(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115989039 A
(43)申请公布日 2023.04.18

(21)申请号 202180049571.2

(22)申请日 2021.06.03

(30)优先权数据
2020901833 2020.06.03 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.01.10

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2021/050554 2021.06.03

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/243415 EN 2021.12.09

(71)申请人 星药私人有限公司
地址 澳大利亚维多利亚州

(72)发明人 S·R·申古尔 D·欧文 R·胡夫顿 K·胡雷赫特

(74)专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713
专利代理师 王建秀 刘小立

(51)Int.Cl.
A61K 47/54(2006.01)

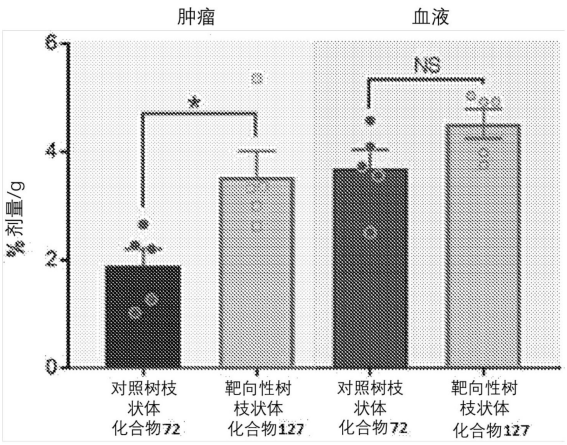
权利要求书4页 说明书176页
序列表8页 附图19页

(54)发明名称

治疗缀合物

(57)摘要

本文中提供了树枝状体-靶向剂缀合物，其包含：(a)树枝状体，所述树枝状体包含：i)核心单元(C)；以及ii)构建单元(BU)，其中树枝状体具有二至六代的构建单元；并且其中核心单元共价附接到至少两个构建单元；并且树枝状体还包含：b)靶向剂，其通过间隔子基团共价连接至树枝状体；c)一个或多个第一末端基团，其附接至树枝状体的最外层构建单元，其中第一末端基团包含用于络合放射性核素的络合基团；以及d)一个或多个第二末端基团，其附接至树枝状体的最外层构建单元，其中第二末端基团包含药代动力学修饰部分，或其盐。还提供了包含所述树枝状体-靶向剂缀合物的组合物，以及在治疗和成像应用中使用所述树枝状体-靶向剂缀合物和包含它们的组合物的方法。



CN 115989039 A

1.一种树枝状体-靶向剂缀合物,其包含:

a)树枝状体,所述树枝状体包含:

i)核心单元(C);以及

ii)构建单元(BU),

其中所述树枝状体具有两代至六代的构建单元;并且

其中所述核心单元共价附接到至少两个构建单元;

b)靶向剂,其通过间隔子基团共价连接至所述树枝状体;

c)一个或多个第一末端基团,其附接至所述树枝状体的最外层构建单元,其中所述第一末端基团包含用于络合放射性核素的络合基团;以及

d)一个或多个第二末端基团,其附接至所述树枝状体的最外层构建单元,其中所述第二末端基团包含药代动力学修饰部分;

或其盐。

2.根据权利要求1所述的缀合物,其中所述靶向剂是具有至多约150kDa、或至多约110kDa、或至多约80kDa、或至多约55kDa、或至多约16kDa的分子量且包含抗原结合位点的肽部分。

3.根据权利要求2所述的缀合物,其中所述靶向剂是具有至多约80kDa的分子量且包含抗原结合位点的肽部分。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的缀合物,其中所述靶向剂选自:抗体、重链抗体、ScFV-Fc、Fab、Fab2、Fv、scFv或单结构域抗体。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的缀合物,其中所述靶向剂包含重链可变(V_H)结构域或由其组成。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的缀合物,其中所述靶向剂包含轻链可变(V_L)结构域或由其组成。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的缀合物,其中所述靶向剂具有约5kDa至约30kDa的分子量。

8.根据权利要求7所述的缀合物,其中所述靶向剂具有约3kDa至约20kDa的分子量。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的缀合物,其中所述靶向剂包含少于120个氨基酸残基。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的缀合物,其中所述靶向剂是HER2靶向剂。

11.根据权利要求10所述的缀合物,其中所述靶向剂是HER2纳米抗体。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的缀合物,其中所述靶向剂包含如本文所定义的任一种靶向剂氨基酸序列或由其组成。

13.根据权利要求1所述的缀合物,其中所述靶向剂是小分子。

14.根据权利要求13所述的缀合物,其中所述靶向剂是结合PSMA的小分子。

15.根据权利要求14所述的缀合物,其中所述靶向剂是DUPA模拟物。

16.根据权利要求13所述的缀合物,其中所述靶向剂是FAP结合基团。

17.根据权利要求1至16中任一项所述的缀合物,其中所述靶向剂与所述间隔子基团之间的共价键已经通过包含所述靶向剂的中间体和包含所述树枝状体的中间体上存在的互补反应性官能团之间的反应而形成。

18.根据权利要求17所述的缀合物,其中所述包含所述靶向剂的中间体包含非天然氨基酸残基,所述非天然氨基酸残基具有包括反应性官能团的侧链。

19.根据权利要求18所述的缀合物,其中所述非天然氨基酸残基是4-叠氮基苯丙氨酸残基。

20.根据权利要求17所述的缀合物,其中所述包含所述靶向剂的中间体包含反应性半胱氨酸残基。

21.根据权利要求1至20中任一项所述的缀合物,其中所述间隔子基团包含PEG基团。

22.根据权利要求1至21中任一项所述的缀合物,其中所述靶向剂在所述靶向剂的C末端处或附近共价连接至所述间隔子基团。

23.根据权利要求18或权利要求19所述的缀合物,其中所述包含所述树枝状体的中间体包含作为炔烃基团的反应性官能团。

24.根据权利要求23所述的缀合物,其中所述炔烃基团是二苯并环辛炔基团。

25.根据权利要求1至24中任一项所述的缀合物,其中所述第一末端基团进一步包含与所述络合基团络合的放射性核素。

26.根据权利要求1至25中任一项所述的缀合物,其中所述络合基团是DOTA、苄基-DOTA、NOTA、DTPA、sarcophagine、macropa、DFO、PEPA或EDTA基团。

27.根据权利要求1至26中任一项所述的缀合物,其中所述含放射性核素部分中的放射性核素是镥、镓、锆、锕、铋、砹、锡、铅、钇或铜放射性核素。

28.根据权利要求27所述的缀合物,其中所述放射性核素是镓、锆、铅或镥放射性核素。

29.根据权利要求1至28中任一项所述的缀合物,其中所述放射性核素是α-发射体。

30.根据权利要求1至28中任一项所述的缀合物,其中所述放射性核素是β-发射体。

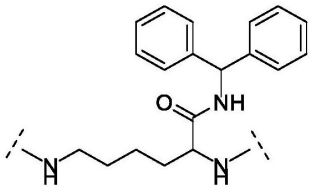
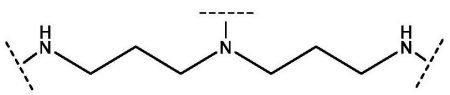
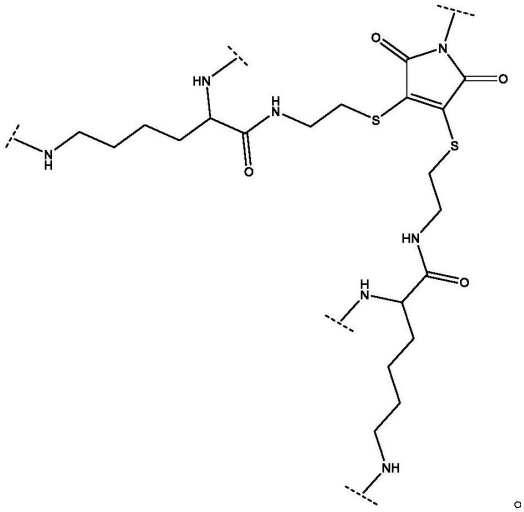
31.根据权利要求1至30中任一项所述的缀合物,其中所述药代动力学修饰部分是聚乙二醇(PEG)基团、或聚乙基恶唑啉(PEOX)基团、或聚-(2)-甲基-(2)-恶唑胺(POZ)、或聚肌氨酸、或聚(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺(pHPMA)基团。

32.根据权利要求31所述的缀合物,其中所述药代动力学修饰部分是聚乙二醇(PEG)基团。

33.根据权利要求31所述的缀合物,其中所述药代动力学修饰部分具有在400至2400道尔顿范围内的平均分子量。

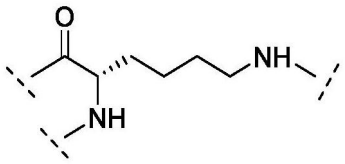
34.根据权利要求1至33中任一项所述的缀合物,其中所述树枝状体具有二至五代之间的构建单元。

35.根据权利要求1至34中任一项所述的缀合物,其中所述核心单元包含或选自:


、

和

。

36.根据权利要求1至35中任一项所述的缀合物，其中所述构建单元是赖氨酸残基或其类似物。

37.根据权利要求1至36中任一项所述的缀合物，其中所述构建单元各自是：


。

38.根据权利要求1至37中任一项所述的缀合物，其中所述缀合物是示例缀合物中的任一种。

39.一种组合物，其包含多种根据权利要求1至38中任一项所定义的缀合物。

40.一种药物组合物，其包含：

i)根据权利要求1至38中任一项所述的缀合物;以及

ii)药学上可接受的赋形剂。

41.根据权利要求1至38中任一项所述的缀合物或根据权利要求40所述的药物组合物，其用于治疗或成像。

42.根据权利要求1至38中任一项所述的缀合物或根据权利要求40所述的药物组合物，其用于治疗癌症。

43.根据权利要求1至38中任一项所述的缀合物、或根据权利要求39所述的组合物、或根据权利要求40所述的药物组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

44.一种治疗受试者癌症的方法，其包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1至38中任一项所述的缀合物、或根据权利要求39所述的组合物、或根据权利要求40所述的药物组合物。

45.根据权利要求41至44中任一项所述的方法、用途或所用的缀合物或组合物，其中所述癌症是前列腺癌、胰腺癌、胃癌、肺癌、乳腺癌或脑癌。

46.根据权利要求41至45中任一项所述的方法、用途或所用的缀合物或组合物，其中所述缀合物与另一种活性剂组合施用。

47.一种用于产生根据权利要求1至38中任一项所定义的治疗缀合物的试剂盒，所述试剂盒包含：

a)根据权利要求1至24、26和31至38中任一项所述的缀合物；以及

b)放射性核素。

治疗缀合物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于治疗和成像的靶向剂-树枝状体缀合物。所述缀合物可用于治疗应用,例如肿瘤的治疗。本发明还涉及包含所述缀合物的药物组合物和使用所述缀合物的治疗方法。

背景技术

[0002] 根据WHO,癌症是全世界第二大死亡原因,在2018年造成估计960万死亡。最常见的癌症包括影响肺、乳腺、结直肠、前列腺、皮肤和胃组织的癌症。

[0003] 在研究和开发新的且有效的肿瘤学疗法方面已经做出了重大努力。然而,迄今为止,现代癌症疗法在治疗具有许多常见类型癌症的患者和延长他们的生命方面仅取得了部分成功。这种有限的成功在很大程度上是由于在许多主要类别的抗癌剂和细胞毒性技术中可见的相对缺乏特异性。事实上,目前可用的大多数肿瘤学疗法都是在简单破坏任何表现出不受控制生长的细胞的前提下发挥作用的。这种对非特异性细胞分裂的关注导致了非选择性治疗,因为它们无意中损害了快速分裂的非肿瘤细胞(例如,存在于肠道中的细胞)。因此,肿瘤学疗法的施用往往会对患者的健康细胞造成不可逆的损害,从而产生大量的副作用,对患者的生活质量有害。

[0004] 这种非特异性肿瘤学疗法包括放射性核素疗法。放射性核素疗法是一种全身性治疗,其使用标记有放射性核素的分子向肿瘤细胞递送高水平的辐射,以治疗某些癌症。这种疗法利用电离辐射杀死癌细胞,并且通过破坏细胞的DNA来缩小肿瘤,从而阻止这些细胞继续生长和分裂。现有的将放射疗法递送到期望位点的方法包括模拟物,诸如Xifigo(Ra223,拜耳公司)放射性珠(诸如sirspheres(Y-90Sirtex)),以及靶向疗法,诸如Luathera(AAA/诺华公司)。

[0005] 虽然放射性核素可以有效地减少癌细胞的生长和扩散,但患者的健康组织也可能在不经意间会受到损害。在提供安全的放射性核素疗法方面仍然存在一个重大挑战,即在靶位点(例如,肿瘤细胞)实现并维持治疗相关水平持续一段时间,从而使放射性核素有效。安全且持久的放射性核素疗法的这种挑战因放射性核素本身的性质而加剧,这会无意中损害长期暴露于放射性核素的健康细胞(例如,血细胞和免疫系统的其他细胞)。这种不合期望的健康细胞暴露通常表现为癌症患者无法忍受的副作用,这会进一步限制疗法的有效性。本质上,至少对于一些放射性核素疗法,放射性核素疗法的药代动力学/药效学特性和/或副作用曲线是次优的。

[0006] 因此,仍然需要开发安全且有效的放射性核素疗法,其中药代动力学/药效学特性提供有效的、选择性的、持久的且全面受控的放射性核素递送,同时对患者产生较少的副作用。

发明内容

[0007] 在第一方面,提供了一种树枝状体-靶向剂缀合物,其包含:

[0008] a)树枝状体,所述树枝状体包含:

[0009] i)核心单元(C);以及

[0010] ii)构建单元(BU),每个构建单元是赖氨酸残基或其类似物,

[0011] 其中所述树枝状体具有两代至六代的构建单元;并且其中所述核心单元共价附接到至少两个构建单元;

[0012] b)靶向剂,所述靶向剂通过间隔子基团共价连接至树枝状体;

[0013] c)一个或多个第一末端基团,其附接至树枝状体的最外层构建单元,其中所述第一末端基团包含用于络合放射性核素的络合基团;以及

[0014] d)一个或多个第二末端基团,其附接至树枝状体的最外层构建单元,其中所述第二末端基团包含药代动力学修饰部分;

[0015] 或其盐。

[0016] 第一方面的树枝状体-靶向剂缀合物可以具有与络合基团络合的放射性核素,以形成树枝状体-靶向剂治疗缀合物。

[0017] 在一个方面,提供了一种树枝状体-靶向剂治疗缀合物,其包含:

[0018] a)树枝状体,所述树枝状体包含:

[0019] i)核心单元(C);以及

[0020] ii)构建单元(BU),每个构建单元是赖氨酸残基或其类似物,

[0021] 其中所述树枝状体具有两代至六代的构建单元;并且其中所述核心单元共价附接到至少两个构建单元;

[0022] b)靶向剂,所述靶向剂通过间隔子基团共价连接至树枝状体;

[0023] c)一个或多个第一末端基团,其附接至树枝状体的最外层构建单元,其中所述第一末端基团包含与放射性核素络合的络合基团;以及

[0024] d)一个或多个第二末端基团,其附接至树枝状体的最外层构建单元,其中所述第二末端基团包含药代动力学修饰部分;

[0025] 或其盐。

[0026] 在一些实施方式中,所述靶向剂是具有至多约150kDa、或至多约110kDa、或至多约80kDa、或至多约55kDa、或至多约20kDa或至多约16kDa的分子量且包含抗原结合位点的肽部分。

[0027] 在一些实施方式中,所述靶向剂是具有至多约80kDa的分子量且包含抗原结合位点的肽部分。

[0028] 在一些实施方式中,所述靶向剂选自:抗体、重链抗体、ScFV-Fc、Fab、Fab2、Fv、scFv或单结构域抗体。在一些实施方式中,所述靶向剂包含重链可变(V_H)结构域或由其组成。在一些实施方式中,所述靶向剂包含轻链可变(V_L)结构域或由其组成。

[0029] 在一些实施方式中,所述靶向剂具有约5kDa至约30kDa的分子量。在一些实施方式中,所述靶向剂具有约5kDa至约20kDa的分子量。

[0030] 在一些实施方式中,所述靶向剂包含少于120个氨基酸残基。

[0031] 在一些实施方式中,靶向剂是HER2靶向剂或EGFR靶向剂。

[0032] 在一些实施方式中,所述靶向剂包含如本文所定义的任一种靶向剂氨基酸序列或由其组成。

[0033] 在一些实施方式中,所述靶向剂是小分子。

[0034] 在一些实施方式中,所述靶向剂是结合PSMA的小分子。

[0035] 在一些实施方式中,所述靶向剂是DUPA类似物。

[0036] 在一些实施方式中,靶向剂是结合至FAP的靶向剂。

[0037] 在一些实施方式中,所述靶向剂与所述间隔子基团之间的共价键已经通过包含靶向剂的中间体和包含树枝状体的中间体上存在的互补反应性官能团之间的反应而形成。

[0038] 在一些实施方式中,所述包含靶向剂的中间体包含非天然氨基酸残基,所述非天然氨基酸残基具有包括反应性官能团的侧链。在一些实施方式中,所述非天然氨基酸残基是4-叠氮基苯丙氨酸残基。

[0039] 在一些实施方式中,所述间隔子基团包含PEG基团。

[0040] 在一些实施方式中,所述靶向剂在肽部分的C末端处或附近共价连接至所述间隔子基团。

[0041] 在一些实施方式中,所述包含树枝状体的中间体包含作为炔烃基团的反应性官能团。在一些实施方式中,所述炔烃基团是二苯并环辛炔-胺基团。

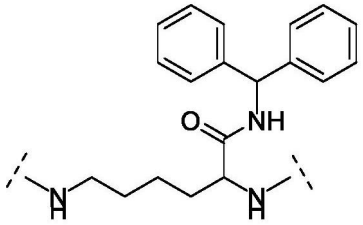
[0042] 在一些实施方式中,如上文所讨论的,所述第一末端基团包含与放射性核素络合的络合基团。这可以被认为是形成放射性核素-络合部分。在一些实施方式中,所述络合基团是DOTA、苄基-DOTA、NOTA、DTPA、macropa、sarcophagine、DFO、EDTA或PEPA基团。

[0043] 在一些实施方式中,所述放射性核素-络合部分中的放射性核素是镥、钆、镓、锆、锕、铋、砹、锡、铅、钇或铜放射性核素。在一些实施方式中,所述放射性核素是钆、镓、锆、铅或镥放射性核素。在一些实施方式中,所述放射性核素是α-发射体。在一些实施方式中,所述放射性核素是β-发射体。

[0044] 在一些实施方式中,所述药代动力学修饰部分是聚乙二醇(PEG)基团、或聚乙基恶唑啉(PEOX)基团、或聚-(2)-甲基-(2)-恶唑胺(POZ)、或者聚(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺(pHPMA)基团或聚肌氨酸。在一些实施方式中,所述药代动力学修饰部分是聚乙二醇(PEG)基团。在一些实施方式中,所述药代动力学修饰部分是具有在400道尔顿至2400道尔顿或400道尔顿至2200道尔顿或400道尔顿至1400道尔顿范围内的平均分子量的PEG基团。

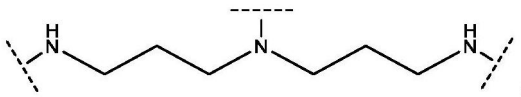
[0045] 在一些实施方式中,所述树枝状体具有四代的构建单元。在一些实施方式中,所述构建单元的代是完全的代。

[0046] 在一些实施方式中,所述核心单元是:

[0047] 

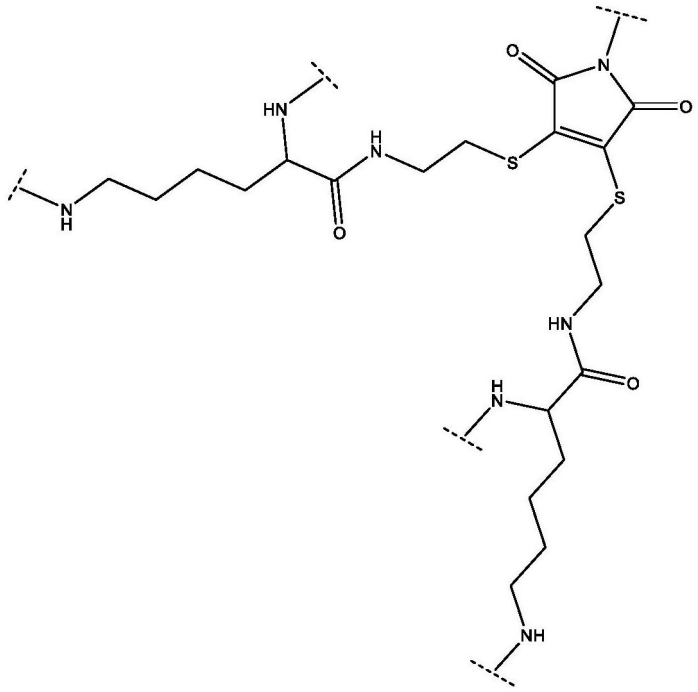
。

[0048] 在一些实施方式中,所述核心单元包含以下结构:

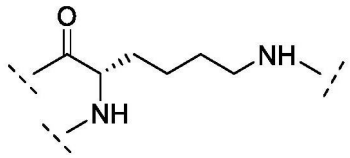
[0049] 

。

[0050] 在一些实施方式中,所述核心单元是:

[0051] 

[0052] 在一些实施方式中，所述构建单元是赖氨酸残基或其类似物。在一些实施方式中，所述构建单元各自是：

[0053] 

[0054] 在一些实施方式中，表面构建单元中存在的氮原子中的1至3个附接至第一末端基团。在一些实施方式中，表面构建单元中存在的氮原子的至少三分之一附接至第二末端基团。在一些实施方式中，表面构建单元中存在的氮原子的至少三分之一附接至第三末端基团。

[0055] 在一些实施方式中，所述树枝状体包含表面构建单元，其含有被乙酰基团封端的氮原子。

[0056] 在一些实施方式中，所述树枝状体是示例缀合物中的任一者。

[0057] 在另一方面，提供了一种组合物，其包含多种如本文所定义的缀合物。

[0058] 在另一方面，提供了一种药物组合物，其包含：

[0059] i)如本文所定义的缀合物；以及

[0060] ii)药学上可接受的赋形剂。

[0061] 在一些实施方式中，所述缀合物或药物组合物用于疗法中。在一些实施方式中，所述缀合物或药物组合物用于治疗癌症。在此类治疗性实施方式中，所述树枝状体-靶向剂缀合物树枝状大分子靶向剂缀合物可能已经与放射性核素络合，成为树枝状体-靶向剂治疗缀合物，以分配给需要这种治疗的受试者。本文中对‘缀合物’或‘树枝状体缀合物’的提及可以包括树枝状体-靶向剂缀合物和树枝状体-靶向剂治疗缀合物两者。

[0062] 在另一方面，提供了如本文所定义的缀合物或药物组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

[0063] 在另一方面，提供了一种治疗受试者癌症的方法，其包括向受试者施用治疗有效量的如本文所定义的缀合物或药物组合物。在一些实施方式中，所述癌症是前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌或脑癌。在一些实施方式中，所述癌症是胶质母细胞瘤、脑膜瘤、垂体、神经鞘、星形细胞瘤、少突胶质瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤或颅咽管瘤的脑癌。

[0064] 在另一方面，提供了一种用于如本文所定义的用途的方法、用途或缀合物或组合物，其中所述缀合物与另一种活性剂组合施用。

[0065] 在另一方面，提供了一种用于产生如本文所定义的治疗缀合物的试剂盒，其包含：

[0066] a)如本文所定义的第一方面的缀合物；以及

[0067] b)放射性核素。

[0068] 在另一方面，提供了一种用于产生如本文所述的治疗缀合物的方法，其包括使如本文所定义的第一方面的缀合物与放射性核素接触，从而产生所述治疗缀合物。

附图说明

[0069] 图1a示出树枝状体-纳米抗体缀合反应(泳道反应混合)，如通过SDSPAGE和荧光成像可见，所述反应生成连接至1个、2个、3个、4个或更多个纳米抗体的产物树枝状体的混合物。SDSPAGE大小标记(蓝色)表示近似千道尔顿质量。

[0070] 图1b示出树枝状体-纳米抗体缀合反应(泳道反应混合)，如通过SDSPAGE和荧光成像可见，所述反应生成连接至1个、2个、3个、4个或更多个纳米抗体的产物树枝状体的混合物。SDSPAGE大小标记(蓝色)表示近似千道尔顿质量。

[0071] 图1c示出树枝状体-纳米抗体缀合反应(泳道反应混合)，如通过SDSPAGE和荧光成像可见，所述反应生成连至1个、2个、3个、4个或更多个纳米抗体的产物树枝状体的混合物。SDSPAGE大小标记(蓝色)表示近似千道尔顿质量。

[0072] 图1d示出树枝状体-纳米抗体缀合反应(泳道M)，如通过SDSPAGE和荧光成像可见，所述反应生成连接至1个、2个、3个、4个或更多个纳米抗体的产物树枝状体的混合物。SDSPAGE大小标记(蓝色)表示近似千道尔顿质量。

[0073] 图1e示出树枝状体-纳米抗体缀合反应(泳道M)，如通过SDSPAGE和荧光成像可见，所述反应生成连接至1个、2个、3个、4个或更多个纳米抗体的产物树枝状体的混合物。SDSPAGE大小标记(蓝色)表示近似千道尔顿质量。

[0074] 图1f示出树枝状体-纳米抗体缀合反应(泳道M)，如通过SDSPAGE和荧光成像可见，所述反应生成连接至1个、2个、3个、4个或更多个纳米抗体的产物树枝状体的混合物。SDSPAGE大小标记(蓝色)表示近似千道尔顿质量。

[0075] 图1g示出树枝状体-纳米抗体缀合反应(泳道M)，如通过SDSPAGE和荧光成像可见，所述反应生成连接至1个、2个、3个、4个或更多个纳米抗体的产物树枝状体的混合物。SDSPAGE大小标记(蓝色)表示近似千道尔顿质量。

[0076] 图1h示出从尺寸排阻获得的级分的SDS-PAGE。SDS-PAGE标记(蓝色)表示近似千道尔顿质量，红色表示从树枝状体发射的Cy5荧光。纳米抗体-树枝状体的预期分子量(约25kDa)。

[0077] 图1i示出从尺寸排阻获得的级分的SDS-PAGE。SDS-PAGE标记(蓝色)表示近似千道尔顿质量，红色表示从树枝状体发射的Cy5荧光。纳米抗体-树枝状体的预期分子量(约

25kDa)。

[0078] 图2示出在24h内化合物71(对照)和化合物123(靶向性)与MDA-MB-231、MDA-MB-231/HER2和SKOV-3细胞的平均荧光强度值。每次测量计数至少10000个细胞。值是平均值±标准偏差(SD;n=3)。

[0079] 图3示出在37℃下以3.33nM与HER2阳性细胞(MDA-MB-231/HER2)和HER2阴性细胞(MDA-MB-231)一起孵育的树枝状体在24h孵育内的流式细胞术分析。每次测量计数至少10000个细胞。值是平均值±标准偏差(SD;n=3)。

[0080] 图4示出用浓度为3.33nM的a)化合物71(对照)或b)化合物123(靶向性)处理24h的MDA-MB-231细胞的共聚焦显微镜图像。绿色荧光、蓝色荧光和红色荧光分别表示用AF-488-WGA染色的细胞膜、用DAPI染色的核以及用Cy5标记的树枝状体。比例尺=50μm。

[0081] 图5示出用浓度为3.33nM的a)化合物71(对照)或b)化合物123(靶向性)处理24h的MDA-MB-231/HER2细胞的共聚焦显微镜图像。绿色荧光、蓝色荧光和红色荧光分别表示用AF-488-WGA染色的细胞膜、用DAPI染色的核以及用Cy5标记的树枝状体。比例尺=50μm。

[0082] 图6示出用浓度为3.33nM的a)化合物71(对照)或b)化合物123(靶向性)处理24h的SKOV-3细胞的共聚焦显微镜图像。绿色荧光、蓝色荧光和红色荧光分别表示用AF-488-WGA染色的细胞膜、用DAPI染色的核以及用Cy5标记的树枝状体。比例尺=50μm。

[0083] 图7示出在48h时牺牲之后3H标记的化合物72和化合物127树枝状体的肿瘤和血液分布数据。所有数据按组织质量归一化。所有数据表示平均值±SEM(n=5);(NS=不显著;*=p值<0.05)。

[0084] 图8示出在48h时牺牲之后化合物71和化合物123的代表性离体肿瘤分布。数据表示(a)非靶向性树枝状体(化合物71)和(b)靶向性树枝状体(化合物123)的典型视场。

[0085] 图9示出显示靶向性树枝状体(化合物123)被摄入至肿瘤的核心和外周区域中,并且显示对照化合物71并非如此的图像。

[0086] 图10示出针对接种有用以下处理后的SKOV3细胞的小鼠的平均肿瘤体积随时间的图:媒介物、对照化合物71、靶向性化合物123、Kadcyla®或Herceptin®。

[0087] 图11示出针对接种有用以下处理后的SKOV3细胞的小鼠的随时间的存活百分比:媒介物、对照化合物71、靶向性化合物123、Kadcyla®或Herceptin®。

[0088] 图12示出针对接种有用以下处理后的SKOV3细胞的小鼠的随时间的平均重量变化%:媒介物、对照化合物71、靶向性化合物123、Kadcyla®或Herceptin®。

[0089] 图13示出具有单一缀合(化合物91;MFI单一)或多个缀合(化合物92;MFI多个)的抗HER2纳米抗体的第4代树枝状体的内化动力学。

[0090] 图14示出在与化合物92(多个2D3树枝状体缀合物)在37℃下一起孵育a)1h、b)3h、c)6h或d)24h之后的SKOV-3细胞的共聚焦显微镜图像。将化合物92用Cy5(品红)进行标记,将细胞膜用AF488-WGA(绿色)进行染色,并且将核用Hoechst 33342(蓝色)进行标记。比例尺=30μM。

[0091] 图15示出了在与化合物91(单一2D3-树枝状体缀合物)在37℃下一起孵育a)1h、b)3h、c)6h或d)24h之后的SKOV-3细胞的共聚焦显微镜图像。将化合物91用Cy5(品红)进行标记,将细胞膜用AF488-WGA(绿色)进行染色,并且将核用Hoechst 33342(蓝色)进行标记。比

例尺＝30μM。

[0092] 图16是化合物73的放射TLC图像，其显示^{89}Zr结合至树枝状体。

[0093] 图17示出对于化合物89、91和93，在9天内在(a)肾脏、(b)肝脏和(c)肿瘤中注射锆剂量百分比/克的图。

[0094] 图18示出在4小时至9天时动物的放射标记缀合物PET图像的代表性最大强度投影。数据表示为贝可/体素(cm^3)并且已经阈值处理以突出显示肿瘤摄入。

[0095] 图19示出针对接种有用媒介物处理后的BT474细胞的balb/c裸小鼠和递送15Mbq ^{177}Lu的测试品(曲妥珠单抗KY-3-310、HER2纳米抗体靶向性SRS-2-304和非靶向性RH-3-160)的肿瘤体积随时间的变化%的图。

[0096] 图20示出在不同剂量^{177}Lu的情况下，针对接种有用媒介物处理后的BT474细胞的balb/c裸小鼠、曲妥珠单抗KY-3-310或HER2纳米抗体靶向性SRS-2-304的肿瘤体积随时间的变化%的图。

[0097] 图21示出还原和未还原的KY-2a的SDS page凝胶。

[0098] 图22示出树枝状体缀合物SRS-15、SRS-16、SRS-17(以及相应的起始材料)的SDS page凝胶。

[0099] 图23示出树枝状体缀合物SRS-20、SRS-21和SRS-22(以及相应的起始材料)的SDS page凝胶。

[0100] 序列表的说明

[0101] SEQ ID NO:1单域抗体是2D3氨基酸序列。

[0102] SEQ ID NO:2示例单域抗体氨基酸序列。

[0103] SEQ ID NO:3示例单域抗体氨基酸序列。

[0104] SEQ ID NO:4示例单域抗体氨基酸序列。

[0105] SEQ ID NO:5示例单域抗体氨基酸序列。

[0106] SEQ ID NO:6示例单域抗体氨基酸序列。

[0107] SEQ ID NO:7示例单域抗体氨基酸序列。

[0108] SEQ ID NO:8示例单域抗体氨基酸序列。

[0109] SEQ ID NO:9示例单域抗体氨基酸序列。

[0110] SEQ ID NO:10示例单域抗体氨基酸序列。

具体实施方式

[0111] 一般定义

[0112] 除非另外明确定义，否则本文中使用的所有技术和科学术语应被视为具有与本领域(例如，化学、生物化学、药物化学、聚合物化学等)的普通技术人员通常所理解的相同的含义。

[0113] 如本文所用，术语“和/或”(例如，“X和/或Y”)应理解为意指“X和Y”或者“X或Y”，并且应被视为提供对于两种含义或对于任一种含义的明确支持。

[0114] 如本文所用，除非相反地声明，否则术语约是指指定值的+/-20%，更优选地+/-10%。

[0115] 除非上下文另外明确指出，否则如本文所用，术语“一个”、“一种”和“所述”包括单

数和复数方面。

[0116] 除非另有说明，否则诸如“第一”、“第二”等术语在本文中仅用作标记，并不旨在对这些术语所指的项施加顺序、位置或等级要求。此外，提及“第二”项并不要求或排除存在编号较低的项(例如，“第一”项)和/或编号较高的项(例如，“第三”项)。

[0117] 如本文所用，短语“……中至少一者”在与项目列表一起使用时，意指可以使用这些项目中的一者或多者的不同组合，并且可能仅仅需要列表中的一个项目。项目可以是特定的对象、事物或类别。换言之，“……中至少一个”意指可以使用列表中的任何项目组合或任何数量的项目，但可能不需要列表中的所有项目。例如，“项目A、项目B和项目C中的至少一个”可以意指项目A；项目A和项目B；项目B；项目A、项目B和项目C；或项目B和项目C。在一些情况下，“项目A、项目B和项目C中的至少一个”可以意指(例如但不限于)项目A中的两个、项目B中的一个和项目C的十个；项目B中的四个和项目C中的七个；或某个其他合适的组合。

[0118] 如本文所用，术语“受试者”是指易感疾病或病症的任何生物体。例如，受试者可以是动物、哺乳动物、灵长类动物、家畜动物(例如，绵羊、奶牛、马、猪)、伴侣动物(例如，狗、猫)或实验动物(例如，小鼠、兔子、大鼠、豚鼠、仓鼠)。在一个实例中，受试者是哺乳动物。在一个实施方式中，受试者是人。在一个实施方式中，受试者是非人动物。

[0119] 如本文所用，术语“治疗”包括缓解与特定障碍或病症相关的症状。例如，如本文所用，术语“治疗癌症”包括缓解与癌症相关的症状。在一个实施方式中，术语“治疗癌症”是指癌性肿瘤大小的减小。在一个实施方式中，术语“治疗癌症”是指无进展存活期的增加。如本文所用，术语“无进展存活期”是指在治疗癌症期间和之后，患者伴随疾病(即，癌症)活着，但不具有疾病复发或症状增加的时间长度。

[0120] 如本文所用，术语“预防”包括预防特定障碍或病症。例如，如本文所用，术语“预防癌症”是指防止与癌症相关的症状的发作或持续。在一个实施方式中，术语“预防癌症”是指减缓或停止癌症的进展。在一个实施方式中，术语“预防癌症”是指减缓或防止转移。

[0121] 如本文所用，术语“治疗有效量”是指树枝状体的施用量足以在一定程度上缓解或预防所治疗的障碍或病症的一种或多种症状。结果可以是疾病或病症的体征、症状或病因的减轻和/或缓解，或者生物系统的任何其他期望变化。在一个实施方式中，术语“治疗有效量”是指树枝状体的施用量足以导致癌性肿瘤大小的减小。在一个实施方式中，术语“治疗有效量”是指树枝状体的施用量足以导致无进展存活期的增加。如本文所用，术语“有效量”是指树枝状体有效实现期望的药理学效果或治疗性改善而无过度不良副作用的量。术语“治疗有效量”包括例如预防有效量。在一个实施方式中，预防有效量是足以防止转移的量。应理解，“有效量”或“治疗有效量”可以由于以下方面的变化而在受试者之间变化：化合物的代谢以及受试者的年龄、体重、一般状况、所治疗的病症、所治疗的病症的严重程度以及处方医师的判断中的任一者。

[0122] 如本文所用，术语“诊断”可以包括以下过程：向患有或疑似患有病症、疾病或障碍的受试者施用本公开的缀合物，随后使用诸如单光子发射、正电子发射断层扫描和/或正电子发射断层扫描-磁共振成像的技术，以提供关于身体各个部分中的放射性水平的信息，例如对受试者身体的一部分或多个部分进行成像，以便能够就疾病、障碍或病症(例如癌症)的存在和/或就疾病、障碍或病症的状态、分期和/或程度做出决定。在一些实施方式中，术语“诊断”可以包括根据体征或症状对疾病、障碍或病症的状态、分期或程度进行识别和/或

分类的行为。例如，如本文所用，术语“诊断癌症”可以包括对受试者癌症的状态、分期或程度进行识别和/或分类。

[0123] 树枝状体的合适盐包括与有机或无机酸或碱形成的盐。如本文所用，短语“药学上可接受的盐”是指药学上可接受的有机或无机盐。示例性酸加成盐包括但不限于硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸式柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、丹宁酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、富马酸盐、葡糖酸盐、葡糖醛酸盐、糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲烷磺酸盐、乙烷磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和双羟萘酸(即，1,1’-亚甲基-双-(2-羟基-3-萘甲酸))盐。示例性碱加成盐包括但不限于铵盐；碱金属盐，例如钾和钠的那些；碱土金属盐，例如钙和镁的那些；以及与有机碱的盐，所述有机碱例如二环己基胺，N-甲基-D-葡糖胺，吗啉，硫代吗啉，哌啶，吡咯烷，单-、二-或三-低级烷基胺(例如乙基-、叔丁基-、二乙基-、二异丙基-、三乙基-、三丁基-或二甲基-丙胺)，或单-、二-或三-羟基低级烷基胺(例如单、二或三乙醇胺)。药学上可接受的盐可以涉及包括另一种分子，诸如乙酸根离子、琥珀酸根离子或其他抗衡离子。抗衡离子可以是使母体化合物上的电荷稳定的任何有机或无机部分。此外，药学上可接受的盐在其结构中可以具有多于一个带电荷的原子。多个带电荷的原子是药学上可接受的盐的一部分的情况可以具有多个抗衡离子。因此，药学上可接受的盐可以具有一个或多个带电荷的原子和/或一个或多个抗衡离子。还应当理解，非药学上可接受的盐也落入本公开的范围内，因为这些可用作在制备药学上可接受的盐中的中间体，或者可以在储存或运输过程中是有用的。

[0124] 有机和/或药物化学领域的技术人员应当理解，许多有机化合物可以与它们在其中发生反应或从其中沉淀或结晶的溶剂形成复合物。这些复合物被称为“溶剂化物”。例如，与水的复合物被称为“水合物”。如本文所用，短语“药学上可接受的溶剂化物”或“溶剂化物”是指一个或多个溶剂分子和本公开的化合物的缔合。形成药学上可接受的溶剂化物的溶剂的实例包括但不限于水、异丙醇、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸和乙醇胺。

[0125] 如本文所用，术语“5至10元单环或双环杂环基团”是指类似于碳环基团的单环或双环芳族或非芳族环状基团，但其中一个或多个碳原子被一个或多个独立地选自氮、氧或硫的杂原子取代。多环杂环可以例如含有稠环。在双环杂环基团中，每个环中可以有一个或多个杂原子，或者仅在其中一个环中有杂原子。杂原子可以是N、O或S。含有合适氮原子的杂环基团包括相应的N-氧化物。在一个实例中，杂环基团由五至十个原子组成(即，5至10元杂环)。单环非芳族杂环基团的实例包括氮丙啶基、氮杂环丁烷基、吡咯烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、哌啶基、哌嗪基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、吗啉基、硫代吗啉基和氮杂环庚基。其中一个环是非芳族的双环杂环基团的实例包括二氢苯并呋喃基、茚基、吲哚基、异吲哚基、四氢异喹啉基、四羟基喹啉基和苯并氮杂环庚基。单环芳族杂环基团(也称为单环杂芳基团)的实例包括呋喃基、噻吩基、吡咯基、恶唑基、噻唑基、咪唑基、恶二唑基、噻二唑基，吡啶基、三唑基、三嗪基、吡啶基、异噻唑基、异恶唑基，吡嗪基、吡唑基和嘧啶基。双环芳族杂环基团(也称为双环杂芳基团)的实例包括喹喔啉基、喹唑啉基、吡啶并吡嗪基、苯并恶唑基、苯甲硫基、苯并咪唑基、萘并吡啶基、喹啉基、苯呋喃基、吲哚基、吲唑基、苯并噻唑基、恶唑基[4,5-b]吡啶基、吡啶并嘧啶基、异喹啉基和苯并氢恶唑。

[0126] 如本文所用，术语“饱和”是指主链原子的所有可用价键附接至其他原子的基团。

饱和基团的代表性实例包括但不限于丁基、环己基、哌啶等。

[0127] 如本文所用，术语“不饱和”是指两个相邻主链原子的至少一个价键未附接至其他原子的基团。代表性实例包括但不限于烯烃(例如，$-CH_2-CH_2CH=CH$)、苯基、吡咯等。

[0128] 如本文所用，术语“取代的”是指其中一个或多个氢或其他原子从碳或合适的杂原子中去除并被另一个基团(即，取代基)取代的基团。

[0129] 如本文所用，术语“树枝状体”是指含有核心和附接至核心的树枝化基元(dendron)的分子。每个树枝化基元由数代的支化构建单元组成，从而产生具有随着每代构建单元而增加的支链数的支化结构。树枝状体可以包括如上文所定义的药学上可接受的盐或溶剂化物。

[0130] 如本文所用，术语“构建单元”是指包含官能团的支化分子，至少一个官能团用于附接至核心或前一代构建单元，并且至少两个官能团用于附接至下一代构建单元或形成树枝状体分子的表面。

[0131] 如本文所用，术语“附接”是指化学组分之间通过共价键合的连接。术语“共价键合”与术语“共价附接”可互换使用。

[0132] 缀合物

[0133] 在第一方面，提供了一种树枝状体-靶向剂缀合物，其包含：

[0134] a)树枝状体，所述树枝状体包含：

[0135] i)核心单元(C)；以及

[0136] ii)构建单元(BU)，

[0137] 其中所述树枝状体具有两代至六代的构建单元；并且其中所述核心单元共价附接到至少两个构建单元；

[0138] b)靶向剂，所述靶向剂通过间隔子基团共价连接至树枝状体；

[0139] c)一个或多个第一末端基团，其附接至树枝状体的最外层构建单元，其中所述第一末端基团包含用于络合放射性核素的络合基团；以及

[0140] d)一个或多个第二末端基团，其附接至树枝状体的最外层构建单元，其中所述第二末端基团包含药代动力学修饰部分；或其盐。

[0141] 第一方面的树枝状体-靶向剂缀合物可以具有与络合基团络合的放射性核素，以形成树枝状体-靶向剂治疗缀合物。所述树枝状体-靶向剂治疗缀合物可以用于治疗性或成像/诊断应用。

[0142] 在一个方面，提供了一种树枝状体-靶向剂治疗缀合物，其包含：

[0143] a)树枝状体，所述树枝状体包含：

[0144] i)核心单元(C)；以及

[0145] ii)构建单元(BU)，每个构建单元是赖氨酸残基或其类似物，

[0146] 其中所述树枝状体具有两代至六代的构建单元；并且其中所述核心单元共价附接到至少两个构建单元；

[0147] b)靶向剂，所述靶向剂通过间隔子基团共价连接至树枝状体；

[0148] c)一个或多个第一末端基团，其附接至树枝状体的最外层构建单元，其中所述第一末端基团包含与放射性核素络合的络合基团；以及

[0149] d)一个或多个第二末端基团，其附接至树枝状体的最外层构建单元，其中所述第

二末端基团包含药代动力学修饰部分；

[0150] 或其盐。

[0151] 本公开的缀合物包含并入靶向剂的树枝状支架和包含用于络合放射性核素的络合基团的第一末端基团，可用作药物应用的试剂，例如用作癌症治疗中有用的治疗剂。据认为，树枝状支架与药代动力学修饰基团(诸如PEG或PEOX基团)的特定组合缀合至靶向剂，以使得能够提供持续治疗效果的方式将放射性核素递送到作用位点。缀合物的设计还准许以允许延迟引入靶向剂、用于络合放射性核素的络合基团以及特别是放射性核素的方式进行合成。

[0152] 树枝状体

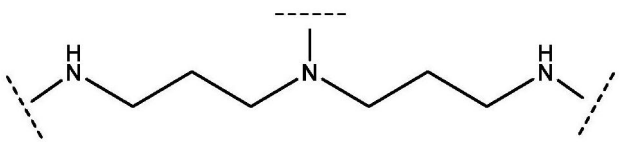
[0153] 核心单元

[0154] 树枝状体的核心单元(C)提供了用于由构建单元形成的树枝化基元的附接点。可以使用含有能够与构建单元上存在的官能团形成共价键的官能团的任何合适的核心单元。

[0155] 在一些实施方式中，核心单元经由酰胺键共价附接到至少两个构建单元。在一些实施方式中，每个酰胺键在核心单元中存在的氮原子与构建单元中存在酰基基团的碳原子之间形成。在其他实施方式中，每个酰胺键在核心单元中存在的酰基基团的碳原子与构建单元中存在的氮原子之间形成。

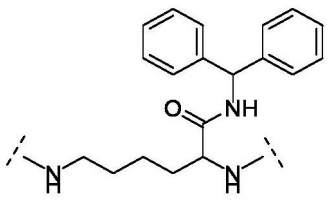
[0156] 在一些实施方式中，核心单元共价附接至2个、3个或4个构建单元。在一个特定实施方式中，核心单元共价附接至2个构建单元。核心单元可以例如由包含氨基基团的核心单元前体形成。又如，核心单元可以由包含羧酸基团的核心单元前体形成。在核心单元附接至2个构建单元的情况下，树枝状体的核心单元可以例如由包含两个氨基基团的核心单元前体形成。

[0157] 在一些实施方式中，核心单元可从具有三个反应性氮原子(其中两个可用于附接构建单元，并且其中一个可用于附接间隔子基团)的前体衍生。在一些实施方式中，所述核心单元是：

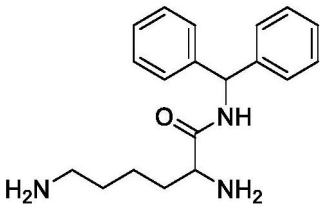
[0158]  。通过使用合适的保护基团策略，末端氮可以用与中心氮不同的基团官能化，例如构建单元可以附接至末端氮，并且中心氮可以用间隔子基团官能化。

[0159] 在一些实施方式中，核心单元可从具有两个反应性氮原子(其可用于附接构建单元)的前体衍生。例如，在一些实施方式中，核心单元可以从乙二胺、1,4-二氨基丁烷或1,6-二氨基己烷衍生。

[0160] 在一些实施方式中，所述核心单元是：

[0161]  ，即，由此核心单元包含赖氨酸残基，其中酸部分已经用二苯甲胺封端(BHA-Lys)以形成相应的酰胺，并且可以例如由具有两个反应性(氨基)氮的以

下核心单元前体形成：

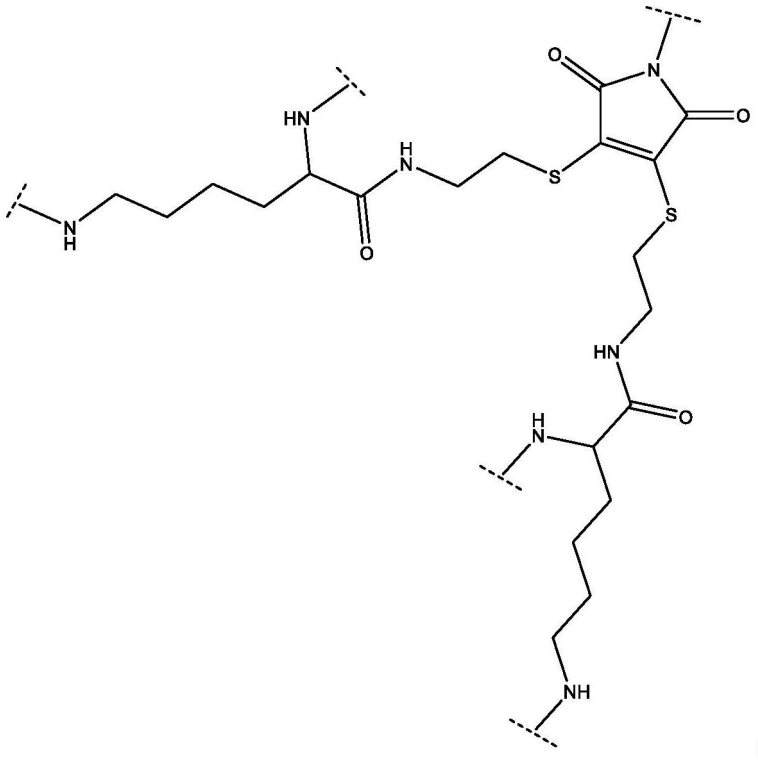
[0162]  具有两个活性(氨基)氮。

[0163] 在使用仅具有两个反应性氮原子的核心单元前体(诸如BHA-Lys)的情况下，通常将两个氨基基团用构建单元官能化，并且通常将间隔子基团附接至表面构建单元。

[0164] 本发明的树枝状体允许多个末端基团以受控方式呈现在树枝状体的表面上。特别地，在使用赖氨酸构建单元的情况下，可以如下文所述预先确定在构建单元的α或ε氮原子上的放置。在一些优选实施方式中，所有的络合基团(含放射性核素的部分)、药代动力学基团、靶向剂和(如果存在)药物活性剂的残基都经由通过构建单元的附接提供在树枝状体的表面上。换言之，在那些实施方式中，核心单元不提供除了经由构建单元之外的用于末端基团的附接点。应理解，在此类实施方式中，核心单元中存在的不用于共价附接至构建单元的任何官能团将是不反应的(即在缀合物已经暴露的条件下不起反应)，或者将已经用合适的封端基团封端以防止进一步反应。这种核心单元的实例是上文讨论的BHA-Lys基团。

[0165] 马来酰亚胺核心单元

[0166] 在一些实施方式中，核心是：

[0167] 

[0168] 其中与来自赖氨酸氮原子的键相邻的虚线指示附接构建单元，而与来自马来酰亚胺氮的键相邻的虚线可以指示例如如本文所讨论的官能部分的附接点。

[0169] 使用这种核心的优点是，从附接至马来酰亚胺的硫醚键延伸的每个臂的性质可以相同或不同。这允许在树枝状体的合成中增加灵活性，从而允许调整例如树枝状体代、构建单元类型和末端基团。

[0170] 这可以通过多种方式实现，但在一个实施方式中并且如方案1所示，可能期望从简单的胱胺核心开始，树枝状体最初经由赖氨酸残基的缀合构建在其上，如图所示。虽然树枝状体可以用胱胺核心进行任何期望数量的代，但两代、三代、四代或五代可能是最合适的。如方案2所示，胱胺树枝状体可以通过二硫键的还原而分裂成两个单独的树枝化基元。这为树枝化基元提供了硫醇部分，以用于随后偶联到马来酰亚胺单元。

[0171] 该偶联步骤也可以通过多种方式实现，但是已经发现方案2中所示的实施方式是有用的，其中提供了二溴马来酰亚胺试剂。马来酰亚胺环的氮提供了用例如官能部分、间隔子基团或其前体或组分官能化的机会，如下文所讨论。在方案2中，这显示为用四嗪官能度活化的PEG部分，但应当理解，可以使用广泛范围的其他间隔子或接头基团。允许树枝化基元的硫醇基团与二溴马来酰亚胺单元反应，因此有效地形成新的树枝状体核心。方案2显示，然后可以经由另外的构建单元将进一步的迭代添加到树枝状体，直到期望的代。马来酰亚胺氮上的间隔子基团可以在适当的时间进一步官能化或以其他方式发展，以缀合靶向剂、治疗性或其他期望的部分。

[0172] 应当理解，当树枝化基元暴露于二溴马来酰亚胺单元时，可以添加不同树枝化基元的混合物，因此在随后形成的核心上具有不同的树枝状体臂。来自胱胺核心的单独批次的不同树枝化基元可以经由还原进行合成和去除，然后将树枝化基元以所选的相对量与马来酰亚胺单元混合，以得到具有马来酰亚胺核心的期望树枝状体。

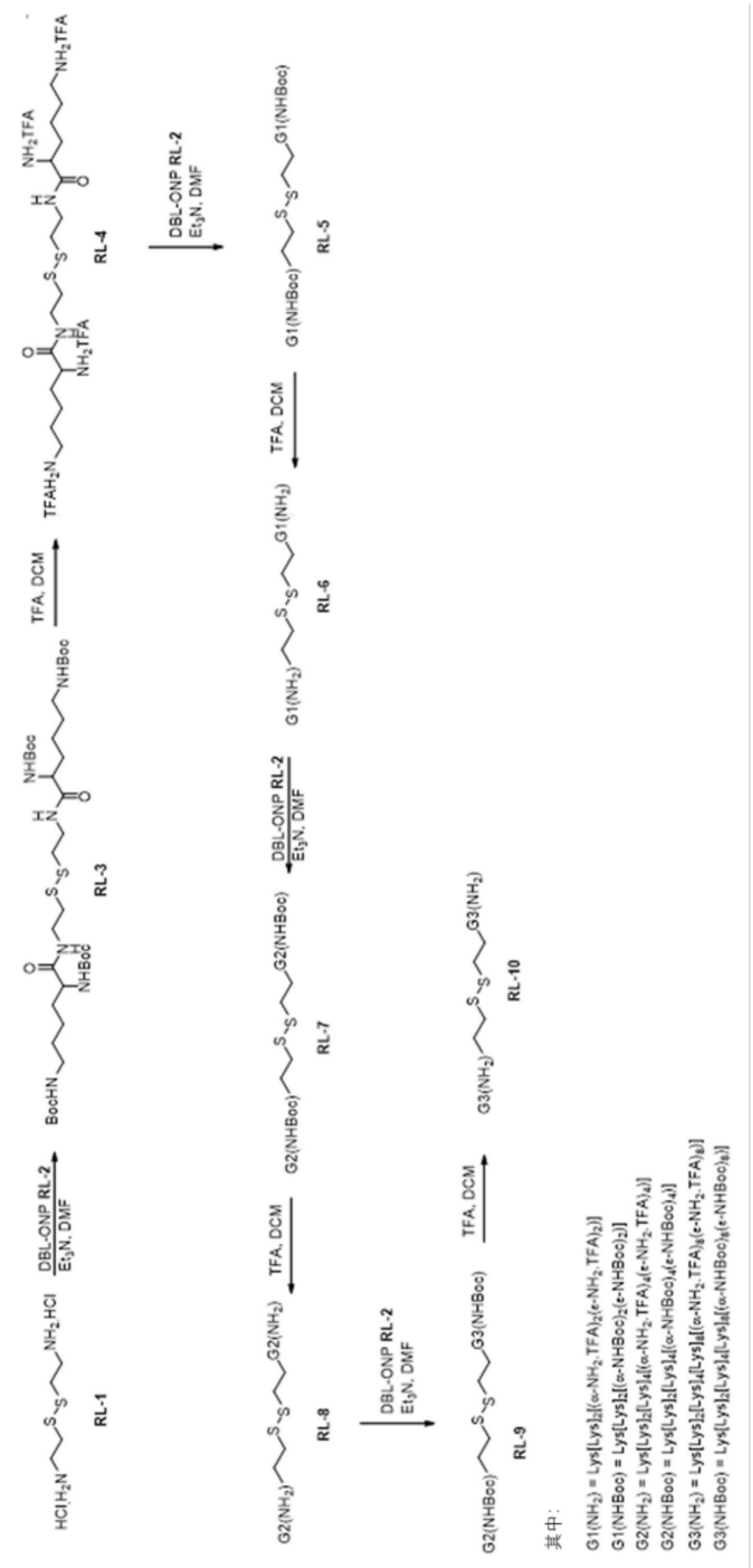
[0173] 在一个实施方式中，核心单元可以是或可以包含甲基马来酰亚胺单元，因此所述环的一个碳可以具有附接的甲基，因此在环碳之间存在双键，这可以在稳定性方面具有益处。

[0174] 在一个实施方式中，马来酰亚胺环的氮可以简单地呈现氢。在一个实施方式中，马来酰亚胺环的氮可以附接至官能部分。当氮附接至官能部分时，马来酰亚胺核心基本上具有另一个“合成手柄”，通过该手柄可以将另外的官能度引入核心。例如，治疗剂、靶向剂或药代动力学修饰剂可以作为官能部分缀合至核心。

[0175] 官能部分可以直接缀合至马来酰亚胺核心。可替代地，官能部分可以经由如本文所定义的间隔子基团缀合至马来酰亚胺核心。经由间隔子基团将官能部分缀合至马来酰亚胺核心的优点是将官能部分在远端系接至树枝状体，从而减少来自树枝状体的可能以其他方式降低官能部分发挥其功能的能力(即，治疗剂或靶向剂与靶受体或分子相互作用的能力)的任何位阻。

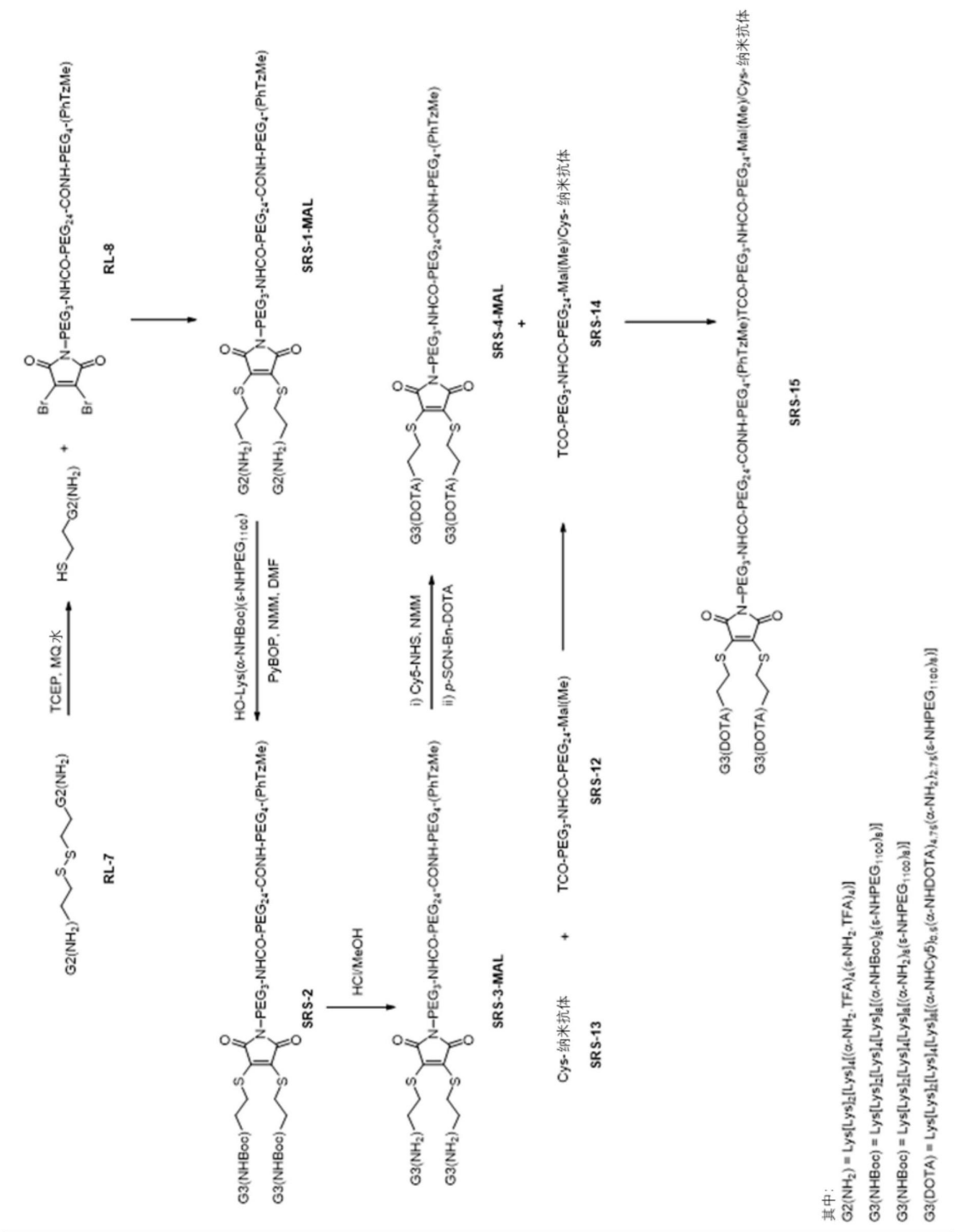
[0176] 在一个实施方式中，马来酰亚胺环的氮附接至包含靶向剂的官能部分。如本文所述，靶向剂可以直接或以其他方式通过任何合适的间隔子基团缀合至马来酰亚胺核心。在一个实例中，R^3是缀合至马来酰亚胺核心的HER2靶向剂。在一个实例中，R^3是经由如本文所述的间隔子基团缀合至马来酰亚胺核心的HER2靶向剂。在一个实例中，R^3是缀合至马来酰亚胺核心的FAP结合基团。在一个实例中，R^3是经由如本文所述的间隔子基团缀合至马来酰亚胺核心的FAP结合基团。

[0177]



方案1: RL-10的合成。

[0178]



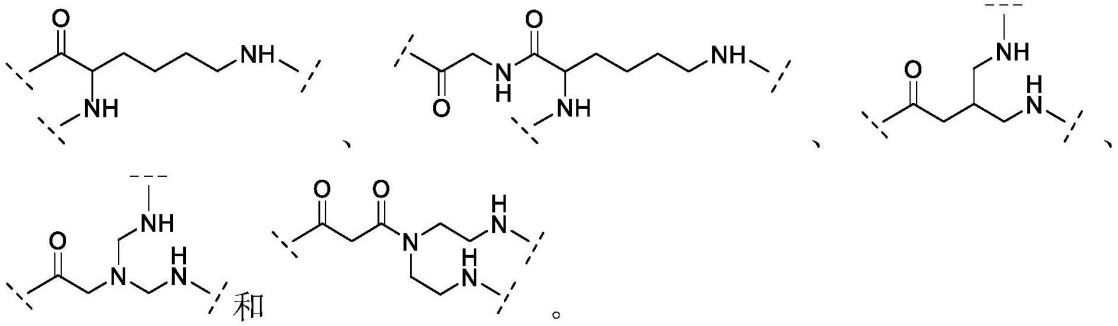
[0179] 方案2:[[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_8$(α-NHDOTA)$_{4.75}$(α-NHCy5)$_{0.5}$(α-NH_2)$_{2.75}$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$MAL-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)/TCO-NHCO-PEG_{24}-(MAL)Me/Cys-纳米抗体SRS-15的合成;其中G2(NH_2)=Lys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[(α-NH_2.TFA)$_4$(ε-NH_2.TFA)$_4$)];G3(NHBoc)=Lys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$(α-NHBoc)$_8$(ε-NHPEG_{1100})$_8$)];G3(NH_2)=Lys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$(α-NH_2)$_8$(ε-NHPEG_{1100})$_8$)];G3(DOTA)=Lys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$(α-NHCy5)$_{0.5}$(α-NHDOTA)$_{4.75}$(α-NH_2)$_{2.75}$(ε-NHPEG_{1100})$_8$)]。

[0180] 构建单元

[0181] 任何合适的构建单元(BU)均可以用于产生树枝状体,只要其含有能够与另一个构

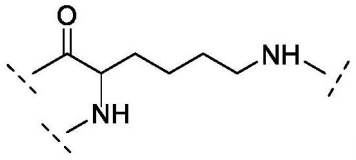
建单元或核心单元上存在的官能团形成键的第一官能团，并且含有(例如在去保护之后)能够与另一个构建单元上存在的官能团形成键的至少两个另外的官能团。

[0182] 在一些优选的实施方式中，经由一个构建单元中存在的氮原子与另一个构建单元中存在的酰基基团的碳原子之间形成的酰胺键将不同代的构建单元彼此共价附接。例如，在一些实施方式中，构建单元是赖氨酸残基或其类似物，并且可以由合适的构建单元前体(例如含有适当的保护基团的赖氨酸或赖氨酸类似物)形成。赖氨酸类似物具有用于键合至后续代构建单元的两个氨基氮原子和用于键合至前一代构建单元或核心的酰基基团。合适的构建单元的实例包括：

[0183] 

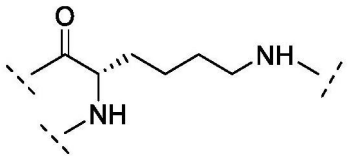
[0184] 其中每个构建单元的酰基基团提供了用于附接至核心或前一代构建单元的共价附接点；并且其中每个氮原子提供了可以用于共价附接至后续代构建单元或末端基团的共价附接点。

[0185] 在一些优选的实施方式中，构建单元各自是：

[0186] 

[0187] 其中每个构建单元的酰基基团提供了用于附接至核心或前一代构建单元的共价附接点；并且其中每个氮原子提供了可以用于共价附接至后续代构建单元或末端基团的共价附接点。

[0188] 在一些优选的实施方式中，构建单元各自是：

[0189] 

[0190] 在其他实施方式中，构建单元是天冬氨酸残基、谷氨酸残基或其类似物，即由合适的前体(例如天冬氨酸、谷氨酸或其类似物)形成，含有合适的保护基团。在此类实施方式中，核心单元可以由包含羧酸基团的核心单元前体形成(即，其可以与天冬氨酸/谷氨酸/类似物中存在的氨基基团反应)。

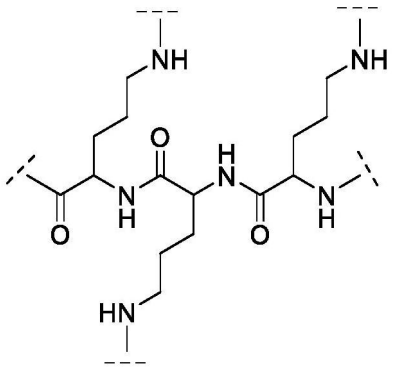
[0191] 最外代构建单元($BU_{外}$)可以由如在如上所述的其他代构建单元(BU)中使用的构建单元(例如赖氨酸或赖氨酸类似物构建单元)形成。最外代构建单元($BU_{外}$)是树枝状体的核心的最外部的一代构建单元，即没有进一步代的构建单元附接至最外代构建单元($BU_{外}$)。

[0192] 应当理解，树枝状体的树枝化基元可以例如通过相应地附接构建单元(BU)来合成

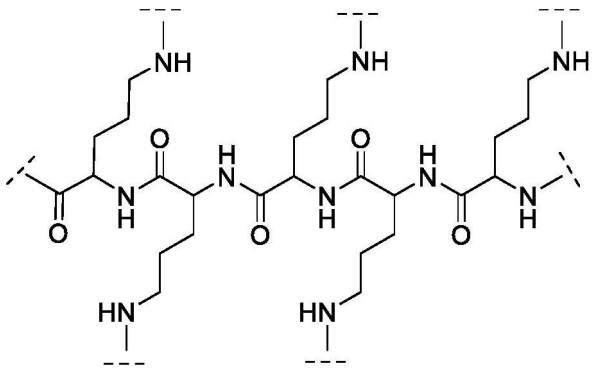
至所需数量的代。在一些实施方式中，每一代构建单元(BU)可以由相同的构建单元形成，例如所有代的构建单元可以是赖氨酸构建单元。在一些其他实施方式中，一代或多代构建单元可以由不同于其他代构建单元的构建单元形成。

[0193] 树枝状体具有两代至六代的构建单元，即2、3、4、5或6代的构建单元。

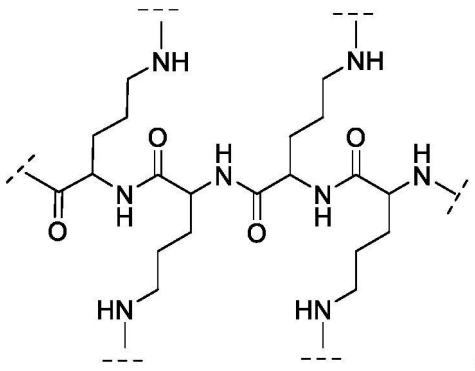
[0194] 在一些实施方式中，树枝状体具有三代的构建单元。三代构建单元树枝状体是具有这样的结构的树枝状体，所述结构包括彼此共价连接的三个构建单元，例如在构建单元是赖氨酸的情况下，它可以包含以下亚结构：

[0195]  。

[0196] 在一些实施方式中，树枝状体具有五代的构建单元。五代构建单元树枝状体是具有这样的结构的树枝状体，所述结构包括彼此共价连接的五个构建单元，例如在构建单元是赖氨酸的情况下，它可以包含以下亚结构：

[0197]  。

[0198] 在一些实施方式中，树枝状体具有四代的构建单元。四代构建单元树枝状体是具有这样的结构的树枝状体，所述结构包括彼此共价连接的四个构建单元，例如在构建单元是赖氨酸的情况下，它可以包含以下亚结构：

[0199]  。

[0200] 在一些实施方式中，所述构建单元的代是完全的代。例如，在树枝状体具有三代的构建单元的情况下，在一些实施方式中，树枝状体具有三个完全代的构建单元。在核心具有

两个反应性胺基团的情况下，这种树枝状体将包含14个构建单元(即核心单元+2BU+4BU+8BU)。

[0201] 类似地，例如，在树枝状体具有四代的构建单元的情况下，在一些实施方式中，树枝状体具有四个完全代的构建单元。在核心具有两个反应性胺基团的情况下，这种树枝状体将包含30个构建单元(即核心单元+2BU+4BU+8BU+16BU)。

[0202] 类似地，例如，在树枝状体具有五代的构建单元的情况下，在一些实施方式中，树枝状体具有五个完全代的构建单元。在核心具有两个反应性胺基团的情况下，这种树枝状体将包含62个构建单元(即核心单元+2BU+4BU+8BU+16BU+32BU)。

[0203] 然而，应当理解，由于用于产生树枝状体的合成方法的性质，为产生树枝状体进行的一个或多个反应可能未完全进行至完成。因此，在一些实施方式中，树枝状体可能包含不完全代的构建单元。例如，可以获得树枝状体的群体，其中树枝状体具有构建单元数/树枝状体的分布。

[0204] 在一些实施方式中，在树枝状体具有三代的构建单元的情况下，获得了树枝状体的群体，其具有至少8、或至少9、或至少10、或至少11、或至少12、或至少13的平均构建单元数/树枝状体。在一些实施方式中，获得了树枝状体的群体，其中至少60％、至少70％、至少80％、至少90％或至少95％的树枝状体具有10或更多个构建单元。在一些实施方式中，获得了树枝状体的群体，其中至少60％、至少70％、至少80％、至少90％或至少95％的树枝状体具有12或更多个构建单元。

[0205] 在一些实施方式中，在树枝状体具有四代的构建单元的情况下，获得了树枝状体的群体，其具有至少25、或至少26、或至少27、或至少28、或至少29的平均构建单元数/树枝状体。在一些实施方式中，获得了树枝状体的群体，其中至少60％、至少70％、至少80％、至少90％或至少95％的树枝状体具有25或更多个构建单元。在一些实施方式中，获得了树枝状体的群体，其中至少60％、至少70％、至少80％、至少90％或至少95％的树枝状体具有29或更多个构建单元。

[0206] 在一些实施方式中，在树枝状体具有五代的构建单元的情况下，获得了树枝状体的群体，其具有至少55、或至少56、或至少57、或至少58、或至少59、或至少60的平均构建单元数/树枝状体。在一些实施方式中，获得了树枝状体的群体，其中至少60％、至少70％、至少80％、至少90％或至少95％的树枝状体具有55或更多个构建单元。在一些实施方式中，获得了树枝状体的群体，其中至少60％、至少70％、至少80％、至少90％或至少95％的树枝状体具有60或更多个构建单元。

[0207] 在一些实施方式中，核心单元前体的每个反应性(氨基)基团表示用于包含构建单元的树枝化基元的缀合位点。

[0208] 在一些实施方式中，每个树枝化基元(X)中的每一代构建单元可以由式$[BU]_2^{(b-1)}$表示，其中b是代数。具有三个完全代的构建单元的树枝化基元(X)表示为$[BU]_1$-$[BU]_2$-$[BU]_4$。具有三个完全代的构建单元的树枝化基元(X)表示为$[BU]_1$-$[BU]_2$-$[BU]_4$-$[BU]_8$。具有五个完全代的构建单元的树枝化基元(X)表示为$[BU]_1$-$[BU]_2$-$[BU]_4$-$[BU]_8$-$[BU]_{16}$。

[0209] 在一些实施方式中，树枝状体包含多于一个树枝化基元。在一些实施方式中，树枝化基元是相同的。在一些实施方式中，树枝化基元是不同的。在一些实施方式中，树枝化基元在构建单元、表面基团、代大小、第一末端基团或第二末端基团的层面上是相同或不同

的。

[0210] 第一末端基团

[0211] 第一末端基团(T1)包含用于络合放射性核素的络合基团。在暴露于合适的放射性核素后,用于络合放射性核素的络合基团然后包含放射性核素和络合基团,并且可以称为含放射性核素部分。

[0212] 在实施方式中,含放射性核素部分可以包含与络合基团螯合的放射性核素。

[0213] 在实施方式中,含放射性核素部分可以包含与络合基团的配位络合物中的放射性核素。

[0214] 在实施方式中,含放射性核素部分可以包含螯合至络合基团的至少两个不同原子的放射性核素。

[0215] 在实施方式中,含放射性核素部分可以包含与络合基团配位键合的放射性核素。

[0216] 放射性核素

[0217] 任何合适的放射性核素均可以用于本发明的树枝状体。放射性核素也称为放射性同位素,是一种不稳定形式的化学元素,它会发生放射性衰变,从而产生核辐射发射。

[0218] 放射性核素可用于治疗疾病,诸如癌症。在此类情况下,向患者施用含放射性核素物质会导致放射性核素递送至肿瘤,并且在放射性衰变和辐射发射后杀死肿瘤细胞。

[0219] 优选地,放射性核素是金属或类金属(例如,出于本发明的目的,将砹视为类金属)放射性核素,例如金属离子或类金属离子。在一些实施方式中,放射性核素是阿尔法发射体(α-发射体)。在一些实施方式中,放射性核素是贝塔发射体(β-发射体)。在一些实施方式中,放射性核素是贝塔和伽玛发射体(γ-发射体)。

[0220] 在实施方式中,放射性核素不是氢的同位素,包括氘和氚。

[0221] 在一些实施方式中,放射性核素是锕(例如Ac^{225})、砹(例如As^{211})、铋(例如Bi^{212}、Bi^{213})、铅(例如Pb^{212})、锝(例如Tc^{99m})、钍(例如Th^{227})、镭(例如Ra^{223})、镥(例如Lu^{177})、钇(例如Y^{90})、铟(例如In^{111}、In^{114})、钆(例如Gd^{153})、镓(例如Ga^{68})、锆(例如Zr^{89})、铼(例如Re^{186})、碘(例如I^{131})或铜(例如Cu^{60}、Cu^{61}、Cu^{62}、Cu^{64}、Cu^{67})放射性核素。在一些实施方式中,放射性核素是镥(例如Lu^{177})、镓(例如Ga^{68})、锆(例如Zr^{89})、锕(例如Ac^{225})、铋(例如Bi^{212}、Bi^{213})、砹(例如As^{211})、锝(例如Tc^{99m})、或铜(例如Cu^{60}、Cu^{61}、Cu^{62}、Cu^{64}、Cu^{67})放射性核素。在一些实施方式中,放射性核素是镥(例如Lu^{177})、镓(例如Ga^{68})、锆(例如Zr^{89})、或铜(例如Cu^{60}、Cu^{61}、Cu^{62}、Cu^{64}、Cu^{67})放射性核素。在一些实施方式中,放射性核素是镓(例如Ga^{68})、锆(例如Zr^{89})、或镥(例如Lu^{177})放射性核素。

[0222] 在一些实施方式中,放射性核素用于治疗病症(例如,癌症)。此类放射性核素的实例包括锕(例如Ac^{225})、砹(例如As^{211})、铋(例如Bi^{212}、Bi^{213})、钍(例如Th^{227})、镭(例如Ra^{223})、镥(例如Lu^{177})、钇(例如Y^{90})、钆(例如Gd^{153})、铅(例如Pb^{212})和铜(例如Cu^{60}、Cu^{61}、Cu^{62}、Cu^{64})。

[0223] 在一些实施方式中,放射性核素是选自锕(例如Ac^{225})、砹(例如As^{211})、铋(例如Bi^{212}、Bi^{213})和铅(例如Pb^{212})的α发射体。

[0224] 在一些实施方式中,放射性核素是选自镥(例如Lu^{177})、钇(例如Y^{90})、碘(例如I^{131})、铜(例如,Cu^{67})和铼(例如Re^{186})的β-发射体。

[0225] 理想情况下,治疗性放射性核素的发射特性应考虑病灶大小,以将能量集中在肿瘤内,并且具有合适的半衰期,以与树枝状体的延长递送保持一致。在一些实施方式中,放

射性核素是半衰期小于20天或小于12天的α发射体。在一些实施方式中，放射性核素是半衰期为2至20天或5至10天的β发射体。^{177}Lu是中能β-发射体(490keV)，其中最大能量为0.5MeV且最大组织穿透<2mm。^{177}Lu还发射208和113keV的低能γ-射线，这允许进行体外成像，因此收集与肿瘤定位和剂量测定相关的信息。在一些实施方式中，治疗性放射性核素的注射剂量为1至50GBq/单次注射。在其他实施方式中，注射剂量为2至20GBq/单次注射/注入。在其他实施方式中，注射剂量为2至10GBq/单次注射。对于个别患者的剂量计算可以根据疾病负担、患者体重和肾功能的组合来确定。建议在每个治疗周期进行基于图像的剂量测定，例如，利用SPECT-CT。

[0226] 放射性核素还用于医疗诊断领域。诸如单光子发射、正电子发射断层扫描(PET)成像和正电子发射断层扫描-磁共振成像(PET-MRI)的技术可以用于检测施用了合适的含放射性核素物质的受试者体内的放射性核素，并产生图像，以告知疾病(诸如肿瘤)的存在和/或进展。

[0227] 在一些实施方式中，放射性核素用于诊断或病症(例如癌症)的成像。此类放射性核素的实例包括镓(例如Ga^{68})、铟(例如In^{111})、锆(例如Zr^{89})、碘(例如^{123}I、^{131}I)、锝(例如Tc^{99m})、钇(例如Y^{86})、氟(例如F^{18})和铜(例如Cu^{60}、Cu^{61}、Cu^{62}、Cu^{64})。在一些实施方式中，放射性核素是选自镓(例如Ga^{68})、锝(例如Tc^{99m})、锆(例如Zr^{89})和铜(例如Cu^{60}、Cu^{61}、Cu^{62}、Cu^{64})的显像剂。在一些实施方式中，放射性核素选自镓(例如Ga^{68})、锆(例如Zr^{89})和铜(例如Cu^{64})。

[0228] 在一些实施方式中，放射性核素不是钆。

[0229] 在一些实施方式中，放射性核素不是顺磁剂。

[0230] 所用放射性核素的类型可以根据树枝状结构进行调整，以优化受试者接受的放射性暴露水平。例如，据认为，身体通常会更大地暴露于具有更大数量代的构建单元的树枝状体。因此，通过将此类树枝状体与具有适当半衰期的放射性核素配对，可以实现最佳的治疗和/或诊断活动，同时避免或减少与身体暴露于放射性相关的副作用。

[0231] 在一些实施方式中，树枝状体是4代或5代树枝状体，并且放射性核素的半衰期不超过10天，优选地小于5天。在一些实施方式中，树枝状体是4代树枝状体，并且放射性核素的半衰期不超过10天，优选地小于5天。在一些实施方式中，树枝状体是5代树枝状体，并且放射性核素的半衰期小于10天，优选地小于5天。在一些实施方式中，树枝状体是4代树枝状体，并且放射性核素选自由以下组成的组：Y^{90}、Tc^{99m}、Th^{201}、Rb^{82}、Lt^{177}、Ga^{67}、Ga^{68}和In^{111}。在一些实施方式中，树枝状体是3代树枝状体，并且放射性核素的半衰期不超过10天。在一些实施方式中，树枝状体是3代树枝状体，并且放射性核素选自由以下组成的组：Y^{90}、Tc^{99m}、Th^{201}、Rb^{82}、Lt^{177}、Ga^{67}、Ga^{68}、Ac^{225}和In^{111}。

[0232] 放射性核素络合基团

[0233] 可以使用任何合适的络合基团，只要其适合与期望的放射性核素形成络合物。用于络合放射性核素的络合基团提供了能够络合放射性核素的官能部分。此类官能部分的实例包括羧酸、胺、酰胺、羟基基团、硫醇基团、脲、硫脲、-N-OH基团、磷酸盐以及与放射性核素形成络合物的次膦酸酯基团。

[0234] 在一些实施方式中，络合基团直接络合至放射性核素。

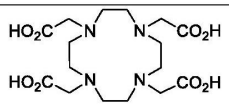
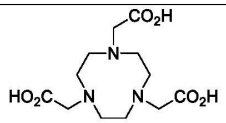
[0235] 在一些实施方式中，络合基团直接络合至放射性核素以形成配位络合物。也就是说，络合基团配位键合至放射性核素以形成络合物。

[0236] 在一些实施方式中，络合基团仅仅与放射性核素形成配位共价键。例如，络合基团可以与放射性核素形成至少两个单独的配位共价键。

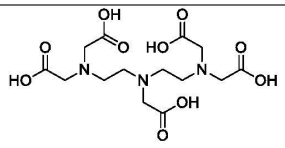
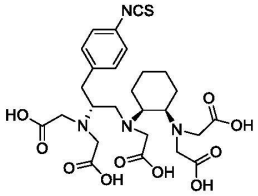
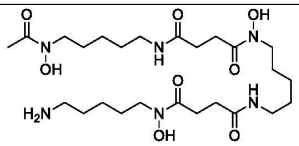
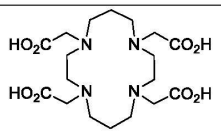
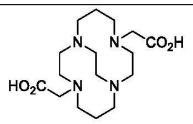
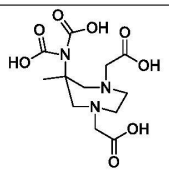
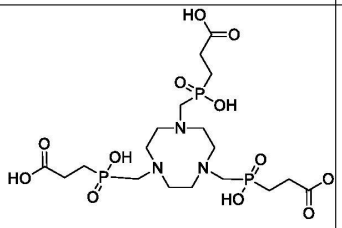
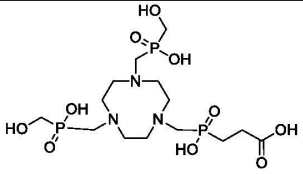
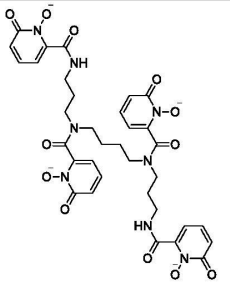
[0237] 在一些实施方式中，使用与放射性核素形成螯合物的络合基团。如本文所用，短语“与放射性核素形成螯合物的络合基团”意指络合基团与放射性核素形成至少两个单独的键(即来自络合基团的至少两个不同原子的键)。

