



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105979970 B

(45)授权公告日 2019.09.10

(21)申请号 201480067849.9

(22)申请日 2014.10.10

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105979970 A

(43)申请公布日 2016.09.28

(30)优先权数据

61/890,046 2013.10.11 US

61/975,455 2014.04.04 US

61/988,011 2014.05.02 US

62/010,972 2014.06.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.06.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/060170 2014.10.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/054659 EN 2015.04.16

(73)专利权人 梅尔莎纳医疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 A.V.于尔科夫茨基 尹茂

T.B.罗温格尔 J.D.托马斯

C.A.斯蒂芬森 V.R.古里贾拉

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 初明明 彭昶

(51)Int.Cl.

A61K 47/60(2017.01)

A61K 45/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

WO 2012171020 A1,2012.12.13,

US 2012289535 A1,2012.11.15,

EP 1667726 A2,2006.06.14,

Moorthy S S Palanki,et al.

“Development of novel linkers to
conjugate pharmacophores to a carrier
antibody”.《Bioorganic & Medicinal
Chemistry Letters》.2012,第22卷(第13期),

Yurkovetskiy A,et al. “Fully
degradable hydrophilic polyals for
protein modification”.

《BIOMACROMOLECULES》.2005,第6卷(第5期),

审查员 吴冲

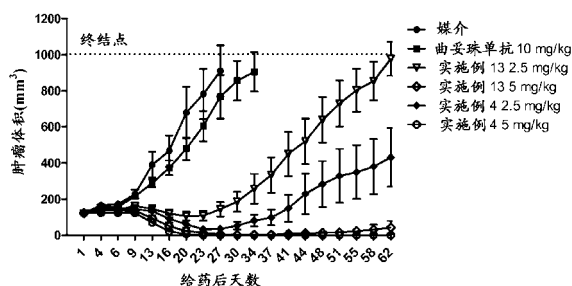
权利要求书6页 说明书180页 附图8页

(54)发明名称

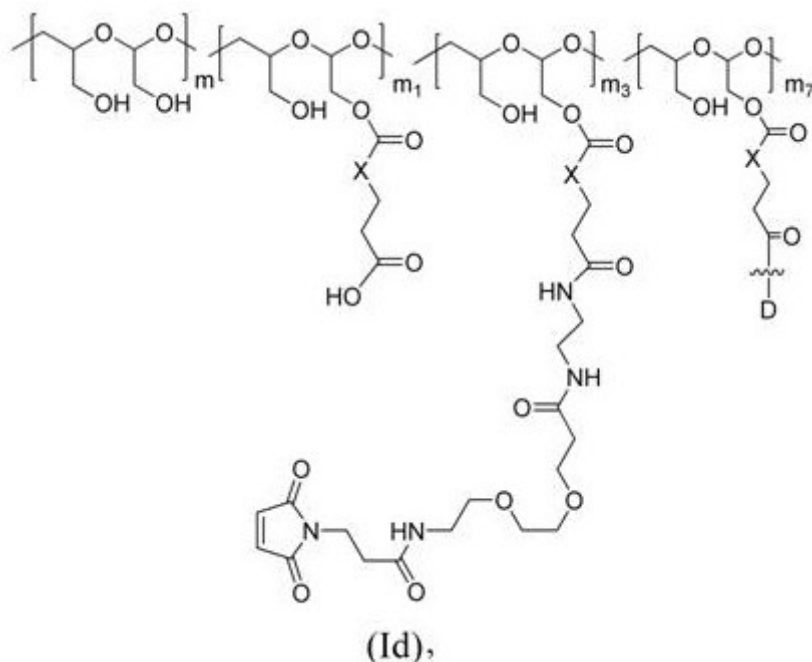
蛋白质-聚合物-药物共轭物

(57)摘要

本文描述了可用来与基于蛋白质的识别分子(PBRM)共轭以形成PBRM-聚合物-药物共轭物的聚合物支架。所述支架包括一个或多个末端马来酰亚胺基。本发明还公开了一种从所述支架制备的PBRM-聚合物-药物共轭物。本发明还描述了包含该共轭物的组合物,其制备方法,和采用该共轭物或其组合物来治疗各种病症的方法。



1.一种用于与基于蛋白质的识别分子(PBRM)共轭的式(Id)的聚合物支架:



其中：

所述支架包含具有分子量范围从2 kDa至40 kDa的聚(1-羟基甲基亚乙基羟基甲基-缩甲醛) (PHF)；

D的每次出现独立地为具有分子量 $\leq 5\text{kDa}$ 的治疗剂,且D和羰基之间的表示D与羰基直接或间接连接,

X是CH₂、O或NH:

m 为从1至300的整数,

m_1 为从 1 至 140 的整数,

m_7 为从1至40的整数,

m_3 为从1至18的整数,和

m, m_1, m_3 和 m_7 的总和的范围是从 15 至 300。

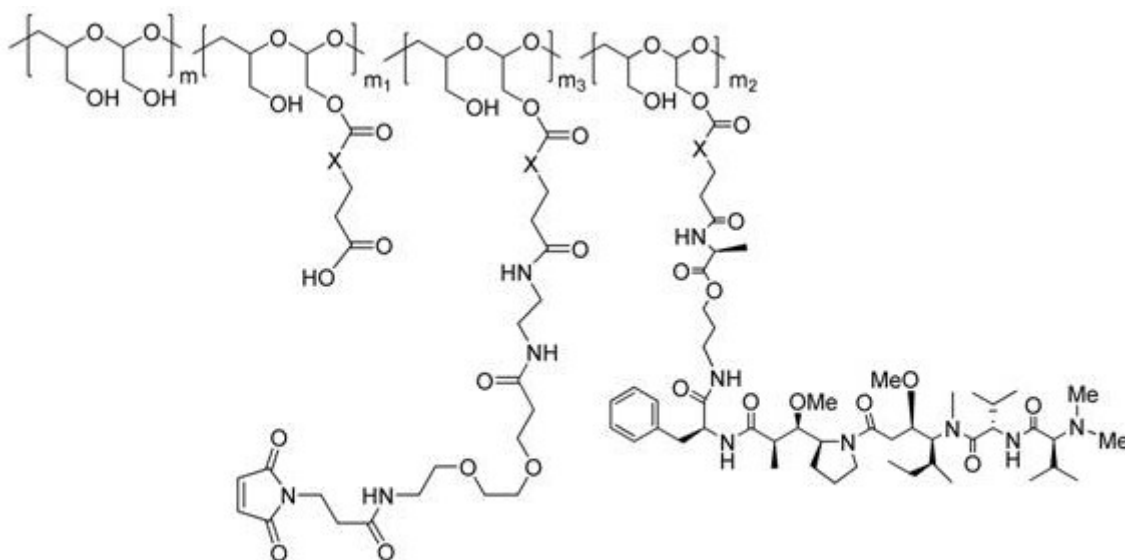
2. 权利要求1的支架, 其中PHF具有范围从2 kDa至20 kDa的分子量, m_7 为从1至20的整数, m_3 为从1至10的整数, m_1 为从1至70的整数和 m 、 m_1 、 m_3 和 m_7 的总和的范围是从15至150。

3. 权利要求1的支架, 其中PHF具有范围从3 kDa至15 kDa的分子量, m_7 为从2至15的整数, m_3 为从1至8的整数, m_1 为从2至50的整数和 m_1 、 m_3 和 m_7 的总和的范围是从20至110。

4. 权利要求1的支架,其中PHF具有范围从5 kDa至10 kDa的分子量,m₇为从3至10的整数,m₃为从1至5的整数,m₁为从5至35的整数和m₁、m₃和m₇的总和的范围是从40至75。

5. 权利要求1-4的任一项的支架,其中D的每次出现独立地选自奥瑞斯他汀化合物、拓扑异构酶抑制剂、卡奇霉素化合物、长春花化合物、土布立辛(tubulysin)化合物、倍癌霉素化合物、吡咯并苯并二氮杂䓬化合物、激酶抑制剂、KSP抑制剂、类美登素、DNA-结合药物、DNA烷基化药物或DNA嵌入药物、RNA聚合酶抑制剂和蛋白质合成抑制剂。

6. 权利要求1的支架,其具有式(Ia)



(Ia),

其中:

m_2 为从1至40的整数,

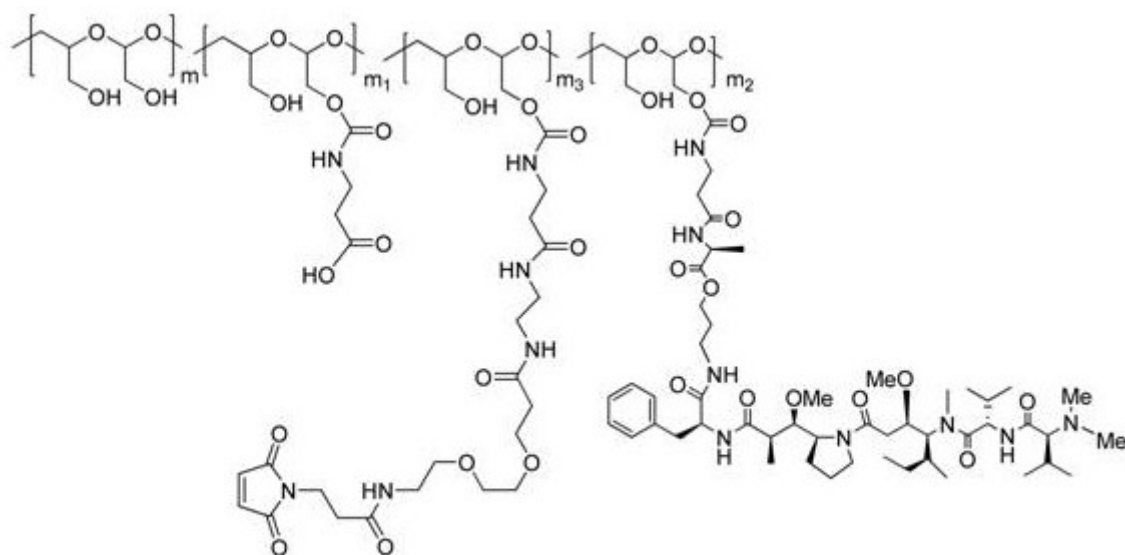
m 、 m_1 、 m_2 和 m_3 的总和的范围是从15至300。

7. 权利要求6的支架,其中PHF具有范围从2 kDa至20 kDa的分子量, m_2 为从1至20的整数, m_3 为从1至10的整数, m_1 为从1至70的整数和 m 、 m_1 、 m_2 和 m_3 的总和的范围是从15至150。

8. 权利要求6的支架,其中PHF具有范围从3 kDa至15 kDa的分子量, m_2 为从2至15的整数, m_3 为从1至8的整数, m_1 为从2至50的整数和 m 、 m_1 、 m_2 和 m_3 的总和的范围是从20至110。

9. 权利要求6的支架,其中PHF具有范围从5 kDa至10 kDa的分子量, m_2 为从3至10的整数, m_3 为从1至5的整数, m_1 为从5至35的整数和 m 、 m_1 、 m_2 和 m_3 的总和的范围是从40至75。

10. 权利要求6的支架,其具有式(A):



(A),

其中:

PHF具有范围从5 kDa至10 kDa的分子量;

m 为从1至75的整数，

m_1 为从5至35的整数，

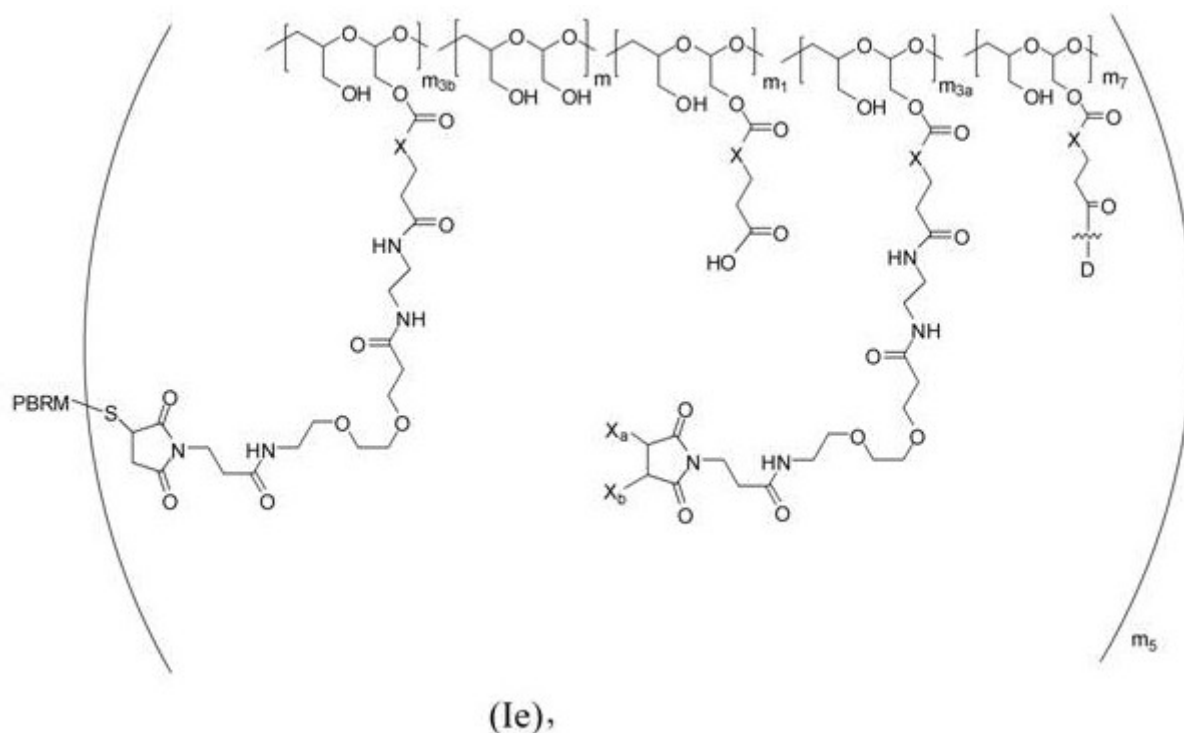
m_2 为从3至10的整数，

m_3 为从1至5的整数，和

m 、 m_1 、 m_2 和 m_3 的总和的范围是从40至75。

11. 权利要求1-4和6-10的任一项的支架，其还包含经由马来酰亚胺基与PHF共轭的PBRM。

12. 权利要求11的支架，当与PBRM共轭时具有式(Ie)：



其中：

X_a 和 X_b 之一是H，而另一个为马来酰亚胺基封闭部分，或 X_a 和 X_b 与它们连接的碳原子一起形成碳-碳双键；

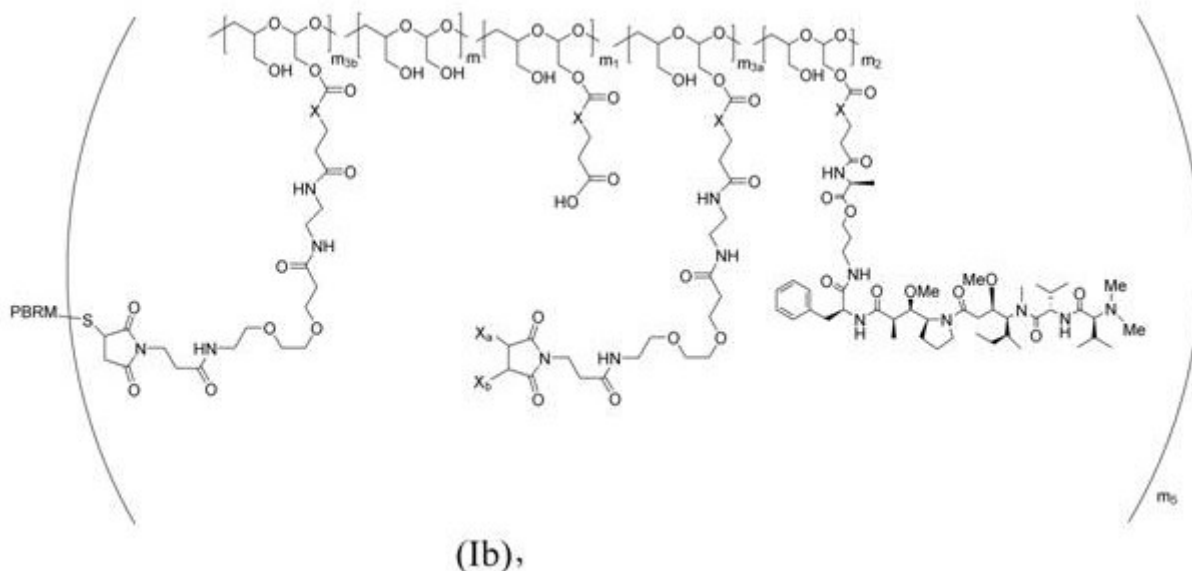
m_{3a} 为从0至17的整数，

m_{3b} 为从1至8的整数，其中 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和是 m_3 ，

m 、 m_1 、 m_7 、 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和的范围是从15至300，和

m_5 为从1至10的整数。

13. 权利要求11的支架，当与PBRM共轭时具有式(Ib)：



其中：

X_a 和 X_b 之一是H,而另一个为马来酰亚胺基封闭部分,或 X_a 和 X_b 与它们连接的碳原子一起形成碳-碳双键；

m_{3a} 为从0至17的整数，

m_{3b} 为从1至8的整数,其中 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和是 m_3 ，

m 、 m_1 、 m_2 、 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和的范围是从15至300,和

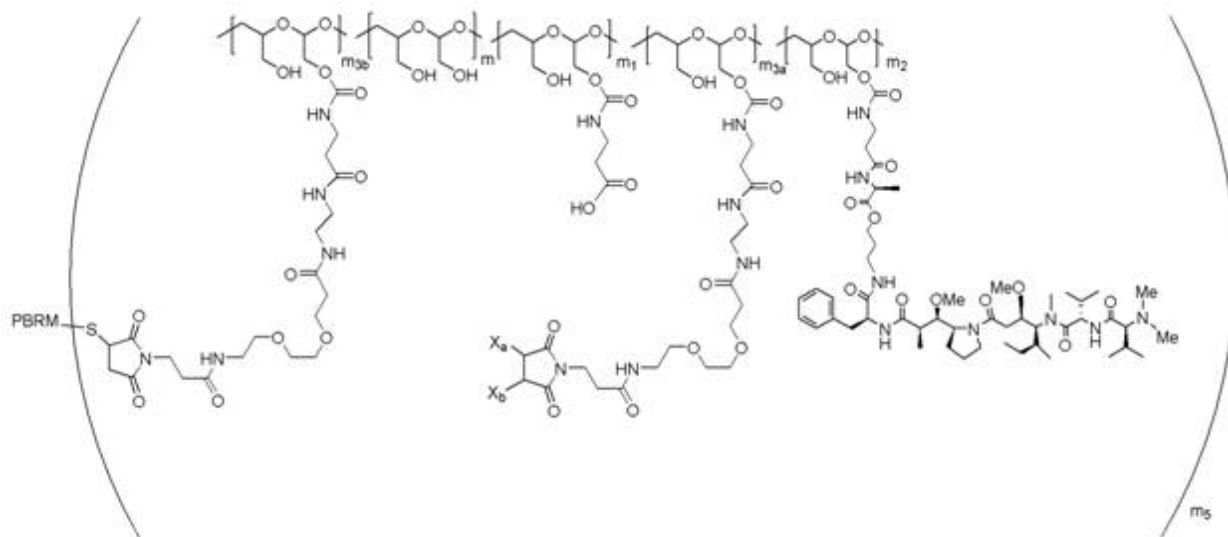
m_5 为从1至10的整数。

14. 权利要求13的支架,其中PHF具有范围从2 kDa至20 kDa的分子量, m 、 m_1 、 m_2 、 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和的范围是从15至150, m_1 为从1至70的整数, m_2 为从1至20的整数, m_{3a} 为从0至9的整数, m_{3b} 为从1至8的整数和 m_5 为从2至8的整数。

15. 权利要求13的支架,其中PHF具有范围从3 kDa至15 kDa的分子量, m 、 m_1 、 m_2 、 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和的范围是从20至110, m_1 为从2至50的整数, m_2 为从2至15的整数, m_{3a} 为从0至7的整数, m_{3b} 为从1至8的整数和 m_5 为从2至4的整数。

16. 权利要求13的支架,其中PHF具有范围从5 kDa至10 kDa的分子量, m 、 m_1 、 m_2 、 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和的范围是从40至75, m_1 为从5至35的整数, m_2 为从3至10的整数, m_{3a} 为从0至4的整数, m_{3b} 为从1至5的整数和 m_5 为从2至4的整数。

17. 权利要求13的支架,其具有式(B)：



(B),

其中:

PHF具有范围从5 kDa至10 kDa的分子量;

m 为从1至75的整数,

m_1 为从5至35的整数,

m_2 为从3至10的整数,

m_{3a} 为从0至4的整数,

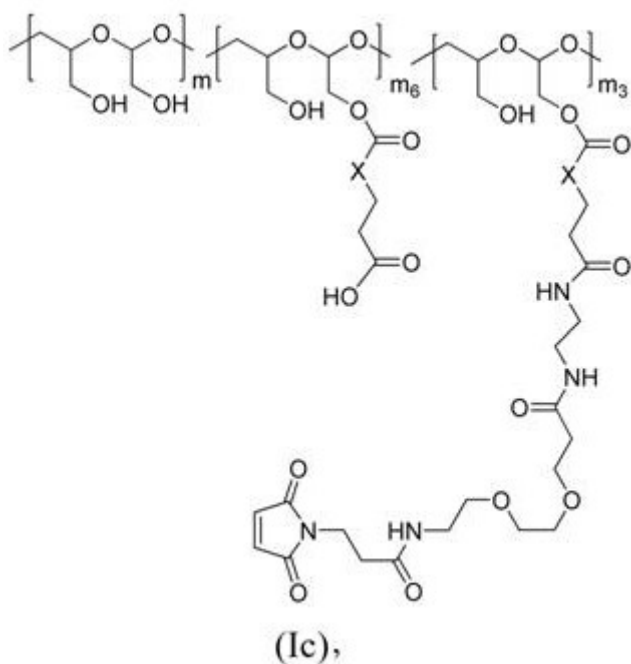
m_{3b} 为从1至5的整数,

m 、 m_1 、 m_2 、 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和的范围是从40至75,和

m_5 为从2至4的整数。

18. 权利要求1-4、6-10和12-17的任一项的支架,其中PBRM具有大于40 kDa的分子量。

19. 一种式(Ic)的聚合物支架:



(Ic),

其中：

所述支架包含具有分子量范围从2 kDa至40 kDa的PHF；

X是CH₂、O或NH；

m为从1至300的整数，

m₆为从2至180的整数，

m₃为从1至18的整数，和

m、m₆和m₃的总和的范围是从15至300。

20. 一种药物组合物，其包含权利要求11-18的任一项的支架和药学上可接受的载体。

21. 权利要求1-4、6-10、12-17和19的任一项的支架或权利要求20的药物组合物，其用于疗法。

22. 权利要求11的支架或权利要求20的药物组合物，其用于治疗癌症。

23. 权利要求22的支架或药物组合物，其中所述癌症选自肛门癌、星形细胞瘤、白血病、淋巴瘤、头部和颈部癌、肝癌、睾丸癌、子宫颈癌、肉瘤、血管瘤、间皮瘤、皮肤癌、骨髓瘤、口腔癌、直肠癌、喉癌、膀胱癌、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌、胰腺癌、肾癌和胃癌。

24. 权利要求22的支架或药物组合物，其中所述癌症选自食道癌、眼癌、咽癌和口部癌。

蛋白质-聚合物-药物共轭物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请依据35USC§119(e)请求享有下列申请的利益及优先权:美国专利申请号61/890,046,于2013年10月11日申请;61/975,455,于2014年4月4日申请;61/988,011,于2014年5月2日申请;和62/010,972,于2014年6月11日申请。这些申请的每一篇的内容以其整体通过引用结合到本文中。

[0003] 发明背景

[0004] 传统上,药物主要由口服分配的(作为固体丸剂及液体)或作为可注射剂分配的小分子组成。在过去的三十年间,制剂(即,控制药物递送的途径和/或速率且允许治疗剂递送至需要其的位置的组合物)已经变得日益普遍且复杂。虽然如此,有关新疗法及其施用机制的众多疑问和挑战仍有待解决。例如,由于许多药物在到达体内合意的靶点之前通常会遭到部分降解,或者在不同于该靶点的组织中累积,或者二者皆有,因此呈现出有限的或者降低的效力和治疗效果。

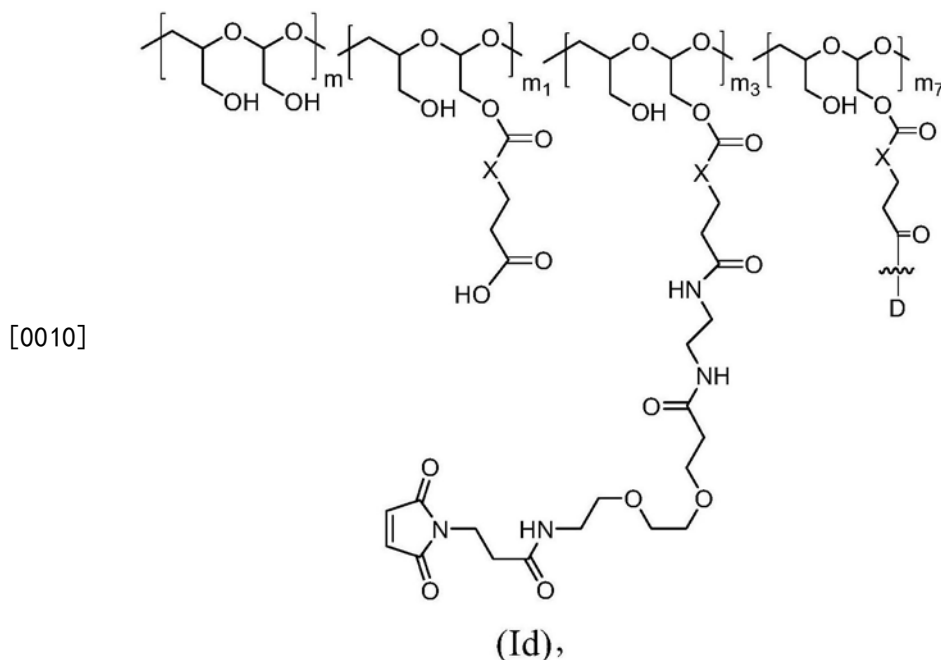
[0005] 因此,药物递送系统领域的课题之一在于通过利用生理学或化学机制(或者二者皆有)而能够稳定药物并且控制治疗剂的体内转移的系统将药物完整地递送至身体内的特定靶点区域。

[0006] 抗体-药物共轭物已经被开发成为靶点特异性的治疗剂。对抗各种癌细胞表面抗原的抗体已经与不同的细胞毒性剂共轭,所述细胞毒性剂抑制各种基本的细胞靶点如微管(类美登素、奥瑞斯他汀(auristatins)、紫杉烷:美国专利号5,208,020;5,416,064;6,333,410;6,441,163;6,340,701;6,372,738;6,436,931;6,596,757;和7,276,497);DNA(卡奇霉素、阿霉素、CC-1065类似物;美国专利号5,475,092;5,585,499;5,846,545;6,534,660;6,756,397;和6,630,579)。在癌症治疗的临床上,已经对含有其中一些细胞毒性药物的抗体共轭物进行了积极的研究(Ricart,A.D.,和Tolcher,A.W.,2007,Nature Clinical Practice,4,245-255;Krop et al.,2010,J.Clin.Oncol.,28,2698-2704)。然而,现有的抗体-药物共轭物已经呈现出一些限制。主要的限制在于其不能将足够浓度的药物递送至靶点位置,这归因于有限数目的靶点抗原以及癌症药物如甲氨蝶呤、柔红霉素、类美登素、紫杉烷,和长春新碱的相对温和的细胞毒性。实现显著的细胞毒性的解决手段之一是将大量的药物分子直接或间接连接至抗体。然而,像这样经过高度修饰的抗体通常显示出与靶点抗原的受损结合和来自血流的快速体内清除。因此,需要改善将足够浓度的药物递送至靶点以实现该药物的最大细胞毒性的能力。

[0007] 发明简述

[0008] 本发明涉及蛋白质-聚合物-药物共轭物,其是生物可降解的、生物相容性的并且呈现出高载药量(drug load)以及与靶点抗原的强结合。本发明还涉及聚合物支架,其用于与基于蛋白质的识别分子(PBRM)共轭,以便得到蛋白质-聚合物-药物共轭物。

[0009] 在另一方面,本发明涉及一种用于与基于蛋白质的识别分子(PBRM)共轭的式(Id)的聚合物支架:



[0011] 其中：

[0012] 所述支架包含具有分子量范围从约2kDa至约40kDa的聚(1-羟基甲基亚乙基羟基甲基-缩甲醛)(PHF)；

[0013] D的每次出现独立地为具有分子量 ≤ 5 kDa的治疗剂，且D和羰基之间的 $\text{---}\xi\text{---}$ 表示D与羰基直接或间接连接，

[0014] X是 CH_2 、O或NH；

[0015] m为从1至约300的整数，

[0016] m_1 为从1至约140的整数，

[0017] m_7 为从1至约40的整数，

[0018] m_3 为从1至约18的整数，和

[0019] m、 m_1 、 m_3 和 m_7 的总和的范围是从约15至约300。

[0020] 式(Id)的支架可包括一个或多个以下特征：

[0021] 当式(Id)中的PHF具有范围从约2kDa至约20kDa的分子量时， m_7 为从1至约20的整数， m_3 为从1至约10的整数， m_1 为从1至约70的整数和m、 m_1 、 m_3 和 m_7 的总和的范围是从约15至约150。

[0022] 当式(Id)中的PHF具有范围从约3kDa至约15kDa的分子量时， m_7 为从2至约15的整数， m_3 为从1至约8的整数， m_1 为从2至约50的整数和m、 m_1 、 m_3 和 m_7 的总和的范围是从约20至约110。

[0023] 当式(Id)中的PHF具有范围从约5kDa至约10kDa的分子量时， m_7 为从约3至约10的整数， m_3 为从1至约5的整数， m_1 为从约5至约35的整数和m、 m_1 、 m_3 和 m_7 的总和的范围是从约40至约75。

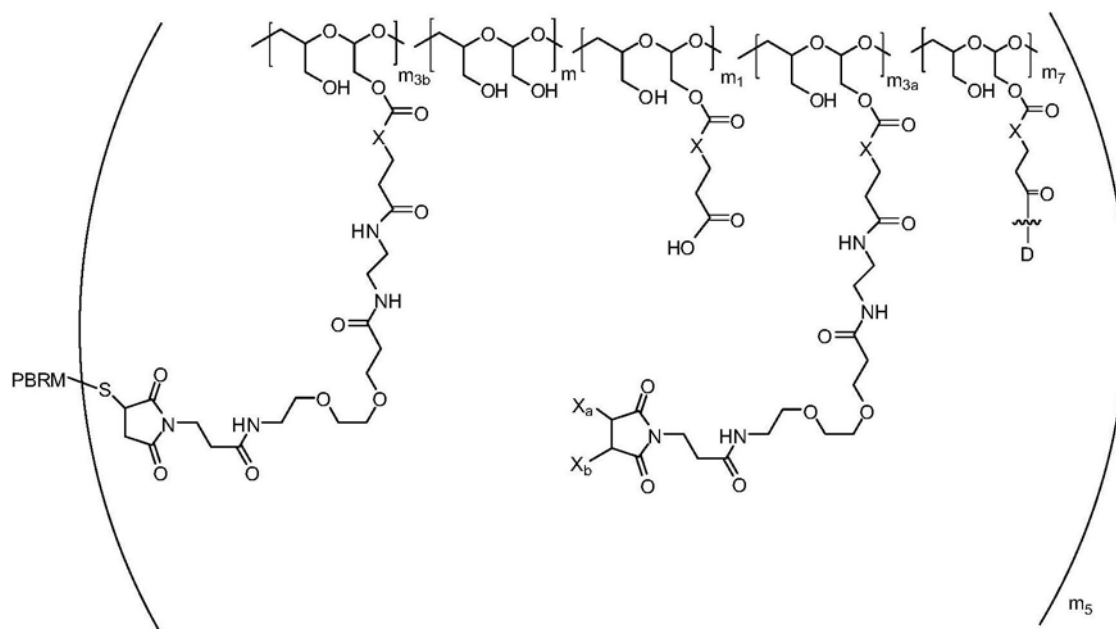
[0024] 式(Id)的“ m_3 ”单元中的马来酰亚胺基部分的每次出现还与PBRM的官能团形成共价键。

[0025] 在一个实施方案中， m_1 和 m_7 的总和为从2至约180的整数。

[0026] 式 (Id) 的支架可进一步包含经由含D支架的一个或多个马来酰亚胺基与含D支架共轭的PBRM,形成蛋白质-聚合物-药物共轭物。例如,式 (Id) 的支架还包括经由支架的两个或更多个马来酰亚胺基(如,至多5个)与含D支架共轭的一个PBRM。例如,一个PBRM连接于一个或多个式 (Id) 的含D聚合物支架。

[0027] 在某些实施方案中,聚合物药物共轭物 (Id) 当与PBRM共轭时具有式 (Ie) :

[0028]



(Ie),

[0029] 其中:

[0030] X_a 和 X_b 之一是H,而另一个为马来酰亚胺基封闭部分,或 X_a 和 X_b ,与它们连接的碳原子一起,形成碳-碳双键;

[0031] m_{3a} 为从0至约17的整数,

[0032] m_{3b} 为从1至约8的整数,其中 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和是 m_3 ,

[0033] m 、 m_1 、 m_7 、 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和的范围是从约15至约300,和

[0034] m_5 为从1至约10的整数。

[0035] 在式 (Id) 的蛋白质-聚合物-药物共轭物中,每个D可以是相同或不同的部分和每个PBRM可以是相同或不同的部分。

[0036] 在某些实施方案中,D和PBRM之间的比例可以是约30:1、29:1、28:1、27:1、26:1、25:1、24:1、23:1、22:1、21:1、20:1、19:1、18:1、17:1、16:1、15:1、14:1、13:1、12:1、11:1、10:1、9:1、8:1、7:1或6:1。

[0037] 在一些实施方案中,D和PBRM之间的比例可以是约20:1、19:1、18:1、17:1、16:1、15:1、14:1、13:1、12:1、11:1或10:1。

[0038] 在其它实施方案中,D和PBRM之间的比例可以是约18:1、17:1、16:1、15:1、14:1、13:1或12:1。

[0039] 在某些实施方案中,PHF和PBRM之间的比例可以是约10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1,或2:1。

[0040] 在一些实施方案中,PHF和PBRM之间的比例可以是约6:1、5:1、4:1、3:1,或2:1。

[0041] 在其它实施方案中,PHF和PBRM之间的比例可以是约4:1,3:1,或2:1。

[0042] 在一个实施方案中,D是a) 奥瑞斯他汀化合物;(b) 卡奇霉素化合物;(c) 倍癌霉素(Duocarmycins)化合物;(d) 拓扑异构酶抑制剂,(e) 吡咯并苯并二氮杂萘化合物;(f) 长春花化合物;(g) 蛋白质合成抑制剂;(h) RNA聚合酶抑制剂;(i) 微管蛋白结合化合物;或其类似物。

[0043] 在某些实施方案中,D是a) 奥瑞斯他汀化合物;(b) 卡奇霉素化合物;(c) 倍癌霉素化合物;(d) 喜树碱化合物,(e) 吡咯并苯并二氮杂萘化合物;(f) 长春花化合物;或其类似物。

[0044] 在一个实施方案中,奥瑞斯他汀化合物是奥瑞斯他汀、多拉司他汀、单甲基奥瑞斯他汀E(MMAE)、单甲基奥瑞斯他汀F(MMAF)、奥瑞斯他汀F羟基丙基酰胺(AF HPA),或奥瑞斯他汀F苯二胺(AFP)。

[0045] 在一个实施方案中,倍癌霉素或其类似物是倍癌霉素A、倍癌霉素B1、倍癌霉素B2、倍癌霉素C1、倍癌霉素C2、倍癌霉素D、倍癌霉素SA、CC-1065、阿多来新(adozelesin)、比折来新(bizelesin),或卡折来新。

[0046] 在一个实施方案中,喜树碱化合物是喜树碱、CPT-11(伊立替康)、SN-38,或托泊替康。

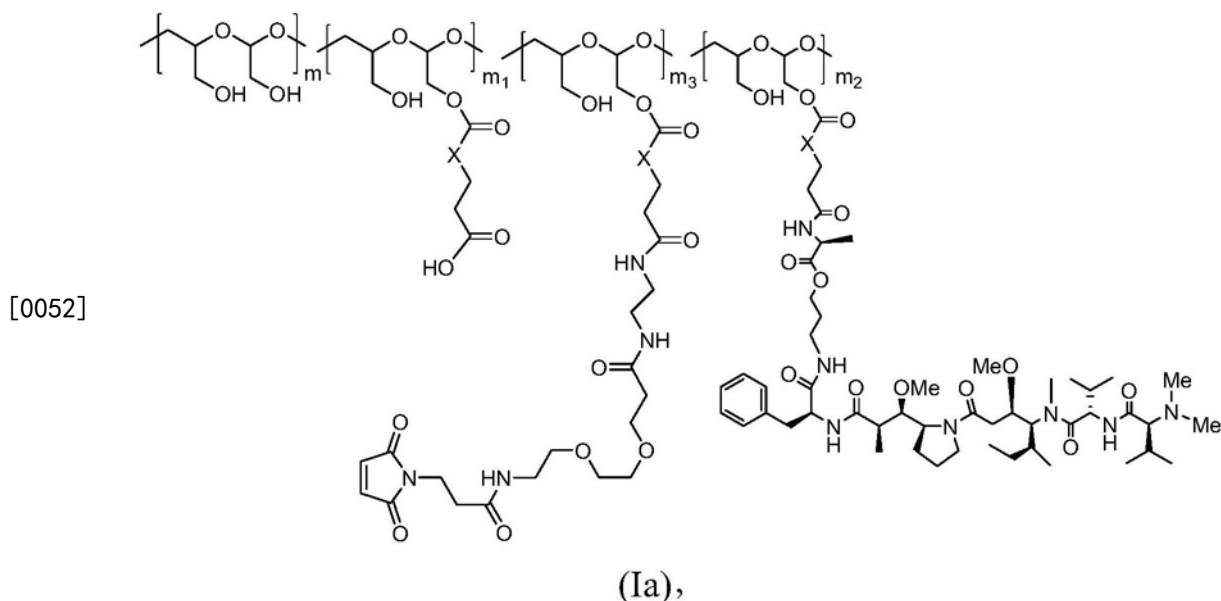
[0047] 在一个实施方案中,吡咯并苯并二氮杂萘化合物为吡咯并苯并二氮杂萘单体、对称的吡咯并苯并二氮杂萘二聚体或不对称的吡咯并苯并二氮杂萘二聚体。

[0048] 在一个实施方案中,D是AF HPA和AF HPA和PBRM之间的比例可以是约30:1、29:1、28:1、27:1、26:1、25:1、24:1、23:1、22:1、21:1、20:1、19:1、18:1、17:1、16:1、15:1、14:1、13:1、12:1、11:1、10:1、9:1、8:1、7:1或6:1。

[0049] 在另一个实施方案中,AF HPA和PBRM之间的比例可以是约20:1、19:1、18:1、17:1、16:1、15:1、14:1、13:1、12:1、11:1或10:1。

[0050] 在还有的其它实施方案中,AF HPA和PBRM之间的比例可以是约18:1、17:1、16:1、15:1、14:1、13:1或12:1。

[0051] 在另一方面,本发明涉及用来与基于蛋白质的识别分子(PBRM)共轭的式(Ia)的聚合物支架:



[0053] 其中：

[0054] 所述支架包含具有分子量范围从约2kDa至约40kDa的聚(1-羟基甲基亚乙基羟基甲基-缩甲醛)(PHF)；

[0055] X是CH₂、O或NH；

[0056] m为从1至约300的整数，

[0057] m₁为从1至约140的整数，

[0058] m₂为从1至约40的整数，

[0059] m₃为从1至约18的整数，和

[0060] m、m₁、m₂和m₃的总和的范围是从约15至约300。

[0061] 式(Ia)的支架可包括一个或多个以下特征：

[0062] 当式(Ia)中的PHF具有范围从约2kDa至约20kDa的分子量时，m₂为从1至约20的整数，m₃为从1至约10的整数，m₁为从1至约70的整数和m、m₁、m₂和m₃的总和的范围是从约15至约150。

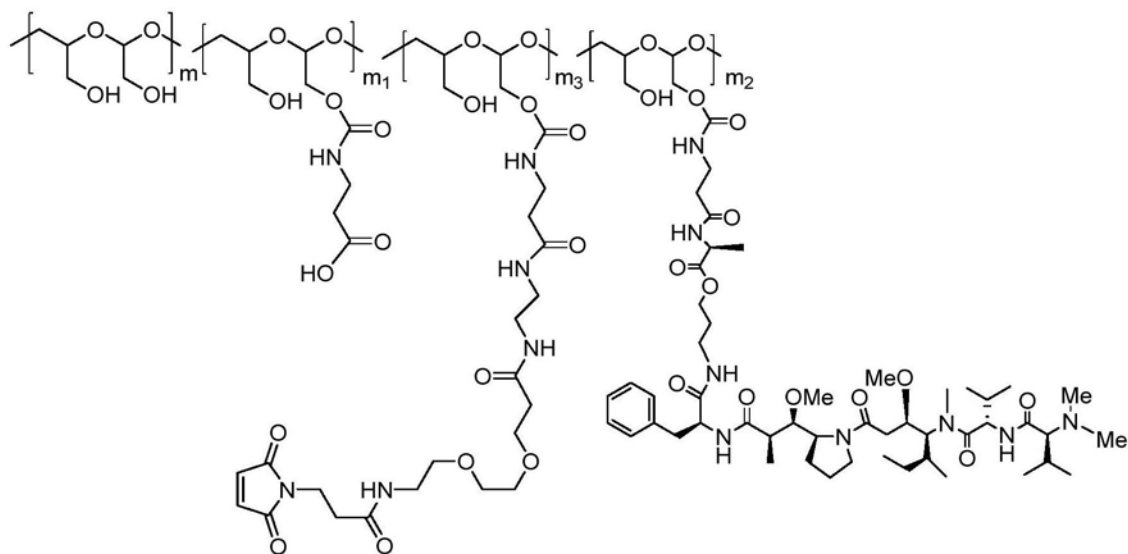
[0063] 当式(Ia)中的PHF具有范围从约3kDa至约15kDa的分子量时，m₂为从2至约15的整数，m₃为从1至约8的整数，m₁为从2至约50的整数和m、m₁、m₂和m₃的总和的范围是从约20至约110。

[0064] 当式(Ia)中的PHF具有范围从约5kDa至约10kDa的分子量时，m₂为从约3至约10的整数，m₃为从1至约5的整数，m₁为从约5至约35的整数和m、m₁、m₂和m₃的总和的范围是从约40至约75。

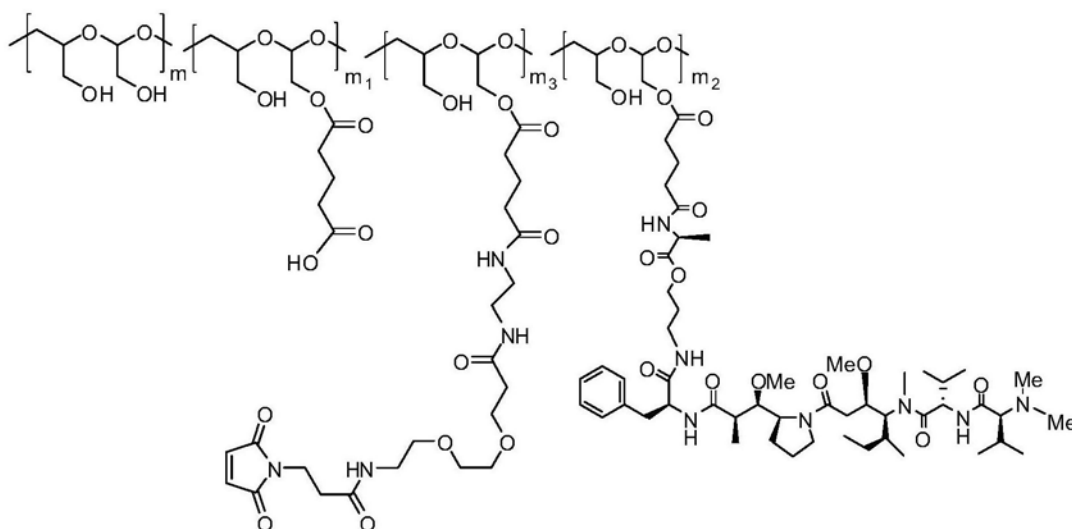
[0065] 式(Ia)的“m₃”单元中的马来酰亚胺基部分的每次出现还与PBRM的官能团形成共价键。

[0066] 在一个实施方案中，式(Ia)的支架具有式(A)或(A1)：

[0067]



(A), 或



(A1)

[0069] 其中：

[0070] PHF具有范围从约5kDa至约10kDa的分子量；

[0071] m为从1至约75的整数，

[0072] m₁为从约5至约35的整数，[0073] m₂为从约3至约10的整数，[0074] m₃为从1至约5的整数，和[0075] m、m₁、m₂和m₃的总和的范围是从40至约75。[0076] 例如，式 (A) 或 (A1) 的“m₃”单元中的马来酰亚胺基部分的每次出现还与PBRM的官能团形成共价键。

[0077] 式 (Ia) 的支架还包括经由聚合物支架的一个或多个马来酰亚胺基与支架共轭的PBRM。例如，式 (Ia) 的支架还包括经由支架的两个或更多个 (如，至多5个) 马来酰亚胺基与支架共轭的一个PBRM。

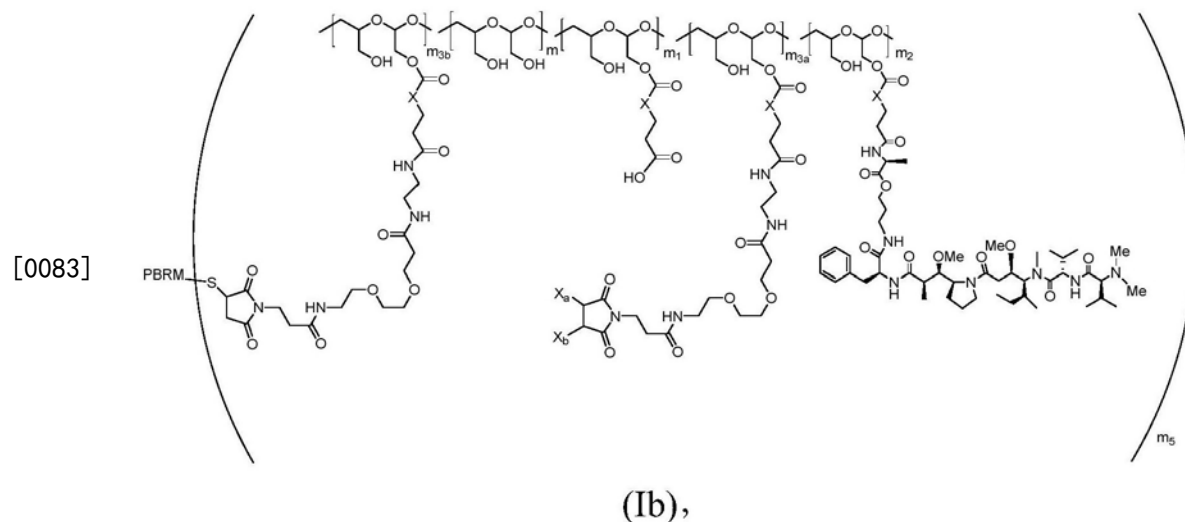
[0078] PBRM具有约40kDa或更大(如,60kDa或更大;80kDa或更大;100kDa或更大;120kDa或更大;140kDa或更大;160kDa或更大;180kDa或更大;或200kDa或更大,或约40-200kDa、40-180kDa、40-140kDa、60-200kDa、60-180kDa、60-140kDa、80-200kDa、80-180kDa、80-140kDa、100-200kDa、100-180kDa,或100-140kDa)的分子量。

[0079] PBRM具有约40kDa或更大(如,60kDa或更大;80kDa或更大;100kDa或更大;120kDa或更大;140kDa或更大;160kDa或更大;180kDa或更大;或200kDa或更大,或约40-200kDa、40-180kDa、40-140kDa、60-200kDa、60-180kDa、60-140kDa、80-200kDa、80-180kDa、80-140kDa、100-200kDa、100-180kDa,或100-140kDa)的分子量并具有巯基(即,-SH或硫氢基)基团。

[0080] PBRM经由连接于载药的聚合物共轭物的马来酰亚胺基的PBRM的巯基,见例如,本文公开的任何结构式,例如,式(Ib)、(B)、(B1)或(Ie)的圆括号内“ m_{3b} ”单元中的硫原子(-S-),与载药的聚合物共轭物共轭。在实施方案中,硫原子是PBRM的部分并来自PBRM的巯基(硫氢基)基团,其与马来酰亚胺基反应,形成与载药的聚合物共轭物的连接(硫化物键)。

[0081] 一个PBRM连接于一个或多个载药的式(Ia)的聚合物支架。

[0082] 包含PBRM的支架具有式(Ib)：



[0084] 其中：

[0085] X_a 和 X_b 之一是H,而另一个为马来酰亚胺基封闭部分,或 X_a 和 X_b ,与它们连接的碳原子一起,形成碳-碳双键;

[0086] m_{3a} 为从0至约17的整数,

[0087] m_{3b} 为从1至约8的整数,其中 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和是 m_3 (如,从1至约18的整数),

[0088] m 、 m_1 、 m_2 、 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和的范围是从约15至约300,和

[0089] m_5 为从1至约10的整数。

[0090] 式(Ib)的支架可包括一个或多个以下特征：

[0091] PBRM具有约40kDa或更大(如,60kDa或更大;80kDa或更大;100kDa或更大;120kDa或更大;140kDa或更大;160kDa或更大;180kDa或更大;或200kDa或更大,或约40-200kDa、40-180kDa、40-140kDa、60-200kDa、60-180kDa、60-140kDa、80-200kDa、80-180kDa、80-140kDa、100-200kDa、100-180kDa,或100-140kDa)的分子量。

[0092] PBRM具有巯基(即,-SH或硫氢基)基团。

[0093] PHF和PBRM之间形成的共价键的总和(如,硫化物键)(或连接点的总和)是10或更少。

[0094] 当式(Ib)中的PHF具有范围从约2kDa至约20kDa的分子量时, m 、 m_1 、 m_2 、 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和的范围是从约15至约150, m_1 为从1至约70的整数, m_2 为从1至约20的整数, m_{3a} 为从0至约9的整数, m_{3b} 为从1至约8的整数和 m_5 为从2至约8的整数。

[0095] 当式(Ib)中的PHF具有范围从约3kDa至约15kDa的分子量时, m 、 m_1 、 m_2 、 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和的范围是从约20至约110, m_1 为从2至约50的整数, m_2 为从2至约15的整数, m_{3a} 为从0至约7的整数, m_{3b} 为从1至约8的整数和 m_5 为从2至约4的整数。

[0096] 当式(Ib)中的PHF具有范围从约5kDa至约10kDa的分子量时, m 、 m_1 、 m_2 、 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和的范围是从约40至约75, m_1 为从约5至约35的整数, m_2 为从约3至约10的整数, m_{3a} 为从0至约4的整数, m_{3b} 为从1至约5的整数和 m_5 为从2至约4的整数。

[0097] 在某些实施方案中,奥瑞斯他汀F羟基丙基酰胺(“AF HPA”)和PBRM之间的比例可以是约30:1、29:1、28:1、27:1、26:1、25:1、24:1、23:1、22:1、21:1、20:1、19:1、18:1、17:1、16:1、15:1、14:1、13:1、12:1、11:1、10:1、9:1、8:1、7:1或6:1。

[0098] 在一些实施方案中,AF HPA和PBRM之间的比例可以是约20:1、19:1、18:1、17:1、16:1、15:1、14:1、13:1、12:1、11:1或10:1。

[0099] 在其它实施方案中,AF HPA和PBRM之间的比例可以是约18:1、17:1、16:1、15:1、14:1、13:1或12:1。

[0100] 在某些实施方案中,PHF和PBRM之间的比例可以是约10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1,或2:1。

[0101] 在一些实施方案中,PHF和PBRM之间的比例可以是约6:1、5:1、4:1、3:1,或2:1。

[0102] 在其它实施方案中,PHF和PBRM之间的比例可以是约4:1、3:1,或2:1。

[0103] 马来酰亚胺基封闭部分(如, X_a 或 X_b)是可在马来酰亚胺基与式(II)的含硫氢基化合物反应时,共价连接于两个烯烃碳原子之一的部分:

[0104] $R_{90}-(CH_2)_d-SH$ (II)

[0105] 其中:

[0106] R_{90} 是 NHR_{91} 、 OH 、 $COOR_{93}$ 、 $CH(NHR_{91})COOR_{93}$ 或取代的苯基;

[0107] R_{93} 是氢或 C_{1-4} 烷基;

[0108] R_{91} 是氢、 CH_3 或 CH_3CO 和

[0109] d 为从1至3的整数。

[0110] 在一个实施方案中,式(II)的马来酰亚胺基封闭化合物可以是半胱氨酸、N-乙酰基半胱氨酸、半胱氨酸甲基酯、N-甲基半胱氨酸、2-巯基乙醇、3-巯基丙酸、2-巯基乙酸、巯基甲醇(即, $HOCH_2SH$)、其中苯基被一个或多个亲水性取代基取代的苄基硫醇,或3-氨基丙烷-1-硫醇。苯基上的一个或多个亲水性取代基包含 OH 、 SH 、甲氧基、乙氧基、 $COOH$ 、 CHO 、 COC_{1-4} 烷基、 NH_2 、 F 、氰基、 SO_3H 、 PO_3H 等。

[0111] 在另一方面,马来酰亚胺基封闭基团是 $-S-(CH_2)_d-R_{90}$,其中,

[0112] R_{90} 是 OH 、 $COOH$,或 $CH(NHR_{91})COOR_{93}$;

[0113] R_{93} 是氢或 CH_3 ;

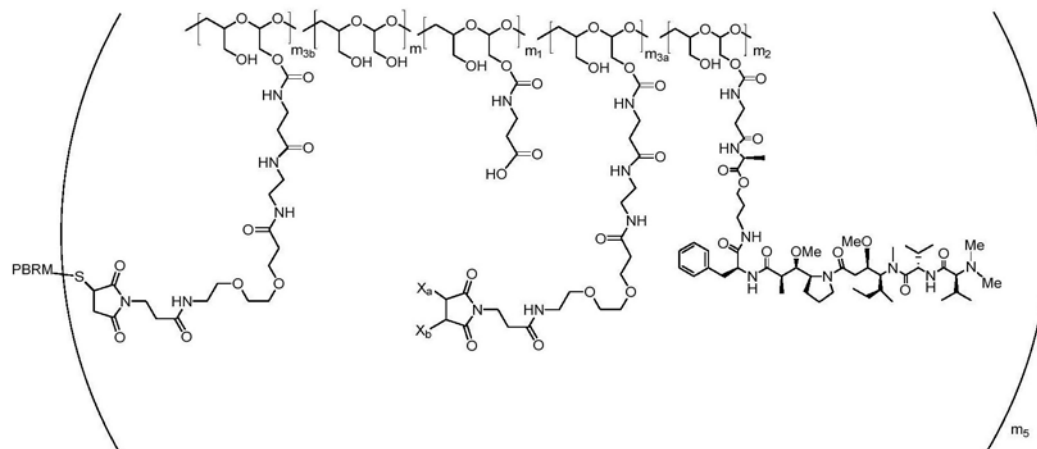
[0114] R_{91} 是氢或 CH_3CO ;和

[0115] d是1或2。

[0116] 在另一个实施方案中,马来酰亚胺基封闭基团是 $-S-CH_2-CH(NH_2)COOH$ 。

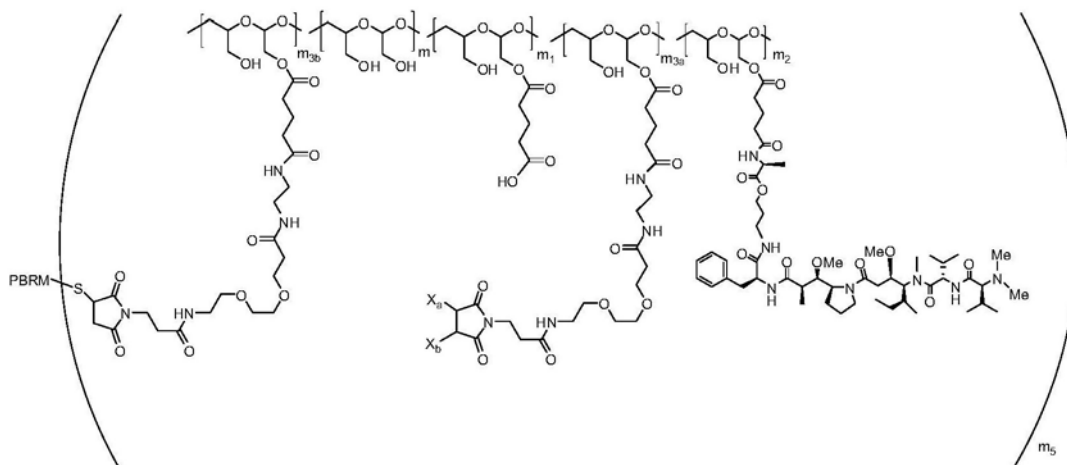
[0117] 在一些实施方案中,马来酰亚胺基封闭基团是水溶性的。

[0118] 式(Ib)的支架具有式(B)或(B1):



(B), 或

[0119]



(B1),

[0120] 其中:

[0121] PHF具有范围从5kDa至10kDa的分子量;

[0122] m为从1至75的整数,

[0123] m₁为从约5至约35的整数,

[0124] m₂为从约3至约10的整数,

[0125] m_{3a}为从0至约4的整数,

[0126] m_{3b}为从1至约5的整数,

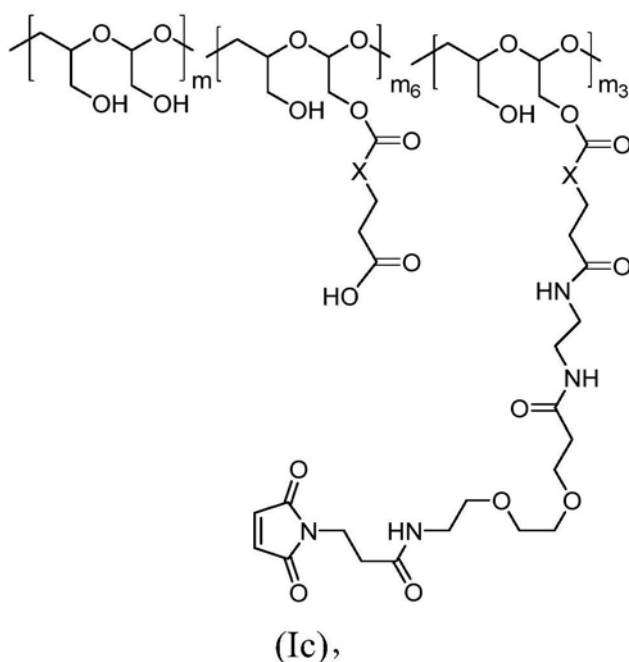
[0127] m、m₁、m₂、m_{3a}和m_{3b}的总和的范围是从约40至约75,和

[0128] m₅为从2至约4的整数。

[0129] 在某些实施方案中,在式(B)或(B1)中,连接点的总和是10或更少。

[0130] 本发明也提供式(Ic)的聚合物支架:

[0131]



[0132] 其中：

[0133] 所述支架包含具有分子量范围从约2kDa至约40kDa的PHF；

[0134] X是CH₂、O或NH；

[0135] m为从1至约300的整数，

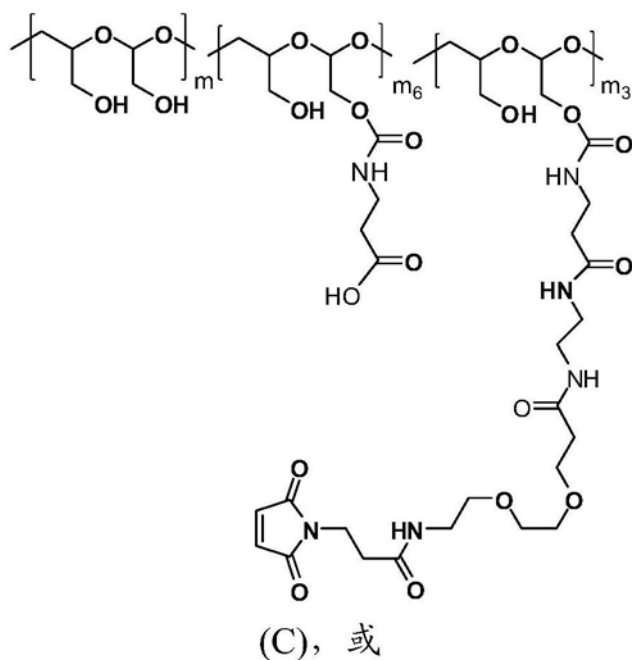
[0136] m₆为从2至180的整数，[0137] m₃为从1至约18的整数，和[0138] m、m₆和m₃的总和的范围是从约15至约300。

[0139] 式(Ic)的支架可包括一个或多个以下特征：

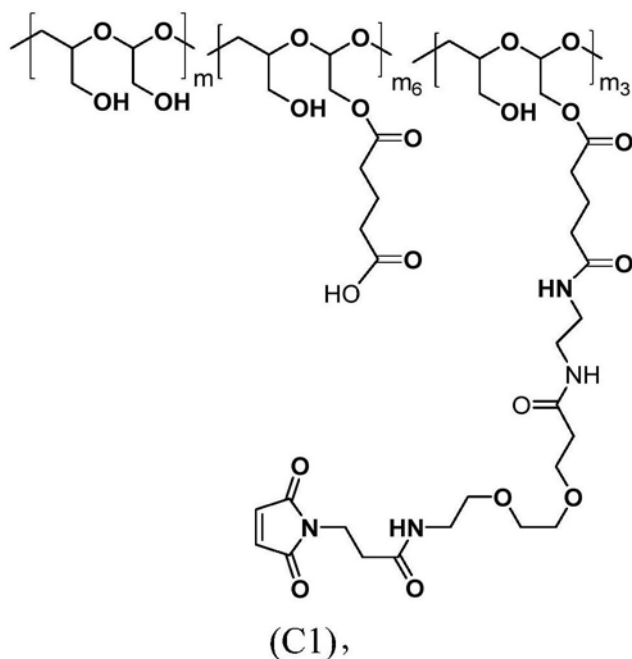
[0140] 当式(Ic)的PHF具有范围从约2kDa至约20kDa的分子量时，m、m₆和m₃的总和的范围是从约15至约150，m₆为从2至约90的整数，和m₃为从1至约10的整数。[0141] 当式(Ic)的PHF具有范围从约3kDa至约15kDa的分子量时，m、m₆和m₃的总和的范围是从约20至约110，m₆为从约4至约65的整数，和m₃为从1至约8的整数。[0142] 当式(Ic)的PHF具有范围从约5kDa至约10kDa的分子量时，m、m₆和m₃的总和的范围是从约40至约75，m₆为从约8至约45的整数，和m₃为从1至约5的整数。[0143] 式(Ic)的“m₃”单元中每次出现的马来酰亚胺基部分还与PBRM的官能团形成共价键。

[0144] 式(Ic)的支架具有式(C)或(C1)：

[0145]



[0146]



[0147] 其中：

[0148] PHF具有范围从约5kDa至约10kDa的分子量；

[0149] m为从1至约75的整数，

[0150] m₆为从约8至约45的整数，[0151] m₃为从1至约5的整数，和[0152] m、m₆和m₃的总和的范围是从约40至约75。[0153] 在式 (C) 或 (C1) 的“m₃”单元中每次出现的马来酰亚胺基部分还与PBRM的官能团形成共价键。

[0154] 式 (Ic) 的支架可还包括连接于PHF的一个或多个药物分子 (“D”)。

[0155] 在一个实施方案中，式 (Ic) 的含D支架具有式 (Id)。

[0156] 在本文公开的结构式,例如式(Ia)、(Ib,) (Ic)、(Id)、(Ie)、(A)、(A1)、(B)、(B1)、(C)、(C1)或(E)中,聚缩醛单元之间的断开或间隔表示所述单元能够以任何顺序相互连接。此外,为了简化说明的目的,在本文公开的某些结构式(如,表D中的那些)中,括号内的结构,即聚缩醛单体单元,不附有重复单元的数目(如, m_1 、 m_2 、 m_3 等),并且不应视为每个仅具有一个重复单元。

[0157] PBRM的实例包括但不限于,全长抗体例如IgG和IgM,抗体片段例如Fabs、scFv、scFvFc、camelids、Fab2等,小蛋白质,和肽。

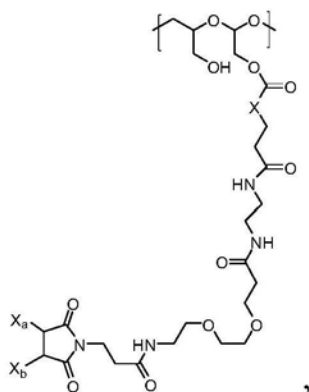
[0158] 在一个实施方案中,PBRM为全长抗体或人源化抗-5T4scFvFc抗体。例如,PBRM为包含靶向人癌胚蛋白5T4的免疫球蛋白或其功能片段的配体(LG)。

[0159] 在进一步的实施方案中,提供用于抗-肿瘤疗法的治疗药物和靶向共轭物。治疗药物和靶向共轭物包含

[0160] (a) 包含靶向人癌胚蛋白5T4的免疫球蛋白或其功能片段的配体(LG),具有结合于(b)的聚合物支架的 m_5 的配体(如,其在一些实施方案中具有约40kDa或更大的分子量),其中 m_5 是1-约10;和

[0161] (b) 包含具有分子量范围从约2kDa至约40kDa的聚(1-羟基甲基亚乙基羟基甲基-缩甲醛)(PHF)的聚合物支架,其中聚合物支架包含随机排列的如下定义的单体单元 m 、 m_1 、 m_2 、 m_{3a} 和 m_{3b} :

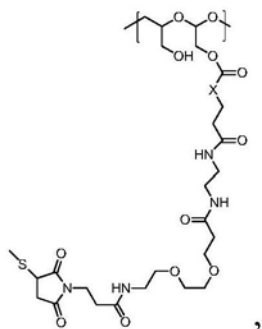
[0162] (i) m_{3a} :



其中 m_{3a} 为不存在,或1至约17个单体 m_{3a} 单元存在于

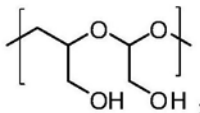
聚合物支架中,和在每个单元中, X_a 和 X_b 独立地选自(A)一个是H,而另一个为马来酰亚胺基封闭部分,或(B) X_a 和 X_b ,与它们连接的碳原子一起,形成碳-碳双键;

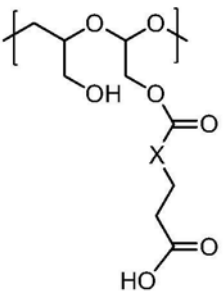
[0163] (ii) m_{3b} :

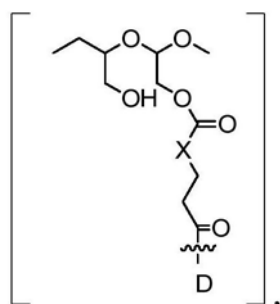


其中硫化物键(-S-)形成对LG的连接点,和其中1至约

8个单体 m_{3b} 单元存在于聚合物支架中,其中 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和是1-18,和其中硫原子是配体(LG)的部分,

[0164] (iii) m :  其中1至约300个单体 m 单元存在于聚合物支架中;

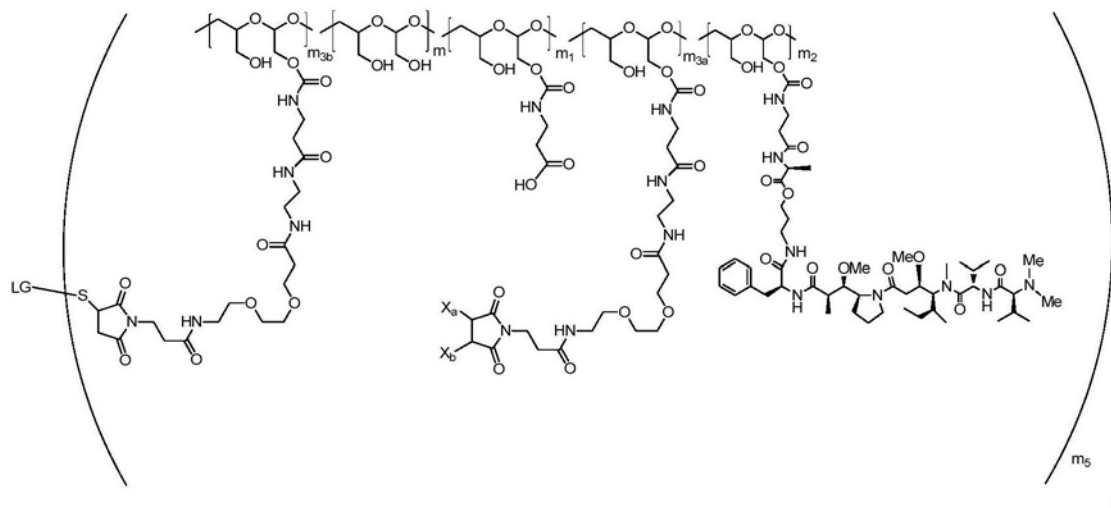
[0165] (iv) m_1 :  其中1至约140个单体 m_1 单元存在于聚合物支架中;和

[0166] (v) m_2 :  其中1至约40个单体 m_2 单元存在于聚合物支架中;其

中在单体单元 m 、 m_1 、 m_2 、 m_{3a} 和 m_{3b} 的每一个中, X 是 CH_2 、 O 或 NH ,和 m 、 m_1 、 m_2 、 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和的范围是从约15至约300,和其中 D 的每次出现独立地为具有分子量 $\leq 5kDa$ 的治疗剂,且 D 和羰基之间的  表示 D 与羰基直接或间接连接。

[0167] 在一个实施方案中,治疗药物和靶向共轭物具有以下结构:

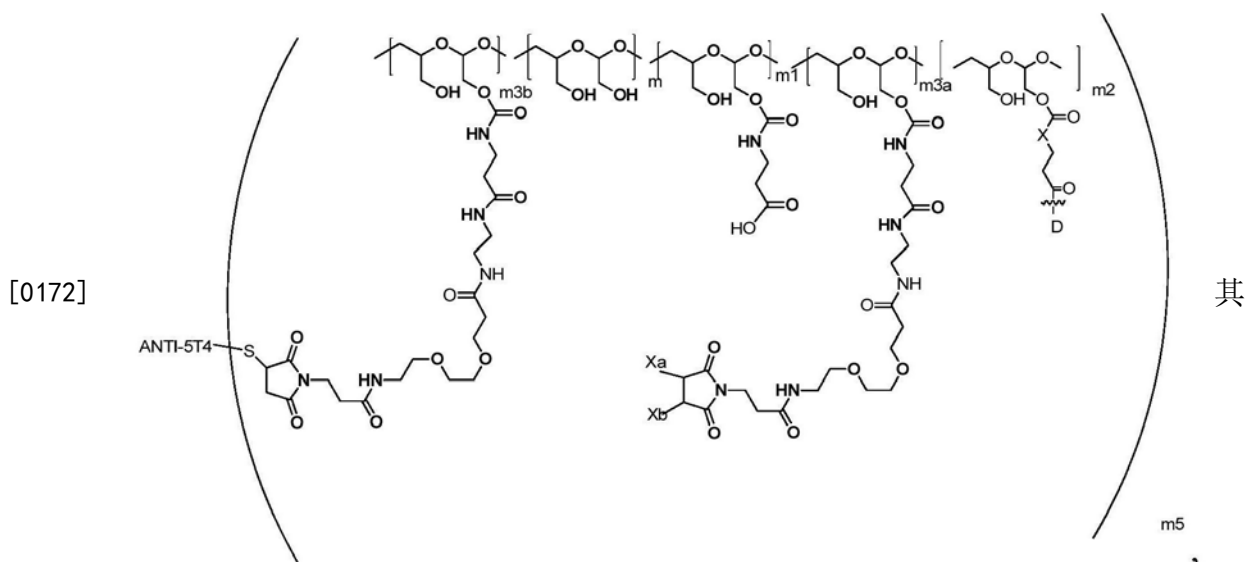
[0168]



[0169] 其中:

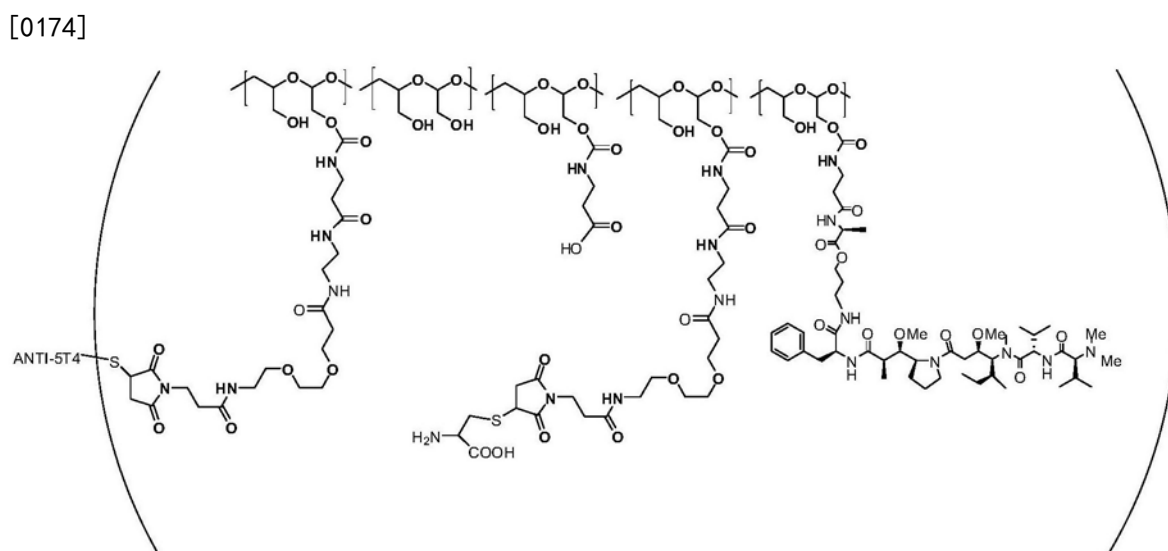
[0170] PHF具有范围从5kDa至10kDa的分子量; m 是1-75, m_1 是约5-约35, m_2 是约3-约10, m_{3a} 是0-约4, m_{3b} 是1-约5, m 、 m_1 、 m_2 、 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和是约40至约75,和 m_5 是2-约4。

