



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 115103689 A

(43) 申请公布日 2022. 09. 23

(21) 申请号 202080095453.0

(22) 申请日 2020.12.04

(30) 优先权数据

62/943,705 2019.12.04 US

63/108,186 2020.10.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.08.02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/063332 2020.12.04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/113651 EN 2021.06.10

(71) 申请人 阿什瓦塔治疗股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 J. 克莱兰德 R. 夏尔马 M. 孙

S. 阿皮亚尼

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 许斐斐

(51) Int. Cl.

A61K 47/56 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

权利要求书4页 说明书64页 附图20页

(54) 发明名称

用于药物递送的树枝状大分子组合物和方法

(57) 摘要

本发明描述了用于治疗癌症或自身免疫性疾病的树枝状大分子组合物和方法。所述组合物包括与一种或多种活性剂复合或缀合的树枝状大分子,用于治疗或缓解癌症或自身免疫疾病的一种或多种症状。树枝状大分子可以包括一种或多种乙二胺核聚(酰胺基胺)(PAMAM)羟基封端的第4、5、6、7、8、9或10代树枝状大分子。活性剂可以是免疫调节剂,如STING激动剂、CSF1R抑制剂、PARP抑制剂、VEGFR酪氨酸激酶抑制剂、MEK抑制剂、谷氨酰胺酶抑制剂、TIE II拮抗剂和CXCR2抑制剂以及STING拮抗剂。还提供了使用所述树枝状大分子组合物治疗癌症、骨疾病或炎症疾病的方法。

1. 一种组合物,其包含与一种或多种免疫调节剂复合或共价缀合的树枝状大分子,所述免疫调节剂的量有效压制或抑制需要其的受试者中与肿瘤相关的一种或多种免疫抑制细胞。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述树枝状大分子是羟基封端的树枝状大分子。

3. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述树枝状大分子是第4代、第5代或第6代PAMAM树枝状大分子。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的组合物,其中所述免疫调节剂是选自以下的一种或多种:STING激动剂、CSF1R抑制剂、PARP抑制剂、VEGFR酪氨酸激酶抑制剂、MEK抑制剂、谷氨酰胺酶抑制剂、TIEII拮抗剂、CXCR2抑制剂、CD73抑制剂、精氨酸酶抑制剂、PI3K抑制剂、TLR4激动剂、TLR7激动剂、SHP2抑制剂、细胞毒性剂及其组合。

5. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述免疫调节剂是STING激动剂。

6. 根据权利要求5所述的组合物,其中所述STING激动剂是环二核苷酸GMP-AMP或DMXAA。

7. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述免疫调节剂是CSF1R抑制剂。

8. 根据权利要求7所述的组合物,其中所述CSF1R抑制剂选自PLX3397、PLX108-01、ARRY-382、PLX7486、BLZ945、JNJ-40346527和GW 2580。

9. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述免疫调节剂是PARP抑制剂。

10. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述PARP抑制剂选自奥拉帕尼、维利帕尼、尼拉帕尼或卢卡帕尼。

11. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述免疫调节剂是VEGFR酪氨酸激酶抑制剂。

12. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述VEGFR酪氨酸激酶抑制剂选自舒尼替尼、索拉非尼、帕唑帕尼、凡德他尼、阿昔替尼、西地尼布、瓦他拉尼、达沙替尼、尼达尼布和莫特塞尼。

13. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述VEGFR酪氨酸激酶抑制剂是舒尼替尼或其衍生物或类似物。

14. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述免疫调节剂是MEK抑制剂。

15. 根据权利要求14所述的组合物,其中所述MEK抑制剂选自曲美替尼、考比替尼、比美替尼、司美替尼、PD325901、PD035901、PD032901和TAK-733。

16. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述免疫调节剂是谷氨酰胺酶抑制剂。

17. 根据权利要求16所述的组合物,其中所述谷氨酰胺酶抑制剂选自双-2-(5-苯基乙酰亚氨基-1,2,4-噻二唑-2-基)乙基硫醚(BPTES)和6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸(DON)、氮杂丝氨酸、阿西维辛和CB-839。

18. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述免疫调节剂是TIE II拮抗剂。

19. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述免疫调节剂是CXCR2抑制剂。

20. 根据权利要求19所述的组合物,其中,所述CXCR2抑制剂是那伐立辛、SB225002或SB332235。

21. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述免疫调节剂是CD73抑制剂。

22. 根据权利要求21所述的组合物,其中所述CD73抑制剂是APCP、槲皮素或替诺福韦,或其衍生物、类似物。

23. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述免疫调节剂是精氨酸酶抑制剂。
24. 根据权利要求23所述的组合物,其中所述精氨酸酶抑制剂是2-(S)-氨基-6-二羟硼基己酸的衍生物或类似物。
25. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述免疫调节剂是PI3K抑制剂。
26. 根据权利要求25所述的组合物,其中所述PI3K抑制剂是阿培利司、serabelisib、pilaralisib、WX-037、达托利司、prexasertib、voxtalisib、PX-866、ZSTK474、布帕尼西、pictilisib、库潘尼西,或其衍生物、类似物。
27. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述免疫调节剂是TLR4激动剂或TLR7激动剂。
28. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述免疫调节剂是SHP2抑制剂。
29. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述免疫调节剂是细胞毒性剂。
30. 根据权利要求29所述的组合物,其中所述细胞毒性剂是澳瑞他汀E或Mertansine。
31. 根据权利要求1-30中任一项所述的组合物,其中所述免疫调节剂与所述树枝状大分子共价缀合。
32. 根据权利要求1-31中任一项所述的组合物,其中所述免疫调节剂通过连接部分或间隔部分与所述树枝状大分子共价缀合。
33. 根据权利要求32所述的组合物,其中所述连接部分或间隔部分通过选自醚、酯和酰胺连接键的连接键与所述树枝状大分子结合。
34. 根据权利要求32或33所述的组合物,其中所述连接部分或间隔部分通过醚连接键与所述树枝状大分子结合。
35. 根据权利要求32-34中任一项所述的组合物,其中所述连接部分或间隔部分通过选自醚、酯和酰胺连接键的连接键与所述免疫调节剂结合。
36. 根据权利要求32-35中任一项所述的组合物,其中所述连接部分或间隔部分通过酰胺或醚连接键与所述免疫调节剂结合。
37. 根据权利要求1-36中任一项所述的组合物,其中所述树枝状大分子进一步与一种或多种化疗剂复合或缀合。
38. 根据权利要求37所述的组合物,其中所述一种或多种化疗剂选自安吡啶、博来霉素、白消安、喜树碱、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氯法拉滨、克利桑酶、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素D、柔红霉素、多西他赛、阿霉素、表鬼臼毒素、表柔比星、依托泊苷、磷酸依托泊苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基尿素、伊达比星、异环磷酰胺、innotecan、亚叶酸钙、脂质体阿霉素、脂质体柔红霉素、洛莫司汀、氮芥、美法仑、巯基嘌呤、美司那、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、喷司他丁、甲基苄肼、雷替曲塞、赛特铂、链脲菌素、替尼泊苷、替加氟尿嘧啶、替莫唑胺、替尼泊苷、噻替派、硫鸟嘌呤、拓扑替康、苏消安、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨、伏立诺他、紫杉醇、曲古抑菌素A及其衍生物、曲妥单抗、西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐单抗和其组合。
39. 权利要求1-38中任一项的组合物,其量在需要其的受试者中有效压制或抑制与肿瘤相关的一种或多种免疫抑制细胞。
40. 根据权利要求1-39中任一项所述的组合物,其中所述树枝状大分子进一步与一种或多种诊断剂或标记剂复合或缀合,所述一种或多种诊断剂或标记剂的量在需要其的受试

者中有效诊断或标记与肿瘤相关的一种或多种免疫抑制细胞。

41. 根据权利要求1-40中任一项所述的组合物,其中所述免疫抑制细胞是髓源性抑制细胞和/或肿瘤相关巨噬细胞(M2巨噬细胞)。

42. 一种药物组合物,其包含有效量的权利要求1-41中任一项的组合物。

43. 一种治疗癌症的方法,包括向有此需要的受试者施用有效量的权利要求42的药物组合物。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中所述一种或多种免疫调节剂选自STING激动剂、CSF1R抑制剂、PARP抑制剂、VEGFR酪氨酸激酶抑制剂、MEK抑制剂、谷氨酰胺酶抑制剂、TIEII拮抗剂、CXCR2抑制剂、CD73抑制剂、精氨酸酶抑制剂、PI3K抑制剂、TLR4激动剂、TLR7激动剂、SHP2抑制剂、细胞毒性剂及其组合。

45. 根据权利要求43或44所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、前列腺癌、睾丸生殖细胞瘤、脑癌、胃癌、食道癌、肺癌、肝癌、肾细胞癌和结肠癌。

46. 根据权利要求43-45中任一项所述的方法,其中所述有效量有效减小肿瘤大小。

47. 一种减少或抑制肿瘤部位的一种或多种免疫抑制细胞的方法,包括向被鉴定为患有癌症的受试者施用有效量的权利要求42的药物组合物。

48. 根据权利要求47所述的方法,其中所述免疫抑制细胞是髓源性抑制细胞和/或肿瘤相关巨噬细胞(M2巨噬细胞)。

49. 一种在被鉴定为患有癌症的受试者中增强肿瘤特异性细胞毒性T细胞应答的方法,包括向所述受试者施用有效量的权利要求42的药物组合物。

50. 根据权利要求43-49中任一项所述的方法,进一步包括向所述受试者施用一种或多种选自PD-1拮抗剂、PD-1配体拮抗剂和CTLA4拮抗剂的免疫检查点调节剂。

51. 根据权利要求43-50中任一项所述的方法,还包括向所述受试者施用一种或多种选自化疗剂、抗感染剂及其组合的其它活性剂。

52. 根据权利要求43-51中任一项所述的方法,进一步包括向所述受试者施用过继性T细胞疗法和/或癌症疫苗。

53. 根据权利要求43-52中任一项所述的方法,还包括对所述受试者施用手术或放射治疗。

54. 一种组合物,其包含与一种或多种免疫调节剂复合或缀合的树枝状大分子,所述免疫调节剂的量有效压制或抑制需要其的受试者中一种或多种与炎性疾病相关的促炎细胞。

55. 根据权利要求54所述的组合物,其中所述树枝状大分子是羟基封端的树枝状大分子。

56. 根据权利要求54或55所述的组合物,其中所述树枝状大分子是第4代、第5代或第6代PAMAM树枝状大分子。

57. 根据权利要求54-56中任一项所述的组合物,其中所述免疫调节剂选自以下的一种或多种:STING拮抗剂、JAK1抑制剂、抗炎剂及其组合。

58. 根据权利要求57所述的组合物,其中所述免疫调节剂是STING拮抗剂。

59. 根据权利要求58所述的组合物,其中所述STING拮抗剂是C-178、C-176、C18、AstinC、No₂-cLA、H-151和α-倒捻子素。

60. 根据权利要求57所述的组合物,其中所述免疫调节剂是JAK1抑制剂。

61. 根据权利要求60所述的组合物,其中所述JAK1抑制剂选自托法替尼、鲁索替尼、巴瑞替尼、培菲替尼、德塞替尼、非戈替尼、索西替尼、伊他替尼、SHR0302、乌帕替尼、PF-04965842、Target-007和Target-006,或其组合。

62. 根据权利要求54-61中任一项所述的组合物,其中所述免疫调节剂与所述树枝状大分子共价缀合。

63. 根据权利要求54-62中任一项所述的组合物,其中所述树枝状大分子进一步与一种或多种诊断剂或标记剂复合或缀合,所述一种或多种诊断剂或标记剂的量在需要其的受试者中有效诊断或标记与自身免疫性疾病相关的一种或多种促炎细胞。

64. 根据权利要求54-63中任一项所述的组合物,其中所述促炎细胞是促炎巨噬细胞(M1巨噬细胞)。

65. 一种药物组合物,其包含有效量的权利要求54-64中任一项的组合物。

66. 一种治疗炎性疾病的方法,包括向有此需要的受试者施用有效量的权利要求65的药物组合物。

67. 根据权利要求66所述的方法,其中所述炎性疾病是自身免疫性疾病。

68. 根据权利要求67所述的方法,其中所述自身免疫性疾病选自类风湿性关节炎、银屑病、银屑病关节炎、系统性红斑狼疮(SLE)、1型糖尿病、炎性肠病和甲状腺疾病。

69. 根据权利要求66所述的方法,其中所述炎性疾病是炎性关节疾病。

70. 根据权利要求69所述的方法,其中所述炎性关节疾病选自骨关节炎、类风湿性关节炎、银屑病关节炎和幼年关节炎。

71. 一种用于治疗骨疾病或病症的组合物,其包含与一种或多种有效治疗一种或多种骨病症的量的治疗剂复合或缀合的羟基封端的树枝状大分子,其中所述树枝状大分子进一步与阿仑膦酸盐共价缀合。

72. 根据权利要求71所述的组合物,其中所述一种或多种治疗剂通过一种或多种共价连接基与所述树枝状大分子共价缀合。

73. 一种用于治疗有此需要的受试者的骨疾病或病症的方法,包括向有此需要的受试者施用组合物,所述组合物包含与一种或多种有效治疗所述一种或多种骨病症的量的治疗剂复合或缀合的羟基封端的树枝状大分子,其中所述树枝状大分子进一步与阿仑膦酸盐共价缀合。

用于药物递送的树枝状大分子组合物和方法

[0001] 相关应用的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年12月4日提交的第62/943,705号美国临时申请和2020年10月30日提交的第63/108,186号美国临时申请的优先权,这些申请的全部内容通过引用结合于此。

技术领域

[0003] 本发明总体上属于药物递送领域,具体而言,涉及一种将药物选择性地递送至需要其的部位或区域的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 免疫/炎性反应主要对宿主有益,旨在对抗病原体和转化细胞,然后重建稳态。免疫反应广泛分为促炎(包括Th1和Th17细胞、M1激活的巨噬细胞和设计用于杀死病原体或肿瘤细胞的促炎介质)或抗炎(以Th2细胞、M2激活的巨噬细胞和设计用于修复组织损伤的抗炎细胞因子为主)。许多其他类型的细胞活化,包括不同类型的调节性T细胞、巨噬细胞和B细胞,也参与免疫/炎性反应。

[0006] 在癌症和自身免疫性疾病中,免疫/炎性反应的异常激活会导致慢性疾病和组织损伤的累积。然而,从免疫学的角度来看,这两个家族的疾病是根本不同的,并代表相反的方式,其中免疫系统可以出错。在癌症中,肿瘤细胞大多未被识别为抗原,因为由肿瘤细胞驱动的显性抗炎反应抑制抗肿瘤免疫反应并促进肿瘤进展和播散(免疫抑制)。相比之下,在自身免疫性疾病中,自我耐受是被破坏并且过度激活炎性反应以针对宿主组织细胞,所述宿主组织细胞表达被免疫系统错误识别和攻击的自身抗原,导致永久的组织损伤。

[0007] 肿瘤细胞利用免疫抑制机制,建立强免疫抑制的肿瘤微环境(TME),抑制抗肿瘤免疫反应,支持疾病进展。许多细胞类型被认为有助于产生免疫抑制性TME,包括癌相关成纤维细胞、髓源性抑制细胞(MDSC)、调节性T细胞(Treg)和肿瘤相关巨噬细胞(TAM)。

[0008] TAM参与促进肿瘤血管生成、纤维间质沉积和转移。巨噬细胞经历“极化”过程,其中它们响应于环境刺激而表达不同的表面标记物和功能程序,所述环境刺激例如细胞因子和其它信号介质:典型的,活化的巨噬细胞(M1)产生促炎细胞因子和活性氧/氮类,它们对于宿主防御和肿瘤细胞杀伤是至关重要的,因此被认为是“好的”巨噬细胞;或者,活化的巨噬细胞(M2)产生抗炎细胞因子并参与炎症的消退。已在TME鉴别出M1-和M2-极化型巨噬细胞。

[0009] MDSC是不成熟骨髓细胞的异质性群体,具有很强的免疫抑制潜能。它们抑制T细胞和NK细胞的抗肿瘤反应性,促进血管生成,建立转移前生态位(niche),并募集其他免疫抑制细胞,如调节性T细胞。

[0010] 肿瘤组织中免疫抑制细胞的积聚会对癌症治疗的临床结果产生负面影响,并且与总体生存率和无进展生存率较差相关。仍然需要针对癌症的有效疗法,特别是由免疫抑制细胞介导或调节的癌症。

[0011] 自发性T细胞对肿瘤的反应频繁发生且对患者有预后价值。针对肿瘤相关抗原的

自发性T细胞应答的产生依赖于先天免疫激活,先天免疫激活会驱动I型干扰素 (IFN) 的产生。最近的研究揭示了细胞溶质DNA传感的STING途径在这一过程中的主要作用。这一系列事件有助于激活Batf3谱系树突状细胞 (DC), 这似乎是抗肿瘤免疫的核心。非T细胞炎症性肿瘤缺乏Batf3 DC募集的趋化因子, batf3 DC很少, 并且缺乏I型IFN基因标签, 这表明先天免疫激活失败可能是缺乏自发性T细胞激活和积累的最终原因 (Corrales L, 等人, Cell Research volume 27, pages 96-108 (2017))。需要有效触发先天免疫激活和/或Batf3 DC募集的新策略, 以获得最佳抗肿瘤效果。

[0012] 在自身免疫性疾病的情况下, 免疫应答通常由Th1和Th17细胞及其细胞因子产物IL-2、IFN γ 和IL-17 (在Th1自身免疫性疾病如类风湿性关节炎、RA、多发性硬化、MS和桥本甲状腺炎、HT中) 或由Th2细胞及其抗炎细胞因子IL-4、TGF β 和IL-10 (在Th2自身免疫性疾病如系统性红斑狼疮、SLE、系统性或局部硬化、SSc或硬皮病中) 主导。相对于健康个体, 自身免疫患者的Tregs部分受损, 这部分解释了自身免疫所特有的耐受断裂。M1巨噬细胞诱导强烈的促炎表型, 产生细胞因子 (TNF- α 、IL-6、IL-12和IL-23) 和趋化因子 (CCL-5、CXCL9、CXCL10和CXCL), 促进Th1和自然杀伤 (NK) 细胞的募集。抑制促炎巨噬细胞可能是一种抑制炎症的策略。

[0013] 因此, 本发明的一个目的是提供用于调节免疫微环境以获得期望的免疫结果的组合物和方法。

[0014] 本发明的另一个目的是提供用于治疗癌症和/或自身免疫性疾病的组合物和方法。

[0015] 本发明的另一个目的是提供将药物选择性靶向需要其的细胞/组织的组合物和方法, 特别是肿瘤微环境中的免疫抑制细胞或与自身免疫疾病相关的慢性炎症部位的促炎细胞。

[0016] 本发明的另一个目的是提供用于减少、抑制或消除一种或多种与免疫抑制肿瘤微环境相关的细胞以增强抗肿瘤免疫应答的组合物和方法。

[0017] 本发明的另一个目的是提供用于减少、抑制或消除一种或多种与促炎微环境相关的细胞以改善炎症性和/或自身免疫性疾病的组合物和方法。

[0018] 本发明的另一个目的是提供用于调节一种或多种先天免疫传感器如STING途径的组合物和方法, 例如, 激活或增加STING途径以增强癌症中的抗肿瘤免疫应答, 或减少或抑制STING途径以改善与自身免疫疾病相关的慢性炎症。

发明内容

[0019] 已经开发了用于将治疗剂选择性递送至肿瘤内和肿瘤周围的肿瘤相关免疫细胞的组合物和方法。该组合物选择性地将免疫治疗剂递送至肿瘤内的肿瘤相关巨噬细胞 (TAM) 细胞, 以产生肿瘤抑制微环境并治疗癌症。

[0020] 组合物包括与一种或多种免疫调节剂复合或缀合的树枝状大分子, 其量有效压制或抑制需要其的受试者中与肿瘤相关的免疫细胞。优选地, 树枝状大分子是羟基封端的树枝状大分子, 最优选大部分端基是羟基, 例如25、50、60、75、80、90或100%的端基是羟基。在一些实施方案中, 树枝状大分子是第4代、第5代或第6代PAMAM树枝状大分子。示例性免疫调节剂包括STING激动剂、CSF1R抑制剂、PARP抑制剂、VEGFR酪氨酸激酶抑制剂、MEK抑制剂、

TIEII抑制剂和谷氨酰胺酶抑制剂及其组合。

[0021] 在一些实施方案中,免疫调节剂是STING激动剂,例如环二核苷酸GMP-AMP或DMXAA。在其它实施方案中,免疫调节剂是CSF1R抑制剂。CSF1R抑制剂的示例包括PLX3397、PLX108-01、ARRY-382、PLX7486、BLZ945、JNJ-40346527和GW 2580。在其它实施方案中,免疫调节剂是PARP抑制剂,如奥拉帕尼、维利帕尼、尼拉帕尼或卢卡帕尼。在其它实施方案中,免疫调节剂是VEGFR酪氨酸激酶抑制剂。示例性的VEGFR酪氨酸激酶抑制剂包括舒尼替尼、索拉非尼、帕唑帕尼、凡德他尼、阿昔替尼、西地尼布、瓦他拉尼和莫特塞尼。

[0022] 在其它实施方案中,免疫调节剂是MEK抑制剂。示例性的MEK抑制剂包括曲美替尼、考比替尼(Cobimetinib)、比美替尼(Binimetinib)、司美替尼、PD-325901、PD035901和TAK-733。在其它实施方案中,免疫调节剂是谷氨酰胺酶抑制剂。谷氨酰胺酶抑制剂的示例包括双-2-(5-苯基乙酰氨基(phenylacetamido)-1,2,4-噻二唑-2-基)乙基硫醚(BPTES)和6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸(DON)、氮杂丝氨酸、阿西维辛和CB-839。在其它实施方案中,免疫调节剂是细胞毒性剂。示例性的细胞毒性剂包括溴瑞他汀E和Mertansine。免疫调节剂可以与树枝状大分子共价和/或非共价连接。在一些实施方案中,免疫调节剂通过连接基或间隔基部分与树枝状大分子连接。示例性的共价连接键包括醚、酯和酰胺连接键。例如,在一些实施方案中,连接基或间隔基部分通过醚连接键与树枝状大分子结合,和/或连接基或间隔基部分通过醚、酯或酰胺连接键或其组合与活性剂结合。在一些实施方案中,与免疫调节剂复合或缀合的树枝状大分子与一种或多种另外的治疗、预防和/或诊断剂复合或缀合。诊断或标记剂可以有效标记有此需要的受试者中与肿瘤相关的免疫细胞的量存在,其可用于诊断、预后(例如通过评估转移)或确定治疗的功效。其他治疗药物的例子包括抗感染药、抗炎药和疼痛缓解化合物。

[0023] 还提供了制备所述树枝状大分子组合物和药物制剂的方法,所述药物制剂包含有效量的所述树枝状大分子组合物,其用于施用给需要其的受试者以减少炎症或增强抗肿瘤应答。

[0024] 本发明描述了通过向有此需要的受试者施用有效量的所述药物组合物以降低增殖、转移、肿瘤存活力或增强内源性抗肿瘤应答来治疗癌症的方法。在一些实施方案中,所述方法减少或抑制被鉴定为患有癌症的受试者中的肿瘤相关巨噬细胞。在其它实施方案中,所述方法可增强被鉴定为患有癌症的受试者中的肿瘤特异性细胞毒性T细胞应答。

[0025] 还开发了用于在有需要的受试者中将治疗剂选择性递送至与炎症性疾病或病症相关的促炎性免疫细胞的组合物和方法。该组合物选择性地向促炎巨噬细胞(M1巨噬细胞)细胞递送免疫治疗剂,以产生抗炎微环境和治疗和/或改善所述疾病的一种或多种症状。在一个特定的实施方案中,炎症性疾病是自身免疫性疾病。

[0026] 还描述了包含与一种或多种免疫调节剂复合或缀合的树枝状大分子的组合物,所述免疫调节剂的量有效压制或抑制需要其的受试者中与自身免疫性疾病相关的病理部位相关的促炎性免疫细胞。优选地,树枝状大分子是羟基封端的树枝状大分子,最优选大部分端基是羟基,例如25、50、60、75、80、90或100%的端基是羟基。在一些实施方案中,树枝状大分子是第4代、第5代或第6代PAMAM树枝状大分子。示例性免疫调节剂包括STING拮抗剂、细胞毒性剂及其组合。在一些实施方案中,免疫调节剂是STING拮抗剂,如C-178、C-176、C18、Astin C、No₂-cLA、H-151和 α -倒捻子素。免疫调节剂可以与树枝状大分子共价和/或非共价

连接。在一些实施方案中,与免疫调节剂复合或缀合的树枝状大分子与一种或多种另外的治疗剂、预防剂和/或诊断剂复合或缀合。诊断剂或标记剂可以有效标记患有或怀疑患有自身免疫性疾病的受试者中与自身免疫性疾病相关的促炎免疫细胞的量存在,其可用于诊断、预后或确定治疗的功效。其他治疗剂的实例包括抗感染药、抗炎药和疼痛缓解化合物。

[0027] 本发明描述了通过向需要治疗的受试者施用有效量的所述药物组合物来治疗炎性疾病和病症的方法。在特定实施方案中,炎性疾病是自身免疫性疾病。在一些实施方案中,所述方法减少或抑制受试者中与自身免疫性疾病相关的促炎免疫细胞。在其它实施方案中,所述方法可减少与自身免疫性疾病相关的炎症。在一些实施方案中,自身免疫性疾病是类风湿性关节炎、银屑病、银屑病关节炎、系统性红斑狼疮(SLE)、1型糖尿病、炎性肠病或甲状腺疾病。在一些实施方案中,炎性疾病是炎性关节疾病,例如骨关节炎。

[0028] 还描述了包括与一种或多种治疗剂复合或缀合的羟基封端的树枝状大分子的组合物,所述治疗剂的量对于治疗一种或多种骨病症有效。在优选的实施方案中,树枝状大分子与阿仑膦酸盐共价缀合。在一些实施方案中,一种或多种治疗剂通过一种或多种连接基与树枝状大分子共价缀合。本发明还描述了治疗有此需要的受试者的骨疾病或病症的方法,包括向受试者施用有效治疗一种或多种骨病症的量的组合物,其包含与阿仑膦酸盐复合或缀合的羟基封端的树枝状大分子和一种或多种治疗剂。

附图说明

[0029] 图1是显示合成树枝状大分子-DMXAA缀合物的化学反应的示意图。

[0030] 图2A和2B是显示合成树枝状大分子-GW 2580醚缀合物(图2A)和树枝状大分子-GW 2580酯缀合物(图2B)的化学反应步骤的示意图。

[0031] 图3A和3B是显示通过羟甲基连接键(图3A)和酰胺连接键(图3B)合成树枝状大分子-舒尼替尼缀合物的化学反应步骤的示意图。

[0032] 图4A和4B为点图,显示了在用PBS(组1×)和D-Cy5(组2▲)每日静脉注射治疗3天后,雌性C57BL/6小鼠中肿瘤的以 $[p/sec/cm^2/sr]/[\mu W/cm^2]$ 测量的平均辐射效率;每组的平均值用一条水平线表示。图4C是在用PBS(组1×)和D-Cy5(组2▲)每天静脉注射治疗3天后比较小鼠肿瘤以对数标度绘制的中位平均辐射效率。

[0033] 图5是显示雌性C57BL/6小鼠每日静脉注射PBS(组1×)和D-Cy5(组2▲)3天后肿瘤体积的方框图和须状图;其中“方框”表示观察值的第25和75个百分位数,“线”表示观察值的中位值,“须”表示极端观察值。

[0034] 图6A-6H是点图,显示每天静脉注射PBS(组1×)和D-Cy5(组2▲)3天后,雌性C57BL/6小鼠肿瘤中CD45+细胞在总活细胞中的百分比(图6A);常规CD4+群体在总CD45+细胞中的百分比(图6B); T_{reg} 群体在总CD45+细胞中的百分比(图6C);CD8+群体在总CD45+细胞中的百分比(图6D);gMDSC群体在总CD45+细胞中的百分比(图6E);M1巨噬细胞群在总CD45+细胞中的百分比(图6F);M2巨噬细胞占全部CD45+细胞的百分比(图6G);mMDSC群体在总CD45+细胞的百分比(图6H)。

[0035] 图7A-7G是点图,其显示在用PBS(组1×)和D-Cy5(组2▲)每天静脉注射治疗3天后,雌性C57BL/6小鼠肿瘤中树枝状大分子+细胞在总常规CD4+群体中的百分比(图7A); T_{reg} 群体中树枝状大分子+细胞的百分比(图7B);CD8+群体中树枝状大分子+细胞的百分比(图7C);M1巨噬细胞中树枝状大分子+细胞的百分比(图7D);M2巨噬细胞中树枝状大分子+细胞的百分比(图7E);gMDSC群体中树枝状大分子+细胞的百分比(图7F);mMDSC群体中树枝状大分子+细胞的百分比(图7G)。

7C);树枝状大分子+细胞在M1巨噬细胞群中的百分比(图7D);树枝状大分子+细胞在M2巨噬细胞群中的百分比(图7E);树枝状大分子+细胞在gMDSC群体中的百分比(图7F);mMDSC群体中树枝状大分子+细胞的百分比(图7G)。

[0036] 图8是线图,其显示在用载体对照、舒尼替尼60mg/kg腹膜内注射,以56.7mg/kg、11.34mg/kg和2.27mg/kg通过酰胺连接键与舒尼替尼缀合的树枝状大分子(D-NSA);以57.8mg/kg、11.55mg/kg和2.31mg/kg通过酯连接键与舒尼替尼缀合的树枝状大分子(D-CSA)治疗的组中在20天的治疗期内的肿瘤体积。

[0037] 图9是条形图,其显示在治疗期结束时用载体对照、舒尼替尼60mg/kg腹膜内注射,以56.7mg/kg(D-NSA高剂量)、11.34mg/kg(D-NSA中剂量)和2.27mg/kg(D-NSA低剂量)的通过酰胺连接键与舒尼替尼缀合的树枝状大分子(D-NSA);以57.8mg/kg(D-CSA高剂量)、11.55mg/kg(D-CSA中剂量)和2.31mg/kg(D-CSA低剂量)通过酯连接键与舒尼替尼缀合的树枝状大分子(D-CSA)治疗的组中的肿瘤重量(单位为克)。

[0038] 图10是显示羟基磷灰石与阿仑膦酸盐(ALN)结合的结合百分比(0-100%)随培养时间(1-5小时)变化的图。

[0039] 图11A-11B是显示6组G1(CIA,D-CY5);G2(CIA,ALN D-CY5);G3(CIA,载体);G4(天然(Naïve),D-CY5);G5(天然,ALN D-CY5)和G6(天然,载体),分别在左爪(图11A)和右爪(图11B)中每组爪体积(毫升;平均值 $\pm$ SEM)随时间(第0-21天)变化的图。

[0040] 图12为条形图,显示了4组G1(CIA,D-CY5);G2(CIA,ALN D-CY5);G4(天然,D-CY5)和G5(天然,ALN D-CY5)中每组试验动物的后肢足中的对比指数(0-5,平均值 $\pm$ SEM)。对比指数为 $[\text{Fluor}(\text{ROI}) - \text{Fluor}(\text{av.ROI自体荧光})] / [\text{Fluor}(\text{参考组织}) - (\text{av. Ref组织自体荧光})]$ 。

[0041] 图13A是与两种不同类别的活性剂R1和R2缀合的树枝状大分子的合成方案。图13B显示了包括卡培他滨和吉西他滨及其类似物的示例性R1基团。图13C显示了示例性的R2基团,例如TIE II抑制剂及其类似物。

[0042] 图14A和14B是与两种示例性TLR4激动剂缀合的树枝状大分子的合成方案。

[0043] 图15是与示例性CSF1R抑制剂缀合的树枝状大分子的合成方案。

[0044] 图16是树枝状大分子-N-乙酰-L-半胱氨酸甲酯缀合物的合成方案。

[0045] 发明详述

[0046] I. 定义

[0047] 术语“活性剂”或“生物活性剂”是可互换使用的治疗剂、预防剂或诊断剂,指诱导期望的药理学和/或生理学效果的化学或生物化合物,所述效果可以是预防的、治疗的或诊断的。它们可以是核酸、核酸类似物、分子量小于2kDa,更典型地小于1kDa的小分子、肽模拟物、蛋白质或肽、碳水化合物或糖、脂质或表面活性剂,或其组合。该术语还包括活性剂的药理学上可接受的药理学活性衍生物,包括但不限于盐、酯、酰胺、前药、活性代谢物和类似物。

[0048] 术语“前药”是指以非活性(或活性明显较低)形式施用于受试者的药理学物质(药物)。一旦给药,前药在身体中(体内)通过酶代谢或化学反应,或通过两者的组合,转化成具有所需药理活性的化合物。前药可以通过用“前体部分”取代上述化合物中存在的适当官能团来制备,如H.Bundgaard, Design of Prodrugs (1985)中所述。关于前药的进一步讨论,参见例如Rautio, J.等人Nature Reviews Drug Discovery.7:255-270 (2008)。

[0049] 术语“药学上可接受的盐”是本领域公认的,包括化合物的相对无毒的无机和有机酸加成盐。药学上可接受的盐的实例包括衍生自无机酸的盐,如盐酸和硫酸,以及衍生自有机酸的盐,如乙磺酸、苯磺酸和对甲苯磺酸。用于形成盐的合适无机碱的实例包括氨、钠、锂、钾、钙、镁、铝和锌的氢氧化物、碳酸盐和碳酸氢盐。盐也可以与合适的有机碱形成,包括无毒且足够强以形成这种盐的有机碱。出于说明的目的,这类有机碱可以包括单烷基胺、二烷基胺和三烷基胺,如甲胺、二甲胺和三乙胺;单-、二-或三羟基烷基胺,例如单-、二-和三乙醇胺;氨基酸,如精氨酸和赖氨酸;胍;N-甲基氨基葡萄糖;N-甲基葡萄糖胺;L-谷氨酰胺;N-甲基哌嗪;吗啉;乙二胺;N-苄基苯乙胺;

[0050] 术语“治疗剂”是指可被施用以治疗疾病或病症的一种或多种症状的活性剂。

[0051] 术语“诊断剂”是指可被施用以揭示、查明和阐明病理过程的定位的活性试剂。诊断试剂可以标记靶细胞,从而允许随后检测或成像这些标记的靶细胞。在一些实施方案中,诊断剂可以通过树枝状大分子或合适的递送载体靶向/结合癌细胞或与肿瘤部位相关和位于肿瘤部位/附近的细胞,例如与肿瘤相关的巨噬细胞。

[0052] 术语“预防剂”是指可施用以预防疾病或预防某些病症的活性剂,例如疫苗。

[0053] 术语“免疫学”、“免疫学的”或“免疫”应答是指在受体患者中针对免疫原的有益体液(抗体介导的)和/或细胞(由抗原特异性T细胞或其分泌产物介导的)应答的发展。这种应答可以通过施用免疫原诱导的主动应答,也可以通过施用抗体或已接触抗原的T细胞诱导的被动应答。细胞免疫应答是通过多肽表位与I类或II类MHC分子结合激活抗原特异性CD4⁺T辅助细胞和/或CD8⁺细胞毒性T细胞而引发的。所述应答还可涉及单核细胞、巨噬细胞,NK细胞、嗜碱性粒细胞、树突状细胞、星形胶质细胞、小胶质细胞、嗜酸性粒细胞或先天性免疫的其他成分。细胞介导的免疫应答的存在可以通过增殖试验(CD4⁺T细胞)或CTL(细胞毒性T淋巴细胞)试验来确定。体液和细胞应答对免疫原的保护或治疗作用的相对贡献可以通过从免疫的同系动物中分别分离抗体和T细胞并测量第二受试者中的保护或治疗作用来区分。

[0054] 术语“免疫调节剂”或“免疫治疗剂”是指可施用以调节、增强、减少、延长、降低或以其它方式改变受体中先天或适应性免疫应答的一种或多种因素的活性剂。一般而言,免疫调节剂可通过将一种或多种免疫细胞或细胞类型靶向靶位点来调节免疫微环境以产生所需的免疫应答,因此,不一定对任何癌症类型具有特异性。例如,免疫细胞上的单个分子,程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)的阻断导致了抗肿瘤活性。在一些实施方案中,特异性递送免疫调节剂以抑制或减少抑制性免疫细胞如肿瘤相关巨噬细胞用于在肿瘤部位增强抗肿瘤应答。

[0055] 术语“免疫抑制细胞”是指促进肿瘤生长、血管生成、侵袭、转移、对治疗的抗性或其组合的免疫细胞。示例性的免疫抑制细胞包括癌相关成纤维细胞、髓源性抑制细胞(MDSC)、调节性T细胞(Treg)、间充质基质细胞(MSC)和表达TIE2的单核细胞以及肿瘤相关巨噬细胞(TAM)。

[0056] 术语“促炎细胞”是指促进促炎活性、促炎细胞因子如IL-12、IFN- γ 和TNF- α 的分泌或其组合的免疫细胞。示例性促炎细胞包括促炎M1巨噬细胞或经典激活巨噬细胞(CAM)。

[0057] 短语“药学上可接受的”或“生物相容的”是指在合理的医学判断的范围内,适用于与人和动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激、过敏反应或其它问题或并发症,与合理

的益处/风险比相称的组合物、聚合物和其它材料和/或剂型。短语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、组合物或媒介物,例如液体或固体填充剂、稀释剂、溶剂或封装材料,其涉及将任何主题组合物从身体的一个器官或部分运送或转运到身体的另一个器官或部分。每种载体必须是“可接受的”,即与受试组合物的其他成分相容且对患者无害。

