类低聚物 - 小分子药物轭合物表现出降低的血 - 脑屏障穿过率。当与未连接于水溶性低聚物的小分子药物的血 - 脑屏障穿过率相比时,本文所述的化合物的血 - 脑屏障穿过率的优选示例性降低包括降低:至少约 30%;至少约 40%;至少约 50%;至少约 60%;至少约 70%;至少约 80%或至少约 90%。轭合物的血 - 脑屏障穿过率的优选降低为至少约 20%。

[0121] 如上文所指出的那样,本发明的化合物包括阿片样激动剂的残基。确定给定化合物 (不论该化合物是否是轭合形式的) 是否可充当 μ 受体或 κ 受体的激动剂的测定在下文中描述。

[0122] 在一些情况下,阿片样激动剂可获自商业来源。此外,可通过化学合成获得阿片样激动剂。制备阿片样激动剂的合成方法描述在文献中以及例如美国专利 2,628,962、2,654,756、2,649,454 和 2,806,033 中。

[0123] 这些 (及其它) 阿片样激动剂中的每一种均可 (直接地或通过一个或多个原子) 共价连接于水溶性非肽类低聚物。

[0124] 本发明中有用的小分子药物的分子量通常小于 1000Da。小分子药物的示例性分子量包括如下的分子量:小于约 950;小于约 900;小于约 850;小于约 800;小于约 750;小于约 700;小于约 650;小于约 600;小于约 550;小于约 500;小于约 450;小于约 400;小于约 350;以及小于约 300。

[0125] 如果本发明中使用的小分子药物是手性的,则其可以是外消旋混合物或光学活性形式的,例如单一的光学活性对映体或对映体的任意组合或比例 (即,非外消旋手性混合物)。此外,小分子药物可具有一种或多种几何异构体。就几何异构体而言,组合物可包含单一的几何异构体或两种或更多种几何异构体的混合物。用于本发明的小分子药物可以是其惯常的活性形式,或者可以具有某种程度的修饰。例如,小分子药物在共价连接低聚物之前或之后可具有连接于其上的靶向剂、标记物或运载体。作为另外的选择,小分子药物可具有连接于其上的亲脂部分,如磷脂 (例如二硬酯酰磷脂酰乙醇胺或 “DSPE”、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺或 “DPPE” 等) 或小脂肪酸。然而在一些情况下,优选小分子药物部分不包括对亲脂部分的连接。

[0126] 用于偶联水溶性非肽类低聚物的阿片样激动剂具有适合共价连接于低聚物的游离羟基、羧基、硫代基、氨基等 (即 “柄 (handle)”)。此外,可通过引入反应性基团来修饰阿片样激动剂,优选方式是将其现有的官能团之一转化为适合在低聚物与药物之间形成稳定的共价键合的官能团。

[0127] 因此,每种低聚物由最多三种不同的单体类型组成,所述单体类型选自:环氧烷,如环氧乙烷或环氧丙烷;烯醇,如乙烯醇、1-丙烯醇或2-丙烯醇;乙烯基吡咯烷酮;羟烷基甲基丙烯酰胺或羟烷基甲基丙烯酸酯,其中烷基优选是甲基;-羟酸,如乳酸或乙醇酸;磷酸、噁唑啉、氨基酸、碳水化合物,如单糖、糖或甘露醇;以及N-丙烯酰吗啉。优选的单体类型包括环氧烷、烯醇、羟烷基甲基丙烯酰胺或羟烷基甲基丙烯酸酯、N-丙烯酰吗啉和-羟酸。优选地,每种低聚物独立地为选自该组的两种单体类型的共-低聚物,或者更优选地为选自该组的一种单体类型的同-低聚物。

[0128] 共-低聚物中的两种单体类型可以是相同的单体类型,例如两种环氧烷,如环氧乙烷和环氧丙烷。优选地,低聚物是环氧乙烷的同-低聚物。虽然不是必须的,但通常封住低聚物不共价连接于小分子的末端(或多个末端)以使其不起反应。作为另外的选择,末端可包括反应性基团。当末端是反应性基团时,选择反应性基团使得其在形成最终低聚物的条件下或在低聚物共价连接于小分子药物期间不起反应,或必要时将其保护。一种常见的端官能团是羟基或-OH,特别是对于低聚环氧乙烷(oligoethylene oxide)来说。

[0129] 水溶性非肽类低聚物(例如本文中提供的各种结构中的“POLY”)可具有许多不同的几何形状中的任何一种。例如它可以是直链的、支链的或叉状的。最常见地,水溶性非肽类低聚物是直链的或支链的,例如具有一个支化点。虽然本文中的讨论大多侧重于将聚(环氧乙烷)作为示例的低聚物,但本文中提供的讨论和结构可容易延伸以涵盖以上描述的任何水溶性非肽类低聚物。

[0130] 不算连接体(linker)部分的水溶性非肽类低聚物的分子量通常是相对较低的。水溶性聚合物的示例性分子量值包括:低于约1500;低于约1450;低于约1400;低于约1350;低于约1300;低于约1250;低于约1200;低于约1150;低于约1100;低于约1050;低于约1000;低于约950;低于约900;低于约850;低于约800;低于约750;低于约700;低于约650;低于约600;低于约550;低于约500;低于约450;低于约400;低于约350;低于约300;低于约250;低于约200;和低于约100道尔顿。

[0131] 水溶性非肽类低聚物(不算连接体)的示例分子量范围包括:约100至约1400道尔顿;约100至约1200道尔顿;约100至约800道尔顿;约100至约500道尔顿;约100至约400道尔顿;约200至约500道尔顿;约200至约400道尔顿;约75至1000道尔顿;以及约75至约750道尔顿。

[0132] 优选地,水溶性非肽类低聚物中的单体数目落在以下范围中的一个或多个内:在约1至约30之间(含);在约1至约25之间;在约1至约20之间;在约1至约15之间;在约1至约12之间;在约1至约10之间。在某些情况下,低聚物(及相应的轭合物)中连续的单体的数目是1、2、3、4、5、6、7或8中的一个。在另外的实施方案中,低聚物(及相应的轭合物)含9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个单体。又在进一步的实施方案中,低聚物(及相应的轭合物)具有连续的21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个单体。因此,例如当水溶性非肽类低聚物包括 $\text{CH}_3-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ 时,“n”是整数,该整数可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30,并且可落在以下范围中的一个或多个内:在约1至约25之间;在约1至约20之间;在约1至约15之间;在约1至约12之间;在约1至约10之间。

[0133] 当水溶性非肽类低聚物具有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个单体时,这些值分别对应

于具有约 75、119、163、207、251、295、339、383、427 和 471 道尔顿分子量的甲氧基封端的低聚（环氧乙烷）。当低聚物具有 11、12、13、14 或 15 个单体时，这些值分别对应于具有相当于约 515、559、603、647 和 691 道尔顿分子量的甲氧基封端的低聚（环氧乙烷）。

[0134] 当水溶性非肽类低聚物连接于阿片样激动剂（与分步加入一种或多种单体以使低聚物有效地“生长”到阿片样激动剂上相反）时，优选含活化形式的水溶性非肽类低聚物的组合物是单分散的。然而，在使用双峰组合物的情况下，组合物将具有以上述单体数目中的任何两个为中心的双峰分布。理想地，双峰分布中的每个峰的多分散性指数 M_w/M_n 为 1.01 或更小，甚至更优选为 1.001 或更小，并且甚至更优选为 1.0005 或更小。最优选地，每个峰的 M_w/M_n 值为 1.0000。例如，双峰低聚物可具有单体亚单元的以下示例性组合中的任何一种：1-2、1-3、1-4、1-5、1-6、1-7、1-8、1-9、1-10 等；2-3、2-4、2-5、2-6、2-7、2-8、2-9、2-10 等；3-4、3-5、3-6、3-7、3-8、3-9、3-10 等；4-5、4-6、4-7、4-8、4-9、4-10 等；5-6、5-7、5-8、5-9、5-10 等；6-7、6-8、6-9、6-10 等；7-8、7-9、7-10 等；以及 8-9、8-10 等。

[0135] 在一些情况下，含活化形式的水溶性非肽类低聚物的组合物是三峰（trimodal）或甚至是四峰的（tetramodal），具有如先前描述的一系列单体单元。具有明确的低聚物（即，双峰、三峰、四峰等）的混合物的低聚物组合物的制备方式可以是，混合纯化的单分散低聚物以获得所需的低聚物分布（仅单体数目不同的两种低聚物的混合物是双峰的；仅单体数目不同的三种低聚物的混合物是三峰的；仅单体数目不同的四种低聚物的混合物是四峰的；），或作为另外的选择，可以由多分散低聚物的柱色谱法获得，方式是回收“中间级分（center cut）”以获得具有所需和确定的分子量范围的低聚物混合物。

[0136] 优选的是，由优选为单分子或单分散的组合物获得水溶性非肽类低聚物。就是说，组合物中的低聚物具有相同的离散分子量值而不是分子量的分布。一些单分散低聚物可购自商业来源，如可获自 Sigma-Aldrich 的那些，或作为另外的选择，可直接由可商购（如 Sigma-Aldrich）获得的起始物料制备。水溶性非肽类低聚物的制备可如 Chen Y., Baker, G. L., J. Org. Chem., 6870-6873 (1999)、WO 02/098949 和美国专利申请公布 2005/0136031 中所述。

[0137] 当存在间隔部分（水溶性非肽类聚合物通过其连接于阿片样激动剂）时，其可以是单键、单个原子（如氧原子或硫原子）、两个原子或多个原子。间隔部分的性质通常但不一定是直链的。间隔部分“X”优选是水解稳定的，并优选也是酶稳定的。优选地，间隔部分“X”的链长不到约 12 个原子，优选不到约 10 个原子，甚至更优选不到约 8 个原子，并且甚至更优选不到约 5 个原子，其中的长度表示不算取代基的单链中的原子数目。例如，如这个 R 低聚物 -NH-(C=O)-NH-R' 药物的脲键合被认为具有 3 个原子（ -NH-C(=O)-NH- ）的链长。在选定的实施方案中，间隔部分键合不包含进一步的间隔基团（spacer group）。

[0138] 在一些情况下，间隔部分“X”包括醚、酰胺、氨基甲酸酯、胺、硫醚、脲或碳-碳键。如下文中讨论的和实施例中的示例的官能团通常用于形成键合。间隔部分不那么优选地也可以包含（或邻接于或侧部具有）间隔基团，如下文进一步的描述。

[0139] 更具体地说，在选定的实施方案中，间隔部分 X 可以是以下中的任何一种：“-”（即，在小分子阿片样激动剂的残基与水溶性非肽类低聚物之间可以是稳定的或可降解的共价键）、 -C(O)O- 、 -OC(O)- 、 $\text{-CH}_2\text{-C(O)O-}$ 、 $\text{-CH}_2\text{-OC(O)-}$ 、 $\text{-C(O)O-CH}_2\text{-}$ 、 $\text{-OC(O)-CH}_2\text{-}$ 、 -O- 、 -NH- 、 -S- 、 -C(O)- 、 C(O)-NH 、 NH-C(O)-NH 、 O-C(O)-NH 、 -C(S)- 、 $\text{-CH}_2\text{-}$ 、 $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ 、 $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}$

$2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ 、二价环烷基、 $-\text{N}(\text{R}^6)-$ ， R^6 是 H 或选自以下的有机基：烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基和取代的芳基。

[0140] 然而对于本发明来说,当原子组直接邻接于低聚物片段且该原子组与低聚物的单体相同,以致该组将仅代表低聚物链的延伸时,其不被认为是间隔部分。

[0141] 通常通过低聚物（或当需要使低聚物“生长”到阿片样激动剂上面时，一种或多种单体）的末端上的官能团与阿片样激动剂内的相应官能团反应来形成水溶性非肽类低聚物与小分子之间的键合“X”。下文中简要描述示例的反应。例如，低聚物上的氨基可与小分子上的羧酸或活化的羧酸衍生物反应或反之以形成酰胺键合。作为另外的选择，低聚物上的胺与药物上的活化碳酸酯（例如琥珀酰亚胺基碳酸酯或苯并三唑基碳酸酯）反应或反之形成氨基甲酸酯键合。低聚物上的胺与药物上的异氰酸酯（ $R-N=C=O$ ）反应或反之形成脲键合（ $R-NH-(C=O)-NH-R'$ ）。进一步地，低聚物上的醇（烷氧）基团与药物内的烷基卤或卤化物基团反应或反之形成醚键合。在又一偶联方法中，具有醛官能的小分子通过还原性胺化偶联于低聚物氨基，导致在低聚物与小分子之间形成仲胺键合。

[0142] 特别优选的水溶性非肽类低聚物是带有醛官能团的低聚物。在这点上,低聚物将具有如下结构: $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-(\text{CH}_2)_p-\text{C}(\text{O})\text{H}$, 其中 (n) 是 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10 中的一个, 且 (p) 是 1、2、3、4、5、6 和 7 中的一个。优选的 (n) 值包括 3、5 和 7, 且优选的 (p) 值包括 2、3 和 4。此外, $-\text{C}(\text{O})\text{H}$ 部分的 α 位的碳原子可任选用烷基取代。

[0143] 通常情况下,封住不带官能团的水溶性非肽类低聚物的末端以使其不起反应。当低聚物在末端的确包括旨在形成轭合物的官能团之外的进一步的官能团时,选择该基团以使其在形成键合“X”的条件下不起反应,或者在形成键合“X”期间保护该基团。

[0144] 如上所述,水溶性非肽类低聚物在辄合前包括至少一个官能团。根据小分子内含有或引入到小分子当中的反应性基团情况,该官能团通常包括用于共价连接于小分子的亲电子基团或亲核基团。可存在于低聚物或小分子中的亲核基团的例子包括羟基、胺、肼($-\text{NHNH}_2$)、酰肼($-\text{C}(\text{O})\text{NHNH}_2$)和硫醇。优选的亲核试剂包括胺、肼、酰肼和硫醇,特别是胺。用于共价连接于低聚物的大多数小分子药物具有游离的羟基、氨基、硫代基、醛基、酮基或羧基。

[0145] 可存在于低聚物或小分子中的亲电子官能团的例子包括羧酸、羧酸酯（特别是酰

亚胺酯、原酸酯、碳酸酯、异氰酸酯、异硫氰酸酯)、醛、酮、硫酮、烯基、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酰胺、砜、马来酰亚胺、二硫化物、碘代、环氧、磺酸酯、硫代磺酸酯、硅烷、烷氧基硅烷和卤代硅烷。这些基团的更具体的例子包括琥珀酰亚胺基酯或琥珀酰亚胺基碳酸酯、咪唑基(imidazolyl)酯或咪唑基碳酸酯、苯并三唑酯或苯并三唑碳酸酯、乙烯基砜、氯乙基砜、乙烯基吡啶、吡啶基二硫化物、碘乙酰胺、乙二醛、二酮、甲磺酸酯、甲苯磺酸酯和三氟乙磺酸酯(2,2,2-三氟乙烷磺酸酯)。

[0146] 还包括这些基团中的若干种的硫类似物,如硫酮、硫酮水合物、酮缩硫醇、是2-噻唑烷硫酮等,以及任何上述部分的水合物或被保护的衍生物(例如,醛水合物、半缩醛、缩醛、酮水合物、半缩酮、缩酮、酮缩硫醇、硫缩醛)。

[0147] 羧酸的“活化衍生物”指容易与亲核试剂反应的羧酸衍生物,其通常远比未衍生化的羧酸更容易反应。活化的羧酸包括例如酰卤(如酰氯)、酸酐、碳酸酯和酯。这种酯包括通式 $-(CO)O-N[(CO)-]_2$ 的酰亚胺酯;例如,N-羟基琥珀酰亚胺基(NHS)酯或N-羟基邻苯二甲酰亚胺基酯。还优选的是咪唑基酯和苯并三唑酯。特别优选的是活化的丙酸酯或丁酸酯,如在共同拥有的美国专利No. 5,672,662中所描述的。这些包括式 $-(CH_2)_2-3C(=O)O-Q$ 的基团,其中Q优选地选自N-琥珀酰亚胺、N-磺基琥珀酰亚胺、N-邻苯二甲酰亚胺、N-戊二酰亚胺、N-四氢邻苯二甲酰亚胺、N-降冰片烯-2,3-二羧酰亚胺、苯并三唑、7-氮杂苯并三唑和咪唑。

[0148] 其它优选的亲电子基团包括琥珀酰亚胺基碳酸酯、马来酰亚胺、苯并三唑碳酸酯、缩水甘油醚、咪唑基碳酸酯、对硝基苯基碳酸酯、丙烯酸酯、三氟乙磺酸酯、醛和邻吡啶基二硫化物。

[0149] 这些亲电子基团经历与亲核试剂(例如羟基、硫代基或氨基)的反应以产生不同的键类型。本发明优选的是有利于形成水解稳定的键合的反应。例如,羧酸及其活化的衍生物(包括原酸酯、琥珀酰亚胺基酯、咪唑基酯和苯并三唑酯)与上述类型的亲核试剂反应,分别形成酯、硫酯和酰胺,其中的酰胺是最为水解稳定的。碳酸酯(包括琥珀酰亚胺基碳酸酯、咪唑基碳酸酯和苯并三唑碳酸酯)与氨基反应形成氨基甲酸酯。异氰酸酯($R-N=C=O$)与羟基或氨基反应,分别形成氨基甲酸酯($RNH-C(O)-OR'$)或脲($RNH-C(O)-NHR'$)键合。优选使醛、酮、乙二醛、二酮和它们的水合物或醇加合物(即,醛水合物、半缩醛、缩醛、酮水合物、半缩酮和缩酮)与胺反应,如有必要,接着还原所产生的亚胺以得到胺键合(还原性胺化)。

[0150] 若干亲电子官能团包括亲电子双键,亲核基团(如硫醇)可以对其进行加成以形成例如硫醚键。这些基团包括马来酰亚胺、乙烯基砜、乙烯基吡啶、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯和丙烯酰胺。其它基团包括可由亲核试剂置换的离去基团;这些包括氯乙基砜、吡啶基二硫化物(其包括可裂解的S-S键)、碘乙酰胺、甲磺酸酯、甲苯磺酸酯、硫代磺酸酯和三氟乙磺酸酯。环氧化物通过由亲核试剂开环反应以形成例如醚键或胺键。涉及低聚物和小分子上的互补反应性基团(如以上提到的那些)的反应用于制备本发明的轭合物。

[0151] 在一些情况下,阿片样激动剂可能不具有适合于轭合的官能团。在这种情况下,有可能修饰“初始的”阿片样激动剂,从而使之确实具有所需的官能团。例如,如果阿片样激动剂具有酰胺基团,但所需的是胺基团,则有可能通过Hofmann重排、Curtius重排(一旦酰胺被转化为叠氮化物)或Lossen重排(一旦酰胺被转化为羟酰胺(hydroxamide),接着

用亚苄基-2-磺酰氯 / 碱处理) 将酰胺基团修饰成胺基团。

[0152] 有可能制备带有羧基的小分子阿片样激动剂的轭合物, 其中带有羧基的小分子阿片样激动剂偶联于端氨基低聚乙二醇, 得到具有将小分子阿片样激动剂共价连接于低聚物的酰胺基团的轭合物。这可以例如通过在偶联剂 (如二环己基碳二酰亚胺或“DCC”) 的存在下于无水有机溶剂中将带有羧基的小分子阿片样激动剂与端氨基低聚乙二醇合并来进行。

[0153] 进一步地, 有可能制备带有羟基的小分子阿片样激动剂的轭合物, 其中带有羟基的小分子阿片样激动剂偶联于低聚乙二醇卤化物, 结果得到醚 (-O-) 连接的小分子轭合物。这可以例如通过使用氢化钠将羟基去质子化并接着与端卤化物低聚乙二醇反应来进行。

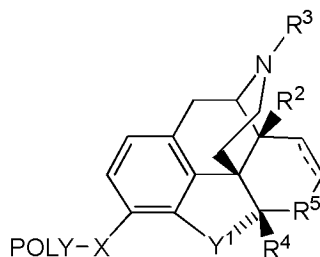
[0154] 在另一例子中, 通过首先还原酮基团以形成相应的羟基, 有可能制备带有酮基团的小分子阿片样激动剂的轭合物。此后, 可如本文描述来偶联现在带有羟基的小分子阿片样激动剂。

[0155] 在又一种情况下, 有可能制备带有胺基团的小分子阿片样激动剂的轭合物。在一种方法中, 将带有胺基团的小分子阿片样激动剂和带有醛的低聚物溶解于合适的缓冲液中, 之后加入合适的还原剂 (例如 NaCNBH_3)。还原后, 结果在含有胺基团的小分子阿片样激动剂的胺基团与带有醛的低聚物的羰基碳之间形成胺键合。

[0156] 在制备带有胺基团的小分子阿片样激动剂的轭合物的另一种方法中, 通常在偶联剂 (例如 DCC) 的存在下合并带有羧酸的低聚物和带有胺基团的小分子阿片样激动剂。结果在含有胺基团的小分子阿片样激动剂的胺基团与带有羧酸的低聚物的羰基之间形成酰胺键合。

[0157] 式 I 的阿片样激动剂的示例性轭合物包括具有如下结构的轭合物:

[0158]

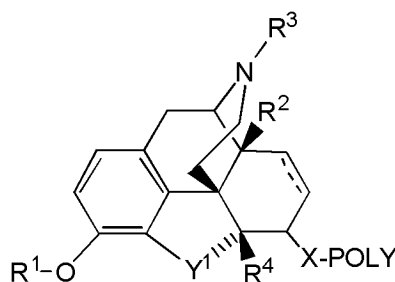


[0159] 式 I-Ca

[0160] 其中 R^2 、 R^3 、 R^4 、虚线 (“---”)、 Y^1 和 R^5 中的每一个都如先前关于式 I 所定义的那样, X 是间隔部分, 且 POLY 是水溶性非肽类低聚物。

[0161] 式 I 的阿片样激动剂的另外的示例性轭合物包括具有如下结构的轭合物:

[0162]

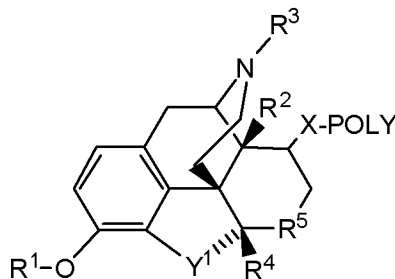


[0163] 式 I-Cb

[0164] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、虚线 (“---”) 和 Y^1 中的每一个都如先前关于式 I 所定义的那样, X 是间隔部分, 且 POLY 是水溶性非肽类低聚物。

[0165] 式 I 的阿片样激动剂的进一步另外的示例性甾合物包括具有如下结构的甾合物:

[0166]

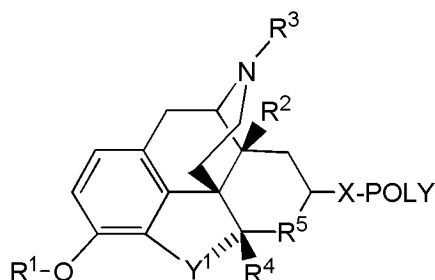


[0167] 式 I-Cc

[0168] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 Y^1 和 R^5 中的每一个都如先前关于式 I 所定义的那样, X 是间隔部分, 且 POLY 是水溶性非肽类低聚物。

[0169] 式 I 的阿片样激动剂的又进一步的示例性甾合物包括具有如下结构的甾合物:

[0170]

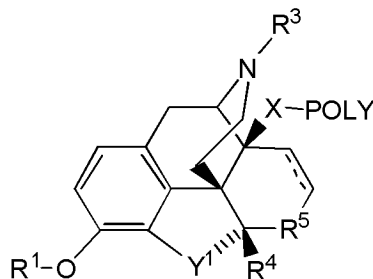


[0171] 式 I-Cd

[0172] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 Y^1 和 R^5 中的每一个都如先前关于式 I 所定义的那样, X 是间隔部分, 且 POLY 是水溶性非肽类低聚物。

[0173] 式 I 的阿片样激动剂的另外的示例性甾合物包括具有如下结构的甾合物:

[0174]

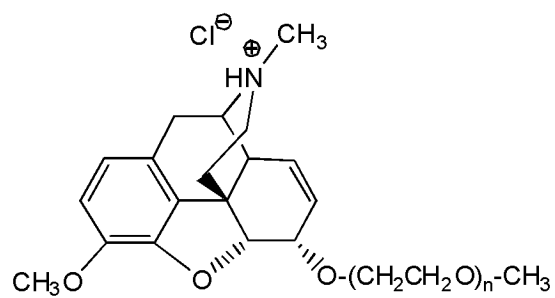
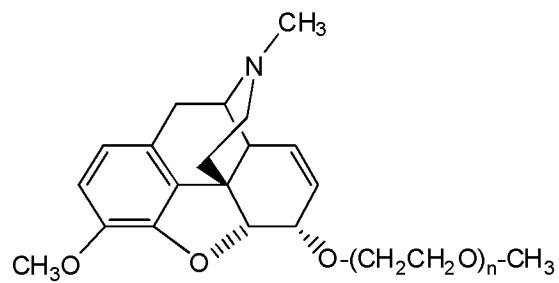
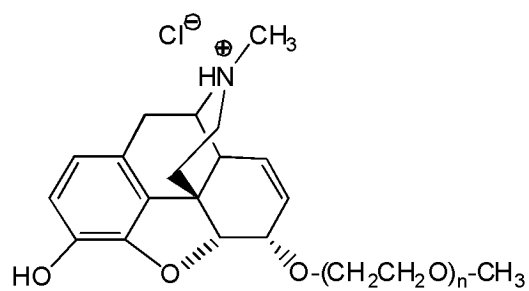
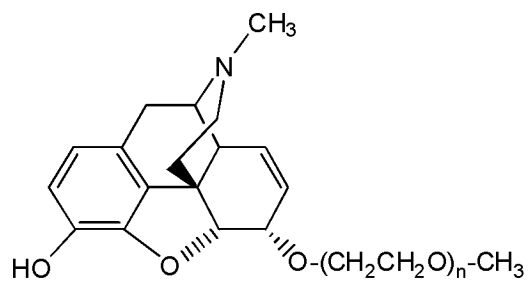
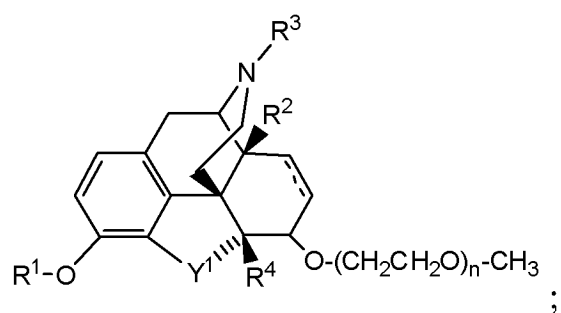


[0175] 式 I-Ce

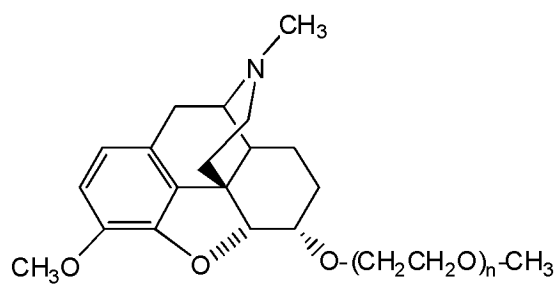
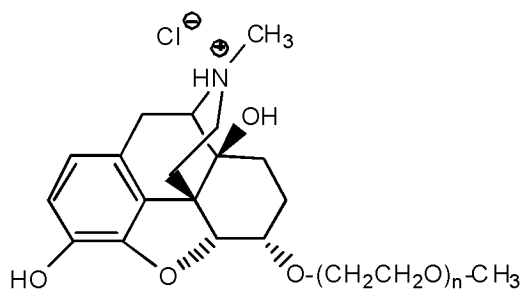
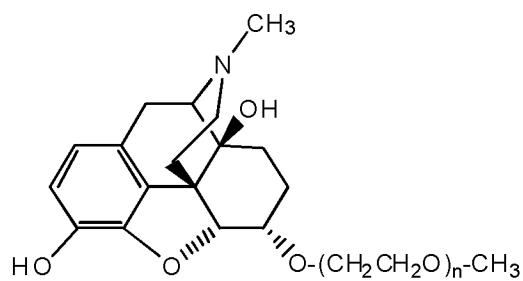
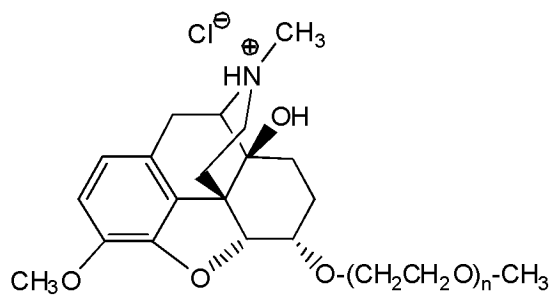
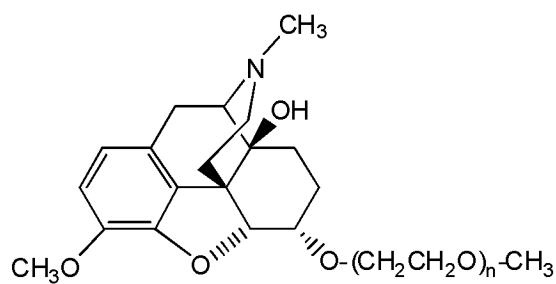
[0176] 其中 R^1 、 R^3 、 R^4 、虚线 (“---”)、 Y^1 和 R^5 中的每一个都如先前关于式 I 所定义的那样, X 是间隔部分, 且 POLY 是水溶性非肽类低聚物。

[0177] 另外的示例性甾合物涵盖在以下式中:

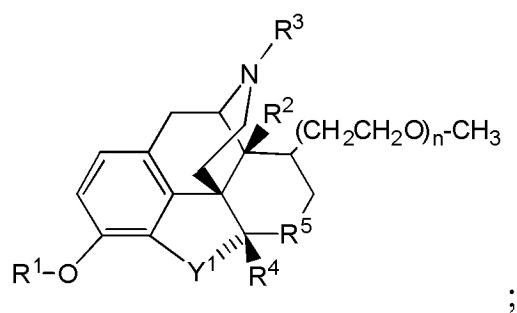
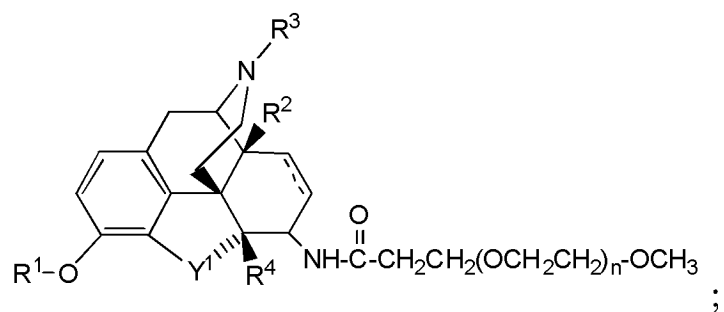
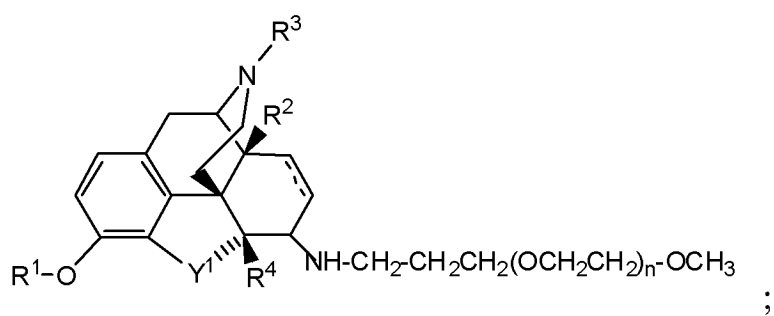
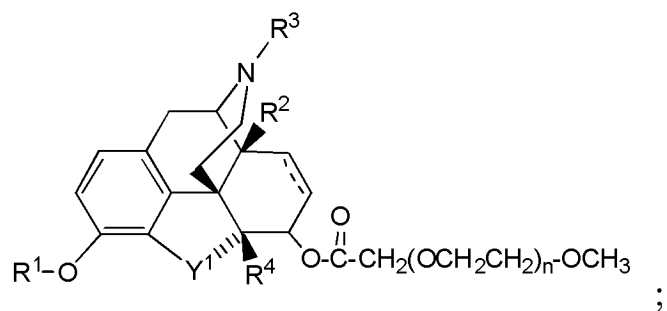
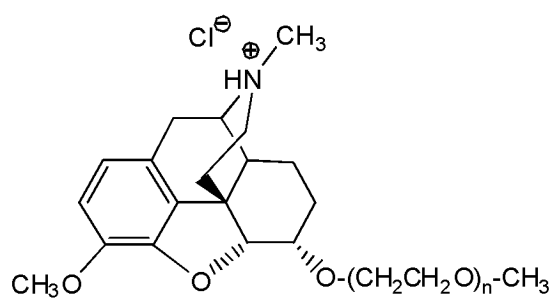
[0178]



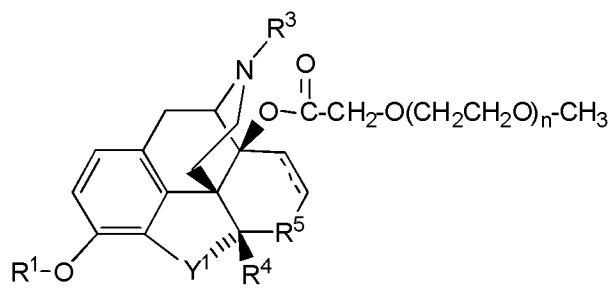
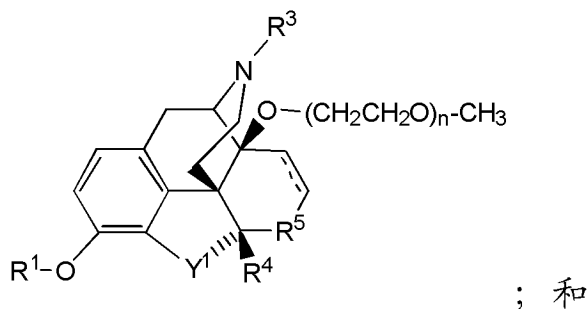
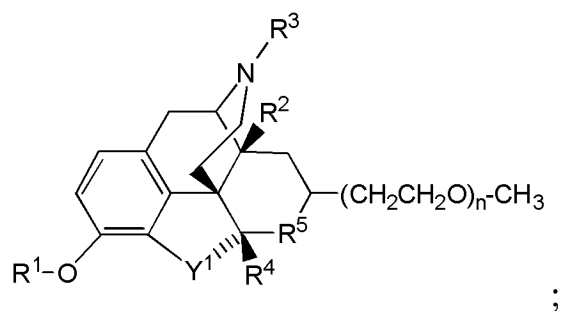
[0180]



[0181]



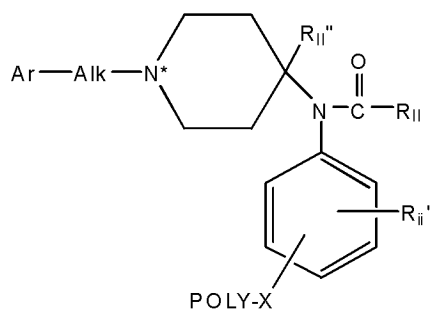
[0182]



[0183] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、虚线 (“—”)、 Y^1 和 R^5 中的每一个在存在时都如先前关于式 I 所定义的那样, 并且变量 “n” 是 1 到 30 的整数。

[0184] 式 II 的阿片样激动剂的示例性钹合物包括具有如下结构的钹合物:

[0185]



[0186] 式 II-Ca

[0187] 其中:

[0188] N^* 是氮;

[0189] Ar 选自环己基、苯基、卤代苯基、甲氧基苯基、氨基苯基、吡啶基、呋喃基和噻吩基;

[0190] Alk 选自亚乙基和亚丙基;

[0191] R_{II} 选自低级烷基、低级烷氧基、二甲基氨基、环丙基、1-吡咯烷基、吗啉代 (优选低级烷基, 如乙基);

[0192] R_{II}' 选自氢、甲基和甲氧基;

[0193] R_{II}'' 选自氢和有机基（优选低级烷基）；

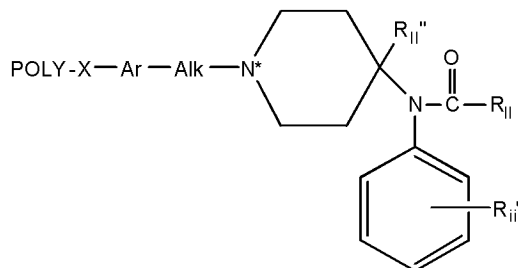
[0194] X 是连接体（例如共价键“-”或一个或多个原子）；且

[0195] POLY 是水溶性非肽类低聚物。

[0196] 关于式 II-Ca 要理解的是，根据条件，式 II-Ca 中的一个或两个胺 -- 但更通常的是标以星号（“N*”）的胺 -- 可以被质子化。

[0197] 式 II 的阿片样激动剂的另外的示例性轭合物包括具有如下结构的轭合物：

[0198]



[0199] 式 II-Cb

[0200] 其中：

[0201] N* 是氮；

[0202] Ar 选自环己基、苯基、卤代苯基、甲氧基苯基、氨苯基、吡啶基、呋喃基和噻吩基；

[0203] Alk 选自亚乙基和亚丙基；

[0204] R_{II} 选自低级烷基、低级烷氧基、二甲基氨基、环丙基、1-吡咯烷基、吗啉代（优选低级烷基，如乙基）；

[0205] R_{II}' 选自氢、甲基和甲氧基；

[0206] R_{II}'' 选自氢和有机基（优选低级烷基）；

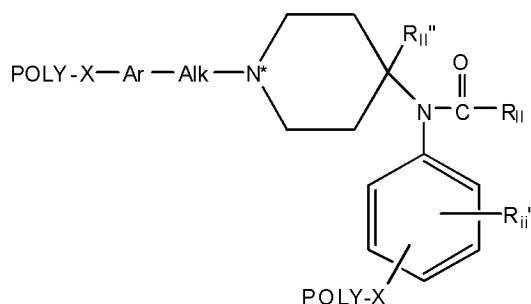
[0207] X 是连接体（例如，共价键“-”或一个或多个原子）；且

[0208] POLY 是水溶性非肽类低聚物。

[0209] 关于式 II-Cb 要理解的是，根据条件，式 II-Cb 中的一个或两个胺 -- 但更通常的是标以星号（“N*”）的胺 -- 可以被质子化。

[0210] 式 II 的阿片样激动剂的另外的示例性轭合物包括具有如下结构的轭合物：

[0211]



[0212] 式 II-Cc

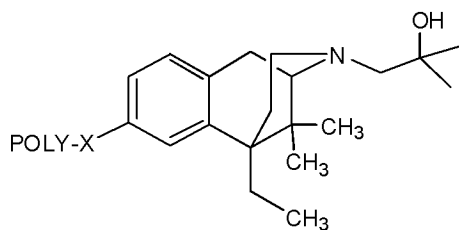
[0213] 其中：

[0214] N* 是氮；

[0215] Ar 选自环己基、苯基、卤代苯基、甲氧基苯基、氨苯基、吡啶基、呋喃基和噻吩基；

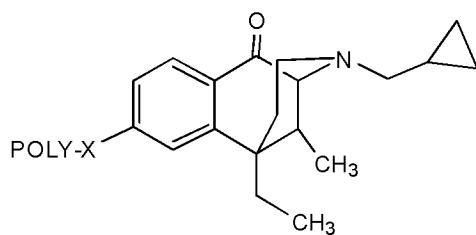
[0216] Alk 选自亚乙基和亚丙基；

[0229]



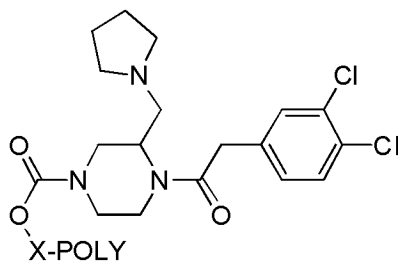
[0230] (示例的布马佐辛衍合物)

[0231]



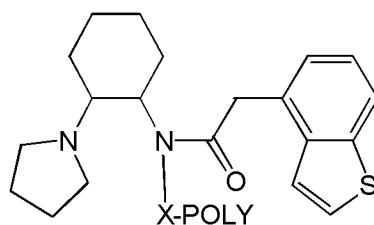
[0232] (示例的乙基氧代环唑星衍合物)

[0233]



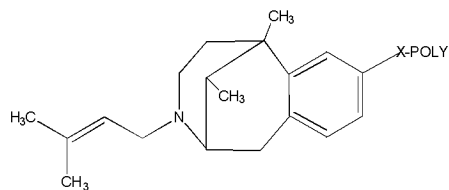
[0234] (示例的 GR89, 696 衍合物)

[0235]



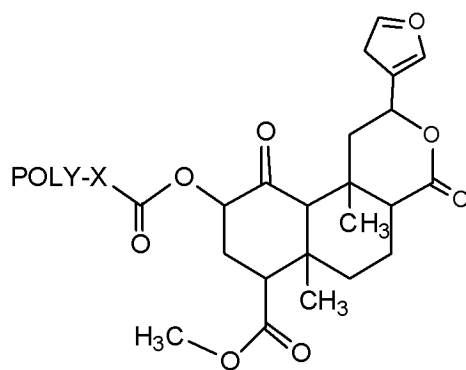
[0236] (示例的 PD117, 302 衍合物)

[0237]



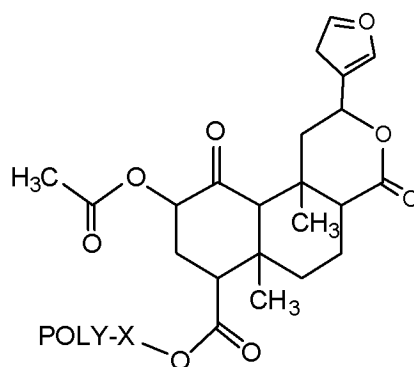
[0238] (示例的喷他佐辛衍合物)

[0239]



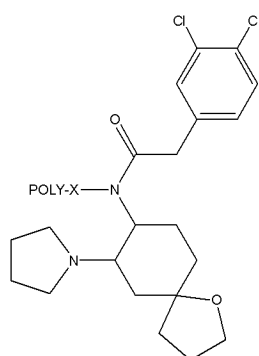
[0240] (示例的丹酚 A 衍生物)

[0241]



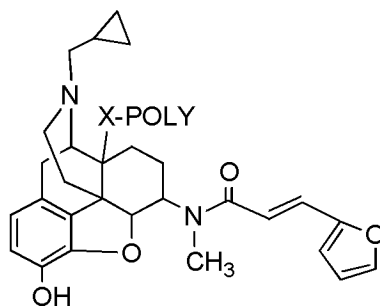
[0242] (示例的丹酚 A 衍生物)

[0243]



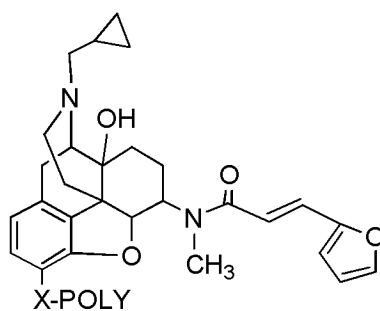
[0244] (示例的螺朵林衍生物)

[0245]



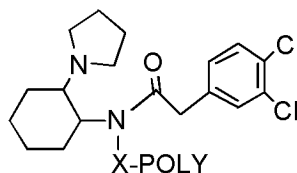
[0246] (示例的 TRK-820 衍生物)

[0247]