[0171] 在进一步的实施方案中,提供用于抗-肿瘤疗法的治疗性抗-5T4药物靶向共轭物。所述共轭物包含聚合物支架,其含有具有分子量从约2kDa至约40kDa的聚(1-羟基甲基亚乙基甲基基-缩甲醛)(PHF),其中共轭物具有以下结构:



中 m_5 是1-10; m 为从1至约300的整数; m_1 为从1至约140的整数; m_2 为从1至约40的整数; m_{3a} 为从0至约17的整数; m_{3b} 为从1至约8的整数;其中 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和为从1至约18的整数;和 m 、 m_1 、 m_2 和 m_3 的总和的范围是从约15至约300; X 是NH; X_a 或 X_b 之一是H,而另一个为马来酰亚胺基封闭部分;和其中D的每次出现独立地为具有分子量 $\leq 5kDa$ 的治疗剂,且D和羰基之间的 $\text{---}\zeta\text{---}$ 表示D与羰基直接或间接连接;其中ANTI-5T4为抗-5T4配体,其包含对人癌胚抗原5T4有选择性的免疫球蛋白或其功能片段。例如,抗-5T4的分子量是至少约40kDa。

[0173] 在更进一步的实施方案中,提供用于抗-肿瘤疗法的治疗药物和靶向共轭物,其包含抗-5T4和含有下面所示的可以彼此随机连接的单元的聚(1-羟基甲基亚乙基羟基甲基-缩甲醛)(PHF)聚合物支架:



[0175] ,其中:

[0176] ANTI-5T4为包含指定为SEQ ID NO:A的氨基序列的单链抗体构件;PHF具有范围从约2kDa至约40kDa的分子量;聚合物支架与抗-5T4抗体的平均比例为约2:1至约3:1或约3:1至约4:1和AF HPA与抗-5T4抗体的比例为约12:1至约18:1。

[0177] 在一些实施方案中,本发明的聚合物支架含有随机排列的单体单元 m 、 m_1 、 m_2 、 m_{3a} 和

m_{3b}。在一些实施方案中,本发明的聚合物支架含有随机排列的单体单元m、m₁、m₂和m_{3b}。

[0178] 在一些实施方案中,本发明的聚合物支架含有随机排列的单体单元m、m₁、m₇、m_{3a}和m_{3b}。在一些实施方案中,本发明的聚合物支架含有随机排列的单体单元m、m₁、m₇和m_{3b}。

[0179] 在另一方面,本发明提供包含共轭物的组合物,其制备方法及其用于治疗各种病症(包括,但不局限于癌症)的方法。靶标癌症可以是肛门癌、星形细胞瘤、白血病、淋巴瘤、头部和颈部癌、肝癌、睾丸癌、子宫颈癌、肉瘤、血管瘤、食道癌、眼癌、咽癌、口部癌、间皮瘤、皮肤癌、骨髓瘤、口腔癌、直肠癌、喉癌、膀胱癌、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌、胰腺癌、肾癌或胃癌。

[0180] 本发明还涉及一种药物组合物,其包含本文所述的聚合物支架或共轭物和药学上可接受的载体。

[0181] 在又一方面,本发明涉及一种诊断疑似患有病症的患者的病症的方法。所述方法包括将有效量的本文所描述的共轭物施用于疑似患有病症的患者,或者进行分析以检测来自所述患者的样品中的靶点抗原/受体,以便测定所述患者是否表达靶点抗原或受体。

[0182] 除非另有定义,本文所使用的所有技术及科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的意义。在本说明书中,单数形式也包括复数,除非上下文中另有清楚的指示。虽然与本文所描述的类似或等同的方法和物质可以用于实施或测试本发明,但是下文将描述适合的方法和物质。将本文所提及的所有出版物、专利申请、专利及其它参考文献通过引用结合到本文中。本文所引用的参考文献不应被承认为本发明的现有技术。如有争议,则以本说明书(包括定义)为准。此外,物质、方法及实施例仅作为说明之用,而无限制之意。

[0183] 本发明的优点之一在于本文所描述的蛋白质-聚合物-药物共轭物或聚合物支架大大地提高了待递送药物的生物利用度和/或提高了衔接至聚合物载体的蛋白质的生物利用度。本发明的另一个优点在于本文所述的蛋白质-聚合物-药物共轭物的功效随着共轭物的药物载荷的增加而增加或至少保持基本上相同。本发明的又一个优点在于经由硫氢基与蛋白质的半胱氨酸部分共轭的蛋白质-聚合物共轭物显示出基本上改进的稳定性。通过下面的详细说明和权利要求书,本发明的其它特征和优点将会变得显而易见。

[0184] 附图简述

[0185] 图1显示在作为第1天的单次剂量经IV给予媒介;PBRM(曲妥珠单抗),10mg/kg;在实施例4或实施例13中描述的PBRM-聚合物-药物共轭物,2.5mg/kg和5mg/kg后,在用BT474肿瘤皮下接种的小鼠(每组n=10)中的肿瘤应答。

[0186] 图2显示在作为第1天的单次剂量经IV给予媒介;PBRM(曲妥珠单抗),10mg/kg;在实施例4或实施例7中描述的PBRM-聚合物-药物共轭物,2.5mg/kg后,在用JIMT-1细胞皮下接种的小鼠(每组n=10)中的肿瘤应答。

[0187] 图3显示在作为第1天的单次剂量经IV给予媒介;PBRM(林妥珠单抗(lintuzumab),20mg/kg;或在实施例8中描述的PBRM-聚合物-药物共轭物,20mg/kg后,在用HL-60细胞皮下接种的小鼠(每组n=10)中的肿瘤应答。

[0188] 图4显示在作为第1天的单次剂量经IV给予媒介;PBRM(曲妥珠单抗),20mg/kg;Kadcyla®,20mg/kg;或在实施例14中描述的PBRM-聚合物-药物共轭物,2mg/kg、0.67mg/kg或0.3mg/kg后,在用JIMT-1细胞皮下接种的小鼠(每组n=10)中的肿瘤应答。

[0189] 图5显示在作为第1天的单次剂量经IV给予媒介,或在实施例15中描述的PBRM-聚合物-药物共轭物,3mg/kg、1mg/kg或0.3mg/kg后,在用NCI-N87细胞皮下接种的小鼠(每组n=10)中的肿瘤应答。

[0190] 图6显示在作为第1天的单次剂量经IV给予媒介,在实施例14(0.67mg/kg)或实施例16(3mg/kg)中描述的PBRM-聚合物-药物共轭物后,在用NCI-N87细胞皮下接种的小鼠(每组n=10)中的肿瘤应答。

[0191] 图7显示在作为第1天的单次剂量经IV给予媒介,在实施例33(0.67mg/kg);实施例43A(1mg/kg)或实施例43C(0.67mg/kg或3mg/kg)中描述的PBRM-聚合物-药物共轭物后,在用NCI-N87细胞皮下接种的小鼠(每组n=10)中的肿瘤应答。

[0192] 图8显示在作为第1天的单次剂量经IV给予媒介,在实施例5A中描述的聚合物-药物共轭物,0.22mg/kg;或在实施例30B或实施例30C(各自2mg/kg);实施例40(0.67mg/kg),或实施例43B(1mg/kg);或实施例38(10mg/kg);或实施例39(10mg/kg)中描述的PBRM-聚合物-药物共轭物(各自每周给予1次,持续3周)后,在用NCI-N87细胞皮下接种的小鼠(每组n=10)中的肿瘤应答。

[0193] 图9显示在作为第1天的单次剂量经IV给予媒介;实施例40(1mg/kg)和实施例43C(2mg/kg)后,在用JIMT-1细胞皮下接种的小鼠(每组n=10)中的肿瘤应答。

[0194] 图10显示在用BT474肿瘤皮下接种的小鼠中,在IV推注给予实施例4中描述的PBRM-聚合物-药物共轭物(5mg/kg,3只动物/时间点)后,对于共轭的AF HPA(总)、未共轭的AF HPA和AF(表示为“游离AF-HPA”),和曲妥珠单抗的血浆PK。

[0195] 图11说明通过表面等离子体共振测量的、对人5T4细胞外域的5T4-特异性scADC的亲力和动力学。结合亲和力($K_D < 30\text{pM}$)类似于非-共轭的抗-5T4scFvFc的结合亲和力。

[0196] 图12说明5T4-特异性scADC的抗-肿瘤功效,如在A431肿瘤异种移植模型中所测量的。肿瘤体积在指定的天测量。值表示为均值 $\pm$ SEM。统计学分析通过双向ANOVA进行,接着使用Graph Pad Prism(版本5)的Bonferroni事后检验。

[0197] 图13说明5T4-特异性scADC在携带过度表达MDA-MB-231 5T4的转染肿瘤异种移植物的裸鼠中的抗肿瘤功效。值表示为均值 $\pm$ SEM。统计学分析通过双向ANOVA进行,接着使用Graph Pad Prism(版本5)的Bonferroni事后检验。

[0198] 本发明某些优选实施方案的详细描述

[0199] 本发明提供了新颖的蛋白质-聚合物-药物共轭物、用于制备所述共轭物的聚合物支架、用于制备所述共轭物或聚合物支架的合成方法、含有所述共轭物或聚合物支架的药物组合物以及所述共轭物的各种用途。

[0200] 本发明还提供了新颖的聚合物-药物共轭物、用于制备所述共轭物的合成方法、包含所述共轭物的药物组合物以及所述共轭物的各种用途。

[0201] 本发明进一步提供了新颖的药物衍生物、用于制备所述衍生物的合成方法、包含所述药物衍生物的药物组合物以及所述药物衍生物的各种用途。

[0202] 定义/术语

[0203] 本文中还可能更加详细地描述了本发明的某些化合物和特定官能团的定义。就本发明的目的而言,化学元素根据元素周期表(CAS版本,Handbook of Chemistry and Physics,第75版,封面插页)加以确定,并且特定的官能团通常如本文所描述的加以定义。此外,有机

化学的通用原理以及特定的官能片段和反应性如“Organic Chemistry”, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito:1999中所记载的, 将其全部内容通过引用结合到本文中。另外, 本领域技术人员将会理解: 如本文所描述的合成方法会利用到各种保护基。

[0204] 在下面的说明书和权利要求书中, 冠词“一(a)”、“一个(an)”和“该(the)”的使用应被解释为同时包括单数和复数, 除非本文中另有指示或者上下文有清楚的矛盾情况。术语“包含”、“具有”、如在“具有化学式”中的“具有”、“包括”, 和“含有”应被解释为开放式术语(即, 意味着“包括但不限于”), 除非另有注释。例如, 某些式的聚合物支架包括在所述式中所示的所有单体单元并且还可包括在所述式中没有显示的另外的单体单元。另外, 每当“包含”或者另一个开放式术语用于一个实施方案时, 应当理解为使用中间式术语“基本上由…组成”或封闭式术语“由…组成”可以更加狭义地要求同一个实施方案的保护范围。

[0205] 术语“约”、“大约”, 或“近似”, 当与数值连接使用时, 意味着包括值的集合或范围。例如, “约X”包括为 $X \pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、 $\pm 0.2\%$, 或 $\pm 0.1\%$ 的值的范围, 其中X为数值。在一个实施方案中, 术语“约”指比特定值多或少5%的值的范围。在另一个实施方案中, 术语“约”指比特定值多或少2%的值的范围。在另一个实施方案中, 术语“约”指比特定值多或少1%的值的范围。

[0206] 数值范围的列举仅仅旨在充当一种个别引用落在范围内的每一个单独数值的简化方法, 除非本文中另有指示, 并且如果每一个单独数值在本文中被个别列举则将其并入本说明书中。除非另有注明, 本文所使用的范围包括所述范围的二个界限。例如, “x是1-6之间的整数”和“x是1-6的整数”的表述都意味着“x是1、2、3、4、5或6”, 即术语“X和Y之间”和“范围从X至Y”, 包括X和Y及其之间的整数。

[0207] 本文所描述的所有方法都能够以任何适当的顺序进行, 除非本文中另有指示或者上下文有清楚的矛盾情况。本文所提供的任何和所有实施例或示例性语言(例如, “如”)的使用仅仅旨在更好地阐释本发明而不应被解释为对于权利要求范围的限制, 除非另有明确的主张。说明书中无任何语言应被解释为表明任何未请求保护的要素都是请求保护者所必需的。

[0208] “抗体”指全长抗体或包含免疫球蛋白的抗体的功能片段。所谓“功能片段”, 其意指提供部分与其靶标细胞群体的细胞表面分子, 如人癌胚抗原有效地结合或缀合的免疫球蛋白或抗体的充分部分。

[0209] 如本文所用的, 人癌胚抗原包括例如肿瘤相关蛋白例如甲胎蛋白、癌胚抗原、前列腺特异性抗原, 和癌胚抗原蛋白(也称为不成熟的层粘连蛋白受体蛋白, 并且其已与例如肠和肾癌有关)。

[0210] 免疫球蛋白可使用本领域技术人员已知的技术纯化、重组生成、合成地生成, 或其组合。虽然IgG抗体内的免疫球蛋白或从IgG抗体衍生的免疫球蛋白是特别完全适合用于本发明的, 但可选择来自任何种类或亚类的免疫球蛋白, 如IgG、IgA、IgM、IgD和IgE。合适地, 免疫球蛋白具有IgG类, 包括但不限于IgG亚类(IgG1、2、3和4)或IgM类, 其能够特异性结合至抗原上的特异性表位。抗体可以是自天然来源或自重组来源衍生而得的完整免疫球蛋白并且可以是完整免疫球蛋白的免疫反应性部分。抗体可以以各种形式存在, 包括, 例如多克隆抗体、单克隆抗体、骆驼化单域抗体(camelized single domain antibodies)、细胞内抗体(“胞内抗体”)、重组抗体、抗遗传型抗体、域抗体、线性抗体、多重特异性抗体

(multispecific antibody), 抗体片段, 如Fv、Fab、F(ab)₂、F(ab)₃、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、单链可变片段抗体(scFv)、串联/双-scFv、Fc、pFc'、scFvFc(或scFv-Fc)、二硫化Fv(dsFv)、双特异性抗体(bc-scFv)例如BiTE抗体; 骆驼化抗体、表面重塑抗体抗体(resurfaced antibodies)、人源化抗体、完全人类抗体、单域抗体(sdAb, 也称为NANOBODY®)、嵌合抗体、包含至少一个人类恒定区的嵌合抗体、双亲和性抗体如双亲和性重新靶向蛋白(DART™)、二价(或双价)单链可变片段(di-scFvs, bi-scFvs)(其包括但不限于微小抗体(minibodies)、双抗体(diabodies)、三抗体(triabodies或tribodies)、四抗体(tetrabodies)等), 和多价抗体。”抗体片段”是指结合至其靶点的免疫球蛋白分子的可变区的至少一部分, 即抗原结合区。本文所使用的术语“抗体”指全长抗体和抗体片段, 除非另外指明。

[0211] “基于蛋白质的识别-分子”或“PBRM”指识别和结合至细胞表面标志物或受体的分子, 如跨膜蛋白、表面固定化蛋白或蛋白多糖。PBRMs的实例包括但不限于, 抗体(如, 曲妥珠单抗、西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、依帕珠单抗、维妥珠单抗、拉贝珠单抗、B7-H4、B7-H3、CA125、CD33、CXCR2、EGFR、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、HER2、NaPi2b、c-Met、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、PD-L1、c-Kit、MUC1和抗-5T4)或肽(LHRH受体靶向肽、EC-1肽)、脂笼蛋白, 例如, 安提卡林(anticalins)、蛋白质(例如, 干扰素、淋巴因子、生长因子、集落刺激因子等)、肽或肽模拟物等。基于蛋白质的识别分子除了将修饰的聚合物共轭物靶向至特定的细胞、组织或位点之外, 还可以具有某些治疗效果如对于靶点细胞或通路的抗增殖(抑制细胞增殖/和/或细胞毒性)活性。基于蛋白质的识别分子包含或者可以通过基因工程改造而包含至少一个化学反应性基团, 如-COOH、伯胺、仲胺-NHR、-SH, 或化学反应性氨基酸部分或侧链例如, 酪氨酸、组氨酸、半胱氨酸, 或赖氨酸。在一个实施方案中, PBRM可以是与给定的靶标细胞群体的细胞表面分子, 例如细胞表面受体或抗原特异性地结合或复合的配体(LG)或靶向部分。在配体与其受体特异性结合或复合后, 细胞对配体或配体-药物-共轭物的吸收是允许的, 然后其被内在化到细胞中。如本文所用的, “与细胞表面分子特异性地结合或复合”或“靶向”细胞表面分子的配体优选地经由分子间力与细胞表面分子缔合。例如, 配体可优选地以少于约50nM、少于约5nM, 或少于500pM的Kd与细胞表面分子缔合。测量配体与细胞表面分子的结合亲和力的技术是众所周知的; 例如, 一种合适的技术, 被称为表面等离子共振(SPR)。在一个实施方案中, 配体被用来寻靶, 且当与它递送的药物分离时没有可检测到的治疗效果。在另一个实施方案中, 配体起着作为靶向部分和作为治疗剂或免疫调节剂的功能(如, 增强活性药物或前药的活性)。

[0212] 本文所使用的“生物相容性的”旨在描述当与体液或活细胞或组织接触时发挥最低限度的破坏性或宿主反应效应的化合物。因此, 本文所使用的生物相容性的基团是指脂族、环烷基、杂脂族、杂环烷基、芳基或杂芳基片段, 其符合上述和本文所定义的术语生物相容性的定义。本文所使用的术语“生物相容性”也被认为是指呈现出与识别蛋白(例如, 天然存在的抗体、细胞蛋白、细胞和生物系统的其它成分)之间最低限度的相互反应的化合物, 除非这样的相互反应是特别合意的。因此, 特别旨在引起上述最低限度的相互反应的物质和官能团(例如, 药物和前药)被认为是生物相容性的。优选地(除了旨在作为细胞毒性的化合物如, 抗肿瘤剂以外), 若有下列情形, 则化合物是“生物相容性的”: 将该化合物以与预定的全身性体内浓度类似的浓度添加至正常的体外细胞时, 在等同于该化合物的体内半衰期

(例如,50%的体内给予的化合物被消除/清除所需的时间周期)的时间内导致小于或等于1%的细胞死亡,以及所述化合物的体内给予诱发最低,和医学上可接受的炎症、异物反应、免疫毒性、化学毒性和/或其它这样的不良反应。在上述句子中,术语“正常细胞”是指不旨在被受试化合物破坏或者显著影响的细胞。

[0213] “生物可降解的”:如本文所用的,“生物可降解的”聚合物是指在体内易遭受生物学处理的聚合物。如本文所用的,“生物可降解的”化合物或部分是指当被细胞摄入时能够通过溶酶体或其它化学机制或者通过水解作用分解为能够被细胞再使用或者丢弃而不会对细胞产生显著的毒性效应的成分的化合物。本文所使用的术语“生物可裂解的”具有与“生物可降解的”相同的含义。降解片段优选导致少量或不引起器官或细胞过负荷或者由这样的过负荷或其它的体内不良反应造成的病理过程。生物降解过程的实例包括酶学和非酶学水解、氧化和还原。适合于本文所描述的生物可降解的蛋白质-聚合物-药物共轭物(或其成分,例如,生物可降解的聚合物载体载体以及载体与抗体或药物分子之间的接头)的生物降解也能够在细胞外得到提高,例如,在动物体的低pH区域(例如,发炎区域)在活化巨噬细胞或其它释放降解促进因子的细胞的近邻。在某些优选的实施方案中,在pH~7.5下的聚合物载体的有效尺寸在1-7天之间不会有可检测的变化,并且在至少数周的期间里,保持在原始聚合物尺寸的50%以内。另一方面,在pH~5下,聚合物载体优选在1-5天之间发生可检测的降解,并且在两周至数月的时间范围内完全转换为低分子量的片段。例如,在这样的试验中,聚合物完整性能通过尺寸排阻HPLC来测量。虽然在某些情况下,较快的降解是优选的,但是通常合意的是,聚合物在细胞内降解的速率不超过细胞新陈代谢或排泄聚合物片段的速率。在优选的实施方案中,聚合物和聚合物生物降解副产物是生物相容性的。

[0214] “生物利用度”:术语“生物利用度”是指给予受试者的给定量的药物或化合物的全身性利用度(即,血液/血浆水平)。生物利用度是一种纯粹的术语,其同时表示药物或化合物由所给予的剂型到达体循环的时间(速率)和总量(程度)的测量。

[0215] “马来酰亚胺基封闭化合物”:如本文所用的,指可与马来酰亚胺反应以将其转化为琥珀酰亚胺的化合物和“马来酰亚胺基封闭部分”指在转化时连接于琥珀酰亚胺的化学部分。在某些实施方案中,马来酰亚胺基封闭化合物为具有用于与马来酰亚胺反应的末端巯基的化合物。在某些实施方案中,马来酰亚胺基封闭化合物为水溶性的,以致与马来酰亚胺的反应可水性溶液中发生。例如,生成的马来酰亚胺基封闭部分是水溶性或亲水性的。在一个实施方案中,马来酰亚胺基封闭化合物是半胱氨酸、N-乙酰基半胱氨酸、半胱氨酸甲基酯、N-甲基半胱氨酸、2-巯基乙醇、3-巯基丙酸、2-巯基乙酸、巯基甲醇(即, HOCH_2SH),其中苯基被一个或多个亲水性取代基取代的苄基硫醇,或3-氨基丙烷-1-硫醇。

[0216] “亲水性”:当涉及聚合物单体单元或马来酰亚胺基封闭部分上的取代基以赋予它们亲水性或水溶性时,术语“亲水性的”基本上无异于该术语在本领域中的通常含义,并且表示含有可离子化的、极性的或者可极化的原子或者可以被水分子溶剂化的化学片段。因此,如本文所使用的亲水性基团是指符合如上所述的术语“亲水性的”的定义的脂族、环烷基、杂脂族、杂环烷基、芳基或杂芳基片段。适合的特定亲水性有机片段的实例包括(但不局限于)包含在约1-12之间范围内的原子的链的脂族或杂脂族基团、羟基、羟烷基、胺、羧基、酰胺、羧酸酯、硫酯、醛、硝基、异硝基、亚硝基、羟基胺、巯基烷基、杂环、氨基甲酸酯、羧酸及其盐类、磺酸及其盐类、磺酸酯类、磷酸及其盐类、磷酸酯类、聚二醇醚类、聚胺、聚羧酸

酯、聚酯和聚硫酯。在某些实施方案中,亲水性取代基包含羧基(COOH)、醛基(CHO)、酮基(COC₁₋₄烷基)、甲醇(CH₂OH)或二醇(例如,CHOH-CH₂OH或CH-(CH₂OH)₂)、NH₂、F、氰基、SO₃H、PO₃H等。

[0217] 当涉及本发明的聚合物时,术语“亲水性”通常无异于该术语在本领域中的用法,并且表示包含如上所定义的亲水性官能团的聚合物。在优选的实施方案中,亲水性聚合物为水溶性聚合物。聚合物的亲水性能够通过水合能的测定而直接测量,或者通过二个液相之间的考察或通过具有已知的疏水性的固相(例如,C₄或C₁₈)上的色谱法而测定。

[0218] “聚合物载体”:如本文所用的,术语聚合物载体是指聚合物或修饰的聚合物,其适合于共价附接至或者能够共价附接至一个或多个带有指定接头的药物分子和/或一个或多个带有指定接头的PBRMs。

[0219] “生理条件”:词组“生理条件”是指在活组织的细胞外液中可能遭遇到的化学(如,pH、离子强度)和生物化学(如,酶浓度)条件的范围。就大多数正常组织而言,生理学pH范围在从约7.0至7.4之间。循环血浆和正常的间质液代表正常生理学条件的典型实例。

[0220] “多糖”、“碳水化合物”或“寡糖”:术语“多糖”、“碳水化合物”或“寡糖”是本领域已知的并且通常是指具有化学式(CH₂O)_n,其中通常n>2,及其衍生物。碳水化合物是多羟基醛或多羟基酮,或者通过简单的化学转化(例如水解、氧化或还原),变化为这样的物质。典型地,碳水化合物以环状缩醛或缩酮的形式存在(如,葡萄糖或果糖)。这些环状单元(单糖)可以互相连接以形成带有少数(寡糖)或数个(多糖)单糖单元的分子。通常,带有明确定义的数目、种类和位置的单糖单元的碳水化合物被称为寡糖,而由具有可变数目和/或位置的单糖单元的分子的混合物组成的碳水化合物被称为多糖。术语“多糖”、“碳水化合物”和“寡糖”在本文中可互换使用。多糖可以包括天然的糖(例如,葡萄糖、果糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖、核糖和木糖)和/或天然存在的糖的衍生物(例如,2'-氟核糖、2'-脱氧核糖和己糖)。

[0221] “药物”:如本文所用的,术语“药物”指为生物学活性的并在给予有需要的受试者后提供所需生理学作用的化合物(例如,活性药物成分)。

[0222] “前药”:如本文所用的术语“前药”指活性药物的前体,即可转化为活性药物的化合物。典型地这样一种前药经历体内加工,其转化药物为一种生理学活性形式。在一些情况下,前药本身可具有所需生理学作用。所需生理学作用可以是例如治疗性的、细胞毒性的、免疫调节的等。

[0223] “细胞毒性的”:如本文所用的术语“细胞毒性的”意指对细胞或选择的细胞群体(如,癌症细胞)有毒的。毒性作用可导致细胞死亡和/或溶胞作用。在某些情况下,毒性作用可以是对细胞的亚致死破坏作用,例如减慢或阻止细胞生长。为了获得细胞毒作用,药物或前药可选自DNA损伤剂、微管破坏剂,或细胞毒性蛋白质或多肽等。

[0224] “抑制细胞生长的”:如本文所用的术语“抑制细胞生长的”指抑制或停止细胞生长和/或增殖的药物或其它化合物。

[0225] “小分子”:如本文所用的,术语“小分子”是指或者天然存在或者人工制造(例如经由化学合成)的具有相对较低的分子量的分子。优选的小分子是生物学活性的,以便其在动物,优选哺乳动物,更优选人类体内产生局部性或全身性作用。在某些优选的实施方案中,该小分子是药物并且该小分子被称为“药物分子”或“药物”或“治疗剂”。在某些实施方案

中,该药物分子具有小于或等于约5kDa的MW。在其它实施方案中,药物分子具有小于或等于约1.5kDa的MW。在实施方案中,药物分子选自长春花生物碱、奥瑞斯他汀、倍癌霉素、激酶抑制剂、MEK抑制剂、KSP抑制剂、PI3激酶抑制剂、卡奇霉素、SN38、喜树碱、拓扑异构酶抑制剂、非-天然喜树碱、蛋白质合成抑制剂、RNA聚合酶抑制剂、吡咯并苯并二氮杂萘、类美登素、DNA-结合剂药物、DNA嵌入药物及其类似物。优选地,虽然非必要,该药物已经被适当的政府机关或团体,例如FDA认定为可以安全且有效使用。例如,根据FDA的21C.F.R. §§330.5, 331至361,和440至460列举的供人类使用的药物;根据FDA的21C.F.R. §§500至589列举的供兽医使用得药物都被视为适合于与本发明的亲水性聚合物一起使用(通过引用结合到本文中)。能够用于实施本发明的药物分子的类别包括,但不限于,抗-癌物质、放射性核素、维生素、抗-AIDS物质、抗生素、免疫抑制剂、抗病毒物质、酶抑制剂、神经毒素、阿片类、安眠药、抗组胺剂、润滑剂、镇静剂、抗痉剂、肌肉松弛剂和抗-帕金森症物质、解痉剂和肌肉收缩剂(包括通道阻断剂)、缩瞳药和抗-胆碱剂、抗-青光眼化合物、抗-寄生虫和/或抗-原虫化合物、细胞-细胞外基质相互作用的调节剂(包括细胞生长抑制剂和抗-粘合分子)、血管舒张剂、DNA、RNA或蛋白质合成的抑制剂、抗-高血压剂、镇痛剂、解热剂、甾体和非-甾体抗炎剂、抗-血管生成因子、抗-分泌因子、抗凝血剂和/或抗血栓剂、局部麻醉剂、眼药、前列腺素、抗-忧郁剂、抗-精神病物质、镇吐剂、显像剂。许多大分子也是药物并且这样的大分子可用于本文描述的共轭物和其它构件。合适的大分子的实例包括例如,氨基酸基分子。氨基酸基分子可包含例如肽、多肽、酶、抗体、免疫球蛋白,或其功能片段及其它。

[0226] 虽非穷举,适合于在本发明中使用的类别和特定药物的更加完整的清单可见于由Axel Kleemann和Jurgen Engel编辑的“药用物质:合成、专利申请(Pharmaceutical Substances:Syntheses,Patents,PatentsKleemann”,Thieme Medical Publishing,1999和由Susan Budavari et al.编辑的“默克索引:化学、药物和生物学(Merck Index:An Encyclopedia of Chemicals,Drugs,and Biologicals)”,CRC Press,1996,其二者通过引用结合到本文中。在优选的实施方案中,在本发明中使用的药物是对靶点细胞或通路具有抗增殖(抑制细胞生长的和/或细胞毒性)活性的治疗剂。该药物可以具有化学反应性基团,例如-COOH、伯胺、仲胺-NHR、-OH、-SH、-C(O)H、-C(O)R、-C(O)NHR^{2b}、C(S)OH、-S(O)₂OR^{2b}、-P(O)₂OR^{2b}、-CN、-NC或-ONO,其中R为脂族、杂脂族、碳环或杂环烷基片段并且R^{2b}为氢,脂族、杂脂族、碳环或杂环基部分。

[0227] 如本文所用的“药物衍生物”或“修饰的药物”等是指包含旨在通过本发明的共轭物递送的药物分子和能够将该药物分子附接至聚合物载体的官能团的化合物。

[0228] 如本文所用的“活性形式”是指在体内或体外呈现出预期的药物效果的化合物形式。特别地,当旨在通过本发明的共轭物递送的药物分子从该共轭物中释放时,该活性形式可以是药物本身或其衍生物,呈现出预期的治疗性质。药物从该共轭物中的释放可以通过将该药物附接至聚合物载体的接头的生物可降解的键的裂解而实现。因此,活性药物衍生物可包含该接头的一部分。

[0229] “诊断标签”:如本文所用的,术语诊断标签是指使用本领域中已知的分析法,在体内或体外能够检测到的物质组合物的原子、原子团、部分或官能团、纳米晶体或者其它的独立组件。当与本发明的共轭物结合时,这样的诊断标签容许在体内监测该共轭物。可选地或额外地,包括诊断标签的构件和组合物能够用于监测生物学功能或结构。诊断标签的实例

包括,但不限于,能够用于医学诊断过程的标签,例如用于 γ 闪烁图术和正电子发射断层显像术(PET)的放射性同位素(放射性核素);用于核磁共振造影术(MRI)的造影剂(例如顺磁原子和超顺磁纳米晶体);用于计算机断层显像术和其它基于X-射线的造影法的造影剂;用于基于超声波的诊断方法(超声波扫描术)的试剂;用于中子活化法的试剂(例如,硼、钆);用于各种光学过程的荧光团;以及能够发射、反射、吸收、散射或影响电磁场或波(例如, γ -射线、X-射线、无线电波、微波、光)、粒子(例如 α 粒子、电子、正电子、中子、质子)或其它形式辐射(例如超声波)的普通片段。

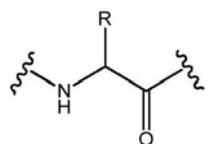
[0230] 以下是本申请通篇使用的更加通用的术语:

[0231] “动物”:如本文所用的,术语动物是指在任何发展阶段的人类以及非-人动物,包括,例如哺乳类、鸟类、爬行类、两栖类、鱼类、蠕虫类和单细胞类。细胞培养物和活组织样品被认为是多种动物。优选地,该非-人动物为哺乳动物(例如,啮齿动物、小鼠、大鼠、兔子、猴子、狗、猫、灵长类动物或猪)。动物可以是转基因动物或人类克隆动物。术语“受试者”涵盖动物。

[0232] “有效量”:通常,当谈及活性剂或药物递送装置时,术语“有效量”指引起合意的生物学反应所必需的量。本领域技术人员将会理解的是,药剂或装置的有效量可以随着下列因素而改变,如合意的生物学终结点、待递送的药剂、包封基质的组成、靶点组织等。例如,含有待递送以免疫个体的抗原的微粒的有效量是导致足以避免受到含有所给予抗原的感染的免疫应答的量。

[0233] 如本文所用的“天然氨基酸”是指在下列天然存在的蛋白质中发现的常见的天然存在的L-氨基酸中的任何一个:甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、组氨酸(His)、脯氨酸(Pro)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、苯丙氨酸(Phe)、酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、天冬酰胺(Asn)、谷氨酰胺(Gln)、半胱氨酸(Cys)和甲硫氨酸(Met)。

[0234] 如本文所用的“非天然氨基酸”指不是天然氨基酸的任何氨基酸。其包括例如,包含 α -、 β -、 ω -、D-、L-氨基酰基残基的氨基酸。更普遍地,非天然氨基酸包含通式



的残基,其中侧链R不是天然存在的氨基酸侧链。示例性的非天然氨基酸,包

括但不限于,肌氨酸(N-甲基甘氨酸)、瓜氨酸(cit)、高瓜氨酸、 β -脲基丙氨酸、硫代瓜氨酸、羟基脯氨酸、别-苏氨酸、哌啶甲酸(高脯氨酸)、 α -氨基异丁酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、别-异亮氨酸、正亮氨酸、 α -甲基亮氨酸、环己基甘氨酸、 β -环己基丙氨酸、 β -环戊基丙氨酸、 α -甲基脯氨酸、苯基甘氨酸、 α -甲基苯丙氨酸和及高苯丙氨酸。

[0235] “氨基酰基”:更普遍地,如本文所使用的,术语氨基酰基涵盖天然氨基酸和非天然氨基酸。

[0236] “聚酰胺”:指天然氨基酸和非天然氨基酸的均聚物或杂聚物。示例性的均聚物包括,但不限于,聚-赖氨酸、聚-精氨酸、聚- γ -谷氨酸等。示例性杂聚物包括,但不限于,包含肽片段选自肽酶、溶菌酶、金属蛋白酶等的肽片段的聚合物。

[0237] “PHF”指聚(1-羟基甲基亚乙基羟基甲基-缩甲醛)。

[0238] 如本文所用的,术语“聚合物单元”、“单体单元”、“单体”、“单体单元”、“单元”都是

指聚合物中的重复结构单元。

[0239] 如本文所用的,聚合物或聚合物载体/支架或聚合物共轭物的“分子量”或“MW”指重均分子量,除非另外指明。

[0240] 本发明意欲包括本发明的化合物中存在的原子的所有同位素。同位素包括具有相同的原子序数但质量数不同的原子。借助于普通的且无限制的实例,氢的同位素包括氕和氘。碳的同位素包括C-13和C-14。

[0241] 本发明意欲包括化合物的所有异构体,其是指并且包括光学异构体和互变异构体,其中光学异构体包括对映异构体和非对映异构体、手性异构体和非手性异构体,并且该光学异构体包括分离的光学异构体以及包括外消旋混合物和非外消旋混合物的光学异构体的混合物;其中异构体可以以分离的形式或者以与一个或多个其它异构体混合的形式存在。

[0242] 聚合物载体

[0243] 在某些示例性的实施方案中,本发明的共轭物可用于生物医药用途,如药物递送和组织工程,并且载体是生物相容性的和生物可降解的。在某些实施方案中,载体是可溶性聚合物、纳米粒子、凝胶、脂质体、微胞、缝线、植入物等。在某些实施方案中,术语“可溶性聚合物”涵盖生物可降解的、生物相容性的聚合物如羧基聚缩物(polyal)(例如,亲水性聚缩醛或聚缩酮)。在某些其它实施方案中,载体是全合成的、半合成的或天然存在的聚合物。在某些其它实施方案中,载体是亲水性。

[0244] 在某些示例性的实施方案中,在本发明中使用的载体是生物可降解的、生物相容性的羧基聚缩物,其在位于主链内的每个单体单元包含至少一个可水解的键。这确保了(通过单体单元的水解/裂解)降解过程将会导致聚合物共轭物断裂为单体的组分(即,降解),并且将生物可降解的属性赋予本发明的聚合物共轭物。生物可降解的、生物相容性的聚合物共轭物的属性(例如,溶解性、生物粘附性和亲水性)能够通过后续的其它亲水性或疏水性基团的取代加以修饰。适合于实施本发明的生物可降解的、生物相容性的聚合物的实例尤其可见于美国专利号5,811,510;5,863,990;5,958,398;7,838,619和7,790,150;和美国专利公开号2006/0058512中;将如上所列出的每一篇专利文献整体通过引用结合到本文中。有关这种类型聚合物的意义、制备和用途的指导可见于如上所列出的文献。在某些实施方案中,可以预见的是,本发明将特别可用于与如上所引用的专利文献以及美国专利号5,582,172和6,822,086的组合,将如上所列出的文献整体通过引用结合到本文中。

[0245] 本发明的共轭物是亲水性的、可水解的并包含药物分子(例如,长春花生物碱或衍生物、拓扑异构酶抑制剂,例如,SN38、喜树碱、托泊替康、依沙替康、非-天然喜树碱化合物或衍生物;奥瑞斯他汀、多拉司他汀、奈莫柔比星及其衍生物、PNU-159682、蒽环霉素、倍癌霉素、激酶抑制剂(如,PI3激酶抑制剂或MEK抑制剂)、KSP抑制剂、卡奇霉素、吡咯并苯并二氮杂萘、类美登素、依利蔡法德、DNA-结合剂药物、DNA嵌入药物,及其立体异构体、等排物、类似物和衍生物)和抗体(如,曲妥珠单抗、西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、依帕珠单抗、维妥珠单抗、拉贝珠单抗、B7-H4、B7-H3、CA125、CD33、CXCR2、EGFR、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、HER2、NaPi2b、c-Met、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、PD-L1、NaPi2b、c-Kit、MUC1,和抗-5T4)或肽(LHRH受体靶向肽、EC-1肽),其通过含有一个或多个生物可降解的键的接头共价连接于聚合物载体。因此,在某些示例性的实施方案中,适合于实施本发明的载体是在

位于主链内的每一个单体单元中具有至少一个缩醛/缩酮氧原子的羰基聚缩物。如上所讨论,这确保了(通过聚合物缩醛/缩酮基团的水解/裂解作用)降解过程将会导致羰基聚缩物共轭物断裂为低分子量组分(即,降解)。在某些实施方案中,用于制备本发明的聚合物共轭物的生物可降解的、生物相容性的聚合物载体是天然存在的多糖、葡聚多糖和聚糖苷、聚缩醛、聚酰胺、聚醚和聚酯来源的合成聚合物及其氧化、官能化、修饰、交联和共轭的产物。

[0246] 在某些其它实施方案中,载体为亲水性的、生物可降解的聚合物,其选自碳水化合物、葡聚多糖、糖脂、糖共轭物、聚缩醛、聚缩酮及其衍生物。

[0247] 在某些示例性的实施方案中,载体是天然存在的、线性的和/或支链的、生物可降解的/生物相容性的均多糖,其选自纤维素、直链淀粉、葡聚糖、果聚糖、岩藻依聚糖、角叉菜胶、菊糖、果胶、支链淀粉、糖原和里瑟南(lixenane)。

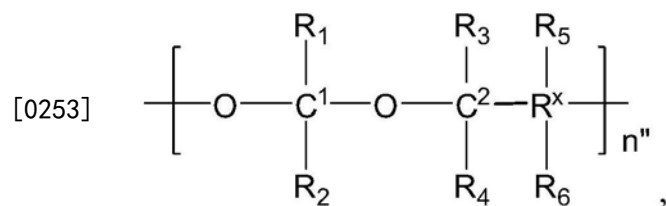
[0248] 在某些其它示例性的实施方案中,该载体是天然存在的、线性的和支链的、生物可降解的、生物相容性的杂多糖,其选自琼脂糖、透明质酸(hyaluronan)、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角质素、海藻酸和肝素。

[0249] 在还有的其它示例性实施方案中,聚合物载体包含聚缩醛/聚缩酮与亲水性聚合物的共聚物,所述亲水性聚合物选自聚丙烯酸酯、聚乙烯聚合物、聚酯、聚原酸酯类、聚酰胺、多肽,及其衍生物。

[0250] 在还有的另一个示例性实施方案中,聚合物载体是糊精,其通过从各种天然产物,例如,小麦、大米、玉米和树薯中获得的淀粉的水解而制得。根据淀粉起始原料的结构,每一种糊精包含独特分布的 α -1,4连键和 α -1,6连键。由于 α -1,6连键的生物可降解性的速率典型地小于 α -1,4连键,所以 α -1,6连键的百分比优选小于10%并且更优选小于5%。在一个实施方案中,糊精的分子量在约2kDa-约40kDa,更优选为约2kDa-约20kDa,或约3kDa-约15kDa或约5kDa-约10kDa。

[0251] 在某些实施方案中,载体包含多糖,其在与药物分子或PBRMs共轭之前,通过1,2-、1,4-、1,6-和2,6-吡喃糖苷和1,2-,1,5-,1,6-呋喃糖苷的环状邻位二醇的选择性氧化而活化,或者通过含有侧向6-羟基和5,6-二醇的多糖的氧化而活化。

[0252] 在还有的其它实施方案中,聚合物载体包含生物可降解的、生物相容性的聚缩醛,其中至少一个子集的聚缩醛重复结构单元具有下列的化学结构:



[0254] 其中,就n括号结构的每一次出现而言, R_1 和 R_2 之一是氢,而另一个为生物相容性的基团并且包括共价连接于 C^1 的碳原子; R^x 为共价连接于 C^2 的碳原子; n'' 为整数;每一次出现的 R_3 、 R_4 、 R_5 和 R_6 为生物相容性的基团并且独立地是氢或有机部分;并且对于括号结构n的每一次出现,至少 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 和 R_6 中的至少一个包含适合于偶联的官能团。在某些实施方案中,官能团为羟基部分。

[0255] 在一个实施方案中,聚合物载体包含活化的、亲水性的、生物可降解的、生物相容性的聚合物,其包含从0.1%至100%聚缩醛部分,其主干由以下化学结构表示:

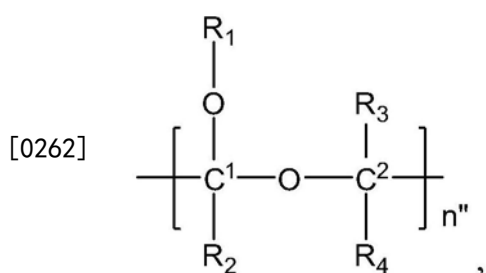
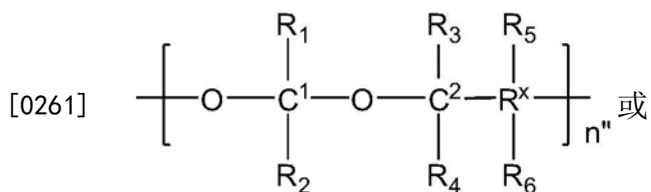
[0256] $(-\text{CH}_2-\text{CHR}_7-\text{O}-\text{CHR}_8-\text{O}-)_o$,

[0257] 其中:

[0258] R_7 和 R_8 独立地是氢、羟基、羟烷基(如, $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2\text{OH}$)、 $-\text{CHO}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CHO}$ 或 $-\text{羰基}$;和

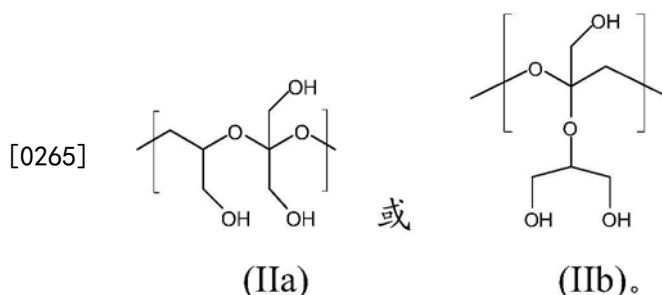
[0259] o 是20至2000的整数。

[0260] 在还有的其它实施方案中,聚合物载体包含生物可降解的、生物相容性的聚缩酮,其中至少一个子集的聚缩酮重复结构单元具有以下化学结构:



[0263] 其中每次出现的 R_1 和 R_2 为生物相容性的基团和 R^x 、 R_3 、 R_4 、 R_5 和 R_6 如本文所定义。

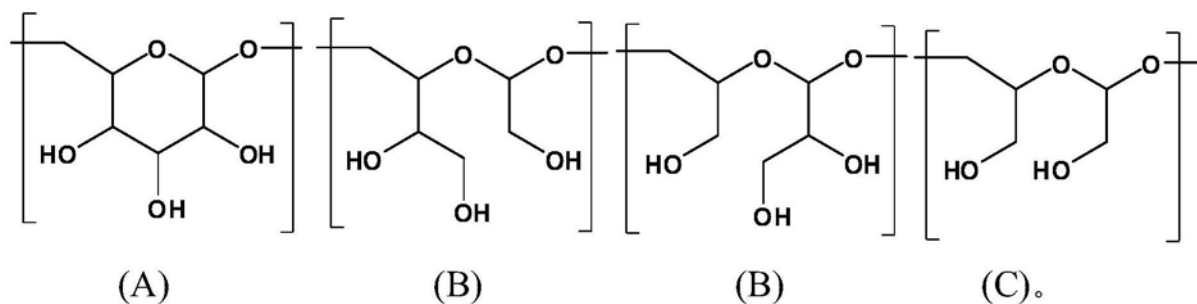
[0264] 在某些实施方案中,缩酮单元是式(IIa)或(IIb)的单体:



[0266] 生物可降解的、生物相容性的聚缩酮聚合物及其制备方法已经描述于美国专利号5,811,510、7,790,150和7,838,619,其整体通过引用结合到本文中。

[0267] 在一个实施方案中,聚合物载体能够由葡聚糖($\beta 1 \rightarrow 6$ -D-葡萄糖)的部分氧化,接着还原而得到。在这个实施方案中,聚合物包含具有下列结构的未修饰的葡聚糖(A)、部分氧化的葡聚糖缩醛单元(B)和彻底氧化的葡聚糖缩醛单元(C)的随机混合物:

[0268]

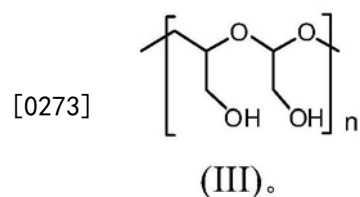


[0269] 在另一个实施方案中, 聚合物载体包含未修饰的缩醛单元, 即, 聚缩醛片段。在一些实施方案中, 聚缩醛能够由葡聚糖的彻底氧化, 接着还原而衍生。这些聚合物已经描述于参考文献, 见例如美国专利号5,811,510中, 将其中第2栏第65行至第8栏第55行有关聚缩醛的描述和第10栏第45行至第11栏第14行有关聚缩醛合成的描述通过引用结合到本文中。在一个实施方案中, 未修饰的聚缩醛聚合物为聚(羟基甲基亚乙基羟基甲基甲醛) 聚合物(PHF)。

[0270] 除了聚(羟基甲基亚乙基羟基甲基甲醛) 聚合物之外, 聚合物载体的主干也可包含聚(羟基甲基亚乙基羟基甲基甲醛) 嵌入和其它缩醛或非-缩醛单体或聚合物的共聚物。例如, 聚乙二醇聚合物在聚合物主链中用作隐密剂 (stealth agent), 因为它们能够降低附加官能团的聚合物侧链之间的相互作用。这样的基团也能够用于限制例如血清因子和修饰聚合物之间的相互作用。用于包含在聚合物主干中的其它隐密剂单体包括, 例如, 乙撑亚胺、甲基丙烯酸、丙烯酰胺、谷氨酸及其组合。

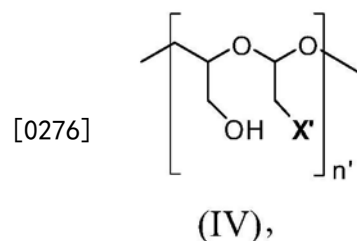
[0271] 缩醛或缩酮单元以有效地促进生物相容性的量存在于修饰的聚合物中。未修饰的缩醛或缩酮单元可被描述为“隐密剂”, 其为修饰的聚合物提供生物相容性和溶解性。此外, 与聚缩醛或聚缩酮聚合物的共轭能够改善与其附接的部分对于代谢和降解的敏感性, 并且影响生物分布、清除和降解。

[0272] 未修饰的缩醛单元是式 (III) 的单体:



[0274] 基于修饰的聚合物中聚合物单元的总和, 未修饰的聚缩醛单元的摩尔分数 (n) 是可供促进生物相容性、溶解性并增加半衰期的摩尔分数。该摩尔分数 n 可以是提供生物相容性、溶解性、稳定性或特定半衰期所需的未修饰的单体缩醛单元的最小分数, 或者能够是某些较大的分数。最合意的程度是基本上没有细胞毒性, 即修饰的聚合物对于受试者是基本上惰性的。然而, 如本领域技术人员所了解的, 根据待治疗的疾病或症状的严重性、治疗的有效性、免疫应答的类别和程度和类似的考虑因素, 某些程度的细胞毒性是能够耐受的。

[0275] 在一个实施方案中, 修饰的聚合物主链包含式 (IV) 的单元:



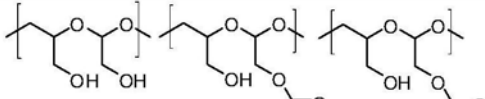
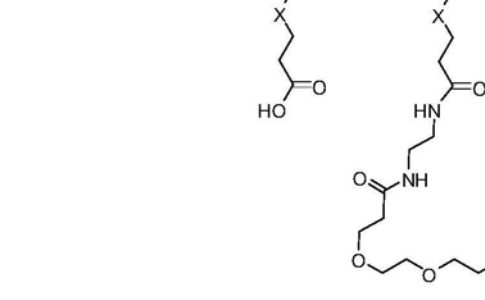
[0277] 其中 X' 表示聚合物主链的羟基的取代基。如式 (IV) 和本文所描述的其它通式所示, 每个聚缩醛单元具有附接至该单元的甘油部分的单一羟基和附接至该单元的甘油醛部分的 X' 基团 (或者另一个取代基例如 -L^D-D)。这仅仅是为了方便并且应被解释为: 具有式 (IV) 和本文所描述的其它通式的单元的聚合物可含有下列单元的随机分布: 具有具有附接至该单元的甘油醛部分的 X' 基团 (或另一个取代基例如包含马来酰亚胺末端的接头) 的单

元和具有附接至该单元的甘油片发段的单一X'基团(或另一个取代基例如包含马来酰亚胺末端的接头)的单元以及具有两个X'基团(或其它取代基例如包含马来酰亚胺末端的接头)且其中一个附接至该单元的甘油醛部分,而另一个附接至该单元的甘油片段的单元。

[0278] 在一个实施方案中,适合于实施本发明的生物可降解的、生物相容性的羧基聚缩物具有在约0.5-约300kDa的分子量。例如,生物可降解的、生物相容性的羧基聚缩物具有在约1-约300kDa(如,约1-约200kDa之间、约2-约300kDa之间、约2-约200kDa之间、约5-约100kDa之间、约10-约70kDa之间、约20-约50kDa之间、约20-约300kDa之间、约40-约150kDa之间、约50-约100kDa之间、约2-约40kDa之间、约6和约20kDa之间,或约8和约15kDa之间)的分子量。例如,本发明的聚合物支架或共轭物所用的生物可降解的、生物相容性的羧基聚缩物是具有在约2和约40kDa(如,约2-20kDa, 3-15kDa, 或5-10kDa)之间的分子量的PHF。

[0279] 在一个实施方案中,适合于实施本发明的生物可降解的、生物相容性的羧基聚缩物在与药物或PBRM共轭之前被修饰。例如,该羧基聚缩物含有 $-C(=O)-X-(CH_2)_v-C(=O)-$,其中X是 CH_2 、O或NH,和v是从1至6的整数。下表A提供了适合于与药物或PBRM或其衍生物共轭的修饰的羧基聚缩物的一些实例。除非另外指明,下表A-D中的参考号码对应于如本文所描述的实施例编号;术语“ND”是指未检测到;和X是 CH_2 、O或NH。

[0280] 表A

Ref #	聚合物支架
X = NH Ex 2	
X = CH ₂ Ex 11	

[0282] 治疗剂

[0283] 在某些实施方案中,治疗剂为具有分子量优选 $\leq$ 约5kDa,更优选 $\leq$ 约4kDa,更优选 $\leq$ 约3kDa,最优选 $\leq$ 约1.5kDa或 $\leq$ 约1kDa的小分子。

[0284] 在某些实施方案中,治疗剂具有少于约1nM的 IC_{50} 。

[0285] 在另一个实施方案中,治疗剂具有大于约1nM的 IC_{50} ,例如,治疗剂具有约1-50nM的 IC_{50} 。

[0286] 一些具有 IC_{50} 大于约1nM的治疗剂(如,“不太有效的药物”)是不适合使用本领域公认的共轭技术与PBRM共轭的。不希望受到理论的束缚,这样的治疗剂对于使用常规技术,用于靶向PBRM-药物共轭物而言,具有不充分的效力,因为药物的足够拷贝(即,超过8)不能使用本领域公认的技术共轭,而不导致共轭物的减少的药代动力学和理化性质。然而这些不太有效的药物的足够高的载荷可使用本文描述的共轭策略实现,从而导致高载荷的治疗剂,同时维持合意的药代动力学和理化性质。因此,本发明还涉及包括PBRM、PHF和至少8个

治疗剂部分的PBRM-聚合物-药物共轭物,其中治疗剂具有大于约1nM的IC₅₀。

[0287] 在某些实施方案中,约0.3-约15%,更优选约2-约12%,和甚至更优选约5-约10%的单体包含治疗剂。

[0288] 在本发明中使用的小分子治疗剂(例如,能够连接至聚合物载体的抗增殖(细胞毒性和抑制细胞生长)剂)包括细胞毒性化合物(如,广谱)、血管生成抑制剂、细胞周期进展抑制剂、PI3K/m-TOR/AKT通路抑制剂、MAPK信号传导通路抑制剂、激酶抑制剂、蛋白质伴侣抑制剂、HDAC抑制剂、PARP抑制剂、Wnt/Hedgehog信号传导通路抑制剂和RNA聚合酶抑制剂。

[0289] 广谱细胞毒素包括,但不限于,DNA-结合剂、嵌入或烷基化药物、微管稳定化和去稳定化剂、铂化合物、拓扑异构酶I抑制剂和蛋白质合成抑制剂。

[0290] 示例性的DNA-结合、嵌入或烷基化药物包括CC-1065及其类似物、蒽环霉素(阿霉素、表柔比星、伊达比星、柔红霉素、奈莫柔比星及其衍生物、PNU-159682)、双萘亚胺(bisnaphthalimide)化合物例如依利蔡法德(LU79553)及其类似物、烷基化剂,例如卡奇霉素、放线菌素、丝裂霉素、吡咯并苯并二氮杂萘等。示例性的CC-1065类似物包括倍癌霉素SA、倍癌霉素A、倍癌霉素C1、倍癌霉素C2、倍癌霉素B1、倍癌霉素B2、倍癌霉素D、DU-86、KW-2189、阿多来新、比折来新、卡折来新、裂环-阿多来新,和相关的类似物和前药形式,其实例描述于美国专利号5,475,092;5,595,499;5,846,545;6,534,660;6,586,618;6,756,397和7,049,316。阿霉素及其类似物包括描述于美国专利号6,630,579中的那些。卡奇霉素包括,如烯二炔类(enediynes),如埃斯波霉素,和描述于美国专利号5,714,586和5,739,116中的那些。倍癌霉素(Duocarmycins)包括描述于美国专利号5,070,092;5,101,038;5,187,186;6,548,530;6,660,742;和7,553,816B2;和Li et al.,Tet Letts.,50:2932-2935(2009)中的那些。

[0291] 吡咯并苯并二氮杂萘(PBD)及其类似物包括描述于Denny, Exp.Opin.Ther.Patents.,10(4):459-474(2000)和Antonow和Thurston,Chem Rev.,2815-2864(2010)中的那些。

[0292] 示例性的微管稳定化和去稳定化剂包括紫杉烷化合物,例如太平洋紫杉醇(paclitaxel)、多西他赛、替司他赛和卡巴它赛(carbazitaxel);类美登素、奥瑞斯他汀及其类似物、长春花生物碱衍生物、埃博霉素和念珠藻环肽类(cryptophycins)。

[0293] 示例性的类美登素或类美登素类似物包括美登醇和美登醇类似物、美登素或DM-1和DM-4为描述于美国专利号5,208,020;5,416,064;6,333,410;6,441,163;6,716,821;RE39,151和7,276,497中的那些。在某些实施方案中,细胞毒性剂为类美登素,另一组抗-微管蛋白剂(ImmunoGen, Inc.;也可以参见Chari等,1992,Cancer Res.52:127-131),类美登素或类美登素类似物。合适的类美登素的实例包括美登醇和美登醇类似物。合适的类美登素公开于美国专利号4,424,219;4,256,746;4,294,757;4,307,016;4,313,946;4,315,929;4,331,598;4,361,650;4,362,663;4,364,866;4,450,254;4,322,348;4,371,533;6,333,410;5,475,092;5,585,499;和5,846,545中。

[0294] 示例性的奥瑞斯他汀包括奥瑞斯他汀E(也称为多拉司他汀-10的衍生物)、奥瑞斯他汀EB(AEB)、奥瑞斯他汀EFP(AEFP)、单甲基奥瑞斯他汀E(MMAE)、单甲基奥瑞斯他汀F(MMAF)、奥瑞斯他汀F、奥瑞斯他汀F苯二胺(AFP)、奥瑞斯他汀F HPA和多拉司他汀。合适的

奥瑞斯他汀还描述了美国专利公开号2003/0083263, 2011/0020343, 和2011/0070248; PCT 申请公开号WO 09/117531, WO 2005/081711, WO 04/010957; WO 02/088172和WO01/24763, 和美国专利号7,498,298; 6,884,869; 6,323,315; 6,239,104; 6,124,431; 6,034,065; 5,780,588; 5,767,237; 5,665,860; 5,663,149; 5,635,483; 5,599,902; 5,554,725; 5,530,097; 5,521,284; 5,504,191; 5,410,024; 5,138,036; 5,076,973; 4,986,988; 4,978,744; 4,879,278; 4,816,444; 和4,486,414中, 其公开内容整体通过引用结合到本文中。

[0295] 示例性的长春花生物碱类包括长春新碱、长春碱、长春地辛, 和诺维本(长春瑞滨)。可在本发明中使用的合适的长春花生物碱类也公开于美国专利公开号2002/0103136 和2010/0305149, 和美国专利号7,303,749B1中, 其公开内容整体通过引用结合到本文中。

[0296] 示例性的埃博霉素化合物包括埃博霉素A、B、C、D、E和F, 及其衍生物。合适的埃博霉素化合物及其衍生物描述于, 例如, 美国专利号6,956,036; 6,989,450; 6,121,029; 6,117,659; 6,096,757; 6,043,372; 5,969,145; 和5,886,026; 和WO 97/19086; WO 98/08849; WO 98/22461; WO 98/25929; WO 98/38192; WO 99/01124; WO 99/02514; WO 99/03848; WO 99/07692; WO 99/27890; 和WO 99/28324中; 其公开内容整体通过引用结合到本文中。

[0297] 示例性的念珠藻环肽化合物描述于美国专利号6,680,311和6,747,021中。

[0298] 示例性的铂化合物包括顺铂(PLATINOL®)、卡铂(PARAPLATIN®)、奥沙利铂(ELOXATINE®)、异丙铂、奥马铂和特拉铂。

[0299] 可选择另外的其它种类的化合物或具有这些或其它细胞毒性的作用模式的化合物, 包括, 如丝裂霉素C、丝裂霉素A、柔红霉素、阿霉素、吗啉代-阿霉素、氰基吗啉代-阿霉素、氨基蝶啶、博来霉素、1-(氯代甲基)-2,3-二氢-1H-苯并[e]吡啶-5-醇、吡咯并苯并二氮杂革(PBD) 聚酰胺及其二聚体。其它合适的细胞毒性剂包括, 例如, 嘌呤霉素、托泊替康、根霉素、棘霉素、风车子抑碱、纺锤菌素、雌莫司汀、念珠藻环肽、西马多丁、蜥皮海绵内酯、艾榴素, 和米托蒽醌。

[0300] 示例性的拓扑异构酶I抑制剂包括喜树碱、喜树碱衍生物、喜树碱类似物和非-天然喜树碱, 例如, CPT-11 (伊立替康)、SN-38、GI-147211C、托泊替康、9-氨基喜树碱、7-羟基甲基喜树碱、7-氨基甲基喜树碱、10-羟基喜树碱、(20S)-喜树碱、鲁比替康、吉马替康、卡瑞尼特辛(karenitecin)、席拉替康(silatecan)、勒托替康(lurtotecan)、依沙替康、二氟替康、贝洛替康(belotecan)、勒托替康和S39625。可在本发明中使用的其它喜树碱化合物包括在例如, J. Med. Chem., 29:2358-2363 (1986); J. Med. Chem., 23:554 (1980); J. Med. Chem., 30:1774 (1987) 中描述的那些。

[0301] 血管生成抑制剂包括, 但不限于, MetAP2抑制剂、VEGF抑制剂、PIGF抑制剂、VGFR抑制剂、PDGFR抑制剂、MetAP2抑制剂。示例性的VGFR和PDGFR抑制剂包括索拉非尼(Nexavar)、舒尼替尼(Sutent) 和伐他拉尼。示例性的MetAP2抑制剂包括烟曲霉醇(fumagillol) 类似物, 是指包括夫马洁林核心结构的任何化合物, 包括烟曲霉胺(fumagillamine), 其抑制MetAP-2将NH₂-末端甲硫氨酸从蛋白质中除去的能力, 如于Rodeschini等, J. Org. Chem., 69,357-373, 2004和Liu等, Science 282,1324-1327, 1998中所述。“烟曲霉醇类似物”的非限制性实例公开于J. Org. Chem., 69,357, 2004; J. Org. Chem., 70,6870, 2005; 欧洲专利申请 0 354 787; J. Med. Chem., 49,5645, 2006; Bioorg. Med. Chem., 11,5051, 2003;

Bioorg.Med.Chem.,14,91,2004;Tet.Lett.40,4797,1999;W099/61432;美国专利号6,603,812;5,789,405;5,767,293;6,566,541;和6,207,704中。

[0302] 示例性的细胞周期进展抑制剂包括CDK抑制剂,例如,BMS-387032和PD0332991;Rho-激酶抑制剂,例如GSK429286;检查点激酶抑制剂如,例如,AZD7762;极光激酶抑制剂如,例如,AZD1152、MLN8054和MLN8237;PLK抑制剂,例如,BI 2536,BI6727 (Volasertib)、GSK461364、ON-01910 (Estybon);和KSP抑制剂,例如,SB 743921、SB 715992 (伊匹尼塞)、MK-0731、AZD8477、AZ3146和ARRY-520。

[0303] 示例性的PI3K/m-TOR/AKT信号传导通路抑制剂包括磷脂酰肌醇3-激酶 (PI3K) 抑制剂、GSK-3抑制剂、ATM抑制剂、DNA-PK抑制剂和PDK-1抑制剂。

[0304] 示例性的PI3激酶抑制剂公开于美国专利号6,608,053中,并包括BEZ235、BGT226、BKM120、CAL101、CAL263、脱甲氧基绿胶酶素 (demethoxyviridin)、GDC-0941、GSK615、IC87114、LY294002、Palomid 529、哌立福辛、PI-103、PF-04691502、PX-866、SAR245408、SAR245409、SF1126、渥曼青霉素、XL147和XL765。

[0305] 示例性的AKT抑制剂包括,但不限于AT7867。

[0306] 示例性的MAPK信号传导通路抑制剂包括MEK、Ras、JNK、B-Raf和p38MAPK抑制剂。

[0307] 示例性的MEK抑制剂公开于美国专利号7,517,994并包括GDC-0973、GSK1120212、MSC1936369B、AS703026、R05126766和R04987655、PD0325901、AZD6244、AZD 8330和GDC-0973。

[0308] 示例性的B-raf抑制剂包括CDC-0879、PLX-4032和SB590885。

[0309] 示例性的B p38MAPK抑制剂包括BIRB 796、LY2228820和SB 202190。

[0310] 受体酪氨酸激酶 (RTK) 是细胞表面受体,其通常与信号传导通路结合,所述信号通路刺激癌细胞的不受控制的增殖和新血管生成。已经鉴定出许多RTK,其过度表达或具有突变而导致受体的持续活化,其包括,但不限于,VEGFR、EGFR、FGFR、PDGFR、EphR和RET受体家族受体。示例性的特异性RTK靶向包括ErbB2、FLT-3、c-Kit和c-Met。

[0311] 示例性的ErbB2受体 (EGFR家族) 的抑制剂包括但不限于AEE788 (NVP-AEE 788)、BIBW2992, (阿伐替尼)、拉帕替尼、厄洛替尼 (得舒缓 (Tarceva)), 和吉非替尼 (易瑞沙 (Iressa))。

[0312] 示例性的靶向一个以上信号传导通路 (多靶标激酶抑制剂) 的RTK抑制剂包括AP24534 (泊那替尼),其靶向FGFR、FLT-3、VEGFR-PDGFR和Bcr-Abl受体;ABT-869 (里尼凡尼 (Linifanib)),其靶向FLT-3和VEGFR-PDGFR受体;AZD2171,其靶向VEGFR-PDGFR、Flt-1和VEGF受体;CHR-258 (多韦替尼),其靶向VEGFR-PDGFR、FGFR、Flt-3和c-Kit受体;舒尼替尼 (Sutent),其靶向VEGFR、PDGFR、KIT、FLT-3和CSF-IR;索拉非尼 (Nexavar) 和伐他拉尼,其靶向VEGFR、PDGFR以及在Raf/Mek/Erk通路中的细胞内丝氨酸/苏氨酸激酶。

[0313] 示例性的蛋白质伴侣抑制剂包括HSP90抑制剂。示例性的HSP90抑制剂包括17AAG衍生物、BIIB021、BIIB028、SNX-5422、NVP-AUY-922和KW-2478。

[0314] 示例性的HDAC抑制剂包括贝林司他 (Belinostat) (PXD101)、CUDC-101、佐西司他 (Droxinostat)、ITF2357 (奇维司他 (Givinostat)、加维司他 (Gavinostat)), JNJ-26481585、LAQ824 (NVP-LAQ824、达西司他 (Dacinostat))、LBH-589 (帕比司他)、MC1568、MGCD0103 (莫西司他 (Mocetinostat))、MS-275 (恩替司他 (Entinostat))、PCI-24781、吡羟

酰胺 (Pyroxamide) (NSC 696085)、SB939、曲古抑菌素A和伏立诺他 (SAHA)。

[0315] 示例性的PARP抑制剂包括依尼帕尼 (BSI 201)、奥拉帕尼 (AZD-2281)、ABT-888 (凡立帕尼 (Veliparib))、AG014699、CEP 9722、MK 4827、KU-0059436 (AZD2281)、LT-673、3-氨基苯甲酰胺、A-966492和AZD2461。

[0316] 示例性的Wnt/Hedgehog信号传导通路抑制剂包括维莫德吉 (vismodegib) (RG3616/GDC-0449)、环巴胺 (11-去氧芥芬胺) (Hedgehog通路抑制剂) 和XAV-939 (Wnt通路抑制剂)。

[0317] 示例性的RNA聚合酶抑制剂包括鹅膏毒环肽 (amatoxins)。示例性的鹅膏毒环肽包括 α -瓢菌素、 β -瓢菌素、 γ -瓢菌素、 ϵ -瓢菌素、鹅膏无毒环肽 (amanullin)、鹅膏毒肽羧酸 (amanullic acid)、鹅膏毒肽酰胺 (amaninamide)、鹅膏素 (amanin)、和鹅膏无毒环肽原 (proamanullin)。

[0318] 示例性的蛋白质合成抑制剂包括单端孢霉烯族化合物。

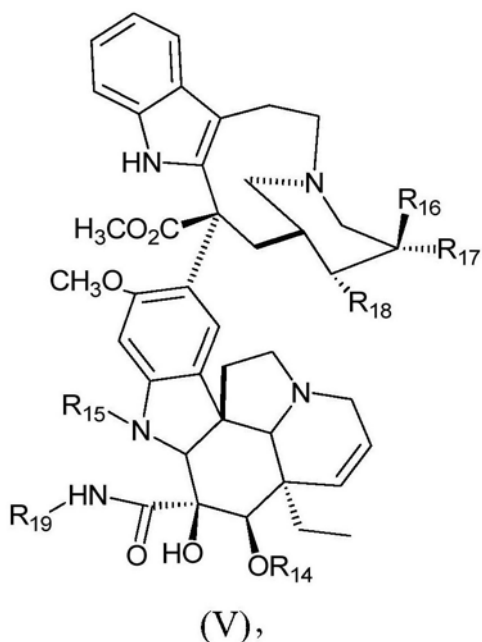
[0319] 在一个实施方案中,本发明的药物是拓扑异构酶抑制剂 (例如,非-天然喜树碱化合物)、长春花生物碱、激酶抑制剂 (如,PI3激酶抑制剂 (GDC-0941和PI-103))、MEK抑制剂、KSP抑制剂、RNA聚合酶抑制剂、蛋白质合成抑制剂、PARP抑制剂、多西他赛、太平洋紫杉醇、阿霉素、倍癌霉素、奥瑞斯他汀、多拉司他汀、卡奇霉素、托泊替康、SN38、喜树碱、依沙替康、奈莫柔比星及其衍生物、PNU-159682、CC1065、依利蔡法德、单端孢霉烯族、吡咯并苯并二氮杂草、类美登素、DNA-结合剂药物或铂化合物,及其类似物。在特定的实施方案中,药物为SN-38的衍生物、喜树碱、托泊替康、依沙替康、卡奇霉素、依沙替康、奈莫柔比星、PNU-159682、蒽环霉素、类美登素、紫杉烷、单端孢霉烯族化合物、CC1065、依利蔡法德、长春地辛、长春碱、PI-103、AZD 8330、多拉司他汀、奥瑞斯他汀E、奥瑞斯他汀F、倍癌霉素化合物、伊匹尼塞、吡咯并苯并二氮杂草、ARRY-520及其立体异构体、等排物和类似物。

[0320] 在另一个实施方案中,本发明中使用的药物是两个或更多个药物的组合,例如,PI3激酶抑制剂和MEK抑制剂;广谱细胞毒性的化合物和铂化合物;PARP抑制剂和铂化合物;广谱细胞毒性的化合物和PARP抑制剂。

[0321] 在还有的另一个实施方案中,用于本发明的药物是奥瑞斯他汀F-羟基丙基酰胺-L-丙氨酸。

[0322] 在一个实施方案中,长春花生物碱为式(V)的化合物:

[0323]



[0324] 其中：

[0325] R_{14} 是氢、-C(O)- C_{1-3} 烷基或-C(O)-氯取代的 C_{1-3} 烷基；[0326] R_{15} 是氢、-CH₃或-CHO；[0327] 当 R_{17} 和 R_{18} 独立地采取时， R_{18} 是氢，和 R_{16} 或 R_{17} 的任一个是乙基，而另一个是羟基；[0328] 当 R_{17} 和 R_{18} 与它们连接的碳一起形成环氧乙烷环时， R_{16} 是乙基；[0329] R_{19} 是氢、OH、氨基、烷基氨基或-[C($R_{20}R_{21}$)]_a- R_{22} ；[0330] R_{20} 和 R_{21} 各自独立地是氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{6-10} 芳基、羟基化 C_{6-10} 芳基、多羟基化 C_{6-10} 芳基、5-12元杂环、 C_{3-8} 环烷基、羟基化 C_{3-8} 环烷基、多羟基化 C_{3-8} 环烷基或者天然或非天然氨基酸的侧链；[0331] R_{22} 是-OH、-NH₂、-COOH、- R_{82} -C(O)(CH₂)_c-C(H)(R_{23})-N(H)(R_{23})、- R_{82} -C(O)(CH₂)_d-(OCH₂-CH₂)_f-N(H)(R_{23})或- R_{82} -(C(O)-CH(X^2)-NH)_d- R_{77} ；[0332] R_{23} 各自独立地是氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{6-10} 芳基、 C_{3-8} 环烷基、-COOH，或-COO- C_{1-6} 烷基；[0333] X^2 为天然或非天然氨基酸的侧链；[0334] R_{77} 是氢或 X^2 和NR₇₇形成含氮的杂环部分；[0335] R_{82} 是-NH或氧；

[0336] a为从1至6的整数；

[0337] c为从0至3的整数；

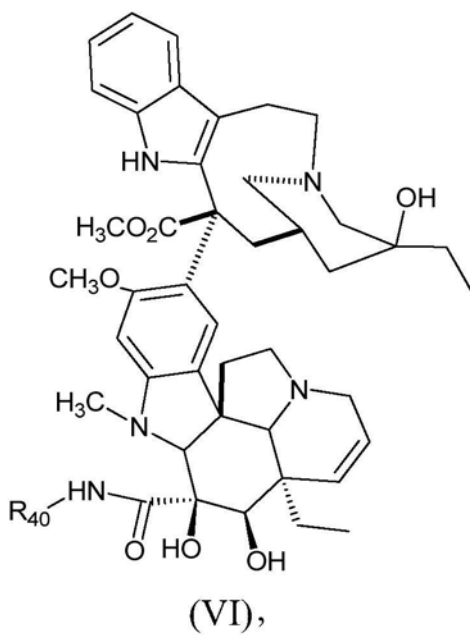
[0338] d为从1至3的整数；和

[0339] f为从1至12的整数。

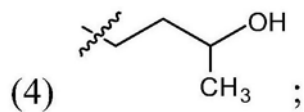
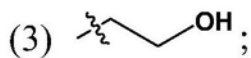
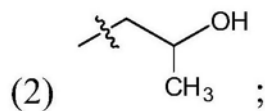
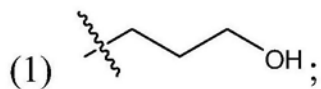
[0340] 长春花生物碱的其它实例描述于US8524214B2和US 2002/0103136中。

