(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116390932 A
(43)申请公布日 2023.07.04

(21)申请号 202180051965.1

(22)申请日 2021.06.23

(30)优先权数据
PCT/EP2020/071045 2020.07.24 EP
2025904 2020.06.24 NL

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.02.22

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2021/067239 2021.06.23

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/260061 EN 2021.12.30

(71)申请人 萨普雷米科技有限公司
地址 荷兰比尔特霍芬

(72)发明人 鲁本·波斯特尔 盖伊·赫尔曼斯
亨德里克·福斯

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 11204
专利代理师 王达佐 安佳宁

(51)Int.Cl.
C07J 63/00(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)
A61P 31/00(2006.01)
A61P 1/16(2006.01)
A61K 47/68(2010.01)
C12N 5/09(2017.01) (续)

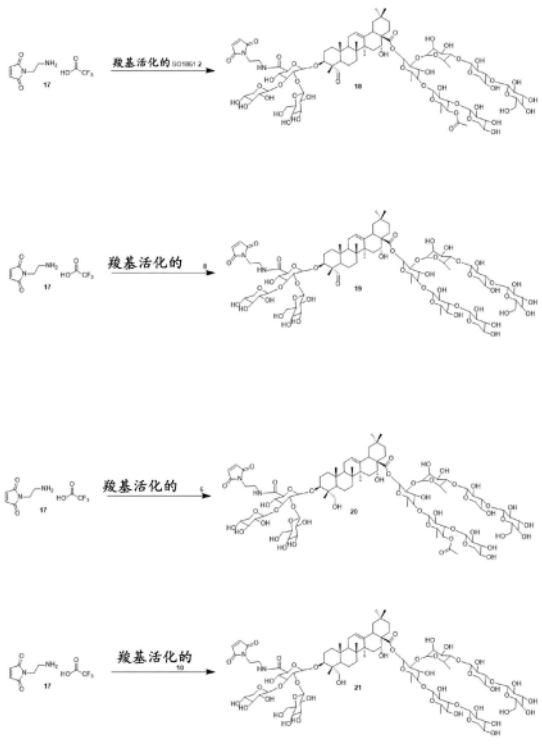
权利要求书31页 说明书125页
序列表2页 附图57页

(54)发明名称

用于在药品中使用的皂苷衍生物

(57)摘要

本发明涉及基于皂苷的肥皂草皂树皂苷衍生物，该皂苷包含三萜苷元和第一糖链和/或第二糖链，并且该肥皂草皂树皂苷衍生物包含：含有已衍生化的醛基的苷元核心结构；和/或第一糖链，其中该第一糖链包含已衍生化的羧基基团；和/或第二糖链，其中该第二糖链包含至少一个已衍生化的乙酰氧基基团。本发明还涉及包含本发明的皂苷衍生物的第一药物组合物。另外，本发明涉及包含本发明的第一药物组合物和第二药物组合物的药物组合，该第二药物组合物包含抗体-毒素缀合物、受体-配体-毒素缀合物、抗体-药物缀合物、受体-配体-药物缀合物、抗体-寡核苷酸缀合物或受体-配体-寡核苷酸缀合物中的任何一种或多种。本发明还涉及本发明的第一药物组合物或药物组合，该第一药物组合物或药物组合用作药剂或用于在治疗或预防癌症、传染病、病毒感染、高胆固醇血症、原发性高草酸尿症、血友病A、血友病B、α-1抗胰蛋白酶相关肝病、急性肝卟啉症、甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性或自身免疫性疾病中使用。此外，本发明涉及用于将分子从细胞外转移到所述细胞内的体外或离体方法，该方法包括使所述细胞与该分子和本发明的皂苷衍生物接触。



CN 116390932 A

[转续页]

[接上页]

(51)Int.Cl.

C12N 5/0781(2010.01)
A61P 3/06(2006.01)
A61P 7/04(2006.01)
A61K 31/704(2006.01)
A61P 31/12(2006.01)
C12N 5/0783(2010.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 19/06(2006.01)

1.一种基于肥皂草皂树(QS)皂苷的皂苷衍生物,该肥皂草皂树皂苷包含三萜苷元核心结构和与该苷元核心结构连接的第一糖链和第二糖链中的至少一种;所述皂苷进一步包含以下中的至少一种:

在C-4处包含醛基的所述苷元核心结构;包含羧基基团、优选地葡糖醛酸部分的羧基基团的该第一糖链;其中:

i.该皂苷衍生物包含含有已衍生化的醛基的苷元核心结构;或

ii.该皂苷衍生物包含该第一糖链,其中该第一糖链包含已衍生化的羧基基团、优选地葡糖醛酸部分的羧基基团;或

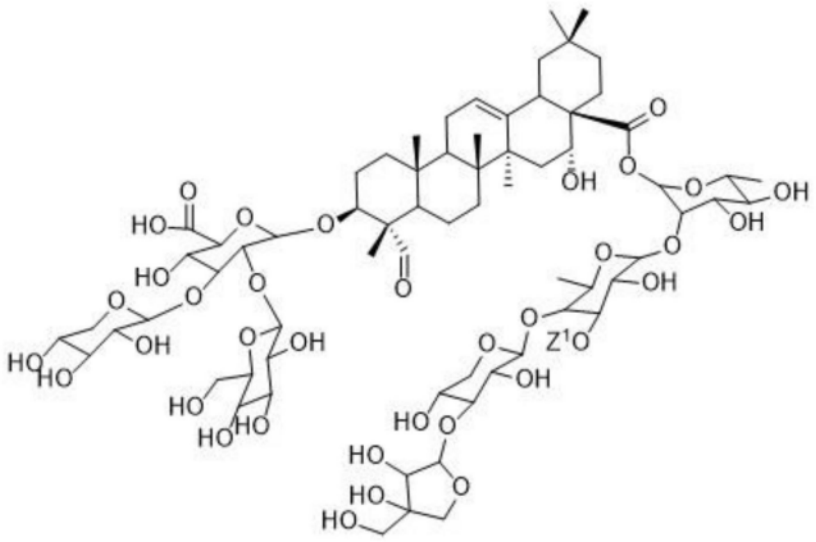
iii.该皂苷衍生物包含衍生化i.和ii.的组合,优选地衍生化i.和ii.中的一种;

其中该第一糖链和该第二糖链独立地选自单糖、线性寡糖和支链寡糖。

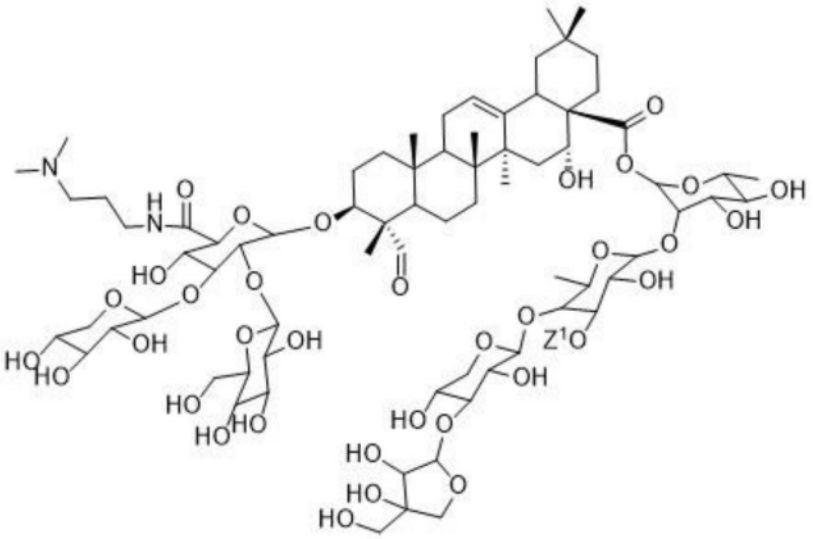
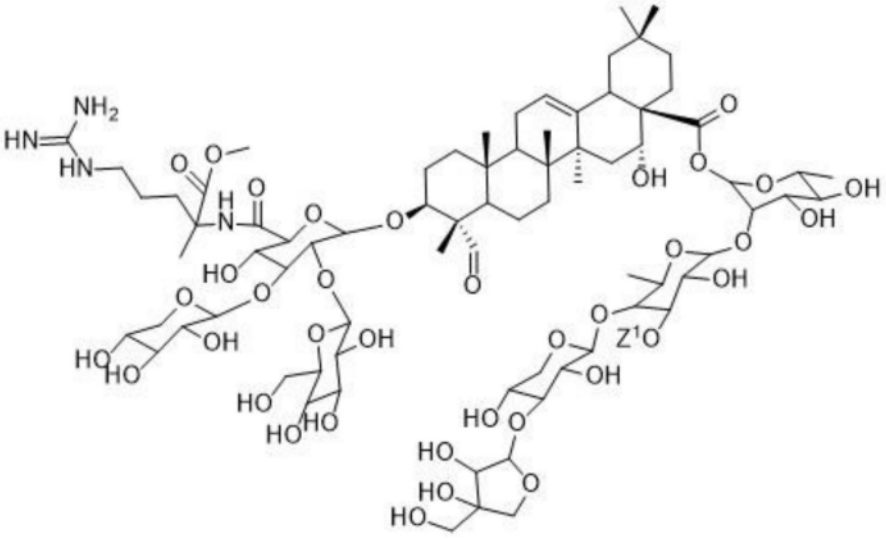
2.根据权利要求1所述的皂苷衍生物,其中该皂苷是天然存在的皂苷。

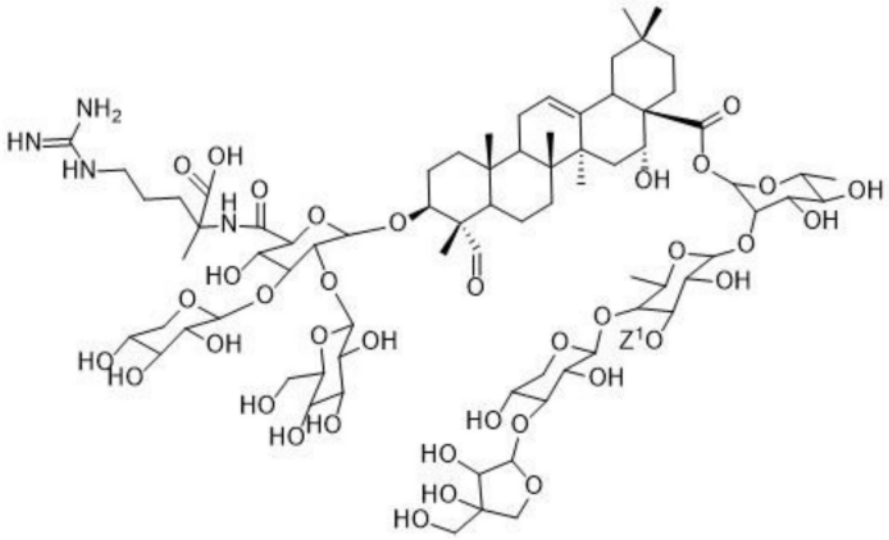
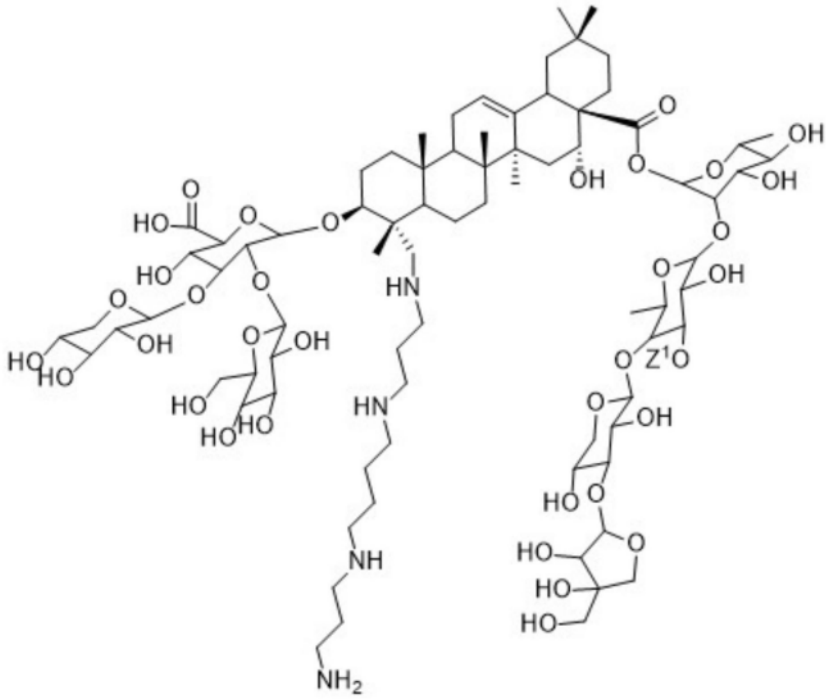
3.根据权利要求1-2中任一项所述的皂苷衍生物,条件是该皂苷衍生物不是以下具有式(VI)-(XXXIV)和(XL)-(XLV)的皂苷衍生物中的任一种:

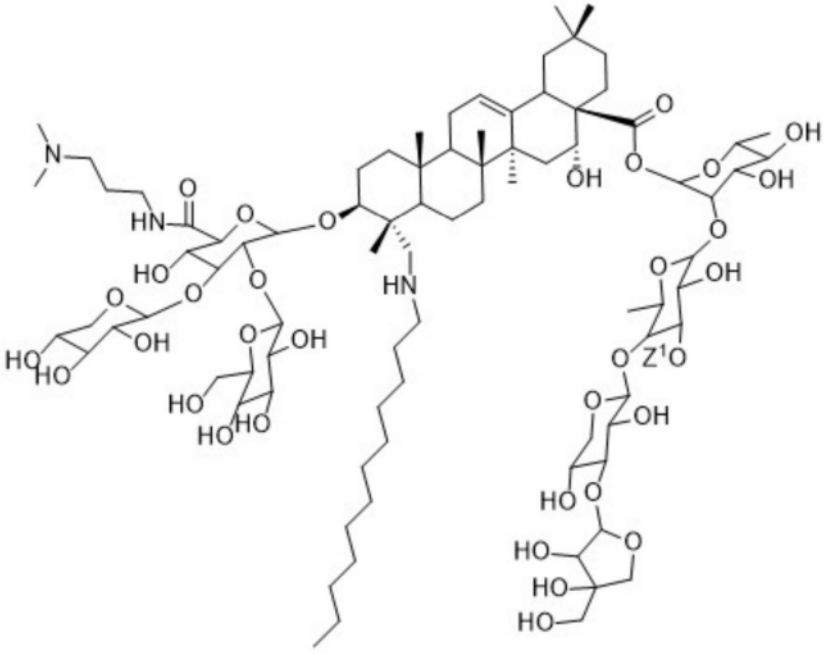
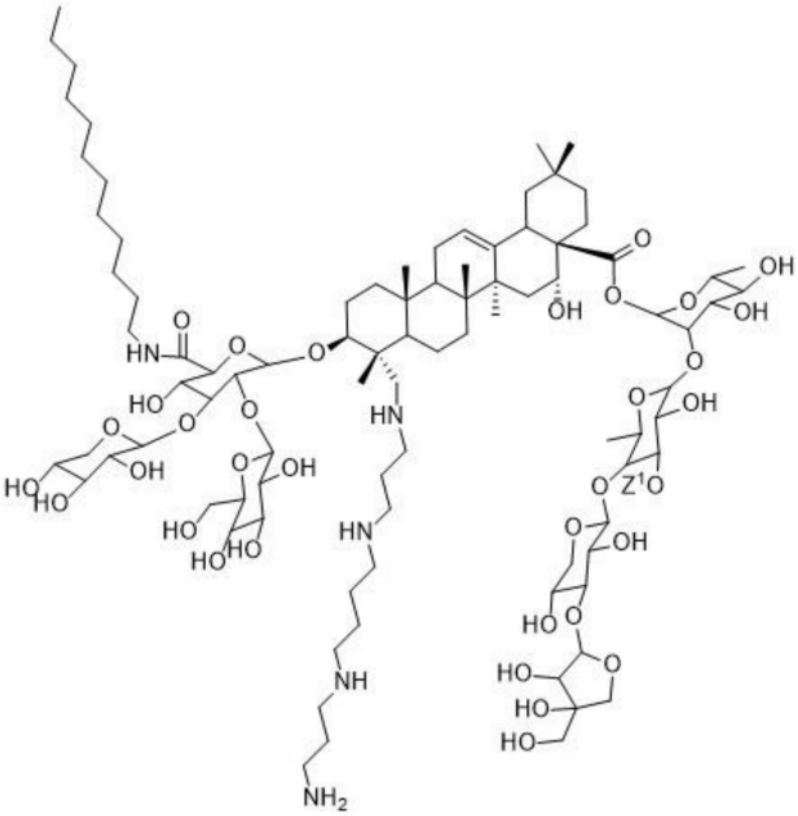
(VI)

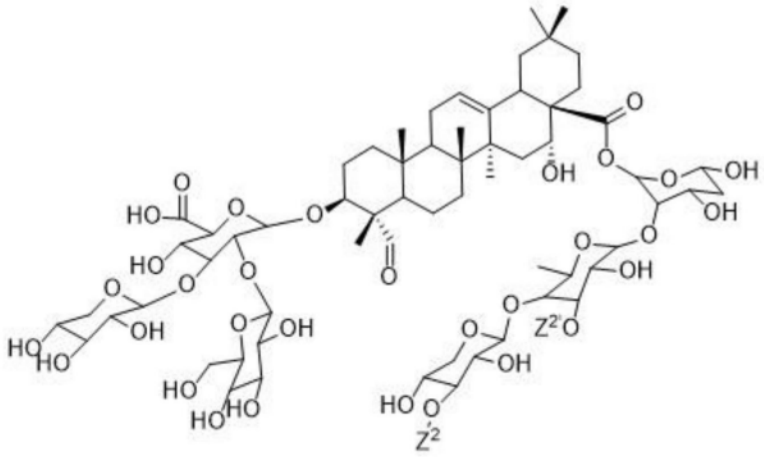
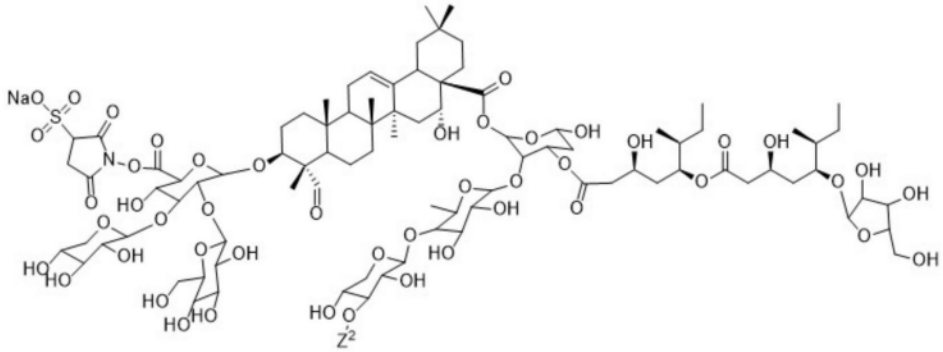


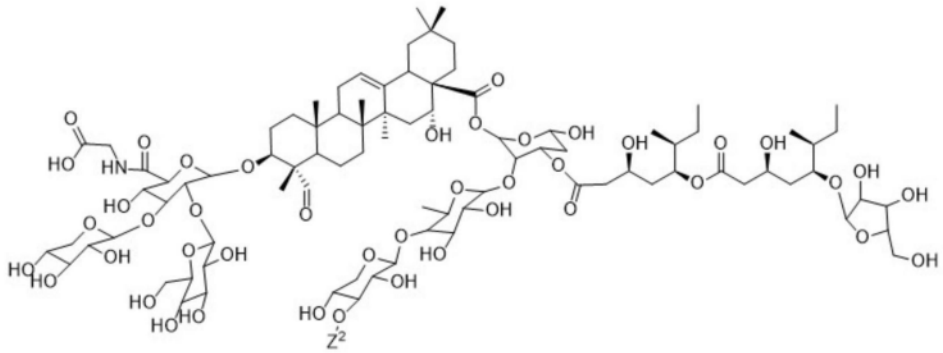
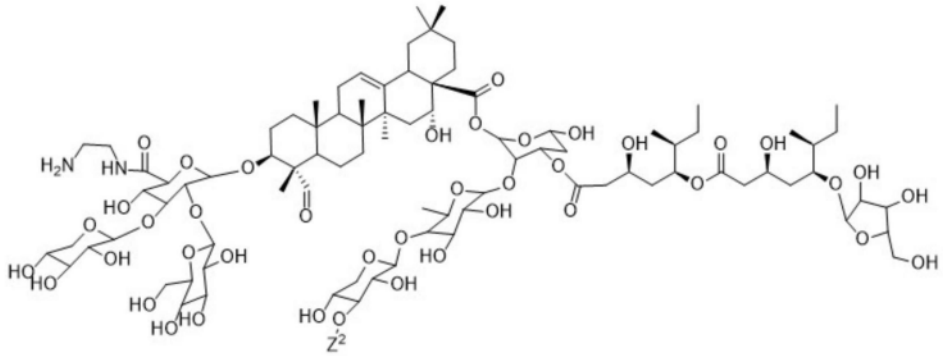
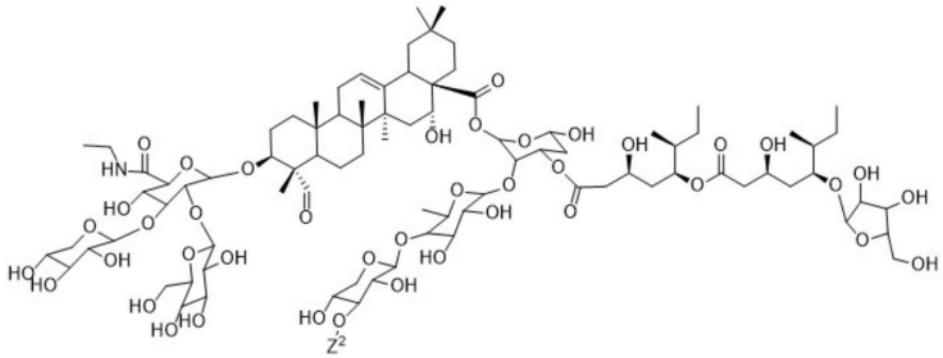
其中 Z^1 是氢或葡萄糖;

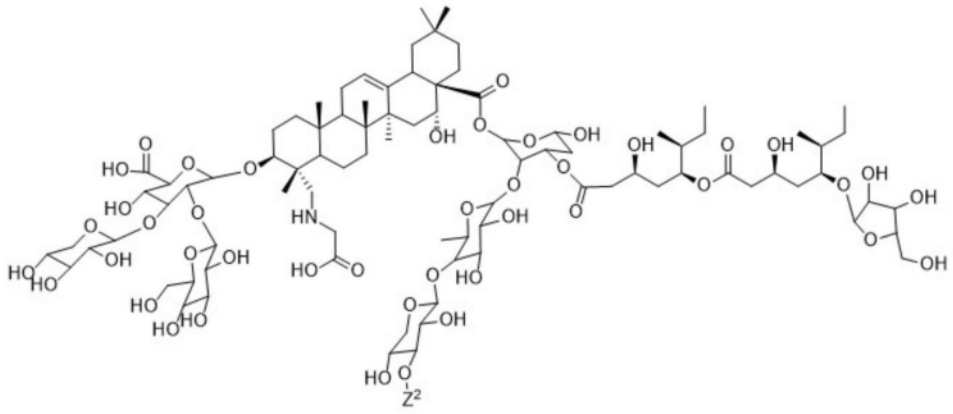
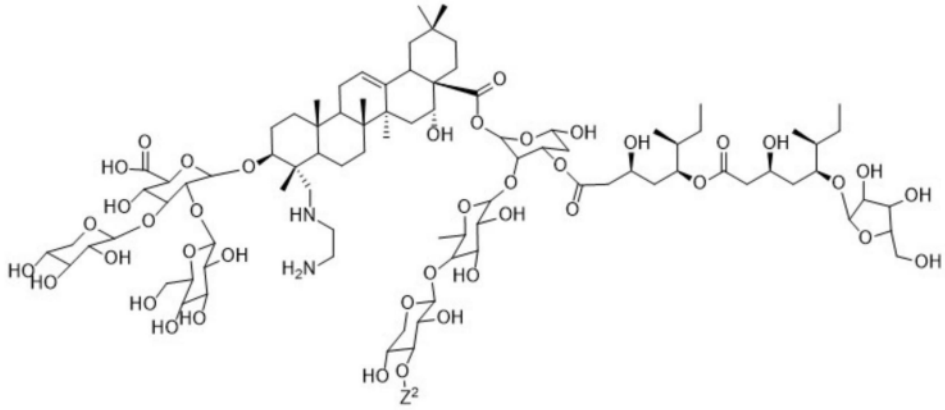
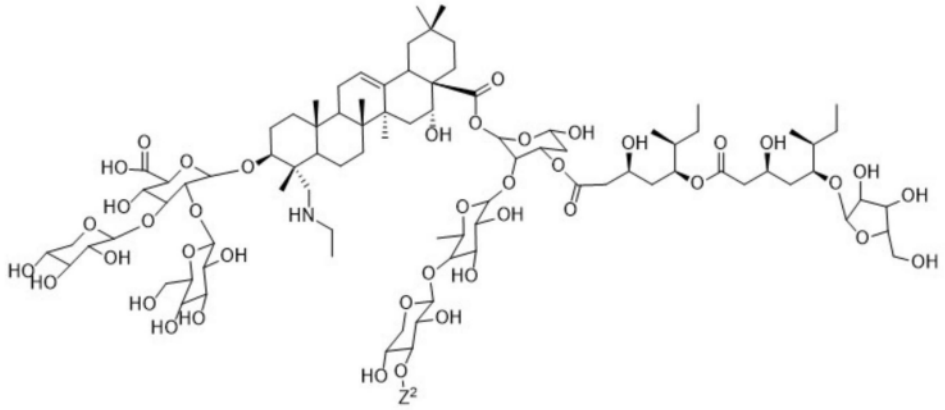
	脱酰化皂树皂苷
(VII)	 其中 Z^1 是氢或葡萄糖； 3-二甲基氨基-1-丙胺-脱酰化皂树皂苷
(VIII)	 其中 Z^1 是氢或葡萄糖； 精氨酸甲酯脱酰化皂树皂苷

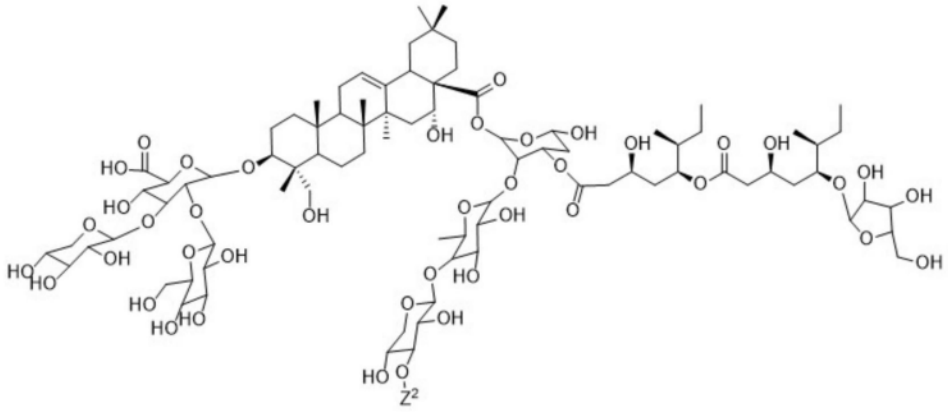
(IX)	 其中 Z^1 是氢或葡萄糖； 精氨酸甲酯脱酰化皂树皂苷
(X)	 其中 Z^1 是氢或葡萄糖； 亚精胺醛脱酰化皂树皂苷

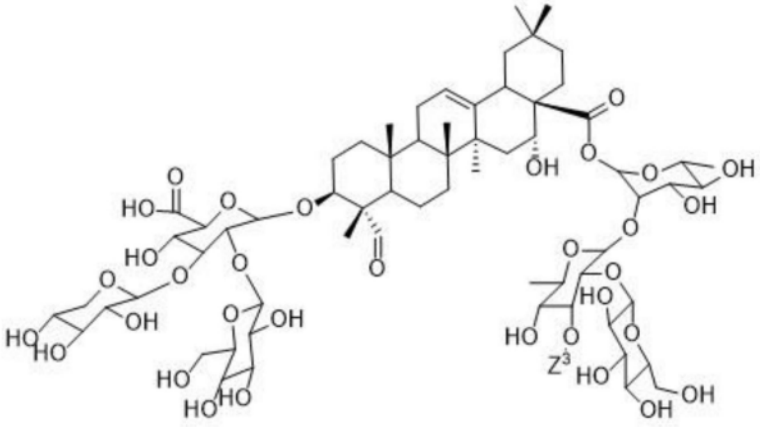
(XI)	 其中 Z^1 是氢或葡萄糖； 3-二甲基氨基-1-丙胺-十二烷胺脱酰化皂树皂苷
(XII)	 其中 Z^1 是氢或葡萄糖；
	十二烷基酰胺皂苷-精胺醛脱酰化皂树皂苷

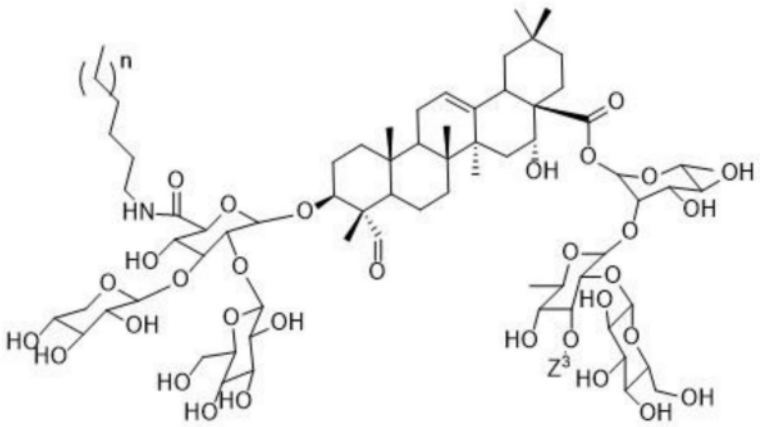
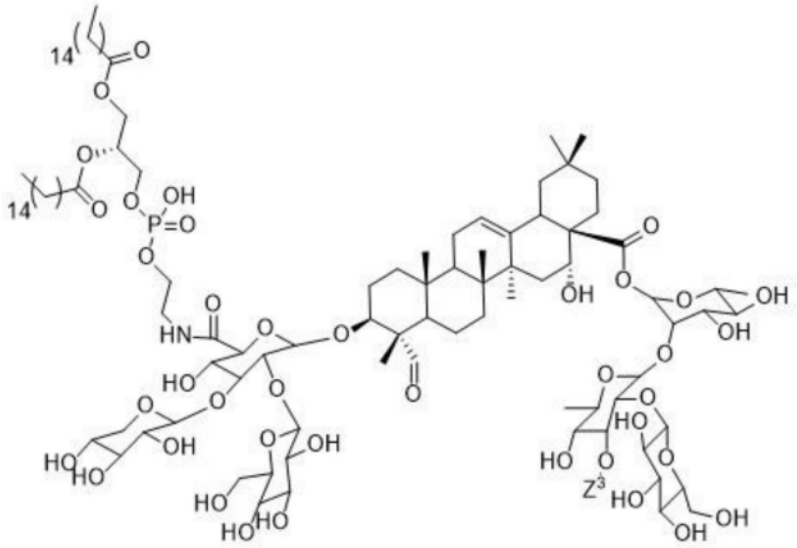
(XIII)	 ; 其中 Z^2 = 芹菜糖，并且 $Z^{2'}$ = 葡萄糖（QA18-H）；或 其中 Z^2 = 芹菜糖，并且 $Z^{2'}$ = 氢（QA21-V1-H）；或 其中 Z^2 = 木糖，并且 $Z^{2'}$ = 葡萄糖（QA21-V2-H）；
(XIV)	 其中 Z^2 是芹菜糖或木糖； QS-21-S-NHS

(XV)	 其中 Z^2 是芹菜糖或木糖； 甘氨酸 QA-21
(XVI)	 其中 Z^2 是芹菜糖或木糖； 乙二胺 QA-21
(XVII)	 其中 Z^2 是芹菜糖或木糖； 乙胺 QA-21

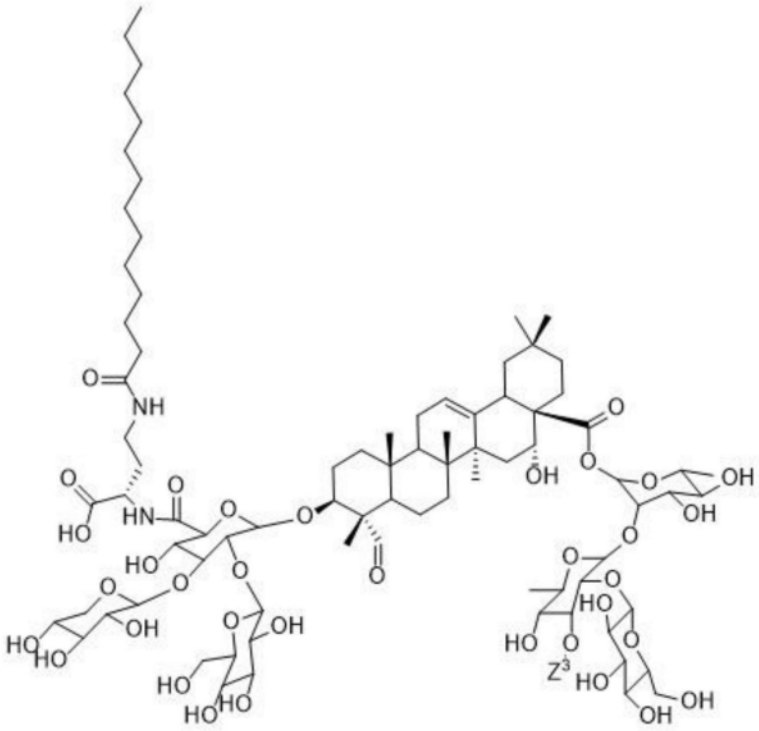
(XVIII)	 其中 Z^2 是芹菜糖或木糖； 甘氨酸醛 QA-21
(XIX)	 其中 Z^2 是芹菜糖或木糖； 乙二胺醛 QA-21
(XX)	 其中 Z^2 是芹菜糖或木糖；

	乙胺醛 QA-21
(XXI)	 其中 Z^2 是芹菜糖或木糖； 醇 QA-21

(XXII)	 其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 皂树脱酰基皂苷

(XXIII)	 其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖，并且 n = 1-15； C_6-C_{20} 脂肪族胺皂树脱酰基皂苷
(XXIV)	 其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 磷脂酰乙醇胺二棕榈酰基皂树脱酰基皂苷

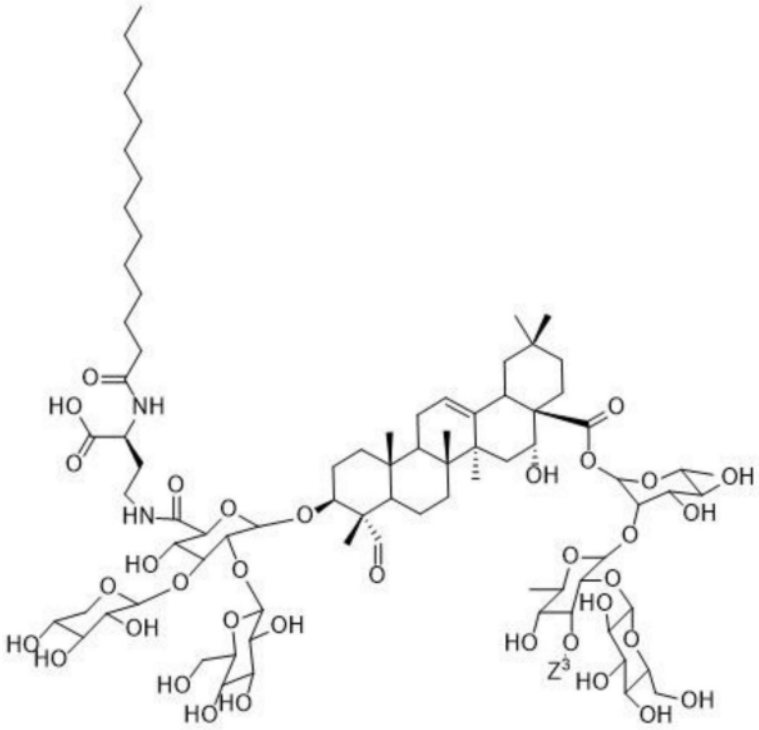
(XXV)

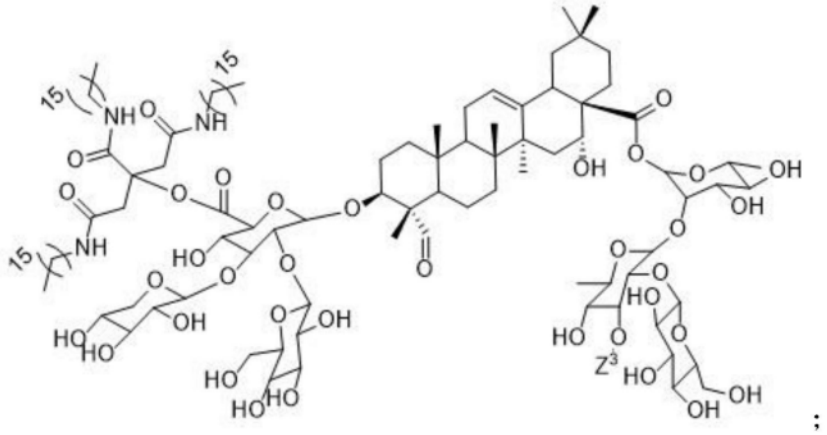
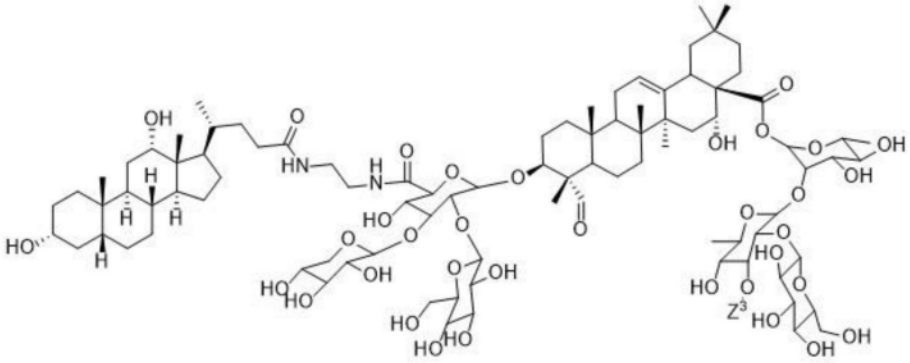


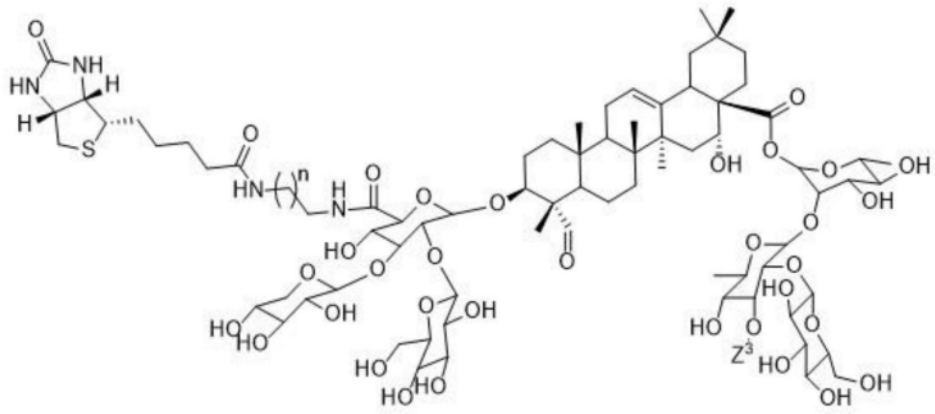
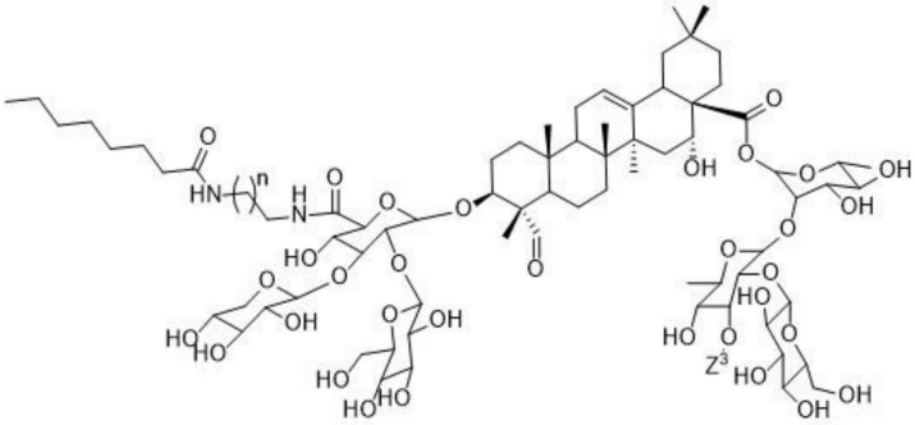
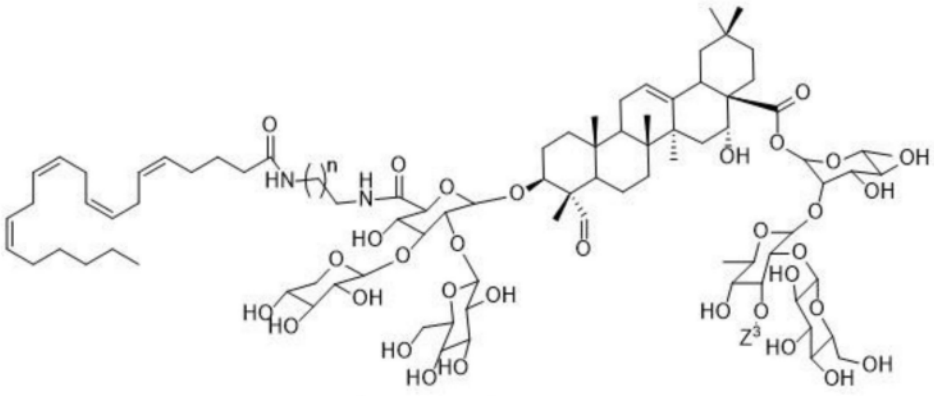
其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖;

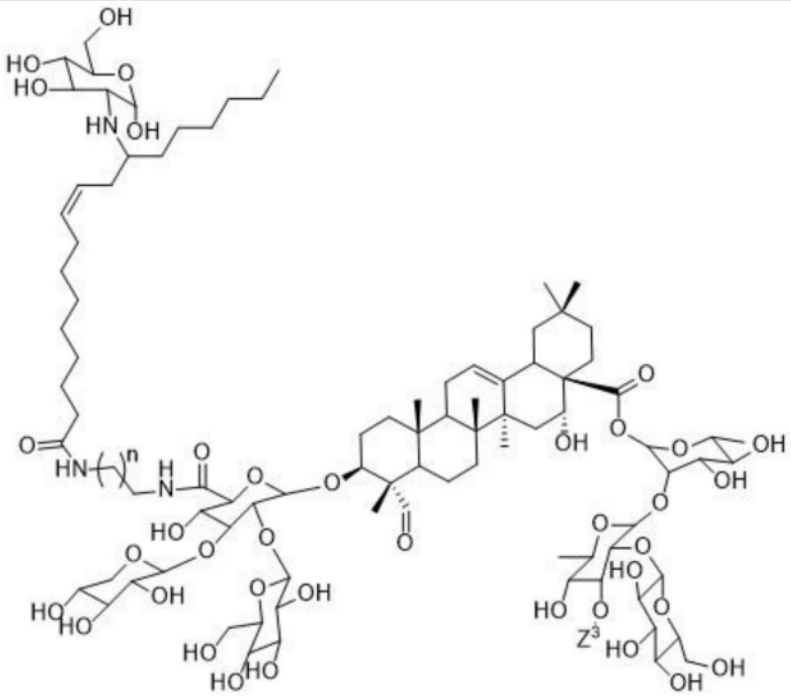
L-2,4-二氨基丁酸二肉豆蔻酰基皂树脱酰基皂苷

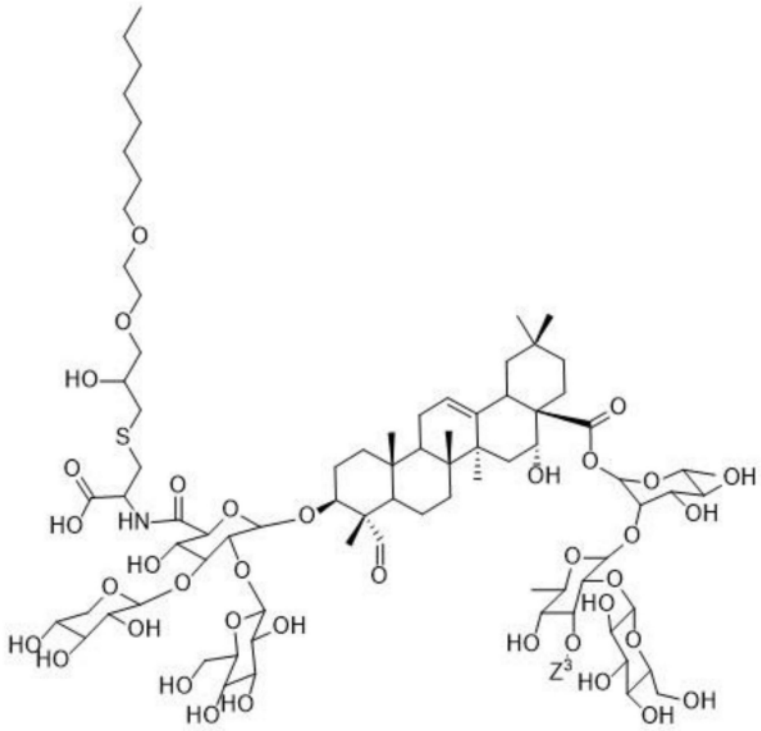
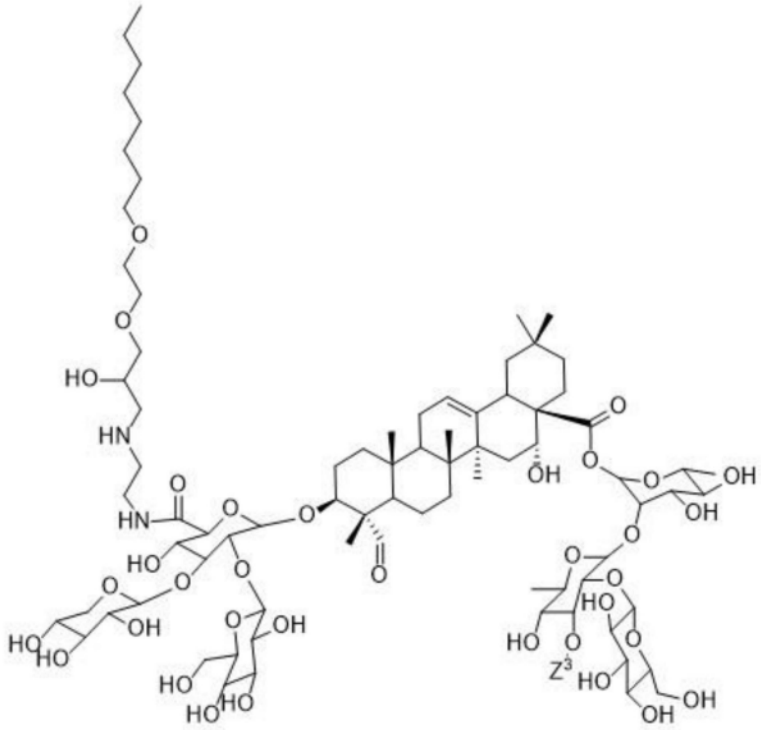
(XXVI)



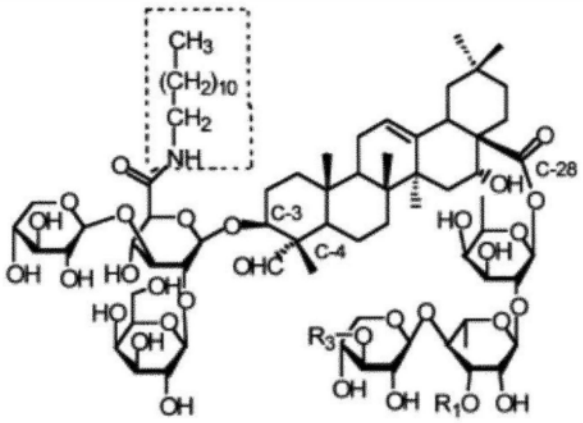
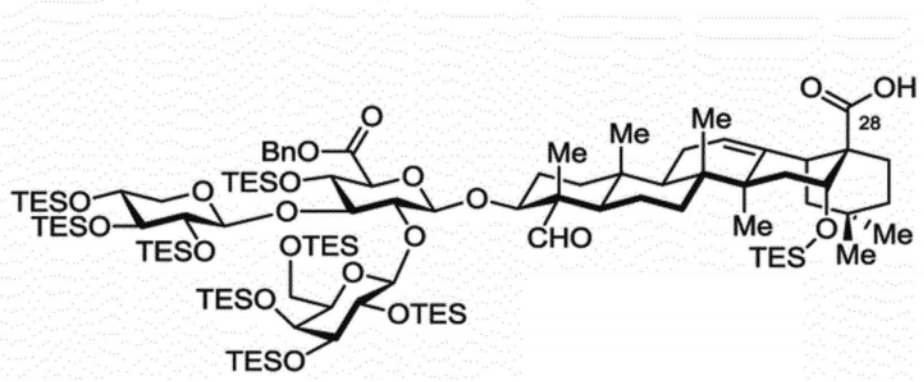
	其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； L-2,4-二氨基丁酸二肉豆蔻酰基皂树脱酰基皂苷
(XXVII)	 ； 其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 柠檬酸-三棕榈酰基皂树脱酰基皂苷
(XXVIII)	 其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 脱氧胆酸皂树脱酰基皂苷

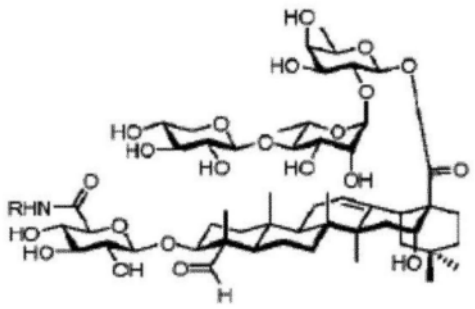
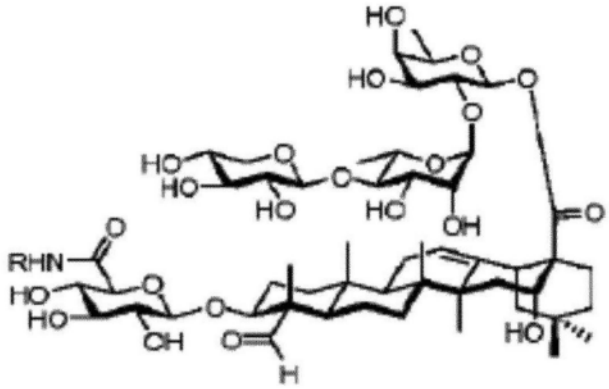
(XXIX)	 其中 n = 1-5，并且 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 生物素皂树脱酰基皂苷
(XXX)	 其中 n = 1 或 2，并且 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 脂肪酸二胺皂树脱酰基皂苷
(XXXI)	 其中 n = 1 或 2，并且 Z^3 是氢或 β-葡萄糖；

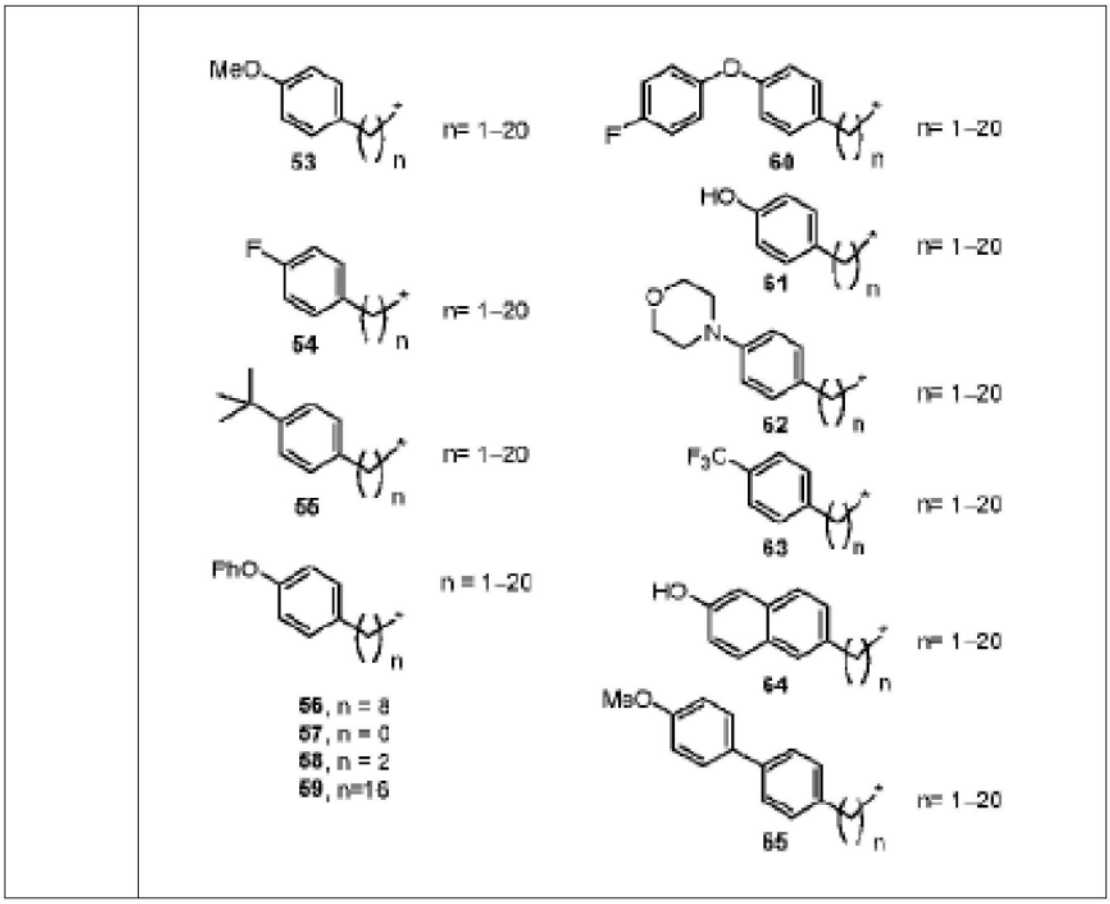
	视黄醛二胺皂树脱酰基皂苷
(XXXII)	 其中 n = 1-5，并且 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 葡糖胺-蓖麻油酸皂树脱酰基皂苷

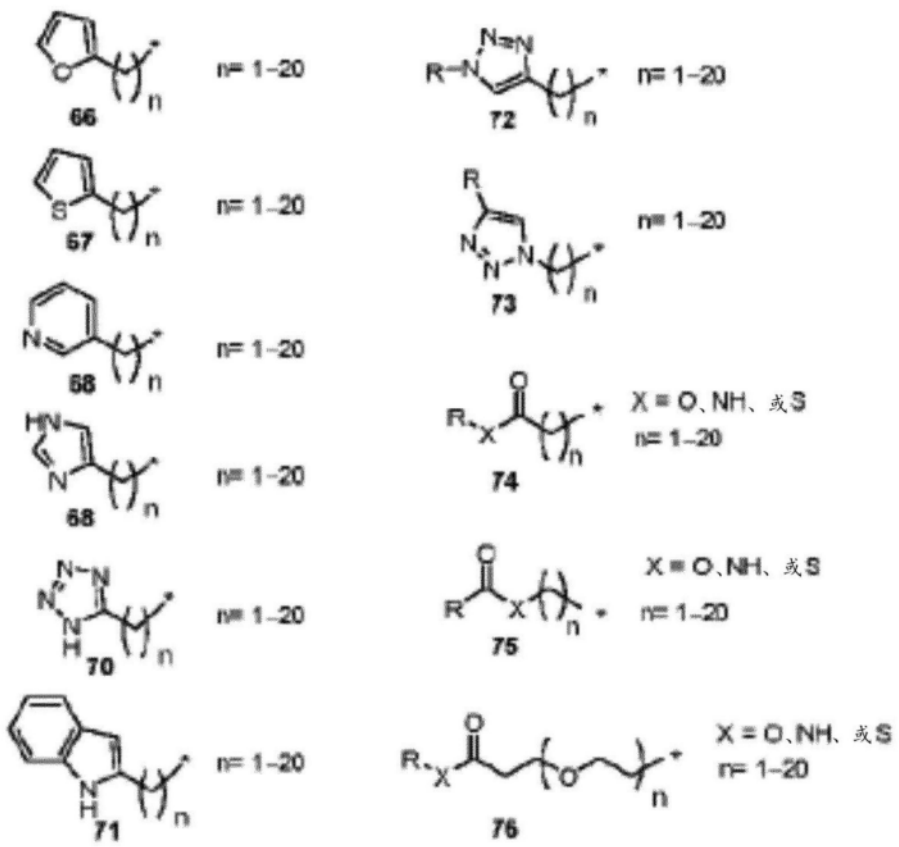
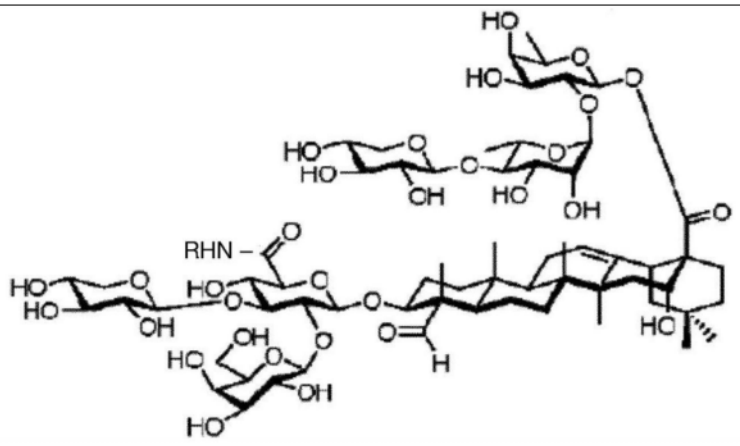
(XXXIII)	 其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 正辛基-单氧乙烯半胱氨酸皂树脱酰基皂苷
(XXXIV)	
	其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 正辛基-单乙烯乙二胺皂树脱酰基皂苷

或

(XL)	 GPI-0100 其中 R_3 是芹菜糖或木糖； 脱酰化皂树皂苷
(XLI)	 其中 Bn＝ 苯基；TES 是三乙基甲硅烷基

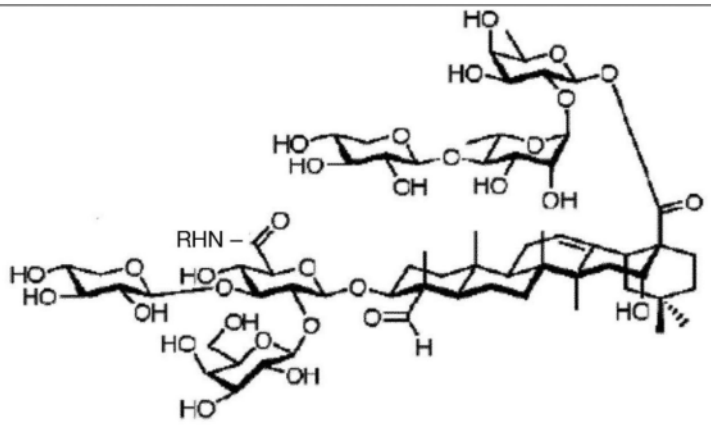
(XLII)	 其中 R 是烷基，如十二烷基、甲基、己基、十八烷基、乙基、丙基或戊基
(XLIII)	 其中 R 是以下中的任一个：


MeO
53
n= 1–20
F
54
n= 1–20
55
n= 1–20
PhO
n = 1–20
56, n = 8
57, n = 0
58, n = 2
59, n=16
O
F
60
n= 1–20
HO
61
n= 1–20
O
N
62
n= 1–20
F3C
63
n= 1–20
HO
64
n= 1–20
MeO
65
n= 1–20

<table>
<tr><td></td><td>
</td></tr>
<tr><td>(XLIV)</td><td>

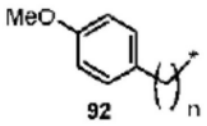
衍生自 Quil A
其中 R 是烷基，如十二烷基、甲基、己基、十八烷基、乙基、丙基或戊基</td></tr>
</table>

(XLV)

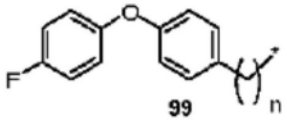


衍生自 Quil A；

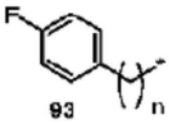
其中 R 是以下中的任一个：



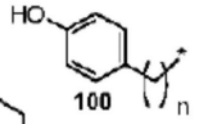
92 n= 1–20



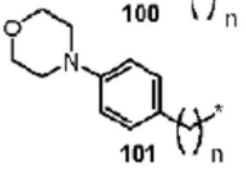
99 n= 1–20



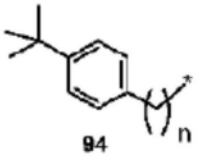
93 n= 1–20



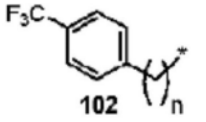
100 n= 1–20



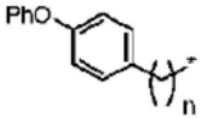
101 n= 1–20



94 n= 1–20

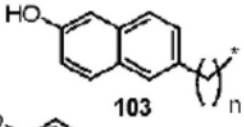


102 n= 1–20

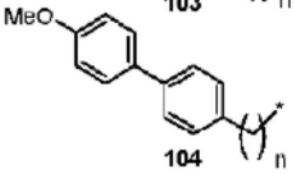


n = 1–20

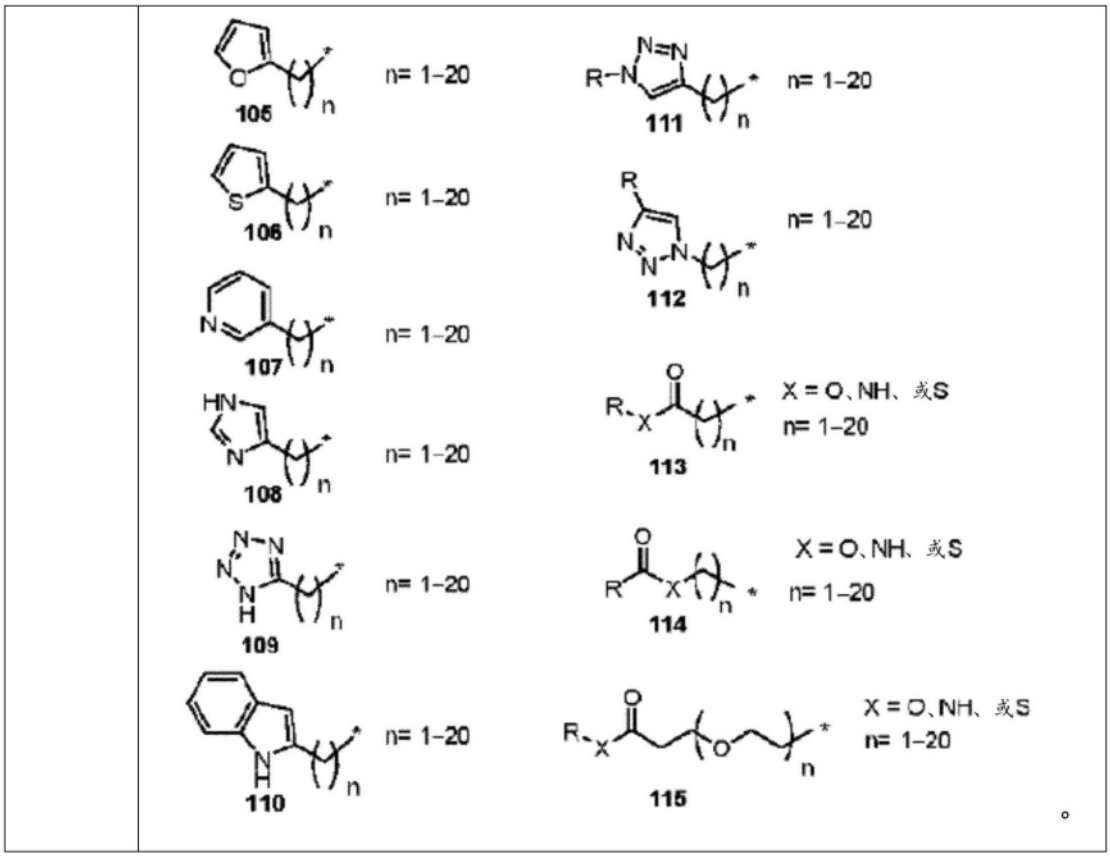
95, n = 8
96, n = 0
97, n = 2
98, n=16



103 n= 1–20



104 n= 1–20



4.根据权利要求1-3中任一项所述的皂苷衍生物，其中该皂苷衍生物是单糖链三萜糖苷或双糖链三萜糖苷，更优选地双糖链三萜糖苷。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的皂苷衍生物，其中该皂苷衍生物包含该第一糖链，其中该第一糖链包含已衍生化的羧基基团、优选地葡糖醛酸部分的羧基基团，

更优选地，该皂苷衍生物包含已衍生化的所述第一糖链，并且该皂苷衍生物包含含有醛基或已衍生化的醛基的苷元核心结构，

最优选地，该皂苷衍生物包含已衍生化的所述第一糖链，并且该皂苷衍生物包含含有醛基的苷元核心结构。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的皂苷衍生物，其中该皂苷衍生物包含苷元核心结构，该苷元核心结构选自由以下组成的组：

2α-羟基齐墩果酸；

16α-羟基齐墩果酸；

常春藤皂苷元(23-羟基齐墩果酸)；

16α,23-二羟基齐墩果酸；

丝石竹皂苷元；

皂皮酸；

原七叶皂苷元-21(2-甲基丁-2-烯酸酯)-22-乙酸酯；

23-氧代-玉蕊皂苷元C-21,22-双(2-甲基丁-2-烯酸酯)；

23-氧代-玉蕊皂苷元C-21(2-甲基丁-2-烯酸酯)-16,22-二乙酸酯；

洋地黄皂苷配基；

3,16,28-三羟基齐墩果烷-12-烯；

丝石竹酸，

优选地该皂苷衍生物包含苷元核心结构皂皮酸。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的皂苷衍生物，其中该皂苷衍生物包含选自由皂皮酸和丝石竹皂苷元组成的组的苷元核心结构，优选地该皂苷衍生物包含苷元核心结构皂皮酸，其中该第一糖链，当存在时，与该苷元核心结构的C_3原子或C_{28}原子连接，优选地与该C_3原子连接，和/或其中该第二糖链，当存在时，与该苷元核心结构的C_{28}原子连接。

8.根据权利要求1-7中任一项所述的皂苷衍生物，其中该第一糖链，如果存在，选自：

GlcA-、

Glc-、

Gal-、

Rha-(1→2)-Ara-、

Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-、

Glc-(1→2)-[Glc-(1→4)]-GlcA-、

Glc-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-、

Xyl-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-、

Glc-(1→3)-Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-Glc-(1→4)-Gal-、

Rha-(1→2)-Gal-(1→3)-[Glc-(1→2)]-GlcA-、

Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-、

Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-、

Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-、

Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-、

Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-、

Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-、

Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-、

Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Gal-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-、

Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-、

Xyl-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-、

Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-、

Xyl-(1→4)-Fuc-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-、

Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-、

Xyl-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-、

Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-、

Xyl-(1→4)-Fuc-(1→2)-Gal-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-、及其衍生物，

和/或其中该第二糖链，如果存在，选自：

Glc-；

Gal-；

Rha-(1→2)-[Xyl-(1→4)]-Rha-；

Rha-(1→2)-[Ara-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-；

Ara-；

Xyl-；

Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R1-(→4)]-Fuc-，其中R1是4E-甲氧基肉桂酸；

Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R2-(→4)]-Fuc-，其中R2是4Z-甲氧基肉桂酸；

Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-；

Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-3,4-二-OAc-Fuc-；

Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R3-(→4)]-3-OAc-Fuc-，其中R3是4E-甲氧基肉桂酸；

Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-；

Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-；

(Ara-或Xyl-)(1→3)-(Ara-或Xyl-)(1→4)-(Rha-或Fuc-)(1→2)-[4-OAc-(Rha-或Fuc-)(1→4)]-(Rha-或Fuc-)；

Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-；

Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-；

Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-；

Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-；

Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→4)-[Glc/Gal-(1→2)]-Fuc-；

Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R4-(→4)]-Fuc-，其中R4是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸)；

Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R5-(→4)]-Fuc-，其中R5是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸)；

Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-；

Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-；

6-OAc-Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-；

Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc--Rha-(1→3)]-Fuc-；

Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-；

Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-；

Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-；

Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3,4-二-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-；

Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-；

6-OAc-Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-；

Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-；

Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-；

Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-；

Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-；

Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R6-(→4)]-Fuc-，其中R6是5-O-[5-O-Rha-(1→2)-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸)；

Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R7-(→4)]-Fuc-，其中R7是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸)；

Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R8-(→4)]-Fuc-,其中R8是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸);

Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R9-(→4)]-Fuc-,其中R9是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸);

Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R10-(→4)]-Fuc-,其中R10是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸);

Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R11-(→3)]-Fuc-,其中R11是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸);

Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R12-(→3)]-Fuc-,其中R12是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸);

Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal-;及

其衍生物,

优选地,该第一糖链是Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-,并且该第二糖链是以下中的任一种:

Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-;

Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-;

Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R6-(→4)]-Fuc-,其中R6是5-O-[5-O-Rha-(1→2)-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸);

Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R7-(→4)]-Fuc-,其中R7是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸);

Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R8-(→4)]-Fuc-,其中R8是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸);

Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R9-(→4)]-Fuc-,其中R9是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸);

Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R10-(→4)]-Fuc-,其中R10是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸);

Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R11-(→3)]-Fuc-,其中R11是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸);

Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R12-(→3)]-Fuc-,其中R12是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸)。

9.根据权利要求1-8中任一项所述的皂苷衍生物,其中该皂苷衍生物包含该第一糖链并且包含该第二糖链,其中该第一糖链包含多于一个糖部分,并且该第二糖链包含多于一个糖部分,并且其中该苷元核心结构是皂皮酸或丝石竹皂苷元,其中以下中的一种或两种,优选地一种:

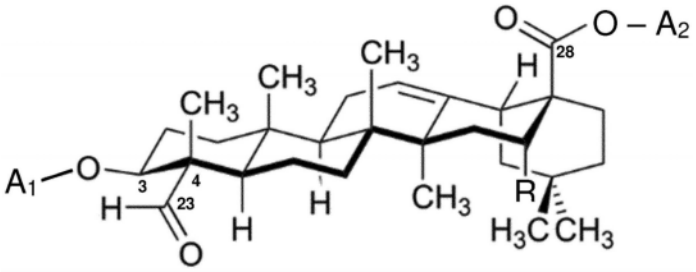
i.该苷元核心结构中的醛基已衍生化,以及

ii.该第一糖链包含葡糖醛酸部分的羧基基团,该羧基基团已衍生化。

10.根据权利要求1-9中任一项所述的皂苷衍生物,其中该皂苷衍生物是选自由以下组成的皂苷组的皂苷的衍生物:皂树树皮皂苷、QS-7、QS1861、QS-7api、QS1862、QS-17、QS-18、

QS-21、QS-21A-apio、QS-21A-xylo、QS-21B-apio、QS-21B-xylo、其立体异构体及其组合，优选地该皂苷衍生物选自由QS-21衍生物组成的组。

11.根据权利要求1-10中任一项所述的皂苷衍生物，其中该皂苷衍生物是根据权利要求7所述的皂皮酸皂苷或丝石竹皂苷元皂苷的皂苷衍生物，该皂苷衍生物由分子1表示：



(分子1)

其中

该第一糖链A_1代表氢、单糖、或线性或支链寡糖，优选地A_1代表如权利要求8所定义的糖链，更优选地A_1代表如权利要求8所定义的糖链，并且A_1包含葡糖醛酸部分或由其组成；

该第二糖链A_2代表氢、单糖、或线性或支链寡糖，优选地A_2代表如权利要求8所定义的糖链，

其中A_1和A_2中的至少一个不是氢，优选地A_1和A_2均为寡糖链；

并且R是丝石竹皂苷元中的氢或皂皮酸中的羟基；

其中该皂苷衍生物对应于由分子1表示的该皂苷，其中存在以下衍生化中的至少一种：

i.该皂皮酸或丝石竹皂苷元的C_{23}位处的醛基已衍生化；以及

ii.当A_1代表如权利要求8所定义的糖链并且A_1包含葡糖醛酸部分或由其组成时，A_1的葡糖醛酸部分的羧基基团已衍生化。

12.根据权利要求11所述的皂苷衍生物，其中A_1代表如权利要求8所定义的糖链，并且包含葡糖醛酸部分或由其组成，并且其中A_1的葡糖醛酸部分的羧基基团已衍生化。

13.根据权利要求11或12所述的皂苷衍生物，其中由分子1表示的该皂苷是双糖链三萜皂苷。

14.根据权利要求11-13中任一项所述的皂苷衍生物，其中该皂苷衍生物对应于由分子1表示的该皂苷，其中存在以下衍生化中的至少一种，优选地存在以下衍生化中的一种或两种：

i.皂皮酸或丝石竹皂苷元的C_{23}位处的醛基已通过以下衍生化：

-还原成醇；或

-通过与N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH)反应转化成腙键，由此提供皂苷-Ald-EMCH，如SO1861-Ald-EMCH或QS-21-Ald-EMCH，其中该EMCH的马来酰亚胺基团任选地通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化；或

-通过与N-[β-马来酰亚胺基丙酸]酰肼(BMPH)反应转化成腙键，其中该BMPH的马来酰亚胺基团任选地通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化；或

-通过与N-[κ-马来酰亚胺基十一酸]酰肼(KMUH)反应转化成腙键，其中该KMUH的马来酰亚胺基团任选地通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化；以及

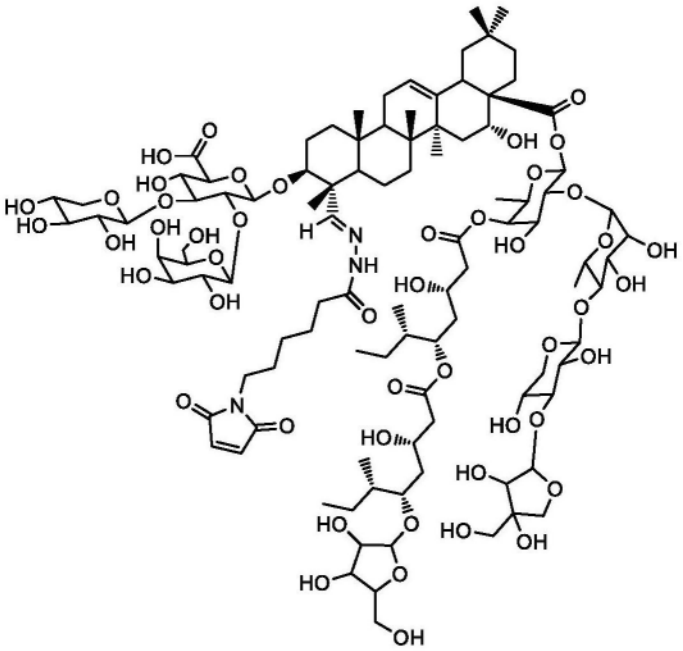
ii.当A_1代表如权利要求8所定义的糖链并且A_1包含葡糖醛酸部分或由其组成时，A_1的

葡糖醛酸部分的羧基基团已通过以下衍生化:通过与2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇(AMPD)或N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺(AEM)反应转化成酰胺键,由此提供皂苷-Glu-AMPD,如QS-21-Glu-AMPD,或皂苷-Glu-AEM,如QS-21-Glu-AEM。

15.根据权利要求11-14中任一项所述的皂苷衍生物,其中A_1是Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA,和/或A_2是Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc,更优选地QS-21衍生物,其中A_1是Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA,和/或A_2是Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc。

16.根据权利要求1-15中任一项所述的皂苷衍生物,其中该皂苷衍生物选自由以下的衍生物组成的组:QS-21、QS-21A、QS-21A-api、QS-21A-xyl、QS-21B、QS-21B-api、QS-21B-xyl、QS-7-xyl、QS-7-api、QS-17-api、QS-17-xyl、QS1861、QS1862、皂树皂苷、QS-18、Quil-A、其立体异构体及其组合,优选地该皂苷衍生物选自由QS-21衍生物组成的组。

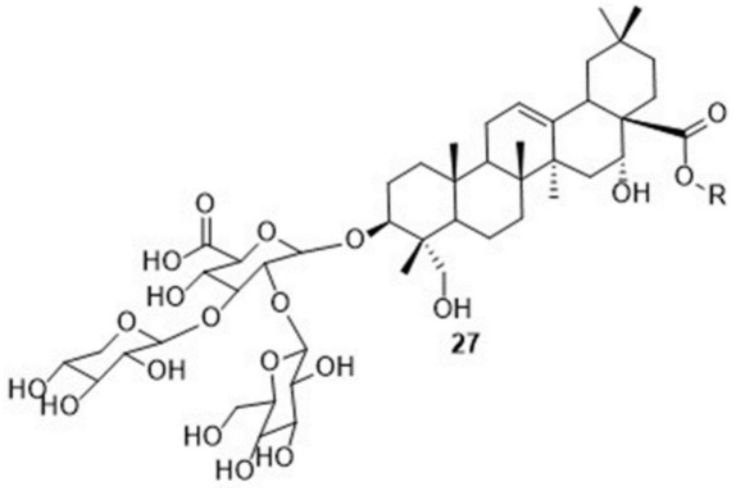
17.根据权利要求1-16中任一项所述的皂苷衍生物,其中该皂苷衍生物是包含单一衍生化的QS-21衍生物,其中该单一衍生化是通过将1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐(HATU)与QS-21的葡糖醛酸部分的羧基基团结合或通过将(苯并三唑-1-基氧基)三(二甲基氨基)鏻六氟磷酸盐(BOP)与QS-21的葡糖醛酸部分的羧基基团结合来转化QS-21的葡糖醛酸部分的羧基基团,或其中该皂苷衍生物是由分子30表示的QS-21衍生物,该QS-21衍生物代表包含该皂皮酸苷元核心结构的指定的C_{23}位处的醛基的QS-21衍生物,该醛基已通过与N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH)反应转化成腙键而衍生化:



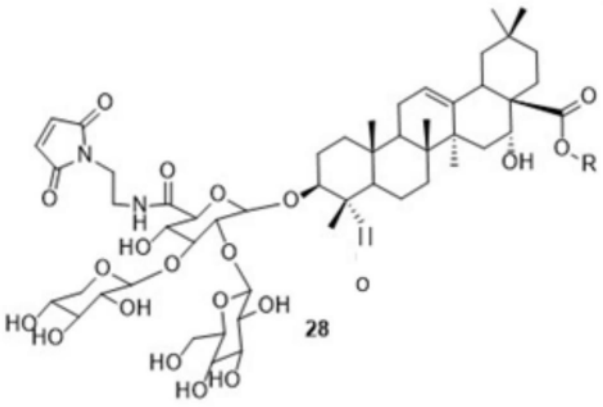
(30),

或其中该皂苷衍生物是QS-21衍生物,该QS-21衍生物包含该皂皮酸苷元核心结构的指定的C_{23}位处的醛基,该醛基已通过与N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH)反应转化成腙键而衍生化,其中用巯基乙醇衍生化该EMCH的马来酰亚胺基团,由此形成硫醚键,

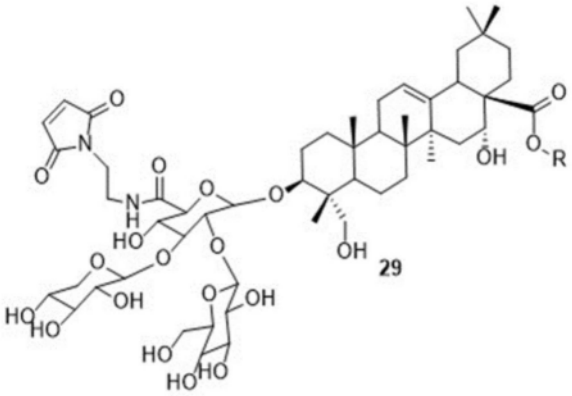
或者,其中该皂苷衍生物是QS-21衍生物,其中该皂苷衍生物具有根据以下之一的式:



27

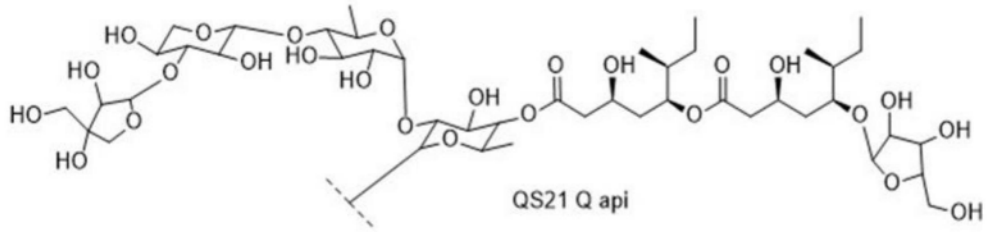


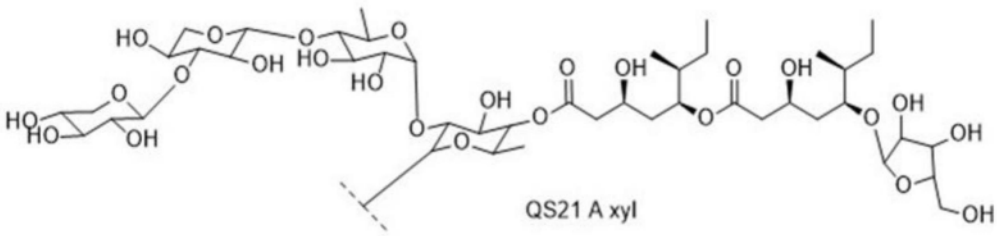
28

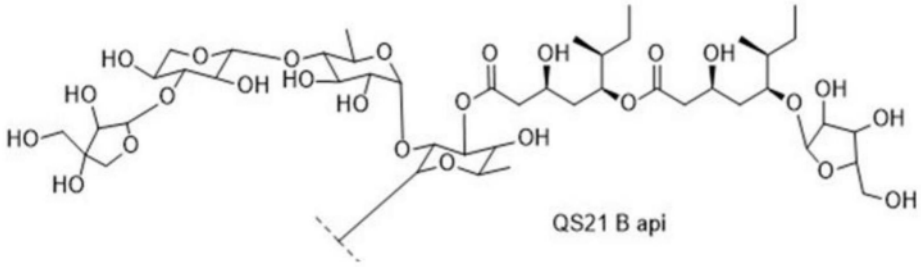


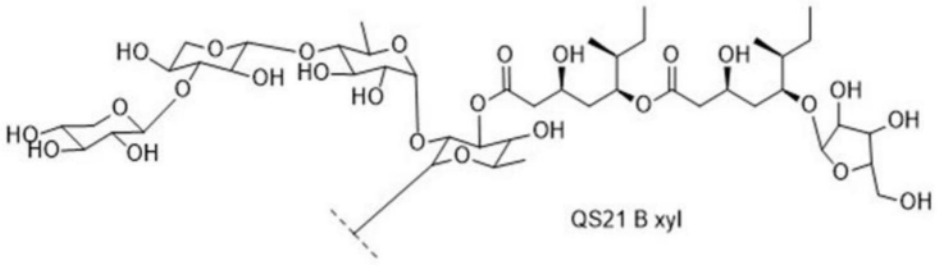
29

其中根据下式,将R定义为Q api、A xyl、B api和B xyl中的任一个：



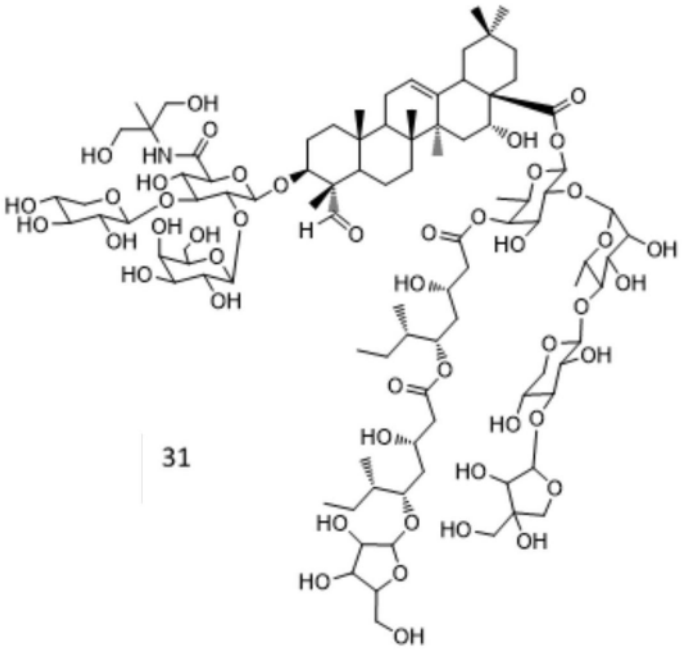




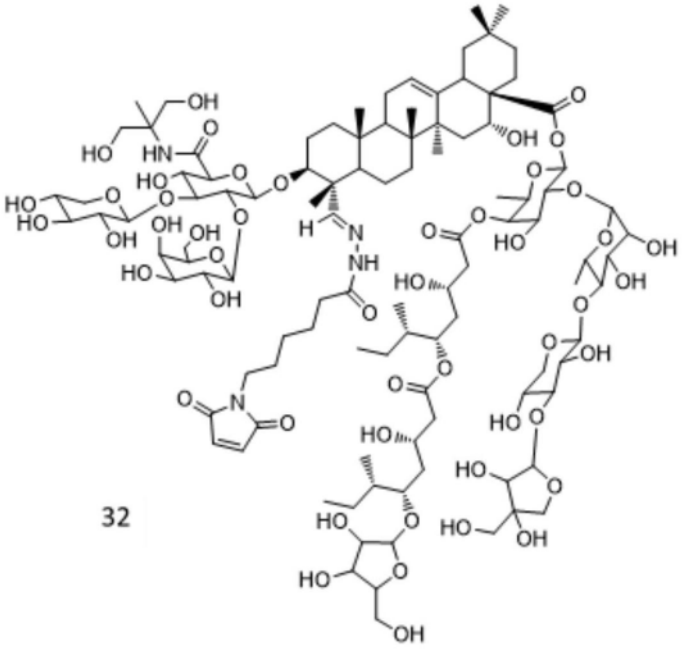


，

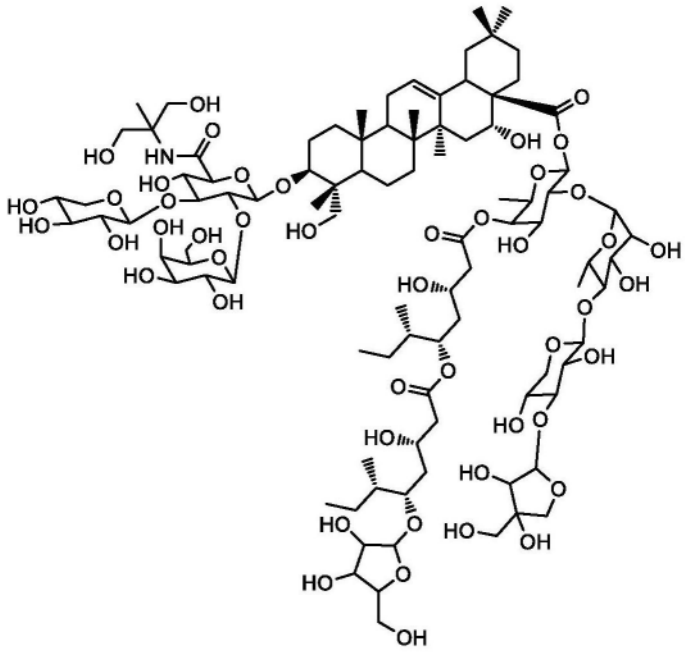
或者该皂苷衍生物具有根据以下之一的式：



31



32



(33)。

18.根据权利要求1-17中任一项所述的皂苷衍生物,其中

i.该皂苷衍生物包含苷元核心结构,其中该苷元核心结构包含已通过以下衍生化的醛基:

-还原成醇;或

-通过与N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH)反应转化成腙键,其中该EMCH的马来酰亚胺基团任选地通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化;或

-通过与N-[β-马来酰亚胺基丙酸]酰肼(BMPH)反应转化成腙键,其中该BMPH的马来酰亚胺基团任选地通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化;或

-通过与N-[κ-马来酰亚胺基十一酸]酰肼(KMUH)反应转化成腙键,其中该KMUH的马来酰亚胺基团任选地通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化;或

ii.该第一糖链包含羧基基团、优选地葡糖醛酸部分的羧基基团,该羧基基团已通过与2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇(AMPD)或N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺(AEM)反应转化成酰胺键而衍生化;或

iii.该皂苷衍生物包含两种衍生化i.、ii.的任何组合;

优选地,该皂苷衍生物包含苷元核心结构,其中该苷元核心结构包含已通过与EMCH反应转化成腙键而衍生化的醛基,其中该EMCH的马来酰亚胺基团任选地通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化。

19.根据权利要求18所述的皂苷衍生物,其中该皂苷衍生物包含苷元核心结构,其中该苷元核心结构包含醛基,并且其中该第一糖链包含羧基基团、优选地葡糖醛酸部分的羧基基团,该羧基基团已通过与N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺(AEM)反应转化成酰胺键而衍生化。

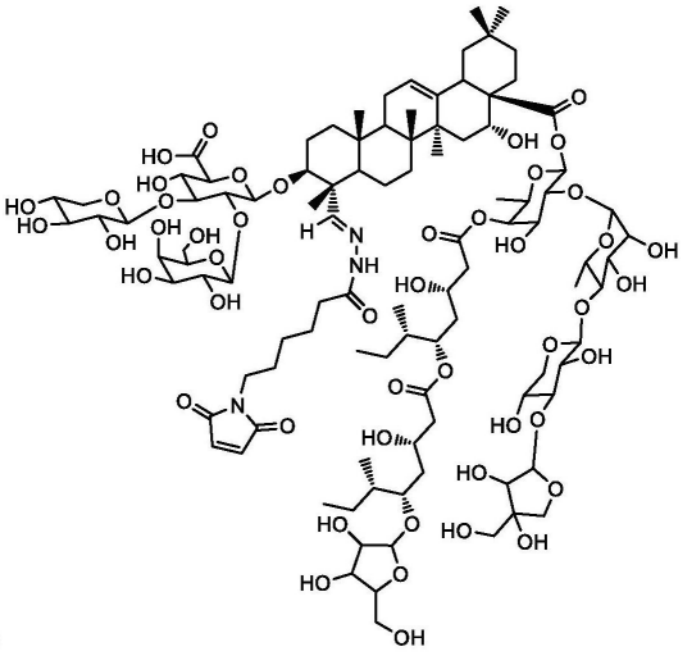
20.根据权利要求18所述的皂苷衍生物,条件是当该苷元核心结构中的醛基通过与N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH)反应转化成腙键而衍生化并且该皂苷是QS-21时,该葡糖醛酸也衍生化,并且条件是当该皂苷是QS-21并且QS-21的葡糖醛酸部分的羧基基团通过1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐(HATU)与

QS-21的葡糖醛酸部分的羧基基团的反应而衍生化时，该醛基也被修饰。

21.根据权利要求18所述的皂苷衍生物，条件是当该皂苷衍生物的苷元核心结构中的醛基通过与EMCH反应而衍生化并且该皂苷是QS-21时，该葡糖醛酸也衍生化，并且条件是当该皂苷是QS-21并且QS-21的葡糖醛酸部分的羧基基团通过结合HATU而衍生化时，该醛基也衍生化。

22.一种第一药物组合物，其包含根据权利要求1-21中任一项所述的皂苷衍生物和任选地药学上可接受的赋形剂和/或稀释剂。

23.根据权利要求22所述的第一药物组合物，其中该皂苷衍生物是由分子30表示的皂苷衍生物：



(30) ，

或包含单一衍生化的QS-21衍生物，其中该单一衍生化是通过1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐(HATU)与QS-21的葡糖醛酸部分的羧基基团的反应来转化QS-21的葡糖醛酸部分的羧基基团。

24.一种药物组合，其包含：

• 根据权利要求22或23所述的第一药物组合物；以及

• 第二药物组合物，该第二药物组合物包含抗体-毒素缀合物、受体-配体-毒素缀合物、抗体-药物缀合物、受体-配体-药物缀合物、抗体-寡核苷酸缀合物或受体-配体-寡核苷酸缀合物中的任何一种或多种，并且任选地包含药学上可接受的赋形剂和/或稀释剂。

25.一种第三药物组合物，其包含根据权利要求1-23中任一项所述的皂苷衍生物，并且进一步包含以下中的任何一种或多种：抗体-毒素缀合物、受体-配体-毒素缀合物、抗体-药物缀合物、受体-配体-药物缀合物、抗体-核酸缀合物或受体-配体-核酸缀合物，并且任选地包含药学上可接受的赋形剂和/或稀释剂。

26.根据权利要求24所述的药物组合或根据权利要求25所述的第三药物组合物，其中该第二药物组合物或该第三药物组合物包含抗体-药物缀合物、受体-配体-药物缀合物、抗体-寡核苷酸缀合物或受体-配体-寡核苷酸缀合物中的任何一种或多种，其中该药物例如是毒素如皂草毒蛋白和香石竹毒蛋白，并且其中该寡核苷酸例如是siRNA或BNA，例如用于

载脂蛋白B或HSP27的基因沉默。

27.根据权利要求24或权利要求26所述的药物组合或根据权利要求25或26所述的第三药物组合物，其中该皂苷衍生物是根据权利要求17所述的皂苷衍生物。

28.根据权利要求22或23所述的第一药物组合物、根据权利要求24或26-27中任一项所述的药物组合或根据权利要求25-27中任一项所述的第三药物组合物，用作抗体-毒素缀合物、受体-配体-毒素缀合物、抗体-药物缀合物、受体-配体-药物缀合物、抗体-寡核苷酸缀合物或受体-配体-寡核苷酸缀合物的内体逃逸增强子并与这些缀合物组合。