[0238] 下表中提供了合适的络合基团的实例：

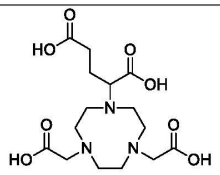
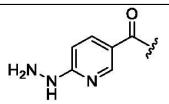
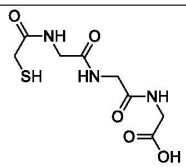
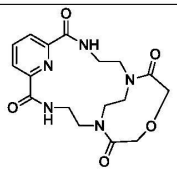
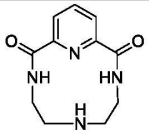
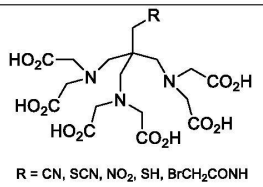
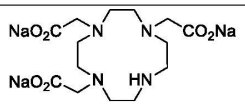
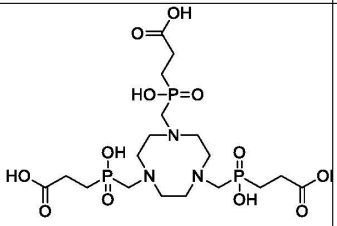
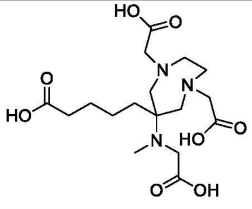
[0239]

配体	结构	化学名称
DOTA		1,4,7,10-四氮杂环癸烷-N,N',N",N'"-四乙酸
NOTA		1,4,7-三氮杂环壬烷-N,N',N"-三乙酸

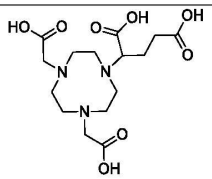
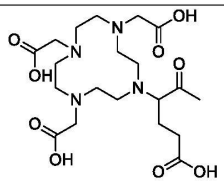
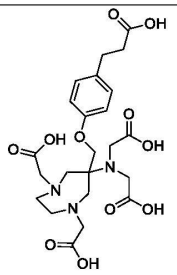
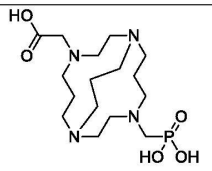
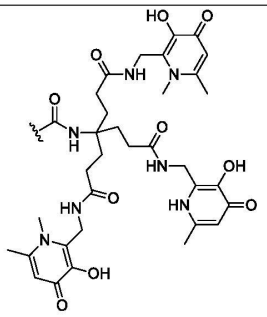
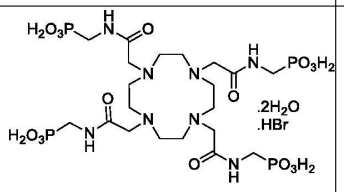
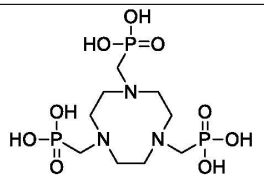
[0240]

DTPA		二乙烯三胺五乙酸酐
CHX-A DTPA		[(R)-2-氨基-3-(4-异硫氰酸苯)丙基]-反式-(S,S)-环己烷-1,2-二胺-五乙酸
去铁胺（DFO）		N'-[5-[[4-[[5-(乙酰羟基氨基)戊基]氨基]-1,4-二氧丁基]羟基氨基]戊基]-N-(5-氨基戊基)-N-羟基-丁二酰胺
TETA		1,4,8,11-四氮杂环十四烷-1,4,8,11-四乙酸
cb-TE2A		1,4,8,11-四氮杂双环[6.6.2]十六烷-4,11-二乙酸
AAZTA		1,4-双(羧甲基)-6-[双(羧甲基)]氨基-6-甲基过氢-1,4-二氮杂卓)
TRAP		1,4,7-三氮杂环壬烷次膦酸
NOPO		1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4-双[亚甲基(羟甲基)次膦酸]-7-[亚甲基(2-羧乙基)次膦酸]
HOPO		6-[(3-{[(1-氧代-6-氧代-1,6-二氢-2-吡啶基)羰基]氨基}丙基)(4-{[(1-氧代-6-氧代-1,6-二氢-2-吡啶基)羰基](3-{[(1-氧代-6-氧代-1,6-二氢-2-吡啶基)羰基]氨基}氨基)氨基}丁基)氨基甲酰基]-2-氧代-1(2H)-吡啶甲酸

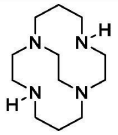
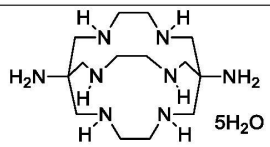
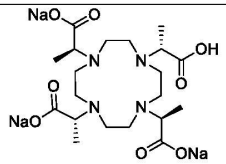
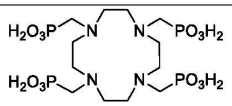
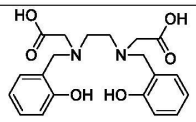
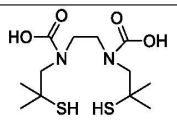
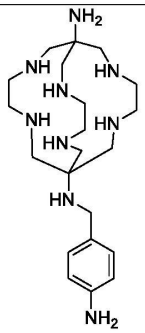
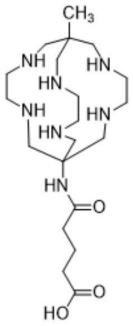
[0241]

NOGADA		2-[4,7-双(羧甲基)-1,4,7-三氮杂环壬烷-1-基]戊二酸
HYNIC		6-肼基烟酸
MAG3		巯替肽
OPTT		9-乙二酸-3,6,12,15,21-五氮杂三环[15,3,2,1]三烯-1(21),17,19-三烯-2,7,11,16-四酮
TBPD		3,6,9,15-四氮杂双环[9.3.1]十五烷-1(15),11,13-三烯-2,10-二酮
TAME-Hex	 R = CN, SCN, NO_2, SH, $BrCH_2CONH$	1,1,1-三(氨甲基)乙烷 （基本骨架）
DO3A		1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三乙酸三钠盐
TRAP		1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三[(2-羧乙基)亚甲基次膦酸]
DATA		2,2'-(6-((羧甲基) 氨基)-1,4-二氮烯-1,4-二基)二乙酸)

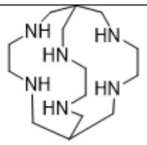
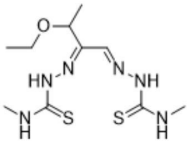
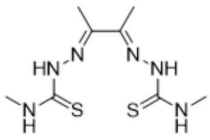
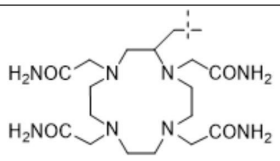
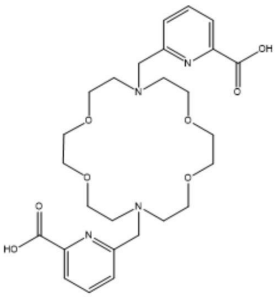
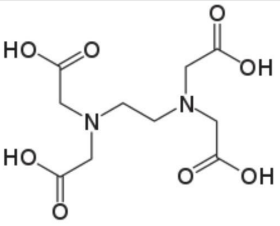
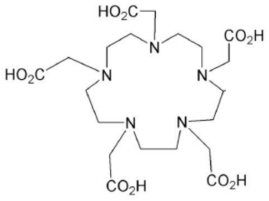
[0242]

NODAGA		2-[4,7-双(羧甲基)-1,4,7-三氮杂环壬烷-1-基]戊二酸
DOTAGA		1,4,7,10-四氮杂环十二烷,1-(戊二酸)-4,7,10-三乙酸
PhenA		2,2'-(6-(双(羧甲基)氨基)-6-((4-(2-羧乙基)苯氧基)甲基)-1,4-二氮杂庚烷-1,4-二基)二乙酸
PCB-TE1A1P		11-羧甲基-1,4,8,11-四氮杂双环[6.6.2]十六烷-4-甲基膦酸
H3THP		三(6-羟基吡啶-2-基甲基)胺
DOTA-4AMP		1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四(乙酰氨基-亚甲基膦酸)
NOTP		1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三(亚甲基膦酸)

[0243]

CB-Cyclam		1,4,8,11-四氮杂双环[6.6.2]十六烷
DiAmSar		1,8-二氨基-3,6,10,13,16,19-六氮杂双环[6,6,6]-二十烷
DOTMA		(1R,4R,7R,10R)-α,α',α",α"'-四甲基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸四钠盐
DOTP		1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四(亚甲基膦酸)
HBED		2,2'-{1,2-乙二酰基双[(2-羟基苄基)亚氨基]}二乙酸
6SS		N,N'-双(2,2-二甲基-2-巯基乙基)乙二胺-N,N'-二乙酸
SarAr		1-N-(4-氨基苄基)-3,6,10,13,16,19-六氮杂双环[6.6.6]-二十烷-1,8-二胺
MeCOSar		5-(8-甲基-3,6,10,13,16,19-六氮杂-双环[6.6.6]二十烷-1-基氨基)-5-氧代戊酸

[0244]

Sar（sarcophagine）		3,6,10,13,16,19-六氮杂双环(6,6,6)二十烷
H_2KTSM		3-乙氧基-2-氧代丁醛-双(N^4-甲基氨基硫脲)
H_2ATSM		二乙酰基-2-(N^4-甲基-3-缩氨基硫脲)-3-(N^4-氨基-3-缩氨基硫脲)
TCMC		1,4,7,10-四氮杂-1,4,7,10-四(2-氨基甲酰基甲基)环十二烷
MACROPA		6-[[16-[(6-羧基吡啶-2-基)甲基]-1,4,10,13-四氧杂-7,16-二氮杂环十八碳-7-基]甲基]-4-异硫氰酸吡啶-2-羧酸
EDTA		乙二胺四乙酸
PEPA		1,4,7,10,13-五氮杂环十五烷-N,N',N",N"',N"-三胺五乙酸

[0245] 在一些实施方式中，络合基团是DOTA、NOTA、DTPA、sarcophagine或DFO。

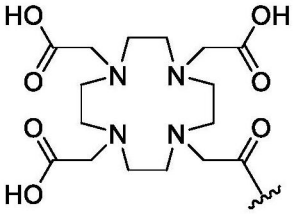
[0246] 在一些实施方式中，络合基团是macropa基团。例如，macropa基团特别适合于与Ac^{225}放射性核素一起使用。在一些实施方式中，络合基团是macropa基团，并且放射性核素是Ac^{225}。

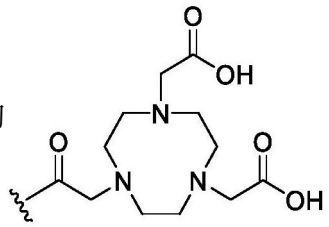
[0247] 在一些实施方式中，络合基团是EDTA或PEPA基团。

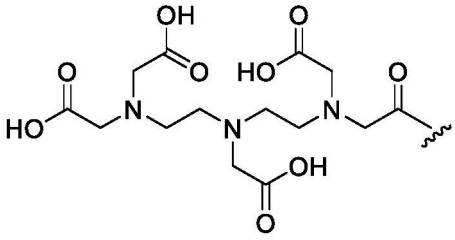
[0248] 第一末端基团例如经由最外层构建单元的氮原子附接至最外层构建单元，其中构建单元是赖氨酸残基或其类似物。在一些实施方式中，在络合基团包含适合于与最外层构

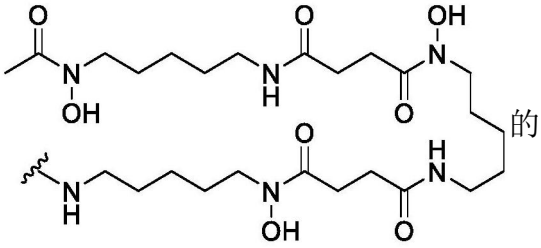
建单元直接反应的基团的情况下,络合基团可以与构建单元直接进行反应。在其他实施方式中,可以使用负载基团将络合基团负载到树枝状体上,即在第一端共价附接至络合基团并且在第二端具有适合于与最外层构建单元上存在的官能团反应的官能团(例如,在第一末端基团经由最外层构建单元的氮原子附接的情况下)的基团。例如,负载基团可以具有适合于与氨基基团反应的官能团。

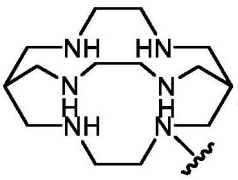
[0249] 为了在最外层构建单元与第一末端基团之间形成附接,可在合适的络合前体基团与具有可用于反应的官能团(例如胺基团)的树枝状中间体之间进行反应。在一些实施方式中,络合前体是含DOTA、含NOTA、含DTPA、含sarcophagine或含DFO的基团。

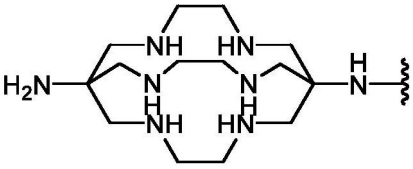
[0250] 在一些实施方式中,络合基团是具有结构  的含DOTA基团,并且其中所述含DOTA基团附接至所述缀合物。

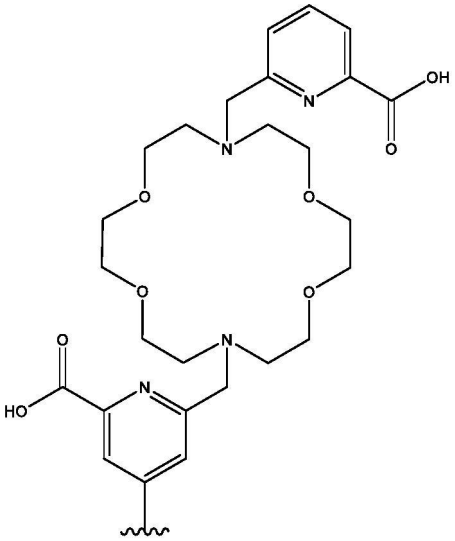
[0251] 在一些实施方式中,络合基团是具有结构  的含NOTA基团,并且其中所述含NOTA基团附接至所述缀合物。

[0252] 在一些实施方式中,络合基团是具有结构  的含DTPA基团,其中所述含DTPA基团附接至所述缀合物。

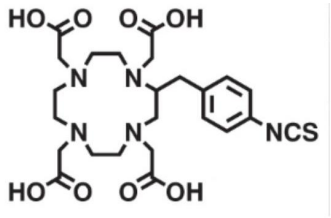
[0253] 在一些实施方式中,络合基团是具有结构  的含DFO基团,其中所述含DFO基团附接至所述缀合物。

[0254] 在一些实施方式中,络合基团是具有结构  的含sarcophagine基团,其中所述含sarcophagine基团附接至所述缀合物。

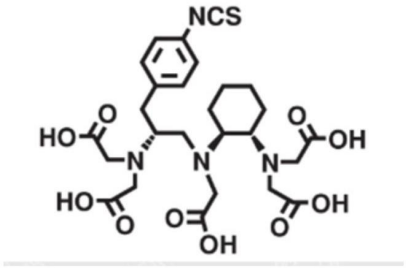
[0255] 在一些实施方式中，络合基团是具有结构  的含sarcophagine基团，其中所述含sarcophagine基团附接至所述缀合物。

[0256] 在一些实施方式中，络合基团是具有结构  的含macropa基团，其中所述含macropa基团附接至所述缀合物。

[0257] 合适的络合前体基团的具体实例包括以下：

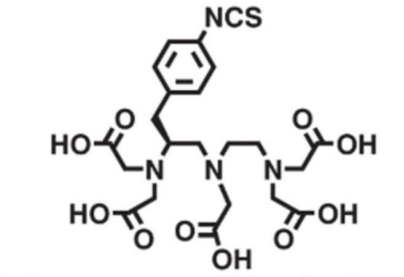


p-SCN-Bn-DOTA

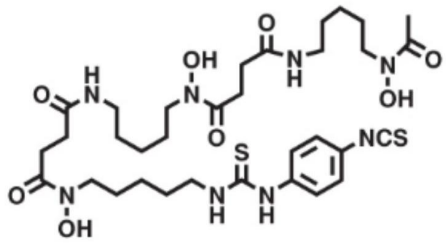


p-SCN-Bn-CHX-A''-DTPA

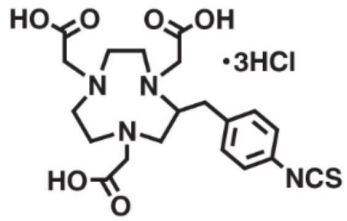
[0258]



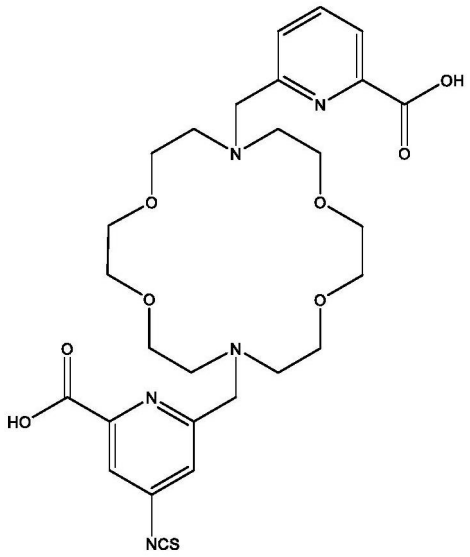
p-SCN-Bn-DTPA



p-SCN-Bn-DFO



p-SCN-Bn-NOTA

[0259] 

Macropa-NCS。

[0260] 上述这样的基团可以与最外层构建单元上存在的胺基团反应，以形成硫脲连接的第一末端基团。

[0261] 第二末端基团

[0262] 缀合物包含多个第二末端基团(T2)，每个第二末端基团包含药代动力学修饰部分，即可以修饰或调节缀合物的药代动力学曲线的部分。药代动力学修饰部分可以调节树枝状体的吸收、分布、代谢、排泄和/或毒性。药代动力学修饰部分(T2)可以改变树枝状体的溶解度曲线，增加或降低树枝状体在药学上可接受的载体中的溶解度。药代动力学修饰部分(T2)可以例如减少树枝状体的清除。

[0263] 在树枝状体包含具有药物活性剂的第三末端基团的情况下，药代动力学修饰部分(T2)可以通过减慢或增加活性剂通过化学(例如，水解)或酶降解途径从树枝状体释放的速率来影响药物活性剂的释放速率。药代动力学修饰部分(T2)可以帮助树枝状体将药物活性剂递送至特定组织(例如，肿瘤)。

[0264] 药代动力学修饰部分可以例如是低聚或聚合基团，例如其是生物相容的、水溶性的。在一些实施方式中，药代动力学修饰部分是具有分子量在300道尔顿至5000道尔顿范围内的水溶性低聚物或聚合物。

[0265] 在一些优选的实施方式中，药代动力学修饰部分是聚乙二醇(PEG)基团、或聚乙基恶唑啉(PEOX)基团、或聚-(2)-甲基-(2)-恶唑胺(POZ)、或聚肌氨酸(聚(n-甲基化甘氨酸))或聚(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺(pHPMA)基团。

[0266] 在一些实施方式中，第二末端基团包含PEG基团。PEG基团是聚乙二醇基团，即包含具有式-CH_2CH_2O-的重复单元的基团。用于产生本公开的树枝状体的PEG材料通常含有具有分子量的一些变化(即，±10％)的PEG的混合物，并且因此，在指定分子量的情况下，通常其是PEG组合物的平均分子量的近似值。例如，术语“$PEG_{\sim 2100}$”是指具有大约2100道尔顿的平均分子量(即，±大约10％)的聚乙二醇(PEG_{1890}至PEG_{2310})。术语“$PEG_{\sim 2300}$”是指具有大约2300道尔顿的平均分子量(即，±大约10％)的聚乙二醇(PEG_{2070}至PEG_{2530})。通常使用三种方法来计算MW平均值：数均分子量、重均分子量和z均分子量。如本文所用，短语“分子量”旨在

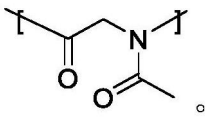
是指可以使用本领域熟知的技术测量的重均分子量，所述技术包括但不限于NMR、质谱、基质辅助激光解吸电离飞行时间(MALDI-TOF)、凝胶渗透色谱或其他液相色谱技术、光散射技术、超速离心和粘度测定法。

[0267] 在一些实施方式中，第二末端基团包含具有在约200道尔顿至5000道尔顿之间、或200道尔顿至4000道尔顿、或300道尔顿至3000道尔顿、或300道尔顿至2000道尔顿、或400道尔顿至1500道尔顿、或400道尔顿至1200道尔顿、或400道尔顿至1000道尔顿、或400道尔顿至800道尔顿、或400道尔顿至600道尔顿的平均分子量的PEG基团。在一些实施方式中，第二末端基团包含具有约400、约450、约500、约550、约600、约700、约800、约900、约1000、约1100、约1200、约1300、约1400或约1500道尔顿的平均分子量的PEG基团。在一些实施方式中，第二末端基团包含具有约470道尔顿的平均分子量的PEG基团。在一些实施方式中，第二末端基团包含具有在500道尔顿至3000道尔顿、或1500道尔顿至2500道尔顿范围内的平均分子量的PEG基团。在一些实施方式中，第二末端基团包含具有在220道尔顿至2500道尔顿、或570道尔顿至2500道尔顿、或220道尔顿至1100道尔顿、或570道尔顿至1100道尔顿、或1000道尔顿至5500道尔顿、或1000至2500道尔顿、或1000道尔顿至2300道尔顿范围内的平均分子量的PEG基团。在一些实施方式中，第二末端基团包含具有在1900道尔顿至2300道尔顿范围内的平均分子量的PEG基团。在一些实施方式中，第二末端基团包含具有在2100道尔顿至2500道尔顿范围内的平均分子量的PEG基团。在一些实施方式中，第二末端基团包含具有在2400道尔顿至2800道尔顿范围内的平均分子量的PEG基团。在一些实施方式中，第二末端基团包含具有约1900、约2000、约2100、约2200、约2300、约2400、约2500、约2600、约2700或约2800道尔顿的平均分子量的PEG基团。

[0268] 在一些实施方式中，PEG基团具有在约1.00至约1.50之间、在约1.00至约1.25之间或在约1.00至约1.10之间的多分散指数(PDI)。在一些实施方式中，PEG基团具有约1.05的多分散指数(PDI)。术语“多分散指数”是指分子质量在给定聚合物样品中的分布量度。多分散指数(PDI)等于重均分子量(M_w)除以数均分子量(M_n)，并且指示单独分子质量在一批聚合物中的分布。多分散指数(PDI)具有等于或大于1的值，但当聚合物接近均匀变化的长度和平均分子量时，多分散指数(PDI)将更接近1。

[0269] 在第二末端基团包含PEG基团的情况下，PEG基团可以是直链或支链的。如果需要，可以使用封端的PEG基团。在一些实施方式中，PEG基团是甲氧基封端的PEG。

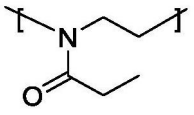
[0270] 在一些实施方式中，第二末端基团包含聚肌氨酸基团，即包含具有下式的重复单元的基团：

[0271] 

。

[0272] 在一些实施方式中，第二末端基团包含具有至少750道尔顿、至少1000道尔顿、或至少1500道尔顿的平均分子量的聚肌氨酸基团。在一些实施方式中，第二末端基团包含具有在750道尔顿至2500道尔顿、或1000道尔顿至2500道尔顿范围内的平均分子量的聚肌氨酸基团。

[0273] 在一些实施方式中，第二末端基团包含PEOX基团。PEOX基团是聚乙基噁唑啉基团，即包含具有下式的重复单元的基团：

[0274]  。

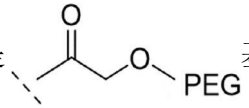
[0275] PEOX基团如此命名是因为它们可以通过乙基噁唑啉的聚合产生。用于产生本公开的树枝状体的PEOX材料通常含有具有分子量的一些变化(即,±10%)的PEOX的混合物,并且因此,在指定分子量的情况下,通常其是PEOX组合物的平均分子量的近似值。在一些实施方式中,第二末端基团包含具有至少750道尔顿、至少1000道尔顿、或至少1500道尔顿的平均分子量的PEOX基团。在一些实施方式中,第二末端基团包含具有在750道尔顿至2500道尔顿、或1000道尔顿至2000道尔顿范围内的平均分子量的PEOX基团。如果需要,可以使用封端的PEOX基团。在一些实施方式中,PEOX基团是甲氧基封端的PEOX。

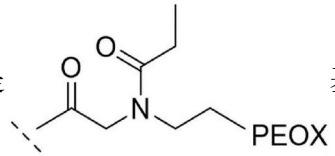
[0276] 在一些实施方式中,第二末端基团包含聚-(2)甲基-(2)-恶唑胺(POZ)基团。

[0277] 在一些实施方式中,第二末端基团包含聚(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺(pHPMA)基团。

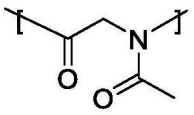
[0278] 第二末端基团可以经由任何合适手段附接至最外层构建单元。在一些实施方式中,在第二末端基团包含PEG基团、PEOX基团、POZ基团或pHPMA基团的情况下,使用连接基团将PEG基团、PEOX基团、POZ基团或pHPMA基团附接至外部构建单元。

[0279] 通常经由使用第二末端基团前体来附接第二末端基团,所述前体含有与胺基团反应的反应性基团,诸如反应性酰基基团(其可以形成酰胺键)、或醛(其可以在还原胺化条件下形成胺基团)。

[0280] 在一些实施方式中,第二末端基团各自包含PEG基团,所述PEG基团经由PEG基团中存在的碳原子与PEG连接基团中存在的氧原子之间形成的醚键而共价附接至PEG连接基团(L1),并且每个第二末端基团经由构建单元中存在的氮原子与PEG连接基团中存在的酰基基团的碳原子之间形成的酰胺键而共价附接至构建单元。在一些实施方式中,第二末端基团各自是  基团,并且其中PEG基团是具有在约500道尔顿至3000道尔顿、或2000道尔顿至2700道尔顿范围内的平均分子量的甲氧基封端的PEG。

[0281] 在一些实施方式中,第二末端基团各自包含PEOX基团,所述PEOX基团经由PEOX基团中存在的氮原子与PEOX连接基团中存在的碳原子之间形成的键而共价附接至PEOX连接基团(L1'),并且每个第二末端基团经由构建单元中存在的氮原子与PEOX连接基团中存在的酰基基团的碳原子之间形成的酰胺键而共价附接至构建单元。在一些实施方式中,第二末端基团各自是  基团。

[0282] 在一些实施方式中,第二末端基团各自是例如具有下式的聚肌氨酸基团:

[0283] 

[0284] 并且经由构建单元中存在的氮原子与聚肌氨酸基团中存在的酰基基团的碳原子之间形成的酰胺键而附接至构建单元。

[0285] 靶向剂

[0286] 如本文所述的树枝状体-靶向剂缀合物包含至少一种靶向剂，用于将缀合物定位和集中在体内感兴趣的位点或目标处。靶向剂包括抗体、抗体片段、肽序列和能够选择性地结合至感兴趣目标的其他基序。

[0287] 相互作用可以通过任何类型的键合或缔合(包括例如共价、离子键合、氢键合和范德华力)发生。

[0288] 如本文所用，“肽”是指由肽键连接的两个或更多个氨基酸组成的分子。

[0289] 如本文所述的靶向剂可用于将所公开的树枝状体-靶向剂缀合物靶向于诸如肿瘤、癌细胞和/或肿瘤微环境的靶标。

[0290] 例如，靶向剂可以包含抗原结合位点或抗原结合结构域，其特异性地结合靶分子(本文中也称为“靶标”或“抗原”)和/或对靶分子具有亲和力。

[0291] 在实施方式中，靶标选自以下中的一种或多种：人表皮生长因子受体2(HER2)、表皮生长因子受体(EGFR)、血管上皮生长因子(VEGF)受体、G蛋白偶联受体161(GPR161)、成纤维细胞生长因子受体(例如FGFR2)、肝细胞生长因子(HGF)、肝细胞生长因子受体(HGFR)、酪氨酸-蛋白激酶met(C-met)、非典型趋化因子受体3(CXCR7)、C-X-C基序趋化因子受体4(CXCR4)、癌胚抗原、粘蛋白1(MUC-1)、粘蛋白-16(MUC16)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、滋养层糖蛋白(5T4)、白细胞介素-2(IL-2)、糖蛋白(gpNMB)、粘结蛋白聚糖1(CD138)、前列腺-特异性膜抗原(PSMA)、癌胚抗原相关细胞粘附分子5(CEACAM5)、溶质载体家族44成员4(CSLC44A4)、粒细胞集落刺激因子受体(G-CSFR)、外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶3(ENPP3)、间皮素、粘连蛋白细胞粘附分子4(粘连蛋白-4)、成纤维细胞活化蛋白(FAP)、叶酸受体、透明质酸受体、整合素受体(αvβ3)、凝集素结合糖蛋白、TfR、VEGFR-1和VEGFR-2、细胞因子、CD56、CD19、CD16、CD74、CD37、CD70、CD52、CD19、CD22、CD20、CD30、CD3和CD79b。

[0292] 在一个实施方式中，靶标是HER2，也称为ERBB2；基因ID号2064(NCBI)。

[0293] 在一个实施方式中，靶标是表皮生长因子受体(EGFR)，也称为ERBB1或HER1；基因ID号1956(NCBI)。

[0294] 在一个实施方式中，靶标是前列腺特异性膜抗原(PSMA)；基因ID号2346(NCBI)。

[0295] 在一个实施方式中，靶标是成纤维细胞活化蛋白(FAP)。丝氨酸蛋白酶成纤维细胞活化蛋白在癌症中的过表达促进肿瘤的选择性靶向(Loktev等人，J Nucl Med，2019，60(10)，p1421-1429)。

[0296] 在一个实施方式中，靶向剂包含至多约200kDa、或至多约150kDa、或至多约110kDa、或至多约80kDa、或至多约55kDa或至多约16kDa的分子量。在一个实施方式中，靶向剂包含至多约200kDa的分子量。在一个实施方式中，靶向剂包含至多约150kDa的分子量。在一个实施方式中，靶向剂包含至多约110kDa的分子量。在一个实施方式中，靶向剂包含至多约80kDa的分子量。在一个实施方式中，靶向剂包含至多约55kDa的分子量。在一个实施方式中，靶向剂包含至多约16kDa的分子量。在一个实施方式中，靶向剂具有约3kDa至约80kDa的分子量。在一个实施方式中，靶向剂具有约3kDa至约60kDa的分子量。在一个实施方式中，靶向剂具有约3kDa至约50kDa的分子量。在一个实施方式中，靶向剂具有约3kDa至约40kDa的分子量。在一个实施方式中，靶向剂具有约3kDa至约30kDa的分子量。在一个实施方式中，靶向剂具有约3kDa至约20kDa的分子量。在一个实施方式中，靶向剂具有约3kDa至约15kDa的

分子量。在一个实施方式中，靶向剂具有约3kDa至约13kDa的分子量。在一个实施方式中，靶向剂具有约5kDa至约15kDa的分子量。在一个实施方式中，靶向剂具有约5kDa至约12kDa的分子量。在一个实施方式中，靶向剂具有约5kDa至约10kDa的分子量。

[0297] 如本文所述的“kDa”或“千道尔顿”是指由1000道尔顿组成的分子质量单位。

[0298] 在一个实施方式中，靶向剂选自：抗体、重链抗体、ScFV-Fc、Fab、Fab2、Fv、scFv或单结构域抗体。在一个实施方式中，靶向剂选自：抗体或抗体片段。

[0299] 在一个实施方式中，靶向剂是抗体。出于本公开的目的，术语“抗体”包括四链蛋白质，其包含例如两条轻链和两条重链，包括能够通过Fv特异性结合一种或几种密切相关抗原的重组或修饰抗体(例如，嵌合抗体、人源化抗体、灵长类化抗体、去免疫化抗体和半抗体、双特异性抗体)。抗体通常包含恒定结构域，其可以排列成恒定区或恒定片段或可结晶片段(Fc)。抗体的示例性形式包含作为其基本单元的四链结构。全长抗体包含共价连接的两个重链(约50-70kDa)和两个轻链(各自约23kDa)。轻链通常包含可变区和恒定结构域，并且在哺乳动物中是κ轻链或λ轻链。重链通常包含可变区和由铰链区连接至另外一个或多个恒定结构域的一个或两个恒定结构域。哺乳动物的重链具有以下类型之一：α、δ、ε、γ或μ。每条轻链也与其中一条重链共价连接。例如，这两条重链以及这些重链和轻链通过链间二硫键和非共价相互作用保持在一起。链间二硫键的数量在不同类型的抗体中可能有所不同。每条链具有N末端可变区(V_H或V_L，其中每个的长度为约110个氨基酸)和在C末端的一个或多个恒定结构域。轻链的恒定结构域(CL，其长度为约110个氨基酸)与重链的第一恒定结构域(CH，其长度为-330-440个氨基酸)对齐并且二硫键合至重链的第一恒定结构域。轻链可变区与重链可变区对齐。抗体重链可以包含2个或更多个另外的CH结构域(诸如CH2、CH3等)，并且可以包含CH1和CH2恒定结构域之间的铰链区。抗体可以具有任何类型(例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。在一个实例中，抗体是人抗体或其去免疫化或种系化形式、或其亲和力成熟的形式。术语“全长抗体”或“整个抗体”可互换用于指呈基本上完整形式的抗体，与抗体的抗原结合片段相对。具体地，整个抗体包括具有重链和轻链(包括恒定区)的抗体。恒定区可以是野生型序列恒定区(例如，人野生型序列恒定区)或其氨基酸序列变体。

[0300] 在一个实施方式中，靶向剂是融合蛋白。如本文所用，“融合蛋白”是通过针对单独蛋白质或其部分进行最初编码的两个或更多个核酸序列的结合(例如，蛋白受体的一部分与抗体的一部分(依那西普)的融合)而产生的蛋白质。

[0301] 在一个实施方式中，靶向剂是抗体片段。如本文所用，术语“抗体片段”应被视为意指能够特异性结合抗原的抗体的一部分或片段，包括例如本文所定义的F_V、V_H、V_L或可变区。该术语应被理解为涵盖直接来源于抗体的片段以及使用重组手段产生的蛋白质。在一个实施方式中，抗体片段选自Fab、Fab2、Fv、scFv、重链抗体、结构域抗体、重链抗体、双抗体或三抗体。

[0302] 如本文所用，术语“Fv”应被视为意指任何蛋白质，无论其由多个多肽或单一多肽(scFV)组成，其中V_L和V_H缔合并且形成具有抗原结合结构域(即，能够特异性结合抗原)的复合物。形成抗原结合结构域的V_H和V_L可以在单一多肽链中或在不同的多肽链中。在一个实施方式中，本公开的Fv(以及本公开的任何蛋白质)可以具有多个抗原结合位点，其可以或可以不结合相同的抗原。该术语应被理解为涵盖直接来源于抗体的片段以及使用重组手段产

生的蛋白质。在一些实例中，V_H未连接至重链恒定结构域CH1，并且/或者V_L未连接至轻链恒定结构域(CL)，例如结构域抗体。示例性含Fv多肽或蛋白质包括Fab片段、Fab'片段、F(ab')片段、scFv、双抗体、三抗体，“Fab片段”由免疫球蛋白的单价抗原结合片段组成，并且可以通过用木瓜蛋白酶消化整个抗体以产生由完整轻链和一部分重链组成的片段来产生，或者可以使用重组手段来产生。Fab片段通常包含V_H和C_H1以及V_L和C_L或由其组成。抗体的“Fab'片段”可以通过以下方式来获得：用胃蛋白酶处理整个抗体，之后进行还原，以产生由完整轻链和一部分重链(包含V_H和单一恒定结构域)组成的分子。每个以这种方式处理的抗体获得两个Fab'片段。Fab'片段还可以通过重组手段产生。“单链Fv”或“scFv”是含有抗体的可变区片段(Fv)的重组分子，其中轻链的可变区和重链的可变区通过合适的柔性多肽接头共价连接。

[0303] 在一些实施方式中，抗体片段选自：重链抗体、Fab、Fab2、Fv、scFv或单结构域抗体。

[0304] 如本文所用，“单结构域抗体(sdAb)”(也称为“结构域抗体(dAb)”或“纳米抗体”)包含重链V_H或轻链V_L的单一可变区。在一个实施方式中，可变区是骆驼科动物衍生的。在一个实施方式中，可变区衍生自鲨鱼。在一个实施方式中，V_H是骆驼科动物衍生的V_H。

[0305] 在一些实施方式中，靶向剂是单结构域抗体。在一些实施方式中，靶向剂是VH单结构域抗体。在一些实施方式中，靶向剂是VL单结构域抗体。

[0306] 在一个实施方式中，单结构域抗体包含如描述于例如EP2215125A1、US20110028695、Hussack等人(2018)、Arezumand等人(2017)、Chanier等人(2019)中的单结构域氨基酸序列。在一个实施方式中，单结构域抗体包含如描述于US20110028695中的单结构域氨基酸序列。

[0307] 在一个实施方式中，单结构域抗体包含如实施例7中所公开的单结构域氨基酸序列。在一个实施方式中，单结构域抗体是2D3，其包含如US20110028695的SEQ ID NO:1986中所示的氨基酸序列。

[0308] 在一个实施方式中，单结构域抗体包含氨基酸序列EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQVTVSS(SEQ ID NO:1)。在一个实施方式中，所述序列包括用于缀合的附加半胱氨酸残基。

[0309] 在一个实施方式中，单结构域抗体包含氨基酸序列EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQVTVSS#ENLYFQGHHHHHH，其中#表示非天然氨基酸，优选地4-叠氮苯基丙氨酸残基(SEQ ID NO:2)。

[0310] 在一个实施方式中，单结构域抗体包含氨基酸序列EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQVTVSS#，其中#表示非天然氨基酸，优选地4-叠氮苯基丙氨酸残基(SEQ ID NO:3)。

[0311] 在一个实施方式中，单结构域抗体包含氨基酸序列GGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYENLYFQGEVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQVTVSS(SEQ ID NO:4)。

[0312] 在一个实施方式中,单结构域抗体包含氨基酸序GGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYENLYFQGEVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQVTVSS#,其中#表示非天然氨基酸,优选地4-叠氮苯基丙氨酸残基(SEQ ID NO:5)。

[0313] 在一个实施方式中,单结构域抗体包含氨基酸序EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQVTVSS[X]$_n$C,其中X是任何氨基酸并且n=0至20。在一个实施方式中,n=0、1、2、3、4或5。在一个实施方式中,n=4(SEQ ID NO:6)。

[0314] 在一个实施方式中,单结构域抗体包含氨基酸序列C[X]$_n$EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQVTVSS,其中X是任何氨基酸并且n=0至20。在一个实施方式中,n=0、1、2、3、4或5(SEQ ID NO:7)。

[0315] 在一个实施方式中,单结构域抗体包含氨基酸序EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQVTVSS[X]$_n$C[X]$_m$,其中X是任何氨基酸,m=0至20并且n=0至20。在一个实施方式中,n=0、1、2、3、4或5(SEQ ID NO:8)。

[0316] 在一个实施方式中,单结构域抗体包含氨基酸序[X]$_n$C[X]$_m$EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQVTVSS,其中X是任何氨基酸,m=0至20并且n=0至20。在一个实施方式中,n=0、1、2、3、4或5(SEQ ID NO:9)。

[0317] 在一个实施方式中,单结构域抗体包含氨基酸序列EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQVTVSSLGTLCTPSRENLYFQGHHHHHH(SEQ ID NO:10)。

[0318] 在一些实施方式中,靶向剂是单结构域抗体并且具有以下分子量:约4kDa至约80kDa、或约5kDa至约80kDa、或约5kDa至约60kDa、或约5kDa至约50kDa、或约5kDa至约40kDa、或约5kDa至约30kDa、或约5kDa至约20kDa、或约5kDa至约16kDa、或约5kDa至约15kDa、或约5kDa至约12kDa、或约10kDa至约16kDa或约15kDa至20kDa。

[0319] 在一些实施方式中,靶向剂包含少于约500、少于约400、少于约300、少于约200、少于约150、少于约140、少于约130、少于约120、少于约110、少于约100个氨基酸残基。在一些实施方式中,靶向剂包含多于约50、多于约75、多于约100或多于约120个氨基酸残基。在一些实施方式中,靶向剂包含少于120个氨基酸残基。在一些实施方式中,靶向剂包含约100至约120个氨基酸残基。

[0320] 在一些实施方式中,靶向剂是抗体的模拟物。如本文所用,术语“模拟物(mimetic/mimetics)”是指像抗体或抗体片段一样可以结合抗原,但在结构上不与抗体相关的化合物。该术语应理解为不涵盖如本文所述的抗体或抗体片段。该术语应理解为涵盖合成模拟物(体外产生)和使用重组手段产生的模拟物。该术语应被理解为涵盖蛋白质模拟物。

[0321] 在一个实施方式中,模拟物选自:亲和体(affibody)、适配体、affilin、affimer、affitin、anticalin、avimer、α体、单体、DARPin、适配体、Fyomer、III型纤连蛋白衍生蛋白支架、植物胱抑素衍生蛋白支架和互补位模拟肽。像抗体一样,模拟物可以用作靶向部分。

[0322] 在一个实施方式中，模拟物衍生自以下蛋白支架之一：蛋白A的z结构域、γ-B晶状体蛋白、泛素、胱抑素、sac7d、三重螺旋、卷曲螺旋、脂质运载蛋白、环肽、膜受体的A结构域、锚蛋白重复基序、Fym的sh3结构域、蛋白酶抑制剂的Kunits结构域、纤连蛋白的III型结构域以及来自产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens)的IgG样热稳定碳水化合物结合模块家族32(CBM32)。

[0323] 在一个实施方式中，模拟物是约3kDa至约20kDa、或约4kDa至约18kDa、或约6kDa至约16kDa、或约6kDa至约14kDa、或约6kDa至约12kDa、或约6kDa至约10kDa、或约6kDa至约8kDa。在一个实施方式中，模拟物是约3kDa至约20kDa。在一个实施方式中，模拟物是约3kDa至约20kDa。在一个实施方式中，模拟物是约4kDa至约18kDa。在一个实施方式中，模拟物是约6kDa至约16kDa。在一个实施方式中，模拟物是约6kDa至约14kDa。在一个实施方式中，模拟物是约6kDa至约12kDa。在一个实施方式中，模拟物是约6kDa至约10kDa。在一个实施方式中，模拟物是约6kDa至约8kDa。

[0324] 在一些实施方式中，靶向剂是亲和体。如本文所用，术语“亲和体”是指基于称为“Z结构域”的长度为约58个氨基酸的三α螺旋束结构域的任何一类非常小(大约6kDa)的多肽抗体模拟物。通常，用于亲和体的支架基于蛋白A的B-结构域的修饰形式。亲和体的特征在于非常高的稳定性(耐受至多90℃的温度)并且靶标亲和力在纳摩尔至皮摩尔的范围内。参见例如Nord等人(1995)，Protein Eng.，8:601-608。已知亲和体的实例包括例如针对HER2的亲和体(例如，抗HER2亲和体®，AFFIBODY AB，Bromma，Sweden；美国专利号7,993,650)。

[0325] 在一些实施方式中，靶向剂是亲和体并且具有在约3kDa至约10kDa、或约3kDa至约8kDa、或约4kDa至约8kDa、或约4kDa至约7kDa、或约5kDa至约7kDa、或约6kDa范围内的分子量。

[0326] 在一些实施方式中，靶向剂是亲和体并且具有少于80个氨基酸残基、或少于70个氨基酸残基、或少于65个氨基酸残基、或少于60个氨基酸残基。在一些实施方式中，靶向剂由40至80个氨基酸残基、或50至70个氨基酸残基、或55至65个氨基酸残基、或56至60个氨基酸残基、或约58个氨基酸残基组成。

[0327] 出于本公开的目的，术语“抗体”包含四链蛋白质，其包含例如两条轻链和两条重链，包括能够通过Fv特异性结合一种或几种密切相关抗原的重组或修饰抗体(例如，嵌合抗体、人源化抗体、灵长类化抗体、去免疫化抗体和半抗体、双特异性抗体)。抗体通常包含恒定结构域，其可以排列成恒定区或恒定片段或可结晶片段(Fc)。抗体的示例性形式包含作为其基本单元的四链结构。全长抗体包含共价连接的两个重链(约50-70kDa)和两个轻链(各自约23kDa)。轻链通常包含可变区和恒定结构域，并且在哺乳动物中是κ轻链或λ轻链。重链通常包含可变区和由铰链区连接至另外一个或多个恒定结构域的一个或两个恒定结构域。哺乳动物的重链具有以下类型之一：α、δ、ε、γ或μ。每条轻链也与其中一条重链共价连接。例如，这两条重链以及这些重链和轻链通过链间二硫键和非共价相互作用保持在一起。链间二硫键的数量在不同类型的抗体中可能有所不同。每条链具有N末端可变区(VH或VL，其中每个的长度为约110个氨基酸)和在C末端的一个或多个恒定结构域。轻链的恒定结构域(CL，其长度为约110个氨基酸)与重链的第一恒定结构域(CH，其长度为-330-440个氨基酸)对齐并且二硫键合至重链的第一恒定结构域。轻链可变区与重链可变区对齐。抗体重链可以包含两个或更多个另外的CH结构域(诸如CH2、CH3等)，并且可以包含CH1和CH2恒定

结构域之间的铰链区。抗体可以具有任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。在一个实例中,抗体是人抗体或其去免疫化或种系化形式、或其亲和力成熟的形式。

[0328] 术语“全长抗体”或“整个抗体”可互换用于指呈基本上完整形式的抗体,与抗体的抗原结合片段相对。具体地,整个抗体包括具有重链和轻链(包括恒定区)的抗体。恒定区可以是野生型序列恒定区(例如,人野生型序列恒定区)或其氨基酸序列变体。

[0329] 如本文所用,术语“可变区”是指如本文所定义的抗体的轻链和/或重链或者仅重链抗体(例如,骆驼科动物抗体或软骨鱼免疫球蛋白新抗原受体(IgNAR))的部分,所述部分能够特异性结合抗原并且包括互补决定区(CDR)(即CDR1、CDR2和CDR3)和框架区“FR”的氨基酸序列。FR是不同于CDR残基的那些可变区残基。例如,可变区包含三个或四个FR(例如,FR1、FR2、FR3和任选的FR4)以及三个CDR。V_H是指重链的可变区。V_L是指轻链的可变区。

[0330] 如本文所用,术语“互补决定区”(同义词CDR,即CDR1、CDR2和CDR3)是指抗体可变区的如下氨基酸残基,其存在是特异性抗原结合的主要贡献因素。每个可变区通常具有三个CDR区,标识为CDR1、CDR2和CDR3。每个互补决定区可以包含来自如由Kabat等人(1987和/或1991)定义的“互补决定区”的氨基酸残基。例如,在重链可变区中,CDRH1在残基31-35之间,CDRH2在残基50-65之间并且CDRH3在残基95-102之间。在轻链中,CDRL1在残基24-34之间,CDRL2在残基50-56之间并且CDRL3在残基89-97之间。这些CDR也可以包含多个插入物,例如,如Kabat(1987和/或1991)中所述。本公开不限于如由Kabat编号系统定义的FR和CDR,而是包括所有编号系统,包括Chothia和Lesk(1987)、Chothia等人(1989)和/或Al-Lazikani等人(1997)的经典编号系统;Honnegher和Plükthun(2001)的编号系统;Giudicelli等人(1997)中讨论的IMGT系统;或增强型Chothia编号方案(http://www.bioinfo.org.uk/mdex.html)。在一个实例中,CDR和/或FR根据Kabat编号系统定义,例如,如图9A-9D中以粗体文本描绘的。任选地,根据Kabat编号系统的重链CDR2不包含在本文列出的五个C末端氨基酸,或者那些氨基酸中的任何一种或多种被另一天然存在的氨基酸取代。在另外或替换性选择中,轻链CDR1不包含在本文列出的四个N末端氨基酸,或者那些氨基酸中的任何一种或多种被另一天然存在的氨基酸取代。就这一点而言,Padlan等人(1995)确立了重链CDR2的五个C末端氨基酸和/或轻链CDR1的四个N末端氨基酸通常不参与抗原结合。在一个实例中,CDR和/或FR根据Chothia编号系统定义,例如,如图9A-9D中以下划线文本描绘的。

[0331] 如本文所用,术语“Kabat编号系统”是指如Kabat等人(1987和/或1991)中陈述的用于编号抗体可变区和鉴定CDR(高变区)的方案。

[0332] 如本文所用,术语“Chothia编号系统”是指如Chothia和Lesk(1987)或Al-Lazikani等人(1997)中陈述的用于编号抗体可变区和鉴定CDR(结构环)的方案。

[0333] 如本文所用,术语“抗原结合结构域”应被视为意指能够特异性结合抗原(例如HER2)的靶向剂的区域。

[0334] 如本文所用,关于蛋白质或其抗原结合结构域与抗原的相互作用的术语“结合(binds/binding)”意指相互作用依赖于抗原上特定结构(例如,抗原性决定子或表位)的存在。例如,抗体识别并结合特定蛋白质结构而非广泛结合蛋白质。如果抗体结合表位“A”,则在含有经标记的“A”和抗体的反应中,含有表位“A”的分子(或游离的、未标记的“A”)的存在

将会降低与抗体结合的经标记的“A”的量。

[0335] 如本文所用，术语“特异性结合”、“特异性地结合”或类似短语应被视为意指与用替代性抗原或细胞的情况相比，本公开的蛋白质以更久的持续时间和/或以更大的亲和力与特定抗原(诸如HER2)或表达所述特定抗原的细胞更频繁更快速地反应或缔合。例如，与结合其他抗原的情况相比，特异性结合抗原的蛋白质以更大的亲和力(例如，大20倍、或40倍、或60倍、或80倍、或100倍、或150倍、或200倍的亲和力)、亲合力，更容易地和/或以更久的持续时间结合该抗原。通过读取该定义还应理解，例如，特异性结合第一抗原的蛋白质可以或可以不特异性结合第二抗原。因此，“特异性结合”不一定要求排他性地结合或不可检测地结合另一种抗原，这由术语“选择性结合”释义。

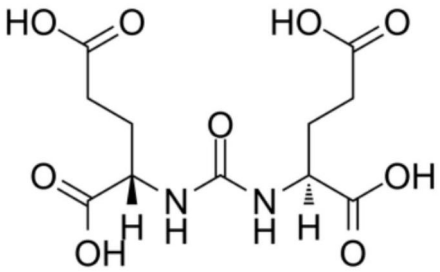
[0336] 在一些实施方式中，靶向剂包含与如本文所定义的靶向剂氨基酸序列相对应的氨基酸序列或由其组成。

[0337] 在一些实施方式中，靶向剂是或包含长度为例如至多20个氨基酸的寡聚肽序列。在一些实施方式中，靶向剂是5至20个氨基酸、7至18个氨基酸、或9至15个氨基酸的肽序列。在一些实施方式中，靶向剂是7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、或18个氨基酸的肽序列。

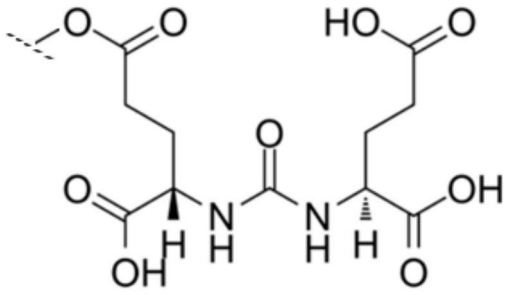
[0338] 在一些实施方式中，靶向剂具有小于2000Da、小于1000Da、或小于500Da的分子量。在一些实施方式中，靶向剂是小分子，其可以认为是具有小于约1000Da或小于约750Da、或小于约500Da的分子量的小分子。

[0339] 在一个实例中，靶向剂是结合至PSMA的小分子。在一个实施方式中，结合至PSMA的小分子可以是肽。这样的连接肽是本领域已知的。在一个实例中，靶向剂是结合至成纤维细胞活化蛋白(FAP)的小分子。

[0340] 在一些实施方式中，靶向剂是特异性结合至前列腺特异性膜抗原(PSMA)的靶向剂。例如，靶向剂可以是或可以含有DUPA基团或其类似物。DUPA具有以下结构：

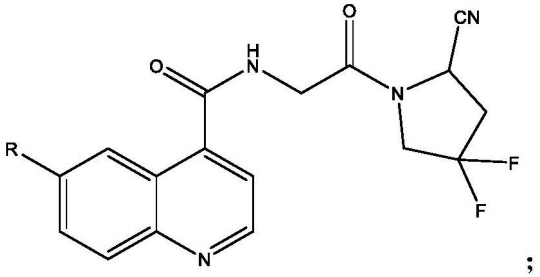
[0341] 

[0342] 在一些实施方式中，靶向剂是或含有经由羧基基团缀合的DUPA基团，例如：

[0343] 

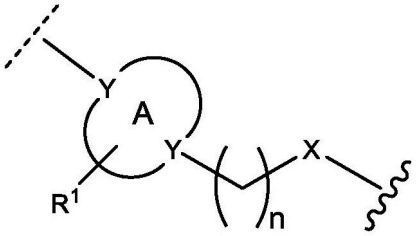
。

[0344] 在一些实施方式中，靶向剂是特异性结合至成纤维细胞活化蛋白(FAP)的靶向剂。在一些实施方式中，靶向剂可以是或可以含有抑制成纤维细胞活化蛋白(FAP)的基团。例如，靶向剂可以是或可以含有FAP结合基团或其类似物，其具有以下结构：

[0345] 

;

[0346] 其中R是式I的取代基：

[0347] 

[0348] 式I；

[0349] 其中

[0350] X选自O、NH、N(CH_3)、S、和CH_2；

[0351] Y选自N和C；

[0352] n是选自由0、1、2、3、4、5和6组成的组中的整数；

[0353] A是5至10元单环或双环杂环基团；

[0354] R^1选自由以下组成的组：任选地被一个或多个5至10元环状基团取代的C_1-C_6烷基基团；并且

[0355]  表示与树枝状体的缀合点。

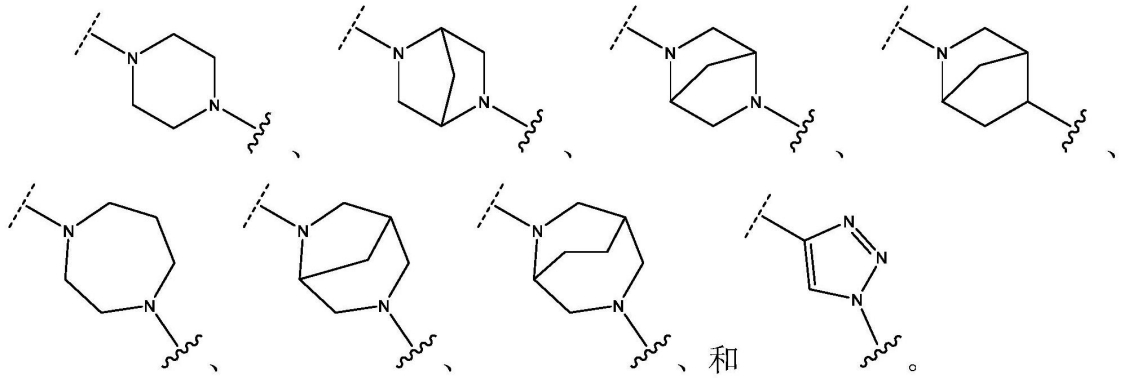
[0356] 在一些实施方式中，R是式I的取代基，其中X是O。在一些实施方式中，R是式I的取代基，其中X是NH。在一些实施方式中，R是式I的取代基，其中X是N(CH_3)。在一些实施方式中，R是式I的取代基，其中X是S。在一些实施方式中，R是式I的取代基，其中X是CH_2。

[0357] 在一些实施方式中，R是式I的取代基，其中Y是N。在一些实施方式中，R是式I的取代基，其中Y是C。在该实施方式中，在Y是C的情况下，应当理解，A可以是芳香族或饱和的5至10元单环或双环杂环基团。在一些实施方式中，R是式I的取代基，其中Y是CH。在该实施方式中，在Y是C的情况下，应当理解，A是部分或完全饱和的5至10元单环或双环杂环基团。

[0358] 在一些实施方式中，R是式I的取代基，其中n是0。在该实施方式中，当n是0时，应当理解，X直接键合至Y。在一些实施方式中，R是式I的取代基，其中n是1。在一些实施方式中，R是式I的取代基，其中n是2。在一些实施方式中，R是式I的取代基，其中n是3。在一些实施方式中，R是式I的取代基，其中n是4。在一些实施方式中，R是式I的取代基，其中n是5。在一些实施方式中，R是式I的取代基，其中n是6。

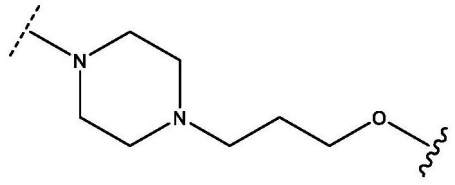
[0359] 在一些实施方式中，R是式I的取代基，其中A是5至10元单环或双环杂环基团。在一个实例中，A是5元单环杂环基团。在一个实例中，A是6元单环杂环基团。在一个实例中，A是7元单环杂环基团。在一个实例中，A是7元双环杂环基团。在一个实例中，A是8元双环杂环基团。在一个实例中，A是9元双环杂环基团。在一个实例中，A是10元双环杂环基团。

[0360] A基团的实例包括但不限于：

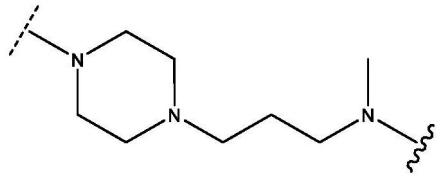
[0361] 

[0362] 在一些实施方式中，R是式I的取代基，其中R^1是C_1-C_6烷基基团。在一个实例中，R^1是C_1-烷基基团(即，CH_3)。在一些实施方式中，R是式I的取代基，其中R^1是任选地被一个或多个5至10元环状基团取代的C_1-C_6烷基基团。在一些实施方式中，R^1是被6元环状基团取代的C_1-烷基基团。在一个实例中，R^1是CH_2-苯基。

[0363] 在一个实例中，R是式I的取代基，为：

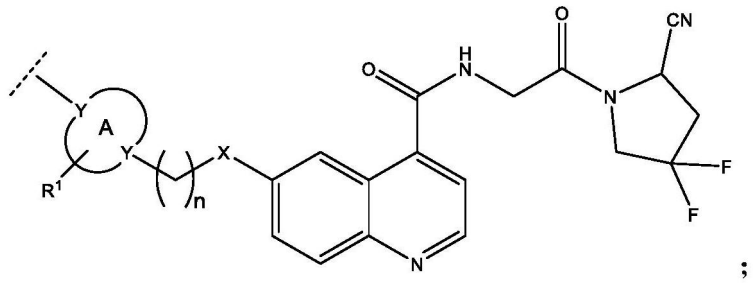
[0364] 

[0365] 在一个实例中，R是式I的取代基，为：

[0366] 

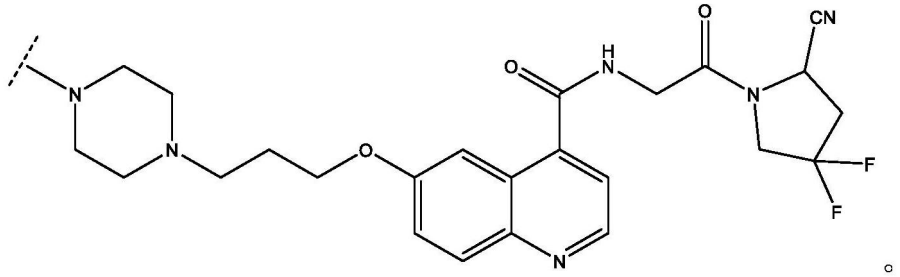
[0367] R取代基的另外实例包括Loktev等人发表的那些(Loktev,A.等人，The Journal of Nuclear Medicine,60(10),2019,p1421-1429)。

[0368] 因此，在一个实施方式中，靶向剂是具有以下结构的FAP结合基团：

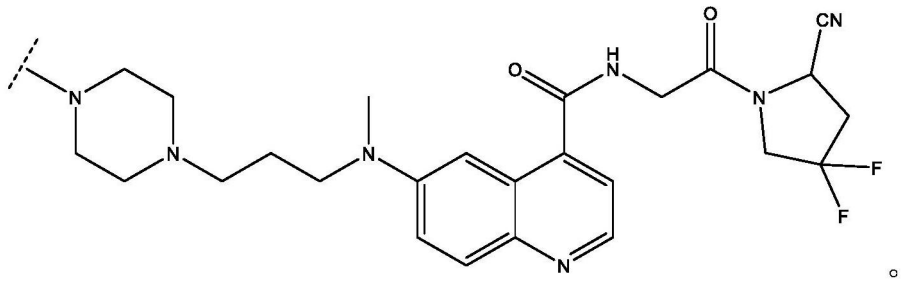
[0369] 

[0370] 其中X、Y、n、A、和R^1如本文所描述。

[0371] 在一个实例中，靶向剂是具有以下结构的FAP结合基团：

[0372] 

[0373] 在一个实例中,靶向剂是具有以下结构的FAP结合基团:

[0374] 

[0375] 在一些实施方式中,靶向剂是对HER2、EGFR、PSMA或FAP中的一种或多种有选择性的靶向剂。在一个实施方式中,靶向剂是对HER2有选择性的靶向剂。在一个实施方式中,靶向剂是对EGFR有选择性的靶向剂。在一个实施方式中,靶向剂是对PSMA有选择性的靶向剂。在一个实施方式中,靶向剂是对FAP有选择性的靶向剂。

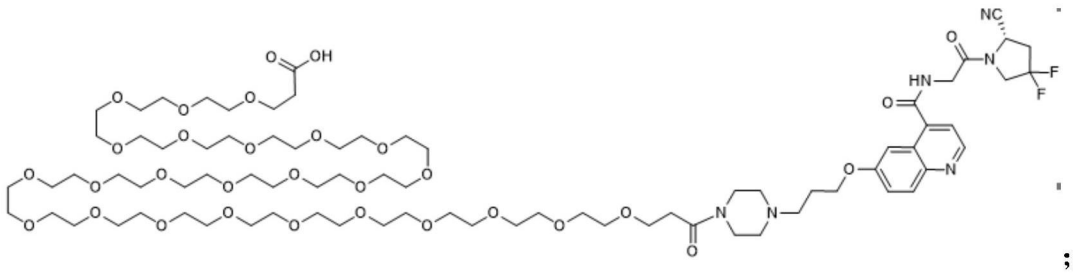
[0376] 在一些实施方式中,靶向剂对于与其他靶向剂(诸如市售的靶向剂)的结合具有竞争性。在一个实例中,靶向剂对于与市售的抗体疗法的结合具有竞争性。在一个实例中,靶向剂对HER2有选择性,并且对于与HER2抗体(例如,曲妥珠单抗、帕妥珠单抗和马吉妥昔单抗)的结合具有竞争性。在一个实例中,靶向剂对EGFR有选择性,并且对于与EGFR抗体(例如,西妥昔单抗、帕尼单抗、尼妥珠单抗和耐昔妥珠单抗)的结合具有竞争性。在一个实例中,靶向剂对FAP有选择性,并且对于与FAP抗体(例如,西罗珠单抗)的结合具有竞争性。

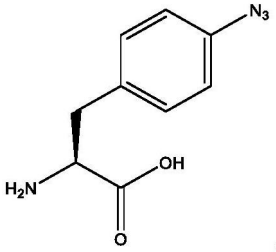
[0377] 在一些实施方式中,缀合物包含单一靶向剂。在其他实施方式中,缀合物包含多种靶向剂,例如2、3、4、或5种靶向剂。在一些实施方式中,缀合物包含1至32种靶向剂。在一些实施方式中,缀合物包含至少5种靶向剂。在一些实施方式中,缀合物包含5至30种之间的靶向剂。

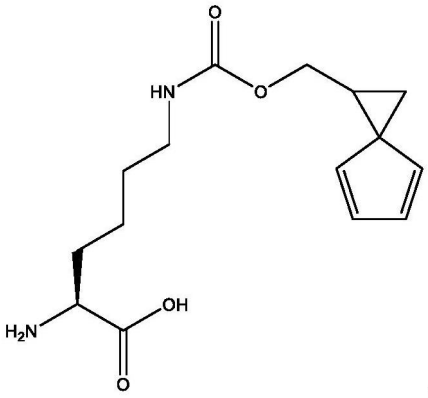
[0378] 靶向剂经由间隔子附接至缀合物的其余部分。在一些实施方式中,靶向剂与间隔子基团之间的共价附接或键已经通过包含靶向剂的中间体和包含树枝状体的中间体上存在的互补反应性官能团之间的反应而形成。

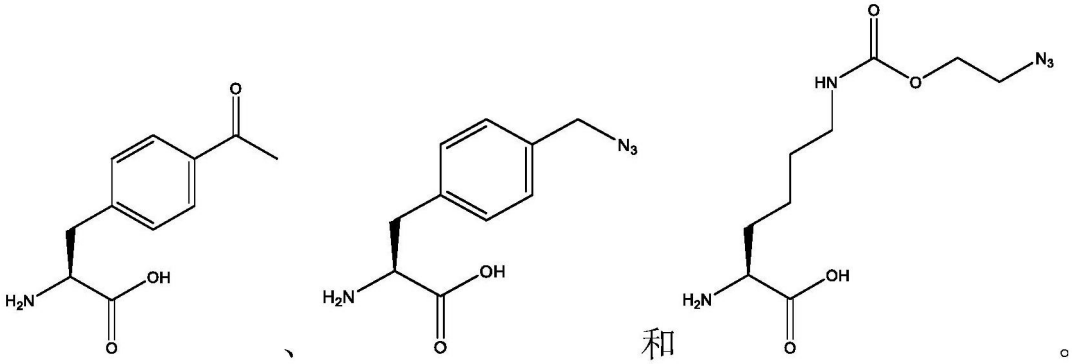
[0379] 在一些实施方式中,靶向剂在靶向剂的C末端共价连接至间隔子基团。

[0380] 在一个实施方式中,FAP结合基团经由如本文所述的间隔子基团缀合至树枝状体。因此,在一个实例中,靶向剂是经由包含聚乙二醇(PEG)的间隔子基团缀合至树枝状体的FAP结合基团。在一个实施方式中,靶向剂是经由包含聚乙二醇(PEG)的间隔子基团缀合至树枝状体的FAP结合基团,其具有以下结构:

[0381]  其中间隔子基团经由间隔子的末端羧基基团缀合至树枝体。

[0382] 用于将靶向剂附接至间隔子并因此附接至树枝状体的共价附接位点可以例如是半胱氨酸、赖氨酸、N末端胺、酪氨酸、碳水化合物、非天然氨基酸或转氨酶或识别序列。用于共价附接至蛋白质的结合位点是本领域已知的(例如,Milla P.等人,Current Drug Metabolism(2012)V13,1:105-119)。在一些实施方式中,包含靶向剂的中间体包含非天然氨基酸残基以用于附接至间隔子。非天然氨基酸残基可以具有有着反应性官能团的侧链,所述反应性官能团与可能存在于间隔子基团上、或存在于包含附接有间隔子基团的树枝状体的中间体上的反应性官能团互补。在一些实施方式中,非天然氨基酸残基是含有叠氮化物基团的残基,例如其可以是4-叠氮基苯丙氨酸残基,例如  叠氮化物基团能够与可能存在于间隔子前体基团中的炔烃基团进行环加成反应。在一些实施方式中,非天然氨基酸是含二烯氨基酸,例如含螺环戊二烯氨基酸,诸如:

[0383]  二烯基团能够与烯烃基团(诸如存在于马来酰亚胺上的那些)进行环加成(例如狄尔斯-阿尔德)反应。可以用于附接至间隔子的非天然氨基酸的另外实例包括含有羰基基团的那些(诸如酮)和含有甲基环丙烯基团的那些。非天然氨基酸的另外实例包括:

[0384] 

[0385] 在一些实施方式中，靶向剂包含如本文所定义的任一种氨基酸序列或由其组成。

[0386] 间隔子基团

[0387] 如本文所用，术语“间隔子基团”是指用于将靶向剂附接至树枝状体的化学实体。也就是说，间隔子基团将靶向剂接合至树枝状体。在一些实施方式中，间隔物可以简单地是原子或小化学连接基团，靶向剂通过它键合至树枝状体。在其他实施例中，间隔子基团可以更广泛。在此类实施方式中，间隔子基团旨在将靶向剂定位成使得其能够结合例如HER2受体而没有来自树枝状体的其他成分的过度有害干扰。

[0388] 在一些实施方式中，靶向剂通过树枝状体的核心附接至树枝状体。也就是说，靶向剂(诸如抗体片段)通过间隔子基团共价附接至树枝状体的核心。如果树枝状体是空间拥挤的，则经由附接至树枝状体的核心的间隔子将靶向剂附接至树枝状体可能是有益的，其中间隔子基团可以具有足够长度以突出超过树枝状体的表面，从而允许靶向剂与其受体或类似物的体内结合。例如，如果核心是含马来酰亚胺的核心，则靶向剂可以附接至马来酰亚胺环氮，并且在这种情况下，间隔子基团将是有益的。

[0389] 在一些其他实施方式中，靶向剂经由树枝状体的表面构建单元附接至树枝状体。例如，靶向剂可以经由间隔子基团连接至赖氨酸残基的表面氮，例如通过赖氨酸残基的胺基团与包含靶向剂和间隔子基团的中间体上存在的羧酸基团之间形成的酰胺键。

[0390] 可以使用任何合适的化学基团，所述化学基团用于将靶向剂与树枝状体隔开适当的距离，使得靶向剂能够结合至其靶标。示例性间隔子基团包括包含聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚芳基、酰胺键、肽、氨基酸、烷氧基、烷基氨基、烷基和烯基链以及糖类(单糖、寡糖和多糖)或其残基的基团。在一些实施方式中，间隔子基团包含一个或多个PEG基团，诸如2至60个乙烯氧基重复单元，例如2至20或20至48个重复单元。在一个实施方式中，PEG是8至36个重复单元。在另外的实施方式中，PEG是12、16、20、24或36个重复单元。

[0391] 在一些实施方式中，间隔子基团包含穿插有其他官能团的多个PEG基团。例如，间隔子基团可以包含经由例如可用于连接间隔子基团的部分的酰胺基团或其他官能团连接的PEG基团。

[0392] 可以使用将包含间隔子基团的中间体附接至包含靶向剂的中间体的任何合适的手段。例如，用于共价附接的位点包括但不限于半胱氨酸残基、赖氨酸残基、C末端氨基酸残基、N末端胺、酪氨酸残基、碳水化合物、合适的非天然氨基酸残基或转氨酶或识别序列。用于共价附接至蛋白质(诸如靶向剂)的结合位点是本领域已知的(例如，Milla P.等人，2012)。例如，可以使包含间隔子基团的中间体与包含靶向剂的中间体在靶向剂的C末端反应，使得间隔子基团经由C末端附接至靶向剂。在一些实施方式中，靶向剂经由靶向剂的C末

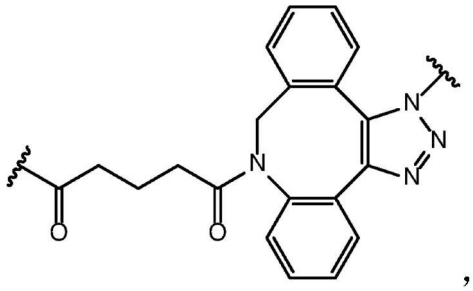
端附接至间隔子基团。在一个实施方式中，靶向剂经由靶向剂的C末端共价附接或连接至间隔子基团。

[0393] 因此，为了将间隔子基团附接至靶向剂和/或树枝状体，包含间隔子基团的中间体可以包括一个或多个反应性官能团。

[0394] 在特定实施方式中，反应性官能团可以是选自由以下组成的组中的互补反应性基团：羟基、羧基、活性酯(诸如NHS或五氟苯酚酯)、氨基、叠氮化物、马来酰亚胺(包括磺基-马来酰亚胺)、二烯(诸如环戊二烯，例如螺[2.4]庚-4,6-二烯基团)、四嗪、柠康酰亚胺(citraconimide)、含炔烃基团(包括BCN(二环[6.1.0]壬-4-烯-9-基)、DBCO(二苯并环辛炔-胺))、硫醇、羰基基团(诸如醛和酮)、烷氧胺、卤代乙酸酯、生物素、四嗪、含烯烃基团(包括TCO(反式环辛烯)、甲基-环丙烯基团)以及PTAD或其他酪氨酸反应性基团。

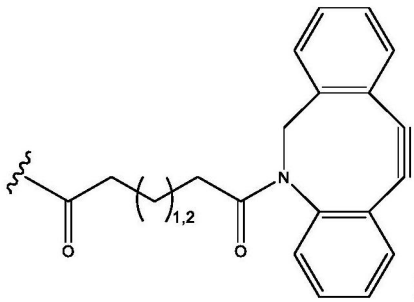
[0395] 例如，在一些实施方式中，间隔子基团中间体可以包含两个反应性基团，例如在每端一个，所述两个反应性基团是正交的，即反应性基团中的至少一个能够在其他反应性基团是稳定的并且基本上不反应的条件下与包含靶向剂的中间体或包含树枝状体的中间体上存在的互补基团反应，以将间隔子基团附接至缀合物的该成分。此举允许间隔子附接至树枝状体或靶向剂，并且然后随后通过其他反应性基团与其余成分上存在的互补基团的反应，以便将靶向剂连接至树枝状体。

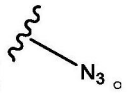
[0396] 在一些实施方式中，通过分别含有炔烃和叠氮化物基团的前体(例如含有靶向基团的中间体可以含有叠氮化物基团，并且含有间隔子基团的中间体可以含有炔烃基团)的反应将间隔子基团附接(直接或间接)至靶向剂。这种反应导致例如以下的含三唑基团的形成：

[0397] 

，

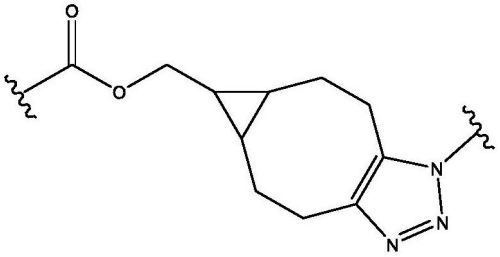
[0398] 并且所述含三唑基团可以通过具有以下结构的前体的反应形成：

[0399] 

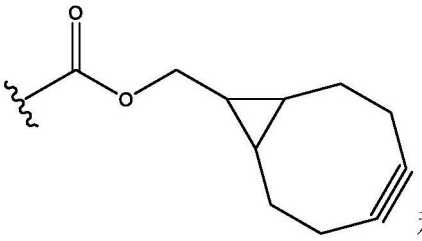
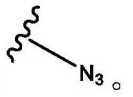
和 

。

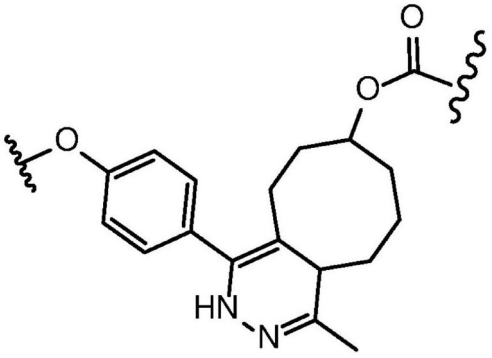
[0400] 又如，间隔子基团可以经由例如以下的含三唑基团的形成附接：

[0401] 

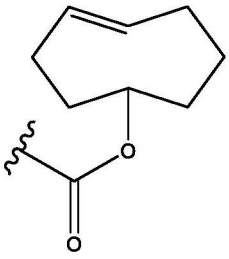
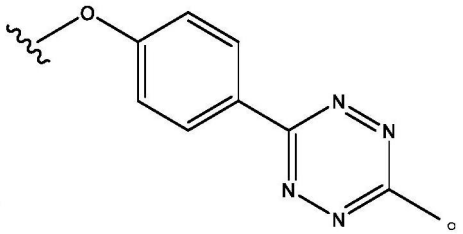
[0402] 并且所述含三唑基团可以通过具有以下结构的前体的反应形成：

[0403]  和  。

[0404] 在一些实施方式中，通过分别含烯烃(例如，应变烯烃诸如反式环辛烯)和四嗪基团的前体的反应将间隔子基团附接至靶向剂。这种反应随着氮的逐出导致例如以下的含哒嗪基团的形成：

[0405] 

[0406] 并且所述含哒嗪基团可以通过具有以下结构的前体的反应形成：

[0407]  和  。

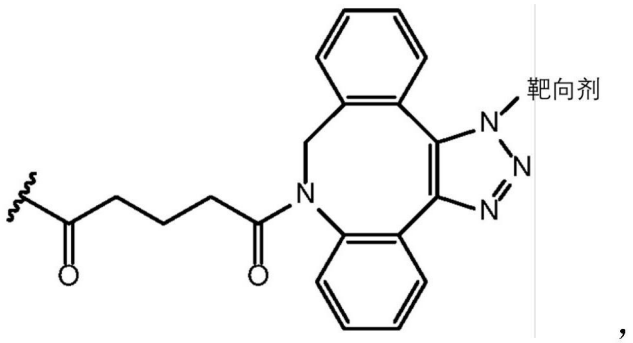
[0408] 在一些实施方式中，通过包含羧酸和胺基团的前体的反应将间隔子基团附接至树枝状体，例如，间隔子基团中间体可以含有可以与作为核心单元的一部分存在或从核心单元延伸的胺基团反应(例如形成酰胺键)的羧酸基团。

[0409] 在一些实施方式中，通过包含羧酸和胺基团的前体的反应将间隔子基团附接至树枝状体，例如间隔子基团中间体可以含有可以与作为核心单元的一部分存在或从核心单元延伸的胺基团反应(例如形成酰胺键)的羧酸基团，并且通过分别含有炔烃和叠氮化物基团的前体的反应将间隔子基团附接至靶向剂(例如含有靶向基团的中间体可以含有叠氮化物基团，并且含有间隔子基团的中间体可以含有炔烃基团)。

[0410] 如上所讨论，包含靶向剂的前体可以包含非天然氨基酸残基。该非天然氨基酸残

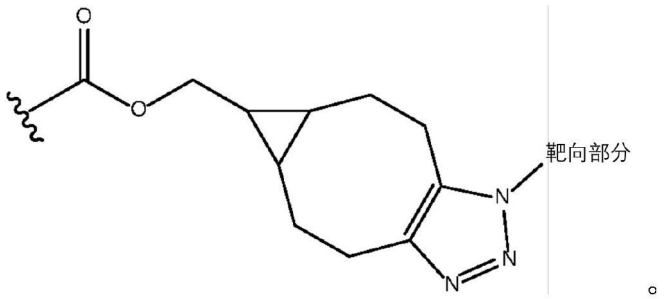
基可以例如是能够呈现反应性侧链的非天然氨基酸,其中反应性侧链带有与间隔子基团中间体上存在的官能团互补的官能团。这样,互补官能团可以反应,并且因此可以发生靶向部分与间隔子基团的附接。在一些实施方式中,所述非天然氨基酸残基是4-叠氮基苯丙氨酸残基。在一些实施方式中,包含间隔子基团的中间体含有炔烃基团以用于缀合至包含靶向部分的中间体,所述靶向部分包含含有叠氮化物基团的非天然氨基酸残基。在一些实施方式中,含间隔子基团中间体含有炔烃基团以用于缀合至包含含有4-叠氮基苯丙氨酸残基的靶向剂的中间体。在一些实施方式中,含间隔子基团中间体含有作为二苄基环辛炔-胺(DBCO)基团的炔烃基团以用于缀合至包含含有4-叠氮基苯丙氨酸残基的靶向部分的中间体。

[0411] 在一些实施方式中,通过以下方式将间隔子基团的一端附接至靶向部分:DBCO基团与形成靶向部分的一部分的4-苯丙氨酸残基上的叠氮基部分的环加成反应,例如形成诸如以下的含三唑基团:

[0412] 

,

[0413] 或BCN((二环[6.1.0]壬-4-烯-9-基))基团与形成靶向部分的一部分的4-苯丙氨酸残基上的叠氮基部分的反应,例如形成诸如以下的含三唑基团:

[0414] 

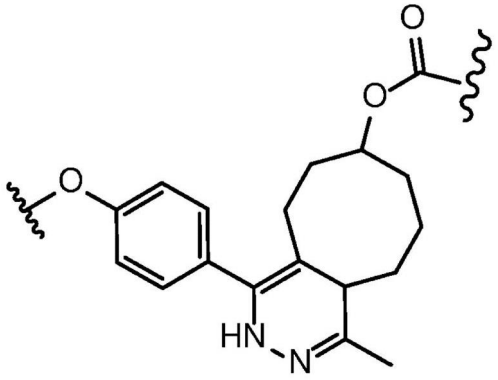
。

[0415] 在一些实施方式中,通过以下方式将间隔子基团的一端附接至树枝状体:核心上存在的或表面构建单元上存在的氨基基团与间隔子基团上存在的羧基基团(例如,通过活化酯的反应)之间的酰胺化反应。在一些实施方式中,含有间隔子基团的中间体含有四嗪基团。在一些实施方式中,含有间隔子基团的中间体包含马来酰亚胺基团,例如以用于缀合至二烯(诸如环戊二烯,例如螺[2.4]庚-4,6-二烯基团)。

[0416] 在一些实施方式中,包含间隔子基团的中间体包含PEG基团、羧基以用于与形成树枝状体的一部分或从树枝状体的核心延伸的胺反应,并且包含炔烃基团以用于与含有靶向部分的中间体中存在的叠氮化物基团反应。在一些实施方式中,包含间隔子基团的中间体含有PEG链,所述PEG链具有用于接合至树枝状体的核心处的胺的反应性羧基基团和用于缀合至含有反应性炔烃部分的靶向剂中间体的叠氮化物基团。在一些实施方式中,包含间隔子基团的中间体具有PEG链、用于接合至树枝状体的核心处的羧基基团的反应性胺基团、和

用于缀合至含有反应性炔烃部分的靶向剂中间体的叠氮化物基团。在一些实施方式中，间隔子基团中间体具有PEG链，所述PEG链具有用于接合至树枝状体的核心处的胺的反应性羧基基团和用于缀合至含有反应性硫醇部分的靶向剂中间体的马来酰亚胺基团。在一些实施方式中，间隔子基团中间体具有PEG链，所述PEG链具有用于接合至树枝状体的核心处的羧基基团的反应性胺基团和用于缀合至含有反应性马来酰亚胺部分的靶向剂中间体的硫醇或掩蔽硫醇基团。在一些实施方式中，间隔子基团中间体含有PEG链，所述PEG链具有用于接合至树枝状体的核心处的胺的反应性羧基基团和用于缀合至含有反应性烯烃部分的靶向剂中间体的四嗪基团。在一些实施方式中，间隔子基团中间体含有PEG链，所述PEG链具有用于接合至树枝状体的核心处的胺的反应性羧基基团和用于缀合至含有反应性二烯(诸如环戊二烯，例如螺[2.4]庚-4,6-二烯基团)的靶向剂中间体的马来酰亚胺基团。

[0417] 在一些实施方式中，靶向剂与树枝状体的连接可以通过以下方式实现：将第一间隔子基团附接至靶向剂中间体，将第二间隔子基团附接至树枝状体(例如树枝状体的核心)，并且然后使第一间隔子基团和第二间隔子基团上存在的互补官能团一起反应，以便将靶向剂和树枝状体连接。这种方法可以提供树枝状体与靶向剂的容易连接。例如，第一间隔子基团中间体可以包含在一端的第一反应性基团，其与靶向剂上的反应性基团互补(例如，炔烃基团，其与叠氮化物基团互补，并且可以一起反应形成三唑基团)；和第二反应性基团，其与第二间隔子基团上的反应性基团互补(例如含四嗪基团，其与含反式环辛烯基团互补反应)。第二间隔子基团中间体可以例如包含在一端的第三反应性基团，其与树枝状体上的反应性基团互补反应(例如，羧酸基团，其与胺基团互补反应)；和在另一端的第四反应性基团，其与第一间隔子基团中间体上的反应性基团互补反应(例如含反式环辛烯基团，其与四嗪基团互补反应)。例如，第一间隔子基团和第二间隔子基团可以经由这样的基团附接，所述基团通过反式环辛烯基团和四嗪基团的反应产生，并且包含以下结构：

[0418] 

