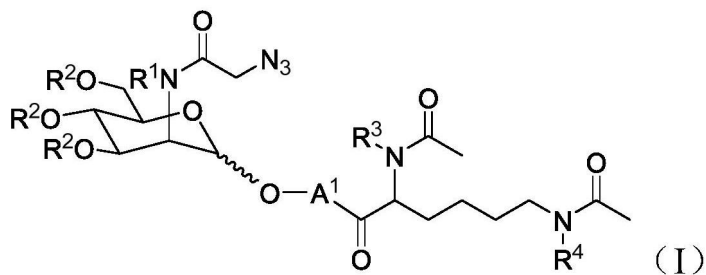




(45) 授权公告日 2022.05.13

权利要求书2页 说明书54页 附图17页

1. 由式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐:



其中:

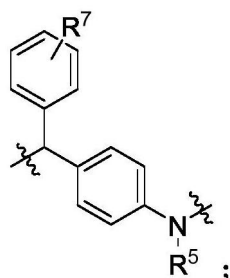
$R^1$  表示 H 或三 (( $C_1-C_6$ ) 烷基) 甲硅烷基;

$R^2$  在每次出现时独立地表示 H 或  $-C(=O)$  (( $C_1-C_6$ ) 烷基);

$R^3$  和  $R^4$  在每次出现时独立地表示 H、三 (( $C_1-C_6$ ) 烷基) 甲硅烷基或  $-C(=O)$  (( $C_1-C_6$ ) 烷基);

和

$A^1$  表示自我牺牲型连接基团:



其中

$R^5$  表示 H、三 (( $C_1-C_6$ ) 烷基) 甲硅烷基或  $-C(=O)$  (( $C_1-C_6$ ) 烷基);

$R^7$  表示 H、卤素、 $-C(=O)_2H$ 、( $C_1-C_6$ ) 烷氧基、二 (( $C_1-C_6$ ) 烷基) 氨基、 $-NO_2$ 、 $-O(CH_2CH_2O)_qCH_3$ ;

并且

$q$  是 1 或 2。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R^1$  表示 H。

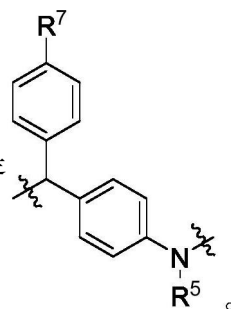
3. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R^2$  在每次出现时独立地表示 H 或  $-C(=O)CH_3$ 。

4. 根据权利要求 3 所述的化合物, 其中所有出现的  $R^2$  是相同的。

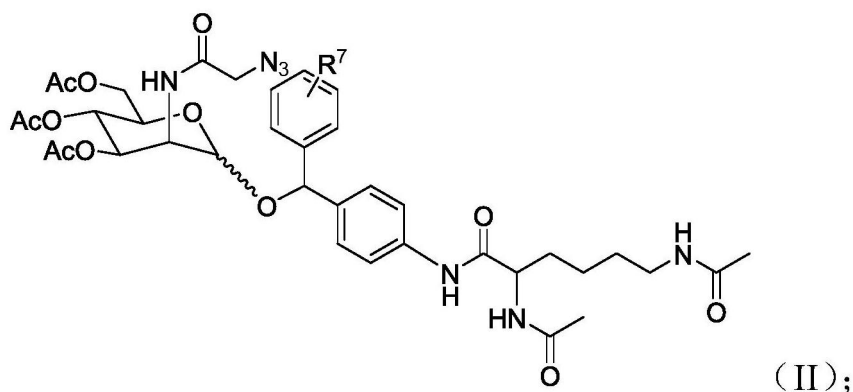
5. 根据权利要求 2 所述的化合物, 其中  $R^3$  和  $R^4$  是 H。

6. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R^7$  是 H。

7. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中所述自我牺牲型连接基团是

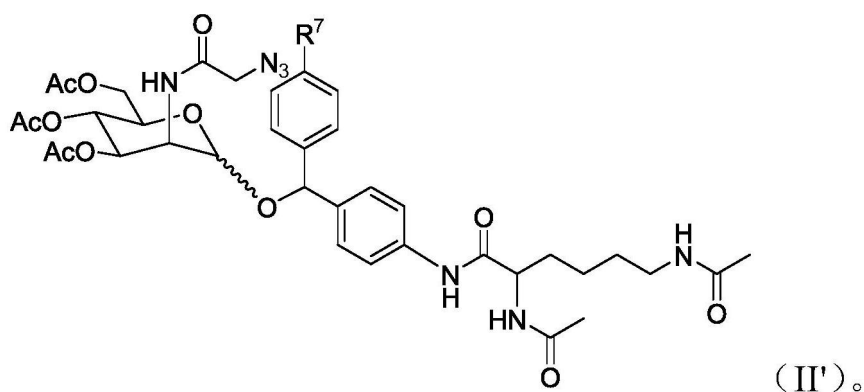


8. 根据权利要求 1 所述的化合物, 由式 (II) 表示, 或其药学上可接受的盐:



其中R<sup>7</sup>表示H、卤素、-C(O)<sub>2</sub>H、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 烷氧基、二((C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 烷基) 氨基、-NO<sub>2</sub>、-O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>q</sub>CH<sub>3</sub>; 并且  
q是1或2。

9. 根据权利要求8所述的化合物, 由式(II')表示, 或其药学上可接受的盐:



10. 根据权利要求8所述的化合物, 其中R<sup>7</sup>是H。

11. 一种药物组合物, 包含根据权利要求1到10中任一项所述的化合物和药学上可接受的赋形剂。

12. 根据权利要求1到10中任一项所述的化合物在制备用于在癌细胞的表面上表达叠氮基糖的药物中的用途, 其中所述癌细胞是乳腺癌细胞或结肠癌细胞。

13. 根据权利要求1到10中任一项所述的化合物在制备用于在哺乳动物的恶性组织中表达叠氮基糖的药物中的用途, 其中所述恶性组织是乳腺癌或结肠癌。

14. 根据权利要求1到10中任一项所述的化合物在制备用于医治癌症的药物中的用途, 其中所述癌症是乳腺癌或结肠癌。

15. 根据权利要求11的药物组合物, 其中所述药学上可接受的赋形剂是载剂。

## 用于癌症选择性标记和靶向的触发子可活化代谢糖前体

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2015年10月7日提交的美国临时专利申请第62/238,326号的优先权,所述申请以全文引用的方式并入本文中。

### 背景技术

[0003] 长久以来实行癌症靶向疗法以改善药物在癌中的积累并且使其不期望暴露于身体的其它部位最小化。关键的挑战在于癌组织中独特受体的鉴定和对应的靶向配体的研发。已经研发了若干类型的靶向配体,并且所述若干类型的靶向配体包括小分子、肽和适体。然而,其对应的受体很少是癌症特异性的,并且蛋白质受体和这些配体之间的结合亲和力相对低。迄今研发的最有前景的靶向配体是单克隆抗体(mAb)。此领域的进展已使得可以产生对细胞外/细胞表面蛋白质具有特异性的mAb,并且已经鉴定了若干癌症排它性的蛋白质。尽管在临床上是最成功的靶向配体,但是mAb具有多个缺点,如高生产成本、大尺寸、严重的免疫原性、受体饱和和差的实体肿瘤穿透。另外,研发的每种mAb仅对某些类型的癌症起良好的作用,因为被靶向的蛋白质受体随癌症的不同而不同。

[0004] 值得注意的是,在所有现有的有效靶向策略中的共同特点是细胞表面蛋白质被视为靶点。此选择是有意义的,因为蛋白质提供用于与靶向配体特异性结合的多个疏水性和带电荷的位点。然而,与细胞膜上的其它两种主要组分糖和脂质相比,细胞表面蛋白质的数量密度低得多。表面附挂糖代表有前景的靶点,并且已知在调节细胞识别和通信方面起重要作用。最近发现非天然糖(例如,四乙酰基N-叠氮乙酰基甘露糖胺(Ac<sub>4</sub>ManAz))可在细胞表面上代谢地表达。<sup>1-11</sup>然而,非天然糖的这些代谢标记过程不但在癌细胞中发生,也在正常细胞中发生,因此在使此代谢标记过程为癌细胞选择性或排它性的方面存在很大的挑战。

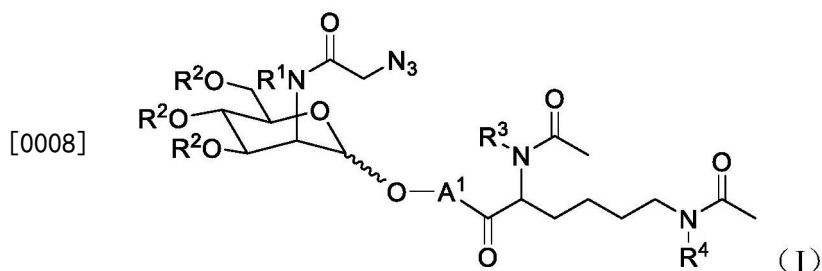
[0005] 因此,需要研发可在癌细胞的细胞表面上选择性地、代谢地表达的糖。还需要研发可利用选择性代谢标记过程的用于医治癌症的另外试剂和方法。

### 发明内容

[0006] 本发明的一个方面提供适用于在癌细胞的细胞表面上表达叠氮基糖(例如,叠氮基唾液酸;参见附图)的组合物和方法。因此,本发明的一方面是化合物或其药学上可接受的盐,所述化合物或其药学上可接受的盐包含任选地经取代的N-((叠氮基)酰基)-2-氨基-2-脱氧-D-吡喃甘露糖基部分、通过触发子裂解的触发子响应性部分和自我牺牲型连接基团,其中自我牺牲型连接基团共价键结到吡喃甘露糖基部分并且键结到触发子响应性部分。

[0007] 在某些方面,这类化合物由式(I)或其药学上可接受的盐表示:





[0009] 其中：

[0010]  $R^1$ 表示H或三(( $C_1-C_6$ )烷基)甲硅烷基；

[0011]  $R^2$ 在每次出现时独立地表示H或-C(O)(( $C_1-C_6$ )烷基)；

[0012]  $R^3$ 和 $R^4$ 在每次出现时独立地表示H、三(( $C_1-C_6$ )烷基)甲硅烷基或-C(O)(( $C_1-C_6$ )烷基)；

[0013]  $A^1$ 表示自我牺牲型连接基团；并且

[0014] m是1、2或3。

[0015] 在其它方面，本发明提供由式(III)表示的化合物或其药学上可接受的盐：

[0016] K-Pol-Pep- $A^2$ -D (III)；

[0017] 其中：

[0018] K表示任选地经取代的环炔基、杂环炔基或炔基部分；

[0019] Pol表示聚合部分；

[0020] Pep表示氨基酸或寡肽序列；

[0021]  $A^2$ 表示自我牺牲型连接基团；并且

[0022] D表示药效团；

[0023] 其中：

[0024] 聚合部分为聚烷二醇或聚亚烷基酰亚胺；并且

[0025] 氨基酸或寡肽序列包含酰胺键，所述酰胺键通过(i)相对于对应的健康细胞在恶性细胞中过度表达或(ii)在恶性细胞中表达而在对应的健康细胞中不表达的酶裂解。

[0026] 在其它方面，本发明提供包含本发明化合物(例如，式(I)或式(III)化合物)和药学上可接受的赋形剂或载剂的药物组合物。

[0027] 在其它方面，本发明涉及在哺乳动物的恶性组织中表达叠氮基糖(例如，叠氮基唾液酸)的方法，所述方法包含向具有恶性组织的哺乳动物施用有效量的化合物，所述化合物(例如，式(I)化合物)包含任选地经取代的N-((叠氮基)酰基)2-氨基-2-脱氧-D-吡喃甘露糖基部分、通过触发子裂解的触发子响应性部分和自我牺牲型连接基团。

[0028] 在其它方面，本发明涉及医治癌症的方法，所述方法包含向对其有需要的受试者施用有效量的化合物，所述化合物(例如，式(I)化合物)包含任选地经取代的N-((叠氮基)酰基)2-氨基-2-脱氧-D-吡喃甘露糖基部分、通过触发子裂解的触发子响应性部分和自我牺牲型连接基团。

[0029] 在其它方面，本发明涉及医治癌症的方法，所述方法包含向对其有需要的受试者施用有效量的式(III)化合物。

## 附图说明

[0030] 图1是描绘 $\text{Ac}_4\text{ManAz}$ 的代谢标记过程和 $\text{Ac}_3\text{ManAz}$ 衍生物的触发子活化标记过程的流程。P表示保护基团。

[0031] 图2由图区a-e组成。图区(a)示出包括 $\text{Ac}_3\text{ManAzEt}$ 和 $\text{Ac}_3\text{ManAzNB}$ 的 $\text{Ac}_3\text{ManAz}$ 衍生物的合成途径。图区(b)是描绘 $\text{Ac}_3\text{ManAzNB}$ 的UV照射活化的代谢标记和随后经由不含铜的点击化学(Click chemistry)通过DBC0-Cy5进行的叠氮基检测的流程。图区(c)含有在用 $50\mu\text{M}$   $\text{Ac}_4\text{ManAz}$ 、 $\text{Ac}_3\text{ManAzEt}$ 、 $\text{Ac}_3\text{ManAzNB-UV}$ 或 $\text{Ac}_3\text{ManAzNB+UV}$ 培育72小时并且随后进一步用 $50\mu\text{M}$  DBC0-Cy5培育1小时之后的LS174T结肠癌细胞的CLSM图像。施加强度为 $10\text{mW}/\text{cm}^2$ 的UV照射持续10分钟。细胞核用DAPI染色。比例尺表示 $10\mu\text{m}$ 。图区(d)是描绘对于不同组: $\text{Ac}_4\text{ManAz}$ 、 $\text{Ac}_3\text{ManAzEt}$ 、 $\text{Ac}_3\text{ManAzNB-UV}$ 、 $\text{Ac}_3\text{ManAzNB+UV}$ 和PBS的LS174T细胞的流式细胞术分析的图示。图区(e)是分别用 $50\mu\text{M}$   $\text{Ac}_4\text{ManAz}$ 、 $\text{Ac}_3\text{ManAzEt}$ 、 $\text{Ac}_3\text{ManAzNB-UV}$ 和 $\text{Ac}_3\text{ManAzNB+UV}$ 处理72小时的LS174T细胞的蛋白质印迹(western Blot)分析。

[0032] 图3由图区a-d组成,并且描绘 $\text{Ac}_4\text{ManAz}$ 、 $\text{Ac}_3\text{ManAzEt}$ 和 $\text{Ac}_3\text{ManAzNB}$ 的体内标记研究。图区(a)是体内标记研究的时间轴。每天一次将糖- $\text{N}_3$ 注射到左侧肿瘤持续三天,并且随后通过DBC0-Cy5检测。右侧肿瘤用PBS预处理作为对照组。图区(b)是描绘在静脉内注射DBC0-Cy5后48小时分别用 $\text{Ac}_4\text{ManAz}$ 、 $\text{Ac}_3\text{ManAzEt}$ 和 $\text{Ac}_3\text{ManAzNB}$ 预处理的小鼠的体内全身荧光成像的一系列图像。肿瘤由黄色箭头示出。图区(c)是描绘肿瘤和主要器官(1-肝、2-脾、3-心脏、4-肾、5-肾、6-肺、7-右侧肿瘤、8-左侧肿瘤)的离体荧光成像的一系列图像。图区(d)是示出来自不同组的肿瘤的荧光强度的量化的图示(R代表右侧肿瘤,并且L意指左侧肿瘤)。将荧光强度归一化为按比例调整的计数/s。数据以平均值 $\pm$ SEM( $n=3$ )形式呈现,并且通过单因素方差分析(费舍尔(Fisher); $0.01<*P\leq 0.05$ ;  $**P\leq 0.01$ ;  $***P\leq 0.001$ )进行分析。

[0033] 图4由三个图区组成。图区(a)描绘示出用于常规前药系统中的两种常规自我牺牲型连接基团(CL1和CL2)的使用的流程。图区(b)示出衍生自CL2的第一种提出的连接基团PL1。图区(c)示出从PL1修饰的第二种提出的连接基团(PL2)。附加苯环使裂解产物稳定,从而有助于降解过程。

[0034] 图5描绘用于受控细胞标记的触发子可活化 $\text{Ac}_3\text{ManAz}$ 衍生物( $\text{H}_2\text{O}_2$ 响应性 $\text{Ac}_3\text{ManAzBB}$ 、低氧响应性 $\text{Ac}_3\text{ManAzAB}$ 、NQ01响应性 $\text{Ac}_3\text{ManAzHQ}$ 和HDAC/CTSL响应性E-S)的库。

[0035] 图6描绘体外HDAC/CTSL响应性E-S介导的受控细胞标记。图区(a)示出E-S的HDAC/CTSL诱导降解的示意性说明。图区(b)是在分别用 $50\mu\text{M}$  E-S、 $50\mu\text{M}$  E-S+ $1\mu\text{M}$  TSA和 $50\mu\text{M}$  E-S+ $50\mu\text{M}$  Z-FY-CHO培育72小时并且用DBC0-Cy5( $50\mu\text{M}$ )标记1小时之后的LS174T结肠癌细胞和4T1乳腺癌细胞的一系列CLSM图像。细胞核用DAPI染色。比例尺表示 $10\mu\text{m}$ 。图区(c)含有在用 $50\mu\text{M}$  E-S或PBS培育72小时并且用DBC0-Cy5标记1小时之后的IMR-90人类成纤维细胞的CLSM图像。细胞核用DAPI染色。比例尺: $10\mu\text{m}$ 。图区(d)是示出在不同处理情况下LS174T细胞或IMR-90细胞的平均Cy5荧光强度的条形图。数据以平均值 $\pm$ SEM形式呈现,并且通过单因素方差分析(费舍尔; $0.01<*P\leq 0.05$ ;  $**P\leq 0.01$ ;  $***P\leq 0.001$ )进行分析。图区(e)是分别用E-S、E-S+TSA、E-S+Z-FY-CHO和PBS处理的LS174T细胞的蛋白质印迹分析。在凝胶上跑动之前在 $37^\circ\text{C}$ 下用DBC0-Cy5培育细胞裂解物持续1小时。使用ImageQuant LAS 4010系统可视化蛋白质带。图区(f)是示出LS174T细胞中的浓度依赖性E-S标记和时间依赖性E-S标记的

图示。细胞用各种浓度的E-S (10 $\mu$ M、50 $\mu$ M、200 $\mu$ M和1mM) 处理持续不同的时间(0小时、1小时、3小时、6小时、12小时、24小时、48小时和72h), 并且用DBC0-Cy5 (50 $\mu$ M) 标记2小时。

[0036] 图7是示出体内E-S介导的选择性肿瘤标记的一系列图像。图区(a) 示出体内标记研究的时间轴。每天一次静脉内注射E-S (60mg/kg) 或Ac<sub>4</sub>ManAz (40mg/kg) 或PBS持续三天。通过蛋白质印迹分析或通过监测静脉内注射的DBC0-Cy5 (10mg/kg) 的生物分布来分析叠氮基的代谢表达。图区(b) 含有从小鼠收集的组织的蛋白质印迹分析, 所述小鼠分别每天一次用E-S、Ac<sub>4</sub>ManAz和PBS处理持续三天。图区(c) 是示出在注射DBC0-Cy5之后24小时分别用E-S和PBS预处理的小鼠的离体全身荧光成像的图像。肿瘤由黄色箭头示出。图区(d) 是示出肿瘤和器官的荧光强度的量化的条形图。图区(e) 是分别在静脉内注射E-S (60mg/kg) 后8小时、12小时和24小时从无胸腺裸小鼠采集的肿瘤组织切片的CLSM图像。肿瘤组织切片用DBC0-Cy5标记30分钟。比例尺: 10 $\mu$ m。图区(f) 是示出在E-S注射后不同时间采集的肿瘤组织切片的归一化平均Cy5荧光强度的条形图。图区(g) 是示出来自用不同次数的E-S给药处理的小鼠的肿瘤组织切片的归一化Cy5荧光强度的条形图。所有的数字数据以平均值 $\pm$ SEM形式呈现, 并且通过单因素方差分析(费舍尔; 0.01<\*P $\leq$ 0.05; \*\*P $\leq$ 0.01; \*\*\*P $\leq$ 0.001) 进行分析。

[0037] 图8由图区a-f组成, 并且证实E-S介导的肿瘤标记改善DBC0-药物偶联物对LS174T原发性肿瘤模型的抗肿瘤功效。图区(a) 示出组织蛋白酶B响应性DBC0-Val-Cit-DOX0(D-D) 的结构。图区(b) 是示出来自急性抗肿瘤功效研究中的不同组的LS174T肿瘤的代表性TUNEL染色切片的一系列图像。比例尺: 50 $\mu$ m。图区(c) 是经由ImageJ示出TUNEL染色的量化的条形图。细胞凋亡指数测定为凋亡细胞数量(TUNEL) 与总细胞数量(DAPI) 的比率。每个肿瘤计数20个组织切片; n=4。图区(d) 是示出在长期功效研究的时程内每个组的平均肿瘤尺寸的图示。图区(e) 含有针对所有组的卡普兰-迈耶(Kaplan-Meier) 绘图。丧失小鼠是因为处理相关的死亡或非处理相关的死亡或在达到预定终点之后安乐死。图区(f) 含有每个组中无胸腺裸小鼠的存活分析。TTE: 到终点的时间。TGD: 肿瘤生长延迟; TGD=TTE(经处理的组)-TTE(PBS组)。%TGD=100% $\times$ TGD/TTE(PBS组)。所有的数字数据以平均值 $\pm$ SEM形式呈现, 并且通过单因素方差分析(费舍尔; 0.01<\*P $\leq$ 0.05; \*\*P $\leq$ 0.01; \*\*\*P $\leq$ 0.001) 进行分析。

[0038] 图9由图区a-g组成, 证实E-S介导的肿瘤标记表现出DBC0-药物偶联物对4T1转移性肿瘤模型的改善的抗肿瘤功效。图区(a) 示出功效研究的时间范围。通过静脉内注射荧光素酶改造的4T1乳腺癌细胞在Balb/c小鼠上建立4T1转移性肿瘤。每天一次静脉内注射E-S持续三天(第1天、第2天和第3天), 并且在第4天、第8天和第12天静脉内施用药物。图区(b) 分别描绘在第5天、第9天和第13天在不同处理情况下的Balb/c小鼠的生物发光成像。图区(c) 是示出在不同处理情况下的小鼠的综合生物发光强度随时间的改变的图示。图区(d) 是示出来自不同组肺组织上的平均肿瘤计数的图示。图区(e) 示出来自不同组的肺组织的代表性图片。图区(f) 是示出针对不同组的肿瘤表面积相对于总肺组织面积的百分比的条形图。图区(g) 含有骨髓和脾切片的代表性图像, 所述图像示出与游离Doxo相比, E-S+D-D组的显著降低的全身性毒性。所有的数字数据以平均值 $\pm$ SEM形式呈现(n=7-8), 并且通过单因素方差分析(费舍尔; 0.01<\*P $\leq$ 0.05; \*\*P $\leq$ 0.01; \*\*\*P $\leq$ 0.001) 进行分析。

[0039] 图10由图区a-d组成。图区示出(a) 在分别用50 $\mu$ M E-S、50 $\mu$ M E-S+1 $\mu$ M TSA和50 $\mu$ M E-S+50 $\mu$ M Z-FY-CHO培育72小时并且用DBC0-Cy5标记1小时之后的MDA-MB-231乳腺癌细胞

的CLSM图像。细胞核和细胞膜分别用DAPI和CellMask橙色质膜染色剂染色。比例尺:10 $\mu$ m。图区(b)是示出在分别用50 $\mu$ M E-S、50 $\mu$ M E-S+1 $\mu$ M TSA和50 $\mu$ M E-S+50 $\mu$ M Z-FY-CHO培育72小时并且用DBCO-Cy5标记1小时之后的MDA-MB-231细胞的平均Cy5荧光强度的条形图。图区(c)是示出在进行或不进行E-S预处理(72小时)情况下的MDA-MB-231乳腺癌细胞历经不同培育时间(30分钟、1小时和2小时)的D-D吸收量的条形图。所有的数字数据以平均值 $\pm$ SEM形式呈现,并且通过单因素方差分析(费舍尔; $0.01 < *P \leq 0.05$ ;  $**P \leq 0.01$ ;  $***P \leq 0.001$ )进行分析。

[0040] 图11由图区a-f组成,并且描绘在携带经皮下移植的MDA-MB-231肿瘤的无胸腺裸小鼠中E-S+D-D的长期抗肿瘤功效研究的结果。图区(a)描绘肿瘤缩减研究的时间范围。在第0天、第1天和第2天静脉内注射E-S(60mg/kg)。在第3天、第7天和第11天静脉内注射D-D(以等价于DOXO的形式:12mg/kg)。密切地监测小鼠的肿瘤尺寸、体重和食物摄入量。图区(b)以图示示出在长期功效研究的时程内每个组的平均MDA-MB-231肿瘤尺寸。数据以平均值 $\pm$ SEM形式呈现。通过单因素方差分析(费舍尔; $0.01 < *P \leq 0.05$ ;  $**P \leq 0.01$ ;  $***P \leq 0.001$ )进行显著性分析。图区(c)含有针对所有组的卡普兰-迈耶绘图。丧失小鼠是因为处理相关的死亡或非处理相关的死亡或在达到预定终点之后安乐死。图区(d)提供每个组中无胸腺裸小鼠的存活分析。TTE:到终点的时间。TGD:肿瘤生长延迟;TGD=TTE(经处理的组)-TTE(PBS组)。%TGD=100% $\times$ TGD/TTE(PBS组)。图区(e)是示出来自不同组的小鼠在功效研究的时程内的体重的图。当两个或更多个小鼠死亡或被处死时截断曲线。

## 具体实施方式

[0041] 长久以来实行癌症靶向疗法以改善药物在癌中的积累并且使其不期望暴露于身体的其它部位最小化。然而,现有癌症靶向技术对于治疗性应用并不令人满意。尽管大多数现有癌症靶向策略利用癌细胞表面蛋白质作为靶点,但是我们力图探究癌细胞表面糖作为治疗靶点,这部分是因为其较高的细胞表面密度。非天然糖的代谢糖工程过程提供将化学基团引入到细胞表面上的便捷方法,这使得能够深入研究以其它方式难以理解的细胞生物学问题,如细胞内化、细胞融合和细胞靶向。本文公开的是有助于癌细胞-表面糖的受控标记的化合物和方法,以及利用这类癌症靶向能力的另外的治疗性组合物和方法。

[0042] 本发明的原理证实可从结构角度控制叠氨基-糖的代谢标记能力。图1中示出Ac<sub>4</sub>ManAz的代谢标记过程。Ac<sub>4</sub>ManAz在进入细胞时被非特异性酯酶水解,随后进行6-OH磷酸化和开环异构化。磷酸烯醇丙酮酸(PEP)然后攻击新形成的羰基以形成唾液酸,所述唾液酸然后(1)失去磷酸酯基团、(2)偶联到蛋白质,并且最终(3)以糖蛋白的形式在细胞表面上表达。可预期的是,开环异构化步骤对于成功的代谢标记是至关重要的,并且在C1位点处的羟基(1-OH)的暴露对于成功的开环异构化是必需的。本发明人出人意料地发现通过形成将经受住细胞酯酶的糖苷键来修饰Ac<sub>4</sub>ManAz的C1位点阻止开环异构化步骤,从而阻断整个代谢标记过程。通过设计在某些触发子存在下可使1-OH暴露的触发子响应性糖苷(醚)键,可控制代谢标记过程。可通过使用响应于特定的癌症相关联的触发子的Ac<sub>3</sub>ManAz衍生物潜在地实现癌症选择性化学标记。示例性癌症相关联的触发子可包括氧化还原调节异常、升高的氧化剂水平和过度表达的酶。

[0043] 本发明化合物

[0044] 本发明的一方面涉及化合物或其药学上可接受的盐,所述化合物或其药学上可接受的盐包含:

[0045] 任选地经取代的N-((叠氮基)酰基)2-氨基-2-脱氧-D-吡喃甘露糖基部分;

[0046] 通过触发子裂解的触发子响应性部分;和

[0047] 自我牺牲型连接基团;

[0048] 其中

[0049] 自我牺牲型连接基团共价键结到吡喃甘露糖基部分并且键结到触发子响应性部分。

[0050] 在某些实施例中,相对于健康组织,在癌变组织中触发子被加强、过度表达或以其它方式增强。

[0051] 在某些实施例中,触发子是细胞过氧化物。

[0052] 在某些这类实施例中,触发子响应性部分包含硼酸基团、二烷基硼酸酯基团、二芳基硼酸酯基团、二(芳烷基)硼酸酯基团、硼杂环戊烷基团或二氧杂硼杂环戊烷基团。图5中示出示例性实施例。

[0053] 在某些这类实施例中,在通过细胞过氧化物裂解触发子响应性部分时,自我牺牲型连接基团拆解,从而释放任选地经取代的N-((叠氮基)酰基)2-氨基-2-脱氧-D-吡喃甘露糖苷。

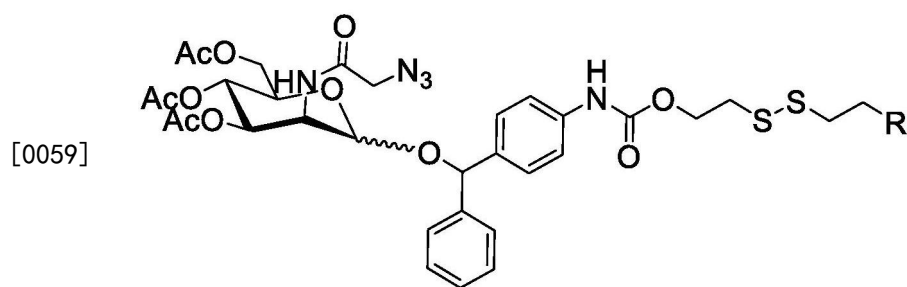
[0054] 在替代实施例中,触发子是低氧。

[0055] 在某些这类实施例中,触发子响应性部分包含2-硝基咪唑部分或偶氮基,如偶氮苯。图5中示出示例性实施例。

[0056] 在某些这类实施例中,在低氧条件下裂解触发子响应性部分时,自我牺牲型连接基团拆解,从而释放任选地经取代的N-((叠氮基)酰基)2-氨基-2-脱氧-D-吡喃甘露糖苷。

[0057] 在替代实施例中,触发子是含巯基或含硫醇酯的化合物,如谷胱甘肽。

[0058] 在某些这类实施例中,触发子响应性部分包含二硫键。以下示出示例性实施例:



[0060] 在某些这类实施例中,在通过含巯基或含硫醇酯的化合物裂解二硫键时,自我牺牲型连接基团拆解,从而释放任选地经取代的N-((叠氮基)酰基)2-氨基-2-脱氧-D-吡喃甘露糖苷。

[0061] 在替代实施例中,触发子是NAD(P)H脱氢酶(醌1)(NQO1)。

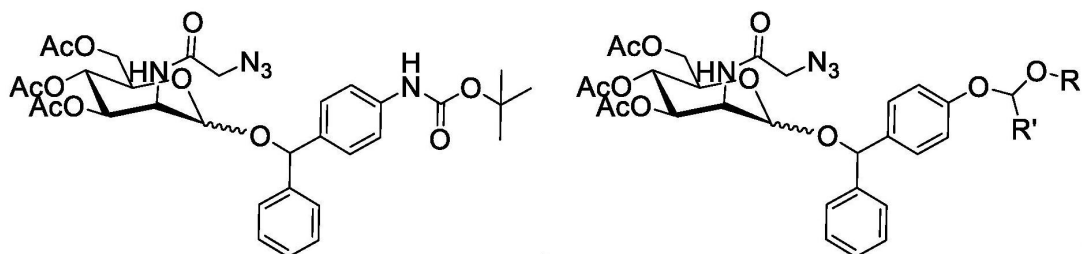
[0062] 在某些这类实施例中,触发子响应性部分包含与任选地经取代的丙酸或丙酰胺部分共价结合的任选地经取代的醌。图5中示出示例性实施例。

[0063] 在某些这类实施例中,在通过NAD(P)H脱氢酶(醌1)(NQO1)裂解与任选地经取代的丙酸或丙酰胺部分共价结合的任选地经取代的醌时,自我牺牲型连接基团拆解,从而释放任选地经取代的N-((叠氮基)酰基)2-氨基-2-脱氧-D-吡喃甘露糖苷。

[0064] 在某些实施例中,触发子是组织蛋白酶。

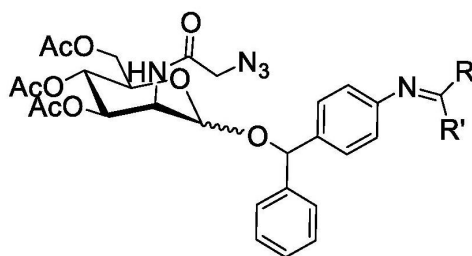
[0065] 在某些这类实施例中,触发子响应性部分是包含通过组织蛋白酶裂解的酰胺键的氨基酸或寡肽序列。

[0066] 在另外的实施例中,触发子响应性基团包含酸敏性部分,如亚胺、缩醛、缩酮或氨基甲酸酯。以下示出的实施例中描绘示例性触发子响应性基团:



和

[0067]



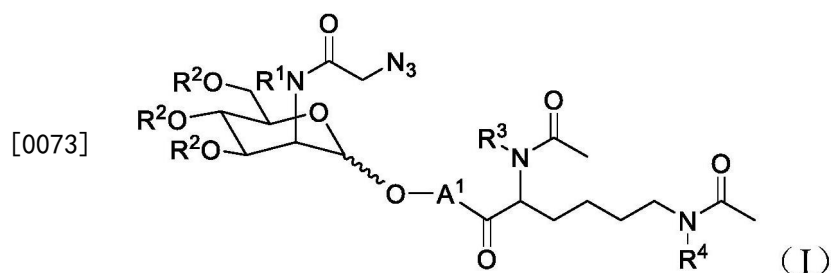
[0068] 在某些这类实施例中,包含酰胺键的氨基酸或寡肽序列包含Phe-Lys、Val-Lys、Ala-Lys、Val-Cit、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Arg (NO<sub>2</sub>)、Phe-Arg (Ts)。Cit表示瓜氨酸,并且Ts表示甲苯磺酸酯保护基团。

[0069] 在某些实施例中,氨基酸或寡肽序列是经取代的赖氨酸酰胺。

[0070] 在某些这类实施例中,在通过组织蛋白酶裂解酰胺键时,自我牺牲型连接基团拆解,从而释放任选地经取代的N-((叠氮基)酰基)-2-氨基-2-脱氧-D-吡喃甘露糖苷。

[0071] 在某些实施例中,组织蛋白酶是组织蛋白酶L。

[0072] 在某些实施例中,化合物由式(I)或其药学上可接受的盐表示:



[0074] 其中:

[0075] R<sup>1</sup>表示H或三((C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基)甲硅烷基;

[0076] R<sup>2</sup>在每次出现时独立地表示H或-C(=O)((C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基);

[0077] R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>在每次出现时独立地表示H、三((C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基)甲硅烷基或-C(=O)((C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基);

[0078] A<sup>1</sup>表示自我牺牲型连接基团;并且

[0079] m是1、2或3。

[0080] 在某些实施例中,R<sup>1</sup>表示H。

[0081] 在某些实施例中,  $R^2$  在每次出现时独立地表示 H 或  $-C(O)CH_3$ 。

[0082] 在某些实施例中, 所有出现的  $R^2$  是相同的。

[0083] 在某些实施例中,  $R^3$  和  $R^4$  是 H。

[0084] 在某些实施例中,  $m$  是 1。

[0085] 本发明化合物包括间隔吡喃甘露糖基部分和触发子响应性部分并且将吡喃甘露糖基部分和触发子响应性部分共价连接在一起的自我牺牲型连接基团。自我牺牲型连接基团是能够将两个间隔开的化学部分(即, 吡喃甘露糖基部分和触发子响应性部分)共价连接在一起成为通常稳定的三联分子的双官能化学部分。自我牺牲型连接基团使得能够通过触发子诱导的裂解(例如, 酶促裂解)从三联分子释放间隔开的化学部分中的一个; 并且这类裂解可自发地从分子的其余部分裂解以释放间隔开的化学部分中的另一个来。