29.根据权利要求22或23所述的第一药物组合物、根据权利要求24或26-27中任一项所述的药物组合或根据权利要求25-27中任一项所述的第三药物组合物，用作药剂。

30.根据权利要求22或23所述的第一药物组合物、根据权利要求24或26-27中任一项所述的药物组合或根据权利要求25-27中任一项所述的第三药物组合物，用于在治疗或预防癌症、传染病、病毒感染、高胆固醇血症、原发性高草酸尿症、血友病A、血友病B、α-1抗胰蛋白酶相关肝病、急性肝卟啉症、甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性或自身免疫性疾病中使用。

31.一种用于将分子从细胞外转移到所述细胞内，优选地转移到所述细胞的胞质溶胶内的体外或离体方法，该方法包括以下步骤：

a)提供细胞；

b)提供用于从细胞外转移到步骤a)中提供的细胞内的分子；

c)提供根据权利要求1-21中任一项所述的皂苷衍生物；

d)使步骤a)的细胞在体外或离体与步骤b)的分子和步骤c)的皂苷衍生物接触，由此建立该分子从该细胞外到所述细胞内的转移。

32.根据权利要求31所述的方法，其中该细胞是人细胞，如T细胞、NK细胞、肿瘤细胞，和/或其中该皂苷衍生物是根据权利要求15-21中任一项所述的皂苷衍生物，和/或其中步骤b)的分子是以下中的任一种：抗体-药物缀合物、受体-配体-药物缀合物、抗体-寡核苷酸缀合物或受体-配体-寡核苷酸缀合物，其中该药物例如是毒素，并且其中该寡核苷酸例如是siRNA或BNA。

用于在药品中使用的皂苷衍生物

技术领域

[0001] 本发明涉及基于皂苷的肥皂草皂树(Quillaja saponaria)皂苷衍生物,该皂苷包含三萜苷元和第一糖链和/或第二糖链,并且该肥皂草皂树皂苷衍生物包含:含有已衍生化的醛基的苷元核心结构;和/或第一糖链,其中该第一糖链包含已衍生化的羧基基团;和/或第二糖链,其中该第二糖链包含至少一个已衍生化的乙酰氧基基团。本发明还涉及包含本发明的皂苷衍生物的第一药物组合物。另外,本发明涉及包含本发明的第一药物组合物和第二药物组合物的药物组合,该第二药物组合物包含抗体-毒素缀合物、受体-配体-毒素缀合物、抗体-药物缀合物、受体-配体-药物缀合物、抗体-寡核苷酸缀合物或受体-配体-寡核苷酸缀合物中的任何一种或多种。本发明还涉及本发明的第一药物组合物或药物组合,该第一药物组合物或药物组合用作药剂或用于在治疗或预防癌症、传染病、病毒感染、高胆固醇血症、原发性高草酸尿症、血友病A、血友病B、α-1抗胰蛋白酶相关肝病、急性肝卟啉症、甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性或自身免疫性疾病中使用。此外,本发明涉及用于将分子从细胞外转移到所述细胞内的体外或离体方法,该方法包括使所述细胞与该分子和本发明的皂苷衍生物接触。

[0002] 发明背景

[0003] 靶向肿瘤疗法是使用药物靶向参与癌细胞生长和存活的特定基因和蛋白质的癌症治疗。免疫毒素(其是含有抗体作为靶向部分的靶向毒素)非常有前途,因为它们结合了抗体针对肿瘤特异性抗原的特异性,这使得它们能够将毒素引导至目标作用点,并且可以额外引入细胞杀伤机制,如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性和补体依赖性细胞毒性。毒素需要在内化后释放到胞质溶胶中才能发挥其作用。一个主要的缺点是承载有效负载的靶向部分通常没有完全内化,在内化后直接再循环到表面,或在溶酶体中降解,从而阻碍了有效负载充分递送到细胞胞质溶胶中。为了确保针对肿瘤细胞的毒性有效负载浓度并克服胞质溶胶进入不足的问题,需要靶向毒素的高血清水平,这通常会导致严重的副作用,特别地包括免疫原性和血管渗漏综合征。因此,当用抗体-药物缀合物(ADC)治疗癌症患者时,足够宽的治疗窗仍然是值得关注的。

[0004] 为了解决胞质溶胶进入不足的缺点,开发了几种策略,例如涉及将毒素重定向到生物合成途径的内源性细胞膜转运复合物、破坏内体、减弱内体膜的膜完整性或使用细胞穿透肽。

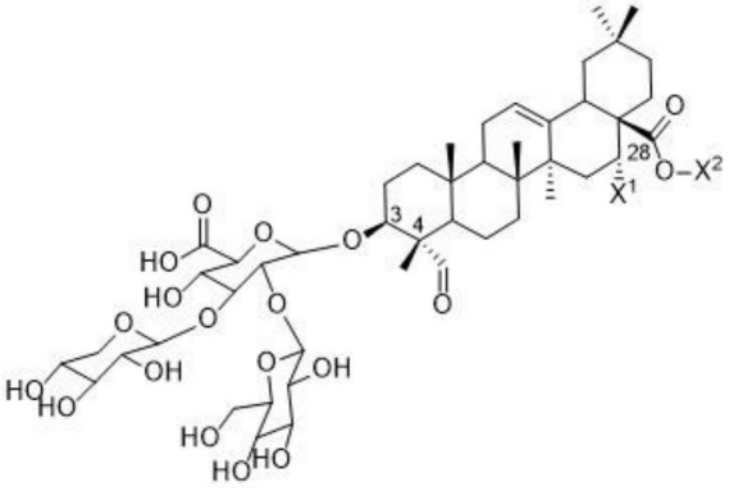
[0005] 例如,在肿瘤疗法中,发现糖基化三萜如皂苷作为靶向毒素如核糖体失活蛋白(RIP)的内体逃逸增强子。皂苷的结构-活性关系分析显示,以下核心结构元件的存在似乎有益于皂苷增强RIP的细胞毒性的能力(参见式(I),其中X^1=H或OH,X^2=多糖部分):

[0006] -含有葡糖醛酸的C-3处的支链三糖

[0007] -C-4处的醛

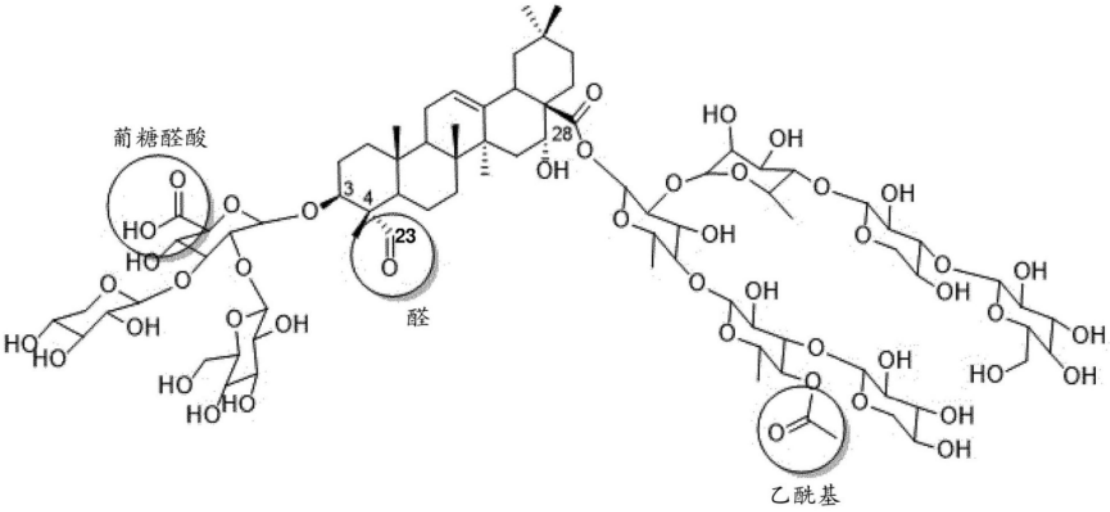
[0008] -C-28处的羧基基团

[0009] -与至少四个含有乙酰基基团的糖部分的C-28位连接的多糖部分(R^2)。

[0010] 

式 (I)

[0011] 特别地,SO1861(式II,有时也称为SPT001,一种三萜类皂苷)被鉴定为一种增强肿瘤细胞靶向毒素的内体逃逸的强效分子。假设增强子机制具有双重效应:首先,内体逃逸的直接增加导致胱天蛋白酶依赖性凋亡,其次,其与溶酶体介导的细胞死亡途径组合,这些途径在溶酶体膜破坏后组织蛋白酶和其他水解酶释放后触发。

[0012] 

式 (II)

[0013] 皂苷作为内体逃逸增强子的应用基于这些皂苷具有破裂红细胞膜的能力的认识。然而,与此同时,当受试者用此类皂苷治疗时,皂苷的细胞破裂活性导致副作用(风险),由此影响到限制治疗指数的最佳治疗窗。事实上,当例如考虑最佳给药方案和施用途径和频率时,此类皂苷施用于需要抗肿瘤疗法的患者时的细胞外和/或细胞内毒性是值得关注的。

[0014] 皂苷本身的化学组成的所有特征(包括三萜主链(一种五环C30萜骨架(也称为皂苷元或苷元))的结构、糖侧链的数量和长度以及与主链连接的糖残基的类型和连接变体)促成此类皂苷的溶血潜能和/或细胞毒性。

[0015] 当考虑细胞的内体和胞质溶胶时,皂苷本身不是靶向特异性的,并且即使考虑相同的施用途径,皂苷也预期且最常以靶向毒素以外的其他动力学分布在(人)受试者中。因此,在向有需要的患者施用包含例如ADC和皂苷的治疗组合后,可以在任何器官中发现皂苷

分子,这意味着特异性仅由靶向毒素介导。与靶细胞中的特异性积累相比,皂苷在全身的分布需要更高的浓度来实现成功治疗。因此,考虑到皂苷在体内的全身应用,修饰的皂苷的毒性需要足够低以成功应用,以实现合适的治疗窗。

[0016] 肥皂草皂树(Quillaja saponaria)皂苷可从WO 2004/092329和WO 93/05789中进一步了解。皂苷的合成类似物尤其从WO 2015/184451中了解。

[0017] 因此,当考虑皂苷与例如ADC共同施用时,仍然需要改善治疗指数:需要更好地控制(或更好地:降低)皂苷的细胞毒性,同时当考虑增强ADC的细胞毒性作用时,还需保持足够的功效。

发明内容

[0018] 令人惊讶的是,诸位发明人已经发现具有以下的修饰的皂苷,即皂苷衍生物:

[0019] -在皂苷的苷元的C-3处结合并含有修饰的葡糖醛酸的支链三糖部分;和/或

[0020] -皂苷的苷元的C-4处的修饰的醛;和/或

[0021] -结合在皂苷的苷元的C-28位处的多糖部分;

[0022] 当考虑与皂苷衍生物接触的细胞的细胞活力时具有降低的毒性,当考虑例如毒素细胞毒性或BNA介导的基因沉默的增强时具有活性(不希望受任何理论的约束:涉及修饰的皂苷的类似或改善的内体逃逸增强活性),和/或与未修饰的皂苷的毒性、活性和溶血活性相比具有降低的溶血活性。由此,由于细胞毒性与例如毒素增强或基因沉默的IC50值之间的比率增加,和/或由于皂苷溶血活性与例如毒素增强或基因沉默的IC50值之间的比率增加,诸位发明人提供了具有改善的治疗窗的皂苷衍生物。

[0023] 本发明的第一方面涉及基于肥皂草皂树(QS)皂苷的皂苷衍生物,该肥皂草皂树皂苷包含三萜苷元核心结构和与该苷元核心结构连接的第一糖链和第二糖链中的至少一种,其中:

[0024] i.该皂苷衍生物包含含有已衍生化的醛基的苷元核心结构;或

[0025] ii.该皂苷衍生物包含该第一糖链,其中该第一糖链包含已衍生化的羧基基团、优选地葡糖醛酸部分的羧基基团;或

[0026] iii.该皂苷衍生物包含衍生化i.和ii.的组合,优选地衍生化i.和ii.中的一种;

[0027] 其中该第一糖链和该第二糖链独立地选自单糖、线性寡糖和支链寡糖。

[0028] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物,其中皂苷衍生物所基于的所述QS皂苷进一步包含以下中的至少一种:

[0029] -在C-4处包含醛基的所述苷元核心结构;以及

[0030] -包含羧基基团、优选地葡糖醛酸部分的羧基基团的第一糖链。

[0031] 在特定的实施例中,皂苷衍生物所基于的皂苷是肥皂草皂树(QS)皂苷。

[0032] 本发明的一方面涉及基于QS皂苷的皂苷衍生物,该QS皂苷包含三萜苷元核心结构和与该苷元核心结构连接的第一糖链和第二糖链中的至少一种;所述皂苷进一步包含以下中的至少一种:

[0033] 在C-4处包含醛基的所述苷元核心结构;包含羧基基团、优选地葡糖醛酸部分的羧基基团的该第一糖链;

[0034] 其中:

[0035] i.该皂苷衍生物包含含有已衍生化的醛基的苷元核心结构;或

[0036] ii.该皂苷衍生物包含该第一糖链,其中该第一糖链包含已衍生化的羧基基团、优选地葡糖醛酸部分的羧基基团;或

[0037] iii.该皂苷衍生物包含衍生化i.和ii.的组合,优选地一种衍生化i.或ii.;

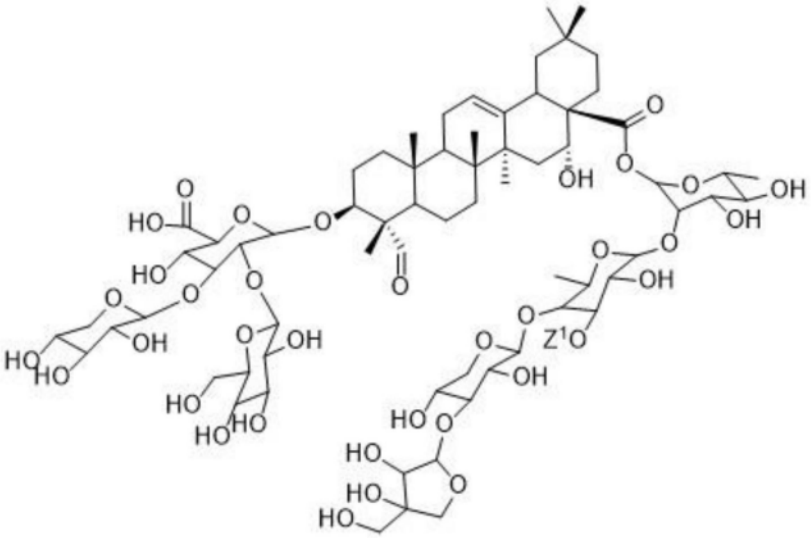
[0038] 其中该第一糖链和该第二糖链独立地选自单糖、线性寡糖和支链寡糖。

[0039] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物,其中皂苷是天然存在的皂苷。

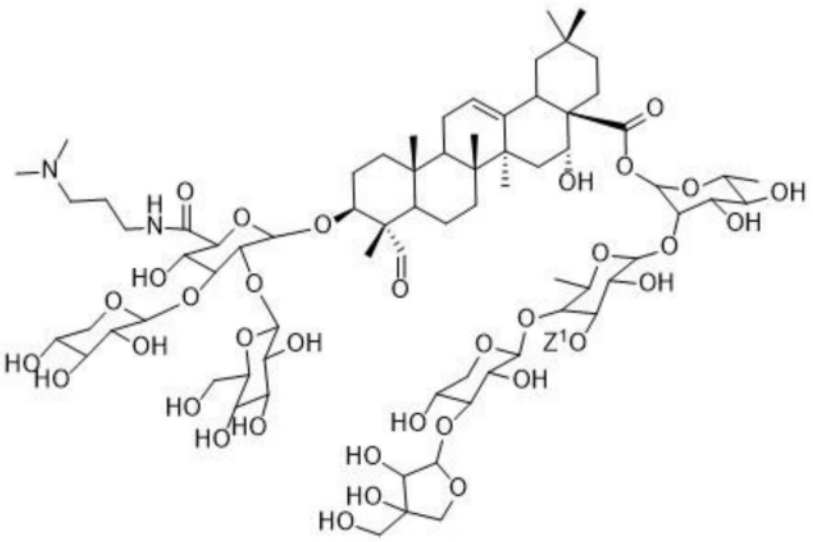
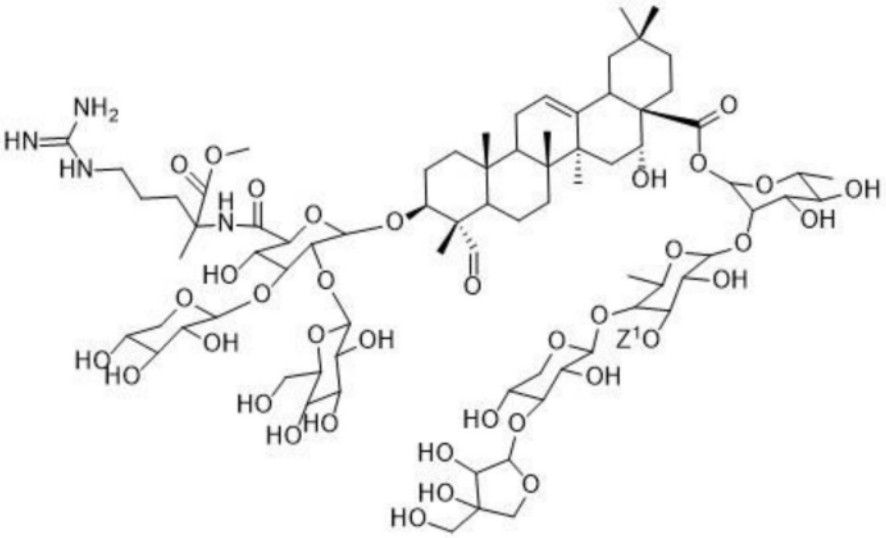
[0040] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物,其中该皂苷衍生物是单糖链三萜糖苷或双糖链三萜糖苷,更优选地双糖链三萜糖苷。

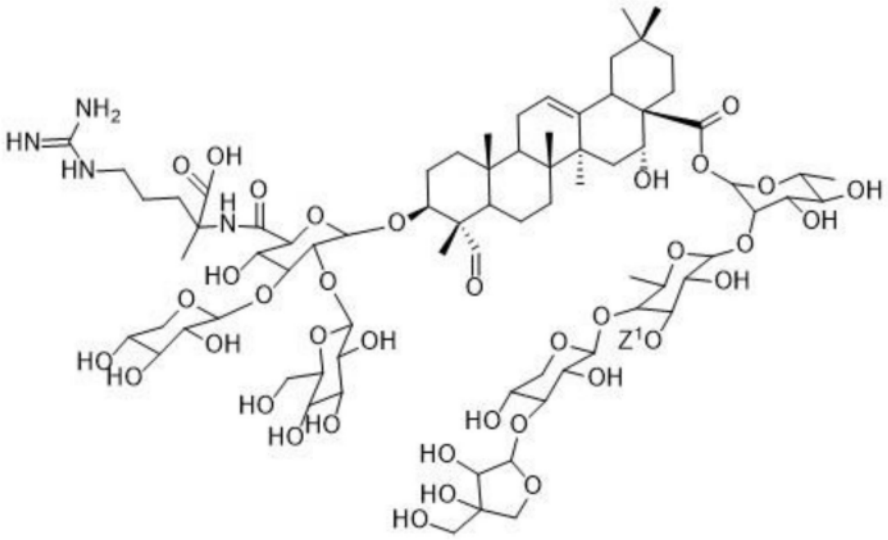
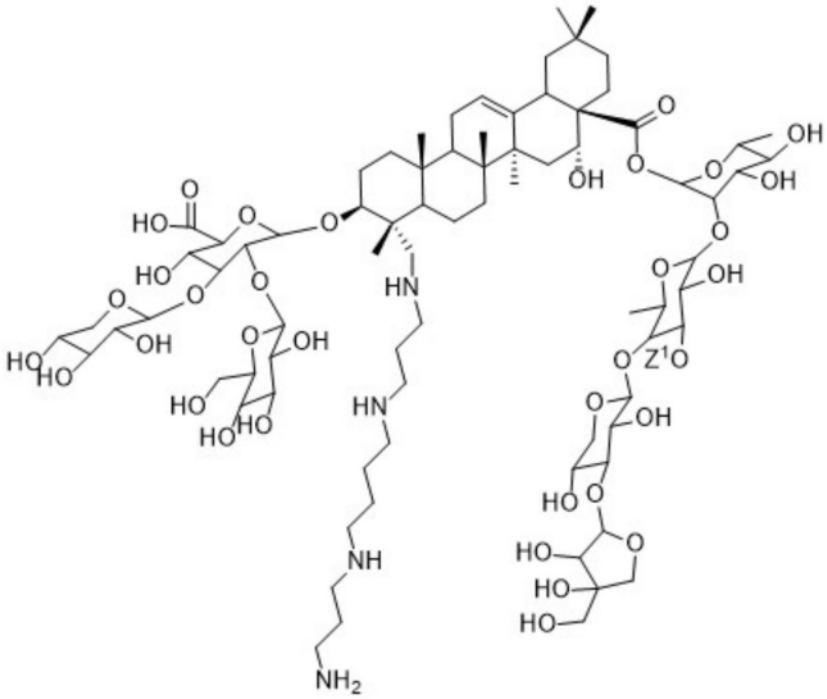
[0041] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物,条件是该皂苷衍生物不是以下具有式(VI)-(XXXIV)的皂苷衍生物中的任一种:

[0042]

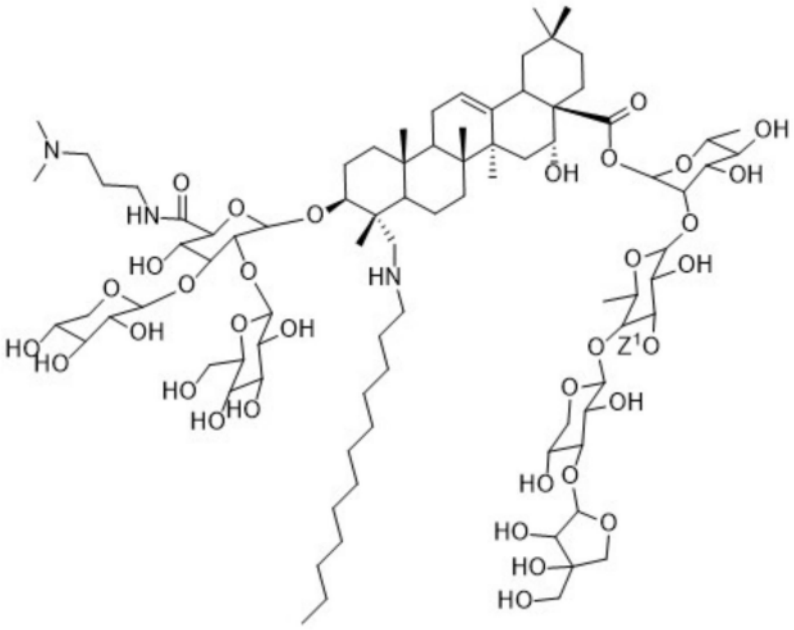
(VI)	 其中 Z^1 是氢或葡萄糖; 脱酰化皂树皂苷

[0043]

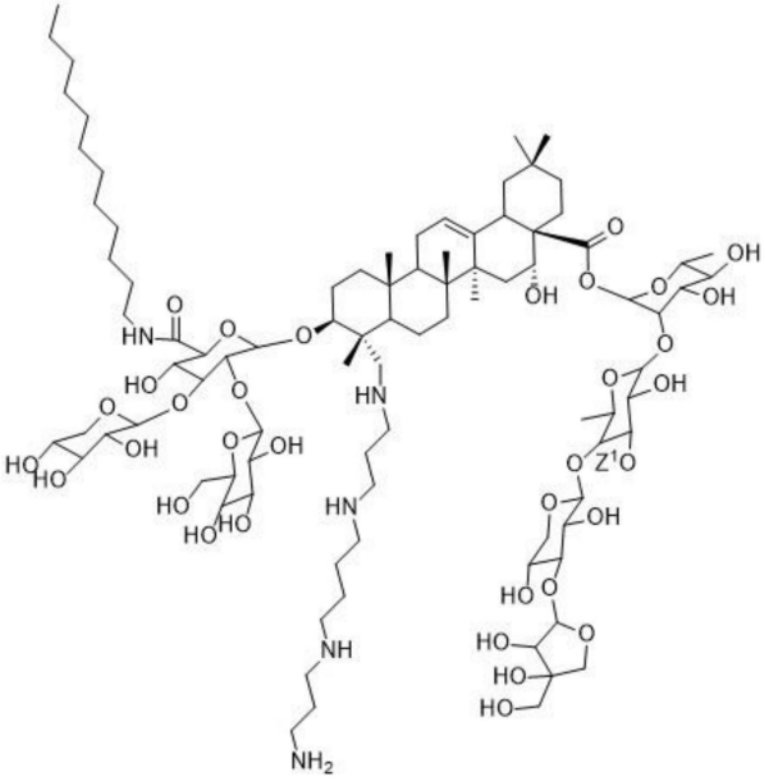
(VII)	 其中 Z^1 是氢或葡萄糖； 3-二甲基氨基-1-丙胺-脱酰化皂树皂苷
(VIII)	 其中 Z^1 是氢或葡萄糖； 精氨酸甲酯脱酰化皂树皂苷

(IX)	 其中 Z^1 是氢或葡萄糖； 精氨酸甲酯脱酰化皂树皂苷
(X)	 其中 Z^1 是氢或葡萄糖； 亚精胺醛脱酰化皂树皂苷

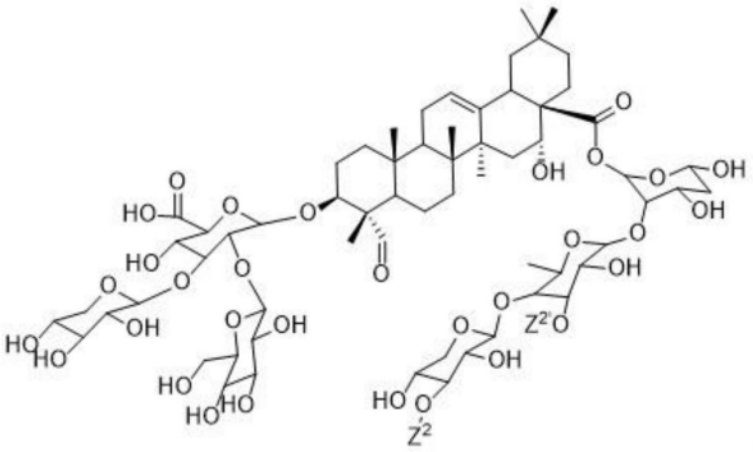
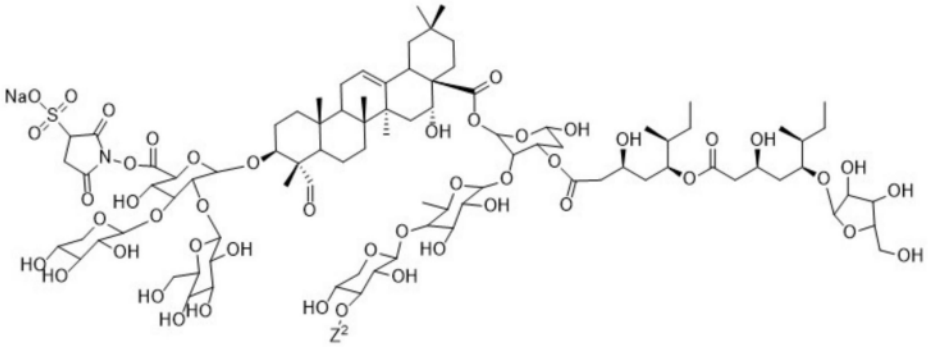
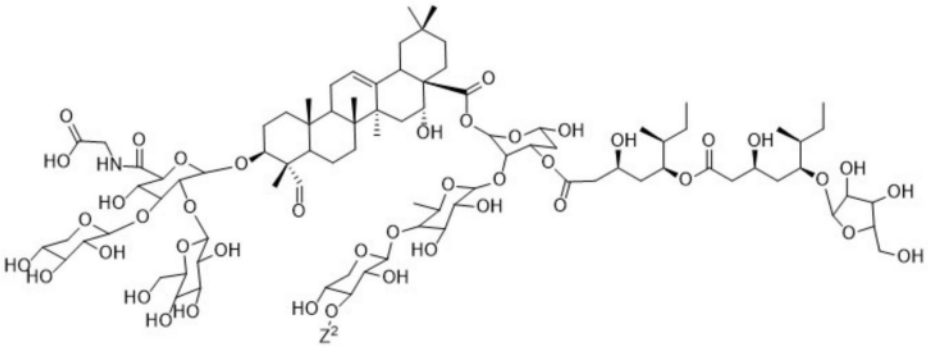
[0044]

(XI)	 其中 Z^1 是氢或葡萄糖； 3-二甲基氨基-1-丙胺-十二烷胺脱酰化皂树皂苷

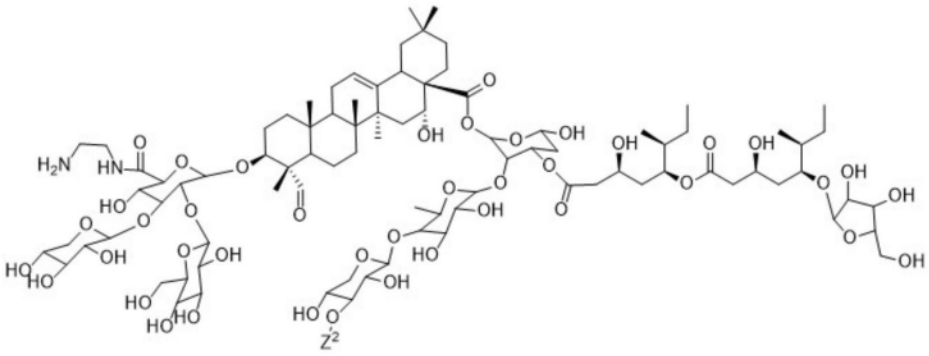
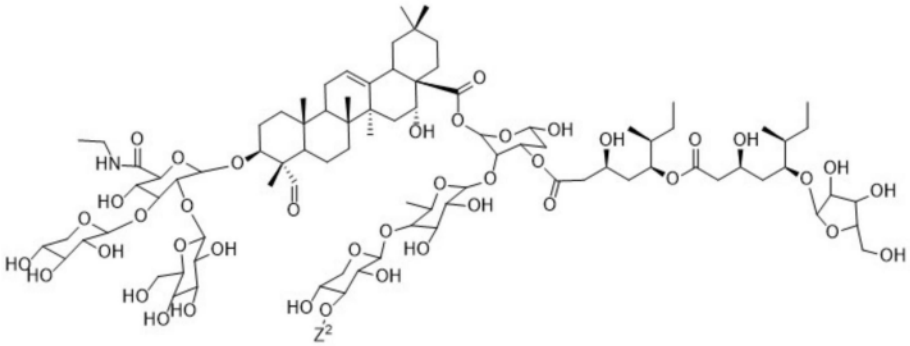
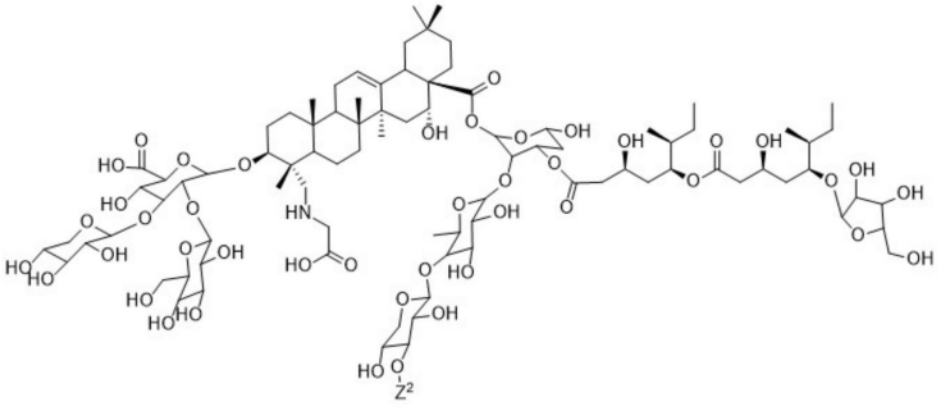
[0045]

(XII)	 其中 Z^1 是氢或葡萄糖； 十二烷基酰胺皂苷-精胺醛脱酰化皂树皂苷

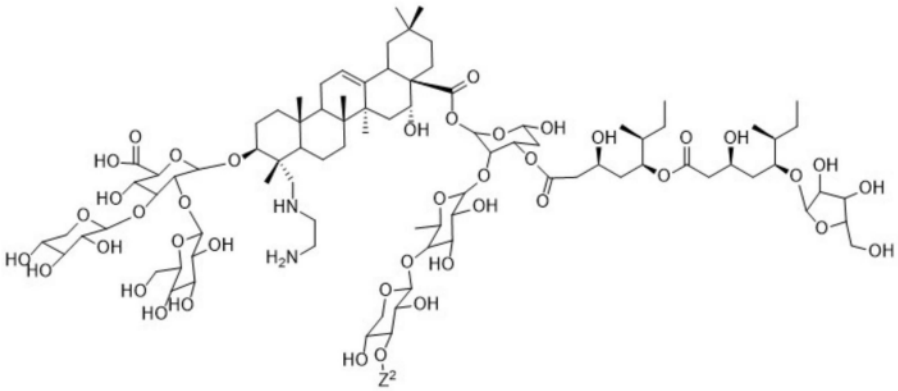
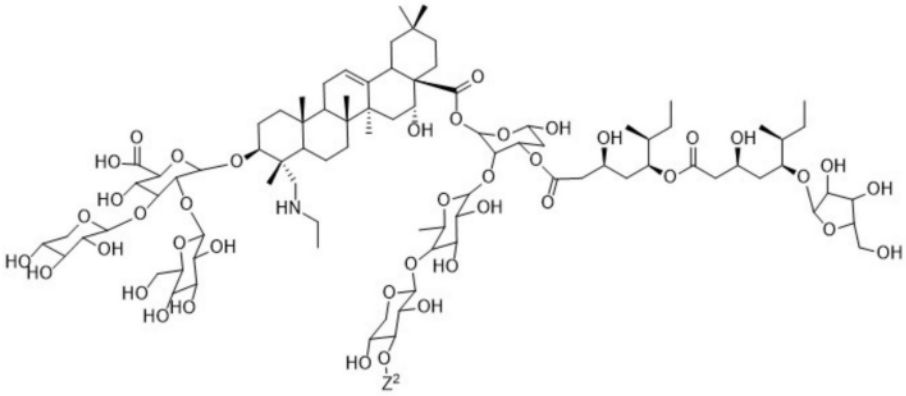
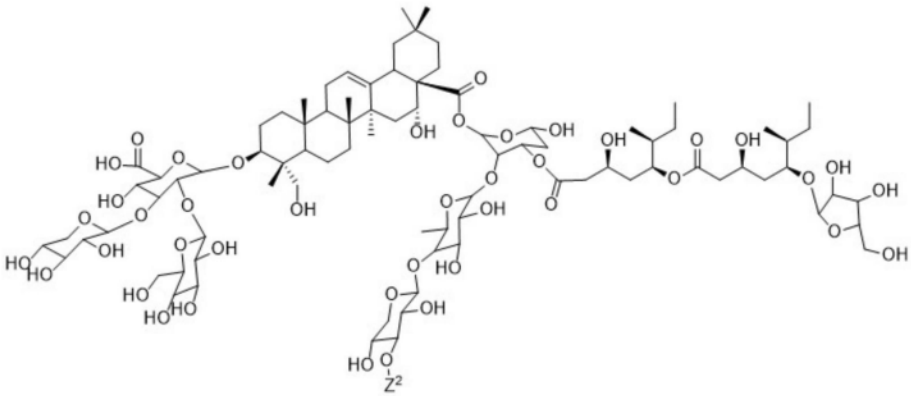
[0046]

(XIII)	 ； 其中 Z^2 = 芹菜糖，并且 $Z^{2'}$ = 葡萄糖（QA18-H）；或 其中 Z^2 = 芹菜糖，并且 $Z^{2'}$ = 氢（QA21-V1-H）；或 其中 Z^2 = 木糖，并且 $Z^{2'}$ = 葡萄糖（QA21-V2-H）；
(XIV)	 其中 Z^2 是芹菜糖或木糖； QS-21-S-NHS
(XV)	 其中 Z^2 是芹菜糖或木糖；

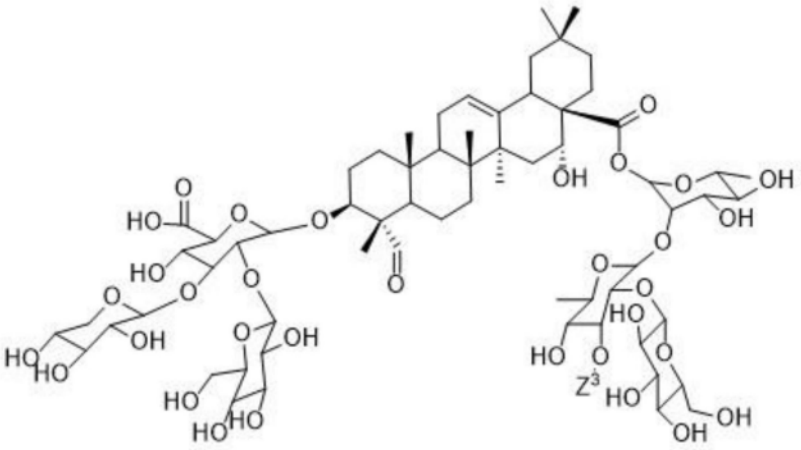
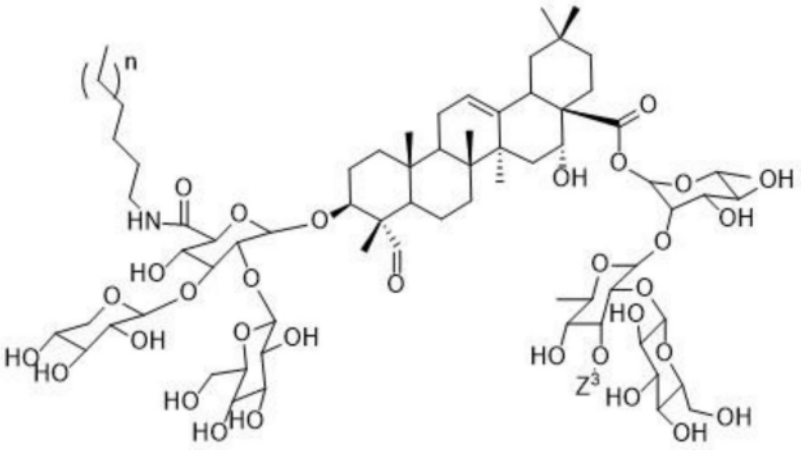
[0047]

	甘氨酸 QA-21
(XVI)	 其中 Z^2 是芹菜糖或木糖； 乙二胺 QA-21
(XVII)	 其中 Z^2 是芹菜糖或木糖； 乙胺 QA-21
(XVIII)	 其中 Z^2 是芹菜糖或木糖； 甘氨酸醛 QA-21

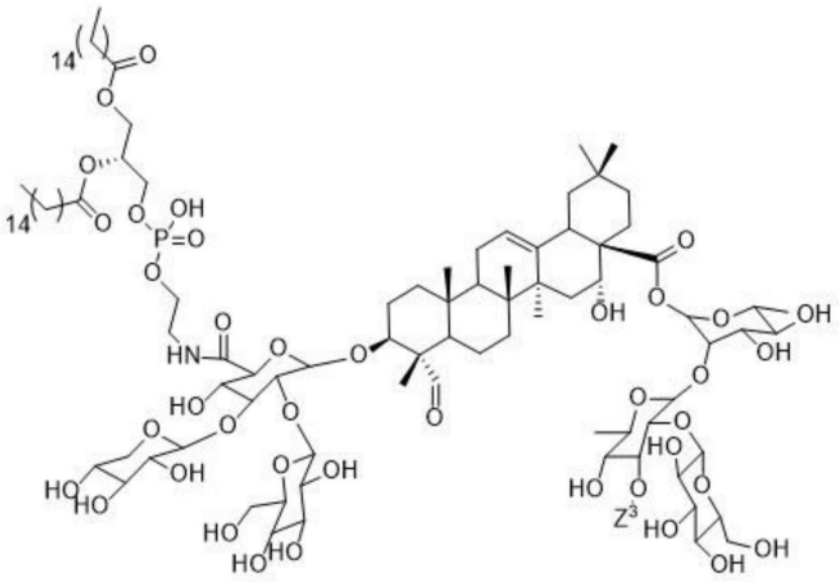
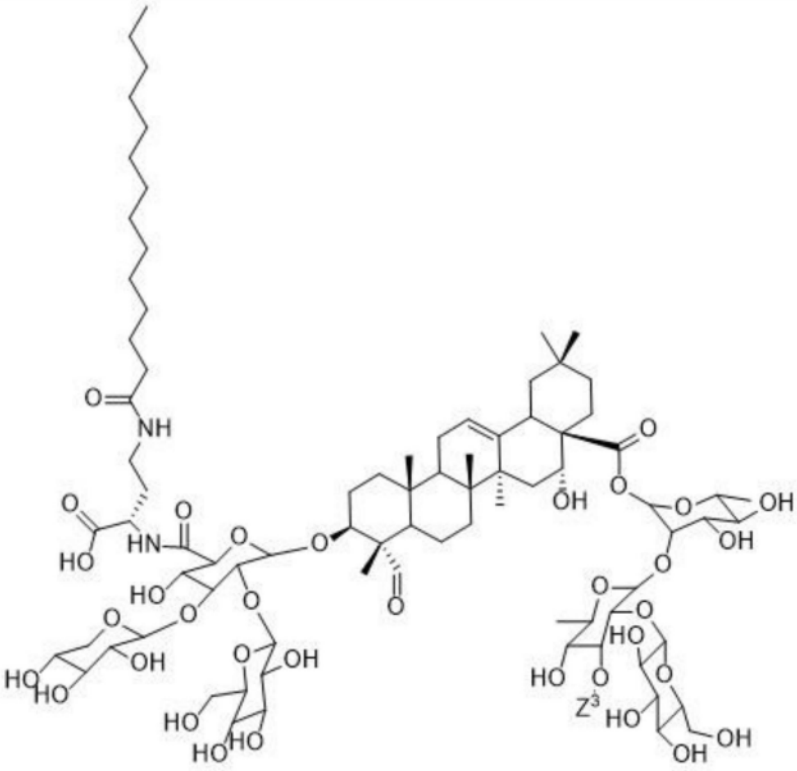
[0048]

(XIX)	 其中 Z^2 是芹菜糖或木糖； 乙二胺醛 QA-21
(XX)	 其中 Z^2 是芹菜糖或木糖； 乙胺醛 QA-21
(XXI)	 其中 Z^2 是芹菜糖或木糖； 醇 QA-21

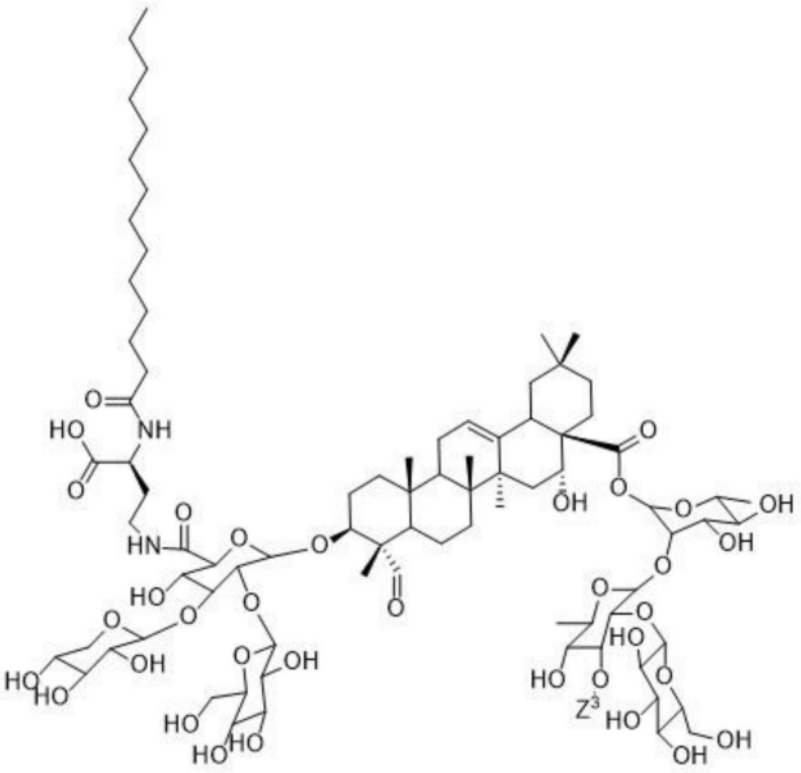
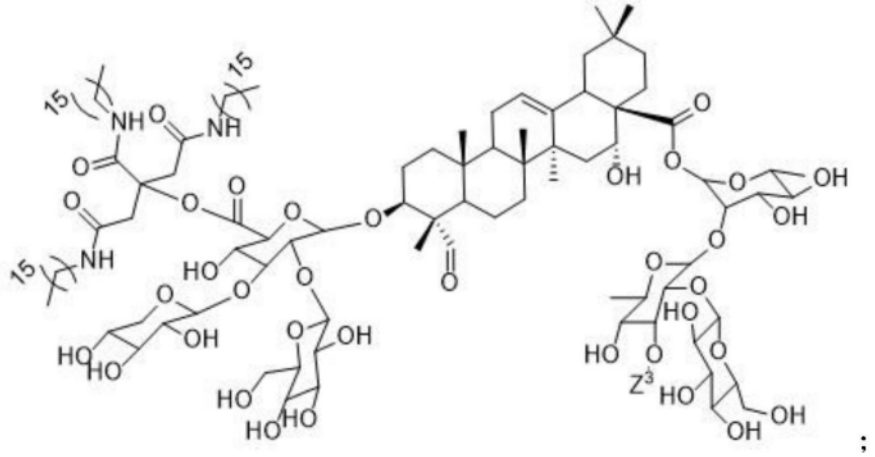
[0049]

(XXII)	 其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 皂树脱酰基皂苷（desacylsaponin）
(XXIII)	 其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖，并且 n = 1-15； C_6-C_{20} 脂肪族胺皂树脱酰基皂苷

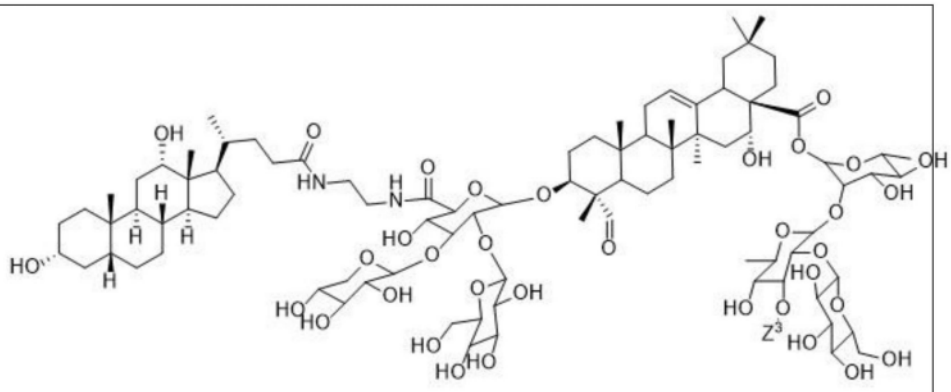
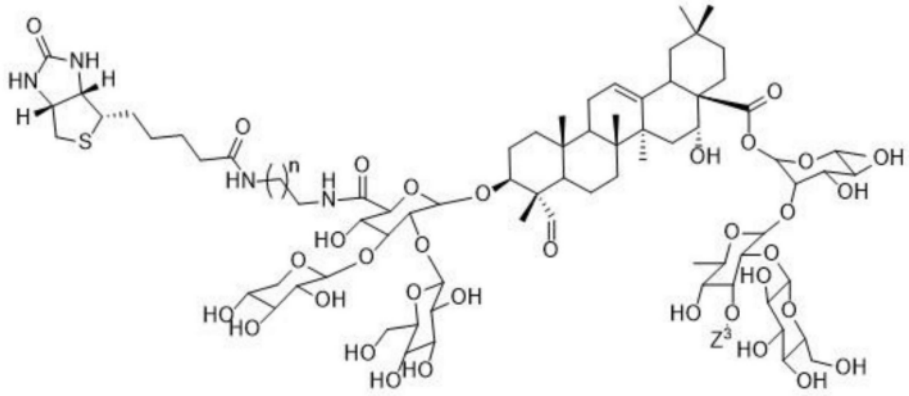
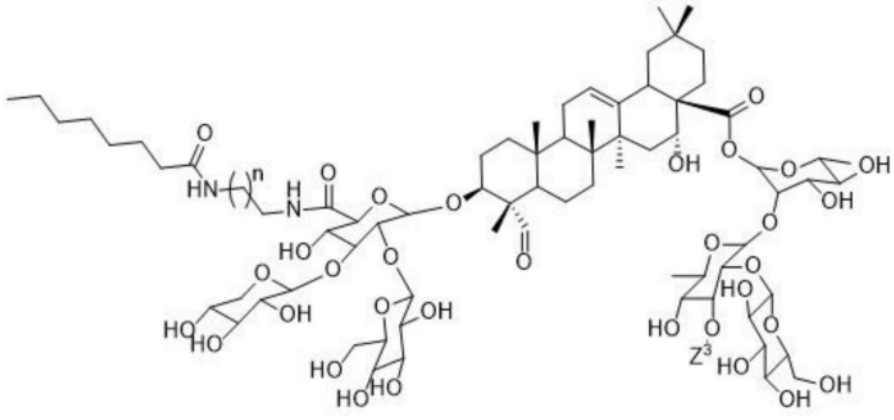
[0050]

(XXIV)	 其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 磷脂酰乙醇胺二棕榈酰基皂树脱酰基皂苷
(XXV)	 其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； L-2,4-二氨基丁酸二肉豆蔻酰基皂树脱酰基皂苷

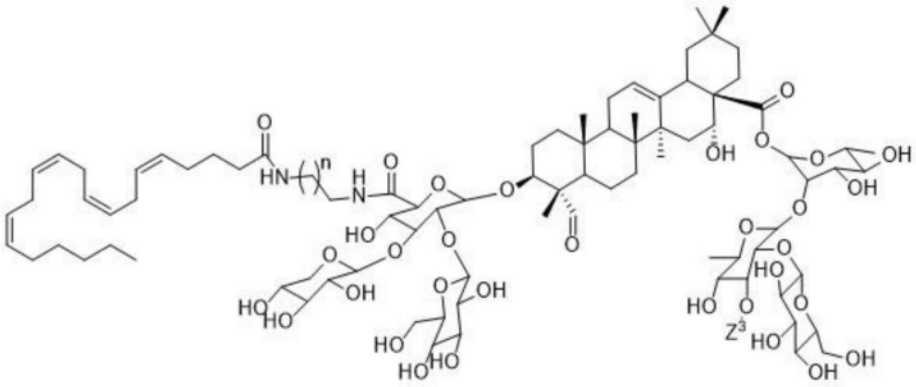
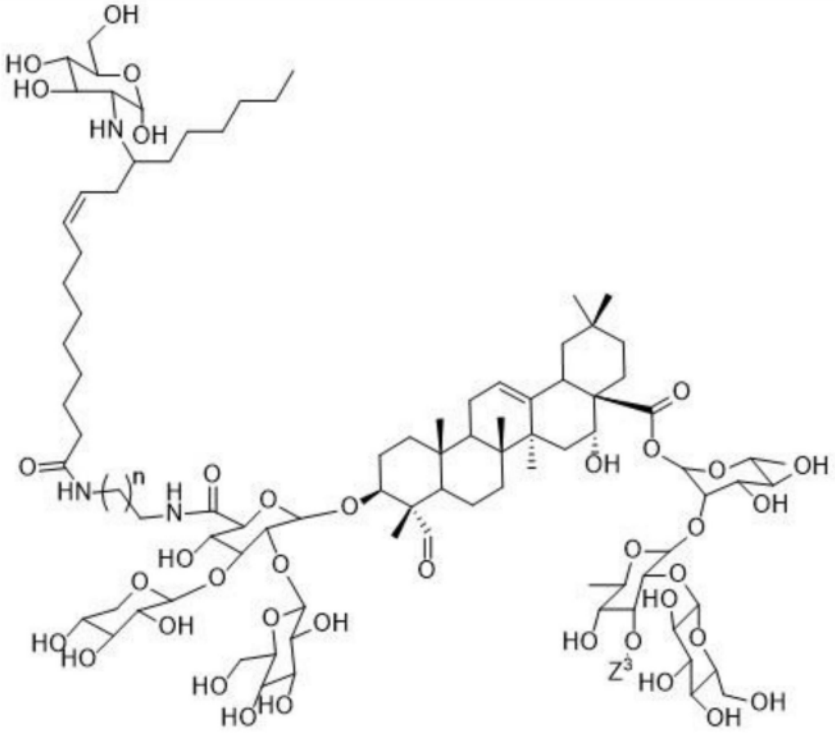
[0051]

(XXVI)	 其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； L-2,4-二氨基丁酸二肉豆蔻酰基皂树脱酰基皂苷
(XXVII)	 其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 柠檬酸-三棕榈酰基皂树脱酰基皂苷

[0052]

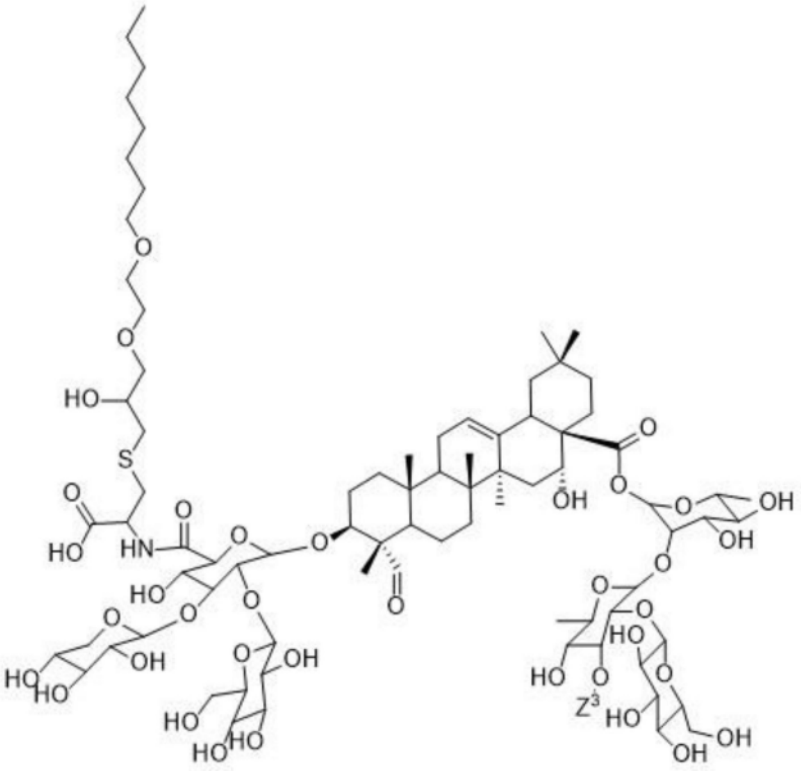
(XXVIII)	 其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 脱氧胆酸皂树脱酰基皂苷
(XXIX)	 其中 n = 1-5，并且 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 生物素皂树脱酰基皂苷
(XXX)	 其中 n = 1 或 2，并且 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 脂肪酸二胺皂树脱酰基皂苷

[0053]

(XXXI)	 其中 n = 1 或 2，并且 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 视黄醛二胺皂树脱酰基皂苷
(XXXII)	 其中 n = 1-5，并且 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 葡糖胺-蓖麻油酸皂树脱酰基皂苷

[0054]

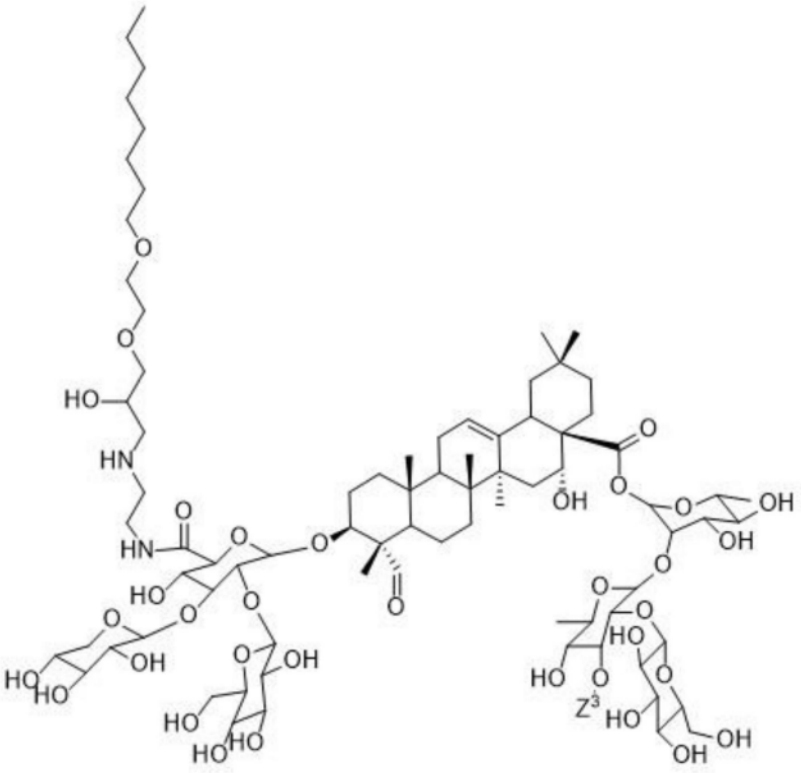
(XXXIII)



其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖；

正辛基-单氧乙烯半胱氨酸皂树脱酰基皂苷

(XXXIV)

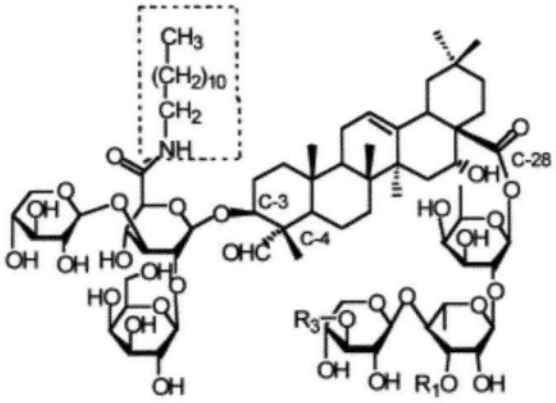
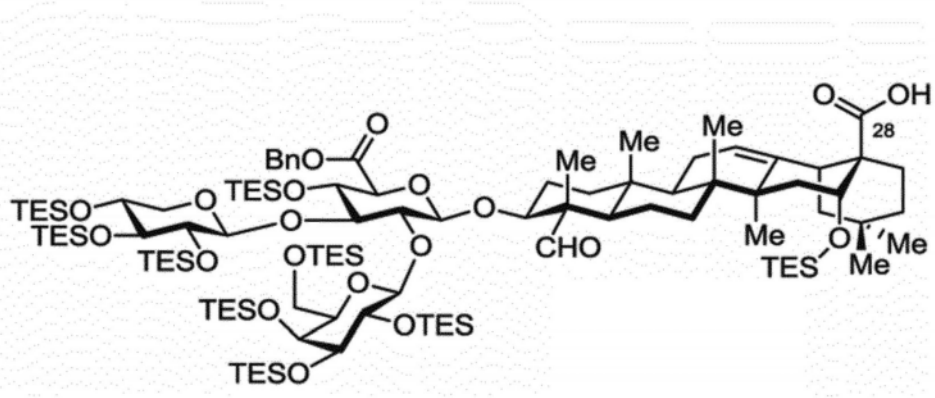


[0055]

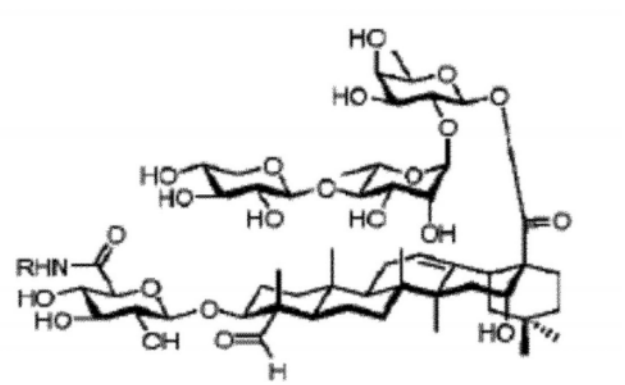
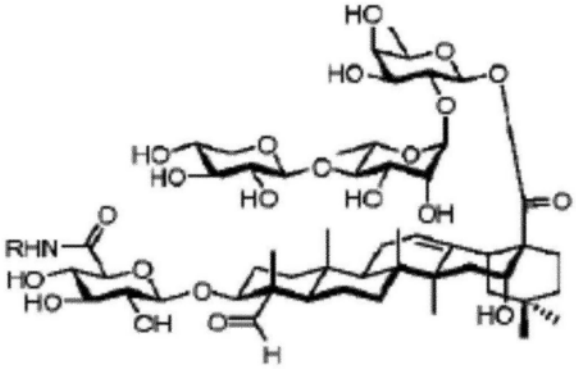
	其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 正辛基-单乙烯乙二胺皂树脱酰基皂苷

[0056] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物，条件是该皂苷衍生物不是以下具有式(XL)-(XLV)的皂苷衍生物中的任一种：

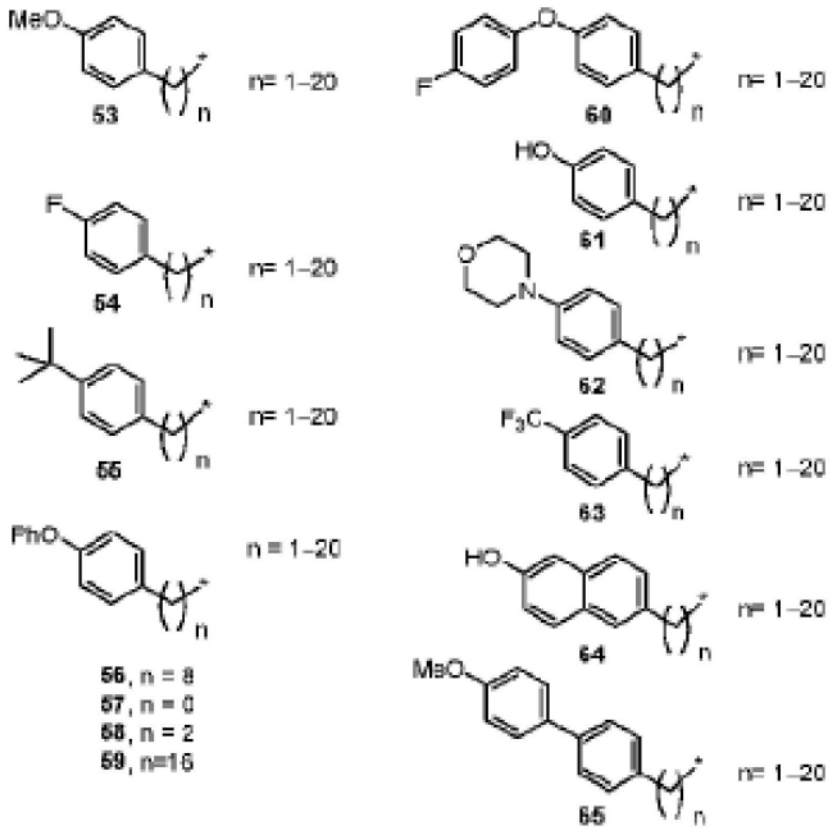
[0057]

(XL)	 GPI-0100 其中 R_3 是芹菜糖或木糖； 脱酰化皂树皂苷
(XLI)	 其中 Bn = 苯基；TES 是三乙基甲硅烷基。

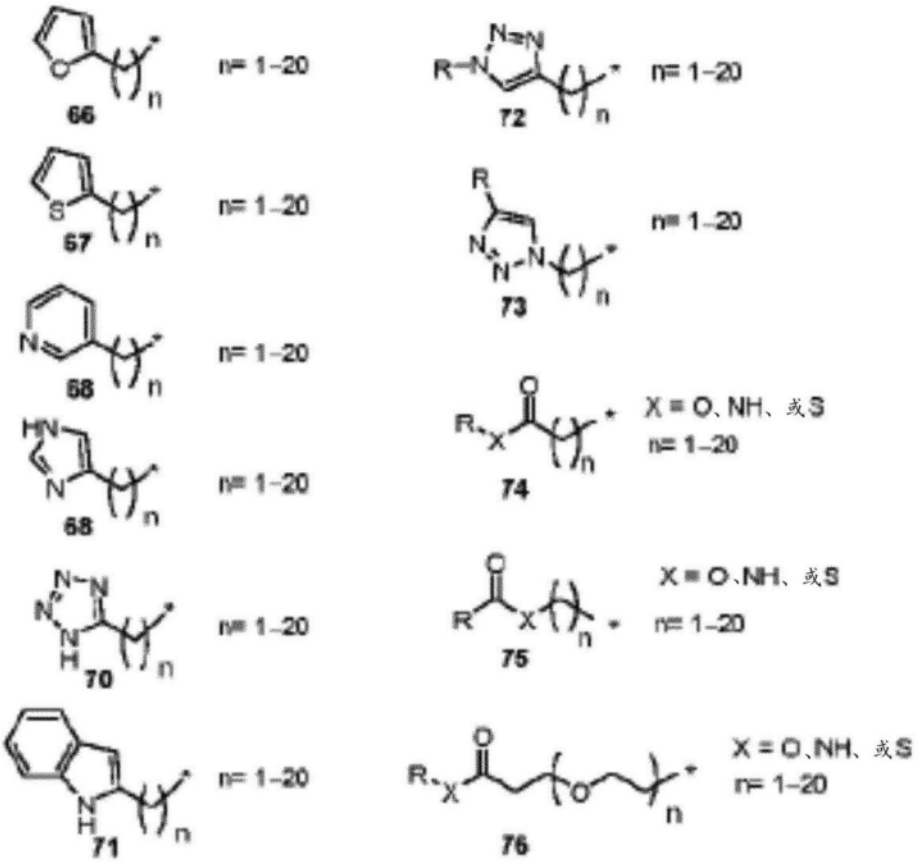
[0058]

(XLII)	 其中 R 是烷基，如十二烷基、甲基、己基、十八烷基、乙基、丙基或戊基。
(XLIII)	 其中 R 是以下中的任一个：

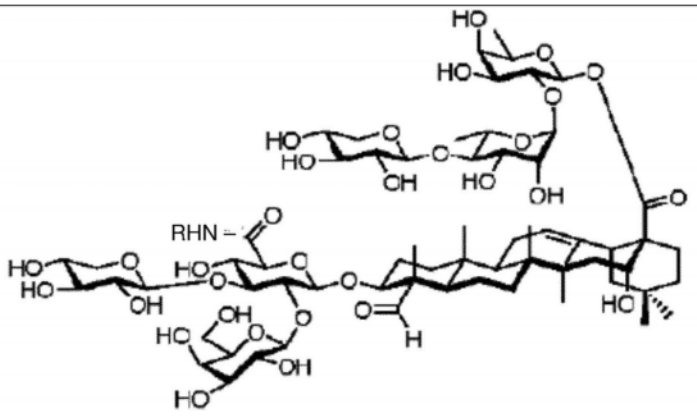
[0059]


MeO
53
n= 1–20
F
54
n= 1–20
55
n= 1–20
PhO
n = 1–20
56, n = 8
57, n = 0
58, n = 2
59, n=16
O
F
60
n= 1–20
HO
61
n= 1–20
O
N
62
n= 1–20
F3C
63
n= 1–20
HO
64
n= 1–20
MeO
65
n= 1–20

[0060]



(XLIV)

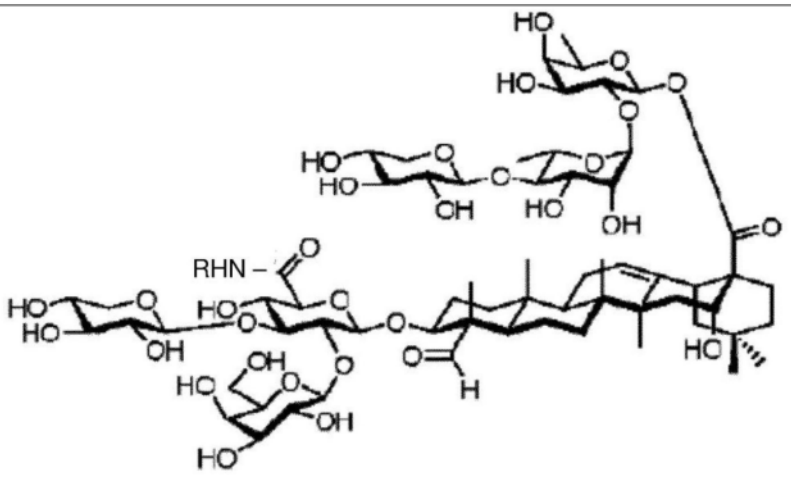


衍生自 Quil A

其中 R 是烷基，如十二烷基、甲基、己基、十八烷基、乙基、丙基或戊基。

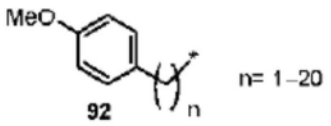
[0061]

(XLV)

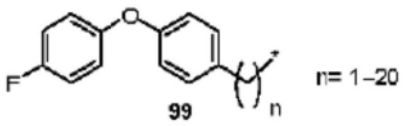


衍生自 Quil A；

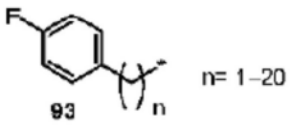
其中 R 是以下中的任一个：



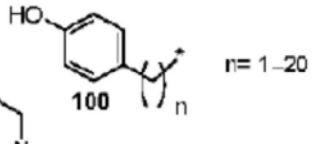
92 n= 1–20



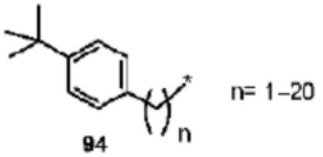
99 n= 1–20



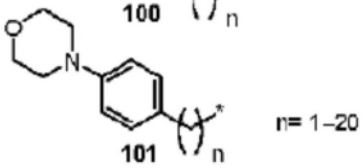
93 n= 1–20



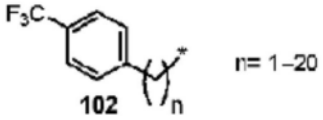
100 n= 1–20



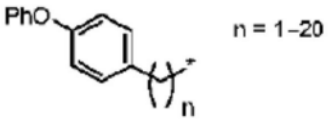
94 n= 1–20



101 n= 1–20

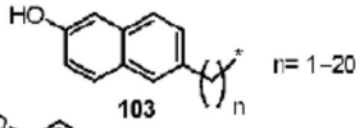


102 n= 1–20

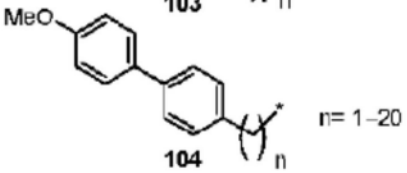


n = 1–20

95, n = 8
96, n = 0
97, n = 2
98, n=16

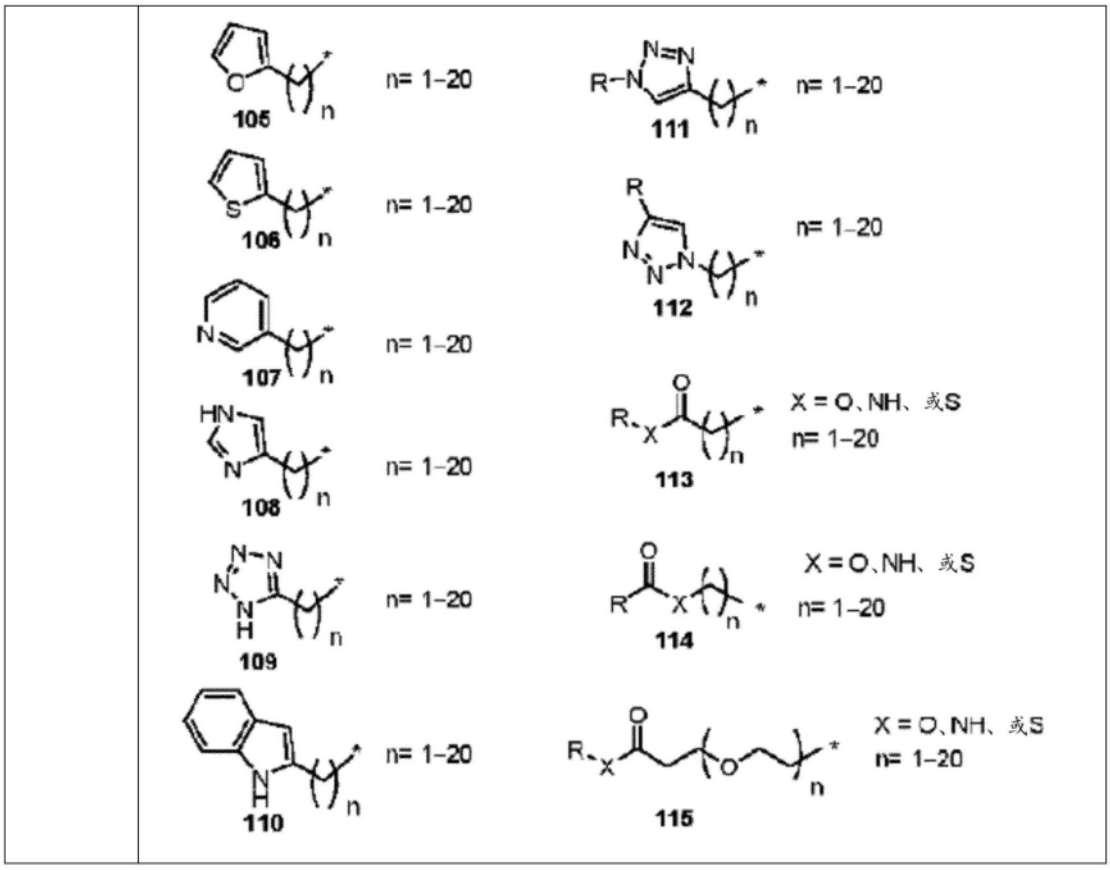


103 n= 1–20



104 n= 1–20

[0062]



[0063] 本发明的第二方面涉及第一药物组合物，该第一药物组合物包含根据本发明的皂苷衍生物和任选地药学上可接受的赋形剂和/或稀释剂。

[0064] 本发明的第三方面涉及药物组合，该药物组合包含：

[0065] • 本发明的第一药物组合物；以及

[0066] • 第二药物组合物，该第二药物组合物包含抗体-毒素缀合物、受体-配体-毒素缀合物、抗体-药物缀合物、受体-配体-药物缀合物、抗体-寡核苷酸缀合物或受体-配体-寡核苷酸缀合物中的任何一种或多种，并且任选地包含药学上可接受的赋形剂和/或稀释剂。

[0067] 本发明的第四方面涉及第三药物组合物，该第三药物组合物包含本发明的皂苷衍生物，并且进一步包含以下中的任何一种或多种：抗体-毒素缀合物、受体-配体-毒素缀合物、抗体-药物缀合物、受体-配体-药物缀合物、抗体-核酸缀合物或受体-配体-核酸缀合物，并且任选地包含药学上可接受的赋形剂和/或稀释剂。

[0068] 本发明的第五方面涉及本发明的第一药物组合物、本发明的药物组合或本发明的第三药物组合物，用作药剂。

[0069] 本发明的第六方面涉及本发明的第一药物组合物、本发明的药物组合或本发明的第三药物组合物，用于在治疗或预防癌症、传染病、病毒感染、高胆固醇血症、原发性高草酸尿症、血友病A、血友病B、α-1抗胰蛋白酶相关肝病、急性肝卟啉症、甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性或自身免疫性疾病中使用。

[0070] 本发明的第七方面涉及用于将分子从细胞外转移到所述细胞内，优选地转移到所述细胞的胞质溶胶内的体外或离体方法，该方法包括以下步骤：

[0071] a)提供细胞；

[0072] b)提供用于从细胞外转移到步骤a)中提供的细胞内的分子；

[0073] c)提供根据本发明的皂苷衍生物；

[0074] d)使步骤a)的细胞在体外或离体与步骤b)的分子和步骤c)的皂苷衍生物接触，由此建立该分子从该细胞外到所述细胞内的转移。

[0075] 定义

[0076] 术语“皂苷”具有其常规的科学含义，本文是指一组两亲性糖苷，这些两亲性糖苷包含一个或多个亲水性糖基部分与亲脂性苷元核心(即皂苷元)的组合。皂苷可以是天然存在的或合成的(即非天然存在的)。术语“皂苷”包括天然存在的皂苷、天然存在的皂苷的衍生物以及通过化学和/或生物技术合成途径从头合成的皂苷。

[0077] 术语“修饰的皂苷”具有其常规的科学含义，本文是指皂苷，即皂苷衍生物，该皂苷衍生物在进行化学修饰以提供修饰的皂苷之前的未衍生化的皂苷中先前存在醛基、羧基基团、乙酸酯基团和/或乙酰基基团的任一个的位置处具有一种或多种化学修饰。例如，修饰的皂苷通过对该修饰的皂苷所基于的皂苷中的醛基、羧基基团、乙酸酯基团和/或乙酰基基团中的任何一个或多个进行化学修饰来提供，即提供皂苷，并且对醛基、羧基基团、乙酸酯基团和/或乙酰基基团中的任一个进行化学修饰，由此提供修饰的皂苷。例如，为提供修饰的皂苷而修饰的皂苷是天然存在的皂苷。典型地，修饰的皂苷是合成皂苷，典型地，该修饰的皂苷是对天然皂苷的修饰，因此衍生自天然皂苷，尽管修饰的皂苷也可以衍生自可能具有或可能不具有天然对应物的合成皂苷。典型地，修饰的皂苷不具有天然对应物，即该修饰的皂苷不是由例如植物或树木天然产生的。

[0078] 术语“半合成皂苷衍生物”具有其常规的科学含义，本文是指对皂苷的合成修饰，这些皂苷在自然界中发现。因此，天然存在的皂苷本身，如QS-7、QS-17、QS-18和QS-21或Quil-A的组分(分离自肥皂草皂树莫利纳(Molina)树的树皮)，不涵盖在术语“半合成皂苷衍生物”中。半合成皂苷衍生物应被解释为分离的天然存在的皂苷，该分离的天然存在的皂苷已被分离并经受化学转化。因此，在实验室规模或工业规模上经受生物转化或酶转化的天然存在的皂苷也覆盖在术语“合成皂苷衍生物”中。此类皂苷的实例是脱酰化皂苷(也称为脱酰基皂苷或脱酰化皂苷或脱酰基皂苷(desacyl saponin))，这些脱酰化皂苷被修饰以从寡糖残基中去除酰基或酰基油基团，该寡糖残基本身通过碱性水解连接到三萜的28位。

[0079] 术语“合成皂苷衍生物”具有其常规的科学含义，本文是指通过化学和/或生物技术合成途径从头合成皂苷，例如通过将合成的苷元核心结构中间体偶联到取代基，如碳水化合物取代基或糖部分或糖链。

[0080] 术语“苷元核心结构”具有其常规的科学含义，本文是指皂苷的苷元核心，其中没有一个或两个碳水化合物天线(antenna)或糖链(聚糖)与其结合。例如，皂皮酸是SO1861、QS-7和QS21的苷元核心结构。典型地，皂苷的聚糖是单糖或寡糖，如线性或支链聚糖。

[0081] 除非另外指出，术语“QS21”或“QS-21”是指QS21的异构体中的任一种，这些异构体具有图41所示结构式，也指图41所示的异构体中的两种或更多种，如全部的混合物。如技术人员将理解的，包含QS21的典型天然提取物将包含QS21的不同异构体的混合物。

[0082] 术语“糖链”具有其常规的科学含义，本文是指聚糖、碳水化合物天线、单个糖部分(单糖)或包含多个糖部分(寡糖、多糖)的链中的任一种。糖链可以仅由糖部分组成，或者还可以包含其他部分，如存在于QS-21中的4E-甲氧基肉桂酸、4Z-甲氧基肉桂酸和5-O-[5-O-

Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸)中的任一种。

[0083] 术语“化学修饰的”具有其常规的科学含义,本文是指对第一化学基团或第一化学部分的化学修饰,从而提供第二化学基团或第二化学部分。实例是将羰基基团化学修饰为-(H)C-OH基团,将乙酸酯基团化学修饰为羟基基团,经由化学反应提供在其醛基上与N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH)部分缀合的皂苷等。

[0084] 术语“化学修饰的醛基”具有其常规的科学含义,本文是指通过涉及皂苷的醛基的化学反应获得的化学反应产物,使得初始的醛基被新的化学基团替代。例如,从皂苷的初始醛基形成-(H)C-OH基团。

[0085] 术语“化学修饰的羧基基团”具有其常规的科学含义,本文是指通过涉及皂苷的羧基基团(如葡糖醛酸部分的羧基基团)和另一个分子的化学反应获得的化学反应产物,使得初始的羧基基团被新的化学基团替代。例如,皂苷与2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇(AMPD)、N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺(AEM)或1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐(HATU)中的任一种形成缀合物,涉及皂苷的葡糖醛酸的羧基基团。

[0086] 术语“Api/Xyl-”或“Api-或Xyl-”在糖链名称的上下文中具有其常规的科学含义,本文是指包含芹菜糖(Api)部分或包含木糖(Xyl)部分的糖链。

[0087] 术语“修饰的皂苷所基于的皂苷”具有其常规的科学含义,本文是指为了提供修饰的皂苷而被修饰的皂苷。典型地,修饰的皂苷所基于的皂苷是天然存在的皂苷,该天然存在的皂苷经受化学修饰以提供修饰的皂苷。

[0088] 术语“基于皂苷的修饰的皂苷”具有其常规的科学含义,本文是指已经受化学修饰步骤从而提供修饰的皂苷的皂苷,其中制备修饰的皂苷所用的皂苷典型地是天然存在的皂苷。

[0089] 术语“寡核苷酸”具有其常规的科学含义,本文尤其是指任何天然或合成的核酸串,该核酸串涵盖DNA、修饰的DNA、RNA、mRNA、修饰的RNA、合成核酸,以单链分子或双链分子呈现,如BNA、反义寡核苷酸(ASO、AON)、短或小干扰RNA(siRNA;沉默RNA)、反义DNA、反义RNA等。

[0090] 术语“抗体-药物缀合物”或“ADC”具有其常规的科学含义,本文是指抗体如IgG、Fab、scFv、免疫球蛋白、免疫球蛋白片段、一个或多个V_H结构域、单结构域抗体、V_{HH}、骆驼科V_H等与当与受试者(如人患者)的细胞接触时可以发挥治疗作用的任何分子(如活性药物成分、毒素、寡核苷酸、酶、小分子药物化合物等)的任何缀合物。

[0091] 术语“抗体-寡核苷酸缀合物”或“AOC”具有其常规的科学含义,本文是指抗体如IgG、Fab、scFv、免疫球蛋白、免疫球蛋白片段、一个或多个V_H结构域、单结构域抗体、V_{HH}、骆驼科V_H等与当与受试者(如人患者)的细胞接触时可发挥治疗作用的任何寡核苷酸分子(如选自天然或合成核酸串的寡核苷酸,该核酸串涵盖DNA、修饰的DNA、RNA、mRNA、修饰的RNA、合成核酸,以单链分子或双链分子呈现,如BNA、反义寡核苷酸(ASO)、短或小干扰RNA(siRNA;沉默RNA)、反义DNA、反义RNA等)的任何缀合物。

[0092] 术语“效应分子”或“效应部分”在指效应分子作为例如共价缀合物的一部分时具有其常规的科学含义,本文是指分子,该分子可以选择性地与例如以下靶分子中的任何一种或多种结合:蛋白质、肽、碳水化合物、糖如聚糖、(磷)脂、核酸(如DNA、RNA)、酶,并调节此

一种或多种靶分子的生物活性。效应分子例如是选自小分子如药物分子、毒素如蛋白质毒素、寡核苷酸如BNA、外源核酸或siRNA、酶、肽、蛋白质或其任何组合中的任何一种或多种的分子。因此，例如，效应分子或效应部分是选自小分子如药物分子、毒素如蛋白质毒素、寡核苷酸如BNA、外源核酸或siRNA、酶、肽、蛋白质或其任何组合中的任何一种或多种的分子或部分，该分子或部分可以选择性地与以下靶分子中的任何一种或多种结合：蛋白质、肽、碳水化合物、糖如聚糖、(磷)脂、核酸(如DNA、RNA)、酶，并且与靶分子结合后调节此一种或多种靶分子的生物活性。典型地，效应分子可以在细胞内，如哺乳动物细胞(如人细胞)内，如在所述细胞的胞质溶胶内发挥生物学作用。因此，典型的效应分子是药物分子、质粒DNA、毒素如由抗体-药物缀合物(ADC)构成的毒素、寡核苷酸如siRNA、BNA、由抗体-寡核苷酸缀合物(AOC)构成的核酸。例如，效应分子是可以作为可增加或减少(细胞内)酶活性、基因表达或细胞信号传导的配体的分子。

[0093] 术语“HSP27”涉及在细胞中沉默HSP27表达的BNA分子。

[0094] 术语“桥接核酸”或简称“BNA”是指“锁核酸”或简称“LNA”，或2'-O,4'-C-氨基乙烯或2'-O,4'-C-氨基亚甲基桥接核酸(BNA^{NC})，具有其常规的科学含义，本文是指修饰的RNA核苷酸。BNA也称为“受约束的RNA分子”或“不可及RNA分子”。BNA单体可以含有具有“固定的”C_3'-内糖褶皱的五元、六元或甚至七元桥接结构。该桥在核糖的2',4'-位置合成结合，以得到2',4'-BNA单体。可以使用本领域已知的标准亚磷酰胺化学将BNA单体掺入寡核苷酸聚合物结构中。BNA是一种结构刚性寡核苷酸，具有增加的结合亲和力和稳定性。

[0095] 术语“C-4处的醛”或“皂苷苷元的C-4处的修饰的醛”用于定位醛基或衍生自该醛基的修饰的基团相对于皂苷的苷元的位置，并且可从分子1中看出。典型地，皂皮酸苷元核心和丝石竹皂苷元(gypsogenin)苷元核心具有与C-4连接的醛基。同时，所述醛基的相同位置也可以定义为在皂皮酸或丝石竹皂苷元的C23位处，这也可以从分子1中看出。因此，醛基位置的两个定义均可以使用。

[0096] 说明书和权利要求书中的术语第一、第二、第三等用于区分例如相似元素、组合物、组合物中的成分或单独的方法步骤，而不一定用于描述顺序或时间顺序。除非另有说明，否则这些术语在适当的情况下是可互换的，并且本发明的实施例能够以除了本文描述或展示的其它顺序进行操作。

[0097] 除非另有说明，否则本文描述的本发明的实施例能够以组合和协作进行操作。

[0098] 此外，尽管称为“优选的”或“例如(e.g.或for example)”或“特别地”等，各种实施例应被解释为可以实现本发明的示例性方式，而不是限制本发明的范围。

[0099] 权利要求中使用的术语“包含/包括(comprising)”不应被解释为限于例如其后列出的组合物的元素或方法步骤或成分；不排除某一组合物中的其他元素或方法步骤或成分。需要被解释为指定如提及的所述特征、整数、(方法)步骤或组分的存在，但不排除一个或多个其他特征、整数、步骤或组分或其组的存在或添加。因此，表达“包括步骤A和B的方法”的范围不应限于仅由步骤A和B组成的方法，而对于本发明，该方法的仅列举的步骤是A和B，并且进一步地，权利要求书应被解释为包括那些方法步骤的等同物。因此，表达“包含组分A和B的组合物”的范围不应限于仅由组分A和B组成的组合物，而对于本发明，该组合物的仅列举的组分是A和B，并且进一步地，权利要求书应被解释为包括那些组分的等同物。

[0100] 另外，通过不定冠词“一个/一种”(“a”或“an”)指代元素或组分并不排除存在多于

一个/一种元素或组分的可能性，除非上下文明确要求存在一个/一种并且仅一个/一种元素或组分。因此，不定冠词“一个/一种”(“a”或“an”)通常意指“至少一个/一种”。

附图说明

[0101] 图1:分子3A的合成

[0102] 图2:分子6的合成

[0103] 图3:分子8的合成

[0104] 图4:分子9的合成

[0105] 图5:分子10的合成

[0106] 图6:分子11的合成

[0107] 图7:分子12的合成

[0108] 图8:分子14的合成

[0109] 图9:分子15的合成

[0110] 图10:分子16的合成

[0111] 图11:分子18的合成

[0112] 图12:分子19的合成

[0113] 图13:分子20的合成

[0114] 图14:分子21的合成

[0115] 图15:分子6的质量色谱图

[0116] 图16:从SO1861开始合成分子6的质量色谱图的细节

[0117] 图17:从分子6开始的分子9的质量色谱图的细节

[0118] 图18A:在非有效固定浓度为5pM的EGF-香石竹毒蛋白存在下，皂苷衍生物对表达EGFR的细胞(HeLa)的内体逃逸增强活性的IC50曲线

[0119] 图18B:在非有效固定浓度为5pM的EGF-香石竹毒蛋白存在下，皂苷衍生物对表达EGFR的细胞(A431)的内体逃逸增强活性的IC50曲线图18B的y轴与图18A的y轴相同。

[0120] 图19A:在非有效固定浓度为5pM的EGF-香石竹毒蛋白存在下，皂苷衍生物对表达EGFR的细胞(HeLa)的内体逃逸增强活性的IC50曲线

[0121] 图19B:在非有效固定浓度为5pM的EGF-香石竹毒蛋白存在下，皂苷衍生物对表达EGFR的细胞(A431)的内体逃逸增强活性的IC50曲线图19B的y轴与图19A的y轴相同。

[0122] 图20A:在非有效固定浓度为5pM的EGF-香石竹毒蛋白存在下，皂苷衍生物对表达EGFR的细胞(HeLa)的毒性的IC50曲线

[0123] 图20B:在非有效固定浓度为5pM的EGF-香石竹毒蛋白存在下，皂苷衍生物对表达EGFR的细胞(A431)的毒性的IC50曲线图20B的y轴与图20A的y轴相同。

[0124] 图21A:皂苷衍生物对表达EGFR的细胞(HeLa)的毒性的IC50曲线

[0125] 图21B:皂苷衍生物对表达EGFR的细胞(A431)的毒性的IC50曲线。图21B的y轴与图21A的y轴相同。

[0126] 图22:通过人红细胞溶血测定法确定的皂苷衍生物的溶血活性

[0127] 图23A:在非有效固定浓度为5pM的EGF-香石竹毒蛋白存在下，皂苷衍生物对表达EGFR的细胞(HeLa)的内体逃逸增强活性的IC50曲线

[0128] 图23B:在非有效固定浓度为5pM的EGF-香石竹毒蛋白存在下,皂苷衍生物对表达EGFR的细胞(A431)的内体逃逸增强活性的IC50曲线

[0129] 图24A:在非有效固定浓度为5pM的EGF-香石竹毒蛋白存在下,皂苷衍生物对表达EGFR的细胞(HeLa)的内体逃逸增强活性的IC50曲线

[0130] 图24B:在非有效固定浓度为5pM的EGF-香石竹毒蛋白存在下,皂苷衍生物对表达EGFR的细胞(A431)的内体逃逸增强活性的IC50曲线

[0131] 图25A:皂苷衍生物对表达EGFR的细胞(HeLa)的毒性的IC50曲线

[0132] 图25B:皂苷衍生物对表达EGFR的细胞(A431)的毒性的IC50曲线

[0133] 图26A:皂苷衍生物对表达EGFR的细胞(HeLa)的毒性的IC50曲线

[0134] 图26B:皂苷衍生物对表达EGFR的细胞(A431)的毒性的IC50曲线

[0135] 图27:通过人红细胞溶血测定法确定的皂苷衍生物的溶血活性。

[0136] 图28:通过人红细胞溶血测定法确定的皂苷衍生物的溶血活性。

[0137] 图29:通过人红细胞溶血测定法确定的皂苷衍生物的溶血活性。

[0138] 图30A:在非有效固定浓度为5pM的EGF-香石竹毒蛋白存在下,皂苷衍生物对表达EGFR的细胞(HeLa)的活性的IC50曲线

[0139] 图30B:在非有效固定浓度为5pM的EGF-香石竹毒蛋白存在下,皂苷衍生物对表达EGFR的细胞(A431)的活性的IC50曲线

[0140] 图31A:皂苷衍生物对表达EGFR的细胞(HeLa)的毒性的IC50曲线

[0141] 图31B:皂苷衍生物对表达EGFR的细胞(A431)的毒性的IC50曲线

[0142] 图32:通过人红细胞溶血测定法确定的皂苷衍生物的溶血活性

[0143] 图33A:在浓度为5pM的西妥昔单抗(cetuximab)-皂草毒蛋白存在下,不同QS皂苷级分对表达EGFR的细胞(HeLa)的内体逃逸增强活性的IC50曲线

[0144] 图33B:在浓度为5pM的西妥昔单抗-皂草毒蛋白存在下,不同QS皂苷级分对表达EGFR的细胞(A431)的内体逃逸增强活性的IC50曲线

[0145] 图34A:QS皂苷级分对表达EGFR的细胞(HeLa)的毒性的IC50曲线

[0146] 图34B:QS皂苷级分对表达EGFR的细胞(A431)的毒性的IC50曲线

[0147] 图35:通过人红细胞溶血测定法确定的QS皂苷级分的溶血活性

[0148] 图36:分子23的合成

[0149] 图37:分子25的合成

[0150] 图38:分子27的合成

[0151] 图39:分子28的合成

[0152] 图40A:分子29的合成

[0153] 图40B:QS21-Ald-EMCH(分子30)

[0154] 图40C:QS21-Glu-AMPD(分子31)

[0155] 图40D:QS21-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD)(分子32)

[0156] 图40E:QS21-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)(分子33)

