



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103732257 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 16

(21) 申请号 201280035091. 1

R • M • 费斯特根 R • 罗辛

(22) 申请日 2012. 05. 16

F • J • M • 赫本

(30) 优先权数据

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

11166241. 7 2011. 05. 16 EP

代理人 安琪 张晓威

11166942. 0 2011. 05. 20 EP

11176736. 4 2011. 08. 05 EP

11176741. 4 2011. 08. 05 EP

11192577. 2 2011. 12. 08 EP

11192572. 3 2011. 12. 08 EP

61/515, 432 2011. 08. 05 US

61/515, 458 2011. 08. 05 US

(51) Int. Cl.

A61K 47/48 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 01. 15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2012/052447 2012. 05. 16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/156920 EN 2012. 11. 22

(71) 申请人 皇家飞利浦有限公司

地址 荷兰艾恩德霍芬

(72) 发明人 M • S • 罗比亚尔 W • 坦恩赫费尔

权利要求书11页 说明书78页

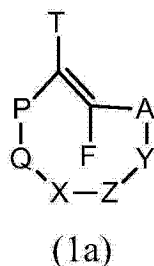
(54) 发明名称

生物正交药物活化

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗的前药活化方法,其中使用相互间表现生物正交反应性的非生物反应性化学基团。本发明还涉及前药药盒,其包含至少一种前药和至少一种活化剂,其中所述前药包含药物和第一生物正交反应基团(触发剂),并且其中所述活化剂包含第二生物正交反应基团。本发明还涉及在上述方法和药盒中使用的靶向治疗。本发明特别涉及抗体-药物缀合物以及双特异性和三特异性抗体衍生物。

1. 用于前药的给药和活化的药盒,所述药盒包含直接或间接连接至触发基团的药物和所述触发基团的活化剂,其中所述触发基团包含亲双烯体并且所述活化剂包含双烯,所述亲双烯体满足下式 (1a) :



其中 T、F 各自独立地表示 H,或者选自烷基、F、Cl、Br 或 I 的取代基;字母 A、P、Q、X、Y 和 Z 的含义选自下列 (1)-(6) :

(1) PQ、QP、QX、XQ、XZ、ZX、ZY、YZ、YA、AY 键中的一个由 $-CR^aX^D-CR^aY^D-$ 组成,其余由 A、Y、Z、X、Q、P 构成的基团彼此独立地为 CR^a_2 、S、O、 SiR^b_2 ,使得 P 和 A 为 CR^a_2 ,并且不存在选自 O-O、O-S 和 S-S 的相邻原子对,并且使得如果存在 Si,则所述 Si 与 CR^a_2 或 O 相邻; X^D 为 $O-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $O-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $NR^c-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $NR^c-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$;并且 Y^D 为 NHR^c 、OH、SH;或者 X^D 为 $C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $C(S)-(L^D)_n-(D^D)$;并且 Y^D 为 $CR^c_2NHR^c$ 、 CR^c_2OH 、 CR^c_2SH 、 $NH-NH_2$ 、 $O-NH_2$ 或 $NH-OH$;

(2) A 为 CR^aX^D 并且 Z 为 CR^aY^D ,或者 Z 为 CR^aX^D 并且 A 为 CR^aY^D ,或者 P 为 CR^aX^D 并且 X 为 CR^aY^D ,或者 X 为 CR^aX^D 并且 P 为 CR^aY^D ,使得 X^D 和 Y^D 相互以反式构象放置;其余由 A、Y、Z、X、Q 和 P 构成的基团彼此独立地为 CR^a_2 、S、O、 SiR^b_2 ,使得 P 和 A 为 CR^a_2 ,并且不存在选自 O-O、O-S 和 S-S 的相邻原子对,并且使得如果存在 Si,则所述 Si 与 CR^a_2 或 O 相邻; X^D 为 $O-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $O-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $NR^c-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $NR^c-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$,并且 Y^D 为 NHR^c 、OH、SH、 $CR^c_2NHR^c$ 、 CR^c_2OH 、 CR^c_2SH 、 $NH-NH_2$ 、 $O-NH_2$ 或 $NH-OH$;或者 X^D 为 $CR^c_2-O-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $CR^c_2-S-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $CR^c_2-O-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $CR^c_2-S-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $CR^c_2-NR^c-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $CR^c_2-NR^c-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$,并且 Y^D 为 NHR^c 、OH、SH;或者 X^D 为 $C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $C(S)-(L^D)_n-(D^D)$;并且 Y^D 为 $CR^c_2NHR^c$ 、 CR^c_2OH 、 CR^c_2SH 、 $NH-NH_2$ 、 $O-NH_2$ 、 $NH-OH$;

(3) A 为 CR^aY^D 并且 P、Q、X、Z 中的一个为 CR^aX^D ,或者 P 为 CR^aY^D 并且 A、Y、Z、X 中的一个为 CR^aX^D ,或者 Y 为 CR^aY^D 并且 X 或 P 为 CR^aX^D ,或者 Q 为 CR^aY^D 并且 Z 或 A 为 CR^aX^D ,或者 Z 或 X 为 CR^aY^D 并且 A 或 P 为 CR^aX^D ,使得 X^D 和 Y^D 相互以反式构象放置;其余由 A、Y、Z、X、Q 和 P 构成的基团彼此独立地为 CR^a_2 、S、O、 SiR^b_2 ,使得 P 和 A 为 CR^a_2 ,并且不存在选自 O-O、O-S 和 S-S 的相邻原子对,并且使得如果存在 Si,则所述 Si 与 CR^a_2 或 O 相邻; X^D 为 $(O-C(O))_p-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $O-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$,并且 Y^D 为 $CR^c_2NHR^c$ 、 CR^c_2OH 、 CR^c_2SH 、 $NH-NH_2$ 、 $O-NH_2$ 、 $NH-OH$;p 为 0 或 1;

(4) P 为 CR^aY^D 并且 Y 为 CR^aX^D ,或者 A 为 CR^aY^D 并且 Q 为 CR^aX^D ,或者 Q 为 CR^aY^D 并且 A 为 CR^aX^D ,或者 Y 为 CR^aY^D 并且 P 为 CR^aX^D ,使得 X^D 和 Y^D 相互以反式构象放置;其余由 A、Y、Z、X、Q 和 P 构成的基团彼此独立地为 CR^a_2 、S、O、 SiR^b_2 ,使得 P 和 A 为 CR^a_2 ,并且不存在选自 O-O、O-S 和 S-S 的相邻原子对,并且使得如果存在 Si,则所述 Si 与 CR^a_2 或 O 相邻; X^D 为 $(O-C(O))_p-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $O-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$; Y^D 为 NHR^c 、OH、SH;

$p=0$ 或 1 ;

(5) Y 为 Y^D 并且 P 为 CR^aX^D , 或者 Q 为 Y^D 并且 A 为 CR^aX^D ; 其余由 A、Y、Z、X、Q 和 P 构成的基团彼此独立地为 CR^a_2 、S、O、 SiR^b_2 , 使得 P 和 A 为 CR^a_2 , 并且不存在选自 O-O、O-S 和 S-S 的相邻原子对, 并且使得如果存在 Si, 则所述 Si 与 CR^a_2 或 O 相邻; X^D 为 $(O-C(O))_p-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $O-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $NR^c-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $NR^c-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $C(S)-(L^D)_n-(D^D)$; Y^D 为 NH; $p=0$ 或 1 ;

(6) Y 为 Y^D 并且 P 或 Q 为 X^D , 或者 Q 为 Y^D 并且 A 或 Y 为 X^D ; 其余由 A、Y、Z、X、Q 和 P 构成的基团彼此独立地为 CR^a_2 、S、O、 SiR^b_2 , 使得 P 和 A 为 CR^a_2 , 并且不存在选自 O-O、O-S 和 S-S 的相邻原子对, 并且使得如果存在 Si, 则所述 Si 与 CR^a_2 或 O 相邻; X^D 为 $N-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $N-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$; Y^D 为 NH;

其中 R^a 各自独立地选自 H、烷基、芳基、 OR' 、 SR' 、 $S(=O)R'''$ 、 $S(=O)_2R'''$ 、 $S(=O)_2NR'R''$ 、 $Si-R'''$ 、 $Si-O-R'''$ 、 $OC(=O)R'''$ 、 $SC(=O)R'''$ 、 $OC(=S)R'''$ 、 $SC(=S)R'''$ 、F、Cl、Br、I、 N_3 、 SO_2H 、 SO_3H 、 SO_4H 、 PO_3H 、 PO_4H 、NO、 NO_2 、CN、OCN、SCN、NCO、NCS、 CF_3 、 CF_2-R' 、 $NR'R''$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=S)R'$ 、 $C(=O)O-R'$ 、 $C(=S)O-R'$ 、 $C(=O)S-R'$ 、 $C(=S)S-R'$ 、 $C(=O)NR'R''$ 、 $C(=S)NR'R''$ 、 $NR'C(=O)-R'''$ 、 $NR'C(=S)-R'''$ 、 $NR'C(=O)O-R'''$ 、 $NR'C(=S)O-R'''$ 、 $NR'C(=O)S-R'''$ 、 $NR'C(=S)S-R'''$ 、 $OC(=O)NR'-R'''$ 、 $SC(=O)NR'-R'''$ 、 $OC(=S)NR'-R'''$ 、 $SC(=S)NR'-R'''$ 、 $NR'C(=O)NR''-R''$ 、 $NR'C(=S)NR''-R''$ 、 $CR'NR''$, 其中每个 R' 和每个 R'' 独立地为 H、芳基或烷基, 并且 R''' 独立地为芳基或烷基; 其中 R^b 各自独立地选自 H、烷基、芳基、O-烷基、O-芳基、OH; 其中 R^c 各自独立地选自 H、 C_{1-6} 烷基和 C_{1-6} 芳基;

其中两个或更多个 R^a 、 R^b 、 R^c 基团可共同形成环;

并且其中 $(L^D)_n$ 是其中 $n=0$ 或 1 的任意的连接基, 其优选通过 S、N、NH 或 O 连接至 T^R , 其中所述 S、N、NH 或 O 是所述连接基的一部分, 所述连接基可由多个以线性和 / 或支化方式排列的单元组成; D^D 为一个或多个治疗基团或药物, 其优选通过 S、N、NH 或 O 连接, 其中所述 S、N、NH 或 O 为所述治疗基团的一部分。

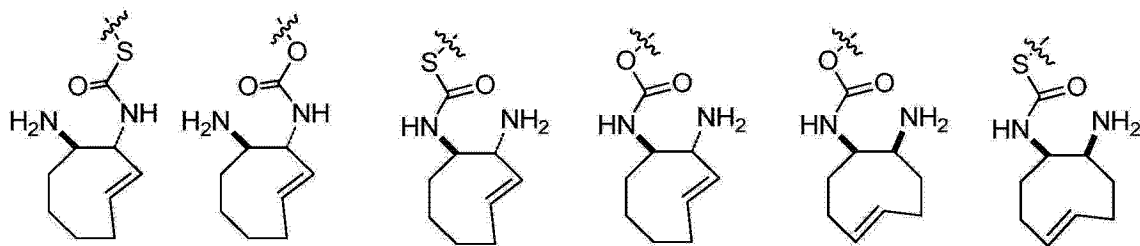
2. 权利要求 1 的药盒, 其中 A、P、Q、X、Y 和 Z 的选择使得 PQ、QP、QX、XQ、XZ、ZX、ZY、YZ、YA、AY 键中的一个由 $-CR^aX^D-CR^aY^D-$ 组成, 其余由 A、Y、Z、X、Q、P 构成的基团彼此独立地为 CR^a_2 、S、O、 SiR^b_2 , 使得 P 和 A 为 CR^a_2 , 并且不存在选自 O-O、O-S 和 S-S 的相邻原子对, 并且使得如果存在 Si, 则所述 Si 与 CR^a_2 或 O 相邻; X^D 为 $O-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $O-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $NR^c-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $NR^c-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$; 并且 Y^D 为 NHR^c 、OH、SH; 或者 X^D 为 $C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $C(S)-(L^D)_n-(D^D)$; 并且 Y^D 为 $CR^c_2NHR^c$ 、 CR^c_2OH 、 CR^c_2SH 、 $NH-NH_2$ 、 $O-NH_2$ 或 $NH-OH$ 。

3. 权利要求 2 的药盒, 其中 PQ、QP、AY 或 YA 为 $-CR^aX^D-CR^aY^D-$, 并且 X^D 和 Y^D 相互以反式放置。

4. 权利要求 2 的药盒, 其中 ZX 或 XZ 为 $-CR^aX^D-CR^aY^D-$, 并且 X^D 和 Y^D 相互以顺式放置。

5. 前述权利要求中任一项的药盒, 其中 X^D 为 $NR^c-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$, 并且 Y^D 为 NHR^c 。

6. 权利要求 5 的药盒, 其中所述亲双烯体为选自下列结构的化合物:

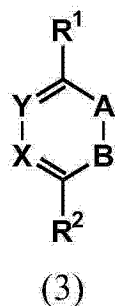


~ = 所连接的 D^D 、 L^D - D^D 的其余部分, 其任选地包含 T^T 或 S^P - T^T 或 M^M 或 S^P - M^M 。

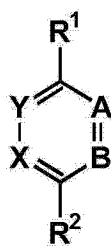
7. 前述权利要求中任一项的药盒, 其中所述活化剂包含双烯, 所述双烯为选自式 (2)-(4) 的双烯:



其中 R^1 选自 H、烷基、芳基、 CF_3 、 CF_2-R' 、 OR' 、 SR' 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=S)R'$ 、 $C(=O)O-R'$ 、 $C(=O)S-R'$ 、 $C(=S)O-R'$ 、 $C(=S)S-R''$ 、 $C(=O)NR'R''$ 、 $C(=S)NR'R''$ 、 $NR'R''$ 、 $NR'C(=O)R''$ 、 $NR'C(=S)R''$ 、 $NR'C(=O)OR''$ 、 $NR'C(=S)OR''$ 、 $NR'C(=O)SR''$ 、 $NR'C(=S)SR''$ 、 $NR'C(=O)NR''R''$ 、 $NR'C(=S)NR''R''$, 其中每个 R' 和每个 R'' 独立地为 H、芳基或烷基; A 和 B 各自独立地选自烷基取代的碳、芳基取代的碳、氮、 N^+O^- 、 N^+R , 其中 N^+R 中的 R 为烷基, 条件是 A 和 B 不都为碳; X 选自 O、N-烷基和 C=O; 并且 Y 为 CR, 其中 CR 中的 R 选自 H、烷基、芳基、 $C(=O)OR'$ 、 $C(=O)SR'$ 、 $C(=S)OR'$ 、 $C(=S)SR'$ 、 $C(=O)NR'R''$, 其中 R' 和 R'' 各自独立地为 H、芳基或烷基;



其中 R^1 和 R^2 各自独立地选自 H、烷基、芳基、 CF_3 、 CF_2-R' 、 NO_2 、 OR' 、 SR' 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=S)R'$ 、 $OC(=O)R'''$ 、 $SC(=O)R'''$ 、 $OC(=S)R'''$ 、 $SC(=S)R'''$ 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'''$ 、 $S(=O)_2NR'R''$ 、 $C(=O)O-R'$ 、 $C(=O)S-R'$ 、 $C(=S)O-R'$ 、 $C(=S)S-R'$ 、 $C(=O)NR'R''$ 、 $C(=S)NR'R''$ 、 $NR'R''$ 、 $NR'C(=O)R''$ 、 $NR'C(=S)R''$ 、 $NR'C(=O)OR''$ 、 $NR'C(=S)OR''$ 、 $NR'C(=O)SR''$ 、 $NR'C(=S)SR''$ 、 $OC(=O)NR'R''$ 、 $SC(=O)NR'R''$ 、 $OC(=S)NR'R''$ 、 $SC(=S)NR'R''$ 、 $NR'C(=O)NR''R''$ 、 $NR'C(=S)NR''R''$, 其中每个 R' 和每个 R'' 独立地为 H、芳基或烷基, 并且 R''' 独立地为芳基或烷基; A 选自 N-烷基、N-芳基、C=O 和 CN-烷基; B 为 O 或 S; X 选自 N、CH、C-烷基、C-芳基、 $CC(=O)R'$ 、 $CC(=S)R'$ 、 $CS(=O)R'$ 、 $CS(=O)_2R'''$ 、 $CC(=O)O-R'$ 、 $CC(=O)S-R'$ 、 $CC(=S)O-R'$ 、 $CC(=S)S-R'$ 、 $CC(=O)NR'R''$ 、 $CC(=S)NR'R''$ 、 R' 和 R'' 各自独立地为 H、芳基或烷基, 并且 R''' 独立地为芳基或烷基; Y 选自 CH、C-烷基、C-芳基、N 和 N^+O^- ;

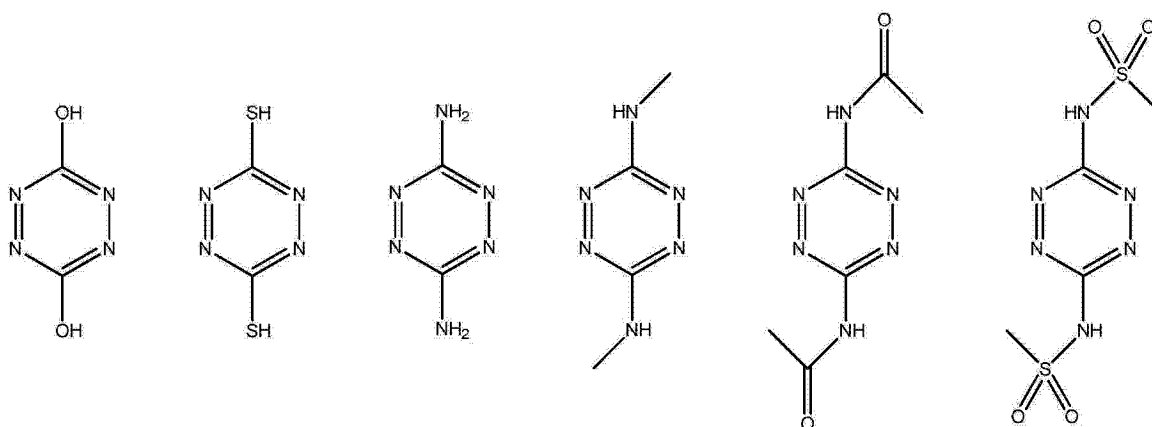


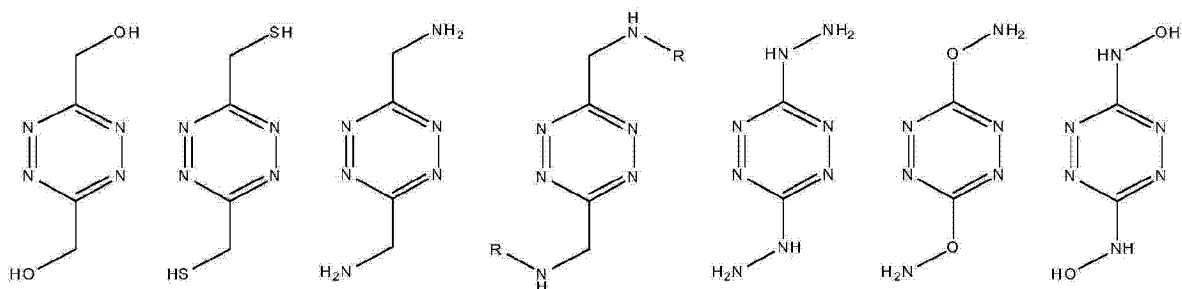
(4)

其中 R^1 和 R^2 各自独立地选自 H、烷基、芳基、 CF_3 、 CF_2-R' 、NO、 NO_2 、OR'、SR'、CN、 $C(=O)R'$ 、 $C(=S)R'$ 、 $OC(=O)R'''$ 、 $SC(=O)R'''$ 、 $OC(=S)R'''$ 、 $SC(=S)R'''$ 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'''$ 、 $S(=O)_2OR'$ 、 $PO_3R'R''$ 、 $S(=O)_2NR'R''$ 、 $C(=O)O-R'$ 、 $C(=O)S-R'$ 、 $C(=S)O-R'$ 、 $C(=S)S-R'$ 、 $C(=O)NR'R''$ 、 $C(=S)NR'R''$ 、 $NR'R''$ 、 $NR'C(=O)R''$ 、 $NR'C(=S)R''$ 、 $NR'C(=O)OR''$ 、 $NR'C(=S)OR''$ 、 $NR'C(=O)SR''$ 、 $NR'C(=S)SR''$ 、 $OC(=O)NR'R''$ 、 $SC(=O)NR'R''$ 、 $OC(=S)NR'R''$ 、 $SC(=S)NR'R''$ 、 $NR'C(=O)NR''R''$ 、 $NR'C(=S)NR''R''$ ，其中每个 R' 和每个 R'' 独立地为 H、芳基或烷基，并且 R''' 独立地为芳基或烷基；A 选自 N、C-烷基、C-芳基和 N^+O^- ；B 为 N；X 选自 N、CH、C-烷基、C-芳基、 $CC(=O)R'$ 、 $CC(=S)R'$ 、 $CS(=O)R'$ 、 $CS(=O)_2R'''$ 、 $CC(=O)O-R'$ 、 $CC(=O)S-R'$ 、 $CC(=S)O-R'$ 、 $CC(=S)S-R'$ 、 $CC(=O)NR'R''$ 、 $CC(=S)NR'R''$ ，其中 R' 和 R'' 各自独立地为 H、芳基或烷基，并且 R''' 独立地为芳基或烷基；Y 选自 CH、C-烷基、C-芳基、N 和 N^+O^- 。

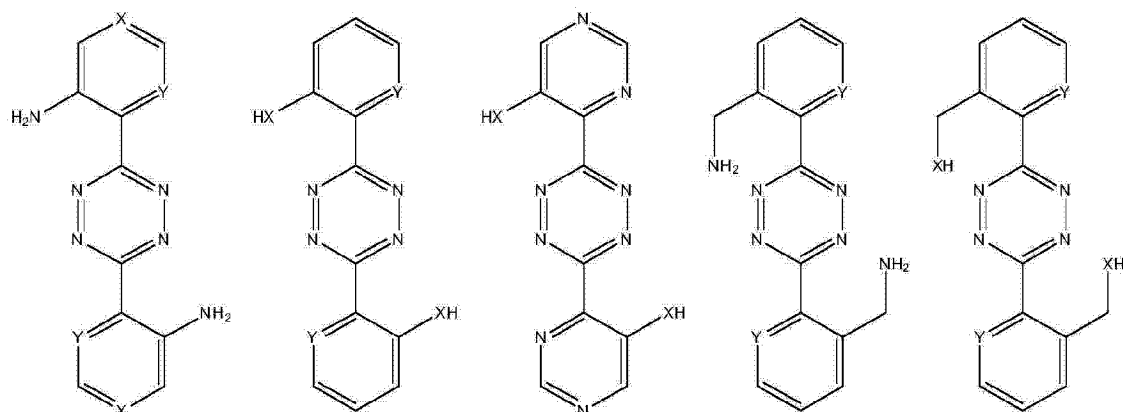
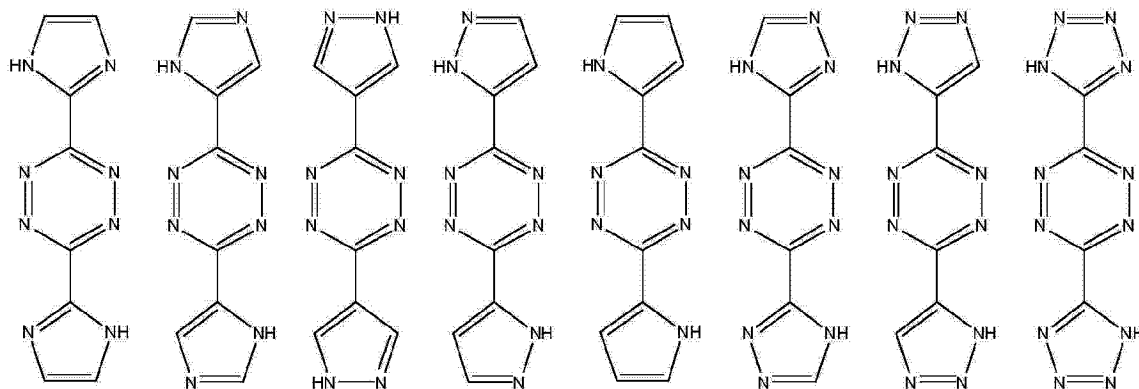
8. 权利要求 7 的药盒，其中所述双烯满足如说明书中给出的式 (7)，其为用 R^1 和 R^2 对位取代的四嗪，其中 R^1 和 R^2 各自独立地表示选自下列的取代基：H、烷基、 NO_2 、F、Cl、 CF_3 、CN、COOR、CONHR、CONR₂、COR、SO₂R、SO₂OR、SO₂NR₂、PO₃R₂、NO、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2,6-嘧啶基、3,5-嘧啶基、2,4-嘧啶基、2,4-咪唑基、2,5-咪唑基和苯基，所述取代基任选被一个或多个吸电子基团取代，所述吸电子基团选自 NO_2 、F、Cl、 CF_3 、CN、COOR、CONHR、CONR、COR、SO₂R、SO₂OR、SO₂NR₂、PO₃R₂、NO 和 Ar，其中 R 为 H 或 C₁-C₆ 烷基，并且 Ar 表示苯基、吡啶基或萘基。

9. 权利要求 7 的药盒，其中所述双烯选自：





两个 R = 甲基, 或
两个 R = 乙基, 或
两个 R = 苯基



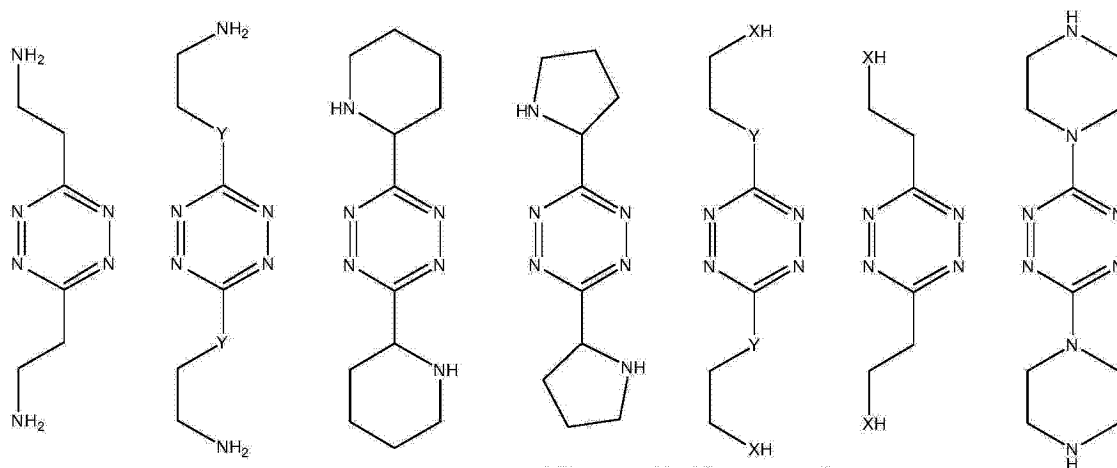
两个 Y = C 且两个 X = C,
或
两个 Y = C 且两个 X = N,
或
两个 Y = N 且两个 X = C,
或
两个 Y = N 且两个 X = N

两个 X = O 且两个 Y = C,
或
两个 X = O 且两个 Y = N,
或
两个 X = S 且两个 Y = C,
或
两个 X = S 且两个 Y = N

两个 X = O,
或
两个 X = S

两个 Y = C,
或
两个 Y = N

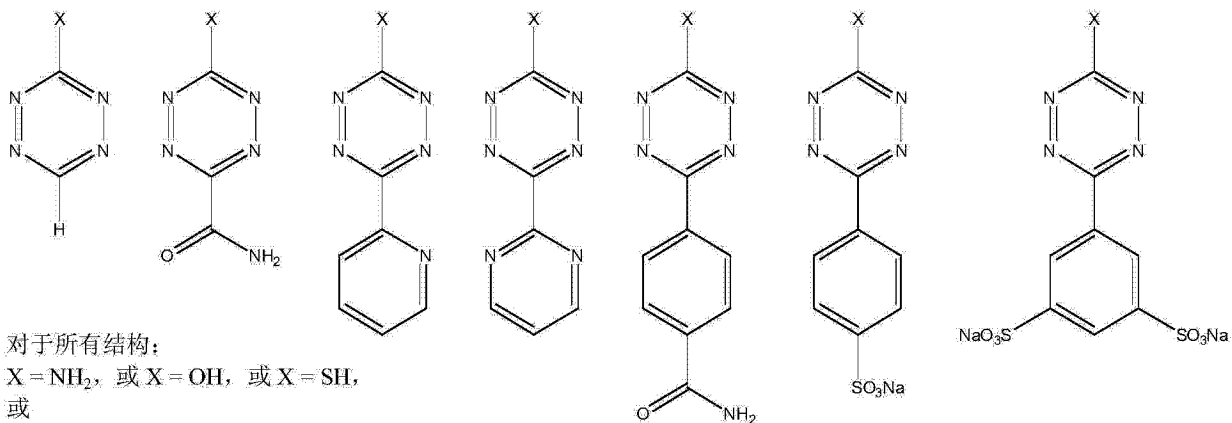
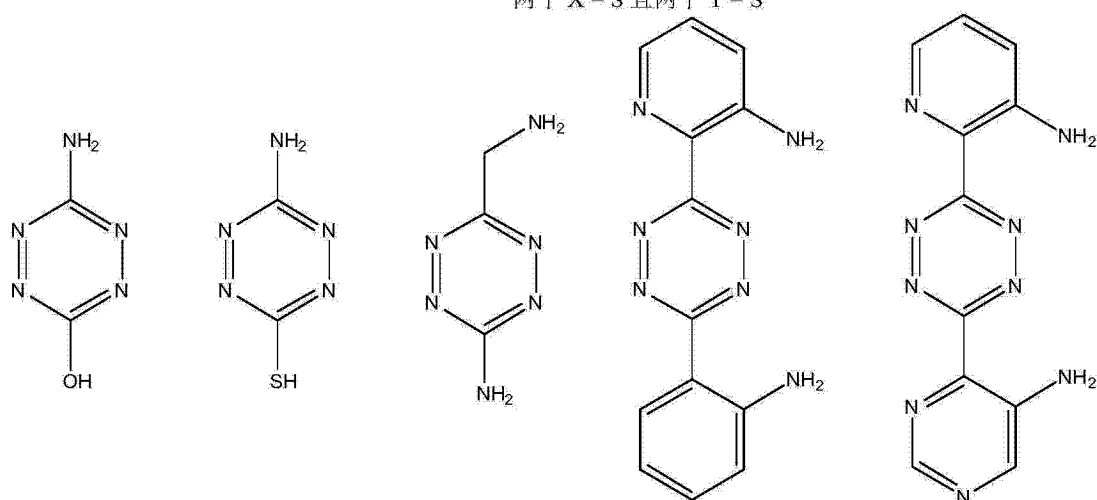
两个 X = O 且两个 Y = C,
或
两个 X = O 且两个 Y = N,
或
两个 X = S 且两个 Y = C,
或
两个 X = S 且两个 Y = N



两个 $Y=O$, 或
两个 $Y=S$

两个 $X=O$ 且两个 $Y=O$, 或
两个 $X=O$ 且两个 $Y=S$, 或
两个 $X=S$ 且两个 $Y=O$, 或
两个 $X=S$ 且两个 $Y=S$

两个 $X=O$, 或
两个 $X=S$



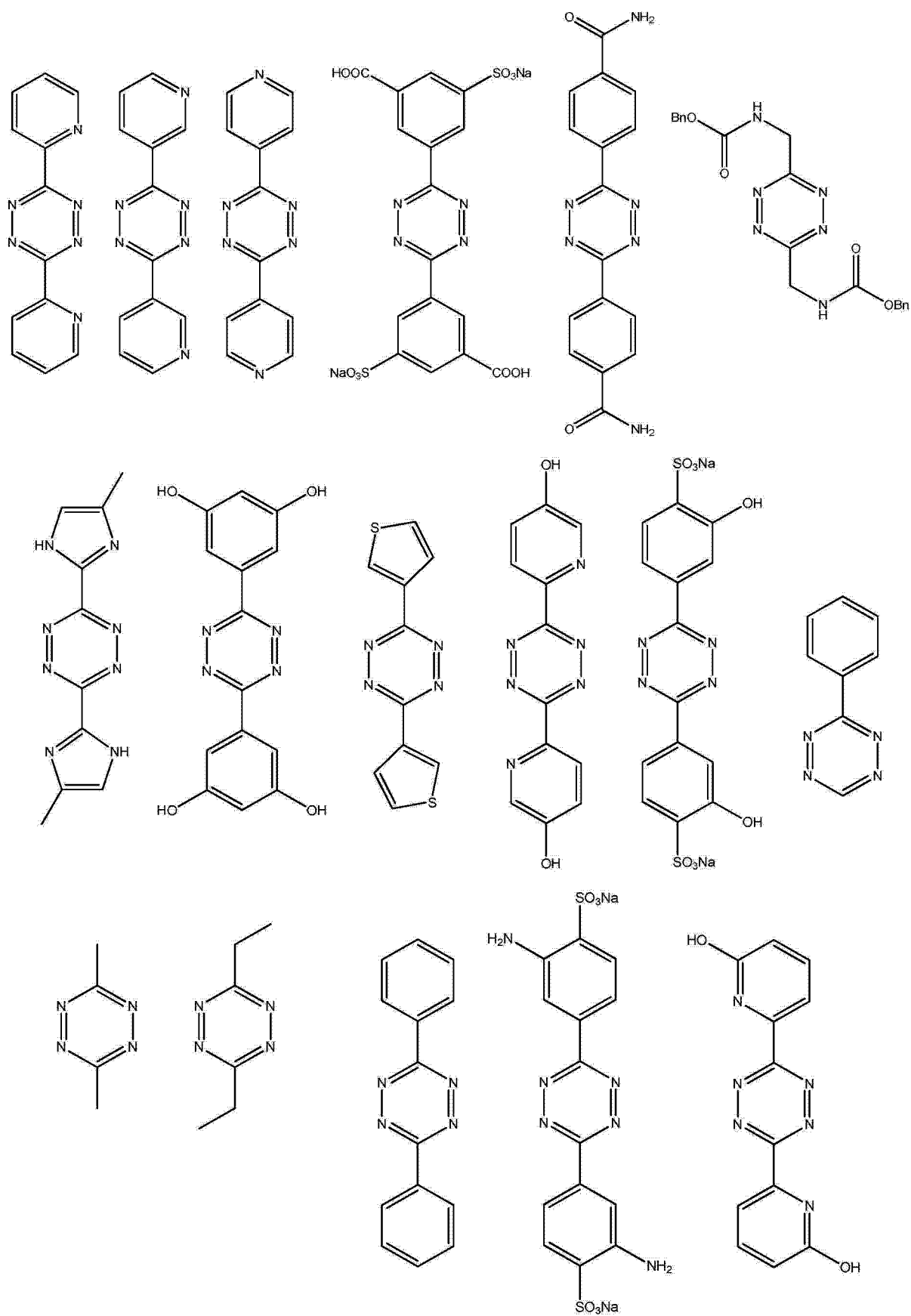
对于所有结构:

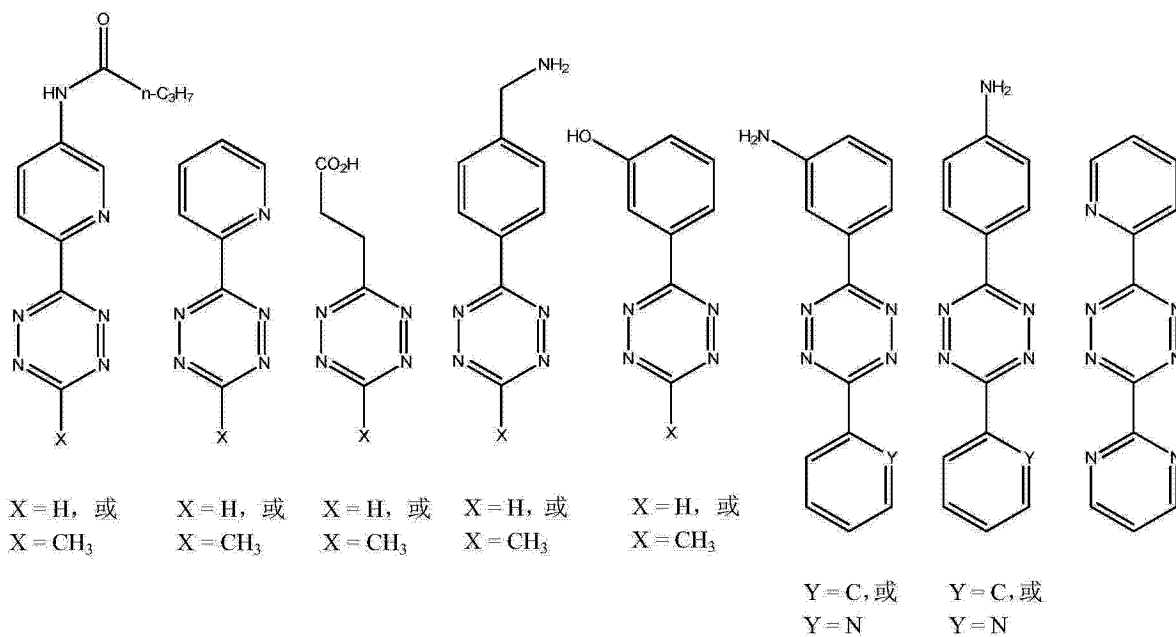
$X=NH_2$, 或 $X=OH$, 或 $X=SH$,
或

$X=CH_2NH_2$, 或 $X=2,5$ -咪唑基,

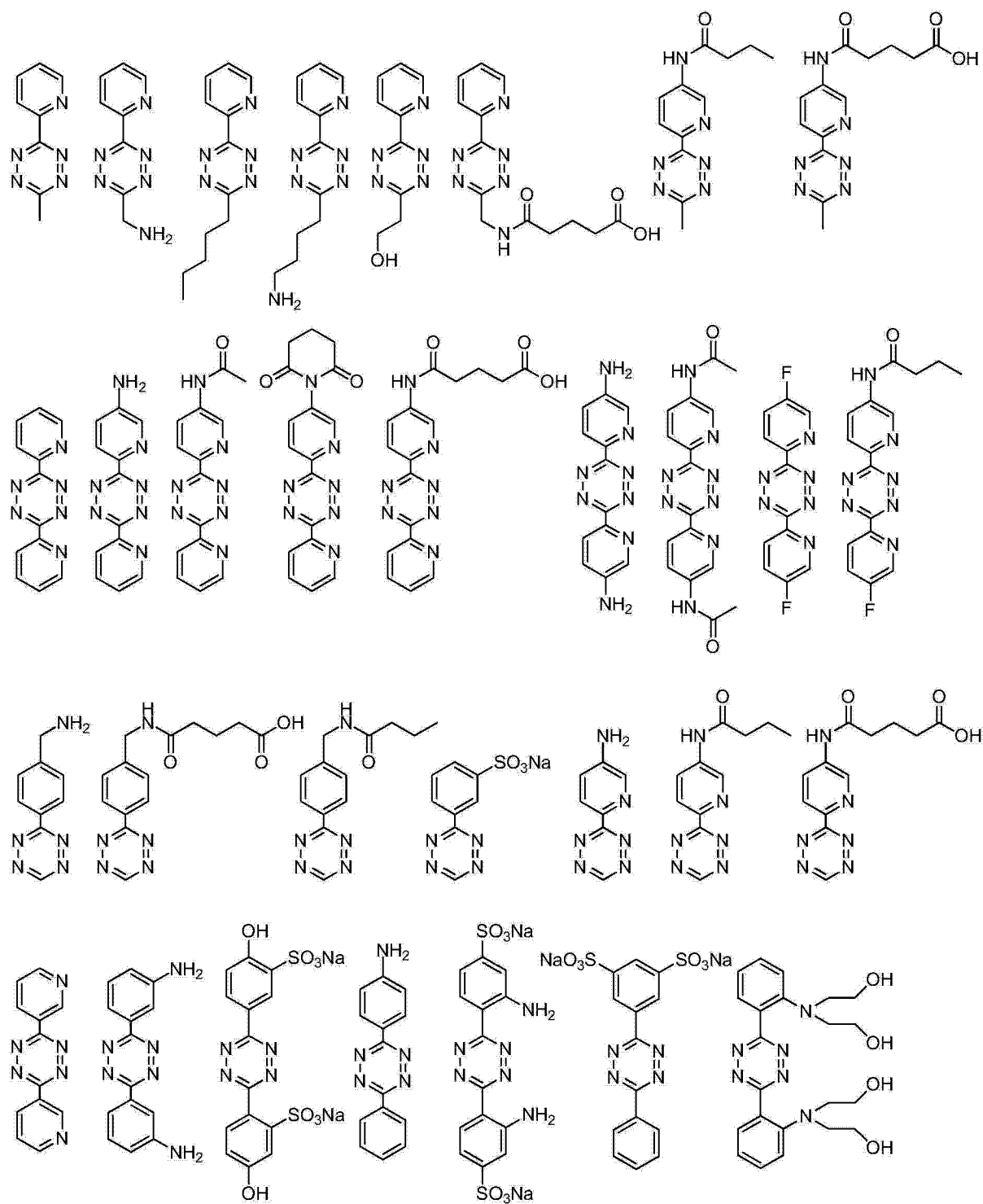
或

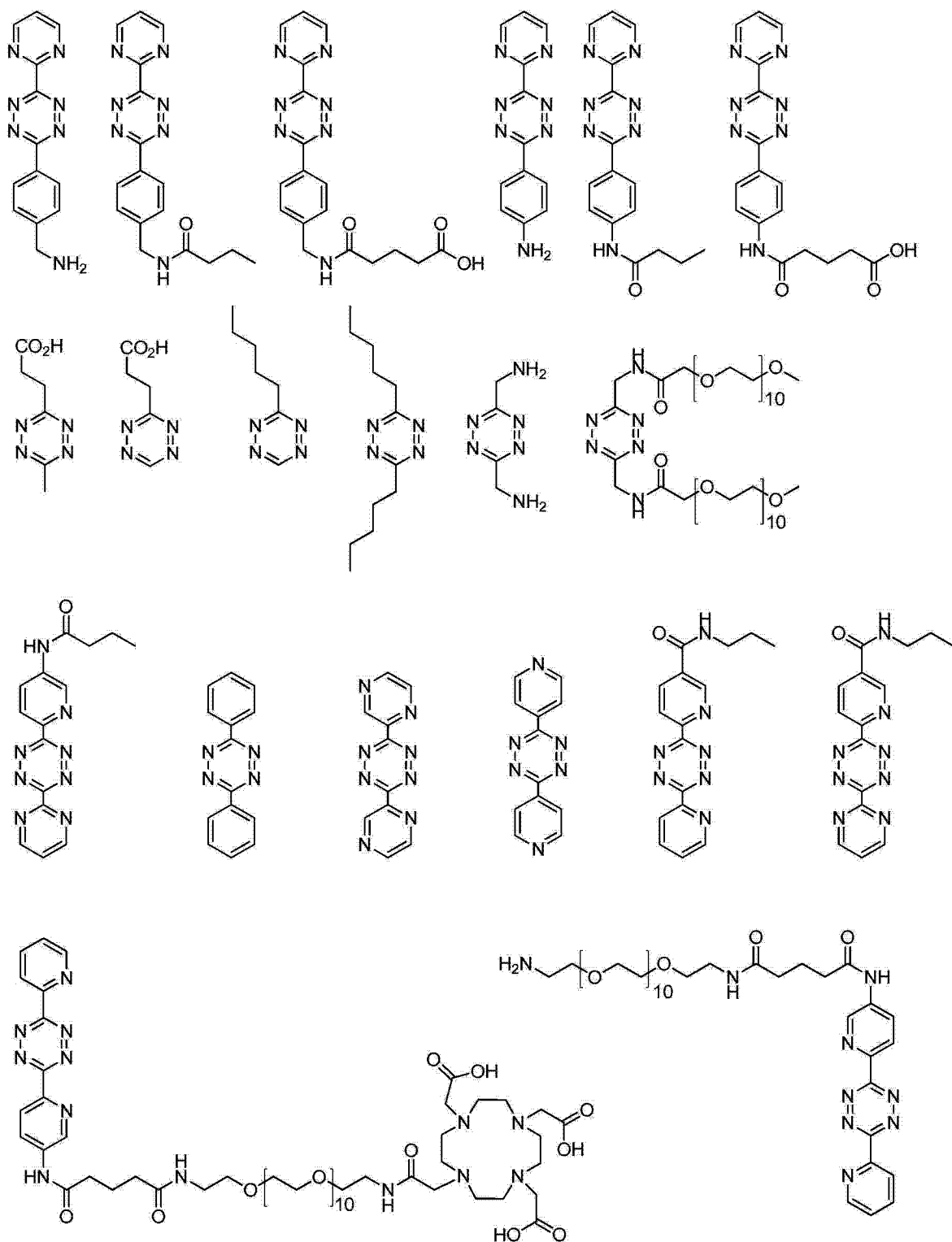
$X=2$ -氨基苯基, 或 $X=(CH_2)_7-NH_2$





10. 权利要求 7 的药盒,其中所述双烯选自:





11. 前述权利要求中任一项的药盒,其中所述药物 D^D 或所述连接基 L^D 或所述触发基团 T^R 中的至少一个包含靶向剂 T^T ,其优选为抗体。

12. 权利要求 1-10 中任一项的药盒,其中所述 L^D 或所述触发基团 T^R 中的至少一个包含掩蔽基团 M^M ,其优选为肽。

13. 前述权利要求中任一项的药盒,其中所述药物为 T 细胞结合抗体构建体。

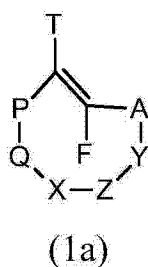
14. 权利要求 1-11 中任一项的药盒,其中所述前药包含抗体-毒素或抗体-药物缀合物。

15. 前药,其包含直接或间接地连接至如权利要求 1-6 中任一项所定义的式 (1a) 的亲双烯体基团的药物化合物。

16. 将药物化合物修饰为可通过非生物的生物正交反应触发的前药的方法,其包括提供药物,以及将所述药物化学连接至如权利要求 1-6 中任一项所定义的式 (1a) 的亲双烯体基团。