。

[0419] 在一些实施方式中，靶向部分可以经由间隔子基团连接至树枝状体，所述树枝状体通过以下方式形成：靶向剂上存在的叠氮化物部分与在间隔子基团一端的含炔烃基团(例如DBCO、BCN)的反应，以及附接至树枝状体的四嗪部分与在间隔子基团的另一端的应变烯烃基团(例如，反式环辛烯)的反应。

[0420] 第三末端基团

[0421] 在一些实施方式中，树枝状体包含附接至最外层构建单元的一个或多个第三末端基团(T3)，所述第三末端基团包含不是含放射性核素部分的药物活性剂的残基。在构建单元是赖氨酸残基或其类似物的情况下，第三末端基团可以例如附接至最外层构建单元的氮原子。将药物活性剂掺入至树枝状体中可以提供改善的治疗特性，并且可以导致同一种树

枝状剂能够用于诊断/治疗成像和疾病治疗。例如,在被怀疑患有癌症或已经被诊断为患有癌症的受试者的情况下,可以首先施用本公开的树枝状体并对受试者身体的一个或多个相关部分进行成像,以便通过成像诊断患者的病症和/或在存在癌症的情况下,确定癌症对具有树枝状体的治疗疗程的可能易感性。在肿瘤可能对具有树枝状体的治疗敏感的情况下,可以例如然后向受试者施用相同树枝状体的另一疗程或本公开的另一树枝状体,例如含有不同的放射性核素。

[0422] 药物活性剂

[0423] 任何合适的药物活性剂都可以例如经由连接基团缀合至树枝状体作为第三末端基团。在一些实施方式中,药物活性剂是抗癌剂。抗癌剂的实例包括但不限于超细胞毒性剂、紫杉烷和拓扑异构酶抑制剂。在一些实施方式中,抗癌剂是超细胞毒性剂。在一些实施方式中,抗癌剂是澳瑞司他汀(auristatin)。在一些实施方式中,抗癌剂是美登木素生物碱(maytansinoid)。在一些实施方式中,抗癌剂是紫杉烷。在一些实施方式中,抗癌剂是拓扑异构酶抑制剂。

[0424] 如本文所用,术语"超细胞毒性剂"是指表现出高度有效的化学治疗剂特性,但它们本身太具毒性而不能单独作为抗癌剂施用的药剂。也就是说,超细胞毒性剂尽管展示出化学治疗剂特性,但通常不能安全施用至受试者,因为有害的毒性副作用超过化学治疗剂益处。在一些实施方式中,超细胞毒性剂具有小于100nM、或小于10nM、或小于5nM、或小于3nM、或小于2nM、或小于1nM、或小于0.5nM的针对癌细胞系(如SKBR3和/或HEK293细胞和/或MCF7细胞)的体外IC_{50}。超细胞毒性剂尤其包括例如多拉司他汀(dolastatin)(例如,多拉司他汀-10、多拉司他汀-15)、澳瑞司他汀(例如,单甲基澳瑞司他汀-E、单甲基澳瑞司他汀-F)、美登木素生物碱(例如,美登素、默坦辛(mertansine)/美坦辛(DM1,拉夫坦辛(ravtansine)(DM4))、卡奇霉素(例如,卡奇霉素γ1)、埃斯培拉霉素(esperamicin)(如埃斯培拉霉素A1)和吡咯苯并二氮杂卓(PDB)。

[0425] 在一些实施方式中,药物活性剂是澳瑞司他汀。在一些实施方式中,药物活性剂是单甲基澳瑞司他汀。在一个实施方式中,药物活性剂是单甲基澳瑞司他汀E(MMAE)。在一个实施方式中,药物活性剂是单甲基澳瑞司他汀F(MMAF)。MMAE和MMAF两者应理解为通过阻断微管蛋白的聚合来抑制细胞分裂。

[0426] 在一些实施方式中,超细胞毒性剂是美登木素生物碱。在一个实施方式中,超细胞毒性剂是美登素。在一个实施方式中,超细胞毒性剂是安丝菌素。在一个实施方式中,超细胞毒性剂是美坦辛/默坦辛(DM1)。在一个实施方式中,超细胞毒性剂是拉夫坦辛(DM4)。美登木素生物碱被理解为通过结合微管蛋白来抑制微管的组装。

[0427] 紫杉烷包括例如紫杉醇、卡巴他赛和多西他赛。在一些实施方式中,药物活性剂是紫杉醇。在一些实施方式中,药物活性剂是卡巴他赛。在一些实施方式中,药物活性剂是多西他赛。

[0428] 拓扑异构酶抑制剂包括但不限于喜树碱活性物质。在一些实施方式中,药物活性剂是喜树碱活性物质。喜树碱活性物质的实例包括但不限于SN-38、伊立替康(CPT-11)、拓扑替康、硅替康、科斯替康、埃克替康、勒托替康、吉马替康、贝洛替康和鲁比替康。在一些实施方式中,药物活性剂是SN-38。在一些实施方式中,药物活性剂是伊立替康。

[0429] 在一些实施方式中,药物活性剂是抗癌剂,所述抗癌剂选自由以下组成的组:卡巴

他赛、多西他赛、SN-38、单甲基澳瑞司他汀A和单甲基澳瑞司他汀F。

[0430] 接头

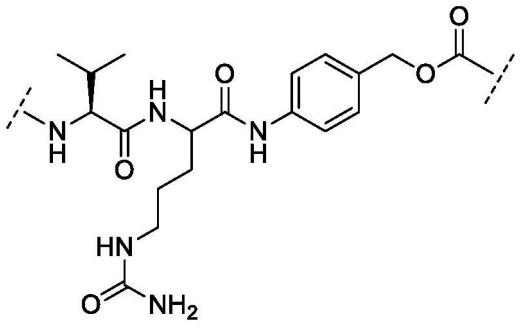
[0431] 在一些实施方式中，在树枝状体包含含有药物活性剂的残基的第三末端基团(T3)的情况下，药物活性剂的残基经由接头附接至最外层构建单元。在一些实施方式中，接头是可裂解接头。在一些实施方式中，接头是不可裂解接头。接头基团可以用于例如提供用于将药物活性剂附接至树枝状体的合适基团，例如其中药物活性剂中的可用官能性不适于直接附接至构建单元。接头基团还可以或替代地用于促进药物活性剂从树枝状支架的受控释放，从而将药物活性剂的治疗有效浓度和期望药代动力学概况提供合适(例如延长)的时间段。

[0432] 本领域的技术人员应当理解可以使用多种合适接头中的任一种。接头应在全身性循环期间提供足够的稳定性，但允许在其作用位点处(例如一旦内化至癌细胞中)以活性形式快速且高效地释放细胞毒性药物。

[0433] 在一些实施方式中，接头是可裂解接头，其(自身或与其至药物活性剂的连接结合)包含以下可裂解部分中的一种或多种：酯基团、腙基团、肼基团、亚胺基团或二硫化物基团。在一些实施方式中，接头是肿瘤环境可裂解的、酸不稳定性的、还原环境不稳定性的、水解不稳定性的或蛋白酶敏感性的。

[0434] 化学不稳定性接头包括但不限于酸不稳定性接头(即，腙)和二硫化物接头。酶可裂解接头包括但不限于肽接头(例如二肽接头，诸如含有Val-Cit或Phe-Lys基团的接头)和β-葡糖苷酸接头。有利地预期肽接头及其肽键具有良好血清稳定性，因为溶酶体的蛋白分解酶在血液中具有低活性。Val-Cit接头和Phe-Lys接头都会被组织蛋白酶B快速水解。在一些实施方式中，接头是酶可裂解接头。例如，在一些实施方式中，接头包含能够被酶识别和裂解的氨基酸残基。

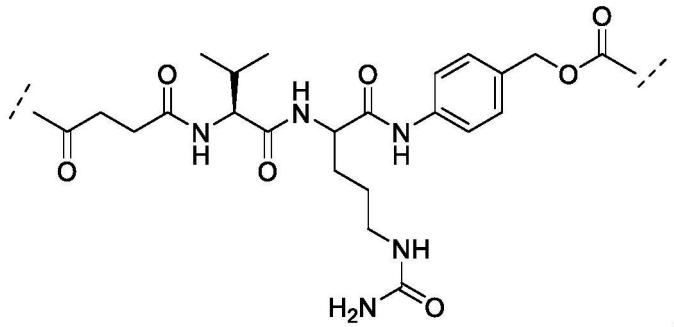
[0435] 在一些实施方式中，接头包含肽基团。在一些实施方式中，接头包含二肽基团。在一些实施方式中，接头包含含缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄醇基团(Val-Cit-PAB)，例如具有以下结构：

[0436] 

。

[0437] 例如，PAB基团可以经由羰基基团共价附接至治疗剂部分上存在的胺基团，从而形成氨基甲酸酯键，并且可以经由二酰基接头附接至外部构建单元上存在的胺基团，所述二酰基接头与缬氨酸氨基基团和外部构建单元上存在的胺基团形成酰胺键。

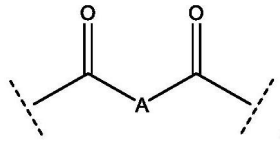
[0438] 在一些实施方式中，接头包含戊二酸-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄醇基团或由其组成，例如具有以下结构：

[0439] 

。

[0440] 在一些实施方式中，药物活性剂包含羟基基团，并且药物活性剂的残基经由羟基基团的氧原子附接至接头。该方法允许经由酯基团附接至接头，并且已经发现此类酯基团在体内可裂解，从而以期望速率释放药物活性剂。

[0441] 在一些实施方式中，核心单元由包含氨基基团的核心单元前体形成，构建单元是赖氨酸残基或其类似物，药物活性剂包含羟基基团，药物活性剂的残基经由羟基基团的氧原子附接，并且可裂解接头是二酰基接头，使得在药物活性剂的残基与接头之间存在酯键，并且在接头与最外层构建单元上存在的氮原子之间存在酰胺键。在一些实施方式中，药物活性剂包含羟基基团，药物活性剂的残基经由羟基基团的氧原子附接，并且可裂解接头是具有下式的二酰基接头基团：

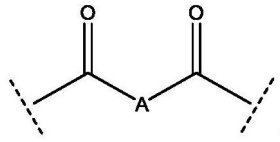
[0442] 

，其中A是任选地插入有O、S、S-S、NH或N(Me)的C_2-C_{10}亚烷基基团，或者其中A是选自由四氢呋喃、四氢噻吩、吡咯烷和N-甲基吡咯烷组成的组中的杂环。

[0443] 如本文所用，术语“烷基”是指单价直链(即线性)或支链的饱和烃基团。在一个实例中，烷基基团含有1至10个碳原子((即C_{1-10}烷基)。在一个实例中，烷基基团含有1至6个碳原子(即C_{1-6}烷基)。烷基基团的实例包括甲基、乙基、丙基(例如正丙基、异丙基)、丁基(例如正丁基、仲丁基、叔丁基)、戊基和己基基团。

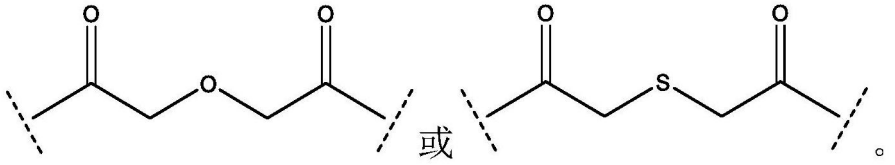
[0444] 如本文所用，术语“亚烷基”是指二价直链(即线性)或支链的饱和烃基团。在一个实例中，亚烷基基团含有2至10个碳原子((即C_{2-10}亚烷基)。在一个实例中，亚烷基基团含有2至6个碳原子(即C_{2-6}亚烷基)。亚烷基基团的实例包括例如-CH_2CH_2-、-$CH_2CH_2CH_2$-、-$CH_2CH(CH_3)$-、-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-$CH_2CH(CH_3)CH_2$-等。

[0445] 在一些实施方式中，药物活性剂包含羟基基团，药物活性剂的残基经由羟基基团的氧原子附接，并且可裂解接头是具有下式的二酰基接头基团：

[0446] 

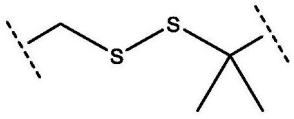
，其中A是插入有O、S、NH或N(Me)的C_2-C_{10}亚烷基基团。

[0447] 在一些实施方式中，药物活性剂包含羟基基团，药物活性剂的残基经由羟基基团的氧原子附接，并且二酰基接头是

[0448]  或 。

[0449] 可裂解接头的具体类型是含有二硫化物部分的可裂解接头。此类接头易受谷胱甘肽的裂解。例如,该类型的接头可以包含经由插入有二硫化物部分的烷基链连接的两个酰基基团。

[0450] 在一些实施方式中,接头包含插入有二硫化物部分的烷基链,其中在二硫化物基团旁边的一个或两个碳原子被一或多个甲基基团取代。例如,在二硫化物部分旁边的一个碳原子可以被偕二甲基基团取代,例如接头可以包含以下基团:

[0451]  。

[0452] 不可裂解接头是连接基团,所述连接基团是在暴露于体内条件时在所需时间段内对裂解惰性或基本惰性的。不可裂解接头在生物条件下不被裂解。

[0453] 实例包括通过亚烷基或环亚烷基基团(例如C_{1-10}亚烷基基团或C_{3-10}环亚烷基基团)桥接的二酰基接头。不可裂解接头的另外实例包括硫醚接头。不可裂解接头的具体实例是通过使用SMCC(琥珀酰亚胺4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯)形成的不可裂解接头。SMCC可以通过马来酰亚胺官能性与治疗剂部分上存在的或附接至治疗剂部分的硫醇基团进行反应,形成硫酯键。羧酸官能性可以用于与外部构建单元上存在的氨基基团反应。

[0454] 组合物

[0455] 在一些实施方式中,将缀合物呈现为组合物、优选地药物组合物。因此,提供了一种组合物,其包含多种如本文所述的缀合物。

[0456] 所述组合物或药物组合物可以包含多个树枝状体-靶向剂缀合物和/或树枝状体-靶向剂治疗缀合物。如果所述组合物或药物组合物仅包含树枝状体-靶向剂缀合物,则所述组合物可以暴露于合适的放射性核素,以在用于放射治疗或成像或类似目的的施用之前形成树枝状体-靶向剂治疗缀合物。

[0457] 应当理解,作为用于产生缀合物的合成方法的性质的结果,在给定组合物中存在的缀合物之间可能存在分子组成的一些变化。例如,如上文所讨论,用于产生缀合物的一个或多个合成步骤可能未完全进行至完成,这可能导致并非全部包含相同数量的标靶剂、第一末端基团、第二末端基团或第三末端基团,或缀合物的树枝状组分中含有不完全代的构建单元的缀合物的存在。

[0458] 在一些实施方式中,在所述组合物包含含有三代的构建单元的缀合物的情况下,每个缀合物的靶向剂的平均数量约为1。在一些实施方式中,在所述组合物包含含有三代的构建单元的缀合物的情况下,所述组合物中每个缀合物的第一末端基团的平均数量在1至4的范围内。在一些实施方式中,在所述组合物包含含有三代的构建单元的缀合物的情况下,所述组合物中每个缀合物的第二末端基团的平均数量在4至7的范围内。在一些实施方式中,在所述组合物包含如本文所定义的含有三代的构建单元的缀合物的情况下,每个缀合物的靶向剂的平均数量约为1,所述组合物中每个缀合物的第一末端基团的平均数量在1至

4的范围内，并且所述组合物中每个缀合物的第二末端基团的平均数量在4至7的范围内。

[0459] 在一些实施方式中，在所述组合物包含含有四代的构建单元的缀合物的情况下，每个缀合物的靶向剂的平均数量约为1。在一些实施方式中，在所述组合物包含含有四代的构建单元的缀合物的情况下，所述组合物中每个缀合物的第一末端基团的平均数量在1至4的范围内。在一些实施方式中，在所述组合物包含含有四代的构建单元的缀合物的情况下，所述组合物中每个缀合物的第二末端基团的平均数量在4至7的范围内。在一些实施方式中，在所述组合物包含如本文所定义的含有四代的构建单元的缀合物的情况下，每个缀合物的靶向剂的平均数量约为1，所述组合物中每个缀合物的第一末端基团的平均数量在1至4的范围内，并且所述组合物中每个缀合物的第二末端基团的平均数量在4至7的范围内。

[0460] 在一些实施方式中，所述组合物中至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％或至少95％的缀合物含有靶向剂。

[0461] 在一些实施方式中，所述组合物中至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％或至少95％的缀合物含有第一末端基团。

[0462] 在一些实施方式中，所述组合物中至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％或至少95％的缀合物含有第二末端基团。

[0463] 在一些实施方式中，所述组合物中至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％或至少95％的缀合物含有第三末端基团。

[0464] 本公开还提供了用于兽医和人医学用途的药物配制品或组合物，其包含本公开的缀合物或其药学上可接受的盐，以及一种或多种药学上可接受的载体和任选的任何其他治疗性成份、稳定剂等。因此，在一些实施方式中，所述组合物是药物组合物，并且所述组合物包含如本文所定义的缀合物和药学上可接受的赋形剂。

[0465] 赋形剂和/或载体必须在与配制品的其他成份相容并且对其受者不过度有害的意义上是药学上可接受的。本公开的组合物还可以包含聚合物赋形剂/添加剂或载体，例如聚乙烯基吡咯烷酮、衍生化纤维素(诸如羟甲基纤维素、羟乙基纤维素和羟丙基甲基纤维素)、ficoll(聚合物糖)、羟乙基淀粉(HES)、葡萄糖结合剂(例如，环糊精，诸如2-羟丙基-β-环糊精和磺基丁基醚-β-环糊精)、聚乙二醇和果胶。组合物可以进一步包含稀释剂、缓冲液、柠檬酸盐、海藻糖、粘合剂、崩解剂、增稠剂、润滑剂、防腐剂(包括抗氧化剂)、无机盐(例如，氯化钠)、抗微生物剂(例如，苯扎氯铵)、甜味剂、抗静电剂、山梨糖醇酯、脂质(例如，磷脂诸如卵磷脂和其他磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、脂肪酸和脂肪酯、类固醇(例如，胆固醇))和螯合剂(例如，EDTA、锌和其他此类合适的阳离子)。适于在根据本公开的组合物中使用的其他药物赋形剂和/或添加剂列出于以下文献中：“Remington:The Science&Practice of Pharmacy”，第19版，Williams&Williams,(1995)和“Physician's Desk Reference”，第52版，Medical Economics,Montvale,N.J.(1998)以及“Handbook of Pharmaceutical Excipients”，第三版，A.H.Kibbe编辑，Pharmaceutical Press,2000。

[0466] 可以将本公开的缀合物配制在组合物中，所述组合物包括适于通过任何合适的途径、包括例如通过肠胃外(包括腹膜内、静脉内、皮下或肌内注射)施用的那些。

[0467] 组合物可以方便地以单位剂型呈现，并且可以通过药学领域熟知的任何方法制备。所有方法包括将树枝状体与构成一种或多种辅助成份的载体联合的步骤。一般来讲，通过以下方式来制备组合物：将树枝状体与液体载体联合以形成溶液或悬浮液；或者可替代

地，将树枝状体与适于形成固体、任选地微粒产品的配制组分联合，并且然后，如果需要，将产品成形为期望的递送形式。当为微粒时，本公开的固体配制品通常将包含大小在约1纳米至约500微米范围内的颗粒。一般来讲，对于旨在用于静脉内施用的固体配制品，颗粒的直径通常将在约1nm至约10微米的范围内。组合物可以含有本公开的树枝状体，其是微粒直径低于1000nm的纳米微粒，例如5至1000nm，尤其是5至500nm、更尤其是5至400nm，诸如5至50nm并且尤其是5至20nm。在一个实例中，组合物含有平均大小在5至20nm之间的树枝状体。在一些实施方式中，树枝状体在组合物中是多分散的，其中PDI在1.01至1.8之间、尤其是在1.01至1.5之间、且更尤其是在1.01至1.2之间。在一个实例中，树枝状体在组合物中是单分散的。

[0468] 在一些优选的实施方式中，将所述组合物配制用于肠胃外递送。例如，在一个实施方式中，配制品可以是适于在注射前重构在水性媒介物中无菌的冻干组合物。

[0469] 在一个实施方式中，适于肠胃外施用的配制品方便地包含树枝状体的无菌水性制剂，例如可以将其配制为与受者的血液等渗。

[0470] 在一些实施方式中，将所述组合物配制用于瘤间递送。也可以使用其他合适的递送手段。例如，在一些实施方式中，递送可以通过灌洗或气雾剂进行。在一个实施方式中，将组合物配制用于腹膜内递送，并且用于治疗腹膜腔中的癌症，所述癌症包括恶性上皮肿瘤(例如，卵巢癌)和腹膜癌病(例如胃肠癌尤其是结肠直肠癌、胃癌、妇科癌症和原发性腹膜赘生物)。

[0471] 还提供了药物配制品，其适于作为气雾剂通过吸入施用。这些配制品包括所期望缀合物或其盐的溶液或悬浮液。可以将所期望配制品放置于小腔室中并且使其雾化。可以通过压缩空气或通过超声能量完成雾化以便形成包含树枝状体或其盐的多个液滴或固体颗粒。

[0472] 如下文所讨论，可以例如将本公开的缀合物与一种或多种另外的药物活性剂组合施用。在一些实施方式中，所述缀合物与另外的活性剂组合提供。在一些实施方式中，提供了一种组合物，其包含如本文所定义的缀合物或其药学上可接受的盐、一种或多种药学上可接纳的载体以及一种或多种另外的药物活性剂，例如另外的抗癌/肿瘤剂，诸如小分子细胞毒性剂、检查点抑制剂或抗体疗法。本公开的缀合物不仅可以与其他化学疗法药物一起施用，而且还可以与其他药品(诸如皮质类固醇、抗组胺、镇痛剂和帮助恢复或保护免受血液毒性的药物(例如细胞因子))一起施用。

[0473] 在一些实施方式中，将组合物配制用于作为化学疗法方案的一部分的肠胃外输注。

[0474] 缀合物的治疗用途

[0475] 如本文所述的缀合物和组合物可以用于药学领域的各种应用。例如，缀合物可用于治疗各种病症，诸如癌症。

[0476] 因此，提供了如本文所述的缀合物或药物组合物以用于治疗，并且更具体地以用于癌症的治疗。在一些实施方式中，将缀合物用于治疗或预防癌症，例如用于抑制肿瘤的生长的方法中。在一些实施方式中，所述缀合物用于治疗癌症。还提供了一种治疗癌症的方法，其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的如本文所定义的缀合物或药物组合物。还提供了如本文所定义的缀合物或如本文所定义的组合物在制备用于治疗癌症的药物中的

用途。

[0477] 在一些实施方式中，癌症是实体肿瘤。癌症可以是原发性或转移性肿瘤。在一些实施方式中，癌症是原发性肿瘤。在一些实施方式中，癌症是转移性肿瘤。

[0478] 在一些实施方式中，癌症的特征在于HER2(也称为ERBB2)的异常表达或过表达。已知HER2的这种异常表达或过表达在例如以下癌症中发生：乳腺癌、睾丸癌、卵巢癌、腹癌、肺的腺癌、胃癌、胰腺癌、涎腺导管癌、食管癌和子宫癌(例如，子宫浆液性子宫内膜癌)。

[0479] 在一些实施方式中，癌症的特征在于EGFR的异常表达或过表达。在一些实施方式中，癌症的特征在于PSMA的异常表达或过表达。在一些实施方式中，癌症的特征在于FAP的异常表达或过表达。

[0480] 在一些实施方式中，癌症选自由以下组成的组：前列腺癌、脑癌、乳腺癌、睾丸癌、卵巢癌、腹癌、肺的腺癌、胃癌、胰腺癌、涎腺导管癌、食管癌和子宫癌(例如，子宫浆液性子宫内膜癌)。

[0481] 在一些实施方式中，癌症选自由以下组成的组：结肠直肠癌、胃癌、胰腺癌、前列腺癌和乳腺癌。

[0482] 在一些实施方式中，癌症是前列腺癌。在一些实施方式中，癌症是乳腺癌。在一些实施方式中，癌症是睾丸癌。在一些实施方式中，癌症是卵巢癌。在一些实施方式中，癌症是胃癌。在一些实施方式中，癌症是肺的腺癌。在一些实施方式中，癌症是胃癌。在一些实施方式中，癌症是胰腺癌。在一些实施方式中，癌症是涎腺导管癌。在一些实施方式中，癌症是食管癌。在一些实施方式中，癌症是子宫癌。

[0483] 在一些实施方式中，癌症是脑癌。脑癌包括但不限于胶质母细胞瘤、脑膜瘤、垂体、神经鞘、星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤或颅咽管瘤。在一些实施方式中，癌症是脑癌，所述脑癌选自由以下组成的组：胶质母细胞瘤、脑膜瘤、垂体、神经鞘、星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤和颅咽管瘤。在一些实施方式中，脑癌是胶质母细胞瘤。在一些实施方式中，脑癌是脑膜瘤。在一些实施方式中，脑癌是垂体。在一些实施方式中，脑癌是神经鞘。在一些实施方式中，脑癌是星形细胞瘤。在一些实施方式中，脑癌是少突胶质细胞瘤。在一些实施方式中，脑癌是室管膜瘤。在一些实施方式中，脑癌是髓母细胞瘤。在一些实施方式中，脑癌是颅咽管瘤。

[0484] 治疗有效量的缀合物或组合物用于治疗方法和用途。应当理解，术语“治疗有效量”是指缀合物或包含所述缀合物的组合物的施用量足以在一定程度上缓解或预防所治疗的障碍或病症的一种或多种症状。

[0485] 树枝状体-靶向剂治疗缀合物可以通过任何合适的途径施用，包括例如通过静脉注射。在一些实施方式中，将树枝状体-靶向剂治疗缀合物作为IV团注递送。在一些实施方式中，将树枝状体-靶向剂治疗缀合物在0.5至60分钟范围内、或在0.5至30分钟范围内、或在0.5至15分钟范围内、或在0.5至5分钟范围内的时间段内IV施用。在另一个实例中，可以腹膜内施用树枝状体-靶向剂治疗缀合物。施用的途径可以例如靶向至受试者患有的疾病或障碍。例如，在一些实施方式中，疾病或障碍可以是腹内恶性肿瘤，诸如妇科或胃肠癌症，并且可以腹膜内施用所述缀合物。在一些实施方式中，所述缀合物可以用于治疗腹膜腔的癌症，诸如恶性上皮肿瘤(例如，卵巢癌)或腹膜癌病(例如胃肠癌，尤其是结肠直肠癌、胃癌、妇科癌症和原发性腹膜赘生物)，并且腹膜内施用所述缀合物。

[0486] 当用于治疗目的时，缀合物的施用量将足以向靶标(例如肿瘤)递送治疗有效剂量的放射性，同时避免身体其他部分(例如其他器官)不可接受地暴露于辐射。精确剂量可能取决于放射性核素的性质(例如α发射体、β发射体)和待治疗的病症。

[0487] 在一些实施方式中，缀合物的剂量或每种剂量含有的放射性核素量具有至多约10Gbq、或至多约7.5Gbq、或达5Gbq或至多2.5Gbq、或者至多1Gbq、或至多约500Mbq、或至多约250Mbq、或者至多约100Mbq，或至多约50Mbq、或至多约25Mbq、或至多约10Mbq、或至多约5Mbq的放射性。在一些实施方式中，缀合物的剂量或每种剂量含有的放射性核素量具有在0.1Mbq至10Gbq、0.1Mbq至7.5Gbq、0.1Mbq至5Gbq、0.1Mbq至2.5Gbq、0.1Mbq至1Gbq、0.1Mbq至500Mbq、0.1Mbq至250Mbq、0.1Mbq至100Mbq、0.1Mbq至50Mbq、0.1Mbq至25Mbq、0.1Mbq至10Mbq、0.1Mbq至5Mbq、0.1Mbq至2Mbq、0.1Mbq至1Mbq、0.5Mbq至10Mbq、1至10Mbq、1至5Mbq、5至10Mbq范围内，或者为约1Mbq、约2Mbq、约3Mbq、约4Mbq、约5Mbq、约6Mbq、约7Mbq、约8Mbq、约9Mbq、或约10Mbq的放射性。在一些实施方式中，缀合物的剂量或每种剂量含有的放射性核素量具有在0.1Mbq至10Gbq、1Mbq至10Gbq、10MBq至10Gbq、100Mbq至10Gbq、500Mbq至10Gbq、1Gbq至10Gbq、或5Gbq至10Gbq范围内的放射性。

[0488] 例如，在放射性核素是Lu^{177}的一些实施方式中，缀合物的剂量或每种剂量含有的放射性核素量具有在1Gbq至25Gbq范围内、更优选地在4Gbq至25Gbq范围内、或在4Gbq至10Gbq范围内的放射性。在一些实施方式中，含有Lu^{177}的缀合物的给药提供在每千克受试者体重5至20Mbq范围内的放射性量。

[0489] 又如，在放射性核素是Ga^{68}的一些实施方式中，缀合物的剂量或每种剂量含有的放射性核素量具有在50Mbq至1Gbq范围内的放射性。在一些实施方式中，含有Ga^{68}的缀合物的给药量在每千克受试者体重1至5Mbq范围内，更优选地在每千克1至3Mbq范围内，或为每千克约2Mbq。

[0490] 又如，在放射性核素是Y^{90}的一些实施方式中，缀合物的剂量或每种剂量含有的放射性核素量具有在500Mbq至20Gbq或10Gbq至20Gbq范围内的放射性。在一些实施方式中，含有Y^{90}的缀合物的给药量在每千克受试者体重5至50Mbq范围内，更优选地在每千克10至15Mbq范围内。

[0491] 在放射性核素是Ac^{225}的情况下，缀合物的剂量或每种剂量可以例如含有的放射性核素量具有在1Mbq至20Mbq范围内的放射性。在一些实施方式中，含有Ac^{225}的缀合物的给药量在每千克体重15至200Mbq范围内。

[0492] 在放射性核素是At^{211}的情况下，缀合物的剂量或每种剂量可以例如含有的放射性核素量具有在50Mbq至400Mbq范围内的放射性。

[0493] 如上文所讨论，缀合物的施用量足以向靶标(例如肿瘤)递送治疗有效剂量的放射性，同时避免身体其他部分(例如其他器官)不可接受的暴露。

[0494] 在一些实施方式中，以单剂量给药的缀合物的量使得由肺、脾脏、膀胱、肾脏、心脏、骨髓、肝脏和胃肠道(癌症或肿瘤位于这种器官中的情况除外)组成的器官组的每个器官吸收的平均辐射小于5mGy、或小于5Mbq、或小于2mGy、或小于2Mbq、或小于1mGy、或小于1Mbq或小于0.5mGy。

[0495] 在缀合物包含作为另一种药物活性剂的第三末端基团的情况下，在一些实施方式中，缀合物的施用量足以递送2至100mg的活性剂/m^2、2至50mg的活性剂/m^2、2至40mg的活性

剂/m^2、2至30mg的活性剂/m^2、2至25mg的活性剂/m^2、2至20mg的活性剂/m^2、5至50mg的活性剂/m^2、10至40mg的活性剂/m^2、15至35mg的活性剂/m^2、10至20mg/m^2、20至30mg/m^2、或25至35mg的活性剂/m^2。小鼠中10mg/kg的活性剂剂量应近似等同于30mg/m^2的人剂量(FDA指南2005)。(为了将人mg/kg剂量转化为mg/m^2,可以将数字乘以37,FDA指南2005)。

[0496] 在一些实施方式中,将治疗有效量的缀合物以预定频率施用至有需要的受试者。在一些实施方式中,根据剂量方案将缀合物施用至有需要的受试者,在所述剂量方案中每一至四周施用一次缀合物。在一些实施方式中,根据剂量方案将缀合物施用至有需要的受试者,在所述剂量方案中每三至四周施用一次缀合物。在一些实施方式中,使用的配量方案包括每三至四周施用一次,总共2、3、4、5、6、7、8、8、9或10次剂量。

[0497] 组合

[0498] 尤其是在化学疗法期间,常常将药物与其他药物组合施用。因此,在一些实施方式中,将缀合物与一种或多种另外的药物活性剂(例如,一种或多种另外的抗癌剂/药物)组合施用。可以同时、随后或单独施用树枝状体-靶向剂缀合物和一种或多种另外的药物活性剂。例如,它们可以作为相同组合物的一部分、或通过施用单独组合物来施用。

[0499] 一种或多种另外的药物活性剂可以例如是用于治疗前列腺癌、脑癌、乳腺癌、睾丸癌、卵巢癌、腹癌、肺的腺癌、胃癌、胰腺癌、涎腺导管癌、食管癌或子宫癌(例如,子宫浆液性子宫内膜癌)的抗癌剂。

[0500] 一种或多种另外的药物活性剂可以例如是用于治疗结肠直肠癌、胃癌、胰腺癌、前列腺癌或乳腺癌的抗癌剂。

[0501] 另外的药物活性剂的实例包括化学治疗剂和细胞毒性剂、小分子细胞毒素、酪氨酸激酶抑制剂、检查点抑制剂、EGFR抑制剂、抗体疗法、紫杉烷(例如紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛、nab-紫杉醇)、拓扑异构酶抑制剂(例如SN-38、伊立替康(CPT-11)、拓扑替康、硅替康、科斯替康、埃克替康、勒托替康、吉马替康、贝洛替康或鲁比替康)、以及芳香化酶抑制剂。

[0502] 诊断/成像

[0503] 如本文所述的缀合物和组合物还可用作诊断剂,例如像显像剂。诊断应用的实例包括成像、诊断治疗学、伴随诊断-治疗、监测疾病进展、评估治疗效果、确定患者群结果以及为特定患者或患者群制定治疗方案。

[0504] 因此,提供了一种确定受试者是否患有癌症的方法,其包括:

[0505] 向受试者施用如本文所定义的缀合物或包含所述缀合物的药物组合物;

[0506] 对受试者的身体或其一部分进行成像;以及

[0507] 基于成像结果确定受试者是否患有癌症。

[0508] 还提供了一种对受试者癌症进行成像的方法,其包括:

[0509] 向受试者施用如本文所定义的缀合物或包含所述缀合物的药物组合物;以及

[0510] 对受试者的身体或其一部分进行成像。

[0511] 还提供了一种确定受试者癌症的进展的方法,其包括:

[0512] 向受试者施用第一量的如本文所定义的缀合物或包含所述缀合物的药物组合物;

[0513] 对受试者的身体或其一部分进行第一成像步骤;

[0514] 随后向受试者施用第二量的如本文所定义的缀合物或包含所述缀合物的药物组合物;

[0515] 对受试者的身体或其一部分进行第二成像步骤;以及

[0516] 基于第一和第二成像结果确定癌症是否有进展。

[0517] 还提供了一种确定用于患有癌症的受试者的适当疗法的方法,其包括:

[0518] 向受试者施用如本文所定义的缀合物或包含所述缀合物的药物组合物;

[0519] 对受试者的身体或其一部分进行成像;以及

[0520] 如果成像结果指示癌症对疗法的易感性,则向受试者施用所述疗法。

[0521] 还提供了一种确定向患有癌症的受试者施用的癌症疗法的有效性的方法,其包括:

[0522] 向受试者施用第一量的如本文所定义的缀合物或如本文所定义的药物组合物;

[0523] 对受试者的身体或其一部分进行第一成像步骤;

[0524] 向受试者施用癌症疗法;

[0525] 随后向受试者施用第二量的如本文所定义的缀合物或如本文所定义的药物组合物;

[0526] 对受试者的身体或其一部分进行第二成像步骤;以及

[0527] 基于第一和第二成像结果确定所述癌症疗法的有效性。

[0528] 还提供了一种如本文所定义的缀合物或含有所述缀合物的药物组合物,以用于诊断受试者癌症、以用于确定用于患有癌症的受试者的适当疗法、以用于确定向受试者施用的癌症疗法的有效性、以用于确定受试者癌症的进展或以用于治疗癌症。

[0529] 还提供了一种如本文所定义的缀合物或含有所述缀合物的药物组合物的用途,在制备用于诊断癌症的药物时,以用于确定用于患有癌症的受试者的适当疗法、以用于确定向受试者施用的癌症疗法的有效性、以用于确定受试者癌症的进展、或以用于治疗癌症。

[0530] 癌症可以例如是上文关于缀合物的治疗应用所讨论的癌症中的任一种。例如,在一些实施方式中,癌症是实体肿瘤。癌症可以是原发性或转移性肿瘤。在一些实施方式中,癌症是原发性肿瘤。在一些实施方式中,癌症是转移性肿瘤。

[0531] 在一些实施方式中,癌症的特征在于HER2(也称为ERBB2)的异常表达或过表达。已知HER2的这种异常表达或过表达在例如以下癌症中发生:乳腺癌、睾丸癌、卵巢癌、腹癌、肺的腺癌、胃癌、胰腺癌、涎腺导管癌、食管癌和子宫癌(例如,子宫浆液性子宫内膜癌)。

[0532] 在一些实施方式中,癌症选自由以下组成的组:前列腺癌、脑癌、乳腺癌、睾丸癌、卵巢癌、腹癌、肺的腺癌、胃癌、胰腺癌、涎腺导管癌、食管癌和子宫癌(例如,子宫浆液性子宫内膜癌)。

[0533] 在一些实施方式中,癌症选自由以下组成的组:结肠直肠癌、胃癌、胰腺癌、前列腺癌和乳腺癌。

[0534] 在上述方法和用途中,可以使用用于施用缀合物或组合物的量足以用于诊断用途的任何合适方法。例如,缀合物或组合物可以静脉注射施用给受试者。

[0535] 本领域技术人员已知用于对含有放射性核素的样品或已施用放射性核素的受试者进行成像以及用于分析结果的合适技术,并且所述技术可以用于上述方法和用途。

[0536] 基于放射性核素的成像方法,尤其是PET(正电子发射断层扫描),由于其高灵敏度(皮摩尔水平)和无限的组织渗透性,仍然是诊断和治疗应用的活跃领域。在一些实施方式中,使用PET成像。在一些实施方式中,使用PET-MRI、SPECT、SPECT-CT、CT、闪烁扫描或PET-

CT成像。

[0537] 通常，当用于成像和诊断目的时，施用缀合物，然后在合适的时间段之后对受试者或受试者的相关部分进行成像。施用和成像步骤之间的时间段可以取决于包括靶向剂的性质在内的方面。例如，在使用小分子靶向剂的一些情况下，在施用后2小时内、1小时内或30分钟内对受试者进行成像可能是有益的。又如，在使用抗体靶向剂或树枝状体较大(例如G4或G5)的一些情况下，在进行成像之前，可能优选允许在施用后经过另外的时间，例如1、2、3、4、5、6、或7天的时间段。在一些实施方式中，施用缀合物，并且之后大约24小时或大约48小时进行成像。

[0538] 在一些实施方式中，用于诊断和成像的缀合物是具有2代或3代的构建单元的缀合物。

[0539] 本发明的缀合物和包含它们的组合物对感兴趣的靶标(例如肿瘤组织)具有良好的选择性。为了进一步提高选择性，并降低其他组织或器官(诸如肾脏或肝脏)中存在的缀合物水平，诊断和治疗方法可以包括作为施用方案的一部分的附加步骤。

[0540] 例如，可以进行降低与肾脏暴露于放射性试剂相关的肾毒性可能性的试剂的预施用或联合施用。这样，在本文提供的治疗和诊断方法的一些实施方式中，缀合物或提供缀合物的药物组合物与降低肾毒性可能性的试剂组合施用。

[0541] 此类试剂的实例包括氨基酸，例如碱性氨基酸诸如赖氨酸和/或精氨酸。在一个实例中，使用每1.5-2.2L溶液含有18-24g L-赖氨酸和18-24g L-精氨酸的水溶液。这样的溶液可例如具有小于1200mOsmol、或小于1100mOsmol、或小于1060mOsmol的渗透压。合适试剂的其他实例包括琥珀酰化明胶(豪斯曼实验室有限公司以商品名Gelufusine出售4％w/v溶液)。此类试剂的其他实例包括呋塞米(以品牌名Lasix出售)和螺内酯(以品牌名Aldactone出售)。

[0542] 在一些实施方式中，可以使用氨基酸诸如赖氨酸或精氨酸的预施用或联合施用。因此，在本文提供的治疗和诊断方法的一些实施方式中，缀合物或提供缀合物的药物组合物与氨基酸(例如赖氨酸或精氨酸)组合施用。在一些实施方式中，在施用缀合物或含有缀合物的组合物之前施用氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸)。在一些实施方式中，氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸)与缀合物或含有缀合物的组合物同时施用。

[0543] 在一些实施方式中，琥珀酰化明胶与缀合物或提供缀合物的药物组合物组合施用。在一些实施方式中，在施用缀合物或含有缀合物的组合物之前施用琥珀酰化明胶。

[0544] 在一些实施方式中，在施用缀合物之前或同时施用琥珀酰化明胶和氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸)的组合。

[0545] 在一些实施方式中，在施用缀合物之前或同时施用呋塞米。

[0546] 在一些实施方式中，在施用缀合物之前或同时施用螺内酯。

[0547] 所述试剂(例如氨基酸诸如赖氨酸、精氨酸)通常以药物组合物(例如水性组合物)的形式施用。所述试剂可以例如静脉注射(例如通过注射或输注)施用。

[0548] 应当理解，适用于诊断、治疗、成像和需要放射性核素存在的其他目的的缀合物将是如本文所述的治疗缀合物，即使最终用途本质上可能不是治疗性的，而是诊断性的或以其他方式用于成像。

[0549] 治疗缀合物的制备

[0550] 放射性材料是危险物质，理想地最小化使用此类材料的处理步骤。期望的是仅在晚期，理想地就在使用缀合物之前的时间，将放射性核素组分引入到缀合物中。

[0551] 因此，提供了一种用于产生如本文所定义的治疗缀合物的方法，其包括：

[0552] 使如上文所定义的合适的树枝状体-靶向剂缀合物与放射性核素接触，从而产生治疗缀合物；其中所述树枝状体-靶向剂缀合物包含：

[0553] a)树枝状体，所述树枝状体包含：

[0554] i)核心单元(C)；以及

[0555] ii)构建单元(BU)，

[0556] 其中所述树枝状体具有两代至六代的构建单元；并且其中所述核心单元共价附接到至少两个构建单元；

[0557] b)靶向剂，所述靶向剂通过间隔子基团共价连接至树枝状体；

[0558] c)一个或多个第一末端基团，其附接至树枝状体的最外层构建单元，其中所述第一末端基团包含用于络合放射性核素的络合基团；以及

[0559] d)一个或多个第二末端基团，其附接至树枝状体的最外层构建单元，其中所述第二末端基团包含药代动力学修饰部分；或其盐。

[0560] 还提供了一种用于产生如本文所定义的治疗缀合物的试剂盒，其包含a)如上文所定义的树枝状体-靶向剂缀合物；以及b)放射性核素。

[0561] 应当理解，还可以为中间体提供如本文针对缀合物(例如针对核心单元(C)、构建单元(BU)、末端基团、靶向剂或树枝状体)所述的任何一个或多个不同的实施方式或实例。类似地，上文关于缀合物所讨论的任何放射性核素都可以用于产生缀合物的方法中。

[0562] 可以使用从树枝状体-靶向剂缀合物和放射性核素产生治疗缀合物的任何合适的手段。例如，树枝状体-靶向剂缀合物和放射性核素(例如以金属盐的形式)可以混合在合适的溶剂中，优选的是适合于向患者施用的溶剂。例如，在一些实施方式中，可以使用水性溶剂。

[0563] 在一些实施方式中，放射性核素(例如Zr^{89}草酸)在水性溶液中的合适盐形式可以与树枝状体-靶向剂缀合物或中间体在合适缓冲液(例如HEPES)中的溶液混合。可以使用中间体与放射性核素盐的任何合适的摩尔比，例如至少25:1、至少50:1或约100:1。如有需要，可以进行纯化以与未结合的放射性核素分离。如果需要，可以在施用之前交换溶液，例如可以进行缓冲液到磷酸盐缓冲盐水中的交换。

[0564] 如果存在其他金属离子种类(例如，如果中间体含有大量的螯合金属)，则在用放射性核素标记之前，如果需要，可以去除这些金属离子。例如，在用放射性核素标记之前，可以通过用EDTA(乙二胺四乙酸)处理来去除铁污染物。

[0565] 树枝状体-靶向剂缀合物或中间体的标记可以例如根据Verel等人，J.Nucl.Med.，2003,44(8)，p1271-1281中描述的程序进行。

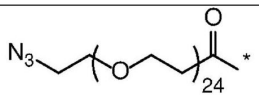
[0566] 上述试剂盒、中间体和方法可以用于在临床中提供药物组合物的有效制备，通过允许就在施用前在临床中对中间体进行放射标记和产生缀合物。

[0567] 本领域技术人员应当理解，在不脱离本公开的广泛总体范围的情况下，可以对上述实施方式进行各种变化和/或修改。因此，本发明的实施方式在所有方面都被认为是说明性的而非限制性的。

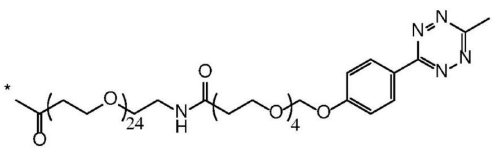
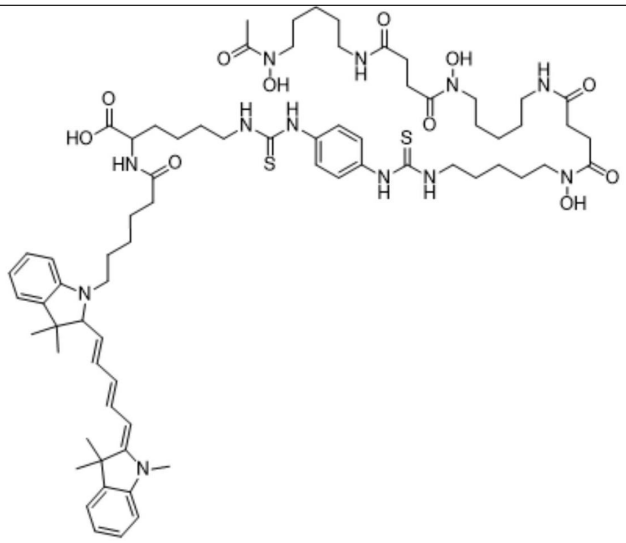
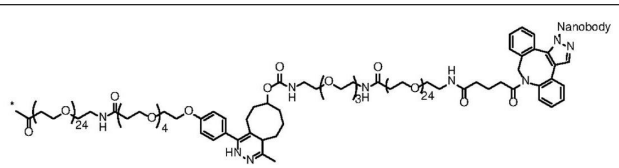
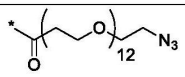
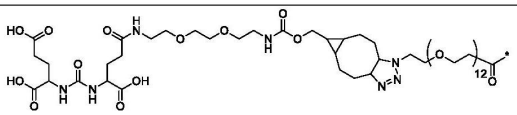
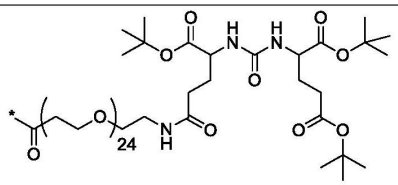
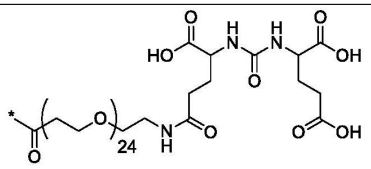
[0568] 实施例

[0569] 在本文中关于树枝状体缀合物合成使用以下命名：

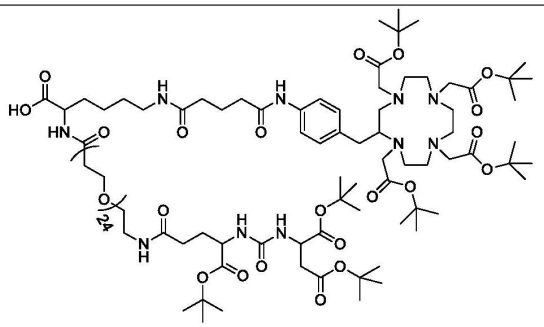
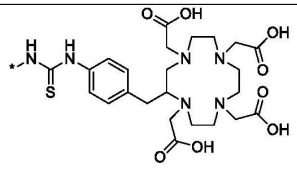
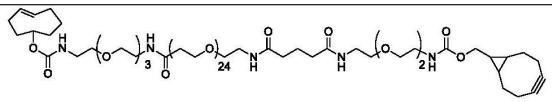
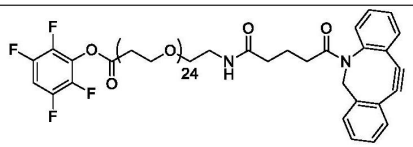
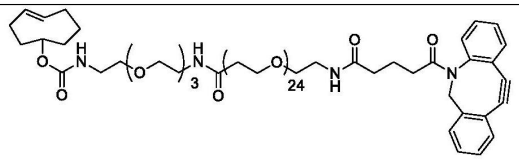
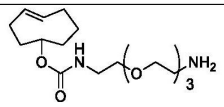
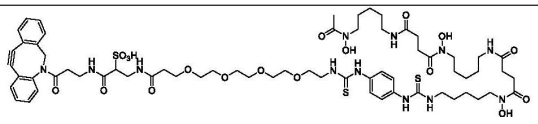
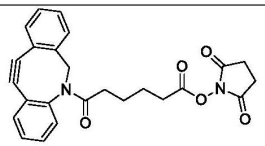
[0570]

缩写	结构
叠氮基-$PEG_{24}CO$-	

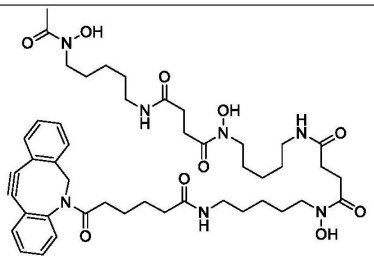
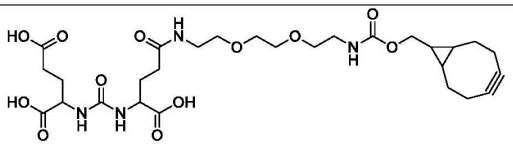
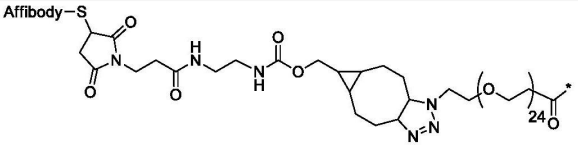
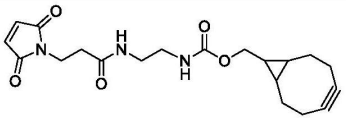
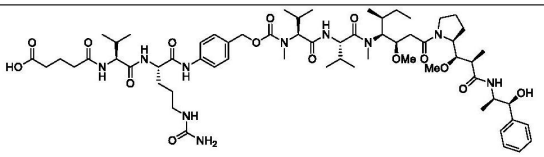
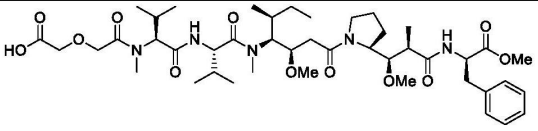
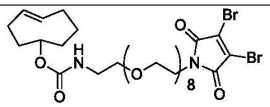
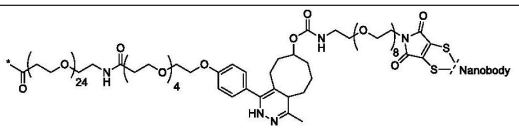
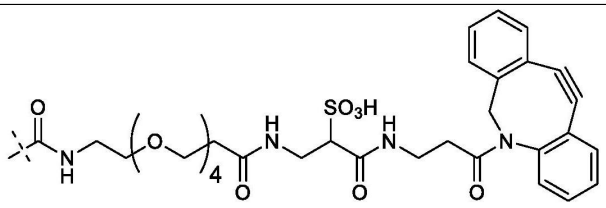
[0571]

-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)	
HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NHDFO)] *化合物60*	
-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体)	
-COPEG$_{570}$N$_3$	
-COPEG$_{570}$N$_3$/BCN-DUPA	
-COPEG$_{24}$NH-DUPA(OtBu)$_3$)	
-COPEG$_{24}$NH-DUPA(OH)$_3$)	

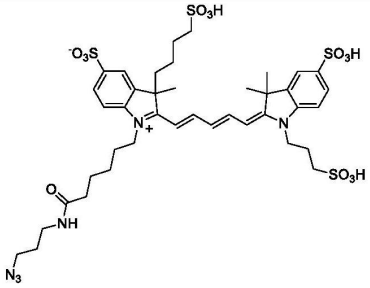
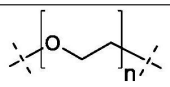
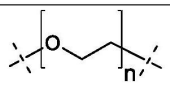
[0572]

HO-Lys[(α-NH-COPEG$_2$ $_4$NH-DUPA(OtBu)$_3$)(ε-GluNH-p-Bn-DOTA(OtBu)$_4$)] *化合物45*	
(α-(NH DOTA)	
BCN-PEG$_2$-Glu-CO-NHPEG$_{24}$CO-NHPEG$_3$-TCO *化合物50*	
DBCO-Glu-NHPEG$_{24}$COOTFP	
DBCO-Glu-NHPEG$_{24}$CO-NHPEG$_3$-TCO *化合物51*	
TCO-PEG$_3$-NH$_2$ or TCO-PEG$_3$-胺	
DFO-PEG$_4$-磺基-DBCO *化合物55*	
DBCO-NHS 酯	

[0573]

DFO-DBCO *化合物56*	
DUPA-BCN *化合物61*	
亲和体 -BCN/N_3-PEG_{24}CO-	
Mal-BCN	
Glu-vc-PAB-MMAE	
DGA-MMAF(OMe)	
TCO-PEG_8-二溴马来酰亚胺	
-$COPEG_{24}$NH-$COPEG_4$(PhTzMe)/TCO-PEG_8-纳米抗体	
CONH-PEG_4-磺基-DBCO	

[0574]

AFDye 647 叠氮化物	
$mPEG_n$	 单分散的 PEG. n = MW（以 Da 为单位）的定义范围
$dPEG_n$	 离散的 PEG. n = 定义的 MW（以 Da 为单位）

[0575]

MeCN	乙腈
LCMS	液相色谱质谱
ESI MS	电喷雾质谱
Lys	赖氨酸
Boc	苄氧基羰基
PBS	磷酸盐缓冲盐水
DIPEA	二异丙基乙胺
PEG	聚乙二醇
NHPEG	NH-聚乙二醇
PyBop	苯并三唑-1-基-氧基三-吡咯烷基鏻六氟磷酸盐
TFA	三氟乙酸
NMM	N-甲基吗啉
DMF	二甲基甲酰胺
DBL-ONp	二-Boc-(*L*)-赖氨酸对硝基苯酯
NHFmoc	NH-芴基甲氧基羰基

[0576]

NHBoc	NH-苄氧基羰基
MMAE	单甲基澳瑞司他汀 E
MMAF（OMe）	单甲基澳瑞司他汀 F（甲基酯）
$N(PNBoc)_2$	二 Boc 二亚丙基三胺
TEA	三乙胺
NMR	核磁共振
D_2O	氧化氘
CD_3OD	氘代甲醇
Glu	谷氨酸衍生物
Val	缬氨酸
Cit	瓜氨酸
PAB	对氨基苄基
DGA	二甘醇酸
R_t	保留时间
DMAP	4-(二甲基氨基)吡啶
NHS	N-羟基琥珀酰亚胺
DCM	二氯甲烷
EtOAc	乙酸乙酯
THF	四氢呋喃
N_3	叠氮化物
MAL	马来酰亚胺
BCN	二环[6.1.0.]壬炔
MAL-EDA-BCN	马来酰亚胺基-乙二胺-二环壬炔
DBCO	二苯并环辛炔
UPA	唯一附接点；具有附接或可以附接接头或靶向剂的选择连接点的树枝状体

[0577]

BCN 三唑并	二环[6.1.0]壬炔-[1,2,3]三唑并
DBCO 三唑并	二苯并环辛炔-[1,2,3]三唑并
MPED	N-(3-马来酰亚胺基丙酸)-乙二胺
PSSP	二丙酸二硫化物
LyP	庚酰基 ^{1} Lys(fd)^{2} LyP-1：序列 = Hept-CGNKRTRGC-NH_2（环状）
DTX	多西他赛
t-BuOH	叔丁醇
TBTA	三[(1-苄基-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)甲基]胺
PEOX	聚乙基恶唑啉
POZ	聚-(2)甲基-(2)-恶唑胺
pHPMA	聚(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺
nmPEG	mPEG（单分散的 PEG）单元的数量
nFAPI	FAPI（离散的 PEG-FAPI-04）单元的数量
DCC	二环己基碳二亚胺

[0578] 制备性HPLC

[0579] 使用Waters XBridge™ BEH300 Prep C18 5μm OBD™30 x150mm柱，使用由溶剂a(水、水与甲酸或水与TFA)和溶剂B(乙腈或乙腈与甲酸或TFA)组成的二元溶剂系统，在Gilson HPLC系统上执行制备性HPLC。使用紫外检测器在波长214nm、243nm或254nm处检测到峰。

[0580] 制备型HPLC法

[0581] 制备型HPLC法5%-60%TFA：溶剂A，0.05%TFA(v/v)在水中；溶剂B，0.05%TFA(v/v)在MeCN中；流速：8.0mL/min；梯度：0-5min，5%B；5-35min，5%-60%，35-47min，60%B；47-50min，60%-5%B；50-60min，5%。使用紫外检测器在波长214nm和254nm处检测到峰。

[0582] 制备型HPLC法30%-50%TFA：溶剂A，0.05%TFA(v/v)在水中；溶剂B，0.05%TFA(v/v)在MeCN中；流速：8.0mL/min；梯度：0-5min，30%B；5-35min，30%-50%，35-47min，50%B；47-50min，50%-30%B；50-60min，30%。使用紫外检测器在波长214nm和254nm处检测到峰。

[0583] 制备型HPLC法40%-70%TFA：溶剂A，0.05%TFA(v/v)在水中；溶剂B，0.05%TFA(v/v)在MeCN中；流速：8.0mL/min；梯度：0-5min，40%B；5-35min，40%-70%，35-47min，

70%B;47-50min,70%-40%B;50-60min,40%。使用紫外检测器在波长214nm和254nm处检测到峰。

[0584] 制备型HPLC法20-60,TFA:溶剂A,0.05%TFA(v/v)在水中;溶剂B,0.05%TFA(v/v)在MeCN中;流速:8.0mL/min;梯度:0-5min,20%B;5-35min,20%-60%,35-40min,60%-100%B;40-47min,100%B;47-50min,100%-10%B;50-60min,10%。使用紫外检测器在波长214nm和254nm处检测到峰。

[0585] 制备型HPLC法20-60:溶剂A,水;溶剂B,MeCN;流速:8.0mL/min;梯度:0-7min,20%B;7-37min,20%-60%,37-47min,60%B;47-54min,60%-20%B;54-60min,20%。λ=214nm和254nm。

[0586] 制备型HPLC法20-60(2):溶剂A,水;溶剂B,MeCN;流速:8.0mL/min;梯度:0-5min,20%B;5-55min,20%-60%,55-60min,60%-20%B。在λ=214nm和254nm处检测。

[0587] 制备型HPLC法20-90,TFA:溶剂A,0.05%TFA(v/v)在水中;溶剂B,0.05%TFA(v/v)在MeCN中;流速:8.0mL/min;梯度:0-6min,20%B;6-40min,20%-90%,40-47min,90%B;47-51min,90%-20%B;51-60min,20%B。使用紫外检测器在波长214nm和254nm处检测到峰。

[0588] 制备型HPLC法30-90,TFA:溶剂A,0.05%TFA(v/v)在水中;溶剂B,0.05%TFA(v/v)在MeCN中;流速:8.0mL/min;梯度:0-5min,30%B;5-40min,30%-90%,40-45min,90%B;45-50min,90%-30%B;50-60min,30%B。使用紫外检测器在波长214nm和254nm处检测到峰。

[0589] 制备型HPLC法5-60:溶剂A,水;溶剂B,MeCN;流速:8.0mL/min;梯度:0-5min,5%B;5-42min,5%-60%,42-49.5min,60%-80%B;49.5-55min,80%,55-57min,80%-5%B;57-60min,5%。使用紫外检测器在波长214nm和254nm处检测到峰。

[0590] 制备型HPLC法5-60(2):溶剂A,水;溶剂B,MeCN;流速:8.0mL/min;梯度:0-9min,5%B;9-38min,5%-60%,38-48min,60%B;48-54min,60%-5%B;54-60min,5%B。使用紫外检测器在波长214nm和254nm处检测到峰。

[0591] 制备型HPLC法40-60:溶剂A,水;溶剂B,MeCN;流速:8.0mL/min;梯度:0-9min,40%B;9-37min,40%-60%,37-47.5min,60%B;47.5-54min,60%-40%B;54-60min,40%B。使用紫外检测器在波长214nm和254nm处检测到峰。

[0592] 制备型HPLC法20-40:溶剂A,水;溶剂B,MeCN;流速:8.0mL/min;梯度:0-10min,20%B;10-38min,20%-40%,38-47.5min,40%B;47.5-54min,40%-20%B;54-60min,20%。在λ=214nm和254nm处检测。

[0593] 自动快速色谱:

[0594] 使用正相或反相硅胶药筒在Biotage®Selekt 5自动快速色谱系统上执行自动快速纯化。

[0595] 自动快速色谱法

[0596] 自动快速-方法1:药筒=Biotage Sfar C18 D(Duo100Å30μm)12g药筒;溶剂A,水;溶剂B,甲醇;流速:12mL/min;梯度:0-3CV,10%B;3-5CV,10%-60%B;5-9.8CV,60%-74%B;9.8-11.4CV,74%B;11.4-13.6CV,74%-80%B;13.6-15.6CV,80%-100%B;15.6-20.6CV,100%B;20.6-21.6CV,100%-10%B和21.6-24.6CV,10%B。在λ=214nm和254nm处

检测并且$\lambda_{总}$为198-810nm。

[0597] 自动快速-方法2:药筒＝Biotage Sfar C18 D(Duo100Å30μm)12g药筒;溶剂A,水;溶剂B,甲醇;流速:12mL/min;梯度:0-3CV,5%B;3-4CV,5%-30%B;4-14CV,30%-100%B和14-19CV,100%B。在λ＝214nm和254nm处检测并且$\lambda_{总}$为198-810nm。

[0598] 分析型LCMS

[0599] 使用Waters XBridge™ 3.5μm 3x100mm C8柱或Phenomenex Kinetex®2.6μm2.1x75mm C18柱,使用由溶剂A(水)、溶剂B(乙腈)和溶剂C[10%的1%v/v甲酸水溶液(甲酸缓冲液)或10%的1%v/v TFA(TFA缓冲液)]组成的三元溶剂系统,在具有Waters 2996二极管阵列检测器的Waters 2795HPLC上记录LCMS。流速通常为0.4mL/min,且注射体积通常为5-10μL。使用紫外检测器在λ＝214nm、243nm或254nm处检测到峰(除非另有规定)。

[0600] MS-Waters ZQ4000,具有ESI探针、入口流量分流以对MS产生约50μL/min。以如所指示的正或负电喷雾电离模式获取质谱数据。使用如在由Waters Corporation提供的MassLynx软件v4.0中实现的极大熵方法(MaxEnt)解卷积原始数据。在实验细节中报告的数据对应于在解卷积至理论零电荷状态之后的观察值。

[0601] LCMS法

[0602] LCMS法(亲性,TFA/甲酸缓冲液):梯度为:0-1min,5%B;1-10min,5%-60%B;10-11min,60%B;11-13min,60%-5%B;13-15min,5%B。

[0603] LCMS法(疏性,TFA/甲酸缓冲液):梯度为:0-1min,40%B;1-7min,40%-90%B;7-9min,90%B;9-11min,90%-40%B;11-15min,40%B。

[0604] LCMS法40-65,TFA缓冲液:梯度为:0-1min,40%B;1-10min,40%-65%B;10-11min,65%B;11-12min,60%-45%B;12-15min,45%B。

[0605] LCMS法(20-90,15min):梯度为:0-1min,20%B;1-9min,20%-90%B;9-11min,90%B;11-13min,90%-20%B;13-15min,20%B(具有0.1%HCOOH酸)。

[0606] LCMS法5-60,8min,TFA:梯度为0-1min,5%B;1-5min,5%-60%B;5-6min,60%B;6-6.1min,60%-5%B;6.1-8min,5%B。

[0607] LCMS法20-90,8min,TFA:梯度为0-0.5min,5%B;0.5-1min,5%-20%B;1-5min,20%-90%B;5-6min,90%B;6-6.1min,90%-5%B;6.1-8min,5%B。

[0608] LCMS法40-90,8min,TFA:梯度为0-0.5min,5%B;0.5-1min,5%-40%B;1-5min,40%-90%B;5-6min,90%B;6-6.1min,90%-5%B;6.1-8min,5%B。

[0609] LCMS法20-60,8min,TFA:梯度为0-0.5min,5%B;0.5-1min,5%-20%B;1-5min,20%-60%B;5-6min,60%B;6-6.1min,60%-5%B;6.1-8min,5%B。

[0610] LCMS法60-90,8min,TFA:梯度为0-0.5min,5%B;0.5-1min,5%-60%B;1-5min,60%-90%B;5-6min,90%B;6-6.1min,90%-5%B;6.1-8min,5%B。

[0611] LCMS法40-60,8min,TFA:梯度为0-0.5min,5%B;0.5-1min,5%-40%B;1-5min,40%-60%B;5-6min,60%B;6-6.1min,60%-5%B;6.1-8min,5%B。

[0612] LCMS法5-80,8min,TFA:梯度为0-1min,5%B;1-5min,5%-80%B;5-6min,80%B;6-6.1min,80%-5%B;6.1-8min,5%B。

[0613] LCMS法5-60,15min,TFA:梯度为0-1min,5%B;1-10min,5%-80%B;10-11min,80%B;11-13min,80%-5%B,13-15min,5%B,0.1%TFA。

[0614] 分析型HPLC

[0615] 使用Waters XBridge™ C8 3.5μm 3x100mm柱或Phenomenex Kinetex® 2.6μm 2.1x75mm C18柱，在具有2996PDA检测器的Waters 2695分离模块上记录HPLC数据。仪器控制软件为Waters Empower 3。使用的三个流动相是a)1%v/v TFA缓冲液或1%v/v甲酸缓冲液或100mM甲酸铵、b)水和c)乙腈。流速通常为0.4mL/min，且注射体积通常为5-10μL。使用紫外检测器在λ＝214nm、243nm或254nm处检测到峰(除非另有规定)。

[0616] HPLC法

[0617] HPLC法5-80，15min，甲酸酯/TFA：梯度为0-1min，5%B；1-7min，5%-80%B；7-12min，80%B；12-13min，80%-5%B；13-15min，5%B；流速为0.40mL/min。使用紫外检测器在波长214nm、243nm和254nm处检测到峰。

[0618] HPLC法5-80，8min，TFA：梯度为0-0.5min，5%B；0.5-3.5min，5%-80%B；3.5-6min，80%B；6-6.5min，80%-5%B；6.5-8min，5%B；流速为0.40mL/min。使用紫外检测器在波长214nm、243nm和254nm处检测到峰。

[0619] HPLC-亲性法，甲酸/TFA缓冲液，15min：梯度为：0-1min，5%B；1-10min，5%-60%B；10-11min，60%B；11-13min，60%-5%B；13-15min，5%B。

[0620] 分析型UPLC-ToF(超高压液相色谱-飞行时间)

[0621] 利用具有Waters Aquity PDA检测器和Waters LCT Premiere(ToF)质谱仪的Waters Aquity UPLC二元分离模块记录UPLC-ToF数据。使用柱是Phenomenex Kinetex EVO C18 2.6μm 2.1x100mm柱。仪器控制软件为Waters Masslynx 4.1版。使用的两个流动相是a)0.01%v/v TFA在水中和b)0.01%v/v TFA在乙腈中。流速通常为0.2mL/min或0.4mL/min，且注射体积通常为2-5μL。在200nm-400nm范围内检测到峰(除非另有规定)。

[0622] UPLC-ToF法

[0623] 方法1：梯度为15%-35%MeCN/H_2O(1-9min)、35%MeCN/H_2O(9-11min)、35%-15%MeCN/H_2O(11-12min)、15%MeCN/H_2O(12-15min)、0.01%TFA缓冲液)和254nm处的紫外检测。

[0624] 方法2：梯度为20%-80%MeCN/H_2O(1-10min)、80%MeCN/H_2O(10-11min)、80%-20%MeCN/H_2O(11-13min)、20%MeCN/H_2O(13-15min)、0.01%TFA缓冲液)和254nm处的紫外检测。

[0625] 尺寸排阻色谱(SEC)

[0626] 使用甲醇或乙腈作为洗脱液，以约50-60滴/分钟流速在重力下在Sephadex™ LH-20柱上执行尺寸排阻色谱。每个级分大小由400-600滴组成。通过TLC检测[TLC板在aq 5%(w/v)$BaCl_2$中展开，之后在I_2在乙醇中的溶液中展开]或通过HPLC分析含有聚乙二醇化化合物的级分。

[0627] 切向流过滤

[0628] 使用水作为洗脱介质在50cm^2 Pellicon® XL cassette Ultracel®再生纤维素膜上，或者使用水或乙腈作为洗脱介质在具有Ultracel®再生纤维素膜的0.11m^2 Pellicon® 3Cassette上进行切向流过滤。

[0629] 离心超滤

[0630] 使用具有指定分子量截止值(MWCO)Ultracel®再生纤维素膜的Amicon®Ultra离心过滤器，以4000rpm在Eppendorf离心机5810R上或以14000rpm在5415R上进行离心超滤。

[0631] NMR

[0632] NMR谱记录在CD_3OD、$CDCl_3$、D_2O、CD_3CN中，或以其他方式在Bruker(布鲁克道尔顿公司，新南威尔士州，澳大利亚)300UltraShield™ 300MHz NMR仪器上进行说明。

[0633] IR

[0634] 使用16次扫描在Cary 630FTIR安捷伦科技公司金刚石ATR附件上记录IR光谱。

[0635] 一般程序：

[0636] 羧基反应性树枝状体支架的制备先前已描述，特别是参考WO2008/017125。本领域技术人员可以改编这些方法来制备本文概述的各种树枝状体。在以下实施例中，式中的[Lys]是指树枝状体的表面层上的赖氨酸构建单元。

[0637] 一般程序A.Boc脱保护

[0638] 向Boc化合物(1.0当量)在水中的冰冷却的搅拌悬浮液中添加TFA(40-200当量/Boc基团)。在5分钟后，移除冰浴并且将反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物，并且将剩余的水性溶液进一步用水稀释并冻干，产生定量产率的脱保护产物。

[0639] 一般程序B.在树枝状体表面上添加赖氨酸层。

[0640] 在氮气气氛下向TFA树枝状体(1.0当量)在DMF中的搅拌溶液中添加TEA(6.0当量/NH_2)，之后添加DBL-ONp(2.0当量/NH_2)。将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物，并且将所得粗制物质使用标准方法纯化。

[0641] 一般程序C.使用HO-Lys[(α-NHBoc)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]楔形物对树枝状体表面进行聚乙二醇化。

[0642] 在氮气气氛下向TFA树枝状体(1.0当量)在DMF中的搅拌溶液中添加PyBOP(2.0当量/NH_2)和DIPEA(8.0当量/NH_2)。在10分钟后，添加HO-Lys[(α-NHBoc)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)](1.35当量/NH_2)在DMF中的溶液，并且将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物，并且将所得粗制物质使用标准方法纯化。

[0643] 一般程序D.用HO-Lys[(α-NHBoc)(ε-NHFmoc)]楔形物对树枝状体表面进行封端，然后进行Fmoc脱保护

[0644] 步骤1：向HO-Lys[(α-NHBoc)(ε-NHFmoc)](1.5当量/NH_2)和NMM(2.5当量/NH_2)在DMF中的搅拌溶液中添加PyBOP(1.4当量/NH_2)。将随后反应混合物在室温下搅拌15min，然后添加TFA-树枝状体(1.0当量)和NMM(2.5当量/NH_2)在DMF中的溶液。将随后反应混合物在室温下搅拌1小时，然后缓慢添加至冰冷的MeCN中并搅拌15min。将所得固体通过过滤收集并用MeCN(3x)洗涤，然后冻干。

[0645] 步骤2：向Fmoc/Boc树枝状体(1.0当量)在DMF中的溶液中添加哌啶(21当量/Fmoc)。使溶液在室温下搅拌90分钟，然后缓慢添加至冰冷的Et_2O。在15min后，将沉淀的固体通过过滤收集、用Et_2O洗涤、溶解于H_2O中并且冻干。

[0646] 一般程序E.用Glu-vc-PAB-MMAE或DGA-MMAF(OMe)封端树枝状体表面

[0647] 在室温下将叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH_2.TFA)(ε-NH-$COPEG_{570/1100/2000}$)]$_8$化合物10、化合物14或化合物16(1.0当量)溶解于DMF和NMM(5.0当量/NH_2)的混合物中。将该溶液添加至HO-Glu-vc-PAB-MMAE(Levena生物制药)或DGA-MMAF(OMe)(Concortis生物系统)(1.2当量/NH_2)和PyBOP(2.0当量/NH_2)并且在室温下静置。将所得粗制物质通过SEC纯化。

[0648] 一般程序F.将亲和体缀合至MMAE/MMAF树枝状体

[0649] 步骤1:将亲和体蛋白(HER2,亲合体AB,1.0mg/mL PBS)的溶液用TCEP(50mM,39.0当量)处理,并且在室温下将反应混合物在650rpm下摇动2h。将所得溶液通过SEC纯化。

[0650] 步骤2:收集的渗透物用((1R,8S,9s)-双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基)甲基(2-(3-(2,5-二氧-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丙酰胺基)乙基)氨基甲酸酯(Mal-BCN)(化合物117)(20.0当量)在DMSO中的溶液处理。在室温下将随后反应混合物在650rpm下摇动2h。将所得溶液通过SEC纯化。

[0651] 步骤3:将亲合体-BCN溶液用叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHGlu-vc-PAB-MMAE)(ε-NH-COPEG$_{570/1100/2000}$)]$_8$化合物64、化合物65、化合物66(在PBS中240μM)或叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHDGA-MMAF(OMe))(ε-NH-COPEG$_{1100}$)]$_8$化合物67(在PBS中365μM)(1.3当量亲合体-BCN/树枝状体)处理。在室温下将随后反应混合物在650rpm下摇动过夜,并且然后用DBCO琼脂糖(5.0当量/树枝状体)的9.38mM(30%EtOH/水)溶液处理。在室温下将随后悬浮液在1200rpm下摇动过夜。将悬浮液使用SEC纯化。

[0652] 一般程序G.将纳米抗体缀合至MMAE树枝状体

[0653] 步骤1:通过将接头(1mg)溶解于20:80(DMSO/10mM PBS,1mL)中来制备接头(BCN-PEG_2NH-Glu-NHPEG$_{24}$CO-NHPEG$_3$TCO化合物50或DBCO-Glu-NHPEG$_{24}$CO-NHPEG$_3$TCO)化合物51的溶液。

[0654] 步骤2:将TCO-接头溶液(1当量)添加至四嗪官能化树枝状体(1.0当量,8mg/mL)在PBS(1)中的溶液。使反应混合物在室温下静置30min。通过粉红色四嗪颜色的消失来指示反应的完成。通过HPLC监测反应。

[0655] 步骤3:一旦完成反应,就将内容物用PBS稀释(至最终体积为0.5mL)。将BCN/DBCO-MMAE-树枝状体(1.0当量)的一部分添加至纳米抗体-N_3(1.0当量,9.2mg/ml)在Tris缓冲液(20mM,1mL)中的溶液。将所得溶液在室温下静置7h,然后在4℃下静置过夜。通过阴离子交换色谱然后通过SEC进行纳米抗体-树枝状体构建体的纯化。

[0656] 一般程序H.用N_3-$PEG_{570/1100}$-NHS酯对树枝状体表面进行封端然后移除Boc基团

[0657] 步骤1:向BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NH_2)$_{32}$](参考文献1,WO2007/082331A1,J.Controlled Release 2011,152,241-248)和DIPEA(2.0当量/NH_2)在DMF中的搅拌溶液中添加N_3-$PEG_{570/1100}$-NHS酯(1.5当量/NH_2)或N_3-$PEG_{570/1100}$-酸(1.3当量/NH_2)和PyBOP(1.3当量/NH_2)在DMF中的溶液。将随后反应混合物在室温下搅拌15h。向反应混合物中添加去离子水,并且过滤所得溶液(0.45μm acrodisc注射器过滤器)。使用水作为循环介质,通过10kDa再生纤维素Pellicone膜超滤滤液,直到收集20渗滤体积(DV)作为渗透物。收集渗余物,并与管路洗涤液合并并且冻干。

[0658] 步骤2:向叠氮基树枝状体(1.0当量)在DCM中的溶液中添加三氟乙酸(321当量/NHBoc)(TFA/DCM 1:1v/v)。将溶液在室温下搅拌15h,并且真空移除挥发物。

[0659] 一般程序I.将花菁5缀合至树枝状体然后乙酰化

[0660] 步骤1:向BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH_2.TFA)$_{32}$(ε-NH-COPEG$_{570/1100}$$N_3$)$_{32}$]化合物32和化合物33以及DIPEA(4.0当量/NH_2)在DMF中的搅拌溶液中添加花菁5-NHS脂(2.0当量)。将反应混合物在环境温度下搅拌3h。真空移除挥发物,并且将残

余物不经进一步纯化而用于步骤2中。

[0661] 步骤2:向在步骤1中获得的干燥残余物在吡啶(1mL)中的搅拌溶液中加入乙酸酐(2mL)。将反应混合物在环境温度下搅拌15h。真空移除挥发物,并且使用甲醇作为洗脱剂,通过SEC(Sephadex LH-20)纯化残余物。

[0662] 一般程序J.DUPA-BCN与叠氮基树枝状体的点击反应

[0663] 向BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$(ε-NH-COPEG$_{570/1100}$N$_3$)$_{32}$]化合物34和化合物35在乙腈和水(1:1)中的搅拌溶液中添加DUPA-BCN(19)。将反应混合物在环境温度下搅拌15h。将反应混合物冻干,并且将冻干后获得的残余物使用甲醇作为洗脱剂通过SEC(LH-20)纯化,或使用水在10kDa MWCO Pellicone再生纤维素TFF膜上超滤。

[0664] 一般程序K.DOTA树枝状体与纳米抗体-Cys SRS-13的缀合。

[0665] 步骤1:纳米抗体二聚体的还原:向纳米抗体-Cys二聚体的溶液(3.33mg/mL在10mM PBS中,pH 7.4;1当量)中添加aq 0.5M TCEP(10当量)。将反应混合物在37℃孵育2h。由具有10kDa MWCO Ultracel®再生纤维素膜的Amicon®Ultra离心过滤器从反应混合物中去除过量的TCEP,并通过在4000rpm下离心10min进行浓缩。用pH 7.4的PBS缓冲液(x5)通过在4000rpm下离心来洗涤渗余物,然后用pH 7.2的PBS缓冲液(PBS 10mM;EDTA 5mM;用氮气脱气)缓冲交换获得的渗余物。

[0666] 步骤2:纳米抗体-Cys/Me(MAL)-PEG$_{24}$-CONH-PEG$_3$-TCO SRS-14的合成。向还原的纳米抗体(步骤1,3.16mg/mL)在aq PBS pH 7.2的缓冲液(10mM PBS,5mM EDTA)中的溶液中添加Me(MAL)-PEG$_{24}$-CONH-PEG$_3$-TCO SRS-12(2当量;10mg/mL)在去离子水中的溶液。将所得溶液冷在4℃下静置,并且通过UPLC分析监测反应。(UPLC法2)。在18h后,使用具有10kDa MWCO Ultracel®再生纤维素膜的Amicon®Ultra离心过滤器从反应混合物中去除过量的接头SRS-12,并通过在4000rpm下离心10min进行浓缩。通过在4000rpm(x5)下离心,用pH 7.2的aq PBS缓冲液(10mM PBS,5mM EDTA)洗涤渗余物。

[0667] 步骤3:缀合反应:将四嗪取代的树枝状体(10mg/mL;1当量)在去离子水中的溶液在室温下添加至纳米抗体-Cys/Me(MAL)-PEG$_{24}$-CONH-PEG$_3$-TCO SRS-14(1.2当量)的溶液中。在18h后,将纳米抗体-树枝状体构建体通过镍亲和柱色谱、之后通过SEC纯化。

[0668] 一般程序L.Cy5标记的树枝状体-纳米抗体缀合物的量化。

[0669] 通过相对于使用相应的非缀合树枝状体制备的标准曲线内插所测量的样品的650nm吸光度来执行纯化缀合物的定量。在Nanodrop ND-1000分光光度计(Thermo Fisher)上执行吸光度测量。对于每个树枝状体-纳米抗体缀合物,在数字微天平(Mettler Toledo)上称取一定量的干燥未缀合的树枝状体,将其溶解于适当体积的10mM HEPES pH8缓冲液中。通过在10mM HEPES pH8缓冲液中稀释来制备已知浓度在10mg/ml与0.05mg/ml之间的标准溶液,并测量其在650nm处的吸光度。使用Prism 9软件(Graphpad)来执行通过线性回归和插值生成的标准曲线。

[0670] 化合物表1

[0671]

描述	化合物编号
叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PNBoc)$_2$]	1
叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PNH_2.TFA)$_2$]	2
叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[NHBoc]$_4$，G1	3
叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[NH_2.TFA]$_4$，G1	4
叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[(α-NHBoc)(ε-NH-COPEG_{1100})]$_4$，G2	5
叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[(α-NH_2.TFA)(ε-NH-COPEG_{1100})]$_4$，G2	6

[0672]

叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[NHBoc]$_8$，G2	7
叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[NH_2.TFA]$_8$，G2	8
叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)(ε-NHCOPEG1100)]$_8$，G3	9
叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH_2.TFA)(α-NHCOPEG_{1100})]$_8$，G3	10
叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)(ε-NHFmoc)]$_8$，G3	11
叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)(ε-NH_2)]$_8$，G3，	12
叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)(ε-NH-COPEG_{570})]$_8$，G3	13
叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH_2.TFA)(ε-NHCOPEG_{570})]$_8$，G3	14
叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)(ε-NH-COPEG_{2000})]$_8$，G3	15
叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH_2.TFA)(α-NHCOPEG_{2000})]$_8$，G3	16
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[((α-NH-COPEG_{24}NH-COPEG_4(PhTzMe))$_1$(α-NH_2)$_3$)(ε-NH-COPEG_{1000})$_4$]，G2	17
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG_{24}NH-COPEG_4(PhTzMe))$_1$(α-NH_2)$_7$)(ε-NH-COPEG_{412})$_8$]，G3	18
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG_{24}NH-COPEG_4(PhTzMe))$_1$(α-NH_2)$_7$)(ε-NH-COPEG_{1000})$_8$]，G3	19
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG_{24}NH-COPEG_4(PhTzMe))$_1$(α-NH_2)$_{15}$)(ε-NH-COPEG_{1000})$_{16}$]，G4	20
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[((α-NH-COPEG_{24}NH-COPEG_4(PhTzMe))$_1$(α-NH_2)$_{31}$)(ε-NH-COPEG_{1000})$_{32}$]，G5	21

[0673]

BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[(α-NHBoc)$_4$(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)$_4$]，G2	22
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[(α-NH$_2$.HCl)$_4$(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)$_4$]，G2	23
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[((α-Lys(α-NHCy5)(α-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_3$)(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)$_4$]，G2	24
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_2$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_4$]，G2	25
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_6$)(ε-NH-COPEG$_{412}$)$_8$]，G3	26
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_6$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_8$]，G3	27
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{14}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{16}$]，G4	28
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{30}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{32}$]，G5	29
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NH-COPEG$_{570}$N$_3$)$_{32}$]	30
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NH-COPEG$_{1100}$N$_3$)$_{32}$]	31
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH$_2$.TFA)$_{32}$(ε-NH-COPEG$_{570}$N$_3$)$_{32}$]	32
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH$_2$.TFA)$_{32}$(ε-NH-COPEG$_{1100}$N$_3$)$_{32}$]	33
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$(ε-NH-COPEG$_{570}$N$_3$)$_{32}$]	34
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$(ε-NH-COPEG$_{1100}$N$_3$)$_{32}$]	35