[0086] 在某些实施例中:

[0087]  $A^1$  表示基团  $-X^1-Y^1-$ ;

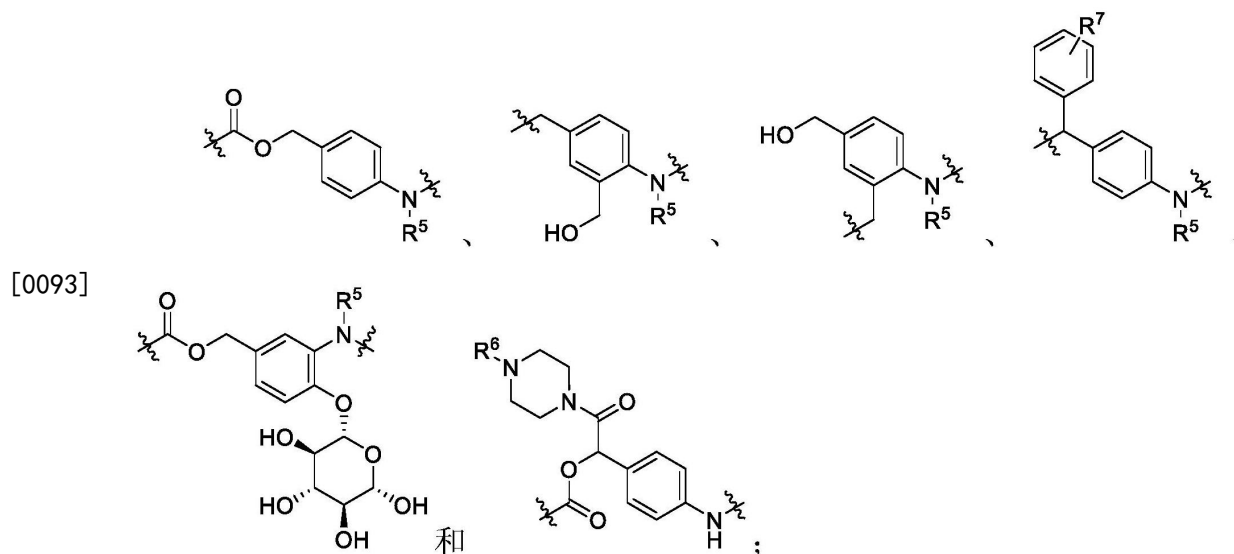
[0088]  $X^1$  表示键或  $-C(O)_2-$ ;

[0089]  $Y^1$  表示键或任选地经取代的  $-(C_1)$  亚烷基-亚芳基-或  $-(C_1)$  亚烷基-亚杂芳基-; 并且

[0090]  $X^1$  和  $Y^1$  不都表示键。

[0091] 在某些这类实施例中,  $Y^1$  表示任选地经取代的  $-(C_1)$  亚烷基-亚芳基-。

[0092] 在某些这类实施例中, 自我牺牲型连接基团选自以下组成的组:



[0094] 其中

[0095]  $R^5$  表示 H、三  $((C_1-C_6)$  烷基) 甲硅烷基或  $-C(O)((C_1-C_6)$  烷基);

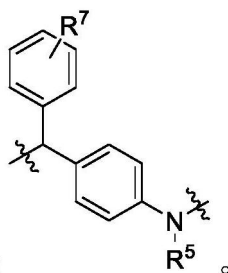
[0096]  $R^6$  表示 H、 $(C_1-C_6)$  烷基或杂环烷基;

[0097]  $R^7$  表示 H、卤素、 $-C(O)_2H$ 、 $(C_1-C_6)$  烷氧基、二  $((C_1-C_6)$  烷基) 氨基、 $-NO_2$ 、 $-O(CH_2CH_2O)_qCH_3$ ; 并且

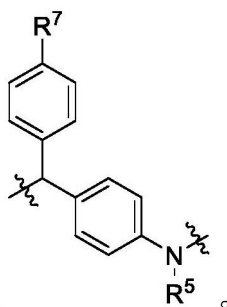
[0098]  $q$  是 1 或 2。

[0099] 在某些这类实施例中,  $R^7$  是 H。

[0100] 在某些实施例中,自我牺牲型连接基团是

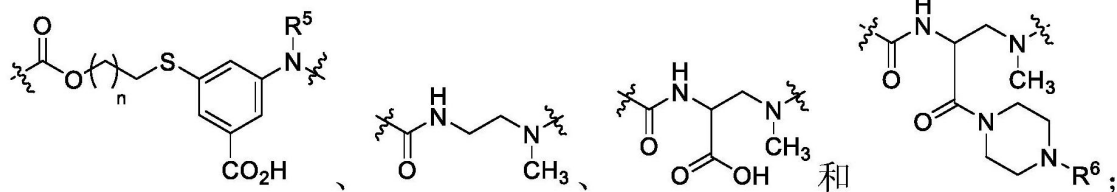
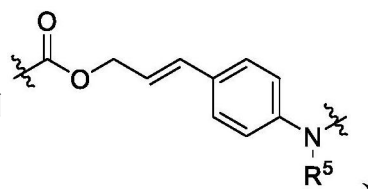


[0101] 在某些这类实施例中,自我牺牲型连接基团是



[0102] 在另外的这类实施例中, $R^7$ 是H。

[0103] 在替代实施例中,自我牺牲型连接基团选自



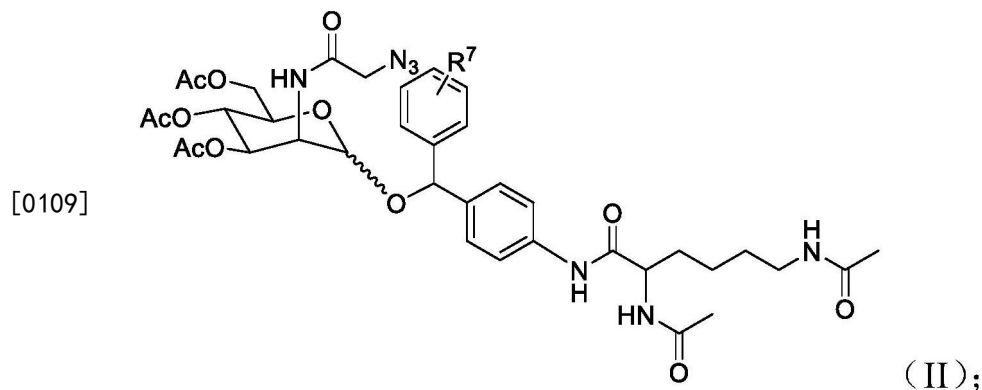
[0104] 其中

[0105]  $R^5$ 表示H、三(( $C_1-C_6$ )烷基)甲硅烷基或-C(0)(( $C_1-C_6$ )烷基)

[0106]  $R^6$ 表示H、( $C_1-C_6$ )烷基或杂环烷基;并且

[0107] n是1或2。

[0108] 在某些实施例中,用于在癌细胞的细胞表面上表达叠氮基糖(例如,叠氮基唾液酸)的化合物由式(II)或其药学上可接受的盐表示:



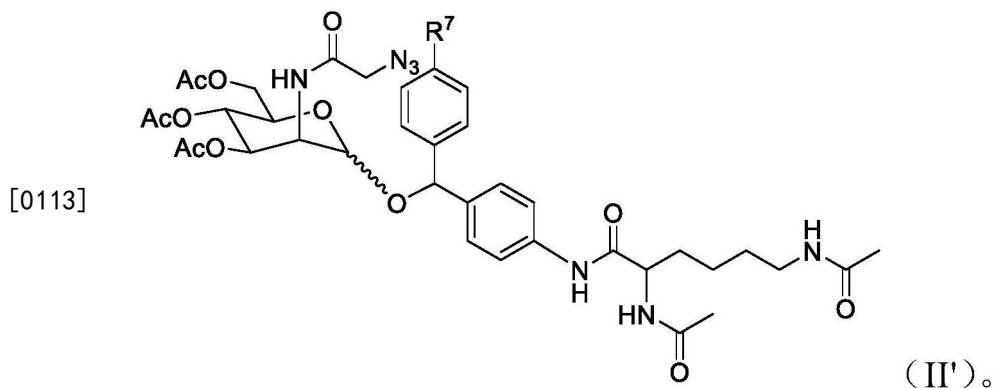
[0110] 其中 $R^7$ 表示H、卤素、-C(0)<sub>2</sub>H、( $C_1-C_6$ )烷氧基、二(( $C_1-C_6$ )烷基)氨基、-NO<sub>2</sub>、-O



$(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_q\text{CH}_3$ ; 并且

[0111]  $q$  是 1 或 2。

[0112] 在另外的实施例中, 化合物由式 (II') 或其药学上可接受的盐表示:



[0114] 在另外的这类实施例中,  $R^7$  是 H。

[0115] 在其它方面, 本发明涉及可将治疗剂选择性地递送到在其细胞表面上表达叠氮基糖 (例如, 叠氮基唾液酸) 的细胞的化合物。因此, 在某些实施例中, 本发明涉及式 (III) 化合物:

[0116]  $\text{K-Pol-Pep-A}^2\text{-D}$  (III);

[0117] 其中:

[0118] K 表示任选地经取代的环炔基、杂环炔基或炔基部分;

[0119] Pol 表示聚合部分;

[0120] Pep 表示氨基酸或寡肽序列;

[0121]  $A^2$  表示自我牺牲型连接基团; 并且

[0122] D 表示药效团;

[0123] 其中:

[0124] 聚合部分是聚乙二醇或聚亚烷基酰亚胺; 并且

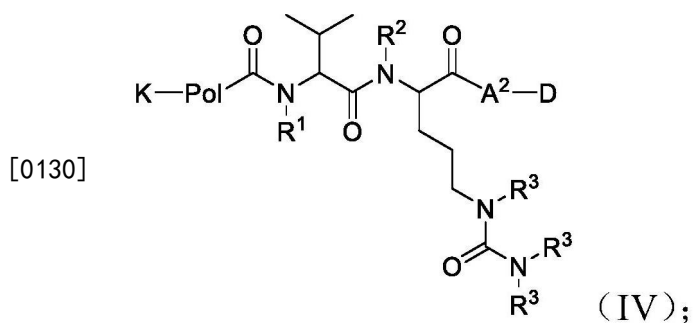
[0125] 氨基酸或寡肽序列包含酰胺键, 所述酰胺键通过 (i) 相对于对应的健康细胞在恶性细胞中过度表达或 (ii) 在恶性细胞中表达而在对应的健康细胞中不表达的酶裂解。

[0126] 在某些实施例中, 在通过酶裂解酰胺键时, 自我牺牲型连接基团拆解, 从而释放药效团。

[0127] 在某些实施例中, 酶是组织蛋白酶。举例来说, 酶可是组织蛋白酶 B。

[0128] 在某些实施例中, Pep 表示任选地经取代的 Val-Cit。

[0129] 在某些实施例中, 式 (III) 化合物由式 (IV) 表示:



[0131] 其中：

[0132]  $R^1$ 、 $R^2$ 和 $R^3$ 在每次出现时独立地表示H、三(( $C_1$ - $C_6$ )烷基)甲硅烷基或-C(O)(( $C_1$ - $C_6$ )烷基)。

[0133] 在某些实施例中, $R^1$ 、 $R^2$ 和 $R^3$ 是H。

[0134] 在某些实施例中,K包含任选地经取代的杂环炔基或环炔基。在某些实施例中,K包含任选地经取代的二苯并环辛炔部分。

[0135] 在某些实施例中,Po1表示聚乙二醇或聚丙二醇部分。

[0136] 在某些实施例中,Po1表示10到30个重复单元的聚乙二醇或聚丙二醇。

[0137] 在某些实施例中,Po1表示10到30个重复单元的聚乙二醇,或15到25个重复单元的聚乙二醇。

[0138] 在某些实施例中,

[0139]  $A^2$ 表示基团- $Y^2$ - $X^2$ -;

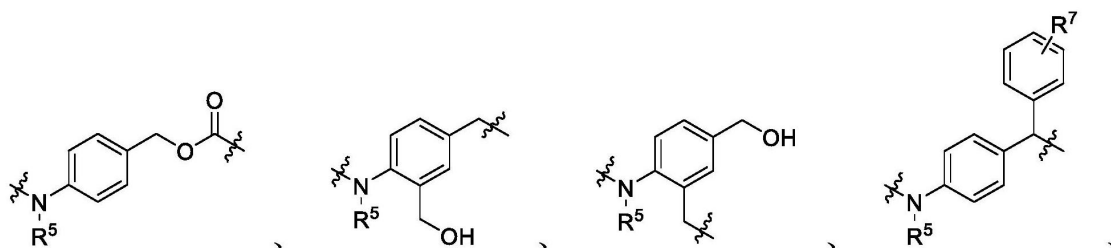
[0140]  $X^2$ 表示键或-C(O)<sub>2</sub>-;

[0141]  $Y^2$ 表示键或任选地经取代的-亚芳基-(( $C_1$ )亚烷基)-或-亚杂芳基-(( $C_1$ )亚烷基)-;并且

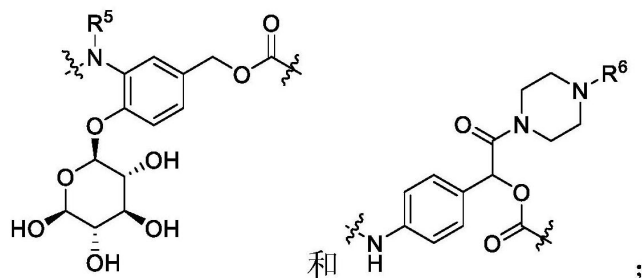
[0142]  $X^2$ 和 $Y^2$ 不都表示键。

[0143] 在某些实施例中, $Y^2$ 表示任选地经取代的-亚芳基-(( $C_1$ )亚烷基)-。

[0144] 在某些这类实施例中,自我牺牲型连接基团选自以下组成的组:



[0145]



[0146] 其中

[0147]  $R^5$ 表示H、三(( $C_1$ - $C_6$ )烷基)甲硅烷基或-C(O)(( $C_1$ - $C_6$ )烷基);

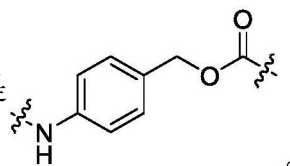
[0148]  $R^6$ 表示H、( $C_1$ - $C_6$ )烷基或杂环烷基;

[0149]  $R^7$ 表示H、卤素、-C(O)<sub>2</sub>H、( $C_1$ - $C_6$ )烷氧基、二(( $C_1$ - $C_6$ )烷基)氨基、-NO<sub>2</sub>、-O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>q</sub>CH<sub>3</sub>;并且

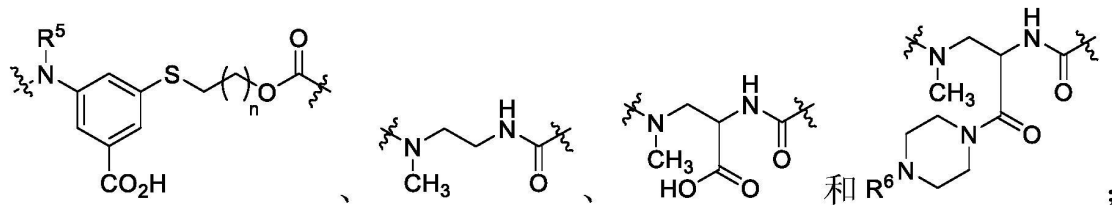
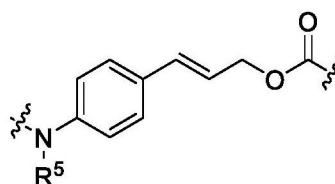
[0150] q是1或2。

[0151] 在某些这类实施例中, $R^7$ 是H

[0152] 在某些实施例中,自我牺牲型连接基团是



[0153] 在替代实施例中,自我牺牲型连接基团选自



[0154] 其中 $R^5$ 表示H、三(( $C_1-C_6$ )烷基)甲硅烷基或- $C(O)((C_1-C_6)$ 烷基)

[0155]  $R^6$ 表示H、( $C_1-C_6$ )烷基或杂环烷基;并且

[0156]  $n$ 是1或2。

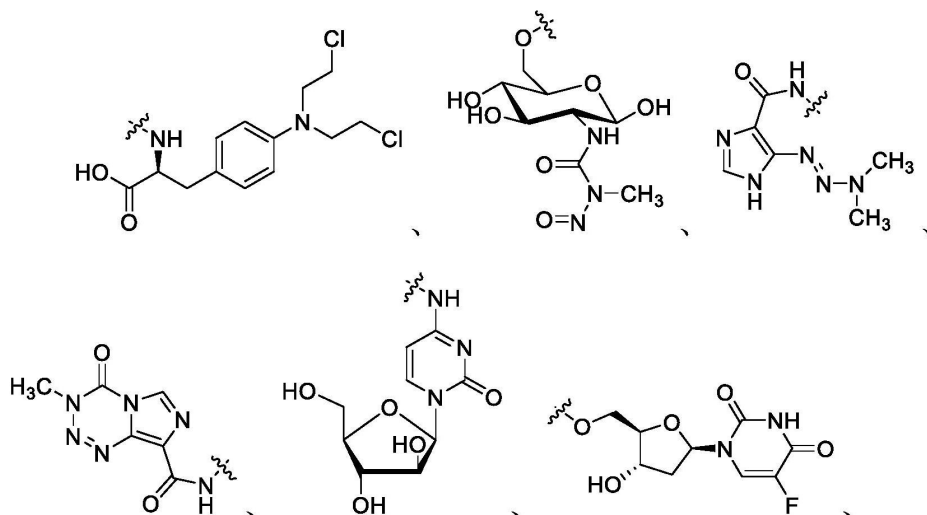
[0157] 在某些实施例中,式(III)或式(IV)化合物的药效团是镇痉剂、麻醉剂、消炎剂(如非类固醇消炎(NSAID)剂)、抗癌治疗剂、钙通道阻滞剂、抗生素剂、免疫抑制剂、抗病毒剂、抗增殖剂、抗微生物剂、神经生长诱导剂或平滑肌松弛剂。

[0158] 在某些实施例中,药效团是抗癌治疗剂。

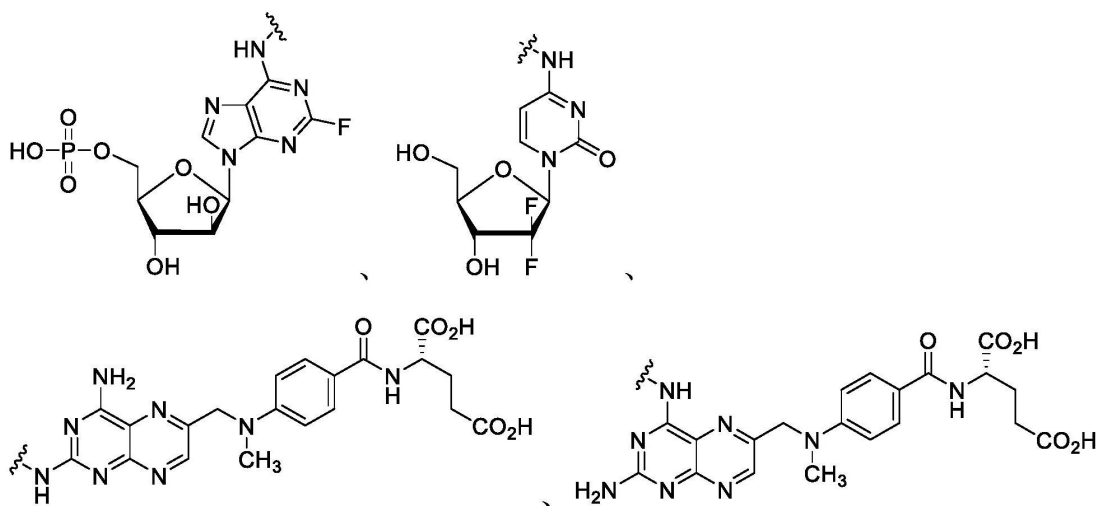
[0159] 在某些实施例中,抗癌治疗剂是放线菌素-D、六甲蜜胺、氨鲁米特、安吡啶、阿那曲唑、天冬酰胺酶、布拉地新A(belactosin A)、比卡鲁胺、博来霉素、硼替佐米、布舍瑞林、白消安、喜树碱、卡培他滨、卡铂、卡非唑米、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、氯奎、顺铂、克拉屈滨、氯屈膦酸盐、秋水仙碱、环磷酰胺、环丙孕酮、阿糖胞苷、达卡巴嗪、更生霉素、柔红霉素、去甲氧基甲绿胶霉素、地塞米松、二氯乙酸酯、双烯雌酚、己烯雌酚、多西他赛、阿霉素、表阿霉素、埃普霉素、雌二醇、雌莫司汀、依托泊苷、依维莫司、依西美坦、非鲁米特B(fellutamide B)、非格司亭、氟达拉滨、氟氢可的松、5-氟尿嘧啶、氟尿苷、氟羟甲睾酮、氟他胺、吉西他滨、染料木黄酮、戈舍瑞林、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊马替尼、干扰素、伊立替康、伊沙匹隆、来那度胺、来曲唑、甲酰四氢叶酸、亮丙瑞林、左旋咪唑、洛莫司汀、氯尼达明、马瑞佐米、氮芥、甲羟孕酮、甲地孕酮、美法仑、巯嘌呤、美司钠、二甲双胍、甲氨蝶呤、甲基泼尼松龙、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、单甲基奥瑞他汀、尼鲁米特、诺考达唑、奥曲肽、奥姆蔡得(omuralide)、奥沙利铂、紫杉醇、帕米膦酸盐、培美曲塞、喷司他汀、哌立福新、普卡霉素、泊马度胺、吡吩姆、泼尼松、甲基苄肼、雷替曲赛、利妥昔单抗、索拉非尼、链脲霉素、舒尼替尼、苏拉明、他莫西芬、替莫唑胺、坦罗莫司、替尼泊苷、睾酮、沙利度胺、硫鸟嘌呤、噻替派、二氯化二茂钛、拓扑替康、曲妥珠单抗、维甲酸、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨、MG-132、PSI、CEP-18770、MLN-2238、MLN-9708、NC-005、YU-101、LU-005、YU-102、NC-001、LU-001、NC-022、PR-957(LMP7)、CPSI( $\beta 5$ )、10LMP2-sp-ek、BODIPY-NC-001、叠氮基-NC-002、ONX-0912、PS-519、125I-NIP-L3VS、NC-005-VS或MV151。

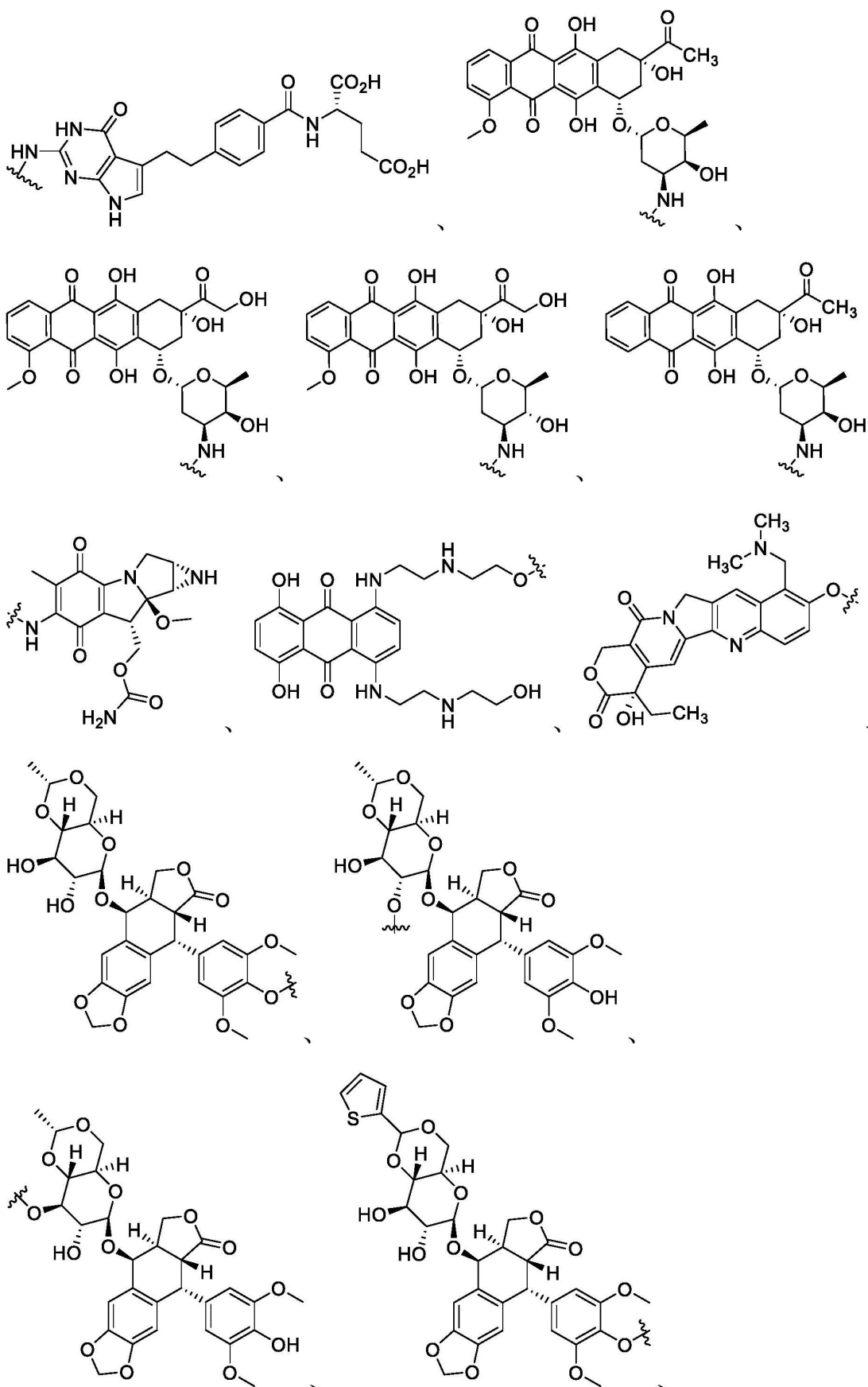
[0160] 在某些实施例中,抗癌治疗剂是阿霉素。

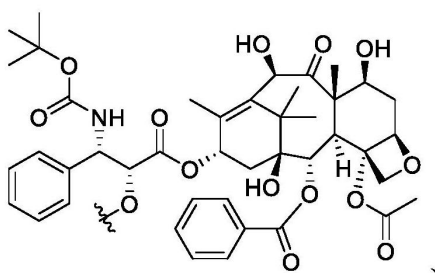
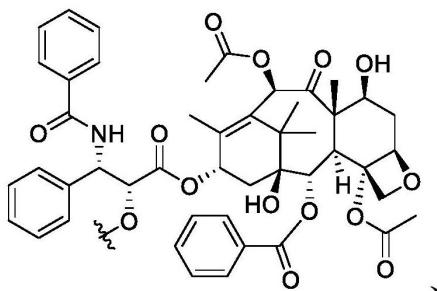
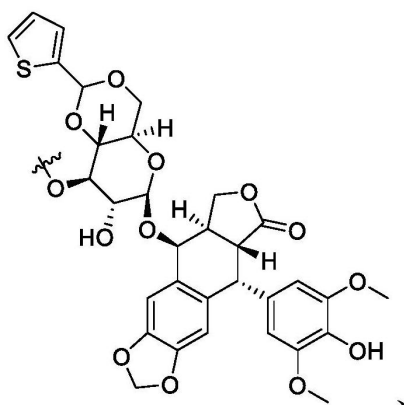
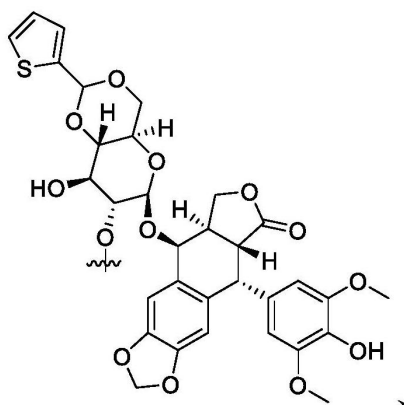
[0161] 在式 (III) 或式 (IV) 化合物的某些实施例中, D 表示选自以下组成的组的药效团:



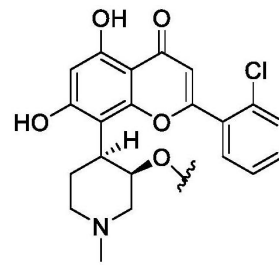
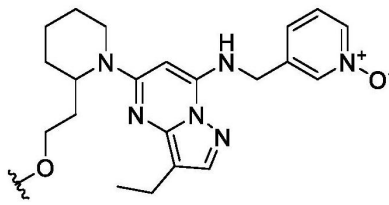
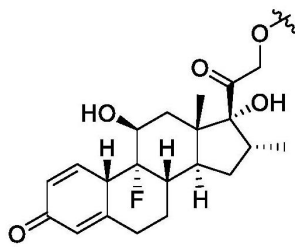
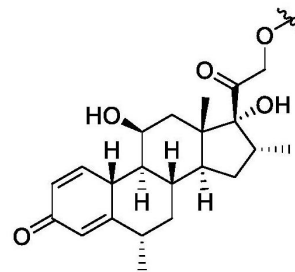
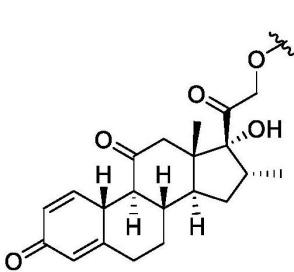
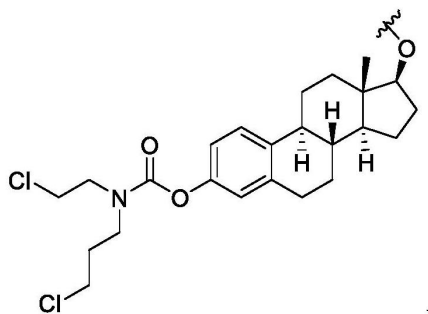
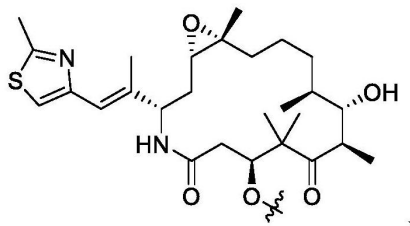
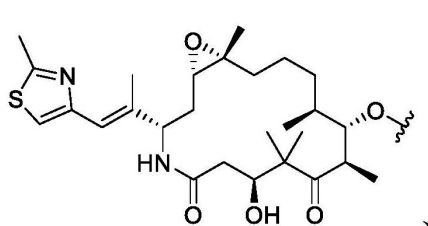
[0162]



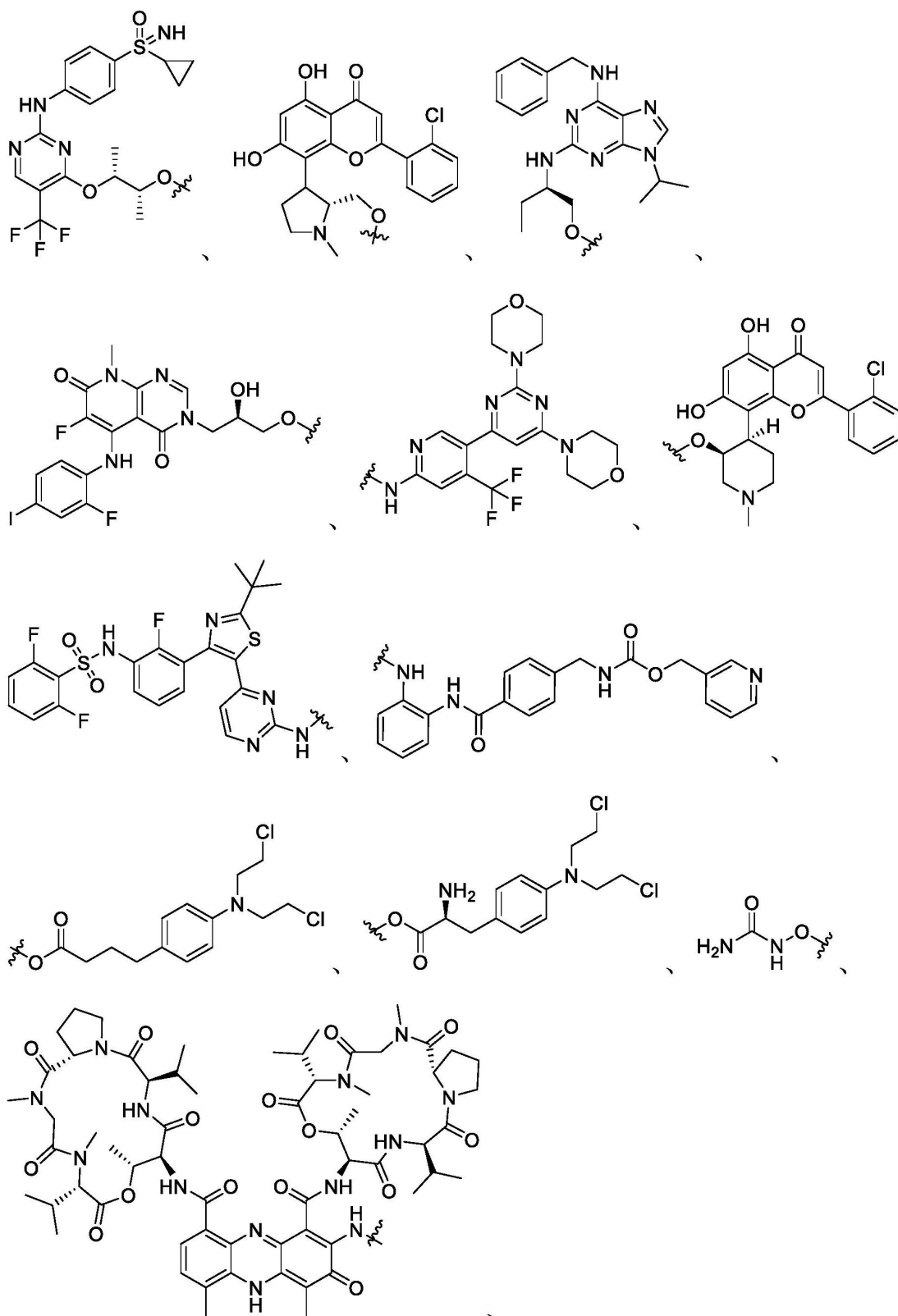


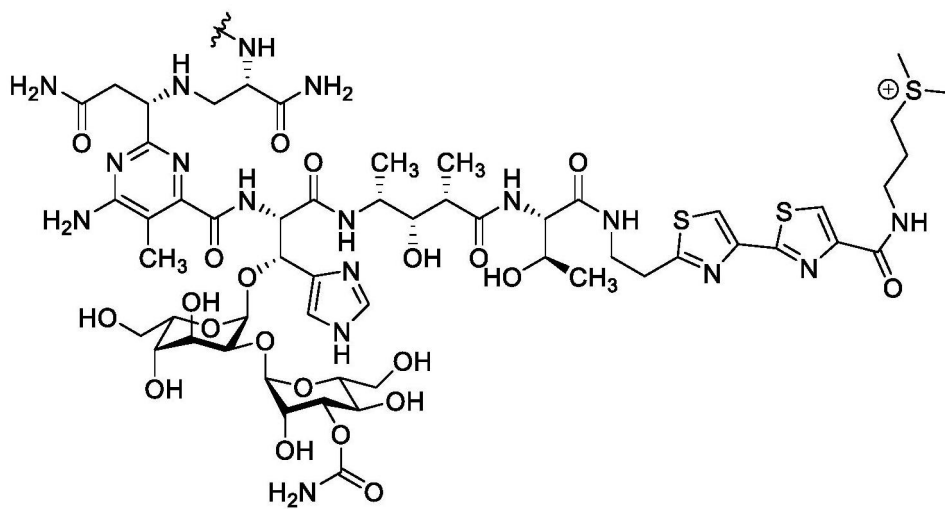


[0164]