17. 治疗方法,其中通过向患有可通过药物调节的疾病的患者给药包含在其活化后所述药物会被释放的触发基团的前药来治疗所述患者,其中所述触发基团包含反式-环辛烯环,所述环任选地包含一个或多个杂原子,并且选择所述双烯以便能与所述亲双烯体以反电子需求的 Diels-Alder 反应的形式反应,所述触发基团满足如权利要求 1-6 中任一项所定义的式 (1a)。

18. 满足如权利要求 1-6 中任一项所定义的式 (1a) 的化合物,其用于动物或人中的前药疗法:



所述化合物包含与药物连接的键。

19. 四嗪作为用于在生理环境下释放连接至满足如权利要求 1-6 中任一项所定义的式 (1a) 的化合物的物质的活化剂的用途。

20. 满足如权利要求 1-6 中任一项所定义的式 (1a) 的化合物与四嗪间的反电子需求的 Diels-Alder 反应作为用于在生理环境中释放以化学结合形式给药的物质的化学工具的用途,其中所述物质结合至满足式 (1a) 的化合物。

21. 满足如权利要求 1-6 中任一项所定义的式 (1a) 的反式-环辛烯作为治疗化合物的载体的用途。

生物正交药物活化

发明领域

[0001] 本发明涉及基于通过非生物的生物正交化学反应 (abiotic, bio-orthogonal chemical reaction) 活化的无活性药物 (inactivated drug) (如前药) 的治疗方法。

[0002] 发明背景

[0003] 在医学领域,使用在人体或动物体内特定部位活化的无活性化合物(如前药)是广为人知的。另外,无活性药物(如前药)的靶向递送也已有深入研究。已对有效药物在靶位和/或期望的时间选择性释放的药物递送系统的研究投入了大量精力。一种方法为通过局部和特定的酶活性特异性地选择性活化(全身性)前药。然而,很多情况下,关注的靶位缺乏适合的过表达酶。另一种方法为通过称作抗体导向酶前药疗法(antibody-directed enzyme prodrug therapy, ADEPT)的技术将酶运送到靶组织。在该途径中,酶通过与抗体(与肿瘤相关抗原结合)缀合来靶向至肿瘤部位。在全身性给药该缀合物,其在靶点集中并清除未结合的缀合物后,将设计的前药全身性给药并局部活化。该方法需要必定不被内源酶催化完成的反应。满足这些要求的非哺乳动物来源的酶很可能为高免疫原性,这使其不能重复给药。或者,前药可靶向疾病部位,然后经历疾病特异性或非特异性内源性活化过程(如 pH、酶、含巯基化合物)。

[0004] 靶向抗癌治疗被设计为相对于常规癌症化学疗法降低非特异性毒性并且提高有效性。该途径通过单克隆抗体(mAbs)的强大靶向能力以特异性地将高活性的缀合小分子治疗剂递送至癌细胞来实现。在尝试处理毒性问题中,已将化学治疗剂(药物)与靶向分子(如与肿瘤细胞高度特异性结合的抗体或蛋白质受体配体)连接,以形成被称作抗体-药物缀合物(ADC)或免疫缀合物(immunoconjugate)的化合物。理论上免疫缀合物应为低毒性,因为它们将细胞毒性药物靶向至表达特定细胞表面抗原或受体的肿瘤。该策略已实现有限的成功,部分因为当将毒性药物缀合至大的抗体或蛋白质受体配体上时,所述细胞毒性药物倾向于为无活性或低活性。免疫缀合物的有前景的进展已将细胞毒性药物通过连接基(linker)连接至抗体,所述连接基在肿瘤部位或肿瘤细胞内部断裂(Senter 等人, Current Opinion in Chemical Biology 2010, 14:529-537)。理想地, mAb 会特异性与抗原结合,所述抗原在肿瘤细胞上大量表达,但在正常组织有限表达。特别使那些对于临床应用毒性过大的药物得以使用。多数该领域的近期工作集中于高活性细胞毒性剂的使用。这需要连接基技术的研发,该连接基技术提供条件稳定性,从而其在与肿瘤结合后进行药物的释放,而不是在循环中进行。

[0005] 药物作为缀合物是无活性的,但当其在靶点集中后,药物通过如 pH 或酶释放,这可为靶点特异性的,但也可更为普遍的。药物释放可由细胞外机制(如肿瘤组织中的低 pH、缺氧、特定酶)实现,但通常可通过需要抗体缀合物首先内化的细胞内(大多为溶酶体)释放机制(如谷胱甘肽、蛋白酶、分解代谢)来实现更有选择性的药物释放。特定的细胞内释放机制(如谷胱甘肽、组织蛋白酶)通常(根据其性质)生成母体药物,其可逃出细胞并攻击附近细胞。这被看作是一些抗体-药物缀合物的重要作用机制,特别是在有不同受体表达的肿瘤或 mAb 穿透性较差的肿瘤中。可裂解的连接基的实例为:脘(对酸不稳定)、肽连

接基（组织蛋白酶 B 可裂解）、有位阻的二硫基团（巯基可裂解）。此外，不可裂解的连接基也可用于 mAb- 药物缀合物。这些构建体在分解代谢时释放它们的药物，可能生成仍连接至一个氨基酸上的药物分子。仅一部分药物作为这样的缀合物会恢复它们的活性。此外，这些氨基酸-连接的药物不能逃离细胞。然而，由于该连接基是稳定的，因此这些构建体通常被认为是最安全的并且根据药物和靶点可为非常有效的。

[0006] 目前的抗体-药物缀合物释放策略有它们的局限性。细胞外药物释放机制通常太无特异性（如 pH 敏感连接基），其导致毒性。细胞内释放依赖于 mAb- 药物的效率（如受体调节的内化），然而数种癌症缺乏以足够高重复数存在的癌症特异性且有效地内化的靶点。细胞内释放还依赖以足够高的量存在的活化酶（蛋白酶）或分子（巯基化合物，如谷胱甘肽）。细胞内释放后，在特定情况下，药物可从细胞逃离至靶点附近细胞。在不是每个细胞表达足够高量的靶受体的异源性肿瘤（heterogeneous tumor）中，这种效果被认为是有利的。在由于如升高的组织间隙压（其阻碍对流流动）而难以穿透的肿瘤中，这也是重要的。这对于大的如 mAb（缀合物）的构建体特别是问题。在有结合部位屏障存在的情况下，这种机制也是至关重要的。一旦靶向剂离开脉管系统并且与受体结合，它在肿瘤内的运动会受限制。mAb 缀合物被限制在血管周空间的可能性与其对它的靶点的亲和力有关。可通过增加 mAb 剂量改善穿透，然而这种途径受如在肝中的毒性剂量的限制。此外，从死细胞脱落的抗原可存在于肿瘤间质空间，在此它们可阻止 mAb 缀合物与它们的靶细胞结合。另外，许多靶点受无效内化阻碍，并且不同的药物不能以相同的方式连接至 mAb。此外，已证明设计由靶点中的内源性元素选择性裂解，同时对于到靶点途中的内源性元素稳定（特别对于完整 mAb 清除慢的情况）的连接基是麻烦的。因此，最优的药物、连接基、mAb 和靶点的组合需要基于个例选择并优化。

[0007] 另一个可受益于有效前药途径的应用领域为 T 细胞结合抗体构建体（T-cell engaging antibody construct）（如双特异性或三特异性抗体片段）领域，其通过使免疫系统参与而作用于癌症。早已考虑到使活化的 T 细胞与癌细胞直接接触提供杀死癌细胞的有效方法（Thompson 等人，Biochemical and Biophysical Research Communications 366 (2008) 526 - 531）。在大量为此构建的双特异性抗体中，大部分包含两个抗体结合位点，一个位点靶向肿瘤，并且另一个靶向 T 细胞（Thakur 等人，Current Opinion in Molecular Therapeutics 2010, 12 (3), 340-349）。然而，对于包含活性 T 细胞结合位点的双特异性抗体，会发生周围的 T 细胞结合。这不仅阻碍了缀合物到达肿瘤，还导致细胞因子风暴和 T 细胞耗竭。光活化的抗 T 细胞抗体被用来克服这些问题，其中所述抗 T 细胞活性仅在其需要的时间和位置（即通过肿瘤结合臂在肿瘤集中后）用紫外线辐射后恢复。抗-人 CD3（T 细胞靶向）抗体可用光裂解的 1-(2-硝基苯基)乙醇（NPE）包衣可逆地抑制（Thompson 等人，Biochemical and Biophysical Research Communications 366 (2008) 526 - 531）。然而，基于光的活化限制于身体上光可穿透的部位，并且不容易修改以治疗全身性疾病（如转移癌）。可受益于前药途径的密切相关构建体为三特异性 T 细胞结合的抗体构建体，例如除了癌症靶向剂的 CD3- 和 CD28 T 细胞结合基团（T-cell engaging moiety）。这样的构建体毒性太大不能像这样使用，并且 CD3 或 CD28 或者两者的结合域需要掩蔽。

[0008] 以下是期望的：可选择性地且可预期地在靶位活化靶向药物，而不依赖于同源穿

透和靶向,并且不依赖于在到靶点的途中和在靶点内可能变化以及不同病症和不同患者可能变化的内源性参数。

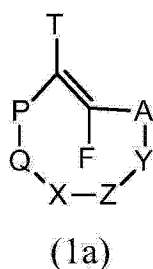
[0009] 为了避免目前前药活化的缺点,在 Bioconjugate Chem2008, 19, 714-718 中已提出利用非生物的生物正交化学反应(也就是 Staudinger 反应)引发前药的活化。简而言之,在所引出的概念中,前药为药物和触发剂的缀合物,该药物-触发剂缀合物不是内源性(如酶或特定的 pH)活化,而是通过活化剂(即与前药中的触发基团(Trigger moiety)反应的物质)的受控的给药来活化,从而引发药物从触发剂的释放(或者反之亦然,从药物释放触发剂,但是人们可观察该释放过程)。然而结果证明对于此概念,Staudinger 方法效果不好,并且鉴于利用 Staudinger 反应的释放机制的特定本质,其适用性是有限的。使用 Staudinger 反应的其它缺点为它们有限的反应速率,以及这些反应组分氧化不稳定性。因此,期望提供用于非生物的生物正交反应的反应物,其在生理条件下稳定,相互间更易反应,并且可通过多种机制引发结合药物的释放,从而提供更通用的活化药物释放方法。

[0010] 在癌症治疗中,使用不依赖于内源性活化机制(如 pH、酶)的生物相容性化学反应用于选择性前药活化是强大的新工具。在需要的时间和位置的前药选择性活化可控制体内的许多过程,包括癌症。从而疗法(如抗肿瘤抗体疗法)可变得更具特异性,提供正常细胞和肿瘤间的增强的治疗对比,以减少不良副作用。在 T-细胞结合的抗癌抗体的内容中,本发明提供失活抗体构建体(即前药)的全身性给药和肿瘤靶向,减少偏离靶点的毒性。在肿瘤充分摄取并且抗体在非靶点区域清楚后,通过给药活化剂将肿瘤结合抗体活化,活化剂与触发剂或者抗体或特定抗体域上的触发剂反应,导致触发剂的移除以及 T 细胞结合功能的恢复。这导致了 T 细胞的活化和抗癌作用(即这为药物释放)。

[0011] 发明概述

[0012] 为了更好地解决一个或多个上述期望,本发明提供用于前药的给药和活化的药盒,所述药盒包含直接或间接连接至触发基团的药物和所述触发基团的活化剂,其中所述触发基团包含亲双烯体并且所述活化剂包含双烯,所述亲双烯体满足下式(1a):

[0013]



[0014] 其中 T、F 各自独立地表示 H,或者选自烷基、F、Cl、Br 或 I 的取代基;字母 A、P、Q、X、Y 和 Z 的含义选自下列实施方案:

[0015] (1) PQ、QP、QX、XQ、XZ、ZX、ZY、YZ、YA、AY 键中的一个由 $-CR^aX^D-CR^aY^D-$ 组成,其余由 A、Y、Z、X、Q、P 构成的基团彼此独立地为 CR^a_2 、S、O、 SiR^b_2 ,使得 P 和 A 为 CR^a_2 ,并且不存在选自 O-O、O-S 和 S-S 的相邻原子对,并且使得如果存在 Si,则所述 Si 与 CR^a_2 或 O 相邻; X^D 为 $O-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $O-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $NR^c-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $NR^c-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$;并且 Y^D 为 NHR^c 、OH、SH;或者 X^D 为 $C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $C(S)-(L^D)_n-(D^D)$;并且 Y^D 为 $CR^c_2NHR^c$ 、 CR^c_2OH 、 CR^c_2SH 、 $NH-NH_2$ 、 $O-NH_2$ 或 $NH-OH$;

[0016] (2) A 为 CR^aX^D 并且 Z 为 CR^aY^D , 或者 Z 为 CR^aX^D 并且 A 为 CR^aY^D , 或者 P 为 CR^aX^D 并且 X 为 CR^aY^D , 或者 X 为 CR^aX^D 并且 P 为 CR^aY^D , 使得 X^D 和 Y^D 相互以反式构象放置; 其余由 A、Y、Z、X、Q 和 P 构成的基团彼此独立地为 CR^a_2 、S、O、 SiR^b_2 , 使得 P 和 A 为 CR^a_2 , 并且不存在选自 O-O、O-S 和 S-S 的相邻原子对, 并且使得如果存在 Si, 则所述 Si 与 CR^a_2 或 O 相邻; X^D 为 $O-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $O-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $NR^c-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $NR^c-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$, 并且 Y^D 为 NHR^c 、OH、SH、 $CR^c_2NHR^c$ 、 CR^c_2OH 、 CR^c_2SH 、 $NH-NH_2$ 、 $O-NH_2$ 或 $NH-OH$; 或者 X^D 为 $CR^c_2-O-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $CR^c_2-S-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $CR^c_2-O-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $CR^c_2-S-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $CR^c_2-NR^c-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $CR^c_2-NR^c-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$, 并且 Y^D 为 NHR^c 、OH、SH; 或者 X^D 为 $C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $C(S)-(L^D)_n-(D^D)$; 并且 Y^D 为 $CR^c_2NHR^c$ 、 CR^c_2OH 、 CR^c_2SH 、 $NH-NH_2$ 、 $O-NH_2$ 、 $NH-OH$;

[0017] (3) A 为 CR^aY^D 并且 P、Q、X、Z 中的一个为 CR^aX^D , 或者 P 为 CR^aY^D 并且 A、Y、Z、X 中的一个为 CR^aX^D , 或者 Y 为 CR^aY^D 并且 X 或 P 为 CR^aX^D , 或者 Q 为 CR^aY^D 并且 Z 或 A 为 CR^aX^D , 或者 Z 或 X 为 CR^aY^D 并且 A 或 P 为 CR^aX^D , 使得 X^D 和 Y^D 相互以反式构象放置; 其余由 A、Y、Z、X、Q 和 P 构成的基团彼此独立地为 CR^a_2 、S、O、 SiR^b_2 , 使得 P 和 A 为 CR^a_2 , 并且不存在选自 O-O、O-S 和 S-S 的相邻原子对, 并且使得如果存在 Si, 则所述 Si 与 CR^a_2 或 O 相邻; X^D 为 $(O-C(O))_p-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $O-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$, 并且 Y^D 为 $CR^c_2NHR^c$ 、 CR^c_2OH 、 CR^c_2SH 、 $NH-NH_2$ 、 $O-NH_2$ 、 $NH-OH$; p 为 0 或 1;

[0018] (4) P 为 CR^aY^D 并且 Y 为 CR^aX^D , 或者 A 为 CR^aY^D 并且 Q 为 CR^aX^D , 或者 Q 为 CR^aY^D 并且 A 为 CR^aX^D , 或者 Y 为 CR^aY^D 并且 P 为 CR^aX^D , 使得 X^D 和 Y^D 相互以反式构象放置; 其余由 A、Y、Z、X、Q 和 P 构成的基团彼此独立地为 CR^a_2 、S、O、 SiR^b_2 , 使得 P 和 A 为 CR^a_2 , 并且不存在选自 O-O、O-S 和 S-S 的相邻原子对, 并且使得如果存在 Si, 则所述 Si 与 CR^a_2 或 O 相邻; X^D 为 $(O-C(O))_p-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $O-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$; Y^D 为 NHR^c 、OH、SH; p=0 或 1;

[0019] (5) Y 为 Y^D 并且 P 为 CR^aX^D , 或者 Q 为 Y^D 并且 A 为 CR^aX^D ; 其余由 A、Y、Z、X、Q 和 P 构成的基团彼此独立地为 CR^a_2 、S、O、 SiR^b_2 , 使得 P 和 A 为 CR^a_2 , 并且不存在选自 O-O、O-S 和 S-S 的相邻原子对, 并且使得如果存在 Si, 则所述 Si 与 CR^a_2 或 O 相邻; X^D 为 $(O-C(O))_p-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $O-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $NR^c-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $NR^c-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $C(S)-(L^D)_n-(D^D)$; Y^D 为 NH; p=0 或 1;

[0020] (6) Y 为 Y^D 并且 P 或 Q 为 X^D , 或者 Q 为 Y^D 并且 A 或 Y 为 X^D ; 其余由 A、Y、Z、X、Q 和 P 构成的基团彼此独立地为 CR^a_2 、S、O、 SiR^b_2 , 使得 P 和 A 为 CR^a_2 , 并且不存在选自 O-O、O-S 和 S-S 的相邻原子对, 并且使得如果存在 Si, 则所述 Si 与 CR^a_2 或 O 相邻; X^D 为 $N-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $N-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$; Y^D 为 NH;

[0021] 其中 R^a 各自独立地选自 H、烷基、芳基、 OR' 、 SR' 、 $S(=O)R'''$ 、 $S(=O)_2R'''$ 、 $S(=O)_2NR'R''$ 、 $Si-R'''$ 、 $Si-O-R'''$ 、 $OC(=O)R'''$ 、 $SC(=O)R'''$ 、 $OC(=S)R'''$ 、 $SC(=S)R'''$ 、F、Cl、Br、I、 N_3 、 SO_2H 、 SO_3H 、 SO_4H 、 PO_3H 、 PO_4H 、NO、 NO_2 、CN、OCN、SCN、NCO、NCS、 CF_3 、 CF_2-R' 、 $NR'R''$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=S)R'$ 、 $C(=O)O-R'$ 、 $C(=S)O-R'$ 、 $C(=O)S-R'$ 、 $C(=S)S-R'$ 、 $C(=O)NR'R''$ 、 $C(=S)NR'R''$ 、 $NR'R''C(=O)-R'''$ 、 $NR'R''C(=S)-R'''$ 、 $NR'R''C(=O)O-R'''$ 、 $NR'R''C(=S)O-R'''$ 、 $NR'R''C(=O)S-R'''$ 、 $NR'R''C(=S)S-R'''$ 、 $OC(=O)NR'R''-R'''$ 、 $SC(=O)NR'R''-R'''$ 、 $OC(=S)NR'R''-R'''$ 、 $SC(=S)NR'R''-R'''$ 、 $NR'R''C(=O)NR''-R'''$ 、 $NR'R''C(=S)NR''-R'''$ 、 $CR'NR''$, 其中每个 R' 和每个 R'' 独立地为 H、芳基或烷基, 并且 R''' 独立

地为芳基或烷基；其中 R^b 各自独立地选自 H、烷基、芳基、O-烷基、O-芳基、OH；其中 R^c 各自独立地选自 H、 C_{1-6} 烷基和 C_{1-6} 芳基；

[0022] 其中两个或更多个 R^a 、 R^b 、 R^c 基团可共同形成环；

[0023] 并且其中 $(L^D)_n$ 是其中 $n=0$ 或 1 的任选的连接基，其优选通过 S、N、NH 或 O 连接至 T^R ，其中所述 S、N、NH 或 O 是所述连接基的一部分，所述连接基可由多个以线性和 / 或支化方式排列的单元组成； D^D 为一个或多个治疗基团或药物，其优选通过 S、N、NH 或 O 连接，其中所述 S、N、NH 或 O 为所述治疗基团的一部分。

[0024] 另一方面，本发明提供包含直接或间接连接至满足上式 (1a) 的反式-环辛烯基团的药物化合物的前药。

[0025] 再一方面，本发明提供将药物化合物修饰为可通过非生物的生物正交反应触发的前药的方法，所述方法包括提供药物和将所述药物化学连接至满足上式 (1a) 的环状基团的步骤。

[0026] 另一方面，本发明提供治疗方法，其中通过向患有可通过药物调节的疾病的患者给药包含在通过给药活化剂将其活化后所述药物会被释放的触发基团的前药来治疗所述患者，其中所述触发基团包含满足上式 (1a) 的环结构。

[0027] 另一方面，本发明提供包含八元非芳族环状单烯 (mono-alkenylene) 基团 (优选环辛烯基团，更优选反式-环辛烯基团) 的化合物，其用于动物或人中的前药疗法，所述基团包含与药物连接的键。

[0028] 另一方面，本发明提供双烯优选四嗪作为用于在生理环境下释放连接至满足式 (1a) 的化合物的物质的活化剂的用途。与此相关，本发明还涉及用作用于在生理环境下释放连接至满足式 (1a) 的化合物的物质的活化剂的四嗪，并且本发明还涉及在生理环境下活化连接至满足式 (1a) 的化合物的物质的释放的方法，其中四嗪用作活化剂。

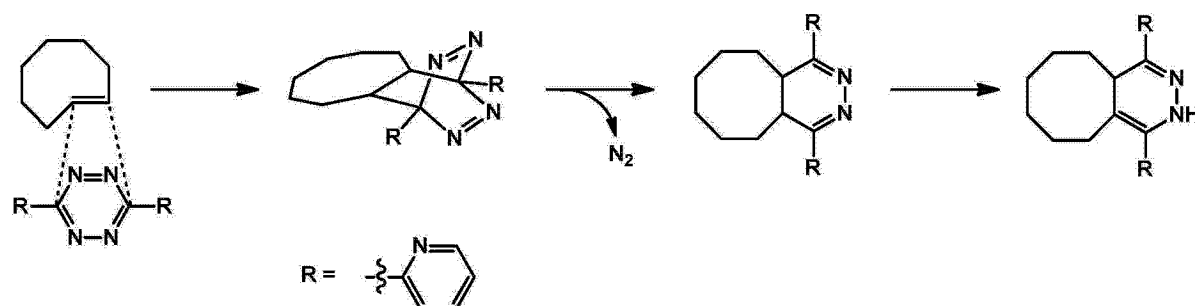
[0029] 在另一方面，本发明提供满足式 (1a) 的化合物与双烯 (优选四嗪) 间的反电子需求的 Diels-Alder 反应 (inverse electron-demand Diels-Alder reaction) 作为用于在生理环境下释放以化学结合形式给药的物质的化学工具的用途，其中所述物质连接至满足式 (1a) 的化合物。

[0030] 反电子需求的 (“逆”) Diels-Alder 反应

[0031] 式 (1a) 的亲双烯体和双烯能够以反电子需求的 Diels-Alder 反应的形式反应。通过触发剂与活化剂的逆 Diels-Alder 反应来活化前药，导致药物的释放。

[0032] 下面给出的反应路线为 (3,6)-二-(2-吡啶基)-s-四嗪双烯和反式-环辛烯亲双烯体的 [4+2] Diels-Alder 反应，然后进行逆 Diels-Alder 反应，其中形成产物和双氮。反应产物可互变异构化，这也如该路线所示。因为反式-环辛烯衍生物不包含如在经典 Diels Alder 反应中的吸电子基团，该类型 Diels Alder 反应区别于经典的 Diels Alder 反应，通常称作“反电子需求的 Diels-Alder 反应”。在下文中，两个反应步骤顺序 (即开始的 Diels-Alder 环加成 (通常为反电子需求的 Diels Alder 环加成) 和随后的逆 Diels Alder 反应) 会被简称作“逆 Diels Alder 反应”或“逆-DA”。有时会缩写为“rDA”反应。从而反应产物为逆 Diels-Alder 加成化合物或 rDA 加成化合物。

[0033]



[0034] 发明详述

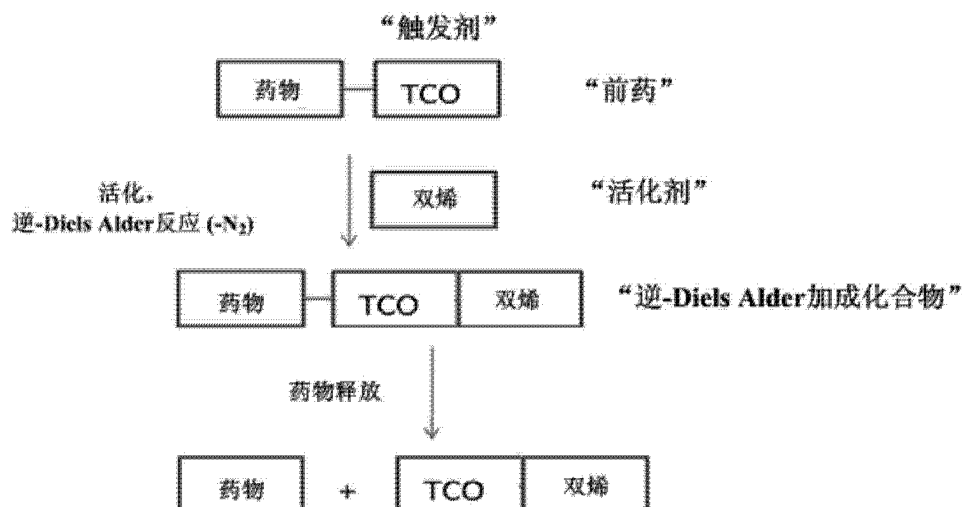
[0035] 在广义上,本发明是基于以下认识:当满足式(1a)的反式-环辛烯衍生物与适合的双烯(如四嗪衍生物)环加成后,药物可从所述反式-环辛烯衍生物释放。式(1a)的亲双烯体具有以下优势:它们与基本上与任意双烯反应(并实现药物释放)。

[0036] 不希望被理论束缚,发明人相信所述逆 Diels-Alder 加成化合物的分子结构使得该 rDA 加成化合物内发生自发性消除(spontaneous elimination)反应或环化反应以释放药物。特别地,发明人相信适当地修饰 rDA 组分(即根据本发明),生成 rDA 加成化合物,其中源自亲双烯体的部分上连接药物的键通过与源自亲双烯体的部分上的亲核体的反应断裂,同时在与双烯的 rDA 反应之前,排除了这样的源自亲双烯体的部分内的分子内反应。

[0037] 在前药活化中使用逆-Diels Alder 反应的一般概念如路线 1 中说明。

[0038] 路线 1:

[0039]



[0040] 该路线中,“TCO”表示反式-环辛烯。在此使用的术语反式-环辛烯可能包含一个或多个杂原子,并且特别指满足式(1a)的结构。广义上讲,除了在 Staudinger 反应基础上做出的尝试外,发明人发现,选择 TCO 作为前药触发基团提供了使得药物(活性)基团变为前药(可活化)基团的通用工具,其中通过亲双烯体(触发剂)与双烯(活化剂)的强效的非生物的生物正交反应(也就是前面提到的逆 Diels-Alder 反应)进行活化,并且其中所述前药为药物-亲双烯体缀合物。

[0041] 从路线 1 中会理解,在逆 Diels-Alder 加成化合物和终产物中,所示的 TCO 基团和所示的双烯基团分别是 TCO 和双烯基团在逆 Diels-Alder 反应中转化后的基团。

[0042] 成功应用非生物的生物正交化学反应的要求为两个参加的官能团具有经过细致

调整的反应性,这样避免了共存官能团的干扰。理想地,反应的参加者为非生物的、在生理条件下可反应的、并且不管它们的细胞 / 生理环境仅相互可反应 (生物正交) 的。生物环境对于选择性的需求排除了大部分常规反应的使用。

[0043] 然而,已证明反电子需求的 Diels-Alder 反应在动物中低浓度和半 - 等摩尔条件下的用途 (R. Rossin 等人, Angewandte Chemie Int Ed 2010, 49, 3375-3378)。本发明的反应参加者为有张力的 (strained) 反式 - 环辛烯 (TCO) 衍生物和适合的双烯如四嗪衍生物。TCO 和四嗪的环加成反应得到中间体,然后其通过逆 -Diels - Alder 环加成中排除双氮来重排,以形成二氢哒嗪缀合物。该物质及其互变异构体为逆 Diels-Alder 加成化合物。

[0044] 考虑到 rDA 反应的适合性,一方面,本发明提供四嗪作为用于在生理环境中释放连接至反式 - 环辛烯的物质的活化剂的用途。与此相关,本发明还涉及用作用于在生理环境下释放连接至反式 - 环辛烯的物质的活化剂的四嗪,并且本发明还涉及在生理环境下活化连接至反式 - 环辛烯的物质的释放的方法,其中四嗪用作活化剂。

[0045] 本发明的发明人还非显而易见地认识到,式 (1a) 的 TCO 的结构非常适合引发与其连接的药物的释放 (作为 TCO 亲双烯体中可用的双键和双烯参与的反应的结果)。据信使其可能的特点为将亲双烯体反应物中的 TCO 的八元环与 rDA 加成化合物中的八元环比较时,其性质上的改变。rDA 加成化合物中的八元环具有显著更高的构象自由度,并且具有与 rDA 反应前的高度张力的 TCO 中的八元环相比显著不同的构象。rDA 反应前的亲双烯体中的亲核位点锁定在亲双烯体的特定构象中,因而其未适合地放置以进行分子内反应,从而释放药物。与此相反,由于八元环性质的变化,该亲核位点在 rDA 加成化合物中适合地放置,并且会进行分子内反应,从而释放药物。根据上述,但不受理论限制,我们相信通过与双烯活化剂的 rDA 反应后的 TCO- 亲双烯体的张力释放以及由于与双烯活化剂的 rDA 反应的 TCO- 亲双烯体的张力释放来调节药物释放。

[0046] 因此要强调本发明的范围远远超越具体的化学结构。广义上讲,本发明利用了以下认识:使用式 (1a) 的亲双烯体的 rDA 反应以及 rDA 加成化合物体现了在生物正交反应中能够引起药物释放的通用平台。

[0047] 考虑到这点,本发明还提供反式 - 环辛烯和四嗪间的反电子需求的 Diels-Alder 反应作为用于在生理环境中释放所连接物质的化学工具的用途。

[0048] 本领域技术人员清楚该反应为生物正交的和对于反应对 (reaction pair) 存在多种结构选择的事实。如:rDA 反应是预靶向药物 (pre-targeted medicine) 领域已知的。参考如 W02010/119382、W02010/119389 和 W02010/051530。应当理解,尽管本发明呈现该反应完全不同的用途,但如在预靶向中使用的可用于 rDA 反应对的多种结构可能性在本发明领域也是可用的。

[0049] 本发明中所用的亲双烯体触发基团包含反式 - 环辛烯环,该环任选地包含一个或多个杂原子。在下文中,为了易读性,该八元环基团会被定义为反式 - 环辛烯基团,或者缩写为“TCO”基团。应当理解,实质上在于八元环作为亲双烯体以及反应时从其缀合的药物释放的可能性。本领域技术人员熟悉以下事实:亲双烯体活性不是必须依赖于环中所有碳原子的存在,因为杂环单烯烃八元环也已知具有亲双烯体活性。

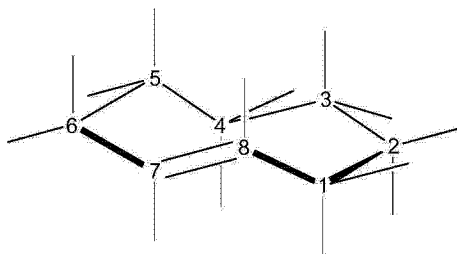
[0050] 从而,总体上讲,本发明不严格限于药物 - 取代的反式 - 环辛烯。有机化学领域技术人员会知道,存在其它八元环系亲双烯体,其包含与反式 - 环辛烯相同的环内双键,但其

可在环上其它位置具有一个或多个杂原子。即本发明一般涉及八元非芳族环状烯基团,优选环辛烯基团,并且更优选反式-环辛烯基团,其包含缀合的药物。

[0051] 不同于例如药物活性物质的情况(其中体内作用经常随小的结构变化而变化),本发明首先且首要地要求合适的化学反应性与合适的药物-缀合物设计的组合。从而,可能的结构扩展到本领域技术人员熟悉的作为亲双烯体反应的那些。

[0052] 应当注意,根据命名法的选择,TCO 亲双烯体也可被表示为 E-环辛烯。参考常规命名法会理解,作为环辛烯环上取代的结果,根据取代基的位置和分子量,相同的环辛烯异构体可形式上变为用 Z-异构体表示。在本发明中,本发明的任意取代变体(不管形式上为“E”或“Z”,或者“顺式”或“反式”异构体)均会被认作是未取代的反式-环辛烯或未取代的 E-环辛烯的衍生物。术语“反式-环辛烯”(TCO)和 E-环辛烯可互换使用,并且对于本发明的所有亲双烯体均保持,即使在取代基形式上要求相反命名法的情况下也保持。即本发明涉及环辛烯,其中如下编号的碳原子 1 和 6 为 E(异侧)式位置或反式位置。

[0053]



式(1)

[0054] 本发明会参照具体实施方案并参考具体图进一步说明,但本发明不限于此,而仅由权利要求限定。权利要求中的任意参考标记不应被解释为限制范围。描述的图仅为示意性且非限制性的。在图中为了说明目的,一些要素的尺寸可扩大并且不是按比例画。除非另外明确说明,当指代单数名词时使用不定冠词或定冠词(如“a”、“an”、“the”)时,包括该名词的复数。

[0055] 此外应注意,说明书和权利要求中使用的术语“包含/包括”不应解释为受限于之后所列的方式;它不排除其它要素或步骤。从而,表述“包含装置 A 和 B 的设备”的范围不应限制为仅由组件 A 和 B 组成的设备。其意指对于本发明,所述设备有重要意义的组件仅为 A 和 B。

[0056] 在下面数个化学式中涉及“烷基”和“芳基”。就“烷基”而言,其各自独立地表示至多 10 个碳原子的脂族的直链的、支链的、饱和的、不饱和的和/或环状的烃基,可能包含 1-10 个如 O、N 或 S 的杂原子,并且“芳基”各自独立地表示至多 20 个碳原子的芳族或杂芳族基团,其可能被取代,并且可能包含 1-10 个如 O、N、P 或者 S 的杂原子。“芳基”还包括“烷基芳基”或“芳基烷基”(简单实例:苄基)。“烷基”、“芳基”、“烷基芳基”和“芳基烷基”包含的碳原子数目可通过这些术语之前的标号表示(即 C₁₋₁₀ 烷基意指所述烷基可包含 1-10 个碳原子)。本发明的某些化合物具有手性中心和/或互变异构体,并且所有对映异构体、非对映异构体和互变异构体及其混合物均在本发明的范围内。在多个结构式中,基团或取代基用字母(如“A”、“B”、“X”、“Y”)和多个(编号的)“R”基团表示。这些字母的定义参考各个结构式解释,

[0057] 即除非另外说明,在不同结构式中,这些字母可各自独立地具有不同的含义。

[0058] 在本文描述的本发明的所有实施方案中,烷基优选低级烷基(C₁₋₄ 烷基),并且芳基各自优选为苯基。

[0059] 前期工作(R. Rossin 等人,Angewandte Chemie Int Ed2010, 49, 3375-3378)证明了反电子需求的 Diels-Alder 反应对于预靶向放射免疫显象术的用途。(3,6)-二-(2-吡啶基)-s-四嗪衍生物和 E-环辛烯间发生特定环加成实例,然后进行逆 Diels Alder 反应,其中形成产物和氮气。因为反式-环辛烯衍生物不包含如在经典 Diels Alder 反应中的吸电子基团,该类型的 Diels Alder 反应区别于经典的 Diels Alder 反应,经常称作“反电子需求的 Diels-Alder 反应”。在下文中,这两个反应步骤顺序(即开始的 Diels-Alder 环加成(通常为反电子需求的 Diels Alder 环加成)和随后的逆 Diels Alder 反应)简称作“逆 Diels Alder 反应”。

[0060] 逆 Diels-Alder 反应

[0061] 逆 Diels-Alder 偶联化学一般包括一对反应物,其偶联以形成不稳定中间体,该中间体通过逆 Diels-Alder 反应消除作为唯一副产物的小分子(根据起始化合物其可为如 N₂、CO₂、RCN)以形成逆 Diels-Alder 加成化合物。一对反应物包含:适合的双烯(例如四嗪衍生物,如缺电子四嗪)作为一个反应物(即一个生物正交反应基团),和适合的亲双烯体(如有张力的环辛烯(TCO))作为另一个反应物(即另一个生物正交反应基团)。

[0062] 如缺电子(取代的)四嗪与 TCO 基团极快的反应生成了连接中间体(ligation intermediate),其通过在[4+2]逆 Diels-Alder 环加成中消除作为唯一副产物的 N₂ 重排为二氢吡嗪逆 Diels-Alder 加成化合物。在水溶液环境中,起始形成的 4,5-二氢吡嗪产物可互变异构为 1,4-二氢吡嗪产物。

[0063] 这两个反应物质是非生物的,并且在体内不经历快速代谢或副反应。它们是生物正交的,如它们在生理介质中选择性相互反应。从而,本发明的化合物和方法可在活有机体中使用。此外,反应性基团较小,并且可在生物样品或活有机体中引入而不显著改变其中生物分子的尺寸。关于反电子需求的 Diels-Alder 反应和反应性物质对的行为的参考包括:Thalhammer, F; Wallfahner, U; Sauer, J, Tetrahedron Letters, 1990, 31(47), 6851-6854; Wijnen, JW; Zavarise, S; Engberts, JBFN, Journal Of Organic Chemistry, 1996, 61, 2001-2005; Blackman, ML; Royzen, M; Fox, JM, Journal Of The American Chemical Society, 2008, 130(41), 13518-19), R. Rossin, P. Renart Verkerk, Sandra M. van den Bosch, R. C. M. Vulders, I. Verel, J. Lub, M. S. Robillard, Angew Chem Int Ed2010, 49, 3375, N. K. Devaraj, R. Upadhyay, J. B. Haun, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, Angew Chem Int Ed2009, 48, 7013, 和 Devaraj 等人, Angew. Chem. Int. Ed., 2009, 48, 1-5。

[0064] 应当理解,广义上讲,根据本发明,之前提到的逆 Diels-Alder 偶联和随后的药物活化化学可适用于基本上任意一对可在前药疗法中使用的分子、基团或结构片段。即,这样的反应对中的一个包含连接至亲双烯体(触发剂)的药物。另一个为与所述亲双烯体的反应中使用的互补的双烯。

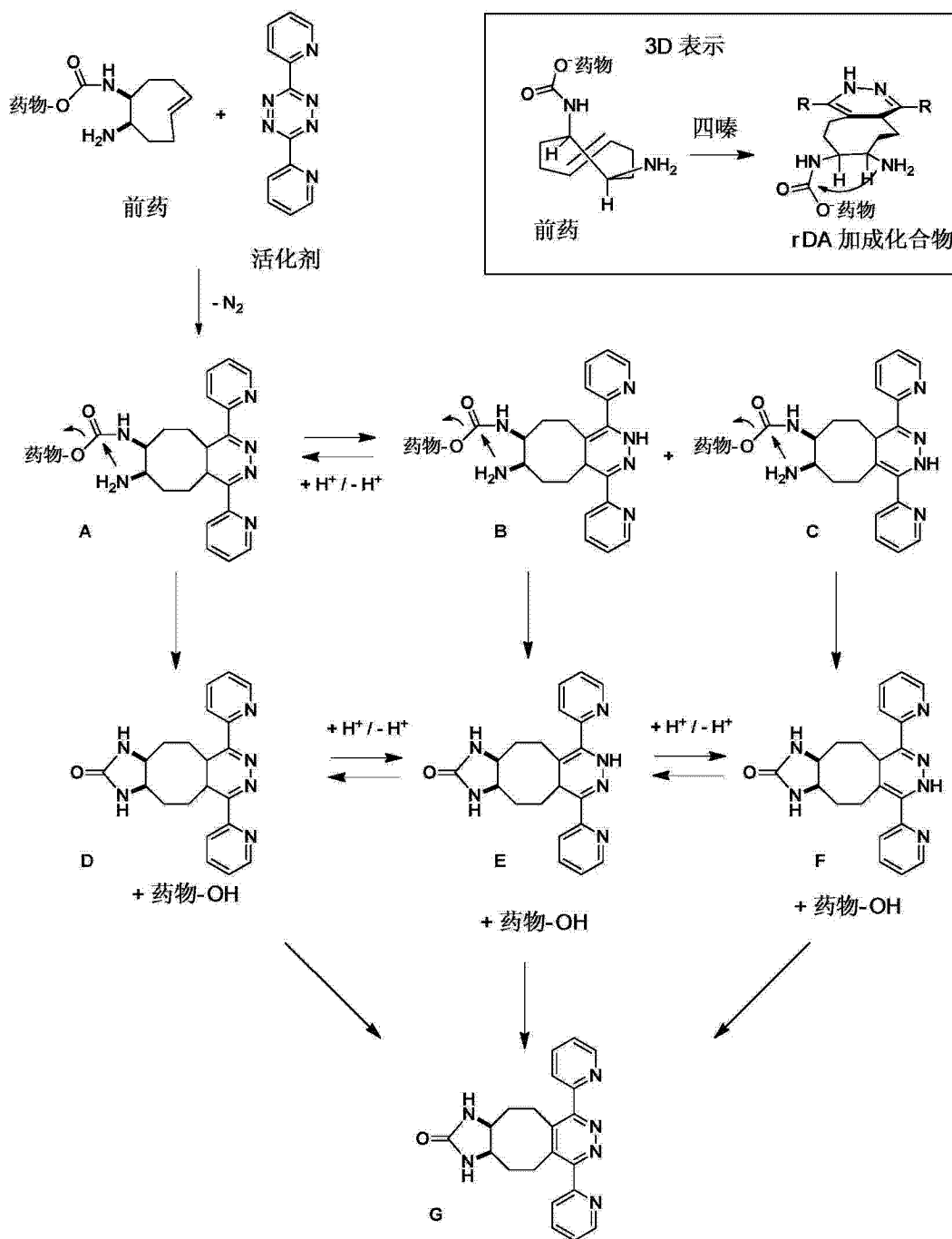
[0065] 触发剂

[0066] 所述前药包含用 D^p 表示的直接或间接连接至用 T^R 表示的触发基团的药物,其中所述触发基团为亲双烯体。所述亲双烯体广义上讲为八元非芳族环状烯烃基团(优选环辛烯

基团,并且更优选为反式-环辛烯基团)。

[0067] 在本发明中,通过源自 TCO 亲双烯体的逆 Diels-Alder 加成化合物的部分的分子内环化/消除反应导致一个或多个药物的释放。在该 TCO 与活化剂反应形成 rDA 加成化合物,然后存在于 TCO 上的亲核位点(即亲双烯体,特别是在触发剂中的 Y^D 基团,参见前文)与相同 TCO 上的亲电位点(特别是在触发剂中的 X^D 基团)反应。源自 TCO 的 rDA 加成化合物部分(即 rDA 加成化合物的八元环)具有不同的构象,并且与 rDA 反应前的 TCO 中的八元环相比具有提高的构象自由度,这促使亲核反应的发生,从而将药物作为离去基团释放。随着在逆 Diels-Alder 加成化合物内使亲核位点和亲电位点贴近,发生分子内环化/消除反应,并且生成具有低张力的有利结构。另外,环状结构的形成也是分子内反应发生的驱动力,从而也可促使离去基团的有效释放,即药物的释放。在逆 Diels-Alder 反应之前,亲核位点和亲电位点之间不发生反应或其反应相对不充分,因为相对刚性的、构象限制的 TCO 环使得对于这样的反应而言,两个位点都不利地放置。这样的前药自身相对稳定,并且只有活化剂与前药反应且组装入进行分子内反应的逆 Diels-Alder 加成化合物后,才利于消除。在一个优选实施方案中,TCO 环为冠式构象。以下实例说明了本发明的释放机制。

[0068]



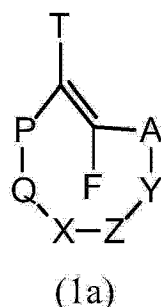
[0069] 上述实例说明了逆 Diels-Alder 加成化合物内的分子内环化 / 消除反应可如何导致药物物质的释放。rDA 反应生成 A, 其可互变异构以生成 B 和 C。结构 B 和 C 也可相互互变异构 (未显示)。rDA 产物 A、B 和 C 可分子内环化, 释放连接的药物, 并且得到结构 D、E 和 F, 其可任选地氧化以形成产物 G。由于在水中由 A 互变异构为 B 和 C 是非常快速的 (大约几秒), 发明人相信, 主要从结构 B 和 C 发生药物的释放。以下也是可能的: 亲核位点通过在亲电位点上的亲核攻击和随后的药物释放而不真正形成 (稳定的) 环状结构, 从而放出药物物质。在该情况中, 未形成环结构, 并且亲核位点保持完整, 例如因为该环结构是短暂存在且不稳定的, 并且随着亲核位点的再形成而裂开。在任意情况中以任意方式检查该方法, 药物物质 (在此为醇“药物-OH”) 有效地从逆 Diels-Alder 加成化合物放出, 而不从单独的前药放出。

[0070] 不希望被理论束缚,上述实例说明 rDA 加成化合物形成后,构象限制和所导致的 TCO 触发剂中亲核位点和亲电位点的不利位置如何缓解,从而导致消除/环化反应以及药物释放。

[0071] 对于 TCO 上的亲核位点,人们必须考虑到可在(人)体内存在的条件下(这样的条件例如 pH= 约 7.4 的生理条件,或者例如在恶性组织中普遍的条件(pH 值可能低于 7.4)下),该位点必须能够用作亲核体。优选的亲核体为氨基、巯基或醇基,因为这些通常性质上最亲核,并且因此最有效。

[0072] 在本发明中,TCO 满足下式 (1a) :

[0073]



[0074] 在实施方案 1 中, PQ、QP、QX、XQ、XZ、ZX、ZY、YZ、YA、AY 键中的一个由 $-CR^aX^D-CR^aY^D-$ 组成,其余(来自 A、Y、Z、X、Q、P 的)基团彼此独立地为 CR^a_2 、S、O、 SiR^b_2 ,使得 P 和 A 为 CR^a_2 ,并且不存在选自 O-O、O-S 和 S-S 的相邻原子对,并且使得如果存在 Si,则所述 Si 与 CR^a_2 或 O 相邻。

[0075] X^D 为 $O-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $O-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $NR^c-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $NR^c-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$, 并且 Y^D 为 NHR^c 、OH、SH; 或者 X^D 为 $C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $C(S)-(L^D)_n-(D^D)$; 并且 Y^D 为 $CR^c_2NHR^c$ 、 CR^c_2OH 、 CR^c_2SH 、 $NH-NH_2$ 、 $O-NH_2$ 、 $NH-OH$ 。