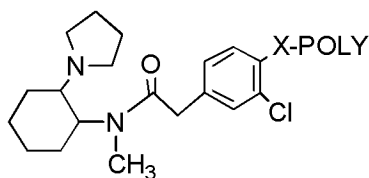
[0248] (示例的 TRK-820 轆合物)

[0249]



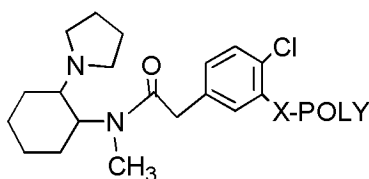
[0250] (示例的 U50488 轆合物)

[0251]



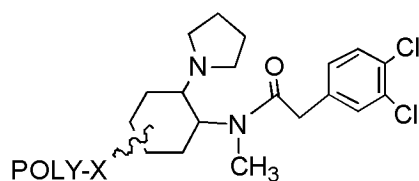
[0252] (示例的 U50488 轆合物)

[0253]



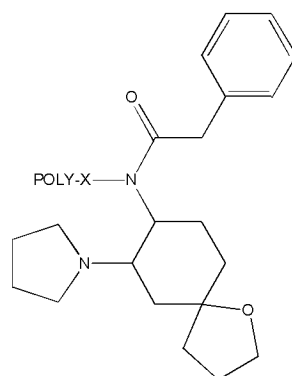
[0254] (示例的 U50488 轆合物)

[0255]



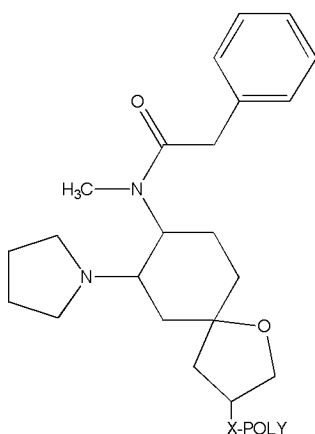
[0256] (示例的 U50488 轆合物)

[0257]



[0258] (示例的 U69593 钹合物)

[0259]

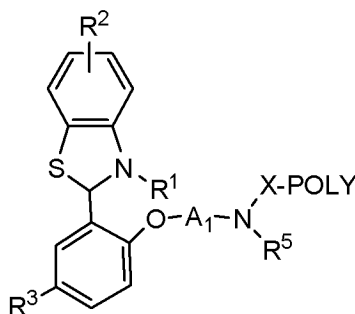


[0260] (示例的 U69593 钹合物)

[0261] 其中对于上述钹合物中的每一种, X 是连接体 (例如, 共价键“-”或一个或多个原子), 且 POLY 是水溶性非肽类低聚物。

[0262] 另外的钹合物在下面提供:

[0263]



[0264] 其中:

[0265] R^1 是酰基;

[0266] R^2 选自氢、卤素、未取代的烷基和卤素取代的烷基;

[0267] R^3 选自卤素和烷氧基;

[0268] R^5 选自羟基、酯、烷氧基和烷氧基烷基;

[0269] A_1 是亚烷基;

[0270] X 是连接体; 且

[0271] POLY 是水溶性非肽类低聚物。

[0272] 本发明的钹合物可表现出减少的血-脑屏障穿过率。此外, 钹合物保持了未修饰的母体小分子药物的生物活性的至少约 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70% 或更多。

[0273] 虽然据信已经描述了本文所公开的钹合物的全部范围, 但最佳尺寸的低聚物可确定如下。

[0274] 首先, 将由单分散或双峰的水溶性低聚物获得的低聚物钹合于小分子药物。优选地, 该药物是口服可生物利用的, 并且独立地表现出不容忽视的血-脑屏障穿过率。接下来, 使用适当的模型确定钹合物穿过血-脑屏障的能力, 并与未修饰的母体药物进行比较。

如果结果是有利的,也就是说,例如,如果穿过率大为降低,那么就进一步评价轭合物的生物活性。优选地,根据本发明的化合物相对于母体药物保持很大程度的生物活性,即保持母体药物的生物活性的约 30% 以上,或者甚至更优选地,保持母体药物的生物活性的约 50% 以上。

[0275] 使用相同单体类型但具有不同数目亚单元的低聚物重复进行上述步骤一次或多次,并比较结果。

[0276] 然后对与非轭合的小分子药物相比穿过血-脑屏障的能力降低的每种轭合物评估其口服生物利用度,基于这些结果,也就是说,基于不同尺寸的低聚物的轭合物与在小分子内的给定位置或部位处的给定小分子的比较,有可能确定能最有效地提供在以下方面之间具有最佳平衡的轭合物的低聚物尺寸:穿过生物膜的减少、口服生物利用度和生物活性。低聚物的小尺寸使这种筛选成为可能,并允许能有效地定制 (tailor) 所得到的轭合物的特性。通过使低聚物的尺寸产生小的增量变化,并利用实验设计方法,能够有效地确定出在生物膜穿过率的减少、生物活性和口服生物利用度之间具有有利的平衡的轭合物。在一些情况下,如本文所述的低聚物的连接对于实际增加药物的口服生物利用度是有效的。

[0277] 例如,本领域普通技术人员利用常规实验可以确定最适合提高口服生物利用度的分子尺寸和键合,方式是首先制备一系列具有不同重量和官能团的低聚物,然后对患者施用轭合物,并定期进行血液和/或尿液采样,由此获得必要的清除曲线。一旦获得了每一测试轭合物的系列清除曲线就可以确定出合适的轭合物。

[0278] 动物模型(啮齿动物和狗)也可用于研究口服药物运输。此外,非体内方法包括啮齿动物外翻肠切除组织和 Caco-2 细胞单层组织培养模型。这些模型对于预测口服药物生物利用度是有用的。

[0279] 为了确定阿片样激动剂或阿片样激动剂与水溶性非肽类低聚物的轭合物是否具有作为 μ 阿片样受体激动剂的活性,可以测试这种化合物。例如,可以采用由 Malatynska 等人 (1995) *NeuroReport* 6:613-616 中所述的方法修改而来的方法来确定 K_D (结合亲和力) 和 B_{max} (受体数目)。简言之,人 μ 受体可被重组表达在中国仓鼠卵巢细胞中。可以使用最终配体浓度为 [0.3 nM] 的放射性配体 [3H]-二丙诺啡 (30-50 Ci/mmol)。使用纳络酮为非特异性的决定子 (determinate) [3.0 nM]、参比化合物和阳性对照。在 25°C 下,反应在含有 5 mM $MgCl_2$ 的 50 mM TRIS-HCl (pH 7.4) 中进行 150 分钟。通过快速真空过滤到玻璃纤维过滤器上来终止反应。测定被捕集到过滤器上的放射性,并与对照值作比较,以便确定测试化合物与克隆的 μ 结合位点的任何相互作用。

[0280] 可以对 κ 阿片样受体激动剂进行类似的测试。参见例如,Lahti 等人 (1985), *Eur. J. Pharmacol.* 109:281-284; Rothman 等人 (1992), *Peptides* 13:977-987; Kinouchi 等人 (1991) *Eur. J. Pharmacol.* 207:135-141。简言之,可从豚鼠小脑膜中获得人 κ 受体。可以使用最终配体浓度为 [0.75 nM] 的放射性配体 [3H]-U-69593 (40-60 Ci/mmol)。使用 U-69593 为非特异性的决定子 [1.0 μ M]、参比化合物和阳性对照。在 30°C 下,反应在 50 mM HEPES (pH 7.4) 中进行 120 分钟。通过快速真空过滤到玻璃纤维过滤器上来终止反应。测定被捕集到过滤器上的放射性,并与对照值作比较,以便确定测试化合物与克隆的 κ 结合位点的任何相互作用。

[0281] 本文中所述的轭合物不仅包括轭合物本身,还包括药学上可接受的盐形式的轭合

物。本文中所述的轭合物可具有足够的酸性基团、足够的碱性基团或这两种官能团兼而有之,并因此与多种无机碱及无机和有机酸中的任一种反应形成盐。通常用于形成酸加成盐的酸是无机酸,如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、磷酸等,以及有机酸,如对甲苯磺酸、甲磺酸、草酸、对溴苯基磺酸、碳酸、琥珀酸、柠檬酸、苯甲酸、乙酸等。这种盐的例子包括硫酸盐、焦硫酸盐、硫酸氢盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、磷酸盐、磷酸一氢盐、磷酸二氢盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、乙酸盐、丙酸盐、癸酸盐、辛酸盐、丙烯酸盐、甲酸盐、异丁酸盐、己酸盐、庚酸盐、丙炔酸盐、草酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、辛二酸盐、癸二酸盐、富马酸盐、马来酸盐、丁炔-1,4-二酸盐、己炔-1,6-二酸盐、苯甲酸盐、氯代苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、羟基苯甲酸盐、甲氧基苯甲酸盐、邻苯二甲酸盐、磺酸盐、二甲苯磺酸盐、苯乙酸盐、苯丙酸盐、苯丁酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、 γ -羟基丁酸盐、乙醇酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、丙磺酸盐、萘-1-磺酸盐、萘-2-磺酸盐、扁桃酸盐等。

[0282] 碱加成盐包括衍生自无机碱的碱加成盐,如铵或碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐等。在制备本发明的盐中有用的这种碱因此包括氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、碳酸钾等。

[0283] 本发明还包括药物制剂,所述药物制剂包含本文提供的轭合物与药物赋形剂的组合。一般来说,轭合物本身为固体形式(例如沉淀),其可与合适的药物赋形剂组合,所述药物赋形剂可以为固体或液体形式。

[0284] 示例的赋形剂包括但不限于选自糖类、无机盐、抗微生物剂、抗氧化剂、表面活性剂、缓冲剂、酸、碱及其组合的赋形剂。

[0285] 碳水化合物可以作为赋形剂存在,如糖、衍生化糖,如糖醇、糖醛酸、酯化糖和/或糖聚合物。具体的碳水化合物赋形剂包括例如:单糖,如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等;二糖,如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等;多糖,如多糖,如棉子糖、松三糖、麦芽糖糊精、右旋糖酐、淀粉等;以及糖醇,如甘露醇,木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇、山梨醇(葡萄糖醇)、吡喃糖基山梨醇(pyranosyl sorbitol)、肌醇等。

[0286] 赋形剂还可以包括无机盐或缓冲剂,如柠檬酸、氯化钠、氯化钾、硫酸钠、硝酸钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠及其组合。

[0287] 制剂还可包括用于防止或阻止微生物生长的抗微生物剂。适合于本发明的抗微生物剂的非限制性例子包括苯扎氯铵、苄索氯铵、苄醇、西吡氯铵、氯丁醇、苯酚、苯乙醇、硝酸苯汞、硫柳汞(thimersol)及其组合。

[0288] 抗氧化剂也可存在于制剂中。抗氧化剂用于防止氧化,从而防止轭合物或制剂的其它组分变质。用于本发明中的合适的抗氧化剂包括例如棕榈酸抗坏血酸酯、丁基化羟基茴香醚、丁基化羟基甲苯、次磷酸、一硫代甘油、没食子酸丙酯、亚硫酸氢钠、甲醛次硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠及其组合。

[0289] 表面活性剂可作为赋形剂存在。示例的表面活性剂包括:聚山梨醇酯,如“吐温 20”和“吐温 80”,普卢兰尼克,如 F68 和 F88(两者都可从 BASF, Mount Olive, New Jersey 获得);脱水山梨醇酯;脂质,如磷脂,如卵磷脂和其它的磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺(虽然优选不以脂质体的形式)、脂肪酸和脂肪酸酯;类固醇,如胆固醇;以及螯合剂,如 EDTA、锌和其它这类合适的阳离子。

[0290] 在制剂中,药学上可接受的酸或碱可作为赋形剂存在。可使用的酸的非限制性例

子包括选自以下的酸：盐酸、乙酸、磷酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、甲酸、三氯乙酸、硝酸、高氯酸、磷酸、硫酸、富马酸及其组合。合适的碱的例子包括但不限于选自以下的碱：氢氧化钠、乙酸钠、氢氧化铵、氢氧化钾、乙酸铵、乙酸钾、磷酸钠、磷酸钾、柠檬酸钠、甲酸钠、硫酸钠、硫酸钾、富马酸钾及其组合。

[0291] 组合物中轭合物的量可有所变化，这取决于多种因素，但最佳的是治疗有效剂量（当将组合物储存于单位剂量容器中时）。通过反复施用增加量的轭合物，以便确定产生临床所需终点的量，由此可实验确定治疗有效剂量。

[0292] 组合物中任何单种赋形剂的量可有所变化，这取决于赋形剂的活性和组合物的具体要求。通常情况下，通过常规实验确定任何单种赋形剂的最佳量，即通过制备含有变化量的赋形剂（范围从低到高）的组合物，检查稳定性和其它参数，然后确定获得最佳性能且没有显著不良反应的范围。

[0293] 然而一般来说，赋形剂在组合物中的存在量为约 1 重量%至约 99 重量%，优选为约 5 重量% -98 重量%，更优选为约 15-95 重量%的赋形剂，最优选的浓度小于 30 重量%。

[0294] 这些前述药物赋形剂连同其它的赋形剂以及关于药物组合物的一般教导描述于“Remington: The Science & Practice of Pharmacy (雷明顿: 药学科学与实践)”，第 19 版，Williams & Williams, (1995)；“Physician's Desk Reference (医师案头参考)”，第 52 版，Medical Economics, Montvale, NJ (1998) 和 Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients (药物赋形剂手册)，第三版，American Pharmaceutical Association, Washington, D. C., 2000 中。

[0295] 药物组合物可采用任何数目的形式，本发明在这方面不受限制。示例的制剂最优选是适合口服施用形式的，如片剂、囊片、胶囊、胶囊锭 (gel cap)、锭剂、分散剂、悬浮剂、溶液剂、酏剂、糖浆、糖锭、透皮贴片、喷雾剂、栓剂和粉栓。

[0296] 对于具有口服活性的轭合物，口服剂型是优选的，包括片剂、囊片、胶囊、胶囊锭、悬浮剂、溶液剂、酏剂和糖浆，并且还可以包括任选被包封的多种颗粒、珠、粉末或丸。这种剂型是采用药物制剂领域的技术人员已知的常规方法制备的，并且描述于相关的教科书中。

[0297] 例如，可采用标准的片剂加工程序和设备来制备片剂和囊片。当制备含有本文描述的轭合物的片剂或囊片时，直接压制和造粒技术是优选的。除了轭合物之外，片剂和囊片一般还含有无活性的药学上可接受的载体材料，如粘结剂、润滑剂、崩解剂、填料、稳定剂、表面活性剂、着色剂等。粘结剂用于对片剂提供粘聚性，并因此确保片剂保持完整。合适的粘结剂材料包括但不限于淀粉（包括玉米淀粉和预胶凝化淀粉）、明胶、糖（包括蔗糖、葡萄糖、右旋糖和乳糖）、聚乙二醇、蜡以及天然的和合成的树胶（例如阿拉伯树胶）藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素聚合物（包括羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素等）和硅酸镁铝。润滑剂用于方便片剂制造、促进粉末流动，并防止当解除压力时颗粒顶裂（即颗粒破裂）。有用的润滑剂有硬脂酸镁、硬脂酸钙和硬脂酸。崩解剂用于促进片剂的崩解，通常是淀粉、粘土、纤维素、褐藻胶、树胶或交联聚合物。填料例如包括诸如二氧化硅、二氧化钛、氧化铝、滑石、高岭土、粉状纤维素和微晶纤维素之类的材料以及诸如甘露醇、脲、蔗糖、乳糖、右旋糖、氯化钠和山梨醇之类的可溶物质。本领域所公知的稳定剂用于抑制或延缓药物分解反应（作为例子，氧化反应）。

[0298] 胶囊也是优选的口服剂型,在这种情况下,可以包封液体或凝胶(例如在胶囊锭的情况下)或固体(包括微粒状物质,如颗粒、珠、粉末或丸)形式的含轭合物的组合物。合适的胶囊包括硬胶囊和软胶囊,且通常由明胶、淀粉或纤维素材料制成。优选密封两件式(two-piece)硬明胶胶囊,如用明胶带等密封。

[0299] 本发明包括基本干燥形式的胃肠外制剂(通常为冻干物或沉淀物,其可以是粉末或块的形式),以及为注射制备的制剂,该制剂通常是液体,并且需要重组干燥形式的胃肠外制剂的步骤。用于在注射前重组固体组合物的合适稀释剂的例子包括注射用抑菌水、5%右旋糖水溶液、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液、盐水、无菌水、去离子水及其组合。

[0300] 在一些情况下,拟用于胃肠外施用的组合物可采取非水溶液、悬浮剂或乳剂的形式,每种通常都是无菌的。非水溶剂或媒介物的例子有丙二醇、聚乙二醇、植物油(如橄榄油和玉米油)、明胶和可注射有机酯(如油酸乙酯)。

[0301] 本文描述的胃肠外制剂还可以含有佐剂,如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。通过加入杀菌剂、经截留细菌的过滤器过滤、照射或加热使制剂无菌。

[0302] 也可以使用常规的透皮贴片或其它透皮递送系统通过皮肤施用轭合物,其中轭合物容纳在充当要贴于皮肤上的药物递送装置的层状结构内。在这种结构中,轭合物容纳在上部衬层(backing layer)下面的层或“储层(reservoir)”中。层状结构可含有单个储层,或其可含有多个储层。

[0303] 也可以将轭合物配制成用于直肠施用的栓剂。关于栓剂,将轭合物与栓剂基质材料混合,所述基质材料是(例如,在室温下保持为固体但在体温下软化、融化或溶解的赋形剂)如可可脂(可可油)、聚乙二醇、甘油胶、脂肪酸及其组合。可通过例如进行以下步骤来制备栓剂(不必按照所提供的顺序):融化栓剂基质材料以形成融体;加入轭合物(在融化栓剂基质材料之前或之后);将融体倒入模具中;冷却融体(例如将含有融体的模具放置于室温环境中)以由此形成栓剂;并将栓剂从模具中移出。

[0304] 本发明还提供将本文提供的轭合物施用于患有对用该轭合物治疗有反应的的症状的患者的方法。该方法包括施用(通常是口服施用)治疗有效量的轭合物(优选提供为药物制剂的一部分)。也可设想其它的施用模式,如肺部、鼻部、口腔、直肠、舌下、透皮和胃肠外施用。如本文所用,术语“胃肠外”包括皮下、静脉内、动脉内、腹膜内、心脏内、鞘内和肌肉内注射以及输液注射。

[0305] 在利用胃肠外施用的情况下,可能有必要使用比先前描述稍大的低聚物,分子量范围在约 500 至 30K 道尔顿(例如具有约 500、1000、2000、2500、3000、5000、7500、10000、15000、20000、25000、30000 或更大的分子量)。

[0306] 该施用方法可用于治疗能通过施用特定的轭合物施治或预防的任何症状。本领域普通技术人员了解具体的轭合物所能有效治疗的症状。要施用的实际剂量将有所不同,这取决于受试者的年龄、体重和一般状况以及所治疗症状的严重性、保健专业人员的判断和所施用的轭合物。治疗有效量是本领域技术人员已知的,和/或描述在相关的参考课本和文献中。一般来说,治疗有效量的范围在约 0.001mg 至 1000mg,优选剂量为 0.01mg/天至 750mg/天,更优选的剂量为 0.10mg/天至 500mg/天。

[0307] 可以按多种给药方案来施用任何给定轭合物(再次地,优选提供为药物制剂的一部分)的单位剂量,这取决于临床医师的判断、患者的需要等。具体的给药方案是本领域普

通技术人员已知的,或者可以采用常规方法实验确定。示例的给药方案包括但不限于一天五次、一天四次、一天三次、一天两次、一天一次、一周三次、一周两次、一周一次、每月两次、每月一次施用及其任意组合。一旦已达到临床终点就停止组合物的给药。

[0308] 施用本发明轭合物的一个优点是相对于母体药物,可实现首过代谢的降低。这种结果对基本上通过穿过肠道代谢的许多口服施用的药物来说是有利的。按这种方式,可以通过选择提供所需清除率特性的低聚物分子尺寸、键合和共价连接位置来调节轭合物的清除率。本领域普通技术人员可基于本文的教导确定低聚物的理想分子尺寸。与相应非轭合的小药物分子相比,轭合物首过代谢的优选的降低包括:至少约 10%;至少约 20%;至少约 30%;至少约 40%;至少约 50%;至少约 60%;至少约 70%;至少约 80%和至少约 90%。

[0309] 因此,本发明提供了降低活性剂代谢的方法。该方法包括以下步骤:提供单分散或双峰轭合物,每种轭合物由衍生自小分子药物的部分组成,所述小分子药物通过稳定的键合共价连接于水溶性低聚物,其中与没有连接到水溶性低聚物的小分子药物的代谢率相比,所述轭合物表现出降低的代谢率;以及对患者施用所述轭合物。通常情况下,经由选自以下施用中的一种类型进行施用:口服施用、透皮施用、口腔施用、透粘膜施用、阴道施用、直肠施用、胃肠外施用和肺部施用。

[0310] 虽然该轭合物适用于降低许多类型的代谢(包括 I 期和 II 期代谢可以被降低),但在由肝酶(例如细胞色素 P450 亚型的一种或多种)和/或由一种或多种肠酶代谢小分子药物时,该轭合物是特别有用的。

[0311] 本文引用的所有文章、书籍、专利、专利公布和其它出版物均通过引用全文并入。在本说明书中的教导与通过引用并入的技术之间不一致的情况下,应以本说明书中的教导的含义为准。

[0312] 实验

[0313] 应理解的是,虽然已结合某些优选和具体的实施方案对本发明进行了描述,但前面的描述以及随后的实施例旨在例示而非限制本发明的范围。本发明所属领域的技术人员将显而易见本发明范围内的其它方面、优点和修改。

[0314] 除另指出外,所附实施例中涉及的所有化学试剂均为市售的。PEG-mer 的制备描述在例如美国专利申请公布 No. 2005/0136031 中。

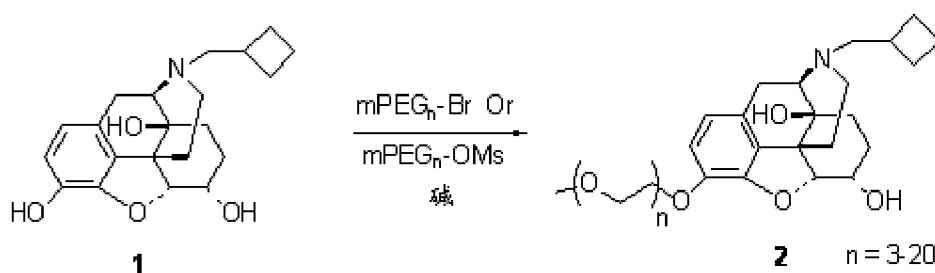
[0315] 所有的 ^1H NMR(核磁共振)数据均由 Bruker 制造的 NMR 波谱仪($\text{MHz} \geq 200$)产生。在下面提供了某些化合物的清单以及化合物的来源。

[0316] 实施例 1

[0317] 制备低聚物-纳布啡轭合物-“方法 A”

[0318] 采用第一种方法制备 PEG-纳布啡。本实施例所采用的方法示意地显示如下。

[0319]

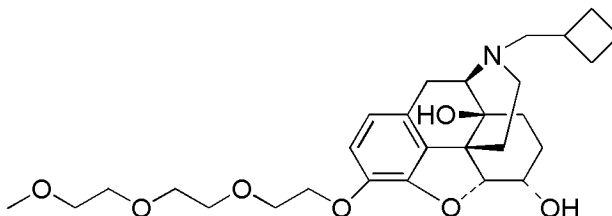


[0320] 盐酸纳布啡二水合物的脱盐：

[0321] 将盐酸纳布啡二水合物 (600mg, 来自 Sigma) 溶解在水 (100mL) 中。加入饱和 K_2CO_3 水溶液, 然后用 1N HCl 溶液将 pH 调到 9.3, 用氯化钠饱和。用二氯甲烷 ($5 \times 25\text{mL}$) 萃取溶液。将合并的有机溶液用盐水 (100mL) 洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥, 浓缩至干并在高真空下干燥以产生纳布啡 (483.4mg, 97% 回收率)。在 $CDCl_3$ 中通过 1H -NMR 确认产物。

[0322] 合成 3-O-mPEG₃-纳布啡 (2) ($n = 3$) :

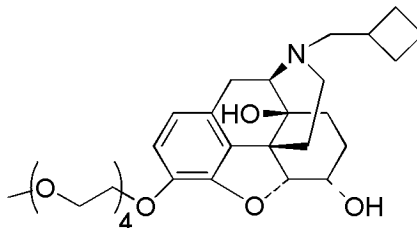
[0323]



[0324] 将纳布啡 (28.5mg, 0.08mmol) 溶解在丙酮 (2mL) 和甲苯 (1.5mL) 的混合物中。在室温下加入碳酸钾 (21mg, 0.15mmol), 接着加入 mPEG₃-Br (44.5mg, 0.20mmol)。将所得到的混合物在室温下搅拌 27.5 小时。加入更多的碳酸钾 (24mg, 0.17mmol)。用 CEM 微波加热混合物, 以在 60°C 下达 20 分钟, 然后在 100°C 下达 30 分钟。加入 DMF (0.2mL)。用 60°C 微波加热混合物 20 分钟, 100°C 微波加热 30 分钟。浓缩反应物以除去有机溶剂, 将残余物与水 (10mL) 混合, 用二氯甲烷 ($4 \times 15\text{mL}$) 萃取。将合并的有机溶液用盐水洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥, 浓缩。用 HPLC 和 LC-MS 检测粗产物。将残余物再次与水 (10mL) 混合, 用 1N HCl 将 pH 调节至 2.3, 用二氯甲烷 ($2 \times 15\text{mL}$) 洗涤。用 0.2N NaOH 将水溶液调节至 pH 10.4, 用二氯甲烷 ($4 \times 15\text{mL}$) 萃取。将合并的有机溶液用盐水洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥, 浓缩。通过使用二氯甲烷中的 0-10% MeOH 的 Biotage 快速柱色谱法纯化残余物, 得到 81% 收率的所需产物 3-O-mPEG₃-纳布啡 (2) ($n = 3$) (32.7mg)。通过 1H -NMR、LC-MS 确认产物。

[0325] 合成 3-O-mPEG₄-纳布啡 (2) ($n = 4$) :

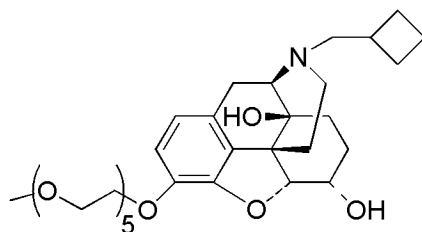
[0326]



[0327] 在碳酸钾 (113mg, 0.82mmol) 的存在下将纳布啡 (96mg, 0.27mmol) 和 mPEG₄-OMs (131mg, 0.46mmol) 在丙酮 (8mL) 中的混合物加热到回流 16 小时, 冷却到室温, 过滤并用丙酮和 DCM 洗涤固体。收集溶液并浓缩至干。通过使用二氯甲烷中的 0-10% MeOH 的 Biotage 自动快速柱色谱法纯化残余物, 得到 74% 收率的产物 3-O-mPEG₄-纳布啡 2 ($n = 4$) (109mg)。通过 1H -NMR、LC-MS 确认产物。

[0328] 合成 3-O-mPEG₅-纳布啡 (2) ($n = 5$) :

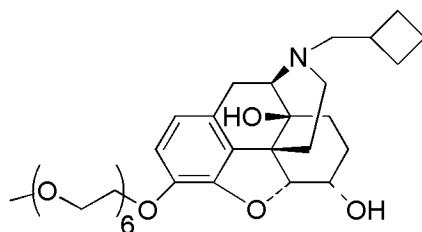
[0329]



[0330] 在碳酸钾 (93mg, 0.67mmol) 的存在下, 将纳布啡 (78.3mg, 0.22mmol) 和 mPEG₅-OMs (118mg, 0.36mmol) 在丙酮 (8mL) 中的混合物加热到回流 16 小时, 冷却到室温, 过滤并用丙酮和 DCM 洗涤固体。收集溶液并浓缩至干。通过使用二氯甲烷中的 0-10% MeOH 的 Biotage 自动快速柱色谱法纯化残余物, 得到 76% 收率的产物 3-O-mPEG₅-纳布啡 (2) (n = 5) (101mg)。通过 ¹H-NMR、LC-MS 确认产物。

[0331] 合成 3-O-mPEG₆-纳布啡 (2) (n = 6) :

[0332]



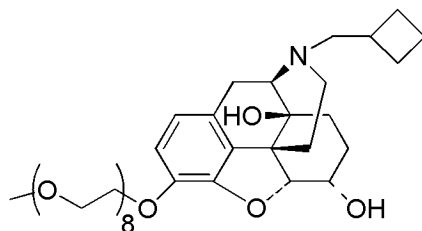
[0333] 在碳酸钾 (98mg, 0.71mmol) 的存在下, 将纳布啡 (89.6mg, 0.25mmol) 和 mPEG₆-OMs (164mg, 0.44mmol) 在丙酮 (8mL) 中的混合物加热到回流 18 小时, 冷却到室温, 过滤并用丙酮和 DCM 洗涤固体。收集溶液并浓缩至干。通过使用二氯甲烷中的 0-10% MeOH 的 Biotage 自动快速柱色谱法纯化残余物, 得到 91% 收率的产物 3-O-mPEG₆-纳布啡 (2) (n = 6) (144mg)。通过 ¹H-NMR、LC-MS 确认产物。

[0334] 合成 3-O-mPEG₇-纳布啡 (2) (n = 7) :

[0335] 在碳酸钾 (67mg, 0.49mmol) 的存在下, 将纳布啡 (67mg, 0.19mmol) 和 mPEG₇-Br (131mg, 0.33mmol) 在丙酮 (10mL) 中的混合物加热到回流 6 小时, 冷却到室温, 过滤并用二氯甲烷洗涤固体。将溶液浓缩至干。通过使用二氯甲烷中的 2-10% MeOH 的 Biotage 自动快速柱色谱法纯化残余物, 得到产物 3-O-mPEG₇-纳布啡 (2) (n = 7) (40.6mg)。通过 ¹H-NMR、LC-MS 确认产物。

[0336] 合成 3-O-mPEG₈-纳布啡 (2) (n = 8) :

[0337]



[0338] 在碳酸钾 (40.8mg, 0.30mmol) 的存在下, 用 CEM 微波加热纳布啡 (60mg, 0.17mmol) 和 mPEG₈-Br (105.7mg, 0.24mmol) 在甲苯 /DMF (3mL/0.3mL) 中的混合物, 以在 100℃ 下达 30 分钟。然后加入丙酮 (1mL)。用 CEM 微波加热混合物, 在 100℃ 下达 90 分钟之后, 加入更多的 K₂CO₃ (31mg, 0.22mmol) 和 mPEG₈-Br (100mg, 0.22mmol)。用 CEM 微波加热混合, 以在

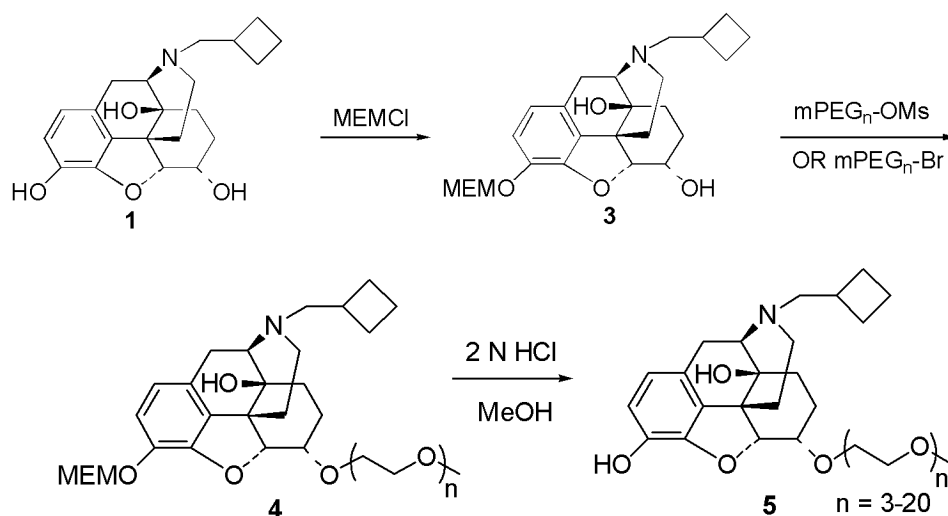
100℃下达 60 分钟。再次加入 mPEG₈-Br (95mg, 0.21mmol)。再次用 CEM 微波加热混合物, 以在 100℃下达 30 分钟。在减压下浓缩反应混合物。将残余物与水 (2mL) 和盐水 (10mL) 混合。用 1N HCl 将溶液的 pH 调节至 1.56, 用二氯甲烷 (3×20mL) 萃取。将合并的有机溶液经 Na₂SO₄ 干燥, 浓缩以产生残余物 I (所需产物与前体物质的混合物)。用 0.2N NaOH 使水溶液的 pH 变为 10.13, 用二氯甲烷 (4×15mL) 萃取。用盐水洗涤有机溶液, 经 Na₂SO₄ 干燥, 浓缩以产生残余物 II (19.4mg), 其含有产物和起始物纳布啡。通过使用二氯甲烷中的 2-10% MeOH 的 Biotage 自动快速柱色谱法纯化残余物 I, 得到产物 3-O-mPEG₈-纳布啡 (2) (n = 8) (44.6mg)。通过 ¹H-NMR、LC-MS 确认产物。

[0339] 实施例 2

[0340] 制备低聚物-纳布啡衍合物-“方法 B”

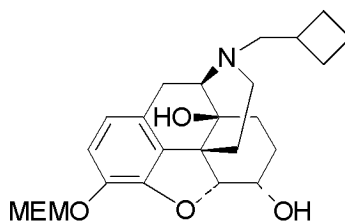
[0341] 采用第二种方法制备 PEG-纳布啡。本实施例所采用的方法示意地显示如下。

[0342]



[0343] 合成 3-O-MEM-纳布啡 (3) :

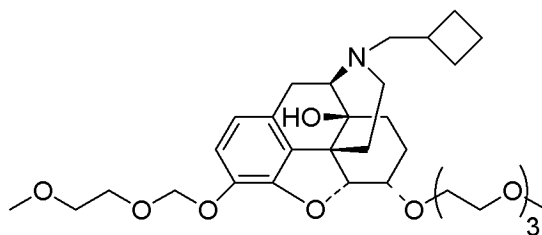
[0344]



[0345] 将纳布啡 (321.9mg, 0.9mmol) 溶解在丙酮 / 甲苯 (19mL/8mL) 中。然后加入碳酸钾 (338mg, 2.45mmol), 接着加入 MEMCl (160 μL, 1.41mmol)。在室温下将所得到的混合物搅拌 21 小时, 加入 MeOH (0.3mL) 猝灭反应。在减压下将反应混合物浓缩至干。将残余物与水 (5mL) 和盐水 (15mL) 混合, 用二氯甲烷 (3×15mL) 萃取。将合并的有机溶液用盐水洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥, 浓缩。通过使用二氯甲烷中的 2-10% MeOH 的 Biotage 自动快速柱色谱法分离残余物, 得到产物 3-O-MEM-纳布啡 (3) (341mg) 和起始物纳布啡 (19.3mg)。通过 ¹H-NMR、LC-MS 确认产物。

[0346] 合成 6-O-mPEG₃-3-O-MEM-纳布啡 (4) (n = 3) :

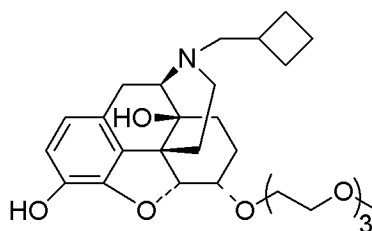
[0347]



[0348] 在 20mL 小瓶中放入 3-O-MEM-纳布啡 (3) (85mg, 0.19mmol) 和甲苯 (15mL)。浓缩混合物以除去 7mL 的甲苯。加入无水 DMF (0.2mL)。使氮气快速通过小瓶。加入 NaH (矿物油中的 60% 分散体, 21mg, 0.53mmol), 接着加入 mPEG₃-OMs (94mg, 0.39mmol)。将所得到的混合物在 45℃ 下加热 22.5 小时后, 加入更多的 NaH (22mg, 0.55mmol)。将混合物在 45℃ 下再加热六小时, 加入 NaH (24mg) 并将混合物在 45℃ 下再加热 19 小时。当混合物冷却到室温时, 加入饱和 NaCl 水溶液 (1mL) 以猝灭反应。用水 (10mL) 稀释混合物, 用 EtOAc (4×15mL) 萃取。将合并的有机溶液用盐水洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥, 浓缩。通过使用二氯甲烷中的 0-10% MeOH 的 Biotage 自动快速柱色谱法分离残余物, 得到 71% 收率的产物 6-O-mPEG₃-3-O-MEM-纳布啡 (4) (n = 3) (79.4mg)。通过 ¹H-NMR、LC-MS 确认产物。

[0349] 合成 6-O-mPEG₃-纳布啡 (5) (n = 3) :

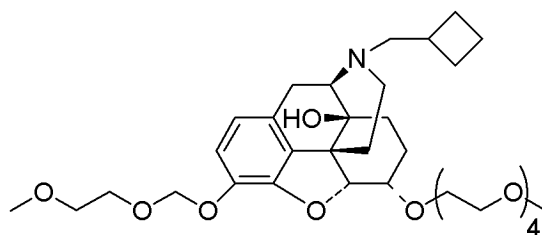
[0350]



[0351] 在室温下将 6-O-mPEG₃-3-O-MEM-纳布啡 (4) (79.4mg) 在甲醇中的 2M HCl 里搅拌六小时。用水 (5mL) 稀释混合物并浓缩以除去甲醇。用二氯甲烷 (5mL) 洗涤水溶液, 并用 0.2N NaOH 和固体 NaHCO₃ 将溶液的 pH 调节至 9.35, 用二氯甲烷 (4×30mL) 萃取。将合并的有机溶液用盐水洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥, 浓缩得到 93% 收率的产物 6-O-mPEG₃-纳布啡 (5) (n = 3) (62.5mg)。通过 ¹H-NMR、LC-MS 确认产物。

[0352] 合成 6-O-mPEG₄-3-O-MEM-纳布啡 (4) (n = 4) :

[0353]

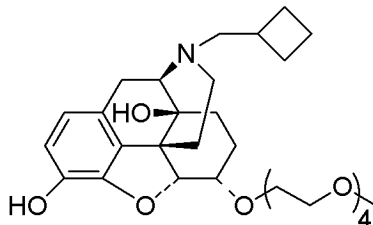


[0354] 在 50mL 圆底烧瓶中放入 3-O-MEM-纳布啡 (3) (133.8mg, 0.3mmol) 和 mPEG₄-OMs (145mg, 0.51mmol) 以及甲苯 (20mL)。浓缩混合物以除去约 12mL 的甲苯。加入无水 DMF (0.2mL)。加入 NaH (矿物油中的 60% 分散体, 61mg, 1.52mmol)。将所得到的混合物在 45℃ 下加热 21.5 小时后, 加入更多的 NaH (30mg, 0.75mmol)。将混合物在 45℃ 下再加热五小时。当混合物冷却到室温时, 加入饱和 NaCl 水溶液 (1mL) 以猝灭反应。用水 (15mL) 稀释混合物, 并用 EtOAc (4×15mL) 萃取。将合并的有机溶液用盐水洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥, 浓

缩。通过使用二氯甲烷中的 0-10% MeOH 的 Biotage 自动快速硅胶柱色谱法分离残余物, 得到产物 6-O-mPEG₄-3-O-MEM- 纳布啡 (4) ($n = 4$) (214.4mg)。¹H-NMR 显示产物中有一些 mPEG₄-OMs。未尝试进一步的纯化。通过 ¹H-NMR、LC-MS 确认产物。

[0355] 合成 6-O-mPEG₄- 纳布啡 (5) ($n = 4$) :

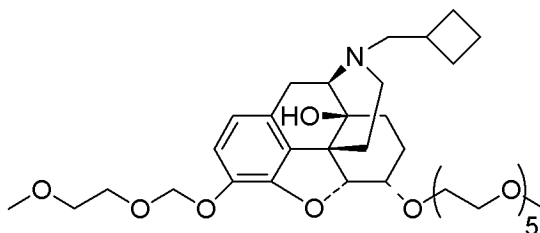
[0356]



[0357] 在室温下将 6-O-mPEG₄-3-O-MEM- 纳布啡 (4) (214.4mg) 在甲醇 (30mL) 中的 2M HCl 里搅拌 6 小时。用水 (5mL) 稀释混合物并浓缩以除去甲醇。将水溶液用 1N NaOH 调节到 9.17, 用二氯甲烷 (4×25mL) 萃取。将合并的有机溶液用盐水洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥并浓缩。通过使用 3-8% MeOH/DCM 的硅胶快速柱色谱法 (Biotage) 纯化残余物, 得到纯的产物 6-O-mPEG₄- 纳布啡 (5) ($n = 4$) (90.7mg), 连同一些不纯的产物。通过 ¹H-NMR、LC-MS 确认产物。将不纯的部分溶解在 DCM (~1.5mL) 中。加入醚 (20mL) 中的 1N HCl, 离心。收集残余物并将其重新溶解在 DCM (25mL) 中。用 5% NaHCO₃ 水溶液 (20mL)、盐水 (2×30mL) 洗涤 DCM 溶液, 经 Na₂SO₄ 干燥, 浓缩得到另一部分纯的产物 (24.8mg)。

[0358] 合成 6-O-mPEG₅-3-O-MEM- 纳布啡 (4) ($n = 5$) :

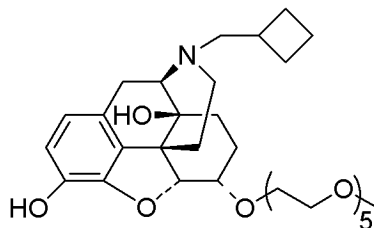
[0359]



[0360] 在 50mL 圆底烧瓶中放入 3-O-MEM- 纳布啡 (3) (103.9mg, 0.23mmol)、mPEG₅-OMs (151mg, 0.46mmol) 和甲苯 (38mL)。浓缩混合物以除去约 20mL 的甲苯。加入无水 DMF (0.5mL)。加入 NaH (矿物油中的 60% 分散体, 102mg, 2.55mmol)。将所得到的混合物在 45℃ 下加热 18 小时后, 加入更多的 NaH (105mg)。将混合物在 45℃ 下再加热 5.5 小时。加入 NaH (87mg), 并将混合物在 45℃ 下再加热 17.5 小时。当混合物冷却到室温时, 加入饱和 NaCl 水溶液 (3mL) 以猝灭反应。用水 (10mL) 稀释混合物, 用 EtOAc (4×20mL) 萃取。将合并的有机溶液用盐水洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥, 浓缩。通过使用二氯甲烷中的 3-8% MeOH 的 Biotage 自动快速硅胶柱色谱法分离残余物, 得到产物 6-O-mPEG₅-3-O-MEM- 纳布啡 (4) ($n = 5$)。

[0361] 合成 6-O-mPEG₅- 纳布啡 (5) ($n = 5$) :

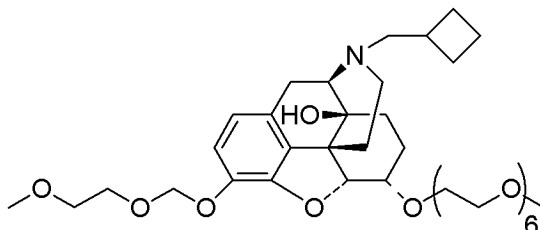
[0362]