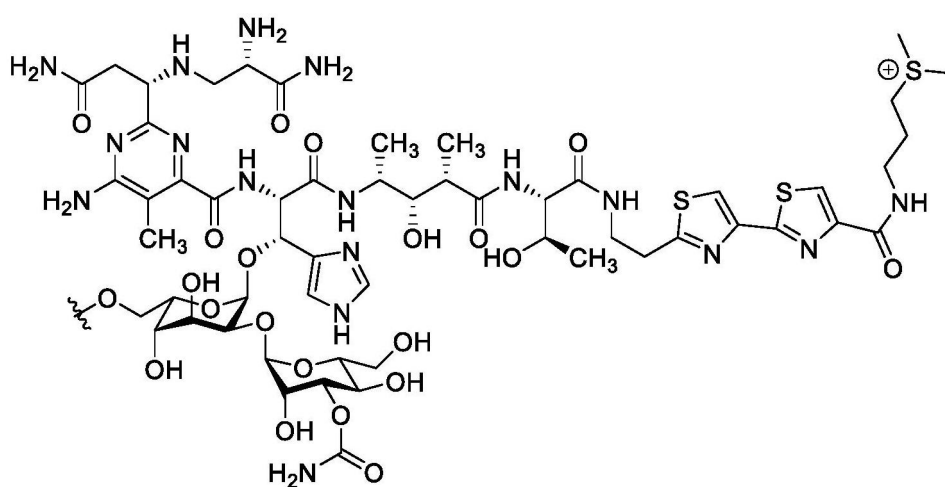


[0165]

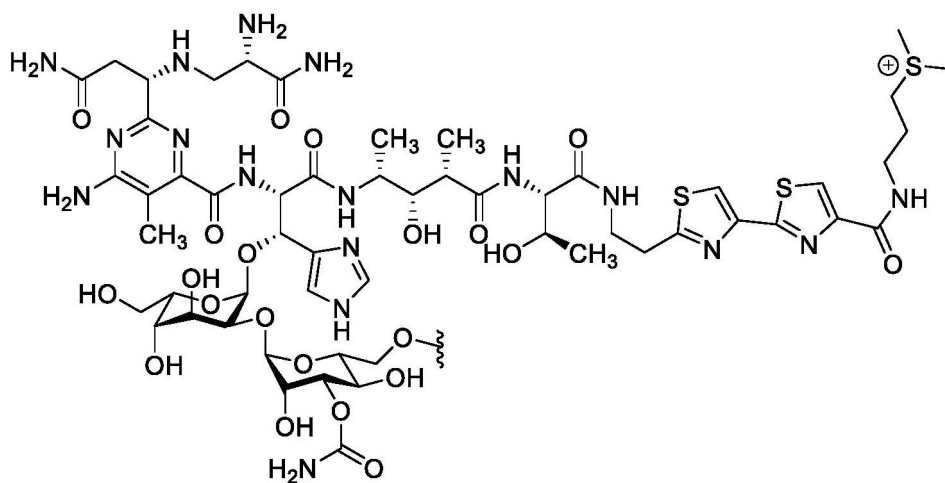




[0166]

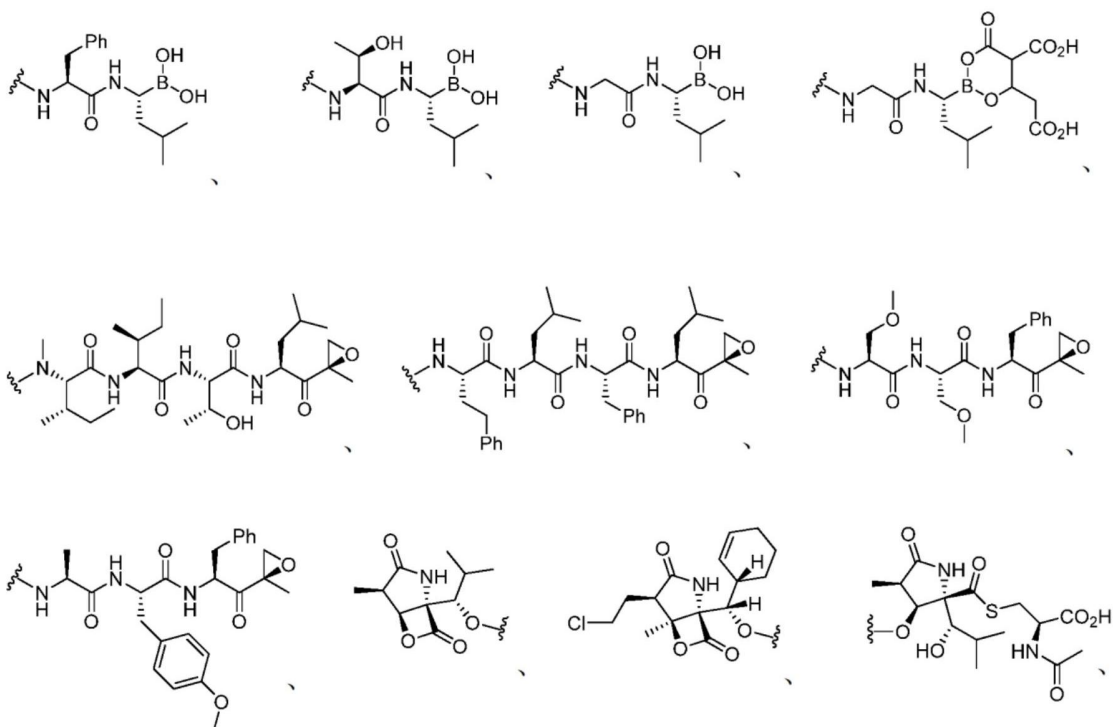


和

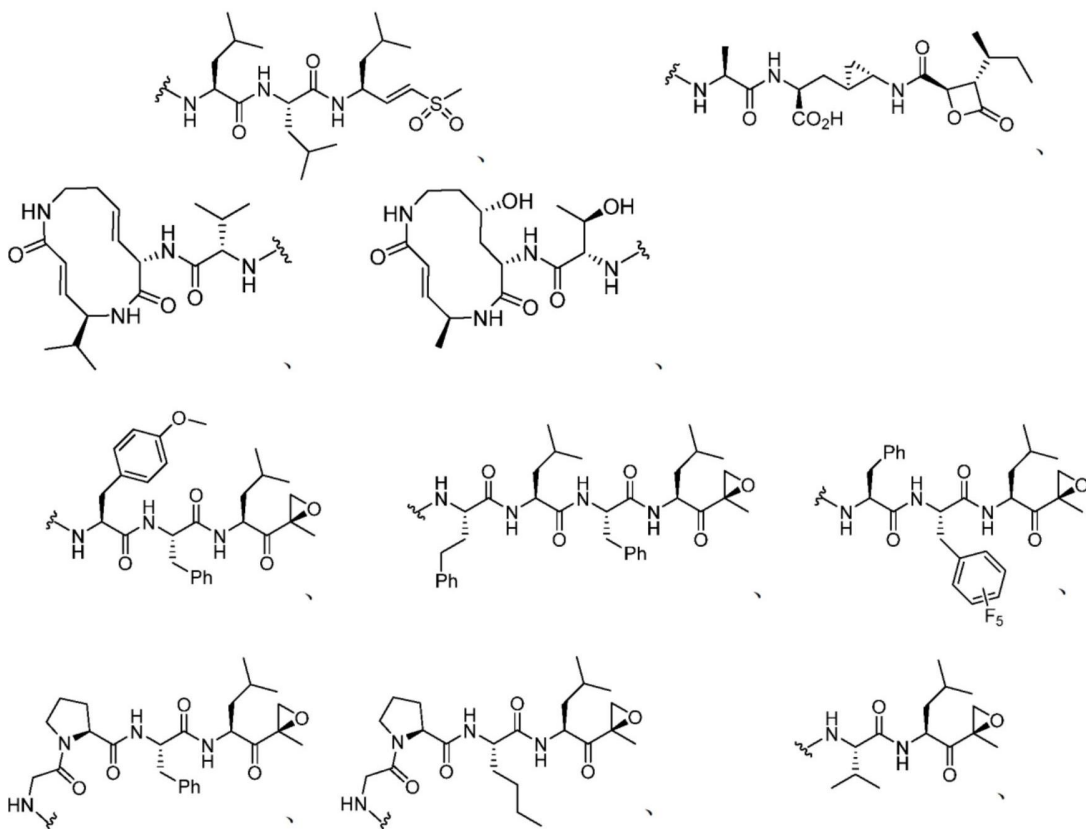


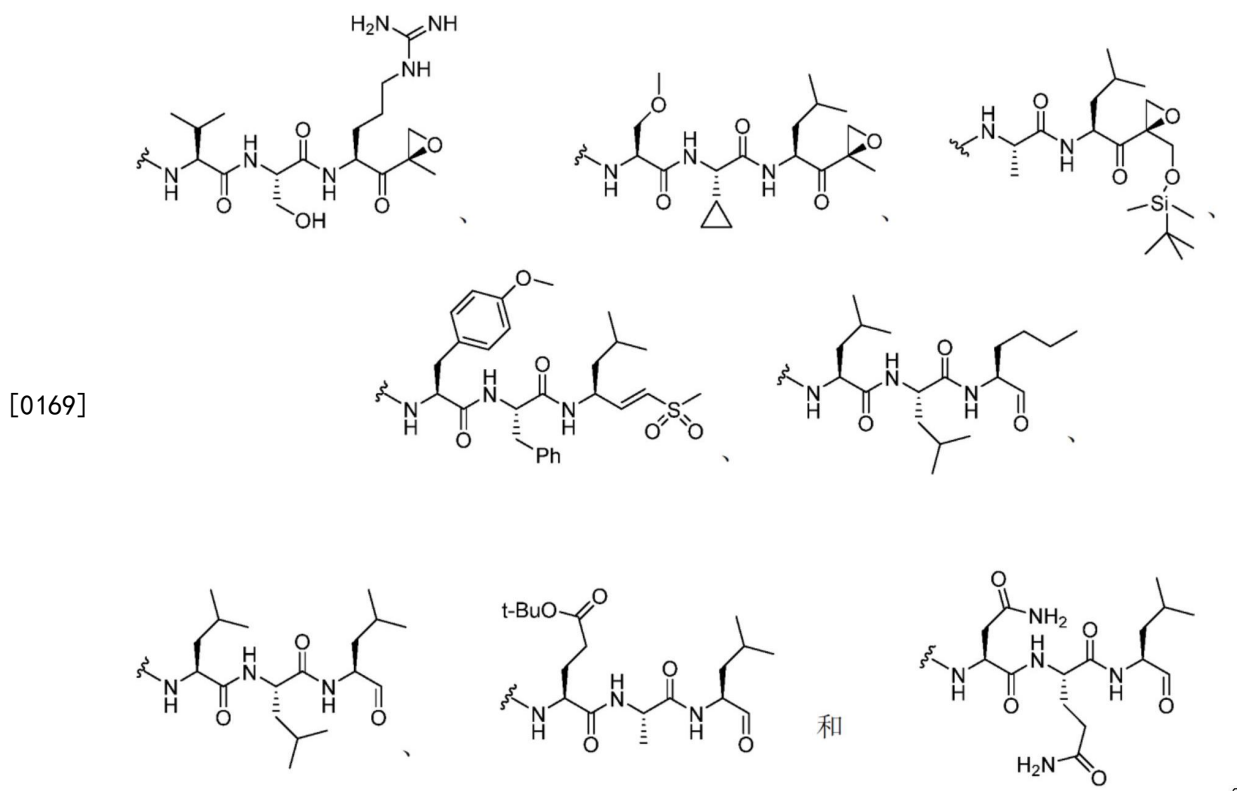
[0167] 在替代实施例中,D表示选自以下组成的组的药效团:



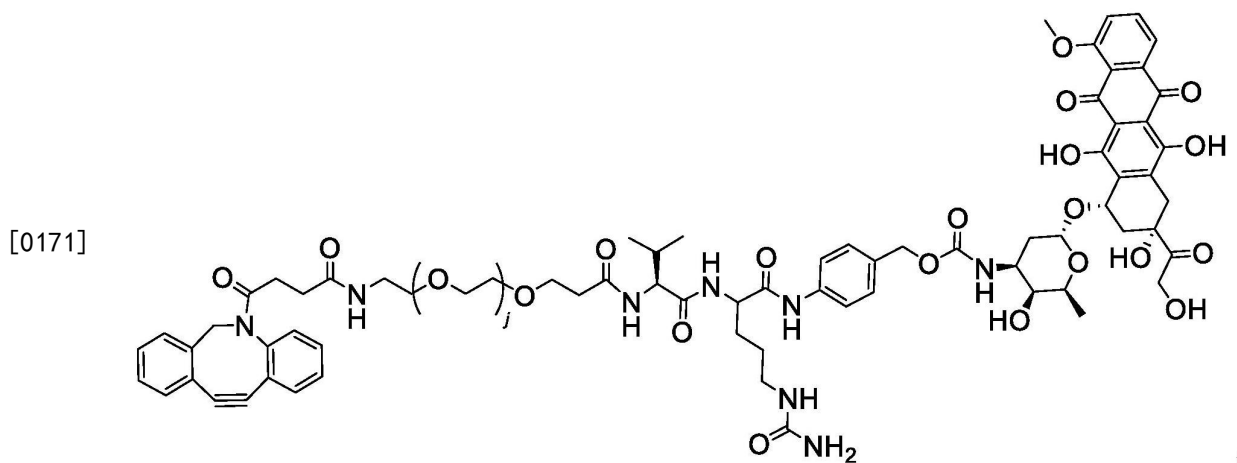


[0168]





[0170] 在某些实施例中,式(III)化合物由以下表示:



[0172] 其中j是10到30的整数。

[0173] 在某些方面,本发明涉及包含本发明化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载剂的药物组合物。下文详细描述药学上可接受的载剂。

[0174] 医治方法

[0175] 在某些方面,本发明涉及在癌细胞的表面上表达叠氮基糖(例如,叠氮基唾液酸;参见附图)的方法,所述方法包含:

[0176] 使癌细胞与化合物接触;

[0177] 其中化合物在本文中进行描述,并且包含任选地经取代的N-((叠氮基)酰基)-2-氨基-2-脱氧-D-吡喃甘露糖基部分;通过触发子裂解的触发子响应性部分;和自我牺牲型连接基团;其中自我牺牲型连接基团共价键结到吡喃甘露糖基部分并且键结到触发子响应性部分;

[0178] 从而在癌细胞的表面上表达叠氮基糖。

[0179] 在某些方面,在癌细胞的表面上表达叠氮基糖的方法,包含使癌细胞与式(I)化合物接触;从而在癌细胞的表面上表达叠氮基糖。

[0180] 在某些方面,本发明提供医治癌症的方法,所述方法包含向对其有需要的受试者施用治疗有效量的如本文所述的化合物,其中化合物包含任选地经取代的N-((叠氮基)酰基)2-氨基-2-脱氧-D-吡喃甘露糖基部分;通过触发子裂解的触发子响应性部分;和自我牺牲型连接基团;其中自我牺牲型连接基团共价键结到吡喃甘露糖基部分并且键结到触发子响应性部分。

[0181] 在某些实施例中,医治癌症的这类方法进一步包含向受试者施用治疗有效量的式(III)化合物。

[0182] 在某些方面,本发明提供医治癌症的方法,所述方法包含向对其有需要的受试者施用治疗有效量的式(III)化合物。

[0183] 在某些实施例中,癌症选自急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、急性骨髓白血病(AML)、肾上腺皮质癌、AIDS相关的癌症(卡波西肉瘤和淋巴瘤)、肛门癌、阑尾癌、非典型畸胎样/横纹肌样肿瘤、基底细胞癌、胆管癌(包括肝外的)、膀胱癌、骨癌(包括骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤)、脑肿瘤(如星形细胞瘤、脑和脊髓肿瘤、脑干神经胶质瘤、中枢神经系统非典型畸胎样/横纹肌样肿瘤、中枢神经系统胚胎肿瘤、颅咽管瘤、室管膜母细胞瘤、室管膜瘤、成神经管细胞瘤、髓上皮瘤、中间分化型松果体实质性肿瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤和成松果体细胞瘤)、乳腺癌、支气管肿瘤、伯基特淋巴瘤、基底细胞癌、胆管癌(包括肝外的)、膀胱癌、骨癌(包括骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤)、类癌瘤、未知原发性中枢神经系统癌(如非典型畸胎样/横纹肌样肿瘤、胚胎肿瘤和淋巴瘤)、宫颈癌、儿童期癌症、脊索瘤、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、慢性骨髓增生性病症、结肠癌、结肠直肠癌、颅咽管瘤、皮肤T细胞淋巴瘤(蕈样真菌病和塞扎莱(Sézary)综合征)、胆管(肝外的)、乳腺管原位癌(DCIS)、胚胎肿瘤(中枢神经系统)、子宫内膜癌、室管膜母细胞瘤、室管膜瘤、食道癌、鼻腔神经胶质瘤、尤文氏肉瘤肿瘤族、颅外生殖细胞肿瘤、性腺外生殖细胞肿瘤、肝外胆管癌、眼癌(比如眼内黑素瘤、成视网膜细胞瘤)、骨纤维组织细胞瘤(包括恶性和骨肉瘤)胆囊癌、胃(胃部)癌、胃肠道类癌肿瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、生殖细胞肿瘤(颅外、性腺外、卵巢)、妊娠期滋养细胞肿瘤、神经胶质瘤、毛细胞白血病、头颈癌、心脏癌、肝细胞(肝)癌、组织细胞增多病、兰格汉氏细胞、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、眼内黑素瘤、胰岛细胞瘤(内分泌、胰腺)、卡波西肉瘤、肾(包括肾细胞)、兰格汉氏细胞组织细胞增多病、喉癌、白血病(包括急性成淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、毛细胞)、唇和口腔癌、肝癌(原发性)、小叶原位癌(LCIS)、肺癌(非小细胞和小细胞)、淋巴瘤(AIDS相关的淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤(蕈样真菌病和塞扎莱综合征)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤、巨球蛋白血症、瓦尔登斯特伦氏(Waldenström)、雄性乳腺癌、恶性骨纤维组织细胞瘤和骨肉瘤、成神经管细胞瘤、髓上皮瘤、黑素瘤(包括眼内(眼部))、梅克尔细胞瘤、间皮瘤(恶性)、具有隐性原发性的转移性鳞状颈癌、涉及NUT基因的中线道(Midline Tract)癌、口癌、多发性内分泌瘤形成综合征、多发性骨髓瘤/浆细胞赘瘤、蕈样真菌病、骨髓发育不良综合征、骨髓发育不良/骨髓增生性赘瘤、髓细胞性白血病、慢性(CML)、骨髓白

血病、急性 (AML)、骨髓瘤和多发性骨髓瘤、骨髓增生性病症 (慢性)、鼻腔和鼻窦癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、口部癌、口腔癌、唇和口咽癌、骨肉瘤和恶性骨纤维组织细胞瘤、卵巢癌 (如上皮、生殖细胞肿瘤和低恶性潜在肿瘤)、胰腺癌 (包括胰岛细胞瘤)、乳头瘤病、副神经节瘤、鼻窦和鼻腔癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、中间分化型松果体实质性肿瘤、成松果体细胞瘤和幕上原始神经外胚层肿瘤、垂体肿瘤、浆细胞瘤/多发性骨髓瘤、胸膜肺母细胞瘤、妊娠期乳腺癌、原发性中枢神经系统 (CNS) 淋巴瘤、前列腺癌、直肠癌、肾细胞 (肾) 癌、肾盂和输尿管移行细胞癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤 (比如尤文氏肉瘤肿瘤族、卡波西肉瘤、软组织肉瘤、子宫肉瘤)、塞扎莱综合征、皮肤癌 (如黑素瘤、梅克尔细胞癌、非黑素瘤)、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、具有隐性原发性、转移性的鳞状颈、癌胃部 (胃) 癌、幕上原始神经外胚层肿瘤、T 细胞淋巴瘤 (皮肤 T 细胞淋巴瘤、蕈样真菌病和塞扎莱综合征)、睾丸癌、喉癌、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、肾盂和输尿管的移行细胞癌、滋养细胞肿瘤 (妊娠期)、儿童期未知原发性不寻常癌、输尿管和肾盂移行细胞癌、尿道癌、子宫癌、子宫内膜、子宫肉瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症和韦尔姆斯氏 (Wilms) 肿瘤。

[0184] 在某些实施例中,受试者是哺乳动物,例如,人类。

[0185] 定义

[0186] 如本文所使用的短语“保护基团”意指保护反应性官能团而使其不进行不期望化学反应的取代基。这类保护基团的实例包括羧酸和硼酸的酯、醇的醚,以及醛和酮的缩醛和缩酮。举例来说,如本文所使用的短语“N 末端保护基团”或“氨基-保护基团”是指可采用以在合成过程期间针对不期望的反应保护氨基酸或肽的 N 末端的各种氨基-保护基团。合适的基团的实例包括酰基保护基团 (如为了说明,甲酰基、丹酰基、乙酰基、苯甲酰基、三氟乙酰基、丁二酰基和甲氧基丁二酰基); 芳香族氨基甲酸酯保护基团 (例如,苯甲氧基羰基 (Cbz)); 和脂肪族氨基甲酸酯保护基团 (如叔丁氧基羰基 (Boc) 或 9- 苄基甲氧羰基 (Fmoc))。

[0187] 如本文所使用的术语“氨基-末端保护基团”是指通常在有机合成,尤其是肽合成中采用的末端氨基保护基团。可采用已知种类的保护基团中任一种,包括酰基保护基团 (如乙酰基和苯甲酰基); 芳香族氨基甲酸酯保护基团 (如苯甲氧基羰基); 和脂肪族氨基甲酸酯保护基团 (如叔丁氧基羰基)。参见例如 Gross 和 Mienhoffer 编,《肽 (The Peptides)》,学术出版社 (Academic Press), 纽约,1981; 第 3 卷,3-88; 和 Green, T.W.; Wuts, P.G.M.,《有机合成中的保护基团 (Protective Groups in Organic Synthesis)》第 2 版,威利出版社 (Wiley): 纽约,1991。优选的保护基团包括芳基-、芳烷基-、杂芳基- 和杂芳基烷基-羰基和磺酰基部分。

[0188] 如本文所使用的术语“生理条件”是指与活的有机体相容的和/或通常以细胞内形式存在于活的哺乳动物细胞中的温度、pH、离子强度、粘度和类似的生物化学参数。

[0189] 如本文所使用的术语“前药”涵盖在生理条件下转化为治疗活性剂的化合物。制备前药的常用方法是包括在生理条件下水解以显露期望的分子的经选择的部分。在其它实施例中,通过宿主动物的酶活性使前药转化。

[0190] 如本文所使用的短语“药学上可接受的赋形剂”或“药学上可接受的载剂”意指将主题化学物质从身体的一个器官或部分运载或运输到身体的另一个器官或部分所涉及的药学上可接受的材料、组合物或媒剂,如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材

料。每种载剂必须在与配制物的其它成分相容的意义上是“可接受的”、对患者不是有害的并且基本上非热原性的。可充当药学上可接受的载剂的材料的一些实例包括：(1) 糖，如乳糖、葡萄糖和蔗糖；(2) 淀粉，如玉米淀粉和马铃薯淀粉；(3) 纤维素和其衍生物，如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素；(4) 粉末状黄蓍胶；(5) 麦芽；(6) 明胶；(7) 滑石；(8) 赋形剂，如可可油和栓剂蜡；(9) 油，如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油；(10) 二醇，如丙二醇；(11) 多元醇，如丙三醇、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇；(12) 酯，如油酸乙酯和月桂酸乙酯；(13) 琼脂；(14) 缓冲剂，如氢氧化镁和氢氧化铝；(15) 海藻酸；(16) 无热原质水；(17) 等渗盐水；(18) 林格氏溶液 (Ringer's solution)；(19) 乙醇；(20) 磷酸盐缓冲溶液；以及(21) 药物配制物中采用的其它无毒相容物质。在某些实施例中，本发明的药物组合物是非热原性的，即，当向患者施用时不诱导明显温度升高。

[0191] 术语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的相对无毒、无机和有机酸加成盐。这些盐可在(一种或多种)化合物的最终分离和纯化期间原位制备，或通过单独地使经纯化的(一种或多种)化合物以其游离碱形式与合适的有机或无机酸反应并且分离如此形成的盐来制备。代表性盐包括氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲磺酸盐、柠檬酸盐、顺丁烯二酸盐、反丁烯二酸盐、丁二酸盐、酒石酸盐、萘二甲酸盐、甲磺酸盐、葡庚糖酸盐、乳糖醛酸盐和月桂基磺酸盐等。参见例如Berge等人(1977)“药物盐(Pharmaceutical Salts)”，药物科学杂志(J.Pharm.Sci.) 66:1-19。

[0192] 在其它情况下，适用于本发明的方法中的化合物可含有一个或多个酸性官能团，并且因此能够与药学上可接受的碱形成药学上可接受的盐。在这些情况下，术语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的相对无毒无机和有机碱加成盐。这些盐可同样地在(一种或多种)化合物的最终分离和纯化期间原位制备，或通过单独地使(一种或多种)经纯化的化合物以其游离酸形式与合适的碱(如药学上可接受的金属阳离子的氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐)、与氨或与药学上可接受的有机伯胺、仲胺或叔胺反应来制备。代表性碱或碱土金属盐包括锂、钠、钾、钙、镁和铝盐等。适用于形成碱加成盐的代表性有机胺包括乙胺、二乙胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪等(参见例如Berge等人，同前文献)。

[0193] 针对在医治中使用的化合物的“治疗有效量”是指根据针对待医治的病症或病况或美容目的的临床上可接受的标准，例如在适用于任何医药医治的合理的效益/风险比下，当作为期望的服用量方案的一部分施用(到哺乳动物，优选地人类)时，缓解症状、改善病况或减缓疾病病况的发作的制剂中化合物的量。

[0194] 术语“预防性或治疗性”医治是本领域公认的，并且包括向宿主施用主题组合物中的一种或多种。如果在不希望的病况(例如，疾病或宿主动物的其它不希望的状态)的临床表现之前施用，那么医治是预防性的(即，其保护宿主以免形成不希望的病况)，然而如果在不希望的病况的表现之后施用，那么医治是治疗性的(即，旨在减轻、改善或稳定现有不希望的病况或其副作用)。

[0195] 术语“自我消除型连接基团”或“自我牺牲型连接基团”是指通过在限定条件下裂解以释放两个分子的化学键将两个或更多个分子附接在一起的临时延伸基团、间隔基团或占位基团单元。自我消除型连接基团的实例包括(但不限于)对氨基苯甲氧基羰基(PABC)、2,4-双(羟基甲基)苯胺和4-(苯基亚甲基)苯胺。自我消除型或自我牺牲型连接基团可是线

性或分支的,并且可将两个或更多个相同的分子连接在一起,或可将两个或更多个不同的分子连接在一起。自我消除型或自我牺牲型连接基团可在例如生理条件、酸性条件、碱性条件下或在特定化学试剂的存在下降解、分解或碎裂。

[0196] 用于本发明中的药效团对于对应的药物所针对而有效的通常目的是有效的,并且在某些实施例中,因为叠氮基糖靶向部分中固有的将药物运输到期望细胞(在所述期望细胞处,其具有具体效益)的能力,所述药效团具有优越功效。

[0197] 用于本发明实施例中的优选治疗剂是细胞毒性药物,如用于癌症疗法的那些。一般来说,这类药物包括烷基化剂、抗代谢物、抗肿瘤抗生素如蒽环霉素、拓扑异构酶抑制剂、有丝分裂抑制剂和皮质类固醇。

[0198] 本领域技术人员可对所期望化合物进行化学修饰以便使所述化合物的反应更便于制备本发明的偶联物的目的。

[0199] 在某些实施例中,D是具有化学反应性官能团的药效团,药效团通过所述化学反应性官能团键结到自我牺牲型连接基团。在某些情况下,官能团选自伯胺、仲胺、羟基和巯基。在某些情况下,官能团是伯胺或仲胺。在某些情况下,官能团是羟基。

[0200] 如上文所提及,本发明的某些化合物可以具体几何或立体异构形式存在。如落入本发明的范围内,本发明设想所有这类化合物,包括其顺式和反式异构体、R-和S-对映异构体、非对映异构体、(D)-异构体、(L)-异构体、外消旋混合物和其的其它混合物。附加不对称碳原子可存在于取代基(如烷基)中。所有这类异构体以及其混合物旨在包括于本发明中。

[0201] 如果例如期望本发明化合物的具体对映异构体,那么其可通过不对称合成或通过利用手性助剂衍生来制备,其中所得非对映异构混合物被分离,并且助剂基团裂解以提供纯的期望对映异构体。替代地,在分子含有碱性官能团(如氨基)或酸性官能团(如羧基)的情况下,用适当的光学活性的酸或碱形成非对映异构体盐,随后通过本领域中熟知的分步结晶或色谱手段离析如此形成的非对映异构体,并且随后回收纯对映异构体。

[0202] 脂肪族链包含以下定义的烷基、烯基和炔基类别。直脂肪族链限于非分支碳链部分。如本文所使用,术语“脂肪族基团”是指直链、支链或环状脂肪族烃基,并且包括饱和和不饱和脂肪族基团,如烷基、烯基或炔基。

[0203] “烷基”是指具有指定数量的碳原子或至多30个碳原子(如果未进行指定的话)的完全饱和环状或非环状、分支或非分支碳链部分。举例来说,1到8个碳原子的烷基是指如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基和辛基的部分以及是这些部分的位置异构体的那些部分。10到30个碳原子的烷基包括癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基、十九烷基、二十烷基、二十一烷基、二十二烷基、二十三烷基和二十四烷基。在某些实施例中,直链或支链烷基在其骨架中具有30个或更少的碳原子(例如,对于直链, $C_1-C_{30}$ ,对于支链, $C_3-C_{30}$ ),并且更优选地20个或更少。

[0204] “环烷基”意指各自具有3到12个碳原子的单或双环或桥连饱和碳环。同样地,优选的环烷基在其环结构中具有5-12个碳原子,并且更优选地在环结构中具有6-10个碳。

[0205] 除非碳的数量另外指定,否则如本文所使用的“低级烷基”意指如上定义的,但在其骨架结构中具有一到十个碳、更优选地一到六个碳原子的烷基,如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。同样地,“低级烯基”和“低级炔基”具有类似链长度。贯穿本申请,优选的烷基是低级烷基。在某些实施例中,在本文中指示为烷基的取代基



是低级烷基。

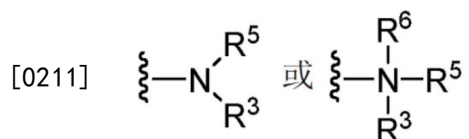
[0206] “烯基”是指任何环状或非环状分支或非分支不饱和碳链部分,所述任何环状或非环状分支或非分支不饱和碳链部分具有指定数量的碳原子或至多26个碳原子(如果未指定对碳原子数量的限制的话),并且在所述部分中具有一个或多个双键。6到26个碳原子的烯基通过呈其各种异构形式的以下示例:己烯基、庚烯基、辛烯基、壬烯基、癸烯基、十一烯基、十二烯基、十三烯基、十四烯基、十五烯基、十六烯基、十七烯基、十八烯基、十九烯基、二十烯基、二十一烯基、二十二烯基、二十三烯基和二十四烯基,其中(一个或多个)不饱和键可位于部分中的任何位置,并且可具有关于(一个或多个)双键的(Z)或(E)构型。

[0207] “炔基”是指烯基的范围的烃基部分,但是在所述部分中具有一个或多个三键。

[0208] 术语“烷硫基”是指如上文所定义的具有附接到其的硫部分的烷基。在某些实施例中,“烷硫基”部分由-(S)-烷基、-(S)-烯基、-(S)-炔基和-(S)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>1</sup>中的一种表示,其中在下文限定m和R<sup>1</sup>。代表性烷硫基包括甲硫基、乙硫基等。

[0209] 如本文所使用的术语“烷氧基(alkoxyl或alkoxy)”是指如下文所定义的具有附接到其的氧部分的烷基。代表性烷氧基包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、叔丁氧基等。“醚”是通过氧共价连接的两个烃。因此,使烷基成醚的烷基的取代基是或类似于烷氧基,如可由-O-烷基、-O-烯基、-O-炔基、-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>1</sup>中的一种表示,其中m和R<sup>1</sup>在下文描述。

[0210] 术语“胺”和“氨基”是本领域公认的,并且是指未经取代和经取代的胺两者,例如,可由下式表示的部分:



[0212] 其中R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>和R<sup>6</sup>各自独立地表示氢、烷基、烯基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>1</sup>,或R<sup>3</sup>和R<sup>5</sup>与所附接的N原子连在一起完成在环结构中具有4到8个原子的杂环;R<sup>1</sup>表示烯基、芳基、环烷基、环烯基、杂环基或多环基;并且m是零或在1到8范围内的整数。在某些实施例中,R<sup>3</sup>或R<sup>5</sup>中的仅一个可是羰基,例如,R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>和氮一起不形成酰亚胺。在甚至更多的某些实施例中,R<sup>3</sup>和R<sup>5</sup>(和任选地R<sup>6</sup>)各自独立地表示氢、烷基、烯基或-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>1</sup>。因此,如本文所使用的术语“烷基胺”意指如上文所定义的具有附接到其的经取代或未经取代的烷基的胺基团,即,R<sup>3</sup>和R<sup>5</sup>中的至少一个是烷基。在某些实施例中,氨基或烷基胺是碱性的,意指其具有pK<sub>a</sub>>7.00的共轭酸,即,这些官能团的质子化形式的pK<sub>a</sub>相对于水高于约7.00。

[0213] 如本文所使用的术语“芳基”包括3到12元经取代或未经取代的单环芳香族基团,其中环的每个原子是碳(即,碳环芳基),或其中一个或多个原子是杂原子(即,杂芳基)。优选地,芳基包括5到12元环,更优选地6到10元环。在某些实施例中,芳基包括(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)芳基。术语“芳基”还包括具有两个或更多个碳共用两个邻接环的两个或更多个环的多环体系,其中环中的至少一个是芳香族环,例如,其它环可是环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基和/或杂环基。碳环芳基包括苯、萘、菲、酚、苯胺等。杂芳基包括其环结构包括一到四个杂原子的经取代或未经取代的芳香族3到12元环结构,更优选地5到12元环,更优选地6到10元环。在某些实施例中,杂芳基包括(C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>)杂芳基。杂芳基包括例如吡咯、呋喃、噻吩、咪唑、恶唑、噻唑、三唑、吡唑、吡啶、吡嗪、哒嗪和嘧啶等。

[0214] 术语“芳烷基”是本领域公认的,并且是指经芳基取代的烷基。





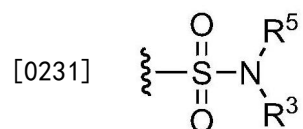
酰亚胺。

[0227] 如本文所使用,设想术语“经取代的”包括有机化合物的所有可容许的取代基。在广泛方面,可容许取代基包括有机化合物的非环状和环状、分支和未分支、碳环和杂环、芳香族和非芳香族取代基。说明性取代基包括例本文中以上所描述的那些取代基。对于适当的有机化合物,可容许取代基可是一个或多个并且相同或不同。出于本发明的目的,如氮的杂原子可具有氢取代基和/或满足杂原子价态的本文所描述的有机化合物的任何可容许的取代基。本发明并不旨在以任何方式受有机化合物的可容许取代基的限制。应理解,“取代”或“经取代的”包括隐含的限制条件,这类取代与经取代的原子和取代基的容许价态一致,并且取代产生例如不自发地(如通过重排、环化、消除等)进行转变的稳定化合物。