[0674]

BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-DUPA(OtBu)$_3$)$_8$]，G3	36
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH$_2$.TFA)$_8$(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-DUPA(OH)$_3$)$_8$]，G3	37
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((a-(NHDOTA))$_1$)(α-NHAc)$_7$)(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-DUPA)$_8$]，G3	38
DUPA(OtBu)$_3$-NHS 酯	39
DUPA(OtBu)$_3$-NHPEG$_{24}$CO$_2$H	40
DUPA(OtBu)$_3$-NHPEG$_{24}$-NHS 脂	41
HO-Lys[(α-NHCOPEG$_{24}$NH-DUPA(OtBu)$_3$)(ε-NHFmoc)]	42
DOTA(OtBu)$_4$-p-BnNH-Glu-OH	43
DOTA(OtBu)$_4$-BnNH-Glu-NHS 脂	44
HO-Lys[(α-NH-COPEG$_{24}$NH-DUPA(OtBu)$_3$)(ε-GluNH-p-Bn-DOTA(OtBu)$_4$)]	45
二叔丁基 ((1-(叔丁-氧基)-5-((2,5-二氧代吡咯烷-1-基) 氧基)-1,5-二氧戊环-2-基)氨基甲酰基)谷氨酸	46
三叔丁基 (18S,22S)-2,2-二甲基-4,15,20-三氧代-3,8,11-三氧杂-5,14,19,21-四氮杂二十四烷-18,22,24-三甲酸	47
(13S,17S)-1-氨基-10,15-二氧代-3,6-二氧杂-9,14,16-三氮杂十一烷-13,17,19-三羧酸	48
BCN-PEG$_2$-Glu-CO-NHPEG$_{24}$CO$_2$H	49
BCN-PEG$_2$-Glu-CO-NHPEG$_{24}$CO-NHPEG$_3$-TCO	50
DBCO-Glu-NHPEG$_{24}$CO-NHPEG$_3$-TCO	51
(MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_7$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]，G3	52
(MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[((α-NHCy5)$_1$(a-NHAc)$_{15}$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_{16}$]，G4	53

	(MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_{32}$]，G5	54
	DFO-PEG$_4$-磺基-DBCO	55
	DFO-DBCO 的合成	56
	TCO-PEG$_8$-二溴马来酰亚胺的合成	57
	HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NHDFO)]楔形物的合成	58
	HO-Lys[(α-NHCy5) (ε-NH$_2$)]	59
	HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NHDFO)]	60
	(17S,21S)-1-((1R,8S,9S)-双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基)-3,14,19-二氧代-2,7,10-二氧杂-4,13,18,20-四氮杂二十烷-17,21,23-三羧酸	61
	叠氮基-PEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHGlu-vc-PAB-MMAE)$_8$(ε-NH-COPEG$_{570}$)$_8$]，G3	64
[0675]	*叠氮基-PEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHGlu-vc-PAB-MMAE)$_8$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]，G3*	65
	叠氮基-PEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHGlu-vc-PAB-MMAE)$_8$(ε-NH-COPEG$_{2000}$)$_8$]，G3	66
	叠氮基-PEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHDGA-MMAF(OMe))$_8$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]，G3	67
	BHA[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))$_1$(α-NH$_2$)$_7$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]，G3	69
	BHA[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_2$-BCN)$_1$(α-NH$_2$)$_7$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]，G3	70
	(MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHGlu-VC-PAB-MMAE)$_7$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]，G3	71
	(MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[^{3}H-Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHGlu-VC-PAB-MMAE)$_8$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]	72

[0676]

(MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NHDFO)$_2$(α-NHGlu-VC-PAB-MMAE)$_6$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]	73
BHA[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))$_1$(α-NHDFO)$_2$(α-NHGlu-VC-PAB-MMAE)$_5$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]	74
亲和体-BCN/N$_3$PEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHGlu-vc-PAB-MMAE)$_8$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]，G3	77
亲和体-BCN/N$_3$PEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHGlu-vc-PAB-MMAE)$_8$(ε-NH-COPEG$_{2000}$)$_8$]，G3	78
亲和体-BCN/N$_3$PEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHDGA-MMAF(OMe)$_8$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]，G3	81
纳米抗体#-N$_3$-DBCO-磺基-PEG$_3$-DFO	82
纳米抗体#-N$_3$/DBCO-Glu-NHPEG$_{24}$CONHPEG$_3$-TCO/(MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NHDFO)$_2$(α-NHGlu-VC-PAB-MMAE)$_6$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]	83
BHA[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体#)$_1$(α-NHDFO)$_2$(α-NHGlu-VC-PAB-MMAE)$_5$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_8$]，G3	84
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体#)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_2$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_4$]，G2	85
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体#)$_2$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$))$_1$(ε-NHCOPEG$_{1000}$)$_4$]，G2	86

[0677]

BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体#)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_6$)(ε-NH-COPEG$_{412}$)$_8$]，G3	87
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体#)$_2$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_5$)(ε-NH-COPEG$_{412}$)$_8$]，G3	88
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体#)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_6$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_8$]，G3	89
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体#)$_2$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_5$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_8$]，G3	90
BHA[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体#)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{14}$(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{16}$]，G4	91
BHA[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体#)$_2$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{13}$(ε-NHCOPEG$_{1000}$)$_{16}$]，G4	92
BHA[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体#)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{30}$(ε-NH-COP	93

	EG$_{1000}$)$_{32}$]，G5	
	BHA[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体#)$_2$[α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)]$_1$(α-NH$_2$)$_{29}$(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{32}$]，G5	94
	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_3$)(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))$_2$)(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体#)$_2$]，G2	95
	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_3$)(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))$_1$(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体#)$_3$]，G2	96
[0678]	*BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_3$)(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体#)$_4$]，G2*	97
	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)/TCO-PEG$_8$-纳米抗体#)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)$_1$(ε-NHDFO)$_1$)$_1$(α-NH$_2$)$_2$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_4$]，G2	98
	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[((α-NH-COPEG$_{24}$-NH-COPEG$_4$(PhTzMe)/TCO-PEG$_3$-纳米抗体#)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)$_1$(ε-NHDFO)$_1$)$_1$(α-NH$_2$)$_2$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_4$]，G2	99
	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$)(ε-NH-COPEG$_{570}$N$_3$)$_{12}$(ε-NH-COPEG$_{570}$N$_3$/BCN-DUPA)$_{20}$]	100
	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$)((ε-NH-COPEG$_{570}$N$_3$)$_{20}$(ε-NH-COPEG$_{570}$N$_3$/BCN-DUPA)$_{12}$)]	101

	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$N$_3$)$_{25}$(ε-NH-COPEG$_{1100}$N$_3$/BCN-DUPA)$_7$]	102
	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$N$_3$)$_{22}$(ε-NH-COPEG$_{1100}$N$_3$/BCN-DUPA)$_{10}$]	103
	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[((α-Cy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$(ε-NH-COPEG$_{1100}$N$_3$)$_{19}$(ε-NH-COPEG$_{1100}$N3/BCN-DUPA)$_{13}$]	104
	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-(NHDOTA))$_1$(α-NH$_2$)$_7$)(ε-NH-COPEG$_{24}$-N$_3$/BCN-DUPA)$_8$]，G3	105
	(MeTzPh)PEG$_{24}$CO-[N(PNBoc)$_2$]	106
	(MeTzPh)PEG$_{24}$CO-[N(PNH$_2$.HCl)$_2$]	107
	(MeTzPh)PEG$_{24}$CO-[N(PNH$_2$.HCl)$_2$]	108
	(MeTzPh)PEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$[Lys]$_2$[NHBoc]$_4$，G1	109
[0679]	*(MeTzPh)PEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$[Lys]$_2$[NH$_2$.HCl]$_4$，G1*	110
	(MeTzPh)PEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[NHBoc]$_8$，G2	111
	(MeTzPh)PEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[NH$_2$.HCl]$_8$，G2	112
	(MeTzPh)PEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(NH$_2$.HCl)(PEG$_{1100}$)]$_8$ G3	113
	纳米抗体#/DBCO-DFO	114
	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NH-COPEG$_{24}$-NHFmoc)$_8$]，G3	115
	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NH-COPEG$_{24}$-NH$_2$)$_8$]，G3	116
	((1R,8S,9s)-双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基)甲基(2-(3-(2,5-二氧-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丙酰胺基)乙基)氨基甲酸酯	117

[0680]

纳米抗体（普通的） GGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYENLYFQ**G** EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAM SWVRQVPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGR FTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWR DAGTTWFEKSGSAGQGTQVTVSS	118
(MeTzPh)-PEG$_4$-PEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$ [NH$_2$.HCl]$_{16}$，G3	119
(MeTzPh)-PEG$_4$-PEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$ [Lys]$_{16}$[(α-NH$_2$.HCl)(ε-NH-CO PEG$_{1100}$)]$_{16}$，G4	120
(MeTzPh)-PEG$_4$-PEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$ [Lys]$_{16}$[NH$_2$.TFA]$_{32}$，G4	121
(MeTzPh)-PEG$_4$-PEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$ [Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH$_2$.TFA)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)]$_{32}$，G5	122
*纳米抗体 *-N$_3$/DBCO-NHCO-PEG$_{12}$TCO/(MeTzPh)PEG$_4$CO-NH PEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHGlu-VC-PAB-MMAE)$_7$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]*	123
*纳米抗体 *-N$_3$/DBCO-NHCO-PEG$_{12}$TCO/(MeTzPh)PEG$_4$CO-NH PEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_7$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]*	124
*纳米抗体 *-N$_3$/DBCO-NHCO-PEG$_{12}$TCO/((MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[((α-NHCy5)$_1$(a-NHAc)$_{15}$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_{16}$*	125
*纳米抗体 *-N$_3$/DBCO-NHCO-PEG$_{12}$TCO/(MeTzPh)PEG$_4$CO-NH PEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[((α-NHCy5)$_1$(a -NHAc)$_{31}$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_{32}$]*	126
*纳米抗体 *-N$_3$/DBCO-NHCO-PEG$_{12}$TCO/(MeTzPh)PEG$_4$CO-NH PEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[^{3}H-Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHGlu-VC-PAB-MMAE)$_8$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]*	127

[0681]

BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_6$)(ε-NH-COPEG$_{412}$)$_8$]，G3	128
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO))$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_2$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_4$]，G2	129
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_6$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_8$]，G3	130
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{14}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{16}$]，G4	131
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{30}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{32}$]，G5	132
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)$_1$(α-NHCy5)$_1$(α-NHDOTA))$_{10}$(α-NH$_2$)$_4$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{16}$]，G4	SRS-1
TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体#	SRS-2a
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体#)$_1$(α-NHCy5)$_1$(α-NHDOTA))$_{10}$(α-NH$_2$)$_4$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{16}$]，G4	SRS-2-304
N$_3$-PEG$_7$-NHCO-Lys[(α-NHBoc)(ε-NHFmoc)]	SRS-3
N$_3$-PEG$_7$-NHCO-Lys[(α-NH$_2$.HCl)(ε-NHFmoc)]	SRS-3a
N$_3$-PEG$_7$-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NHFmoc)]	SRS-4

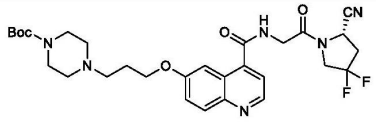
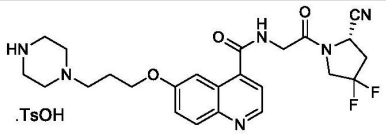
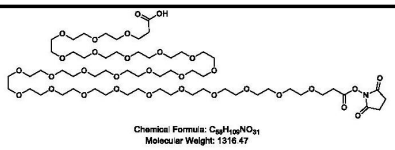
N_3-PEG_7-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH_2)]	SRS-4a
N_3-PEG_4-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NHDOTA)]	SRS-5
曲妥珠单抗-去糖基化	KY-1
曲妥珠单抗-{CONH-PEG_4-磺基-DBCO}$_2$	KY-2
曲妥珠单抗-{CONH-PEG_4-磺基-DBCO/N_3-647 (AFDye)}$_2$	KY-2a
曲妥珠单抗-{CONH-PEG_4-磺基-DBCO/N_3-PEG_7-NHCO[Lys(α-NHCy5)(ε-NHDOTA)]}$_2$	KY-3-310
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH_2.TFA)$_{32}$ (ε-NHCOPEG$_{2000}$)$_{32}$]	RH-1
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH_2)$_{30}$(α-NHDOTA)$_2$(ε-NHCOPEG$_{2000}$)$_{32}$]	RH-2
BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHAc)$_{30}$(α-NHDOTA)$_2$(ε-NHCOPEG$_{2000}$)$_{32}$]	RH-3-160

[0682]

[0683] 纳米抗体#＝纳米抗体-N3-C末端标签

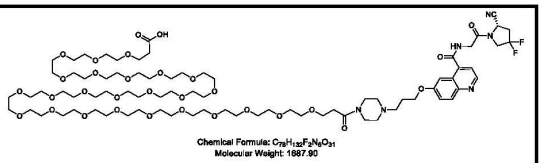
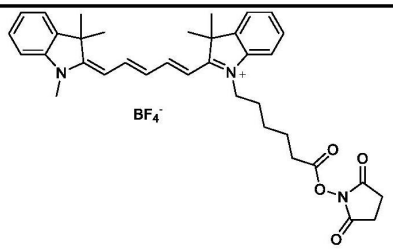
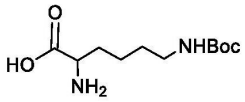
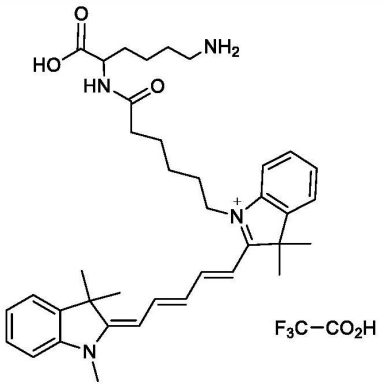
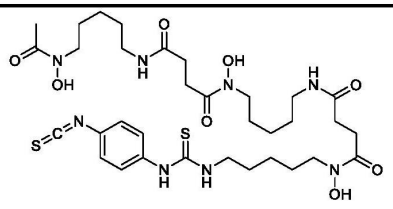
[0684] 纳米抗体*＝N末端标签-纳米抗体-N3

[0685] 化合物表2

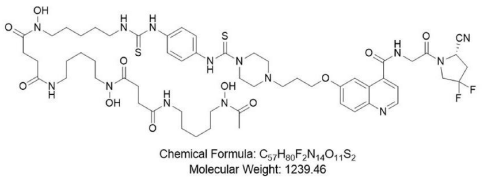
化合物编号	化合物描述	结构或简写命名法
RHa-1	FAPI-04-NBoc	 Chemical Formula: $C_{29}H_{36}F_2N_6O_5$ Molecular Weight: 586.63
RHa-2	FAPI-04-NH	 Chemical Formula: $C_{24}H_{28}F_2N_6O_3$ Molecular Weight: 486.51 Chemical Formula: $C_{31}H_{36}F_2N_6O_6S$ Molecular Weight: 658.72
RHa-3	酸-$dPEG_{1100}$-NHS 脂	 Chemical Formula: $C_{98}H_{192}NO_{51}$ Molecular Weight: 1316.47

[0686]

[0687]

RHa-4	FAPI-04-NC(O)-dPEG$_{1100}$-CO$_2$H	 $C_{78}H_{132}F_2N_6O_{31}$ 分子量：1687.90
RHa-5	Cy5-NHS 脂	 Chemical Formula: $C_{36}H_{42}BF_4N_3O_4$ Molecular Weight: 667.54
RHa-6	HO-Lys[(α-NH$_2$)(ε-NHBoc)]	 Chemical Formula: $C_{11}H_{22}N_2O_4$ Molecular Weight: 246.30
RHa-7	HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH$_2$.TFA)]	 Chemical Formula: $C_{38}H_{51}N_4O_3^+$ Molecular Weight: 611.84 Chemical Formula: $C_{40}H_{52}F_3N_4O_5^+$ Molecular Weight: 725.86
RHa-8	*p*-SCN-Ph-DFO	 Chemical Formula: $C_{33}H_{52}N_8O_8S_2$ Molecular Weight: 752.94

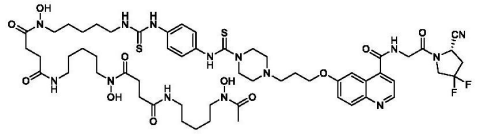
[0688]

RHa-9	HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)]	
RHa-10	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NH$_2$)$_{32}$]	**G5** ε-(32 NH$_2$) α-(32 NHBoc)
RHa-11	mPEG$_{1000}$-CO$_2$H	市售的
RHa-12	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_{31}$]	**G5** ε-(1 PEG$_{1100}$-FAPI:31 MeO) α-(32 NHBoc)
RHa-13	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_{10}$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_{19}$(ε-NH$_2$)$_3$]	**G5** ε-(10 PEG$_{1100}$-FAPI: 19 MeO: 3 NH$_2$) α-(32 NHBoc) MW = 49,214Da
RHa-14	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_4$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$)$_{28}$]	**G5** ε-(4 PEG$_{1100}$-FAPI: 28 MeO) α-(32 NHBoc)
RHa-15	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NH$_2$)$_8$]	**G5** ε-(8 NH$_2$) α-(8 NHBoc)
RHa-16	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_5$(ε-NH$_2$)$_2$]	**G3** ε-(1 PEG$_{1100}$-FAPI: 5 MeO: 2 NH$_2$) α-(8 NHBoc)
RHa-17	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_3$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_5$]	**G3** ε-(3 PEG$_{1100}$-FAPI: 5 MeO) α-(8 NHBoc)
RHa-18	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α	**G3**

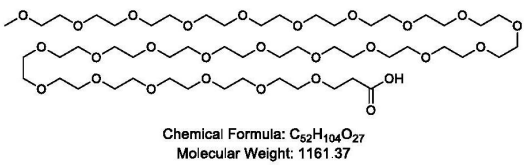
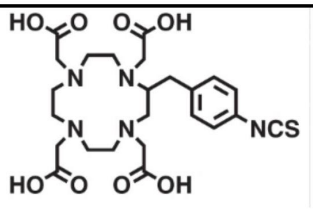
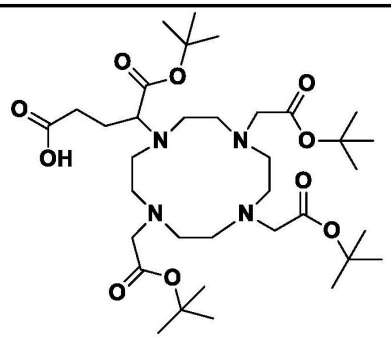
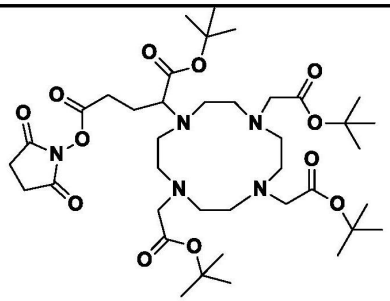
[0689]

	-NHBoc)$_8$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_{7.4}$(ε-NH$_2$)$_{0.6}$]	ε-(7.4 PEG$_{1100}$-FAPI: 0.6 MeO) α-(8 NHBoc)
RHa-19	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH$_2$.TFA)$_{32}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_{10}$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_{19}$(ε-NH$_2$)$_3$]	**G5** ε-(10 PEG$_{1100}$-FAPI: 19 MeO: 3 NH$_2$) α-(32 NH$_2$.TFA)
RHa-20	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH$_2$.TFA)$_{32}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_{31}$]	**G5** ε-(1 PEG$_{1100}$-FAPI:31 MeO) α-(32 NH$_2$.TFA)
RHa-21 *中间体*	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH$_2$.TFA)$_{32}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_4$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$)$_{28}$]	**G5** ε-(4 PEG$_{1100}$-FAPI:28 MeO) α-(32 NH$_2$.TFA)
RHa-22 *中间体*	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH$_2$.TFA)$_8$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_5$(ε-NH$_2$)$_2$]	**G3** ε-(1 PEG$_{1100}$-FAPI: 5 MeO: 2 NH$_2$) α-(8 NH$_2$.TFA)
RHa-23 *中间体*	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH$_2$.TFA)$_8$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_3$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_5$]	**G3** ε-(3 PEG$_{1100}$-FAPI: 5 MeO) α-(8 NH$_2$.TFA)
RHa-24 *中间体*	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH$_2$.TFA)$_8$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_{7.4}$(ε-NH$_2$)$_{0.6}$]	**G3** ε-(7.4 PEG$_{1100}$-FAPI: 0.6 MeO) α-(8 NH$_2$.TFA)
RHa-25	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)])$_{1.5}$(α-NH$_2$)$_{30.5}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_{10}$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_{19}$(ε-NH$_2$)$_3$]	**G5** ε-(10 PEG$_{1100}$-FAPI: 19 MeO: 3 NH$_2$) α-(1.5 Cy5/DFO: 30.5 NH$_2$) MW=48,033Da

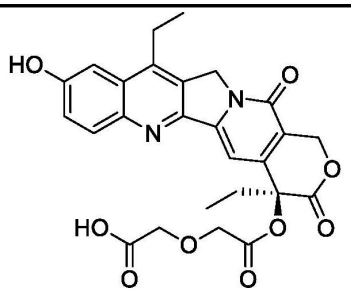
[0690]

RHa-26	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)])$_{1.5}$(α-NH_2)$_{30.5}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_{31}$]	**G5** ε-(1 PEG$_{1100}$-FAPI:31 MeO) α-(1.5 Cy5/DFO: 30.5 NH_2) MW=46,467Da
RHa-27	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)])$_{1.5}$(α-NH_2)$_{30.5}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_4$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$)$_{28}$]	**G5** ε-(4 PEG$_{1100}$-FAPI:28 MeO) α-(1.5 Cy5/DFO: 30.5 NH_2) MW=49,143Da
RHa-28	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)])$_{1.5}$(α-NH_2)$_{6.5}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_5$(ε-NH_2)$_2$]	**G3** ε-(1 PEG$_{1100}$-FAPI: 5 MeO: 2 NH_2) α-(1.5 Cy5/DFO: 6.5 NH_2) MW=8,768Da
RHa-29	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)])$_{1.5}$(α-NH_2)$_{6.5}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_3$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_5$]	**G3** ε-(3 PEG$_{1100}$-FAPI: 5 MeO) α-(1.5 Cy5/DFO: 6.5 NH_2) MW=12,108Da
RHa-30	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)])$_{1.5}$(α-NH_2)$_{6.5}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_{7.4}$(ε-NH_2)$_{0.6}$]	**G3** ε-(7.4 PEG$_{1100}$-FAPI: 0.6 MeO) α-(1.5 Cy5/DFO: 6.5 NH_2) MW=13,916Da
RHa-31	FAPI-04-DFO	 Chemical Formula: $C_{57}H_{80}F_2N_{14}O_{11}S_2$ Molecular Weight: 1239.46

[0691]

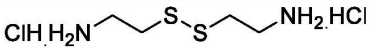
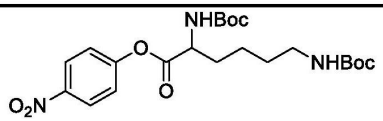
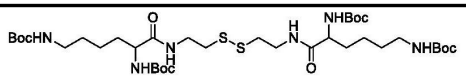
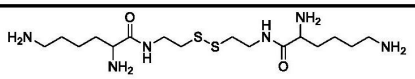
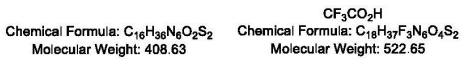
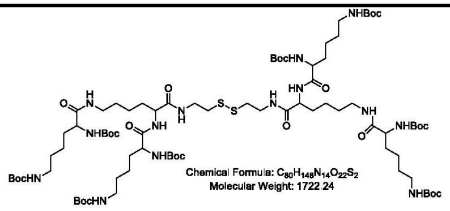
RHa-32	dPEG$_{1000}$-CO$_2$H	
RHa-33	*p*-SCN-Bn-DOTA	
RHa-34	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH-C(S)-NH-Bn-DOTA)$_4$(α-NH$_2$)$_4$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_3$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_5$]	**G3** ε-(3 PEG$_{1100}$-FAPI: 5 MeO) α-(4 DOTA: 4 NH$_2$) MW=12,127Da
RHa-35	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH-C(S)-NH-Bn-DOTA)$_8$(α-NH$_2$)$_{24}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_{10}$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_{19}$(ε-NH$_2$)$_3$]	**G5** ε-(10 FAPI: 19 MeO: 3 NH$_2$) α-(8 DOTA: 24 NH$_2$) MW=50,427Da
RL-19	DOTAGA-tetra-(*叔*丁酯)	
RL-20	DOTA(OtBu)$_4$GA-NHS 酯	

[0692]

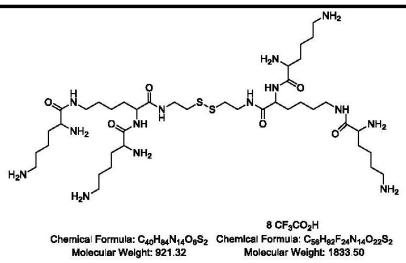
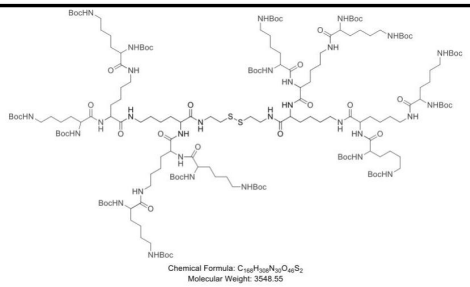
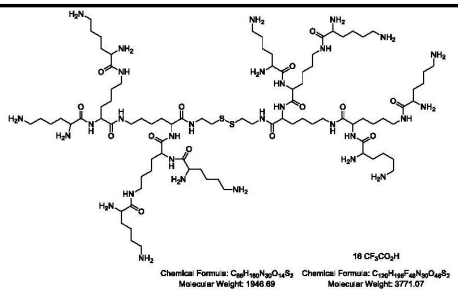
RL-21	DOTA(OtBu)$_4$GA-NHCO-PEG$_{24}$-COOH	
RL-22	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCy5)$_1$(α-NHCO-PEG$_{24}$-NH-DUPA)$_{15}$(α-NHCO-PEG$_{24}$NH-GADOTA)$_4$(α-NH$_2$.TFA)$_{11}$(ε-NHCOPEG$_{1000}$)$_{32}$]	**G5** ε-(32 mPEG$_{1000}$) α-(1 Cy5: 15 DUPA: 4 DOTA: 11 NH$_2$.TFA)
RL-23	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCy5)$_1$(α-NHCO-PEG$_{24}$NH-DUPA)$_5$(α-NHDGA-SN38)$_{16}$(α-NH$_2$.TFA)$_{10}$(ε-NHCOPEG$_{1000}$)$_{32}$]	**G5** ε-(32 mPEG$_{1000}$) α-(1 Cy5: 5 PEG$_{24}$-DUPA: 16 DGA-SN38: 10 NH$_2$.TFA) MW = 62,559Da
RL-24	DGA-(C-20) SN38	
RL-25	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCy5)$_1$(α-NHCO-PEG$_{24}$NH-DUPA)$_8$(α-NHDOTA)$_{14}$(α-NH$_2$.TFA)$_9$(ε-NHCOPEG$_{1000}$)$_{32}$]	**G5** ε-(32 mPEG$_{1000}$) α-(1 Cy5: 8 PEG$_{24}$-DUPA: 14 DOTA: 9 NH$_2$.TFA)
RL-26	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α/ε-NHCy5)$_1$(α/ε-NHCO-PEG$_{24}$NH-DUPA)$_5$(α/ε-NH-DOTAGA)$_7$(α/ε-NH$_2$.TFA)$_3$]	**G3** α/ε-(8 mPEG$_{1000}$) α/ε -(1 Cy5: 5 PEG$_{24}$-DUPA: 14 DOTA: 3 NH$_2$.TFA)

[0693] 化合物表3

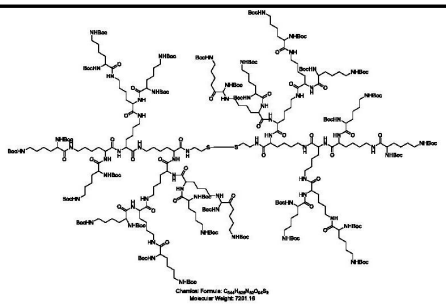
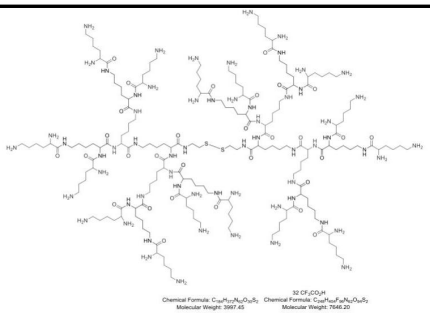
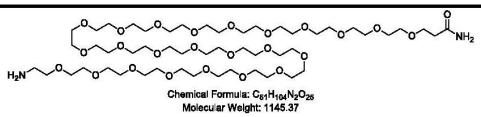
[0694]

化合物编号	化合物描述	结构
RL-1	盐酸胱胺	 Chemical Formula: $C_4H_{14}Cl_2N_2S_2$ Molecular Weight: 225.20 $C_4H_{14}Cl_2N_2S_2$ 分子量：225.20
RL-2	Boc-Lys(Boc)-ONp	 Chemical Formula: $C_{22}H_{33}N_3O_8$ Molecular Weight: 467.51 $C_{22}H_{33}N_3O_8$ 分子量：467.51
RL-3	[[(ε-NHBoc)(α-NHBoc)][Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$	 Chemical Formula: $C_{36}H_{68}N_6O_{10}S_2$ Molecular Weight: 809.09 $C_{36}H_{68}N_6O_{10}S_2$ 分子量：809.09
RL-4	[[(ε-NH_2.TFA)(α-NH_2.TFA)][Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$	  Chemical Formula: $C_{16}H_{36}N_6O_2S_2$ Molecular Weight: 408.63 Chemical Formula: $C_{18}H_{37}F_3N_6O_4S_2$ Molecular Weight: 522.65 $C_{16}H_{36}N_6O_2S_2$ 分子量：408.63 $C_{18}H_{37}F_3N_6O_4S_2$ 分子量：522.65
RL-5	[[(ε-NHBoc)$_2$(α-NHBoc)$_2$][Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$	 Chemical Formula: $C_{80}H_{148}N_{14}O_{22}S_2$ Molecular Weight: 1722.24 $C_{80}H_{148}N_{14}O_{22}S_2$

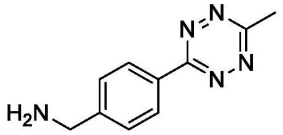
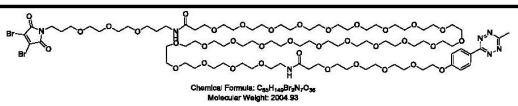
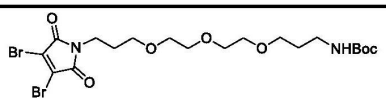
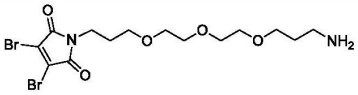
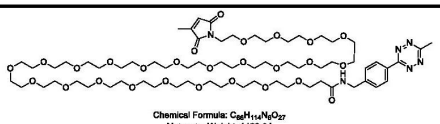
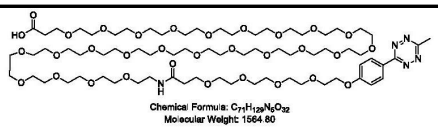
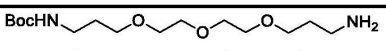
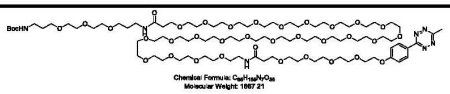
[0695]

		分子量：1722.24
RL-6	[[(ε-NH_2.TFA)$_2$(α-NH_2.TFA)$_2$][Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$	 $C_{40}H_{84}N_{14}O_6S_2$ 分子量：921.32 $C_{56}H_{92}F_{24}N_{14}O_{22}S_2$ 分子量：1833.50
RL-7	[[(ε-NHBoc)$_4$(α-NHBoc)$_4$][Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$	 $C_{168}H_{308}N_{30}O_{46}S_2$ 分子量：3548.55
RL-8	[[(ε-NH_2.TFA)$_4$(α-NH_2.TFA)$_4$][Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$	 $C_{88}H_{180}N_{30}O_{14}S_2$ 分子量：1946.69 $C_{120}H_{196}F_{48}N_{30}O_{46}S_2$ 分子量：3771.07

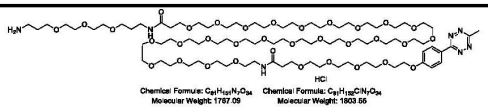
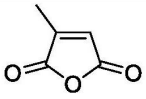
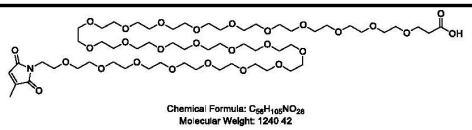
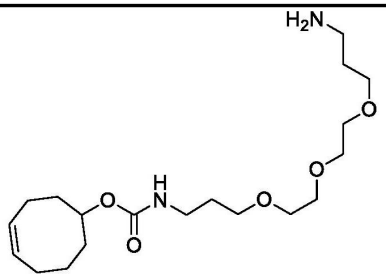
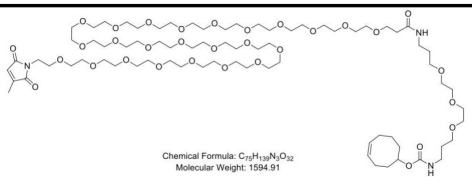
[0696]

RL-9	[[(ε-NHBoc)$_8$(α-NHBoc)$_8$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$	 $C_{344}H_{628}N_{62}O_{94}S_2$ 分子量：7201.16
RL-10	[[(ε-NH_2.TFA)$_8$(α-NH_2.TFA)$_8$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$	 $C_{184}H_{372}N_{62}O_{30}S_2$ 分子量：3997.45 $C_{248}H_{404}F_{96}N_{62}O_{94}S_2$ 分子量：7646.20
RL-11	氨基-PEG_{24}-酸	 Chemical Formula: $C_{51}H_{104}N_2O_{25}$ Molecular Weight: 1145.37 $C_{51}H_{104}N_2O_{25}$ 分子量：1145.37
RL-12	1*H*-吡咯-1-羧酸，3,4-二溴-2,5-二氢-2,5-二氧-，乙酯	 Chemical Formula: $C_7H_5Br_2NO_4$ Molecular Weight: 326.93

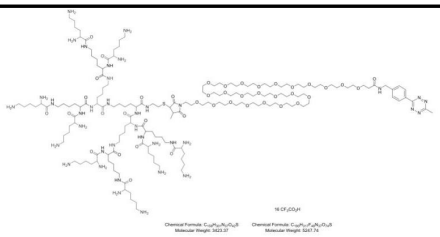
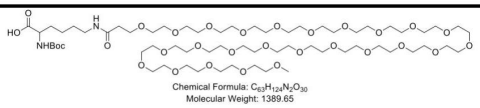
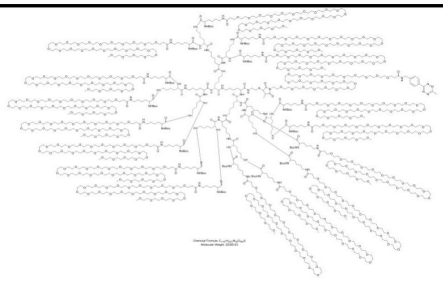
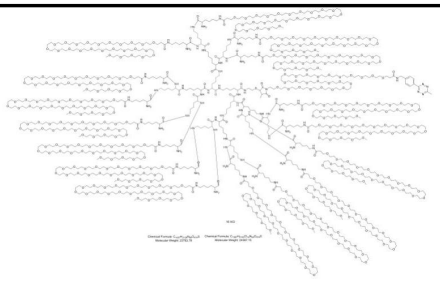
[0697]

RL-13	4-(6-甲基-1,2,4,5-四嗪-3-基)苯甲胺	 Chemical Formula: $C_{10}H_{11}N_5$ Molecular Weight: 201.23
RL-15	Br_2(MAL)-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)	 $C_{85}H_{149}Br_2N_7O_{36}$ 分子量：2004.93
RL-16	Br_2(MAL)-PEG_3-NHBoc	 Chemical Formula: $C_{19}H_{30}Br_2N_2O_7$ Molecular Weight: 558.26
RL-17	Br_2(MAL)-PEG_3-NH_2.TFA	 Chemical Formula: $C_{14}H_{22}Br_2N_2O_5$ Molecular Weight: 458.14 CF3COOH Chemical Formula: $C_{16}H_{23}Br_2F_3N_2O_7$ Molecular Weight: 572.17
RL-18	Me(MAL)-PEG_{24}-CONH-Bn-Tz(Me)	
SRS-5a	HO_2C-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)	 $C_{71}H_{129}N_5O_{32}$ 分子量：1564.80
SRS-6	BocHN-PEG_3-NH_2	 Chemical Formula: $C_{15}H_{32}N_2O_5$ Molecular Weight: 320.42 $C_{15}H_{32}N_2O_5$ 分子量：320.42
SRS-7	BocHN-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)	

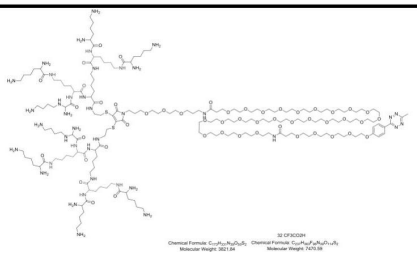
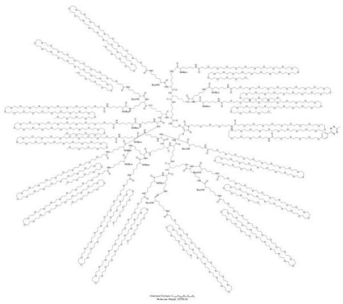
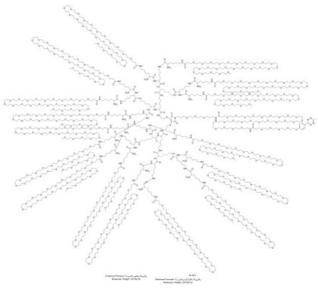
[0698]

		$C_{86}H_{159}N_7O_{36}$ 分子量：1867.21
SRS-8	H_2N-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)	 $C_{81}H_{151}N_7O_{34}$ 分子量：1767.09 $C_{81}H_{152}ClN_7O_{34}$ 分子量：1803.55
SRS-9	柠檬酸酐	 Chemical Formula: $C_5H_4O_3$ Molecular Weight: 112.08
SRS-10	Me(MAL)-PEG_{24}-CO_2H	 $C_{56}H_{105}NO_{28}$ 分子量：1240.42
SRS-11	NH_2-PEG_3-TCO	 Chemical Formula: $C_{19}H_{36}N_2O_5$ Molecular Weight: 372.50
SRS-12	Me(MAL)-PEG_{24}-CONH-PEG_3-TCO	 $C_{75}H_{139}N_3O_{32}$ 分子量：1594.91

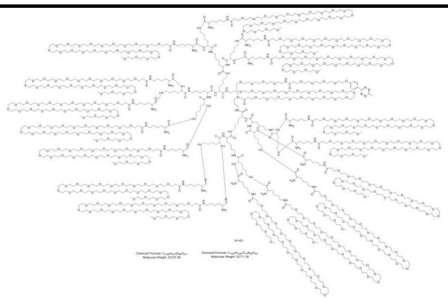
[0699]

RP-1	[(ε-NH_2.TFA)$_8$(α-NH_2.TFA)$_8$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-Me(MAL)-PEG_{24}-CONH-Bn-Tz(Me)	 $C_{158}H_{301}N_{37}O_{42}S$ 分子量：3423.37 $C_{190}H_{317}F_{48}N_{37}O_{74}S$ 分子量：5247.74
RP-2	HO-Lys(Boc)(PEG_{1100})	 Chemical Formula: $C_{63}H_{124}N_2O_{30}$ Molecular Weight: 1389.65 $C_{63}H_{124}N_2O_{30}$ 分子量：1389.65
RP-3	[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_{16}$(α-NHBoc)$_{16}$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S/Me(MAL)-PEG_{24}-CONH-Bn-Tz(Me)	 $C_{1167}H_{2257}N_{69}O_{506}S$ 分子量：25385.63
RP-4	[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_{16}$(α-NH_2.HCl)$_{16}$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S/Me(MAL)-PEG_{24}-CONH-Bn-Tz(Me)	 $C_{1087}H_{2129}N_{69}O_{474}S$ 分子量：23783.78 $C_{1087}H_{2145}Cl_{16}N_{69}O_{474}S$

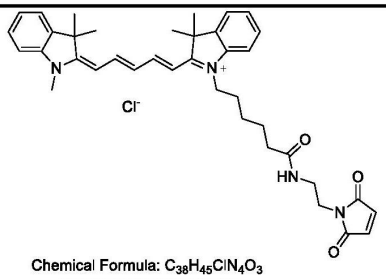
[0700]

		分子量：24367.15
RP-5	[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_{16}$(α-NHCy5)$_1$(α-NHDOTA)$_8$(α-NH_2)$_7$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S/Me(MAL)-PEG_{24}-CONH-Bn-Tz(Me)	分子量：26665
SRS-1-Mal	[[(ε-NH_2)$_4$(α-NH_2)$_4$][Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$MAL-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)	 $C_{173}H_{331}N_{39}O_{50}S_2$ 分子量：3821.84 $C_{237}H_{363}F_{96}N_{39}O_{114}S_2$ 分子量：7470.59
SRS-2	[[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_8$(α-NHBoc)$_8$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$MAL-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)	 $C_{1181}H_{2283}N_{71}O_{514}S_2$ 分子量：25768.06
SRS-3-Mal	[[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_8$(α-NH_2.HCl)$_8$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$MAL-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)	 $C_{1102}H_{2159}N_{71}O_{482}S_2$

[0701]

		分子量：24182.25 化学式：$C_{1102}H_{2175}Cl_{16}N_{71}O_{482}S_2$ 分子量：24765.63
SRS-4-Mal	[[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_8$(α-NHDOTA)$_{4.75}$(α-NHCy5)$_{0.5}$(α-NH_2)$_{2.75}$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$MAL-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)	
HH-1	[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_{16}$(α-NH_2.HCl)$_{16}$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-(PN)NCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)	 $C_{1058}H_{2076}N_{68}O_{461}$ 分子量：23127.98 $C_{1058}H_{2092}Cl_{16}N_{68}O_{461}$ 分子量：23711.36
HH-2	[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_{16}$(α-DOTA)$_7$(α-NHCy5)$_1$(α-NH_2)$_8$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-(PN)NCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)	分子量：27420
SRS-13	纳米抗体-Cys	Her-2 靶向纳米抗体（Cys 缀合位点） MEVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQVTVSSLGTLCTPSRENLYFQGHHHHHH MW= 16209.87（计算）

[0702]

SRS-14	纳米抗体-Cys/Me(MAL)-PEG_{24}-CONH-PEG_3-TCO	纳米抗体-接头中间体 MW= 17,803（计算）
SRS-15	[[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_8$(α-NHDOTA)$_{4.75}$(α-NHCy5)$_{0.5}$(α-NH_2)$_{2.75}$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$MAL-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)/TCO-NHCO-PEG_{24}-(MAL)Me/Cys-纳米抗体	
SRS-16	[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_{16}$(α-NHCy5)$_1$(α-NHDOTA)$_8$(α-NH_2)$_7$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-(Me)MAL-PEG_{24}-CONH-Bn-Tz(Me)/TCO-NHCO-PEG_{24}-(MAL)Me/Cys-纳米抗体	
SRS-17	[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_{16}$(α-DOTA)$_7$(α-NHCy5)$_1$(α-NH_2)$_8$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-(PN)NCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)/TCO-NHCO-PEG_{24}-(MAL)Me/Cys-纳米抗体	
SRS-18	MAL-Cy5	
SRS-19	Nb-Cys/MAL-Cy5	用 Cy5 标记的纳米抗体
SRS-20	[[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_8$(α-NHDOTA)$_{4.75}$(α-NHCy5)$_{0.5}$(α-NH_2)$_{2.75}$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$MAL-P	

[0703]

	EG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)/TCO-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-Glu-DBCO/N_3-纳米抗体	
SRS-20a	[[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_8$(α-NHDOTA)$_{4.75}$(α-NHCy5)$_{0.5}$(α-NH_2)$_{2.75}$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$MAL-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)/TCO-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-Glu-DBCO	
SRS-21	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG_{24}NH-COPEG_4(PhTzMe)/TCO-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-(MAL)Me/Cys-纳米抗体)$_1$(α-NHCy5)$_1$(α-NHDOTA))$_{10}$(α-NH_2)$_4$)(ε-NH-COPEG_{1000})$_{16}$	
SRS 21a	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG_{24}NH-COPEG_4(PhTzMe)/TCO-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-(MAL)Me)$_1$(α-NHCy5)$_1$(α-NHDOTA)$_{10}$(α-NH_2)$_4$)(ε-NH-COPEG_{1000})$_{16}$，	
SRS-22	[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_{16}$(α-DOTA)$_7$(α-NHCy5)$_1$(α-NH_2)$_8$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-(PN)NCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)/TCO-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-Glu-DBCO/N_3-纳米抗体	
SRS-22a	[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_{16}$(α-DOTA)$_7$(α-NHCy5)$_1$(α-NH_2)$_8$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-(PN)NCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-	

[0704]

	(PhTzMe)/TCO-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-Glu-DBCO	

[0705] 实施例1：中间体和对照的合成

[0706] 1a.双官能接头和赖氨酸楔形物的合成

[0707] 1a.1BCN-PEG_2-Glu-CO-NHP$EG_{24}CO_2H$,化合物49

[0708] 向NH_2-PEG_{24}-COOH(93.7mg,0.082mmol)在水/THF混合物(1:1,4mL)中的溶液中添加碳酸氢钠(15.2mg,0.181mmol)。将混合物在室温下搅拌5min,然后添加BCN-PEG_2-Glu-NHS酯(50mg,0.093mmol)在THF(2mL)中的溶液。将所得反应混合物在室温下搅拌15h。然后减压移除挥发物,并且将MeCN(2.5mL)添加至所得水性悬浮液。将该溶液通过制备性HPLC((制备型HPLC法5%-60%TFA)R_t=32.2-34.3min)纯化,在冻干^{1}H NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):0.85-0.92(m,2H);1.25-1.35(m,1H);1.43-1.57(m,2H);1.73-1.83(m,2H);2.09-2.25(m,9H);2.39(t,J=9.0Hz,2H);3.21-3.31(m,6H);3.35-3.85(m,106H);4.10(d,J=9.0Hz,2H)后产生呈白色固体的化合物49(42mg,33%)。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)R_t=10.28min;ESI MS(+ve)m/z 1566.7$[M]^+$。

[0709] 1a.2BCN-PEG_2-Glu-CO-NHPEG_{24}CO-NHPEG_3-TCO,化合物50

[0710] 向BCN-PEG_2-Glu-CO-NHPEG_{24}-COOH化合物49(10.0mg,0.006mmol)在DMF(3.0mL)中的搅拌溶液中添加PyBOP(3.64mg,0.007mmol)、NMM(1.31μL,0.012mmol),之后添加TCO-PEG_3-NH_2(点击化学工具,2.41mg,0.007mmol)。将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。然后减压移除溶剂,并且将所得残余物溶解于MeCN(2mL)中,然后通过0.45μm过滤器过滤。将收集的滤液通过制备性HPLC((制备型HPLC法30%-50%TFA)R_t=40-42min)纯化,并且减压浓缩含产物级分以移除MeCN。将剩余的水性溶液冻干过夜,产生呈白色固体的化合物50(4.7mg,39%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):0.89-1.05(m,2H),1.26-1.48(m,2H),1.52-1.79(m,5H),1.83-2.06(m,6H),2.11-2.39(m,12H),2.48(t,2H,J=6.0Hz),3.35-3.44(m,6H),3.47-3.79(m,102H),3.83-3.92(m,1H),4.16(d,2H,J=6.0Hz),4.26-4.41(m,1H),4.58(bs,10H),5.39-5.74(m,3H)。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)R_t=11.0min。ESI MS(+ve)1894.0$[M]^+$;$C_{90}H_{165}N_5O_{36}[M]^+$的计算m/z:1894.2。

[0711] 1a.3DBCO-Glu-NHPEG_{24}CO-NHPEG_3-TCO,化合物51

[0712] 向DBCO-Glu-NHPEG_{24}COOTFP(50.0mg,0.031mmol)在DMF(3mL)中的搅拌溶液中添加TCO-PEG_3-NH_2(点击化学工具,10.7mg,0.031mmol),之后添加NMM(4.08μL,0.037mmol)。将随后反应混合物在室温下搅拌3h,然后减压浓缩。将所得残余物溶解于MeCN(2mL)中,通过0.45μm过滤器过滤并将滤液通过制备性HPLC((制备型HPLC法40%-70%TFA)Rt=27-29min)纯化。减压浓缩含产物级分以移除MeCN,并且将剩余的水性溶液冻干过夜,产生呈粘性无色液体的化合物51(25.0mg,42%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.31-1.62(m,4H),1.60-1.83(m,6H),1.92-2.16(m,4H),2.25(t,2H,J=6.0Hz),2.91-3.03(m,4H),3.12-3.58(m,78H),3.59-3.69(m,1H),4.01-4.18(m,1H),4.92(d,2H,J=15H),5.15-5.49(m,3H),6.95-7.59(m,8H)。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)R_t=7.0min。ESI MS(+ve)1775.0.0$[M]^+$;$C_{88}H_{148}N_4O_{32}[M]^+$的计算m/z:1775.12。

[0713] 1a.4N_3-PEG_7-NHCO-Lys[(α-NHBoc)(ε-NHFmoc)],化合物SRS-3

[0714] 向N_3-PEG_7-NH_2(QuantaBiodesign,514mg,1.30mmol)、HO-Lys[(α-NHBoc)(ε-NHFmoc)](488mg,1.04mmol)和NMM(286μL,2.60mmol)在DMF(5mL)中的搅拌溶液中添加PyBOP(811mg,1.56mmol),并且将反应混合物在室温下搅拌18h。减压移除挥发物,将残余物通过硅胶柱色谱纯化,用二氯甲烷:MeOH(从100:0到90:10v/v的梯度洗脱)洗脱,产生呈粘

性无色油状物的SRS-3(410mg,47%)。LCMS(LCMS法20-90,15min):R_t=9.35min,ESI MS(+ve)845[M+H]$^+$;$C_{42}H_{64}N_6O_{12}$[M+H]$^+$的计算m/z=845;^{1}H NMR(300MHz,MeOD)δ(ppm):1.17-1.94(m,16H),3.12(t,2H,J=6.0Hz),3.33-3.44(m,4H),3.45-3.74(m,28H),3.89-4.65(m,1H),4.12(t,1H,J=9.0Hz),4.38(d,2H,J=6.0Hz),7.33(t,2H,J=9.0Hz),7.41(t,2H,J=9.0Hz),7.66(d,2H,J=6.0Hz),7.81(d,2H,J=9.0Hz)。

[0715] 1a.5N_3-PEG_7-NHCO-Lys[(α-NH_2.HCl)(ε-NHFmoc)]化合物SRS-3a

[0716] 将N_3-PEG_7-NHCO-Lys[(α-NHBoc)(ε-NHFmoc)](200mg,0.236mmol)化合物SRS-3溶解于1.5M HCl的甲醇(4mL)中,并将反应混合物在室温下搅拌3h。减压移除挥发物,产生呈白色固体的N_3-PEG_7-NHCO-Lys[(α-NH_2.HCl)(ε-NHFmoc)]SRS-3a(180mg,98%)。LCMS(LCMS法20-90,15min):R_t=6.13min,ESI MS(+ve)745[M+H]$^+$;$C_{37}H_{56}N_6O_{10}$[M+H]$^+$的计算m/z=745。

[0717] 1a.6N_3-PEG_7-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NHFmoc)]化合物SRS-4

[0718] 向N_3-PEG_7-NHCO-Lys[(α-NH_2.HCl)(ε-NHFmoc)]SRS-3a(58mg,0.074mmol)和NMM(16μL,0.148mmol)在DMF(5mL)中的搅拌溶液中添加Cy5 NHS脂(50mg,0.074mmol)。将反应混合物在室温下搅拌20h,之后减压移除挥发物。将残余物溶解于MQ水:MeCN(2mL,1:1v/v)中,过滤(0.45μm acrodisc过滤器)并使用制备性HPLC纯化,产生呈蓝色固体的化合物SRS-4(30mg,33%)。HPLC:C18柱,其中梯度为30%MeCN/H_2O(1-10min)、30%-90%MeCN/H_2O(10-35min)、90%MeCN/H_2O(35-48min)、90%-30%MeCN/H_2O(48-55min)、0.05%甲酸缓冲液)以及在254nm处的紫外检测。R_t=35-40min。LCMS(LCMS法20-90,15min)R_t=8.20min,ESI MS(+ve)1210[M+H]$^+$;$C_{69}H_{93}N_8O_{11}$[M+H]$^+$的计算m/z=1210。

[0719] 1a.7N_3-PEG_7-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH_2)]化合物SRS-4a

[0720] 将N_3-PEG_7-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NHFmoc)]化合物SRS-4(30mg,0.024mmol)溶解于DMF:哌啶(3.0mL,4:1v/v)中,并将反应混合物在室温下搅拌。在18h后,减压移除挥发物,并且将残余物通过制备性HPLC纯化,产生呈蓝色固体的N_3-PEG_7-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH_2)]SRS-4a(18.0mg,75%)。HPLC:C18柱,其中梯度为20%MeCN/H_2O(1-10min)、20%-60%MeCN/H_2O(10-35min)、60%MeCN/H_2O(35-48min)、60%-20%MeCN/H_2O(48-55min)、0.05%甲酸缓冲液)以及在214nm和254nm处的紫外检测。R_t=24-28min。LCMS(LCMS法20-90,15min)R_t=4.91min,ESI MS(+ve)988[M+H]$^+$;$C_{54}H_{83}N_8O_9$[M+H]$^+$的计算m/z=988。

[0721] 1a.8N_3-PEG_7-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NHDOTA)]化合物SRS-5

[0722] 向胺SRS-4a(18.0mg,0.018mmol)在DMF(4mL)中的搅拌溶液中添加NMM(4μL,0.036mmol)和p-SCN-Bn-DOTA(13mg,0.018mmol)在DMSO(500μL)中的溶液。搅拌18h后,减压移除挥发物,并且将残余物通过制备性HPLC纯化,产生呈蓝色固体的SRS-5(9.0mg,32%)。HPLC:C18柱,其中梯度为40%MeCN/H_2O(1-10min)、40%-80%MeCN/H_2O(10-35min)、80%MeCN/H_2O(35-48min)、80%-40%MeCN/H_2O(48-55min)、0.05%甲酸缓冲液)以及在214nm和254nm处的紫外检测。R_t=26-28min。LCMS(LCMS法20-90,15min)R_t=3.95min,ESI MS(+ve)1538[M+H]$^+$;$C_{78}H_{116}N_{13}O_{17}S$[M+H]$^+$的计算m/z=1538。

[0723] 1a.9DFO-PEG_4-磺基-DBCO,化合物55

[0724] 向去铁胺-SCN(22.3mg,29.7mmol)和磺基-PEG_3-DBCO(20.0mg,2.97mmol)在DMF(2mL)中的悬浮液中添加NMM(6.5μL,59.1μmol)。超声处理不能提供均匀的溶液。另外的NMM(10μL,91.0μmol)和DIPEA(10μL,57.4μmol)也不会进一步溶解反应混合物。添加DMSO

(2mL),并且将内容物超声处理1min,这最终提供透明的溶液。将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。减压浓缩内容物并将MeCN(12mL)添加至残留溶液,然后过滤(0.45μm acrodisc)内容物。将滤液通过制备性HPLC(1000μL注射体积,5%-80%MeCN历经60min,0.1%甲酸,R_t=33.5-34.5min)纯化。合并产物级分,减压移除MeCN,并且将剩余的水性溶液冻干,产生12.7mg(30%)呈白色固体的标题产物。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)R_t=4.70min;ESI MS(+ve)1428$[M]^+$;$C_{65}H_{94}N_{12}O_{18}S_3[M]^+$的计算m/z=1427.7。^{1}H NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):7.71-6.98(m,12H),5.11-4.95(m,1H),3.90-3.01(m,36H),2.87-2.30(m,11H),2.21-1.90(m,4H),1.80-1.16(m,17H)。

[0725] 1a.10DFO-DBCO化合物56的合成

[0726] 向去铁胺甲磺酸酯(Macrocyclics,200.0mg,0.304mmol)在DMSO(1mL)中的搅拌溶液中添加NMM(100.0μL,0.912mmol)和DBCO-NHS脂(130.7mg,304mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜,并且然后通过将氮气流在溶液上吹2h来浓缩。将残余物溶解于MQ水:乙腈(3mL,1:1v/v)混合物中,并且然后进行过滤(0.45μm acrodisc注射器过滤器)。将滤液通过制备性HPLC(在MQ水+0.1%甲酸中的30-40%MeCN(60min,R_t 42-44min))纯化,产生呈无色粘性液体的产物(195.0mg,73%)。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)R_t=5.64min;ESI MS(+ve)876$[M]^+$;$C_{46}H_{65}N_7O_{10}[M]^+$的计算m/z=876,$[M+Fe]^+$=929;^{1}H NMR(300MHz,DMSO-d6)δ(ppm):9.96-9.46(bs,2H),7.92-7.24(m,9H),5.09(d,1H,J=15.0Hz),3.66(d,1H,J=12.0Hz),3.56-3.43(m,10H),3.13-2.87(m,4H),2.69-2.58(m,4H),2.40-2.27(m,3H),2.13(s,6H),2.02(s,2H),1.94-1.75(m,2H),1.68-1.09(m,17H)。

[0727] 1a.11TCO-PEG_8-二溴马来酰亚胺化合物57的合成

[0728] 向乙基3,4-二溴-2,5-二氧-2H-吡咯-1(5H)-羧酸盐(25.0mg,0.077mmol)在THF(2.0mL)中的搅拌溶液中添加TCO-PEG_8-NH_2(Broadpharm;44.0mg,0.077mmol),并且将反应混合物在室温下搅拌过夜。减压移除溶剂,并且将残余物通过硅胶柱色谱纯化,用二氯甲烷:MeOH(从100:0到97:3v/v的梯度洗脱)洗脱,之后通过制备性HPLC纯化,用50%至90%MeCN在MQ中洗脱历经60min,产生呈无色油状物的化合物57(8.0mg,13%)。^{1}H NMR(300MHz,MeOD)5.79-5.42(m,2H),4.77-4.62(m,1H),3.80(t,2H,J=6.0Hz),3.70-3.57(m,29H),3.53(t,2H,J=6.0Hz),3.27(t,2H,J=6.0Hz),2.48-2.30(m,1H),2.26-1.46(m,9H)。

[0729] 1a.12HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NHDFO)]楔形物,化合物58的合成

[0730] 向HO-Lys[(α-NH_2.TFA)(ε-NHFmoc)](57.0mg,0.118mmol)在DMF(5mL)中的搅拌溶液中添加NMM(52μL,0.472mmol)和Cy5-NHS酯(Lumiprobes,40.0mg,0.059mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜,之后真空移除挥发物。将残余物溶解于MeCN:MQ水(3mL,1:1v/v)中,并且过滤(0.45μm acrodisc注射器过滤器)溶液。将滤液通过制备性HPLC(在MQ水+0.1%甲酸中的20%-90%MeCN(60min,R_t=39.0-42.0min))纯化,产生呈蓝色固体的化合物58(33mg(67%))。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)R_t=10.54min;ESI MS(+ve)833$[M]^+$;$C_{53}H_{61}N_4O_5[M]^+$的计算m/z=833.46,^{1}H NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):8.21(t,2H,J=15.0Hz),7.79(d,2H,J=6.0Hz),7.63(d,2H,J=6.0Hz),7.49-7.24(m,10H),6.61(t,1H,J=12.0Hz),6.29-6.22(m,2H),4.49-4.26(m,2H),.18(t,1H,J=6.0Hz),4.07(t,2H,J=6.0Hz),3.68-3.60(m,2H),3.60(s,3H),3.12(t,2H,J=6.0Hz),2.28(t,2H,J=6.0Hz),1.94-1.61(m,6H),1.71(s,12H),1.62-1.19(m,6H)。

[0731] 1a.13HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH_2)],化合物59

[0732] 向化合物58(36mg;0.043mmol)在DMF(4mL)中的搅拌溶液中添加哌啶(1.5mL),并且将反应混合物在室温下搅拌1h。减压移除溶剂,并且将残余物通过制备性HPLC(在MQ水+0.1%甲酸中的20%-90%MeCN(60min,R_t=32.0-33.0min))纯化,产生呈蓝色固体的产物化合物59(12mg(44%))。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)R_t=7.65min;ESI MS(+ve)611$[M]^+$;$C_{38}H_{51}N_4O_3[M]^+$的计算m/z=611。

[0733] 1a.14HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NHDFO)],化合物60

[0734] 向化合物59(20.0mg,0.032mmol)在DMSO(5mL)中的搅拌溶液中添加DIPEA(32μL,0.224mmol),之后添加p-SCN-去铁胺(Macrocyclics,24.0mg,0.032mmol)。将反应混合物在室温下搅拌4h,并且然后通过将氮气流在溶液上吹若干小时来浓缩。然后将获得的残余物通过制备性HPLC(在MQ水+0.1%TFA中的30%-60%MeCN(60min,R_t 39-42min))纯化,产生呈蓝色固体的产物化合物60(15mg(34%))。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)R_t=5.93min;ESI MS(+ve)1364$[M]^+$;$C_{71}H_{103}N_{12}O_{11}S_2[M]^+$的计算m/z=1364,^{1}H NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):8.25(t,2H,J=12.0Hz),7.56-7.18(m,9H),6.65(t,1H,J=12.0Hz),6.37-6.15(m,2H),4.43-4.32(m,1H),4.11(t,2H,J=6.0Hz),3.70-3.46(m,8H),3.22-3.10(m,3H),2.86-2.69(m,3H),2.56-2.38(m,3H),2.31(t,2H,J=6.0Hz),2.11(s,2H),1.96-1.18(m,32H)。

[0735] 1a.15DUPA-BCN接头(17S,21S)-1-((1R,8S,9S)-双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基)-3,14,19-三氧代-2,7,10-三氧杂-4,13,18,20-四氮杂二十烷-17,21,23-三羧酸,化合物61的合成

[0736] 向3.3(13S,17S)-1-氨基-10,15-二氧代-3,6-二氧杂-9,14,16-三氮杂壬烷-13,17,19-三羧酸化合物48(149mg,0.26mmol)和三乙胺(184μL,1.32mmol)在四氢呋喃和水(1:1,4mL)的混合物中的搅拌溶液中分批添加((1R,8S,9s)-双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基)甲基(2,5-二氧吡咯烷-1-基)碳酸二氯甲烷(BCN-NHS脂)(84mg,0.29mmol)。将反应混合物在环境温度下搅拌2.5,并且真空移除挥发物。将残余物通过制备性HPLC(Gilson HPLC系统;柱:X-Bridge BEH300 Prep C18 5um OBD 30x150mM;溶剂:A=去离子水;B=具有0.05%甲酸的MeCN;流速:8mL/min)纯化,在冻干后产生呈白色固体的标题产物,化合物61(120mg,73%)。^{1}H NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):0.77-0.90(m,2H);1.13-1.36(m,1H);1.45-1.49(m,2H);1.79-1.93(m,2H);2.01-2.19(m,9H);2.24-2.31(m,2H);2.39-2.44(m,2H);3.20-3.30(m,4H);3.48-3.52(m,4H);3.56-3.62(m,4H);4.06-4.19(m,4H)。LCMS(亲性,甲酸缓冲液)R_t=8.92min。ESI MS(+ve)627$[M+1]^+$;$C_{28}H_{42}N_4O_{12}[M]^+$的计算m/z:626.28。

[0737] 1a.16BocHN-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)SRS-7

[0738] 向HO_2C-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)SRS-5a(500mg,0.32mmol)、BocNH-PEG_3-NH_2 SRS-6(1-2.5mg,0.32mmol)和NMM(53μL,0.48mmol)在室温下在DMF(12.0mL)中的搅拌溶液中添加PyBOP(166mg,0.32mmol)。将反应混合物搅拌16h,并且真空移除挥发物。将残余物溶解于MeCN(3.0mL)中,过滤(0.45μm滤盘)并通过制备性HPLC(制备型HPLC法20-60,R_t=34-47min)纯化,产生呈红色固体的BocHN-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)SRS-7(550mg,92%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD):δ(ppm)1.78(q,J=6.7Hz,2H),1.95(q,J=6.2Hz,2H),2.46(t,J=6.2Hz,4H),3.02(s,3H),3.13(t,J=6.8Hz,2H),3.26-3.43(m,4H),3.50-3.58(m,4H),3.58-3.78(m,128H),3.89-3.95(m,2H),4.25-4.32(m,2H),7.20(d,J=9.0Hz,

2H)和8.52(d,J＝9.0Hz,2H)。LCMS(LCMS法20-60,8min,TFA)R_t＝6.12min。ESI MS(+ve)1885$[M+H_2O]^+$;$C_{86}H_{159}N_7O_{36}[M+H_2O]^+$的计算m/z＝1885。

[0739] 1a.17HCl.H_2N-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)SRS-8

[0740] 在室温向BocHN-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)SRS-7(450mg mg,0.241mmol)添加在甲醇中的2.0M HCl(4.0mL)。将所得溶液搅拌18h,并且真空移除挥发物。将残余物溶解于水(4.0mL)中并且冻干,产生呈粉红色固体的HCl.H_2N-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)SRS-8(420mg(97%))。LCMS(LCMS法5-60,8min,TFA):Rt＝5.72min。ESI MS(+ve)1769$[MH]^+$;$C_{81}H_{151}N_7O_{34}[MH]^+$的计算m/z＝1769。

[0741] 1a.18Me(MAL)-PEG_{24}-CO_2H SRS-10

[0742] 向氨基-PEG_{24}-酸RL-11(510mg,0.44mmol)在冰醋酸(15mL)中的搅拌溶液中添加柠康酸酐(50μL,0.53mmol)。然后将反应混合物在120℃下搅拌加热2h,并且然后冷却至室温,之后添加另外的柠康酸酐等分试样(50μL,0.53mmol)。将反应混合物在120℃下加热2h并且然后冷却至室温。在16h后,将反应混合物真空浓缩,并且将残留的棕色油状物通过制备性HPLC(制备型HPLC法5-60,Rt＝35-37.5min)纯化,产生呈浅棕色固体的Me(MAL)-PEG_{24}-CO_2H SRS-10(236mg,43%)。^1H NMR(300MHz,CD_3OD):δ(ppm)2.07(d,J＝1.8Hz,3H),2.56(t,J＝6.3Hz,2H),3.48-3.72(m,98H),3.75(t,J＝6.3Hz,2H)和6.46(q,J＝1.8Hz,1H)。LCMS(LCMS法60-90,8min,TFA):R_t＝5.54min。ESI MS(+ve)1258$[M+H_2O]^+$;$C_{56}H_{107}NO_{29}[M+H_2O]$的计算m/z＝1258。

[0743] 1a.19Me(MAL)-PEG_{24}-CONH-PEG_3-TCO SRS-12

[0744] 向Me(MAL)-PEG_{24}-CO_2H SRS-10(130mg,0.105mmol)在室温下在DMF(2.0mL)中的搅拌溶液中添加NH_2-PEG_3-TCO SRS-11(47mg,0.126mmol)、PyBOP(65mg,0.126mmol)和NMM(23μL,0.126mmol)。在搅拌3.5h后,真空移除挥发物,并将残余物溶解于MeCN:水(1:2v/v,3mL)中,并且通过制备性HPLC(制备型HPLC法5-60(2),R_t＝41-43min)纯化,产生呈无色油状物的Me(MAL)-PEG_{24}-CONH-PEG_3-TCO SRS-12(77mg,46%)。^1H NMR(300MHz,CD_3OD):δ(ppm)1.53-2.40(m,15H),2.07(d,J＝1.85Hz,3H),2.45(t,J＝6.2Hz,2H),3.13-3.21(m,2H),3.28(t,J＝6.8Hz,2H),3.47-3.81(m,118H),5.42-5.84(m,2H)和6.46(m,1H)。LCMS(LCMS法5-60,8min,TFA)R_t＝6.51min。ESI MS(+ve)1612$[M+H_2O]^+$;$C_{75}H_{141}N_3O_{33}[M+H_2O]^+$的计算m/z＝1612。

[0745] 1a.20Br_2(MAL)-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)RL-15

[0746] 向HCl.H_2N-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)SRS-8(100mg,0.057mmol)在室温下在THF(2.0mL)中的溶液中添加TEA(15μL,0.068mmol)和1H-吡咯-1-羧酸,3,4-二溴-2,5-二氢-2,5-二氧代-,乙酯RL-12(22mg,0.068mmol)。将反应混合物搅拌18h,并且然后真空浓缩。将残余物溶解于MeCN:水(2.0mL,1:1v/v)并且通过制备性HPLC(制备型HPLC法40-60,R_t＝25-27min)纯化,产生Br_2(MAL)-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)RL-15(42mg,37%)。

[0747] 可替代地,向Br_2(MAL)-PEG_3-NH_2.TFA RL-17(202mg,0.35mmol)在室温下在DMF(3.0mL)中的溶液中添加HO_2C-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)SRS-5a(461mg,0.30mmol)、PyBOP(184mg,0.35mmol)和NMM(85μL,0.78mmol)。将反应混合物搅拌18h,并且然后真空浓缩。将残余物溶解于MeCN:水(1:1v/v,4.0mL)并且通过制备性HPLC[制备型HPLC法20-60(2)]纯

化，产生呈粉红色固体的Br_2(MAL)-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)RL-15(37mg，6％)。^{1}H NMR(300MHz，CD_3OD)：δ(ppm)1.70-1.82(m,2H)，1.82-1.93(m,2H)，2.45(m,4H)，3.02(s,3H)，3.20-3.43(m,4H)，3.47-3.89(m,132H)，3.91(m,2H)，4.28(m,2H)，7.20(d,J＝9.0Hz,2H)和8.50(d,J＝9.0Hz,2H)。LCMS(LCMS法40-60,8min,TFA)R_t＝5.12min。ESI MS(+ve)2024$[M+H_3O]^+$；$C_{85}H_{149}Br_2N_7O_{36}[M+H_3O]^+$的计算m/z＝2024。

[0748] 1a.21Br_2(MAL)-PEG_3-NHBoc RL-16

[0749] 向1H-吡咯-1-羧酸，3,4-二溴-2,5-二氢-2,5-二氧代-，乙酯RL-12(212mg，0.66mmol)在室温下在二氯甲烷(2.0mL)中的溶液中添加BocHN-PEG_3-NH_2SRS-6的溶液。将反应混合物搅拌2d，之后真空移除挥发物。将残余物通过硅胶柱色谱纯化，用在二氯甲烷中的甲醇洗脱([梯度洗脱；％甲醇(v/v)]：0％至3.3％至6.7％)，产生呈灰白色固体的Br_2(MAL)-PEG_3-NHBoc RL-16(220mg,59％)。^{1}H NMR(300MHz，CD_3CN)：δ(ppm)1.41(s,9H)，1.67(m,2H)，1.82(m,2H)，3.10(q,J＝6.7Hz,2H)，3.42-4.58(m,12H)和3.64(t,J＝7.1Hz,2H)。LCMS(LCMS法60-90,8min,TFA)R_t＝3.99min。ESI MS(+ve)459$[MH-Boc]^+$；$C_{14}H_{23}Br_2N_2O_5[MH-Boc]^+$的计算m/z＝459。

[0750] 1a.22Br_2(MAL)-PEG_3-NH_2.TFA RL-17

[0751] 在室温下向Br_2(MAL)-PEG_3-NHBoc RL-16(220mg,0.40mmol)在二氯甲烷(6.0mL)中的溶液中添加TFA(609μL,7.79mmol)。将反应混合物搅拌2h并且真空浓缩。将残余物溶解于去离子水(约2mL)中，并且将所得溶液冻干，产生呈灰白色固体的Br_2(MAL)-PEG_3-NH_2.TFA RL-17(202mg,88％)。^{1}H NMR(300MHz，CD_3OD)：δ(ppm)1.84-1.98(m,4H)，3.12(t,J＝6.4Hz,2H)和3.49-3.74(m,14H)。LCMS(LCMS法60-90,8min,TFA)R_t＝3.19min。ESI MS(+ve)459$[MH]^+$；$C_{14}H_{23}Br_2N_2O_5[MH]^+$的计算m/z＝459。

[0752] 1a.23Me(MAL)-PEG_{24}-CONH-Bn-Tz(Me)RL-18

[0753] 向Me(MAL)-PEG_{24}-CO_2H SRS-10(50mg,0.04mmol)和4-(6-甲基-1,2,4,5-四嗪-3-基)苯甲胺RL-13(11mg,0.06mmol)在室温下在DMF(2.0mL)中的溶液中添加PyBOP(24mg，0.06mmol)和NMM(6μL,0.06mmol)。将反应物搅拌16h，之后添加在DMF(2mL)中的另外4-(6-甲基-1,2,4,5-四嗪-3-基)苯甲胺RL-13(5mg,0.02mmol)，然后添加PyBOP(12mg,0.02mol)和NMM(6μL,0.06mmol)。在2h后，真空浓缩反应混合物，并且将残余物通过制备性HPLC(制备型HPLC法20-40，R_t＝45-48min)纯化，产生呈粉红色固体的Me(MAL)-PEG_{24}-CONH-Bn-Tz(Me)RL-18(24mg,42％)。^{1}H NMR(300MHz，CD_3OD)：δ(ppm)2.06(d,J＝1.9Hz,3H)，2.56(t,J＝6.0Hz,2H)，3.05(s,3H)，3.58-3.84(m,96H)，4.55(s,2H)，6.46(m,1H)，7.59(d,J＝8.6Hz,2H)和8.53(d,J＝8.6Hz,2H)。LCMS(LCMS法60-90,8min,TFA)R_t＝6.07min。ESI MS(+ve)1424$[M]^+$；$C_{66}H_{114}N_6O_{27}[M]^+$的计算m/z＝1424。

[0754] 1b.树枝状体中间体的合成

[0755] 1b.1叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PNBoc)$_2$]，化合物1

[0756] 在N_2气氛下向叠氮基-PEG_{24}-酸(Quanta Biodesign,2.00g,1.71mmol)和PyBOP(1.33g,2.56mmol)在DMF(20mL)中的搅拌溶液中添加NMM(563μL,5.12mmol)。在10min后，添加N(PNBoc)$_2$(622mg,1.88mmol)在DMF(5mL)中的溶液，并且将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物，并且将所得油状物溶解于MeCN中并且通过制备性HPLC(27％-50％-70％MeCN，R_t 47-50min)纯化，产生淡黄色油状固体(1.37g,54％)。^{1}H NMR(300MHz,

CD_3OD)δ(ppm):1.44(m,18H);1.65-1.84(m,4H);2.63(t,J=6.3Hz,2H);3.05(dt,J=6.9和14.7Hz,4H);3.36-3.41(m,6H);3.60-3.78(m,98H)。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)R_t=9.32min。ESI MS(+ve)1486.3$[M]^+$;$C_{67}H_{132}N_6O_{29}[M]^+$的计算m/z:1486.8。

[0757] 1b.2叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PNH_2.TFA)$_2$],化合物2

[0758] 根据一般程序A使用叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PNBoc)$_2$],化合物1(1.37g,922μmol)制备。获得呈淡黄色油状物的冻干产物,化合物2(1.67g,119%)。^{1}H NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):1.88-2.06(m,4H);2.74(t,J=6.0Hz,2H);2.96(t,J=7.2Hz,2H);3.04(表观t,J=7.5Hz,2H);3.42-3.52(m,6H);3.67-3.95(m,93H)。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)R_t=8.47min,ESI MS(+ve)1286.0$[M]^+$;$C_{57}H_{116}N_6O_{25}[M]^+$的计算m/z=1286.6。

[0759] 1b.3叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[NHBoc]$_4$,G1,化合物3

[0760] 根据一般程序B使用叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PNH_2.TFA)$_2$],化合物2(186mg,145μmol)制备。将粗制物质溶解于MeCN中并且通过制备性HPLC(30%-80%MeCN,R_t 33.5-36min)纯化,产生呈淡黄色油状物的化合物3(224mg,80%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.22-1.87(m,56H);2.64(t,J=6.0Hz,2H);3.03(t,J=6.6Hz,4H);3.13-3.23(m,4H),3.36-3.45(m,6H);3.60-3.69(m,100H);3.77(t,J=6.0Hz,2H);3.85-3.88(m,1H);3.92-4.02(m,2H)。LCMS(疏性法,甲酸缓冲液)R_t=6.74min;ESI MS(+ve)1942.4,$[M]^+$;$C_{89}H_{172}N_{10}O_{35}^+[M+H]^+$的计算m/z=1942.4。

[0761] 1b.4叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[NH_2.TFA]$_4$,G1,化合物4

[0762] 根据一般程序A使用叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$[Lys]$_2$[NHBoc]$_4$,化合物3(220mg,113μmol)制备。获得呈淡黄色油状物的冻干产物化合物4(251mg,111%)。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)R_t=6.49min,ESI MS(+ve)1542.1$[M]^+$;$C_{69}H_{140}N_{10}O_{27}[M]^+$的计算m/z=1541.90。

[0763] 1b.5叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[(α-NHBoc)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_4$,G2,化合物5

[0764] 根据一般程序C使用叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$[Lys]$_2$[NH_2.TFA]$_4$,化合物4(120mg,60.1μmol)制备。将粗制物质溶解于MeCN/H_2O(1:1)中并且通过制备性HPLC(20%-70%MeCN,R_t 31-32.5min)纯化,产生呈淡黄色油状物的产物,化合物5(244mg,59%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.24-1.91(m,74H);2.42-2.47(m,8H);2.62-2.66(m,2H);3.13-3.25(m,12H);3.36(s,12H);3.52-3.78(m,490H);3.85-3.88(m,4H);3.94-4.11(m,4H);4.25-4.31(m,2H)。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)R_t=8.70min;ESI MS(+ve)1714.0$[M+4H]^{4+}$/4,1371.7$[M+5H]^{5+}$/5;1143.0$[M+6H]^{6+}$/6,980.0$[M+7H]^{7+}$/7。转换为6852。

[0765] 1b.6叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[(α-NH_2.TFA)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_4$,G2,化合物6

[0766] 根据一般程序A使用叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[(α-NHBoc)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_4$,化合物5(244mg,35.6μmol)制备。将粗制冻干物质重新溶解于水中并且通过制备性HPLC(22%-70%MeCN,.01%TFA,R_t 27min)纯化,产生呈淡黄色粘性固体的产物,化合物6(173mg,67%)。^{1}H NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):1.31-1.98(m,40H);2.51-2.56(m,8H);2.72(宽t,J=6.0Hz,2H);3.16-3.30(m,16H);3.40(s,12H);3.46-3.53(m,4H);3.62-3.97(m,490H);4.03(t,J=6.6Hz,2H);4.24-4.29(m,2H)。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)R_t=9.85min;ESI MS(+ve)1614.1$[M+4H]^{4+}$/4,1291.6$[M+5H]^{5+}$/5;1076.5$[M+6H]^{6+}$/6。转换为6452。

[0767] 1b.7叠氮基-$PEG_{24}CO$-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[NHBoc]$_8$,G2,化合物7

[0768] 根据一般程序B使用叠氮基-$PEG_{24}CO$-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[NH_2.TFA]$_4$,化合物6(117mg,58.6μmol)制备。获得呈淡黄色油状物的粗制物质,化合物7(167mg,100%)。LCMS(疏性法,甲酸缓冲液)R_t=8.35min;ESI MS(+ve)1328.6$[M+2H]^{2+}$/2-Boc;$C_{133}H_{252}N_{18}O_{47}[M]^+$的计算m/z=2855.6。

[0769] 1b.8叠氮基-$PEG_{24}CO$-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[NH_2.TFA]$_8$,G2,化合物8

[0770] 根据一般程序A使用叠氮基-$PEG_{24}CO$-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[NHBoc]$_8$,化合物7(167mg,58.6μmol)制备。将粗制水性溶液通过制备性HPLC(10%-60%MeCN,0.1%TFA缓冲液;R_t 27-29min)纯化,产生呈淡黄色粘性固体的产物,化合物8(124mg,71%,经2步)。^{1}H NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):1.30-1.96(m,42H);2.71(t,J=6.0Hz,2H);2.98-3.04(m,8H);3.13-3.30(m,8H);3.36-3.53(m,7H);3.68-3.84(m,100H);3.93(t,J=6.6Hz,2H);4.04(t,J=6.6Hz,2H);4.25(t,J=7.2Hz,2H)。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)R_t=7.76min,ESI MS(+ve)1028.3$[M+2H]^{2+}$/2,685.9$[M+3H]^{3+}$/3;$C_{93}H_{190}N_{18}O_{31}{}^{2+}[M+2H]^{2+}$/2的计算m/z:1028.3,$C_{93}H_{191}N_{18}O_{31}{}^{3+}[M+3H]^{3+}$/3的计算m/z:685.9。

[0771] 1b.9叠氮基-$PEG_{24}CO$-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_8$,G3,化合物9

[0772] 根据一般程序C使用叠氮基-$PEG_{24}CO$-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[NH_2.TFA]$_8$,化合物8(123mg,41.5μmol)制备,产生呈棕色油状物的粗制物质,化合物9。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)R_t=11.52min,ESI MS(+ve)2113$[M+6H]^{6+}$/6,1812$[M+7H]^{7+}$/7,1585$[M+8H]^{8+}$/8,1409$[M+9H]^{9+}$/9,1268$[M+10H]^{10+}$/10,1153$[M+11H]^{11+}$/11,1057$[M+12H]^{12+}$/12。转换为12,673。

[0773] 1b.10叠氮基-$PEG_{24}CO$-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH_2.TFA)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_8$,G3,化合物10

[0774] 根据一般程序A使用叠氮基-$PEG_{24}CO$-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_8$,化合物9(526mg,41.5μmol)制备。将粗制水性溶液通过制备性HPLC(3%-60%MeCN,0.1%TFA缓冲液;R_t 38-39min)纯化,产生呈淡黄色粘性固体的产物,化合物10(359mg,68%,经2步)。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)R_t=10.27min。转换为11,880。

[0775] 1b.11叠氮基-$PEG_{24}CO$-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)(ε-NH-Fmoc)]$_8$,G3,化合物11

[0776] 根据一般程序D使用叠氮基-$PEG_{24}CO$-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[NH_2.TFA]$_8$,化合物8(105mg,35.4μmol)制备。获得呈白色固体的产物,化合物11(166mg,83%)。^{1}H NMR(300MHz,$(CD_3)_2S$=O)δ(ppm):1.23-1.49(m,160H);2.73-2.95(m,36H);3.44-3.60(m,94H);3.83(m,8H);4.05-4.28(m,29H);6.33-6.90(m,8H,NH);7.24-7.87(m,84H)。

[0777] 1b.12叠氮基-$PEG_{24}CO$-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)(ε-NH_2)]$_8$,G3,化合物12

[0778] 根据一般程序D使用叠氮基-$PEG_{24}CO$-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)(ε-NHFmoc)]$_8$,化合物11(169mg,29.9μmol)制备,产生呈蓬松固体的化合物12(95mg,82%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.46-1.49(m,160H);2.69(br s,14H);3.09-3.19(m,18H);3.38-3.41(m,8H);3.55-3.78(m,96H),3.89-4.33(m,14H)。