[0341] 在一个实施方案中，式(V)长春花生物碱是式(VI)的化合物：

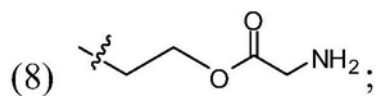
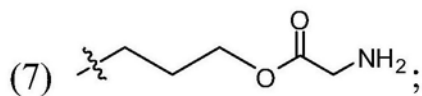
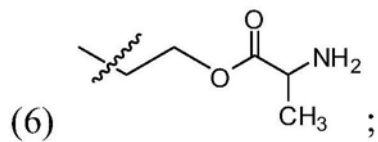
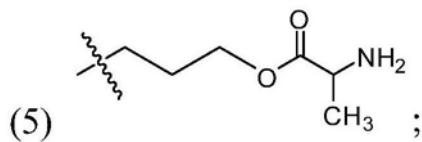
[0342]

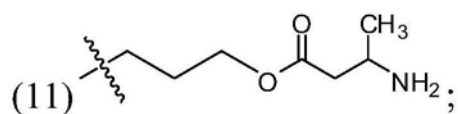
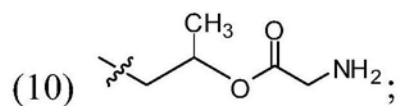
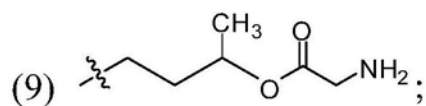


[0343] 其中:

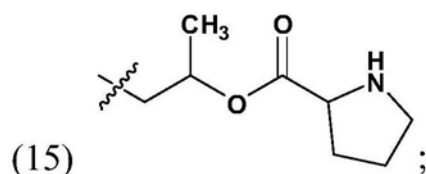
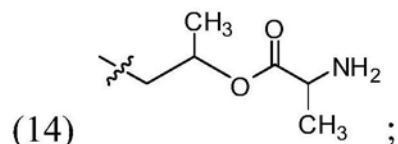
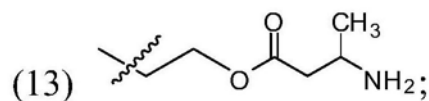
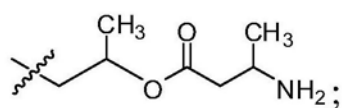
[0344] R_{40} 是氢、-OH、-NH₂,或任何下列结构:

[0345]

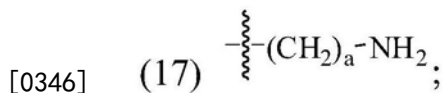
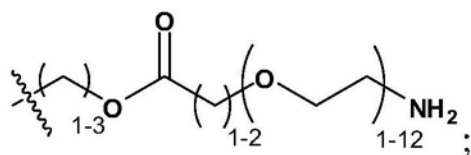




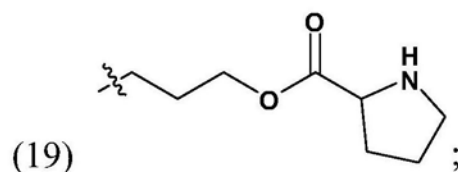
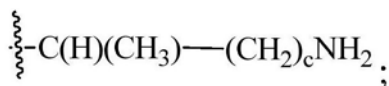
(12)



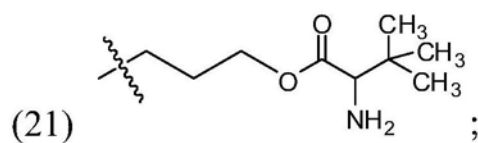
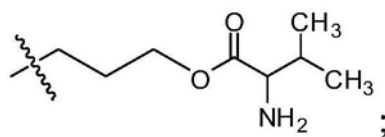
(16)



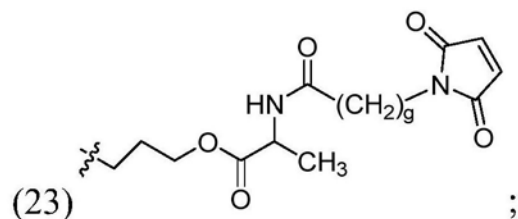
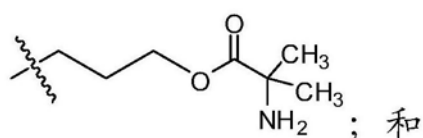
(18)



(20)



(22)

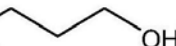


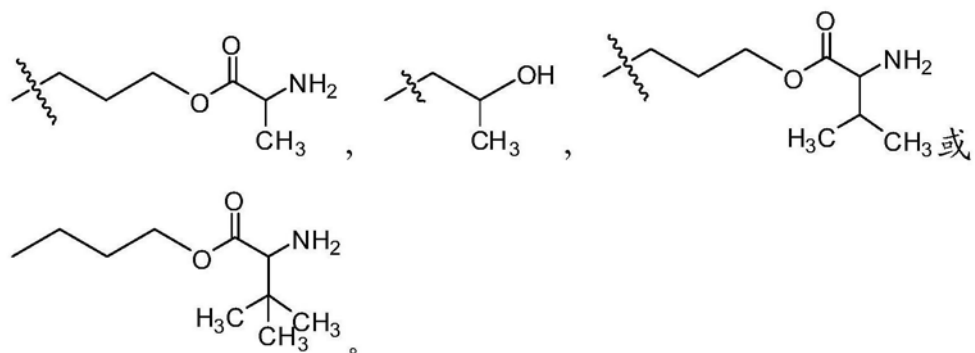
[0347] 其中:

[0348] a为从1至6的整数;

[0349] g为从2至6的整数;和

[0350] c为从0至3的整数。

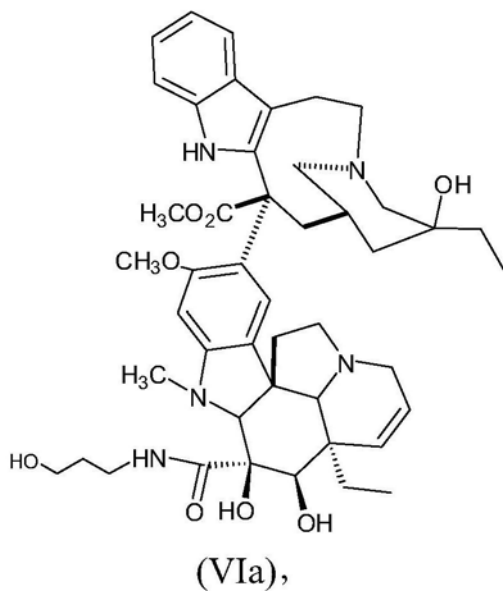
[0351] 在一个实施方案中,在式(VI)中, R_{40} 是   OH ,

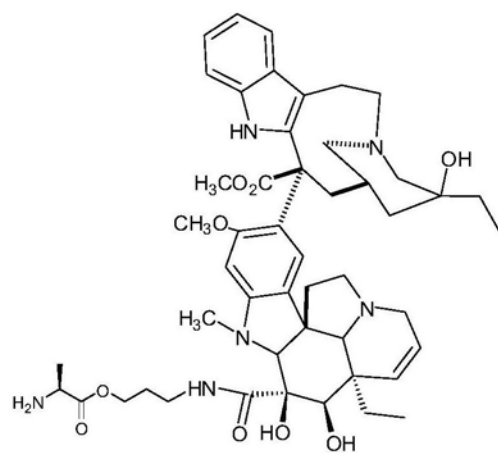


[0352] 在另一个实施方案中, R_{40} 是   OH 。

[0353] 在另一个实施方案中,式(VI)的化合物为式(VIa)、(VIb)、(VIc)或(VId)化合物:

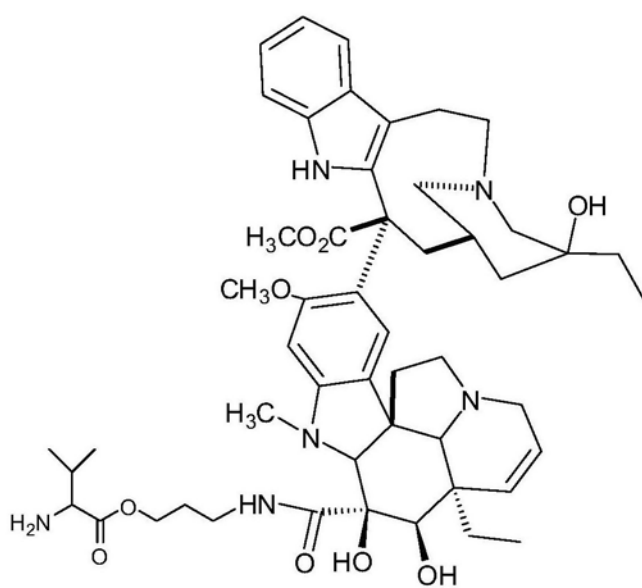
[0354]





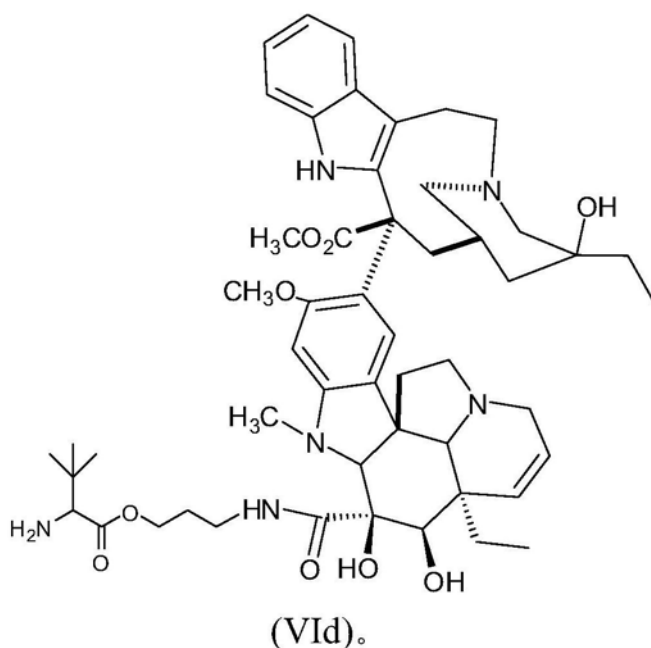
(VIb),

[0355]



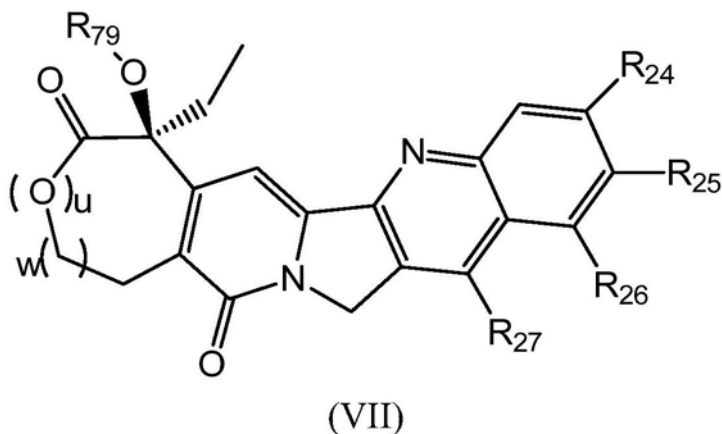
(VIc), 或

[0356]



[0357] 在另一个实施方案中,拓扑异构酶抑制剂为式(VII)的喜树碱化合物:

[0358]



[0359] 其中:

[0360] R_{24} 是-H、-Cl、-F、-OH或烷基;或 R_{24} 和 R_{25} 可结合在一起形成任选取代的5-或6-元环;

[0361] R_{25} 是-H、-F、-OH、-CH₃、-CH=N-O-叔丁基、-CH₂CH₂Si(CH₃)₃、-Si((CH₃)₂)-叔丁基、-O-C(O)- R_{29} ;

[0362] R_{29} 是-NH₂、- R_{28} -C₁₋₆烷基- R_{22} 、5-12元杂环烷基、 R_{28} -C₅₋₁₂杂环烷基-C₁₋₆烷基- R_{22} 或- R_{28} -C₁₋₆烷基-C₆₋₁₂芳基-C₁₋₆烷基- R_{22} ;或 R_{29} 是如本文所定义的 R_{47} ;

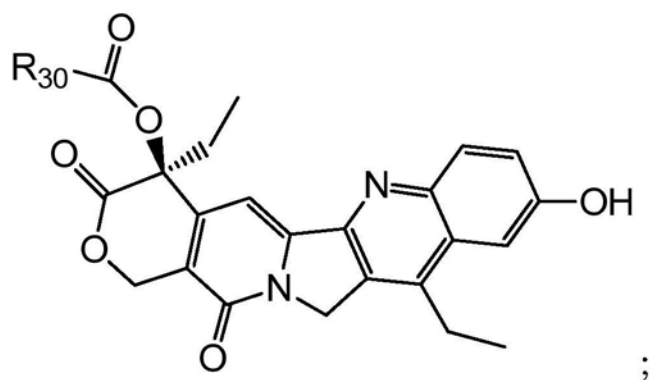
[0363] R_{26} 是-H、-CH₂-N(CH₃)₂,NH₂,或NO₂;

[0364] R_{27} 是-H、乙基、N-甲基哌啶、环烷基、-CH₂OH、-CH₂CH₂NHCH(CH₃)₂,或-N-4-甲基环己胺;

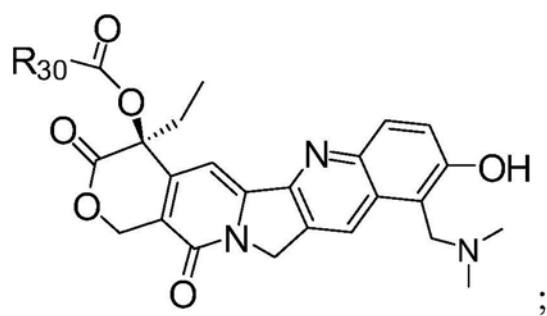
[0365] R_{79} 是-H或-C(O)- R_{28} -[C($R_{20}R_{21}$)]_a- R_{22} ;

[0366] R_{20} 和 R_{21} 各自独立地是氢、C₁₋₆烷基、C₆₋₁₀芳基、羟基化C₆₋₁₀芳基、多羟基化C₆₋₁₀芳基、5-12元杂环、C₃₋₈环烷基、羟基化C₃₋₈环烷基、多羟基化C₃₋₈环烷基或天然或非天然氨基酸的侧链;

- [0367] R_{22} 是 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{R}_{82}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_c-\text{C}(\text{H})(\text{R}_{23})-\text{N}(\text{H})(\text{R}_{23})$ 、 $-\text{R}_{82}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_d-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_f-\text{N}(\text{H})(\text{R}_{23})$ ，或 $-\text{R}_{82}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}(\text{X}^2)-\text{NH}_d-\text{R}_{77}$ ；
- [0368] 每个 R_{23} 独立地是氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{6-10} 芳基、 C_{3-8} 环烷基、 $-\text{COOH}$ ，或 $-\text{COO}-\text{C}_{1-6}$ 烷基；
- [0369] X^2 为天然或非天然氨基酸的侧链；
- [0370] R_{77} 为氢或 X^2 和 NR_{77} 形成含氮环状化合物；
- [0371] R_{82} 是 $-\text{NH}$ 或氧；
- [0372] 或者当 R_{26} 和 R_{27} 与它们连接的两个碳原子和连接该两个碳原子的第三个碳原子结合在一起时，形成任选取代的6元环；
- [0373] R_{28} 为不存在、 NH 或氧；
- [0374] a 为从1至6的整数；
- [0375] c 为从0至3的整数；
- [0376] d 为从1至3的整数；
- [0377] f 为从1至12的整数；
- [0378] u 为0或1的整数；
- [0379] w 为0或1的整数；和
- [0380] 前提条件是式(VII)的化合物必须含有 R_{29} 和 R_{79} 的至少一个。
- [0381] 在一个实施方案中，式(VII)的喜树碱化合物为式(VIII)、(VIIIa)，或(VIIIb)，或式(XXV)或(XXVa)的化合物：

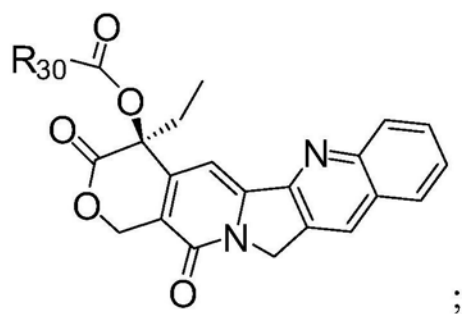


(VIII)

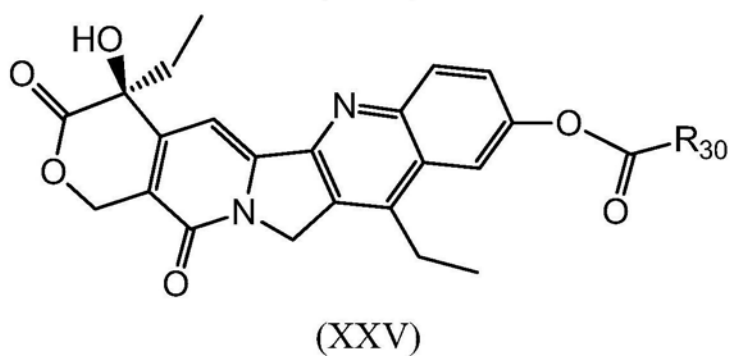


(VIIIa)

[0382]

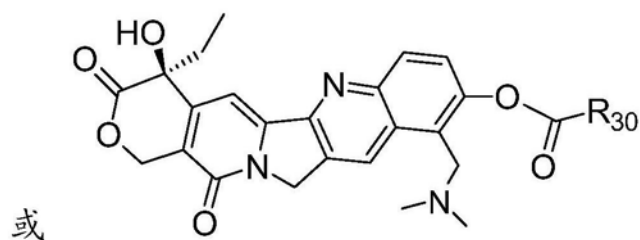


(VIIIb)



(XXV)

[0383]



或

(XXVa),

[0384] 其中R₃₀是-NH₂、-R₂₈-[C(R₂₀R₂₁)]_a-R₂₂、-R₂₈-C₁₋₆烷基-R₂₂、5-12元杂环烷基、R₂₈-C₅₋₁₂杂环烷基-C₁₋₆烷基-R₂₂或-R₂₈-C₁₋₆烷基-C₆₋₁₂芳基-C₁₋₆烷基-R₂₂;

[0385] R₂₈为不存在、NH或氧;

[0386] R₂₀和R₂₁各自独立地是氢、C₁₋₆烷基、C₆₋₁₀芳基、羟基化C₆₋₁₀芳基、多羟基化C₆₋₁₀芳基、5-12元杂环、C₃₋₈环烷基、羟基化C₃₋₈环烷基、多羟基化C₃₋₈环烷基或天然或非天然氨基酸的侧链;

[0387] R₂₂是-OH、-NH₂、-COOH、-R₈₂-C(O)(CH₂)_c-C(H)(R₂₃)-N(H)(R₂₃)、-R₈₂-C(O)(CH₂)_d-(OCH₂-CH₂)_f-N(H)(R₂₃)或-R₈₂-(C(O)-CH(X²)-NH)_d-R₇₇;

[0388] 每个R₂₃独立地是氢、C₁₋₆烷基、C₆₋₁₀芳基、C₃₋₈环烷基、-COOH,或-COO-C₁₋₆烷基;

[0389] X²为天然或非天然氨基酸的侧链;

[0390] R₇₇为氢或X²和NR₇₇形成含氮环状化合物;

[0391] R₈₂是-NH或氧;

[0392] a为从1至6的整数;

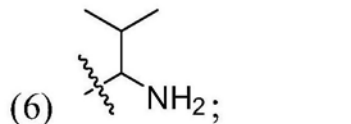
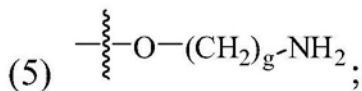
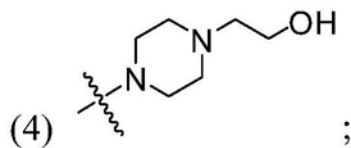
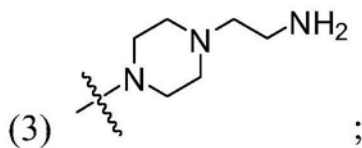
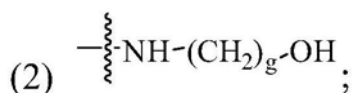
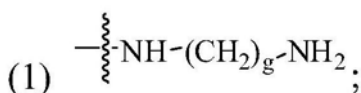
[0393] c为从0至3的整数;

[0394] d为从1至3的整数;和

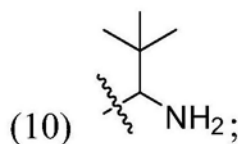
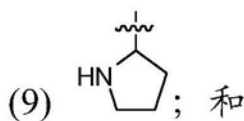
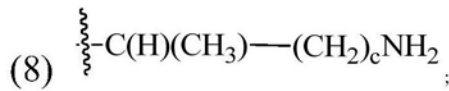
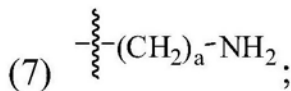
[0395] f为从1至12的整数。

[0396] 在一些实施方案中,R₃₀是下列结构中的任何一个:

[0397]



[0398]



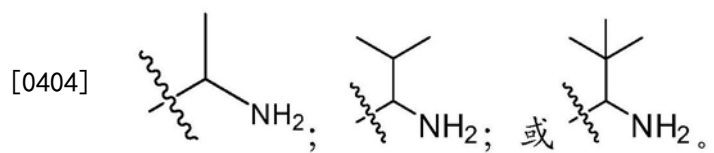
[0399] 其中:

[0400] a为从1至6的整数；

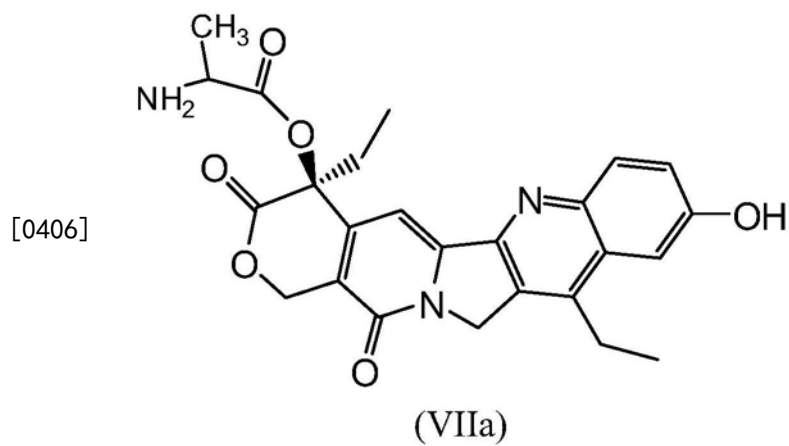
[0401] c为从0至3的整数；和

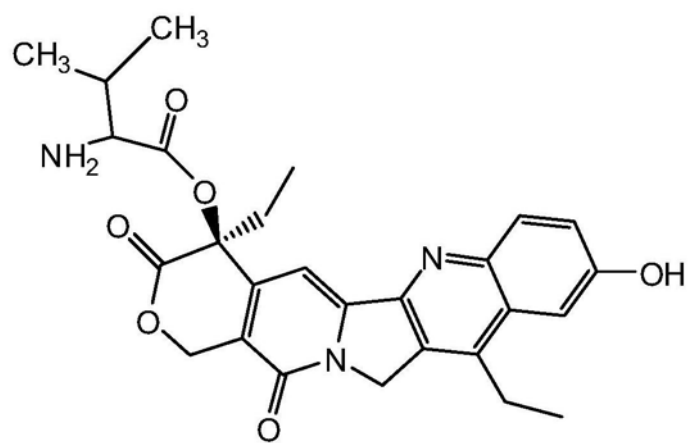
[0402] g为从2至6的整数。

[0403] 在一个实施方案中，在式 (VII) 中， R_{30} 是：

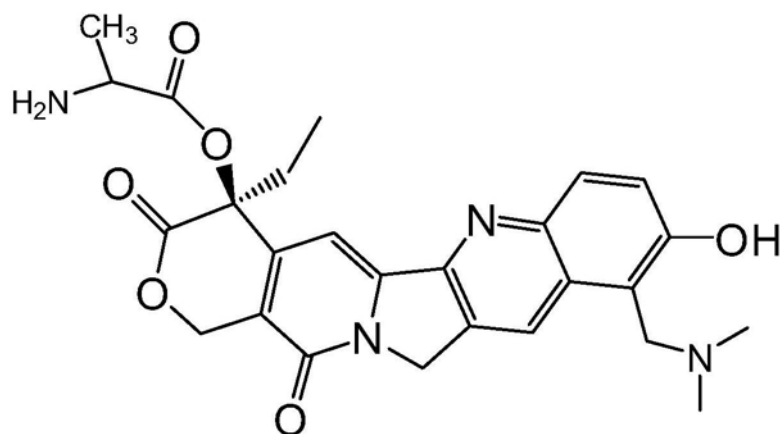


[0405] 在另一个实施方案中，式 (VII) 的化合物为式 (VIIa)、(VIIb)、(VIIc)、(VIId)、(VIIe) 或 (VIIf) 的化合物：

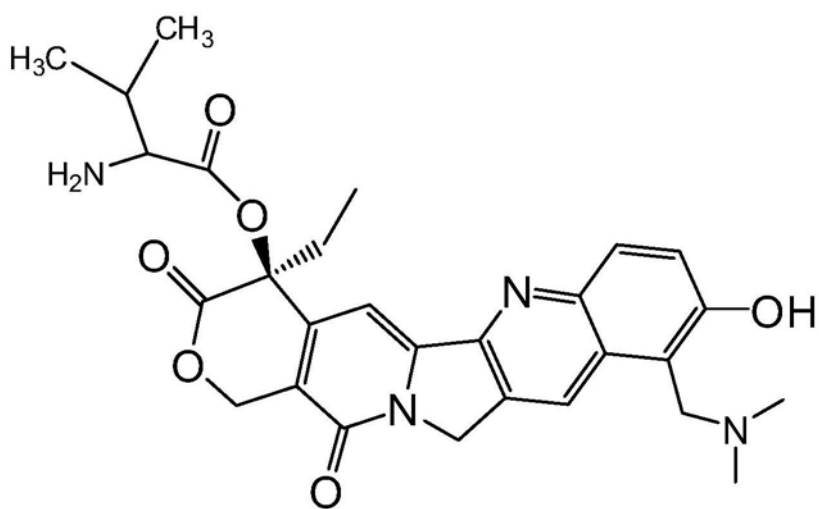




(VIIb)

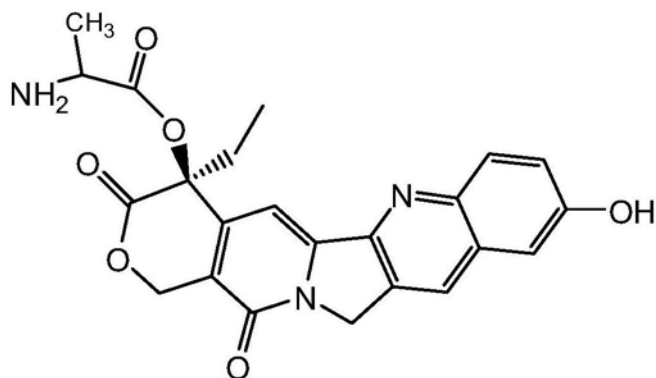


(VIIc)



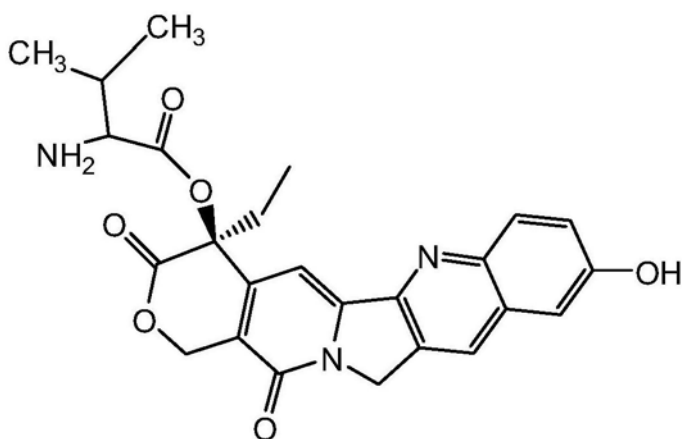
(VIIId)

[0407]



(VIIe), 或

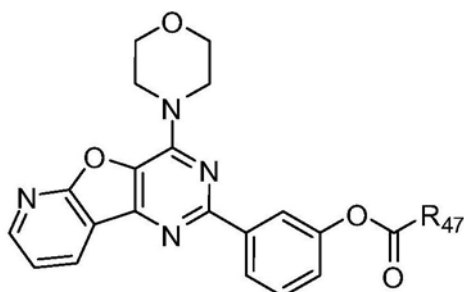
[0408]



(VIIIf)。

[0409] 在另一个实施方案中,PI3激酶抑制剂为式(IX)的化合物:

[0410]

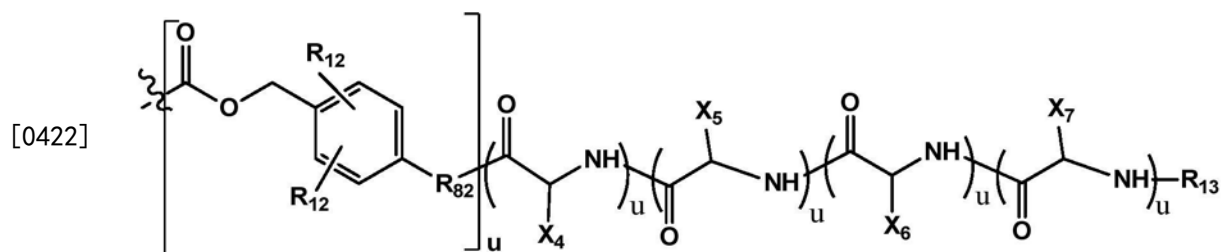


(IX),

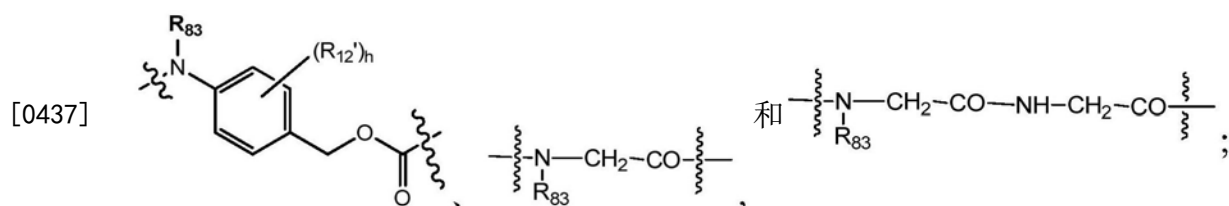
[0411] 其中

[0412] R_{47} 为氨基、 $-R_9-[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{10}$ 、 $-R_9-C_{5-12}$ 杂环烷基- C_{1-6} 烷基- R_{10} 、5-12元杂环烷基,或 $-R_9-C_{6-10}$ 芳基;[0413] R_{20} 和 R_{21} 各自独立地是氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{6-10} 芳基、羟基化 C_{6-10} 芳基、多羟基化 C_{6-10} 芳基、5-12元杂环、 C_{3-8} 环烷基、羟基化 C_{3-8} 环烷基、多羟基化 C_{3-8} 环烷基或天然或非天然氨基酸的侧链;[0414] R_{10} 是 $-OH$ 、 $-NHR_{83}$ 、 $-N-(R_{83})R_{11}$ 、 $-COOH$ 、 $-R_{82}-C(O)(CH_2)_c-C(H)(R_{23})-N(H)(R_{23})$ 、 $-R_{82}-C(O)(CH_2)_d-(OCH_2-CH_2)_f-N(H)(R_{23})$ 、 $-R_{82}-(C(O)-CH(X^2)-NH)_d-R_{77}$ 或 $-R_{82}-C(O)-[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{82}-R_{83}$;[0415] 每个 R_{23} 独立地是氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{6-10} 芳基、 C_{3-8} 环烷基、 $-COOH$,或 $-COO-C_{1-6}$ 烷基;

- [0416] X^2 为天然或非天然氨基酸的侧链；
 [0417] R_{77} 为氢或 X^2 和 NR_{77} 形成含氮环状化合物；
 [0418] R_{82} 是-NH或氧；
 [0419] R_9 为不存在, N- (R_{83}) 或氧；
 [0420] R_{83} 是氢或 CH_3 ；
 [0421] R_{11} 是：



- [0423] 每个 R_{12} 独立地是氢、氯化物、 $-CH_3$ 或 $-OCH_3$ ；
 [0424] R_{13} 是氢或 $-C(O)-(CH_2)_d-(O-CH_2-CH_2)_f-NH_2$ ；
 [0425] R_{82} 是-NH或氧
 [0426] X_4 是赖氨酸、精氨酸、瓜氨酸、丙氨酸或甘氨酸的侧链；
 [0427] X_5 是苯丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸或色氨酸的侧链；
 [0428] X_6 和 X_7 各自独立地是甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、缬氨酸或脯氨酸的侧链；
 [0429] a 为从1至6的整数；
 [0430] c 为从0至3的整数；
 [0431] d 为从1至3的整数；
 [0432] f 为从1至12的整数；和
 [0433] 每个 u 独立地为0或1的整数；
 [0434] 或 R_{11} 是 $-Y_u-W_q-R_{88}$ ，
 [0435] 其中：
 [0436] Y 是下列结构中的任何一个：



- [0438] 在其每一个中, Y 的末端 NR_{83} 基团邻近于 R_{88} ；
 [0439] R_{83} 是氢或 CH_3 ；
 [0440] 每个 W 是氨基酸单元；
 [0441] 每个 R_{12}' 独立地是卤素、 $-C_{1-8}$ 烷基、 $-O-C_{1-8}$ 烷基、硝基或氰基；
 [0442] R_{88} 是氢或 $-C(O)-(CH_2)_{ff}-(NH-C(O))_{aa}-E_j-(CH_2)_{bb}-R_{85}$
 [0443] R_{85} 是 NH_2 或 OH ；
 [0444] E 是 $-CH_2-$ 或 $-CH_2CH_2O-$ ；
 [0445] u 为0或1的整数；
 [0446] q 为从0至12的整数；

[0447] aa为0或1的整数；

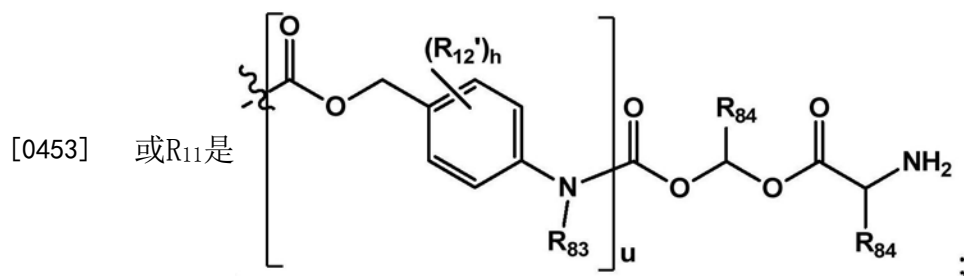
[0448] bb为0至2的整数；

[0449] ff为从0至10的整数；

[0450] h为从0至4的整数；

[0451] j为从0至12的整数；和

[0452] 当E是 $-\text{CH}_2-$ 时，bb是0和j为从0至10的整数；和当E是 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-$ 时，bb是2和j为从1至12的整数；



[0454] 其中：

[0455] R_{83} 是氢或 CH_3 ；

[0456] R_{84} 是 C_{1-6} 烷基或 C_{6-10} 芳基；

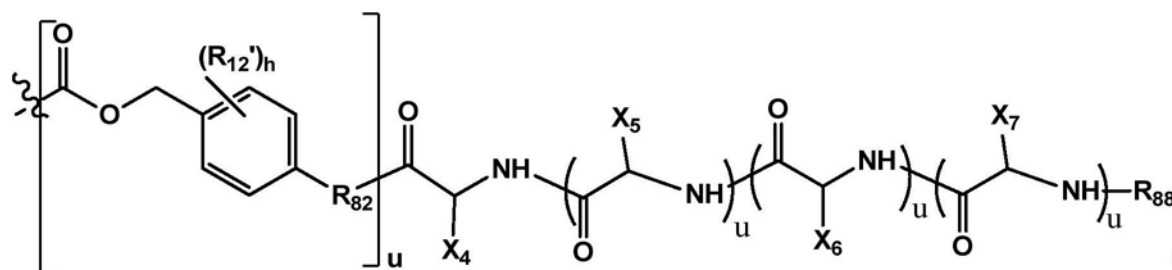
[0457] 每个 R_{12}' 独立地是卤素、 $-\text{C}_{1-8}$ 烷基、 $-\text{O}-\text{C}_{1-8}$ 烷基、硝基或氰基；

[0458] h为从0至4的整数；和

[0459] u为0或1的整数。

[0460] 在一些实施方案中， R_{11} 是：

[0461]



[0462] 其中：

[0463] 每个 R_{12}' 独立地是氯化物、 $-\text{CH}_3$ 或 $-\text{OCH}_3$ ；

[0464] R_{88} 是氢或 $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_{ff}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O})_j-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ；

[0465] R_{82} 是 $-\text{NH}$ 或氧；

[0466] X_4 是赖氨酸、精氨酸、瓜氨酸、丙氨酸或甘氨酸的侧链；

[0467] X_5 是苯丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸或色氨酸的侧链；

[0468] X_6 和 X_7 各自独立地是甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、缬氨酸或脯氨酸的侧链；

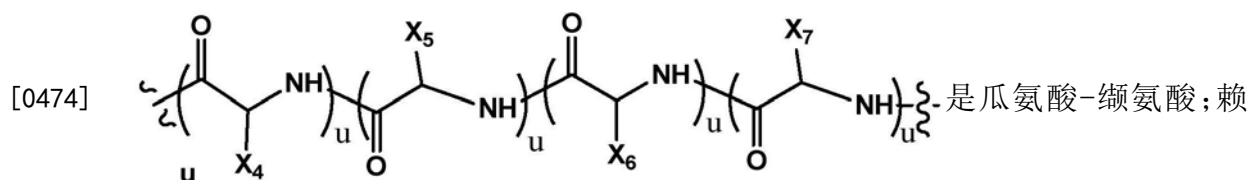
[0469] ff为从1至3的整数；

[0470] j为从1至12的整数

[0471] h为从0至4的整数；和

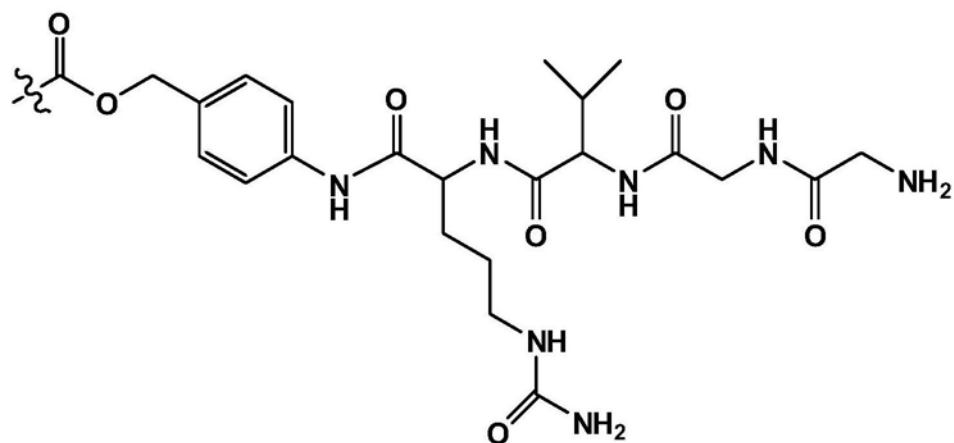
[0472] 每个u独立地为0或1的整数。

[0473] 在一些实施方案中，



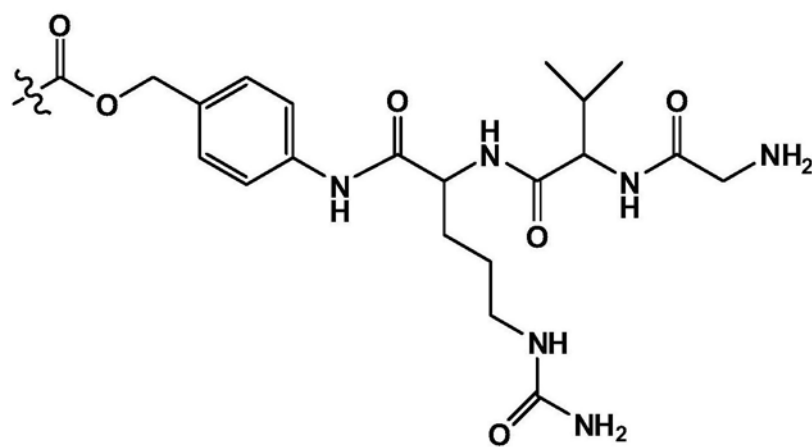
[0475] 在另一个实施方案中, R₁₁是下列结构中的任何一个:

(1)



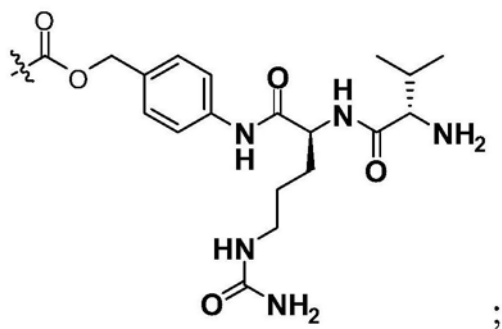
;

[0476] (2)

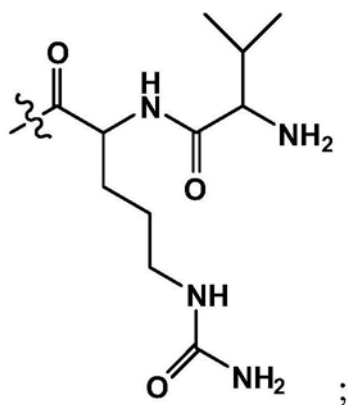


;

(3)

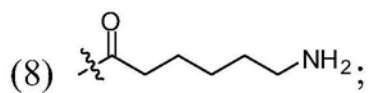
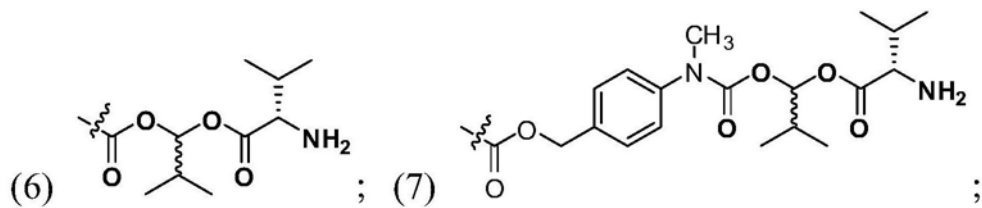
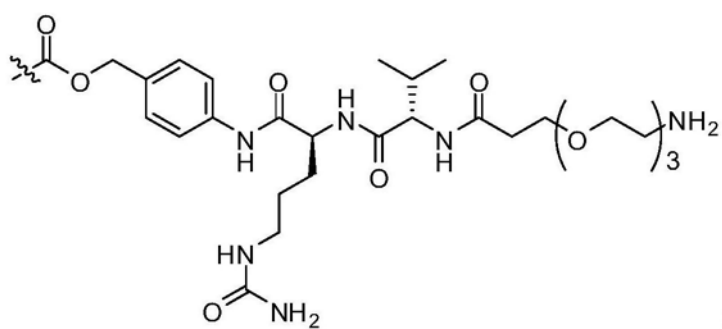


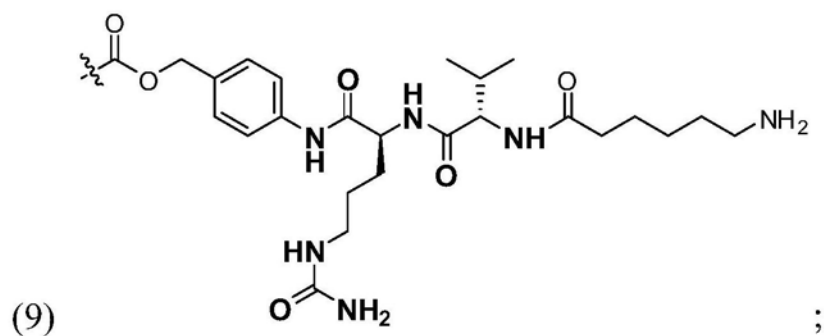
(4)



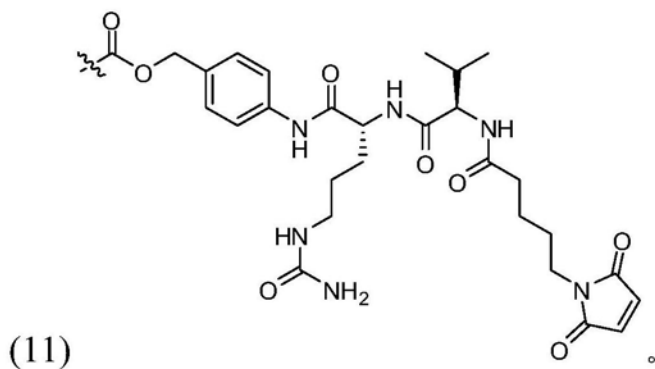
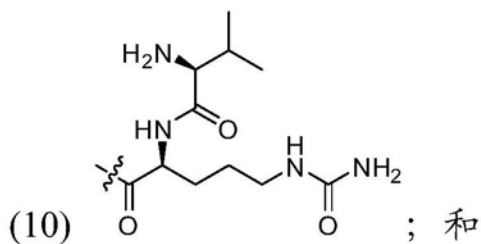
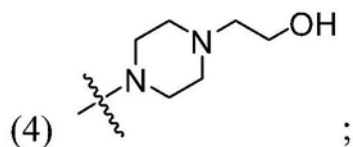
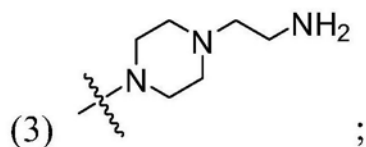
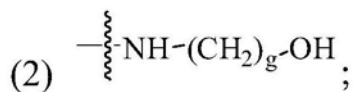
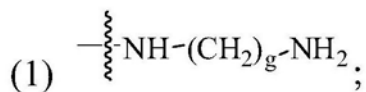
[0477]

(5)

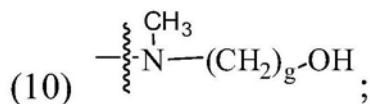
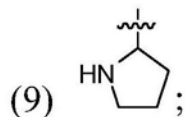
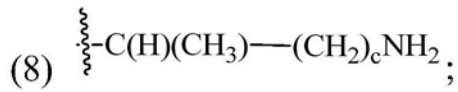
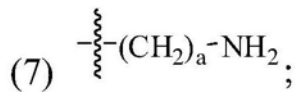
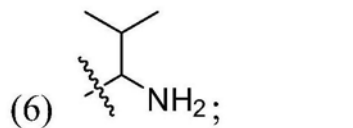
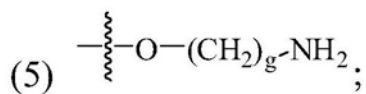


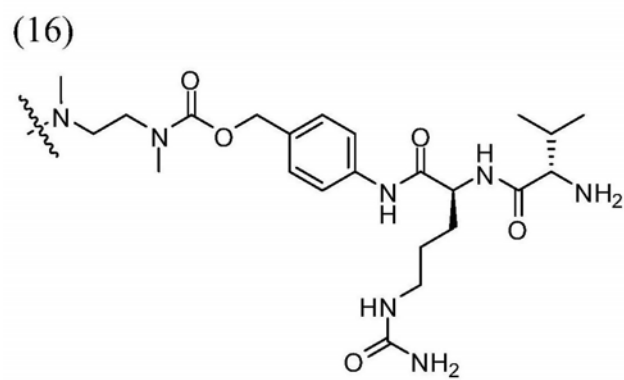
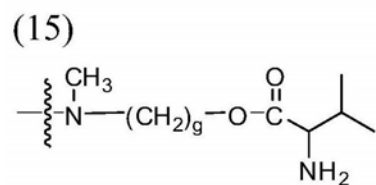
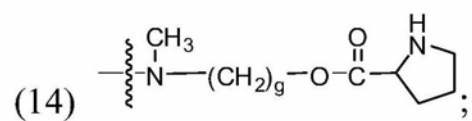
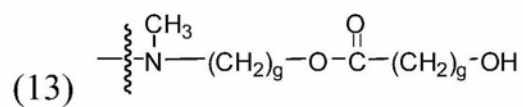
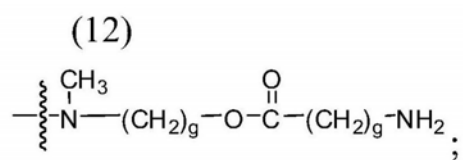
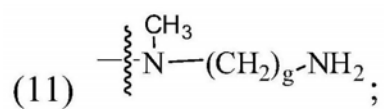


[0478]

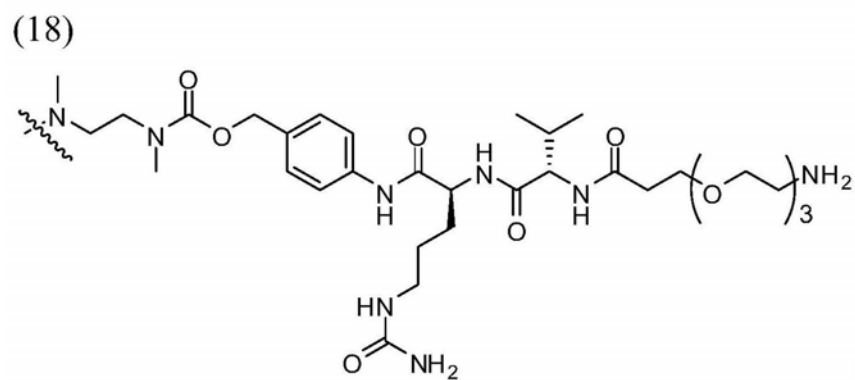
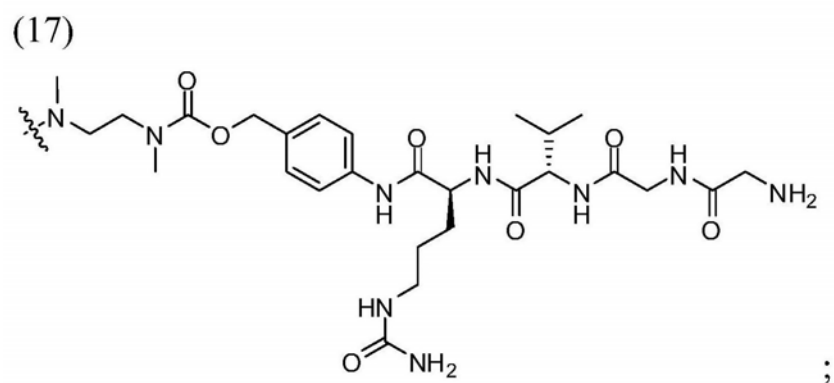
[0479] 在一些实施方案中, R_{47} 是下列结构中的任何一个:

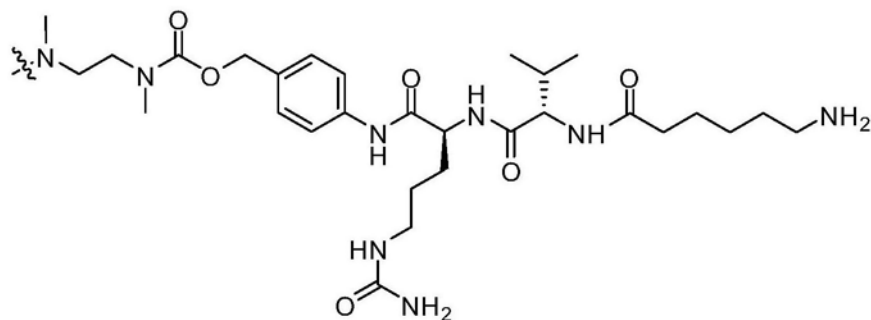
[0480]





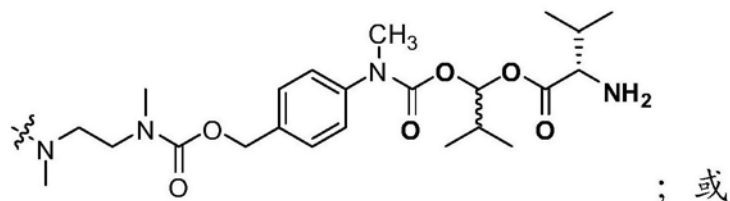
[0481]



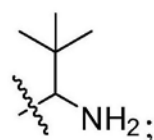


(20)

[0482]



(21)



[0483] 其中：

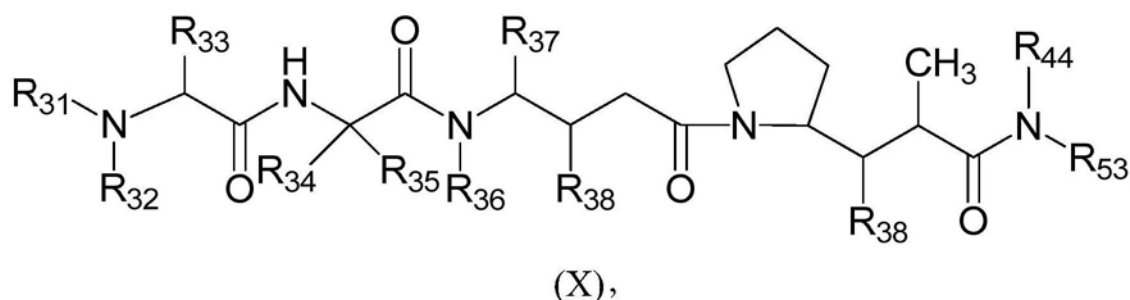
[0484] a为从1至6的整数；

[0485] c为从0至3的整数；和

[0486] g为从2至6的整数。

[0487] 在另一个实施方案中，奥瑞斯他汀为式 (X) 的化合物：

[0488]



(X),

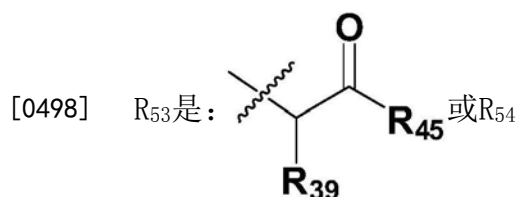
[0489] 其中：

[0490] R₃₁和R₃₂各自独立地是氢或C₁₋₈烷基和R₃₁和R₃₂的最多一个是氢；[0491] R₃₃是氢、C₁₋₈烷基、C₃₋₈碳环、C₆₋₁₀芳基、C₁₋₈烷基-C₆₋₁₀芳基、X¹-(C₃₋₈碳环)、C₃₋₈杂环或X¹-(C₃₋₈杂环)；[0492] R₃₄是氢、C₁₋₈烷基、C₃₋₈碳环、C₆₋₁₀芳基、X¹-C₆₋₁₀芳基、X¹-(C₃₋₈碳环)、C₃₋₈杂环或X¹-(C₃₋₈杂环)；[0493] R₃₅是氢或甲基；[0494] 或R₃₄和R₃₅与它们连接的碳原子一起形成具有式-(CR₅₅R₄₁)_b-的碳环基环，其中R₅₅和R₄₁各自独立地是氢或C₁₋₈烷基和b为从3至7的整数；

[0495] R_{36} 是氢或 C_{1-8} 烷基；

[0496] R_{37} 是氢、 C_{1-8} 烷基、 C_{3-8} 碳环、 C_{6-10} 芳基、 $-X^1-C_{6-10}$ 芳基、 $-X^1-(C_{3-8}$ 碳环)、 C_{3-8} 杂环或 $-X^1-(C_{3-8}$ 杂环)；

[0497] 每个 R_{38} 独立地是氢、OH、 C_{1-8} 烷基、 C_{3-8} 碳环或 $O-(C_{1-8}$ 烷基)；



[0499] R_{39} 是H、 C_{1-8} 烷基、 C_{6-10} 芳基、 $-X^1-C_{6-10}$ 芳基、 C_{3-8} 碳环、 C_{3-8} 杂环、 $-X^1-C_{3-8}$ 杂环、 $-C_{1-8}$ 亚烷基-NH₂，或 $(CH_2)_2SCH_3$

[0500] 每个 X^1 独立地是 C_{1-10} 亚烷基或 C_{3-10} 环亚烷基；

[0501] R_{44} 是氢或 C_{1-8} 烷基；

[0502] R_{45} 是 X^3-R_{42} 或NH- R_{19} ；

[0503] X^3 是O或S；

[0504] R_{19} 是氢、OH、氨基、烷基氨基或 $-[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{22}$ ；

[0505] R_{42} 为氨基、 C_{1-6} 烷基氨基或 $-[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{22}$ ；

[0506] R_{20} 和 R_{21} 各自独立地是氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{6-10} 芳基、羟基化 C_{6-10} 芳基、多羟基化 C_{6-10} 芳基、5-12元杂环、 C_{3-8} 环烷基、羟基化 C_{3-8} 环烷基、多羟基化 C_{3-8} 环烷基或天然或非天然氨基酸的侧链；

[0507] R_{22} 是-OH、-NHR₂₃、-COOH、 $-R_{82}-C(O)(CH_2)_c-C(H)(R_{23})-N(H)(R_{23})$ 、 $-R_{82}-C(O)(CH_2)_d-(OCH_2-CH_2)_f-N(H)(R_{23})$ 或 $-R_{82}-C(O)-CH(X^2)-NH_d-R_{77}$ ；

[0508] 每个 R_{23} 独立地是氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{6-10} 芳基、 C_{3-8} 环烷基、-COOH，或-COO- C_{1-6} 烷基；

[0509] X^2 为天然或非天然氨基酸的侧链；

[0510] R_{77} 为氢或 X^2 和NR₇₇形成含氮环状化合物；

[0511] R_{82} 是-NH或氧；

[0512] R_{54} 是 $-C(R_{56})_2-C(R_{56})_2-C_{6-10}$ 芳基、 $-C(R_{56})_2-C(R_{56})_2-C_{3-8}$ 杂环或 $-C(R_{56})_2-C(R_{56})_2-C_{3-8}$ 碳环；

[0513] R_{56} 独立地选自H、OH、 C_{1-8} 烷基、 C_{3-8} 碳环、 $-O-C_{1-8}$ 烷基、 $-O-C(O)-R_{29}$ 和 $-O-R_{23}-O-C_{1-6}$ 烷基-NH₂；

[0514] R_{29} 是氨基、5-12元杂环烷基、 $-R_{28}-C_{1-6}$ 烷基- R_{22} 、 $R_{28}-C_{5-12}$ 杂环烷基- C_{1-6} 烷基- R_{22} 、 $-[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{22}$ ，或 $-R_{28}-C_{1-6}$ 烷基- C_{6-12} 芳基- C_{1-6} 烷基- R_{22} ；或 R_{29} 是如本文所定义的 R_{47} ；

[0515] R_{28} 为不存在、NH或氧；

[0516] a为从1至6的整数；

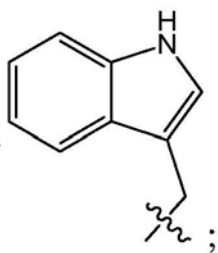
[0517] c为从0至3的整数；

[0518] d为从1至3的整数；和

[0519] f为从1至12的整数。

[0520] 在一些实施方案中，在式(X)的奥瑞斯他汀化合物中：

[0521] R_{39} 是苣基或

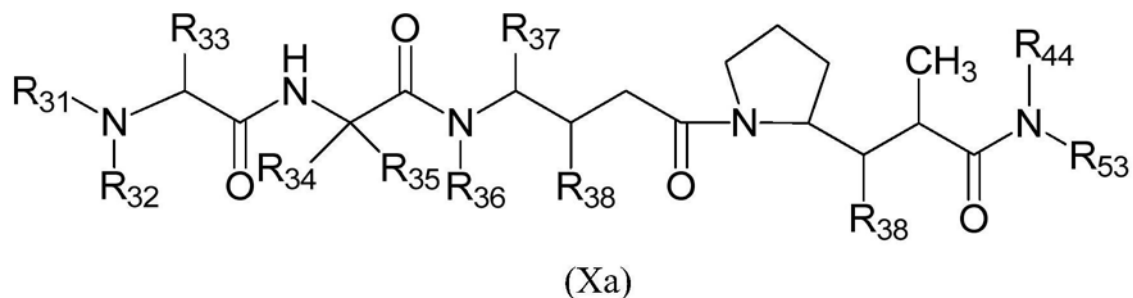


和

[0522] R_{44} 是氢。

[0523] 在另一个实施方案中,奥瑞斯他汀为式 (Xa) 的化合物

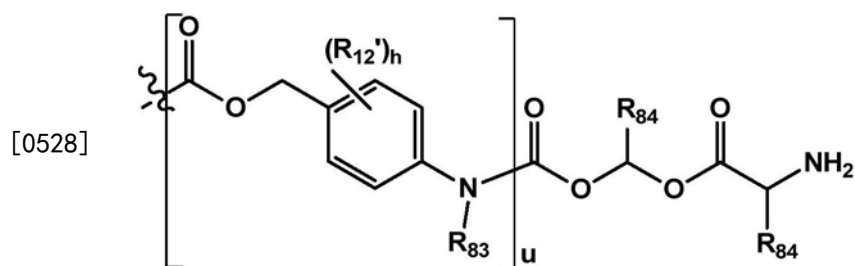
[0524]



[0525] 其中:

[0526] R_{33} 至 R_{38} ,和 R_{44} 是如本文所定义,

[0527] R_{31} 和 R_{32} 之一是氢或 C_{1-8} 烷基,而另一个是:



[0529] 其中:

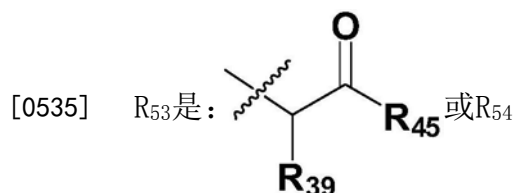
[0530] R_{83} 是氢或 CH_3 ;

[0531] R_{84} 是 C_{1-6} 烷基或 C_{6-10} 芳基;

[0532] 每个 R_{12}' 独立地是卤素、 $-C_{1-8}$ 烷基、 $-O-C_{1-8}$ 烷基、硝基或氰基;

[0533] h 为从0至4的整数;和

[0534] u 为0或1的整数;

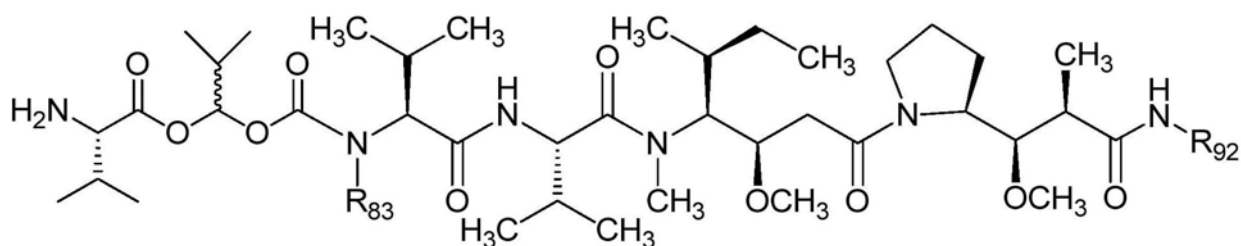


[0536] R_{39} 是H、 C_{1-8} 烷基、 C_{6-10} 芳基、 $-X^1-C_{6-10}$ 芳基、 C_{3-8} 碳环、 C_{3-8} 杂环、 $-X^1-C_{3-8}$ 杂环、 $-C_{1-8}$ 亚烷基- NH_2 ,或 $(CH_2)_2SCH_3$,

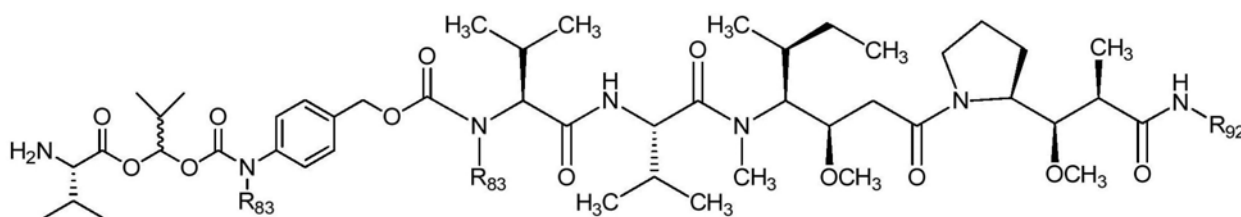
[0537] 每个 X^1 独立地是 C_{1-10} 亚烷基或 C_{3-10} 环亚烷基;

[0538] R_{45} 是 X^3-R_{42} 或 $NH-R_{19}$;

- [0539] X^3 是O或S;
- [0540] R_{19} 是氢、OH、氨基、烷基氨基或 $-[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{22}$;
- [0541] R_{42} 是H、氨基、 C_{1-6} 烷基氨基或 $-[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{22}$;
- [0542] R_{20} 和 R_{21} 各自独立地是氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{6-10} 芳基、羟基化 C_{6-10} 芳基、多羟基化 C_{6-10} 芳基、5-12元杂环、 C_{3-8} 环烷基、羟基化 C_{3-8} 环烷基、多羟基化 C_{3-8} 环烷基或天然或非天然氨基酸的侧链;
- [0543] R_{22} 是-OH、-NHR₂₃、-COOH、-R₈₂-C(O)(CH₂)_c-C(H)(R₂₃)-N(H)(R₂₃)、-R₈₂-C(O)(CH₂)_d-(OCH₂-CH₂)_f-N(H)(R₂₃)或-R₈₂-(C(O)-CH(X²)-NH)_d-R₇₇;
- [0544] 每个 R_{23} 独立地是氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{6-10} 芳基、 C_{3-8} 环烷基、-COOH,或-COO- C_{1-6} 烷基;
- [0545] X^2 为天然或非天然氨基酸的侧链;
- [0546] R_{77} 为氢或 X^2 和NR₇₇形成含氮环状化合物;
- [0547] R_{82} 是-NH或氧;
- [0548] R_{54} 是-C(R₅₆)₂--C(R₅₆)₂- C_{6-10} 芳基、-C(R₅₆)₂--C(R₅₆)₂- C_{3-8} 杂环或-C(R₅₆)₂--C(R₅₆)₂- C_{3-8} 碳环;
- [0549] R_{56} 独立地选自H、OH、 C_{1-8} 烷基、 C_{3-8} 碳环、-O- C_{1-8} 烷基、-O-C(O)-R₂₉和-O-R₂₃-O- C_{1-6} 烷基-NH₂;
- [0550] R_{29} 是氨基、5-12元杂环烷基、-R₂₈- C_{1-6} 烷基-R₂₂、R₂₈- C_{5-12} 杂环烷基- C_{1-6} 烷基-R₂₂、- $[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{22}$,或-R₂₈- C_{1-6} 烷基- C_{6-12} 芳基- C_{1-6} 烷基-R₂₂;或 R_{29} 是如本文所定义的 R_{47} ;
- [0551] R_{28} 为不存在,NH或氧;
- [0552] a为从1至6的整数;
- [0553] c为从0至3的整数;
- [0554] d为从1至3的整数;和
- [0555] f为从1至12的整数。
- [0556] 在一个实施方案中,式(Xa)的奥瑞斯他汀化合物为式(XIa)或式(XIb)的化合物:
- [0557]



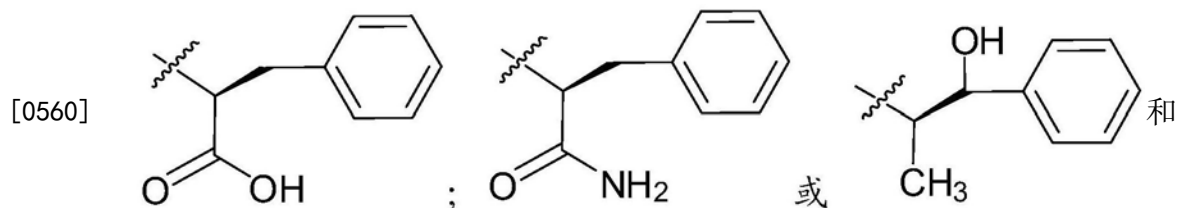
(XIa) 或



(XIb),

- [0558] 其中:

[0559] R_{92} 是:

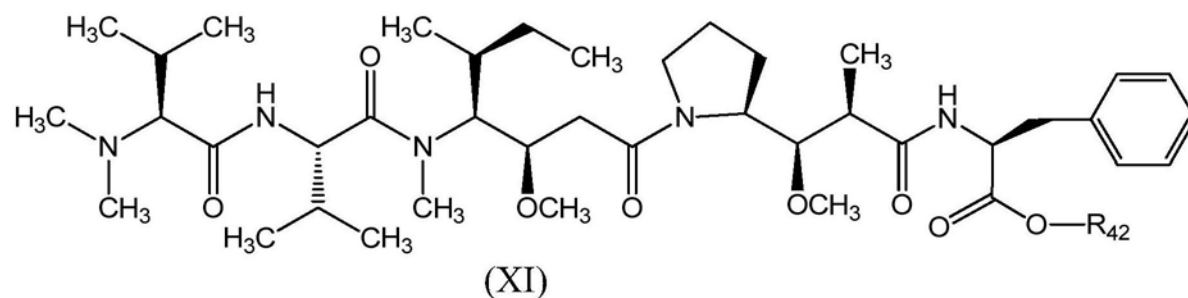


[0561] R_{83} 是氢或 CH_3 。

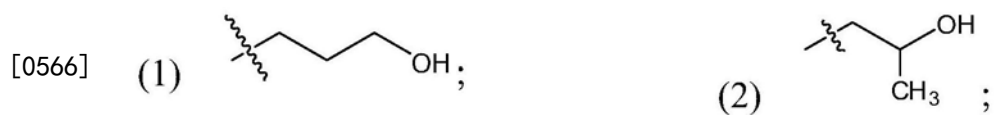
[0562] 在一个实施方案中,式(X)的奥瑞斯他汀为式(XI)、式(XII)或式(XIII)的化合物:

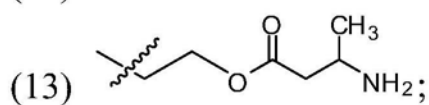
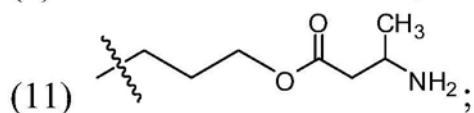
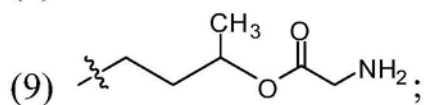
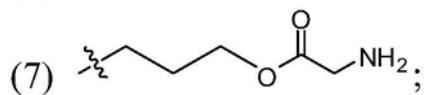
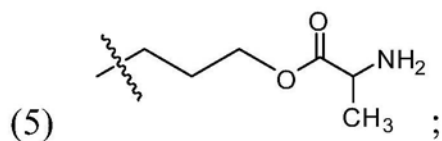
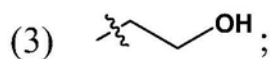
[0563] 其中式(XI)的化合物是:

[0564]

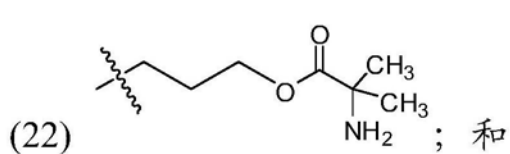
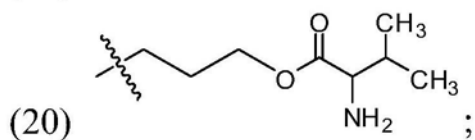
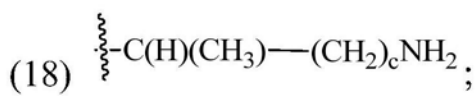
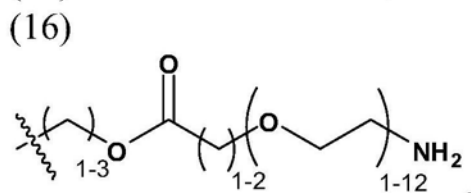
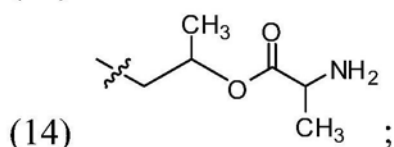
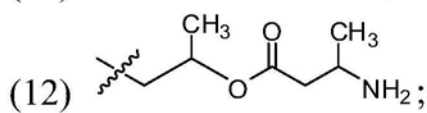
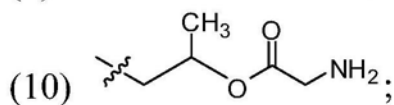
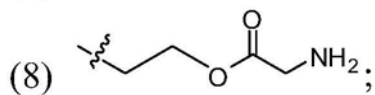
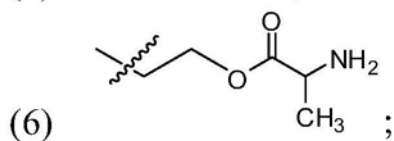
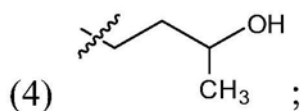
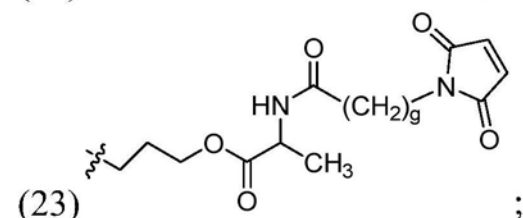
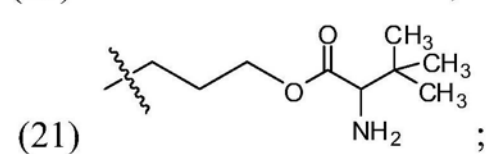
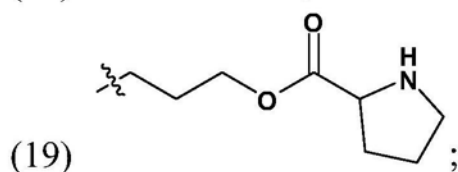
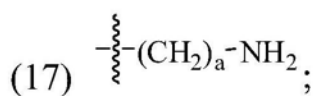
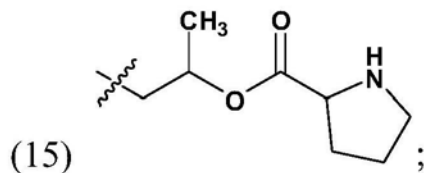


[0565] 其中 R_{42} 是 $-CH_3$ 或下列结构的任何一个:





[0567]