[0228] 如本文所使用,术语“硝基”意指-NO<sub>2</sub>;术语“卤素”指示-F、-Cl、-Br或-I;术语“巯基”意指-SH;术语“羟基”意指-OH;术语“磺酰基”意指-SO<sub>2</sub>-;术语“叠氮基”意指-N<sub>3</sub>;术语“氰基”意指-CN;术语“异氰酸酯基”意指-NCO;术语“硫氰基”意指-SCN;术语“异硫氰基”意指-NCS;并且术语“氰酸酯基”意指-OCN。

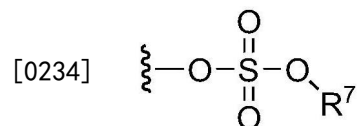
[0229] 术语“卤烷基”意指通过如本文所定义的烷基附连到母体分子部分的如本文所定义的至少一种卤素。卤烷基的代表性实例包括(但不限于)氯甲基、2-氟乙基、三氟甲基、五氟乙基和2-氯基-3-氟戊基。

[0230] 术语“氮磺酰基”是本领域公认的并且包括可由下式表示的部分:



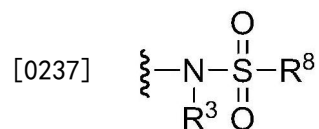
[0232] 其中R<sup>3</sup>和R<sup>5</sup>如上文所定义。

[0233] 术语“硫酸酯基”是本领域公认的并且包括可由下式表示的部分:



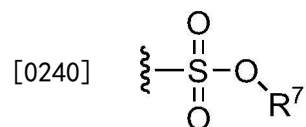
[0235] 其中R<sup>7</sup>如上文所定义。

[0236] 术语“磺酰胺”是本领域公认的并且包括可由下式表示的部分:



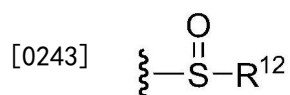
[0238] 其中R<sup>3</sup>和R<sup>8</sup>如上文所定义。

[0239] 术语“磺酸酯基”是本领域公认的并且包括可由下式表示的部分:



[0241] 其中R<sup>7</sup>是电子对、氢、烷基、环烷基或芳基。

[0242] 如本文所使用,术语“亚砷基”或“亚磺酰基”是指可由下式表示的部分:



[0244] 其中R<sup>12</sup>选自以下组成的组：氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳烷基或芳基。

[0245] 如本文所使用，当每种表达（例如，烷基、m、n、等）在任何结构中出现多于一次时，其定义旨在独立于其在相同结构中其它地方的定义。

[0246] 出于本发明的目的，根据元素周期表，CAS版本，《化学和物理手册 (Handbook of Chemistry and Physics)》第67版，1986-87 (封面内侧) 鉴定化学元素。

[0247] 药物组合物

[0248] 还提供包含本发明化合物（例如，式I、II、III或IV中的任一种的化合物）或其药学上可接受的盐和药学上可接受的赋形剂或载剂的药物组合物。还提供用于制备这类药物组合物的方法。方法包含将本发明化合物或其药学上可接受的盐置于药学上可接受的赋形剂或载剂中。

[0249] 本发明化合物和本发明的药物组合物适用于医治受试者的癌症。在某些实施例中，向对其有需要的受试者施用治疗有效量的本发明化合物或其药学上可接受的盐，从而医治癌症。

[0250] 如本文所使用，“抑制 (inhibit或inhibiting)”意指与对照组相比，降低可客观地测量的量或程度。在一个实施例中，抑制意指与对照组相比，降低至少在统计上显著的量。在一个实施例中，抑制意指与对照组相比，降低至少5%。在各种单独的实施例中，抑制意指与对照组相比，降低至少10%、15%、20%、25%、30%、33%、40%、50%、60%、67%、70%、75%、80%、90%或95%。

[0251] 如本文所使用，术语“医治 (treat和treating)”是指执行产生以下的干预：(a) 防止在可处于形成病况或疾病的风险或易患病况或疾病，但尚未被诊断为患有病况或疾病的受试者出现病况或疾病；(b) 抑制病况或疾病，例如减缓或遏制其发展；或(c) 缓解或改善病况或疾病，例如使病况或疾病消退。在一个实施例中，术语“医治”是指执行产生以下的干预：(a) 抑制病况或疾病，例如减缓或遏制其发展；或(b) 缓解或改善病况或疾病，例如使病况或疾病消退。

[0252] 如本文所使用，“受试者”是指活的哺乳动物。在各种实施例中，受试者是非人类哺乳动物，包括（但不限于）小鼠、大鼠、仓鼠、天竺鼠、兔、绵羊、山羊、猫、狗、猪、马、奶牛或非人类灵长类动物。在某些实施例中，受试者是人类。

[0253] 在某些实施例中，受试者是人类。

[0254] 如本文所使用，“施用”具有其通常意义，并且涵盖通过任何合适的施用途径，包括（但不限于）静脉内、肌内、腹膜内、鞘内、眼内（例如，玻璃体内）、皮下、直接注射（例如到肿瘤中）、经粘膜、吸入、口服和体表进行的施用。

[0255] 在一个实施例中，施用是静脉内的。

[0256] 在一个实施例中，施用是口服的。

[0257] 如本文所使用，短语“有效量”是指足够实现期望生物效应的任何量。

[0258] 本发明化合物可与其它治疗剂组合，或可与本发明的其它化合物组合使用。可同时或依次施用本发明化合物和其它治疗剂。当同时施用其它治疗剂时，它们可在相同或单

独配制物中施用,但是它们基本上同时施用。当其它治疗剂和本发明化合物的施用在时间上是分离的时,其它治疗剂彼此依次并且与本发明化合物依次施用。在施用这些化合物之间的时间上的间隔可是几分钟,或其可更长。

[0259] 其它治疗剂的实例包括抗生素、抗病毒剂、消炎剂、免疫抑制剂、抗心律失常剂、 $\beta$ 阻滞剂、镇痛剂和抗癌剂。

[0260] 如上文所陈述,“有效量”是指足够实现期望生物效应的任何量。与本文所提供的教导组合,通过在各种活性化合物和加权因素(如效力、相对生物利用度、患者体重、不良副作用的严重程度和优选的施用模式)中选择,可规划不引起显著不希望的毒性但对医治具体受试者有效的有效预防性或治疗性医治方案。对于任何具体应用的有效量可根据如以下的这类因素变化:被医治的疾病或病况、被施用的本发明的具体化合物、受试者的尺寸或疾病或病况的严重程度。本领域普通技术人员可凭经验确定本发明的具体化合物和/或其它治疗剂的有效量,而不必要进行过度的实验。有时优选使用最大剂量,即,根据一些医疗判断的最高安全剂量。可设想每天多次给药以实现化合物的适当的全身性水平。适当的全身性水平可通过例如测量患者的药物的峰值或持续血浆水平来测定。“剂量”和“服用量”在本文中可互换地使用。

[0261] 一般来说,对于人类受试者,活性化合物的每天口服剂量将为每天约0.01mg/kg到每天1000mg/kg。预期以每天一次或若干次施用形式的在0.5到50mg/kg范围内的口服剂量将得到期望结果。可根据施用模式适当地调节服用量以实现期望的局部或全身性药物水平。举例来说,预期静脉内施用的每天剂量将低一个到若干数量级。倘若在这类剂量下受试者的响应不足,那么可在患者耐受性容许的程度下采用甚至更高的剂量(或通过不同、更局部化的递送途径的有效的更高剂量)。设想每天多次给药以实现化合物的适当的全身性水平。

[0262] 在一个实施例中,本发明化合物的静脉内施用通常可是0.1mg/kg/天到20mg/kg/天。

[0263] 对于本文所描述的任何化合物,可从动物模型初始地确定治疗有效量。对于已经在人类中进行测试的本发明化合物和已知展现类似药理活性的化合物(如其它相关活性剂),还可从人类数据确定治疗有效剂量。对于肠胃外施用可能需要更高的剂量。可基于相对生物利用度和施用的化合物的效力调节施用剂量。基于上文所描述的方法和如本领域熟知的其它方法调节剂量以实现最大功效完全在本领域普通技术人员的能力之内。

[0264] 可以药学上可接受的溶液形式施用本发明的配制物,所述溶液常规地可含有药学上可接受浓度的盐、缓冲剂、防腐剂、相容的载剂、佐剂和任选地其它治疗性成分。

[0265] 对于在疗法中使用,可通过将本发明化合物递送到期望部位或表面的任何模式向受试者施用有效量的本发明化合物。可通过本领域技术人员已知的任何手段实现施用本发明的药物组合。施用途包括(但不限于)口服、静脉内、肌内、腹膜内、皮下、直接注射(例如到肿瘤或脓肿中)、经粘膜、吸入和体表。

[0266] 对于静脉内和其它肠胃外施用途,可将化合物配制为具有脱氧胆酸的冻干制剂、插入脂质体的或经脂质体包封的活性化合物的冻干制剂、呈水性悬浮液形式的脂质络合物或胆甾醇基硫酸酯络合物。在施用之前不久,通常在合适的水溶液,例如在无菌水或盐水中使冻干配制物复原。

[0267] 对于口服施用,可通过将(一种或多种)活性化合物与本领域中熟知的药学上可接受的载剂组合容易地配制化合物(即,本发明化合物和其它治疗剂)。这类载剂使得本发明化合物能够配制为片剂、丸剂、糖衣药丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液、悬浮液等,以供待医治的受试者口服摄取。可在添加合适的助剂(如果需要)之后,任选地磨碎所得混合物并且加工细粒混合物以获得片剂或糖衣药丸核,以固体赋形剂的形式获得供口服使用的药物制剂。具体来说,合适的赋形剂是填充剂,如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露糖醇或山梨糖醇;纤维素制剂,例如玉米淀粉、小麦淀粉、水稻淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。如果需要,可添加崩解剂,如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐(如海藻酸钠)。任选地,口服配制物还可例如,在盐水或用于中和内部酸条件的缓冲剂(例如,EDTA)中配制,或可在没有任何载剂的情况下施用。

[0268] 还特定地设想以上一种或多种组分的口服剂型。可化学修饰一种或多种组分使得衍生物的口服递送是有效的。一般来说,设想的化学修饰是将至少一个部分附接到组分分子自身,其中所述部分容许(a)抑制酸水解;并且(b)从胃部或肠吸收到血流中。还期望提高一种或多种组分的整体稳定性并且增加体内循环时间。这类部分的实例包括:聚乙二醇、乙二醇和丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮和聚脯氨酸。在《作为药物的酶(Enzymes as Drugs)》,Hocenberg和Roberts编,纽约州纽约市的威利-国际科学(Wiley-Interscience, New York, N.Y.),第367-383页(1981)中的Abuchowski和Davis,“可溶聚合物-酶加合物(Soluble Polymer-Enzyme Adducts)” ;Newmark等人,《应用生物化学杂志(J Appl Biochem)》4:185-9(1982)。可使用的其它聚合物是聚-1,3-二氧戊环和聚-1,3,6-三氧戊环。如上文所指示,对于药物用途,优选的是聚乙二醇部分。

[0269] 对于组分(或衍生物),释放部位可是胃部、小肠(十二指肠、空肠或回肠)或大肠。本领域技术人员具有将在胃部中不溶解,但将在十二指肠中或肠中的其它地方释放材料的可用的配制物。优选地,通过保护本发明化合物(或衍生物)或通过胃部环境以外(如在肠中)释放生物活性材料,释放将避免胃部环境的有害影响。

[0270] 为了确保完全的胃阻挡,不可渗透至少pH 5.0的包衣是必需的。用作肠溶包衣的更常见惰性成分的实例是偏苯三酸乙酸纤维素(CAT)、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素(HPMCP)、HPMCP 50、HPMCP 55、聚乙酸乙烯酯邻苯二甲酸酯(PVAP)、尤特奇(Eudragit) L30D、Aquateric、邻苯二甲酸乙酸纤维素(CAP)、尤特奇L、尤特奇S以及虫胶。这些包衣可用作混合膜。

[0271] 包衣或包衣的混合物还可在片剂上使用,这不旨在用于针对胃部的保护。这可包括糖包衣或使片剂更容易吞咽的包衣。胶囊可由用于递送干治疗性(例如粉末)的硬壳(如明胶)组成;对于液体形式,可使用软明胶壳。扁胶剂的壳材料可是厚淀粉或其它可食用的纸。对于丸剂、锭剂、模制片剂或片剂研磨物,可使用湿法块化(moist massing)技术。

[0272] 治疗剂可作为呈粒度为约1mm的细粒或团粒形式的细微多微粒包括于配制物中。用于胶囊施用的材料的配制物还可作为粉末、轻微压缩的塞栓或甚至作为片剂。治疗剂可通过压缩制备。

[0273] 着色剂和调味剂可均被包括。举例来说,本发明化合物(或衍生物)可(如通过脂质体或微球体包封)配制,并且然后进一步含于可食用产品,如含有着色剂和调味剂的冷藏饮

料内。

[0274] 可用惰性材料稀释治疗剂或增加治疗剂的体积。这些稀释剂可包括碳水化合物，尤其是甘露糖醇、 $\alpha$ -乳糖、无水乳糖、纤维素、蔗糖、经修饰的葡聚糖和淀粉。某些无机盐还可用作填充剂，包括三磷酸钙、碳酸镁和氯化钠。一些可商购的稀释剂是Fast-Flo、Emdex、STA-Rx 1500、Emcompress和Avicell。

[0275] 可在将治疗剂配制为固体剂型中包括崩解剂。用作崩解剂的材料包括(但不限于)淀粉，包括基于淀粉的商业崩解剂Explotab。羟基乙酸淀粉钠、安伯来特(Amberlite)、羧甲基纤维素钠、超支链淀粉、海藻酸钠、明胶、桔皮、酸性羧甲基纤维素、天然海绵和膨润土均可使用。崩解剂的另一形式是不可溶阳离子交换树脂。粉末状树胶可用作崩解剂和粘结剂，并且这些可包括如琼脂、刺梧桐树胶或黄蓍胶的粉末状树胶。海藻酸和其钠盐也适用作崩解剂。

[0276] 粘结剂可用于将治疗剂保持在一起以形成硬片剂，并且包括来自天然产品(如阿拉伯胶、黄蓍胶、淀粉和明胶)的材料。其它包括甲基纤维素(MC)、乙基纤维素(EC)和羧甲基纤维素(CMC)。聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和羟丙基甲基纤维素(HPMC)都可用于醇溶液中以细粒化治疗剂。

[0277] 抗摩擦剂可包括于治疗剂的配制物中以防止在配制过程期间的粘着。润滑剂可用作治疗剂和模具壁之间的层，并且这些可包括(但不限于)硬脂酸(包括其镁和钙盐)、聚四氟乙烯(PTFE)、液体石蜡、植物油和蜡。还可使用可溶润滑剂，如月桂基硫酸钠、月桂基硫酸镁、各种分子量的聚乙二醇、Carbowax 4000和6000。

[0278] 可添加可在配制期间改善药物的流动特性并且在压缩期间帮助重排的助滑剂。助滑剂可包括淀粉、滑石、热解二氧化硅和水合硅铝酸盐。

[0279] 为了帮助治疗剂溶解到水性环境中，可添加表面活性剂作为润湿剂。表面活性剂可包括阴离子清洁剂，如月桂基硫酸钠、二辛基磺基琥珀酸钠和二辛基磺酸钠。可使用阳离子清洁剂，并且其可包括苯扎氯铵和苄索氯铵。可作为表面活性剂包括于配制物中的潜在非离子清洁剂包括聚桂醇400、聚炔氧40硬脂酸酯、聚环氧乙烷氢化蓖麻油10、50和60、单硬脂酸甘油酯、聚山梨醇酯40、60、65和80、蔗糖脂肪酸酯、甲基纤维素和羧甲基纤维素。这些表面活性剂可单独或作为不同比率的混合物存在于本发明化合物或衍生物的配制物中。

[0280] 可口服使用的药物制剂包括由明胶制成的推入配合胶囊以及由明胶和塑化剂(如甘油或山梨糖醇)制成的软密封胶囊。推入配合胶囊可含有与如乳糖的填充剂、如淀粉的粘结剂和/或如滑石或硬脂酸镁的润滑剂以及任选的稳定剂掺合的活性成分。在软胶囊中，活性化合物可溶解或悬浮于合适液体(如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇)中。另外，可添加稳定剂。还可使用被配制用于口服施用的微球体。这类微球体已经在本领域中充分定义。用于口服施用的所有配制物应呈适合于这类施用的剂型。

[0281] 对于经颊施用，组合物可呈以常规方式配制的片剂或锭剂形式。

[0282] 对于通过吸入的施用，借助使用合适的推进剂，例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它合适的气体，可方便地以从加压包装或喷雾器提供的气雾剂喷雾形式递送根据本发明用于使用的化合物。在加压气雾剂的情况下，可通过提供用于递送计量量的阀门来测定单位剂量。用于在吸入器或吹入器中使用的例如明胶的胶囊和药筒可配制含有化合物和合适的粉末基剂(如乳糖或淀粉)的粉末混合物。

[0283] 本文还设想本发明化合物(或其衍生物)的经肺递送。本发明化合物(或衍生物)在吸入时被递送到哺乳动物的肺,并且横穿肺上皮衬壁到血流。吸入的分子的其它报导包括 Adjei等人,《药学研究(Pharm Res)》7:565-569(1990);Adjei等人,《国际药剂学杂志(Int J Pharmaceutics)》63:135-144(1990)(乙酸亮丙瑞林);Braquet等人,《心血管药理学杂志(J Cardiovasc Pharmacol)》13(增刊5):143-146(1989)(内皮素-1);Hubbard等人,《内科医学年鉴(Annal Int Med)》3:206-212(1989)( $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶);Smith等人,1989,《临床研究杂志(J Clin Invest)》84:1145-1146(a-1-蛋白酶);Osweine等人,1990,“蛋白质的气雾化(Aerosolization of Proteins)”(科罗拉多州凯斯通,3月,呼吸道药物递送研讨会II的会议记录(Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II,Keystone, Colorado,March)),(重组型人类生长激素);Debs等人,1988,《免疫学杂志(J Immunol)》140:3482-3488(干扰素- $\gamma$ 和肿瘤坏死因子- $\alpha$ )和Platz等人,美国专利第5,284,656号(粒细胞集落刺激因子)。1995年9月19日授予Wong等人的美国专利第5,451,569号中描述用于针对全身性效应的药物经肺递送的方法和组合物。

[0284] 设想用于本发明的实践中的是广泛范围的经设计用于治疗性产品的经肺递送的机械装置,包括(但不限于)喷雾器、计量剂量吸入器和粉末吸入器,以上所有装置都是本领域技术人员所熟悉的。

[0285] 适用于本发明实践的可商购装置的一些特定实例是由密苏里州圣路易斯的马林克罗公司(Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Mo.)制造的Ultravent喷雾器;由科罗拉多州恩格尔伍德的Marquest医疗产品(Marquest Medical Products, Englewood, Colo.)制造的Acorn II喷雾器;由北卡罗莱纳州三角研究园的葛兰素公司(Glaxo Inc., Research Triangle Park, North Carolina)制造的Ventolin计量剂量吸入器;和由马萨诸塞州贝德福德的费森斯公司(Fisons Corp., Bedford, Mass.)制造的Spinhaler粉末吸入器。

[0286] 所有这类装置需要使用适用于本发明化合物(或衍生物)的分配的配制物。通常,每种配制物特定于采用的装置的类型,并且除了适用于疗法的通常稀释剂、佐剂和/或载剂以外,还可涉及使用适当的推进剂材料。此外,设想使用脂质体、微胶囊或微球体、包合物或其它类型的载剂。还可根据化学修饰的类型或采用的装置的类型以不同的配制物制备本发明的化学修饰化合物。

[0287] 适合与喷雾器(喷射或超声)一起使用的配制物将通常包含以每mL溶液约0.1到25mg的本发明的生物活性化合物的浓度溶解于水中的本发明化合物(或衍生物)。配制物还可包括缓冲剂和单糖(例如,用于本发明化合物稳定和渗透压的调节)。喷雾器配制物还可含有表面活性剂以减少或防止在形成气雾剂中由溶液的雾化引起的本发明化合物的表面诱导聚集。

[0288] 用于与计量剂量吸入器装置一起使用的配制物将通常包含在表面活性剂的辅助下悬浮于推进剂中的含有本发明化合物(或衍生物)的细微粉碎粉末。推进剂可以是出于此目的采用的任何常规材料,如含氯氟烃、氢氯氟碳化物、氢氟碳化物或烃,包括三氯氟甲烷、二氯二氟甲烷、二氯四氟乙醇和1,1,1,2-四氟乙烷或其组合。合适的表面活性剂包括山梨聚糖三油酸酯和大豆卵磷脂。油酸也可适用作表面活性剂。

[0289] 用于从粉末吸入器装置分配的配制物将包含含有本发明化合物(或衍生物)的细微粉碎的干粉末,并且还可包括有助于粉末从装置分散的量(例如,配制物的50重量%到90

重量%)的膨化剂,如乳糖、山梨糖醇、蔗糖或甘露糖醇。本发明化合物(或衍生物)应当有利地以平均粒度小于10微米( $\mu\text{m}$ ),最优选地0.5到5 $\mu\text{m}$ 的微粒形式制备,以用于最有效地递送到深肺。

[0290] 还设想本发明的药物组合物的经鼻递送。经鼻递送允许在将治疗性产品施用到鼻之后,本发明的药物组合物直接通过到血流,而不必要产品沉积在肺中。用于经鼻递送的配制物包括具有葡聚糖或环葡聚糖的那些配制物。

[0291] 对于经鼻施用,适用的装置是附接计量剂量喷射器的小、硬瓶子。在一个实施例中,计量剂量通过将本发明的药物组合物溶液抽吸到限定体积的腔室中来递送,所述腔室具有尺寸经设定以当压缩腔室中的液体时通过形成喷雾使气雾剂配制物气雾化的孔口。压缩腔室以施用本发明的药物组合物。在特定实施例中,腔室是活塞布置。这类装置是可商购的。

[0292] 替代地,使用具有尺寸经设定以当挤压时通过形成喷雾使气雾剂配制物气雾化的孔口或开口的塑料挤压瓶。开口通常存在于瓶子的顶部,并且顶部通常是逐渐变细的以在鼻通道中部分地配合,用于气雾剂配制物的高效施用。优选地,经鼻吸入器将提供计量量的气雾剂配制物,用于施用测量剂量的药物。

[0293] 当期望全身性递送化合物时,化合物可配制成用于通过注射(例如,通过快速浓注或连续输注)进行的肠胃外施用。用于注射的配制物可呈例如在安瓿或多剂量容器中的单位剂型,其中添加有防腐剂。组合物可采用如在油性或水性媒剂中的悬浮液、溶液或乳液的这类形式,并且可含有如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂的配制剂。

[0294] 用于肠胃外施用的药物配制物包括水可溶形式的活性化合物的水溶液。另外,活性化合物的悬浮液可制备为适当的油性注射悬浮液。合适的亲脂性溶剂或媒剂包括脂肪油(如芝麻油),或合成脂肪酸酯(如油酸乙酯或甘油三酯),或脂质体。水性注射悬浮液可含有增加悬浮液粘度的物质,如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。任选地,悬浮液还可含有合适的稳定剂或增加化合物的溶解度以允许制备高度浓缩溶液的试剂。

[0295] 替代地,活性化合物可呈粉末形式,用于在使用之前与合适的媒剂(例如,无菌无热原质水)组成在一起。

[0296] 化合物还可配制成例如含有常规栓剂基质(如可可脂或其它甘油酯)的经直肠或经阴道组合物,如栓剂或保留灌肠剂。

[0297] 除了以上描述的配制物以外,化合物还可配制为贮库制剂。这类长效配制物可用合适的聚合或疏水性材料(例如为可接受油中的乳液)或离子交换树脂配制,或配制为微溶性衍生物,例如微溶性盐。

[0298] 药物组合物还可包含合适的固体或凝胶相载剂或赋形剂。这类载剂或赋形剂的实例包括(但不限于)碳酸钙、磷酸钙、各种糖、淀粉、纤维素衍生物、明胶和聚合物,如聚乙二醇。

[0299] 合适的液体或固体药物制剂形式是,例如用于吸入的水溶液或盐水溶液、微包封的、包囊的、涂覆到微观金颗粒上的、含于脂质体中的、经雾化的、气雾剂、植入到皮肤中的团粒,或干燥到尖锐物件上以刮擦进入皮肤中。药物组合物还包括细粒、粉末、片剂、包衣片剂、(微)胶囊、栓剂、糖浆、乳液、悬浮液、乳膏、滴剂或具有活性化合物延缓释放的制剂,在其制备中,通常如上所述使用赋形剂和添加剂和/或助剂,如崩解剂、粘结剂、包衣剂、膨胀

剂、润滑剂、调味剂、甜味剂或增溶剂。药物组合物适合用于各种药物递送系统中。药物递送方法的简要评述参见以引用的方式并入本文中的Langer R,《科学 (Science)》249:1527-33 (1990)。

[0300] 本发明化合物和任选地其它治疗剂可以本身(纯)或药学上可接受的盐的形式施用。当用于药品中时,盐应当是药学上可接受的,但是非药学上可接受的盐可方便地用于制备其药学上可接受的盐。这类盐包括(但不限于)由以下酸制备的那些:盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、顺丁烯二酸、乙酸、水杨酸、对甲苯磺酸、酒石酸、柠檬酸、甲磺酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸、萘-2-磺酸和苯磺酸。此外,这类盐可制备为碱金属盐或碱土金属盐,如羧酸盐的钠、钾或钙盐。

[0301] 合适的缓冲剂包括:乙酸和盐(1-2%w/v);柠檬酸和盐(1-3%w/v);硼酸和盐(0.5-2.5%w/v);和磷酸和盐(0.8-2%w/v)。合适的防腐剂包括苯扎氯铵(0.003-0.03%w/v);氯丁醇(0.3-0.9%w/v);对羟基苯甲酸酯(0.01-0.25%w/v)和硫柳汞(0.004-0.02%w/v)。

[0302] 本发明的药物组合物含有包括于药学上可接受的载剂中的有效量的本发明化合物和任选地治疗剂。术语“药学上可接受的载剂”意指适用于施用到人类或其它脊椎动物的一种或多种相容的固体或液体填充剂、稀释剂或包封物质。术语“载剂”表示天然或合成的有机或无机成分,活性成分与所述载剂组合以促进应用。药物组合物的组分还能够以使得不存在将显著减损期望药物效能的相互作用的方式与本发明化合物共混和彼此共混。

[0303] 可以颗粒形式提供特定地包括(但不限于)本发明化合物的(一种或多种)治疗剂。如本文所使用的颗粒意指可全部或部分地由如本文所描述的本发明化合物或(一种或多种)其它治疗剂组成的纳米粒子或微米粒子(或在一些情况下较大颗粒)。颗粒可含有在由包衣,包括(但不限于)肠溶包衣包围的芯中的(一种或多种)治疗剂。(一种或多种)治疗剂还可分散在整个颗粒中。(一种或多种)治疗剂还可吸附到颗粒中。颗粒可具有任何级数的释放动力学,包括零级释放、一级释放、二级释放、延迟释放、持续释放、立即释放和其任何组合等。除了(一种或多种)治疗剂以外,颗粒还可包括常规地用于药剂学和医学领域中的那些材料中的任一种,包括(但不限于)可侵蚀材料、不可侵蚀材料、可生物降解材料或不可生物降解材料或其组合。颗粒可是含有呈溶液或半固体状态的本发明化合物的微胶囊。颗粒可是几乎任何形状。

[0304] 不可生物降解和可生物降解聚合物材料都可用于制造用于递送(一种或多种)治疗剂的颗粒中。这类聚合物可是天然或合成聚合物。基于期望进行释放的时间段选择聚合物。特别令人感兴趣的生物粘合性聚合物包括描述于Sawhney H S等人(1993)《大分子 (Macromolecules)》26:581-7中的生物可侵蚀水凝胶,所述文献的教导并入本文中。这些包括聚透明质酸、酪蛋白、明胶、谷胱甘肽、聚酸酐、聚丙烯酸、海藻酸盐、脱乙酰壳多糖、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸乙酯)、聚(甲基丙烯酸丁酯)、聚(甲基丙烯酸异丁酯)、聚(甲基丙烯酸己酯)、聚(甲基丙烯酸异癸酯)、聚(甲基丙烯酸月桂酯)、聚(甲基丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)和聚(丙烯酸十八烷酯)。

[0305] (一种或多种)治疗剂可含于受控释放系统中。术语“受控释放”旨在指其中从配制物的药物释放的方式和特征曲线受控的任何含药物配制物。这是指立即以及非立即释放配制物,其中非立即释放配制物包括(但不限于)持续释放和延迟释放配制物。术语“持续释



放”(也称为“延长释放”)在其常规意义上使用,用于指在延长的时间段内提供药物的逐渐释放,并且优选地(但不一定)在延长的时间段内产生基本上恒定的血液药物水平的药物配制物。术语“延迟释放”在其常规意义上使用,用于指在配制物的施用和药物从其中释放之间存在时间延迟的药物配制物。“延迟释放”可涉及或可不涉及药物在延长的时间段内的逐渐释放,并且因此可是或可不是“持续释放”。

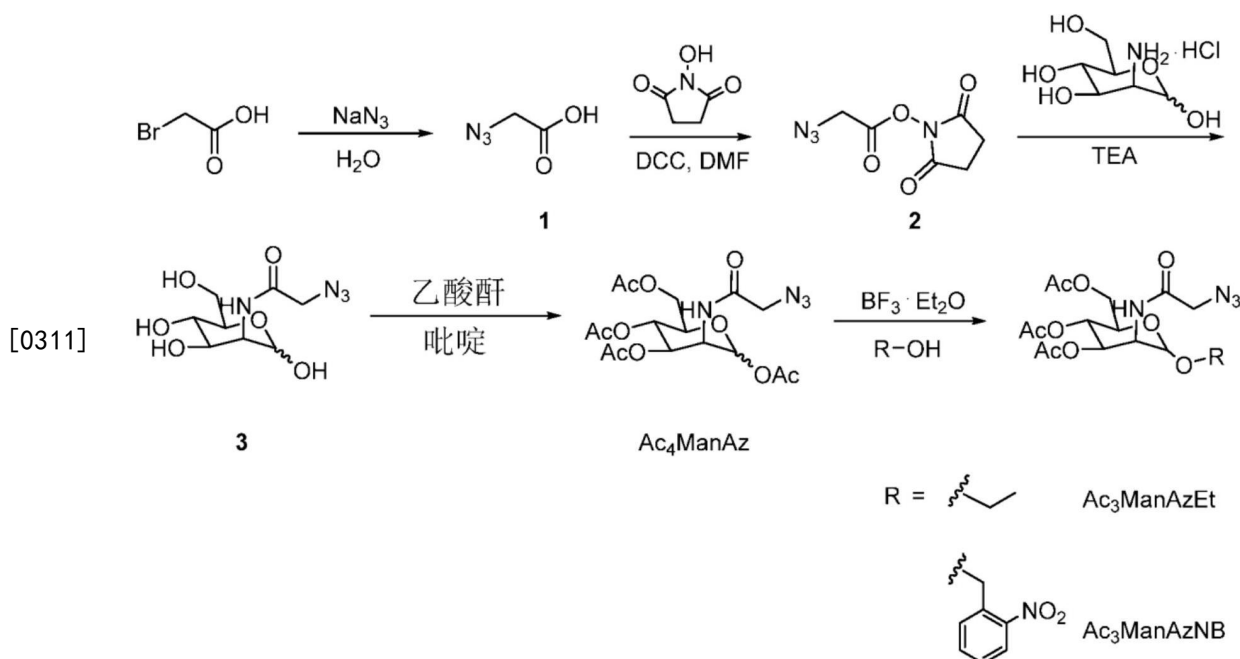
[0306] 长期持续释放植入物的使用可特别适用于医治慢性病况。如本文所使用,“长期”释放意指植入物经构造和布置以递送治疗水平的活性成分至少7天,并且优选地30-60天。长期持续释放植入物是本领域普通技术人员所熟知的,并且包括以上描述的释放系统中的一些。

[0307] 相关领域的普通技术人员将理解,鉴于本领域普通技术人员已知的信息,根据本文中含有的本发明的描述,对本文所描述的组合物和方法的其它合适的修改和调适是显而易见的,并且可在不脱离本发明的范围或其任何实施例的情况下进行。

[0308] 实例

[0309] 在现已详细描述本发明的情况下,通过参考以下实例将更清楚地理解本发明,所述实例仅出于说明的目的包括在内,并不旨在限制本发明。

[0310] 实例1.  $\text{Ac}_4\text{ManAz}$  衍生物的合成



[0312] 2-叠氮基乙酸(1)的合成。将溴乙酸(2.78g, 20mmol)溶解于去离子水(30mL)中,随后添加叠氮化钠(2.60g, 40mmol)。在室温下搅拌混合物24小时。使用氯化氢溶液将所得溶液调节到pH=1,并且然后用二乙醚萃取三次(100mL×3)。收集有机相,用无水硫酸钠干燥并且浓缩以获得无色油状物(80%收率, 1.62g)。

[0313] N-(2-叠氮乙酰基)丁二酰亚胺(2)的合成。将N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC, 2.06g, 10mmol)和1(1.01g, 10mmol)溶解于无水DMF中,随后添加N-羟基丁二酰亚胺(1.15g, 10mmol)。在室温下搅拌混合物24小时。在移除沉淀物之后,移除溶剂以得到黄色固体。使粗产物从二氯甲烷/己烷中再结晶以获得白色固体(70%收率, 1.39g)。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz):  $\delta$ 4.25 (s, 2H,  $\text{N}_3\text{CH}_2$ ), 2.88 (s, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ )。  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz): 168.7, 164.4,

48.2, 25.8。LRMS (ESI)  $m/z$ :  $C_6H_7N_4O_4 [M+H]^+$  计算值199.0, 实验值199.0。

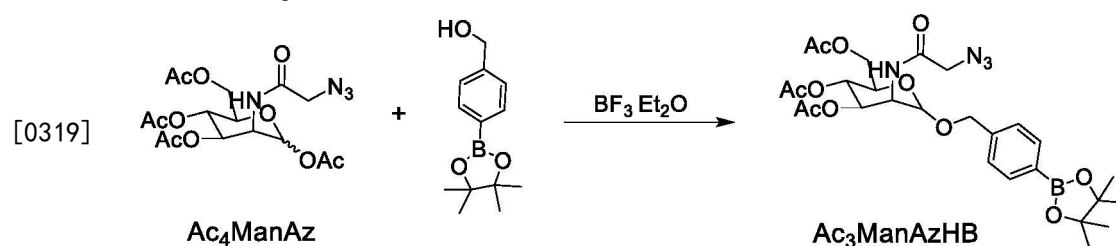
[0314]  $Ac_4ManAz$ 的合成。将D-甘露糖胺盐酸盐(539mg, 2.5mmol)和三乙胺(253mg, 2.5mmol)溶解于甲醇(40mL)中, 随后添加2(545mg, 2.75mmol)。在室温下搅拌混合物24小时。在减压下移除溶剂, 并且将残留物再溶解于吡啶中。添加乙酸酐(10mL), 并且在室温下再搅拌反应混合物24小时。在移除溶剂之后, 使用乙酸乙酯/己烷(1/1, v/v)作为洗脱剂, 通过硅胶柱色谱纯化粗产物以得到白色固体(45%收率, 484.5mg)。LRMS (ESI)  $m/z$ :  $C_{16}H_{22}N_4O_{10}Na [M+Na]^+$  计算值453.1, 实验值453.1。