[0076] 优选地, X^D 为 $NR^c-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$, 并且 Y^D 为 NHR^c 。

[0077] 在该实施方案 1 中, X^D 和 Y^D 基团可相互以顺式或反式放置,其中根据其在 TCO 上的位置,顺式或反式是优选的;如果 PQ、QP、AY 或 YA 为 $-CR^aX^D-CR^aY^D-$,则 X^D 和 Y^D 优选相互以反式放置;如果 ZX 或 XZ 为 $-CR^aX^D-CR^aY^D-$,则 X^D 和 Y^D 优选相互以顺式放置。

[0078] 在实施方案 2 中, A 为 CR^aX^D 并且 Z 为 CR^aY^D , 或者 Z 为 CR^aX^D 并且 A 为 CR^aY^D , 或者 P 为 CR^aX^D 并且 X 为 CR^aY^D , 或者 X 为 CR^aX^D 并且 P 为 CR^aY^D , 使得 X^D 和 Y^D 相互以反式构象放置;其余(来自 A、Y、Z、X、Q、P 的)基团彼此独立地为 CR^a_2 、S、O、 SiR^b_2 ,使得 P 和 A 为 CR^a_2 ,并且不存在选自 O-O、O-S 和 S-S 的相邻原子对,并且使得如果存在 Si,则所述 Si 与 CR^a_2 或 O 相邻; X^D 为 $O-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $O-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $NR^c-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $NR^c-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$, 并且 Y^D 为 NHR^c 、OH、SH、 $CR^c_2NHR^c$ 、 CR^c_2OH 、 CR^c_2SH 、 $NH-NH_2$ 、 $O-NH_2$ 、 $NH-OH$; 或者 X^D 为 $CR^c_2-O-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $CR^c_2-S-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $CR^c_2-O-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $CR^c_2-S-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $CR^c_2-NR^c-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $CR^c_2-NR^c-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$; 并且 Y^D 为 NHR^c 、OH、SH; 或者 X^D 为 $C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $C(S)-(L^D)_n-(D^D)$; 并且 Y^D 为 $CR^c_2NHR^c$ 、 CR^c_2OH 、 CR^c_2SH 、 $NH-NH_2$ 、 $O-NH_2$ 、 $NH-OH$ 。

[0079] 优选地, X^D 为 $NR^c-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$, 并且 Y^D 为 NHR^c 。

[0080] 在实施方案 3 中, A 为 CR^aY^D 并且 P、Q、X、Z 中的一个为 CR^aX^D , 或者 P 为 CR^aY^D 并且

A、Y、Z、X 中的一个为 CR^aX^D , 或者 Y 为 CR^aY^D 并且 X 或 P 为 CR^aX^D , 或者 Q 为 CR^aY^D 并且 Z 或 A 为 CR^aX^D , 或者 Z 或 X 为 CR^aY^D 并且 A 或 P 为 CR^aX^D , 使得 X^D 和 Y^D 相互以反式构象放置; 其余 (来自 A、Y、Z、X、Q、P 的) 基团彼此独立地为 CR^a_2 、S、O、 SiR^b_2 , 使得 P 和 A 为 CR^a_2 , 并且不存在选自 O-O、O-S 和 S-S 的相邻原子对, 并且使得如果存在 Si, 则所述 Si 与 CR^a_2 或 O 相邻。

[0081] X^D 为 $(O-C(O))_p-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $O-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$; Y^D 为 $CR^c_2NHR^c$ 、 CR^c_2OH 、 CR^c_2SH 、 $NH-NH_2$ 、 $O-NH_2$ 、 $NH-OH$; $p=0$ 或 1。

[0082] 优选地, X^D 为 $(O-C(O))_p-(L^D)_n-(D^D)$, 其中 $p=1$, 并且 Y^D 为 $CR^c_2NHR^c$ 。

[0083] 在实施方案 4 中, P 为 CR^aY^D 并且 Y 为 CR^aX^D , 或者 A 为 CR^aY^D 并且 Q 为 CR^aX^D , 或者 Q 为 CR^aY^D 并且 A 为 CR^aX^D , 或者 Y 为 CR^aY^D 并且 P 为 CR^aX^D , 使得 X^D 和 Y^D 相互以反式构象放置; 其余 (来自 A、Y、Z、X、Q、P 的) 基团彼此独立地为 CR^a_2 、S、O、 SiR^b_2 , 使得 P 和 A 为 CR^a_2 , 并且不存在选自 O-O、O-S 和 S-S 的相邻原子对, 并且使得如果存在 Si, 则所述 Si 与 CR^a_2 或 O 相邻。

[0084] X^D 为 $(O-C(O))_p-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $O-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$; Y^D 为 NHR^c 、OH、SH; $p=0$ 或 1。

[0085] 优选地, X^D 为 $(O-C(O))_p-(L^D)_n-(D^D)$, 其中 $p=1$, 并且 Y^D 为 NHR^c 。

[0086] 在实施方案 5 中, Y 为 Y^D 并且 P 为 CR^aX^D , 或者 Q 为 Y^D 并且 A 为 CR^aX^D ; 其余 (来自 A、Y、Z、X、Q、P 的) 基团彼此独立地为 CR^a_2 、S、O、 SiR^b_2 , 使得 P 和 A 为 CR^a_2 , 并且不存在选自 O-O、O-S 和 S-S 的相邻原子对, 并且使得如果存在 Si, 则所述 Si 与 CR^a_2 或 O 相邻。

[0087] X^D 为 $(O-C(O))_p-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $O-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $S-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $NR^c-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $NR^c-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $C(S)-(L^D)_n-(D^D)$; Y^D 为 NH; $p=0$ 或 1。

[0088] 优选地, X^D 为 $NR^c-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 或 $(O-C(O))_p-(L^D)_n-(D^D)$, 其中 $p=0$ 或 1。

[0089] 在实施方案 6 中, Y 为 Y^D 并且 P 或 Q 为 X^D , 或者 Q 为 Y^D 并且 A 或 Y 为 X^D ; 其余 (来自 A、Y、Z、X、Q、P 的) 基团彼此独立地为 CR^a_2 、S、O、 SiR^b_2 , 使得 P 和 A 为 CR^a_2 , 并且不存在选自 O-O、O-S 和 S-S 的相邻原子对, 并且使得如果存在 Si, 则所述 Si 与 CR^a_2 或 O 相邻。

[0090] X^D 为 $N-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 、 $N-C(S)-(L^D)_n-(D^D)$; Y^D 为 NH;

[0091] 优选地, X^D 为 $N-C(O)-(L^D)_n-(D^D)$ 。

[0092] T、F 各自独立地表示 H, 或者选自烷基、F、Cl、Br 或 I 的取代基。 $(L^D)_n$ 是任选的连接基 (其中 $n=0$ 或 1), 其优选地通过 S、N、NH 或 O 连接至 T^R , 其中所述 S、N、NH 或 O 是所述连接基的一部分, 所述连接基可由多个以线性和 / 或支化方式排列的单元组成。 D^D 为一个或多个治疗基团或药物, 其优选通过 S、N、NH、或 O 连接, 其中所述 S、N、NH、或 O 为所述治疗基团的一部分。

[0093] 在一个优选实施方案中, 式 (1a) 的 TCO 为全碳环。在另一优选实施方案中, 式 (1a) 的 TCO 为环中具有一个或两个氧原子 (优选具有一个氧原子) 的杂环碳环。

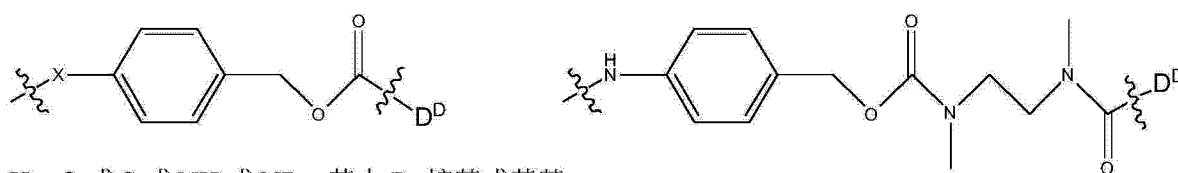
[0094] 优选地, 当 D^D 通过 NH 结合至 T^R 或 L^D 时, 所述 NH 为来自 D^D 的伯胺 ($-NH_2$) 基团, 并且当 D^D 通过 N 结合时, 所述 N 为来自 D^D 的仲胺 ($-NH-$) 基团。类似地, 优选地, 当 D^D 通过 O 或 S 结合时, 所述 O 或 S 分别为来自 D^D 的羟基 ($-OH$) 基团或巯基 ($-SH$) 基团。还优选地, D^D 中包含的所述 S、N、NH 或 O 基团结合至 D^D 的脂族碳或芳族碳。

[0095] 优选地, 当 L^D 通过 NH 结合至 T^R 时, 所述 NH 为来自 L^D 的伯胺 ($-NH_2$) 基团, 并且当

L^D 通过 N 结合时,所述 N 为来自 L^D 的仲胺 (-NH-) 基团。类似地,优选地,当 L^D 通过 O 或 S 结合时,所述 O 或 S 分别为来自 L^D 的羟基 (-OH) 基团或巯基 (-SH) 基团。还优选地, L^D 中包含的所述 S、N、NH 或 O 基团结合至 L^D 的脂族碳或芳族碳。

[0096] 提及本发明中的连接基 L^D ,其可以是能够或不能自切除 (self-immolative) 的或其组合,并且其可由多个自切除单元组成。作为进一步说明,如果 $p=0$ 且 $n=0$,则药物物质 D^D 直接构成消除反应的离去基团,并且如果 $p=0$ 且 $n=1$,则自切除连接基构成消除反应的离去基团。连接基 L^D 和药物 D^D 的结合位置和方式是技术人员已知的 (参见例如, Papot 等人, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2008, 8, 618-637)。然而,自切除连接基 L^D 的代表性但非限制性实例为苄基衍生物,如以下所画的那些。右侧展示了具有多个单元的自切除连接基的实例;该连接基不仅会降解为 CO_2 和一个 4-氨基苄基醇单元,还会降解为一个 1,3-二甲基咪唑烷-2-酮单元。

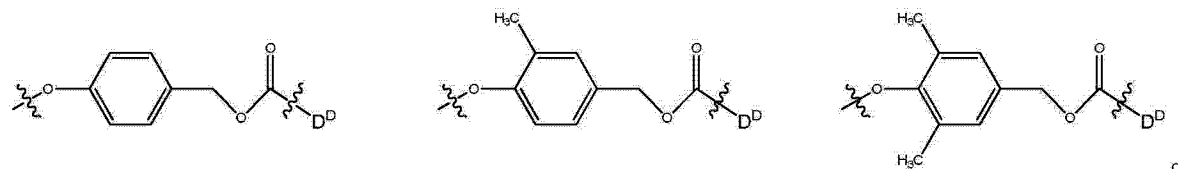
[0097]



X = O 或 S 或 NH 或 NR, 其中 R = 烷基或芳基

[0098] 通过 (优选在其 2- 和 / 或 6- 位) 取代上述提到的自切除连接基 L^D 的苄基,由于对于分子内环化 / 消除反应的立体和 / 或电子效应可调节药物物质 D^D 的释放速率。这样的取代的苄基衍生物的合成方法是本领域技术人员已知的 (参见例如 Greenwald 等人, *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 3657-3667, 以及 Thornthwaite 等人, *Polym. Chem.*, 2011, 2, 773-790)。以下画出一些具有不同释放速率的取代的苄基衍生物的实例:

[0099]



[0100] 如上所示的 R^a 可各自独立地为 H、烷基、芳基 OR' 、 SR' 、 $S(=O)R'''$ 、 $S(=O)_2R'''$ 、 $S(=O)_2NR'R''$ 、 $Si-R'''$ 、 $Si-O-R'''$ 、 $OC(=O)R'''$ 、 $SC(=O)R'''$ 、 $OC(=S)R'''$ 、 $SC(=S)R'''$ 、F、Cl、Br、I、 N_3 、 SO_2H 、 SO_3H 、 SO_4H 、 PO_3H 、 PO_4H 、NO、 NO_2 、CN、OCN、SCN、NCO、NCS、 CF_3 、 CF_2-R' 、 $NR'R''$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=S)R'$ 、 $C(=O)O-R'$ 、 $C(=S)O-R'$ 、 $C(=O)S-R'$ 、 $C(=S)S-R'$ 、 $C(=O)NR'R''$ 、 $C(=S)NR'R''$ 、 $NR'C(=O)-R'''$ 、 $NR'C(=S)-R'''$ 、 $NR'C(=O)O-R'''$ 、 $NR'C(=S)O-R'''$ 、 $NR'C(=O)S-R'''$ 、 $NR'C(=S)S-R'''$ 、 $OC(=O)NR'-R'''$ 、 $SC(=O)NR'-R'''$ 、 $OC(=S)NR'-R'''$ 、 $SC(=S)NR'-R'''$ 、 $NR'C(=O)NR''-R''$ 、 $NR'C(=S)NR''-R''$ 、 $CR'NR''$, 其中每个 R' 与每个 R'' 独立地为 H、芳基或烷基,并且 R''' 独立地为芳基或烷基;

[0101] 如上所示的 R^b 各自独立地选自 H、烷基、芳基、O-烷基、O-芳基、OH;

[0102] 如上所示的 R^c 各自独立地选自 H、 C_{1-6} 烷基和 C_{1-6} 芳基;

[0103] 其中两个或更多个 R^a 、 R^b 、 R^c 基团可共同形成环;

[0104] 优选地, R^a 各自独立地选自 H、烷基、O-烷基、O-芳基、OH、 $C(=O)NR'R''$ 、 $NR'C(=O)-R'''$, 其中每个 R' 和每个 R'' 独立地为 H、芳基或烷基,并且 R''' 独立地为烷基

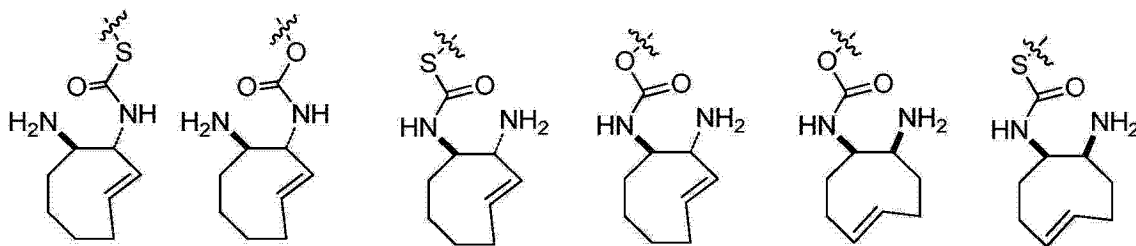
和芳基。

[0105] 在上述全部实施方案中,任选地,A、P、Q、Y、X和Z中的一个或者取代基或者自切除连接基 L^D 或者药物 D^D 任选地通过一个或多个间隔基(spacer) S^P 结合至一个或多个靶向剂 T^T 或掩蔽基团 M^M 。

[0106] 如上所述的TCO的合成对本领域技术人员而言是容易获取的。特别地,这也适用于在张力环烯烃环中具有一个或多个杂原子的TCO。这方面的参考包括Cere等人,Journal of Organic Chemistry 1980, 45, 261和Prevost等人,Journal of the American Chemical Society 2009, 131, 14182。

[0107] 在另一优选实施方案中,所述亲双烯体为选自下列结构的化合物:

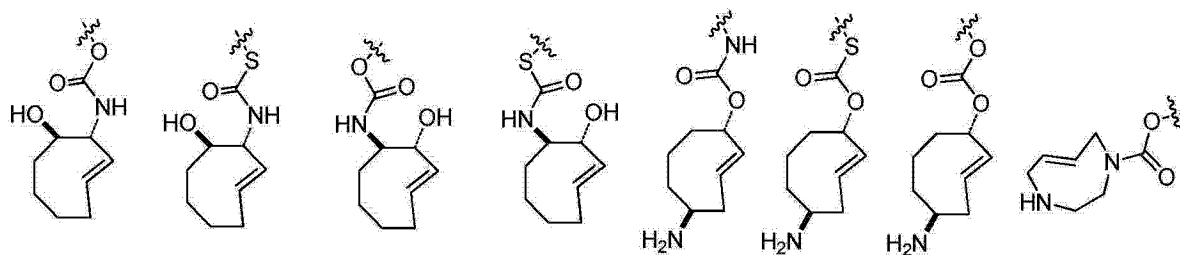
[0108]



[0109] $\sim$ = 所连接的 D^D 、 L^D - D^D 的其余部分,其任选地包含 T^T 或 S^P - T^T 或 M^M 或 S^P - M^M

[0110] 在又一实施方案中,所述亲双烯体为选自下列结构的化合物:

[0111]



[0112] $\sim$ = 所连接的 D^D 、 L^D - D^D 的其余部分,其任选地包含 T^T 或 S^P - T^T 或 M^M 或 S^P - M^M

[0113] TCO作为载体的用途

[0114] 在其全部实施方案中,本发明还涉及满足式(1a)的反式-环辛烯作为治疗化合物的载体的用途。如上所讨论,广义上讲,将反式-环辛烯认作TCO,优选全碳环或包含一个或两个杂原子的环。治疗化合物为药物或旨在具有治疗用途的其它化合物或基团。根据本发明此方面的TCO作为载体的用途不涉及治疗化合物的治疗活性。事实上,如果治疗化合物是意图开发为药物的药物物质(实践中其中许多会失败),在测试药物时仍可使用TCO作为载体。在这个意义上,具有载体能力的TCO以相同方式被视作药物赋形剂,用作将药物引入个体时的载体。

[0115] 将TCO用作载体具有下述优势:它能够向个体给药由可与双烯(特别是四嗪)进行生物正交反应的基团运载的药物。这提供了有力的工具,不仅影响运载入体内的药物的结果,还跟踪其结果(如通过使标记的双烯与其反应),或者改变其结果(如通过使pK调节剂与其结合)。这都基于使双烯与TCO在上面讨论的rDA反应中反应的可能性。所述载体优选与下面讨论的活化剂反应,以便引起在此充分讨论的治疗化合物从TCO的释放。

[0116] 活化剂

[0117] 活化剂包含生物正交反应基团,其中所述活化剂的生物正交反应基团为双烯。双烯与其它生物正交反应基团(触发剂,其为亲双烯体(参见前文))反应。选择活化剂的双烯以便能够与触发剂的亲双烯体通过进行 Diels-Alder 环加成然后进行逆 Diels-Alder 反应来进行反应,从而得到逆 Diels-Alder 加成化合物。然后该中间体加成化合物释放一个或多个药物,其中所述药物释放可由多种与逆 Diels-Alder 加成化合物的具体分子结构有关的环境或条件导致。

[0118] 双烯

[0119] 本领域技术人员知道在逆 Diels-Alder 反应中反应的双烯的价值。包含于活化剂中的双烯可为包含第三双键的环(如四嗪,其为本发明的优选活化剂)的一部分。

[0120] 通常,活化剂为包含含有至少两个共轭双键的杂环基团的分子。

[0121] 优选的双烯如下参照式(2)-(4)给出。

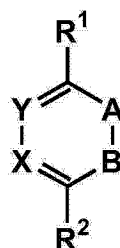
[0122]



(2)

[0123] 在式(2)中, R^1 选自H、烷基、芳基、 CF_3 、 CF_2-R' 、 OR' 、 SR' 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=S)R'$ 、 $C(=O)O-R'$ 、 $C(=O)S-R'$ 、 $C(=S)O-R'$ 、 $C(=S)S-R''$ 、 $C(=O)NR'R''$ 、 $C(=S)NR'R''$ 、 $NR'R''$ 、 $NR'C(=O)R''$ 、 $NR'C(=S)R''$ 、 $NR'C(=O)OR''$ 、 $NR'C(=S)OR''$ 、 $NR'C(=O)SR''$ 、 $NR'C(=S)SR''$ 、 $NR'C(=O)NR''R''$ 、 $NR'C(=S)NR''R''$,其中每个 R' 和每个 R'' 独立地为H、芳基或烷基;A和B各自独立地选自烷基取代的碳、芳基取代的碳、氮、 N^+O^- 、 N^+R ,其中 N^+R 中的R为烷基,条件是A和B不都为碳;X选自O、N-烷基和C=O;并且Y为CR,其中CR中的R选自H、烷基、芳基、 $C(=O)OR'$ 、 $C(=O)SR'$ 、 $C(=S)OR'$ 、 $C(=S)SR'$ 、 $C(=O)NR'R''$,其中 R' 和 R'' 各自独立地为H、芳基或烷基。

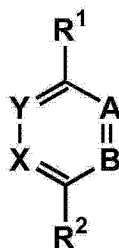
[0124]



(3)

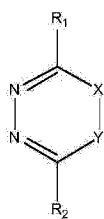
[0125] 特别适合作为环辛烯的反应配体的双烯如式(3)给出,其中 R^1 和 R^2 各自独立地选自H、烷基、芳基、 CF_3 、 CF_2-R' 、 NO_2 、 OR' 、 SR' 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=S)R'$ 、 $OC(=O)R'''$ 、 $SC(=O)R'''$ 、 $OC(=S)R'''$ 、 $SC(=S)R'''$ 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'''$ 、 $S(=O)_2NR'R''$ 、 $C(=O)O-R'$ 、 $C(=O)S-R'$ 、 $C(=S)O-R'$ 、 $C(=S)S-R'$ 、 $C(=O)NR'R''$ 、 $C(=S)NR'R''$ 、 $NR'R''$ 、 $NR'C(=O)R''$ 、 $NR'C(=S)R''$ 、 $NR'C(=O)OR''$ 、 $NR'C(=S)OR''$ 、 $NR'C(=O)SR''$ 、 $NR'C(=S)SR''$ 、 $OC(=O)NR'R''$ 、 $SC(=O)NR'R''$ 、 $OC(=S)NR'R''$ 、 $SC(=S)NR'R''$ 、 $NR'C(=O)NR''R''$ 、 $NR'C(=S)NR''R''$,其中每个 R' 和每个 R'' 独立地为H、芳基

或烷基,并且 R''' 独立地为芳基或烷基;A 选自 N-烷基、N-芳基、C=O 和 CN-烷基;B 为 O 或 S;X 选自 N、CH、C-烷基、C-芳基、CC(=O)R'、CC(=S)R'、CS(=O)R'、CS(=O)₂R'''、CC(=O)O-R'、CC(=O)S-R'、CC(=S)O-R'、CC(=S)S-R'、CC(=O)NR' R''、CC(=S)NR' R''、R' 和 R'' 各自独立地为 H、芳基或烷基,并且 R''' 独立地为芳基或烷基;Y 选自 CH、C-烷基、C-芳基、N 和 N^+O^- 。
[0126]

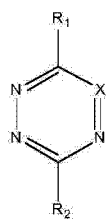


(4)

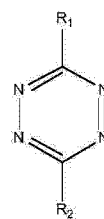
[0127] 特别适合作为对于环辛烯的反应配体的另一个双烯如式 (4) 给出,其中 R^1 和 R^2 各自独立地选自 H、烷基、芳基、 CF_3 、 CF_2-R' 、NO、 NO_2 、OR'、SR'、CN、C(=O)R'、C(=S)R'、OC(=O)R'''、SC(=O)R'''、OC(=S)R'''、SC(=S)R'''、S(=O)R'、S(=O)₂R'''、S(=O)₂OR'、PO₃R' R''、S(=O)₂NR' R''、C(=O)O-R'、C(=O)S-R'、C(=S)O-R'、C(=S)S-R'、C(=O)NR' R''、C(=S)NR' R''、NR' R''、NR' C(=O)R''、NR' C(=S)R''、NR' C(=O)OR''、NR' C(=S)OR''、NR' C(=O)SR''、NR' C(=S)SR''、OC(=O)NR' R''、SC(=O)NR' R''、OC(=S)NR' R''、SC(=S)NR' R''、NR' C(=O)NR'' R''、NR' C(=S)NR'' R''、其中每个 R' 和每个 R'' 独立地为 H、芳基或烷基,并且 R''' 独立地为芳基或烷基;A 选自 N、C-烷基、C-芳基和 N^+O^- ;B 为 N;X 选自 N、CH、C-烷基、C-芳基、CC(=O)R'、CC(=S)R'、CS(=O)R'、CS(=O)₂R'''、CC(=O)O-R'、CC(=O)S-R'、CC(=S)O-R'、CC(=S)S-R'、CC(=O)NR' R''、CC(=S)NR' R''、其中 R' 和 R'' 各自独立地为 H、芳基或烷基,并且 R''' 独立地为芳基或烷基;Y 选自 CH、C-烷基、C-芳基、N 和 N^+O^- 。
[0128]



(5)



(6)



(7)

[0129] 根据本发明,特别有用的双烯为如式 (5)、(6) 和 (7) 分别给出的 1,2-二嗪、1,2,4-三嗪和 1,2,4,5-四嗪衍生物。

[0130] 1,2-二嗪在 (5) 中给出,其中 R^1 和 R^2 各自独立地选自 H、烷基芳基、 CF_3 、 CF_2-R' 、 NO_2 、OR'、SR'、C(=O)R'、C(=S)R'、OC(=O)R'''、SC(=O)R'''、OC(=S)R'''、SC(=S)R'''、S(=O)R'、S(=O)₂R'''、S(=O)₂NR' R''、C(=O)O-R'、C(=O)S-R'、C(=S)O-R'、C(=S)S-R'、C(=O)NR' R''、C(=S)NR' R''、NR' R''、NR' C(=O)R''、NR' C(=S)R''、NR' C(=O)OR''、NR' C(=S)OR''、NR' C(=O)SR''、NR' C(=S)SR''、OC(=O)NR' R''、SC(=O)NR' R''、OC(=S)NR' R''、SC(=S)NR' R''、NR' C(=O)NR'' R''、NR' C(=S)NR'' R''、其中每个 R' 和每个 R'' 各自独立地为 H、芳基或烷基,并且 R''' 独

立地为芳基或烷基;X和Y各自独立地选自O、N-烷基、N-芳基、C=O、CN-烷基、CH、C-烷基、C-芳基、CC(=O)R'、CC(=S)R'、CS(=O)R'、CS(=O)₂R''、CC(=O)O-R'、CC(=O)S-R'、CC(=S)O-R'、CC(=S)S-R'、CC(=O)NR'R''、CC(=S)NR'R''，其中R'和R''各自独立地为H、芳基或烷基，并且R'''独立地为芳基或烷基，其中X-Y可为单键或双键，并且其中X和Y可在除六元二嗪外的二级环结构中连接。优选地，X-Y表示酯基(X=O且Y=C=O;X-Y为单键)或者X-Y表示环烷基(X=CR'且Y=CR'';X-Y为单键;R'和R''连接)，优选为环丙烷环，这样R'和R''在1,2-二嗪外的第一碳原子处相互连接。

[0131] 1,2,4-三嗪在(6)中给出，其中R¹和R²各自独立地选自H、烷基、芳基、CF₃、CF₂-R'、NO₂、OR'、SR'、C(=O)R'、C(=S)R'、OC(=O)R'''、SC(=O)R'''、OC(=S)R'''、SC(=S)R'''、S(=O)R'、S(=O)₂R'''、S(=O)₂NR'R''、C(=O)O-R'、C(=O)S-R'、C(=S)O-R'、C(=S)S-R'、C(=O)NR'R''、C(=S)NR'R''、NR'R''、NR'C(=O)R''、NR'C(=S)R''、NR'C(=O)OR''、NR'C(=S)OR''、NR'C(=O)SR''、NR'C(=S)SR''、OC(=O)NR'R''、SC(=O)NR'R''、OC(=S)NR'R''、SC(=S)NR'R''、NR'C(=O)NR''R''、NR'C(=S)NR''R''，其中每个R'和每个R''独立地为H、芳基或烷基，并且R'''独立地为芳基或烷基;X选自CH、C-烷基、C-芳基、CC(=O)R'、CC(=S)R'、CS(=O)R'、CS(=O)₂R'''、CC(=O)O-R'、CC(=O)S-R'、CC(=S)O-R'、CC(=S)S-R'、CC(=O)NR'R''、CC(=S)NR'R''，R'和R''各自独立地为H、芳基或烷基，并且R'''独立地为芳基或烷基。

[0132] 1,2,4,5-四嗪在(7)中给出，其中R¹和R²各自独立地选自H、烷基、芳基、CF₃、CF₂-R'、NO、NO₂、OR'、SR'、CN、C(=O)R'、C(=S)R'、OC(=O)R'''、SC(=O)R'''、OC(=S)R'''、SC(=S)R'''、S(=O)R'、S(=O)₂R'''、S(=O)₂OR'、PO₃R'R''、S(=O)₂NR'R''、C(=O)O-R'、C(=O)S-R'、C(=S)O-R'、C(=S)S-R'、C(=O)NR'R''、C(=S)NR'R''、NR'R''、NR'C(=O)R''、NR'C(=S)R''、NR'C(=O)OR''、NR'C(=S)OR''、NR'C(=O)SR''、NR'C(=S)SR''、OC(=O)NR'R''、SC(=O)NR'R''、OC(=S)NR'R''、SC(=S)NR'R''、NR'C(=O)NR''R''、NR'C(=S)NR''R''，其中每个R'和每个R''独立地为H、芳基或烷基，并且R'''独立地为芳基或烷基。

[0133] 由于缺电子1,2-二嗪(5)、1,2,4-三嗪(6)或1,2,4,5-四嗪(7)对亲双烯体通常更有反应性，因此这样的双烯是特别令人关注的。当二嗪、三嗪或四嗪被通常不认为是供电子的基团或结构片段取代或被吸电子基团取代时，其为缺电子的。例如，R¹和/或R²可表示选自下列的取代基：H、烷基、NO₂、F、Cl、CF₃、CN、COOR、CONHR、CONR₂、COR、SO₂R、SO₂OR、SO₂NR₂、PO₃R₂、NO、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2,6-嘧啶基、3,5-嘧啶基、2,4-嘧啶基、2,4-咪唑基、2,5-咪唑基或苯基，所述取代基任选被一个或多个吸电子基团(如NO₂、F、Cl、CF₃、CN、COOR、CONHR、CONR、COR、SO₂R、SO₂OR、SO₂NR₂、PO₃R₂、NO、Ar)取代，其中R为H或C₁-C₆烷基，并且Ar表示芳族基团，特别是苯基、吡啶基或萘基。

[0134] 式(7)的1,2,4,5-四嗪作为活化剂双烯是最优选的，因为这些分子在逆Diels-Alder反应中与亲双烯体(如优选的TCO亲双烯体)是最易反应的，甚至当R¹和/或R²基团不必须是吸电子时，并且甚至当R¹和/或R²实际上是供电子时。供电子基团例如OH、OR'、SH、SR'、NH₂、NHR'、NR'R''、NHC(=O)R''、NR'C(=O)R''、NHC(=S)R''、NR'C(=S)R''、NHSO₂R''、NR'SO₂R''，其中R'和R''各自独立地为烷基或芳基。其它供电子基团的实例为与一个或多个如上所列的供电子基团结合的苯基，特别是当在苯基的2-、4-和/或6-位取代时。

[0135] 根据本发明，具有两个吸电子基团的1,2,4,5-四嗪或那些具有一个吸电子基团

和一个既不是吸电子也不是供电子的基团的 1, 2, 4, 5- 四嗪被称作缺电子的。相似的, 具有两个供电子基团的 1, 2, 4, 5- 四嗪或那些具有一个供电子基团和一个既不是吸电子也不是供电子的基团的 1, 2, 4, 5- 四嗪被称作富电子。具有两个既不是吸电子也不是供电子基团的 1, 2, 4, 5- 四嗪或者那些具有一个吸电子基团和一个供电子基团的 1, 2, 4, 5- 四嗪既不缺电子也不富电子。

[0136] 1, 2, 4, 5- 四嗪本质上可为不对称的或对称的, 即式 (7) 中的 R^1 和 R^2 基团可分别为不同基团或相同基团。对称的 1, 2, 4, 5- 四嗪是更方便的, 因为这些活化剂易通过合成方法获得。

[0137] 我们已检测了数种 1, 2, 4, 5- 四嗪关于它们作为活化剂来从前药通过消除过程释放模型药物化合物 (如苯酚) 的能力, 并且我们已发现缺电子、富电子、或既不缺电子也不富电子的四嗪能够诱导药物释放。此外, 对称四嗪和不对称四嗪都是有效的。

[0138] 缺电子 1, 2, 4, 5- 四嗪和既不缺电子也不富电子的 1, 2, 4, 5- 四嗪在逆 Diels-Alder 反应中与亲双烯体 (如 TCO) 通常更易反应, 所以这两种 1, 2, 4, 5- 四嗪相对于富电子 1, 2, 4, 5- 四嗪是更优选的, 即使后者也能够诱导前药中药物的释放。

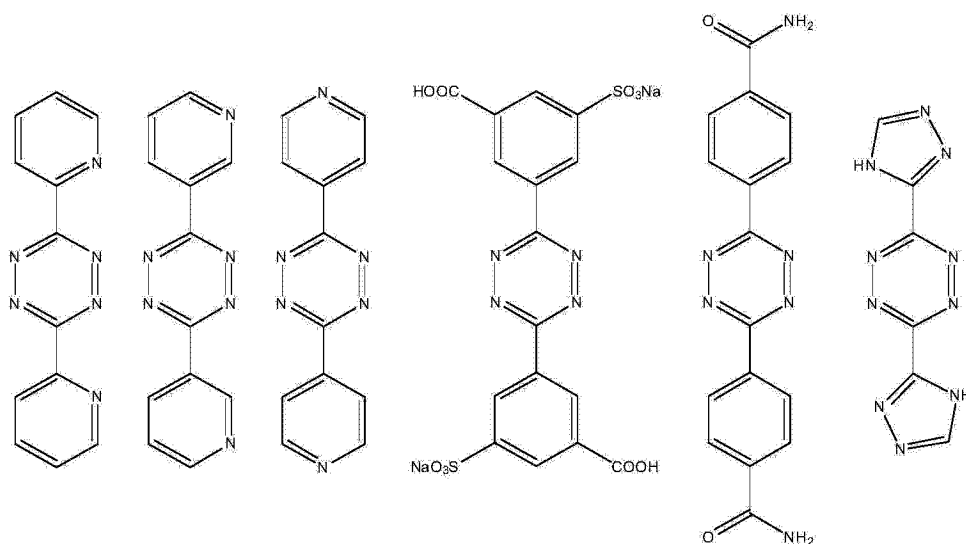
[0139] 因此, 特别有用的四嗪衍生物为缺电子四嗪, 即用通常不认为是供电子的基团或片段取代的, 并且优选带有吸电子取代基的四嗪。参照式 (7), 对于缺电子四嗪, R^1 和 R^2 各自独立地为选自 2- 吡啶基、3- 吡啶基、4- 吡啶基、2, 6- 嘧啶基、3, 5- 嘧啶基、2, 4- 嘧啶基或苯基的取代基, 其任选地被一个或多个吸电子基团 (如 NO_2 、F、Cl、 CF_3 、CN、 COOH 、 COOR 、 CONH_2 、 CONHR 、 CONR_2 、CHO、COR、 SO_2R 、 SO_2OR 、NO、Ar, 其中 R 为 C_1 - C_6 烷基, 并且 Ar 表示芳族基团特别是苯基、吡啶基或萘基) 取代。

[0140] 在根据式 (2)-(7) 的各个化合物中, R^1 和 R^2 基团可另外带有本文讨论的适合的连接基或间隔基基团。

[0141] 在下文中, 1, 2, 4, 5- 四嗪活化剂的具体实例会通过定义式 (7) 中 R^1 和 R^2 基团来强调。

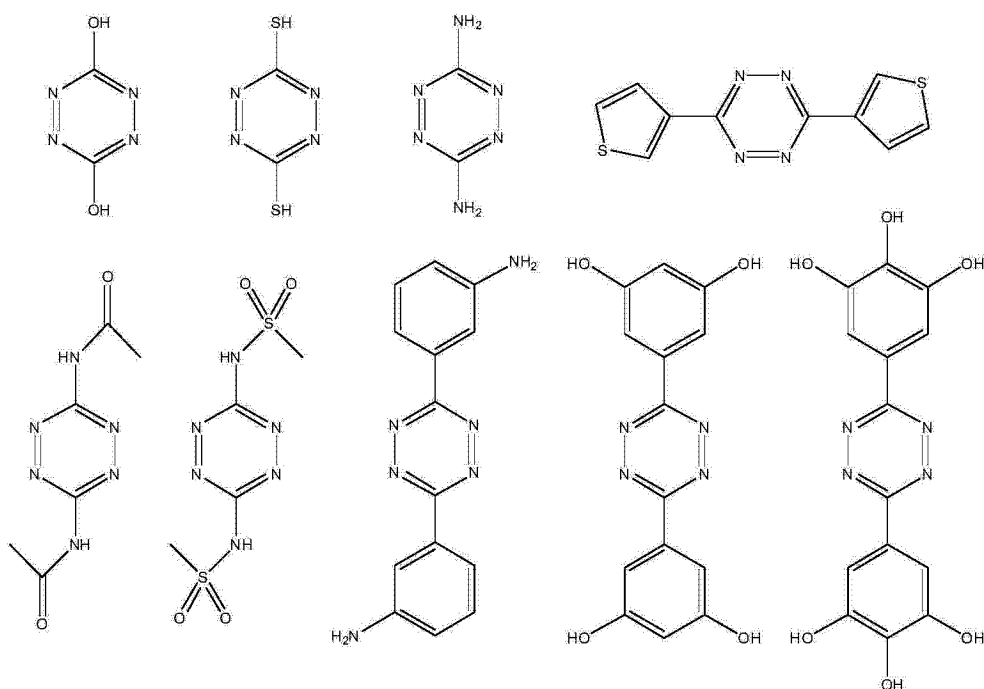
[0142] 具有缺电子基团的对称缺电子 1, 2, 4, 5- 四嗪例如 $R^1=R^2=\text{H}$ 、2- 吡啶基、3- 吡啶基、4- 吡啶基、2, 4- 嘧啶基、2, 6- 嘧啶基、3, 5- 嘧啶基、2, 3, 4- 三嗪基 (triazyl) 或 2, 3, 5- 三嗪基的那些。其它实例为 $R^1=R^2=$ 在苯基的 2-、3- 或 4- 位, 或者在 3- 和 5- 位, 或者在 2- 和 4- 位, 或者在 2- 和 6- 位具有取代基的苯基, 所述取代基为 COOH 或 COOMe 羧化物 (carboxylate) 或者 CN 腈, 或者 CONH_2 、 CONHCH_3 或 $\text{CON}(\text{CH}_3)_2$ 酰胺、或者 SO_3H 或 SO_3Na 磺酸盐、或者 SO_2NH_2 、 SO_2NHCH_3 或 $\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 磺酰胺、或者 PO_3H_2 或 PO_3Na_2 膦酸盐。其它取代方式也是可能的, 包括使用不同的取代基, 只要四嗪保持对称。参见以下这些结构的一些实例。

[0143]



[0144] 具有供电子基团的对称富电子 1, 2, 4, 5- 四嗪例如其中 $R^1=R^2=OH$ 、 OR' 、 SH 、 SR' 、 NH_2 、 NHR' 、 NR'_2 、 $NH-CO-R'$ 、 $NH-SO-R'$ 、 $NH-SO_2-R'$ 、2- 吡咯基、3- 吡咯基、2- 噻吩基、3- 噻吩基的那些, 其中 R' 表示甲基、乙基、苯基或甲苯基。其它实例为其中 $R^1=R^2=$ 具有 OH 、 OR' 、 SH 、 SR' 、 NH_2 、 NHR' 、 NR'_2 、 $NH-CO-R'$ 、 $NR''-CO-R'$ 、 $NH-SO-R'$ 或 $NH-SO_2-R'$ 取代基的苯基, 其中 R' 表示甲基、乙基、苯基或甲苯基, 其中 R'' 表示甲基或乙基, 并且其中在 2- 或 3- 或 4- 或 2- 和 3- 或 2- 和 4- 或 2- 和 5- 或 2- 和 6- 或 3- 和 4- 或 3- 和 5- 或 3-、4- 和 5- 位上进行取代的那些。参见以下这些结构的一些实例。

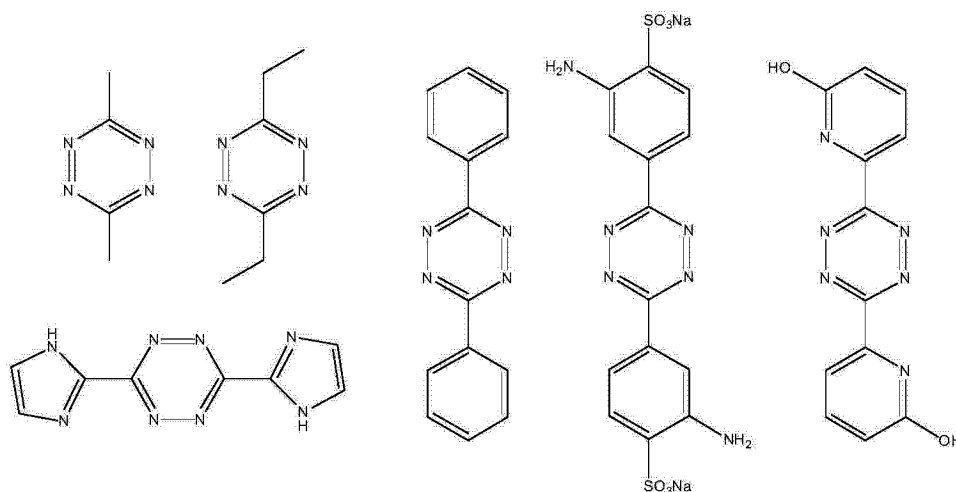
[0145]



[0146] 具有既不吸电子也不供电子基团的对称的 1, 2, 4, 5- 四嗪例如其中 $R^1=R^2=$ 苯基、甲基、乙基、(异) 丙基、2, 4- 咪唑基、2, 5- 咪唑基、2, 3- 吡唑基 (pyrazyl) 或 3, 4- 吡唑基的那些。其它实例为其中 $R^1=R^2=$ 杂 (芳) 环 (如噁唑环、异噁唑环、噻唑环或噻唑啉环) 的那些。其它实例为其中 $R^1=R^2=$ 具有一个吸电子取代基和一个供电子取代基的苯基, 其中所述吸电子取代基选自 $COOH$ 、 $COOMe$ 、 CN 、 $CONH_2$ 、 $CONHCH_3$ 、 $CON(CH_3)_2$ 、 SO_3H 、 SO_3Na 、 SO_2NH_2 、 SO_2NHCH_3 、

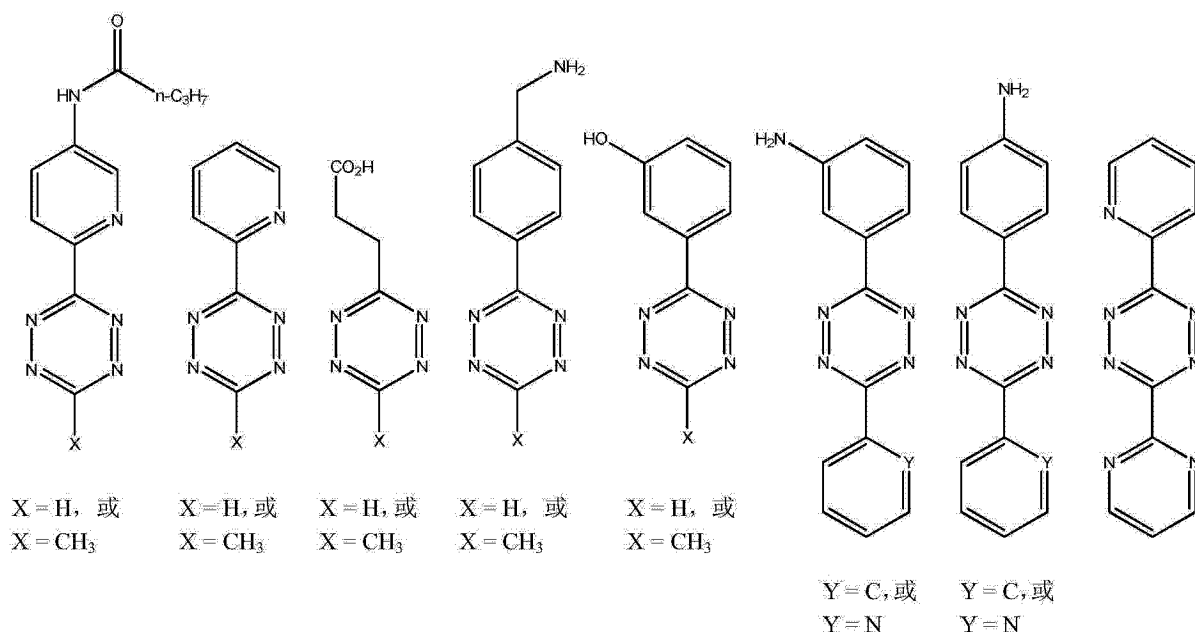
$\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 PO_3H_2 或 PO_3Na_2 , 并且所述供电子取代基选自 OH 、 OR' 、 SH 、 SR' 、 NH_2 、 NHR' 、 NR'_2 、 $\text{NH-CO-R}'$ 、 $\text{NR}''-\text{CO-R}'$ 、 $\text{NH-SO-R}'$ 、 $\text{NH-SO}_2-\text{R}'$ 取代基, 其中 R' 表示甲基、乙基、苯基或甲苯基并且其中 R'' 表示甲基或乙基。可在 2- 和 3-、2- 和 4-、2- 和 5-、2- 和 6-、3- 和 4- 以及 3- 和 5- 位上进行取代。然而其它实例为其中 $\text{R}^1=\text{R}^2=$ 具有一个供电子取代基的吡啶基或嘧啶基, 所述供电子取代基选自 OH 、 OR' 、 SH 、 SR' 、 NH_2 、 NHR' 、 NR'_2 、 $\text{NH-CO-R}'$ 、 $\text{NR}''-\text{CO-R}'$ 、 $\text{NH-SO-R}'$ 或 $\text{NH-SO}_2-\text{R}'$ 取代基, 其中 R' 表示甲基、乙基、苯基或甲苯基, 并且其中 R'' 表示甲基或乙基。参见下列一些实例。

[0147]



[0148] 在考虑不对称的 1, 2, 4, 5- 四嗪的情况中, 人们可选择上述对于式 (7) 的对称四嗪所强调和列出的 R^1 和 R^2 基团的任意组合, 条件当然是 R^1 和 R^2 不同。优选的不对称 1, 2, 4, 5- 四嗪为基团 R^1 或 R^2 中至少一个本质上为吸电子的那些。参见下列一些画出的实例结构。

[0149]