[0058] 术语“治疗有效量”是指当结合到树枝状大分子中和/或上时,在适用于任何医学治疗的合理的益处/风险比下产生一些所需效果的治疗剂的量。有效量可根据诸如所治疗的疾病或病症、所施用的特定靶向构建体(construct)、受试者的尺寸或疾病或病症的严重性等因素而变化。本领域普通技术人员可以凭经验确定特定化合物的有效量,而无需过多的实验。在一些实施方案中,术语“有效量”是指治疗剂或预防剂的量,以减少或减轻一种或多种疾病或病症的症状,例如减少肿瘤大小(例如,肿瘤体积)或减少或减轻自身免疫疾病的一种或多种症状,例如类风湿性关节炎患者腕部和手及足的小关节疼痛和肿胀等。在癌症或肿瘤的情况下,有效量的药物可以具有减少癌细胞数量;减小肿瘤的大小;抑制癌细胞向周围器官的浸润;抑制肿瘤转移;抑制肿瘤生长;和/或减轻一种或多种与病症相关的症状的作用。有效量可一次或多次给药。

[0059] 在抑制的上下文中,术语“抑制”或“减少”是指活性和数量的降低或减少。这可以是活性或数量的完全抑制或减少,也可以是部分抑制或减少。

[0060] 可将抑制或降低与对照或标准水平进行比较。抑制可以是5、10、25、50、75、80、85、90、95、99或100%。例如,包含一种或多种抑制剂的树枝状大分子组合物可抑制或减少与未接受或未用树枝状大分子组合物治疗的受试者的等效肿瘤组织中相同细胞的活性和/或量相比肿瘤相关巨噬细胞的活性和/或量约10%、20%、30%、40%、50%、75%、85%、90%、95%或99%。在一些实施方案中,在mRNA、蛋白质、细胞、组织和器官水平比较抑制和减少。例如,抑制和减少肿瘤增殖或肿瘤大小/体积。

[0061] 术语“治疗”或“预防”可能易患疾病、障碍和/或病症但尚未被诊断为患有该疾病、障碍和/或病症的动物中发生的疾病、障碍或病症;抑制疾病、障碍或病症,例如阻碍其进展;和缓解所述疾病、障碍或病症,例如引起所述疾病、障碍和/或病症的消退。治疗所述疾病或病症包括改善所述特定疾病或病症的至少一种症状,即使潜在的病理生理学不受影响,例如通过施用镇痛剂治疗受试者的疼痛,即使所述药剂不治疗疼痛的原因。治疗的预期效果包括降低疾病进展速度、改善或减轻疾病状态以及缓解或改善预后。例如,如果减轻或消除了一种或多种与癌症相关的症状,则成功地“治疗”了个体,包括但不限于减少癌细胞的增殖、减少由疾病引起的症状、提高那些患有疾病的人的生活质量、减少治疗疾病所需的其它药物的剂量、延缓疾病的进展和/或延长个体的存活。

[0062] 短语“增强T细胞功能”是指诱导、造成或刺激T细胞具有持续或扩增的生物学功能,或更新或重新激活衰竭或失活的T细胞。增强T细胞功能的实例包括:相对于干预前的水平,CD8⁺T细胞分泌颗粒酶B和/或IFN- γ 增加,增殖增加,抗原反应性(如病毒、病原体或肿瘤清除率)增加。在一个实施方案中,增强水平至少为50%,或者为60%、70%、80%、90%、100%、120%、150%或200%。测量这种增强的方式是本领域普通技术人员已知的。

[0063] “肿瘤免疫”是指肿瘤逃避免疫识别和清除的过程。因此,作为一个治疗概念,当这种逃避被减弱,并且肿瘤被免疫系统识别和攻击时,肿瘤免疫被“治疗”。肿瘤识别的示例包括肿瘤结合、肿瘤缩小和肿瘤清除。

[0064] “免疫原性”是指特定物质激发免疫反应的能力。肿瘤可以是免疫原性的且增强的肿瘤免疫原性有助于通过免疫应答清除肿瘤细胞。

[0065] 术语“可生物降解的”通常是指在生理条件下会降解或侵蚀为能够被受试者代谢、消除或排泄的较小单位或化学物种的材料。降解时间是组成和形态的函数。

[0066] 术语“树枝状大分子”包括但不限于具有内核、规则地连接到该引发剂核(initiator core)的重复单元的内层(或“代(generation)”)和连接到最外层(outmost generation)的末端基团的外表面的分子架构。

[0067] 术语“官能化”是指以导致官能团或部分连接的方式修饰化合物或分子。例如,可以通过引入使分子成为强亲核试剂或强亲电试剂的分子来官能化分子。

[0068] 术语“靶向部分”是指定位于或远离特定区域的部分。该部分可以是例如蛋白质、核酸、核酸类似物、碳水化合物或小分子。所述实体可以是例如治疗化合物如小分子,或诊断实体如可检测标记。区域可以是组织、特定的细胞类型或亚细胞区室。在一个实施方案中,靶向部分指导活性剂的定位。

[0069] 术语“延长的停留时间”是指药剂从患者体内或该患者的器官或组织中清除所需的时间增加。在某些实施方案中,“延长的停留时间”是指被清除的药剂,其半衰期比较标准(例如不与递送载体如树枝状大分子缀合的可比药剂)长10%、20%、50%或75%。在某些实施方案中,“延长的停留时间”是指清除的药物的半衰期为比较标准(如没有特异性靶向与肿瘤相关的特定细胞类型的树枝状大分子的可比试剂)的2、5、10、20、50、100、200、500、1000、2000、5000或10000倍。

[0070] 术语“掺入的”和“包封的”是指将活性剂掺入、配制或以其它方式包括到组合物中和/或组合物上,该组合物允许这种活性剂在所需应用中释放,例如持续释放。可以将活性剂或其它材料掺入到树枝状大分子中,包括掺入到这种树枝状大分子的一个或多个表面官能团中(通过共价、离子或其它结合相互作用)、物理混合、将试剂包封在树枝状结构内、包囊在树枝状结构内等。

[0071] 粒子的术语“中性表面电荷”是指粒子的动电位(ζ -电位)为0mV。在一些实施方案中,术语“近中性表面电荷”指的是大约0mV的 ζ 电位,例如从-10mV到10mV,从-5mV到5mV,优选从-1mV到1mV。

[0072] II. 组合物

[0073] 本发明描述了适于递送一种或多种活性剂,特别是一种或多种活性剂以预防、治疗或诊断一种或多种肿瘤或自身免疫性疾病的树枝状大分子复合物。

[0074] 还提供了树枝状大分子复合物的组合物,其包括包封、缔合(associated)和/或缀合在树枝状大分子中的一种或多种预防、治疗和/或诊断试剂。通常,一种或多种活性剂以约0.01%至约30%、优选约1%至约20%、更优选约5%至约20%的重量浓度包封、缔合和/或缀合在树枝状大分子复合物中。在一些实施方案中,活性剂通过一个或多个连接键例如二硫键、酯、醚、硫酯、氨基甲酸酯、碳酸酯、肟和酰胺与树枝状大分子共价缀合,任选通过一个或多个间隔基。在一些实施方案中,间隔基是活性剂,例如N-乙酰半胱氨酸。示例性的活性剂包括抗炎药物、化疗药物、抗癫痫药、血管扩张剂和抗感染药。

[0075] 额外药剂的存在会影响颗粒的 ζ 电位或表面电荷。在一个实施方案中,树枝状大分子的 ζ 电位在-100mV和100mV之间,在-50mV和50mV之间,在-25mV和25mV之间,在-20mV和

20mV之间,在-10mV和10mV之间,在-10mV和5mV之间,在-5mV和5mV之间,或在-2mV和2mV之间。在一个优选的实施方案中,表面电荷是中性或接近中性的。上述范围包括-100mV至100mV的所有值。

[0076] A. 树枝状大分子

[0077] 树枝状大分子是具有高密度表面端基的三维、超支化、单分散、球状和多价大分子(Tomalia,D.A.,等人,Biochemical Society Transactions,35,61(2007);和Sharma,A.,等人,ACS Macro Letters,3,1079(2014))。由于其独特的结构和物理特征,树枝状大分子可用作各种生物医学应用的纳米载体,包括靶向药物/基因递送、成像和诊断(Sharma,A.,等人,RSCAdvances,4,19242(2014);Caminade,A.-M.,等人,Journal of Materials Chemistry B,2,4055(2014);Esfand,R.,等人,Drug Discovery Today,6,427(2001);和Kannan,R.M.,等人,Journal of Internal Medicine,276,579(2014))。

[0078] 最近的研究表明树枝状大分子表面基团对其生物分布有显著影响(Nance,E.,等人,Biomaterials,101,96(2016))。与健康对照相比,在脑瘫(CP)兔模型中全身给药时,不含任何靶向配体的羟基封端的第4代PAMAM树枝状大分子(约4nm大小)穿过受损BBB显著更多(>20倍),并且选择性靶向活化的小胶质细胞和星形胶质细胞(Lesniak,W.G.,等人,Mol Pharm,10(2013))。

[0079] 术语“树枝状大分子”包括但不限于以下分子结构,其具有内核和连接到该内核并从该内核延伸的重复单元层(或“代”),每层具有一个或多个分支点,以及连接到最外代的末端基团的外表面。在一些实施方案中,树枝状大分子具有规则的树枝状大分子或“星放射状(starburst)”分子结构。

[0080] 通常,树枝状大分子的直径为约1nm至约50nm,更优选约1nm至约20nm,约1nm至约10nm,或约1nm至约5nm。在一些实施方案中,直径在约1nm至约2nm之间。缀合物通常在相同的大小范围内,尽管大蛋白如抗体可能会使大小增加5-15nm。一般而言,对于较大代的树枝状大分子,药剂与树枝状大分子的包封比例为1:1至4:1。在优选的实施方案中,树枝状大分子的直径有效穿透肿瘤组织并长时间保留在靶细胞中。

[0081] 在一些实施方案中,树枝状大分子的分子量为约500道尔顿至约100,000道尔顿,优选约500道尔顿至约50,000道尔顿,最优选约1,000道尔顿至约20,000道尔顿。

[0082] 可以使用的合适的树枝状大分子支架包括聚(酰胺基胺),也称为PAMAM,或STARBURST™树枝状大分子;聚丙基胺(POPAM)、聚乙烯亚胺、聚赖氨酸、聚酯、iptycene、脂肪族聚(醚)和/或芳香族聚醚树枝状大分子。树枝状大分子可以具有羧酸、胺基和/或羟基末端。在优选的实施方案中,树枝状大分子具有羟基末端。树枝状大分子复合物的每个树枝状大分子可以与其它树枝状大分子具有相同或相似或不同的化学性质(例如,第一树枝状大分子可以包括PAMAM树枝状大分子,而第二树枝状大分子可以是POPAM树枝状大分子)。

[0083] 术语“PAMAM树枝状大分子”是指聚(酰胺基胺)树枝状大分子,其可以含有不同的核,具有酰胺基胺结构模块,并且可以具有任何代的羧酸、胺和羟基末端,包括但不限于第1代PAMAM树枝状大分子、第2代PAMAM树枝状大分子、第3代PAMAM树枝状大分子、第4代PAMAM树枝状大分子、第5代PAMAM树枝状大分子、第6代PAMAM树枝状大分子、第7代PAMAM树枝状大分子、第8代PAMAM树枝状大分子、第9代PAMAM树枝状大分子,或第10代PAMAM树枝状大分子。在优选的实施方案中,树枝状大分子可溶于制剂中,并且是4、5或6代(“G”)树枝状大分子

(即,G4-G6树枝状大分子),和/或G4-G10树枝状大分子、G6-G10树枝状大分子或G2-G10树枝状大分子。树枝状大分子的功能性表面基团上可能连接有羟基。在优选的实施方案中,树枝状大分子是第4代、第5代、第6代、第7代或第8代羟基封端的聚(酰胺基胺)树枝状大分子。

[0084] 用于制备树枝状大分子的方法是本领域技术人员已知的,并且通常包括两步迭代反应顺序,其在中心引发剂核(例如乙二胺核)周围产生树枝状 β -丙氨酸单元的同心壳(代)。每个后续生长步骤代表了新的“一代”聚合物,其具有较大的分子直径、两倍数量的反应性表面位点和大约是前一代分子量的两倍。适合使用的树枝状大分子支架可在多代产品中购得。优选地,树枝状大分子组合物基于第0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10代树枝状大分子支架。这些支架分别具有4、8、16、32、64、128、256、512、1024、2048和4096个反应位点。因此,基于这些支架的树枝状化合物可具有至多相应数量的组合靶向部分(如果有的话)和活性剂。

[0085] 在一些实施方案中,树枝状大分子包括多个羟基。一些示例性的高密度含羟基树枝状大分子包括市售聚酯树枝状聚合物,例如超支化2,2-双(羟基-甲基)丙酸聚酯聚合物(例如,超支化双-MPA聚酯-64-羟基,第4代),树枝状聚甘油。

[0086] 在一些实施方案中,所述高密度含羟基的树枝状大分子是低聚乙二醇(OEG)样树枝状大分子。例如,可以使用高效、稳健和原子经济的化学反应合成第2代OEG树枝状大分子(D2-OH-60),例如Cu(I)催化的炔烃-叠氮化物点击化学和光催化的硫醇-烯点击化学。在最少的反应步骤中非常低代的高度致密的多元醇树枝状大分子可以通过使用正交超单体和超核策略来实现,例如如在WO 2019094952中所述的。在一些实施方案中,树枝状大分子主链在整个结构中具有不可裂解的聚醚键,以避免树枝状大分子在体内崩解,并允许从体内消除作为单一实体的此类树枝状大分子(不可生物降解)。

[0087] 在一些实施方案中,树枝状大分子能够特异性靶向特定组织区域和/或细胞类型,优选肿瘤相关巨噬细胞或参与自身免疫疾病的促炎巨噬细胞。在优选的实施方案中,树枝状大分子能够特异性靶向特定的组织区域和/或细胞类型,而没有靶向部分。

[0088] 在优选的实施方案中,树枝状大分子在树枝状大分子的表面上具有多个羟基(-OH)基团。羟基(-OH)基团的优选表面密度为至少1个OH基团/ nm^2 (羟基表面基团的数量/以 nm^2 为单位的表面积)。例如,在一些实施方案中,羟基的表面密度大于2、3、4、5、6、7、8、9、10;优选至少10、15、20、25、30、35、40、45、50或50个以上的表面基团/表面积,单位为 nm^2 。在进一步的实施例,羟基(-OH)基团的表面密度在约1和约50之间,优选5-20个OH基团/ nm^2 (羟基表面基团的数目/以 nm^2 为单位的表面积),同时分子量在约500道尔顿和约10000道尔顿之间。在优选的实施方案中,游离的(即未缀合的)羟基在树枝状大分子上的总表面基团(缀合的和未缀合的)中的百分比大于70%、75%、80%、85to、90%、95%和/或小于100%。在第4代PAMAM树枝状大分子的情况下,在总共64个表面末端/基团中,游离的(即未缀合的)羟基的优选数目大于50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62或63。在进一步的实施方案中,羟基封端的树枝状大分子具有有效数量的游离羟基,用于选择性靶向靶细胞,例如活化的小胶质细胞、活化的小噬细胞和与肿瘤相关的小噬细胞。

[0089] 在一些实施方案中,树枝状大分子可以具有暴露在外表面上的一部分羟基,而其它羟基在树枝状大分子的内核中。在优选的实施方案中,树枝状大分子的羟基(-OH)基团的体积密度为至少1个OH基团/ nm^3 (羟基基团的数量/以 nm^3 为单位的体积)。例如,在一些实施方案中,羟基的体积密度为2、3、4、5、6、7、8、9、10或大于10、15、20、25、30、35、40、45和50个

羟基/以 nm^3 为单位的体积。在一些实施方案中,羟基的体积密度为约4至约50个羟基/ nm^3 ,优选约5至约30个羟基/ nm^3 ,更优选约10至约20个羟基/ nm^3 。

[0090] B. 偶联剂和间隔基

[0091] 树枝状大分子复合物可以由与树枝状大分子、树枝状聚合物或超支化聚合物缀合或连接的治疗活性剂或化合物形成。任选地,活性剂通过一个或多个间隔基/连接基,通过不同的连接键,如二硫化物、酯、醚、碳酸酯、氨基甲酸酯、硫醇、硫酯、肼、酰肼、N-烷基、乙基和酰胺连接键,与树枝状大分子缀合。在一些实施方案中,树枝状大分子和试剂之间的一个或多个间隔基/连接基被设计成在体内提供树枝状大分子-活性复合物的可释放或不可释放形式。在一些实施方案中,通过在试剂和树枝状大分子之间提供酯键的合适间隔基发生连接。在一些实施方案中,通过在试剂和树枝状大分子之间提供酰胺或醚键的适当间隔基发生连接。在优选的实施方案中,加入树枝状大分子和试剂之间的一个或多个间隔基/连接基,以在体内实现所需的和有效的释放动力学。

[0092] 术语“间隔基”包括用于将治疗活性剂连接到树枝状大分子的部分和组合物。间隔基可以是单个化学实体,或者是两个或更多个连接在一起以桥接树枝状大分子和活性剂的化学实体。间隔基可以包括任何小的化学实体、具有巯基的肽或聚合物,硫代吡啶、琥珀酰亚胺基、马来酰亚胺、乙烯基砜和碳酸酯端基。

[0093] 间隔基可选自一类以巯基、硫代吡啶、琥珀酰亚胺基、马来酰亚胺、乙烯基砜和碳酸酯基为末端的化合物。间隔基可以包括硫代吡啶封端的化合物,例如二硫代二吡啶、N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二巯基)-丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚胺基6-(3-[2-吡啶基二巯基]-丙酰氨基)己酸酯LC-SPDP或磺基LC-SPDP。间隔基还可以包括肽,其中所述肽是基本上具有巯基的线性或环状肽,例如谷胱甘肽、高半胱氨酸、半胱氨酸及其衍生物、arg-gly-asp-cys(RGDC)、环(Arg-Gly-Asp-d-Phe-Cys)(c(RGDfc))、环(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Cys)和环(Arg-Ala-Asp-d-Tyr-Cys)。在一些实施方案中,间隔基包括巯基酸衍生物如3-巯基丙酸、巯基乙酸、4-巯基丁酸、硫杂环戊烷-2-酮(thiolan-2-one)、6-巯基己酸、5-巯基戊酸和其它巯基衍生物如2-巯基乙醇和2-巯基乙胺。在一些实施方案中,间隔基包括硫代水杨酸及其衍生物、(4-琥珀酰亚胺基氧基羰基-甲基- α -2-吡啶基巯基)甲苯、(3-[2-吡啶基巯基]丙酰肼)。在一些实施方案中,间隔基包括马来酰亚胺封端,其中间隔基包括聚合物或小的化学实体,例如双马来酰亚胺二甘醇和双马来酰亚胺三甘醇、双马来酰亚胺乙烷和双马来酰亚胺己烷。在一些实施方案中,间隔基包括乙烯基砜,例如1,6-己烷-双乙烯基砜。在一些实施方案中,间隔基包括硫苷类,例如硫代葡萄糖。在其它实施方案中,间隔基包括还原的蛋白质,例如牛血清白蛋白和人血清白蛋白,能够形成二硫键的任何巯基封端的化合物。在特定实施例中,间隔基包括具有马来酰亚胺、琥珀酰亚胺基和巯基末端的聚乙二醇。

[0094] 治疗活性剂、显像剂和/或靶向部分可以共价连接或分子内分散或包封。树枝状大分子优选为第1代(G1)、G2、G3、G4、G5、G6、G7、G8、G9或G10的PAMAM树枝状大分子,具有羧基、羟基或胺端基。在优选的实施方案中,树枝状大分子通过末端为醚或酰胺键的间隔基与活性剂连接。

[0095] 在一些实施方案中,与相同树枝状大分子/活性剂复合物的可释放形式相比,树枝状大分子/活性剂复合物的不可释放形式提供增强的治疗功效。因此,在一些实施方案中,一种或多种活性剂通过间隔基与树枝状大分子缀合,所述间隔基以不可释放的方式例如通

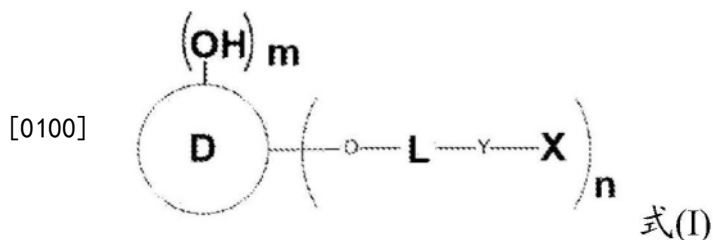
过醚或酰胺键与树枝状大分子连接。在一些实施方案中,一种或多种活性剂以不可释放的方式连接到间隔基上,例如通过醚或酰胺键。因此,在一些实施方案中,一种或多种活性剂通过连接在树枝状大分子上的间隔基连接到树枝状大分子上,并且以不可释放的方式连接到活性剂上。在一个示例性实施方案中,一种或多种活性剂通过间隔基与树枝状大分子连接,所述间隔基通过酰胺和/或醚键与树枝状大分子和活性剂连接。示例性的间隔基是聚乙二醇(PEG)。

[0096] 1. 树枝状大分子通过醚连接键与活性剂缀合

[0097] 在一些实施方案中,描述了组合物包括通过醚连接键与活性剂缀合的羟基封端的树枝状大分子,任选地具有一个或多个连接基/间隔基。

[0098] 在优选的实施方案中,树枝状大分子的表面基团和连接基或树枝状大分子和活性剂(如果缀合而没有任何连接部分)之间的共价键在体内条件下是稳定的,即当施用于受试者和/或完整地体内排出时可被最小程度地裂解。例如,在优选的实施方案中,总的具有活性剂的树枝状大分子复合物的小于10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%或小于0.1%在体内给药后24小时或48小时或72小时内裂解。在一个实施方案中,共价键是醚键。在进一步优选的实施方案中,树枝状大分子的表面基团和连接基之间的共价键,或树枝状大分子和活性剂之间的共价键(如果缀合而没有任何连接部分的话)不是可水解或可酶促裂解的键,例如酯键。

[0099] 在一些实施方案中,羟基封端的树枝状大分子的一个或多个羟基与一个或多个连接部分和一个或多个活性剂通过一个或多个醚键缀合,如下式(I)所示。



[0101] 其中D是第2代至第10代聚(酰胺基胺)(PAMAM)树枝状大分子;L是一个或多个连接部分或间隔基;X是活性剂或其类似物;n是从1到100的整数;m是从16到4096的整数;

[0102] Y是选自仲酰胺(-CONH-),叔酰胺(-CONR-),磺酰胺(-S(O)₂-NR-),仲氨基甲酸酯(-OCONH-;-NHCOO-),叔氨基甲酸酯(-OCONR-;-NRCOO-),碳酸酯(-O-C(O)-O-),脲(-NHCONH-;-NRCONH-;-NHCONR-;-NRCONR-),甲醇(-CHOH-;-CROH-),二硫化物基团、脎、酰肼和醚(-O-)的连接基,其中R是烷基、芳基或杂环基团。优选地,Y是在体内可最小裂解的键(bond)或连接键(linkage)。

[0103] 在优选的实施方案中,Y是仲酰胺(-CONH-)。

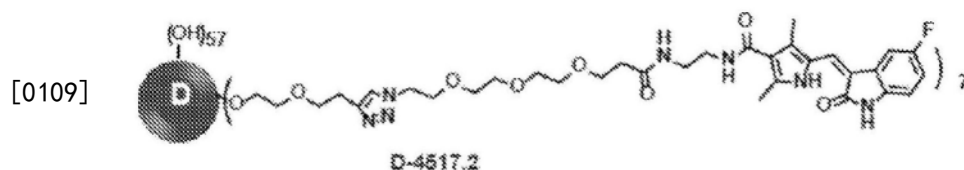
[0104] 在一个实施方案中,L和Y都不存在,D通过醚连接键直接与X(活性剂或其类似物)缀合。

[0105] 在一个实施方案中,D是第4代PAMAM树枝状大分子;L是一个或多个连接部分或间隔部分;X是STING激动剂、CSF1R抑制剂、PARP抑制剂、VEGFR酪氨酸激酶抑制剂、EGFR酪氨酸激酶抑制剂、MEK抑制剂、谷氨酰胺酶抑制剂、TIE II拮抗剂、CXCR2抑制剂、CD73抑制剂、精氨酸酶抑制剂、PI3K抑制剂、TLR4激动剂、TLR7激动剂、SHP2抑制剂、STING拮抗剂和JAK1抑制剂或其衍生物、类似物或前药;n约为5-15;m是约49-59的整数;其中n+m=64。

[0106] 在另一个实施方案中,D是第4代PAMAM树枝状大分子;L是一个或多个连接部分或间隔部分;X为N,N-二去乙基舒尼替尼;n约为5-15;m是约49-59的整数;其中 $n+m=64$ 。

[0107] 在一个优选的实施方案中,Y是仲酰胺(-CONH-)。

[0108] 在一个具体实施方案中,式I具有以下结构(也称为D-4517.2):



[0110] C. 活性剂

[0111] 待递送的树枝状大分子复合物中包括的试剂可以是蛋白质或肽、糖或碳水化合物、核酸或寡核苷酸、脂质、小分子(例如分子量小于2000道尔顿,优选小于1500道尔顿,更优选300-700道尔顿)或其组合。核酸可以是编码蛋白质的寡核苷酸,例如,DNA表达盒或mRNA。代表性的寡核苷酸包括siRNA、microRNA、DNA和RNA。在一些实施方案中,活性剂是治疗性抗体。

[0112] 树枝状大分子的优点在于,可以用相同的树枝状大分子递送多种治疗剂、预防剂和/或诊断剂。在一些实施方案中,一种或多种类型的活性剂被包封、复合或缀合到树枝状大分子上。在特定实施方案中,树枝状大分子以有效检测受试者中肿瘤的量共价连接到至少一个可检测部分。在一个实施方案中,树枝状大分子组合物具有多种试剂,例如化疗剂、免疫治疗剂、抗癫痫剂、减少肿胀的类固醇、抗生素、抗血管生成剂和/或诊断剂,其与树枝状大分子复合或缀合。

[0113] 在一些实施方案中,树枝状大分子与两种或多种不同类别的活性剂复合或缀合,在靶位点提供具有不同或独立释放动力学的同时递送。例如,将STING激动剂和CSF1R抑制剂均缀合到同一树枝状大分子上,以递送至靶细胞/组织。在另一个实施方案中,为了联合治疗,同时施用各自携带不同种类的活性剂的树枝状大分子复合物。在一个实施方案中,将第4代或第6代PAMAM树枝状大分子与舒尼替尼和CXCR2抑制剂或其类似物缀合。在另一个实施方案中,第4代或第6代PAMAM树枝状大分子与长春新碱和舒尼替尼或其类似物缀合。

[0114] 活性剂也可以是下述任何化合物的药学上可接受的前药。前药是在体内代谢时会转化为具有所需药理活性的化合物的化合物。前药可以通过用“前体部分”替代上述化合物中存在的适当官能团来制备,如H. Bundgaard, Design of Prodrugs (1985) 中所述。前药的实例包括上述化合物的酯、醚或酰胺衍生物、上述化合物的聚乙二醇衍生物、N-酰胺衍生物、二氢吡啶吡啶衍生物、与多肽缀合的含氨基衍生物、2-羟基苯甲酰胺衍生物、氨基甲酸酯衍生物、生物还原为活性胺的N-氧化物衍生物和N-曼尼希碱衍生物。关于前药的进一步讨论,参见例如Rautio, J.等人Nature Reviews Drug Discovery.7:255-270 (2008)。

[0115] 1. 免疫调节剂

[0116] 树枝状大分子复合物包括一种或多种作为免疫调节剂的治疗剂。术语“免疫调节剂”和“免疫治疗剂”是指引起作用于受体的免疫系统的特定作用的活性剂。免疫调节可以包括对针对抗原的先天或适应性免疫应答的一个或多个生理过程与对照相比的抑制、减少、增强、延长或刺激。通常,免疫调节剂可通过将一种或多种免疫细胞或细胞类型靶向靶位点来调节免疫微环境以产生所需的免疫应答(例如,增加抗肿瘤活性,或增加自身免疫疾

病中需要其的位点的抗炎活性),因此,不一定对任何癌症类型特异。在一些实施方案中,特异性递送免疫调节剂以杀死、抑制或减少抑制性免疫细胞如肿瘤相关巨噬细胞的活性或数量,从而在肿瘤部位增强抗肿瘤应答。在其它实施方案中,特异性递送免疫调节剂以杀死、抑制或减少促炎免疫细胞如M1巨噬细胞的活性或量,用于减少与自身免疫疾病相关的致病位点处的促炎免疫环境。

[0117] 与树枝状大分子一起使用的一些示例性免疫调节剂包括STING激动剂、集落刺激因子1受体(CSF1R)抑制剂、聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)抑制剂、VEGFR酪氨酸激酶抑制剂、EGFR酪氨酸激酶抑制剂、MEK抑制剂、谷氨酰胺酶抑制剂、TIE II拮抗剂、CXCR2抑制剂、CD73抑制剂、精氨酸酶抑制剂、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)抑制剂、Toll样受体4(TLR4)激动剂、TLR7激动剂和SHP2(含Src同源-2结构域的蛋白酪氨酸磷酸酶-2)抑制剂。在优选的实施方案中,与一种或多种STING激动剂、CSF1R抑制剂、PARP抑制剂、VEGFR酪氨酸激酶抑制剂、EGFR酪氨酸激酶抑制剂、MEK抑制剂、谷氨酰胺酶抑制剂、TIE II拮抗剂、CXCR2抑制剂、CD73抑制剂、精氨酸酶抑制剂、PI3K抑制剂、TLR4激动剂、TLR7激动剂、SHP2抑制剂或其组合缔合或缀合的树枝状大分子特别适合于靶向肿瘤区域中的一种或多种抑制性免疫细胞以及减少癌细胞的数量;减少肿瘤大小;抑制癌细胞向周围器官的浸润;抑制肿瘤转移;抑制肿瘤生长;和/或缓解与肿瘤/癌症相关的一种或多种症状。在一些实施方案中,与一种或多种免疫调节剂缔合或缀合的树枝状大分子与抗肿瘤疫苗和/或过继细胞疗法(ACT)组合用作佐剂,例如以增加先天免疫基因的表达、活化的效应T细胞的浸润和扩增、抗原铺展和持久的免疫应答。

[0118] 在一些实施方案中,免疫调节剂是靶向EGFR、ERBB2、VEGFRs、Kit、PDGFRs、ABL、SRC、mTOR中的一种或多种及其组合的任何抑制剂。在一些实施方案中,免疫调节剂是一种或多种抑制剂及其类似物,例如克唑替尼、色瑞替尼、艾乐替尼、布加替尼、博舒替尼、达沙替尼、伊马替尼、尼洛替尼、帕纳替尼、维莫非尼、达拉菲尼、依鲁替尼、帕博西尼、索拉非尼、瑞博西利、卡博替尼、吉非替尼、厄洛替尼、拉帕替尼、凡德他尼、阿法替尼、奥希替尼、鲁索替尼、托法替尼、曲美替尼、阿昔替尼、仑伐替尼、尼达尼布、帕唑帕尼、瑞格拉非尼、索拉非尼、舒尼替尼、凡德他尼、博舒替尼、达沙替尼、达克替尼、帕纳替尼和其组合。在一些实施方案中,免疫调节剂是酪氨酸激酶抑制剂如HER2抑制剂、EGFR酪氨酸激酶抑制剂。示例性的EGFR酪氨酸激酶抑制剂包括吉非替尼、厄洛替尼、阿法替尼、达克替尼和奥希替尼。

[0119] 其它免疫调节剂可包括一种或多种对一种或多种免疫细胞有毒的细胞毒性剂,因此可杀死/抑制一种或多种类型的抑制性免疫细胞。当选择性地递送至靶免疫细胞(例如与树枝状大分子缀合)时,这些试剂能够选择性地杀死抑制性免疫细胞或促炎性免疫细胞,从而改变肿瘤中和肿瘤周围或自身免疫性疾病中受影响的病理部位中和病理部位周围的免疫微环境。细胞毒性免疫调节剂包括澳瑞他汀E和Mertansine。

[0120] STING激动剂

[0121] 在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种STING激动剂缀合或复合。干扰素基因刺激因子(STING)是一种胞质受体,可感知外源性和内源性胞质环状二核苷酸(CDN),激活TBK1/IRF3(干扰素调节因子3)、NF- κ B(核因子 κ B)和STAT6(信号转导和转录激活因子6)信号通路,从而诱导稳健的I型干扰素和促炎细胞因子应答。在癌症小鼠模型中,需要STING来诱导抗肿瘤CD8⁺T反应。在肿瘤微环境中,T细胞、内皮细胞和成纤维细胞在STING激

动剂离体刺激下产生I型IFN(Corrales,等人,Cell Rep(2015) 11(7):1018-30)。相比之下,大多数研究表明肿瘤细胞能够抑制STING通路的激活,从而在癌变过程中潜在地导致免疫规避(He,等人,Cancer Lett(2017) 402:203-12;Xia,等人,Cancer Res(2016) 76(22):6747-59)。例如,有证据表明STING途径的激活与涉及I型IFN基因表达的自发性抗肿瘤T细胞应答的诱导相关(Chen,等人,Nat Immunol(2016) 17(10):1142-9;Barber,等人,Nat Rev Immunol(2015) 15(12):760-70;Woo,等人,Immunity(2014) 41(5):830-42)。此外,宿主STING途径是DC介导的肿瘤-Ag特异性CD8⁺T细胞的有效交叉启动所必需的(Woo,等人,Immunity(2014) 41(5):830-42;Deng,等人,Immunity(2014) 41(5):843-52)。基于这些结果,已经探索了直接药理学刺激STING途径作为癌症疗法。

[0122] 此外,正在探索将STING免疫疗法与其他免疫调节剂相结合的策略。在黑色素瘤和结肠癌小鼠模型中,通过瘤内注射环二核苷酸GMP-AMP(cGAMP)强制激活STING,有效增强了抗肿瘤CD8⁺T应答,导致注射肿瘤和对侧肿瘤的生长控制。当与抗程序性死亡-1(PD-1)和抗细胞毒性T淋巴细胞相关-4(CTLA-4)抗体(Demaria,等人,Proc Natl Acad Sci US A(2015) 112(50):15408-13)联合用药时,cGAMP触发抗肿瘤免疫的能力进一步增强。在其他研究中,在鳞状细胞癌模型和黑素瘤模型的小鼠模型中,环二核苷酸(CDN)与抗程序性死亡-L1阻断抗体一起激发了比单一疗法强得多的抗肿瘤效应(Gadkaree,等人,Head Neck(2017) 39(6):1086-94;Wang,et al.,Proc Natl Acad Sci US A(2017) 114(7):1637-42)。Luo等人通过将STING激活纳米疫苗与抗PD1抗体相结合,显示出令人鼓舞的结果,这导致在TC-1肿瘤模型中产生长期抗肿瘤记忆(Luo,等人,Nat Nanotechnol(2017) 12(7):648-54)。

[0123] 当与肿瘤疫苗联合使用时,STING激动剂也可增强抗肿瘤反应。用称为STINGVAX的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子产生细胞癌症疫苗配制的CDN配体在几种已建立的癌症模型中显示出强的体内治疗效力(Fu,等人,Sci Transl Med(2015) 7(283):283ra52),并且STING激动剂与传统化疗剂或放疗组合可触发抗肿瘤应答(Xia,等人,Cancer Res(2016) 76(22):6747-59;Baird,等人,Cancer Res(2016) 76(1):50-61)。

[0124] DMXAA(也称为Vadimezan或ASA404)靶向STING途径。DMXAA的抗肿瘤活性与其诱导多种细胞因子和趋化因子的能力有关,包括TNF- α 、IP-10、IL-6和RANTES。DMXAA也是IFN- β 的强效诱导剂。

[0125] 因此,在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种STING激动剂或其类似物缔合或缀合。示例性STING激动剂包括环二核苷酸,如2'3'环鸟苷一磷酸-腺苷一磷酸(cGAMP)和DMXAA。STING激动剂可以被官能化,例如,用醚、酯或酰胺连接键,任选地用一个或多个间隔基/连接基,以便于与树枝状大分子缀合和/或用于所需的释放动力学。例如,可以将DMXAA修饰为DMXAA类似物,如DMXAA酯、DMXAA醚或DMXAA酰胺。在优选实施方案中,所述STING激动剂或其衍生物、类似物或前药通过Cu(I)催化的炔烃-叠氮化物点击或硫醇-烯点击化学与树枝状大分子缀合,任选通过一个或多个间隔基/连接基如聚乙二醇(PEG)。图1显示了STING激动剂(例如DMXAA)与树枝状大分子(例如第4代或第6代PAMAM树枝状大分子)的示例性缀合。

[0126] 在优选的情况下,包括一种或多种STING激动剂的树枝状大分子复合物以有效诱导/增强肿瘤浸润APC(例如,CD11c⁺CD11b⁻或CD11c⁺CD11b⁺细胞)产生IFN- β 、抑制肿瘤生长、减小肿瘤大小、增加长期存活率、改善对免疫检查点阻断的应答和/或诱导保护免受肿

瘤再攻击的免疫记忆的量给药。

[0127] 集落刺激因子1受体 (CSF1R) 抑制剂

[0128] 在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种CSF1R抑制剂缀合或复合。CSF1R属于III型蛋白酪氨酸激酶受体家族,且CSF1或最近鉴定的配体IL-34的结合,诱导受体同二聚化,随后激活受体信号(Achkova D, Maher J. *Biochem Soc Trans.* (2016) 44:333--41)。CSF1受体(CSF1R)介导的信号传导对单核巨噬细胞系统特别是巨噬细胞的分化和存活至关重要(Stanley ER, Chitu V. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2014), 6(6))。由于肿瘤内CSF1R+巨噬细胞的存在与各种肿瘤类型的存活率低相关(Pedersen MB, 等人, *Histopathology.* (2014), 65:490-500; Zhang QW等人, *PLoS One.* (2012), 7:e50946),在促瘤TAM中靶向CSF1R信号是消除或复极这些细胞的有吸引力的策略。除TAM外,还可在肿瘤微环境中的其他髓系细胞(如树突状细胞、中性粒细胞和髓系来源的抑制细胞(MDSC))上检测到CSF1R表达。