[0157] 图41:四种QS-21异构体的结构。

[0158] 图42:确定临界胶束浓度:单修饰的SO1861的ANS荧光产率。

[0159] 图43:确定临界胶束浓度:双修饰的SO1861的ANS荧光产率。

[0160] 图44:确定临界胶束浓度:三修饰的SO1861的ANS荧光产率。

[0161] 图45:确定临界胶束浓度:QS皂苷的ANS荧光产率。

[0162] 图46:确定临界胶束浓度:QS21的ANS荧光产率。

[0163] 图47A:确定临界胶束浓度:修饰的QS21的ANS荧光产率。

[0164] 图47B:确定临界胶束浓度:单修饰的QS21的ANS荧光产率。

[0165] 图47C:确定临界胶束浓度:双修饰的QS21的ANS荧光产率。

[0166] 图48:SO1861或SO1861-EMCH+10pM西妥昔单抗-皂草毒蛋白对A431细胞的细胞活力测定(MTS)。

[0167] 图49:西妥昔单抗-香石竹毒蛋白+300nM和4000nM SO1861-EMCH对A431细胞的细胞活力测定(MTS)。

[0168] 图50:西妥昔单抗-皂草毒蛋白+300nM和1500nM SO1861或4000nM SO1861-EMCH对A431细胞的细胞活力测定(MTS)。

[0169] 图51:SO1861或SO1861-EMCH+10pM EGF香石竹毒蛋白对A431细胞的细胞活力测定(MTS)。

[0170] 图52A、B:EGF香石竹毒蛋白+10nM、300nM和1500nM SO1861或4829nM SO1861-EMCH对A431细胞的细胞活力测定(MTS)。

[0171] 图53A、B:曲妥珠单抗(trastuzumab)-香石竹毒蛋白或曲妥珠单抗-皂草毒蛋白+1500nM SO1861或4000nM SO1861-EMCH对A431细胞的细胞活力测定(MTS)。

[0172] 图54:SO1861-EMCH+100nM HSP27BNA、100nM西妥昔单抗-HSP27BNA对A431细胞的HSP27 mRNA基因沉默分析。

[0173] 图55:西妥昔单抗-HSP27BNA缀合物(DAR1.5或DAR4)+100nM SO1861-EMCH或4000nM SO1861-EMCH对A431细胞的HSP27 mRNA基因沉默分析。

[0174] 图56:曲妥珠单抗-HSP27BNA缀合物(DAR4.4)+100nM SO1861-EMCH或4000nM SO1861-EMCH对SK-BR-3细胞的HSP27 mRNA基因沉默分析。

[0175] 图57A、B:HSP27BNA+4000nM SO1861-EMCH对A431细胞和A2058细胞的HSP27 mRNA基因沉默分析。

[0176] 图58:HSP27BNA或HSP27LNA+4829nM SO1861-EMCH对SK-BR-3细胞的HSP27 mRNA基因沉默分析。

[0177] 图59:分子26的合成。

[0178] 图60:EMCH马来酰亚胺基团与硫醇的迈克尔(Michael)加成反应的一般反应方案(如果R＝CH_2-CH_2-OH,则图60描述了SO1861-Ald-EMCH-阻断(SO1861-Ald-EMCH-巯基乙醇)的合成)。

[0179] 图61:(A)SO1861-Ald-EMCH的MALDI-TOF-MS谱,以及(B)SO1861-Ald-EMCH-巯基乙醇的MALDI-TOF-MS谱。(A)RP模式:m/z 2124Da($[M+K]^+$,皂苷-Ald-EMCH),m/z 2109Da($[M+K]^+$,SO1861-Ald-EMCH),m/z 2094Da($[M+Na]^+$,SO1861-EMCH)。(B)RP模式:m/z 2193Da($[M+K]^+$,皂苷-Ald-EMCH-巯基乙醇),m/z 2185Da($[M+K]^+$,SO1861-Ald-EMCH-巯基乙醇),m/z 2170Da($[M+Na]^+$,SO1861-Ald-EMCH-巯基乙醇)。

[0180] 图62:SO1861-EMCH在pH为3的HCl溶液中水解之前(A)和之后(B)的MALDI-TOF-MS谱。

[0181] 图63.非缀合皂苷介导的内体逃逸和靶细胞杀伤增强。A)用含或不含1.5pM EGF香石竹毒蛋白的SO1861、SO1832、SO1862(SO1861的异构体)或SO1904处理的HeLa细胞($EGFR^+$)的细胞活力分析,B)用EGF香石竹毒蛋白和固定浓度的SO1861、SO1832、SO1862(SO1861的异构体)或SO1904处理的HeLa细胞($EGFR^+$)的细胞活力分析。C)用含或不含1.5pM EGF香石竹毒蛋白的SO1861或GE1741处理的HeLa细胞($EGFR^+$)的细胞活力分析。D)用含或不含1.5pM EGF香石竹毒蛋白的不同QSmix(来自肥皂草皂树的皂苷混合物)处理的HeLa细胞($EGFR^+$)的细胞活力分析。图63B和图63D的y轴与图63A的y轴相同。

[0182] 图64.非缀合SO1861相比于SO1861-Ald-EMCH的活性。根据本发明,癌细胞中EGFR靶向反义BNA寡聚体递送和基因沉默。A、B、C)用含或不含1.5pM EGF香石竹毒蛋白的SO1861或SO1861-Ald-EMCH处理的A431($EGFR^{++}$)、HeLa($EGFR^+$)或A2058($EGFR^-$)细胞的细胞活力分析。D、E)用含或不含1.5pM EGF香石竹毒蛋白的SO1861或SO1861-L-N_3(也称为SO1861-N3或SO1861-N3/叠氮化物)处理的A431($EGFR^{++}$)或HeLa($EGFR^+$)细胞的细胞活力分析。图64B、图64C和图64E的y轴与图64A的y轴相同。

[0183] 图65.非缀合SO1861相比于SO1861-Ald-EMCH(不稳定的腙键)相比于SO1861-HATU(也称为SO1861-(S)(稳定的)和SO1861-Glu-HATU)。用含或不含EGF香石竹毒蛋白的SO1861、SO1861-Glu-HATU(也称为SO1861-(S)(S=HATU))和SO1861-Ald-EMCH(SO1861苷元核心与EMCH接头之间的腙键也称为“不稳定的接头”)处理的HeLa细胞($EGFR^+$)的细胞活力分析。

[0184] 图66:皂苷衍生物对A)表达EGFR的细胞(HeLa)和B)表达EGFR的细胞(A431)的毒性的IC50图。图66B的y轴与图66A的y轴相同。

[0185] 图67:通过人红细胞溶血测定法确定的皂苷衍生物的溶血活性。

[0186] 图68:皂苷衍生物对A)表达EGFR的细胞(HeLa)和B)表达EGFR的细胞(A431)的毒性的IC50图。图68B的y轴与图68A的y轴相同。

[0187] 图69:皂苷对A)表达EGFR的细胞(HeLa)和B)表达EGFR的细胞(A431)的毒性的IC50图。图69B的y轴与图69A的y轴相同。

[0188] 图70:通过人红细胞溶血测定法确定的皂苷和皂苷衍生物的溶血活性。

[0189] 图71:SO1861和SO1861-EMCH影响下的红细胞裂解。

[0190] 图72:SO1831-Ald-EMCH的分子结构。

[0191] 图73:A)七叶皂苷(Aescin);B)SO1831、SO1831-Ald-EMCH(“SO1831-EMCH”)的胶束形成。

具体实施方式

[0192] 本发明将相对于特定实施例来说明,但本发明并不受限于此而只受权利要求限制。

[0193] 令人惊讶的是,诸位发明人已经发现具有以下基团的皂苷,即皂苷衍生物:

[0194] -在皂苷的苷元的C-3处结合并含有修饰的葡糖醛酸的支链三糖部分;和/或

[0195] -皂苷的苷元的C-4处的修饰的醛;和/或

[0196] -结合在皂苷的苷元的C-28位处的多糖部分;

[0197] 当考虑与皂苷衍生物接触的细胞的细胞活力时具有降低的毒性;当考虑例如毒素

细胞毒性或BNA介导的基因沉默的增强时具有活性(不希望受任何理论的约束:涉及修饰的皂苷的类似或改善的内体逃逸增强活性),如果修饰的皂苷中的上述基团中的一个或两个衍生化(即以下中的一个或两个:苷元中的醛基、结合在苷元的C-3处的多糖链中葡糖醛酸的羧基基团);和/或与未修饰的皂苷的毒性、活性和溶血活性相比具有降低的溶血活性。由此,诸位发明人提供了具有改善的治疗窗的皂苷衍生物,因为对于皂苷衍生物,细胞毒性低于对其天然存在的对应物确定的细胞毒性,溶血活性低于对皂苷衍生物的天然存在的对应物确定的溶血活性,并且对于单一衍生化皂苷和双衍生化皂苷,细胞毒性与例如毒素增强或基因沉默的IC50值之间的比率相似或增加,和/或因为皂苷溶血活性与例如毒素增强或基因沉默的IC50值之间的比率相似或增加。结合图1-14和36-40以及66-70,参考表A2了解示例性皂苷衍生物的概述,参考表A5和表A6以及表A12了解针对不同细胞确定的细胞毒性、溶血活性和内体逃逸增强活性("活性")的概述,以及细胞毒性的IC50与活性的IC50之间的比率、以及溶血活性的IC50与活性的IC50之间的比率的概述。

[0198] 本发明的第一方面涉及基于皂苷的皂苷衍生物,该皂苷包含三萜苷元核心结构(也称为"苷元")和与该苷元核心结构连接的第一糖链和第二糖链中的至少一种,其中:

[0199] i.该皂苷衍生物包含含有已衍生化的醛基的苷元核心结构;或

[0200] ii.该皂苷衍生物包含该第一糖链,其中该第一糖链包含已衍生化的羧基基团、优选地葡糖醛酸部分的羧基基团;或

[0201] iii.该皂苷衍生物包含衍生化i.、ii.的任何组合,优选地i.和ii.中的一种衍生化;

[0202] 其中该第一糖链和该第二糖链独立地选自单糖、线性寡糖和支链寡糖。

[0203] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物,其中该皂苷衍生物所基于的所述皂苷进一步包含以下中的至少一种:

[0204] -在C-4处包含醛基的所述苷元核心结构;以及

[0205] -包含羧基基团、优选地葡糖醛酸部分的羧基基团的第一糖链。

[0206] 在特定的实施例中,皂苷衍生物所基于的皂苷是肥皂草皂树(QS)皂苷。

[0207] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物,其中皂苷是天然存在的皂苷。

[0208] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物,其中该皂苷衍生物包含含有已衍生化的醛基的苷元核心结构。

[0209] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物,其中该皂苷衍生物是半合成皂苷衍生物。

[0210] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物,其中该皂苷衍生物具有小于5000g/mol,优选地小于4000g/mol,更优选地小于3000g/mol,最优选地小于2500g/mol的分子量,和/或具有超过1000g/mol,优选地超过1500g/mol,更优选地超过1800g/mol的分子量。

[0211] 本发明的一方面是基于肥皂草皂树(QS)皂苷的皂苷衍生物,该肥皂草皂树皂苷包含三萜苷元核心结构和与该苷元核心结构连接的第一糖链和第二糖链中的至少一种;所述皂苷进一步包含以下中的至少一种:

[0212] 在C-4处包含醛基的所述苷元核心结构;包含羧基基团、优选地葡糖醛酸部分的羧基基团的该第一糖链;其中:

[0213] i.该皂苷衍生物包含含有已衍生化的醛基的苷元核心结构;或

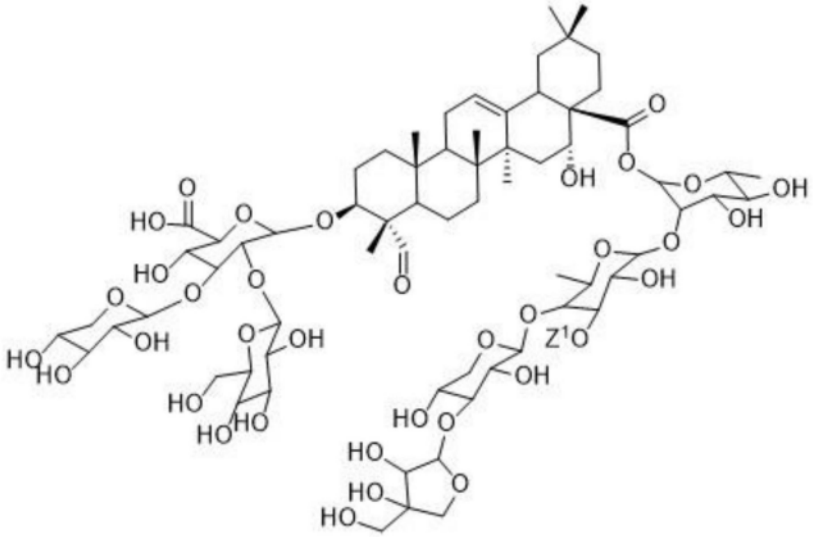
[0214] ii.该皂苷衍生物包含该第一糖链,其中该第一糖链包含已衍生化的羧基基团、优选地葡糖醛酸部分的羧基基团;或

[0215] iii.该皂苷衍生物包含衍生化i.和ii.的组合,优选地衍生化i.和ii.中的一种;

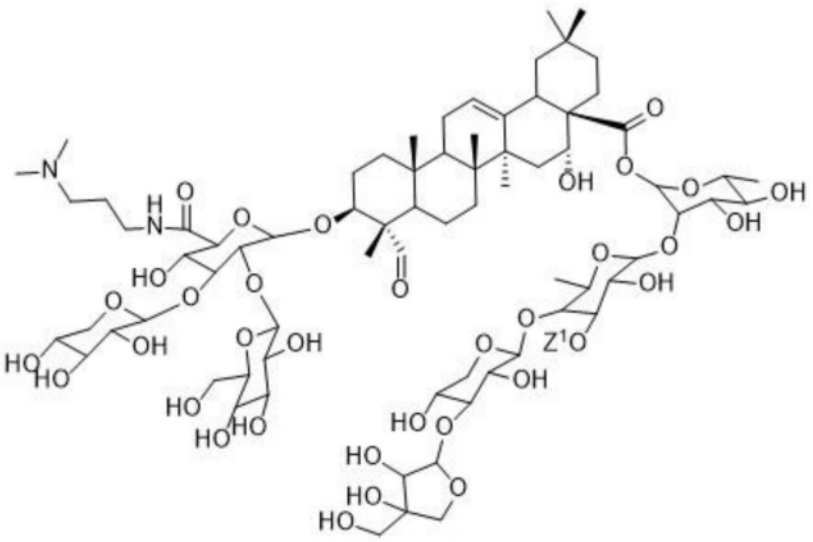
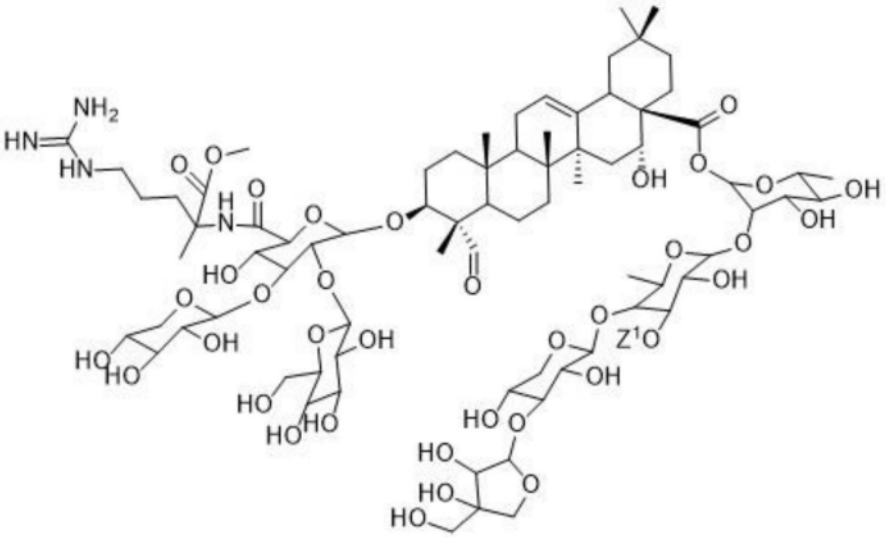
[0216] 其中该第一糖链和该第二糖链独立地选自单糖、线性寡糖和支链寡糖。

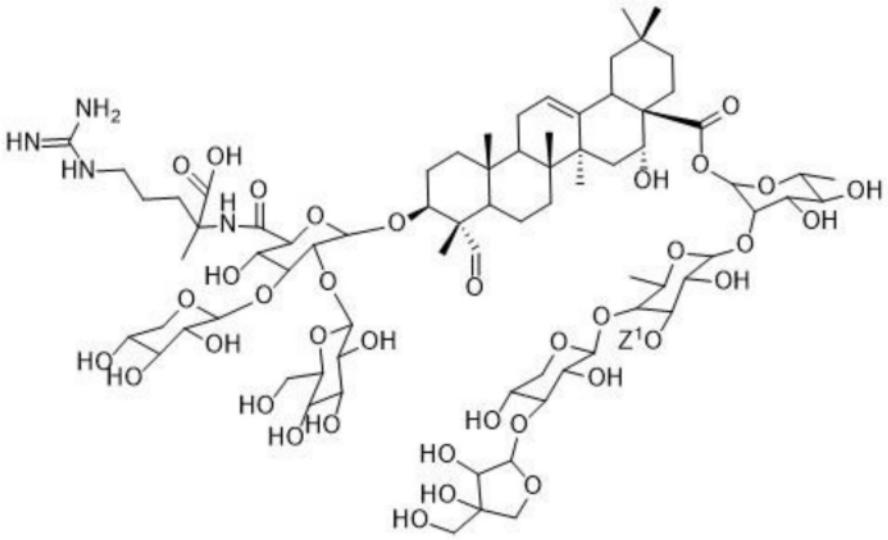
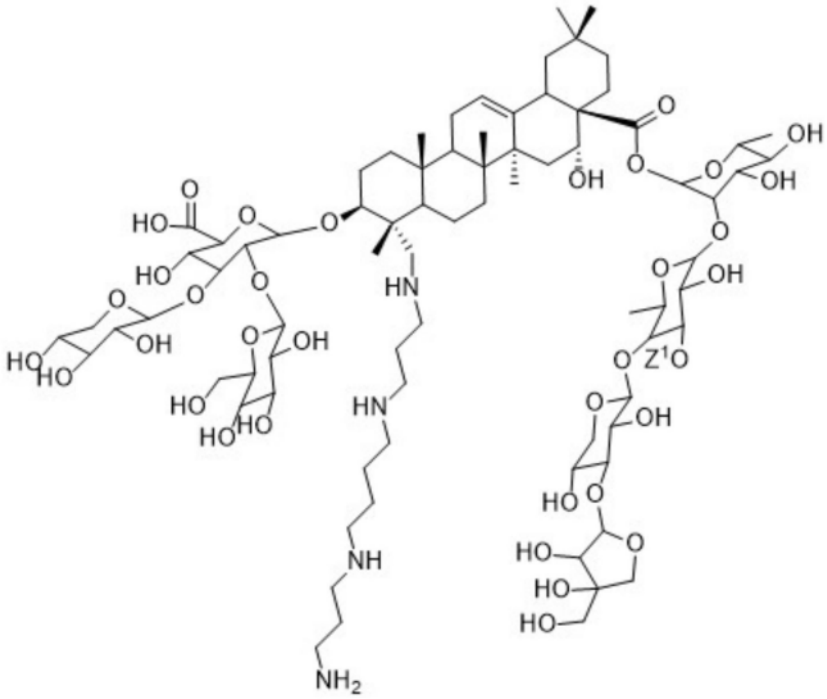
[0217] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物,条件是该皂苷衍生物不是以下具有式(VI)-(XII)的皂苷衍生物中的任一种:

[0218]

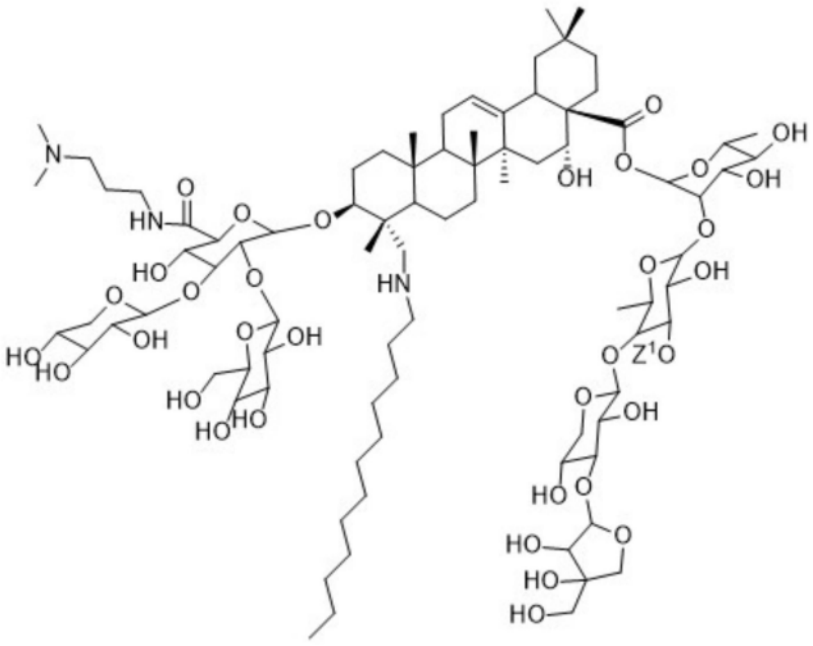
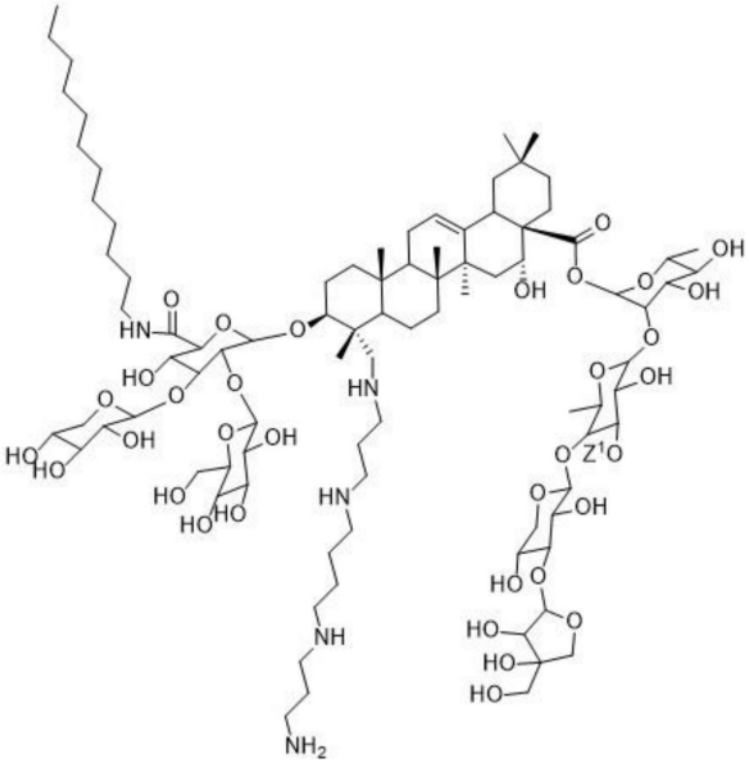
(VI)	 其中 Z^1 是氢或葡萄糖; 脱酰化皂树皂苷

[0219]

(VII)	 其中 Z^1 是氢或葡萄糖； 3-二甲基氨基-1-丙胺-脱酰化皂树皂苷
(VIII)	 其中 Z^1 是氢或葡萄糖； 精氨酸甲酯脱酰化皂树皂苷

(IX)	 其中 Z^1 是氢或葡萄糖； 精氨酸甲酯脱酰化皂树皂苷
(X)	 其中 Z^1 是氢或葡萄糖； 亚精胺醛脱酰化皂树皂苷

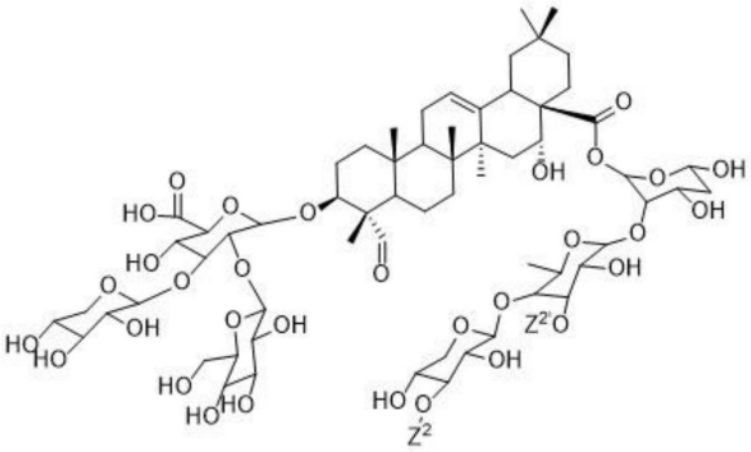
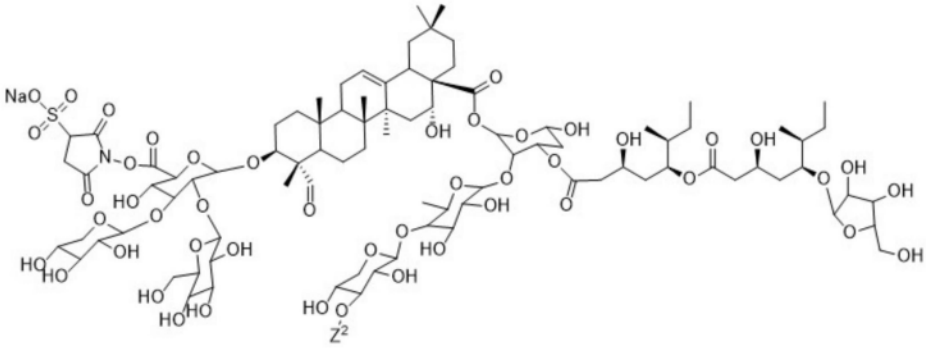
[0220]

(XI)	 其中 Z^1 是氢或葡萄糖； 3-二甲基氨基-1-丙胺-十二烷胺脱酰化皂树皂苷
(XII)	 其中 Z^1 是氢或葡萄糖； 十二烷基酰胺皂苷-精胺醛脱酰化皂树皂苷

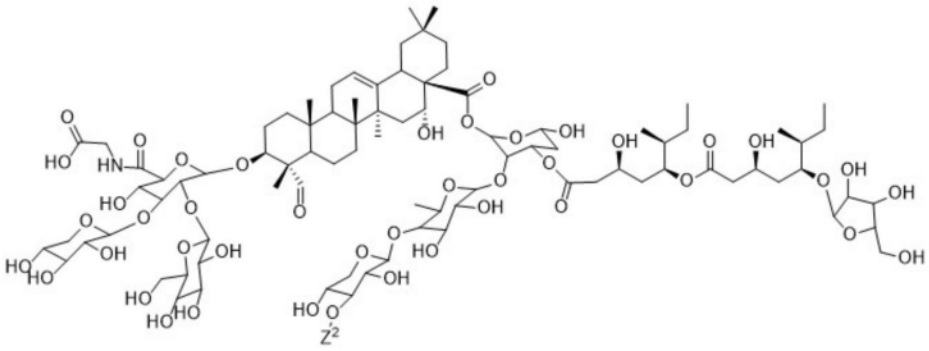
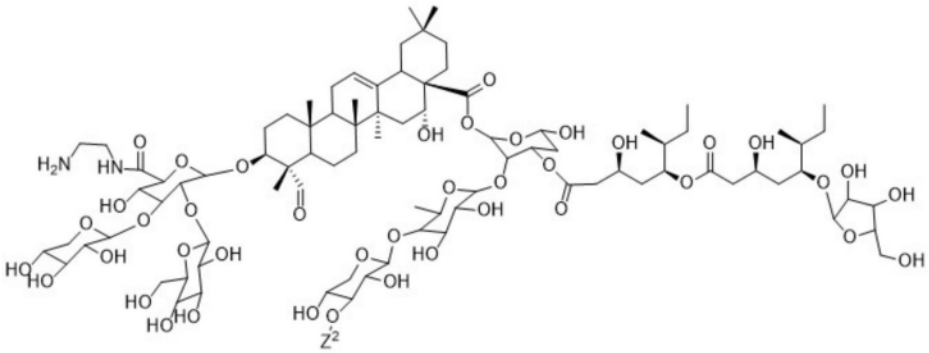
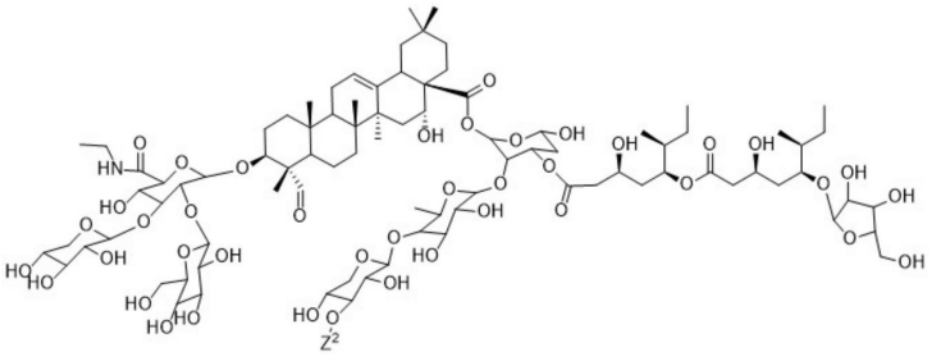
[0221]

[0222] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物，条件是该皂苷衍生物不是以下具有式(XIII)-(XXI)的衍生自肥皂草皂树皂苷的皂苷衍生物中的任一种：

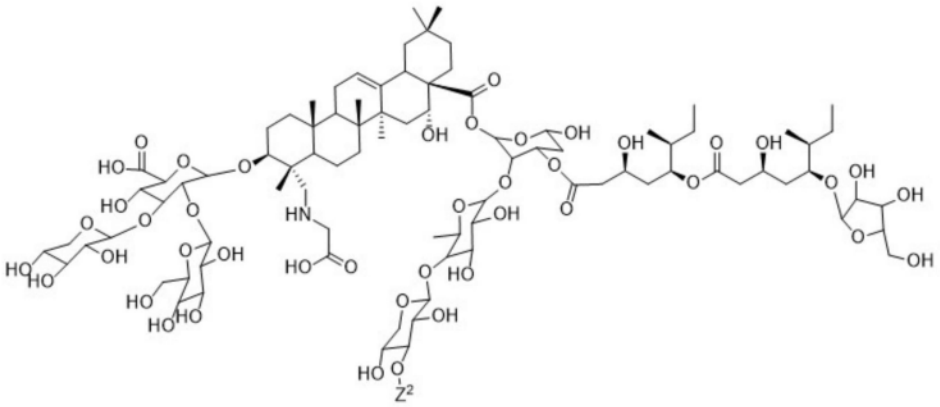
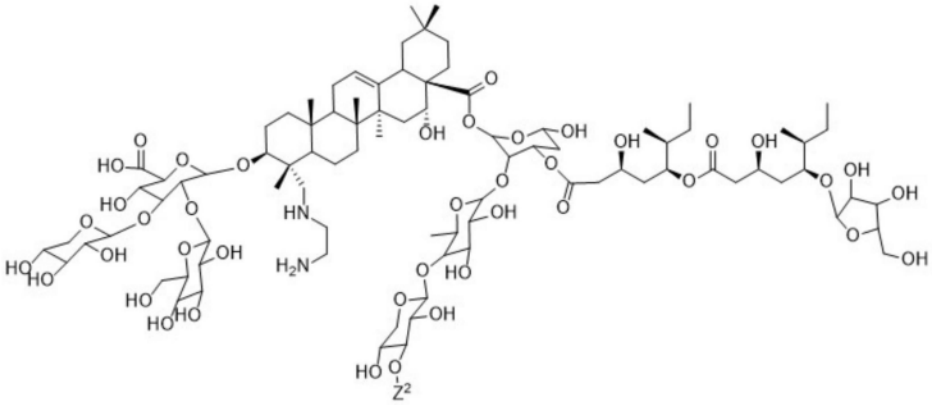
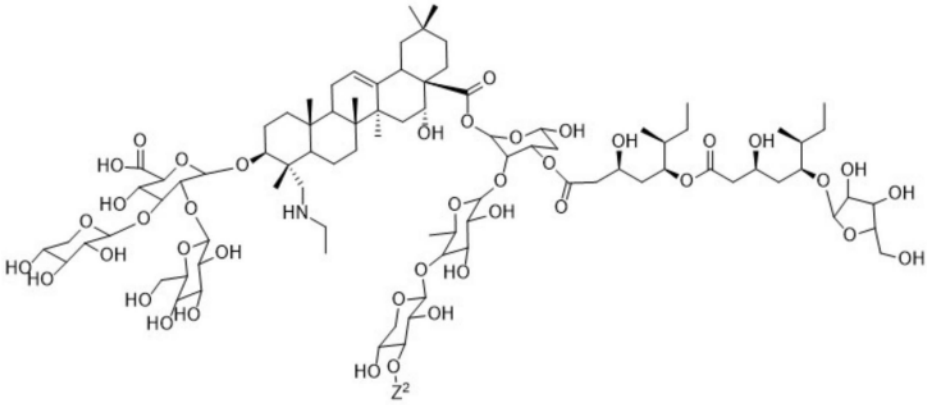
[0223]

(XIII)	 ; 其中 Z^2 = 芹菜糖，并且 $Z^{2'}$ = 葡萄糖（QA18-H）；或 其中 Z^2 = 芹菜糖，并且 $Z^{2'}$ = 氢（QA21-V1-H）；或 其中 Z^2 = 木糖，并且 $Z^{2'}$ = 葡萄糖（QA21-V2-H）；
(XIV)	 其中 Z^2 是芹菜糖或木糖； QS-21-S-NHS

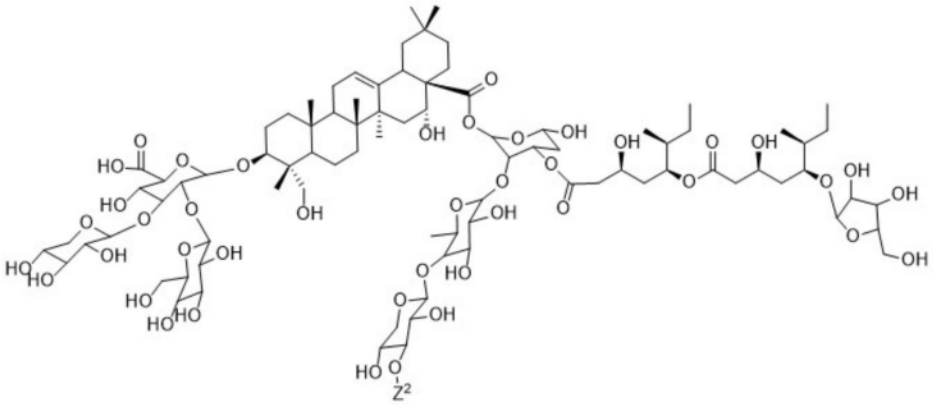
[0224]

(XV)	 其中 Z^2 是芹菜糖或木糖； 甘氨酸 QA-21
(XVI)	 其中 Z^2 是芹菜糖或木糖； 乙二胺 QA-21
(XVII)	 其中 Z^2 是芹菜糖或木糖； 乙胺 QA-21

[0225]

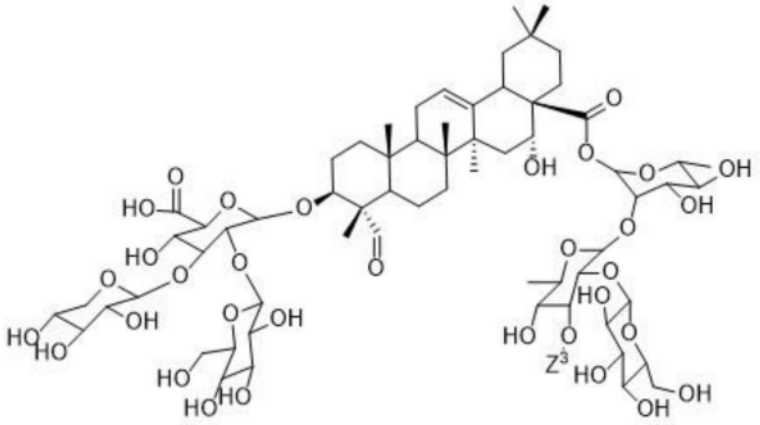
(XVIII)	 其中 Z^2 是芹菜糖或木糖； 甘氨酸醛 QA-21
(XIX)	 其中 Z^2 是芹菜糖或木糖； 乙二胺醛 QA-21
(XX)	 其中 Z^2 是芹菜糖或木糖；

[0226]

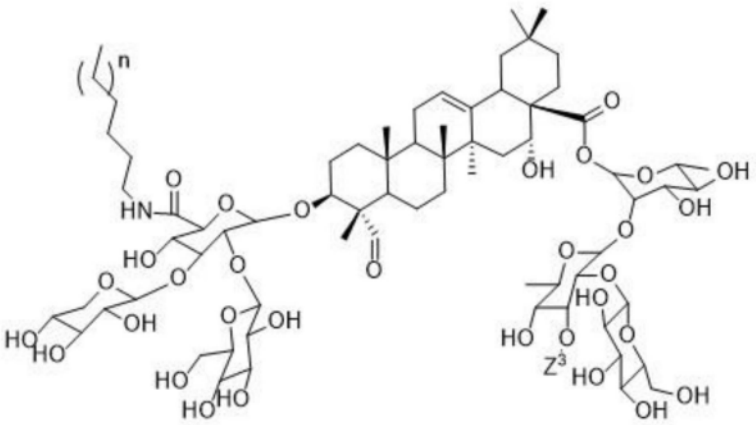
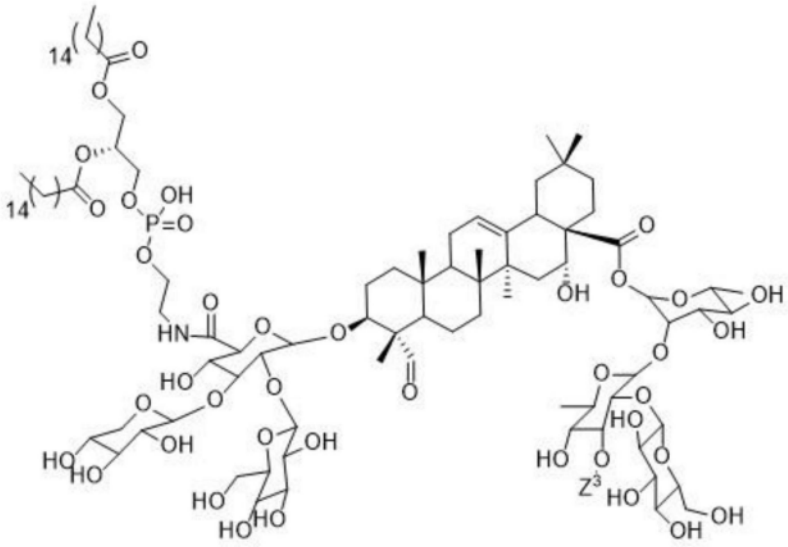
	乙胺醛 QA-21
(XXI)	 其中 Z^2 是芹菜糖或木糖； 醇 QA-21

[0227] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物，条件是该皂苷衍生物不是以下具有式(XXII)-(XXXIV)的皂苷衍生物中的任一种：

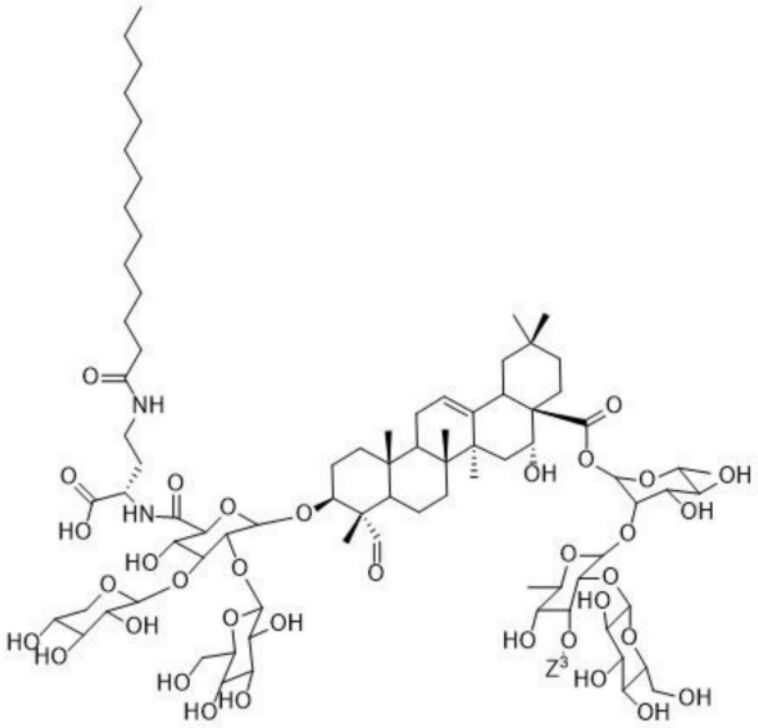
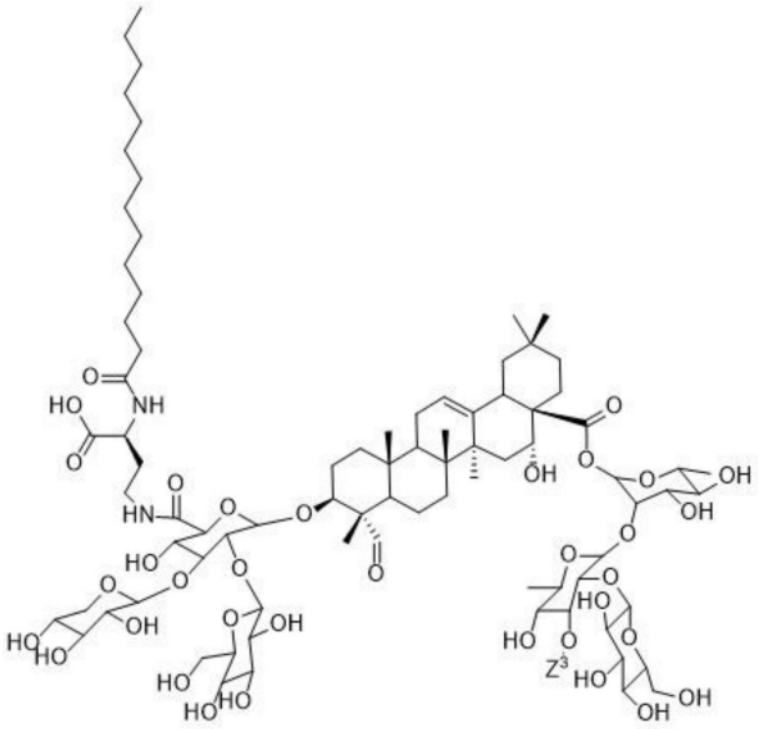
[0228]

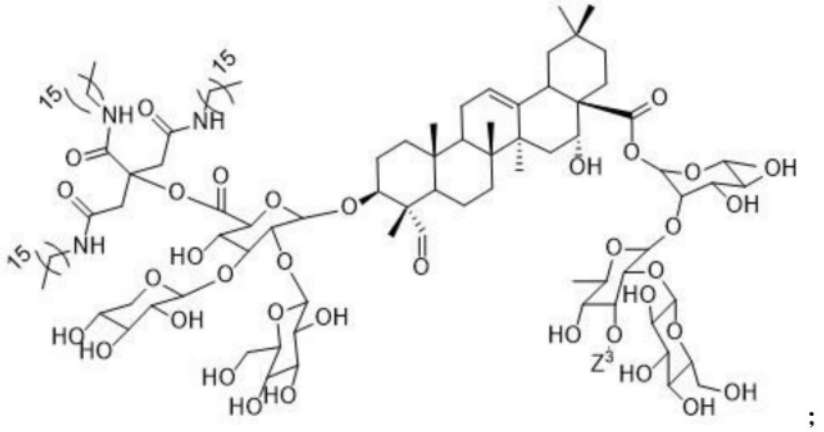
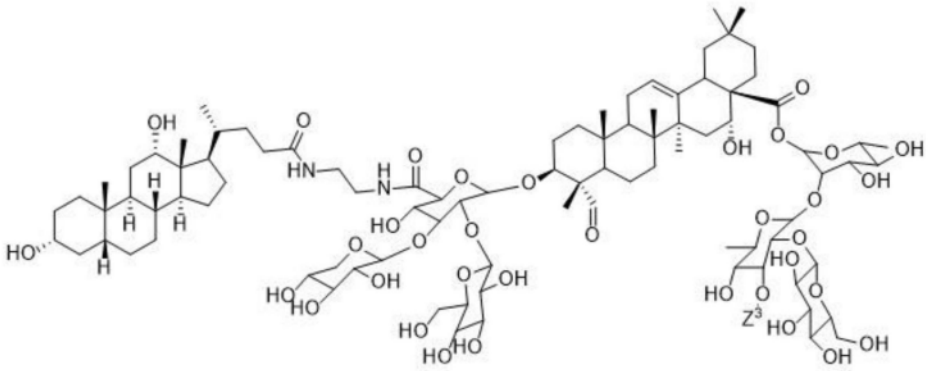
(XXII)	 其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 皂树脱酰基皂苷

[0229]

(XXIII)	 其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖，并且 n = 1-15； C_6-C_{20} 脂肪族胺皂树脱酰基皂苷
(XXIV)	 其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 磷脂酰乙醇胺二棕榈酰基皂树脱酰基皂苷

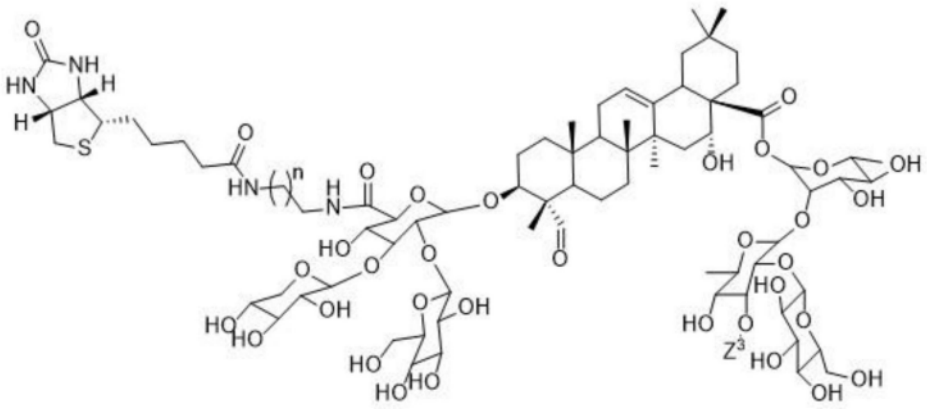
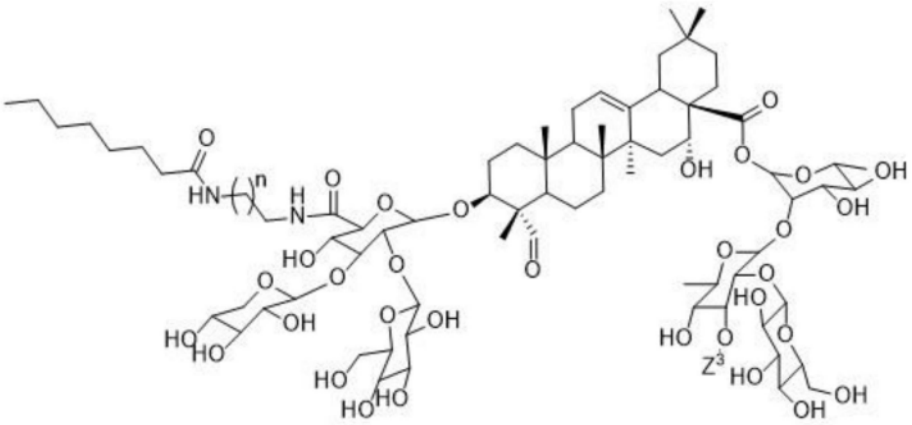
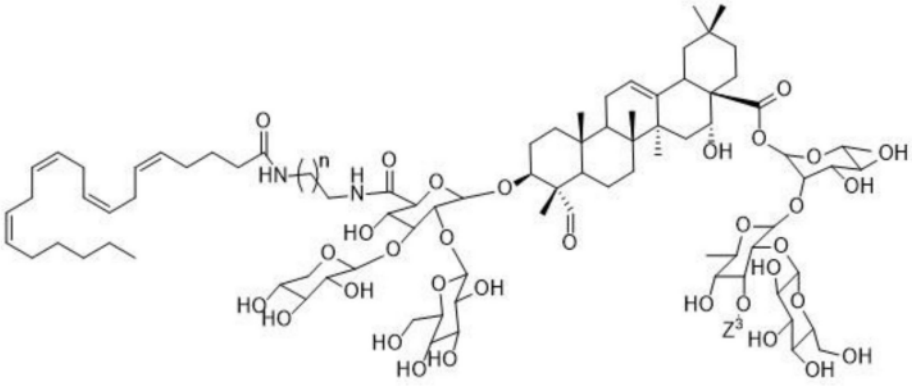
[0230]

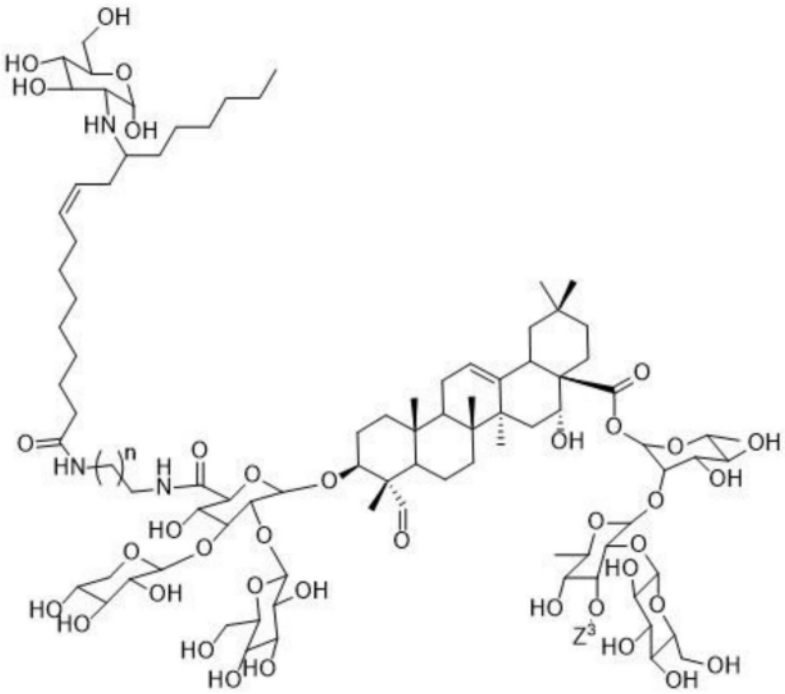
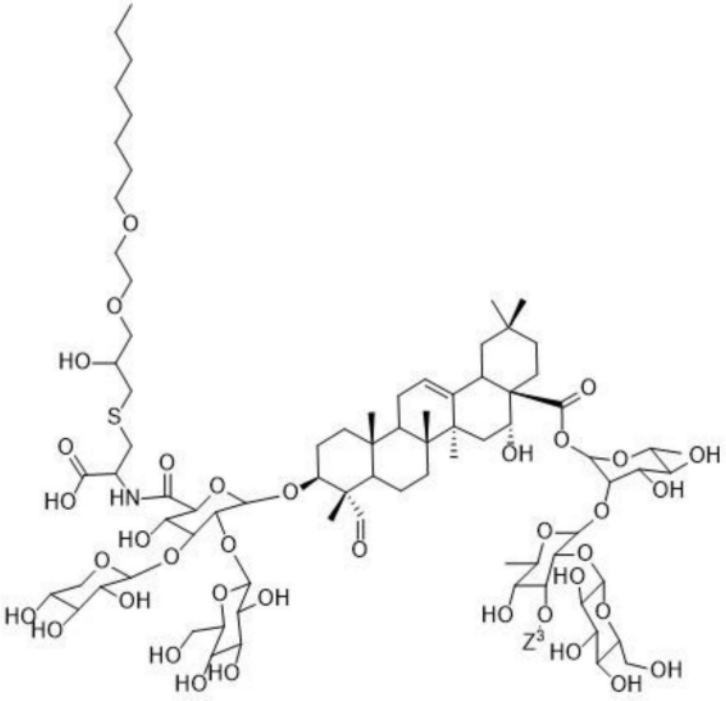
(XXV)	 其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； L-2,4-二氨基丁酸二肉豆蔻酰基皂树脱酰基皂苷
(XXVI)	

	其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； L-2,4-二氨基丁酸二肉豆蔻酰基皂树脱酰基皂苷
(XXVII)	 其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 柠檬酸-三棕榈酰基皂树脱酰基皂苷
(XXVIIII)	 其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 脱氧胆酸皂树脱酰基皂苷

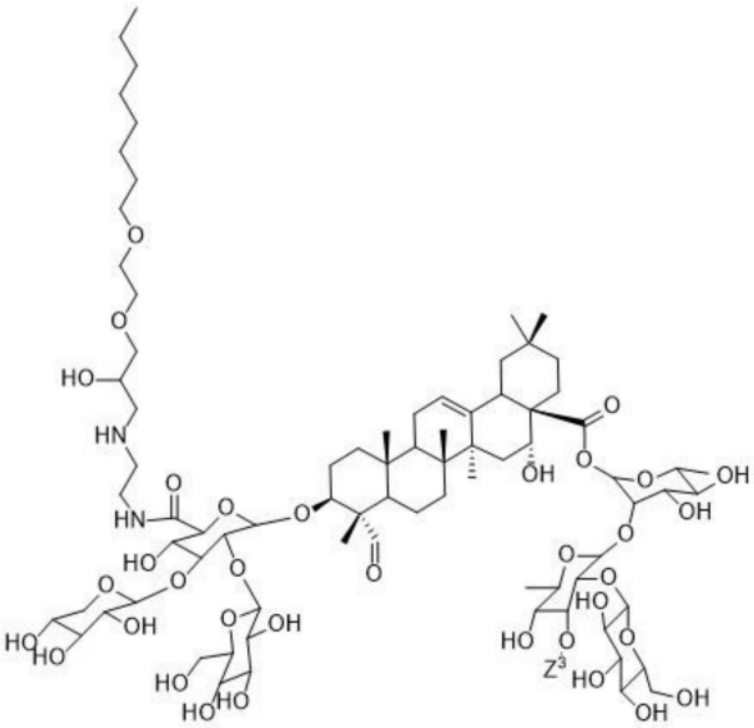
[0231]

[0232]

(XXIX)	 其中 n = 1-5，并且 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 生物素皂树脱酰基皂苷
(XXX)	 其中 n = 1 或 2，并且 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 脂肪酸二胺皂树脱酰基皂苷
(XXXI)	 其中 n = 1 或 2，并且 Z^3 是氢或 β-葡萄糖；

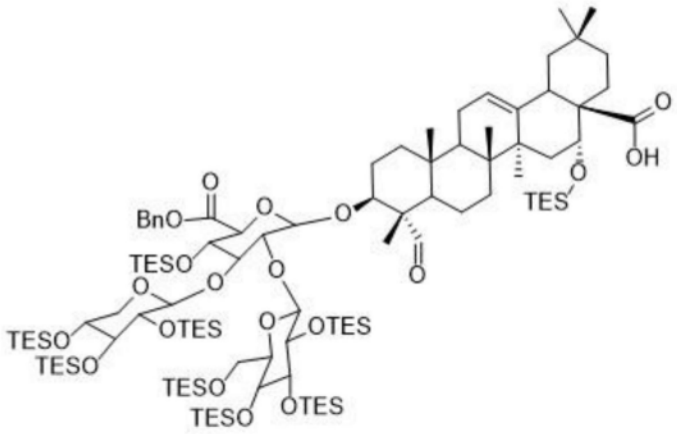
	视黄醛二胺皂树脱酰基皂苷
(XXXII)	
[0233]	其中 n = 1-5，并且 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 葡糖胺-蓖麻油酸皂树脱酰基皂苷
(XXXIII)	

[0234]

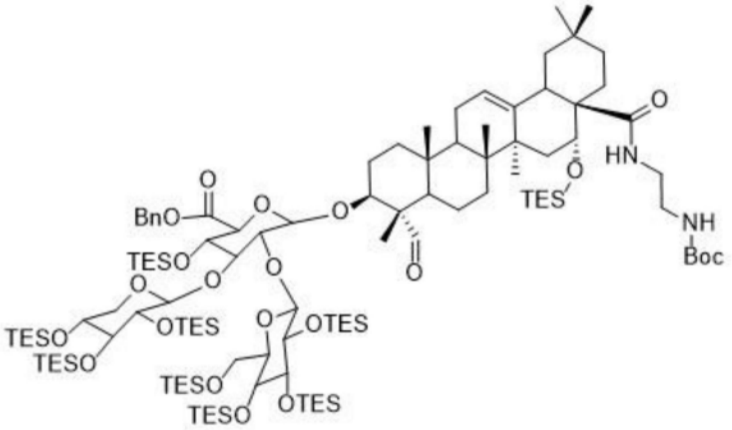
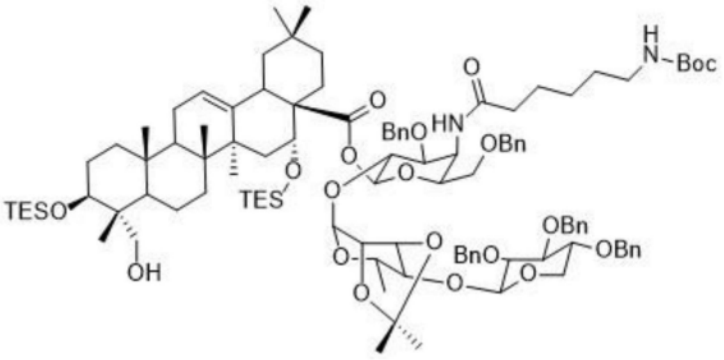
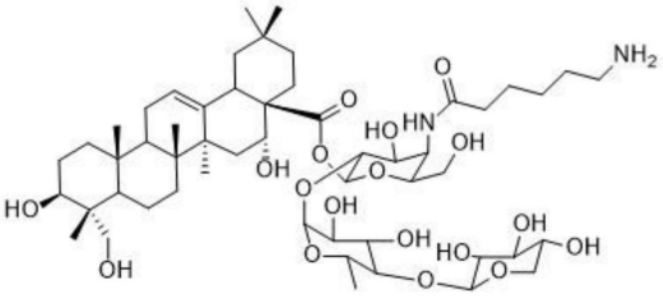
	其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 正辛基-单氧乙烯半胱氨酸皂树脱酰基皂苷
(XXXIV)	 其中 Z^3 是氢或 β-葡萄糖； 正辛基-单乙烯乙二胺皂树脱酰基皂苷

[0235] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物，条件是该皂苷衍生物不是以下具有式(XXXV)-(XXXIX)的合成皂苷中的任一种：

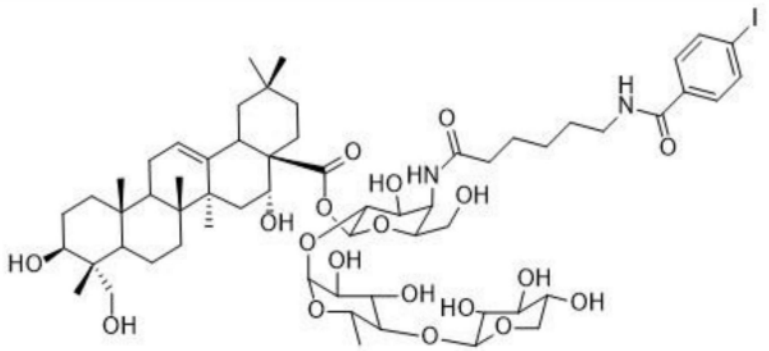
[0236]

(XXXV)	

[0237]

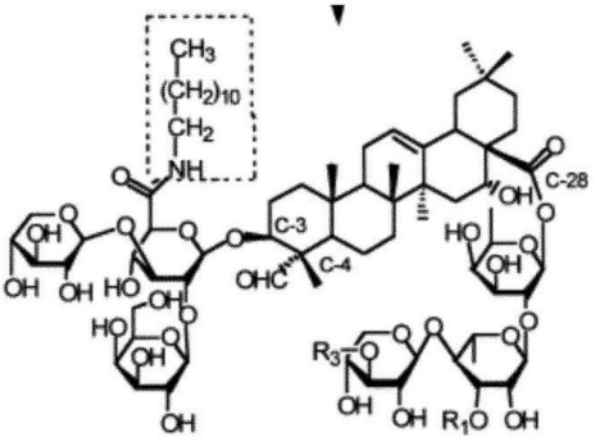
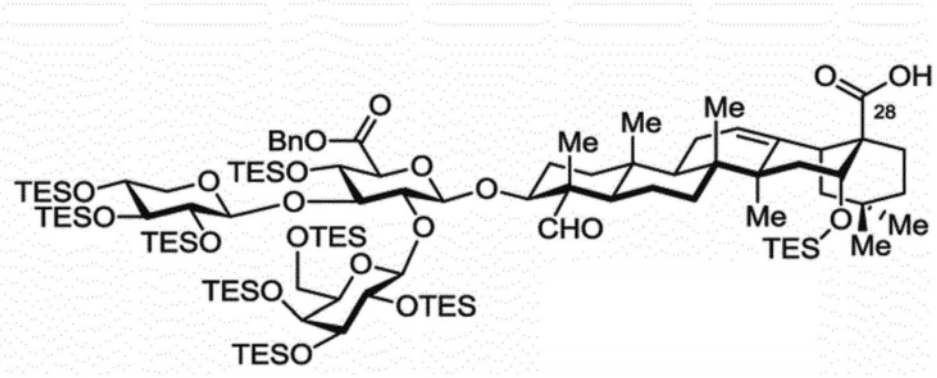
	Bn = 苄基，并且 TES = 三乙基甲硅烷基； 受保护的 QS-7-Api
(XXXVI)	 Bn = 苄基，并且 TES = 三乙基甲硅烷基； 受保护的氨酰基原皂苷元
(XXXVII)	 Bn = 苄基，并且 TES = 三乙基甲硅烷基； 受保护的氨酰基葳岩仙皂苷元皂苷
(XXXVIII)	 氨酰基葳岩仙皂苷元皂苷

[0238]

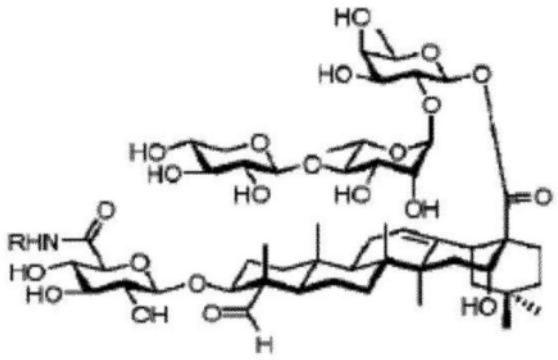
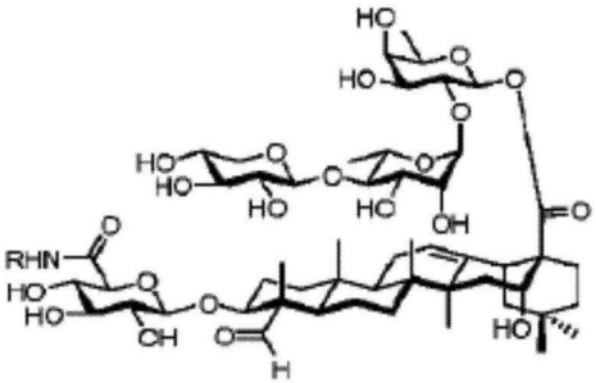
(XXXIX)	 SQS-1-11-5-18

[0239] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物,条件是该皂苷衍生物不是以下具有式(XL)-(XLV)的合成皂苷中的任一种:

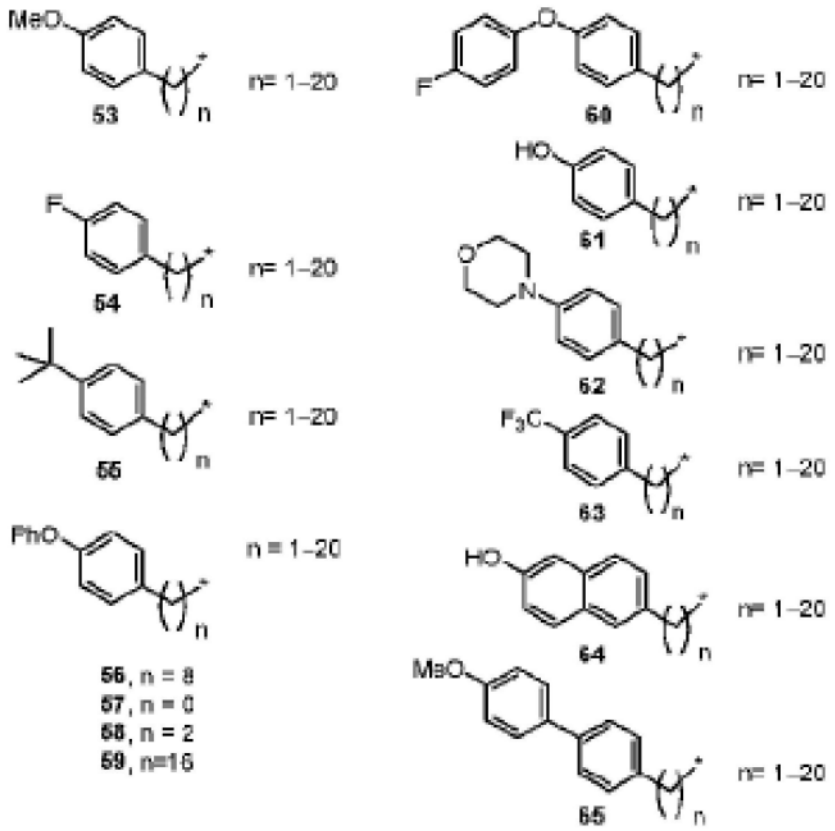
[0240]

(XL)	 GPI-0100 其中 R_3 是芹菜糖或木糖; 脱酰化皂树皂苷
(XLI)	

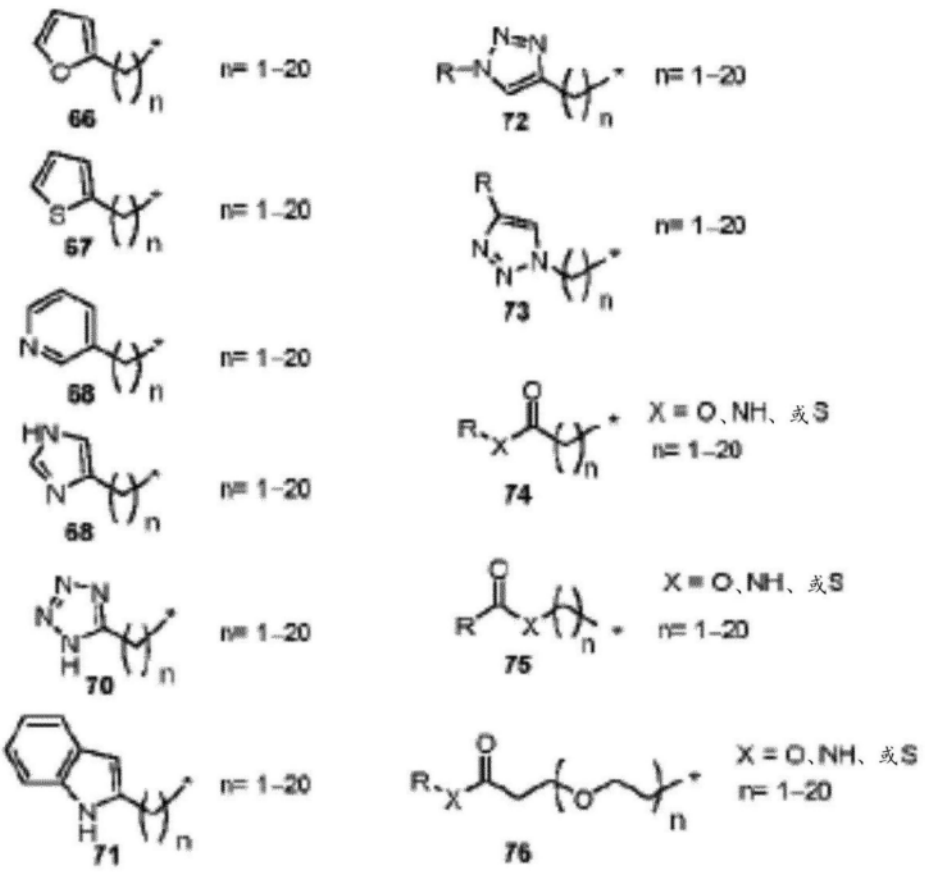
[0241]

	其中 Bn = 苯基；TES 是三乙基甲硅烷基。
(XLII)	 其中 R 是烷基，如十二烷基、甲基、己基、十八烷基、乙基、丙基或戊基。
(XLIII)	 其中 R 是以下中的任一个：

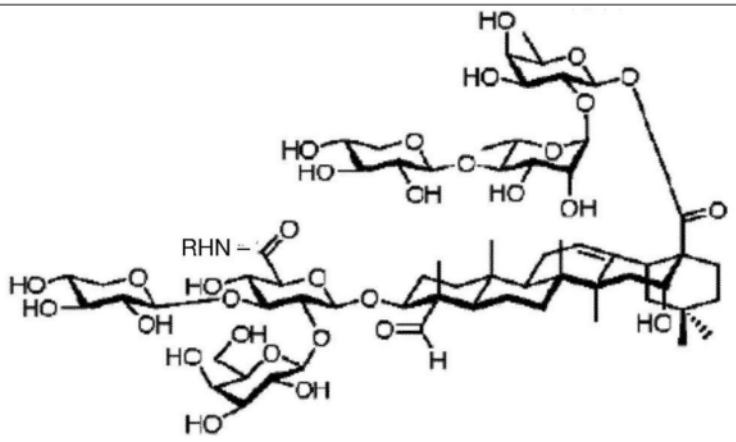
[0242]


MeO
53
n= 1–20
F
54
n= 1–20
55
n= 1–20
PhO
n = 1–20
56, n = 8
57, n = 0
58, n = 2
59, n=16
O
F
60
n= 1–20
HO
61
n= 1–20
O
N
62
n= 1–20
F3C
63
n= 1–20
HO
64
n= 1–20
MeO
65
n= 1–20

[0243]



(XLIV)

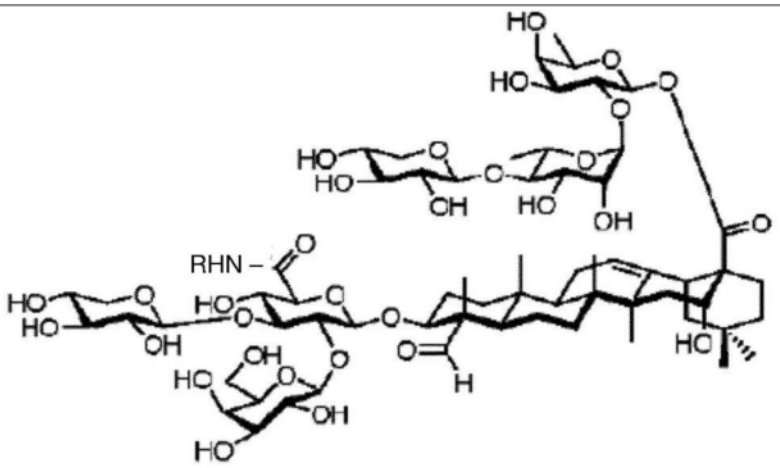


衍生自 Quil A

其中 R 是烷基，如十二烷基、甲基、己基、十八烷基、乙基、丙基或戊基。

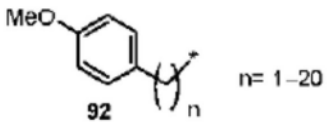
[0244]

(XLV)

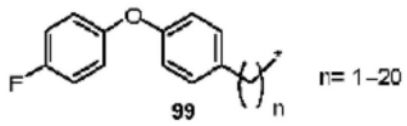


衍生自 Quil A；

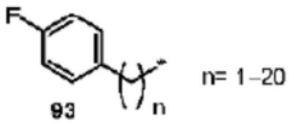
其中 R 是以下中的任一个：



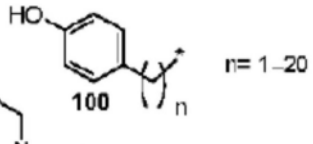
92 n= 1-20



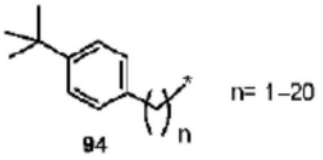
99 n= 1-20



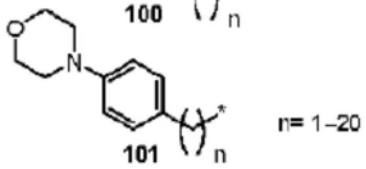
93 n= 1-20



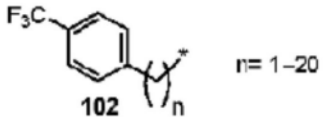
100 n= 1-20



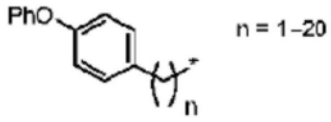
94 n= 1-20



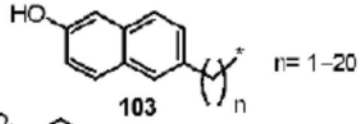
101 n= 1-20



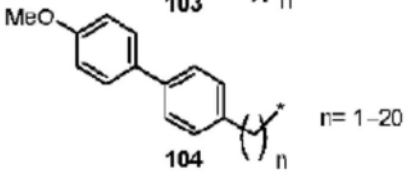
102 n= 1-20



95, n = 8
96, n = 0
97, n = 2
98, n=16 n = 1-20

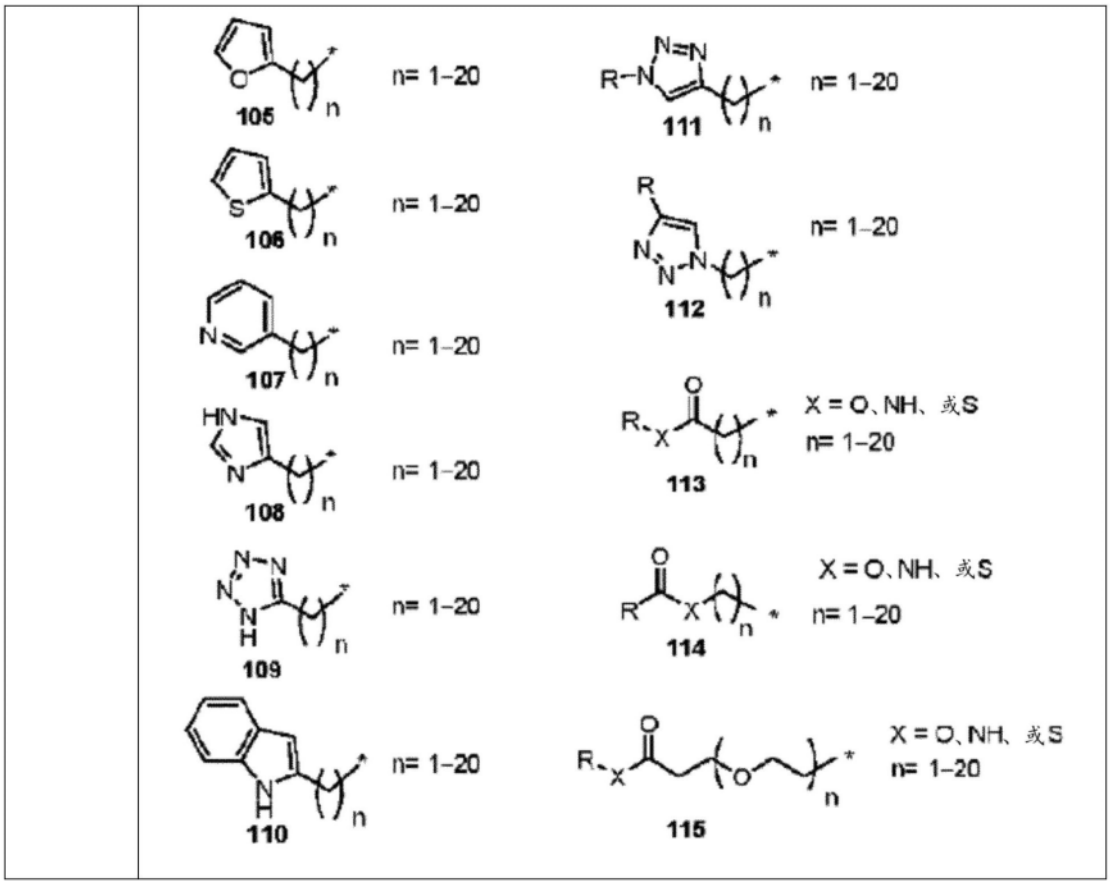


103 n= 1-20



104 n= 1-20

[0245]



[0246] 一个优选实施例是根据本发明的皂苷衍生物，条件是该皂苷衍生物是肥皂草皂树皂苷的衍生物。

[0247] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物，其中该皂苷衍生物是单糖链三萜糖苷或双糖链三萜糖苷，更优选地双糖链三萜糖苷。

[0248] 一个优选实施例是根据本发明的皂苷衍生物，其中该皂苷衍生物是属于12,13-脱氢齐墩果烷类型的三萜类皂苷和/或双糖链三萜皂苷的衍生物(该12,13-脱氢齐墩果烷在C-23位具有醛官能团，并且任选地在皂苷的C-3β-OH基团的碳水化合物取代基中包含葡糖醛酸官能团)和/或从肥皂草皂树物种中分离的皂苷的衍生物。

[0249] 一个优选实施例是根据本发明的皂苷衍生物，其中该皂苷属于12,13-脱氢齐墩果烷类型。

[0250] 令人惊讶的是，对皂苷苷元的C-23处的醛基和苷元C-3处的糖部分(即葡糖醛酸部分)中的羧基基团中的任何一个或两个的修饰(衍生化)导致细胞毒性降低(当此类皂苷衍生物与细胞(即不同类型的细胞)接触时)。对于表A2、表A3、表A12和图1-14和36-40及66-70中列出的一系列不同的皂苷衍生物，诸位发明人已经确定了细胞毒性的降低。因此，本发明的一部分是提供具有降低的细胞毒性的这些系列的皂苷衍生物，其中细胞毒性的降低是相对于未修饰的天然存在的皂苷对应物所测定的细胞毒性而言的。皂苷衍生物可以由此类天然存在的皂苷形成。典型地，当与自然界中存在的天然存在的对应物如QS-21(亚型)相比时，本发明的皂苷衍生物包含一种或两种。当考虑细胞毒性的降低时，提供具有降低的细胞毒性的皂苷时，在如上所概述的皂苷分子的位点上包含一个、两个或三个修饰(衍生化)的皂苷衍生物同等合适。此外，诸位发明人令人惊讶地证实，大量不同的修饰适用于降低细胞

毒性、降低溶血活性，以及保存和保持足够程度的内体逃逸增强活性。当考虑溶血活性时，类似于细胞毒性降低，当皂苷中的一个、两个或三个指定的化学基团衍生化时，溶血活性降低。这些衍生化可以是各种性质的，如表A2、表A3、表A12和图1-14和36-40及66-70中概述的那些衍生化。小到醛基通过还原成羟基基团的衍生化，大到醛基用EMCH的衍生化，与葡糖醛酸的羧基基团用AEM的衍生化的组合均降低了细胞毒性和溶血活性。显而易见的是，为了提供皂苷衍生物(当与天然存在的皂苷对应物相比时，该皂苷衍生物就细胞毒性降低而言具有改善的细胞毒性，且就溶血活性降低而言具有改善的溶血活性)，皂苷中的两个化学基团中的任何一个或多个(如一个或两个)可以通过具有不同大小和/或具有不同化学性质的各种不同化学基团衍生化。

[0251] 不希望受任何理论的约束，假设皂苷苷元的C-233原子处的醛基涉及和/或有助于皂苷的双糖链三萜糖苷型的内体逃逸增强活性，即例如在体外和体内，与在不存在此类皂苷的情况下相同剂量的这种毒素接触相同细胞时的毒性相比，在存在此类皂苷的情况下(蛋白质)毒素与细胞接触时的毒性增加。事实上，诸位发明人确定了在葡糖醛酸单元中具有衍生化羧基基团和在苷元中包含游离醛基的皂苷衍生物具有内体逃逸增强活性。这些衍生物具有降低的溶血活性和降低的细胞毒性。例如，作为分子3A、8、11、18、19和28及31的皂苷衍生物(表A2、表A3、表A5、表A6、表A12、图1、图3、图6、图11、图12、图39、图40C)在苷元核心中具有游离的未修饰的醛基，并且当考虑与表达抗体结合的受体的各种(肿瘤)细胞接触的抗体-药物缀合物的细胞毒性增强时，确实显示出活性。因此，这些皂苷衍生物是本发明明确设想的实施例。

[0252] 令人惊讶的是，当以配体-毒素缀合物(例如ADC)的形式提供给(肿瘤)细胞的效应分子的细胞毒性时，并且前提是C-23处的多糖链中没有基团或羧基基团衍生化时，在苷元中具有衍生化醛基的皂苷衍生物(使得皂苷衍生物不包含游离醛基)仍然显示出特征性的内体逃逸增强活性。例如，在表A2、表A3、表A12和图2、图4、图5、图8、图9、图13、图38和图40中指定为分子6、9、10、14、15、20、27和29的具有修饰的醛基且没有或只有一个进一步衍生化的皂苷衍生物，在苷元中存在具有衍生化醛基的此类皂苷衍生物的情况下，具有增强与肿瘤细胞接触的效应分子的细胞毒性作用的能力。所有这些皂苷衍生物显示出降低的细胞毒性并显示出降低的溶血活性，因此是本发明明确设想的实施例。

[0253] 诸位发明人还发现，与对应的未修饰皂苷相比，某些修饰导致临界胶束浓度(CMC)增加。例如，指定为分子2、6、8、10、15、27和28的皂苷衍生物，优选地指定为分子2、6、8、10和15的皂苷衍生物与它们对应的未衍生化皂苷相比具有增加的CMC，因此是本发明明确设想的实施例。不希望受任何理论的约束，据信由于几个原因，增加的CMC是有利的。例如，增加的CMC可以促进修饰的皂苷在随后的缀合反应中的应用，因为游离分子通常比以胶束结构有序的分子更容易发生缀合反应。此外，在皂苷衍生物需要发挥生物学功能的情况下(例如在体内治疗或离体方法或体外方法中)，例如在皂苷衍生物被如此使用的情况下，或者甚至在它们从载体或另一实体裂解后原位释放的情况下，与未修饰的皂苷相比增加的CMC是有利的，因为与这些皂苷衍生物以胶束结构有序的情况相比，游离皂苷分子将更容易与它们的生物学靶标相互作用。增加的CMC也可用于促进皂苷衍生物的大规模生产和浓缩，因为在超过(高于)临界胶束浓度的浓度下，皂苷形成阻碍分离的胶束(例如使用制备型HPLC)。令人惊讶的是，对于根据本发明的皂苷衍生物，观察到的增加的CMC与增加的细胞毒性或溶血

活性无关。CMC与细胞毒性之间的关系是不可预测且复杂的，例如可以从de Groot等人(“Saponin interactions with model membrane systems-Langmuir monolayer studies,hemolysis and formation of ISCOMs[皂苷与模型膜系统的相互作用-Langmuir单层研究、溶血和ISCOM的形成]”,Planta medica[药用植物]82.18(2016):1496-1512.)的表2中的数据中看出，该数据表明，以α-常春藤皂苷为参考点，CMC的增加可能与一般细胞毒性的增加有关(如毛地黄皂苷的情况)，但也可能与细胞毒性的降低有关(如甘草甜素(Glycyrrhizin)和常春藤苷(Hederacoside)C的情况)。此外，对于指定为分子2、6、10和15的皂苷衍生物，与对应的游离皂苷相比，增加的CMC还与增加的比率：IC50溶血/IC50活性相关，使得这些皂苷衍生物是本发明的特别优选的实施例。

[0254] 因此，当考虑细胞毒性和/或当考虑溶血活性时，以及当考虑例如毒素的增强和/或与对应的非衍生化皂苷相比增加的CMC时，诸位发明人提供了具有改善的治疗窗的皂苷衍生物。本发明的此类皂苷衍生物特别适合应用于涉及例如ADC或AOC的治疗方案中，用于预防或治疗例如癌症。当考虑细胞毒性和/或溶血活性时，特别是当将此类皂苷衍生物施用于需要例如用ADC或用AOC治疗的患者时，此类皂苷衍生物的安全性得到改善。

[0255] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物，其中该皂苷衍生物包含第一糖链，其中该第一糖链包含已衍生化的羧基基团、优选地葡糖醛酸部分的羧基基团，更优选地，该皂苷衍生物包含已衍生化的所述第一糖链，并且该皂苷衍生物包含含有醛基或已衍生化的醛基的苷元核心结构，最优选地，该皂苷衍生物包含已衍生化的所述第一糖链，并且该皂苷衍生物包含含有醛基的苷元核心结构。同样优选的是这两种衍生化的所有其他可能的组合。此外，皂苷中的化学基团中的一个或两个根据表A2和表A3中列出的衍生化中的任何一种或多种进行衍生化。

[0256] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物，其中该皂苷衍生物包含选自由以下组成的组的苷元核心结构：

[0257] 2α-羟基齐墩果酸；

[0258] 16α-羟基齐墩果酸；

[0259] 常春藤皂苷元(23-羟基齐墩果酸)；

[0260] 16α,23-二羟基齐墩果酸；

[0261] 丝石竹皂苷元；

[0262] 皂皮酸；

[0263] 原七叶皂苷元-21(2-甲基丁-2-烯酸酯)-22-乙酸酯；

[0264] 23-氧代-玉蕊皂苷元C-21,22-双(2-甲基丁-2-烯酸酯)；

[0265] 23-氧代-玉蕊皂苷元C-21(2-甲基丁-2-烯酸酯)-16,22-二乙酸酯；

[0266] 洋地黄皂苷配基；

[0267] 3,16,28-三羟基齐墩果烷-12-烯；

[0268] 丝石竹酸，

[0269] 以及

[0270] 其衍生物，

[0271] 优选地该皂苷衍生物包含苷元核心结构，该苷元核心结构选自皂皮酸和丝石竹皂苷元或其衍生物，更优选地该皂苷衍生物苷元核心结构是皂皮酸或其衍生物。一个实施例

是根据本发明的皂苷衍生物，其中该皂苷衍生物包含选自由以下组成的组的苷元核心结构：

[0272] 2α-羟基齐墩果酸；

[0273] 16α-羟基齐墩果酸；

[0274] 常春藤皂苷元(23-羟基齐墩果酸)；

[0275] 16α,23-二羟基齐墩果酸；

[0276] 丝石竹皂苷元；

[0277] 皂皮酸；

[0278] 原七叶皂苷元-21(2-甲基丁-2-烯酸酯)-22-乙酸酯；

[0279] 23-氧代-玉蕊皂苷元C-21,22-双(2-甲基丁-2-烯酸酯)；

[0280] 23-氧代-玉蕊皂苷元C-21(2-甲基丁-2-烯酸酯)-16,22-二乙酸酯；

[0281] 洋地黄皂苷配基；

[0282] 3,16,28-三羟基齐墩果烷-12-烯；

[0283] 丝石竹酸，

[0284] 优选地该皂苷衍生物包含苷元核心结构皂皮酸。

[0285] 由于诸位发明人现在发现，基于三萜糖苷类型的皂苷，可以提供关于与此类衍生物接触的细胞的细胞毒性降低和溶血降低的改善的皂苷衍生物，基本上可以相应地改善如诸位发明人测试的具有这种内体逃逸增强活性的任何皂苷，如具有前述实施例中并在表A1中列出的苷元的皂苷。当考虑到单独或与例如ADC或AOC组合的皂苷衍生物的治疗窗拓宽，考虑到毒素和例如BNA的增强时，降低毒性并降低溶血活性同时将活性保持到足够高的程度是诸位发明人的重要成就。足够高剂量的衍生化皂苷可应用于例如有需要的癌症患者的肿瘤疗法，而与应用天然皂苷对应物相比，由皂苷衍生物施加或诱导的细胞毒性副作用(风险)和不期望的溶血活性(风险)降低。本发明的皂苷衍生物的治疗窗的改善例如对于表A5和表A6中的示例性皂苷衍生物是明显的：列出了细胞毒性或溶血活性的IC50与内体逃逸增强活性的IC50之间的比率、以及溶血活性、细胞毒性和活性。

[0286] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物，其中该皂苷衍生物包含选自由皂皮酸、丝石竹皂苷元及其衍生物组成的组的苷元核心结构，优选地该皂苷衍生物包含选自由皂皮酸及其衍生物组成的组的苷元核心结构，其中第一糖链，当存在时，与该苷元核心结构的C_3原子(也表示为“C-3”原子)或C_{28}原子(也表示为“C-28”原子)连接，优选地与C_3原子连接，和/或其中第二糖链，当存在时，与该苷元核心结构的C_{28}原子连接。优选的是基于具有与苷元结合的两个糖链的皂苷的那些皂苷衍生物，但通常显示内体逃逸增强活性的任何皂苷都适合于根据本发明的衍生化，目的是提供具有更低的细胞毒性、更低的溶血活性和足够高的内体逃逸增强活性的单、双或三，优选地单或双衍生化皂苷。优选的是皂苷衍生物，其中该皂苷衍生物包含选自由皂皮酸和丝石竹皂苷元组成的组的苷元核心结构，优选地该皂苷衍生物包含苷元核心结构皂皮酸，其中该第一糖链，当存在时，与该苷元核心结构的C_3原子或C_{28}原子连接，优选地与该C_3原子连接，和/或其中该第二糖链，当存在时，与该苷元核心结构的C_{28}原子连接。

[0287] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物，其中第一糖链，如果存在，选自(列表S1)：

[0288] GlcA-、

[0289] Glc-、

[0290] Gal-、

[0291] Rha-(1→2)-Ara-、

[0292] Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-、

[0293] Glc-(1→2)-[Glc-(1→4)]-GlcA-、

[0294] Glc-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-、

[0295] Xyl-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-、

[0296] Glc-(1→3)-Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-Glc-(1→4)-Gal-、

[0297] Rha-(1→2)-Gal-(1→3)-[Glc-(1→2)]-GlcA-、

[0298] Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-、

[0299] Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-、

[0300] Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-、

[0301] Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-、

[0302] Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-、

[0303] Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-、

[0304] Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-、

[0305] Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Gal-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-、

[0306] Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-、

[0307] Xyl-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-、

[0308] Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-、

[0309] Xyl-(1→4)-Fuc-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-、

[0310] Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-、

[0311] Xyl-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-、

[0312] Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-、

[0313] Xyl-(1→4)-Fuc-(1→2)-Gal-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-、及

[0314] 其衍生物，

[0315] 和/或其中第二糖链，如果存在，选自(列表S2)：

[0316] Glc-；

[0317] Gal-；

[0318] Rha-(1→2)-[Xyl-(1→4)]-Rha-；

[0319] Rha-(1→2)-[Ara-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-；

[0320] Ara-；

[0321] Xyl-；

[0322] Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R1-(→4)]-Fuc-，其中R1是4E-甲氧基肉桂酸；

[0323] Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R2-(→4)]-Fuc-，其中R2是4Z-甲氧基肉桂酸；

[0324] Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-；

[0325] Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-3,4-二-OAc-Fuc-；

[0326] Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R3-(→4)]-3-OAc-Fuc-，其中R3是4E-

甲氧基肉桂酸；

[0327] Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-；

[0328] Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-；

[0329] (Ara-或Xyl-)(1→3)-(Ara-或Xyl-)(1→4)-(Rha-或Fuc-)(1→2)-[4-OAc-(Rha-或Fuc-)(1→4)]-(Rha-或Fuc-)；

[0330] Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-；

[0331] Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-；

[0332] Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-；

[0333] Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-；

[0334] Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→4)-[Glc/Gal-(1→2)]-Fuc-；

[0335] Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R4-(→4)]-Fuc-,其中R4是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸)；

[0336] Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R5-(→4)]-Fuc-,其中R5是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸)；

[0337] Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-；

[0338] Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-；

[0339] 6-OAc-Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-；

[0340] Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc--Rha-(1→3)]-Fuc-；

[0341] Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-；

[0342] Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-；

[0343] Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-；

[0344] Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3,4-二-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-；

[0345] Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-；

[0346] 6-OAc-Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-；

[0347] Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-；

[0348] Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-；

[0349] Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-；

[0350] Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-；

[0351] Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R6-(→4)]-Fuc-,其中R6是5-O-[5-O-Rha-(1→2)-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸)；

[0352] Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R7-(→4)]-Fuc-,其中R7是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸)；

[0353] Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R8-(→4)]-Fuc-,其中R8是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸)；

[0354] Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R9-(→4)]-Fuc-,其中R9是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸)；

[0355] Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R10-(→4)]-Fuc-,其中R10是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸);

[0356] Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R11-(→3)]-Fuc-,其中R11是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸);

[0357] Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R12-(→3)]-Fuc-,其中R12是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸);

[0358] Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal-;及

[0359] 其衍生物。

[0360] 优选地,该第一糖链是Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-,并且该第二糖链是以下中的任一种(列表S3):

[0361] Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-;

[0362] Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-;

[0363] Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R6-(→4)]-Fuc-,其中R6是5-O-[5-O-Rha-(1→2)-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸);

[0364] Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R7-(→4)]-Fuc-,其中R7是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸);

[0365] Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R8-(→4)]-Fuc-,其中R8是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸);

[0366] Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R9-(→4)]-Fuc-,其中R9是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸);

[0367] Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R10-(→4)]-Fuc-,其中R10是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸);

[0368] Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R11-(→3)]-Fuc-,其中R11是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸);

[0369] Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R12-(→3)]-Fuc-,其中R12是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸)。此类糖链典型地是QS皂苷QS-7、QS-17、QS-18和QS-21的一部分。

[0370] 典型地,当细胞与皂苷和毒素接触时,增强毒素细胞毒性的皂苷具有与苷元结合的此类单糖链或多糖链中的一条或两条。优选的是那些选择用于衍生化的包含两条糖链的皂苷。表A1提供了特别优选的皂苷的概述,用于使此类皂苷经受单、双或三衍生化,优选地单或双衍生化,同时内体逃逸增强活性应保持到足够高的程度。当然,此类皂苷的结构变体同样适用于根据本发明的衍生化,前提是此类皂苷对例如毒素、BNA等表现出内体逃逸增强活性。

[0371] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物,其中该皂苷衍生物包含第一糖链并且包含第二糖链,其中该第一糖链包含多于一个糖部分,并且该第二糖链包含多于一个糖部分,并且其中苷元核心结构是皂皮酸或丝石竹皂苷元,其中以下中的一种或两种,优选地一种:

[0372] i.该苷元核心结构中的醛基已衍生化,以及

[0373] ii.该第一糖链包含葡糖醛酸部分的羧基基团,该羧基基团已衍生化。

[0374] 在实施例中,根据本发明的皂苷衍生物包含第一糖链并且包含第二糖链,其中该第一糖链包含多于一个糖部分,并且该第二糖链包含多于一个糖部分,并且其中苷元核心结构是皂皮酸,其中以下中的一种:

[0375] i.该苷元核心结构中的醛基已衍生化;以及

[0376] ii.该第一糖链包含葡糖醛酸部分的羧基基团,该羧基基团已衍生化。

[0377] 在特定的实施例中,根据本发明的皂苷衍生物包含第一糖链并且包含第二糖链,其中该第一糖链包含多于一个糖部分,并且该第二糖链包含多于一个糖部分,并且其中苷元核心结构是皂皮酸,其中:

[0378] i.该苷元核心结构中的醛基已衍生化,并且

[0379] ii.该第一糖链包含葡糖醛酸部分的羧基基团,该羧基基团未衍生化。

[0380] 在特定的实施例中,根据本发明的皂苷衍生物包含第一糖链并且包含第二糖链,其中该第一糖链包含多于一个糖部分,并且该第二糖链包含多于一个糖部分,并且其中苷元核心结构是皂皮酸或丝石竹皂苷元,其中:

[0381] i.该苷元核心结构中的醛基未衍生化,并且

[0382] ii.该第一糖链包含葡糖醛酸部分的羧基基团,该羧基基团已衍生化。

[0383] 以下总结说明了适当的衍生化:

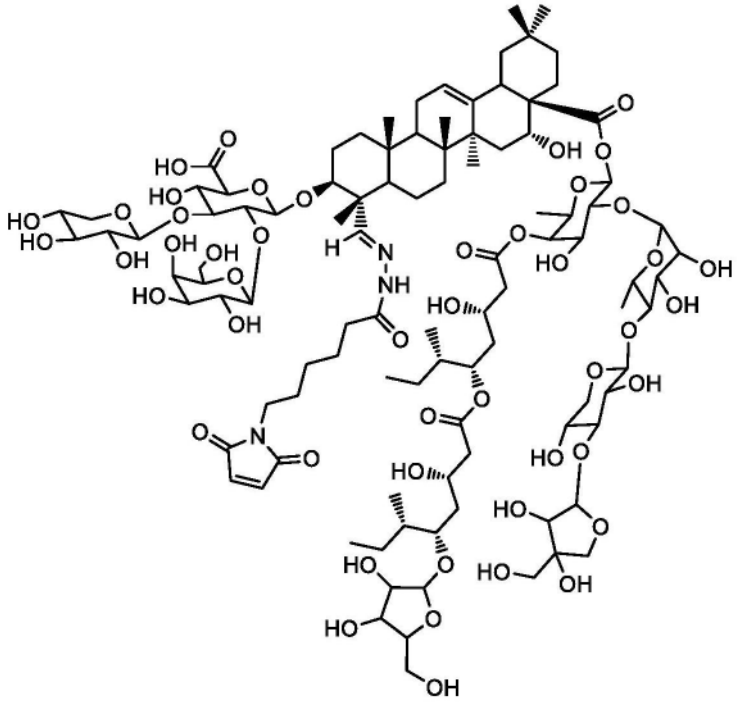
[0384]

官能团	衍生化
醛(化学选择性的、可逆的)	- 与酰肼形成腙 - 与胺形成亚胺 - 与羟胺形成化学选择性可逆肟
羧酸 (化学选择性的)	- 与胺形成酰胺或与醇形成酯(活化后)

[0385] 根据本发明,皂苷可以包含三种衍生化,并且仍然显示足够高的内体逃逸增强活性。特别是当细胞毒性和/或溶血活性的降低大于增强细胞内效应分子(如与效应分子和衍生化皂苷接触的肿瘤细胞中的毒素或BNA)的作用和活性的能力的(潜在或表观)降低时。因此,当考虑苷元的醛基时,当考虑多糖C-3处的葡糖醛酸单元中的羧基基团时(如果存在)时,本发明提供包含单个或两个衍生化的衍生化皂苷。优选地是具有一种或两种修饰的皂苷衍生物。适合于改善效应分子(如毒素或BNA)的内体逃逸的是例如具有游离醛基和在糖链中具有一种或两种衍生化的皂苷衍生物。如前所述,具有衍生化醛基的皂苷衍生物也同样合适。在衍生化时在苷元中没有游离醛基的此类皂苷衍生物仍然显示出足够和有效的内体逃逸增强活性。不希望受任何理论的约束,由于(哺乳动物)细胞(如人细胞)的内体和溶酶体中的酸性条件,在最初与皂苷的醛基结合的部分的pH驱动裂解时,在细胞内可以再次形成醛基,用于在C-23位处为皂苷衍生物提供衍生化苷元。具有可再次在内体或溶酶体中形成的修饰的醛基的皂苷衍生物的实例是包含腙键的皂苷衍生物,该腙键在醛的羰基基团

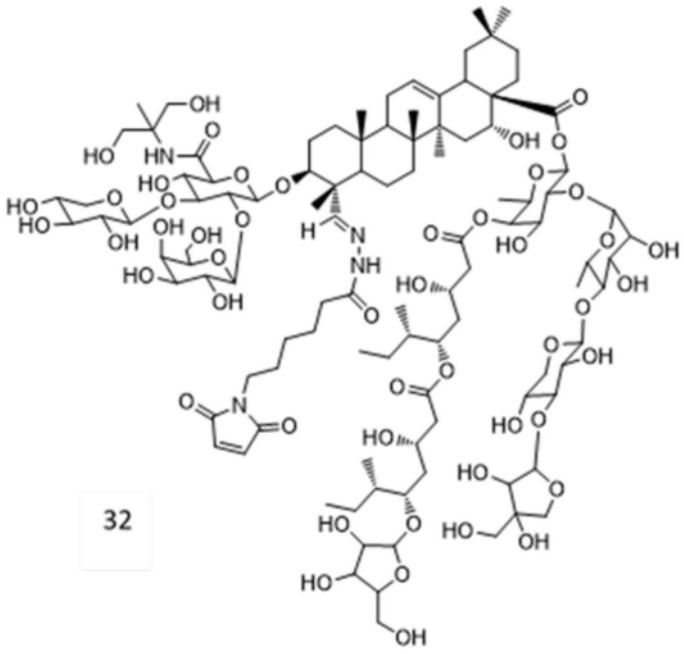
与例如与苷元结合的化学基团中的酰肼部分之间形成，例如与结合到马来酰亚胺基团的巯基乙醇形成硫醚键的N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH)或EMCH。此类皂苷衍生物的实例在图40B和图40D中提供，并且在下文显示为分子30和分子32：

[0386] (30)



，

[0387]



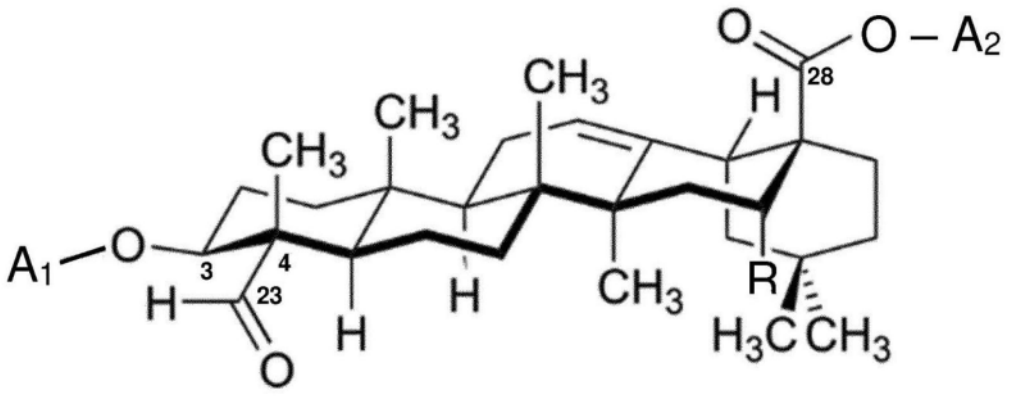
32

。

[0388] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物，其中该皂苷衍生物是选自由以下组成的皂苷组的皂苷的衍生物：皂树树皮皂苷、QS-7、QS1861、QS-7api、QS1862、QS-17、QS-18、QS-21、QS-21A-apio、QS-21A-xylo、QS-21B-apio、QS-21B-xylo，优选地该皂苷衍生物选自由QS-21衍生物组成的组。这些皂苷基本上是如诸位发明人所确定的显示内体逃逸增强活性的皂苷，或在结构上与已确定内体逃逸增强活性的皂苷高度相似的皂苷。表A1总结了这些皂苷的结构概述。

[0389] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物，其中该皂苷衍生物是皂皮酸皂苷或丝石竹皂苷元皂苷的衍生物，该衍生物由分子1表示：

[0390]



（分子 1）

[0391] 其中

[0392] 该第一糖链A_1代表氢、单糖、或线性或支链寡糖，优选地A_1代表如上文针对本发明的某些实施例所定义的糖链(列表S1)，更优选地A_1代表如上文针对本发明的某些实施例所定义的糖链(列表S1)，并且A_1包含葡糖醛酸部分或由其组成；

[0393] 该第二糖链A_2代表氢、单糖、或线性或支链寡糖，优选地A_2代表如上文针对本发明的某些实施例所定义的糖链(列表S2)，其中A_1和A_2中的至少一个不是氢，优选地A_1和A_2均为寡糖链；

[0394] 并且R是丝石竹皂苷元中的氢或皂皮酸中的羟基；

[0395] 其中该皂苷衍生物对应于由分子1表示的该皂苷，其中存在以下衍生化中的至少一种：

[0396] i.该皂皮酸或丝石竹皂苷元的C_{23}位处的醛基已衍生化；以及

[0397] ii.当A_1代表如上文针对本发明的某些实施例所定义的糖链(列表S1)并且A_1包含葡糖醛酸部分或由其组成时，A_1的葡糖醛酸部分的羧基基团已衍生化。

[0398] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物，其中A_1代表如上文针对本发明的某些实施例所定义的糖链(列表S1)并且包含葡糖醛酸部分或由其组成，并且其中A_1的葡糖醛酸部分的羧基基团已衍生化，和/或其中A_2代表如上文针对本发明的某些实施例所定义的糖链(列表S2)。

[0399] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物，其中A_1代表糖链Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-并且包含葡糖醛酸部分或由其组成，并且其中A_1的葡糖醛酸部分的羧基基团已衍生化，和/或其中A_2代表如上文针对本发明的某些实施例所定义的糖链(列表S3)。一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物，其中由分子1表示的皂苷是双糖链三萜皂苷。

[0400] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物，其中该皂苷衍生物对应于由分子1表示的皂苷，其中存在以下衍生化中的至少一种，优选地存在以下衍生化中的一种或两种，更优选地一种：

[0401] i.皂皮酸或丝石竹皂苷元的C_{23}位处的醛基已通过以下衍生化：

[0402] -还原成醇；或

[0403] -优选地通过与酰肼反应转化成腙键；以及

[0404] ii.当A_1代表如上文针对本发明的某些实施例所定义的糖链(列表S1,优选地Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-)并且A_1包含葡糖醛酸部分或由其组成时,A_1的葡糖醛酸部分的羧基基团已通过转化成酰胺键,优选地通过与胺反应而衍生化。

[0405] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物,其中该皂苷衍生物对应于由分子1表示的皂苷,其中存在以下衍生化中的至少一种,优选地存在以下衍生化中的一种或两种,更优选地一种:

[0406] i.皂皮酸或丝石竹皂苷元的C_{23}位处的醛基已通过以下衍生化:

[0407] -还原成醇;或

[0408] -通过与N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH)反应转化成腙键,由此提供皂苷-Ald-EMCH,如QS-21-Ald-EMC,其中该EMCH的马来酰亚胺基团任选地通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化;或

[0409] -通过与N-[β-马来酰亚胺基丙酸]酰肼(BMPH)反应转化成腙键,其中该BMPH的马来酰亚胺基团任选地通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化;或

[0410] -通过与N-[κ-马来酰亚胺基十一酸]酰肼(KMUH)反应转化成腙键,其中该KMUH的马来酰亚胺基团任选地通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化;以及

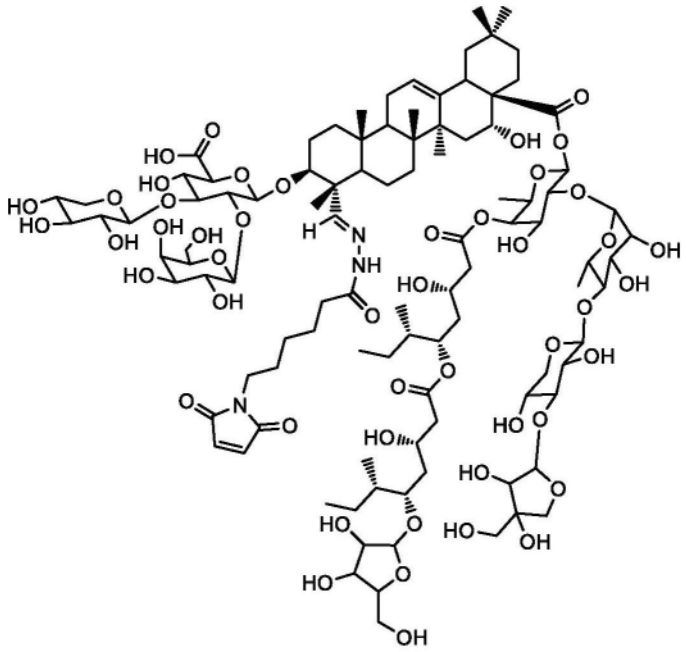
[0411] ii.当A_1代表如上文针对本发明的某些实施例所定义的糖链(列表S1)并且A_1包含葡糖醛酸部分或由其组成时,A_1的葡糖醛酸部分的羧基基团已通过以下衍生化:通过与2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇(AMPD)或N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺(AEM)反应转化成酰胺键,由此提供皂苷-Glu-AMPD,如QS-21-Glu-AMPD,或皂苷-Glu-AEM,如QS-21-Glu-AEM。

[0412] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物,其中A_1是Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA,和/或A_2是Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc,更优选地由分子1表示的皂苷是QS-21衍生物,其中A_1是Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA,和/或A_2是Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc。

[0413] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物,其中该皂苷衍生物选自由以下的衍生物组成的组:QS-21、QS-21A、QS-21A-api、QS-21A-xyl、QS-21B、QS-21B-api、QS-21B-xyl、QS-7-xyl、QS-7-api、QS-17-api、QS-17-xyl、QS1861、QS1862、皂树皂苷、QS-18、Quil-A、其立体异构体及其组合,优选地该皂苷衍生物选自由QS-21衍生物组成的组。

[0414] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物,其中该皂苷衍生物是包含单一衍生化的QS-21衍生物,其中该单一衍生化是通过如将1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐(HATU)与QS-21的葡糖醛酸部分的羧基基团结合或通过将(苯并三唑-1-基氧基)三(二甲基氨基)鏻六氟磷酸盐(BOP)与QS-21的葡糖醛酸部分的羧基基团结合来转化QS-21的葡糖醛酸部分的羧基基团,或其中该皂苷衍生物是由分子30表示的QS-21衍生物,该QS-21衍生物代表包含该皂皮酸苷元核心结构的指定的C_{23}位处的醛基的QS-21衍生物,该醛基已通过与N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH)反应转化成腙键而衍生化:

[0415] (30)

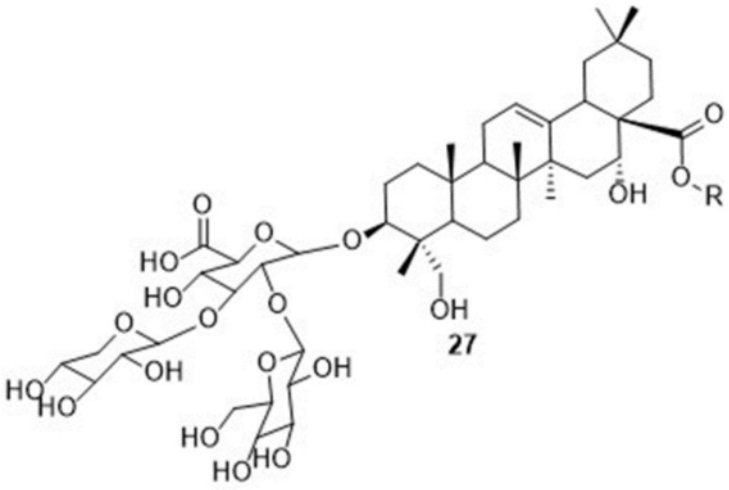


,

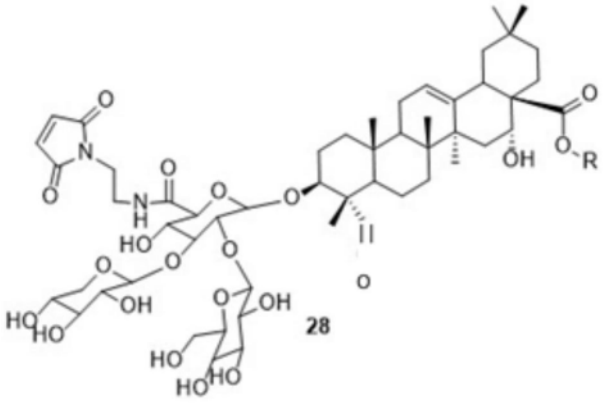
[0416] 或其中该皂苷衍生物是QS-21衍生物，该QS-21衍生物包含该皂皮酸苷元核心结构的指定的C_{23}位处的醛基，该醛基已通过与N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH)反应转化成腙键而衍生化，其中用巯基乙醇衍生化该EMCH的马来酰亚胺基团，由此形成硫醚键，

[0417] 或者，其中该皂苷衍生物是QS-21衍生物，其中该皂苷衍生物具有根据以下之一的式：

[0418]

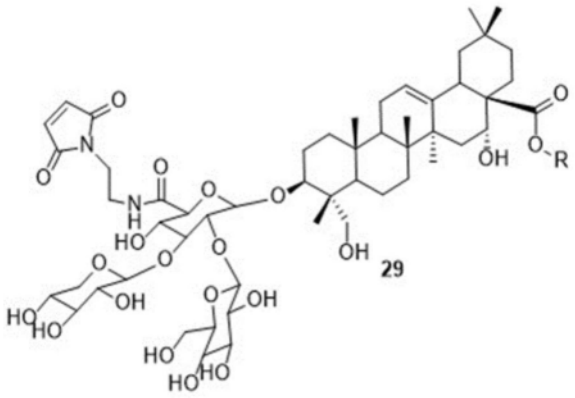


、



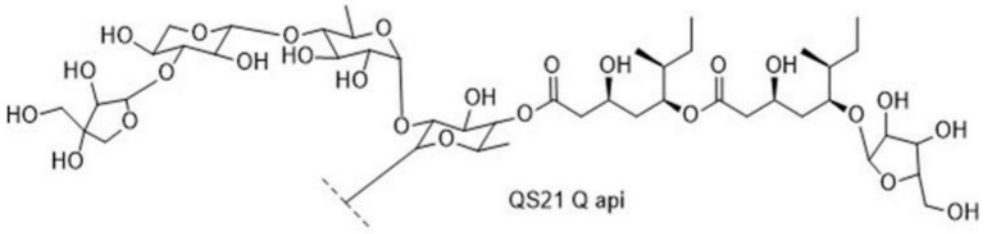
28

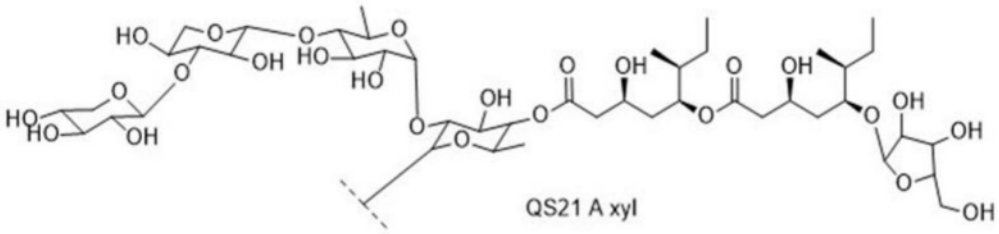
[0419]



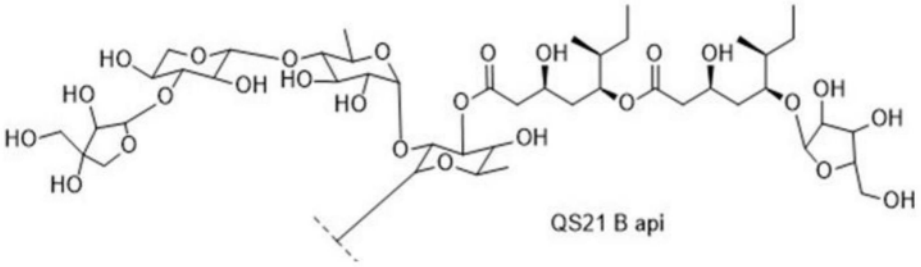
29

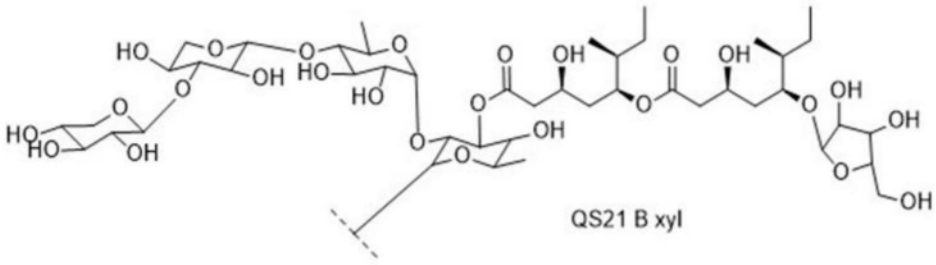
[0420] 其中根据下式,将R定义为Q api、A xyl、B api和B xyl中的任一个：



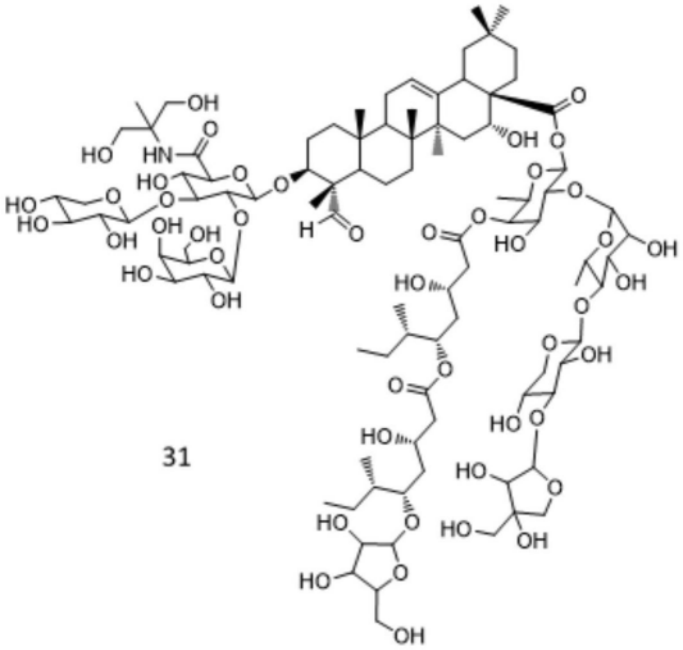


[0421]



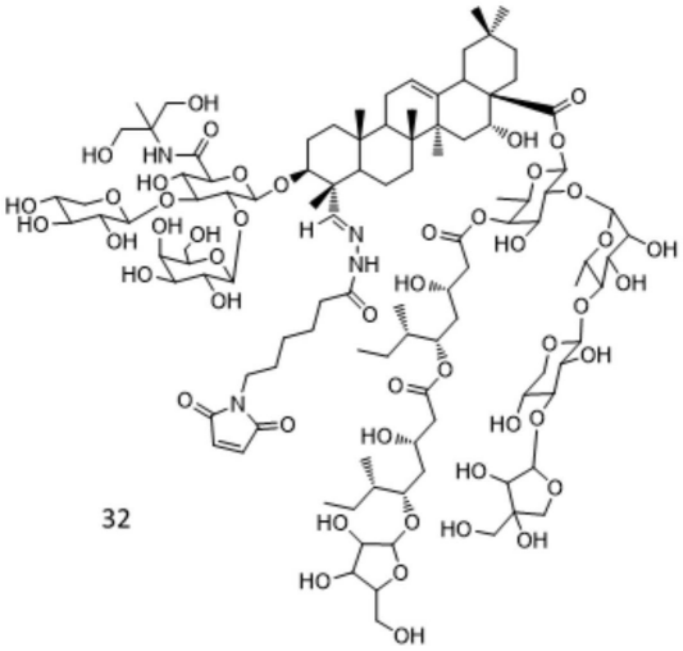


[0422] 或者该皂苷衍生物具有根据以下之一的式：

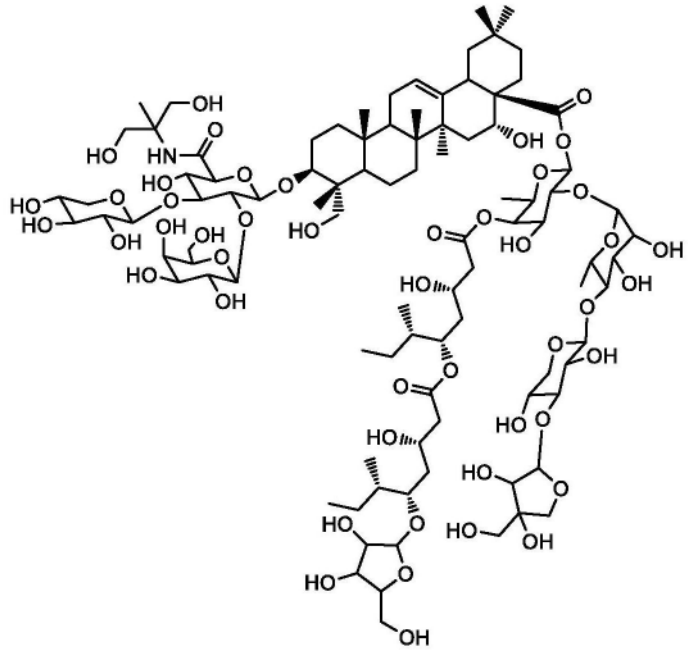


31

[0423]



32

[0424] 

(33)。

[0425] 由分子30表示的皂苷适合用作用于与包含游离巯基基团的另一分子发生缀合反应的前体。显示为分子30的皂苷衍生物的马来酰亚胺基团可以与这种游离巯基基团形成硫醚键。例如,分子30的皂苷衍生物可以与包含游离巯基基团的肽或蛋白质(如具有游离巯基基团的半胱氨酸)共价偶联。这种蛋白质例如是抗体或其结合片段或结合结构域,如Fab、scFv、单结构域抗体,如V_{HH},例如骆驼科V_H。当抗体(或其结合结构域或片段)是用于与靶细胞表面分子如受体(例如存在于肿瘤细胞上)特异性结合的抗体时,分子2的皂苷衍生物在与例如包含游离巯基基团的抗体的偶联反应中的应用提供了用于将皂苷靶向递送至细胞和细胞内的缀合物。优选地,皂苷衍生物与能够与肿瘤细胞特异性表面分子如受体(例如HER2、EGFR、CD71)结合的抗体或V_{HH}偶联。

[0426] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物,其中

[0427] i.该皂苷衍生物包含苷元核心结构,其中该苷元核心结构包含已通过以下衍生化的醛基:

[0428] -还原成醇;或

[0429] -通过与N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH)反应转化成腙键,其中该EMCH的马来酰亚胺基团任选地通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化;或

[0430] -通过与N-[β-马来酰亚胺基丙酸]酰肼(BMPH)反应转化成腙键,其中该BMPH的马来酰亚胺基团任选地通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化;或

[0431] -通过与N-[κ-马来酰亚胺基十一酸]酰肼(KMUH)反应转化成腙键,其中该KMUH的马来酰亚胺基团任选地通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化;或

[0432] ii.该第一糖链包含羧基基团、优选地葡糖醛酸部分的羧基基团,该羧基基团已通过与2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇(AMPD)或N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺(AEM)反应转化成酰胺键而衍生化;或

[0433] iii.该皂苷衍生物包含两种衍生化i.和ii.的任何组合;

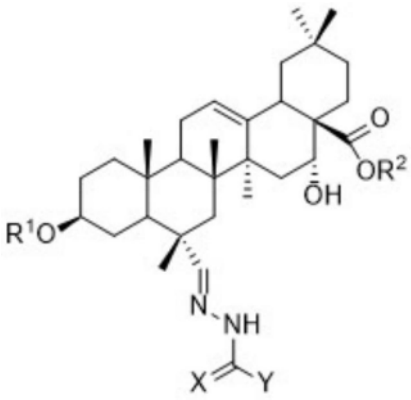
[0434] 优选地，该皂苷衍生物包含苷元核心结构，其中该苷元核心结构包含已通过与EMCH反应转化成腙键而衍生化的醛基，其中该EMCH的马来酰亚胺基团任选地通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化。

[0435] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物，其中该皂苷衍生物包含苷元核心结构，其中该苷元核心结构包含醛基，并且其中该第一糖链包含羧基基团、优选地葡糖醛酸部分的羧基基团，该羧基基团已通过与N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺(AEM)反应转化成酰胺键而衍生化。

[0436] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物，条件是当该苷元核心结构中的醛基通过与N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH)反应转化成腙键而衍生化并且该皂苷是QS-21时，该葡糖醛酸也衍生化，并且条件是当该皂苷是QS-21并且QS-21的葡糖醛酸部分的羧基基团通过1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐(HATU)与QS-21的葡糖醛酸部分的羧基基团的反应而衍生化时，该醛基和该乙酰氧基基团(Me(CO)O-)也被修饰。

[0437] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物，条件是当该皂苷衍生物的苷元核心结构中的醛基通过与EMCH反应而衍生化并且该皂苷是QS-21时，该葡糖醛酸也衍生化，并且条件是当该皂苷是QS-21并且QS-21的葡糖醛酸部分的羧基基团通过结合HATU而衍生化时，该醛基也衍生化。

[0438] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物，其中该皂苷衍生物根据式(a)：

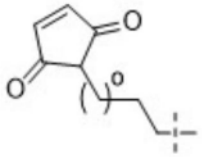
[0439] 

(a)

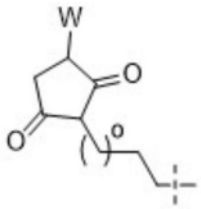
[0440] 其中R^1和R^2独立地选自氢、单糖、线性寡糖和支链寡糖，优选地R^1是如本发明所定义的第一糖链，并且R^2是如本发明所定义的第二糖链，

[0441] 其中X＝O、P或S，优选地O；以及

[0442] 其中Y＝代表H，未取代的C_1-C_{10}直链、支链或环状烷基，未取代的C_2-C_{10}直链、支链或环状烯基或未取代的C_2-C_{10}直链或支链炔基或根据式(b)或式(c)的马来酰亚胺部分，优选地根据式(b)或式(c)的马来酰亚胺部分，

[0443] 

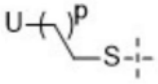
(b)



(c)

[0444] 其中o是选自0-10,优选地2-7,更优选地4-6的整数,并且

[0445] W是根据式(d)的硫醇官能团

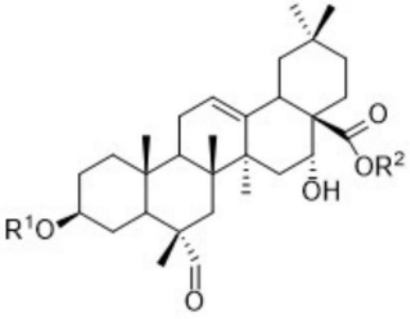
[0446] 

(d)

[0447] 其中U＝SH、NH_2或OH,优选地OH,并且

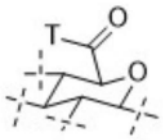
[0448] p是选自0-4,优选地1-3,更优选地1或2的整数。

[0449] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物,其中该皂苷衍生物根据式(e):

[0450] 

(e)

[0451] 其中R^1和R^2独立地选自氢、单糖、线性寡糖和支链寡糖,优选地R^1是如本发明所定义的第一糖链,并且R^2是如本发明所定义的第二糖链,并且其中R_1包含根据式(f)的官能化葡糖醛酸部分:

[0452] 

(f)

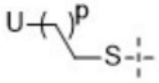
[0453] 其中T＝NR^3R^4,其中R^3和R^4独立地代表H,未取代的C_1-C_{10}直链、支链或环状烷基,未取代的C_2-C_{10}直链、支链或环状烯基或未取代的C_2-C_{10}直链或支链炔基,或根据式(b)或式(c)的马来酰亚胺部分,

[0454] 

(b) (c)

[0455] 其中o是选自0-10,优选地2-7,更优选地4-6的整数,并且

[0456] W是根据式(d)的硫醇官能团

[0457] 

(d)

[0458] 其中U＝SH、NH_2或OH,优选地OH,并且

[0459] p是选自0-4,优选地1-3,更优选地1或2的整数;或

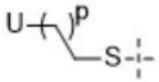
[0460] 其中T＝OR^5,其中R^5独立地代表H,未取代的C_1-C_{10}直链、支链或环状烷基,未取代的C_2-C_{10}直链、支链或环状烯基或未取代的C_2-C_{10}直链或支链炔基,或根据式(b)或式(c)的马来酰亚胺部分,

[0461] 

(b) (c)

[0462] 其中o是选自0-10,优选地2-7,更优选地4-6的整数,并且

[0463] W是根据式(d)的硫醇官能团

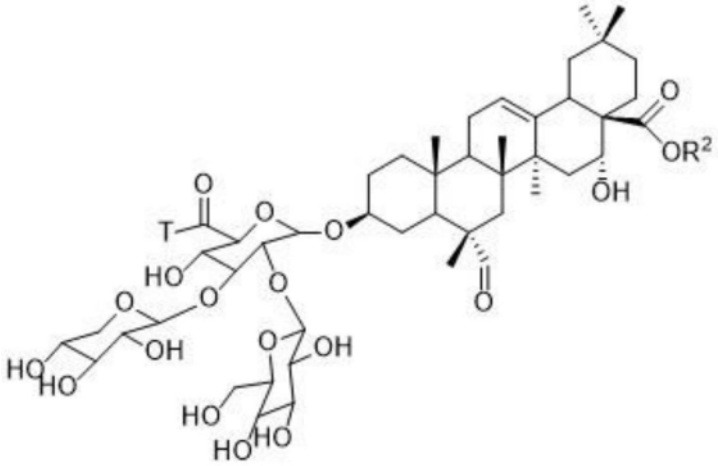
[0464] 

(d)

[0465] 其中U＝SH、NH_2或OH,优选地OH,并且

[0466] p是选自0-4,优选地1-3,更优选地1或2的整数。

[0467] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物,其中该皂苷衍生物根据式(g):

[0468] 

(g)

[0469] 其中R^2独立地选自氢、单糖、线性寡糖和支链寡糖，优选地R^2是如本发明所定义的第二糖链，

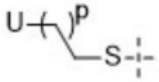
[0470] 其中T＝NR^3R^4，其中R^3和R^4独立地代表H，未取代的C_1-C_{10}直链、支链或环状烷基，未取代的C_2-C_{10}直链、支链或环状烯基或未取代的C_2-C_{10}直链或支链炔基，或根据式(b)或式(c)的马来酰亚胺部分，

[0471] 

(b) (c)

[0472] 其中o是选自0-10，优选地2-7，更优选地4-6的整数，并且

[0473] W是根据式(d)的硫醇官能团

[0474] 

(d)

[0475] 其中U＝SH、NH_2或OH，优选地OH，并且

[0476] p是选自0-4，优选地1-3，更优选地1或2的整数；或

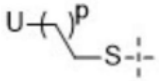
[0477] 其中T＝OR^5，其中R^5独立地代表H，未取代的C_1-C_{10}直链、支链或环状烷基，未取代的C_2-C_{10}直链、支链或环状烯基或未取代的C_2-C_{10}直链或支链炔基，或根据式(b)或式(c)的马来酰亚胺部分，

[0478] 

(b) (c)

[0479] 其中o是选自0-10,优选地2-7,更优选地4-6的整数,并且

[0480] W是根据式(d)的硫醇官能团

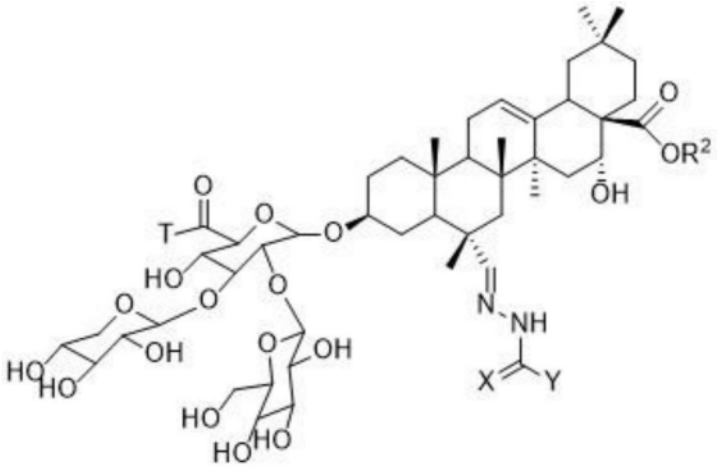
[0481] 

(d)

[0482] 其中U＝SH、NH_2或OH,优选地OH,并且

[0483] p是选自0-4,优选地1-3,更优选地1或2的整数。

[0484] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物,其中该皂苷衍生物根据式(g):

[0485] 

(g)

[0486] 其中R^2独立地选自氢、单糖、线性寡糖和支链寡糖,优选地R^2是如本发明所定义的第二糖链,

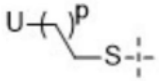
[0487] 其中T＝NR^3R^4,其中R^3和R^4独立地代表H,未取代的C_1-C_{10}直链、支链或环状烷基,未取代的C_2-C_{10}直链、支链或环状烯基或未取代的C_2-C_{10}直链或支链炔基,或根据式(b)或式(c)的马来酰亚胺部分,

[0488] 

(b) (c)

[0489] 其中o是选自0-10,优选地2-7,更优选地4-6的整数,并且

[0490] W是根据式(d)的硫醇官能团

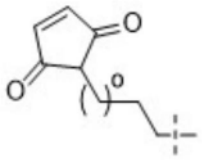
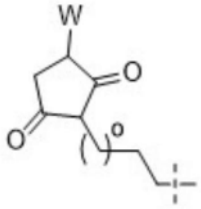
[0491] 

(d)

[0492] 其中U＝SH、NH_2或OH,优选地OH,并且

[0493] p是选自0-4,优选地1-3,更优选地1或2的整数;或

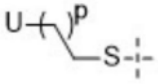
[0494] 其中T＝OR^5，其中R^5独立地代表H，未取代的C_1-C_{10}直链、支链或环状烷基，未取代的C_2-C_{10}直链、支链或环状烯基或未取代的C_2-C_{10}直链或支链炔基，或支链炔基或根据式(b)或式(c)的马来酰亚胺部分，

[0495]  

(b) (c)

[0496] 其中o是选自0-10，优选地2-7，更优选地4-6的整数，并且

[0497] W是根据式(d)的硫醇官能团

[0498] 

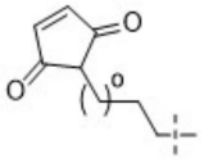
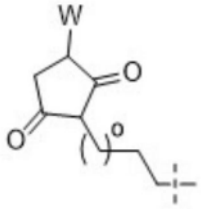
(d)

[0499] 其中U＝SH、NH_2或OH，优选地OH，并且

[0500] p是选自0-4，优选地1-3，更优选地1或2的整数，

[0501] 其中X＝O、P或S，优选地O；以及

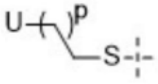
[0502] 其中Y＝代表H，未取代的C_1-C_{10}直链、支链或环状烷基，未取代的C_2-C_{10}直链、支链或环状烯基或未取代的C_2-C_{10}直链或支链炔基或根据式(b)或式(c)的马来酰亚胺部分，优选地H或支链炔基或根据式(b)或式(c)的马来酰亚胺部分，

[0503]  

(b) (c)

[0504] 其中o是选自0-10，优选地2-7，更优选地4-6的整数，并且

[0505] W是根据式(d)的硫醇官能团

[0506] 

(d)

[0507] 其中U＝SH、NH_2或OH，优选地OH，并且

[0508] p是选自0-4，优选地1-3，更优选地1或2的整数。

[0509] 实施例(本文称为实施例D2)是根据本发明的皂苷衍生物，其特征在于该皂苷衍生物不是皂苷，特别地SO1861，其中苷元核心结构包含已通过与N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH)反应来转化成腙键而衍生化的醛基，其中该EMCH的马来酰亚胺基团任选地通过与硫醇形成硫醚键而衍生化，并且其中皂苷上不存在其他衍生化，优选地其特征在于该皂苷衍生物不是皂苷，特别地SO1861，其中苷元核心结构包含已通过与N-ε-马来酰亚胺基己酸酰

肼(EMCH)反应来转化成腙键而衍生化的醛基,其中该EMCH的马来酰亚胺基团任选地通过与硫醇形成硫醚键而衍生化。

[0510] 实施例(本文称为实施例D3)是根据本发明的皂苷衍生物,其特征在于该皂苷衍生物不是皂苷,特别地SO1861,其中苷元核心结构包含已通过与N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH)反应来转化成腙键而衍生化的醛基,其中该EMCH的马来酰亚胺基团通过与选自以下中的一种,优选地全部的硫醇形成硫醚键而衍生化:

[0511] • 巯基乙醇,

[0512] • 具有乙二胺核心的聚(酰胺基胺)树枝状聚合物,该乙二胺核心已用至少2-亚氨基硫烷(iminothiolane)衍生化,

[0513] • 花青素苷-3与具有乙二胺核心的聚(酰胺基胺)树枝状聚合物的缀合物,该乙二胺核心已用至少2-亚氨基硫烷衍生化,

[0514] • 已用至少2-亚氨基硫烷衍生化的G4枝状物(dendron),

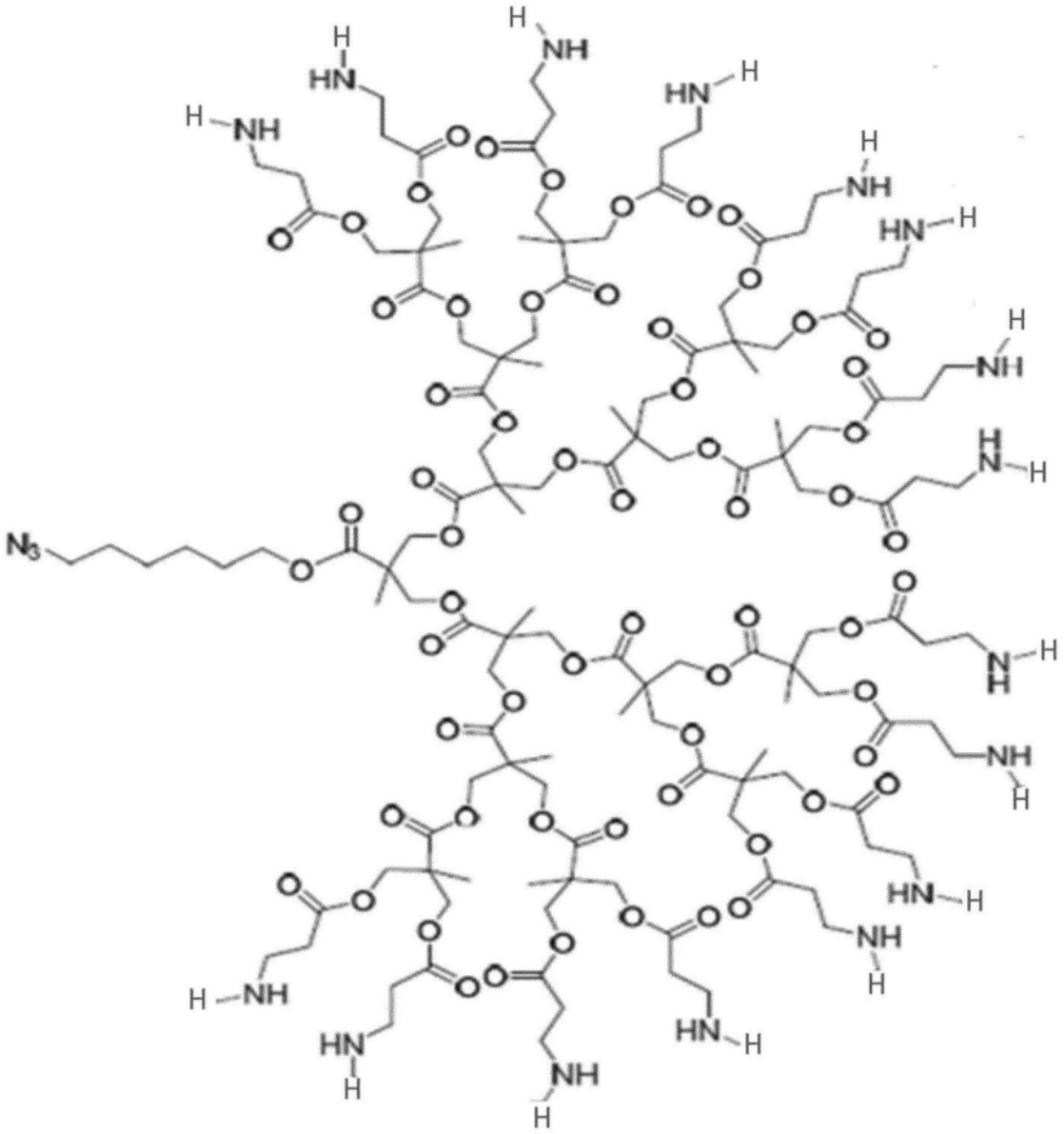
[0515] • 花青素苷-5与G4枝状物的缀合物,该G4枝状物已用至少2-亚氨基硫烷进一步衍生化,

[0516] • 牛血清白蛋白(BSA),以及

[0517] • 具有序列SESDDAMFCDAMDESDSK[SEQ ID NO:1]的肽

[0518] 并且其中皂苷上不存在其他衍生化。如本领域技术人员将理解的,表达“G4枝状物”应理解为意指具有式(A2)的化合物:

[0519]



(A2)。

[0520] 实施例(本文称为实施例D4)是根据本发明的皂苷衍生物,其特征在于该皂苷衍生物不是皂苷,特别地SO1861,其中羧基基团已通过与花青素苷-3与具有乙二胺核心的聚(酰胺基胺)树枝状聚合物的任选地进一步衍生化缀合物反应来转化成酰胺而衍生化,并且其中皂苷上不存在其他衍生化,优选地其特征在于该皂苷衍生物不是皂苷,特别地SO1861,其中羧基基团已通过与花青素苷-3与具有乙二胺核心的聚(酰胺基胺)树枝状聚合物的任选地进一步衍生化缀合物反应来转化成酰胺而衍生化。

[0521] 实施例(本文称为实施例D5)是根据本发明的皂苷衍生物,其特征在于该皂苷衍生物不是皂苷,特别地SO1861,其中苷元核心结构包含已通过与花青素苷-3与具有乙二胺核心的聚(酰胺基胺)树枝状聚合物的缀合物反应来转化(如经由还原胺化)成胺而衍生化的醛基,并且其中皂苷上不存在其他衍生化,优选地其特征在于该皂苷衍生物不是皂苷,特别地SO1861,其中苷元核心结构包含已通过与花青素苷-3与具有乙二胺核心的聚(酰胺基胺)树枝状聚合物的缀合物反应来转化(如经由还原胺化)成胺而衍生化的醛基。

[0522] 实施例(本文称为实施例D6)是根据本发明的皂苷衍生物,其特征在于该皂苷衍生物不包含毒素、微小RNA或编码蛋白质的多核苷酸,优选地其特征在于皂苷衍生物不包含药学活性物质,如毒素、药物、多肽和/或多核苷酸,更优选地其特征在于该皂苷衍生物不包含效应分子。

[0523] 实施例(本文称为实施例D7)是根据本发明的皂苷衍生物,其特征在于该皂苷衍生物不包含聚合物结构或寡聚结构,该聚合物结构或寡聚结构选自由以下组成的组:

[0524] • 聚或寡聚(胺),如聚乙烯亚胺和聚(酰胺基胺),

[0525] • 聚乙二醇,

[0526] • 聚或寡聚(酯),如聚(丙交酯),

[0527] • 聚(内酰胺),

[0528] • 聚丙交酯-共-乙交酯共聚物,

[0529] • 聚或寡糖,如环糊精和聚右旋糖,

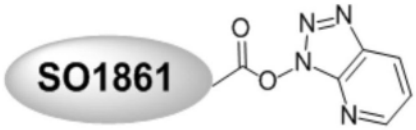
[0530] • 聚或寡聚(氨基酸),如蛋白质和肽,以及

[0531] • 核酸及其类似物,如DNA、RNA、LNA(锁核酸)和PNA(肽核酸);

[0532] 优选地其特征在于该皂苷衍生物不包含结构有序形成的聚合物或寡聚结构,如聚合物、寡聚体、树枝状聚合物、柱状树枝化聚合物或柱状树枝化寡聚体,或者该聚合物或寡聚结构是组装的聚合物结构,如水凝胶、微凝胶、纳米凝胶、稳定的聚合物胶束或脂质体,更优选地其特征在于该皂苷衍生物不包含聚合物或寡聚结构。

[0533] 实施例(本文称为实施例D8)是根据本发明的皂苷衍生物,其特征在于该皂苷衍生物不包含主要或完全由至少2个相同或类似的键合在一起的单元构成的分子结构。

[0534] 实施例(本文称为实施例D9)是根据本发明的皂苷衍生物,其特征在于该皂苷衍生物不是具有式(A3)的化合物,该化合物是SO1861与N-[(二甲基氨基)-1H-1,2,3-三唑并-[4,5-b]吡啶-1-基亚甲基]-N-甲基甲铵六氟磷酸盐N-氧化物(HATU)的反应产物:

[0535] 

(A3),

[0536] 优选地其特征在于该皂苷衍生物不是活化酯。参见图59。

[0537] 实施例(本文称为实施例D10)是根据本发明的皂苷衍生物,其特征在于该皂苷衍生物不是皂苷,特别地SO1861,其中羧基基团已通过转化成酰胺键或酯键而衍生化,并且其中皂苷上不存在其他衍生化。

[0538] 实施例(本文称为实施例D11)是根据本发明的皂苷衍生物,其特征在于该皂苷衍生物不包含香石竹毒蛋白部分。

[0539] 优选实施例(本文称为实施例D12)是根据本发明的皂苷衍生物,其特征在于该皂苷衍生物包含单个皂苷部分。

[0540] 优选实施例(本文称为实施例D13)是根据本发明的皂苷衍生物,其特征在于该皂苷衍生物具有小于2500g/mol,优选地小于2300g/mol,更优选地小于2150g/mol的分子量。

[0541] 优选实施例(本文称为实施例D14)是根据本发明的皂苷衍生物,其特征在于皂苷

衍生化具有小于400g/mol,优选地小于300g/mol,更优选地小于270g/mol的分子量。皂苷衍生化的分子量对应于不包括苷元核心和一条(对于单糖链皂苷)或两条(对于双糖链皂苷)多聚糖(糖)链的皂苷衍生物的分子量。本领域技术人员将理解,如果皂苷衍生物的分子量低于其相应的未衍生化皂苷,皂苷衍生化不会带来分子量的任何增加,因此符合实施例D14的皂苷衍生化具有小于400g/mol,优选地小于300g/mol,更优选地小于270g/mol的分子量的要求。

[0542] 如本领域技术人员将理解的,实施例D2-D14可以彼此组合,也可以与本申请中描述的其他实施例组合。例如,在本发明的实施例中,提供了实施例D2-D14的以下组合:

[0543] • D12和D2-D11、D13中的一个或多个;

[0544] • D13和D2-D12中的一个或多个;

[0545] • D12、D13和D2-D11中的一个或多个;

[0546] • D2、D10和D12;

[0547] • D3、D7、D9和优选地D13;或

[0548] • D3、D9、D12和D13。

[0549] 本领域技术人员将理解,实施例D2-D14的这些组合可以再次与根据本发明的其他实施例组合,例如,并且优选地与实施例D14组合。

[0550] 特别优选的实施例对应于实施例D3、D9、D12以及D13和D14中的一个或两个的组合。换句话说,特别优选的实施例是根据本发明的皂苷衍生物,其中该皂苷衍生物包含单个皂苷部分,其中该皂苷衍生物具有小于2500g/mol,优选地小于2300g/mol,更优选地小于2150g/mol的分子量,并且其中该皂苷衍生物

[0551] • 不是皂苷,特别地SO1861,其中苷元核心结构包含已通过与N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH)反应来转化成腙键而衍生化的醛基,其中该EMCH的马来酰亚胺基团任选地通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化,并且其中优选地皂苷上不存在其他衍生化;以及

[0552] • 不是活化酯,该活化酯是SO1861与N-[(二甲基氨基)-1H-1,2,3-三唑并-[4,5-b]吡啶-1-基亚甲基]-N-甲基甲铵六氟磷酸盐N-氧化物(HATU)的反应产物。

[0553] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物,其中该皂苷衍生物包含苷元核心结构,其中该苷元核心结构包含醛基,并且其中该第一糖链包含羧基基团、优选地葡糖醛酸部分的羧基基团,该羧基基团已通过与N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺(AEM)反应转化成酰胺键而衍生化。

[0554] 一个实施例是根据本发明的皂苷衍生物,条件是当该苷元核心结构中的醛基通过与N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH)反应转化成腙键而衍生化并且该皂苷是QS-21时,该葡糖醛酸也衍生化,并且条件是当该皂苷是QS-21并且SO1861的葡糖醛酸部分的羧基基团通过1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐(HATU)与QS-21的葡糖醛酸部分的羧基基团的反应而衍生化时,该醛基也被修饰。

[0555] 一个实施例是本发明的皂苷衍生物,条件是当该皂苷衍生物的苷元核心结构中的醛基通过与EMCH反应而衍生化并且该皂苷是QS-21时,该葡糖醛酸也衍生化,并且条件是当该皂苷是QS-21并且QS-21的葡糖醛酸部分的羧基基团通过结合HATU而衍生化时,该醛基也衍生化。

[0556] 本发明的第二方面涉及第一药物组合物,该第一药物组合物包含根据本发明的皂

苷衍生物和任选地药学上可接受的赋形剂和/或稀释剂。

[0557] 一个实施例是根据本发明的第一药物组合物，该第一药物组合物包含根据本发明的皂苷衍生物，优选地药学上可接受的稀释剂，并且进一步包含：

[0558] • 药学上可接受的盐，优选地药学上可接受的无机盐，如铵盐、钙盐、铜盐、铁盐、镁盐、锰盐、钾盐、钠盐、锶盐或锌盐，优选地NaCl；和/或

[0559] • 药学上可接受的缓冲系统，如含有磷酸盐、硼酸盐、柠檬酸盐、碳酸盐、组氨酸、乳酸盐、氨丁三醇、葡萄糖酸盐、天冬氨酸盐、谷氨酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、苹果酸盐、富马酸盐、乙酸盐和/或酮戊二酸盐的缓冲系统。

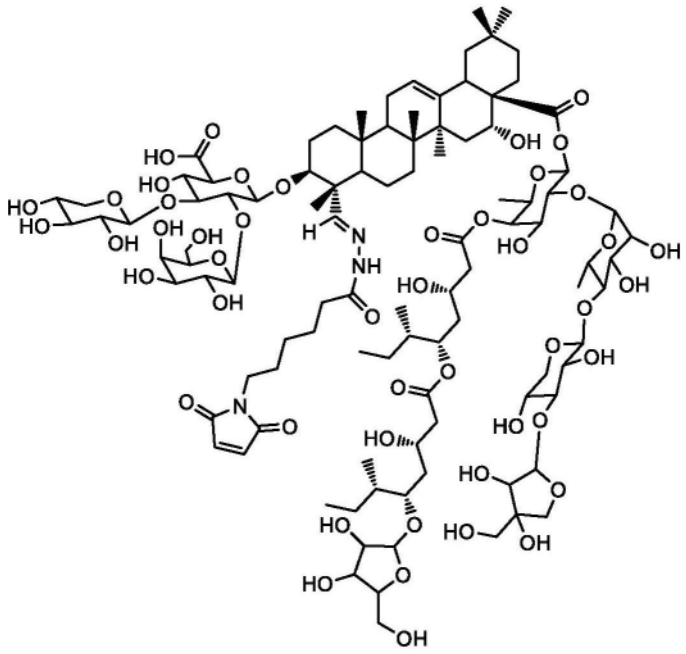
[0560] 一个实施例是根据本发明的第一药物组合物，该第一药物组合物包含根据本发明的皂苷衍生物和药学上可接受的稀释剂，优选地水，其中该组合物在25℃的温度下为液体，并且pH在2-11的范围内，优选地在4-9的范围内，更优选地在6-8的范围内。

[0561] 一个实施例是根据本发明的第一药物组合物，该第一药物组合物包含根据本发明的皂苷衍生物和药学上可接受的稀释剂，优选地水，其中该组合物在25℃的温度下为液体，并且其中该皂苷衍生物的浓度在10^{-12}至1mol/l的范围内，优选地在10^{-9}至0.1mol/l的范围内，更优选地在10^{-6}至0.1mol/l的范围内。

[0562] 典型地，这种第一药物组合物适合与例如ADC或AOC组合使用。例如，在将ADC或AOC与ADC或AOC一起施用之前，或在将ADC或AOC施用至需要这种ADC或AOC疗法的患者之后(不久)，将第一药物组合物施用至需要施用ADC或AOC的患者。例如，将第一药物组合物与包含ADC或AOC的药物组合物混合，并且将所获得的混合物的合适剂量施用至需要ADC或AOC疗法的患者。根据本发明，当皂苷衍生物和ADC或AOC共定位在靶细胞(如肿瘤细胞)内时，由第一药物组合物构成的皂苷衍生物增强了由这种ADC或AOC构成的效应分子的功效和效力。在皂苷衍生物的影响下，与在不存在皂苷衍生物的情况下用相同剂量的ADC或AOC接触相同细胞相比，效应分子以更高的程度释放到靶细胞的胞质溶胶中。因此，当效应分子与第一药物组合物的皂苷衍生物一起共定位在靶细胞内时，与在递送包含效应分子的ADC或AOC的细胞内不存在皂苷衍生物时实现相同功效所需的剂量相比，以较低的ADC或AOC剂量可以获得类似的功效。

[0563] 一个实施例是本发明的第一药物组合物，其中皂苷衍生物是由分子30表示的皂苷衍生物：

[0564] (30)



，

[0565] 或包含单一衍生化的QS-21衍生物，其中该单一衍生化是通过1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐(HATU)与QS-21的葡糖醛酸部分的羧基基团的反应来转化QS-21的葡糖醛酸部分的羧基基团。

[0566] 本发明的第三方面涉及药物组合，该药物组合包含：

[0567] o本发明的第一药物组合物；以及

[0568] o第二药物组合物，该第二药物组合物包含抗体-毒素缀合物、受体-配体-毒素缀合物、抗体-药物缀合物、受体-配体-药物缀合物、抗体-寡核苷酸缀合物或受体-配体-寡核苷酸缀合物中的任何一种或多种，并且任选地包含药学上可接受的赋形剂和/或稀释剂。

[0569] 本发明的第四方面涉及第三药物组合物，该第三药物组合物包含本发明的皂苷衍生物，并且进一步包含以下中的任何一种或多种：抗体-毒素缀合物、受体-配体-毒素缀合物、抗体-药物缀合物、受体-配体-药物缀合物、抗体-核酸缀合物或受体-配体-核酸缀合物，并且任选地包含药学上可接受的赋形剂和/或稀释剂。

[0570] 一个实施例是本发明的药物组合或本发明的第三药物组合物，其中该第二药物组合物或该第三药物组合物包含抗体-药物缀合物、受体-配体-药物缀合物、抗体-寡核苷酸缀合物或受体-配体-寡核苷酸缀合物中的任何一种或多种，其中该药物例如是毒素如皂草毒蛋白和香石竹毒蛋白，并且其中该寡核苷酸例如是siRNA或BNA，例如用于载脂蛋白B或HSP27的基因沉默。

[0571] 一个实施例是本发明的药物组合或本发明的第三药物组合物，其中该皂苷衍生物是选自由以下的衍生物组成的组的皂苷衍生物：QS-21、QS-21A、QS-21A-api、QS-21A-xyl、QS-21B、QS-21B-api、QS-21B-xyl、QS-7-xyl、QS-7-api、QS-17-api、QS-17-xyl、QS1861、QS1862、皂树皂苷、QS-18、Quil-A、其立体异构体及其组合，优选地该皂苷衍生物选自由QS-21衍生物组成的组，更优选地该皂苷衍生物是QS21衍生物。

[0572] 一个实施例是根据本发明的第三药物组合物，该第一药物组合物包含根据本发明的皂苷衍生物，优选地药学上可接受的稀释剂，并且进一步包含：

[0573] • 药学上可接受的盐，优选地药学上可接受的无机盐，如铵盐、钙盐、铜盐、铁盐、

镁盐、锰盐、钾盐、钠盐、锶盐或锌盐，优选地NaCl；和/或

[0574] • 药学上可接受的缓冲系统，如含有磷酸盐、硼酸盐、柠檬酸盐、碳酸盐、组氨酸、乳酸盐、氨丁三醇、葡萄糖酸盐、天冬氨酸盐、谷氨酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、苹果酸盐、富马酸盐、乙酸盐和/或酮戊二酸盐的缓冲系统。

[0575] 一个实施例是根据本发明的第三药物组合物，该第三药物组合物包含根据本发明的皂苷衍生物和药学上可接受的稀释剂，优选地水，其中该组合物在25℃的温度下为液体，并且pH在2-11的范围内，优选地在4-9的范围内，更优选地在6-8的范围内。

[0576] 一个实施例是根据本发明的第三药物组合物，该第三药物组合物包含根据本发明的皂苷衍生物和药学上可接受的稀释剂，优选地水，其中该组合物在25℃的温度下为液体，并且其中该皂苷衍生物的浓度在10^{-12}至1mol/l的范围内，优选地在10^{-9}至0.1mol/l的范围内，更优选地在10^{-6}至0.1mol/l的范围内。

[0577] 本发明的第五方面涉及本发明的第一药物组合物、本发明的药物组合或本发明的第三药物组合物，用作药剂。在优选实施例中，提供了本发明的第一药物组合物，其中皂苷衍生物包含QS-21-Ald-EMCH、QS-21-Ald-EMCH-巯基乙醇、QS21-Glu-AEM、QS21-Glu-AMPD、QS21-(Ald-OH)-(Glu-AEM)、QS21-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)、QS21-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD)、QS-21-L-N_3或QS-21-Glu-HATU，优选地由其组成；提供了本发明的药物组合，其中皂苷衍生物包含QS-21-Ald-EMCH、QS-21-Ald-EMCH-巯基乙醇、QS21-Glu-AEM、QS21-Glu-AMPD、QS21-(Ald-OH)-(Glu-AEM)、QS21-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)、QS21-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD)、QS-21-L-N_3或QS-21-Glu-HATU，优选地由其组成；或提供了本发明的第三药物组合物，其中皂苷衍生物包含QS-21-Ald-EMCH、QS-21-Ald-EMCH-巯基乙醇、QS21-Glu-AEM、QS21-Glu-AMPD、QS21-(Ald-OH)-(Glu-AEM)、QS21-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)、QS21-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD)、QS-21-L-N_3或QS-21-Glu-HATU，优选地由其组成，用作药剂。

[0578] 在本发明的另一方面，提供了本文所述的皂苷衍生物，优选地QS-21-Ald-EMCH、QS-21-Ald-EMCH-巯基乙醇、QS21-Glu-AEM、QS21-Glu-AMPD、QS21-(Ald-OH)-(Glu-AEM)、QS21-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)、QS21-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD)、QS-21-L-N_3或QS-21-Glu-HATU，用作药剂。

[0579] 本发明的第六方面涉及本发明的第一药物组合物、本发明的药物组合或本发明的第三药物组合物，用于在治疗或预防癌症、传染病、病毒感染、高胆固醇血症、原发性高草酸尿症、血友病A、血友病B、α-1抗胰蛋白酶相关肝病、急性肝卟啉症、甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性或自身免疫性疾病中使用。

[0580] 在优选实施例中，提供了本发明的第一药物组合物，其中皂苷衍生物包含QS-21-Ald-EMCH、QS-21-Ald-EMCH-巯基乙醇、QS21-Glu-AEM、QS21-Glu-AMPD、QS21-(Ald-OH)-(Glu-AEM)、QS21-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)、QS21-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD)、QS-21-L-N_3或QS-21-Glu-HATU，优选地由其组成；提供了本发明的药物组合，其中皂苷衍生物包含QS-21-Ald-EMCH、QS-21-Ald-EMCH-巯基乙醇、QS21-Glu-AEM、QS21-Glu-AMPD、QS21-(Ald-OH)-(Glu-AEM)、QS21-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)、QS21-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD)、QS-21-L-N_3或QS-21-Glu-HATU，优选地由其组成；或提供了本发明的第三药物组合物，其中皂苷衍生物包含QS-21-Ald-EMCH、QS-21-Ald-EMCH-巯基乙醇、QS21-Glu-AEM、QS21-Glu-AMPD、QS21-(Ald-OH)-(Glu-AEM)、QS21-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)、QS21-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD)、QS-21-L-N_3

或QS-21-Glu-HATU,优选地由其组成,用于在治疗或预防癌症、传染病、病毒感染、高胆固醇血症、原发性高草酸尿症、血友病A、血友病B、α-1抗胰蛋白酶相关肝病、急性肝卟啉症、甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性或自身免疫性疾病中使用。

[0581] 在优选实施例中,第四药物组合物包含基于皂苷的皂苷衍生物,该皂苷包含三萜苷元核心结构和与该苷元核心结构连接的第一糖链和第二糖链中的至少一种,其中:

[0582] i.该皂苷衍生物包含含有已衍生化的醛基的苷元核心结构;或

[0583] ii.该皂苷衍生物包含该第一糖链,其中该第一糖链包含已衍生化的羧基基团、优选地葡糖醛酸部分的羧基基团;或

[0584] iii.该皂苷衍生物包含衍生化i.、ii.的任何组合;

[0585] 其中该第一糖链和该第二糖链独立地选自单糖、线性寡糖和支链寡糖,

[0586] 其中该皂苷衍生物具有小于2500g/mol的分子量,

[0587] 以及任选地药学上可接受的赋形剂和/或稀释剂

[0588] 用于在治疗或预防癌症、传染病、病毒感染、高胆固醇血症、原发性高草酸尿症、血友病A、血友病B、α-1抗胰蛋白酶相关肝病、急性肝卟啉症、甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性或自身免疫性疾病,优选地癌症中使用。

[0589] 在优选实施例中,用于在治疗或预防癌症、传染病、病毒感染、高胆固醇血症、原发性高草酸尿症、血友病A、血友病B、α-1抗胰蛋白酶相关肝病、急性肝卟啉症、甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性或自身免疫性疾病,优选地癌症中使用的第二药物组合包含:

[0590] •基于皂苷的皂苷衍生物,该皂苷包含三萜苷元核心结构和与该苷元核心结构连接的第一糖链和第二糖链中的至少一种,其中:

[0591] i.该皂苷衍生物包含含有已衍生化的醛基的苷元核心结构;或

[0592] ii.该皂苷衍生物包含该第一糖链,其中该第一糖链包含已衍生化的羧基基团、优选地葡糖醛酸部分的羧基基团;或

[0593] iii.该皂苷衍生物包含衍生化i.、ii.的任何组合;

[0594] 其中该第一糖链和该第二糖链独立地选自单糖、线性寡糖和支链寡糖,

[0595] 以及任选地药学上可接受的赋形剂和/或稀释剂

[0596] •第五药物组合物,该第五药物组合物包含抗体-毒素缀合物、受体-配体-毒素缀合物、抗体-药物缀合物、受体-配体-药物缀合物、抗体-寡核苷酸缀合物或受体-配体-寡核苷酸缀合物中的任何一种或多种,并且任选地包含药学上可接受的赋形剂和/或稀释剂。

[0597] 在优选实施例中,第六药物组合物包含基于皂苷的皂苷衍生物,该皂苷包含三萜苷元核心结构和与该苷元核心结构连接的第一糖链和第二糖链中的至少一种,其中:

[0598] i.该皂苷衍生物包含含有已衍生化的醛基的苷元核心结构;或

[0599] ii.该皂苷衍生物包含该第一糖链,其中该第一糖链包含已衍生化的羧基基团、优选地葡糖醛酸部分的羧基基团;或

[0600] iii.该皂苷衍生物包含衍生化i.、ii.的任何组合;

[0601] 其中该第一糖链和该第二糖链独立地选自单糖、线性寡糖和支链寡糖,

[0602] 以及任选地药学上可接受的赋形剂和/或稀释剂

[0603] 并且进一步包含以下中的任何一种或多种:抗体-毒素缀合物、受体-配体-毒素缀合物、抗体-药物缀合物、受体-配体-药物缀合物、抗体-核酸缀合物或受体-配体-核酸缀合

物,并且任选地包含药学上可接受的赋形剂和/或稀释剂,用于在治疗或预防癌症、传染病、病毒感染、高胆固醇血症、原发性高草酸尿症、血友病A、血友病B、α-1抗胰蛋白酶相关肝病、急性肝卟啉症、甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样变性或自身免疫性疾病中使用。

[0604] 在优选实施例中,根据本发明使用的第二药物组合或根据本发明使用的第三药物组合物包含抗体-药物缀合物、受体-配体-药物缀合物、抗体-寡核苷酸缀合物或受体-配体-寡核苷酸缀合物中的任何一种或多种,其中该药物例如是毒素如皂草毒蛋白和香石竹毒蛋白,并且其中该寡核苷酸例如是siRNA或BNA,例如用于载脂蛋白B或HSP27的基因沉默。

[0605] 本发明的第七方面涉及用于将分子从细胞外转移到所述细胞内,优选地转移到所述细胞的胞质溶胶内的体外或离体方法,该方法包括以下步骤:

[0606] a)提供细胞;

[0607] b)提供用于从细胞外转移到步骤a)中提供的细胞内的分子;

[0608] c)提供根据本发明的皂苷衍生物;

[0609] d)使步骤a)的细胞在体外或离体与步骤b)的分子和步骤c)的皂苷衍生物接触,由此建立该分子从该细胞外到所述细胞内的转移。

[0610] 优选实施例是本发明的方法,该方法包括以下步骤:

[0611] a)提供细胞;

[0612] b)提供用于从细胞外转移到步骤a)中提供的细胞内的分子;

[0613] 提供

[0614] c)基于优选地天然存在的皂苷的皂苷衍生物,该皂苷包含三萜苷元核心结构和与该苷元核心结构连接的第一糖链和第二糖链中的至少一种,其中:

[0615] i.该皂苷衍生物包含含有已衍生化的醛基的苷元核心结构;或

[0616] ii.该皂苷衍生物包含该第一糖链,其中该第一糖链包含已衍生化的羧基基团、优选地葡糖醛酸部分的羧基基团;或

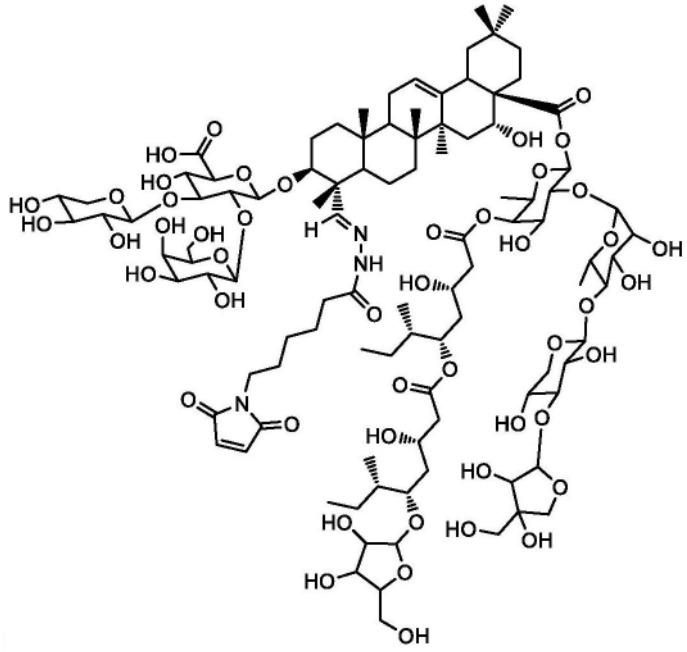
[0617] iii.该皂苷衍生物包含衍生化i.、ii.的任何组合;

[0618] 其中该第一糖链和该第二糖链独立地选自单糖、线性寡糖和支链寡糖,

[0619] d)使步骤a)的细胞在体外或离体与步骤b)的分子和步骤c)的皂苷衍生物接触,由此建立该分子从该细胞外到所述细胞内的转移。

[0620] 一个实施例是本发明的方法,其中细胞是人细胞,如T细胞、NK细胞、肿瘤细胞,和/或其中步骤b)的分子是以下中的任一种:抗体-药物缀合物、受体-配体-药物缀合物、抗体-寡核苷酸缀合物或受体-配体-寡核苷酸缀合物,其中该药物例如是毒素,并且其中该寡核苷酸例如是siRNA或BNA,和/或其中该皂苷衍生物选自由以下的衍生物组成的组:QS-21、QS-21A、QS-21A-api、QS-21A-xyl、QS-21B、QS-21B-api、QS-21B-xyl、QS-7-xyl、QS-7-api、QS-17-api、QS-17-xyl、QS1861、QS1862、皂树皂苷、QS-18、Quil-A、其立体异构体及其组合,优选地该皂苷衍生物选自由QS-21衍生物组成的组,更优选地该皂苷衍生物是QS21衍生物,或者其中该皂苷衍生物是由分子30表示的QS-21衍生物,该QS-21衍生物代表包含该皂皮酸苷元核心结构的指定的C4位处的醛基的QS-21衍生物,该醛基已通过与N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH)反应转化成腙键而衍生化:

[0621] (30)



,

[0622] 或其中该皂苷衍生物是QS-21衍生物,该QS-21衍生物包含该皂皮酸苷元核心结构的指定的C_{23}位处的醛基,该醛基已通过与N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH)反应转化成腙键而衍生化,其中用巯基乙醇衍生化该EMCH的马来酰亚胺基团,由此形成硫醚键,

[0623] 或者其中该皂苷衍生物是衍生物,其中

[0624] i.该皂苷衍生物包含苷元核心结构,其中该苷元核心结构包含已通过以下衍生化的醛基:

[0625] -还原成醇;或

[0626] -通过与N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH)反应转化成腙键,其中该EMCH的马来酰亚胺基团任选地通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化;或

[0627] -通过与N-[β-马来酰亚胺基丙酸]酰肼(BMPH)反应转化成腙键,其中该BMPH的马来酰亚胺基团任选地通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化;或

[0628] -通过与N-[κ-马来酰亚胺基十一酸]酰肼(KMUH)反应转化成腙键,其中该KMUH的马来酰亚胺基团任选地通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化;或

[0629] ii.该第一糖链包含羧基基团、优选地葡糖醛酸部分的羧基基团,该羧基基团已通过与2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇(AMPD)或N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺(AEM)反应转化成酰胺键而衍生化;或

[0630] iii.该皂苷衍生物包含两种衍生化i.、ii.的任何组合;

[0631] 优选地,该皂苷衍生物包含苷元核心结构,其中该苷元核心结构包含已通过与EMCH反应转化成腙键而衍生化的醛基,其中该EMCH的马来酰亚胺基团任选地通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化;或者其中该皂苷衍生物包含苷元核心结构,其中该苷元核心结构包含醛基,并且其中该第一糖链包含羧基基团、优选地葡糖醛酸部分的羧基基团,该羧基基团已通过与N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺(AEM)反应转化成酰胺键而衍生化;或其中该皂苷衍生物是衍生物,条件是当该苷元核心结构中的醛基通过与N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH)反应转化成腙键而衍生化并且该皂苷是QS-21时,该葡糖醛酸也衍生化,并且条件是当该皂苷是QS-21并且QS-21的葡糖醛酸部分的羧基基团通过1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-

1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐(HATU)与QS-21的葡糖醛酸部分的羧基基团的反应而衍生化时,该醛基也被修饰;或其中该皂苷是衍生物,条件是当该皂苷衍生物的苷元核心结构中的醛基通过与EMCH反应而衍生化并且该皂苷是QS-21时,该葡糖醛酸也衍生化,并且条件是当该皂苷是QS-21并且QS-21的葡糖醛酸部分的羧基基团通过结合HATU而衍生化时,该醛基也衍生化。

[0632] 在特定的实施例中,提供了用于将分子从细胞外转移到所述细胞内,优选地转移到如本文所述的细胞的胞质溶胶中的体外或离体方法,其中皂苷衍生物包含QS-21-Ald-EMCH、QS-21-Ald-EMCH-巯基乙醇、QS-21-L-N_3或QS-21-Glu-HATU,优选地由其组成。

[0633] 尽管已经根据几个实施例描述了本发明,但是可以预期,对于本领域普通技术人员而言,通过阅读说明书和研究附图,其替代、修改、排列和等同物将变得显而易见。本发明不以任何方式限于所示实施例。可以在不偏离所附权利要求书限定的范围的情况下进行改变。

[0634] 上面已经参考多个示例性实施例描述了本发明。修改是可能的,并且包括在所附权利要求书所限定的保护范围内。本发明由以下实例进一步说明,这些实例不应被解释为以任何方式限制本发明。

[0635]

表 A1.显示（晚期）内体/溶酶体逃逸增强活性的皂苷，以及包含类似于显示（晚期）内体/溶酶体逃逸增强活性的此类皂苷的结构的皂苷

皂苷名称	**苷元核心**	**C-3β-OH 基团上的碳水化合物取代基**	**C-28-OH 基团上的碳水化合物取代基**
NP-005236	2α-羟基齐墩果酸	GlcA-	Glc/Gal-
AMA-1	16α-羟基齐墩果酸	Glc-	Rha-(1→2)-[Xyl-(1→4)]-Rha-
AMR	16α-羟基齐墩果酸	Glc-	Rha-(1→2)-[Ara-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-
α-常春藤皂苷	常春藤皂苷元（23-羟基齐墩果酸）	Rha-(1→2)-Ara-	-
NP-012672	16α,23-二羟基齐墩果酸	Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→2)-Glc/Gal-(1→2)-Rha/Fuc-(1→2)-GlcA-	Ara/Xyl-
NP-017777	丝石竹皂苷元	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc-（R = 4E-甲氧基肉桂酸）
NP-017778	丝石竹皂苷元	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc-（R = 4Z-甲氧基肉桂酸）
NP-017774	丝石竹皂苷元	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
NP-018110[c]、NP-017772[d]	丝石竹皂苷元	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-3,4-二-OAc-Fuc-
NP-018109	丝石竹皂苷元	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-

[0636]

			[R-(→4)]-3-OAc-Fuc-（R = 4E-甲氧基肉桂酸）
NP-017888	丝石竹皂苷元	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
NP-017889	丝石竹皂苷元	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
NP-018108	丝石竹皂苷元	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Ara/Xyl-(1→3)-Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→2)-[4-OAc-Rha/Fuc-(1→4)]-Rha/Fuc-
SA1641[a]、AEX55[b]	丝石竹皂苷元	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
NP-017674	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
NP-017810	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
AG1	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
NP-003881	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→4)-[Glc/Gal-(1→2)]-Fuc-
NP-017676	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc-（R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸）
NP-017677	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc-（R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸）
NP-017706	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
NP-017705	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc

[0637]

			-
NP-017773	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	6-OAc-Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-
NP-017775	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc--Rha-(1→3)]-Fuc-
SA1657	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
AG2	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
SO1861	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
GE1741	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3,4-二-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
SO1542	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
SO1584	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	6-OAc-Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
SO1658	丝石竹皂苷元	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
SO1674	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
SO1832	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
QS-7（也称为QS1861）	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-
QS-7 api（也称为 QS1862）	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-
QS-17	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc-（R = 5-O-[5-O-Rha-(1→2)-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-

[0638]

			甲基-辛酸）
QS-18	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc-（R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸）
QS-21 A-apio	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc-（R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸）
QS-21 A-xylo	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc-（R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸）
QS-21 B-apio	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→3)]-Fuc-（R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸）
QS-21 B-xylo	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→3)]-Fuc-（R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸）
β-七叶皂苷（描述为：七叶皂苷 Ia）	原七叶皂苷元-21(2-甲基丁-2-烯酸酯)-22-乙酸酯	Glc-(1→2)-[Glc-(1→4)]-GlcA-	-
茶籽皂苷 I	23-氧代-玉蕊	Glc-(1→2)-Ara-(1→3)-[	-

[0639]

	皂苷元C-21,22-双(2-甲基丁-2-烯酸酯)	Gal-(1→2)]-GlcA-	
茶籽皂苷J	23-氧代-玉蕊皂苷元C-21,22-双(2-甲基丁-2-烯酸酯)	Xyl-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-	-
阿萨姆皂苷F	23-氧代-玉蕊皂苷元C-21(2-甲基丁-2-烯酸酯)-16,22-二乙酸酯	Glc-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-	-
毛地黄皂苷	洋地黄皂苷配基	Glc-(1→3)-Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-Glc-(1→4)-Gal-	-
樱草属植物酸1	3,16,28-三羟基齐墩果烷-12-烯	Rha-(1→2)-Gal-(1→3)-[Glc-(1→2)]-GlcA-	-
AS64R	丝石竹酸	-	Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal-
		C-23-OH基团上的碳水化合物取代基	
AS6.2	丝石竹酸	Gal-	Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal-
a、b：不同的名称是指相同结构的不同分离物 c、d：不同的名称是指相同结构的不同分离物			

[0640] 实例和示例性实施例

[0641] 材料：

[0642] SO1861、SO1832、SO1862(异构体)和SO1904由Analyticon Discovery GmbH公司从肥皂草(Saponaria officinalis L.)获得的原始植物提取物中分离和纯化。QS21(纯)、QS18(级分)、QS17(级分)、QS7(级分)、QS21(级分)购自圣地亚哥沙漠之王国际公司(Desert King International,San Diego)。曲妥珠单抗(Tras,Herceptin®,罗氏公司(Roche))、西妥昔单抗(Cet,Erbitux®,默克公司(Merck KGaA))购自制药公司。根据标准程序从大肠杆菌生产EGF香石竹毒蛋白。西妥昔单抗-皂草毒蛋白缀合物由高级靶向系统公司(Advanced Targeting Systems)(加利福尼亚州圣地亚哥)生产并从该公司购买。三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP,98％,西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))、5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸)

(DTNB,埃尔曼试剂(Ellman'sreagent),99%,西格玛奥德里奇公司)、Zeba™旋转脱盐柱(2mL,赛默飞世尔公司(Thermo-Fisher))、NuPAGE™4%-12%双-Tris蛋白质凝胶(赛默飞世尔公司)、NuPAGE™MES SDS运行缓冲液(赛默飞世尔公司)、Novex™Sharp预染色蛋白质标准品(赛默飞世尔公司)、PageBlue™蛋白质染色溶液(赛默飞世尔公司)、Pierce™BCA蛋白质测定试剂盒(赛默飞世尔公司)、N-乙基马来酰亚胺(NEM,98%,西格玛奥德里奇公司)、1,4-二硫苏糖醇(DTT,98%,西格玛奥德里奇公司)、Sephadex G25(通用电气医疗集团(GE Healthcare))、Sephadex G50 M(通用电气医疗集团)、Superdex 200P(通用电气医疗集团)、异丙醇(IPA,99.6%,VWR)、三(羟甲基)氨基甲烷(Tris,99%,西格玛奥德里奇公司)、三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐(Tris.HCL,西格玛奥德里奇公司)、L-组氨酸(99%,西格玛奥德里奇公司)、D-(+)-脱水海藻糖(99%,西格玛奥德里奇公司)、聚乙二醇山梨聚糖单月桂酸酯(TWEEN 20,西格玛奥德里奇公司)、杜氏磷酸盐缓冲盐水(DPBS,赛默飞世尔公司)、胍盐酸盐(99%,西格玛奥德里奇公司)、乙二胺四乙酸二钠盐二水合物(EDTA-Na2,99%,西格玛奥德里奇公司)、无菌过滤器0.2μm和0.45μm(赛多利斯公司(Sartorius))、琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-甲酸酯(SMCC,赛默飞世尔公司)、Vivaspin T4和T15浓缩器(赛多利斯公司)、Superdex 200PG(通用电气医疗集团)、四(乙二醇)琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(PEG4-SPDP,赛默飞世尔公司)、[O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N,N-四甲基脲六氟磷酸酯](HATU,97%,西格玛奥德里奇公司)、二甲基亚砜(DMSO,99%,西格玛奥德里奇公司)、N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺三氟乙酸盐(AEM,98%,西格玛奥德里奇公司)、L-半胱氨酸(98.5%,西格玛奥德里奇公司)、去离子水(DI)新鲜取自超纯实验室水系统(Ultrapure Lab Water Systems,MilliQ,默克公司(Merck))、镍-次氮基三乙酸琼脂糖(Ni-NTA琼脂糖,Protino)、甘氨酸(99.5%,VWR)、5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸(埃尔曼试剂,DTNB,98%,西格玛奥德里奇公司)、S-乙酰巯基琥珀酸酐荧光素(SAMSA试剂,英杰公司(Invitrogen))、碳酸氢钠(99.7%,西格玛奥德里奇公司)、碳酸钠(99.9%,西格玛奥德里奇公司)、使用Sephadex G-25树脂的PD MiniTrap脱盐柱(通用电气医疗集团)、PD10 G25脱盐柱(通用电气医疗集团)、Zeba旋转脱盐柱(0.5、2、5和10mL,赛默飞世尔公司)、Vivaspin离心过滤器T4 10kDa MWCO、T4 100kDa MWCO和T15(赛多利斯公司)、Biosep s3000 aSEC柱(菲罗门公司(Phenomenex))、Vivacell超滤装置10和30kDa MWCO(赛多利斯公司)、Nalgene快速流动过滤器(赛默飞世尔公司)。

[0643] 缩写

[0644] AEM:N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺三氟乙酸盐

[0645] AMPD:2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇

[0646] BOP:(苯并三唑-1-基氧基)三(二甲基氨基)鏻六氟磷酸盐

[0647] DIPEA:N,N-二异丙基乙胺

[0648] DMF:N,N-二甲基甲酰胺

[0649] EMCH.TFA:N-(ε-马来酰亚胺基己酸)酰肼,三氟乙酸盐

[0650] HATU:1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐

[0651] Min:分钟

[0652] NMM:4-甲基吗啉

[0653] r.t.:保留时间

[0654] TCEP:三(2-羧乙基)膦盐酸盐

[0655] Temp:温度

[0656] TFA:三氟乙酸

[0657] 分析方法

[0658] LC-MS方法1

[0659] 设备:Waters IClass;二元(Bin.)泵:UPIBSM,SM:具有SO的UPISMFTN;UPCMA,PDA:UPPDATC,210-320nm,SQD:ACQ-SQD2 ESI,质量范围取决于1500-2400或2000-3000范围内负(neg)或负/正(neg/pos)产物的分子量;ELSD:气体压力40psi,漂移管temp:50℃;柱:Acquity C18,50×2.1mm,1.7μm Temp:60℃,流速:0.6mL/min,

[0660] 取决于产品的极性的梯度:

[0661] At0＝2%A,t5.0min＝50%A,t6.0min＝98%A

[0662] Bt0＝2%A,t5.0min＝98%A,t6.0min＝98%A

[0663] 后时间:1.0min,洗脱液A:乙腈,洗脱液B:在水中的10mM碳酸氢铵(pH＝9.5)。

[0664] LC-MS方法2,[2]

[0665] 设备:Waters IClass;二元(Bin.)泵:UPIBSM,SM:具有SO的UPISMFTN;UPCMA,PDA:UPPDATC,210-320nm,SQD:ACQ-SQD2 ESI,质量范围取决于产物的分子量:pos/neg 100-800或neg 2000-3000;ELSD:气体压力40psi,漂移管temp:50℃;柱:Waters XSelectTM CSH C18,50×2.1mm,2.5μm,Temp:25℃,流速:0.5mL/min,梯度:t0min＝5%A,t2.0min＝98%A,t2.7min＝98%A,后时间:0.3min,洗脱液A:乙腈,洗脱液B:在水中的10mM碳酸氢铵(pH＝9.5)。

[0666] LC-MS方法3

[0667] 设备:Waters IClass;二元(Bin.)泵:UPIBSM,SM:具有SO的UPISMFTN;UPCMA,PDA:UPPDATC,210-320nm,SQD:ACQ-SQD2 ESI,质量范围取决于pos/neg产物105-800、500-1200或1500-2500的分子量;ELSD:气体压力40psi,漂移管temp:50℃;柱:Waters XSelectTM CSH C18,50×2.1mm,2.5μm,Temp:40℃,流速:0.5mL/min,梯度:t0min＝5%A,t2.0min＝98%A,t2.7min＝98%A,后时间:0.3min,洗脱液A:在乙腈中的0.1%甲酸,洗脱液B:在水中的0.1%甲酸。

[0668] LC-MS方法4

[0669] 设备:Waters IClass;二元(Bin.)泵:UPIBSM,SM:具有SO的UPISMFTN;UPCMA,PDA:UPPDATC,210-320nm,SQD:ACQ-SQD2 ESI,质量范围取决于产物的分子量:pos/neg 100-800或neg 2000-3000;ELSD:气体压力40psi,漂移管temp:50℃,柱:Waters Acquity Shield RP18,50×2.1mm,1.7μm,Temp:25℃,流速:0.5mL/min,梯度:t0min＝5%A,t2.0min＝98%A,t2.7min＝98%A,后时间:0.3min,洗脱液A:乙腈,洗脱液B:在水中的10mM碳酸氢铵(pH＝9.5)。

[0670] 制备方法

[0671] 制备型MP-LC方法1,

[0672] 仪器类型:Reveleris™制备型MPLC;柱:Waters XSelectTM CSH C18(145×25mm,10μm);流速:40mL/min;柱温:室温;洗脱液A:在水中的10mM碳酸氢铵(pH＝9.0);洗脱液B:

99％乙腈+在水中的1％10mM碳酸氢铵;梯度:

[0673] [A]t0min＝5％B,t1min＝5％B,t2min＝10％B,t17min＝50％B,t18min＝100％B,t23min＝100％B

[0674] [B]t0min＝5％B,t1min＝5％B,t2min＝20％B,t17min＝60％B,t18min＝100％B,t23min＝100％B

[0675] ;检测UV:210、235、254nm和ELSD。

[0676] 制备型MP-LC方法2

[0677] 仪器类型:Reveleris™制备型MPLC;柱:Phenomenex LUNA C18(3)(150×25mm,10μm);流速:40mL/min;柱温:室温;洗脱液A:在水中的0.1％(v/v)甲酸,洗脱液B:在乙腈中的0.1％(v/v)甲酸;梯度:

[0678] [A]t0min＝5％B,t1min＝5％B,t2min＝20％B,t17min＝60％B,t18min＝100％B,t23min＝100％B

[0679] [B]t0min＝2％B,t1min＝2％B,t2min＝2％B,t17min＝30％B,t18min＝100％B,t23min＝100％B

[0680] [C]t0min＝5％B,t1min＝5％B,t2min＝10％B,t17min＝50％B,t18min＝100％B,t23min＝100％B

[0681] [D]t0min＝5％B,t1min＝5％B,t2min＝5％B,t17min＝40％B,t18min＝100％B,t23min＝100％B

[0682] ;检测UV:210、235、254nm和ELSD。

[0683] 制备型LC-MS方法3

[0684] MS仪器类型:Agilent Technologies G6130B Quadrupole;HPLC仪器类型:Agilent Technologies 1290制备型LC;柱:Waters XSelectTM CSH(C18,150×19mm,10μm);流速:25ml/min;柱温:室温;洗脱液A:100％乙腈;洗脱液B:在水中的10mM碳酸氢铵,pH＝9.0;梯度:

[0685] [A]t0＝20％A,t2.5min＝20％A,t11min＝60％A,t13min＝100％A,t17min＝100％A

[0686] [B]t0＝5％A,t2.5min＝5％A,t11min＝40％A,t13min＝100％A,t17min＝100％A

[0687] ;检测:DAD(210nm);检测:MSD(ESI pos/neg)质量范围:100-800;基于DAD的级分收集。

[0688] 制备型LC-MS方法4

[0689] MS仪器类型:Agilent Technologies G6130B Quadrupole;HPLC仪器类型:Agilent Technologies 1290制备型LC;柱:Waters XBridge Protein(C4,150×19mm,10μm);流速:25ml/min;柱温:室温;洗脱液A:100％乙腈;洗脱液B:在水中的10mM碳酸氢铵,pH＝9.0;梯度:

[0690] [A]t0＝2％A,t2.5min＝2％A,t11min＝30％A,t13min＝100％A,t17min＝100％A

[0691] [B]t0＝10％A,t2.5min＝10％A,t11min＝50％A,t13min＝100％A,t17min＝100％A

[0692] [C]t0＝5％A,t2.5min＝5％A,t11min＝40％A,t13min＝100％A,t17min＝100％A

[0693] ;检测:DAD(210nm);检测:MSD(ESI pos/neg)质量范围:100-800;基于DAD的级分收集

[0694] 快速色谱法

[0695] Grace Reveleris X2® C-815Flash;溶剂递送系统:具有自动启动功能的3活塞泵,4个独立通道,一次运行最多4种溶剂,当溶剂耗尽时自动切换管路;最大泵流速250mL/min;最大压力50巴(725psi);检测:UV 200-400nm,多达4个UV信号的组合和整个UV范围的扫描,ELSD;柱尺寸:仪器上4-330g,鲁尔型(luer type),750g至3000g,带可选支架。

[0696] 实例1:皂苷衍生物的合成

[0697] 以下修饰的SO1861皂苷,即皂苷衍生物,基于天然存在的SO1861合成,如表A2中总结的:

[0698]

表 A2：合成的修饰的 SO1861（SO1861 衍生物）的概述：

皂苷衍生物	分子编号	衍生化基团	衍生化基团的数目	衍生化的类型
SO1861-Ald-EMCH	**2**	醛	1	通过与 N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼（EMCH）反应将苷元核心醛基转化为腙键（分子 2）。参见图 60。
SO1861-Ald-EMCH-巯基乙醇 或 SO1861-Ald-EMCH-阻断	**3**	醛	1	通过与 EMCH 反应苷元核心醛基转化为腙键，该 EMCH 已通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化（分子 3）。
SO1861-Glu-AMPD	**3A**	葡糖醛酸	1	通过与 2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇（AMPD）反应，与皂苷的苷元核心结构的 C_3 结合的第一糖链中的葡糖醛酸单元的羧基基团转化为酰胺键。参见图 1。
SO1861-Ald-OH	**6**	醛	1	苷元核心醛基还原成醇（用 $NaBH_4$（4）处理）。参见图 2。
SO1861-Ac-OH	**8**	乙酰氧基	1	通过脱乙酰作用，与皂苷的苷元核心结构的 C_{28} 结合的第二糖链中的乙酰氧基（Me(CO)O-）基团转化为羟基基团（HO-）。参见图 3。