[0363] 在室温下将上述 6-O-mPEG₅-3-O-MEM- 纳布啡 (4) 在甲醇 (30mL) 中的 2M HCl 里搅拌 2.5 小时。用水 (5mL) 稀释混合物, 浓缩以除去甲醇。将水溶液用 1N NaOH 调节到 9.19, 用二氯甲烷 (4×15mL) 萃取。将合并的有机溶液用盐水洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥, 浓缩。在用硅胶快速柱色谱法纯化后, ¹H-NMR 观察到 mPEG₅-OMs。将残余物溶解在 DCM (~1mL) 中。加入醚 (18mL) 中的 1N HCl, 离心。收集残余物并将其重新溶解在 DCM (25mL) 中。用 5% NaHCO₃ 水溶液 (2×20mL)、盐水 (2×30mL) 洗涤 DCM 溶液, 经 Na₂SO₄ 干燥, 浓缩。通过使用二氯甲烷中的 4-8% MeOH 的 Biotage 自动快速硅胶柱色谱法分离残余物, 得到产物 6-O-mPEG₅- 纳布啡 (5) (n = 5) (55mg)。

[0364] 合成 6-O-mPEG₆-3-O-MEM- 纳布啡 (4) (n = 6) :

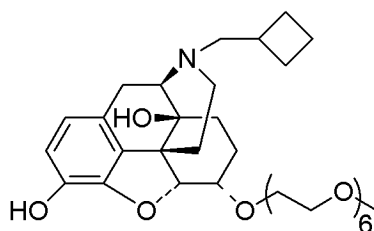
[0365]



[0366] 将 3-O-MEM- 纳布啡 (3) (77.6mg, 0.17mmol) 和 mPEG₆-OMs (199mg, 0.53mmol) 溶解于甲苯 (20mL) 中。浓缩混合物以除去约 12mL 的甲苯。加入无水 DMF (0.2mL), 接着加入 NaH (矿物油中的 60% 分散体, 41mg, 1.03mmol)。将所得到的混合物在 45°C 下加热 23 小时后, 加入更多的 NaH (46mg)。将混合物在 45°C 下再加热 24 小时。当混合物冷却到室温时, 加入饱和 NaCl 水溶液 (5mL) 以猝灭反应。用水 (10mL) 稀释混合物, 用 EtOAc (4×15mL) 萃取。将合并的有机溶液用盐水洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥, 浓缩。残余物直接用于下一步。

[0367] 合成 6-O-mPEG₆- 纳布啡 (5) (n = 6) :

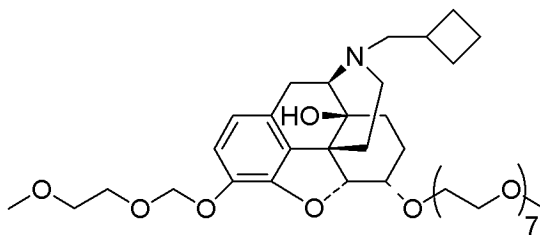
[0368]



[0369] 在室温下将上述 6-O-mPEG₆-3-O-MEM- 纳布啡 (4) 在甲醇 (30mL) 中的 2M HCl 里搅拌 20 小时。用水 (5mL) 稀释混合物, 浓缩以除去甲醇。将水溶液用 1N NaOH 调节至 9.30, 用二氯甲烷 (5×20mL) 萃取。将合并的有机溶液用盐水洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥, 浓缩。将残余物溶解在 DCM (~1mL) 中。加入醚 (20mL) 中的 1N HCl, 离心。收集残余物并将其重新溶解在 DCM (40mL) 中。用 5% NaHCO₃ 水溶液 (2×20mL)、水 (30mL)、盐水 (2×30mL) 洗涤 DCM 溶液, 经 Na₂SO₄ 干燥, 浓缩, 得到产物 6-O-mPEG₆- 纳布啡 (5) (n = 6) (68mg)。

[0370] 合成 6-O-mPEG₇-3-O-MEM- 纳布啡 (4, n = 7) :

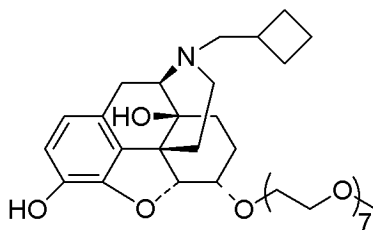
[0371]



[0372] 在 50mL 圆底烧瓶中放入 3-O-MEM- 纳布啡 (3) (82.8mg, 0.186mmol)、mPEG₇-Br (151mg, 0.46mmol) 和甲苯 (15mL)。浓缩混合物以除去约 9mL 的甲苯。加入无水 DMF (0.2mL)。加入 NaH (矿物油中的 60% 分散体, 50mg, 1.25mmol)。将所得到的混合物在 45℃ 下加热 22.5 小时后, 加入更多的 NaH (38mg, 0.94mmol)。将混合物在 45℃ 下再加热 5 小时。当混合物冷却到室温时, 加入饱和 NaCl 水溶液 (5mL) 以猝灭反应。用水 (10mL) 稀释混合物, 并用 EtOAc (4×10mL) 萃取。将合并的有机溶液用盐水洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥, 浓缩。残余物直接用于下一步。

[0373] 合成 6-O-mPEG₇- 纳布啡 (5) (n = 7) :

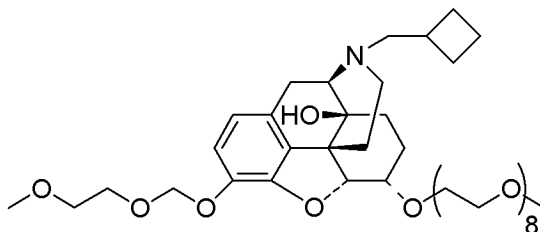
[0374]



[0375] 在室温下将上述 6-O-mPEG₇-3-O-MEM- 纳布啡 (4) 在甲醇 (20mL) 中的 2M HCl 里搅拌 20 小时。用水稀释混合物并浓缩以除去甲醇。用 NaHCO₃ 和 0.2N NaOH 将水溶液调节到 9.30, 用二氯甲烷 (4×20mL) 萃取。将合并的有机溶液用盐水洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥, 浓缩。利用硅胶快速柱色谱法纯化残余物, 并在酸性条件下用 DCM 洗涤, 将 pH 调节到 9.35, 用 DCM 萃取。产物中仍掺杂有少量 PEG。将残余物溶解在 DCM (~2mL) 中。加入醚 (10mL) 中的 1N HCl, 离心。收集残余物并将其重新溶解在 DCM (10mL) 中。用 5% NaHCO₃ 水溶液、盐水洗涤 DCM 溶液, 经 Na₂SO₄ 干燥, 浓缩以得到产物 6-O-mPEG₇- 纳布啡 (5) (n = 7) (49mg)。

[0376] 合成 6-O-mPEG₈-3-O-MEM- 纳布啡 (4) (n = 8) :

[0377]

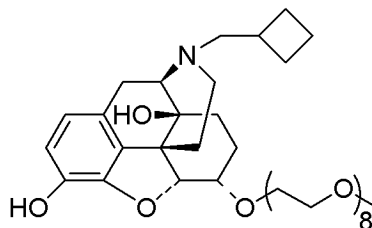


[0378] 在 50mL 圆底烧瓶中放入 3-O-MEM- 纳布啡 (3) (80.5mg, 0.181mmol)、mPEG₈-Br (250mg, 0.56mmol) 和甲苯 (15mL)。浓缩混合物以除去约 6mL 的甲苯。加入无水 DMF (0.2mL)。加入 NaH (矿物油中的 60% 分散体, 49mg, 1.23mmol)。将所得到的混合物在 45℃ 下加热 23 小时, 将混合物冷却到室温, 加入饱和 NaCl 水溶液 (5mL) 和水 (10mL) 以猝

灭反应。用 EtOAc (4×20mL) 萃取混合物。将合并的有机溶液用盐水洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥, 浓缩。残余物直接用于下一步。

[0379] 合成 6-O-mPEG₈- 纳布啡 (5) (n = 8) :

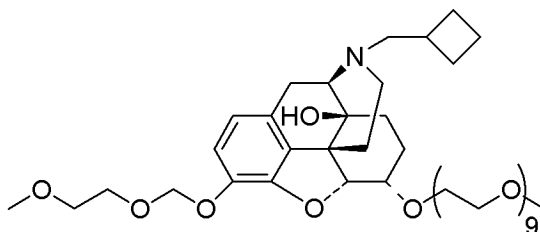
[0380]



[0381] 在室温下将上述 6-O-mPEG₈-3-O-MEM- 纳布啡 (4) 在甲醇 (20mL) 中的 2M HCl 里搅拌 17 小时。用水稀释混合物, 浓缩以除去甲醇。用 NaHCO₃ 和 0.2N NaOH 将水溶液调节到 9.32, 用二氯甲烷 (4×20mL) 萃取。将合并的有机溶液用盐水洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥, 浓缩。将残余物溶解在 DCM (~1mL) 中。加入醚 (20mL) 中的 1N HCl, 离心。收集残余物并将其重新溶解在 DCM (30mL) 中。用 5% NaHCO₃ 水溶液 (60mL)、水 (30mL)、盐水 (30mL) 洗涤 DCM 溶液, 经 Na₂SO₄ 干燥, 浓缩。通过使用二氯甲烷中的 0-10% 甲醇的硅胶快速柱色谱法纯化残余物, 得到产物 6-O-mPEG₈- 纳布啡 (5) (n = 8) (78.4mg)。

[0382] 合成 6-O-mPEG₉-3-O-MEM- 纳布啡 (4) (n = 9) :

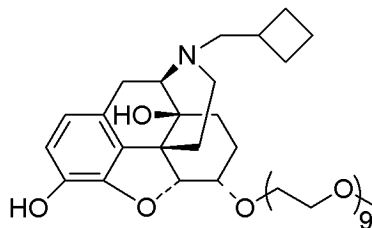
[0383]



[0384] 在 50mL 圆底烧瓶中放入 3-O-MEM- 纳布啡 (3) (120mg, 0.27mmol)、mPEG₉-OMs (245mg, 0.48mmol) 和甲苯 (20mL)。浓缩混合物以除去约 10mL 的甲苯。加入 NaH (矿物油中的 60% 分散体, 63mg, 1.57mmol), 接着加入无水 DMF (0.5mL)。将所得到的混合物在 45℃ 下加热 17 小时。基于 HPLC 结果加入更多的 NaH (矿物油中的 60% 分散体, 60mg), 然后将混合物在 45℃ 下再加热 5.5 小时。将混合物冷却到室温, 加入饱和 NaCl 水溶液 (2mL) 和水 (15mL) 以猝灭反应。用 EtOAc (4×20mL) 萃取混合物。将合并的有机溶液用盐水洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥, 浓缩。通过使用二氯甲烷中的 3-8% 甲醇的硅胶快速柱色谱法 (Biotage) 纯化残余物, 得到 90% 收率的产物 6-O-mPEG₉-3-MEM-O- 纳布啡 (207mg)。

[0385] 合成 6-O-mPEG₉- 纳布啡 (5) (n = 9) :

[0386]



[0387] 在室温下将上述 6-O-mPEG₉-3-O-MEM- 纳布啡 (4) (207mg, 0.24mmol) 在甲醇

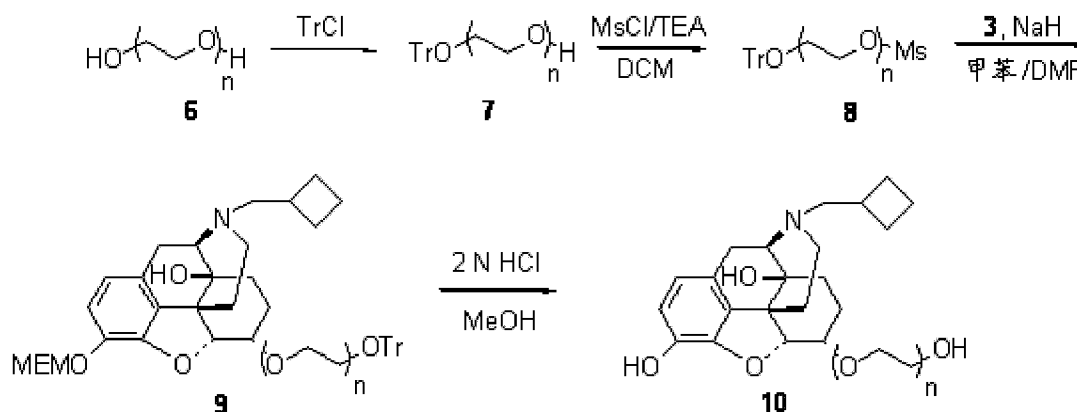
(33mL) 中的 2M HCl 里搅拌 17 小时。用水稀释混合物并浓缩以除去甲醇。用 1N NaOH 将水溶液调节到 9.16, 并用二氯甲烷 (4×25mL) 萃取。将合并的有机溶液用盐水洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥, 浓缩。通过使用二氯甲烷中的 3-8% 甲醇的硅胶快速柱色谱法纯化残余物, 得到 70% 收率的产物 6-O-mPEG₉-纳布啡 (4) (n = 9) (129.3mg)。

[0388] 实施例 3

[0389] 制备低聚物-纳布啡衍合物-“方法 C”

[0390] 采用第三种方法制备 PEG-纳布啡。本实施例所采用的方法示意地显示如下。

[0391]



[0392] 合成 TrO-PEG₅-OH (7) (n = 5) : $\text{TrO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_5\text{H}$

[0393] 将 PEG₅-二-OH (6) (n = 5) (5.88g, 24.19mmol) 溶解于甲苯 (30mL) 中, 并在减压下浓缩以除去甲苯。在高真空下干燥残余物。加入无水 DMF (40mL), 接着加入 DMAP (0.91g, 7.29mmol) 和 TrCl (三苯甲基氯) (1.66g, 5.84mmol)。将所得到的混合物在 50℃ 下加热 22 小时。浓缩反应物以除去溶剂 (高真空, 50℃)。将残余物与水混合, 并用 EtOAc (3×25mL) 萃取。将合并的有机溶液用盐水洗涤, 经 Na₂CO₃ 干燥, 浓缩。利用硅胶快速柱色谱法纯化残余物, 得到 46% 收率的产物 1.29g。在 CDCl₃ 中通过 ¹H-NMR 确认产物。

[0394] 合成 TrO-PEG_n-OH (7) (n = 各种) :

[0395] 按与制备 TrO-PEG₅-OH 类似的程序, 由相应的 PEG_n-二-OH 合成其它的 TrO-PEG_n-OH。

[0396] 合成 TrO-PEG₅-OMs (8) (n = 5) : $\text{TrO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_5\text{Ms}$

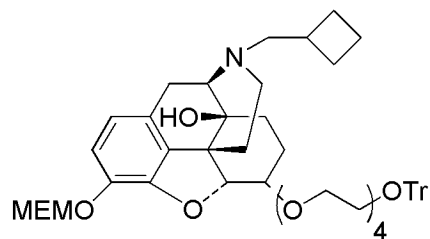
[0397] 在 0℃ 下将甲磺酰氯 (0.35mL, 4.48mmol) 滴加到 TrO-PEG₅-OH (8) (n = 5) (1.29g, 2.68mmol) 和三乙胺 (0.9mL, 6.46mmol) 在二氯甲烷 (15mL) 中的搅拌溶液里。加入后将所得到的溶液在室温下搅拌 16.5 小时。加入水以猝灭反应。分离有机相并用二氯甲烷 (10mL) 萃取水溶液。将合并的有机溶液用盐水 (3×30mL) 洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥并浓缩, 得到 78% 收率的油状产物 (1.16g)。在 CDCl₃ 中利用 ¹H-NMR 确认产物 (8) (n = 5)。

[0398] 合成 TrO-PEG_n-OMs (8) (n = 各种) :

[0399] 按与制备 TrO-PEG₅-OMs 类似的程序, 由相应的 TrO-PEG_n-OH 合成其它的 TrO-PEG_n-OMs。

[0400] 合成 3-O-MEM-6-O-TrO-PEG₄-纳布啡 (9) (n = 4) :

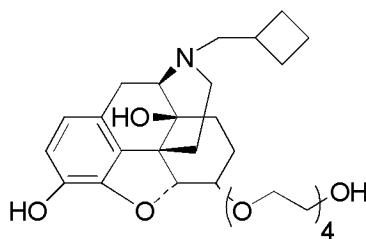
[0401]



[0402] 在圆底烧瓶中放入 3-O-MEM- 纳布啡 (3) (120mg, 0.27mmol) [事先按照实施例 2 中提供的化合物 (3) 的合成制备]、TrO-PEG₄-OMs (8) (n = 4) (143.4mg, 0.28mmol) 和甲苯 (40mL)。浓缩混合物以除去约 30mL 的甲苯。加入 NaH (矿物油中的 60% 分散体, 150mg, 3.75mmol), 接着加入无水 DMF (0.2mL)。将所得到的混合物在 45℃ 下加热 4.5 小时。加入更多的 NaH (矿物油中的 60% 分散体, 146mg), 将混合物在 45℃ 下再搅拌 18 小时。将混合物冷却到室温, 用 NaCl 水溶液 (2mL) 饱和, 并加入水 (15mL) 以猝灭反应。用 EtOAc (4×20mL) 萃取混合物。将合并的有机溶液用盐水洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥并浓缩。通过使用二氯甲烷中的 0-10% 甲醇的硅胶快速柱色谱法 (Biotage) 纯化残余物, 得到产物 3-O-MEM-6-O-TrO-PEG₄- 纳布啡 (9) (n = 4) (~150mg)。

[0403] 合成 6-O-HO-PEG₄- 纳布啡 (10) (n = 4) :

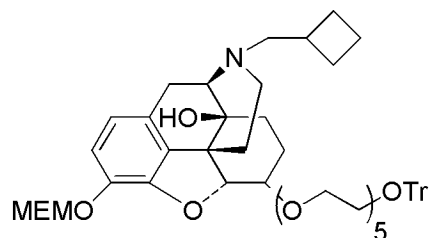
[0404]



[0405] 在室温下将上述 6-O-TrO-PEG₄-3-O-MEM- 纳布啡 (9) (n = 4) (150mg) 在甲醇 (12mL) 中的 2M HCl 里搅拌一天。用水稀释混合物并浓缩以除去甲醇。用 NaOH 将水溶液调节到 pH 9.08, 并用 EtOAc (3×20mL) 萃取。将合并的有机溶液用盐水洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥并浓缩。利用硅胶快速柱色谱法纯化残余物, 得到产物 6-O-OH-PEG₄- 纳布啡 (10) (n = 4) (26.9mg)。利用 ¹H-NMR、LC-MS、HPLC 分析产物。

[0406] 合成 3-O-MEM-6-O-TrO-PEG₅- 纳布啡 (9) (n = 5) :

[0407]

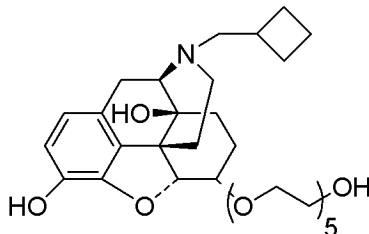


[0408] 在圆底烧瓶中放入 3-O-MEM- 纳布啡 (3) (318mg, 0.71mmol) [事先按照实施例 2 中提供的化合物 (3) 的合成制备]、TrO-PEG₅-OMs (8) (n = 5) (518.5mg, 0.93mmol) 和甲苯 (100mL)。浓缩混合物以除去约 75mL 的甲苯。加入 NaH (矿物油中的 60% 分散体, 313mg, 7.8mmol), 接着加入无水 DMF (1.0mL)。将所得到的混合物在室温下搅拌 30 分钟, 然后在 60℃ 下搅拌 19.5 小时。将混合物冷却到室温, 用 NaCl 水溶液 (5mL) 饱和, 并加入水 (5mL) 以猝灭反应。分离有机相并用 EtOAc 萃取水溶液。将合并的有机溶液用盐水洗涤, 经 Na₂SO₄

干燥,浓缩。通过使用二氯甲烷中的 0-10% 甲醇的硅胶快速柱色谱法 (Biotage) 纯化残余物,得到产物 3-O-MEM-6-O-TrO-PEG₅- 纳布啡 (718mg)。产物 (9) (n = 5) 是不纯的,其不经进一步纯化就用于下一步。

[0409] 合成 6-O-HO-PEG₅-纳布啡 (10) (n = 5) :

[0410]



[0411] 在室温下将上述 6-O-TrO-PEG₅-3-O-MEM- 纳布啡 (9) (n = 5) (718mg) 在甲醇 (30mL) 中的 2M HCl 里搅拌 19 小时。用水稀释混合物并浓缩以除去甲醇。用 NaOH 将水溶液调节到 PH9.16, 用 DCM (3×20mL) 萃取。将合并的有机溶液用盐水洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥并浓缩。用硅胶快速柱色谱法纯化残余物两次, 得到非常纯的产物 6-O-HO-PEG₅- 纳布啡 10 (n = 5) (139mg) 和纯度较低的产物 (48mg)。利用 ¹H-NMR、LC-MS、HPLC 分析产物。

[0412] 实施例 4

[0413] PEG- 纳布啡钇合物的受体结合

[0414] 利用常规的受体结合检测技术检测若干分子以确定对阿片样受体的 kappa、mu 和 delta 阿片样亚型的结合活性。

[0415] 简单地说,在异源表达重组人 mu、delta 或 kappa 阿片样受体的 CHO 细胞中利用放射性配体结合检测来测量纳布啡和 PEG- 纳布啡轭合物的受体结合亲和力。将细胞以 $0.2-0.3 \times 10^6$ 细胞 / 孔的密度铺在 24 孔板中,并用含 50mM Tris.HCl 和 5mM $MgCl_2$ 的检测缓冲液 (pH7.4) 洗涤。在适当浓度的放射性配体的存在下在用浓度渐增的测试化合物温育的全细胞中进行竞争结合检测。分别使用 $0.5nM^3H$ 纳洛酮、 $0.5nM^3H$ 二丙诺啡和 $0.5nM^3H$ DPDPE 作为针对 mu、kappa 和 delta 受体的竞争放射性配体。温育在室温下进行两小时,在每一浓度下使用同样的三个孔。在温育结束之时用 50mM Tris HCl (pH8.0) 洗涤细胞,用 NaOH 进行增溶,并使用闪烁计数器测定结合的放射性。

[0416] 通过减去在 50-100X 过量的冷配体的存在下结合的 cpm 确定特异性结合。使用 GraphPad Prism 4.0 分析进行结合数据检测,并通过由剂量反应曲线进行非线性回归产生 IC50。使用来自饱和等温线的 Kd 值,利用 Cheng Prusoff 方程计算 Ki 值,如下所述: $K_i = IC_{50} / (1 + [配体] / K_d)$ 。

[0417] 纳布啡的 PEG 衍生物保持对阿片样受体的结合亲和力。表 1 显示纳布啡的 PEG 衍生物对 mu、delta 和 kappa 阿片样受体的结合亲和力 (K_i , 以 nM 表示)。对所有三种受体亚型, PEG 衍生物后的结合亲和力损失小于母体纳布啡的 15 倍。参见表 1。PEG 衍生物对 mu 和 kappa 阿片样受体产生 10-15 倍的结合亲和力损失, 但对 delta 阿片样受体没有。对 delta 阿片样受体的结合亲和力与母体纳布啡的相当, 或者在一些情况下甚至更大。参见图 1。对三种阿片样受体亚型的结合亲和力的差别变化意味着, 与母体纳布啡相比, 纳布啡衍生物的受体选择性被改变。

[0418] 表 1

[0419] 结合活性

[0420]

分子	对 KAPPA 受体的 Ki (nM)	对 KAPPA, 倍数 vs 纳 布啡	对 MU 受体 的 Ki (nM)	对 MU, 倍 数 vs 纳布 啡	对 DELTA 受体的 Ki (nM)	对 DELTA, 倍数 vs 纳 布啡
纳布啡	25.95	1	14.31	1	318.85	1
3-O-mPEG _n - 纳布啡*	-	-	-	-	-	-
6-O-mPEG ₃ - 纳布啡	218.1	8.40	27.41	1.92	163.30	0.51
6-O-mPEG ₄ - 纳布啡			17.54	1.23	148.90	0.47
6-O-mPEG ₅ - 纳布啡	35.56	1.37	35.09	2.45	147.70	0.46
6-O-mPEG ₆ - 纳布啡	246.9	9.51	44.28	3.09	130.00	0.41
6-O-mPEG ₇ - 纳布啡	346.1	13.34	77.94	5.45	313.80	0.98
6-O-mPEG ₈ - 纳布啡	282.2	10.87	79.55	5.56	167.50	0.53
6-O-mPEG ₉ - 纳布啡	186.1	7.17	122.30	8.55	157.70	0.49

[0421] * 实施例 1 中制备的“3-O-mPEG_n- 纳布啡”系列分子没有显示出可检测的结合活性;据信其中在 3-O 位置共价连接水溶性非肽类低聚物的分子在例如共价键合为可降解形式的键合时具有价值。上表中的一些结合活性值已经被在进一步优化的检测条件下得到的值替换。虽然据信原始值是可靠和有用的,但在这里为简便的目的对它们进行了替换。

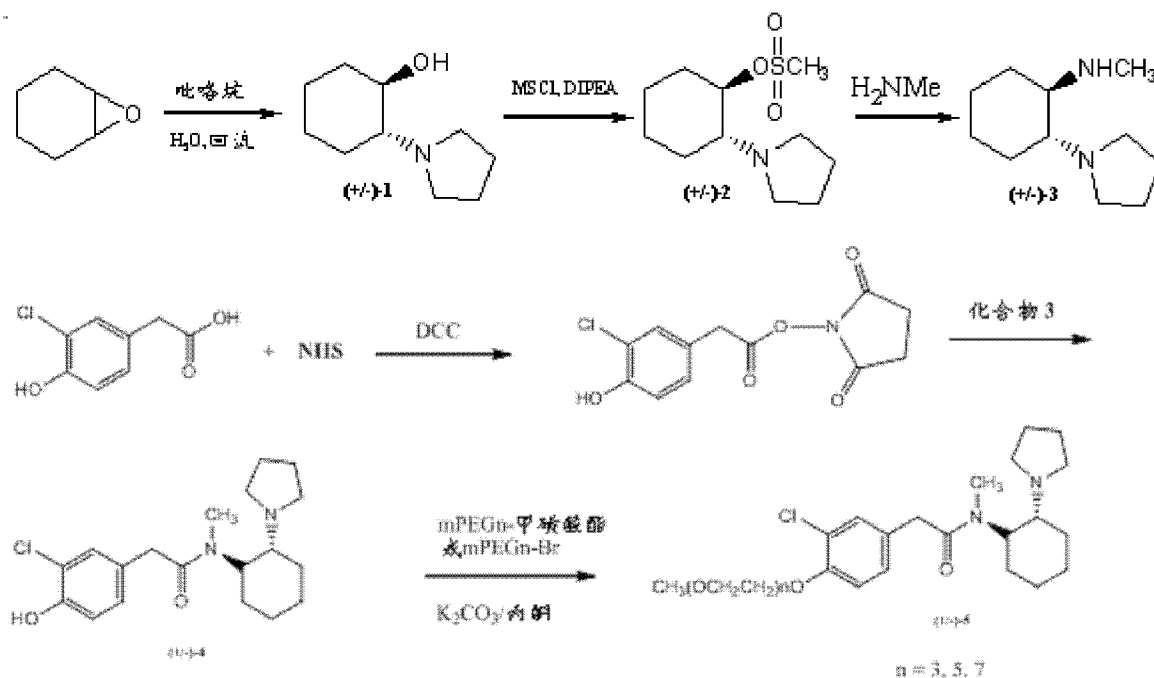
[0422] 实施例 5

[0423] 制备 U50488 衍合物

[0424] 可以按下面示意显示的方法制备 PEG-U50488。

[0425] 实施例 5a :合成 mPEG_n-O-U50488 衍合物[0426] 可以按下面提供的一般示意过程制备 mPEG_n-O-U50488 衍合物。

[0427]



[0428] (+/-)-反-2-(吡咯烷-1-基)环己醇((+/-)-1):将吡咯烷(4.26g,60mmol)加入到环氧环己烷(1.96g,20mmol)在 H_2O (6mL)中的溶液里,并将所得到的混合物在 90°C 下加热16小时。冷却后,在减压下除去溶剂,并用DCM(10mL x 3)萃取所得到的残余物。合并有机相并用无水 Na_2SO_4 干燥。在通过过滤除去 Na_2SO_4 之后,蒸发溶剂并将材料在真空下干燥,得到所需的化合物(+/-)-1(3.3g,19.5mmol,收率98%)。 $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ 4.06(s,1H), 3.45-3.30(m,1H), 2.75-2.63(m,2H), 2.62-2.50(m,2H), 2.51-2.42(m,1H), 1.90-1.58(m,8H), 1.45-1.15(m,4H)。

[0429] (+/-)-反-N-甲基-2-(吡咯烷-1-基)环己胺((+/-)-2):向化合物(+/-)-1(1.01g,6mmol)和TEA(0.98mL,7mmol)在DCM(20mL)中的溶液里滴加甲磺酰氯(0.51mL,6.6mmol)。在室温下搅拌反应混合物2小时。在减压下除去溶剂,并在室温下加入5mL甲胺(在水中40%)。将溶液在室温下再搅拌16小时。然后将反应混合物加入到DCM(50mL)中,并用饱和 NaHCO_3 溶液(2x25mL)洗涤。合并有机相并用无水 Na_2SO_4 干燥。在通过过滤除去 Na_2SO_4 后,除去溶剂并将材料在真空下干燥,得到所需的化合物(+/-)-2(1.0g,5.5mmol,收率91%)。 $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ 2.61(s,1H), 2.49-2.30(m,6H), 2.29(s,3H), 2.09-1.96(m,2H), 1.67-1.52(m,7H), 1.11-1.02(m,3H)。

[0430] (+/-)-N-甲基-N-[2-(吡咯烷-1-基)环己基]-2-(3-氯-4-羟基苯基)乙酰胺((+/-)-4):将3-氯-4-羟基苯乙酸(186mg,1mmol)和NHS(115mg,3mmol)溶解在DCM(20mL)中。然后将DCC(1.1mmol)加入到溶液当中,并在室温下搅拌反应混合物16小时,在此期间形成了沉淀。在通过过滤除去沉淀后,将所得到的滤液与化合物(+/-)-3(182mg,1mmol)混合。在室温下将所得到的溶液搅拌过夜。在减压下除去溶剂,并对所得到的残余物进行快速色谱法纯化($\text{MeOH}/\text{DCM} = 2\% \sim 18\%$),得到所需的产物(+/-)-4(120mg,0.34mmol,收率34%)。 $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ 7.12(s,1H), 7.00-6.86(m,2H), 4.56(s,1H), 3.66-3.61(m,2H), 3.09-2.85(m,6H), 2.85(s,3H), 1.71-1.45(m,8H), 1.44-1.11(m,4H)。LC/MS 351.1[M+H] $^+$ 。

[0431] (+/-)-N-甲基-N-[2-(吡咯烷-1-基)环己基]-2-(3-氯-4-甲氧基-三(乙二

醇) 苯基) 乙酰胺 ((+/-)-5a): 将化合物 (+/-)-4 (50mg, 0.14mmol)、甲氧基三(乙二醇) 甲磺酸酯 (48.4mg, 0.2mmol) 和无水 K_2CO_3 (70mg, 0.5mmol) 加入到丙酮 (10mL) 中。将所得到的混合物回流搅拌 16 小时。通过过滤除去固体, 并在减压下蒸发溶剂。对所得到的残余物进行快速色谱法纯化 (MeOH/DCM = 2% ~ 15%), 得到所需的化合物 (+/-)-5a (30mg, 0.06mmol, 收率 43%)。 1H NMR($CDCl_3$) 7.31 (s, 1H), 7.18 (d, 1H), 7.06 (d, 1H), 4.61-4.51 (m, 1H), 4.19 (t, 2H), 3.90 (t, 2H), 3.76-3.44 (m, 10H), 3.36 (s, 3H), 2.95-2.83 (m, 6H), 2.11-1.19 (m, 12H)。LC/MS 497.2 [M+H]⁺

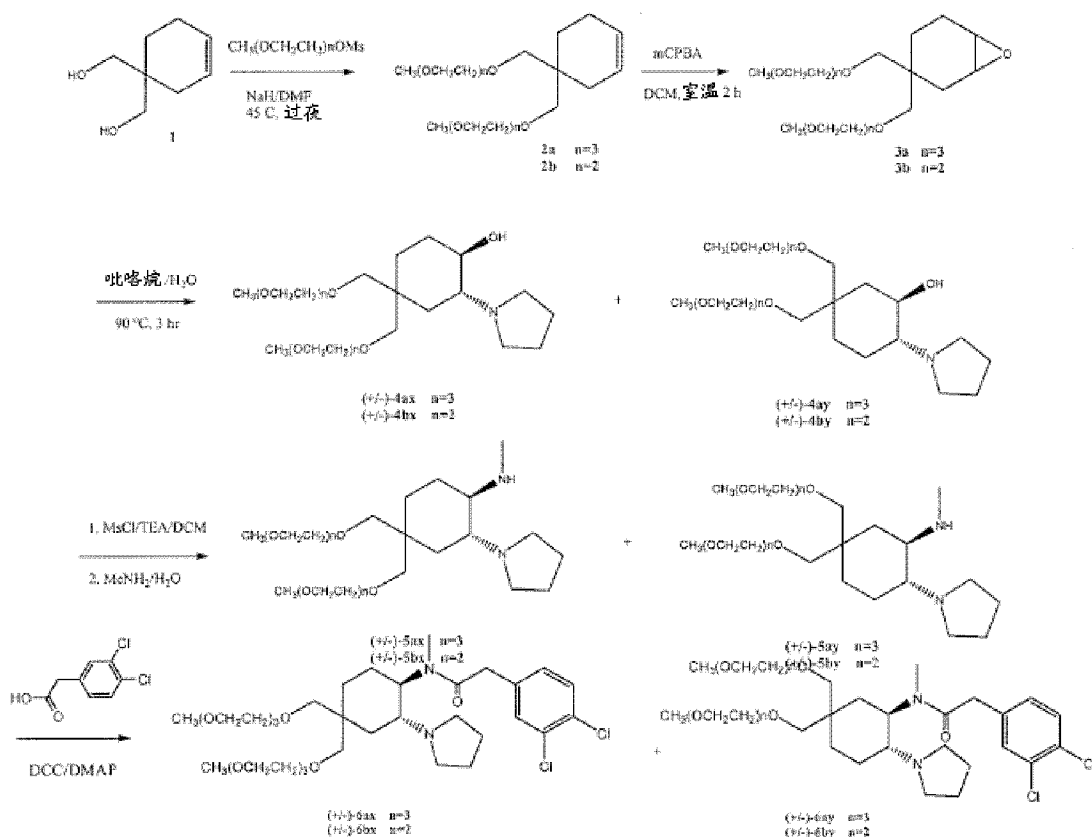
[0432] (+/-)-N-甲基-N-[2-(吡咯烷-1-基)环己基]-2-(3-氯-4-甲氧基-五(乙二醇) 苯基) 乙酰胺 ((+/-)-5b): 将化合物 (+/-)-4 (80mg, 0.23mmol)、甲氧基五(乙二醇) 甲磺酸酯 (108.9mg, 0.33mmol) 和无水 K_2CO_3 (112mg, 0.8mmol) 加入到丙酮 (15mL) 中。将混合物回流搅拌 16 小时。通过过滤除去固体, 并在减压下蒸发溶剂。对所得到的残余物进行快速色谱法纯化 (MeOH/DCM = 2% ~ 15%), 得到所需的化合物 (+/-)-5a (60mg, 0.10mmol, 收率 45%)。 1H NMR($CDCl_3$) 7.25 (s, 1H), 7.10 (d, 1H), 6.85 (d, 1H), 4.55-4.45 (m, 1H), 4.14 (t, 2H), 3.87 (t, 2H), 3.81-3.42 (m, 18H), 3.37 (s, 3H), 2.90-2.35 (m, 6H), 2.09-1.15 (m, 12H)。LC/MS 585.3 [M+H]⁺。

[0433] (+/-)-N-甲基-N-[2-(吡咯烷-1-基)环己基]-2-(3-氯-4-甲氧基-六(乙二醇) 苯基) 乙酰胺 ((+/-)-5c): 将化合物 (+/-)-4 (50mg, 0.23mmol)、甲氧基六(乙二醇) 甲磺酸酯 (150mg, 0.37mmol) 和无水 K_2CO_3 (112mg, 0.8mmol) 加入到丙酮 (15mL) 中。将混合物回流搅拌 16 小时。通过过滤除去固体, 并在减压下蒸发溶剂。对所得到的残余物进行快速色谱法纯化 (MeOH/DCM = 2% ~ 15%), 得到所需的化合物 (+/-)-5c (61mg, 0.09mmol, 收率 39%)。 1H NMR($CDCl_3$) 7.27 (s, 1H), 7.16 (d, 1H), 6.88 (d, 1H), 4.72-4.51 (m, 1H), 4.16 (t, 2H), 3.89 (t, 2H), 3.79-3.49 (m, 26H), 3.38 (s, 3H), 3.18-2.53 (m, 6H), 2.10-1.12 (m, 12H)。LC/MS 673.4 [M+H]⁺。

[0434] 实施例 5B: 合成二-mPEG_n-CH₂-U50488 衍合物

[0435] 可以按下面提供的一般示意过程制备二-mPEG_n-CH₂-U50488 衍合物。

[0436]



[0437] 3-环己烯 1,1-二甲醇甲氧基三(乙二醇)醚 (2a): 将 3-环己烯 1,1-二甲醇 1 (284mg, 2mmol) 溶解在无水 DMF (6mL) 中。在室温下加入 NaH (矿物油中 60%, 320mg, 8mmol), 并将溶液再搅拌 10 分钟。向溶液中加入甲氧基三(乙二醇)甲磺酸酯 (1.21g, 5mmol)。将反应溶液在 45°C 下搅拌 18 小时, 然后向所述溶液中加入饱和 NH_4Cl 溶液 (30mL)。用 EtOAc (20mL x 2) 萃取溶液。合并有机相, 用 Na_2SO_4 干燥, 过滤并在减压下除去溶剂, 得到化合物 2a (850mg, 1.96mmol, 98% 收率)。 ^1H NMR (CDCl_3) 5.62–5.58 (m, 2H), 3.66–3.51 (m, 24H), 3.38 (s, 6H), 3.34 (d, 2H), 3.25 (d, 2H), 2.01 (m, 2H), 1.87 (m, 2H), 1.52 (t, 2H)。LC/MS 435 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 452 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 457 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。

[0438] 3-环己烯 1,1-二甲醇甲氧基二(乙二醇)醚 (2b): 将 3-环己烯 1,1-二甲醇 (426mg, 3mmol) 溶解在无水 DMF (9mL) 中。在室温下加入 NaH (矿物油中 60%, 480mg, 12mmol), 并将溶液再搅拌 10 分钟。向溶液中加入甲氧基二(乙二醇)甲磺酸酯 (1.5g, 7.5mmol)。将反应溶液在 45°C 下搅拌 18 小时, 然后向所述溶液中加入饱和 NH_4Cl 溶液 (30mL)。用 EtOAc (20mL x 2) 萃取溶液。合并有机相, 用 Na_2SO_4 干燥, 过滤并在减压下除去溶剂, 得到化合物 2b (1.18g, 2.9mmol, 98% 收率)。 ^1H NMR (CDCl_3) 5.64–5.56 (m, 2H), 3.66–3.54 (m, 16H), 3.35 (s, 6H), 3.33 (d, 2H), 3.28 (d, 2H), 1.99 (m, 2H), 1.87 (m, 2H), 1.53 (t, 2H)。

[0439] 3,3-二[甲氧基三(乙二醇)甲基]-7-氧杂双环[4.1.0]庚烷 (3a): 将化合物 2a (850mg, 1.96mmol) 溶解在 DCM (20mL) 中。在室温下向溶液中加入 mCPBA (77% 最高, 0.75g, ~3mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 3.5 小时。向所述溶液中加入饱和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液 (10mL), 并再进行搅拌 10 分钟。用 DCM (20mL x 2) 萃取所得到的溶液。合并有机相, 用 Na_2SO_4 干燥, 过滤并在减压下除去溶剂, 得到化合物 3a (870mg, 1.86mmol, 95% 收率)。 ^1H

NMR(CDCl₃) 3.66-3.55(m, 24H), 3.38(s, 6H), 3.27-3.12(m, 6H), 1.99-1.67(m, 6H)。LC/MS 451[M+H]⁺, 468[M+NH₄]⁺, 473[M+Na]⁺。

[0440] 3,3-二[甲氧基二(乙二醇)甲基]-7-氧杂双环[4.1.0]庚烷(3b):将化合物 2b(1.18g, 3.41mmol) 溶解在 DCM(20mL) 中。在室温下向溶液中加入 mCPBA(77% 最高, 1.3g, ~ 5.2mmol)。将反应溶液在室温下搅拌 3.5 小时。向所述溶液中加入饱和 Na₂S₂O₃ 溶液(15mL), 并再进行搅拌 10 分钟。用 DCM(20mL x 2) 萃取所得到的溶液。合并有机相, 用 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并在减压下除去溶剂, 得到化合物 3b(1.27g, 3.12mmol, 92% 收率)。¹H NMR(CDCl₃) 3.65-3.54(m, 24H), 3.38(s, 6H), 3.27-3.10(m, 6H), 2.00-1.68(m, 6H)。

[0441] 反-(+/-)-4 或 -5-二[甲氧基三(乙二醇)甲基]-2-(1-吡咯烷基)-环己醇(4a):将化合物 3a(870mg, 1.93mmol) 和吡咯烷(2.5mL) 加入到水(8mL) 中, 并加热至回流 5 小时。用 DCM(10mL x 2) 萃取所得到的溶液。合并有机相, 用 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并在减压下除去溶剂, 得到作为 4ax 和 4ay(总共 910mg) 的混合物的 4a。产物不经进一步纯化用于接下来的反应。

[0442] 反-(+/-)-4 或 -5-二[甲氧基二(乙二醇)甲基]-2-(1-吡咯烷基)-环己醇(4b):将化合物 3b(1.27g, 3.12mmol) 和吡咯烷(2.5mL) 加入到水(8mL) 中, 并加热至回流 5 小时。用 DCM(10mL x 2) 萃取所得到的溶液。合并有机相, 用 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并在减压下除去溶剂, 得到作为 4bx 和 4by(总共 1.3g) 的混合物的 4b。产物不经进一步纯化用于接下来的反应。

[0443] 反-(+/-)-4 或 -5-二[甲氧基三(乙二醇)甲基]-N-甲基-2-(1-吡咯烷基)-环己胺(5a):将化合物 4a(910mg, 1.74mmol) 溶解在 DCM(20mL) 中并加入 TEA(0.42mL, 3mmol)。在室温下滴加甲磺酰氯(0.16mL, 2mmol)。在室温下持续搅拌过夜后, 在减压下蒸发所得到的混合物。将所得到的残余物溶解在甲胺(在水中 40% w/w, 6mL) 中, 并将溶液在室温下搅拌 30 小时。然后用 DCM(10mL x 2) 萃取溶液。合并有机相, 用 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并在减压下除去溶剂, 得到作为 5ax 和 5ay 的混合物的 5a。产物不经进一步纯化用于接下来的反应。