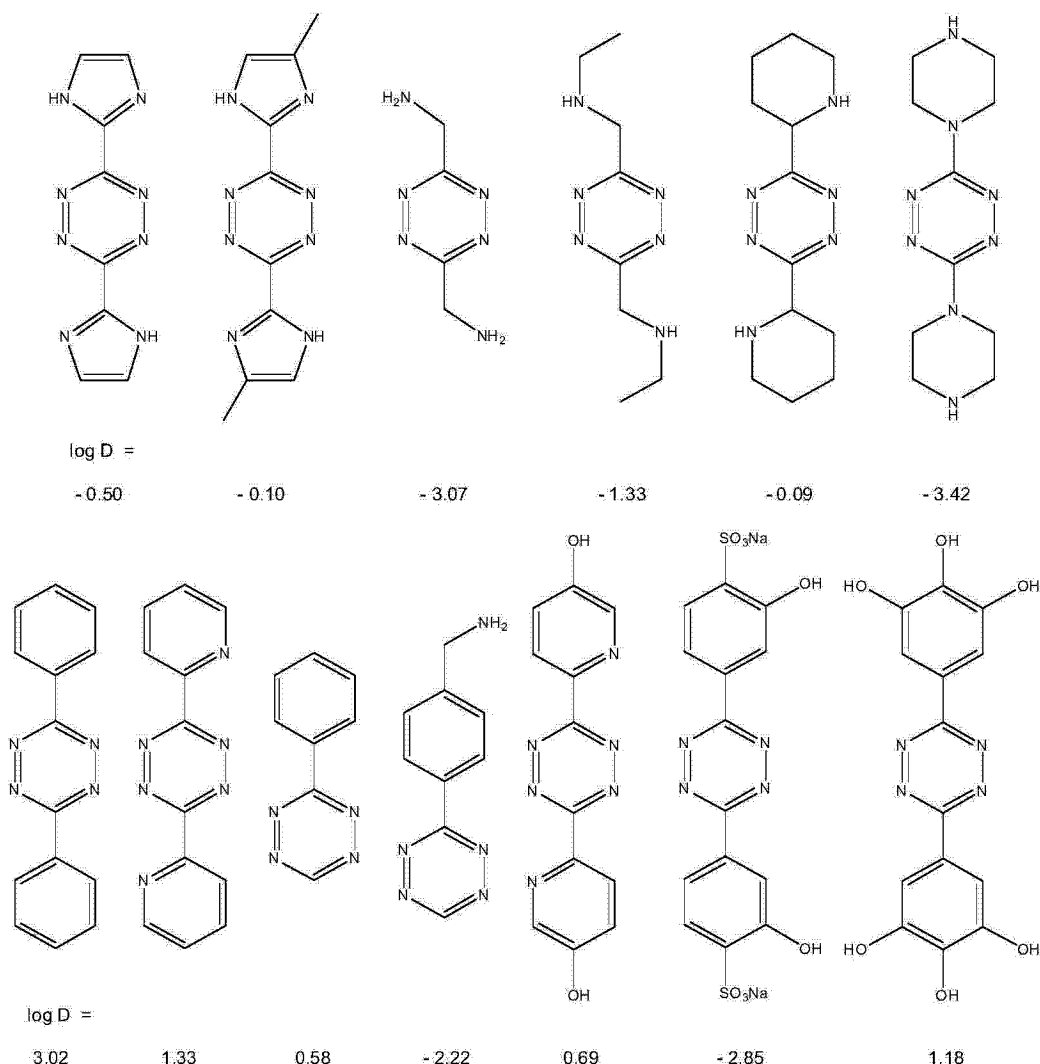
[0150] 对于活化剂的进一步考虑

[0151] 在上文中, 就本发明的两种优选实施方案而言描述并定义了活化剂, 并且对于两

种实施方案, 1, 2-二嗪、1, 2, 4-三嗪和 1, 2, 4, 5-四嗪, 特别是 1, 2, 4, 5-四嗪是优选的双烯活化剂。以下会强调活化剂的一些相关特点, 从此也可明确, 对于每个具体应用来设计正确的活化剂分子式有众多选择。

[0152] 根据本发明, 活化剂 (如 1, 2, 4, 5-四嗪) 具有有用且有利的药理性质和药物代谢动力学性质, 表明活化剂为无毒的或至少毒性足够低, 产生毒性也足够低的代谢产物, 在生理溶液中足够可溶, 可在水溶液中或药学中通常使用的其它制剂中应用, 并且具有合适的 log D 值 (log D 值反映在生理 pH 下活化剂分子的亲水 / 疏水平衡)。如本领域已知, log D 值可为负的 (亲水分子) 或正的 (疏水分子), 在此 log D 值变得越低或越高, 则该分子分别为更亲水或更疏水。对于多数分子, 可充分地预测 log D 值, 并且可在活化剂设计中通过添加或移除极性或非极性基团来调节 log D 值。参见以下一些活化剂的设计以及它们对应的 log D 计算值 (pH=7.4)。注意添加甲基、环烯基、吡啶、胺、醇或磺酸盐基团或删除苯基调节了 log D 值, 并且可获得非常宽的 log D 值范围。

[0153]



[0154] 给出的 log D 数值为基于在 0.1M Na⁺/K⁺ Cl⁻ 的水溶液, 由与“VG” (Viswanadhan, V. N. ; Ghose, A. K. ; Revankar, G. R. ; Robins, R. K. , J. Chem. Inf. Comput. Sci., 1989, 29, 163-172)、’KLOP’ (根据 Klopman, G. ; Li, Ju-Yun. ; Wang, S. ; Dimayuga, M. :

J. Chem. Inf. Comput. Sci., 1994, 34, 752) 以及 'PHYS' (根据 **PHYSPROP**®数据库) 方法同样重要的的加权法计算得出的。

[0155] 本发明的活化剂对于前药具有合适的反应性, 并且这可通过使双烯 (特别是 1, 2, 4, 5- 四嗪) 足够缺电子来调节。足够的反应性会确保活化剂一接触前药就发生快速的逆 Diels-Alder 反应。

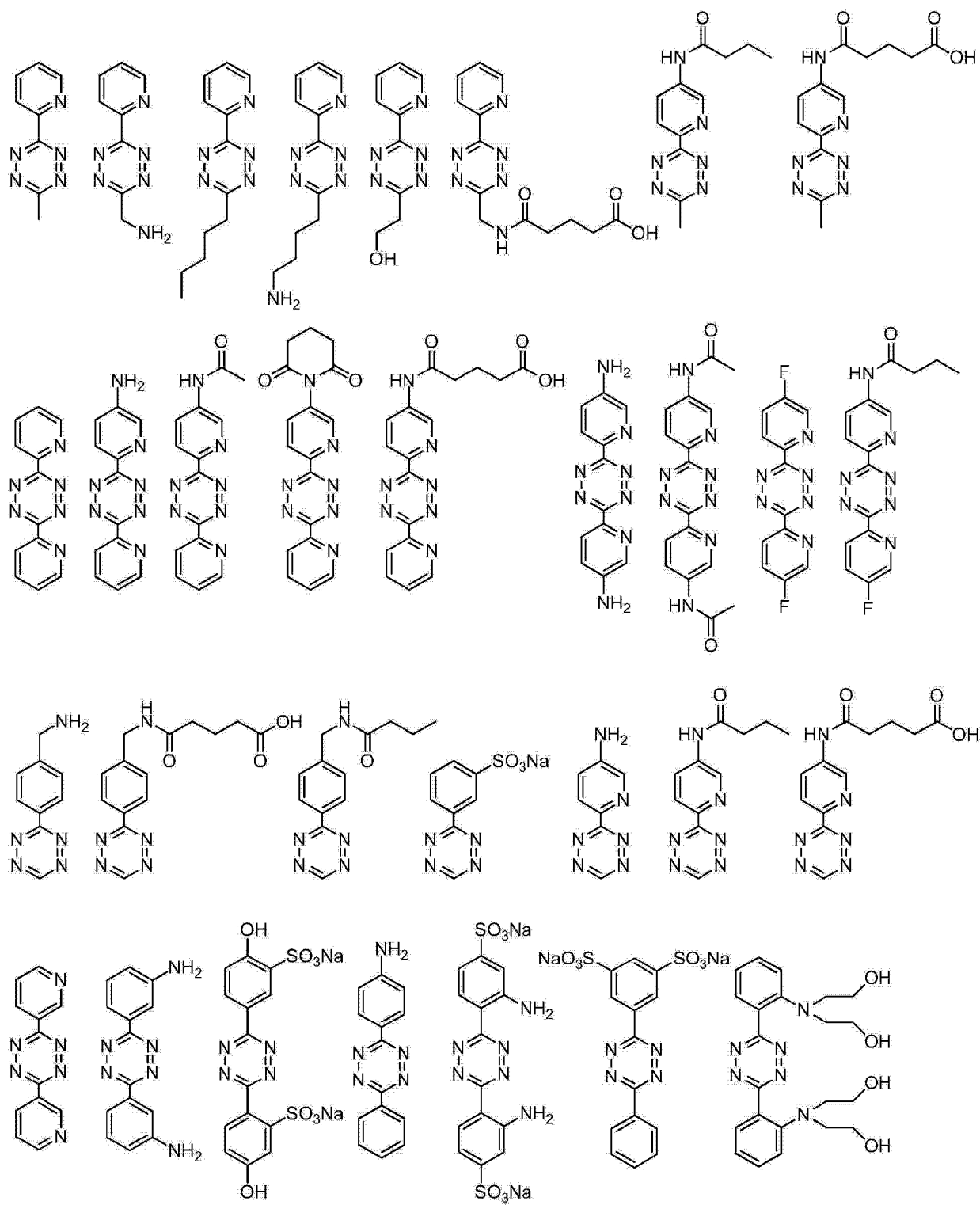
[0156] 本发明的活化剂具有良好的生物利用度, 表明它可用于在 (人) 体内实现其预期目的 (在主要靶点 (Primary Target) 有效接触前药)。因此, 活化剂不显著附着于非靶点的血液组分或组织。活化剂可设计为结合至血液中的白蛋白上 (如本领域已知, 这样以便增加血液循环时间), 但是它同时应从血流有效释放以便能够到达前药。因此, 血液结合和血液释放应为适合的平衡。活化剂的血液循环时间也可通过增加活化剂的分子量来增加, 如通过使聚乙二醇 (PEG) 基团连接活化剂 ("聚乙二醇化")。或者, 活化剂的 PK/PD 可通过将活化剂结合至另一基团 (如聚合物、蛋白质、(短) 肽、碳水化合物) 来调节。

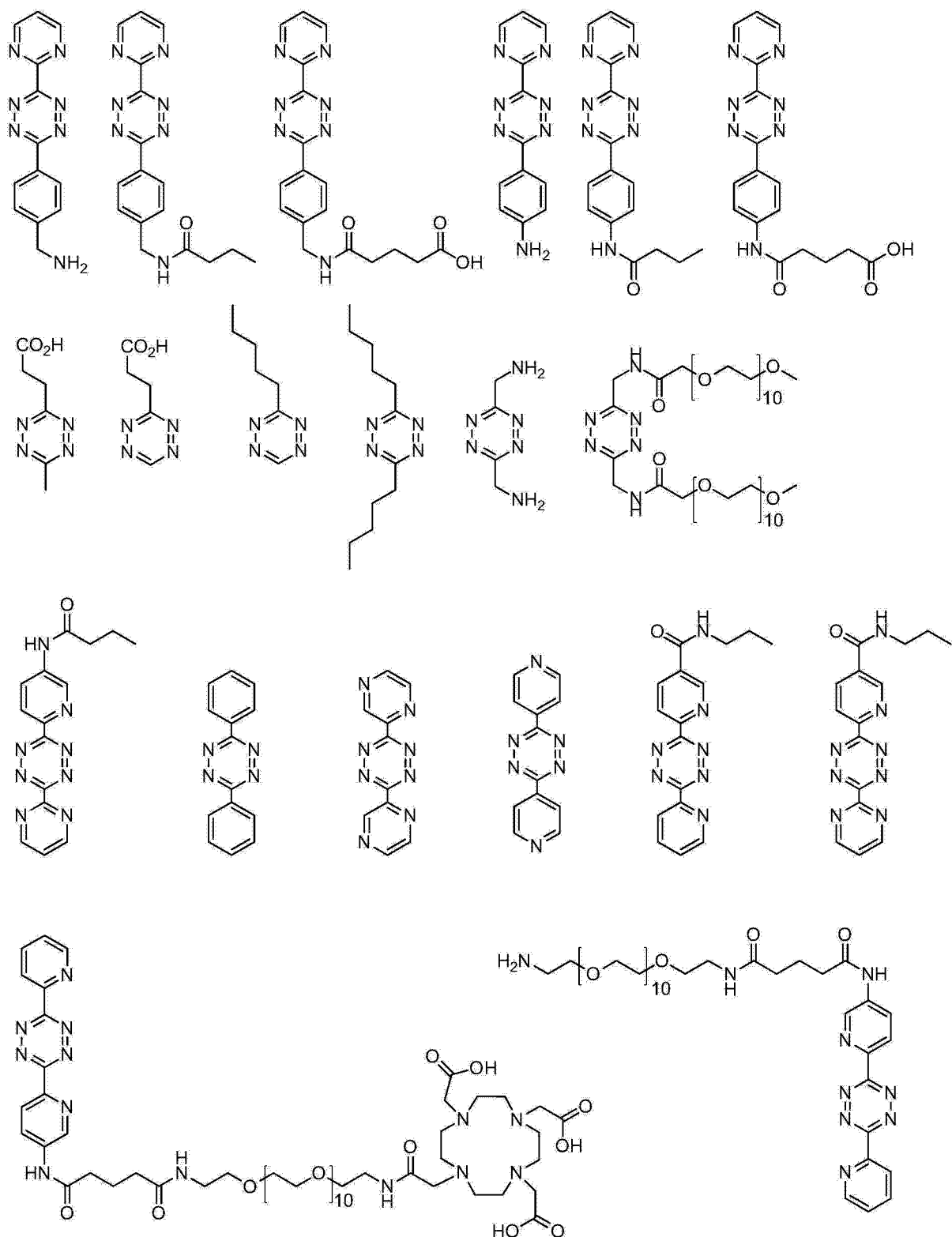
[0157] 本发明的活化剂可为多聚体, 这样多个双烯基团可结合至分子骨架, 特别是如多官能团分子、碳水化合物、聚合物、树枝状高分子、蛋白质或肽, 在此这些骨架优选为水溶性的。可用的骨架的实例为 (多官能团的) 聚乙二醇、聚丙烯亚胺 (PPI) 树枝状高分子、PAMAM 树枝状高分子、乙二醇系树枝状高分子、肝素衍生物、透明质酸衍生物或血清白蛋白 (如 HSA)。

[0158] 对于在胞外域中发生前药活化的应用, 所述双烯为相对亲水的。

[0159] 优选地, 活化剂为选自下式的四嗪:

[0160]





[0162] 根据前药的位置（如细胞内或细胞外；靶向的具体器官），将活化剂设计为能够有效到达该前药。因此，可例如通过改变其 log D 值、其反应性或其电荷来使活化剂适应。甚至活化剂可用靶向剂（如蛋白质、肽和 / 或糖基团）处理（engineer），以便可主动而非被动到达主要靶点。在应用靶向剂的情况中，优选其为简单基团（即短肽或单糖）。

[0163] 根据本发明，可应用不同活化剂的混合物。这对于药物释放特性的调节可能是相关的。

[0164] 根据本发明,会引发和调节在主要靶点的药物释放的活化剂还可向向其提供额外功能的基团修饰以供体内和 / 或体外研究或应用。例如,活化剂可用染料基团或荧光基团修饰 (参见例如 S.Hilderbrand 等人, Bioconjugate Chem., 2008, 19, 2297-2299, 3-(4-benzylamino)-1,2,4,5-tetrazine that is amidated with the near-infrared(NIR) fluorophore VT680), 或者它们可用显像探针官能化, 其中这些探针可用于显像模式 (如核成像技术 PET 或 SPECT) 中。这样,活化剂不仅引发药物释放, 而且可在 (人) 体内定位, 并且从而可用于前药在 (人) 体内的定位。因此,可检测药物释放的位置和量。例如,活化剂可用 DOTA (或 DTPA) 配体修饰, 其中这些配体非常适合与 $^{111}\text{In}^{3+}$ 离子络合以进行核成像。在其它实例中,活化剂可连接至 ^{123}I 或 ^{18}F 基团上, 已知其分别用于 SPECT 或 PET 成像。此外,当与如 β -发射同位素 (如 Lu-177 或 Y-90) 联合使用时,前药活化可与局部放射疗法以前靶向形式结合。

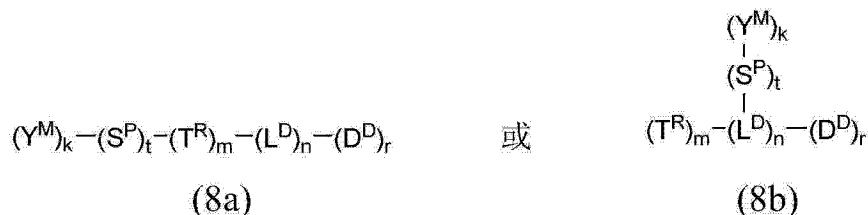
[0165] 基于本领域基本常识,对于本领域技术人员而言,上述活化剂的合成路线是容易获得的。四嗪的合成路线的参考文献包括 Lions 等人, J. Org. Chem., 1965, 30, 318-319; Horwitz 等人, J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 3155-3159; Hapiot 等人, New. J. Chem., 2004, 28, 387-392, Kaim 等人, Z. Naturforsch., 1995, 50b, 123-127。

[0166] 前药

[0167] 前药为药物 D^{D} 和触发剂 T^{R} 的缀合物, 从而其包含在其从触发剂释放后发挥治疗作用的药物。这样的前药可任选地具有对于疾病靶点的特异性。

[0168] 前药的通式如下式 (8a) 和 (8b) 所示:

[0169]



[0170] 基团 Y^{M} 可为靶向剂 T^{T} 或掩蔽剂 M^{M} ; S^{P} 为间隔基; T^{R} 为触发剂, L^{D} 连接基; 并且 D^{D} 为药物。

[0171] 对于药物从靶向剂释放的应用: Y^{M} 为靶向剂 T^{T} 。

[0172] 式 (8a): $k=1; m, r \geq 1; t, n \geq 0$ 。

[0173] 式 (8b): $k=1; m, n, r \geq 1; t \geq 0$ 。

[0174] 对于需掩蔽药物未掩蔽的应用: Y^{M} 为掩蔽基团 M^{M} ;

[0175] 式 (8a) 和 (8b): $r=1; m \geq 1; k, n, t \geq 0$ 。

[0176] 尽管为了明确而在上式中已删除, 但 D^{D} 还可任选地通过 S^{P} 包含 T^{T} 和 / 或 M^{M} 。

[0177] 可在本发明相关的前药中使用的药物包括但不限于: 抗体、抗体衍生物、抗体片段 (如 Fab2、Fab、scFv、双链抗体 (diabody)、三链抗体 (triabody))、抗体 (片段) 融合物 (如双特异性 mAb 片段和三特异性 mAb 片段)、蛋白质、适体、寡肽、寡核苷酸、寡糖, 以及肽、类肽、甾族化合物、有机药物化合物、毒素、激素、病毒、整个细胞、噬菌体。适合本发明的代表性药物包括但不限于双特异性 mAb 片段和三特异性 mAb 片段、免疫毒素 (包括如蓖麻毒蛋白 A、白喉毒素、霍乱毒素)。其它实施方案使用 auristatin、美坦辛、卡奇霉素、多卡米星、

美登木素 (maytansinoid) DM1 和 DM4、auristatin MMAE、CC1065 及其类似物、喜树碱及其类似物、SN-38 及其类似物；抗增殖 / 抗肿瘤剂、抗生素、细胞因子、抗炎剂、抗病毒剂、抗高血压剂、化学增敏剂和放射增敏剂。在其它实施方案中，释放的药物 D^D 自身为前药，其被设计为释放另一个药物 D^D。药物任选地包含任选地通过稳定的或不稳定的连接基连接的膜转位基团（金刚烷胺 (adamantine)，聚 - 赖氨酸 / 精氨酸，TAT）和 / 或靶向剂（靶向如肿瘤细胞受体）。

[0178] 用作与 TCO 衍生物的缀合并且在与活化剂的逆 Diels Alder 反应时释放的示例性药物包括但不限于：细胞毒药物，特别是用于癌症治疗的那些。这样的药物通常包括 DNA 损伤剂、抗代谢剂、天然产物及其类似物。细胞毒素剂的代表性种类包括酶抑制剂，如二氢叶酸还原酶抑制剂和胸苷酸合酶抑制剂、DNA 烷化剂、辐射增敏剂、DNA 嵌入剂、DNA 切断剂、抗微管蛋白剂、拓扑异构酶抑制剂、铂系药物、蒽环类抗生素药物家族、长春花药物、丝裂霉素、博来霉素、细胞毒核苷、紫杉烷、lexitropsin、蝶啶药物家族、烯二炔 (diynene)、鬼臼毒素、多拉司他汀、美登木素、分化诱导剂和紫杉醇。这些种类中特别有用的成员为，例如多卡米星、甲氨蝶呤 (methotrexate)、甲基叶酸 (methopterin)、二氯甲氨蝶呤、5- 氟尿嘧啶 DNA 小沟结合剂、6- 巯基嘌呤、阿糖胞苷、美法仑、环氧长春碱、leurosine、放线菌素、柔红霉素、多柔比星、丝裂霉素 C、丝裂霉素 A、caminomycin、氨基蝶呤、他利霉素、鬼臼毒素及其衍生物（如依托泊甙或磷酸依托泊苷、长春碱、长春新碱、长春地辛、紫杉醇、视黄酸泰索帝、丁酸、N8- 乙酰基亚精胺、喜树碱、卡奇霉素、埃斯波霉素、烯 - 二炔 (ene-diynes)，及其类似物）。

[0179] 示例性药物包括多拉司他汀及其类似物，其包括：多拉司他汀 A (美国专利 4, 486, 414)、多拉司他汀 B (美国专利 4, 486, 414)、多拉司他汀 10 (美国专利 4, 486, 444、5, 410, 024、5, 504, 191、5, 521, 284、5, 530, 097、5, 599, 902、5, 635, 483、5, 663, 149、5, 665, 860、5, 780, 588、6, 034, 065、6, 323, 315)、多拉司他汀 13 (美国专利 4, 986, 988)、多拉司他汀 14 (美国专利 5, 138, 036)、多拉司他汀 15 (美国专利 4, 879, 278)、多拉司他汀 16 (美国专利 6, 239, 104)、多拉司他汀 17 (美国专利 6, 239, 104) 和多拉司他汀 18 (美国专利 6, 239, 104)，每个专利以其整体援引加入本文。

[0180] 在本发明的示例性实施方案中，药物部分为丝裂霉素、长春花生物碱、紫杉醇、蒽环类抗生素、卡奇霉素、美登木素或 auristatin。

[0181] 应当理解，为了制备本发明的缀合物，也可对期望化合物进行化学修饰以使该化合物的反应更方便。包含用于与 TCO 偶联的氨基官能团的药物包括丝裂霉素 -C、丝裂霉素 -A、柔红霉素、多柔比星、氨基蝶呤、放线菌素、博来霉素、9- 氨基喜树碱、N8- 乙酰基亚精胺、1-(2- 氯乙基)-1, 2- 二甲磺酰肼、他利霉素、阿糖胞苷、多拉司他汀（包括 auristatin）及其衍生物。

[0182] 包含用于与 TCO 偶联的羟基官能团的药物包括依托泊甙、喜树碱、紫杉醇、埃斯波霉素、1, 8- 二氢 - 双环 [7. 3. 1] 十三 -4-9- 二烯 -2, 6- 二炔 -13- 酮 (美国专利第 5, 198, 560 号)、鬼臼毒素、anguidine、长春新碱、长春碱、吗啡 - 多柔比星、正 -(5, 5- 二乙酰氧基 - 戊基) 多柔比星及其衍生物。

[0183] 包含用于与 TCO 偶联的巯基官能团的药物包括埃斯波霉素和 6- 巯基嘌呤及其衍生物。

[0184] 应当理解,药物可任选地通过连接基 L^D 或自切除连接基 L^D 或者其组合连接至 TCO 衍生物,并且所述连接基可由多个(自切除或非自切除)单元组成。

[0185] 还应当理解,一个或多个靶向剂 T^T 或掩蔽基团 M^M 可任选地通过一个或多个间隔基 S^P 任选地连接至药物 D^D 、触发剂 T^R 或连接基 L^D 上。

[0186] 数种药物可被可成像标记替代以检测药物靶向和释放。

[0187] 根据本发明的另一具体实施方案,选择前药以靶向和/或应对疾病如癌症、炎症、感染、心血管疾病(如血栓、粥样硬化病变)、缺氧部位(如卒中、肿瘤、心血管病症、脑疾病、凋亡、血管发生)、器官和报告基因/酶。

[0188] 根据一个实施方案,前药和/或活化剂可为多聚体化合物,其包含多个药物和/或生物正交反应基团。这些多聚体化合物可为聚合物、树状聚合物、脂质体、聚合物颗粒或者其它聚合构建体。

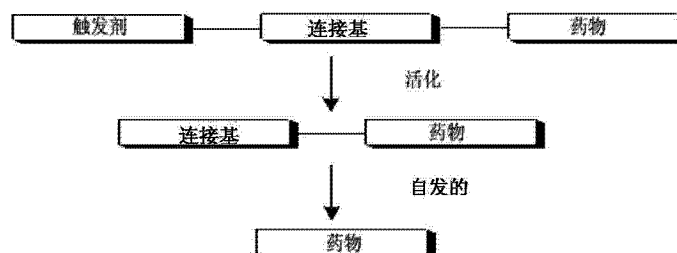
[0189] 在前药中,药物 D^D 和触发剂 T^R (TCO 衍生物) 可相互直接连接。它们也可通过连接基或自切除连接基 L^D 相互连接。应当理解,本发明包括亲双烯体触发剂连接至药物的任意可能方式。这同样适用于任选的靶向剂 T^T 或掩蔽剂 M^M 与前药的连接。影响与这些药物的结合的方法(例如在蛋白质的情况中,通过反应性的氨基酸(如赖氨酸或半胱氨酸))为本领域技术人员已知的。

[0190] 应当理解,药物基团以在形成逆 Diels-Alder 加成化合物后,药物最终能够释放的方式与 TCO 连接。通常,这意味着药物和 TCO 间的键(或者在连接基的情况中,TCO 和连接基 L^D 间的键,或者在自切除连接基 L^D 的情况中,连接基和 TCO 间的键以及药物和连接基间的键)应为可断裂的。药物和任选的连接基主要通过杂原子连接,优选通过 O、N、NH 或 S 连接。所述可断裂键优选选自氨基甲酸酯键、硫代氨基甲酸酯键、碳酸酯键、醚键、酯键、胺键、酰胺键、硫醚键、硫酯键、亚砷键和亚磺酰氨基键。

[0191] 从而在本发明中,连接基概念可类似地适用于本领域技术人员已知的那些。大多报道的前药由三种组分组成:触发剂、连接基和母体药物,任选地,靶向分子连接至连接基或触发剂。触发剂(其可为如位点专一性酶或 pH 不稳定基团的底物)经常通过自消除连接基连接至母体药物。加入连接基以促使触发剂的酶裂解,增加活性位点的可达性,并且降低来自连接药物的位阻。连接基也有助于直接将很多前药与相同触发剂结合使用。此外,连接基调节前药的稳定性、药代动力学、器官分布、酶识别和释放动力学。触发剂活化/脱除后,连接基必须自发消除以释放母体药物。根据连接的药物,连接基或其一部分可保留在药物上而不损害其作用。总体概念如路线 2 所描述。

[0192] 路线 2:

[0193]

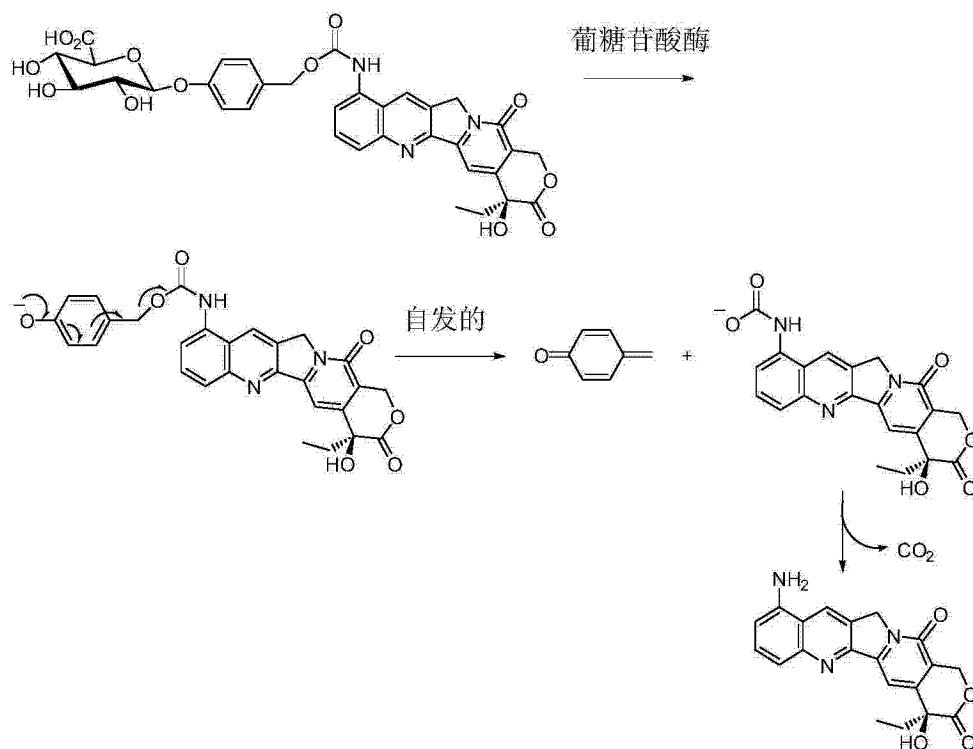


[0194] 两种自消除连接基值得注意:a) 电子级联连接基 (electronic cascade linker);

b) 环化连接基。级联连接基中最突出的实例为如路线 3 所示的在抗肿瘤剂 9-氨基喜树碱的 β -葡萄糖苷酸前药的 1,6-消除间隔基。通过酶 β -葡萄糖苷酸酶 (在特定肿瘤坏死区域存在) 将芳族羟基官能团去掩蔽, 然后该基团变为供电子基团并引发脱除离去基团的电子级联, 除去 CO_2 后释放游离药物。该基于醌-甲基化物重排的级联也可由未掩蔽的胺或硫醇的孤电子对而非羟基的孤电子对引发。水捕获形成的醌-甲基化物质以形成苯酚衍生物。

[0195] 路线 3:

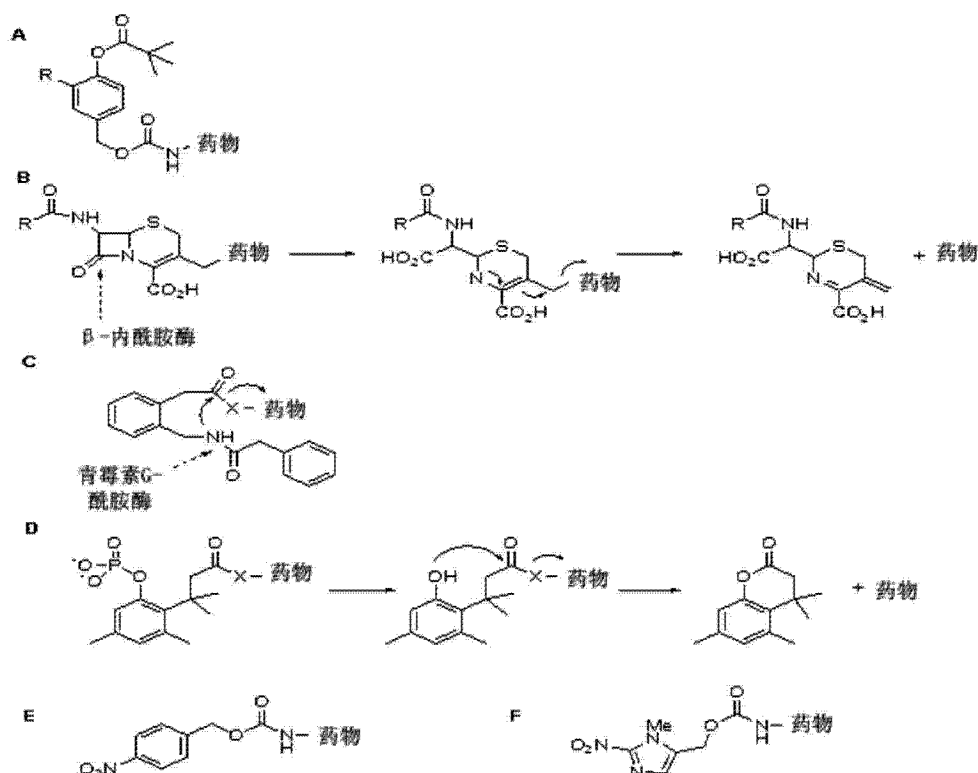
[0196]



[0197] 一些其它触发剂-连接基概念如路线 4 所描述。A 中的触发剂被血浆酯酶 (plasmatic esterase) 活化。叔丁基酯的水解得到游离芳族羟基, 这启动了醌-甲基化物级联。该构建体已通过缀合至抗体 (R) 来靶向。在 B 中, 将头孢菌素通过 β -内酰胺酶水解用作触发剂。根据其离去基团的性质, 内酰胺环的水解可导致药物取代基的脱除。药物已通过酯、酰胺、硫化物、胺和氨基甲酸酯连接基结合。芳族环化系连接基的两个实例为 C 和 D。在 C 中, 通过青霉素 G-酰胺酶的裂解导致羰基上的氨基的分子内进攻, 从而释放药物。D 显示磷酸酶敏感的前药。通过人碱性磷酸酶裂解磷酸酯得到羟基, 其通过释放药物而反应为内酰胺。在 E 中展示了通过将硝基还原为氨基来触发的前药的实例。该还原可在 NADPH 的存在下通过硝基还原酶进行。此外, 已知许多在缺氧 (肿瘤) 组织中还原的杂环硝基构建体 (F), 因此, 其可在无酶帮助下引发级联。其它在前药疗法中使用的触发剂对纤溶酶、酪氨酸羟化酶 (在神经细胞瘤中高表达)、酪氨酸酶或组织蛋白酶 B 敏感。

[0198] 路线 4: X=O、N、S

[0199]

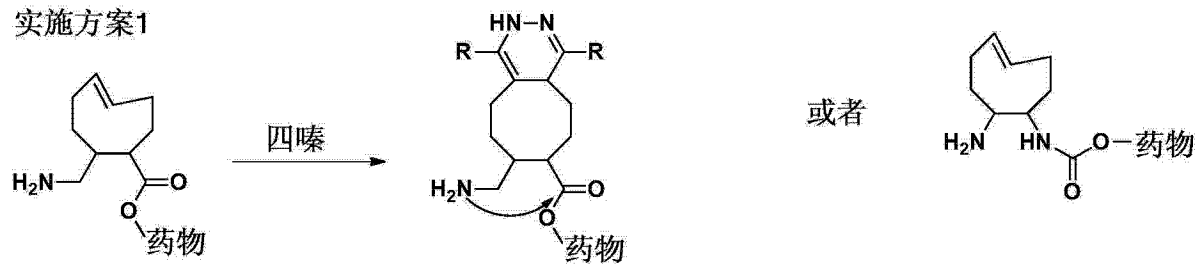


[0200] TCO-触发剂和活化剂的组合及其之间的反应

[0201] 下列路线描述了说明多种机制的非限制性实例，基于用于活化前药的 rDA 反应的选择可应用所述多种机制。注意，在胺官能化药物释放的情况下，其可为如伯胺或仲胺、苯胺、咪唑或吡咯型药物，从而药物离去基团性质可变化。如果应用对应的水解稳定的 TCO 前药，则释放无其它官能度的药物也是可能的（如巯基官能化药物）。所画的稠环产物可或不可互变异构为其它更有利的互变异构体。

[0202]

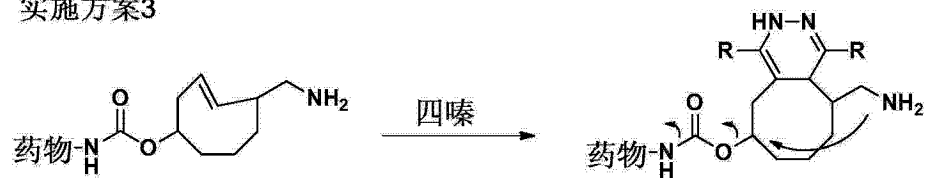
实施方案1



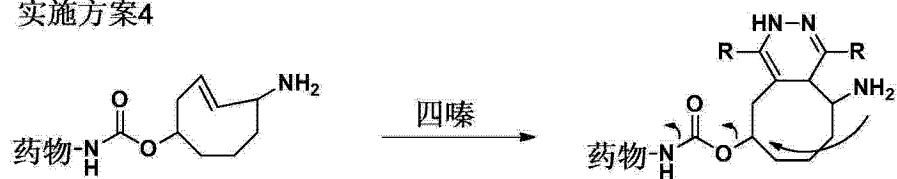
实施方案2



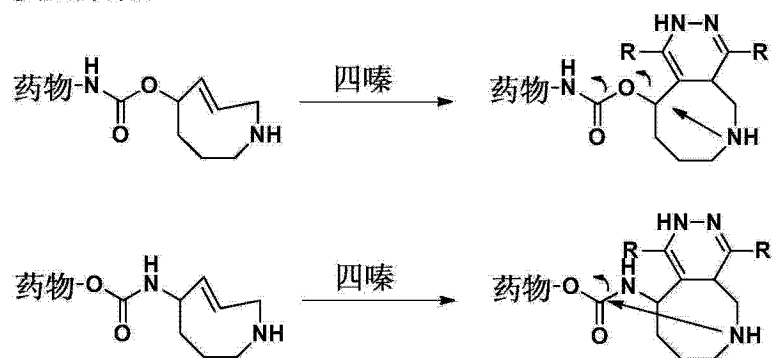
实施方案3



实施方案4

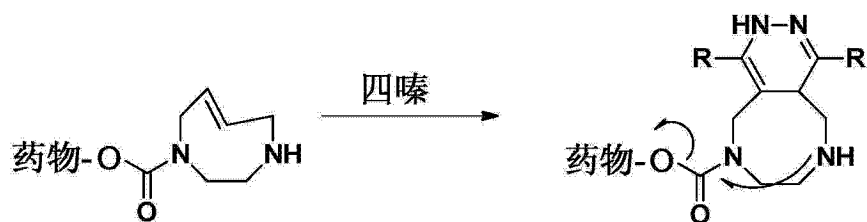


实施方案5



[0203]

实施方案6



[0204] 在一个优选实施方案中,药物以抗体-毒素缀合物的形式提供。该缀合物具有与以上相同的 TC0 基团,以便使生物正交化学活化毒素能够释放。在另一实施方案中,药物是用来与肿瘤细胞结合并恢复和活化 T 细胞的双特异性或三特异性抗体衍生物,其 T 细胞结合功能通过如上描述的与 TC0 基团连接而失活。所述 TC0 基团再使生物正交化学活化的药物能够活化。

[0205] 靶向

[0206] 本发明的药盒和方法非常适合用于药物的靶向递送。

[0207] 如本发明中使用的“主要靶点”涉及用于治疗靶点的靶点。例如,主要靶点可为在生物、组织或细胞中存在的任意分子。靶点包括细胞表面靶点,如受体、糖蛋白;结构蛋白,如淀粉样斑块;丰富的细胞外靶点,如间质;细胞外基质靶点如生长因子以及酶;细胞内靶点,如高尔基体表面、线粒体表面、RNA、DNA、酶、细胞信号通路组分和/或异物,如病原体(例如病毒、细菌、真菌、酵母菌或其部分)。主要靶点的实例包括如蛋白质的化合物,所述蛋白质的存在或表达水平与在特定病症中表达水平上调或下调的特定组织或细胞种类相关。根据本发明的一个具体实施方案,主要靶点为如(内化或非内化)受体的蛋白质。

[0208] 根据本发明,主要靶点可选自人体或动物体内或者病原体或寄生虫上的任意适合的靶点,例如细胞(如细胞膜和细胞壁)、受体(如细胞膜受体)、细胞内结构(如高尔基体或线粒体、酶、受体、DNA、RNA、病毒或病毒颗粒、抗体、蛋白质、碳水化合物、单糖、多糖、细胞因子、激素、甾族化合物、生长抑素受体、单胺氧化酶、毒蕈碱受体、心肌交感神经系统、白三烯受体(如在白细胞上)、尿激酶纤溶酶原激活物受体(uPAR)、叶酸受体、凋亡标志物(marker)、(抗)血管发生标志物、胃泌素受体、多巴胺能系统、5-羟色胺能系统、GABA 能系统、肾上腺素系统、胆碱能系统、阿片受体、GPIIb/IIIa 受体和其它血栓相关系统、纤维蛋白、降钙素受体、促吞噬肽受体、整合素受体、纤连蛋白、VEGF/EGF 和 VEGF/EGF 受体、TAG72、CEA、CD19、CD20、CD22、CD40、CD45、CD74、CD79、CD105、CD138、CD174、CD227、CD326、CD340、MUC1、MUC16、GPNMB、PSMA、生长因子(Cripto)、腱糖蛋白(Tenascin C)、黑皮质素-1 受体、CD44v6、G250、HLA DR、ED-B、TMEFF2、EphB2、EphA2、FAP、间皮素、GD2、CAIX、5T4、基质金属蛋白酶(MMP)、P/E/L-选择蛋白受体、LDL 受体、P-糖蛋白、神经降压肽受体、神经肽受体、P物质受体、NK 受体、CCK 受体、 σ 受体、白细胞介素受体、单纯疱疹病毒酪氨酸激酶、人酪氨酸激酶)。为了能够对上述所列主要靶点特定靶向,靶向剂 T^T 可包含的化合物包括但不限于抗体、抗体片段(如 Fab2、Fab、scFv)、双链抗体、三链抗体、VHH、抗体(片段)融合物(如双特异 mAb 片段和三特异 mAb 片段)、蛋白质、肽(如奥曲肽及其衍生物、VIP、MSH、LHRH、趋化肽、铃蟾肽、弹性蛋白)、模拟肽、碳水化合物、单糖、多糖、病毒、整体细胞、药物、聚合物、脂质体、化学治疗剂、受体激动剂和拮抗剂、细胞因子、激素、甾族化合物。本发明上下文包

括的有机化合物的实例为或衍生自雌激素（如雌二醇）、雄激素、孕激素、皮质类甾醇、甲氨蝶呤、叶酸和胆固醇。在一个优选的实施方案中，靶向剂 T^T 为抗体。根据本发明的一个具体实施方案，主要靶点为受体，并且使用了可特异性结合至主要靶点的靶向剂。适合的靶向剂包括但不限于受体的配体或其仍结合至受体的部分，如在受体结合蛋白质配体中的受体结合肽。蛋白质性质的靶向剂的其它实例包括干扰素（如 α 干扰素、 β 干扰素和 γ 干扰素）、白细胞介素和蛋白质生长因子（例如肿瘤生长因子（如 α 肿瘤生长因子、 β 肿瘤生长因子）、血小板源性生长因子（PDGF）、uPAR 靶向蛋白、载脂蛋白、LDL、钙磷脂结合蛋白 V、内皮他丁和血管他丁。靶向剂的其它实例包括如与主要靶点互补的 DNA、RNA、PNA 和 LNA。

[0209] 根据本发明的另一具体实施方案，选择主要靶点和靶向剂以得到对疾病（如癌症、炎症、感染、心血管疾病（如血栓、粥样硬化病变）、缺氧部位（如卒中、肿瘤、心血管病症、脑疾病、凋亡、血管发生）、器官和报告基因/酶的特异性靶向或提高的靶向。这可通过选择具有组织特异性表达、细胞特异性表达或疾病特异性表达的主要靶点来实现。例如，膜叶酸受体调节叶酸及其类似物（如甲氨蝶呤）的细胞内蓄积。在正常组织中表达被限制，但在多种肿瘤细胞类型中，受体过表达。

[0210] 掩蔽基团

[0211] 掩蔽基团 M^M 可为蛋白质、肽、聚合物、聚乙二醇、碳水化合物、有机构建体，其进一步掩蔽连接的药物 D^D 或前药。这种掩蔽可基于如位阻，但是它也可基于与药物 D^D 的非共价相互作用。这样的掩蔽基团还可用于影响药物 D^D 或前药的体内性质（如血液清除；免疫系统识别）。

[0212] 间隔基

[0213] 间隔基 S^P 包括但不限于具有 2-200，特别是 3-113，并且优选 5-50 个重复单元的聚乙二醇（PEG）链。其它实例为生物聚合物片段，如寡肽或多肽或者聚乳酸。其它优选的实例如实施例 9 中所示。

[0214] 给药

[0215] 在本发明的内容中，通常首先给药前药，并且在前药到达主要靶点前会花费一定时间。这段时间会由不用的应用而不同，并且可为几分钟、几天或几周。选定的时间过后，给药活化剂，其会寻找前药并与其反应，并且从而会在主要靶点活化药物的释放。

[0216] 本发明的组分可通过不同的途径给药，包括静脉注射、腹膜内给药、口服给药、直肠给药和吸入给药。适合用于这些不同给药途径的制剂为技术人员已知的。本发明的前药或活化剂可与药学可接受载体共同给药。在此使用的适合的药学可接受载体涉及对于医学或兽医学目的适合的载体，其为无毒的，否则不能接受。这样的载体是本领域熟知的，并且包括盐水、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、乙醇及其组合。制剂应适合给药的方式。

[0217] 应当理解，给药的化学实体（也就是前药和活化剂）可为不改变所述化学实体的化学功能性的修饰形式，如其盐、水合物或溶剂合物。

[0218] 在循环中前药的活化是不期望的以及前药的自然清除是不充分的情况下，在给药前药后并且在给药活化剂前，优选通过清除剂的方式移除过量的前药。清除剂是为了与要从循环移除的过量的给药物质（在本情况中为前药）结合或络合而向个体给药的物质、化合物或基团。清除剂可直接从循环移除。尽管如技术人员已知存在从循环分泌的其它方式，所述移除通常通过基于肝受体的机制实现。在本发明中，用于移除循环前药的清除剂优选