[0779] 1b.13叠氮基-$PEG_{24}CO$-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)(ε-NH-

$COPEG_{570})]_8$,G3,化合物13和叠氮基-$PEG_{24}CO$-$[N(PN)_2][Lys]_2[Lys]_4[Lys]_8$

[0780] $[(\alpha\text{-}NH_2.TFA)(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{570})]_8$,G3,化合物14

[0781] 向$mPEG_{570}$-CO_2H(205mg,348μmol)、NMM(60μL,546μmol)和PyBOP(171mg,329μmol)在DMF(1.5mL)中的溶液中添加在DMF(0.5mL)中的叠氮基-$PEG_{24}CO$-$[N(PN)_2][Lys]_2[Lys]_4[Lys]_8[(\alpha\text{-}NHBoc)(\varepsilon\text{-}NH_2)]_8$,化合物12。使随后反应混合物在室温下搅拌过夜,然后真空浓缩,得到直接溶解于水中、用TFA处理并且在室温下搅拌过夜的粗制化合物13。将混合物浓缩并且溶解于水中,然后使用Millipore离心过滤单元(3K MWCO再生纤维素)纯化并且获得呈灰白色蓬松物质的冷冻干燥产物,化合物14(68%,经2步)。^1H NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):1.33-1.90(m,88H);2.51-2.55(m,16H);2.67-2.75(m,4H),3.16-3.23(m,32H);3.40-3.53(m,32H),3.62-4.03(m,470H);4.21-4.39(m,7H)。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)R_t=7.50min。

[0782] 1b.14叠氮基-$PEG_{24}CO$-$[N(PN)_2][Lys]_2[Lys]_4[Lys]_8[(\alpha\text{-}NHBoc)(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{2000})]_8$,G3,化合物15

[0783] 向叠氮基-$PEG_{24}CO$-$[N(PN)_2][Lys]_2[Lys]_4[Lys]_8[(\alpha\text{-}NHBoc)(\varepsilon\text{-}NH_2)]_8$,化合物12(95.0mg,24.5μmol)在DMF(4mL)中的搅拌溶液中添加DIPEA(85μL,488μmol),之后添加$mPEG_{2000}$-NHS(720mg,313μmol)。使随后反应混合物在室温下搅拌过夜。将粗制残余物溶解于水中并且通过超滤(5K,Pall PES膜)纯化。收集渗余物并且将其冷冻干燥,产生呈灰白色蓬松物质的化合物15(76%)。^1H NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):1.33-1.63(m,160H);3.05-3.15(m,35H);3.29(s,24H);3.35-3.96(m,1370H);4.13-4.19(m,6H)。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)R_t=11.24min。

[0784] 1b.15叠氮基-$PEG_{24}CO$-$[N(PN)_2][Lys]_2[Lys]_4[Lys]_8[(\alpha\text{-}NH_2.TFA)(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{2000})]_8$,G3,化合物16

[0785] 根据一般程序A使用叠氮基-$PEG_{24}CO$-$[N(PN)_2][Lys]_2[Lys]_4[Lys]_8[(\alpha\text{-}NHBoc)(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{2000})]_8$,化合物15(40.0mg,1.87μmol)制备,产生呈灰白色蓬松物质的产物(35mg,88%)。^1H NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):1.28-1.79(m,88H);2.51-2.58(m,4H);3.04-3.18(m,35H);3.28(s,24H);3.35-3.97(m,1348H),4.14-4.25(m,6H)。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)R_t=9.12min。

[0786] 1b.16BHALys$[Lys]_2[Lys]_4[((\alpha\text{-}NH\text{-}COPEG_{24}NH\text{-}COPEG_4(PhTzMe))_1(\alpha\text{-}NH_2)_3)(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{1000})_4]$,G2,化合物17

[0787] 根据一般程序C使用BHALys$[Lys]_2[Lys]_4[(\alpha\text{-}NH2.TFA)_4(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{1000})_4]$(参考文献1)(50.0mg,0.007mmol)和$HOOCPEG_{24}NH$-$COPEG_4$(PhTzMe)(点击化学工具,13.39mg,0.010mmol)制备,不同的是反应容器用箔包裹以阻挡光,并且将残余物通过SEC(Sephadex™ LH-20)使用甲醇作为洗脱剂纯化,产生产物化合物17(44.00mg,77%);^1H NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):8.42-8.26(m,2H),7.44-7.11(m,12H),6.04(bs,1H),4.44-4.07(m,8H),4.07-3.37(m,556H),3.33(s,12H),3.25-2.90(m,17H),2.62-2.43(m,2H),1.96-0.97(m,48H);HPLC(C8XBridge,3x100mm)梯度(甲酸盐缓冲液):5%MeCN/H_2O(0-1min),5%-80%MeCN(1-7min),80%MeCN(7-12min),80%-5%MeCN(12-13min),5%MeCN(13-15min),214nm,0.4mL/min,R_t=8.08-9.01min。

[0788] 1b.17BHALys$[Lys]_2[Lys]_4[Lys]_8[((\alpha\text{-}NH\text{-}COPEG_{24}NH\text{-}COPEG_4(PhTzMe))_1(\alpha\text{-}NH_2)_7)(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{412})_8]$,G3,化合物18

[0789] 根据一般程序C使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH$_2$.TFA)$_8$(ε-NH-COPEG$_{412}$)$_8$](参考文献1)(50.0mg,0.008mmol)和HOOC-PEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)(点击化学工具,11.2mg,0.008mmol)制备,不同的是反应容器用箔包裹以阻挡光,并且将残余物通过SEC(Sephadex™ LH-20)使用甲醇作为洗脱剂纯化,产生产物化合物18(29mg,55%);^{1}H NMR(300MHz,D$_2$O)δ(ppm):8.43-8.20(m,2H),7.50-7.09(m,10H),6.03(bs,1H),4.41-4.05(m,10H),4.01-3.41(m,258H),3.31(s,16H),3.24-2.83(m,28H),2.41(bs,13H),2.00-0.98(m,75H);HPLC(C8 XBridge,3x100mm)梯度(甲酸盐缓冲液):5%MeCN/H$_2$O(0-1min),5%-80%MeCN(1-7min),80%MeCN(7-12min),80%-5%MeCN(12-13min),5%MeCN(13-15min),214nm,0.4mL/min,R$_t$=8.16-8.93min。

[0790] 1b.18BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_1$(α-NH$_2$)$_7$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_8$],G3,化合物19

[0791] 根据一般程序C使用BHALys[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH$_2$.TFA)$_8$(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_8$](参考文献1)(100.0mg,0.007mmol)和HOOCPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)(点击化学工具,15.97mg,0.010mmol)制备,不同的是反应容器用箔包裹以阻挡光,并且将残余物通过SEC(Sephadex™ LH-20)使用甲醇作为洗脱剂纯化,产生产物化合物19(69mg,66%);^{1}H NMR(300MHz,D$_2$O)δ(ppm):8.45-8.25(m,2H),7.47-7.07(m,12H),6.07(bs,1H),4.45-4.05(m,12H),4.04-3.37(m,936H),3.32(s,25H),3.23-2.88(m,32H),2.59-2.32(m,6H),1.90-0.98(m,90H);HPLC(C8XBridge,3x100mm)梯度(甲酸盐缓冲液):5%MeCN/H$_2$O(0-1min),5%-80%MeCN(1-7min),80%MeCN(7-12min),80%-5%MeCN(12-13min),5%MeCN(13-15min),214nm,0.4mL/min,R$_t$=8.21-9.15min。

[0792] 1b.19BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTz Me))$_1$(α-NH$_2$)$_{15}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{16}$],G4,化合物20

[0793] 根据一般程序C使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[(α-NH$_2$.TFA)$_{16}$(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{16}$](参考文献1)(100.0mg,0.004mmol)和HOOCPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)(点击化学工具,6.74mg,0.005mmol)制备,不同的是反应容器用箔包裹以阻挡光,并且将残余物通过SEC(Sephadex™ LH-20)使用甲醇作为洗脱剂纯化,产生产物化合物20(63mg,65%);^{1}H NMR(300MHz,D$_2$O)δ(ppm):8.45-8.28(m,2H),7.47-7.07(m,12H),6.03(bs,1H),4.40-4.08(m,23H),4.06-3.38(m,1906H),3.33(s,56H),3.29-2.91(m,78H),2.63-2.45(m,3H),1.98-0.98(m,200H);HPLC(C8 XBridge,3x100mm)梯度(甲酸盐缓冲液):5%MeCN/H$_2$O(0-1min),5%-80%MeCN(1-7min),80%MeCN(7-12min),80%-5%MeCN(12-13min),5%MeCN(13-15min),243nm,0.4mL/min,R$_t$=8.51-9.02min。

[0794] 1b.20BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_1$(α-NH$_2$)$_{31}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{32}$],G5,化合物21

[0795] 根据一般程序C使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH$_2$.TFA)$_{32}$(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{32}$](参考文献1)(100.0mg,0.002mmol)和HOOCPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)(点击化学工具,3.38mg,0.005mmol)制备,不同的是反应容器用箔包裹以阻挡光,并且将残余物通过SEC(Sephadex™ LH-20)使用甲醇作为洗脱剂纯化,产生产物化合物21(68mg,72%);^{1}H NMR(300MHz,D$_2$O)δ(ppm):8.44-8.29(m,2H),7.44-7.09(m,12H),6.02(bs,1H),4.37-4.11(m,31H),4.08-3.37(m,2937H),3.32(s,83H),3.27-2.88(m,116H),2.59-2.42(m,3H),

2.18-0.92(m,313H);HPLC(C8 XBridge,3x100mm)梯度(甲酸盐缓冲液):5%MeCN/H_2O(0-1min),5%-80%MeCN(1-7min),80%MeCN(7-12min),80%-5%MeCN(12-13min),5%MeCN(13-15min),214nm,0.4mL/min,R_t=8.77min。

[0796] 1b.21BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[(α-NHBoc)$_4$(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTz Me)$_4$],G2,化合物22

[0797] 向BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[(α-NHBoc)$_4$(ε-NH_2)$_4$](参考文献1)(46.0mg,0.031mmol)在室温下在DMF中的搅拌溶液中添加NMM(68.0μL,0.620mmol)、HOOCPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)(点击化学工具;43.0mg,0.155mmol)和PyBOP(81.0mg,0.155mmol)。在16h后,将反应混合物溶解于MeCN:MQ水(3mL,1:1v/v)中,并且过滤(0.45μm acrodisc注射器过滤器)溶液。将滤液通过制备性HPLC(30%-80%MeCN,历经60min,流动相:MQ水和乙腈,R_t33.0-36.0min))纯化,产生呈粉红色固体的化合物22(52mg(22%))。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)R_t=5.66min;^{1}H NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):8.52(d,8H,J=9.0Hz),7.40-7.26(m,10H),7.20(d,8H,J=9.0Hz),6.23-6.17(m,1H),4.36-4.21(m,10H),3.99-3.83(m,13H),3.82-3.46(m,487H),3.46-3.32(m,22H),3.27-3.02(m,15H),3.02(s,12H),2.54-2.38(m,17H),1.92-1.14(m,89H)。

[0798] 1b.22BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[(α-NH_2.HCl)$_4$(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTz Me)$_4$],G2,化合物23

[0799] 向BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[(α-NHBoc)$_4$(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)$_4$],G2,化合物22(48.0mg)在甲醇(2mL)中的搅拌溶液中添加3M HCl在甲醇(2mL)中的溶液,并且将反应混合物在室温下搅拌20h。减压移除挥发物,产生粉红色固体的BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[(α-NH_2.HCl)$_4$(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)$_4$],G2,化合物23(41.0mg(91%))。LCMS(LCMS法20-90,8min,TFA)R_t=5.27min。

[0800] 1b.23BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[((α-Lys(α-NHCy5)(α-NHDFO))$_1$(α-NH_2)$_3$)(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)$_4$],G2,化合物24

[0801] 向BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[(α-NH_2.HCl)$_4$(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)$_4$],G2,化合物23(11.0mg,0.0015mmol)在室温下在DMF(3mL)中的搅拌溶液中添加NMM(3.32μL,0.039mmol)、HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NHDFO)]化合物60(2.06mg,0.0015mmol)和PyBOP(1.18mg,0.0022mmol)。在18h后,减压移除挥发物,并且将蓝色固体残余物溶解于MQ水中,并且过滤(0.45μm acrodisc注射器过滤器)溶液。将滤液通过旋转柱(Amicon Ultra,0.5mL,3kDa MW截止值)浓缩,并且将渗余物用MQ水(10x450μL)重复洗涤,产生化合物24(在MQ水中浓度10mg/mL;1.3mL。LCMS(LCMS法20-90,8min,TFA)R_t=5.64mins;^{1}H NMR(300MHz,D2O)δ(ppm):8.52(d,8H,J=9.0Hz),8.32(s,1H),8.29-8.17(m,2H),7.78-7.70(m,2H),7.69-7.62(m,2H),7.57-7.47(m,2H),7.48-7.25(m,16H),7.21(d,8H,J=9.9Hz),7.15-7.08(m,1H),7.06-7.00(m,1H),6.70-6.60(m,2H),6.21-6.12(m,2H),4.37-4.20(m,14H),4.18-4.06(m,8H),3.98-3.50(m,480H),3.48-3.34(m,15H),3.27-3.06(m,18H),3.06-2.97(m,19H),2.88(s,8H),2.54-2.40(m,19H),2.08-1.98(m,28H),1.93-1.12(m,99H),1.00-0.82(m,8H)。

[0802] 1b.24BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH_2)$_2$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_4$],G2,化合物25

[0803] 根据一般程序C使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[(α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_1$(α-NH$_2$)$_3$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_4$],G2,化合物17(3.0mg,0.414μmol)和HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NHDFO)]化合物60(0.56mg,0.414μmol)制备,并且通过旋转柱(10kDa MW截止值,用10x450μL MQ水洗涤)纯化,产生期望的产物化合物25(最终浓度为300μL MQ水中3.56mg)。

[0804] 1b.25BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_6$)(ε-NH-COPEG$_{412}$)$_8$],G3,化合物26

[0805] 根据一般程序C使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NHCOPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_1$(α-NH$_2$)$_7$))(ε-NH-COPEG$_{412}$)$_8$],G3,化合物18(2.97mg,0.452μmol)和HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NHDFO)]化合物60(0.61mg,0.452μmol)制备,并且通过旋转柱(10kDa MW截止值,用10x450μL MQ水洗涤)纯化,产生产物化合物26(最终浓度为300μL MQ水中3.60mg)。

[0806] 1b.26BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_6$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_8$],G3,化合物27

[0807] 根据一般程序C使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NHCOPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_1$(α-NH$_2$)$_7$)(ε-NHCOPEG$_{1000}$)$_8$],G3,化合物19(3.14mg,0.234μmol)和HO-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)化合物60(0.32mg,0.234μmol)制备,并且通过旋转柱(10kDa MW截止值,用10x450μL MQ水洗涤)纯化,并且通过旋转柱(10kDa MW截止值,用10x450μL MQ水洗涤)纯化,产生产物化合物27(最终浓度为300μL MQ水中3.45mg)。

[0808] 1b.27BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTz Me))$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{14}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{16}$],G4,化合物28

[0809] 根据一般程序C使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$-[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_1$(α-NH$_2$)$_{15}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{16}$],G4,化合物20(11.8mg,0.454μmol)和HO-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)化合物60(0.62mg,0.454μmol)制备,并且通过旋转柱(10kDa MW截止值,用10x450μL MQ水洗涤)纯化,产生9.3mg呈蓝色固体的化合物28(在冻干后)。

[0810] 1b.28BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{30}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{32}$],G5,化合物29

[0811] 根据一般程序C使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$-[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_1$(α-NH$_2$)$_{30}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{32}$],G4,化合物21(12.9mg,0.271μmol)和HO-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)化合物60(0.37mg,0.271μmol)制备,并且通过旋转柱(10kDa MW截止值,用10x450μL MQ水洗涤)纯化,产生在冻干后8.4mg呈蓝色固体的化合物29。

[0812] 1b.29BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NH-COPEG$_{570}$N$_3$)$_{32}$],化合物30

[0813] 根据一般程序H使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NH$_2$)$_{32}$](参考文献1)),75mg,6.5μmol)制备。获得呈灰白色粘性固体的冻干产物化合物30(40mg,19%)。^{1}HNMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):0.39-2.11(m,666H);2.25-2.53(m,58H);2.53-2.70(m,12H);2.70-4.42(m,1540H);6.89-7.48(m,12H)。HPLC(HPLC法5-80,15min,甲酸盐)R_t=10.21min。

[0814] 1b.30BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NH-COPEG$_{1100}$N$_3$)$_{32}$],化合物31

[0815] 根据一般程序H步骤1使用BHALys-[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-

NHBoc)$_{32}$(ε-NH$_2$)$_{32}$](参考文献1)(0,50mg,4.4μmol)和N_3-PEG$_{1100}$-COOH制备。获得呈灰白色粘性固体的冻干产物化合物31(159mg,75%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):0.91-2.08(m,666H);2.27-2.58(m,64H);3.01-3.27(m,113H);3.33-3.92(m,3018H);3.95-4.18(m,33H);4.20-4.50(m,31H);7.10-7.55(m,12H),7.62-8.15(m,24H)。HPLC(HPLC法5-80,15min,甲酸盐)R_t=9.62min。

[0816] 1b.31BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH$_2$.TFA)$_{32}$(ε-NH-COPEG$_{570}N_3$)$_{32}$],化合物32

[0817] 根据一般程序H步骤2使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NH-COPEG$_{570}N_3$)$_{32}$]化合物30(40mg,1.3μmol)制备。获得呈淡黄色油状物的产物化合物32(41mg,定量)。^{1}H NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):0.87-1.93(m,378H);2.24-2.51(m,67H);2.52-2.69(m,20H);2.77-3.20(m,122H);3.20-4.05(m,1312H);4.05-4.32(m,34H);5.97(s,1H);6.98-7.34(m,10H)。

[0818] 1b.32BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH$_2$.TFA)$_{32}$(ε-NH-COPEG$_{1100}N_3$)$_{32}$],化合物33

[0819] 根据一般程序H步骤2使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NH-COPEG$_{1100}N_3$)$_{32}$]化合物31(145mg,3.0μmol)制备。获得呈淡黄色粘性固体的产物化合物33(146mg,定量)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.20-2.03(m,378H);2.37-2.59(m,63H);3.00-3.28(m,121H);3.35-3.96(m,3036H);3.96-4.13(m,22H);4.18-4.56(m,39H);6.19(s,1H);7.20-7.42(m,10H)。HPLC(HPLC法5-80,15min,甲酸盐)R_t=9.41min。

[0820] 1b.33BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$(ε-NH-COPEG$_{570}N_3$)$_{32}$],化合物34

[0821] 根据一般程序I步骤1和2使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH$_2$.TFA)$_{32}$(ε-NH-COPEG$_{570}N_3$)$_{32}$](46.1mg,1.6μmol)制备。获得呈蓝色固体的产物化合物34(31mg,72%)。^{1}H NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):0.93-1.85(m,400H);1.89-2.02(m,89H);2.04-2.09(m,23H);2.30-2.52(m,59H);2.53-2.73(m,13H);2.91-3.21(m,121H);3.24-3.94(m,1313H);3.97-4.37(m,67H);5.87-6.31(m,6H);6.83-7.60(m,25H)。IR(cm^{-1}):2100(-N_3)。

[0822] 1b.34BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$(ε-NH-COPEG$_{1100}N_3$)$_{32}$],化合物35

[0823] 根据一般程序I步骤1和2使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH$_2$.TFA)$_{32}$(ε-NH-COPEG$_{1100}N_3$)$_{32}$],化合物33(112.5mg,2.3μmol)制备。获得呈蓝色固体的产物化合物35(98mg,85%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.04-2.18(m,507H);2.38-2.55(m,64H);2.99-3.27(m,122H);3.37-3.96(m,3026H);4.15-4.51(m,67H);6.10-6.48(m,5H);7.15-7.58(m,24H)。HPLC(HPLC法5-80,15min,甲酸盐)R_t=9.52min。

[0824] 1b.35BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTz Me))$_1$(α-NHCy5)$_1$(α-NHDOTA)$_{10}$(α-NH$_2$)$_4$(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{16}$],G4,化合物SRS-1

[0825] 向BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_1$(α-NH$_2$)$_{15}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{16}$],G4,化合物20(148.0mg,0.0054mmol)和NMM(38.0μL,0.474mmol)在DMF(4mL)的搅拌溶液中添加Cy5-NHS酯(Lumirobes,3.66mg,0.0054mmol),并且将反应混合物在室温下搅拌,并通过LCMS监测Cy5 NHS酯的消耗。在18h后,添加p-SCN-

Bn-DOTA(Macrocyclics,75.0mg,0.109mmol)在DMSO(1mL)中的溶液并且继续搅拌24h。真空移除挥发物,并且将残余物溶解于MQ水(15.0mL)中,然后过滤(0.45μm acrodisc过滤器)溶液。将滤液通过旋转柱(Amicon Ultra-15,10kDa MWCO)纯化,并且将渗余物用MQ水(5x15mL)重复洗涤。通过冻干使渗余物干燥,产生蓝色固体的SRS-1(173.0mg,96%)。HPLC:XBridge C8柱,其中梯度为5%-80%MeCN/H_2O(1-7min),80%MeCN/H_2O(7-12min),80%-5%MeCN/H_2O(12-13min),5%MeCN/H_2O(13-15min),10mM $HCOONH_4$)以及在214nm处的紫外检测。R_t=5.07min。^1H NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):0.33-2.08(m,177H),2.26-4.46(m,1979H),6.87-7.66(bs,59H),8.34(bs,2H)。

[0826] 1b.36BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH_2)$_{30}$(α-NHDOTA)$_2$(ε-$NHCOPEG_{2000}$)$_{32}$]G5 RH-2

[0827] 向BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH_2.TFA)$_{32}$(α-(ε-$NHCOPEG_{2000}$)$_{32}$](如WO20200014750中所描述,实施例1)RH-1(301mg,3.97μmol)在DMF(6.0mL)中的搅拌溶液中添加p-SCN-Bn-DOTA(8.13mg,11.8μmol,2.98当量),之后添加NMM(114μL,1.03mmol)。将所得反应混合物在环境温度下搅拌4.5h,然后移除一部分反应混合物(2.0mL),并且将其放置于另一个配有搅拌棒的反应烧瓶中并继续搅拌。在24h后,将反应混合物的较小等分试样真空浓缩至干燥,溶解于MeOH(1.0mL)中,并且通过SEC(固定相=Sepahdex LH-20™,流动相=乙腈,洗脱速率=约1滴s^{-1},级分大小=400滴)纯化。合并含产物的级分并真空浓缩,并且将所得残余物溶解于MQ水中,过滤(0.45μm acrodisc过滤器)并冻干,产生呈白色固体的化合物RH-2(82.5mg)。^1H NMR(300MHz,CD_3OD-d_4)δ(ppm):1.17-2.29(m,401H),3.36(s,96H),3.39-3.43(m,43H),3.50-4.08(m,5564H),4.21-4.67(m,84H),6.17(宽s,1H),7.18-7.64(m,18H),8.09(s,1H)。^1H NMR分析表明大约2.1DOTA/树枝状体;DOTA的%(w/w)=2.0%。

[0828] 1b.37[(ε-NHBoc)(α-NHBoc)][Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$RL-3

[0829] 向盐酸胱胺RL-1(1.26g,5.6mmol)和Boc-Lys(Boc)-ONp RL-2(5.68g,12.2mmol)在DMF(100mL)中的搅拌溶液中添加TEA(5.44mL,39.0mmol)。将反应混合物在室温下搅拌3d,然后添加甘氨酸(1.82g,24.4mmol)在去离子水(10mL)中的溶液,之后从溶液中沉淀出白色固体。将悬浮液搅拌2h,并且真空移除挥发物。将悬浮在乙酸乙酯(50mL)中的残余物和有机物依次用饱和碳酸钠水溶液(5x20mL)、0.1M HCl水溶液(20mL)和盐水(20mL)洗涤,干燥($MgSO_4$),并且真空移除挥发物。将残余物溶解于二氯甲烷(50mL)中,用0.2M NaOH水性溶液(4x50mL)、盐水(50mL)洗涤,干燥($MgSO_4$),并且真空移除挥发物,产生呈灰白色固体的[(ε-NHBoc)(α-NHBoc)][Lys]-NHCO-CH_2-CH_2-S-]$_2$RL-3(3.66g,81%)。^1H NMR(300MHz,CD_3OD):δ(ppm)1.13-1.82(m,48H),2.83(t,J=6.6Hz,4H),3.02(t,J=6.6Hz,4H),3.52(m,4H),3.98(m,2H)。LCMS(LCMS法40-90,8min,TFA):R_t=5.36min。ESI MS(+ve)809$[M]^+$;$C_{36}H_{68}N_6O_{10}S_2[M]^+$的计算m/z=809。

[0830] 1b.38[(ε-NH_2.TFA)(α-NH_2.TFA)][Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$RL-4

[0831] 向[(ε-NHBoc)(α-NHBoc)][Lys]-NHCO-CH_2-CH_2-S-]$_2$RL-3(3.66g,4.5mmol)在室温下在二氯甲烷(30mL)中的溶液中滴加TFA(27.7mL,362.0mmol)历经5min。将反应混合物在室温下搅拌18h,并且真空浓缩。将残余物溶解于去离子水中(50mL)并冻干,产生呈浅棕色固体的[(ε-NH_2.TFA)(α-NH_2.TFA)][Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$RL-4(3.91g,定量)。^1H NMR

(300MHz,CD_3OD):δ(ppm)1.28-1.42(m,4H),1.54-1.68(m,4H),1.76-1.88(m,4H),2.70-2.86(m,4H),2.90(t,J=7.7Hz,2H),3.39-3.62(m,4H),3.88(t,J=6.6Hz,2H)。LCMS(LCMS法5-60,8min,TFA):R_t=0.80min。ESI MS(+ve)409$[M]^+$;$C_{16}H_{36}N_6O_2S_2[M]^+$的计算m/z=409。

[0832] 1b.39[[(ε-NHBoc)$_2$(α-NHBoc)$_2$][Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$RL-5

[0833] 向[(ε-NH_2.TFA)(α-NH_2.TFA)][Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$RL-4(3.91g,4.52mmol)在DMF(18mL)中的溶液中添加Boc-Lys(Boc)-ONp RL-2(10.13g,21.7mmol)。将混合物在40℃下加热,直到获得澄清溶液,并且然后冷却至室温并添加TEA(7.55mL,54.2mmol)。在室温下搅拌18h后,添加甘氨酸(509mg,4.46mmol)在水(1.28mL)中的溶液,并且然后在40℃下搅拌加热反应混合物。在2h后,将反应混合物冷却至室温,并且然后将其滴加到水中(在搅拌下)历经20min。通过过滤收集所得沉淀物,用去离子水(5x30mL)洗涤,并且在空气流中干燥30min。将固体溶解于DMF(18mL)中,并且在搅拌下将溶液滴加到水(180mL)中。通过过滤收集所得白色固体,用水(3x30mL)洗涤,并且在40℃的真空烘箱中干燥20h,产生呈白色固体的[[(ε-NHBoc)$_2$(α-NHBoc)$_2$][Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$RL-5(6.49g,83.3%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD):δ(ppm)1.26-1.93(m,108H),2.84(m,4H),3.04(m,8H),3.20(m,4H),3.51(m,4H),4.00(m,4H),4.33(m,2H)。LCMS(LCMS法40-90,8min,TFA)R_t=6.34min。ESI MS(+ve)1722$[M]^+$;$C_{80}H_{148}N_{14}O_{22}S_2[M]^+$的计算m/z=1722。

[0834] 1b.40[[(ε-NH_2.TFA)$_2$(α-NH_2.TFA)$_2$][Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$RL-6

[0835] 向[[(ε-NHBoc)$_2$(α-NHBoc)$_2$][Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$RL-5(6.49g,3.8mmol)在0℃下在二氯甲烷(65mL)中的搅拌悬浮液中滴加TFA(34.6mL,451.2mmol)历经10min。使所得溶液升温至室温并且搅拌4h,之后真空移除挥发物。将残余物溶解于最少量的去离子水中并冻干两次(注意:在第二次冻干期间,将混浊的水性溶液通过0.45μm滤盘过滤,并且将滤液冻干),产生呈浅棕色泡沫状物的[[(ε-NH_2.TFA)$_2$(α-NH_2.TFA)$_2$][Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$RL-6(6.20g,96.9%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD):δ(ppm)1.13-1.87(m,36H),2.72(m,4H),2.87(m,8H),3.09(t,J=7.0Hz,4H),3.30-3.53(m,4H),3.79(t,J=6.6Hz,2H),3.90(t,J=6.5Hz,2H),4.13(t,J=7.1Hz,2H)。

[0836] 1b.41[[(ε-NHBoc)$_4$(α-NHBoc)$_4$][Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$RL-7向[[(ε-NH_2.TFA)$_2$(α-NH_2.TFA)$_2$][Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$RL-6(4.02g,2.20mmol)在DMF(16mL)中的溶液中添加Boc-Lys(Boc)-ONp RL-2(9.02g,19.3mmol)。将混合物在40℃下加热,直到获得澄清溶液,并且然后冷却至室温并添加TEA(7.35mL,52.8mmol)。在室温下搅拌18h后,添加DMF(25mL)以溶解任何沉淀的固体,并且将所得溶液在55℃下加热,并添加甘氨酸(250mg,3.3mmol)在水(1.20mL)中的溶液。搅拌2h后,将反应混合物冷却至室温,并且然后在搅拌下滴加到水(200mL)中历经10min。通过过滤收集所得沉淀物并且在空气流中干燥30min。将固体溶解于DMF(40mL)中,并且在搅拌下将所得溶液滴加到去离子水(200mL)中。通过过滤收集所得白色固体,在空气流中干燥30min,并且然后悬浮在MeCN中,并且真空移除挥发物,产生呈白色固体的[[(ε-NHBoc)$_4$-(α-NHBoc)$_4$][Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$RL-7(4.80g,37.0%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD):δ(ppm)1.17-1.95(m,228H),2.86(m,4H),3.05(m,16H),3.20(m,12H),3.53(m,4H),4.03&4.32(14H)。LCMS(LCMS法40-90,8min,TFA)R_t=7.69min。ESI MS(+ve)1773$[M/2]^+$;$C_{84}H_{154}N_{15}O_{23}S_1[M/2]^+$的计算m/z=1773。

[0837] 1b.42[[(ε-NH_2.TFA)$_4$(α-NH_2.TFA)$_4$][Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$RL-8

[0838] 向[[(ε-NHBoc)$_4$-(α-NHBoc)$_4$][Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH$_2$-CH$_2$-S-]$_2$RL-7(4.80g,1.4mmol)在0℃下在二氯甲烷(50mL)中的搅拌悬浮液中滴加TFA(50.0mL,648.0mmol)历经15min。使所得溶液升温至室温并且搅拌4h,之后真空移除挥发物。将残余物溶解于最少量的去离子水中并且冻干(两次),产生浅棕色泡沫状物(5.38g),随后将其溶解于甲醇(约15mL)中,并且在搅拌下将所得溶液滴加到乙醚(300mL)中。通过过滤收集这样形成的白色沉淀物,将其溶解于甲醇中并且真空移除挥发物,产生呈灰白色吸湿泡沫状物的[[(ε-NH$_2$.TFA)$_4$(α-NH$_2$.TFA)$_4$]$_4$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH$_2$-CH$_2$-S-]$_2$RL-8(3.50g,74.1%)。^{1}H NMR(300MHz,CD$_3$OD):δ(ppm)1.27-2.01(m,84H),2.82(m,4H),2.90-3.04(m,16H),3.06-3.29(m,12H),3.52(m,4H),3.87(m,4H),3.99(t,J=6.32Hz,4H),4.30(m,4H),4.38(m,2H)。LCMS(LCMS法5-60,8min,TFA)R$_t$=0.65min。ESI MS(+ve)975[(M/2)+H]$^+$;C$_{44}$H$_{91}$N$_{15}$O$_7$S$_1$[(M/2)+H]$^+$的计算m/z=975。

[0839] 1b.43[[(ε-NHBoc)$_8$(α-NHBoc)$_8$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH$_2$-CH$_2$-S-]$_2$RL-9和[[(ε-NH$_2$.TFA)$_8$(α-NH$_2$.TFA)$_8$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH$_2$-CH$_2$-S-]$_2$RL-10

[0840] 在室温下向[[(ε-NH$_2$.TFA)$_4$(α-NH$_2$.TFA)$_4$]$_4$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH$_2$-CH$_2$-S-]$_2$RL-8(1.5g,0.398mmol)在DMF(17mL)中的溶液中添加Boc-Lys(Boc)-ONp RL-2(3.27g,6.99mmol)和NMM(2.10mL,19.1mmol)。将反应混合物搅拌2d,之后添加甘氨酸(66mg)在水(1.0mL)中的溶液。在4h后,在搅拌下将反应混合物滴加到水(200mL)中。通过过滤收集所得黄色沉淀物,并且用水(5x50mL)洗涤,并且在空气流中干燥。将固体溶解于DMF(20mL)中,并且将所得溶液添加至水(200mL)中,产生灰白色沉淀物,如上所述收集并干燥所述沉淀物。将固体溶解于DMF(4.0mL)和TEA(2.1mL)中,并且在55℃下搅拌加热,之后添加甘氨酸(66mg)在水(1mL)中的溶液。在4h后,将反应混合物冷却至室温并搅拌2d,并且然后在搅拌下滴加到水(250mL)中。通过过滤收集所得沉淀物,用水(3x50mL)洗涤并且真空干燥,产生灰白色固体[[(ε-NHBoc)$_8$(α-NHBoc)$_8$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH$_2$-CH$_2$-S-]$_2$RL-9(约0.8g),所述固体不经进一步纯化而使用。

[0841] 向[[(ε-NHBoc)$_8$(α-NHBoc)$_8$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH$_2$-CH$_2$-S-]$_2$RL-9(约0.8g)在0℃下在二氯甲烷(16mL)中的溶液中添加TFA(16mL)。使反应混合物升温至室温,搅拌18h,并且真空移除挥发物。将残余物溶解于水(20mL)中,并且通过使用具有3kDa MWCO Ultracel®再生纤维素膜的15mL Amicon®Ultra离心过滤器在4000rpm下离心20min进行浓缩。将渗余物用水稀释,并且重复(x 10)离心/浓缩过程,并且将最终渗余物冻干,产生呈灰白色固体的[[(ε-NH$_2$.TFA)$_8$(α-NH$_2$.TFA)$_8$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH$_2$-CH$_2$-S-]$_2$RL-10(606mg,20%,2步)。^{1}H NMR(300MHz,CD$_3$OD):δ(ppm)1.24-2.00(m,180H),2.81(m,4H),2.90-3.04(m,32H),3.12-3.33(m,28H),3.52(m,4H),3.83(m,8H),3.94(m,8H)和4.23-4.42(m,14H)。LCMS(LCMS法5-60,8min,TFA)R$_t$=3.76min。ESI MS(+ve)1000[M/4+H]$^+$;[C$_{184}$H$_{373}$N$_{62}$O$_{30}$S$_2$]/4[M/4+H]$^+$的计算m/z=1000。

[0842] 1b.44[(ε-NH$_2$.TFA)$_8$(α-NH$_2$.TFA)$_8$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH$_2$-CH$_2$-S-Me(MAL)-PEG$_{24}$-CONH-Bn-Tz(Me)RP-1

[0843] 向[[Lys(ε-NH$_2$.TFA)(α-NH$_2$.TFA)]$_8$-[Lys]$_4$-[Lys]$_2$-[Lys]-CONH-CH$_2$-CH$_2$-S-]$_2$RL-10(128mg,0.017mmol)在室温下在水(6.0mL)中的搅拌溶液中添加0.5M的TCEP在水(335μL,0.170mmol)中的溶液。将反应混合物搅拌1h,之后测量反应混合物的pH(pH 5.2),并且通过

滴加aq.0.1M NaOH将其调整到pH 6.5。然后单份添加Me(MAL)-PEG_{24}-CONH-Bn-Tz(Me)RL-18(28.6mg,0.020mmol)并且继续搅拌。在2h后,将反应混合物转移到具有3kDa MWCO Ultracel®再生纤维素膜的Amicon®Ultra离心过滤器中,并且通过在4000rpm下离心20min进行浓缩。通过在4000rpm下离心,将渗余物用水(x5)洗涤并冻干,产生黄色固体(109mg)。将固体溶解于水(6mL)中,并且使空气鼓泡通过溶液18h,得到粉红色溶液。将溶液冻干,产生粉红色固体(111mg),将所述固体通过制备性HPLC(HPLC法5-80,8min,TFA)进一步纯化,产生呈粉红色固体的[(ε-NH_2.TFA)$_8$(α-NH_2.TFA)$_8$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]CONH-CH_2-CH_2-S-(Me)MAL-Me(MAL)-PEG_{24}-CONH-Bn-Tz(Me)RP-1(32.5mg,32.5%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD):δ(ppm)1.21-2.05(m,87H),2.90-3.04(m,14H),3.06(s,3H),3.06-3.26(m,11H),3.48-4.07(m,89H),4.17-4.53(m,11H),7.59(d,J=7.6Hz,2H)和8.53(d,J=8.0Hz,2H)。LCMS(LCMS法40-90,8min,TFA)R_t=3.98min。ESI MS(+ve)1141[(M/3)+H]$^+$;$C_{158}H_{301}N_{37}O_{42}S$[(M/3)+H]$^+$的计算m/z=1141。

[0844] 1b.45[(ε-NHBoc)$_{16}$(α-NHCOPEG$_{25}$)$_{16}$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]CONH-CH_2-CH_2-S-Me(MAL)-PEG_{24}-CONH-Bn-Tz(Me)RP-3

[0845] 向[(ε-NH_2.TFA)$_8$(α-NH_2.TFA)$_8$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]CONH-CH_2-CH_2-S-(Me)MAL-PEG_{24}-CONH-Bn-Tz(Me)RP-1(31.4mg,6μmol)在无水DMF(3.0mL)中的搅拌溶液中添加NMM(105μL,955μmol),之后添加PyBOP(59.8mg,115μmol)和HO-Lys(Boc)(PEG_{1100})RP-2在无水DMF(2.0mL)中的溶液。将反应混合物搅拌18h,并且然后使用水作为循环介质通过TFF(Pellicon 10kDa MWCO膜)纯化,直到收集10渗滤体积作为渗透物。收集渗余物,并与管路洗涤液合并并且冻干,产生呈粉红色固体的[(ε-NHBoc)$_{16}$(α-NHCOPEG$_{25}$)$_{16}$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]CONH-CH_2-CH_2-S-(Me)MAL-PEG_{24}-CONH-Bn-Tz(Me)RP-3(104mg,65%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD):δ(ppm)1.19-1.97(m,383H),2.38-2.54(m,36H),3.06(s,3H),3.09-3.29(m,64H),3.38(s,56H),3.39-3.48(m,8H),3.51-3.59(m,36H),3.59-3.70(m,1889H),3.70-3.80(m,32H),3.85-3.92(m,6H),3.94-4.15(m,7H),4.21-4.44(m,10H),7.60(d,J=8.1Hz,2H)和8.53(d,J=8.1Hz,2H)。HPLC(HPLC法5-80,8min,TFA)R_t=5.10min。

[0846] 1b.46[(ε-NH_2.HCl)$_{16}$(α-NHCOPEG$_{25}$)$_{16}$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]CONH-CH_2-CH_2-S-Me(MAL)-PEG_{24}-CONH-Bn-Tz(Me)RP-4

[0847] 向冷冻小瓶中的[(ε-NHBoc)$_{16}$(α-NHCOPEG$_{25}$)$_{16}$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]CONH-CH_2-CH_2-S-(Me)MAL-PEG_{24}-CONH-Bn-Tz(Me)RP-3(83mg,3.3μmol)添加在甲醇(1.75mL)中的3.0M HCl。将所得溶液搅拌18h并使其升温至室温,之后真空移除挥发物。将残余物溶解于水中并且冻干,产生呈粉红色固体的[(ε-NH_2.HCl)$_{16}$(α-NHCOPEG$_{25}$)$_{16}$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]CONH-CH_2-CH_2-S-Me(MAL)-PEG_{24}-CONH-Bn-Tz(Me)RP-4(82.6mg,定量)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD):δ(ppm)1.27-2.05(m,198H),2.39-2.57(m,36H),3.15-3.29(m,44H),3.38(s,39H),3.39-3.59(m,9H),3.59-3.73(m,32H),3.59-3.70(m,1217H),3.73-3.83(m,33H)和3.85-4.15(m,31H)和4.21-4.55(m,26H)。HPLC(HPLC法5-80,8min,TFA)R_t=4.78min。

[0848] 1b.47[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_{16}$(α-NHCy5)$_1$(α-NHDOTA)$_8$(α-NH_2)$_7$]][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-(Me)MAL-PEG_{24}-CONH-Bn-Tz(Me)RP-5

[0849] 在室温下向[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_{16}$(α-NH_2.HCl)$_{16}$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-

CONH-CH_2-CH_2-S-(Me)MAL-PEG_{24}-CONH-Bn-Tz(Me)RP-4(82.6mg,3.2μmol)在DMF(2.0mL)和NMM(24μL,0.21mmol)中的搅拌溶液中添加花菁5NHS酯(2.3mg,3.2μmol)在DMF(1.0mL)中的溶液。通过LCMS(LCMS法20-90,8min,TFA)监测反应混合物中花菁5NHS酯的消耗。在18h后,向反应混合物中添加p-SCN-Bn-DOTA(44.7mg,68μmol)在DMSO(1.0mL)中的溶液,并且继续搅拌。在2d后,添加水(50mL),并且将所得溶液通过0.45μm滤盘过滤,并使用水作为循环介质通过TFF(Pellicon 10kDa MWCO膜)纯化,直到收集11渗滤体积作为渗透物。收集渗余物,并与管路洗涤液合并并且冻干,产生呈蓝色固体的[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_{16}$(α-NHCy5)$_1$(α-NHDOTA)$_8$(α-NH_2)$_7$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-(Me)MAL-PEG_{24}-CONH-Bn-Tz(Me)RP-5(74.5mg)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD):δ(ppm)0.74-2.23(m,230H),2.36-2.65(m,53H),2.91-3.28(m,102H),3.38(s,63H),3.40-3.46(m,19H),3.52-3.94(m,1959H),6.17-6.86(m,3H),6.96-7.74(m,46H)。通过比较芳香区(δ6.96-7.74ppm)的积分与内标的芳香质子(δ8.62ppm,$2H_{IS}$),使用3,4,5-三氯吡啶作为内标,通过qNMR来确定DOTA的负载量。以这种方式,发现每个分子的DOTA基团数为8.6。由于观察到花菁5NHS酯的完全消耗,因此将每个树枝状体的花菁5基团数设置为1。树枝状体的分子量计算为26,665Da。HPLC(HPLC法5-80,8min,TFA)R_t=4.76min。

[0850] 1b.48[[(ε-NH_2)$_4$(α-NH_2)$_4$][Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$MAL-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)SRS-1-Mal

[0851] 向[[(ε-NH_2.TFA)$_4$(α-NH_2.TFA)$_4$][Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$RL-8(65mg,17.2μmol)在室温下在水(1.0mL)中的溶液中添加0.5M TCEP在水中的溶液(17.0μL,8.5μmol,pH 7.0)。通过LCMS(LCMS法2)监测反应混合物,并且以递增方式添加0.5M TCEP溶液,直到观察到二硫键完全还原(总共在大约1h内添加另外17.0μL、8.5μmol的TCEP)。使用0.1N NaOH(aq)将反应混合物的pH调节至6.2,之后添加Br_2(MAL)-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)RL-15(32mg,16.4μmol)在水(0.5mL)中的溶液。将反应混合物搅拌1h,用水(30mL)稀释,过滤(0.45μm注射器滤盘),并且将滤液转移至具有3kDa MWCO Ultracel®再生纤维素膜的15mL Amicon®Ultra离心过滤器,并且通过在4000rpm下离心20min进行浓缩。通过在4000rpm下离心,将渗余物用水(6x15mL)洗涤,并将其冻干,产生呈橙色固体的[[(ε-NH_2)$_4$(α-NH_2)$_4$][Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$MAL-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-Bn-Tz(Me)SRS-1-Mal(65mg,99%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD):δ(ppm)1.31-1.66(m,37H),1.66-2.02(m,45H),2.05-2.26(m,7H),2.38-2.59(11H),2.91-3.08(m,18H),3.12-3.26(m,8H),3.27-3.41(m,8H),3.40-3.62(m,20H),3.68-3.80(m,20H),3.80-4.05(m,9H),4.23-4.47(m,7H),7.21(d,J=9.0Hz,2H)和8.52(d,J=9.0Hz,2H)。LCMS(LCMS法5-60,8min,TFA)R_t=5.04min。ESI MS(+ve)1265[(M/3)+H]$^+$;$C_{171}H_{327}N_{39}O_{50}S_2$[(M/3)+H]$^+$的计算m/z=1265。

[0852] 1b.49[[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_8$(α-NH_2)$_8$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$MAL-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)SRS-2

[0853] 在室温下向[[(ε-NH_2)$_4$(α-NH_2)$_4$][Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$MAL-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-Bn-Tz(Me)SRS-1-Mal(65mg,17.1μmol)、HO-Lys(Boc)(PEG_{1100})RP-2(289mg,208μmol)和(119μL,1.08mmol)在DMF(4.0mL)中的溶液中添加PyBOP(108mg,208μmol)。在18h后,将反应混合物用水(50mL)稀释,过滤(0.45μm注射器滤盘),并且使用水

作为循环介质通过TFF(Pellicon10kDa MWCO膜)纯化,直到收集10渗滤体积作为渗透物。收集渗余物并与管路洗涤液合并,并且冻干,产生呈深橙色固体的[[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_8$(α-NH_2)$_8$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$MAL-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PE G_4-(PhTzMe)SRS-2(158mg,36%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD):δ(ppm):1.19-2.01(m,307H),2.40-2.55(m,34H),3.03(s,3H)3.10-3.30(m,52H),3.38(s,45H),3.39-3.44(m,9H)3.53-3.59(m,35H),3.59-3.70(m,1522H),3.70-3.80(m,37H),3.84-3.94(m,7H),3.95-4.14(m,8H),4.26-4.44(m,11H),7.22(d,J=9Hz,2H)和8.53(d,J=9Hz,2H)。HPLC(HPLC法5-80,8min,TFA)R_t=5.09min。

[0854] 1b.50[[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_8$(α-NH_2.HCl)$_8$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$MAL-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)SRS-3-Mal

[0855] 在室温下将[[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_8$(α-NH_2)$_8$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$MAL-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)SRS-2(156mg,6.1μmol)溶解于甲醇(3.23mL)中的3.0M HCl中。将所得溶液搅拌18h,之后真空移除挥发物。将残余物溶解于水(约10mL)中,并且将溶液冻干,产生呈深橙色固体的[[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_8$(α-NH_2.HCl)$_8$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$MAL-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)SRS-3-Mal(142mg,95%)。HPLC(HPLC法5-80,8min,TFA)R_t=4.77min。

[0856] 1b.51[[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_8$(α-NHDOTA)$_{4.75}$(α-NHCy5)$_{0.5}$(α-NH_2)$_{2.75}$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$MAL-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)SRS-4-Mal

[0857] 向[[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_8$(α-NH_2.HCl)$_8$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$MAL-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)SRS-3-Mal(130mg,5.3μmol)和NMM(37μL,337μmol)在DMF(mL)中的溶液中添加花菁5NHS脂(3.5mg,5.2μmol)。将反应混合物在室温下搅拌18h,之后添加p-SCN-Bn-DOTA(72mg,105μmol)在DMSO(500μL)中的溶液并继续搅拌另外24h。真空移除挥发物,并且将残余物溶解于水(50mL)中,并且然后将溶液过滤(0.45μm注射器滤盘)并使用水作为循环介质通过TFF(Pellicon 10kDa MWCO膜)纯化,直到收集10渗滤体积作为渗透物。收集渗余物并与管路洗涤液合并,并且冻干,产生呈蓝色固体的[[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_8$(α-NHDOTA)$_{4.75}$(α-NHCy5)$_{0.5}$(α-NH_2)$_{2.75}$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$MAL-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)SRS-4-Mal(120mg)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD):δ(ppm):1.02-2.14(m,110H),2.36-2.61(m,26H),3.03(s,3H),3.07-3.30(m,39H),3.38(s,32H),3.39-3.45(m,11H),3.53-3.59(m,33H),3.69-3.97(m,61H),6.87-7.79(m,22H)和8.52(d,J=9.0Hz,2H)。通过比较芳香区(δ6.80-7.92ppm)的积分与内标的芳香质子(δ8.62ppm,$2H_{IS}$),使用3,4,5-三氯吡啶作为内标,通过qNMR来确定DOTA的负载量。以这种方式,发现每个分子的DOTA基团数为9.5。由于观察到华菁5NHS酯的完全消耗,因此将每个树枝状体的华菁5基团数设置为1。树枝状体的分子量计算为29,817Da。LCMS(LCMS法20-90,8min,TFA,无MS)R_t=5.03min。

[0858] 1b.52[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_{16}$(α-DOTA)$_7$(α-NHCy5)$_1$(α-NH_2)$_8$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-(PN)NCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)HH-2

[0859] 向[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_{16}$(α-NH_2.HCl)$_{16}$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-(PN)NCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)HH-1(129mg,5.6μmol)在DMF(4.0mL)中的搅拌溶液中添加和NMM(39μL,357μmol),之后添加花菁5NHS脂(3.7mg,5.5 5.5μmol)。搅拌18h后,反应混合物

的分析(LCMS法3)显示花菁5NHS酯的完全消耗。添加p-SCN-Bn-DOTA(77mg,112μmol)在DMSO(1.0mL)中的溶液,并且继续搅拌另外24h。然后用稀释反应混合物,将所得溶液转移到Amicon®Ultra离心过滤器中,该过滤器具有10kDa MWCO Ultracel®再生纤维素膜。通过在4000rpm下离心,用水(x5)洗涤渗余物,并且将渗余物冻干,产生蓝色胶状物(117mg)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD):δ(ppm):1.05-2.16(m,172H),2.37-2.58(m,32H),2.98-3.29(m,61H),3.38(s,48H),3.40-3.44(m,9H),3.58-3.70(m,1351H),3.70-3.83(m,43H),3.83-3.97(m,15H)和6.99-7.70(m,25H)。通过比较芳香区(δ6.99-7.70ppm)的积分与内标的芳香质子(δ8.62ppm,$2H_{IS}$),使用3,4,5-三氯吡啶作为内标,通过qNMR来确定DOTA的负载量。以这种方式,发现每个分子的DOTA基团数为7。由于观察到华菁5NHS酯的完全消耗,因此将每个树枝状体的华菁5基团数设置为1。树枝状体的分子量计算为27,420Da。LCMS(LCMS法20-90,8min,TFA,无MS)R_t=5.11min。

[0860] 1b.53(MeTzPh)PEG_4CO-NHPEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_7$)(ε-NH-COPEG_{1100})$_8$],G3,化合物52

[0861] 将Cy5-NHS酯的溶液(1.0mL的在DMF中的1mg/mL溶液;1.0mg,1.59μmol)添加至含有在DMF(0.5mL)中的(MeTzPh)PEG_4CO-NHPEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH_2)$_8$)(ε-NH-COPEG_{1100})$_8$],化合物113(20mg,1.59μmol)的小瓶。向该溶液中添加NMM(10μL,91.0μmol),并且将随后反应混合物避光并且在室温下搅拌。在3.5h后,添加乙酸酐(20μL,212μmol),并且将反应混合物搅拌过夜。将反应混合物减压浓缩,然后溶解于MQ水(5mL)中并且分为两份以用于通过两个(预平衡)PD10柱进行纯化。一旦样品进入柱床,将样品用3.5mL MQ水洗脱,并且收集滤液。将滤液合并并且冷冻干燥过夜。冻干产生呈亮蓝色粉末的标题产物(19.3mg(93%))。HPLC(C8 Xbridge,3x100mm)梯度:5%MeCN/H_2O(0-1min),5%-80%MeCN(1-7min),80%MeCN(7-12min),80%-5%MeCN(12-13min),5%MeCN(13-15min),214nm,0.4mL/min,R_t=8.30min。

[0862] 1b.54(MeTzPh)PEG_4CO-NHPEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_{15}$)(ε-NH-COPEG_{1100})$_{16}$],G4,化合物53

[0863] 将Cy5-NHS酯(520μL的在DMF中的1mg/mL溶液;0.52mg,844nmol)的溶液添加至含有在DMF(1.0mL)中的(MeTzPh)PEG_4CO-NHPEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[((α-NH_2.HCl)$_{16}$)(ε-NH-COPEG_{1100})$_{16}$]化合物120(20mg,844nmol)的小瓶。向该溶液中添加NMM(10μL,94.5μmol),并且将随后反应混合物避光并且在室温下搅拌。在3.5h后,添加乙酸酐(20μL,230μmol),并且将反应混合物搅拌过夜。将反应混合物减压浓缩,然后溶解于MQ水(5mL)中并且分为两份以用于通过两个(预平衡)PD10柱进行纯化。一旦样品进入柱床,将样品用3.5mL MQ水洗脱,并且收集滤液。将滤液合并并且冷冻干燥过夜。冻干产生呈亮蓝色粉末的标题产物(19.9mg(98%))。HPLC(C8 Xbridge,3x100mm)梯度:5%MeCN/H_2O(0-1min),5%-80%MeCN(1-7min),80%MeCN(7-12min),80%-5%MeCN(12-13min),5%MeCN(13-15min),214nm,0.4mL/min,R_t=8.40min。

[0864] 1b.55(MeTzPh)PEG_4CO-NHPEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$)(ε-NH-COPEG_{1100})$_{32}$],G5,化合物54

[0865] 将Cy5-NHS酯的溶液(300μL的在DMF中的1mg/mL溶液;0.30mg,487nmol)添加至含有在DMF(1.2mL)中的(MeTzPh)PEG_4CO-NHPEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$

$[Lys]_{32}[(\alpha\text{-}NH_2.TFA)_{32}(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{1100})_{32}]$化合物122(20mg,435nmol)的小瓶。向该溶液中添加NMM(11μL,97.5μmol),且将随后反应混合物避光并在室温下搅拌。在3.5h后,添加乙酸酐(22μL,237μmol),并且将反应混合物搅拌过夜。将反应混合物减压浓缩,然后溶解于MQ水(5mL)中并且分为两份以用于通过两个(预平衡)PD10柱进行纯化。一旦样品进入柱床,将样品用3.5mL MQ水洗脱,并且收集滤液。将滤液合并并且冷冻干燥过夜。冻干产生呈亮蓝色粉末的标题产物(18.7mg(91%))。HPLC(C8 Xbridge,3x100mm)梯度:5%MeCN/H_2O(0-1min),5%-80%MeCN(1-7min),80%MeCN(7-12min),80%-5%MeCN(12-13min),5%MeCN(13-15min),214nm,0.4mL/min,R_t=8.50min。

[0866] 1b.56叠氮基-$PEG_{24}CO$-$[N(PN)_2][Lys]_2[Lys]_4[Lys]_8[(\alpha\text{-}NHGlu\text{-}vc\text{-}PAB\text{-}MM\ AE)_8(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{570})_8]$,G3,化合物64

[0867] 根据一般程序E使用叠氮基-$PEG_{24}CO$-$[N(PN)_2][Lys]_2[Lys]_4[Lys]_8[(\alpha\text{-}NH_2.TFA)_8(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{570})_8]$化合物14(7.2mg,842nmol)和HO-Glu-vc-PAB-MMAE(10.0mg,8.08μmol)制备,产生浓度为14.6mg/3.5mL的产物化合物64(240μm)。

[0868] 1b.57叠氮基-$PEG_{24}CO$-$[N(PN)_2][Lys]_2[Lys]_4[Lys]_8[(\alpha\text{-}NHGlu\text{-}vc\text{-}PAB\text{-}MM\ AE)_8(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{1100})_8]$,G3,化合物65

[0869] 根据一般程序E使用叠氮基-$PEG_{24}CO$-$[N(PN)_2][Lys]_2[Lys]_4[Lys]_8[(\alpha\text{-}NH_2.TFA)_8(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{1100})_8]$化合物10(10.8mg,842nmol)和HO-Glu-vc-PAB-MMAE(10.0mg,8.08μmol)制备,产生浓度为18mg/3.5mL的产物化合物65(240μm)。

[0870] 1b.58叠氮基-$PEG_{24}CO$-$[N(PN)_2][Lys]_2[Lys]_4[Lys]_8[(\alpha\text{-}NHGlu\text{-}vc\text{-}PAB\text{-}MM\ AE)_8(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{2000})_8]$,G3,化合物66

[0871] 根据一般程序E使用叠氮基-$PEG_{24}CO$-$[N(PN)_2][Lys]_2[Lys]_4[Lys]_8[(\alpha\text{-}NH_2.TFA)_8(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{2000})_8]$化合物16(18.1mg,842nmol)和HO-Glu-vc-PAB-MMAE(10.0mg,8.08μmol)制备,产生浓度为25.5mg/3.5mL的产物化合物66(240μm)。

[0872] 1b.59叠氮基-$PEG_{24}CO$-$[N(PN)_2][Lys]_2[Lys]_4[Lys]_8[(\alpha\text{-}NHDGA\text{-}MMAF(OMe))_8(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{1100})_8]$,G3,化合物67

[0873] 根据一般程序E使用叠氮基-$PEG_{24}CO$-$[N(PN)_2][Lys]_2[Lys]_4[Lys]_8[(\alpha\text{-}NH_2.TFA)_8(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{1100})_8]$化合物10(16.3mg,1.28μmol)和DGA-MMAF(OMe)(10.6mg,12.3μmol)制备,产生浓度为23.8mg/3.5mL的产物化合物67(365μm)。

[0874] 1b.60BHA$[Lys]_2[Lys]_4[Lys]_8[((\alpha\text{-}NH\text{-}COPEG_{24}NH\text{-}COPEG_4(PhMeTz))_1(\alpha\text{-}NH_2)_7)(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{1000})_8]$,G3,化合物69

[0875] 在室温下制备BHA$[Lys]_2[Lys]_4[Lys]_8[(\alpha\text{-}NH_2.TFA)_8(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{1000})_8]$(参考文献1)(100mg,0.00786mmol,1.0当量)在DMF(300μL)中的搅拌溶液。向该搅拌溶液中添加(MeTzPh)PEG_4CO-$NHPEG_{24}CO_2H$(点击化学工具;16mg,0.01mmol,1.3当量)、PyBOP(8mg,0.013mmol,1.6当量)和DMF(200μL)。将反应混合物搅拌3min,然后添加NMM(40mg,50μL,0.38mmol,48当量)。将内容物避光并且在室温下搅拌过夜。将反应混合物用MQ水稀释并且冻干过夜。将冻干物质溶解于MeOH(1mL)中,并且通过SEC(400滴/管,MeOH sephadex LH20,35滴/min)纯化。将含产物级分通过HPLC检查并且以2个不同级分收集。减压浓缩每个级分,然后将所得残余物溶解于MQ水中,过滤(0.45μm acrodisc过滤器)并且冷冻干燥,产生呈粉红色固体的化合物69(69mg,66%)。HPLC(C8 Xbridge,3x100mm)梯度:5%MeCN/H_2O(0-

1min),5%-80%MeCN(1-7min),80%MeCN(7-12min),80%-5%MeCN(12-13min),5%MeCN(13-15min),214nm,0.4mL/min,R_t=8.4min(宽峰)。^{1}H NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):1.00-2.00(m,90H),2.51(t,3H),2.60(br s,3H),3.00-3.12(m,6H),3.12-3.35(br s,27H),3.35-3.45(m,26H),3.45-4.15(m,937H),4.15-4.45(m,12H),6.12(s,1H),7.15-7.50(m,12H),8.40-8.50(m,2H)。

[0876] 1b.61BHA[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_2$-BCN)$_1$(α-NH$_2$)$_7$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_8$],G3,化合物70

[0877] 在室温下制备BCN-PEG$_2$CO-NHPEG$_{24}$-CO$_2$H化合物19(9.6mg,0.006mmol,1.3当量)在DMF(200μL)中的搅拌溶液。向该搅拌溶液中添加PyBOP(4mg,0.008mmol,1.6当量)和NMM(23mg,25μL,0.226mmol,48当量)并且在5min后,添加BHA[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH$_2$.TFA)$_8$(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_8$](参考文献1)(60mg,0.006mmol,1.0当量),之后添加DMF(200μL)。将内容物避光并且在室温下搅拌过夜。将反应混合物用MeCN(10mL)稀释,然后通过SEC(400滴/管,MeCN sephadex LH20,35滴/min)纯化。将含产物级分通过HPLC检查,收集,过滤(0.45μm acrodisc过滤器),减压浓缩并且冷冻干燥过夜,产生呈淡黄色固体的化合物70(58mg,产率92%)。HPLC(C8XBridge,3x100mm)梯度:5%MeCN/H_2O(0-1min),5-80%MeCN(1-7min),80%MeCN(7-12min),80-5%MeCN(12-13min),5%MeCN(13-15min),214nm,0.4mL/min,R_t=8.43min(宽峰)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):0.75-1.12(m,15H),1.12-2.15(m,95H),2.15-2.35(m,7H),2.55(br s,3H),3.00-3.35(m,90H),3.35-3.38(s,17H),3.38-4.09(m,592H),4.13(d,2H),4.18-4.63(br s,7H),6.18(s,0.9H),7.12-7.48(m,7H)。

[0878] 1b.62(MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHGlu-VC-PAB-MMAE)$_7$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$],G3,化合物71

[0879] 将Cy5-NHS的溶液(214μL的在DMF中的4.2mg/mL溶液;1.43μmol,1.0当量)添加至纯的(MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH$_2$.HCl)$_8$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]化合物113(18mg,1.43μmol)。一旦完全溶解,就添加NMM(10μL,91.0μmol),并且将随后反应混合物搅拌并避光。在2h后,将NMM(10μL,91.0μmol)和PyBOP(7.3mg,14.0μmol)添加至树枝状体溶液中,之后添加Glu-VC-PAB-MMAE在DMF中的溶液(290μL 60mg/mL溶液,14.0μmol,9.8当量)。将随后反应混合物避光并且在室温下搅拌过夜。将反应混合物用PBS(2.0mL)稀释,以产生2.5mL的最终体积。然后将稀释的溶液通过PD10脱盐柱(用PBS预平衡)。一旦全部溶液进入了柱床,就添加PBS(3.5mL)以洗脱产物(其显现为蓝色条带)。化合物71在PBS中的最终理论浓度=8.7mg/mL。将物质在-80℃下冷冻储存。HPLC(C8 Xbridge,3x100mm)梯度:5%MeCN/H_2O(0-1min),5%-80%MeCN(1-7min),80%MeCN(7-12min),80%-5%MeCN(12-13min),5%MeCN(13-15min),214nm,0.4mL/min,R_t=95-10min(宽峰);具有7%MMAE/MMAE-接头的83%缀合物相关峰。

[0880] 1b.63(MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[^{3}H-Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH Glu-VC-PAB-MMAE)$_8$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$],G3,化合物72

[0881] 向(MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[^{3}H-Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH$_2$.HCl)$_8$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$](根据用于合成化合物114的程序合成,但使用氚化DBL-OPNP(参考文献1)来合成G2层)(36.8mg,2.93μmol)在NMM/DMF(7.8μL/0.5mL)中的溶液中添加固体PyBOP(24.7mg,47.5μmol)。一旦完全溶解,就将树枝状体溶液添加至HO-Glu-VC-PAB-MMAE(40mg,

32.3μmol)在NMM/DMF(7.8μL/0.5mL)中的溶液。将随后反应混合物避光并且在室温下搅拌过夜。将反应混合物用PBS(4.0mL)稀释,以产生5mL的最终体积。然后将稀释的溶液通过两个PD10脱盐柱(用PBS预平衡,2.5mL通过每个柱)。一旦全部溶液进入了柱床,就将PBS(3.5mL)添加至每个柱以洗脱产物。将所得粗制混合物使用再生纤维素Amicon Ultra-0.5mL离心单元(10K MWCO)进一步纯化。化合物72在PBS中的最终理论浓度=29-30mg/mL。将物质在-20℃下冷冻储存。HPLC(C8 Xbridge,3x100mm)梯度:5%MeCN/H_2O(0-1min),5%-80%MeCN(1-7min),80%MeCN(7-12min),80%-5%MeCN(12-13min),5%MeCN(13-15min),214nm,0.4mL/min,R_t=9.5-12min(宽峰);具有8.6%MMAE/MMAE-接头相关峰的91.4%缀合物相关峰。

[0882] 1b.64(MeTzPh)PEG_4CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NHDF O)$_2$(α-NHGlu-VC-PAB-MMAE)$_6$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$],化合物73

[0883] 在室温下制备p-SCN-去铁胺(2.1mg,2.79μmol)在DMSO(100μL)中的搅拌溶液。向该搅拌溶液中添加在DMF(200μL)中的(MeTzPh)PEG_4CO-NHPEG$_{24}$CO[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH_2.HCl)$_8$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]化合物113(17.0mg,1.35μmol)。将随后反应混合物搅拌3min,然后添加NMM(10μL,91.0μmol)。将所得溶液避光并在室温下搅拌4h。添加PyBOP(7.0mg,13.5μmol),并且在5min后,将反应混合物添加至纯的HO-Glu-VC-PAB-MMAE(9.76mg,7.89μmol)。将随后反应混合物静置过夜。将反应混合物用PBS缓冲液(4.5mL)稀释并且跨4个Amicon Ultra离心过滤器(10K MWCO)划分,并且离心(14K rcf,15min)过滤器。将渗余物在PBS中渗滤(400μL,14K rcf,15min x 10次)。将渗余物合并,产生粉红色溶液,近似浓度为2mL中16mg化合物73。HPLC(C8 Xbridge,3x100mm)梯度:5%MeCN/H_2O(0-1min),5%-80%MeCN(1-7min),80%MeCN(7-12min),80%-5%MeCN(12-13min),5%MeCN(13-15min),214nm,0.4mL/min,R_t=8.7-9.8min(宽峰)。

[0884] 1b.65BHA[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))$_1$(α-NH DFO)$_2$(α-NHGlu-VC-PAB-MMAE)$_5$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$],化合物74

[0885] 在室温下制备p-SCN-去铁胺(2.0mg,2.66μmol)在DMSO(100μL)中的搅拌溶液。向该搅拌溶液中添加在DMF(200μL)中的BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))$_1$(α-NH_2)$_7$)(ε-NHPEG$_{1100}$)$_8$]化合物69(17.0mg,1.27μmol)。将随后反应混合物搅拌3min,然后添加NMM(10μL,91.0μmol)。将所得溶液避光并且在室温下搅拌4h。添加PyBOP(7.0mg,13.5μmol),并且在5min后,将反应混合物添加至纯的HO-Glu-VC-PAB-MMAE(9.17mg,7.41μmol)。将随后反应混合物静置过夜。将反应混合物用PBS缓冲液(4.5mL)稀释并且跨4个Amicon Ultra离心过滤器(10K MWCO)划分,并且离心(14K rcf,15min)过滤器。将渗余物在PBS中渗滤(400μL,14K rcf,15min x 10次)。将渗余物合并,产生粉红色溶液,近似浓度为2mL中16mg化合物74。HPLC(C8 Xbridge,3x100mm)梯度:5%MeCN/H_2O(0-1min),5%-80%MeCN(1-7min),80%MeCN(7-12min),80%-5%MeCN(12-13min),5%MeCN(13-15min),214nm,0.4mL/min,R_t=9.3-9.7min(宽峰)。

[0886] 1b.66(MeTzPh)-PEG$_{24}$-CO[N(PNBoc)$_2$]化合物106

[0887] 在N_2气氛下向(MeTzPh)-PEG$_{24}$-CO_2H(0.402g,0.305mmol)、PyBOP(0.205g,0.394mmol)和NMM(130μL,1.18mmol)在DMF(3mL)中的搅拌溶液中添加NH(PNBoc)$_2$(0.147g,0.444mmol)。将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且将所得油状物在

硅胶色谱(5%至10%MeOH/DCM)上纯化,产生呈红色残余物的所需产物化合物106(0.474g,95%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.43-1.44(m,18H);1.64-1.80(m,4H);2.63(t,J 6.0Hz,2H);3.00(s,3H);3.02-3.09(m,4H);3.34-3.40(m,4H),3.58-3.77(m,99H);3.88-3.91(m,2H);4.25-4.28(m,2H);7.15-7.20(m,2H);8.46-8.51(m,2H)。LCMS(疏性法,甲酸缓冲液)R_t=6.20min。ESI MS(+ve)1631.0[M+H]+;$C_{76}H_{140}N_7O_{30}$[M+H]$^+$的计算m/z:1631.0。

[0888] 1b.67(MeTzPh)-PEG_{24}-CO[N(PNH_2.HCl)$_2$]化合物107

[0889] 向在冰/水浴中的(MeTzPh)-PEG_{24}-CO[N(PNBoc)$_2$]化合物106(0.420g,0.258mmol)中缓慢添加1.25M HCl/MeOH溶液(8mL,10.0mmol)。在5min后,移除冰浴并且使随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,产生呈红色残余物的产物化合物107(0.388g,100%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.91-2.07(m,4H);2.68(t,J 6.0Hz,2H);2.94-3.09(m,7H);3.53-3.80(m,108H);3.88-3.91(m,2H);4.25-4.28(m,2H);7.16-7.20(m,2H);8.47-8.51(m,2H)。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)R_t=8.12min。ESI MS(+ve)1430.9[M+H]$^+$;$C_{66}H_{124}N_7O_{26}$[M+H]$^+$的计算m/z:1430.8。

[0890] 1b.68(MeTzPh)-PEG_4-PEG_{24}-CO[N(PNH_2.HCl)$_2$]化合物108

[0891] 向H_2N-PEG_{24}-CO[N(PNBoc)$_2$](0.418g,0.286mmol)在DMF(2.0mL)中的搅拌溶液中添加(MeTzPh)-PEG_4-CO_2H(0.15g,0.344mmol)、PyBOP(0.178g,0.342mmol)和NMM(80μL,0.727mmol)。将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且将所得油状物在冰/水浴中冷却,然后缓慢添加1.25M HCl/MeOH溶液(10.0mL,12.5mmol)。在5min后,移除冰浴并且使随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且将所得油状物溶解于MeCN/H2O(8mL,1:1)中并且通过制备性HPLC(10%-50%MeCN,0.1%甲酸缓冲液,RT 35min)纯化,产生红色固体化合物108(1.37g,54%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.91-2.04(m,4H);2.43(t,J 6.0Hz,2H);2.68(t,J 6.0Hz,2H);2.94-3.07(m,4H);3.00(s,3H);3.35(t,J 6.0Hz,2H);3.51-3.80(m,119H);3.88-3.91(m,2H);4.25-4.28(m,2H);7.16-7.20(m,2H);8.46-8.51(m,2H)。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)R_t=8.15min。ESI MS(+ve)1677.9[M+H]$^+$;$C_{77}H_{145}N_8O_{31}$[M+H]$^+$的计算m/z:1678.0。

[0892] 1b.69(MeTzPh)-PEG_4-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_2$[NHBoc]$_4$G1化合物109

[0893] N_2气氛下向(MeTzPh)-PEG_4-PEG_{24}-CO[N(PNH_2.HCl)$_2$]化合物108(0.195g,0.111mmol)和DBL-OPNP(参考文献1)(0.146g,0.312mmol)在DMF(3.0mL)中的搅拌溶液中添加NMM(125μL,0.864mmol)。然后将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且将所得油状残余物通过硅胶柱色谱(5%-10%-15%MeOH/DCM)纯化,产生呈红色油状物的所需产物化合物109(0.186g,72%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.28-1.87(m,56H);2.43(t,J 6.0Hz,2H);2.63(t,J 6.0Hz,4H);3.00(s,3H);3.02-3.06(m,4H);3.10-3.21(m,4H);)。3.35-3.41(m,6H);3.51-3.78(m,110H);3.84-3.99(m,4H);4.25-4.28(m,4H);7.15-7.20(m,2H);8.47-8.51(m,2H)。LCMS(疏性法,甲酸缓冲液)R_t=6.68min;ESI MS(+ve)2335.3,[M+H]$^+$;$C_{109}H_{201}N_{12}O_41$+[M+H]$^+$的计算m/z=2335.4。

[0894] 1b.70(MeTzPh)-PEG_4-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_2$[NH_2.HCl]$_4$G1化合物110

[0895] 向冰冷却的(MeTzPh)-PEG_4-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_2$[NHBoc]$_4$化合物109(0.215g,0.0921mmol)中缓慢添加1.25M HCl/MeOH(6.0mL,7.50mmol)的溶液。在5min后,移除冰浴并且使随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,产生呈红色油状物的产物化合

物110(0.208g,108%)。%)。^{1}H NMR(300MHz,CD3OD)δ(ppm):1.51-1.99(m,20H);2.47(t,J 6.0Hz,2H);2.67(t,J6.0Hz,4H);2.90-3.04(m,7H);3.35-3.41(m,7H);3.51-3.78(m,106H);4.25-4.28(m,2H);7.17-7.20(m,2H);8.47-8.51(m,2H);LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)R_t=7.28min,ESI MS(+ve)1934.9$[M+H]^+$;$C_{89}H_{169}N_{12}O_{33}[M]^+$的计算m/z=1935.2。

[0896] 1b.71(MeTzPh)-PEG_4-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[NHBoc]$_8$G2化合物111

[0897] N_2气氛下向(MeTzPh)-PEG_4-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_2$[NH_2.HCl]$_4$化合物110(0.192g,0.0822mmol)和DBL-OPNP(参考文献1)(0.215g,0.460mmol)在DMF(3.0mL)中的搅拌溶液中添加NMM(215μL,0.1.96mmol)。然后将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且将所得油状残余物在硅胶色谱(5%-10%-15%MeOH/DCM)上纯化,产生呈红色油状物的所需产物化合物111(0.231g,87%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.28-1.87(m,140H);2.44(t,J 6.0Hz,2H);2.63(t,J 6.0Hz,2H);3.00(s,3H);3.02-3.06(m,10H);3.10-3.21(m,16kH))。3.33-3.40(m,8k H);3.51-3.77(m,120H);3.84-3.99(m,14H);3.94-4.10(m,4H);4.25-4.28(m,4H);7.15-7.20(m,2H);8.47-8.52(m,2H)。LCMS(疏性法,甲酸缓冲液)R_t=8.15min;ESI MS(+ve)$[M+2]^+$=1624.5;[(M-3Boc)+3]=1016.6;$C_{153}H_{281}N_{20}O_{53}^+[M+H]^+$的计算m/z=3247.99。

[0898] 1b.72(MeTzPh)-PEG_4-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[NH_2.HCl]$_8$G2化合物112

[0899] 向冰冷却的(MeTzPh)-PEG_4-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[NHBoc]$_8$化合物111(0.231g,0.0711mmol)中缓慢添加1.25M HCl/MeOH(9.0mL,11.3mmol)的溶液。在5min后,移除冰浴并且使随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,产生呈红色油状物的产物化合物112(0.226g,100%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.51-1.96(m,40H);2.53(t,J=6.0Hz,2H);2.96-3.04(m,10H);3.15-3.20(m,8H);3.39-3.45(m,7H);3.54-4.10(m,102H);4.25-4.28(m,2H);7.17-7.20(m,2H);8.48-8.51(m,2H);LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)R_t=6.38min,ESI MS(+ve)2447.6$[M+H]^+$;$C_{113}H_{217}N_{20}O_{37}[M+H]^+$的计算m/z=2447.6。

[0900] 1b.72(MeTzPh)-PEG_4-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH_2.HCl)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_8$G3化合物113

[0901] 在N_2气氛下向HO-Lys(Boc)(PEG_{1100})(参考文献1)(0.541g,0.402mmol)和PyBOP(0.195g,0.375mmol)在DMF(2mL)中的搅拌溶液中添加NMM(225μL,2.96mmol)。在10min后,将该溶液添加至在DMF(1mL)中的(MeTzPh)-PEG_4-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[NH_2.HCl]$_8$化合物112(0.109g,0.0398mmol)。将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且将所得粗制物在冰/水浴中冷却。向冷却的残余物中缓慢添加1.25M(8.0mL,10mmol)。在10min后,移除冷浴,且将反应物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,然后溶解于H_2O(16mL)中。将溶液使用Millipore Amicon Ultra-15离心过滤器单元(4个单元x 10kDa MWCO单元)通过离心*纯化。将渗余物冷冻干燥过夜,产生呈红色固体的产物化合物113(0.327g,65%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.40-1.87(m,88H);2.49-2.56(m,18H);2.68-2.72(m,2H);3.08(s,3H);3.17-3.30(m 30H);3.37-3.51(m,10H);3.41(s,24H);3.59-4.01(m,816H);4.25-4.40(m,8H);7.29-7.33(m,2H);8.44-8.49(m,2H);LCMS(亲性法,TFA缓冲液)R_t=10.28min。

[0902] *[将单元用H_2O(5mL)预冲洗,并且在4000rpm下旋转5min。重复该过程。将粗制溶液通过0.45μm注射器过滤器过滤,然后放置于离心单元中。然后将所述单元在4000rpm下旋

转15min。然后用H_2O(4mL)稀释渗余物,然后再次在4000rpm下旋转15min。重复该过程8次。]

[0903] 1b.73纳米抗体-N_3/DBCO-DFO化合物114

[0904] DBCO-DFO化合物56的溶液是通过以下方式制备的:将0.4mg化合物溶解于200μL DMSO中,将124μL DBCO-DFO溶液(48μg,0.054μmol)添加至Tris缓冲液(pH 8)中的纳米抗体-N_3("纳米抗体-N3-C末端标签")溶液(228μg;0.015μmol)中,并将溶液在4℃下静置过夜。反应混合物的UPLC分析显示未反应的叠氮基纳米抗体,表明反应未完成。将另外24μg(0.027μmol)的DBCO-DFO化合物添加至反应混合物中,并且将反应混合物在4℃下静置过周末。反应混合物的UPLC分析显示反应完成。UPLC:30%至40%MeCN与0.01TFA历经15分钟,R_t:对于叠氮基纳米抗体-N_3为9.91min,其中m/z为14308,并且R_t:对于NB-DFO产品为10.79,其中m/z为15184。

[0905] 使用Tris缓冲液(pH 8)将样品稀释至1mL,并然后使用旋转柱纯化(Amicon0.5mL;10kDa截止值;Tris作为流动相;10次洗涤(450μL/洗涤)。获得在Tris缓冲液(pH 8)中浓度为约250μg/300μL的NB-DFO产物114。

[0906] 1b.74BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NH-COPEG$_{24}$-NHFmoc)$_8$],G3化合物115

[0907] 向BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[α-NHBoc)$_8$(ε-NH$_2$)$_8$](参考文献1)(100mg,0.0344mmol)在DMF(2mL)中的溶液中添加Fmoc-NH-PEG$_{24}$-COOH(451mg,0.329mmol)、PyBOP(171mg,0.329mmol)和NMM(90μL,0.0826mmol),并且将反应物在室温下搅拌过夜。通过HPLC检查反应进程,并且一旦认为完成,就真空浓缩,并且将产物化合物115不经进一步纯化而用于下一步中。

[0908] 1b.75BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NH-COPEG$_{24}$-NH$_2$)$_8$],G3化合物116

[0909] 向BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NH-COPEG$_{24}$-NHFmoc)$_8$]化合物115(470mg,0.0343mmol,按前一步骤的100%产率处理)在DMA(4mL)中的溶液中添加哌啶(1mL),并且通过HPLC分析监测反应。在起始材料消耗后,减压浓缩反应物并通过SEC(400滴/管,MeOH sephadex LH20,35滴/min)纯化。通过TLC分析(5%$BaCl_2$溶液,之后是碘染料;深棕色斑点)然后HPLC检查级分,将含有产物的级分合并并且减压浓缩。将残余物溶解于MQ水中,过滤(0.45μm acrodisc过滤器)并冷冻干燥,产生呈浅棕色膜状物的化合物116(190mg,46%产率,经两步)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):0.9-1.93(m,162H),2.44(m,16H),2.93-3.24(m,46H),3.40(m,7H),3.48-3.78(m,800H),3.87(m,6H),4.00(m,9H),4.3(m,7H),4.45(m,1H),6.19(s,1H),7.23-7.37(m,10H)。HPLC(C8 Xbridge,3x100mm)梯度:5%MeCN/H_2O(0-1min),5%-80%MeCN(1-7min),80%MeCN(7-12min),80%-5%MeCN(12-13min),5%MeCN(13-15min),214nm,0.4mL/min,R_t=7.9-8.1min(宽峰)。

[0910] 1b.76((1R,8S,9s)-双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基)甲基(2-(3-(2,5-二氧-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丙酰胺基)乙基)氨基甲酸酯化合物117

[0911] 向MPS-EDA.TFA(0.204g,0.627mmol,来自Quanta BioDesign)和BCN-NHS(0.224g,0.769mmol,来自SynAffix)在DMF(3.0mL)中的溶液中添加NMM(0.210mL,1.91mmol)。使反应在室温下搅拌2h,然后真空浓缩。将残余物通过硅胶色谱(100%EtOAc,1%Et_3N)纯化,获得产物(0.147g,61%)。^{1}H NMR(300MHz,d_6-DMSO)δ(ppm):0.85-0.87(m,2H);1.23-1.28(m,2H);1.49-1.51(m,2H);2.15-2.32(m,8H);2.98-3.02(m,4H);3.57-3.61(m 2H););4.01-

4.03(m 2H);6.98(brs,2H);7.05(brs,1H);7.97(brs,1H)。

[0912] 1b.77纳米抗体(普通的,具有纯化标签)GGSHHHHHHGMASMTGGQQM GRDLYENLYFQGE VQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQ VPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRNNAN NTLYLQMNSLKSEDT AVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQVTVSS化合物118

[0913] 1b.78(MeTzPh)-PEG_4-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[NH_2.HCl]$_{16}$G3化合物119

[0914] 在N_2气氛下向(MeTzPh)-PEG_4-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[NH_2.HCl]$_8$化合物112(0.098g,0.0358mmol)和DBL-OPNP(参考文献1)(0.207g,0.443mmol)在DMF(2.0mL)中的搅拌溶液中添加NMM(190μL,1.973mmol)。然后将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且将所得油状残余物在硅胶色谱(5%-10%-15%MeOH:二氯甲烷)上纯化,产生呈红色油状物的Boc保护产物(0.128g,70%)。将纯化物质在冰/水浴中冷却,然后缓慢添加1.25M HCl/MeOH(6.5mL,8.5mmol)的溶液。在5min后,移除冰浴并且使随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,产生呈红色油状物的产物化合物119(0.107g,100%)。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)R_t=7.48min,ESI MS(+ve)3471$[M+H]^+$;计算m/z$[M+H]^+$=3472。

[0915] 1b.79(MeTzPh)-PEG_4-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[(α-NH_2.HCl)(ε-NH-CO PEG_{1100})]$_{16}$G4化合物120

[0916] 在N_2气氛下向HO-Lys(Boc)(PEG_{1100})(参考文献1)(0.107g,0.132mmol)和PyBOP(0.065g,0.125mmol)在DMF(1.5mL)中的搅拌溶液中添加NMM(50μL,0.455mmol)。在10min后,将该溶液添加至(MeTzPh)-PEG_4-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[NH_2.HCl]$_{16}$化合物119(0.0221g,0.00545mmol)。将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且将所得粗制物在冰/水浴中冷却。向冷却的残余物中缓慢添加1.25M HCl/MeOH(1.5mL,1.88mmol)。在10min后,移除冷浴,并且将反应物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,然后溶解于H_2O(5mL)中。将溶液使用Millipore Amicon Ultra-15离心过滤器单元(10kDa MWCO)通过离心纯化。将渗余物冷冻干燥过夜,并且在Gilson仪器[单一梯度60min,10>60% MeCN(0.1%TFA缓冲液,RT 36min]上通过制备性HPLC进一步纯化,产生呈红色固体的产物化合物120(0.021g,25%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.28-1.87(m,184H);2.42-249(m,35H);3.00(s,3H);3.12-3.23(m 60H);3.34-3.40(m,63H);3.52-4.01(m,826H);4.25-4.39(m,16H);7.17-7.20(m,2H);8.48-8.51(m,2H);LCMS(亲性法,TFA缓冲液)R_t=8.96min。ESI MS(+ve)2095$[M+7H]^+$;1834$[M+8H]^+$;1630$[M+9H]^+$。