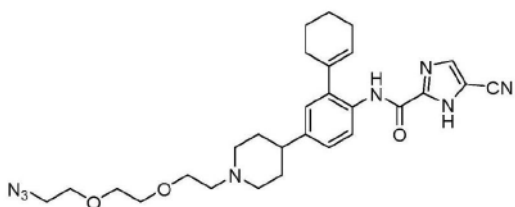
[0129] 针对CSF1R或其配体CSF1的多种小分子和单克隆抗体(mAbs)正在临床开发中,它们都作为单一疗法和与标准治疗形式如化疗以及其它癌症免疫疗法的组合。在小分子类别中,pexidainib(plx 3397),一种CSF1R、cKIT、突变型fms样酪氨酸激酶3 (FLT3) 和血小板衍生长因子受体(PDGFR)- β 的口服酪氨酸激酶抑制剂,是单一疗法中最广泛的临床开发项目的研究对象,已完成或正在进行c-kit突变黑色素瘤、前列腺癌、成胶质细胞瘤(GBM)、经典型霍奇金淋巴瘤(cHL)、神经纤维瘤、肉瘤和白血病的研究。其他靶向CSF1R的小分子,包括ARRY-382、PLX7486、BLZ945和JNJ-40346527,目前正在实体瘤和cHL中进行研究。临床开发中的单克隆抗体包括emactuzumab (RG7155)、AMG820、IMC-CS4 (LY3022855)、cabiralizumab、MCS110和PD-0360324,后两种是靶向配体CSF1的化合物。短语“CSF1R抑制剂”是受体和配体靶向化合物的总称。

[0130] 因此,在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种用于降低或抑制CSF1R信号通路活性的试剂如一种或多种CSF1R抑制剂或一种或多种靶向配体CSF1的化合物缔合或缀合。在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种小分子CSF1R抑制剂或其类似物缔合或缀合。示例性小分子CSF1R抑制剂参见Current Medicinal Chemistry, 2019, 26, 1-23。靶向CSF1R的示例性小分子包括pexidatinib(plx 3397, PLX108-01)、ARRY-382、PLX7486、BLZ945、JNJ-40346527,和GW 2580。小分子CSF1R抑制剂可以被官能化,例如用醚、酯或酰胺连接键,任选地用一个或多个间隔基/连接基,以便于与树枝状大分子缀合和/或用于所需的释放动力学。在优选的实施方案中,小分子CSF1R抑制剂或其衍生物、类似物或前药通过Cu(I)催化的炔烃-叠氮化物点击或硫醇-烯点击化学与树枝状大分子缀合,任选地通过一个或多个间隔基/连接基如聚乙二醇(PEG)。

[0131] 适合与树枝状大分子缀合的示例性CSF1R靶向小分子或其类似物的化学结构如下所示:

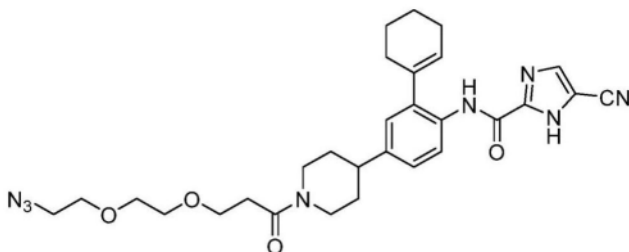
[0132] 结构I:CSF1R抑制剂1的化学结构

[0133]



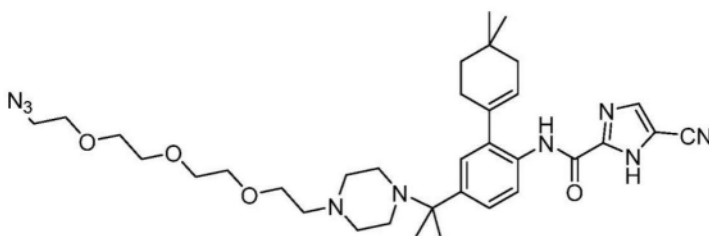
[0134] 结构II:CSF1R抑制剂2的化学结构

[0135]



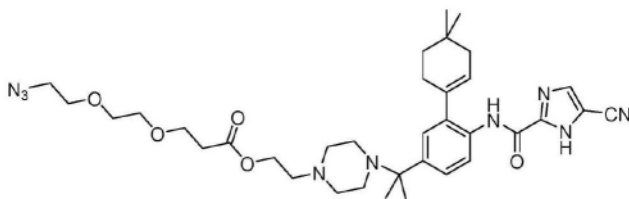
[0136] 结构III:CSF1R抑制剂3的化学结构

[0137]



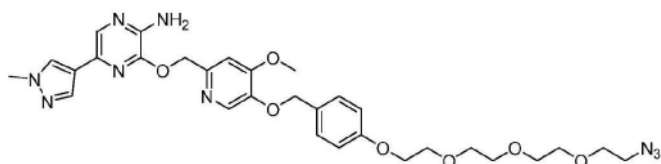
[0138] 结构IV:CSF1R抑制剂4的化学结构

[0139]



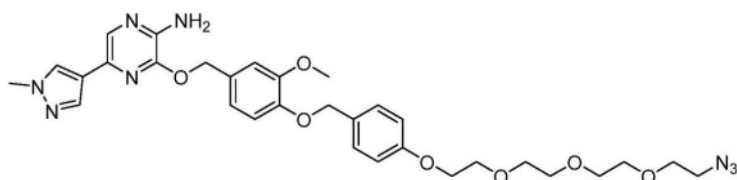
[0140] 结构V:CSF1R抑制剂5的化学结构

[0141]

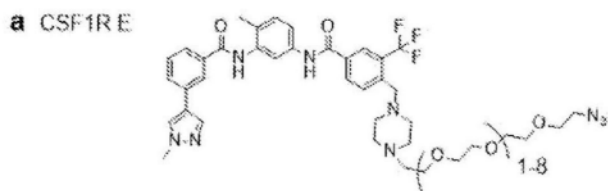


[0142] 结构VI:CSF1R抑制剂6的化学结构

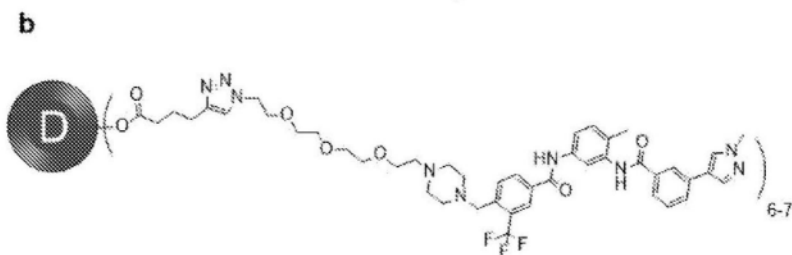
[0143]



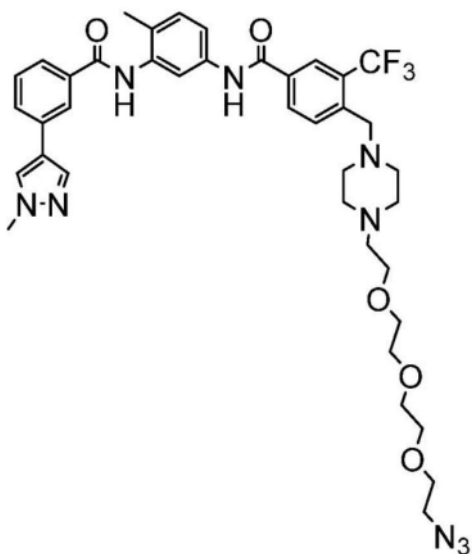
[0144] 结构VII a-b: (a) CSF1R-E类似物和 (b) 树枝状大分子缀合的CSF1R-E的化学结构



[0145]



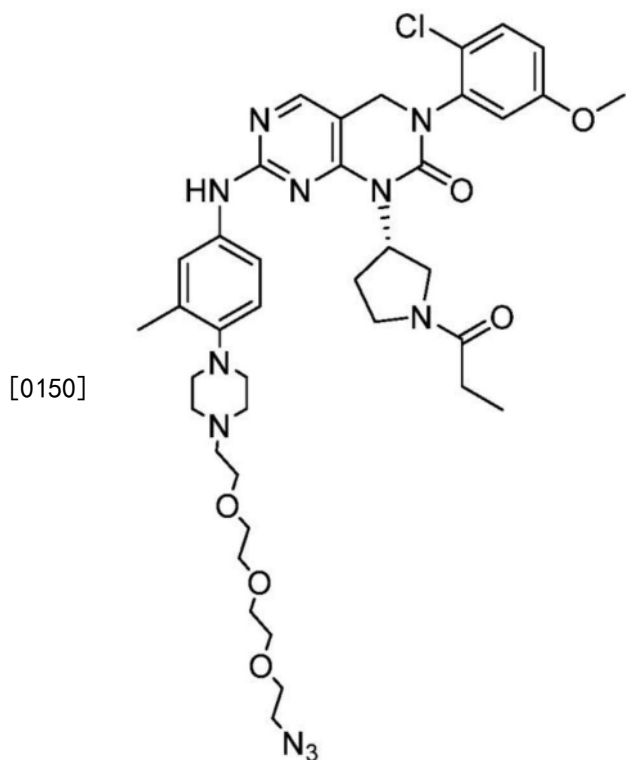
[0146] 结构VIII:CSF1R-E类似物1的化学结构



[0147]

[0148] CSF1R-E类似物1 (结构VIII) 的结合亲和力约为13nm, 树枝状大分子缀合的CSF1R-E类似物1 (例如通过炔烃-叠氮化物点击化学) 的结合亲和力约为200nm。因此, 在优选的实施方案中, CSF1R抑制剂使用或不使用间隔基与树枝状大分子以使对CSF1R的结合亲和力的降低最小化 (例如, 小于1倍, 2倍, 3倍, 4倍, 5倍, 10倍, 20倍, 30倍, 40倍, 50倍, 或100倍) 的方式缀合。

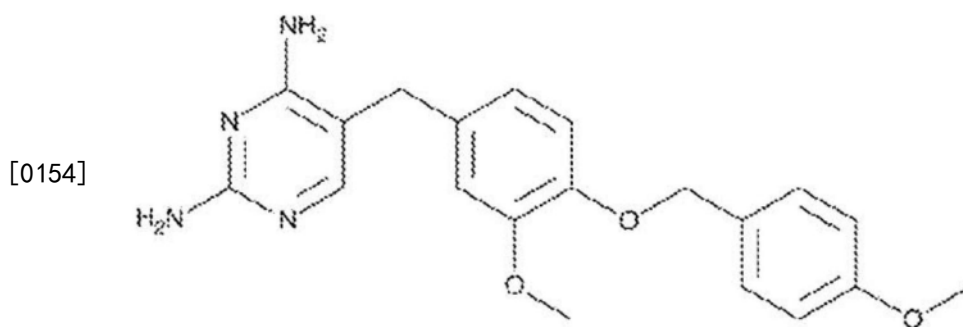
[0149] 结构IX:CSF1R抑制剂F的化学结构



[0151] 靶向CSF1R的单克隆抗体的示例包括emactuzumab (RG7155)、AMG820、IMC-CS4 (LY3022855) 和cabiralizumab。示例性单克隆抗体靶向配体CSF1MCS110和PD-0360324。

[0152] 在优选的实施方案中,树枝状大分子与CSF1R的一种或多种酪氨酸激酶抑制剂如GW2580 (显示为结构X) 缀合。CSF1R抑制剂可以被官能化,例如用醚、酯或酰胺连接键,任选地用一个或多个间隔基/连接基,以便于与树枝状大分子缀合和/或用于所需的释放动力学。例如,可以将GW2580修饰为GW2580类似物,包括GW2580醚、GW2580酯和GW2580酰胺。在优选的实施方案中,GW2580或其衍生物、类似物或前药通过Cu(I)催化的炔烃-叠氮化物点击或硫醇-烯点击化学与树枝状大分子缀合,任选地通过一个或多个间隔基/连接基如聚乙二醇(PEG)。图2A和2B显示了使CSF1R抑制剂(例如GW2580)与树枝状大分子缀合的示例性策略。

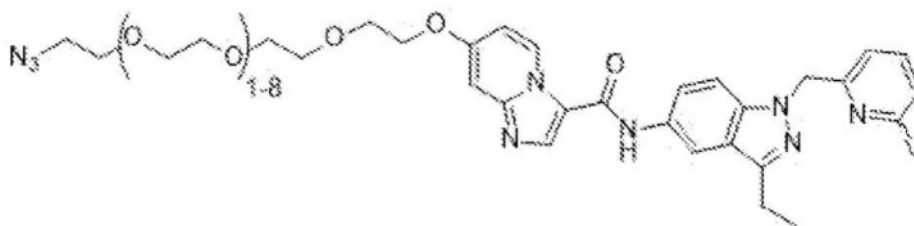
[0153] 结构X:GW2580的化学结构



[0155] 在一个实施方案中,树枝状大分子与具有以下结构的CSF1R抑制剂或其类似物缀合。

[0156] 结构XI:AR004的化学结构

[0157]



[0158] 图15所示为与AR004缀合的树枝状大分子的合成路线。

[0159] 聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)抑制剂

[0160] 在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种PARP抑制剂缀合或复合。聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)是一个由17种核蛋白组成的家族,其特征是有一个共同的催化位点,利用NAD⁺作为辅因子将ADP-核糖基团转移到特定的受体蛋白上。聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)抑制剂奥拉帕尼(C₂₄H₂₃FN₄O₃)是临床实践中引入的第一种PARP抑制剂。尼拉帕尼是PARP-1和PARP-2的强效选择性抑制剂。卢卡帕尼是一种强效PARP抑制剂,于2016年12月获得FDA批准,由EMA于2018年5月批准作为单一药物用于在接受gBRCAm或sBRCAm治疗,在至少两个化疗方案后复发的HGSOC患者中治疗。

[0161] 在一些实施方案中,树枝状大分子复合物包括一种或多种PARP抑制剂,例如奥拉帕尼、尼拉帕尼和卢卡帕尼。PARP抑制剂可以被官能化,例如用醚、酯或酰胺连接键,任选地用一个或多个间隔基/连接基,以便于与树枝状大分子缀合和/或用于所需的释放动力学。在优选的实施方案中,PARP抑制剂或其衍生物、类似物或前药通过Cu(I)催化的炔烃-叠氮化物点击或硫醇-烯点击化学,任选地通过一个或多个间隔基/连接基如聚乙二醇(PEG)与树枝状大分子缀合。

[0162] VEGFR酪氨酸激酶抑制剂

[0163] 在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种VEGF酪氨酸激酶抑制剂缀合。酪氨酸激酶是重要的细胞信号蛋白,具有细胞增殖和迁移等多种生物学活性。血管生成涉及多种激酶,包括血管内皮生长因子受体(VEGFR)等受体酪氨酸激酶。临床开发的抗血管生成酪氨酸激酶抑制剂主要针对VEGFR-1、-2、-3、表皮生长因子受体(EGFR)、血小板衍生生长因子受体(PDGFR)、PDGFR-β、KIT、fms相关酪氨酸激酶3(FLT3)、集落刺激因子-1受体(CSF-1R)、Raf和RET。

[0164] VEGFR家族包括三种相关的受体酪氨酸激酶,称为VEGFR-1、-2和-3,它们介导VEGF配体的血管生成作用(Hicklin DJ, Ellis LM. J Clin Oncol. (2005), 23(5):1011-27)。哺乳动物基因组中编码的VEGF家族包括五个成员:VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D和胎盘生长因子(PlGF)。VEGFs是内皮细胞增殖和迁移的重要刺激因子。VEGF-A(通常称为VEGF)是肿瘤血管生成的主要介质,并通过VEGF-2(主要的VEGF信号受体)发出信号(Kerb R, S, N Engl J Med. (2008), 358(19):2039-49)。

[0165] 最著名的血管生成抑制剂是针对血管内皮生长因子信号通路的,如单克隆抗体贝伐单抗(Avastin, Genentech/Roche)和两种激酶抑制剂舒尼替尼(SU11248, Sutent, Pfizer)和索拉非尼(BAY43-9006, Nexavar, Bayer)。贝伐单抗是临床上批准的第一种血管生成抑制剂,最初用于治疗结肠直肠癌,最近也用于治疗乳腺癌和肺癌。小分子酪氨酸激酶抑制剂舒尼替尼和索拉非尼靶向VEGF受体(VEGFR),主要是VEGFR-2,已在多种癌症类型中显示出临床疗效。两种药物在肾细胞癌患者中均显示出获益(Motzer RJ, Bukowski RM,

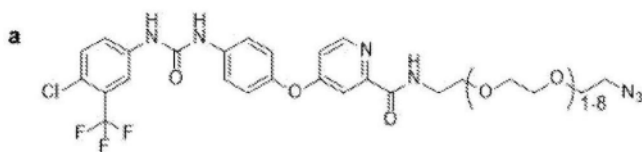
JClin Oneal. (2006);24 (35):5601-8).此外,舒尼替尼已被批准用于治疗胃肠道间质瘤(GISTs)。索拉非尼还可抑制Raf丝氨酸激酶,并已被批准用于治疗肝细胞癌。西地尼布是一种VEGF受体(VEGFR)的口服酪氨酸激酶抑制剂。

[0166] 在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种VEGF受体抑制剂缀合,包括舒尼替尼(SU11248; **SUTENT®**),索拉非尼(BAY439006; **NEXAVAR®**),帕唑帕尼(GW786034; **VOTRIENT®**),凡德他尼(ZD6474; **ZACTIMA®**)、阿昔替尼(AG013736)、西地尼布(AZD2171; **RECENTIN®**),瓦他拉尼(PTK787; ZK222584),达沙替尼、尼达尼布和莫特塞尼(AMG706)或其类似物。

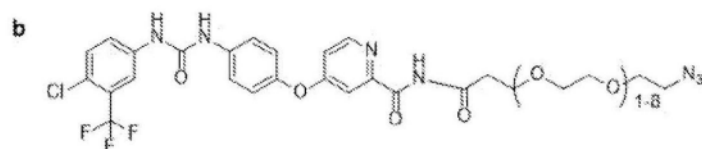
[0167] 在一些实施方案中,VEGF受体抑制剂可以用一个或多个间隔基/连接基官能化,例如用醚、酯或酰胺连接键官能化,任选地用一个或多个间隔基/连接基,以易于与树枝状大分子缀合和/或用于所需的释放动力学。在优选的实施方案中,一种或多种VEGF受体抑制剂或其衍生物、类似物或前药通过Cu(I)催化的炔炔-叠氮化物点击或硫醇-烯点击化学,任选地通过一个或多个间隔基/连接基如聚乙二醇(PEG)与树枝状大分子缀合。例如,舒尼替尼可以修饰为具有酯连接键或酰胺连接键的舒尼替尼(图3A和3B)。VEGF受体抑制剂(例如舒尼替尼)与树枝状大分子的示例性缀合示于图3A(通过羟甲基连接键)和3B(通过酰胺连接键)。在一个实施方案中,舒尼替尼类似物是N,N'-二去乙基舒尼替尼。

[0168] 下面结构XII、结构XIII和结构XIV中显示了具有官能性间隔基/连接键的示例性VEGF受体抑制剂类似物。

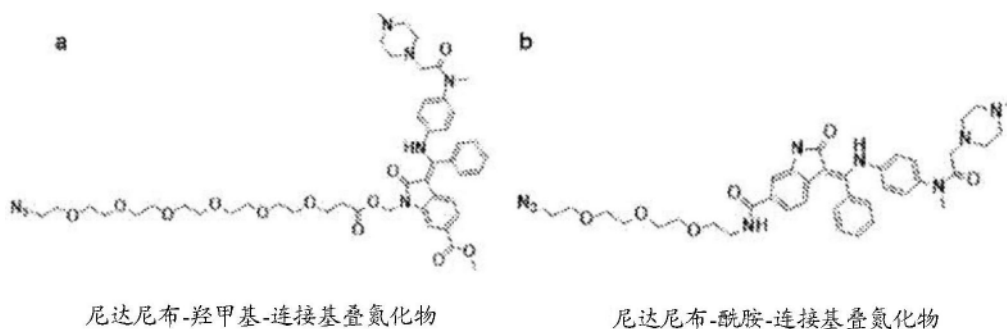
[0169] 结构XII a-b:索拉非尼类似物的化学结构



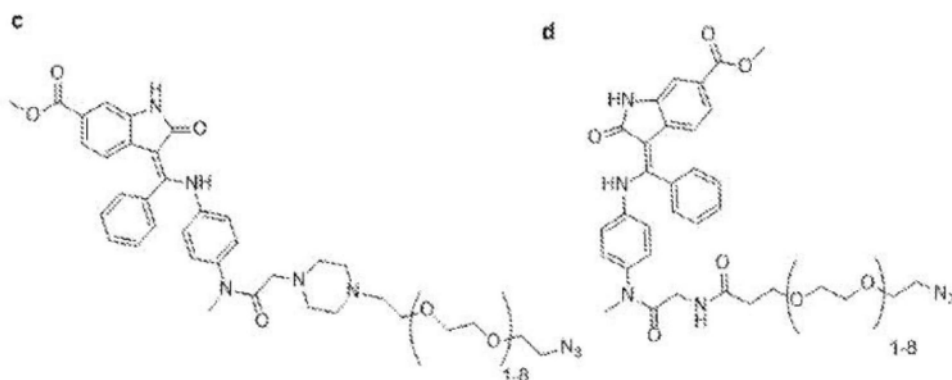
[0170]



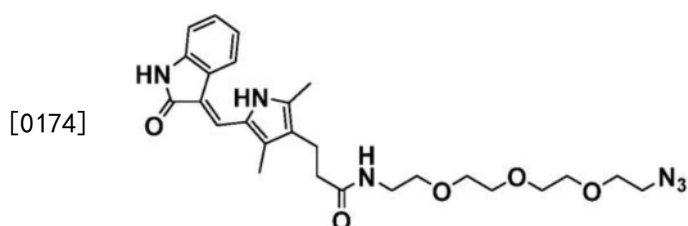
[0171] 结构XIII a-d:尼达尼布和类似物的化学结构



[0172]



[0173] 结构XIV: orantinib类似物的化学结构



[0175] Orantinib-酰胺-连接基叠氮化物

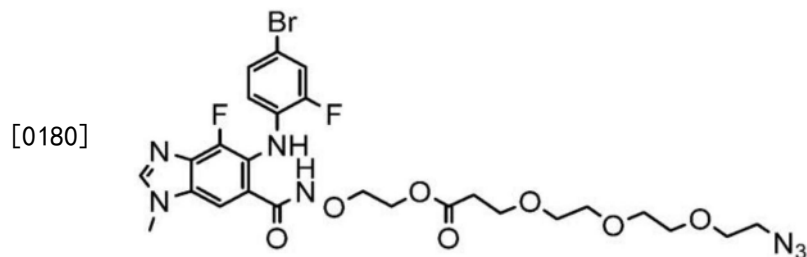
[0176] MEK抑制剂

[0177] 在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种MEK抑制剂缀合或复合。促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联反应是人类癌细胞存活、扩散和抵抗药物治疗的关键途径。MAPK/ERK(细胞外信号调节激酶)通路是一个汇聚性信号节点,接收来自多种刺激的输入,包括内部代谢应激和DNA损伤通路、改变的蛋白质浓度,以及通过来自外部生长因子、细胞-基质相互作用和来自其他细胞的通讯的信号。

[0178] 在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种MEK抑制剂缀合,例如瑞法替尼、派吗色替(pimasertib)、曲美替尼(GSK1120212)、考比替尼(或XL518)、比美替尼(MEK162)、司美替尼、CI-1040(PD-184352)、PD325901、PD035901、PD032901和TAK-733或其类似物。在优选的实施方案中,MEK抑制剂被官能化,例如用醚、酯或酰胺连接键,任选地用一个或多个间隔基/连接基,以易于与树枝状大分子缀合和/或用于所需的释放动力学。在优选的实施方案中,MEK抑制剂或其衍生物、类似物或前药通过Cu(I)催化的炔烃-叠氮化物点击或硫醇-烯点击化学与树枝状大分子缀合,任选地通过一个或多个间隔基/连接基如聚乙二醇(PEG)。例如,可以将比美替尼修饰为比美替尼酯、比美替尼醚或比美替尼酰胺;可以将曲美替尼修饰为曲美替尼醚、曲美替尼酯或曲美替尼酰胺;派吗色替可以修饰为派吗色替酯和

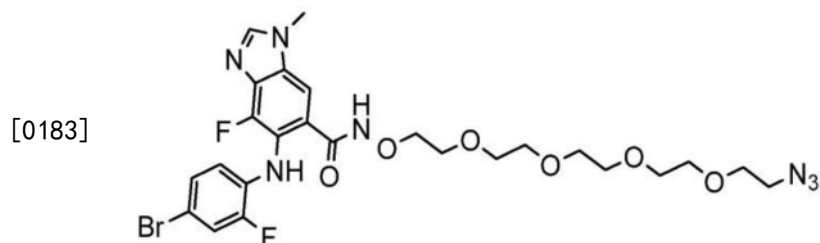
派吗色替醚等。示例性MEK抑制剂及其类似物如下所示：通过酯连接键(结构XV)和醚连接键(结构XVI)用PEG连接基和叠氮化物基团官能化的比美替尼；通过酰胺连接键用PEG连接基和叠氮化物基团官能化的曲美替尼类似物(结构XVII)；和通过酯连接键用PEG连接基和叠氮化物基团官能化的派吗色替类似物(结构XVIII)。

[0179] 结构XV：比美替尼类似物1的化学结构



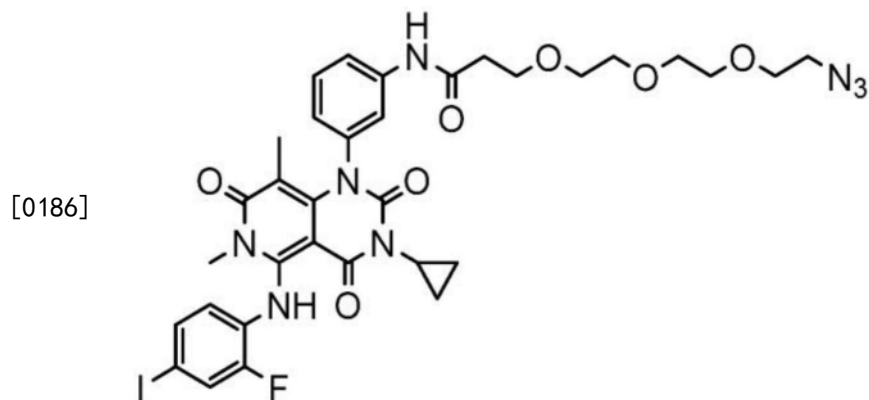
[0181] 比美替尼-酯连接基

[0182] 结构XVI：比美替尼类似物2的化学结构



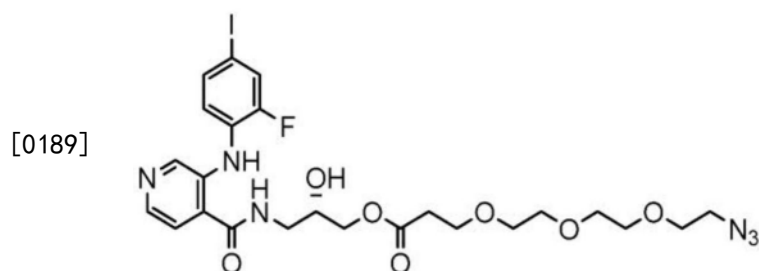
[0184] 比美替尼-醚连接基

[0185] 结构XVII：曲美替尼类似物的化学结构



[0187] 曲美替尼-酰胺-连接基

[0188] 结构XVIII：派吗色替类似物的化学结构



[0190] 派吗色替-酯连接基

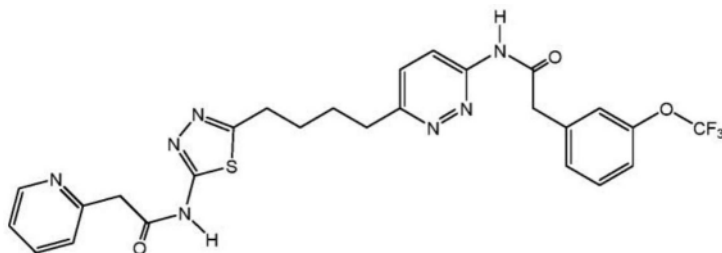
[0191] 谷氨酰胺酶抑制剂

[0192] 在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种谷氨酰胺酶抑制剂缀合或复合。谷氨酰胺酶 (GLS) 负责将谷氨酰胺转化为谷氨酸,在上调肿瘤细胞生长的细胞代谢中发挥重要作用。谷氨酰胺酶抑制剂的示例包括双-2-(5-苯基乙酰亚氨基-1,2,4-噻二唑-2-基)乙基硫醚 (BPTES)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸 (DON)、氮杂丝氨酸、阿西维辛和CB-839。在一些实施方案中,谷氨酰胺酶抑制剂是BPTES类似物,如JHU-198、JHU-212和JHU-329 (Thomas AG等人,Biochem Biophys Res Commun. (2014) ;443 (1) :32-36)。

[0193] 在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种谷氨酰胺酶抑制剂缀合,例如BPTES、DON、氮杂丝氨酸、阿西维辛、CB-839、JHU-198、JHU-212和JHU-329。谷氨酰胺酶抑制剂可以例如用醚、酯或酰胺连接键官能化,任选地用一个或多个间隔基/连接基,以易于与树枝状大分子缀合和/或用于所需的释放动力学。在优选的实施方案中,谷氨酰胺酶抑制剂或其衍生物、类似物或前药通过Cu (I) 催化的炔烃-叠氮化物点击或硫醇-烯点击化学与树枝状大分子缀合,任选地通过一个或多个间隔基/连接基如聚乙二醇 (PEG)。在优选的实施方案中,树枝状大分子与CB-839、或其衍生物、类似物或前药、或其药理学活性盐缀合。CB-839具有以下结构:

[0194] 结构XIX:CB-839的化学结构

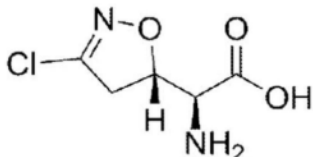
[0195]



[0196] 在一些实施方案中,树枝状大分子与谷氨酰胺类似物或拮抗剂L-[α S,5S]- α -氨基-3-氯-4,5-二氢-5-异噻唑乙酸 (阿西维辛) 或其衍生物、类似物或前药或药理学活性盐缀合。阿西维辛的化学结构如结构XX所示。

[0197] 结构XX:

[0198]



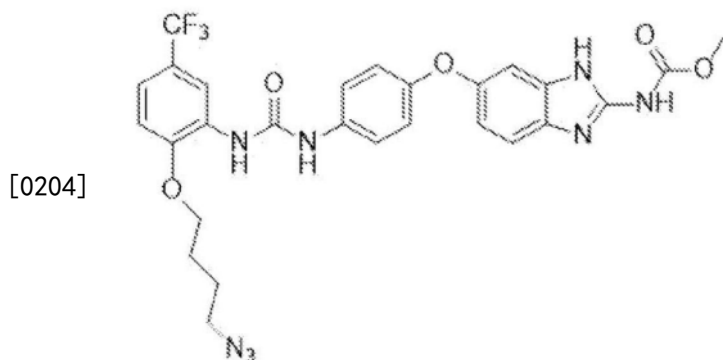
[0199] 阿西维辛一直是癌症治疗临床试验的主题。剂量和制剂是本领域已知的,参见,例如Hidalgo,Clinical Cancer Research,4 (11) :2763-2770 (1998),美国专利3,856,807、3,878,047和5,087,639。在一个实施方案中,树枝状大分子与阿西维辛缀合。在优选的实施方案中,在与树枝状大分子缀合之前,阿西维辛被官能化,例如用醚、酯、N-烷基或酰胺连接键,任选地用一个或多个间隔基/连接基如聚乙二醇 (PEG)。

[0200] TIE II拮抗剂

[0201] 在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种TIE II拮抗剂复合或缀合。血管生成素-1受体也被称为CD202B (分化簇202B),或TIE II,是一种由TEK基因编码的人类蛋白。它是一种血管生成素受体。血管生成素是血管形成 (血管生成) 所需的蛋白质生长因子,支持肿瘤的生长和发展。因此,在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种TIE拮抗剂缀合。

[0202] TIE II拮抗剂可以被官能化,例如,用醚、酯或酰胺连接键,任选地用一个或多个间隔基/连接基,以便于与树枝状大分子缀合和/或用于所需的释放动力学。示例性TIE II抑制剂的化学结构如结构XXI所示。游离TIE II拮抗剂的TIE II抑制作用的解离常数 K_d 约为8.8nM,树枝状大分子缀合的TIE II拮抗剂(结构XXI)的TIE II抑制作用的解离常数 K_d 约为25nM。因此,在优选的实施方案中,将TIE II拮抗剂使用或不使用间隔基与树枝状大分子以使TIE II抑制的降低最小化(例如,小于1倍,2倍,3倍,4倍,5倍,10倍,20倍,30倍,40倍,50倍和100倍)的方式缀合。

[0203] 结构XXI:TIE II拮抗剂1



[0205] 在一些实施方案中,树枝状大分子与两种或更多种不同类别的活性剂复合或缀合,在靶位点提供具有不同或独立释放动力学的同时递送。在一个实施方案中,将第4代或第6代PAMAM树枝状大分子与TIE II抑制剂和吉西他滨或其类似物缀合。在另一个实施方案中,将第4代或第6代PAMAM树枝状大分子与TIE II抑制剂和卡培他滨或其类似物缀合。与两种或更多种不同类别的活性剂缀合的树枝状大分子的示例性合成路线示于图13A-13C。

[0206] CXCR2抑制剂

[0207] 在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种CXCR2抑制剂缔合或缀合。CXCR2由多种肿瘤细胞表达,并参与不同癌症临床前模型的化疗耐药性(Poeta VM等人,Front Immunol.2019;10:379)。在乳腺癌细胞中,CXCR2缺失导致对紫杉醇的应答更好。在黑色素瘤模型中,CXCR2抑制剂那伐立辛(Navarixin)与MEK抑制协同;而在卵巢肿瘤模型中,CXCR2抑制剂SB225002改善了索拉非尼的抗血管生成治疗。在人胃癌模型中,瑞帕立辛(Reparixin)一种CXCR1和CXCR2抑制剂,可增强5-氟尿嘧啶的疗效。

[0208] CXCR2靶向还会抑制肿瘤生长,因为它会影响骨髓细胞浸润。在胰腺肿瘤中,CXCR2抑制可防止中性粒细胞聚集,释放T细胞应答,从而抑制转移扩散并改善抗PD-1应答。有趣的是,CXCR2和CCR2抑制剂联合治疗限制了TAM的代偿性反应,增加了抗肿瘤免疫,并改善了对FX的反应。最后,在前列腺癌模型中,SB265610对CXCR2的抑制减少了骨髓细胞的募集,增强了多西他赛诱导的衰老,从而限制了肿瘤的生长。

[0209] 因此,在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种CXCR2抑制剂缔合或缀合,所述一种或多种CXCR2抑制剂例如那伐立辛(navarixin)、SB225002、SB332235、SB265610、瑞帕立辛和AZD5069。在优选的实施方案中,树枝状大分子与那伐立辛、SB225002或SB332235,或其衍生物、类似物或前药、或其药理学活性盐缀合。CXCR2抑制剂可以被官能化,例如用醚、酯、N-烷基或酰胺连接键,以便于与树枝状大分子缀合和/或用于所需的释放动力学。在一些实施方案中,CXCR2抑制剂使用点击化学通过N-烷基连接键与树枝状大分子

缀合。

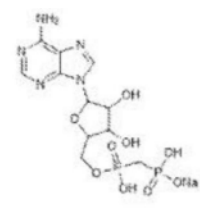
[0210] CD73抑制剂

[0211] 在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种CD73抑制剂缀合或复合。CD73将细胞外一磷酸腺苷 (AMP) 转化为免疫抑制性腺苷,从而关闭T细胞和自然杀伤 (NK) 细胞、树突状细胞 (DC)、髓源性抑制细胞 (MDSC) 和肿瘤相关巨噬细胞 (TAM) 水平的抗肿瘤免疫监测。在癌症中,肿瘤细胞和肿瘤间质细胞中CD73表达的上调会导致腺苷生成的增加,从而抑制T细胞和NK细胞的细胞毒性、细胞因子的生成和增殖以及抗原呈递细胞 (APC) 的抑制;调节性T细胞 (Treg) 增殖和抑制活性增强,以及MDSCs和巨噬细胞M2极化。这些变化导致肿瘤生长和疾病进展。

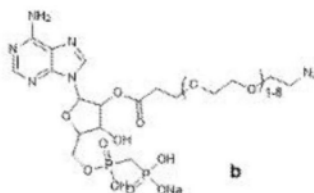
[0212] 因此,在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种CD73抑制剂缀合,例如不可水解的AMP类似物,例如5' - (α , β -亚甲基) 二磷酸腺苷 (APCP))、基于类黄酮的化合物,例如槲皮素,以及嘌呤核苷酸类似物,例如替诺福韦和磺酸化合物。在优选的实施方案中,树枝状大分子与一种或多种CD73抑制剂缀合,所述CD73抑制剂包括APCP、槲皮素或替诺福韦,或其衍生物、类似物或前药,或其药理学活性盐。CD73抑制剂可以被官能化,例如用醚、酯或酰胺连接键,任选地用一个或多个间隔基/连接基,以便于与树枝状大分子缀合和/或用于期望的释放动力学。在优选的实施方案中,CD73抑制剂或其衍生物、类似物或前药通过Cu (I) 催化的炔烃-叠氮化物点击或硫醇-烯点击化学与树枝状大分子缀合。

[0213] 在一些实施方案中,具有如下结构XXII a-i和结构XXIII a-c所示结构的一种或多种CD73抑制剂和/或其衍生物或类似物适合与树枝状大分子缀合。