[0568] 其中：

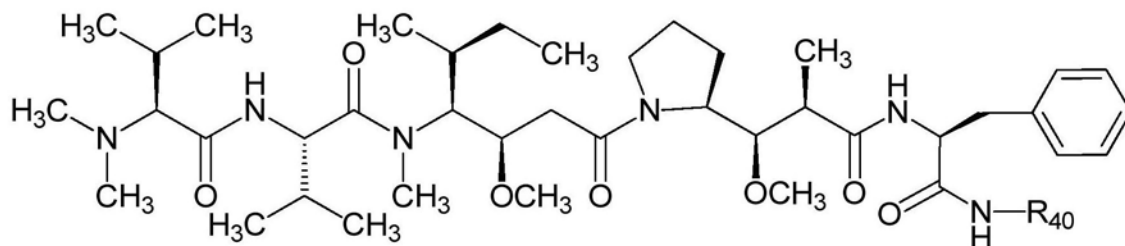
[0569] a为从1至6的整数；

[0570] c为从0至3的整数；和

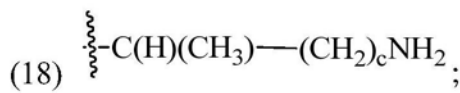
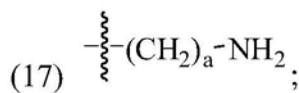
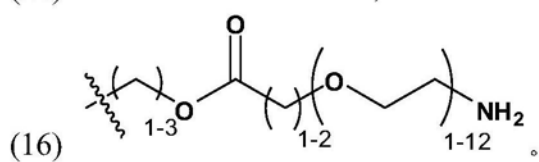
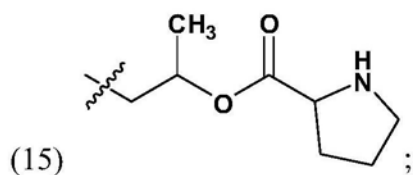
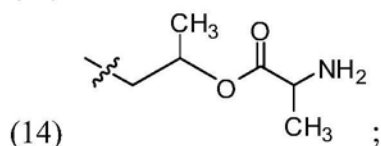
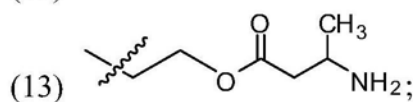
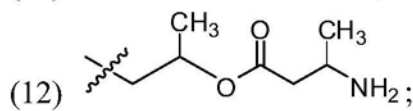
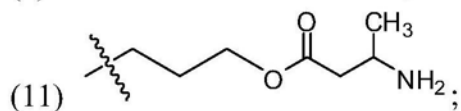
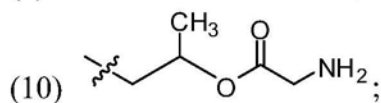
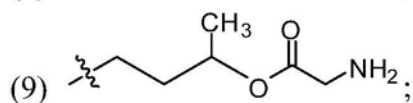
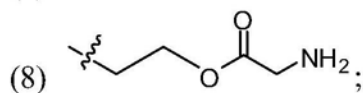
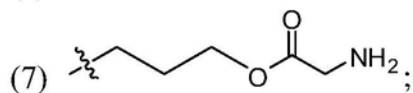
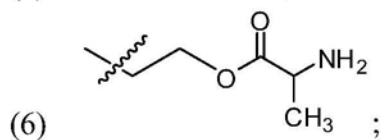
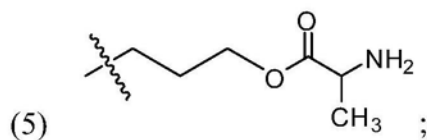
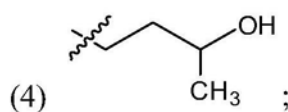
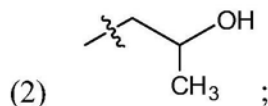
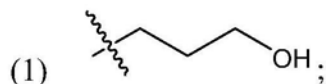
[0571] g为从2至6的整数；

[0572] 其中式(XII)的化合物是：

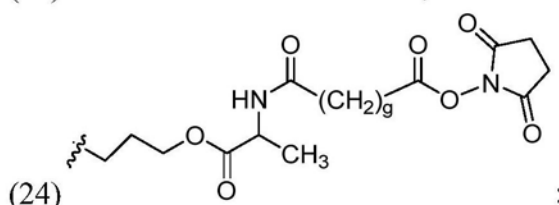
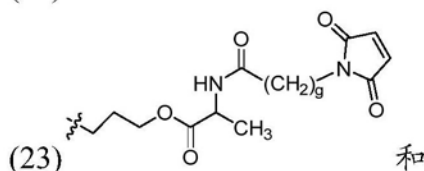
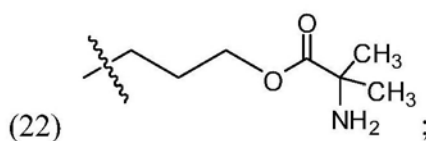
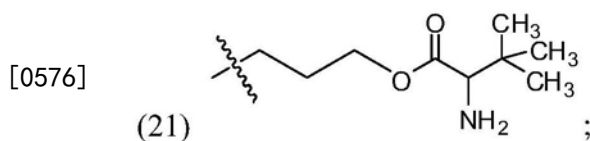
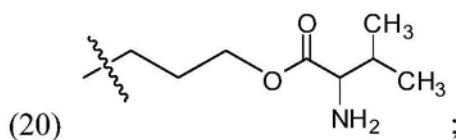
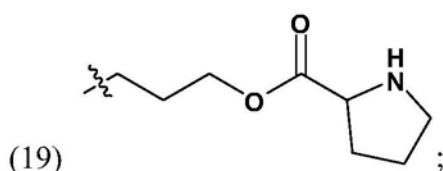
[0573]



(XII),

[0574] 其中R₄₀是氢、-OH、-NH₂,或任何下列结构:

[0575]



[0577] 其中：

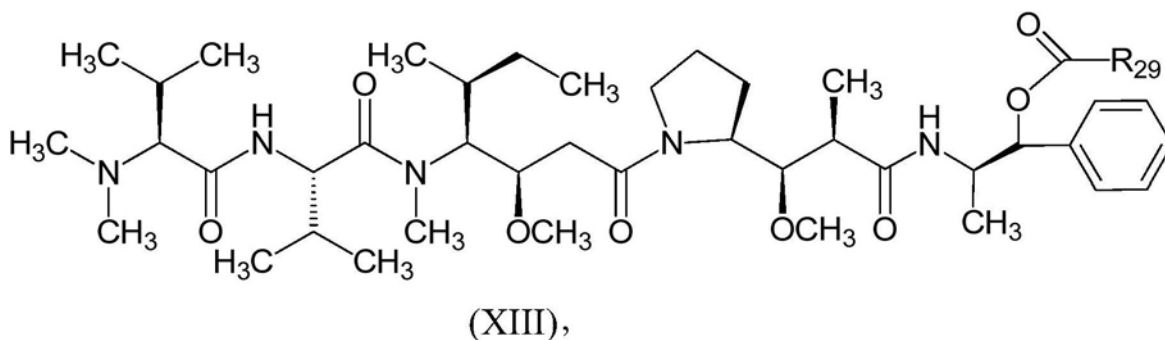
[0578] a为从1至6的整数；

[0579] g为从2至6的整数；和

[0580] c为从0至3的整数；

[0581] 其中式 (XIII) 的化合物是：

[0582]



[0583] 其中R₂₉是氨基、5-12元杂环烷基、-R₂₈-C₁₋₆烷基-R₂₂、R₂₈-C₅₋₁₂杂环烷基-C₁₋₆烷基-R₂₂、-R₂₈-[C(R₂₀R₂₁)]_a-R₂₂，或-R₂₈-C₁₋₆烷基-C₆₋₁₂芳基-C₁₋₆烷基-R₂₂；或R₂₉是如本文所定义的R₄₇；

[0584] R₂₀和R₂₁各自独立地是氢、C₁₋₆烷基、C₆₋₁₀芳基、羟基化C₆₋₁₀芳基、多羟基化C₆₋₁₀芳基、5-12元杂环、C₃₋₈环烷基、羟基化C₃₋₈环烷基、多羟基化C₃₋₈环烷基或天然或非天然氨基酸的侧链；

[0585] R₂₂是-OH、-NHR₂₃、-COOH、-R₈₂-C(O)(CH₂)_c-C(H)(R₂₃)-N(H)(R₂₃)、-R₈₂-C(O)(CH₂)_d-(OCH₂-CH₂)_f-N(H)(R₂₃)或-R₈₂-(C(O)-CH(X²)-NH)_d-R₇₇；

[0586] 每个R₂₃独立地是氢、C₁₋₆烷基、C₆₋₁₀芳基、C₃₋₈环烷基、-COOH，或-COO-C₁₋₆烷基；

[0587] X²为天然或非天然氨基酸的侧链；

[0588] R₇₇为氢或X²和NR₇₇形成含氮环状化合物；

[0589] R₈₂是-NH或氧；

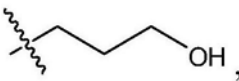
[0590] R₂₈为不存在、NH或氧；

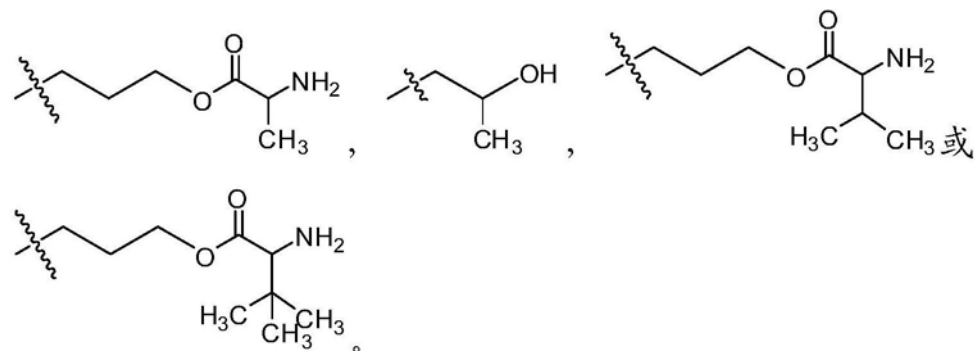
[0591] a为从1至6的整数；

[0592] c为从0至3的整数；

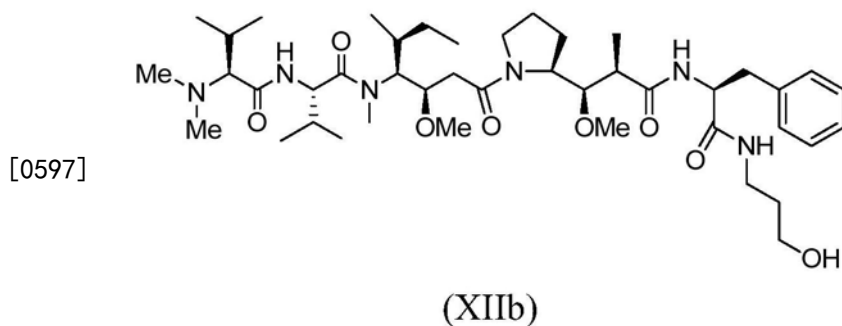
[0593] d为从1至3的整数；和

[0594] f为从1至12的整数。

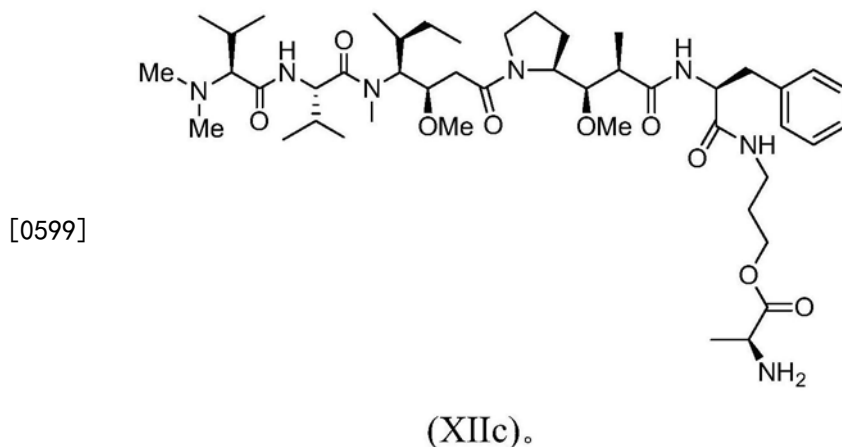
[0595] 在一个实施方案中,在式 (XII) 中, R_{40} 是 ,



[0596] 在另一个实施方案中,式 (XII) 化合物为式 (XIIb) 或 (XIIc) 的化合物:



[0598] 或



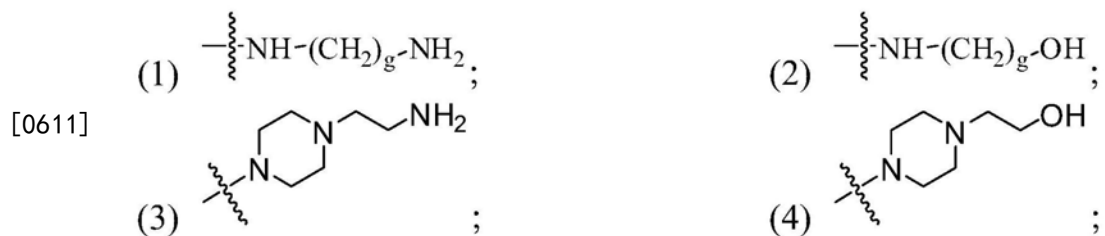
[0600] 在一个实施方案中,在式 (XIII) 的化合物中, R_{29} 是 $-NH_2$ 、5元杂环烷基、 $-R_{28}-C_{1-6}$ 烷基- R_{22} 、 $R_{28}-C_{5-12}$ 杂环烷基- C_{1-6} 烷基- R_{22} 或 $-R_{28}-C_{1-6}$ 烷基- C_{6-12} 芳基- C_{1-6} 烷基- R_{22} ;或 R_{29} 是如本文所定义的 R_{47} ;

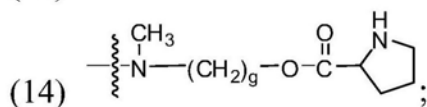
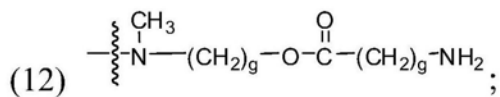
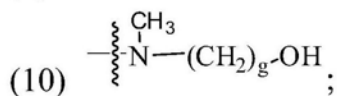
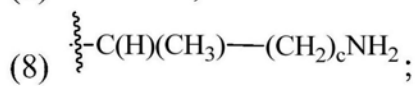
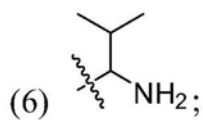
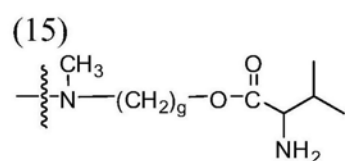
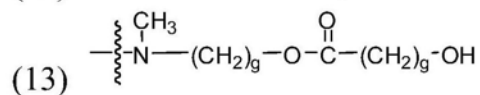
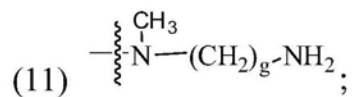
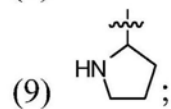
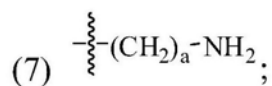
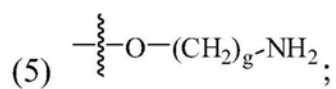
[0601] R_{28} 为不存在、NH或氧;

[0602] R_{22} 是 $-OH$ 、 $-NHR_{23}$ 、 $-COOH$ 、 $-R_{82}-C(O)(CH_2)_c-C(H)(R_{23})-N(H)(R_{23})$ 、 $-R_{82}-C(O)(CH_2)_d-(OCH_2-CH_2)_f-N(H)(R_{23})$ 或 $-R_{82}-C(O)-CH(X^2)-NH_d-R_{77}$;

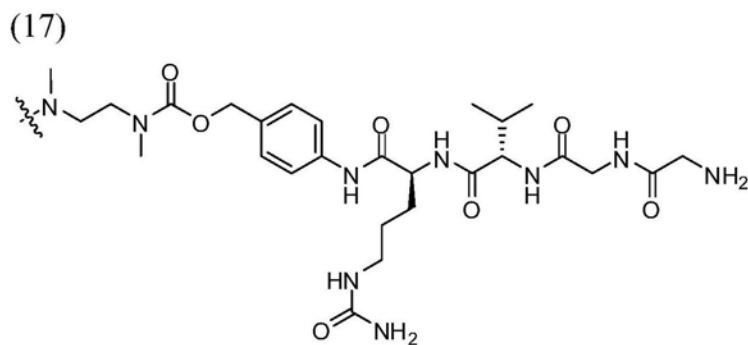
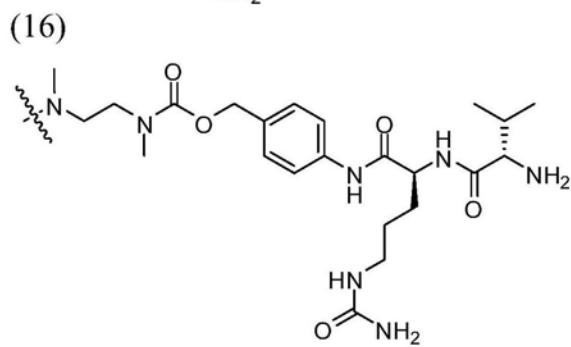
[0603] 每个 R_{23} 独立地是氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{6-10} 芳基、 C_{3-8} 环烷基、 $-COOH$,或 $-COO-C_{1-6}$ 烷基;

- [0604] X^2 为天然或非天然氨基酸的侧链；
 [0605] R_{77} 为氢或 X^2 和 NR_{77} 形成含氮环状化合物；
 [0606] R_{82} 是-NH或氧；
 [0607] c 为从0至3的整数；
 [0608] d 为从1至3的整数；和
 [0609] f 为从1至12的整数。
 [0610] 在还有的另一个示例性实施方案中， R_{29} 是下列结构中的任何一个：

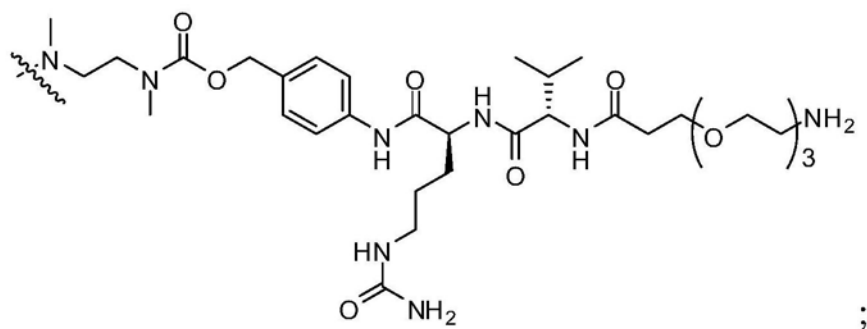




[0612]

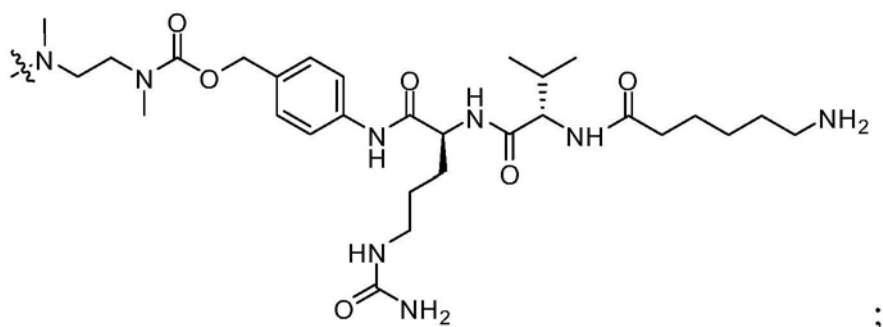


(18)

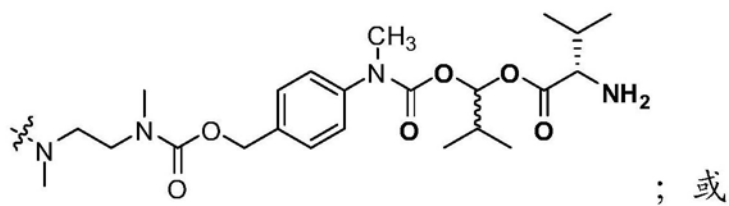


(19)

[0613]



(20)



(21)

[0614] 其中：

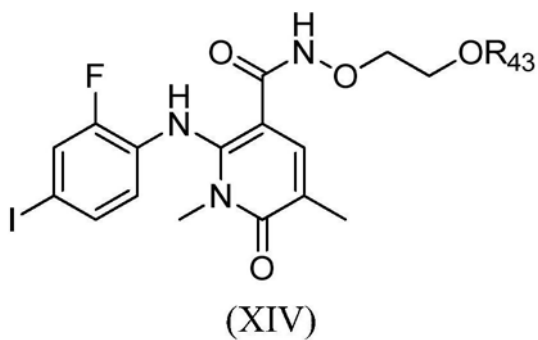
[0615] a为从1至6的整数；

[0616] c为从0至3的整数；和

[0617] g为从2至6的整数。

[0618] 在一个实施方案中，MEK抑制剂为式 (XIV) 的化合物：

[0619]



(XIV)

[0620] 其中 R_{43} 是H或 $-R_{46}-R_{47}$;

[0621] R_{20} 和 R_{21} 各自独立地是氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{6-10} 芳基、羟基化 C_{6-10} 芳基、多羟基化 C_{6-10} 芳基、5-12元杂环、 C_{3-8} 环烷基、羟基化 C_{3-8} 环烷基、多羟基化 C_{3-8} 环烷基或天然或非天然氨基酸的侧链;

[0622] R_{22} 是 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-R_{82}-C(O)(CH_2)_c-C(H)(R_{23})-N(H)(R_{23})$ 、 $-R_{82}-C(O)(CH_2)_d-(OCH_2-CH_2)_f-N(H)(R_{23})$ 或 $-R_{82}-C(O)-CH(X^2)-NH_d-R_{77}$;

[0623] 每个 R_{23} 独立地是氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{6-10} 芳基、 C_{3-8} 环烷基、 $-COOH$ ，或 $-COO-C_{1-6}$ 烷基;

[0624] X^2 为天然或非天然氨基酸的侧链;

[0625] R_{77} 为氢或 X^2 和 NR_{77} 形成含氮环状化合物;

[0626] R_{82} 是 $-NH$ 或氧;

[0627] R_{46} 是 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-O-$ 、 $-C(O)-NH-$ ，或不存在;

[0628] R_{47} 是如本文所定义;

[0629] a 为从1至6的整数;

[0630] c 为从0至3的整数;

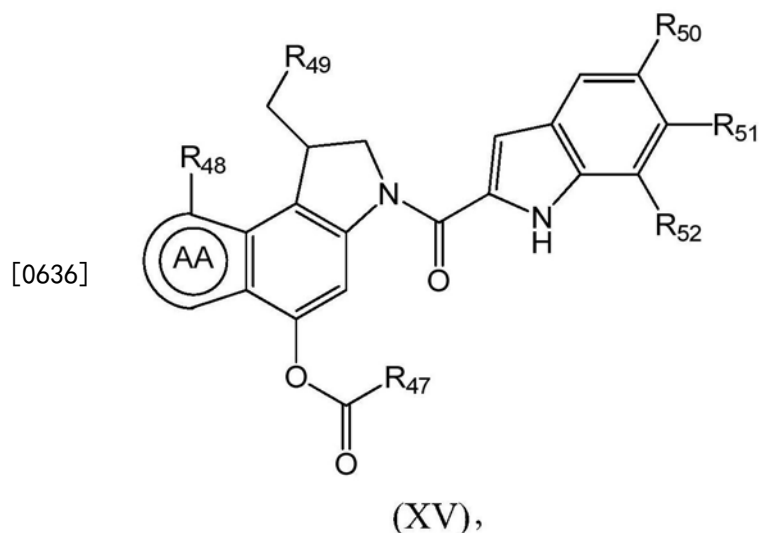
[0631] d 为从1至3的整数;和

[0632] f 为从1至12的整数。

[0633] MEK抑制剂的其它实例公开于US 7,517,994B2中。

[0634] 在一些实施方案中 R_{43} 是 $-C(O)-(CH_2)_a-NH_2$ ，或 $-C(O)-C(H)(CH_3)-(CH_2)_c-NH_2$ ；其中 a 为从1至6的整数;和 c 为从0至3的整数。

[0635] 在另一个实施方案中，倍癌霉素化合物为式 (XV) 的化合物:



[0637] 其中:

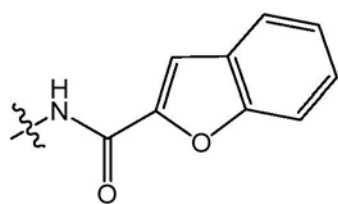
[0638] R_{47} 是如本文所定义;

[0639] R_{48} 是氢、 $-COOC_{1-6}$ 烷基、 $-COOH$ 、 $-NH_2$ 或 $-CH_3$;

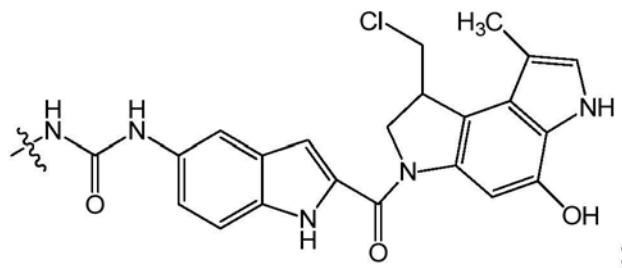
[0640] R_{49} 是Cl、Br或 $-OH$;

[0641] R_{50} 是氢、 $-OCH_3$,

[0642]



； 或



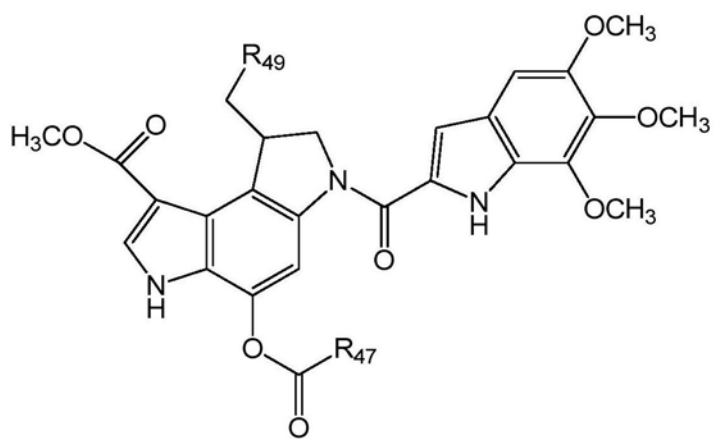
；

[0643] R_{51} 和 R_{52} 各自独立地是氢或 $-OCH_3$ ；和

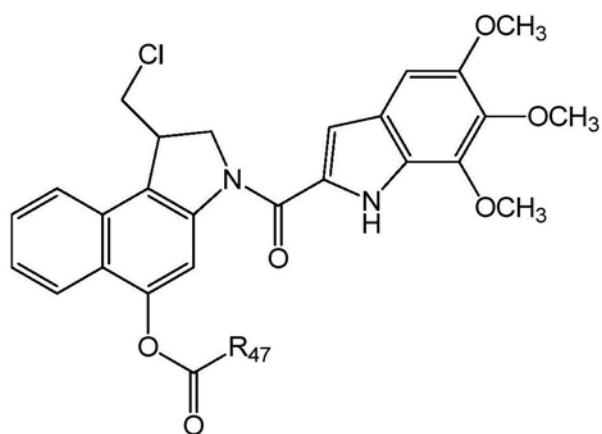
[0644] 环AA是或者苯基或者吡咯环。

[0645] 倍癌霉素化合物的其它实例公开于US 7,553,816中。

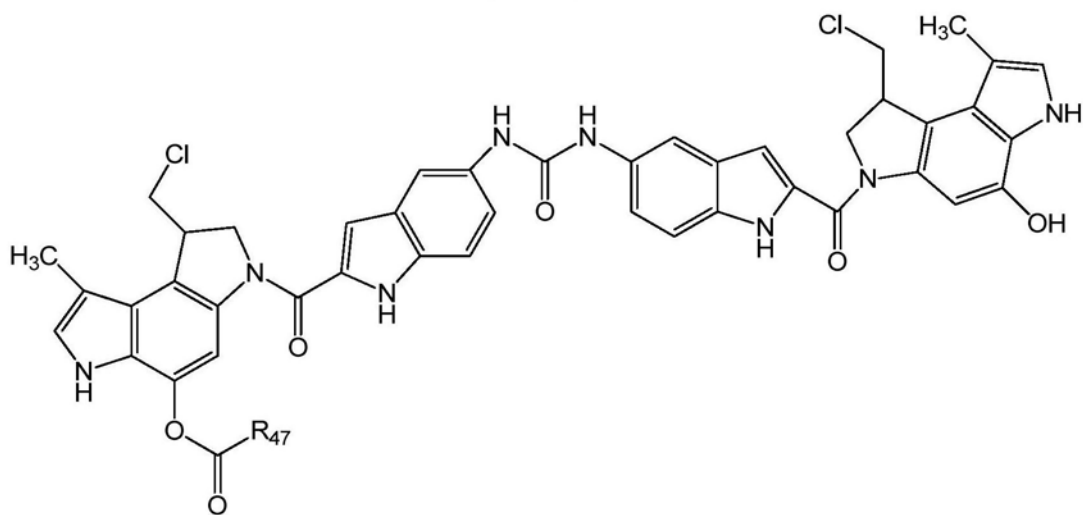
[0646] 在一个实施方案中，式(XV)的倍癌霉素化合物为式(XVI)、(XVII)、(XVIII)或(XIX)的化合物：



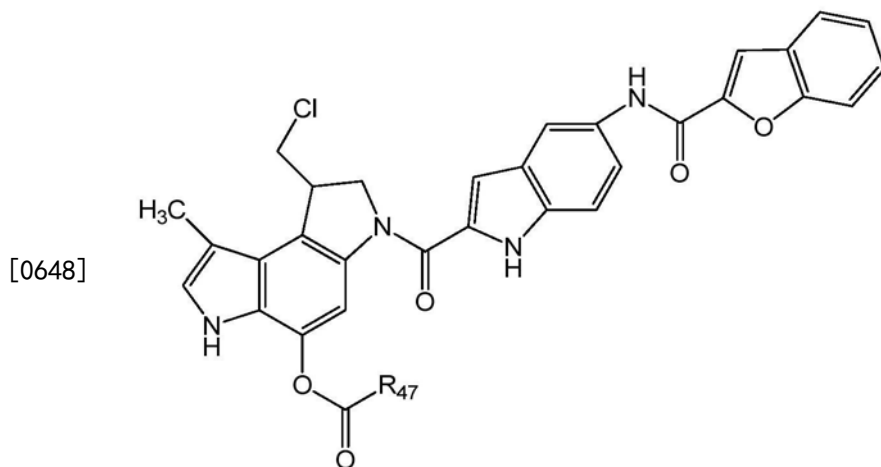
(XVI)



(XVII)



(XVIII)



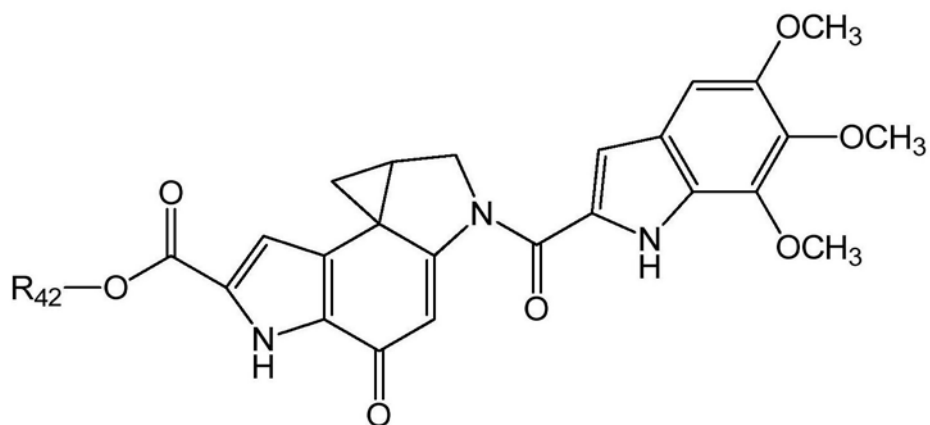
(XIX);

[0649] 其中：

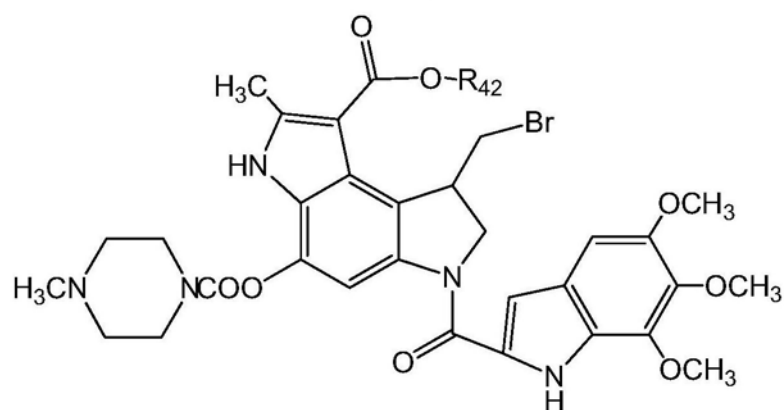
[0650] R₄₉是Cl、Br或-OH; 和

[0651] R₄₇是如本文所定义。

[0652] 在另一个实施方案中,倍癌霉素化合物为式 (XX) 的倍癌霉素SA化合物:US 5101038;或 (XXI):


$$(XX)$$

[0653]



(XXI),

[0654]

[0655] 其中：

[0656] R_{42} 是 C_{1-6} 烷基氨基或 $-[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{22}$;

[0657] R_{20} 和 R_{21} 各自独立地是氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{6-10} 芳基、羟基化 C_{6-10} 芳基、多羟基化 C_{6-10} 芳基、5-12元杂环、 C_{3-8} 环烷基、羟基化 C_{3-8} 环烷基、多羟基化 C_{3-8} 环烷基或天然或非天然氨基酸的侧链;

[0658] R_{22} 是 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-R_{82}-C(O)(CH_2)_c-C(H)(R_{23})-N(H)(R_{23})$ 、 $-R_{82}-C(O)(CH_2)_d-(OCH_2-CH_2)_f-N(H)(R_{23})$,或 $-R_{82}-C(O)-CH(X^2)-NH_d-R_{77}$;

[0659] 每个 R_{23} 独立地是氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{6-10} 芳基、 C_{3-8} 环烷基、 $-COOH$,或 $-COO-C_{1-6}$ 烷基;

[0660] X^2 为天然或非天然氨基酸的侧链;

[0661] R_{77} 为氢或 X^2 和 NR_{77} 形成含氮环状化合物;

[0662] R_{82} 是 $-NH$ 或氧;

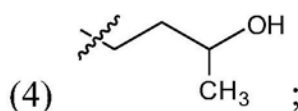
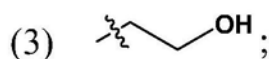
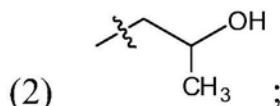
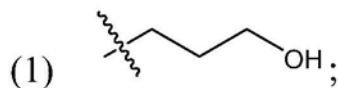
[0663] a 为从1至6的整数;

[0664] c 为从0至3的整数;

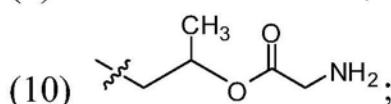
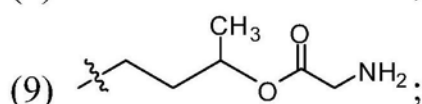
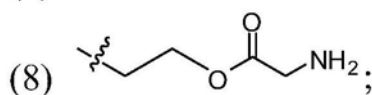
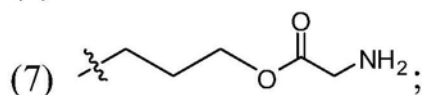
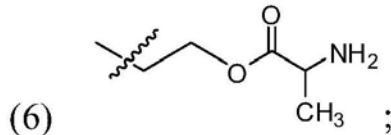
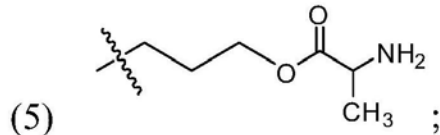
[0665] d 为从1至3的整数;和

[0666] f 为从1至12的整数。

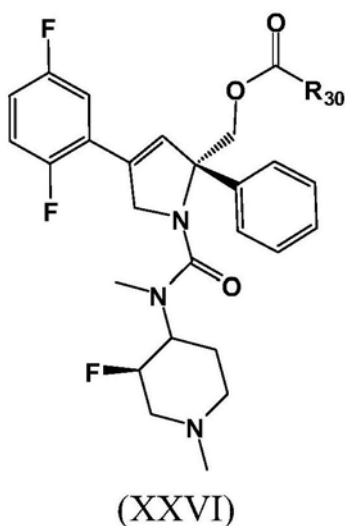
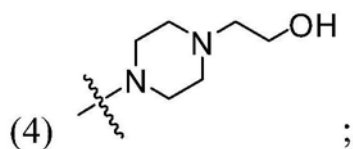
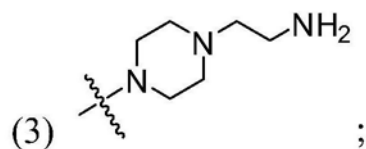
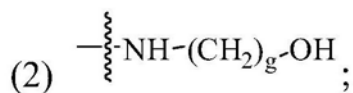
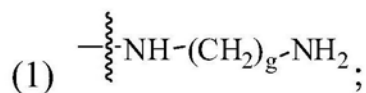
[0667] 在一些实施方案中, R_{42} 是下列结构中的任何一个:



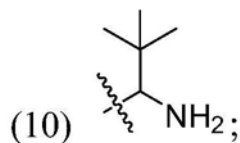
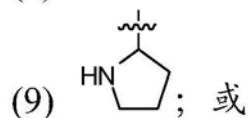
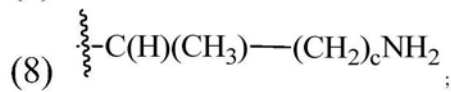
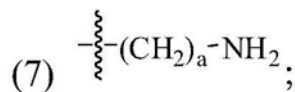
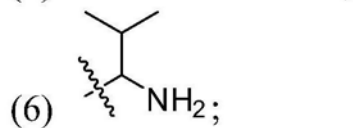
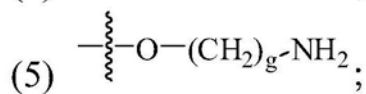
[0668]



[0675]

[0676] 其中R₃₀是如本文所定义。[0677] 在一些实施方案中,R₃₀是:

[0678]



[0679] 其中:

[0680] a为从1至6的整数;

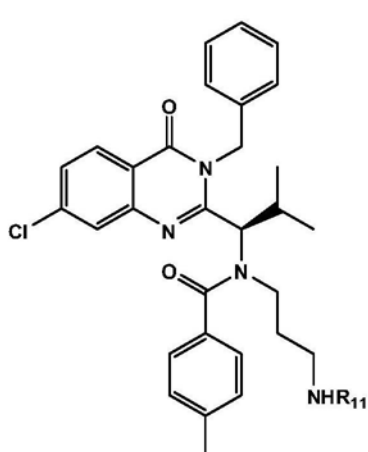
[0681] c为从0至3的整数;和

[0682] g为从2至6的整数。

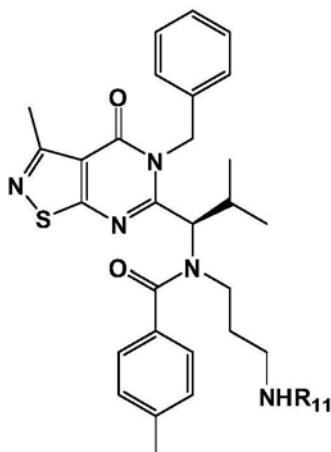
[0683] 在另一个实施方案中,倍癌霉素化合物是倍癌霉素A、倍癌霉素B1、倍癌霉素B2、倍癌霉素C1、倍癌霉素C2、倍癌霉素D、CC-1065、阿多来新、比折来新或卡折来新。

[0684] 在另一个实施方案中,KSP抑制剂化合物为式(XXVII)、(XXVIII)或(XXIX)的化合物:

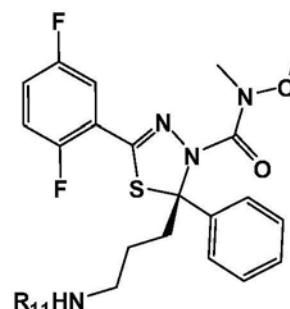
[0685]



(XXVII)



(XXIX)



(XXVIII)

[0686] 其中:

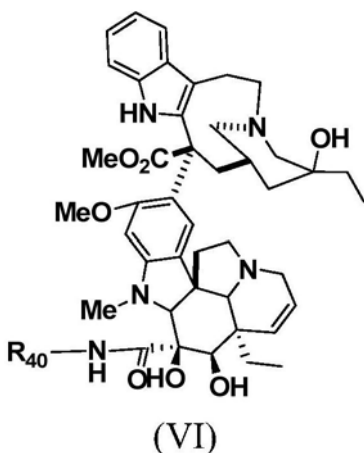
[0687] R₁₁是如本文所定义。

[0688] 治疗剂领域的技术人员将容易地理解,本文描述的每一种治疗剂都能够以这样一种方式修饰,即所生成的化合物依然保持原始化合物的特异性和/或活性。本领域技术人员也将会了解到,这些化合物中的许多可用于替代如本文所描述的治疗剂。因此,本发明的治疗剂包括如本文所描述的化合物的类似物和衍生物。

[0689] 下表B提供适合于共轭以形成本发明的聚合物-药物-蛋白质共轭物或聚合物-药物支架的治疗剂及其衍生物的更多实例。还提供了某些化合物的光谱数据(表中的ND指“未检测到”)。当药物在体外或者在体内从共轭物中释放出来时,这些实例也可以是该药物的活性形式。

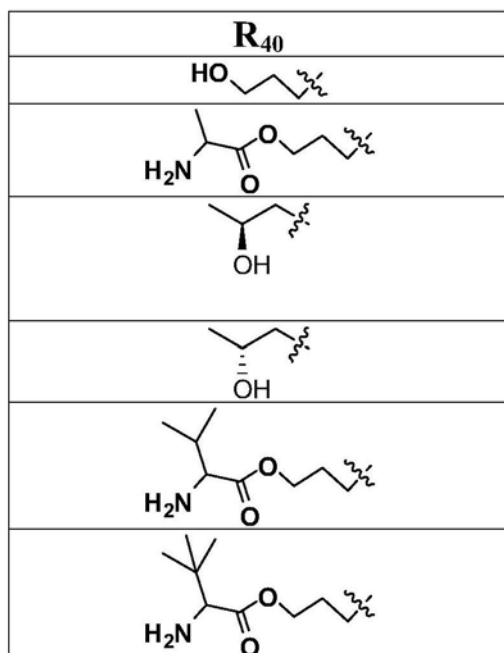
[0690] 表B

[0691]

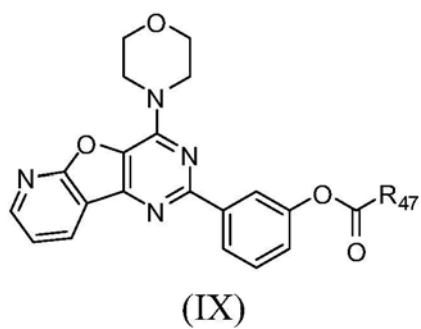


(VI)

[0692]



[0693]



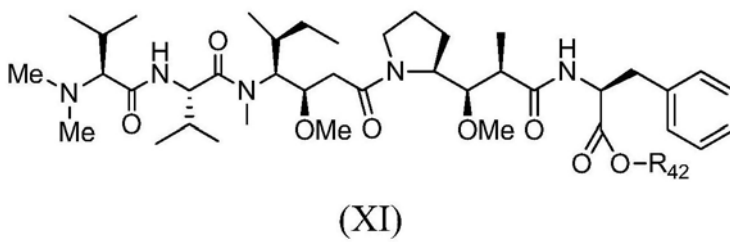
[0694]

R₄₇	<u>m/z</u>
	ND
	ND
	ND

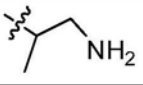
[0695]

	ND
--	----

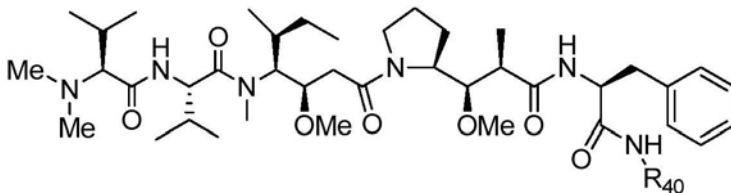
[0696]



[0697]

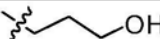
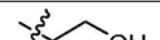
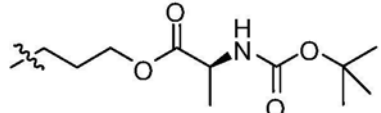
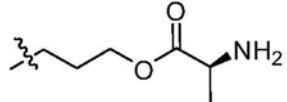
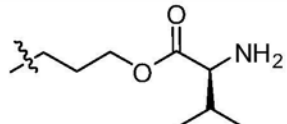
R_{42}	m/z
H	
-CH ₃	760
	802.6
	790
	804

[0698]



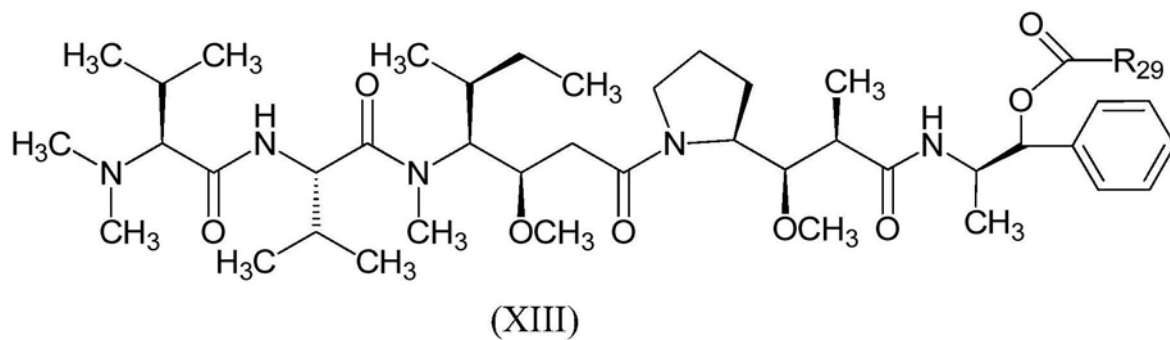
(XII)

[0699]

R_{40}	m/z
-H	
	803.5
	789.1
	974.2
	874.5
	902.2
	ND
	ND
-OH	788

[0700]

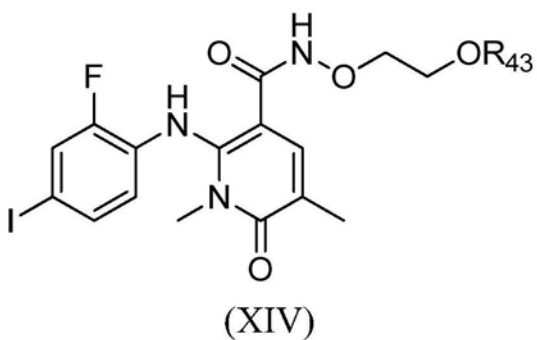
[0701]



[0702]

-C(O)-R₂₉	m/z
	903.2
	803.1
	790
	832.6
	829.1
	802

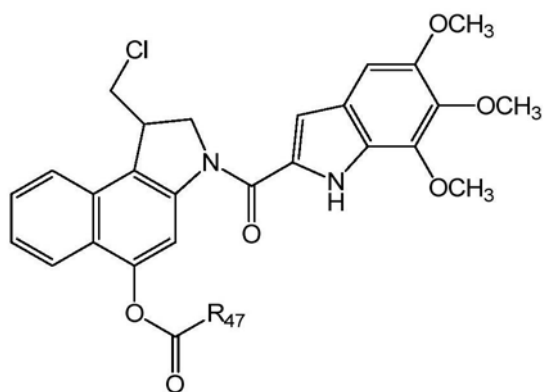
[0703]



[0704]

R₄₃	<u>m/z</u>
	ND
	644.9

[0705]

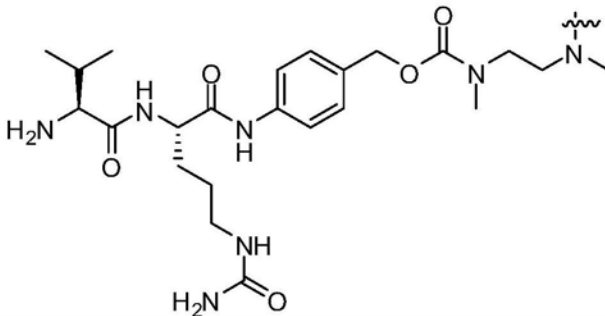
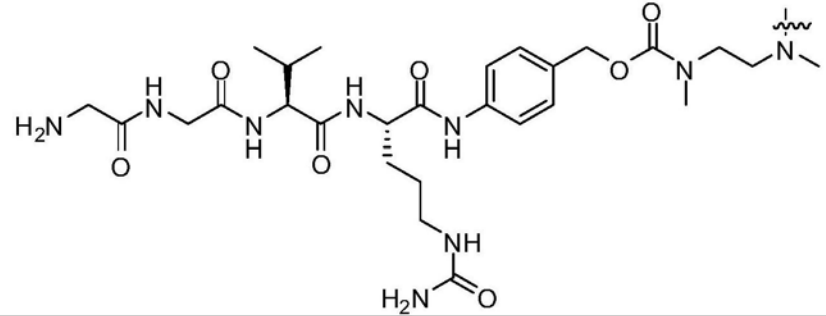
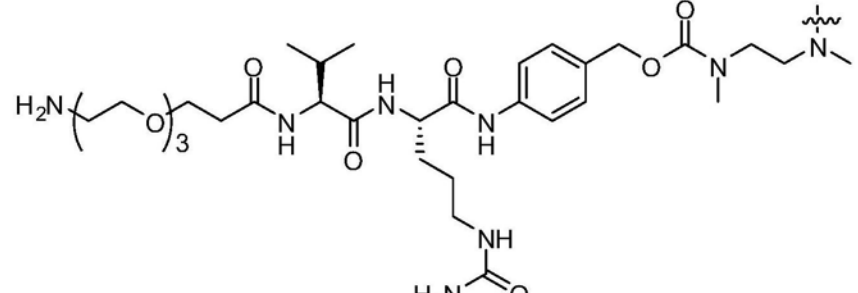


(XVII)

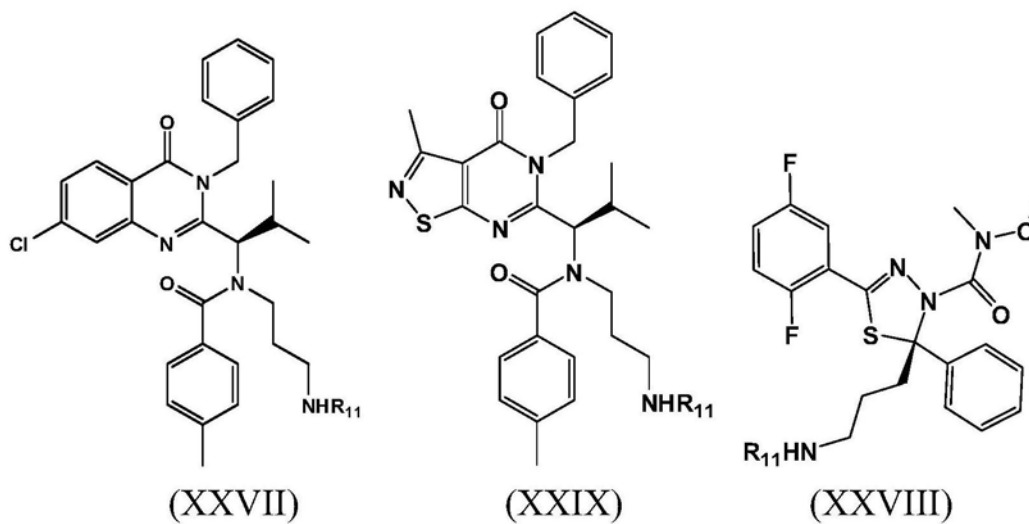
[0706]

R_{47}	m/z
	553.1
	538.1
	564.1
	566.1
	568.1
	ND
	ND
	667.2
	622.2
	632.02

[0707]

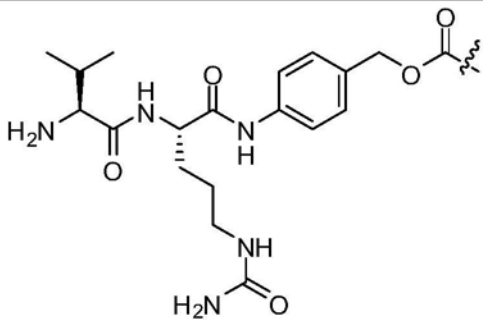
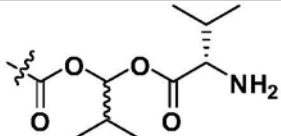
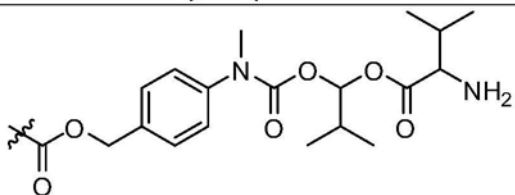
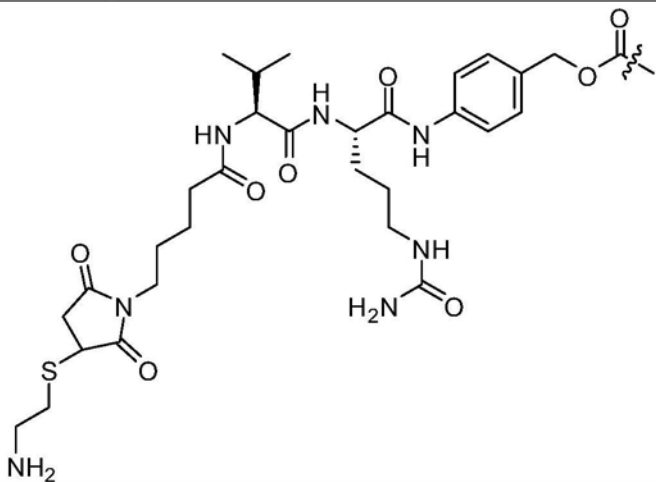
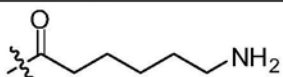
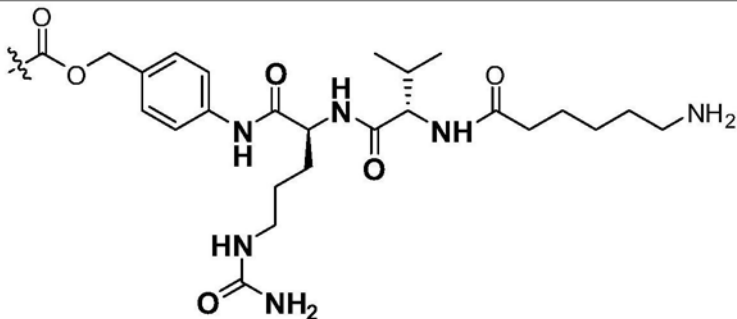
R_{47}	m/z
	986.2
	ND
	ND

[0708]



[0709]

R_{11}	m/z (XXVII)
----------	----------------

	R ₁₁	m/z (XXVII)
		922.3
		732.2
		ND
[0710]		ND
		ND
		ND

[0711] 蛋白质-基识别分子 (PBRMs)

[0712] 蛋白质-基识别分子将药物-聚合物载体共轭物导向至特定的组织、细胞,或细胞内的位置。蛋白质-基识别分子可以导向培养物中的或者完整的有机体中的或者二者中的

修饰的聚合物。在每一种情况下,基于蛋白质的识别分子具有配体,该配体存在于靶点细胞的细胞表面上,并且以有效的特异性、亲和性和结合性与该配体结合。在一些实施方案中,基于蛋白质的识别分子将修饰的聚合物靶向至组织而非肝脏。在其它实施方案中,蛋白质-基识别分子靶向将修饰的聚合物靶向至特定的组织如肝脏、肾脏、肺脏或胰脏。基于蛋白质的识别分子能够将修饰的聚合物靶向至靶点细胞如癌细胞,如在细胞如癌细胞上表达的受体、基质组织或与癌症有关的蛋白质如肿瘤抗原。可选地,可以靶向包含肿瘤血管分布的细胞。基于蛋白质的识别分子能够将聚合物导向至特定类型的细胞如特定靶向至肝脏中的肝细胞而非Kupffer细胞。在其它情况下,基于蛋白质的识别分子能够将聚合物导向至网状内皮或淋巴系统的细胞或者导向至专业的吞噬细胞(professional phagocytic cell)如巨噬细胞或嗜酸性粒细胞。(在这样的情况下,聚合物本身也可以是有有效的递送系统,无需特定的靶向)。

[0713] 在还有的其它实施方案中,基于蛋白质的识别分子能够将修饰的聚合物靶向至细胞内的位置,例如细胞核、细胞质或核内体。在特定的实施方案中,基于蛋白质的识别分子能够增强与受体的细胞结合,或者细胞质至细胞核的运输,以及细胞核进入核内体或其它细胞内囊泡或从核内体或其它细胞内囊泡中释放出来。

[0714] 在特定的实施方案中,基于蛋白质的识别分子包括抗体、蛋白质和肽或肽模拟物。

[0715] 在优选的实施方案中,基于蛋白质的识别分子包含巯基,基于蛋白质的识别分子通过经由巯基和聚合物的官能团形成共价键与聚合物-药物共轭物共轭。

[0716] 对于细胞表面标志物具有特异性的示例性的抗体或衍生自Fab、Fab2、scFv或骆驼抗体重链片段的抗体包括,但不限于,5T4、AOC3、ALK、AXL、C242、CA-125、CCL11、CCR 5、CD2、CD3、CD4、CD5、CD15、CA15-3、CD18、CD19、CA19-9、CD20、CD22、CD23、CD25、CD28、CD30、CD31、CD33、CD37、CD38、CD40、CD41、CD44、CD44v6、CD51、CD52、CD54、CD56、CD62E、CD62P、CD62L、CD70、CD74、CD79-B、CD80、CD125、CD138、CD141、CD147、CD152、CD 154、CD326、CEA、聚集因子、CTLA-4、CXCR2、EGFR (HER1)、ErbB2、ErbB3、EpCAM、EPhA2、EPhB2、EPhB4、FGFR (即FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4)、FLT3、叶酸受体、FAP、GD2、GD3、GPNMB、HGF、HER2、HER3、HMI. 24、ICAM、ICOS-L、IGF-1受体、VEGFR1、EphA2、TRPV1、CFTR、gpNMB、CA9、畸胎瘤衍化生长因子(Cripto)、c-KIT、c-MET、ACE、APP、肾上腺素能受体- β 2、紧密连结蛋白3、间皮素、MUC1、NaPi2b、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、RON、ROR1、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-B4、IL-2受体、IL-4受体、IL-13受体、整联蛋白(包括 α_4 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 、 $\alpha_v\beta_6$ 、 $\alpha_1\beta_4$ 、 $\alpha_4\beta_1$ 、 $\alpha_4\beta_7$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_4$ 、 $\alpha_{11b}\beta_3$ 整联蛋白(intergins))、IFN- α 、IFN- γ 、IgE、IgE、IGF-1受体、IL-1、IL-12、IL-23、IL-13、IL-22、IL-4、IL-5、IL-6、干扰素受体、ITGB2 (CD18)、LFA-1 (CD11a)、L-选择蛋白 (CD62L)、粘蛋白、MUC1、肌肉生长抑制素、NCA-90、NGF、PDGFR α 、磷脂酰丝氨酸、前列腺癌细胞、绿脓假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)、狂犬病毒、RANKL、呼吸道合胞病毒、恒河猴因子、SLAMF7、鞘氨醇-1-磷酸、TAG-72、T-细胞受体、腱生蛋白C、TGF-1、TGF- β 2、TGF- β 、TNF- α 、TRAIL-R1、TRAIL-R2、肿瘤抗原CTAA16.88、VEGF-A、VEGFR2、波形蛋白等。

[0717] 在一个实施方案中,对于细胞表面标志物具有特异性的抗体或衍生自Fab、Fab2、scFv或骆驼抗体重链片段的抗体包括CA-125、C242、CD3、CD19、CD22、CD25、CD30、CD31、CD33、CD37、CD40、CD44、CD51、CD54、CD56、CD62E、CD62P、CD62L、CD70、CD138、CD141、CD326、CEA、CTLA-4、EGFR (HER1)、ErbB2、ErbB3、FAP、叶酸受体、IGF-1受体、GD3、GPNMB、HGF、HER2、

VEGF-A、VEGFR2、VEGFR1、EphA2、EpCAM、5T4、TAG-72、腱生蛋白C、TRPV1、CFTR、gpNMB、CA9、畸胎瘤衍生生长因子(Cripto)、ACE、APP、PDGFR α 、磷脂酰丝氨酸、前列腺癌细胞、肾上腺素能受体- β 2、紧密连结蛋白3、粘蛋白、MUC1、间皮素、IL-2受体、IL-4受体、IL-13受体和整联蛋白(包括 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 、 $\alpha_v\beta_6$ 、 $\alpha_1\beta_4$ 、 $\alpha_4\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_4$ 整联蛋白)、腱生蛋白C、TRAIL-R2和波形蛋白。

[0718] 示例性抗体包括3F8、阿巴伏单抗(abagovomab)、阿昔单抗(REOPRO)、阿达木单抗(HUMIRA)、阿德木单抗(adecatumumab)、阿非莫单抗、阿夫土珠单抗(afutuzumab)、阿拉昔单抗(alacizumab)、ALD518、阿仑珠单抗(CAMPATH)、阿妥莫单抗、阿马昔单抗、麻安莫单抗、安芦珠单抗(anrukinzumab)、阿泊珠单抗、阿西莫单抗(CEA-SCAN)、阿塞珠单抗、阿立珠单抗(atlizumab)(托西珠单抗(tocilizumab)、安挺乐(Actemra)、RoActemra)、阿托木单抗、巴匹珠单抗、巴利昔单抗(Simulect)、巴士昔单抗、贝妥莫单抗(LYMPHOSCAN)、贝利木单抗(BENLYSTA)、班拉珠单抗(benralizumab)、柏替莫单抗、贝索单抗(SCINITIMUN)、贝伐珠单抗(AVASTIN)、比西单抗(FIBRISCINT)、比伐珠单抗、柏纳妥莫单抗(blinatumomab)、布雷昔单抗(brentuximab)、布里金单抗(briakinumab)、坎金单抗(canakinumab)(ILARIS)、坎妥珠单抗(cantuzumab)、卡罗单抗、卡妥索单抗(REMOVAB)、CC49、西利珠单抗、赛妥珠单抗、西妥昔单抗(ERBITUX)、西他土珠单抗(citatumumab)、西妥木单抗(cixutumumab)、克利昔单抗、克利凡珠单抗(clivatuzumab)、可纳木单抗(conatumumab)、CR6261、达西珠单抗(dacetuzumab)、达克珠单抗(ZENAPAX)、达雷木单抗(daratumumab)、地舒单抗(PROLIA)、地莫单抗、朵利莫单抗(dorlimomab)、朵利珠单抗、依美昔单抗、依库珠单抗(SOLIRIS)、埃巴单抗、依决洛单抗(PANOREX)、依法珠单抗(RAPTIVA)、依夫单抗(MYCOGRAB)、依洛珠单抗(elotuzumab)、艾西莫单抗、恩莫单抗、依匹莫单抗、依帕珠单抗、厄利珠单抗(erlizumab)、厄妥韦单抗(ertumaxomab)(REXOMUN)、伊瑞西珠单抗(etaracizumab)(ABEGRIN)、艾韦单抗、法索单抗(NEUTROSPEC)、法拉莫单抗、法乐特殊单抗(farletuzumab)、非韦珠单抗、非扎奴单抗(fezakinumab)、斐济木单抗(figuretinumab)、芳妥珠单抗(HuZAF)、夫瑞韦单抗(foravirumab)、夫苏木单抗(fresolimumab)、加利昔单抗(galiximab)、更汀芦单抗(gantenerumab)、加维莫单抗(gavilimumab)、吉姆单抗、吉伦昔单抗(girentuximab)、格雷木单抗(glembatumumab)、戈利木单抗(SIMPONI)、戈利昔单抗、艾巴珠单抗(ibalizumab)、替伊莫单抗、伊戈伏单抗(INDIMACIS-125)、英西单抗(MYOSCINT)、英夫利昔单抗(REMICADE)、英妥木单抗(intetumumab)、伊诺莫单抗、伊珠单抗、伊匹木单抗、伊妥木单抗、凯利昔单抗、拉贝珠单抗(CEA-CIDE)、拉贝珠单抗(lebrikizumab)、来马索单抗(lemalesomab)、乐地单抗、来沙木单抗、利韦单抗、林妥珠单抗、鲁卡木单抗(lucatumumab)、鲁昔单抗、马帕木单抗、马司莫单抗、马妥珠单抗、美泊利单抗(BOSATRIA)、美替木单抗、米拉土珠单抗(milatuzumab)、明瑞莫单抗、米妥莫单抗、莫罗木单抗、莫他珠单抗(NUMAX)、莫罗单抗-CD3(ORTHOCLONE OKT3)、那可单抗(nacolumab)、那莫单抗(naptumomab)、那他珠单抗(TYSABRI)、奈巴库单抗、奈西木单抗(necitumumab)、奈瑞莫单抗、尼妥珠单抗(THERACIM)、诺莫单抗、奥瑞珠单抗、奥度莫单抗、奥法木单抗(ARZERRA)、奥拉木单抗(olaratumab)、奥马珠单抗(XOLAIR)、翁特殊单抗(ontecizumab)、奥普珠单抗(oportuzumab)、奥戈伏单抗(OVAREX)、奥特希珠单抗(otelixizumab)、帕昔单抗、帕利珠单抗(SYNAGIS)、帕尼单抗(VECTIBIX)、帕诺库单抗(panobacumab)、帕考珠单抗、沛土莫单抗(pemtumomab)(THERAGYN)、培妥珠单抗(OMNITARG)、培克珠单抗、平妥单抗(pintumomab)、

普立昔单抗、普立木单抗、PRO 140、雷韦单抗(rafivirumab)、雷莫芦单抗、雷珠单抗(LUCENTIS)、雷昔库单抗、瑞加韦单抗、瑞利珠单抗、利妥木单抗(rilotumumab)、利妥昔单抗(RITUXAN)、若巴木单抗(robatumumab)、罗利珠单抗(rontalizumab)、罗维珠单抗(LEUKARREST)、鲁利珠单抗(ANTOVA)、沙妥莫单抗喷地肽、司韦单抗、西罗珠单抗、西法木单抗(sifalimumab)、丝妥昔单抗(siltuximab)、西利珠单抗、索岚珠单抗(solanezumab)、索西珠单抗(sonenpcizumab)、松妥珠单抗、司他莫单抗、硫索单抗(LEUKOSCAN)、替拉珠单抗(AFP-CIDE)、替塞坦、他度珠单抗、他利珠单抗、他尼珠单抗(tanezumab)、帕他普莫单抗(taplutumomab paptox)、替非珠单抗(AUREXIS)、替莫单抗、替妥莫单抗(tenatumomab)、替奈昔单抗、替利珠单抗(teplizumab)、TGN1412、替西木单抗(tremelimumab)、替加珠单抗(tigatuzumab)、TNX-650、托西珠单抗(阿立珠单抗、安挺乐(Actemra))、托利珠单抗、托西莫单抗(BEXXAR)、曲妥珠单抗(HERCEPTIN)、翠每莫单抗(tremelimumab)、土可珠单抗(tucotuzumab)、妥韦单抗、乌珠单抗、优特克单抗(ustekinumab)(STELERA)、伐利昔单抗、维多珠单抗(vedolizumab)、维妥珠单抗(veltuzumab)、维帕莫单抗(vepalimomab)、维西珠单抗(visilizumab)(NUVION)、伏洛昔单抗(HUMASPECT)、伏妥莫单抗、扎芦木单抗(HuMEX-EGFr)、扎木单抗(HuMAX-CD4)、齐拉木单抗(ziralimumab)和佐莫单抗。

[0719] 在一些实施方案中,抗体导向至下列细胞表面标志物:5T4、CA-125、CEA、CD3、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD40、CD44、CD51、CTLA-4、EpCAM、HER2、EGFR(HER1)、FAP、叶酸受体、HGF、整联蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 、整联蛋白 $\alpha_5\beta_1$ 、IGF-1受体、GD3、GPNMB、粘蛋白、MUC1、磷脂酰丝氨酸、前列腺癌细胞、PDGFR α 、TAG-72、腱生蛋白C、TRAIL-R2、VEGF-A和VEGFR2。在这个实施方案中,抗体是阿巴伏单抗、阿德木单抗、阿拉昔单抗、阿妥莫单抗、麻安莫单抗、阿西莫单抗、巴土昔单抗、贝伐珠单抗(AVASTIN)、比伐珠单抗、柏纳妥莫单抗、布雷昔单抗、坎妥珠单抗、卡妥索单抗、卡罗单抗、西妥昔单抗、西他土单抗(citatumab)、克利凡单抗、可纳木单抗、达西单抗、依决洛单抗、依帕珠单抗、厄妥韦单抗(ertumaxomab)、艾瑞西单抗(etaracizumab)、法乐特殊单抗、斐济木单抗、吉姆单抗、格雷木单抗、替伊莫单抗、伊戈伏单抗、英妥木单抗、伊珠单抗、拉贝珠单抗、来沙木单抗、林妥珠单抗、鲁卡木单抗、马妥珠单抗、米妥莫单抗、那莫单抗estafenatox、奈西木单抗、奥普珠单抗、奥戈伏单抗、帕尼单抗、沛土莫单抗(pemtumomab)、培妥珠单抗、普立木单抗、利妥昔单抗(RITUXAN)、利妥木单抗、若巴木单抗、沙妥莫单抗、西罗珠单抗、他普莫单抗(taplutumomab)、替妥莫单抗、替妥莫单抗、替西木单抗(翠每莫单抗)、替加珠单抗、曲妥珠单抗(HERCEPTIN)、托西莫单抗、翠每莫单抗、土可珠单抗celmoleukin、伏洛昔单抗和扎芦木单抗。

[0720] 在特定的实施方案中,就HER2抗而言,导向至细胞表面标志物的抗体是培妥珠单抗或曲妥珠单抗,而就EGFR(HER1)而言,抗体是西妥昔单抗或帕尼单抗;并且就CD20而言,抗体是利妥昔单抗,并且就VEGF-A而言是贝伐珠单抗,并且就CD-22而言,抗体是依帕珠单抗或维妥珠单抗,并且就CEA而言,抗体是拉贝珠单抗。

[0721] 示例性的肽或肽模拟物包括整联蛋白靶向肽(RGD肽)、LHRH受体靶向肽、ErbB2(HER2)受体靶向肽、前列腺特异性膜结合抗原(PSMA)靶向肽、脂蛋白受体LRP1靶向肽、ApoE蛋白质衍生的肽、ApoA蛋白质肽、生长激素抑制素受体靶向肽、蝎氯毒素衍生的肽,和蛙皮素。

[0722] 在特定的实施方案中,肽或肽模拟物等是LHRH受体靶向肽和ErbB2(HER2)受体靶

向肽。

[0723] 示例性的蛋白质包括胰岛素、转铁蛋白、纤维蛋白原- γ 片段、血小板反应蛋白、密蛋白、载脂蛋白E、Affibody分子如, ABY-025、锚蛋白重复蛋白质、锚蛋白样重复蛋白和合成肽。

[0724] 在本发明的一些实施方案中, 蛋白质-聚合物-药物共轭物包含广谱细胞毒素与细胞表面标志物的组合, 就HER2而言, 该细胞表面标志物例如培妥珠单抗或曲妥珠单抗; 对于EGFR而言, 该细胞表面标志物例如西妥昔单抗和帕尼单抗; 就CEA而言, 该细胞表面标志物例如拉贝珠单抗; 就CD20而言, 该细胞表面标志物例如利妥昔单抗; 就VEGF-A而言, 该细胞表面标志物例如贝伐珠单抗; 或就CD-22而言, 该细胞表面标志物例如依帕珠单抗或维妥珠单抗。

[0725] 在本发明的其它实施方案中, 在本发明中使用的蛋白质-药物-聚合物共轭物或蛋白质-聚合物共轭物包括两种或更多种基于蛋白质的识别分子的组合, 例如, 导向至肿瘤细胞上的EGF受体 (EGFR) 和T细胞上的CD3和CD28的双特异性抗体的组合; 抗体或衍生自Fab、Fab2、scFv或骆驼抗体重链片段的抗体与肽或肽模拟物的组合; 抗体或衍生自Fab、Fab2、scFv或骆驼抗体重链片段的抗体与蛋白质的组合; 两种双特异性抗体例如CD3x CD19加CD28x CD22双特异性抗体的组合。

[0726] 在本发明的其它实施方案中, 在本发明中使用的蛋白质-药物-聚合物共轭物或蛋白质-聚合物共轭物包含基于蛋白质的识别分子, 其为对抗抗原的抗体, 例如, 曲妥珠单抗、西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、依帕珠单抗、维妥珠单抗、拉贝珠单抗、B7-H4、B7-H3、CA125、CD33、CXCR2、EGFR、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、HER2、NaPi2b、c-Met、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、PD-L1、c-Kit、MUC1和5T4。

[0727] 在本发明的特定实施方案中, 蛋白质-药物-聚合物共轭物或蛋白质-聚合物本发明的共轭物包含基于蛋白质的识别分子, 其为对抗5T4的抗体, 例如人源化抗-5T4scFvFc抗体。

[0728] 合适的5T4靶向配体或免疫球蛋白的实例包括为可市售获得的, 或已经描述于专利或非-专利文献, 如US 8,044,178、US 8,309,094、US 7,514,546、EP1036091 (可作为TroVax™市售获得, Oxford Biomedica)、EP2368914A1、WO 2013041687A1 (Amgen)、US 2010/0173382, 和P. Sapra等, Mol. Cancer Ther. 2013, 12:38-47中的那些。抗-5T4抗体公开于2013年9月13日提交的美国临时申请号61/877,439, 和2013年6月17日提交的美国临时申请号61/835,858中。每一篇专利文件和科学出版物的内容通过引用以其全文结合到本文中。