包含例如如上所讨论的能够与前药的 TCO 基团反应的双烯结构。

实施例

[0219] 下列实施例说明本发明或本发明的方面,并且不用来限定或限制本发明或其权利要求的范围。

[0220] 方法:在 Varian Mercury 谱仪 ($^1\text{H-NMR}$:400MHz; $^{13}\text{C-NMR}$:100MHz),298K 下记录 $^1\text{H-NMR}$ 谱和 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱。在室温下从 TMS 向低场以 ppm 报告化学位移。用于分裂模式的缩写为 s=单峰, t=三重峰, q=四重峰, m=多重峰并且 br=宽峰。在 Perkin Elmer1600FT-IR(UATR)上记录 IR 谱。使用联接至二极管阵列检测器 (Finnigan Surveyor PDA Plus 检测器, Thermo Electron Corporation) 和离子阱 (LCQ Fleet, Thermo Scientific) 的 Shimadzu LC-10AD VP 系列 HPLC 进行 LC-MS。使用 Alltech Alltima HP C_{18} 3 μ 柱,进样量为 1-4 μ L,流速为 0.2mL min^{-1} ,并且使用代表性梯度(10 分钟内从 5% 至 100%,100% 下再保持 3 分钟)的 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (均包含 0.1% 甲酸)在 25 $^\circ\text{C}$ 下进行分析。使用联接至两个 Shimadzu LC-8A 泵和 Shimadzu SPD-10AV VP 紫外-可见光检测器的 Shimadzu SCL-10A VP,在 Phenomenex Gemini5 μ C_{18} 110A 柱上进行制备 RP-HPLC(含 0.1% 甲酸的 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$)。在装备有 Gabi 放射性检测器的 Agilent1200 系统上进行体积排阻 (SEC)HPLC。将样品装载到 Superdex-20010/300GL 柱 (GE Healthcare Life Sciences) 上,并用 10mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 以 0.35-0.5mL/分钟的流速洗脱。紫外波长预设为 260nm 和 280nm。抗体溶液的浓度用 NanoDrop1000 分光光度计 (Thermo Fisher Scientific) 分别从 322nm 和 280nm 的吸光度测定。

[0221] 原料:所有试剂、化学品、原料和溶剂均从商业来源获得,并且以获得时的形式使用:从 Biosolve, Merck and Cambridge Isotope Laboratories 获得(氘化)溶剂;并且从 Aldrich、Acros、ABCR、Merck 和 Fluka 获得化学品、原料和试剂。所有溶剂为分析纯试剂 (AR) 品质。根据文献步骤 (Y. H. Choe, C. D. Conover, D. Wu, M. Royzen, Y. Gervacio, V. Borowski, M. Mehlig, R. B. Greenwald, J. Controlled Release2002, 79, 55 - 70) 合成 4-(叔丁基二甲基甲硅烷氧基甲基)-2,6-二甲基苯酚。盐酸多柔比星从 Avachem Scientific 获得。

[0222] 实施例 1

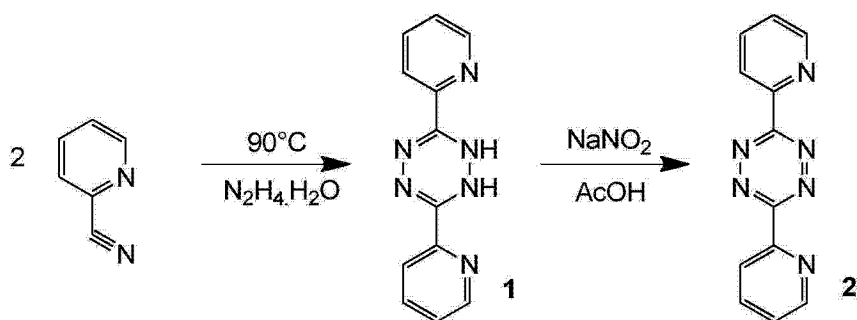
[0223] 四嗪活化剂的合成

[0224] 一般操作

[0225] 除了下面具体描述的四嗪外,还制备了一系列的其它四嗪。使用 Pinner 型反应,将合适的脒与脒反应以制备二氢 1,2,4,5-四嗪中间体。如本领域已知,脒也被用作反应物来代替脒。在该反应中使用硫也是已知的,在一些情况中,这有助于二氢 1,2,4,5-四嗪的形成。氧化该中间体得到四嗪双烯活化剂。下面的反应描述了一些制备的四嗪,并且说明了一些制备和分离四嗪的可能性(如溶剂的使用、浓度、温度、反应物的当量、氧化的选择等)。其它本领域已知的方法也可用于制备四嗪或其它活化剂。

[0226] 3,6-双(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪(2)的合成

[0227]



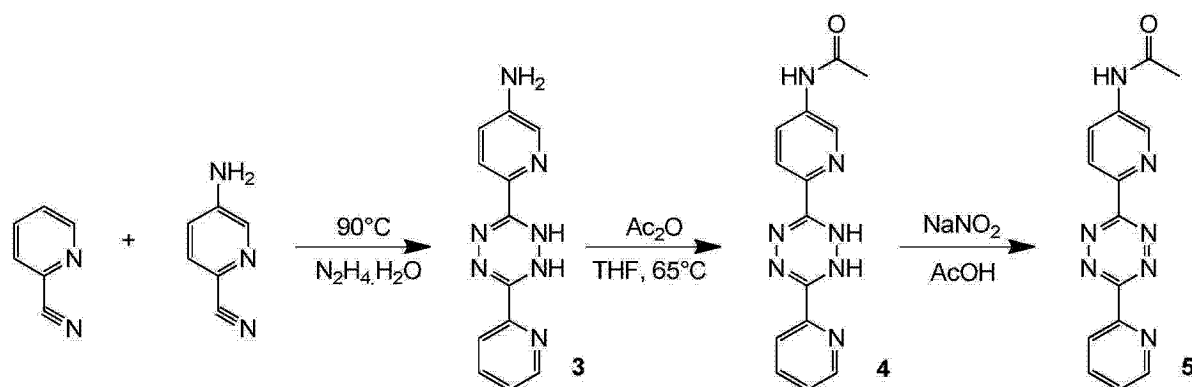
[0228] 将 2-氰基吡啶 (10.00g, 96.0mmol) 和水合肼 (15.1g; 300mmol) 在 90℃, 惰性气氛下搅拌过夜。将混浊的混合物冷却至室温, 过滤, 并且随后用水 (20mL) 和乙醇 (20mL) 洗涤残渣, 真空干燥, 以得到橙黄色固体形式的粗品二氢四嗪 1 (7.35g; 65%)。

[0229] 将二氢四嗪 (1, 100mg; 0.419mmol) 悬浮于乙酸 (3mL) 中, 并且加入亚硝酸钠 (87mg; 1.26mmol)。立即观察到从橙黄色到暗红色的颜色变化, 并且将氧化产物通过过滤分离。将残渣用水 (10mL) 洗涤并在真空中干燥以得到紫色固体形式的标题化合物 (2, 92mg; 93%)。

[0230] ^1H NMR (CDCl_3): δ = 9.00 (d, 2H), 8.76 (d, 2H), 8.02 (t, 2H), 7.60 (dd, 2H) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3): δ = 163.9, 151.1, 150.1, 137.5, 126.6, 124.5 ppm. HPLC-MS/PDA: 色谱图中一个峰, m/z = 237.00 ($\text{M}+\text{H}^+$), λ_{max} = 296 和 528nm。

[0231] 3-(5-乙酰氨基-2-吡啶基)-6-(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪 (5) 的合成

[0232]



[0233] 将 2-氰基吡啶 (5.00g, 48.0mmol)、5-氨基-2-氰基吡啶 (5.72g; 48.0mmol) 和水合肼 (15.1g; 300mmol) 在 90℃, 惰性气氛下搅拌过夜。将混浊的混合物冷却至室温, 过滤, 并且随后用水 (20mL) 和乙醇 (20mL) 洗涤残渣, 并真空干燥。将橙色固体悬浮于丙酮 (200mL) 中, 注入在硅胶 (20 克) 上, 并且使用梯度 (0% 至 70%) 的丙酮和庚烷色谱分析, 以橙色固体形式得到二氢四嗪 3 (1.46g; 12% 收率)。

[0234] 将二氢四嗪 (3, 90mg; 0.355mmol) 溶解于 THF (1mL) 中, 并且加入乙酸酐 (54.4mg; 0.533mmol)。将该溶液在惰性气氛中加热至回流, 持续 18 小时。通过过滤分离橙色固体, 并且用 THF (3mL) 洗涤以提供乙酰氨基的二氢四嗪 (4, 90mg; 86% 收率)。

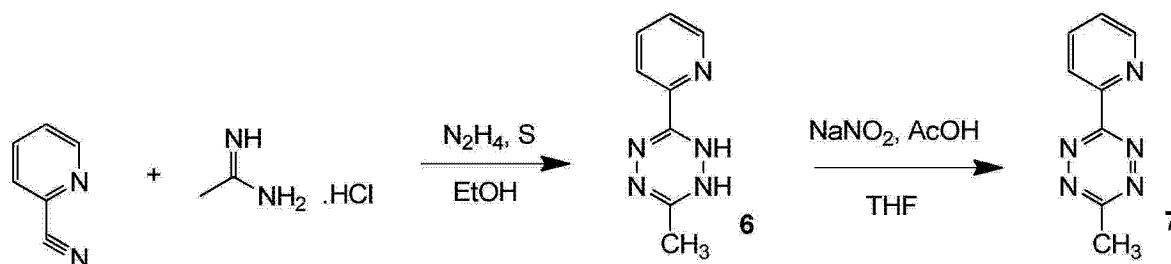
[0235] 将乙酰胺 (4, 50mg; 0.169mmol) 悬浮于乙酸 (1mL) 中, 并且加入亚硝酸钠 (35mg; 0.508mmol)。立即观察到从橙黄色到暗红色的颜色变化, 并且将氧化产物通过过滤分离。残渣用水 (5mL) 洗涤并在真空中干燥以得到紫色固体形式的标题化合物

(5, 42mg; 84%)。

[0236] ^1H NMR(DMSO- d_6): δ =9.03(d, 1H), 8.93(d, 1H), 8.61(dd, 2H), 8.42(dd, 1H), 8.16(dt, 1H), 7.73(dd, 1H), 2.17(s, 3H)ppm. ^{13}C NMR(DMSO- d_6): δ =169.5, 163.0, 162.8, 150.6, 150.2, 143.8, 141.2, 138.5, 137.8, 126.6, 126.1, 124.9, 124.2, 24.1ppm. HPLC-MS/PDA: 色谱图中一个峰, m/z =293.9($M+H^+$), $\lambda_{\max}$ =323 和 529nm。

[0237] 3-(2-吡啶基)-6-甲基-1,2,4,5-四嗪(7)的合成

[0238]



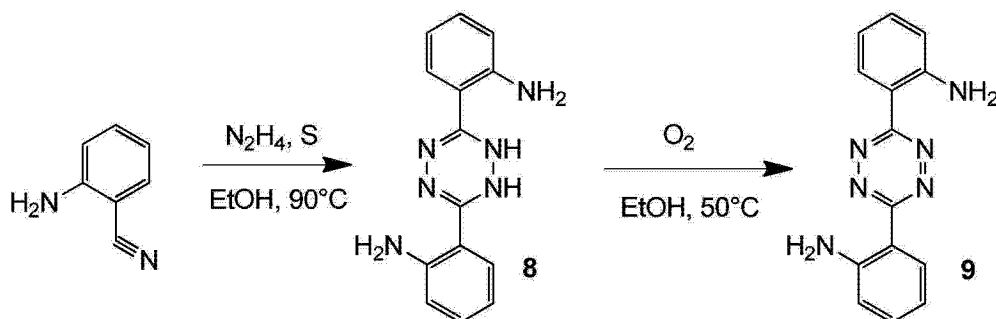
[0239] 在氩气的惰性气氛下,将2-氰基吡啶(500mg, 4.8mmol)、盐酸乙脒(2.00g, 21.2mmol)和硫(155mg, 4.8mmol)在乙醇(5mL)中搅拌。加入水合肼(2.76g; 55.2mmol)并且将混合物在20℃下搅拌过夜。将浑浊的混合物过滤,并且将滤液蒸发至干燥,以得到2.9g的橙色粗产物6。

[0240] 随后,将6(800mg)悬浮于THF(3mL)和乙酸(4mL)的混合物中。将 NaNO_2 (2.0g; 29.0mmol)在水(3mL)中的溶液在0℃下加入。观察到其瞬间变色为红色/紫色悬浮液。0℃下搅拌5分钟,然后加入氯仿和水。紫色的氯仿层用水洗涤两次,然后浓缩。将固体残渣在氯仿和己烷的1:1混合物中搅拌,然后过滤。浓缩滤液,并且将粗产物用硅胶色谱法(氯仿/丙酮混合物用作洗脱液)纯化,得到纯产物(7, 48mg, 21%总收率,从2-氰基吡啶计算)。

[0241] ^1H NMR(CDCl_3): δ =8.96(d, 1H), 8.65(d, 1H), 7.99(t, 1H), 7.56(dd, 1H), 3.17(s, 3H)ppm. ^{13}C NMR(CDCl_3): δ =168.1, 163.6, 150.9, 150.3, 137.4, 126.3, 123.9, 21.4ppm. HPLC-MS/PDA: 色谱图中一个峰, m/z =174.3($M+H^+$), $\lambda_{\max}$ =274 和 524nm。

[0242] 3,6-双(2-氨基苯基)-1,2,4,5-四嗪(9)的合成

[0243]



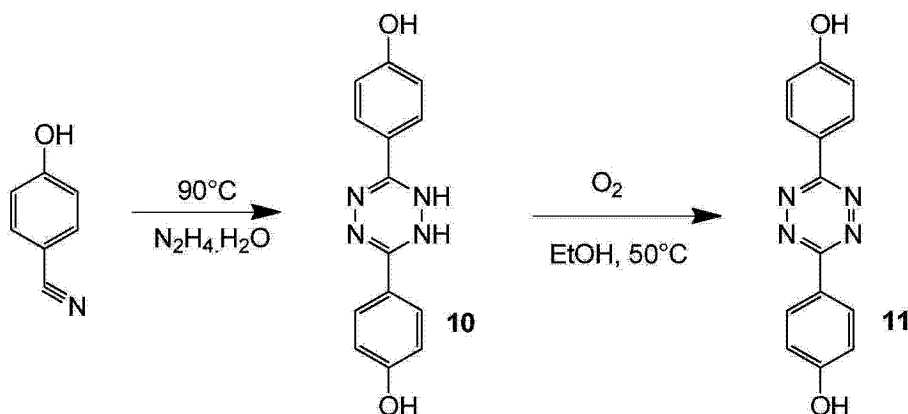
[0244] 将2-氨基苯甲腈(1.00g; 8.46mmol)溶解于乙醇(3mL)中,并且加入水合肼(2.06g; 41.2mmol)。将混合物冷却至0℃并且加入硫(0.17g; 5.30mmol)。搅拌持续15分钟,随后将混合物在90℃下加热。3小时后,过滤分离黄色沉淀,用乙醇(10mL)洗涤,并且随后用氯仿研磨两次(2次, 10mL),以得到黄色中间体8(343mg, 30%)。

[0245] 将中间体 8 (105mg; 0.394mmol) 溶解于乙醇 (15mL) 中, 并且 50℃ 下将氧气鼓泡通入溶液中。几分钟内, 颜色从黄色变为暗黄色 / 红色, 并且形成了沉淀。2 小时后, 过滤沉淀, 用乙醇洗涤并且干燥以得到暗红色晶体形式的产物 9 (89mg, 86%)。

[0246] ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ = 8.39 (d, 2H), 7.32 (t, 2H), 7.04 (s, 4H), 6.93 (d, 2H), 6.75 (t, 2H) ppm. ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ = 162.7, 149.6, 133.0, 129.0, 117.1, 115.8, 111.6 ppm. HPLC-MS/PDA: 色谱图中一个峰, m/z = 265.4 ($\text{M}+\text{H}^+$), λ_{max} = 237, 293, 403 和 535nm。

[0247] 3,6-双(4-羟基苯基)-1,2,4,5-四嗪 (11) 的合成

[0248]



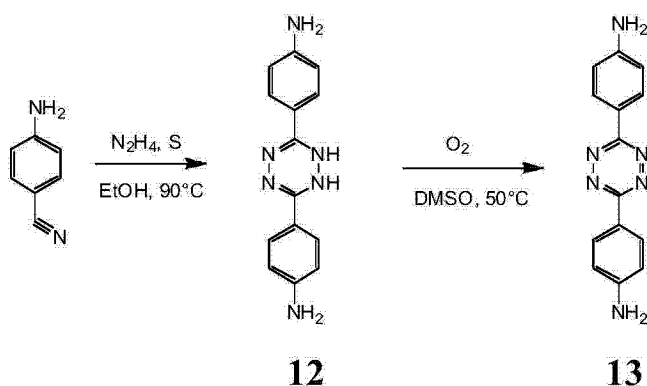
[0249] 将 4-羟基苯甲腈 (1.06g; 8.90mmol) 溶解在水合肼 (3.09g; 61.7mmol) 中, 并且将混合物加热至 90℃, 持续 16 小时。过滤黄色沉淀, 并且将其用水 (25mL) 和乙醇 (10mL) 洗涤, 以得到黄色粉末形式的粗中间体 10 (870mg; 62%)。

[0250] 将中间体 (10, 173mg; 0.645mmol) 悬浮于乙醇 (10mL) 中, 并且 50℃ 下将氧气鼓泡通入该混合物中。几分钟内, 颜色从黄色变为暗黄色 / 红色。6 小时后, 过滤沉淀, 用乙醇洗涤并且干燥以得到暗红色晶体形式的产物 11 (136mg, 80%)。

[0251] ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ = 10.35 (br. s, 2H), 8.36 (d, 4H), 7.02 (d, 4H) ppm. ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ = 162.6, 161.5, 129.2, 122.6, 116.3 ppm. HPLC-MS/PDA: 色谱图中一个峰, m/z = 267.1 ($\text{M}+\text{H}^+$), λ_{max} = 235, 330 和 535nm。

[0252] 3,6-双(4-氨基苯基)-1,2,4,5-四嗪 (13) 的合成

[0253]



[0254] 将 4-氨基苯甲腈 (1.00g; 8.46mmol) 溶解于乙醇 (3mL) 中, 并且随后加入水合肼 (2.12g; 42.2mmol) 和硫 (0.176g; 5.5mmol)。将混合物在 90℃ 下加热持续 90 分钟。过滤分离黄色沉淀, 用乙醇 (10mL) 洗涤, 并且随后用丙酮 (12mL) 研磨, 以得到黄色中间体

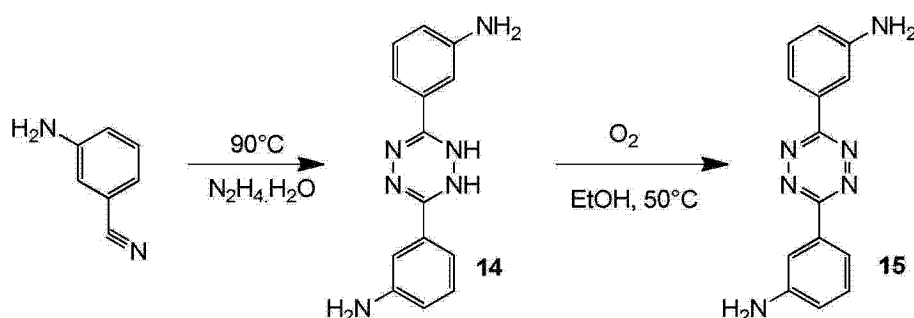
12 (190mg, 17%)。

[0255] 将中间体 12 (50mg; 0.188mmol) 溶解于 DMSO (1mL) 中, 并且 20℃ 下, 将氧气鼓泡通入该溶液。5 小时后, 将反应混合物倒入盐水 (13mL) 中, 并且过滤红色沉淀, 用水 (10mL) 洗涤, 并且真空干燥。将红色粉末通过用丙酮 (15mL) 研磨进一步纯化, 以得到红色固体形式的产物 13 (13.7mg, 27%)。

[0256] ^1H NMR (DMSO- d_6): δ = 8.17 (d, 2H), 7.75 (d, 2H), 6.02 (s, 4H) ppm. ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ = 162.3, 152.8, 128.5, 118.3, 113.8 ppm. HPLC-MS/PDA: 色谱图中一个峰, m/z = 265.2 ($M+H^+$), $\lambda_{\max}$ = 241, 370 和 530nm。

[0257] 3,6-双(3-氨基苯基)-1,2,4,5-四嗪 (15) 的合成

[0258]



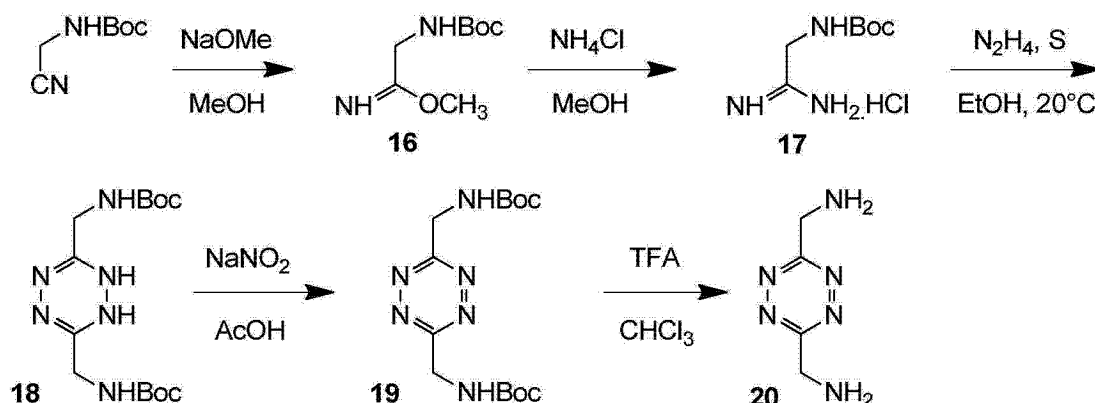
[0259] 将 3-氨基苯甲腈 (1.00g; 8.460mmol) 溶解在水合肼 (2.50mL; 51.4mmol) 中, 并且将混合物加热至 90℃, 持续 3 天。加入水 (5mL), 并且过滤黄色沉淀, 并用水 (15mL) 和乙醇 (10mL) 洗涤, 以得到橙色粉末形式的粗中间体 14 (910mg; 81%)。

[0260] 将中间体 14 (50mg; 0.188mmol) 悬浮于乙醇 (4mL) 中, 并且 50℃ 下将氧气鼓泡通入该混合物中。几分钟内, 颜色从黄色变为红色。16 小时后, 过滤沉淀, 并用乙醇洗涤以得到红色粉末形式的产物 15 (31mg, 62%)。

[0261] ^1H NMR (DMSO- d_6): δ = 7.77 (s, 2H), 7.66 (d, 2H), 7.30 (t, 2H), 6.85 (d, 2H), 5.53 (s, 4H) ppm. HPLC-MS/PDA: 色谱图中一个峰, m/z = 265.2 ($M+H^+$), $\lambda_{\max}$ = 240, 296 和 527nm。

[0262] 3,6-双(氨基甲基)-1,2,4,5-四嗪 (20) 的合成

[0263]



[0264] 将 Boc-氨基乙腈 (1.00g; 6.40mmol) 溶解于甲醇 (10mL) 中, 并且加入甲醇钠 (0.145mL 25% 的甲醇溶液; 0.64mmol)。混合物在 20℃ 下搅拌 18 小时, 随后加入氯化铵 (0.34g; 6.40mmol), 并且将混合物在 20℃ 下搅拌 3 天。将溶液在乙醚 (40mL) 中沉淀, 通过

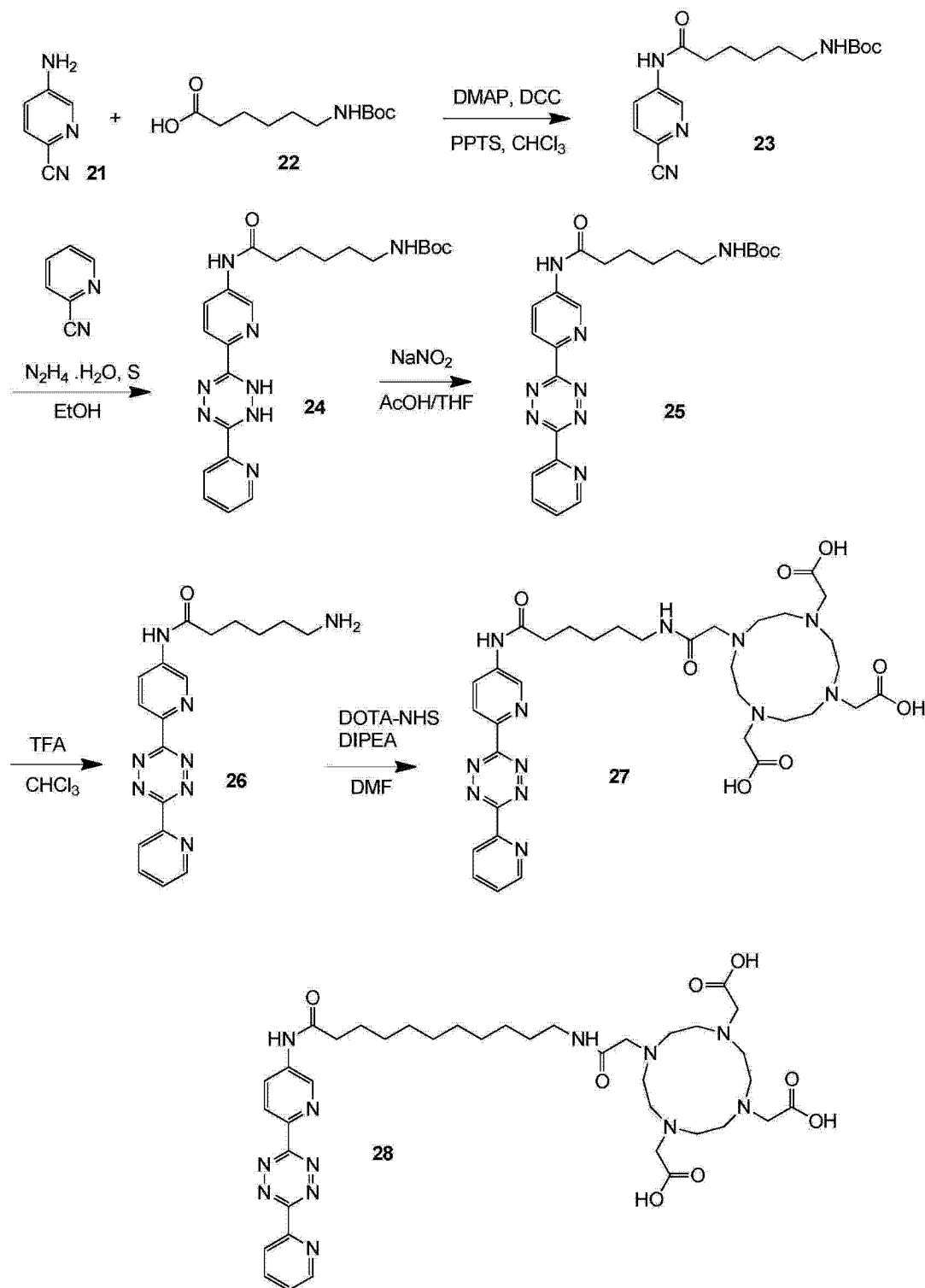
过滤收集沉淀,并且干燥以得到盐酸脒 17。

[0265] 将盐酸脒 (17, 241mg; 1.15mmol) 溶解在水合肼 (3mL; 61.9mmol) 中, 并且将该溶液在 20℃ 下搅拌 16 小时。然后将其用水 (10mL) 稀释, 并且通过离心法收集沉淀并干燥。将无色固体溶解于乙酸 (1.5mL) 中, 并且加入亚硝酸钠 (28mg; 0.41mmol)。将粉色混合物搅拌 15 分钟, 并且随后加入氯仿 (15mL) 和饱和碳酸氢钠 (30mL)。分离有机层并且用水 (15mL) 洗涤, 硫酸钠干燥, 并且蒸发至干燥, 以得到粉色固体形式的 Boc 保护四嗪。将该化合物 (12mg; 0.035mmol) 溶解于氯仿 (1mL) 中并加入 TFA (1mL)。将混合物搅拌 15 分钟, 并且在乙醚 (15mL) 中沉淀。过滤粉色沉淀, 洗涤并干燥, 以得到标题化合物的 TFA 盐 (20, 10mg, 78%)。

[0266] ^1H NMR (D_2O): δ = 5.06 (s, 4H) ppm. ^{13}C NMR (D_2O): δ = 164.5, 41.1 ppm. HPLC-MS/PDA: 色谱图中一个峰, m/z = 141 ($\text{M}+\text{H}^+$), λ_{max} = 267 和 517nm。

[0267] 2, 2', 2'' - (10- (2- 氧代 -2- (6- 氧代 -6- (6- (6- (吡啶 -2- 基) -1, 2, 4, 5- 四嗪 -3- 基) 吡啶 -3- 基氨基) 己基氨基) 乙基) -1, 4, 7, 10- 四氮杂环十二烷 -1, 4, 7- 三基) 三乙酸 (27) 和 2, 2', 2''' - (10- (2- 氧代 -2- (11- 氧代 -11- (6- (6- (吡啶 -2- 基) -1, 2, 4, 5- 四嗪 -3- 基) 吡啶 -3- 基氨基) 十一基氨基) 乙基) -1, 4, 7, 10- 四氮杂环十二烷 -1, 4, 7- 三基) 三乙酸 (28) 的合成

[0268]



[0269] 将 5-氨基-2-氰基吡啶 **21** (1.02g; 8.60mmol)、N-Boc-6-氨基己酸 **22** (0.99g; 4.30mmol)、DCC (1.77g; 8.60mmol)、DMAP (1.05g; 8.60mmol) 和 PPTS (0.37g; 1.47mmol) 悬浮于氯仿 (15mL) 中。将混合物在室温下搅拌 18 小时, 然后蒸发至干燥, 并在乙腈 (20mL) 中搅拌。通过过滤移除沉淀, 并将滤液蒸发至干燥, 在氯仿 (20mL) 中溶解, 并且分别用柠檬酸水溶液 (15mL 0.5M)、碳酸氢钾水溶液 (15mL, 1M) 和水 (15mL) 洗涤。有机层用硫酸钠干燥并蒸发至干燥。粗产物通过柱色谱法 (二氧化硅, 己烷/乙酸乙酯=1:1) 纯化以得到白色固体形式的产物 **23** (0.95g; 61%)。

[0270] MS(ESI, m/z): $C_{17}H_{25}N_4O_3^+$ ([M+H]⁺) 理论值: 333. 19 实测值: 333. 17。

[0271] 将 6-(6- 氰基吡啶-3-基氨基)-6-氧代己基氨基甲酸叔丁基酯 23(0. 70g; 2. 1mmol)、2- 氰基吡啶(0. 87g; 8. 4mmol)、水合肼(1. 25g; 20mmol) 溶解在乙醇(2mL) 中, 并且加入硫(0. 22g; 7mmol)。将混合物在 70℃, 氩气的惰性气氛下搅拌 2 小时, 然后在 50℃下持续 16 小时。橙色悬浮液用氯仿(10mL) 稀释, 并且所得溶液用水洗涤(2 次, 15mL)。有机层用硫酸钠干燥并蒸发至干燥。粗产物通过柱色谱法(二氧化硅, 氯仿/ 丙酮=4:1) 纯化以得到橙色固体形式的产物 24(0. 65g; 66%)。MS(ESI, m/z): $C_{23}H_{31}N_8O_3^+$ ([M+H]⁺) 理论值: 467. 25 实测值: 467. 33,

[0272] 将 6-氧代-6-(6-(6-(吡啶-2-基)-1, 2-二氢-1, 2, 4, 5-四嗪-3-基) 吡啶-3-基氨基) 己基氨基甲酸叔丁酯 24(0. 30g; 0. 64mmol) 溶解于 THF(1. 5mL) 中, 并且加入乙酸(2mL)。将亚硝酸钠(0. 25g; 3. 62mmol) 溶解于水(1mL) 中, 并且滴加。将红色溶液倒入碳酸氢钾水溶液(50mL; 1M) 中, 并且用氯仿(50mL) 萃取。有机层用水(50mL) 洗涤, 并用硫酸钠干燥, 并且蒸发至干燥, 以得到紫色固体形式的产物 25(0. 25g; 83%)。

[0273] MS(ESI, m/z): $C_{23}H_{29}N_8O_3^+$ ([M+H]⁺) 理论值: 465. 23 实测值: 465. 42。

[0274] 将 6-氧代-6-(6-(6-(吡啶-2-基)-1, 2, 4, 5-四嗪-3-基) 吡啶-3-基氨基) 己基氨基甲酸叔丁酯 25(66mg; 0. 14mmol) 溶解于氯仿(6mL) 中, 并且加入 TFA(6mL)。溶液在室温下搅拌 2 小时, 并随后蒸发至干燥, 以得到产物 26 的 TFA 盐(52mg; 100%)。

[0275] MS(ESI, m/z): $C_{18}H_{21}N_8O^+$ ([M+H]⁺) 理论值: 365. 19 实测值: 365. 33,

[0276] 将 6-氨基-N-(6-(6-(吡啶-2-基)-1, 2, 4, 5-四嗪-3-基) 吡啶-3-基) 乙酰胺 26(52mg; 0. 14mmol) 溶解于 DMF(2. 5mL) 中, 并且加入 DIPEA(320mg; 2. 0mmol)。加入 N-羟基琥珀酰亚胺活化的 DOTA(161mg; 0. 2mmol), 并且将混合物在室温下搅拌 5 小时。将溶液蒸发至干燥, 粗产物溶解于乙腈和水的混合物中, 并用制备型 RP-HPLC 纯化。冻干后得到粉色松散固体形式的纯产物 27(80mg, 76% 收率)。

[0277] ¹H-NMR(D₂O 中 30% 乙腈-d₃): δ=8. 90(m, 2H, ArH), 8. 68(d, 1H, ArH), 8. 60(dd, 1H, ArH), 8. 31(m, 1H, ArH), 8. 24(t, 1H, ArH), 7. 82(t, 1H, ArH), 3. 80(br s, 6H, NCH₂COOH), 3. 72(br s, 2H, NCH₂CONH), 3. 34-3. 23(br m, 18H, NCH₂CH₂N, CH₂NHCO), 2. 49(t, 2H, NHCOCH₂), 1. 70(m, 2H, NHCOCH₂CH₂), 1. 59(m, 2H, CH₂CH₂NHCO), 1. 41(m, 2H, CH₂CH₂CH₂NHCO) ppm。 ¹³C-NMR(D₂O 中 30% 乙腈-d₃): δ=175. 5, 171. 5(br), 162. 6, 162. 5, 150. 1, 148. 1, 142. 9, 141. 6, 139. 6, 138. 4, 128. 0, 127. 9, 125. 4, 124. 8, 55. 4, 54. 3(br), 49. 4(br), 39. 4, 36. 5, 28. 2, 25. 9, 24. 6ppm。 ESI-MS:m/z $C_{34}H_{47}N_{12}O_8^+$ ([M+H]⁺): 751. 37; obs. [M+H]⁺751. 58, [M+Na]⁺773. 50, [M+2H]²⁺376. 42, [M+3H]³⁺251. 33. FT-IR(ATR): ν=3263, 3094, 2941, 2862, 1667, 1637, 1582, 1540, 1460, 1431, 1395, 1324, 1296, 1272, 1251, 1226, 1198, 1128, 1087, 1060, 1020, 992, 977, 920, 860, 831, 798, 782, 742, 718, 679, 663cm⁻¹。

[0278] 对于 28, 使用与 2, 2', 2''-(10-(2-氧代-2-(6-氧代-6-(6-(6-(吡啶-2-基)-1, 2, 4, 5-四嗪-3-基) 吡啶-3-基氨基) 己基氨基) 乙基)-1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷-1, 4, 7-三基) 三乙酸(27) 的所述合成类似的步骤。

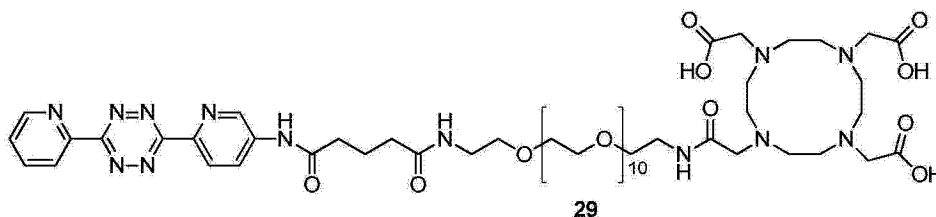
[0279] 冻干后得到粉色松散固体形式的纯产物 28(90mg, 78% 收率)。

[0280] ¹H-NMR(DMSO-d₆): δ=10. 65(s, 1H, NH), 9. 06(d, 1H, ArH), 8. 93(d, 1H, ArH), 8. 61(t, 2H, ArH), 8. 44(dd, 1H, ArH), 8. 16(t, 2H, ArH, NH), 7. 73(dd, 1H, ArH), 3. 51(br

s, 6H, NCH₂COOH), 3.28 (br s, 2H, NCH₂CONH), 3.06 (q, 2H, CH₂NHCO), 3.34-3.23 (br m, 16H, NCH₂CH₂N), 2.43 (t, 2H, NHCOCH₂), 1.64 (m, 2H, NHCOCH₂CH₂), 1.42 (m, 2H, CH₂CH₂NHCO), 1.38-1.22 (m, 12H, CH₂) ppm. ¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ = 173.0, 171.0 (br), 169.1 (br), 163.5, 163.2, 151.0, 150.6, 144.2, 141.7, 139.1, 138.2, 127.0, 126.5, 125.3, 124.6, 57.3 (br), 55.2 (br), 50.7, 39.0, 36.8, 29.5, 29.4, 29.3, 29.19, 29.17, 29.1, 26.9, 25.3 ppm. ESI-MS: m/z C₃₉H₅₇N₁₂O₈⁺ ([M+H]⁺) 理论值: 821.44; obs. [M+Na]⁺ 843.58, [M+H]⁺ 821.58, [M+2H]²⁺ 411.42, [M+3H]³⁺ 274.67. FT-IR (ATR): ν = 3261, 3067, 2925, 2851, 1633, 1583, 1541, 1458, 1433, 1394, 1324, 1298, 1270, 1249, 1228, 1200, 1165, 1128, 1088, 1059, 1016, 991, 920, 885, 860, 832, 798, 782, 764, 742, 719, 687, 661 cm⁻¹.

[0281] DOTA-四嗪活化剂 29

[0282]



[0283] 上述四嗪 29 已在 Robillard 等人 Angew. Chem., 2010, 122, 3447-3450 中详细描述。它也作为可用作本发明活化剂的示例结构。1,2,4,5-四嗪基团的 2-吡啶基之一上的酰胺官能团为供电子基团,而两个吡啶基均可看做吸电子基团。因此该四嗪可看作稍缺电子。

[0284] 活化剂 29 表现出适合的且有利的药理性质:29 在 PBS 溶液中较稳定,2 小时内基本无降解,并且过夜孵育后大部分原料仍未改变;在小鼠中,它具有 10 分钟的血液清除半衰期;小鼠中它的部分分布容积 (V_d) 与总细胞外水隔室 (extracellular water compartment) 相对应,因为它不显著进入细胞。活化剂 29 包含 DOTA 配体,并且这样的配体在多种显像模式 (如 MRI、SPECT、PET) 中是起作用的。因此,活化剂 29 不仅对于药物释放是适合的,它同时可用于成像目的。实际上,活化剂 29 已在与 ¹¹¹In³⁺ 络合后被用作 SPECT/CT 显像探针。更多细节参见 Robillard 等人, Angew. Chem., 2010, 122, 3447-3450。

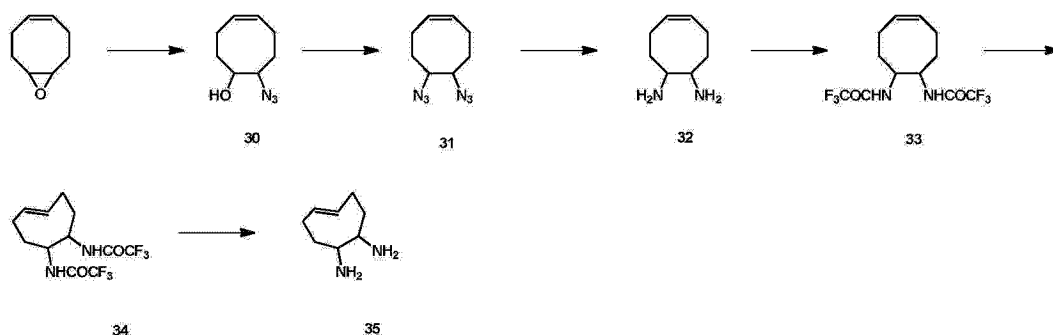
[0285] 注意,活化剂 27-29 中包含的氨基-1,2,4,5-四嗪基团可用于与一些其它官能团 (如糖、PEG、聚合物、肽 (如 RGD 或 c-RGD)、蛋白质、荧光分子或染料分子) 结合。

[0286] 实施例 2

[0287] (E)-环辛烯模型前药和前药的合成

[0288] 顺式-(E)-环辛-5-烯-1,2-二胺 (35) 的合成

[0289]



[0290] 通过 1, 5- 环辛二烯与过硼酸钠在乙酸和二氯甲烷中的反应制备环氧环辛烯, 参阅 Günes, Y. ; Senocak, E. ; Tosun, C. ; Taskesenligil, Y., Org. Commun. 2009, 2:3, 79-83。以这样的形式使用该粗产物。在 45 分钟的时间内, 将环氧环辛烯 (80.0g, 0.645mol) 在 140mL 丙酮中的溶液加入到叠氮化钠 (80g, 1.23mol) 在 200mL 水中的溶液。将加料漏斗用 20mL 丙酮冲洗, 并且将混合物在回流下加热, 持续 76 小时。大部分丙酮通过旋转蒸发移除, 向残渣中加入 100mL 水, 并且将混合物用 3x250mL TBME 萃取。将有机层用 100mL 水洗涤, 然后干燥并旋转蒸发以得到反式-(Z)-8-叠氨基环辛基-4-烯醇 (30) 粗品 (混有环氧化物), 将其以这样的形式在下一步中使用。

[0291] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.6 - 2.6$ (m, 8H), 3.65 - 3.8 (m, 2H), 5.5 - 5.65 (m, 2H) ppm。

[0292] 向全部 30 中加入甲苯 (200mL), 并且将 150mL 溶剂通过旋转蒸发移除。向剩余物中加入 300mL 甲苯 (叠氮基醇 30 和起始环氧化物约 1/1 的混合物), 并且将溶液在冰中冷却。加入三乙胺 (86.1g, 0.852mol), 然后在机械搅拌下, 在 1 小时内加入 100mL 甲苯中的甲磺酰氯 (93.8g, 0.819mol)。将悬浮液搅拌 2 天, 然后加入 200mL 水。分层并且有机层用 2x50mL 水洗涤。连续的水层用 250mL 甲苯萃取。干燥并旋转蒸发, 得到残渣, 其为甲磺酸叠氮和起始环氧化物的混合物。

[0293] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.95 - 2.6$ (m, 8H), 3.95 (dt, 1H), 4.8 (dt, 1H), 5.5 - 5.65 (m, 2H) ppm。

[0294] 将半份残渣与 100mL DMF 和叠氮化钠 (20g, 0.307mol) 在 75°C 下温热 44 小时, 然后在 85°C 下温热 3 小时。将混合物倒入 200mL 水中, 然后用 3x200mL TBME 萃取。将有机层用 3x50mL 水洗涤, 然后干燥并旋转蒸发以得到残渣, 其为顺式-(Z)-5, 6-二叠氨基环辛-1-烯 (31)、环氧环辛烯和杂质的混合物。

[0295] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.8$ (m, 2H), 1.95 - 2.1 (m, 4H), 2.5 - 2.65 (m, 2H), 3.8 (dt, 2H), 5.6 - 5.7 (m, 2H) ppm。

[0296] 将以上获得的二叠氮化物 31 粗品在 150mL THF 中溶解, 并且在 90 分钟内加入到在 200mL THF 中的氢化铝锂 (12.0g, 0.315mol), 用冷水进行冷却。将反应混合物在回流下加热 8 小时, 然后将其冷却, 并且用 6mL 水和 12mL 30% 氢氧化钠溶液缓慢终止。过滤, 用 THF 洗涤, 并旋转蒸发得到溶解在 150mL 二氯甲烷中的残渣, 然后在冰中冷却。在 30 分钟内加入三氟乙酸酐 (69.0g, 0.328mol)。将溶液搅拌 4 小时, 然后旋转蒸发。将残渣在 250g 硅胶柱上色谱分离, 用含有增加量的乙酸乙酯的庚烷进行洗脱。第一部分为环辛-2-烯-1-醇的三氟乙酸盐。将含有期望的顺式-(Z)-N, N'-(环辛-5-烯-1, 2-二基)双(2, 2, 2-三氟乙酰胺) (33) 的部分合并, 从 TBME 和庚烷的混合物中重结晶以得到 18.85g 的产物 (33, 56.74mmol, 基于环氧环辛烯为 18%)。

[0297] 二胺 32 的 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.65 (m, 2H), 1.8 (m, 2H), 2.0 (m, 2H), 2.4 (m, 2H), 3.0 (dt, 2H), 5.6 (m, 2H) ppm。

[0298] 双酰胺 33 的 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.65 (m, 2H), 2.0 (m, 2H), 2.2 (m, 2H), 2.35 (m, 2H), 4.15 (dt, 2H), 5.9 (m, 2H) ppm。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 23 (CH_2), 32 (CH_2), 54 (CH), 110-122 (q, CF_3), 132 (CH), 157 - 159 (q, C=O) ppm。 $^{19}\text{F-NMR}$ (CDCl_3): δ = -76 ppm。

[0299] 将三氟乙酰胺 33 粗品 (将 3.50g (25.0mmol) 顺式-(Z)-环辛-5-烯-1,2-二胺 32 和三氟乙酸酐 (12.3g, 58.6mmol) 的反应产物蒸发后获得) 与苯甲酸甲酯和约 500mL 庚烷/乙醚 (约 2:1) 混合。将混合物照射 42 小时, 同时将溶液连续流动通过 41g 硝酸银浸渍的硅胶柱 (包含约 4.1g 硝酸银)。将柱子用 150mL TBME 冲洗, 然后用 150mL 含有一些甲醇的 TBME 冲洗。将流分用 100mL 15% 氨洗涤, 干燥并且旋转蒸发。第一流分得到 Z 和 E 烯烃的 1:2 的混合物, 第二流分得到少量的 E 烯烃。将柱填料与 TBME 和氨搅拌, 然后过滤, 并且分层。将固体用水层和 TBME 再处理一次, 然后过滤并分层。干燥有机层, 旋转蒸发以得到 3.07g 的 E 烯烃顺式-(E)-N,N'-(环辛-5-烯-1,2-二基)双(2,2,2-三氟乙酰胺) (34, 9.25mmol, 基于胺为 37%)。