[0699]

SO1861-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)	**9**	醛 葡糖醛酸	2	通过与 AMPD 反应，苷元核心醛基还原成醇，与皂苷的苷元核心结构的 C_3 结合的第一糖链中的葡糖醛酸单元的羧基基团转化成酰胺键。参见图 4。
SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)	**10**	醛 乙酰氧基	2	通过脱乙酰作用，苷元核心醛基还原成醇，与皂苷的苷元核心结构的 C_{28} 结合的第二糖链中的乙酰氧基（Me(CO)O-）基团转化成羟基基团（HO-）。参见图 5。
SO1861-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)	**11**	乙酰氧基 葡糖醛酸	2	通过脱乙酰作用，与皂苷的苷元核心结构的 C_{28} 结合的第二糖链中的乙酰氧基（Me(CO)O-）基团转化为羟基基团（HO-），且通过与 AMPD 反应，与皂苷的苷元核心结构的 C_3 结合的第一糖链中的葡糖醛酸单元的羧基基团转化为酰胺键。参见图 6。
SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)	**12**	醛 乙酰氧基 葡糖醛酸	3	通过脱乙酰作用，苷元核心醛基还原成醇，与皂苷的苷元核心结构的 C_{28} 结合的第二糖链中的乙酰氧基（Me(CO)O-）基团转化为羟基基团（HO-），且通过与 AMPD 反应，与皂苷的苷元核心结构的 C_3 结合的第一糖链中的葡糖醛酸单元的羧基基团转化为酰胺键。参见图 7。
SO1861-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD)	**14**	醛 葡糖醛酸	2	通过与 EMCH 反应，苷元核心醛基转化为腙键，并通过与 AMPD 反应，与皂苷的苷元核心结构的 C_3 结合的第一糖链中的葡糖醛酸单元的羧基基团转化为酰胺键。参见图 8。

[0700]

SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH)	**15**	乙酰氧基醛	2	通过与 EMCH 反应，苷元核心醛基转化为腙键，且通过脱乙酰作用，与皂苷的苷元核心结构的 C_{28} 结合的第二糖链中的乙酰氧基（Me(CO)O-）基团转化为羟基（HO-）。参见图 9。
SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)	**16**	乙酰氧基醛 葡糖醛酸	3	通过与 EMCH 反应，苷元核心醛基转化为腙键，通过脱乙酰作用，与皂苷的苷元核心结构的 C_{28} 结合的第二糖链中的乙酰氧基（Me(CO)O-）基团转化为羟基基团（HO-），且通过与 AMPD 反应，与皂苷的苷元核心结构的 C_3 结合的第一糖链中的葡糖醛酸单元的羧基基团转化为酰胺键。参见图 10。
SO1861-Glu-AEM 或 SPT-S-Mal	**18**	葡糖醛酸	1	通过与 *N*-(2-氨基乙基)马来酰亚胺（AEM）反应，与皂苷的苷元核心结构的 C_3 结合的第一糖链中的葡糖醛酸单元的羧基基团转化为酰胺键。参见图 11。
SO1861-(Glu-AEM)-(Ac-OH)	**19**	乙酰氧基 葡糖醛酸	2	通过脱乙酰作用，与皂苷的苷元核心结构的 C_{28} 结合的第二糖链中的乙酰氧基（Me(CO)O-）基团转化为羟基基团（HO-），且通过与 AEM 反应，与皂苷的苷元核心结构的 C_3 结合的第一糖链中的葡糖醛酸单元的羧基基团转化为酰胺键。参见图 12。
SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH)	**20**	醛 葡糖醛酸	2	通过与 AEM 反应，苷元核心醛基还原成醇，与皂苷的苷元核心结构的 C_3 结合的第一糖链中的葡糖醛酸单元的羧基基团转化成酰胺键。参见图 13。

[0701]

SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH)-(Ac-OH)	**21**	醛 乙酰氧基 葡糖醛酸	3	参见图 14。
SO1861-L-N_3	**23**	醛	1	通过与分子 **22** 反应，苷元核心醛基转化为腙键（参见图 36）
SO1861-L-NHS	**25**	醛	1	通过首先与分子 **22** 反应，苷元核心醛基转化为腙键（参见图 36），提供分子 **23**，分子 23 已通过与 DBCO-NHS 反应衍生化（分子 **24**，参见图 37）
SO1861-Glu-HATU	**26**	葡糖醛酸	1	通过与 1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓 3-氧化物六氟磷酸盐反应，转化与皂苷的苷元核心结构的 C_3 结合的第一糖链中的葡糖醛酸单元的羧基基团（参见图 59）

[0702] 参考以下对SO1861衍生物的合成的描述，参考表A2和附图。

[0703] SO1861-Ald-EMCH(分子2)的合成；参见图60、图61A

[0704] 将来自肥皂草的SO1861(59mg,31.7mol)和EMCH(301mg,888μmol)置于带搅拌器的圆烧瓶中,溶解于13mL甲醇中。将TFA(400μL,cat.)添加到溶液中,并且将反应混合物在RCTB磁力搅拌器(IKA Labortechnik公司(IKA Labortechnik))上以800rpm和室温搅拌3h。搅拌3h后,将混合物用MilliQ水或PBS稀释,并使用MWCO为1kDa的再生纤维素膜管(Spectra/Por 7)用MilliQ水或PBS彻底透析24h。透析后,将溶液冻干以获得白色粉末。产量62.4mg(95%)。

[0705] 干燥的等分试样经由

[0706] ^{1}H NMR和MALDI-TOF-MS进一步用于表征。

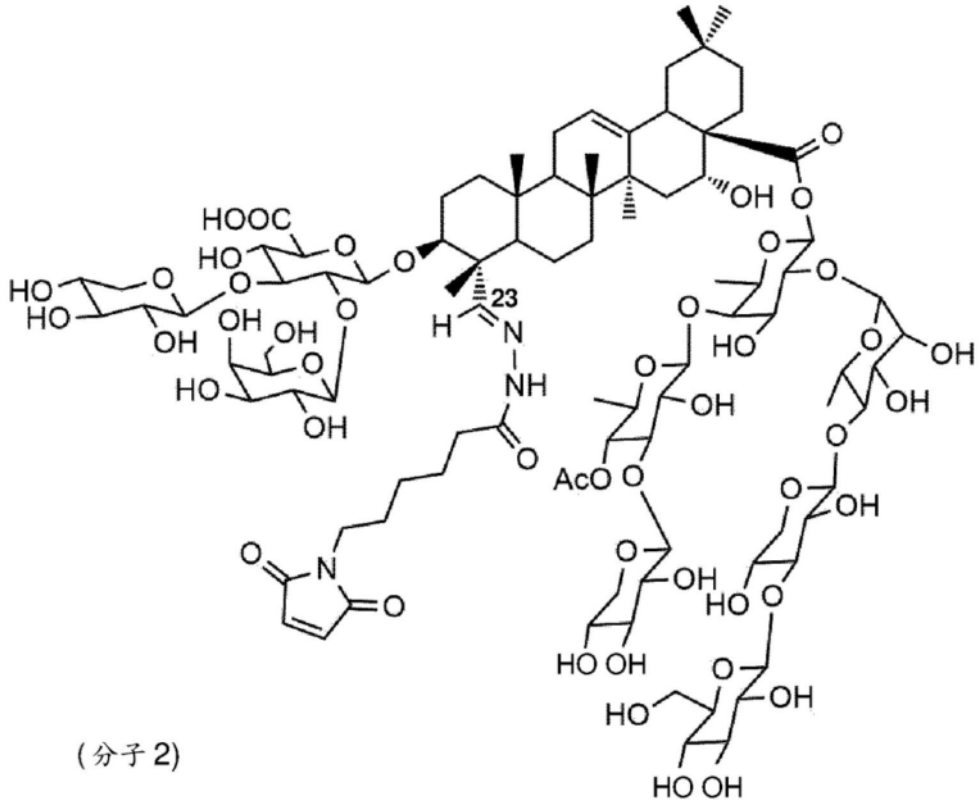
[0707] ^{1}H NMR(400MHz,甲醇-D_4)(SO1861):δ=0.50-5.50(m,皂苷三萜类和糖主链质子),9.43(1H,s,皂苷的醛质子,H^a)。

[0708] ^{1}H NMR(400MHz,甲醇-D_4)(SO1861-Ald-EMCH,PBS处理):δ=0.50-5.50(m,皂苷三萜类和糖主链质子),6.79(2H,s,马来酰亚胺质子,H^c),7.62-7.68(1H,m,腙质子,H^b)。

[0709] MALDI-TOF-MS(RP模式):m/z 2124Da([M+K]$^+$,皂苷-EMCH),m/z 2109Da([M+K]$^+$,SO1861-ALD-EMCH),m/z 2094Da([M+Na]$^+$,SO1861-ALD-EMCH)。参见图61A。

[0710] MALDI-TOF-MS(RN模式):m/z 2275Da([M-H]$^-$,皂苷-EMCH缀合物),2244Da([M-H]$^-$,皂苷-EMCH缀合物),2222Da([M-H]$^-$,皂苷-EMCH缀合物),2178Da([M-H]$^-$,皂苷-EMCH缀合物),2144Da([M-H]$^-$,皂苷-EMCH缀合物),2122Da([M-H]$^-$,皂苷-EMCH缀合物),2092Da([M-H]$^-$,皂苷-EMCH缀合物),2070Da([M-H]$^-$,SO1861-ALD-EMCH),2038Da([M-H]$^-$,SO1832-EMCH),1936Da([M-H]$^-$,SO1730-EMCH),1861Da([M-H]$^-$,SO1861)。SO1861-ALD-EMCH由分子2(化学式:$C_{93}H_{143}N_3O_{48}$,准确质量:2069.88)表示:

[0711]



(分子2)

[0712] 为了测试腙键的pH依赖性水解,将SO1861-Ald-EMCH溶解于pH为3的HCl溶液中,并在两个不同的时间点记录MALDI-TOF-MS谱(图62)。如图62A和62B所示,在图61B中可以看到

对应于SO1861-Ald-EMCH的峰在m/z 2070Da处的明显下降趋势。由于SO1861是在水解过程中产生的,因此记录了m/z 1861Da处的峰的增加伴随着m/z 2070Da处的峰的下降趋势。这些结果表明腙键对水解有反应,即使其附接在SO1861上也会被裂解。

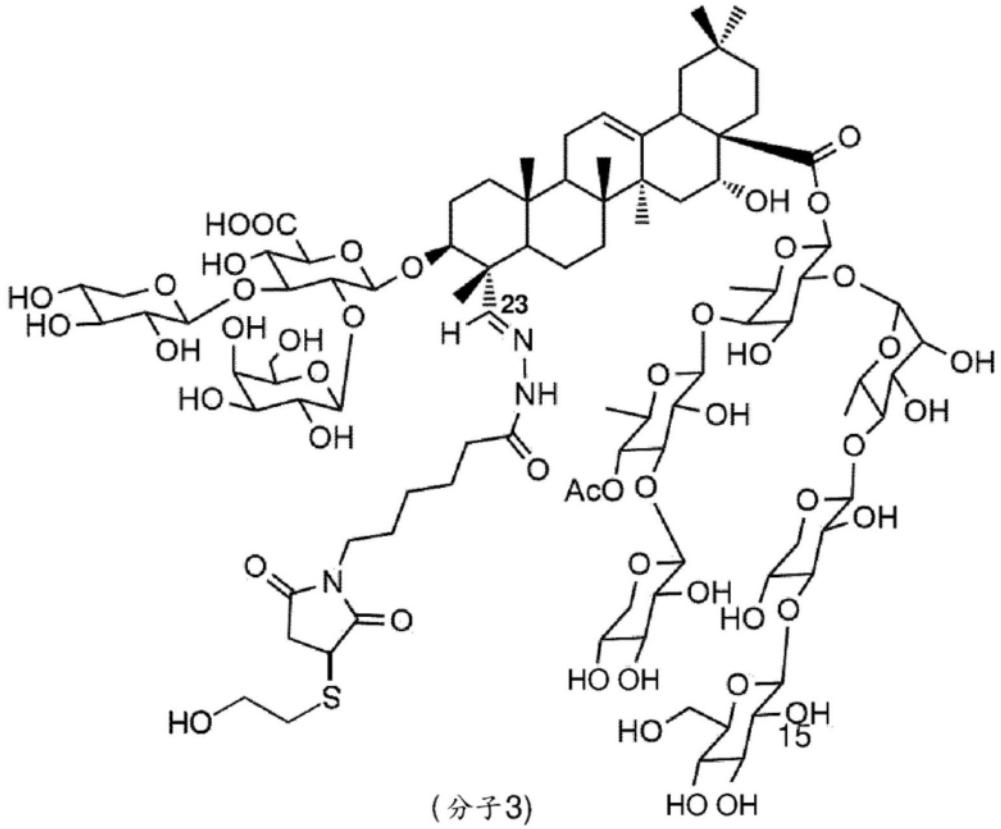
[0713] SO1861-Ald-EMCH-巯基乙醇(分子3;SO1861-Ald-EMCH-阻断)的合成;参见图60和图61B

[0714] 当在6.5-7.5的pH范围内进行时,SO1861-Ald-EMCH的马来酰亚胺基团与硫醇进行快速和特异性的迈克尔加成反应。

[0715] 向SO1861-Ald-EMCH(0.1mg,48nmol)中添加200μL巯基乙醇(18mg,230μmol),并且将溶液在ThermoMixer C(Eppendorf)上在800rpm和室温下振荡1h。振荡1h后,将溶液用甲醇稀释,并使用MWCO为1kDa的再生纤维素膜管(Spectra/Por 7)对甲醇彻底透析4h。透析后,提供SO1861-Ald-EMCH-巯基乙醇(分子3),取出等分试样并通过MALDI-TOF-MS进行分析。

[0716] MALDI-TOF-MS(RP模式):m/z 2193Da([M+K]$^+$,SO1861-Ald-EMCH-巯基乙醇),m/z 2185Da([M+K]$^+$,SO1861-Ald-EMCH-巯基乙醇),m/z 2170Da([M+Na]$^+$,SO1861-Ald-EMCH-巯基乙醇)。参见图61B。SO1861-Ald-EMCH-巯基乙醇由分子3表示(化学式:$C_{95}H_{149}N_3O_{49}S$,准确质量:2147.90)表示:

[0717]



(分子3)

[0718] SO1861-Glu-AMPD(分子3A)的合成;参见图1

[0719] 将SO1861(28.8mg,0.015mmol)、AMPD(8.11mg,0.077mmol)和HATU(17.6mg,0.046mmol)溶解于DMF(1.00mL)和NMM(8.48μL,0.077mmol)的混合物中。将反应混合物振荡1min,并在室温下静置。1小时后,使反应混合物经受制备型MP-LC。将对应于产物的^{2}级分立即汇集在一起,冷冻并冻干过夜。接下来,将产物通过使用制备型LC-MS再纯化。将对应于产

物的[3]级分立即汇集在一起，冷冻并冻干过夜，以给出呈白色蓬松固体的标题化合物(20.2mg，67％)。基于LC-MS的纯度＝93％(化学式：$C_{87}H_{139}NO_{47}$，准确质量：1949,85。

[0720] LRMS(m/z)：1949[M-1]$^{1-}$

[0721] LC-MS r.t.(min)：2.45[1B]

[0722] SO1861-Ald-OH(分子6)的合成；参见图2

[0723] 将SO1861(20.0mg，10.7μmol)溶解于甲醇(1.00mL)中。接下来，添加硼氢化钠(4.06mg，0.107mmol；$NaBH_4$)。将反应混合物振荡1min，并在室温下静置。30min后，将反应混合物用水(0.50mL)稀释，并且进行制备型MP-LC。将对应于产物的[2]级分立即汇集在一起，冷冻并冻干过夜，以给出呈白色蓬松固体的标题化合物(15.9mg，79％)。基于LC-MS的纯度97％(化学式：$C_{83}H_{132}O_{46}$，准确质量：1864,80)。

[0724] LRMS(m/z)：1865[M-1]$^{1-}$(参见图15和16)

[0725] LC-MS r.t.(min)：1.95[1B]

[0726] SO1861-Ac-OH(分子8)的合成；参见图3

[0727] 向SO1861(9.30mg，4.99μmol)中添加氢氧化钠(2.00mg，0.050mmol)在水(0.25mL)和甲醇(0.25mL)中的溶液。将反应混合物振荡1min，并在室温下静置。2小时后，使反应混合物经受制备型MP-LC。将对应于产物的[2]级分立即汇集在一起，冷冻并冻干过夜，以给出呈白色蓬松固体的标题化合物(8.86mg，97％)。基于LC-MS的纯度＝97％(化学式：$C_{81}H_{128}O_{45}$，准确质量：1820,77)。

[0728] LRMS(m/z)：1820[M-1]$^{1-}$

[0729] LC-MS r.t.(min)：1.83[1B]

[0730] SO1861-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)(分子9)的合成；参见图4

[0731] 将SO1861-Ald-OH(9.37mg，5.02μmol)、AMPD(2.64mg，0.025mmol)和BOP(6.66mg，0.015mmol)溶解于DMF(0.50mL)和NMM(5.52μL，0.050mmol)的混合物中。将反应混合物振荡1min，并在室温下静置。1小时后，使反应混合物经受制备型MP-LC。将对应于产物的[2]级分立即汇集在一起，冷冻并冻干过夜，以给出呈白色蓬松固体的标题化合物(6.32mg，64％)。基于LC-MS的纯度＝95％(化学式：$C_{87}H_{141}NO_{47}$，准确质量：1951,87。

[0732] LRMS(m/z)：1952[M-1]$^{1-}$(参见图17)

[0733] LC-MS r.t.(min)：2.45[1B]

[0734] SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)(分子10)的合成；参见图5

[0735] 向SO1861-Ald-OH(26.8mg，0.014mmol)中添加氢氧化钠(5.74mg，0.144mmol)在水(0.50mL)和甲醇(0.50mL)中的溶液。将反应混合物振荡1min，并在室温下静置。2小时后，使反应混合物经受制备型MP-LC。将对应于产物的[2]级分立即汇集在一起，冷冻并冻干过夜，以给出呈白色蓬松固体的标题化合物(24.2mg，92％)。基于LC-MS的纯度＝98％。(化学式：$C_{81}H_{130}O_{45}$，准确质量：1822,79)

[0736] LRMS(m/z)：1822[M-1]$^{1-}$

[0737] LC-MS r.t.(min)：1.81[1B]

[0738] SO1861-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)(分子11)的合成；参见图6

[0739] 将SO1861-Ac-OH(14.3mg，7.84μmol)、AMPD(4.12mg，0.039mmol)和BOP(10.4mg，0.024mmol)溶解于DMF(0.50mL)和NMM(8.62μL，0.078mmol)的混合物中。将反应混合物振荡

1min,并在室温下静置。1小时后,使反应混合物经受制备型MP-LC。将对应于产物的[2]级分立即汇集在一起,冷冻并冻干过夜。接下来,将产物通过首先使用制备型MP-LC[2],随后使用制备型LC-MS再纯化。将对应于产物的[3]级分立即汇集在一起,冷冻并冻干过夜,以给出呈白色蓬松固体的标题化合物(9.47mg,63%)。基于LC-MS的纯度=98%(化学式:$C_{85}H_{137}NO_{46}$,准确质量:1907,84)。

[0740] LRMS(m/z): 1908[M-1]$^{1-}$

[0741] LC-MS r.t.(min):2.31[1B]

[0742] SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)(分子12)的合成;参见图7

[0743] 将SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)(8.57mg,4.70μmol)、AMPD(42.58mg,0.025mmol)和BOP(6.57mg,0.015mmol)溶解于DMF(0.50mL)和NMM(5.17μL,0.047mmol)的混合物中。将反应混合物振荡1min,并在室温下静置。1小时后,使反应混合物经受制备型MP-LC。将对应于产物的[2]级分立即汇集在一起,冷冻并冻干过夜。接下来,将产物通过再次使用制备型MP-LC再纯化。将对应于产物的[2]级分立即汇集在一起,冷冻并冻干过夜,以给出呈白色蓬松固体的标题化合物(7.21mg,80%)。基于LC-MS的纯度=97.8%化学式:$C_{85}H_{139}NO_{46}$,准确质量:1909,86)

[0744] LRMS(m/z): 1910[M-1]$^{1-}$

[0745] LC-MS r.t.(min):2.21[1B]

[0746] SO1861-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD)(分子14)的合成;参见图8

[0747] 将SO1861-Glu-AMPD(10.6mg,5.43μmol)和EMCH.TFA(9.22mg,0.027mmol)溶解于甲醇(特干的,0.50mL)中。接下来,添加TFA(1.66μL,0.022mmol)。将反应混合物振荡1min,并在室温下静置。2小时后,使反应混合物经受制备型MP-LC。将对应于产物的[1]级分立即汇集在一起,冷冻并冻干过夜。接下来,将产物通过使用制备型LC-MS再纯化。将对应于产物的[3]级分汇集在一起。将所得溶液使用甲酸中和,冷冻并冻干过夜,以给出呈白色蓬松固体的标题化合物(2.61mg,22%)。基于LC-MS的纯度=95%(化学式:$C_{97}H_{152}N_4O_{49}$,准确质量:2156,95)。

[0748] LRMS(m/z):2156[M-1]$^{1-}$

[0749] LC-MS r.t.(min):2.64[1B]

[0750] SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH)(分子15)的合成;参见图9

[0751] 将SO1861-Ac-OH(9.05mg,4.97μmol)和EMCH.TFA(8.43mg,0.025mmol)溶解于甲醇(特干的,0.50mL)中。接下来,添加TFA(1.52μL,0.022mmol)。将反应混合物振荡1min,并在室温下静置。2小时后,使反应混合物经受制备型MP-LC。将对应于产物的[1]级分立即汇集在一起,冷冻并冻干过夜,以给出呈白色蓬松固体的标题化合物(6.58mg,65%)。基于LC-MS的纯度=97%(化学式:$C_{91}H_{141}N_3O_{47}$,准确质量:2027,87)。

[0752] LRMS(m/z):2028[M-1]$^{1-}$

[0753] LC-MS r.t.(min):1.96[1B]

[0754] SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)(分子16)的合成;参见图10

[0755] 将SO1861-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)(6.00mg,3.14μmol)和EMCH.TFA(5.33mg,0.016mmol)溶解于甲醇(特干的,0.50mL)中。接下来,添加TFA(0.96μL,0.013mmol)。将反应混合物振荡1min,并在室温下静置。2小时后,使反应混合物经受制备型MP-LC。将对应于产

物的[1]级分立即汇集在一起，冷冻并冻干过夜。接下来，将产物通过使用制备型LC-MS再纯化。将对应于产物的[3]级分汇集在一起。将所得溶液使用甲酸中和，冷冻并冻干过夜，以给出呈白色蓬松固体的标题化合物(1.04mg，16％)。基于LC-MS的纯度＝94％(化学式：$C_{95}H_{150}N_4O_{48}$，准确质量:2114,94)。

[0756] LRMS(m/z):2115[M-1]$^{1-}$

[0757] LC-MS r.t.(min):2.55^{1B}

[0758] SO1861-Glu-AEM(分子18)的合成;参见图11

[0759] 将SO1861(10.4mg，5.58μmol)、AEM(7.10mg，0.028mmol)和HATU(6.36mg，0.017mmol)溶解于DMF(1.00mL)和NMM(6.13μL，0.056mmol)的混合物中。将反应混合物振荡1min，并在室温下静置。1小时后，使反应混合物经受制备型MP-LC。将对应于产物的[2]级分立即汇集在一起，冷冻并冻干过夜，以给出呈白色蓬松固体的标题化合物(7.82mg，71％)。基于LC-MS的纯度＝95％(化学式：$C_{89}H_{136}N_2O_{47}$，准确质量:1984,83)。

[0760] LRMS(m/z): 1985[M-1]$^{1-}$

[0761] LC-MS r.t.(min):2.62^{1B}

[0762] SO1861-(Glu-AEM)-(Ac-OH)(分子19)的合成;参见图12

[0763] 将SO1861-Ac-OH(9.02mg，4.95μmol)、AEM(7.10mg，0.028mmol)和HATU(5.65mg，0.015mmol)溶解于DMF(0.50mL)和NMM(5.44μL，0.050mmol)的混合物中。将反应混合物振荡1min，并在室温下静置。1小时后，使反应混合物经受制备型MP-LC。将对应于产物的[2]级分立即汇集在一起，冷冻并冻干过夜，以给出呈白色蓬松固体的标题化合物(7.16mg，74％)。基于LC-MS的纯度＝96％(化学式：$C_{87}H_{134}N_2O_{46}$，准确质量:1942,82)。

[0764] LRMS(m/z):1944[M-1]$^{1-}$

[0765] LC-MS r.t.(min):2.47^{1B}

[0766] SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH)(分子20)的合成;参见图13

[0767] 将SO1861-Ald-OH(9.38mg，5.03μmol)、AEM(6.39mg，0.025mmol)和HATU(5.73mg，0.015mmol)溶解于DMF(0.50mL)和NMM(5.53μL，0.050mmol)的混合物中。将反应混合物振荡1min，并在室温下静置。1小时后，使反应混合物经受制备型MP-LC。将对应于产物的[2]级分立即汇集在一起，冷冻并冻干过夜，以给出呈白色蓬松固体的标题化合物(8.63mg，86％)。基于LC-MS的纯度＝95％(化学式：$C_{89}H_{138}N_2$047，准确质量:1986,85)。

[0768] LRMS(m/z):1987[M-1]$^{1-}$

[0769] LC-MS r.t.(min):2.62^{1B}

[0770] SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH)-(Ac-OH)(分子21)的合成;参见图14

[0771] 将SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)(8.92mg，4.89μmol)、AEM(6.54mg，0.026mmol)和HATU(5.65mg，0.015mmol)溶解于DMF(0.50mL)和NMM(5.38μL，0.049mmol)的混合物中。将反应混合物振荡1min，并在室温下静置。1小时后，使反应混合物经受制备型MP-LC。将对应于产物的[2]级分立即汇集在一起，冷冻并冻干过夜，以给出呈白色蓬松固体的标题化合物(8.92mg，94％)。基于LC-MS的纯度＝97％(化学式：$C_{87}H_{136}N_2O_{46}$，准确质量:1944,84)。

[0772] LRMS(m/z): 1944[M-1]$^{1-}$

[0773] LC-MS r.t.(min):2.46^{1B}

[0774] SO1861-L-N_3(分子23)的合成;参见图36

[0775] 化学式:$C_{94}H_{151}N_5O_{50}$,准确质量:2149,94

[0776] SO1861-L-NHS(分子25)的合成;参见图37

[0777] 将SO1861-L-N_3(7.71mg,3.58μmol)和DBCO-NHS(2.88mg,7.17μmol)溶解于干燥的DMF(0.50mL)中。将反应混合物振荡1min,并在室温下静置。30min后,将反应混合物逐滴添加到二乙醚(40mL)中。离心(7800RPM,5min)后,将上清液倾析,并且将沉淀重悬于二乙醚(20mL)中,并再次离心。倾析上清液后,将残余物溶解于水/乙腈(3:1,v/v,3mL)中,并且将所得溶液直接冷冻并冻干过夜,以给出呈白色蓬松固体的标题化合物(8.81mg,96%)。基于LC-MS的纯度84%。含有14%的水解的NHS酯(化学式:$C_{117}H_{169}N_7O_{55}$,准确质量:2552,06)。

[0778] LRMS(m/z):2551$[M-1]^{1-}$

[0779] LC-MS r.t.(min):2.76/2.78^2(异构体引起的双峰)

[0780] SO1861-Glu-HATU(分子26)的合成;参见图59

[0781] 为了产生SO1861-Glu-HATU,将SO1861的羧基基团通过肽偶联化学中使用的试剂活化以生成活性酯,即1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐(HATU)。所得的SO1861活性酯如图59所示。

[0782] 以下修饰的QS-21皂苷,即皂苷衍生物,基于天然存在的QS-21合成:

[0783]

表 A3：合成修饰的 QS-21 的概述：

皂苷衍生物	分子编号	衍生化基团	衍生化基团的数目	衍生化的类型
QS21-Ald-OH	**27**	醛	1	将苷元核心醛基还原成醇。参见图 38。
QS21-Glu-AEM	**28**	葡糖醛酸	1	通过与 *N*-(2-氨基乙基)马来酰亚胺（AEM）反应，与皂苷的苷元核心结构的 C_3 结合的第一糖链中的葡糖醛酸单元的羧基基团转化为酰胺键。参见图 39。
QS21-(Ald-OH)-(Glu-AEM)	**29**	醛 葡糖醛酸	2	通过与 AEM 反应，苷元核心醛基还原成醇，与皂苷的苷元核心结构的 C_3 结合的第一糖链中的葡糖醛酸单元的羧基基团转化成酰胺键。参见图 40。
QS21-Ald-EMCH	**30**	醛	1	通过与 EMCH 反应将苷元核心醛基转化为腙键。参见图 40B。
QS21-Glu-AMPD	**31**	葡糖醛酸	1	通过与 AMPD 反应，与皂苷的苷元核心结构的 C_3 结合的第一糖链中的葡糖醛酸单元的羧基基团转化为酰胺键。参见图 40C。
QS21-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD)	**32**	醛、葡糖醛酸	2	通过与 EMCH 反应，苷元核心醛基转化为腙键，并通过与 AMPD 反应，与皂苷的苷元核心结构的 C_3 结合的第一糖链中的葡糖醛酸单元的羧基基团转化为酰胺键。参见图 40D。

[0784]

QS21-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)	33	醛、葡糖醛酸	2	通过与 AMPD 反应，苷元核心醛基还原成醇，与皂苷的苷元核心结构的 C_3 结合的第一糖链中的葡糖醛酸单元的羧基基团转化成酰胺键。参见图 40E。

[0785] QS21-Ald-OH(分子27)的合成;参见图38

[0786] 将QS21(9.41mg,4.73μmol)溶解于甲醇(0.50mL)中。接下来,添加硼氢化钠

(1.79mg,0.047mmol)。将反应混合物振荡1min,并在室温下静置。30min后,将反应混合物用水(0.50mL)稀释,并且进行制备型MP-LC。将对应于产物的2A级分立即汇集在一起,冷冻并冻干过夜,以给出呈白色蓬松固体的标题化合物(4.68mg,50%)。基于LC-MS的纯度99%(准确质量:1990,4个异构体:Api/Xyl(2:1))。

[0787] LRMS(m/z):1990[M-1]$^{1-}$

[0788] LC-MS r.t.(min):1.25/2.31^{1B}(双峰,17/83UV-面积%,由于QS21是混合物)

[0789] QS21-Glu-AEM(分子28)的合成;参见图39

[0790] 将QS-21(2.42mg,1.22μmol;图41)、AEM(1.68mg,6.61μmol)和HATU(1.48mg,3.89μmol)溶解于DMF(0.50mL)和NMM(1.34μL,0.012mmol)的混合物中。将反应混合物振荡1min,并在室温下静置。1小时后,使反应混合物经受制备型MP-LC。将对应于产物的2A级分立即汇集在一起,冷冻并冻干过夜,以给出呈白色蓬松固体的标题化合物(1.80mg,70%)。基于LC-MS的纯度92%(准确质量:2110,4个异构体:Api/Xyl(2:1))。

[0791] LRMS(m/z):2110[M-1]$^{1-}$

[0792] LC-MS r.t.(min):2.84/2.93^{1B}(双峰,10/90UV-面积%,由于QS21是混合物)

[0793] QS21-(Ald-OH)-(Glu-AEM)(分子29)的合成;参见图40A

[0794] 将QS-21-Ald-OH(1.92mg,0.964μmol)、AEM(1.29mg,5.08μmol)和HATU(1.10mg,2.89μmol)溶解于DMF(0.50mL)和NMM(1.06μL,9.64μmol)的混合物中。将反应混合物振荡1min,并在室温下静置。1小时后,使反应混合物经受制备型MP-LC。将对应于产物的2A级分立即汇集在一起,冷冻并冻干过夜,以给出呈白色蓬松固体的标题化合物(1.46mg,72%)。基于LC-MS的纯度92%(准确质量:2112,4个异构体:Api/Xyl(2:1))。

[0795] LRMS(m/z):2112[M-1]$^{1-}$

[0796] LC-MS r.t.(min):2.83/2.92^{1B}(双峰,7/93UV-面积%,由于QS21是混合物)

[0797] QS21-Ald-EMCH(图40B;分子30)的合成

[0798] 将QS21(4.82mg,2.42μmol)和EMCH.TFA(4.11mg,0.012mmol)溶解于甲醇(特干的,0.25mL)中。将反应混合物振荡1min,并在室温下静置。2小时后,使反应混合物经受制备型MP-LC。将对应于产物的^{2A}级分立即汇集在一起,冷冻并冻干过夜。接下来,将产物通过使用制备型MP-LC再纯化。将对应于产物的^{2A}级分立即汇集在一起,冷冻并冻干过夜,以给出呈白色蓬松固体的标题化合物(2.78mg,52%)。基于LC-MS的纯度96%。

[0799] LRMS(m/z): 2196[M-1]$^{1-}$

[0800] LC-MS r.t.(min):2.44^{1B}(由于QS21是混合物而引起的多个峰)

[0801] QS21-Glu-AMPD(图40C;分子31)的合成

[0802] 将QS21(4.89mg,2.46μmol)、AMPD(1.29mg,0.012mmol)和BOP(3.26mg,7.37μmol)溶解于DMF(0.50mL)和NMM(2.70μL,0.025mmol)的混合物中。将反应混合物振荡1min,并在室温下静置。1小时后,使反应混合物经受制备型MP-LC。将对应于产物的^{2A}级分立即汇集在一起,冷冻并冻干过夜,以给出呈白色蓬松固体的标题化合物(3.76mg,74%)。基于LC-MS的纯度94%。

[0803] LRMS(m/z):2076[M-1]$^{1-}$

[0804] LC-MS r.t.(min):2.78^{1B}(由于QS21是混合物而引起的多个峰)

[0805] QS21-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD)(图40D;分子32)的合成

[0806] 将QS21-Glu(2.47mg,1.19μmol)和EMCH.TFA(2.02mg,5.95μmol)溶解于甲醇(特干的,100μL)中。接下来,添加TFA(0.36μL,4.76μmol)。将反应混合物振荡1min,并在室温下静置。2小时后,使反应混合物经受制备型MP-LC。将对应于产物的[2A]级分立即汇集在一起,冷冻并冻干过夜,以给出呈白色蓬松固体的标题化合物(2.25mg,83%)。基于LC-MS的纯度95%。

[0807] LRMS(m/z): 2283[M-1]$^{1-}$

[0808] LC-MS r.t.(min):2.88[1B](由于QS21是混合物而引起的多个峰)

[0809] QS21-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)(图40E;分子33)的合成

[0810] 将QS21-(Ald-OH)(4.90mg,2.46μmol)、AMPD(1.29mg,0.012mmol)和BOP(3.26mg,7.37μmol)溶解于DMF(0.50mL)和NMM(2.70μL,0.025mmol)的混合物中。将反应混合物振荡1min,并在室温下静置。1小时后,使反应混合物经受制备型MP-LC。将对应于产物的[2A]级分立即汇集在一起,冷冻并冻干过夜,以给出呈白色蓬松固体的标题化合物(2.16mg,42%)。基于LC-MS的纯度96%。

[0811] LRMS(m/z): 2077[M-1]$^{1-}$

[0812] LC-MS r.t.(min):2.77[1B](由于QS21是混合物而引起的多个峰)

[0813] 实例2:皂苷衍生物的活性-试验性研究

[0814] 发现本文所述的皂苷修饰基本上不干扰皂苷增强内体逃逸(修饰的皂苷或内体内的缀合物中释放的皂苷)的能力。实验结果总结于下表Ex2中。

[0815] 化学修饰的皂苷SO1861在基于细胞的生物测定中确实显示出反应性,读数为相对细胞活力。将HeLa细胞与以下构建体一起孵育72h,并评估72h孵育前后的细胞活力。在实验中,将细胞暴露于1,5pM的香石竹毒蛋白-EGF缀合物。阴性对照是与缓冲媒剂和10微克/ml皂苷孵育的细胞,不含香石竹毒蛋白-EGF。对于省略皂苷和EGF-香石竹毒蛋白两者的对照,细胞活力设置为100%。阳性对照为10微克/ml的非修饰的皂苷SO1861+香石竹毒蛋白-EGF。72h后的细胞活力基本上为0%。对于化学修饰的皂苷变体,测试了10微克/ml皂苷与1,5pM的香石竹毒蛋白-EGF的组合。SO1861-Ald-EMCH在10微克/ml时降低了细胞活力。

[0816] 这些数据表明,可以在游离醛基或游离羰基基团上对皂苷进行修饰,而不会失去内体逃逸增强活性。

[0817] 表Ex2.当与靶向毒素(EGF香石竹毒蛋白)共同施用时,SO1861和SO1861衍生物的细胞杀伤活性(+或-)。与未处理的表达EGFR的细胞(例如A431,HeLa)对照相比,共同施用导致增强的细胞杀伤

[0818]

	仅缓冲液	SO1861	SO1861-Ald-EMCH(也称为“SO1861-EMCH”)	SO1861-L-N_3(也称为“SO1861 N3/叠氮化物”)	SO1861-Glu-HATU(也称为“SO1861-HATU”和“SO1861-(S)”)
10 μg/ml SO1861 或 SO1861-衍	-	-	-	-	-

[0819]

生物					
10 μg/ml SO1861 或 SO1861-衍生物 +1.5 pM EGF 香石竹毒蛋白	-	+	+	+	+

[0820] 实例3:皂苷衍生物的活性-详细研究

[0821] 将各种皂苷(例如SO1861、QS-21)作为“游离的”未缀合分子与配体毒素融合物(例如EGF-香石竹毒蛋白)或抗体-蛋白质毒素缀合物组合共同施用至细胞,使得靶表达细胞的细胞杀伤活性增强。

[0822] 本发明人在分子内的不同位置对SO1861(从肥皂草的根提取物中分离和纯化)和QS21(从肥皂草皂树分离和纯化;沙漠之王国际公司(Desert King))进行化学修饰(单修饰、双修饰或三修饰),从而提供一系列皂苷衍生物,如表A2和A3所概括。测试皂苷衍生物的1)配体毒素(修饰的SO1861/QS21滴定+5pM EGF香石竹毒蛋白)对表达EGFR的细胞(HeLa和A431)的内体逃逸增强活性;2)对HeLa和A431的内在细胞毒性(修饰的SO1861/QS21滴定);和3)人红细胞溶血活性(对人红细胞的修饰的SO1861/QS21滴定)。

[0823] 为了确定内体逃逸增强活性,在表达EGFR的细胞(HeLa和A431)上存在非有效固定浓度的5pM的EGF-香石竹毒蛋白的情况下,滴定修饰的SO1861(参见图18A-B和19A-B)。此外,还测定了在存在非有效固定浓度的5pm EGF-香石竹毒蛋白的情况下滴定的皂苷衍生物的内体逃逸增强活性(参见图23A-B的SO1861与SO1861-Ald-EMCH和SO1861-Ald-EMCH-阻断-的比较,以及图24A-B的SO1861与SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH)、SO1861-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD)和SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)的比较)。这表明,与SO1861相比具有单修饰的修饰的皂苷在以下浓度下显示活性:HeLa上的SO1861-Ald-OH:IC50＝600nM和A431:IC50＝600nM,HeLa上的SO1861-Glu-AMPD:IC50＝600nM和A431:IC50＝600nM,HeLa上的SO1861-Ac-OH:IC50＝1000nM和A431:IC50＝800nM,HeLa上的SO1861-Glu-AEM:IC50＝1500nM和A431:IC50＝2000nM,以及HeLa上的SO1861-Ald-EMCH:IC50＝2000nM和A431:IC50＝2000nM,并且双修饰显示活性,IC50值如下:HeLa上的SO1861-(Ac-OH)-(Glu-AMPD):IC50＝3000nM和A431:IC50＝3000nM,HeLa上的SO1861-(Ald-OH)-(Glu-AMPD):IC50＝4000nM和A431:IC50＝4000nM,HeLa上的SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH):IC50＝4000nM和A431:IC50＝5000nM,HeLa上的SO1861-(Glu-AEM)-(Ac-OH):IC50＝8000nM和A431:IC50＝4000nM,HeLa上的SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH):IC50＝8000nM和A431:IC50＝10.000nM,HeLa上的SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH):IC50＝40.000nM和A431:IC50＝20.000nM。测试的三修饰在当前浓度下未显示活性。使用未修饰的SO1861对照,获得以下IC50值:在HeLa:IC50＝100nM,以及在A431:IC50＝200nM。修饰的QS21的内体逃逸增强通过在表达EGFR的细胞上非有效固定浓度5pM EGF-香石竹毒蛋白存在下滴定皂苷衍生物来确定(参见图30A和30B)。这表明,与未修饰的QS21相比,以下修饰的QS21在以下浓度下显示活性:HeLa上的QS21:IC50

＝200nM和A431:IC50＝200nM,HeLa上的QS21-Ald-OH:IC50＝600nM和A431:IC50＝600nM,HeLa上的QS21-Glu-AEM:IC50＝600nM和A431:IC50＝700nM,HeLa上的QS21-(Ald-OH)-(Glu-AEM):IC50＝1500nM和A431:IC50＝3000nM。总之,在HeLa和A431细胞中,未修饰的SO1861和QS21在IC50＝200nM时都是有效的。单SO1861/QS21修饰(SO1861-Ald-EMCH、SO1861-Ald-EMCH-阻断、SO1861-Glu-AMPD、SO1861-Ald-OH、SO1861-Ac-OH、SO1861-Glu-AEM、QS21-Ald-OH、QS21-Glu-AEM)在HeLa或A431细胞中显示IC50＝600nM-2000nM时的活性(表A5和表A6),而双SO1861/QS21修饰在HeLa或A431细胞中显示IC50＝1500-40.000nM时的活性(表A5和表A6)。对于SO1861的三修饰,在高达20.000nM时没有观察到活性。

[0824] 如上所述,为了确定内体逃逸增强活性,在表达EGFR的细胞(HeLa和A431)上存在非有效固定浓度为5pM的EGF香石竹毒蛋白的情况下滴定SO1861衍生物、QS21衍生物和它们的非衍生化对应物。这表明在HeLa和A431细胞中,非衍生化SO1861和非衍生化QS21以及QS21衍生物QS21-Glu-AMPD在IC50＝200nM时有效。单SO1861/QS21修饰(SO1861-Ald-EMCH、SO1861-Ald-EMCH(阻断)、(SO1861-Ald-EMCH(巯基乙醇)、SO1861-Glu-AMPD、SO1861-(Ald-OH)、SO1861-Ac-OH、SO1861-Glu-AEM、QS21-Ald-EMCH、QS21-(Ald-OH)、QS21-Glu-AEM)在HeLa或A431细胞中显示IC50＝600nM-2000nM时的活性(表A5和表A6),而双SO1861修饰和双QS21修饰在HeLa或A431细胞中显示IC50＝1500-40.000nM时的活性(表A5和表A6)。对于SO1861的三修饰,在高达20.000nM时没有观察到活性。

[0825] 为了测定毒性,在HeLa细胞(参见图20A和21A)和A431细胞(参见图20B和21B)上滴定修饰的SO1861。图25A和25B描述了SO1861、SO1861-Ald-EMCH、SO1861-Ald-EMCH-阻断的毒性试验的细节,图26A和26B显示了SO1861、SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH)、SO1861-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD)和SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)的细节。这揭示了未修饰的SO1861在HeLa细胞上表现出最强的内在毒性:IC50＝2000nM,而HeLa细胞上的单修饰SO1861-Ac在IC50＝10.000nM时显示毒性。对于所有其他SO1861衍生物,对HeLa细胞的内在毒性(IC50)高于20.000nM。在A431细胞中,在IC50:1000nM时观察到未修饰的SO1861的毒性,而单修饰SO1861-Ac-OH、SO1861-Ald-OH、SO1861-Glu-AMPD、SO1861-Ald-EMCH分别在IC50＝2000nM、IC50＝7000nM、IC50＝20.000nM和IC50＝30.000nM时显示毒性。为了测定修饰的QS21的毒性,在HeLa细胞(参见图31A)和A431细胞(图31B)上滴定皂苷衍生物。这揭示了QS21对HeLa细胞显示毒性:IC50＝6000nM,以及对A431细胞显示毒性:IC50＝3000nM,HeLa细胞上的QS21-Ald-OH:IC50＝20.000nM,以及A431细胞:IC50＝20.000nM,HeLa细胞上的QS21-Glu-AEM:IC50＝>100.000nM,以及A431细胞:IC50＝>100.000nM,HeLa细胞上的QS21-(Ald-OH)-(Glu-AEM):IC50＝>100.000nM,以及A431细胞:IC50＝>100.000nM,对于SO1861或QS21双修饰和SO1861三修饰,在高达100.000nM时没有观察到毒性。如上所述,在HeLa和A431细胞上滴定未修饰或修饰的SO1861或QS21。这揭示了未修饰的SO1861在IC50＝1000nM(HeLa)和IC50＝2000nM(A431)时显示毒性,而QS21在IC50＝6000nM(HeLa)、IC50＝3000nM(A431)时显示毒性,且QS21-Glu-AMPD在IC50＝9000nM(HeLa)和IC50＝5000nM(A431)时显示毒性(表A5和A6)。对于HeLa细胞上的单SO1861修饰和单QS21修饰,SO1861-Ald-EMCH、SO1861-Ald-EMCH(阻断)、SO1861-(Ald-OH)、SO1861-Glu-AEM、QS21-Ald-EMCH、QS21-Glu-AEM在高达100.000nM时没有显示毒性,而SO1861-Glu-AMPD、SO1861-Ac-OH、QS21-(Ald-OH)分别在IC50＝20.000nM、IC50＝10.000nM、IC50＝20.000nM时显示毒性(表

A5和A6)。在A431细胞中,SO1861-Glu-AEM和QS21-Glu-AEM在高达100.000nM时没有显示毒性,而对于SO1861-Ald-EMCH(IC50＝30.000nM)、SO1861-Ald-EMCH(阻断)(IC50＝30.000nM)、SO1861-(Ald-OH)(IC50＝7000nM)、SO1861-Ac-OH(IC50＝2000nM)、SO1861-Glu-AMPD(IC50＝20.000nM)、QS21-Ald-EMCH(IC50＝30.000nM)、QS21-(Ald-OH)(IC50＝20.000nM)可以观察到毒性(表A5和A6)。对于SO1861双修饰或QS21双修饰和SO1861三修饰,在高达100.000nM时没有观察到毒性(表A5和A6)。

[0826] 另外,通过人红细胞溶血测定法确定未修饰和修饰的SO1861的溶血活性(参见图22、图27、图28和图32)。这揭示了未修饰的SO1861在IC50＝8000nM时显示活性,并且未修饰的QS21在IC50＝3000nM时显示活性。单修饰SO1861-Ald-EMCH在高达1.000.000nM时没有显示溶血活性,而对于SO1861-Ald-EMCH-阻断(IC50＝300.000nM)、SO1861-Ald-OH(IC50＝30.000nM)、SO1861-Ac-OH(IC50＝20.000nM)、SO1861-Glu-AMPD(IC50＝20.000nM)、SO1861-Glu-AEM(IC50＝30.000nM)、QS21-Ald-OH(IC50＝20.000nM)和QS21-Glu-AEM(IC50＝10.000nM)可观察到人红细胞的溶血活性(表A5和表A6)。对于SO1861或QS21双修饰,对于SO1861-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD)、SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH)、SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH)和QS21-(Ald-OH)-(Glu-AEM)没有观察到溶血活性(高达1.000.000nM),而对于SO1861-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)(IC50＝100.000)、SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)(IC50＝200.000)、SO1861-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)(IC50＝140.000)、SO1861-(Glu-AEM)-(Ac-OH)(IC50＝100.000)观察到溶血活性。对于SO1861三修饰,在高达100.000nM时都未观察到溶血性。溶血测定法揭示,未修饰的SO1861在IC50＝8000nM时具有溶血活性,未修饰的QS21在IC50＝3000nM时具有溶血活性,修饰的QS21-Glu-AMPD在IC50＝3000nM时具有溶血活性。单修饰SO1861-Ald-EMCH在高达1.000.000nM时没有显示溶血活性,而对于SO1861-Ald-EMCH(阻断)(IC50＝300.000nM)、SO1861-(Ald-OH)(IC50＝30.000nM)、SO1861-Ac-OH(IC50＝20.000nM)、SO1861-Glu-AMPD(IC50＝20.000nM)、SO1861-Glu-AEM(IC50＝30.000nM)、QS21-Ald-EMCH(IC50＝30.000nM)、QS21-(Ald-OH)(IC50＝20.000nM)和QS21-Glu-AEM(IC50＝10.000nM)可观察到人红细胞的溶血活性(表A5和A6)。对于SO1861双修饰或QS21双修饰,对于SO1861-Ald-EMCH-(Glu-AMPD)、SO1861-(Ac-OH)-EMCH、SO1861-(Ald-OH)-(Glu-AEM)、QS21-Ald-EMCH-(Glu-AMPD)和QS21-(Ald-OH)-(Glu-AEM)没有观察到溶血活性(高达1.000.000nM),而对于SO1861-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)(IC50＝100.000nM)、SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)(IC50＝200.000nM)、SO1861-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)(IC50＝140.000nM)、SO1861-(Ac-OH)-(Glu-AEM)(IC50＝100.000nM)和QS21-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)(IC50＝40.000nM)观察到溶血活性(表A5和A6)。对于SO1861三修饰,在高达100.000nM时都未观察到溶血性(表A5和A6)。

[0827] 测试了各种QS皂苷级分的内体逃逸增强活性(在HeLa和A431细胞上滴定皂苷+5pM西妥昔单抗-皂草毒蛋白,参见图33A-B)、毒性(在HeLa和A431细胞上滴定皂苷,参见图34A-B)和溶血活性(在人红细胞上滴定皂苷,参见图32和图35)。这揭示了QS21(级分)、QS17(级分)、QS18(级分)在HeLa细胞和A431细胞中在200nM时显示活性,而QS7(级分)在IC50＝6000nM(HeLa)和10.000nM(A431)时显示活性。当观察到在毒性测定过程中,QS21(级分)、QS17(级分)、QS18(级分)在HeLa细胞和A431细胞中在IC50＝10.000nM时显示毒性,而QS7(级分)在IC50＝20.000nM时显示毒性(图34)。接下来,进行溶血测定,这揭示了QS21(级分)

在IC50＝3000nM时的溶血活性,QS17(级分)、QS18(级分)在IC50＝5000nM时的溶血活性,而对于QS7(级分),在高达20.000nM时没有检测到溶血活性(图35)。

[0828] 测试了各种SO皂苷(SO1862(异构体)、SO1832、SO1904)以及抗体-SO1861缀合物(西妥昔单抗-SO1861(DAR4)、曲妥珠单抗-SO1861(DAR4))的溶血活性。这表明SO1862(异构体、SO1832、SO1904)的溶血活性与SO1861(IC50＝10.000nM)相当(图29)。西妥昔单抗-SO1861(DAR4)缀合物在高达60.000nM时没有显示溶血活性,而曲妥珠单抗-SO1861(DAR4)在60.000nM以后(IC50＝200.000nM)显示初始溶血活性(图29)。

[0829] 当比较SO1861、SO1861-Ald-EMCH和SO1861-Ald-EMCH-巯基乙醇(SO1861-Ald-EMCH-阻断)的细胞毒性、溶血活性和内体逃逸增强活性时,后两者的细胞毒性、溶血活性和内体逃逸增强活性生物测定中的活性相似或基本相同,并且后两者的细胞毒性和溶血活性低于SO1861。也参见表A5和表A6。

[0830] 细胞活力测定

[0831] 通过根据制造商的说明(CellTiter 96®AQueous单溶液细胞增殖测定试剂盒,普洛麦格公司(Promega))进行的MTS测定确定细胞活力。将MTS溶液在DMEM中稀释20x,不含补充有10％FBS(PAN-Biotech GmbH公司)的苯酚红(PAN-Biotech GmbH公司)。每孔的细胞用200μL PBS洗涤一次,之后每孔添加100μL稀释的MTS溶液。将板在37℃下孵育大约20-30分钟。随后,在Thermo Scientific Multiskan FC板读取器(赛默科技公司)上测量492nm处的光密度。为了定量,在计算未处理/处理细胞的比率之前,通过将未处理孔的背景校正信号除以处理孔的背景校正信号,从所有其他孔中减去‘仅培养基’孔的背景信号。

[0832] FACS分析

[0833] 将细胞以在10cm培养皿中500,000c/板接种在补充有10％胎牛血清(PAN-Biotech GmbH公司)和1％青霉素/链霉素(PAN-Biotech GmbH公司)的DMEM(PAN-Biotech GmbH公司)中,并孵育48小时(5％CO_2,37℃),直到达到90％的融合。接下来,将细胞胰蛋白酶化(TryplE Express,吉布科赛默科技公司)为单个细胞。将0.75x10^6个细胞转移到15mL falcon管中并离心(1,400rpm,3min)。丢弃上清液,同时将细胞沉淀浸没。通过在涡旋振荡器上轻轻敲击falcon管来解离沉淀,并将细胞用4mL冷PBS(不含Mg^{2+}和Ca^{2+},2％FBS)洗涤。洗涤后,将细胞重悬于3mL冷PBS(不含Mg^{2+}和Ca^{2+},2％FBS)中,并在3个圆底FACS管(1mL/管)中平均分配。再次离心细胞,重悬于200μL冷PBS(不含Mg^{2+}和Ca^{2+},2％FBS)或200μL抗体溶液中;在195μL冷PBS(不含Mg2+和Ca2+,2％FBS)中含有5μL抗体。将APC小鼠IgG1,κ同种型Ctrl FC(#400122,生物传奇公司(Biolegend))用作同种型对照,并且使用APC抗人EGFR(#352906,生物传奇公司)。将样品在管滚轴混合器(roller mixer)上在4℃下孵育30min。然后,将细胞用冷PBS(不含Mg^{2+}和Ca^{2+},2％FBS)洗涤3x,并在室温下使用PBS中的2％PFA溶液固定20min。将细胞用冷PBS洗涤2x,并重悬于250-350μL冷PBS中用于FACS分析。使用BD FACSCanto II流式细胞仪系统(BD生物科学公司)和FlowJo软件分析样品。表A4总结了FACS分析的结果。

[0834] 表A4.各种细胞系中EGFR和HER2的细胞表面表达水平(平均荧光强度(MFI))。

[0835]

细胞系	EGFR 表达水平（MFI）	HER2 表达（MFI）
A431	1593	10
HeLa	91	7
SK-BR-3	28	1162
A2058	1	5

[0836] 溶血测定法

[0837] 使用Ficoll梯度从血沉棕黄层中分离红细胞(RBC)。将获得的RBC沉淀(约4-5ml)用50ml DPBS(不含Ca^{2+}/Mg^{2+},PAN-Biotech GmbH公司)洗涤2x。将细胞通过在RT下以800xg离心10min沉淀。基于总细胞计数,将RBC计数并以500.000.000c/ml重悬于DPBS(不含Ca^{2+}/Mg^{2+})中。

[0838] 在DPBS(含Ca^{2+}/Mg^{2+},PAN-Biotech GmbH公司)中以1.11x的最终强度制备皂苷稀释液。对于阳性裂解对照,在$DPBS^{+/+}$中制备0.02%Triton-X100溶液。在96孔V型底板中,所有的化合物溶液以135µl/孔分配。向其中加入15µl RBC悬浮液,并快速混合(10秒-600rpm)。将板在RT下温和搅拌下孵育30min。之后,将板以800xg旋转10min以沉淀RBC,并将100-120µl上清液转移至标准96wp(96孔板)。随后,在Thermo Scientific Multiskan FC板读取器(赛默科技公司)上测量405nm处的OD。为了定量,在计算与0.02%Triton-X100相比的溶血百分比之前,通过将处理孔的背景校正信号除以0.02%Triton-X100孔的背景校正信号(x 100),从所有其他孔中减去“仅$DPBS^{+/+}$”孔的背景信号。

[0839] 表A5.用SO1861、SO1861衍生物、QS-21衍生物和QS-21处理红细胞和HeLa细胞。

[0840]

缀合物样品	IC50 nM（活性）	IC50 nM（毒性）	IC50 nM（溶血）	比率：IC50毒性/IC50活性	比率：IC50溶血/IC50活性
SO1861	200	2000	10.000	11	70
QS21	200	6000	3000	30	15
SO1861-Ald-EMCH	1500	> 100.000	> 1.000.000	> 50	> 500
SO1861-Ald-EMCH-阻断[i]	1500	> 100.000	300.000	> 50	200
SO1861-Glu-AMPD	600	20.000	20.000	66	66
SO1861-Ald-OH	600	> 100.000	30.000	> 166	88
SO1861-Ac-OH	1.000	10.000	20.000	10	30
SO1861-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)	4.000	> 100.000	100.000	> 25	25
SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)	5.000	> 100.000	200.000	> 20	40
SO1861-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)	3.000	> 100.000	140.000	> 33	46
SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)	> 20.000	> 100.000	> 1.000.000	无活性/无毒性	无活性/无毒性
SO1861-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD)	5000	> 100.000	> 1.000.000	> 20	> 200
SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH)	8.000	> 100.000	> 1.000.000	> 12	> 125

[0841]

SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)	> 20.000	> 100.000	> 1.000.000	无活性/无毒性	无活性/无毒性
SO1861-Glu-AEM	1.500	> 100.000	30.000	> 66	20
SO1861-(Glu-AEM)-(Ac-OH)	8.000	> 100.000	100.000	> 12	12
SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH)	40.000	> 100.000	> 1.000.000	> 2	> 25
SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH)-(Ac-OH)	> 20.000	> 100.000	> 1.000.000	无活性/无毒性	无活性/无毒性
QS21-Ald-OH	600	20.000	20.000	33	
QS21-Glu-AEM	600	> 100.000	10.000	> 166	16
QS21-(Ald-OH)-(Glu-AEM)	1500	> 100.000	> 1.000.000	> 50	> 500

[0842] 参见分子3,也称为SO1861-Ald-EMCH-巯基乙醇或SO1861-Ald-EMCH(巯基乙醇)

[0843] 表A6.用SO1861、SO1861衍生物、QS-21衍生物和QS-21处理红细胞和A431细胞。

[0844]

缀合物样品	IC50 nM（活性）	IC50 nM（毒性）	IC50 nM（溶血）	比率：IC50毒性/IC50活性	比率：IC50溶血/IC50活性
SO1861	200	1000	8000	5	40
QS21	200	3000	3000	15	15
SO1861-Ald-EMCH	1500	30.000	> 1.000.000	15	> 500
SO1861-Ald-EMCH-阻断	1500	30.000	300.000	20	200

[0845]

SO1861-Glu-AMPD	600	20.000	20.000	33	33
SO1861-Ald-OH	600	7000	30.000	11	50
SO1861-Ac-OH	800	2000	20.000	2,5	25
SO1861-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)	4.000	> 100.000	100.000	> 25	25
SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)	4.000	> 100.000	200.000	> 25	50
SO1861-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)	3.000	> 100.000	140.000	> 33	46
SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)	> 20.000	> 100.000	> 1.000.000	无活性/无毒性	无活性/无毒性
SO1861-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD)	15.000	> 100.000	> 1.000.000	> 7	> 66
SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH)	10.000	> 100.000	> 1.000.000	> 10	> 100
SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)	> 20.000	> 100.000	> 1.000.000	无活性/无毒性	无活性/无毒性
SO1861-Glu-AEM	2000	> 100.000	30.000	> 50	15
SO1861-(Glu-AEM)-(Ac-OH)	4.000	> 100.000	100.000	> 25	25
SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH)	20.000	> 100.000	> 1.000.000	> 50	> 50
SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH)-(Ac-OH)	> 20.000	> 100.000	> 1.000.000	无活性/无毒性	无活性/无毒性
QS21-Ald-OH	600	20.000	20.000	33	33
QS21-Glu-AEM	700	> 100.000	10.000	> 142	14
QS21-(Ald-OH)-(Glu-AEM)	3000	> 100.000	> 1.000.000	> 33	> 333

[0846] 实例4:皂苷衍生物的临界胶束浓度(CMC)材料与方法

[0847] 通过DeVendittis等人(A fluorimetric method for the estimation of the critical micelle concentration of surfactants[用于估计表面活性剂临界胶束浓度的荧光法],Analytical Biochemistry[分析生物化学],第115卷,第2期,1981年8月,第278-286页)的方法如下测定来源于肥皂草(SO)(表A7)和来源于肥皂草皂树(QS)(表A8和表A9)的皂苷的临界胶束浓度(CMC):

[0848] 在覆盖CMC以下和以上的范围的1至1400μM范围的皂苷干重浓度范围内测定了纯净水(MQ)或PBS(杜氏PBS+/+)中8-苯胺萘(Anilinonaphthalene)-1-磺酸(ANS)的发射谱。在CMC以上,ANS的荧光产率增加,最大发射波长减小,这是由于荧光染料被分成胶束。在

Fluoroskan Ascent FL(赛默科技公司)上记录355nm的激发波长和460nm的发射波长时的荧光产率。每个样品和测量使用6μg(浓度为75.86μM)的ANS。

[0849] 结果

[0850] SO1861皂苷

[0851] 官能团醛(Ald)、葡糖醛酸(Glu)的化学修饰和乙酰基基团(Ac)的去除显示了对各自皂苷胶束性质的影响。如图42所示,SO1861皂苷上各个官能团的单一修饰显著影响了胶束形成能力,这表现在所获得的ANS相对荧光值的斜率中。对葡糖醛酸(SO1861-Glu-AMPD、SO1861-Glu-AEM)的修饰明显导致斜率更陡(图42),从而导致天然SO1861获得的CMC值更低,为185μM。对于SO1861-Ald-EMCH阻断样品也获得了类似的观察结果。然而,对醛和乙酰基基团的修饰(SO1861-Ald-OH、SO1861-Ald-EMCH、SO1861-Ac-OH)导致明显更平坦的斜率(图42),导致相对于天然SO1861更高的CMC值。SO1861-Ald-EMCH样品特别令人感兴趣,因为获得的斜率几乎平坦,且即使浓度高达800μM,也无法确定CMC。

[0852] 对于SO1861皂苷的双修饰(图43)和三修饰(图44)已经获得了关于修饰位点的类似观察结果。虽然对葡糖醛酸(SO1861-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)、SO1861-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)、SO1861-(Glu-AEM)-(Ac-OH)、SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH)、SO1861-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD))的修饰导致更陡的ANS荧光产率斜率并因此导致更低的CMC值,但对醛和乙酰基位置(SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)、SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH))的修饰导致平坦的ANS荧光产率斜率并因此导致相对于天然SO1861增加的CMC值(表A7)。

[0853] 当比较三修饰的皂苷SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH)-(Ac-OH)和SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)时,SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH)-(Ac-OH)的葡糖醛酸修饰导致各ANS荧光产率的斜率更平,而SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)的葡糖醛酸修饰导致各ANS荧光产率相对于天然SO1861的斜率更陡(图44)。这些结果表明,在考虑CMC的情况下在醛和/或乙酰氧基位置修饰的重要性,因为即使在Glu修饰的衍生物(其具有比游离皂苷更低的CMC)中,当考虑CMC时,所述醛和/或乙酰氧基修饰可以增加CMC,至少部分地减轻Glu修饰的负面影响。

[0854] 表A7.在PBS中确定的SO皂苷的CMC值

[0855]

皂苷	CMC（μM）
SO1861	185 ± 19
SO1861-Ald-EMCH	n.d.
SO1861-Ac-OH	350 ± 35
SO1861-Ald-OH	135 ± 14
SO1861-Glu-AMPD	50 ± 5
SO1861-Ald-EMCH-阻断	50 ± 5
SO1861-Glu-AEM	45 ± 5
SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH)	> 300
SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)	> 280
SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH)	90 ± 10
SO1861-(Glu-AEM)-(Ac-OH)	90 ± 10
SO1861-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)	90 ± 10
SO1861-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD)	> 30
SO1861-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)	50 ± 5
SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH)-(Ac-OH)	> 150
SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)	120 ± 12

[0856]

SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)	n.d.

[0857] QS皂苷

[0858] 对于来源于肥皂草皂树(QS)的皂苷,已经确定了QS7、QS17、QS18、QS21 Frac和QS21 SP CMC值,如表A8所示。如图45所示,相关QS皂苷的ANS荧光产率的斜率与导出的CMC值相对应。所获得的CMC值显示下降趋势,从最高CMC值49μM的QS21 SP开始,QS-17、QS-18和QS-21Frac均显示在70μM左右的相似CMC值。最后,对于QS-7,获得了230μM的CMC值。

[0859] 当比较在纯净水(MQ)和PBS中测量的QS21 SP的ANS荧光产率时,纯净水(MQ)中的斜率略陡,导致纯净水中的CMC值预期略高(图46,表A9)。

[0860] 对于单修饰的QS21皂苷QS21-Ald-EMCH(分子30;图40B)、QS21-Glu-AEM、QS21-(Ald-OH)和QS21-Glu-AMPD(图47A、图47B),仅葡糖醛酸上的AMPD修饰(QS21-Glu-AMPD,图47B)导致ANS荧光产率相对于天然QS21的斜率更陡,产生40μM的更低CMC值(表A9)。葡糖醛酸(QS21-Glu-AEM)和醛位置(QS21-(Ald-OH)、QS21-Ald-EMCH)的所有其他QS21单修饰导致比天然QS21更平坦的ANS荧光产率斜率(图47B)。

[0861] 与肥皂草皂苷SO1861的双修饰的发现相似,QS21皂苷的AldGlu修饰(QS21-(Ald-OH)-(Glu-AMPD),图40E,分子33,图47C)导致ANS荧光产率相对于天然QS21的斜率更陡,产生39μM的更低CMC值(表A9)。葡糖醛酸和醛位置(QS21-(Ald-OH)-(Glu-AEM)、QS21-Ald-EMCH-(Glu-AEM),图47C)的所有其他QS21双修饰导致比天然QS21更平坦的ANS荧光产率斜率。

[0862] 表A8.在纯净水(MQ)中确定的QS皂苷的CMC值

[0863]

皂苷	CMC(μM)
QS7	230±25
QS21(Frac)	75±8
QS17	70±7
QS18	68±7
QS21(SP)	49±5

[0864] 表A9.在PBS中确定的修饰的QS21皂苷的CMC值

[0865]

皂苷	CMC(μM)
MQ中的QS21(SP)	49±5
PBS中的QS21(SP)	40±5
QS21-Ald-OH	>60
QS21-Ald-EMCH	n.d.
QS21-Glu-AMPD	20
QS21-Glu-AEM	n.d.
QS21-(Ald-OH)-(Glu-AEM)	n.d.
QS21-Ald-EMCH-(Glu-AMPD)	n.d.
QS21-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)	39±4

[0866] 实例5:SO1861和SO1861-Ald-EMCH的内体逃逸增强活性

[0867] 测试了SO1861和SO1861-Ald EMCH(也称为SO1861-EMCH,例如在图48-58中)增强靶向蛋白毒素的内体逃逸的能力。为此,在表达EGFR的细胞(A431)上,以10pM西妥昔单抗-皂草毒蛋白(西妥昔单抗与蛋白毒素皂草毒蛋白缀合,具有DAR4)的固定浓度滴定SO1861或SO1861-Ald EMCH。这表明,SO1861(IC50=800nM)和SO1861-Ald EMCH(IC50=2000nM)与10pM西妥昔单抗-皂草毒蛋白组合诱导A431细胞的有效细胞杀伤,而单独SO1861或SO1861-Ald EMCH未显示细胞杀伤活性(图48)。

[0868] 接下来,在不同固定浓度的SO1861或SO1861 Ald EMCH上滴定西妥昔单抗-香石竹毒蛋白或西妥昔单抗-皂草毒蛋白。这表明,在4000nM SO1861-Ald-EMCH、4829nM SO1861-Ald-EMCH或1500nM SO1861的存在下,使用低pM浓度的西妥昔单抗-香石竹毒蛋白(IC50=1pM,图49)或西妥昔单抗-皂草毒蛋白(IC50=0,5pM,图50)可有效杀伤细胞。300nM SO1861或300nM SO1861-Ald-EMCH未观察到这种细胞杀伤效应(图49和50)。

[0869] 接下来,在表达EGFR的细胞(A431)上,以10pM EGF香石竹毒蛋白(EGFR靶向融合蛋白毒素)的固定浓度滴定SO1861或SO1861-Ald-EMCH。这表明,SO1861(IC50=800nM)和SO1861-Ald-EMCH(IC50=2000nM)与10pM EGF香石竹毒蛋白组合诱导A431细胞的有效细胞杀伤,而单独SO1861或SO1861-Ald-EMCH未显示细胞杀伤活性(图51)。

[0870] 接下来,在不同固定浓度的SO1861或SO1861-Ald-EMCH上滴定EGF香石竹毒蛋白。这表明,在4829nM SO1861-Ald-EMCH或1500nM SO1861的存在下,使用低pM浓度的EGF香石竹毒蛋白(IC50=0,1pM,图52)可有效杀伤细胞。10nM SO1861或300nM SO1861未观察到这种细胞杀伤效应(图52)。

[0871] 接下来,在表达HER2的细胞(SK-BR-3)上,以1500nM SO1861或4000nM SO1861-Ald-EMCH的固定浓度滴定曲妥珠单抗-香石竹毒蛋白或曲妥珠单抗-皂草毒蛋白(曲妥珠单抗与蛋白毒素皂草毒蛋白缀合,具有DAR4)。这表明,在1500nM SO1861或4000nM SO1861-Ald-EMCH的存在下,使用低pM浓度的曲妥珠单抗-香石竹毒蛋白(IC50=0,1pM)或曲妥珠单抗-皂草毒蛋白(IC50=0,1pM)可有效杀伤细胞(图53)。

[0872] 图48-53中概述的所有这些结果表明,SO1861-Ald-EMCH有效地增强了靶向蛋白毒素的内体逃逸和胞质递送,从而显著降低了靶向蛋白毒素的有效浓度,从nM范围降至低pM范围。

[0873] 测试了SO1861-Ald-EMCH增强针对HSP27 mRNA的反义寡核苷酸(BNA,桥接核酸)的内体逃逸的能力。为此,在表达EGFR/HER2的细胞(A431)上,以100nM HSP27BNA、100nM西妥昔单抗-HSP27BNA(西妥昔单抗与HSP27BNA缀合,具有DAR4)或100nM曲妥珠单抗-HSP27BNA(曲妥珠单抗与HSP27BNA缀合,具有DAR4)的固定浓度滴定SO1861-Ald-EMCH。这表明,SO1861-Ald-EMCH(IC50=700nM)在A431细胞中与100nM HSP27BNA、100nM西妥昔单抗-HSP27BNA(图54)或100nM曲妥珠单抗-HSP27BNA组合诱导有效的HSP27基因沉默细胞(未显示)。单独SO1861-Ald-EMCH未显示HSP27基因沉默活性(图54)。

[0874] 接下来,在表达EGFR(A431)或HER2(SK-BR-3)的细胞中,以SO1861-Ald-EMCH的各种固定浓度滴定西妥昔单抗-HSP27BNA(DAR1.5或DAR4)、曲妥珠单抗-HSP27BNA(DAR4.4)。这表明,在4000nM SO1861-Ald-EMCH的存在下,使用低nM浓度的西妥昔单抗-HSP27BNA(IC50=0,5nM,图55)的A431细胞中HSP27基因有效沉默,而单独西妥昔单抗-HSP27BNA或西妥昔单抗-HSP27BNA+100nM SO1861-Ald-EMCH在非常高的浓度下没有显示基因沉默活性或只有轻微活性(IC50>100nM;图550)。在SKBR-3细胞中,在4000nM SO1861-Ald-EMCH存在下,曲妥珠单抗-HSP27BNA(IC50=0,5nM,图56)显示出有效的HSP27基因沉默活性,而单独曲妥珠单抗-HSP27BNA或曲妥珠单抗-HSP27BNA+100nM SO1861-Ald-EMCH仅显示出轻微的基因沉默活性(IC50>100nM;图56)。

[0875] 接下来,在各种细胞系中以固定浓度的SO1861-Ald-EMCH滴定未靶向的HSP27BNA。这揭示了在4000nM或4829nM SO1861-Ald-EMCH的存在下,使用低nM浓度的HSP27BNA(IC50(SK-BR3)=2nM;IC50(A431)=10nM;IC50(A2058)=10nM)在A431、A2058和SK-BR-3细胞中HSP27基因的有效沉默(图57和58),而单独HSP27BNA在高得多的浓度(IC50(SK-BR3)=300nM;IC50(A431)=1000nM;IC50(A2058)>1000nM)下诱导基因沉默(图57和58)。当将HSP27BNA的活性(具有和不具有SO1861-Ald-EMCH)与HSP27LNA(LNA,锁核酸)活性进行比较时,诸位发明人观察到,与HSP27BNB相比,内体逃逸/基因沉默增强因子具有可比性,但处于较高的HSP27LNB浓度(图58)。

[0876] 所有这些表明,SO1861-Ald-EMCH有效地增强了靶向反义BNA寡聚体以及非靶向的BNA/LNA寡聚体的内体逃逸和胞质递送,从而显著降低了靶向和非靶向反义寡聚体的有效浓度,从μM范围降至低nM范围。

[0877] 材料

[0878] 曲妥珠单抗(Tras，Herceptin®,罗氏公司)、西妥昔单抗(Cet，Erbitux®,默克公司)。香石竹毒蛋白-cys由法国Proteogenix公司生产,并从该公司购买,EGF香石竹毒蛋白是根据标准程序从大肠杆菌生产的。西妥昔单抗-皂草毒蛋白和曲妥珠单抗-皂草毒蛋白缀合物由高级靶向系统公司(加利福尼亚州圣地亚哥)生产并从该公司购买。

[0879] 方法

[0880] 快速色谱法

[0881] Grace Reveleris X2® C-815Flash;溶剂递送系统:具有自动启动功能的3活塞泵,4个独立通道,一次运行最多4种溶剂,当溶剂耗尽时自动切换管路;最大泵流速250mL/min;最大压力50巴(725psi);检测:UV 200-400nm,多达4个UV信号的组合和整个UV范围的扫描,ELSD;柱尺寸:仪器上4-330g,鲁尔型(luer type),750g至3000g,带可选支架。

[0882] HSP27BNA寡聚体序列

[0883] 根据Zhang等人(2011)([Y Zhang,Z Qu,S Kim,V Shi,B Liao1,P Kraft,R Bandaru,Y Wu,LM Greenberger和ID Horak,Down-modulation of cancer targets using locked nucleic acid(LNA)-based antisense oligonucleotides without transfection[使用基于锁核酸(LNA)的反义寡核苷酸在没有转染的情况下下调癌症靶点],Gene Therapy[基因疗法](2011)18,326-333])的HSP27 BNA寡聚体(5'-GGCacagccagtgGCG-3')([SEQ-ID NO:2])订购自生物合成公司(Bio-Synthesis Inc.)(德克萨斯州刘易斯维尔(Lewisville,Texas)),含或不含5'-硫醇C6接头。HSP27 LNA寡聚体(5'-ggcacagccagtggcg-3')([SEQ-ID NO:3])在生物合成公司(德克萨斯州刘易斯维尔)订购。

[0884] RNA分离和基因表达分析

[0885] 根据标准方案(伯乐公司(Biorad))分离并分析来自细胞的RNA。使用的qPCR引物如表A10所指定。

[0886] 表A10.qPCR中使用的引物如下所示:

[0887]

基因	引物	序列(5′-3′)	SEQ ID NO:
HSP27	正向	GCAGTCCAACGAGATCACCA	4
	反向	TAAGGCTTTACTTGGCGGCA	5

[0888] 曲妥珠单抗-皂草毒蛋白和西妥昔单抗-皂草毒蛋白的合成

[0889] 定制mAb-皂草毒蛋白缀合物由高级靶向系统公司(加利福利亚州圣地亚哥)生产并从该公司购买。

[0890] 曲妥珠单抗-香石竹毒蛋白和西妥昔单抗-香石竹毒蛋白的合成

[0891] 将香石竹毒蛋白-Cys(17.0ml,约9.6mg)使用vivaspin T15过滤管通过超滤(3,000g,20℃,10分钟)浓缩。将所得3.25ml等分试样用zeba 10ml旋转柱进行凝胶过滤,用TBS(pH 7.5)洗脱。

[0892] 曲妥珠单抗(mAb)或西妥昔单抗(mAb)(0.30ml,约10mg)用DPBS(pH 7.5)稀释至10mg/ml,通过zeba 5ml旋转柱用DPBS(pH 7.5)洗脱脱盐,并归一化为2.50mg/ml。向mAb的等分试样中添加在DMSO中的新鲜制备的SMCC溶液(1.00mg/ml,4.20摩尔当量,13.9×10-

^{5}mmol)的等分试样,将混合物短暂涡旋,然后在20℃伴随滚轴混合孵育60分钟。之后,将反应通过添加在DPBS(pH 7.5)中的新鲜制备的甘氨酸溶液(2.0mg/ml,5.0摩尔当量,69.5×10^{-5}mmol)的等分试样来淬灭。使用zeba 10ml旋转柱(用TBS(pH 7.5)洗脱)凝胶过滤后,获得mAb-SMCC(4.27mg,2.80×10^{-5}mmol,1.514mg/ml)。

[0893] 向香石竹毒蛋白-Cys(7.54mg,25.3×10^{-5}mmol,2.258mg/ml)中添加在TBS(pH 7.5)中的新鲜制备的TCEP溶液(1.00mg/ml,0.5摩尔当量,12.6×10^{-5}mmol)的等分试样,将混合物短暂涡旋,然后在20℃伴随滚轴混合孵育60分钟。之后,使用zeba 10ml旋转柱(用TBS(pH 7.5)洗脱)通过凝胶过滤获得香石竹毒蛋白-SH(6.0mg,20.2×10^{-5}mmol,1.722mg/ml,香石竹毒蛋白:SH=1.1)。

[0894] 向本体mAb-SMCC中添加香石竹毒蛋白-SH的等分试样(7.20摩尔当量),将混合物短暂涡旋,然后在20℃下孵育过夜。大约16小时后,通过添加在TBS(pH 7.5)中的新鲜制备的NEM溶液(2.50mg/ml,5.0摩尔当量,101×10^{-5}mmol)等分试样将反应淬灭。将反应混合物过滤至0.45μm,然后使用vivaspin T15过滤管通过超滤(3,000g,20℃,15分钟)浓缩至<2ml。将缀合物使用1.6×35cm Superdex 200PG柱(用DPBS(pH 7.5)洗脱)通过凝胶过滤来纯化。

[0895] 抗体-(L-HSP27 BNA)^{n}[在HSP27 BNA二硫化物之上]

[0896] 通过PEG_4-SPDP合成曲妥珠单抗-(L-HSP27)^{4}、西妥昔单抗-(L-HSP27)^{4},具有DAR4;并且通过PEG_4-SPDP合成西妥昔单抗-(L-HSP27)^{2},具有DAR2曲妥珠单抗、西妥昔单抗在下文中称为“Ab”。Ab通过四(乙二醇)琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(PEG_4-SPDP)接头与HSP27 BNA二硫化物缀合,在Ab与HSP27 BNA之间形成不稳定的(L)二硫键。该程序是对曲妥珠单抗-(L-HSP27 BNA)$_4$的示例性描述:

[0897] 将HSP27 BNA二硫化物寡聚体(2.7mg,470nmol,6.10mg/ml)与TCEP(10摩尔当量,4.7μmol,1.34mg,50mg/ml)在20℃下伴随滚轴混合反应30分钟。然后,将寡聚体-SH通过PD10 G25脱盐柱洗脱到TBS(pH 7.5)中来纯化,并立即使用。获得寡聚体-SH(2.48mg,90%,1.24mg/ml,SH与寡聚体的比率=0.8)

[0898] 将曲妥珠单抗(1.5mg,10.3nmol,2.50mg/ml)与在DMSO(1mg/ml)中的新鲜制备的PEG_4-SPDP溶液(6.81摩尔当量,70.1nmol,39μg)的等分试样在20℃下伴随滚轴混合反应60分钟。之后,将反应用甘氨酸(15.1μl的TBS(pH 7.5)中的2mg/ml新鲜制备的溶液)淬灭,然后通过zeba脱盐柱(用TBS(pH 7.5)洗脱)脱盐。将所得Tras-S-PEG_4-SPDP的等分试样取出,并通过UV-Vis分析进行测试。使用TCEP释放吡啶基-2-硫酮(PDT)并通过343nm处的UV-vis分析(SPDP与Ab的比率:4)来确定SPDP掺入。将剩余的Tras-(S-PEG_4-SPDP)$_4$与新鲜制备的HSP27寡核苷酸(寡聚体-SH)(8摩尔当量,82.4nmol,1.24mg/ml)的等分试样反应,并在20℃下伴随滚轴混合孵育过夜。17小时后,通过UV-vis分析对缀合物进行分析,以通过在343nm处置换吡啶基-2-硫酮(PDT)确定HSP27的掺入。将粗缀合物使用1.6×33cm Sephadex G50柱(用DPBS(pH 7.5)洗脱)来纯化。得到的曲妥珠单抗-(L-HSP27)$_4$为单一级分。产量:n.d.纯度:96%,HSP27 BNA与Ab的比率=4.4

[0899] 实例6-皂苷的内体逃逸增强活性

[0900] 先前,将各种皂苷(SO1861、SA1642)的功效作为“游离的”未缀合分子与配体毒素融合物(例如EGF香石竹毒蛋白)或抗体-蛋白质毒素缀合物组合共同施用至细胞,使得靶表

达细胞的细胞杀伤活性增强。这里，在HeLa(EGFR$^+$)细胞上，在非有效固定浓度的1.5pM EGF香石竹毒蛋白的存在和不存在下，滴定从肥皂草根提取物中分离的三种不同皂苷分子(SO1861、SO1862(SO1861的异构体)、SO1832和SO1904)。这揭示了与没有EGF香石竹毒蛋白的处理相比，所有测试的皂苷变体的细胞杀伤活性的强烈增强(IC50＝300nM;图63A)。接下来，用固定浓度的皂素(约1000nM)滴定EGF香石竹毒蛋白，这表明EGF香石竹毒蛋白的低pM浓度下的强烈靶向细胞杀伤增强(IC50＝0.4pM;图63B)，所有使用的皂苷SO1861、SO1862(SO1861的异构体)、SO1832和SO1904都能观察到。单独EGF-香石竹毒蛋白只能在非常高的浓度下诱导细胞杀伤(IC50＝10.000pM)。这表明，这些特定类型的皂苷都具有有效诱导内体逃逸的内在能力，只有非常少量的靶向毒素可用。

[0901] 为了扩展该测试，分析了其他来源的皂苷。从缕丝花(Gypsophila elegans M.Bieb.)的根提取物中纯化的皂苷(GE1741)在HeLa细胞上在1.5pM EGF香石竹毒蛋白的存在和不存在下滴定，并与纯化的SO1861进行比较。GE1741也增强EGF香石竹毒蛋白诱导的HeLa细胞杀伤，但与SO1861相比显示出稍低的功效。(GE1741 IC50＝800nM;图63C)，并且还显示出更高的一般毒性(不存在EGF香石竹毒蛋白的情况下IC50＝5.000nM;图63C)。在HeLa细胞上，将不同的部分纯化的肥皂草皂树皂苷的混合物(QSmix 1-3)与1.5pM EGF香石竹毒蛋白共同施用的类似试验显示，3个中的2个(QSmix 1和QSmix 3)的活性与SO1861相似(IC50 QSmix/QSmix3＝300nM;图63D)。QSmix(2)在增强1.5pM EGF香石竹毒蛋白诱导的细胞杀伤方面效果较差(IC50＝2000nM;图63D)，然而，没有观察到一般毒性。这表明，在QS提取物中，也有特定类型的皂苷可有效诱导靶向配体毒素EGF香石竹毒蛋白的内体逃逸。因此，本实例中描述的皂苷，如肥皂草皂树皂苷、GE1741、SO1861、SO1862、SO1832和SO1904，是根据本发明衍生的特别有吸引力的皂苷。

[0902] 实例7-皂苷和皂苷衍生物的内体逃逸增强活性

[0903] 不稳定/酸敏感衍生化(Ald-EMCH或SO1861-L-N_3(也称为SO1861-N3和SO1861-叠氮化物或SO1861-N3/叠氮化物))，通过醛基应用于SO1861，产生SO1861-Ald-EMCH或SO1861-L-N_3。为了验证SO1861-Ald-EMCH的活性，在表达EGFR的细胞(A431,HeLa)和不表达EGFR的细胞(A2058)上存在和不存在固定的非有效(1.5pM)EGF香石竹毒蛋白浓度的情况下，对分子进行滴定。在所有三种细胞系中，单独SO1861显示出强烈的细胞活力降低，而SO1861-Ald-EMCH作为单一化合物在高达25.000nM时未显示毒性(图64A-C)。当SO1861-Ald-EMCH与1.5pM EGF香石竹毒蛋白组合时，在EGFR$^+$A431和HeLa细胞中观察到强烈的靶特异性细胞活力降低(IC50＝3.000nM;图64A、B)，而EGFR$^-$A2058细胞完全不受影响(图64C)。SO1861-L-N_3也获得了类似的结果。与1.5pM EGF香石竹毒蛋白共同施用的SO1861-L-N_3也显示出对A431和HeLa细胞的有效细胞杀伤(IC50＝3.000nM)，但是没有EGF香石竹毒蛋白的情况下，在10.000nM以上观察到一般毒性(图64D、64E)。

[0904] HATU通过SO1861的羧酸基团与SO1861缀合，产生SO1861-(S)(也称为SO1861-HATU和SO1861-Glu-HATU)。为了确定活性，将不同浓度的SO1861-(S)与1.5pM EGF香石竹毒蛋白共同施用，并测试在表达EGFR的HeLa细胞中的细胞杀伤活性。SO1861-(S)显示出与SO1861相似的活性，这表明与羧酸基团的缀合不影响分子的内体逃逸增强效力，类似于用SO1861-Ald-EMCH观察到的情况(图65)。

[0905] 实例8

[0906] QS21(从肥皂草皂树中分离和纯化)在分子内的醛基和葡糖醛酸基团处进行化学修饰(单修饰或双修饰;图40)。测试修饰的QS21的1)配体毒素(修饰的QS21+5pM EGF香石竹毒蛋白)对表达EGFR的细胞的内体逃逸增强活性(表A4),2)对HeLa和A431的内在细胞毒性(QS21滴定),3)人红细胞溶血活性(对人红细胞的修饰的QS21滴定)。为了确定内体逃逸增强活性,在表达EGFR的细胞(HeLa和A431)上存在非有效固定浓度的5pM的EGF香石竹毒蛋白的情况下,滴定修饰的QS21。这揭示了在HeLa细胞中,QS21-Glu-AMPD+5pM EGF香石竹毒蛋白与QS21+5pM EGF香石竹毒蛋白一样有效(IC50＝200nM),而在A431中,QS21-Glu-AMPD+5pM EGF香石竹毒蛋白(IC50＝150nM)的活性略低于QS21+5pM EGF香石竹毒蛋白(IC50＝90nM)的活性(图66A和66B)。QS21-Ald-EMCH+5pM EGF香石竹毒蛋白在HeLa和A431细胞中在IC50＝900nM时有效,而QS21-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)+5pM EGF香石竹毒蛋白在HeLa细胞中在IC50＝2000nM时和在A431细胞中在IC50＝1500nM时有效,并且QS21-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD)+5pM EGF香石竹毒蛋白在HeLa细胞中在IC50＝4000nM时和在A431细胞中在IC50＝2000nM时有效。(图66A和66B)。接下来测定毒性,为此在HeLa和A431细胞上滴定修饰的皂苷。这表明QS21-Ald-EMCH在HeLa细胞中表现出与QS21相同的毒性(IC50＝10.000nM),而在A431中,与QS21(IC50＝2000nM)相比,QS21-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)的毒性较低(IC50＝5000nM)(图66A和66B)。QS21-Ald-EMCH在HeLa中的IC50>30.000nM和在A431细胞中的IC50＝30.000nM时显示出毒性,而对于QS21-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)和QS21-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD)两者,在HeLa和A431细胞中在高达30.000nM时未观察到毒性(图66A和66B)。

[0907] 接下来进行红细胞溶血测定,这揭示QS21-Glu-AMPD显示出与未修饰的QS21相似的溶血活性(IC50＝3000nM),而QS21-Ald-EMCH在IC50＝40.000nM时显示出溶血活性,QS21-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)在IC50＝50.000nM时显示出溶血活性,且QS21-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD)在这些浓度下显示出最小的溶血活性(IC50>300.000nM)(图67)。

[0908] 接下来,SO1831(从肥皂草中分离和纯化)在醛基处进行化学修饰,(产生)SO1831-Ald-EMCH(图72)。修饰和未修饰的SO1831以及1种其它皂苷:测试七叶皂苷(95%和98%)的1)配体毒素(5pM EGF香石竹毒蛋白)对表达EGFR的细胞的内体逃逸增强活性,2)对HeLa和A431的内在细胞毒性,3)人红细胞溶血活性和4)临界胶束浓度(CMC),参见表A12。为了确定内体逃逸增强活性,在表达EGFR的细胞(HeLa和A431)上存在非有效固定浓度为5pM的EGF香石竹毒蛋白的情况下,滴定修饰的SO1831、未修饰的SO1831和七叶皂苷(95%和98%)。这揭示了SO1831+5pM EGF香石竹毒蛋白在HeLa细胞和A431细胞中在IC50＝300nM时有效,而SO1831-Ald-EMCH+5pM EGF香石竹毒蛋白在HeLa细胞和A431细胞中在IC50＝5000nM时显示活性(图68A和68B)。七叶皂苷(95%或98%)+5pM EGF香石竹毒蛋白在HeLa细胞和A431细胞中在4000nM时显示活性(图68A和68B)。接下来测定毒性,为此在HeLa和A431细胞上滴定修饰的皂苷。这表明SO1831在HeLa细胞中在IC50＝4000nM时显示毒性,在A431细胞中在IC50＝2000nM时显示毒性,而SO1831-Ald-EMCH在HeLa细胞中高达30.000nM时没有显示毒性,在A431细胞中在IC50＝30.000nM时显示毒性(图68A和68B)。七叶皂苷(95%或98%)在HeLa细胞或A431细胞中在高达30.000nM时没有显示毒性(图69A和69B)。

[0909] 接下来进行红细胞溶血测定,该测定显示七叶皂苷(95%或98%)在IC50＝10.000nM时显示溶血(图70)。SO1831在15.000nM时显示溶血活性,而SO1831-Ald-EMCH在IC50＝100.000nM时溶血活性较低(图71)。

[0910] SO1831在官能团醛(Ald)上的化学修饰显示了对各皂苷的胶束性质的影响(参见表A11)。如图73B所示,SO1831皂苷上各官能团的单一修饰显著影响了胶束形成能力,这表现在所获得的ANS相对荧光值的斜率中。还测定了七叶皂苷的CMC,并显示在图73A和表A11中。

[0911] 表A11.在PBS中确定的SO皂苷的CMC值

[0912]

皂苷	CMC (μM)
SO1831	95 ± 10

[0913]

SO1831-Ald-EMCH	120 ± 12
七叶皂苷 (95%) [参见图 73A]	130 ± 13
七叶皂苷 (98%) [参见图 73A]	135 ± 14

[0914] 材料与方法

[0915] 细胞活力测定

[0916] 通过根据制造商的说明(CellTiter 96®AQueous单溶液细胞增殖测定试剂盒,普洛麦格公司(Promega))进行的MTS测定确定细胞活力。将MTS溶液在DMEM中稀释20x,不含补充有10%FBS(PAN-Biotech GmbH公司)的苯酚红(PAN-Biotech GmbH公司)。每孔的细胞用200μL PBS洗涤一次,之后每孔添加100μL稀释的MTS溶液。将板在37℃下孵育大约20-30分钟。随后,在Thermo Scientific Multiskan FC板读取器(赛默科技公司)上测量492nm处的光密度。为了定量,在计算未处理/处理细胞的比率之前,通过将未处理孔的背景校正信号除以处理孔的背景校正信号,从所有其他孔中减去'仅培养基'孔的背景信号。

[0917] 溶血测定法

[0918] 使用Ficoll梯度从血沉棕黄层中分离红细胞(RBC)。将获得的RBC沉淀(约4-5ml)用50ml DPBS(不含Ca^{2+}/Mg^{2+},PAN-Biotech GmbH公司)洗涤2x。将细胞通过在RT下以800xg离心10min沉淀。基于总细胞计数,将RBC计数并以500.000.000c/ml重悬于DPBS(不含Ca^{2+}/Mg^{2+})中。

[0919] 在DPBS(含Ca^{2+}/Mg^{2+},PAN-Biotech GmbH公司)中以1.11x的最终强度制备皂苷稀释液。对于阳性裂解对照,在$DPBS^{+/+}$中制备0.02%Triton-X100溶液。在96孔V型底板中,所有的化合物溶液以135μl/孔分配。向其中加入15μl RBC悬浮液,并快速混合(10秒-600rpm)。将板在RT下温和搅拌下孵育30min。之后,将板以800xg旋转10min以沉淀RBC,并将100-120μl上清液转移至标准96wp(96孔板)。随后,在Thermo Scientific Multiskan FC板读取器(赛默科技公司)上测量405nm处的OD。为了定量,在计算与0.02%Triton-X100相比的溶血百分比之前,通过将处理孔的背景校正信号除以0.02%Triton-X100孔的背景校正信号(x 100),从所有其他孔中减去"仅$DPBS^{+/+}$"孔的背景信号。

[0920] CMC确定

[0921] 通过如下DeVendittis等人(A fluorimetric method for the estimation of the critical micelle concentration of surfactants[用于估计表面活性剂临界胶束浓度的荧光法],Analytical Biochemistry[分析生物化学],第115卷,第2期,1981年8月,

第278-286页)的方法确定皂苷的临界胶束浓度(CMC)：

[0922] 在覆盖CMC以下和以上的范围的1至1400μM范围的皂苷干重浓度范围内测定了纯净水(MQ)或PBS(杜氏PBS+/+)中8-苯胺萘(Anilinonaphthalene)-1-磺酸(ANS)的发射谱。在CMC以上，ANS的荧光产率增加，最大发射波长减小，这是由于荧光染料被分成胶束。在Fluoroskan Ascent FL(赛默科技公司)上记录355nm的激发波长和460nm的发射波长时的荧光产率。每个样品和测量使用6μg(浓度为75.86μM)的ANS。