[0444] 反-(+/-)-4 或 -5-二[甲氧基二(乙二醇)甲基]-N-甲基-2-(1-吡咯烷基)-环己胺(5b):将化合物 4b(1.3g, 3mmol) 溶解在 DCM(20mL) 中并加入 TEA(0.84mL, 6mmol)。在室温下滴加甲磺酰氯(0.28mL, 3.5mmol)。在室温下持续搅拌过夜后, 在减压下蒸发所得到的混合物。将得到的残余物溶解在甲胺(在水中 40% w/w, 6mL) 中, 并将溶液在室温下搅拌 30 小时。然后用 DCM(10mL x 2) 萃取所得到的溶液。合并有机相, 用 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并在减压下除去溶剂, 得到作为 5bx 和 5by 的混合物的 5b。产物不经进一步纯化用于接下来的反应。

[0445] 反-(+/-)-4 或 -5-二[甲氧基三(乙二醇)甲基]-N-甲基-N-[2-(吡咯烷-1-基)环己基]-2-(3,4-二氯)乙酰胺(6a):将 3,4-二氯苯乙酸(410mg, 2mmol)、化合物 5a(926mg, 1.74mmol) 和 DMAP(10mg) 溶解在 DCM(10mL) 中。然后向所述溶液中加入 DCC(515mg, 2.5mmol), 并将反应混合物在室温下搅拌 4 小时, 在此期间形成沉淀, 在通过过滤除去沉淀后, 蒸发所得到的滤液溶剂, 并对残余物进行快速色谱法纯化(MeOH/DCM = 2%~8%), 得到所需的产物 6a, 其为 6ax 和 6ay 的混合物(总共 477mg, 0.34mmol, 收率 20%)。¹H NMR(CDCl₃) 7.39-7.33(m, 2H), 7.15-7.10(m, 1H), 3.71-3.51(m, 28H),

3.42-3.16(m, 3H), 3.35(s, 6H), 2.82, 2.79(s, s, 总共 3H, 3 : 5 比例), 2.70-2.30(m, 5H), 1.73-1.17(m, 11H)。LC/MS 721[M+H]⁺, 743[M+Na]⁺。

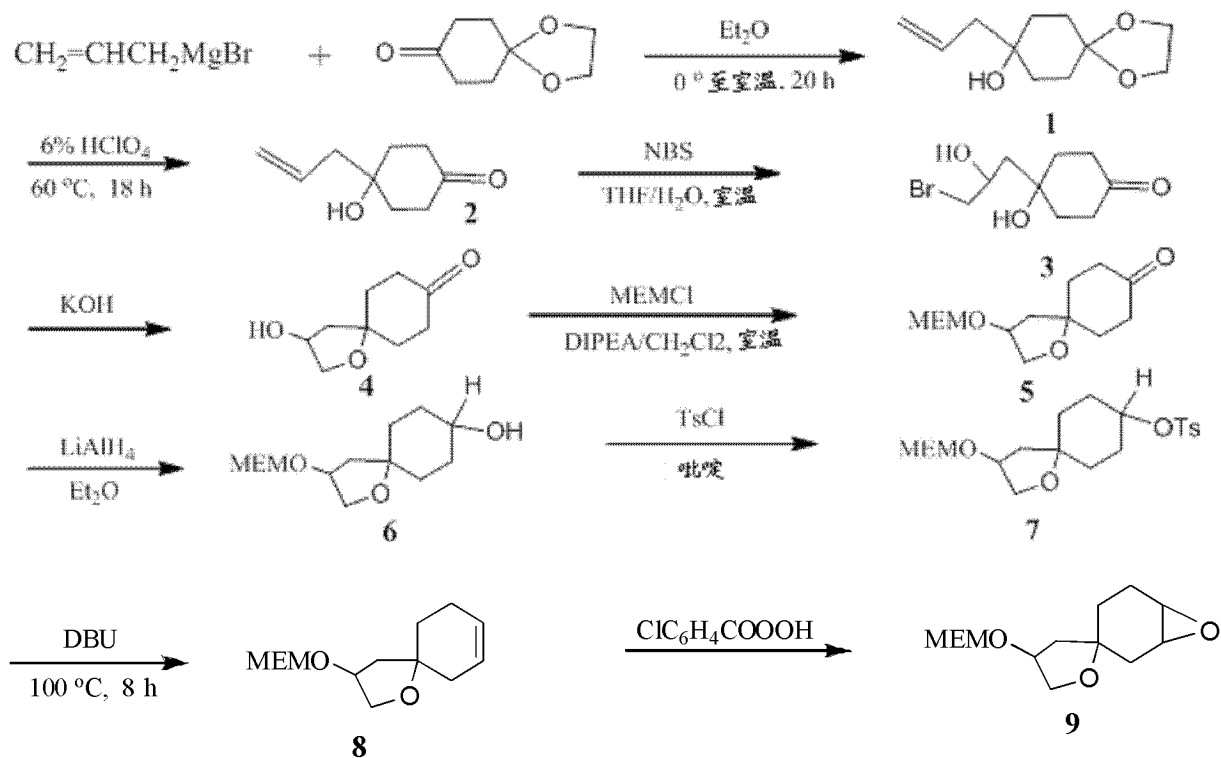
[0446] 反-(+/-)-4或-5-二[甲氧基二(乙二醇)甲基]-N-甲基-N-[2-(吡咯烷-1-基)环己基]-2-(3,4-二氯)乙酰胺(6b):将3,4-二氯苯乙酸(707mg, 3.45mmol)、化合物5b(1.33g, 2.98mmol)和DMAP(10mg)溶解在DCM(10mL)中。然后向溶液中加入DCC(865mg, 4.2mmol),并将反应混合物在室温下搅拌4小时,在此期间形成沉淀。在通过过滤除去沉淀后,蒸发所得到的滤液溶剂,并对残余物进行快速色谱法纯化(MeOH/DCM = 2%~8%),得到所需的产物6b,其为6bx和6by的混合物(总共306mg, 0.49mmol, 收率16%)。¹H NMR(CDC13) δ 7.33-7.27(m, 2H), 7.06-7.04(m, 1H), 3.65-3.46(m, 20H), 3.42-3.12(m, 3H), 3.37(s, 6H), 2.76, 2.74(s, s, 总共 3H, 1.1 : 1 比例), 2.72-2.24(m, 5H), 1.71-1.07(m, 11H)。LC/MS 633[M+H]⁺, 655[M+Na]⁺。

[0447] 实施例 6

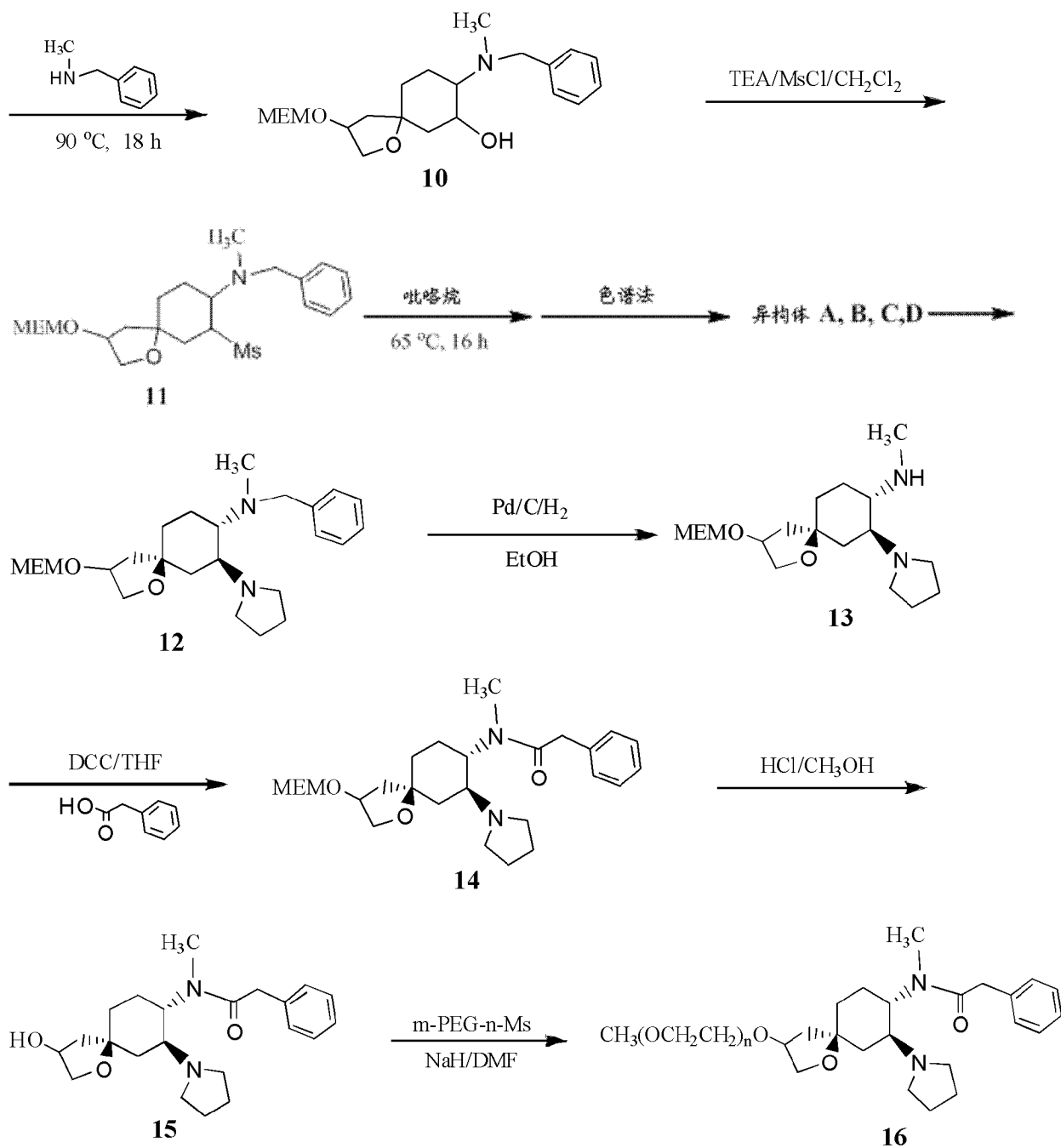
[0448] 制备低聚物-U69593 衍合物

[0449] 可以按下面示意显示的方法制备PEG-U69593。在进行所述方法时采用常规的有机合成技术。

[0450]



[0451]

[0452] 实施例 7

[0453] 制备与带有纳布啡不同的甾合物 U50488 和 U69593

[0454] 可以制备不同于纳布啡的阿片样激动剂的甾合物 U50488 和 U69593, 其中可以按实施例 1 中给出的一般合成方案及程序, 但式 I 的阿片样激动剂被用来代替纳布啡、U50488 和 U69593。

[0455] 实施例 8

[0456] PEG- 纳布啡甾合物的体外功效

[0457] 在表达重组人 μ 或 δ 阿片样受体的 CHO 细胞或表达重组人 κ 阿片样受体的 HEK 细胞中利用 GTP γ S 结合检测确定 PEG- 纳布啡甾合物的体外功效。将测试化合物和 / 或媒介物用细胞膜和修饰的 HEPES 缓冲液 (pH7.4) 中的 $3 \mu M$ GDP 预温育 20 分钟, 接着在 $30^\circ C$ 下加入 SPA 珠再经 60 分钟。以 $0.3 nM [^{35}S]GTP \gamma S$ 引发反应再经 30 分钟的温育

期。相对于受体亚型特异性激动剂反应,测试化合物诱导的 [³⁵S]GTP γ S 结合增加 50% 或更多 (≥ 50%), 显示了可能的阿片受体激动剂活性。分别使用 0.1 μ M DPDPE、1 μ M U-69593 和 1 μ M DAMGO 作为针对 delta、kappa 和 mu 阿片样受体的特异性激动剂。采用抑制激动剂诱导的 [³⁵S]GTP γ S 结合反应增加 50% 或更多 (≥ 50%) 来测定阿片样受体拮抗剂活性。以激动剂和拮抗剂模式的 10、1、0.1、0.01 和 0.001 μ M 的浓度筛选纳布啡、6-O-mPEG₃- 纳布啡、6-O-mPEG₆- 纳布啡、6-O-mPEG₉- 纳布啡。由剂量 - 反应曲线计算 EC₅₀ 或 IC₅₀ 值, 分别作为测试化合物的激动剂或拮抗剂活性的量度。

[0458] 表 2 显示激活或抑制 GTP γ S 结合的纳布啡和 PEG- 纳布啡轭合物的 EC₅₀/IC₅₀ 值, 因此反映了它们的激动剂或拮抗剂活性。PEG- 纳布啡轭合物对 kappa 阿片样受体是完全激动剂, 对 mu 阿片样受体是拮抗剂, 类似于纳布啡的药理特征。6-O-mPEG₃- 纳布啡的 EC₅₀ 类似于纳布啡对 kappa 阿片样受体的, 表明此 PEG 尺寸没有功效损失。PEG 尺寸超过 3 时, PEG- 纳布啡轭合物对 kappa 阿片样受体的功效随 PEG 尺寸而降低, 如 6-O-mPEG₆- 纳布啡和 6-O-mPEG₉- 纳布啡的 EC₅₀ 值增加所示。PEG- 纳布啡似乎具有对 mu 阿片样受体的拮抗剂效力, 其与对母体纳布啡的相当。对于 delta 阿片样受体, 6-O-mPEG₉- 纳布啡的作用是弱拮抗性的, 然而纳布啡、6-O-mPEG₃- 纳布啡、6-O-mPEG₆- 纳布啡对 delta 阿片样受体没有效果。

[0459] 表 2

[0460] PEG- 纳布啡轭合物保持母体纳布啡的体外药理特性

[0461]

分子	功能检测 GTP-γS 结合		
	Kappa	Mu	Delta
	激动剂	拮抗剂	
	EC50 (nM)	IC50 (nM)	IC50 (nM)
纳布啡	25.1	752	
6-O-mPEG ₃ -纳布啡	26.80	398.0	---
6-O-mPEG ₆ -纳布啡	164.00	284.0	---
6-O-mPEG ₉ -纳布啡	485.00	1010.0	8970.0

[0462] 实施例 9

[0463] 体外渗透度

[0464] 在 Caco-2 细胞中利用双向运输检测来测定 PEG- 纳布啡轭合物的体外渗透度。以 10 μ M 的浓度将 PEG- 纳布啡轭合物加入到 Caco-2 单层的顶端或基底外侧隔室中并温育两个小时。在温育结束之时, 利用 LC-MS 测量顶端和基底外侧隔室中的浓度。将渗透度计算为 $P_{app} = J/A \cdot C_o$, 其中 P_{app} 是以 cm/s 表示的表观渗透度, J 是以摩尔 /s 表示的通量, A 是以 cm² 表示的插入物表面积, 而 C_o 是以摩尔 /cm³ 表示的初始浓度。

[0465] 图 2A 显示在 Caco-2 细胞中在 A-B (顶端 - 基底外侧) 和 B-A (基底外侧 - 顶端) 方向上测量的 PEG- 纳布啡轭合物的体外表观渗透度。A-B 渗透度随 PEG 链长的增加而减小, B-A 渗透度随 PEG 链长的增加而减小, 但程度较低些。代表体内粘膜 - 浆膜运输的 A-B 渗透度对于所有化合物来说都大于 1*10⁻⁶cm/s, 表明纳布啡和 PEG- 纳布啡轭合物有可能经口服被良好地吸收。

[0466] 图 2B 显示 PEG- 纳布啡轭合物的外排比例, 其计算为 $B-A/A-B$ 渗透度比例。外排比例大于一反映的是顶端 - 基底外侧方向上的运输不对称, 并表明了转运体在总渗透度中的作用。母体纳布啡的外排比例接近于一, 表明它不是转运体的可能的底物。然而, 6-O-mPEG₅- 纳布啡、6-O-mPEG₆- 纳布啡、6-O-mPEG₇- 纳布啡、6-O-mPEG₈- 纳布啡和 6-O-mPEG₉- 纳布啡的外排比例大于 3, 因此在 Caco-2 细胞中是外排转运体的可能的底物。

[0467] 实施例 10

[0468] PEG- 纳布啡轭合物的体内脑渗透

[0469] 利用大鼠中的脑：血浆比例测定 PEG- 纳布啡轭合物穿过血脑屏障 (BBB) 并进入 CNS 的能力。简言之, 对大鼠静脉注射 25mg/kg 纳布啡、PEG- 纳布啡轭合物或阿替洛尔。注射一小时后, 处死动物, 收集血浆和脑并立即冷冻。在取出组织和血浆之后, 利用 LC-MS/MS 测量化合物在脑和血浆中的浓度。将脑：血浆比例计算为脑和血浆中的测定浓度的比例。使用不穿过 BBB 的阿替洛尔作为脑组织的血管污染的量度。

[0470] 图 3 显示 PEG- 纳布啡轭合物的脑：血浆浓度比例。纳布啡的脑：血浆比例为 2.86 : 1, 表明与血浆隔室相比, 纳布啡在脑中的浓度几乎大 3 倍。PEG 轭合使纳布啡进入 CNS 显著减少, 这可由 PEG- 纳布啡轭合物的较低的脑：血浆比例得到证实。用 3 个 PEG 单元的轭合使脑：血浆比例减小到 0.23 : 1, 表明脑中的 6-O-mPEG₃- 纳布啡的浓度比血浆中的浓度低大约 4 倍。6-O-mPEG₆- 纳布啡和 6-O-mPEG₉- 纳布啡被显著地排除在 CNS 外, 因为它们的脑：血浆比例与血管标记物阿替洛尔没有显著的不同。

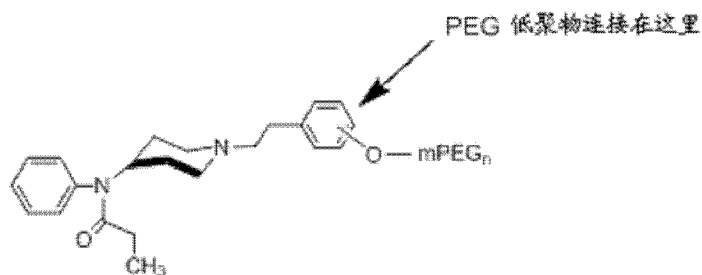
[0471] 实施例 11

[0472] 制备低聚物 - 芬太尼轭合物

[0473] 可以按下面示意显示的方法制备 mPEG_n-O- 芬太尼轭合物。在进行所述合成方法时采用常规的有机合成技术。

[0474] 下面提供示例的方法制备如下的结构, 其中 PEG 低聚物位于, 即共价连接于 N-(1-(2- 苯乙基) 哌啶 -4- 基) 苯基:

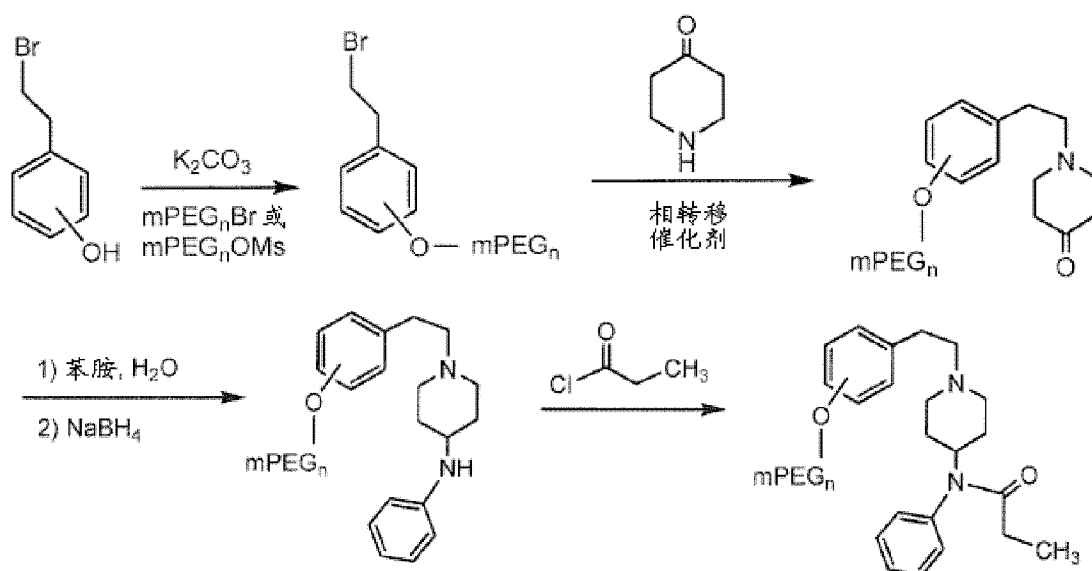
[0475]



[0476] [其中 mPEG_n 是 $-(CH_2CH_2O)_n-CH_3$, 且 n 是 1 到 9 的整数]。

[0477] 方案 11-A

[0478]

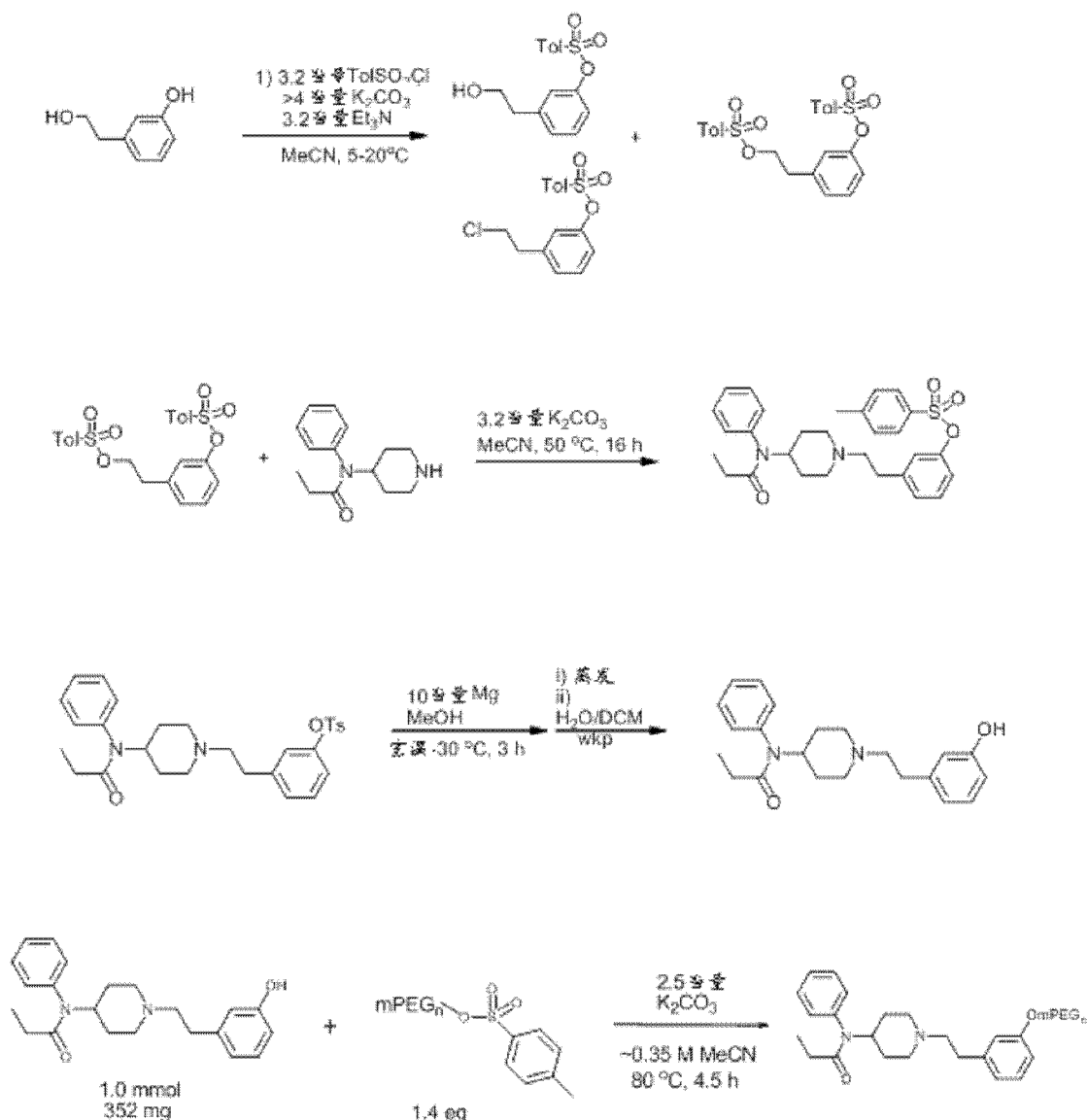


[0479] 在上面的方法中,起始物为(卤乙基)羟基苯,其中羟基形成PEG低聚物的连接点。使(卤乙基)羟基苯,即(溴乙基)羟基苯与甲磺酰化或卤化的活化mPEG低聚物反应,从而形成所需的PEG-低聚物修饰的(卤乙基)苯中间体。然后在相转移催化剂的存在下使此中间体与哌啶-4-酮反应;溴基在哌啶-4-酮的氮处发生反应,形成下一个中间体1-(mPEG低聚物-苯乙基)哌啶-4-酮。然后酮官能团在还原剂(如硼氢化钠)的存在下被还原,并通过与苯胺反应转化成氨基,即N-苯基-哌啶-4-胺。最后,仲氨基通过与丙酰氯反应转化成叔胺,从而形成上述方案中所示的所需产物。

[0480] 采用由上面的方案11-A略作修改的反应方案合成所说的在N-(1-(2-苯乙基)哌啶-4-基)苯基位置处具有PEG低聚物的mPEG_n-O-芬太尼衍合物,如下面的方案11-B所示:

[0481] 方案11-B

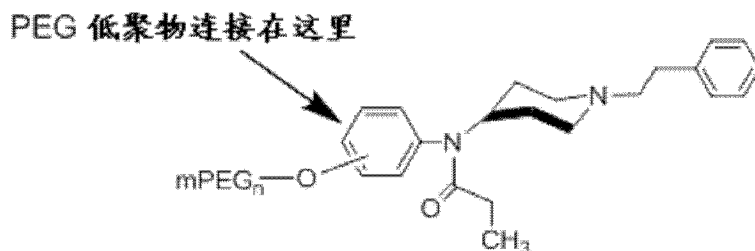
[0482]



[0483] 上述方法在合成的各步骤中使用甲苯磺酰基（对甲苯磺酸酯）离去基团。通过二-甲苯磺酰化 3-(2-羟乙基)苯酚与 N-苯基-N-(哌啶-4-基)丙酰胺反应,形成甲苯磺酰化形式的 N-(1-(3-羟苯基乙基)哌啶-4-基)-N-苯基丙酰胺,接着去掉甲苯磺酰基,由此组装所需的 PEG-低聚物钆合物 (n = 1 至 9)。然后通过 N-(1-(3-羟苯基乙基)哌啶-4-基)-N-苯基丙酰胺与摩尔过量的 mPEG_{低聚物}-甲苯磺酸酯反应,形成所需的 mPEG_n-O-芬太尼钆合物,由此在苯基羟基位置将 PEG-低聚物基团引入到分子当中。上述反应方案中提供了常用的反应物比例和反应条件。

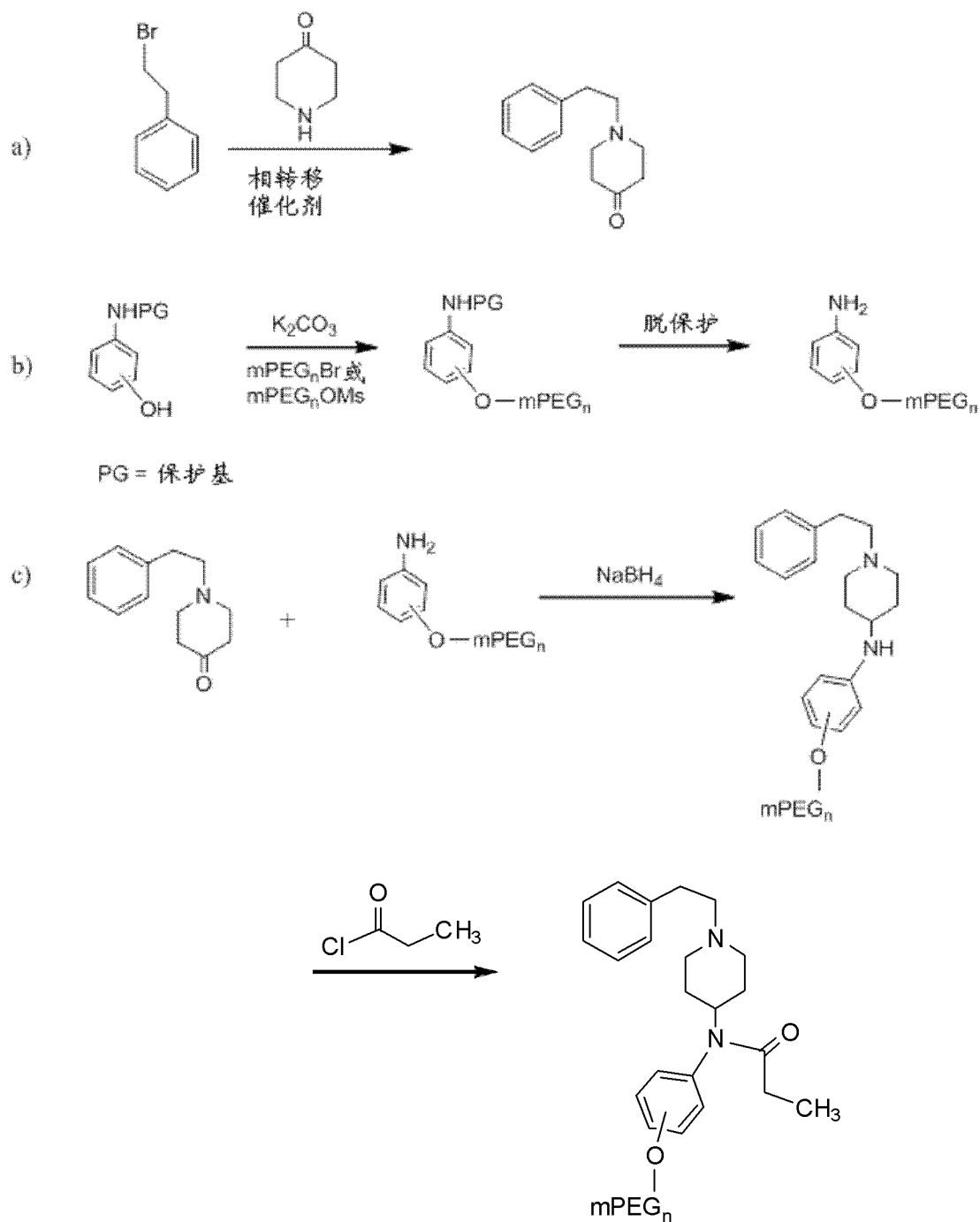
[0484] 下面给出提供如下结构的示例方法,其中 PEG 低聚物位于,即共价连接于 N- 苯基:

[0485]



[0486] 方案 11-C

[0487]

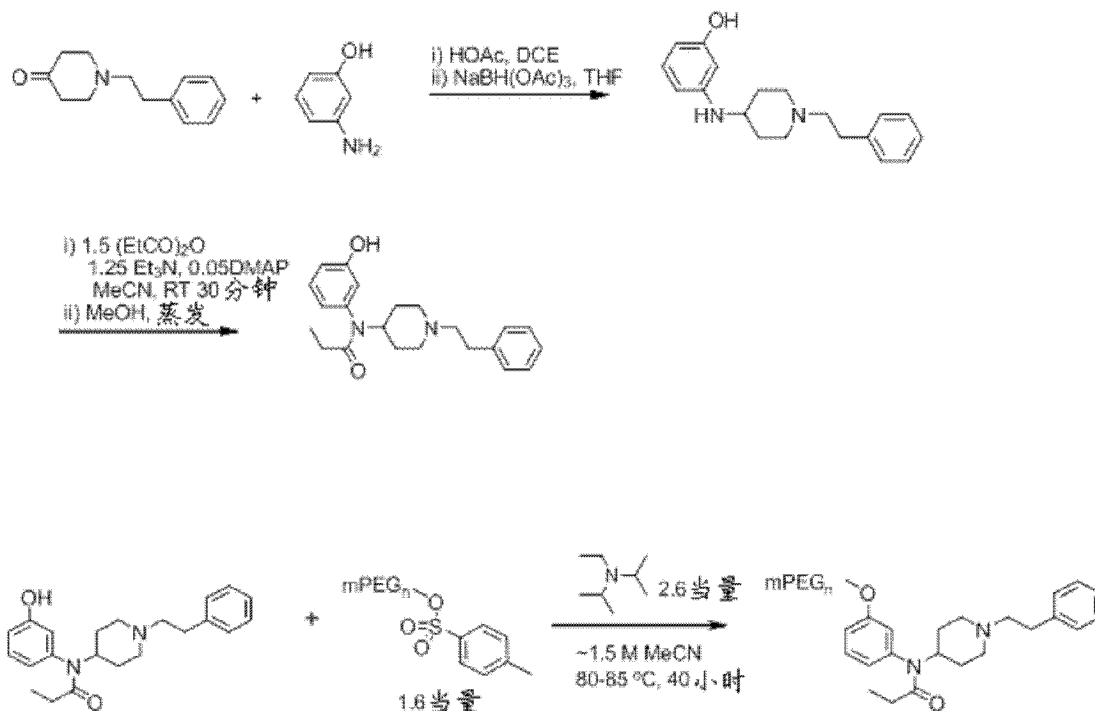


[0488] 形成在 N-苯基环位置具有 PEG 低聚物的 $m\text{PEG}_n\text{-O-}$ 芬太尼衍合物的上述示例方法以例如 2-溴乙基苯为起始物。在相转移催化剂的存在下使 2-溴乙基苯与哌啶-4-酮反应，从而形成所得到的 1-苯乙基哌啶-4-酮。1-苯乙基哌啶-4-酮偶联于 $m\text{PEG}_{\text{低聚物}}$ -取代的苯胺，后者的制备方式是，取 N-保护的羟基苯胺并使其与活化的 $m\text{PEG}$ 低聚物（如溴甲氧基 $\text{PEG}_{\text{低聚物}}$ 或 $m\text{PEG}_{\text{低聚物}}$ ）反应，接着去掉保护基（见上面的步骤 (b)）。如上面的反应步骤 (c) 所示，1-苯乙基哌啶-4-酮在还原剂的存在下与 $m\text{PEG}_{\text{低聚物}}$ -取代的苯胺反应，将酮基转化成胺以形成中间体 1-苯乙基哌啶-4-基氨基- $m\text{PEG}_{\text{低聚物}}$ 苯。最后，仲氨基通过与丙酰氯反应转化成叔胺，从而形成如上述方案所示的所需产物。

[0489] 采用由上面的方案 11-C 略作修改的反应方案合成所说的在 N- 苯基位置处具有 PEG 低聚物的 mPEG_n-O'- 芬太尼衍合物, 如下面的方案 11-D 所示:

[0490] 方案 11-D

[0491]



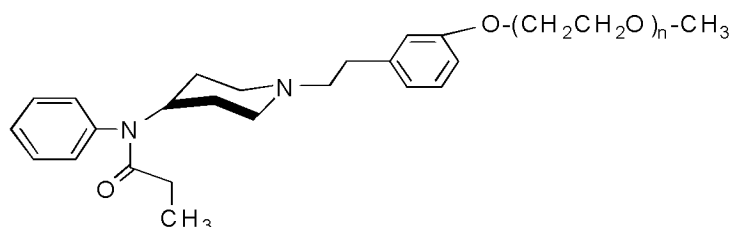
[0492] 如上面的方案 11-D 所示, 通过首先使 1- 苯乙基哌啶 -4- 酮在还原条件下与 3- 氨基苯酚反应, 从而将酮官能团转化成胺, 即通过与 3- 氨基苯酚的氨基反应, 由此制备所需的 mPEG_n-O- 芬太尼衍合物。然后在碱 (例如三乙胺) 和二甲基氨基吡啶 (DMAP) 的存在和能有效形成 N-(3- 羟苯基)-N-(1- 苯乙基哌啶 -4- 基) 丙酰胺的条件下使产物 3-(1- 苯乙基哌啶 -4- 基氨基) 苯酚与丙酸酐反应。最后, 通过在能有效形成所需衍合物的偶联条件下使前体 N-(3- 羟苯基)-N-(1- 苯乙基哌啶 -4- 基) 丙酰胺与摩尔过量的 mPEG_{低聚物} 甲苯磺酸酯反应来实施低聚 PEG 官能团的引入。上述反应方案中提供了常用的反应物比例和反应条件。

[0493] 实施例 11A

[0494] 制备 m-mPEG_n-O- 芬太尼衍合物

[0495] 合成 m-mPEG₁-O- 芬太尼衍合物 (n = 1):

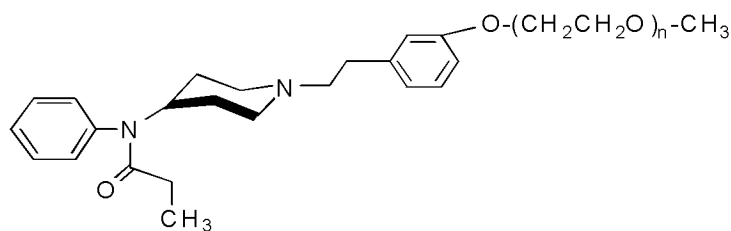
[0496]



[0497] 采用实施例 11 中给出且如方案 11-B 中示意描述的方法制备上述衍合物。

[0498] 合成 m-mPEG₂-O- 芬太尼衍合物 (n = 2):

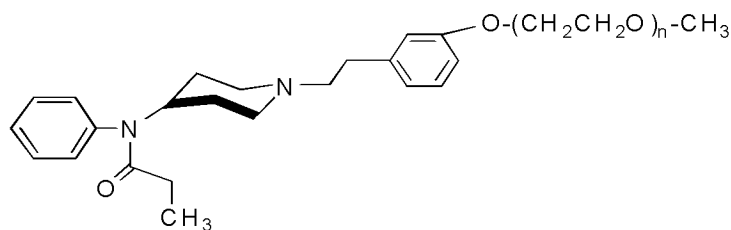
[0499]



[0500] 采用实施例 11 中给出且如方案 11-B 中示意描述的方法制备上述衍合物。

[0501] 合成 m-mPEG₃-0- 芬太尼衍合物 (n = 3) :

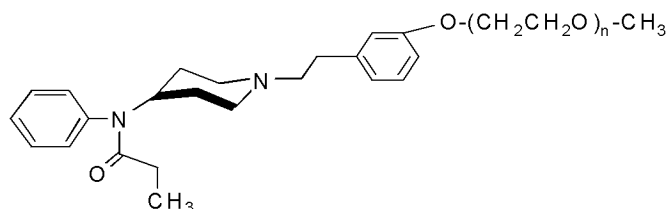
[0502]



[0503] 采用实施例 11 中给出且如方案 11-B 中示意描述的方法制备上述衍合物。

[0504] 合成 m-mPEG₄-0- 芬太尼衍合物 (n = 4) :

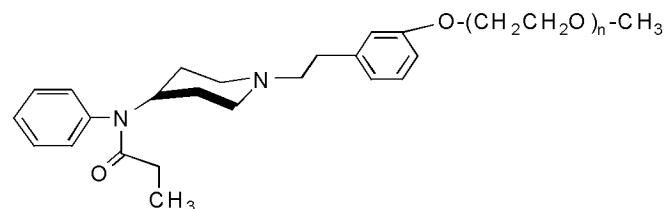
[0505]



[0506] 采用实施例 11 中给出且如方案 11-B 中示意描述的方法制备上述衍合物。

[0507] 合成 m-mPEG₅-0- 芬太尼衍合物 (n = 5) :

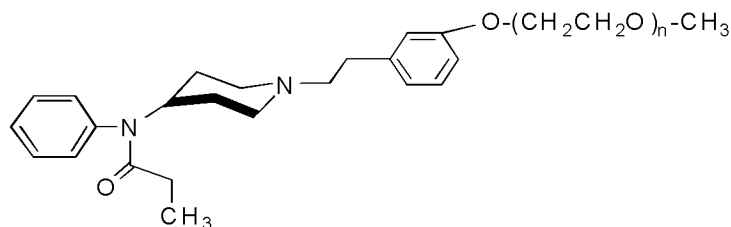
[0508]



[0509] 采用实施例 11 中给出且如方案 11-B 中示意描述的方法制备上述衍合物。

[0510] 合成 m-mPEG₆-0- 芬太尼衍合物 (n = 6) :

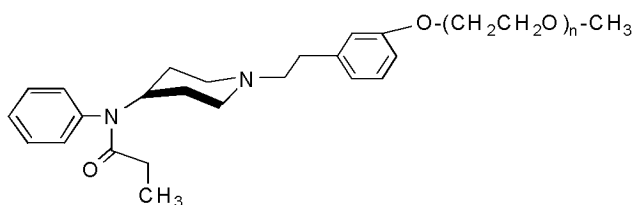
[0511]



[0512] 采用实施例 11 中给出且如方案 11-B 中示意描述的方法制备上述衍合物。

[0513] 合成 m-mPEG₇-0- 芬太尼衍合物 (n = 7) :

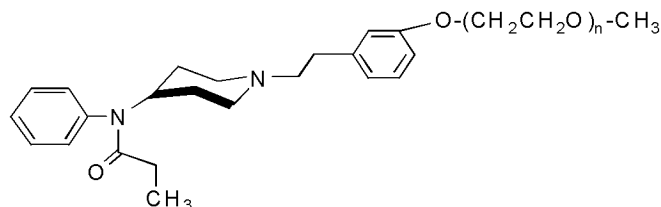
[0514]



[0515] 采用实施例 11 中给出且如方案 11-B 中示意描述的方法制备上述衍合物。

[0516] 合成 m-mPEG₇-O- 芬太尼衍合物 (n = 7) :

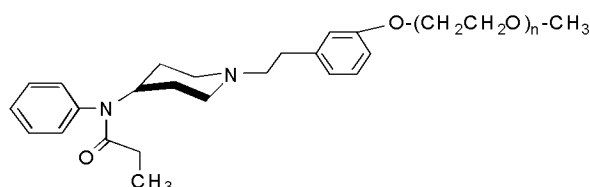
[0517]



[0518] 采用与实施例 11 中给出的类似且如方案 11-B 中示意描述的方法制备上述衍合物。

[0519] 合成 m-mPEG₈-O- 芬太尼衍合物 (n = 8)

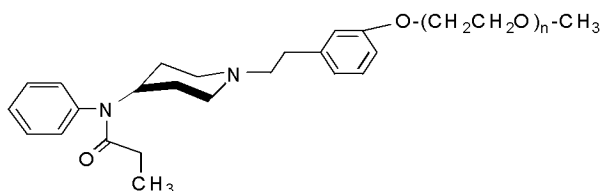
[0520]



[0521] 采用实施例 11 中给出且如方案 11-B 中示意描述的方法制备上述衍合物。

[0522] 合成 m-mPEG₉-O- 芬太尼衍合物 (n = 9) :

[0523]



[0524] 采用实施例 11 中给出且如方案 11-B 中示意描述的方法制备上述衍合物。

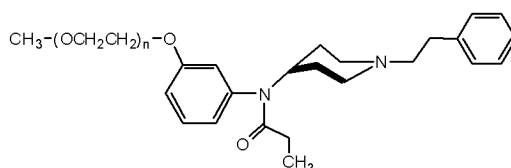
[0525] 通过 ¹H NMR (200MHz Bruker) 和通过 LC/MS 表征上述 mPEG₁₋₉-O- 芬太尼衍合物中的每一种。

[0526] 实施例 12

[0527] 制备 m-mPEG_n-O' - 芬太尼衍合物

[0528] 合成 m-mPEG₁-O' - 芬太尼衍合物 (n = 1) :

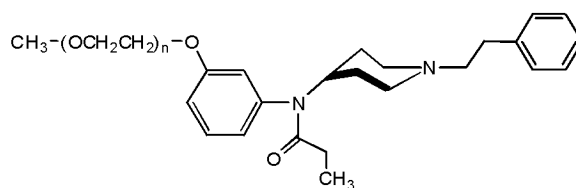
[0529]