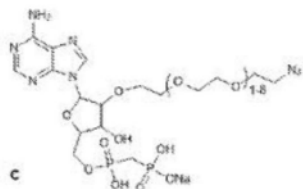
[0214] 结构XXII a-i:CD73抑制剂和其类似物的结构



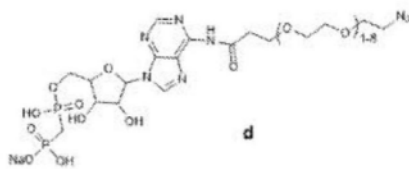
a 5'-(α,β-亚甲基)二磷酸腺苷



b

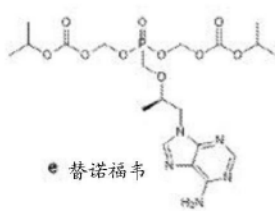


c

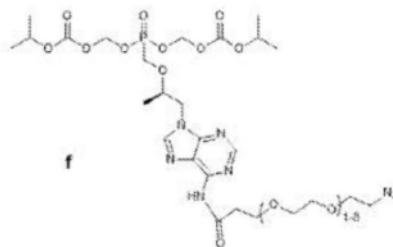


d

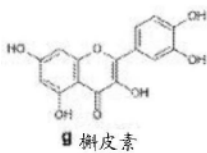
[0215]



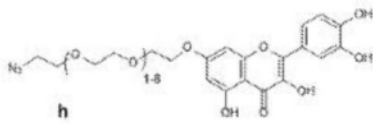
e 替诺福韦



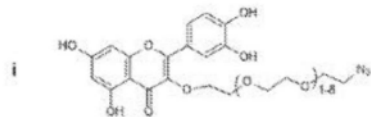
f



g 槲皮素

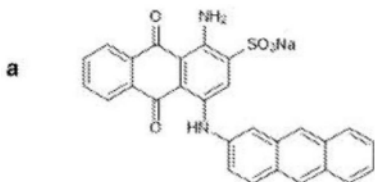


h

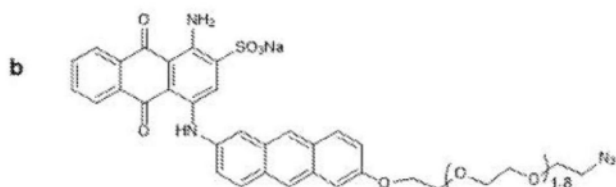


i

[0216] 结构XXIII a-c:CD73抑制剂及其类似物的结构

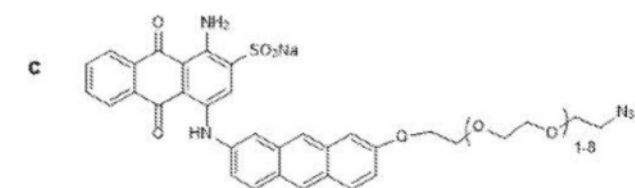


a



b

[0217]



c

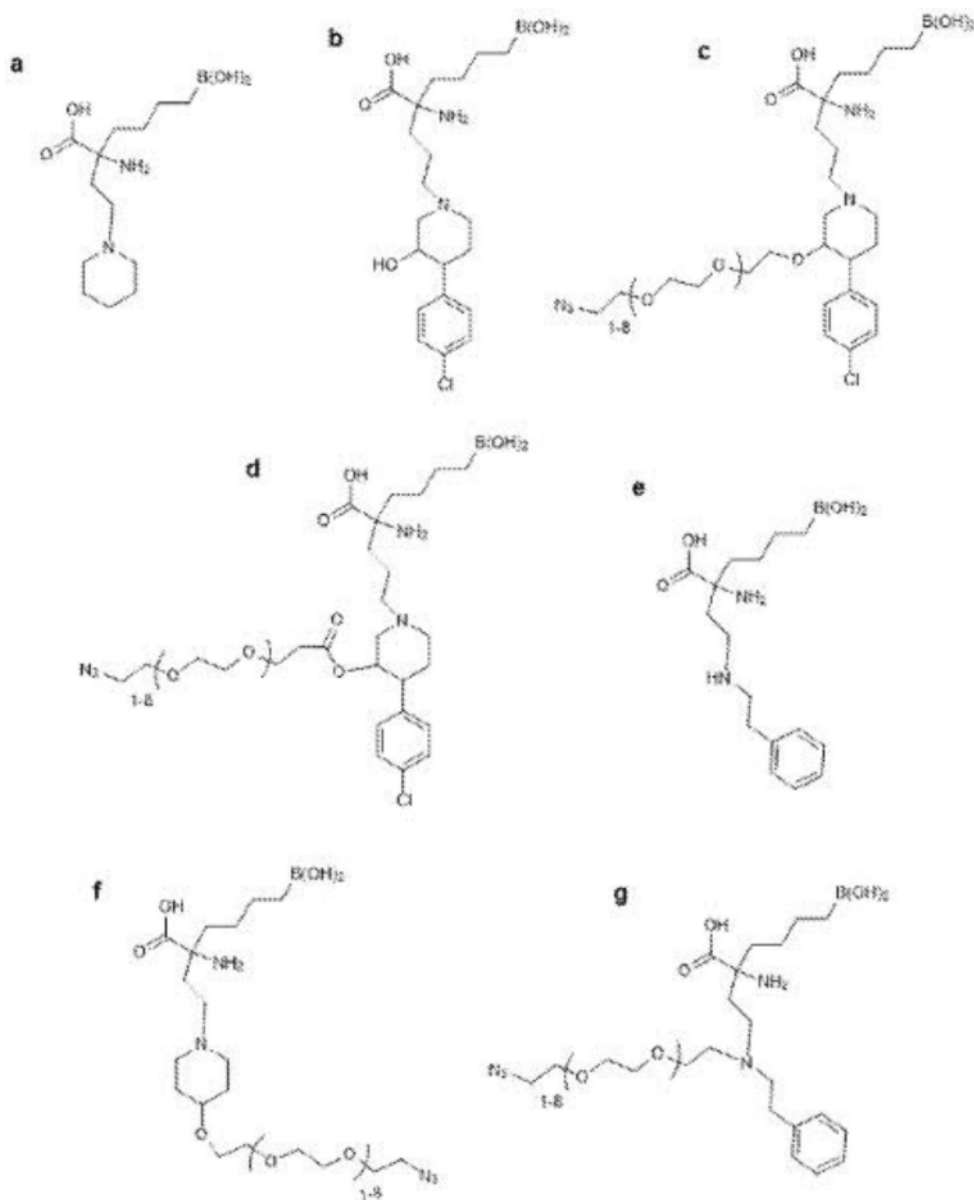
[0218] 精氨酸酶抑制剂

[0219] 在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种精氨酸酶抑制剂缔合或缀合。酶精氨酸酶1 (Arg1) 的表达是免疫抑制性髓系细胞的一个决定性特征,会导致L-精氨酸的消除,L-精氨酸是T细胞和自然杀伤(NK)细胞增殖所需的一种营养物质。因此,在癌症情况下阻断Arg1活性可能会改变L-精氨酸代谢的平衡,从而有利于淋巴细胞增殖。实际上,在小鼠研究中,注射精氨酸酶抑制剂nor-NOHA或髓室中Arg1的遗传破坏导致肿瘤生长减少,表明Arg1是促肿瘤的。

[0220] 因此,在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种精氨酸酶抑制剂如基于硼酸的精氨酸酶抑制剂缔合或缀合,例如2-(S)-氨基-6-二羟硼基己酸(2-(S)-amino-6-borono-hexanoic acid,ABH)的衍生物(Borek B等人,Bioorg Med Chem.2020Sep 15;28(18):115658),或其衍生物、类似物或前药,或其药理学活性盐。在优选的实施方案中,树枝状大分子与一种或多种精氨酸酶抑制剂或衍生物、类似物或前药或其药理学活性盐缀合。精氨酸酶抑制剂可以被官能化,例如用醚、酯、胺或酰胺连接键,任选地用一个或多个间隔基/连接基,以易于与树枝状大分子缀合和/或用于所需的释放动力学。在优选的实施方案中,精氨酸酶抑制剂或其衍生物、类似物或产物通过Cu(I)催化的炔烃-叠氮化物点击或硫醇-烯点击化学与树枝状大分子缀合。

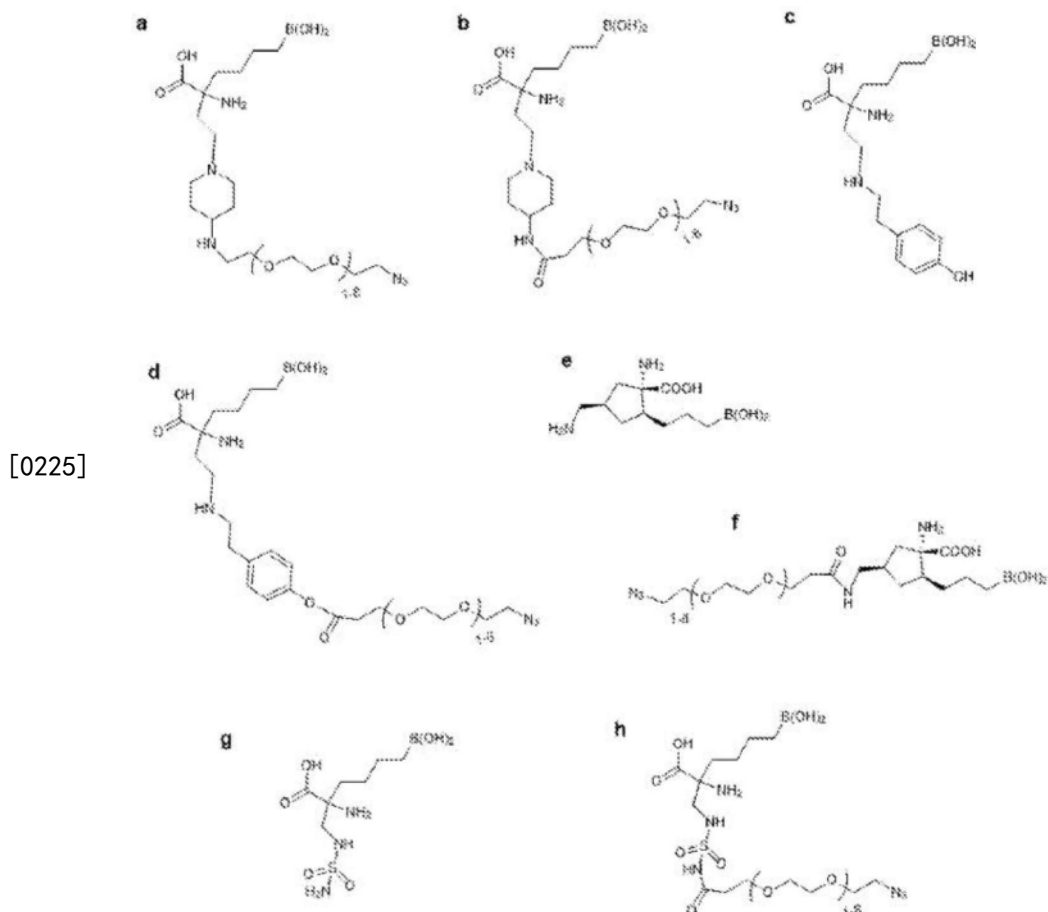
[0221] 在一些实施方案中,具有如下结构XXIV a-g和结构XXV a-h所示结构的一种或多种精氨酸酶抑制剂和/或其衍生物或类似物与树枝状大分子缀合。

[0222] 结构XXIV a-g:精氨酸酶抑制剂和其类似物的结构



[0223]

[0224] 结构XXV a-h:精氨酸酶抑制剂和其类似物的结构

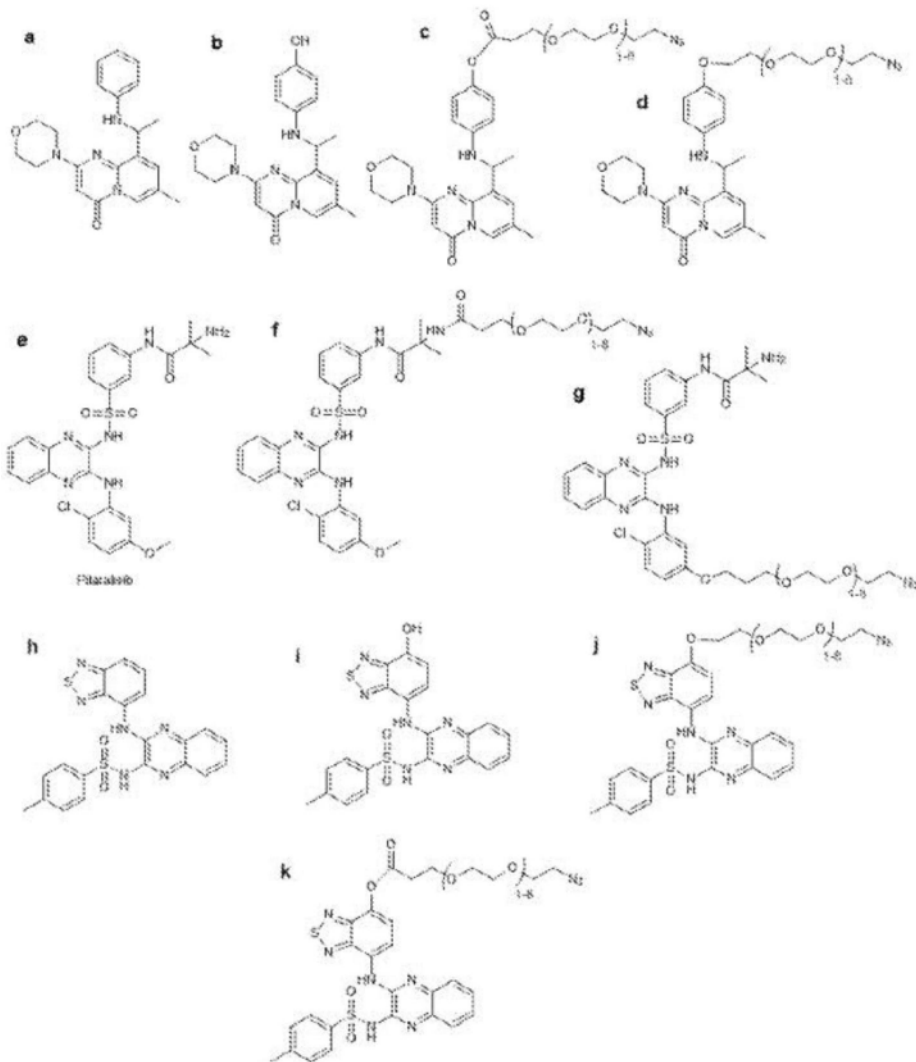


[0226] 磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) 抑制剂

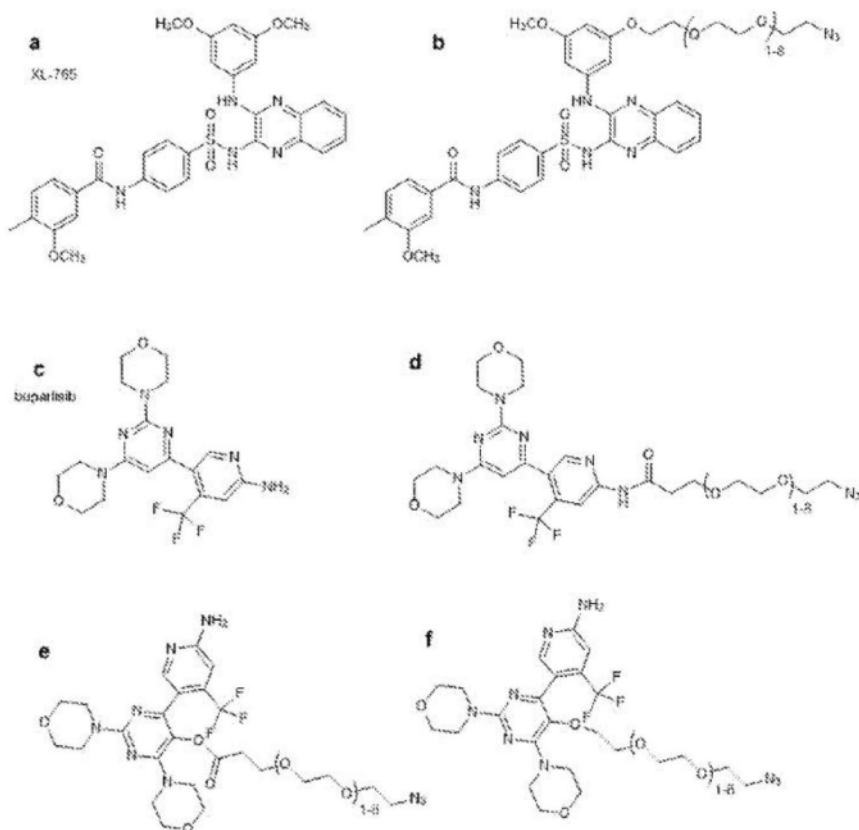
[0227] 在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种PI3K抑制剂缔合或缀合。在各种癌症中经常观察到PI3K/PTEN通路成分的调节异常,导致PI3K信号过度激活,并与肿瘤生长和存活相关。对多种抗癌疗法(包括受体酪氨酸激酶(RTK)抑制剂和化疗药物)的耐药性,已被归因于PI3K/PTEN通路下调信号的缺失或减弱。巨噬细胞PI 3-激酶 γ 在炎症和癌症中控制免疫刺激和抑制之间的关键转换。PI3K γ 信号传导通过Akt和mTor在刺激C/EBP β 活化的同时抑制NFV活化,从而诱导转录程序,促进炎症和肿瘤生长中的免疫抑制。相比之下,巨噬细胞PI3K γ 的选择性失活会刺激和延长NF κ B活化并抑制C/EBP β 活化,从而促进免疫刺激转录程序,恢复CD8⁺T细胞活化和细胞毒性。

[0228] 因此,在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种PI3K抑制剂如一种或多种PI3K γ 抑制剂缔合或缀合。示例性的PI3K抑制剂包括BYL719(阿培利司)、INK1117 (serabelisib、MLN-1117或TAK-117)、XL147 (SAR245408)、pilaralisib、WX-037、NVP-BEZ235(达托利司或BEZ235)、LY3023414(prexasertib)、XL765(voxtalisib或SAR245409)、PX-866、ZSTK474、NVP-BKM120(布帕尼西)、GDC-0941(pictilisib)和BAY80-6946(库潘尼西)。PI3K抑制剂可以被官能化,例如用醚、酯或酰胺连接键,任选地用一个或多个间隔基/连接基,以便于与树枝状大分子缀合和/或用于期望的释放动力学。在优选的实施方案中,PI3K抑制剂或其衍生物、类似物或前药通过Cu(I)催化的炔烃-叠氮化物点击或硫醇-烯点击化学,任选地通过一个或多个间隔基/连接基如聚乙二醇(PEG)与树枝状大分子缀合。示例性PI3K抑制剂的化学结构如下结构XXVI和结构XXVII所示。

[0230]



36



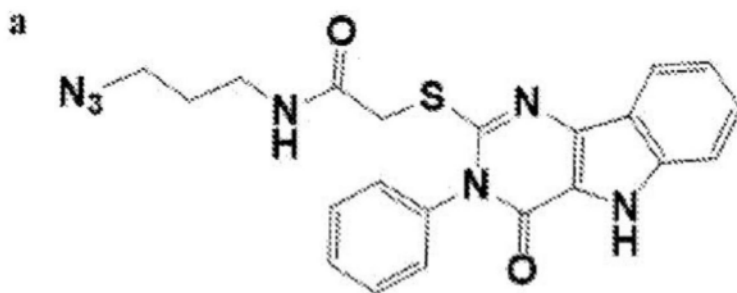
[0232]

[0233] Toll样受体4 (TLR4) 和TLR7激动剂

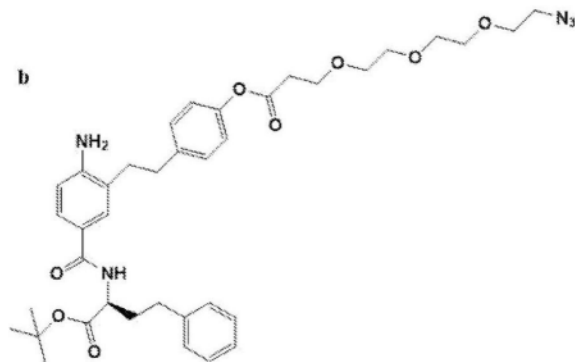
[0234] 在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种Toll样受体4 (TLR4) 和/或TLR7激动剂缔合或缀合。TLR在激活免疫反应中起着至关重要的作用。TLR识别在多种微生物上表达的保守的病原体相关分子模式 (PAMPs), 以及应激或死亡细胞释放的内源性DAMP。

[0235] 在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种TLR4激动剂缔合或缀合。示例性的TLR4激动剂包括合成的toll样受体4激动剂吡喃葡萄糖基脂质A、卡介苗 (BCG) 和单磷酸基脂质A (MPLA) 中。TLR4激动剂可以被官能化,例如用醚、酯或酰胺连接键,任选地用一个或多个间隔基/连接基,以易于与树枝状大分子缀合和/或用于所需的释放动力学。在一些实施方案中,树枝状大分子是第4、5或6代羟基封端的PAMAM树枝状大分子。在优选的实施方案中,TLR4激动剂或其衍生物、类似物或前药通过Cu (I) 催化的炔烃-叠氮化物点击或硫醇-烯点击化学,任选通过一个或多个间隔基/连接基如聚乙二醇 (PEG) 与树枝状大分子缀合。示例性的TLR4激动剂或其类似物如下所示。

[0236] 结构XXVIII a-b:两种TLR4激动剂类似物的结构



[0237]



[0238] 与树枝状大分子缀合的示例性TLR4激动剂的化学合成路线在图14A和14B中示出。

[0239] 在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种TLR7激动剂缔合或缀合。示例性的TLR7激动剂包括咪喹莫特、瑞喹莫德、gardiquimod、852A、洛索立宾、溴匹立明、3M-011、3M-052、DSR-6434、DSR-29133、SC1、SZU-101、SM-276001和SM-360320。在优选的实施方案中,TLR激动剂是瑞喹莫德。TLR7激动剂可以被官能化,例如用醚、酯或酰胺键,任选地用一个或多个间隔基/连接基,以便于与树枝状大分子缀合和/或用于期望的释放动力学。

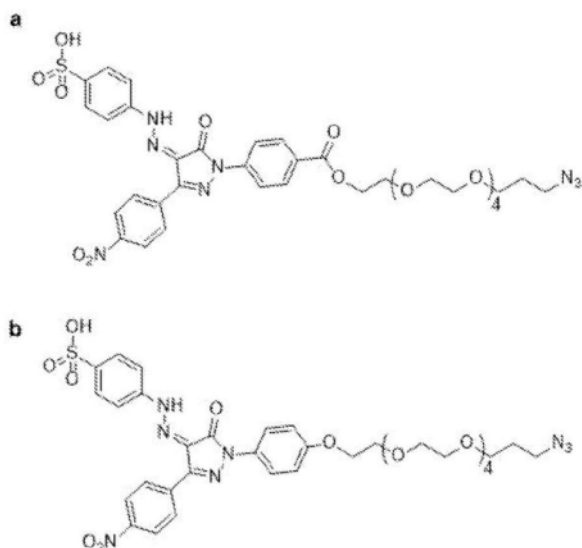
[0240] 在一些实施方案中,与一种或多种TLR4或TLR7激动剂缔合或缀合的树枝状大分子与抗肿瘤疫苗和/或过继细胞疗法(ACT)组合用作佐剂,例如用于增加先天免疫基因的表达、活化的效应T细胞的浸润和扩增、抗原呈递和持久的免疫应答。

[0241] SHP2抑制剂

[0242] SHP2(含Src同源-2结构域的蛋白酪氨酸磷酸酶-2)是一种去除酪氨酸磷酸化的非受体蛋白酪氨酸磷酸酶。在功能上,SHP2是连接多种细胞内致癌信号通路的重要中枢,如Jak/STAT、PI3K/AKT、RAS/Raf/MAPK和PD-1/PD-L1通路。SHP2的突变和/或过表达与遗传性发育疾病和癌症有关。

[0243] 因此,在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种SHP2抑制剂或其衍生物、类似物或前药或药理学活性盐缔合或缀合。示例性的SHP2抑制剂包括靶向SHP2催化位点的抑制剂和靶向SHP2变构位点的抑制剂,例如TN0155、RMC-4630、JAB-3068、JAB-3312和RMC-4550。SHP2抑制剂可以例如用醚、酯或酰胺连接键官能化,任选地用一个或多个间隔基/连接基,以易于与树枝状大分子缀合和/或用于所需的释放动力学。在一些实施方案中,所述树枝状大分子是第4、5或6代羟基封端的PAMAM树枝状大分子。在优选的实施方案中,SHP2抑制剂或其衍生物、类似物或前药,通过Cu(I)催化的炔烃-叠氮化物点击或硫醇-烯点击化学,任选地通过一个或多个间隔基/连接基如聚乙二醇(PEG)与树枝状大分子缀合。示例性SHP2抑制剂或其类似物如下所示。

[0244] 结构XXIX a-b:两种SHP2抑制剂类似物的结构



[0245]

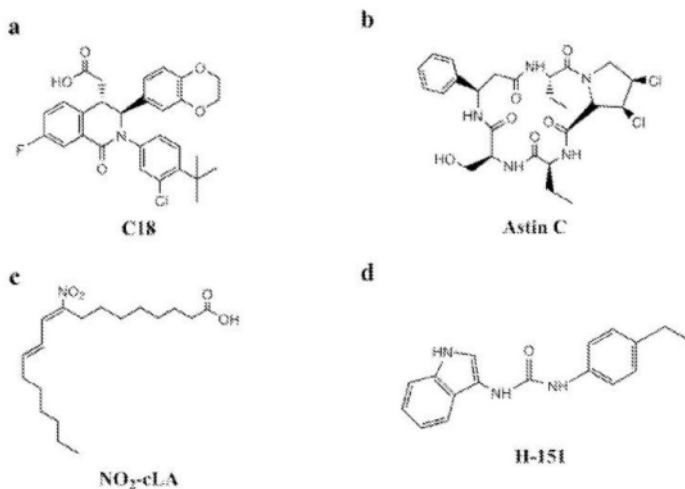
[0246] 与树枝状大分子一起使用的一些示例性免疫调节剂还包括STING拮抗剂、JAK1抑制剂和抗炎剂。在优选的实施方案中，与一种或多种免疫调节剂(包括STING拮抗剂、JAK1抑制剂和抗炎剂)缔合或缀合的树枝状大分子特别适合于靶向一种或多种促炎免疫细胞。

[0247] STING拮抗剂

[0248] 在一些实施方案中，树枝状大分子与一种或多种STING拮抗剂缀合。STING激活引发1型干扰素应答。在自身免疫性疾病的情况下，STING拮抗剂(“关闭”STING)可能在I型干扰素病中具有治疗潜力，例如SLE(狼疮)，其中STING会导致干扰素反应过度。

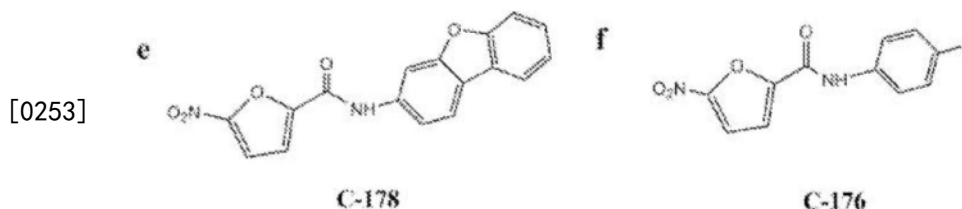
[0249] 因此，在一些实施方案中，树枝状大分子与一种或多种STING拮抗剂缀合，包括C-178、C-176、C18、Astin C、NO₂-cLA和H-151。在一个实施方案中，树枝状大分子与H-151、或其衍生物、类似物或前药、或其药理学活性盐缀合。STING拮抗剂可以被官能化，例如，用醚、酯或酰胺连接键，任选地用一个或多个间隔基/连接基，以便于与树枝状大分子缀合和/或用于所需的释放动力学。在优选的实施方案中，STING拮抗剂或其衍生物、类似物或前药通过Cu(I)催化的炔烃-叠氮化物点击或硫醇-烯点击化学，任选通过一个或多个间隔基/连接基如聚乙二醇(PEG)与树枝状大分子缀合。示例性的STING拮抗剂如下所示。

[0250] 结构XXX a-f:人和小鼠STING拮抗剂



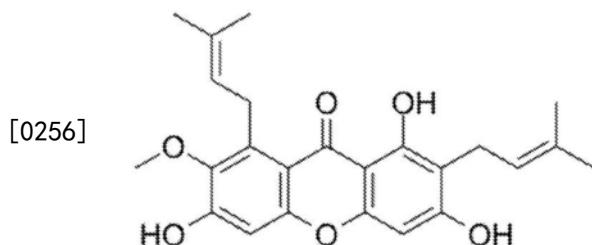
[0251]

[0252] 小鼠STING拮抗剂



[0254] 在一些实施方案中,所述STING拮抗剂是 α -倒捻子素(结构如下所示)。

[0255] 结构XXXI: α 倒捻子素



[0257] JAK1抑制剂

[0258] Janus激酶(JAK)/信号转导子和转录激活子(STAT)是一组与许多细胞因子发挥和整合其功能的主要途径之一相关的分子,因此它们越来越被认为在各种免疫介导疾病的发病机制中起关键作用,包括RA、PsA、SpAs、IBD、皮肤病(例如斑秃、特应性皮炎)、单基因疾病如干扰素病等。JAK是JAK/STAT途径的关键启动者。当其各自的效应分子(细胞因子、IFN、生长因子等)与I型和II型受体结合时,JAK被激活,并通过自身和其他分子(包括STATs)的磷酸化,介导细胞核的信号转导。在过去的十年里,已经开发了一类称为JAK抑制剂或阻断一种或多种JAKinibs的药物。

[0259] 示例性的JAK抑制剂包括托法替尼、鲁索替尼、巴瑞替尼、培菲替尼、德塞替尼、非戈替尼、索西替尼、伊他替尼、SHR0302、乌帕替尼、PF-04965842。托法替尼是第一代JAKinib,可抑制JAK3、JAK1、以及JAK2(程度较轻),是第一种开发用于治疗自身免疫性疾病的JAKinib。巴瑞替尼是第一代JAKinib,具有对抗JAK1和JAK2的活性,在结构上与鲁索替尼相关。培菲替尼阻断所有四种JAK亚型,但具有轻微的JAK3选择性。

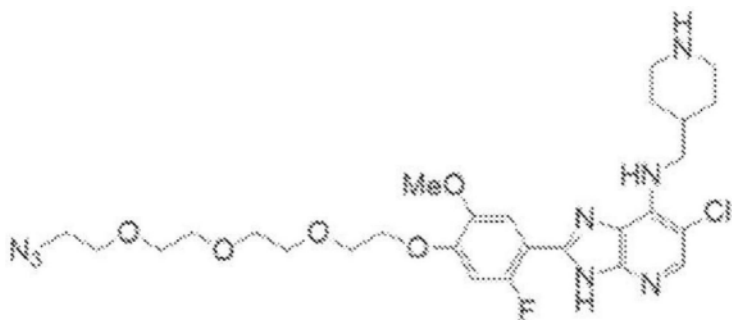
[0260] 在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种JAK抑制剂缔合或缀合。在一些实施方案中,与一种或多种JAK1抑制剂缀合的树枝状大分子被配制用于治疗或减轻一种或多种慢性炎症病症的一种或多种症状,所述慢性炎症病症例如类风湿性关节炎、银屑病性疾病、脊椎关节病和炎症肠病(IBD)。

[0261] JAK1抑制剂可以例如用醚、酯或酰胺连接键官能化,任选地用一个或多个间隔基/连接基,以易于与树枝状大分子缀合和/或用于所需的释放动力学。在优选的实施方案中,JAK1抑制剂或其衍生物、类似物或前药通过Cu(I)催化的炔烃-叠氮化物点击或硫醇-烯点击化学,任选地通过一个或多个间隔基/连接物如聚乙二醇(PEG)与树枝状大分子缀合。

[0262] 在一个实施方案中,与树枝状大分子复合或缀合的JAK1抑制剂是Target-006(结构XXXII)或其衍生物、类似物或前药,或其药理学活性盐。

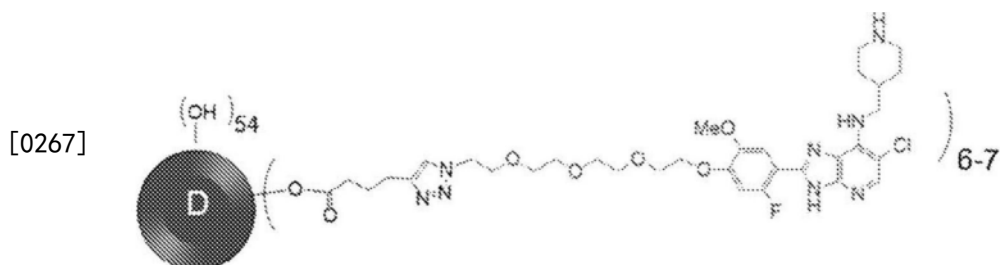
[0263] 结构XXXII:Target-007

[0264]



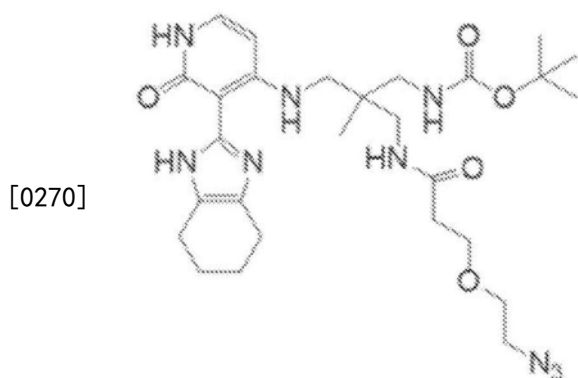
[0265] JAK1抑制剂Target-007与树枝状大分子的示例性缀合如下所示(结构XXXIII)。Target-007的JAK1结合亲和力约为1nM,树枝状大分子缀合的Target-007的结合亲和力约为30nM。因此,在优选的实施方案中,JAK1抑制剂使用或不使用间隔基与树枝状大分子以使得其使对JAK1的结合亲和力的降低最小化(例如,小于1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、200倍和500倍)的方式缀合。

[0266] 结构XXXIII:树枝状大分子缀合的Target-007 (D-007)



[0268] 在另一个实施方案中,与树枝状大分子复合或缀合的JAK1抑制剂是Target-006 (结构XXXIV) 或其衍生物、类似物或前药,或其药理学活性盐。

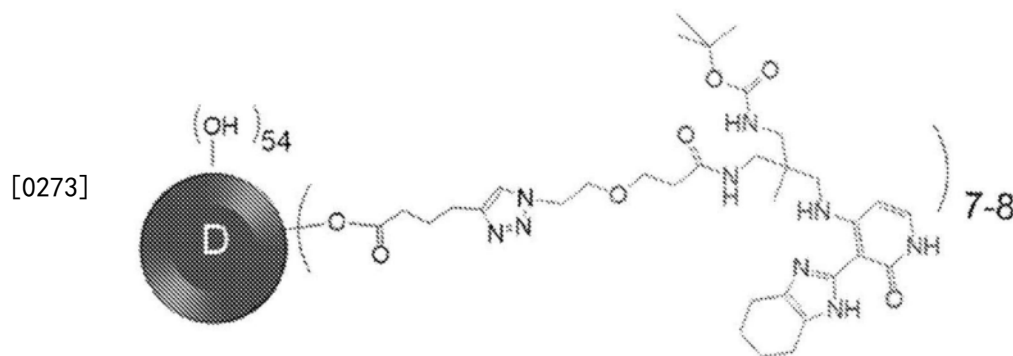
[0269] 结构XXXIV:Target-006



[0270]

[0271] JAK1抑制剂Target-006与树枝状大分子的示例性缀合如下所示(结构XXXV)。

[0272] 结构XXXV:树枝状大分子缀合的Target-006 (D-006)



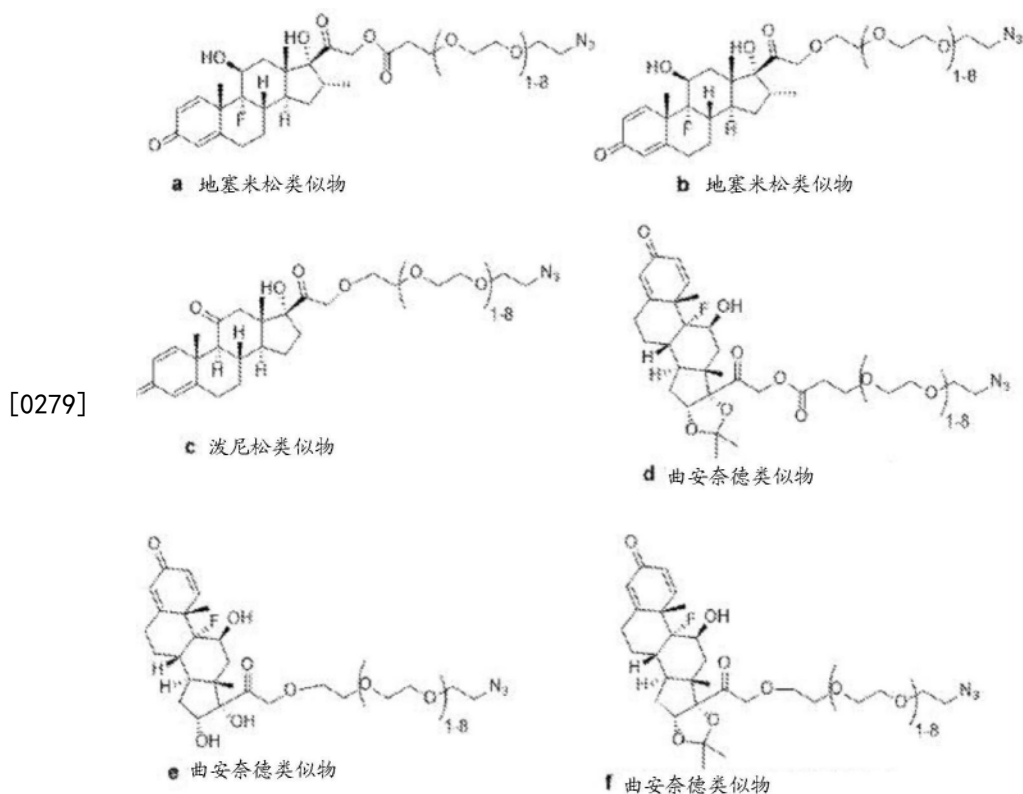
[0274] 抗炎剂

[0275] 在一些实施方案中，一种或多种抗炎剂缔合或缀合至树枝状大分子。抗炎剂可减轻炎症，包括类固醇和非类固醇药物。合适的类固醇活性剂包括糖皮质激素、孕激素 (progestin)、盐皮质激素和皮质类固醇。在一些实施方案中，一种或多种活性剂是一种或多种皮质类固醇。