[0729] 如本文所用的, 术语“5T4抗原-结合部分”指能够选择性地结合于5T4抗原的多肽序列。在示例性的共轭物中, 5T4抗原-结合部分一般包含从抗-5T4抗体经改造的单链scFv-Fc形式。单链可变片段 (scFv-Fc) 为免疫球蛋白的重链 (VH) 和轻链 (VL) 可变区的融合蛋白, 其与接头肽连接, 并且还连接于包含抗体的铰链区和CH2和CH3区的Fc区 (抗体各部分彼此或与其它肽序列的任何这样的组合有时在此被称为“免疫融合”分子)。在这样一种scFvFc分子内, scFv片段可以通过接头肽经C-末端连接于Fc片段的N-末端。

[0730] 免疫融合分子的5T4抗原-结合部分的至少部分可源自鼠科动物来源。例如, 人们可通过表达被设计以编码具有根据SEQ ID NO:A的多肽序列的至少鼠抗-5T4scFv区的多核苷酸获得免疫融合分子 (见例如, 美国临时申请号61/835,858, 2013年6月17日提交)。另外

地,至少部分的5T4-抗原结合部分可根据熟知的方法生成以被嵌入或人源化。见,Borras等,J.Biol.Chem.2010Mar 19;285(12):9054-66。因此,人们可通过表达被设计编码至少根据SEQ ID NO:B的多肽序列的多核苷酸,获得具有5T4-抗原结合部分与人源化scFv部分的免疫融合分子(见例如,美国临时申请号61/835,858,2013年6月17日提交)。

[0731] 在一些实例中,5T4抗原-结合部分的Fv部分可通过熟知的分子生物学技术,被设计以在VH区中包含一个或多个氨基酸取代。5T4抗原结合部分的Fc部分优选地包含从人铰链,抗-5T4抗体的CH2和CH3区改造的多肽序列。例如,有可能改造多核苷酸以编码具有根据SEQ ID NO:C的多肽序列的至少Fc部分(见例如,美国临时申请号61/835,858,2013年6月17日提交)。

[0732] 编码其中单链Fv和Fc区连接在一起的肽的多核苷酸可编码具有根据SEQ ID NO:D的多肽序列的共轭物的至少嵌合5T4抗原-结合部分或可编码具有根据SEQ ID NOs:E或F的多肽序列的人源化5T4抗原-结合部分。

[0733] 多肽接头,例如具有多肽序列ASTC(SEQ ID NO:Y)或ASTX(SEQ ID NO:Z)(其中“X”指任何氨基酸或相邻氨基酸之间的直接肽键)的多肽接头,可将ScFv部分的C-末端融合至5T4抗原-结合部分的Fc部分的N-末端。因此,有可能设计多核苷酸以编码至少具有根据SEQ ID NOs:Y或Z的多肽序列的接头。虽然或者SEQ ID NOs:Y或者Z可被用作接头,由于存在半胱氨酸残基,具有根据SEQ ID NO:Y的肽接头的免疫融合分子可从位点-特异性共轭中收益。

[0734] 优选地,肽模拟物的任何氨基酸取代、插入或缺失或使用基本上不减少5T4抗原-结合部分的亲和力或特异性。具有氨基酸取代、插入,或缺失的免疫融合分子或5T4抗原-结合部分中的肽模拟物优选地保留大于75%,优选大于80%,优选大于85%,优选大于90%,或优选大于95%的对结合5T4抗原的亲和力或特异性(与具有未修饰的5T4-抗原结合部分的共轭物比较)。

[0735] 抗-5T4单链抗体-Fc融合蛋白(“抗-5T4scFv-Fc”)在CHO DG44细胞中制备,如在2013年6月17日提交的美国临时申请号61/835,858中所公开的。

[0736] SEQ ID NO:A:5T4-特异性鼠scFv:

[0737] EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSTGYMHVWKQSPGKGLEWIGRINPNNGVTLYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARSTMITNYVM DYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSIVMTQTPTSL LVSAGDRVITITCKASQSVSNDAWYQQKPGQSPKLLISYTSSRYAGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDA AVYFCQQDYNSPPTFGGGTKLEIK

[0738] SEQ ID NO:B:5T4-特异性人源化scFv:

[0739] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKASGYSTGYMHVVRQAPGKGLEWVSRINPNNGVTLYNQKFKDRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTMITNYVM DYWGQGTSLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQSVSNDAWYQQKPGKAPKLLIYYTSSRYAGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQDYNSPPTFGGGTKLEIK

[0740] SEQ ID NO:C:人铰链-CH2-CH3(Fc γ 1):

[0741] EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ

KSLSLSPGK

[0742] SEQ ID NO:Y:位点-特异性共轭-1:ASTC

[0743] SEQ ID NO:Z:非位点-特异性共轭-1:ASTX

[0744] SEQ ID NO:D:嵌合抗-5T4scFv-Fc:

[0745] EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSTGYMHVWKQSPGKGLEWIGRINPNNGVTLYNQKFKDKAT
LTVDKSSTTAYMELRSLTSEDSAVYYCARSTMITNYVMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSIVMTQTPTSL
LVSAGDRVTITCKASQSVSNDAWYQQKPGQSPKLLISYSSRYAGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDAAYVFC
QQDYNSPPTFGGGTKLEIKASTCEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0746] SEQ ID NO:E:人源化抗-5T4scFv-Fc (ASTC):

[0747] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKASGYSTGYMHVWRQAPGKGLEWVSRINPNNGVTLYNQKFKDRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTMITNYVMDYWGQGTSLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG
GGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQSVSNDAWYQQKPGKAPKLLIYYTSSRYAGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQDYNSPPTFGGGTKLEIKASTCEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0748] SEQ ID NO:F:人源化抗-5T4scFv-Fc (ASTX):

[0749] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKASGYSTGYMHVWRQAPGKGLEWVSRINPNNGVTLYNQKFKDRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTMITNYVMDYWGQGTSLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG
GGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQSVSNDAWYQQKPGKAPKLLIYYTSSRYAGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQDYNSPPTFGGGTKLEIKASTXEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0750] 这些抗体可经重组、合成,或通过其它本领域已知的合适方法生产。这样的方法和构件利用编码本文鉴定的多肽和肽序列的核酸序列。可选择地,这样的用于抗体生产的方法和构件利用经天然地或人工地修饰的,如本文提供的SEQ ID NOs(如,A)的天然变体或密码子优化变体的序列。各种密码子优化方案是本领域已知的。见例如,UpGeneTM和OptimizerTM,其是基于网络的优化方法。另外地,许多商业机构使用专有方案,如SignGen Laboratories,DNA2.0,OpenX及其它方案进行密码子优化。

[0751] 本文描述的这些靶向配体、接头和药物或前药片段可例如根据公开的技术和方法,组装到本发明的治疗药物和靶向共轭物中。本发明的治疗性和靶向共轭物,及其制备方法,通过非-限制性实施例描述于下文。

[0752] 共轭物或聚合物支架

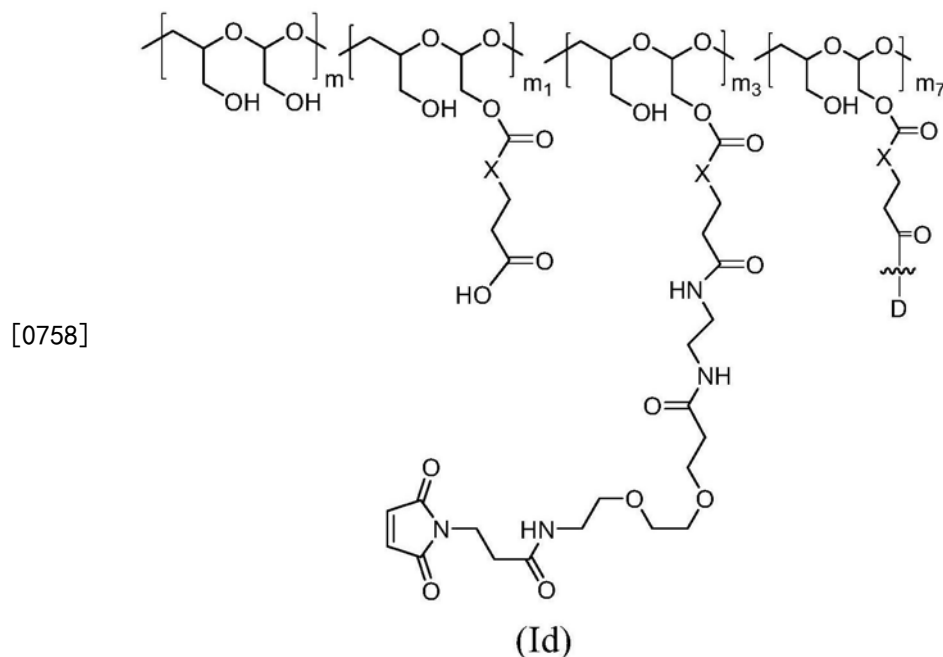
[0753] 本发明的共轭物包含出现一次或多次的D,其中D为治疗剂,例如,药物,其中一次或多次出现的D可以是相同或不同的。

[0754] 在某些其它实施方案中,一次或多次出现的PBRM附接于聚合物载体,其中一次或多次出现的PBRM可以是相同或不同的。在某些其它实施方案中,含有一次或多次出现的D的一个或多个聚合物载体连接于PBRM(如,抗体)。

[0755] 如通常在上面所讨论的,在某些实施方案中,聚合物载体各自独立地具有约0.1%-约25%,更优选约0.5%-约20%,更优选约1%-约15%,和甚至更优选约2%-约10%的含D单体。例如,聚合物载体是具有分子量约2kDa-约40kDa的PHF并具有约0.3%至约15%,更优选约2%-12%,更优选约5%-10%的包含奥瑞斯他汀F的单体。

[0756] 在某些实施方案中,当D是对于在宽范围的细胞系中具有 $IC_{50} < 10\text{pM}$ 的抗增殖活性的药物时,聚合物载体是具有分子量约2kDa-约40kDa的PHF并具有约0.1%-约25%,更优选约2%-10%,更优选约2%-5%的含D单体。

[0757] 在某些实施方案中,本发明的共轭物具有式(Id):



[0759] 其中:

[0760] D的每次出现独立地为具有分子量 $\leq 5\text{kDa}$ 的治疗剂,且D和羰基之间的 $\sim$ 表示D与羰基直接或间接连接,

[0761] m_1 为从1至约140的整数,和

[0762] m_7 为从1至约40的整数,其中 m_1 和 m_7 的总和是 m_6 (即,2至约180)。

[0763] 在一个实施方案中,D是(a)奥瑞斯他汀化合物;(b)卡奇霉素化合物;(c)倍癌霉素化合物;(d)拓扑异构酶抑制剂,(e)吡咯并苯并二氮杂萘化合物;(f)长春花化合物;(g)蛋白质合成抑制剂;(h)RNA聚合酶抑制剂;(i)微管蛋白结合化合物;或其类似物。

[0764] 在某些实施方案中,D是(a)奥瑞斯他汀化合物;(b)卡奇霉素化合物;(c)倍癌霉素化合物;(d)喜树碱化合物,(e)吡咯并苯并二氮杂萘化合物;(f)长春花化合物;或其类似物。

[0765] 例如,奥瑞斯他汀化合物是奥瑞斯他汀、多拉司他汀、单甲基奥瑞斯他汀E(MMAE)、

单甲基奥瑞斯他汀F (MMAF)、奥瑞斯他汀F、AF HPA、苯二胺 (AFP)。

[0766] 例如,倍癌毒素或其类似物是倍癌毒素A、倍癌毒素B1、倍癌毒素B2、倍癌毒素C1、倍癌毒素C2、倍癌毒素D、倍癌毒素SA、CC-1065、阿多来新、比折来新,或卡折来新。

[0767] 例如,喜树碱化合物是喜树碱、CPT-11 (伊立替康)、SN-38,或托泊替康。

[0768] 例如,吡咯并苯并二氮杂萘化合物为吡咯并苯并二氮杂萘单体、对称的吡咯并苯并二氮杂萘二聚体或不对称的吡咯并苯并二氮杂萘二聚体。

[0769] 式 (Id) 的聚合物-药物共轭物可被用来与具有以下分子量的PBRM共轭:约40kDa或更大(如,60kDa或更大;80kDa或更大;100kDa或更大;120kDa或更大;140kDa或更大;160kDa或更大;180kDa或更大;或200kDa或更大,或约40-200kDa,40-180kDa,40-140kDa,60-200kDa,60-180kDa,60-140kDa,80-200kDa,80-180kDa,80-140kDa,100-200kDa,100-180kDa,或100-140kDa)。

[0770] 例如,为了与具有分子量40kDa或更大(如,60kDa或更大,80kDa或更大,100kDa或更大,120kDa或更大,140kDa或更大,160kDa或更大或180kDa或更大)的PBRM共轭,本发明的支架的聚合物载体为聚缩醛,例如,具有分子量(即,未修饰的PHF的MW)范围从约2kDa至约40kDa(如,约2-20kDa或约3-15kDa或约5-10kDa)的PHF。

[0771] 例如,为了与具有分子量40kDa-200kDa的PBRM共轭,本发明的支架的聚合物载体为聚缩醛,例如,具有分子量(即,未修饰的PHF的MW)范围从约2kDa至约40kDa(如,约2-20kDa或约3-15kDa或约5-10kDa)的PHF。

[0772] 例如,为了与具有分子量40kDa-80kDa的PBRM共轭,本发明的支架的聚合物载体为聚缩醛,例如,具有分子量(即,未修饰的PHF的MW)范围从约2kDa至约40kDa(如,约2-20kDa或约3-15kDa或约5-10kDa)的PHF。例如PHF具有约5kDa,10kDa或15kDa的分子量。

[0773] 在该分子量范围内的PBRM包括,但不限于,例如,抗体片段,例如,Fabs。

[0774] 例如,为了与具有分子量60kDa-120kDa的PBRM共轭,本发明的支架的聚合物载体为聚缩醛,例如,具有分子量(即,未修饰的PHF的MW)范围从约2kDa至约40kDa(如,约2-20kDa或约3-15kDa或约5-10kDa)的PHF。例如PHF具有约5kDa、10kDa或15kDa的分子量。

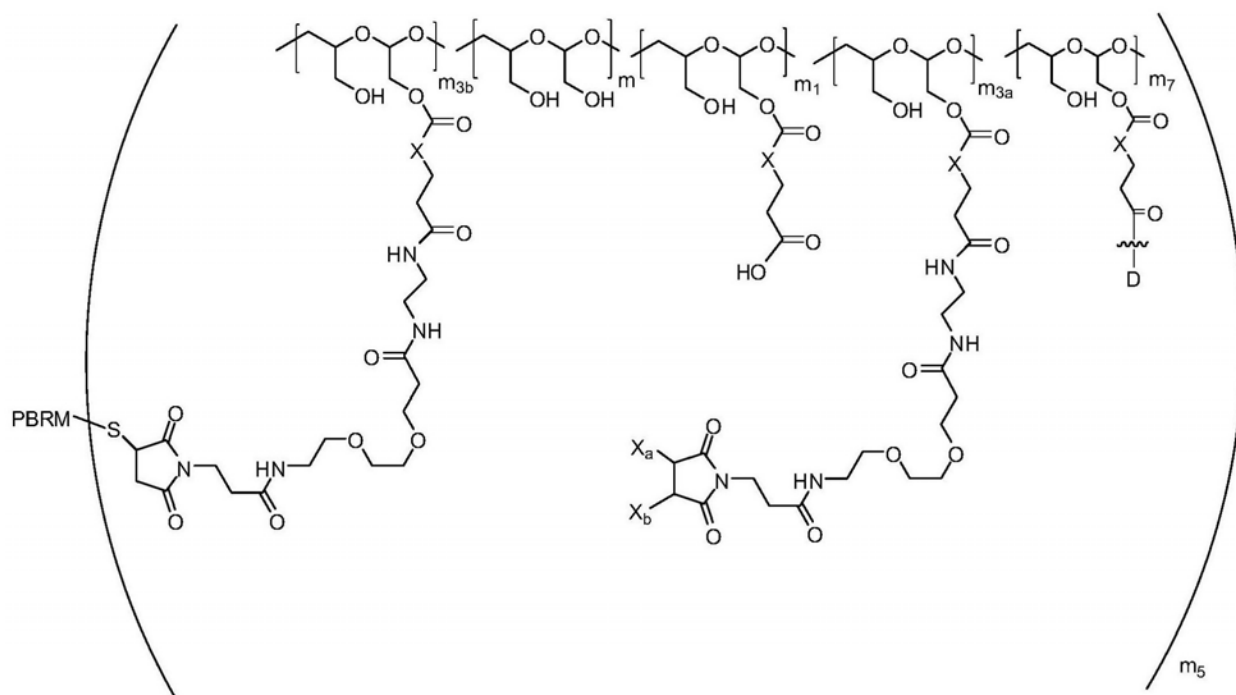
[0775] 在该分子量范围内的PBRM包括,但不限于,例如,camelids、Fab2、scFvFc等。

[0776] 例如,为了与具有分子量140kDa-180kDa的PBRM共轭,本发明的支架的聚合物载体为聚缩醛,例如,具有分子量(即,未修饰的PHF的MW)范围从约2kDa至约40kDa(如,约2-20kDa或约3-15kDa或约5-10kDa)的PHF。例如PHF具有约5kDa、10kDa或15kDa的分子量。

[0777] 在该分子量范围内的PBRM包括,但不限于,例如,全长抗体,例如,IgG、IgM。

[0778] 在某些实施方案中,聚合物药物共轭物 (Id) 当与PBRM共轭时具有式 (Ie) :

[0779]



(Ie),

[0780] 其中:

[0781] X_a 和 X_b 之一是H,而另一个为马来酰亚胺基封闭部分,或 X_a 和 X_b ,与它们连接的碳原子一起,形成碳-碳双键;

[0782] m_{3a} 为从0至约17的整数,

[0783] m_{3b} 为从1至约8的整数,其中 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和是 m_3 ,

[0784] m 、 m_1 、 m_7 、 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和的范围是从约15至约300,和

[0785] m_5 为从1至约10的整数。

[0786] PBRM具有约40kDa或更大的分子量(如,60kDa或更大;80kDa或更大;100kDa或更大;120kDa或更大;140kDa或更大;160kDa或更大;180kDa或更大;或200kDa或更大,或约40-200kDa、40-180kDa、40-140kDa、60-200kDa、60-180kDa、60-140kDa、80-200kDa、80-180kDa、80-140kDa、100-200kDa、100-180kDa,或100-140kDa)。

[0787] 例如,PBRM具有约40kDa或更大的分子量(如,60kDa或更大;80kDa或更大;100kDa或更大;120kDa或更大;140kDa或更大;160kDa或更大;180kDa或更大;或200kDa或更大,或约40-200kDa、40-180kDa、40-140kDa、60-200kDa、60-180kDa、60-140kDa、80-200kDa、80-180kDa、80-140kDa、100-200kDa、100-180kDa,或100-140kDa)并且具有巯基(即,-SH或硫氢基)基团。

[0788] 例如,PHF和PBRM之间形成的硫化物键的总和(或连接点的总和)是10或更少。

[0789] 例如, m_7 和 m_{3b} 之间的比例是大于1:1和小于或等于10:1。

[0790] 例如, m_7 和 m_{3b} 之间的比例是约9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1,或2:1。

[0791] 例如, m_7 和 m_{3b} 之间的比例是2:1和8:1之间。

[0792] 例如, m_7 和 m_{3b} 之间的比例是约8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1,或2:1。

[0793] 例如, m_7 和 m_{3b} 之间的比例是2:1和4:1之间。

[0794] 例如, m_7 和 m_{3b} 之间的比例是约 4:1、3:1 或 2:1。

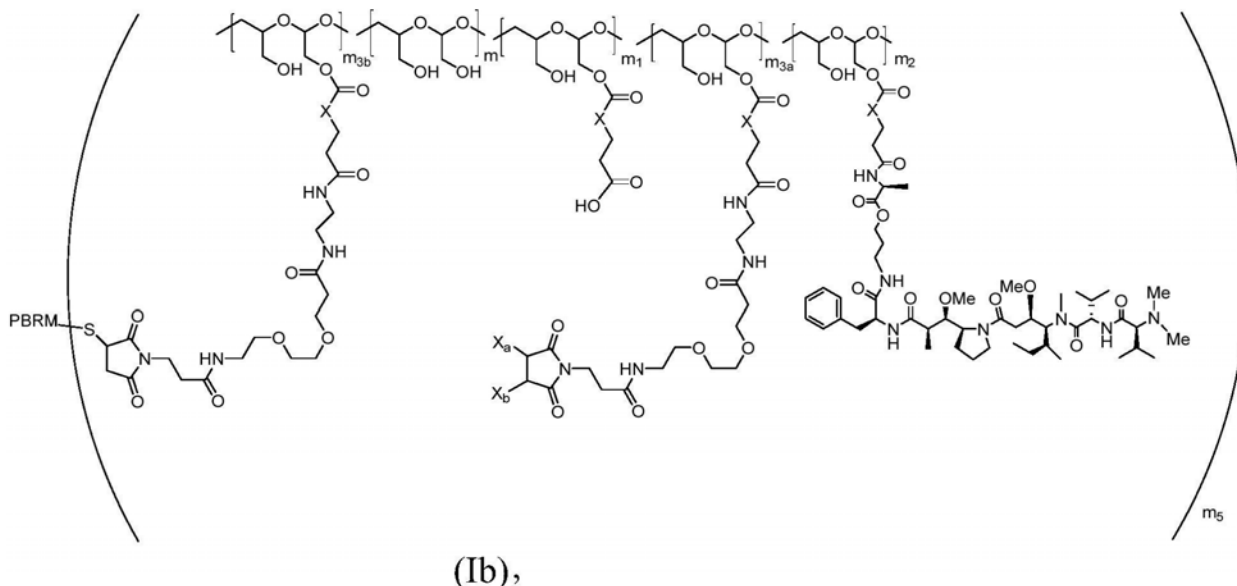
[0795] 例如,当式(Ie)中的PHF具有范围从约2kDa至约20kDa的分子量时, m 、 m_1 、 m_7 、 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和的范围是从约15至约150, m_1 为从1至约70的整数, m_7 为从1至约20的整数, m_{3a} 为从0至约9的整数, m_{3b} 为从1至约8的整数和 m_5 为从2至约8的整数。

[0796] 例如,当式(Ie)中的PHF具有范围从约3kDa至约15kDa的分子量时, m 、 m_1 、 m_7 、 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和的范围是从约20至约110, m_1 为从2至约50的整数, m_7 为从2至约15的整数, m_{3a} 为从0至约7的整数, m_{3b} 为从1至约8的整数和 m_5 为从2至约4的整数。

[0797] 例如,当式(Ie)中的PHF具有范围从约5kDa至约10kDa的分子量时, m 、 m_1 、 m_7 、 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和的范围是从约40至约75, m_1 为从约5至约35的整数, m_7 为从约3至约10的整数, m_{3a} 为从0至约4的整数, m_{3b} 为从1至约5的整数和 m_5 为从2至约4的整数。

[0798] 在某些实施方案中,本发明的蛋白质-聚合物药物共轭物具有如本文描述的式 (Ib) :

[0799]



[0800] 其中：

[0801] X_a 和 X_b 之一是H,而另一个为马来酰亚胺基封闭部分,或 X_a 和 X_b ,与它们连接的碳原子一起,形成碳-碳双键,;

[0802] m_{3a} 为从0至约17的整数,

[0803] m_{3b} 为从1至约8的整数,其中 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和是 m_3 ,

[0804] m 、 m_1 、 m_2 、 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和的范围是从约15至约300,和

[0805] m_5 为从1至约10的整数。

[0806] 例如, PBRM具有约40kDa或更大的分子量(如, 60kDa或更大; 80kDa或更大; 100kDa或更大; 120kDa或更大; 140kDa或更大; 160kDa或更大; 180kDa或更大; 或200kDa或更大, 或约40-200kDa、40-180kDa、40-140kDa、60-200kDa、60-180kDa、60-140kDa、80-200kDa、80-180kDa、80-140kDa、100-200kDa、100-180kDa, 或100-140kDa)。

[0807] 例如,PHF和PBRM之间形成的硫化物键的总和(或连接点的总和)是10或更少。

[0808] 例如, m_2 和 m_{3b} 之间的比例是大于 1:1 和小于或等于 10:1。

- [0809] 例如, m_2 和 m_{3b} 之间的比例是约9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1,或2:1。
- [0810] 例如, m_2 和 m_{3b} 之间的比例是2:1和8:1之间。
- [0811] 例如, m_2 和 m_{3b} 之间的比例是约8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1,或2:1。
- [0812] 例如, m_2 和 m_{3b} 之间的比例是2:1和4:1之间。
- [0813] 例如, m_2 和 m_{3b} 之间的比例是约4:1、3:1或2:1。
- [0814] 例如, 当式 (Ib) 中的PHF具有范围从约2kDa至约20kDa的分子量时, m 、 m_1 、 m_2 、 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和的范围是从约15至约150, m_1 为从1至约70的整数, m_2 为从1至约20的整数, m_{3a} 为从0至约9的整数, m_{3b} 为从1至约8的整数和 m_5 为从2至约8的整数。
- [0815] 例如, 当式 (Ib) 中的PHF具有范围从约3kDa至约15kDa的分子量时, m 、 m_1 、 m_2 、 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和的范围是从约20至约110, m_1 为从2至约50的整数, m_2 为从2至约15的整数, m_{3a} 为从0至约7的整数, m_{3b} 为从1至约8的整数和 m_5 为从2至约4的整数。
- [0816] 例如, 当式 (Ib) 中的PHF具有范围从约5kDa至约10kDa的分子量时, m 、 m_1 、 m_2 、 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和的范围是从约40至约75, m_1 为从约5至约35的整数, m_2 为从约3至约10的整数, m_{3a} 为从0至约4的整数, m_{3b} 为从1至约5的整数和 m_5 为从2至约4的整数。
- [0817] 例如, 马来酰亚胺基封闭部分是当马来酰亚胺基与式 (II) 的含硫氢基化合物反应时, 可共价连接于两个烯烃碳原子之一的部分:
- [0818] $R_{90}-(CH_2)_d-SH$
- [0819] (II)
- [0820] 其中:
- [0821] R_{90} 是 NHR_{91} 、 OH 、 $COOR_{93}$ 、 $CH(NHR_{91})COOR_{93}$ 或取代的苯基;
- [0822] R_{93} 是氢或 C_{1-4} 烷基;
- [0823] R_{91} 是氢、 CH_3 或 CH_3CO 和
- [0824] d 为从1至3的整数。
- [0825] 例如, 式 (II) 的马来酰亚胺基封闭化合物可以是半胱氨酸、N-乙酰基半胱氨酸、半胱氨酸甲基酯、N-甲基半胱氨酸、2-巯基乙醇、3-巯基丙酸、2-巯基乙酸、巯基甲醇 (即, $HOCH_2SH$), 其中苯基被一个或多个亲水性取代基取代的苄基硫醇, 或3-氨基丙烷-1-硫醇。苯基上的一个或多个亲水性取代基包含 OH 、 SH 、甲氧基、乙氧基、 $COOH$ 、 CHO 、 COC_{1-4} 烷基、 NH_2 、 F 、氰基、 SO_3H 、 PO_3H 等。
- [0826] 例如, 马来酰亚胺基封闭基团是 $-S-(CH_2)_d-R_{90}$, 其中,
- [0827] R_{90} 是 OH 、 $COOH$, 或 $CH(NHR_{91})COOR_{93}$;
- [0828] R_{93} 是氢或 CH_3 ;
- [0829] R_{91} 是氢或 CH_3CO ; 和
- [0830] d 是1或2。
- [0831] 例如, 马来酰亚胺基封闭基团是 $-S-CH_2-CH(NH_2)COOH$ 。
- [0832] 例如, 当PHF具有范围从2kDa至40kDa (如, 约2-20kDa或约3-15kDa或约5-10kDa) 的分子量时, 每个PHF的药物数 (如, m_2) 为从1至约40的整数 (如, 约1-20或约2-15或约3-10)。这种支架可被用来, 例如, 共轭具有以下分子量的PBRM: 40kDa或更大 (如, 60kDa或更大; 80kDa或更大; 或100kDa或更大; 120kDa或更大; 140kDa或更大; 160kDa或更大或180kDa或更大)。在这个实施方案中, 每个PHF与PBRM的比例是在约1:1和约1:10之间, 约1:1和约1:9之

间,约1:1和约1:8之间,约1:1和约1:7之间,约1:1和约1:6之间,约1:1和约1:5之间,约1:1和约1:4之间,约1:1和约1:3之间,约1:1和约1:2之间,约1:2和约1:6之间,约1:2和约1:5之间,约1:2和约1:4之间或约1:2和约1:3之间。

[0833] 例如,当PHF具有范围从2kDa至40kDa,(如,约2-20kDa或约3-15kDa或约5-10kDa)的分子量时,每个PHF的药物数(如, m_2)为从1至约40的整数(如,约1:20或约2:15或约3:10)。这种支架可被用来,例如,共轭具有分子量140kDa-180kDa的PBRM。在这个实施方案中,每个PHF与PBRM的比例是在约1:1和约1:10之间,约1:1和约1:9之间,约1:1和约1:8之间,约1:1和约1:7之间,约1:1和约1:6之间,约1:1和约1:5之间,约1:1和约1:4之间,约1:1和约1:3之间,约1:1和约1:2之间,约1:2和约1:6之间,约1:2和约1:5之间,约1:2和约1:4之间或约1:2和约1:3之间。

[0834] 在该分子量范围内的PBRM包括,但不限于,例如,全长抗体,例如,IgG、IgM。

[0835] 例如,当PHF具有范围从2kDa至40kDa的分子量(如,约2-20kDa或约3-15kDa或约5-10kDa)时,每个PHF的药物数(如, m_2)为从1至约40的整数(如,约1:20或约2:15或约3:10)。这种支架可被用来,例如,共轭具有分子量60kDa-120kDa的PBRM。在这个实施方案中,每个PHF与PBRM的比例是在约1:1和约1:10之间,约1:1和约1:9之间,约1:1和约1:8之间,约1:1和约1:7之间,约1:1和约1:6之间,约1:1和约1:5之间,约1:1和约1:4之间,约1:1和约1:3之间,约1:1和约1:2之间,约1:2和约1:6之间,约1:2和约1:5之间,约1:2和约1:4之间或约1:2和约1:3之间。

[0836] 在该分子量范围内的PBRM包括,但不限于,例如,抗体片段如,例如Fab2、scFv和 camelids。

[0837] 例如,当PHF具有范围从2kDa至40kDa的分子量(如,约2-20kDa或约3-15kDa或约5-10kDa)时,每个PHF的药物数(如, m_2)为从1至约40的整数(如,约1:20或约2:15或约3:10)。这种支架可被用来,例如,共轭具有分子量40kDa-80kDa的PBRM。在这个实施方案中,每个PHF与PBRM的比例是在约1:1和约1:10之间,约1:1和约1:9之间,约1:1和约1:8之间,约1:1和约1:7之间,约1:1和约1:6之间,约1:1和约1:5之间,约1:1和约1:4之间,约1:1和约1:3之间,约1:1和约1:2之间,约1:2和约1:6之间,约1:2和约1:5之间,约1:2和约1:4之间或约1:2和约1:3之间。

[0838] 在该分子量范围内的PBRM包括,但不限于,例如,抗体片段,例如,Fabs。

[0839] 在另一方面,本发明的特征是可用来与基于蛋白质的识别分子(PBRM)和治疗剂(D)二者共轭的聚合物支架。无D支架包含聚合物载体、一个或多个连接于聚合物载体的接头(其适合于连接PBRM与聚合物载体),和一个或多个适合于连接药物(D)与聚合物载体的接头。

[0840] 在某些实施方案中,共轭物以数个步骤中形成。这些步骤包括(1)修饰聚合物,以使其含有能够与药物或其衍生物的官能团反应的官能团;(2)使修饰的聚合物与药物或其衍生物反应,以便药物连接至聚合物;(3)修饰聚合物-药物共轭物,以便聚合物含有能够与PBRM或其衍生物的官能团反应的官能团;和(4)使修饰的聚合物-药物共轭物与PBRM或其衍生物反应,以形成本发明的共轭物。如果通过步骤(1)制备的修饰的聚合物含有能够与PBRM或其衍生物的官能团反应的官能团,就可以省略步骤(3)。

[0841] 在另一个实施方案中,共轭物以数个步骤中形成:(1)修饰聚合物,以便其含有能

够与第一个药物或其衍生物的官能团反应的官能团；(2) 使修饰的聚合物与第一个药物或其衍生物反应，以便第一个药物连接至聚合物；(3) 修饰聚合物-药物共轭物，以便其含有能够与第二个药物或其衍生物的官能团反应的官能团；(4) 使修饰的聚合物-药物共轭物与第二个药物或其衍生物反应，以便第二个药物连接至聚合物-药物共轭物；(5) 修饰含有两个不同药物的聚合物-药物共轭物，以便聚合物含有能够与PBRM或其衍生物的官能团反应的官能团；和(6) 使步骤(5)的修饰的聚合物-药物共轭物与PBRM或其衍生物反应，以形成本发明的共轭物。如果两个不同的PBRM或其衍生物有待于共轭，以形成包含两个不同药物和两个不同PBRM的聚合物-药物共轭物，就可以重复步骤(5)和(6)。

[0842] 在还有的另一个示例性实施方案中，共轭物以数个步骤中形成。这些步骤包括(1) 修饰聚合物，以便其含有能够与药物或其衍生物的官能团反应的官能团；(2) 进一步修饰聚合物，以便其还含有能够与PBRM或其衍生物的官能团反应的官能团；(3) 使修饰的聚合物与药物或其衍生物反应，以便药物连接至聚合物；和(4) 使修饰的聚合物-药物共轭物与PBRM或其衍生物反应，以形成本发明的共轭物。步骤(1)和(2)的顺序或步骤(3)和(4)的顺序能够颠倒。此外，如果修饰的聚合物含有能够同时与药物或其衍生物的官能团以及PBRM或其衍生物的官能团反应的官能团，就可以省略步骤(1)或(2)。

[0843] 在另一个实施方案中，共轭物以数个步骤中形成：(1) 修饰聚合物，以便其含有能够与第一个药物或其衍生物的官能团反应的官能团；(2) 进一步修饰聚合物，以便其含有能够与PBRM或其衍生物的官能团反应的官能团；(3) 使修饰的聚合物与第一个药物或其衍生物反应，以便第一个药物连接至聚合物；(4) 修饰聚合物-药物共轭物，以便其含有能够与第二个药物或其衍生物的官能团反应的不同官能团；(5) 使修饰的聚合物-药物共轭物与第二个药物或其衍生物反应，以便第二个药物连接至聚合物-药物共轭物；(6) 使含有两个不同药物的修饰的聚合物-药物共轭物反应，以便聚合物与PBRM或其衍生物形成本发明的共轭物。如果两个不同的PBRM或其衍生物有待于共轭，以形成包含两个不同药物和两个不同PBRM的聚合物-药物共轭物，就可以重复步骤(6)。步骤(4)可以在步骤(1)之后进行，以便修饰的聚合物含有能够与两个不同药物或其衍生物反应的两个不同官能团。在这个实施方案中，在修饰的聚合物与两个不同药物(步骤(3)和步骤(5)或与PBRM(步骤(6))反应之前，能够对含有能够与两个不同药物或其衍生物反应的两个不同官能团的修饰的聚合物进行进一步修饰，以便其含有能够与PBRM或其衍生物的官能团反应的官能团。

[0844] 可制备生物可降解的、生物相容性的本发明的共轭物以符合生物可降解性和亲水性所需的要求。例如，在生理学条件下，能够达到生物可降解性和稳定性之间平衡。例如，人们已知分子量超过一定阈值(通常，在40-100kDa以上，取决于分子的物理形状)的分子无法(像小分子一样)通过肾脏排泄，并且仅能够通过细胞摄取和细胞内胞器(最显著的是溶酶体)中的降解从身体中清除。该观察结果说明了官能上稳定但生物可降解的物质如何可以通过调节其在一般生理条件($\text{pH}=7.5\pm0.5$)下和在溶酶体 pH (pH 接近5)下的稳定性而加以设计。例如，人们已知酸类可催化缩醛和缩酮基团的水解，因此，羰基聚缩物在酸性溶酶体环境下通常将会比，例如，在血浆中更不稳定。人们可设计一项试验来比较在，例如， $\text{pH}=5$ 和 $\text{pH}=7.5$ 下，于 37°C ，在含水介质中的聚合物降解概况，并因此测定出在正常生理学环境下和被细胞摄取后在“消化”溶酶体胞器中预期的聚合物稳定性平衡。例如，通过尺寸排阻HPLC能够测量这样的试验中的聚合物完整性。本领域技术人员能够选择其它适合的方法

来研究本发明的降解共轭物的各种片段。

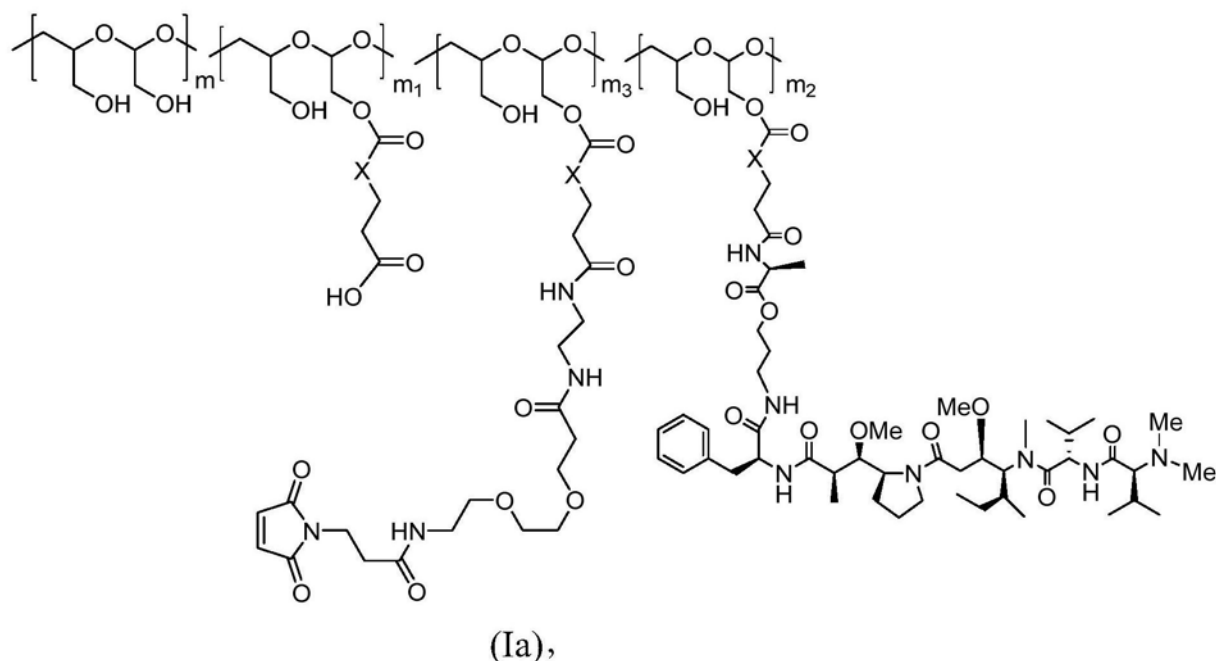
[0845] 在许多情况下,优选在pH=7.5下,在1-7天内,聚合物的有效尺寸将不会有可检测到的改变,并且至少在数周内,仍然保持在原始的50%以内。另一方面,在At pH=5下,在1-5天内,聚合物优选应该有可检测到的降解,并且在两周至数月的时间范围内,完全转化为低分子量的片段。虽然在某些情况下可以优选更快的降解,但是通常更合意的可以是,聚合物在细胞内降解的速率不超过聚合物片段通过细胞代谢或排泄的速率。因此,在某些实施方案中,本发明的共轭物被期望是生物可降解的,尤其在被细胞摄取时,并且对于生物系统是相对“惰性的”。载体降解的产物优选是不带电的并且不会显著地改变环境的pH。丰富的醇基团被认为可以提供较低的细胞受体(尤指吞噬细胞)对聚合物识别的速率。本发明的聚合物主链通常几乎不含有(如果含有任何)抗原决定簇(例如,对于一些多糖和多肽而言为特征性的)并且通常不包含能够在体内参与“锁钥(key-and-lock)”类型相互作用的刚性结构,除非后者的相互作用是合意的。因此,本发明的可溶性、交联的且固态的共轭物被预期具有低毒性和生物粘附性,这使其适合于多种生物医药应用。

[0846] 在本发明的某些实施方案中,生物可降解的、生物相容性的共轭物可形成线性或支链结构。例如,本发明的生物可降解的、生物相容性的羧基聚缩物共轭物可以是手性的(光学活性的)。任选地,本发明的生物可降解的、生物相容性的羧基聚缩物共轭物可以是差向异构的。

[0847] 在某些实施方案中,本发明的共轭物是水溶性的。在某些实施方案中,本发明的共轭物是非水溶性的。在某些实施方案中,本发明的共轭物呈现固体形式。在某些实施方案中,本发明的共轭物是胶体。在某些实施方案中,本发明的共轭物呈现颗粒形式。在某些实施方案中,本发明的共轭物呈现凝胶形式。

[0848] 本发明的特征还在于一种用于与PBRM共轭以形成如本文所描述的聚合物-药物-PBRM共轭物的聚合物支架。该支架包含式(Ia)的聚合物载体,用来与基于蛋白质的识别分子(PBRM),例如,具有约40kDa或更大的分子量的PBRM共轭:

[0849]



[0850] 所述支架包含具有分子量范围从约2kDa至约40kDa的聚(1-羟基甲基亚乙基羟基甲基-缩甲醛)(PHF)；

[0851] X是CH₂、O或NH；

[0852] m为从1至约300的整数，

[0853] m₁为从1至约140的整数，

[0854] m₂为从1至约40的整数，

[0855] m₃为从1至约18的整数，和

[0856] m、m₁、m₂和m₃的总和的范围是从约15至约300。

[0857] 例如，在式(Ia)的“m₃”单元中每次出现马来酰亚胺基部分还与PBRM的官能团形成共价键。

[0858] 例如，为了与具有分子量40kDa或更大(如，60kDa或更大、80kDa或更大、100kDa或更大、120kDa或更大、140kDa或更大、160kDa或更大或180kDa或更大，或约40-200kDa、40-180kDa、40-140kDa、60-200kDa、60-180kDa、60-140kDa、80-200kDa、80-180kDa、80-140kDa、100-200kDa、100-180kDa，或100-140kDa)的PBRM共轭，本发明的支架的聚合物载体为聚缩醛，例如，具有分子量(即，未修饰的PHF的MW)范围从约2kDa至约40kDa(如，约2-20kDa或约3-15kDa或约5-10kDa)的PHF。

[0859] 例如，为了与具有分子量40kDa-200kDa的PBRM共轭，本发明的支架的聚合物载体为聚缩醛，例如，具有分子量(即，未修饰的PHF的MW)范围从约2kDa至约40kDa(如，约2-20kDa或约3-15kDa或约5-10kDa)的PHF。

[0860] 例如，为了与具有分子量40kDa-80kDa的PBRM共轭，本发明的支架的聚合物载体为聚缩醛，例如，具有分子量(即，未修饰的PHF的MW)(即，未修饰的PHF的MW)范围从约2kDa至约40kDa(如，约2-20kDa或约3-15kDa或约5-10kDa)的PHF。例如PHF具有约5kDa、8kDa、10kDa、13kDa或15kDa的分子量。

[0861] 在该分子量范围内的PBRM包括，但不限于，例如，抗体片段，例如，Fabs。

[0862] 例如，为了与具有分子量60kDa-120kDa的PBRM共轭，本发明的支架的聚合物载体为聚缩醛，例如，具有分子量(即，未修饰的PHF的MW)范围从约5kDa至约40kDa(如，约5-30kDa、约5-20kDa或约5-15kDa或约5-10kDa)的PHF。例如PHF具有约10kDa、20kDa、30kDa或40kDa的分子量。

[0863] 在该分子量范围内的PBRM包括，但不限于，例如，camelids、Fab2、scFv等。

[0864] 例如，为了与具有分子量140kDa-180kDa的PBRM共轭，本发明的支架的聚合物载体为聚缩醛，例如，具有分子量(即，未修饰的PHF的MW)范围从约2kDa至约40kDa(如，约2-20kDa或约3-15kDa或约5-10kDa)的PHF。例如PHF具有约5kDa、8kDa、10kDa、13kDa或15kDa的分子量。

[0865] 在该分子量范围内的PBRMs包括，但不限于，例如，全长抗体，例如，IgG、IgM。

[0866] 例如，当式(Ia)中的PHF具有范围从约2kDa至约40kDa(即，m、m₁、m₂和m₃的总和的范围是从约1至约300)的分子量时，m₂为从1至约40的整数，m₃为从1至约18的整数，和/或m₁为从1至约140的整数(如，m₁是约1-90)。

[0867] 例如，当式(Ia)中的PHF具有范围从约2kDa至约20kDa(即，m、m₁、m₂和m₃的总和的范围是从约1至约150)的分子量时，m₂为从1至约20的整数，m₃为从1至约10的整数，和/或m₁为

从1至约70的整数(如, m_1 是约4-45)。

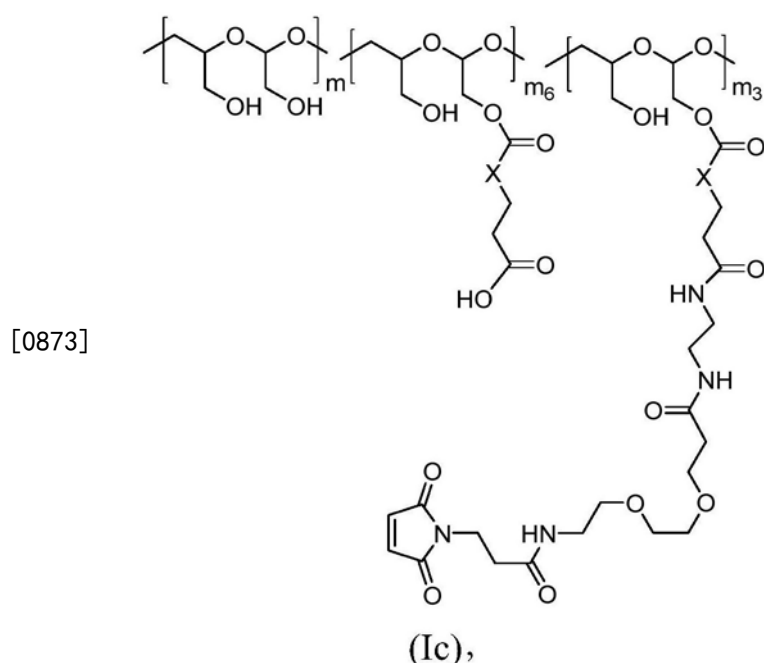
[0868] 例如,当式(Ia)中的PHF具有范围从约3kDa至约15kDa(即, m 、 m_1 、 m_2 和 m_3 的总和的范围是从约1至约110)的分子量时, m_2 为从2至约15的整数, m_3 为从1至约8的整数,和/或 m_1 为从2至约50的整数(如, m_1 是约4-30)。

[0869] 例如,当式(Ia)中的PHF具有范围从约5kDa至约10kDa(即, m 、 m_1 、 m_2 和 m_3 的总和的范围是从约1至约75)的分子量时, m_2 为从3至约10的整数, m_3 为从1至约5的整数,和/或 m_1 为从5至约35的整数(如, m_1 是约10-25)。

[0870] 例如,一个或多个载药的聚合物载体连接于一个PBRM。例如,所述支架(如,PBRM-聚合物-药物共轭物)包含具有约40kDa或更大的分子量的PBRM和一个或多个连接于PBRM的携带D的聚合物载体。

[0871] 例如,所述支架还包含经由马来酰亚胺基连接于聚合物载体的PBRM。

[0872] 本发明也提供分子量范围从约2kDa至约40kDa的式(Ic)的聚合物支架;



[0874] 其中:

[0875] X是CH₂、O或NH;

[0876] m为从1至约300的整数,

[0877] m_6 为从2至180的整数,

[0878] m_3 为从1至约18的整数,和

[0879] m 、 m_6 和 m_3 的总和的范围是从约15至约300。

[0880] 例如,在式(Ic)的“ m_3 ”单元中每次出现的马来酰亚胺基部分还与PBRM的官能团形成共价键。

[0881] 例如,当式(Ic)的PHF具有范围从约2kDa至约20kDa(即, m 、 m_6 和 m_3 的总和的范围是从约15至约150)的分子量时, m_3 为从1至约9的整数,和/或 m_6 为从2至约90的整数(如, m_6 是约6-60)。

[0882] 例如,当式(Ic)的PHF具有范围从约3kDa至约15kDa(即, m 、 m_6 和 m_3 的总和的范围是从约20至约110)的分子量时, m_3 为从1至约8的整数,和/或 m_6 为从约4至约65的整数(如, m_6 是

约6-45)。

[0883] 例如,当式(Ic)的PHF具有范围从约5kDa至约10kDa的分子量时, m 、 m_6 和 m_3 的总和的范围是从约40至约75, m_6 为从约8至约45的整数,和 m_3 为从1至约5的整数。

[0884] 在一些实施方案中,通过利用半胱氨酸-基生物共轭策略,使聚合物支架(如,聚缩醛聚合物如PHF)与PBRM共轭。见例如,W02010100430和US 7,595,292,其整体内容通过引用结合到本文中。在一个实施方案中,使聚合物支架(如,聚缩醛聚合物如PHF)经由抗体铰链区的半胱氨酸与PBRM(如,抗体)共轭。不希望受到理论的束缚,生成的共轭物通过形成链间桥结构来稳定。

[0885] 因此,本发明还涉及包含至少两个连接于聚合物支架的部分的聚合物支架(如,羰基聚缩物聚合物),其中每个部分能够与来自PBRM中的氨基酸(如,半胱氨酸)的硫氢基共轭,以形成蛋白质-聚合物共轭物。在一个实施方案中,至少两个连接于聚合物支架的部分是马来酰亚胺基团。

[0886] 在实施方案中,PBRM的一个或多个游离硫氢基通过还原蛋白质而产生。然后PBRM的一个或多个游离硫氢基与聚合物支架包含的至少两个能够与来自氨基酸的硫氢基共轭的部分反应,以使PBRM与聚合物支架共轭。在一个实施方案中,至少两个连接于聚合物支架的部分是马来酰亚胺基团。

[0887] 在实施方案中,被用来共轭的PBRM的游离硫氢基源自天然蛋白质的二硫桥或由通过二硫桥连接的两个或更多个蛋白链组成的蛋白复合物的二硫桥。二硫桥可以是链内或链间的桥。或者,PBRM的游离硫氢基是来自半胱氨酸或不参与链内或链间二硫桥形成的天然蛋白质的不成对的硫氢基。

[0888] 二硫化物键可采用常规方法,例如,用二硫苏糖醇、巯基乙醇、三-羧基乙基膦(tris-carboxyethylphosphine)、脱氢抗坏血酸、硫酸铜还原。蛋白质可含有一个或多个二硫桥。可控制产生游离硫氢基的还原以还原蛋白质中的一个或多个特定二硫桥。取决于二硫化物还原的程度和聚合物支架聚合的部分化学计算,一个或多个聚合物支架与蛋白质共轭是可能的。如果希望还原少于总和的二硫化物,可使用固定化还原剂,因为可采用不同的反应条件或加入变性剂来部分还原。

[0889] 聚合物经由硫氢基与蛋白质共轭的优点包括,但不限于优化效果,改进剂量与剂量的一致性和均匀性(因为每蛋白质共轭的聚合物分子数目对于各蛋白质分子是基本上相同的),导向每个蛋白质上特定的一个或多个残基的特异性共轭,和更容易的纯化。此外,与未共轭的蛋白质比较,经由硫氢基共轭的蛋白质-聚合物共轭物显示出明显改善的半衰期,平均残留时间,和/或在循环中的清除率。

[0890] 在一些实施方案中,本文描述的药物-聚合物-PBRM共轭物、药物-聚合物共轭物、载药的聚合物支架,或携带PBRM的聚合物支架通常各自具有 ≤ 1.5 ,例如, < 1.2 的多分散指数(PDI)。

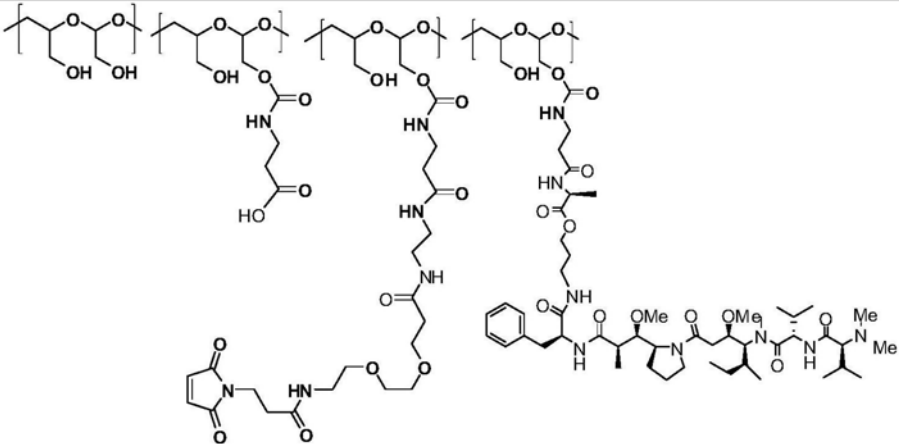
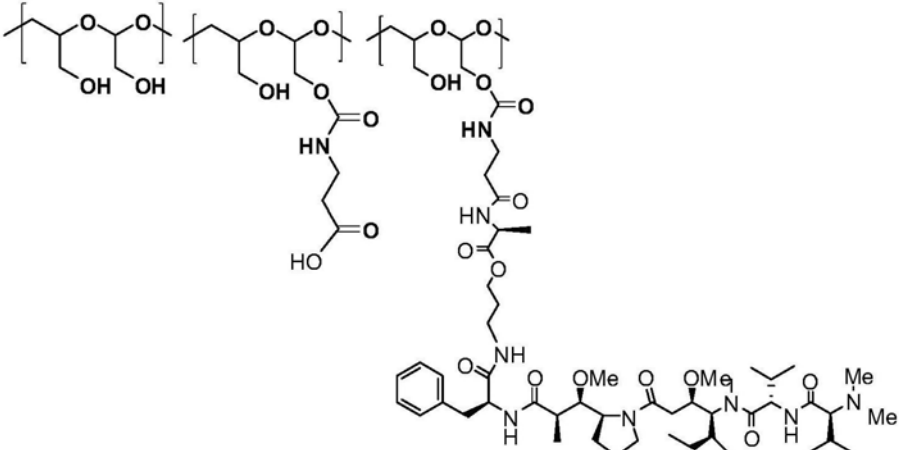
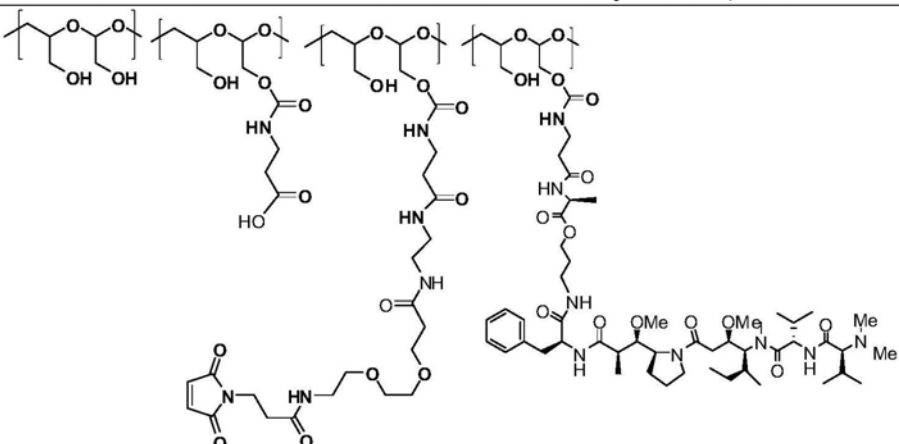
[0891] 通过广泛的渗滤法(extensive diafiltration)可以纯化PBRM-聚合物-药物共轭物、载药的聚合物支架,或携带PBRM的聚合物支架(即,除去残留的未反应药物、PBRM,或聚合物起始原料)。如果有必要,可进行通过尺寸排阻色谱法的额外的纯化,以除去任何聚集的PBRM-聚合物-药物共轭物。通常,如此纯化的PBRM-聚合物-药物共轭物典型地含有如通过SEC测定的少于5%(如, $< 2\%w/w$)的聚集的PBRM-聚合物-药物共轭物;如通过RP-HPLC测

定的少于0.5% (如, <0.1% w/w) 的游离 (未共轭的) 药物; 如通过SEC测定的少于1% 聚合物-药物共轭物和如通过RP-HPLC测定少于2% (如, <1% w/w) 的未共轭的PBRM。

[0892] 下表C和D分别提供了本发明的载药聚合物支架和聚合物-药物-蛋白质共轭物的实例。在表D中, 在化学结构中的 m_5 如在本文描述的式 (Ib) 中所定义。

[0893] 表C

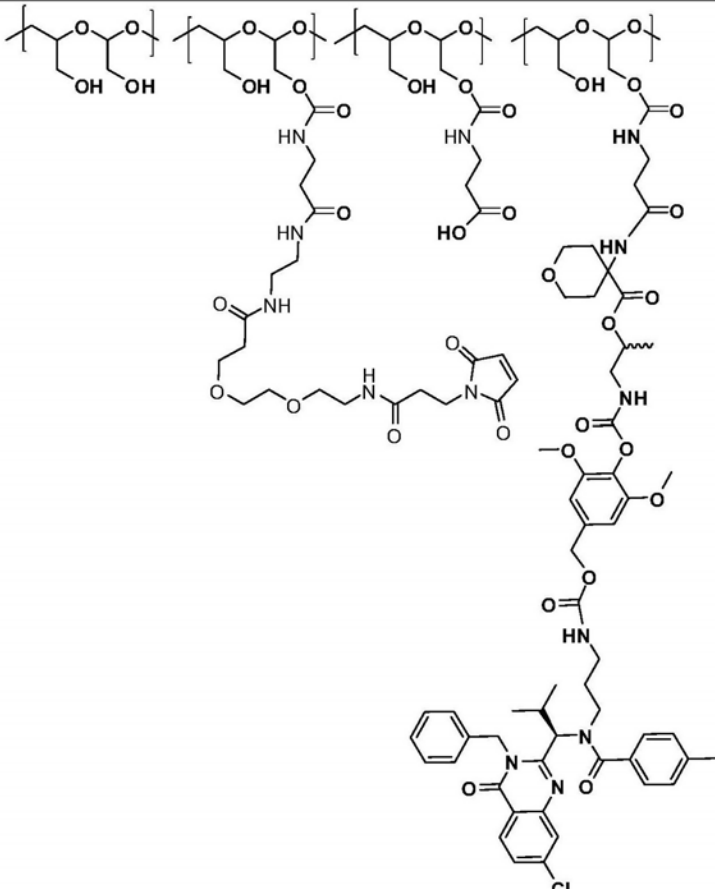
[0894]

Ref #	药物:聚合物比例	结构
Ex 3	6:1	
Ex 5	6:1	
Ex 6	6:1	

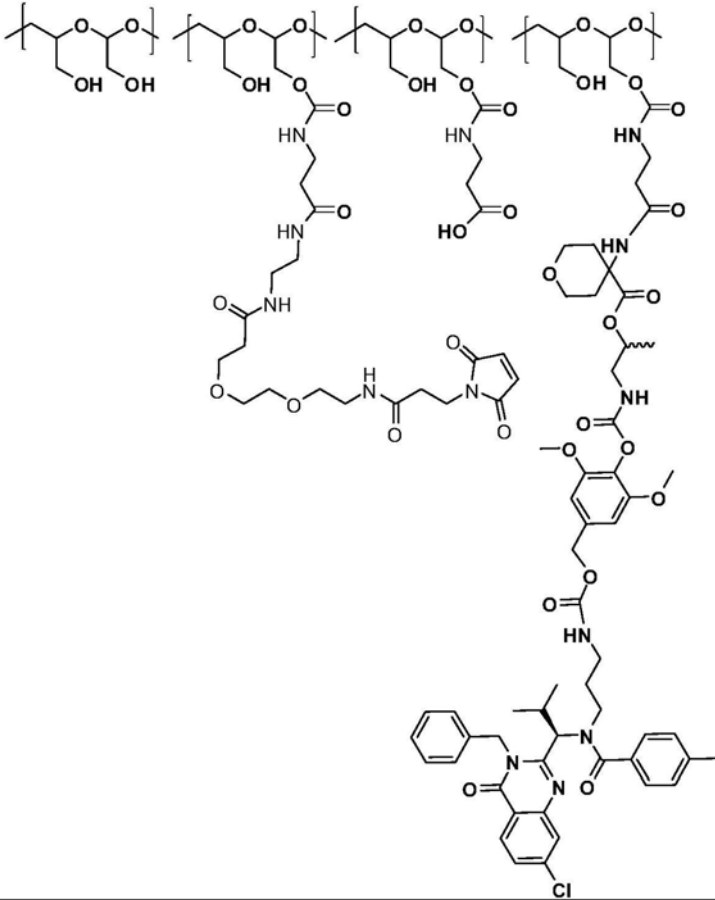
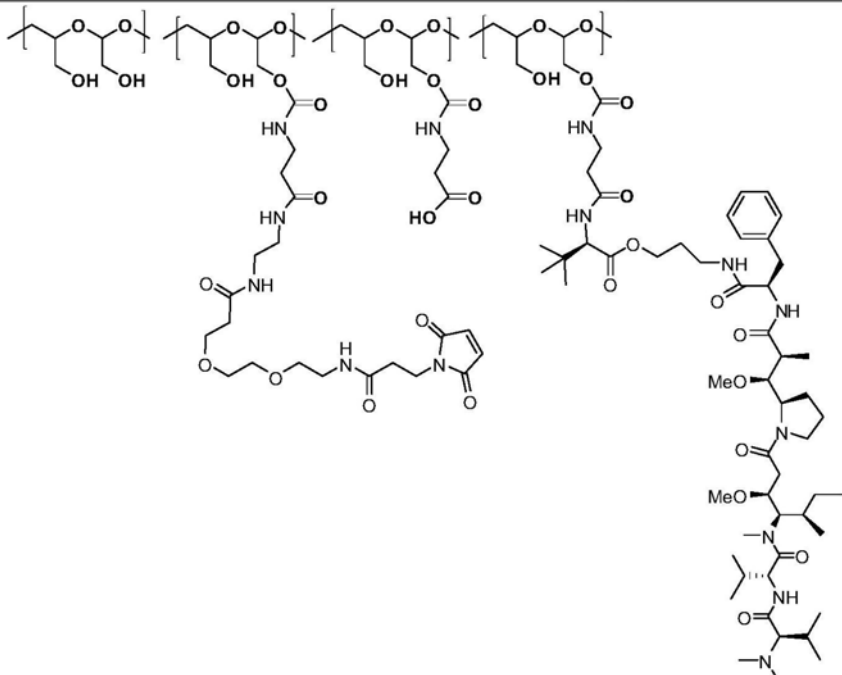
[0895]

Ref #	药物:聚合物比例	结构
Ex 12	4.5:1	
X = NH Ex 19A Ex 19B Ex 19C	2.4:1 4.6:1 2.6:1	
Ex 21	2.5:1	

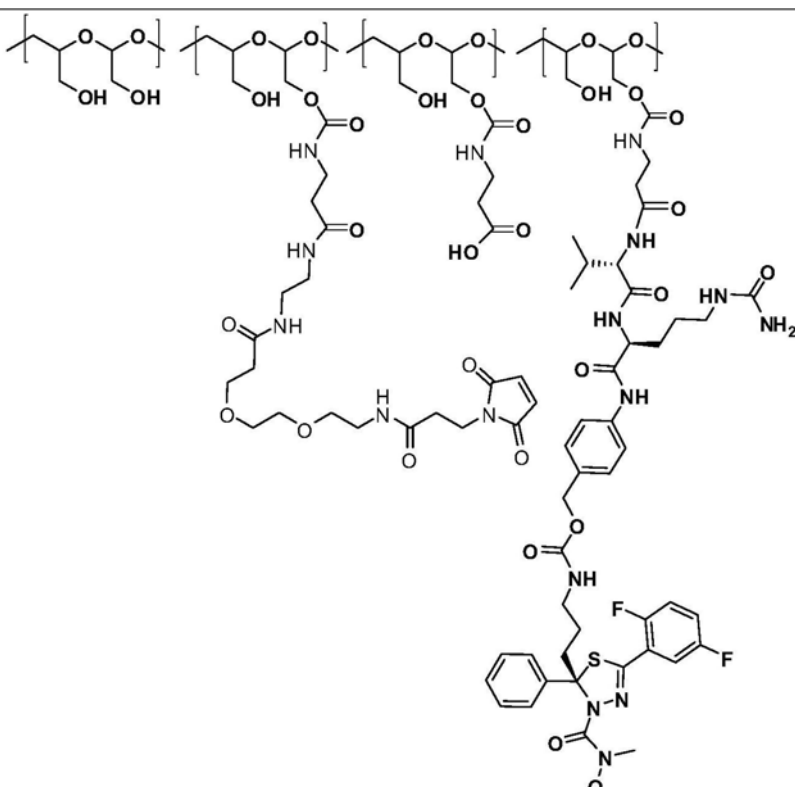
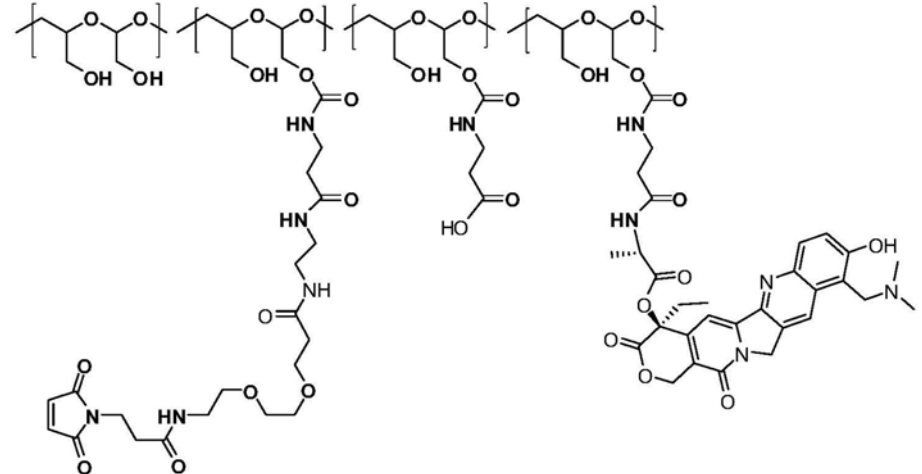
[0896]

Ref #	药物:聚合物比例	结构
Ex 25	1.7:1	

[0897]

Ref #	药物:聚合物比例	结构
Ex 29	2.2:1	
Ex 32	5.7:1	

[0898]

Ref #	药物:聚合物比例	结构
Ex 37	2.1:1	
Ex 42	4.2:1	

[0899]

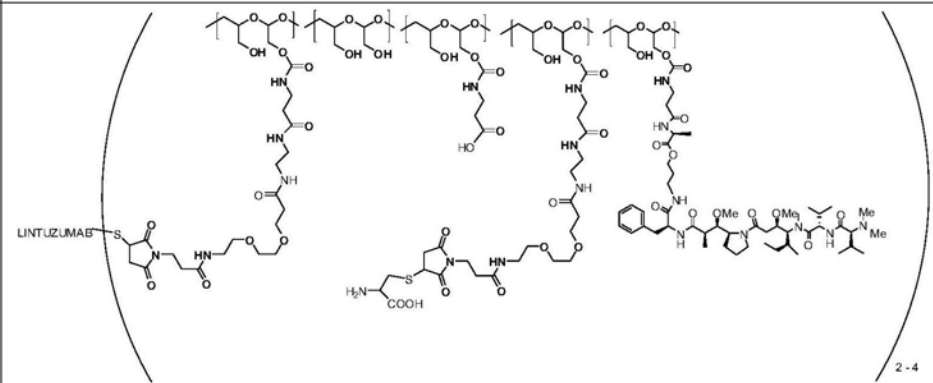
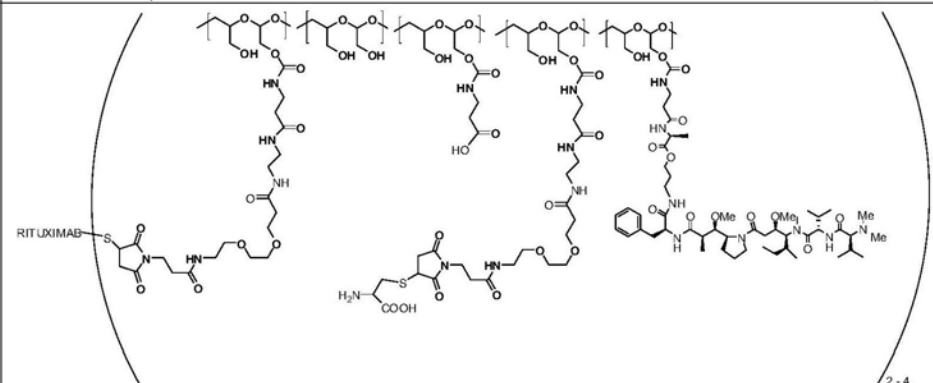
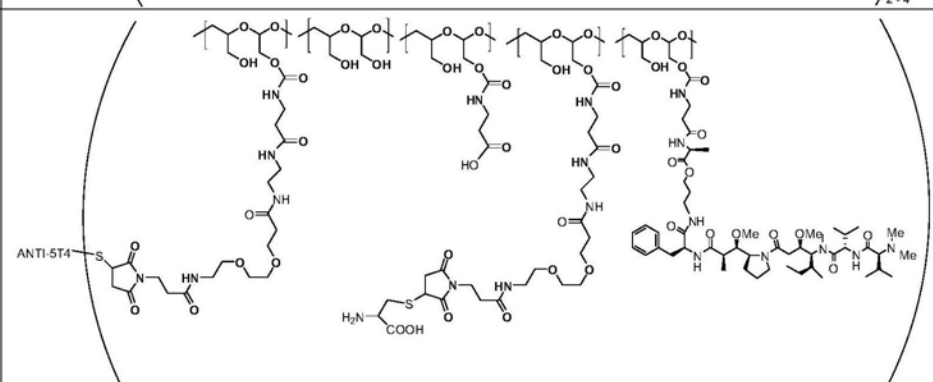
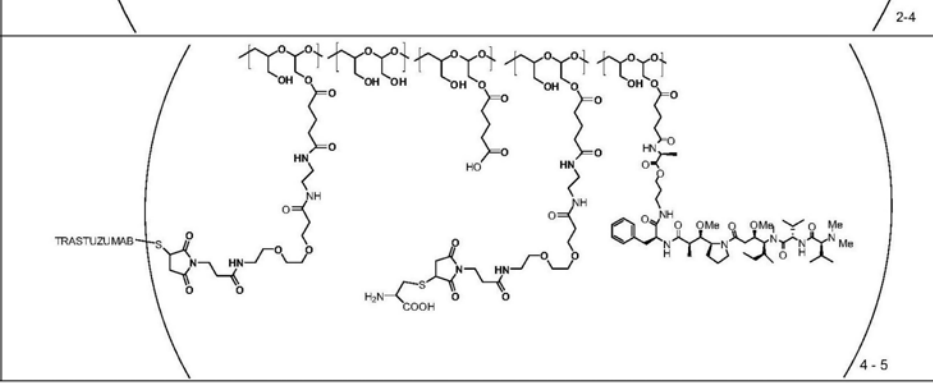
Ref #	药物:聚合物比例	结构

[0900] 表D

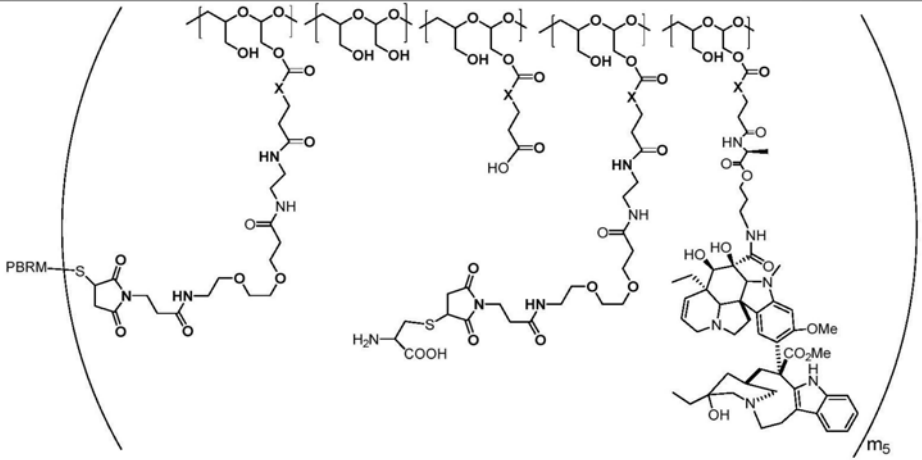
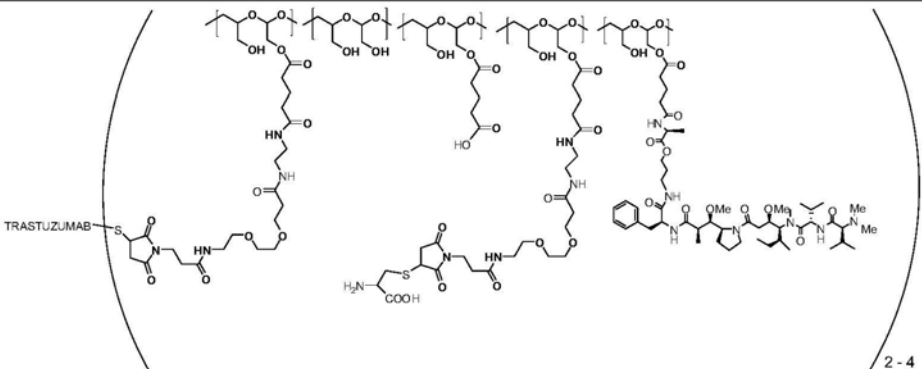
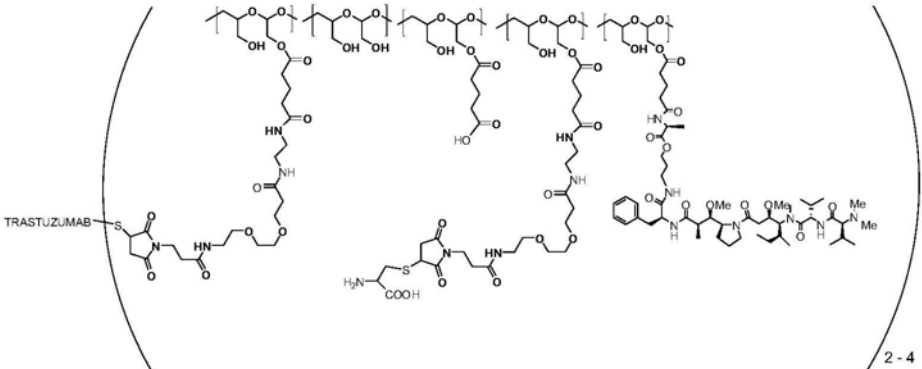
[0901]