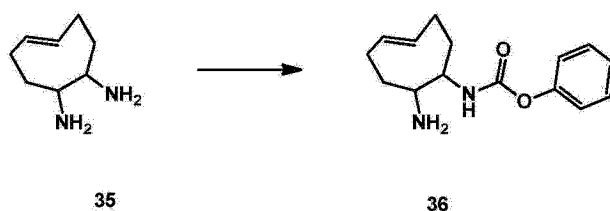
[0300] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.6-1.9 (m, 4H), 2.1-2.5 (m, 4H), 3.8 (m, 1H), 4.1 (t, 1H), 5.4 - 5.55 (m, 1H), 5.65 - 5.8 (m, 1H), 6.4 (bs, 1H), 7.9 (bs, 1H) ppm。

[0301] 将以上获得的酰胺 34 与 40mL 甲醇、5.0g 氢氧化钠和 10mL 水混合。将混合物在接近回流下温热 90 分钟, 然后将其旋转蒸发, 并且残渣用 30mL 水稀释。用 3x50mL 二氯甲烷萃取, 干燥并旋转蒸发, 得到期望的二胺顺式-(E)-环辛-5-烯-1,2-二胺 (35), 其包含少量溶剂 (1.38g, 约 100%)。

[0302] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.4 - 2.5 (m, 8H), 2.8 (bs, 1H), 2.9 (d, 1H), 5.4 - 5.6 (m, 2H) ppm。

[0303] 顺式-(E)-(8-氨基环辛-4-烯-1-基)氨基甲酸苯酯 (36) 的合成

[0304]

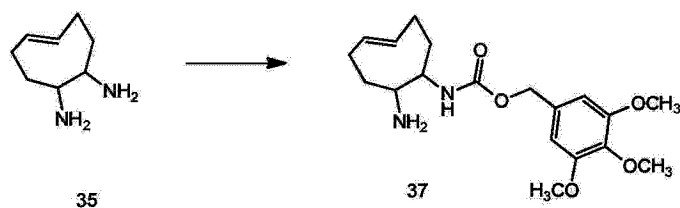


[0305] 将碳酸二苯酯 (500mg, 2.33mmol) 加入到二胺 35 (300mg, 2.14mmol) 在 10mL 二氯甲烷的溶液中, 将溶液在室温下搅拌 4 天。将溶液在 25g 二氧化硅上色谱分离, 用含有增加量的甲醇的二氯甲烷洗脱。将产物流分合并, 并且与 15mL TBME 搅拌 2 小时。加入 15mL 庚烷, 并且将混合物过滤。将固体与 15mL TBME 搅拌, 然后过滤。将合并的滤液旋转蒸发, 并且将残渣与庚烷过夜搅拌以得到固体。过滤得到期望的产物顺式-(E)-苯基(8-氨基环辛-4-烯-1-基)氨基甲酸酯 (36)。

[0306] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.5 (bs, 4H), 1.8 - 2.35 (m, 6H), 3.1 (bs, 1H), 3.6 (t, 1H), 5.5 (b d, 1H), 5.6 (m, 2H), 7.05 - 7.4 (m, 5H) ppm。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 28.4 (CH_2), 33.0 (CH_2), 36.7 (CH_2), 40.7 (CH_2), 57.7 (CH), 58.4 (CH), 121.8 (CH), 125.4 (CH), 129.5 (CH), 133.2 (CH), 133.3 (CH), 151.3 (C), 154.0 (C) ppm。

[0307] 顺式-(E)-3,4,5-三甲氧基苄基(8-氨基环辛-4-烯-1-基)氨基甲酸酯(37)的合成

[0308]



[0309] 在 15 分钟内,将 3,4,5-三甲氧基苄醇(6.20g, 31.3mmol)在 THF(20mL)中的溶液加入到 CDI(5.44g, 33.58mmol)在 THF(25mL)中的溶液(在冰-水浴中冷却)。然后将混合物在室温下搅拌 3 天。在真空下将溶剂移除,并且加入 TBME(100mL)。将混合物搅拌 1 小时,缓慢倒出并过滤。将残渣与 TBME(25mL)搅拌 5 分钟,缓慢倒出并过滤。将合并的 TBME 滤液浓缩,得到 CDI-加成化合物(10.45g, 35.78mmol, 未对游离咪唑校准),其为缓慢固化的油。通过 NMR,它包含一当量的游离咪唑。

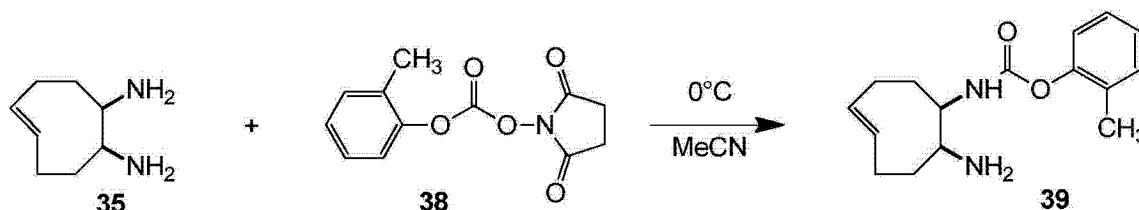
[0310] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 3.85 (s, 3H), 3.9 (s, 6H), 5.35 (s, 2H), 6.65 (s, 2H), 7.05 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 8.2 (s, 1H) ppm。

[0311] 将 CDI-衍生物(705mg, 2.41mmol)加入到二胺 35(330mg, 2.35mmol)在二氯甲烷(15mL)的溶液中,并且将混合物在室温下搅拌 1 小时。将混合物浓缩,将乙酸乙酯(20mL)加入到残渣中,并且将混合物趁热过滤。将残渣用温热的乙酸乙酯洗涤,并且将合并的滤液在冰中冷却,知道沉淀开始出现,然后将其搅拌 1 小时。将混合物在 -15°C 下冷却 30 分钟,并且通过过滤收集沉淀,将其用冷乙酸乙酯洗涤,并且干燥以得到顺式-(E)-3,4,5-三甲氧基苄基(8-氨基环辛-4-烯-1-基)氨基甲酸酯 37(170mg, 0.47mmol, 20%)。

[0312] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.4 - 2.3 (m, 10H), 3.05 (bs, 1H), 3.55 (t, 1H), 3.8 (s, 3H), 3.85 (s, 6H), 5.0 (s, 2H), 5.2 (m, 1H), 5.6 (m, 2H), 6.6 (s, 2H), 7.45 (s, 1H), 8.2 (s, 1H) ppm。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 28 (CH_2), 33 (CH_2), 37 (CH_2), 41 (CH_2), 56 (CH), 58 (CH), 58.5 (CH), 61 (CH), 67 (CH_2), 106 (CH), 132.5 (C), 133 (CH), 133.5 (CH), 138 (C), 153.5 (C), 155.5 (C) ppm。

[0313] 顺式 2-甲基苯基((E)-8-氨基环辛-4-烯-1-基)氨基甲酸酯(39)的合成

[0314]

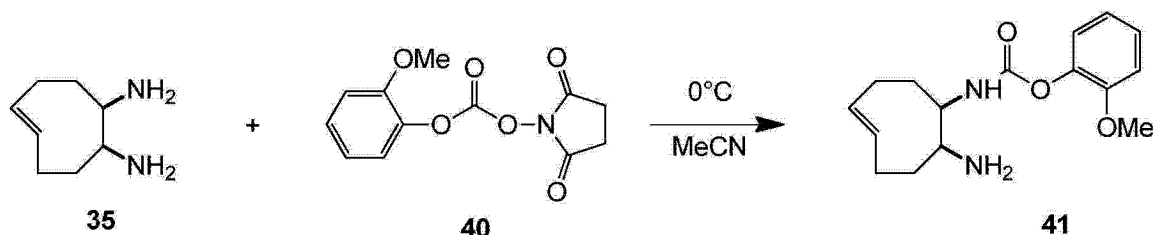


[0315] 将顺式-(E)-环辛-5-烯-1,2-二胺(35, 9.7mg; 0.069mmol)在乙腈(1mL)中溶解,并且冷却至 0°C 。将 NHS 活化的邻甲酚 38(17.2mg; 0.069mmol)在乙腈(1mL)中溶解,并且将其加入。将混合物在 0°C 下搅拌 30 分钟。通过过滤移除沉淀,并且将滤液蒸发至干燥。将油状残渣在二氯甲烷(2mL)中溶解,并且用水(1mL)洗涤。将产物用 0.5M 柠檬酸(1.5mL)萃取,并且将水相分离,用盐水(2mL)中和。将产物用二氯甲烷(2次, 2mL)萃取。将合并的有机层用硫酸钠干燥,并且蒸发至干燥,以得到黏稠油形式的产物 39(6.1mg, 32%)。

[0316] $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.2 - 7.0 (m, 4H), 5.62 (m, 2H), 5.57 (s, 1H), 3.59 (t, 1H), 3.1

4 (d, 1H), 2.19 (s, 3H), 2.3 - 1.8 (m, 8H), 1.6 (br. s, 2H) ppm. HPLC-MS/PDA: 色谱图中一个峰, $m/z=275 (M+H^+)$, $\lambda_{\max}=261\text{nm}$ 。

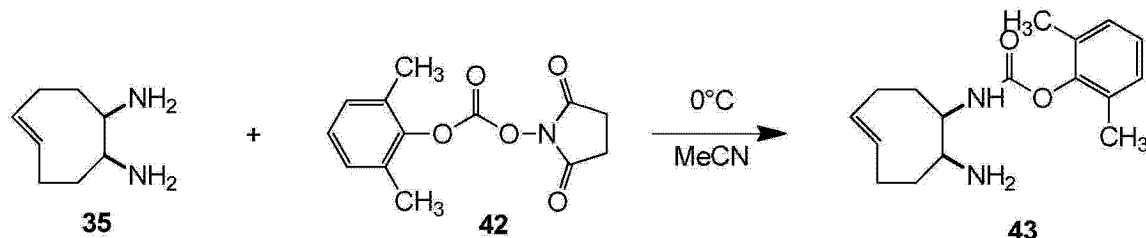
[0317] 顺式 2-甲氧基苯基 ((E)-8-氨基环辛-4-烯-1-基)氨基甲酸酯 (41) 的合成
[0318]



[0319] 将顺式-(E)-环辛-5-烯-1,2-二胺 (35, 9.7mg; 0.069mmol) 在乙腈 (1mL) 中溶解, 并且冷却至 0°C。将 NHS 活化的 2-甲氧基苯酚 (40, 18.3mg; 0.069mmol) 在乙腈 (1mL) 中溶解, 并且将其加入。将混合物在 0°C 下搅拌 45 分钟。通过过滤移除沉淀, 并且将滤液蒸发至干燥。将油状残渣在二氯甲烷 (2mL) 中溶解, 并且用水 (1mL) 洗涤。将产物用 0.5M 柠檬酸 (1.5mL) 萃取, 并且将水相分离, 用盐水 (2mL) 中和。将产物用二氯甲烷 (2 次, 2mL) 萃取。将合并的有机层用硫酸钠干燥, 并且蒸发至干燥, 以得到黏稠油形式的产物 41 (9.0mg, 45%)。

[0320] ^1H NMR (CDCl_3): $\delta=7.22$ (m, 2H), 6.97 (m, 2H), 5.62 (m, 2H), 5.71 (s, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.59 (t, 1H), 3.14 (d, 1H), 2.3 - 1.8 (m, 8H), 1.6 (br. s, 2H) ppm. HPLC-MS/PDA: 色谱图中一个峰, $m/z=291 (M+H^+)$, $\lambda_{\max}=269\text{nm}$ 。

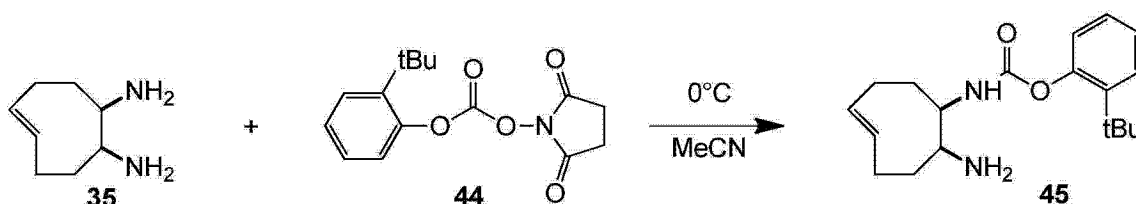
[0321] 顺式 2,6-二甲基苯基 ((E)-8-氨基环辛-4-烯-1-基)氨基甲酸酯 (43) 的合成
[0322]



[0323] 将顺式-(E)-环辛-5-烯-1,2-二胺 (35, 26.5mg; 0.189mmol) 在乙腈 (1.5mL) 中溶解, 并且冷却至 0°C。加入 NHS 活化的 2,6-二甲基苯酚 (42, 50mg; 0.189mmol), 并且将混合物搅拌 1 小时。将沉淀通过过滤移除, 并且将滤液蒸发至干燥。将油状残渣在二氯甲烷 (3mL) 中溶解, 并且用水 (1.5mL) 洗涤。将产物用 0.5M 柠檬酸 (2mL) 萃取, 并且将水相分离, 用盐水 (3mL) 中和。将产物用二氯甲烷 (2 次, 3mL) 萃取。将合并的有机层用硫酸钠干燥, 并且蒸发至干燥, 以得到黏稠油形式的产物 43 (32mg, 60%)。

[0324] ^1H NMR (CDCl_3): $\delta=7.02$ (m, 3H), 5.57 (m, 2H), 5.49 (s, 1H), 3.58 (t, 1H), 3.10 (d, 1H), 2.17 (s, 6H), 2.3 - 1.8 (m, 8H), 1.6 (br. s, 2H) ppm. HPLC-MS/PDA: 色谱图中一个峰, $m/z=289 (M+H^+)$, $\lambda_{\max}=259\text{nm}$ 。

[0325] 顺式 2-叔丁基苯基 ((E)-8-氨基环辛-4-烯-1-基)氨基甲酸酯 (45) 的合成
[0326]

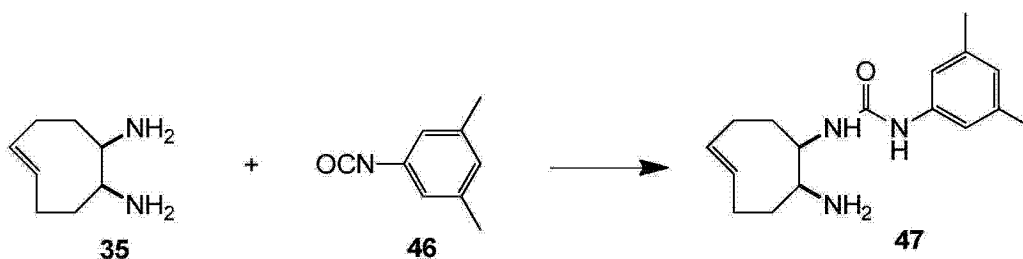


[0327] 将顺式-(E)-环辛-5-烯-1,2-二胺(35, 26.5mg; 0.189mmol)在乙腈(1.5mL)中溶解,并且冷却至0℃。加入NHS活化的2-叔丁基苯酚(44, 55mg; 0.189mmol),并且将混合物搅拌1小时,然后蒸发至干燥。将油状残渣在二氯甲烷(3mL)中溶解,并且用水(1.5mL)洗涤。将产物用0.5M柠檬酸(2mL)萃取,并且将水相分离,用盐水(3mL)中和。将产物用二氯甲烷(2次,3mL)萃取。将合并的有机层用硫酸钠干燥,并且蒸发至干燥,以得到黏稠油形式的产物45(15mg, 25%)。

[0328] HPLC-MS/PDA: 色谱图中一个峰, $m/z=317(M+H^+)$, $\lambda_{\max}=259\text{nm}$ 。

[0329] 顺式苯基((E)-8-氨基环辛-4-烯-1-基)脲(47)的合成

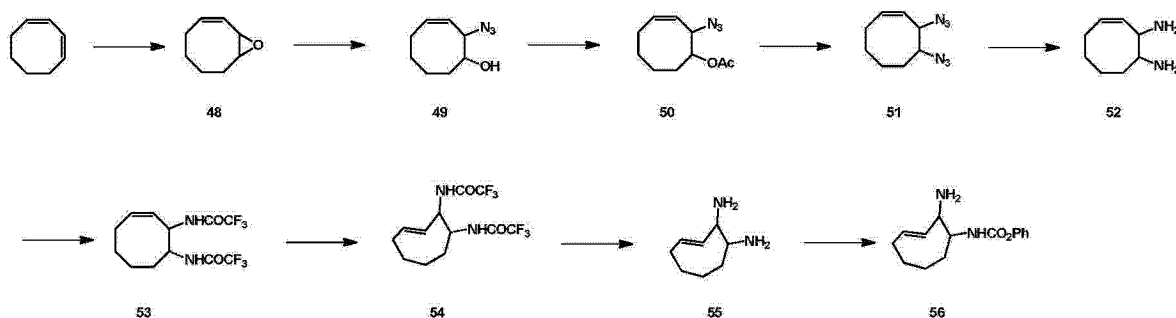
[0330]



[0331] 将顺式-(E)-环辛-5-烯-1,2-二胺(35, 23.4mg; 0.167mmol)溶解在氯仿(1mL)中。将3,5-二甲基苯基异氰酸酯(46, 24.5mg; 0.167mmol)溶解在氯仿(1mL)中,并且将其在20℃下缓慢加入。将混合物在20℃下搅拌30分钟,随后在真空中浓缩。随后将粗产物通过制备-HPLC纯化,得到两个异构体产物47, $m/z=288(M+H^+)$, $\lambda_{\max}=243\text{nm}$: 10.9mg 主要异构体(23%收率)和1.9mg 次要异构体(4%收率)。

[0332] 反式苯基(E)-2-氨基环辛-3-烯-1-基氨基甲酸酯(56)的合成

[0333]



[0334] 将1,3-环辛二烯(21.72g, 0.201mol)、200mL二氯甲烷、75mL乙酸和35.16g高硼酸钠四水合物(0.228mol)的混合物在室温下搅拌2天,然后在35℃下搅拌28小时。将混合物倒入150mL水和200mL二氯甲烷中。分层并且将有机层用50mL水和100mL20%氢氧化钠溶液洗涤。将连续的水层用200mL二氯甲烷萃取(必须通过赛力特硅藻土(Celite)过滤)。将有机层干燥并旋转蒸发。将包含(Z)-9-氧杂二环[6.1.0]壬-2-烯(48)的残渣以这样的形式使用。

[0335] 在 30 分钟的时间内,将上述获得的环氧环辛烯 48 在 65mL 丙酮中的溶液加入到叠氮化钠 (24.0g, 0.369mol) 在 60mL 水中的溶液。将混合物在回流下加热 7 天,4 天后蒸馏出约 30mL 丙酮 (注意)。向残渣中加入 50mL 水,并且将混合物用 2x200mL TBME 萃取。有机层用 25mL 水洗涤,然后干燥,并且旋转蒸发以得到 19.6g 包含反式-(Z)-2-叠氨基环辛-3-烯醇 (49) 的残渣。注意:用叠氮化钠的开环在 Organic Synthesis 2010, 87, 161 的环己烯氧化物中记载。我们对于所报道的使用丙酮作为有机溶剂有怀疑,因为 Organic Synthesis 方法报道 85℃ 的回流温度,这似乎更好地与乙腈作为溶剂对应,而不是丙酮。

[0336] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: $\delta = 1.2 - 2.4$ (m, 8H), 3.55 (m, 1H), 4.35 (t, 1H), 5.55 (m, 1H), 5.85 (m, 1H) ppm.

[0337] 将上述获得的 49 粗品在 130mL TBME 和 28mL 三乙胺中溶解。用乙醇-干冰冷却该溶液,并且在 30 分钟的时间内,在 $-10-0^\circ\text{C}$ 下加入 30mL TBME 中的甲磺酰氯 (21.2g, 0.185mol)。将所得的悬浮液过夜搅拌,然后加入 100mL 水。分层并且将有机层用 50mL 水洗涤。连续的水层用 200mL TBME 萃取。干燥并旋转蒸发,得到 20.3g 叠氨基甲磺酸酯 (azidomesylate) 残渣,将其在 75mL DMF 中溶解。加入乙酸钾 (19.65g, 0.20mol), 并且将混合物在 80°C 下加热 2 小时。再加入 50mL DMF, 并且在 90°C 下持续加热 17 小时。冷却,然后将混合物倒入 150mL 稀释的氨中,并且将产物用 3x200mL TBME 萃取。将连续的有机层用 3x25mL 水洗涤,然后干燥并旋转蒸发。将残渣在 150g 二氧化硅上色谱分离,用庚烷/乙酸乙酯洗脱,得到顺式 (Z)-2-叠氨基环辛-3-烯-1-基乙酸酯 (50)。

[0338] 叠氨基甲磺酸酯的 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: $\delta = 1.2 - 2.4$ (m, 8H), 3.1 (s, 3H), 4.5 - 4.65 (m, 2H), 5.4 (m, 1H), 6.0 (m, 1H) ppm.

[0339] 叠氨基乙酸酯 50 的 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: $\delta = 1.2 - 2.0$ (m, 8H), 2.05 (s, 3H), 4.35 (m, 1H), 5.45 - 5.7 (m, 3H) ppm.

[0340] 将叠氨基乙酸酯 50 与 50mL 甲醇和 15mL 30% 的氢氧化钠溶液搅拌。然后将大部分甲醇通过旋转蒸发移除。将残渣用 2x100mL TBME 萃取。将有机层干燥,并旋转蒸发以得到 10.5g 叠氨基醇。

[0341] 将残渣在 100mL TBME 中溶解,并且加入三乙胺 (21mL, 0.151mol)。将混合物在冰中冷却,并且在 1 小时内,加入在 50mL TBME 中的甲磺酰氯 (13.75g, 0.120mol)。将所得的悬浮液搅拌过夜,然后加入 100mL 水。分层并且将有机层用 50mL 水洗涤。将连续的水层用 100mL TBME 萃取。干燥并旋转蒸发,得到叠氨基甲磺酸酯衍生物,将其在 45mL DMF 中溶解。加入叠氮化钠 (11.0g, 0.169mol), 并且将混合物在 70°C 下加热 18 小时,然后在 90°C 下加热 18 小时。冷却,然后将混合物倒入 150mL 水中,并且将产物用 3x150mL TBME 萃取。将连续的有机层用 2x50mL 水洗涤,然后干燥并旋转蒸发。在下步中,将包含反式-(Z)-3,4-二叠氨基环辛-1-烯 (51, 11.28g) 的残渣以这样的形式使用。

[0342] 叠氨基醇的 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: $\delta = 1.2 - 2.2$ (m, 8H), 4.25 (m, 1H), 4.55 (m, 1H), 5.45 (m, 1H), 5.7 (m, 1H) ppm.

[0343] 叠氨基甲磺酸酯的 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: $\delta = 1.2 - 2.3$ (m, 8H), 3.0 (s, 3H), 4.25 (m, 1H), 5.4 (m, 1H), 5.55 - 5.8 (m, 1H) ppm.

[0344] 二叠氮化物 51 的 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: $\delta = 1.2 - 2.4$ (m, 8H), 3.45 (m, 1H), 4.35 (m, 1H), 5.45 (m, 1H), 5.95 (m, 1H) ppm.

[0345] 将以上获得的二叠氮化物 51 粗品在 100mL THF 中溶解,并且在 30 分钟内加入到在 100mL THF 中的氢化铝锂 (5.4g, 0.142mol),用冷水进行冷却。将反应混合物在回流下加热 18 小时,然后将其冷却,并且用 6mL 水和 6mL30% 氢氧化钠溶液缓慢终止。

[0346] 过滤,用 THF 洗涤,并旋转蒸发得到溶解在 100mL 二氯甲烷中的 7.8g 二胺 52 的粗品,然后在冰中冷却。在 30 分钟内加入三氟乙酸酐 (20.87g, 0.099mol)。将溶液搅拌 30 分钟,回流下加热 1 小时,并且旋转蒸发。将残渣在 100g 二氧化硅上色谱分离,用含有增加量的乙酸乙酯的庚烷进行洗脱。将产物流分合并,并且将残渣与 TBME 和庚烷的混合物搅拌,以得到悬浮液。过滤得到 5.86g 反式 N,N'-((Z)-环辛-3-烯-1,2-二基)双(2,2,2-三氟乙酰胺) (53, 17.64mmol, 基于 1,3-环辛二烯 9%)。

[0347] 二胺 52 的 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: $\delta=1.2-2.3(\text{m}, 8\text{H}), 2.55(\text{m}, 1\text{H}), 3.4(\text{t}, 1\text{H}), 5.35(\text{m}, 1\text{H}), 5.6(\text{m}, 1\text{H})\text{ppm}$ 。

[0348] 双酰胺 53 的 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: $\delta=1.3-2.0(\text{m}, 6\text{H}), 2.25(\text{m}, 2\text{H}), 4.05(\text{m}, 1\text{H}), 5.0(\text{q}, 1\text{H}), 5.4(\text{t}, 1\text{H}), 5.9(\text{q}, 1\text{H}), 7.0(\text{bs}, 1\text{H}), 7.1(\text{bs}, 1\text{H})\text{ppm}$ 。

[0349] 将三氟乙酰胺 53 (5.86g, 17.64mmol) 与 6.25g 苯甲酸甲酯和约 500mL 庚烷/乙醚 (约 1:2) 混合。将悬浮液照射 78 小时,同时将混合物连续流动通过 32.2g 硝酸银浸渍的硅胶柱 (包含约 3.2g 硝酸银)。在柱子顶部收集未溶解的酰胺 53,其在照射和冲洗过程中溶解地非常缓慢,并且在照射结束时尚未完全溶解。将柱填料用 300mL 庚烷/TBME (1:1) 冲洗,然后用 300mL TBME 冲洗。将流分用 100mL15% 的氨洗涤,将其干燥并旋转蒸发,得到 53 和 54 的混合物,其中 54 可通过与庚烷:TBME 搅拌来纯化。将柱填料与二氯甲烷和氨搅拌,然后过滤,并且分层。将固体用水层和二氯甲烷再处理一次,然后过滤并分层。将合并的有机层干燥,并旋转蒸发,得到反式烯烃 54 (0.91g, 16%)。

[0350] 54 的 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: $\delta=0.8-2.5(\text{m}, 8\text{H}), 4.35(\text{m}, 1\text{H}), 4.55(\text{m}, 1\text{H}), 5.7-6.0(\text{m}, 2\text{H})\text{ppm}$ 。 $^{19}\text{F-NMR}(\text{CDCl}_3)$: $\delta=-75.9, -76.1\text{ppm}$ (另外,在 -76.4 和 -76.6ppm 处有两个小信号,可能是另外的 E-异构体)。

[0351] 将酰胺 54 (430mg, 1.29mmol) 与 10mL 甲醇混合,并且加入 1.65g50% 氢氧化钠溶液。将混合物在接近回流下温热 90 分钟,然后将其旋转蒸发,并且残渣用 15mL 水稀释。用 4x30mL 二氯甲烷萃取,干燥并旋转蒸发,得到期望的反式 (E)-环辛-3-烯-1,2-二胺 (55, 128mg, 0.91mmol, 71%)。

[0352] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: $\delta=1.1-2.1(\text{m}, 9\text{H}), 2.45(\text{m}, 1\text{H}), 3.15(\text{d}, 1\text{H}), 3.45(\text{s}, 1\text{H}), 5.95(\text{m}, 1\text{H})\text{ppm}$ 。 $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$: $\delta=20.0(\text{CH}_2), 30.6(\text{CH}_2), 35.9(\text{CH}_2), 36.2(\text{CH}_2), 59.2(\text{CH}), 63.7(\text{CH}), 130.8(\text{CH}), 133.4(\text{CH})\text{ppm}$ 。

[0353] 将碳酸二苯酯 (200mg, 0.93mmol) 加入到二胺 55 (95mg, 0.68mmol) 在 10mL 二氯甲烷的溶液中,将溶液在室温下搅拌 3 天 (反应尚未进行完全)。将溶液旋转蒸发,并将残渣在 13g 二氧化硅上色谱分离,用含有增加量的甲醇的二氯甲烷洗脱。这得到 52mg 的期望产物反式-(E)-2-氨基环辛-3-烯-1-基)氨基甲酸苯酯 56 (0.2mmol, 30%)。推测具有较低 R_f 值的流分为 2-氨基位上为氨基甲酸酯的产物。未获得该产物的完全纯的形式 (26mg, 0.1mmol, 15%)。

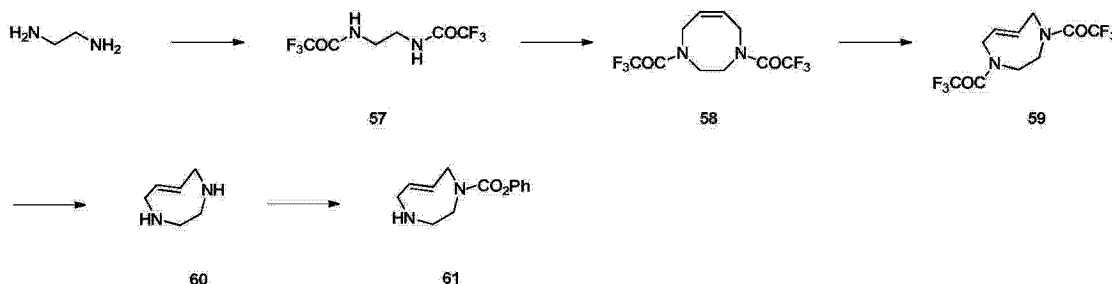
[0354] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: $\delta=0.8-2.2(\text{m}, 9\text{H}), 2.45(\text{m}, 1\text{H}), 3.8-3.95(\text{m}, 2\text{H}), 5.35(\text{bd}, 1\text{H}, \text{amide NH}), 5.75(\text{dd}, 1\text{H}), 6.0-6.15(\text{m}, 1\text{H}), 7.1-7.4(\text{m}, 5\text{H})$

ppm. ^{13}C -NMR (CDCl_3): δ = 21.9 (CH_2), 28.1 (CH_2), 36.1 (CH_2), 36.2 (CH_2), 56.4 (CH), 63.2 (CH), 121.8 (CH), 125.6 (CH), 129.5 (CH), 131.7 (CH), 132.7 (CH), 151.2 (C), 154.3 ($\text{C}=\text{O}$) ppm. MS: 261.0 ($\text{M}+1$).

[0355] 被推测为另一个异构体的化合物具有以下 ^1H -NMR 信号: δ 1.0 - 2.2 (m, 7H), 2.45 (m, 1H), 3.6 (bs, 1H), 3.8 (b, 2H), 4.25 (bs, 1H), 5.6 (bs, 1H), 5.7 (m, 1H), 6.0 (d, 1H), 7.1 - 7.4 (m, 5H) ppm. MS 261.0 ($\text{M}+1$).

[0356] (E)-2,3,4,5-四氢-1,4-二氮杂环辛间四烯(diazocine)-1(8H)-羧酸苯酯(61)的合成

[0357]



[0358] 在 1 小时内将三氟乙酰胺 (92.69g, 0.441mol) 加入到冰冷却的乙二胺 (12.09g, 0.20mol) 在 250mL 二氯甲烷的溶液中。将混合物温热至回流, 持续 1 小时, 然后旋转蒸发。加入水 (100mL) 和 TBME (250mL), 并且将混合物搅拌 1 小时。过滤并用 TBME 洗涤, 得到产物。分离滤液层, 将有机层旋转蒸发, 并将残渣与一些 TBME 搅拌。过滤得到额外量的 N,N' -(2,2,2-三氟乙酰胺) 双 (2,2,2-三氟乙酰胺) (57), 总收率为 47.23g (0.187mol, 93%)。

[0359] 将上述获得的产物 57 与 400mL 乙腈、100g 碳酸钾和 3.2g 苄基三乙基氯化铵搅拌 15 分钟。在 30 分钟内加入溶解在 50mL 乙腈中的顺式-1,4-二氯-2-丁烯 (26.97g, 95%, 0.205mol)。在 3 小时内将混合物温热至 71°C , 并且保持在该温度下 64 小时, 然后在 77°C 下加热 24 小时。将混合物趁热过滤, 并将固体用乙腈洗涤。旋转蒸发得到残渣, 将其在 250g 硅胶上色谱分离, 使用二氯甲烷和包含一些三乙胺的二氯甲烷作为洗脱液。这得到 23.25g 的 (Z)-1,1'-(2,3-二氢-1,4-二氮杂环辛间四烯-1,4(5H,8H)-二基) 双 (2,2,2-三氟乙酰胺) (58, 76.43mmol, 41%)。

[0360] ^1H -NMR (CDCl_3): δ = 3.65 - 3.95 (m, 5.4H), 4.05 - 4.2 (m, 1.1H), 4.25 (bs, 1.5H), 5.6 (m, 0.8H), 5.8 (bs, 0.5H), 6.15 (m, 0.7H) ppm. ^{13}C -NMR (CDCl_3): δ = 45 (2CH_2), 47 (CH_2), 48 (CH_2), 48.5 (CH_2), 49 (CH_2), 50 (CH_2), 53 (CH_2), 110-122 (2q , CF_3), 126 (CH), 127 (CH), 128 (CH), 128.5 (CH), 155 - 158 (2q , $\text{C}=\text{O}$) ppm. ^{19}F -NMR (CDCl_3): δ = -69.2, -69.4, -69.8, -70.0 ppm. MS: 305.0 ($\text{M}+1$), 303.0 ($\text{M}-1$)。

[0361] 将三氟乙酰胺 58 (14.0g, 46.0mmol) 与 8.0g 苯甲酸甲酯和约 500mL 庚烷/乙醚 (约 10:1) 混合。将混合物照射 92 小时, 同时将溶液连续流动通过 70g 硝酸银浸渍的硅胶柱 (包含约 7.0g 硝酸银)。然后用 300mL 5:1, 3:1, 2:1, 1:1 比率的庚烷/TBME 冲洗柱填料, 然后用 300mL TBME 冲洗, 每一流分用 200mL 10% 的氨洗涤, 干燥并旋转蒸发。将剩下的柱填料与 TBME 和氨搅拌, 然后过滤, 并且分层。将固体用水层和 TBME 再处理一次, 然后过滤并分层。将合并的有机层干燥并旋转蒸发得到 3.48g 固化油形式的 (E)-1,1'-(2,3-二氢-1,4-二氮杂环辛间四烯-1,4(5H,8H)-diyl) 双 (2,2,2-三氟乙酰胺) (59) (11.45mmol, 25%)。

[0362] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.6 (t, 1H), 2.95 (t, 1H), 3.4-3.55 (m, 1H), 3.75-3.9 (m, 1H), 4.0-4.3 (m, 1H), 4.35-4.6 (m, 1H), 4.65 (d, 1H), 5.25 (d, 1H), 5.8-6.0 (m, 2H) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 49.4 (CH_2), 49.6 (CH_2), 50.0 (CH_2), 50.1 (CH_2), 51.9 (CH_2), 52.0 (CH_2), 53.9 (CH_2), 54.1 (CH_2), 110-122 (2q, CF_3), 136.0 (CH), 136.1 (CH), 155-158 (2q, C=O) ppm. $^{19}\text{F-NMR}$ (CDCl_3): δ = -69.2, -69.25, -69.4, -69.45 ppm.

[0363] 将上述获得的酰胺 59 (520mg, 1.71mmol) 与 10mL 甲醇和 1.60g 50% 氢氧化钠溶液混合, 然后在 55°C 下温热 1 小时。通过旋转蒸发移除大部分甲醇, 并且将残渣用 20mL 水稀释。用 5x25mL 二氯甲烷萃取, 干燥并旋转蒸发, 得到期望的 (E)-1, 2, 3, 4, 5, 8-六氢-1, 4-二氮杂环辛间四烯 (60, 150mg, 1.34mmol, 78%)。

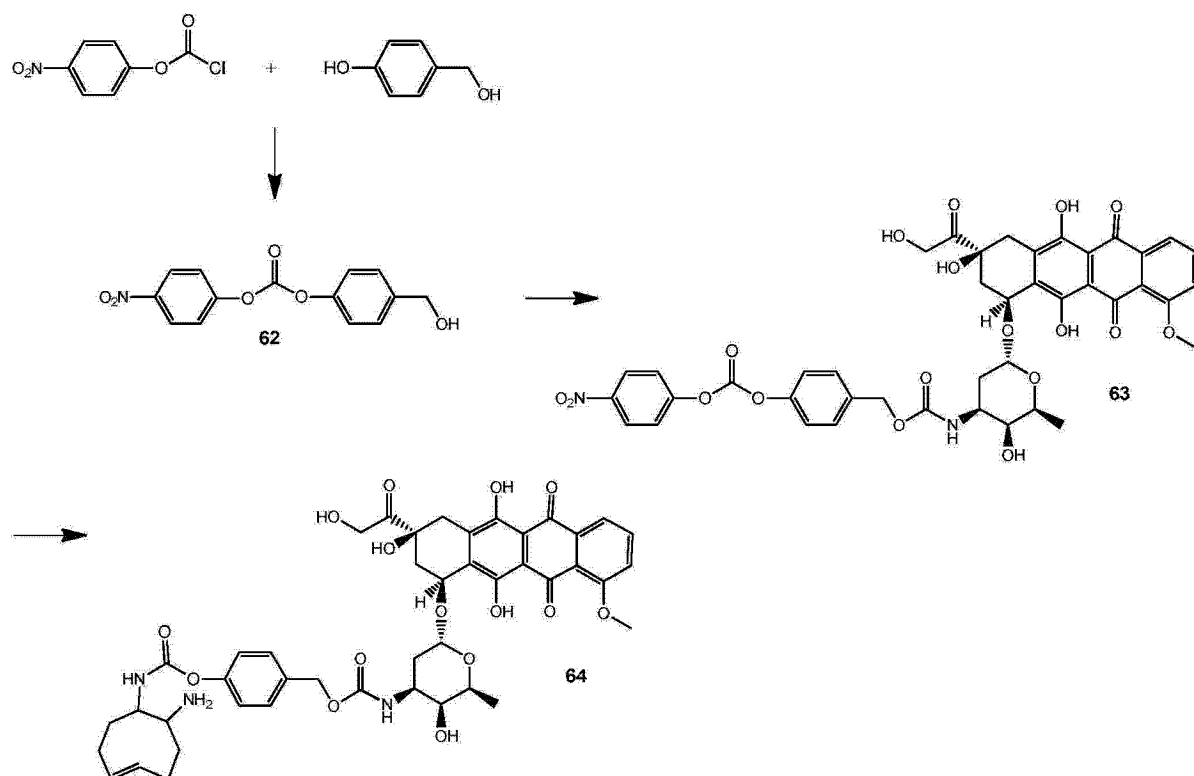
[0364] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.45 (d, 2H), 3.15 (d, 2H), 3.3 (m, 2H), 3.55 (dd, 2H), 6.0 (m, 2H) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 53.0 (CH_2), 54.0 (CH_2), 140.0 (CH) ppm.

[0365] 将碳酸二苯酯 (266mg, 1.24mmol) 加入到上述获得的二胺 60 在 10mL 二氯甲烷的溶液中, 并且将溶液在 30°C 下搅拌 2 天。将溶液在 17g 二氧化硅上色谱分离, 用含有增加量甲醇的二氯甲烷洗脱。将产物流分合并并且旋转蒸发。将残渣在 20g 二氧化硅上色谱分离, 用含有增加量甲醇的 TBME 洗脱。进一步用二氯甲烷-甲醇洗脱, 得到产物 (E)-2, 3, 4, 5-四氢-1, 4-二氮杂环辛间四烯-1 (8H)-羧酸苯酯 (61)。

[0366] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.5-2.85 (m, 2H), 3.25-3.4 (m, 2H), 3.4-3.55 (m, 2H), 4.25 (m, 1H), 4.9 (m, 1H), 5.8-6.1 (m, 2H), 7.0-7.4 (m, 5H) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 50.2 (CH_2), 50.8 (CH_2), 52.5 (CH_2), 52.6 (CH_2), 53.5 (CH_2), 121.9 (CH), 125.5 (CH), 129.5 (CH), 135.3 (CH), 135.4 (CH), 141.3 (CH), 141.6 (CH), 151.6 (C), 155.0 (C=O) ppm. MS: 232.9 (M+1)。

[0367] (E)-环辛烯-多柔比星缀合物 64 的合成

[0368]



[0369] 通过修改的文献方法 (K. Haba, M. Popkov, M. Shamis, R. A. Lerner, C. F. Barbas III, and D. Shabat, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 716 - 720) 合成 4-(羟甲基)-4-硝基苯基碳酸苯酯 (62)。在 25mL 圆底烧瓶中, 将 4-羟基苄醇 (0.3g, 2.3mmol) 和 DIPEA (400 μ L, 0.3g, 2.3mmol, 1 当量) 在干燥 THF (3mL) 中溶解。将烧瓶置于冰浴中, 滴加在干燥 THF (2mL) 中的 4-硝基苯基氯甲酸酯 (0.52g, 2.5mmol, 1.05 当量), 并将混合物在室温下搅拌 1 小时。过滤形成的白色沉淀 (DIPEA $\cdot$ HCl 盐), 然后将溶剂在真空中移除, 并且将残渣在 EtOAc (50mL) 中再溶解。将有机层用水和盐水 (两者均为 20mL) 洗涤, 用 MgSO_4 干燥, 过滤并将溶剂在真空中移除。使用柱色谱法 (快速二氧化硅 (flash silica), 在氯仿中 10% THF, 将化合物加入到 30mL 洗脱液中的柱子的顶部) 和沉淀法 (丙酮 $\rightarrow$ 戊烷) 进行纯化。这得到纯的白色固体形式的 62 (0.57g, 2.0mmol, 84%)。它的光谱特性与报道的数据相符。

[0370] 在 10mL 圆底烧瓶中, 在 Ar 气氛下, 将 62 (50mg, 0.17mmol) 在干燥 THF (1mL) 中溶解。加入光气 (179 μ L 的 1.9M 在甲苯中的溶液, 0.34mmol, 2 当量), 然后将烧瓶密封, 并且将混合物在室温下搅拌 15 小时。在真空中移除溶剂, 并且将所得的油用甲苯 (3 $\times$) 和氯仿冲洗。这得到了无色油形式的氯甲酸酯类似物, 将其立即使用而无进一步纯化。

[0371] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.33 (d, 2H, ArH), 7.49 (d, 2H, ArH), 7.48 (d, 2H, ArH), 7.33 (d, 2H, ArH), 5.31 (s, 2H, CH_2) ppm。

[0372] 随后, 在 25mL 圆底烧瓶中, 将盐酸多柔比星 (86mg, 0.15mmol) 在干燥 THF (2mL) 中溶解, 并且加入氯甲酸酯 (61mg, 0.17mmol, 1.2 当量) 在干燥 THF (4mL) 中的溶液。加入 DIPEA (115 μ L, 0.65mmol, 4.4 当量), 然后将混合物在室温下搅拌 23 小时。将溶液在 Celite 上过滤, 并且将溶剂在真空中移除。将残渣在氯仿 (60mL) 中再溶解并且用水 (2 $\times$) 和盐水 (全部 20mL) 洗涤。将有机层用 MgSO_4 干燥, 过滤并将溶剂在真空中移除。使用柱色谱法

(快速二氧化硅),用在氯仿中 2%MeOH 至在氯仿中 12%MeOH 的梯度进行纯化。这得到纯的橙色固体形式的 63 (70mg, 82 μ mol, 56%)。

[0373] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 13.97 (s, 1H, ArOH), 13.22, (s, 1H, ArOH), 8.30 (d, 2H, ArH), 8.03 (d, 1H, ArH), 7.78 (t, 1H, ArH), 7.46 (d, 2H, ArH), 7.39 (m, 3H, ArH), 7.23 (d, 2H, ArH), 5.50 (d, 1H, OCHO), 5.28 (s, 1H, CCHHCH), 5.17 (d, 1H, NH), 5.04 (s, 2H, ArCH₂O), 4.75 (s, 2H, CH₂OH), 4.54 (s, 1H, COH), 4.14 (m, 1H, CHCH₃), 4.08 (s, 3H, OCH₃), 3.87 (m, 1H, NHCH), 3.66 (s, 1H, CHOH), 3.27 (d, 1H, ArCHH), 3.02 (s, 1H, CH₂OH), 3.00 (d, 1H, ArCHH), 2.33 (d, 1H, CCHH), 2.17 (d, 1H, CCHH), 1.98 (br, 1H, CHOH), 1.88 (m, 1H, NHCHCHH), 1.77 (m, 1H, NHCHCHH), 1.2-9 (d, 3H, CHCH₃) ppm。该归属通过 2D (^1H - ^1H) 相关光谱法 (gCOSY) 确证。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 213.8, 187.1, 186.6, 161.0, 156.2, 155.6, 155.3, 155.2, 150.9, 150.3, 145.6, 135.8, 135.4, 135.1, 133.6, 133.5, 129.5, 125.4, 125.3, 121.7, 120.8, 119.9, 118.5, 111.6, 111.4, 100.7, 69.7, 69.6, 67.2, 65.8, 65.5, 56.7, 47.0, 35.6, 34.0, 30.2, 16.8 ppm。ESI-MS:m/z 计算值: 858.21; 实测值: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 881.42。