[0315]  $Ac_3ManAzEt$ 的合成。将 $Ac_4ManAz$ (43mg, 0.1mmol)和无水乙醇(14mg, 0.3mmol)溶解于无水DCM(1.5mL)中, 并且用氮气吹扫10分钟。通过注射器添加三氟化硼醚化物(71mg, 0.5mmol)。在室温下在黑暗下搅拌混合物过夜。然后添加DCM(30mL), 并且溶液分别用饱和碳酸氢钠溶液洗涤两次(10mL  $\times$  2)和去离子水洗涤两次(10mL  $\times$  2)。收集有机相, 用无水硫酸钠干燥, 并且浓缩以得到黄色油状物。使用乙酸乙酯/己烷(1/1, v/v)作为洗脱剂通过硅胶柱色谱纯化粗产物以得到白色固体(30%收率, 12.5mg)。LRMS (ESI)  $m/z$ :  $C_{16}H_{25}N_4O_9 [M+H]^+$  计算值417.2, 实验值417.2。

[0316]  $Ac_3ManAzNB$ 的合成。将 $Ac_4ManAz$ (43mg, 0.1mmol)和2-硝基苄基醇(30mg, 0.2mmol)溶解于无水DCM(1.5mL)中, 并且用氮气吹扫10分钟。通过注射器添加三氟化硼醚化物(70.9mg, 0.5mmol)。在室温下在氮气氛围下搅拌混合物过夜。然后添加DCM(30mL), 并且溶液分别用饱和碳酸氢钠溶液洗涤两次(10mL  $\times$  2)和去离子水洗涤两次(10mL  $\times$  2)。收集有机相, 用无水硫酸钠干燥, 并且浓缩以得到棕色油状物。使用乙酸乙酯/己烷(1/1, v/v)作为洗脱剂通过硅胶柱色谱纯化粗产物以得到浅红色固体(25%收率, 13.0mg)。LRMS (ESI)  $m/z$ :  $C_{21}H_{25}N_5O_{11}Na [M+Na]^+$  计算值546.2, 实验值546.2。

[0317]  $Ac_3ManAzNB$ 的UV诱导降解。将 $Ac_3ManAzNB$ (1mg)溶解于无水DCM(1.0mL)中并且在室温下在UV照射下搅拌。UV照射的强度设定为20mW/cm<sup>2</sup>。在选择的时间点(0、5、15和30分钟)取出20 $\mu$ L的反应溶液, 并且在HPLC测量之前稀释到600 $\mu$ L。在HPLC示出起始材料的完全降解之后, 测量反应溶液的ESI质谱以确认降解的产物。

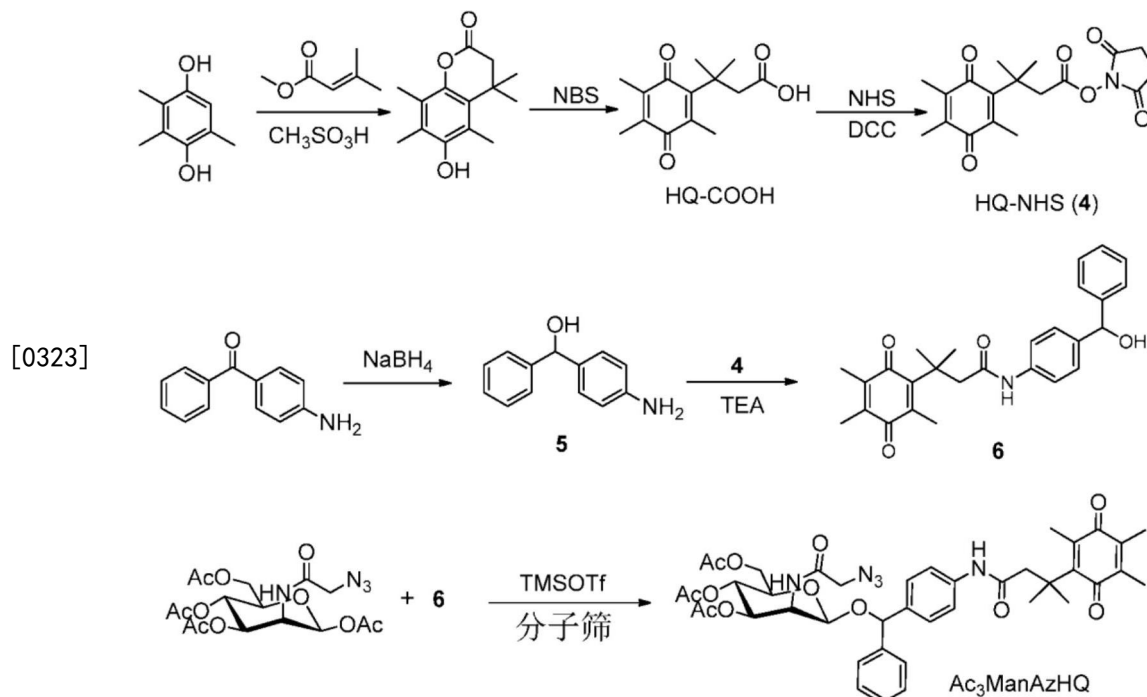
[0318] 流程S2.  $Ac_3ManAzHB$ 的合成途径



[0320]  $Ac_3ManAzHB$ 的合成。类似于 $Ac_3ManAzEt$ 和 $Ac_3ManAzNB$ 合成 $Ac_3ManAzHB$ 。将 $Ac_4ManAz$ (43mg, 0.1mmol)和4-羟基苯基硼酸频哪醇酯(44mg, 0.2mmol)溶解于无水DCM(1.5mL)中, 并且用氮气吹扫10分钟。通过注射器添加三氟化硼醚化物(71mg, 0.5mmol)。在室温下在黑暗下搅拌混合物过夜。添加DCM(30mL), 并且溶液分别用饱和碳酸氢钠溶液洗涤两次(10mL  $\times$  2)和去离子水洗涤两次(10mL  $\times$  2)。收集有机相, 用无水硫酸钠干燥, 并且浓缩以得到黄色油状物。使用己烷/乙酸乙酯(2/1到1/1, v/v)作为洗脱剂通过硅胶柱色谱纯化粗产物以得到无色油状物(50%收率, 30.0mg)。LRMS (ESI)  $m/z$ :  $C_{27}H_{38}BN_4O_{11} [M+H]^+$  计算值605.3, 实验值605.1。

[0321] 在 $H_2O_2$ 存在下 $Ac_3ManAzHB$ 的降解研究。将 $Ac_3ManAzHB$  (2mg) 溶解于无水甲醇 (1.0mL) 中。添加最终 $H_2O_2$ 浓度为10mM的 $H_2O_2$ 水溶液, 并且在 $37^\circ C$ 下保温所得混合物。在不同的时间点 (0分钟、1小时、6小时、24小时和48小时) 取出20 $\mu$ L的反应溶液, 并且在HPLC测量之前稀释到600 $\mu$ L。通过ESI质谱确认降解的产物。

[0322] 流程S3. $Ac_3ManAzHQ$ 的合成途径



[0324] HQ-NHS (4) 的合成。遵循报导的程序合成HQ-COOH。<sup>1</sup>将HQ-COOH (2.0mmol, 501mg)、N-羟基丁二酰亚胺(NHS, 2.1mmol, 242mg) 和三甲胺 (2.0mmol, 202mg) 溶解于无水DMF (30mL) 中, 随后添加N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC, 2.1mmol, 433mg)。在室温下搅拌混合物24小时。过滤出沉淀物, 并且在减压下移除溶剂。使用己烷/乙酸乙酯 (3/1, v/v) 作为洗脱剂通过硅胶柱色谱纯化粗产物以得到黄色固体 (75%收率)。LRMS (ESI)  $m/z$ :  $C_{18}H_{22}NO_6$   $[M+H]^+$  计算值 348.1, 实验值 348.1。

[0325] 化合物5的合成。将4-氨基二苯甲酮 (5mmol, 985mg) 溶解于无水甲醇 (50mL) 中, 随后添加 $NaBH_4$  (10mmol, 378mg)。在室温下搅拌混合物24小时。在移除溶剂之后, 使用己烷/乙酸乙酯 (6/1到3/1) 作为洗脱剂通过硅胶柱色谱纯化粗产物。获得呈淡黄色固体的化合物5 (80%收率)。LRMS (ESI)  $m/z$ :  $C_{13}H_{14}NO$   $[M+H]^+$  计算值 200.1, 实验值 200.1。

[0326] 化合物6的合成。将化合物4 (1.0mmol, 347mg) 和5 (1.0mmol, 199mg) 溶解于无水DMF (40mL) 中, 随后添加三乙胺 (1.0mmol, 101mg)。在 $50^\circ C$ 下搅拌混合物48小时。然后在减压下移除溶剂, 并且使用己烷/乙酸乙酯 (1/1) 作为洗脱剂通过硅胶柱色谱纯化粗产物。获得呈淡黄色固体的化合物6。LRMS (ESI)  $m/z$ :  $C_{27}H_{30}NO_4$   $[M+H]^+$  计算值 432.2, 实验值 432.2。

[0327]  $Ac_3ManAzHQ$ 的合成。将 $Ac_4ManAz$  (0.2mmol, 86mg) 溶解于无水THF中, 随后添加在THF中的TMSOTf (0.25mmol)。在室温下搅拌混合物48小时。添加分子筛 (3 Å), 并且在室温下进一步搅拌混合物6小时。然后添加化合物6, 并且在室温下进一步搅拌反应溶液24小时。在移除溶剂之后, 使用乙酸乙酯到乙酸乙酯/甲醇 (95/5, v/v) 作为洗脱剂通过硅胶柱色谱纯化粗产物。获得淡黄色固体 (35%收率)。LRMS (ESI)  $m/z$ :  $C_{41}H_{47}N_5O_{12}Na$   $[M+Na]^+$  计算值 824.3,

实验值824.3。

[0328]  $\text{Ac}_3\text{ManAzHQ}$ 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 诱导降解。将 $\text{Ac}_3\text{ManAzHQ}$  (1mg) 溶解于甲醇/ $\text{H}_2\text{O}$  (9/1, v/v, 1mL) 中, 随后添加 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  (1mg)。在37℃下搅拌混合物(100rpm)。在选择的时间点, 将20 $\mu\text{L}$ 的溶液注射到HPLC中以监测 $\text{Ac}_3\text{ManAzHQ}$ 的降解过程。在HPLC示出完全降解之后, 测量ESI质谱以确认降解的产物。

[0329] 实例2.  $\text{Ac}_4\text{ManAz}$ 衍生物在细胞标记中的探究

[0330] 为了证实通过形成糖苷(醚)键修饰 $\text{Ac}_4\text{ManAz}$ 的C1位点是否可阻断代谢标记过程, 我们首先合成 $\text{Ac}_3\text{ManAzEt}$ 、对应的乙基糖苷(图2, 图区a), 并且探究其体外细胞标记能力。分别用 $\text{Ac}_4\text{ManAz}$ 、 $\text{Ac}_3\text{ManAzEt}$ 和PBS培育LS174T结肠癌细胞三天, 并且经由点击反应通过DBC0-Cy5检测潜在表达的叠氮基。如图2图区c中所示, 用 $\text{Ac}_4\text{ManAz}$ 处理的细胞在细胞表面上示出强Cy5荧光, 指示叠氮基的成功表达。相比之下, 用 $\text{Ac}_3\text{ManAzEt}$ 或PBS处理的LS174T细胞在细胞表面上示出可忽略的Cy5荧光, 指示 $\text{Ac}_3\text{ManAzEt}$ 未能经由代谢标记过程将叠氮基引入到细胞表面上。用 $\text{Ac}_4\text{ManAz}$ 处理的LS174T细胞的流式细胞术分析还示出比用 $\text{Ac}_3\text{ManAzEt}$ 或PBS处理的细胞显著增强的Cy5荧光(图2, 图区d)。为了确认叠氮基在细胞表面上以糖蛋白形式表达, 执行分别用 $\text{Ac}_4\text{ManAz}$ 、 $\text{Ac}_3\text{ManAzEt}$ 和PBS处理的LS174T细胞的蛋白质印迹分析。叠氮基糖蛋白通过与磷化氢-PEG<sub>3</sub>-生物素一起培育来生物素化, 并且因此可容易被检测。图2图区e中示出结果, 其示出在 $\text{Ac}_4\text{ManAz}$ 组中的一系列蛋白质带, 而在 $\text{Ac}_3\text{ManAzEt}$ 和PBS组中仅LS174T细胞的两个内源性生物素化的蛋白质。这些数据证实 $\text{Ac}_3\text{ManAzEt}$ 未能用叠氮基代谢地标识癌细胞。

[0331] 为了进一步证实在C1位点处的糖苷键是引起阻断代谢标记过程的原因和此键裂解以暴露1-OH可再活化标记过程, 合成UV-可裂解 $\text{Ac}_3\text{ManAzNB}$ (图2, 图区b), 并且体外探究其受控标记能力。在有或没有UV处理(10分钟, 10mW/cm<sup>2</sup>)的情况下, 用 $\text{Ac}_3\text{ManAzNB}$ 培育LS174T细胞三天, 并且通过DBC0-Cy5检测细胞表面叠氮基。在没有UV照射的情况下, 用 $\text{Ac}_3\text{ManAzNB}$ 处理的LS174T细胞在细胞表面上示出可忽略的Cy5荧光, 进一步证实在C1位点处的化学修饰的阻断效应(图2, 图区c)。然而, 在存在UV照射的情况下, 由于 $\text{Ac}_3\text{ManAzNB}$ 降解成再活化标记过程的 $\text{Ac}_3\text{ManAzOH}$ , LS174T细胞示出强Cy5荧光。流式细胞术分析还示出与仅用 $\text{Ac}_3\text{ManAzNB}$ 处理的细胞相比, 在用 $\text{Ac}_3\text{ManAzNB}$ 和UV照射处理的LS174T细胞中显著增强的Cy5荧光(图2, 图区d)。用 $\text{Ac}_3\text{ManAzNB}/\text{UV}$ 处理的LS174T细胞的蛋白质印迹分析示出一系列蛋白质带, 指示成功地将叠氮基并入到细胞表面糖蛋白中。相比之下, 仅用 $\text{Ac}_3\text{ManAzNB}$ 处理的LS174T细胞示出与PBS组相同的两个内源性生物素化的蛋白质带。以此方式, 我们完全证实了假设, 即通过形成糖苷进行的 $\text{Ac}_4\text{ManAz}$ 的C1位点的化学修饰可阻断整个代谢标记过程, 所述代谢标记过程将在存在可裂解糖苷键以暴露1-OH的特定触发子的情况下再活化。

[0332] 叠氮基糖标记的细胞的共焦成像的一般程序。以40k/孔的细胞密度将细胞接种到6孔板中盖玻片上。以50 $\mu\text{M}$ 的最终浓度添加 $\text{Ac}_4\text{ManAz}$ 或 $\text{Ac}_3\text{ManAz}$ 衍生物, 并且将细胞在37℃下培育72小时。移除培养基, 并且用PBS洗涤培养基三次。然后添加在Opti-MEM中的DBC0-Cy5 (50 $\mu\text{M}$ ), 并且再培育细胞1小时。然后移除培养基, 并且用PBS洗涤细胞三次。添加4%多聚甲醛(PFA)溶液以使细胞固定持续10分钟, 随后用DAPI (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 对细胞核进行染色持续10分钟。将盖玻片安装在添加有ProLong Gold抗衰减剂(ProLong Gold antifade reagent)的显微镜载玻片上, 并且将所制备的样品储存在黑暗下用于成像。

[0333] 叠氮基糖标记的细胞的流式细胞术分析的一般程序。以40k/孔的细胞密度将细胞接种到6孔板中盖玻片上。添加Ac<sub>4</sub>ManAz或Ac<sub>3</sub>ManAz衍生物,并且与细胞一起培育72小时。在移除培养基和多次洗涤步骤之后,添加在opti-MEM中的DBCO-Cy5,并且与细胞一起在37℃下培育1小时。然后移除opti-MEM,并且用PBS洗涤细胞三次。通过用胰蛋白酶溶液(1mL)在37℃下培育3分钟提升细胞,并且将细胞转移到添加有4%PFA溶液(0.5mL)的试管。通过流式细胞术对每个样品分析二万个细胞,并且在FCS Express软件上执行数据分析。

[0334] Ac<sub>3</sub>ManAzNB介导的受控细胞标记。以40k/孔的细胞密度将LS174T细胞接种到6孔板中盖玻片上。添加最终浓度为50μM的Ac<sub>3</sub>ManAzNB。允许细胞附着12小时,在此阶段施加UV光(20mW/m<sup>2</sup>)持续10分钟,并且进一步培育细胞60小时。在没有UV照射的情况下持续地培育细胞72小时。然后遵循以上提及的程序制备用于共焦成像和流式细胞术的细胞样品。

[0335] Ac<sub>3</sub>ManAzHQ介导的受控细胞标记。以40k/孔的细胞密度将LS174T结肠癌细胞或Caco-2结肠癌细胞或人类成纤维细胞IMR90细胞接种到6孔板中盖玻片上,并且允许其附着过夜。添加最终浓度为50μM的Ac<sub>3</sub>ManAzHQ,随后添加最终浓度为50μM的姜黄素。仅用PBS或Ac<sub>3</sub>ManAzHQ处理的细胞用作对照组。在72小时培育之后,遵循以上提及的程序制备用于共焦成像和流式细胞术的细胞样品。

[0336] 用叠氮基糖处理的细胞的蛋白质印迹分析。以每个板1×10<sup>6</sup>个细胞的密度将LS174T细胞接种到细胞培养瓶上(25cm<sup>2</sup>生长面积)5mL培养基中。添加不同的叠氮基糖,并且与细胞一起培育72小时。细胞用PBS洗涤两次,并且使用细胞刮棒从烧瓶采集。通过以1000rpm离心5分钟使细胞团粒化,并且将细胞再悬浮于200μL的含有1片蛋白酶抑制剂(不含EDTA)的裂解缓冲剂(1%SDS,100mM Tris.HCl,pH 7.4)中。将裂解物在4℃下培育30分钟,随后以3000rcf离心10分钟以移除不可溶碎片。每个样品中可溶蛋白质的总浓度通过二喹啉甲酸(BCA)检定来测定并且调节到相同浓度。然后取出20μL的裂解物,并且用磷化氢-PEG<sub>3</sub>-生物素(2μL,在PBS中5mM)在37℃下培育6小时。将加载缓冲剂添加到每个样品,并且在95℃下加热之后将样品加载到10%SDS-PAGE凝胶上。在凝胶上跑动100分钟之后,将蛋白质转移到Hybond P膜,随后用在TBST(50mM Tris.HCl,150mM NaCl,0.1%Tween 20,pH 7.4)中的5%牛血清白蛋白(BSA)阻断膜持续2小时。然后,膜用抗生蛋白链菌素-HRP(1:2000稀释在TBST中)在4℃下培育过夜,用TBST冲洗三次并且通过ECL蛋白质印迹底物显影。为了蛋白质带的荧光可视化,直接用DBCO-Cy3溶液培育20μL的细胞裂解物3小时。在凝胶跑动和膜转移之后,使用具有Cy3/Cy3(激发/发射)通道的Image Quant LAS 4010系统可视化蛋白质带。

[0337] 实例3.Ac<sub>4</sub>ManAz衍生物在体内细胞标记中的探究

[0338] 接下来,我们研究包括Ac<sub>3</sub>ManAzEt和Ac<sub>3</sub>ManAzNB的Ac<sub>3</sub>ManAz衍生物在体内是否可维持其阻断效应。对携带皮下LS174T肿瘤的无胸腺裸小鼠每天一次分别用Ac<sub>4</sub>ManAz、Ac<sub>3</sub>ManAzEt或Ac<sub>3</sub>ManAzNB注射到左侧肿瘤持续三天。右侧肿瘤用作对照组。在注射后(p.i.)24小时,采集肿瘤以确定肿瘤细胞是否代谢地标记有叠氮基。如所预期,用Ac<sub>4</sub>ManAz处理的肿瘤示出一系列经叠氮基修饰的糖蛋白,而用Ac<sub>3</sub>ManAzEt或Ac<sub>3</sub>ManAzNB处理的肿瘤示出与PBS组相同的内源性蛋白质带,这指示Ac<sub>3</sub>ManAzEt和Ac<sub>3</sub>ManAzNB未能在体内用叠氮基代谢地标记癌细胞。为了理解表达的叠氮基将如何改善DBCO-载体(cargo)的肿瘤积累,在单独研究中,我们在注射叠氮基糖后24小时静脉内(i.v.)注射DBCO-Cy5,并且使用体内荧光成像

监测其生物分布(图3,图区a)。在注射后24小时,用Ac<sub>4</sub>ManAz预处理的左侧肿瘤示出比右侧肿瘤强得多的Cy5荧光强度(FI)(图3,图区b),表明在体内Ac<sub>4</sub>ManAz成功地标记肿瘤细胞并且通过点击反应产生DBC0-Cy5的显著增强的肿瘤保留。相比之下,用Ac<sub>3</sub>ManAzEt或Ac<sub>3</sub>ManAzNB预处理的肿瘤与对照组肿瘤相比,示出可忽略的Cy5保留增强。与对照组肿瘤相比,经Ac<sub>4</sub>ManAz处理的肿瘤的离体成像在Cy5FI方面示出超过4倍的增加(图3,图区c和d)。对于Ac<sub>3</sub>ManAzEt和Ac<sub>3</sub>ManAzNB组,未观测到经处理肿瘤和对照组肿瘤之间在Cy5FI方面的显著差异。与Ac<sub>3</sub>ManAzEt和Ac<sub>3</sub>ManAzNB组中可忽略的Cy5荧光形成鲜明的对比,用Ac<sub>4</sub>ManAz处理的肿瘤切片的共焦成像还示出强Cy5荧光。这些实验不仅证实在体内Ac<sub>3</sub>ManAzEt和Ac<sub>3</sub>ManAzNB的阻断效应,而且指示由高效点击化学介导的优异体内癌症靶向效应。

[0339] Ac<sub>4</sub>ManAz、Ac<sub>3</sub>ManAzEt和Ac<sub>3</sub>ManAzNB的体内肿瘤标记。通过将在HBSS/基质胶(1/1, v/v)中的LS174T结肠癌细胞(150万)皮下注射到两个侧腹,在6周大的无胸腺裸小鼠上建立LS174T肿瘤模型。当肿瘤生长到5-6mm时,每天一次将Ac<sub>4</sub>ManAz或Ac<sub>3</sub>ManAzEt或Ac<sub>3</sub>ManAzNB(25mM, 20μL)注射到左侧肿瘤中持续三天,同时将相同量的PBS注射到右侧肿瘤,作为对照组(每组N=3)。在最后一次注射后24小时,静脉内注射DBC0-Cy5(5mg/kg),并且通过体内荧光成像监测其生物分布。在成像之前,将裸小鼠置于配备有麻醉输入和输出端口的样品台上,并且通过Maestro体内荧光成像系统(Maestro In-Vivo Fluorescence Imaging System)成像。使用575-605nm的激发滤光片。在用于在每个波长下获取图像的50毫秒的暴露时间的情况下,可调的发射滤光片以10nm增量从630nm自动步进到850nm。通过使用光谱分解算法以从Cy5信号减去自体荧光的Maestro软件分析收集的图像。在注射DBC0-Cy5后24小时从小鼠采集肿瘤和主要器官。使用Maestro系统类似收集离体图像。使用Maestro成像软件量化在选择的ROI下的荧光强度。所有值以平均值±标准偏差形式呈现(n=3)。

[0340] 组织的蛋白质印迹分析。将从经叠氮基糖处理的小鼠采集的肿瘤和器官转移到含有2mL的裂解缓冲液(1%SDS, 100mM Tris.HCl, pH 7.4)的玻璃管中、均质化并且在4℃下培育30分钟。然后将裂解物以3000rcf离心10分钟以移除不可溶碎片。总可溶蛋白质浓度通过BCA检定测定并且对于每个组调节到5mg/mL。其余程序与以上提及的细胞的蛋白质印迹分析相同。

[0341] 肿瘤组织切片的共焦成像。在离体成像之后,将肿瘤直接冷冻在O.C.T.化合物中,并且在低温恒温器(Leica CM3050S)上切片,其中厚度为6-8μm。在PBS中的DAPI(2μg/mL)添加到组织附着的显微镜载玻片上以对细胞核进行染色。在10分钟之后,移除DAPI溶液并且用PBS洗涤组织三次。将盖玻片安装在添加有ProLong Gold抗衰减剂的显微镜载玻片上,并且将所制备的样品储存在黑暗下用于共焦成像。

[0342] 实例4. 替代的自我牺牲型连接基团的探究

[0343] 在证实受控标记策略之后,我们接下来旨在将其应用于体内癌症标记和靶向。由于UV因为其差组织穿透和对健康组织的潜在破坏而不是实用的体内触发子,所以我们旨在研发响应于内部癌症特异性触发子(如氧化还原调节异常、升高的氧化剂水平和过度表达的酶)的Ac<sub>3</sub>ManAz衍生物。然而,不同于可直接将2-硝基苯甲基糖苷键裂解成羟基的UV照射,这些触发子不能够直接裂解糖苷键,因此需要并入可在保护基团的触发子诱导的裂解之后最终释放羟基的自我牺牲型连接基团。两种常规的自我牺牲型连接基团CL1和CL2已经广泛用于前药设计中(图4,图区a)。在移除保护基团时,CL1可快速脱除CO<sub>2</sub>分子以暴露羟

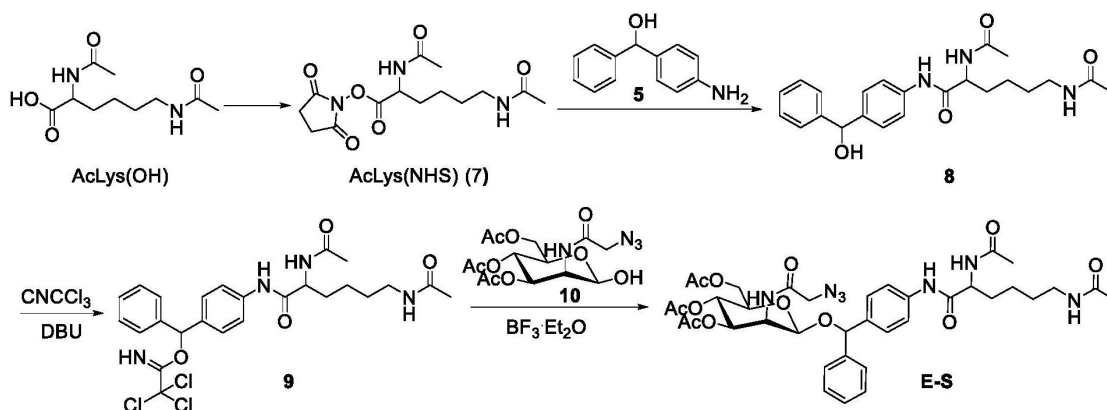
基。然而,CL1含有可容易被细胞酯酶降解的碳酸酯键,并且因此不可用于此设计。CL2可在移除保护基团时快速释放作为良好离去基团的酚结构。考虑到具有未掩蔽1-OH的糖化合物可是良好的离去基团,我们设计具有与CL2类似的结构PL1(图4,图区b),并且将PL1并入到过氧化氢( $H_2O_2$ )响应性 $Ac_3ManAzHB$ 中。然而,即使保护基团容易地通过 $H_2O_2$ 移除,但是 $Ac_3ManAzHB$ 未能释放 $Ac_3ManAzOH$ 。然后,基于极稳定的降解产物将促进自我牺牲型连接基团的裂解的假定,我们设计具有连接到PL1的 $\alpha$ 碳的附加苯基的PL2(图4,图区c)。

#### [0344] 实例5.附加触发子响应性组的探究

[0345] 为了探究PL2作为自我牺牲型连接基团的可行性,合成具有NQO1酶响应性保护基团的 $Ac_3ManAzHQ$ ,并且使用连二亚硫酸钠作为代表性还原剂研究其体外降解。在存在连二亚硫酸钠的情况下, $Ac_3ManAzHQ$ 经历快速降解,其中ESI MS确认形成 $Ac_3ManAzOH$ 作为降解产物。然后我们测试在体外NQO1响应性 $Ac_3ManAzHQ$ 的受控代谢标记能力。在用 $Ac_3ManAzHQ$ 培育三天并且用DBC0-Cy5培育1小时之后,富含NQO1酶的LS174T结肠癌细胞在细胞表面上示出均匀Cy5荧光,指示叠氮基的成功表达。然而,缺乏NQO1的Caco-2结肠癌和IMR-90人类成纤维细胞系在细胞表面上示出可忽略的Cy5荧光。为了进一步确认NQO1酶在活化 $Ac_3ManAzHQ$ 的代谢标记能力中的重要作用,我们研究NQO1酶的抑制剂姜黄素是否能够抑制 $Ac_3ManAzHQ$ 介导的细胞标记。因此,与仅用 $Ac_3ManAzHQ$ 处理的细胞相比,在用 $Ac_3ManAzHQ$ 和姜黄素共培育的LS174T细胞中观测到标记效率的显著降低。

[0346] 图5中示出触发子可活化 $Ac_3ManAz$ 衍生物的库,所述触发子可活化 $Ac_3ManAz$ 衍生物响应于外部触发子(近红外(NIR)光)或内部触发子( $H_2O_2$ 、肿瘤低氧环境、NAD(P)H脱氢酶醌1(NQO1)和组蛋白脱乙酰基酶(HDAC)/组织蛋白酶L(CTSL))。其中,HDAC/CTSL响应性糖衍生物E-S能够在体外和体内两者进行选择性的癌症标记。

#### [0347] 实例6.HDAC/CTSL响应性糖衍生物E-S的合成



[0349] AcLys(NHS)(7)的合成。将AcLys(OH)(2.0mmol,460mg)和三甲胺(2.1mmol,212mg)溶解于无水DMF(40mL)中,随后添加DCC(2.1mmol,433mg)和NHS(2.1mmol,242mg)。在室温下搅拌反应混合物24小时。过滤出沉淀物,并且在减压下移除溶剂。使用乙酸乙酯作为洗脱剂通过硅胶柱色谱纯化粗产物以得到淡黄色固体(70%收率)。

[0350] 化合物8的合成。将AcLys(NHS)(1.2mmol)和化合物5(1.2mmol)溶解于无水DMF(30mL)中,随后添加三甲胺(1.2mmol)。在40℃下搅拌混合物24小时。在移除溶剂之后,使用乙酸乙酯到乙酸乙酯/甲醇(20/1,v/v)作为洗脱剂通过硅胶柱色谱纯化粗产物以得到淡黄色固体(60%收率)。 $^1H$  NMR( $CD_3OD$ ,500MHz): $\delta$ (ppm)7.50(d,2H,Ph),7.34(d,2H,Ph),7.29

(m, 4H, Ph), 7.21 (t, 1H, Ph), 5.74 (s, 1H, CH(OH)), 4.39 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)CH<sub>3</sub>), 3.15 (t, 2H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)CH<sub>3</sub>), 2.00 (s, 3H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)CH<sub>3</sub>), 1.89 (s, 3H, CHNHC(O)CH<sub>3</sub>), 1.83&1.72 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)CH<sub>3</sub>), 1.53 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)CH<sub>3</sub>), 1.41 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)CH<sub>3</sub>)。<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz): 172.2, 172.0, 171.7, 144.7, 140.9, 137.3, 128.1, 127.0, 126.5, 120.1, 75.3, 54.4, 38.9, 31.7, 28.9, 23.1, 21.4, 21.2。ESI MS (m/z): C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 计算值434.2, 实验值434.2。

[0351] AcLys (DPM-CNCCl<sub>3</sub>) (9) 的合成。将化合物8 (0.5mmol) 和CNCCl<sub>3</sub> (5.0mmol) 溶解于无水THF中, 随后添加1,8-二氮杂双环十一-7-烯 (DBU, 0.5mmol)。在室温下搅拌反应混合物4小时。在移除溶剂之后, 通过硅胶柱色谱纯化粗产物以得到白色固体。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz) δ (ppm) 7.99 (m, 1H), 7.53 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.38-7.19 (m, 7H), 5.27 (s, 1H), 4.43 (m, 1H), 3.73 (m, 1H), 3.17 (m, 2H), 2.02 (s, 3H), 1.91 (s, 3H), 1.84&1.73 (m, 2H), 1.55 (m, 2H), 1.44 (m, 2H)。<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz): 208.42, 172.2, 172.1, 171.7, 142.4, 138.5, 137.6, 128.2, 127.3, 126.8, 120.2, 101.8, 85.0, 64.4, 54.3, 39.1, 31.7, 28.9, 23.1, 21.4, 21.3。

[0352] Ac<sub>3</sub>ManAzOH (10) 的合成。将Ac<sub>4</sub>ManAz (0.5mmol) 和碳酸铵 (0.75mmol) 溶解于THF/甲醇 (2/1, v/v) 中, 并且在室温下搅拌。在12小时之后, 移除溶剂并且通过硅胶柱色谱纯化粗产物以得到白色固体。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz): δ (ppm) 6.56 (d, J=9.2Hz, 1H), 5.44 (dd, J=10.1, 4.2Hz, 1H), 5.22 (s, 1H), 5.18 (t, 1H), 4.63 (ddd, J=9.2, 4.2, 1.8Hz, 1H), 4.31-4.01 (m, 5H), 3.74 (m, 1H), 2.14&2.08&2.05 (s, 9H)。<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz): δ (ppm) 171.0, 170.4, 170.1, 167.1, 93.4, 69.2, 68.4, 66.0, 62.5, 52.7, 50.9, 21.1, 21.0, 20.9。

[0353] E-S的合成。将Ac<sub>3</sub>ManAzOH (0.2mmol) 和AcLys (DPM-CNCCl<sub>3</sub>) 溶解于无水乙腈中, 随后添加三氟化硼醚化物 (2.0mmol)。在0℃下搅拌混合物1小时。在移除溶剂之后, 通过硅胶柱色谱和HPLC纯化粗产物以得到白色固体。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz): δ (ppm) 7.55 (m, 2H, Ph), 7.35-7.28 (m, 7H, Ph), 6.73 (m, 1H, CH<sub>3</sub>C(O)NHCH), 6.50 (m, 1H, CH<sub>2</sub>C(O)NHCH), 5.95 (m, 1H, CH<sub>3</sub>C(O)NHCH<sub>2</sub>), 5.65 (s, 1H, PhCH), 5.43 (ddd, J=10.1, 8.3, 4.2Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CHCHCH), 5.17 (td, J=10.2, 3.2Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CHCHCH), 4.75-4.80 (m, 1H, NHCHCHO), 4.68 (m, 1H, NHCHCHO), 4.55 (q, J=7.3Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)CH<sub>3</sub>), 4.18&4.05 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CHCHCH), 4.02 (m, 2H, COCH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 3.94 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CHCHCH), 3.22 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)CH<sub>3</sub>), 2.12&2.06&2.03&1.99&1.96 (15H, CH<sub>3</sub>C(O)O), 1.93&1.74 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)CH<sub>3</sub>), 1.51 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)CH<sub>3</sub>), 1.38 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)CH<sub>3</sub>)。<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz): δ (ppm) 171.5, 171.2, 170.7, 170.4, 170.0, 170.0, 166.8, 141.2, 137.8, 137.2, 135.6, 129.1, 128.8, 128.5, 127.5, 126.7, 120.2, 80.0, 77.5, 77.5, 77.3, 77.2, 77.0, 69.9, 69.0, 65.8, 62.3, 53.9, 52.7, 50.5, 38.8, 31.3, 29.1, 23.4, 22.5, 21.1, 20.9。HR ESI MS (m/z): C<sub>37</sub>H<sub>48</sub>N<sub>7</sub>O<sub>12</sub> [M+H]<sup>+</sup> 计算值782.3361, 实验值782.3354。