[0276] 示例性抗炎剂包括曲安奈德、氟轻松、甲基强的松龙、泼尼松龙、强的松、地塞米松、氯替泼诺、氟米龙、布洛芬、阿司匹林和萘普生。示例性的免疫调节药物包括环孢霉素、他克莫司、雷帕霉素和二甲双胍。非甾体抗炎药 (NSAIDs) 的示例包括甲芬那酸、阿司匹林、二氟尼柳、水杨酰水杨酸、布洛芬、萘普生、非诺洛芬、酮洛芬、右酮洛芬 (Deacketoprofen)、氟比洛芬、奥沙普秦、洛索洛芬、吲哚美辛、舒林酸、依托度酸、酮咯酸、双氯芬酸、萘丁美酮、吡罗昔康、美洛昔康、替诺昔康、屈昔康、氯诺昔康、伊索昔康、甲氯灭酸、氟芬那酸、托灭酸、elecoxib、罗非昔布、伐地考昔、帕瑞昔布、罗美昔布、依托考昔、非罗考昔、磺胺类、尼美舒利、尼氟灭酸和利考非隆。在优选的实施方案中，活性剂是曲安奈德、泼尼松、地塞米松或其衍生物、类似物或前药，或其药理学活性盐。

[0277] 曲安奈德、泼尼松和地塞米松的示例性类似物如下所示 (结构XXXVI)。

[0278] 结构XXXVI a-f: 曲安奈德、泼尼松和地塞米松的类似物的化学结构



[0280] 在一个实施方案中,活性剂是N-乙酰基-L-半胱氨酸。在一个优选的实施方案中,N-乙酰基-L-半胱氨酸通过不可裂解的连接键与羟基封端的PAMAM树枝状大分子缀合,以使给药后游离N-乙酰基-半胱氨酸在体内的释放最小。树枝状大分子/N-乙酰基-半胱氨酸复合物的示例性不可释放(或不可裂解)形式的合成路线如图16所示。与树枝状大分子/N-乙酰基-半胱氨酸复合物的可释放或可裂解形式相比,树枝状大分子/N-乙酰基-半胱氨酸复合物的不可释放形式提供了增强的治疗功效。

[0281] 在一些实施方案中,一种或多种活性剂是聚唾液酸(例如,具有平均聚合度20的低分子量聚唾液酸(polySia avDP20))、转运蛋白配体(例如,地西洋结合抑制剂(DBI))、干扰素-β(IFN-β)和米诺环素。

[0282] 在某些情况下,一种或多种活性剂为抗感染药物。示例性的抗感染剂包括抗病毒剂、抗菌剂、抗寄生虫剂和抗真菌剂。示例性抗生素包括莫西沙星、环丙沙星、红霉素、左氧氟沙星、头孢唑啉、万古霉素、替加环素、庆大霉素、妥布霉素、头孢他啶、氧氟沙星、加替沙星;抗真菌药:两性霉素、伏立康唑、那他霉素。

[0283] D. 要递送的其他活性剂

[0284] 在一些实施方案中,树枝状大分子用于递送一种或多种另外的活性剂,特别是一种或多种活性剂以预防或治疗增殖性疾病的一种或多种症状。合适的治疗剂、诊断剂和/或预防剂可以是生物分子,例如酶、蛋白质、多肽或核酸或小分子试剂(例如分子量小于2000amu,优选小于1500amu),包括有机、无机和有机金属试剂。该试剂可以被包封在树枝状大分子内,分散在树枝状大分子内,和/或与树枝状大分子的表面共价或非共价结合。

[0285] 1. 治疗剂

[0286] 在一些实施方案中,树枝状大分子复合物包括一种或多种与树枝状大分子复合或缀合的治疗剂、预防剂或预后剂。代表性的治疗剂包括但不限于化疗剂、抗感染剂及其组

合。

[0287] 其他治疗剂包括常规癌症治疗剂,如化疗剂、细胞因子、趋化因子和放射治疗。大多数化疗药物可分为烷化剂、抗代谢药、蒽环类、植物生物碱、拓扑异构酶抑制剂和其他抗肿瘤药物。这些药物会以某种方式影响细胞分裂或DNA合成和功能。其他治疗药物包括单克隆抗体和酪氨酸激酶抑制剂,例如甲磺酸伊马替尼(GLEEVEC®或GLIVEC®),其直接靶向某些类型癌症(慢性髓性白血病、胃肠道间质瘤)中的分子异常。

[0288] 代表性的化疗剂包括但不限于:安吡啶、博来霉素、白消安、喜树碱、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氯法拉滨、克利桑酶、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素D、柔红霉素、多西他赛、阿霉素、表鬼臼毒素、表柔比星、依托泊苷、磷酸依托泊苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基尿素、伊达比星、异环磷酰胺、innotecan、亚叶酸钙、脂质体阿霉素、脂质体柔红霉素、洛莫司汀、氮芥、美法仑、巯基嘌呤、美司那、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、喷司他丁、甲基苄肼、雷替曲塞、赛特铂、链脲菌素,替尼泊苷,替加氟尿嘧啶,替莫唑胺,替尼泊苷,噻替派,硫鸟嘌呤、拓扑替康、苏消安、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨、伏立诺他、紫杉醇、曲古抑菌素A及其衍生物,曲妥单抗(HERCEPTIN®)、西妥昔单抗,和利妥昔单抗(RITUXAN®或MABTHERA®)、贝伐单抗(AVASTIN®)和其组合。代表性的促凋亡剂包括但不限于氟达拉滨牛磺孢子素(fludarabinetaurosporine)、环己酰亚胺、放线菌素D、乳酰神经酰胺、15d-PGJ (2) 5及其组合。

[0289] 在一些实施方案中,活性剂是组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂。在一个实施方案中,活性剂是伏立诺他。在其它实施方案中,活性剂是拓扑异构酶I和/或II抑制剂。在一个特定的实施方案中,活性剂是依托泊苷或喜树碱。

[0290] 其他抗癌药物包括但不限于伊立替康、依西美坦、奥曲肽、卡莫氟、克拉霉素、净司他丁、他莫昔芬、替加氟、托瑞米芬、去氧氟尿苷、尼莫司汀、长春地辛、奈达铂、吡柔比星、氟他胺、法曲唑、强的松、甲羟孕酮、米托坦、霉酚酸酯和咪唑立宾。

[0291] 代表性的抗血管生成药物包括但不限于血管内皮生长因子(VEGF)抗体,如贝伐单抗(AVASTIN®)和rhFAB V2(兰尼单抗,LUCENTIS®),以及其他抗VEGF化合物,包括阿帕西普(EYLEA®);MACUGEN®(pegaptanim钠,抗VEGF适体或EYE 001)(Eyetechnopharmaceuticals);色素上皮衍生因子(PEDF);COX-2抑制剂,如塞来昔布(CELEBREX®)和罗非昔布(VIOXX®);干扰素 α ;白介素-12(IL-12);沙利度胺(THALOMID®)及其衍生物如来那度胺(REVLIMID®);角鲨胺;内皮抑素;血管抑素;核酶抑制剂,如ANGIOZYME®(Sirna Therapeutics);多功能抗血管生成剂,如NEOVASTAT®(AE-941)(Aeterna Laboratories,Quebec City,Canada);受体酪氨酸激酶(RTK)抑制剂,如舒尼替尼(SUTENT®);酪氨酸激酶抑制剂,如索拉非尼(Nexavar®)和厄洛替尼(tarceva®);针对表皮生长因子受体的抗体,如帕尼单抗(VECTIBIX®)和西妥昔单抗(ERBITUX®),以及本领域已知的其它抗血管生成剂。

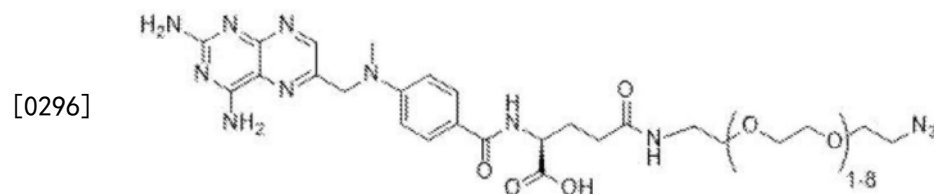
[0292] 在某些情况下,活性剂是抗感染剂。示例性的抗感染剂包括抗病毒剂、抗菌剂、

抗寄生虫剂和抗真菌剂。示例性抗生素包括莫西沙星、环丙沙星、红霉素、左氧氟沙星、头孢唑啉、万古霉素、替加环素、庆大霉素、妥布霉素、头孢他啶、氧氟沙星、加替沙星；抗真菌药：两性霉素、伏立康唑、那他霉素。

[0293] 任何另外的活性化合物可以被官能化，例如用醚、酯、乙基或酰胺连接键，任选地用一个或多个间隔基/连接基，以便于与树枝状大分子缀合和/或用于期望的释放动力学。在优选的实施方案中，活性剂或其衍生物、类似物或前药通过Cu(I)催化的炔烃-叠氮化物点击或硫醇-烯点击化学，任选地通过一个或多个间隔基/连接基如聚乙二醇(PEG)与树枝状大分子缀合。在一些实施方案中，另外的活性剂是化疗剂或其衍生物、类似物或前药，或其药理学活性盐。

[0294] 在一个实施方案中，与树枝状大分子复合或缀合的活性剂是甲氨蝶呤或其衍生物、类似物或前药或药理学活性盐，例如如结构XXXVII所示。

[0295] 结构XXXVII：甲氨蝶呤类似物的化学结构



[0297] 2. 诊断剂

[0298] 在一些实施方案中，树枝状大分子与一种或多种诊断剂缀合或复合。诊断剂的示例包括顺磁性分子、荧光化合物、磁性分子和放射性核素、x射线成像剂和造影剂。其他合适的造影剂的例子包括不透辐射的气体或气体发射化合物。树枝状大分子复合物还可包括用于确定给药组合物位置的试剂。用于此目的的试剂包括荧光标签、放射性核素和造影剂。

[0299] 示例性诊断剂包括染料，例如荧光染料和近红外染料、SPECT成像剂、PET成像剂和放射性同位素。代表性染料包括碳菁染料、吡咯碳菁染料、氧碳菁染料、thiobarbituric acid、部花青、聚次甲基染料、香豆素染料、若丹明染料、氧杂蒽染料、荧光素染料、硼二吡咯甲烷染料(BODIPY染料)、Cy5染料、Cy5.5染料、Cy7染料、VivoTag-680染料、VivoTag-S680染料、VivoTag-S750染料、AlexaFluor660、AlexaFluor680、AlexaFluor700、AlexaFluor750、AlexaFluor790、Dy677、Dy676、Dy682、Dy752、Dy780、DyLight547、DyLight647、HiLyte Fluor 647、HiLyte Fluor 680、HiLyte Fluor 750、IRDye 800CW、IRDye 800RS、IRDye 700DX、ADS780WS、ADS830WS和ADS832WS。

[0300] SPECT或PET成像剂的示例包括螯合剂，例如二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)、二胺二硫醇、活化的巯基乙酰-甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(MAG3)和胍基烟酰胺(HYNIC)。

[0301] 示例性同位素包括Tc-94m、Tc-99m、In-111、Ga-67、Ga-68、Gd3+、Y-86、Y-90、Lu-177、Re-186、Re-188、Cu-64、Cu-67、Co-55、Co-57、F-18、Sc-47、Ac-225、Bi-213、Bi-212、Pb-212、Sm-153、Ho-166和Dy-166。

[0302] 在优选的实施方案中，树枝状大分子复合物包括一种或多种适用于正电子发射断层扫描(PET)成像的放射性同位素。示例性的发射正电子的放射性同位素包括碳-11(^{11}C)、铜-64(^{64}Cu)、氮-13(^{13}N)、氧-15(^{15}O)、镓-68(^{68}Ga)和氟-18(^{18}F)，例如2-脱氧-2- ^{18}F -氟-β-D-葡萄糖(^{18}F -FDG)。

[0303] 在进一步的实施方案中,单个树枝状大分子复合物组合物可同时治疗和/或诊断体内一个或多个部位的疾病或病症,例如原发性肿瘤位点和转移位点。

[0304] 3. 靶向或结合部分

[0305] 在一些实施方案中,树枝状大分子包括一个或多个组织靶向或组织结合部分,用于将树枝状大分子靶向到体内的特定位置,和/或用于提高在体内所需位置的体内停留时间。例如,在一些实施方案中,在局部或全身性施用到体内之后,树枝状大分子被螯合或结合到一个或多个不同的组织或器官。因此,相对于不存在靶向或结合部分的树枝状大分子和活性剂,靶向或结合部分的存在可以增强活性剂向靶位点的递送。树枝状大分子与一个或多个靶向或结合部分的缀合可以通过间隔基,和间隔基与树枝状大分子之间的连接键,和/或间隔基和靶向剂可以设计成提供树枝状大分子-靶向剂复合物的可释放或不可释放形式。

[0306] 一种示例性的靶向剂是阿仑膦酸(阿仑膦酸盐),其与骨表面的羟基磷灰石结合,并增强树枝状大分子复合物在骨上的停留时间。阿仑膦酸盐是一种小分子靶向部分,可选择性结合骨成分羟基磷灰石。因此,在一些实施方案中,树枝状大分子与阿仑膦酸盐缀合,用于将树枝状大分子选择性靶向至骨。在一些实施方案中,阿仑膦酸盐和树枝状大分子之间的缀合是通过可逆(非共价)连接基进行的。在其它实施方案中,阿仑膦酸盐和树枝状大分子之间的缀合是通过不可裂解的或最低限度可裂解的连接基进行的。在一些实施方案中,靶向剂还在靶向位点具有治疗效果。在一些实施方案中,树枝状大分子与阿仑膦酸盐缀合,用于将树枝状大分子复合物靶向至骨并用于在骨炎症部位提供治疗效果。在一些实施方案中,与阿仑膦酸盐结合的树枝状大分子与一种或多种活性剂缀合,用于将活性剂选择性递送至骨炎症部位。

[0307] III. 药物制剂

[0308] 包括一种或多种树枝状大分子复合物的药物组合物可以以常规方式使用一种或多种生理学上可接受的载体来配制,所述载体包括赋形剂和助剂,所述赋形剂和助剂便于将活性化合物加工成可在药学上使用的制剂。正确的配方取决于所选择的给药途径。在优选的实施方案中,组合物被配制用于肠胃外递送。在一些实施方案中,组合物被配制用于肿瘤内注射。通常,将组合物配制在无菌盐水或缓冲溶液中,以注射到待治疗的组织或细胞中。可将组合物冻干储存在一次性小瓶中,以便在使用前立即进行再水合。用于再水合和给药的其它方法是本领域技术人员已知的。

[0309] 药物制剂含有一种或多种树枝状大分子复合物与一种或多种药学上可接受的赋形剂。代表性的赋形剂包括溶剂、稀释剂、pH调节剂、防腐剂、抗氧化剂、悬浮剂、湿润剂、粘度调节剂、张力剂、稳定剂及其组合。合适的药学上可接受的赋形剂优选选自通常被认为是安全的(GRAS)材料,并且可以施用给个体而不引起不希望的生物副作用或不希望的相互作用。

[0310] 通常,药物可接受的盐可以通过活性剂的游离酸或碱形式与化学计量量的合适的碱或酸在水或有机溶剂中或在两者的混合物中反应来制备;通常,非水介质如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈是优选的。药学上可接受的盐包括衍生自无机酸、有机酸、碱金属盐和碱土金属盐的活性剂的盐以及通过药物与合适的有机配体反应形成的盐(例如,季铵盐)。合适的盐类列表见例如Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed.,

Lippincott Williams&Wilkins,Baltimore,MD,2000,p.704。有时以药学上可接受的盐形式给药的药物实例包括马来酸噻吗洛尔、酒石酸溴莫尼定和双氯芬酸钠。

[0311] 为了易于给药和剂量的均匀性,组合物优选配制成剂量单位形式。短语“剂量单位形式”是指适合于待治疗患者的缀合物的物理离散单位。然而,应当理解,组合物的总单次给药将由主治医师在合理的医学判断范围内决定。治疗有效剂量可在细胞培养试验或动物模型(通常为小鼠、兔、犬或猪)中初步估计。该动物模型还用于获得所需的浓度范围和给药途径。然后,此类信息应可用于确定人体给药的有效剂量和途径。缀合物的治疗效力和毒性可通过细胞培养物或实验动物中的标准制药程序测定,例如ED50(该剂量在50%群体中是治疗有效的)和LD50(该剂量对50%群体是致死的)。毒性与治疗作用的剂量比是治疗指数,可表示为比值LD50/ED50。优选表现出大的治疗指数的药物组合物。从细胞培养试验和动物研究中获得的数据可用于制定人类使用的剂量范围。

[0312] 在某些实施方案中,组合物局部给药,例如通过直接注射到待治疗的部位。在一些实施方案中,将所述组合物注射、局部施用或以其它方式直接施用到脉管系统中损伤、手术或植入部位处或附近的血管组织上。例如,在实施方案中,在手术或植入或移植过程中,将组合物局部施用于暴露的血管组织。通常,局部给药引起组合物的局部浓度增加,其大于通过全身给药可实现的浓度。

[0313] 描述了配制用于通过肠胃外(肌内、腹膜内、静脉内(IV)或皮下注射)、肠内和局部给药途径给药的药物组合物。

[0314] A.肠胃外给药

[0315] 在一些实施方案中,将树枝状大分子配制成肠胃外给药。短语“肠胃外给药”和“肠胃外给药”是本领域认可的术语,包括除了肠内和局部给药之外的给药模式,例如注射,并且包括但不限于静脉内、肌内、胸膜内、血管内、心包内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮肤内、腹膜内、经气管、皮下、角质层下的、关节内、包膜下、蛛网膜下、椎管内和胸骨内注射和输注。在一些实施方案中,树枝状大分子是肠胃外给药的,例如通过硬膜下、静脉内、鞘内、心室内、动脉内、羊膜内、腹膜内或皮下途径。

[0316] 对于液体制剂,药学上可接受的载体可以是例如水溶液或非水溶液、悬浮液、乳液或油。肠胃外载体(用于皮下、静脉内、动脉内或肌内注射)包括,例如,氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏试剂和固定油。非水溶剂的例子有丙二醇、聚乙二醇和可注射的有机酯,如油酸乙酯。水性载体包括例如水、醇/水溶液、环糊精、乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。树枝状大分子也可以以乳液形式给药,例如油包水。油的例子是石油、动物、植物或合成来源的油,例如花生油、大豆油、矿物油、橄榄油、向日葵油、鱼肝油、芝麻油、棉籽油、玉米油、橄榄油、凡士林和矿物油。适合用于肠胃外制剂的脂肪酸包括,例如,油酸、硬脂酸和异硬脂酸。油酸乙酯和肉豆蔻酸异丙酯是合适的脂肪酸酯的例子。

[0317] 适于肠胃外给药的制剂可以包括抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与预期受体的血液等渗的溶质,以及可以包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂的水性和非水无菌混悬剂。静脉注射赋形剂可包括液体和营养补充剂、电解质补充剂(如基于林格氏葡萄糖的补充剂)。通常,水、盐水、葡萄糖水溶液和相关的糖溶液以及二醇如丙二醇或聚乙二醇是优选的液体载体,特别是对于可注射溶液。

[0318] 用于可注射组合物的可注射药物载体是本领域普通技术人员熟知的(参见,例如,

Pharmaceutics and Pharmacy Practice, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker and Chalmers, eds., 第238-250页 (1982), 和 ASHP Handbook on Injectable Drugs, Trissel, 第15版, 第622-630页 (2009))。

[0319] B. 肠内给药

[0320] 在一些实施方案中, 将树枝状大分子配制成肠道给药。载体或稀释剂可以是用于固体制剂的固体载体或稀释剂、用于液体制剂的液体载体或稀释剂或其混合物。

[0321] 对于液体制剂, 药学上可接受的载体可以是例如水溶液或非水溶液、悬浮液、乳液或油。非水溶剂的例子有丙二醇、聚乙二醇和可注射的有机酯, 如油酸乙酯。水性载体包括例如水、醇/水溶液、环糊精、乳液或悬浮液, 包括盐水和缓冲介质。

[0322] 油的例子是石油、动物、植物或合成来源的油, 例如花生油、大豆油、矿物质油、橄榄油、向日葵油、鱼肝油、芝麻油、棉籽油、玉米油、橄榄油、凡士林和矿物质。适合用于肠胃外制剂的脂肪酸包括, 例如, 油酸、硬脂酸和异硬脂酸。油酸乙酯和肉豆蔻酸异丙酯是合适的脂肪酸酯的例子。

[0323] 赋形剂包括, 例如, 氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏试剂和固定油。制剂包括, 例如, 水性和非水性等渗无菌注射溶液, 其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与预期受体的血液等渗的溶质, 以及水性和非水性无菌混悬液, 其可包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。载体可以包括, 例如, 液体和营养补充剂, 电解质补充剂, 例如基于林格氏葡萄糖的那些。通常, 水、盐水、葡萄糖水溶液和相关的糖溶液是优选的液体载体。它们也可以与蛋白质、脂肪、糖类和婴儿配方奶粉的其他成分一起配制。

[0324] 在优选的实施方案中, 组合物被配制用于口服给药。口服制剂可以是口香糖、胶条、片剂、胶囊或锭剂的形式。用于制备肠溶口服制剂的封装物质包括醋酸邻苯二甲酸纤维素、聚醋酸邻苯二甲酸酯、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯和甲基丙烯酸酯共聚物。优选胶囊或片剂等固体口服制剂。酞剂和糖浆也是众所周知的口服制剂。

[0325] C. 局部给药

[0326] 在一些实施方案中, 将树枝状大分子配制成局部给药。局部给药可包括例如在手术期间直接应用于暴露的组织、脉管系统、粘膜或组织或假体。局部给药的优选组织是肿瘤。

[0327] IV. 制作方法

[0328] A. 制备树枝状大分子的方法

[0329] 树枝状大分子可以通过各种化学反应步骤来制备。树枝状大分子通常是根据允许在构建的每个阶段控制其结构的方法合成的。树枝状结构主要通过两种不同的途径合成: 发散或会聚。

[0330] 在一些实施方案中, 使用发散方法制备树枝状大分子, 其中树枝状大分子由多功能核组装而成, 所述核通过一系列反应 (通常为迈克尔反应) 向外延伸。该策略包括将具有反应性和保护性基团的单体分子与多功能核心部分偶联, 从而在核心周围逐步增加代, 然后去除保护性基团。例如, 首先通过将 N-(2-氨基乙基) 丙烯酰胺单体偶联到氨核上来合成 PAMAM-NH₂ 树枝状大分子。

[0331] 在其他实施方案中, 使用会聚法制备树枝状大分子, 其中树枝状大分子由小分子构建, 该小分子结束于球体的表面, 并且反应向内进行, 向内构建并最终附着到核上。

[0332] 树枝状大分子的制备还存在许多其他合成途径,如正交法、加速法、双阶段会聚法或超核法、超单体法或支化单体法、双指数法;正交偶联法或两步法、两单体法、 AB_2-CD_2 法。

[0333] 在一些实施方案中,树枝状大分子的核、一个或多个分支单元、一个或多个连接基/间隔基和/或一个或多个表面基团可以通过点击化学被修饰以允许与另外的官能团(分支单元、连接基/间隔基、表面基团等),单体和/或活性剂缀合,采用一种或多种铜辅助叠氮化物-炔烃环加成(CuAAC),Diels-Alder反应,硫醇-烯和硫醇-炔反应,和叠氮化物-炔烃反应(Arseneault M等人,Molecules.2015May 20;20(5):9263-94)。在一些实施方案中,将预制的树突(dendron)点击到高密度羟基聚合物上。“点击化学”涉及例如两个不同部分的偶联(例如,核心基团和分支单元;或支化单元和表面基团)通过在第一部分表面上的炔烃部分(或其等同物)和在第二部分上的叠氮化物部分(例如存在于三嗪组合物上)或其等同物(或任何活性端基,例如伯胺端基、羟基端基、羧酸端基、硫醇端基等)之间的1,3-偶极环加成反应形成。

[0334] 在一些实施方案中,树枝状大分子合成取决于一种或多种反应,如硫醇-烯点击反应、硫醇-炔点击反应、CuAAC、Diels-Alder点击反应、叠氮化物-炔点击反应、迈克尔加成、环氧开环、酯化、硅烷化学及其组合。

[0335] 任何现有的树枝状大分子平台都可以用于制备所需官能团的树枝状大分子,即通过缀合含高羟基的部分,如1-硫代-甘油或季戊四醇,以具有高密度的表面羟基。可以合成和开发示例性树枝状平台例如聚酰胺基胺(PAMAM)、聚(丙烯亚胺)(PPI)、聚-L-赖氨酸、三聚氰胺、聚(醚脲胺)(PEHAM)、聚(酯胺)(PEA)和聚甘油。

[0336] 树枝状大分子也可以通过结合两种或更多种树突来制备。树突是具有反应性焦点官能团的树枝状大分子的楔形截面。许多树突支架都是市售的。它们为1、2、3、4、5和6代,分别具有2、4、8、16、32和64个反应性基团。在某些实施方案中,一种类型的活性剂与一种类型的树突连接,而不同类型的活性剂与另一种类型的树突连接。然后,这两个树突连接在一起,形成一个树枝状大分子。这两个树突可以通过点击化学连接,即一个树突上的叠氮化物部分和另一个树突上的炔烃部分之间的1,3-偶极环加成反应,形成三唑连接基。

[0337] 制备树枝状大分子的示例性方法在国际专利公开W02009/046446、W02015168347、W02016025745、W02016025741、W02019094952和美国专利第8,889,101号中有详细描述。

[0338] B. 树枝状大分子复合物

[0339] 树枝状大分子复合物可以由与树枝状大分子、树枝状聚合物或超支化聚合物缀合或连接的治疗活性剂或化合物形成。一种或多种活性剂与树枝状大分子缀合是本领域已知的,并在美国公开申请US 2011/0034422、US 2012/0003155和US 2013/0136697中详细描述。

[0340] 在一些实施方案中,一种或多种活性剂共价连接到树枝状大分子上。在一些实施方案中,活性剂通过设计为在体内裂解的连接部分与树枝状大分子连接。可以将连接部分设计成可水解、酶促或其组合裂解,从而提供活性药物在体内的持续释放。选择连接部分的组成及其与活性剂的连接点,使得连接部分的裂解释放活性剂或其合适的前药。也可以根据活性剂的所需释放速率来选择连接部分的组成。在一些实施方案中,官能化活性剂和/或连接部分被设计成在体内以最小或不显著的速率裂解。在优选的实施方案中,一种或多种活性剂被官能化为在体内不可从树枝状大分子-三触角型(triantennary)GalNAc裂解或最

低限度裂解,例如通过一个或多个酰胺或醚连接键,任选地,具有一个或多个间隔基/连接基。

[0341] 在一些实施方案中,通过二硫化物、酯、醚、硫酯、氨基甲酸酯、碳酸盐、肼或酰胺连接键中的一种或多种发生连接。在优选的实施方案中,依赖于活性剂的所需释放动力学,通过在药物和树枝状大分子之间提供酯键或酰胺键的适当间隔基发生连接。在某些情况下,引入酯键可形成活性药物的可释放形式。在其他情况下,对于活性剂的不可释放形式,引入了酰胺和/或醚键。

[0342] 连接部分通常包括一个或多个有机官能团。合适的有机官能团的实例包括仲酰胺(-CONH-),叔酰胺(-CONR-),磺酰胺(-S(O)₂-NR-),仲氨基甲酸酯(-OCONH-;-NHC(O)-),叔氨基甲酸酯(-OCONR-;-NRC(O)-),碳酸酯(-O-C(O)-O-),脲(-NHCONH-;-NRCONH-;-NHCONR-;-NRCONR-),甲醇(-CHOH-;-C(OH)-),二硫化物基团、脎、酰肼、醚(-O-)和酯(-COO-;-CH₂O₂C-;-CHRO₂C-),其中R是烷基、芳基或杂环基团。通常,连接部分内的一个或多个有机官能团的特性可以根据活性剂的所需释放速率来选择。此外,可以选择一个或多个有机官能团以促进活性剂与树枝状大分子的共价连接。在优选的实施方案中,连接可以通过在药物和树枝状大分子之间提供二硫键的合适间隔基发生。在体内发现的还原条件下,树枝状大分子复合物能够通过硫醇交换反应在体内快速释放药物。

[0343] 在某些实施方案中,连接部分包括与间隔基组合的一个或多个上述有机官能团。间隔基团可以由任何原子组合构成,包括寡聚和聚合链;然而,间隔基团中的原子总数优选为3-200个原子,更优选3-150个原子,更优选3-100个原子,最优选3-50个原子。合适的间隔基团的实例包括烷基、杂烷基、烷基芳基、寡-和聚乙二醇链以及寡-和聚(氨基酸)链。间隔基的变化提供了对体内活性剂释放的额外控制。在连接部分包括间隔基团的实施方案中,通常使用一个或多个有机官能团将间隔基团连接到活性剂和树枝状大分子上。

[0344] 用于活性剂共价连接到树枝状大分子上的反应和策略是本领域已知的。参见,例如, March, "Advanced Organic Chemistry", 第5版, 2001年, Wiley-Interscience Publication, New York) 和 Hermanson, "Bioconjugate Techniques", 1996, Elsevier Academic Press, U.S.A. 给定活性剂的共价连接的合适方法的选择可以考虑到所需的连接部分, 以及活性剂和树枝状大分子作为一个整体的结构, 因为它涉及官能团的相容性, 保护基团策略, 以及不稳定键的存在。

[0345] 最佳的载药量必然取决于许多因素, 包括药物的选择、树枝状大分子的结构和大小以及待治疗的组织。在一些实施方案中, 一种或多种活性药物以约0.01%至约45%、优选约0.1%至约30%、约0.1%至约20%、约0.1%至约10%、约1%至约10%、约1%至约5%、约3%至约20%重量和约3%至约10%重量的浓度被包封、缔合(associated)和/或缀合到树枝状大分子上。然而, 任何给定药物、树枝状大分子和靶位点的最佳药物负载量可通过常规方法(如所述方法)确定。

[0346] 在一些实施方案中, 活性剂和/或连接基的缀合通过一个或多个表面和/或内部基团发生。因此, 在一些实施方案中, 活性剂/连接基的缀合是在缀合之前通过树枝状大分子的总可用表面官能团(优选羟基)的约1%、2%、3%、4%或5%发生的。在其它实施方案中, 活性剂/连接基的缀合发生在缀合之前的树枝状大分子的少于5%、少于10%、少于15%、少于20%、少于25%、少于30%、少于35%、少于40%、少于45%、少于50%、少于55%、少于

60%、少于65%、少于70%、少于75%的总可用表面官能团上。在优选的实施方案中,树枝状大分子复合物保留有效量的用于靶向特定细胞类型的表面官能团,同时与有效量的活性剂缀合用于治疗、预防疾病或病症和/或使疾病或病症成像。

[0347] V. 使用方法

[0348] 描述了使用树枝状大分子复合物组合物的方法。在一些实施方案中,树枝状大分子复合物用于治疗癌症。在其它实施方案中,树枝状大分子复合物用于治疗自身免疫性疾病。所述方法通常包括向有此需要的受试者施用有效量的组合物,所述组合物包含树枝状大分子和一种或多种活性剂以调节免疫微环境,从而减少自身免疫应答或增加抗肿瘤应答。

[0349] 描述了用于调节免疫微环境以获得期望的免疫结果的方法。在一些实施方案中,在与过度促炎环境相关的疾病或病症中,例如在自身免疫性疾病中,使用所述组合物的治疗减少或抑制一种或多种细胞类型的促炎活性的数量或活性。在其它实施方案中,在与过度免疫抑制环境相关的疾病或病症中(例如在癌细胞/组织中)使用所述组合物的治疗降低或抑制一种或多种细胞类型的抗炎活性的数量或活性。

[0350] 描述了增强肿瘤免疫原性和/或诱导抗肿瘤免疫应答的方法。在一些实施方案中,相对于施用树枝状大分子复合物之前的肿瘤许可性(tumor-permissive)和免疫抑制性免疫细胞的数量或活性,或与施用不存在树枝状大分子支架的活性剂相比,使用所述组合物的治疗减少或抑制肿瘤许可性和免疫抑制性免疫细胞例如TAM和MDSC的数量或活性。

[0351] 描述了消除、抑制或减少受试者中肿瘤相关巨噬细胞(TAM,或M2样巨噬细胞)的方法,例如通过阻断TAM的增殖、迁移或活化。所述方法包括向受试者施用树枝状大分子复合物,所述树枝状大分子复合物包括有效量的一种或多种活性剂以消除、抑制或减少TAM。在一些实施方案中,所述组合物以有效抑制或降低TAM的免疫抑制功能的量给药,例如通过降低一种或多种免疫抑制或抗炎细胞因子如IL-4、IL-10和IL-13,增加一种或多种免疫刺激细胞因子如IL-12、IL-6、IL-1b、CXCL9、CXCL10、TNF α 或其组合。

[0352] 还描述了治疗由TAM介导或调节的癌症的方法。所述方法包括以治疗和/或缓解一种或多种与癌症相关的症状的有效量向受试者施用包括一种或多种活性剂的树枝状大分子复合物。

[0353] 还描述了诱导或增加经典地激活的促炎性和杀瘤性或M1巨噬细胞的扩增和/或功能的方法。

[0354] 髓源性抑制细胞(MDSC)已成为癌症和其他病理状态下免疫反应的主要调节因子。基于表型和形态学特征的两个主要亚群:多形核细胞(PMN)和单核细胞(M)-MDSC。PMN-MDSC也称为粒细胞MDSC(gMDSC)。已知PMN-MDSC(CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{lo})和M-MDSC(CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{hi})的表型标记。在人外周血单核细胞(PBMC)中,PMN-MDSC的等同物定义为CD11b+CD14-CD15+或CD11b+CD14-CD66b+且M-MDSC的等同物定义为CD11b+CD14+HLA-DR^{-/lo}CD15⁻。可使用CD33髓样标记物代替CD11b,因为只有极少数CD15+细胞是CD11b⁻。当M-MDSC表达髓系标志物CD33时,PMN-MDSC显示CD33^{dim}染色(Bronte V等,Nature Communications 7,Article number:12150(2016))。从表型上看,可以通过F4/80的相对表达增加、Ly6C的低至中表达以及S100A9蛋白的低表达或检测不到来区分TAM与M-MDSC。

[0355] 免疫抑制是MDSC的主要特征。尽管MDSC与免疫系统不同细胞的抑制有关,但MDSC

的主要靶点是T细胞。与MDSC介导的免疫抑制有关的主要因素包括精氨酸酶 (ARGI)、iNOS、TGF β 、IL-10、COX2、吡咯胺2,3-双加氧酶 (IDO) 螯合半胱氨酸、T细胞L-选择素表达减少等。

[0356] 描述了消除、抑制或减少受试者肿瘤组织中MDSC的方法,例如通过阻断MDSC的增殖、迁移或活化,和/或逆转其免疫抑制功能。所述方法包括向受试者施用树枝状大分子复合物,所述树枝状大分子复合物包括有效量的一种或多种活性剂,以消除、抑制或降低MDSC在肿瘤组织处的活性、数量和/或功能。靶向TRAIL受体可能是一种有效且选择性的MDSC消除方法(Condamine T,等人J Clin Invest. (2014);124:2626-39.)。在小鼠模型中,包括与抗体Fc片段缀合的S100A9衍生肽在内的peptibody已显示出消除MDSC的潜力(Qin H,等, Nat Med. (2014);20(6):676-81)。靶向MDSC的其他药物包括PDE-5抑制剂他达拉非、合成三萜类化合物、硝基阿司匹林、I类HDAC抑制剂恩替诺特、全反式维甲酸(ATRA)、吉西他滨和5-氟尿嘧啶。因此,在某些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种有效消除、抑制或减少MDSC的试剂缀合。在一些实施方案中,以有效抑制或降低MDSC的免疫抑制功能的量施用所述组合物,例如,通过减少精氨酸酶 (ARGI)、iNOS、TGF β 、IL-10、COX2、吡咯胺2,3-双加氧酶 (IDO) 螯合半胱氨酸或其组合中的一种或多种的产生。

[0357] 还描述了用于激活一种或多种先天免疫传感器和/或Batf3 DCs的募集和激活的方法。示例性的先天性免疫传感器包括用于检测胞质DNA传感的STING途径。在一些实施方案中,以有效激活一种或多种先天免疫传感器和/或Batf3 DC的募集和激活的量施用所述组合物,以增加APC(抗原呈递细胞)分泌I型IFN、CXCL9和/或CXCL10。在一些实施方案中,以有效诱导肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的量施用所述组合物,所述肿瘤浸润淋巴细胞具有能够募集效应T细胞的多种趋化因子的增加的表达,所述趋化因子包括CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CXCL9和CXCL10。

[0358] 在一些实施方案中,所述组合物以有效诱导、引起或刺激肿瘤特异性T细胞(例如细胞毒性CD8+T细胞)具有持续或扩增的生物学功能,或更新或再激活衰竭或失活的肿瘤特异性T细胞,或增加颗粒酶B和/或IFN- γ 从细胞毒性CD8+T细胞的分泌,增加增殖,增加抗原应答性(例如肿瘤)的量给药(相对于治疗前的上述水平)。在一些实施方案中,使用所述组合物的治疗导致免疫抑制调节因子(或免疫激活抑制因子)如PD-1、CTLA4或其组合的表达降低。在优选的实施方案中,所述组合物以相对于用树枝状大分子组合物治疗前的水平有效增加肿瘤特异性T细胞10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、300%或多于300%的量给药。

[0359] 描述了治疗或改善炎性或自身免疫性疾病的一种或多种症状的方法。在一些实施方案中,所述组合物以有效减少促炎细胞因子的产生,和/或促进免疫抑制细胞因子的产生,和/或一种或多种免疫细胞类型的免疫抑制表型的量使用。在其它实施方案中,所述组合物用于抑制参与待治疗的一种或多种免疫病症的一种或多种免疫细胞的促炎性并促进其免疫抑制特性。