[0923] FACS分析

[0924] 将细胞以在10cm培养皿中500,000c/板接种在补充有10％胎牛血清(PAN-Biotech GmbH公司)和1％青霉素/链霉素(PAN-Biotech GmbH公司)的DMEM(PAN-Biotech GmbH公司)中，并孵育48小时(5％CO_2，37℃)，直到达到90％的融合。接下来，将细胞胰蛋白酶化(TryplE Express，吉布科赛默科技公司)为单个细胞。将$0.75x10^6$个细胞转移到15mL falcon管中并离心(1,400rpm，3min)。丢弃上清液，同时将细胞沉淀浸没。通过在涡旋振荡器上轻轻敲击falcon管来解离沉淀，并将细胞用4mL冷PBS(不含Mg^{2+}和Ca^{2+}，2％FBS)洗涤。洗涤后，将细胞重悬于3mL冷PBS(不含Mg^{2+}和Ca^{2+}，2％FBS)中，并在3个圆底FACS管(1mL/管)中平均分配。再次离心细胞，重悬于200μL冷PBS(不含Mg^{2+}和Ca^{2+}，2％FBS)或200μL抗体溶液中；在195μL冷PBS(不含Mg^{2+}和Ca^{2+}，2％FBS)中含有5μL抗体。将APC小鼠IgG1，κ同种型Ctrl FC(#400122，生物传奇公司(Biolegend))用作同种型对照，并且使用APC抗人EGFR(#352906，生物传奇公司)。将样品在管滚轴混合器上在4℃下孵育30min。然后，将细胞用冷PBS(不含Mg^{2+}和Ca^{2+}，2％FBS)洗涤3x，并在室温下使用PBS中的2％PFA溶液固定20min。将细胞用冷PBS洗涤2x，并重悬于250-350μL冷PBS中用于FACS分析。使用BD FACSCanto II流式细胞仪系统(BD生物科学公司)和FlowJo软件分析样品。表A4总结了FACS分析的结果。

[0925] 表A12.用SO1831、SO1831衍生物、QS-21衍生物和七叶皂苷处理红细胞和HeLa细胞。

[0926]

缀合物样品	IC50 nM（活性）	IC50 nM（毒性）	IC50 nM（溶血）	比率：IC50毒性/IC50活性	比率：IC50溶血/IC50活性
SO1831	300	4000	15.000	13	4
SO1831-Ald-EMCH	5000	> 30.000	100.000	> 6	20
七叶皂苷	4000	> 30.000	10.000	> 7.5	2,5
QS21	200	10.000	3000	50	15
QS21-Glu-AMPD	200	10.000	3000	50	15
QS21-Ald-EMCH	900	> 30.000	40.000	> 33	44
QS21-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)	2000	> 30.000	50.000	> 15	25
QS21-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD)	4000	> 30.000	> 300.000	> 7.5	75

序列表

<110> 萨普雷米科技有限公司(Sapreme technologies B.V.)
<120> 用于在药品中使用的皂苷衍生物
<130> P6092645PCT2
<150> NL 2025904
<151> 2020-06-24
<150> PCT/EP2020/071045
<151> 2020-07-24
<160> 5
<170> PatentIn 3.5版
<210> 1
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 定制肽
<400> 1
Ser Glu Ser Asp Asp Ala Met Phe Cys Asp Ala Met Asp Glu Ser Asp
1 5 10 15
Ser Lys
<210> 2
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> HSP27 BNA寡聚体
<400> 2
ggcacagcca gtggcg 16
<210> 3
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> HSP27 LNA寡聚体
<400> 3
ggcacagcca gtggcg 16
<210> 4
<211> 20

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> HSP27正向引物
<400> 4
gcagtccaac gagatcacca 20
<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> HSP27反向引物
<400> 5
taaggcttta cttggcggca 20

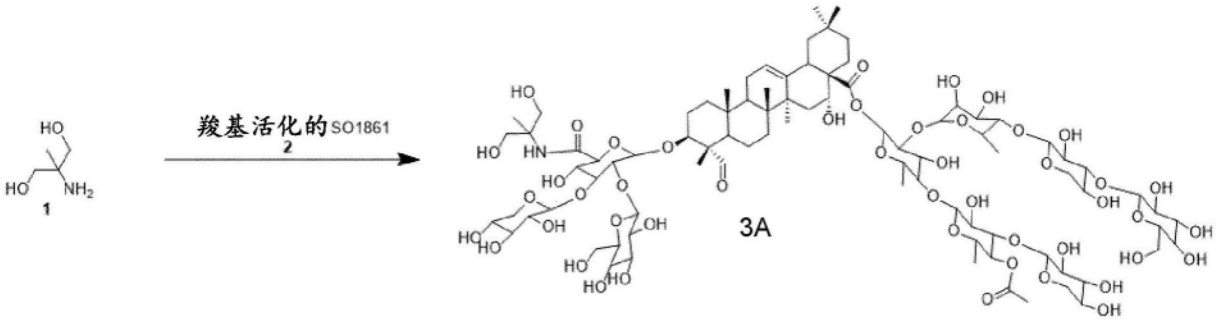


图1

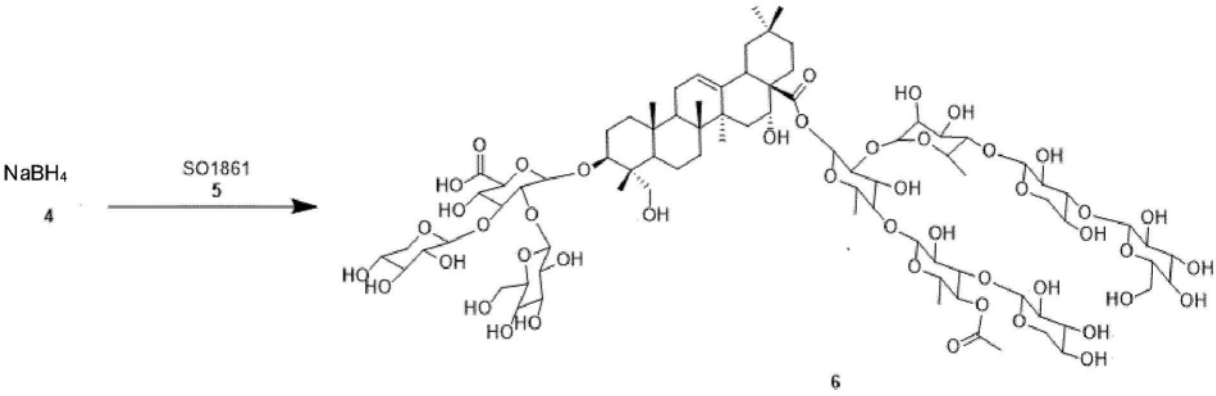


图2

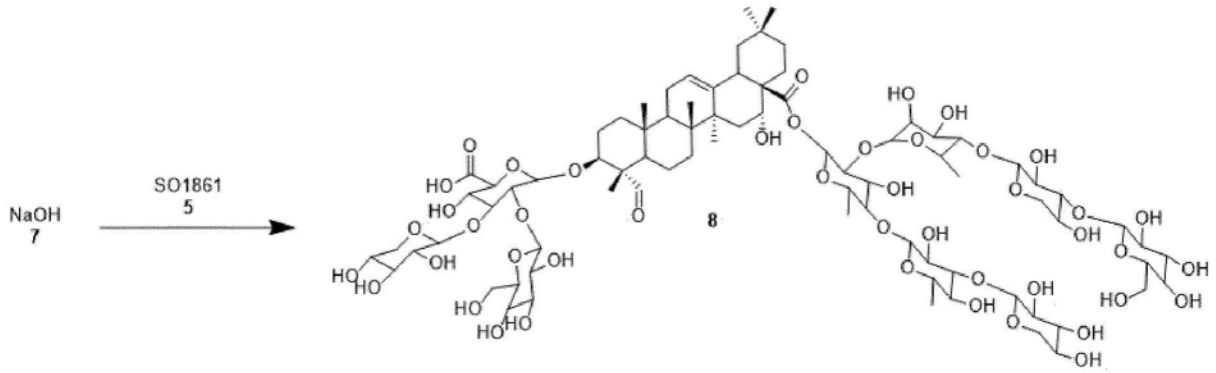


图3

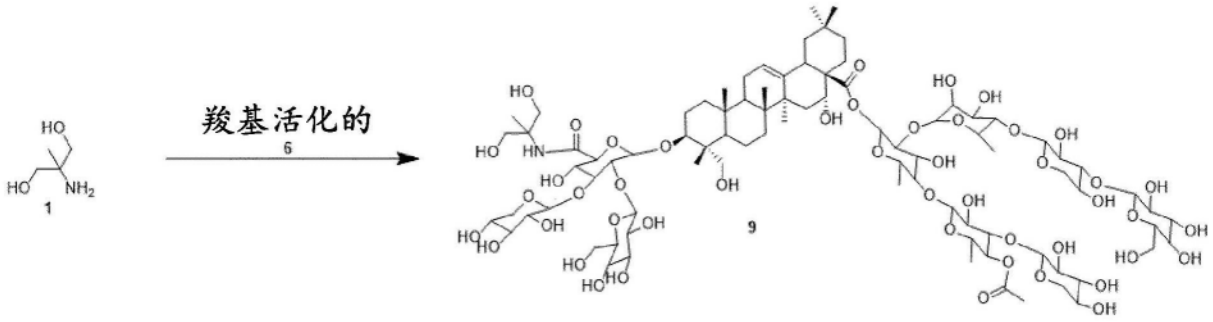


图4

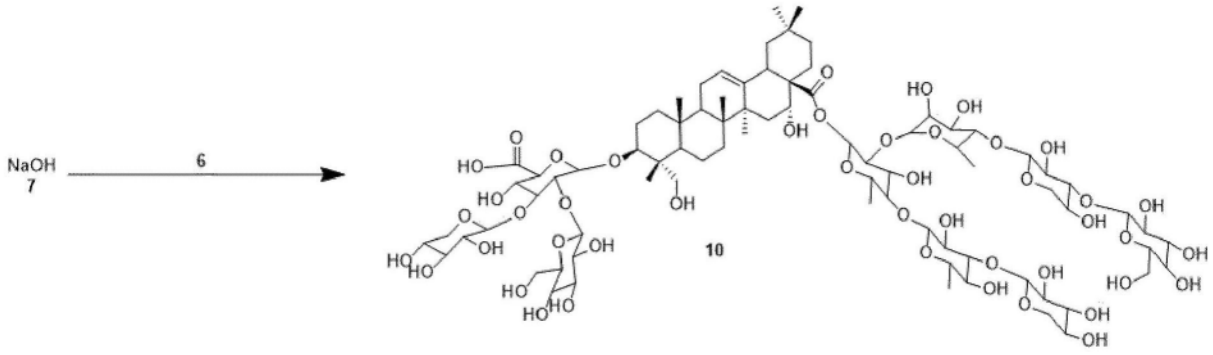


图5

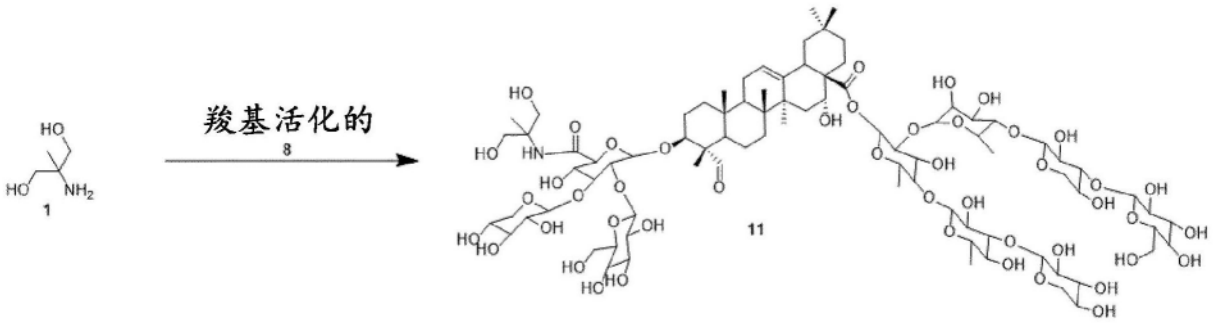


图6

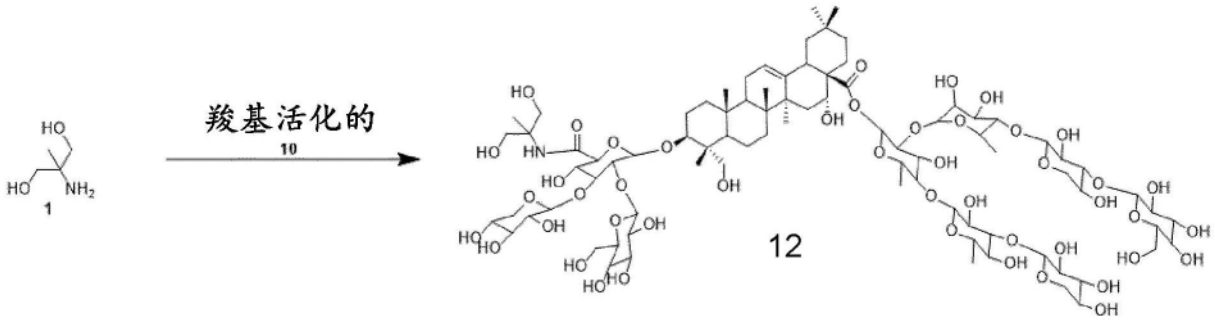

羧基活化的
10
1
12

图7

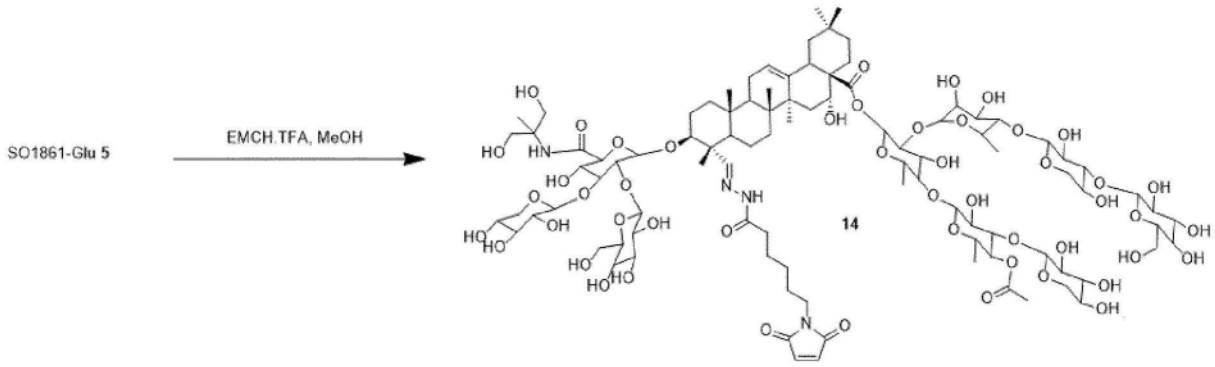

SO1861-Glu 5
EMCH.TFA, MeOH
14

图8

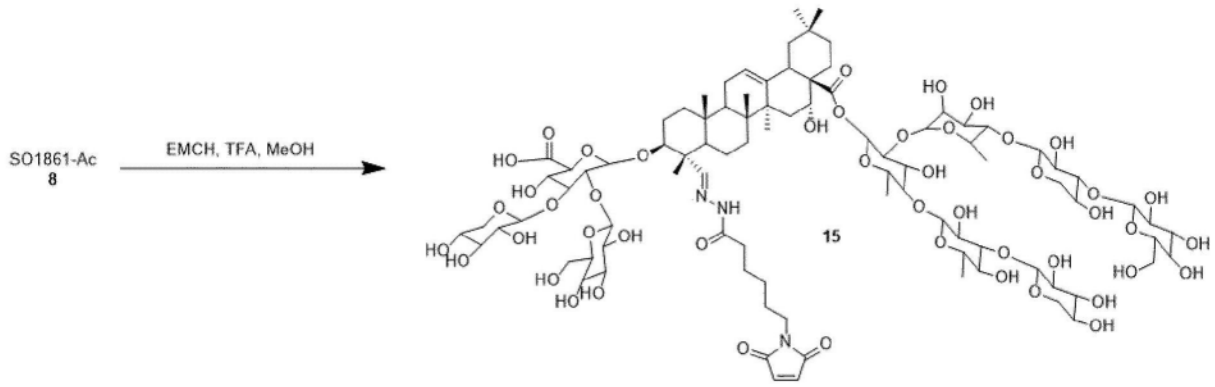

SO1861-Ac
8
EMCH, TFA, MeOH
15

图9

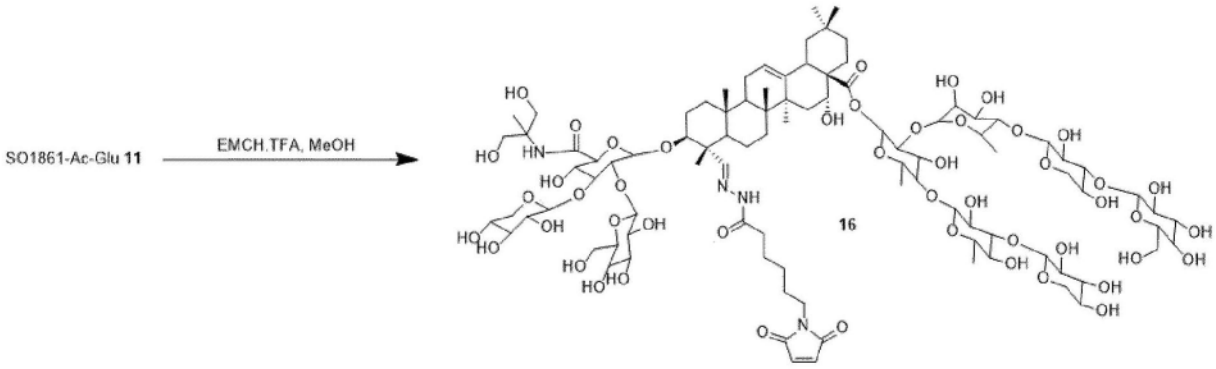

SO1861-Ac-Glu 11
EMCH.TFA, MeOH
16

图10

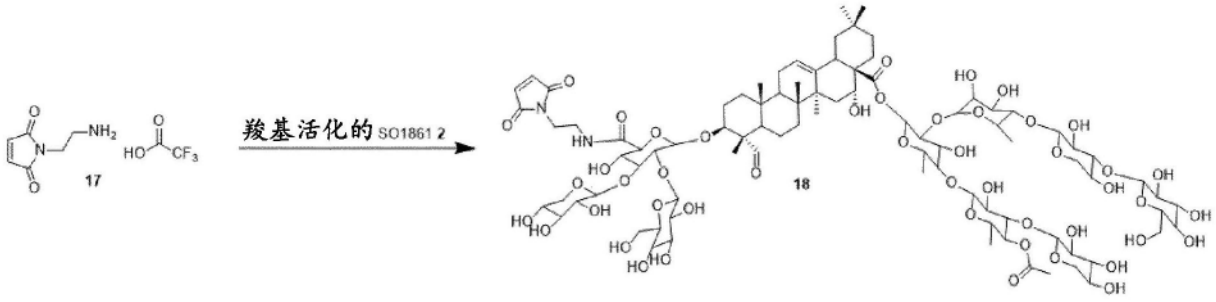

17
羧基活化的 SO1861 2
18

图11

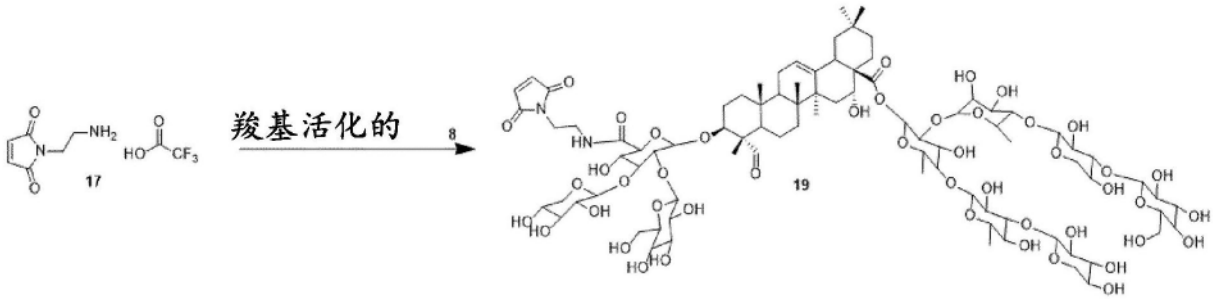

17
羧基活化的
8
19

图12

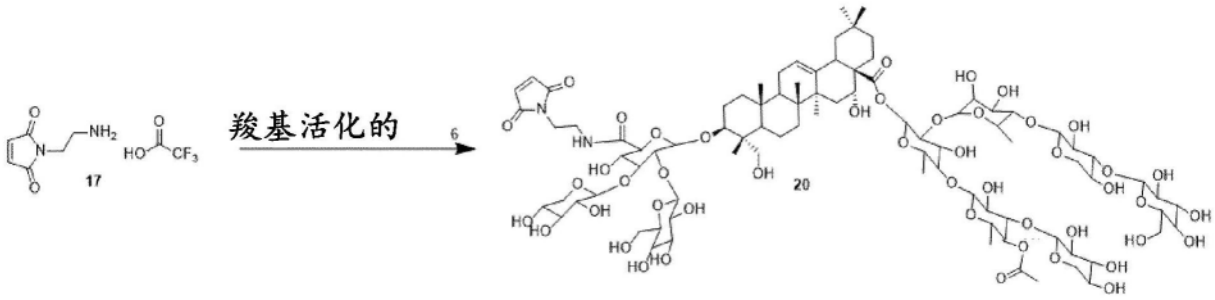


图13

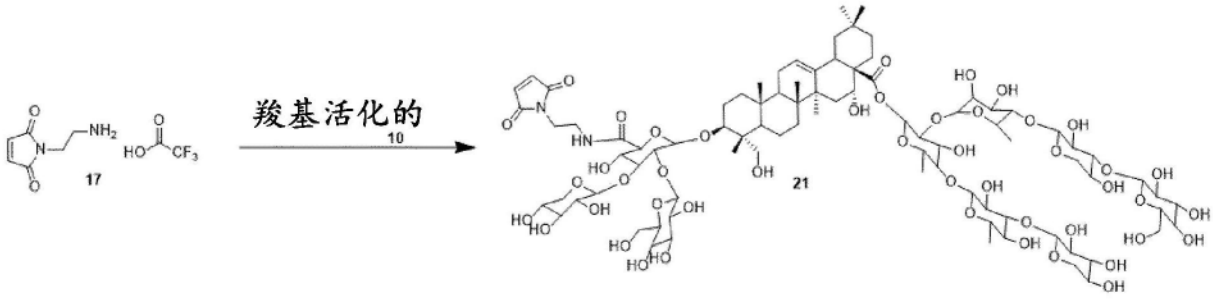


图14

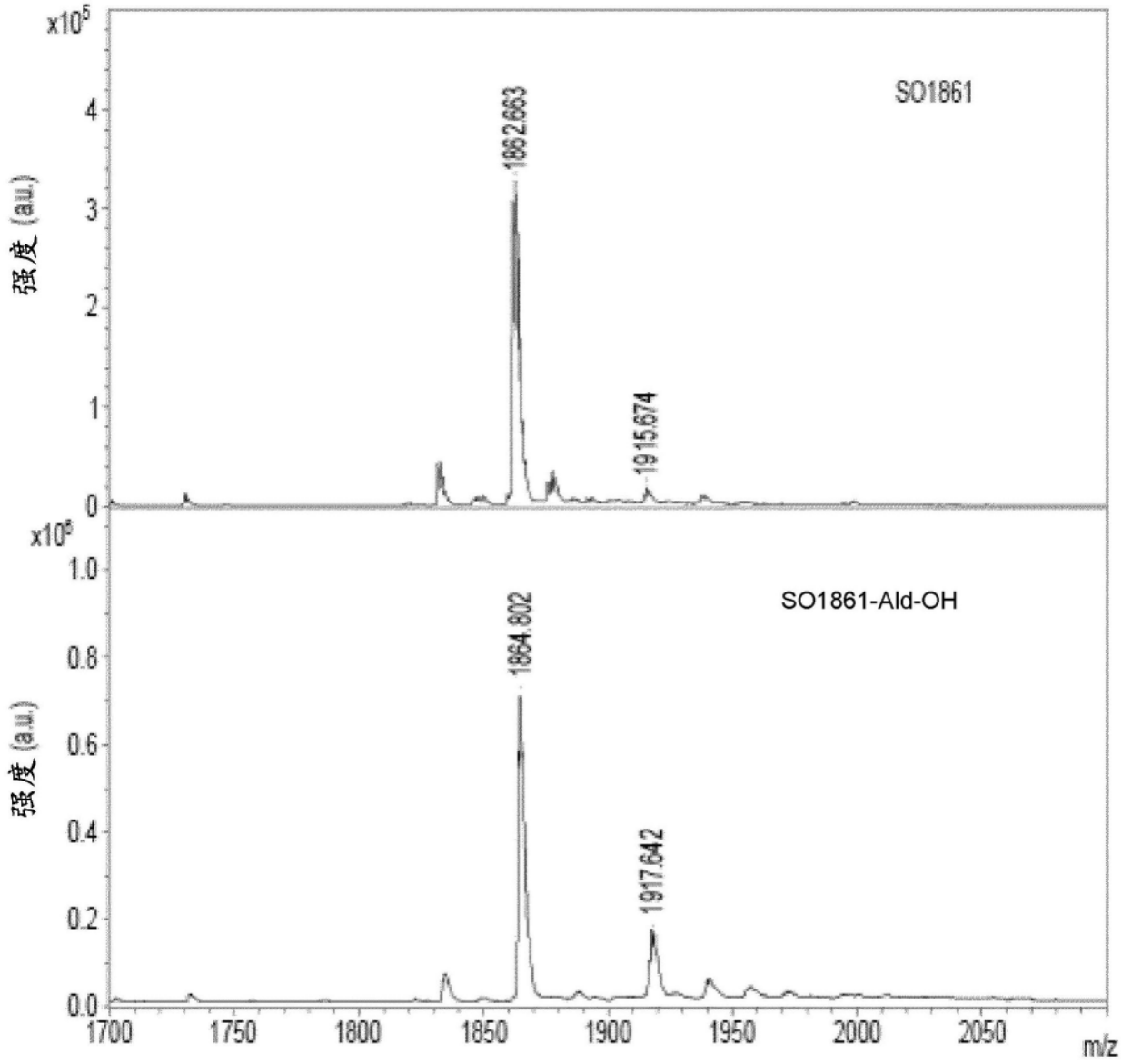

x10^5
SO1861
1862.663
1915.674
强度 (a.u.)
x10^5
SO1861-Ald-OH
1864.802
1917.642
强度 (a.u.)
m/z

图15

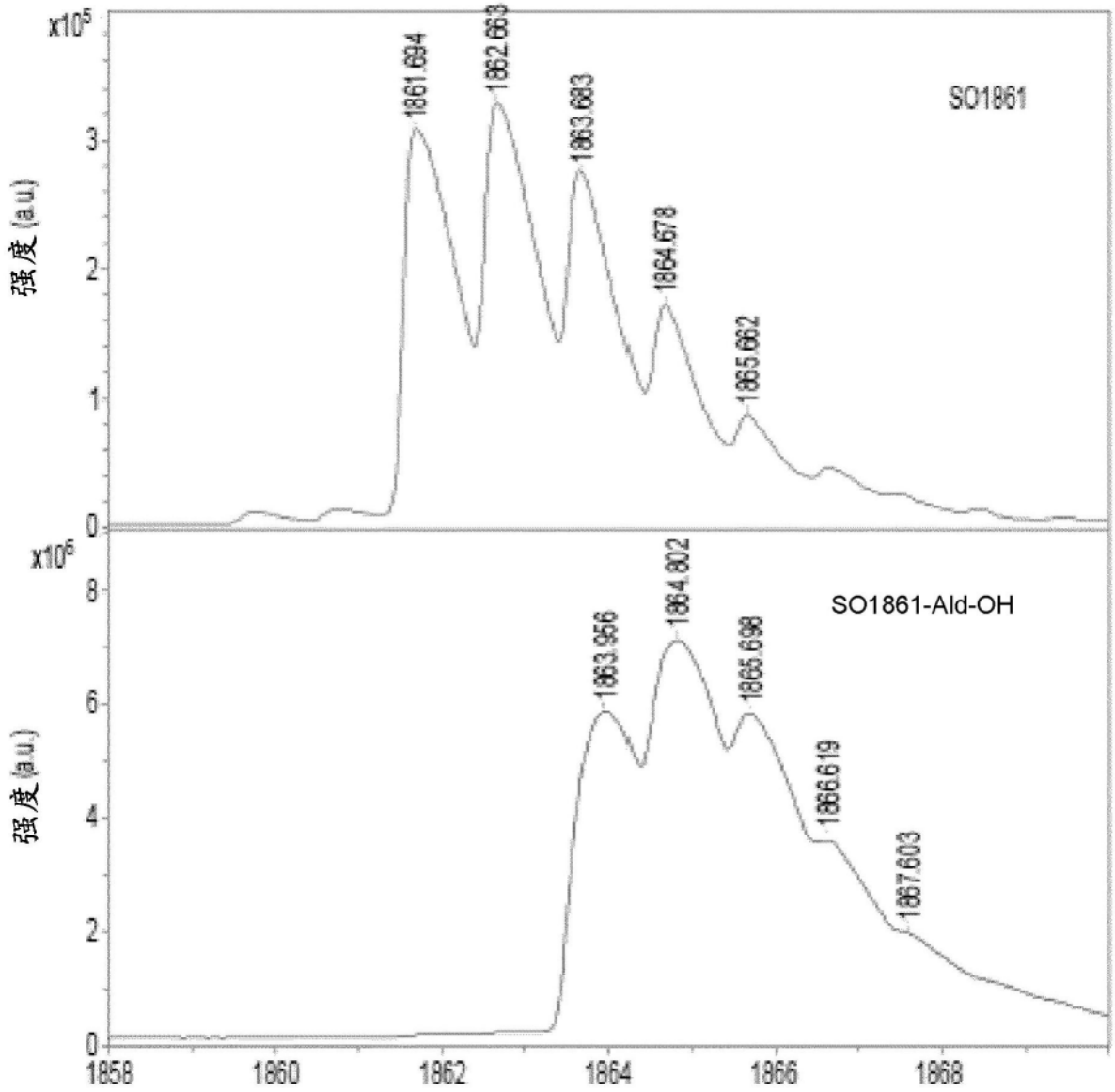

x10^5
强度 (a.u.)
1861.694
1862.663
1863.683
1864.678
1865.662
SO1861
x10^6
强度 (a.u.)
1863.956
1864.802
1865.698
1866.619
1867.603
SO1861-Ald-OH
1858
1860
1862
1864
1866
1868

图16

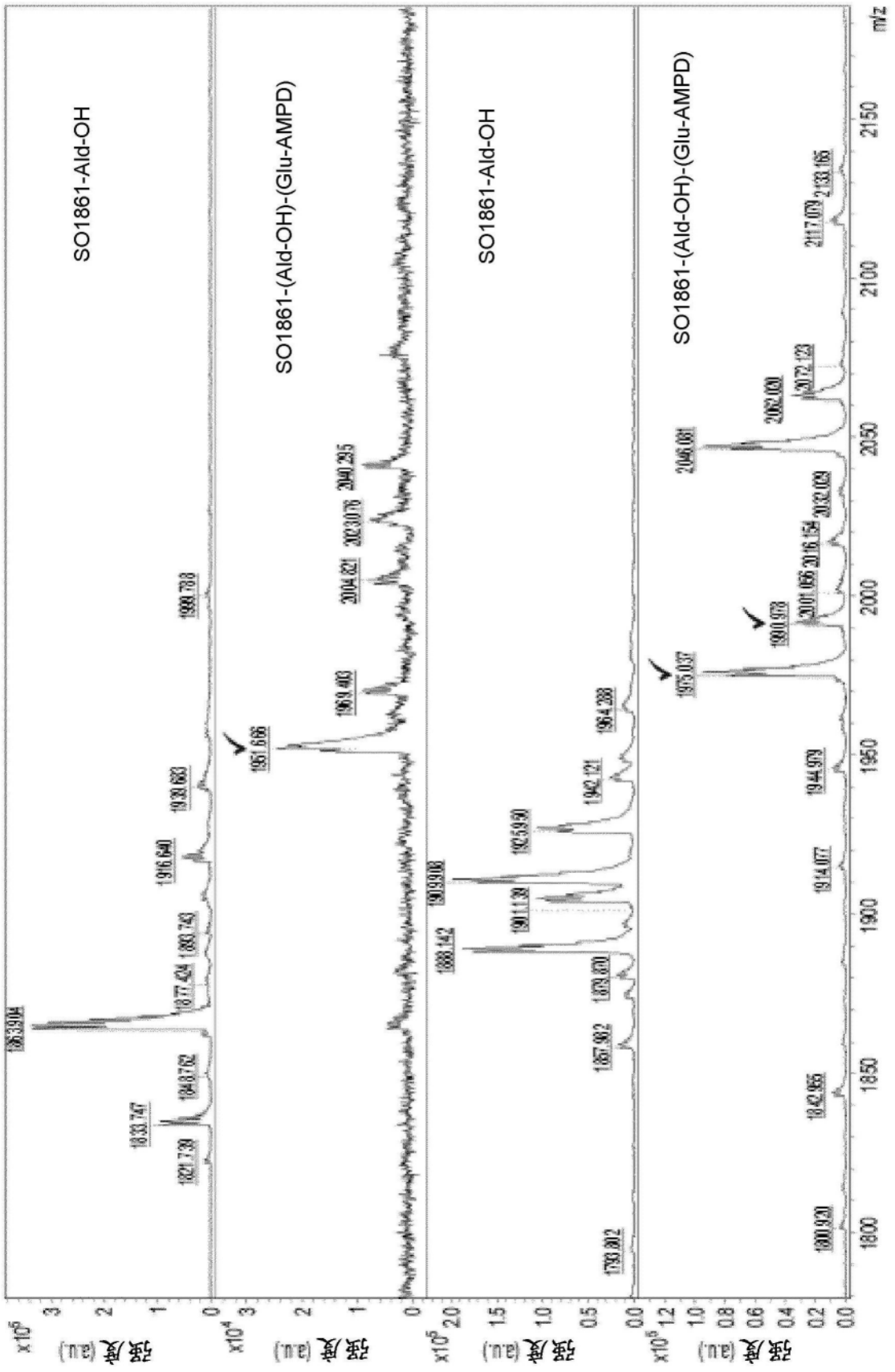

SO1861-Ald-OH
SO1861-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)
SO1861-Ald-OH
SO1861-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)
强度 (a.u.)
m/z
1636.904
1633.747
1621.739
1684.762
1877.424
1883.743
1916.640
1938.833
1998.788
1961.666
1969.403
2004.821
2023.076
2049.295
1888.142
1901.139
1903.906
1925.990
1942.121
1964.288
1793.812
1857.982
1879.670
1800.920
1842.955
1914.077
1944.979
1975.037
1990.978
2001.666
2016.154
2032.029
2046.081
2067.009
2072.123
2117.079
2133.165

图17

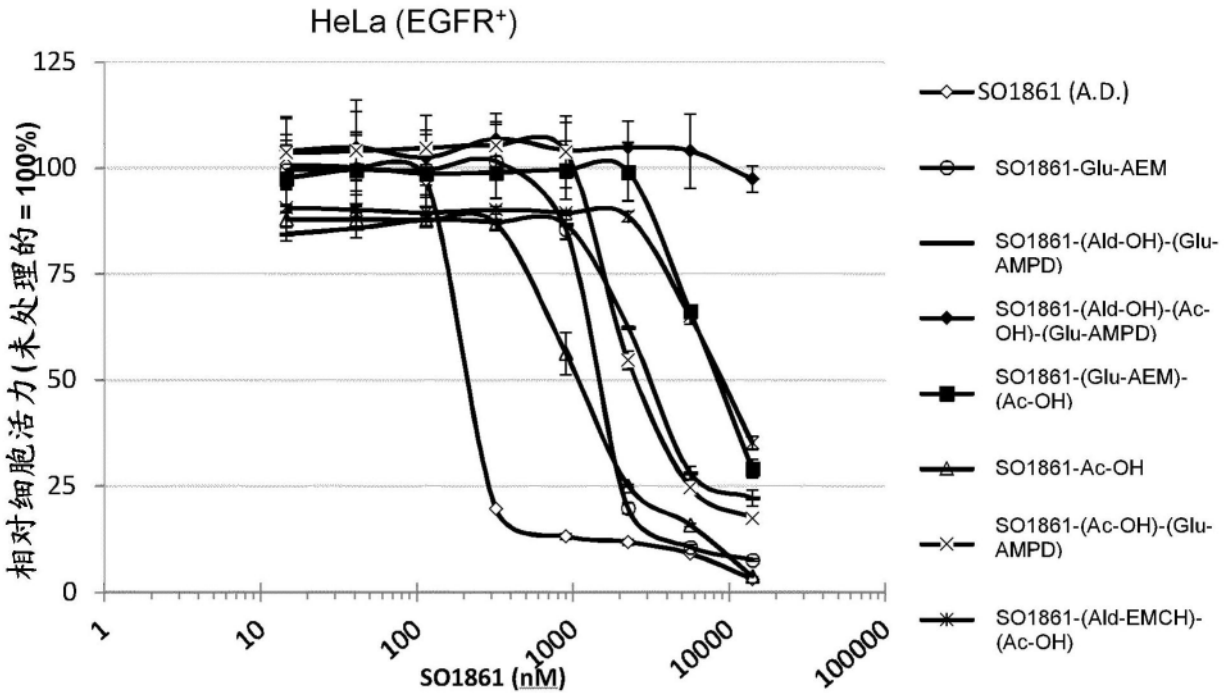

HeLa (EGFR+)
相对细胞活力(未处理的=100%)
125
100
75
50
25
0
1
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)
SO1861 (A.D.)
SO1861-Glu-AEM
SO1861-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)
SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)
SO1861-(Glu-AEM)-(Ac-OH)
SO1861-Ac-OH
SO1861-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)
SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH)

图18A

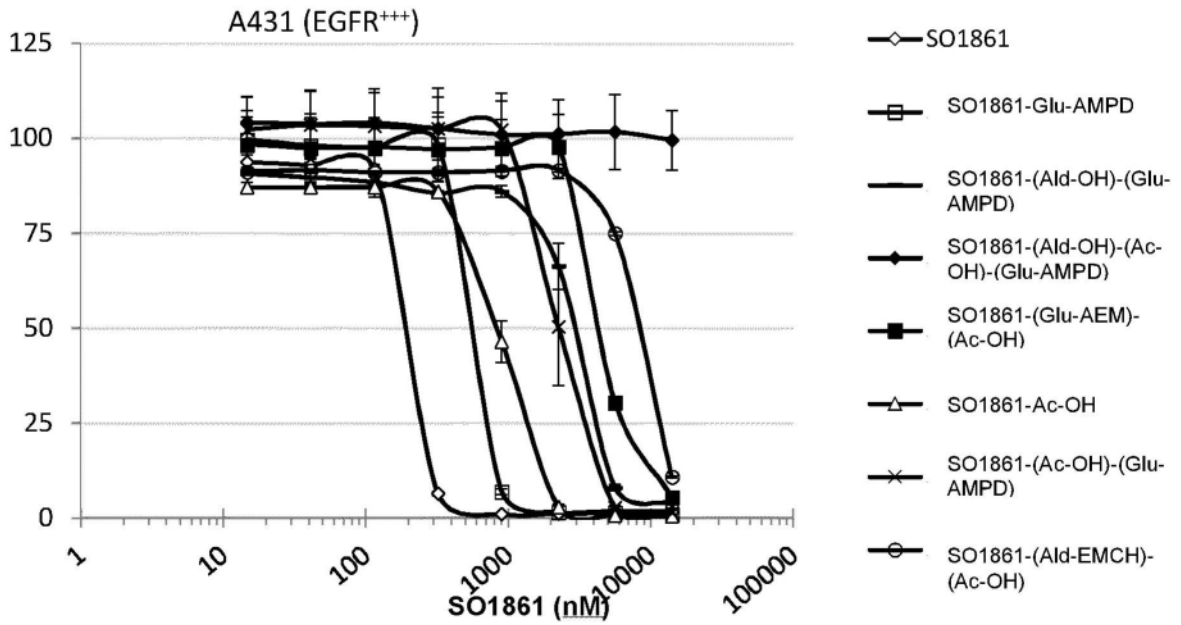

A431 (EGFR+++)
125
100
75
50
25
0
1
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)
SO1861
SO1861-Glu-AMPD
SO1861-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)
SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)
SO1861-(Glu-AEM)-(Ac-OH)
SO1861-Ac-OH
SO1861-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)
SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH)

图18B

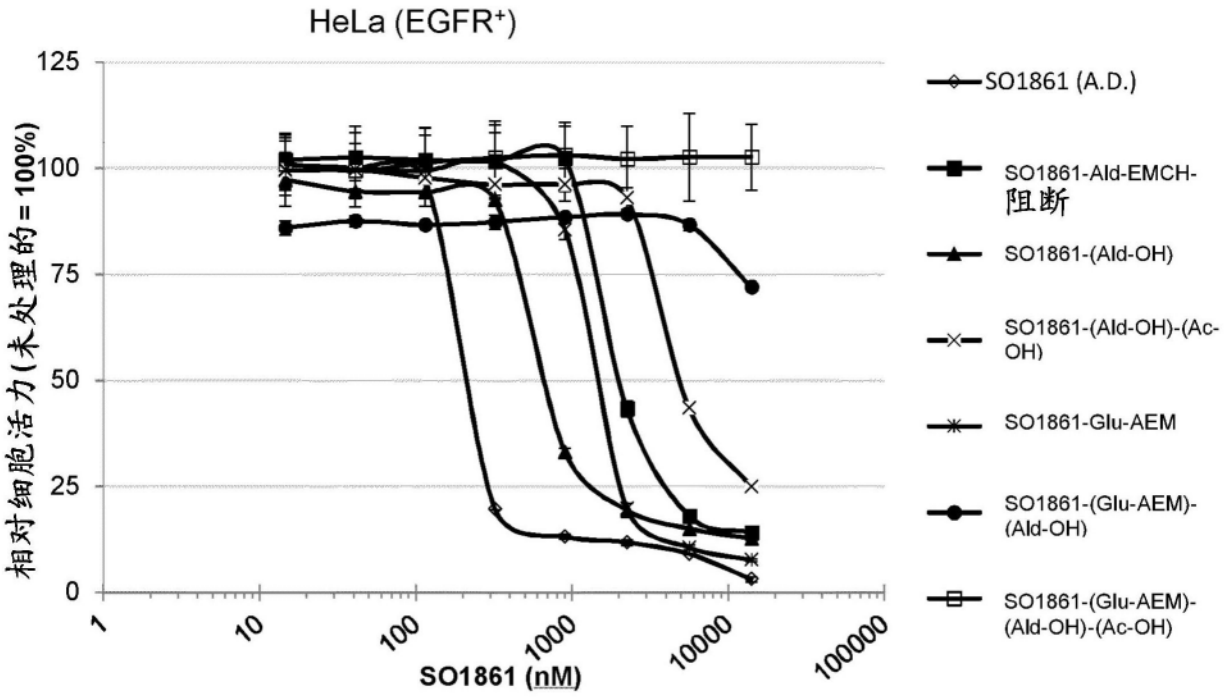

HeLa (EGFR+)
相对细胞活力(未处理的=100%)
125
100
75
50
25
0
1
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)
SO1861 (A.D.)
SO1861-Ald-EMCH-阻断
SO1861-(Ald-OH)
SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)
SO1861-Glu-AEM
SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH)
SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH)-(Ac-OH)

图19A

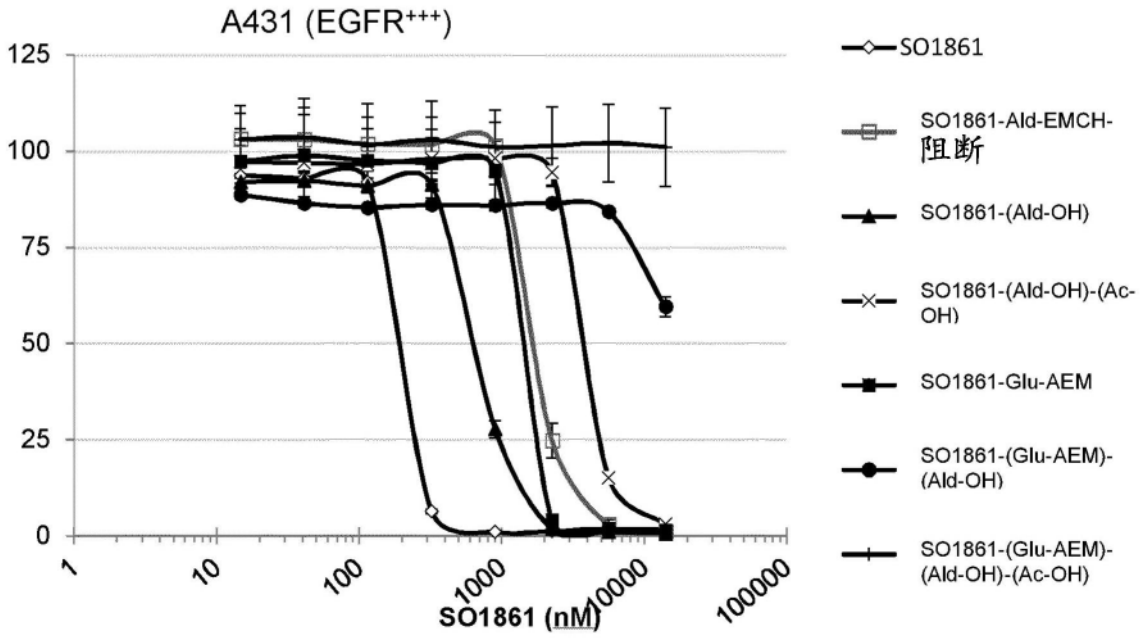

A431 (EGFR+++)
125
100
75
50
25
0
1
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)
SO1861
SO1861-Ald-EMCH-阻断
SO1861-(Ald-OH)
SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)
SO1861-Glu-AEM
SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH)
SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH)-(Ac-OH)

图19B

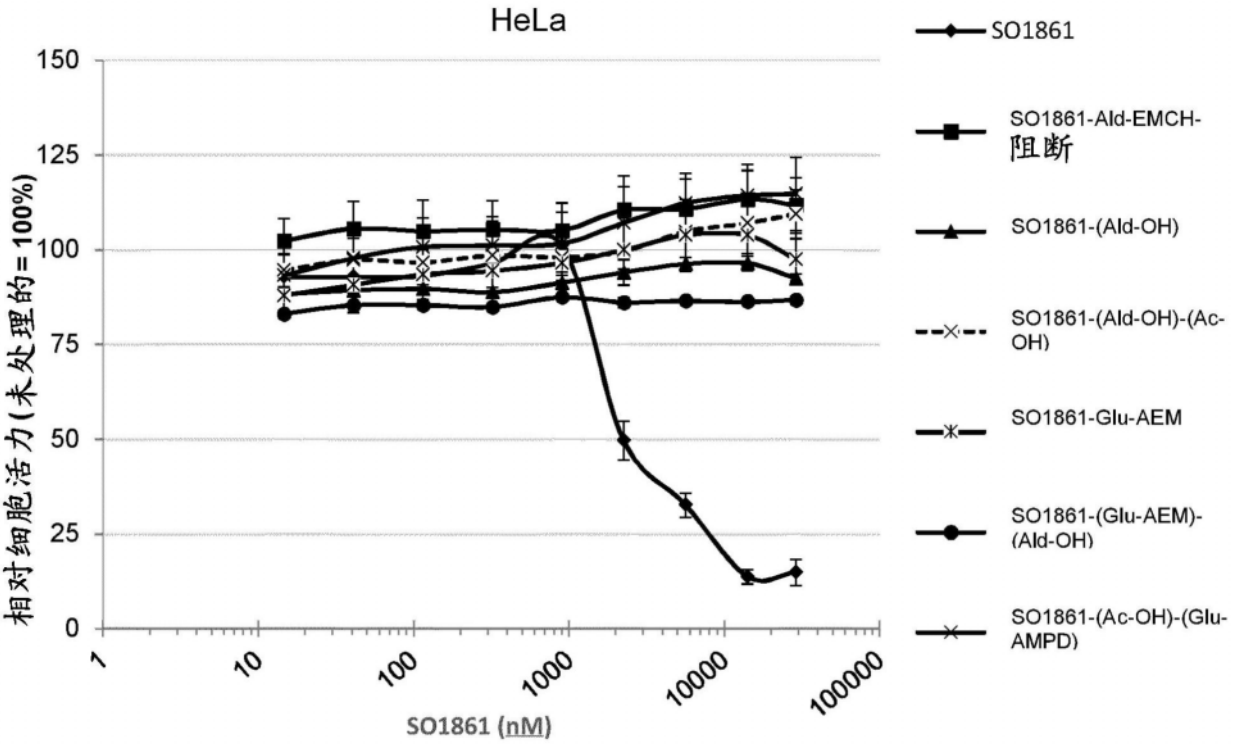

HeLa
相对细胞活力(未处理的=100%)
150
125
100
75
50
25
0
1
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)
SO1861
SO1861-Ald-EMCH-阻断
SO1861-(Ald-OH)
SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)
SO1861-Glu-AEM
SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH)
SO1861-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)

图20A

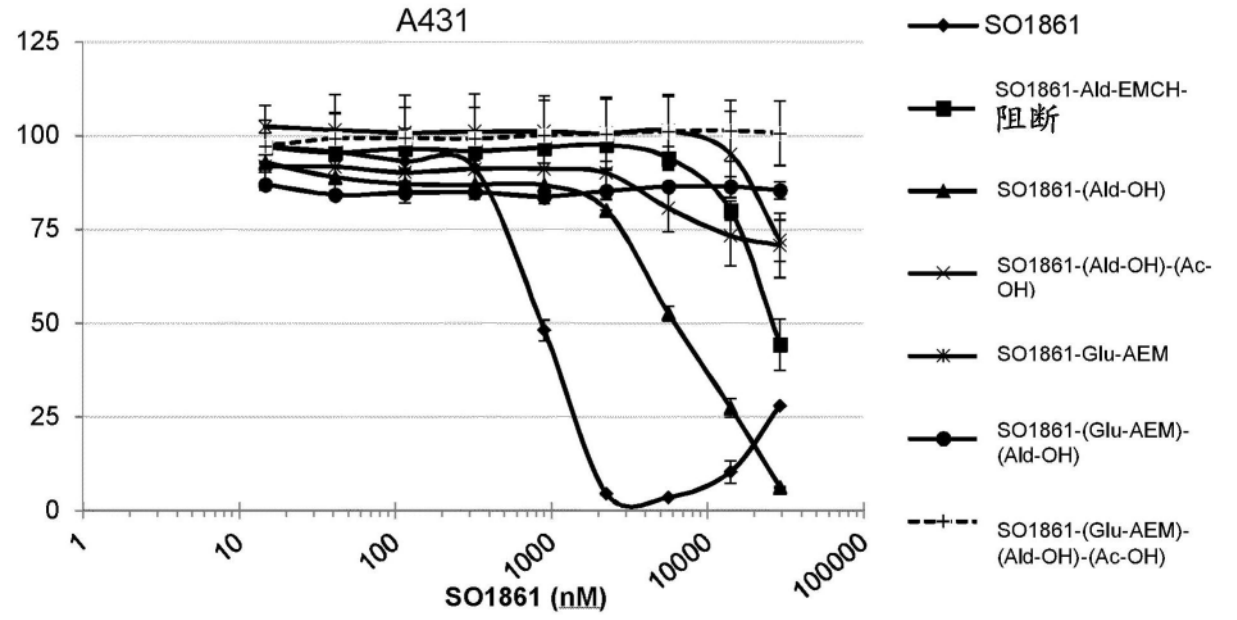

A431
125
100
75
50
25
0
1
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)
SO1861
SO1861-Ald-EMCH-阻断
SO1861-(Ald-OH)
SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)
SO1861-Glu-AEM
SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH)
SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH)-(Ac-OH)

图20B

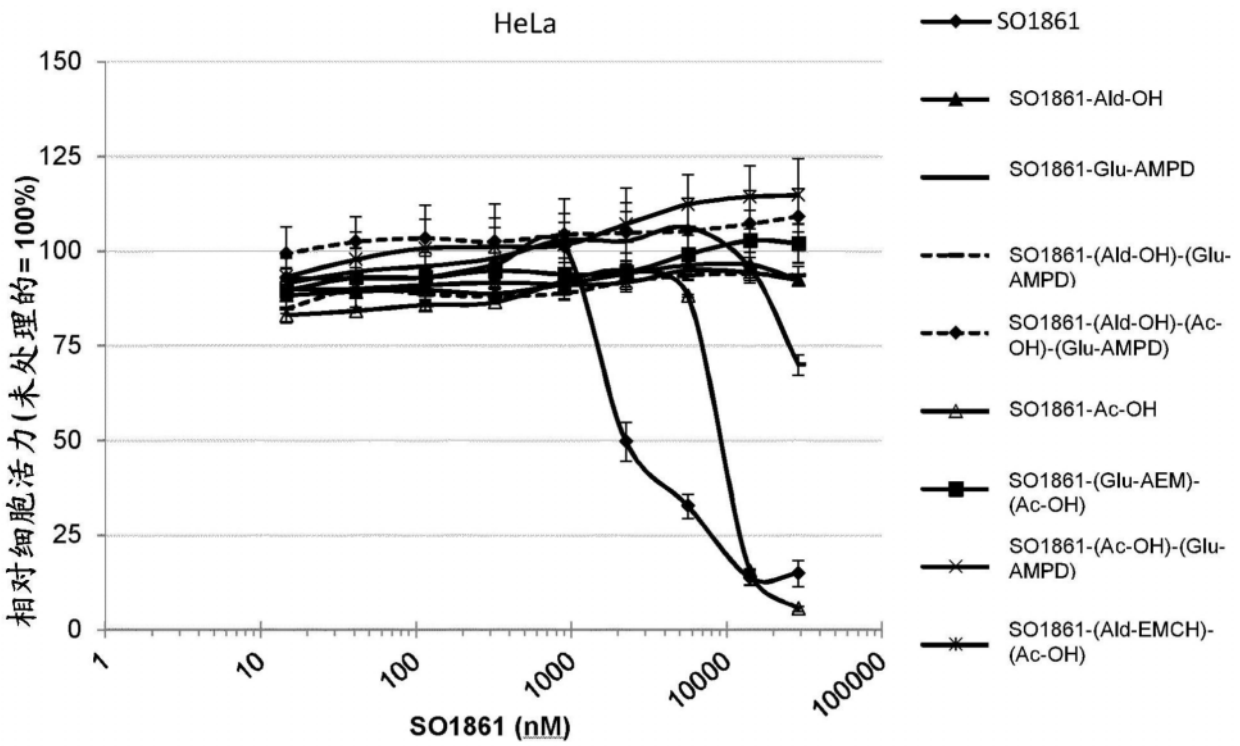

HeLa
相对细胞活力(未处理的=100%)
150
125
100
75
50
25
0
1
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)
SO1861
SO1861-Ald-OH
SO1861-Glu-AMPD
SO1861-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)
SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)
SO1861-Ac-OH
SO1861-(Glu-AEM)-(Ac-OH)
SO1861-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)
SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH)

图21A

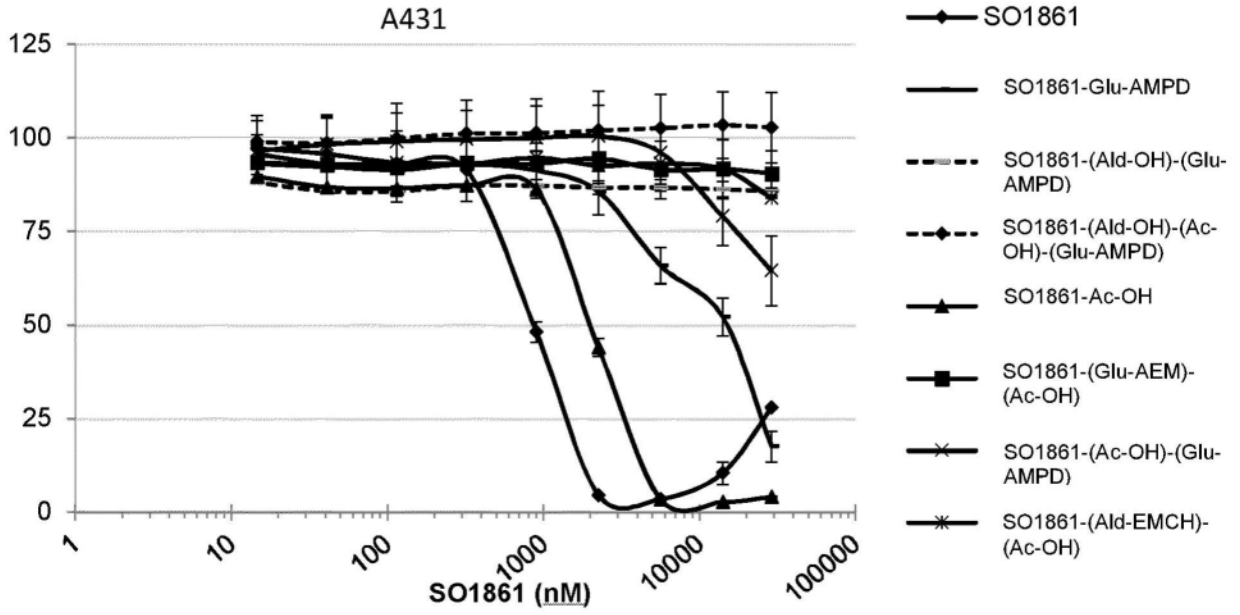

A431
125
100
75
50
25
0
1
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)
SO1861
SO1861-Glu-AMPD
SO1861-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)
SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)
SO1861-Ac-OH
SO1861-(Glu-AEM)-(Ac-OH)
SO1861-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)
SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH)

图21B

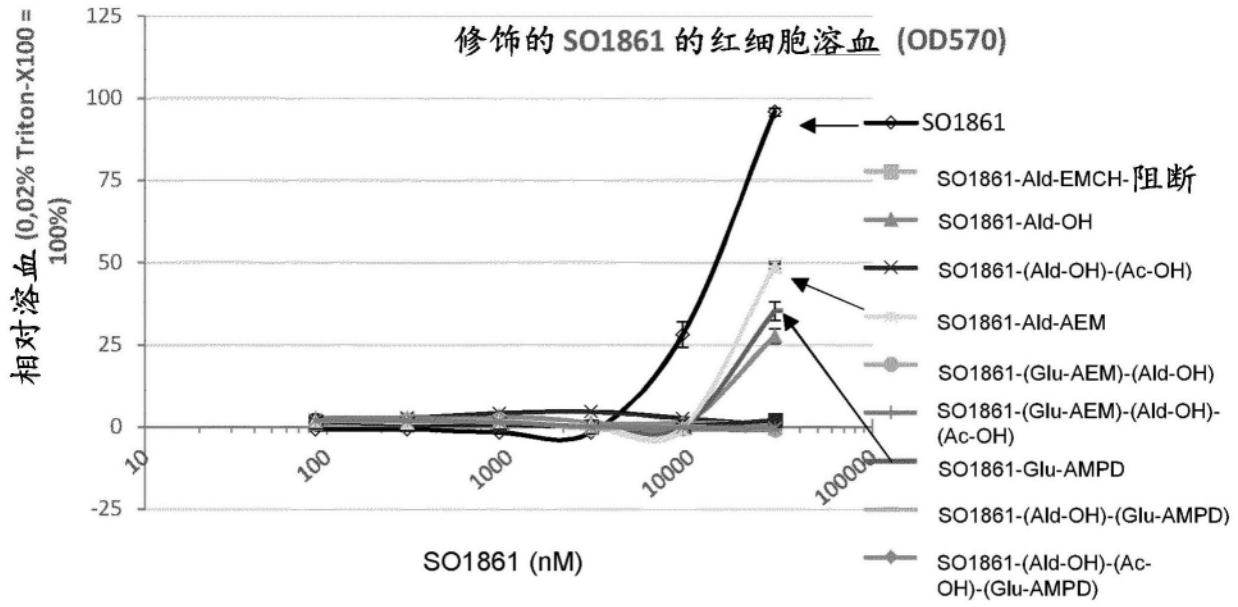

修饰的 SO1861 的红细胞溶血 (OD570)
相对溶血 (0,02% Triton-X100 = 100%)
125
100
75
50
25
0
-25
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)
SO1861
SO1861-Ald-EMCH-阻断
SO1861-Ald-OH
SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)
SO1861-Ald-AEM
SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH)
SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH)-(Ac-OH)
SO1861-Glu-AMPD
SO1861-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)
SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)

图22

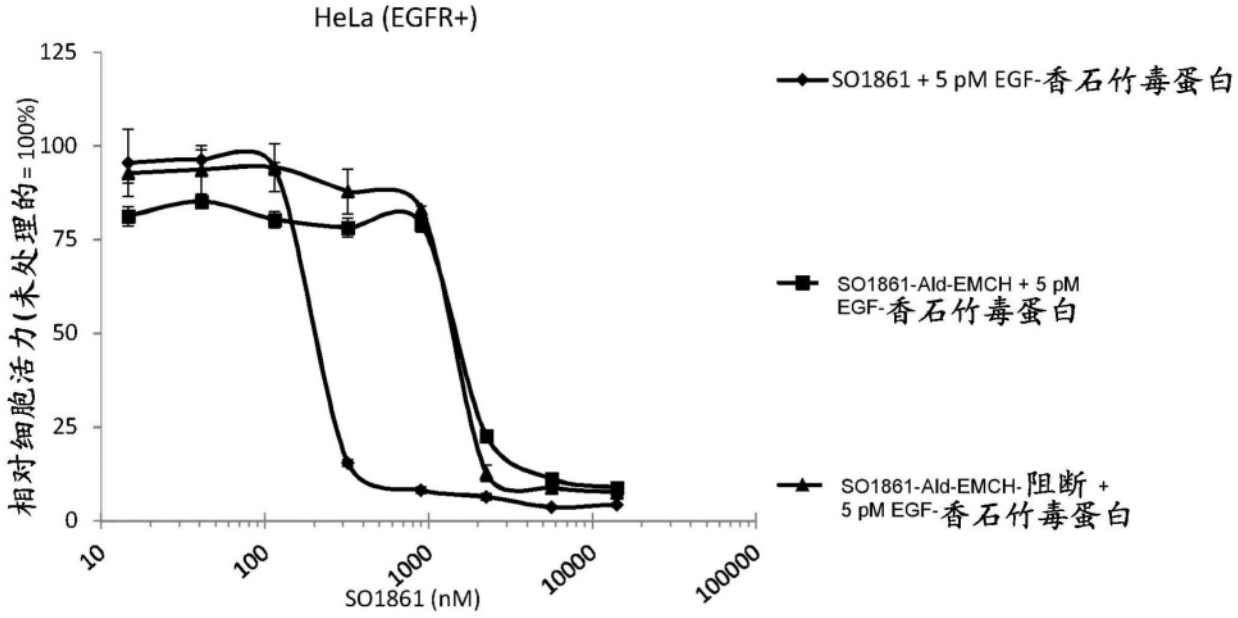

HeLa (EGFR+)
相对细胞活力(未处理的= 100%)
125
100
75
50
25
0
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)
SO1861 + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白
SO1861-Ald-EMCH + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白
SO1861-Ald-EMCH-阻断 + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白

图23A

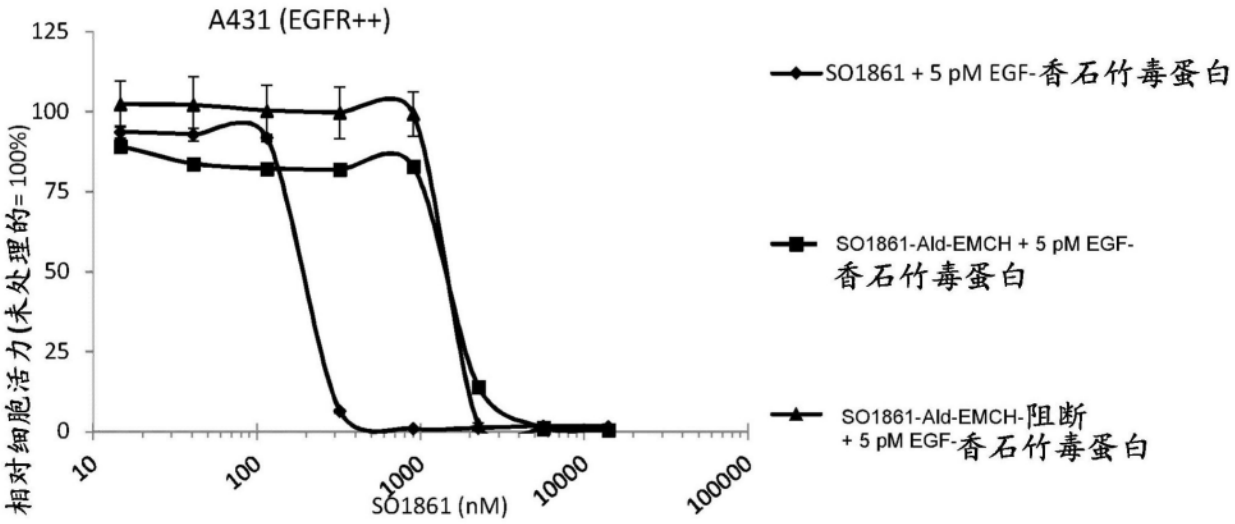

A431 (EGFR++)
125
100
75
50
25
0
相对细胞活力(未处理的=100%)
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)
SO1861 + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白
SO1861-Ald-EMCH + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白
SO1861-Ald-EMCH-阻断 + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白

图23B

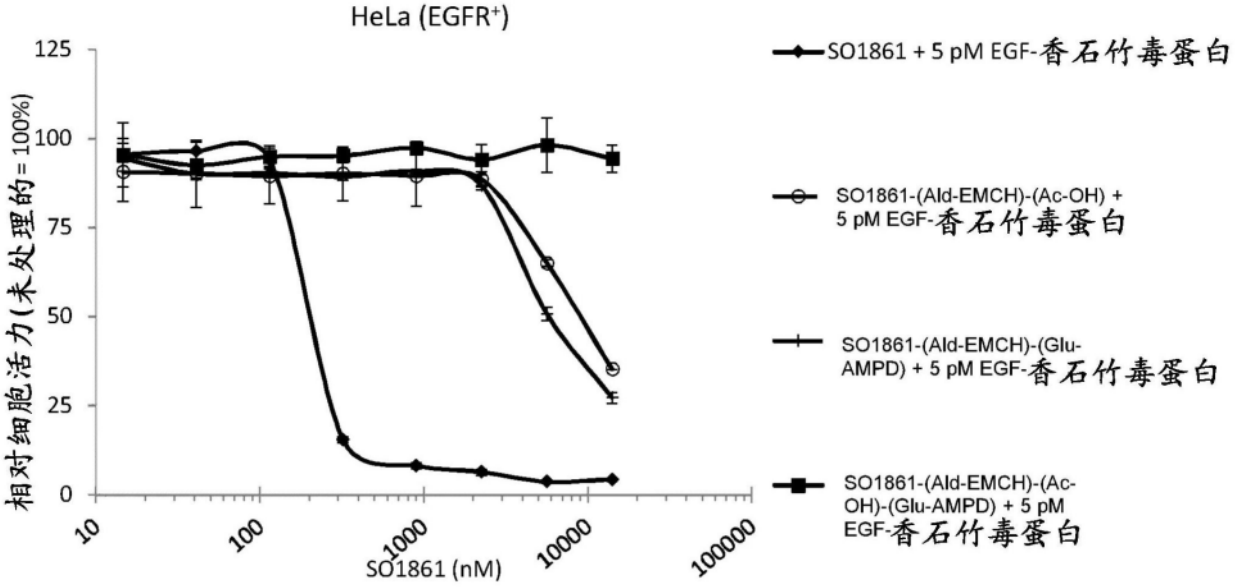

HeLa (EGFR+)
125
100
75
50
25
0
相对细胞活力(未处理的=100%)
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)
SO1861 + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白
SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH) + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白
SO1861-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD) + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白
SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH)-(Glu-AMPD) + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白

图24A

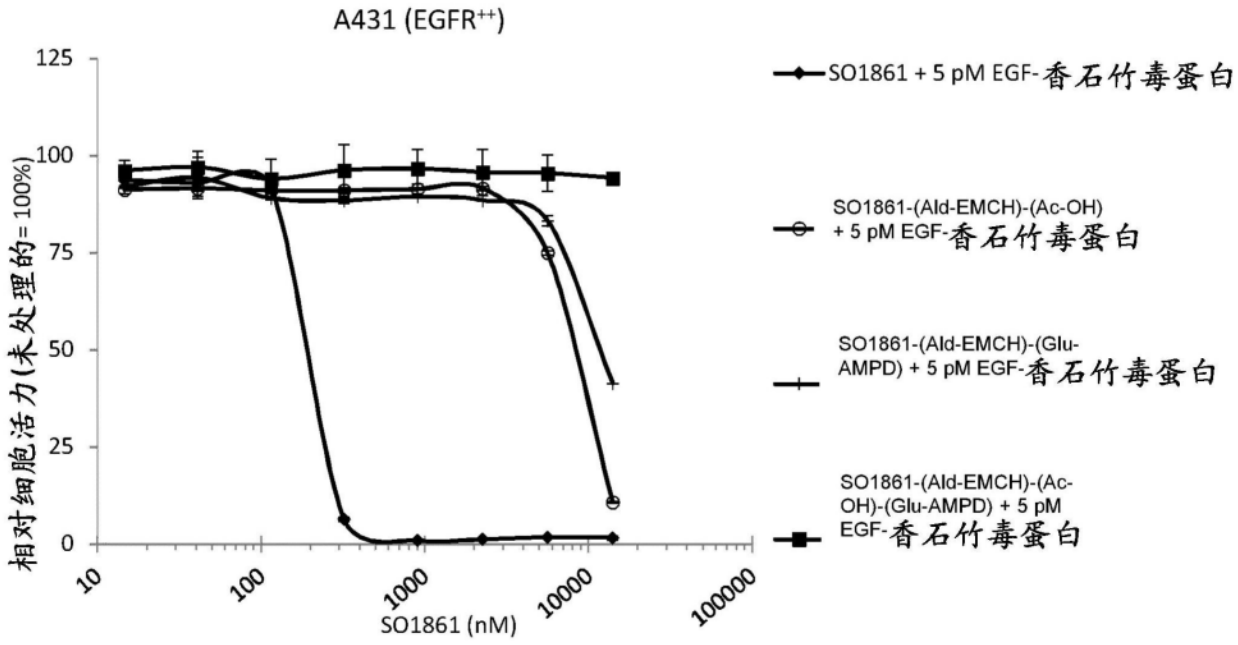

A431 (EGFR++)
125
100
75
50
25
0
相对细胞活力(未处理的=100%)
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)
SO1861 + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白
SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH) + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白
SO1861-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD) + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白
SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH)-(Glu-AMPD) + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白

图24B

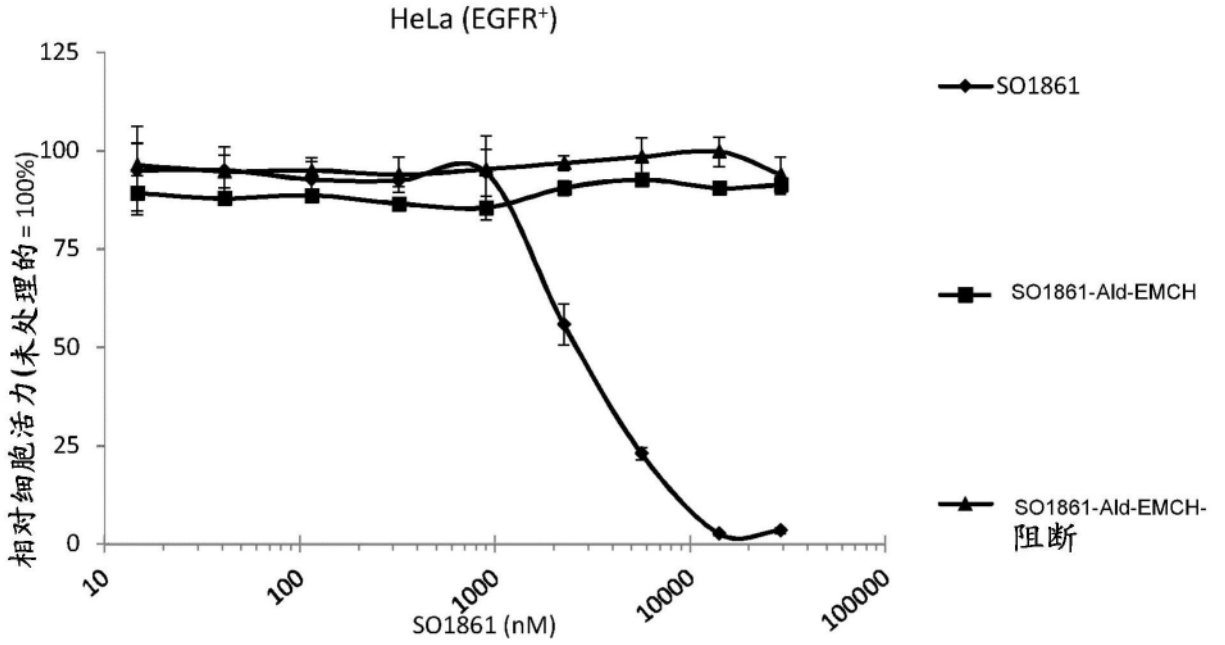

HeLa (EGFR+)
125
100
75
50
25
0
相对细胞活力(未处理的=100%)
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)
SO1861
SO1861-Ald-EMCH
SO1861-Ald-EMCH-阻断

图25A

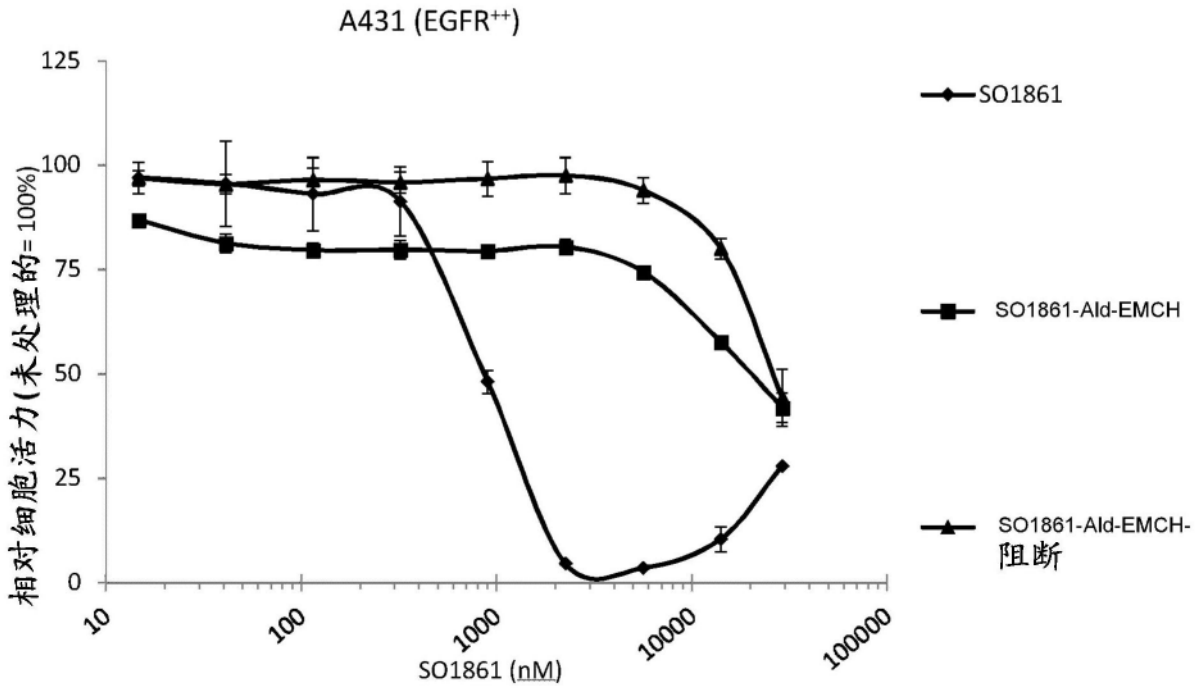

A431 (EGFR++)
125
100
75
50
25
0
相对细胞活力(未处理的=100%)
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)
SO1861
SO1861-Ald-EMCH
SO1861-Ald-EMCH-
阻断

图25B

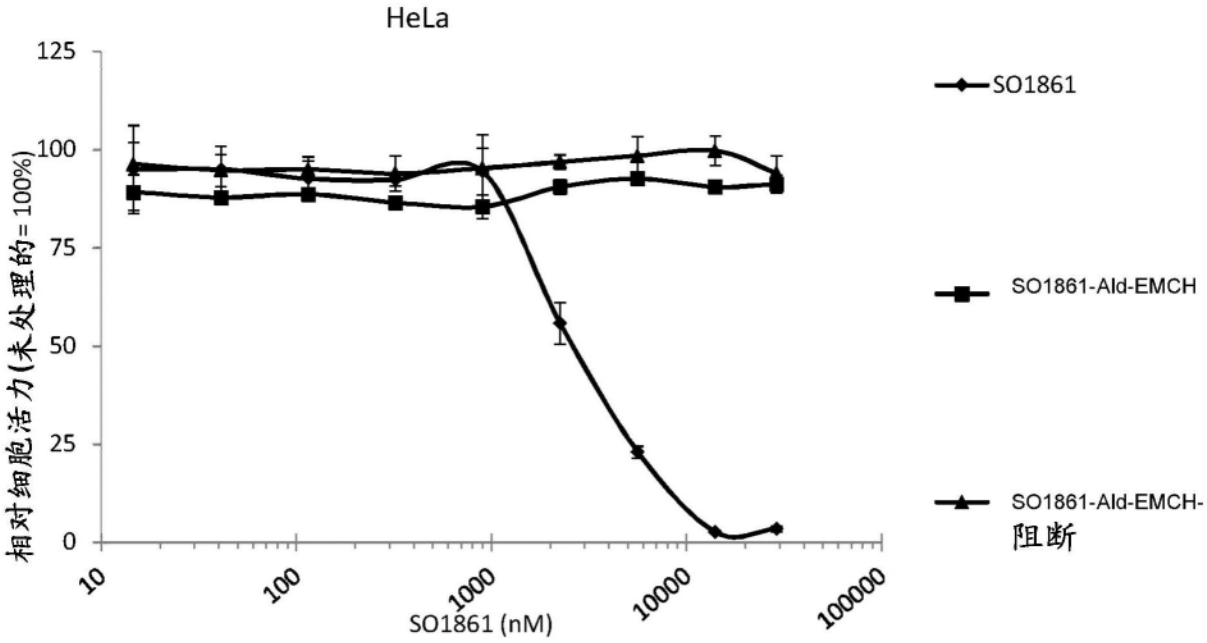

HeLa
125
100
75
50
25
0
相对细胞活力(未处理的=100%)
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)
SO1861
SO1861-Ald-EMCH
SO1861-Ald-EMCH-
阻断

图26A

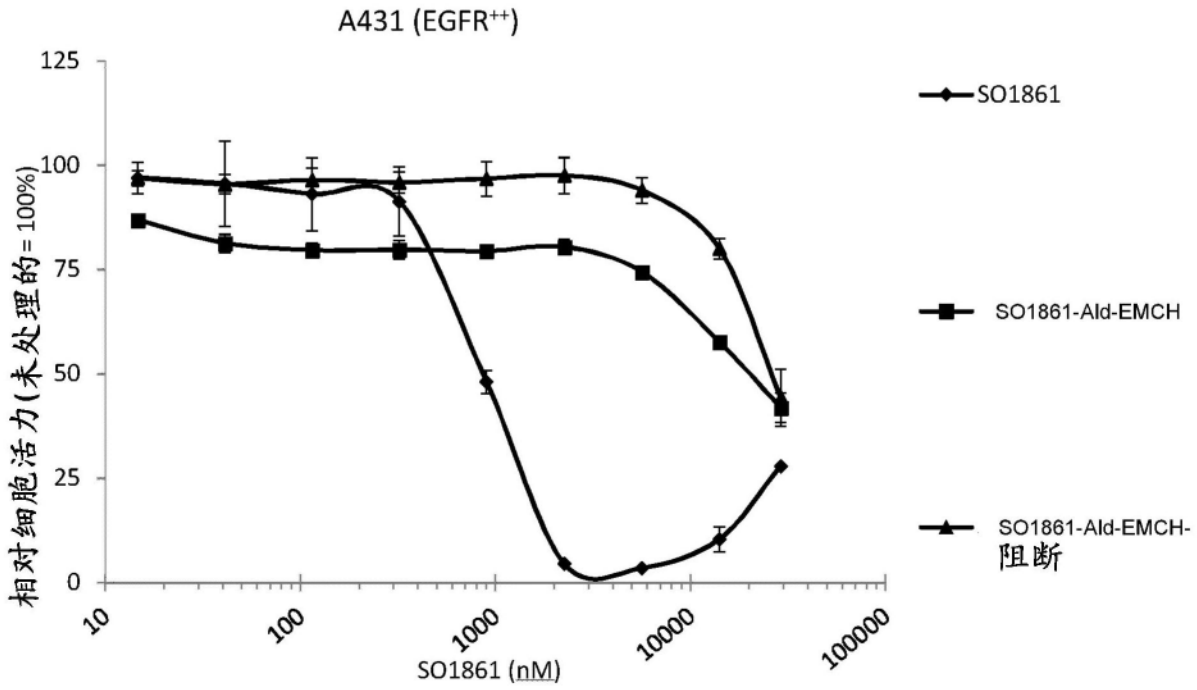

A431 (EGFR++)
125
100
75
50
25
0
相对细胞活力(未处理的=100%)
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)
SO1861
SO1861-Ald-EMCH
SO1861-Ald-EMCH-
阻断

图26B

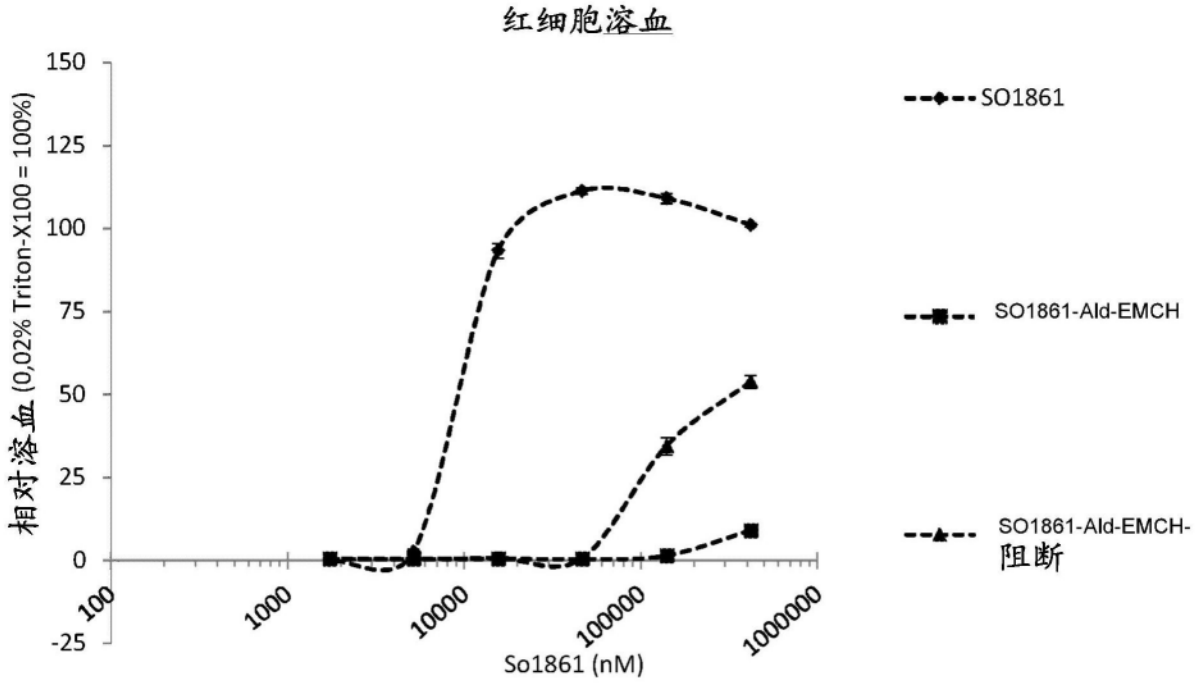

红细胞溶血
150
125
100
75
50
25
0
-25
相对溶血 (0,02% Triton-X100 = 100%)
100
1000
10000
100000
1000000
So1861 (nM)
SO1861
SO1861-Ald-EMCH
SO1861-Ald-EMCH-
阻断

图27

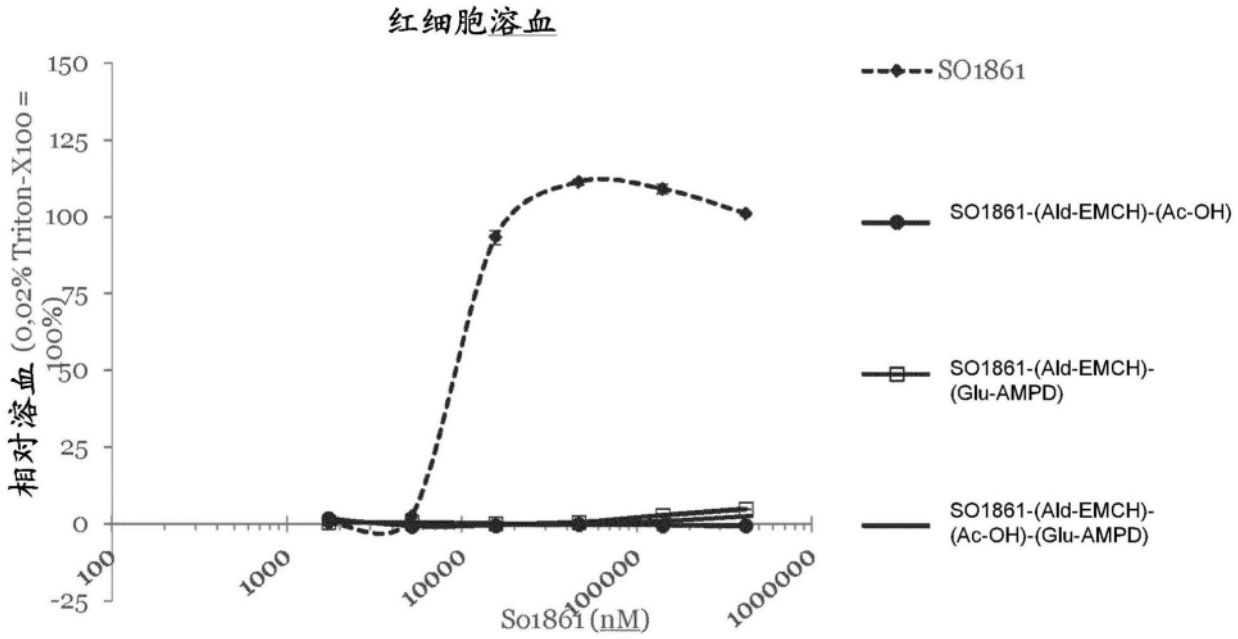

红细胞溶血
相对溶血 (0,02% Triton-X100 = 100%)
150
125
100
75
50
25
0
-25
100
1000
10000
100000
1000000
So1861 (nM)
SO1861
SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH)
SO1861-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD)
SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)

图28

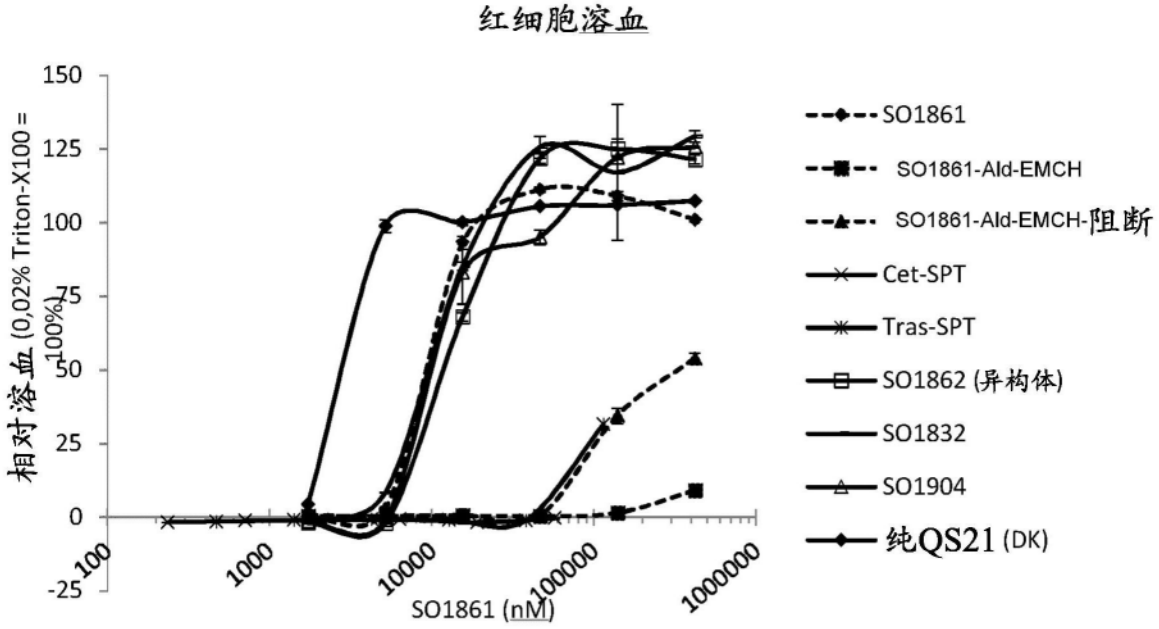

红细胞溶血
相对溶血 (0,02% Triton-X100 = 100%)
150
125
100
75
50
25
0
-25
100
1000
10000
100000
1000000
SO1861 (nM)
SO1861
SO1861-Ald-EMCH
SO1861-Ald-EMCH-阻断
Cet-SPT
Tras-SPT
SO1862 (异构体)
SO1832
SO1904
纯QS21 (DK)

图29

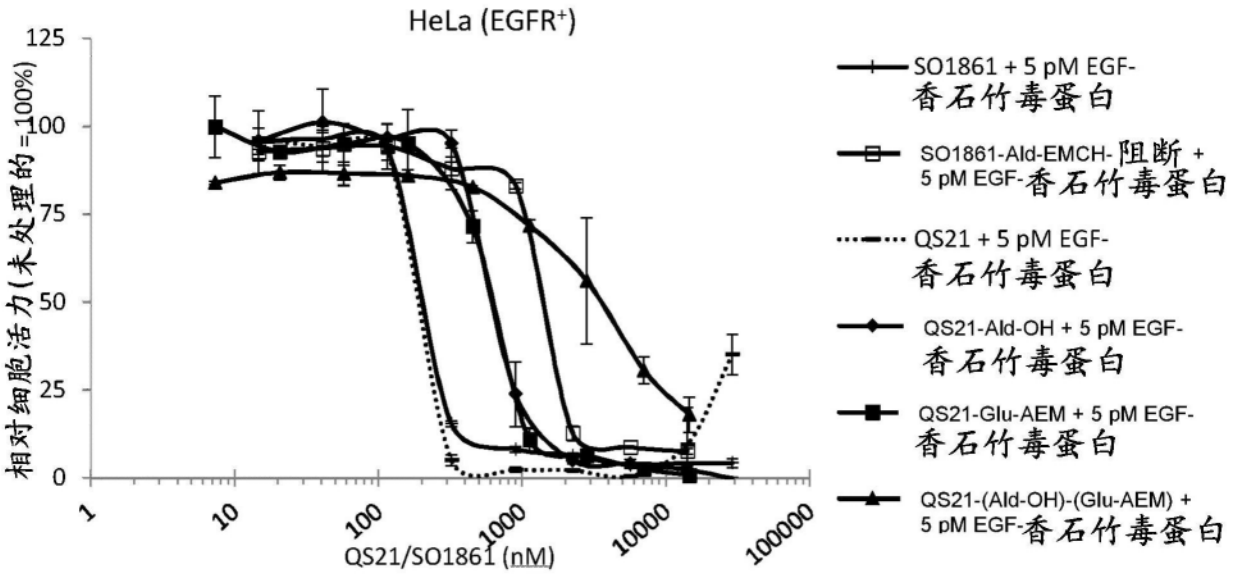

HeLa (EGFR+)
相对细胞活力(未处理的=100%)
125
100
75
50
25
0
1
10
100
1000
10000
100000
QS21/SO1861 (nM)
SO1861 + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白
SO1861-Ald-EMCH-阻断 + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白
QS21 + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白
QS21-Ald-OH + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白
QS21-Glu-AEM + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白
QS21-(Ald-OH)-(Glu-AEM) + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白

图30A

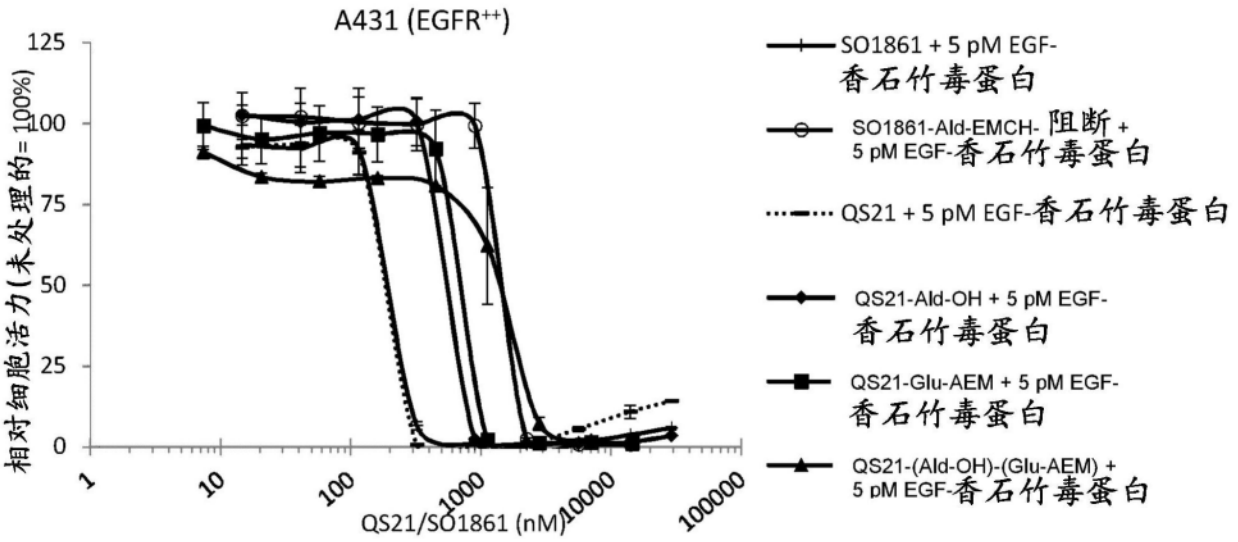

A431 (EGFR++)
相对细胞活力(未处理的= 100%)
125
100
75
50
25
0
1
10
100
1000
10000
100000
QS21/SO1861 (nM)
SO1861 + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白
SO1861-Ald-EMCH-阻断 + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白
QS21 + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白
QS21-Ald-OH + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白
QS21-Glu-AEM + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白
QS21-(Ald-OH)-(Glu-AEM) + 5 pM EGF-香石竹毒蛋白