[0530] 采用实施例 11 中给出且如方案 11-D 中示意描述的方法制备上述衍合物。在这一系列中,低聚 mPEG 在 N- 苯基的间位共价连接。

[0531] 合成 m-mPEG₂-O' - 芬太尼甾合物 (n = 2) :

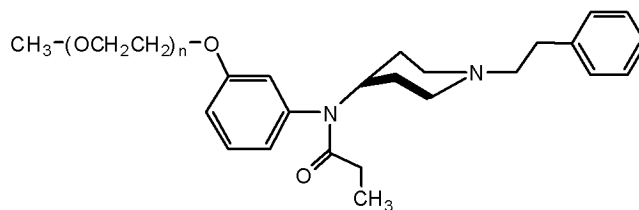
[0532]



[0533] 采用实施例 11 中给出且如方案 11-D 中示意描述的方法制备上述甾合物。

[0534] 合成 m-mPEG₃-O' - 芬太尼甾合物 (n = 3) :

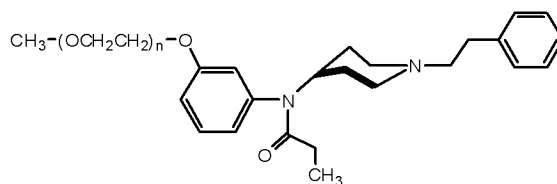
[0535]



[0536] 采用实施例 11 中给出且如方案 11-D 中示意描述的方法制备上述甾合物。

[0537] 合成 m-mPEG₄-O' - 芬太尼甾合物 (n = 4) :

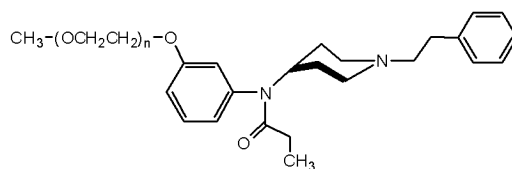
[0538]



[0539] 采用实施例 11 中给出且如方案 11-D 中示意描述的方法制备上述甾合物。

[0540] 合成 m-mPEG₅-O' - 芬太尼甾合物 (n = 5) :

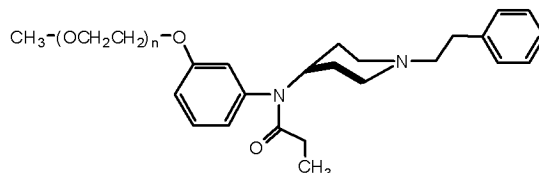
[0541]



[0542] 制备上述甾合物。

[0543] 合成 m-mPEG₆-O' - 芬太尼甾合物 (n = 6) :

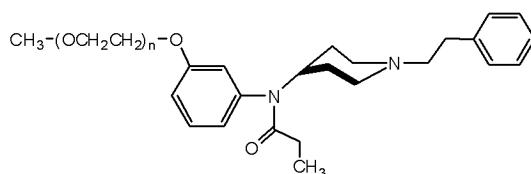
[0544]



[0545] 采用实施例 11 中给出且如方案 11-D 中示意描述的方法制备上述甾合物。

[0546] 合成 m-mPEG₇-O' - 芬太尼甾合物 (n = 7) :

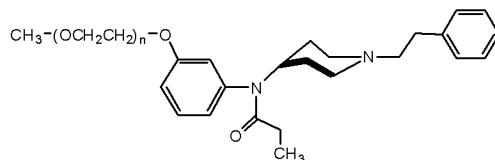
[0547]



[0548] 采用实施例 11 中给出且如方案 11-D 中示意描述的方法制备上述甾合物。

[0549] 合成 m-mPEG₈-O' - 芬太尼甾合物 (n = 8) :

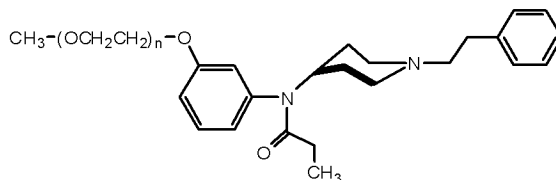
[0550]



[0551] 采用实施例 11 中给出且如方案 11-D 中示意描述的方法制备上述甾合物。

[0552] 合成 m-mPEG₈-O' - 芬太尼甾合物 (n = 8)

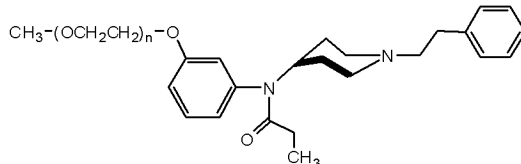
[0553]



[0554] 采用实施例 11 中给出且如方案 11-D 中示意描述的方法制备上述甾合物。

[0555] 合成 m-mPEG₉-O' - 芬太尼甾合物 (n = 9) :

[0556]



[0557] 采用实施例 11 中给出且如方案 11-D 中示意描述的方法制备上述甾合物。

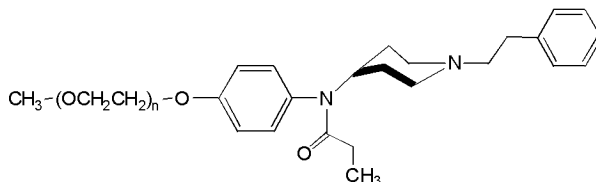
[0558] 通过 ¹H NMR (200MHz Bruker) 和通过 LC/MS 表征上述 mPEG₁₋₉-O' - 芬太尼甾合物中的每一种。

[0559] 实施例 13

[0560] 制备对位 -mPEG_n-O' - 芬太尼甾合物

[0561] 合成对 -mPEG₁-O' - 芬太尼甾合物 (n = 1) :

[0562]

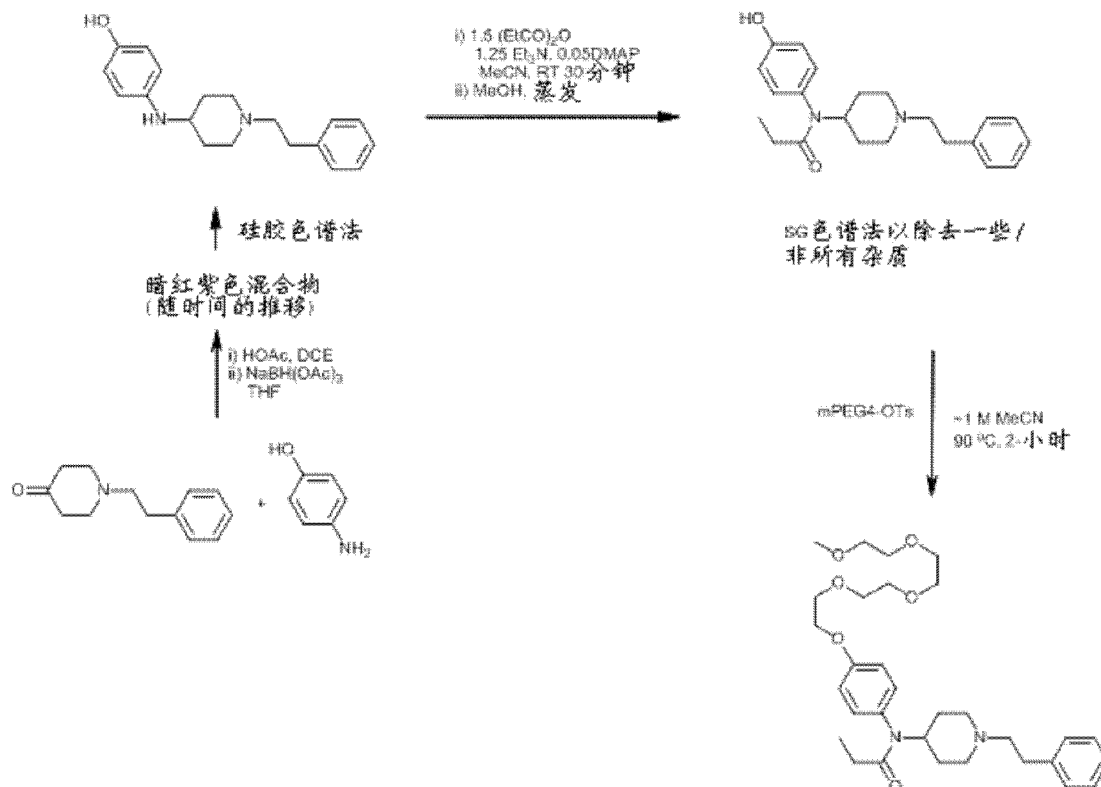


[0563] 采用实施例 11 中给出的方法制备上述甾合物。在这一系列中,低聚 mPEG 在 N- 苯基的对位共价连接。

[0564] 合成 p-mPEG₄-O' - 芬太尼甾合物 (n = 4)

[0565] 根据下示的反应方案制备对位取代的甾合物 :

[0566]



[0567] 通过首先在还原条件下（如在诸如 $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ 之类的还原剂的存在下）使 1- 苯乙基哌啶-4-酮与 4-氨基苯酚反应，从而将酮官能团转化成胺，即通过与 4-氨基苯酚的氨基反应，由此制备所需的 pPEG₄-O- 芬太尼衍合物。然后在碱（例如三乙胺）和二甲基氨基吡啶（DMAP）的存在和能有效形成 N-(4-羟苯基)-N-(1-苯乙基哌啶-4-基)丙酰胺的条件下使产物 4-(1-苯乙基哌啶-4-基氨基)苯酚与丙酸酐反应。最后，通过在能有效形成所需衍合物的偶联条件下使前体 N-(4-羟苯基)-N-(1-苯乙基哌啶-4-基)丙酰胺与 mPEG₄ 甲苯磺酸酯反应来实施低聚 PEG 官能团的引入。上述反应方案中提供了常用的反应物比例和反应条件。

[0568] 可以类似的方式制备别的 pPEG_{低聚物}-O- 芬太尼衍合物。

[0569] 实施例 14

[0570] 制备用于实施例 15、16 和 17 的 mPEG_n-OMs (mPEG_n-O- 甲磺酸酯)

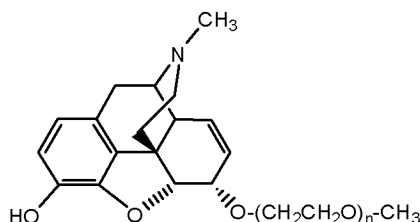
[0571] 在 40mL 玻璃小瓶中混合 $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$ (1.2mL, 10mmol) 和 DIEA (N, N- 二异丙基乙胺, 5.2mL, 30mmol, 3 当量)，将所得到的均质无色混合物冷却到 0°C，并通过注射器经 4 分钟缓慢加入 MsCl (1.55mL, 20mmol, 2 当量)，同时剧烈搅拌。在加入时产生两相混合物：底部的黄色固体和澄清的上清液。移走冰浴，并将反应物暖至室温过夜。此时将其溶于水，用 CHCl_3 (3x50mL) 萃取，用 0.1M HCl / 盐水混合物 2x50mL、接着用盐水 50mL 洗涤。有机层经 MgSO_4 干燥，过滤得到黄色溶液并蒸发得到棕色油状物 (2.14g)。¹H NMR 确认产物特征 3.3 (1H NMR δ 3.1 (s, 3H), 3.3 (s, 3H), 3.5-3.55 (m, 2H), 3.6-3.65 (m, 2H), 3.7-3.75 (m, 2H), 4.3-4.35 (m, 2H) ppm)。

[0572] 按照类似的方式制备所有其它的 PEG_n-OMs' s (n = 3、4、5、6、7 和 9)，并且在每种情况下得到分离为棕色油状物的最终化合物。质谱和质子 NMR 数据（未显示）确认形成了所需的 OMs PEG 化产物。

[0573] 实施例 15

[0574] 制备 mPEG_n-O- 吗啡衍生物

[0575]



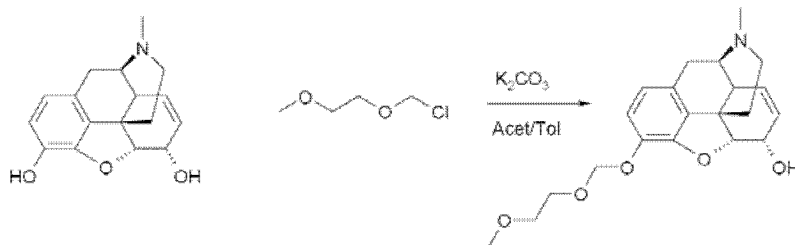
[0576] 以下描述使用市售的硫酸吗啡水合物制备游离碱（一般程序）。

[0577] 将得自 Spectrum 的硫酸吗啡 USP (510mg) 溶于水 (70ml)。然后将所述溶液用 K₂CO₃ 水溶液碱化到 pH10, 得到白色的悬浮液。向白色的悬浮液中加入 DCM (二氯甲烷, 50ml), 但未能溶解固体。用 1M HCl 使混合物呈酸性, 得到澄清的两相溶液。分出有机相, 并用与上面相同的 K₂CO₃ 溶液仔细地将水相调成 pH9.30 (通过 pH 计监测)。再次得到白色的悬浮液。用 DCM (5x25ml) 萃取非均质混合物, 并且不溶性白色固体玷污了有机层和水层。用 MgSO₄ 干燥有机层, 过滤并旋转蒸发, 产生 160mg 吗啡游离碱 (56% 回收率)。使用 MeOH 时由滤饼没有回收得到另外的产物, 但通过用 EtOAc 进行 2x50ml 萃取由水相又回收了 100mg, 得到的合并产量为 260mg (68%)。

[0578] 吗啡游离碱的 MEM 保护

[0579] 下面示意地显示用保护基 β-甲氧基乙氧基甲酯 (“MEM”) 保护吗啡的游离碱的一般方法。

[0580]



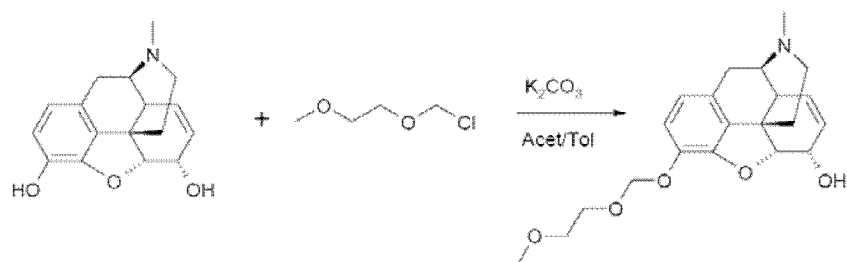
[0581] 将游离碱吗啡 (160mg, 0.56mmol) 溶解在 20ml 丙酮 / 甲苯 (2/1 混合物) 中。向所得到的溶液中加入 K₂CO₃ (209mg, 1.51mmol, 2.7 当量), 接着加入 MEMCl (96 μl, 0.84mmol, 1.5 当量), 并在室温下将所得到的非均质混合物搅拌过夜。在室温下经五小时后, 通过 LC-MS 认为反应完成。在标准的六分钟梯度运行条件 (std 6 分钟, Onyx Monolyth C18 柱, 50x4.6mm; 0 至 100% 乙腈 0.1% TFA 在水中 0.1% TFA, 1.5 毫升 / 分钟; 检测: UV254、ELSD、MS; 保留时间提供自 UV254 检测器, 相对于 UV, ELSD 有约 0.09 分钟延迟, MS 有约 0.04 分钟延迟) 下的吗啡游离碱保留时间为 1.09 分钟; 产物的保留时间 1.54 分钟 (std 6 分钟), 主要杂质 1.79 分钟。将反应混合物蒸发至干, 溶解在水中, 用 EtOAc 萃取 (3x, 用盐水洗涤合并的有机层, 经 MgSO₄ 干燥, 过滤并旋转蒸发), 得到 160mg (77%) 所需的产物, 为无色油状物。通过 UV254 估计产物的纯度为约 80%。

[0582] 硫酸吗啡的直接 MEM 保护 (一般程序)

[0583] 下面示意地显示用保护基 β-甲氧基乙氧基甲酯 (“MEM”) 保护硫酸吗啡的一般方法。虽然在下面的方案中没有明确示出, 但吗啡实际上是硫酸吗啡水合物, 吗

啡·0.5H₂SO₄·2.5H₂O。

[0584]



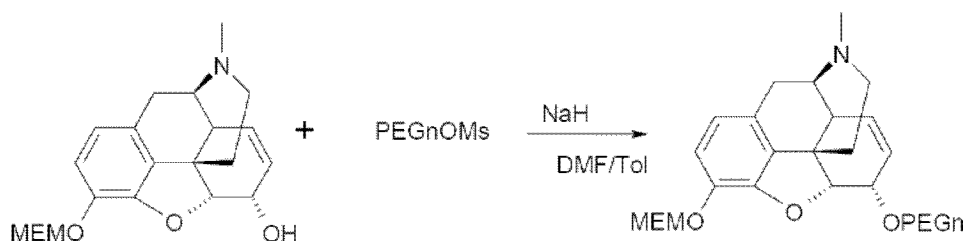
[0585] 向 103mg 硫酸吗啡水合物 (0.26mmol) 在 10ml 2 : 1 丙酮 : 甲苯溶剂混合物中的悬浮液里加入 135mg (1mmol, 3.7 当量) K₂CO₃, 并在室温下搅拌悬浮液 25 分钟。向所得到的悬浮液中加入 60 μl (0.52mmol) MEMCl, 并使混合物在室温下反应。在一小时 (38% 名义转化率, 附加峰在 1.69 分钟和 2.28 分钟)、三小时 (40% 名义转化率, 附加峰在 1.72 分钟 (M+1 = 493.2))、四个半小时 (56% 名义转化率, 附加峰在 1.73 分钟) 和二十三小时 (> 99% 名义转化率, 附加峰在 1.79 分钟 - 在 UV₂₅₄ 中按高度的约 23% 产物峰) 后取样; 此后用 MeOH 猝灭反应, 蒸发, 用 EtOAc 萃取得到 160mg 澄清的油状物。

[0586] 在 100ml 溶剂混合物中以 2g (5.3mmol) 硫酸吗啡水合物、2.2g (16mmol, 3 当量) K₂CO₃、1.2ml (10.5mmol, 2 当量) MEMCl 起始重复同样的反应。在两小时后 (61% 名义转化率, 额外峰在 1.72 分钟 (M+1 = 492.8))、一天后 (80% 名义转化率, 额外峰在 1.73 分钟)、三天后 (85% 名义转化率, 只有少量杂质, 12 分钟梯度运行) 和六天后 (91% 转化率) 进行取样; 此后猝灭反应, 蒸发, 用 EtOAc 萃取, 使用 40g 柱进行 combi 快速纯化, DCM:MeOH 至 30% 流动相。鉴定出三个 (而不是两个) 峰, 其中收集中等峰, 1.15g (58% 收率) 浅黄色油状物, UV₂₅₄ 纯度约 87%。

[0587] MEM- 保护的吗啡的钅合以提供 MEM- 保护的吗啡钅合物

[0588] 下面示意地显示用水溶性低聚物钅合 MEM- 保护的吗啡以得到 MEM- 保护的吗啡 PEG- 低聚物钅合物的一般方法。

[0589]



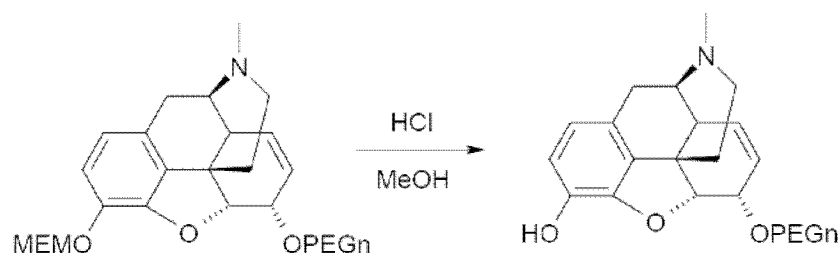
[0590] 向甲苯 / DMF (2 : 1 混合物, 总共 10 体积) 的溶液中装入 MEM- 吗啡游离碱, 接着装入 NaH (4-6 当量), 然后装入先前制备的 PEG_nOMs (1.2-1.4 当量)。将反应混合物加热到 55-75°C 并搅拌, 直到通过 LC-MS 分析确定反应完成 (12-40 小时, 取决于 PEG 链长)。用甲醇 (5 体积) 猝灭反应混合物, 并将反应混合物真空蒸发至干。将残余物重新溶解在甲醇 (3 体积) 中, 并使用 Combiflash 系统 (0-40% MeOH/DCM) 进行色谱操作。收集含大量产物的级分, 合并并蒸发至干。然后通过 RP-HPLC 纯化此物质以得到产物, 为黄色至橙色的油状物。

[0591] MEM- 保护的吗啡钅合物的脱保护以提供吗啡钅合物

[0592] 下面示意地显示使 MEM- 保护的吗啡钅合物脱保护以提供吗啡钅合物的一般方

法。

[0593]



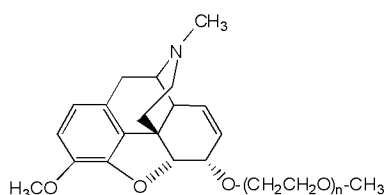
[0594] 化合物 A

[0595] 向 MEM- 保护的啡哌合物 TFA 盐悬浮在 DCM(8 体积) 中的溶液里装入乙醚中的 6 体积 2M HCl。将反应混合物在室温下搅拌两小时,然后在减压下蒸发至干。将油状残余物溶解在 MeOH(8 体积) 中,通过玻璃棉过滤,然后在减压下蒸发,以定量收率得到橙色至黄色的稠油状物。按此方法制得的化合物包括: α -6-mPEG₃-O- 啡哌 (化合物 A, $n = 3$) 217mg HCl 盐 97% 纯度 (按 UV₂₅₄ 为 95%; 按 ELSD 为 98%); α -6-mPEG₄-O- 啡哌 (化合物 A, $n = 4$) 275mg HCl 盐 98% 纯度 (按 UV₂₅₄ 为 97%; 按 ELSD 为 98%); α -6-mPEG₅-O- 啡哌 (化合物 A, $n = 5$) 177mg HCl 盐 95% 纯度 (按 UV₂₅₄ 为 93%; 按 ELSD 为 98%); α -6-mPEG₆-O- 啡哌 (化合物 A, $n = 6$) 310mg HCl 盐 98% 纯度 (按 UV₂₅₄ 为 98%; 按 ELSD 为 99%); α -6-mPEG₇-O- 啡哌 (化合物 A, $n = 7$) 541mg HCl 盐 96% 纯度 (按 UV₂₅₄ 为 93%; 按 ELSD 为 99%); 和 α -6-mPEG₉-O- 啡哌 (化合物 A, $n = 9$) 466mg HCl 盐 98% 纯度 (按 UV₂₅₄ 为 97%; 按 ELSD 为 99%)。另外,类似地制备了具有连接的单个 PEG 单体的啡哌合物 α -6-mPEG₁-O- 啡哌 (化合物 A, $n = 1$), 124mg HCl 盐, 97% 纯度 (按 UV₂₅₄ 为 95% 纯度; 按 ELSD 为 98%); 以及 α -6-mPEG₂-O- 啡哌 (化合物 A, $n = 2$), 485mg HCl 盐, 97% 纯度 (按 UV₂₅₄ 为 95% 纯度; 按 ELSD 为 98%)。

[0596] 实施例 16

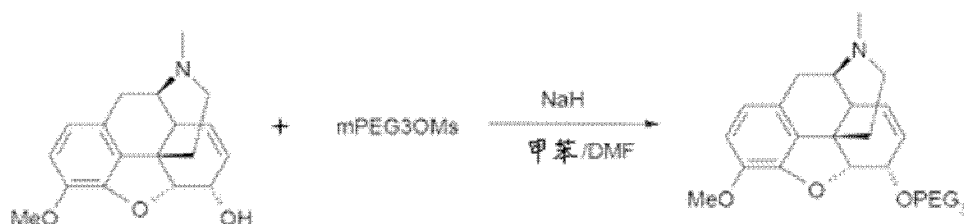
[0597] 制备 mPEG_n-O- 可待因哌合物

[0598]



[0599] 下面示意地显示用水溶性低聚物 (使用 mPEG₃OMs 为代表性低聚物) 的活化磺酸酯哌合可待因以提供可待因哌合物的一般方法。

[0600]



[0601] 将可待因 (30mg, 0.1mmol) 溶解在甲苯 /DMF (75 : 1) 溶剂混合物中,接着加入 HO-CH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂OMs (44ml, 2 当量) 和 NaH (矿物油中的 60% 悬浮液, 24mg, 6 当量)。

将所得到的均质黄色溶液加热到 45℃。一小时后,反应显示出 11% 的转化率(额外峰在 2.71 分钟,12 分钟运行),十八小时后反应显示出 7% 的转化率(额外峰在 3.30 分钟,12 分钟运行),并且 24 小时后反应显示出 24% 的转化率(多个额外峰,两个最高的为 1.11 分钟和 2.79 分钟)。在此时再加入 16mg NaH 并继续加热六小时,此后再加入 16mg NaH,接着继续加热六十六小时以上。此后没有剩余的起始物存在,并且分析显示有许多额外的峰,两个最高的对应于 2.79 分钟和 3 分钟(产物峰是至少 7 个峰当中的次最高峰)。

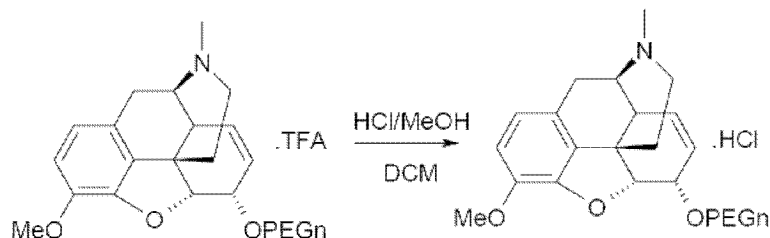
[0602] 采用 10x 规模重复此合成,其中使用 30ml 溶剂混合物。十八小时后,分析显示出 71% 的名义转化率,UV 中有附加峰(一个高峰在 3.17 分钟,以及许多小峰;其中所需的峰在 UV 中对应于 3.43 分钟)。此后加入 80mg (2mmol) NaH,接着继续加热。三小时后,分析显示出 85% 的名义转化率(若干额外峰,主峰 3.17 分钟)。用水稀释反应混合物,用 EtOAc 萃取(3x,用盐水洗涤合并的有机层,经 MgSO_4 干燥,过滤并旋转蒸发),得到黄色油状物(LC-MS 中没有 sm,按 ELSD 为 90% 纯度,按 UV 为 50% 纯度-主要杂质在 3.2 分钟)。将粗产物溶解在 DCM 中,施加到填有 230-400 目 SiO_2 的小柱筒(cartridge)上,干燥,在 Combi-flash 上经由 4g 预填充柱筒进行洗脱,溶剂 A = DCM,且溶剂 B = MeOH,梯度液为 0 至 30% 的 B。分析显示出对称性差的两个峰:小前峰和带有尾部的较大峰)。LC-MS 用于分析级分,其中经确定没有含纯产物的。溶剂蒸发后产生含任何产物的合并级分(tt#22-30),150mg (34% 收率)不纯的产物(按 UV254,LC-MS 纯在 3.35 分钟,其中约 25% 代表主要杂质,12 分钟运行的 3.11 分钟、3.92 分钟、4.32 分钟、5.61 分钟)。使用对应于 15-60% B (70 分钟、10 毫升/分钟)梯度液的 HPLC 二次纯化(溶剂 A = 水,0.1% TFA;溶剂 B = 乙腈,0.1% TFA)导致与相邻峰的较差分离。只有两个级分足够纯净,并得到 21mg 的 TFA 盐(> 95% 纯度,4.7% 收率)。将含所需产物的级分之前和之后的另外三个级分(总共六个另外的级分)合并得到 70mg 约 50% 纯度的产物,为 TFA 盐。

[0603] 采用与此相同的方法,按照上面概述的 NaH 条件制备环氧乙烷单元数不同($n = 4, 5, 6, 7$ 和 9)的其它甾合物。

[0604] 可待因-低聚物甾合物 TFA 盐转化成可待因-低聚物 HCl 盐。

[0605] 下面示意地显示将可待因-低聚物 TFA 盐转化成可待因-低聚物 HCl 盐的一般方法。

[0606]



[0607] 化合物 B

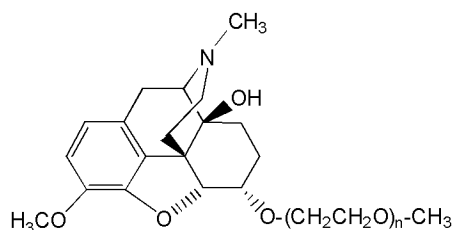
[0608] 向可待因-低聚物甾合物 TFA 盐悬浮在 DCM (8 体积) 中的溶液里装入二乙醚中的 6 体积 2M HCl。将反应混合物在室温下搅拌两小时,然后在减压下蒸发至干。将油状残余物溶解在 MeOH (8 体积) 中,通过玻璃棉过滤,然后在减压下蒸发,以定量收率得到橙色至黄色的稠油状物。按此一般程序合成以下的化合物: α -6-mPEG₃-O-可待因(化合物 B, $n = 3$) 235mg HCl 盐,98% 纯度; α -6-mPEG₄-O-可待因(化合物 B, $n = 4$) 524mg HCl 盐,98% 纯

度； α -6-mPEG₅-O-可待因（化合物 B, n = 5）185mg HCl 盐, 98% 纯度 + 119mg HCl 盐 97% 纯度； α -6-mPEG₆-O-可待因（化合物 B, n = 6）214mg HCl 盐, 97% 纯度； α -6-mPEG₇-O-可待因（化合物 B, n = 7）182mg HCl 盐, 98% 纯度； α -6-mPEG₉-O-可待因（化合物 B, n = 9）221mg HCl 盐, 97% 纯度； α -6-mPEG₁-O-可待因（化合物 B, n = 1）63mg HCl 盐, 90% 纯度；和 α -6-mPEG₂-O-可待因（化合物 B, n = 2）178mg HCl 盐, 90% 纯度。

[0609] 实施例 17

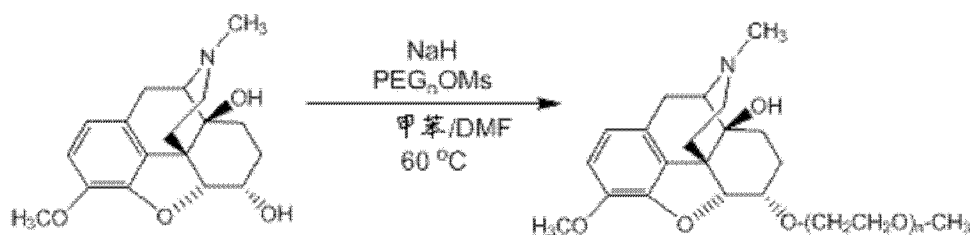
[0610] 制备 mPEG_n-O-羟可酮衍合物

[0611]



[0612] 下面示意地显示用水溶性低聚物（使用“mPEG_nOMs”作为代表性的低聚物）的活化磺酸酯衍合羟可酮以提供羟可酮衍合物的一般方法。

[0613]



[0614] 化合物 C

[0615] 将氧可酮还原成 α -6-羟可酮：在 -20°C 氮气冷却下经 15 分钟向氧可酮游离碱在无水 THF 中的溶液里加入三仲丁基硼氢化钾的 1.0M THF 溶液。在 -20°C 氮气下搅拌溶液 1.5 小时，然后缓慢加入水（10mL）。将反应混合物在 -20°C 下再搅拌 10 分钟，然后将其暖至室温。在减压下除去所有溶剂，并向剩下的残余物中加入 CH_2Cl_2 。用 0.1N HCl/NaCl 水溶液萃取 CH_2Cl_2 相，并用 CH_2Cl_2 洗涤合并的 0.1N HCl 溶液萃取物，然后加入 Na_2CO_3 以调节 $\text{pH} = 8$ 。用 CH_2Cl_2 萃取溶液。 CH_2Cl_2 萃取物经无水 Na_2SO_4 干燥。在减压下除去溶剂后，得到所需的 α -6-HO-3-羟可酮。

[0616] mPEG_nOMs 衍合于 α -6-羟可酮：向甲苯/DMF（2 : 1 混合物，总共 10 体积）的溶液中装入羟可酮（制备如在前面的段落中给出），接着装入 NaH（4 当量），然后装入 mPEG_nOMs（1.3e.）。将反应混合物加热到 60 – 80°C ，并搅拌直到通过 LC-MS 分析确定反应完成（12–40 小时，取决于 PEG 链长）。用甲醇（5 体积）猝灭反应混合物，并将反应混合物真空蒸发至干。将残余物重新溶解在甲醇（3 体积）中，并使用 Combiflash（0–40% MeOH/DCM）进行色谱操作。收集含有大量产物的级分，合并并蒸发至干。然后通过 RP-HPLC 纯化此物质，得到最终产物，为黄色至橙色油状物。

[0617] 羟可酮衍合物 TFA 盐转化成羟可酮衍合物 HCl 盐

[0618] 向羟可酮衍合物 TFA 盐悬浮在 DCM（8 体积）中的溶液里装入二乙醚中的 6 体积 2M HCl。将反应混合物在室温下搅拌两小时，然后在减压下蒸发至干。将油状残余物溶解在

MeOH(8 体积)中,通过玻璃棉过滤,然后在减压下蒸发,以定量收率得到橙色至黄色的稠油状物。按此一般程序合成以下化合物: α -6-mPEG₃-O-氧可酮(aka α -6-mPEG₃-O-羟可酮)(化合物 C, n = 3)242mg HCl 盐,96%纯度; α -6-mPEG₄-O-氧可酮(aka α -6-mPEG₄-O-羟可酮)(化合物 C, n = 4)776mg HCl 盐,94%纯度; α -6-mPEG₅-O-氧可酮(aka α -6-mPEG₅-O-羟可酮)(化合物 C, n = 5)172mg HCl 盐,93%纯度; α -6-mPEG₆-O-氧可酮(aka α -6-mPEG₆-O-羟可酮)(化合物 C, n = 6)557mg HCl 盐,98%纯度; α -6-mPEG₇-O-氧可酮(aka α -6-mPEG₇-O-羟可酮)(化合物 C, n = 7)695mg HCl 盐,94%纯度;和 α -6-mPEG₉-O-氧可酮(aka α -6-mPEG₉-O-羟可酮)(化合物 C, n = 9)435mg HCl 盐 95%纯度。类似地制备了以下化合物, α -6-mPEG₁-O-氧可酮(aka α -6-mPEG₁-O-羟可酮)(化合物 C, n = 1)431mg HCl 盐 99%纯度;和 α -6-mPEG₂-O-氧可酮(aka α -6-mPEG₂-O-羟可酮)(化合物 C, n = 2)454mg HCl 盐,98%纯度。

[0619] 实施例 18

[0620] 体内止痛检测:苯基醌扭体

[0621] 采用止痛检测以确定属于以下轭合物系列的示例性 PEG-低聚物-阿片样激动剂轭合物是否可有效地减少和/或预防小鼠内脏痛:mPEG_{2-7,9}-O-吗啡、mPEG_{3-7,9}-O-可待因和 mPEG_{1-4,6,7,9}-O-羟可酮。

[0622] 所述检测利用 CD-1 雄性小鼠(每组 5-8 只小鼠),每只小鼠在研究当天重大约 0.020-0.030kg。根据标准方案处理小鼠。在施用苯基醌(PQ)溶液三十分钟前,给予小鼠单一“预处理”剂量的没有水溶性非肽类低聚物的共价连接的化合物(即,非 PEG 低聚物-修饰的母体分子)、包含共价连接于水溶性非肽类低聚物的化合物的对应型式物(即,轭合物)或对照溶液(IV、SC、IP 或口服)。对各动物 IP 注射刺激物(苯基醌,PQ),所述刺激物诱导“扭体”,“扭体”可包括:腹部收缩、躯干的扭曲和翻转、拱背以及后肢伸展。给各动物 IP 注射 PQ(1mg/kg PQ,0.1mL/10g 体重)。注射后,将动物放回到它们的观察封闭间内并观察它们的行为。在“预处理”后的 35 至 45 分钟之间对收缩进行计数。这些动物是使用一次的。每一测试物的剂量范围在 0.1 至 100mg/kg 之间(n = 5-10 只动物/剂)。

[0623] 结果示于图 4(mPEG_{2-7,9}-O-吗啡和对照)、图 5(mPEG_{1-4,6,7,9}-O-羟可酮和对照)和图 6(mPEG_{3-7,9}-O-可待因和对照)。下表 3A 和 3B 给出 ED₅₀ 值。

[0624] 表 3A

[0625] mPEG_n-O-吗啡系列的 ED₅₀ 值

[0626]

	吗啡	PEG2	PEG3	PEG4	PEG5	PEG6	PEG7	PEG9
ED ₅₀ (mg/kg)	0.3693	2.512	13.58	3.281	13.4	n/a	n/a	n/a

[0627] 表 3B

[0628] mPEG_n-O-羟可酮系列的 ED₅₀ 值

[0629]

	氧可酮	PEG1	PEG2	PEG3	PEG4	PEG6	PEG7	PEG9

ED ₅₀ (mg/kg)	0.6186	6.064	n/a	n/a	17.31	n/a	n/a	n/a
--------------------------	--------	-------	-----	-----	-------	-----	-----	-----

[0630] 实施例 19

[0631] 体内止痛检测：热板潜伏期检测

[0632] 采用热板潜伏期止痛检测以确定属于以下轭合物系列的示例性 PEG- 低聚物 - 阿片样激动剂轭合物是否可有效地减少和 / 或预防小鼠内脏痛：mPEG₁₋₅-O- 吗啡、mPEG₁₋₅-O- 羟可酮和 mPEG_{2-5,9}-O- 可待因。

[0633] 所述检测利用 CD-1 雄性小鼠（每组 10 只小鼠），每只小鼠在研究当天重大约 0.028-0.031kg。根据标准方案处理小鼠。在进行热板测试三十分钟前，给予小鼠单一“预处理”剂量的没有水溶性非肽类低聚物的共价连接的化合物（即，未修饰的母体分子）、包含共价连接于水溶性非肽类低聚物的化合物的对应型式物（即，轭合物）或对照溶液（SC）。热板温度设定在 55±1℃，开始实验前用表面温度计校准。“预处理”30 分钟后，将每只小鼠放在热板上，并记录舔后爪的潜伏期，精确到 0.1 秒。若 30 秒内没有发生舔动作，则将该小鼠移出。在热板测试后立即将测温探针插入到直肠中达 17mm，并在温度计稳定（大约 10 秒）时读取体温，精确到 0.1℃。这些动物使用一次。每一测试物的剂量范围在 0.3 至 30mg/kg 之间（n = 5-10 只动物 / 剂）。

[0634] 结果示于图 7（羟可酮系列）、图 8（吗啡系列）和图 9（可待因）。图中示出潜伏期（到舔后爪的时间，以秒表示）随化合物施用剂量（mg/kg）的变化。

[0635] 实施例 20

[0636] 在雄性 Sprague-Dawley 大鼠中进行静脉注射（IV）和口服（PO）给药之后的 PEG_{低聚物} - 阿片样化合物的药代动力学 - 研究设计

[0637] 在研究中使用一百七十五（175）只具有留置的颈静脉和颈动脉导管（JVC/CAC）的成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠（Charles River Labs, Hollister, CA）。每组 3 只大鼠。使所有动物禁食过夜。在给药前对大鼠称重，对尾部及笼卡片做标记以用于识别并计算剂量。用 3.0-5.0% 异氟烷诱导并保持麻醉。将 JVC 和 CAC 外置，用 HEP/ 盐水（10IU/mL HEP/mL 盐水）冲洗，塞住并做好标记以识别颈静脉和颈动脉。由 JVC 收集预剂量样品。当所有动物已经从麻醉中苏醒并对预剂量样本进行处理时，对静脉注射组的动物给药，使用含适当测试物的 1mL 注射器经由 JVC 进行静脉注射（IV），用 0.9% 盐水冲洗导管的死体积以确保动物接收到正确的剂量，口服组动物则通过强饲法进行口服处理。

[0638] 在经单一的 IV 给药之后，经由颈动脉导管在以下时间点收集血样：0（如上所述收集的预剂量）、2、10、30、60、90、120 和 240 分钟，并且在口服给药之后，在以下时间点收集血样：0（如上所述收集的预剂量）、15、30、60、120、240 和 480 分钟，并且按方案中的说明进行处理。在最后的收集点之后使动物无痛致死。

[0639] 利用 LC-MS/MS 方法对血浆样本进行生物分析。

[0640] 药代动力学分析：使用 WinNonlin（5.2 版，Mountain View, CA-94014）进行 PK 分析。在生成表格和进行 PK 分析之前，将低于 LLOQ 的血浆中的浓度用零替换。利用每一动物的血浆浓度 - 时间曲线估计以下的 PK 参数：

[0641] C₀ 外推至时间“零”的浓度

[0642] C_{max} 最大（峰值）浓度

- [0643] AUC_{all} 在浓度 - 时间下从零到最后浓度值时间的面积
- [0644] $T_{1/2(z)}$ 终末消除半衰期
- [0645] AUC_{inf} 在浓度 - 时间下从零到无限时间的面积
- [0646] T_{max} 施用后达到最大或峰值浓度的时间
- [0647] CL 总的体内清除率
- [0648] V_z 基于末期的分布体积
- [0649] V_{ss} 稳态下的分布体积
- [0650] MRT_{last} 到最后可观察浓度的平均停留时间
- [0651] F 生物利用度
- [0652] 使用针对仅对 $n = 3/$ 组记录数据的 IV 或 PO 组之一的化合物的平均剂量 - 标准化的 AUC_{all} 数据估计口服生物利用度。
- [0653] 实施例 21
- [0654] $mPEG_n$ -O- 羟可酮衍生物的 IV 和 PO 药代动力学
- [0655] 如上面实施例 20 中所述, 对 Sprague-Dawley 大鼠进行药代动力学研究。施用的化合物是 $mPEG_n$ -O- 羟可酮衍生物, 其中 $n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ 和 9, 以及母体化合物氧可酮。目的是确定通过静脉注射和口服施用的母体化合物及其各种低聚物衍生物的药代动力学
- [0656] 对于氧可酮、 $mPEG_0$ -O- 羟可酮、 $mPEG_1$ -O- 羟可酮、 $mPEG_2$ -O- 羟可酮、 $mPEG_3$ -O- 羟可酮、 $mPEG_4$ -O- 羟可酮、 $mPEG_5$ -O- 羟可酮、 $mPEG_6$ -O- 羟可酮、 $mPEG_7$ -O- 羟可酮和 $mPEG_9$ -O- 羟可酮, 在经 IV (1mg/kg) 和 PO (5mg/kg) 递送之后的血浆 PK 参数总结在下表中, 如表 4 和 5 所示。
- [0657] 基于对 IV 施用的观察数据 (表 4), $mPEG_9$ -O- 羟可酮似乎达到了较高的血浆浓度, 其中平均 $t_{1/2}$ 值为在给予母体氧可酮后观察到的相应平均 $t_{1/2}$ 值的 3 倍。
- [0658] 图 10 显示当以 1.0mg/kg 的浓度施用, 对于如上所述 IV 施用的 $mPEG_n$ -O- 羟可酮衍生物以及对于氧可酮本身的平均血浆浓度 - 时间曲线
- [0659] 基于对口服施用的观察数据 (表 5), 与母体分子氧可酮相比, $mPEG_5$ -O- 羟可酮、 $mPEG_6$ -O- 羟可酮和 $mPEG_7$ -O- 羟可酮在血浆中似乎达到较高的平均暴露 (大约 3 到 8 倍)。
- [0660] 图 11 显示当以 5.0mg/kg 的浓度对大鼠口服施用, 对于如上所述的 $mPEG_n$ -O- 羟可酮衍生物以及对于氧可酮的平均血浆浓度 - 时间曲线。
- [0661] 表 4
- [0662] 对大鼠静脉注射的 $mPEG_n$ -O- 羟可酮衍生物的比较 PK 参数 (平均值 $\pm$ SD)
- [0663]