[0360] 描述了在受试者中消除、抑制或减少促炎性M1巨噬细胞或经典活化的巨噬细胞(M1样巨噬细胞)的方法,例如通过阻断促炎性M1巨噬细胞的增殖、迁移或活化。所述方法包括向受试者施用包括具有有效消除、抑制或减少促炎性M1巨噬细胞的数量或活性的量的一种或多种活性剂的树枝状大分子复合物。

[0361] 在一些实施方案中,以有效抑制或降低促炎性M1巨噬细胞的免疫抑制功能的量施

用所述组合物,例如,通过减少Th1和自然杀伤(NK)细胞的募集,降低一种或多种促炎性细胞因子如TNF- α 、IL-6、IL-12和IL-23、趋化因子如CCL-5、CXCL9、CXCL10和CXCL。

[0362] 在一些实施方案中,所述组合物和制剂通过施用有效量的组合物以减少一种或多种促炎细胞的活化、增殖和/或产生,和/或增强一种或多种抑制性免疫细胞的活化、增殖和/或产生,以调节需要其的受试者的免疫应答。在一些实施方案中,促炎细胞是促炎M1巨噬细胞。在进一步的实施方案中,抑制性免疫细胞是M2样巨噬细胞。因此,在一些实施方案中,所述组合物可促进在自身免疫性疾病的一个或多个患病组织/器官中促炎表型(M1巨噬细胞)向抗炎状态(M2巨噬细胞)的转变,例如通过减少M1巨噬细胞的活化、增殖和/或产生,以增强M2巨噬细胞的活化、增殖和/或产生,和/或增加M2巨噬细胞与M1巨噬细胞的比率,有效地改善自身免疫性疾病的一种或多种症状。

[0363] 在一些实施方案中,通过增加调节性T细胞(如Treg)的总数或增殖,或减少促炎性T细胞(如Th1和Th17)的总数或增殖,或增加调节性T细胞(如Treg)与促炎性T细胞(如Th1和Th17)的水平比,以有效诱导失能状态或免疫耐受状态的量施用所述组合物。因此,在一些方面,所述组合物被配制用于通过增加Treg水平、或降低促炎性T细胞水平、或两者来诱导失能或耐受性。在其它实施方案中,所述组合物可通过分泌抑制性细胞因子或在外周诱导T细胞凋亡来促进抑制/调节细胞导致T细胞失能或克隆缺失。

[0364] 在进一步的实施方案中,所述组合物可以减弱炎性细胞因子的产生和/或诱导抗炎性细胞因子的产生。示例性炎性细胞因子包括TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-12、IL-17、IL21和IL23。

[0365] A. 治疗方案

[0366] 1. 剂量和有效量

[0367] 剂量和给药方案取决于病症或损伤的严重程度和位置和/或给药方法,并且是本领域技术人员已知的。用于治疗癌症或自身免疫性疾病的树枝状大分子组合物的治疗有效量通常足以减少或减轻癌症或自身免疫性疾病的一种或多种症状。

[0368] 癌症的症状可能是身体上的,如肿瘤负荷,也可能是生物上的,如癌细胞增殖。因此,树枝状大分子复合物的量可以有效地例如杀死肿瘤细胞或抑制肿瘤细胞的增殖或转移。优选地,包括一种或多种活性剂(例如免疫调节剂)的树枝状大分子组合物优先递送至肿瘤组织中或肿瘤组织周围的细胞,例如与肿瘤组织相关的癌细胞或免疫细胞(例如M2巨噬细胞)。优选地,所述活性剂不靶向或以其它方式调节不在肿瘤组织内或不与肿瘤组织相关的健康细胞的活性或量,或与癌症或癌症相关细胞相比以降低的水平靶向或以其它方式调节健康细胞的活性或量。以这种方式,减少了与组合物相关的副产物和其它副作用,优选直接或间接导致癌细胞死亡。在一些实施方案中,活性剂直接或间接减少癌细胞迁移、血管生成、免疫逃逸、放射抗性或其组合。在一些实施方案中,所述活性剂直接或间接诱导癌细胞本身或其微环境的改变,所述改变减少针对癌细胞的免疫应答的抑制或诱导针对癌细胞的免疫应答的激活。例如,在一些实施方案中,以增强和/或延长T细胞的活化、增殖和/或功能(即,增加T细胞的肿瘤特异性增殖,增强T细胞的细胞因子产生,刺激分化,刺激T细胞的效应子功能和/或促进T细胞存活)或克服T细胞衰竭和/或失能的有效量施用所述组合物。

[0369] 在一些体内方法中,以降低肿瘤大小的治疗有效量将树枝状大分子复合物给予受试者。在一些实施方案中,有效量的组合物用于使癌症缓解和/或保持癌症缓解。还提供了

有效量的降低或阻止癌症干细胞增殖的组合物。

[0370] 树枝状大分子复合物的实际有效量可以根据各种因素而变化,所述因素包括施用的特定活性剂、配制的特定组合物、施用方式以及所治疗对象的年龄、体重、带治疗的受试者的情况以及给药途径以及疾病或病症。受试者通常是哺乳动物,最优选人。一般情况下,对于静脉注射或输注,剂量可以更低。

[0371] 一般而言,将调整给药的时间和频率,以平衡给定治疗或诊断方案的疗效与给定给药系统的副作用。示例性给药频率包括连续输注、单次给药和多次给药,例如每小时、每天、每周、每月或每年给药。

[0372] 在一些实施方案中,每天一次、两次或三次,或每隔一天、两天、三天、四天、五天或六天向人施用剂量。在一些实施方案中,剂量每周施用约一次或两次、每两周施用、每三周施用或每四周施用。在一些实施方案中,剂量约每月一次或两次、每两个月、每三个月、每四个月、每五个月或每六个月施用。

[0373] 胃肠外给药时,给药剂量范围为0.1至100mg/kg体重。最初可给予较高剂量,以使患者负荷药物并使患病组织(例如肿瘤)中的摄取最大化。负荷剂量之后,患者可接受维持剂量。负荷剂量范围为10至100mg/kg体重,维持剂量范围为0.1至<10mg/kg体重。当肠内或局部给药时,治疗所需剂量可能为有效胃肠外剂量的至多10倍。从患者服用的每种药物的每种试验剂量的安全性和疗效结果中选择最佳剂量。

[0374] 本领域普通技术人员应当理解,给药方案可以是足以治疗受试者病症的任何时间长度。在一些实施方案中,该方案包括一轮治疗的一个或多个周期,随后是药物假期(例如,没有药物)。药物假期可以是1、2、3、4、5、6或7天;或1、2、3、4周,或1、2、3、4、5或6个月。

[0375] 2. 对照

[0376] 可以将包括一种或多种活性剂的树枝状大分子复合物组合物的治疗结果与对照进行比较。合适的对照是本领域已知的,包括例如未处理的细胞或未治疗的受试者。典型的对照是受试者在施用靶向药物之前和之后的状况或症状的比较。病症或症状可以是生化、分子、生理或病理读数。例如,可将组合物对特定症状、药理学或生理学指标的影响与未治疗的受试者或治疗前的受试者状况进行比较。在一些实施方案中,在治疗前在受试者中测量症状、药理学或生理学指标,并且在治疗开始后再次测量一次或多次。在一些实施方案中,所述对照是参考水平,或基于在不具有待治疗疾病或病症的一个或多个受试者(例如,健康受试者)中测量症状、药理学或生理学指标而确定的平均值。在一些实施方案中,将治疗的效果与本领域已知的常规治疗进行比较。

[0377] B. 组合治疗和程序

[0378] 在一些实施方案中,与一种或多种免疫调节剂和/或另外的治疗剂或诊断剂缀合或复合的树枝状大分子的组合物与一种或多种常规疗法例如常规癌症疗法组合施用。在一些实施方案中,常规治疗包括施用一种或多种组合物与一种或多种另外的活性剂的组合。组合治疗可以包括在相同的混合物一起中或在分开的混合物中施用活性剂。因此,在一些实施方案中,药物组合物包括两种、三种或更多种活性剂。这样的制剂通常包括有效量的靶向肿瘤微环境的免疫调节剂。额外的活性剂可以具有相同或不同的作用机制。在一些实施方案中,该组合导致对癌症治疗的相加作用。在一些实施方案中,所述组合对疾病或病症的治疗产生多于相加的效果。

[0379] 在一些实施方案中,所述制剂被配制用于对受试者的静脉内、皮下或肌肉内给药,或用于肠内给药。在一些实施方案中,所述制剂在用一种或多种另外的疗法或程序治疗之前、与所述一种或多种另外的疗法或程序治疗结合、在所述一种或多种另外的疗法或程序治疗之后或与所述一种或多种另外的疗法或程序治疗交替施用。在一些实施方案中,在药物周期之间或在作为组合物剂量方案一部分的药物假期期间进行额外治疗。例如,在一些实施方案中,附加的治疗或程序是手术、放射治疗或化学治疗。

[0380] 其他治疗剂包括常规癌症治疗剂,如化疗剂、细胞因子、趋化因子和放射治疗。大多数化疗药物可分为烷化剂、抗代谢药、蒽环类、植物生物碱、拓扑异构酶抑制剂和其他抗肿瘤药物。这些药物会以某种方式影响细胞分裂或DNA合成和功能。其他治疗药物包括单克隆抗体和酪氨酸激酶抑制剂,例如甲磺酸伊马替尼(GLEEVEC®或GLIVEC®),其直接靶向某些类型癌症(慢性髓性白血病、胃肠道间质瘤)中的分子异常。

[0381] 代表性的化疗剂包括但不限于:安吡啶、博来霉素、白消安、喜树碱、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氯法拉滨、克利桑酶、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素D、柔红霉素、多西他赛、阿霉素、表鬼臼毒素、表柔比星、依托泊苷、磷酸依托泊苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基尿素、伊达比星、异环磷酰胺、innotecan、亚叶酸钙、脂质体阿霉素、脂质体柔红霉素、洛莫司汀、氮芥、美法仑、巯基嘌呤、美司那、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、喷司他丁、甲基苄肼、雷替曲塞、赛特铂、链脲菌素,替尼泊苷,替加氟尿嘧啶,替莫唑胺,替尼泊苷,噻替派,硫鸟嘌呤、拓扑替康、苏消安、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨、伏立诺他、紫杉醇、曲古抑菌素A及其衍生物,曲妥单抗(HERCEPTIN®)、西妥昔单抗,和利妥昔单抗(RITUXAN®或MABTHERA®)、贝伐单抗(AVASTIN®)和其组合。代表性的促凋亡剂包括但不限于氟达拉滨、环己酰亚胺、放线菌素D、乳酰神经酰胺、15d-PGJ(2) 5及其组合。

[0382] 在一些实施方案中,所述组合物和方法在免疫疗法之前或与免疫疗法联合使用,所述免疫疗法使用一种或多种免疫检查点调节剂(例如,PD-1拮抗剂、PD-1配体拮抗剂和CTLA4拮抗剂)、过继性T细胞治疗和/或癌症疫苗来抑制检查点蛋白,例如PD-1/PD-L1轴或CD28-CTLA-4轴的组分。免疫治疗中使用的示例性免疫检查点调节剂包括派姆单抗(抗-PD1 mAb)、德瓦鲁单抗(抗-PDUMAb)、PDR001(抗-PD1 mAb)、阿特珠单抗(抗-PDL1 mAb)、纳武单抗(抗-PD1 mAb)、曲美木单抗(抗-CTLA4 mAb)、Avelumab(抗-PDL1 mAb)和RG7876(CD40激动剂mAb)。

[0383] 采用T细胞治疗的方法是本领域已知的并用于临床实践。一般而言,过继性T细胞治疗包括分离和离体扩增肿瘤特异性T细胞,以获得比单独接种疫苗更多的T细胞。然后将肿瘤特异性T细胞输注给癌症患者,试图通过T细胞赋予其免疫系统压倒剩余肿瘤的能力,从而攻击并杀死癌症。几种形式的过继性T细胞治疗可用于癌症治疗,包括但不限于培养肿瘤浸润淋巴细胞或TIL;分离并扩增一个特定的T细胞或克隆;以及使用已经被设计来识别和攻击肿瘤的T细胞。在一些实施方案中,T细胞直接取自患者的血液。用于适应性T细胞癌症治疗的体外引发和激活T细胞的方法是本领域已知的。参见,例如,Wang,等人,Blood,109(11):4865-4872(2007)和Hervas-Stubbs,等人,j.Immunol.,189(7):3299-310(2012)。

[0384] 历史上,过继性T细胞治疗策略大多集中于输注能直接杀伤肿瘤细胞的肿瘤抗原特异性细胞毒性T细胞(CTL)。但是,也可以使用CD4+T辅助(Th)细胞,如Th1、Th2、Th17、Treg

和Th17。Th可激活抗原特异性效应细胞,招募巨噬细胞、树突状细胞等先天性免疫系统细胞辅助抗原呈递(APC),抗原致敏的(antigen primed)Th细胞可直接激活肿瘤抗原特异性CTL。由于活化了APC,抗原特异性Th₁被认为是表位或决定簇扩散的起始物,表位或决定簇扩散是对肿瘤中其他抗原的免疫增宽。引发表位扩散的能力拓宽了对肿瘤中许多潜在抗原的免疫应答,并且由于能够安装异质响应,可以导致更有效的肿瘤细胞杀伤。这样,可以采用过继性T细胞治疗来刺激内源性免疫。

[0385] 在一些实施方案中,T细胞表达嵌合抗原受体(CARs、CAR T细胞或CART)。人工T细胞受体是工程化受体,将特定的特异性移植到免疫效应细胞上。通常,这些受体用于将单克隆抗体的特异性移植到T细胞上,并且可以被工程化以靶向几乎任何肿瘤相关抗原。第一代CAR通常具有来自CD3 ζ 链的细胞内结构域,是内源性TCR信号的主要递质。第二代CAR将来自各种共刺激蛋白受体(如CD28,41BB,ICOS)的细胞内信号结构域添加到CAR的胞质尾部,从而为T细胞提供额外的信号,第三代CAR结合多个信号结构域,如CD3 ζ -CD28-41BB或CD3 ζ -CD28-0X40,以进一步增强有效性。

[0386] 在一些实施方案中,所述组合物和方法在癌症疫苗(例如树突细胞癌症疫苗)之前使用或与癌症疫苗联合使用。接种疫苗通常包括给受试者施用抗原(例如,癌症抗原)与佐剂一起在体内引发治疗性T细胞。在一些实施方案中,癌症疫苗是树突细胞癌症疫苗,其中由树突细胞递送的抗原被离体启动以呈递癌症抗原。实例包括 **PROVENGE®** (sipuleucel-T),这是一种基于树突细胞的疫苗,用于治疗前列腺癌(Ledford,et al., Nature,519,17-18(05March 2015))。Palucka,et al.,Nature Reviews Cancer,12,265-277(April 2012)中综述了这类疫苗以及免疫疗法的其他组合物和方法。

[0387] 在一些实施方案中,所述组合物和方法在手术切除肿瘤之前或与手术切除肿瘤结合使用,例如,用于预防原发性肿瘤转移。在一些实施方案中,所述组合物和方法用于增强机体自身的抗肿瘤免疫功能。

[0388] C.待治疗受试者

[0389] 一般而言,所述组合物及其治疗方法可用于癌症,包括肿瘤治疗。该组合物还可用于治疗其他疾病、病症和损伤,包括炎性疾病,包括但不限于溃疡性结肠炎、克罗恩病和类风湿性关节炎。

[0390] 在一些实施方案中,待治疗的受试者是人。所述的所有方法可包括鉴定和选择需要治疗的受试者或可受益于与组合物一起给药的受试者的步骤。因此,在一些实施方案中,与一种或多种免疫调节剂和/或另外的治疗剂或诊断剂缀合或复合的树枝状大分子的组合物在治疗癌症或治疗包括炎性疾病如溃疡性结肠炎、克罗恩病、类风湿性关节炎和骨病在内的其它疾病、病症和损伤的背景下被施用给需要免疫调节的受试者。

[0391] 1.癌症

[0392] 在一些实施方案中,将与一种或多种免疫调节剂和/或另外的治疗剂或诊断剂缀合或复合的树枝状大分子的组合物施用于患有增殖性疾病如良性或恶性肿瘤的受试者。在一些实施方案中,待治疗的受试者被诊断为I期、II期、III期或IV期癌症。

[0393] 癌症一词特指恶性肿瘤。除了不受控制的生长外,恶性肿瘤还会出现转移。在这个过程中,小簇的癌细胞从肿瘤上脱落,侵入血液或淋巴管,并被带到其他组织,在那里继续增殖。这样,一个部位的原发肿瘤会导致另一个部位的继发性肿瘤。

[0394] 所述组合物和方法可用于通过延迟或抑制受试者中肿瘤的生长、降低肿瘤的生长或大小、抑制或降低肿瘤的转移、和/或抑制或降低与肿瘤发展或生长相关的症状来治疗患有良性或恶性肿瘤的受试者。

[0395] 可治疗的恶性肿瘤根据肿瘤来源组织的胚胎来源分类。癌是由内胚层或外胚层组织如皮肤或内脏器官和腺体的上皮内层产生的肿瘤。该组合物在治疗癌症中特别有效。肉瘤发生频率较低,来源于中胚层结缔组织,如骨、脂肪和软骨。白血病和淋巴瘤是骨髓造血细胞的恶性肿瘤。白血病以单细胞形式增殖,而淋巴瘤则倾向于以肿瘤块形式生长。恶性肿瘤可能出现在身体的许多器官或组织中,从而形成癌症。

[0396] 可用所述组合物和方法治疗的癌症类型包括但不限于骨、膀胱,脑、乳腺、宫颈、结肠直肠、食管、肾、肝、肺、鼻咽部、胰腺、前列腺、皮肤、胃和子宫。在一些实施方案中,组合物用于同时治疗多种癌症类型。所述组合物还可用于治疗多个部位的转移或肿瘤。

[0397] 示例性的肿瘤细胞包括癌症的肿瘤细胞,包括白血病,包括但不限于急性白血病、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病(例如成髓细胞的、前髓细胞的、骨髓单核细胞的、单核细胞的、红白血病白血病以及骨髓异常增殖综合征、慢性白血病,包括但不限于,慢性髓细胞(粒细胞)白血病、慢性淋巴细胞白血病、毛细胞白血病、红细胞增多症;淋巴瘤包括但不限于霍奇金病、非霍奇金病;多发性骨髓瘤包括但不限于郁积型多发性骨髓瘤、无分泌性骨髓瘤、骨硬化性骨髓瘤、浆细胞白血病、孤立浆细胞瘤和髓外浆细胞瘤;瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症;未确定显著性的单克隆丙种球蛋白病;良性的单克隆丙种球蛋白病;重链病;骨和结缔组织肉瘤包括但不限于骨肉瘤(bone sarcoma)、骨肉瘤(osteosarcoma)、软骨肉瘤、尤因氏肉瘤、恶性巨细胞瘤、骨纤维肉瘤、脊索瘤、骨膜肉瘤、软组织肉瘤、血管瘤(血管瘤)、纤维肉瘤、卡波西肉瘤、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、淋巴管肉瘤、神经鞘瘤、横纹肌肉瘤、滑膜肉瘤;脑瘤包括但不限于神经胶质瘤、星细胞瘤、脑干胶质瘤、室鼓膜瘤、少枝胶质细胞瘤、非神经胶质瘤、听神经瘤、颅咽管瘤、成神经管细胞瘤、脑脊膜瘤、松果体细胞瘤、成松果体细胞瘤、原发性脑恶性淋巴瘤;乳腺癌包括但不限于腺癌、小叶(小细胞)癌、导管内癌、乳腺髓样癌、乳腺黏液癌、管状乳腺癌、乳突状乳腺癌、帕哲病和炎性乳腺癌;肾上腺瘤包括但不限于嗜铬细胞瘤和肾上腺皮质腺癌;甲状腺癌包括但不限于乳头状或滤泡状甲状腺癌、甲状腺髓样癌和甲状腺未分化癌;胰腺癌包括但不限于,胰岛癌、促胃液素瘤、胰高血糖素瘤、VIP肿瘤、生长激素抑制素分泌瘤和良性肿瘤或胰岛细胞瘤;垂体瘤包括但不限于库欣氏病、泌乳素瘤、肢端肥大症和尿崩症;眼癌包括但不限于眼膜恶性黑色素瘤如虹膜恶性黑色素瘤、脉络膜恶性黑色素瘤和睫状体恶性黑色素瘤以及视网膜神经胶质瘤;阴道癌包括但不限于鳞状细胞癌、腺癌和黑素癌;外阴癌包括但不限于鳞状细胞癌、黑素癌、腺癌、基底细胞癌、肉瘤和帕哲病;宫颈癌包括但不限于鳞状细胞癌和腺癌;子宫癌包括但不限于子宫内膜癌和子宫肉瘤;卵巢癌包括但不限于,卵巢上皮性癌、境界瘤、胚组织瘤和间质瘤;食管癌包括但不限于,鳞状细胞癌、腺癌、腺鳞癌、粘表皮癌、腺性鳞状癌、肉瘤、黑素癌、浆细胞瘤、疣状癌和燕麦细胞(小细胞)瘤;胃癌包括但不限于腺癌、真菌样生长(息肉状)、溃疡的、表面传播的、扩散传播的、恶性淋巴瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤和癌肉瘤;结肠癌;直肠癌;肝癌包括但不限于肝细胞癌和肝胚细胞瘤;胆囊癌包括但不限于腺癌;胆管癌包括但不限于乳头状、结节状和扩散的;肺癌包括但不限于非小细胞肺癌、鳞状细胞癌(表皮癌)、腺癌、大细胞癌和小细胞肺癌;睾丸癌包括但不限于胚胎瘤、精原细胞瘤、退行发育的、代

表性的(典型的)、精母细胞、非精原细胞瘤、胚胎性癌、畸胎瘤、绒毛膜癌(卵黄囊瘤);前列腺癌包括但不限于,腺癌、平滑肌肉瘤和横纹肌肉瘤、阴茎癌;口腔癌包括但不限于鳞状细胞癌、基底癌;唾液腺癌症例如但非限制于腺癌、粘表皮癌和腺样囊性癌;咽癌包括但不限于鳞状细胞癌和疣;皮肤癌包括但不限于,基底细胞癌、鳞状细胞癌和黑素瘤、浅表扩散性黑色素瘤、结节性黑色素瘤、恶性雀斑痣样黑素瘤、肢端着色斑性黑素瘤;肾癌包括但不限于肾细胞癌、腺癌、肾上腺样癌、纤维肉瘤、移行细胞癌(肾盂和/或子宫);肾母细胞瘤;膀胱癌包括但不限于转移细胞癌、鳞状细胞癌、腺癌、癌肉瘤。在一个实施方案中,癌症是白血病患者的大脑转移。

[0398] 可以通过所述组合物预防、治疗或以其他方式减少的癌症包括粘液肉瘤、骨源性肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、间皮瘤、滑膜瘤、成血管细胞瘤、上皮癌、囊腺癌、支气管癌、汗腺瘤、皮脂腺癌、乳突状癌、乳突状腺癌和胃癌(这些情况的综述参见Fishman等人,1985,Medicine,第2版,J.B.Lippincott Co.,Philadelphia和Murphy等人,1997,Informed Decisions:The Complete Book of Cancer Diagnosis,Treatment,and Recovery,Viking Penguin,Penguin Books U.S.A.,Inc.,United States of America)。

[0399] 在一些实施方案中,所述癌症的特征为三阴性乳腺癌,或具有一种或多种KRAS突变、EGFR突变、ALK突变、RB1突变、HIF突变、KEAP突变、NRF突变或其它代谢相关突变,或其组合。

[0400] 所述的方法和组合物可用于预防性和治疗性治疗。

[0401] 治疗性治疗包括在诊断出癌症后,向受试者施用治疗有效量的所述组合物或其药学上可接受的盐。

[0402] 在进一步的实施方案中,所述组合物用于预防用途,即预防、延迟发作、减少、根除或延迟发作后的体征或症状的恶化,以及预防复发。对于预防用途,在发病之前(例如,在癌症的明显体征之前)、在早发期间(例如,在癌症的初始体征和症状之后)或在癌症的确定发展之后,向受试者施用治疗有效量的所述化合物和组合物或其药学上可接受的盐。预防性给药可在症状出现前数天至数年内进行。预防性给药可用于例如对呈现癌前病变的受试者、被诊断为早期恶性肿瘤的受试者以及对特定癌症具有易感性(例如,家族、种族和/或职业)的亚组的化学预防性治疗。

[0403] 在一些实施方案中,待治疗的受试者是患有一种或多种实体瘤的受试者。实体瘤是一种异常的组织肿块,通常不含囊肿或液体区域。实体瘤可以是良性的(不是癌症),也可以是恶性的(癌症)。实体瘤的例子有肉瘤、癌和淋巴瘤。在优选的实施方案中,所述组合物和方法可有效治疗皮肤癌、肺癌、肝癌、胰腺癌、脑癌、肾癌、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌和直肠癌、膀胱癌等的一种或多种症状。在进一步的实施方案中,肿瘤是局灶性淋巴瘤或滤泡性淋巴瘤。

[0404] 肾细胞癌(RCC)

[0405] 在一些实施方案中,待治疗的受试者患有肾细胞癌(RCC)。肾细胞癌是指肾小管内形成恶性(癌)细胞的疾病。RCC(肾细胞癌)又称肾细胞腺癌或肾癌,是一种恶性细胞在肾脏小管内层生长的疾病。症状包括尿中带血(诊断时40%在受影响的人)、侧腹部痛(40%)、腹部或侧腹部肿块(25%)、体重减轻(33%)、发烧(20%)、高血压(20%)、盗汗和全身不适以及腹部肿块/腹胀增加。有两种亚型:散发型(即非遗传型)和遗传型。肾细胞癌(RCC)不是一

个单一的实体,而是不同肿瘤的集合,每个肿瘤源自肾单位的不同部分,每个肿瘤都具有独特的遗传特征、组织学特征和/或临床表型。转移性肾细胞癌(mRCC)是原发性肾细胞癌从肾脏到其他器官的扩散。25-30%的RCC患者在被诊断时表现出转移性扩散,这主要是因为RCC进展至更严重阶段之前,临床体征通常较轻。常见的转移部位为淋巴结、肺、骨、肝和脑。

[0406] 肿瘤相关巨噬细胞(TAM)是肿瘤基质中的重要成分。它们来源于被肿瘤细胞产生的趋化因子和细胞因子吸引的血液单核细胞,并在肿瘤微环境的指导下,发展成为强效的肿瘤支持细胞群。TAM直接刺激肿瘤细胞增殖,促进血管生成,通过产生免疫抑制细胞因子提供有效的免疫逃逸,通过产生细胞外基质重塑酶促进肿瘤播散。在肾细胞癌(RCC)中,TAM密度增加与患者生存率差有关(参见Kovaleva,等人,Anal Cell Pathol (Amst).2016;2016:9307549,其内容通过引用整体并入本文)。从RCC肿瘤中分离出的巨噬细胞可产生促炎细胞因子TNF α 、IL-1 β 、IL-6和CCL2,RCC可能是一种具有TAM杂合表型的肿瘤,表现出1型(M1)巨噬细胞和2型(M2)巨噬细胞的特性。因此,在一些实施方案中,所述组合物和方法可有效治疗需要其的受试者的肾细胞癌。该受试者可被诊断为患有肾细胞癌,或被确定为具有增强的肾细胞癌风险。

[0407] 所述组合物和方法可用于通过延迟或抑制受试者中肿瘤的生长、降低肿瘤的生长或大小、抑制或降低肿瘤的转移、和/或抑制或降低与肿瘤发展或生长相关的症状来治疗患有肾细胞癌的受试者。在一个特定实施方案中,所述方法通过向受试者施用有效量的药物组合物来减少或抑制被鉴定为患有肾细胞癌的受试者中肾细胞癌肿瘤部位处的一种或多种免疫抑制细胞,所述药物组合物包括与一种或多种有效减少受试者中肿瘤生长的活性剂复合或缀合的树枝状大分子。在一些实施方案中,树枝状大分子和活性剂之间的连接的方法和化学特性影响活性剂减小肿瘤大小的效率。在一个优选的实施方案中,活性剂通过醚和/或酰胺键与树枝状大分子连接。在一些实施方案中,活性剂通过连接基与树枝状大分子连接。在一个特定的实施方案中,活性剂通过连接基与树枝状大分子连接,该连接基通过醚键与树枝状大分子缀合,活性剂通过酰胺键与连接基缀合。

[0408] 有效减小肿瘤大小的示例性活性剂是舒尼替尼或一种或多种舒尼替尼类似物。在一个优选的实施方案中,舒尼替尼或一种或多种舒尼替尼类似物通过酰胺键与树枝状大分子连接。

[0409] 在一些实施方案中,所述方法包括与一种或多种另外的活性剂联合治疗以抑制肾肿瘤的生长和扩散。示例性的活性药物包括纳武单抗、阿昔替尼、舒尼替尼、卡博替尼、依维莫司、仑伐替尼、帕唑帕尼、贝伐单抗、索拉非尼、替沃扎尼(Tivozanib)、替西罗莫司(Temsirolimus)、白介素-2(IL-2)、干扰素- α 、易普利姆玛、阿特珠单抗、伐立鲁单抗、德瓦鲁单抗、阿维单抗、LAG525、MBG453、TRC105和赛沃替尼。

[0410] 2. 自身免疫性或炎性疾病

[0411] 在一些实施方案中,将与一种或多种免疫调节剂和/或另外的治疗剂或诊断剂缀合或复合的树枝状大分子的组合物给药于具有自身免疫性或炎性疾病或病症。自身免疫性疾病是指人体的自然防御系统无法有效区分自身细胞和外来细胞,导致身体错误攻击正常细胞的疾病。有80多种自身免疫性疾病会影响身体的各个部分。常见的自身免疫性疾病包括类风湿性关节炎、银屑病、银屑病关节炎、系统性红斑狼疮(SLE)、1型糖尿病、炎性肠病和甲状腺疾病。

[0412] 在一些实施方案中,所述组合物还可用于治疗自身免疫性或炎性疾病或病症,例如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性阿狄森氏病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳疾病、自身免疫性淋巴增生综合征(alps)、自身免疫性血小板减少性紫癜(ATP)、贝西氏病(Bechet's Disease)、大疱性类天疱疮、心肌病、乳糜泻性皮炎、慢性疲劳综合征、免疫缺陷综合征(CFIDS)、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病、瘢痕性类天疱疮、冷凝集素病、Crest综合征、克罗恩病、Dego's病、皮炎、皮炎-幼年型、盘状狼疮、原发性混合冷球蛋白血症、纤维肌痛-纤维肌炎、格雷夫斯病、吉兰-巴雷综合征、桥本甲状腺炎、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA肾病、胰岛素依赖性糖尿病(I型)、幼年型关节炎、Meniere病、混合结缔组织病、多发性硬化、重症肌无力、寻常型天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多关节综合征、风湿性多肌痛、多发性肌炎和皮炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、银屑病、雷诺现象(Raynaud's phenomenon)、Reiter's综合征、风湿热、结节病、硬皮病、干燥综合征、僵人综合征、大动脉炎(Takayasu arteritis)、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎、白癜风和Wegener's肉芽肿。

[0413] 在一些实施方案中,所述组合物和方法还可用于治疗涉及骨和关节的自身免疫性或炎性疾病或病症,包括感染和免疫介导的局部和全身性疾病。

[0414] i. 炎性骨疾病和病症

[0415] 在一些实施方案中,待治疗的受试者是患有一种或多种炎性骨病的受试者。炎性骨病是由似乎无故的免疫过程激活引起的,导致骨炎症和骨疾病/病症。炎性骨病变可表现为慢性炎性过程,很少或没有组织病理学改变(Stern,等人,Rheum Dis Clin North Am.2013Nov;39(4):10.1016/j.rdc.2013.05.002)。因此,在一些实施方案中,所述组合物和方法可有效治疗一种或多种炎性骨疾病,包括骨髓炎(急性骨髓炎、亚急性骨髓炎、慢性骨髓炎)、慢性非细菌性骨髓炎(CNO);SAPHO综合征;马吉德综合征(Majeed syndrome);白介素-1受体拮抗剂缺乏(DIRA);和家族性巨颌症。

[0416] 在一个特定的实施方案中,待治疗的受试者是患有骨髓炎的受试者。骨髓炎是与骨和/或骨髓相关的炎症,可能由骨组织内的细菌或真菌感染引起。骨髓炎可在血流感染后发生,例如,由于受伤或手术,或可在无感染的情况下发生(慢性非细菌性骨髓炎),在历史上一直难以治疗。因此,在一些实施方案中,用于将活性剂靶向炎性巨噬细胞的组合物和方法对于治疗骨髓炎是有效的。可治疗的示例性骨髓炎疾病和病症包括慢性非细菌性骨髓炎、急性骨髓炎、亚急性骨髓炎、慢性骨髓炎或腿、脊柱、臂、颌或骨盆骨的血源性骨髓炎。所述组合物和方法可有效治疗或预防诊断为骨髓炎的受试者或鉴定为发展骨髓炎的风险增加的受试者的骨髓炎,例如有深度伤口、血液感染、骨手术、免疫力下降、HIV或糖尿病的人。在一个优选的实施方案中,待治疗的受试者是患有自身炎症性骨髓炎(慢性非细菌性骨髓炎)的受试者。

[0417] ii. 炎性关节病

[0418] 在一些实施方案中,待治疗的受试者是患有一种或多种炎性关节疾病的受试者。巨噬细胞介导的促炎机制导致与许多急慢性关节疾病的发病机制相关的滑膜炎。因此,在一些实施方案中,所述组合物和方法可有效治疗一种或多种炎性关节病。示例性炎性关节病包括创伤后关节损伤、滑膜炎、关节炎、红斑狼疮、强直性脊柱炎、幼年强直性脊柱炎、

急性前葡萄膜炎、纤维肌痛和硬皮病。

[0419] 在特定实施方案中,待治疗的受试者是患有关节炎的受试者。可以治疗的示例性关节炎疾病包括骨关节炎、类风湿性关节炎、幼年关节炎、Reiter's综合征、银屑病关节炎、肠道病性关节炎、感染性关节炎和反应性关节炎。

[0420] 骨关节炎

[0421] 在一些实施方案中,待治疗的受试者是患有骨关节炎的受试者。骨关节炎是一个病因和发病机制多样、累及多关节组织的退行性疾病家族。骨关节炎可累及所有关节组织,表现为关节软骨进行性变性、关节面新生血管浸润、软骨下骨重塑、骨赘形成、骨髓病变、半月板损伤和滑膜炎(滑膜炎)。在创伤或感染以及与年龄相关的磨损过程中,关节软骨受损的风险很高。如果不进行治疗,创伤会导致底层软骨下骨病变,导致软骨退化,关节炎症/关节整体紊乱,最终导致骨关节炎。骨关节炎的治疗针对非药物治疗,并且对症治疗(疼痛管理)。巨噬细胞通过多种分泌性介质介导关节炎症,在调节骨关节炎严重程度方面发挥重要作用。骨关节炎的滑膜炎与滑液中的炎症趋化因子、细胞因子和其他炎症标志物有关(Goldring,等人,Curr Opin Rheumatol.,2011Sep;23(5):471-478)。巨噬细胞是骨关节炎患者发炎的滑膜组织中最常见的免疫细胞类型。因此,在一些实施方案中,用于将活性剂靶向炎性巨噬细胞的组合物和方法对于治疗患有骨关节炎的受试者是有效的。在一些实施方案中,所述方法预防或减少滑膜炎,减少或防止与骨关节炎相关的炎症趋化因子、细胞因子和其它炎症标记物,或增加或诱导骨关节炎患者中巨噬细胞介导的软骨修复和再生。

[0422] 类风湿性关节炎

[0423] 在一些实施方案中,待治疗的受试者是患有类风湿性关节炎(RA)的受试者。类风湿性关节炎是一种长期疾病,会导致关节肿胀、僵硬和疼痛,尤其是手、脚和手腕。类风湿性关节炎是一种自身免疫性疾病,通过免疫系统攻击排列关节的细胞,导致关节炎症。症状包括关节肿胀、僵硬和疼痛、红细胞计数低、肺部周围炎症、心脏周围炎症,还可能出现发热和能量低下。随着时间的推移,炎症会损害关节、软骨和骨骼。在超过15-25%的病例中,这种疾病影响非关节器官。RA是一种系统性(全身性)自身免疫性疾病,具有遗传和环境风险因素。类风湿性关节炎作为一种持续的细胞活化状态启动,导致关节和其他器官出现自身免疫复合物,巨噬细胞是类风湿性关节炎相关炎症的核心成分:成纤维细胞样滑膜细胞在滑膜炎和关节/器官损伤等临床表现的发展中起关键作用。RA进展的三个阶段(起始阶段,由于非特异性炎症;扩增阶段,由于T细胞活化;和慢性炎症期,具有由细胞因子(包括IL-1、TNF- α 和IL-6)引起的组织损伤)导致B淋巴细胞大量产生类风湿因子和IgG和IgM类的ACPA。这些反过来又通过Fc受体和补体结合激活巨噬细胞,导致类风湿性关节炎特有的强烈炎症。因此,在一些实施方案中,用于将活性剂靶向炎性巨噬细胞的组合物和方法对于治疗患有类风湿性关节炎的受试者是有效的。在一些实施方案中,所述方法在类风湿性关节炎患者中预防或减少滑膜炎,减少或防止与类风湿性关节炎相关的炎症趋化因子、细胞因子和其它炎症标记物,和/或增加或诱导巨噬细胞介导的软骨修复和再生。