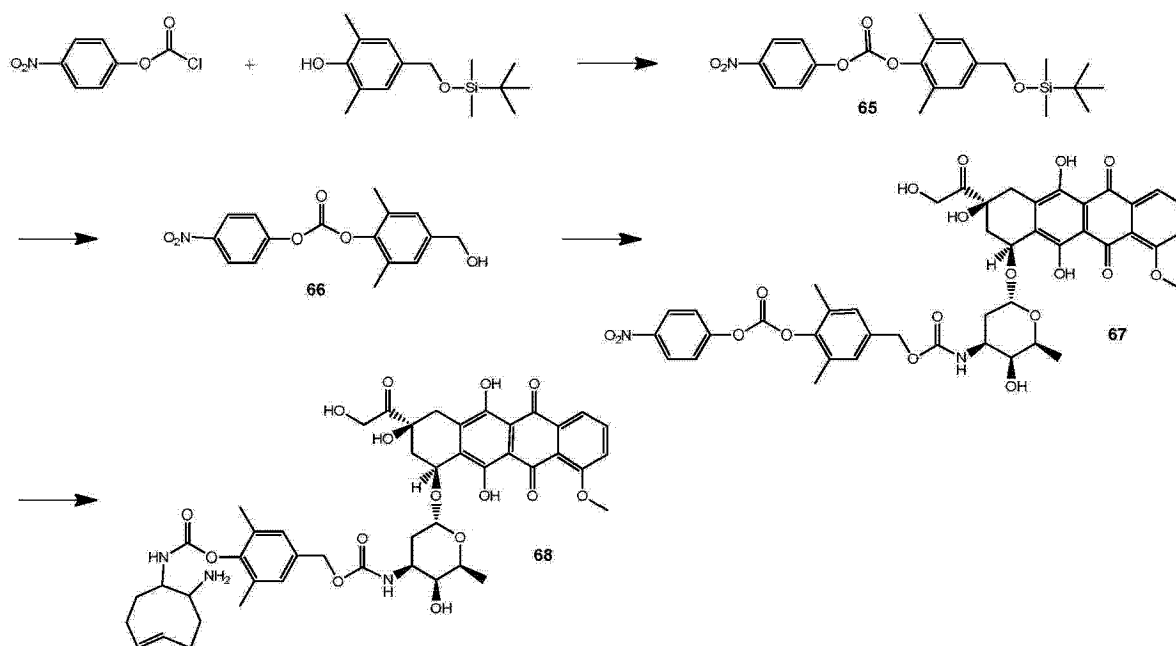
[0374] 在 25mL 圆底烧瓶中,在 Ar 气氛下,将顺式-5,6-二氨基-反式-环辛烯 *35 (16.5mg, 71 μ mol, 1.1 当量) 在干燥 THF (4mL) 中溶解。加入 63 (55mg, 64 μ mol) 在干燥 THF (4mL) 中的溶液,将烧瓶密封,并且将混合物在室温下搅拌 1 小时。将溶剂在真空中移除,并且使用 RP-HPLC (含 0.1% 甲酸的 CH₃CN/H₂O) 同时在 λ = 253 和 317nm 下监测,来纯化残渣。梯度中包含的 %CH₃CN (分钟): 28 (1-11)、28-100 (11-12)、100 (12-13)、100-28 (13-14)、28 (14-15)。这得到了纯的冻干后为橙色固体形式的 (E)-环辛烯-多柔比星缀合物 64 (19mg, 22 μ mol, 35%)。

[0375] $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{MeOD}-d_4$ 95:5): δ = 7.98 (d, 1H, ArH), 7.74 (t, 1H, ArH), 7.35 (d, 1H, ArH), 7.23 (d, 2H, ArH), 6.99 (d, 2H, ArH), 5.75 (m, 1H, CH=CH), 5.64 (m, 1H, CH=CH), 5.43 (s, 1H, OCHO), 5.23 (s, 1H, CCHHCH), 4.97 (d, 1H, ArCHHO), 4.91 (d, 1H, ArCHHO), 4.71 (s, 2H, CH₂OH), 4.09 (m, 1H, CHCH₃), 4.08 (s, 3H, OCH₃), 3.80 (m, 1H, NHCH), 3.70 (m, 1H, NHCHCHNH₂), 3.56 (s, 1H, CHOH), 3.40 (m, 1H, CHNH₂), 3.22 (d, 1H, ArCHH), 2.98 (d, 1H, ArCHH), 2.38-1.96 (m, 10H, 反式-环辛烯 CH₂, CCHH), 1.77 (m, 2H, NHCHCHH), 1.22 (d, 3H, CHCH₃) ppm。 $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{MeOD}-d_4$): δ = 213.2, 186.1, 185.9, 160.8, 156.5, 155.7, 155.1, 154.5, 150.6, 135.7, 134.6, 134.2, 134.1, 133.6, 133.1, 132.8, 128.6, 121.2, 119.7, 119.0, 118.7, 110.8, 110.6, 100.8, 78.0, 76.0, 69.7, 68.7, 67.2, 65.4, 64.3, 57.3, 55.9, 55.6, 35.9, 35.7, 35.5, 32.6, 31.6, 29.4, 27.6, 15.9 ppm。ESI-MS:m/z 计算值: 859.32; 实测值: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 860.50。FT-IR (ATR): ν = 3347, 2972, 2940, 2872, 1676, 1617, 1579, 1525, 1503, 1444, 1429, 1413, 1346, 1285, 1261, 1201, 1134, 1069, 1016, 985, 952, 916, 894, 875, 836, 821, 799, 765, 737, 721, 706, 693, 673 cm^{-1} 。

[0376] * 估计的批次纯度 60%

[0377] (E)-环辛烯-多柔比星缀合物 68 的合成

[0378]



[0379] 在 25mL 圆底烧瓶中, 将 4-(叔丁基二甲基甲硅烷氧基甲基)-2,6-二甲基苯酚 (84mg, 0.32mmol; Y. H. Choe, C. D. Conover, D. Wu, M. Royzen, Y. Gervacio, V. Borowski, M. Mehlig, R. B. Greenwald, J. Controlled Release 2002, 79, 55 - 70) 合 DIPEA (111 μ L, 82mg, 0.63mmol, 2 当量) 在干燥 THF (0.5mL) 中溶解, 并且将混合物在冰浴中冷却。滴加在干燥 THF (0.5mL) 中的 4-硝基苯基氯甲酸酯 (132mg, 0.63mmol, 2 当量), 并且将混合物在 45 $^{\circ}$ C 下搅拌 2 小时。 1 H-NMR 表明 $\eta \approx 78\%$ 后, 加入另外的 DIPEA (55 μ L, 41mg, 0.31mmol, 1 当量) 和 4-硝基苯基氯甲酸酯 (66mg, 0.31mmol, 1 当量), 并且将混合物在 45 $^{\circ}$ C 下搅拌 30 分钟。在 Celite 上过滤形成的白色沉淀 (DIPEA $\cdot$ HCl 盐), 然后将溶剂在真空中移除, 并且将残渣在 EtOAc (140mL) 中再溶解。将有机层用水和盐水 (两者均为 45mL) 洗涤, 用 MgSO_4 干燥, 过滤并将溶剂在真空中移除。使用柱色谱法 (快速二氧化硅), 用 1:1 氯仿 / 戊烷至氯仿的梯度进行纯化。这得到纯的无色固体形式的 2,6-二甲基-4-(叔丁基二甲基甲硅烷氧基甲基)苯基-4-硝基苯基碳酸酯 (65) (75mg, 0.17mmol, 55%)

[0380] 1 H-NMR (CDCl_3): δ = 8.31 (d, 2H, ArH), 7.48 (d, 2H, ArH), 7.06 (s, 2H, ArH), 4.68 (s, 2H, CH_2), 2.28 (s, 6H, Ar CH_3), 0.95 (s, 9H, CCH_3), 0.11 (s, 6H, SiCH_3) ppm. ^{13}C -NMR (CDCl_3): δ = 155.5, 150.4, 146.9, 145.6, 139.8, 129.5, 126.6, 125.4, 121.6, 64.3, 26.0, 18.4, 16.2, -5.3 ppm. ESI-MS: m/z 计算值: 431.18; 实测值: $[\text{M}+2\text{H}-\text{TBDMS}-\text{H}_2\text{O}]^+ 300.17$. FT-IR (ATR): ν = 2954, 2929, 2885, 2857, 1777, 1616, 1594, 1526, 1491, 1471, 1462, 1444, 1407, 1346, 1323, 1292, 1220, 1177, 1164, 1128, 1100, 1003, 947, 910, 883, 834, 815, 775, 736, 700, 673, 657 cm^{-1} .

[0381] 在 25mL 圆底烧瓶中, 将 65 (166mg, 0.38mmol) 在乙醇 (6mL) 中溶解, 并且将溶液在冰浴上冷却。加入在乙醇中的浓 HCl (1% v/v, 4.5mL), 并在室温下将混合物搅拌 75 分钟。将溶剂在真空中移除, 并将残渣用氯仿冲洗。这得到纯的无色油形式的 2,6-二甲基-4-(羟基甲基)苯基-4-硝基苯基碳酸酯 (66) (136mg, 最多 0.38mmol, 100%)。

[0382] 1 H-NMR (CDCl_3): δ = 8.32 (d, 2H, ArH), 7.47 (d, 2H, ArH), 7.13 (s, 2H, ArH), 4.65 (s, 2H, CH_2), 2.30 (s, 6H, Ar CH_3) ppm. ^{13}C -NMR (CDCl_3): δ = 155.4, 150.4, 147.3, 145.6, 13

9.3, 130.0, 127.5, 125.4, 121.6, 64.6, 16.1 ppm。ESI-MS:m/z 计算值:317.09; 实测值:[M+H-H₂O]⁺300.17。FT-IR(ATR): ν =3555, 3366, 3119, 3086, 2924, 2867, 1772, 1616, 1593, 1523, 1490, 1454, 1380, 1346, 1324, 1311, 1293, 1220, 1176, 1164, 1126, 1056, 1035, 1003, 955, 941, 910, 884, 857, 845, 764, 732, 702, 679, 664 cm⁻¹。

[0383] 在 10mL 圆底烧瓶中, 在 Ar 气氛下, 将 66 (51mg, 0.16mmol) 在干燥 THF (1mL) 中溶解。加入光气 (180 μ L 的 1.9M 在甲苯中的溶液, 0.34mmol, 2 当量), 然后将烧瓶密封, 并且将混合物在室温下搅拌 15 小时。在真空中移除溶剂, 并且将所得的油用甲苯 (3 $\times$) 和氯仿冲洗。这得到了无色油形式的氯甲酸酯类似物, 将其立即使用而无进一步纯化。

[0384] ¹H-NMR(CDCl₃): δ =8.33 (d, 2H, ArH), 7.48 (d, 2H, ArH), 7.16 (s, 2H, ArH), 5.24 (s, 2H, CH₂), 2.31 (s, 6H, CH₃) ppm。

[0385] 随后, 在 10mL 圆底烧瓶中, 将盐酸多柔比星 (89mg, 0.15mmol) 在干燥 THF (2mL) 中溶解, 并且加入氯甲酸酯 (最多 0.16mmol, 1.1 当量) 在干燥 THF (4mL) 中的溶液。加入 DIPEA (118 μ L, 88mg, 0.67mmol, 4.4 当量), 然后将混合物在室温下搅拌 24 小时。将溶液在 Celite 上过滤, 并且将溶剂在真空中移除。将残渣在氯仿 (120mL) 中再溶解并且用水 (2 $\times$) 和盐水 (全部 40mL) 洗涤。将有机层用 MgSO₄ 干燥, 过滤并将溶剂在真空中移除。使用柱色谱法 (快速二氧化硅), 用在氯仿中 2%MeOH 至在氯仿中 3%MeOH 的梯度进行纯化。这得到纯的橙色固体形式的 67 (82mg, 92 μ mol, 61%)。

[0386] ¹H-NMR(CDCl₃): δ =13.98 (s, 1H, ArOH), 13.25, (s, 1H, ArOH), 8.30 (d, 2H, ArH), 8.05 (d, 1H, ArH), 7.79 (t, 1H, ArH), 7.45 (d, 2H, ArH), 7.40 (d, 1H, ArH), 7.06 (s, 2H, ArH), 5.51 (s, 1H, OCHO), 5.30 (s, 1H, CCHHCH), 5.11 (d, 1H, NH), 4.97 (s, 2H, ArCH₂O), 4.75 (s, 2H, CH₂OH), 4.53 (s, 1H, COH), 4.14 (m, 1H, CHCH₃), 4.08 (s, 3H, OCH₃), 3.87 (m, 1H, NHCH), 3.67 (d, 1H, CHOH), 3.28 (d, 1H, ArCHH), 3.03 (d, 1H, ArCHH), 2.98 (t, 1H, CH₂OH), 2.33 (d, 1H, CCHH), 2.25 (s, 6H, ArCH₃), 2.17 (d, 1H, CCHH), 1.87 (m, 2H, NHCHCHH, CHOH), 1.77 (m, 1H, NHCHCHH), 1.29 (d, 3H, CHCH₃) ppm。 ¹³C-NMR(CDCl₃): δ =213.8, 186.9, 186.5, 161.0, 156.1, 155.5, 155.4, 155.3, 150.2, 147.7, 145.6, 135.8, 135.4, 134.8, 133.6, 133.5, 130.1, 128.8, 125.4, 121.6, 120.7, 119.8, 118.5, 111.5, 111.3, 100.7, 77.2, 76.6, 69.7, 69.5, 67.3, 66.0, 65.5, 56.6, 47.0, 35.6, 33.9, 30.1, 16.8, 16.0 ppm。ESI-MS:m/z 计算值:886.24; 实测值 [M+Na]⁺909.33。FT-IR(ATR): ν =3492, 3431, 3058, 2937, 1777, 1719, 1616, 1579, 1525, 1491, 1444, 1429, 1412, 1381, 1347, 1325, 1283, 1225, 1209, 1183, 1132, 1071, 1015, 982, 948, 917, 879, 858, 847, 820, 791, 765, 734, 702, 681 cm⁻¹。

[0387] 在 25mL 圆底烧瓶中, 在 Ar 气氛下, 将顺式-5,6-二氨基-反式-环辛烯* (35, 14.6mg, 104 μ mol, 1.1 当量) 在干燥 THF (4mL) 中溶解。加入 67 (82mg, 92 μ mol) 在干燥 THF (2mL) 中的溶液, 将烧瓶密封, 并将混合物在室温下搅拌 90 分钟。¹H-NMR 表明 $\eta \approx 75\%$ 后, 加入另外的 5,6-二氨基-反式-环辛烯 (4.4mg, 31 μ mol, 0.3 当量), 并将混合物在室温下搅拌 1 小时 (根据 ¹H-NMR, 最终 $\eta \approx 90\%$)。将溶剂在真空中移除, 并且使用 RP-HPLC (含 0.1% 甲酸的 CH₃CN/H₂O) 同时在 λ =253 和 317nm 下监测, 来纯化残渣 (100mg) 中的部分 (22mg)。梯度中包含的 %CH₃CN (分钟): 25-45 (1-11)、45-100 (11-12)、100 (12-13)、100-25 (13-14)、25 (14-15)。这得到了纯的冻干后为橙色固体形式的顺式-(E)-环辛烯-多柔比星缀合物 68 (10mg, 11 μ mol, 55%)。

[0388] $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{MeOD}-d_4$ 95:5): δ = 8.02 (d, 1H, ArH), 7.80 (t, 1H, ArH), 7.41 (d, 1H, ArH), 6.98 (s, 2H, ArH), 5.82 (m, 1H, CH=CH), 5.66 (m, 1H, CH=CH), 5.49 (s, 1H, OCHO), 5.32 (s, 1H, CCHHCH), 4.95 (d, 1H, ArCHHO), 4.88 (d, 1H, ArCHHO), 4.77 (s, 2H, CH_2OH), 4.14 (m, 1H, CHCH_3), 4.08 (s, 3H, OCH_3), 3.84 (m, 1H, NHCH), 3.74 (m, 1H, NHCHCHNH₂), 3.60 (s, 1H, CHOH), 3.40 (m, 1H, CHNH₂), 3.26 (d, 1H, ArCHH), 3.02 (d, 1H, ArCHH), 2.38–1.96 (m, 10H, 反式-环辛烯 CH_2 , CCHH), 2.11 (s, 6H, ArCH_3), 1.81 (m, 2H, NHCHCHH), 1.28 (d, 3H, CHCH_3) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{MeOD}-d_4$ 9:1): δ = 213.9, 187.1, 186.7, 161.0, 155.8, 155.3, 153.9, 147.7, 135.8, 135.4, 133.8, 133.6, 133.2, 132.8, 130.9, 128.3, 120.8, 119.7, 118.5, 111.5, 111.3, 100.6, 76.4, 69.3, 69.0, 67.9, 67.4, 66.2, 65.2, 57.8, 56.6, 55.9, 46.8, 36.5, 36.1, 35.7, 33.7, 32.6, 29.9, 28.0, 25.5, 16.6, 15.9 ppm. ESI-MS: m/z 计算值: 887.35; 实测值: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 888.58. FT-IR (ATR): ν = 3432, 2940, 1678, 1617, 1582, 1515, 1412, 1350, 1285, 1236, 1201, 1140, 1075, 1017, 983, 949, 912, 873, 836, 820, 799, 765, 729, 672 cm^{-1} .

[0389] * 估计的批次纯度 98%

[0390] 实施例 3

[0391] 四嗪活化剂的稳定性和反应性

[0392] 四嗪的水解稳定性试验

[0393] 将 10 μL 的特定四嗪在 DMSO 中的溶液 (25mM) 用 PBS 缓冲液 (3mL) (或如果水溶性太低, 用 PBS 和乙腈的混合物) 稀释。过滤该溶液, 使用 UV 光谱仪监测 525nm 处吸收带的降低。从这些数据测定水解率和半衰期。

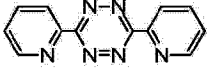
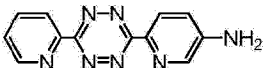
[0394] 四嗪对反式-环辛-4-烯-1-醇 (直立键异构体 (axial isomer)) 的反应性

[0395] 为了测定特定四嗪和 3-(5-乙酰氨基-2-吡啶基)-6-(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪 (其选作参考四嗪) 在与反式-环辛-4-烯-1-醇 (次要异构体, OH 在直立位置, 参见: Whitham 等人, J. Chem. Soc. (C), 1971, 883–896) 之间的反电子需求的 Diels-Alder 反应中的反应性比率, 进行了竞争性试验。

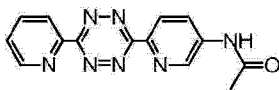
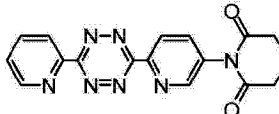
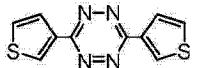
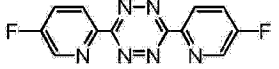
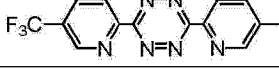
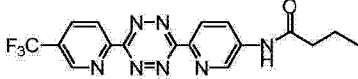
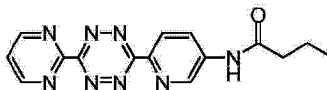
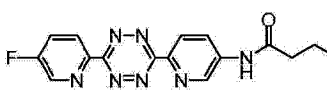
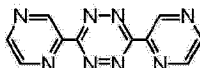
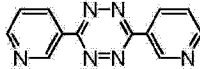
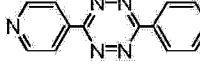
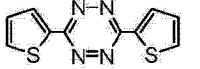
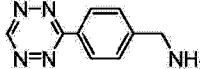
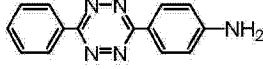
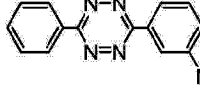
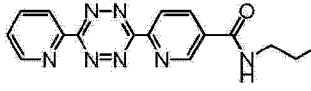
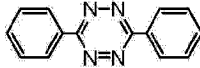
[0396] 向乙腈 (0.100mL) 中加入 5 μL 特定四嗪在 DMSO 中的溶液 (25mM) 和 5 μL 参考四嗪在 DMSO 中的溶液 (25mM)。将混合物用水 (0.9mL) 稀释, 两种四嗪的绝对量通过 HPLC-MS/PDA 分析测定。随后, 缓慢加入反式-环辛-4-烯-1-醇 (直立键异构体) 在 DMSO (25 μL 2.5mM) 中的溶液, 然后将混合物搅拌 5 分钟。再次通过 HPLC-MS/PDA 分析测定两种四嗪的绝对量, 并且计算两种四嗪的转化率。从这些转化率, 使用 Ingold 和 Shaw (J. Chem. Soc., 1927, 2918–2926) 的数学方法计算两种四嗪的反应性比率 ($R=k_{2,\text{TZO}}/k_{2,\text{Ref}}$)。

[0397] 下表证明如何通过改变取代基来将四嗪的反应性和稳定性特征调节至特定特性 (specification)。

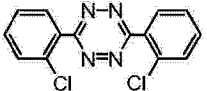
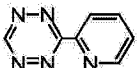
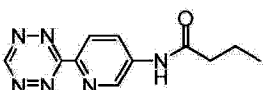
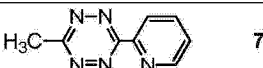
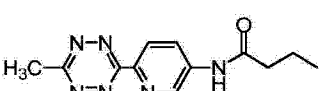
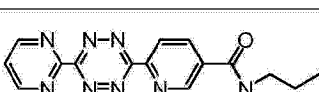
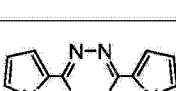
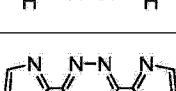
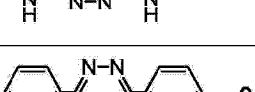
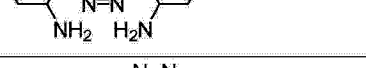
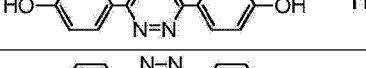
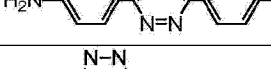
[0398]

四嗪	20°C 下在 PBS 中的稳定性 $t_{1/2}$ (小时)	反应性比率 ($R=k_{2,\text{TZ}}/k_{2,\text{Ref}}$)
 2	44	1.17
	340	0.4

[0399]

 5	80	1
	24	1.6
	>300*	<0.01*
	115	1.07
	3.6*	5.3*
	35*	1.84*
	3.2	2.7
	117	0.95
	0.68	1.5
	>150	0.19
	2.4	0.83
	>300*	<0.01*
	183	0.77
	>300*	<0.01*
	>300*	<0.01*
	4	1.76
	>300*	<0.01*

[0400]

	>300*	<0.01*
	2.7	3.06
	10.3	2.8
	230	0.25
	300	0.18
	0.42	2
	>300*	<0.01*
	n.d.	1.2
	>300*	<0.01*
	>300*	<0.01*
	>300*	<0.01*
	16	n.d.

[0401] * 该值在 PBS 和乙腈的 50:50 混合物中测定。

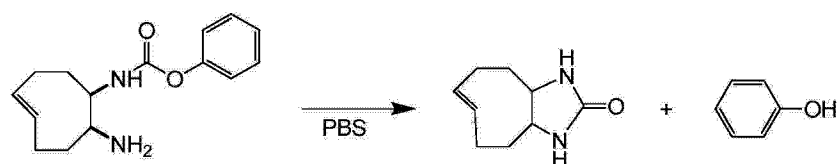
[0402] 实施例 4

[0403] 反式 - 环辛烯模型前药和前药的稳定性和反应性

[0404] 稳定性

[0405] 将 10 μ L 的特定反式 - 环辛烯衍生物在二氧杂环己烷中的溶液 (25mM) 用 PBS 缓冲液 (3mL) 稀释, 并且将该溶液在 20°C 下, 在暗处储存。TCO 化合物的结果通过 HPLC-MS 分析检测, 并且估算其半衰期。

[0406]



[0407] 反式-环辛烯衍生物对双(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪的反应性:二级速率常数的测定

[0408] 在乙腈中,使用紫外-可见光谱法测定 20℃下进行的反式-环辛烯衍生物与 3-(5-乙酰氨基-2-吡啶基)-6-(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪的反电子需求的 Diels-Alder 反应的动力学。向吸收池装入乙腈(3mL)并在 20℃下平衡。加入 3-(5-乙酰氨基-2-吡啶基)-6-(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪(2.50×10^{-7} mol),然后加入反式-环辛烯衍生物(2.50×10^{-7} mol)。检测吸收在 $\lambda = 540\text{nm}$ 下的衰变,并且从此曲线上测定二级速率常数(k_2),呈现二级反应动力学。

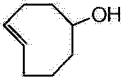
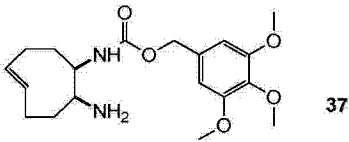
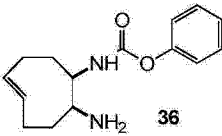
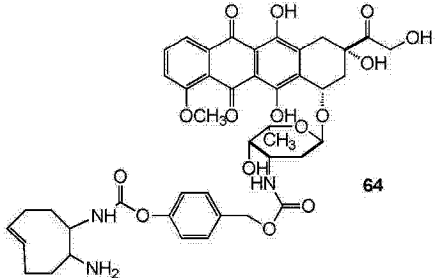
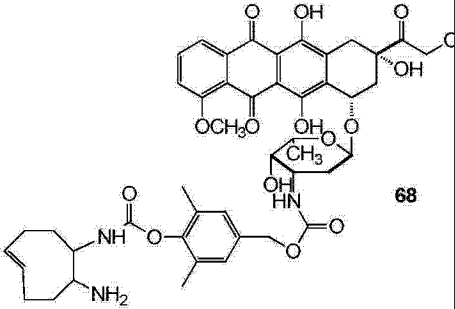
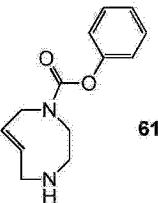
[0409] 反式-环辛烯衍生物对双(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪的反应性:

[0410] 竞争性试验

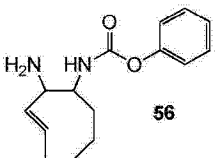
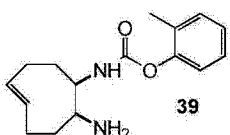
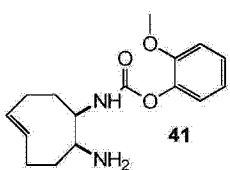
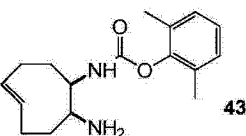
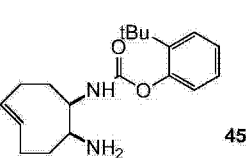
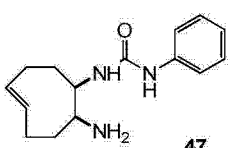
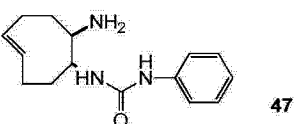
[0411] 实施了竞争性试验,以测定特定反式-环辛烯衍生物和反式-环辛-4-烯-1-醇(直立式异构体,被选作参比反式-环辛烯)与双(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪的反电子需求的 Diels-Alder 反应中的反应性比率。

[0412] 向乙腈(0.05mL)中加入特定反式-环辛烯衍生物在二氧杂环己烷中的溶液($5 \mu\text{L} 25\text{mM}; 1.25 \times 10^{-7}\text{mol}$)和参比反式-环辛烯衍生物在二氧杂环己烷中的溶液($5 \mu\text{L} 25\text{mM}; 1.25 \times 10^{-7}\text{mol}$)。将该混合物用水(0.45mL)稀释。随后,缓慢加入双(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪($6.25 \times 10^{-8}\text{mol}$) 在乙腈(0.05mL)和水(0.45mL)的混合物中的溶液,同时剧烈搅拌。添加完毕后,将混合物搅拌,持续另外 5 分钟。通过 HPLC-MS/PDA 分析测定两种反式-环辛烯衍生物的转化,并使用 Ingold 和 Shaw(J. Chem. Soc., 1927, 2918-2926)的数学方法从这些转化计算特定反式-环辛烯衍生物的反应性比率($R = k_{2, \text{TCO}}/k_{2, \text{Ref}}$)。

[0413]

反式-环辛烯衍生物	在 20℃下在 PBS 中的稳定性, $t_{1/2}$	速率常数* k_2 ($M^{-1} s^{-1}$)	反应性比率** ($R=k_{2,TCO}/k_{2,Ref}$)
 直立键异构体	> 3 天	577	1
	> 10 天	300	
	27 小时	240	
	24 小时@20℃ 3.6 小时@37℃		
	26 天@20℃ 6.2 天@37℃		
	>> 20 天	47	

[0414]

 56	5 天	44.4	
 39	8 天		
 41	21 小时		
 43	>> 20 天		
 45	>> 20 天		
 47 主要异构体	>> 20 天	106	
 47 次要异构体	>> 20 天	56	

[0415] * 在乙腈中, 20℃下通过紫外 - 可见光谱法测定

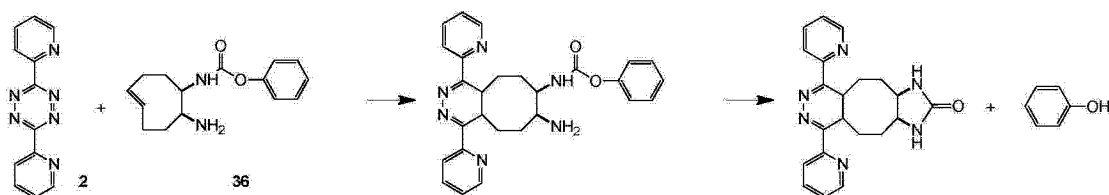
[0416] ** 通过竞争性试验测定

[0417] 实施例 5

[0418] 模型前药的活化

[0419] 3,6-双(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪(2)和((E)-8-氨基环辛-4-烯-1-基)氨基甲酸苯酯(36)

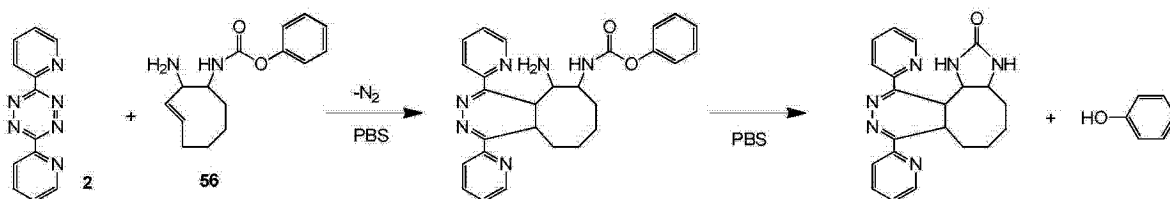
[0420]



[0421] 3,6-双(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪(2, $2.50 \times 10^{-7} \text{ mol}$) 在 PBS 缓冲液 (1mL) 中溶解。然后,加入((E)-8-氨基环辛-4-烯-1-基)氨基甲酸苯酯(36, $2.50 \times 10^{-7} \text{ mol}$)。将溶液在 20°C 下搅拌,并且反应进程通过 HPLC-MS 分析监测,证明几乎瞬间形成 rDA- 加成化合物,然后形成环状脒, $m/z = +375\text{Da} (\text{M} + \text{H}^+)$, 并且释放苯酚: $\lambda_{\text{max}} = 270\text{nm}$ 。该释放的半衰期为 40 分钟。

[0422] 3,6-双(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪(2)和((E)-2-氨基环辛-3-烯-1-基)氨基甲酸苯酯(56)

[0423]



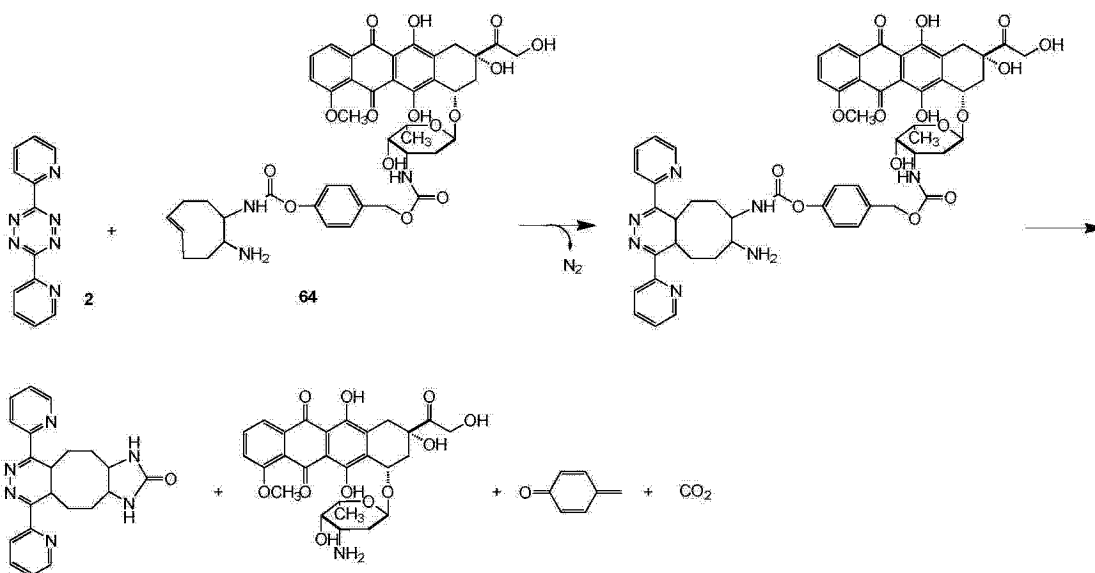
[0424] 将 3,6-双(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪(2, $2.50 \times 10^{-7} \text{ mol}$) 在 PBS 缓冲液 (1mL) 中溶解。然后,加入((E)-2-氨基环辛-3-烯-1-基)氨基甲酸苯酯(56, $2.50 \times 10^{-7} \text{ mol}$)。将溶液在 20°C 下搅拌,并且反应进程通过 HPLC-MS 分析监测,证明几乎瞬间形成 rDA- 加成化合物,然后形成环状脒, $m/z = +375\text{Da} (\text{M} + \text{H}^+)$, 并且释放苯酚: $\lambda_{\text{max}} = 270\text{nm}$ 。该释放的半衰期为 40 分钟。

[0425] 实施例 6

[0426] 多柔比星前药的活化

[0427] 3,6-双(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪(2)和(E)-环辛烯-多柔比星缀合物(64)

[0428]

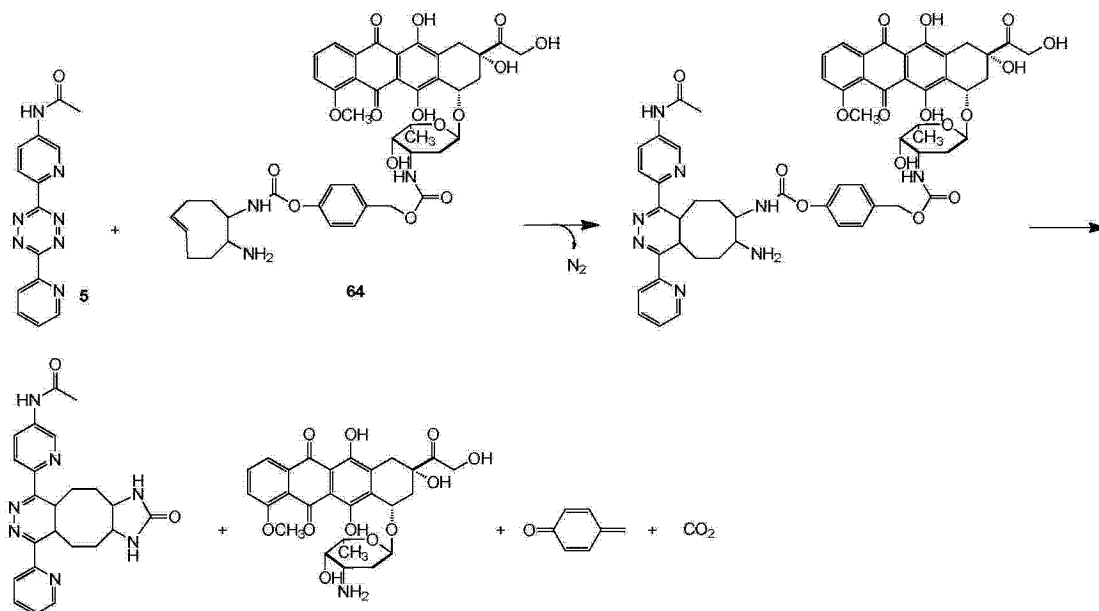


[0429] 将 3,6-双(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪 ($2.18 \times 10^{-5} \text{g}; 5.00 \times 10^{-8} \text{mol}$) 在 PBS 缓冲液 (1mL) 中溶解。然后加入顺式-(E)-环辛烯-多柔比星缀合物 (64, $2.67 \times 10^{-5} \text{g}; 2.50 \times 10^{-8} \text{mol}$)。将溶液在 20°C 下搅拌, 并且反应进程通过 HPLC-MS 分析监测, 证明环状脲的形成, $m/z = +375\text{Da} (\text{M} + \text{H}^+)$, 并且释放多柔比星: $m/z = +544\text{Da} (\text{M} + \text{H}^+)$ 且 $\lambda_{\text{max}} = 478\text{nm}$ 。该释放的半衰期为 2 小时。

[0430] 在 37°C 下进行该反应, 得到多柔比星释放半衰期为 40 分钟。

[0431] 3-(5-乙酰氨基-2-吡啶基)-6-(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪 (5) 和 (E)-环辛烯-多柔比星缀合物 (64)

[0432]

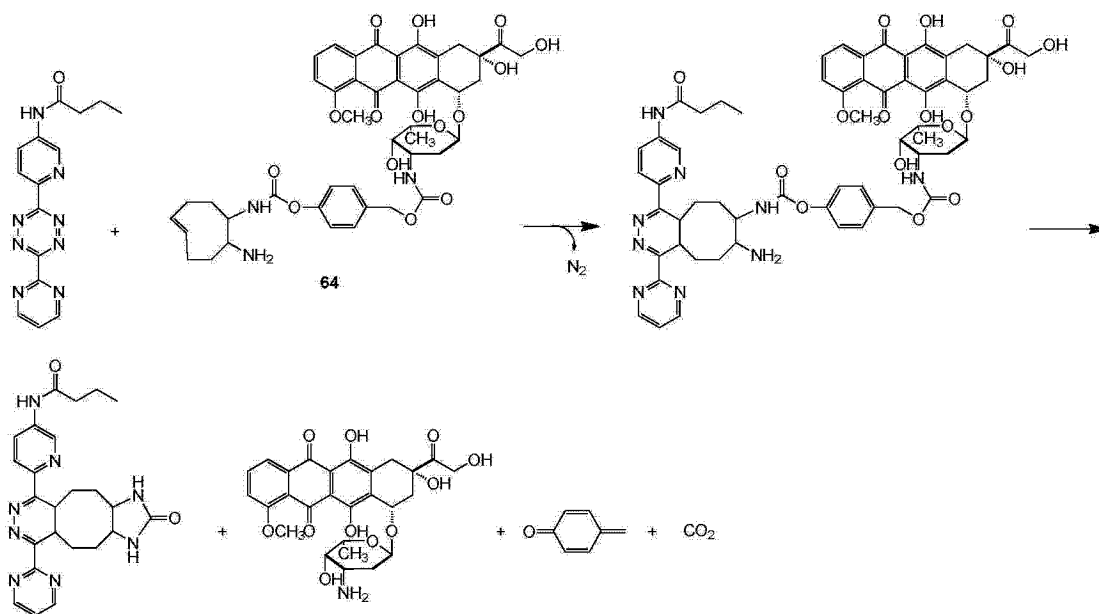


[0433] 与之前反应相同的方法。

[0434] 在 20°C 下, 1 小时后, 释放了 30% 的多柔比星。

[0435] 3-(5-丁酰氨基-2-吡啶基)-6-(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪和 (E)-环辛烯-多柔比星缀合物 (64)

[0436]

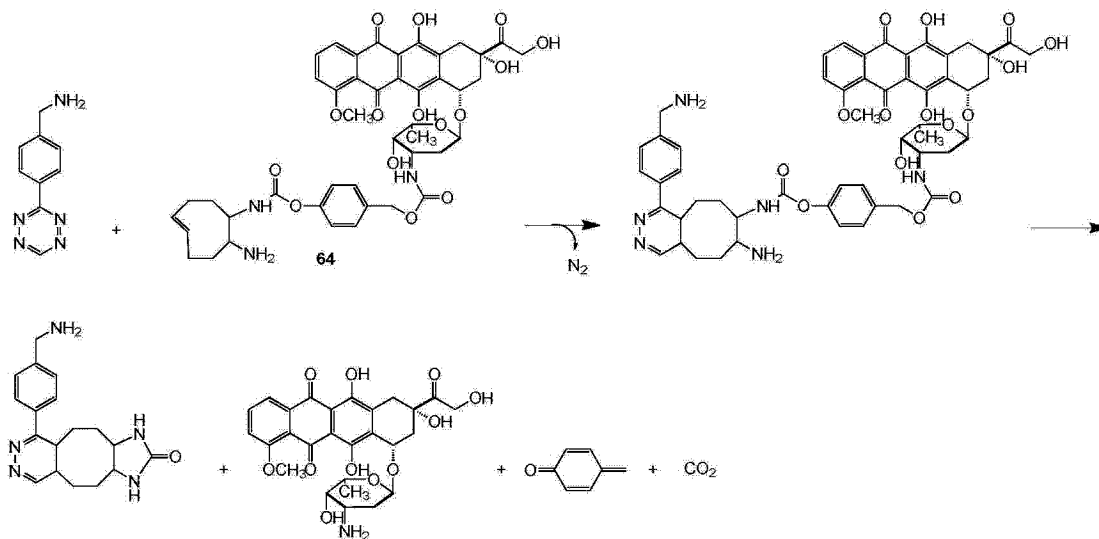


[0437] 与之前反应相同的方法。

[0438] 在 20℃下,1 小时后,释放了 20% 的多柔比星。

[0439] 4-(1, 2, 4, 5- 四嗪 -3- 基) 苯基甲胺和 (E)- 环辛烯 - 多柔比星缀合物 (64)

[0440]

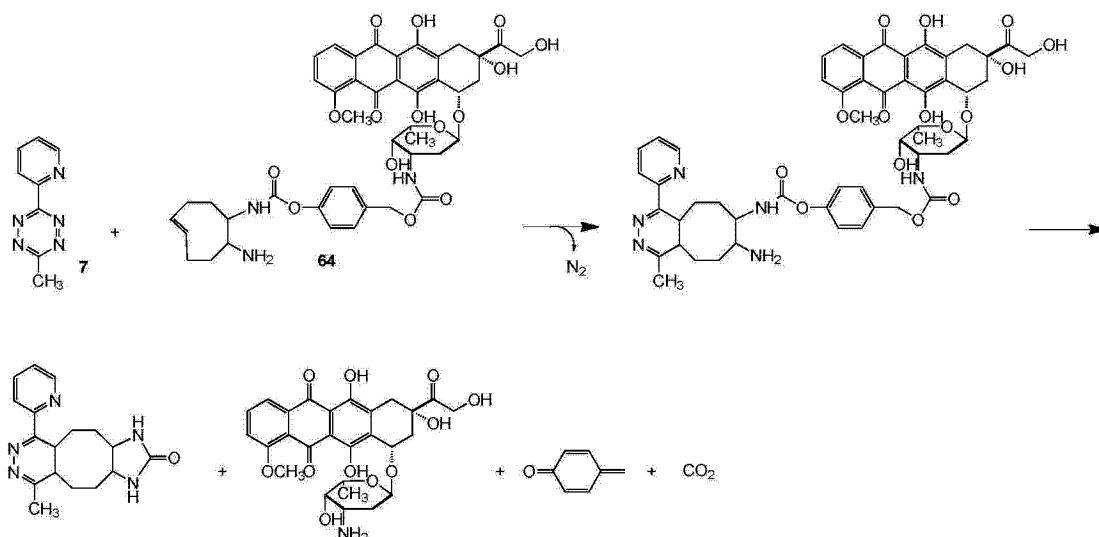


[0441] 与之前反应相同的方法。

[0442] 在 20℃下,1 小时后,释放了 50% 的多柔比星。

[0443] 3- 甲基 -6-(2- 吡啶基)-1, 2, 4, 5- 四嗪 (7) 和 (E)- 环辛烯 - 多柔比星缀合物 (64)

[0444]

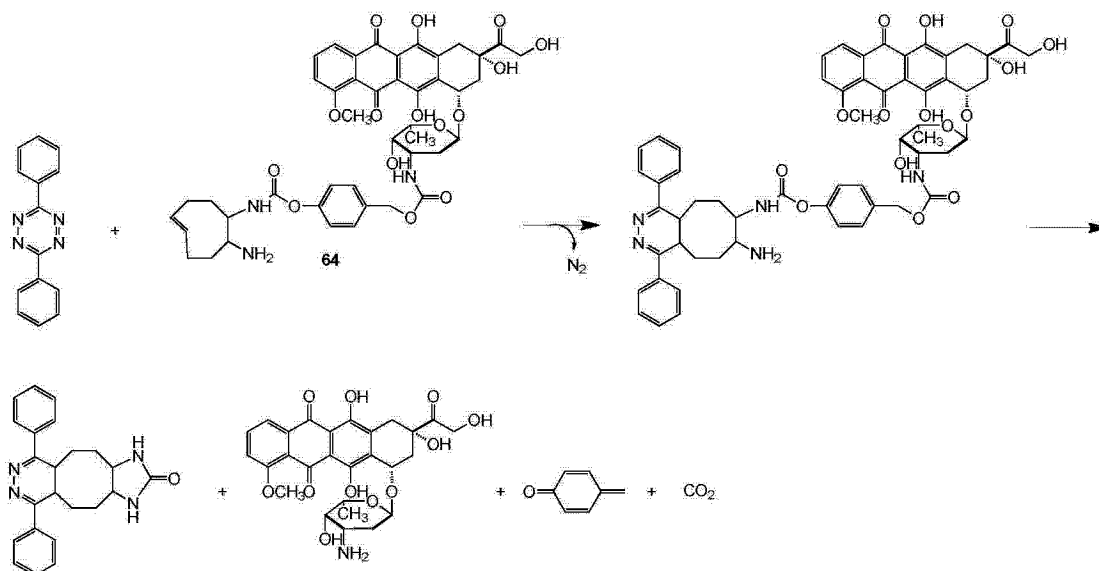


[0445] 与之前反应相同的方法。

[0446] 在 20℃下, 1 小时后, 释放了 52% 的多柔比星。

[0447] 3, 6- 二苯基 -1, 2, 4, 5- 四嗪和 (E)- 环辛烯 - 多柔比星缀合物 (64)

[0448]