图30B

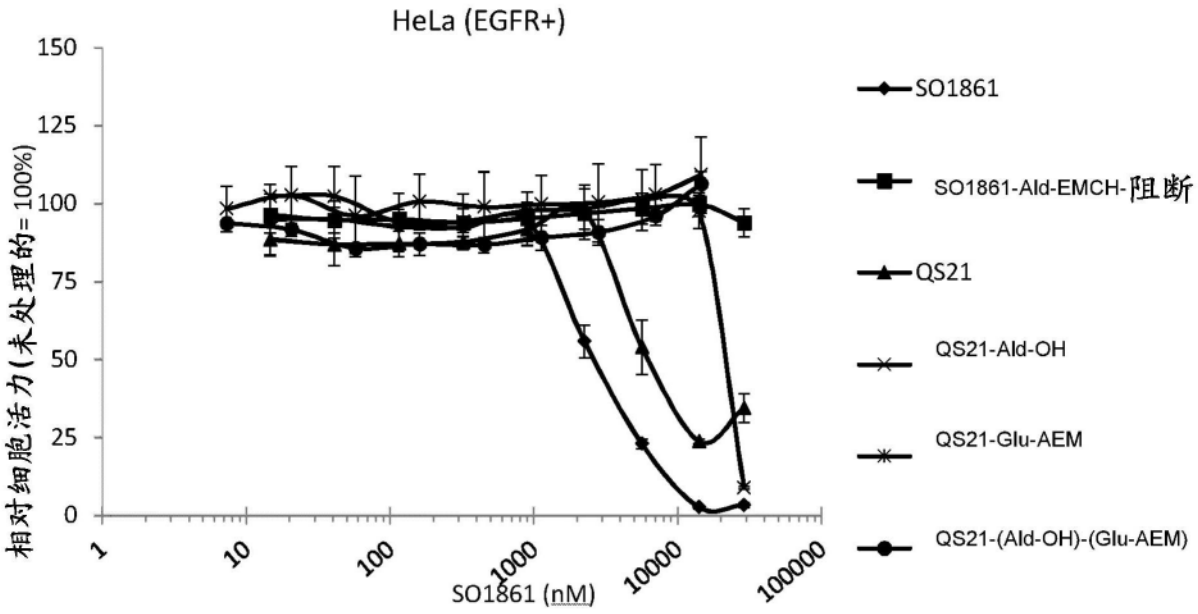

HeLa (EGFR+)
相对细胞活力(未处理的=100%)
150
125
100
75
50
25
0
1
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)
SO1861
SO1861-Ald-EMCH-阻断
QS21
QS21-Ald-OH
QS21-Glu-AEM
QS21-(Ald-OH)-(Glu-AEM)

图31A

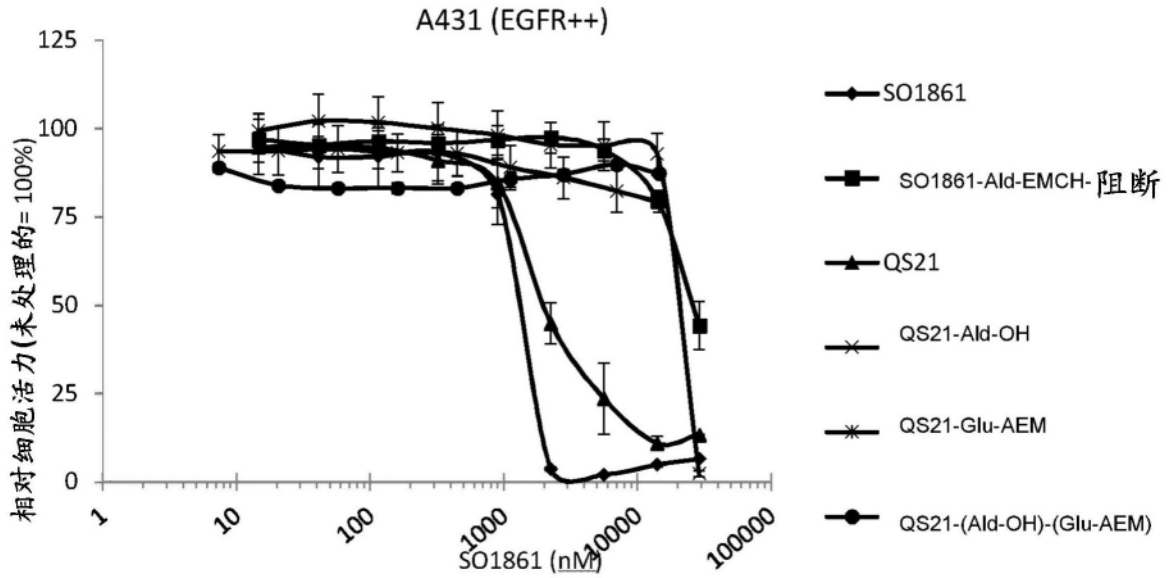

A431 (EGFR++)
相对细胞活力(未处理的=100%)
125
100
75
50
25
0
1
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)
SO1861
SO1861-Ald-EMCH-阻断
QS21
QS21-Ald-OH
QS21-Glu-AEM
QS21-(Ald-OH)-(Glu-AEM)

图31B

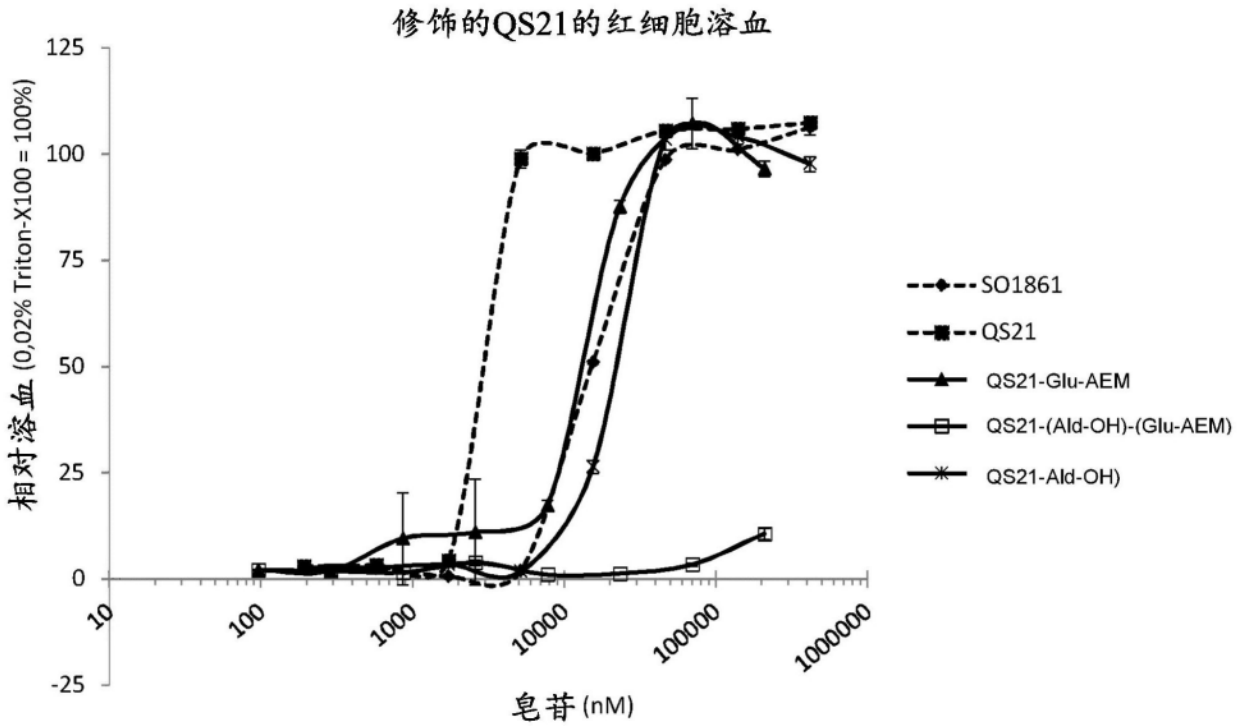

修饰的QS21的红细胞溶血
相对溶血 (0,02% Triton-X100 = 100%)
125
100
75
50
25
0
-25
10
100
1000
10000
100000
1000000
皂苷 (nM)
SO1861
QS21
QS21-Glu-AEM
QS21-(Ald-OH)-(Glu-AEM)
QS21-Ald-OH)

图32

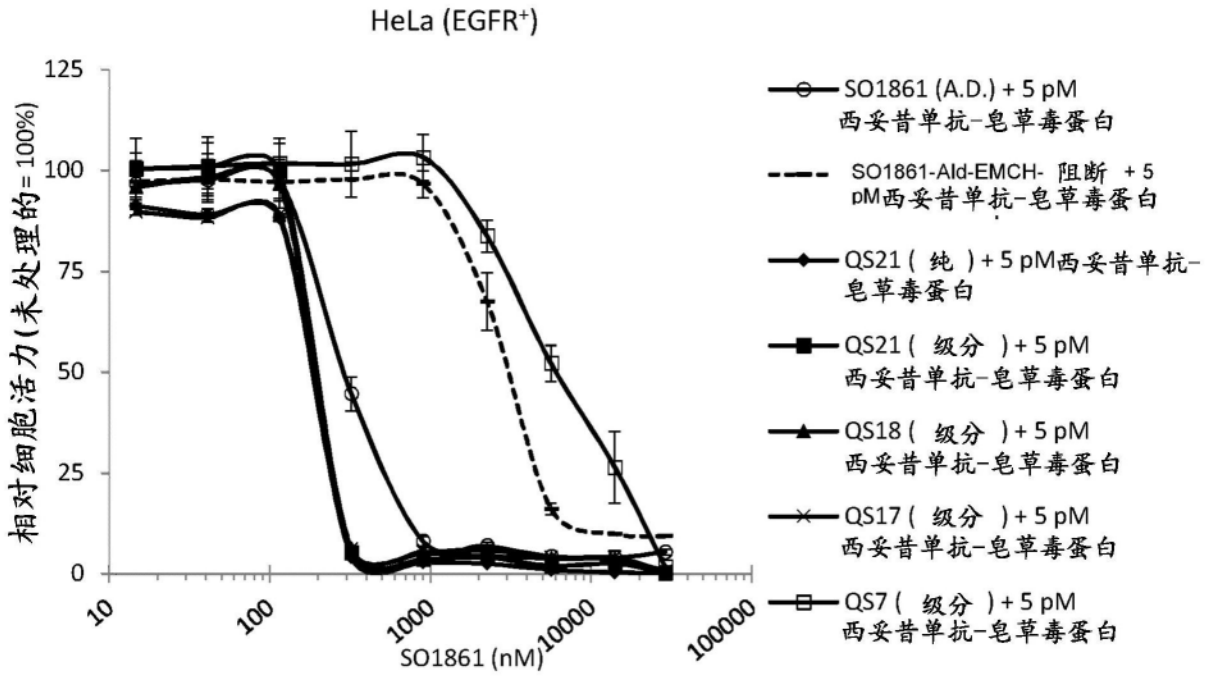

HeLa (EGFR+)
相对细胞活力(未处理的=100%)
125
100
75
50
25
0
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)
SO1861 (A.D.) + 5 pM 西妥昔单抗-皂草毒蛋白
SO1861-Ald-EMCH- 阻断 + 5 pM西妥昔单抗-皂草毒蛋白
QS21 (纯) + 5 pM西妥昔单抗-皂草毒蛋白
QS21 (级分) + 5 pM 西妥昔单抗-皂草毒蛋白
QS18 (级分) + 5 pM 西妥昔单抗-皂草毒蛋白
QS17 (级分) + 5 pM 西妥昔单抗-皂草毒蛋白
QS7 (级分) + 5 pM 西妥昔单抗-皂草毒蛋白

图33A

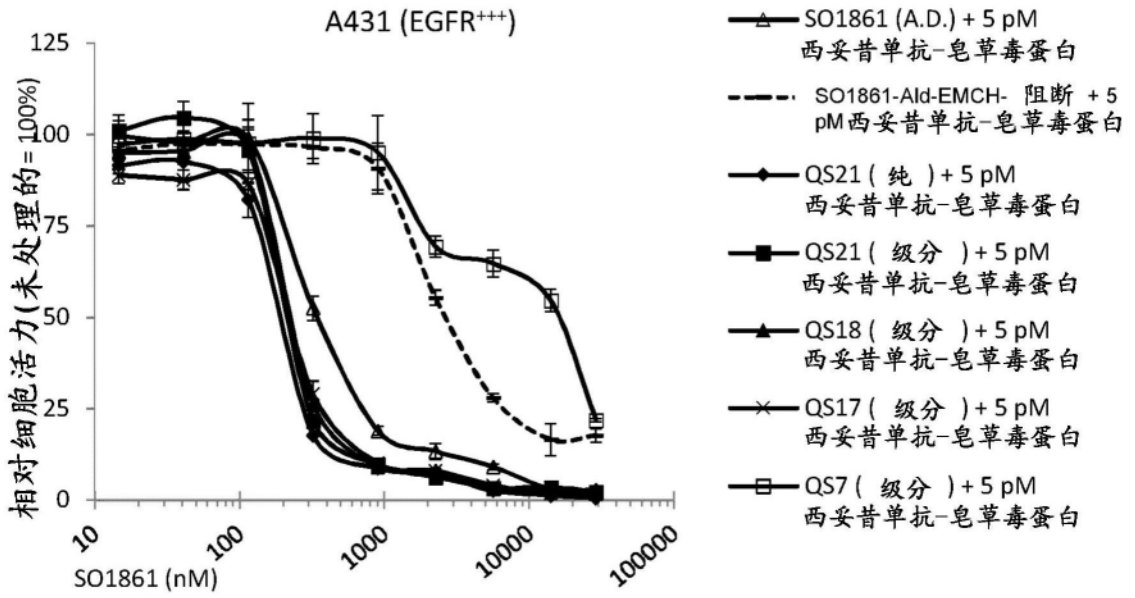

A431 (EGFR+++)
相对细胞活力(未处理的=100%)
125
100
75
50
25
0
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)
SO1861 (A.D.) + 5 pM
西妥昔单抗-皂草毒蛋白
SO1861-Ald-EMCH- 阻断 + 5
pM西妥昔单抗-皂草毒蛋白
QS21 (纯) + 5 pM
西妥昔单抗-皂草毒蛋白
QS21 (级分) + 5 pM
西妥昔单抗-皂草毒蛋白
QS18 (级分) + 5 pM
西妥昔单抗-皂草毒蛋白
QS17 (级分) + 5 pM
西妥昔单抗-皂草毒蛋白
QS7 (级分) + 5 pM
西妥昔单抗-皂草毒蛋白

图33B

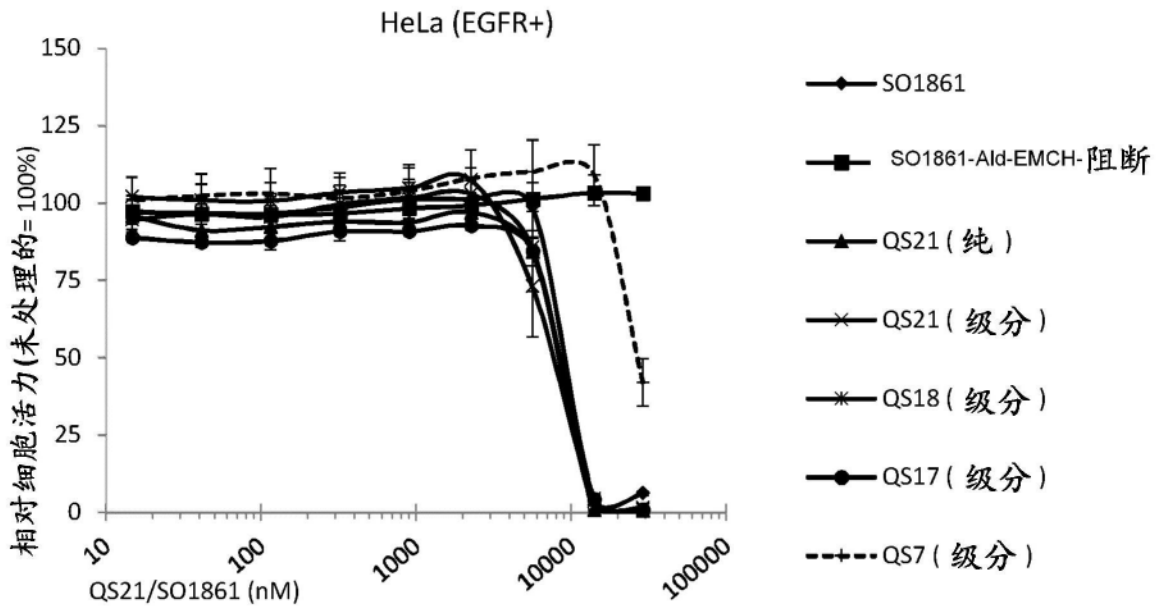

HeLa (EGFR+)
相对细胞活力(未处理的=100%)
150
125
100
75
50
25
0
10
100
1000
10000
100000
QS21/SO1861 (nM)
SO1861
SO1861-Ald-EMCH-阻断
QS21 (纯)
QS21 (级分)
QS18 (级分)
QS17 (级分)
QS7 (级分)

图34A

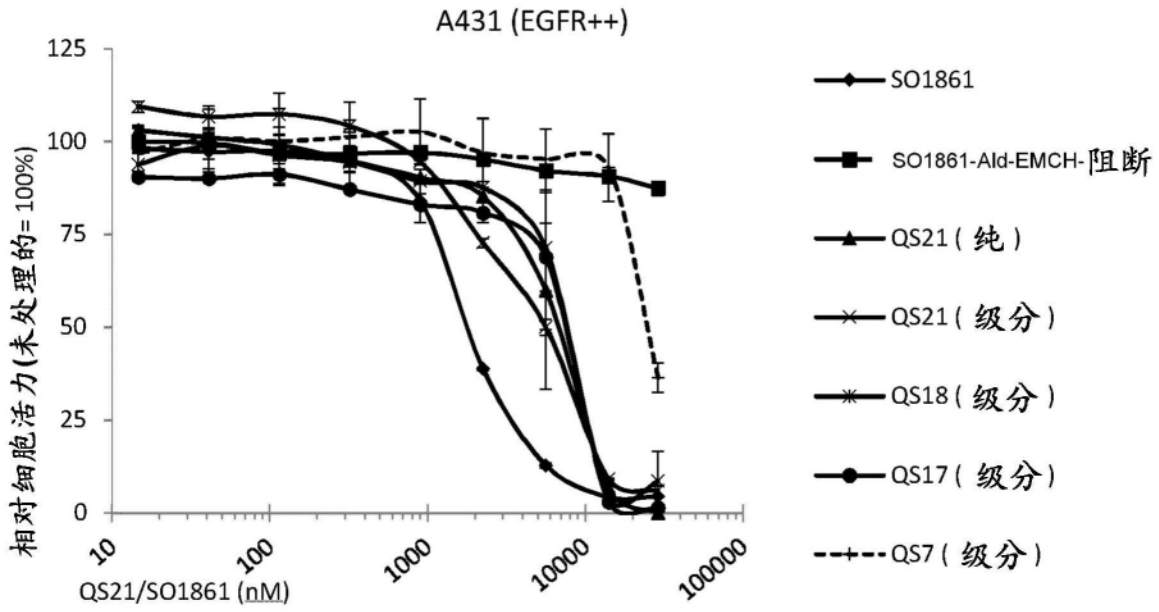

A431 (EGFR++)
相对细胞活力(未处理的= 100%)
125
100
75
50
25
0
10
100
1000
10000
100000
QS21/SO1861 (nM)
SO1861
SO1861-Ald-EMCH-阻断
QS21 (纯)
QS21 (级分)
QS18 (级分)
QS17 (级分)
QS7 (级分)

图34B

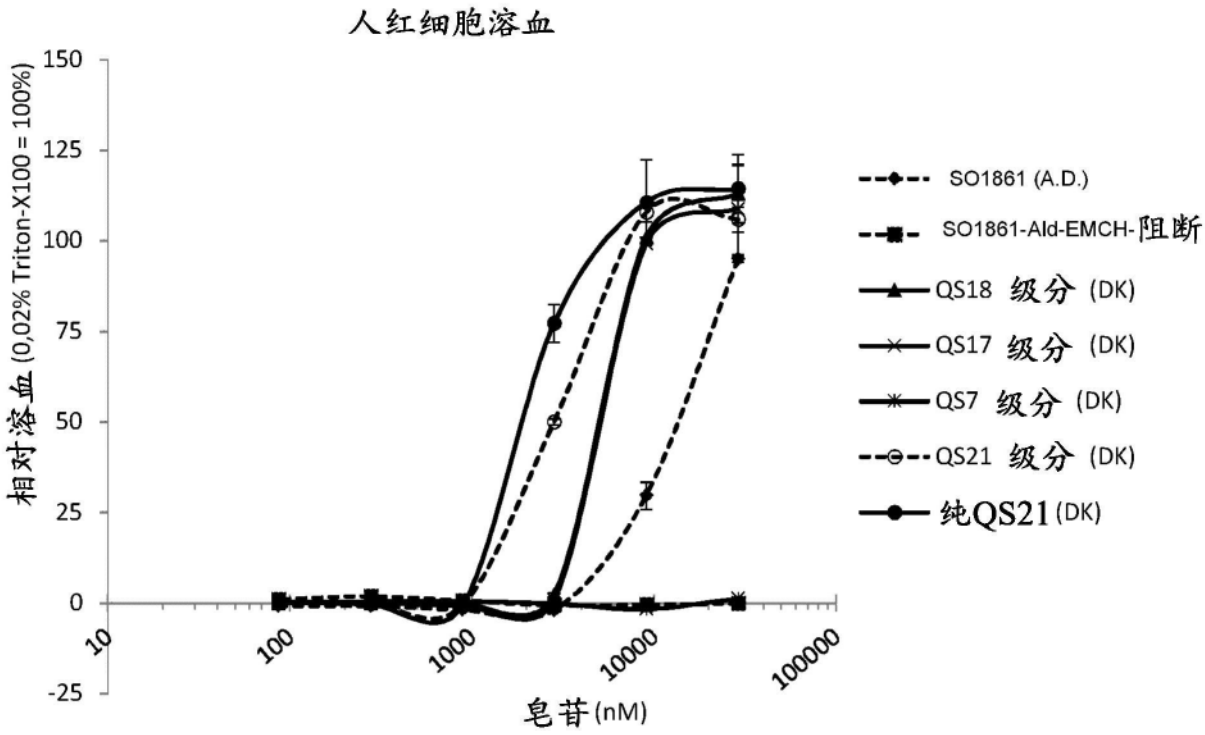

人红细胞溶血
相对溶血 (0,02% Triton-X100 = 100%)
150
125
100
75
50
25
0
-25
10
100
1000
10000
100000
皂苷(nM)
SO1861 (A.D.)
SO1861-Ald-EMCH-阻断
QS18 级分 (DK)
QS17 级分 (DK)
QS7 级分 (DK)
QS21 级分 (DK)
纯QS21 (DK)

图35

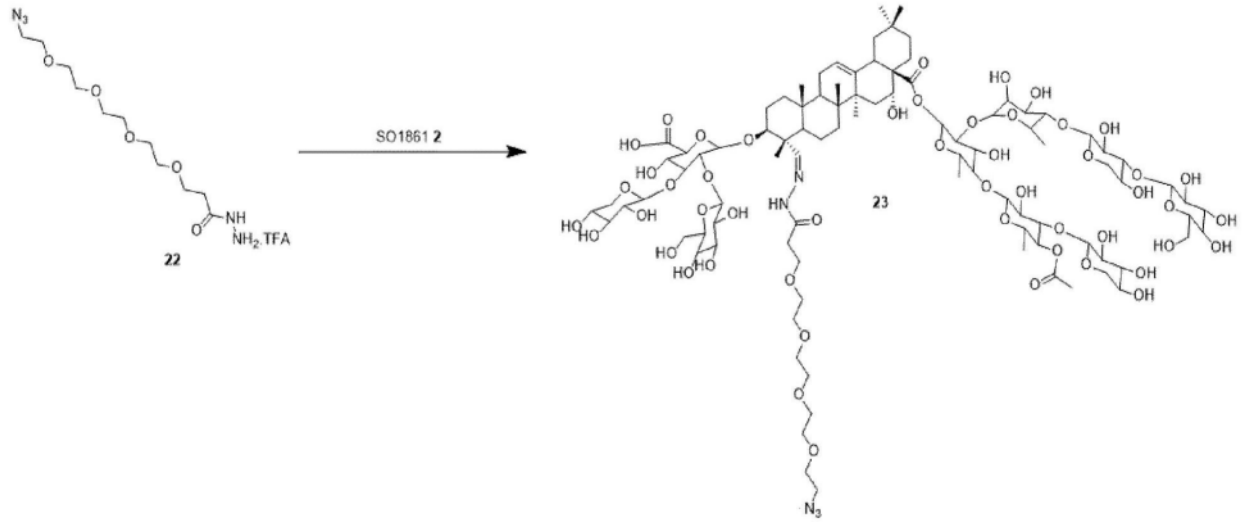


图36

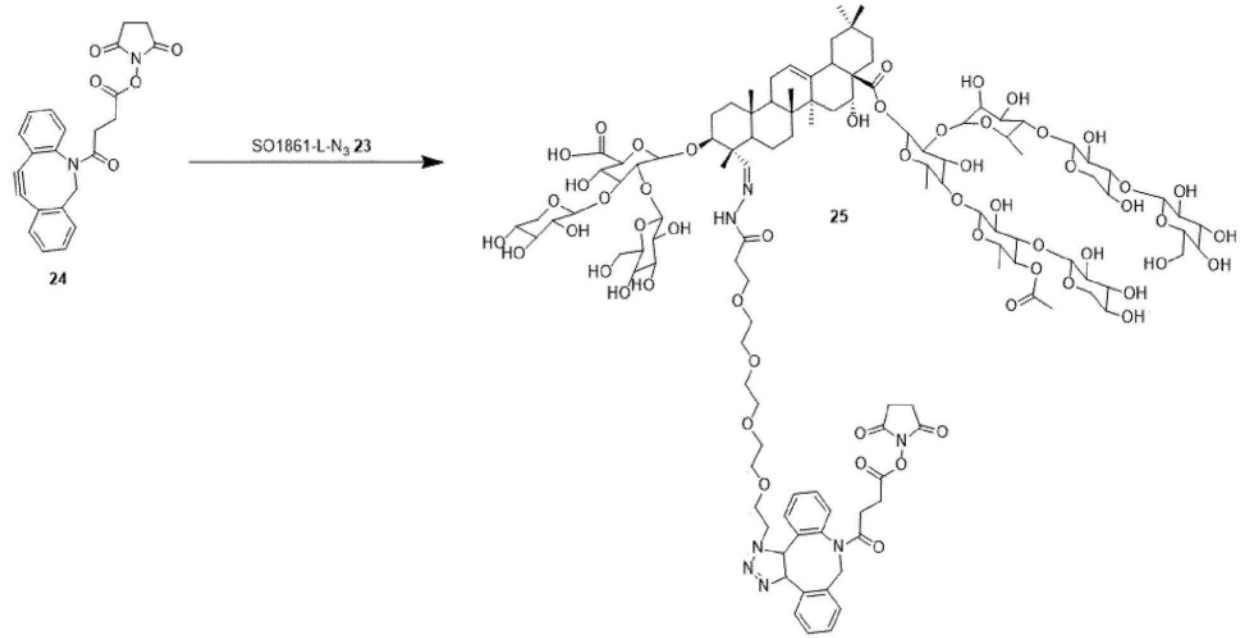


图37

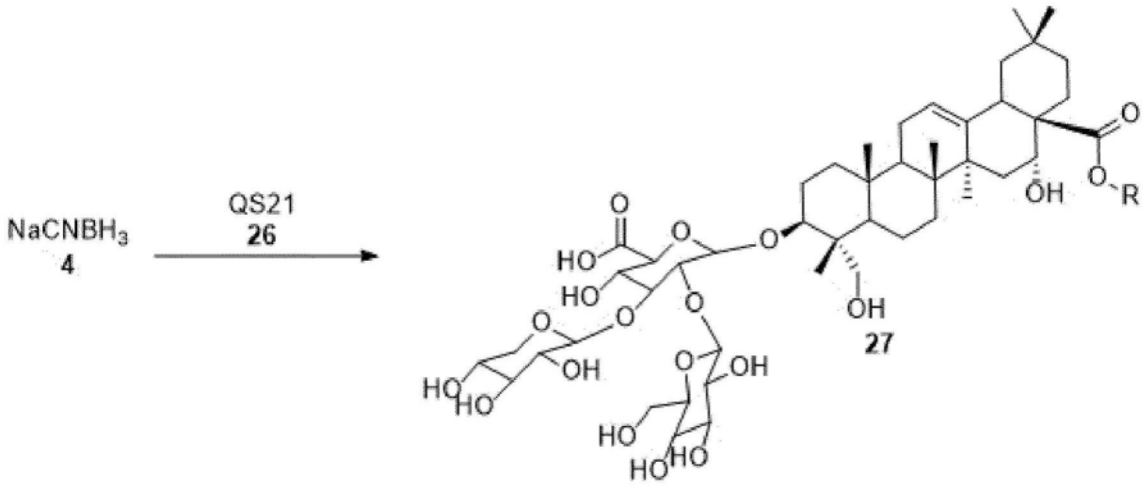


图38

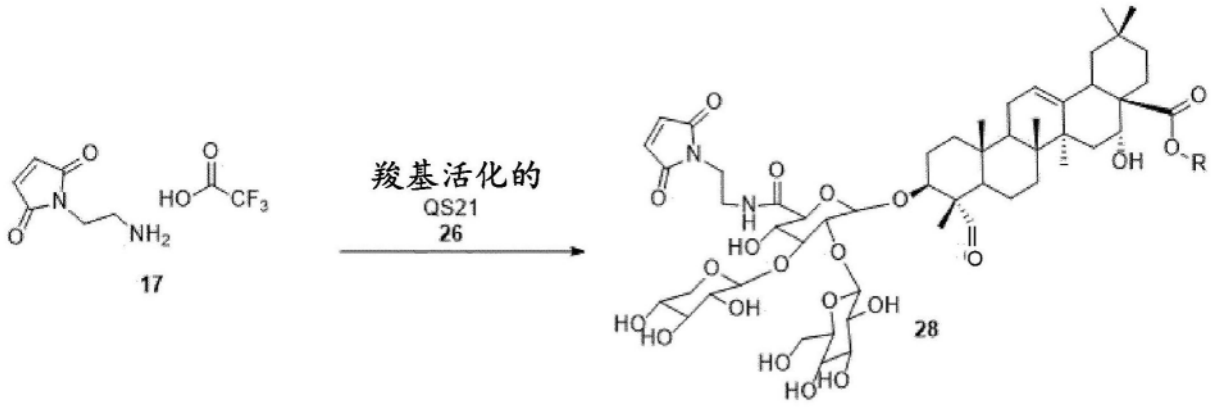


图39

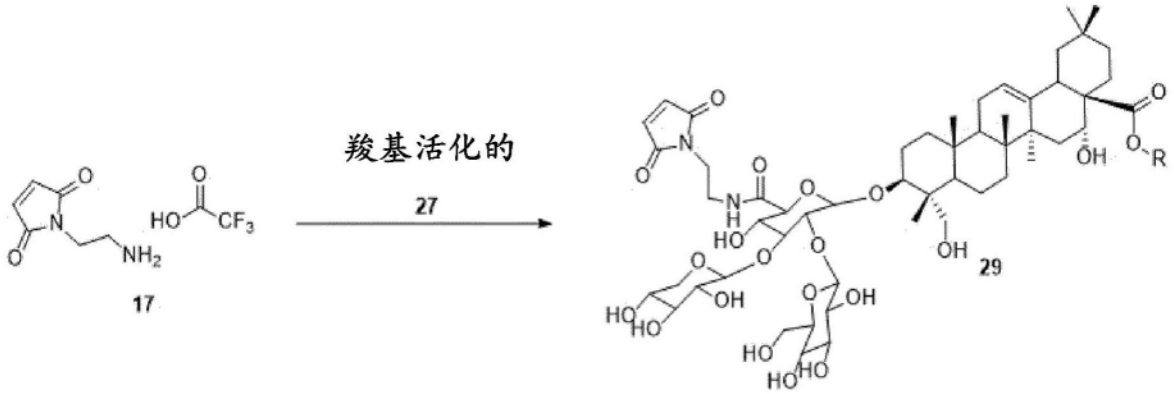


图40A

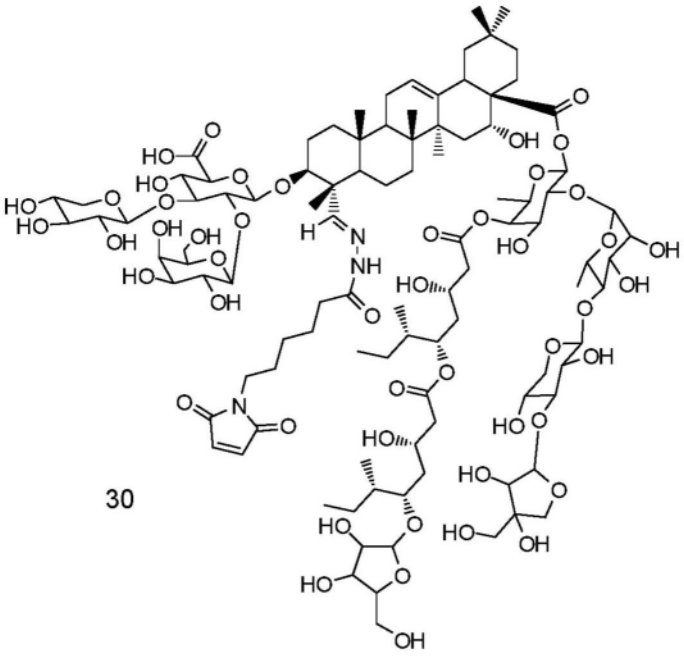


图40B

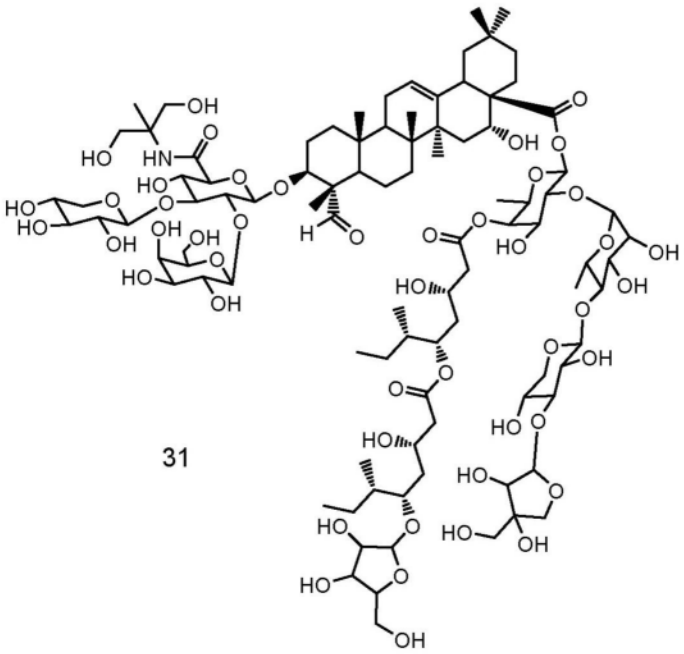


图40C

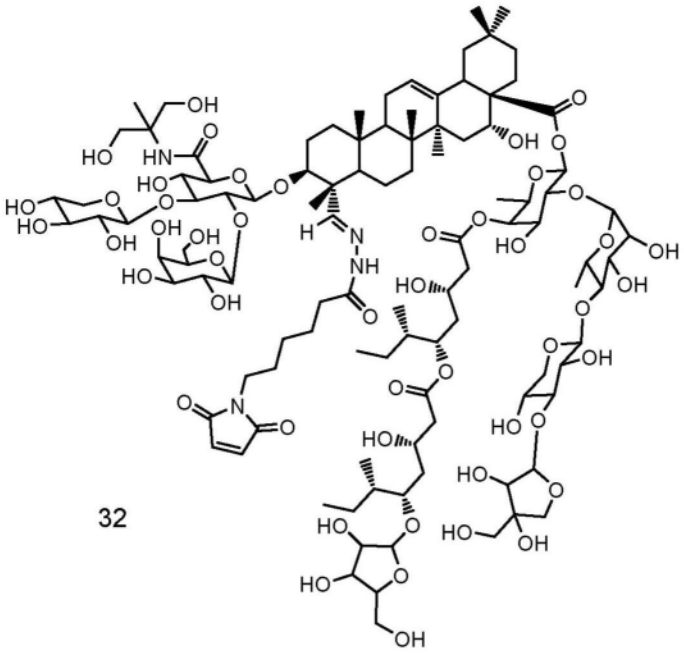


图40D

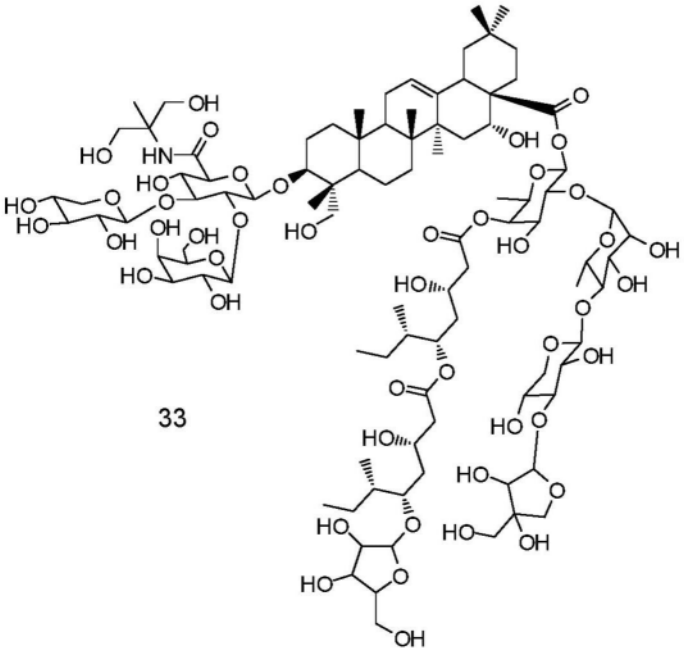
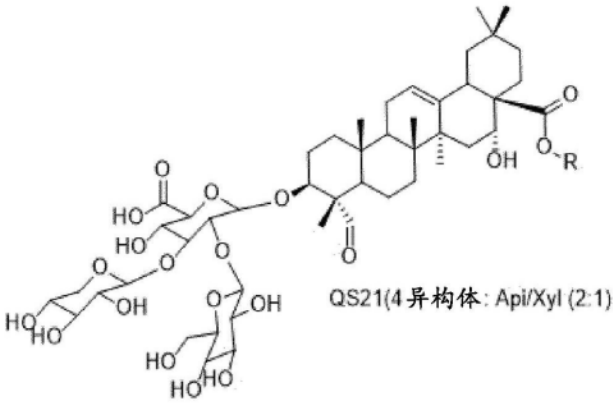
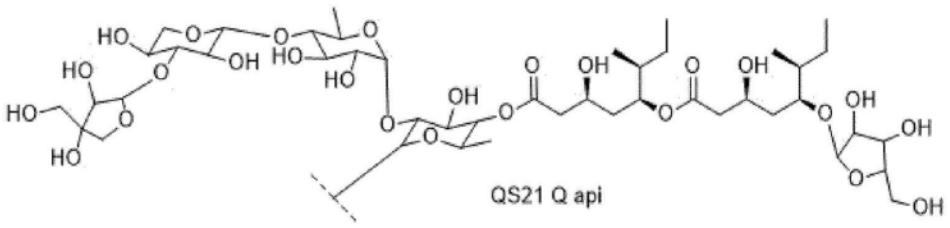
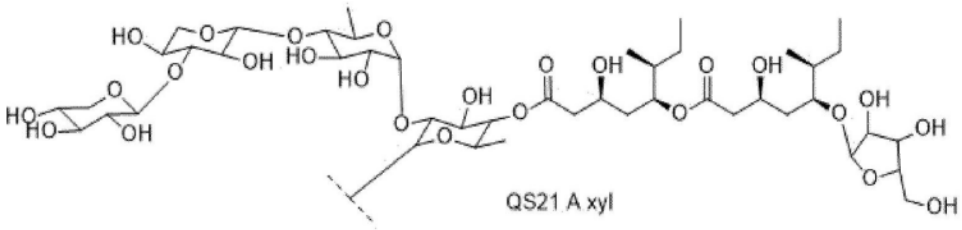
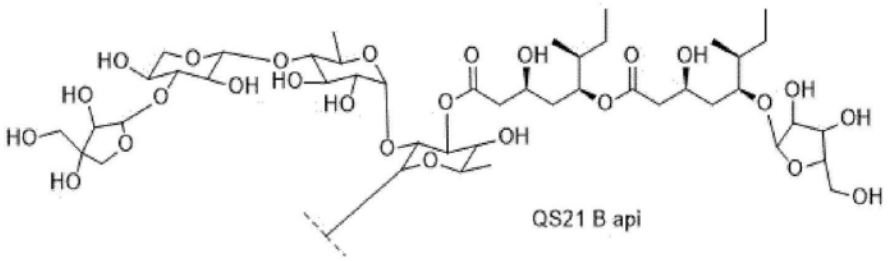


图40E









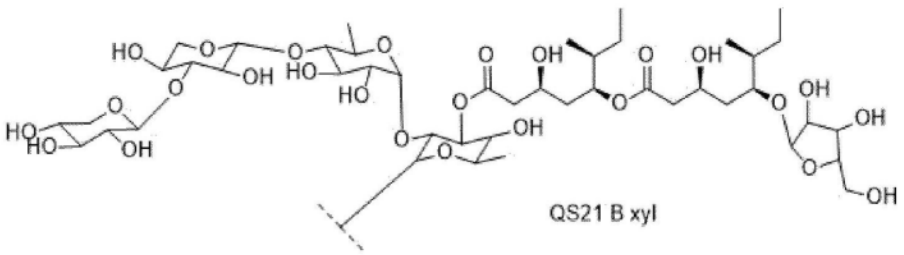


图41

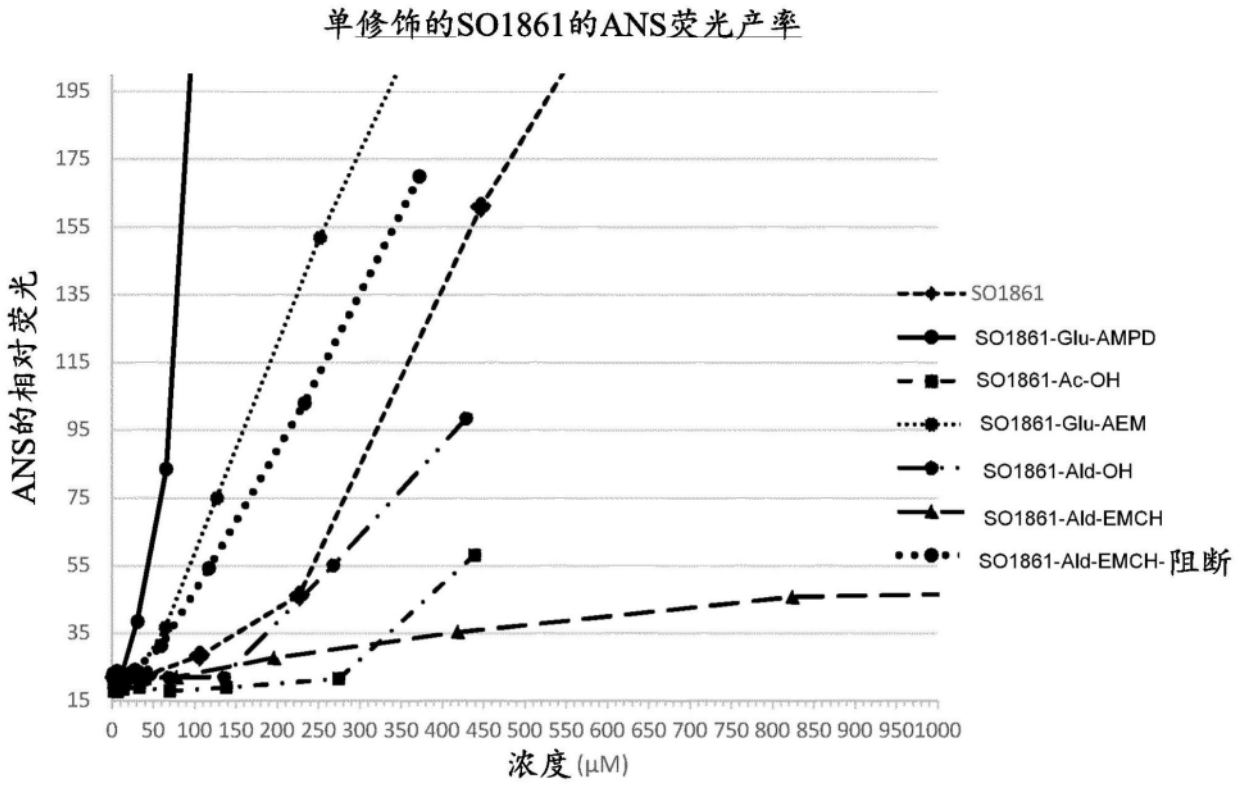

单修饰的SO1861的ANS荧光产率
ANS的相对荧光
195
175
155
135
115
95
75
55
35
15
0 50 100 150 200 250 300 350 400 450 500 550 600 650 700 750 800 850 900 9501000
浓度(μM)
SO1861
SO1861-Glu-AMPD
SO1861-Ac-OH
SO1861-Glu-AEM
SO1861-Ald-OH
SO1861-Ald-EMCH
SO1861-Ald-EMCH-阻断

图42

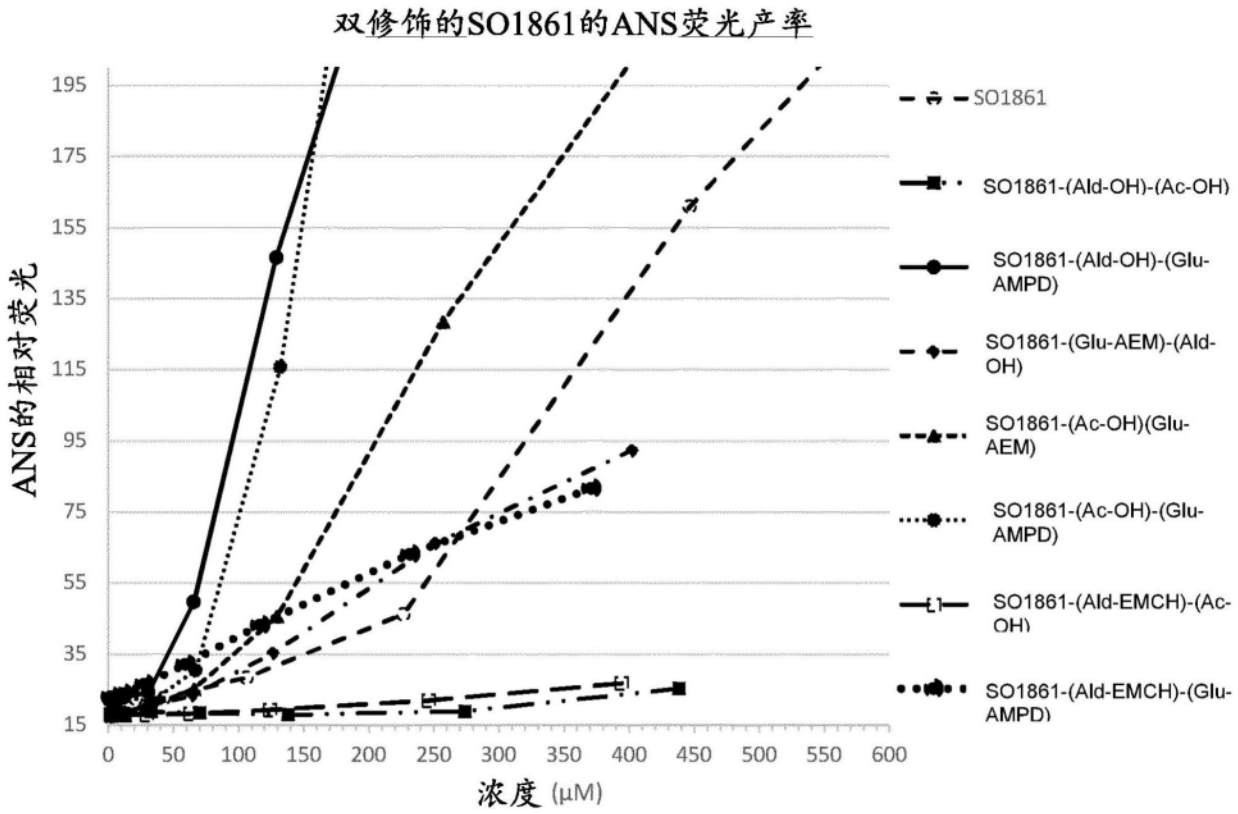

双修饰的SO1861的ANS荧光产率
ANS的相对荧光
195
175
155
135
115
95
75
55
35
15
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
浓度 (μM)
SO1861
SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)
SO1861-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)
SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH)
SO1861-(Ac-OH)(Glu-AEM)
SO1861-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)
SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH)
SO1861-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD)

图43

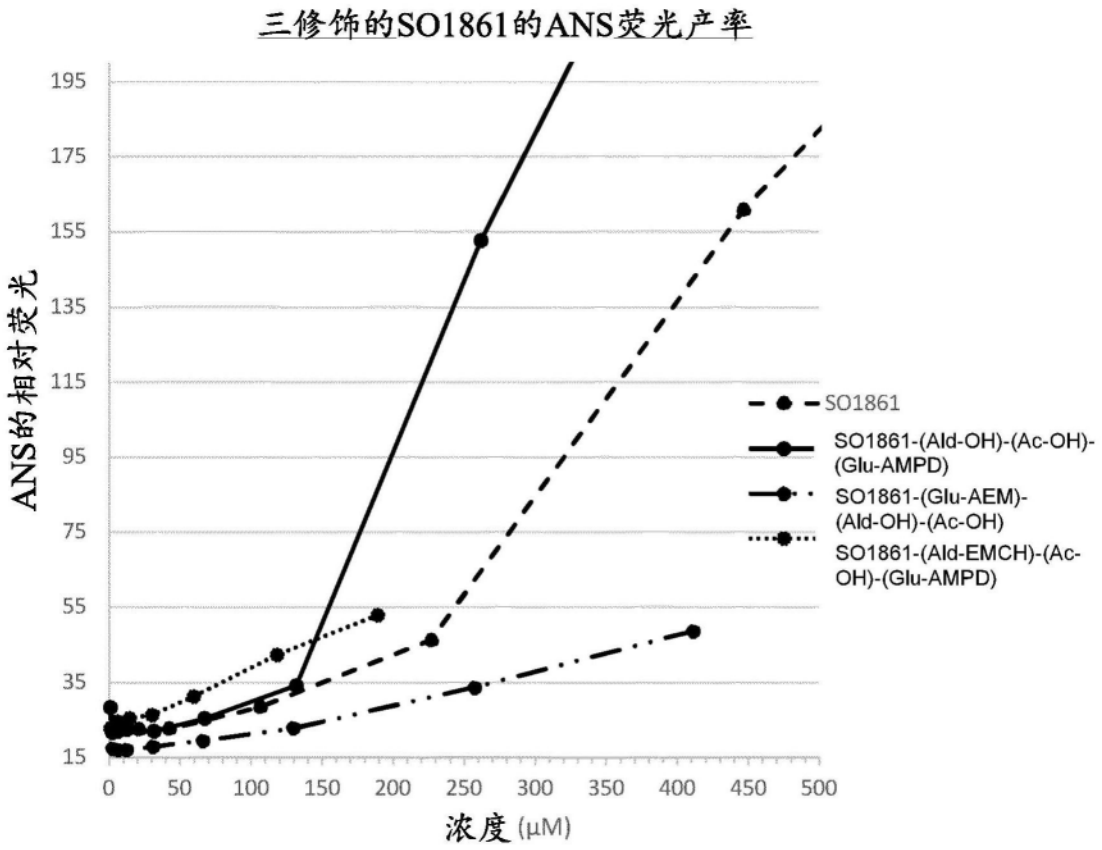

三修饰的SO1861的ANS荧光产率
ANS的相对荧光
195
175
155
135
115
95
75
55
35
15
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
浓度 (μM)
SO1861
SO1861-(Ald-OH)-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)
SO1861-(Glu-AEM)-(Ald-OH)-(Ac-OH)
SO1861-(Ald-EMCH)-(Ac-OH)-(Glu-AMPD)

图44

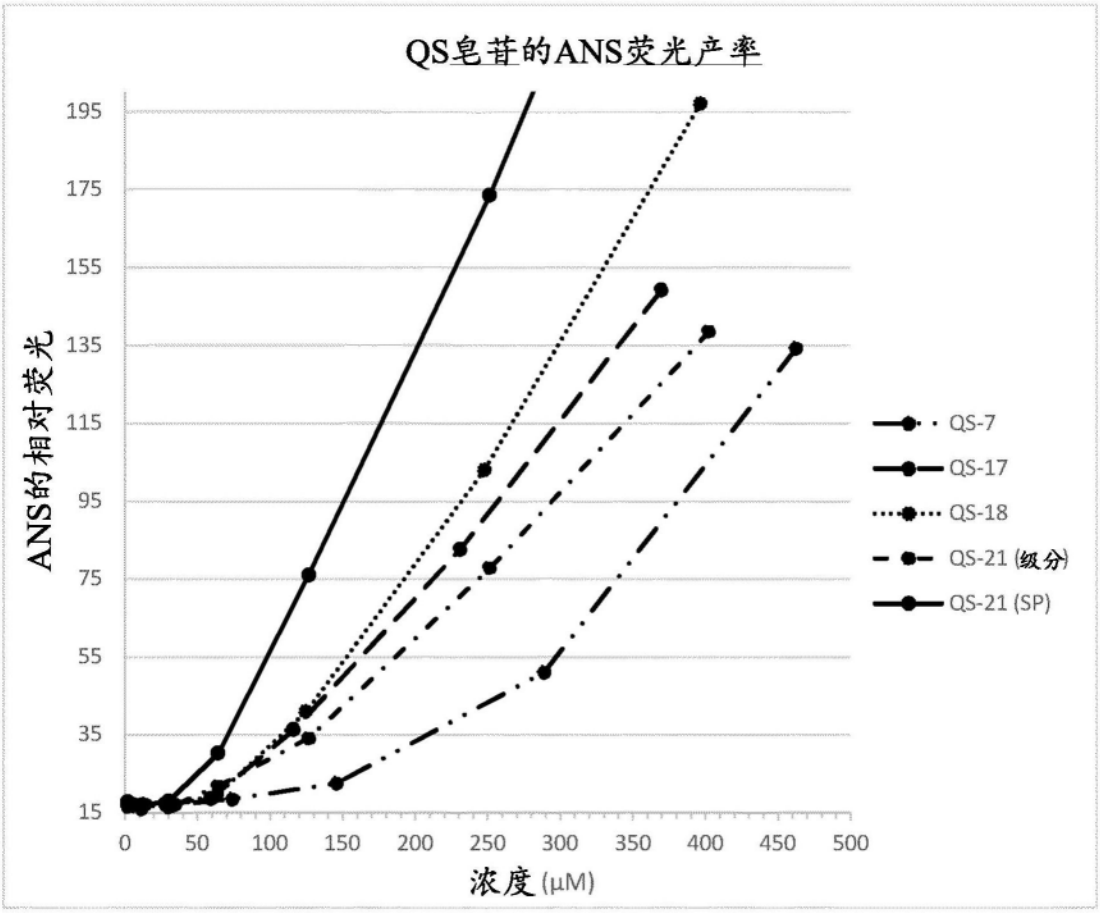

QS皂苷的ANS荧光产率
ANS的相对荧光
195
175
155
135
115
95
75
55
35
15
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
浓度(μM)
QS-7
QS-17
QS-18
QS-21 (级分)
QS-21 (SP)

图45

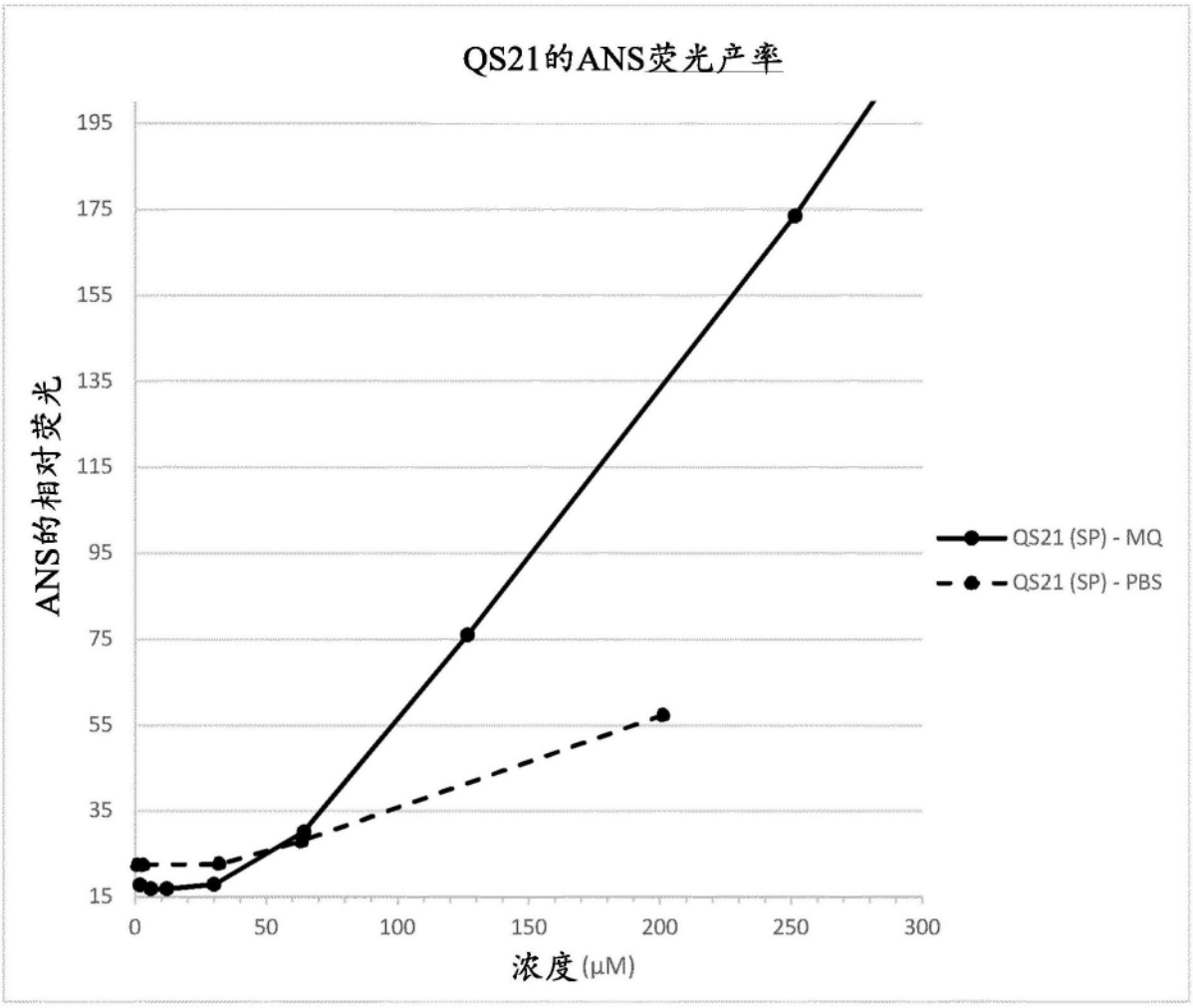

QS21的ANS荧光产率
ANS的相对荧光
195
175
155
135
115
95
75
55
35
15
0
50
100
150
200
250
300
浓度(μM)
QS21 (SP) - MQ
QS21 (SP) - PBS

图46

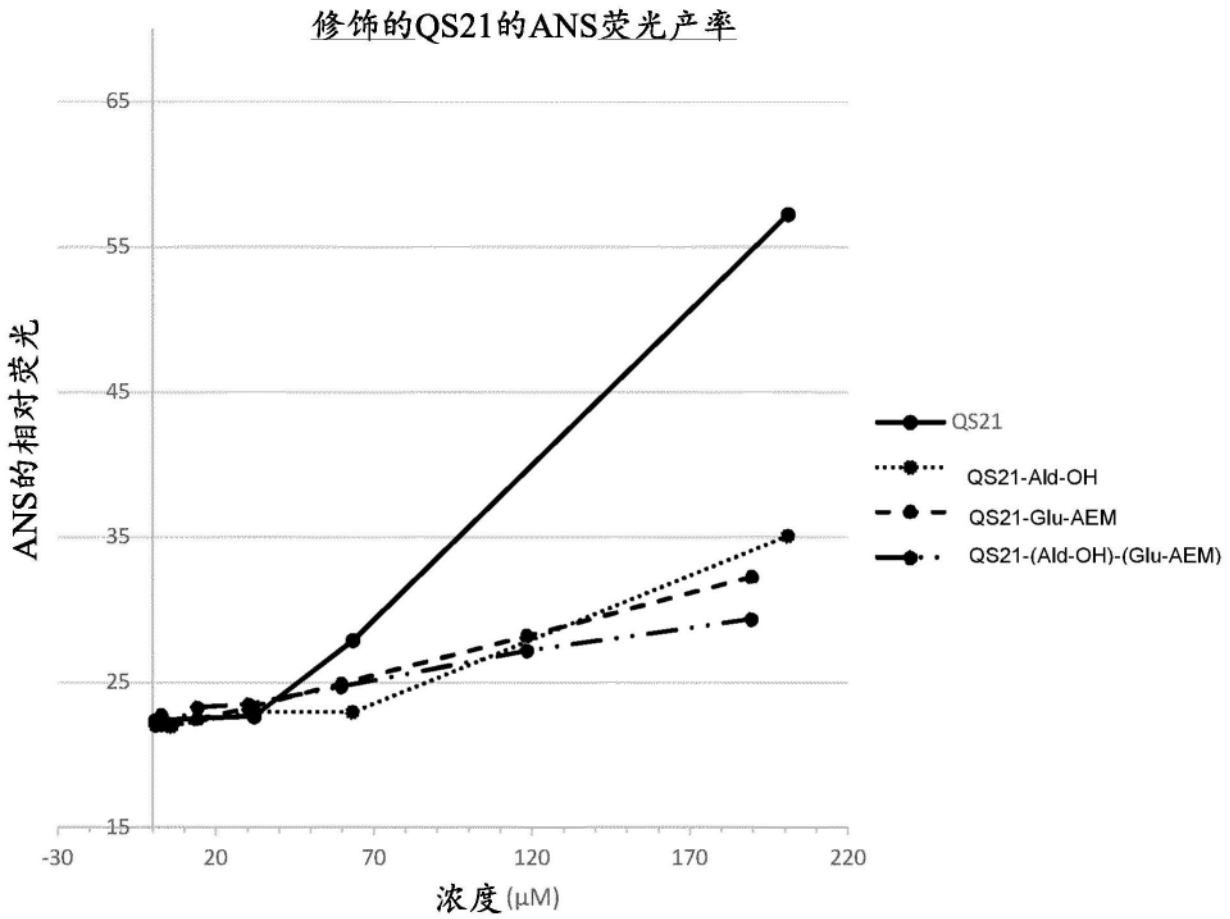

修饰的QS21的ANS荧光产率
ANS的相对荧光
65
55
45
35
25
15
-30
20
70
120
170
220
浓度(μM)
QS21
QS21-Ald-OH
QS21-Glu-AEM
QS21-(Ald-OH)-(Glu-AEM)

图47A

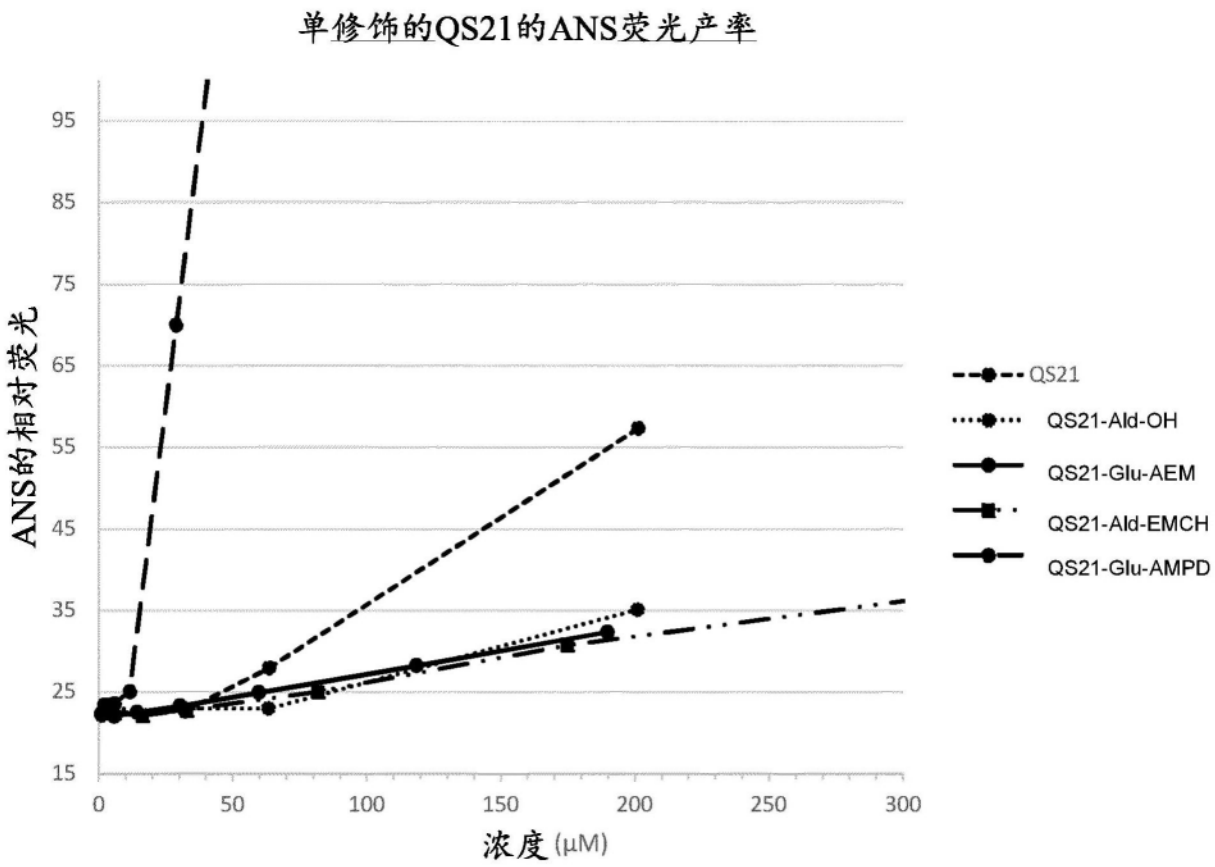

单修饰的QS21的ANS荧光产率
ANS的相对荧光
95
85
75
65
55
45
35
25
15
0
50
100
150
200
250
300
浓度(μM)
QS21
QS21-Ald-OH
QS21-Glu-AEM
QS21-Ald-EMCH
QS21-Glu-AMPD

图47B

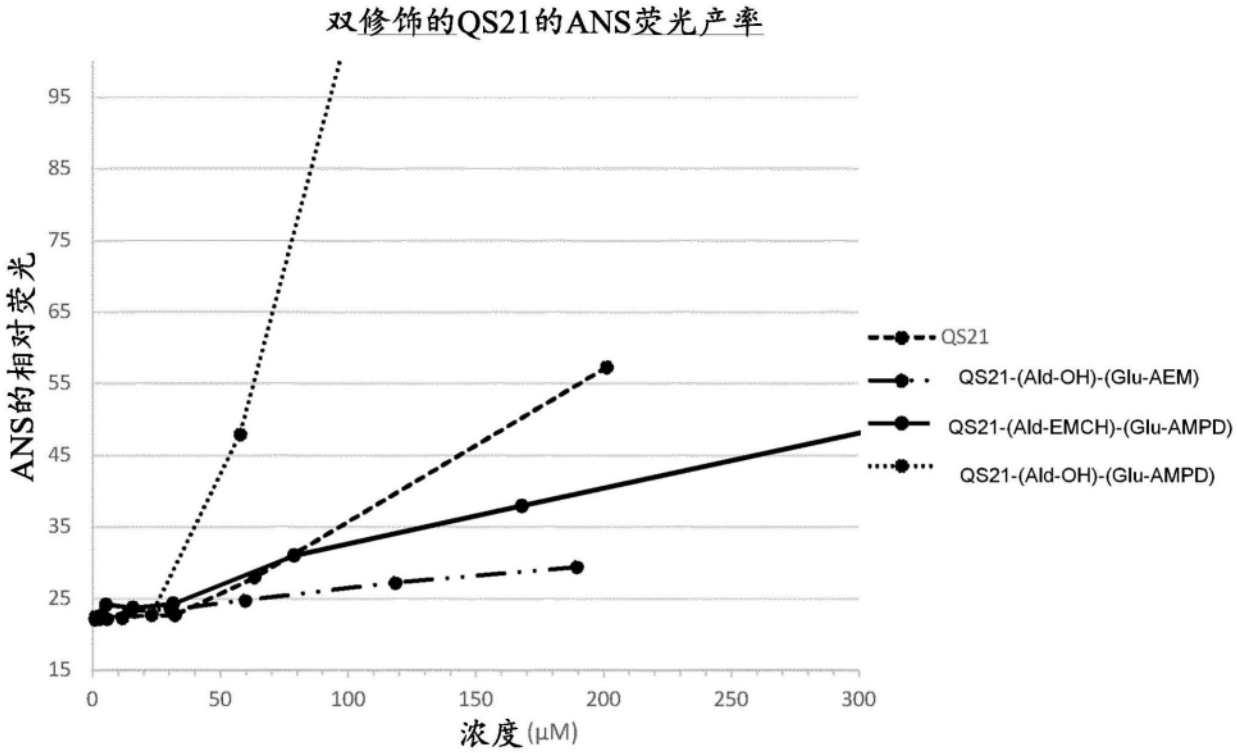

双修饰的QS21的ANS荧光产率
ANS的相对荧光
95
85
75
65
55
45
35
25
15
0
50
100
150
200
250
300
浓度(μM)
QS21
QS21-(Ald-OH)-(Glu-AEM)
QS21-(Ald-EMCH)-(Glu-AMPD)
QS21-(Ald-OH)-(Glu-AMPD)

图47C

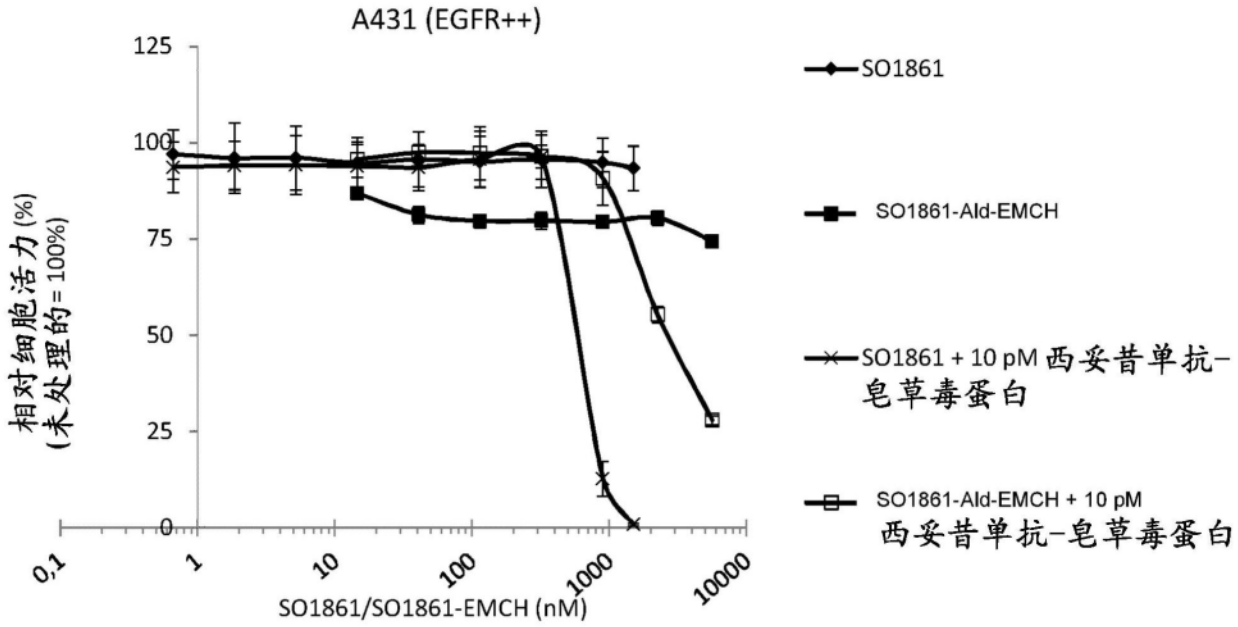

A431 (EGFR++)
相对细胞活力(%)
(未处理的=100%)
125
100
75
50
25
0
0,1
1
10
100
1000
10000
SO1861/SO1861-EMCH (nM)
SO1861
SO1861-Ald-EMCH
SO1861 + 10 pM 西妥昔单抗-皂草毒蛋白
SO1861-Ald-EMCH + 10 pM 西妥昔单抗-皂草毒蛋白

图48

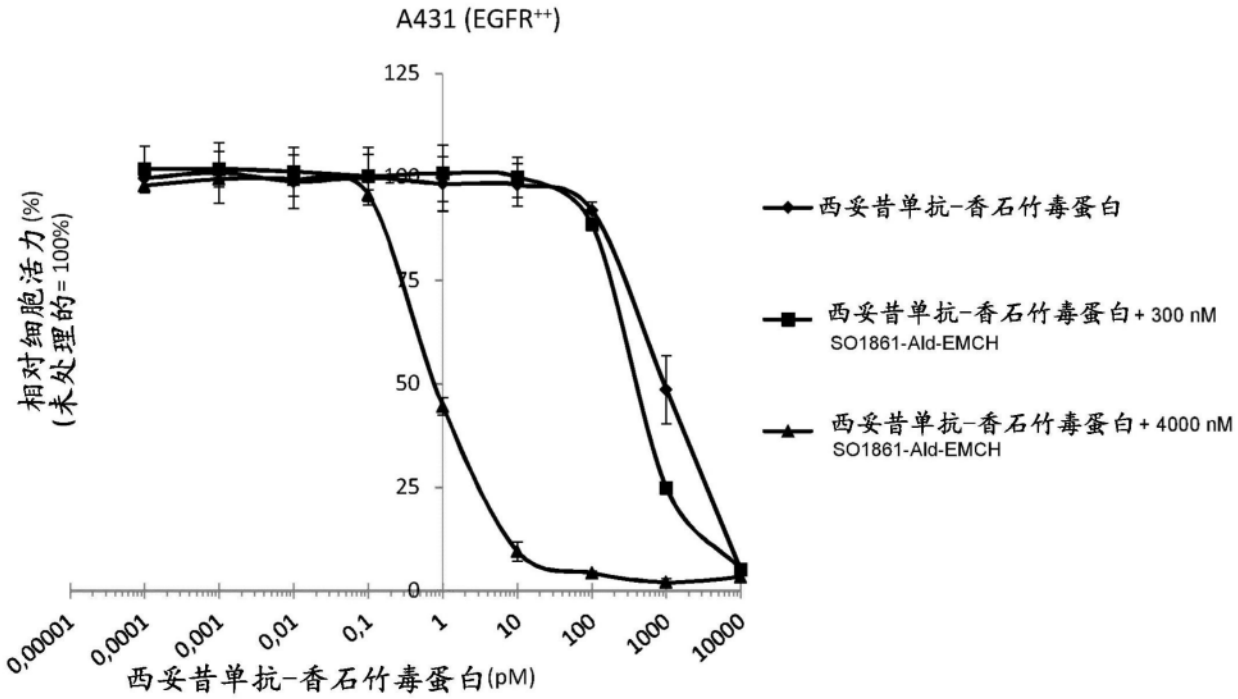

A431 (EGFR++)
相对细胞活力(%)
(未处理的= 100%)
125
100
75
50
25
0
0,00001
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
10000
西妥昔单抗-香石竹毒蛋白(pM)
西妥昔单抗-香石竹毒蛋白
西妥昔单抗-香石竹毒蛋白 + 300 nM SO1861-Ald-EMCH
西妥昔单抗-香石竹毒蛋白 + 4000 nM SO1861-Ald-EMCH

图49

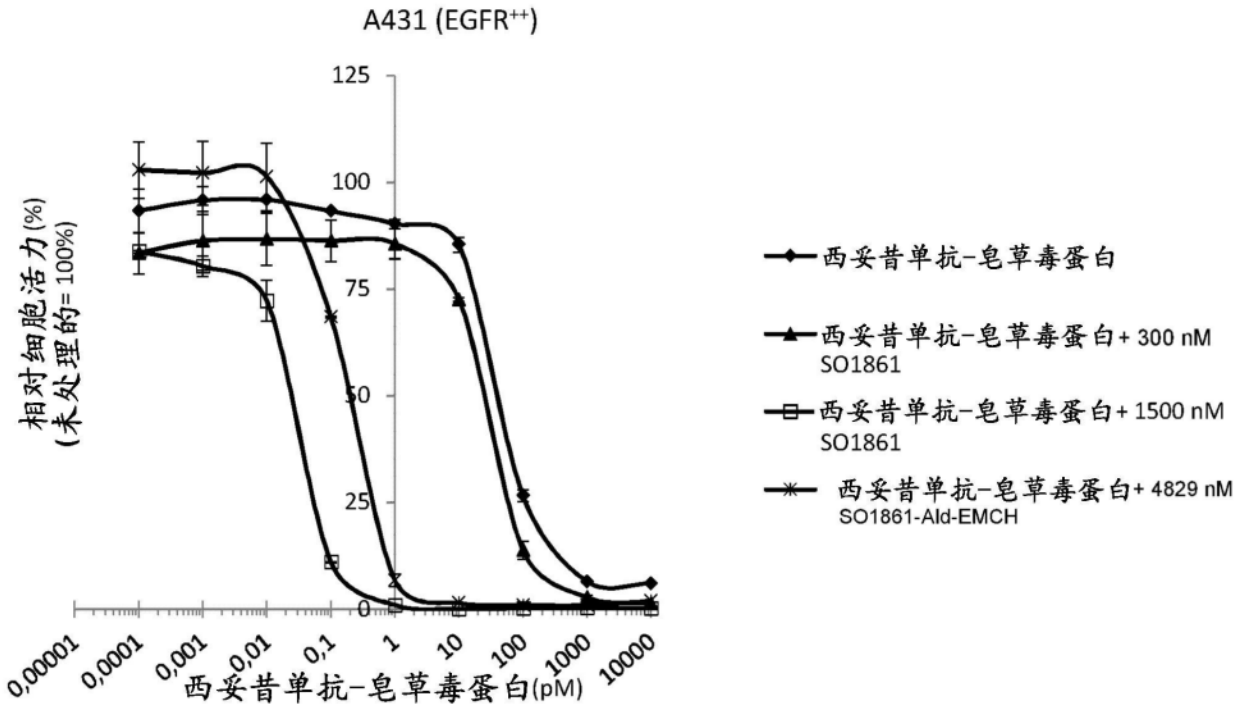

A431 (EGFR++)
相对细胞活力(%)
(未处理的= 100%)
125
100
75
50
25
0
0,00001
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
10000
西妥昔单抗-皂草毒蛋白(pM)
西妥昔单抗-皂草毒蛋白
西妥昔单抗-皂草毒蛋白 + 300 nM SO1861
西妥昔单抗-皂草毒蛋白 + 1500 nM SO1861
西妥昔单抗-皂草毒蛋白 + 4829 nM SO1861-Ald-EMCH

图50

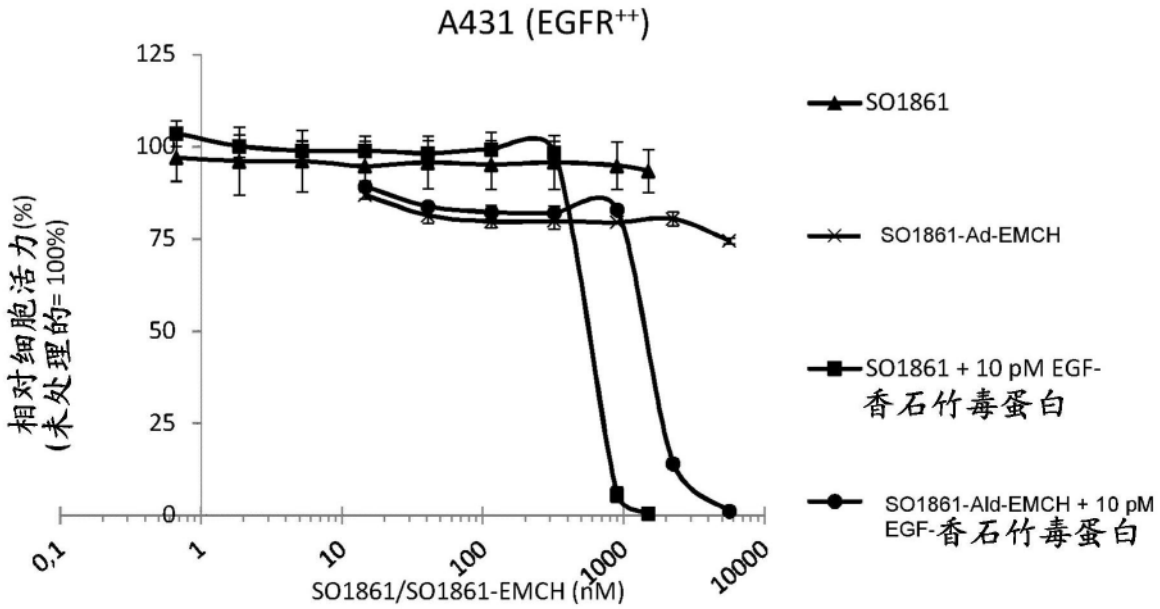

A431 (EGFR++)
125
100
75
50
25
0
相对细胞活力(%)
(未处理的= 100%)
0,1
1
10
100
1000
10000
SO1861/SO1861-EMCH (nM)
SO1861
SO1861-Ad-EMCH
SO1861 + 10 pM EGF-香石竹毒蛋白
SO1861-Ald-EMCH + 10 pM EGF-香石竹毒蛋白

图51

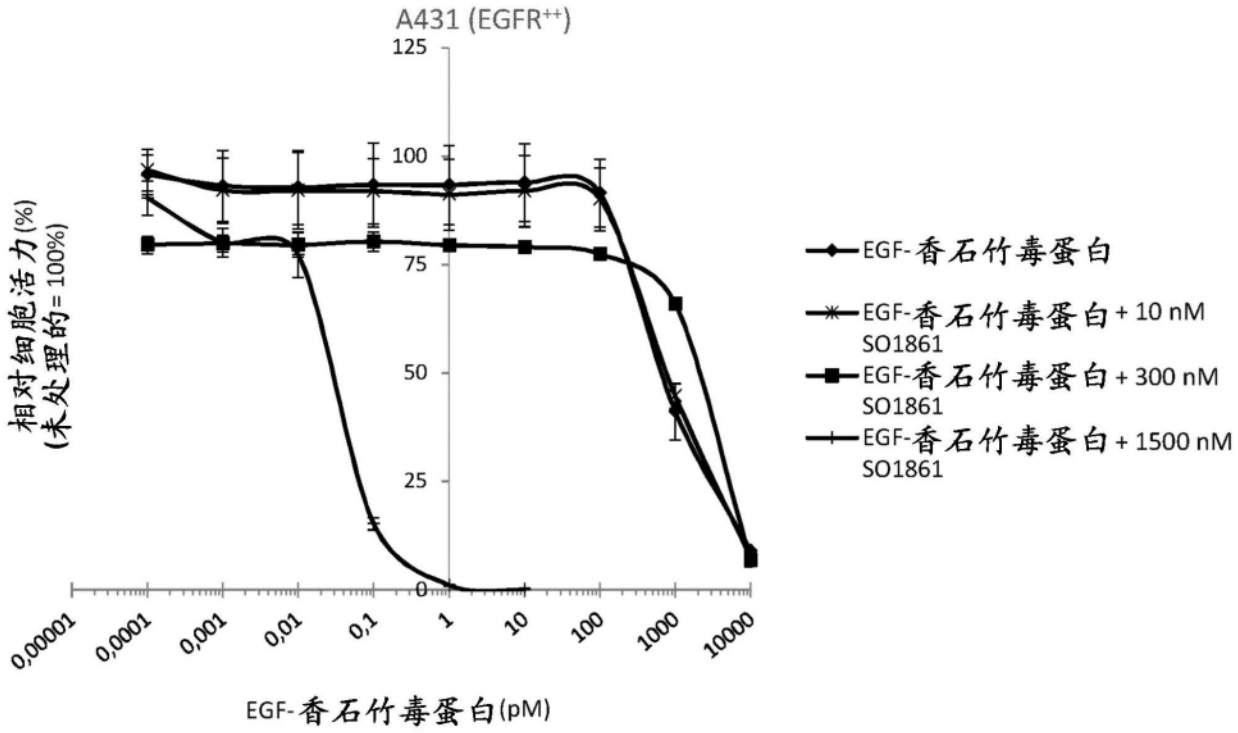

A431 (EGFR++)
125
100
75
50
25
0
相对细胞活力(%)
(未处理的= 100%)
0,00001
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
10000
EGF-香石竹毒蛋白(pM)
EGF-香石竹毒蛋白
EGF-香石竹毒蛋白 + 10 nM SO1861
EGF-香石竹毒蛋白 + 300 nM SO1861
EGF-香石竹毒蛋白 + 1500 nM SO1861

图52A

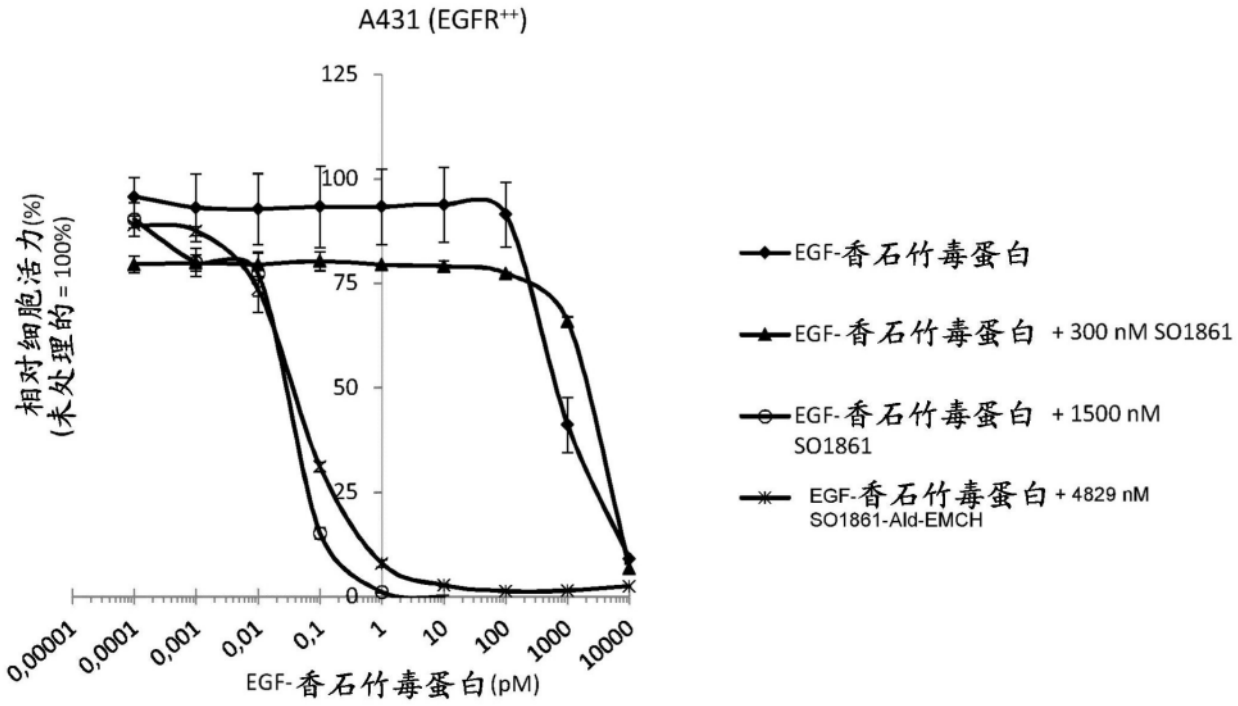

A431 (EGFR++)
相对细胞活力(%)
(未处理的= 100%)
125
100
75
50
25
0
0,00001
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
10000
EGF-香石竹毒蛋白(pM)
EGF-香石竹毒蛋白
EGF-香石竹毒蛋白 + 300 nM SO1861
EGF-香石竹毒蛋白 + 1500 nM SO1861
EGF-香石竹毒蛋白 + 4829 nM SO1861-Ald-EMCH

图52B

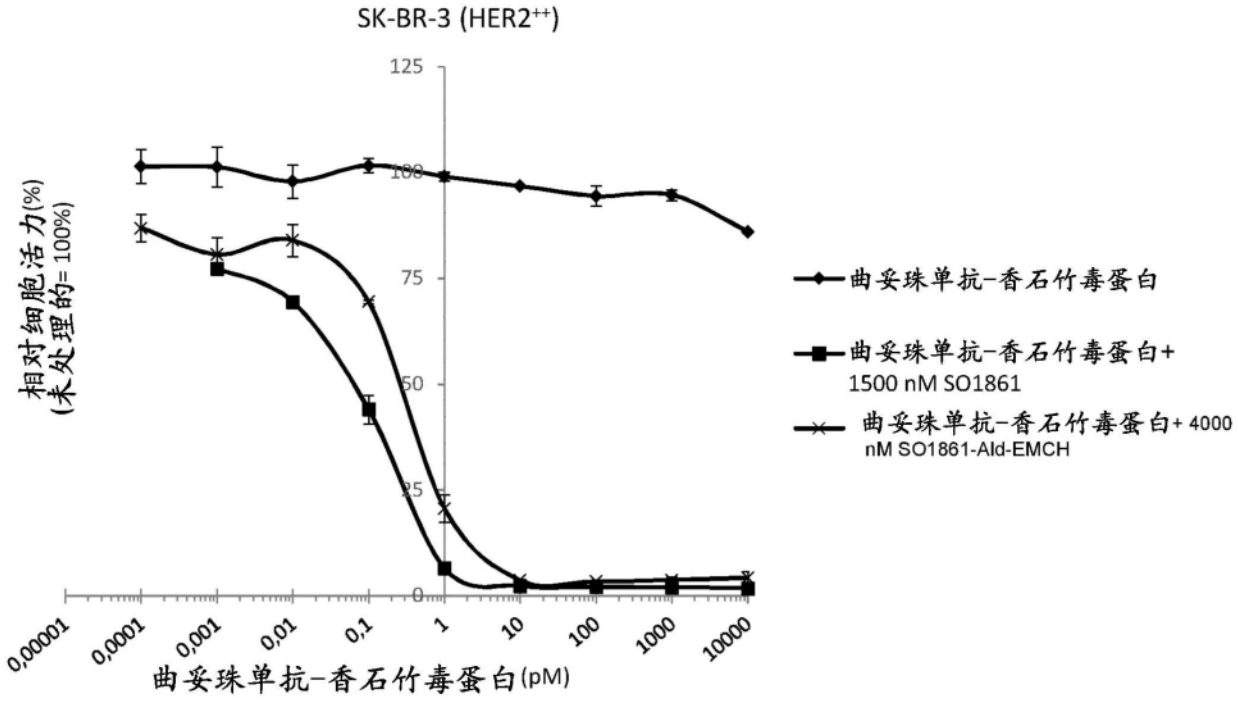

SK-BR-3 (HER2++)
相对细胞活力(%)
(未处理的= 100%)
125
100
75
50
25
0
0,00001
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
10000
曲妥珠单抗-香石竹毒蛋白(pM)
曲妥珠单抗-香石竹毒蛋白
曲妥珠单抗-香石竹毒蛋白+ 1500 nM SO1861
曲妥珠单抗-香石竹毒蛋白+ 4000 nM SO1861-Ald-EMCH