#### [0354] 实例7. 针对改善标记癌细胞的选择性的体外研究

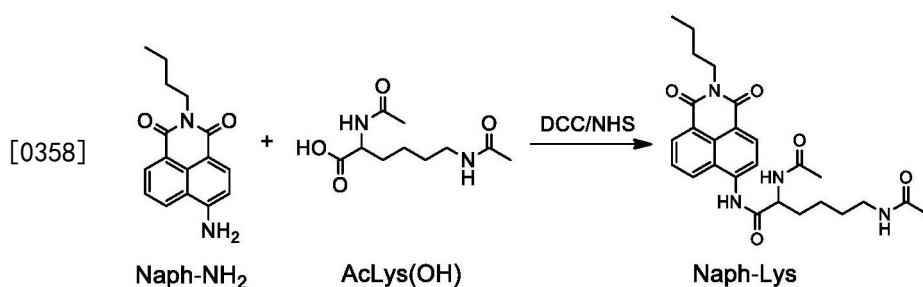
[0355] 在证实PL2用于触发子可活化笼式糖前体的设计的可行性之后, 接下来我们旨在研发具有更佳癌症选择性标记能力的Ac<sub>3</sub>ManAz衍生物。与NQO1酶相比, 若干其它酶类更佳地表示癌细胞和正常细胞之间的总体差异。举例来说, 报导组蛋白脱乙酰基酶 (HDAC) 和组织蛋白酶L (CTSL) 两者在癌细胞系中过度表达。在我们的将HDAC和CTSL组合为单一触发子



的E-S的设计中,首先,HDAC移除赖氨酸残基的乙酰基,随后通过CTSL裂解肽键并且移除自我牺牲型连接基团,释放代谢活性的Ac<sub>3</sub>ManAzOH(图6,图区A)。为了检测在不同细胞系中的HDAC/CTSL活性,我们首先合成荧光报导子(Naph-Lys),所述荧光报导子的荧光将在存在HDAC和CTSL两者的情况下点亮。在大多数癌细胞系(包括LS174T结肠癌细胞、MCF-7乳腺癌细胞、4T1三阴性乳腺癌细胞、海拉(HeLa)细胞和HepG2肝癌细胞)中HDAC/CTSL活性比在健康细胞系(包括IMR-90人类成纤维细胞)中高得多。然而,在存在HDAC的抑制剂(曲古抑菌素A(TSA))或CTSL的抑制剂(Z-FY-CHO)的情况下,由于降低的酶活性,Naph-Lys的点亮荧光强度大大地降低。然后,我们通过用E-S培育不同细胞系三天并且随后使用DBCO-Cy5检测潜在表达的叠氮基,来探究在体外E-S的受控细胞标记能力。与在IMR-90细胞的表面上观测到的可忽略的Cy5荧光形成鲜明的对比,CLSM图像示出在LS174T细胞表面上的清楚和明亮的Cy5荧光信号(图6,图区b和c),表明E-S在LS174T结肠癌细胞中的选择性标记能力超过人类成纤维细胞。当用E-S和HDAC的抑制剂(TSA)或CTSL的抑制剂(Z-FY-CHO)共培育LS174T细胞时,E-S的标记效率大大地降低图6,图区b和d),这暗示E-S的标记过程的HDAC/CTSL诱导的再活化。

[0356] 为了获得对E-S代谢标记过程更佳的理解,我们分析体外E-S的标记动力学。在用各种浓度(10 $\mu$ M、50 $\mu$ M、200 $\mu$ M和1mM)的E-S培育LS174T细胞不同的时间(1小时、3小时、6小时、12小时、24小时、48小时和72小时)之后,通过DBCO-Cy5检测细胞表面叠氮化物。因为DBCO-Cy5的低细胞吸收量,所以细胞表面叠氮化物可通过测量Cy5荧光强度来半定量地测定和比较。E-S的代谢标记过程是时间依赖性和浓度依赖性的,其中细胞表面叠氮化物的数量在48小时接近平台值。在用E-S(200 $\mu$ M)培育LS174T细胞48小时之后,细胞表面叠氮化物的数量密度的估算指示每个细胞10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup>个叠氮化物的值。与在常规靶向策略中蛋白质受体的数量密度(据报导为每个细胞~10<sup>3</sup>到10<sup>4</sup>个)相比,由叠氮基糖联合点击反应产生的靶向效率可潜在地高得多。

[0357] HDAC/CTSL荧光报导子(Naph-Lys)的合成途径



[0359] Naph-NH<sub>2</sub>的合成。将4-氨基-1,8-萘二甲酸酐(10mmol,2.13g)在氮气氛围下溶解于乙醇中并且进行回流。然后添加1-丁胺并且使混合物进一步回流8小时。在冷却之后,在减压下移除溶剂,并且使用DCM/乙酸乙酯(2/1,v/v)作为洗脱剂通过硅胶柱色谱纯化粗产物(75%收率)。<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>,500MHz): $\delta$ 8.60(d,1H,C(O)CCHCHCH),8.42(d,1H,C(O)CCHCHCH),8.10(d,1H,C(O)CCHCHCH),7.66(t,1H,C(O)CCHCHCH),6.89(d,1H,C(O)CCHCHCH),4.94(s,2H,NH<sub>2</sub>),4.18(t,2H,CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>),1.71(m,2H,CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>),1.45(m,2H,CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>),0.97(s,3H,CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)。

[0360] Naph-Lys的合成。将Naph-NH<sub>2</sub>(1.0mmol)和AcLys(OH)(1.0mmol)溶解于无水DMF(40mL)中,随后添加DCC(1.1mmol)、NHS(1.1mmol)和三乙胺(1.0mmol)。在45℃下搅拌混合

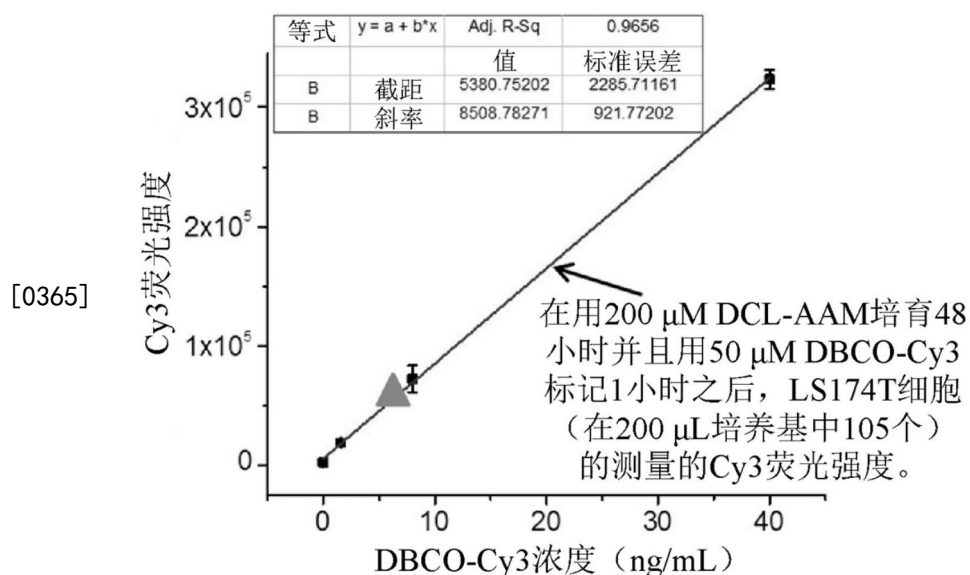
物48小时。过滤出沉淀物,并且在减压下移除溶剂。使用己烷/乙酸乙酯(3/1,v/v)作为洗脱剂通过硅胶柱色谱纯化粗产物以得到黄色固体(60%收率)。LRMS (ESI)  $m/z$ :  $C_{26}H_{33}N_4O_5[M+H]^+$  计算值481.2,实验值481.2。 $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 500MHz):  $\delta$  8.57 (dd, 1H, C(O) CCHCHCH), 8.52 (d, 1H, C(O) CCHCHCH), 8.51 (dd, 1H, C(O) CCHCHCH), 8.12 (dd, 1H, C(O) CCHCHCH), 7.84 (dd, 1H, C(O) CCHCHCH), 4.62 (dd, 1H,  $CHCH_2CH_2CH_2CH_2$ ), 4.14 (t, 2H,  $CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 3.22 (t, 2H,  $CHCH_2CH_2CH_2CH_2$ ), 2.06 (s, 3H,  $CH_3C(O)NHCH$ ), 1.98 (m, 2H,  $CHCH_2CH_2CH_2CH_2$ ), 1.92 (s, 3H,  $CH_3C(O)NHCH_2$ ), 1.69 (m, 2H,  $CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 1.60 (m, 2H,  $CHCH_2CH_2CH_2CH_2$ ), 1.53 (m, 2H,  $CHCH_2CH_2CH_2CH_2$ ), 1.43 (m, 2H,  $CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 0.99 (m, 3H,  $CH_2CH_2CH_2CH_3$ )。

[0361] 细胞HDAC/CTSL活性的检测。以8k/孔的细胞密度将细胞接种在24孔板中,并且允许附着过夜。添加在OptiMEM中的Naph-Lys (50 $\mu$ M),并且与细胞一起培育不同的时间(30分钟、1小时、2小时和4小时)。在移除OptiMEM并且用PBS洗涤两次之后,用4%PFA使细胞固定10分钟,并且用DAPI (2 $\mu$ g/mL) 染色10分钟。使用DAPI和FITC通道在GE-分析仪上测量细胞的平均荧光强度。DAPI通道用于测定每个孔的细胞数量。FITC通道用于测定每个孔的释放的Naph-NH<sub>2</sub>的总荧光强度。数据以每个细胞的平均荧光强度呈现。

[0362] TSA和Z-FY-CHO对细胞HDAC/CTSL活性的抑制性作用。已知TSA和Z-FY-CHO分别是HDAC和CTSL的抑制剂。为了研究其抑制性作用,以8k/孔的细胞密度将细胞接种在24孔板中,并且允许附着过夜。然后将细胞划分成4组:第1组细胞添加Naph-Lys (50 $\mu$ M);第2组细胞添加Naph-Lys (50 $\mu$ M)+TSA (1 $\mu$ M);第3组细胞添加Naph-Lys (50 $\mu$ M)+Z-FY-CHO (20 $\mu$ M);第4组细胞添加PBS作为阴性对照组。细胞培育4小时、用PBS洗涤、用4%PFA固定10分钟并且用DAPI (2 $\mu$ g/mL) 染色10分钟。使用DAPI和FITC通道在GE-分析仪上测量细胞的平均荧光强度。

[0363] 体外E-S介导的受控细胞标记。以40k/孔的细胞密度将LS174T结肠癌细胞或人类成纤维IMR90细胞接种到6孔板中盖玻片上。添加最终浓度为50 $\mu$ M的E-S,随后添加TSA (1 $\mu$ M)或Z-FY-CHO (50 $\mu$ M)。仅用PBS或E-S处理的细胞用作对照组。在72小时培育之后,移除培养基,并且类似于以上提及的程序制备用于共焦成像和GE-分析仪测量的细胞样品。

[0364] 体外E-S的标记动力学。将LS174T细胞接种在黑色96孔板中,并且用各种浓度的E-S (10 $\mu$ M、50 $\mu$ M、200 $\mu$ M和1mM) 培育不同的时间(3小时、6小时、12小时、24小时、48小时和72h)。在移除培养基并且用PBS洗涤三次之后,用在OptiMEM中的DBCO-Cy3 (20 $\mu$ M) 培育细胞2小时。在移除DBCO-Cy3溶液之后,在3个成一式三份的孔中的细胞用胰蛋白酶提升,并且在显微镜下计数以测定每个孔的细胞数量( $N_{\text{细胞}}$ /孔);使另外3个成一式三份的孔中的细胞裂解,并且在板读取器上测量Cy3荧光。DBCO-Cy3溶液的梯度浓度用于测定标准曲线和计算细胞表面上叠氮基的数量。使用以下方法估算每个细胞的表达的叠氮基的数量( $N_{\text{叠氮化物}}$ /细胞):



[0366] 每个细胞的DBCO-Cy3质量:  $(7.5 \text{ ng/mL} \times 200 \mu\text{L}) / 100000 \text{ 个细胞} = 1.5 \times 10^{-5} \text{ ng/细胞}$

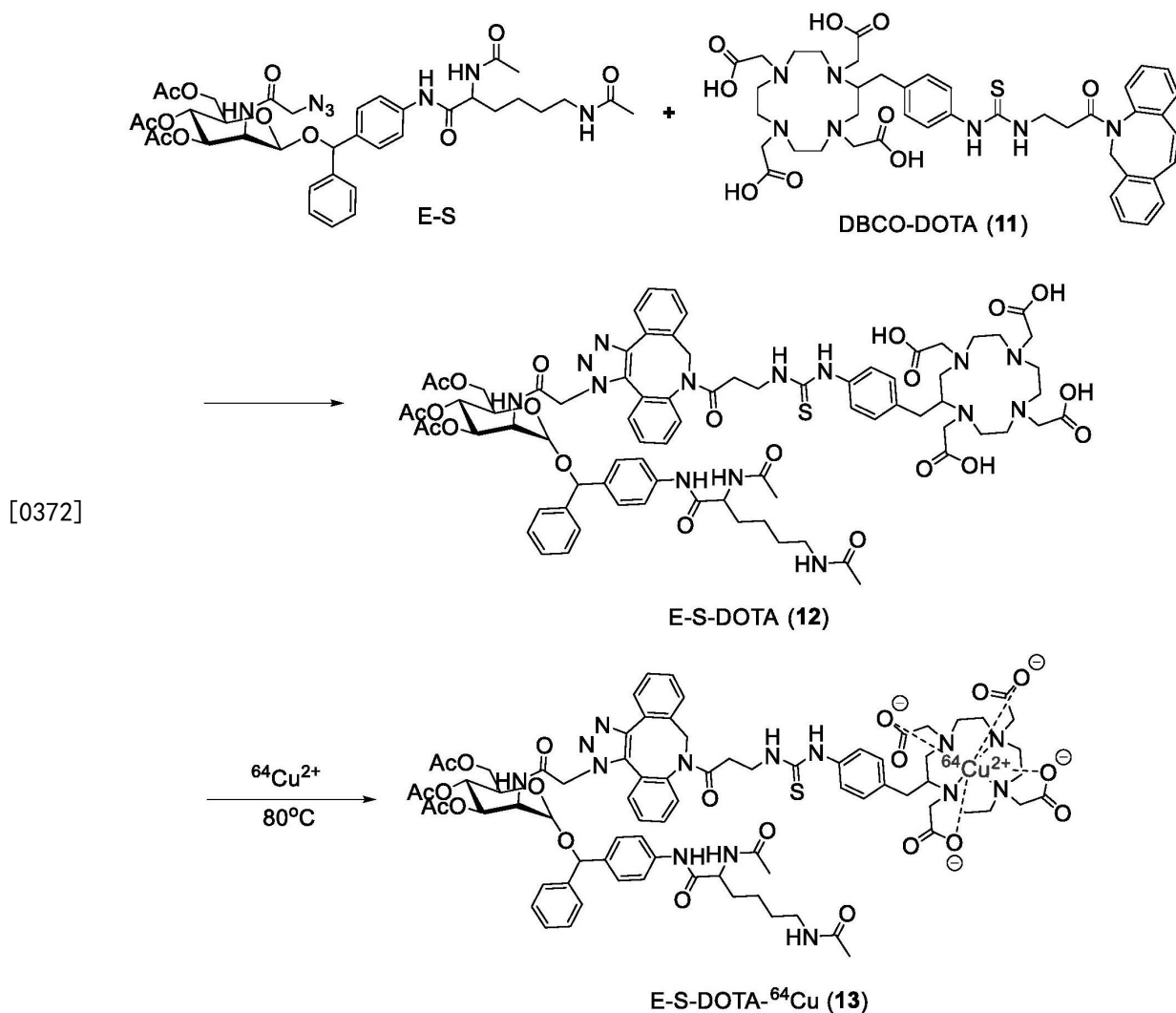
[0367] 每个细胞的叠氮化物的摩尔数:  $(1.5 \times 10^{-5} \text{ ng/细胞}) / (983.18 \text{ g/mol}) = 1.5 \times 10^{-17} \text{ mol}$

[0368] 每个细胞的叠氮化物的数量:  $1.5 \times 10^{-17} \text{ 摩尔} \times (6.02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}) = 9.0 \times 10^6 \text{ 个}$

[0369] 经E-S处理的细胞的蛋白质印迹分析。以每个板  $1 \times 10^6$  个细胞的密度将LS174T细胞接种到细胞培养瓶 (25 cm<sup>2</sup> 生长面积) 上5 mL的培养基中, 并且允许附着过夜。然后分别用E-S (50  $\mu$ M)、E-S (50  $\mu$ M) + TSA (1  $\mu$ M)、E-S (50  $\mu$ M) + Z-FY-CHO (50  $\mu$ M) 和PBS处理细胞72小时。在移除溶剂并且用PBS多次洗涤之后, 使用细胞刮棒从瓶采集细胞。其余程序与以上针对细胞的蛋白质印迹分析提及的一般程序相同。

[0370] E-S的药代动力学概况

[0371] E-S的放射性标记



[0373] DBCO-DOTA的合成。将P-SCN-Bn-DOTA (0.05mmol, 34mg) 和DBCO-胺 (0.05mmol, 14mg) 悬浮于无水DMF (1mL) 中。添加三乙胺 (0.2mmol, 20mg) 并且在40℃下搅拌混合物。HPLC测量示出在12小时之后完全反应。在减压下移除溶剂并且不经进一步纯化的情况下使用产物。LRMS (ESI) m/z: C<sub>42</sub>H<sub>50</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 计算值828.3, 实验值828.2。

[0374] E-S-DOTA的合成。将DBCO-DOTA (0.003mmol, 2.5mg) 和E-S (0.003mmol, 2.3mg) 溶解于甲醇中。在室温下搅拌混合物1小时, 在此时间点, HPLC示出起始材料的完全消耗。

[0375] E-S-DOTA的<sup>64</sup>Cu标记。在NH<sub>4</sub>OAc缓冲溶液 (0.1M, pH=5.5, 1mL) 中的<sup>64</sup>Cu氯化物 (400 μCi, 0.1ng的<sup>64</sup>Cu) 与在PBS中的E-S-DOTA (2mg) 混合。在80℃下剧烈搅拌混合物1小时, 在此时间点, HPLC示出游离<sup>64</sup>Cu的完全消耗。不经进一步纯化的情况下直接使用产物溶液。

[0376] E-S-DOTA-<sup>64</sup>Cu的药代动力学研究。将E-S-DOTA-<sup>64</sup>Cu溶液 (~100μCi) 静脉内注射到携带LS174T肿瘤的雌性无胸腺裸小鼠中 (N=3)。在选择的时间点 (注射后10分钟、30分钟、1小时、3小时、6小时、12小时和24小时), 使用毛细管从眶窦收集血液。在血液收集之前称量毛细管。称量收集的血液样品, 并且在511KeV的光峰下使用适当的能量窗利用Wizard2自动γ-计数器测量<sup>64</sup>Cu放射性。针对背景、衰变和重量校正原始计数。通过先前测定的校准曲线将校正的计数转化为每克血液的微居里 (μCi)。计算每个血液样品中的放射性并且将其以每克血液的注射剂量百分比 (% ID/g) 形式呈现。在注射后24小时收集血液之后, 采集

肿瘤和主要器官用于测量残留放射性。每个组织样品中的放射性以每克组织的注射剂量百分比(%ID/g)形式计算。

#### [0377] 实例8.针对改善标记癌细胞的选择性的体内研究

[0378] 在证实体外HDAC/CTSL响应性E-S的受控标记特性之后,我们接下来研究体内E-S的癌症选择性标记能力。每天一次将E-S静脉内注射到携带LS174T肿瘤的无胸腺裸小鼠中持续连续的三天。用Ac<sub>4</sub>ManAz和PBS静脉内处理的小鼠用作对照组(图7,图区(a))。在注射叠氮基糖后24小时的肿瘤组织的蛋白质印迹分析示出与PBS组相比,E-S组中经叠氮基修饰的蛋白质的量的增加,而观测到E-S组和PBS组之间在肝、脾、心脏和肺中的经叠氮基修饰的蛋白质的量的方面上可忽略的差异(图7,图区(b))。相比之下,不具有标记选择性的Ac<sub>4</sub>ManAz示出在正常组织中的非特异性标记,其中大量的叠氮基在肝、脾、肺和肾组织中表达(图7,图区b)。这些实验证实与Ac<sub>4</sub>ManAz相比,优异的体内E-S的癌症选择性标记能力。在单独的研究中,在叠氮基糖注射后24小时静脉内注射DBC0-Cy5,并且监测其生物分布。在注射DBC0-Cy5后48小时,E-S组中的肿瘤示出比PBS组中的肿瘤显著增强的Cy5保留(图7,图区c)。在E-S组中采集的肿瘤的成像示出与PBS组相比1.52倍的Cy5荧光强度,而肝、脾、心脏、肺和肾中的Cy5保留未显著改变(图7,图区c和d)。与Ac<sub>4</sub>ManAz组相比,E-S组中的DBC0-Cy5示出在肿瘤中改善的积累。这些实验一起证实E-S能够在体内选择性地标记LS174T肿瘤,并且表达的叠氮基可通过点击化学显著增强DBC0-Cy5的肿瘤积累。

[0379] 我们接下来研究体内E-S的标记动力学,以致力于更好地理解E-S介导的肿瘤标记和通过点击反应进行的后续肿瘤靶向效应的潜力。放射性标记的E-S的药代动力学研究示出其在静脉内注射之后快速的肾清除,其中在注射后24小时,4.96%ID/g的放射性标记的E-S留存在肿瘤组织中。为了研究E-S体内标记动力学,将E-S静脉内施用到携带LS174T肿瘤的无胸腺裸小鼠,并且在注射后不同的时间(8小时、24小时和48h)采集肿瘤并将肿瘤切片,以用于使用DBC0-Cy5检测表达的叠氮基。在注射后8小时收集的肿瘤组织切片示出与没有E-S处理的对照组相比,在细胞膜上显著增强的DBC0-Cy5信号,表明E-S成功地用叠氮基标记肿瘤细胞(图7,图区e和f)。允许更多的时间(24小时或48h)用于在肿瘤细胞中E-S的代谢标记过程,表达的叠氮化物的量显著增加。值得注意的是,未观测到24小时组和48小时组肿瘤组织切片之间在细胞表面叠氮化物的量的方面的显著差异,这大概是E-S的快速标记动力学和受限的肿瘤积累的共同结果。我们接下来研究较多次E-S注射是否将引起肿瘤区域中叠氮基量的增加。来自进行两次E-S注射的小鼠的肿瘤组织切片示出DBC0-Cy5显著增强地附接到细胞表面上,表明细胞表面叠氮化物的量增加(图7,图区g)。三次静脉内注射E-S进一步改善叠氮基通过肿瘤细胞进行的代谢表达。这些结果示出时间间隔为24小时的多次E-S注射可持续地增加肿瘤组织中表达的叠氮基的量。

#### [0380] 体内E-S介导的癌症选择性标记:

[0381] (1) 组织的蛋白质印迹分析。通过皮下注射在HBSS/基质胶(1/1,v/v)中的LS174T结肠癌细胞(150万),在6周大的无胸腺裸小鼠中建立LS174T肿瘤模型。当肿瘤生长到5-6mm时,每天一次静脉内注射E-S(60mg/kg)持续三天。静脉内施用Ac<sub>4</sub>ManAz(40mg/kg,10%的在PBS中的DMSO)或PBS的小鼠用作对照组。在最后一次注射后24小时,采集肿瘤和主要器官,转移到裂解缓冲剂(2mL)中并且均质化。裂解物在4℃下培育30分钟,并且通过以3000rpm离心10分钟移除不可溶碎片。总可溶蛋白质浓度通过BCA检定测定并且对于每个组调节到

5mg/mL。其余程序与以上针对蛋白质印迹分析提及的一般程序相同。将所有三个组的肿瘤组织和健康组织中的叠氮基标记的蛋白质带可视化并且进行比较,以理解体内E-S的癌症选择性标记能力。

[0382] (2) DBCO-Cy5的体内和离体生物分布。在单独的研究中,当肿瘤生长到5-6mm时,每天一次静脉内注射E-S (60mg/kg) 持续三天。静脉内注射Ac<sub>4</sub>ManAz (40mg/kg) 和PBS的小鼠用作对照组。在最后一次注射后24小时,静脉内注射DBCO-Cy5 (10mg/kg),并且使用布鲁克体内Xtreme成像系统(Bruker In-Vivo Xtreme Imaging System)通过体内荧光成像监测其生物分布。在注射DBCO-Cy5后48小时从小鼠采集肿瘤和器官。类似地使用布鲁克体内Xtreme成像系统收集离体图像。使用布鲁克成像软件量化在选择的ROI下的荧光强度。所有值以平均值±标准偏差形式呈现(n=3)。

[0383] 体内E-S的肿瘤标记动力学。携带皮下LS174T肿瘤的无胸腺裸小鼠静脉内注射E-S (60mg/kg)。未注射E-S的小鼠用作对照组。在E-S注射后的不同时间(8、24和48小时),采集肿瘤,将其冷冻在O.C.T.化合物中,并且切片(其中厚度为8μm)。肿瘤组织切片用5%BSA培育2小时,并且然后用DBCO-Cy5 (20μM) 标记30分钟。在用PBS洗涤之后,分别添加DAPI (2μg/mL) 和CellMask橙色质膜染色剂(1μg/mL)以对细胞核和膜进行染色。在共焦激光扫描显微镜下使肿瘤组织切片成像。对于成像的所有样品,成像参数保持相同。用ZEN 2011软件执行数据分析。提取每个图像的平均Cy5荧光强度并且对20个图像平均化以获得每个组织切片的平均Cy5荧光强度,然后对20个组织切片平均化以获得每个肿瘤的平均Cy5荧光强度。

[0384] 体内剂量依赖性E-S介导的肿瘤标记。在24小时的时间间隔情况下对携带皮下LS174T肿瘤的无胸腺裸小鼠(每组n=3)静脉内施用E-S (60mg/kg) 不同次数(一次、两次或三次注射)。未注射E-S的小鼠用作对照组。在最后一次注射E-S后24小时,采集肿瘤,将其冷冻在O.C.T.化合物中,并且切片(其中厚度为8μm)。遵循以上描述的程序对肿瘤组织切片进行染色、成像和分析。

[0385] 实例9.通过点击化学反应的抗癌剂的递送。

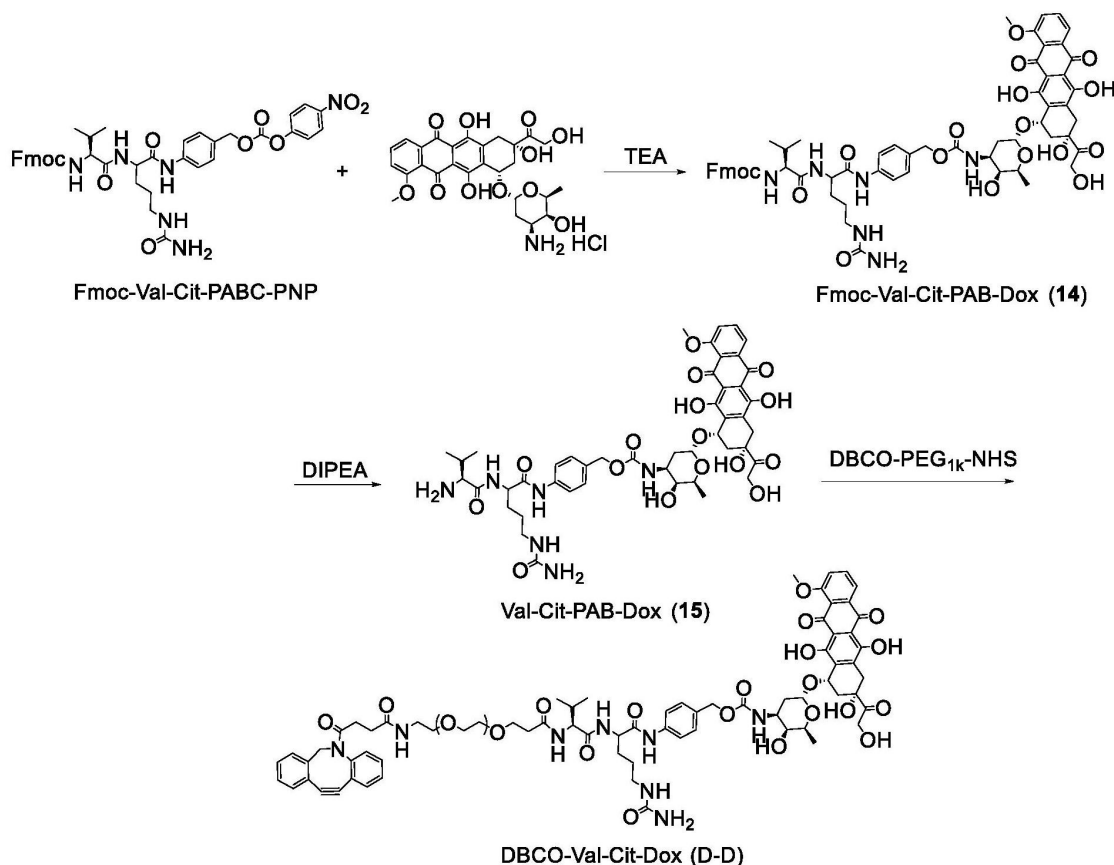
[0386] 在证实E-S可用叠氮基体内选择性地标记癌细胞和表达的叠氮基可通过点击反应良好地留存DBCO-Cy5之后,我们接下来探究E-S预处理是否将引起小分子DBCO-药物偶联物的抗癌功效增强。合成具有组织蛋白酶B可裂解连接基团的DBCO-阿霉素偶联物(DBCO-Val-Cit-DOX0 (D-D)) (图8,图区a)。连接基团由组织蛋白酶B可裂解二肽(val-cit) (用于在酶促降解过程期间降低位阻的自我牺牲型对氨基苯甲基氨基甲酸酯(PABC)连接基团)和用于改善水溶解度的短聚乙二醇(PEG)链段构成。合成的D-D示出在生理条件下优异的稳定性,同时存在活化的组织蛋白酶B的情况下经历游离DOX0的快速释放。通过MTT检定研究D-D对LS174T细胞的体外抗癌活性,所述MTT检定示出IC<sub>50</sub>值为2.5μM。用E-S预处理三天的LS174T细胞示出与对照组细胞相比,在一定量的培育时间(30分钟、1小时和42小时)内通过点击反应显著增强的D-D的细胞吸收量。使用荧光DBCO-Cy5作为模型化合物(利用其低被动细胞吸收量)探究经叠氮基修饰的癌细胞共价附接的DBCO-载物的细胞归宿。在用DBCO-Cy5培育1小时并且洗涤掉未结合的DBCO-Cy5之后,在荧光显微镜下监测经E-S预处理的LS174T细胞。在无E-S预处理的对照组细胞中的可忽略的Cy5信号不包括DBCO-Cy5的被动吸收量。在培育时间期间,DBCO-Cy5首先共价附接到细胞表面(用细胞膜染色剂覆盖),并且逐渐进入溶酶体(用溶酶体示踪剂(lysotracker)覆盖)。当进一步培育细胞12小时时,观测到DBCO-Cy5在

细胞膜上完全消失。可想像,在细胞溶酶体中存在组织蛋白酶B的情况下,共价附接的D-D将能够释放药物。与游离DOXO相比,D-D还显示出显著延长的血液循环。接下来,我们研究E-S预处理是否将产生D-D的增强的肿瘤保留和积累,并且因此赋予扩增的治疗功效。在急性抗肿瘤功效研究中,对携带皮下LS174T肿瘤的无胸腺裸小鼠每天一次静脉内施用E-S或PBS持续三天(第0天、第1天和第2天),并且在第3天静脉内施用药物D-D。在注射后48小时采集肿瘤和主要器官。组织中留存的药物的量化示出与用PBS处理的对照组小鼠相比,在用E-S处理的小鼠中1.46倍的D-D的肿瘤积累,而未观测到在肝、脾、肺、心脏和肾中D-D积累的显著改变(图8,图区(b))。用E-S/D-D处理的肿瘤示出 $33.5 \pm 4.2\%$ 的细胞凋亡指数,所述细胞凋亡指数显著大于仅用D-D处理的肿瘤的细胞凋亡指数( $18.3 \pm 4.0\%$ ) (图8,图区(c))。作为阴性对照组,用E-S或PBS处理的肿瘤分别示出低得多的细胞凋亡指数, $1.5 \pm 0.6\%$ 或 $1.7 \pm 0.5\%$  (图8,图区(c))。这些实验确认E-S介导的癌症选择性标记可显著改善D-D的肿瘤积累和急性抗肿瘤功效。

[0387] 为了进一步理解由E-S标记介导的D-D的增强的肿瘤积累将如何赋予提高的抗肿瘤活性,通过在延长的时间段内监测肿瘤体积进行单独的功效研究。将携带LS174T肿瘤的无胸腺裸小鼠划分成4组:E-S+D-D、D-D、E-S和PBS。与PBS组和E-S组相比,E-S+D-D组发挥更大的肿瘤生长抑制(图8,图区d)。与D-D相比,E-S+D-D还显著地降低肿瘤生长速率(图8,图区d)。与PBS组相比,E-S+D-D将小鼠的存活时间提高86.0%,这显著大于D-D提高的小鼠的存活时间(17.1%) (图8,图区e)。由于通过点击化学而增强药物的肿瘤积累,E-S+D-D一起比单独的D-D发挥大大改善的抗癌功效。

[0388] 转移性癌症已经是癌症患者死亡的主要原因,因为它们可避开常规癌症疗法,如手术、放射疗法和化学治疗疗法。新出现的癌症靶向疗法(包括基于抗体的疗法)已在医治转移性癌症方面示出大潜力。在证实在原发性结肠肿瘤模型中E-S/D-D的优异癌症靶向效应之后,我们继续探究E-S和D-D的组合靶向疗法是否将在抑制4T1肺转移性癌症的生长方面有效。在功效研究之前,研究体外4T1癌细胞的E-S介导的化学标记。如所预期,E-S能够在体外用叠氮基高效地标记荧光素酶改造的4T1癌细胞,所述叠氮基可通过点击反应显著提高D-D的细胞吸收量。通过在第0天静脉内注射荧光素酶改造的4T1细胞在BALB/c小鼠中建立4T1转移性癌症。在用E-S每天处理一次持续三天(第1天、第2天和第3天)之后,从第4天开始对小鼠施用D-D或游离DOXO(在本文中还被标记为Dox)以检查其在转移瘤抑制方面的功效。PBS组小鼠随时间增强的生物发光信号确认肺实质中4T1转移瘤的增殖(图9,图区(b))。与PBS和DCL-AAM组相比,所有药物处理组示出显著降低的生物发光信号和肿瘤结节计数(图9,图区(b))。与D-D组相比,E-S+D-D组小鼠示出显著减少的肺转移瘤(如由降低的生物发光信号所证明(图9,图区b和c))、较少量的肿瘤结节( $47.9 \pm 7.1\%$ 对 $67.4 \pm 13.5\%$ ) (图9,图区d)和降低的肿瘤表面积百分比( $18.2 \pm 8.3\%$ 对 $38.2 \pm 10.4\%$ ) (图9,图区e和f)。尽管产生与E-S+D-D类似的肺转移瘤严重程度,但是Doxo在小鼠组织中,尤其在骨髓和脾中发挥大得多的毒性(图9,图区g)。E-S+D-D一起在极大降低的毒性的情况下发挥最佳抗癌功效,这是通过点击化学而增强D-D的肿瘤积累和通过在癌组织和正常组织之间组织蛋白酶B活性差异赋予的癌症优先药物释放的共同结果。