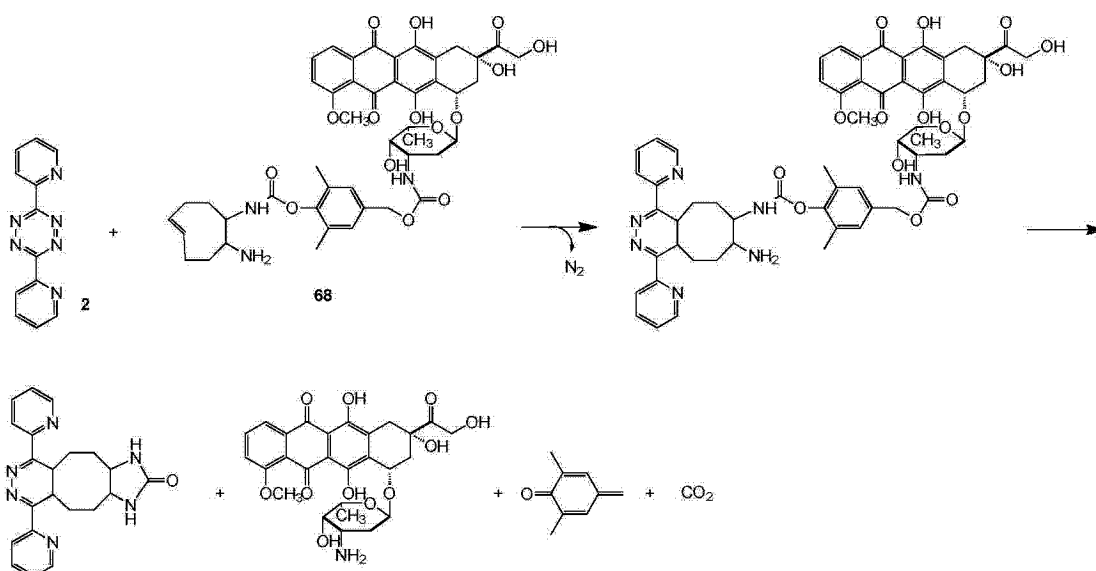


[0449] 与之前反应相同的方法。

[0450] 在 20℃下, 1 小时后, 释放了 48% 的多柔比星。

[0451] 3, 6- 双 (2- 吡啶基) -1, 2, 4, 5- 四嗪 (2) 和 (E)- 环辛烯 - 多柔比星缀合物 (68)

[0452]



[0453] 将 3,6-双(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪 ($2.18 \times 10^{-5} \text{g}$; $5.00 \times 10^{-8} \text{mol}$) 在 PBS 缓冲液 (1mL) 中溶解。然后加入 (E)-环辛烯-多柔比星缀合物 (68, $2.67 \times 10^{-5} \text{g}$; $2.50 \times 10^{-8} \text{mol}$)。将溶液在 20°C 下搅拌,并且反应进程通过 HPLC-MS 分析监测,证明环状脲的形成, $m/z=+375\text{Da}$ ($\text{M}+\text{H}^+$), 并且释放多柔比星: $m/z=+544\text{Da}$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 且 $\lambda_{\text{max}}=478\text{nm}$ 。该释放的半衰期为 4 天。

[0454] 在 37°C 下进行该反应,得到半衰期为 16 小时。

[0455] 实施例 7

[0456] 多柔比星前药 64 和四嗪 29 的细胞增殖试验

[0457] 将在青霉素和链霉素的存在下添加有 10% 热失活胎牛血清和 0.05% glutamax (Invitrogen) 的 DMEM (Invitrogen) 中的 A431 鳞状癌细胞保持在 37°C 下的潮湿 CO_2 (5%) 培养箱中。在实验开始 24 小时前,将细胞以 2000 细胞/孔的密度在 96 孔板 (Nunc) 中铺板。在实验马上开始前,将多柔比星 (Dox) 和前药 64 (在 DMSO 中 1mM) 按序在预热的培养基中稀释,并且将其加入孔中 ($200 \mu\text{L}$ 终体积; $t=0$)。将前药单独加入或将其与 $10 \mu\text{M}$ 四嗪合并加入。在 37°C 下孵育 6 小时,然后将培养基轻轻吸出,向每孔终加入 $200 \mu\text{L}$ 新鲜培养基,并且将细胞孵育多于 66 小时。在平行试验中,将四嗪 29 (在 PBS 中 2mM) 在预热的培养基中按序稀释 (从 1mM 到 1nM), 并将其加入到在 96-孔板中的 A431 细胞中,将其在 37°C 下孵育 72 小时。在各个试验结束时,通过 MTT 试验检测细胞增殖。简要地说,将甲基噻唑基二苯基四唑溴鎓盐 (methylthiazolyldiphenyltetrazolium bromide, MTT) 以 5mg/ml 溶解于 PBS 中,通过 $0.22 \mu\text{m}$ 过滤,并且向每孔中加入 $25 \mu\text{L}$ 。在 37°C 下培养 120 分钟后,将培养基轻轻地吸出。将形成的甲臞晶体溶解在 $100 \mu\text{L}$ DMSO 中,用酶标仪 (BMG Labtech) 在 560nm 下检测吸光度。从用 GraphPad Prism (版本 5.01) 生成的标准化细胞生长曲线 (参见图) 得到 IC_{50} 值 ($\pm$ 标准误差; 参见图)。细胞增殖试验证明,当将 A431 细胞暴露于前药 64 和四嗪 29 的组合时,与单独的前药 ($\text{IC}_{50}=128 \pm 17\text{nM}$) 或单独的四嗪 ($\text{IC}_{50}>100 \mu\text{M}$) 相比,毒性 ($\text{IC}_{50}=49 \pm 4\text{nM}$) 显著提高。这确证了前药的反式-环辛烯和四嗪活化剂的逆 Diels-Alder 反应后释放了多柔比星。

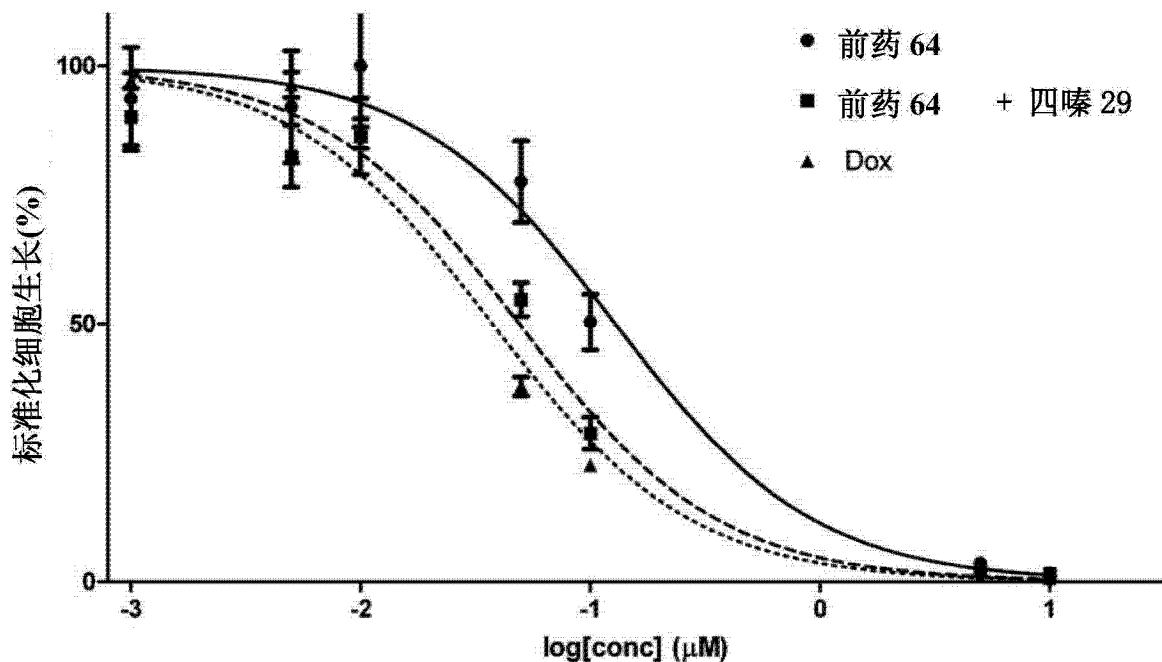
[0458] 在 A431 细胞系中测定的多柔比星 (Dox) 以及经四嗪 29 ($10 \mu\text{M}$) 活化和未经四嗪 29 活化的前药 64 的 IC_{50} 值

[0459]

化合物	IC ₅₀ (μ M)
Dox	0.038±0.003 ^a
前药 64	0.128±0.017 ^a
前药 64+ 四嗪 29(10 μ M)	0.049±0.004 ^a
四嗪 29	>100 ^b

[0460] ^a 在 37℃ 下孵育 6 小时后替换培养基；^b 在 37℃ 下孵育 72 小时

[0461]

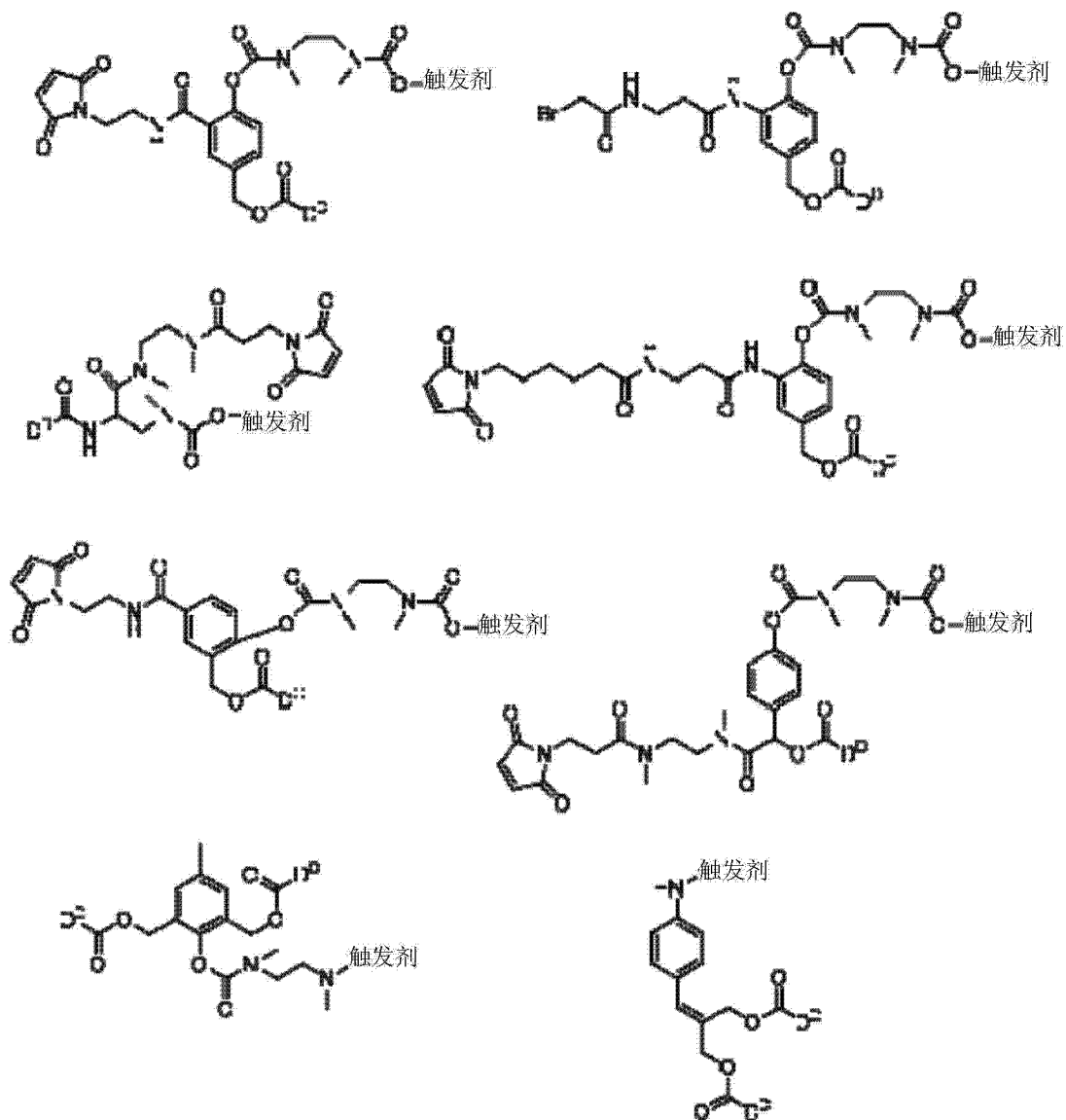


[0462] 在多柔比星 (Dox) 以及经四嗪 29(10 μ M) 活化和未经四嗪 29 活化的前药 64 的存在下对 A431 肿瘤细胞进行的细胞增殖试验。

[0463] 实施例 8

[0464] L^D 基团的示例性结构

[0465]

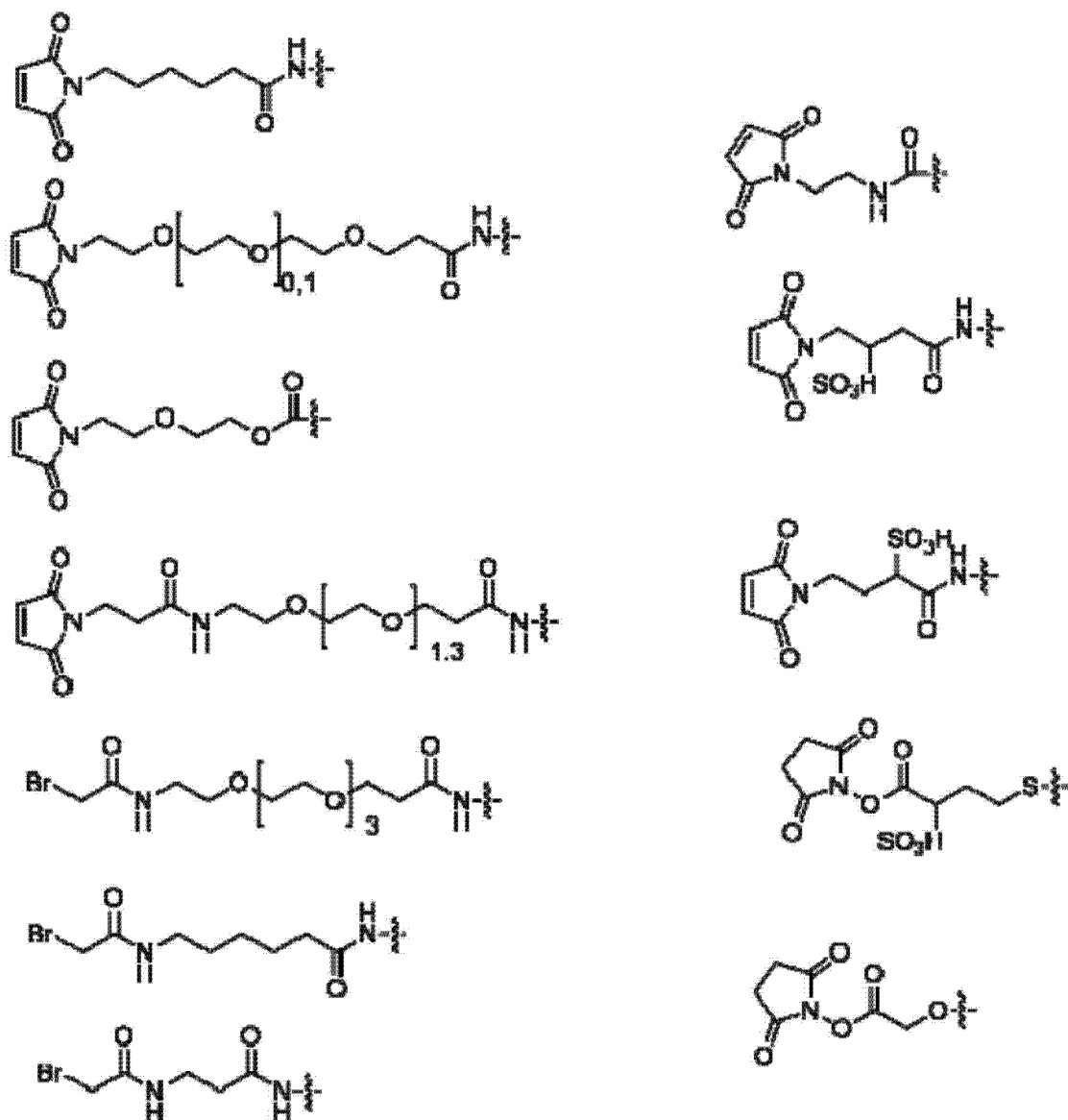


[0466] 连接基 L^D 为所谓的自切除连接基,意指触发剂与活化剂反应时,所述连接基会通过分子内反应降解,从而释放药物 D^D 。上述中一些还包含 S^P 。

[0467] 实施例 9

[0468] S^P 基团的示例性结构

[0469]



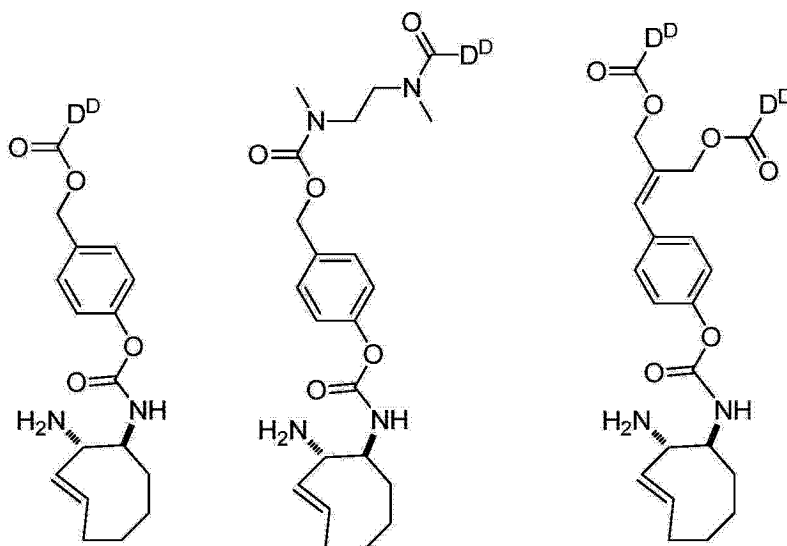
[0470] $\sim$ 结合的前药的其余部分

[0471] 注意, 顺丁烯二酰亚胺、活性酯和溴代乙酰氨基基团是可任选地通过其它间隔基 S^{P} 与靶向基团 T^{T} 和掩蔽基团 M^{M} 偶联的活性基团。顺丁烯二酰亚胺和溴代乙酰氨基基团通常与硫醇反应, 而活性酯通常适合与伯胺或肼胺偶联。

[0472] 实施例 10. 具有所述示例性 L^{D} 基团的 TCO 触发剂结构

[0473] 该实施例中特定的 T^{T} 可任选地被 M^{M} 替代。

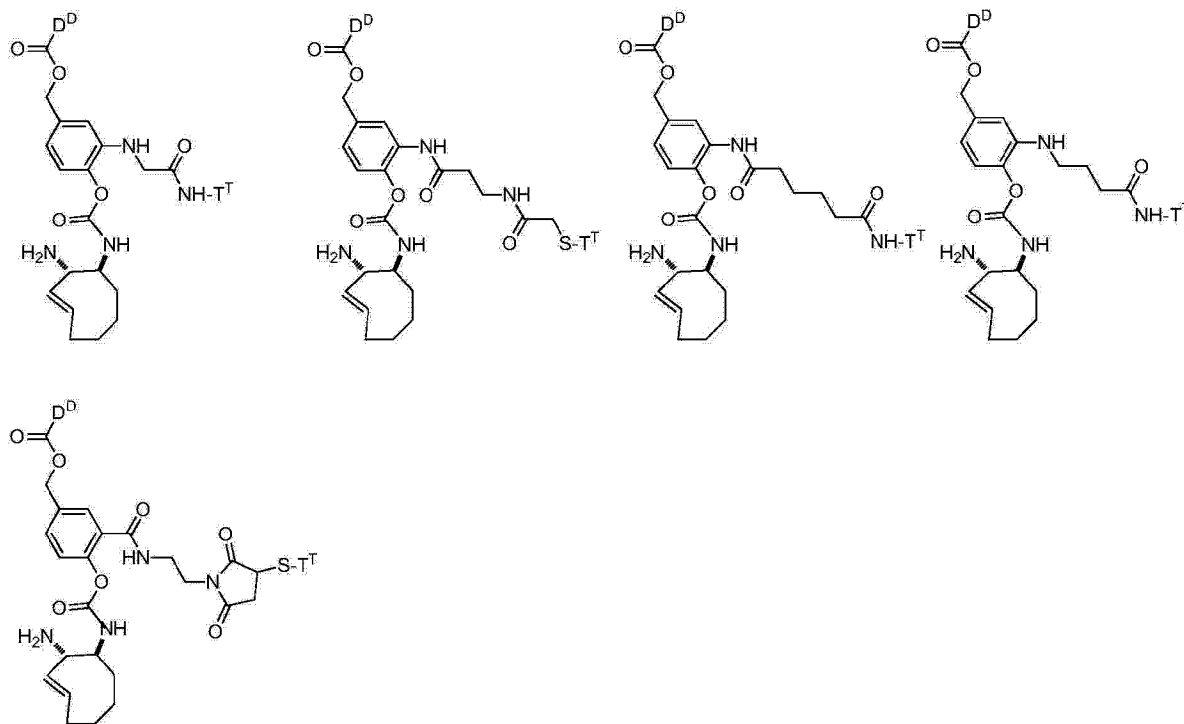
[0474]



[0475] 实施例 11. 具有所述示例性 L^D 和 / 或 S^P 基团的 TC0 触发剂结构

[0476] 触发剂通过 T^T 的胺或硫醇缀合至 T^T。该实施例中特定的 T^T 可任选地被 M^M 替代。

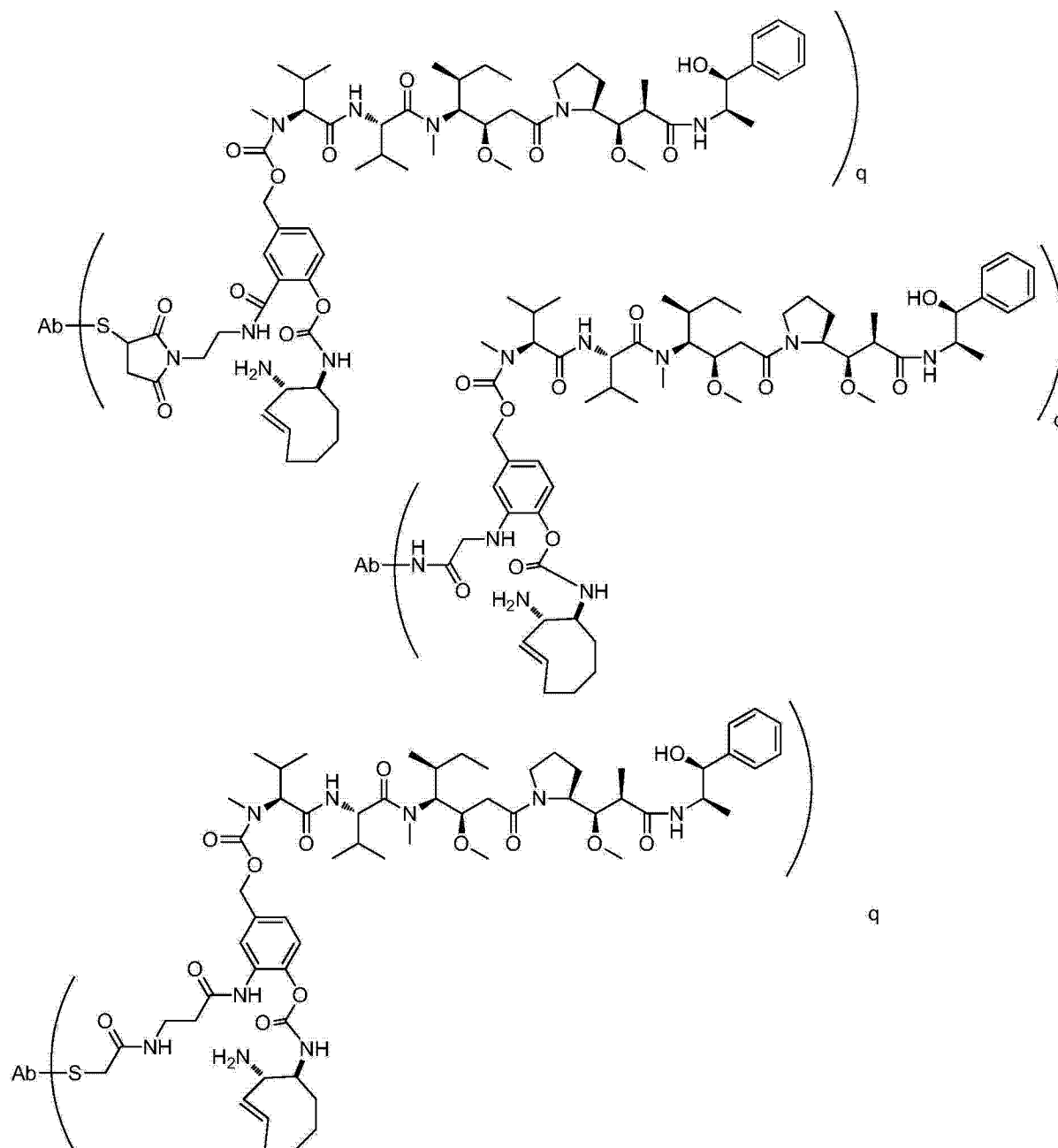
[0477]



[0478] 实施例 12. 抗体 - 药物缀合物的结构

[0479] Auristatin E(MMAE) 毒素通过自切除连接基 L^D 结合至 TC0 触发剂, 并且通过 S^P 结合至目标抗体或片段 (通过半胱氨酸或赖氨酸残基结合)。Ab= 抗体或抗体片段; q=Ab 修饰 # 并且通常为 1-10。

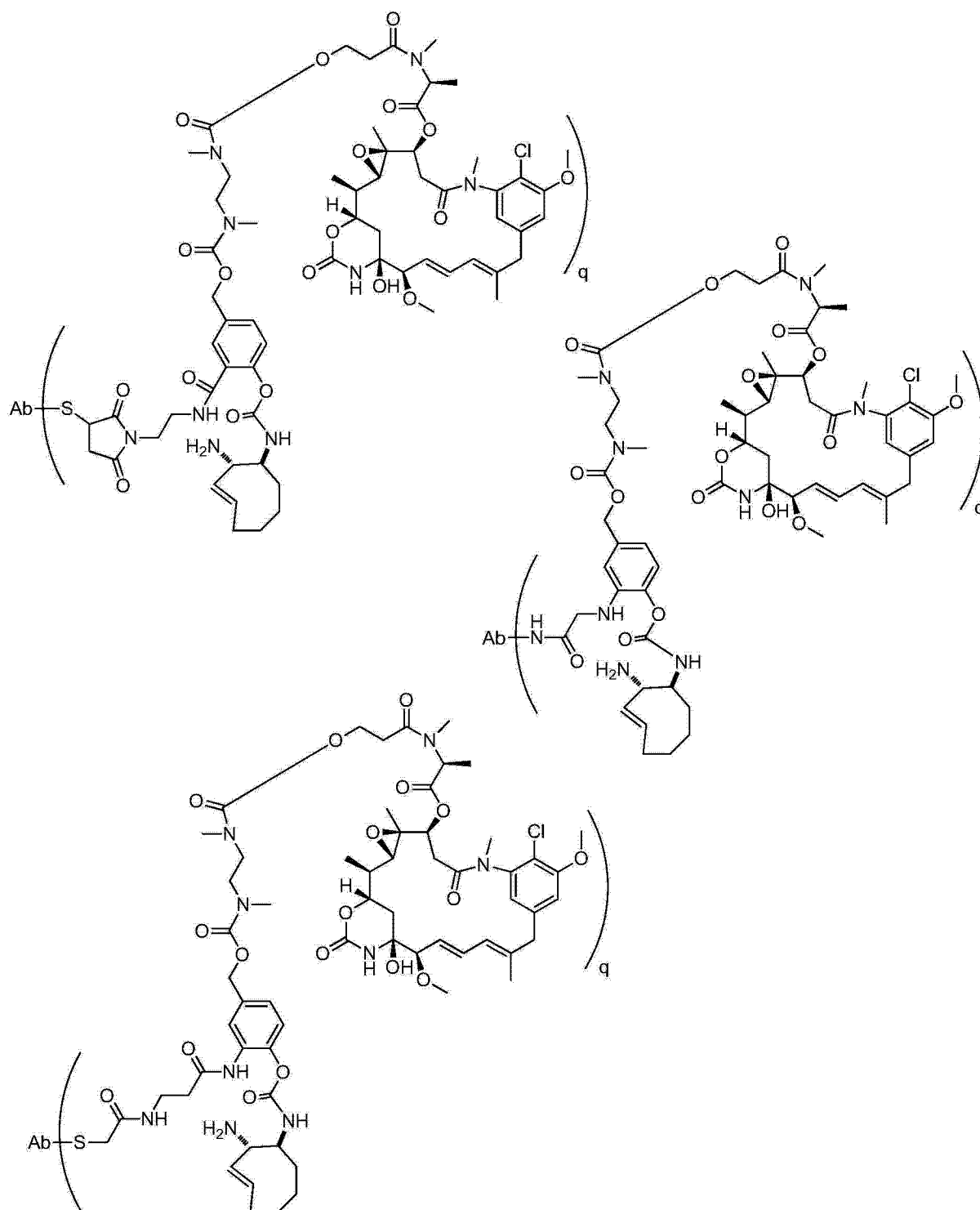
[0480]



[0481] 实施例 13. 抗体 - 药物缀合物的结构

[0482] 美坦辛毒素通过自切除连接基 L^D 结合至 TC0 触发剂, 并且通过 S^P 结合至目标抗体或片段 (通过半胱氨酸或赖氨酸残基结合)。Ab= 抗体或抗体片段; q =Ab 修饰 # 并且通常为 1-10。

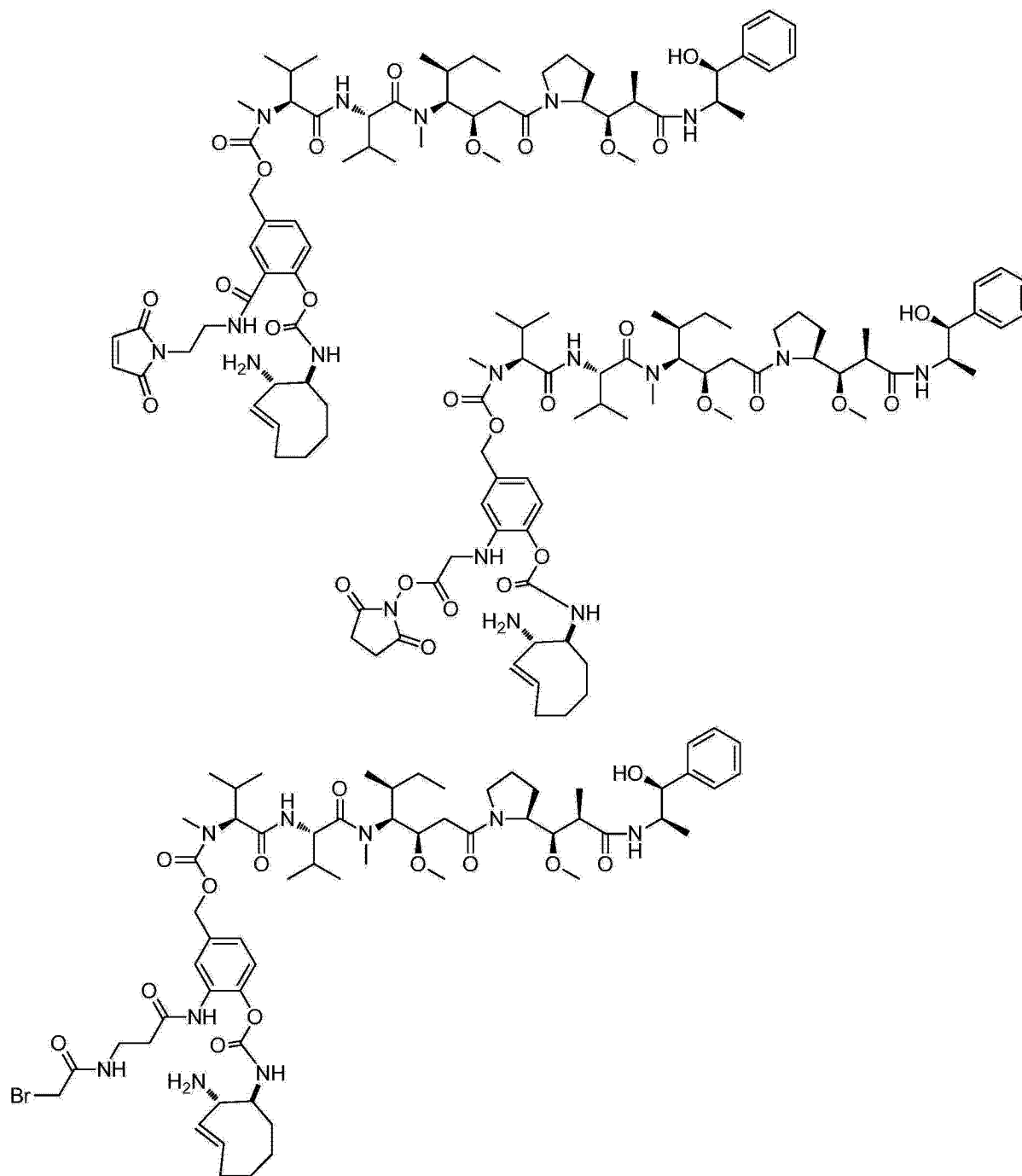
[0483]



[0485] 实施例 14. 可例如通过胺或硫醇基团结合至靶向剂 T^T 的触发剂-药物构建体的结构

[0486] Auristatin E(MMAE) 毒素通过自切除连接基 L^D 结合至 TCO 触发剂, 并且通过 S^P 结合至用于 T^T 缀合的反应性基团。

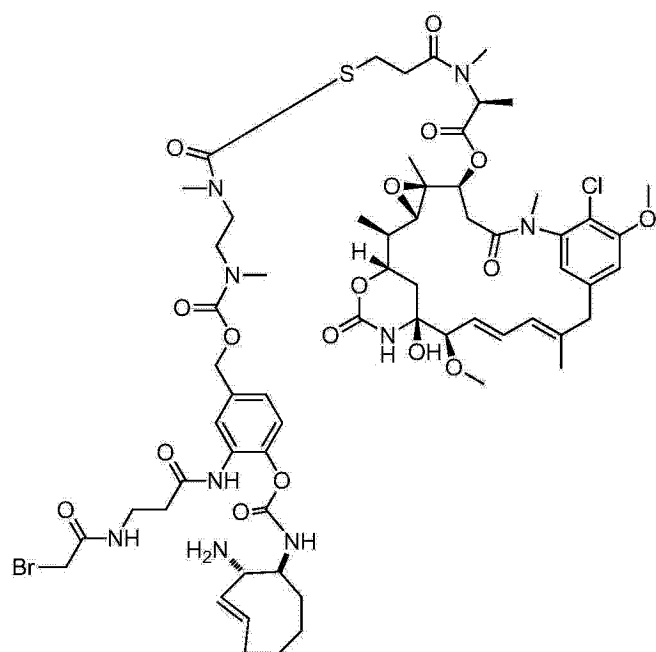
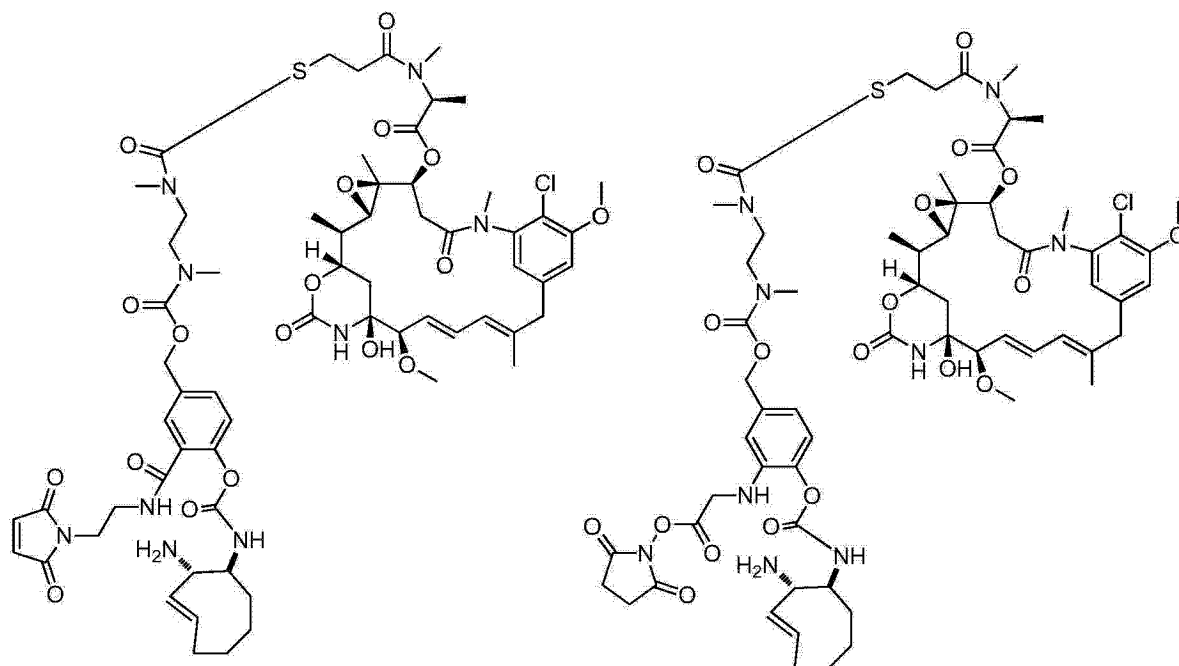
[0487]



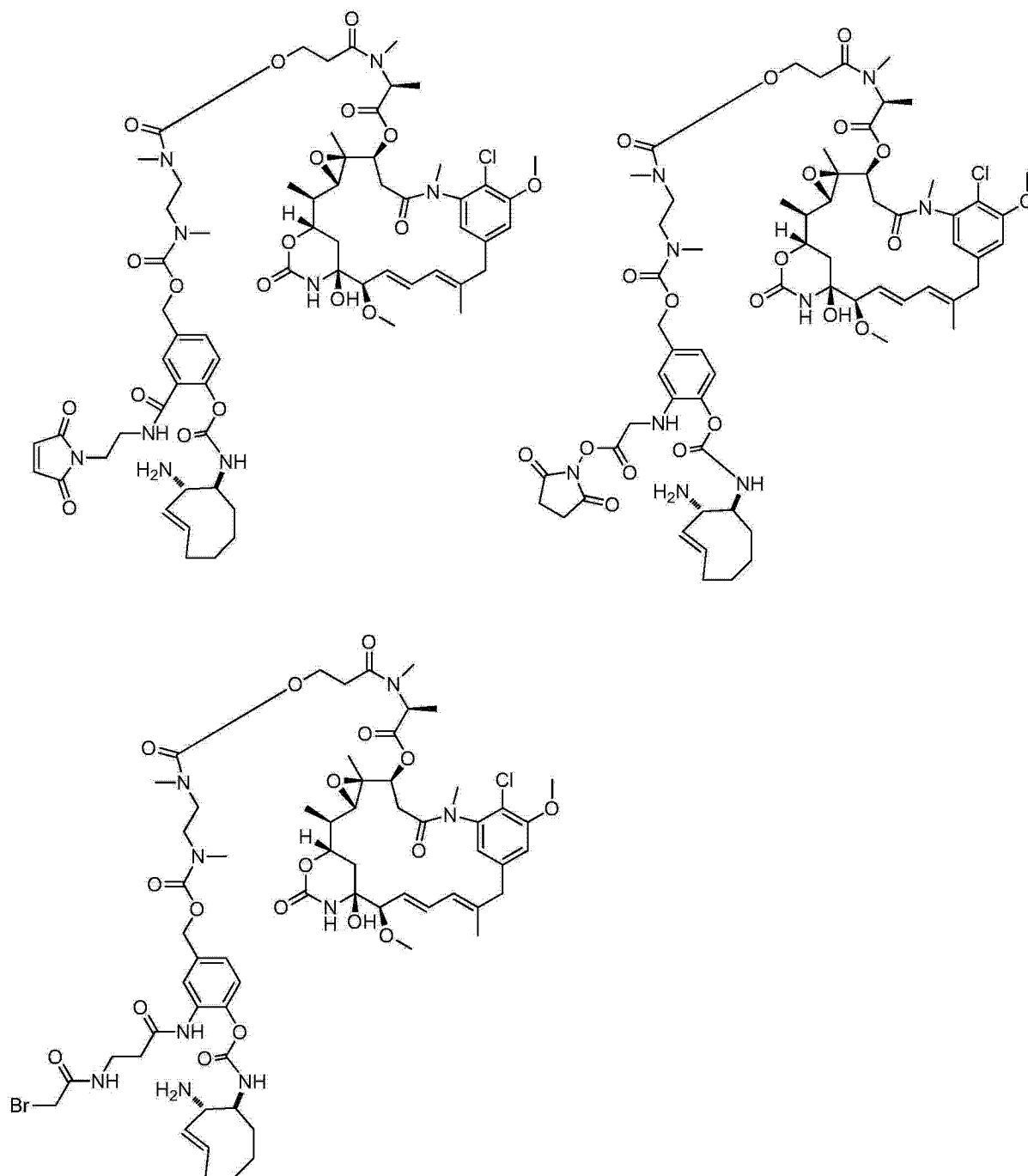
[0488] 实施例 15. 可例如通过胺或硫醇基团结合至靶向剂 T^T 的触发剂 - 药物构建体的结构

[0489] 美坦辛毒素通过自切除连接基 L^D 结合至 TC0 触发剂, 并且通过 S^P 结合至用于 T^T 缀合的反应性基团。

[0490]



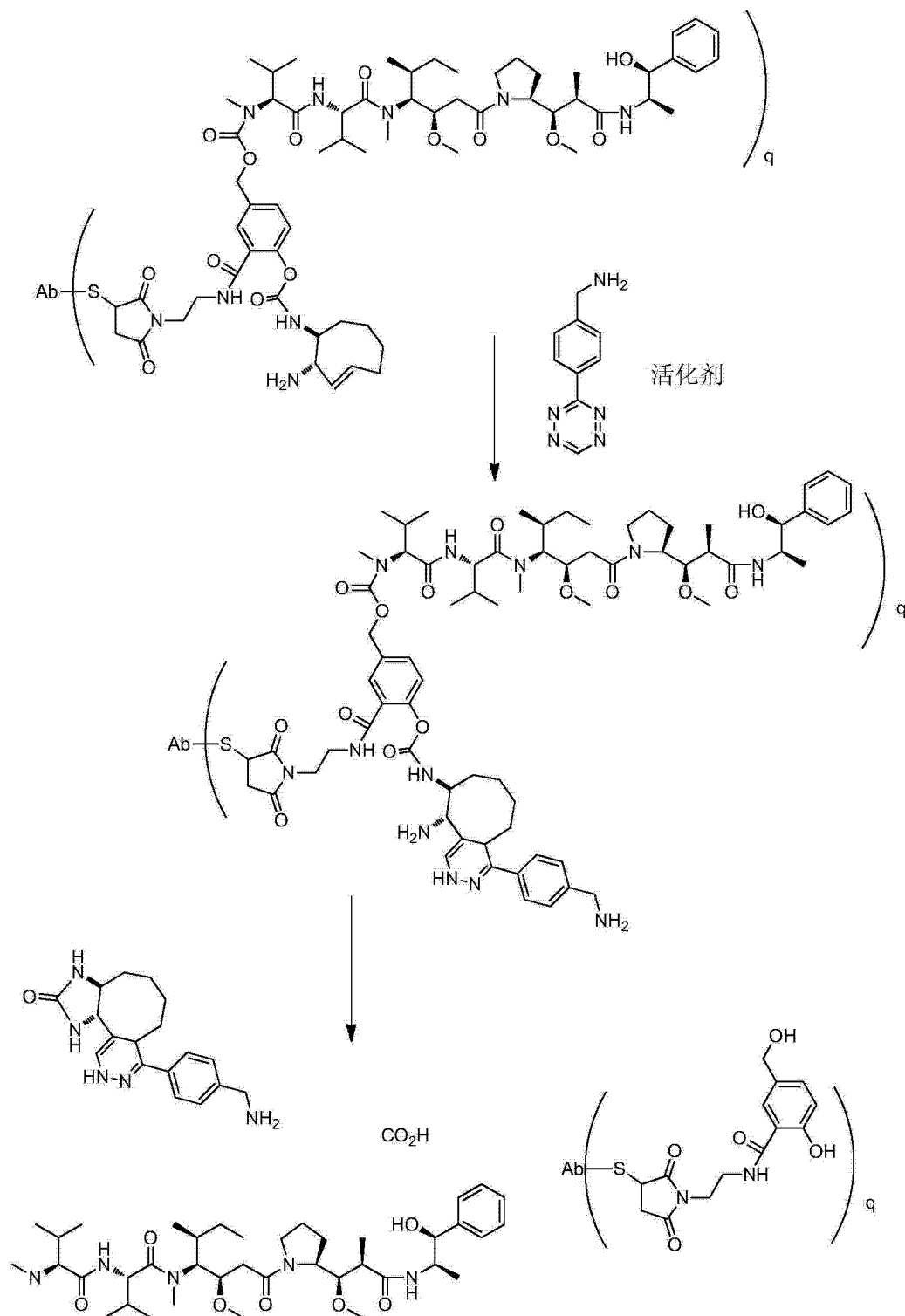
[0491]



[0492] 实施例 16. 结合肿瘤的 CC49-Auristatin E 缀合物的活化

[0493] 作为 mAb 或 mAb 片段的 CC49 结合非内化泛固体 (pan-solid) 肿瘤标志物 TAG72。将前药给药后结合肿瘤, 并从血液清除, 注射活化剂。活化剂与前药中的 TCO 触发剂的反应导致 Auristatin E 从 CC49 (抗体或抗体片段) 释放, 使其穿透癌细胞, 在其中它发挥它的抗癌作用。

[0494]



[0495] 实施例 17. 结合肿瘤的 T 细胞结合三链抗体的活化

[0496] 三链抗体包含肿瘤结合基团、CD3T⁻ 细胞结合基团和 CD28T⁻ 细胞共刺激基团。由于 CD3 和 CD28 组合入一个分子中会导致不期望的偏离靶点的毒性作用, 因此通过掩蔽基团 M^M 阻断抗-CD28 域, 所述蔽基团 M^M 为与 CD28 结合域类似并且其具有对于抗-CD28 基团的亲和力的肽。该肽通过另一个肽或 PEG 链 S^P 连接至 TCO 触发剂, 所述 TCO 触发剂自身缀合至半胱氨酸 (其设计为位点专一性)。将前药给药后结合肿瘤, 并从血液清除, 注射活化剂。活化剂与前药中的 TCO 触发剂反应导致掩蔽基团从抗-CD28 域的释放, 使 CD28 能够共刺激

T 细胞,增强 T 细胞介导的抗癌效果,同时避免偏离靶点的毒性。

[0497]