Ref #	药物: PBRM 比例	结构
Ex 4	12:1-17:1	
Ex 7	16:1-21:1	

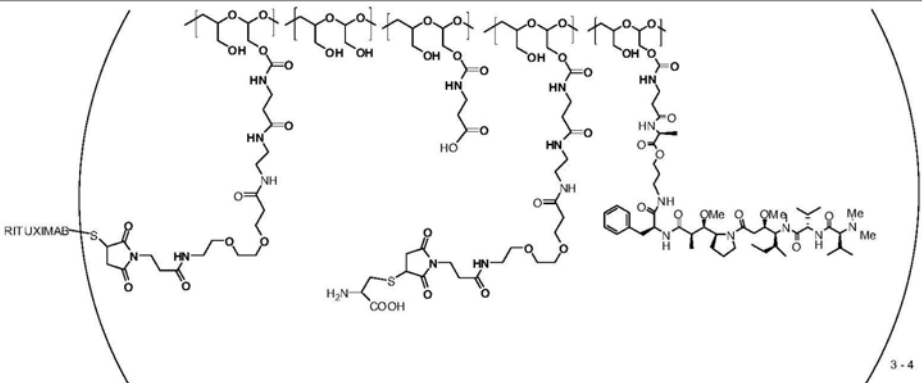
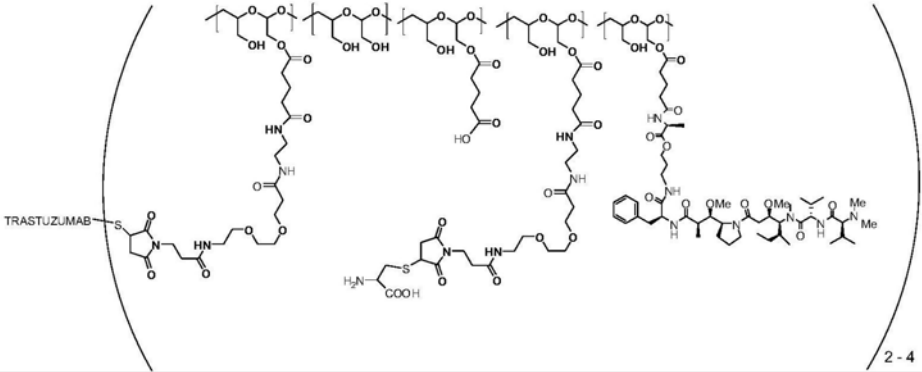
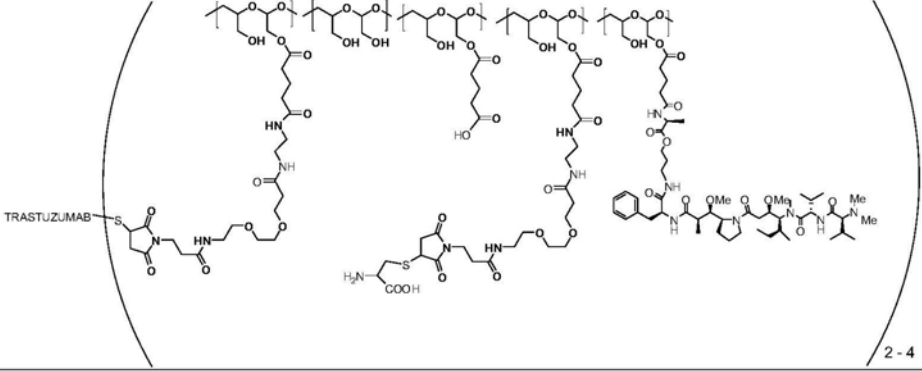
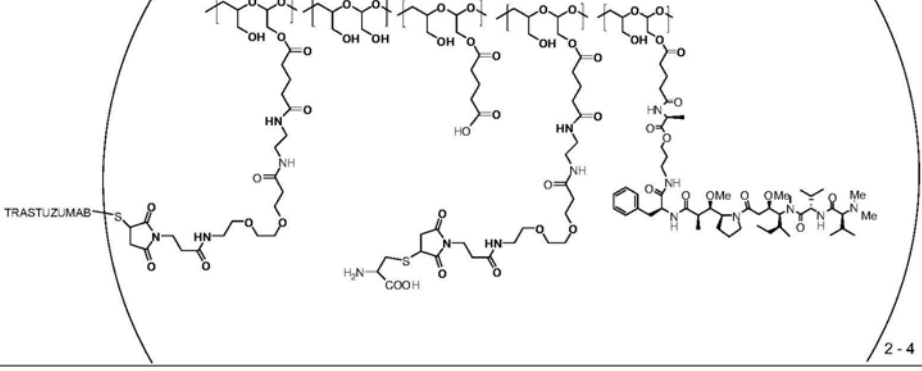
[0902]

Ref #	药物: PBRM 比例	结构
Ex 8	10:1-15:1	
Ex 9	13:1-18:1	
Ex 10	12:1-18:1	
Ex 13	18:1-23:1	

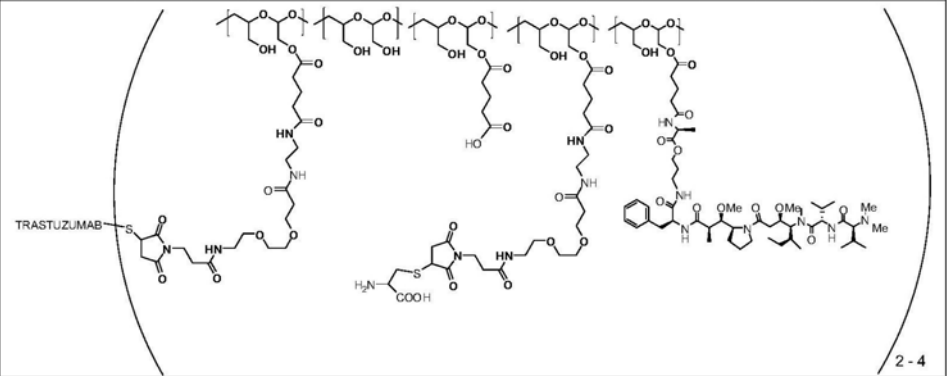
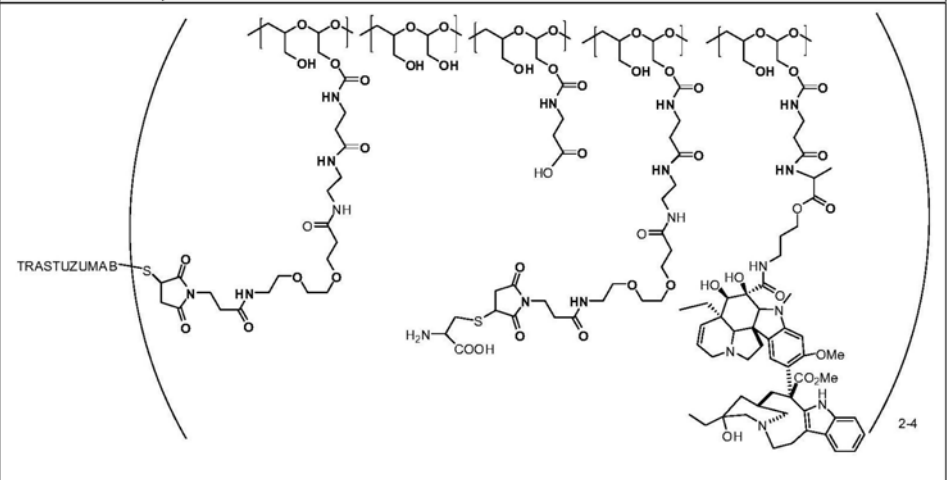
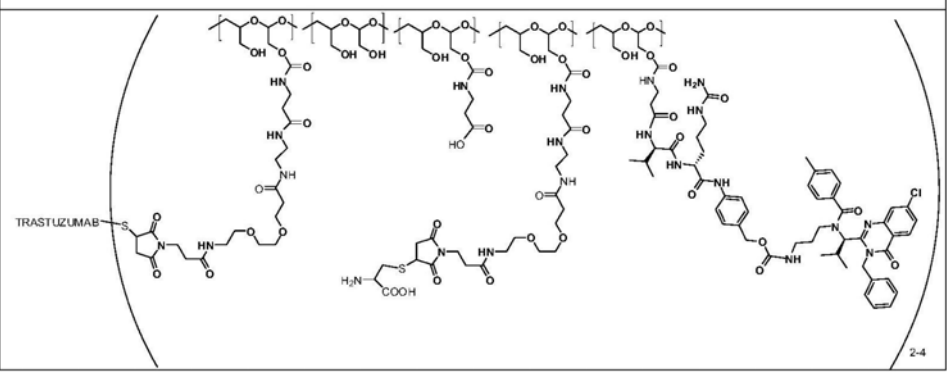
[0903]

Ref #	药物: PBRM 比例	结构
		
Ex 14	10:1-15:1	
Ex 15	11:1-16:1	

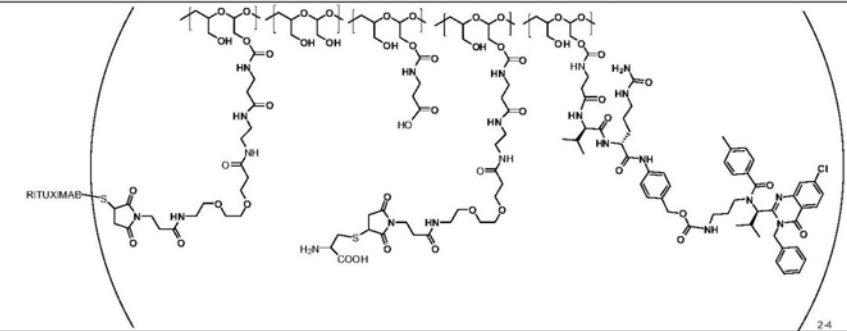
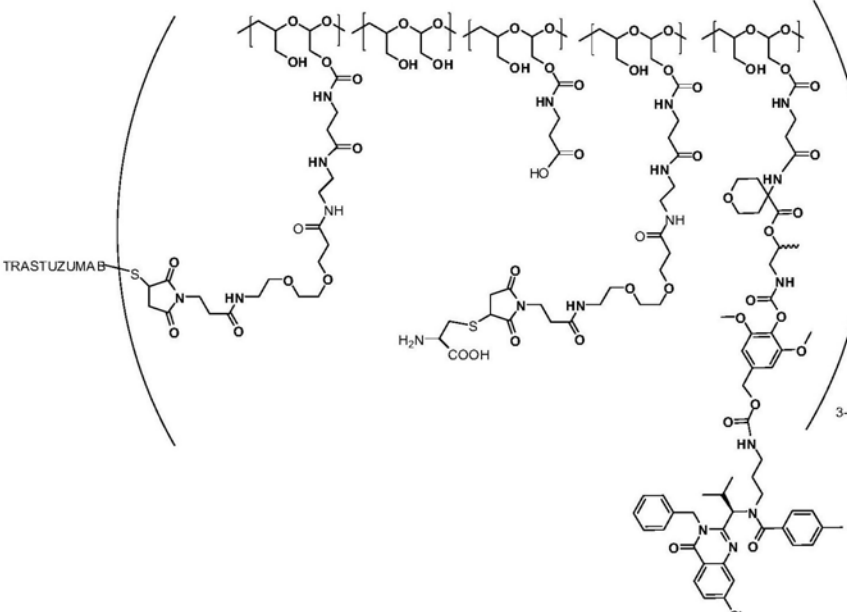
[0904]

Ref #	药物: PBRM 比例	结构
Ex 16	13:1-18:1	
Ex 17	5:1-10:1	
Ex 18 A	19:1-24:1	
Ex 18 B	20:1-25:1	

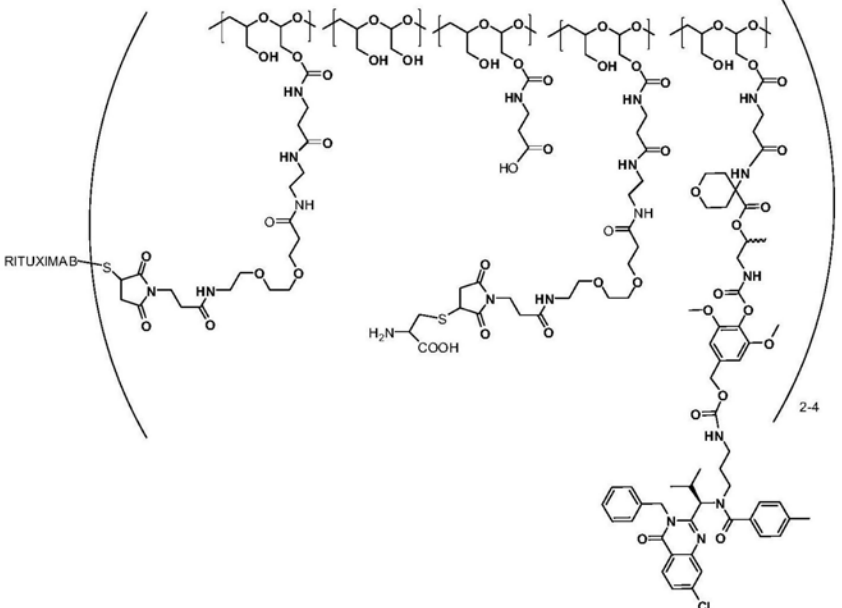
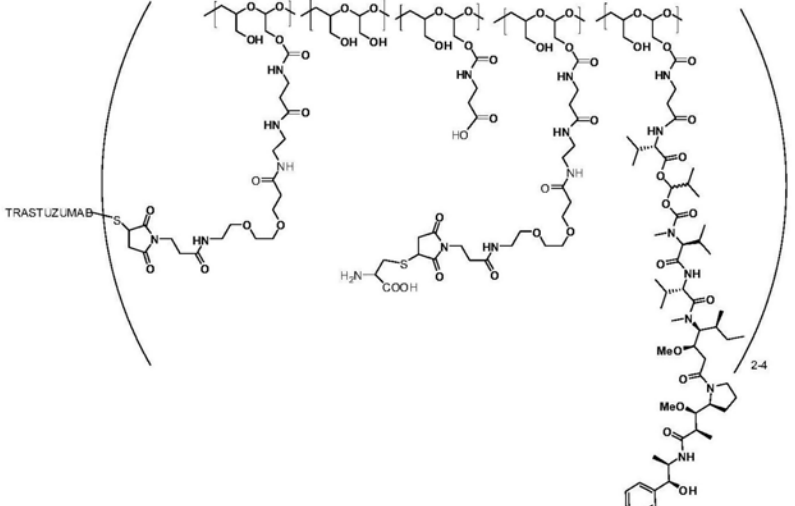
[0905]

Ref #	药物: PBRM 比例	结构
Ex 18 C	23:1-28:1	
Ex 20A	13:1-18:1	
Ex 20B	10:1-14:1	
Ex 20C	8.5:1-12:1	
Ex 22	7.5:1-10:1	

[0906]

Ref #	药物: PBRM 比例	结构
Ex 23	6.5:1-10: 1	
Ex 26	5:1-8:1	

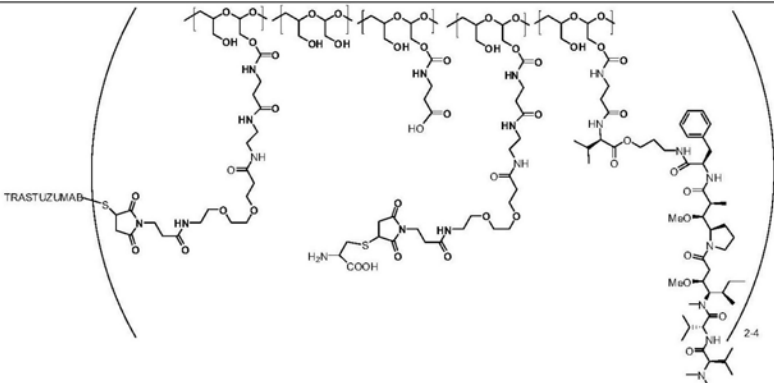
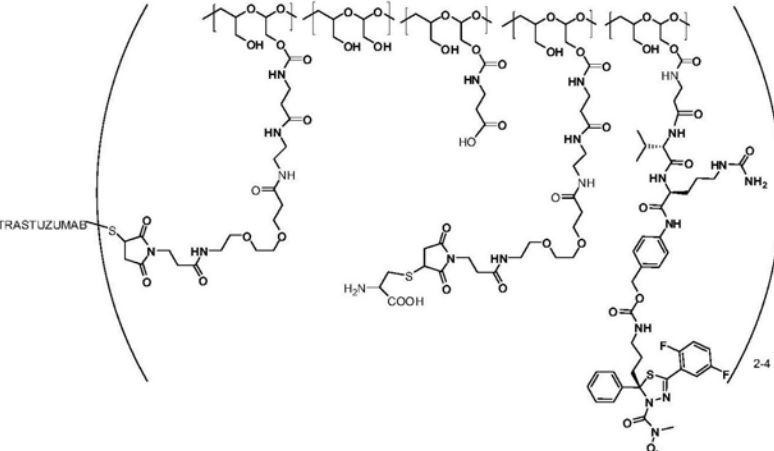
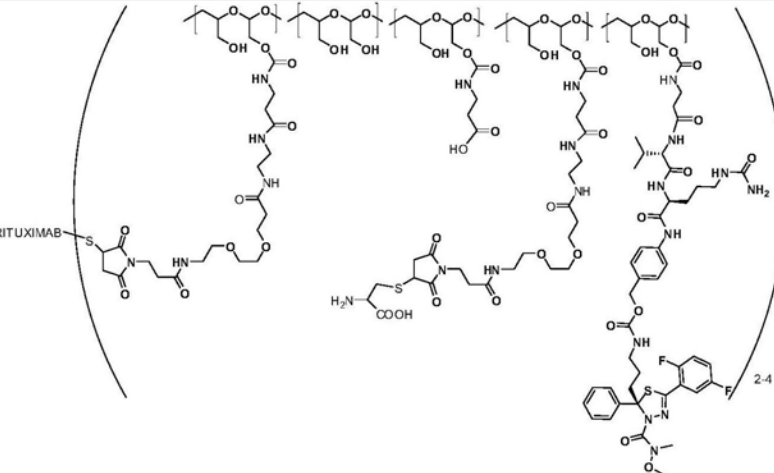
[0907]

Ref #	药物: PBRM 比例	结构
Ex 27	4.5:1-7:1	
Ex 30A	11:1-15:1	
Ex 30B	12:1-16.5:1	

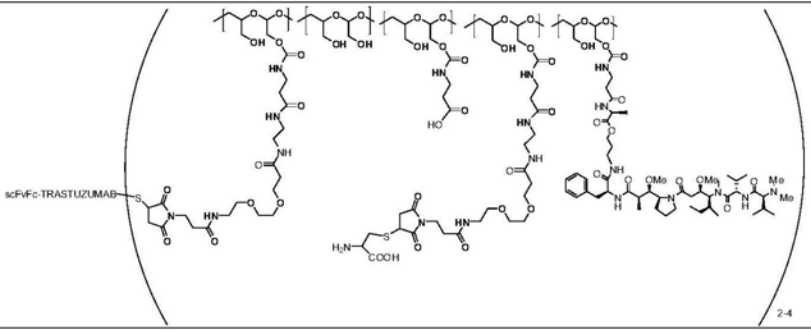
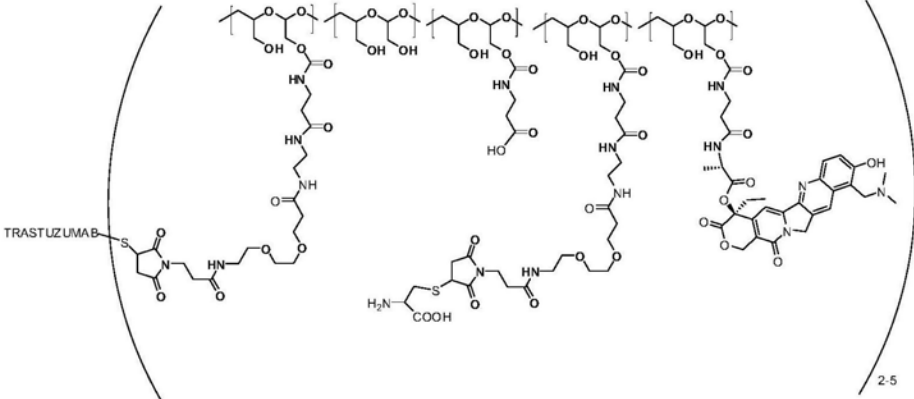
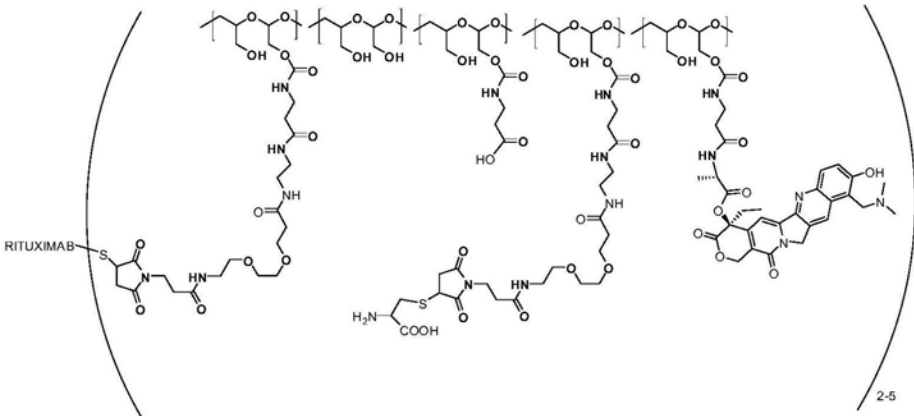
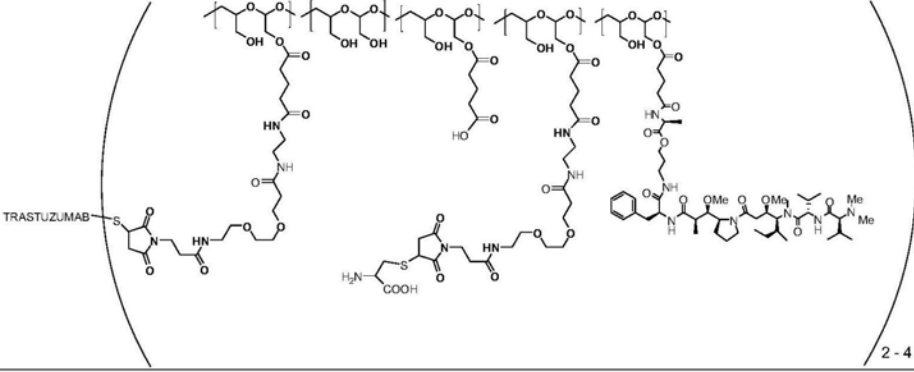
[0908]

Ref #	药物: PBRM 比例	结构
Ex 30C	9.5:1-13: 1	
Ex 33	4:1-6:1	
Ex 34	2.5:1 至 约 3.5:1	

[0909]

Ref #	药物: PBRM 比例	结构
Ex 36	14.5:1-20 :1	
Ex 38	4:1-6:1	
Ex 39	4:1-6:1	

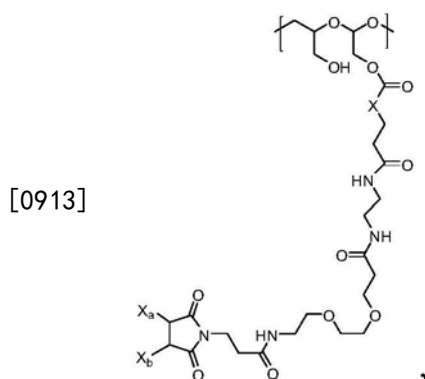
[0910]

Ref #	药物: PBRM 比例	结构
Ex 40	14:1-19:1	 2-4
Ex 42A	19:1-26:1	 2-5
Ex 42B	16:1-22:1	 2-5
Ex 43A	6:1-9:1	 2-4
Ex 43B	12:1-17:1	
Ex 43C	12:1-16:1	

[0911]

Ref #	药物: PBRM 比例	结构
Ex 44		
Ex 45		

[0912] 在其它实施例中,提供抗-5T4治疗药物和靶向共轭物。共轭物包含(a)配体(LG),其为靶向人癌胚蛋白5T4的免疫球蛋白或其功能片段,配体具有大于约40kD的分子量并结合于(b)的聚合物支架的 m_5 ,其中 m_5 是1-约10,和(b)包含聚(1-羟基甲基亚乙基羟基甲基-缩甲醛)(PHF)的聚合物支架,其具有范围从约2kDa至约40kDa的分子量,其中聚合物支架包含随机排列的如下定义的单体单元 m 、 m_1 、 m_2 、 m_{3a} 和 m_{3b} : (i) m_{3a} :

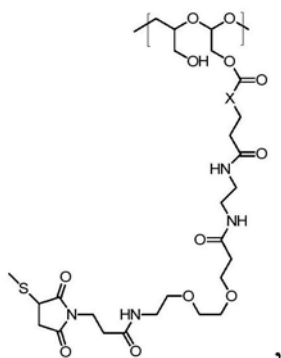


其中 m_{3a} 为不存在或1至约17个单体 m_{3a} 单元存在于聚合物支

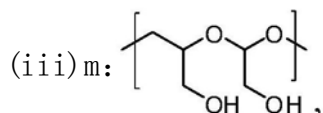
架中,和在每个单元中, X_a 和 X_b 独立地选自(A)一个是H,而另一个为马来酰亚胺基封闭部分,或(B) X_a 和 X_b ,与它们连接的碳原子一起,形成碳-碳双键;

[0914] (ii) m_{3b} ,其中硫化物键形成对LG的连接点,和

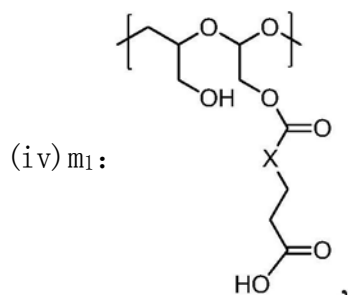
[0915]

其中1至约8个单体 m_{3b} 单元存在于聚合物支架中,其中 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和是1-18,和其中硫原子是LG的部分;

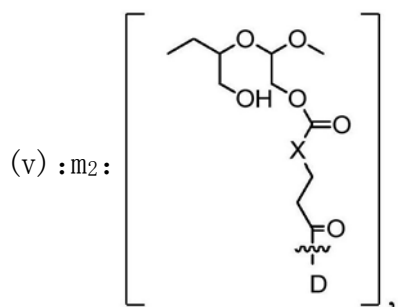
[0916]

(iii) m : 其中1至约300个单体 m 单元存在于聚合物支架中;

[0917]

(iv) m_1 : 其中1至约140个单体 m_1 单元存在于聚合物支架中;和

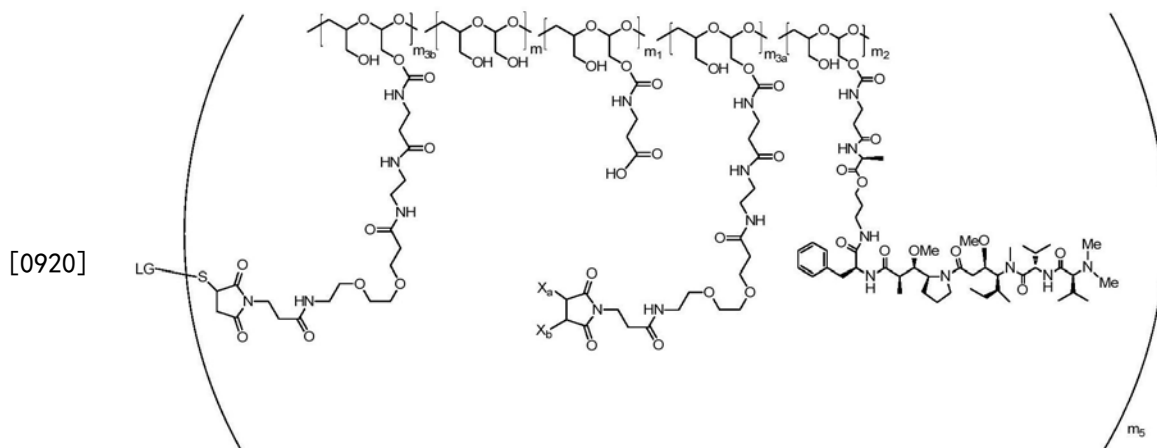
[0918]

(v) m_2 : 其中1至约40个单体 m_2 单元存在于聚合物支架中;其

中在单体单元 m 、 m_1 、 m_2 、 m_{3a} 和 m_{3b} 的每一个中, X 是 CH_2 、 O 或 NH 和 m 、 m_1 、 m_2 、 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和的范围是从约15至约300,和其中 D 的每次出现独立地为具有分子量 $\leq 5kDa$ 的治疗剂,且 D 和羰基

之间的 $-\xi-$ 表示 D 与羰基直接或间接连接。合适地,抗-5T4配体为如本文所定义的免疫球蛋白或其功能片段。例如,免疫球蛋白或其功能片段选自单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、免疫黏附素、F(Ab)2、微抗体、Fab'、单域抗体、纳米体、单链Fv、串联/双-scFv、F(ab)3、scFv-Fc(或scFvFc)、dsFv、双特异性抗体、三特异性抗体和四特异性抗体。

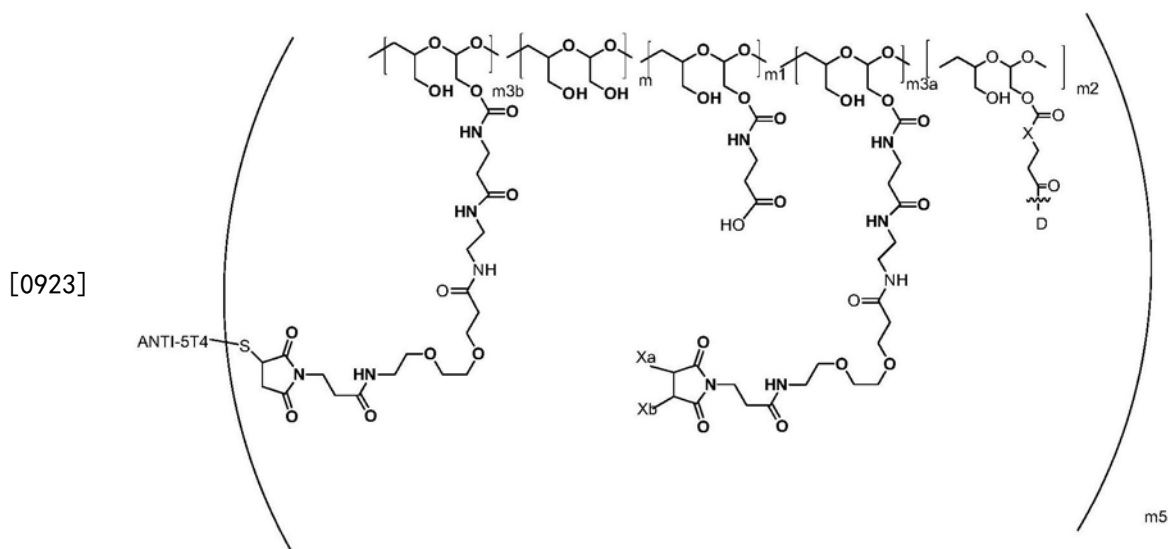
[0919] 在其它实例中,治疗药物和靶向共轭物以在式(E)中说明的结构为特征:



(E),

[0921] 其中:PHF具有范围从约5kDa至约10kDa的分子量; m 是1-75, m_1 是约5-约35, m_2 是约3-约10, m_{3a} 是0-约4, m_{3b} 是1-约5, m 、 m_1 、 m_2 、 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和是约40至约75,和 m_5 是2-约4。

[0922] 在进一步的实施方案中,提供用于抗-肿瘤疗法的治疗性抗-5T4药物靶向共轭物,其包含聚合物支架,所述支架包含具有分子量从约2kDa至约40kDa的PHF,其中共轭物具有以下结构:

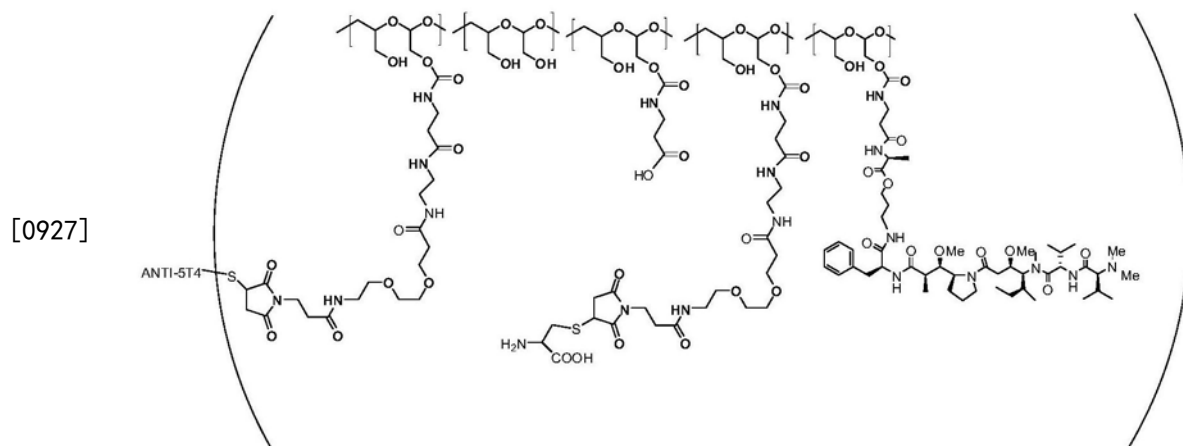


[0924] 其中 m_5 是1-10; m 为从1至约300的整数; m_1 为从1至约140的整数; m_2 为从1至约40的整数; m_{3a} 为从0至约17的整数; m_{3b} 为从1至约8的整数;其中 m_{3a} 和 m_{3b} 的总和为从1至约18的整数;和 m 、 m_1 、 m_2 和 m_3 的总和的范围是从约15至约300; X 是NH; X_a 或 X_b 之一是H,而另一个为马来酰亚胺基封闭部分;和其中D的每次出现独立地为具有分子量 ≤ 5 kDa的治疗剂,且D和羰基之间的 $\text{---}\zeta\text{---}$ 表示D与羰基直接或间接连接;其中抗-5T4为抗-5T4配体,其包含对人癌胚抗原5T4有选择性的免疫球蛋白或其功能片段。例如,抗-5T4的分子量是至少约40kDa。在一个实施方案中,D为经由羟基丙基酰胺-L-丙氨酸部分连接于 m_2 的羰基部分的奥瑞斯他汀或其类似物。在一个实施方案中,药物与抗-5T4的比例是约5:1至约30:1,或约12:1至约18:1。在另一个实施方案中,PHF药物共轭物与抗-5T4抗体的平均比例是约2:1至约4:1。

[0925] 这些共轭物可进一步由形成共轭物的各种单元的摩尔百分比或摩尔分数限定。例

如,包含连接于配体的二乙二醇马来酰亚胺(EG2-MI)部分的单体单元具有约2摩尔%至约5摩尔%的摩尔分数。在更进一步的实施例中,载药的单体单元具有约5摩尔%至约10摩尔%的摩尔分数。例如,药物与抗-5T4的比例是约5:1至约30:1,或约12:1至约18:1。在其它实例中,包含药物的PHF支架与抗-5T4抗体的平均比例是约2:1至约3:1或约3:1至约4:1。在一个实施方案中,共轭物是抗-5T4-(EG2-MI(3%)-(10kDa PHF-BA(30%)-(AF-HPA-Ala(8%))。这种共轭物可如实施例10,且更通常于方案5中所述制备。

[0926] 在更进一步的实施方案中,提供用于抗-肿瘤疗法的治疗药物和靶向共轭物,其包含抗-5T4和包含下面所示的可随机彼此连接的单元的PHF聚合物支架,



[0928] 其中:

[0929] 抗-5T4为包含SEQ ID NO:A的氨基序列的单链抗体构件;PHF具有范围从约2kDa至约40kDa的分子量;聚合物支架与抗-5T4抗体的平均比例为约2:1至约3:1或约3:1至约4:1;和AF-HPA与抗-5T4抗体的比例为约12:1至约18:1。

[0930] 这些共轭物可如本文所述制备并与合适的载体混合为适合于递送给受试者的组合物。这些组合物可含有这些抗-5T4药物靶向共轭物的共混物,即,单一组合物可含有不同的药物和/或不同的聚合物支架的抗-5T4药物靶向共轭物。

[0931] 合成方法

[0932] 根据本发明,任何可用的技术都可用于制备本发明的共轭物或包含其的组合物,以及用于制备其的中间体和组分(例如,载体和修饰剂)。例如,可以使用半合成和全合成方法。

[0933] 载体

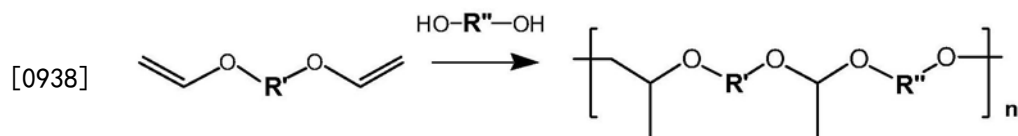
[0934] 用于制备适合于共轭至修饰剂的聚合物载体(例如,生物相容性的、生物可降解的聚合物载体)的方法是本领域已知的。例如,合成指南可见于美国专利号5,811,510;5,863,990;5,958,398;7,838,619;7,790,150;8,685,383;和8,815,226中,其每一篇的内容通过引用以其全文结合到本文中。熟练的技术人员将会知道如何调整这些方法来制备用于实施本发明的聚合物载体。

[0935] 在一个实施方案中,用于形成本发明的生物可降解的、生物相容性的羧基聚缩物共轭物的方法包括将合适的多糖与有效量的二醇-特异性氧化剂结合,以形成醛中间体的过程。然后,可将该醛中间物(其本身为羧基聚缩物)还原为对应的多醇,琥珀酰化,并与一个或多个适合的修饰剂偶合以形成生物可降解的、生物相容性的羧基聚缩物共轭物,其包

含含有琥珀酰胺的连键。

[0936] 在另一个优选的实施方案中,用于本发明的全合成的生物可降解的、生物相容性的羰基聚缩物可通过使适合的引发剂与适合的前体化合物反应而制备。

[0937] 例如,全合成的羰基聚缩物可通过乙烯基醚与保护的取代二醇的缩合而制备。可以使用其它的方法,如开环聚合法,其中方法的效力可以取决于取代的程度以及保护基团的庞大度(bulkiness)。



[0939] 本领域技术人员将会了解,可以使溶剂系统、催化剂和其它因素最优化,以便得到高分子量产物。

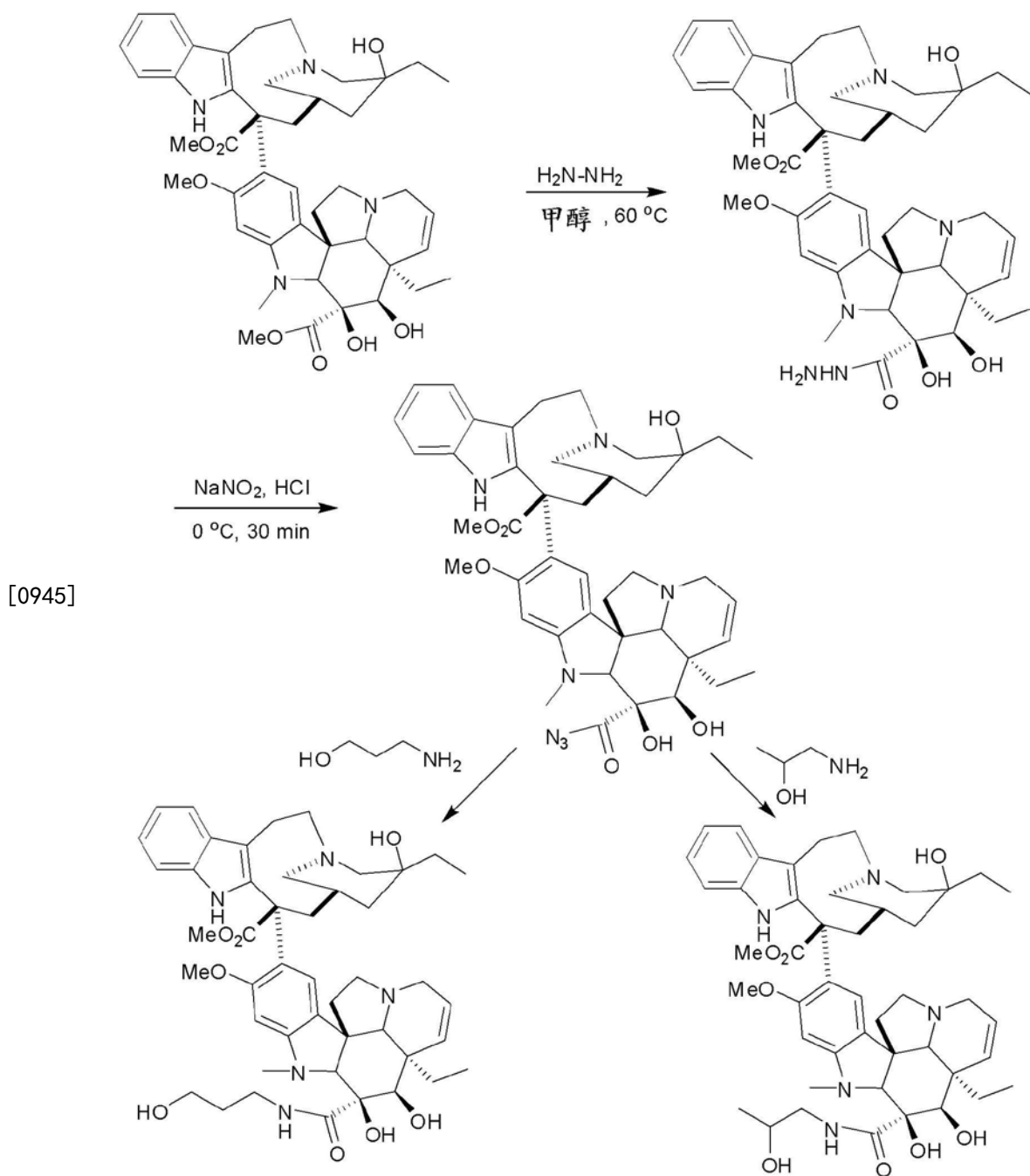
[0940] 在某些实施方案中,载体是PHF。

[0941] 在实施方案中,聚合物载体是具有多分散指数(PDI)少于1.5,例如,<1.2的PHF。

[0942] 药物和药物衍生物

[0943] 在某些实施方案中,药物可在共轭至聚合物载体之前进行修饰。方案1和2是用于修饰长春花生物碱的示例性方法。方案3显示了用于修饰非-天然喜树碱衍生物的方法。方案4显示了用于修饰奥瑞斯他汀F的方法。更多的修饰方法描述于US 2010/0305149中,其通过引用结合到本文中。

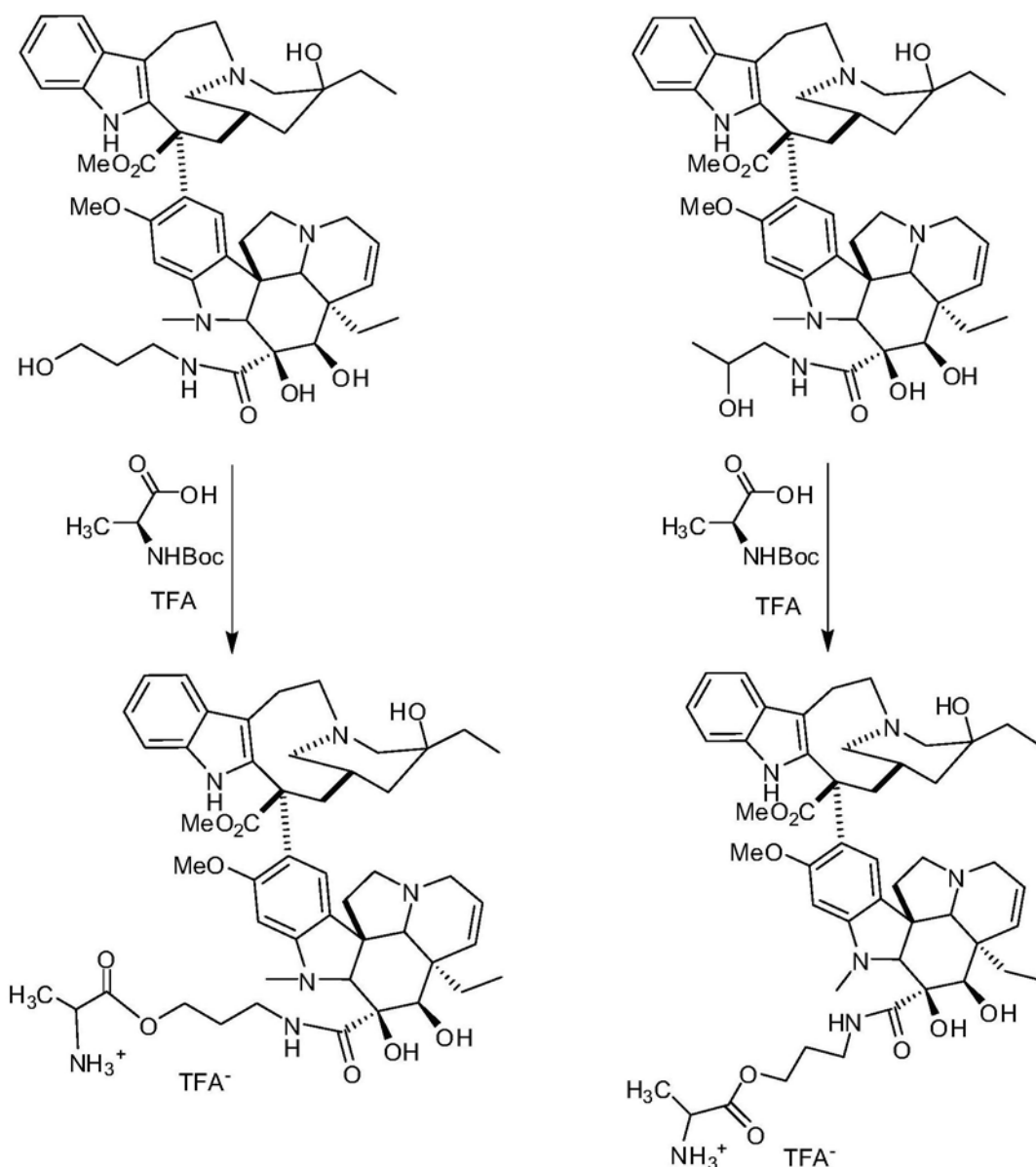
[0944] 方案1



[0946] 长春花生物碱的C₂₃酯与肼反应,接着用NaNO₂处理,生成活性的叠氮酯。叠氮酯与氨基化合物如丙醇胺或1-氨基丙-2-醇反应,生成带有官能化羟基的长春花生物碱衍生物,其能够采用含氨基的化合物,例如,丙氨酸或甲基丙氨酸衍生物进一步衍生化,以便与聚合物共轭(见方案1)。

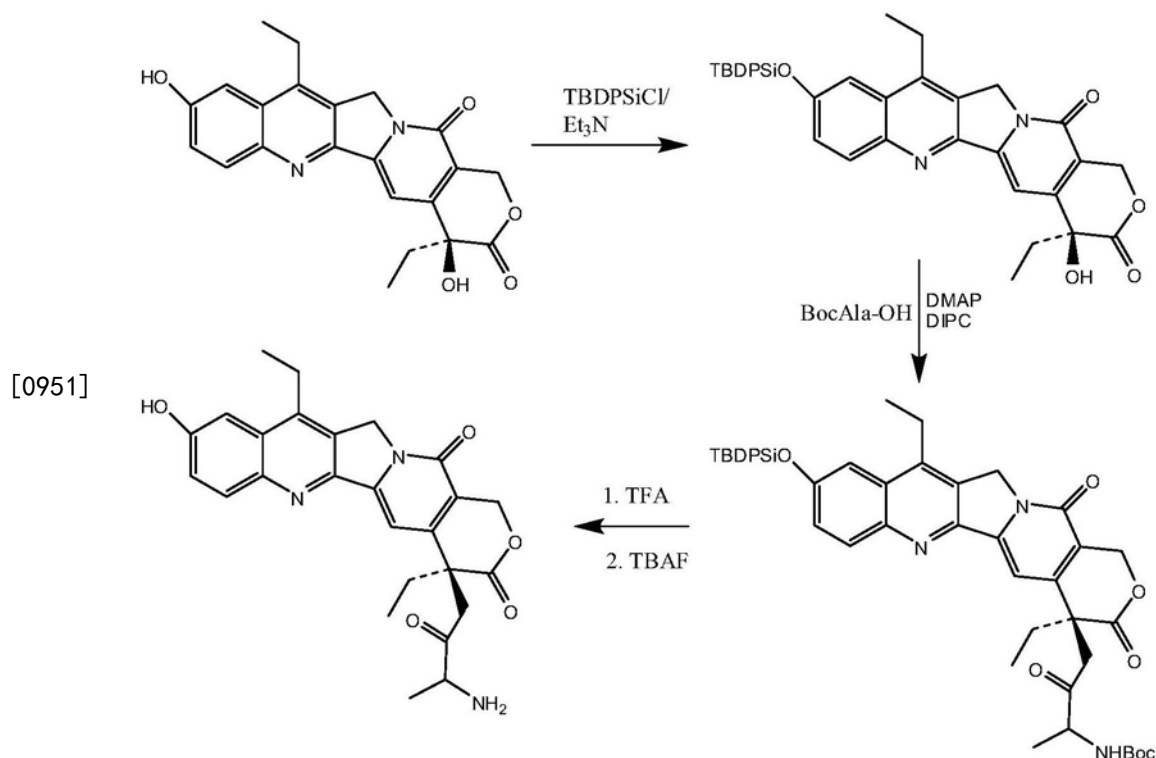
[0947] 方案2

[0948]



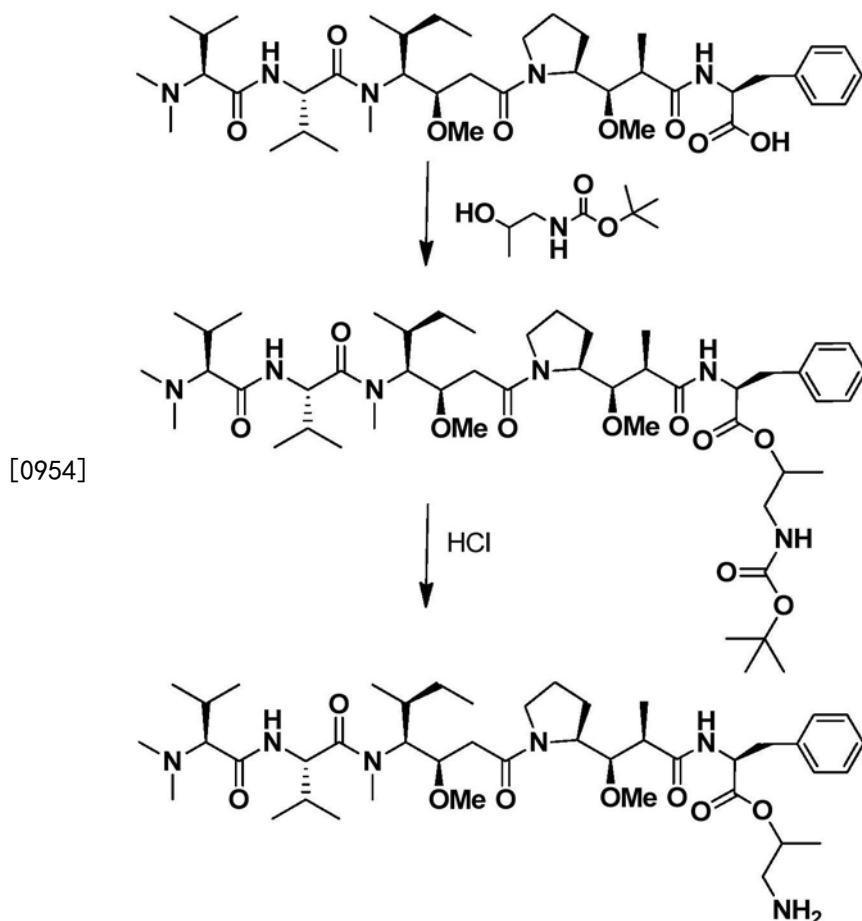
[0949] 采用含有受保护的氨基的系链 (tether) 例如叔丁氧基酯化的氨基酸处理长春花生物碱的羟基衍生物, 接着进行酯的TFA水解, 得到长春花生物碱的三氟甲磺酸酯 (方案2)。将该长春花生物碱共轭至官能化聚合物, 生成药物-聚合物共轭物, 其能够进一步与PBRM或其衍生物, 以生成蛋白质-聚合物-药物共轭物。

[0950] 方案3



[0952] 非-天然喜树碱衍生物(例如, SN38)的10-羟基通过该衍生物与叔丁基二苯基甲硅烷基氯(TBDPSiCl)在三乙胺存在下反应而被选择性地保护。采用Sapra, P. et al., Clin. Cancer Res., 14:1888-1896 (2008)中描述的程序, 20-羟基能够与叔丁基羰基-丙氨酸反应, 形成丙氨酸衍生物。或者, 可使用其它氨基酸, 例如, 甘氨酸。通过采用三氟乙酸的处理除去Boc保护基, 接着采用四丁基氟化铵除去TBDPS保护基, 以便使伯胺去遮蔽(见方案3)。所得到的氨基衍生化的SN38化合物可与官能化的聚合物共轭以形成药物-聚合物共轭物。

[0953] 方案4



[0955] 用含有受保护氨基的系链如叔丁氧基酯化的2-羟基丙基丙胺处理奥瑞斯他汀F，接着对该酯进行HCl水解，得到奥瑞斯他汀F的2-羟基丙基氨基衍生物（见方案4）。将奥瑞斯他汀F衍生物共轭至官能化的聚合物，生成药物-聚合物共轭物，其能够进一步与PBRM或其衍生物共轭，以生成蛋白质-聚合物-药物共轭物。

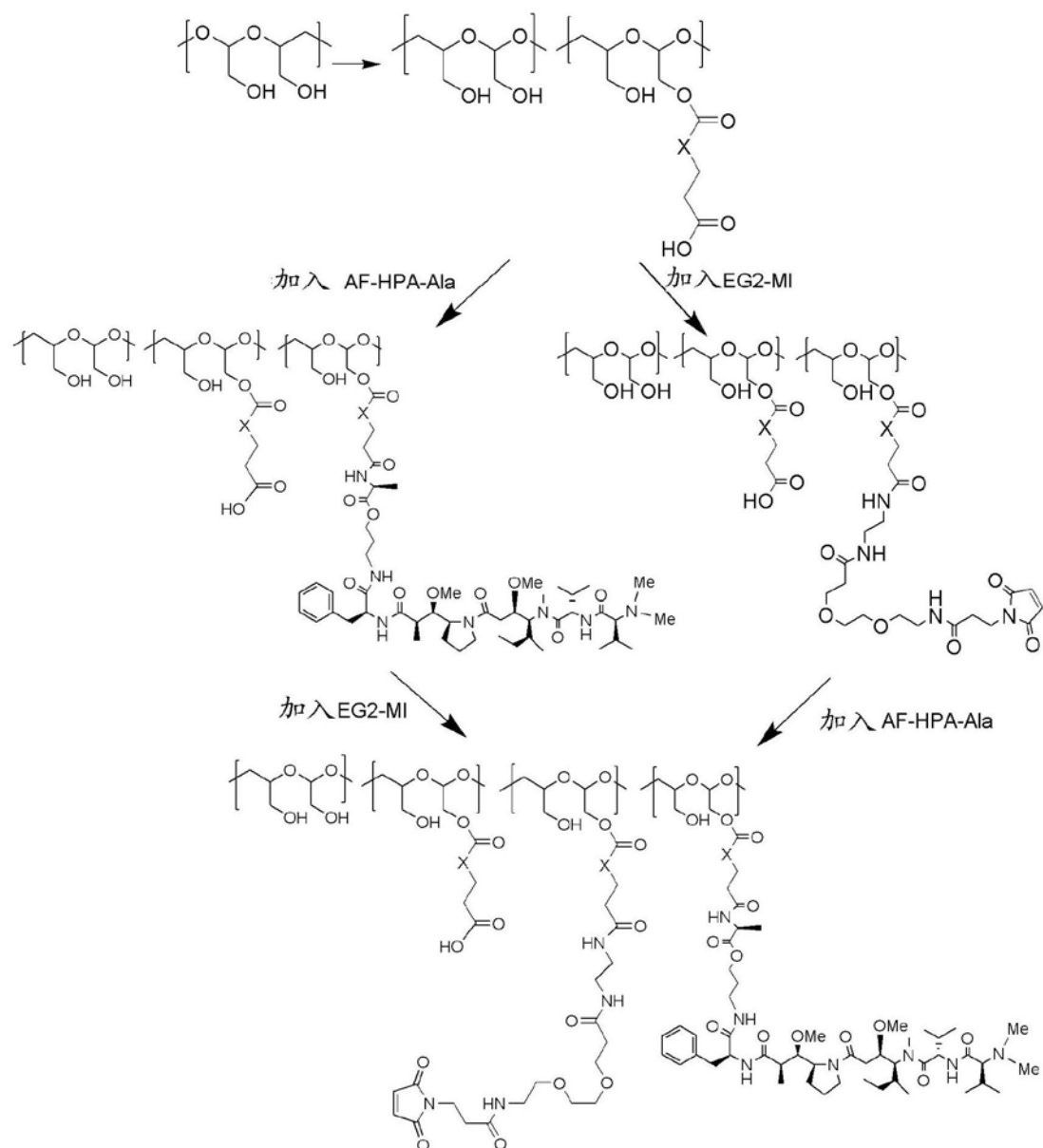
[0956] 共轭物或聚合物支架

[0957] 以下方案5显示了制备本发明的聚合物药物支架的合成方案。在一个实施方案中，共轭物以数个步骤形成：(1) 聚合物PHF经修饰以含有COOH部分（如， $-C(O)-X-(CH_2)_2-COOH$ ）；(2) 然后进一步修饰聚合物，以使它含有可与PBRM的官能团反应的马来酰亚胺基部分（如，EG2-MI）；(3) 使修饰的聚合物（含有两个不同的官能团）与药物或其衍生物的官能团（如，AF-HPA-Ala）反应，以形成聚合物-药物共轭物；(4) 还原PBRM的二硫化物键；(5) 然后使还原的PBRM与聚合物-药物共轭物反应，以形成蛋白质-聚合物-药物共轭物；和(6) 任选地使剩余的马来酰亚胺基部分与马来酰亚胺基封闭化合物（如，半胱氨酸）反应。

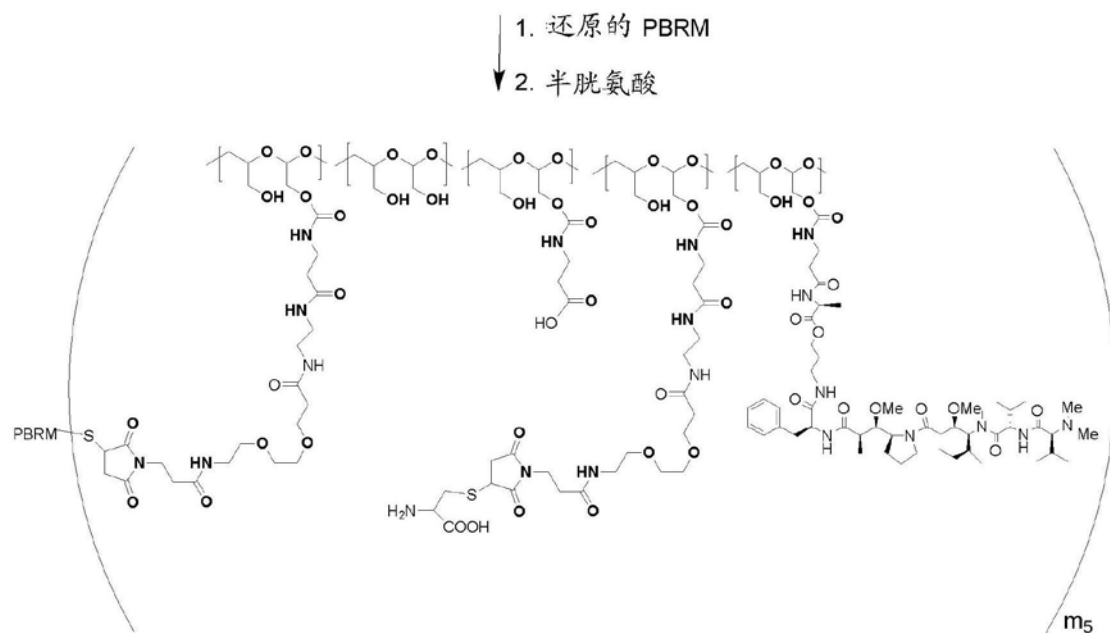
[0958] 在另一个实施方案中，步骤(2)和(3)的顺序可如在以下方案5的右侧路径中所述颠倒进行。

[0959] 方案5

[0960]

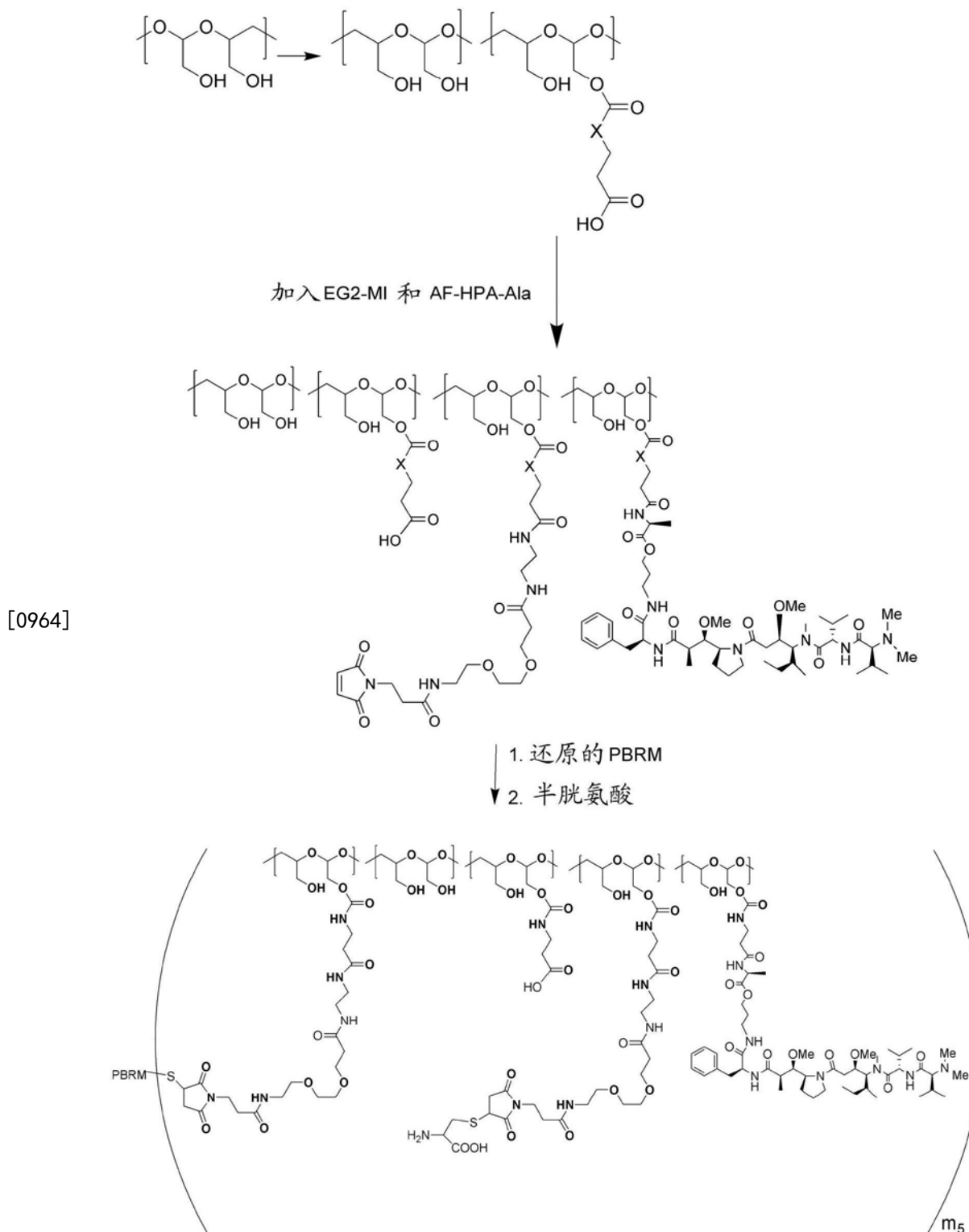


[0961]



[0962] 在还有的另一个示例性实施方案中,以上的步骤(2)和(3)可如在以下方案6中所述同时进行。

[0963] 方案6



[0965] 药物组合物

[0966] 本发明还包括药物组合物,其包含在可接受的载体如稳定剂、缓冲剂等中的一个或多个如本文所公开的蛋白质-聚合物-药物共轭物。通过标准方式,在含有或不含有用于形成药物组合物的稳定剂、缓冲剂等,的情况下,可给予共轭物并且引入受试者体内。给药可以是局部给药(包括眼部给药以及给予至黏膜的包括阴道递送和直肠递送);肺部给药例如,通过粉剂或气雾剂的吸入或吹入,包括借助于喷雾器;气管内给药;鼻内给药;表皮和透皮

给药;口服给药或肠胃外给药包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌内注射或输液;或者颅内给药,例如,鞘内给药或脑室内给药。可配制该共轭物并用于注射给予无菌溶液剂/和/或混悬剂;用于在注射/输液之前重构的冻干粉剂;局部组合物;用于口服给药的片剂、胶囊剂或酏剂;或者用于直肠给药的栓剂;以及本领域中已知的其它组合物。

[0967] 药物组合物或制剂是指以适合于给予(例如,全身性给予)至细胞或受试者(包括例如人)的形式存在的组合物或制剂。合适的形式(部分)取决于用途或进入的途径,例如口服、吸入、透皮或通过注射/输液。这样的形式不应该防止组合物或制剂到达靶标细胞(即,药物合意递送至的细胞)。例如,注射至血流中的药物组合物应该是可溶性的。其它的因素是本领域中已知的并且包括下列考虑如毒性和防止组合物或制剂发挥其功效的形式。

[0968] 所谓“系统给予”是指修饰的聚合物在血流中的体内全身性吸收或累积,接着分布至整个身体。导致全身性吸收的给药途径包括,但不限于静脉内给药、皮下给药、腹膜内给药、吸入给药、口服给药、肺内给药和肌内给药。这些给药途径中的每一个都将修饰的聚合物暴露于可接近的病变组织。活性剂进入循环的速率已经被证实是分子量或尺寸的函数。通过PBRMs的特异性,本发明的共轭物的使用能够将药物集中递送至某些细胞,如癌细胞。

[0969] “药学上可接受的制剂”是指可使共轭物有效分布于最适合于其合意活性的物理部位的组合物或制剂。在一个实施方案中,有效的递送在通过网状内皮系统的清除或能够导致效力降低或毒性的脱靶结合的产生之前发生。适合于与共轭物一起调配的试剂的非限制性实例包括:P-糖蛋白质抑制剂(如Pluronic P85),其能够增强活性剂进入CNS;生物可降解的聚合物,例如在脑内移植之后用于持续释放递送的聚(DL-丙交酯-乙交酯)微球;以及负载纳米粒子,如由聚氰基丙烯酸丁酯制成的负载纳米粒子,其能够递送活性剂穿越血脑屏障并且能够改变神经元摄取机制。

[0970] 本文还包括为了储存或给药而制备的药物组合物,其包含在药学上可接受的载体或稀释剂中的药学上有效量的合意的共轭物。用于治疗用途的可接受的载体、稀释剂和/或赋形剂是药学领域中熟知的。例如,能够提供的有缓冲剂、防腐剂、增积剂、分散剂、稳定剂、染料。此外,能够使用抗氧化剂和助悬剂。适合的载体、稀释剂和/或赋形剂的实例包括,但不限于:(1) Dulbecco's磷酸盐缓冲盐水,pH约6.5,其含有约1mg/ml-25mg/m的人血清白蛋白,(2) 0.9%的盐水(0.9%w/v NaCl),和(3) 5% (w/v) 的右旋糖。

[0971] 如本文所用的,术语“药物有效量”指治疗、缓解或预防已鉴定的疾病或症状,或者呈现出可检测到的治疗或抑制效果的药剂的量。该效果能够通过本领域中已知的任何分析方法检测。对于受试者的精确的有效量将取决于受试者的体重、尺寸和健康状况;病症的性质和程度;以及选择用来给药的治疗剂或治疗剂的组合。对于给定状况的药物有效量能够通过临床医生的技术和判断范围内的例行实验来测定。在优选的方面中,该疾病或病症可通过基因静默来治疗。

[0972] 对于任何共轭物而言,药物有效量最初能够或者在细胞培养分析(例如,肿瘤细胞),或者在动物模型(通常为大鼠、小鼠、兔、狗或猪)中评价。动物模型也可以用于确定适当的浓度范围和给药途径。然后,这样的信息能够用于确定人类给药的有用剂量和途径。通过细胞培养或实验动物中的标准药学流程可以测定治疗/预防效力和毒性,例如,ED₅₀(在50%的群体内治疗有效的剂量)和LD₅₀(对于50%的群体致死剂量)。毒性和治疗效果之间的剂量比例是治疗指数,并且其能够表示为LD₅₀/ED₅₀的比率。优选呈现出较大的治疗指数的

药物组合物。可在此范围内变化的剂量取决于所采用的剂型、患者的敏感度和给予途径。

[0973] 例如,可使用细胞滴定量Glo,对药物或其衍生物、药物-聚合物共轭物或PBRM-聚合物-药物共轭物在几种细胞系中抑制肿瘤生长的能力进行评价。剂量反应曲线可使用SoftMax Pro软件生成,而IC₅₀值可由四参数曲线拟合来确定。使用的细胞系可包括为PBRM的靶标的那些细胞系和包含在试验共轭物中的不为PBRM的靶标的对照细胞系。

[0974] 在一个实施方案中,共轭物被调配用于通过注射的胃肠外给予,包括使用常规的导管插入技术或输液。注射用制剂可以以单位剂量形式存在,例如,与添加的防腐剂一起存在于安瓿或多剂量容器中。共轭物可以在无菌介质中被肠胃外给药。取决于媒介和所使用的浓度,共轭物能够悬浮于或溶解于媒介中。有利地,佐剂如局部麻醉剂、防腐剂,和缓冲剂能够溶解于媒介中。如本文所使用的术语“胃肠外”包括经皮、皮下、血管内(例如,静脉内)、肌肉或气管内注射或输液技术等。此外,本发明提供了一种药物制剂,其包含共轭物和药学上可接受的载体。能够存在一个或多个共轭物与一个或多个非-毒性药学上可接受的载体和/或稀释剂和/或佐剂,以及(如果需要)其它活性成分组合。

[0975] 无菌的注射用制剂也可以是在无毒性的、肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌的注射用溶液剂或混悬剂,例如在1,3-丁二醇中的溶液剂。在可接受的媒介和溶剂中,能够采用的有水、林格氏溶液和等渗的氯化钠溶液。此外,无菌的、非挥发性油类通常用作溶剂或悬浮介质。出于这种目的,可采用无刺激性的非挥发性油类,其包含合成的单甘油酯类或双甘油酯类。此外,脂肪酸类如油酸可用于制备注射用制剂。

[0976] 如本文所描述的共轭物和组合物可以以适当的形式给药,优选肠胃外给药,更优选静脉内给药。就肠胃外给药而言,该共轭物或组合物可以是水性或非水性无菌溶液剂、混悬剂或乳剂。丙二醇、植物油类和注射用有机酯,例如油酸乙酯,可用作溶剂或媒介。该组合物也可以含有佐剂、乳化剂或分散剂。

[0977] 等级在每千克体重约0.001mg和约140mg/天之间的剂量水平可用于治疗如上指出的病症(在每个受试者约0.05mg和约7g/天之间)。在一些实施方案中,给药至患者的剂量在约0.001mg/kg至约100mg/kg受试者体重之间。在一些实施方案中,给药至患者的剂量在约0.01mg/kg至约15mg/kg受试者体重之间。在一些实施方案中,给药至患者的剂量在约0.1mg/kg和约15mg/kg受试者体重之间。在一些实施方案中,给药至患者的剂量在约0.1mg/kg和约20mg/kg受试者体重之间。在一些实施方案中,给予的剂量在约0.1mg/kg至约5mg/kg或约0.1mg/kg至约10mg/kg受试者体重之间。在一些实施方案中,给予的剂量在约1mg/kg至约15mg/kg受试者体重之间。在一些实施方案中,给予的剂量在约1mg/kg至约10mg/kg受试者体重之间。可与载体物质组合以生成单剂量形式的共轭物的量根据受治疗的主体和特定的给药模式而变化。剂量单位剂型通常可含有约0.001mg和约100mg之间;约0.01mg和约75mg之间;或约0.01mg和约50mg之间;或约0.01mg和约25mg之间的共轭物。

[0978] 对于静脉内给予,剂量水平可包括在上文段落中描述的范围,或从约0.01-约200mg/kg动物体重的共轭物。一方面,该组合物可包含从约1至约100mg动物体重的共轭物。另一方面,所给药的化合物的量在从约0.1至约25mg/kg体重的范围内。

[0979] 在一些实施方案中,可被给予的共轭物如下所述。共轭物能够每天提供,持续约5天,或者作为静脉推注每天提供,持续约5天,或者作为连续输液提供,持续约5天。

[0980] 或者,共轭物可以每周给药一次,持续6周或更长时间。作为另一项替代方案,共轭

物可以每两周或三周给药一次。给定的推注剂量是约50-约400ml的生理盐水,其中可添加约5至约10ml的人血清白蛋白。在每24小时期间内,给定的连续输液是约250至约500ml的生理盐水,其中可添加约25至约50ml的人血清白蛋白。

[0981] 在一些实施方案中,在治疗后约一周至约四周,患者可接受第二次疗程。如果临床状况允许,有关给药途径、赋形剂、稀释剂、剂量和时间的特定临床计划可由熟练的技术人员来确定。