[0389] DBCO-Val-Cit-DOXO (D-D) 的合成途径



[0391] DBCO-PEG<sub>1k</sub>-NHS的合成。将DBCO-NHS (0.11mmol, 44mg) 和NH<sub>2</sub>-PEG<sub>1k</sub>-COOH (0.1mmol, 100mg) 溶解于无水DMF (1.5mL) 中, 随后添加三甲胺 (0.11mmol, 11mg)。在45℃下搅拌混合物24小时。添加在DMF中的DCC (0.12mmol, 25mg) 和NHS (0.12mmol, 14mg)。在45℃下进一步搅拌反应混合物24小时。过滤出沉淀物, 并且将滤液超速离心 (重复两次), 其中截留分子量为1k。用DCM稀释残留溶液、收集并且浓缩以得到淡黄色固体 (70%收率)。

[0392] DBCO-Val-Cit-DOX0 (D-D) 的合成。将盐酸阿霉素 (0.05mmol, 29mg) 和Fmoc-Val-Cit-PAB-PNP (0.05mmol, 38mg) 溶解于无水DMF (1mL) 中。添加三乙胺 (0.06mmol, 6mg) 并且在40℃下在氮气氛围下搅拌混合物。HPLC测量示出在12小时之后Fmoc-Val-Cit-PAB-PNP完全消耗, 在此时, 一次性添加二异丙基乙胺 (100 μL)。反应混合物的颜色立即变暗。在12小时之后, 如通过HPLC图谱中的峰偏移所确认, Fmoc基团完全裂解。添加在DMF (100 μL) 中的DBCO-PEG<sub>1k</sub>-NHS (0.05mmol, 65mg), 并且在40℃下再搅拌混合物24小时。反应溶液经浓缩并且在二乙醚中沉淀以得到红色固体。在用二乙醚洗涤两次之后, 将固体再溶解于甲醇中, 并且针对甲醇进行透析48小时 (1k截留分子量) 以脱除小分子。收集残留物溶液, 并且浓缩以得到红色固体 (65%收率)。

[0393] D-D的组织蛋白酶B诱导的降解。通过将冻干固体 (2.1mg) 溶解到1mL的25mM乙酸钠/1mM EDTA缓冲剂 (pH=5.0) 制备牛脾组织蛋白酶B的储备溶液。通过添加30mM DTT/15mM EDTA溶液 (30 μL) 并且培育30分钟, 在冰上活化15 μL的储备溶液。然后用2mL的乙酸钠/EDTA缓冲剂 (pH 5.0) 稀释活化的组织蛋白酶B。将在甲醇中的D-D (10mM, 10 μL) 添加到活化的酶溶液, 并且在37℃下培育混合物。在选择的时间点取出混合物的20 μL等分试样, 并且稀释到600 μL用于HPLC测量。



[0394] D-D和游离DOX0的MTT研究。以4k个细胞/孔的初始密度将LS174T细胞接种在96孔板中,允许其附着24小时,并且在37℃下用游离DOX0或各种DOX0浓度的D-D处理72小时。用PBS处理的细胞用作对照组。通过遵循标准程序执行MTT检定。

[0395] 在经E-S处理的LS174T细胞中D-D的吸收量。将LS174T细胞接种在24孔板中,并且用E-S (50μM) 培育三天。无E-S预处理的细胞用作对照组。在移除旧培养基并且用PBS洗涤三次之后,在不同的时间点(在用于流式细胞术分析的样品制备之前4小时、2小时、1小时和30分钟)添加在OptiMEM中的D-D (20μM)。然后移除OptiMEM,并且用PBS洗涤细胞三次。通过无色胰蛋白酶使细胞脱离,并且转移到添加有4%PFA的流动管用于流式细胞术分析。

[0396] 体外DBC0-Cy5或D-D的吸收机制。将LS174T细胞接种到具有盖玻璃底部的组织培养盘上,并且用E-S (50μM) 培育三天。在用PBS多次洗涤之后,在新鲜培养基中添加溶酶体示踪剂绿 (LysoTracker green),并且培育1小时。然后添加DBC0-Cy5,并且进一步培育细胞1小时。分别添加Hoechst 33342 (10μg/mL) 和CellMask橙色质膜染色剂 (1μg/mL) 以对细胞核和细胞膜进行染色持续10分钟。在移除培养基并且用PBS洗涤之后,进一步在37℃下培育细胞。在不同的时间点(1小时、3小时、6小时、12小时和24小时),在荧光显微镜下使细胞成像以监测DBC0-Cy5的吸收量。无E-S预处理的细胞用作对照组。对于经D-D处理的细胞的活细胞成像,CellMask深红色质膜染色剂用于对细胞膜进行染色,并且不对溶酶体进行染色以避免在D-D的荧光信号上的干扰。

[0397] D-D和游离DOX0的药代动力学研究。为了评估其循环半衰期,经由尾部静脉将D-D (以等价于DOX0的形式:5mg/kg) 或游离DOX0 (5mg/kg) 静脉内注射到雌性无胸腺裸小鼠中 (n=3)。在选择的时间点(注射后10分钟、30分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时和24小时),通过眶窦收集血液。收集的血液样品 (25μL) 用甲醇/H<sub>2</sub>O的混合物 (1/1, v/v, 75μL) 进行稀释并且涡旋10分钟。在以12000rpm离心10分钟之后,将上清液转移到黑色96孔板用于荧光测量。D-D或游离DOX0的梯度浓度用于测定标准曲线。计算D-D或游离DOX0的血浆浓度,以μg/mL为单位。

[0398] E-S/D-D针对皮下LS174T结肠肿瘤的急性功效研究。通过将在HBSS/基质胶 (1/1, v/v, 50μL) 中的LS174T结肠癌细胞 (150万个细胞) 皮下注射到两个侧腹,在6周大的雌性无胸腺裸小鼠中建立LS174T肿瘤。当肿瘤达到~50mm<sup>3</sup>时,将小鼠随机地划分成4组(第1组:E-S/D-D;第2组:D-D;第3组:E-S;第4组:PBS;n=3)。对于第1组和第3组,每天一次静脉内注射E-S (60mg/kg) 持续三天(第0天、第1天和第2天)。其它两组中的小鼠静脉内注射PBS作为对照。在最后一次注射E-S后24小时,静脉内注射D-D (以等价于DOX0的形式:10mg/kg) 或PBS。在注射后48小时,采集肿瘤并且等分。肿瘤的一半用O.C.T.化合物冷冻,将其切片(其中厚度为8μm),并且通过末端脱氧核苷酸转移酶dUTP切口末端标记 (TUNEL) 检定来分析细胞凋亡。称量器官和肿瘤的另一半,均质化并且裂解。在添加酸化的异丙醇之后,使混合物涡旋,并且在-20℃下冷冻过夜。在离心之后,将上清液注射到HPLC中用于量化组织中留存的DOX0。数据以%I.D./g形式呈现。

[0399] E-S/D-D针对皮下LS174T肿瘤的长期肿瘤缩减功效。通过皮下注射LS174T细胞 (1.5×10<sup>6</sup>个细胞,在HBSS/基质胶 (1/1, v/v, 50μL) 中) 到两个侧腹中,在6周大的雌性无胸腺裸小鼠中建立LS174T肿瘤。当肿瘤达到~50mm<sup>3</sup>时,将小鼠随机地划分成4组(第1组:E-S/D-D;第2组:D-D;第3组:E-S;第4组:PBS;n=5-6)。对于第1组和第3组小鼠,在第0天、第1天

和第2天静脉内注射E-S (60mg/kg)。其它两组中的小鼠静脉内注射PBS作为对照。在第3天、第7天和第11天静脉内注射D-D (以等价于Dox的形式: 12mg/kg) 或PBS。每隔一天测量小鼠的肿瘤体积和体重。使用式 (长度)  $\times$  (宽度)<sup>2</sup>/2计算肿瘤体积, 其中将长轴直径视为长度并且将短轴直径视为宽度。当肿瘤体积达到2000mm<sup>3</sup> (作为预定终点) 或动物变得垂死, 或体重下降超出原始重量的20%时, 将动物处死。当动物由于肿瘤体积或处理相关的死亡而结束研究时, 针对此动物记录的最终肿瘤体积用于在后续时间点计算平均肿瘤体积。将每个动物到终点的时间 (TTE) 定义为当其肿瘤体积已达到预定终点时的那一天。向归类为处理相关的死亡的动物指配的TTE值等于死亡的那一天。通过肿瘤生长延迟 (TGD) 测定处理功效, 所述肿瘤生长延迟被定义为与对照组 (PBS) 相比, 处理组中的中值TTE的增加:  $TGD = TTE(T) - TTE(C)$ , 其以天数或对照组的中值TTE的百分比形式表示:  $\%TGD = 100\% \times (TTE(T) - TTE(C)) / TTE(C)$ 。

#### [0400] MB-MDA乳腺癌模型

[0401] MDA-MB-231细胞的E-S介导的体外标记。以40k/孔的细胞密度将MDA-MB-231乳腺癌细胞接种到6孔板中盖玻片上。添加最终浓度为50μM的E-S, 随后添加TSA (1μM) 或Z-FY-CHO (50μM)。仅用PBS或E-S处理的细胞用作对照组。在72小时培育之后, 移除培养基, 并且遵循以上提及的程序制备用于共焦成像和IN细胞分析仪 (IN cell Analyzer) 测量的细胞样品。

[0402] E-S标记的MDA-MB-231细胞的D-D吸收量。以每个孔 $1 \times 10^4$ 个细胞的密度将细胞接种在24孔板中, 并且用E-S (50μM) 或PBS培育三天。在用PBS洗涤之后, 用D-D (20μM) 培育细胞不同的时间 (30分钟、1小时、2小时和4小时), 使所述细胞裂解并且在板读取器上测量D-D的荧光强度。在荧光测量之后, 通过BCA检定测定每个孔中的蛋白质浓度。最终数据以每毫克蛋白质的D-D的荧光强度形式呈现。

[0403] 针对MDA-MB-231细胞的D-D和游离DOXO的MTT检定。以4k个细胞/孔的初始密度将MDA-MB-231乳腺癌细胞接种在96孔板中, 允许其附着12小时, 并且在37℃下用游离DOXO或各种DOXO浓度的D-D处理72小时。用PBS处理的细胞用作对照组。通过遵循标准程序执行MTT检定。

[0404] E-S+D-D针对皮下MDA-MB-231乳腺肿瘤的长期肿瘤缩减功效。通过皮下注射MDA-MB-231细胞 ( $1.5 \times 10^6$ 个细胞, 在HBSS/基质胶 (50μL, 1/1, v/v) 中) 到两个侧腹中, 在6周大的雌性无胸腺裸小鼠中建立MDA-MB-231肿瘤。当肿瘤达到 $\sim 50\text{mm}^3$ 时, 将小鼠随机地划分成4组 (第1组: E-S+D-D; 第2组: D-D; 第3组: E-S; 第4组: PBS; n=5)。每天一次将E-S (60mg/kg) 静脉内注射到第1组和第3组小鼠持续连续的三天 (第0天、第1天和第2天)。在第3天、第7天和第11天静脉内注射D-D (以等价于Doxo的形式: 12mg/kg)。每四天测量每个小鼠的肿瘤体积和体重。肿瘤体积的终点设定为1500mm<sup>3</sup>。数据分析与以上提及的针对LS174T肿瘤的长期功效研究相同。

#### [0405] 4T1转移性癌症模型

[0406] 4T1细胞的E-S介导体外标记。以40k/孔的细胞密度将荧光素酶改造的4T1乳腺癌细胞接种到6孔板中盖玻片上。添加最终浓度为50μM的E-S, 随后添加TSA (1μM) 或Z-FY-CHO (50μM)。仅用PBS或E-S处理的4T1细胞用作对照组。在72小时培育之后, 移除培养基, 并且通过共焦显微镜和流式细胞术对细胞进行分析。

[0407] E-S标记的4T1细胞的D-D吸收量。将荧光素酶改造的4T1细胞接种在96孔黑色板中,并且用E-S (50 $\mu$ M) 培育三天。无E-S预处理的细胞用作对照组。在移除培养基并且用PBS洗涤三次之后,在不同的时间点(在样品制备之前4小时、2小时、1小时和30分钟)添加在OptiMEM中的D-D (20 $\mu$ M)。然后移除OptiMEM,并且用PBS洗涤细胞两次。然后将100 $\mu$ L的裂解缓冲剂添加到每个孔,并且在板读取器上测量每个孔中内化的D-D的荧光强度。在荧光测量之后,通过BCA检定测定每个孔中的蛋白质浓度。最终数据以每毫克蛋白质的D-D的荧光强度(D-D吸收量/mg蛋白质)形式呈现。

[0408] 针对4T1细胞的D-D和游离DOXO的MTT检定。以4k个细胞/孔的初始密度将荧光素酶改造的4T1细胞接种在96孔板中,允许其附着12小时,并且在37 $^{\circ}$ C下用游离DOXO或各种DOXO浓度的D-D处理72小时。用PBS处理的细胞用作对照组。通过遵循标准程序执行MTT检定。

[0409] 针对Balb/c小鼠中4T1转移性癌症的抗癌功效研究。通过在第0天尾部静脉注射荧光素酶改造的4T1细胞( $1 \times 10^5$ 个细胞,在200 $\mu$ L HBSS中)到6周大的BALB/c小鼠中来建立4T1转移性癌症模型。然后将小鼠随机地划分成5组(第1组:E-S+D-D;第2组:D-D;第3组:Dox;第4组:E-S;第5组:PBS;n=7-8)。每天一次静脉内注射E-S (60mg/kg)持续三天(第1天、第2天和第3天)。在第4天、第8天和第12天静脉内注射D-D(以等价于Doxo的形式:12mg/kg)或Doxo (7.5mg/kg,最大耐受剂量)。每隔一天测量每个小鼠的体重和食物摄入量。从第5天开始,每四天使用布鲁克体内Xtreme成像系统通过BALB/c小鼠的生物发光成像来监测肺转移瘤。在成像之前3分钟腹膜内注射D-荧光素钾盐(150mg/kg)。使用布鲁克成像软件处理生物发光成像数据。在第13天的最后一次成像之后,在麻醉下将所有小鼠处死。整体切除每个动物的肺和心脏,称量并且注射10%福尔马林到气管中直到肺膨胀。在解剖显微镜下计数肺上的肿瘤结节(每组n=7-8)。在固定在福尔马林中之后将每个肺叶分离。将所有肺组织进行石蜡包埋、以4 $\mu$ m的厚度切片并且用H&E染色。然后对所有肺切片进行扫描和分析。测量肿瘤和肺的表面积以计算肿瘤表面积与总肺表面积的百分比( $A_{\text{肿瘤}}/A_{\text{总}}$ )。

[0410] E-S+D-D和游离DOXO的毒性评估。将肝、心脏、肾、脾、脑、胸骨和脊髓(颈胸和腰部)固定在福尔马林中、进行石蜡包埋、以4 $\mu$ m的厚度切片并且用H&E染色。由经委员会认证的病理学家对组织进行分析以探究处理介导的毒性。由经委员会认证的病理学家执行这些分析。

[0411] 统计分析。通过单因素方差分析(ANOVA),利用事后费舍尔LSD检验(post hoc Fisher's LSD test)(OriginPro 8.5)执行统计分析,并且P值<0.05被认为是统计显著的。在 $0.01 < *P \leq 0.05$ 时结果被视为显著的,在 $0.001 < **P \leq 0.01$ 时结果被视为高度显著的,并且在 $***P \leq 0.001$ 时结果被视为极其显著的。对于体外细胞实验,样品尺寸凭经验设定为n=3-6,对于体内生物分布和成像研究,n=3-4,对于异种移植肿瘤研究,n=5-6,并且对于转移性肿瘤研究,n=7-8。

[0412] 实例10. TNBC模型中的动物数据。

[0413] 由雌激素受体、孕酮受体和Her2的受限表达表征的三阴性乳腺癌使用于乳腺癌的多种常规抗体疗法无效。我们对探究以下感兴趣:利用叠氮化物的三阴性MDA-MB-231乳腺癌细胞的E-S介导的标记是否将改善DBC0-药物偶联物(例如,D-D)的肿瘤积累和抗癌功效。首先评估体外E-S在MDA-MB-231乳腺癌细胞中的标记能力。在用E-S培育三天并且用DBC0-Cy5培育1小时之后,在细胞膜上观测到强Cy5荧光(图10,图区a),指示叠氮基的成功表达。

TSA和Z-FY-CHO两者显著地降低E-S的标记效率(图10,图区b),这确证了在MDA-MB-231乳腺癌细胞中E-S的代谢标记过程的HDAC/CTSL诱导的再活化。E-S预处理能够在体外在一定量的培育时间(30分钟、1小时和2小时)内提高D-D的吸收量(图10,图区d)。然后我们探究MDA-MB-231肿瘤细胞的E-S介导的标记是否将改善D-D的积累和抗肿瘤功效。将携带皮下MDA-MB-231原发性肿瘤的无胸腺裸小鼠划分成4组:E-S+D-D、D-D、E-S和PBS。在第0天、第1天和第2天静脉内施用E-S。在第3天、第7天和第11天静脉内施用D-D(图11,图区a)。与PBS组相比,E-S组示出在肿瘤生长速率方面的可忽略的差异(图11,图区b),这排除了单独的E-S对抗肿瘤效应的影响。与PBS组相比,两个药物处理组示出显著降低的肿瘤生长速率,其中中值TTE值分别为62.6和29.0(图11,图区b、c和d)。与D-D组相比,E-S+D-D组示出好得多的抗肿瘤功效(其中早在从第24天开始便具有明显更小的肿瘤尺寸)(图11,图区b、c和d),这大概是E-S介导的肿瘤标记和D-D的改善的肿瘤积累和保留的结果。

[0414] 参考文献

[0415] 1.Brandley,B.K.&Schnaar,R.L.在细胞识别和响应中的细胞表面碳水化合物(Cell-surface carbohydrates in cell recognition and response).《白细胞生物学杂志(Journal of Leukocyte Biology)》40,97-111(1986)。

[0416] 2.Stoolman,L.M.&Rosen,S.D.细胞表面碳水化合物结合分子在淋巴细胞再循环中的可能作用(Possible role for cell-surface carbohydrate-binding molecules in lymphocyte recirculation).《细胞生物学杂志(The Journal of cell biology)》96,722-729(1983)。

[0417] 3.Dabelsteen,E.在人类癌症中作为预后标记物的细胞表面碳水化合物(Cell surface carbohydrates as prognostic markers in human carcinomas).《病理学杂志(The Journal of pathology)》179,358-369(1996)。

[0418] 4.Gorelik,E.,Galili,U.&Raz,A.关于细胞表面碳水化合物和其结合蛋白质(凝集素)在肿瘤转移方面的作用(On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins(lectins) in tumor metastasis).《癌症和转移综述(Cancer and Metastasis Reviews)》20,245-277(2001)。

[0419] 5.Fukuda,M.肿瘤相关联的碳水化合物抗原的可能作用(Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens).《癌症研究(Cancer research)》56,2237-2244(1996)。

[0420] 6.Prescher,J.A.,Dube,D.H.&Bertozzi,C.R.活的动物中的细胞表面的化学重塑(Chemical remodelling of cell surfaces in living animals).《自然(Nature)》430,873-877(2004)。

[0421] 7.Laughlin,S.T.&Bertozzi,C.R.通过施陶丁格连接的利用叠氮基糖的聚糖的代谢标记和后续的聚糖图谱分析和可视化(Metabolic labeling of glycans with azido sugars and subsequent glycan-profiling and visualization via Staudinger ligation).《自然实验手册(Nature protocols)》2,2930-2944(2007)。

[0422] 8.Saxon,E.等人利用施陶丁格连接探究合成叠氮基糖的细胞代谢(Investigating cellular metabolism of synthetic azidosugars with the Staudinger ligation).《美国化学学会杂志(Journal of the American Chemical

Society)》124,14893-14902 (2002)。

[0423] 9. Laughlin, S.T., Baskin, J.M., Amacher, S.L. & Bertozzi, C.R. 膜相关联的聚糖在使斑马鱼发育中的体内成像 (In vivo imaging of membrane-associated glycans in developing zebrafish). 《科学 (Science)》320, 664-667 (2008)。

[0424] 10. Chang, P.V. 等人在活的动物中利用炔基糖的唾液酸的代谢标记 (Metabolic labeling of sialic acids in living animals with alkynyl sugars). 《应用化学国际版 (Angewandte Chemie International Edition)》48, 4030-4033 (2009)。

[0425] 11. Breidenbach, M.A. 等人利用非天然糖的酵母N-聚糖的靶向代谢标记 (Targeted metabolic labeling of yeast N-glycans with unnatural sugars). 《美国国家科学院院刊 (Proceedings of the National Academy of Sciences)》107, 3988-3993 (2010)。

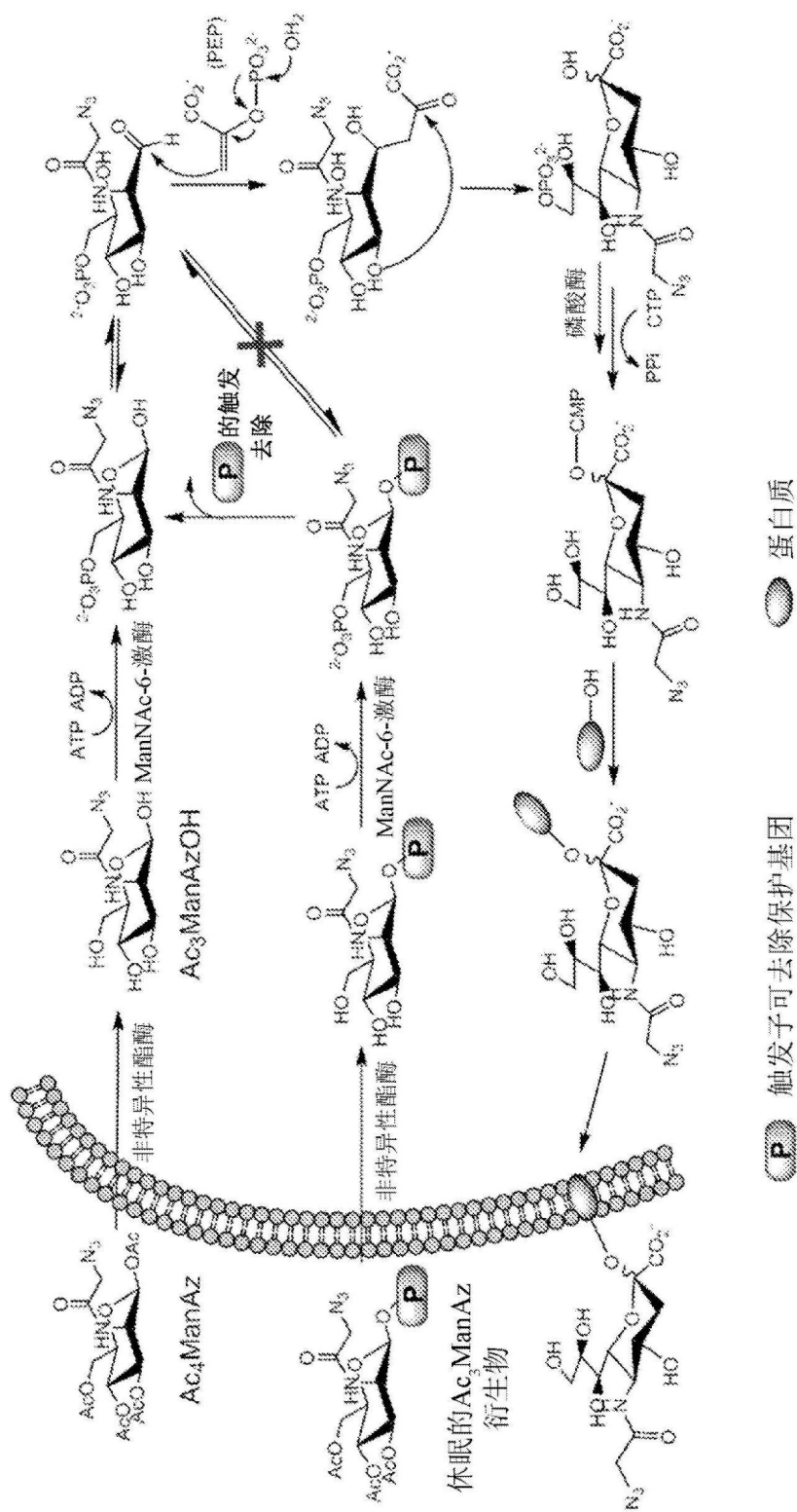


图1





图2



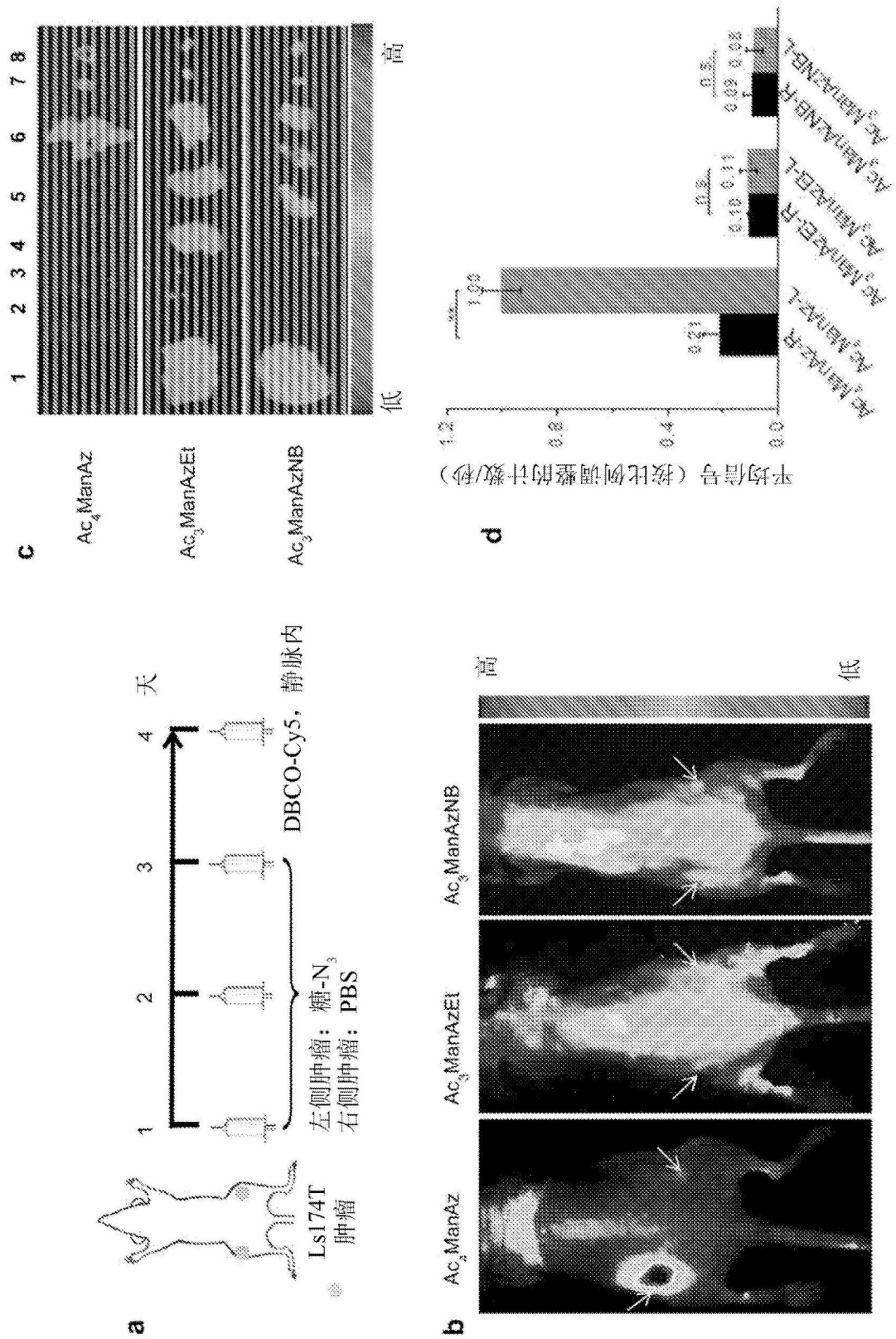


图3

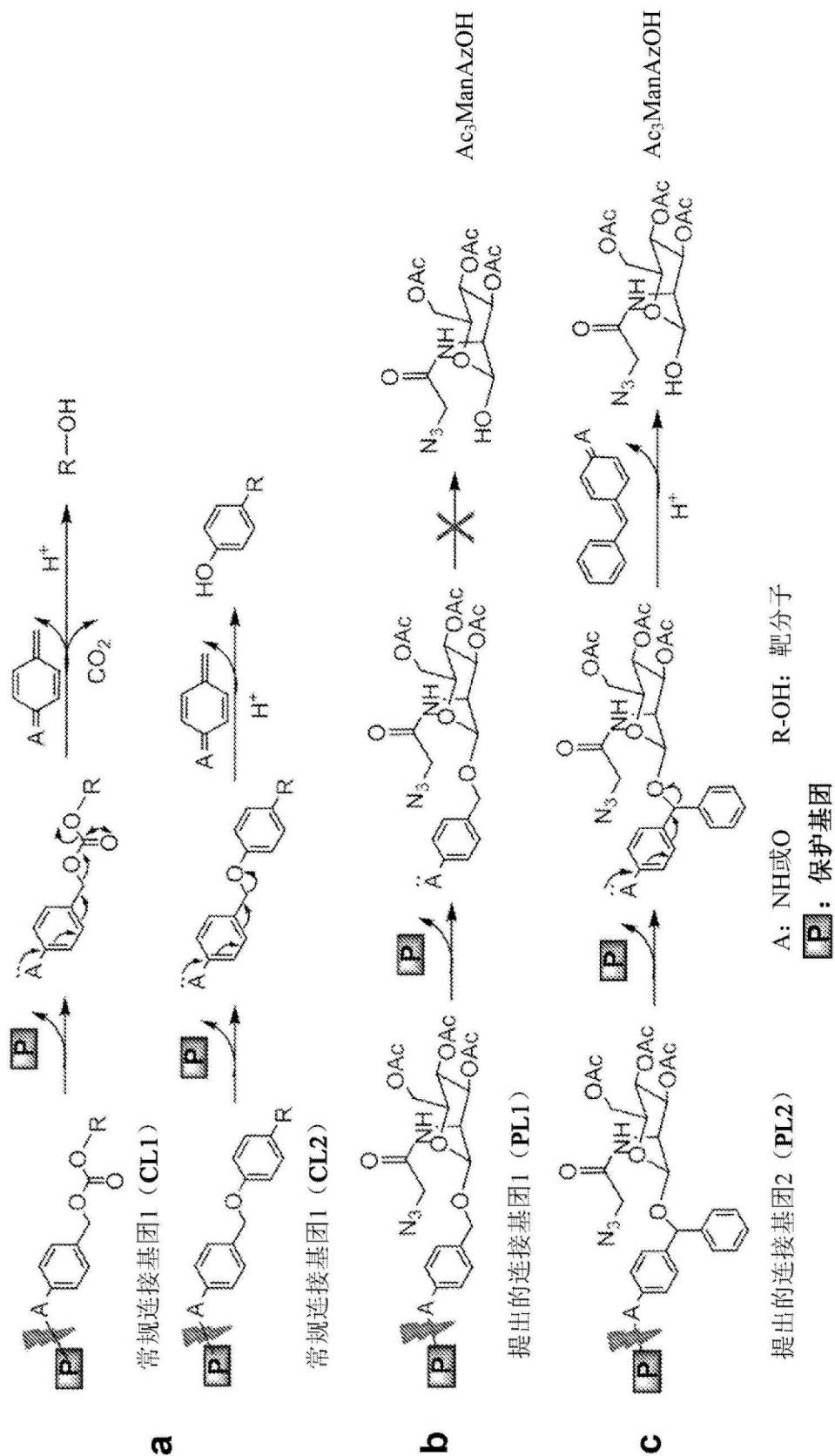


图4

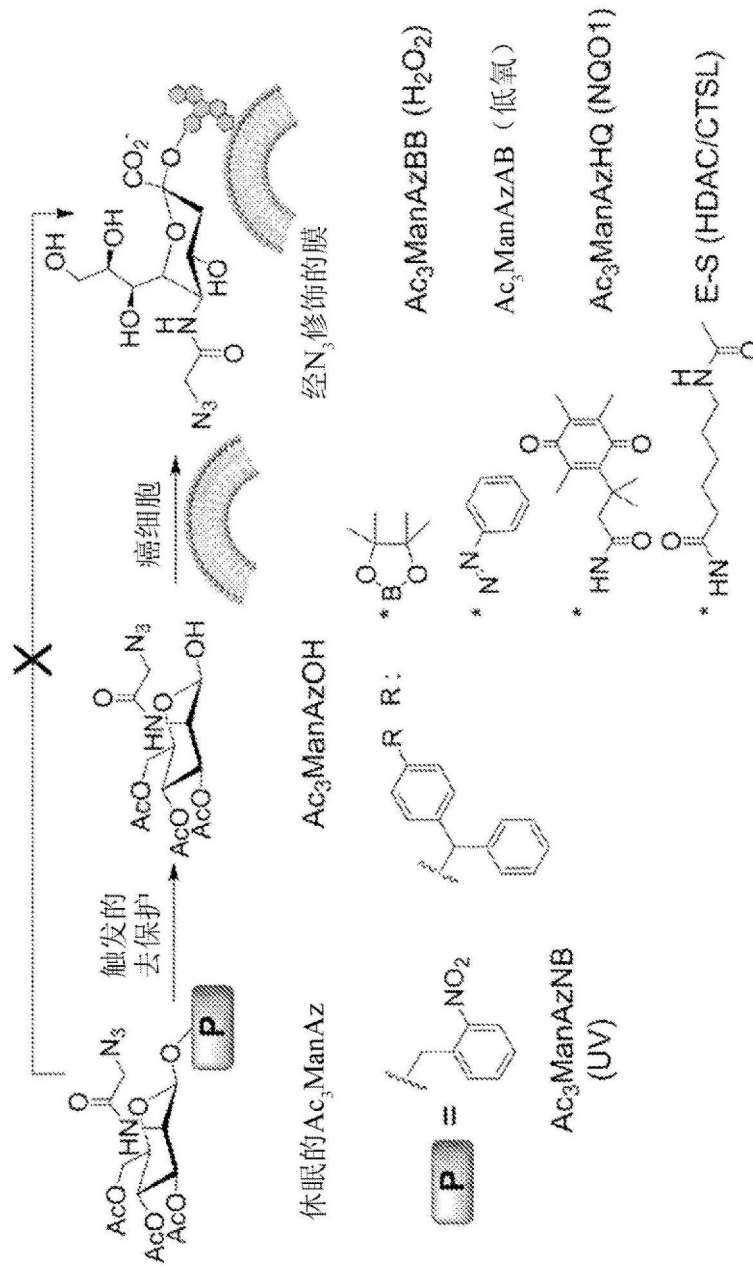
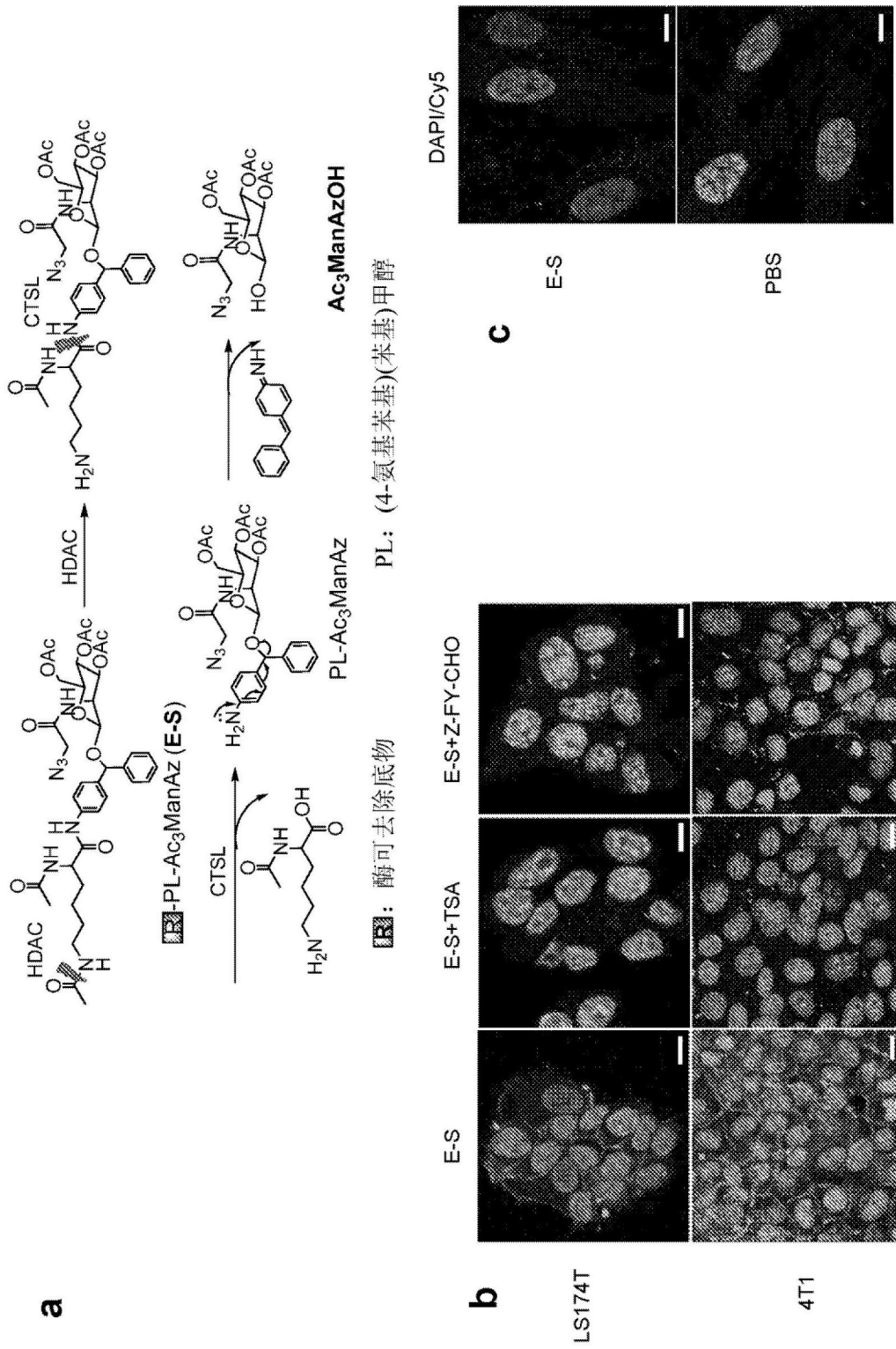