图53A

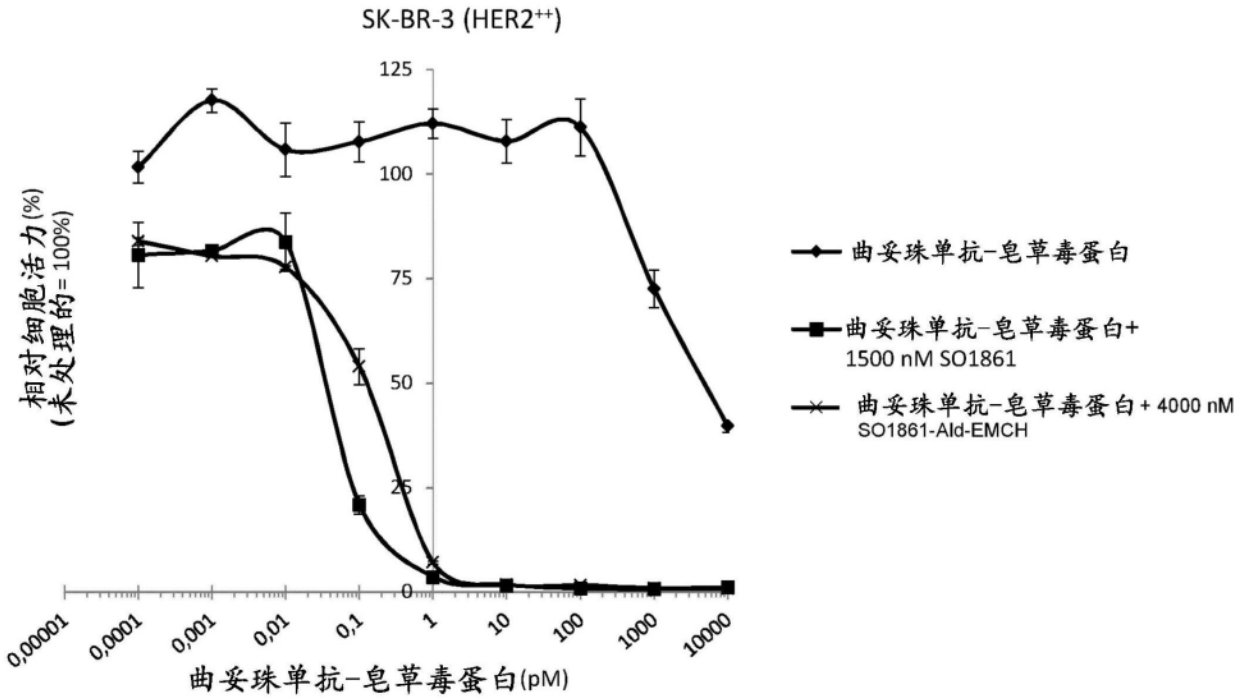

SK-BR-3 (HER2++)
相对细胞活力(%)
(未处理的= 100%)
125
100
75
50
25
0
0,00001
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
10000
曲妥珠单抗-皂草毒蛋白(pM)
曲妥珠单抗-皂草毒蛋白
曲妥珠单抗-皂草毒蛋白+
1500 nM SO1861
曲妥珠单抗-皂草毒蛋白 + 4000 nM
SO1861-Ald-EMCH

图53B

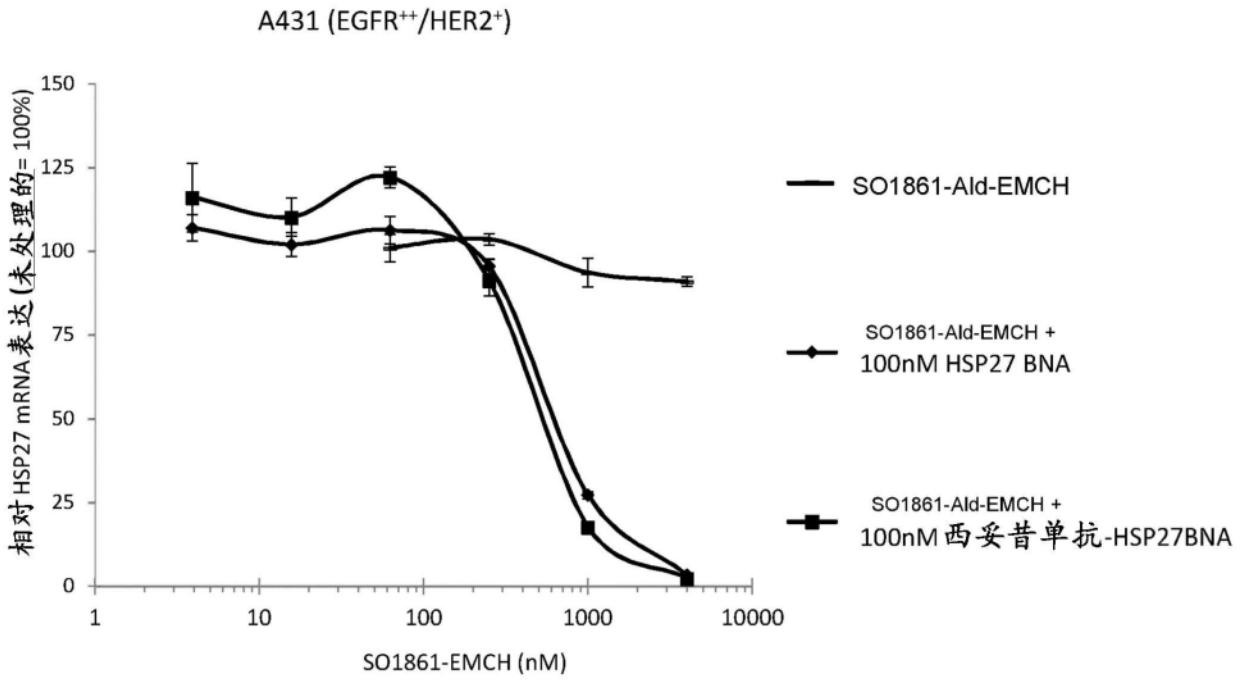

A431 (EGFR++/HER2+)
相对HSP27 mRNA表达(未处理的= 100%)
150
125
100
75
50
25
0
1
10
100
1000
10000
SO1861-EMCH (nM)
SO1861-Ald-EMCH
SO1861-Ald-EMCH +
100nM HSP27 BNA
SO1861-Ald-EMCH +
100nM 西妥昔单抗-HSP27BNA

图54

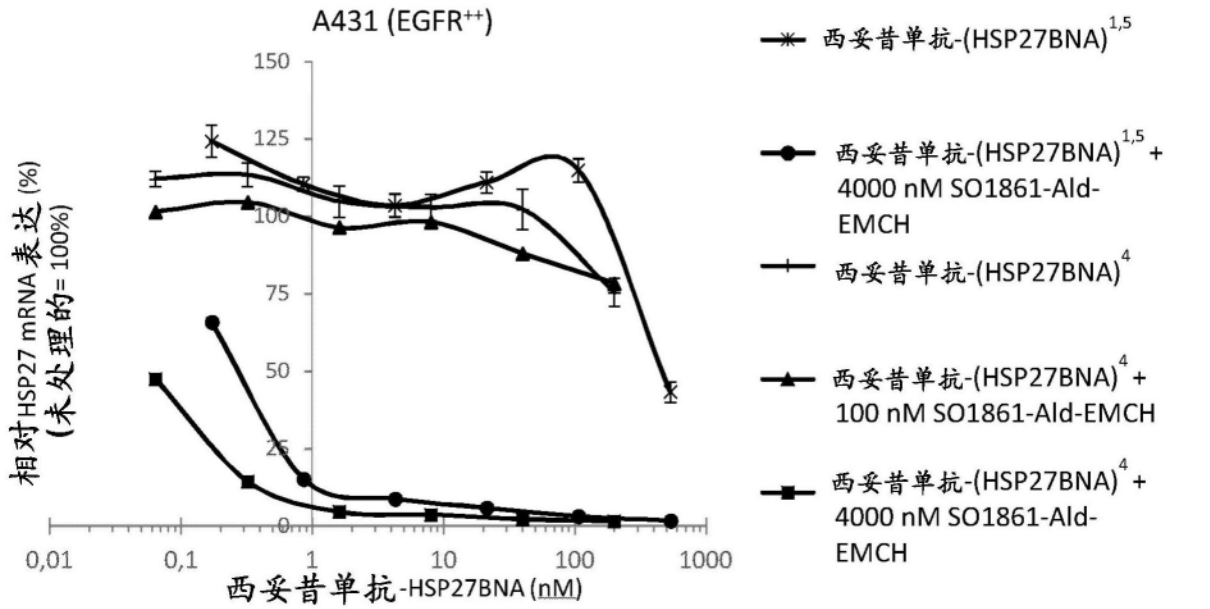

A431 (EGFR++)
相对HSP27 mRNA表达 (%)
(未处理的= 100%)
150
125
100
75
50
25
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
西妥昔单抗-HSP27BNA (nM)
西妥昔单抗-(HSP27BNA)1,5
西妥昔单抗-(HSP27BNA)1,5 + 4000 nM SO1861-Ald-EMCH
西妥昔单抗-(HSP27BNA)4
西妥昔单抗-(HSP27BNA)4 + 100 nM SO1861-Ald-EMCH
西妥昔单抗-(HSP27BNA)4 + 4000 nM SO1861-Ald-EMCH

图55

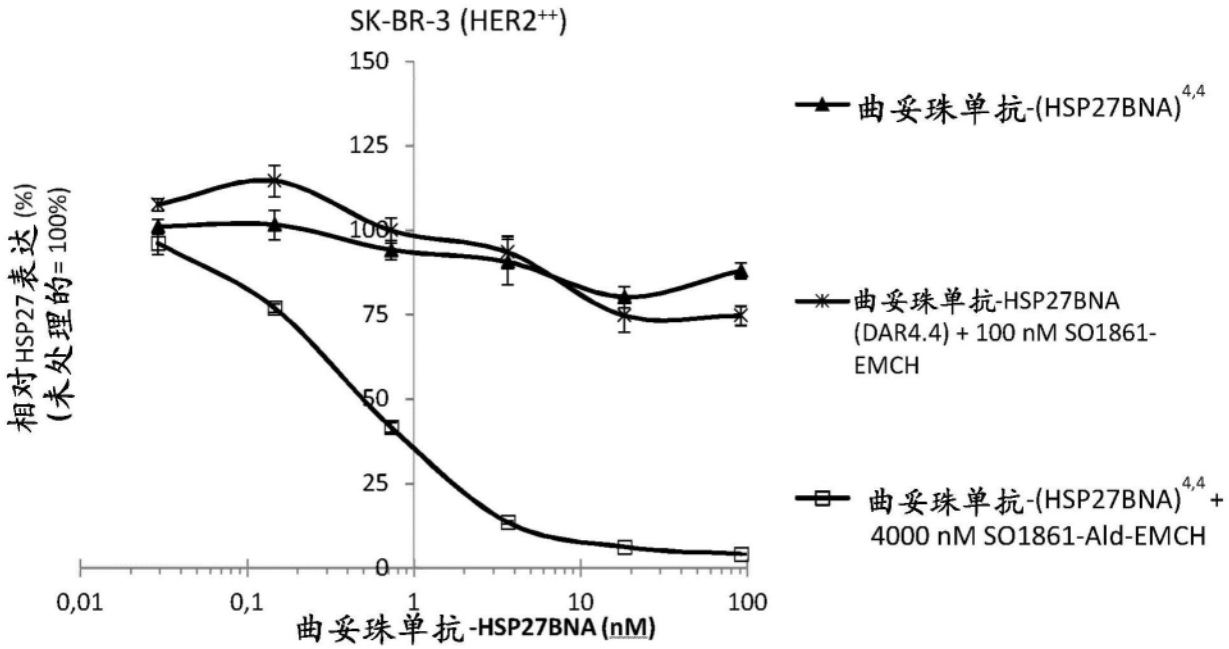

SK-BR-3 (HER2++)
相对HSP27表达 (%)
(未处理的= 100%)
150
125
100
75
50
25
0
0,01
0,1
1
10
100
曲妥珠单抗-HSP27BNA (nM)
曲妥珠单抗-(HSP27BNA)4,4
曲妥珠单抗-HSP27BNA (DAR4.4) + 100 nM SO1861-EMCH
曲妥珠单抗-(HSP27BNA)4,4 + 4000 nM SO1861-Ald-EMCH

图56

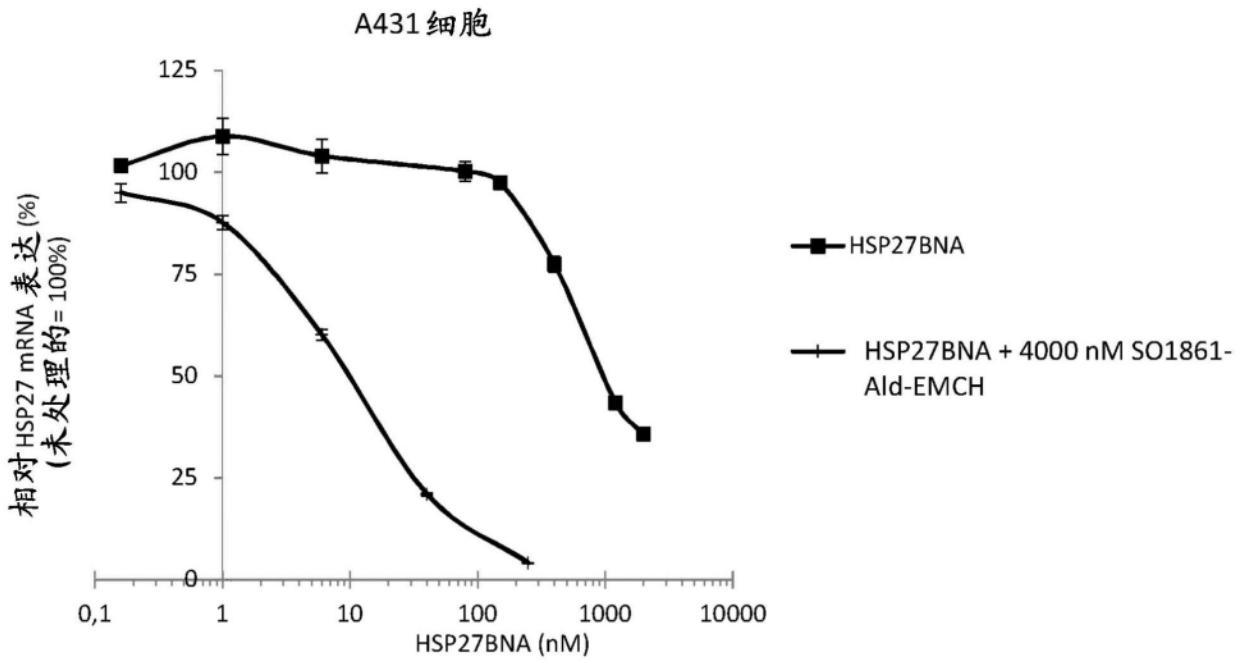

A431细胞
125
100
75
50
25
0
相对HSP27 mRNA表达(%)
(未处理的=100%)
0,1
1
10
100
1000
10000
HSP27BNA (nM)
HSP27BNA
HSP27BNA + 4000 nM SO1861-Ald-EMCH

图57A

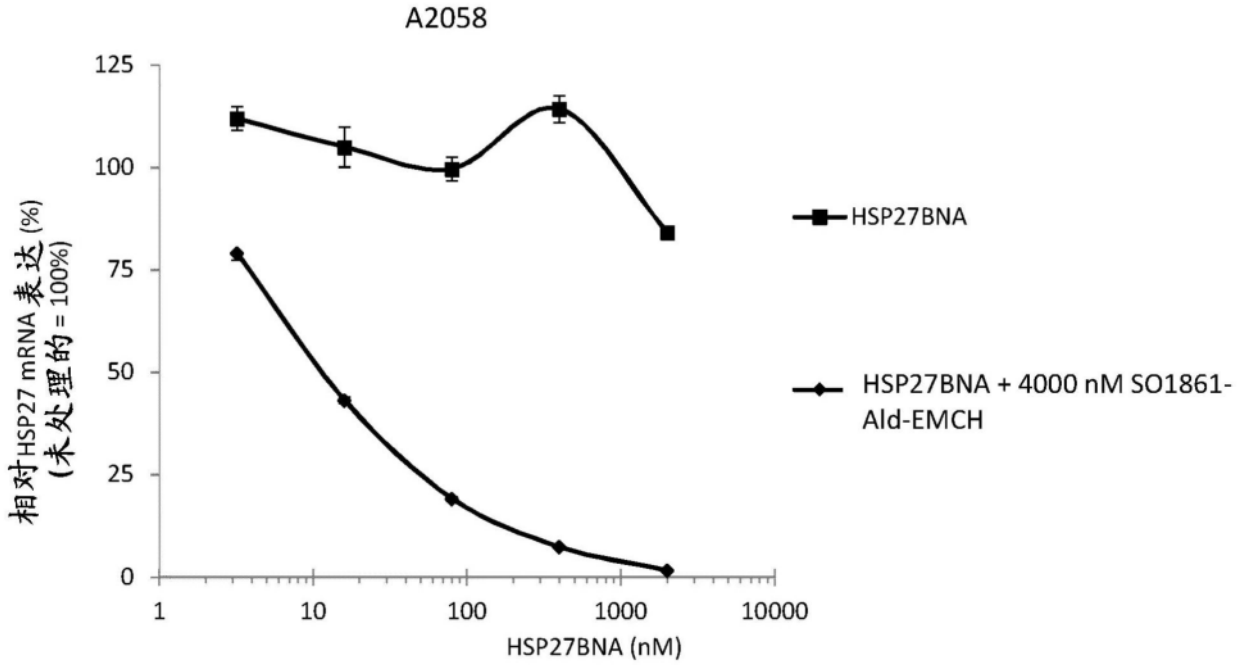

A2058
125
100
75
50
25
0
相对HSP27 mRNA表达(%)
(未处理的=100%)
1
10
100
1000
10000
HSP27BNA (nM)
HSP27BNA
HSP27BNA + 4000 nM SO1861-Ald-EMCH

图57B

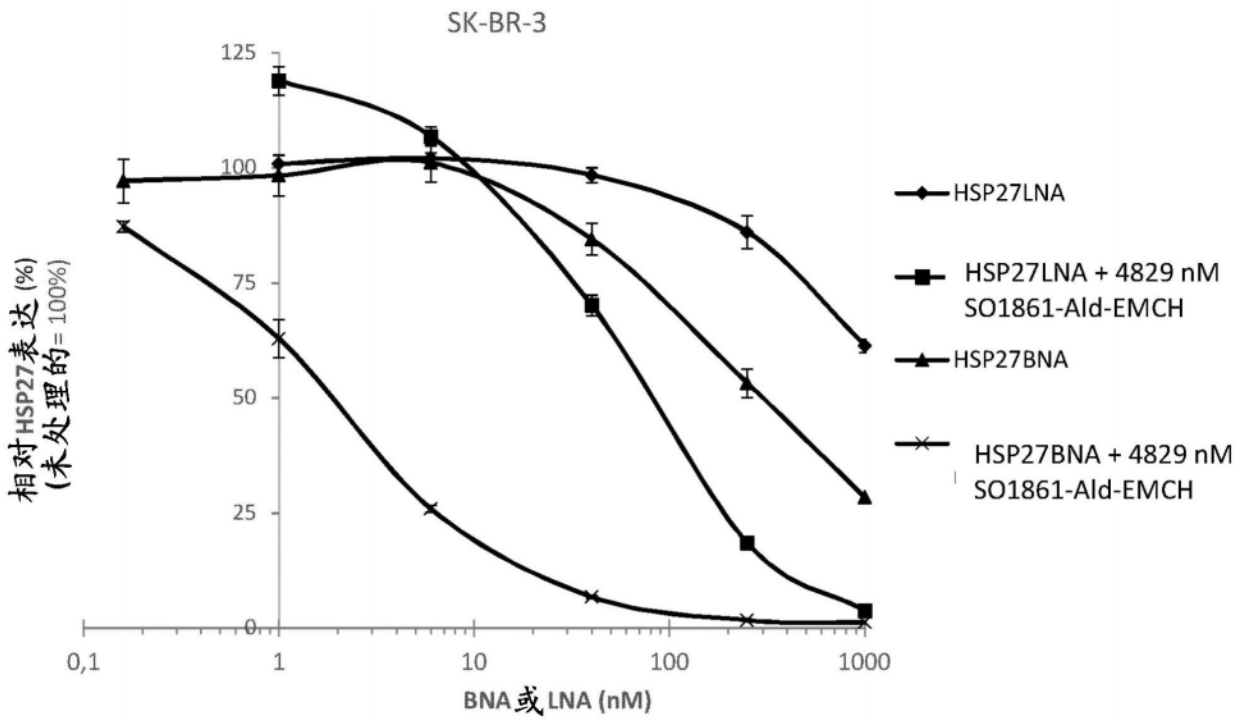

SK-BR-3
125
100
75
50
25
0
0,1
1
10
100
1000
相对HSP27表达 (%)
(未处理的= 100%)
BNA或LNA (nM)
HSP27LNA
HSP27LNA + 4829 nM
SO1861-Ald-EMCH
HSP27BNA
HSP27BNA + 4829 nM
SO1861-Ald-EMCH

图58

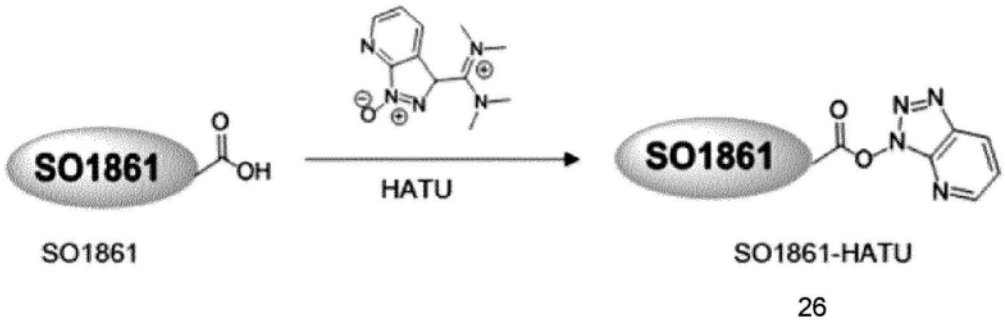

SO1861
OH
HATU
SO1861
SO1861-HATU
26

图59

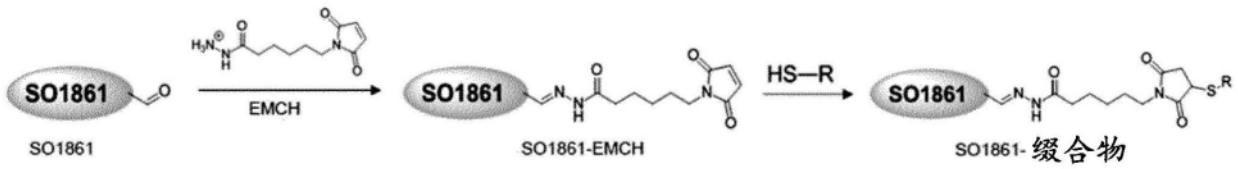

SO1861
EMCH
SO1861
SO1861-EMCH
HS—R
SO1861-缀合物

图60

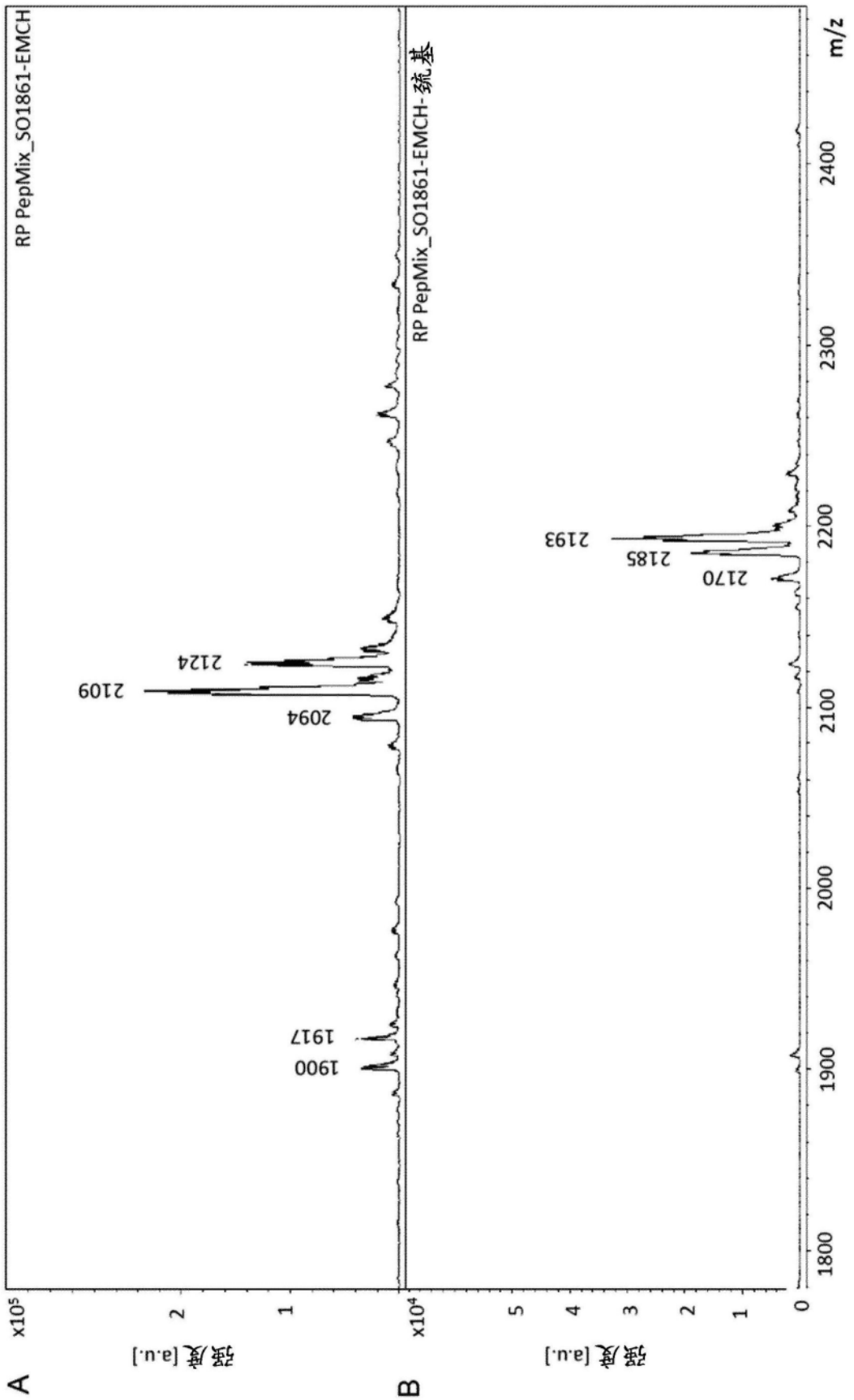

A
B
RP PepMix_SO1861-EMCH
RP PepMix_SO1861-EMCH-巯基
强度 [a.u.]
x10⁵
x10⁴
m/z
1800
1900
2000
2100
2200
2300
2400
1900
1917
2094
2109
2124
2170
2185
2193

图61

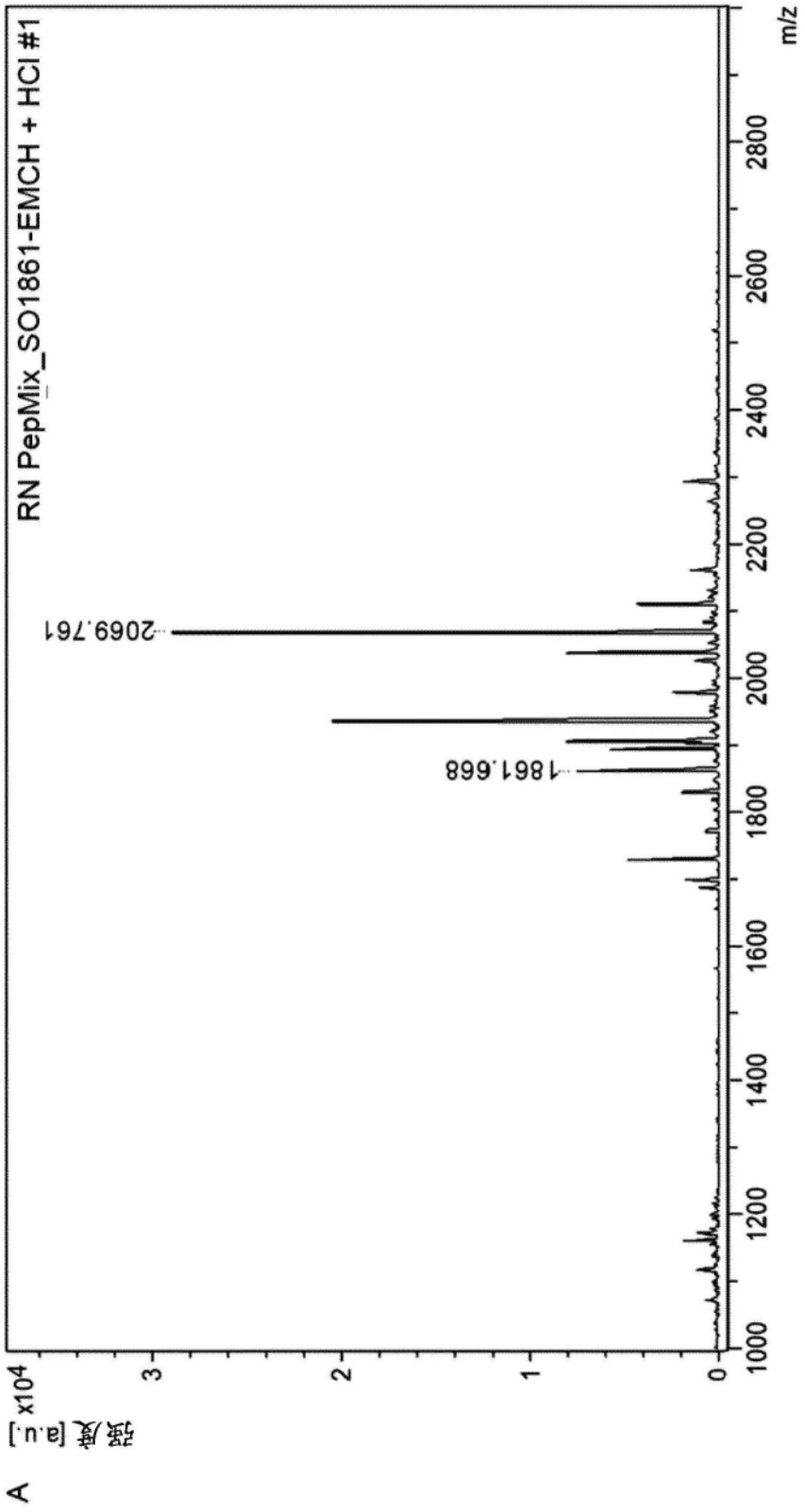


图62

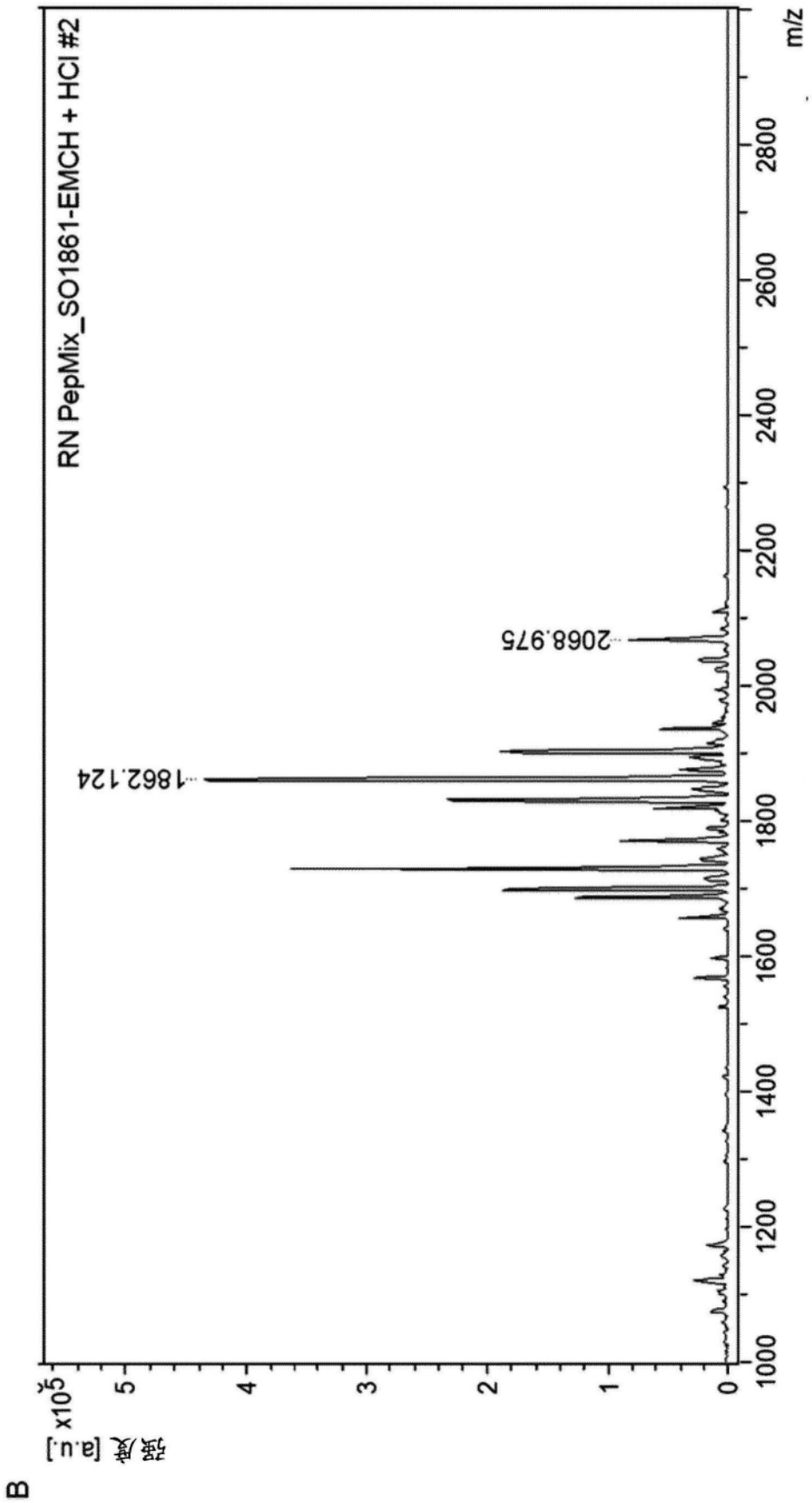


图62

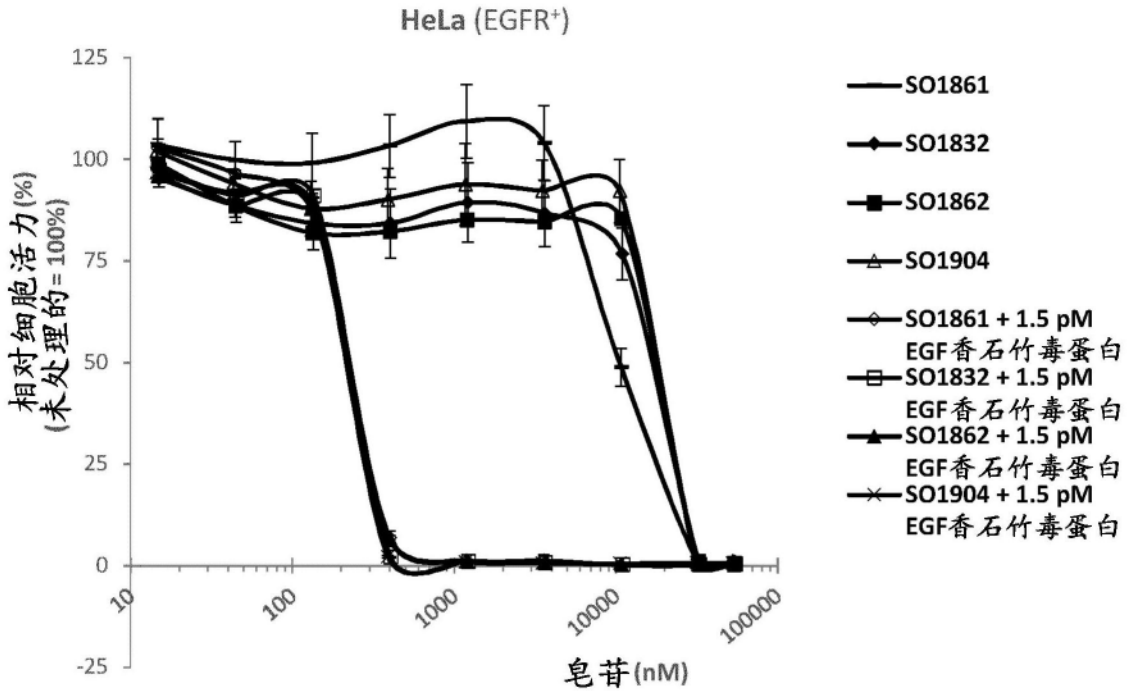

HeLa (EGFR+)
相对细胞活力(%)
(未处理的=100%)
125
100
75
50
25
0
-25
10
100
1000
10000
100000
皂苷(nM)
SO1861
SO1832
SO1862
SO1904
SO1861 + 1.5 pM EGF香石竹毒蛋白
SO1832 + 1.5 pM EGF香石竹毒蛋白
SO1862 + 1.5 pM EGF香石竹毒蛋白
SO1904 + 1.5 pM EGF香石竹毒蛋白

图63A

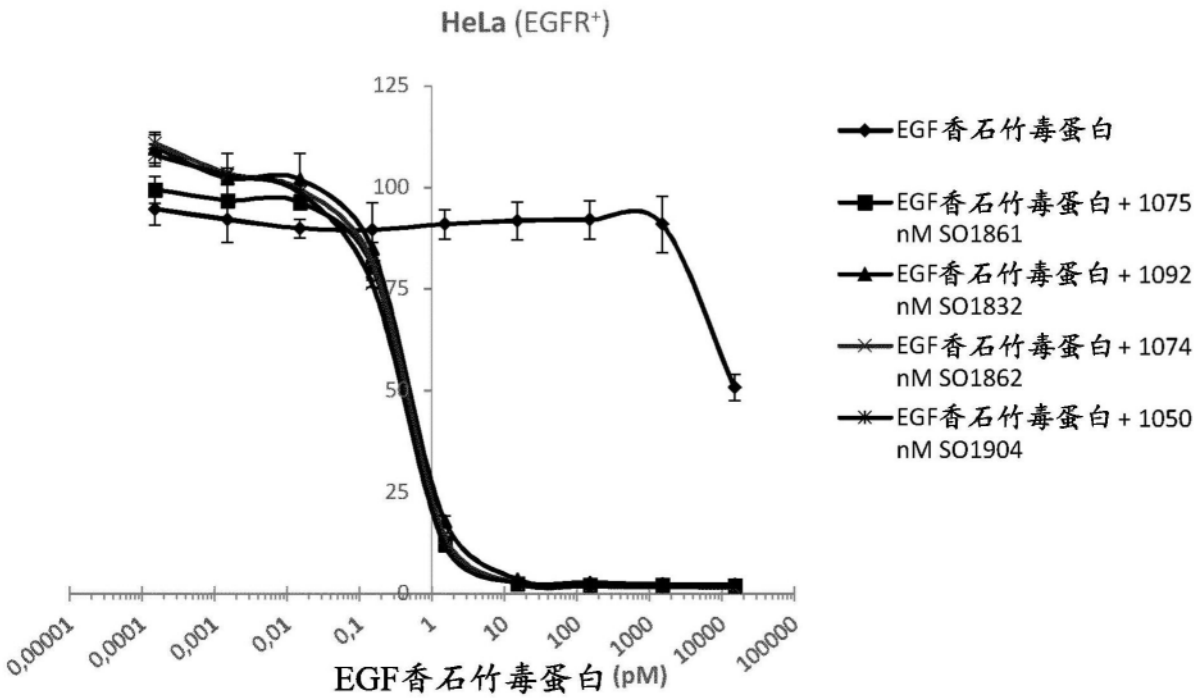

HeLa (EGFR+)
125
100
75
50
25
0
0,00001
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
10000
100000
EGF香石竹毒蛋白 (pM)
EGF香石竹毒蛋白
EGF香石竹毒蛋白 + 1075 nM SO1861
EGF香石竹毒蛋白 + 1092 nM SO1832
EGF香石竹毒蛋白 + 1074 nM SO1862
EGF香石竹毒蛋白 + 1050 nM SO1904

图63B

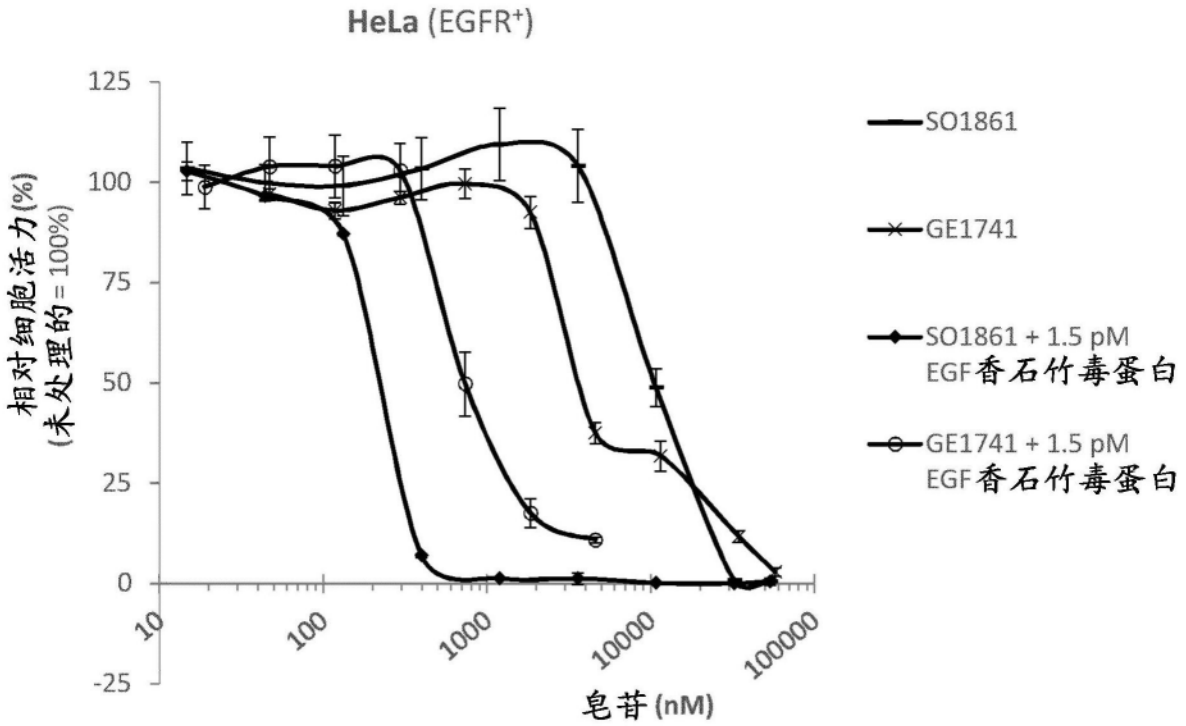

HeLa (EGFR+)
125
100
75
50
25
0
-25
10
100
1000
10000
100000
相对细胞活力(%)
(未处理的=100%)
皂苷(nM)
SO1861
GE1741
SO1861 + 1.5 pM
EGF香石竹毒蛋白
GE1741 + 1.5 pM
EGF香石竹毒蛋白

图63C

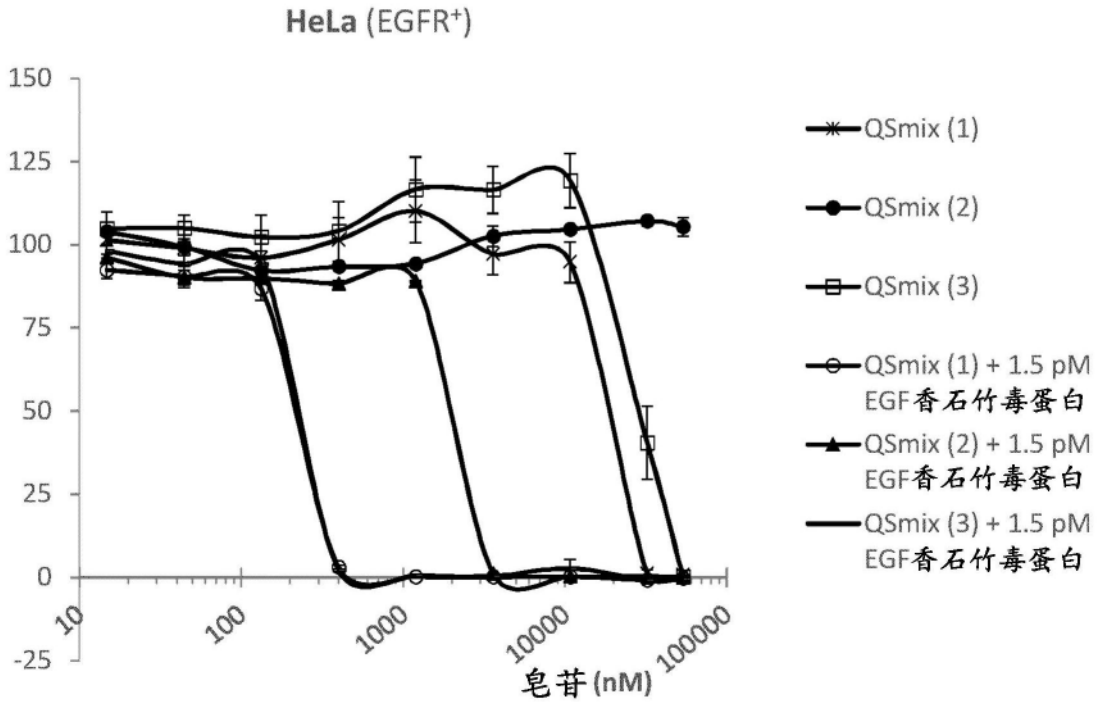

HeLa (EGFR+)
150
125
100
75
50
25
0
-25
10
100
1000
10000
100000
皂苷(nM)
QSmix (1)
QSmix (2)
QSmix (3)
QSmix (1) + 1.5 pM
EGF香石竹毒蛋白
QSmix (2) + 1.5 pM
EGF香石竹毒蛋白
QSmix (3) + 1.5 pM
EGF香石竹毒蛋白

图63D

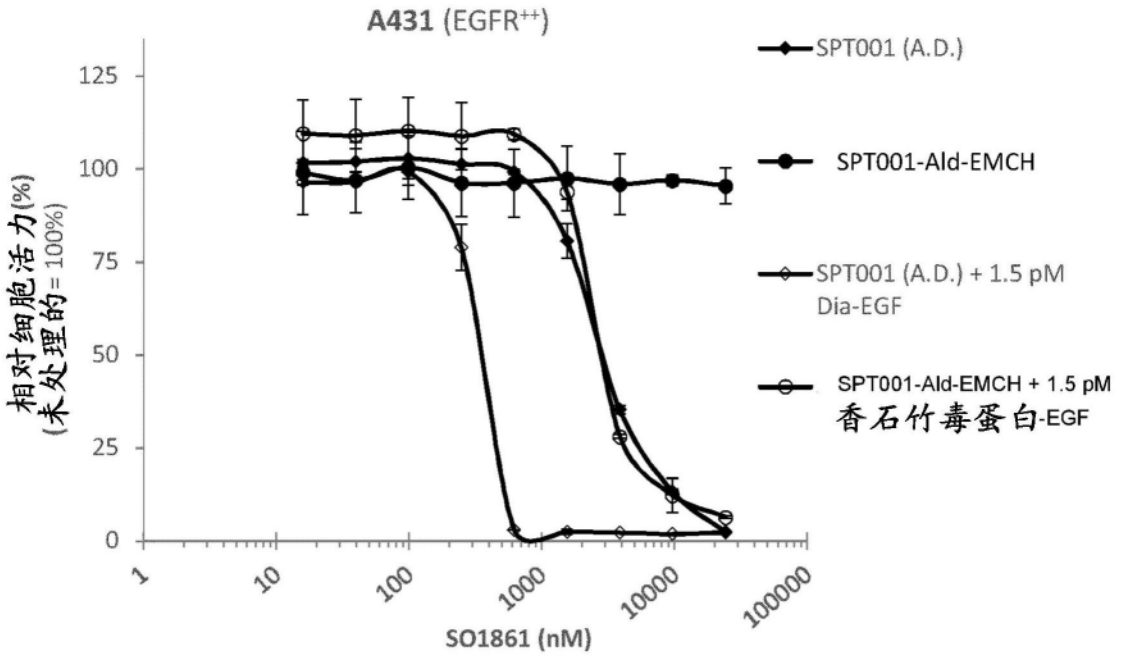

A431 (EGFR++)
SPT001 (A.D.)
SPT001-Ald-EMCH
SPT001 (A.D.) + 1.5 pM Dia-EGF
SPT001-Ald-EMCH + 1.5 pM 香石竹毒蛋白-EGF
相对细胞活力(%) (未处理的= 100%)
125
100
75
50
25
0
1
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)

图64A

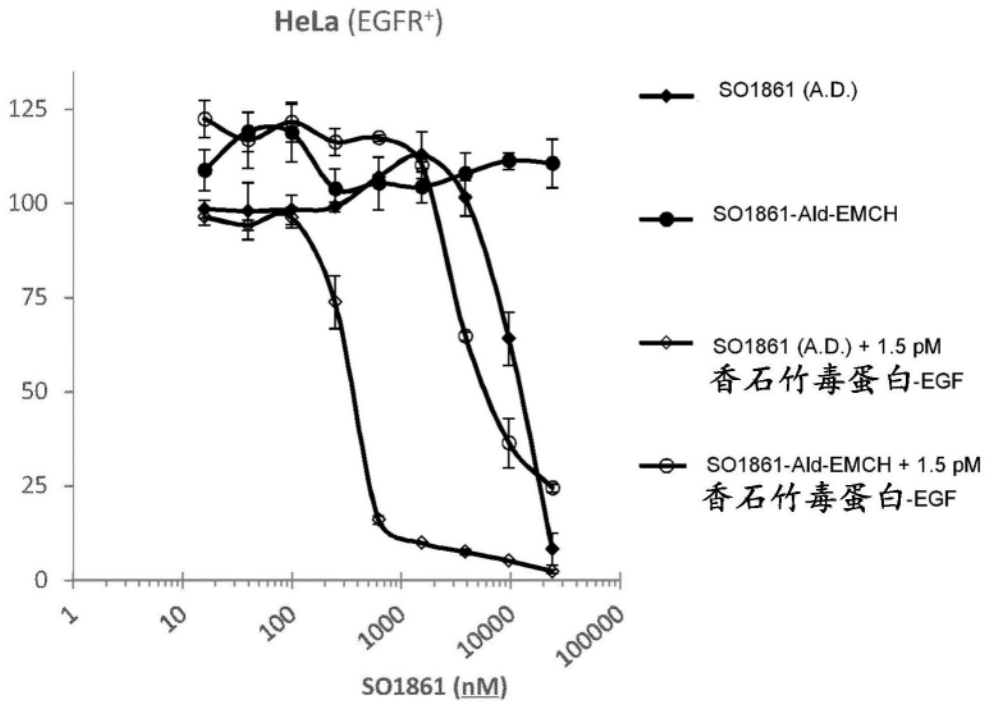

HeLa (EGFR+)
SO1861 (A.D.)
SO1861-Ald-EMCH
SO1861 (A.D.) + 1.5 pM 香石竹毒蛋白-EGF
SO1861-Ald-EMCH + 1.5 pM 香石竹毒蛋白-EGF
125
100
75
50
25
0
1
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)

图64B

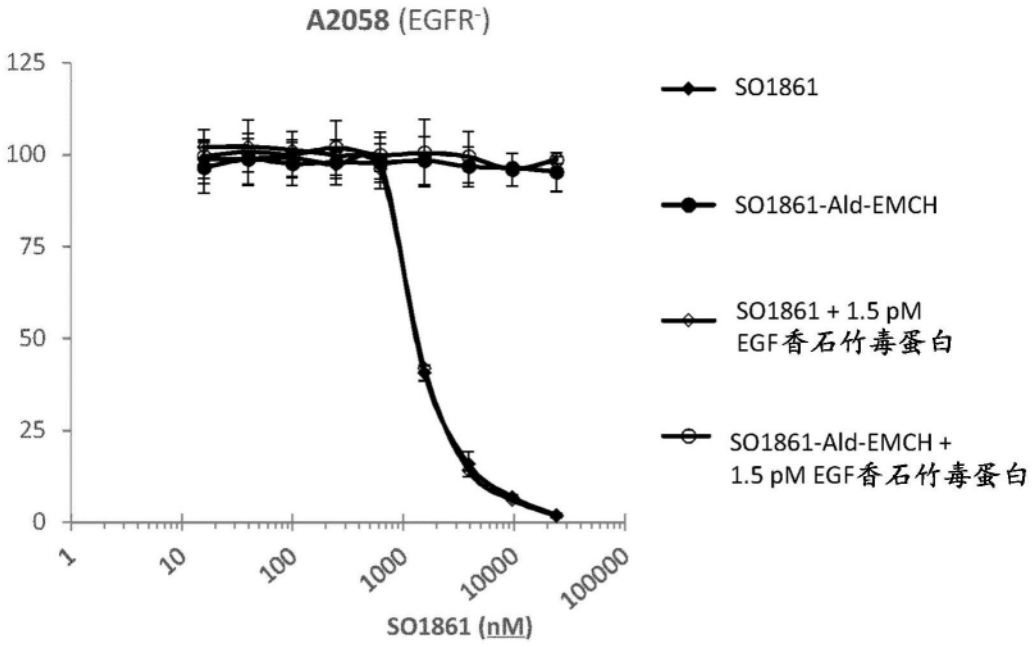

A2058 (EGFR-)
125
100
75
50
25
0
1
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)
SO1861
SO1861-Ald-EMCH
SO1861 + 1.5 pM EGF香石竹毒蛋白
SO1861-Ald-EMCH + 1.5 pM EGF香石竹毒蛋白

图64C

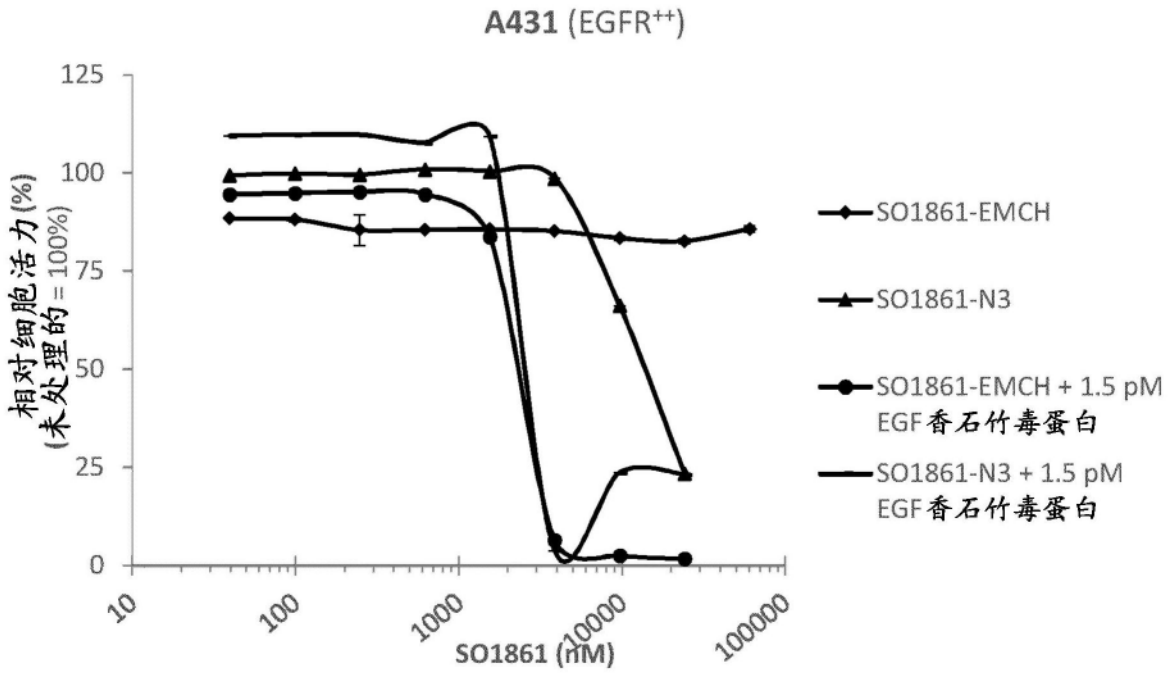

A431 (EGFR++)
相对细胞活力(%)
(未处理的=100%)
125
100
75
50
25
0
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)
SO1861-EMCH
SO1861-N3
SO1861-EMCH + 1.5 pM EGF香石竹毒蛋白
SO1861-N3 + 1.5 pM EGF香石竹毒蛋白

图64D

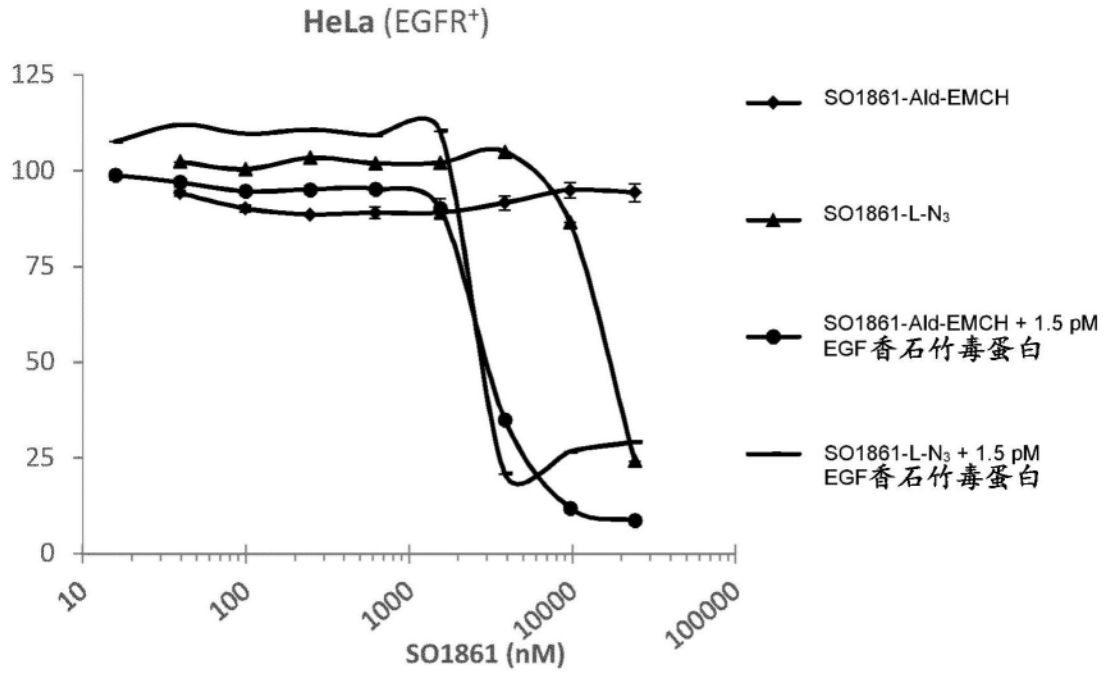

HeLa (EGFR+)
125
100
75
50
25
0
10
100
1000
10000
100000
SO1861 (nM)
SO1861-Ald-EMCH
SO1861-L-N3
SO1861-Ald-EMCH + 1.5 pM EGF香石竹毒蛋白
SO1861-L-N3 + 1.5 pM EGF香石竹毒蛋白

图64E

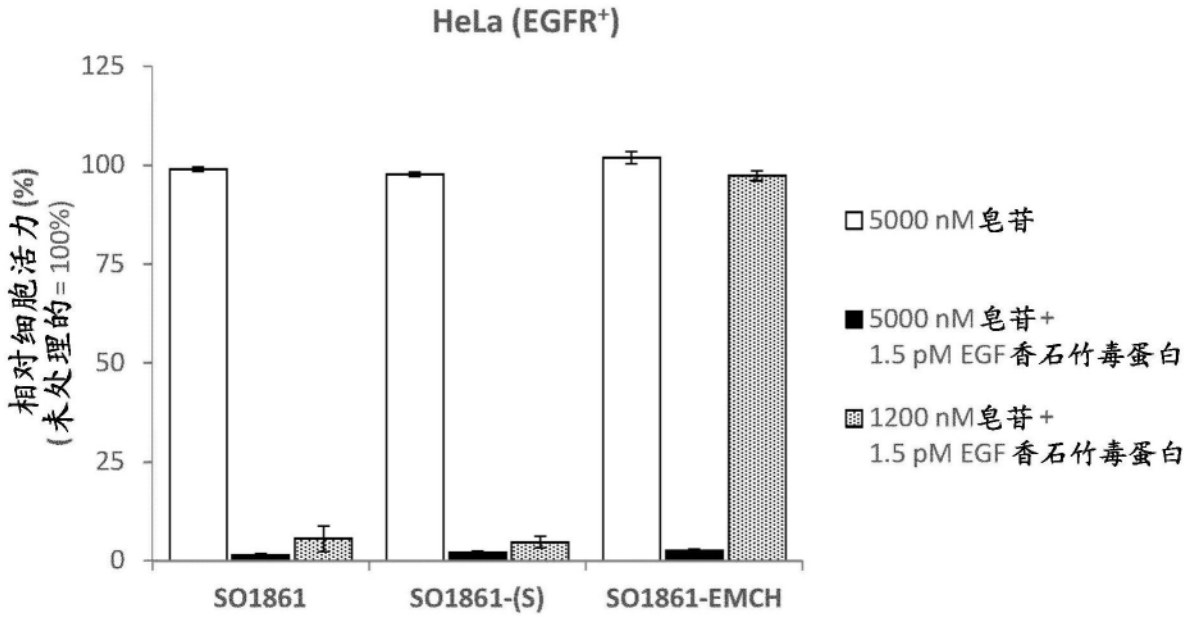

HeLa (EGFR+)
相对细胞活力(%)
(未处理的=100%)
125
100
75
50
25
0
SO1861
SO1861-(S)
SO1861-EMCH
5000 nM皂苷
5000 nM皂苷+
1.5 pM EGF香石竹毒蛋白
1200 nM皂苷+
1.5 pM EGF香石竹毒蛋白

图65

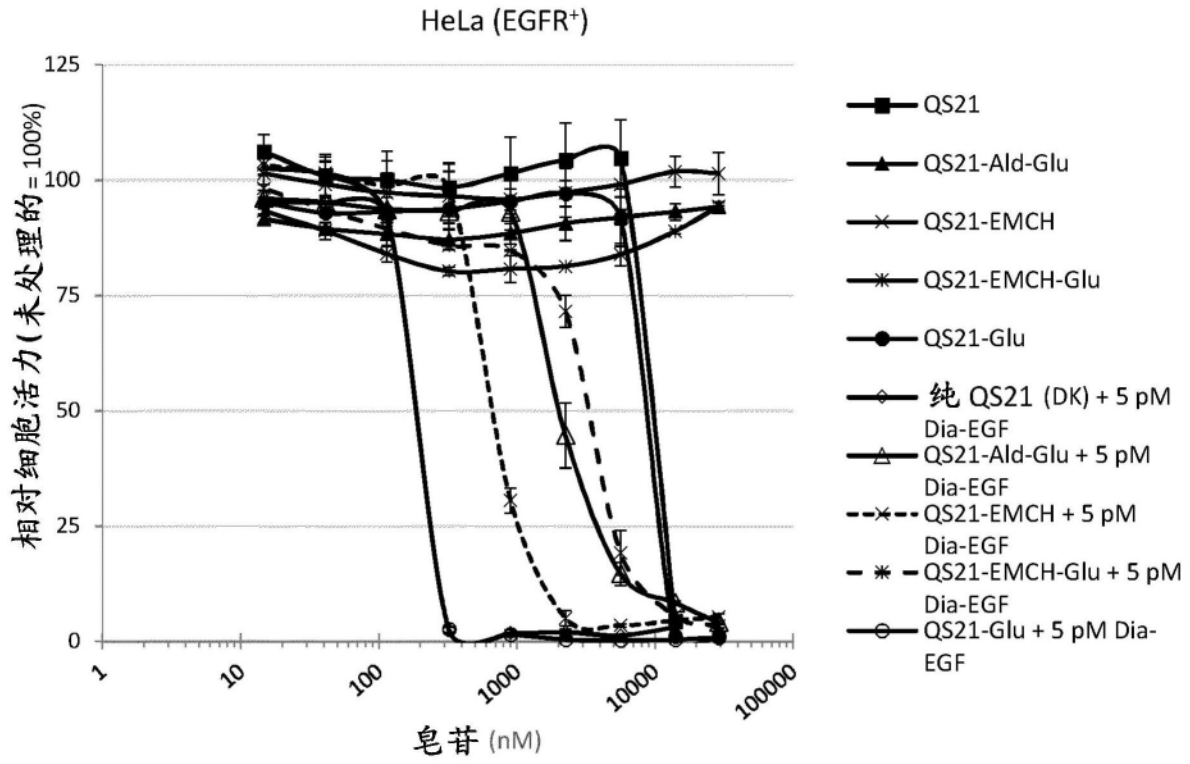

HeLa (EGFR+)
相对细胞活力(未处理的=100%)
125
100
75
50
25
0
1
10
100
1000
10000
100000
皂苷 (nM)
QS21
QS21-Ald-Glu
QS21-EMCH
QS21-EMCH-Glu
QS21-Glu
纯 QS21 (DK) + 5 pM Dia-EGF
QS21-Ald-Glu + 5 pM Dia-EGF
QS21-EMCH + 5 pM Dia-EGF
QS21-EMCH-Glu + 5 pM Dia-EGF
QS21-Glu + 5 pM Dia-EGF

图66A

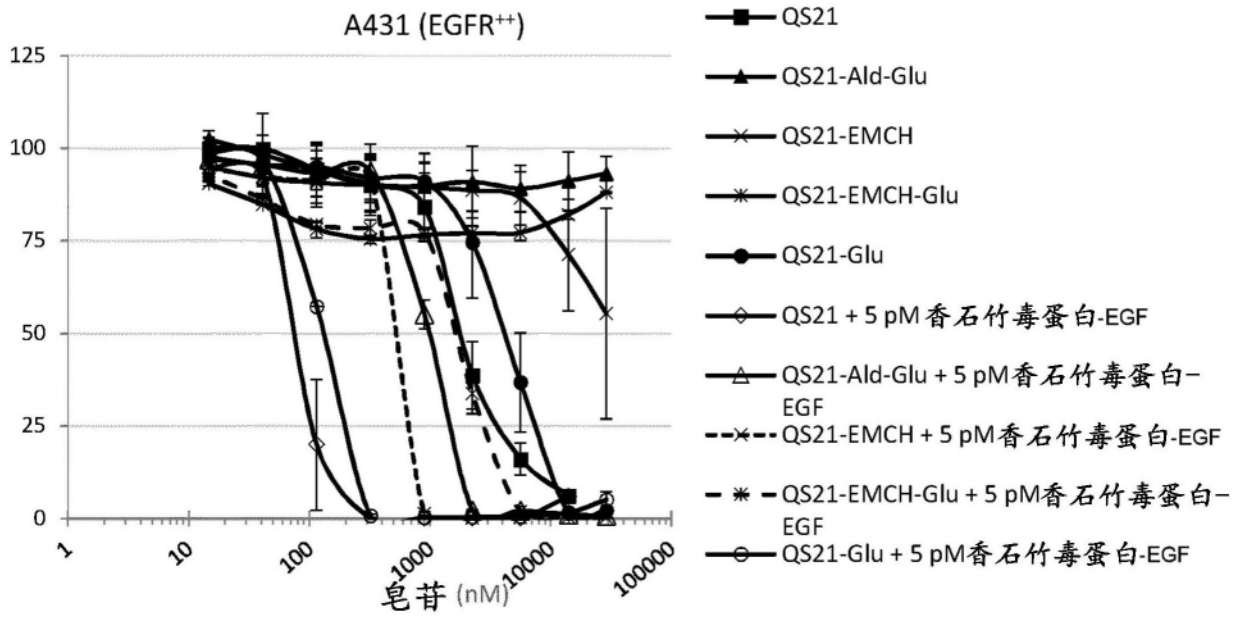

A431 (EGFR++)
125
100
75
50
25
0
1
10
100
1000
10000
100000
皂苷 (nM)
QS21
QS21-Ald-Glu
QS21-EMCH
QS21-EMCH-Glu
QS21-Glu
QS21 + 5 pM 香石竹毒蛋白-EGF
QS21-Ald-Glu + 5 pM香石竹毒蛋白-EGF
QS21-EMCH + 5 pM香石竹毒蛋白-EGF
QS21-EMCH-Glu + 5 pM香石竹毒蛋白-EGF
QS21-Glu + 5 pM香石竹毒蛋白-EGF

图66B

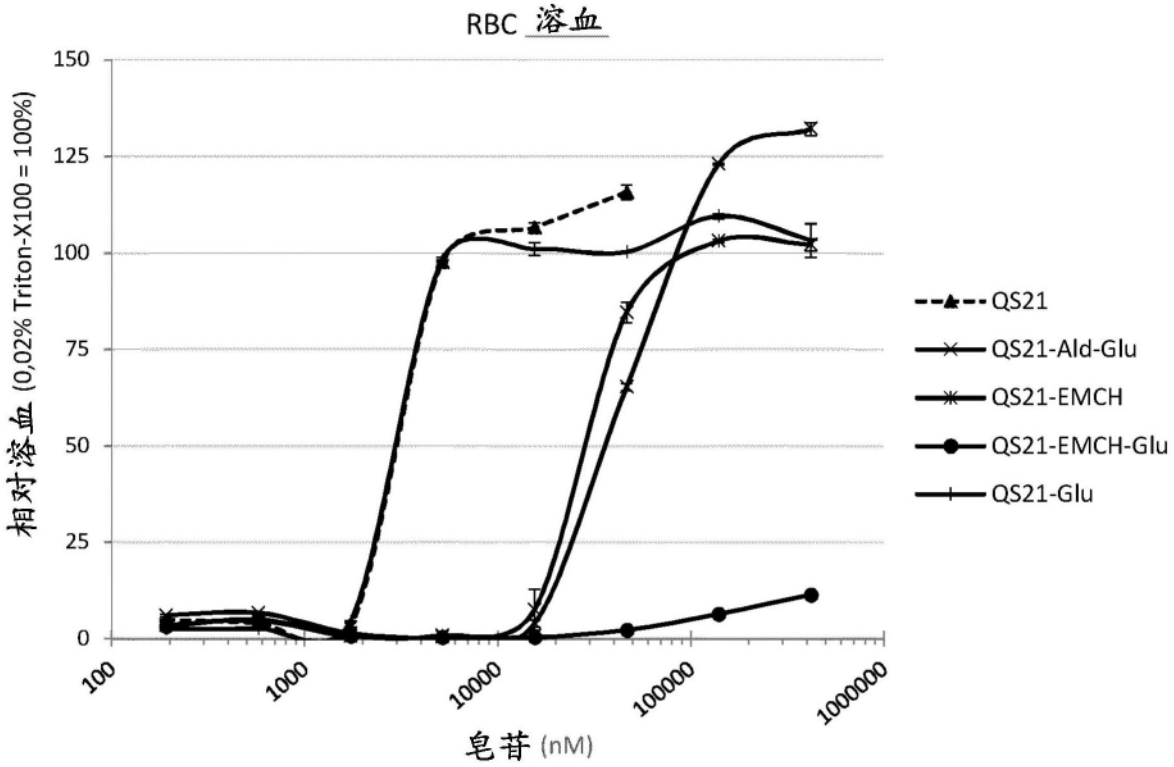

RBC 溶血
相对溶血 (0,02% Triton-X100 = 100%)
150
125
100
75
50
25
0
100
1000
10000
100000
1000000
皂苷 (nM)
QS21
QS21-Ald-Glu
QS21-EMCH
QS21-EMCH-Glu
QS21-Glu

图67

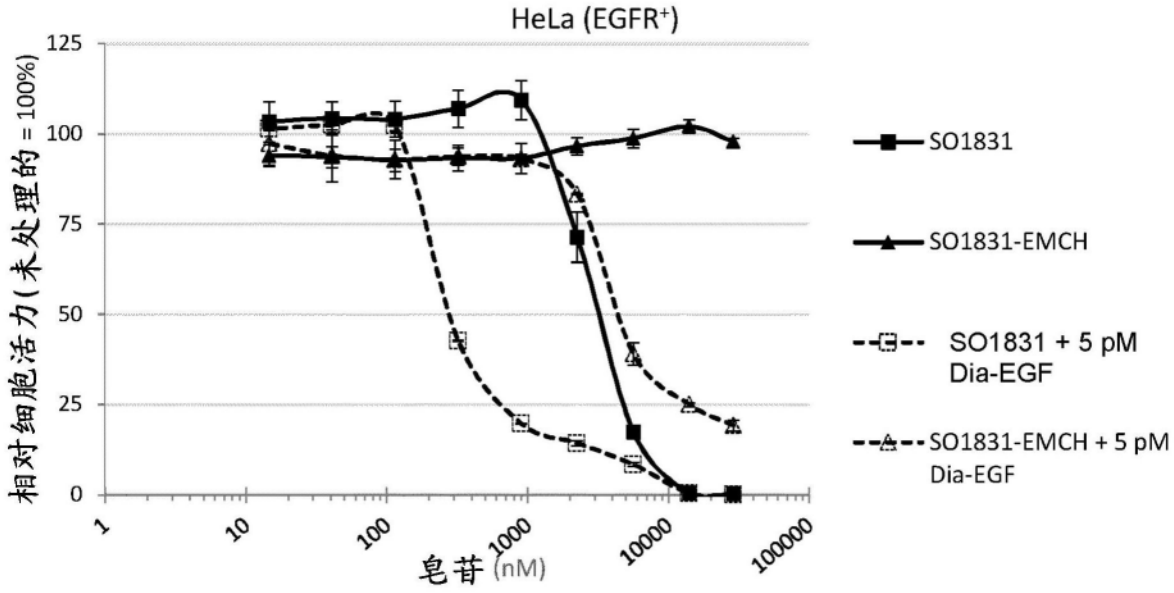

HeLa (EGFR+)
相对细胞活力(未处理的 = 100%)
125
100
75
50
25
0
1
10
100
1000
10000
100000
皂苷 (nM)
SO1831
SO1831-EMCH
SO1831 + 5 pM Dia-EGF
SO1831-EMCH + 5 pM Dia-EGF

图68A

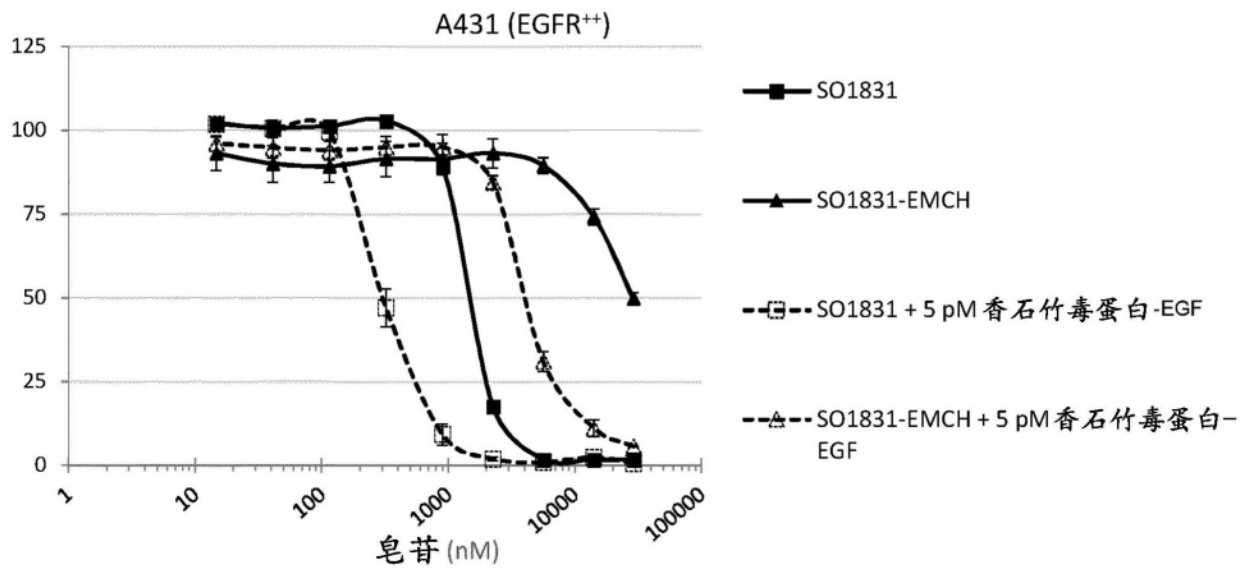

A431 (EGFR++)
125
100
75
50
25
0
1
10
100
1000
10000
100000
皂苷 (nM)
SO1831
SO1831-EMCH
SO1831 + 5 pM 香石竹毒蛋白-EGF
SO1831-EMCH + 5 pM 香石竹毒蛋白-EGF

图68B

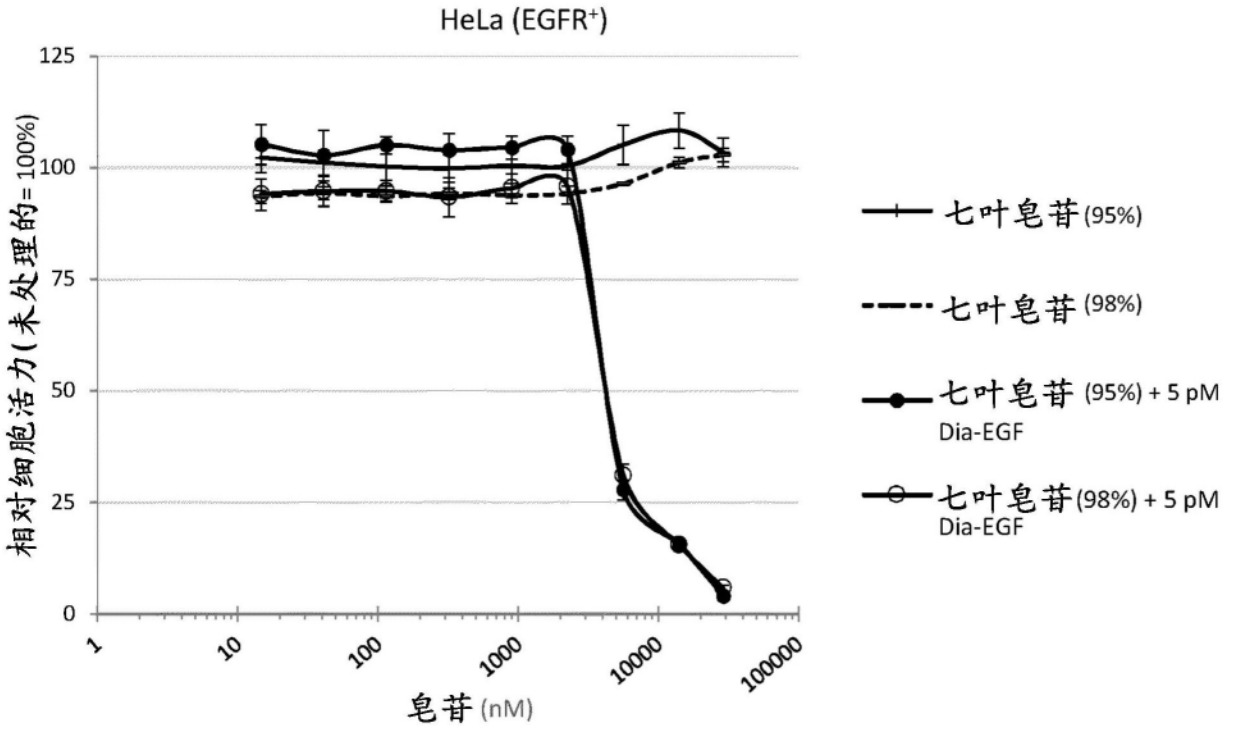

HeLa (EGFR+)
相对细胞活力(未处理的= 100%)
125
100
75
50
25
0
1
10
100
1000
10000
100000
皂苷 (nM)
七叶皂苷 (95%)
七叶皂苷 (98%)
七叶皂苷 (95%) + 5 pM Dia-EGF
七叶皂苷 (98%) + 5 pM Dia-EGF

图69A

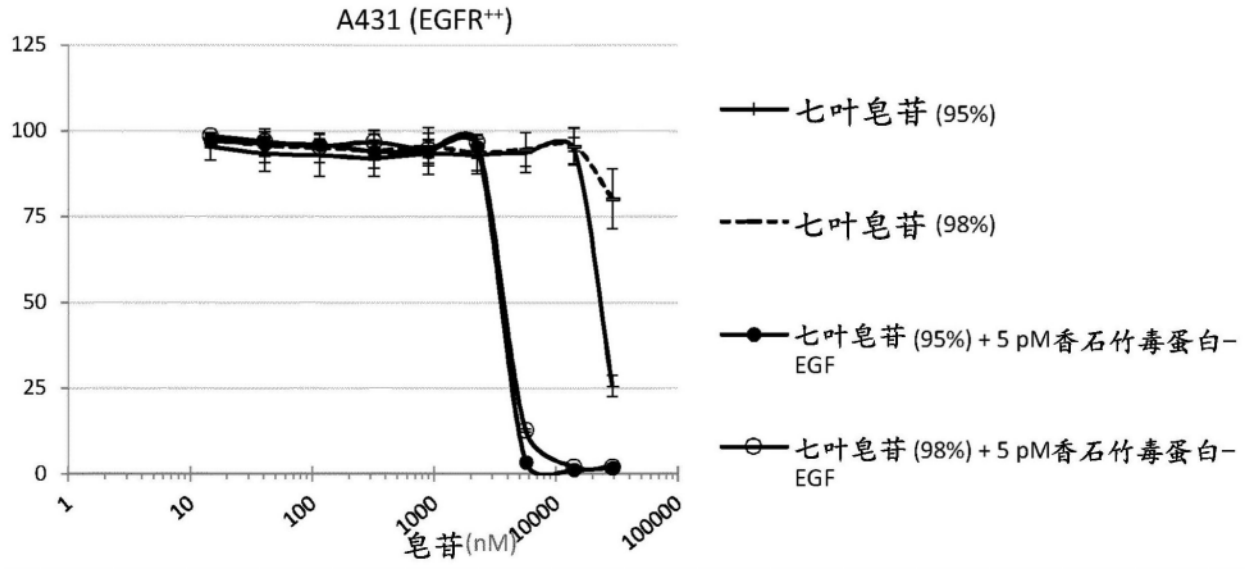

A431 (EGFR++)
125
100
75
50
25
0
1
10
100
1000
10000
100000
皂苷(nM)
七叶皂苷 (95%)
七叶皂苷 (98%)
七叶皂苷 (95%) + 5 pM香石竹毒蛋白-EGF
七叶皂苷 (98%) + 5 pM香石竹毒蛋白-EGF

图69B

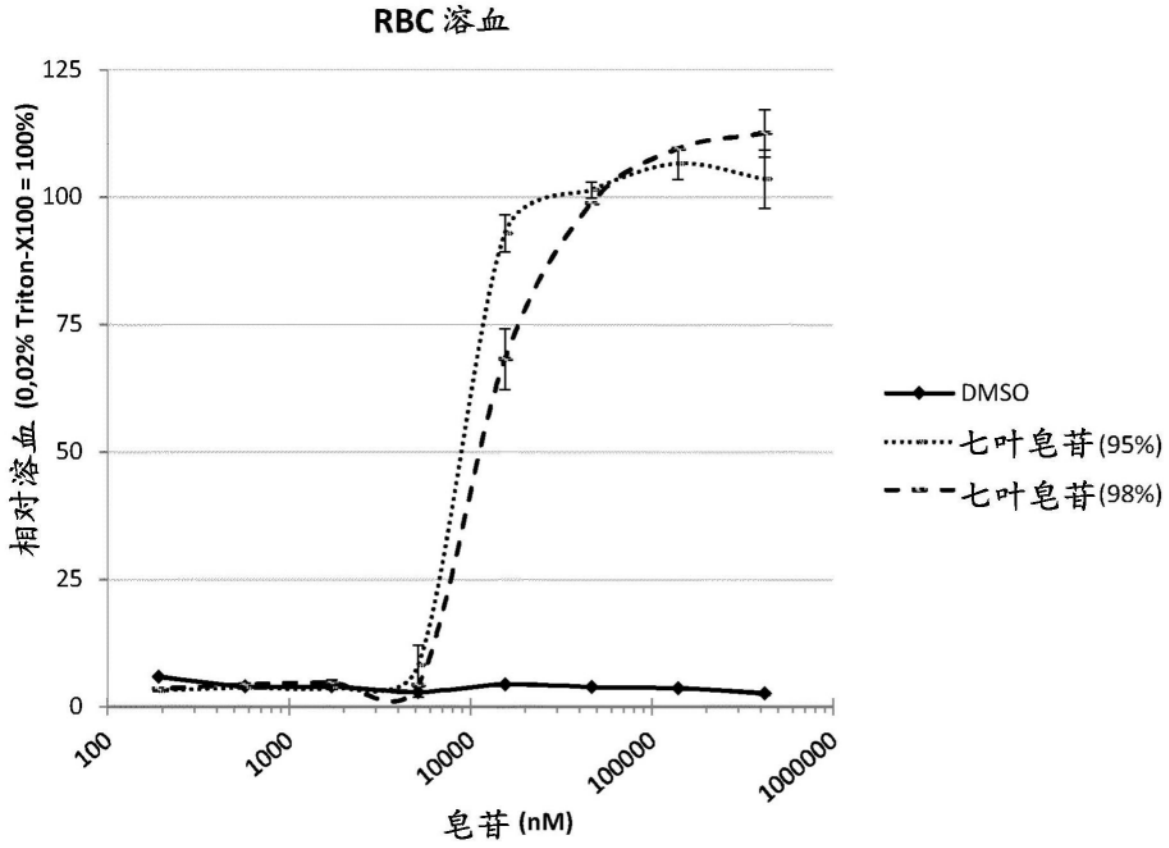

RBC 溶血
相对溶血 (0,02% Triton-X100 = 100%)
125
100
75
50
25
0
100
1000
10000
100000
1000000
皂苷 (nM)
DMSO
七叶皂苷(95%)
七叶皂苷(98%)

图70

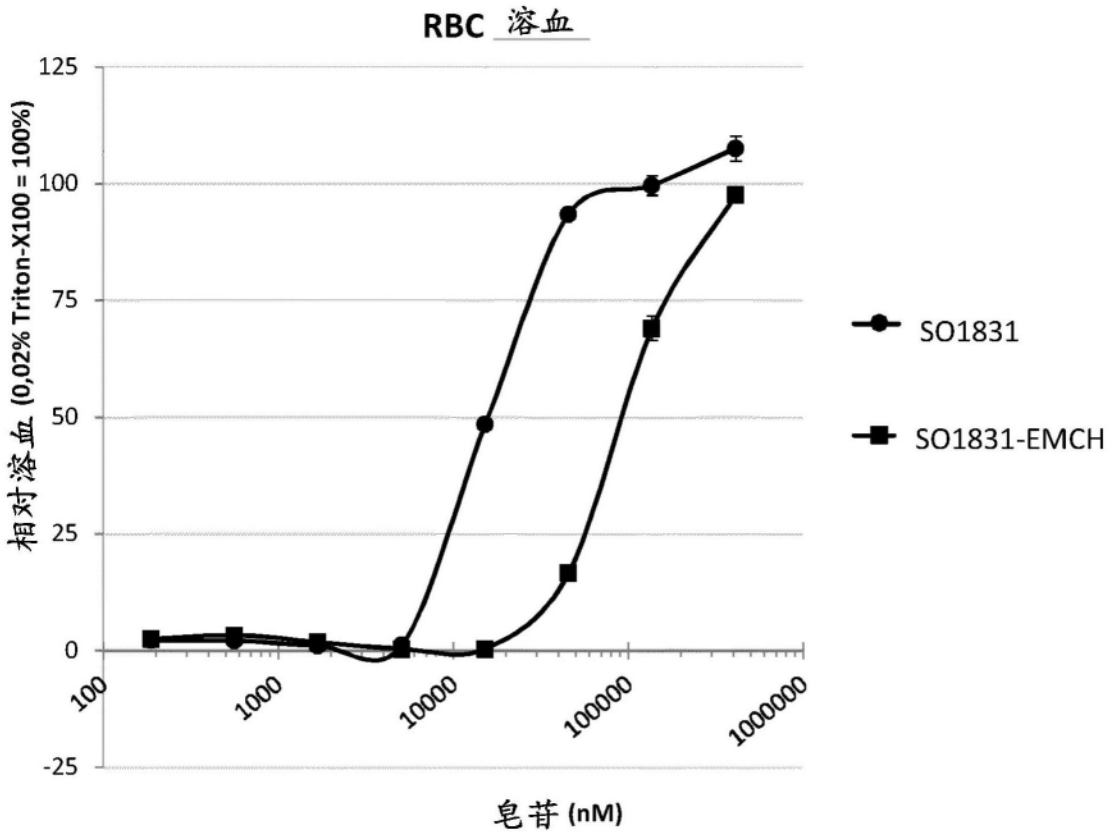

RBC 溶血
125
100
75
50
25
0
-25
相对溶血 (0,02% Triton-X100 = 100%)
100
1000
10000
100000
1000000
皂苷 (nM)
SO1831
SO1831-EMCH

图71

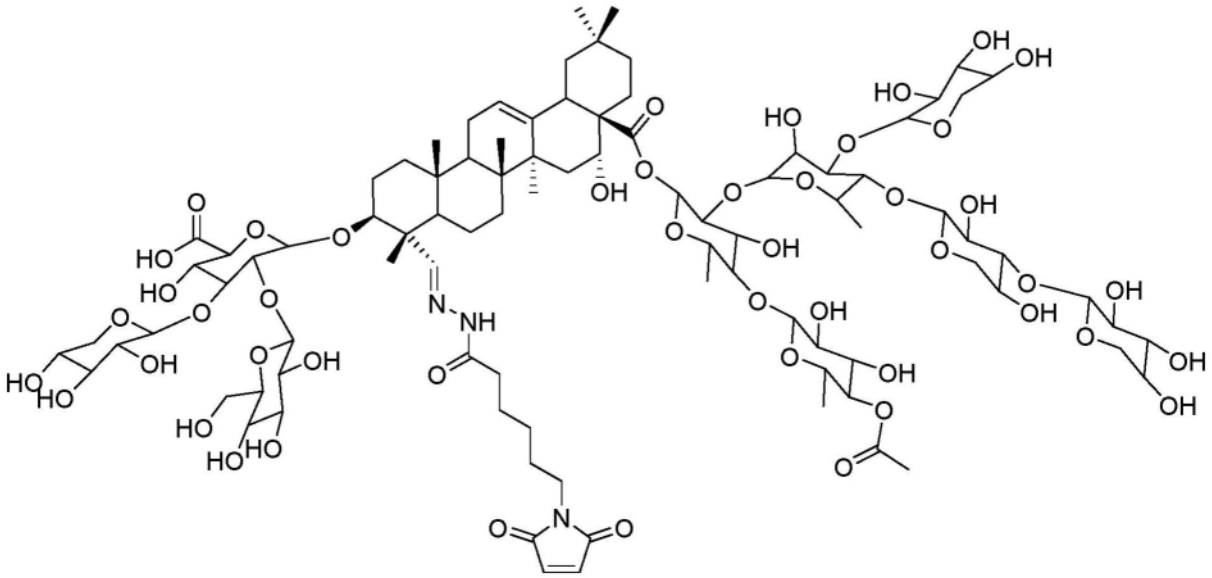


图72

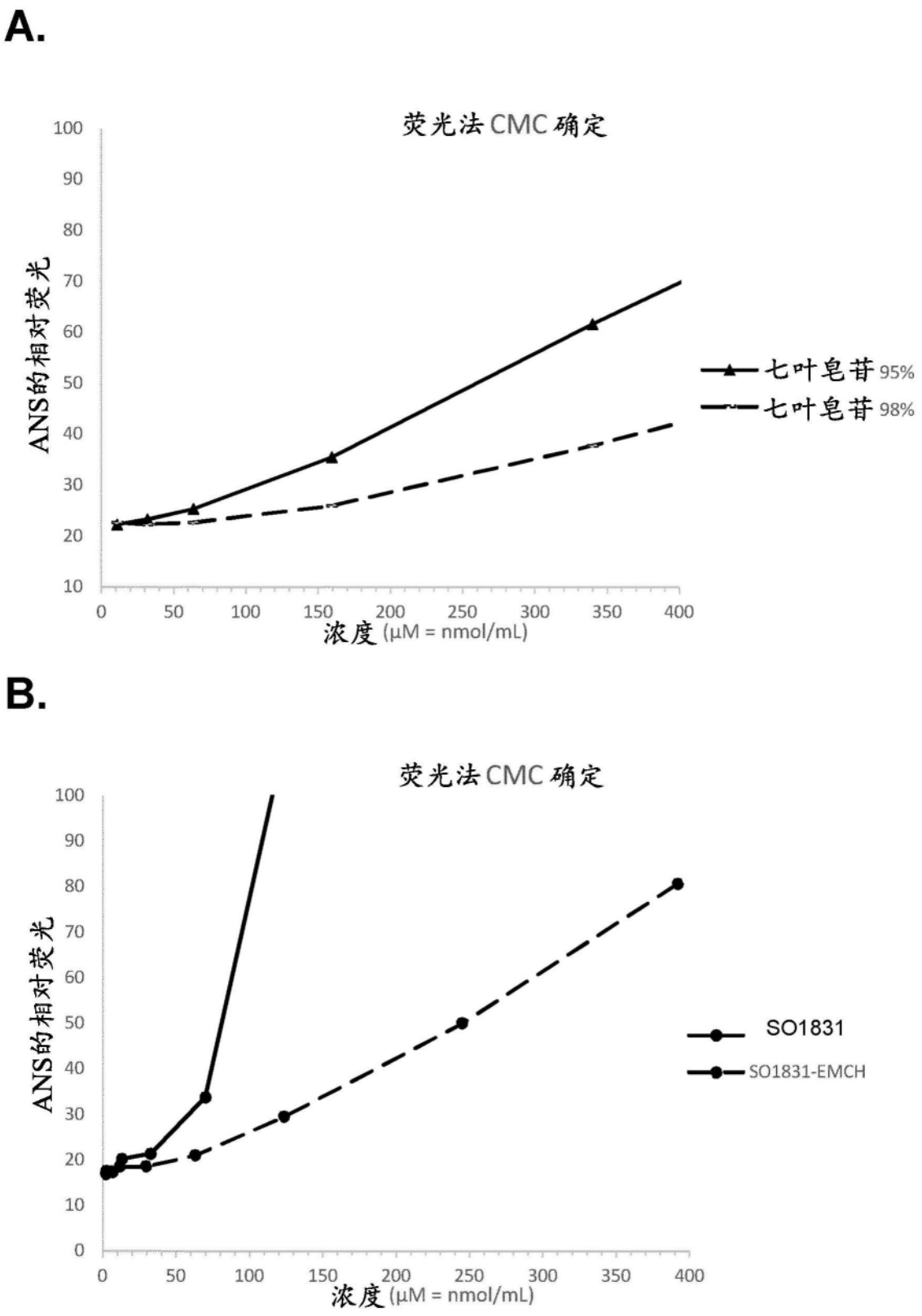

A.
荧光法 CMC 确定
ANS的相对荧光
浓度 (μM = nmol/mL)
七叶皂苷 95%
七叶皂苷 98%
B.
荧光法 CMC 确定
ANS的相对荧光
浓度 (μM = nmol/mL)
SO1831
SO1831-EMCH

图73