[0982] 在其它实施方案中,治疗有效量可根据另一个常规进度表,即,每天、每周、每月,或每年或根据不规则的进度表而不同地给予数天、数周、数月等提供。或者,待给药的治疗有效量可以是变化的。在一个实施方案中,对于首次剂量而言,治疗有效量高于一个或多个后续剂量的治疗有效量。在另一个实施方案中,对于首次剂量而言,治疗有效量低于一个或多个后续剂量的治疗有效量。等效剂量可在不同的时间段给予包括,但不限于,约每2小时、约每6小时、约每8小时、约每12小时、约每24小时、约每36小时、约每48小时、约每72小时、约每周、约每2周、约每3周、约每月,和约每2月。与一个完整的疗程相对应剂量的给予数量和频率将根据有关监管机构的建议和卫生保健专业人员的判断来确定。本文描述的治疗有效量指在一个给定时间段给予的总量;即如果给予超过一个本文描述的不同的共轭物,治疗有效量对应于给予的总量。要理解的是,低于特定受试者的特定剂量取决于多种因素,包括具体共轭物的活性、年龄、体重、总体健康状况、性别、饮食、给药次数、给药途径、排泄速率、与其它活性剂的组合和进行治疗的特殊疾病的严重性。

[0983] 为给予非-人动物,共轭物也可以添加至动物的饲料或饮水中。有利的是,将动物饲料和饮用水调配,以便动物可随着其饮食摄取治疗适当量的共轭物。将共轭物呈现为预混物的形式,用于添加至饲料或饮水中也可能是有利的。

[0984] 共轭物也可以与其它治疗化合物组合给药至受试者,以增加整体的治疗效果。使用多个化合物来治疗病症能够增加有利的效果,同时降低副作用的出现。在一些些实施方案中,共轭物可与化学治疗剂组合使用,如公开于美国专利号7,303,749中的化学治疗剂。在其它实施方案中,化学治疗剂包括,但不限于来曲唑、奥沙利铂、多西他赛、5-FU、拉帕替尼、卡培他滨、亚叶酸钙、厄洛替尼、培妥珠单抗、贝伐珠单抗,和吉西他滨。本发明也提供药物试剂盒,其包含一个或多个容器,其填充有一个或多个本发明的共轭物和/或组合物,包括一个或多个化学治疗剂。这样的试剂盒也可以包括,例如,其它化合物和/或组合物,用于给予该化合物和/或组合物的装置和以管理药品或生物制品的生产、使用和销售政府机关所规定的形式书写的说明书。本文描述的组合物可被包装为单次剂量或用于连续的或周期性的间断给药。对于连续给药,药物包或药剂盒可包含在每个剂量单位(如,上述或在药物递送中可利用的溶液或其它单位)中的共轭物,和任选的对每日、每周,或每月给予剂量,对预定的或处方规定的时间长度的用药说明书。如果需要改变组合物、组合物的各组分的浓度,或组合物内共轭物或各药物随时间推移的相对比例,药物包或药剂盒可含有提供所需可变性的一系列剂量单位。

[0985] 本领域已知用于分发周期性口服使用的药剂的许多药物包或药剂盒。在一个实施方案中,药物包装具有对每个时期的指示。在另一个实施方案中,包装为标记的泡罩包装、拨号分药器包装,或瓶装。药剂盒的包装装置本身可传动给予,例如注射器、移液管、滴眼器,或其它这样的装置,制剂从这些装置可给予身体的受影响区域,注射到受试者体内,或

甚至适用于药剂盒的其它组分和与药剂盒的其它组分混合。

[0986] 使用方法

[0987] 治疗方法

[0988] 在本发明的某些优选实施方案中,本发明的蛋白质-聚合物-药物共轭物被用于治疗动物(优选哺乳动物,最优选人类并且包括男性、女性、婴儿、儿童和成人)。在一个实施方案中,本发明的共轭物可用于治疗动物的方法,其包括将本发明的生物可降解的、生物相容性的共轭物给予动物。例如,根据本发明的共轭物能够以可溶性的线性聚合物、共聚物、共轭物、胶体、颗粒、凝胶、固体物、纤维、薄膜等形式进行给药。本发明的生物可降解的、生物相容性的共轭物能够在药物控释系统、用于低侵入性外科手术的制剂等中用作药物载体和药物载体组分。药物制剂可以是可注射的、可植入用的等。

[0989] 在又一方面,本发明提供一种在有需要的受试者中治疗疾病或病症的方法,其包括给予受试者有效量的至少一个本发明的共轭物;其中所述共轭物在生物降解时释放一个或多个治疗剂。

[0990] 在另一个实施方案中,共轭物能够体外、体内和/或离体给予,以治疗患者和/或调节包括,例如,癌症的选定细胞群体的生长。在一些实施方案中,可用共轭物治疗的特殊种类的癌包括,但不限于:(1)实体瘤,包括但不限于纤维肉瘤、黏液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮细胞肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮细胞肉瘤、滑液膜瘤、间皮瘤、Ewing's肉瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、结肠直肠癌、肾癌、胰癌、骨癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、食道癌、胃癌、口腔癌、鼻咽癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳突癌、乳突状腺癌、囊腺癌、髓质癌、支气管癌、肾细胞癌、肝胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、Wilms'肿瘤、子宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、小细胞肺癌、非-小细胞肺癌、膀胱癌、肺癌、上皮癌、神经胶质瘤、神经胶质母细胞瘤、多形性星状细胞瘤、神经管胚细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、寡树突神经胶细胞瘤、脑脊髓膜瘤、皮肤癌、黑色素瘤、神经胚细胞瘤和视网膜母细胞瘤;(2)血源性癌,包括但不限于急性淋巴性白血病"ALL"、急性淋巴性B-细胞白血病、急性淋巴性T-细胞白血病、急性骨髓胚细胞性白血病"AML"、急性前骨髓细胞性白血病"APL"、急性单核球胚细胞性白血病、急性红血球性白血病、急性巨核胚细胞性白血病、急性骨髓单核细胞性白血病、急性非淋巴性白血病、急性未分化性白血病、慢性骨髓性白血病"CML"、慢性淋巴性白血病"CLL"、毛细胞白血病、多发性骨髓瘤、急性和慢性白血病,例如,淋巴性骨髓性白血病和淋巴性骨髓细胞性白血病;和(3)淋巴瘤如何杰金氏病、非何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)、重链病和真性红血球增多症。

[0991] 在另一个实施方案中,共轭物能够体外、体内和/或离体给予,以治疗患有以下癌症的患者和/或调节患有以下癌症的患者的选定细胞群体的生长:肛门癌、形细胞瘤、白血病、淋巴瘤、头部和颈部癌、肝癌、睾丸癌、子宫颈癌、肉瘤、血管瘤、食道癌、眼癌、咽癌、口部癌、间皮瘤、皮肤癌、骨髓瘤、口腔癌、直肠癌、喉癌、膀胱癌、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌、胰腺癌、肾癌和胃癌。

[0992] 在另一个实施方案中,癌症选自乳腺癌、胃癌、非-小细胞肺癌(NSCLC)和卵巢癌。

[0993] 在另一个实施方案中,共轭物能够体外、体内和/或离体给予,以治疗、预防、减少某些病变(例如,癌症)的进展的风险和/或延迟病变(例如,癌症)的发生。例如,本发明的共

轭物可用于治疗、预防、延缓选自以下癌症的进展或以其它方式改善其症状：肛门癌、星形细胞瘤、白血病、淋巴瘤、头部和颈部癌、肝癌、睾丸癌、子宫颈癌、肉瘤、血管瘤、食道癌、眼癌、咽癌、口部癌、间皮瘤、皮肤癌、骨髓瘤、口腔癌、直肠癌、喉癌、膀胱癌、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、非-小细胞肺癌 (NSCLC)、结肠癌、胰腺癌、肾癌和胃癌。

[0994] 在另一个实施方案中，共轭物可体外、体内和/或离体给药，以治疗自身免疫性疾病，如全身性狼疮、风湿性关节炎、牛皮癣和多发性硬化；移植物排斥反应，如肾移植排斥、肝移植排斥、肺移植排斥、心移植排斥和骨髓移植排斥；移植物对抗宿主疾病；病毒感染，如CMV感染，HIV感染，和AIDS；和寄生虫感染，如鞭毛虫症、变形虫症、血吸虫症等。

[0995] 在某些实施方案中，共轭物也可用于制备可用来治疗或缓和病症，例如以细胞异常生长为特征的病症（如，癌症）的严重性的药物。

[0996] 在某些实施方案中，治疗剂局部递送至特定的靶细胞、组织或器官。

[0997] 在某些实施方案中，在实施本发明的方法时，共轭物还包含诊断标签或与其结合。在某些示例性的实施方案中，诊断标签选自：用于 γ 闪烁扫描法和PET的放射医药性或放射性同位素；用于核磁共振造影术 (MRI) 的造影剂；用于计算机断层显像术的造影剂；用于X-断层显像术的造影剂；用于用于中子活化法的试剂；能够反射、散射或影响X-射线、超声波、无线电波和微波的片段和荧光团。在某些示例性的实施方案中，共轭物在体内进一步受到监测。

[0998] 诊断标签的实例包括，但不限于，用于 γ 闪烁扫描法和PET的放射医药性或放射性同位素；用于核磁共振造影术 (MRI) 的造影剂（例如顺磁原子和超顺磁纳米结晶）；用于计算机断层显像术的造影剂；用于X-射线造影法的造影剂；用于超声波诊断方法的试剂；用于中子活化法的试剂；以及能够反射、散射或影响X-射线、超声波、无线电波和微波的片段；各种光学过程中的荧光团等。诊断的放射医药包括发射 γ -射线的放射性核素，例如，铟-111、锝-99m和碘-131等。用于MRI（核磁共振造影术）包括磁性化合物，例如，顺磁离子、铁、镁、钆、镧、有机顺磁部分以及超顺磁性、铁磁性和反铁磁性化合物，例如，氧化铁胶体、铁氧体胶体等。用于计算机断层显像术和其它基于X-射线的造影法的造影剂包括吸收X-射线的化合物，例如，碘、钡等。用于基于超声波的方法的造影剂包括能够吸收、反射和散射超声波的化合物，例如，乳液、晶体、气泡等。此外其它的实例包括用于中子活化法的物质，如硼和钆。此外，可采用能够反射、折射、散射或影响X-射线、超声波、无线电波、微波和其它可用于诊断过程的射线的标签。荧光标签能够用于光成像。在某些实施方案中，修饰剂包含顺磁离子或基团。

[0999] 在另一方面，本发明提供一种治疗受试者的疾病或病症的方法，其包括制备至少一个本发明的共轭物的水性制剂并且将该制剂肠胃外地注射至受试者。

[1000] 在另一方面，本发明提供治疗受试者的疾病或病症的方法，其包括制备包含至少一个本发明的共轭物的植入物，并且将该植入物植入受试者。在某些示例性的实施方案中，该植入物是生物可降解的凝胶基质。

[1001] 在另一方面，本发明提供种用于治疗需要其的动物的方法，其包括给予根据上述方法的共轭物。

[1002] 在另一方面，本发明提供一种用于引发动物的免疫应答的方法，其包括给予上述方法中的共轭物。

[1003] 在另一方面,本发明提供一种诊断动物的疾病的方法,其包括下列步骤:

[1004] 给予上述方法中的共轭物,其中所述共轭物包含可检测到的分子;和检测该可检测到的分子。

[1005] 在某些示例性的实施方案中,非侵入性地进行检测该可检测到的分子的步骤。在某些示例性的实施方案中,使用适合的成像装置进行检测该可检测到的分子的步骤。

[1006] 在一个实施方案中,用于治疗动物的方法包括给予动物作为用于已经由此除去肿瘤或生长的外科伤口的敷料包的本发明的动物生物可降解的、生物相容性的共轭物。生物可降解的、生物相容性的共轭物将在恢复期间取代肿瘤部位并且随着伤口的愈合而降解和消散。

[1007] 在某些实施方案中,共轭物与诊断标签结合用于体内监测。

[1008] 如上所述的共轭物可用于动物的治疗性、预防性和分析性(诊断性)治疗。共轭物通常计划在胃肠外给予,但是在有些情况下,可以通过其它途径给药。

[1009] 在一个实施方案中,可溶性的或胶体的共轭物经静脉内给予。在另一个实施方案中,可溶性的或胶体的共轭物经由局部(例如,皮下、肌肉)注射给予。在另一个实施方案中,固体共轭物(例如,颗粒、植入物、药物递送系统)经由植入或注射给予。

[1010] 在另一个实施方案中,给予包含可检测到的标签的共轭物以研究动物体内标签分布的模式和动力学。

[1011] 在某些实施方案中,本文所公开的任何一个或多个共轭物可用于实施如上所述的任何方法。在某些示例性的实施方案中,共轭物为曲妥珠单抗-PHF-、利妥昔单抗-PHF-、林妥珠单抗-PHF或抗-5T4-PHF-药物共轭物。

[1012] 在整个说明书中,当组合物被描述为具有、包括或包含特定组分时,可以想到该组合物也基本上由所列举的组分组成,或者由所列举的组分组成。类似地,当方法或过程被描述为具有、包括或包含特定过程步骤时,该过程也基本上由所列举的过程步骤组成,或者由所列举的过程步骤组成。此外,应该理解的是,步骤的顺序或者执行某些动作的顺序并不重要,只要本发明仍然可操作即可。此外,能够同时进行两个或多个步骤或动作。

[1013] 本发明的合成过程可耐受种类广泛的官能团;因此,可以利用各种取代的起始原料。该过程通常在整个过程的终结点或接近终结点时提供合意的最终产物,虽然在某些情况下,合意的是将该化合物进一步转化为其药学上可接受的盐、酯或前药。

[1014] 用于本发明的共轭物的药物化合物可依各种方式,使用市售的起始原料、文献中已知的化合物,或者由容易制备的中间物,通过采用标准的合成方法以及本领域技术人员已知的或本领域技术人员参照本文的教示明显可得知的的方法和程序而制备。用于有机分子的制备以及官能团转换和操控的标准合成方法和过程可由相关的科学文献或本领域的标准教科书中获得。虽然并不局限于任何一种或数种来源,经典教科书如Smith, M.B., March, J., March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 第5版, John Wiley & Sons: New York, 2001; 和Greene, T.W., Wuts, P.G.M., 有机合成中的保护基团(Protective Groups in Organic Synthesis), 第3版, John Wiley & Sons: New York, 1999, (通过引用结合到本文中)是有用的并且是本领域技术人员已知的有机合成的公认参考书。下面有关合成方法的描述旨在说明,而非限制用于制备本发明的化合物的通用程序。

[1015] 本发明的共轭物和包含于其中的药物化合物能够通过本领域技术人员熟悉的各

种方法便利地制备。带有每一个如本文所描述的通式的本发明的共轭物或化合物可以根据下列过程,由市售的起始原料或使用文献中的过程能够制备的起始原料制备。这些过程显示了本发明的代表性共轭物的制备。

[1016] 一旦被生产出来,通过上述方法设计、选择和/或最优化的共轭物就能够使用本领域技术人员已知的各种分析法进行特性化,以确定该共轭物是否具有生物活性。例如,通过常规的分析方法包括,但不限于如下文所描述的分析方法,可特征化该共轭物,以确定其是否具有预期的活性、结合活性和/或结合特异性。

[1017] 此外,高通量筛选能够用于加速使用这样的分析法的分析。因此,使用本领域中已知的技术,有可能对本文所描述的共轭物分子的活性进行快速筛选。用于执行高通量筛选的通用方法学描述于,例如,Devlin (1998) High Throuthput Screening, Marcel Dekker; 和美国专利号5,763,263中。高通量分析能够使用一种或多种不同的分析技术包括,但不限于,下文所描述的那些。

[1018] 本文所引用的所有出版物和专利文件通过引用结合到本文中,就如同将这样的出版物或文件特定地并且个别地通过引用结合到本文中。出版物和专利文件的引用没有打算承认任何一者作为相关的现有技术,也不构成任何对于其内容或日期的承认。本发明既已通过书面的说明书加以说明,本领域技术人员将会认识到,本发明能够以各种实施方案加以实施并且上述说明以及下列实施例是出于说明性目的,而并非对随附的权利要求加以限制。

实施例

[1019] 以下工作实施例是示例性的接头、药物分子和PBRM,及其制备方法。但不打算被限制于这些,并且本领域技术人员应该容易地理解可使用其它试剂或方法。

[1020] 本文所描述的共轭物可通过如上概述的方案以及通过下面实施例中所述的方法制备。除非另有所指,下面某些实施例中使用的术语“含量”是指由预定部分(如接头、药物分子,或PBRM)取代的聚合物结构单元的摩尔分数或摩尔百分比。因此,对于以下实施例的聚合物-药物或PBRM-聚合物-药物共轭物中的各种聚合物单元报告的百分比是摩尔百分比,除非另外指明。

[1021] 缩略语

[1022] 下列缩略语用于后续的反应方案和合成实施例。该列表并不意味着是囊括申请中所使用的全部缩略语的清单,因为有机合成领域的技术人员容易了解的额外的标准缩略语也能够用于合成方案和实施例。

[1023] ACN 乙腈

[1024] AF-HPA 奥瑞斯他汀F-羟基丙基酰胺

[1025] Ala 丙氨酸

[1026] BA β -丙氨酸

[1027] BOC 叔丁氧基羰基

[1028] DCC N,N'-二环己基碳二亚胺

[1029] DCM 二氯甲烷

[1030] DIEA N,N-二异丙基乙胺

- [1031] DMA 二甲基乙酰胺
- [1032] DMAP N,N-二甲基吡啶-4-胺
- [1033] DMF 二甲基甲酰胺
- [1034] DMSO 二甲亚砜
- [1035] EDAC N1-((乙亚氨基)亚甲基)-N3,N3-二甲基丙烷-1,3-二胺盐酸盐
- [1036] EDC.HCl 1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐
- [1037] GA 戊二酸
- [1038] HIC-HPLC 疏水性相互作用高压液相色谱
- [1039] HOAt 1-羟基-7-氮杂苯并三唑
- [1040] HOBt 1-羟基苯并三唑水合物
- [1041] HPLC 高压液相色谱
- [1042] HPSEC 高效尺寸排阻色谱法
- [1043] HPV 羟基丙基长春地辛
- [1044] 2HPV 2-羟基丙基长春地辛
- [1045] MWC0 分子量截止值
- [1046] NHS 1-羟基吡咯烷-2,5-二酮(即,N-羟基-琥珀酰亚胺)
- [1047] NMP N-甲基-2-吡咯烷酮
- [1048] PBS 磷酸盐缓冲盐水,0.9%NaCl
- [1049] EG 乙二醇
- [1050] EG2 二乙二醇
- [1051] MI 马来酰亚胺或马来酰亚胺基
- [1052] HPA-Ala 羟基丙基酰胺-L-丙氨酸
- [1053] PHF 聚(1-羟基甲基亚乙基羟基甲基缩甲醛),或FLEXIMER®
- [1054] RP-HPLC 反相高效液相色谱法
- [1055] SEC 尺寸排阻色谱法
- [1056] TBSCl 叔丁基二甲基甲硅烷基醚氯化物
- [1057] TCEP 三[2-羧基乙基]膦
- [1058] TEA 三乙胺
- [1059] TEAA 三乙基乙酸铵
- [1060] TFA 三氟乙酸
- [1061] WCX 弱阳离子交换色谱
- [1062] 一般信息
- [1063] 马来酰亚胺基-EG2-NHS酯购自Biomatrik,China。
- [1064] Boc-二氨基乙烷HCl购自Chem-Impex International Inc.,Wood Dale,IL。
- [1065] **Kadcyla®** (ado-曲妥珠单抗美坦辛(emtansine)),购自由Genentech生产的注射剂。
- [1066] HPLC纯化在Phenomenex Gemini 5 μ m110 Å,250x 10mm,5微米,半制备柱上进行。
- [1067] SEC在Tosoh Biosciences TSK凝胶G5000柱(7.8mm x 30cm,10 μ m)或Superose 12

柱(GE Healthcare)上进行。

[1068] WCX在ProPac WCX-10 (94mm x 250mm) 柱(ThermoFisher)上进行。

[1069] 当有可能时,共轭物的药物含量经分光光度法或者LC/MS测定,或进行¹H-NMR用于药物含量的定量测定。

[1070] 蛋白质-聚合物-药物共轭物的蛋白含量经分光光度法于280nm或经ELISA测定。

[1071] 聚合物共轭物的分子量(报告称为表观重均分子量或峰值分子量)通过SEC用或者多糖或者蛋白质分子量标准测定。更特别地,对于聚合物或聚合物-药物共轭物,采用多糖分子量标准,而对于蛋白质-药物-聚合物共轭物,采用蛋白质标准。除非另外指明,所报告的聚合物载体分子量是PHF的重均分子量;和聚合物-药物共轭物分子量和蛋白质-聚合物-药物共轭物是峰值分子量。PBRM-聚合物-药物共轭物具有约160kDa至约260kDa的峰值分子量。合成的/测量的聚合物和聚合物共轭物典型地具有 ≤ 1.5 的多分散性。

[1072] PBRM-聚合物-药物共轭物通过广泛的渗滤从残留的未反应的药物聚合物共轭物中分离出来。如果必要,进行通过尺寸排阻色谱法和/或WCX色谱法的额外的纯化,以除去任何聚集的PBRM-聚合物-药物共轭物。通常,PBRM-聚合物-药物共轭物典型地含有如通过SEC测定的 $<5\%$ (w/w,例如, $<2\%$ w/w) 聚集的分数;如通过RP-HPLC或LC-MS/MS测定的 $<0.5\%$ (w/w,例如, $<0.1\%$ w/w) 的游离(未共轭的) 药物;如通过SEC和/或RP-HPLC测定的 $<1\%$ (w/w) 的游离聚合物-药物共轭物和如通过HIC-HPLC和/或WCX HPLC测定的 $<2\%$ (w/w,例如, $<1\%$ w/w) 未共轭的PBRM。使用文献中描述的程序来制备还原的或部分还原的抗体,见例如,Francisco等,Blood 102 (4):1458-1465 (2003)。总药物(共轭的和未共轭的) 浓度通过LC-MS/MS测定。

[1073] 为研究药代动力学特性,即,PBRM-聚合物-药物共轭物吸收、分布、代谢,和排泄的时程,开发了分析法以测量在例如血浆、肿瘤和组织样品中的PBRM-PHF-AF-HPA共轭物(即共轭的AF-HPA) 的浓度和释放的、未共轭的AF-HPA和AF(游离药物) 的浓度。为测定游离药物在样品中的浓度,用乙腈处理酸化的样品。从上清液提取游离药物并通过LC-MS/MS分析。为测定共轭的AF-HPA的浓度,酸化的血浆、肿瘤或组织匀浆经受碱性水解,接着酸化并用乙腈沉淀蛋白质。含有释放的AF-HPA和AF的乙腈上清液通过LC-MS/MS分析。对于在血浆和肿瘤和组织匀浆中的游离药物和共轭的AF-HPA的标准曲线,在0.3-3,000ng/mL和10-20,000ng/mL的浓度范围内分别是线性的。总曲妥珠单抗浓度通过ELISA测定。

[1074] 在本文描述的所有体外或体内实验中,除非另外指明,所用的剂量均以PBRM-聚合物-药物共轭物的PBRM(如,抗体) 为基础。

[1075] 采用RP-HPLC、SDS-PAGE或毛细管电泳以表征PBRM-聚合物-药物共轭物中的半胱氨酸生物共轭位点的特异性和分布。结果给出药物-聚合物共轭物在PBRM的重链(H) 和轻链(L) 中的位置分布并显示主要发生在重链链间半胱氨酸铰链区的与PBRM的共轭。类似的结果用LC-MS PBRM肽图谱获得。

[1076] 通用程序

[1077] 通用程序A. 聚合物与接头或药物的共轭

[1078] 一般来说,聚合物(PHF-BA或PHF-GA) 与含胺接头,例如,EG2-马来酰亚胺或含胺接头药物,例如,AF-HPA-Ala、HPV-Ala的共轭,在激活剂,例如EDC.HCl的存在下,在水性或10-90%有机/水性溶剂混合物中进行。典型的有机溶剂包括,但不限于,与水混溶的溶剂,例

如, DMSO、DMF、DMA、NMP和CAN。为加速偶联, 可加入共激活剂, 例如, NHS。使聚合物首先与含氨基化合物混合, 接着加入共激活剂(NHS), 然后加入激活剂(EDC·HCl)。反应在0-10℃, pH 4.5-7.5下进行1h-24小时(在环境温度下)。生成的聚合物共轭的产物通过渗滤或通过SEC纯化。产物浓缩至2-50mg/mL, pH调节至4.5-6.5以确保药物-聚合物接头稳定性, 并且共轭物于-20至-80℃冷冻贮存, 直至进一步使用。

[1079] 聚合物与含胺接头或药物的共轭可以序贯地、以任何次序或同时进行。

[1080] 通用程序B. 蛋白质(PBRM)的部分选择性还原

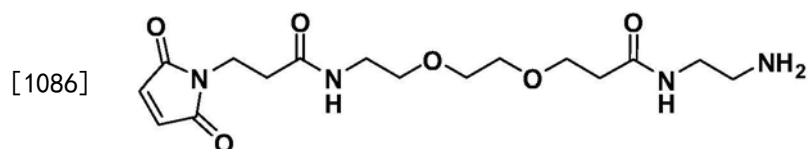
[1081] 在与聚合物-药物共轭物共轭之前, 相关PBRM中的链间二硫化物基团或未配对的二硫化物的部分选择性还原通过使用还原剂, 例如, TCEP、DTT或β-巯基乙醇实现。当用过量的还原剂进行还原时, 还原剂通过SEC在共轭之前除去。PBRM二硫化物基团转化为反应性巯基的程度取决于PBRM、还原剂、pH、温度和/或反应持续时间的化学计算。当PBRM中的一些但不是所有的二硫化物基团被还原时, 还原的PBRM为部分还原的PBRM。

[1082] 通用程序C. 部分还原的PBRM与聚合物药物共轭物的共轭

[1083] 部分还原的PBRM与聚合物-药物共轭物的共轭在中性或弱碱性条件(pH 6.5-8.5)下, 以1-10mg/mL的PBRM浓度和0.5-10mg/mL的聚合物-药物共轭物浓度进行。聚合物-药物共轭物典型地以相对于所需蛋白质-聚合物-药物共轭物化学计算的1-5.0倍过量使用。当PBRM共轭于聚合物-药物共轭物的马来酰亚胺基时, 共轭任选地通过加入水溶性马来酰亚胺基封闭化合物, 例如, N-乙酰基半胱氨酸、半胱氨酸甲基酯、N-甲基半胱氨酸、2-巯基乙醇、3-巯基丙酸、2-巯基乙酸、巯基甲醇(即, HOCH₂SH)、苄基硫醇等终止。

[1084] 生成的PBRM-聚合物-药物共轭物典型地通过渗滤纯化以除去任何未共轭的聚合物-药物共轭物、未共轭的药物和小分子杂质。备选地或另外地, 适当的色谱分离程序, 例如, 尺寸排阻色谱、疏水相互作用色谱、离子色谱, 例如, WCX色谱; 反相色谱、羟基磷灰石色谱、亲和色谱或其组合可被用来纯化PBRM-聚合物-药物共轭物。生成的纯化PBRM-聚合物-药物共轭物通常在pH 5.0-6.5的缓冲液中配制。

[1085] 实施例1. 合成EG2-马来酰亚胺: (O-[N-(3-马来酰亚胺基丙酰基)氨基乙基]-O'-[3-(N-(2-氨基乙基)氨基)-3-氧代丙基]乙二醇)



[1087] (“EG2-马来酰亚胺”或“EG2-MI”)

[1088] 向马来酰亚胺基-EG2-NHS酯(O-[N-(3-马来酰亚胺基丙酰基)氨基乙基]-O'-[3-(N-琥珀酰亚胺基氧基)-3-氧代丙基]乙二醇, 1.2g, 2.82mmol)和Boc-二氨基乙烷盐酸盐(560mg, 2.82mmol)在ACN(15mL)中的冰冷却悬浮液中滴加入TEA(0.571g, 5.64mmol)同时搅拌。使生成的混合物回至室温并于室温下继续搅拌过夜。加入另外的BOC-二氨基乙烷盐酸盐(110mg)以驱使反应完全。反应混合物在真空下浓缩和残留物在RP-HPLC(0-100%ACN在水中)上纯化, 得到Boc-二氨基乙烷-EG2-马来酰亚胺, 为无色固体(1.18g, 89%得率)。ESI MS: 计算值C₂₁H₃₅N₄O₈[M+H⁺] 471.3; 实测值471.2。

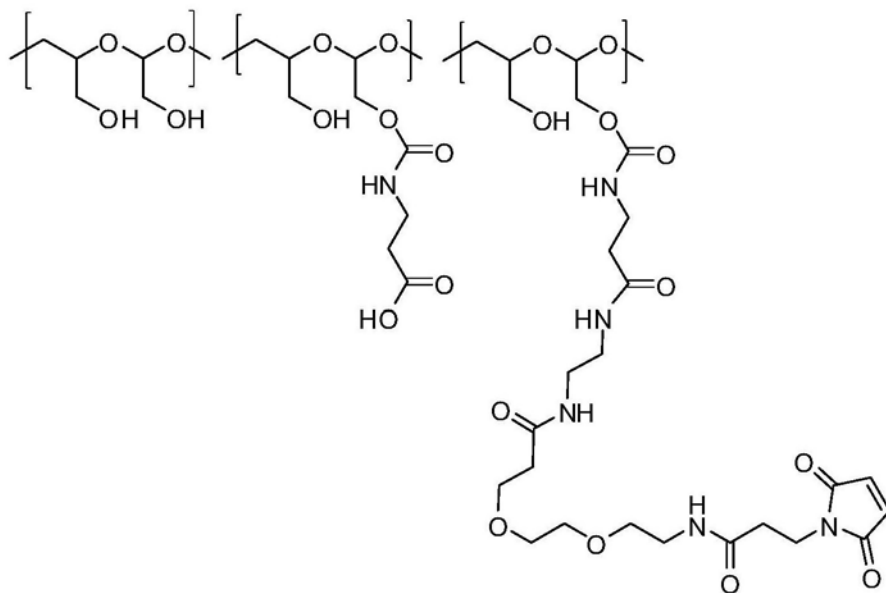
[1089] 于0℃, 使Boc-二氨基乙烷-EG2-马来酰亚胺(1.18g, 2.508mmol)溶于在DCM(20mL)中的30%TFA溶液, 于室温下将生成的溶液搅拌2小时。在真空下浓缩粗制反应混合物, 然后

在RP-HPLC (含有0.1%TFA的0-10%ACN在水中) 上纯化,得到标题化合物(EG2-马来酰亚胺),为无色油(1.04g,86%)。

[1090] ^1H NMR (400MHz, DMSO- $\text{d}_6+\text{D}_2\text{O}$): δ 6.95 (s, 2H), 3.66-3.54 (m, -10H), 3.34 (t, 2H, $J=5.6\text{Hz}$), 3.27 (t, 2H, $J=6.7\text{Hz}$), 3.18-3.10 (m, 2H), 2.84 (t, 2H, $J=6.2\text{Hz}$), 2.33 (q, 4H, $J=6.7\text{Hz}$); ESI MS: 对 $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_6$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 的计算值371.2; 实测值371.2。

[1091] 实施例2. 合成10K PHF-BA (30%) -EG2-MI (3%)

[1092]

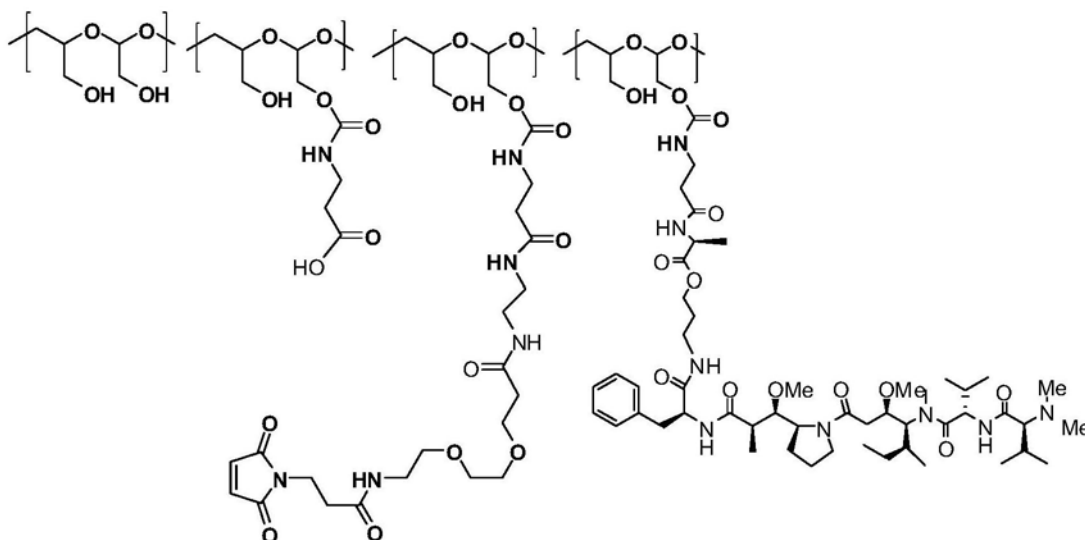


[1093] 向10K PHF-BA (30%) (588mg, 3.46mmol, 以类似于如在US 13/493,899, 现在为US 专利8,685,383, 实施例1中描述的方式制备) 的水 (10mL) 溶液中加入EG2-马来酰亚胺 (102mg, 0.211mmol, 以类似于实施例1中描述的方式制备) 的水 (5mL) 溶液, 接着加入N-羟基-琥珀酰亚胺 (NHS, 25mg, 0.211mmol)。将生成的混合物冷却至5-10℃, 并使用0.1N NaOH 溶液, 将pH调节至5.8 (从5.3)。然后经40分钟将EDC.HCl (94mg, 0.486mmol) 的水 (2mL) 溶液加入到反应混合物中。使反应混合物回至室温并于室温下继续搅拌18小时。生成的产物通过在3K MWCO膜上渗滤来纯化并冻干, 得到为灰白色固体产物的标题化合物 (0.460g, 71% 得率)。

[1094] ^1H -NMR (400MHz, D_2O): 6.9ppm (宽单峰, MI), 5.0-4.7ppm (m, 1H, $\text{O}-\text{CH}-\text{O}-$, 缩醛-质子聚合物), 4.3-3.6ppm (m, $\text{O}-\text{CH}_2-$ 聚合物主链和接头质子), 3.4-3.3ppm (m, $\text{CH}_2-\text{NH}-$, β -丙氨酸和接头质子), 2.7-2.4ppm (m, $\text{CH}_2-\text{COOH}-$, β -丙氨酸和接头质子)。通过 ^1H -NMR测定的EG2-MI 接头加载 (即, 含有EG2-MI接头的聚合物单元含量) 是3%mol的聚合物结构单元。

[1095] 实施例3. 合成10K PHF-BA (30%) -EG2-MI (3%) -AF-HPA-A1a (8%)

[1096]



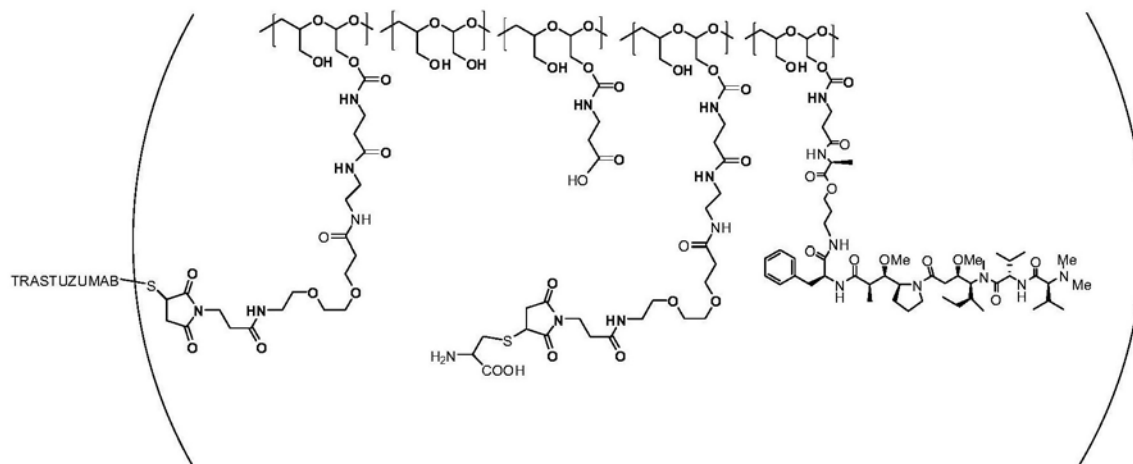
[1097] 将10K PHF-BA (30%) EG2-MI (3%) (144mg, 11.08 μ mol, 以类似于如在实施例2中描述的方式制备) 在水中 (4.2g) 的均匀溶液冷却至5-10 $^{\circ}$ C。使用1N HCl将溶液的pH调节至5.8, 接着加入溶于NMP (1.4mL) 和NHS (16mg在0.5mL水中) 的奥瑞斯他汀F-羟基丙基酰胺-L-丙氨酸.2TFA (AF-HPA-Ala.2TFA) (85mg, 77.52 μ mol, 以类似于在US 13/493,899, 现在为US专利8,685,383, 实施例50中描述的方式制备)。于5-10 $^{\circ}$ C剧烈搅拌该混合物并用0.1N NaOH将溶液的pH调节至5.8。向生成的混合物中加入新鲜制备的EDC.HCl (30mg在0.5mL水中) 的水溶液。45分钟后, 加入另外的EDC.HCl (30mg在0.5mL水中) 并将生成的混合物搅拌18-24小时, 同时维持pH在5.8。反应混合物的RP-HPLC分析指示>95%的起始原料奥瑞斯他汀化合物消耗。产物通过在3K MWCO膜上渗滤来纯化, 接着通过HPLC纯化和冻干, 得到标题化合物 (143mg, 78%得率)。

[1098] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, D_2O) : 7.15ppm (宽单峰, AF-HPA芳族质子), 6.9ppm (宽单峰, MI), 5.0-4.8ppm (m, 1H, O-CH-O-缩醛-质子聚合物), 4.4-3.6ppm (m, O-CH₂-聚合物主链和药物/接头质子), 3.4-2.8ppm (m, CH₂-NH-, β -丙氨酸和药物/接头质子), 2.2-1.8ppm (m, CH₂-COOH-, β -丙氨酸和药物/接头质子) 和1.6-0.9ppm (m, 药物/接头质子)。

[1099] 通过 $^1\text{H-NMR}$ 测定的共轭的产物的药物载荷 (即, 含有药物的聚合物单元的含量) 是8%mol的聚合物结构单元 (或平均约6AF-HPA分子/每聚合物链)。标题共轭物的分子量是约17kDa。

[1100] 实施例4. 合成曲妥珠单抗-((EG2-MI (3%))-(10kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-Ala (8%)))

[1101]



[1102] 向曲妥珠单抗 (6.19mL, 100mg, 0.676 μ mol) 在TEAA缓冲液中的溶液中加入TCEP (0.6mL, 2.36 μ mol, 0.678mg) 溶液同时搅拌。于37 $^{\circ}$ C温育混合物1小时, 然后冷却至 $\sim$ 0 $^{\circ}$ C。然后于0 $^{\circ}$ C, 将部分还原的曲妥珠单抗加入到10K PHF-BA (30%) -EG2-MI (3%) -AF-HPA-Ala (8%) (76mg, 以类似于实施例3中描述的方式制备) 在TEAA缓冲液 (pH 7.4) (26.5mL) 的剧烈搅拌的溶液中。于0 $^{\circ}$ C继续搅拌30min。用半胱氨酸盐酸盐 (65mg, 371 μ mol, 1.9mL) 的水溶液猝灭反应。于室温下于pH 7.0搅拌1h后, 将反应混合物酸化至pH 5.0。粗产物经色谱法纯化, 接着SEC纯化, 得到标题化合物 (61mg, 61%得率)。

[1103] AF-HPA与曲妥珠单抗的比例是约12:1至约17:1。标题共轭物的分子量是180kDa, PDI 1.15。PHF-药物共轭物与曲妥珠单抗的平均比例是约2:1至约3:1或约3:1至约4:1。

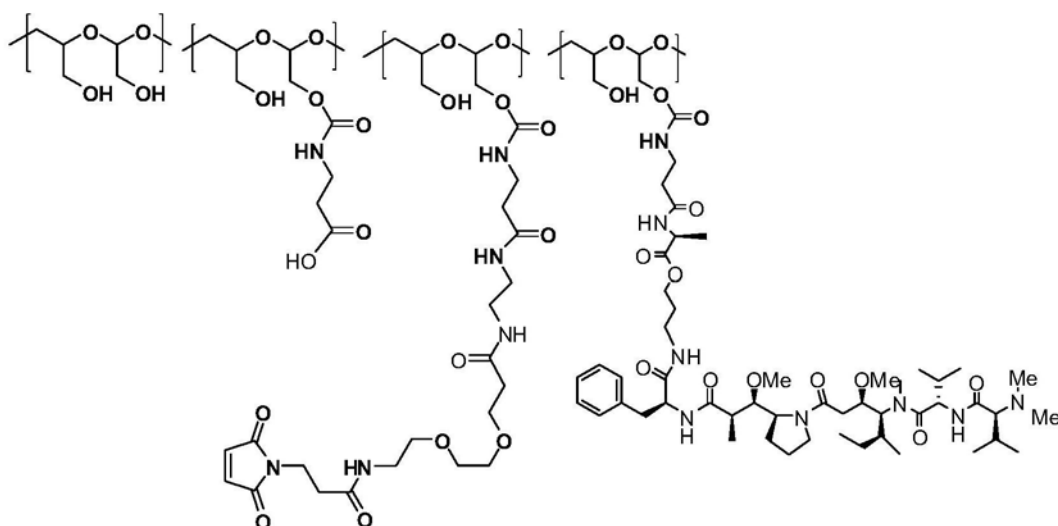
[1104] 使PBRM-聚合物-药物共轭物, 曲妥珠单抗-((PEG2-MI (3%)) - (10kDa PHF-BA (30%) - (AF-HPA-Ala (8%))) (2.5 μ g, 以类似于上述的方式制备) 在非-还原和还原条件下经受SDS-PAGE, 即, 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳) 并用Odyssey IRDye[®]蓝蛋白质染色缓冲液可视化。在非-还原条件下, 将共轭物或者于70 $^{\circ}$ C加热10分钟, 或者在SDS-PAGE分析之前不加热。

[1105] SGS-PAGE凝胶显示共轭物是稳定的并且在非-还原条件下, 例如于70 $^{\circ}$ C经10分钟时不分离。在还原条件下, 共轭物解离成重链和轻链片段。

[1106] 其它PBRM-聚合物-药物共轭物用类似于上述程序的方法合成, 包括其它PBRM衍生物, 例如, 西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑单抗、林妥珠单抗、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。而且, 具有不同比例的药物与PBRM的PBRM-聚合物-药物共轭物通过改变PBRM巯基的数目和药物-聚合物共轭物药物载荷而获得。

[1107] 实施例5. 合成10K PHF-BA (30%) -AF-HPA-Ala (9%)

[1113]



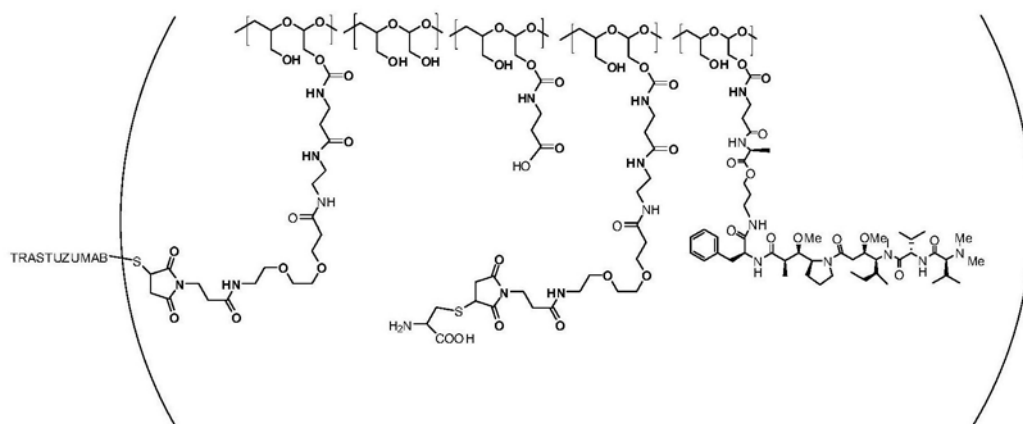
[1114] 向10K PHF-BA (30%) -AF-HPA-Ala (9%) (500mg, 35 μ mol, 以类似于在实施例5中描述的方式制备)的水溶液(13.7mL)中加入EG2-马来酰亚胺(83mg, 0.139mmol, 以类似于在实施例1中描述的方式制备)溶液,接着加入N-羟基-琥珀酰亚胺(NHS, 40mg, 0.348mmol)。使生成的混合物冷却至5-10 $^{\circ}$ C,并使用0.1N NaOH溶液将pH调节至5.8(从4.6)。然后将EDC.HCl (174mg, 0.91mmol)的水溶液(2mL)经40分钟,分成两个相等的部分加入反应混合物中。反应混合物的RP-HPLC分析指示>95%EG2-马来酰亚胺的消耗。使反应混合物回至室温并于室温下继续搅拌18小时。生成的产物通过在3K MWC0膜上渗滤来纯化并冻干,得到为灰白色固体产物的标题化合物(0.57g, 100%得率)。

[1115] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, D_2O): 7.4-7.2ppm(宽单峰, AF-HPA芳族质子), 6.9ppm(宽单峰, MI), 5.0-4.8ppm(m, 1H, O-CH-O-缩醛-质子聚合物, 部分被水峰掩盖), 4.4-3.6ppm(m, O-CH₂-聚合物主链和药物/接头质子), 3.5-2.8ppm(m, CH₂-NH-, β -丙氨酸和药物/接头质子), 2.2-1.6ppm(m, CH₂-COOH-, β -丙氨酸和药物/接头质子)和1.6-0.8ppm(m, 药物/接头质子)。

[1116] 通过 $^1\text{H-NMR}$ 测定的EG2-MI接头加载是 $\sim 2\%$ mol的聚合物结构单元。标题化合物的分子量是约20kDa。平均来说,有6AF-HPA分子/每聚合物链。

[1117] 实施例7. 合成曲妥珠单抗-(EG2-MI (2%)-(10kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-Ala (9%))

[1118]



[1119] 向曲妥珠单抗(6.4mL, 100mg, 0.68 μ mol)在TEAA缓冲液中的溶液中加入TCEP (0.993mg, 3.4 μ mol)溶液,同时搅拌。于室温下温育混合物1.5h。然后于0 $^{\circ}$ C,将部分还原的

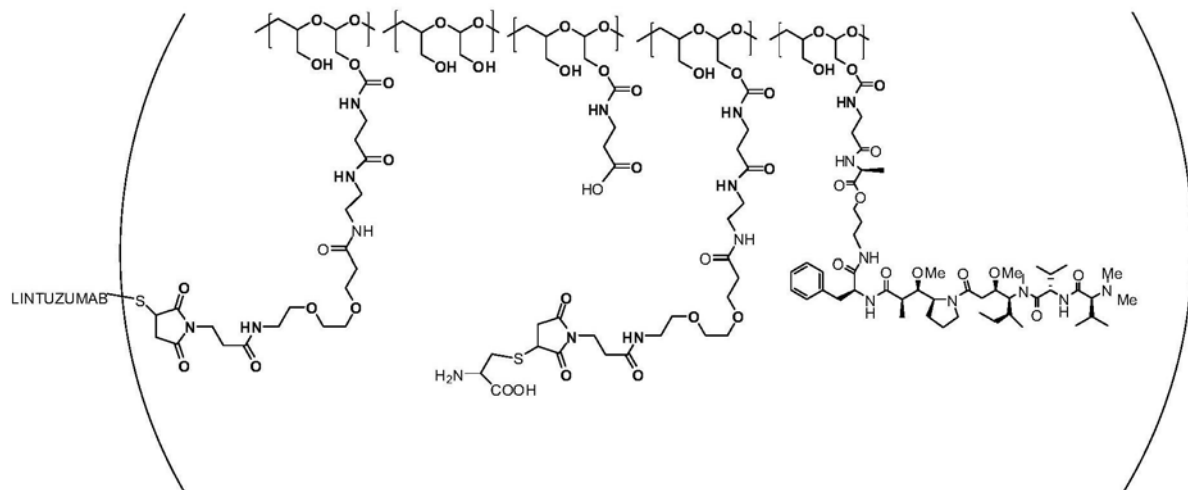
曲妥珠单抗加入到10K PHF-BA (30%) -EG2-MI (2%) -AF-HPA-Ala (9%) (86mg, 4.7 μ mol, 以类似于在实施例6中描述的方式制备) 在TEAA缓冲液 (pH 7.4) (26.5mL) 中的剧烈搅拌溶液中。于室温下继续搅拌45分钟。用半胱氨酸在TEAA缓冲液 (pH 6.8) (65mg, 371 μ mol, 1.9mL) 中的水溶液猝灭反应。于室温下, 与pH 7.0搅拌1h后, 将反应混合物酸化至pH 5.8。粗产物通过SEC纯化法纯化, 得到标题化合物 (35mg, 35%得率)。

[1120] AF-HPA与曲妥珠单抗比例是约16:1至约21:1。标题共轭物的分子量是210kDa。PHF-药物共轭物与曲妥珠单抗的平均比例是约2:1至约3:1或约3:1至约4:1。

[1121] 其它PBRM-聚合物-药物共轭物用类似于上述程序的方法合成, 包括其它PBRM衍生物, 例如, 西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑单抗、林妥珠单抗、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。此外, 具有不同比例的药物与PBRM的PBRM-聚合物-药物共轭物通过改变PBRM巯基的数目和药物-聚合物共轭物药物载荷而获得。

[1122] 实施例8. 合成林妥珠单抗-((EG2-MI (2%) - (10kDa PHF-BA (30%) - (AF-HPA-Ala (9%))

[1123]



[1124] 标题化合物使用在实施例4或实施例7中描述的程序制备, 除了所用10K PHF-BA (30%) -EG2-MI (2%) -AF-HPA-Ala (9%) (以类似于实施例3或实施例6中描述的方式制备)、林妥珠单抗和TCEP:林妥珠单抗3.5:1外。

[1125] AF-HPA与林妥珠单抗的比例是约10:1至约15:1。标题共轭物的分子量是184kDa。PHF-药物共轭物与林妥珠单抗的平均比例是约2:1至约3:1或约3:1至约4:1。

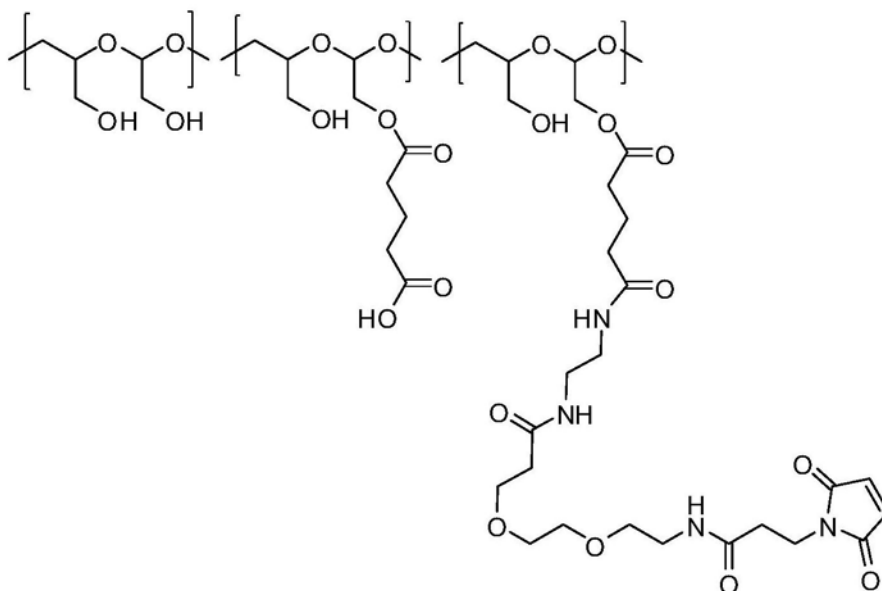
[1126] 其它PBRM-聚合物-药物共轭物用类似于上述程序的方法合成, 包括其它PBRM衍生物, 例如, 西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑单抗、林妥珠单抗、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。此外, 具有不同比例的药物与PBRM的PBRM-聚合物-药物共轭物通过改变PBRM巯基的数目和药物-聚合物共轭物药物载荷而获得。

[1127] 实施例9. 合成利妥昔单抗-((EG2-MI (3%) - (10kDa PHF-BA (30%) - (AF-HPA-Ala (8%))

[1136] 其它PBRM-聚合物-药物共轭物用类似于上述程序的方法合成,包括其它PBRM衍生物,例如,西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑珠单抗、林妥珠单抗、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。此外,具有不同比例的药物与PBRM的PBRM-聚合物-药物共轭物通过改变PBRM巯基的数目和药物-聚合物共轭物药物载荷而获得。

[1137] 实施例11.合成10K PHF-GA (29%) -EG2-MI (1%)

[1138]



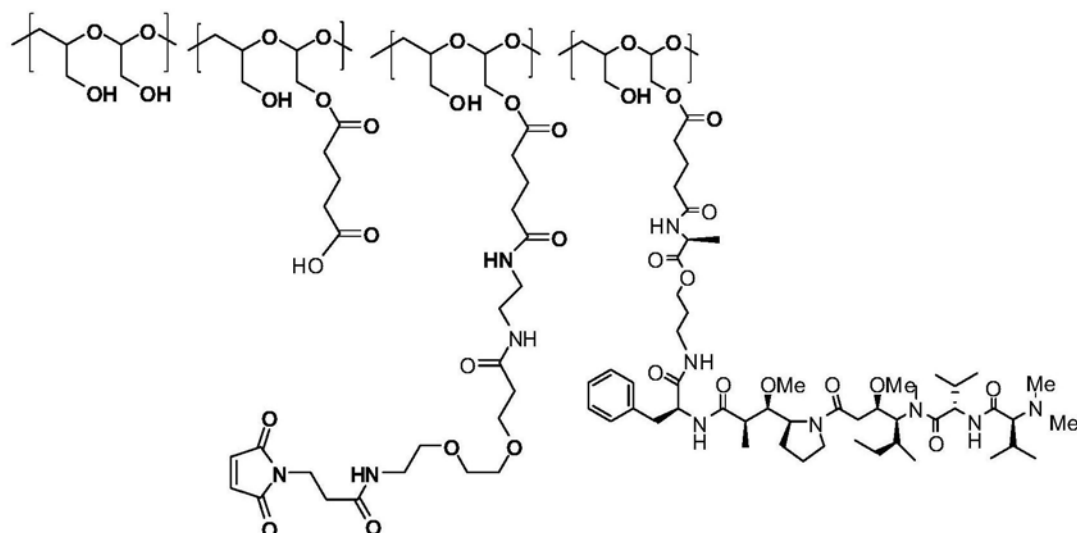
[1139] 向10K PHF-GA (29%) (1.7g, 10.1mmol, 以类似于在US 13/493,899, 现在为US专利 8,685,383, 实施例2中描述的方式制备) 水溶液 (35mL) 中加入EG2-马来酰亚胺 (204mg, 0.42mmol, 以类似于在实施例1中描述的方式制备) 在DMA (3mL) 中的溶液, 接着加入N-羟基-琥珀酰亚胺 (NHS, 70.3mg, 0.611mmol)。使生成的混合物冷却至5-10℃。然后将在水中 (2mL) 中的EDC.HCl (269mg, 1.402mmol) 经40分钟, 分成两个相等的部分加入到反应混合物中。使反应混合物回至室温并于室温下继续搅拌18小时。生成的产物通过在3K MWC0膜上渗滤来纯化并冻干, 得到标题化合物为灰白色固体产物 (1.7g, 91%得率)。

[1140] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, D_2O): 6.9ppm (宽单峰, MI), 5.0-4.7ppm (m, 1H, O-CH-O- , 缩醛-质子聚合物, 部分被水峰掩盖), 4.4-3.6ppm (m, $\text{O-CH}_2\text{-}$ 聚合物主链和接头质子), 3.3-2.6ppm (m, 接头质子), 2.5ppm (m, $\text{CH}_2\text{-CO-}$, 戊二酸质子), 2.3ppm (宽单峰, $\text{CH}_2\text{-COO-}$, 戊二酸质子), 1.9ppm (宽单峰, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$, 戊二酸质子)。

[1141] 通过 $^1\text{H-NMR}$ 测定的EG2-MI连接加载是1%mol的聚合物结构单元。

[1142] 实施例12.合成10K PHF-GA (29%) -EG2-MI (1%) -AF-HPA-Ala (6%)

[1143]



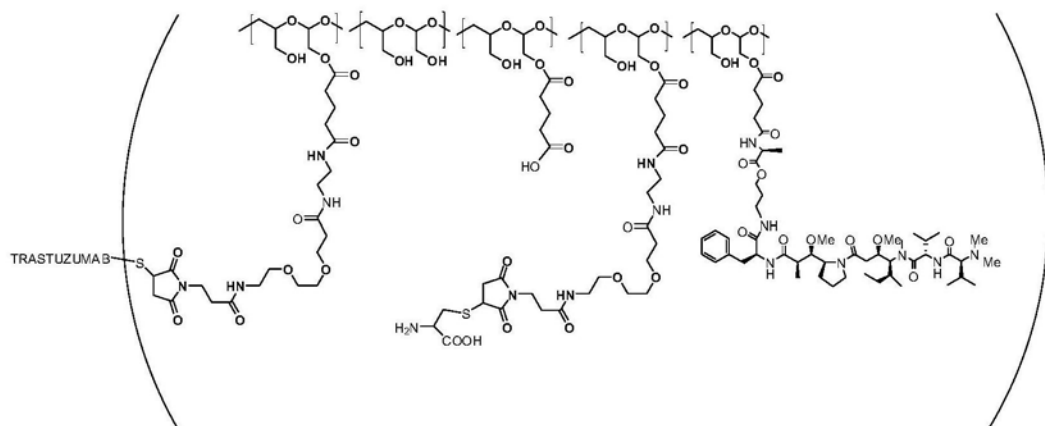
[1144] 向10K PHF-BA (29%) -EG2-MI (1%) (214mg, 15 μ mol, 以类似于在实施例11中描述的方式制备) 在水中 (5.4g) 的均匀溶液中加入溶于NMP (1.85mL) 和NHS (25mg in 0.5mL水) 中的AF-HPA-Ala.2TFA) (98mg, 90 μ mol, 以类似于在US 13/493,899, 现在为US专利8,685,383, 实施例50中描述的方式制备)。于5-10℃剧烈搅拌该混合物。向生成的混合物加入新鲜制备的EDC.HCl (40mg在0.8mL水中) 的水溶液。30分钟后加入另外的EDC.HCl (44mg在0.8mL水中) 并将生成的混合物搅拌18-24小时, 同时维持pH于5.8。RP-HPLC分析指示>95%的起始原料奥瑞斯他汀化合物消耗。产物通过在3K MWC0膜上渗滤来纯化并浓缩至10mL, 得到标题化合物 (177mg, 63%得率)。

[1145] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, D_2O) : 7.4-7.2ppm (宽单峰, AF-HPA芳族质子), 6.9ppm (宽单峰, MI), 5.0-4.8ppm (m, 1H, O-CH-O-, 缩醛-质子聚合物), 4.4-3.6ppm (m, O-CH₂-聚合物主链和接头质子), 3.4-2.9ppm (m, 药物接头质子), 2.5ppm (宽三峰, CO-CH₂-, 戊二酸质子), 2.4-2.2ppm (m, CH₂-COO-, 戊二酸质子和药物/接头质子), 2.0-1.8ppm (m, -CH₂-CH₂-CH₂-CO-, 戊二酸质子), 1.5-0.8 (m, 药物/接头质子)。

[1146] 通过 $^1\text{H-NMR}$ 测定的共轭的产物药物载荷是5.9%mol的聚合物结构单元 (或平均约4.5AF-HPA分子/每聚合物链)。标题共轭物的分子量是约17kDa。

[1147] 实施例13. 合成曲妥珠单抗-((EG2-MI (1%)) - (10kDa PHF-GA (29%) - (AF-HPA-Ala (6%)))

[1148]



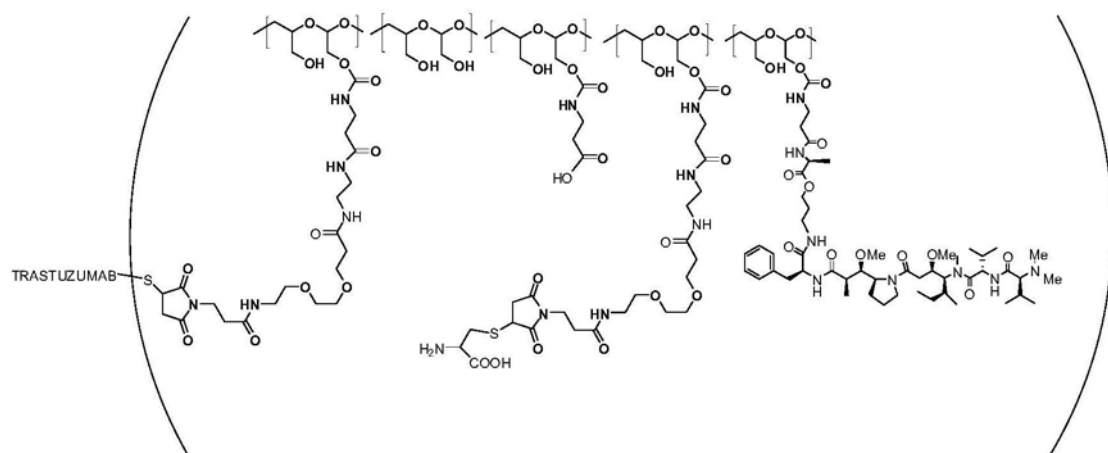
[1149] 标题化合物使用在实施例4或实施例7中描述的程序制备, 除了使用10K PHF-GA

(29%) -EG2-MI (1%) -AF-HPA-Ala (6%) (78mg, 以类似于在实施例1中描述的方式制备2) 和曲妥珠单抗 (25mg) 和TCEP:曲妥珠单抗3.5:1之外。AF-HPA与曲妥珠单抗的比例是约18:1至约23:1。标题共轭物的分子量是200kDa。PHF-药物共轭物与曲妥珠单抗的平均比例是约4:1至约5:1。

[1150] 其它PBRM-聚合物-药物共轭物用类似于上述程序的方法合成, 包括其它PBRM衍生物, 例如, 西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑珠单抗、林妥珠单抗、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。此外, 具有不同比例的药物与PBRM的PBRM-聚合物-药物共轭物通过改变PBRM巯基的数目和药物-聚合物共轭物药物载荷而获得。

[1151] 实施例14. 合成曲妥珠单抗-(EG2-MI (2%) - (10kDa PHF-BA (28%) - (AF-HPA-Ala (9%))

[1152]



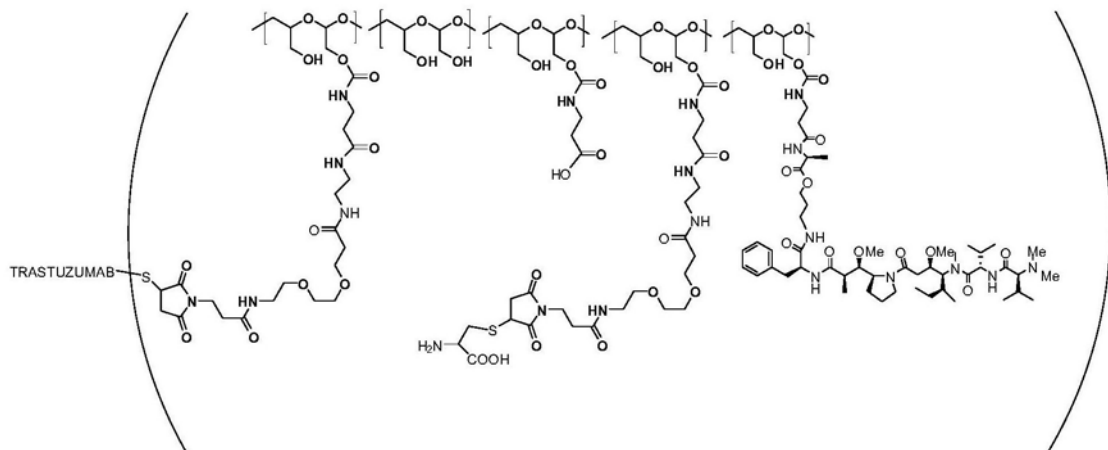
[1153] 标题化合物使用在实施例4或实施例7中描述的程序制备, 除了使用10K PHF-BA (28%) -EG2-MI (2%) -AF-HPA-Ala (9%) (11mg, 使用描述于实施例3或实施例6中的程序制备)、曲妥珠单抗 (620mg) 和TCEP:曲妥珠单抗3.5:1外。

[1154] AF-HPA与曲妥珠单抗比例是约10:1至约15:1。标题共轭物的分子量是183kDa。PHF-药物共轭物与曲妥珠单抗的平均比例是约2:1至约4:1。

[1155] 其它PBRM-聚合物-药物共轭物用类似于上述程序的方法合成, 包括其它PBRM衍生物, 例如, 西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑珠单抗、林妥珠单抗、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。此外, 具有不同比例的药物与PBRM的PBRM-聚合物-药物共轭物通过改变PBRM巯基的数目和药物-聚合物共轭物药物载荷而获得。

[1156] 实施例15. 合成曲妥珠单抗-(EG2-MI (2%) - (10kDa PHF-BA (28%) - (AF-HPA-Ala (9%))

[1157]



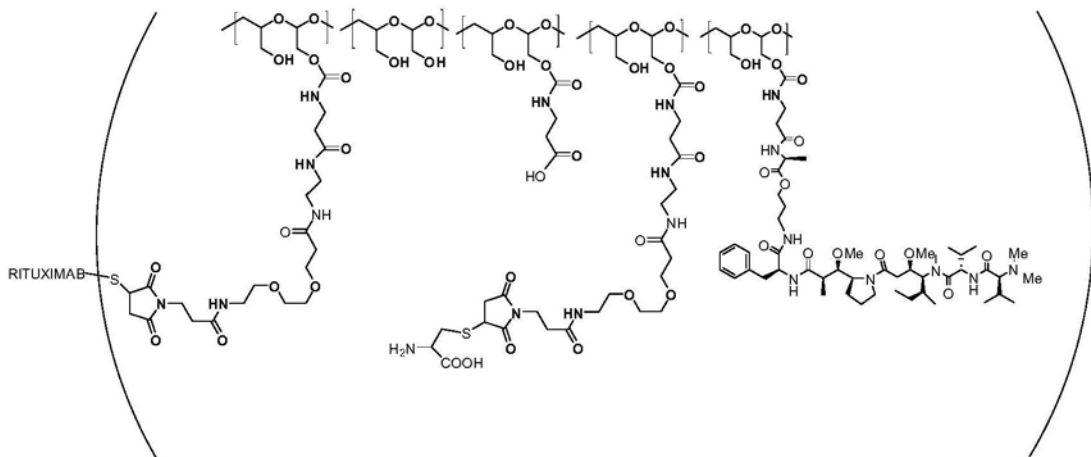
[1158] 标题化合物使用在实施例4或实施例7中描述的程序制备,除了使用10K PHF-BA (28%) -EG2-MI (2%) -AF-HPA-Ala (9%) (243mg, 使用描述于实施例3或实施例6中的程序制备)、曲妥珠单抗 (435mg) 和TCEP:曲妥珠单抗3:1外。

[1159] AF-HPA与曲妥珠单抗比例是约11:1至约16:1。标题共轭物的分子量是197kDa。PHF-药物共轭物与曲妥珠单抗的平均比例是约2:1至约4:1。

[1160] 其它PBRM-聚合物-药物共轭物用类似于上述程序的方法合成,包括其它PBRM衍生物,例如,西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑珠单抗、林妥珠单抗、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。此外,具有不同比例的药物与PBRM的PBRM-聚合物-药物共轭物通过改变PBRM巯基的数目和药物-聚合物共轭物药物载荷而获得。

[1161] 实施例16. 合成利妥昔单抗-((EG2-MI (2%) - (10kDa PHF-BA (28%) - (AF-HPA-Ala (9%))

[1162]



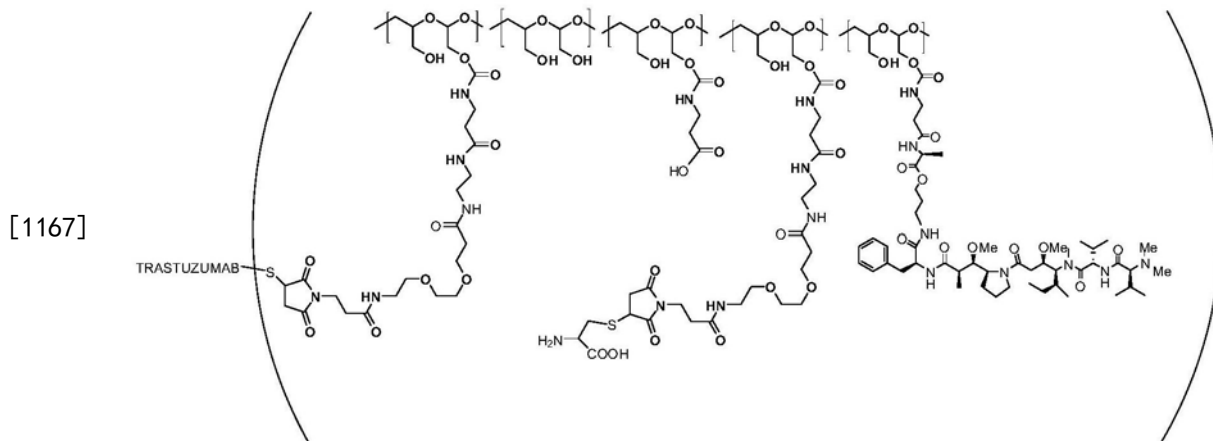
[1163] 标题化合物使用在实施例4或实施例7中描述的程序制备,除了使用10K PHF-BA (28%) -EG2-MI (2%) -AF-HPA-Ala (9%) (170mg, 使用描述于实施例3或实施例6中的程序制备)、300mg利妥昔单抗和TCEP:利妥昔单抗3:1外。

[1164] AF-HPA与利妥昔单抗比例是约13:1至约18:1。标题共轭物的分子量是180kDa。PHF-药物共轭物与利妥昔单抗的平均比例是约3:1至约4:1。

[1165] 其它PBRM-聚合物-药物共轭物用类似于上述程序的方法合成,包括其它PBRM衍生

物,例如,西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑珠单抗、林妥珠单抗、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。此外,具有不同比例的药物与PBRM的PBRM-聚合物-药物共轭物通过改变PBRM巯基的数目和药物-聚合物共轭物药物载荷而获得。

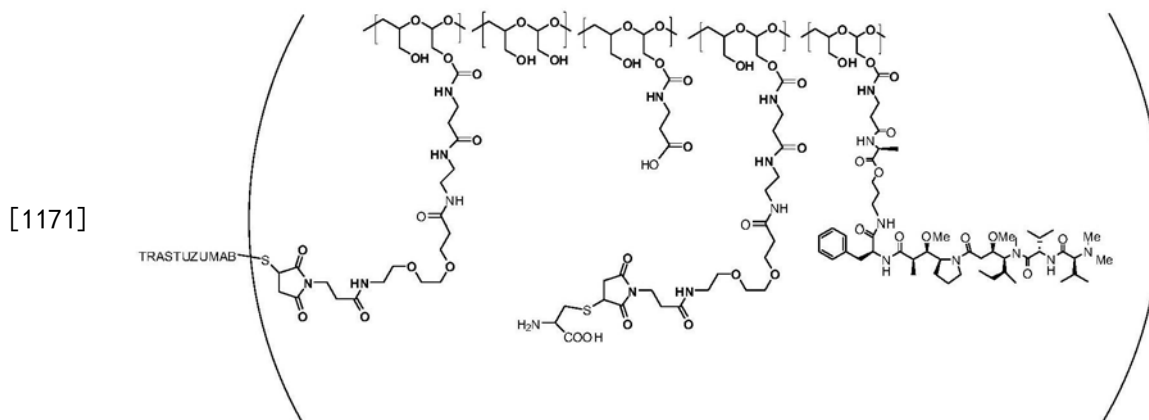
[1166] 实施例17.合成曲妥珠单抗-(EG2-MI (2%)-(10kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (9%))



[1168] 标题化合物使用在实施例4或实施例7中描述的程序制备,除了使用10K PHF-BA (28%)-EG2-MI (2%)-AF-HPA-Ala (9%) (8.4mg,使用描述于实施例3或实施例6中的程序制备)、曲妥珠单抗(15mg)和(TCEP:曲妥珠单抗3.5:1)外。AF-HPA与曲妥珠单抗的比例是约5:1至约10:1。标题共轭物的分子量是183kDa。PHF-药物共轭物与曲妥珠单抗的平均比例是约2:1至约4:1。

[1169] 其它PBRM-聚合物-药物共轭物用类似于上述程序的方法合成,包括其它PBRM衍生物,例如,西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑珠单抗、林妥珠单抗、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。此外,具有不同比例的药物与PBRM的PBRM-聚合物-药物共轭物通过改变PBRM巯基的数目和药物-聚合物共轭物药物载荷而获得。

[1170] 实施例18.合成曲妥珠单抗-(EG2-MI (2%)-(10kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (9%))