[0424] 通过参考以下非限制性实施例,将进一步理解本发明。

实施例

[0425] 实施例1:树枝状大分子在肿瘤组织中的免疫细胞中的分布

[0426] 方法和材料**[0427] 小鼠**

[0428] 雌性C57BL/6小鼠 (C57BL/6NCr1 Charles River) 在研究第1天为8周龄, 体重 (BW) 范围为17.7至21.5g。向动物随意喂食水 (反渗透, 1ppm Cl) 和NIH 31Modified andIrradiated LabDiet®, 包括18.0%粗蛋白、5.0%粗脂肪和5.0%粗纤维。将小鼠饲养在静态微隔离器中经过辐照的ENRICH-O' COBS™床上, 在20-22℃ (68-72°F) 和40-60%湿度下进行12小时光循环。Charles River Discovery Services North Carolina (CR Discovery Services) 特别遵守《实验动物护理和使用指南》中关于约束、饲养、手术程序、饲料和液体调节以及兽医护理方面的建议。在CR Discovery Services的动物护理和使用计划通过了国际实验动物保护协会 (AAALAC) 的评估和认证, 确保符合公认的实验动物保护和标准。

[0429] 肿瘤细胞培养

[0430] MC38小鼠结肠癌细胞在含有10%胎牛血清、2mM谷氨酰胺、100单位/mL青霉素G、100μg/mL硫酸链霉素和25μg/mL庆大霉素的DMEM培养基中生长至对数中期。肿瘤细胞在37℃加湿培养箱的组织培养瓶中, 在5%CO₂和95%空气气氛中培养。

[0431] 体内植入

[0432] 植入当天, 在对数生长期收获MC38细胞, 并以5x 10⁶细胞/mL的浓度重新悬浮于磷酸盐缓冲液 (PBS) 中。通过将5x 10⁵MC38细胞 (0.1mL悬液液) 皮下植入每只试验动物的右侧腹部来引发肿瘤, 并在肿瘤体积接近80至120mm³的目标范围时对其进行监测。肿瘤植入后12天, 指定为研究的第1天, 将动物分为四组 (组1至3的n=10, 组4的n=1), 单个肿瘤体积在75至126mm³之间, 组平均肿瘤体积在95至108mm³之间。

[0433] 使用卡尺二维测量肿瘤, 体积使用以下公式计算:

[0434] 肿瘤体积(mm³) =
$$\frac{w^2 \times l}{2}$$

[0435] 其中w=肿瘤的宽度, l=肿瘤的长度, 单位为mm。在假定1mg相当于1mm³肿瘤体积的情况下, 可估计肿瘤重量。

[0436] 治疗剂

[0437] Ashvattha Therapeutics, Inc提供D-Cy5 (批号1, 编码FFZ1), 储存在-80℃, 给药前后避光保存。给药当天, D-Cy5 (一种小分子染料, 代表小分子药物) 贮备溶液 (均为8.25mg/mL) 在避光和避热条件下平衡至室温。然后对试剂进行超声处理并涡旋3分钟, 以获得透明的蓝色溶液, 然后将其在PBS (媒介物) 中稀释至5.5mg/mL。当以10mL/kg (0.2mL/20g小鼠) 的剂量给药时, 这些给药溶液递送55mg/mL, 并根据每只动物的体重进行调整。未使用的贮备溶液和给药溶液在-80℃避光储存, 并在研究结束时返还给客户。

[0438] 治疗

[0439] 在研究的第1天, 将带有已建立的皮下MC38异种移植物的鼠分为三个治疗组 (n=10) 和一个保持未治疗组 (n=1)。根据表1中总结的治疗方案开始给药。第1组和第2组中的动物在第1天静脉注射一次 (i.v.), 剂量体积为10mL/kg, 按每只动物的体重成比例给药。第1组接受PBS治疗。第2组接受55mg/kg D-Cy5。一只动物 (第3组) 保持未接受治疗。

[0440] 表1. 从第1天开始的研究设计。

组	n	治疗方案			
		药剂	mg/kg	途径	计划
[0441]	1	PBS	-	iv	qd x 1
	2	D-Cy5	55	iv	qd x 1
	3	无治疗	-	-	-

[0442] 用于流式细胞术的组织制备

[0443] 按照制造商的说明,使用gentleMACS™方案“肿瘤分离试剂盒”分离小鼠肿瘤样本。简言之,切除肿瘤并切成小块(2-4mm)。将肿瘤样本置于酶缓冲液中,并在gentleMACS™解离仪上进行处理。将样品在37℃连续旋转下培养20分钟,然后通过70微米细胞过滤器过滤。将样本在含有2.5%FBS的PBS中洗涤两次,以去除酶缓冲液,并在PBS中以 2×10^7 细胞/mL制备最终单细胞悬液,并置于冰上保存。

[0444] 流式细胞术

[0445] 将100μL的单细胞悬液加入96孔板中,并用PBS洗涤一次。免疫染色前,使用50μL体积的TruStain Fc (Biolegend) 在冰上阻断Fc受体5至10分钟。然后,向样本中加入50μL的含2X浓度的抗体的染色缓冲液(如方案所述),总体积为100μL。轻轻上下吸移样本,然后在4℃染色30分钟。用150μL染色缓冲液洗涤细胞两次,并重悬于100μL染色缓冲液中。通过短暂涡旋珠子并在染色缓冲液中制备1:3稀释度的珠子制备Countbright微珠,然后重新悬浮在100μL的染色液中。必要时,使用同种型对照抗体作为阴性染色对照。为了对内部标记进行染色,根据制造商的说明,在4℃用200μL的转录因子固定/透化缓冲液(eBioscience)对细胞进行了30分钟的透化处理。用150μL透化缓冲液(eBioscience)洗涤两次后,使用在100μL透化缓冲液中稀释的抗体在4℃进行内部标记染色30分钟。用150μL透化缓冲液洗涤细胞两次,并重新悬浮在100μL染色缓冲液中。所有数据均在FortessaLSR (BD) 上采集,并使用FlowJo软件(Tree Star, Inc., 版本10.0.7r2) 进行分析。根据研究方案定义细胞群,通过对单个进行初始门控(FSC-H对比FSC-A),然后对活细胞(基于Live/Dead Aqua活力染色)进行初始门控来确定门控策略。表2中总结了用于对靶细胞群进行染色的抗体。

[0446] 表2. CD4、CD8、T_{reg}、MDSC和巨噬细胞的抗体染色组。

细胞群	表型标记	表达	抗体组
CD4	CD45 ⁺ CD11b ⁻ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	树枝状大分子- Cy5	CD45, CD3, CD4, CD8, CD25, FoxP3*, CD11b, F4/80, Ly6C, Ly6G, CD206*, 活/死
CD8	CD45 ⁺ CD11b ⁻ CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺		
T _{reg}	CD45 ⁺ CD11b ⁻ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺		
mMDSC	CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD11b ⁺ F4/80 ⁻ Ly6C ^{hi} Ly6G ⁻		
gMDSC	CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD11b ⁺ F4/80 ⁻ Ly6C ^{lo} Ly6G ⁺		
M1 巨噬细胞	CD45 ⁺ F4/80 ⁺ CD11b ⁺ CD206 ⁻		
M2 巨噬细胞	CD45 ⁺ F4/80 ⁺ CD11b ⁺ CD206 ⁺		

[0448] *表示内部标记

[0449] 离体成像

[0450] 使用配备CCD摄像机(冷却至-90℃)的IVIS®SpectrumCT (Perkin Elmer,MA)对切除的肿瘤成像,摄像机安装在具有640nm激发和680nm发射滤光片的不透光标本室上。数据以平均辐射效率([p/s/cm²]/[μW/cm²])为单位进行采集和定量,其中p代表光子,s代表秒,W代表瓦特。数据采用Living Image软件4.5.1进行分析。(Perkin Elmer,MA)并导出到Excel。

[0451] 毒性

[0452] 在第1、2和3天(研究的最后一天)给动物称重。在此期间,观察小鼠是否有任何不良治疗相关(TR)副作用的明显体征,并在观察时记录临床体征。监测个体体重(BW),对一次测量体重下降超过30%或连续三次测量体重下降超过25%的动物实施安乐死,作为TR死亡。还根据CR Discovery Services方案监测了组内平均体重减轻。可接受毒性定义为研究期间组内平均BW损失小于20%且TR死亡不超过10%。任何死亡如果根据临床体征和/或尸检证明可归因于治疗副作用,则归类为TR。TR分类也用于末次给药14天内不明原因死亡。如果没有证据表明死亡与治疗副作用相关,则将死亡归类为非治疗相关(NTR)。NTR死亡进一步分类如下:NTRa描述因事故或人为错误导致的死亡;NTRm是根据尸体剖检结果被认为是由侵袭和/或转移引起的肿瘤播散所致的死亡;NTRu描述了不明原因的死亡,其缺乏与转移、肿瘤进展、意外或人为错误相关的死亡的可用证据。值得注意的是,治疗副作用不能排除在归类为NTRu的死亡之外。

[0453] 统计和图形分析

[0454] Windows的Prism 8.0(GraphPad)用于图形演示和统计分析。毒性超过可接受限值(>20%组平均体重减轻或大于10%治疗相关死亡)或可评估观察结果少于5个的研究组不包括在统计分析中。请注意,统计显著性检验不能估计组间差异的大小。双尾统计分析在显著性水平P=0.05下进行,未针对多重比较进行校正。

[0455] 结果

[0456] 在图4A和4B中绘制了第3天第1组和第2组的个体平均辐射效率图,每组的平均值用水平线表示。图4C中以对数刻度绘制了组中位平均辐射效率,并使用Kruskal-Wallis和Dunn的多重比较检验进行了统计评估。构建了方框图和须状图,按组显示第3天的肿瘤体积数据,其中“方框”表示观察值的第25和75百分位数,“线”表示观察值的中位值,“须”表示极端观察值(图5A)。表3汇总了三组的中位肿瘤体积。使用Mann-Whitney U检验得出了对照组和治疗组第3天中位肿瘤体积(MTV)之间差异的统计分析。Prism将试验结果总结为P>0.05时不显著(ns)、0.01<P≤0.05时显著(用“*”符号表示)、0.001<P≤0.01时非常显著(“**”)和P≤0.001时极其显著(“***”)。肿瘤生长曲线显示作为时间函数的组中位肿瘤体积(图2B)。

[0457] 表3. 第3天肿瘤体积中位数(MTV)。

[0458]

组	MTV (n) 第3天	%TGI	统计学显著性
1	92 (10)	---	
2	92 (10)	0	ns

[0459] 在MC 38细胞植入后第1、2和3天的三天研究期间,雌性C57BL/6小鼠的组平均体重(BW)变化被监测为自第1天百分比变化±一个平均数标准误差(SEM)。未观察到具有统计学

意义的组平均体重下降。未观察到治疗相关 (TR) 和非治疗相关 (NTR) 死亡。在该为期三天的研究中,未观察到不良事件。

[0460] 为了表征所有三组中的免疫概况,使用表2所示的荧光标记抗体组分析小鼠肿瘤样本。检查的细胞类型包括CD4⁺、Treg、CD8⁺、gMDSC、M1巨噬细胞、M2巨噬细胞和mMDSC群体(图6A-6H)。

[0461] 表4总结了在第3天所有三个实验组中处理的肿瘤组织中总活细胞的CD45⁺细胞群。表5和表6汇总了不同细胞群,包括CD45⁺细胞的常规CD4⁺、Treg、CD8⁺、gMDSC、M1巨噬细胞、M2巨噬细胞和mMDSC群百分比。

[0462] 表4. 肿瘤组织中总活细胞的CD45⁺群体百分比。

组	母体群% (活细胞%)	统计学显著性 (与G1相比)
1	56.89±1.8	---
2	56.07±2.5	ns

[0464] 表5. CD45⁺细胞的常规CD4⁺、Treg和CD8⁺群体百分比。

组	常规CD4 ⁺	Treg	CD8 ⁺
1	1.38±0.1	3.76±0.5	1.83±0.3
2	0.87±0.1 (*)	3.12±0.4	1.52±0.3

[0466] 统计显著性 (与G1相比), 除用*P<0.05表示的以外, 均不显著。

[0467] 表6. CD45⁺细胞的gMDSC、M1巨噬细胞、M2巨噬细胞和mMDSC群体百分比。

组	gMDSC	M1巨噬细胞	M2巨噬细胞	mMDSC
1	4.14±1.2	12.26±1	25.35±1.5	7.43±0.7
2	7.67±3.7	13.32±0.8	23.22±2.3	7.98±0.8

[0469] 在第3天在所有三个实验组中的处理的肿瘤组织中还表征了树枝状大分子阳性细胞(图7A-7G)。表7和表8汇总了常规CD4⁺、Treg、CD8⁺、gMDSC、M1巨噬细胞、M2巨噬细胞和mMDSC细胞的不同树枝状大分子阳性百分比。

[0470] 表7. 常规CD4⁺、Treg和CD8⁺细胞的树枝状大分子+群体百分比。

组	常规CD4 ⁺	Treg	CD8 ⁺
1	0.23±0.1	0.14±0.1	0.24±0.1
2	3.56±1.2 (*)	1.33±0.4 (**)	0.83±0.2 (ns)

[0472] 统计显著性: ns=非显著, *=P<0.05, **=P≤0.01, ***=P≤0.001, 与第1组比较。

[0473] 表8. gMDSC、M1巨噬细胞、M2巨噬细胞和mMDSC细胞的树枝状大分子+群体百分比。

组	gMDSC	M1 巨噬细胞	M2 巨噬细胞	mMDSC
1	0.45±0.1	0.85±0.5	0.32±0.1	0.48±0.1
2	3.58±1.3 (*)	6.47±1.7 (*)	34.02±4 (***)	8.1±1.6 (***)

[0475] 统计显著性: ns=非显著, *=P<0.05, **=P≤0.01, ***=P≤0.001, 与第1组比

较。

[0476] 为了评估羟基树枝状大分子大小和循环时间对靶向M2肿瘤相关巨噬细胞 (TAM) 的影响,生成了两类荧光标记的羟基树枝状大分子:与Cy5 (D4-Cy5) 缀合的第4代树枝状大分子 (约14,000Da,4nm) 和与VivoTag 680 (D6-V) 缀合的第6代树枝状大分子 (约58,000Da,7nm)。CSF1R酪氨酸激酶抑制剂也缀合至G6羟基树枝状大分子以及VivoTag 680 (C-D6-V)。将同系小鼠结肠癌细胞系MC38皮下注射到C57BL/6小鼠 (n=10/组) 中,使肿瘤生长至最小平均大小80-120mm³。肿瘤形成后,静脉注射D4-Cy5或D6-V (55mg/kg,10mL/kg,给药后48小时处死小鼠 (48小时内全身性清除D4和D6)。分析肿瘤的总辐射荧光,免疫细胞亚群和免疫组织化学的FACS分析。总荧光分析表明与D4-Cy5相比,D6-V的肿瘤摄取量更高,与之前的研究一致。在M2巨噬细胞、M1巨噬细胞和mMDSC中观察到选择性摄取和保留。肿瘤包括约56% CD45+细胞 (表4),其中约20-25%为M2巨噬细胞,约13%为M1巨噬细胞,约8%为mMDSC (表6)。单次IV给药后,所有M2巨噬细胞中的34±4%、所有M1巨噬细胞中的6.5%±1.7%、以及所有mMDSC中的8.1±1.6%含有D4-Cy5 (表8)。树枝状大分子在其他免疫细胞群 (包括常规CD4、Treg、CD8+) 中的比例低于5% (表7)。C-D6-V的肿瘤摄取量高于D6-V,表明CSF1R结合进一步增强了肿瘤靶向性,并可能影响M2 TAM。这些结果表明,全身给药后,M2 TAM和其他肿瘤驻留免疫细胞的选择性靶向成功。羟基树枝状大分子为向肿瘤递送免疫调节剂,同时将它们的全身毒性降至最低提供了一种新的载体。目前正在进行疗效研究,以评估与羟基树枝状大分子缀合的CSF1R抑制剂和其他治疗药物。

[0477] 实施例2:在皮下786-0人肾癌异种移植模型中,树枝状大分子结合的酰胺连接的舒尼替尼类似物 (NSA) 的体内抗肿瘤效力优于酯连接的舒尼替尼类似物 (CSA)

[0478] 本研究的目的是评价树枝状大分子缀合的舒尼替尼类似物在治疗雌性BALB/c裸鼠皮下786-0人肾癌CDX模型中的体内抗肿瘤疗效。

[0479] 方法

[0480] 细胞培养

[0481] 786-0肿瘤细胞 (ATCC,cat#CRL-1932) 在补充有10%热灭活胎牛血清、100U/mL青霉素和100μg/mL链霉素的RPMI 1640培养基中于37℃、5%CO₂的空气气氛下作为单层培养物进行体外维持。通过胰蛋白酶-EDTA处理每周两次常规继代培养肿瘤细胞。收获以指数生长期生长的细胞并计数用于肿瘤接种。

[0482] 动物

[0483] BALB/c裸鼠,雌性,6-8周,体重约18-22g。总计128只 (64加100%) 用于本研究,购自上海SLAC实验动物有限公司或其他经认证的供应商。

[0484] 肿瘤接种

[0485] 每只小鼠右侧腹部皮下接种200μl 786-0细胞 (5x10⁶),使用1:1 MATRIGEL®,用于肿瘤发展。随机分配动物,当平均肿瘤体积达到约150-200mm³时开始治疗,用于疗效研究。试验物质给药和各组中的动物数量如表9所示:

[0486] 表9:实验设计

[0487]

组	n	治疗	剂量 (mg/kg)	给药体 积($\mu\text{L/g}$)	给药途径	方案
1	8	媒介物对照 (PBS)	--	10	I.P	BIW $\times$ 3-4W
2	8	舒尼替尼马来酸盐	60	10	I.P	BIW $\times$ 3-4W
3	8	D-NSA-高	450	10	I.P	BIW $\times$ 3-4W
4	8	D-NSA-中	90	10	I.P	BIW $\times$ 3-4W
5	8	D-NSA-低	18	10	I.P	BIW $\times$ 3-4W
6	8	D-CSA-高	550	10	I.P	BIW $\times$ 3-4W
7	8	D-CSA-中	110	10	I.P	BIW $\times$ 3-4W
8	8	D-CSA-低	22	10	I.P	BIW $\times$ 3-4W

[0488] SA=舒尼替尼类似物

[0489] NSA=酰胺连接的舒尼替尼类似物

[0490] CSA=酯连接的舒尼替尼类似物

[0491] 低/中/高=不同量的活性剂缀合的顶部树枝状大分子。

[0492] 开始治疗前,称量所有动物的体重并测量肿瘤体积。由于肿瘤体积会影响任何给定治疗的有效性,因此使用基于Excel的随机分配软件根据其肿瘤体积进行分层随机分配来将小鼠分组。这确保了所有组在基线时均具有可比性。

[0493] 主要终点是观察肿瘤生长延迟或小鼠治愈。每周两次(或每隔一天)使用卡尺测量肿瘤二维尺寸,使用公式以 mm^3 表示体积: $V=0.5a \times b^2$,其中a和b分别为肿瘤的长径和短径。然后使用肿瘤大小计算T-C和T/C值。T-C的计算方法是以T作为治疗组肿瘤达到预定大小(如 $1,000\text{mm}^3$)所需的中位时间(以天为单位),C是对照组肿瘤达到相同大小所需的中位时间(以天为单位)。T/C值(百分比)是抗肿瘤有效性的指征,T和C分别是给定日期治疗组和对照组的平均体积。

[0494] 结果

[0495] 本实验评估了整个治疗期小鼠中的肿瘤生长,以确定树枝状大分子递送的药物(舒尼替尼)的疗效。测量肿瘤大小(重量和体积)。结果表明,舒尼替尼类似物有效转移至RCC部位并缩小肿瘤体积(图8和图9)。此外,数据还表明,不可裂解的(酰胺)连接的舒尼替

尼类似物 (NSA) 优于可释放的 (酯) 连接的 (CSA) 舒尼替尼类似物 (图8和图9)。

[0496] 实施例3:全身性施用羟基树枝状大分子以靶向关节炎组织中的炎症

[0497] 在关节炎和其他自身免疫性疾病中观察到的慢性炎症主要由促炎反应性巨噬细胞介导。全身性给药抗炎剂不会选择性地靶向受影响的组织或反应性巨噬细胞,并且通常具有显著的副作用。已观察到羟基树枝状大分子选择性靶向反应性巨噬细胞,并且在人体内表现出良好的耐受性。羟基树枝状大分子-药物缀合物可从全身给药提供治疗局部炎症的优越方法。

[0498] 方法

[0499] 在37℃,采用紫外/可见分光光度法评价树枝状大分子-阿仑膦酸盐缀合物 (D-ALN) (PBS中0.5mg/ml) 对羟基磷灰石 (HAP;200mg) 的结合亲和力。

[0500] 第1天和第7天,用II型牛胶原在不完全弗氏佐剂中的乳剂皮内免疫Lewis大鼠,建立胶原诱导性关节炎 (CIA)。CIA大鼠组和天然(naïve)大鼠组 (N=5/组) 通过IV给药 (第19天单次IV给药50mg/kg HD-Cy5、ALN-HD-Cy5或媒介物,在第1和第7天诱导CIA,在第19天皮内给药IFA中的II型牛胶原) Cy5标记的羟基树枝状大分子 (D-Cy5)、与阿仑膦酸盐缀合的D-Cy5 (ALN-D-Cy5) 或媒介物对照 (见下表10)。第21天,处死动物,对后肢、肾脏和肝脏进行成像。还使用CD68 (巨噬细胞)、CathK (破骨细胞) 和DAPI对后肢进行免疫组化。

[0501] 表10:实验组

[0502]

组	设置	治疗
1	CIA	HD-Cy5
2	CIA	ALN-HD-Cy5
3	CIA	媒介物
4	天然	HD-Cy5
5	天然	ALN-HD-Cy5
6	天然	媒介物

[0503] 结果

[0504] 在体外,D-ALN显示出对HAP的强结合亲和力,在不到10分钟内>85%的D-ALN与HAP结合 (图10)。静脉给药时,与天然大鼠相比,在CIA大鼠的爪和膝关节中观察到来自Cy5的大于100倍的更大辐射强度,表明D-Cy5显著选择性地摄取到炎症区域。虽然在使用D-Cy5或ALN-D-Cy5治疗的CIA大鼠的关节中观察到了相当的辐射强度,但在用D-Cy5治疗的CIA大鼠的爪中观察到了两倍的更大辐射强度 (图11A、11B)。在CIA大鼠中,单剂量的ALN-D-Cy5在2天后使爪体积减少约10%,临床评分在所有CIA组中相当 (图12)。全身给药的HD定位于关节炎组织,证明选择性靶向反应性巨噬细胞 (HD-Cy5) 和骨 (ALN-HD-Cy5)。因此,在动物模型中,已证明HD仅被反应性炎性细胞摄取。此外,在人 (1期研究) 和动物中,HD在尿液中完整排出。因此,HD治疗 (HDT) 已被配置为向关节炎组织特异性递送药物。

[0505] 总之,数据表明,全身给药的羟基树枝状大分子-药物缀合物定位于关节炎组织中的炎症部位。与羟基树枝状大分子缀合的阿仑膦酸盐 (其结合骨),似乎仅集中在骨区域,在远离骨的反应性巨噬细胞中的摄取可能较少。

[0506] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与所公开的发明所属领域的技术人员通常理解的相同的含义。本文引用的出版物及其引用的材料通过引用具体并入本

文。

[0507] 本领域技术人员将认识到,或者能够仅使用常规实验来确定,这里描述的本发明的具体实施例的许多等同物。这种等同物旨在被以下权利要求所涵盖。

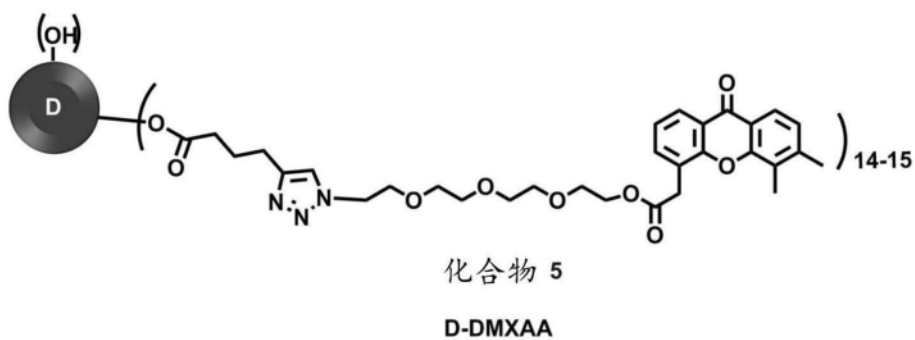
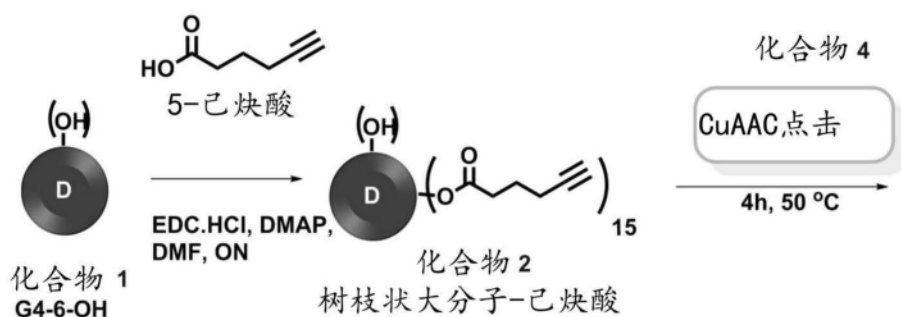
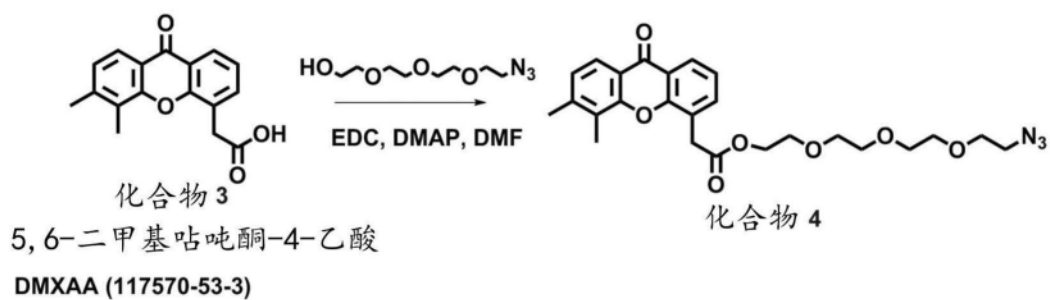