[0917] 1b.80(MeTzPh)-PEG_4-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[NH_2.TFA]$_{32}$G4化合物121

[0918] 根据化合物119制备并且使用TFA/AcOH脱保护,产生呈红色固体的化合物121(0.078g,78%)。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)RT=7.74min。ESI MS(+ve)2095$[M+7H]^+$;1834$[M+8H]^+$;1630$[M+9H]^+$。

[0919] 1b.81(MeTzPh)-PEG_4-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH_2.TFA)(ε-NH-COPEG_{1100})]$_{32}$G5化合物122

[0920] 在N_2气氛下向HO-Lys(Boc)(PEG_{1100})(参考文献1)(0.476g,0.354mmol)和PyBOP(0.170g,0.327mmol)在DMF(3.0mL)中的搅拌溶液中添加NMM(180μL,0.500mmol)。在10min

后，将该溶液添加至(MeTzPh)-PEG_4-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[NH_2.TFA]$_{32}$化合物121(0.078g,0.00850mmol)。将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物，并且将所得粗制物溶解于H_2O(1.0mL)中并且缓慢添加TFA(1.0mL)。将反应物在室温下搅拌过夜。将反应物用H_2O(12mL)稀释，并且使用Millipore Amicon Ultra-15离心过滤器单元(10kDa MWCO)通过离心纯化。将渗余物冷冻干燥过夜，产生呈粉红色固体的产物化合物122(0.374g,91％)。^{1}H NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):1.41-1.87(m,376H);2.52-2.56(m,64H);3.09(s,3H);3.17-3.24(m,126H);3.41(s,93H)3.48-3.98(m,2960H);4.27-4.39(m,32H);7.30-7.33(m,2H);8.46-8.49(m,2H);HPLC(HPLC-Philic法，甲酸盐缓冲液，15min)R_t＝8.60min。

[0921] 1b.82BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHAc)$_{30}$(α-NHDOTA)$_2$(ε-NHCOPEG$_{2000}$)$_{32}$]化合物RH-3

[0922] 向BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH_2)$_{30}$(α-NHDOTA)$_2$(ε-NHCOPEG$_{2000}$)$_{32}$]化合物RH-2(63mg,860μmol)在DMF(0.6mL)中的搅拌溶液中添加TEA(25μL,228μmol)，之后添加乙酸酐(41μL,430μmol)。将随后反应混合物在环境温度下搅拌过夜。将反应混合物真空浓缩，溶解于MeOH(1.0mL)中并且通过SEC纯化。将含产物的级分合并且真空浓缩，将所得残余物溶解于MQ水中，过滤(0.45m acrodisc过滤器)并冻干。将所得固体溶解于MQ水(50mL)中，并且使用MQ水通过超滤(minimate)纯化。在收集11DV的渗透物后，将渗余物浓缩，过滤(0.22μm的acrodisc过滤器)并冻干，产生化合物RH-3-160(52.2mg)。HPLC(HPLC-亲性法，甲酸盐缓冲液，15min)R_t＝8.56min。^{1}H NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):1.16-1.90(m,359H),2.02(宽s,101H),3.01-3.31(m,133H),3.38(s,96H),3.45-3.48(m,43H),3.52-4.40(m,5267H),6.09(宽s,1H),7.13-7.54(m,17H)。^{1}H NMR分析表明大约1.8DOTA/树枝状体；DOTA的％(w/w)＝1.7％。

[0923] 1c.纳米抗体对照的合成

[0924] 1c.1纳米抗体-N_3/DBCO-磺基-PEG_3-DFO，化合物82

[0925] 将纳米抗体-N_3(“纳米抗体-N3-C末端标签”)的溶液(5.78mg在2mL 20mM Tris中，pH8)与DBCO-磺基-PEG_4-DFO化合物55(535μL的1mg/ml水中溶液，1当量)反应。将随后反应混合物在室温下静置过夜。使用10k MWCO Amicon Ultra离心过滤器进行通过缓冲液交换去除过量的未反应DBCO-磺基-PEG_3-DFO。然后将纳米抗体-树枝状体缀合物缓冲交换成pH 8的10mM HEPES以用于放射性标记。通过HPLC确认未反应的DBCO-磺基-PEG_3-DFO的移除。

[0926] 1c.2纳米抗体-Cys/MAL-Cy5 SRS-19

[0927] 纳米抗体-Cys SRS-13在TCEP还原后与磺基-花菁5马来酰亚胺(Lumirobe目录13380)缀合。将10摩尔当量的TCEP添加至pH 7.2 10mM PBS中的纳米抗体-Cys SRS-13。用氮气冲洗反应管，并且将反应混合物在室温下静置2h。通过使用7k MWCO Zebaspin脱盐柱(Thermo Fisher目录89882)脱盐去除过量的TCEP。然后添加5摩尔当量的磺基-花菁5马来酰亚胺。用氮气冲洗反应管，并且将反应混合物在室温下静置20h。使用7k MWCO Zebaspin脱盐柱移除任何未反应的磺基-花菁5马来酰亚胺。

[0928] 1d.曲妥珠单抗对照的合成

[0929] 1d.1曲妥珠单抗-去糖基化化合物KY-1

[0930] SC注射用Herceptin®(曲妥珠单抗)溶液(200μL的120mg/mL赫赛汀)经由7K

Zeba™旋转脱盐柱(0.5mL(Thermo Scientific™))缓冲交换为pH 7.4的10mM PBS。用10mM PBS将浓度调节至10mg/mL。将PNGase F(新英格兰生物实验室,3.5μL)添加至溶液中,并且在37℃下振荡(400rpm)孵育,并通过UPLC监测反应。对于KY-1,β-巯基乙醇的还原,使用10%v/v(Sigma-Aldrich)。β-巯基乙醇还原产物的UPLC-ToF分析(方法1):重链:9.06min(R_t),其中m/z为49153(反应前m/z为50593);轻链:8.55(R_t),其中m/z为23439(反应前m/z为25377)。在22h后,使用离心(Amicon Ultra-0.5,50kDa MWCO)移除PNGase F,在5000x g下运行样品5分钟,总共4次洗涤。

[0931] 1d.2曲妥珠单抗-{CONH-PEG_4-Sulfo-DBCO}$_2$化合物KY-2(和KY-2a)

[0932] 在室温下向去糖基化曲妥珠单抗KY-1在pH 7.4的PBS缓冲液(2mL,10mg/mL)中的溶液中添加磺基DBCO-PEG_4-胺(点击化学工具,7.2mg,0.01mmol)在MQ水(240μL)中的溶液。将反应混合物加热至37℃,之后添加转谷氨酰胺酶(微生物-谷氨酰胺转氨酶,[MTGase],Zedira GmbH),再悬浮在MQ水(300μL)中。最终浓度为每1mg KY-1 6.7单位的MTGase。将样品在37℃下孵育12-18小时或直到完成修饰(经由UPLC-Tof监测反应(方法1)。通过UPLC分析可以观察到KY-1重链质量的增加,其中峰在9.62min(R_t)处,其中m/z为49,885Da(反应前m/z为49153)。完成后,使用尺寸排除柱(SEC)缓冲液10mM HEPES、pH 8的150mM NaCl,用Superdex®200Increase 10/300GL(Cytiva)移除MTGase和未反应的接头。基于280nm吸光度监测纯化。收集感兴趣的峰并用50kDa MWCO Amicon Ultra-0.5离心过滤单元(Merck)浓缩至1mL(在10mM HEPES缓冲液中为16.43mg/mL)。通过用AFDye 647叠氮化物(点击化学工具)处理KY-2等分试样以产生KY-2a,并且随后使用SDS page凝胶进行分析,证实了转谷氨酰胺化的证据(参见图21,泳道1和3,以及还原产物泳道2和4)。相应的细胞结合数据显示于实施例7中。

[0933] 1d.3曲妥珠单抗-{PEG_4-DBCO/N_3-PEG_7-Lys[(α-Cy5)$_1$(ε-NHDOTA)$_1$]}$_2$化合物KY-3-310

[0934] 向曲妥珠单抗-{CONH-PEG_4-Sulfo-DBCO}$_2$KY-2(在pH 8的1.2mL Tris缓冲液中为16mg)的溶液中添加DMSO中的N_3-PEG_7-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NHDOTA)]化合物SRS-5(0.65mg,0.42μmol,10mg/mL)。将反应混合物在室温下静置18h,并且然后用MQ水稀释至15mL的体积。将所得溶液通过离心(Amicon Ultra-15,10kDa MWCO)浓缩,并且用pH 8的Tris缓冲液(5x15mL)洗涤,产生曲妥珠单抗-{PEG_4-DBCO/N_3-PEG_7-Lys[(α-Cy5)$_1$(ε-NHDOTA)$_1$]}$_2$(化合物KY-3-310)在pH 8的Tris缓冲液(16.3mg/mL)中的溶液。β-巯基乙醇还原产物的UPLC-Tof分析(方法1):重链:10.19min(R_t),其中m/z为51345(反应前m/z为49885);轻链:8.72(R_t),其中m/z为23439(反应前m/z为2349)。

[0935] 1e.FAPI中间体的合成

[0936] 1e.1FAPI-04-NH RHa-2

[0937] 向FAPI-04-NBoc RHa-1(425mg,0.72mmol)在MeCN(10mL)中的溶液中添加对甲苯磺酸(206mg,1.09mmol)。将所得混浊混合物在50-60℃下搅拌,并且通过LCMS(LCMS法20-90,8min,TFA)监测反应的进程。将反应混合物加热共31.5h,其中在3.5h和30h的时间点添加另外部分的对甲苯磺酸(144mg,0.72mmol)。将反应混合物冷却至室温,真空浓缩,产生FAPI-04-NH RHa-2。将该物质不经进一步纯化而使用。LCMS(LCMS法20-90,8min,TFA)R_t=0.66[1]min和3.36min。ESI MS(+ve)487$[M]^+$;$C_{24}H_{28}F_2N_6O_3[M]^+$的计算m/z=487。[1]使用该方法,

大多数产物在注射时(R_t=0.66min)似乎是直接从柱中洗脱,但也被保留(R_t=3.36min)。

[0938] 1e.2FAPI-04-NC(O)-dPEG$_{1100}$-CO_2H RHa-4

[0939] 在室温下向FAPI-04-NH RHa-2(0.72mmol)在DMF(10mL)中的搅拌溶液中添加酸-dPEG$_{1100}$-NHS酯RHa-3(795mg,0.60mmol)。一旦所有固体溶解,就添加NMM(1.3mL,11.15mmol),并且反应混合物继续搅拌。在18h后,真空浓缩反应混合物。将残余物溶解于MeCN(8mL)中,过滤(0.45μm acrodisc注射器过滤器),并且将滤液通过制备性HPLC(制备型HPLC法20-60,TFA;R_t=26-29min)纯化,产生呈淡黄色油状物的FAPI-04-NC(O)-dPEG$_{1100}$-CO_2H RHa-4(1.1g,99%)。^1H NMR(300MHz,CD_3OD):δ(ppm)2.33-2.47(m,2H),2.55(t,J=9.0Hz,2H),2.62-3.22(m,4H),3.34-3.54(m,4H),3.56-3.68(m,100H),3.68-3.91(m,5H),3.92-4.57(m,7H),5.12-5.16(m,1H),7.72(dd,J=3.0,9.0Hz,1H),7.90(d,J=5.1Hz,1H),8.15-8.26(m,2H)和9.02(d,J=6Hz,1H)。LCMS(LCMS法5-60,8min,TFA)R_t=5.22min。ESI MS(+ve)1688$[M]^+$;$C_{78}H_{132}F_2N_6O_{31}[M]^+$的计算m/z=1688。

[0940] 1e.3HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH_2.TFA)]RHa-7

[0941] 向Cy5-NHS脂RHa-5(51mg,0.077mmol)在室温下在DMF(2.0mL)中的溶液中添加HO-Lys[(α-NH_2)(ε-NHBoc)]RHa-6(38mg,0.154mmol),然后添加NMM(70μL,0.154mol)。将反应混合物超声处理5min,并且然后搅拌2d,之后真空移除挥发物。将残余物溶解于二氯甲烷(2.0mL)中,并在室温下添加TFA(0.5mL)。将反应混合物搅拌4.5h,用MeCN(约5mL)稀释,真空浓缩并且通过制备性HPLC(制备型HPLC法30-90,TFA;R_t=24-26min)纯化,产生呈深蓝色固体的HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH_2.TFA)]RHa-7(46mg,82%)。LCMS(LCMS法20-90,8min,TFA)R_t=5.09min。ESI MS(+ve)612$[M]^+$;$C_{38}H_{51}N_4O_3[M]^+$的计算m/z=612。

[0942] 1e.4HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)]RHa-9

[0943] 在室温下向HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH_2.TFA)]RHa-7(93mg,0.13mmol)中添加p-SCN-Ph-DFO RHa-8(120mg,0.16mmol)在DMSO(2.0mL)中的溶液和DIPEA(150μL,0.86mmol)。将所得溶液搅拌18h,并且然后通过在反应混合物的表面上吹氮气(16h)将其浓缩至大约一半体积。向浓缩溶液中添加水(约20mL),之后添加MeCN(约2mL)以溶解任何固体。将所得溶液冻干至干燥,并且然后通过自动快速色谱(Autoflash-方法1,R_{CV}=11-13CV)纯化,产生呈深蓝色固体的HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)]RHa-9(108mg,57%)。LCMS(LCMS法5-60,8min,TFA):R_t=6.73min。ESI MS(+ve)1365$[M]^+$;$C_{71}H_{103}N_{12}O_{11}S_2[M]^+$的计算m/z=1365。

[0944] 1e.5BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NHCOPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_{31}$]RHa-12

[0945] 在室温下向FAPI-04-NC(O)-PEG$_{1100}$-CO_2H RHa-4(100mg,0.06mmol)和mPEG$_{1000}$-CO_2H RHa-11在DMF(5mL)中的搅拌溶液中添加PyBOP(200mg,0.38mmol)。将反应混合物搅拌5min,之后BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NH_2)$_{32}$]RHa-10(110mg,0.01mmol)和NMM(150μL,1.35mmol)在DMF(3mL)中的溶液。将所得溶液搅拌2d并且真空浓缩。向残余物中添加水(20mL),并且过滤所得混浊溶液。用水将滤液稀释至总体积为约70mL,并且用去离子水(10DV)洗脱使其经受TFF(Pellicon XL cassette,50cm^2,10kDa MWCO Ultracel膜)。将渗余物通过旋转柱(Amicon Ultra,10kDa MWCO,15mL)进一步浓缩并冻干,产生呈淡黄色胶状物的BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_{31}$]RHa-12(317mg)。使用^1H NMR光谱测定

ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04基团的数量(n_{FAPI})和ε-NHCO-mPEG$_{1000}$基团的数量(n_{mPEG})。将BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_1$(ε-NH CO-mPEG$_{1000}$)$_{31}$]RHa-12(25mg)溶解于CD_3OD(600μL)中,振荡所得溶液并使其在室温下静置24h。记录^{1}H NMR谱[扫描次数=500,d1(脉冲延迟)=30s],进行处理,并将δ=7.16-7.44ppm下与苯二氢(BHA)质子相关的共振积分设置为10H。δ=8.70-8.86ppm下的共振积分值归因于(1H)x n_{FAPI}喹啉质子,并且δ=3.36ppm下的共振归因于(3H)x n_{mPEG}质子。因此,n_{FAPI}=1并且n_{mPEG}=31。HPLC(HPLC法5-80,8min,TFA)R_t=5.06min。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD):δ(ppm):0.73-2.15(m,649H),2.90-3.29(m,100H),3.36(s,93H),3.37-3.92(m,2991H),3.93-4.66(m,103H),6.16-6.28(m,1H),7.16-7.44(m,10H),7.78-8.08(m,26H)和8.70-8.86(m,1H)。

[0946] 1e.6BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NHCOPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_{10}$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_{19}$(ε-NH_2)$_3$]RHa-13

[0947] 如针对BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_{31}$]RHa-12所描述的合成,不同的是使用了在DMF(5+3mL)中的FAPI-04-NC(O)-PEG$_{1100}$-CO_2H RHa-4(355mg,0.21mmol)、mPEG$_{1000}$-CO_2H RHa-11(218mg,0.42mmol)、PyBOP(218mg,0.42mmol)、BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NH_2)$_{32}$]RHa-10(125mg,0.011mmol)和NMM(192μL,1.75mmol)来产生呈深黄色胶状物的BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_{10}$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_{19}$(ε-NH_2)$_3$]RHa-13(460mg,85%,MW_{Calc}=49,214Da)。HPLC(HPLC法5-80,8min,TFA)R_t=4.83min。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD+D_2O):δ(ppm):1.01-2.01(m,681H),2.14-2.29(m,16H),2.39-2.52(m,19H),2.59-2.77(m,17H),2.77-3.29(m,168H),3.36(s,71H),3.38-3.92(m,3239H),3.92-4.48(m,149H),5.03-5.21(m,10H),7.12-7.38(m,10H),7.44-7.56(m,10H),7.56-7.64(m,9H),7.79-8.20(m,88H)和8.73-8.86(m,10H)。n_{FAPI}=10并且n_{mPEG}=19。

[0948] 1e.7BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_4$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$)$_{28}$]RHa-14

[0949] 向FAPI-04-NC(O)-PEG$_{1100}$-CO_2H RHa-4(53mg,31.4μmol)在室温下在DMF(3.5mL)中的搅拌溶液中添加PyBOP(16.3mg,31.4μmol)。将反应混合物搅拌5min,之后BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NH_2)$_{32}$]RHa-10(75mg,6.5μmol),然后NMM(20μL,18.2μmol)。将所得溶液搅拌18h,之后添加dPEG$_{1100}$-CO_2H RHa-32(255mg,0.22mmol)、PyBOP(114mg,0.22mmol)和NMM(121μL,1.10mmol)在DMF(1.7mL)中的预混合溶液并且继续搅拌。在18h后,真空浓缩挥发物,并且将残余物溶解于去离子水(20mL)中。将所得溶液均匀地分配到4x Amicon®Ultra 15,10kDa MWCO旋转柱中,并且通过离心(4000rpm,持续20min)进行浓缩。用水洗涤渗余物(10x3mL,@4000rpm,持续10min),并且然后将最终渗余物冻干,产生浅黄色固体(277mg,84%,MW_{Calc}=50,156Da)。HPLC(HPLC法5-80,8min,TFA)R_t=4.98min。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD):δ(ppm):1.00-2.03(m,698H),2.25-2.57(m,70H),2.61-2.81(m,6H),2.98-3.27(m,115H),3.36(s,90H),3.37-3.92(m,3361H),3.92-4.16(m,25H),4.16-4.50(m,46H),5.05-5.20(m,4H),7.15-7.41(m,10H),7.45-7.54(m,4H),7.56-7.63(m,4H),7.73-8.19(m,33H),8.73-8.86(m,4H);n_{FAPI}=4并且n_{mPEG}=28。

[0950] 1e.8BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_5$(ε-NH$_2$)$_2$]RHa-16

[0951] 如针对BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_{31}$]RHa-12所描述的合成,不同的是使用了在DMF(10mL)中的FAPI-04-NC(O)-PEG$_{1100}$-CO$_2$H RHa-4(627mg,0.37mmol)、mPEG$_{1000}$-CO$_2$H RHa-11(450mg,0.37mmol)、BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NH$_2$)$_8$]RHa-15(225mg,0.077mmol)、PyBOP(387mg,0.74mmol)和NMM(340μL,3.10mmol)来合成呈黄色胶状物的BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_5$(ε-NH$_2$)$_2$]RHa-16(220mg,25%,MW$_{Calc}$=11,225Da)。HPLC(HPLC法5-80,8min,TFA)R$_t$=5.08min。^{1}H NMR(300MHz,CD$_3$OD+D$_2$O):δ(ppm):1.03-1.99(m,165H),2.20-2.38(m,1H),2.38-2.52(m,2H),2.63-2.76(m,1H),2.92-3.29(m,33H),3.36(s,19H),3.38-3.92(m,721H),3.93-4.11(m,18H),4.11-4.42(m,9H),5.07-5.20(m,1H),6.14-6.25(m,1H),7.20-7.40(m,10H),7.44-7.54(m,1H),7.56-7.64(m,1H),7.77-8.21(m,18H)和8.75-8.82(m,11H)。n$_{FAPI}$=1并且n$_{mPEG}$=5。

[0952] 1e.9BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_3$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_5$]RHa-17

[0953] 将来自用于纯化BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_5$(ε-NH$_2$)$_2$]RHa-16的TFF过程的渗透液真空浓缩,溶解于去离子水(24mL)中,并且使用Amicon®Ultra 15离心3kDa MWCO旋转柱(4000rpm,持续30分钟)过滤。将渗余物用去离子水(10x15mL,@4000rpm,每循环持续15min)洗涤并且冻干,产生呈黄色胶状物的BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_3$(ε-NHCO-mPE G$_{1000}$)$_5$]RHa-17(670mg,64%,MW$_{Calc}$=13,457Da)。HPLC(HPLC法5-80,8min,TFA)R$_t$=5.08min。^{1}H NMR(300MHz,CD$_3$OD+D$_2$O):δ(ppm):0.82-2.05(m,170H),2.22-2.54(m,9H),2.64-2.77(m,4H),3.01-3.29(m,34H),3.36(s,18H),3.38-3.82(m,764H),3.82-4.10(m,18H),4.10-4.52(m,19H),5.07-5.19(m,2H),7.15-7.42(m,10H),7.42-7.70(m,5H),7.81-8.12(m,8H)和8.72-8.87(m,3H)。n$_{FAPI}$=3并且n$_{mPEG}$=5。

[0954] 1e.10BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_{7.4}$(ε-NH$_2$)$_{0.6}$]RHa-18

[0955] 在室温下向FAPI-04-NC(O)-PEG$_{1100}$-CO$_2$H RHa-4(77mg,0.05mmol)在DMF(2.0mL)中的溶液中添加PyBOP(23mg,0.050mmol)。将反应混合物搅拌5min,再添加BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NH$_2$)$_8$]RHa-15(13mg,0.005mmol)和NMM(21μL,0.19mmol)。在18h后,真空移除挥发物,并且将残余物通过SEC(固定相=Sephadex LH-20,流动相=MeCN,h=30cm,直径=2.5mm,滴速为约1滴/秒,级分大小=400滴,级分通过HPLC(HPLC-方法1)来分析)纯化。将含有纯化产物的级分合并并且真空浓缩。将残余物溶解于去离子水中,过滤(0.45μm acrodisc注射器过滤器)并且冻干,产生BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_{7.4}$(ε-NH$_2$)$_{0.6}$]RHa-18(20mg)。将不纯级分单独合并并且重新经受如上所述的SEC(不同的是流动相=MeOH),产生呈胶状固体的BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_{7.4}$(ε-NH$_2$)$_{0.6}$]RHa-18(47(47mg,合并产率=67mg,98%,MW$_{Calc}$=15,265Da)。HPLC(HPLC法5-80,8min,TFA)R$_t$=4.62min。^{1}H NMR

(300MHz,CD_3OD+D_2O):δ(ppm):1.15-1.94(m,171H),1.97-2.21(m,14H),2.36-2.74(m,72H),2.74-3.27(m,39H),3.35-3.92(m,813H),3.91-4.72(m,58H),5.05-5.29(m,5H),6.16-6.22(m,1H),7.20-7.38(m,10H),7.41-7.53(m,7H),7.53-7.64(m,7H),7.89-8.06(m,15H)和8.70-8.83(m,7.4H).n_{FAPI}=7.4。

[0956] 1e.11BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH_2.TFA)$_{32}$(ε-NHCO-$dPEG_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_{10}$(ε-NHCO-$mPEG_{1000}$)$_{19}$(ε-NH_2)$_3$]RHa-19

[0957] 向BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NHCO-$dPEG_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_{10}$(ε-NHCO-$dPEG_{1100}$)$_{19}$(ε-NH_2)$_3$]RHa-13(83mg,1.6μmol)在室温下在二氯甲烷(2.5mL)中的溶液中添加TFA(1.5mL)。将反应混合物搅拌18h并且真空浓缩,产生不经进一步纯化而使用的BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH_2.TFA)$_{32}$(ε-NHCO-$dPEG_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_{10}$(ε-NHCO-$mPEG_{1000}$)$_{19}$(ε-NH_2)$_3$]RHa-19。HPLC(HPLC法5-80,8min,TFA)R_t=4.61min。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD):δ(ppm):1.21-2.18(m,348H),2.28-2.54(m,39H),3.03-3.38(m,85H),3.36(s,64H),3.40-4.15(m,2118H),4.15-4.51(m,79H),7.13-7.42(m,10H),7.48-7.73(m,19H),7.90-8.11(m,21H)和8.67-8.88(m,10H)。

[0958] 1e.12BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH_2.TFA)$_{32}$(ε-NHCO-$dPEG_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-$mPEG_{1000}$)$_{31}$]RHa-20

[0959] 使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NHCO-$dPEG_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-$mPEG_{1000}$)$_{31}$]RHa-12(80mg,1.7μmol)根据针对BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH_2.TFA)$_{32}$(ε-NHCO-$dPEG_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_{10}$(ε-NHCO-$mPEG_{1000}$)$_{19}$(ε-NH_2)$_3$]RHa-19所描述的程序制备,并且不经进一步纯化而使用。HPLC(HPLC法5-80,8min,TFA)R_t=4.74min。

[0960] 1e.13BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH_2.TFA)$_8$(ε-NHCO-$dPEG_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_3$(ε-NHCO-$mPEG_{1000}$)$_5$]RHa-23

[0961] 将BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NHCO-$dPEG_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_3$(ε-NHCO-$mPEG_{1000}$)$_5$]RHa-17(60mg,4.5μmol)在TFA:二氯甲烷(1.8mL,1:2v/v)中的溶液在室温下搅拌20h,之后将反应混合物真空浓缩。将残余物溶解于水(约5mL)中并且冻干,产生呈黄色胶状物的BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH_2.TFA)$_8$(ε-NHCO-$dPEG_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_3$(ε-NHCO-$mPEG_{1000}$)$_5$]RHa-23(定量)。HPLC(HPLC法5-80,8min,TFA)R_t=4.52min。

[0962] 1f.DUPA靶向性中间体的合成

[0963] 1f.1DUPA(O-tBu)$_3$-NHS脂,化合物39

[0964] 向DUPA(O-tBu)$_3$-OH(248mg,0.507mmol)在MeCN(3mL)中的溶液中添加N,N'-二琥珀酰亚胺碳酸酯(200mg,0.778mmol)和吡啶(250μL,3.21mmol),并且将反应物在室温下搅拌过夜。减压浓缩反应物,并且使用梯度为1:4至1:1的EtOAc/己烷作为洗脱剂通过硅胶柱色谱纯化,从而产生呈白色固体的标题化合物,化合物39(223mg,75%)。^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$)δ(ppm):1.43(两个重叠单样,18H),1.47(s,9H),1.58-2.18(m,4H),2.20-2.44(m,3H),2.52-2.69(m,2H),2.72-3.10(m,4H),4.34(m,1H),4.54(m,1H),5.22(d,J=8.2Hz,1H),5.53(d,J=8.2Hz,1H)。

[0965] 1f.2DUPA(O-tBu)$_3$-NHP$EG_{24}CO_2$H化合物40

[0966] 向$NH_2PEG_{24}CO_2H$(193mg,0.170mmol)在DCM中的溶液中添加DUPA(O-tBu)-NHS脂化

合物39(100mg,0.170mmol)和NMM(20μL,0.187mmol),并且将反应物在室温下搅拌过夜。减压浓缩反应物,并且使用制备性HPLC(20-90%MeCN,R_t=33min)纯化。^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$)δ(ppm):1.37-1.45(m,27H),1.75-2.11(m,5H),2.27(m,4H),2.57(m,2H),3.32-3.84(m,103H),4.26(m,2H)。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)R_t=5.49min。ESI MS(+ve)1617.5$[M]^+$;$C_{74}H_{141}N_3O_{34}[M]^+$的计算m/z=1616.9

[0967] 1f.3DUPA(O-tBu)$_3$-NHPEG$_{24}$-NHS脂,化合物41

[0968] 向DUPA(O-tBu)$_3$-NHPEG$_{24}CO_2H$化合物40(110mg,0.0538mmol)在DCM(3mL)中的溶液中添加DCC(11mg,0.0538mmol)和N-羟基琥珀酰亚胺(6mg,0.0538mmol),并且通过LCMS监测反应物。在起始材料消耗后,减压浓缩反应物。将粗制残余物悬浮在MeCN(约1-2mL)中,通过0.45μm过滤器过滤,减压浓缩澄清溶液,并且将化合物41的粗制残余物不经进一步纯化而使用。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)R_t=5.66。ESI MS(+ve)1736$[M]^+$;$C_{78}H_{144}N_4NaO_{36}[M]^+$的计算m/z=1735.95

[0969] 1f.4HO-Lys[(α-NH-COPEG$_{24}$NH-DUPA(O-tBu)$_3$)(ε-NHFmoc)],化合物42

[0970] 向DUPA(O-tBu)$_3$-NHPEG$_{24}$-NHS脂化合物41(116mg,0.0676mmol)和Lys-α-NH_2.TFA-ε-NHFmoc(30mg,0.0676mmol)在DMF(3mL)中的混合物中添加三乙胺(9μL,0.203mmol)。悬浮液逐渐变得澄清,并在室温下搅拌过夜。LCMS分析表明产物形成,减压浓缩反应物,并且使用制备性HPLC(20%-90%MeCN,R_t=37min)纯化。收集呈无色油状物的标题化合物,化合物42(23mg,17%)LCMS(亲性,TFA缓冲液)R_t=6.09。ESI MS(+ve)1989$[M]^+$;$C_{95}H_{163}N_5NaO_{37}[M]^+$的计算m/z=1989.09。

[0971] 1f.5DOTA(O-tBu)$_4$-p-BnNH-Glu-OH,化合物43

[0972] 向DOTA(O-tBu)$_4$-p-BnNH_2.TFA(50mg,0.0589mmol)和戊二酸酐(8mg,0.0708mmol)在DMF(2mL)中的溶液中添加NMM(10μL,0.0884mmol),并且将反应物在室温下搅拌过夜。通过LCMS监测反应,并且在起始材料完全消耗时减压浓缩。将粗制残余物溶解于EtOAc(5mL)中,用pH 3的磷酸盐缓冲液(3x5mL)、盐水(3mL)洗涤,用$MgSO_4$干燥,并且减压浓缩,产生化合物43。^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$)δ(ppm):1.39-1.52(m,36H),1.79-3.52(m,36H),6.95(m,2H),7.75(d,J=8.35Hz,2H)。

[0973] 1f.6DOTA(O-tBu)$_4$-BnNH-Glu-NHS脂,化合物44

[0974] 向DOTA(O-tBu)$_4$-p-BnNH-Glu-OH,化合物43(30mg,0.0354mmol)在DCM(2mL)中的溶液中添加DCC(7mg,0.0354mmol)和N-羟基琥珀酰亚胺(4mg,0.0354mmol),并且将反应物在室温下搅拌过夜。通过LCMS监测反应的起始材料消耗和产物的形成。一旦认为反应完成,就将反应物减压浓缩并悬浮在少量MeCN(约1-2mL)中,通过0.45μm acrodisc过滤器过滤,并且减压浓缩澄清溶液。将残余物不经进一步纯化而直接用于下一步中。LCMS(LCMS法40-65,TFA缓冲液)R_t=5.29。ESI MS(+ve)944$[M]^+$;$C_{48}H_{77}N_6O_{13}[M]^+$的计算m/z=944.6。

[0975] 1f.7HO-Lys[(α-NH-COPEG$_{24}$NH-DUPA(O-tBu)$_3$)(ε-GluNH-p-Bn-DOTA(OtBu)$_4$)]化合物45

[0976] 向Lys[(α-NH-COPEG$_{24}$NH-DUPA(O-tBu)$_3$)(ε-NHFmoc)]化合物42(30mg,17.6μmol)在DMF(3mL)中的溶液中添加哌啶(1mL),并且将反应物在室温下搅拌。在2h后,真空浓缩挥发物,并将粗制物质Lys[(α-NH-COPEG$_{24}$NH-DUPA(O-tBu)$_3$)(ε-NH_2)]储存在4℃下直至需要。

[0977] 向Lys[(α-NH-COPEG$_{24}$NH-DUPA(O-tBu)$_3$)(ε-NH_2)](26mg,15.6μmol)在DMF(1mL)中

的溶液中添加DOTA(O-tBu)$_4$-p-Bn-NH-Glu-NHS,化合物44(14mg,15.6mol)和NMM(5μL,46.8μmol)。在2h后,通过LCMS检查反应,其显示起始材料的消耗,并且减压浓缩反应物,并使用制备性HPLC(50%-65%MeCN,R_t=49min)纯化。分离出呈无色油状物的标题化合物,化合物45(4mg,9%)。LCMS(LCMS法40-65,TFA缓冲液)R_t=4.40。ESI MS(+ve)2575$[M]^+$;$C_{124}H_{225}N_{10}O_{45}[M]^+$的计算m/z=2575.6。

[0978] 1f.8二叔丁基((1-(叔丁-氧基)-5-((2,5-二氧代吡咯烷-1-基)氧基)-1,5-二氧戊环-2-基)氨基甲酰基)谷氨酸,化合物46

[0979] 向5-(叔丁-氧基)-4-(3-(1,5-二叔丁氧-1,5-二氧戊环-2-基)脲基)-5-氧代戊酸(Amadis Chemicals,100mg,0.20mmol)在乙腈(5mL)中的搅拌溶液中添加N,N-二琥珀酰亚胺碳酸酯(79mg,0.31mmol)在吡啶(80μL,0.45mmol)中的溶液。将反应混合物在环境温度下搅拌15h。通过TLC(EtOAc:Hexane 1:1)监测反应的进程。真空移除挥发物,并且将粗制混合物通过柱色谱(SiO_2,梯度0-60%EtOAc/己烷)纯化,产生呈白色固体的化合物46(85mg,71%)。^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$)δ(ppm):1.30-1.62(3x br s,27H);1.64-1.94(m,4H);1.97-2.22(m,2H);2.25-2.52(m,3H);2.55-2.74(m,2H);2.77-3.14(m,4H);4.26-4.44(m,1H);4.48-4.67(m,1H);5.08-5.85(2x br s,2H)。

[0980] 1f.9三叔丁基(18S,22S)-2,2-二甲基-4,15,20-三氧代-3,8,11-三氧杂-5,14,19,21-四氮杂二十四烷-18,22,24-三甲酸,化合物47

[0981] 向化合物46(85mg,0.15mmol)在二氯甲烷(5mL)中的搅拌溶液中依次添加叔丁基(2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙基)氨基甲酸酯(54mg,0.22mmol)和NMM(24μL,0.22mol)。将反应混合物在环境温度下搅拌30min。真空移除挥发物,并且将粗制混合物通过柱色谱(SiO_2,梯度0-60%丙酮/己烷)纯化,产生呈无色粘性油状物的化合物47(98mg,67%,经两步)。^{1}HNMR(300MHz,$CDCl_3$)δ(ppm):1.14-1.20(m,4H);1.42-1.51(m,32H);1.76-2.38(m,8H);2.55-2.81(m,8H);2.93-3.09(m,1H);3.24-3.35(m,2H);3.63-3.74(m,1H);3.82-3.94(m,1H);4.30-4.50(m,2H);6.14-6.34(m,2H);9.22-9.28(m,1H)。LCMS(方法20-90,15min,甲酸)R_t=9.52min。ESI MS(+ve)719$[M+1]^+$;$C_{34}H_{62}N_4O_{12}[M]^+$的计算m/z=718.44。

[0982] 1f.10(13S,17S)-1-氨基-10,15-二氧代-3,6-二氧杂-9,14,16-三氮杂十一烷-13,17,19-三羧酸,化合物48

[0983] 向三叔丁基(18S,22S)-2,2-二甲基-4,15,20-三氧代-3,8,11-三氧杂-5,14,19,21-四氮杂二十四烷-18,22,24-三甲酸(90mg,0.13mmol)在二氯甲烷(3mL)中的搅拌溶液中添加三氟乙酸(3mL)。将反应混合物在环境温度下搅拌4h,之后真空移除挥发物。向残余物中添加去离子水(5mL),过滤所得溶液(0.45μm acrodisc注射器过滤器),并且将滤液冻干,获得呈白色固体的化合物48(71mg,定量)。^{1}H NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):1.78-1.93(m,2H);2.00-2.13(m,2H);2.25-2.30(m,2H);2.37-2.44(m,2H);3.06-3.11(m,2H);3.25-3.29(m,2H);3.49-3.53(m,2H);3.59(s,4H);3.60-3.66(m,2H);4.09(dd,J=6Hz和9Hz,1H);4.16(dd,J=6Hz和9Hz,1H)。

[0984] 1f.11BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-DUPA(OtBu)$_3$)$_8$],G3,化合物36

[0985] 根据一般程序D使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NH-COPEG$_{24}$-NH$_2$)$_8$]化合物116(44mg,3.68μmol)和DUPA(OtBu)$_3$OH(17mg,35.3μmol)制备。减压浓缩反应物并且

通过SEC(400滴/管,MeOH sephadex LH20,35滴/min)纯化。通过TLC分析(5%$BaCl_2$溶液,之后是碘染料;深棕色斑点)和HPLC检查级分,将含有产物的级分合并并且减压浓缩。获得呈非常浅的棕色膜状物的标题化合物(47mg,81%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):0.76-1.92(m,402H)1.99-2.16(m,14H),2.23-2.39(m,26H),2.44(m,16H),3.02-3.26(m,32H),3.34-3.41(m,21H),4.34-4.38(m,861H),6.20(s,1H),7.20 -7.39(m,10H)。

[0986] 1f.12DOTA(OtBu)$_4$GA-NHS脂RL-20

[0987] 向DOTAGA-四-(叔丁酯)RL-19(300mg,0.428mmol)在二氯甲烷(5mL)中的溶液中添加DCC(88mg,0.428mmol)和N-羟基琥珀酰亚胺(49mg,0.428mmol),并且将随后反应物在室温下搅拌过夜。将反应物在N_2流下浓缩,并且溶解于少量MeCN(约2mL)中并过滤(0.45μm acrodisc注射器过滤器)。真空浓缩滤液,产生呈浅棕色泡沫状物的DOTA(OtBu)$_4$GA-NHS酯RL-20(380mg,定量产率),其不经进一步纯化而使用。LCMS(LCMS法40-90,8min,TFA)Rt=4.70min。ESI MS(+ve)799$[M]^+$;$C_{39}H_{67}N_5O_{12}[M+H]^+$的计算m/z:799。

[0988] 1f.13DOTA(OtBu)$_4$GA-NHCO-PEG_{24}-COOH RL-21

[0989] 向DOTA(OtBu)$_4$GA-NHS脂RL-20(100mg,0.143mmol)在DMF(5mL)中的溶液中添加氨基-PEG_{24}-酸(163mg,0.143mmol)和NMM(47μL,0.429mmol),并且将随后反应物在室温下搅拌18h。减压浓缩反应物,并且使用制备性HPLC(制备型HPLC法20-90,TFA,R_t=28min)纯化,产生呈无色油状物的标题化合物RL-21(47mg)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD):δ(ppm)1.27-1.90(m,37H),2.56(t,J=6.01,2H),2.72(m,4H),2.94-2.62(m,120H)。LCMS(LCMS法40-90,8min,TFA,Rt=5.20min。ESI MS(+ve)1830$[M]^+$;$C_{86}H_{165}N_5O_{35}[M+H^+]^+$的计算m/z=1830。

[0990] 实施例2.靶向性树枝状体缀合物

[0991] 2a HER-2纳米抗体缀合物

[0992] 2a.1纳米抗体序列信息

[0993] 纳米抗体2D3序列化合物118(SEQ ID NO:1)

[0994] EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQVTVSS

[0995] 纳米抗体2D3 N末端标签、TEV蛋白酶裂解位点、C末端叠氮化物("N末端标签-纳米抗体-N3")(SEQ ID NO:5)

[0996] GGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYENLYFQGEVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQVTVSS#

[0997] 纳米抗体2D3,具有C末端标签、TEV蛋白酶裂解位点、叠氮化物("纳米抗体-N3-C末端标签")(SEQ ID NO:2)

[0998] EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQVTVSS#ENLYFQGHHHHHH

[0999] 其中#=非天然氨基酸。

[1000] 纳米抗体2D3,具有C末端组氨酸标签、TEV蛋白酶裂解位点、另外半胱氨酸("纳米抗体-Cys"SRS-13)(SEQ ID NO:10)

[1001] EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQVTVSSLGTLCTPSRENLYFQGHHHHHH

[1002] 2a.2纳米抗体-N3表达质粒

[1003] 使用标准分子生物学技术将抗HER2纳米抗体克隆2D3的编码序列(US20110028695A1 SEQ ID NO:1986)插入至表达质粒pET-His6-TEV-1B(Addgene plasmid 29653)中。合成大肠杆菌K12密码子优化的DNA序列,并且然后将其克隆至质粒pET-His6-TEV-1B中。

[1004] 为了将非天然氨基酸掺入至重组蛋白中,将琥珀终止密码子(TAG)框内插入在纳米抗体编码序列的最后位置处,之后接着是用于翻译终止的赭石终止密码子(TAA)或蛋白石终止密码子(TGA)。在使用C末端his6标签的情况下,将琥珀终止密码子(TAG)框内插入在纳米抗体编码序列的最后位置,并且然后将编码TEV蛋白酶裂解位点的序列和6his标签之后是用于翻译终止的赭石终止密码子(TAA)或蛋白石终止密码子(TGA)附加至该序列。

[1005] 2a.3纳米抗体-N3的表达和纯化

[1006] 将抗HER2纳米抗体2D3表达在大肠杆菌菌株B95(DE3)(Mukai等人,Scientific Reports(2015),5,9699)中进行,将所述大肠杆菌菌株用纳米抗体表达质粒和正交对表达质粒pEVOL-pAcFRS.2.t1转化(Amiram等人,Nat.Biotechnol(2015),33(12)。在37℃下将细胞在容纳于带挡板摇瓶中的极品肉汤(25g/L胰蛋白胨、30g/L酵母和5g/L甘油、0.017M KH_2PO_4、0.072M K_2HPO_4、50μg/mL硫酸卡那霉素、30μg/mL氯霉素)中培养,直到达到OD_{600} 0.7-1.0的细胞密度。通过添加1.5mM IPTG和0.05%w/v L-(+)-阿拉伯糖以及添加1.5mM对叠氮基-苯丙氨酸诱导重组蛋白表达,并且使其在25℃下进行20小时。通过离心收获细菌并且通过高压均化产生细胞裂解物,之后添加蛋白酶抑制剂混合物、溶菌酶和DNA酶处理。可以将不溶性物质溶解于重折叠缓冲液(6M盐酸胍、50mM NaH_2PO_4、300mM NaCl、20mM咪唑、pH 8)中。在通过高速离心澄清化和通过0.45μM膜过滤器过滤后,将his6标签化纳米抗体通过固定化金属亲和色谱(IMAC)使用装入镍的次氮基三乙酸琼脂糖纯化。通过以下方式实现柱上重折叠:首先用柱体积的3M盐酸胍、50mM NaH_2PO_4、300mM NaCl、20mM咪唑、pH 8;之后用两柱体积的50mM NaH_2PO_4、300mM NaCl、20mM咪唑、pH 8洗涤结合蛋白。将结合蛋白用2柱体积的50mM NaH_2PO_4、300mM NaCl、250mM咪唑、pH 8洗脱。在IMAC后,将纳米抗体-N3通过阴离子交换色谱使用HiTrap Q HP柱(GE Healthcare,目录17115301)进一步纯化。使用Tris缓冲液(20mM,pH 8)进行结合和洗涤步骤,并且使用0%至50%的1M NaCl缓冲液(1M NaCl、20mM Tris、pH 8)的梯度进行洗脱。使用Amicon 10k MWCO过滤器单元(Merck,目录UFC901008)将获得的相关纳米抗体级分缓冲液交换至20mM Tris(pH 8)中。

[1007] 2a.4纳米抗体-N3-C末端标签与树枝状体的缀合

[1008] 根据针对化合物83和84所描述的程序使用生物正交点击化学将纳米抗体-N3-C末端标签缀合至树枝状体化合物128-132,SRS-4-Mal和HH-2以产生化合物85、86、87、89、91、92、93、94、96、97、SRS-20和SRS-22,不同的是使用了接头DBCO-Glu-$NHPEG_{24}CO$-$NHPEG_3$-TCO(化合物51)。

[1009] 针对化合物85至97、123至127,SRS-20和SRS-22(图24)运行凝胶,其显示出适当MW处的针对纳米抗体-树枝状体缀合物的条带。使用非还原十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)确认每种纳米抗体-树枝状体缀合物的纯度。在4%-15%聚丙烯酰胺凝胶(Bio-rad,目录4561086)上电泳分离后,当使用Typhoon生物分子成像仪(GE Healthcare)成像时,纳米抗体-树枝状体缀合物显现为大致对应于树枝状体加纳米抗体附加质量的大

小的荧光条带。随后用考马斯亮蓝(CBB)染色显示出纳米抗体在相同位置处的存在。通过CBB没有显示出其他条带,这表明未反应纳米抗体的存在和制剂纯度。

[1010] 2A.4.1纳米抗体-N_3/DBCO-Glu-NHPEG$_{24}$CONHPEG$_3$-TCO/(MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NHDFO)$_2$(α-NHGlu-VC-PAB-MMAE)$_6$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$],化合物83

[1011] 将DBCO-Glu-NHPEG$_{24}$CO-NHPEG$_3$-TCO化合物51的溶液(167μL的在DMSO:PBS缓冲液(20:80)中的1mg/mL溶液;1当量)添加至(MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NHDFO)$_2$(α-NHGlu-VC-PAB-MMAE)$_6$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]化合物73的溶液(250μL的在PBS中的8mg/mL溶液;1当量)中,并且使混合物在室温下静置30min。用PBS缓冲液将反应混合物稀释至500μL,并且通过HPLC分析所得溶液,结果表明反应混合物中没有残余接头。将该反应混合物的一部分(177μL;1当量)添加至纳米抗体-N_3("纳米抗体-N3-C末端标签")的溶液(62.5μL的在Tris缓冲液中的9.2mg/mL溶液;1当量)中,并且将随后反应混合物在室温下静置7h,然后在4℃下过夜。使用阴离子交换色谱纯化所得纳米抗体-树枝状体缀合物,以使用HiTrap Q HP柱(GE Healthcare,目录17115301)移除未反应的树枝状体。使用Tris缓冲液(20mM,pH 8)进行结合和洗涤步骤,并且使用0%至50%的1M NaCl缓冲液(1M NaCl、20mM Tris、pH 8)的梯度进行洗脱。然后使用尺寸排阻色谱移除未反应的纳米抗体。使用用柱缓冲液(50mM NaH_2PO_4,150mM NaCl,pH 8)平衡的Superdex 75 10/300柱(GE Healthcare,目录17517401)来实现分离。然后将纳米抗体-树枝状体缀合物浓缩,并且使用10k MWCO Amicon Ultra离心过滤器将其缓冲交换到10mM HEPES pH 8中以用于放射性标记。

[1012] 2a.4.2BHA[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N_3-纳米抗体)$_1$(α-NHDFO)$_2$(α-NHGlu-VC-PAB-MMAE)$_5$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_8$],G3,化合物84

[1013] 将DBCO-Glu-NHPEG$_{24}$CO-NHPEG$_3$-TCO的溶液(202μL的在DMSO:PBS缓冲液(20:80)中的1mg/mL溶液;1当量)添加至BHA[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)$_1$(α-NHDFO)$_2$(α-NHGlu-VC-PAB-MMAE)$_5$)(ε-NHCOPEG$_{1000}$)$_8$]化合物74的溶液(250μL的在PBS中的8mg/mL溶液,1当量)中,并且使混合物在室温下静置30min。

[1014] 用PBS缓冲液将反应混合物稀释至500μL,并且通过HPLC分析所得溶液,结果表明反应混合物中没有残余接头。将该反应混合物的一部分(175μL;1当量)添加至纳米抗体-N_3("纳米抗体-N3-C末端标签")的溶液(62.5μL的在Tris缓冲液中的9.2mg/mL溶液;1当量)中,并且将随后反应混合物在室温下静置7h,然后在4℃下过夜。使用阴离子交换色谱纯化所得纳米抗体-树枝状体缀合物,以使用HiTrap Q HP柱(GE Healthcare,目录17115301)移除未反应的树枝状体。使用Tris缓冲液(20mM,pH 8)进行结合和洗涤步骤,并且使用0%至50%的1M NaCl缓冲液(1M NaCl、20mM Tris、pH 8)的梯度进行洗脱。然后使用尺寸排阻色谱移除未反应的纳米抗体。使用用柱缓冲液(50mM NaH_2PO_4,150mM NaCl,pH 8)平衡的Superdex 75 10/300柱(GE Healthcare,目录17517401)来实现分离。然后将纳米抗体-树枝状体缀合物浓缩,并且使用10k MWCO Amicon Ultra离心过滤器将其缓冲交换到10mM HEPES pH 8中以用于放射性标记。

[1015] 2a.4.3BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-

$COPEG_{24}NH$-Glu-DBCO/N_3-纳米抗体)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH_2)$_2$)(ε-NH-$COPEG_{1000}$)$_4$],G2,化合物85和BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[((α-NH-$COPEG_{24}NH$-$COPEG_4$(PhMeTz)/TCO-PEG_3NH-$COPEG_{24}NH$-Glu-DBCO/N_3-纳米抗体)$_2$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH_2))$_1$(ε-NHCOPEG$_{1000}$)$_4$],G2,化合物86

[1016] 根据一般程序G使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[((α-NH-$COPEG_{24}NH$-$COPEG_4$(PhMeTz))$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH_2)$_1$)(ε-NH-$COPEG_{1000}$)$_4$],G2,化合物25制备,不同的是:

[1017] 步骤1:将TCO接头溶液51在纯DMSO中制备;以及

[1018] 步骤2:将树枝状体溶解于pH 8下的Tris缓冲液中,并且在TCO接头与树枝状体完成反应(UPLC或LCMS)后,将反应混合物用Tris缓冲液稀释,使得DMSO的最终浓度≤5%(v/v),并且通过离心超滤(Amicon,0.5mL再生纤维素膜,10kDa MWCO)纯化。

[1019] 纯化方法与用于纯化化合物83和84的方法相同,产生纳米抗体-树枝状体缀合物化合物85(232μg;0.45μg/μL,在pH 8下的HEPES缓冲液中;如图1a泳道6和7中所示)和纳米抗体-树枝状体缀合物化合物86(60μg;0.30μg/μL,在pH 8下的HEPES缓冲液中:如图1a泳道9中所示)。

[1020] 2a.4.4BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-$COPEG_{24}NH$-$COPEG_4$(PhMeTz)/TCO-PEG_3NH-$COPEG_{24}NH$-Glu-DBCO/N_3-纳米抗体)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH_2)$_6$)(ε-NH-$COPEG_{412}$)$_8$],G3,化合物87(和BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-$COPEG_{24}NH$-$COPEG_4$(PhMeTz)/TCO-PEG_3NH-$COPEG_{24}NH$-Glu-DBCO/N_3-纳米抗体)$_2$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH_2)$_5$)(ε-NH-$COPEG_{412}$)$_8$],G3,化合物88

[1021] 根据一般程序G使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-$COPEG_{24}NH$-$COPEG_4$(PhMeTz))$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH_2)$_6$)(ε-NH-$COPEG_{412}$)$_8$],G3,化合物26制备,不同的是:

[1022] 步骤1:将TCO接头化合物51溶液在纯DMSO中制备;以及

[1023] 步骤2:将树枝状体溶解于pH 8下的Tris缓冲液中,并且在TCO接头与树枝状体完成反应(UPLC或LCMS)后,将反应混合物用Tris缓冲液稀释,使得DMSO的最终浓度≤5%(v/v),并且通过离心超滤(Amicon,0.5mL再生纤维素膜,10kDa MWCO)纯化。

[1024] 纯化方法与用于纯化化合物83和84的方法相同,产生纳米抗体-树枝状体缀合物化合物87(140μg;1.48μg/μL,在pH 8下的HEPES缓冲液中;如图1b泳道6和7中所示))和化合物88a(不纯;如图1b泳道8和9中所示)。

[1025] 2a.4.5BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-$COPEG_{24}NH$-$COPEG_4$(PhMeTz)/TCO-PEG_3NH-$COPEG_{24}NH$-Glu-DBCO/N_3-纳米抗体)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH_2)$_6$)(ε-NH-$COPEG_{1000}$)$_8$],G3,化合物89和BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-$COPEG_{24}NH$-$COPEG_4$(PhMeTz)/TCO-PEG_3NH-$COPEG_{24}NH$-Glu-DBCO/N_3-纳米抗体)$_2$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH_2)$_5$)(ε-NH-$COPEG_{1000}$)$_8$],G3,化合物90

[1026] 根据一般程序G使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-$COPEG_{24}NH$-$COPEG_4$(PhMeTz))$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH_2)$_6$)(ε-NH-$COPEG_{1000}$)$_8$],G3,化合物27制备,不同的是:

[1027] 步骤1:将TCO接头(化合物51)溶液在纯DMSO中制备;以及

[1028] 步骤2:将树枝状体溶解于pH 8下的Tris缓冲液中,并且在TCO接头与树枝状体完

成反应(UPLC或LCMS)后,将反应混合物用Tris缓冲液稀释,使得DMSO的最终浓度≤5%(v/v),并且通过离心超滤(Amicon,0.5mL再生纤维素膜,10kDa MWCO)纯化。

[1029] 纯化方法与用于纯化化合物83和84的方法相同,产生纳米抗体-树枝状体缀合物化合物89(249μg;2.68μg/μL,在pH 8下的HEPES缓冲液中;如图1c泳道6和7中所示)和化合物90(不纯;如图1c泳道9和10中所示)。

[1030] 2a.4.6BHA$[Lys]_2[Lys]_4[Lys]_8[Lys]_{16}$[((α-NH-$COPEG_{24}$NH-$COPEG_4$(PhMeTz)/TCO-$PEG_3$NH-$COPEG_{24}$NH-Glu-DBCO/$N_3$-纳米抗体)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH_2)$_{14}$(ε-NH-$COPEG_{1000}$)$_{16}$],G4,化合物91和BHA$[Lys]_2[Lys]_4[Lys]_8[Lys]_{16}$[((a-NH-$COPEG_{24}$NH-$COPEG_4$(PhMeTz)/TCO-$PEG_3$NH-$COPEG_{24}$NH-Glu-DBCO/$N_3$-纳米抗体)$_2$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH_2)$_{13}$(ε-NHCOPEG_{1000})$_{16}$],G4,化合物92

[1031] 根据一般程序G使用BHALys$[Lys]_2[Lys]_4[Lys]_8[Lys]_{16}$[((α-NH-$COPEG_{24}$NH-$COPEG_4$(PhMeTz)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH_2)$_{14}$(ε-NH-$COPEG_{1000}$)$_{16}$],G4,化合物28制备,不同的是:

[1032] 步骤1:将TCO接头(化合物51)溶液在纯DMSO中制备;以及

[1033] 步骤2:将树枝状体溶解于pH 8下的Tris缓冲液中,并且在TCO接头与树枝状体完成反应(UPLC或LCMS)后,将反应混合物用Tris缓冲液稀释,使得DMSO的最终浓度≤5%(v/v),并且通过离心超滤(Amicon,0.5mL再生纤维素膜,10kDa MWCO)纯化。

[1034] 纯化方法与用于纯化化合物83和84的方法相同,产生纳米抗体-树枝状体缀合物化合物91;如图1d:泳道1和2中所示)(203μg;0.975μg/μL和0.556μg/μL,在pH 8下的HEPES缓冲液中)和化合物92;如图1d:泳道3中所示(101μg;0.34μg/μL,在pH 8下的HEPES缓冲液中)。

[1035] 2a.4.7BHA$[Lys]_2[Lys]_4[Lys]_8[Lys]_{16}[Lys]_{32}$[((α-NH-$COPEG_{24}$NH-$COPEG_4$(PhMeTz)/TCO-$PEG_3$NH-$COPEG_{24}$NH-Glu-DBCO/$N_3$-纳米抗体)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH_2)$_{30}$(ε-NH-$COPEG_{1000}$)$_{32}$],G5,化合物93和BHA$[Lys]_2[Lys]_4[Lys]_8[Lys]_{16}[Lys]_{32}$[((α-NH-$COPEG_{24}$NH-$COPEG_4$(PhMeTz)/TCO-$PEG_3$NH-$COPEG_{24}$NH-Glu-DBCO/$N_3$-纳米抗体)$_2$[α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)]$_1$(α-NH_2)$_{29}$(ε-NH-$COPEG_{1000}$)$_{32}$],G5,化合物94

[1036] 根据一般程序G使用BHALys$[Lys]_2[Lys]_4[Lys]_8[Lys]_{16}[Lys]_{32}$[((α-NH-$COPEG_{24}$NH-$COPEG_4$(PhMeTz))$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH_2)$_{30}$)(ε-NH-$COPEG_{1000}$)$_{32}$],G5,化合物29制备,不同的是:

[1037] 步骤1:将TCO接头化合物51溶液在纯DMSO中制备;以及

[1038] 步骤2:将树枝状体溶解于pH 8下的Tris缓冲液中,并且在TCO接头与树枝状体完成反应(UPLC或LCMS)后,将反应混合物用Tris缓冲液稀释,使得DMSO的最终浓度≤5%(v/v),并且通过离心超滤(Amicon,0.5mL再生纤维素膜,10kDa MWCO)纯化。

[1039] 纯化方法与用于纯化化合物83和84的方法相同,产生纳米抗体-树枝状体缀合物化合物93;如图1e泳道5中所示)(370μg;3.66μg/μL,在pH 8下的HEPES缓冲液中)和产物化合物94;如图1e泳道7中所示)(177μg;1.72μg/μL,在pH 8下的HEPES缓冲液中)。

[1040] 2a.4.8BHALys$[Lys]_2[Lys]_4$[(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH_2)$_3$)(ε-NH-$COPEG_{24}$NH-$COPEG_4$(PhMeTz))$_2$)(ε-NH-$COPEG_{24}$NH-$COPEG_4$(PhMeTz))/TCO-PEG_3NH-$COPEG_{24}$NH-Glu-DBCO/N_3-纳米抗体)$_2$],G2,化合物95、BHALys$[Lys]_2[Lys]_4$[(α-Lys(α-NHCy5)(ε-

NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_3$)(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))$_1$(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体)$_3$],G2,化合物96、和BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_3$)(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体)$_4$],G2,化合物97

[1041] 根据一般程序G使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_3$)(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))$_4$],G2树枝状体,化合物24制备,不同的是:

[1042] 步骤1:将TCO接头化合物51溶液在水中制备;以及

[1043] 步骤2:将树枝状体溶解于MQ水中。

[1044] 使用用于纯化化合物83和84的方法进行纯化,产生作为不可分离混合物的纳米抗体-树枝状体缀合物化合物97和化合物96(最终浓度为pH 8下的HEPES缓冲液中294ug;如图1f泳道1中所示)。

[1045] 还通过以下方式来制备:将DBCO-Glu-NHPEG$_{24}$CO-NHPEG$_3$-TCO化合物51的溶液(57μL的在MQ水中的10mg/mL溶液,0.322μmol)添加至纳米抗体-N$_3$("纳米抗体-N3-C末端标签")的溶液(2.5mg,0.161μmol,在pH 8下的900μL Tris缓冲液中。将反应混合物在室温下静置2d,之后接着使用pH 8的Tris缓冲液通过离心超滤(Amicon,0.5mL再生纤维素膜,10kDa MWCO;10x450μL)a纯化反应混合物。向该溶液中添加化合物24的溶液(230.0μg,在500μL MQ水中;0.026umol),并将反应混合物在室温下静置过夜。纯化方法与用于纯化化合物83和84的方法相同,产生作为不可分离混合物的纳米抗体-树枝状体化合物97、化合物95和化合物96(最终浓度为pH 8下的HEPES缓冲液中124μg;如图1g泳道9和10中所示)。

[1046] 2a.4.9BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)/TCO-PE G$_8$-纳米抗体)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)$_1$(ε-NHDFO)$_1$)$_1$(α-NH$_2$)$_2$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_4$],G2,化合物98

[1047] 通过将2.0mg溶解于1mL DMSO(1.0mL)中制备二溴马来酰亚胺接头化合物57的溶液。将TCEP的溶液(0.5M,在pH 7的PBS中)(2.3μL,1.174μmmol)添加至纳米抗体("纳米抗体-N3-C末端标签")(化合物118)的溶液(1.0mg,0.058μmmol,在715μL的pH 8下的Tris缓冲液中)。将反应混合物在37℃下加热1h,之后添加DMSO(673μL),之后添加接头化合物57(93.0μg,0.117μmmol)在DMSO(47.0μL)中的溶液。在1.5h后,将反应混合物冷却至室温并且离心,之后将化合物25的溶液(100μg,17μL,1.78mg,在300μL MQ水中)添加至沉淀物,并且将溶液在4℃下静置过夜。纯化方法与用于纯化化合物83和84的方法相同,产生呈pH 8下的Tris缓冲液中的溶液的化合物98(29μg;如图1h泳道2和3中所示)(最终浓度=1.78mg/mL)。

[1048] 2a.4.10BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[((α-NH-COPEG$_{24}$-NH-COPEG$_4$(PhTzMe)/TCO-PEG$_3$-纳米抗体)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)$_1$(ε-NHDFO)$_1$)$_1$(α-NH$_2$)$_2$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_4$],G2,化合物99

[1049] 将TCO-PEG$_3$-醛(Conju-Probe)接头溶液(0.7mg,1.46μmol)在DMSO(50μL)中的溶液添加至纳米抗体("纳米抗体-N3-C末端标签")(化合物118)的溶液(931μL 1.07mg/mL储备溶液,在pH 6.5下的PBS缓冲液中),之后添加NaBH$_3$CN(0.09mg,1.5μmol)在水中(19μL)中的溶液。将反应混合物冷却至4℃,并且通过UPLC分析监测反应。在16h后,用PBS缓冲液(pH 6.5)将反应混合物稀释至总体积为2.0mL,并且然后使用pH 6.5的PBS缓冲溶液通过离心超滤(Amicon,0.5mL再生纤维素膜,10kDa MWCO;14x450μL)纯化,UPLC:5-20-30MeCN%,历经15分钟,使用0.01%TFA缓冲液;纳米抗体(化合物118)Rt=8.46min,其中m/z为13802;产品:9.99min,其中m/z为14263。向纳米抗体-PEG$_3$-TCO溶液(500μL PBS pH 6.5)中添加G2树

枝状体化合物17(179μg,0.020μmol)在MQ水(15μL)中的溶液。在4℃下静置过夜之后,将反应混合物使用用于纯化化合物83和84的相同方法纯化,产生呈pH 8下的Tris缓冲液中的溶液的化合物99(12μg;如图1i泳道1中所示)(最终浓度=575μg/mL)。

[1050] 2a.4.11[[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_8$(α-NHDOTA)$_{4.75}$(α-NHCy5)$_{0.5}$(α-NH_2)$_{2.75}$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$MAL-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)/TCO-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-Glu-DBCO/N3-纳米抗体SRS-20

[1051] 步骤1:[[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_8$(α-NHDOTA)$_{4.75}$(α-NHCy5)$_{0.5}$(α-NH_2)$_{2.75}$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$MAL-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)/TCO-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-Glu-DBCO SRS-20a的合成:向[[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_8$(α-NHDOTA)$_{4.75}$(α-NHCy5)$_{0.5}$(α-NH_2)$_{2.75}$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$MAL-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)SRS-4-Mal的溶液(8.89mg;10mg/mL在去离子水中)中添加TCO-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-Glu-DBCO化合物51(1.05mg;2当量;10mg/mL在去离子水中),并且将反应混合物在室温下静置2h。通过具有10kDa MWCO Ultracel®再生纤维素膜的Amicon®Ultra离心过滤器从反应混合物中去除过量的接头,并通过在4000rpm下离心10min进行浓缩。通过在4000rpm下离心,用去离子水(x5)洗涤渗余物。通过使用LCMS(LCMS方法3)分析纯化产物来确认过量接头的去除。

[1052] 步骤2:缀合反应:在室温下将[[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_8$(α-NHDOTA)$_{4.75}$(α-NHCy5)$_{0.5}$(α-NH_2)$_{2.75}$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$MAL-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)/TCO-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-Glu-DBCO SRS-20a(9.41mg;10mg/mL;1当量)在去离子水中的溶液添加至纳米抗体-N3的溶液(8.91mg;10mg/mL在pH 8Tris缓冲液中;2当量)。在18h后,首先通过具有30kDa MWCO Ultracel®再生纤维素膜的Amicon®Ultra离心过滤器将纳米抗体-树枝状体构建体纯化,并且通过在4000rpm下离心10min对其进行浓缩。通过在4000rpm下离心,用pH 8的Tris缓冲液(x5)洗涤渗余物。然后通过nNickel亲和柱色谱、之后通过SEC纯化获得的产物,产生[[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_8$(α-NHDOTA)$_{4.75}$(α-NHCy5)$_{0.5}$(α-NH_2)$_{2.75}$][Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-]$_2$MAL-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)/TCO-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-Glu-DBCO/N3-纳米抗体SRS-20(0.42mg)。纯化产物的SDS Page凝胶分析参见图2a(泳道6)。反应混合物。

[1053] 2a.4.12[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_{16}$(α-DOTA)$_7$(α-NHCy5)$_1$(α-NH_2)$_8$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-(PN)NCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)/TCO-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-Glu-DBCO/N3-纳米抗体SRS-22

[1054] 步骤1:[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_{16}$(α-DOTA)$_7$(α-NHCy5)$_1$(α-NH_2)$_8$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-(PN)NCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)/TCO-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-Glu-DBCO SRS-22a的合成:向[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_{16}$(α-DOTA)$_7$(α-NHCy5)$_1$(α-NH_2)$_8$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-(PN)NCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)HH-2的溶液(1.50mg;10mg/mL在去离子水中)中添加TCO-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-Glu-DBCO化合物51(0.20mg;2当量;10mg/mL在去离子水中),并且将反应混合物在室温下静置2h。通过具有10kDa MWCO Ultracel®再生纤维素膜的Amicon®Ultra离心过滤器去除过量的接头,并通过在4000rpm下离心10min进行浓缩。通过在4000rpm下离心,用去离子水(x5)洗涤渗余物。通过使用LCMS(LCMS法20-90,8min,TFA)分析纯化产物来确认过量接头的去除。

[1055] 步骤2:缀合反应:在室温下将[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_{16}$(α-DOTA)$_7$(α-NHCy5)$_1$(α-NH_2)$_8$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-(PN)NCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)/TCO-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-Glu-DBCO(1.59mg;10mg/mL;1当量)在去离子水中的溶液添加至纳米抗体-N3的溶液(1.64mg;10mg/mL在pH 8Tris缓冲液中;2当量)。在18h后,首先通过具有30kDa MWCO Ultracel®再生纤维素膜的Amicon®Ultra离心过滤器将反应混合物纯化,并且通过在4000rpm下离心10min对其进行浓缩。通过在4000rpm下离心,用pH 8的Tris缓冲液(x5)洗涤渗余物。然后通过镍亲和柱色谱、之后通过SEC纯化获得的产物,产生[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_{16}$(α-DOTA)$_7$(α-NHCy5)$_1$(α-NH_2)$_8$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-(PN)NCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)/TCO-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-Glu-DBCO/N3-纳米抗体SRS-22(0.65mg)。纯化产物的SDS Page凝胶分析参见图23(泳道2)。

[1056] 2.4a.12BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[((α-NH-$COPEG_{24}$NH-$COPEG_4$(PhTzMe)/TCO-PEG_3NH-$COPEG_{24}$NH-Glu-DBCO/N_3-纳米抗体)$_1$(α-NHCy5)$_1$(α-NHDOTA))$_{10}$(α-NH_2)$_4$)(ε-NH-$COPEG_{1000}$)$_{16}$],G4,化合物SRS-2-304

[1057] 步骤1:TCO-PEG_3NH-$COPEG_{24}$NH-Glu-DBCO/N_3-纳米抗体(使用“纳米抗体-N_3-C末端标签”)化合物SRS-2a的制备:将TCO-PEG_3NH-$COPEG_{24}$NH-Glu-DBCO,化合物51(4.69mg,2.6μmol)在MQ水(469μL)中的溶液添加至纳米抗体-N_3(“纳米抗体-N_3-C末端标签”)的溶液(3.5mL的在pH 8Tris缓冲液中的5.84mg/mL;1.3μmol)。将反应混合物在室温下静置18h,并且然后通过旋转柱(Amicon Ultra-15,10kDa MWCO)浓缩。用20mM pH 8的Tris缓冲液(6x15mL)重复洗涤渗余物,最后浓缩产生化合物SRS-2a(11.3mg/mL)。UPLC-ToF(方法2):R_t=4.74min。ESI MS(+ve)17242$[M]^+$;$[M]^+$的计算m/z:17242

[1058] 步骤2:向BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[((α-NH-$COPEG_{24}$NH-$COPEG_4$(PhTzMe)$_1$(α-NHCy5)$_1$(α-NHDOTA))$_{10}$(α-NH_2)$_4$)(ε-NH-$COPEG_{1000}$)$_{16}$],G4化合物SRS-1(36.0mg,1.09μmol)在MQ水(4.0mL)中的溶液中添加TCO-PEG_3NH-$COPEG_{24}$NH-Glu-DBCO/N_3-纳米抗体(使用“纳米抗体-N_3-C末端标签”)化合物SRS-2a(1.2当量,2.0mL的在pH8 Tris缓冲液中的11.3mg/mL溶液)。将所得溶液在室温下静置18h,并且然后通过金属亲和色谱、之后通过SEC纯化,产生化合物SRS-2-304(32.28mg,60%;通过SDS凝胶确认,未示出。)参见实施例7,针对Her2+细胞结合数据的表。

[1059] 2A.4纳米抗体-Cys SRS-13表达质粒

[1060] 使用标准分子生物学技术将抗HER2纳米抗体克隆2D3的编码序列(US20110028695A1 SEQ ID NO:1986)插入至表达质粒pET-His6-TEV-1B(Addgene plasmid 29653)中。合成大肠杆菌K12密码子优化的DNA序列,并且然后将其克隆至质粒pET-His6-TEV-1B中。

[1061] 为了将C末端未配对的半胱氨酸残基并入重组蛋白中,将半胱氨酸密码子(TGC)作为硫酸酯酶肽基序(LCTPSR)的一部分(Carrico等人,Nat Chem Biol,3,2007,p321-322)框内插入在纳米抗体编码序列之后,之后接着是编码TEV蛋白酶裂解位点的序列、6his标签和用于翻译终止的蛋白石(TGA)终止密码子。应当理解,这些附加的基序是可选的,而不仅仅是半胱氨酸密码子

[1062] 2a.5纳米抗体-Cys SRS-13的表达和纯化

[1063] 在用纳米抗体表达质粒转化的大肠杆菌菌株BL21(DE3)(Invitrogen)中进行抗

HER2纳米抗体2D3表达。在37℃下将细胞在容纳于带挡板摇瓶中的极品肉汤(25g/L胰蛋白胨、30g/L酵母和5g/L甘油、0.017M KH_2PO_4、0.072M K_2HPO_4、50μg/mL硫酸卡那霉素)中培养，直到达到OD_{600} 0.7-1.0的细胞密度。通过添加1.5mM IPTG诱导重组蛋白表达，并且使其在25℃下进行20小时。通过离心收获细菌并且通过高压均化产生细胞裂解物，之后添加蛋白酶抑制剂混合物、溶菌酶和DNA酶处理。将裂解物在重折叠缓冲液(6M盐酸胍、50mM NaH_2PO_4、300mM NaCl、20mM咪唑、pH 8)中孵育。在通过高速离心澄清化和通过0.45μM膜过滤器过滤后，将his6标签化纳米抗体通过固定化金属亲和色谱(IMAC)使用装入镍的次氮基三乙酸琼脂糖纯化。通过以下方式实现柱上重折叠：首先用柱体积的6M盐酸胍、50mM NaH_2PO_4、300mM NaCl、20mM咪唑、pH 8洗涤结合蛋白；之后接着用相同的缓冲液但在4M、3M、2M、1M和0.5M盐酸胍浓度下洗涤。这之后是用两柱体积的50mM NaH_2PO_4、300mM NaCl、20mM咪唑、pH 8洗涤。将重折叠蛋白用2柱体积的50mM NaH_2PO_4、300mM NaCl、250mM咪唑、pH 8洗脱。在IMAC后，将-纳米抗体-Cys SRS-13通过阴离子交换色谱使用HiTrap Q HP柱(GE Healthcare，目录17115301)进一步纯化。使用Tris缓冲液(20mM，pH 8)进行结合和洗涤步骤，并且使用0％至50％的1M NaCl缓冲液(1M NaCl、20mM Tris、pH 8)的梯度进行洗脱。使用Amicon 10k MWCO过滤器单元(Merck，目录UFC901008)将获得的相关纳米抗体级分缓冲液交换至20mM Tris(pH 8)中。应当注意：纳米抗体-Cys SRS-13主要是二聚形式(经由-S-S-键)，并且必须在缀合之前被还原)。

[1064] 2a.6纳米抗体-Cys SRS-13与树枝状体的缀合

[1065] 使用马来酰亚胺/Cys缀合化学将纳米抗体-CysSRS-13缀合至树枝状体SRS-4-Mal、RP-5、HH-2和SRS-1，以根据一般程序K中描述的程序生成化合物SRS-15-17和21。

[1066] 针对缀合物SRS-15-17和21(图23)运行凝胶，其显示出适当MW处的针对纳米抗体-树枝状体缀合物的条带。使用非还原十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)确认每种纳米抗体-树枝状体缀合物的纯度。在4％-15％聚丙烯酰胺凝胶(Bio-rad，目录4561086)上电泳分离后，当使用Typhoon生物分子成像仪(GE Healthcare)成像时，纳米抗体-树枝状体缀合物显现为大致对应于树枝状体加纳米抗体附加质量的大小的荧光条带。随后用考马斯亮蓝(CBB)染色显示出纳米抗体在相同位置处的存在。通过CBB没有显示出其他条带，这表明未反应纳米抗体的存在和制剂纯度。

[1067] 2a.6.1$[[(\varepsilon\text{-NHCO-PEG}_{1100})_8(\alpha\text{-NHDOTA})_{4.75}(\alpha\text{-NHCy5})_{0.5}(\alpha\text{-NH}_2)_{2.75}][Lys]_8[Lys]_4[Lys]_2[Lys]\text{-CONH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-}]_2$MAL-$PEG_3$-NHCO-$PEG_{24}$-CONH-$PEG_4$-(PhTzMe)/TCO-NHCO-$PEG_{24}$-(MAL)Me/Cys-纳米抗体SRS-15

[1068] SRS-15是通过以下方式合成的：使用一般程序K，使用纳米抗体-Cys/Me(MAL)-PEG_{24}-CONH-PEG_3-TCO SRS-14(6.50mg)和$[[(\varepsilon\text{-NHCO-PEG}_{1100})_8(\alpha\text{-NHDOTA})_{4.75}(\alpha\text{-NHCy5})_{0.5}(\alpha\text{-NH}_2)_{2.75}][Lys]_8[Lys]_4[Lys]_2[Lys]\text{-CONH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-}]_2$MAL-$PEG_3$-NHCO-$PEG_{24}$-CONH-$PEG_4$-(PhTzMe)SRS-4-Mal(9.0mg)，产生$[[(\varepsilon\text{-NHCO-PEG}_{1100})_8(\alpha\text{-NHDOTA})_{4.75}(\alpha\text{-NHCy5})_{0.5}(\alpha\text{-NH}_2)_{2.75}][Lys]_8[Lys]_4[Lys]_2[Lys]\text{-CONH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-}]_2$MAL-$PEG_3$-NHCO-$PEG_{24}$-CONH-$PEG_4$-(PhTzMe)/TCO-NHCO-$PEG_{24}$-(MAL)Me/Cys-纳米抗体SRS-15(0.80mg)。反应混合物的SDSPage凝胶分析参见图22(泳道2)。

[1069] 2a.6.2$[(\varepsilon\text{-NHCO-PEG}_{1100})_{16}(\alpha\text{-NHCy5})_1(\alpha\text{-NHDOTA})_8(\alpha\text{-NH}_2)_7][Lys]_{16}[Lys]_8[Lys]_4[Lys]_2[Lys]\text{-CONH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-}$(Me)MAL-$PEG_{24}$-CONH-Bn-Tz(Me)/TCO-NHCO-PEG_{24}-(MAL)Me/

Cys-纳米抗体SRS-16

[1070] SRS-16是通过以下方式合成的:使用一般程序K,使用纳米抗体-Cys/Me(MAL)-PEG_{24}-CONH-PEG_3-TCO SRS-14(6.66mg)和[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_{16}$(α-NHCy5)$_1$(α-NHDOTA)$_8$(α-NH_2)$_7$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-(Me)MAL-PEG_{24}-CONH-Bn-Tz(Me)RP-5(9.5mg),产生[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_{16}$(α-NHCy5)$_1$(α-NHDOTA)$_8$(α-NH_2)$_7$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-CONH-CH_2-CH_2-S-(Me)MAL-PEG_{24}-CONH-Bn-Tz(Me)/TCO-NHCO-PEG_{24}-(MAL)Me/Cys-纳米抗体SRS-16(0.81mg)。反应混合物的SDS Page凝胶分析参见图22(泳道4)。

[1071] 2a.6.3[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_{16}$(α-DOTA)$_7$(α-NHCy5)$_1$(α-NH_2)$_8$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-(PN)NCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)/TCO-NHCO-PEG_{24}-(MAL)Me/Cys-Nb SRS-17

[1072] SRS-17是通过以下方式合成的:使用一般程序K,使用纳米抗体-Cys/Me(MAL)-PEG_{24}-CONH-PEG_3-TCO SRS-14(9.0mg)和[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_{16}$(α-DOTA)$_7$(α-NHCy5)$_1$(α-NH_2)$_8$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-(PN)NCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)HH-2(14.2mg),产生[(ε-NHCO-PEG_{1100})$_{16}$(α-DOTA)$_7$(α-NHCy5)$_1$(α-NH_2)$_8$][Lys]$_{16}$[Lys]$_8$[Lys]$_4$[Lys]$_2$[Lys]-(PN)NCO-PEG_{24}-CONH-PEG_4-(PhTzMe)/TCO-NHCO-PEG_{24}-(MAL)Me/Cys-纳米抗体SRS-17(3.26mg)。反应混合物的SDS Page凝胶分析参见图22(泳道6)。

[1073] 2a.6.4BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG_{24}NH-COPEG_4(PhTzMe)/TCO-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-(MAL)Me/Cys-纳米抗体)$_1$(α-NHCy5)$_1$(α-NHDOTA))$_{10}$(α-NH_2)$_4$)(ε-NH-COPEG_{1000})$_{16}$SRS-21

[1074] 步骤1:BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG_{24}NH-COPEG_4(PhTzMe)/TCO-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-(MAL)Me)$_1$(α-NHCy5)$_1$(α-NHDOTA))$_{10}$(α-NH_2)$_4$)(ε-NH-COPEG_{1000})$_{16}$]SRS-21a的合成:向BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG_{24}NH-COPEG_4(PhTzMe)$_1$(α-NHCy5)$_1$(α-NHDOTA))$_{10}$(α-NH_2)$_4$)(ε-NH-COPEG_{1000})$_{16}$]SRS-1的溶液(13.0mg;10mg/mL在pH 6.8的水中)中添加TCO-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-(MAL)Me SRS-12(2当量;1.40mg;10mg/mL在去离子水中),并且将反应混合物在室温下静置2h。通过具有10kDa MWCO Ultracel®再生纤维素膜的Amicon®Ultra离心过滤器从反应混合物中去除过量的接头,并通过在4000rpm下离心10min进行浓缩。通过在4000rpm下离心,用pH 6.8的水(x5)洗涤渗余物。

[1075] 步骤2:纳米抗体-Cys二聚体还原为纳米抗体-Cys SRS-13:向纳米抗体-Cys二聚体的溶液(3.33mg/mL在10mM PBS中,pH 7.2;1当量)中添加aq 0.5M TCEP(10当量)。将反应混合物在37℃下孵育2h并且不经进一步纯化而用于随后的步骤中。

[1076] 步骤3:缀合反应:在室温下将BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG_{24}NH-COPEG_4(PhTzMe)/TCO-PEG_3-NHCO-PEG_{24}-(MAL)Me)$_1$(α-NHCy5)$_1$(α-NHDOTA))$_{10}$(α-NH_2)$_4$)(ε-NH-COPEG_{1000})$_{16}$]SRS-21a(13.68mg;10mg/mL;1当量)在pH 6.8的水中的溶液添加至纳米抗体-Cys SRS-13的溶液(7.0mg;3.33mg/mL在10mM PBS中,pH 7.2;1.1当量)。在18h后,首先通过具有30kDa MWCO Ultracel®再生纤维素膜的Amicon®Ultra离心过滤器将反应混合物纯化,并且通过在4000rpm下离心10min对其进行浓缩。通过在4000rpm下离心,用pH 7.2的PBS缓冲液(x5)洗涤渗余物。然后通过镍亲和柱色谱、之后通过SEC纯化获得的半纯产物,产生BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG_{24}NH-COPEG_4(PhTzMe)/TCO-

PEG_3-NHCO-PEG_{24}-(MAL)Me/Cys-Nanobody)$_1$(α-NHCy5)$_1$(α-NHDOTA))$_{10}$(α-NH_2)$_4$)(ε-NH-$COPEG_{1000}$)$_{16}$]SRS-21(0.65mg)。纯化产物的SDS Page凝胶分析参见图23(泳道4)。

[1077] 2b HER-2亲和体-树枝状体缀合物

[1078] 2b.1亲合体-BCN/N_3-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHGlu-vc-PAB-MMAE)$_8$(ε-NH-$COPEG_{1100}$)$_8$],G3,化合物77

[1079] 根据一般程序F使用亲和体-BCN(2.0mg,286nmol,在1.0mg/mL PBS下)和叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHGlu-vc-PAB-MMAE)$_8$(ε-NH-$COPEG_{1100}$)$_8$]化合物65(1.0mL的240μm溶液)制备。冻干纯化物质产生白色蓬松粉末(2.19mg,31%)。SDS-PAGE分析显示出约30kDa的对应于亲和体-树枝状体缀合物的条带(700nm)。

[1080] 2b.2亲合体-BCN/N_3-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHGlu-vc-PAB-MMAE)$_8$(ε-NH-$COPEG_{2000}$)$_8$],G3,化合物78

[1081] 根据一般程序F使用亲和体-BCN(1.0mg,143nmol,在1.0mg/mL PBS下)和叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHGlu-vc-PAB-MMAE)$_8$(ε-NH-$COPEG_{2000}$)$_8$]化合物66(250μL的233μm溶液)制备。SDS-PAGE分析显示出约40kDa的对应于亲和体-树枝状体缀合物的条带(700nm)。

[1082] 2b.3亲合体-BCN/N_3-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHDGA-MMAF(OMe)$_8$(ε-NH-$COPEG_{1100}$)$_8$],G3,化合物81

[1083] 根据一般程序F使用亲和体-BCN(2.0mg,286nmol,在1.0mg/mL PBS下)和叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHDGA-MMAF(OMe)$_8$(ε-NH-$COPEG_{1100}$)$_8$]化合物67(600μL的365μm溶液)制备。冻干纯化物质产生白色蓬松粉末(2.06mg,33%)。SDS-PAGE分析显示出约30kDa的对应于亲和体-树枝状体缀合物的条带(700nm)。