PEG- 长度	C _{max} (ng/mL)	T _{1/2(z)} min	AUC _{all} (min.ng /mL)	AUC _{inf} (min.ng /mL)	MRT _{last} min	CL (mL/min/kg)	V _{ss} (L/kg)
0	495±56.0	47.0±3.99	12800±1090	13000±1070	37.0±1.28	77.1±6.26	3.17±0.293
1	425±41.3	47.2±6.37	9890±1320	10100±1440	38.7±4.54	100±13.4	4.31±0.222
2	513±48.8	44.6±1.80	12000±1610	12200±1650	37.0±2.60	83.3±10.8	3.36±0.298
3	746±2.08	48.5±7.83	13800±1050	14000±1010	32.5±1.92	71.7±4.99	2.62±0.206
4	537±31.0	43.6±3.27	11500±783	11600±827	35.6±2.88	86.5±6.36	3.34±0.113
5	622±39.7	62.1±3.85	16900±1800	17700±1990	46.2±1.86	57.0±6.07	3.30±0.184
6	445±83.6	62.2±5.17	12600±2370	13100±2390	47.7±1.41	77.9±14.4	4.68±0.938
7	489±26.5	87.0±3.25	14300±583	15800±728	54.3±0.372	63.3±2.99	5.31±0.139
9	955±149	143±14.3	16600±2190	21000±4230	52.7±4.04	48.9±9.41	6.35±0.349

[0664] 表 5

[0665] 对 Sprague Dawley 大鼠口服给予的 mPEG_n-O-羟可酮衍合物的比较 PK 参数 (平均值 ± SD)

[0666]

PEG- 长度	C _{max} (ng/mL)	T _{1/2(z)} min	AUC _{all} (min.ng /mL)	AUC _{inf} (min.ng /mL)	T _{max} * min	MRT _{last} min	F%
0	25.5±1.86	NC	4520 ±1660	NC	15.0	179±17.4	7.1
1	14.3±6.43	57.7*	1050±205	1150*	15.0	66.8±23.8	2.1
2	99.4±47.3	48.5±12.0	5910±2690	5830±2600	15.0	55.4±14.7	9.4
3	44.5±29.4	65.6*	3620±1910	4210*	15.0	84.7±17.0	5.3
4	55.8±4.69	70.3*	6340±1810	5280*	15.0	96.6±33.6	11.0
5	178±14.7	75.8±1.08	32800±2020	33300±2090	15.0	124±4.84	37.6
6	171±76.6	85.4±7.83	35100±10100	36200±10200	120	154±6.46	55.3
7	114±38.0	115±29.2	20400±3670	22200±2900	120	178±6.09	28.1
9	27.6±19.6	106(n=1)	7620±4510	13500 (n=1)	120	203±43.8	9.2

[0667] * : n = 2, NC : 未计算。T_{max} 记录为中值。

[0668] 作为对结果的总结,与氧可酮相比,静脉注射施用具有不同低聚 PEG- 长度 (PEG1 到 PEG9) 的 PEG 化羟可酮导致可变的血浆浓度和暴露。具有 3、5、7 和 9 链长的 PEG 显示出较高的平均暴露 (AUC), 而 PEG6 显示出相当的平均暴露 (AUC), 链长 1、2 或 4 的 PEG 显示出稍低的平均暴露 (AUC)。PEG 长度大于 5 的化合物显示出随 PEG 长度的增加而清除率较低、稳态下的分布体积较高、消除半衰期值增加的趋势。

[0669] 口服施用具有不同低聚 PEG- 长度 (PEG1 到 PEG9) 的 PEG 化羟可酮导致血浆暴露的提高, 但共价连接于 PEG1 和 PEG3 的羟可酮例外。共价连接于 mPEG6 的羟可酮的口服生物利用度最高, 为 55.3%, 接着是 mPEG5- 羟可酮和 mPEG7- 羟可酮, 分别为 37.6% 和 28.1%。消除半衰期值显示出随 PEG- 长度增加而增加的趋势。

[0670] 实施例 22

[0671] mPEG_n-O- 吗啡钆合物的 IV 和 PO 药代动力学

[0672] 如上面实施例 20 中所述对 Sprague-Dawley 大鼠进行药代动力学研究。施用的化合物为 mPEG_n-O- 吗啡钆合物, 其中 n = 1、2、3、4、5、6、7 和 9, 以及母体化合物吗啡。目的是确定静脉注射和口服施用的母体化合物及其不同低聚物钆合物的药代动力学。

[0673] 对于吗啡、mPEG₁-O- 吗啡、mPEG₂-O- 吗啡、mPEG₃-O- 吗啡、mPEG₄-O- 吗啡、mPEG₅-O- 吗啡、mPEG₆-O- 吗啡、mPEG₇-O- 吗啡、mPEG₉-O- 吗啡, 经 IV (1mg/kg) 和 PO (5mg/kg) 途径之后的血浆 PK 参数总结分别示于表 6 和表 7。

[0674] 对于静脉注射组: 图 12 显示对大鼠静脉注射施用 1.0mg/kg 后的上述 mPEG_n-O- 吗啡钆合物的平均血浆浓度 - 时间曲线。对每个动物似乎有一个与 mPEG₂-O- 吗啡的血浆曲线不一致的界外 (outlier) 数据, 将它们从 PK 分析中排除。

[0675] 基于观察到的数据 (表 6), mPEG₉-O- 吗啡似乎达到较高的血浆浓度, 其中平均 t_{1/2} 值为在给予母体吗啡后观察到的相应平均 t_{1/2} 值的 4 倍。

[0676] 表 6

[0677] 对大鼠静脉注射的 mPEG_n-O- 吗啡钆合物的比较 PK 参数

[0678]

PEG- 长度	C _{max} (ng/mL)	T _{1/2(z)} min	AUC _{all} (min.ng /mL)	AUC _{inf} (min.ng /mL)	MRT _{last} min	CL (mL/min/kg)	V _{ss} (L/kg)
0	132 ± 5.86	51.1 ± 20.8	2730±276	2760 ± 218	28.5 ± 6.79	364 ± 27.5	14.9 ± 4.0
1	483 ± 37.1	40.0 ± 2.58	11400±1230	11500 ± 1260	29.8 ± 5.05	87.8 ± 9.40	2.75 ± 0.236
2	378 ± 48.8	38.1±8.03	7510±106	7410±404	26.4±5.90	135±7.60	4.2 ± 0.270
3	483 ± 81.0	45.0 ± 2.73	12700±1950	12900 ± 1990	39.3 ± 1.69	78.5 ± 11.8	3.43 ± 0.616
4	622 ± 72.5	52.9 ± 6.50	14600±1140	15000 ± 1270	40.1 ± 0.962	67.1 ± 5.58	3.17 ± 0.168
5	514 ± 38.6	68.4 ± 0.826	13200±998	14000 ± 1050	49.7 ± 1.20	71.6 ± 5.17	4.74 ± 0.347
6	805 ± 30.6	93.7 ± 17.1	19000±1430	21600 ± 2060	56.2 ± 3.84	46.6 ± 4.67	4.39 ± 0.630
7	1110 ± 123	111 ± 32.9	18100±956	21200 ± 1990	49.6 ± 5.20	47.4 ± 4.21	4.76 ± 0.997
9	1840 ± 123	204 ± 28.3	23300±1460	29000 ± 3240	34.2 ± 2.72	34.7 ± 3.64	4.52 ± 0.473

[0679] 对于口服组, 图 13 显示在对大鼠口服施用 (5.0mg/kg) 后的上述 mPEG_n-O- 吗啡钆合物的平均血浆浓度 - 时间曲线。

[0680] 基于观察到的数据 (表 7), 与母体分子吗啡相比, mPEG₄-O- 吗啡在测试钆合物当中似乎达到最高血浆浓度。

[0681] 表 7

[0682] 对 Sprague Dawley 大鼠口服给予的 mPEG_n-O- 吗啡钆合物的比较 PK 参数 (平均值 ± SD)

[0683]

PEG- 长度	C _{max} (ng/mL)	T _{1/2(z)} min	AUC _{all} (min.ng /mL)	AUC _{inf} (min.ng /mL)	T _{max} min	MRT _{last} min	F%
0	29.8 ± 7.78	144 ± 32.1	5510 ± 667	7230 ± 897	15.0	194 ± 22.0	40.4 ^y
2	3.84*	104*	448*	778*	15.0*	60.7*	0.15
3	30.3 ± 4.42	377*	4250 ± 2140	8370*	15.0	151 ± 69.4	9.0
4	87.1 ± 53.6	191 ± 104	15600 ± 7690	18200 ± 1030 0	30.0	149 ± 26.7	22.1
5	35.6 ± 19.8	247*	9190 ± 5650	17400*	120	205 ± 26.2	13.9
6	42.8 ± 31.2	121*	8290 ± 4970	10800 *	120	177 ± 29.4	8.7
7	9.38 ± 0.883	236*	2210 ± 221	2720*	60.0	187 ± 32.0	2.4
9	7.15 ± 3.34	363*	1360 ± 311	2270*	15.0	166 ± 26.0	1.2

[0684] 对于 mPEG₁- 吗啡没有未记录的 PK 参数, 因为所有浓度 < LLOQ。*n = 2。

[0685] 总而言之, 对于 IV 数据, 与吗啡本身相比, 施用具有不同 PEG- 长度的低聚 PEG 化吗啡导致较高的血浆浓度和暴露 (AUC)。随着 PEG- 长度在 5 向上增加, 平均 AUC 存在着明确的增加趋势, 与非吻合的吗啡相比, PEG9- 吗啡化合物的平均 AUC 要高 10 倍。平均半衰期和平均停留时间也随 PEG- 长度的增加而增加。较低的平均清除率值与观察到的较高平均 AUC 值相一致。

[0686] 随着单个 PEG 的引入, 对稳态所估计的平均分布体积立即减少 5 倍, 并在 PEG- 长度 5 时达到恒定值。总的来说, PEG 化似乎增加了消除 t_{1/2} 并降低了吗啡的组织分布。

[0687] 基于口服数据, 与吗啡相比, 施用具有不同 PEG- 长度 (PEG1 到 PEG9) 的 PEG 化吗啡化合物导致口服生物利用度的减少。生物利用度的减少似乎与这些 PEG- 化合物的吸收组分而非代谢组分有关。PEG- 化合物当中, 具有 PEG- 长度 4 的化合物显示出最大的 F- 值 (22.1%), 而具有较短或较长的 PEG- 长度的化合物显示出吸收损失的明确趋势。

[0688] 在这项研究中, 吗啡 F% 值比在 7.5mg/kg 下的文献值 15% 高 3 倍 (J. Pharmacokinet. Biopharm. 1978, 6 :505-19)。这种较高暴露的原因尚不清楚。

[0689] 实施例 23

[0690] mPEG_n-O- 可待因化合物的 IV 和 PO 药代动力学

[0691] 如上面实施例 20 中所述对 Sprague-Dawley 大鼠进行药代动力学研究。施用的化合物为 mPEG_n-O- 可待因化合物, 其中 n = 1、2、3、4、5、6、7 和 9, 以及母体化合物可待因 (n = 0)。目的是确定静脉注射和口服施用的母体化合物 (即可待因) 及其各种低聚物化合物的药代动力学。

[0692] 对于可待因、mPEG₁-O- 可待因、mPEG₂-O- 可待因、mPEG₃-O- 可待因、mPEG₄-O- 可待因、mPEG₅-O- 可待因、mPEG₆-O- 可待因、mPEG₇-O- 可待因、mPEG₉-O- 可待因, 经 IV (1mg/kg) 和 PO (5mg/kg) 途径之后的血浆 PK 参数总结分别示于表 8 和表 9。

[0693] 对于 IV 组：图 14 显示在静脉注射施用后，对于母体分子可待因以及对于如上所述的 mPEG_n-O- 可待因轭合物的平均血浆 - 浓度 - 时间曲线。

[0694] 基于观察到的数据（表 8），在所测试的轭合物当中，mPEG₆-O- 可待因似乎达到了较高的血浆浓度，其中平均 $t_{1/2}$ 值为在施用母体分子可待因之后观察到的相应 $t_{1/2}$ 值的大约 2.5 倍。

[0695] 表 8

[0696] 对大鼠静脉注射施用的可待因及其低聚 PEG 轭合物的比较 PK 参数

[0697]

PEG-长 度	C _{max} (ng/mL)	T _{1/2(z)} min	AUC _{all} (min.ng /mL)	AUC _{inf} (min.ng /mL)	MRT _{last} min	CL (mL/min/kg)	V _{ss} (L/kg)
0	469 ± 20.4	42.1 ± 3.15	11000 ± 1600	11400 ± 2070	40.2 ± 9.08	89.7 ± 15.3	4.14 ± 0.700
1	723 ± 31.2	42.1 ± 4.84	15500 ± 2020	15700 ± 2130	32.2 ± 4.59	64.6 ± 8.75	2.22 ± 0.899
2	685 ± 41.0	35.3 ± 2.78	14500 ± 1590	14600 ± 1590	31.5 ± 2.96	69.0 ± 7.57	2.25 ± 0.166
3	732 ± 27.1	39.4 ± 1.49	17300 ± 1520	17400 ± 1550	33.8 ± 2.40	57.7 ± 4.89	2.07 ± 0.127
4	746 ± 70.0	57.1 ± 43.8	15200 ± 2160	15400 ± 2240	27.5 ± 4.55	65.9 ± 10.4	2.30 ± 0.720
5	533 ± 38.9	42.7 ± 3.56	11500 ± 878	11700 ± 913	31.8 ± 1.53	86.2 ± 7.04	2.95 ± 0.157
6	1780 ± 149	58.0 ± 4.79	45600 ± 2020	47100 ± 2000	41.7 ± 3.08	21.3 ± 0.876	1.08 ± 0.143
7	443 ± 43.3	74.5 ± 5.76	12700 ± 481	13700 ± 320	50.7 ± 2.07	73.1 ± 1.73	5.20 ± 0.596
9	730 ± 68.0	109 ± 1.80	17800 ± 2310	20800 ± 2840	57.2 ± 2.46	48.6 ± 6.74	5.18 ± 0.538

[0698] Tmax 记录为中值。* :n = 2。

[0699] 对于口服组，图 15 显示在对大鼠口服施用 (5.0mg/kg) 后，母体分子可待因对比 mPEG_n- 可待因轭合物的平均血浆浓度 - 时间曲线。

[0700] 基于观察到的数据（表 9），在作为母体分子可待因的测试轭合物当中，PEG-6 化合物、mPEG₆- 可待因似乎达到了最高血浆浓度（比平均 AUC_{all} 高 52 倍）。

[0701] 表 9

[0702] 对 Sprague Dawley 大鼠口服给予的可待因及各种 mPEG_n- 可待因轭合物的比较 PK 参数（平均值 ± SD）

[0703]

PEG- 长度	C _{max} (ng/mL)	T _{1/2(z)} min	AUC _{all} (min.ng /mL)	AUC _{inf} (min.ng /mL)	T _{max} min	MRT _{last} min	F%
0	6.24 ± 2.51	80.8 [#]	328 ± 216	431 [#]	15.0	33.2 ± 12.9	0.60
2	3.47 ± 0.606	97.6 ± 28.4	351 ± 195	419 ± 226	15.0	62.0 ± 27.4	0.57
3	25.0 ± 6.59	125 ± 64.6	1920 ± 245	2080 ± 498	15.0	71.0 ± 9.16	2.39
4	31.1 ± 13.1	118 ± 60.0	2530 ± 682	2670 ± 870	15.0	83.8 ± 22.5	3.47
5	48.7 ± 10.8	125 ± 63.7	5510 ± 963	5890 ± 1470	15.0	108 ± 35.4	10.1
6	617 ± 56.4	126 ± 54.1	70500 ± 12300	74500 ± 10000	15.0	119 ± 11.1	31.6
7	76.6 ± 12.8	97.6*	17100 ± 4220	16000*	120	171 ± 21.7	26.9
9	31.5 ± 8.43	143*	7320 ± 3330	6840*	15.0	179 ± 21.6	8.22

[0704] 对于 NKT-10479, 没有未记录的 PK 参数, 因为浓度为 LLOQ。

[0705] # : n = 1, * : n = 2。T_{max} 记录为中值。

[0706] 总而言之, 对于 IV 数据, 具有不同低聚 PEG- 长度 (PEG1 到 PEG9) 的可待因的 PEG 化仅略微提高了暴露 (平均 AUC), 而对 PEG-6 钆合物观察到了中等程度的提高 (大约 4 倍)。此 PEG- 钆合物的清除率和分布体积均减少了 4 倍。具有 PEG- 长度 7 和 9 的钆合物显示出较长的平均 t_{1/2} 值, 然而对于 PEG7- 和 PEG9- 可待因钆合物, 平均清除率和平均分布体积 (V_{ss}) 都减少。

[0707] 对于口服数据, 可待因的口服生物利用度非常低 (F = 0.52%)。口服的生物利用度似乎随 PEG- 长度从 2 向上增加而增加, 对于具有 PEG- 长度 6 的可待因钆合物达到最大 32% 的生物利用度, 此后减少。一般来说, 平均 t_{1/2} 和平均停留值随 PEG- 长度而增加。在所有测试化合物当中, 达到峰值浓度的时间没有差别 (T_{max} = 15 分钟), 表明吸收是迅速的, 并且吸收速度不会改变。

[0708] 实施例 24

[0709] mPEG_n-O- 阿片样钆合物对阿片样受体的体外结合

[0710] 在由异源表达克隆的人 mu、kappa 或 delta 阿片样受体的 CHO 细胞制备的细胞膜制剂中体外测定各种 PEG- 阿片样钆合物 (mPEG_n-O- 吗啡、mPEG_n-O- 可待因和 mPEG_n-O- 羟可酮) 的结合亲和力。采用闪烁亲近检测法 (SPA) 测量放射性配体置换。

[0711] 简单地说, 将测试化合物的系列稀释物置于 96- 孔板中, 向其中加入 SPA 珠、膜和放射性配体。对于每种阿片样受体亚型的检测条件如下表 10 中所述。在室温下将板温育 8 小时 - 过夜, 以 1000rpm 旋转以使 SPA 珠丸化, 并使用 TopCount® 微孔板闪烁计数器测量放射性。通过减去在过量冷配体的存在下测量的非特异性结合计算在每种测试化合物浓度下的特异性结合。通过特异性结合对比浓度曲线的非 - 线性回归获得 IC₅₀ 值, 并且用对每批膜制剂预先实验确定的 K_d 值计算 K_i 值。

[0712] 表 10

[0713] 阿片样受体结合检测的检测条件

[0714]

实验变量	MU 阿片样受体	KAPPA 阿片样受体	DELTA 阿片样受体
SPA 珠	PVT-WGA PEI Type A (GE Healthcare, Cat. # RPNQ0003)	PVT-WGA (GE Healthcare, Cat. #RPNQ0001)	PVT-WGA PEI Type B (GE Healthcare, Cat. #RPNQ0004)
放射性配体; 浓度	DAMGO, [Tyrosyl-3,5-3H(N)]- (Perkin Elmer, Cat. # NET-902); 6 nM	U-69,593, [苯基 -3,4-3H]- (Perkin Elmer, Cat. #NET-952); 10 nM	纳曲唑, [5',7'-3H]- (Perkin Elmer, Cat. #NET-1065); 3 nM
非特异性结合对照	CTAP	<i>nor</i> -Binaltorphimine (<i>nor</i> -BNI)	SNC80
Buffer	50 mM Tris-HCl, pH 7.5 5 mM MgCl ₂ ; 1 mM EDTA	50 mM Tris-HCl, pH 7.5 5 mM MgCl ₂	50 mM Tris-HCl, pH 7.5 5 mM MgCl ₂
受体及来源	在 CHO-K1 宿主细胞膜中表达的重组人 mu 阿片样受体 (Perkin Elmer, Cat. #ES-542-M)	在 Chem-1 宿主细胞膜中表达的重组人 kappa 阿片样受体 (Millipore, Cat. #HTS095M)	在 Chem-1 宿主细胞膜中表达的重组人 delta 阿片样受体 (Millipore, Cat. #HTS100M)。

[0715] 吗啡、可待因和羟可酮的低聚 PEG 轭合物的结合亲和力示于表 11。总的来说,所有的轭合物对 mu- 阿片样受体显示出可测量的结合,与母体分子的已知药理学一致。对于给定的 PEG 尺寸, mu- 阿片样结合亲和力的排序为 PEG- 吗啡 > PEG- 羟可酮 > PEG- 可待因。与非轭合母体分子相比,增加 PEG 尺寸导致所有 PEG 轭合物对 mu 阿片样受体的结合亲和力逐渐降低。然而, PEG- 吗啡轭合物仍保持有高结合亲和力,其为母体吗啡的结合亲和力的 15 倍以内。PEG- 羟可酮的 mu- 阿片样结合亲和力比 PEG- 吗啡轭合物的低 20-50 倍。可待因及其 PEG 轭合物对 mu 阿片样受体以非常低的亲和力结合。PEG- 吗啡轭合物也与 kappa 和 delta 阿片样受体结合;选择性的排序为 mu > kappa > delta。可待因和羟可酮轭合物对 delta 阿片样受体的结合亲和力显著低于对 mu- 阿片样受体的。

[0716] 表 11

[0717] PEG- 阿片样轭合物对阿片样受体的结合亲和力。

[0718]

化合物	K _i (nM)		
	Mu 阿片样受体	Kappa 阿片样受体	Delta 阿片样受体
吗啡	8.44	118.38	4,297
α -6-mPEG ₁ -O-吗啡	15.72	444.54	2,723
α -6-mPEG ₂ -O-吗啡	21.97	404.33	2,601
α -6-mPEG ₃ -O-吗啡	50.66	575.98	6,176
α -6-mPEG ₄ -O-吗啡	23.11	438.88	3,358
α -6-mPEG ₅ -O-吗啡	39.40	557.54	2,763
α -6-mPEG ₆ -O-吗啡	72.98	773.56	2,595
α -6-mPEG ₇ -O-吗啡	56.86	669.56	2,587
α -6-mPEG ₉ -O-吗啡	111.05	1253.71	5,783
氧可酮	133.48	N/A	N/A
α -6-mPEG ₁ -O-羟可酮	653.90	N/A	N/A
α -6-mPEG ₂ -O-羟可酮	631.76	N/A	N/A
α -6-mPEG ₃ -O-羟可酮	775.19	N/A	N/A
α -6-mPEG ₄ -O-羟可酮	892.70	N/A	N/A
α -6-mPEG ₅ -O-羟可酮	1862.14	N/A	N/A
α -6-mPEG ₆ -O-羟可酮	1898.30	N/A	N/A
α -6-mPEG ₇ -O-羟可酮	1607.19	N/A	N/A
α -6-mPEG ₉ -O-羟可酮	3616.60	N/A	N/A
可待因	1,953	28,067	N/A
α -6-mPEG ₁ -O-可待因	1821.51	54669.89	N/A
α -6-mPEG ₂ -O-可待因	1383.07	22603.05	N/A
α -6-mPEG ₃ -O-可待因	4260.21	36539.78	N/A
α -6-mPEG ₄ -O-可待因	2891.36	96978.61	N/A
α -6-mPEG ₅ -O-可待因	2427.13	59138.22	N/A
α -6-mPEG ₆ -O-可待因	14202.77	>160,000	N/A
α -6-mPEG ₇ -O-可待因	9963.93	108317.50	N/A
α -6-mPEG ₉ -O-可待因	9975.84	72246.23	N/A

[0719]

[0720] N/A 表示无法计算 K_i 值,因为在测试化合物的最高浓度下没有实现 50% 的结合抑

制。

[0721] 实施例 25

[0722] mPEG_n-O- 阿片样甙合物抑制 cAMP 形成的体外功效

[0723] 测量各种 PEG- 阿片样甙合物在受体活化后抑制 cAMP 形成能力的功效。在异源表达克隆的人 mu、kappa 或 delta 阿片样受体的 CHO 细胞中进行研究。利用 cAMP HiRange 同源时间分辨荧光检测 (HTRF 检测) 来测量 cAMP, 其基于竞争免疫测定原理 (Cisbio, Cat. #62AM6PEC)。

[0724] 简言之, 在含 0.5mM 异丁基-甲基黄嘌呤 (IBMX) 的缓冲液中制备表达 mu、kappa 或 delta 阿片样受体的细胞的悬浮液。在室温下用不同浓度的 PEG- 阿片样甙合物和 3 μM 毛喉素温育细胞 30 分钟。根据制造商的说明按两步的检测方案检测 cAMP, 并按以下设置测定时间分辨的荧光: 330nm 激发; 620nm 和 665nm 发射; 380nm 分色镜。将 665nm/620nm 之比例表达为 Delta F%, 并将与测试化合物相关的数据表达为在没有毛喉素的孔中的平均最大反应的百分比。由浓度对比最大反应的 S 形剂量-反应曲线图对每种化合物计算 EC₅₀ 值。为确定化合物在系统中是否表现为完全激动剂或部分激动剂, 将在化合物的最高测试浓度下的最大反应与由已知的完全激动剂产生的相比较。在全细胞中抑制 cAMP 形成的 EC₅₀ 值示于表 12。虽然效力不同, 但吗啡、可待因和羟可酮的低聚 PEG 甙合物对 mu 阿片样受体都是完全激动剂。吗啡及其甙合物在测试的三个系列阿片样物质中是最有效力的, 而 PEG 氢可酮和 PEG 可待因甙合物显示出显著较低的效力。随着 PEG 尺寸增加, 观察到 PEG- 吗啡甙合物的功效逐渐降低, 然而甙合物保持 mu- 激动剂效力在母体的 40 倍以内。与对 mu 阿片样受体的作用相反, 吗啡和 PEG- 吗啡甙合物对 kappa 阿片样受体表现为弱的部分激动剂, 产生最大可能反应的 47-87%。无法计算可待因和羟可酮甙合物对 kappa 和 delta 阿片样受体的 EC₅₀ 值, 因为在测试的浓度范围内 (高达 500 μM) 不能产生完整的剂量-反应曲线。

[0725] 总的来说, 受体结合及功能活性的结果表明 PEG- 阿片样物质是体外 mu 激动剂。

[0726] 表 12

[0727] PEG- 阿片样甙合物的体外功效

[0728]

化合物	MU 阿片样受体		KAPPA 阿片样受体		DELTA 阿片样受体
	EC ₅₀ , nM	%最大作用	EC ₅₀ , nM	%最大作用	
吗啡	28.5	102	624	69	N/A
α -6-mPEG ₁ -O-吗啡	85.0	91	1,189	81	N/A
α -6-mPEG ₂ -O-吗啡	93.3	91	641	87	N/A
α -6-mPEG ₃ -O-吗啡	270	100	4,198	82	N/A
α -6-mPEG ₄ -O-吗啡	128	100	3,092	77	N/A
α -6-mPEG ₅ -O-吗啡	157	95	2,295	71	N/A
α -6-mPEG ₆ -O-吗啡	415	98	3,933	62	N/A
α -6-mPEG ₇ -O-吗啡	508	90	4,237	57	N/A
α -6-mPEG ₉ -O-吗啡	1,061	87	4,417	47	N/A
氧可酮	478	95	N/A	N/A	N/A

[0729]

羟可酮	3,162		N/A	N/A	
α -6-mPEG ₁ -O-羟可酮	3,841	102	N/A	N/A	N/A
α -6-mPEG ₂ -O-羟可酮	5,005	101	N/A	N/A	N/A
α -6-mPEG ₃ -O-羟可酮	2,827	108	N/A	N/A	N/A
α -6-mPEG ₄ -O-羟可酮	3,715	109	N/A	N/A	N/A
α -6-mPEG ₅ -O-羟可酮	5,037	108	N/A	N/A	N/A
α -6-mPEG ₆ -O-羟可酮	12,519	102	N/A	N/A	N/A
α -6-mPEG ₇ -O-羟可酮	7,448	101	N/A	N/A	N/A
α -6-mPEG ₉ -O-羟可酮	17,948	95	N/A	N/A	N/A
可待因	10,418	81	N/A	3	N/A
α -6-mPEG ₁ -O-可待因	8,574	80	N/A	51	N/A
α -6-mPEG ₂ -O-可待因	5,145	75	40,103	59	N/A
α -6-mPEG ₃ -O-可待因	19,740	91	N/A	49	N/A
α -6-mPEG ₄ -O-可待因	22,083	99	N/A	61	N/A
α -6-mPEG ₅ -O-可待因	23,235	95	N/A	60	N/A
α -6-mPEG ₆ -O-可待因	97,381	80	N/A	21	N/A
α -6-mPEG ₇ -O-可待因	44,729	75	N/A	48	N/A
α -6-mPEG ₉ -O-可待因	48,242	80	N/A	61	N/A

[0730] 实施例 26

[0731] mmPEG_n-O- 阿片样物质的脑：血浆比例

[0732] 通过在 IV 施用之后测量大鼠的脑：血浆比例来评估低聚 mPEG-O- 吗啡、mPEG-O- 可待因和 mPEG-O- 羟可酮衍合物穿过血脑屏障 (BBB) 并进入 CNS (中枢神经系统) 的能力。

[0733] 简言之,对 3 只大鼠的组静脉 (i. v) 注射各为 5mg/kg 的吗啡、mPEG_n-O- 吗啡衍合物、可待因和 m-PEG_n-O- 可待因衍合物。按 10mg/kg i. v 施用 PEG-2, 3 和 4- 氧可酮衍合物, 并按 1mg/kg (i. v) 施用氧可酮及其它 PEG 尺寸的氧可酮衍合物。必须调节氧可酮衍合物的剂量以允许在脑组织中检出足够的浓度。使用不穿过 BBB 的阿替洛尔作为脑组织的血管污染的量度, 并以 10mg/kg 的浓度对单独的大鼠组施用。注射一小时之后, 将这些动物处死, 收集血浆和脑并立即冷冻。在取出组织和血浆之后, 利用 LC-MS/MS 测量化合物在脑和血浆中的浓度。将脑：血浆比例计算为在脑和血浆中测得的浓度的比例。结果示于图 16A-C。

[0734] 图 16A、16B 和 16C 分别显示各种低聚 mPEG_n-O- 吗啡、mPEG_n-O- 可待因和 PEG_n-O- 羟可酮衍合物的脑：血浆比例。在各图中示出了阿替洛尔的脑：血浆比例以提供比较的基础。与相应非衍合的母体分子 (在羟可酮的情况下为氧可酮) 相比, PEG- 衍合导致所有衍合物的脑：血浆比例的减少。只有 PEG-1- 吗啡显示出比其母体吗啡大的脑：血浆比例。

[0735] 实施例 27

[0736] 各种示例性 mPEG_n-O- 阿片样碱合物的脑和血浆浓度的时间 - 进程

[0737] 进行实验以确定在 IV 施用之后随时间的推移, 各种低聚 PEG- 阿片样碱合物在脑和血浆中的浓度。

[0738] 实验方法和所使用的浓度与用于实施例 26 中所述的单时间点实验的相同, 然而, 在各个不同的时间点收获脑和血浆。

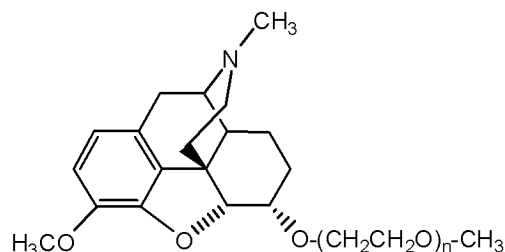
[0739] 按 10mg/kg iv 施用所有的 PEG- 羟可酮碱合物, 而按 1mg/kg iv 施用氧可酮母体。对于所施用的各种 PEG- 阿片样碱合物, 脑和血浆浓度随时间变化的数据示于图 17A-H(吗啡系列)、图 18A-H(可待因系列) 和图 19A-H(氧可酮同 / 羟可酮同系列)。

[0740] 数据表明, 对于所有的母体分子和低聚 PEG- 碱合物, 脑浓度的最大增加发生在最早的时间点, 即 iv 注射后 10 分钟。PEG 碱合导致脑浓度的显著减少, 而对于较大的 PEG 碱合物 (≥ PEG-4), 脑浓度保持相对较低并且随时间稳定。

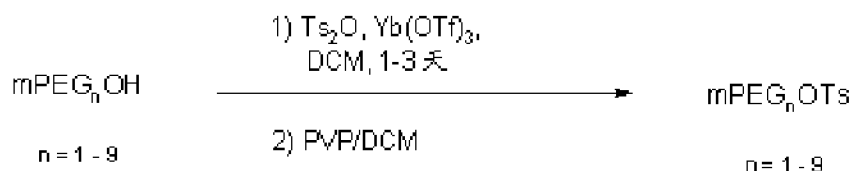
[0741] 实施例 28

[0742] 制备 mPEG_n-O- 氢可醇 (Hydrocodonol) 碱合物

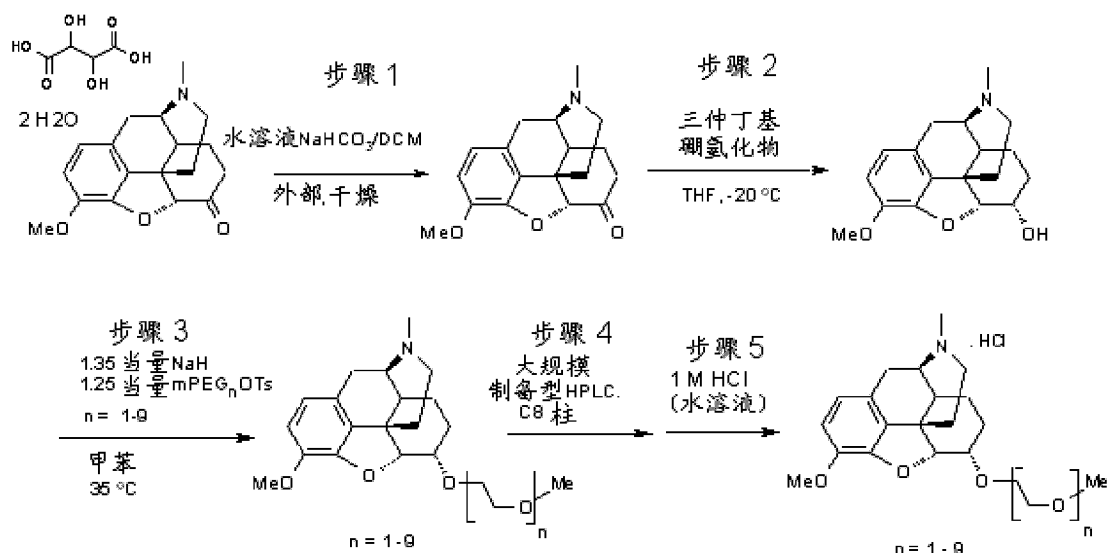
[0743]

[0744] 制备 mPEG_n-OTs (mPEG_n- 甲苯磺酸酯) (n = 1-9)

[0745]

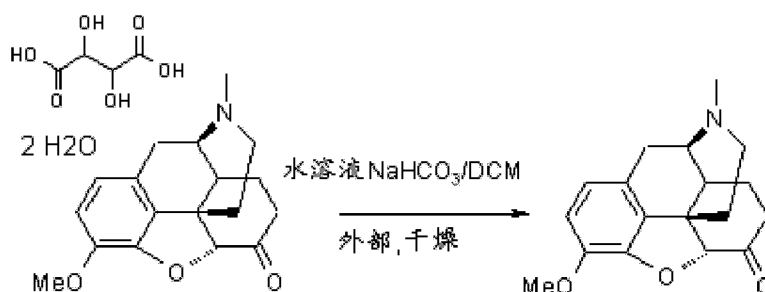
[0746] 将可在高真空中干燥 (还在少量添加的庚烷或甲苯蒸发之后) 的 m-PEG_n-OH 溶解于 DCM 中。加入甲苯磺酸酐 (Ts₂O, 1.05 当量) 和三氟甲磺酸铯 (III) (Yb(OTf)₃, 0.02 当量) 并将反应物搅拌过夜 (反应速度的范围从快到 1 天至 5 天到 mPEG_nOH 被完全消耗)。一旦 mPEG_nOH 被耗尽, 加入带有额外 DCM 的 2-3 当量的聚乙烯基吡啶以保持搅拌。在 ≥ 24 小时之后, 将 PVP 滤出并且在全真空之后将滤液蒸发以产生 ~ 95-100% 的收率。[0747] 合成制备 α-6-mPEG_n-O- 氢可醇碱合物[0748] 按照下面提供的示意过程制备 α-6-mPEG_n-O- 氢可醇 (其中将基本上相同的方法用于 n = 1-9 中的每一个)

[0749]



[0750] 制备氢可酮游离碱

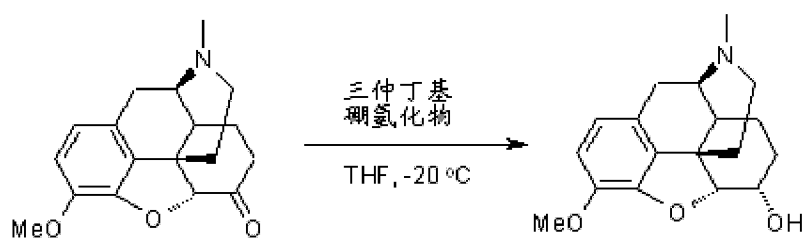
[0751]



[0752] 将重酒石酸氢可酮盐溶于水中。将 2 当量的固体 NaHCO_3 加入其中。氢可酮沉淀并加入二氯甲烷。将该两相溶液搅拌 20 分钟。然后分离各层并用二氯甲烷萃取底部的水层两次。将有机层经 MgSO_4 干燥并蒸发以产生为白色粉末的氢可酮游离碱。分离的收率通常为 95+%

[0753] 制备 6-氢可醇游离碱

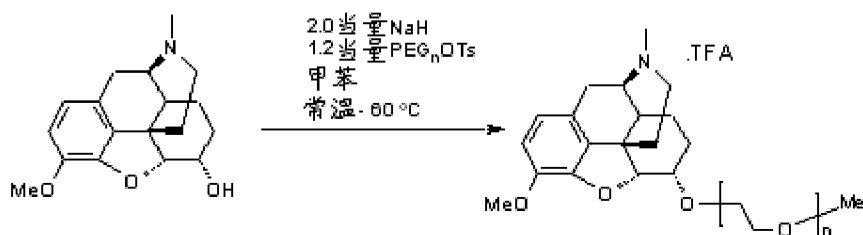
[0754]



[0755] 将氢可酮溶于 THF 并冷却至 -20°C 。将 K-Selectride 在 THF 中的 1M 溶液经大约 1 小时滴加至搅拌溶液中。当反应完成时,用 5 当量的 1M HCl 淬灭并且在真空中除去 THF。将溶液用乙酸乙酯萃取三次。将有机层弃去,并用 K_2CO_3 将酸层碱化且用氯仿萃取三次。将有机层蒸发以得到为固体的 6-氢可醇。分离的收率通常为 95+%。实验质量 = 301.4M+H = 302.5, 保留时间 = 0.79 分钟。

[0756] 制备 6-氢可醇用 $\text{mPEG}_n\text{-OTs}$ 烷基化

[0757]



[0758] 将氢可醇溶于最少量的无水甲苯中（可能需升温及声处理）。在具有良好的搅拌下往室温的溶液中分批加入 2 当量 NaH（在矿物油中的 60% 分散液）。将混合物在室温下搅拌 10 分钟，并然后经五分钟加入在甲苯中含有 1.3 当量 mPEG_n-OTs 的溶液。在室温下 15 分钟后，将混合物在 60°C 油浴中加热过夜。LC-MS 分析显示起始物完全耗尽。通过将混合物倒进水中来淬灭并在真空中除去甲苯。用 CHCl₃ 萃取含水的残余物且弃去水层。将合并的有机层用 1/2 饱和 NaHCO₃ 洗涤且用 1M HCl（水溶液）萃取（同时剧烈摇动）。将合并的水层用 CHCl₃ 洗涤并且在真空中浓缩以提供为深琥珀色油状物的粗产物。

[0759] 通过反相 HPLC 纯化残余物，使用 C8 柱。纯化后的收率通常为 25-50%，如表 13 所示。

[0760] 表 13

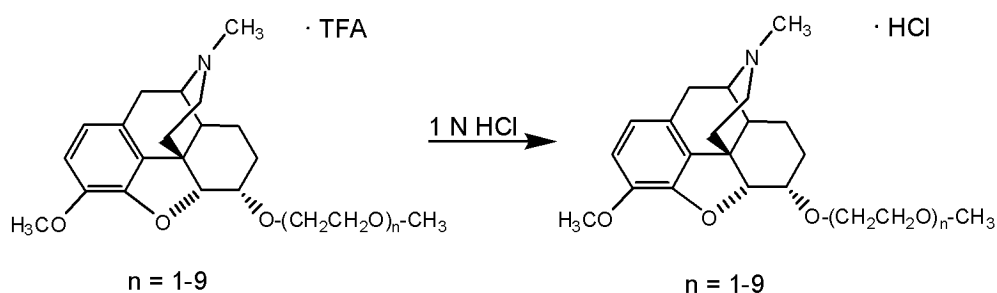
[0761] 示例性 α-6-mPEG_n-O- 氢可醇化合物的收率

[0762]

化合物	使用的氢可醇的总量(g, 所有批次)	使用的氢可醇的总量(mmol, 所有批次)	作为 HCl 盐得到的产物(g)	产量 (mmol)	收率 (%)
α-6-mPEG ₁ -O-氢可醇	24.5	81.3	301.4	26.3	32.4%
α-6-mPEG ₂ -O-氢可醇	28	92.9	301.4	25.7	27.7%
α-6-mPEG ₃ -O-氢可醇	18	59.7	301.4	22.8	38.2%
α-6-mPEG ₄ -O-氢可醇	18	59.7	301.4	20.9	35.0%
α-6-mPEG ₅ -O-氢可醇	18	59.7	301.4	18.8	31.4%
α-6-mPEG ₆ -O-氢可醇	12	39.8	301.4	18.4	46.2%
α-6-mPEG ₇ -O-氢可醇	18	59.7	301.4	24.0	40.2%
α-6-mPEG ₈ -O-氢可醇	26.4	87.6	301.4	16.0	18.3%
α-6-mPEG ₉ -O-氢可醇	17.24	57.2	301.4	8.4	14.7%

[0763] 转化成 α-6-mPEG_n-O- 氢可醇盐酸盐 (n = 1-9)

[0764]



[0765] 将 HPLC 纯化的 mPEG_n-氢可醇 TFA 盐溶于 1M HCl (水溶液) 中且在真空中浓缩。将残余物再次溶于 1M HCl (水溶液) 中且在真空中浓缩。将残余物与乙腈共沸三次以提供为浅琥珀色玻璃状物的 mPEG_n-氢可醇 HCl 盐

[0766] 将所得的材料通过 C18 柱 (Phenomenex Kinetics 50x3.0) 纯化, 其中柱温为 40°C, 流速为 1.5mL/ 分钟, 流动相 A 为 0.1% TFA/ 水且流动相 B 为 0.1% TFA/ACN, 并且经四分钟梯度液流动 5% B 到 100% B, 在 100% B 停留一分钟, 然后经一分钟平衡至 5% B。表 14 中提供了纯化的结果。

[0767] 表 14

[0768] 示例性 α -6-mPEG_n-O-氢可醇化合物的收率

[0769]