图5



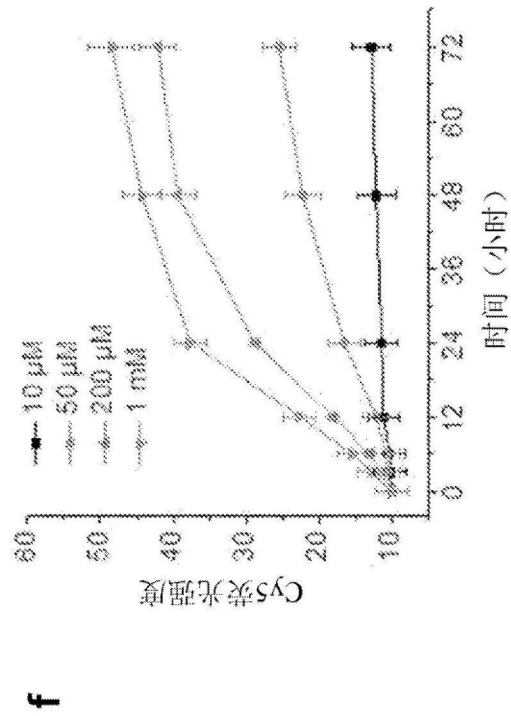
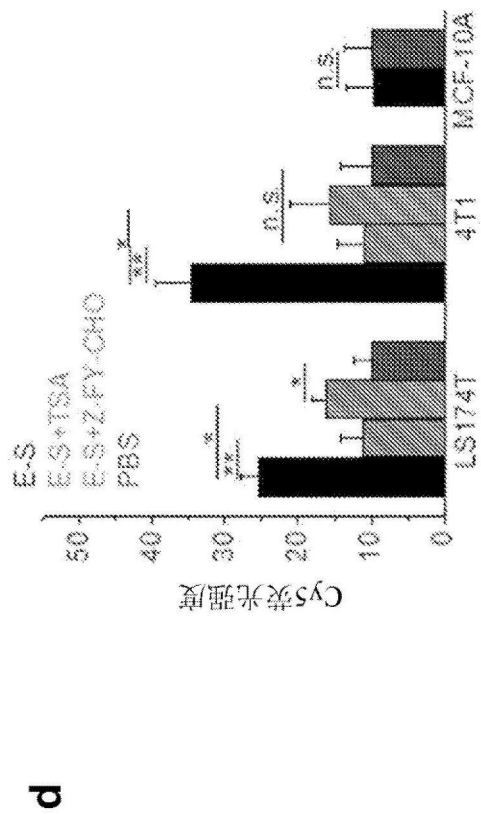
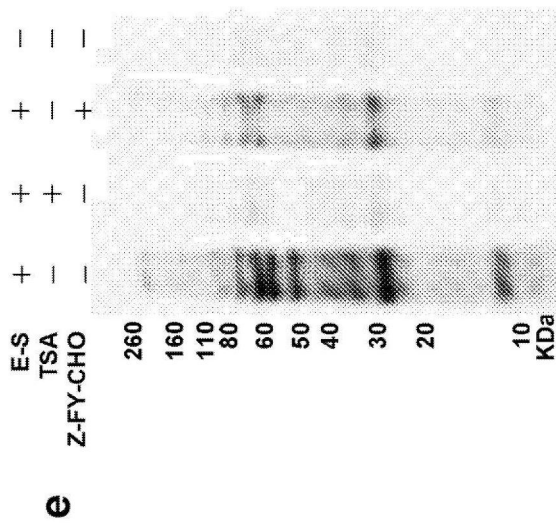
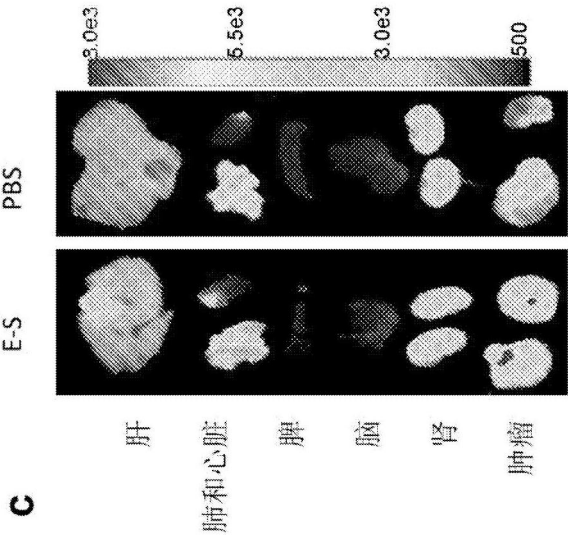
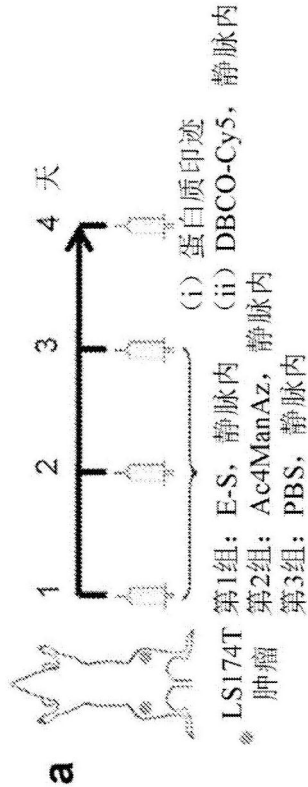
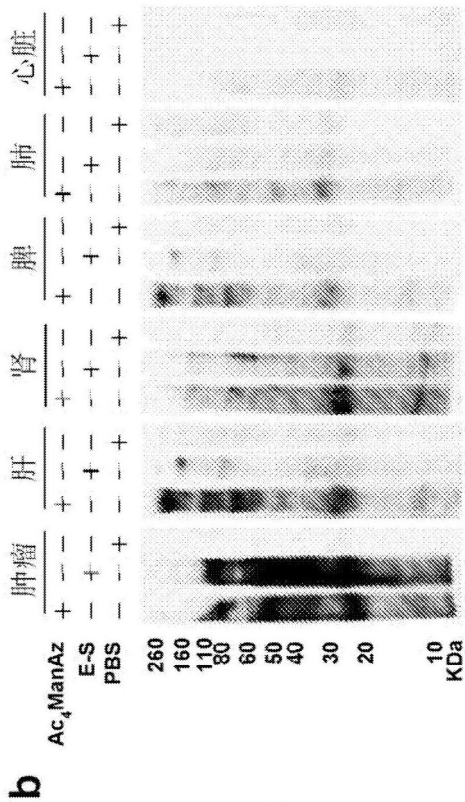


图6



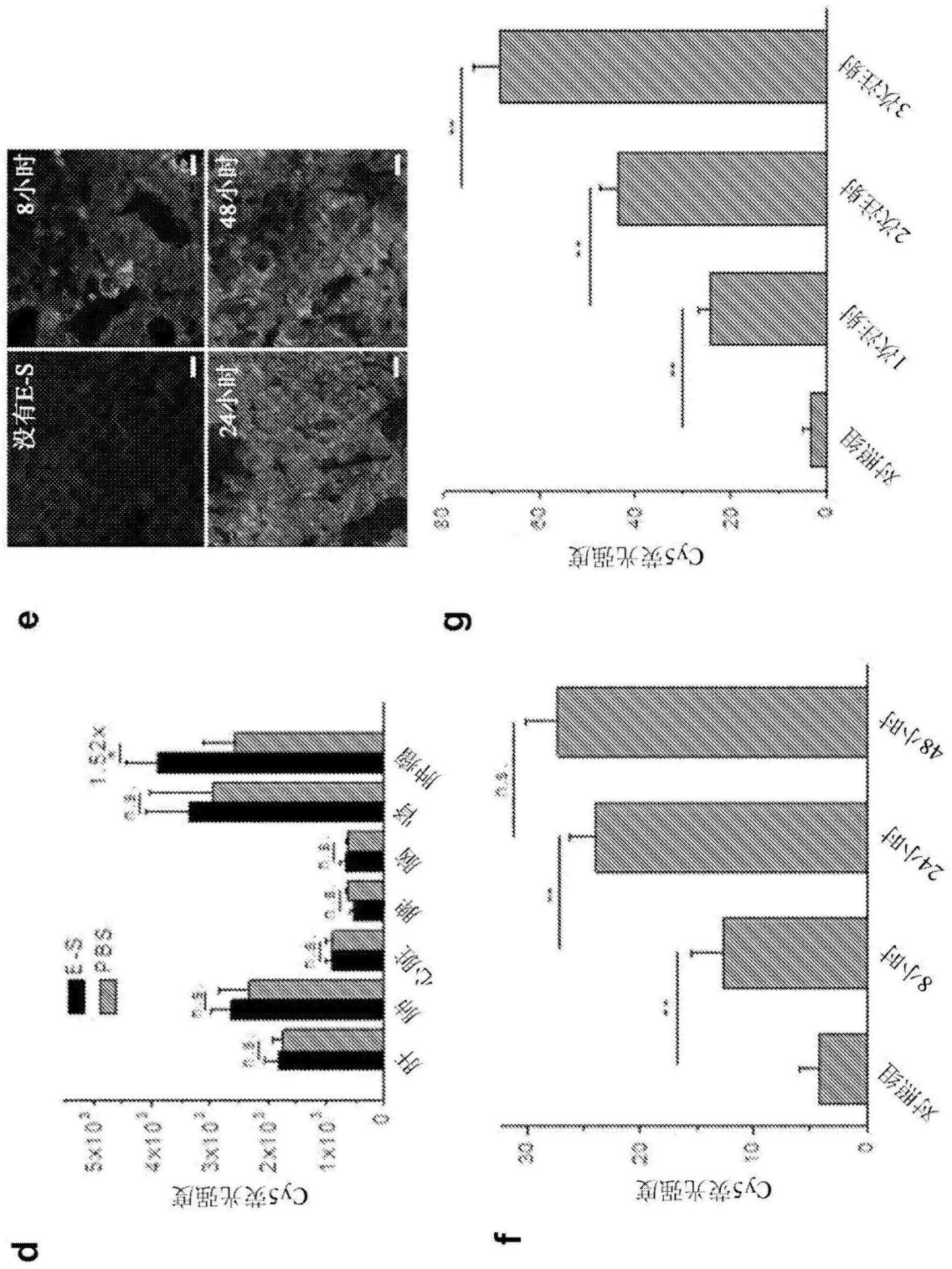
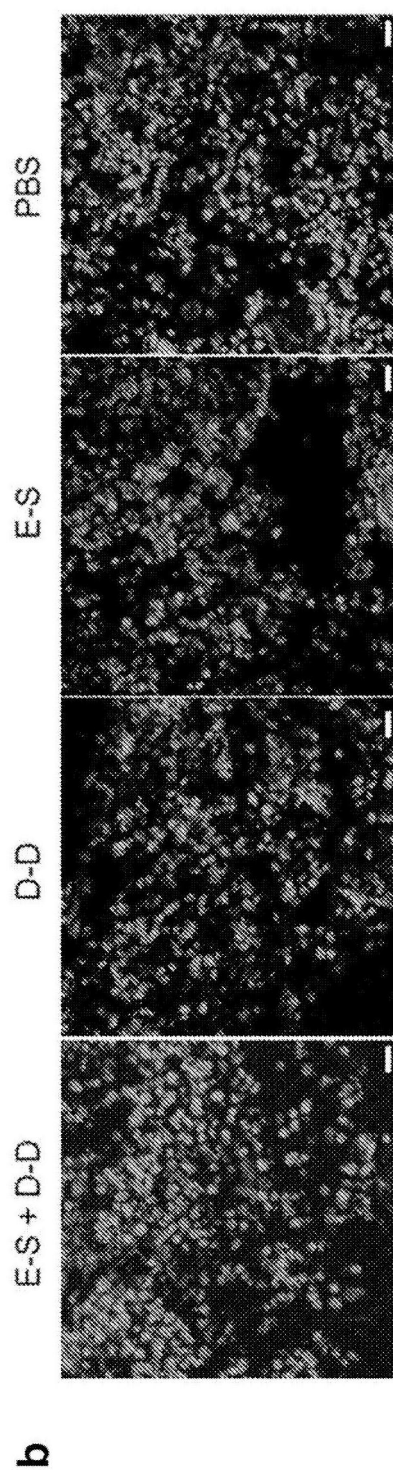
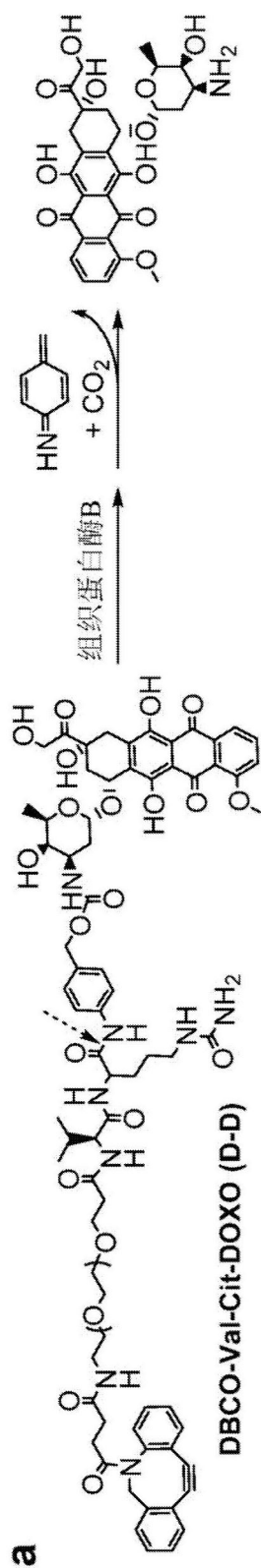


图7





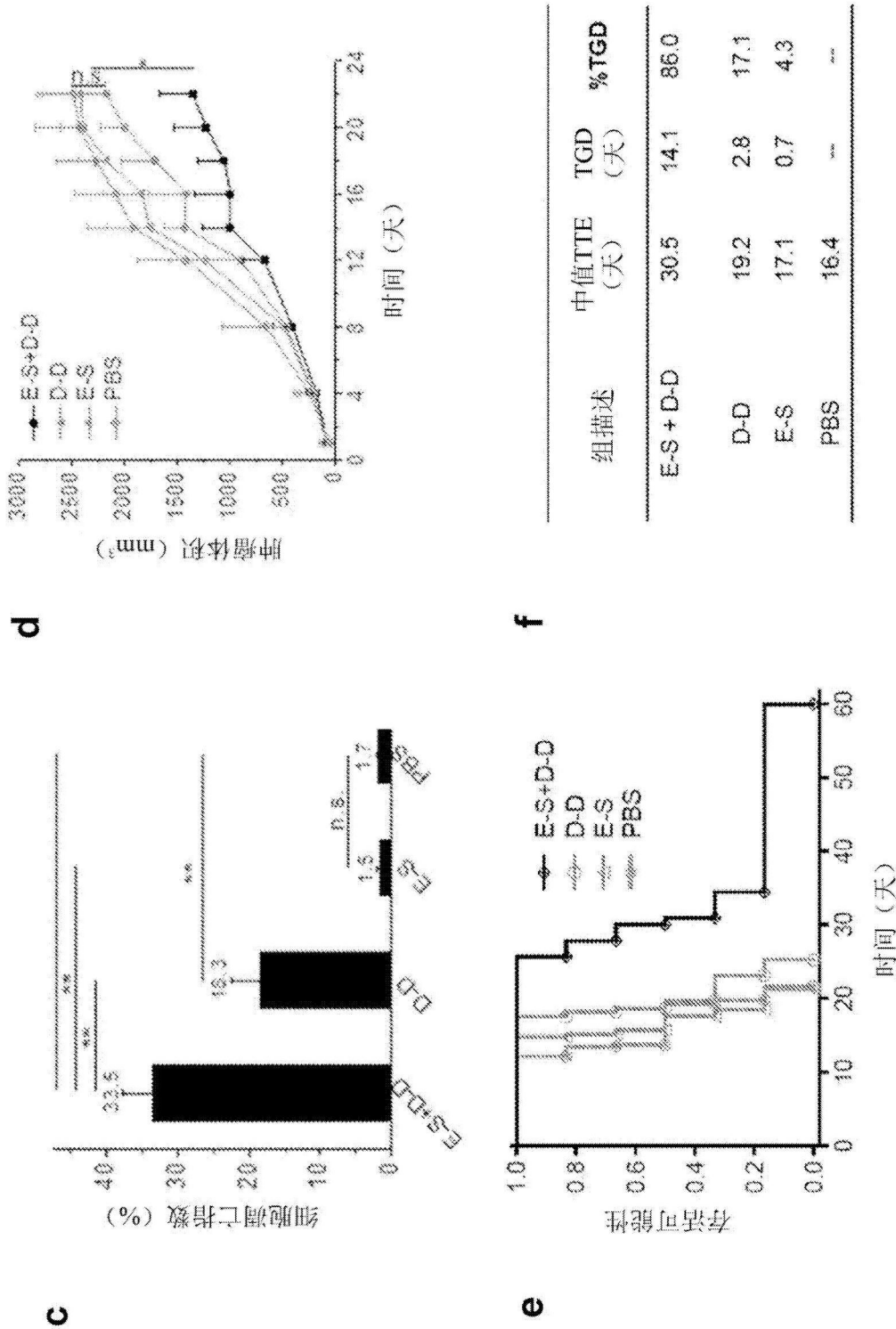
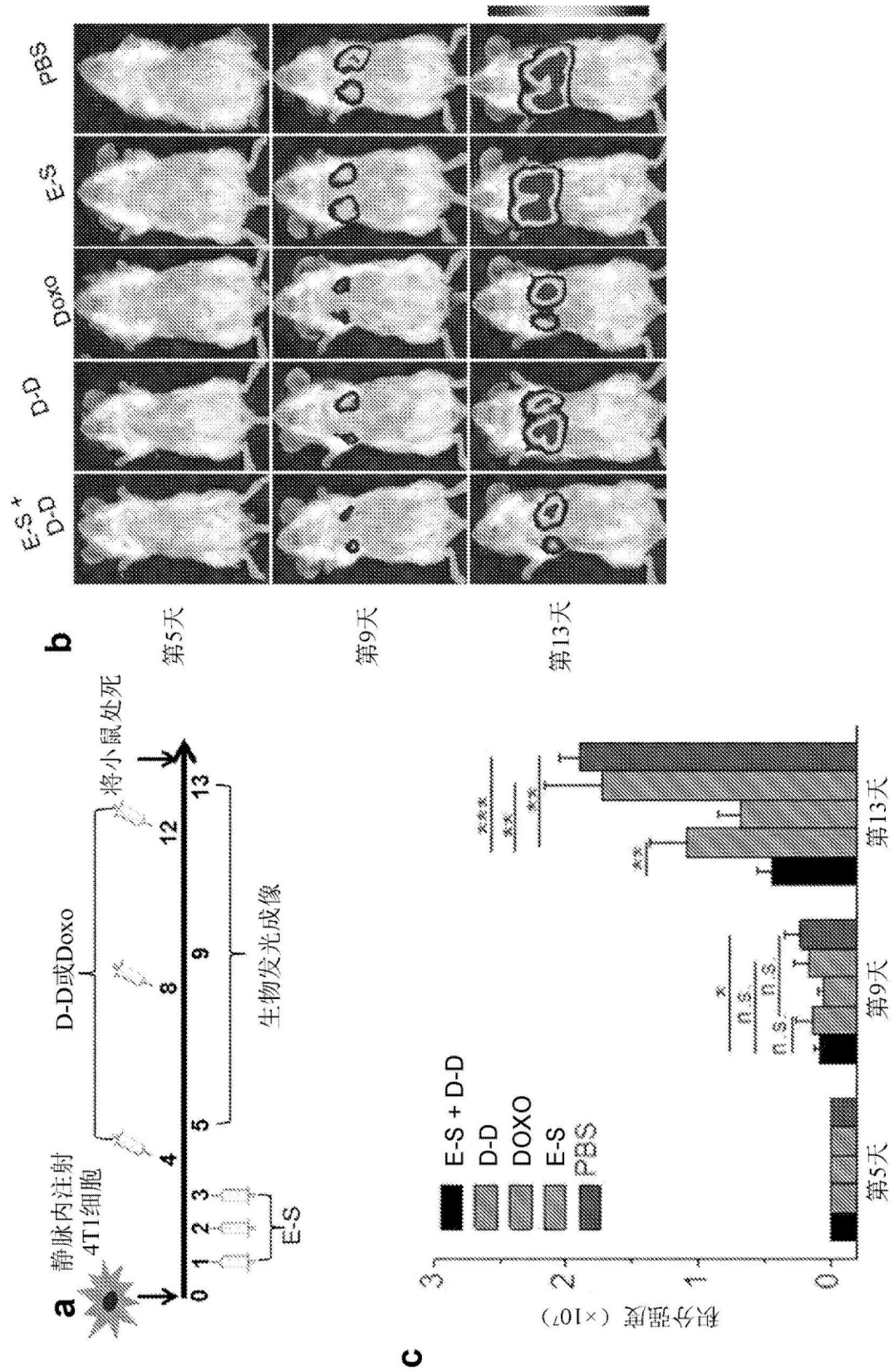
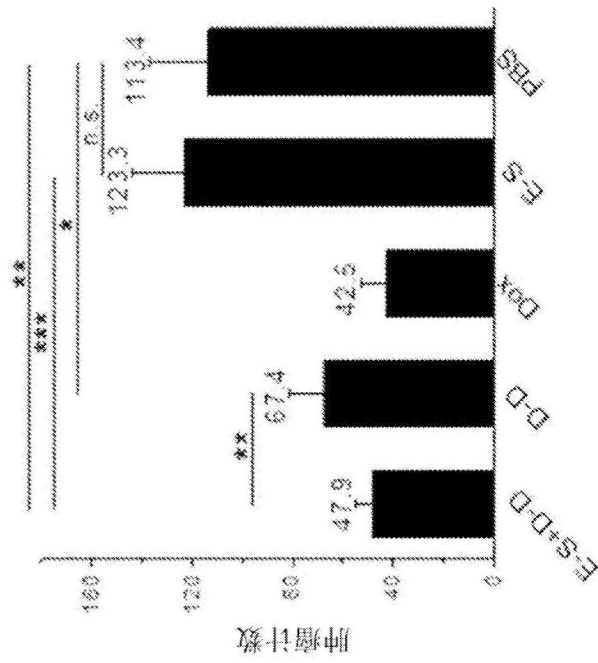
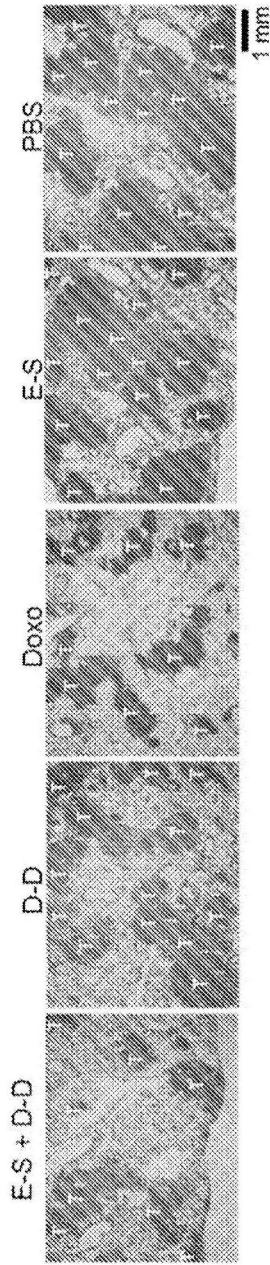


图8



**d****e**

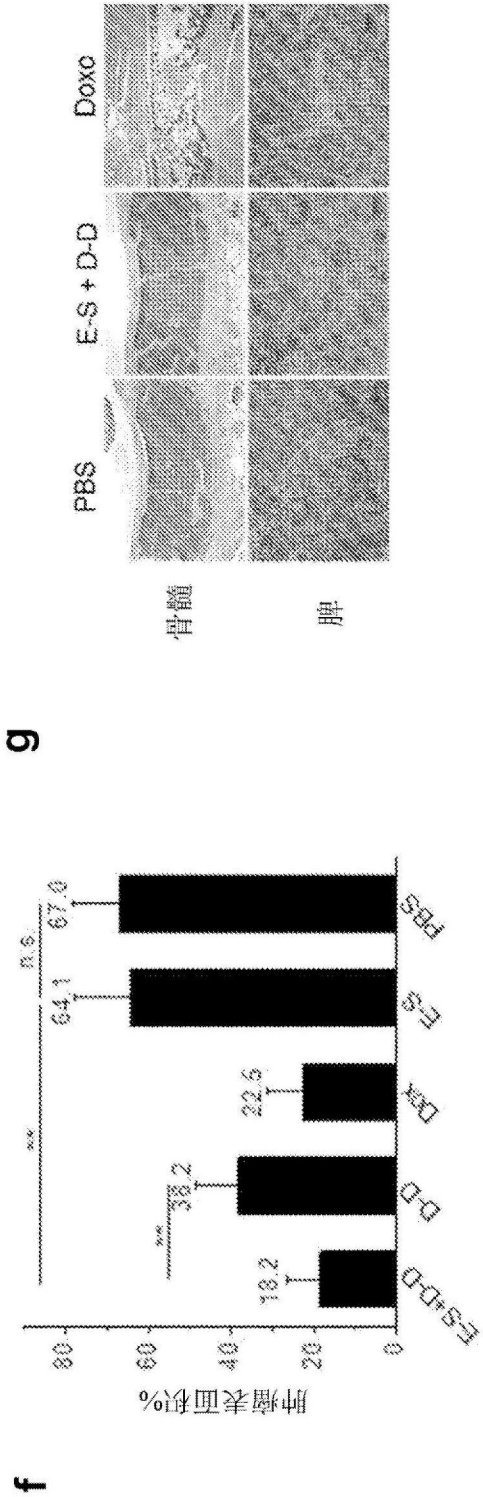


图9

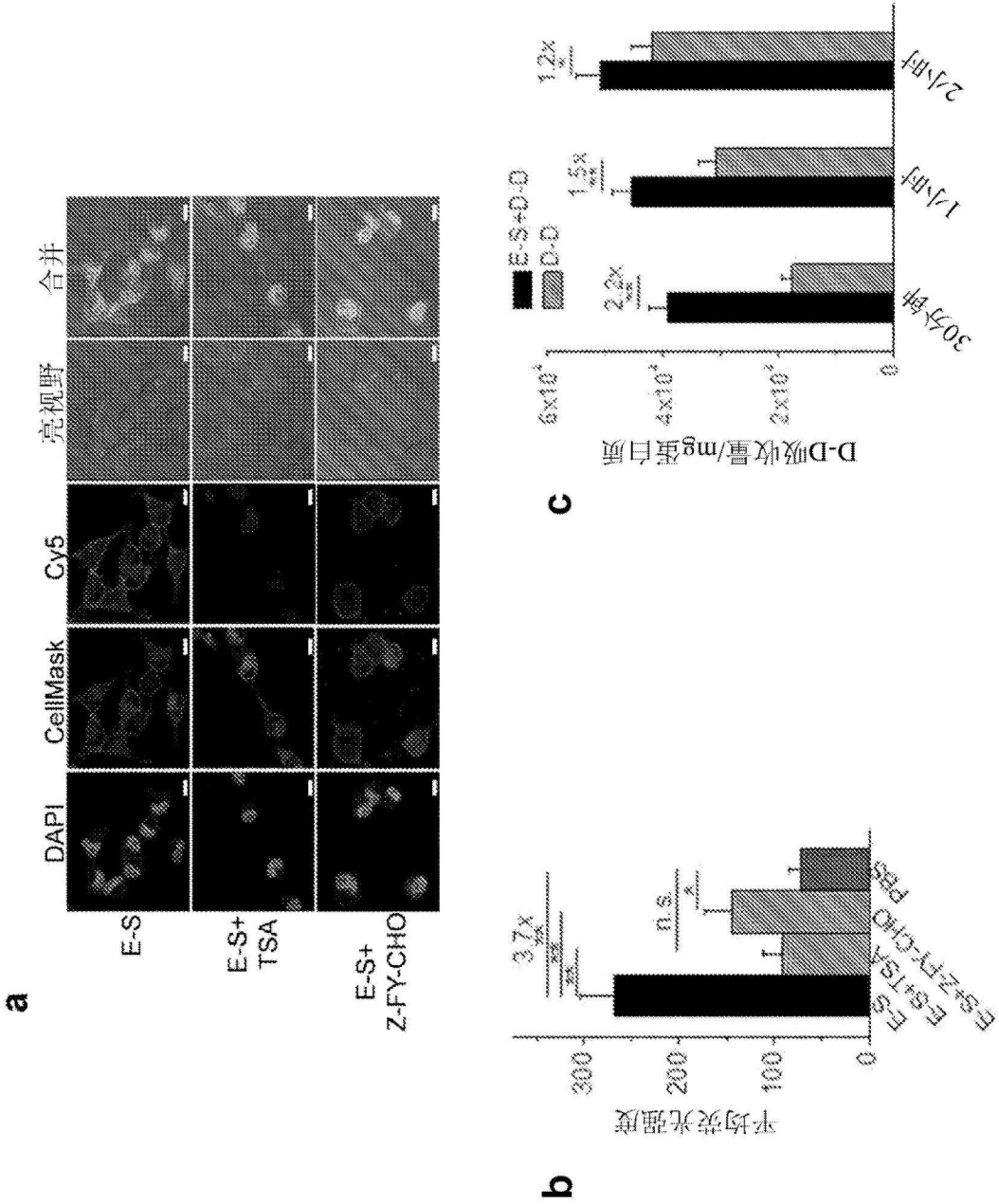


图10

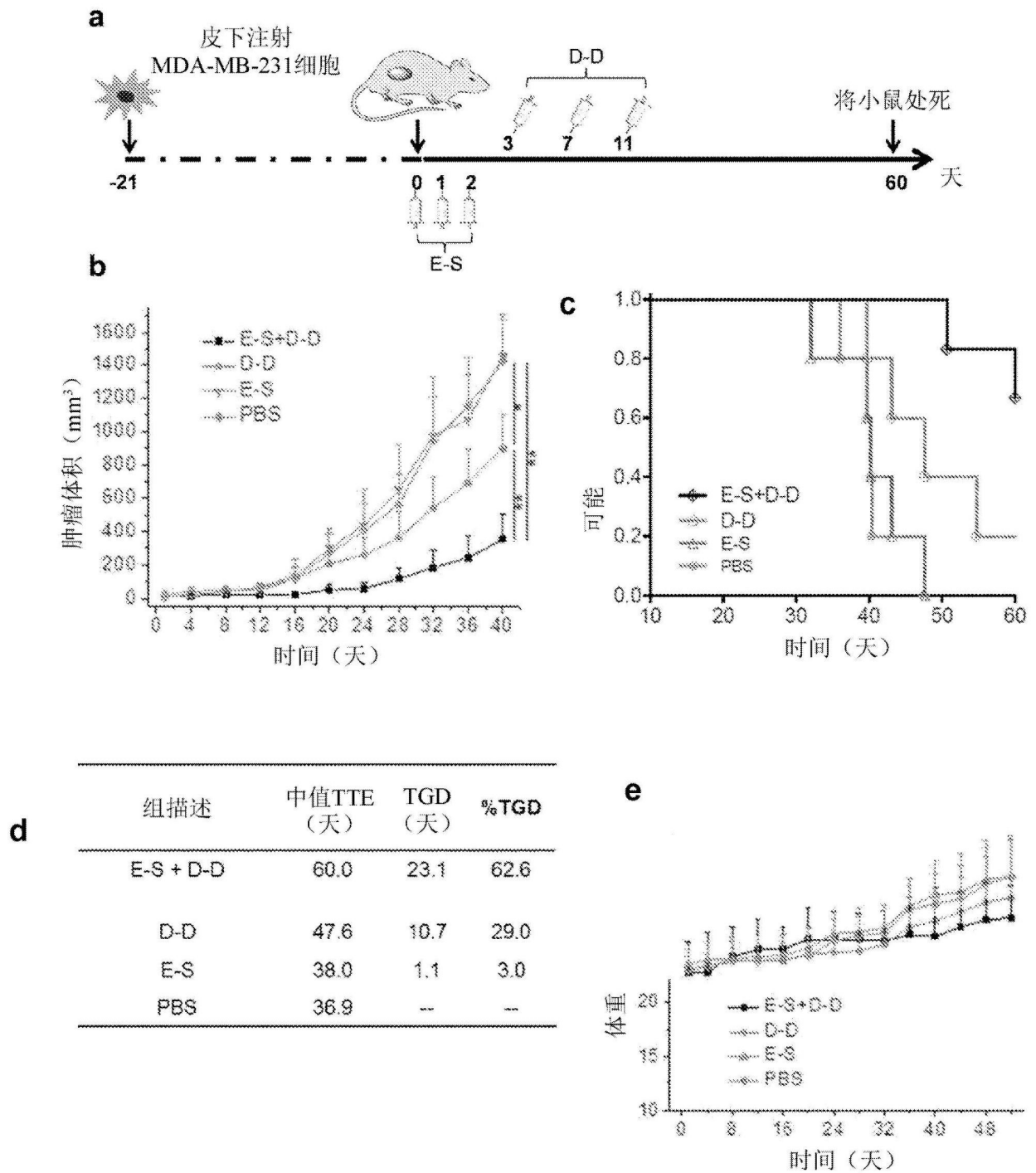


图11