图1

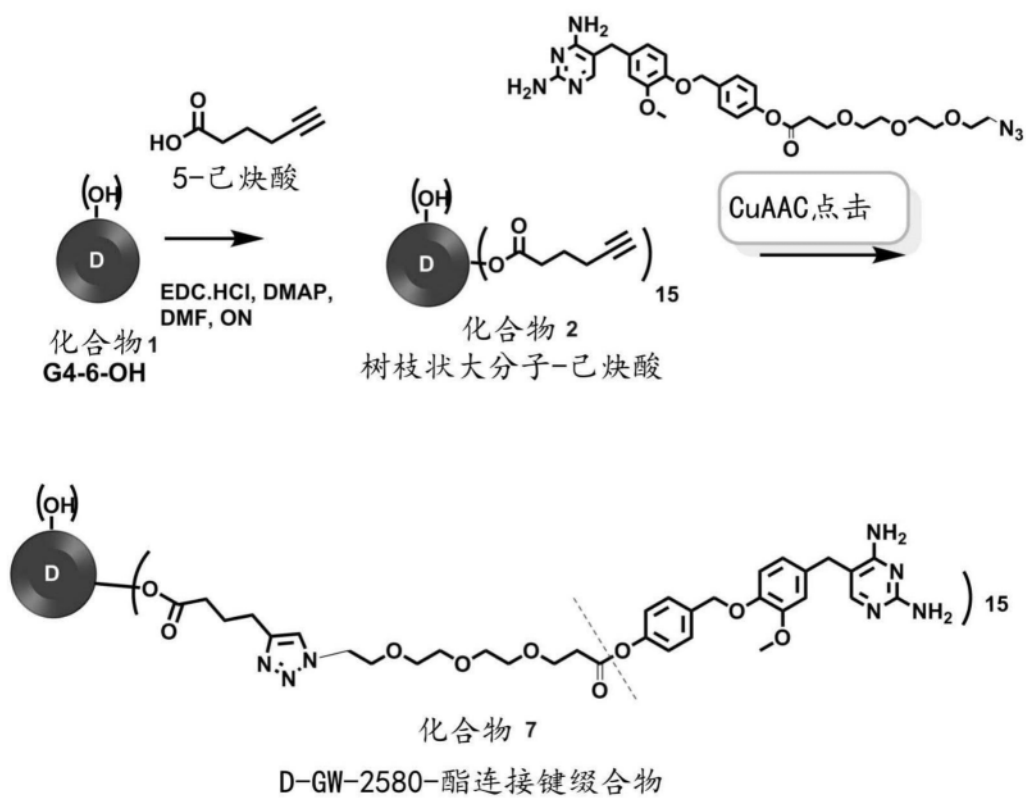


图2B

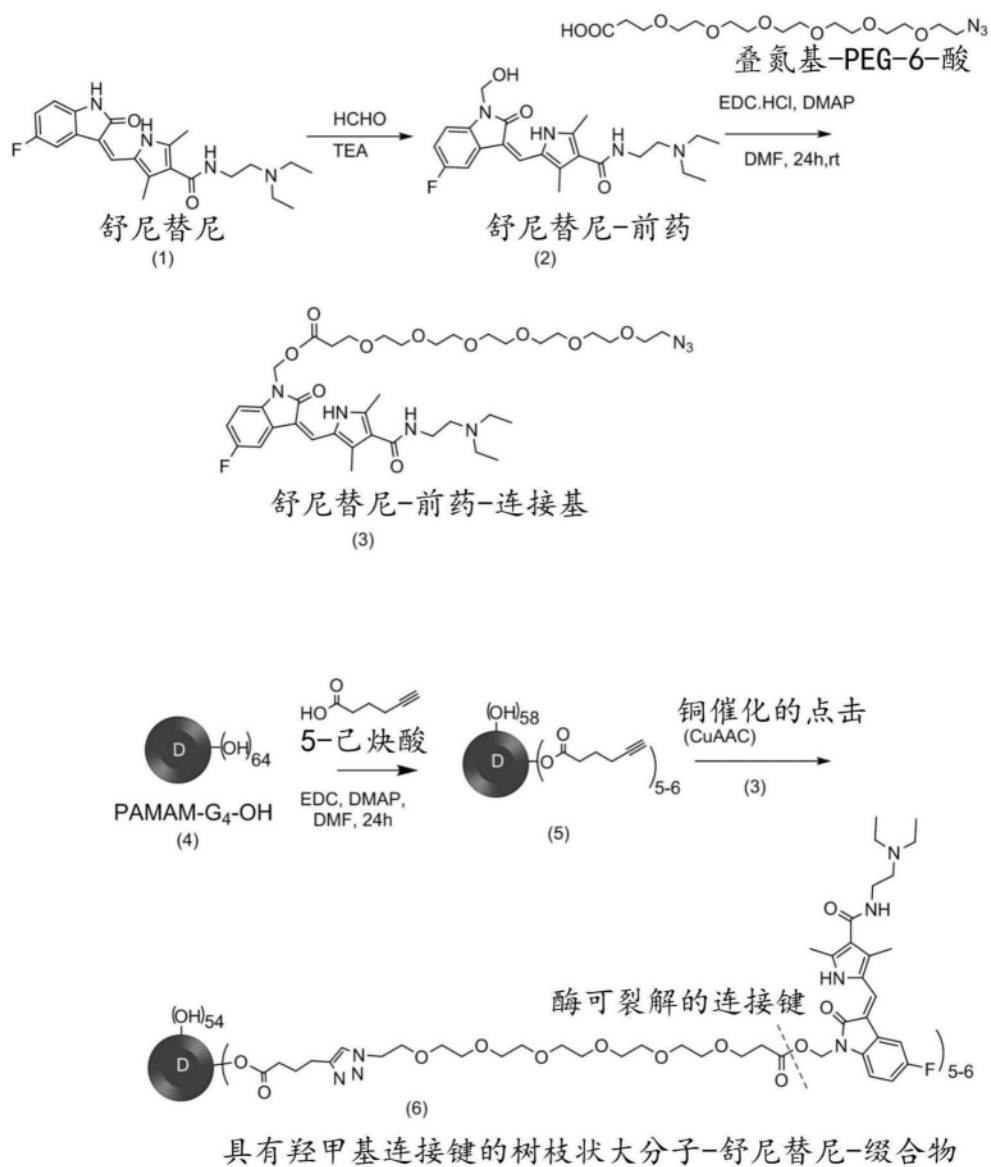


图3A

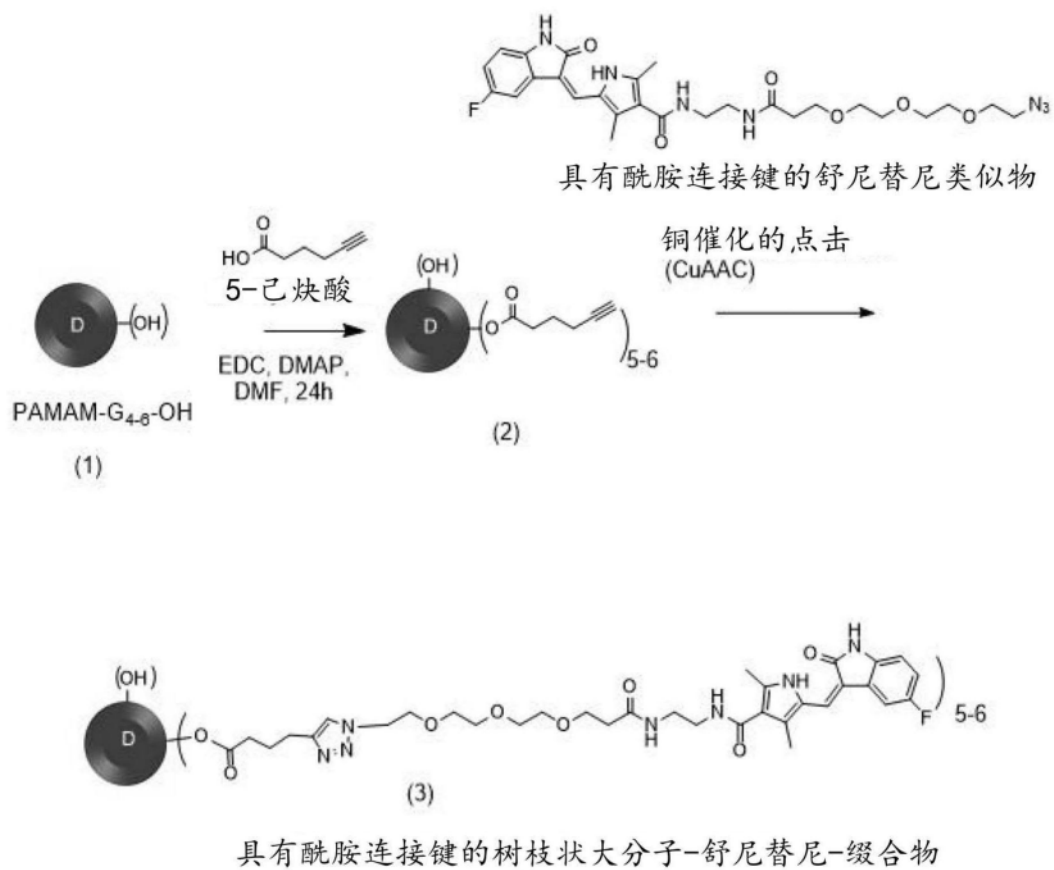


图3B

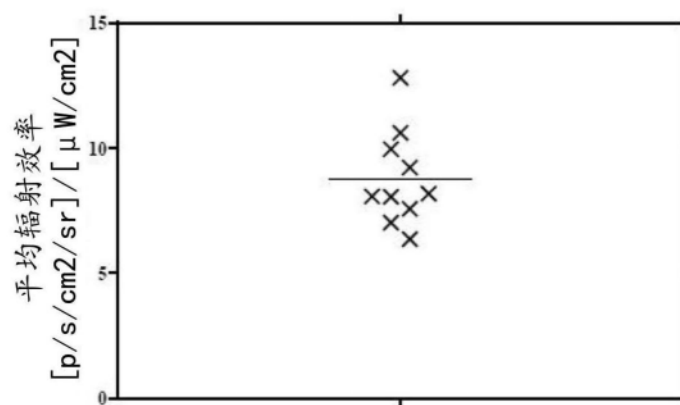


图4A

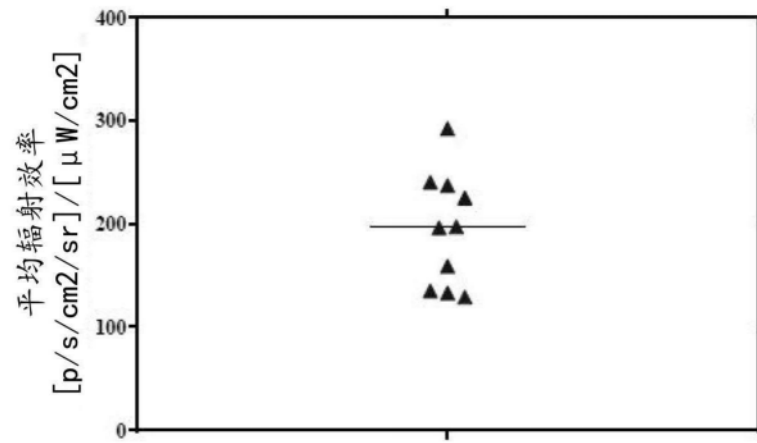


图4B

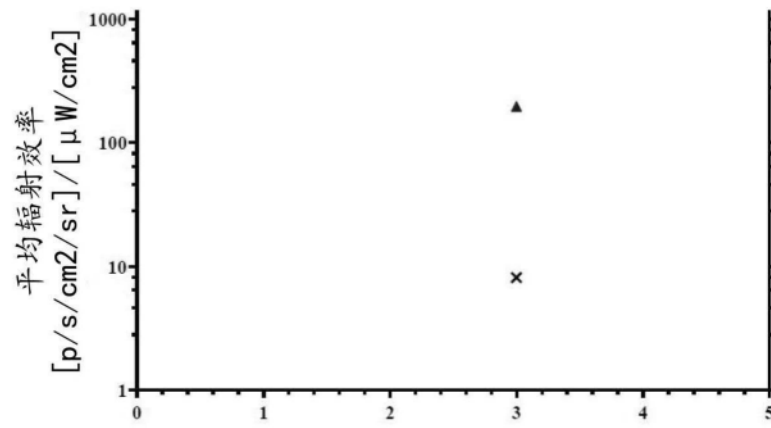


图4C

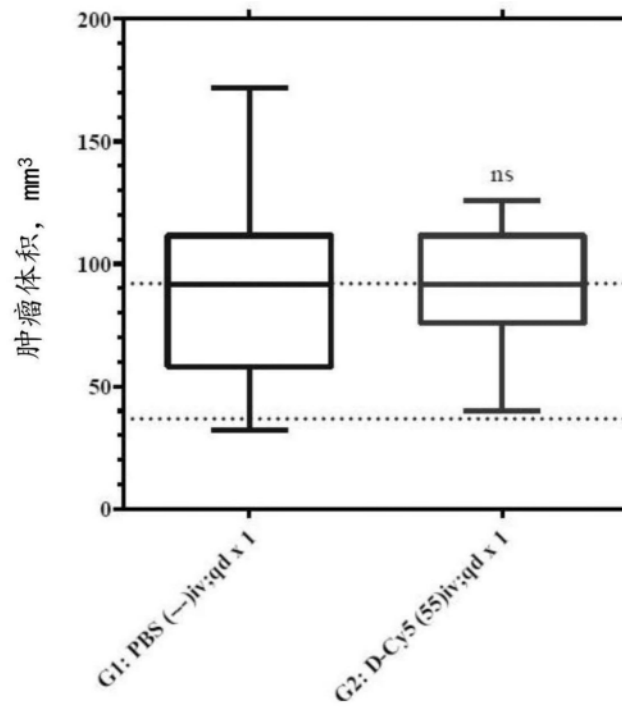


图5

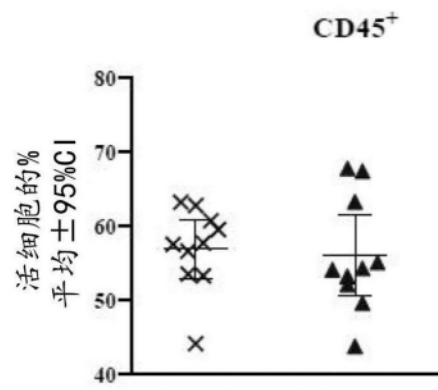


图6A

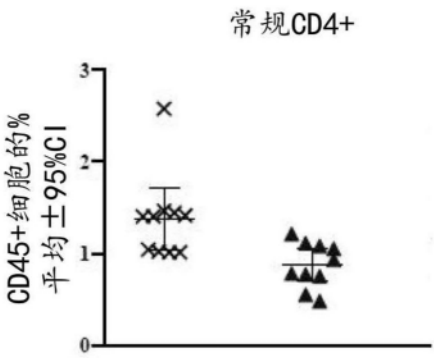


图6B

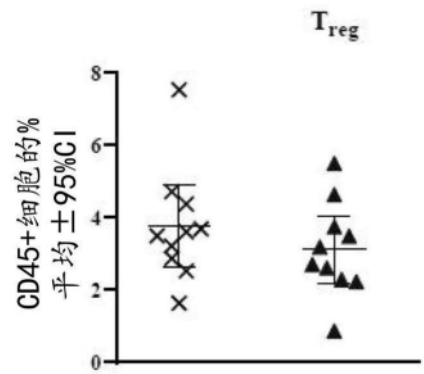


图6C

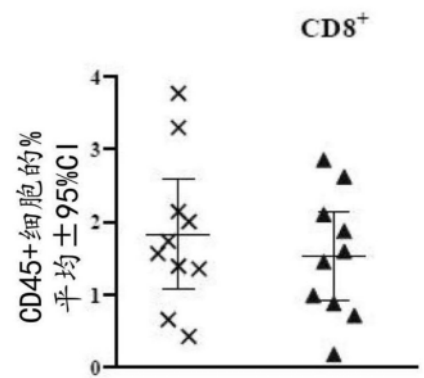


图6D

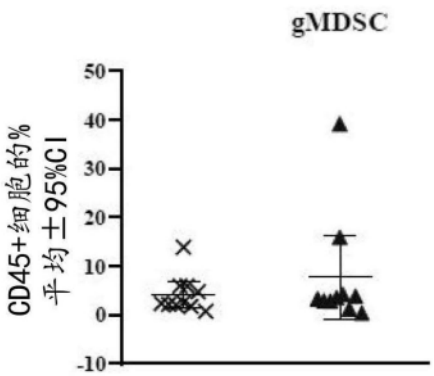


图6E

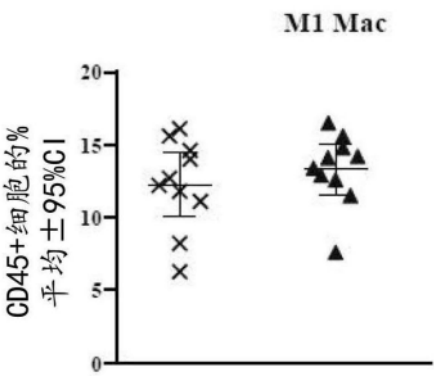


图6F

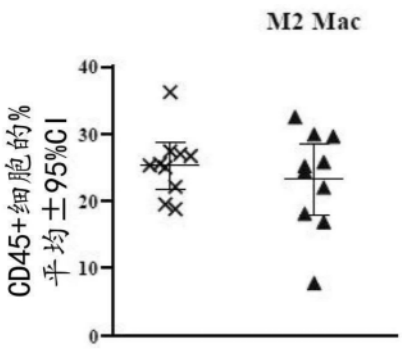


图6G

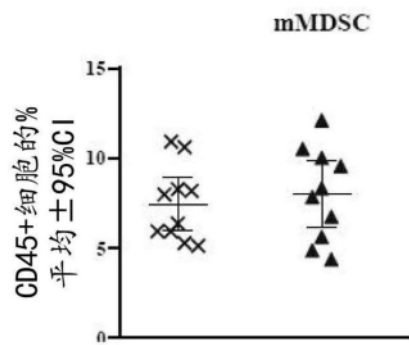


图6H

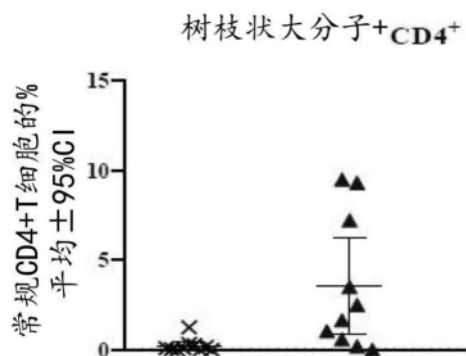


图7A

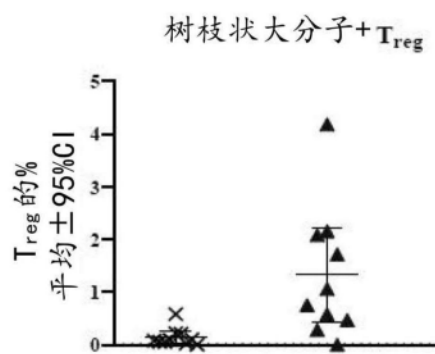


图7B

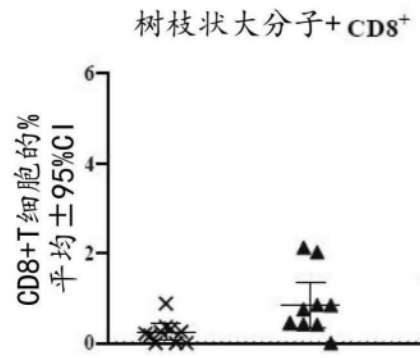


图7C

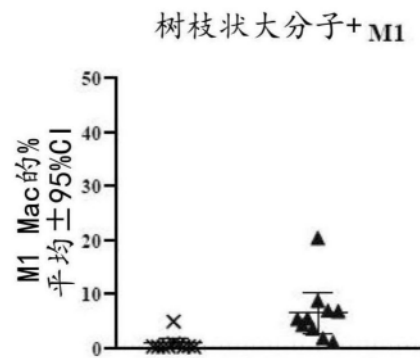


图7D

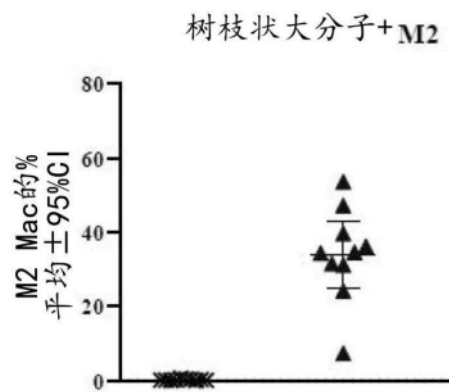


图7E

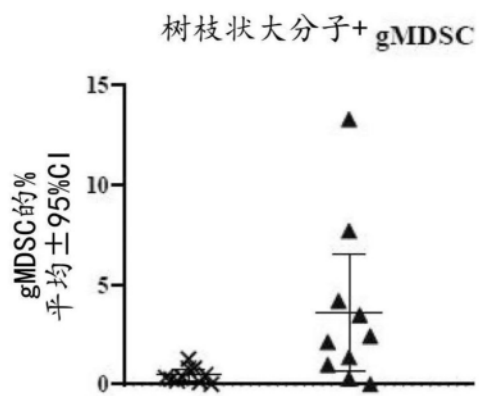


图7F

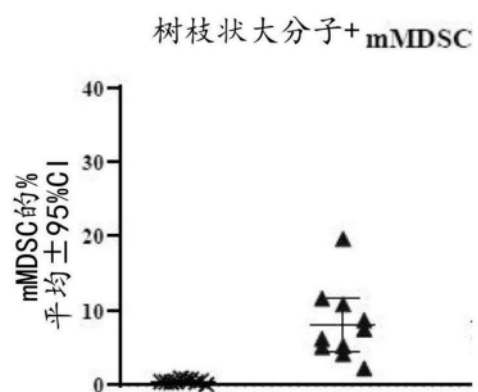


图7G

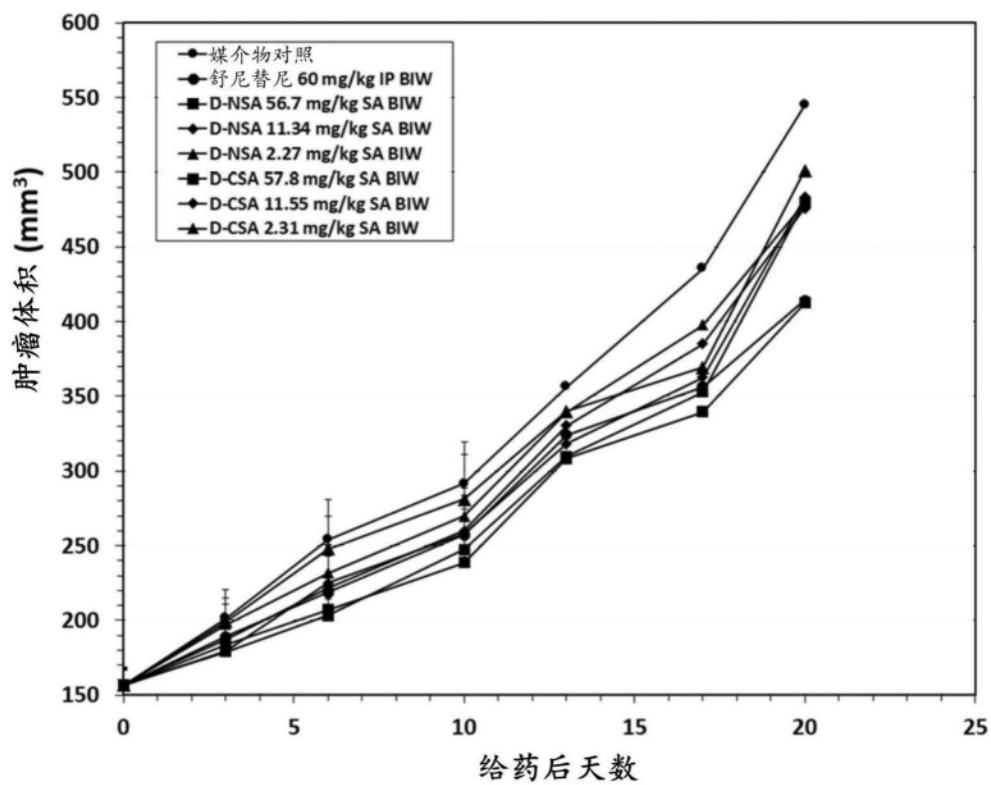


图8

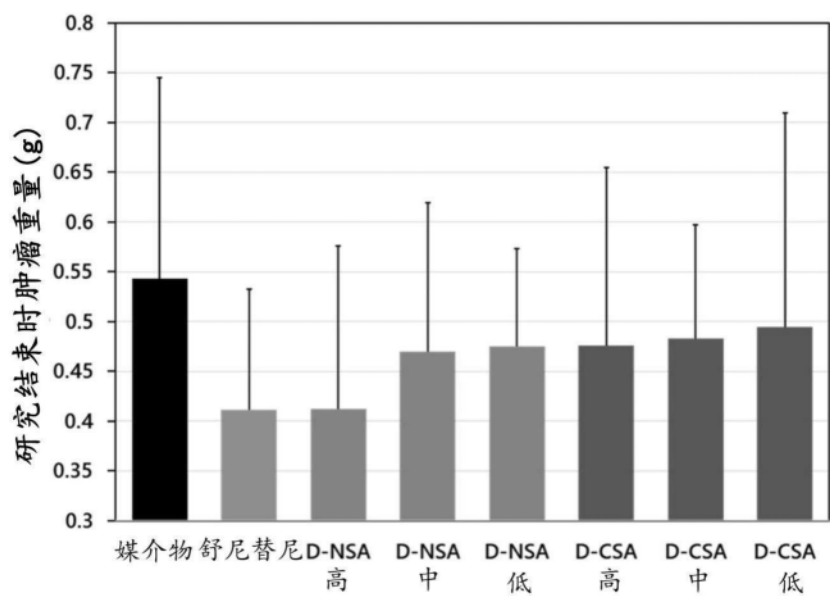


图9

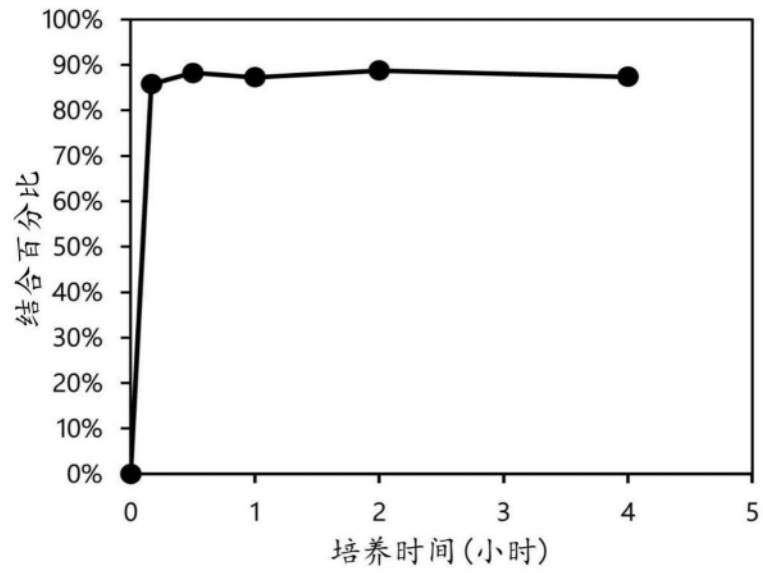


图10

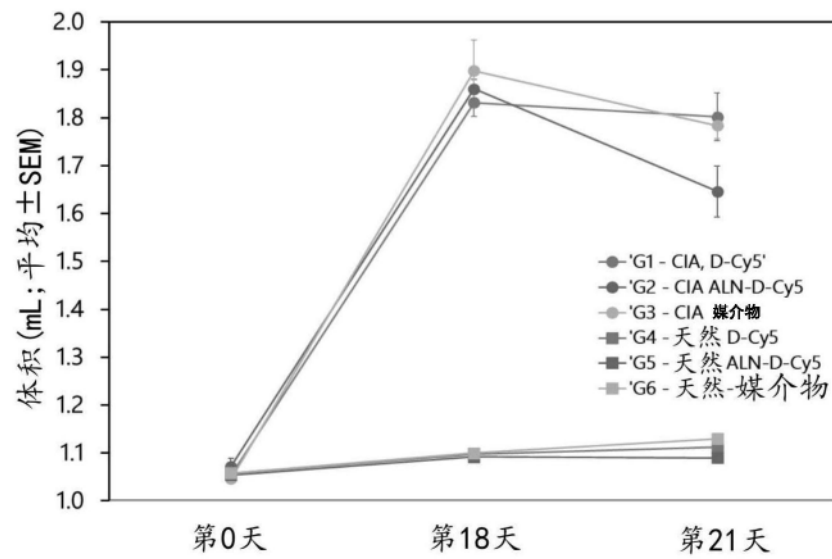


图11A

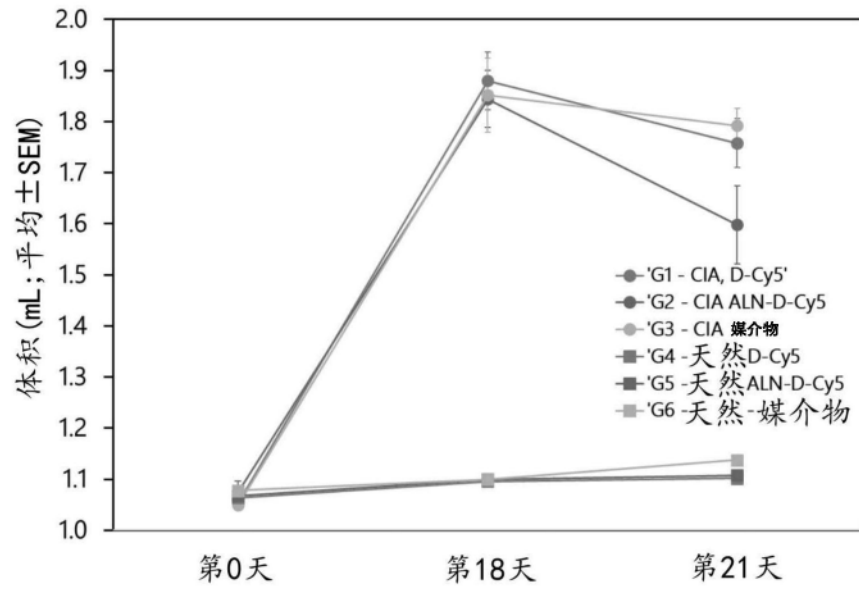


图11B

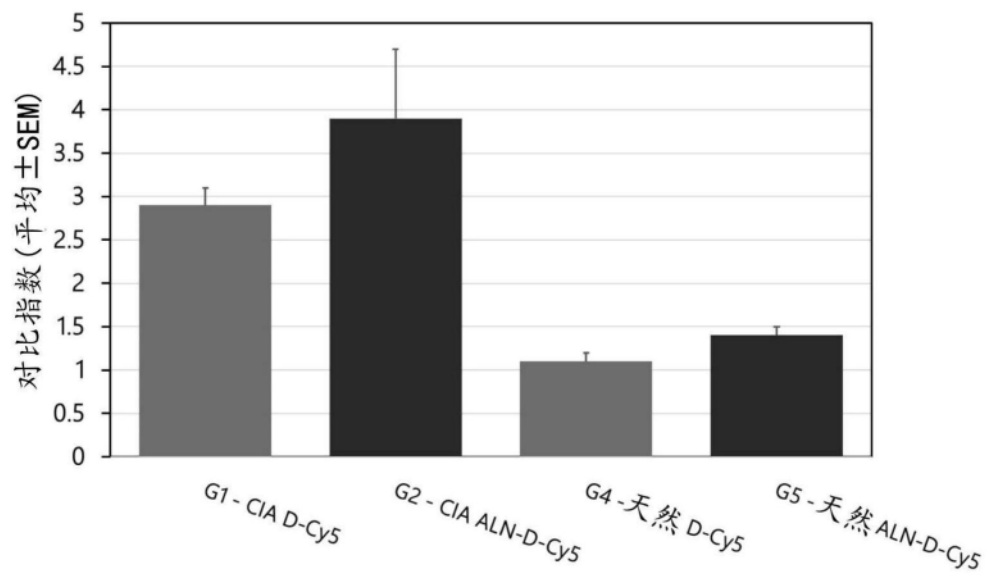


图12

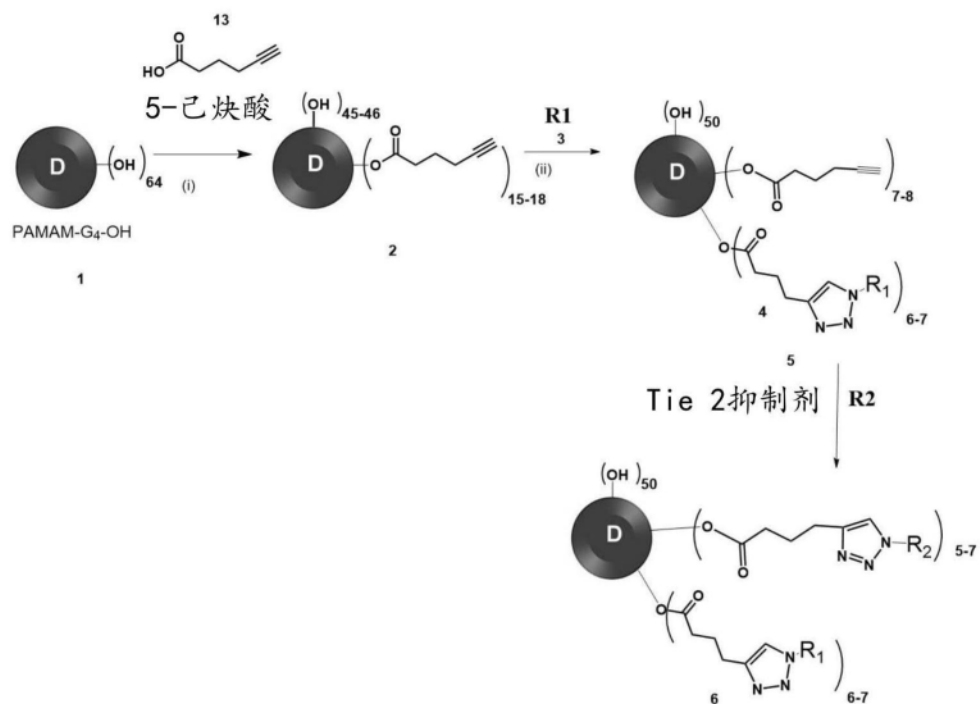


图13A

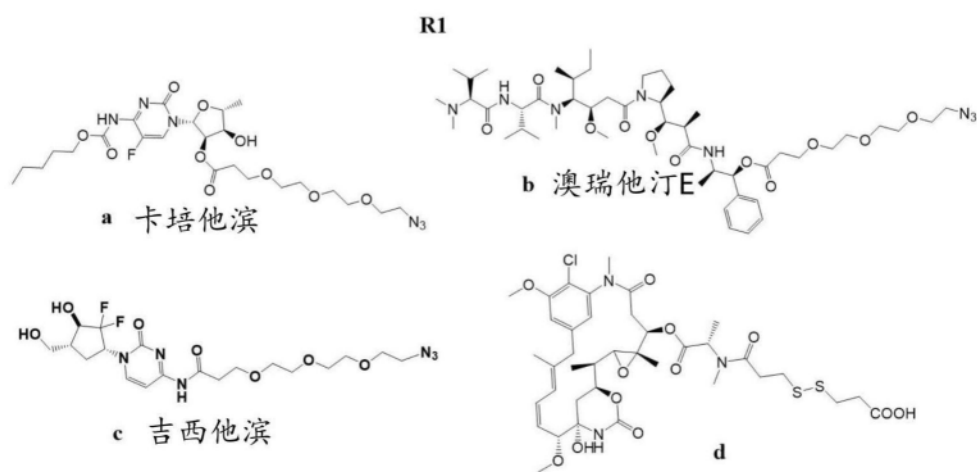


图13B

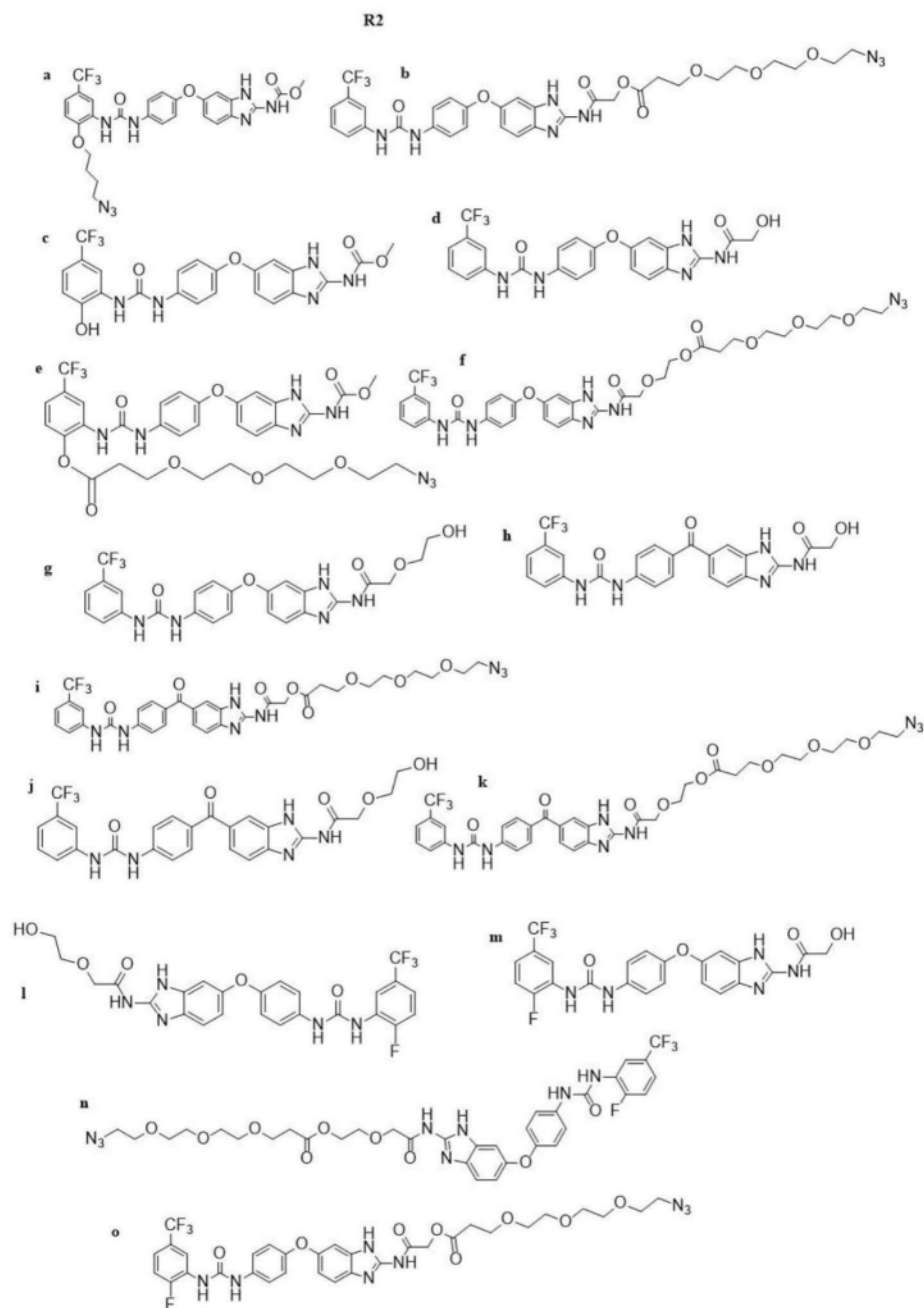


图13C

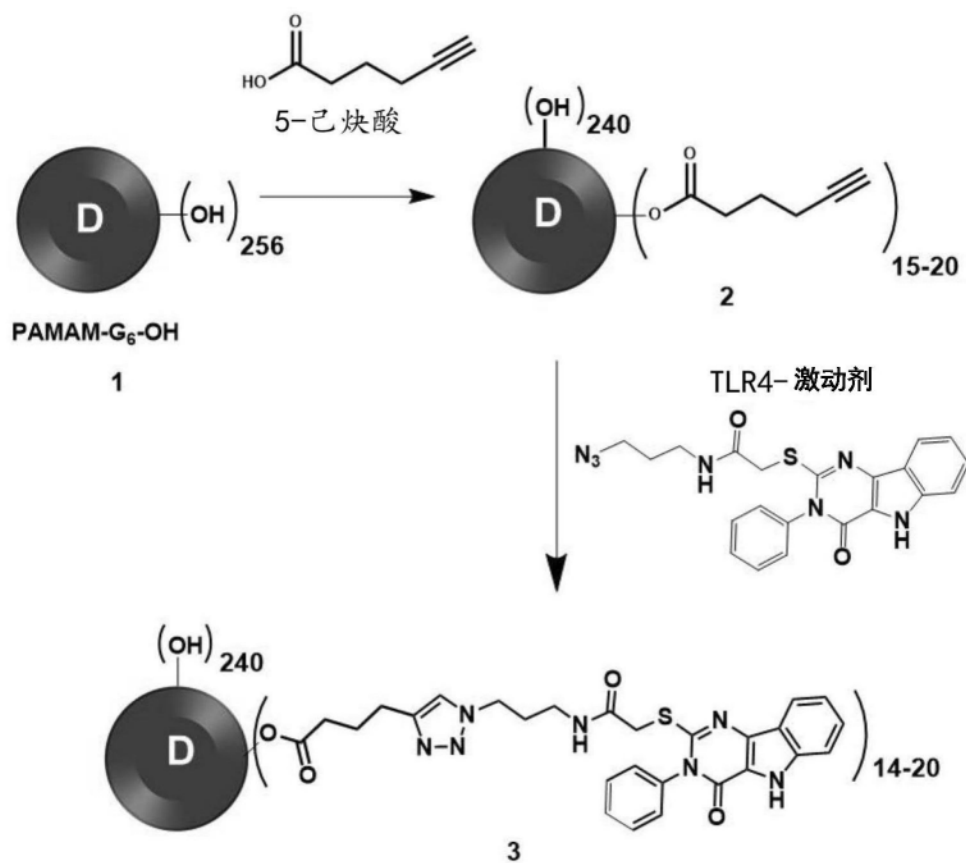


图14A

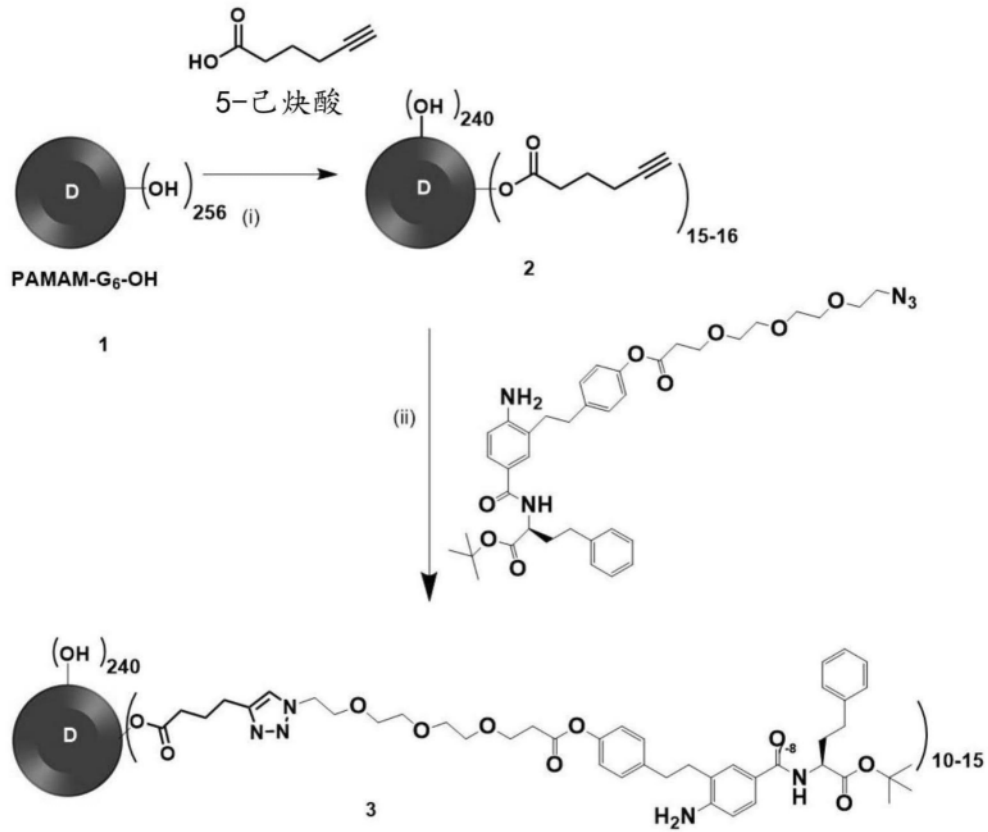


图14B

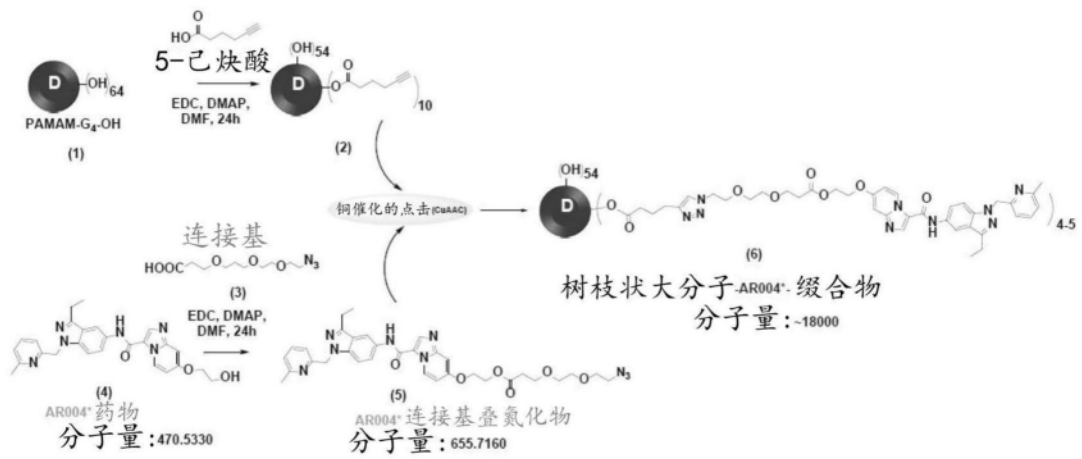


图15

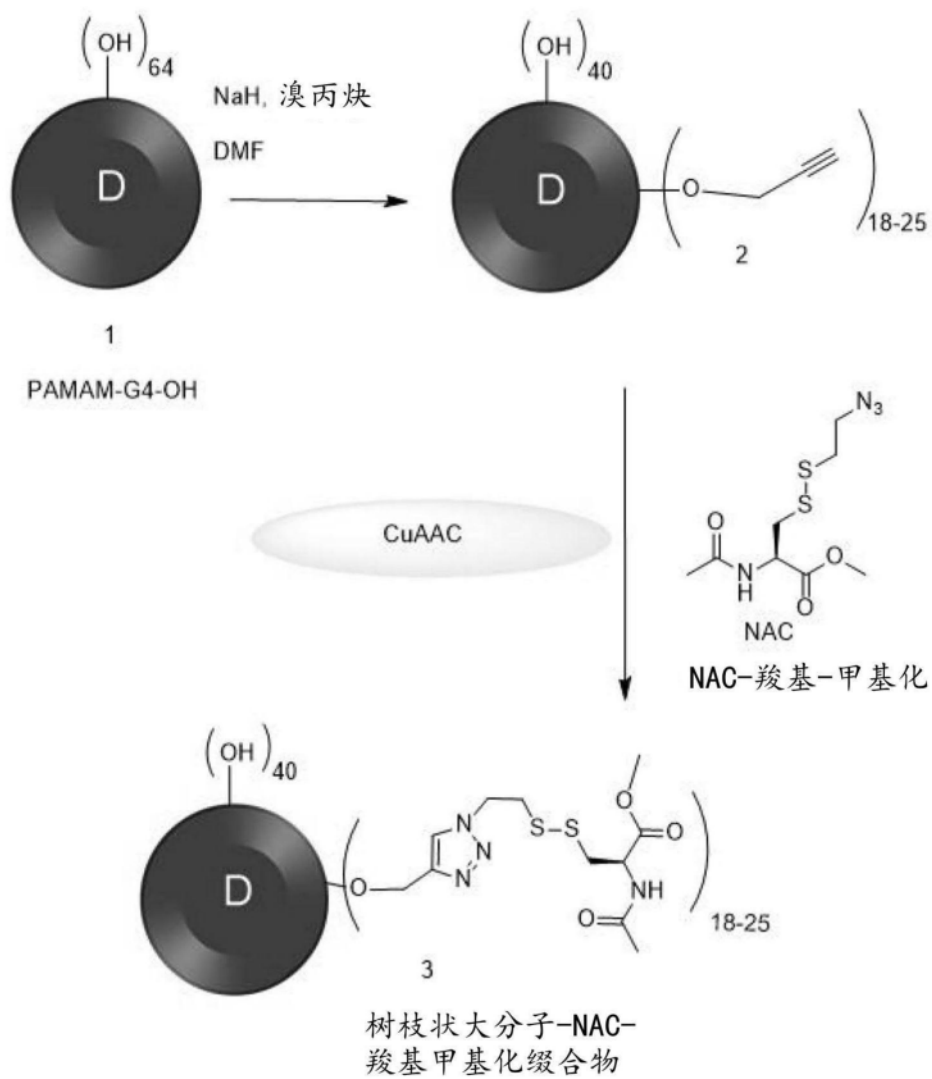


图16