[1084] 2c.FAPI靶向性树枝状体和对照

[1085] 2c.1BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)])$_{1.5}$(α-NH_2)$_{30.5}$(ε-NHCO-$dPEG_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-$mPEG_{1000}$)$_{31}$]RHa-26

[1086] 向BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH_2.TFA)$_{32}$(ε-NHCO-$dPEG_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-$mPEG_{1000}$)$_{31}$]RHa-20(1.7μmol)在室温下在DMF(1.0mL)中的溶液中添加在DMF中的NMM(10μL/mL,37μL,34μmol)、HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)]RHa-9在DMF中的溶液(20mg/mL,185μL,2.5μmol)和PyBOP在DMF中的溶液(100mg/mL,13μL,2.5μmol)。通过HPLC(HPLC方法1)通过监测HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)]RHa-9的消失(R_t=5.32min)来跟踪反应混合物的进程。在18h后,添加在DMF中的NMM(70μL,54μmol),之后添加新鲜制备的在DMF中的PyBOP(50mg/mL,30μL,2.9μmol)。将反应混合物搅拌18h,之后添加另外部分的在DMF中的NMM(100μL,109μmol)和PyBOP(6mg,11.5μmol)。在搅拌另外16h后,真空浓缩反应混合物,并将残余物溶解于去离子水(10mL)中。将所得溶液转移到Amicon® Ultra1,5 10kDa MWCO旋转柱中,并且通过离心(4000rpm,持续20min)浓缩。用水洗涤渗余物(10x5mL,@4000rpm,持续15min),并且然后将最终渗余物冻干,产生深蓝色胶状物(108mg)。由于通过HPLC观察到HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)]RHa-9的完全消耗,因此将反应产物命名为BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)])$_{1.5}$(α-NH_2)$_{30.5}$(ε-NHCO-$dPEG_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-$mPEG_{1000}$)$_{31}$]RHa-26。HPLC(HPLC法5-80,8min,TFA)R_t=4.99min。

[1087] 2c.2BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)])$_{1.5}$(α-NH$_2$)$_{30.5}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(0)N-FAPI-04)$_{10}$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_{19}$(ε-NH$_2$)$_3$]RHa-25

[1088] 根据针对BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)])$_{1.5}$(α-NH$_2$)$_{30.5}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(0)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_{31}$]RHa-26所描述的方法，由BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(0)N-FAPI-04)$_{10}$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_{19}$(ε-NH$_2$)$_3$]RHa-13(1.6μmol)来合成。在室温下，在3d内分批添加总共2.4μmol的PyBOP、90μmol的在DMF(1.5mL)中的NMM，以确保消耗所有HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)]RHa-9(2.2(2.2μmol)(通过HPLC监测反应)。在纯化后，获得呈浓稠的深蓝色油状物的BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)])$_{1.5}$(α-NH$_2$)$_{30.5}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(0)N-FAPI-04)$_{10}$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_{19}$(ε-NH$_2$)$_3$]RHa-25(81mg)。HPLC(HPLC法5-80,8min,TFA)R_t＝4.73min。

[1089] 2c.3BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)])$_{1.5}$(α-NH$_2$)$_{30.5}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(0)N-FAPI-04)$_4$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$)$_{28}$(ε-NH$_2$)$_2$]RHa-27

[1090] 根据针对BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)])$_{1.5}$(α-NH$_2$)$_{30.5}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(0)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_{31}$]RHa-26所描述的方法，由BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHBoc)$_{32}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(0)N-FAPI-04)$_4$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$)$_{28}$(ε-NH$_2$)$_2$]RHa-14(82mg,1.7μmol)来合成。在室温下，在3d内分批添加总共16.9μmol的PyBOP、1.58mmol的在DMF(1.5mL)中的NMM，以确保消耗所有HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)]RHa-9(2.6μmol)(通过HPLC监测反应)。在纯化后，获得呈蓝色胶状物的BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)])$_{1.5}$(α-NH$_2$)$_{30.5}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(0)N-FAPI-04)$_4$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$)$_{28}$(ε-NH$_2$)$_2$]RHa-27(83mg)。HPLC(HPLC法5-80,8min,TFA)R_t＝4.78min。

[1091] 2c.4BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)])$_{1.5}$(α-NH$_2$)$_{6.5}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(0)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_5$(ε-NH$_2$)$_1$]RHa-28

[1092] 根据上文针对BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)])$_{1.5}$(α-NH$_2$)$_{30.5}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(0)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_{31}$]RHa-26所描述的方法，由BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(0)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_5$(ε-NH$_2$)$_2$]RHa-16(85mg,6.9μmol)来合成。在室温下，在2d内分批添加总共20.9μmol的PyBOP、1.23μmol的在DMF(1.5mL)中的NMM，以确保消耗所有HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)]RHa-9(10.3μmol)(通过HPLC监测反应)。在纯化后，获得呈蓝色胶状物的BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)])$_{1.5}$(α-NH$_2$)$_{6.5}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(0)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_5$(ε-NH$_2$)$_2$]RHa-28(96mg)。HPLC(HPLC法5-80,8min,TFA)R_t＝4.89min。

[1093] 2c.5BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)])$_{1.5}$(α-NH$_2$)$_{6.5}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(0)N-FAPI-04)$_3$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_5$]RHa-29

[1094] 根据上文针对BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)])$_{1.5}$(α-NH$_2$)$_{30.5}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(0)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-

$mPEG_{1000})_{31}$]RHa-26所描述的方法，由BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NHCO-$dPEG_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_3$(ε-NHCO-$mPEG_{1000}$)$_5$]RHa-17(85mg，6.9μmol)来合成。在室温下，在2d内分批添加总共19.7μmol的PyBOP、1.22μmol的在DMF(1.5mL)中的NMM，以确保消耗所有HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)]RHa-9(9.5μmol)(通过HPLC监测反应)。在纯化后，获得呈蓝色胶状物的BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)])$_{1.5}$(α-NH_2)$_{6.5}$(ε-NHCO-$dPEG_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_3$(ε-NHCO-$mPEG_{1000}$)$_5$]RHa-29(94mg)。HPLC(HPLC法5-80，8min，TFA)R_t＝5.23min。

[1095] 2c.6BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)])$_{1.5}$(α-NH_2)$_{6.5}$(ε-NHCO-$dPEG_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_{7.4}$(ε-NH_2)$_{0.6}$]RHa-30

[1096] 根据上文针对BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)])$_{1.5}$(α-NH_2)$_{30.5}$(ε-NHCO-$dPEG_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_1$(ε-NHCO-$mPEG_{1000}$)$_{31}$]RHa-26所描述的方法，由BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NHCO-$dPEG_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_{7.4}$(ε-NH_2)$_{0.6}$]RHa-18(40mg，2.5μmol)来合成。添加总共3.9μmol的PyBOP、0.1mmol的在DMF(1.0mL)中的NMM，以确保消耗所有HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)]RHa-9(3.9μmol)(通过HPLC监测反应)。在纯化后，获得呈蓝色胶状物的BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHCO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH-Ph-DFO)])$_{1.5}$(α-NH_2)$_{6.5}$(ε-NHCO-$dPEG_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_{7.4}$(ε-NH_2)$_{0.6}$]RHa-30(45mg)。HPLC(HPLC法5-80，8min，TFA)R_t＝4.61min。^{1}H NMR(300MHz，CD_3OD)：δ(ppm)：1.10-2.02(m，186H)，2.08(s，6H)，2.14-2.37(m，18H)，2.37-2.59(m，25H)，2.59-3.27(m，120H)，3.36-403(m，906H)，4.03-4.52(m，54H)，5.03-5.23(m，5H)，6.07-6.44(m，4H)，6.44-6.78(m，1H)，7.12-7.43(m，28H)，7.43-7.69(m，21H)，7.85-7.92(m，1H)，7.92-8.07(m，FAPI-04-DFO 15H)，8.15-8.30(m，4H)和8.70-8.88(m，8H)。

[1097] 2c.7BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH-C(S)-NH-Bn-DOTA)$_4$(α-NH_2)$_4$(ε-NHCO-$dPEG_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_3$(ε-NHCO-$mPEG_{1000}$)$_5$]RHa-34

[1098] 向BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH_2.TFA)$_8$(ε-NHCO-$dPEG_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_3$(ε-NHCO-$mPEG_{1000}$)$_5$]RHa-23中添加p-SCN-Bn-DOTA RHa-33在DMF中的溶液(10.3mg/mL，1.2mL，18μmol)。将反应混合物用DMF(1.2mL)稀释，并且添加DIPEA(100μL，0.17mmol)。在搅拌1.5h后，将反应混合物真空浓缩，溶解于水(6mL)中，并将所得溶液转移到1x Amicon® Ultra 15 3k MWCO旋转柱中，并在室温下在4000rpm下离心25min。将浓缩的渗余物用水(10x2.5mL，4000rpm，15min)洗涤并且冻干，产生呈淡黄色固体的BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH-C(S)-Bn-DOTA)$_4$(α-NH_2)$_4$(ε-NHCO-$dPEG_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_3$(ε-NHCO-$mPEG_{1000}$)$_5$]RHa-34(59mg，定量)。HPLC(HPLC法5-80，8min，TFA)R_t＝4.45min。^{1}H NMR(300MHz，CD_3OD)：δ(ppm)1.00-2.10(m，104H)，2.10-2.37(m，8H)，2.37-2.54(m，8H)，2.54-2.78(m，13H)，2.78-3.28(m，74H)，3.35(s，21H)，3.37-3.92(m，914H)，3.92-4.60(m，52H)，5.07-5.23(m，3H)，6.12-6.23(m，1H)，7.09-7.40(m，19H)，7.40-7.72(m，14H)，7.92-8.06(m，6H)，8.70-8.74(m，3H)。

[1099] 2c.8BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH-C(S)-NH-Bn-DOTA)$_8$(α-NH_2)$_{24}$(ε-NHCO-$dPEG_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_{10}$(ε-NHCO-$mPEG_{1000}$)$_{19}$(ε-NH_2)$_3$]RHa-35向BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH_2.TFA)$_{32}$(ε-NHCO-$dPEG_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_{10}$(ε-NHCO-$mPEG_{1000}$)$_{19}$(ε-NH_2)$_3$]Rha-19中添加p-SCN-Bn-DOTARHa-33在DMF中的溶液(10.3mg/mL，

0.55mL,8μmol)。将反应混合物用DMF(1.45mL)稀释,并且添加DIPEA(100μL,0.17mmol)。在搅拌1.5h后,将反应混合物真空浓缩,溶解于水(6mL)中,并且将所得溶液转移到1x Amicon®Ultra 15 10k MWCO旋转柱中,并且在室温下在4000rpm下离心25min。将浓缩的渗余物用水(10x2.5mL,4000rpm,15min)洗涤并且冻干,产生呈淡黄色固体的BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH-C(S)-NH-Bn-DOTA)$_8$(α-NH$_2$)$_{24}$(ε-NHCO-dPEG$_{1100}$-C(O)N-FAPI-04)$_{10}$(ε-NHCO-mPEG$_{1000}$)$_{19}$(ε-NH$_2$)$_3$]RHa-35(51mg,98%)。HPLC(HPLC法5-80,8min,TFA)R_t=4.61min。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD):δ(ppm)0.95-2.34(m,401H),2.34-2.61(m,35H),2.61-3.28(m,235H),3.36H(s,76H),3.38-3.81(m,3358H),3.81-3.91(m,46H),3.91-4.55(m,203H),5.04-5.21(m,16H),7.03-7.42(m,28H),7.55-7.72(m,17H),7.93-8.06(m,20H),8.72-8.84(m,10H)。

[1100] 2c.9FAPI-04-DFO RHa-31(FAPI-DFO对照)

[1101] 在室温下将p-SCN-Ph-DFO RHa-8(24.7mg,33μmol)在DMSO(0.5mL)中的溶液添加至FAPI-04-NH(TsOH盐)RHa-2(25.9mg,39μmol)中,之后添加DIPEA(51μL,293μmol)。在1.5h后,添加另一部分FAPI-04-NH(TsOH盐)RHa-2(15mg,23μmol)并且继续搅拌。在2d后,将反应混合物通过自动快速柱色谱(Autoflash方法2,R_{CV}=10-12CV)直接纯化,产生呈灰白色固体的FAPI-04-DFO RHa-31(29mg,71%)。LCMS(LCMS法5-80,8min,TFA)R_t=4.56min。ESI MS(+ve)1240$[M+H]^+$;$C_{57}H_{81}F_2N_{14}O_{11}S_2[M+H]^+$的计算m/z=1240。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD):1.24-1.71(m,20H),2.09-2.15(m,5H),2.41-2.50(m,4H),2.66-3.00(m,13H),3.12-3.19(m,4H),3.54-3.63(m,8H),3.95-4.40(m,7H),5.05-5.20(m,1H),7.19-7.34(m,4H),7.48(dd,J=3.0,9.0Hz,1H),7.58(d,J=3.0Hz,1H),7.86-8.05(m,2H)和8.76(d,J=6.0Hz,1H)。

[1102] 2d.DUPA靶向性树枝状体和对照

[1103] 2d.1BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH$_2$.TFA)$_8$(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-DUPA(OH)$_3$)$_8$],G3,化合物37

[1104] 根据一般程序A使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHBoc)$_8$(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-DUPA(OtBu)$_3$)$_8$],化合物36(36mg,2.29μmol)制备。将反应物在室温下搅拌过夜。减压浓缩反应物并且使用SEC(400滴/管,MeCN sephadex LH20,35滴/min)纯化。使用TLC分析(5%$BaCl_2$溶液,之后是碘染料;深棕色斑点)检查级分,将认为含有产物的级分合并并且减压浓缩。收集呈无色膜状物的标题化合物,化合物37(24mg,72%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):0.60-1.99(m,138H),2.08-2.22(m,16H),2.24-2.52(m,48H),3.07-4.06(m,845H),4.27-4.35(m,16H),6.18(s,1H),7.25-7.39(m,10H)。HPLC(C8 Xbridge,3x100mm)梯度:5%MeCN/H_2O(0-1min),5%-80%MeCN(1-7min),80%MeCN(7-12min),80%-5%MeCN(12-13min),5%MeCN(13-15min),214nm,0.4mL/min,R_t=6.80min(宽峰,低强度)。

[1105] 2d.2BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-(NHDOTA))$_1$(a-NHAc)$_7$)(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-DUPA)$_8$],G3,化合物38

[1106] 根据一般程序I步骤2使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-(NHDOTA))$_1$(α-NH$_2$)$_7$)(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-DUPA)$_8$]化合物106(23mg,1.66μmol)制备。将反应物在N_2流下浓缩并且通过SEC(400滴/管,MeOH sephadex LH20,35滴/min)纯化。通过TLC分析(5%$BaCl_2$溶液,之后是碘染料;深棕色斑点)然后HPLC检查级分,将含有产物的级分合并并且减压浓缩。将残余物溶解于MQ水中,过滤(0.45μm acrodisc过滤器)并冷冻干燥,产生呈棕色蜡状固体的标题

化合物(22mg,91%)。HPLC(C8 Xbridge,3x100mm)梯度:5%MeCN/H_2O(0-1min),5%-80% MeCN(1-7min),80%MeCN(7-12min),80%-5%MeCN(12-13min),5%MeCN(13-15min),214nm,0.4mL/min,R_t=7.22min(宽峰)。

[1107] 2d.3BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCy5)$_1$(α-NHCO-PEG_{24}-NH-DUPA)$_{15}$(α-NHCO-PEG_{24}NH-GADOTA)$_4$(α-NH_2.TFA)$_{11}$(ε-NHCOPEG$_{1000}$)$_{32}$]RL-22向BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH_2.TFA)$_{32}$(ε-NHCOPEG$_{1000}$)$_{32}$](100mg,1.97μmol)和Cy5-NHS脂(2.6mg,3.94μmol)在DMF(3mL)中的搅拌溶液中添加NMM(20μL,189μmol),并且将随后反应物在室温下搅拌过夜,之后真空移除挥发物,产生蓝色油状物。将残余物溶解于DMF(3mL)中,并依次添加DUPA(OtBu)$_3$-NHPEG$_{24}$$CO_2$H化合物40(30mg,18.6μmol)、PyBOP(10mg,18.6μmol)和NMM(10μL,92.9μmol)。将随后反应物在室温下搅拌过夜。将反应混合物分为两份,向一份中添加DOTA(OtBu)$_4$GA-NHCO-PEG_{24}-COOH RL-21(34mg,19.9μmol)和PyBOP(10mg,18.9μmol),并且将随后反应物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且将所得蓝色残余物溶解于去离子水中。通过旋转柱(Amicon Ultra,15mL,30kDa MW截止值,4000rpm,持续20min)浓缩溶液,用水重复洗涤渗余物(10x5mL,@4000rpm,持续20min),并且通过冻干将最终渗余物干燥,产生深蓝色油状物。将一部分所得油状物(20mg)溶解于二氯甲烷(0.5mL)中,并且在室温下添加一份TFA(0.5mL)。将随后反应物在室温下搅拌过夜。将反应混合物在N_2流下浓缩,并且将所得蓝色残余物溶解于水中,过滤(0.45μm acrodisc注射器过滤器),然后通过冻干干燥,产生呈蓝色固体的标题化合物RL-22(15mg)。

[1108] DUPA和DOTA的数量通过比较分离的中间体化合物的^{1}H NMR谱上0.0-2.0ppm与3.4-4.0ppm区域之间的共振的相对积分变化来确定。PEG_{1000}的末端甲氧基基团(3.83ppm,96H)用作参考。

[1109] ^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD):δ(ppm)0.77-2.03(m,383H),2.08-2.27(m,36H),2.27-2.37(m,28H),2.36-2.47(m,28),2.48-2.83(m,63H),3.83(s,96H),3.39-3.93(m,4520),4.01(m,62H)和6.0-8.59(m,24H)。HPLC(HPLC法5-80,8min,TFA)R_t=7.08min。

[1110] 2d.4BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCy5)$_1$(α-NHCO-PEG_{24}NH-DUPA)$_5$(α-NHDGA-SN38)$_{16}$(α-NH_2.TFA)$_{10}$(ε-NHCOPEG$_{1000}$)$_{32}$]RL-23

[1111] 向BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH_2.TFA)$_{32}$(ε-NHCOPEG$_{1000}$)$_{32}$](200mg,3.94μmol)和Cy5-NHS脂(3mg,4.73μmol)在DMF(5mL)中的搅拌溶液中添加NMM(42μL,378μmol),并将随后反应物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,产生蓝色残余物,将所述残余物溶解于去离子水中,并且通过旋转柱(Amicon Ultra,15mL,30kDa MW截止值,4000rpm,持续15min)浓缩溶液,用水重复洗涤渗余物(6x5mL,@4000rpm,持续15min),并且然后冻干最终渗余物,产生深蓝色固体(171mg)。将一部分所得固体(46mg,0.968μmol)溶解于DMF(2mL)中,并将DGA-(C-20)SN38 RL-24(9.4mg,18.6μmol)在DMF(1mL)中的溶液添加至深蓝色溶液中,之后添加PyBOP(9.6mg,18.60μmol)和NMM(10μL,92.2μmol),并且将随后反应物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,产生蓝色残余物,通过尺寸排阻色谱(固定相=Sephadex LH-20®,流动相=MeCN,流速约35滴/分钟,收集400滴/级分)将所述残余物纯化。将蓝色级分收集,合并并且真空浓缩,产生深蓝色油状物。将所得油状物(33mg,0.593μmol)重新溶解于DMF(2mL)中,向其中添加DUPA(OtBu)$_3$-NHPEG$_{24}$$CO_2$H化合物40(18mg,11.4μmol)、PyBOP(6mg,11.4μmol),之后添加NMM(6.25μL,56.9μL)。将随后反应物在室温下搅拌

过夜。真空移除挥发物，产生蓝色残余物，通过尺寸排阻色谱(固定相＝Sephadex LH-20®，流动相＝MeCN，流速约35滴/分钟，收集400滴/级分)将所述残余物纯化。通过LCMS分析检查含有蓝色物质的级分，并将认为含有纯产物的级分真空浓缩，产生深蓝色残余物。在室温下向所得残余物在二氯甲烷(1mL)中的溶液中添加一份TFA(1mL)，并将所得亮绿色溶液搅拌过夜。将反应物在N_2流下浓缩，然后在高真空下浓缩，并且使用尺寸排阻色谱(固定相＝Sephadex LH-20®，流动相＝MeCN，流速约35滴/min，收集400滴/级分)纯化所得蓝色/绿色残余物。使用HPLC分析检查含有蓝色物质的级分，并且将认为含有产物的级分合并且真空浓缩。将所得蓝色残余物溶解于水中，过滤(0.45μm acrodisc注射器过滤器)，然后通过冻干干燥，产生呈蓝色固体的标题化合物RL-23(9mg)。

[1112] 使用PEG_{1000}的末端甲氧基基团(3.83ppm，96H)作为参考，通过^1H NMR谱分析确定DUPA和SN38的数量。

[1113] ^1H NMR(300MHz，CD_3CN)：δ(ppm)0.5-1.9(m，582H)，2.51-3.00(m，76H)，3.33(s，96H)，3.40-5.0(m，3282H)，4.45(m，16H)，5.3(m，16H)和6.0-8.59(m，102H)。HPLC(HPLC法5-80，8min，TFA)R_t＝8.60min。

[1114] 2d.5BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCy5)$_1$(α-NHCO-PEG_{24}NH-DUPA)$_8$(α-NHDOTA)$_{14}$(α-NH_2.TFA)$_9$(ε-NHCOPEG_{1000})$_{32}$]RL-25

[1115] 向BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NH_2.TFA)$_{32}$(ε-NHCOPEG_{1000})$_{32}$](300mg，5.92μmol)和Cy5-NHS脂(6mg，7.10μmol)在DMF(3mL)中的搅拌溶液中添加NMM(62μL，568μmol)，并且将随后反应物在室温下搅拌过夜。使用LCMS分析检查反应中Cy5-NHS酯的消耗，并且真空移除挥发物，产生蓝色油状物。将一部分所得油状物(46mg，0.968μmol)溶解于DMF(2mL)中，依次添加DOTAGA-四-(叔丁酯)RL-19(12mg，17.4μmol)、PyBOP(9mg，17.4μmol)和NMM(10μL，92.9mmol)。在DOTAGA-四-(叔丁酯)RL-19完全消耗(如通过反应混合物的LCMS分析监测)后，真空移除挥发物。将所得蓝色残余物溶解于去离子水中，并且通过旋转柱(Amicon Ultra，15mL，30kDa MW截止值，4000rpm，持续15min)浓缩溶液，用水重复洗涤渗余物(6x5mL，@4000rpm，持续15min)，并且真空浓缩最终渗余物。将残余物溶解于DMF(2mL)中，并且依次添加DUPA(OtBu)$_3$-NHP$EG_{24}CO_2H$化合物40(30mg，18.6μmol)、PyBOP(10mg，18.6μmol)和NMM(10μL，92.9μmol)。将随后反应物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物，将所得蓝色残余物溶解于去离子水中，并且通过旋转柱(Amicon Ultra，15mL，30kDa Mw截止值，4000rpm，15min)浓缩溶液。用MQ水(6x5mL，@4000rpm，持续15min)重复洗涤渗余物，并且将最终渗余物通过冻干干燥，产生深蓝色固体。将所得固体溶解于二氯甲烷(2mL)中，并且在室温下将一份TFA(1mL)添加到溶液中。将反应物随后反应物在室温下搅拌过夜，然后在N_2流下浓缩，溶解于去离子水中，通过旋转柱(Amicon Ultra，15mL，30kDa Mw截止值，4000rpm，持续15min)浓缩溶液。用MQ水(5x5mL，@4000rpm，持续15min)重复洗涤渗余物，并且将最终渗余物通过冻干干燥，产生蓝色油状物(11mg)。

[1116] DUPA和DOTA的数量通过在分离的中间体的^1H NMR谱上0.0-2.0ppm区域之间进行比较来确定。PEG_{1000}的末端甲氧基基团(3.83ppm，96H)用作参考。

[1117] ^1H NMR(300MHz，CD_3OD)：δ(ppm)0.97-1.99(m，412H)，2.06-2.93(m，182H)，2.93-3.29(m，144H)，3.37(s，96H)，3.33-4.72(m，4228H)，7.32(m，10H)和6.0-8.59(m，24H)。HPLC(HPLC法5-80，8min，TFA)R_t＝8.29min。

[1118] 2d.6BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α/ε-NHCy5)$_1$(α/ε-NHCO-PEG$_{24}$NH-DUPA)$_5$(α/ε-NH-DOTAGA)$_7$(α/ε-NH$_2$.TFA)$_3$]RL-26

[1119] 向BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH$_2$.TFA)$_8$(ε-NH$_2$.TFA)$_8$](50mg,25.1μmol)在DMF(3mL)中的溶液中添加Cy5-NHS脂(20mg,30.1μmol)和NMM(52μL,0.481mmol),并且将随后反应物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且将一部分所得蓝色残余物(25mg,16.2μmol)重新溶解于DMF(2mL)中。向所得蓝色溶液中依次添加DOTAGA-四-(叔丁酯)RL-19(95mg,0.136mmol)、PyBOP(70mg,0.136mmol)和NMM(85μL,0.778mmol),并且将反应物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且使用尺寸排阻色谱(固定相=Sephadex LH-20®,流动相=MeCN,流速约35滴/min,收集400滴/级分)将残余物纯化。将含有深蓝色物质的级分合并且真空浓缩,并且将残余物重新溶解于水中,然后通过冻干干燥。向所得蓝色固体(14mg,2.31μmol)的溶液中添加DUPA(OtBu)$_3$-NHPEG$_{24}$CO$_2$H化合物40(35mg,22.2μmol)、PyBOP(11mg,22.2μmol),之后添加NMM(12μL,110μmol),并且将随后反应物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并使用尺寸排阻色谱(固定相=Sephadex LH-20®,流动相=MeCN,流速约35滴/min,收集400滴/级分)将残余物纯化。使用LCMS分析检查含有深蓝色物质的级分,并且将认为含有产物的级分合并并真空浓缩。将所得蓝色油状物重新溶解于二氯甲烷(1mL)中,并且在室温下添加一份TFA(1mL),并且将随后绿色溶液搅拌过夜。将反应物在N$_2$流下浓缩,然后溶解于去离子水中,并且通过旋转柱(Amicon Ultra,15mL,30kDa Mw截止值,4000rpm,持续15min)浓缩溶液。用水(4x5mL,@4000rpm,持续15min)重复洗涤渗余物,并且将最终渗余物通过冻干干燥,产生蓝色油状物(11mg)。

[1120] DUPA和DOTA的数量通过比较分离的中间体化合物的^{1}H NMR谱上0.0-2.0ppm、3.4-4.0ppm、4.0-4.5ppm和6.0-8.5ppm区域之间的共振的相对积分变化来确定。

[1121] ^{1}H NMR(300MHz,CD$_3$OD):δ(ppm)0.67-2.03(m,112H),2.05-2.23(m,19H),2.24-2.84(m,67H),2.90-3.20(m,58H),3.33-3.48(m,30H),3.48-4.09(m,565H),4.10-4.52(m,33H)和6.0-8.59(m,24H)。HPLC(HPLC法5-80,8min,TFA)R$_t$=9.92min(宽)。

[1122] 2d.7BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$)(ε-NH-COPEG$_{570}$N$_3$)$_{12}$(ε-NH-COPEG$_{570}$N$_3$/BCN-DUPA)$_{20}$],化合物100

[1123] 根据一般程序J使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$-[Lys]$_{32}$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$)(ε-NH-COPEG$_{570}$N$_3$)$_{32}$]化合物34(10.0mg,0.4μmol)和DUPA-BCN化合物61(10.9mg,17.4μmol)制备。在通过SEC(Sephadex LH-20)纯化后,获得呈蓝色固体的化合物100(11.6mg,80%)。^{1}HNMR(300MHz,D$_2$O)δ(ppm):0.54-2.54(m,797H);2.54-2.86(m,44H);2.88-3.18(m,123H);3.19-4.32(m,1409H);4.34-4.53(m,40H);6.92-7.53(m,21H);7.76-8.25(m,14H)。LC(LCMS法5-80,15min,TFA,无MS)R$_t$=9.15min。^{1}HNMR分析显示出20DUPA/树枝状体。化合物100的MW为约40.2kDa。

[1124] 2d.8BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$)((ε-NH-COPEG$_{570}$N$_3$)$_{20}$(ε-NH-COPEG$_{570}$N$_3$/BCN-DUPA)$_{12}$)],化合物101

[1125] 根据一般程序J使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$-[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$)(ε-NH-COPEG$_{570}$N$_3$)$_{32}$]化合物34(10.0mg,0.4μmol)和DUPA-BCN化合物61(4.2mg,6.7μmol)制备。在通过SEC(Sephadex LH-20)纯化后,获得呈蓝色固体的化合物101(15.4mg,121%)。^{1}HNMR(300MHz,D$_2$O)δ(ppm):0.40-2.53(m,1430H);2.55-2.83(m,36H);2.91-3.17

(m,123H);3.18-4.32(m,1392H);4.35-4.55(m,24H);6.98-7.50(m,26H);7.76-8.17(m,20H)。LC(LCMS法5-80,15min,TFA,无MS)R_t=9.15min。^{1}HNMR分析显示出12DUPA/树枝状体。化合物101的MW为约35.2kDa。

[1126] 2d.9BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$N$_3$)$_{25}$(ε-NH-COPEG$_{1100}$N$_3$/BCN-DUPA)$_7$],化合物102

[1127] 根据一般程序J使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[(α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$(ε-NH-COPEG$_{1100}$N$_3$)$_{32}$]化合物35(25.2mg,0.5μmol)和DUPA-BCN化合物61(4.2mg,6.7μmol)制备。在通过超滤和冻干纯化后,获得呈蓝色固体的化合物102(21.9mg,79%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):0.50-2.56(m,668H);2.76-2.92(m,125H);3.04-3.62(m,2982H);3.74-3.88(m,28H);3.91-4.21(m,94H);6.85-7.24(m,26H);7.57-7.69(m,47H)。LC(LCMS法5-80,15min,TFA,无MS)R_t=10.11min。^{1}H NMR分析显示出7DUPA/树枝状体。化合物102的MW为约54.6kDa。

[1128] 2d.10BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$N$_3$)$_{22}$(ε-NH-COPEG$_{1100}$N$_3$/BCN-DUPA)$_{10}$],化合物103

[1129] 根据一般程序J使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$-[Lys]$_{32}$[((α-Cy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$N$_3$)$_{32}$](25.0mg,0.5μmol)和DUPA-BCN化合物61(4.2mg,6.7μmol)制备。在通过超滤和冻干纯化后,获得呈蓝色固体的化合物103(19.7mg,70%)。^{1}H NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):0.82-2.19(m,707H);2.45(bs,64H);3.05-3.21(m,135H);3.38-3.92(m,3053H);4.04-4.30(m,101H);6.93-7.54(m,26H)。LC(LCMS法5-80,15min,TFA,无MS)R_t=10.44min。^{1}H NMR分析显示出10DUPA/树枝状体。化合物103的MW为约54.6kDa。

[1130] 2d.11BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[((α-Cy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$(ε-NH-COPEG$_{1100}$N$_3$)$_{19}$(ε-NH-COPEG$_{1100}$N3/BCN-DUPA)$_{13}$],化合物104

[1131] 根据一般程序J使用BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$-[Lys]$_{32}$[((α-Cy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$(ε-NH-COPEG$_{1100}$N$_3$)$_{32}$]化合物35(26.3mg,0.5μmol)和DUPA-BCN化合物61(12.6mg,20.1μmol)制备。在通过超滤和冻干纯化后,获得呈蓝色固体的产物(28.8mg,94%)。^{1}H NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):0.73-2.90(m,823H);2.96-3.27(m,133H);3.34-3.99(m,2894H);4.05-4.22(m,40H);4.24-4.44(m,78H);4.44-4.58(m,34H);7.16-7.57(m,22H);7.89-8.05(m,38H)。LC(LCMS法5-80,15min,TFA,无MS)R_t=9.62min。^{1}H NMR分析显示出13DUPA/树枝状体。化合物104的MW为约58.4kDa。

[1132] 2d.12[[(ε-NHCO-PEG$_{1100}$)$_8$(α-NHDOTA)$_{4.75}$(α-NHCy5)$_{0.5}$(α-1.90

[1133] BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-(NHDOTA))$_1$(α-NH$_2$)$_7$)(ε-NH-COPEG$_{24}$-N$_3$/BCN-DUPA)$_8$],G3,化合物105

[1134] BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH$_2$.TFA)$_8$(ε-NH-COPEG$_{24}$N$_3$/BCN-DUPAOH)$_3$)$_8$]化合物37(23mg,1.66μmol)在DMF(4mL)中的溶液中添加p-SCN-Bn-DOTA(2.6mg,3.8μmol)在DMF中的溶液,并且将反应物在室温下搅拌过夜。HPLC分析表明起始材料消耗,并且将反应物减压浓缩。将化合物105不经进一步纯化而使用。HPLC(C8 Xbridge,3x100mm)梯度:5%MeCN/H_2O(0-1min),5%-80%MeCN(1-7min),80%MeCN(7-12min),80%-5%MeCN(12-13min),5%MeCN(13-15min),214nm,0.4mL/min,R_t=6.15-6.97min(宽峰)。

[1135] 实施例3.具有Erb2 ECD的纳米抗体-MMAE树枝状体的SPR结合研究

[1136] ErbB2-ECD的直接固定化

[1137] 使用ProteOn XPR36仪器，将ErbB2-ECD在25℃下固定化至GLC传感器芯片表面(Bio-Rad)上，使用HBS-P+运行缓冲液(10mM HEPES、pH 7.4、150mM NaCl、0.05％Tween 20)。将Bio-Rad的胺偶联试剂盒中所述的标准胺偶联方法用于该固定化。用EDC(0.5mM)和磺基-NHS(0.125mM)的50:50混合物活化泳道1。将ErbB2蛋白在10mM乙酸钠(pH 5.0)中稀释至2mg/mL，并且注射在活化表面通道上。用1M乙醇胺-HCl(pH 8.5)封闭任何剩余的活化位点。观察到大约590RU(1RU＝1pg蛋白质/mm^2)的平均响应水平下的蛋白质偶联。

[1138] SPR实验分析

[1139] 所有SPR结合实验在25℃下使用HBS-EP+/BSA(10mM HEPES、pH 7.4、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05％Tween20、0.1mg/ml BSA)作为仪器运行缓冲液(RB)进行。在固定化程序后，将各种浓度的抗ErbB2亲和体及其MMAE-树枝状体缀合物以60μl/min注射在固定化ErbB2蛋白上，并且监测其缔合持续90秒。随后将运行缓冲液注射在结合Ab-ErbB2复合物上，并且监测解离长达60min。Herceptin和亲和体对照在适度的时间框(≤60min)内未能与运行缓冲液中的芯表面解离。所有结合测量以一式三份进行。

[1140] SPR数据处理和分析

[1141] 使用Scrubber-Pro软件(www.biologic.com.au)处理收集的实验数据。通过将每组实验数据拟合至Langmuir 1:1结合模型来推导动力学参数(ka＝缔合速率常数并且kd＝解离速率常数)和平衡解离常数(K_D＝k_d/k_a)。将所有结合参数报告为平均值+/-标准偏差。

[1142] SPR结果

[1143] 亲和体-MMAE-树枝状体缀合物以产生经典动力学结合谱的过程特异性结合ErbB2蛋白。随后使用剂量应答方法进行亲和体-MMAE-树枝状体缀合物的动力学结合分析。从SPR传感图推导的动力学速率和亲和力参数汇总于下面。需注意，亲和体是二聚体，并且因此其结合常数低于将对于树枝状体缀合物中使用的单体亲和体观察到的结合常数。对于化合物65和66未观察到结合。结果清楚指示了亲和体-树枝状体靶标的纳摩尔特异性结合，但相比于天然亲和体以减少量。

[1144] 表.SPR结合研究

[1145]

	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)x10^4	k_d (s^{-1})x10^{-4}	K_D
Herceptin	230 ± 10	0.1 ± 0.0	4.3 ± 0.1（pM）
亲和体	190 ± 30	5.1 ± 0.2	266 ± 46（pM）
化合物 77 （亲和体-MMAE-PEG 1100）	2.5 ± 0.2	13.0 ± 00.1	50 ± 5（nM）

[1146]

化合物 78 （亲和体-MMAE-PEG 2000）	3.2 ± 0.2	11.4 ± 00.3	36 ± 3（nM）
化合物 65 （G3-MMAE-PEG 1100）	-	-	-
化合物 66 （G3-MMAE-PEG 2000）	-	-	-

[1147] 实施例4.通过亲和体-MMAE树枝状体的细胞生长抑制(SRB测定)

[1148] 在72h后针对各种癌症细胞系使用磺酰罗丹明B(SRB)测定[Voigt W."Sulforhodamine B assay and chemosensitivity"Methods Mol.Med.2005,110,39-48.]确定$HER2^-$(ES2)和$HER2^+$(SKOV3)细胞系的细胞生长抑制,其中每个实验以一式两份运行。GI50是根据NCI标准方案将总细胞生长抑制50%所需的浓度。

[1149] 将所有化合物基于等同药物负载量测试。结构显示,PEG 1100靶向性树枝状体缀合物在抑制细胞生长方面比具有PEG 2000表面的树枝状体更有效。在该测定中单独亲和体在HER2+或HER2-细胞系中无效。

[1150] 表.HER2-(ES2)和HER2+(SKOV3)细胞中的细胞抑制

[1151]

测试的化合物	使用的溶剂	ES2细胞系	SKOV3细胞系
		GI_{50}(nM)	GI_{50}(nM)
MMAE	DMSO	<5、2	<5、0.6
MMAE-Cit-Val-PAB	DMSO	320、>500	201、330
亲和体	PBS	>500、>500	>500、>500
化合物77	PBS	248,250	4,5
化合物78	PBS	＞100	>500

[1152] 实施例5.体内亲和体-MMAE树枝状体的耐受性

[1153] 每周一次向各组小鼠施用树枝状体(在PBS中的0.1-0.3mL溶液)的静脉内注射,持续3周(第1、8和15天)。每日称重小鼠并且观察毒性的征象。在最终药物剂量后监测动物长达10天。立即处死超过伦理终点(≥20%体重减轻,总体健康状况差)的任何小鼠,并且记录观察结果。

[1154] 1mg/kg下的化合物77在裸SCID小鼠和balb/c小鼠两者中均耐受良好,其中没有动物因健康状况差而需要被处死。

[1155] 实施例6.缀合物的体外功效

[1156] 表.使用的细胞系的描述

[1157]

细胞系	癌症类型	HER2 状态	报告的 HER2 受体密度/细胞	EGFR（HER1）密度	HER 3 状态
MDA-MB-231	乳腺	1+		200000	低/中等
SKOV-3	卵巢	2+/3+	3-700000	50000	低
SK-BR-3	乳腺	3+	~1,500000		中等
NCI-N87	胃	3+	~1,300000		低
OE19	食管	3+	>1000000		

[1158] 第1部分:GI_{50}面板:

[1159] 使用MTT测定评价Herceptin®、Kadcyla®、拉帕替尼、化合物71(对照)和2D3纳米抗体靶向性树枝状体(化合物123)对MDA-MB-231、SKOV-3、SK-Br-3、NCI-N87和OE-19细胞的细胞毒性。将细胞以$5x10^3$的密度接种于96孔板中并且孵育过夜。然后将细胞用测试组合物的1对数单位连续稀释液处理72h(对Herceptin为六天)。在孵育的最终2h期间添加10%培养基体积的MTT(噻唑基蓝四唑鎓溴化物(Merck,目录号M5655,5mg/ml无菌溶液)。MTT在活细胞中的还原产生不溶性紫色甲瓒代谢物。孵育2h后,将所有培养基从测定板移除,添加100μl DMSO并且对板立即读取570nm下的吸光度。GI_{50}定义为将细胞生长/增殖抑制50%的浓度。在GraphPad Prism 7.02中通过4参数非线性曲线拟合从空白校正剂量-应答曲线确定细胞活力和随后的GI_{50}值。结果证明,本公开的示例缀合物特别是针对过表达HER2的细胞系(诸如SK-BR-3、NCI-N87和OE19)具有有效细胞毒性作用。

[1160] 表.化合物71和化合物123的GI_{50}结果

[1161]

	Herceptin（=3）	Kadcyla*（=3）	拉帕替尼（n=2）	化合物 123（n=2）	化合物 71（n=2）
	生长抑制%	GI_{50} nM	GI_{50} nM	GI_{50} nM	GI_{50} nM
MDA-MB-231	1.7	22.9	112000	172	12,470
SKOV-3	10	50.7	7,200	13.1	1600
SK-BR-3	51	0.04	138	0.83	948
NCI-N87	52	0.10	8.1	0.61	2040
OE19	62	0.06	200	1.67	6120

[1162] *基于估计重量ADC;#基于MMAE药物当量

[1163] 第2部分:配对高/低HER2细胞系中的IC_{50}

[1164] 配对高/低HER2细胞系的MDA-MB-231乳腺癌细胞系中HER2+敲入的产生

[1165] 根据制造商的说明书使用Lipofectamine 3000将MDA-MB-231乳腺癌细胞用质粒HER2 WT(Addgene,16257)转染。在500ug/ml遗传霉素(Thermo Fisher,目录10131035)的存在下传代之后,将具有HER2 WT的稳定过表达的细胞通过荧光活化单细胞分选使用MoFlo Astrios(Beckman Coulter)分离。将从该过程分离的克隆性细胞群体在遗传霉素中进一步传代,然后针对转基因表达进行第二轮细胞分选和筛选。然后将选择的克隆进一步扩增,并且将该细胞系(也称为MDA-MB-231/HER2)的储备液冷冻保存以产生稳定转导细胞的主储备液。

[1166] 低/高表达MDA-MB-231模型中的IC_{50}:

[1167] 经由alamarBlue测定评价化合物71(对照)和化合物123(靶向性)对MDA-MB-231和MDA-MB-231/HER2转染细胞的细胞毒性。将细胞以$5x10^3$的密度接种于96孔板中并孵育过夜。然后用指定浓度的测试组合物处理细胞48h。在孵育的最终4h期间添加AlamarBlue(Thermo Fisher,DAL1025)。alamarBlue在活细胞中的还原产生可以在读板仪(560nm激发/610nm发射)上读取的红色荧光代谢物。在GraphPad Prism 7.02中通过4参数非线性曲线拟合、可变斜率(四参数)从空白校正剂量-应答曲线确定细胞活力和随后的IC_{50}。下表示出了化合物71(对照)和化合物123(靶向性)与MDA-MB-231和MDA-MB-231/HER2细胞的IC_{50}值。MDA-MB-231/HER2关于化合物71(对照)和化合物123(靶向性)的IC_{50}值分别为2.842μM和13.55nM。相比于化合物71(对照),化合物123(靶向性)在MDA-MB-231/HER2细胞生长抑制方面是大约140倍增加。

[1168] 下文提供了在不同MMAE浓度下,化合物71(对照)和化合物123(靶向性)对MDA-MB-231和MDA-MB-231/HER2的剂量应答曲线和IC_{50}值。值是平均值±标准偏差(sd;n=4):

[1169] 表.MDA-MB-231HER2低/高模型中化合物71和化合物123的IC_{50}结果

[1170]

	化合物 71（*细胞活力%*）		化合物 123（*细胞活力%*）	
MMAE 浓度（*M*）	MDA-MB-231	MDA-MB-231/HER2	MDA-MB-231	MDA-MB-231/HER2
5×10^{-5}	81.1 ± 5.4	49.9 ± 15.0	-	
1×10^{-5}	94.2 ± 12.1	61.6 ± 3.1		5.25 ± 1.24
1×10^{-6}	94.4 ± 8.2	78.2 ± 9.1		10.9 ± 2.4
1×10^{-7}	94.2 ± 12.5	96.1 ± 3.6	49.7 ± 2.7	27.4 ± 1.3
1×10^{-8}	96.6 ± 11.7	95.4 ± 7.6	67.2 ± 3.0	57.8 ± 2.3
1×10^{-9}			81.0 ± 1.8	80.0 ± 3.3
1×10^{-10}			87.6 ± 4.2	91.1 ± 2.5
1×10^{-11}			96.1 ± 5.6	90.0 ± 3.0
IC_{50}	不确定	2.842μM	不确定	13.55 nM

[1171] 实施例7.2D3树枝状体缀合物与HER2+细胞的结合

[1172] 使用用花菁5(Cy5)标记的不同大小的纳米抗体-树枝状体缀合物,化合物124、125和126来相对于非靶向性化合物52、53和54(G3、G4和G5)展示与HER2+人细胞系的结合。

[1173] 在37℃下在5％CO_2加湿气氛下将HER2表达人转移性癌细胞系MDA-MB-453(ATCC HTB-131)和HER2低上皮腺癌细胞系MDA-MB-231(ATCC HTB-26)维持在含有10％FBS和青霉素-链霉素(100U/mL)的杜尔贝科氏改良伊格尔培养基(DMEM)中，并且在汇合前使用胰蛋白酶继代培养。在37℃下在5％CO_2加湿气氛下将人腺癌细胞系SKOV-3(ATCC®HTB-77)细胞维持在添加有10％(v/v)FBS和青霉素-链霉素(100U/mL)的RPMI培养基中，并且在汇合前继代培养。

[1174] 为了通过荧光显微镜术测量细胞缔合并对其进行成像，将细胞以1x10^5个细胞/孔接种于8孔腔室玻片中，并且使其附着过夜。第二天，将未缀合的树枝状体化合物52、53和54(对照)或纳米抗体树枝状体化合物124、125和126添加至培养基至最终浓度为0.5ug/ml，并且在冰上孵育1小时。将细胞染色以可视化质膜(麦胚凝集素-alexa fluor 488)和核(Hoechst 33342)。将细胞用400μL补充有10％FBS的冷却Fluorobrite培养基洗涤三次。将细胞使用Olympus IX83显微镜成像，所述显微镜具有40×0.9NA空气物镜，所述物镜具有标准“Pinkel”DAPI/FITC/CY5滤光片组。

[1175] 体外缔合研究

[1176] 在37℃下5％CO_2加湿气氛中将MDA-MB-231、MDA-MB-231/HER2(HER2敲入)(如上文实施例6中所述)或SKOV-3细胞接种于24孔板(1×10^5个细胞/孔)中的500μL添加有10％(v/v)胎牛血清(FBS)的适当生长培养基中，并且与3.33nM下的化合物36或化合物41一起孵育，其中孵育时间从1至24h变化。在孵育后，通过用DPBS轻轻洗涤三次(300μL/孔)来从粘附细胞移除非结合/非缔合颗粒。通过在室温下用无酚红TrypLE™ Express酶(1X)(150μL/孔)处理5-10min来从板移除细胞。然后将板放置于冰上。然后通过采集来自Cy5的信号通过流式细胞术确定样品的细胞结合和缔合。

[1177] 为了测量内化动力学，在37℃下将纳米抗体-树枝状体与细胞一起孵育24、4、1、0.5和0.1小时，然后通过洗涤移除未结合的纳米抗体-树枝状体并且通过流式细胞术分析。

[1178] 流式细胞术结果:G3至G5树枝状体与HER高/低细胞系的结合：

[1179] 结果显示，纳米抗体-树枝状体化合物124、125和126结合HER2阳性MDA-MB-453细胞。未缀合的树枝状体化合物52、53和54未结合MDA-MB-453细胞。所示的数据是一式三份孔中处理的细胞的平均MFI，具有标准偏差。将ANOVA和Dunnett多重比较检验用于统计分析。

[1180] 表.与树枝状体一起孵育的细胞的平均荧光强度(Cy5)

[1181]

测试的化合物	MFI	ANOVA
仅细胞对照	3.047±0.02	-
52	3.097±0.01	NS
53	6.827±0.07	NS
54	4.349±0.08	NS
124	50.83±14.98	<0.0001
125	158.4±6.611	<0.0001
44126	176.9±4.041	<0.0001

[1182] 流式细胞术结果:化合物71和化合物123结合HER2低和HER2+细胞系

[1183] 结果清楚地指示在24h内化合物71(对照)对所有三种细胞系的最小结合。化合物123(靶向性)显示出与细胞系的HER2受体表达水平相关的增加结合。到24h，流式细胞术显

示与用化合物71处理的细胞(16.05±1.89)相比，用化合物123处理的MDA-MB-231/HER2细胞(146.1±9.6)显示出强大约9倍的荧光。另外，与用化合物71处理的细胞(16.4±6.86)相比，用化合物123处理的SKOV-3细胞(277.5±5.9)显示出强大约16倍的荧光。结果示出于图2中。

[1184] 细胞缔结：大小为G3至G5的树枝状体与HER2低和HER+细胞系结合：

[1185] 测试另外的树枝状体代：分别未缀合至和缀合至2D3的化合物52和124(G3)、化合物53和125(G4)以及化合物54和126(G5)。未缀合的对照树枝状体化合物52、53和54具有显著更低的与MDA-MB-231(HER2低)和MDA-MB-231/HER2(HER2阳性)的缔合。2D3缀合的树枝状体化合物124、125和126在24h内具有显著的与MDA-MB-231/HER2的缔合，其中化合物126(G5)具有最高百分比的细胞缔合(73.47％±0.92)，第二是化合物124(G3,60.73±0.21)和化合物125(G4,56.27±1.02)。无论树枝状体代如何，与树枝状体缀合的2D3 HER2-纳米抗体大幅度改善对过表达HER2受体的细胞的结合。缀合物的流式细胞术结果示出于图3中。

[1186] 下表示出了24h内不同大小的G2、G3、G4和G5 2D3缀合树枝状体与MDA-MB-231和MDA-MB/231/HER2细胞的细胞缔合值百分比。值为平均值±标准偏差(SD;n＝3)：

[1187] 表.各种树枝状体的细胞缔合值百分比。

[1188]

MDA-MB-231/HER2							
时间（*h*）	化合物124	化合物125	化合物126	化合物85	化合物89	化合物91	化合物93
0.25	0.67±0.12	0.57±0.12	0.43±0.40	-	-	-	-
0.5	0.60±0.0	0.67±0.15	0.70±0.10	189.7±9.074	218.3±16.5	157.3±7.02	165.3±31.5
0.75	-	-	-	-	-	-	-
1	2.57±0.64	0.77±0.15	2.80±0.61	-	-	-	-
2	17.43±4.15	6.13±2.60	17.97±2.20	-	-	-	-
4	50.63±0.15	36.03±2.36	59.77±4.13	-	-	-	-
24	60.73±0.21	56.27±1.02	73.47±0.92	-	-	-	-

[1189]

MDA-MB-231/HER2						
时间（*h*）	化合物 98	化合物 99	化合物 129	化合物 130	化合物 131	化合物 132
0.25	-	-	-	-	-	-
0.5	-	-	14.83±1.60	43.23±3.48	16.7±2.48	25.6±0.43
0.75	14.97 ± 0.7	82.5	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-

[1190]

MDA-MB-231							
时间（*h*）	化合物 124	化合物 125	化合物 126	化合物 85	化合物 89	化合物 91	化合物 93
0.25	1.07±0.38	0.87±0.25	0.53±0.50	-	-	-	-
0.5	0.87±0.12	0.53±0.15	1.03±0.32	30.77±0.50	25.07±3.91	20.03±2.73	17.47±1.62
0.75	-	-	-	-	-	-	-
1	0.80±0.20	1.00±0.44	1.37±0.59	-	-	-	-
2	1.13±0.21	0.77±0.31	0.73±0.49	-	-	-	-
4	0.93±0.45	0.83±0.21	0.67±0.25	-	-	-	-
24	0.83±0.06	0.87±0.06	0.80±0.10	-	-	-	-

[1191]

MDA-MB-231						
时间（*h*）	化合物 98	化合物 99	化合物 129	化合物 130	化合物 131	化合物 132
0.25	-	-	-	-	-	-
0.5	-	-	23.3±3.98	42.8±2.78	20.23±0.63	33.23±2.2
0.75	13.36 ± 2.82	0.15 ± 0.07				
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-

[1192] 下表示出了在24h内化合物52(G3)、化合物53(G4)和化合物54(G5)与MDA-MB-231和MDA-MB-231/HER2细胞的细胞缔合值百分比。值是平均值±标准偏差(SD;n＝3)：

[1193] 表.G3、G4和G5未缀合树枝状体的细胞缔合百分比。

[1194]

	MDA-MB-231/HER2

[1195]

时间（*h*）	化合物 52	化合物 53	化合物 54
1	2.47 ± 0.81	0.90 ± 0.35	1.07 ± 0.35
2	1.00 ± 0.26	0.50 ± 0.10	0.83 ± 0.31
4	1.07 ± 0.64	0.50 ± 0.35	0.47 ± 0.21
24	0.60 ± 0.17	0.37 ± 0.15	0.53 ± 0.49

[1196]

	MDA-MB-231		
时间（*h*）	化合物 52	化合物 53	化合物 54
1	1.10 ± 0.35	0.80 ± 0.10	0.97 ± 0.12
2	1.23 ± 0.47	0.77 ± 0.06	1.07 ± 0.21
4	0.83 ± 0.15	0.60 ± 0.10	0.87 ± 0.15
24	0.73 ± 0.06	0.60 ± 0.17	0.57 ± 0.06

[1197] 在24h内化合物124(G3)、化合物125(G4)和化合物126(G5)与MDA-MB-231和MDA-MB-231/HER2细胞的平均荧光强度值。值是平均值±标准偏差(SD;n＝3)：

[1198] 表:G3、G4和G5 2D3缀合树枝状体的MFI

[1199]

	MDA-MB-231		
时间（h）	化合物 124	化合物 125	化合物 126
0.25	245.7 ± 17.5	227.3 ± 14.0	194.7 ± 95.8
0.5	228.0 ± 4.6	222.7 ± 2.1	245.0 ± 4.0
1	237.0 ± 9.2	229.7 ± 6.4	253.7 ± 12.9
2	241.0 ± 18.2	235.7 ± 4.0	233.3 ± 9.7
4	250.0 ± 5.8	246.3 ± 5.5	247.0 ± 10.6
24	224.3 ± 5.1	219.0 ± 4.6	223.0 ± 4.4

[1200]

[1201]

	MDA-MB-231/HER2		
时间（h）	化合物 124	化合物 125	化合物 126
0.25	235.0 ± 7.0	215.3 ± 14.0	207.0 ± 51.6
0.5	226.3 ± 8.7	224.3 ± 2.9	237.0 ± 9.5
1	294.3 ± 15.6	241.0 ± 11.5	295.0 ± 4.0
2	445.0 ± 33.2	342.3 ± 22.2	435.7 ± 16.3
4	799.7 ± 18.0	611.3 ± 35.2	1,038 ± 127.6
24	1,110 ± 27.8	1,012 ± 45.6	2,749 ± 88.1

[1202] 在24h内化合物52(G3)、化合物53(G4)和化合物54(G5)与MDA-MB-231和MDA-MB-231/HER2细胞的平均荧光强度值。值是平均值±标准偏差(SD;n＝3)：

[1203] 表.G3、G4和G5未缀合树枝状体的MFI

[1204]

	MDA-MB-231/HER2		
时间（h）	化合物 52	化合物 53	化合物 54
1	293.0 ± 8.5	269.0 ± 19.8	257.5 ± 12.0
2	268.0 ± 11.3	225.0 ± 5.7	249.0 ± 15.6
4	241.5 ± 17.7	198.0 ± 2.8	207.0 ± 2.8
24	206.0 ± 2.8	175.5 ± 0.7	207.5 ± 40.3
	MDA-MB-231		
时间（h）	化合物 52	化合物 53	化合物 54
1	258.3 ± 19.6	239.3 ± 1.2	252.0 ± 6.0
2	256.7 ± 24.8	230.7 ± 2.3	249.0 ± 8.7
4	221.3 ± 3.5	217.3 ± 3.2	247.3 ± 7.2
24	215.3 ± 4.9	195.7 ± 0.6	196.3 ± 3.1

[1205] 在24h内化合物SRS-2-304与MDA-MB-231和MDA-MB-231/HER2细胞的平均荧光强度值。值是平均值±标准偏差(SD;n＝3)：

[1206] 表.与KY-2a(曲妥珠单抗)相比,SRS-2-304(Her2纳米抗体树枝状体)的MFI。

[1207]

测试的化合物	细胞系	MFI
-	单独HER2+ve细胞	6.2±0.8
-	单独HER2-ve细胞	6.2±0.1
SRS-2-304	HER2+ve	403.0±9.8
SRS-2-304	HER2-ve	28.1±0.7
KY-2a	HER+ve	555.0±132.3
KY-2a	HER-ve	23.6±4.1

[1208] 与树枝状体缀合的HER2-纳米抗体显示与过度表达HER2受体的细胞结合,其水平与曲妥珠单抗相当。

[1209] 上述结合测定也使用BT-474细胞系进行。孵育1小时后在一定浓度范围内化合物的平均荧光强度值示出于下表中。值是平均值±标准偏差(SD;n＝3)。数据显示Her2靶向性树枝状体与Her2+细胞结合。

[1210] 表:在BT-474细胞系上进行的不同浓度下化合物的平均荧光强度。

[1211]

浓度	(SRS-4-Mal)	(RP-5)	(HH-2)	(SRS-15)	(SRS-16)	(SRS-17)	(SRS-20)	(SRS-21)	(SRS-22)
3mM	15.3 ± 0.7	26.2 ± 8.4	28.9 ± 3.8	915 ± 141.4	715.5 ± 217	1021 ± 459.6	1505 ± 202.2	3104.5 ± 2.1	2638.5 ± 511.2
6mM	23.8 ± 7	25.6 ± 3.3	33.8 ± 5.3	1463 ± 291.3	731.5 ± 70	1532 ± 152.7	2168 ± 60.8	4644.5 ± 1044.3	4911.5 ± 24.7
12mM	21.9 ± 5.1	23.4 ± 2.8	34.6 ± 5.3	2269.5 ± 53	1369 ± 86.2	2271.5 ± 366.9	3135 ± 33.9	5264 ± 838.6	6552 ± 436.9
25mM	18.6 ± 0.6	25.6 ± 2.7	49.3 ± 2.2	2152.5 ± 92.6	1449 ± 0	2551.5 ± 246.7	3401 ± 73.5	4755.5 ± 217	6492 ± 196.5

[1212] 实施例8.证明缀合物内化至HER2过表达细胞中的研究

[1213] 共聚焦细胞摄入

[1214] 将MDA-MB-231、MDA-MB-231/HER2和SKOV-3细胞以1.0×10^4个细胞/孔铺板至μ-玻片8孔腔室盖玻片(ibidi)中，并且使其在37℃、5%CO_2下附着过夜。然后添加化合物71和化合物123(3.33nM)，并使其孵育1、3、6和24小时。将细胞洗涤并且然后在室温下用1%多聚甲醛固定20min。在室温下将细胞膜用在DPBS中的Alexa Fluor 488-麦胚凝集素(AF488-WGA，5μg mL^{-1})染色10min。在室温下将细胞核用在DPBS中的4′,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI，2μg mL^{-1})复染10min。使用共聚焦显微镜(Leica SP8)收集荧光图像和光学切面。用Fiji(Image J 1.52n)处理图像。

[1215] 共聚焦显微镜图像示出于图4至6中。共聚焦图像显示出在24h孵育后少量图4a)化合物71和图4b)化合物123与MDA-MB-231缔合。然而，靶向性化合物123在24h孵育后被MDA-MB-231/HER2和SKOV-3细胞内化(图5a和6a)，化合物71并非如此(图5b和6b)。

[1216] 实施例9.氚标记的MMAE缀合树枝状体(化合物72和127)的肿瘤分布

[1217] 将MDA-MB-231/HER2细胞($5x10^6$个细胞，在50μL PBS:Matrigel中)皮下移植至雌性NOD/SCID小鼠(5-7周龄)的第4乳腺脂肪垫中。使实体肿瘤生长至100mm^3(大约3-4周)。将小鼠分为两个不同组，每组中由六只小鼠组成。然后在异氟烷镇定下经由尾静脉注射化合物72(对照组)或化合物127(靶向性组)(0.5μCi，在100μL中，PBS pH 7)。48h后用异氟烷麻醉小鼠，并且紧临颈椎脱位前经由心脏穿刺收集血液。随后取出选择的器官(包括肿瘤、肝脏、脾脏、肾脏、胰腺、肺、心脏和脑)，称重并且针对氚(^3H)生物分布进行处理。

[1218] 结果示出于图7中。与未缀合的对照化合物72(1.88%剂量/g±0.28)相比，靶向性树枝状体化合物127在HER2阳性肿瘤中在更大程度上累积(3.53%剂量/g±0.43)，这等同于肿瘤摄入的大约80%的增加($p<0.05$)。血液浓度的差异在靶向性树枝状体与对照树枝状体之间不显著，分别为4.52%剂量/g±0.24和3.69%剂量/g±0.31。由于药代动力学的差异不太可能影响肿瘤保留，因此2D3 HER2-纳米抗体靶向改善树枝状体保留。

[1219] 实施例10.在SKOV3肿瘤模型中Cy5标记-MMAE缀合的树枝状体(化合物71和化合物123)的肿瘤摄入的功效和共聚焦成像

[1220] 在侧腹上向雌性NOD SCID小鼠(年龄8周)皮下接种在PBS:Matrigel(1:1)中的$3x10^6$个SKOV3细胞。使实体肿瘤生长至200mm^3(大约3周)。将小鼠分为五个不同组,然后在异氟烷镇定下经由尾静脉注射化合物71(对照组)或化合物123(靶向性组)(0.5mg/kg MMAE当量,在250μL中,PBS pH 7)、Kadcyla®(40mg/kg)和Herceptin®(40mg/kg)。

[1221] (a)共聚焦成像

[1222] 48h后用异氟烷麻醉小鼠,并且紧临颈椎脱位前经由心脏穿刺收集血液(n=2/组)。随后取出肿瘤,将其在4%多聚甲醛中固定过夜,在PBS中洗涤并且包埋在琼脂糖中。然后将肿瘤振动切片机切片至100μm,其中将切片针对核(DAPI,浓度,时间,供应商)和血管(CD31,浓度,时间,供应商)进行染色。使用共聚焦显微镜(Leica SP8)收集荧光图像和光学切面。结果示出于图8和图9中。靶向性树枝状体(化合物123)显示出在肿瘤的核心和外周区域中的摄入,化合物71并未如此。

[1223] (b)缀合物的功效

[1224] 以定期间隔获取肿瘤测量(n=6/组),直到满足伦理终点。将结果示出于图10(平均肿瘤体积随时间的图)、图11(存活期随时间的图)和图12(平均重量变化随时间的图)中。与化合物71、Herceptin®和Kadcyla®相比,靶向性树枝状体化合物123显示出完全的肿瘤消退。

[1225] 实施例11.在MDA-MB-231/HER2+细胞系中4代多个纳米抗体树枝状体内化的动力学

[1226] 使用与1个(单一纳米抗体)或2至4个(多个纳米抗体)抗HER2 2D3纳米抗体缀合的具有铁载体衍生的螯合剂去铁胺(DFO)的4代、Cy5标记的纳米抗体-树枝状体缀合物,如上文所述分离的化合物91和化合物92来比较在每个树枝状体附接不同纳米抗体数的情况下与HER2+人细胞系的结合。

[1227] 在37℃下在5%CO_2加湿气氛下将具有HER2敲入的上皮腺癌细胞系MDA-MB-231/HER2(如实施例6中所述)维持在含有10%FBS和青霉素-链霉素(100UmL^{-1})的杜尔贝科氏改良伊格尔培养基(DMEM)中。

[1228] 为了通过流式细胞术测量细胞结合,将20000个细胞/孔过夜铺板至96孔培养板中的补充有10%FBS的DMEM培养基中。将单一或多个纳米抗体树枝状体以3、6、12和30nM添加至细胞,并且在37C下孵育0.5、1、2、4和6h。将以相同方式制备的对照细胞预冷却并且在冰上与30nM单一和多个纳米抗体树枝状体一起孵育6h。

[1229] 在与纳米抗体缀合的树枝状体细胞一起孵育后,将细胞用补充有1%牛血清白蛋白的冰冷PBS洗涤三次以移除未结合的树枝状体,并使用无酚红TrypLE™ Express酶(1X)(Gibco,12604013)从板释放。将细胞重悬于冷却的DPBS中以用于通过流式细胞术(Stratedigm S1000EON,California)进行分析,其中通过采集来自Cy5的信号测量树枝状体的存在。为了估计每个浓度和时间点下内化树枝状体的量,将在冰上与树枝状体一起孵育的细胞的Cy5信号视为假设没有内化情况下的最大表面结合树枝状体。将该信号从在37℃下孵育的细胞中测量的信号(其表示表面结合和内化树枝状体)中减去,以分离仅来自内化树枝状体的信号(参见图13)。

[1230] 在低浓度下,与单一(化合物91)情况下的相比,多个(化合物92)缀合的抗HER2纳米抗体树枝状体更快内化。在更高浓度下,化合物91在约2小时后显示出比化合物92更高的

内化水平。

[1231] 实施例12.具有单一和多个纳米抗体的缀合物在HER2高细胞系中的共聚焦成像

[1232] 将HER2高SKOV-3细胞以1.0×10^4个细胞/孔铺板至μ-玻片8孔腔室盖玻片(ibidi)中,并且使其在37℃、5%CO_2下附着过夜。然后添加化合物92(多个2D3树枝状体缀合物)和化合物91(单一2D3树枝状体缀合物)(3.33nM),并且使其孵育1、3、6和24h。将细胞用DPBS洗涤并且然后在室温下用1%多聚甲醛固定20min。在室温下将细胞膜用在DPBS中的麦胚凝集素的Alexa Fluor488®缀合物(AF488-WGA,5μg mL^{-1})染色10min。在室温下将细胞核用在PBS中的Hoechst 33342(2μg mL^{-1})复染10min。使用共聚焦显微镜(Leica SP8)收集荧光图像和光学切面。用Fiji(ImageJ 1.52p)处理图像。

[1233] 共聚焦显微镜图像示出于图14和15中。在孵育24h后,化合物91和化合物92两者在SKOV-3细胞的情况下均结合并内化。值得注意地,与化合物91(图15b、c)相比,化合物92(图14b、c)在3和6h时间点时显示出更大程度的结合和内化。

[1234] 在该浓度下多个(化合物92)缀合的抗HER2纳米抗体G4树枝状体比单一纳米抗体G4树枝状体(化合物91)更快内化,并且差异可以看到至6小时,但到24小时,它们未显现不同。

[1235] 实施例13.用靶向性含Zr放射性核素树枝状体-SKOV3乳腺癌异种移植物的成像研究

[1236] 研究了^{89}Zr标记的HER2靶向性和非靶向性树枝状体构建体在卵巢癌的SKOV3鼠类异种移植物模型中的累积。通过PET-CT测量生物分布直至注射后9天,并且在第2天和第9天(在可用的情况下)通过离体γ闪烁切除器官进行验证。本研究分三部分进行。

[1237] 肿瘤引发和生长

[1238] 将$5x10^6$个SKOV3细胞(在50μL 50:50matrigel:PBS中)SC注射至健康雌性NOD-SCID(约20g)8周龄小鼠的右侧腹中。在注射成像化合物前,使肿瘤生长4周。

[1239] 在成像时,所有肿瘤均是可触及的,在成像实验时具有约3-5mm的大小。

[1240] 研究化合物

[1241] 将下表中的化合物如下所述标记。

[1242] 表.研究化合物

[1243]

化合物编号	非靶向性	化合物编号	靶向性
		114	DFO-NB
129	BHA-G2-PEG_{1000}	85	BHA-G2-PEG_{1000}+ NB
		85	BHA-G3-PEG_{1000}+NB + 赖氨酸预负载对照
128	BHA-G3-PEG_{412}	87	BHA-G3-PEG_{412}+NB
130	BHA-G3-PEG_{1000}	89	BHA-G3-PEG_{1000}+NB
131	BHA-G4-PEG_{1000}	91	BHA-G4-PEG_{1000}+NB
132	BHA-G5-PEG_{1000}	93	BHA-G5-PEG_{1000}+NB

[1244] #＝重复

[1245] 用^{89}Zr放射标记研究化合物和放射TLC分析

[1246] 在37℃下将所有构建体(根据需要预处理以移除铁:http://jnm.snmjournals.org/content/44/8/1271.long)与在0.1M pH 7.4HEPES缓冲液中的对于树枝状体过量(关于过量参见上表)的^{89}Zr一起孵育45min。获取每种溶液的样品并且将其与50mM DTPA 1:1混合。将5μL的每种溶液点样在TLC纸(用硅胶浸渍的Agilent iTLC-SG玻璃微纤维色谱纸)上,并且用50:50H_2O:乙醇运行。然后在Eckert&Ziegler微型扫描和流式计数iTLC阅读器上成像板。必要时,通过根据制造商方案使用7K MWCO Zeba旋转柱(Thermo Scientific)进行纯化来移除未结合的锆。所有样品均显示出>95%标记。为了质量控制,进行对照实验以监测游离^{89}Zr和与DTPA结合的^{89}Zr的洗脱行为,并且也在具有和不具有DTPA的情况下运行样品以检查用^{89}Zr标记的任何未结合的螯合剂。在图16中示出了代表性放射TLC图像,其显示所有^{89}Zr与树枝状体结合并且没有游离^{89}Zr。

[1247] 研究注射细节

[1248] 对于体内成像实验,将100μL研究化合物经由尾静脉(29G针头;大约1.5至3.5Mbq)注射至两只小鼠中,以监测各种时间点下的肿瘤累积和生物分布。通过γ计数进行离体定量,以确定注射后9天的器官分布。对于生物分布实验,将构建体注射至两只小鼠中以通过γ计数监测注射后48h时的离体肿瘤累积和生物分布。

[1249] 结果

[1250] PET-CT成像

[1251] 使用30-90分钟静态采集在注射后4h、24h、48h、5d、7d和9d时获取图像。使用有序子集预期最大化(OSEM2D)算法重建PET图像并且使用Inveon研究工作场所软件(IRW 4.1)(Siemens)进行分析,这允许CT和PET图像的融合和感兴趣区域(ROI)的定义。使用IRW软件(Siemens)比对每只单独动物的CT和PET数据集,以确保感兴趣器官的良好重叠。使用通过扫描填充有已知活性的^{89}Zr的圆柱形体模而获得的转换因子来将活性/体素转换为nci/cc以考虑PET扫描仪效率。然后将活性浓度表示为衰减校正的注射活性百分比/cm^3组织,其可以近似为注射剂量百分比/g(%ID/g)。将结果在图17中示出为对于化合物89、91和93,在9

天内在(a)肾脏、(b)肝脏和(c)肿瘤中注射锆剂量百分比/克的图。代表性PET图像示出于图18中。放射标记缀合物的代表性最大强度投影。所有PET数据表示为贝可/体素(cm^3)并且已经阈值处理以突出显示肿瘤摄入。

[1252] 在注射后2天和9天,取出器官并且通过离体γ分析定量信号强度并且进行成像。此外,在48h时选出n=2只/队列并且通过γ分析评价生物分布。离体生物分布结果显示于下表中。

[1253] 表.肿瘤:第2天和第9天注射剂量/g的离体信号的器官比率。

[1254]

化合物	器官	肿瘤:血液		肿瘤:肝脏		肿瘤:脾脏		肿瘤:肾脏	
	时间/天	2	9	2	9	2	9	2	9
25	G2	1.02	6.57	0.20	0.11	0.29	0.11	0.73	0.82
85	G2 + NB	13.04	10.58	0.94	0.28	1.09	0.23	0.10	0.06
26	G3	1.70	0.74	0.04	0.01	0.13	0.01	0.06	0.05
87	G3 + NB	24.30	1.67	0.31	0.05	1.16	0.05	0.03	0.01
27	G3-P1K	0.91	7.76	0.28	0.15	0.33	0.04	0.69	0.51
89	G3-P1K + NB	4.87	25.86	0.96	0.71	1.12	0.25	0.24	1.15
28	G4	1.66	21.92	0.67	0.29	0.35	0.05	2.05	2.03
91	G4 + NB	4.33	98.30	2.24	0.98	1.54	0.29	5.83	4.00
29	G5	0.69	13.68	0.75	0.37	0.29	0.07	2.22	2.29
93	G5 + NB	7.14	325.01	1.63	1.09	1.12	0.09	7.15	6.36
114	NB	17.17	1.24	4.51	1.36	2.56	0.10	0.01	0.00

[1255] 结果显示出靶向性相比于非靶向性的更高肿瘤:血液比率,特别是在第2天在化合物87中(小G3树枝状体)。到第9天,靶向性相比于非靶向性的肿瘤:血液比率更佳,并且特别是对于化合物91和化合物93(较大的G4和G5树枝状体)。

[1256] 表.在第2天和第9天,在离体肿瘤和器官中注射^{89}Zr剂量/克的百分比。

[1257]

	器官	***肿瘤*** （平均%ID/g）	
化合物	**时间（天）**	2	9
129	***G2***	1.74	0.78
85	***G2 + NB***	2.70	1.06
128	***G3***	0.71	0.25
87	***G3-NB***	2.28	0.31
130	***G3-P1K***	2.67	1.53
89	***G3-P1K- NB***	4.78	4.56
131	***G4***	3.96	1.72
91	***G4-NB***	12.30	5.11
132	***G5***	4.04	3.31
93	***G5-NB***	11.96	8.18
114	***NB***	1.05	0.31

[1258]

	器官	***肝脏***		***脾脏***		***肾脏***		***心脏***	
化合物	**时间（天）**	2	9	2	9	2	9	2	9
129	***G2***	8.70	7.18	5.83	7.38	2.36	0.93	1.42	0.64
85	***G2 NB***	3.06	3.71	2.96	4.47	28.56	17.03	0.61	0.52
128	***G3***	18.25	20.85	5.51	35.24	11.23	5.36	1.39	0.92
87	***G3-NB***	7.82	6.02	2.14	6.88	79.08	55.61	0.49	0.28
130	***G3-P1K***	9.62	10.10	8.12	47.73	4.05	3.11	1.91	1.23
89	***G3-P1K -NB***	5.22	6.44	4.27	18.02	20.07	4.06	1.29	0.81
131	***G4***	5.85	5.85	11.13	34.23	1.93	0.85	1.53	1.11

[1259]

91	***G4- NB***	5.54	5.23	8.03	17.53	2.15	1.26	2.51	1.24
132	***G5***	5.48	9.59	16.45	45.59	1.87	1.43	3.08	1.83
93	***G5- NB***	7.29	7.56	10.65	87.39	1.66	1.29	3.33	1.99
114	***NB***	0.23	0.23	0.53	0.00	109.01	62.22	0.10	0.00

[1260]

	器官	***肺***		***骨***		***血液***		***GI 道***	
化合物	**时间（天）**	2	9	2	9	2	9	2	9
129	***G2***	1.25	0.44	1.04	0.28	1.67	0.00	0.87	0.31
85	***G2 – NB***	0.54	0.38	0.63	0.34	0.22	0.00	0.37	0.32
128	***G3***	4.95	2.78	0.98	0.58	0.42	0.00	1.17	0.80
87	***G3 – NB***	0.58	0.55	0.63	0.00	0.09	0.00	0.34	0.29
130	***G3-P1K***	4.36	3.55	0.93	0.79	3.05	0.00	1.01	0.77
89	***G3-P1K-NB***	2.31	1.33	1.75	0.54	1.03	0.00	0.67	0.52
131	***G4***	1.39	1.06	1.31	1.54	2.37	0.08	0.68	0.37
91	***G4-NB***	2.69	1.10	2.05	1.18	3.07	0.00	1.01	0.41
132	***G5***	2.71	1.12	1.70	1.30	5.97	0.04	0.85	0.63
93	***G5-NB***	2.86	1.43	8.07	2.72	2.75	0.00	0.89	0.62
114	***NB***	0.11	0.00	0.26	0.00	0.08	0.00	0.04	0.11

[1261] 结果显示出靶向性相比于非靶向性的更高肿瘤中信号，特别是在第2天对于化合物91和化合物93(更大的G4和G5树枝状体)以及在第9天对于化合物89(G3树枝状体)。

[1262] 结论

[1263] 1、树枝状体越大，肿瘤累积越佳。化合物49(2D3)显示出快速的清除和低累积。

[1264] 2、相比于非靶向性树枝状体，靶向性疗法导致更高的肿瘤累积。

[1265] 3、与其他小树枝状体相比，化合物87(G3 1K-纳米抗体)显示出显著增强的肿瘤中信号。

[1266] 4、化合物91和化合物93(G4和G5纳米抗体)在48h时显示出肿瘤中>12％ID/g，并且在第9天时>8％。

[1267] 5、小的含纳米抗体树枝状体和单独的纳米抗体具有更高的肾脏保留。没有观察到其他清除器官中的不寻常累积，其中肝脏和脾脏信号显示出如通常针对聚合物纳米材料观察到的预期浓度范围。

[1268] 基于PET-CT成像的人体剂量测定模型

[1269] 按照MIRD方案进行剂量测定计算。

[1270] 对提供的^{89}Zr小鼠数据进行单指数拟合。然后针对同位素^{177}Lu和^{68}Ga修改Λ_{phys}，以计算针对每个同位素的分解总数。

[1271] $$A_1 e^{-(\lambda_1+\lambda_{phys})t}$$

[1272] 肿瘤剂量以小鼠肿瘤的大小为模型。

[1273] .