化合物	MW	M+H	保留时间 (分钟)
α -6-mPEG ₁ -O-氢可醇	359.5	360.5	1.17
α -6-mPEG ₂ -O-氢可醇	403.5	404.5	1.00
α -6-mPEG ₃ -O-氢可醇	447.6	448.0	1.06
α -6-mPEG ₄ -O-氢可醇	491.6	492.5	1.10
α -6-mPEG ₅ -O-氢可醇	535.7	536.5	1.16
α -6-mPEG ₆ -O-氢可醇	579.7	580.5	1.19
α -6-mPEG ₇ -O-氢可醇	623.8	624.5	1.22
α -6-mPEG ₈ -O-氢可醇	667.8	668.5	1.19
α -6-mPEG ₉ -O-氢可醇	711.9	713.0	1.25

[0770] 利用常规的体外 μ 阿片样受体亲和力检测来测定对于每一 α -6-mPEG_n-O-氢可醇化合物的 IC₅₀ 值。表 15 中提供了结果。

[0771] 表 15

[0772] 对示例性 α -6-mPEG_n-O-氢可醇化合物的受体结合数据

[0773]

化合物	运行 1 IC50	运行 2 IC50	运行 3 IC50	平均 IC50	STDEV	对比氢可酮 的倍数变化
氢可酮 (+)-重酒石酸盐	5.33E-08	5.41E-08	8.36E-08	6.37E-08	1.73E-08	1.00
α -6-氢可醇	5.53E-07	2.61E-07	6.19E-07	4.78E-07	1.91E-07	7.50 ↓
α -6-mPEG ₁ -O-氢可醇	3.43E-07	1.66E-07	6.42E-07	3.84E-07	2.41E-07	6.03 ↓
α -6-mPEG ₂ -O-氢可醇	2.55E-07	3.43E-07	5.19E-07	3.72E-07	1.34E-07	5.84 ↓
α -6-mPEG ₃ -O-氢可醇	2.53E-07	3.46E-07	5.22E-07	3.74E-07	1.37E-07	5.87 ↓
α -6-mPEG ₄ -O-氢可醇	1.37E-07	5.53E-07	6.74E-07	4.54E-07	2.82E-07	7.14 ↓
α -6-mPEG ₅ -O-氢可醇	3.18E-07	3.51E-07	5.16E-07	3.95E-07	1.06E-07	6.20 ↓
α -6-mPEG ₆ -O-氢可醇	9.20E-07	4.29E-07	7.75E-07	7.08E-07	2.52E-07	11.12 ↓
α -6-mPEG ₇ -O-氢可醇	2.52E-06	6.86E-07	1.82E-06	1.68E-06	9.25E-07	26.32 ↓
α -6-mPEG ₈ -O-氢可醇	5.05E-06	1.04E-06	1.57E-06	2.55E-06	2.18E-06	40.10 ↓
α -6-mPEG ₉ -O-氢可醇	1.35E-06	3.74E-07	1.39E-06	1.04E-06	5.75E-07	16.30 ↓

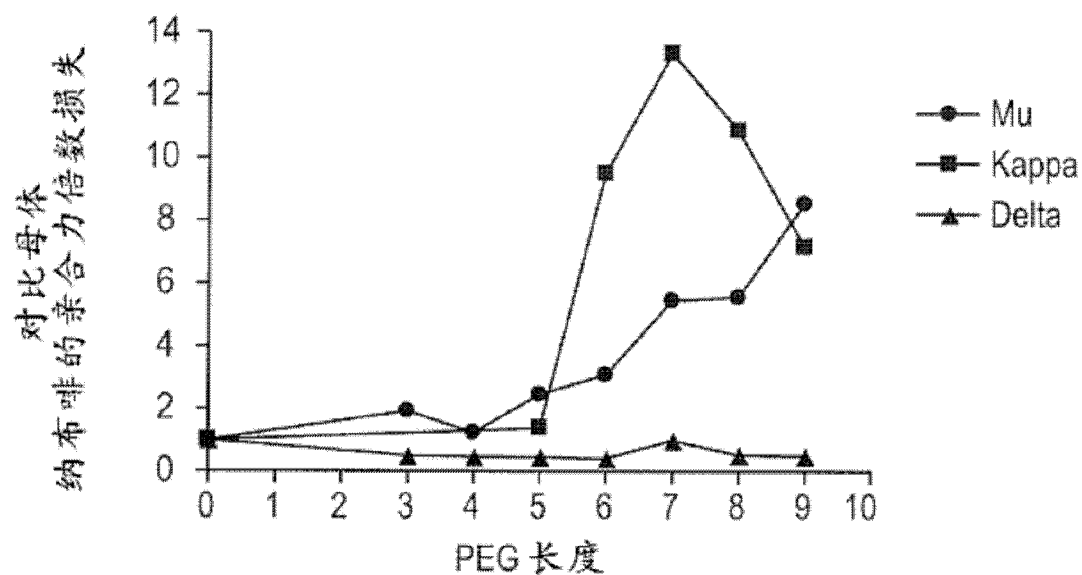


图 1

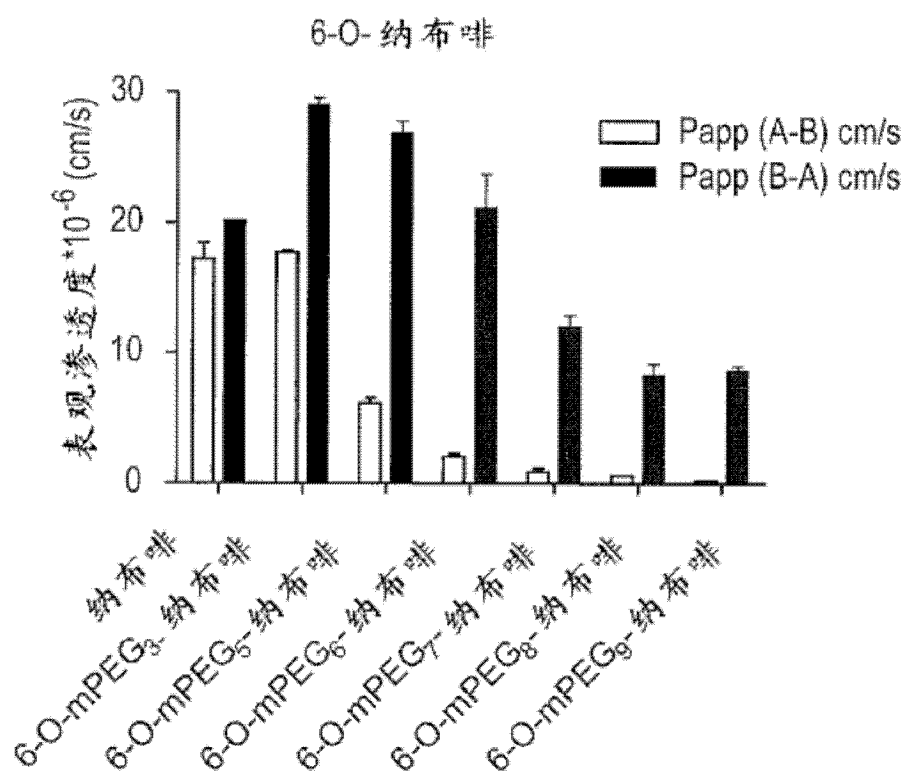


图 2a

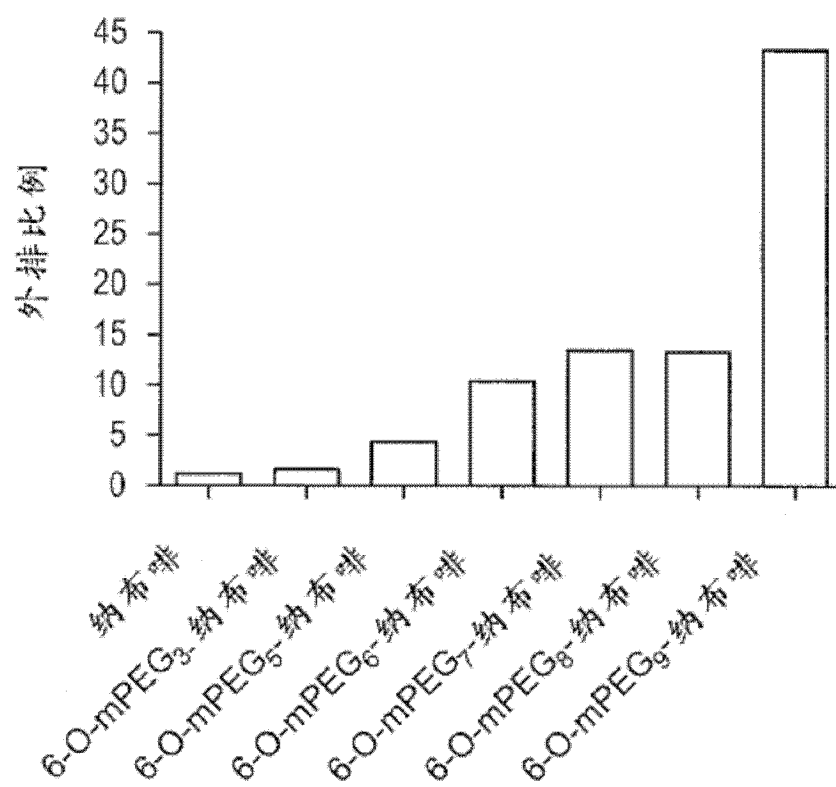


图 2b

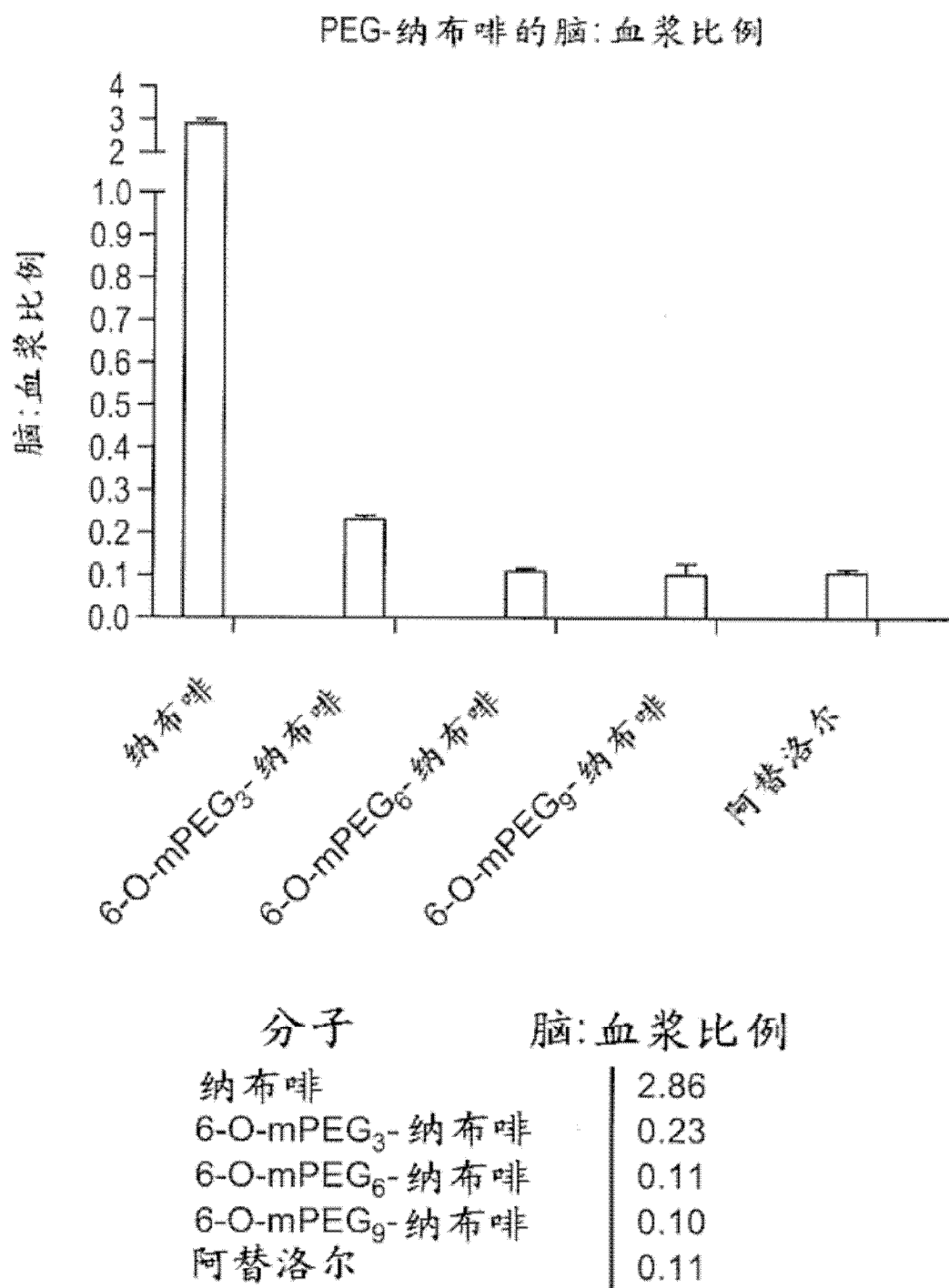


图 3

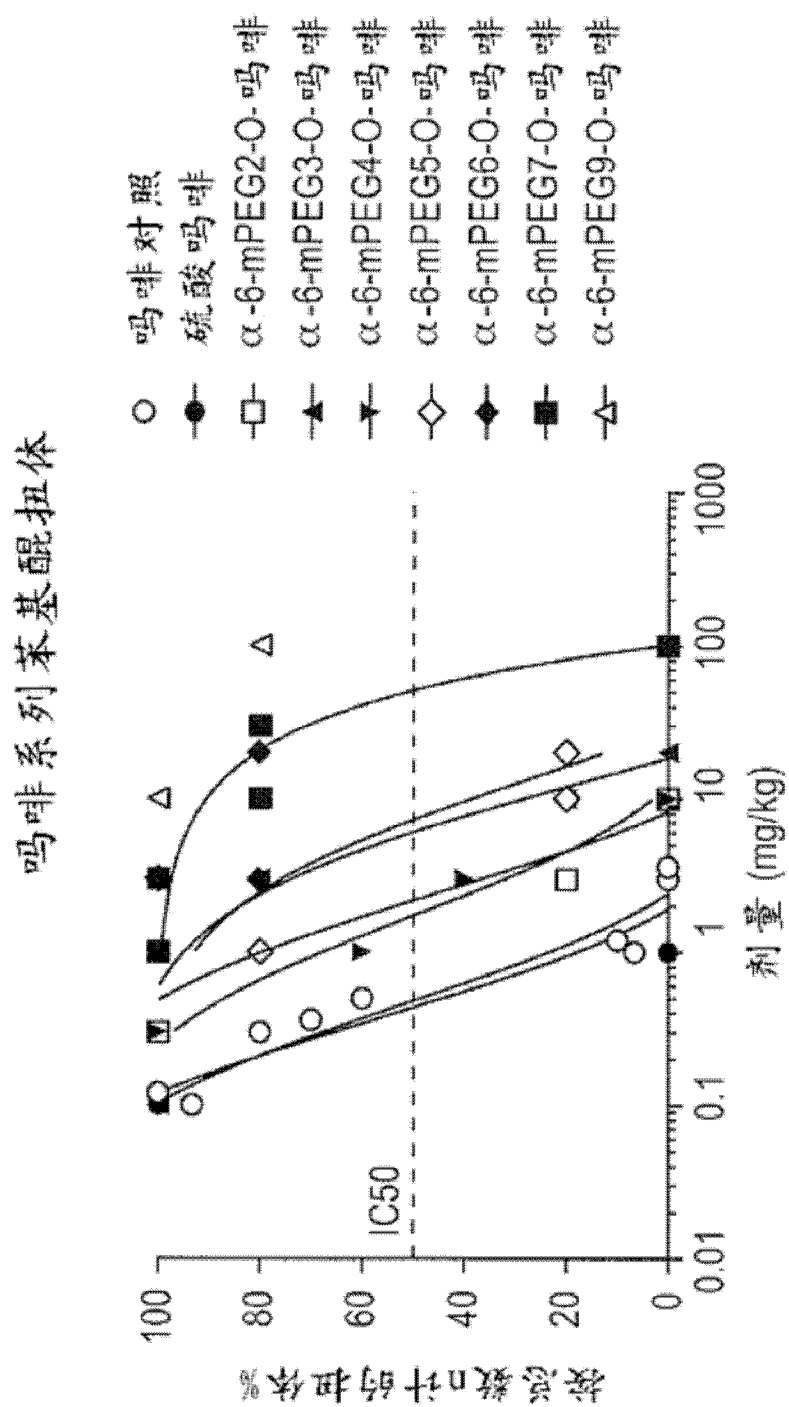


图 4

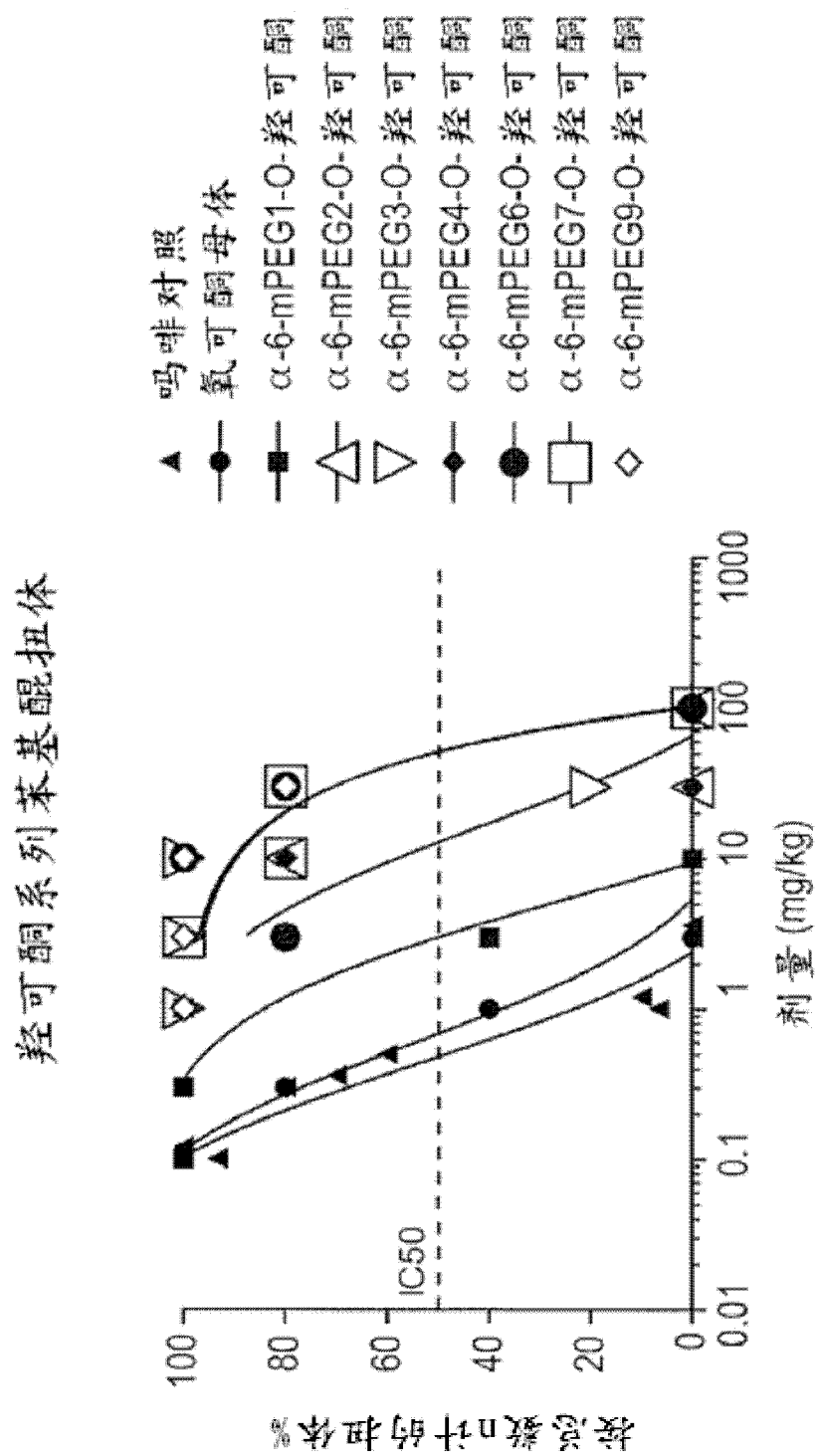


图 5

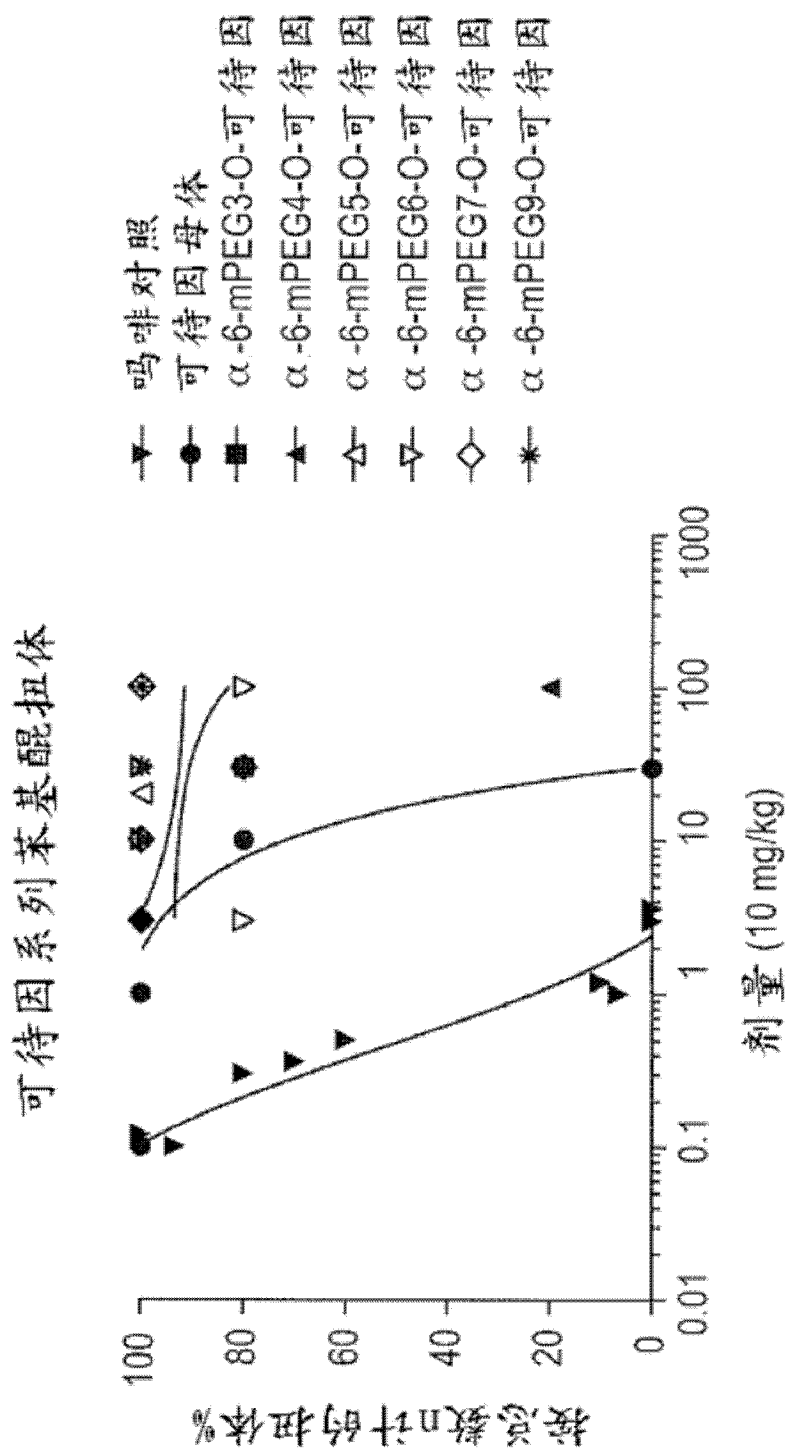


图 6

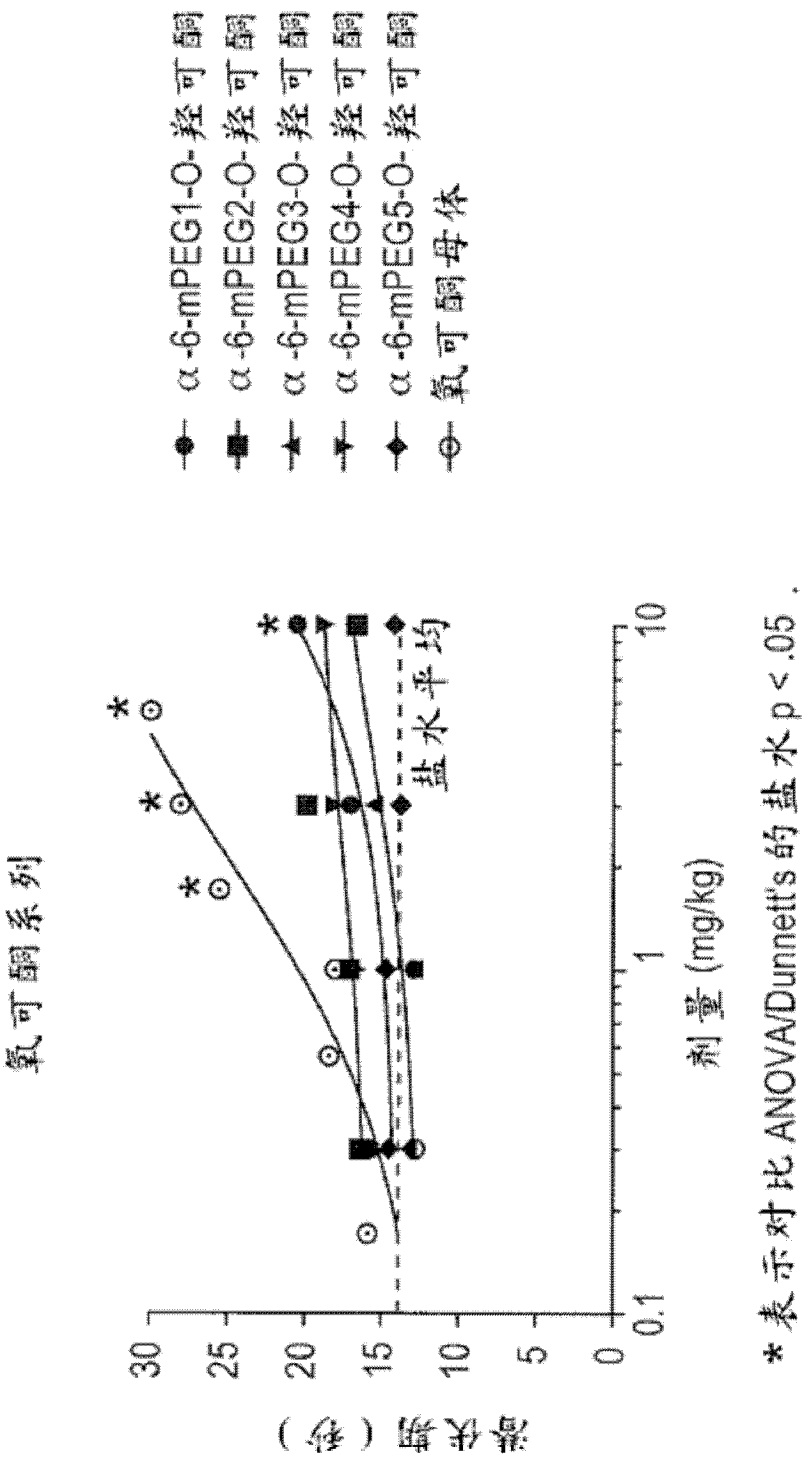


图 7

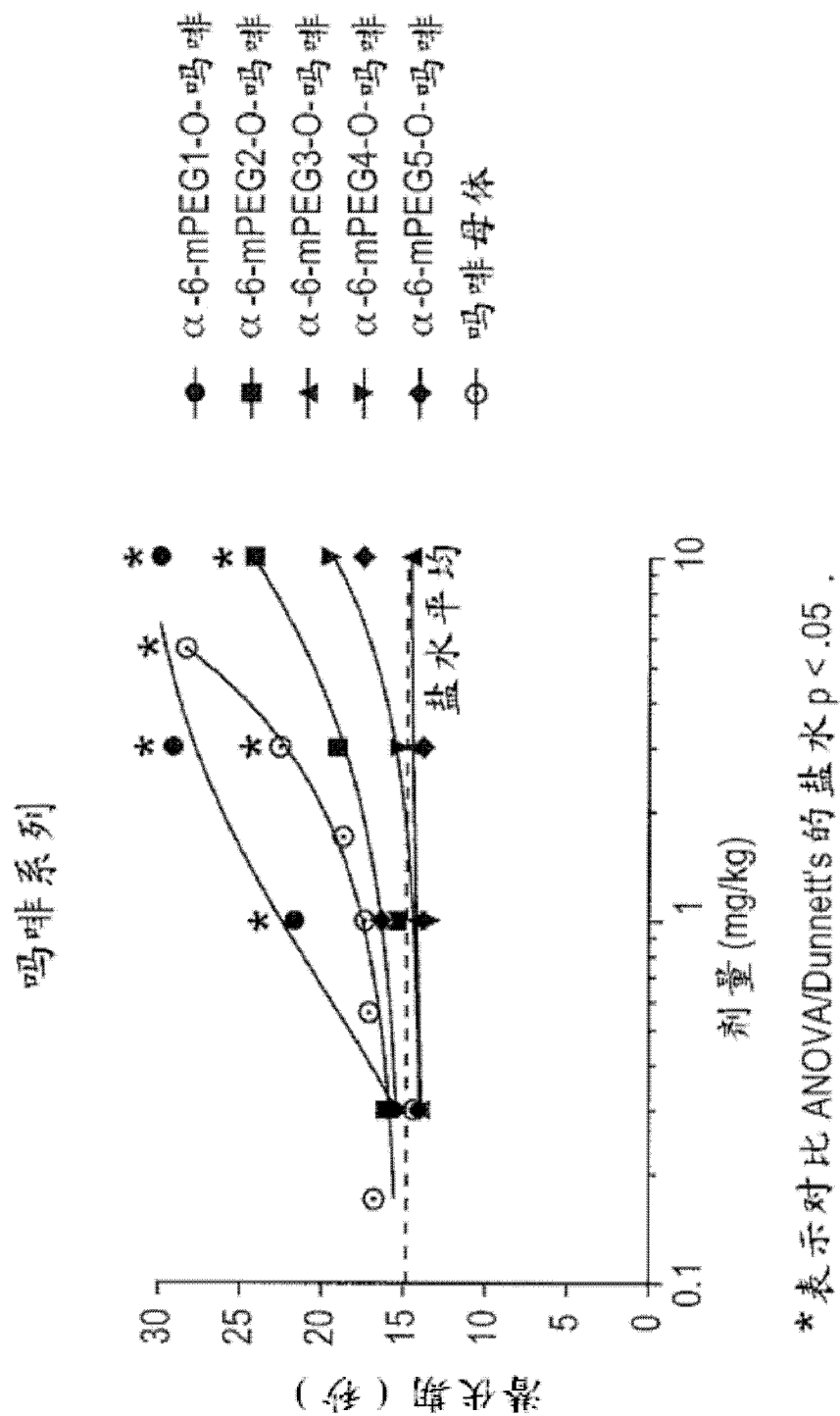


图 8

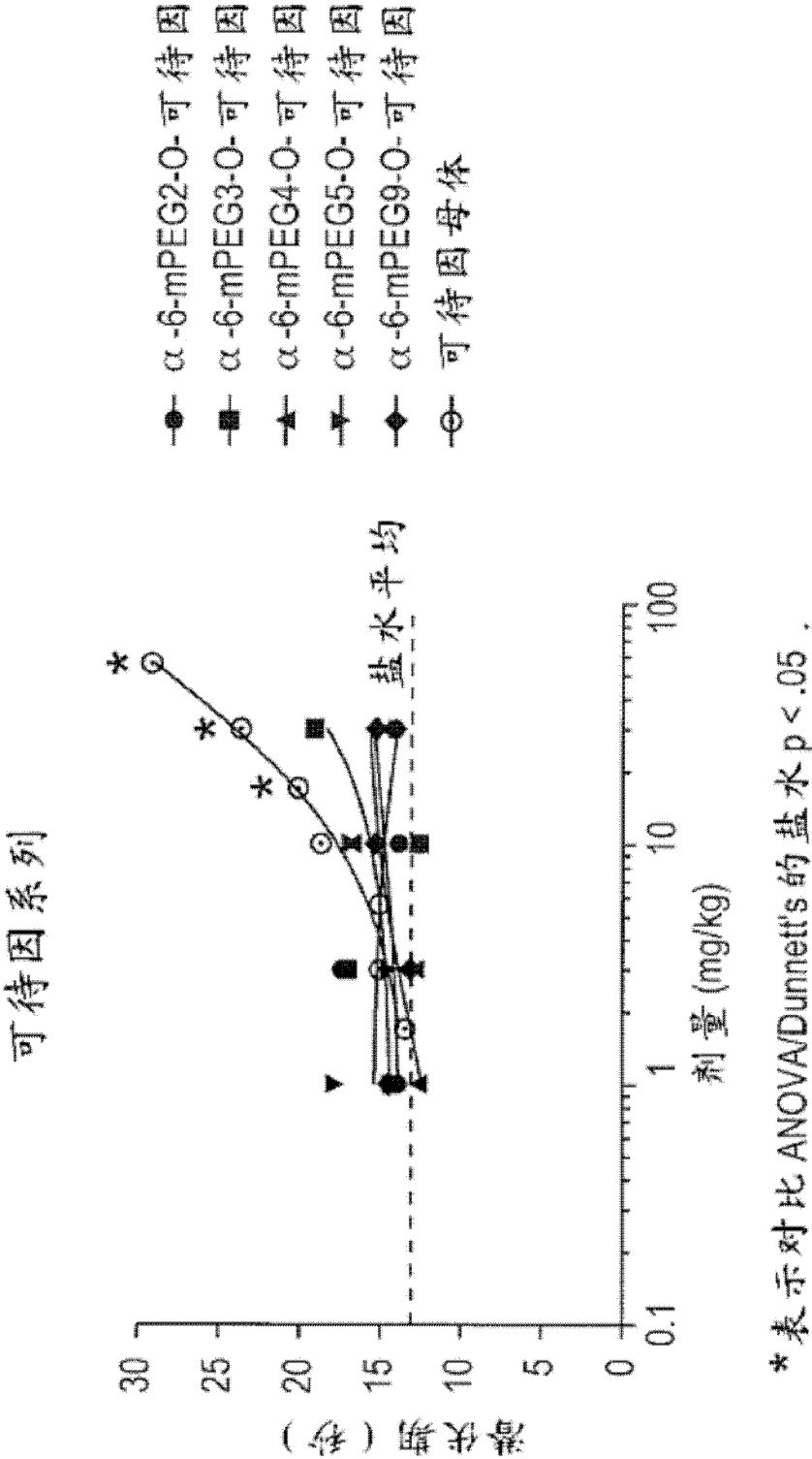


图 9

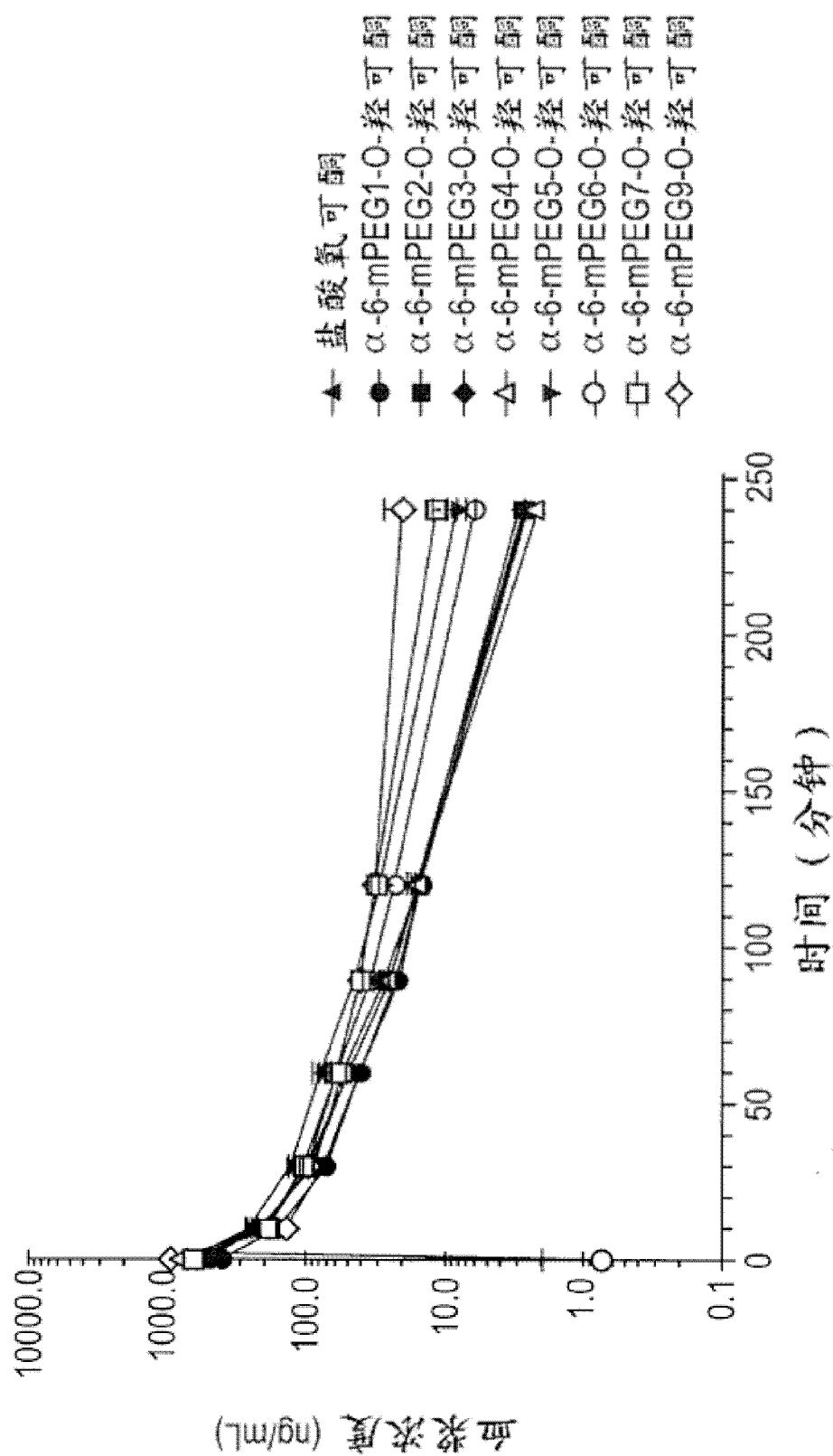


图 10

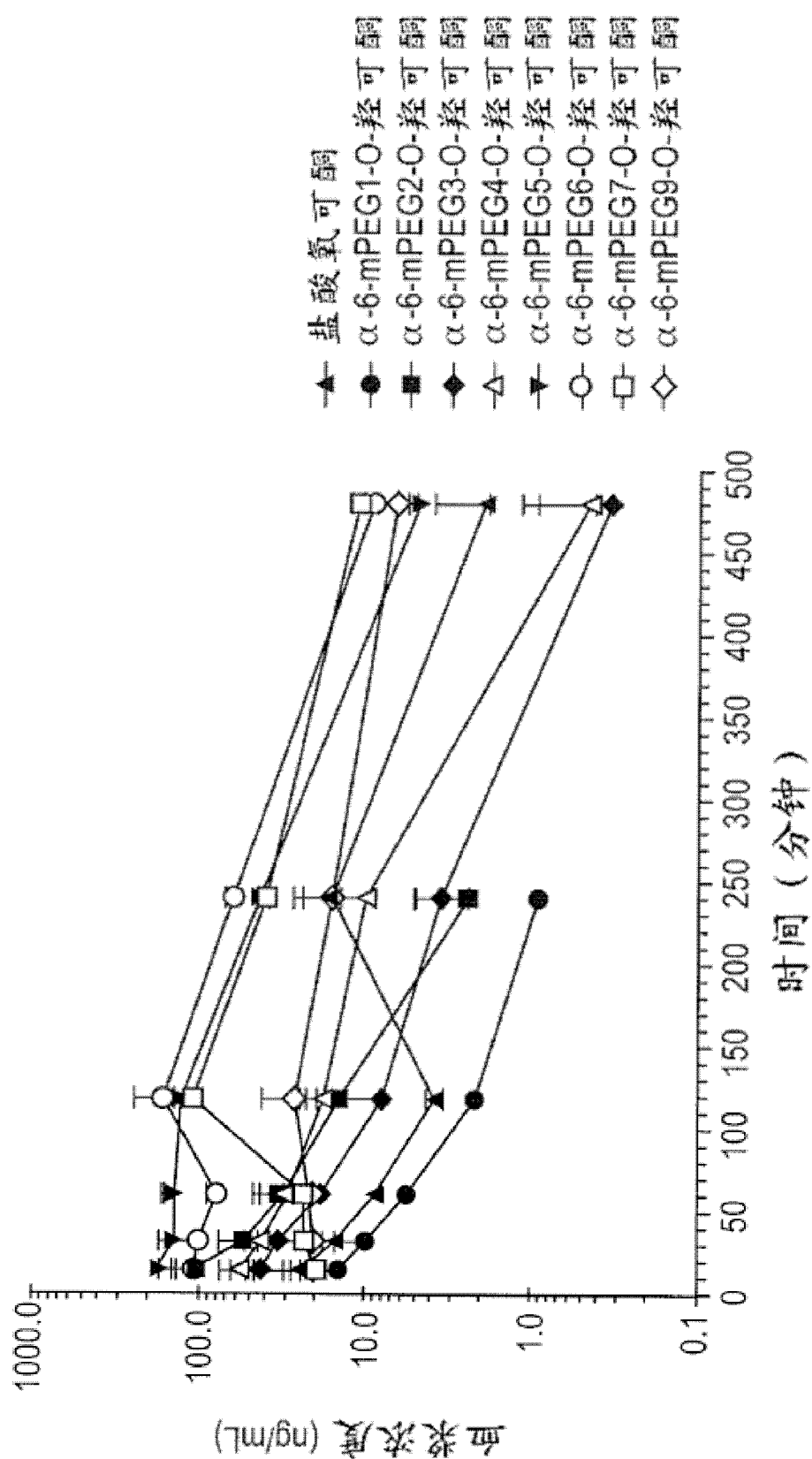


图 11

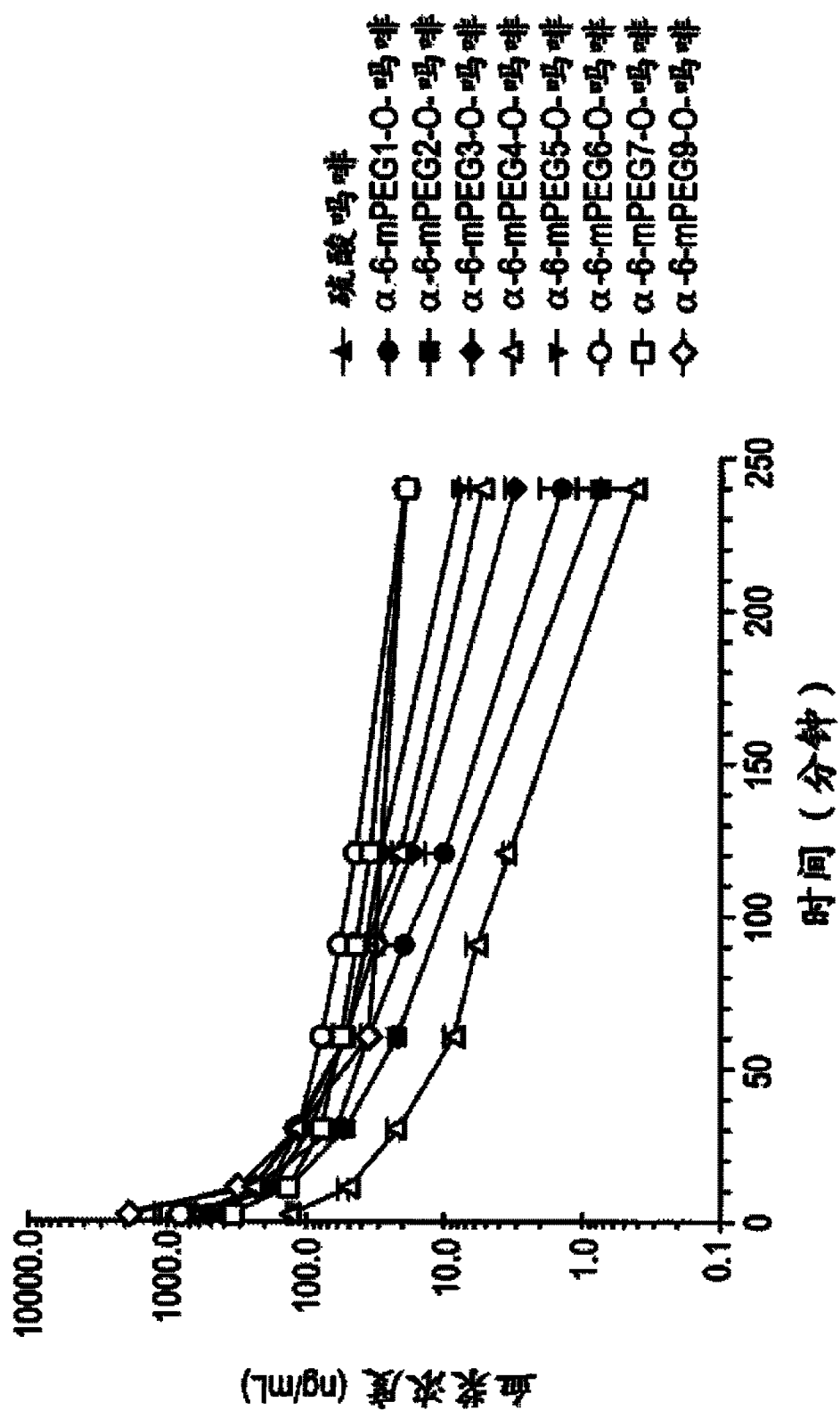


图 12

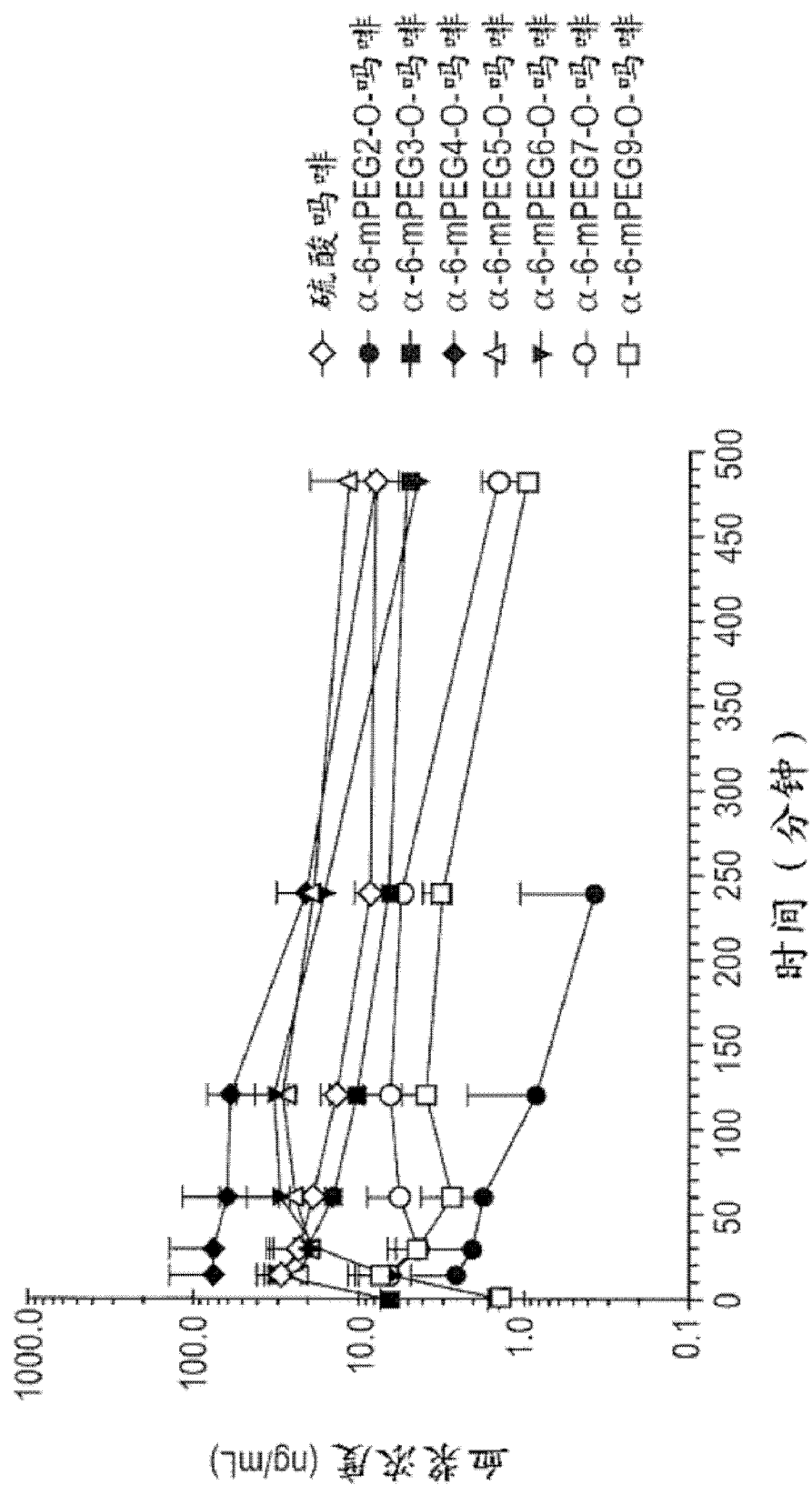


图 13

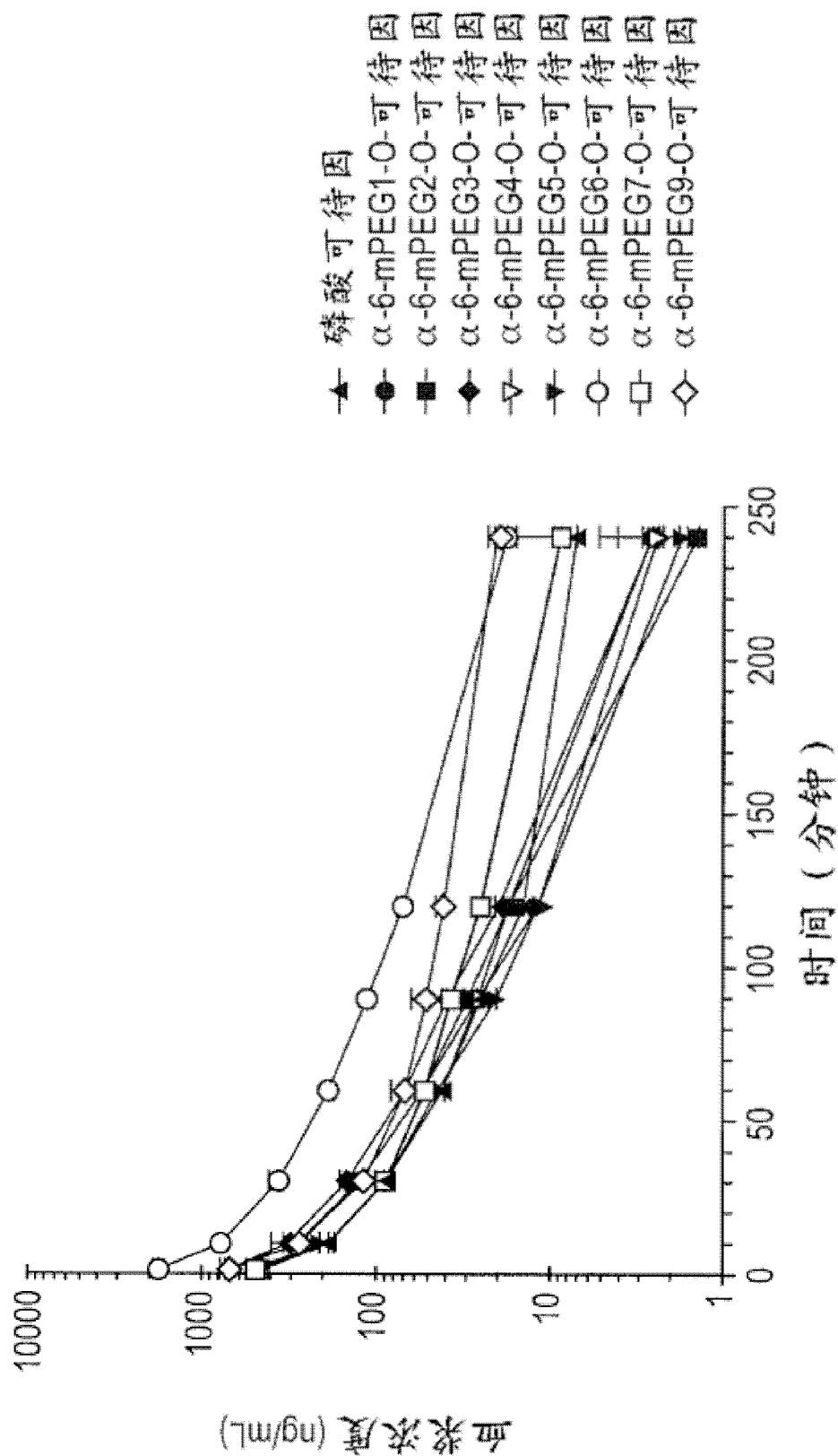


图 14

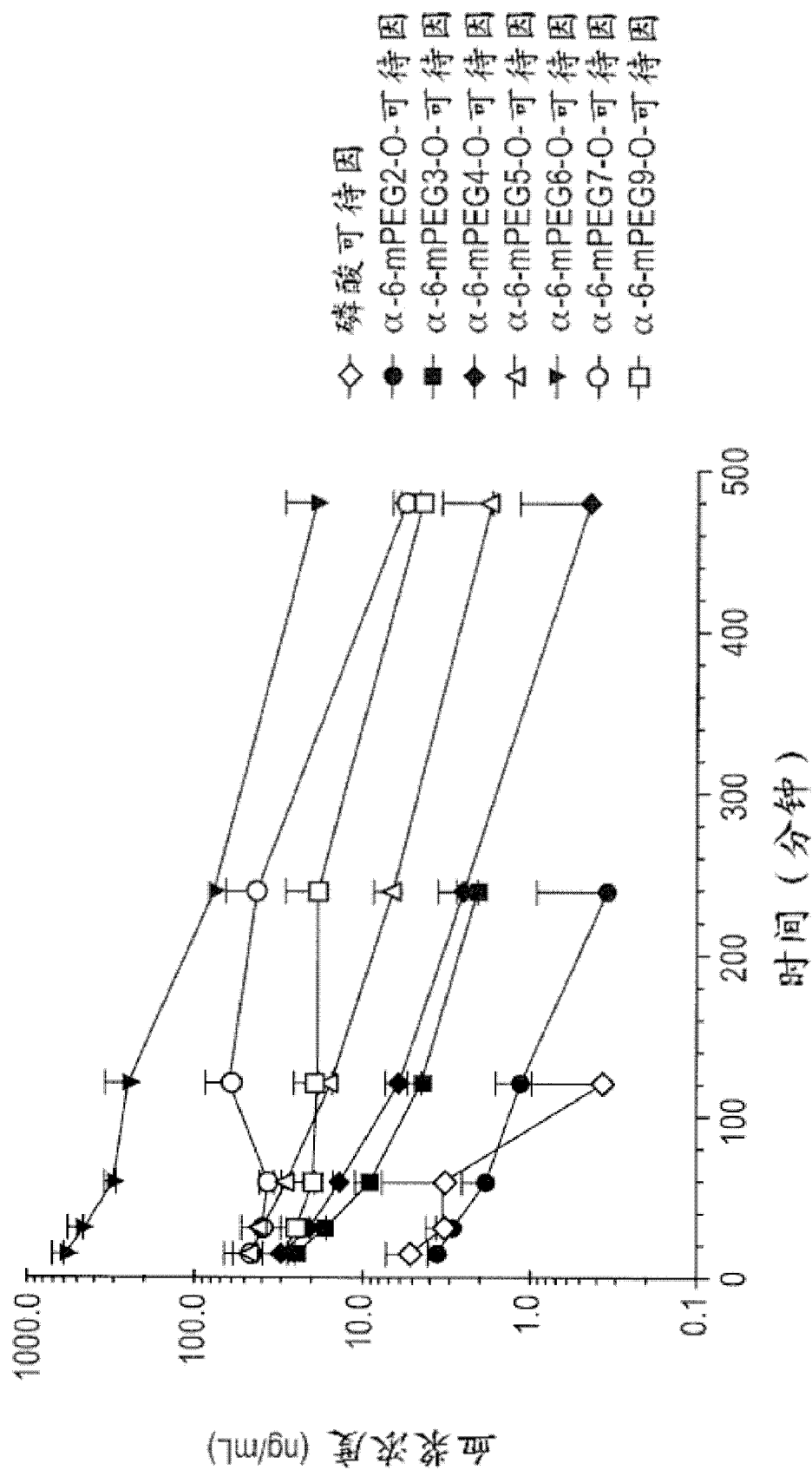


图 15

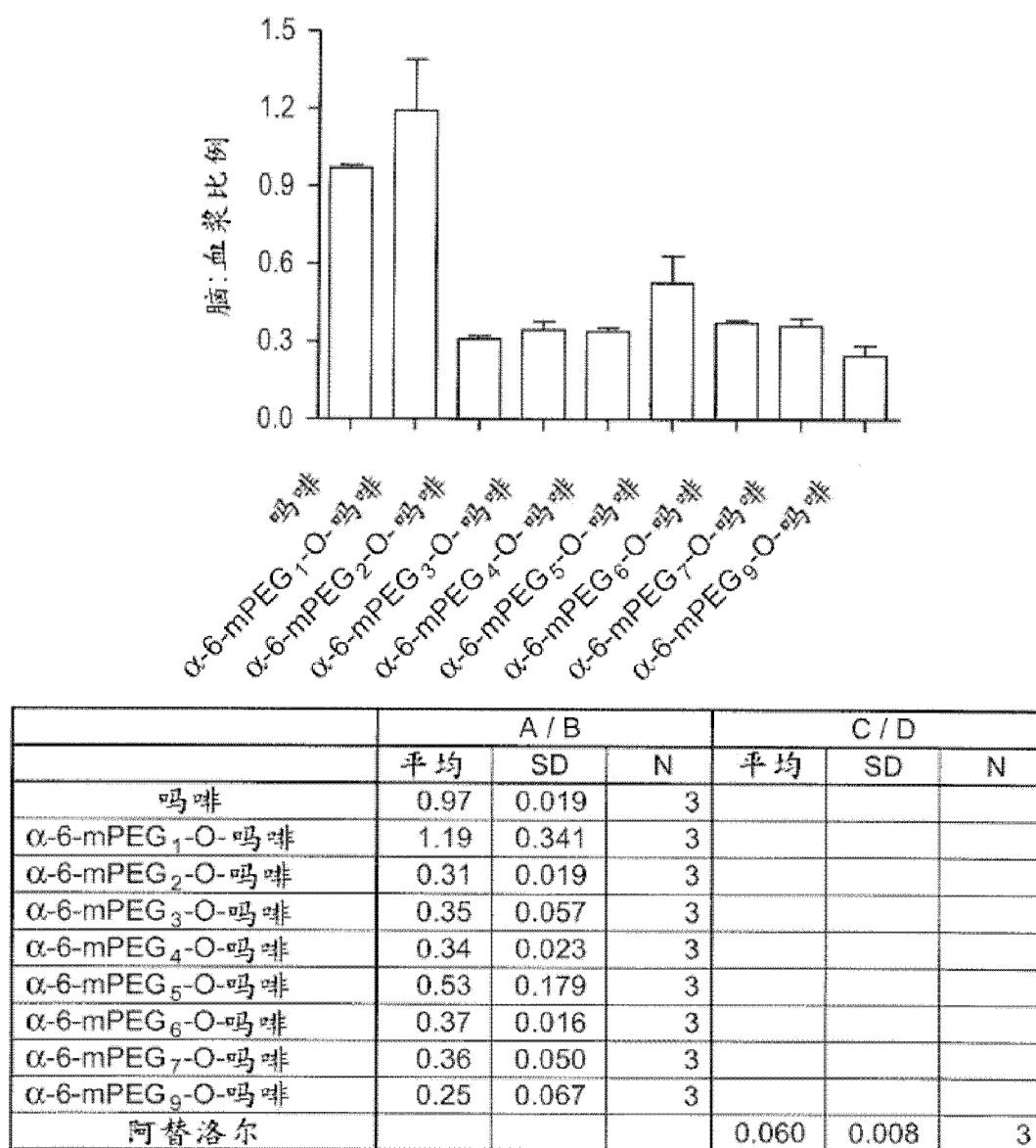
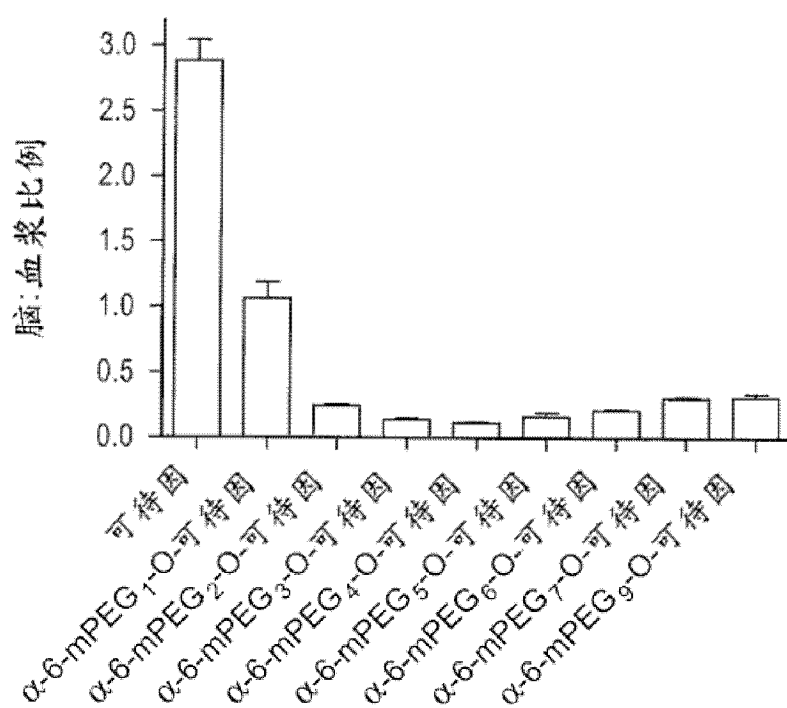
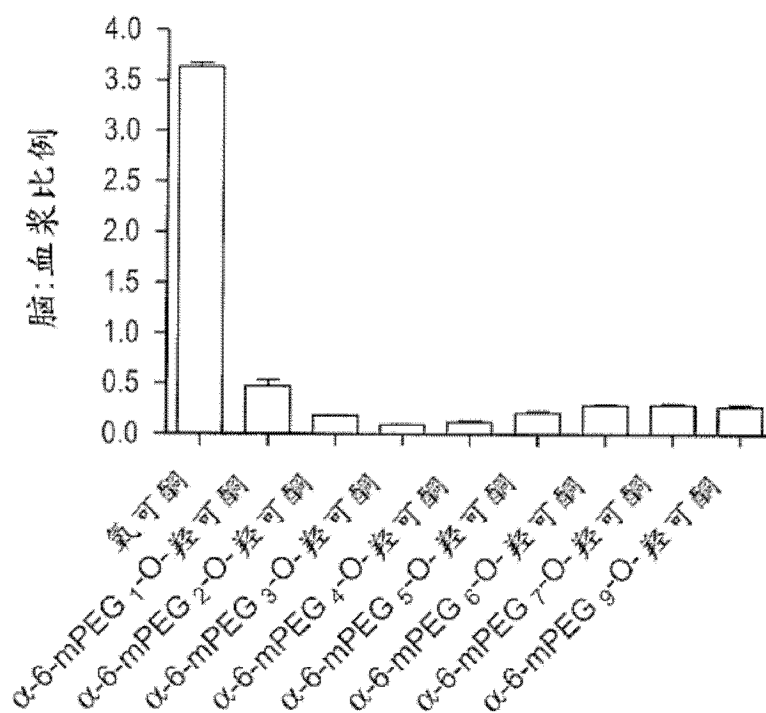


图 16A



分子	脑:血浆比例					
	A / B			C / D		
	平均	SD	N	平均	SD	N
可待因	2.88	0.276	3			
α -6-mPEG ₁ -O-可待因	1.06	0.214	3			
α -6-mPEG ₂ -O-可待因	0.24	0.014	3			
α -6-mPEG ₃ -O-可待因	0.14	0.011	3			
α -6-mPEG ₄ -O-可待因	0.12	0.009	3			
α -6-mPEG ₅ -O-可待因	0.16	0.049	3			
α -6-mPEG ₆ -O-可待因	0.21	0.006	3			
α -6-mPEG ₇ -O-可待因	0.30	0.017	3			
α -6-mPEG ₉ -O-可待因	0.31	0.047	3			
阿替洛尔				0.060	0.013	3

图 16B



分子	脑:血浆比例			C / D		
	平均	SD	N	平均	SD	N
氧可酮	3.63	0.073	3			
α-6-mPEG ₁ -O-羟可酮	0.47	0.108	3			
α-6-mPEG ₂ -O-羟可酮	0.18	0.008	3			
α-6-mPEG ₃ -O-羟可酮	0.10	0.006	3			
α-6-mPEG ₄ -O-羟可酮	0.12	0.028	3			
α-6-mPEG ₅ -O-羟可酮	0.21	0.029	3			
α-6-mPEG ₆ -O-羟可酮	0.29	0.026	3			
α-6-mPEG ₇ -O-羟可酮	0.29	0.020	3			
α-6-mPEG ₉ -O-羟可酮	0.27	0.039	3			
阿替洛尔				0.059	0.015	3

图 16C

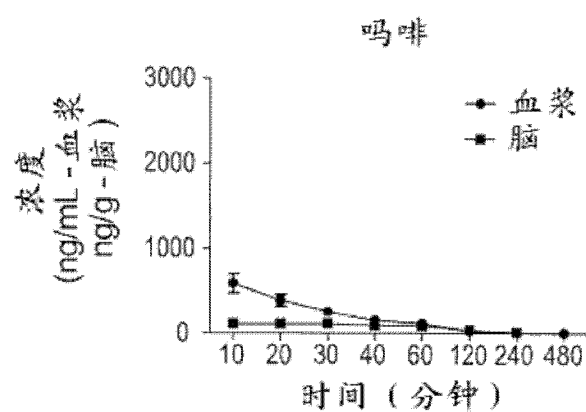


图 17A

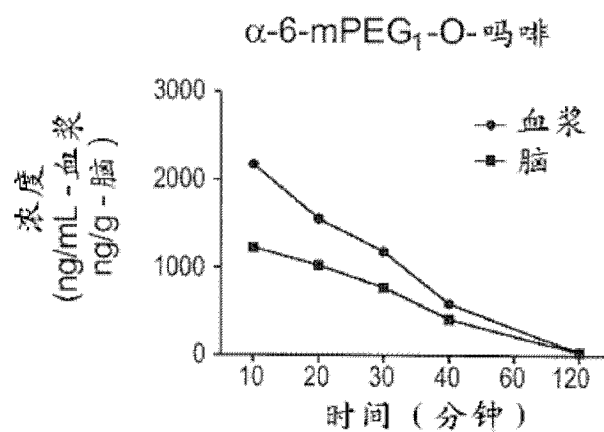


图 17B

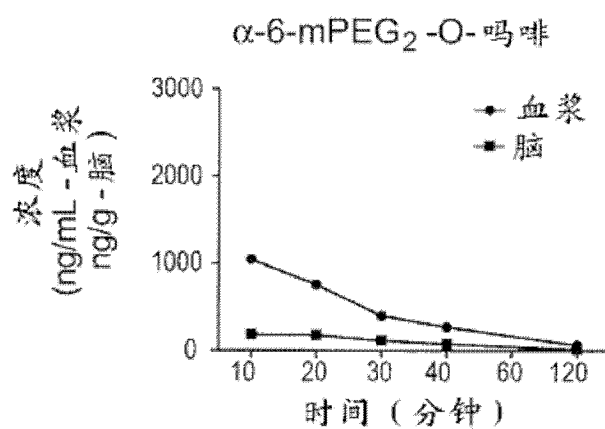


图 17C

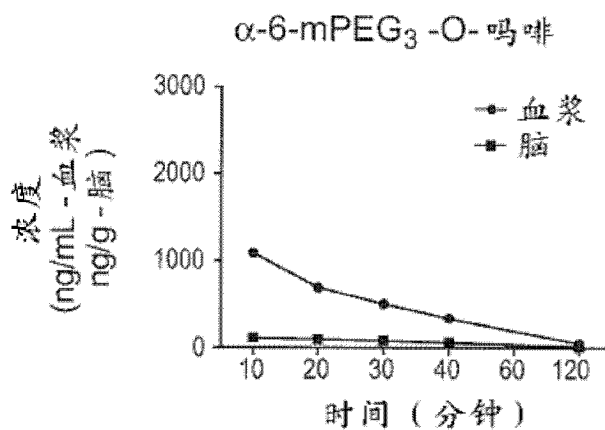


图 17D

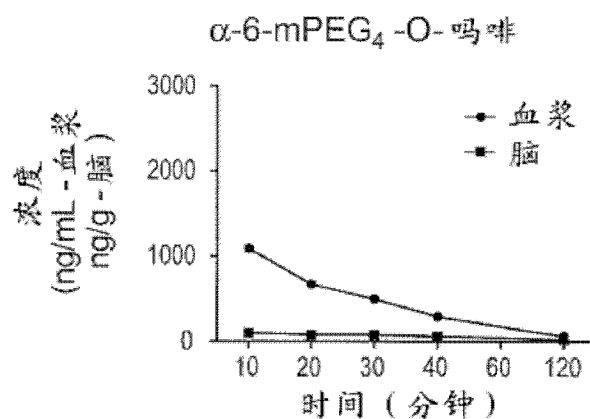


图 17E

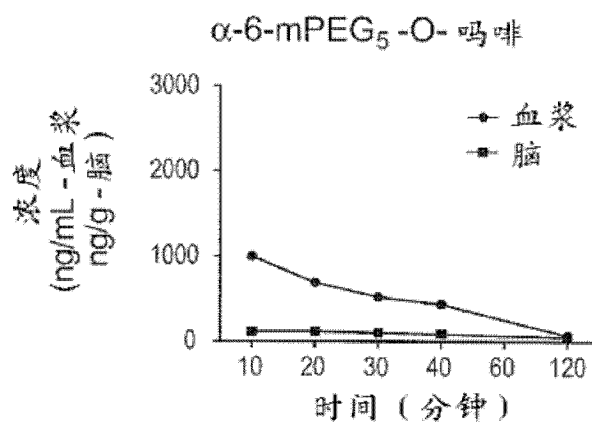


图 17F

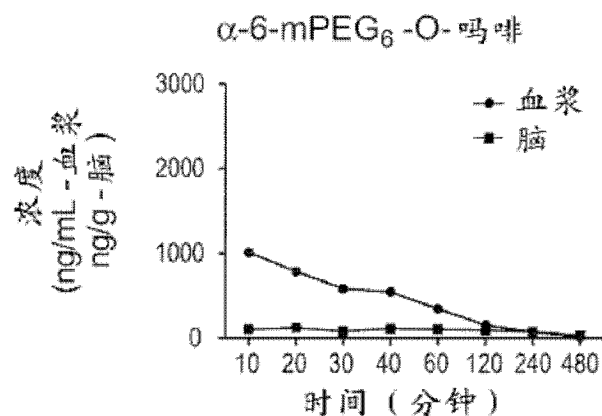


图 17G

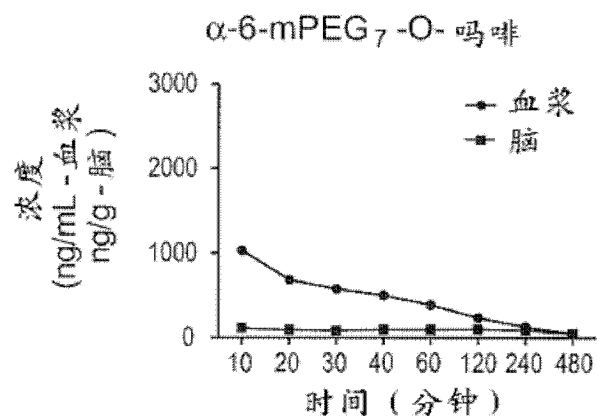


图 17H

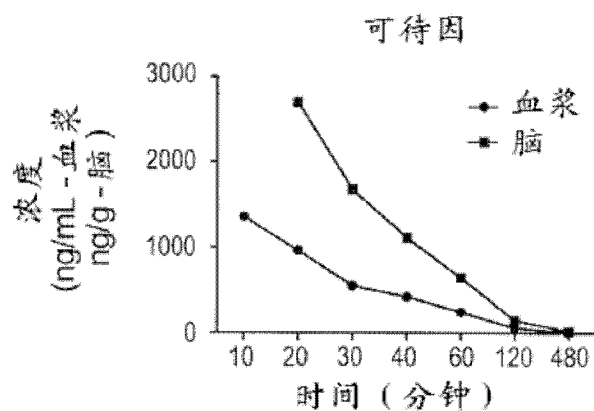


图 18A

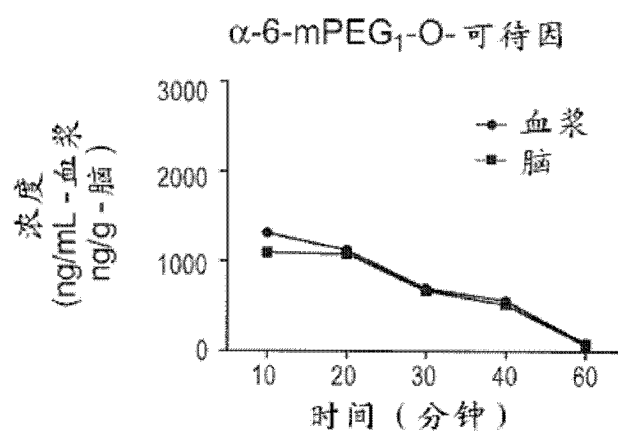


图 18B

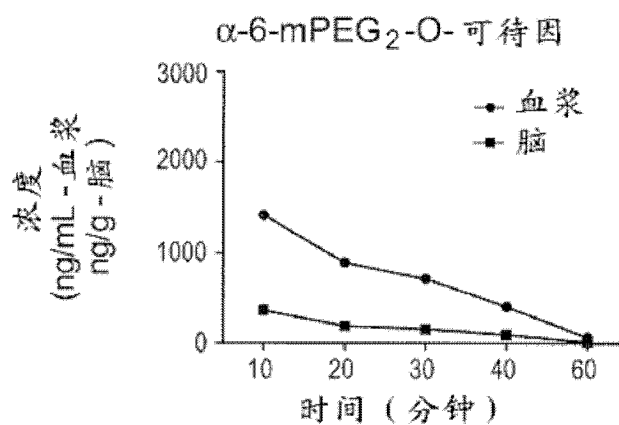


图 18C

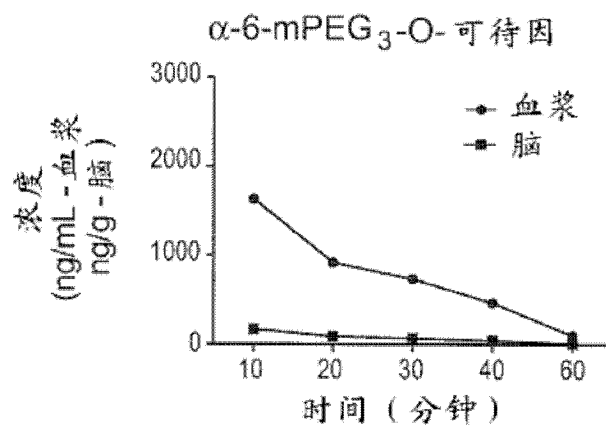


图 18D

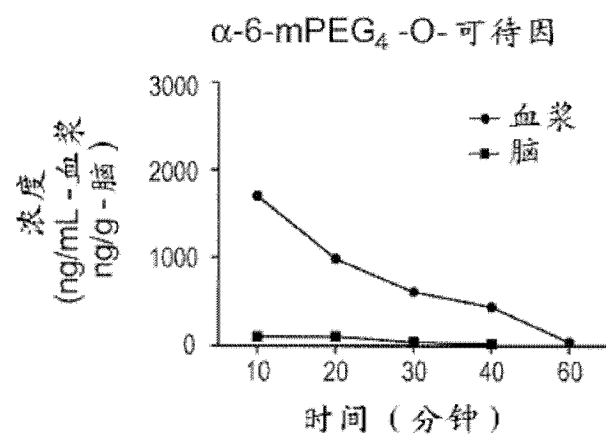


图 18E

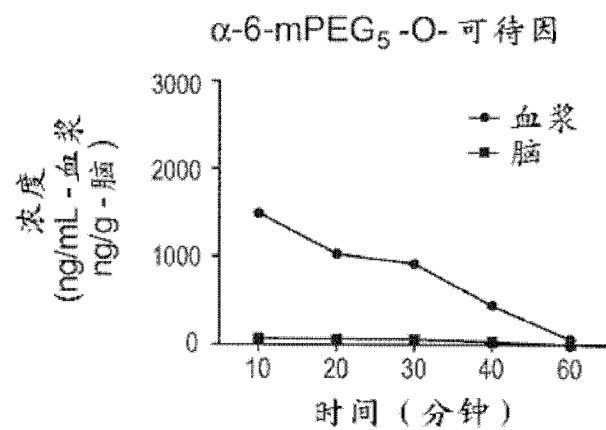


图 18F

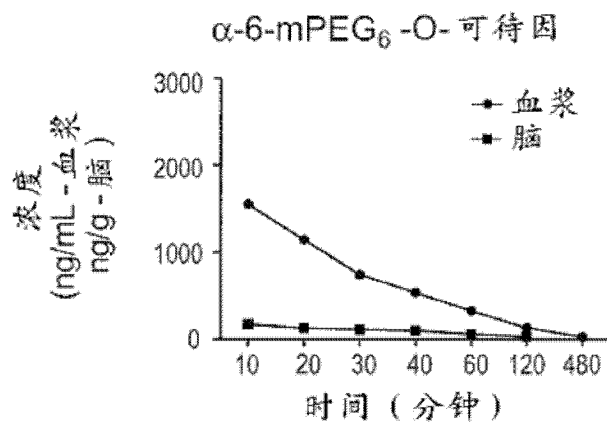


图 18G

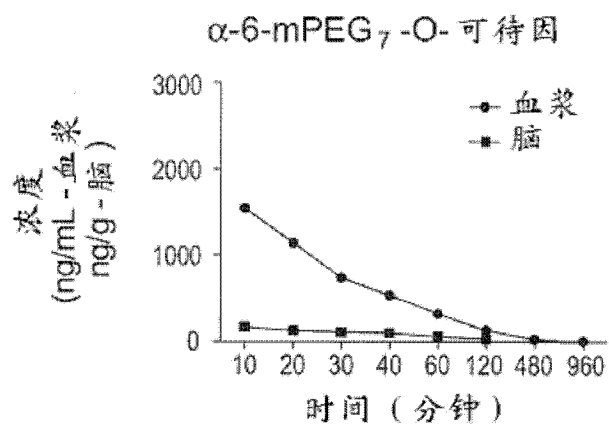


图 18H

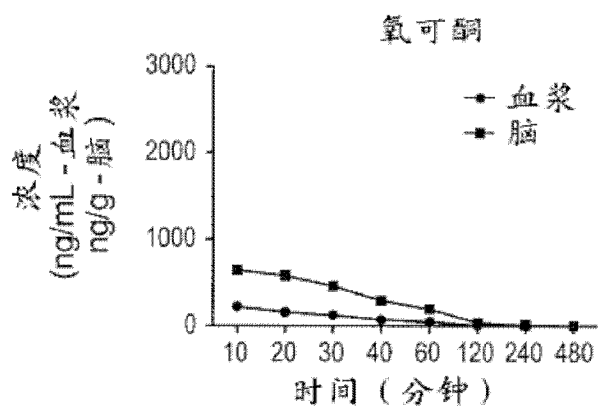


图 19A

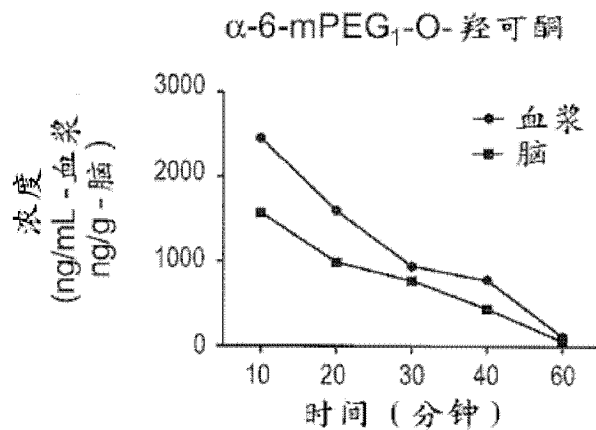


图 19B

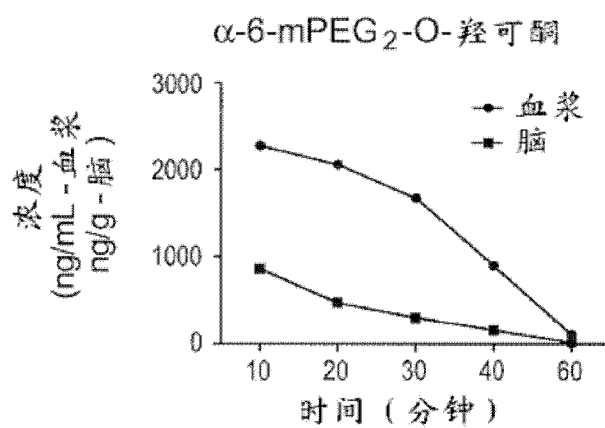


图 19C

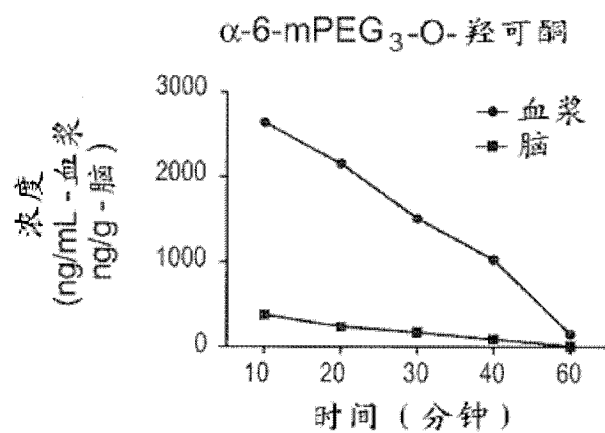


图 19D

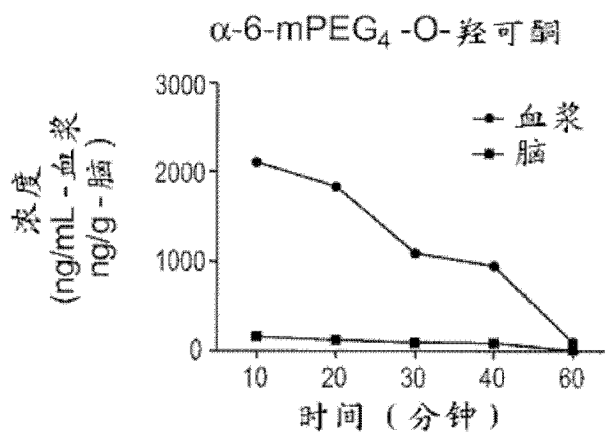


图 19E

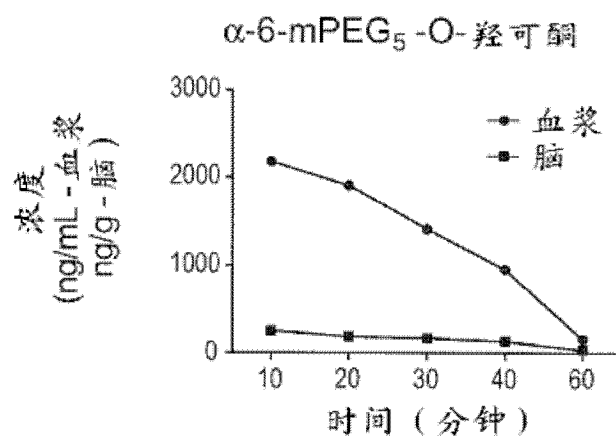


图 19F

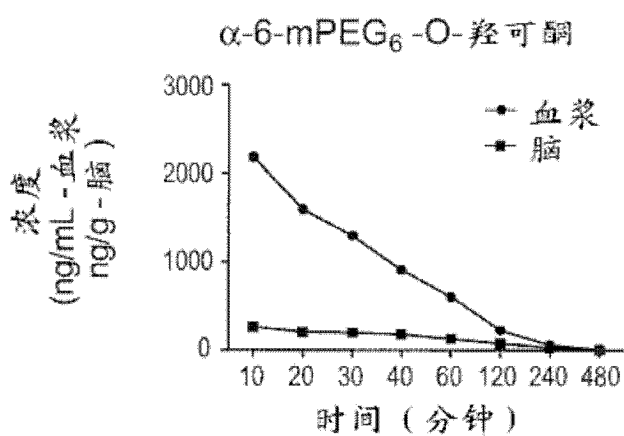


图 19G

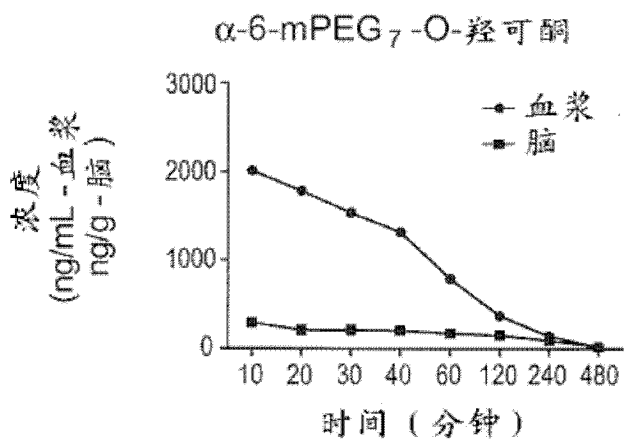


图 19H