[1274] 总体观察；

[1275] -交叉辐射对未列出的器官的剂量是最小的，并且比具有显著摄入的器官的剂量少多个数量级。

[1276] -^{177}Lu的肾脏mGy/MBq似乎与其他^{177}Lu放射性药物(诸如^{1}Lutathera和^{177}LuPSMA-617)具有相似的数量级。

[1277] -与正常器官摄入相比，肿瘤剂量相对较高

[1278]

G2 + NB （化合物 85）	同位素（mGy/MBq）		
器官	Zr-89	Lu-177	Ga-68
心脏	0.048	0.067	0.004
肺	0.025	0.038	0.002
肝脏	0.528	0.534	0.027

G2 (化合物 129)	同位素（mGy/MBq）		
器官	Zr-89	Lu-177	Ga-68
心脏	0.112	0.141	0.013
肺	0.035	0.058	0.003
肝脏	0.837	0.922	0.039

肾脏	1.514	1.859	0.151
肿瘤	224	527	26

肾脏	0.160	0.211	0.014
肿瘤	88	215	10

G3-P1K + NB

（化合物 89）	同位素（mGy/MBq）		
器官	Zr-89	Lu-177	Ga-68
心脏	0.136	0.165	0.017
肺	0.054	0.074	0.007
肝脏	0.722	0.715	0.038
肾脏	1.870	2.136	0.221
肿瘤	529	1511	60

G3-P1K

(化合物 130)	同位素（mGy/MBq）		
器官	Zr-89	Lu-177	Ga-68
心脏	0.256	0.300	0.036
肺	0.077	0.110	0.009
肝脏	1.411	1.480	0.069
肾脏	0.488	0.605	0.048
肿瘤	171	498	20

G4 + NB

（化合物 91）	同位素（mGy/MBq）		
器官	Zr-89	Lu-177	Ga-68
心脏	0.153	0.191	0.018
肺	0.065	0.095	0.007
肝脏	0.807	0.910	0.037
肾脏	0.313	0.393	0.030
肿瘤	532	1404	54

G4

(化合物 131)	同位素（mGy/MBq）		
器官	Zr-89	Lu-177	Ga-68
心脏	0.174	0.203	0.024
肺	0.059	0.080	0.007
肝脏	0.741	0.743	0.038
肾脏	0.369	0.472	0.034
肿瘤	101	325	10

[1279]

G5 + NB

（化合物 93）	同位素（mGy/MBq）		
器官	Zr-89	Lu-177	Ga-68
心脏	0.191	0.234	0.024
肺	0.077	0.108	0.009
肝脏	1.022	1.153	0.046
肾脏	0.327	0.395	0.034

G5

(化合物 132)	同位素（mGy/MBq）		
器官	Zr-89	Lu-177	Ga-68
心脏	0.215	0.259	0.028
肺	0.071	0.106	0.008
肝脏	0.957	1.063	0.044
肾脏	0.403	0.512	0.037

肿瘤	732	2008	82	肿瘤	250	992	18

[1280]

NB-DFO

（化合物 114）	同位素（mGy/MBq）		
器官	Zr-89	Lu-177	Ga-68
心脏	0.009	0.010	0.002
肺	0.008	0.010	0.001
肝脏	0.097	0.083	0.006
肾脏	3.125	4.081	0.277
肿瘤	98	195	25

[1281] 实施例14.BT474异种移植模型的放射治疗效果

[1282] 动物模型

[1283] 健康的雌性Balb/c裸小鼠(9周龄)从西澳大利亚动物资源中心获得。每个配量组共有四只小鼠最初被植入雌激素丸(17β-雌二醇0.72mg/丸,60天释放;美国创新研究院),并且然后在第2天用PBS:Matrigel(1:1)中的$10x10^6$BT474细胞皮下注射到乳腺脂肪垫中。对小鼠进行称重,并且每周用电子卡尺测量2-3次肿瘤。将肿瘤体积(mm^3)计算为((长度(mm)x((宽度(mm))^2)/2。当肿瘤达到大约100mm^3的平均体积(细胞植入后大约5周)时,将小鼠随机分为下表中概述的八个配量组。

[1284] 放射标记和TLC分析。

[1285] 在37℃下,将树枝状体或修饰的曲妥珠单抗与^{177}Lu在0.1M pH 5.5的醋酸铵缓冲液中,以100倍过量的树枝状体/曲妥珠单抗孵育45min。取每种溶液的样品并与50mM DTPA 1:1混合。将5μL的每种DTPA孵育样品或纯溶液点样在TLC纸(用硅胶浸渍的Agilent iTLC-SG玻璃微纤维色谱纸)上,并且用50:50H2O:乙醇运行。然后使用Eckert和Ziegler微型扫描和流量计数系统实现对放射标记的物种迁移的检测。所有样品均显示出≥90%标记。进行对照实验以监测游离^{177}Lu和与DTPA结合的^{177}Lu的洗脱行为,以进行质量控制。

[1286] 必要时,通过根据制造商方案使用7K MWCO Zeba旋转柱(Thermo Scientific)进行纯化来移除未结合的铜。

[1287] 对于所讨论的每个分析,通过将样品与过量的DTPA(50mM)混合以清除任何未结合的^{177}Lu来获得放射性同位素的TLC。用^{177}Lu对测试化合物进行放射标记,通过用冷材料稀释热材料以达到期望的比活性和药物负载量,从而递送约9或15Mbq的放射性剂量。

[1288] 治疗方案

[1289] 按照下述计划表,通过尾静脉注射(29G针头)以大约0.1mL/10g体重IV施用测试品。如果肿瘤达到显著大小(>1cm^3)或符合伦理要求,则将小鼠剔除。

[1290] 表.配量组

[1291]

测试品	^{177}Lu 剂量	剂量方案
盐水	0	
KY-3-310（曲妥珠单抗）	1 x 15Mbq	第 1 天
RH-3-160（非靶向性）	1 x 9Mbq	第 1 天
RH-3-160（非靶向性）	2 x 9Mbq	第 1 天和第 15 天
RH-3-160（非靶向性）	1x 15Mbq	第 1 天
SRS-2-304（纳米抗体）	1 x 9Mbq	第 1 天
SRS-2-304（纳米抗体）	2 x 9Mbq	第 1 天和第 15 天
SRS-2-304（纳米抗体）	1 x 15Mbq	第 1 天

[1292] 结果

[1293] 如图19和下表所示，靶向性放射性核素树枝状体(化合物SRS-2-304)和非靶向性放射性核素树枝状体(化合物RH-3-160)均有效抑制肿瘤生长，其中靶向性树枝状体最有效。图20示出了在15Mbq和2x9Mbq ^{177}Lu剂量下，靶向性(化合物SRS-2-304)在第67天没有肿瘤再生。

[1294] 表.在第67天HER2靶向性和非靶向性树枝状体的体积变化百分比的统计比较(未配对T检验与韦尔奇校正)。

[1295]

测试品 **（Mbq 剂量）**	**与 1 x 15Mbq 的化合物 KY-3-310（曲妥珠单抗）相比**	**与等同 MBq 剂量下的化合物 RH-3-160（非靶向性）相比**
SRS-2-304 （1 x 9Mbq）	NS	P = 0.0155
SRS-2-304 （1 x 15Mbq）	P = 0.0007	P = 0.0025
SRS-2-304 （2 x 9Mbq）	P = 0.0009	P = 0.0126
RH-3-160 （1 x 15Mbq）	P = 0.0107	

序列表

<110> 星药私人有限公司

<120> 治疗缀合物

<130> 531049PCT

<150> AU2020901833

<151> 2020-06-03

<150> AU2021900538

<151> 2021-02-26

<160> 10

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Asn Trp Ser Gly Thr His Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Asn Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asn Trp Arg Asp Ala Gly Thr Thr Trp Phe Glu Lys Ser Gly
100 105 110
Ser Ala Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2

<211> 138

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列
<220>
<221> X
<222> (125)..(125)
<223> 其中X表示非天然氨基酸,优选地
4-叠氮基苯丙氨酸残基
<400> 2

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
            20                  25                  30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ser Ser Ile Asn Trp Ser Gly Thr His Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Asn Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Lys Asn Trp Arg Asp Ala Gly Thr Thr Trp Phe Glu Lys Ser Gly
            100                 105                 110
Ser Ala Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Xaa Glu Asn Leu
        115                 120                 125
Tyr Phe Gln Gly His His His His His His
    130                 135
```

<210> 3
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列
<220>
<221> X
<222> (125)..(125)
<223> 其中A表示非天然氨基酸,优选地
4-叠氮基苯丙氨酸残基
<400> 3

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15
```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Asn Trp Ser Gly Thr His Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Asn Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asn Trp Arg Asp Ala Gly Thr Thr Trp Phe Glu Lys Ser Gly
100 105 110
Ser Ala Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Xaa
115 120 125

<210> 4
<211> 156
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列
<400> 4

Gly Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr Gly
1 5 10 15
Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
20 25 30
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Gly
35 40 45
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
50 55 60
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
65 70 75 80
Ser Ser Ile Asn Trp Ser Gly Thr His Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
85 90 95
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Asn Asn Thr Leu Tyr
100 105 110
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
115 120 125
Ala Lys Asn Trp Arg Asp Ala Gly Thr Thr Trp Phe Glu Lys Ser Gly
130 135 140

Ser Ala Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
145 150 155

<210> 5
<211> 157
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列
<220>
<221> X
<222> (157)..(157)
<223> 其中X表示非天然氨基酸,优选地
4-叠氮基苯丙氨酸残基
<400> 5

Gly Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr Gly
1 5 10 15
Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
20 25 30
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Gly
35 40 45
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
50 55 60
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
65 70 75 80
Ser Ser Ile Asn Trp Ser Gly Thr His Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
85 90 95
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Asn Asn Thr Leu Tyr
100 105 110
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
115 120 125
Ala Lys Asn Trp Arg Asp Ala Gly Thr Thr Trp Phe Glu Lys Ser Gly
130 135 140
Ser Ala Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Xaa
145 150 155

<210> 6
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 人工序列
<220>
<221> X
<222> (125)..(125)
<223> x = 0至20个氨基酸。所述氨基酸可以是任何氨基酸。
<400> 6

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
            20                  25                  30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ser Ser Ile Asn Trp Ser Gly Thr His Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Asn Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Lys Asn Trp Arg Asp Ala Gly Thr Thr Trp Phe Glu Lys Ser Gly
            100                 105                 110
Ser Ala Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Xaa Cys
        115                 120                 125
```

<210> 7
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列
<220>
<221> X
<222> (1)..(1)
<223> X = 0至20个氨基酸。所述氨基酸可以是任何氨基酸。
<400> 7

```
Xaa Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly
1               5                  10                  15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp
            20                  25                  30
Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
        35                  40                  45
```

Val Ser Ser Ile Asn Trp Ser Gly Thr His Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
50 55 60
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Asn Asn Thr Leu
65 70 75 80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Lys Asn Trp Arg Asp Ala Gly Thr Thr Trp Phe Glu Lys Ser
100 105 110
Gly Ser Ala Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 8
<211> 127
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列
<220>
<221> X
<222> (125)..(125)
<223> X = 0至20个氨基酸。所述氨基酸可以是任何氨基酸。
<220>
<221> X
<222> (127)..(127)
<223> X = 0至20个氨基酸。所述氨基酸可以是任何氨基酸。
<400> 8
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Asn Trp Ser Gly Thr His Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Asn Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asn Trp Arg Asp Ala Gly Thr Thr Trp Phe Glu Lys Ser Gly
100 105 110

Ser Ala Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Xaa Cys Xaa
115 120 125

<210> 9
<211> 127
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列
<220>
<221> X
<222> (1)..(1)
<223> X = 0至20个氨基酸。所述氨基酸可以是任何氨基酸。
<220>
<221> X
<222> (3)..(3)
<223> X = 0至20个氨基酸。所述氨基酸可以是任何氨基酸。
<400> 9

Xaa Cys Xaa Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Leu Val Gln
1 5 10 15
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
20 25 30
Asp Asp Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Ser Ser Ile Asn Trp Ser Gly Thr His Thr Asp Tyr Ala
50 55 60
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Asn Asn
65 70 75 80
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95
Tyr Tyr Cys Ala Lys Asn Trp Arg Asp Ala Gly Thr Thr Trp Phe Glu
100 105 110
Lys Ser Gly Ser Ala Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 10
<211> 146
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Asn Trp Ser Gly Thr His Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Asn Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asn Trp Arg Asp Ala Gly Thr Thr Trp Phe Glu Lys Ser Gly
100 105 110
Ser Ala Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Thr Leu
115 120 125
Cys Thr Pro Ser Arg Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly His His His His
130 135 140
His His
145

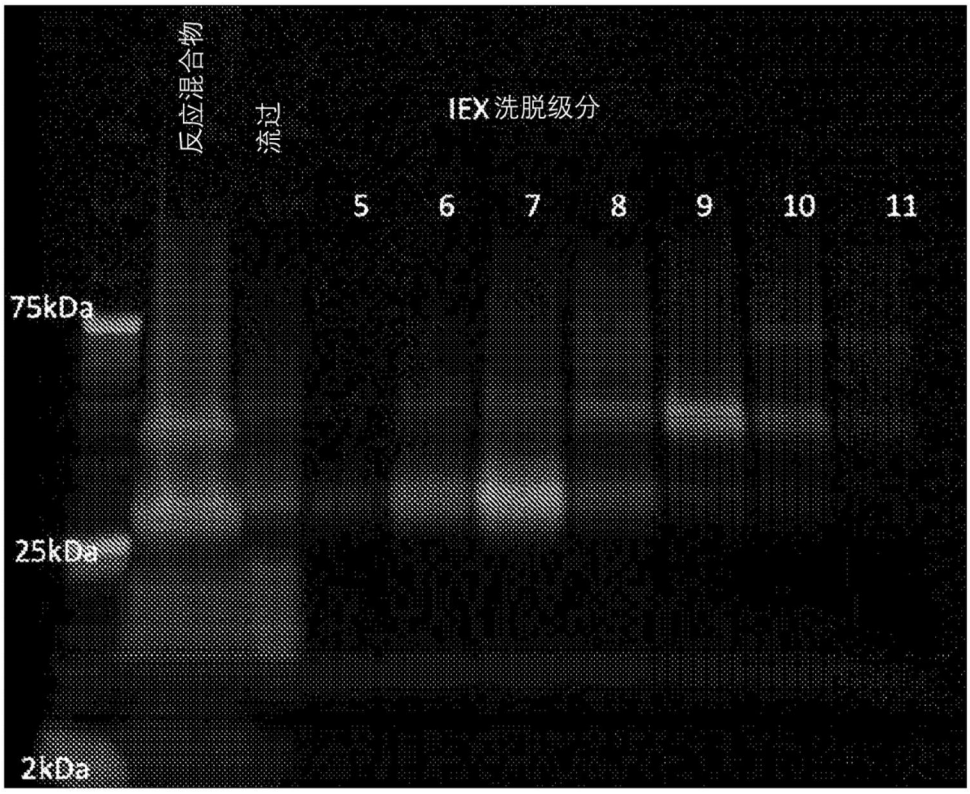

反应混合物
流过
IEX洗脱级分
5
6
7
8
9
10
11
75kDa
25kDa
2kDa

图1a

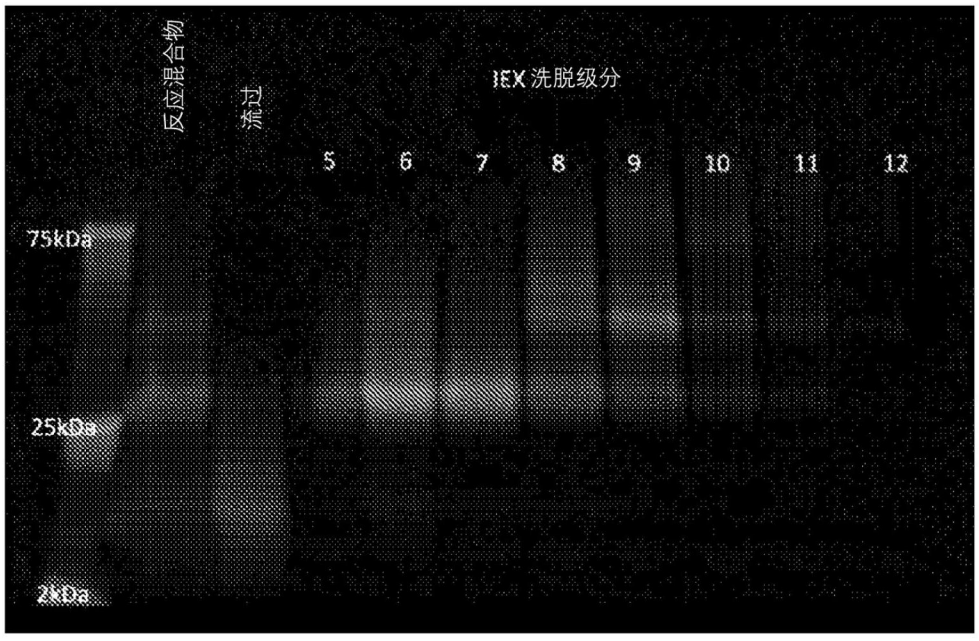

反应混合物
流过
IEX洗脱级分
5
6
7
8
9
10
11
12
75kDa
25kDa
2kDa

图1b

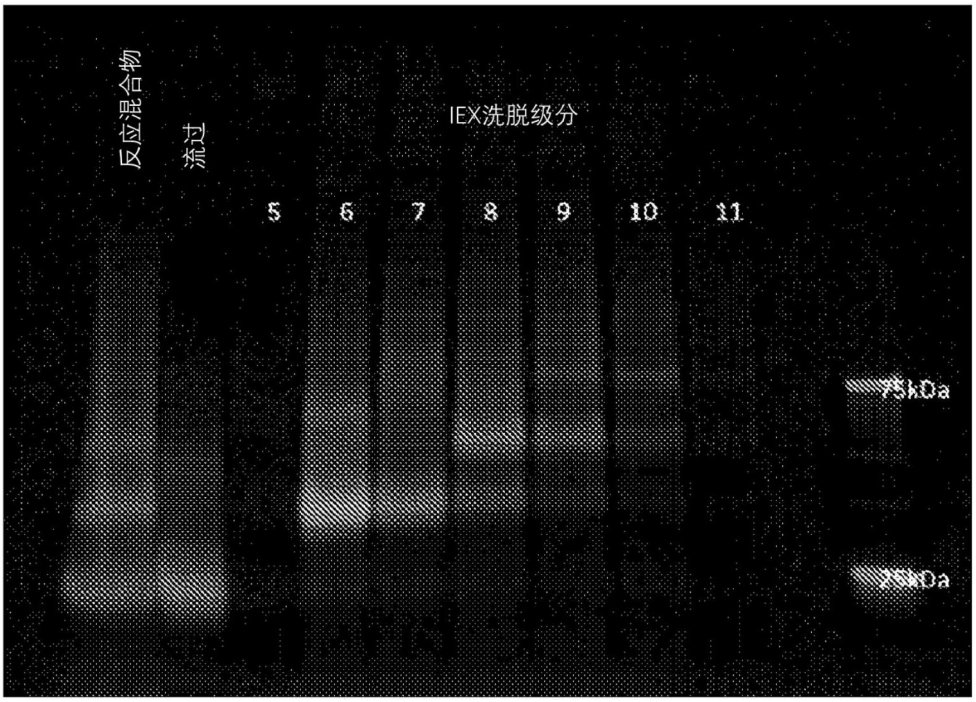

反应混合物
流过
IEX洗脱级分
5
6
7
8
9
10
11
75kDa
25kDa

图1c

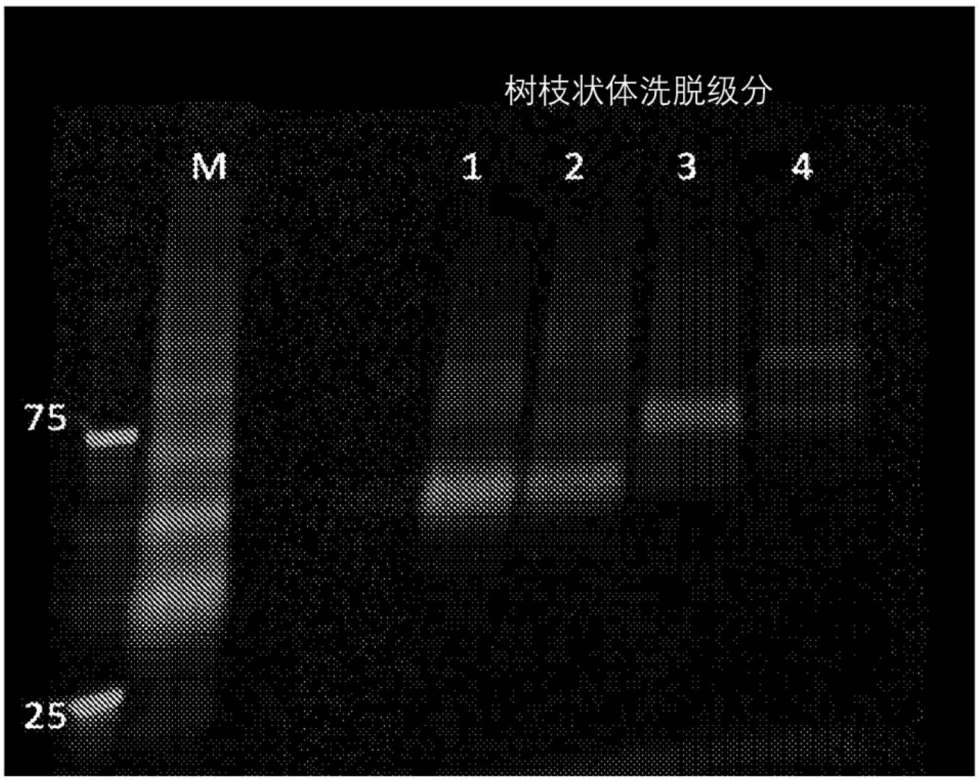

树枝状体洗脱级分
M
1
2
3
4
75
25

图1d

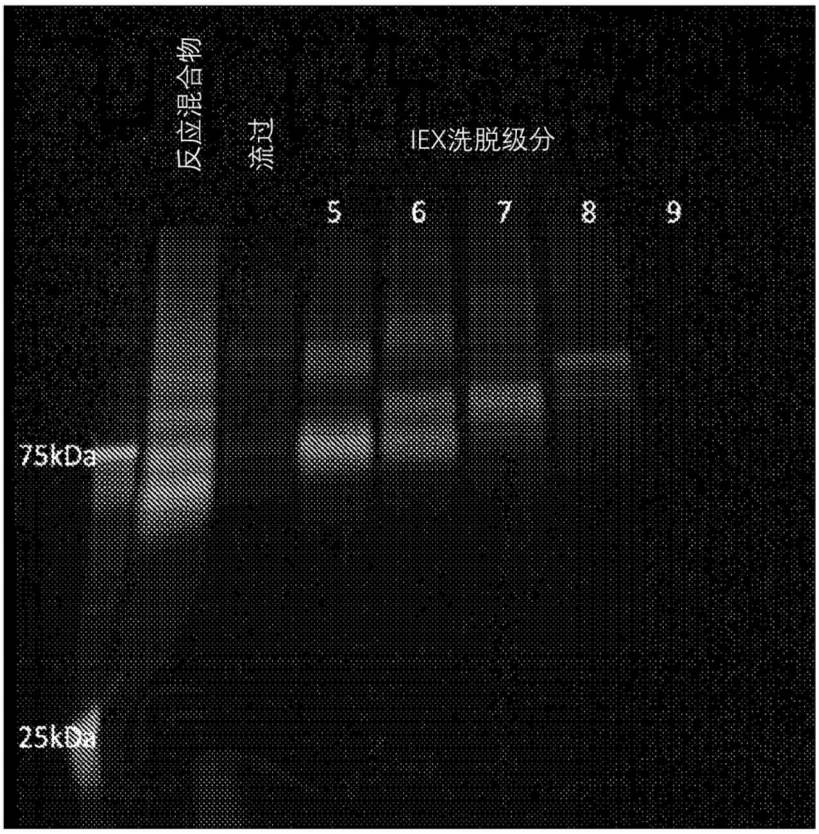


图1e

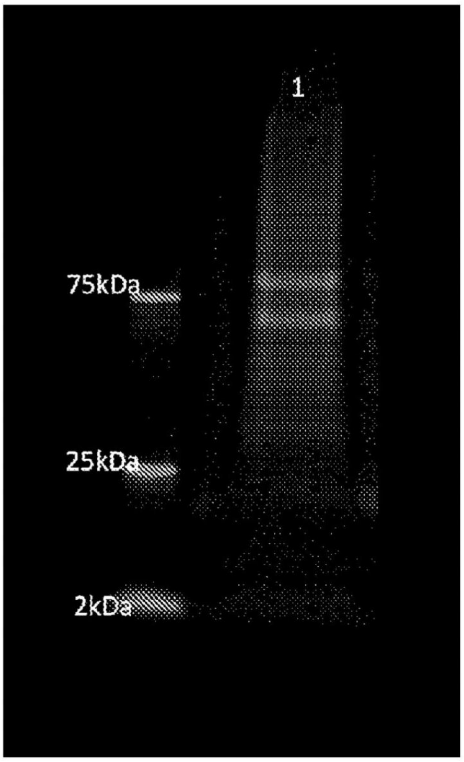

1
75kDa
25kDa
2kDa

图1f

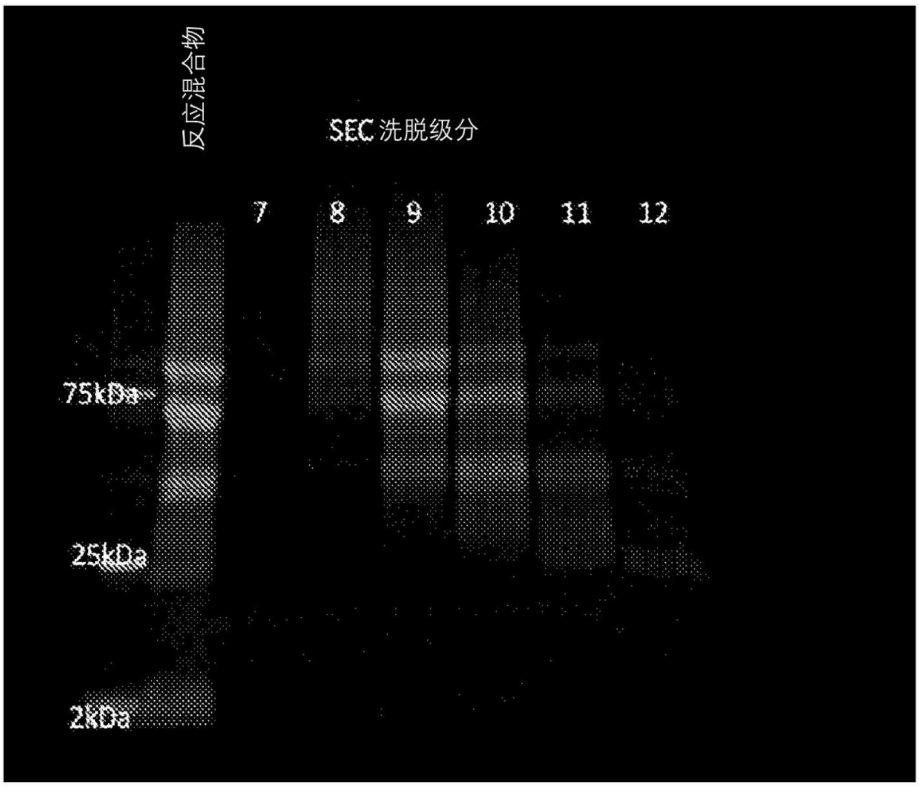

反应混合物
SEC 洗脱级分
7
8
9
10
11
12
75kDa
25kDa
2kDa

图1g

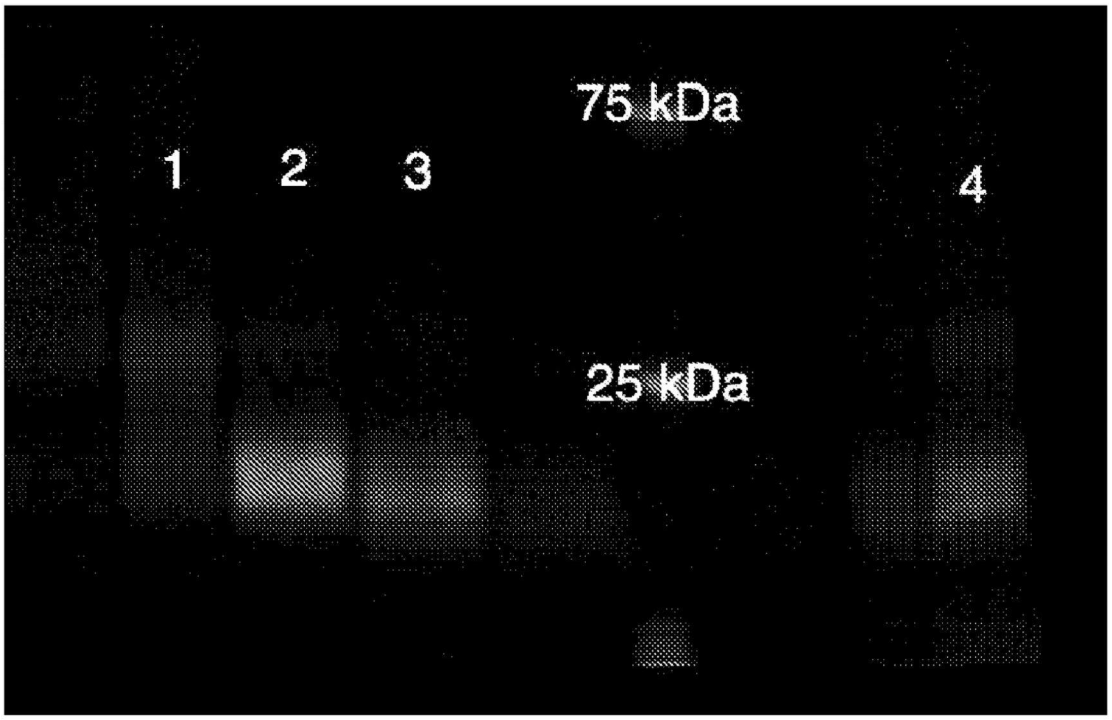


图1h

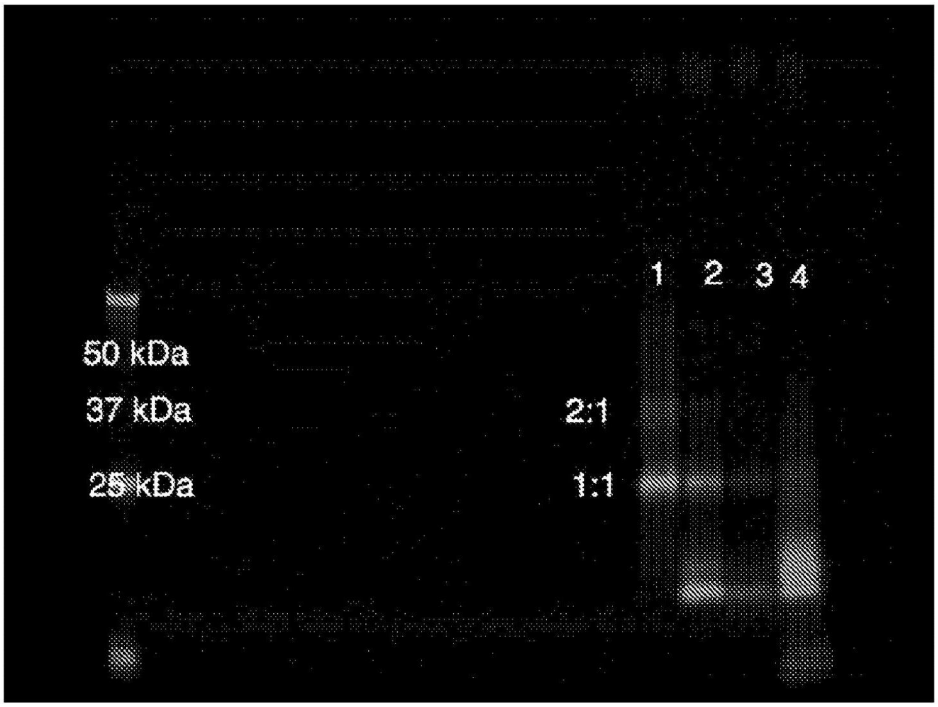


图1i

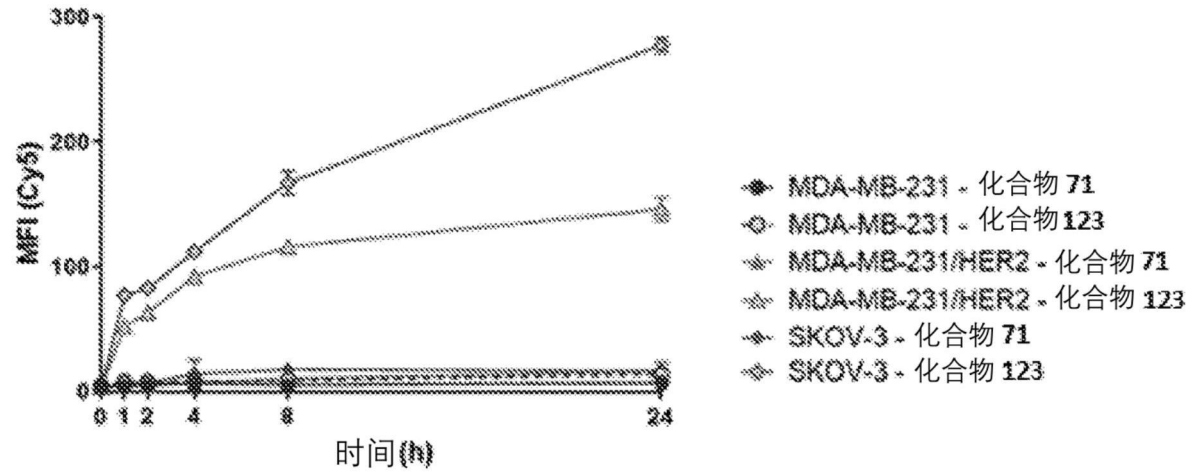

MFI (Cy5)
时间(h)
MDA-MB-231 - 化合物 71
MDA-MB-231 - 化合物 123
MDA-MB-231/HER2 - 化合物 71
MDA-MB-231/HER2 - 化合物 123
SKOV-3 - 化合物 71
SKOV-3 - 化合物 123

图2

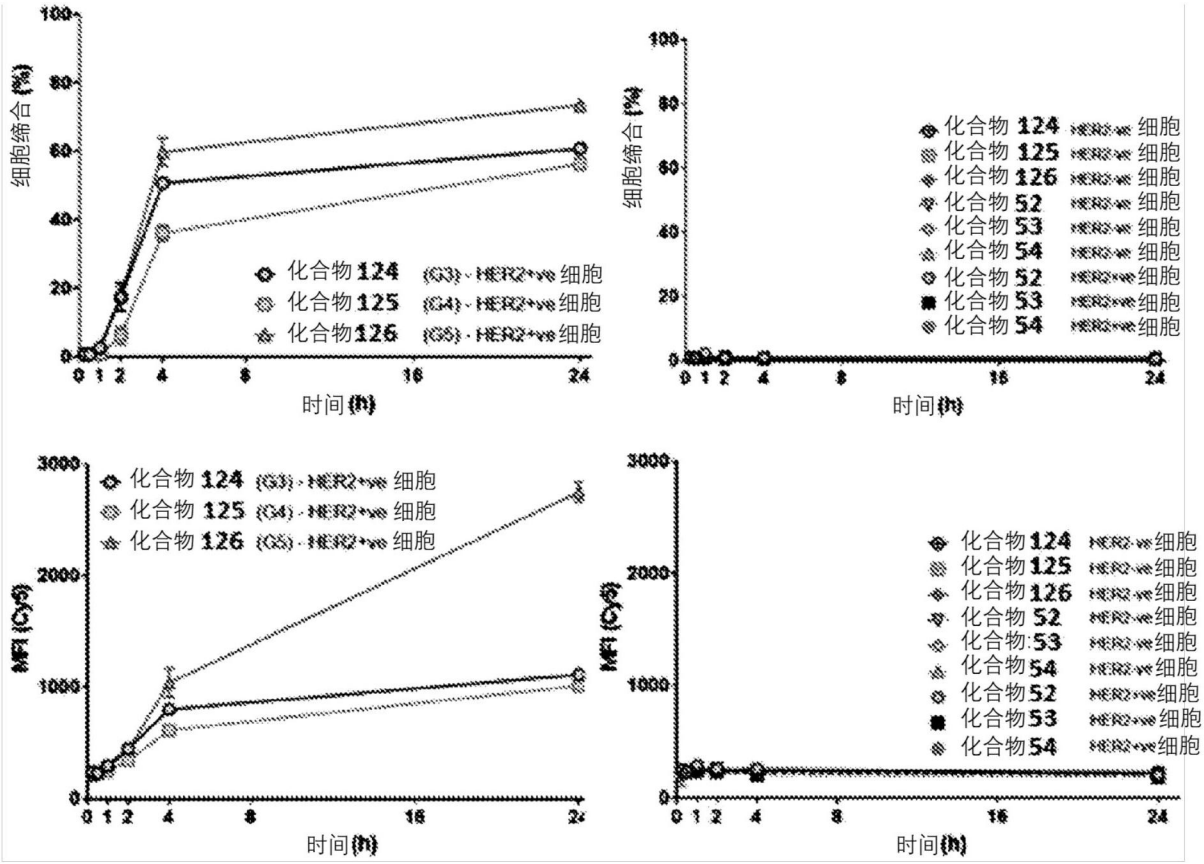

细胞缔合 (%)
时间(h)
化合物 124 (G3) - HER2+ve 细胞
化合物 125 (G4) - HER2+ve 细胞
化合物 126 (G5) - HER2+ve 细胞
化合物 124 HER2-ve 细胞
化合物 125 HER2-ve 细胞
化合物 126 HER2-ve 细胞
化合物 52 HER2-ve 细胞
化合物 53 HER2-ve 细胞
化合物 54 HER2-ve 细胞
化合物 52 HER2+ve 细胞
化合物 53 HER2+ve 细胞
化合物 54 HER2+ve 细胞
MFI (Cy5)

图3

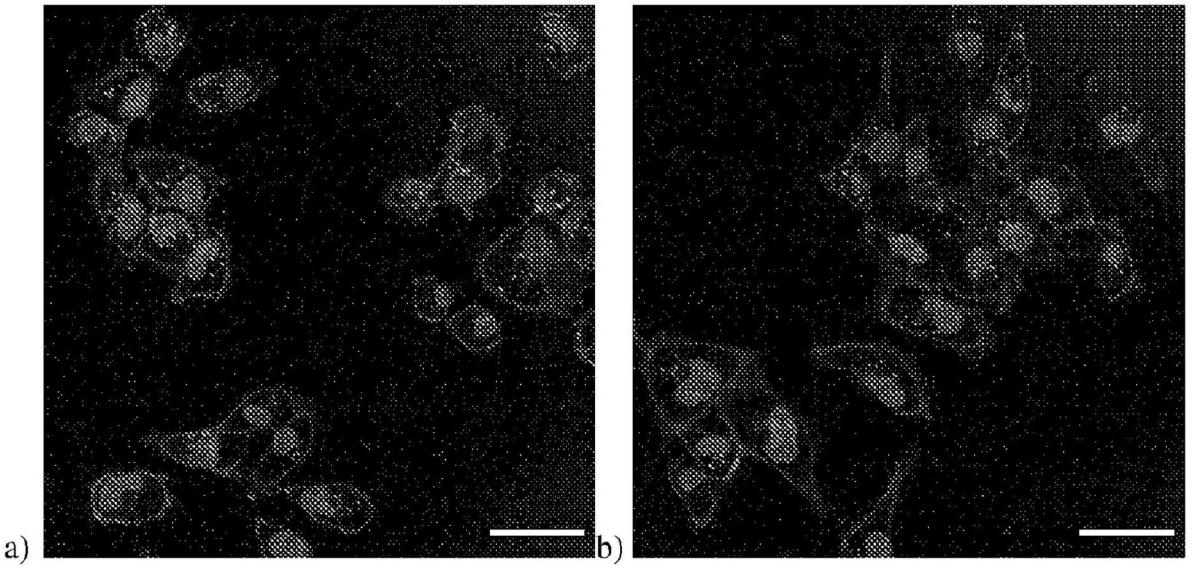


图4

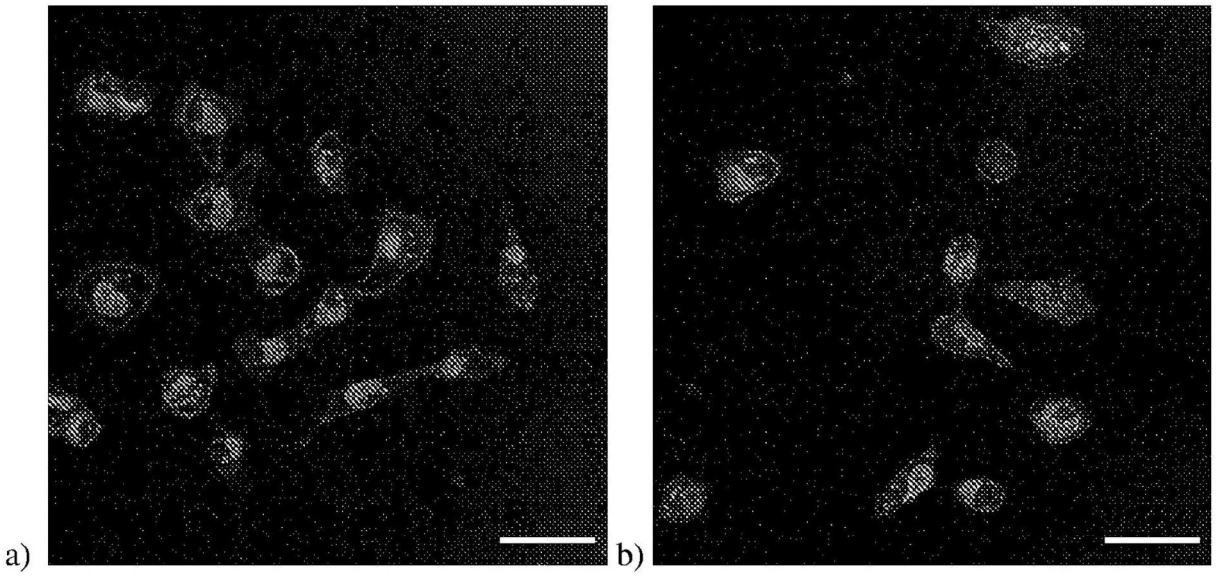


图5

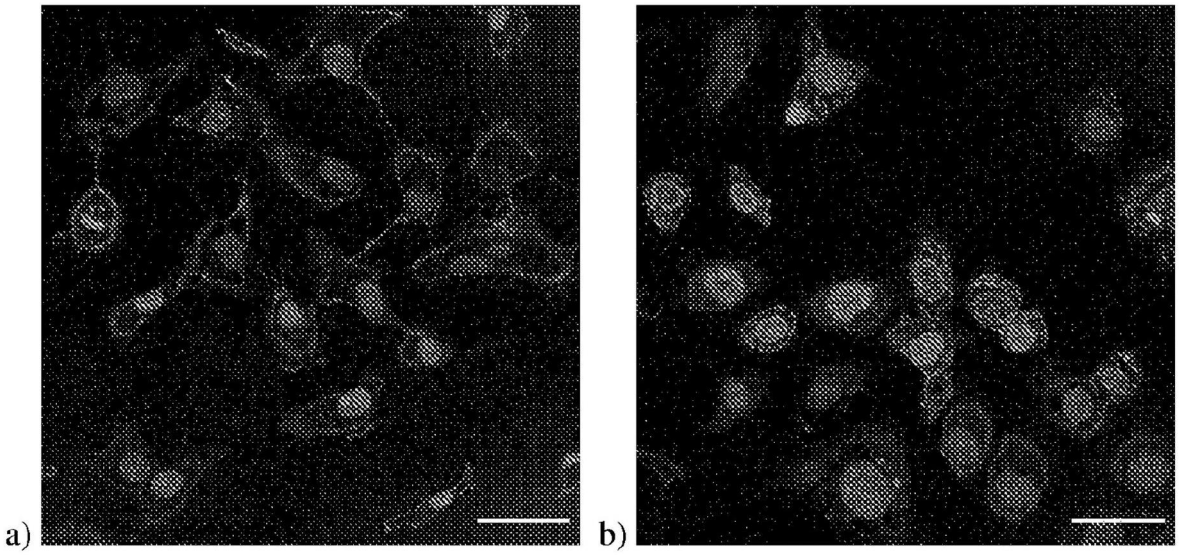

a)
b)

图6

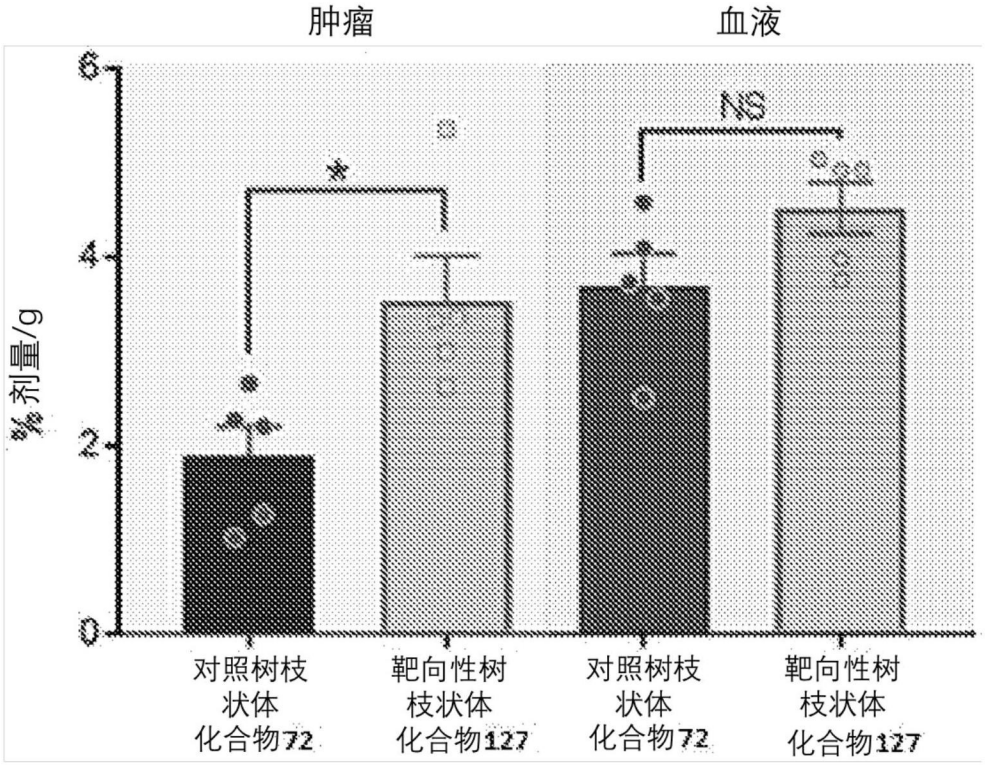

肿瘤
血液
NS
%剂量/g
6
4
2
0
对照树枝状体化合物72
靶向性树枝状体化合物127
对照树枝状体化合物72
靶向性树枝状体化合物127

图7

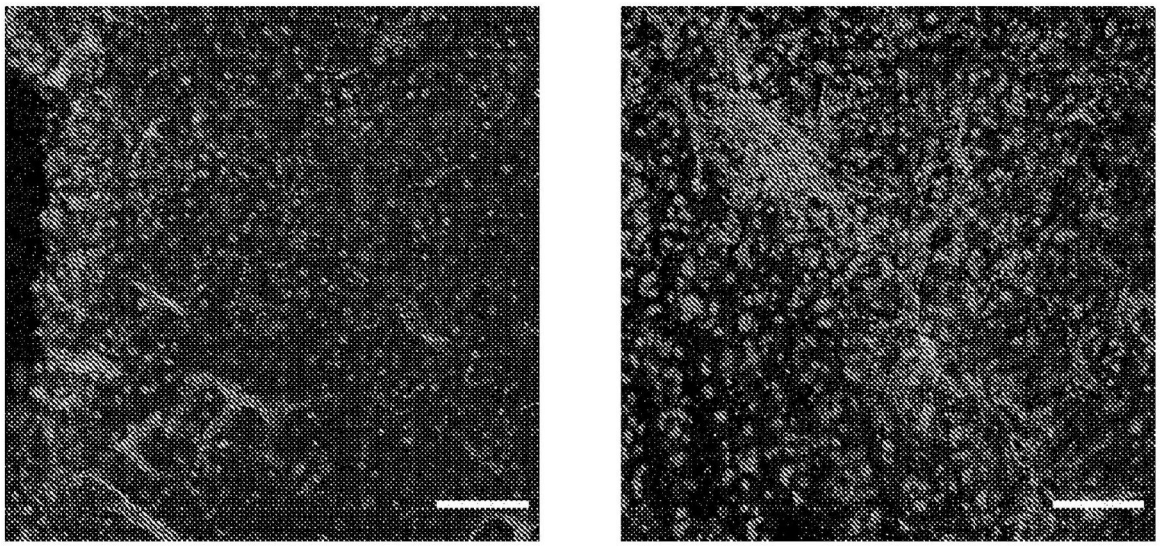


图8

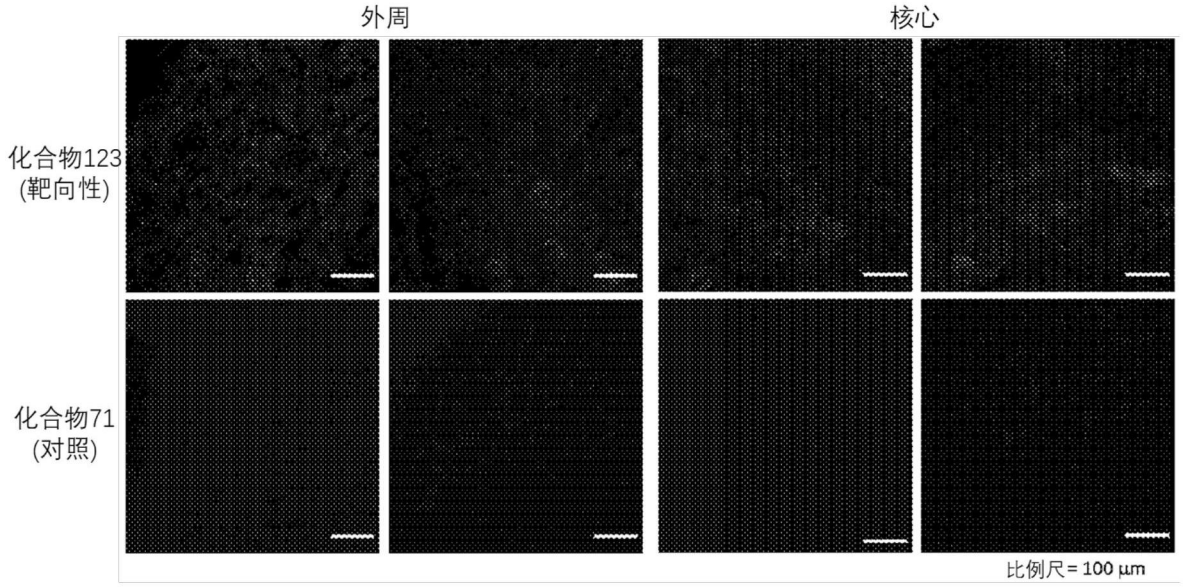


图9

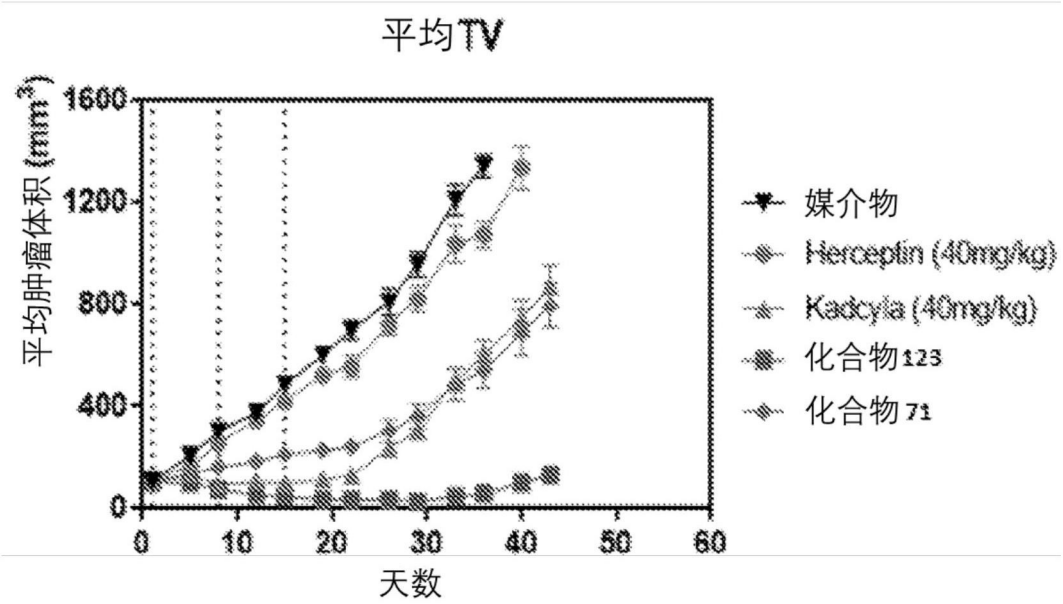

平均TV
平均肿瘤体积 (mm³)
1600
1200
800
400
0
0
10
20
30
40
50
60
天数
媒介物
Herceptin (40mg/kg)
Kadcyla (40mg/kg)
化合物123
化合物71

图10

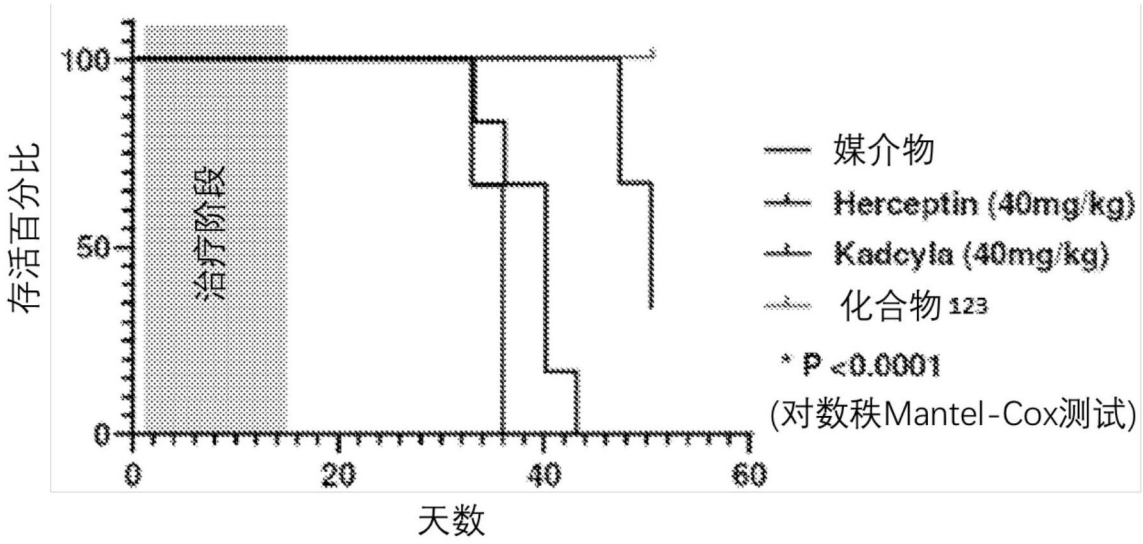

存活百分比
100
50
0
治疗阶段
0
20
40
60
天数
媒介物
Herceptin (40mg/kg)
Kadcyla (40mg/kg)
化合物123
* P <0.0001
(对数秩Mantel-Cox测试)

图11

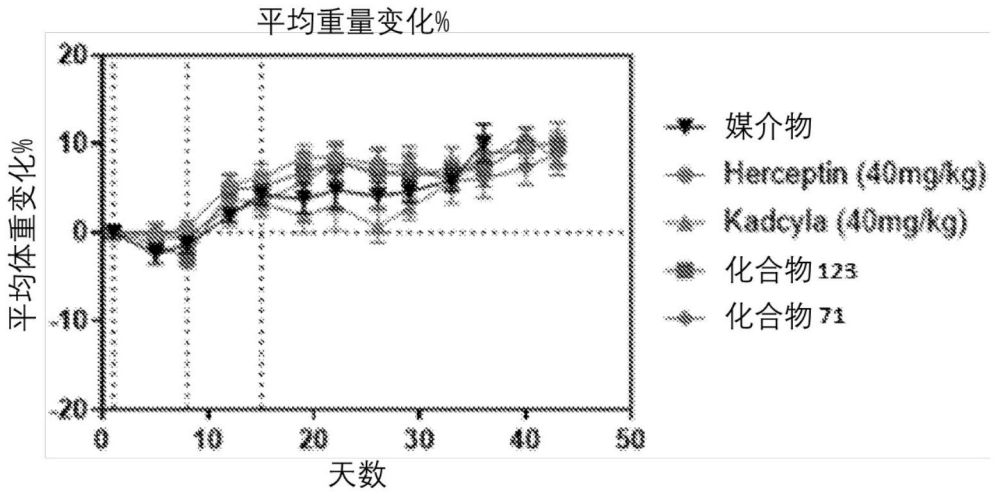

平均重量变化%
平均体重变化%
天数
媒介物
Herceptin (40mg/kg)
Kadcyla (40mg/kg)
化合物123
化合物71

图12

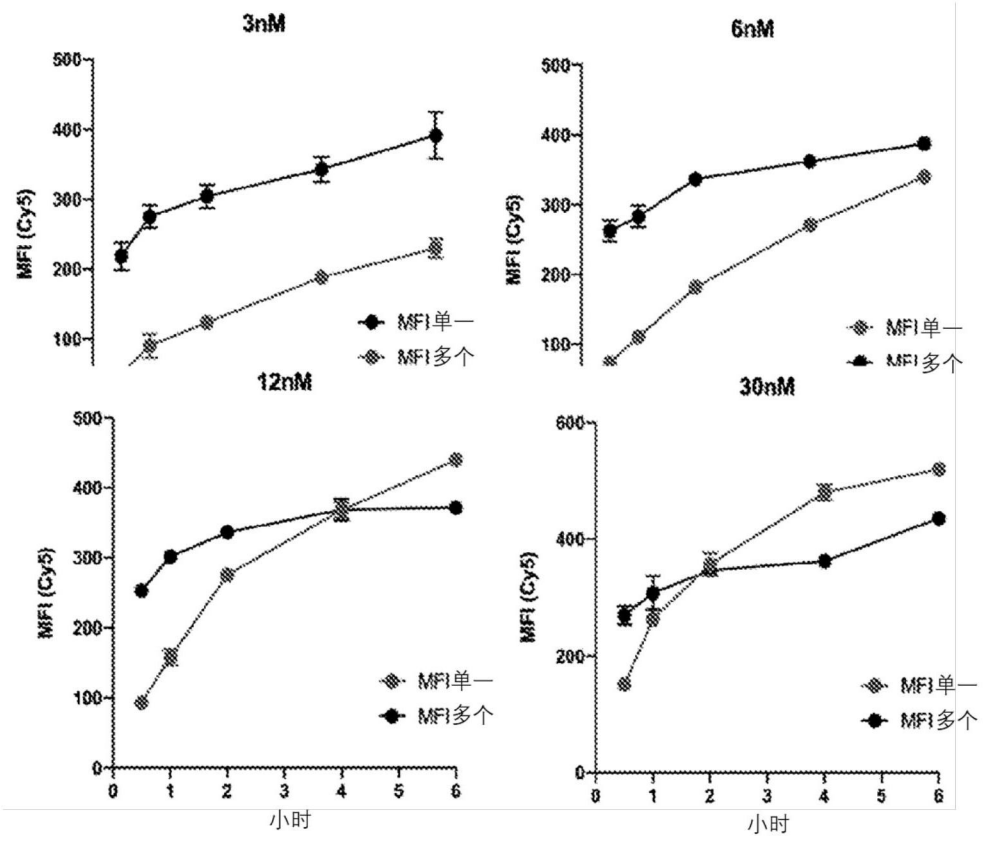

3nM
6nM
12nM
30nM
MFI (Cy5)
MFI单一
MFI多个
小时

图13

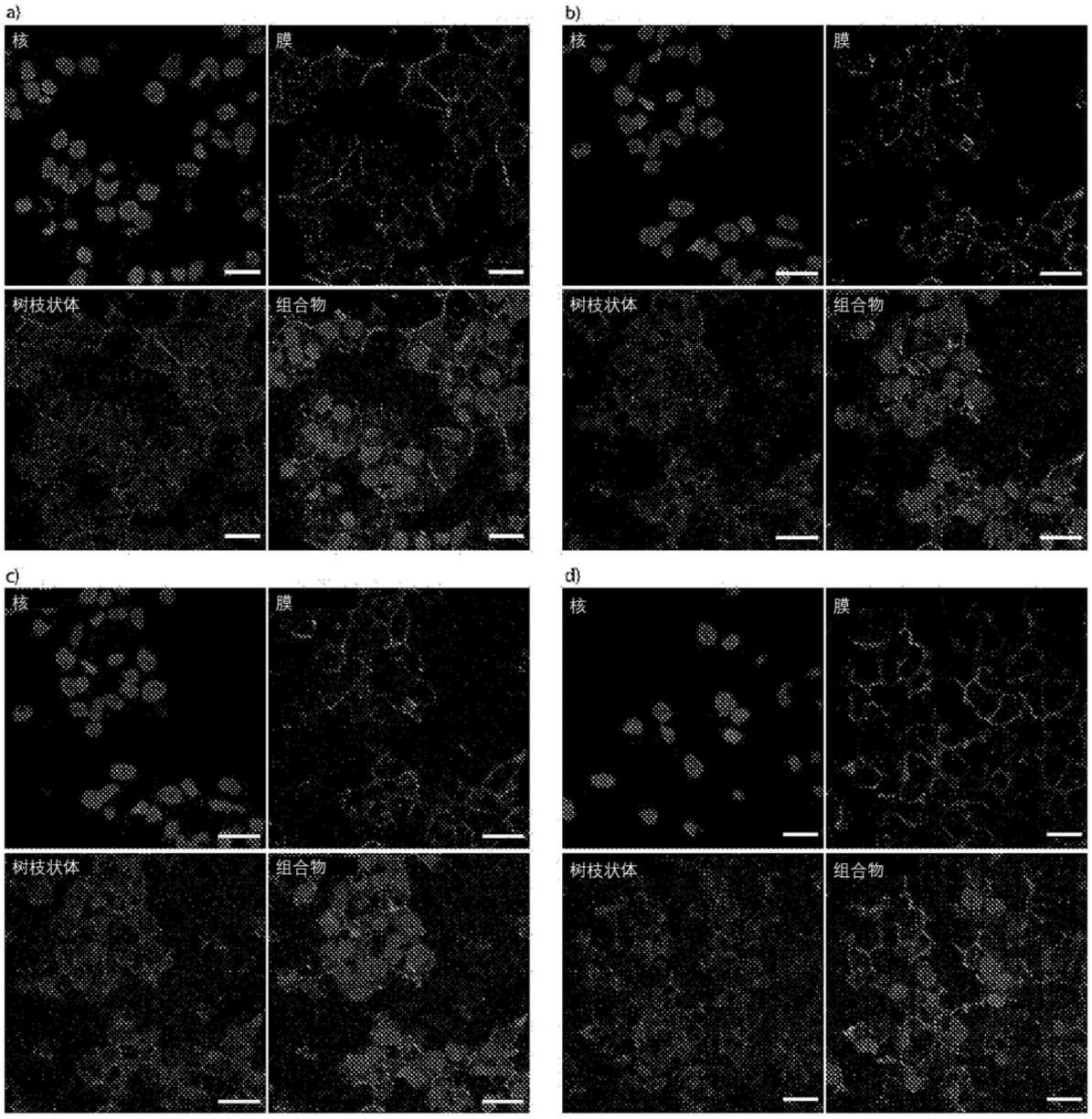


图14

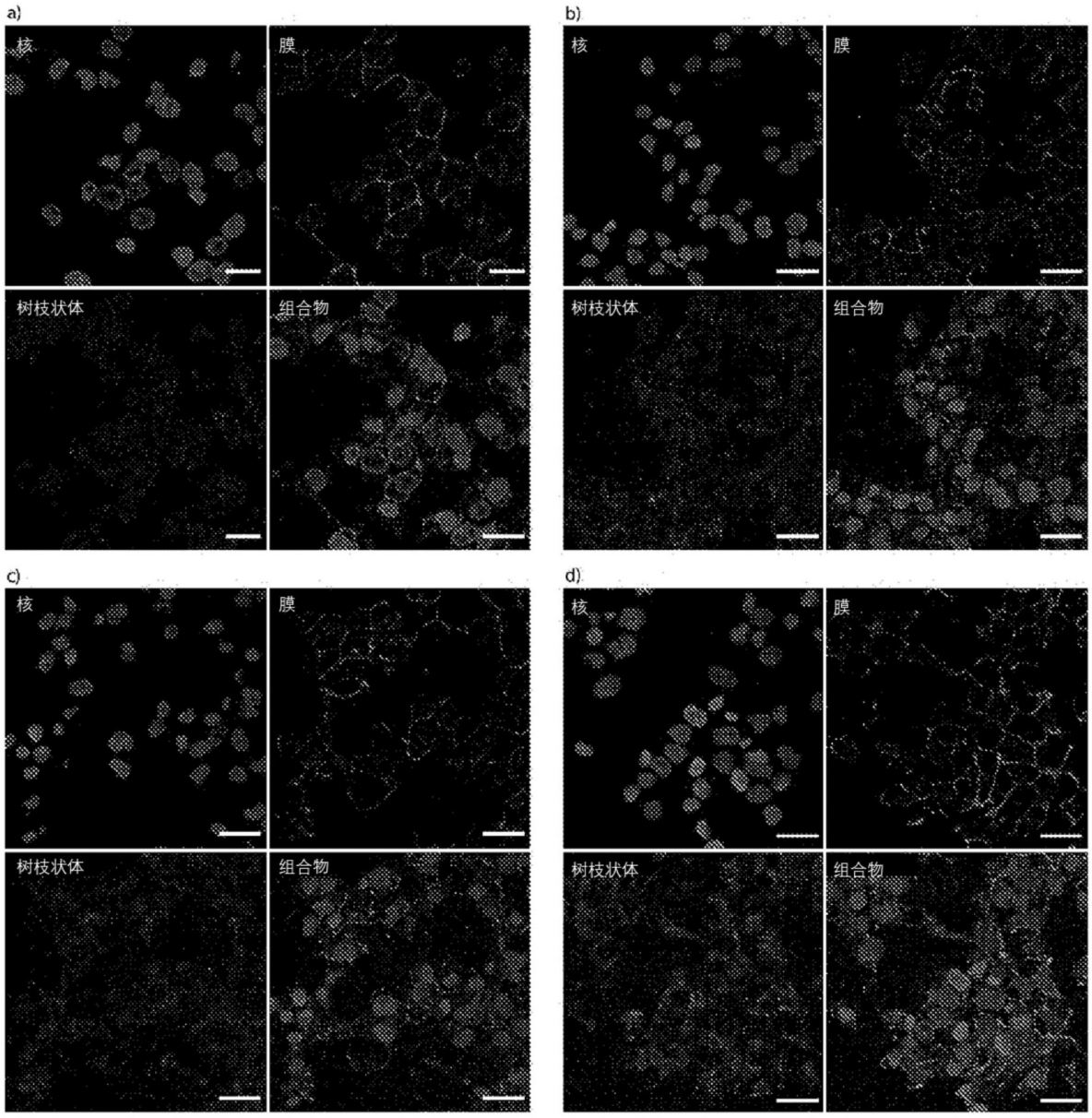


图15

标识符	面积	峰%	最大mm	起始mm	结束mm	最大值	总数%	Rf	质心mm
化合物	55460.00	97.76	120	96	140	5815.00	33.50	0.61	118.44
Zr89	1272.00	2.24	156	148	168	318.00	0.77	0.81	156.10

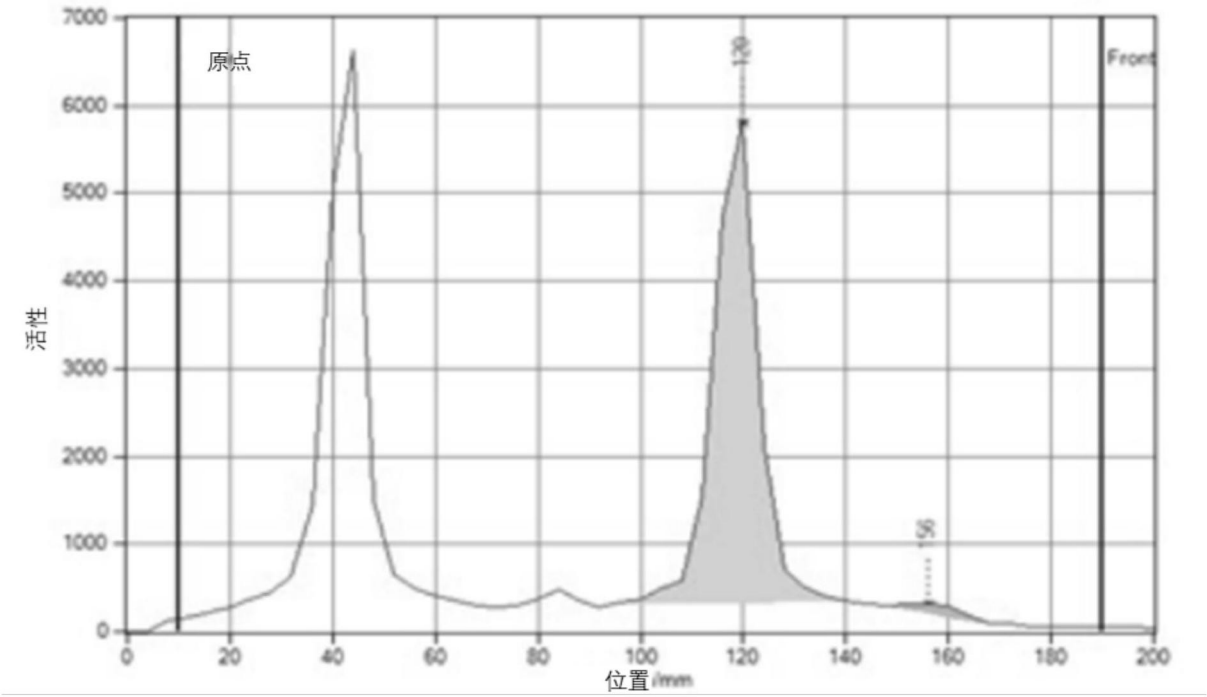
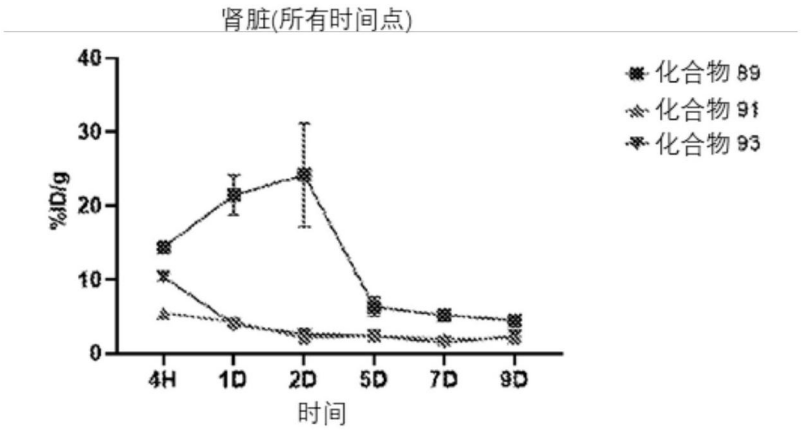
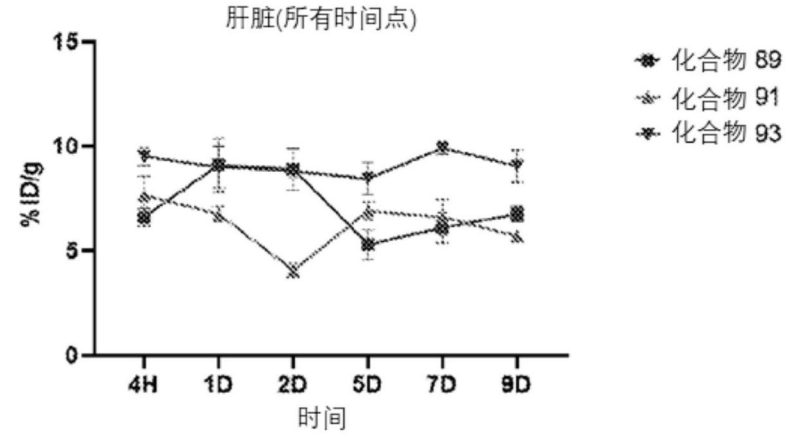


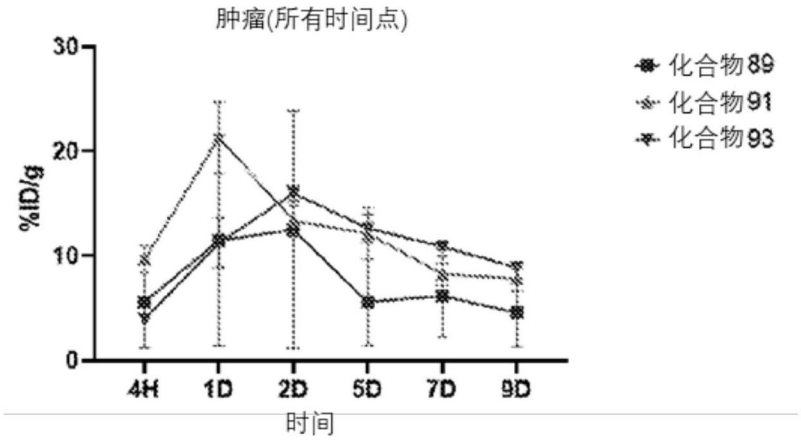
图16


肾脏(所有时间点)
%ID/g
40
30
20
10
0
4H
1D
2D
5D
7D
9D
时间
化合物 89
化合物 91
化合物 93

图A


肝脏(所有时间点)
%ID/g
15
10
5
0
4H
1D
2D
5D
7D
9D
时间
化合物 89
化合物 91
化合物 93

图B


肿瘤(所有时间点)
%ID/g
30
20
10
0
4H
1D
2D
5D
7D
9D
时间
化合物89
化合物91
化合物93

图C

图17

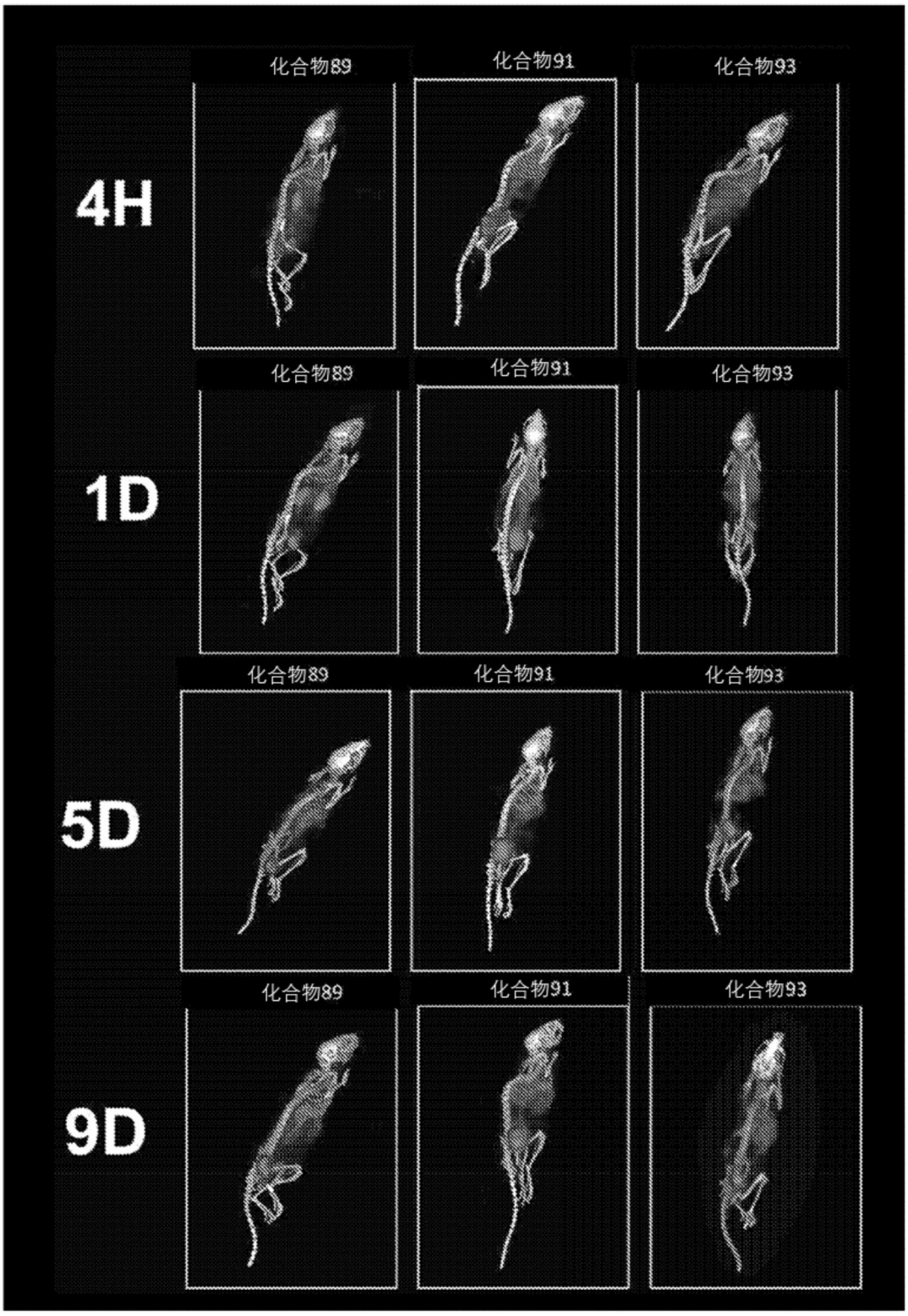

化合物89
化合物91
化合物93
4H
化合物89
化合物91
化合物93
1D
化合物89
化合物91
化合物93
5D
化合物89
化合物91
化合物93
9D

图18

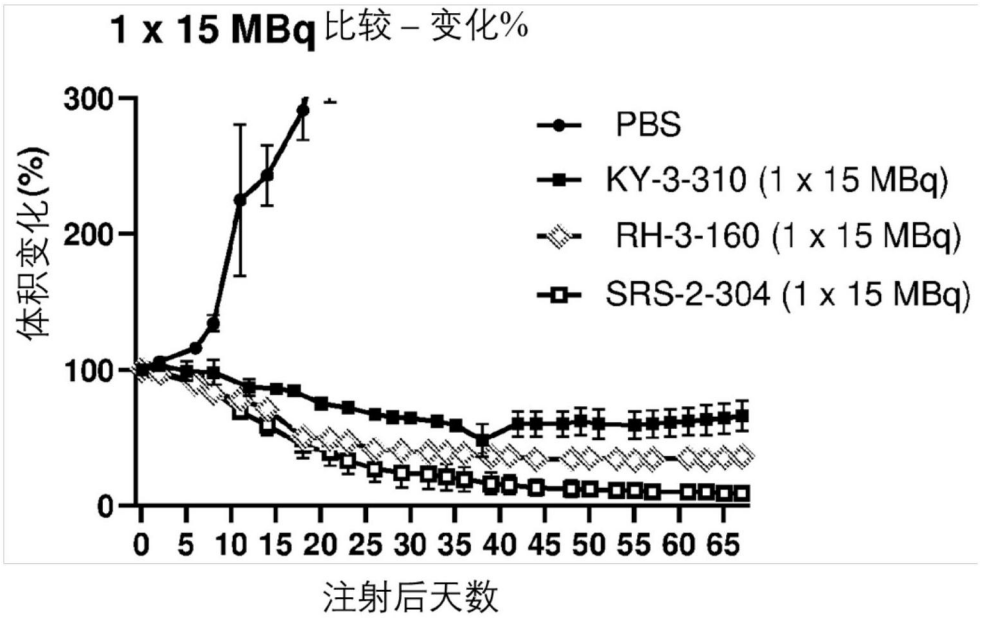

1 x 15 MBq 比较 – 变化%
体积变化(%)
300
200
100
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
注射后天数
PBS
KY-3-310 (1 x 15 MBq)
RH-3-160 (1 x 15 MBq)
SRS-2-304 (1 x 15 MBq)

图19

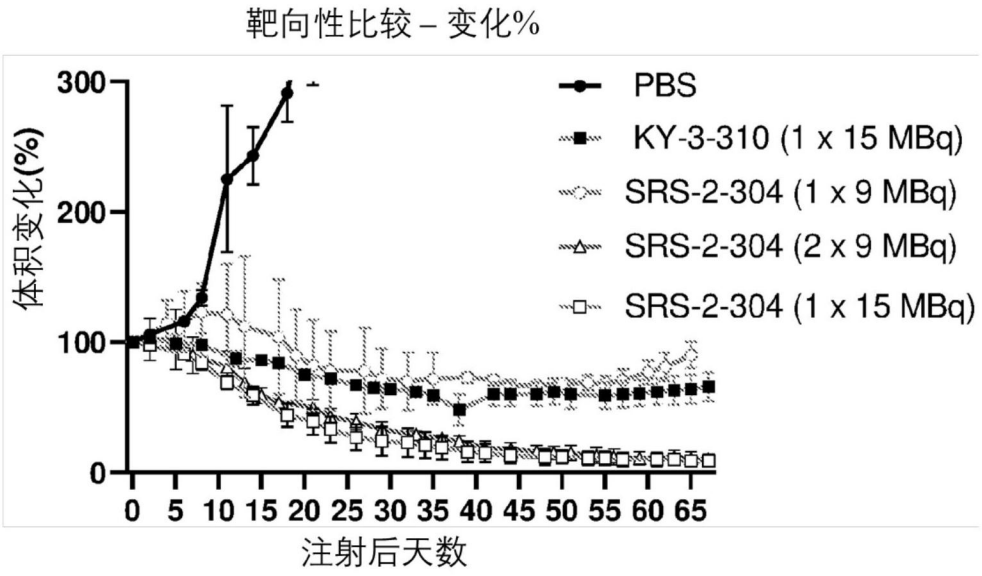

靶向性比较 – 变化%
体积变化(%)
300
200
100
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
注射后天数
PBS
KY-3-310 (1 x 15 MBq)
SRS-2-304 (1 x 9 MBq)
SRS-2-304 (2 x 9 MBq)
SRS-2-304 (1 x 15 MBq)

图20

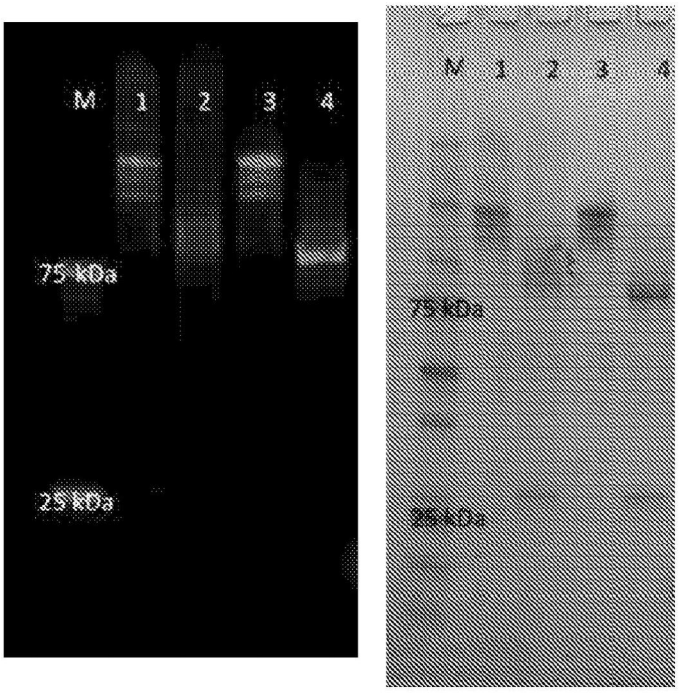

M 1 2 3 4
75 kDa
25 kDa
M 1 2 3 4
75 kDa
25 kDa

图21

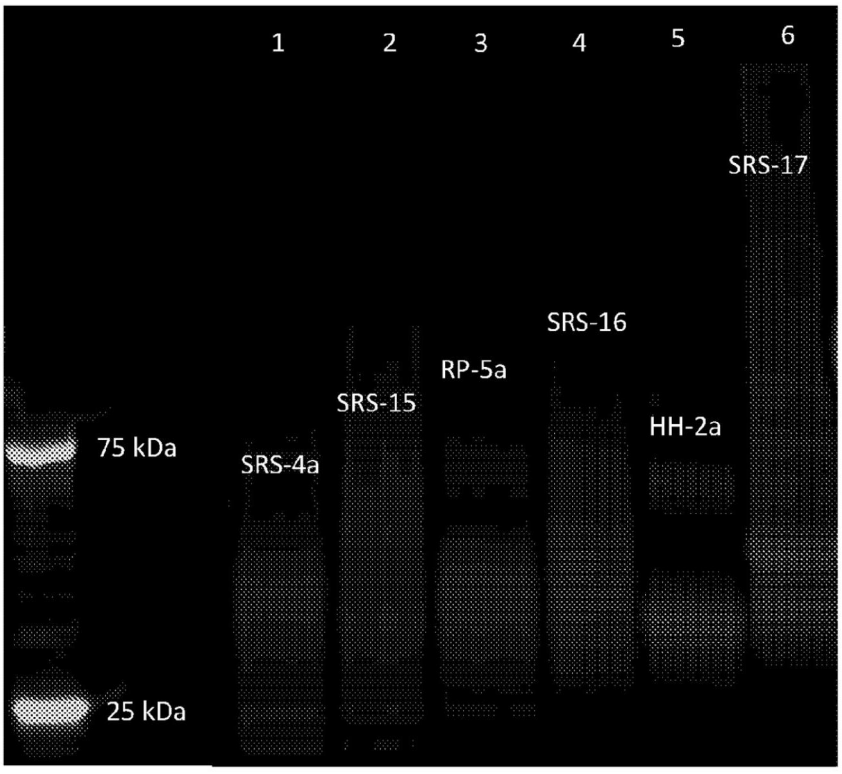

1 2 3 4 5 6
SRS-17
SRS-16
RP-5a
SRS-15
HH-2a
75 kDa
SRS-4a
25 kDa

图22

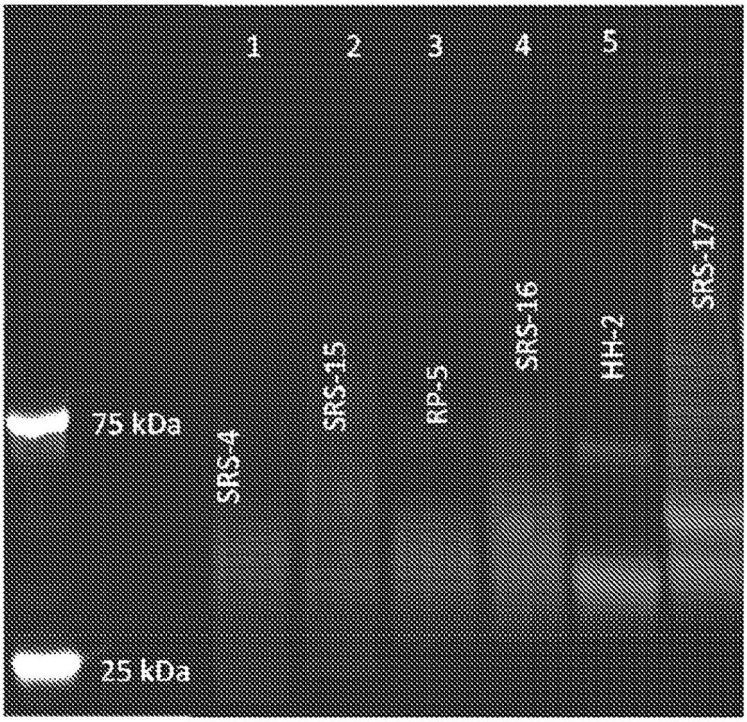

1
2
3
4
5
75 kDa
25 kDa
SRS-4
SRS-15
RP-5
SRS-16
HH-2
SRS-17

图23

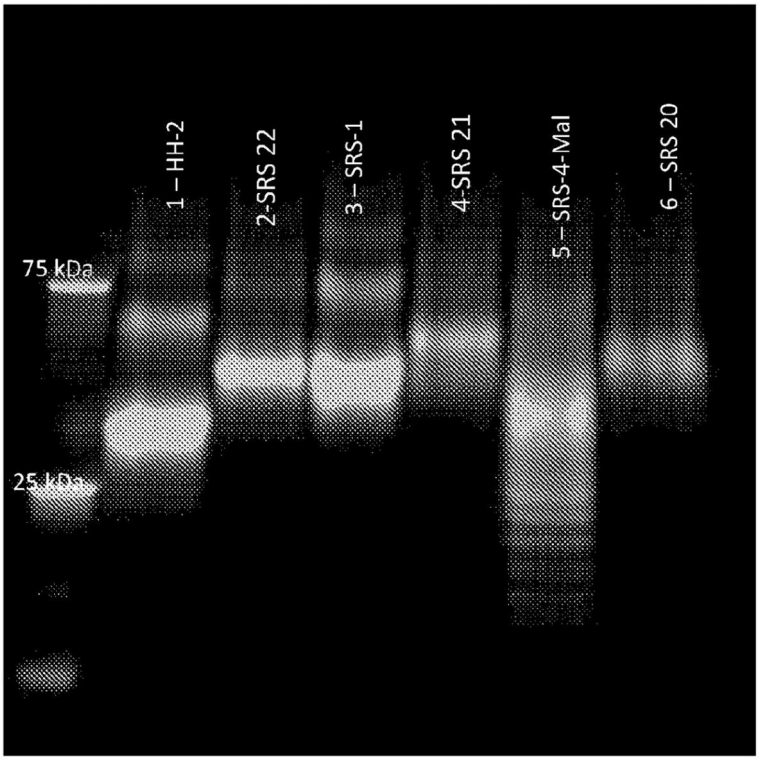

75 kDa
25 kDa
1 – HH-2
2-SRS 22
3 – SRS-1
4-SRS 21
5 – SRS-4-Mal
6 – SRS 20

图24