[1172] 标题化合物使用在实施例4或实施例7中描述的程序制备。

[1173] 共轭物A-AF-HPA与曲妥珠单抗比例是约19:1至约24:1。标题共轭物的分子量是

201kDa。PHF-药物共轭物与曲妥珠单抗的平均比例是约2:1至约4:1。

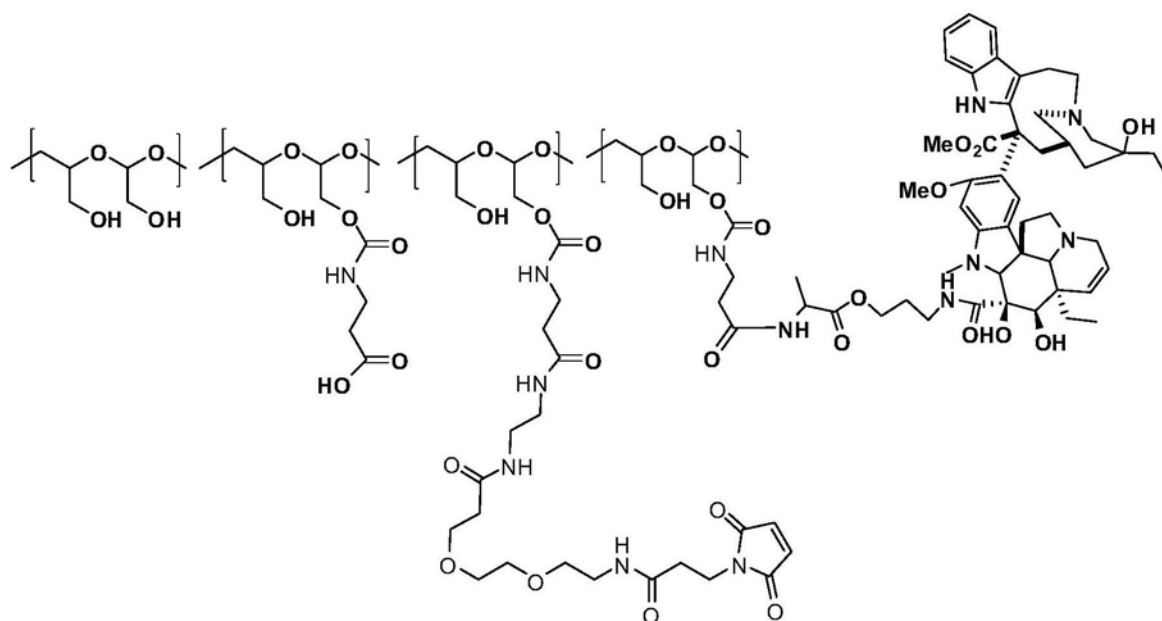
[1174] 共轭物B-AF-HPA与曲妥珠单抗比例是约20:1至约25:1。标题共轭物的分子量是224kDa。PHF-药物共轭物与曲妥珠单抗的平均比例是约2:1至约4:1。

[1175] 共轭物C-AF-HPA与曲妥珠单抗比例是约23:1至约28:1。标题共轭物的分子量是259kDa。PHF-药物共轭物与曲妥珠单抗的平均比例是约2:1至约4:1。

[1176] 其它PBRM-聚合物-药物共轭物用类似于上述程序的方法合成,包括其它PBRM衍生物,例如,西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑珠单抗、林妥珠单抗、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。此外,具有不同比例的药物与PBRM的PBRM-聚合物-药物共轭物通过改变PBRM巯基的数目和药物-聚合物共轭物药物载荷而获得。

[1177] 实施例19合成10K PHF-BA (30%) EG2-MI (2.7%) - (HPV-A1a (14%))

[1178]



[1179] 将10K PHF-BA (30%) EG2-MI (2.7%) (25.00mg, 2.80 μ mol, 以类似于在实施例2中描述的方式制备) 在水中 (0.612mL) 和NMP (0.14mL) 的均匀溶液冷却至0℃。加入在NMP (0.14mL) 中的1-羟基吡咯烷-2,5-二酮 (8.06mg, 0.07mmol), 接着加入HPV-丙氨酸 (15.56mg, 0.018mmol, 以类似于美国专利号8,524,214, 实施例1中描述的方式制备) 的水溶液 (0.250mL)。剧烈搅拌该混合物直至所有的原料已经溶解, 然后加入新鲜制备的EDC.HCl (6.71mg在0.125mL水中) 的水溶液。在45分钟后加入另外的EDC.HCl (6.71mg在0.125mL水中) 并将生成的混合物搅拌18小时, 同时维持pH于5.8。反应混合物的RP-HPLC分析指示该反应完成。使混合物冷却至0℃并加入EDC.HCl (12mg在0.250mL中)。用0.1N NaOH将溶液的pH调节至5.9并将混合物搅拌另外2h, 此时反应混合物的RP-HPLC分析指示起始原料完全消耗。产物经柱层析 (Sephadex G25凝胶) 纯化, 接着通过HPLC纯化和冻干, 得到标题化合物 (10.18mg, 24%得率)。

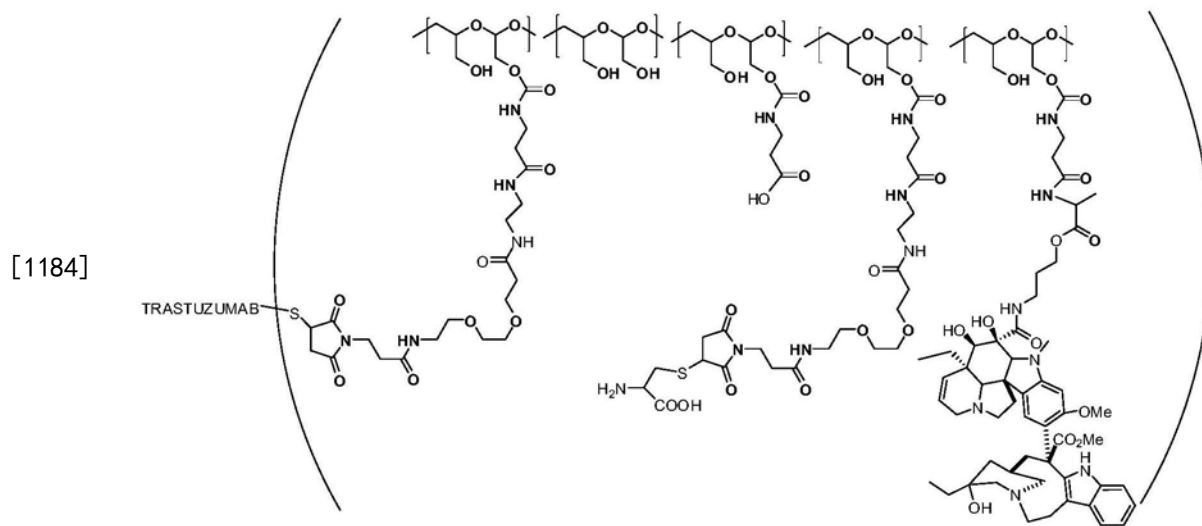
[1180] 共轭物A:10K PHF-BA (30%) EG2-MI (2.7%) - (HPV-A1a (14%)) 以类似于上述的方式制备。通过¹H-NMR测定的共轭产物的药物载荷 (即, 聚合物单元含有药物的含量) 是14%

mol的聚合物结构单元(即平均2.4HPV-A1a分子/每聚合物链)。

[1181] 共轭物B:10K PHF-BA (30%) EG2-MI (2.7%) - (HPV-A1a (7.7%) 使用上述的程序制备。通过¹H-NMR测定的共轭产物的药物载荷(即,聚合物单元含有药物的含量)是28.3%mol的聚合物结构单元(即平均4.6HPV-A1a分子/每聚合物链)。

[1182] 共轭物C:10K PHF-BA (30%) EG2-MI (3.5%) - (HPV-A1a (4.3%) 使用上述的程序制备。通过HPLC测定的共轭产物的药物载荷(即,聚合物单元含有药物的含量)是4.3%mol的聚合物结构单元(即平均2.6HPV-A1a分子/每聚合物链)。

[1183] 实施例20合成曲妥珠单抗-(EG2-MI (2.7%) - (10kDa PHF-BA (30%) - (HPV-A1a (14%))



[1185] 标题化合物使用在实施例4或实施例7中描述的程序制备,除了使用10K PHF-BA (30%) EG2-MI (2.7%) - (HPV-A1a (14%) (1.5mg,以类似于在实施例1中描述的方式制备9)、曲妥珠单抗和TCEP:曲妥珠单抗4:1外。

[1186] 共轭物A:曲妥珠单抗-(EG2-MI (2.7%) - (10kDa PHF-BA (30%) - (HPV-A1a (14%))。HPV-A1a与曲妥珠单抗比例是约13:1至约18:1。标题共轭物的分子量是约168kDa。PHF-药物共轭物与曲妥珠单抗的平均比例是约2:1至约4:1。

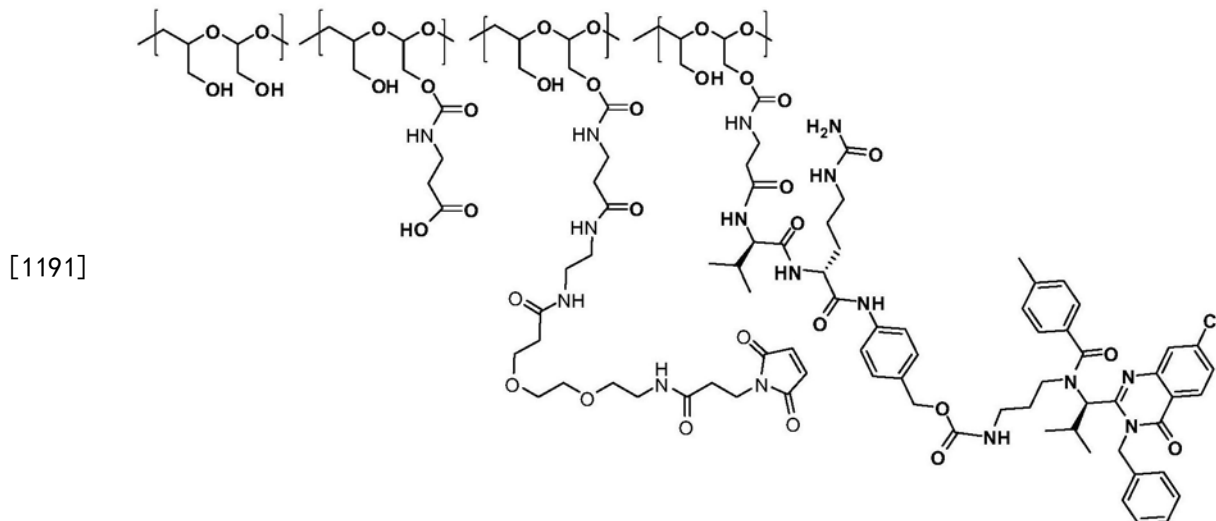
[1187] 共轭物B:曲妥珠单抗-(EG2-MI (2.7%) - (10kDa PHF-BA (30%) - (HPV-A1a (7.7%)) 使用上述程序制备,除了使用10K PHF-BA (30%) EG2-MI (2.7%) - (HPV-A1a (7.7%) (5.7mg,实施例19,共轭物B)、曲妥珠单抗和TCEP:曲妥珠单抗4:1外。HPV-A1a与曲妥珠单抗比例是约10:1至约14:1。标题共轭物的分子量是约180kDa。PHF-药物共轭物与曲妥珠单抗的平均比例是约2:1至约4:1。

[1188] 共轭物C:曲妥珠单抗-(EG2-MI (3.5%) - (10kDa PHF-BA (30%) - (HPV-A1a (4.3%)) 以类似于该实施例描述的方式制备,除了使用10K PHF-BA (30%) EG2-MI (2.7%) - (HPV-A1a (4.3%) (4.2mg,以类似于在实施例19共轭物C中描述的方式制备)、曲妥珠单抗和TCEP:曲妥珠单抗4:1外。HPV-A1a与曲妥珠单抗比例是约8.5:1至约12:1。标题共轭物的分子量是约181kDa。PHF-药物共轭物与曲妥珠单抗的平均比例是约2:1至约4:1。

[1189] 其它PBRM-聚合物-药物共轭物用类似于上述程序的方法合成,包括其它PBRM衍生物,例如,西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑珠单抗、林妥

珠单、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。此外,具有不同比例的药物与PBRM的PBRM-聚合物-药物共轭物通过改变PBRM巯基的数目和药物-聚合物共轭物药物载荷而获得。

[1190] 实施例21合成10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.7%) -(伊匹尼塞-PABA-Val-Cit (3.5%))

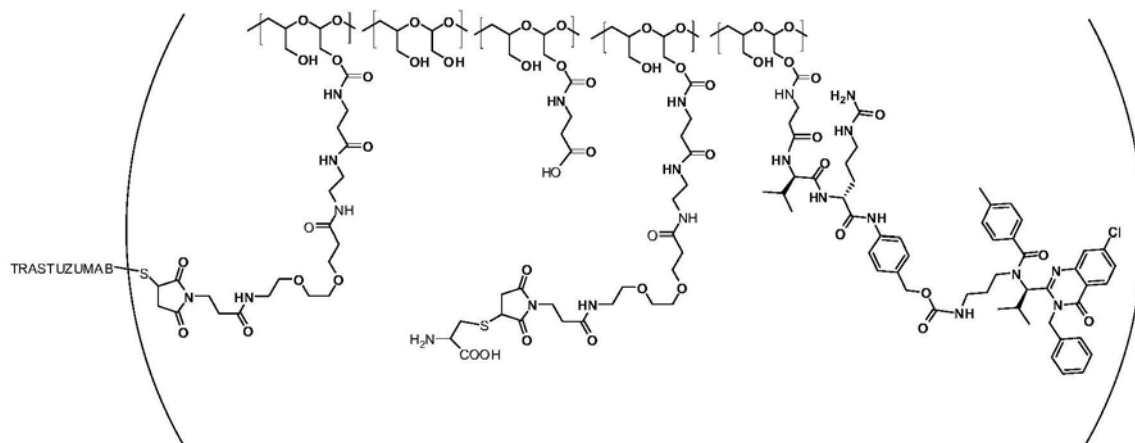


[1192] 向10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.7%) (60.8mg,以类似于在实施例2中描述的方式制备)的5mL NMP溶液中加入在NMP (0.5mL) 中的伊匹尼塞-PABA-Val-Cit-NH₂ (TFA盐, 10.0mg,以类似于美国专利号8,815,226,实施例84中描述的方式制备)。向该混合物中加入在NMP (0.5mL) 中的HATU (5.5mg),接着加入DIEA (4.4mg)。于室温下将反应混合物搅拌5-10min。粗制混合物经超滤纯化,得到标题化合物(得率:64%,基于伊匹尼塞)。

[1193] 经UV测定的共轭产物的药物载荷(即,聚合物单元含有药物的含量)是3.5%mol的聚合物结构单元(或平均约2.5伊匹尼塞-PABA-Val-Cit分子/每聚合物链)。

[1194] 实施例22.合成曲妥珠单抗-(EG2-MI (28%) -(10kDa PHF-BA (2.7%) -(伊匹尼塞-PABA-Val-Cit-(3.5%)))

[1195]

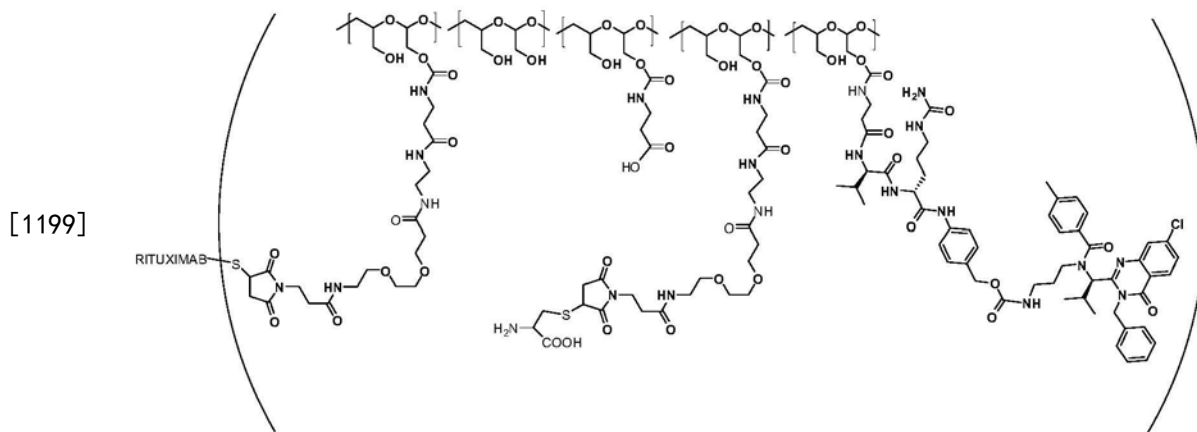


[1196] 标题化合物使用在实施例4或实施例7中描述的程序制备,除了使用10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.7%) -(伊匹尼塞-PABA-Val-Cit (3.5%)) (5.6mg,以类似于在实施例2中描述的方式制备1)、曲妥珠单抗和TCEP:曲妥珠单抗3.5:1外。伊匹尼塞与曲妥珠单抗比例是

约7.5:1至约10:1。PHF-药物共轭物与曲妥珠单抗的平均比例是约2:1至约4:1。

[1197] 其它PBRM-聚合物-药物共轭物用类似于上述程序的方法合成,包括如上所述的其它PBRM衍生物,例如,西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑单抗、林妥珠单抗、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。此外,具有不同比例的药物与PBRM的PBRM-聚合物-药物共轭物通过改变PBRM巯基的数目和药物-聚合物共轭物药物载荷而获得。

[1198] 实施例23.合成利妥昔单抗-(EG2-MI (2.7%)-(10kDa PHF-BA (28%)-(伊匹尼塞-PABA-Val-Cit-(3.5%))

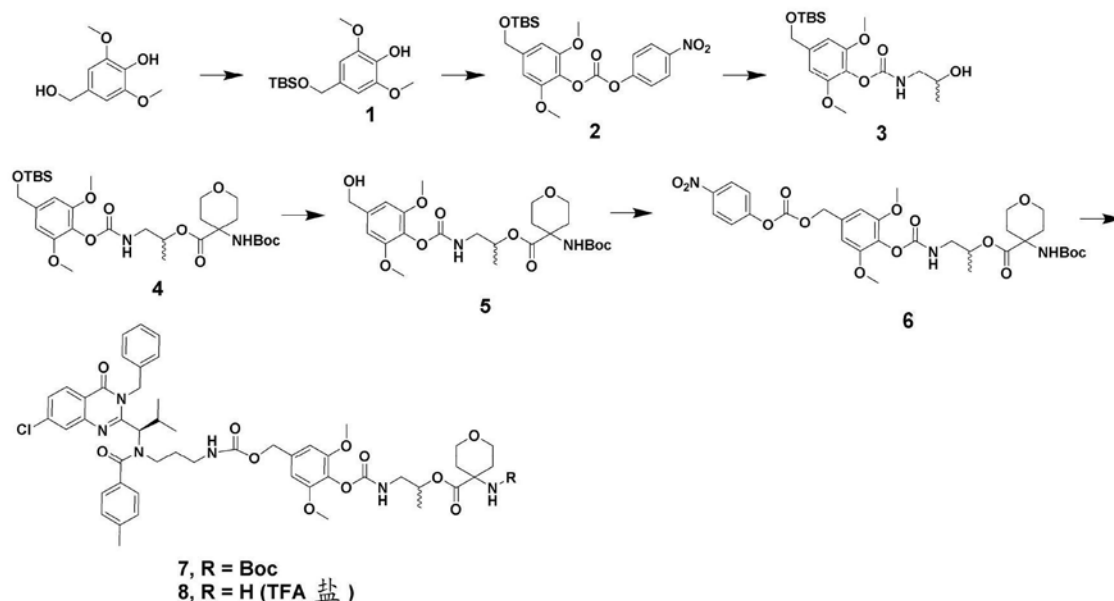


[1200] 标题化合物采用描述于实施例22中的程序制备,除了使用利妥昔单抗和TCEP:利妥昔单抗3.5:1外。伊匹尼塞与利妥昔单抗比例是约6.5:1至约10:1。PHF-药物共轭物与曲妥珠单抗的平均比例是约2:1至约4:1。

[1201] 其它PBRM-聚合物-药物共轭物用类似于上述程序的方法合成,包括如上所述的其它PBRM衍生物,例如,西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑单抗、林妥珠单抗、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。此外具有不同比例的药物与PBRM的PBRM-聚合物-药物共轭物通过改变PBRM巯基的数目和药物-聚合物共轭物药物载荷而获得。

[1202] 实施例24.合成THP-2-甲基-伊匹尼塞

[1203]



[1204] 化合物1:向4-(羟基甲基)-2,6-二甲氧基苯酚(2.77g)的25mL DMA溶液中加入咪唑(1.13g)。在氩气下将混合物冷却至0℃,然后加入TBSCl(2.49g)。使反应混合物升温至室温并在氩气、避光下搅拌3天。反应混合物用DCM(300mL)稀释并用饱和NH₄Cl(100mL)洗涤,然后用盐水(100mL)洗涤。有机相经Na₂SO₄干燥并浓缩,得到经硅胶快速(Hex/EtOAc,0%B-30%B)层析纯化的粗产物,得到无色油(2.24g,50%得率)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ8.17(s,1H),6.54(s,2H),4.59(s,2H),3.72(s,6H),0.89(s,9H),0.05(s,6H)。

[1205] 化合物2:向化合物1(0.508g)、TEA(0.603g)和DMAP(0.021g)的5mL干燥THF的冰冷却溶液中加入4-硝基苯基氯代甲酸酯(0.68g)在~3mL THF中的溶液。移去冰浴并于室温下继续搅拌。用NH₄Cl(20mL)猝灭反应,然后用乙酸乙酯(60mL)提取。有机物用盐水(20mL)洗涤,经Na₂SO₄干燥,然后浓缩,得到经硅胶(Hex:乙酸乙酯,0%B-20%B)快速层析纯化的粗产物,得到化合物2,为无色固体(0.724g,92%得率)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ8.32-8.28(m,2H),7.51-7.48(m,2H),7.12(s,1H),6.64(s,1H),4.75(d,2H,J=12.9Hz),3.93(d,3H,J=13.5Hz),3.88(s,3H),1.0-0.94(m,9H),0.15(s,3H),0.12(s,3H)。

[1206] 化合物3:向化合物2(0.5g)的5mL干燥THF的溶液中加入HOBt(0.291g)并将生成的混合物搅拌~5min。向该混合物中加入2-氨基丙醇(0.324g)和TEA(0.546g)。于0℃将生成的混合物搅拌~1h,此时TLC指示反应完成。混合物用DCM(60mL)稀释并用饱和NH₄Cl(20mL),接着用盐水(20mL)洗涤。干燥有机物(Na₂SO₄)并浓缩,得到黄色油。粗产物经硅胶(Hex:乙酸乙酯,0%B-80%B)快速层析纯化,得到为黄色固体的化合物3(0.356g,83%得率)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ7.50(t,1H J=5.8Hz),6.64(s,2H),4.68(s,2H),4.64(d,1H,J=4.8Hz),3.71(s,6H),3.70-3.61(m,1H),3.04-2.96(m,1H),2.96-2.86(m,1H),1.05(d,3H,J=6.1Hz),0.10(s,6H);ESI MS:理论值C₁₉H₃₃N₆O₆Si(M+H) 400.2,实测值400.2。

[1207] 化合物4:在氩气下,向化合物3(0.358g)和DMAP(0.219g)的5mL干燥DCM的冰冷却溶液中加入DCC(0.369g)在~5mL DCM中的溶液。移去冰浴并于室温下将该混合物搅拌过夜。过滤反应混合物,用DCM(~60mL)稀释并用饱和NH₄Cl(2x 20mL)洗涤,接着用盐水(~20mL)洗涤。有机相经Na₂SO₄干燥并浓缩,得到经硅胶快速层析纯化的粗产物,得到为无色油

的化合物4 (0.422g, 75%得率)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ7.65 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 6.64 (s, 2H), 4.93-4.84 (m, 1H), 4.68 (s, 2H), 3.71 (s, 6H), 3.68-3.62 (m, 1H), 3.62-3.47 (m, 4H), 3.16 (t, 2H, J=5.9Hz), 2.88 (s, 4H), 2.01-1.93 (m, 2H), 1.91-1.77 (m, 3H), 1.75-1.66 (m, 1H), 1.57-1.47 (m, 1H), 1.39 (s, 9H), 1.35-1.29 (m, 1H), 1.28-1.22 (m, 1H), 1.15-1.10 (m, 3H), 0.92 (s, 9H); ESI MS: 理论值C₃₀H₅₀N₂O₁₀Si (M+H) 627.3, 实测值527.2 (M-Boc+H)。

[1208] 化合物5: 在氩气下, 将化合物4 (0.400g) 和SnCl₂二水合物 (0.144g) 在EtOH/水 (7.25mL, 9:1) 中的溶液于室温下搅拌~3h。在反应完成 (TLC) 后, 反应混合物用60mL EtOAc稀释, 然后用饱和NH₄Cl (20mL) 和盐水 (20mL) 洗涤。有机相经Na₂SO₄干燥并浓缩, 得到粗产物, 其经硅胶 (Hex: 乙酸乙酯, 0%B-100%B) 快速层析纯化, 得到为无色油的化合物5 (0.220g, 67%得率)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ6.61 (s, 2H), 5.82 (brs, 1H), 5.16 (brs, 1H), 4.87 (m, 1H), 4.64 (s, 2H), 3.90-3.75 (m, 8H), 3.75-3.62 (m, 2H), 3.62-3.51 (m, 1H), 3.41-3.18 (m, 1H), 2.31-2.13 (m, 2H), 1.93-1.81 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.29 (d, 3H, J=6.6Hz); ESI MS: 理论值C₂₄H₃₆N₂O₁₀ (M+H) 513.2, 实测值413.2 (M-Boc+H)。

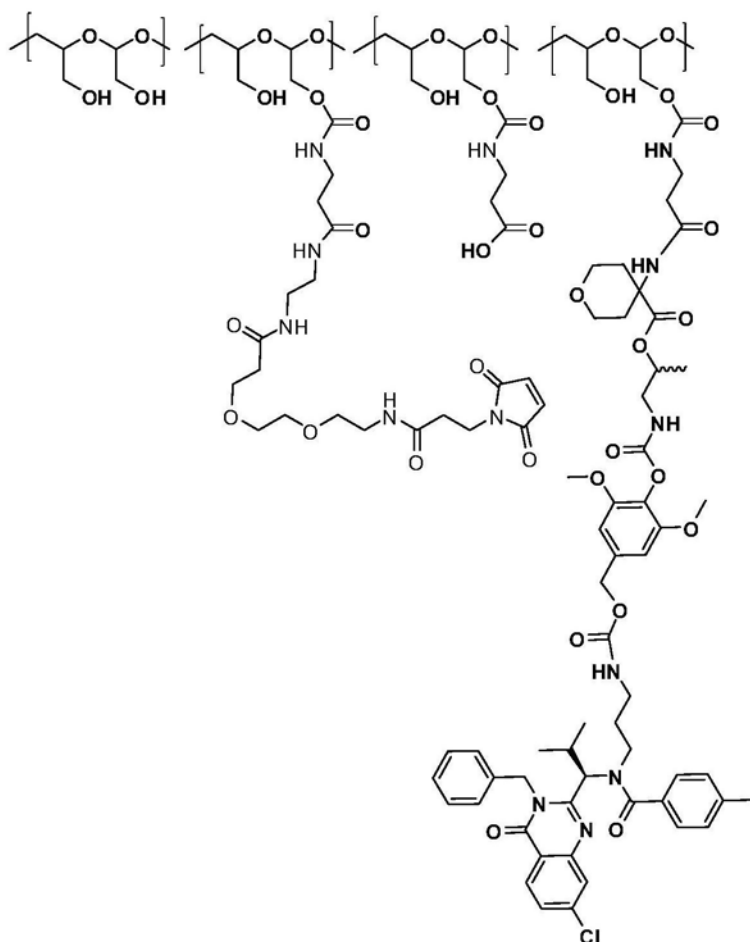
[1209] 化合物6: 向化合物5 (0.220g) 在2mL干燥THF的溶液中加入TEA (0.152g)。将混合物冷却至0℃并加入作为固体的对-硝基苯基氯代甲酸酯 (0.087g)。使该混合物温热至室温并搅拌~4h。加入另外的氯代甲酸酯 (~0.05g in ~1mL THF) 并将混合物搅拌过夜。反应混合物用30mL EtOAc稀释, 然后用饱和NH₄Cl (10mL), 接着盐水 (10mL) 洗涤。有机相经Na₂SO₄干燥并浓缩, 得到为油状物的粗产物。粗产物经硅胶 (己烷:EtOAc 0%B to 90%B) 快速选择纯化, 得到化合物6, 为无色固体 (0.257g, 88%得率)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ8.28 (d, 2H, J=9.3Hz), 7.39 (d, 2H, J=9.8Hz), 6.67 (s, 2H), 5.90 (brs, 1H), 5.23 (s, 2H), 5.21-5.13 (m, 1H), 4.87 (brs, 1H), 3.89-3.76 (m, 8H), 3.75-3.64 (m, 2H), 3.63-3.53 (m, 1H), 2.30-2.19 (m, 1H), 1.95-1.83 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.29 (d, 3H, J=6.7Hz); ESI MS: 理论值C₃₁H₃₉N₃O₁₄ (M+H) 678.2, 实测值578.2 (M-Boc+H)。

[1210] 化合物7: 向化合物6 (53.5mg) 的0.5mL干燥DMA的溶液中顺序加入伊匹尼塞 (37.1mg)、DIEA (9.27mg), 和HOAt (2.93mg)。于室温、氩气下, 将该混合物搅拌过夜。粗制反应混合物经制备型RP-HPLC (Hex: 乙酸乙酯50%B-90%B, 经25min, 0.1%TFA在两种流动相中) 纯化, 得到化合物7, 为无色固体 (64mg, 84%得率)。ESI MS: 理论值C₅₅H₆₇ClN₆O₁₃ (M+H) 1055.5, 实测值1055.4。

[1211] 化合物8: 在氩气下, 向化合物7 (64mg) 的2mL干燥DCM的冰冷却溶液中加入1mL TFA。移去冰浴并于室温下将该混合物搅拌1h, 此时LC/MS指示反应完成。经旋转蒸发除去溶剂并冻干残留物, 得到化合物8, 为无色固体 (64mg, 99%)。ESI MS: 理论值C₅₀H₅₉ClN₆O₁₁ (M+H) 955.4, 实测值955.3。

[1212] 实施例25合成10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.7%) - (THP-2-甲基-伊匹尼塞) (2.4%)

[1213]

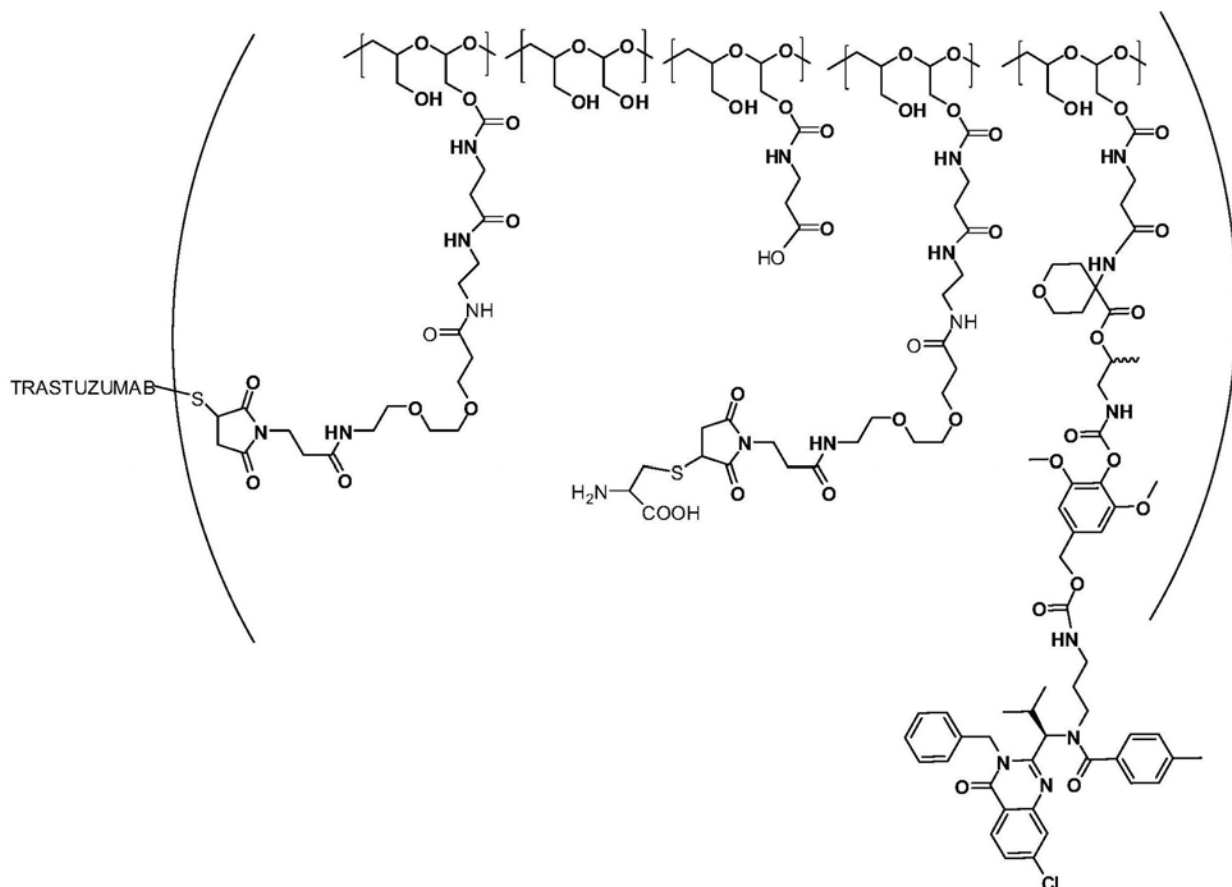


[1214] 标题化合物以类似于在实施例21中描述的方式,使用10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.7%) (58.9mg,以类似于在实施例2中描述的方式制备)和THP-2-甲基-伊匹尼塞 (10.0mg,以类似于在实施例24中描述的方式制备;46%得率(基于伊匹尼塞)制备。

[1215] 经UV测定的共轭产物的药物载荷(即,聚合物单元含有药物的含量)是2.4%mol的聚合物结构单元(或平均约1.7THP-2-甲基-伊匹尼塞分子/每聚合物链)。

[1216] 实施例26.合成曲妥珠单抗-(EG2-MI (2.7%)-(10kDa PHF-BA (28%)-(THP-2-甲基-伊匹尼塞) (2.4%))

[1217]

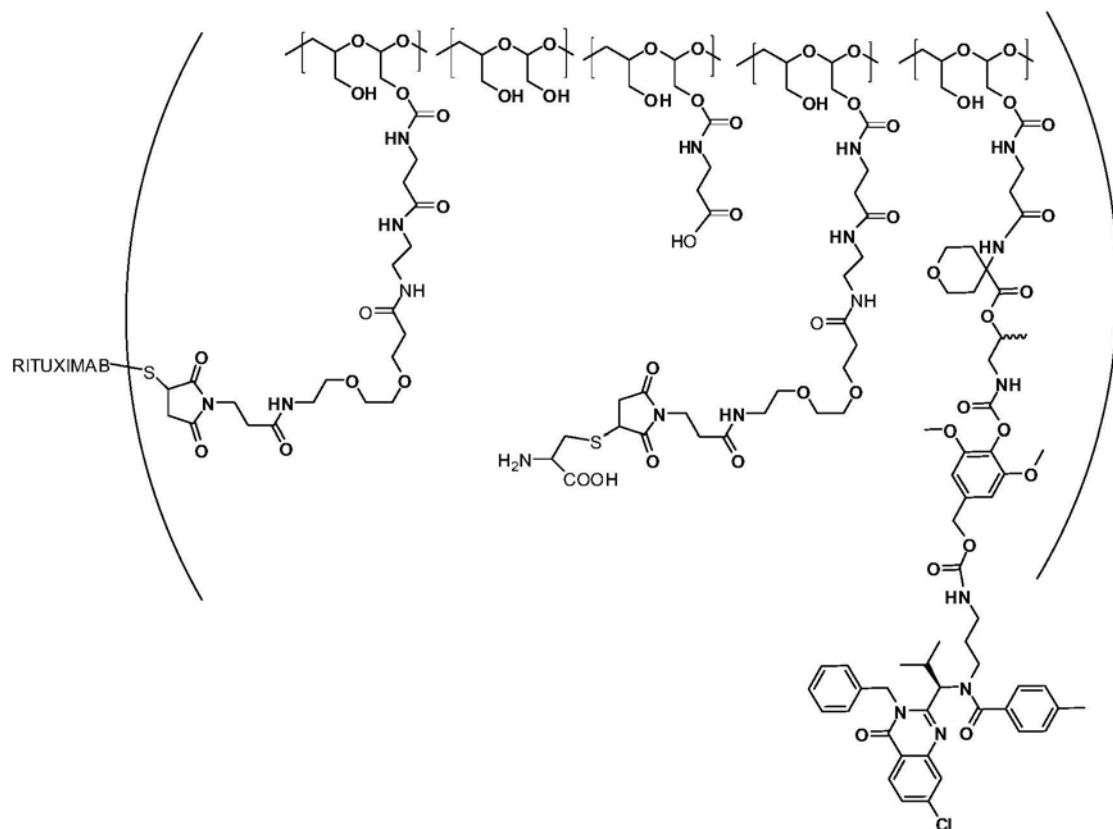


[1218] 标题化合物使用在实施例4或实施例7中描述的程序制备,除了使用10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.7%) - (THP-2-甲基-伊匹尼塞) (2.4%mg,以类似于在实施例2中描述的方式制备5)、曲妥珠单抗和TCEP:曲妥珠单抗3.5:1外。伊匹尼塞与曲妥珠单抗比例是约5:1至约8:1。PHF-药物共轭物与曲妥珠单抗的平均比例是约3:1至约4:1。

[1219] 其它PBRM-聚合物-药物共轭物用类似于上述程序的方法合成,包括如上所述的其它PBRM衍生物,例如,西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑珠单抗、林妥珠单抗、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。此外,具有不同比例的药物与PBRM的PBRM-聚合物-药物共轭物通过改变PBRM巯基的数目和药物-聚合物共轭物药物载荷而获得。

[1220] 实施例27.合成利妥昔单抗-((EG2-MI (2.7%) - (10kDa PHF-BA (28%) - (THP-2-甲基-伊匹尼塞) (2.4%))

[1221]

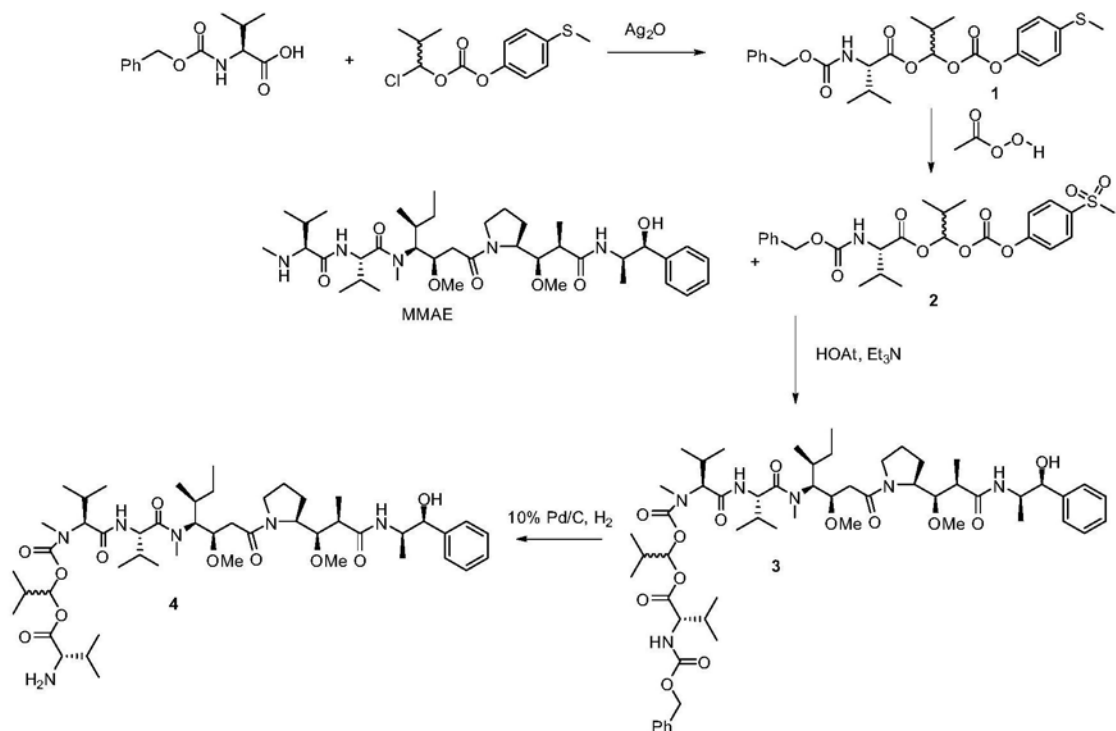


[1222] 标题化合物采用描述于实施例26中的程序制备,除了使用利妥昔单抗和TCEP:利妥昔单抗3.5:1外。伊匹尼塞与利妥昔单抗的平均比例是约4.5:1至约7:1。PHF-药物共轭物与曲妥珠单抗的平均比例是约2:1至约4:1。

[1223] 其它PBRM-聚合物-药物共轭物用类似于上述程序的方法合成,包括如上所述的其它PBRM衍生物,例如,西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑珠单抗、林妥珠单抗、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。此外,具有不同比例的药物与PBRM的PBRM-聚合物-药物共轭物通过改变PBRM巯基的数目和药物-聚合物共轭物药物载荷而获得。

[1224] 实施例28. 合成缬氨酸-酰氧基异丙氧基-MMAE

[1225]



[1226] 化合物1:将(S)-2-(苄氧基羰基氨基)-3-甲基丁酸(4.76g, 18.93mmol)、1-氯代-2-甲基丙基4-(甲硫基)苯基碳酸酯(2.6g, 9.46mmol)和一氧化一银(I)一银(III)(2.193g, 9.46mmol)于90℃加热1h。使反应混合物冷却至室温,用乙醚研磨残留物,并用乙醚洗涤固体。有机物用水(4X)、水性 NaHCO_3 洗涤,经 Na_2SO_4 干燥并浓缩至一种稻草色油。在DCM中的粗制油经硅胶(己烷:EtOAc 0%B-20%B)快速层析纯化,接着经C-18反相HPLC,使用用0.1% TFA缓冲的从20至95%乙腈的乙腈/水梯度液,得到无色油(2.78g, 60%得率)。化合物通过 ^1H , ^{13}C NMR和质谱表征, $\text{M/z}=490.3$ 。

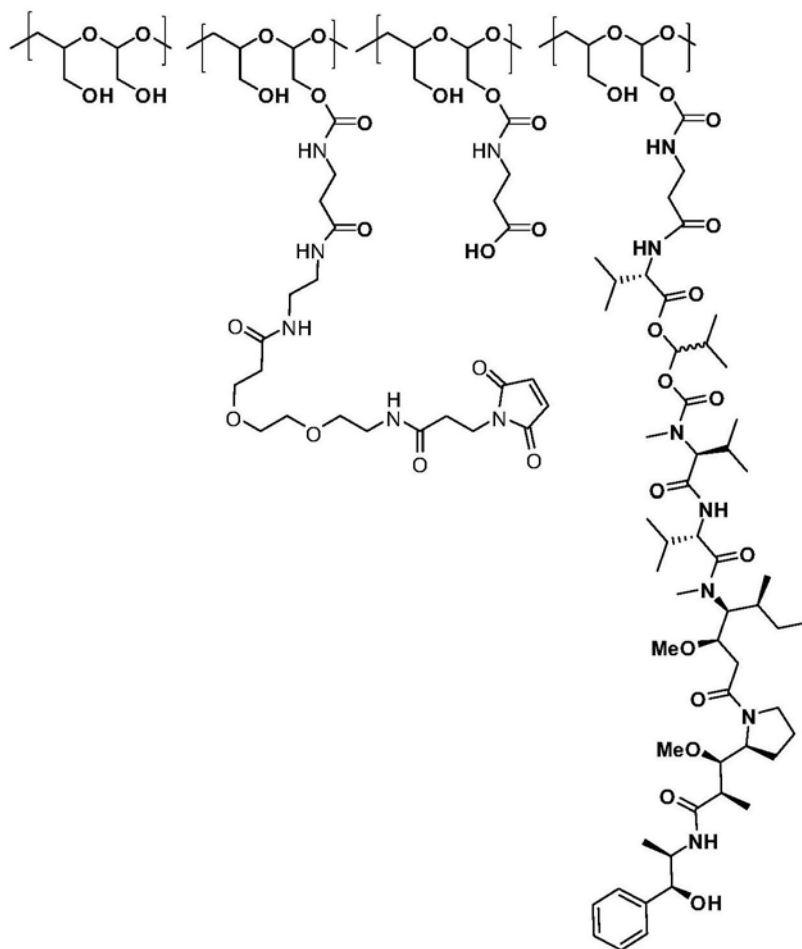
[1227] 化合物2:向化合物1(2.5g, 5.11mmol)的DCM(20ml)的冰冷却溶液中逐滴加入过乙酸的乙酸溶液(12.14g, 51.1mmol)并在加入完成后搅拌2h。反应经LC/MS监测。2h后,向该反应混合物中加入25mL水并搅拌冷却30min,有机物用100mL DCM稀释,用冰冷却的水(5x)、 NaHCO_3 水溶液洗涤,经 Na_2SO_4 干燥并浓缩。粗产物经硅胶(己烷:EtOAc 0%B-50%B)快速层析纯化。

[1228] 化合物3:合并MMAE(300mg, 0.418mmol)、化合物2(436mg, 0.836mmol)、3H-[1,2,3]三唑并[4,5-b]吡啶-3-醇水合物(129mg, 0.836mmol)和THF(25ml)并在冰浴中搅拌。向生成的混合物中加入三乙胺(0.291ml, 2.089mmol)并搅拌冷却15min,然后处于40℃直至如由LC/MS指示的反应完成。在4h后,反应混合物用乙酸乙酯稀释,用 NaHCO_3 水溶液、5%柠檬酸水溶液洗涤,经 Na_2SO_4 干燥,浓缩和通过反相色谱法纯化,得到作为TFA盐的化合物3,为白色无定形固体。LC/MS, $\text{M/z}=1067.6$ 。

[1229] 化合物4:向在THF(10ml)和EtOH(10.00ml)中的化合物3(150mg, 0.141mmol)鼓泡通入氩气。向该混合物中加入10%披钨碳(29.9mg, 0.028mmol),接着附接于氢气囊(0.283mg, 0.141mmol)并通过LC/MS监测反应。当反应完成时,混合物通过反相色谱法,使用用0.1% TFA缓冲的乙腈在水中的梯度液作为流动相来纯化,得到作为TFA盐的标题化合物,

为白色无定形固体 (56%得率)。M/z=933.6。

[1230] 实施例29合成10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.7%) - (缬氨酸-酰氧基异丙氧基-MMAE) (3%)

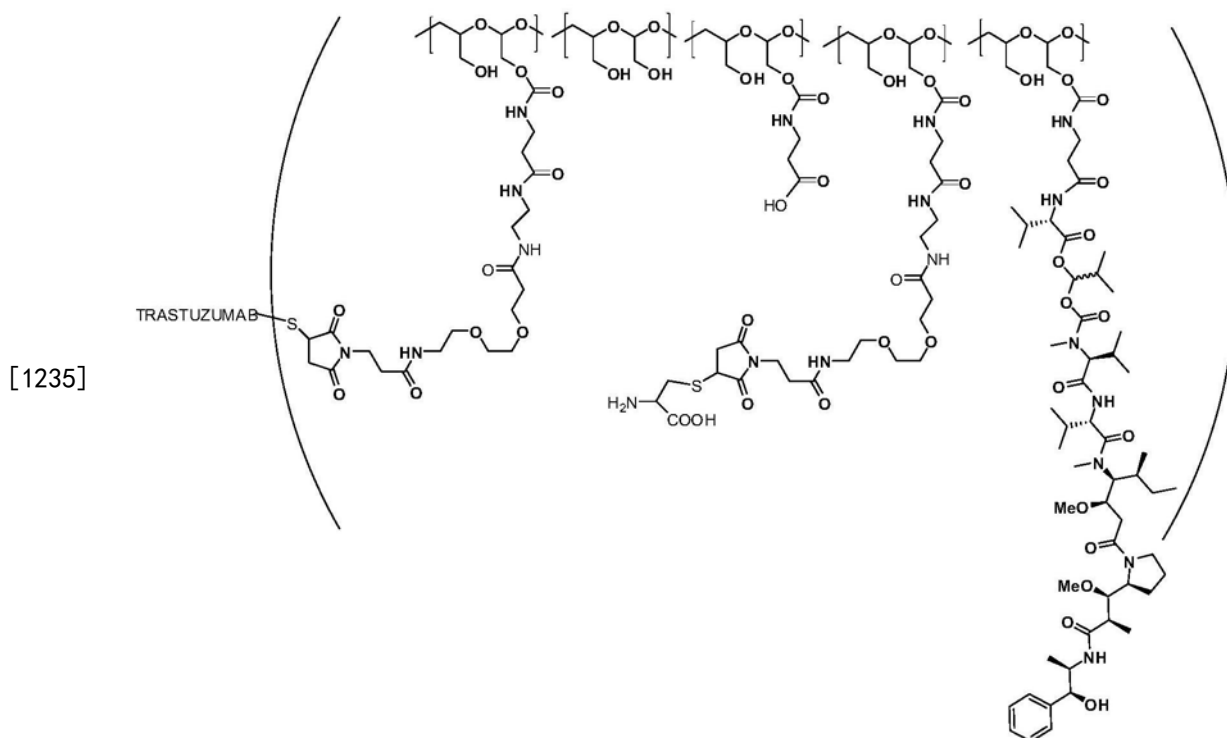


[1231]

[1232] 向10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.7%) (20mg, 以类似于在实施例2中描述的方式制备) 的1mL NMP溶液中加入缬氨酸-酰氧基异丙氧基-MMAE (9.98mg, 以类似于在实施例28中描述的方式制备)。向该混合物中加入HOAt (5.41mg)、EDC.HCl (7.62mg), 和DIEA (3.1mg)。将该反应混合物于室温下搅拌过夜, 然后缓慢加入到搅拌的NaCl (1%, ~50mL) 水溶液中。粗制混合物通过渗滤纯化, 得到标题化合物 (21%得率, 基于MMAE)。

[1233] 通过LC/MS测定的共轭产物的药物载荷 (即聚合物单元含有药物的含量) 是3.1% mol的聚合物结构单元 (或平均约2.2MMAE-val-异丙基-酰氧基异丙氧基分子/每聚合物链)。标题共轭物的分子量是约8.3kDa。

[1234] 实施例30. 合成曲妥珠单抗-((EG2-MI (2.7%) - (10kDa PHF-BA (28%) - (缬氨酸-酰氧基异丙氧基-MMAE) (3%))



[1236] 共轭物A:曲妥珠单抗-(EG2-MI (2.7%)-(10kDa PHF-BA (28%)-(缬氨酸-酰氧基异丙氧基-MMAE) (3%))使用在实施例4或实施例7中描述的程序制备,除了使用10K PHF-BA (28%)EG2-MI (2.7%)-(缬氨酸-酰氧基异丙氧基-MMAE (3%)) (5.6mg,以类似于在实施例2中描述的方式制备9),和TCEP TCEP:曲妥珠单抗3.5:1外。MMAE对曲妥珠单抗的平均比例是约11:1至约15:1。标题共轭物的分子量是约171kDa。

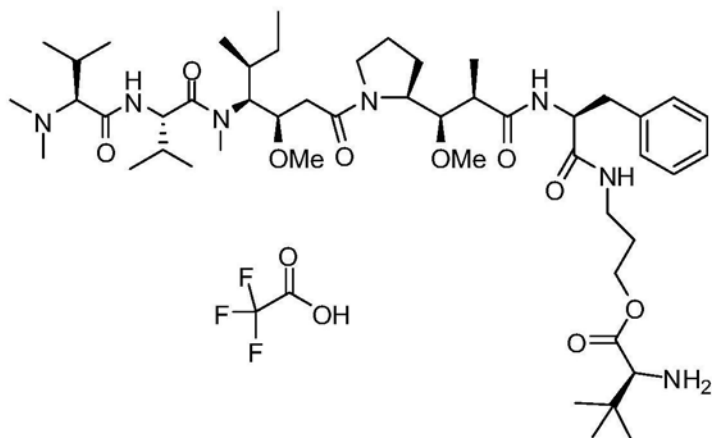
[1237] 共轭物B:曲妥珠单抗-(EG2-MI (2.7%)-(10kDa PHF-BA (28%)-(缬氨酸-酰氧基异丙氧基-MMAE) (9%))使用在实施例4或实施例7中描述的程序制备,除了使用10K PHF-BA (28%)EG2-MI (2.7%)-(缬氨酸-酰氧基异丙氧基-MMAE) (9%) (31.7mg,采用描述于实施例30中的程序制备)、曲妥珠单抗(57mg,TCEP:曲妥珠单抗3.5:1外。MMAE对曲妥珠单抗的平均比例是约12:1至约16.5:1。标题共轭物的分子量是约224kDa。

[1238] 共轭物C:利妥昔单抗-(EG2-MI (2.7%)-(10kDa PHF-BA (28%)-(缬氨酸-酰氧基异丙氧基-MMAE) (9%))通过在上述用于共轭物A的程序中取代还原的利妥昔单抗制备。MMAE与利妥昔单抗的比例是约9.5:1至约13:1。标题共轭物的分子量是约202kDa。

[1239] 其它PBRM-聚合物-药物共轭物用类似于上述程序的方法合成,包括如上所述的其它PBRM衍生物,例如,西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑珠单抗、林妥珠单抗、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。此外,具有不同比例的药物与PBRM的PBRM-聚合物-药物共轭物通过改变PBRM巯基的数目和药物-聚合物共轭物药物载荷而获得。

[1240] 实施例31.合成叔丁基甘氨酸AF-HPA三氟乙酸盐

[1241]

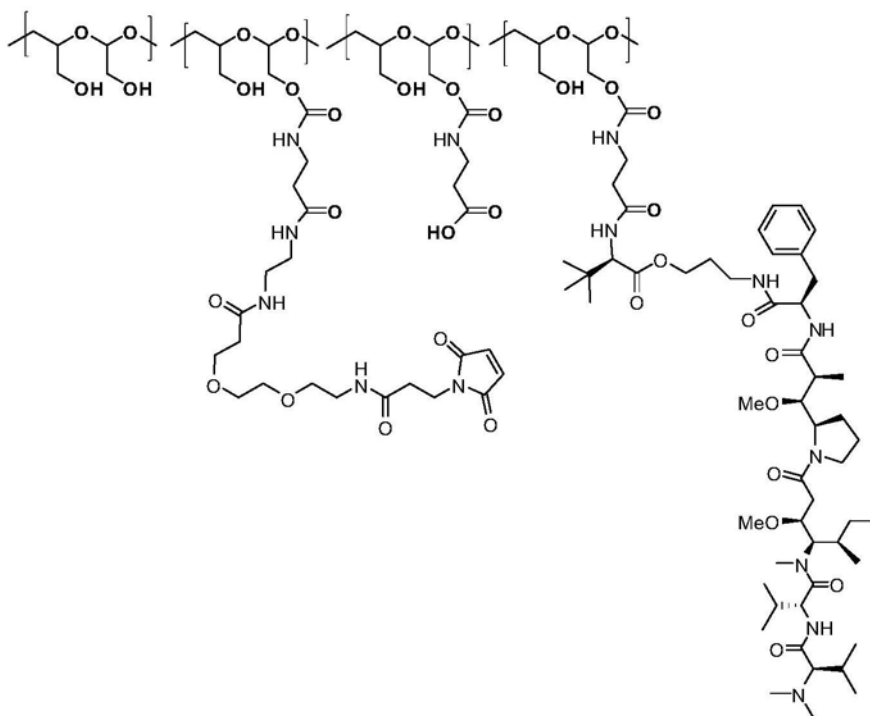


[1242] 向(R)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3,3-二甲基丁酸(67.6mg,0.292mmol)的DCM(5ml)的冰冷却溶液中加入DCC(0.046ml,0.292mmol)并将反应混合物搅拌冷却15-20min。分别冷却AF-HPA(134mg,0.146mmol,以类似于美国专利号8,685,383,实施例18中描述的方式制备)和DMAP(53.6mg,0.438mmol)的DCM(5ml)溶液,合并两种反应混合物,然后于室温下搅拌冷却20-30min。反应混合物通过LC/MS监测。4小时后LC/MS指示反应未完全。加入第二份激活的氨基酸活化DCC酯的等分液(1eq各自在DCM中)并于室温下将反应混合物搅拌过夜,接着使用含有0.1%TFA缓冲的流动相的从25至90%乙腈/水的梯度液进行HPLC纯化。获得作为TFA盐的AF-HPA-Boc-叔丁基甘氨酸,为白色无定形固体(85%得率)。M/z=1016.6。

[1243] 向AF-HPA-Boc-叔丁基甘氨酸(140mg,0.124mmol)的DCM(5ml)的冰冷却溶液中加入TFA(0.477ml,6.19mmol),然后于室温下将该反应混合物搅拌冷却1h,直至如经LC/MS指示的反应完成。浓缩混合物,生成的残留物经HPLC纯化法纯化,使用0.1%TFA缓冲的从10至90%乙腈的乙腈/水梯度液用作流动相。获得作为TFA盐的标题化合物,为白色无定形固体。M/z=917.6。

[1244] 实施例32合成10K PHF-BA(28%)EG2-MI(2.7%)-(叔丁基甘氨酸AF-HPA)(7.5%)

[1245]

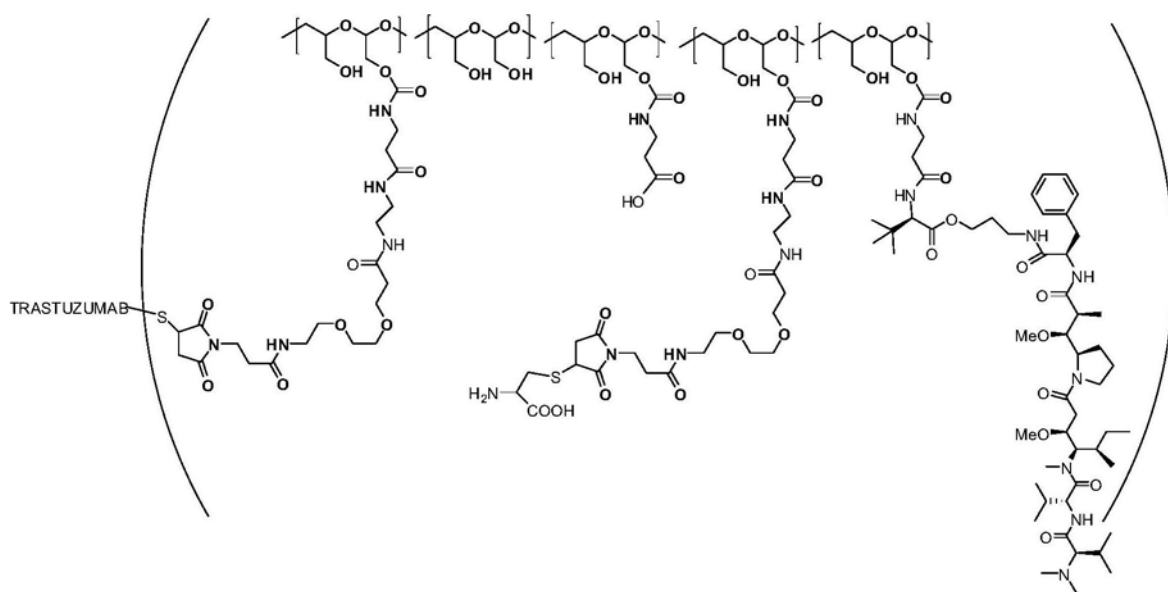


[1246] 向10K PHF-BA (28%) -PEG2-MI (2.7%) (137mg, 10.84 μ mol, 以类似于在实施例2中描述的方式制备) 在水 (5.5ml) 和NMP (1.375ml) 中的冰冷却溶液加入AF-HPA-叔丁基甘氨酸 (67mg, 0.065mmol, 以类似于实施例31中描述的方式制备) 并将生成的混合物搅拌冷却15min, 接着加入1-羟基吡咯烷-2,5-二酮 (15.59mg, 0.135mmol)。向反应混合物中加入EDAC (51.9mg, 0.271mmol)。在30min后, 第二次加入相同量的试剂。4h后, 用0.1N NaHCO₃将pH调节至5.6, 加入额外的等分液的EDAC (50mg) 并将反应混合物搅拌过夜。产物通过凝胶过滤和反相HPLC纯化。

[1247] 通过¹H-NMR测定的共轭产物的药物载荷 (即, 聚合物单元含有药物的含量) 是7.5%mol的聚合物结构单元 (或平均约5.7叔丁基甘氨酸AF-HPA分子/每聚合物链)。

[1248] 实施例33. 合成曲妥珠单抗-((EG2-MI (2.7%) - (10kDa PHF-BA (28%) - (叔丁基甘氨酸AF-HPA) (7.5%))

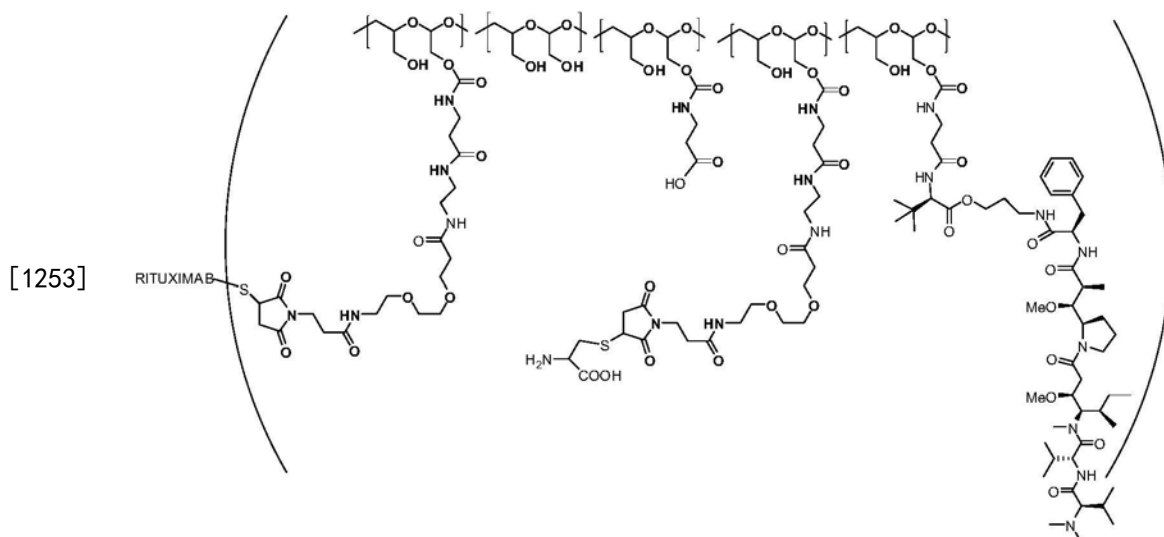
[1249]



[1250] 标题化合物使用在实施例4或实施例7中描述的程序制备, 除了使用10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.7%) - (叔丁基甘氨酸AF-HPA) (7.5%) (45.7mg, 以类似于实施例32中描述的方式制备)、曲妥珠单抗TCEP: 曲妥珠单抗3.5:1外。AF-HPA与曲妥珠单抗的比例是约4:1至约6:1。PHF-药物共轭物与曲妥珠单抗的平均比例是约2:1至约4:1。标题共轭物的分子量是约215kDa。

[1251] 其它PBRM-聚合物-药物共轭物用类似于上述程序的方法合成, 包括如上所述的其它PBRM衍生物, 例如, 西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑珠单抗、林妥珠单抗、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。此外, 具有不同比例的药物与PBRM的PBRM-聚合物-药物共轭物通过改变PBRM巯基的数目和药物-聚合物共轭物药物载荷而获得。

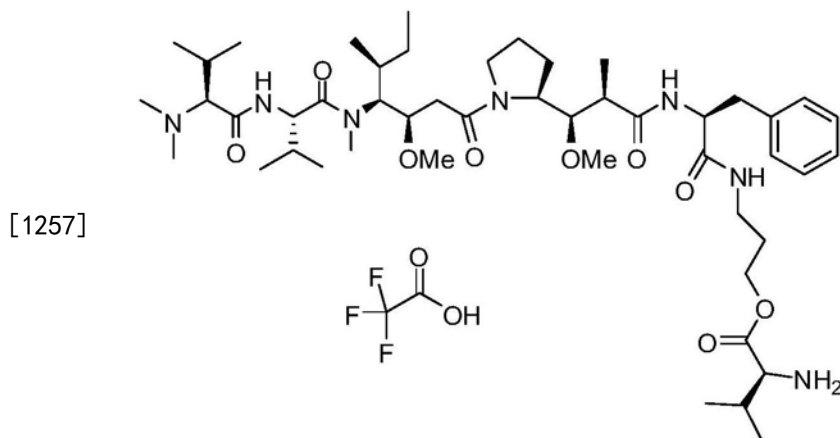
[1252] 实施例34. 合成利妥昔单抗-((EG2-MI (2.7%) - (10kDa PHF-BA (28%) - (叔丁基甘氨酸-AF-HPA) (7.5%))



[1254] 标题化合物采用描述于实施例33的程序制备,除了使用利妥昔单抗和TCEP:利妥昔单抗3.5:1外。平均AF-HPA与利妥昔单抗比例是约2.5:1至约3.5:1。PHF-药物共轭物与曲妥珠单抗的平均比例是约2:1至约4:1。标题共轭物的分子量是约202kDa。

[1255] 其它PBRM-聚合物-药物共轭物用类似于上述程序的方法合成,包括如上所述的其它PBRM衍生物,例如,西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑单抗、林妥珠单抗、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。此外具有不同比例的药物与PBRM的PBRM-聚合物-药物共轭物通过改变PBRM巯基的数目和药物-聚合物共轭物药物载荷而获得。

[1256] 实施例35. 合成val-AF-HPA三氟乙酸盐

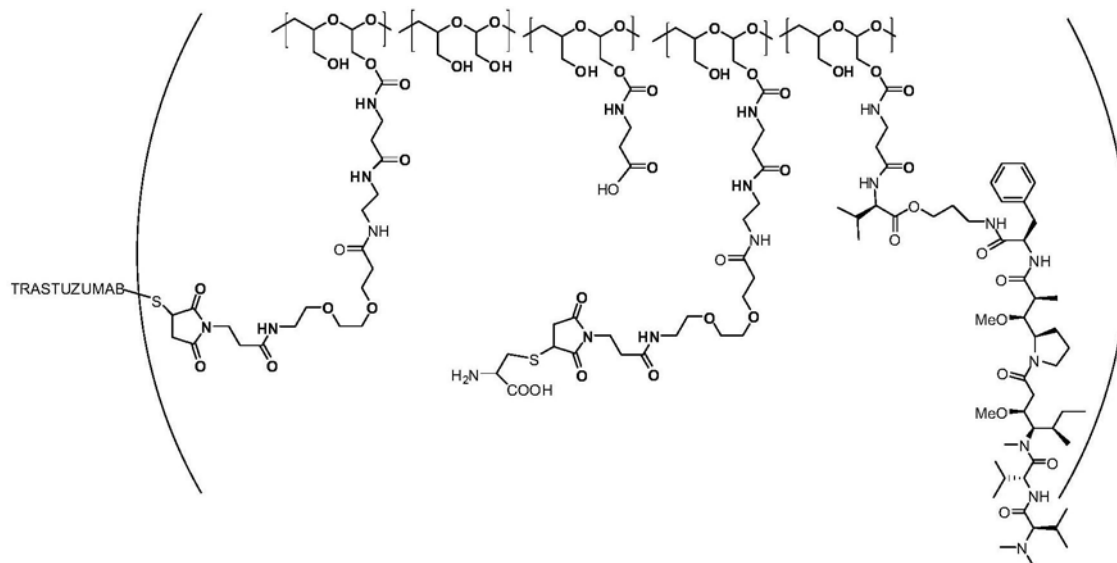


[1258] AF-HPA-Boc-缬氨酸以类似于在实施例31中描述的方式制备,除了使用((R)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-甲基丁酸(63.5mg, 0.292mmol)外。获得作为TFA盐的AF-HPA-Boc-缬氨酸,为白色无定形固体(85%得率)。M/z=1002.6。

[1259] 标题化合物以类似于在实施例31中描述的方式制备,除了使用AF-HPA-Boc-缬氨酸(128mg, 0.115mmol)外,得到106mg, 91%得率。M/z=903.3。

[1260] 实施例36. 合成曲妥珠单抗-((EG2-MI (2.7%)-(10kDa PHF-BA (28%)-(val-AF-HPA) (7.2%))

[1261]

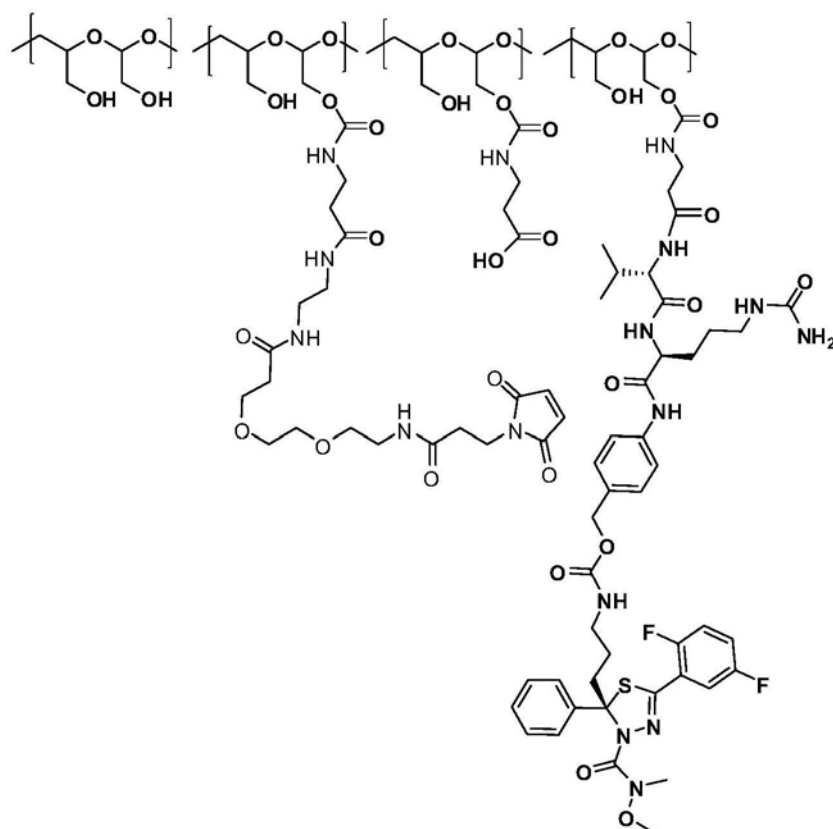


[1262] 标题化合物使用在实施例4或实施例7中描述的程序制备,除了使用10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.7%) - (val AF-HPA) (7.2%) (52.3mg,采用描述于实施例32中的程序制备)、曲妥珠单抗和TCEP:曲妥珠单抗3.5:1外。AF-HPA与曲妥珠单抗的比例是约14.5:1至约20:1。PHF-药物共轭物与曲妥珠单抗的平均比例是约2:1至约4:1。标题共轭物的分子量是约235kDa。

[1263] 其它PBRM-聚合物-药物共轭物用类似于上述程序的方法合成,包括如上所述的其它PBRM衍生物,例如,西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑珠单抗、林妥珠单抗、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。此外,具有不同比例的药物与PBRM的PBRM-聚合物-药物共轭物通过改变PBRM巯基的数目和药物-聚合物共轭物药物载荷而获得。

[1264] 实施例37. 合成10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.7%) - (Val-Cit-PABA-Array 520) (2.9%)

[1265]

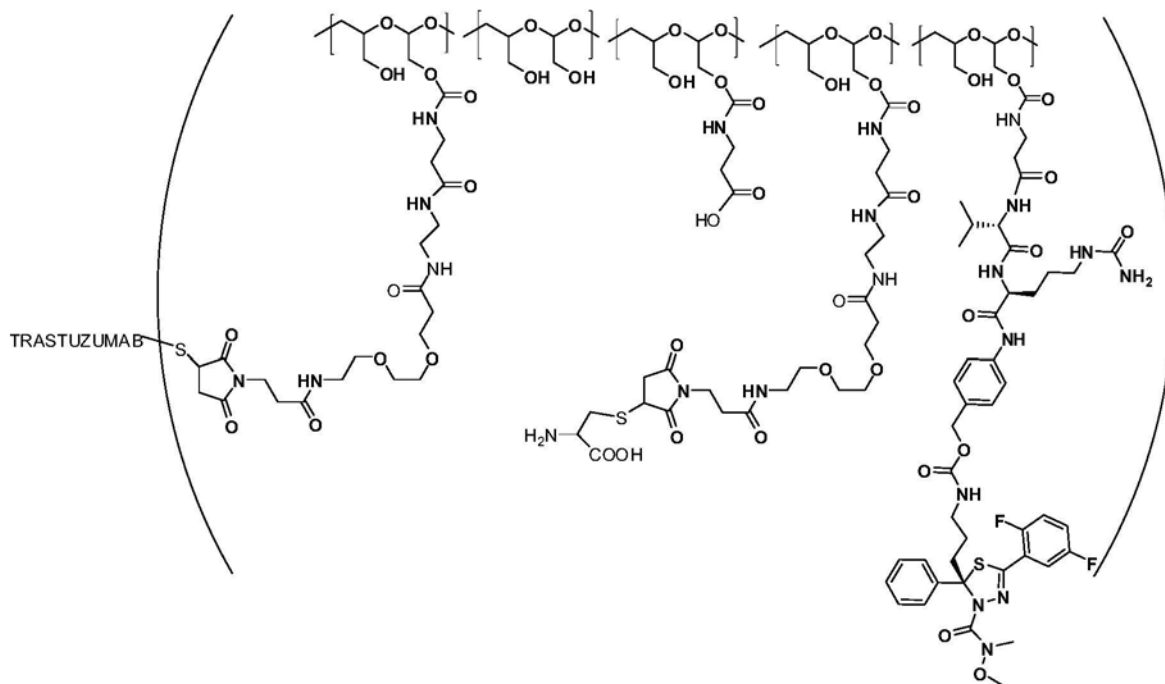


[1266] 向10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.7%) - (252mg, 以类似于在实施例2中描述的方式制备) 的23mL NMP溶液中加入在NMP (1mL) 中的Array 520-PABA-Val-Cit-NH₂ (37.6mg, 采用描述于美国专利号8,815,226, 实施例84中的程序制备)。向该混合物中加入在NMP (1mL) 中的HATU (22.8mg), 接着加入DIEA (20.7mg)。于室温下将该反应混合物搅拌30min。粗制混合物通过渗滤纯化, 得到标题化合物 (47%得率, 基于Array 520)。

[1267] 经UV测定的共轭产物的药物载荷 (即, 聚合物单元含有药物的含量) 是2.9%mol的聚合物结构单元 (或平均约2.1Array520-PABA-Val-Cit分子/每聚合物链)。标题共轭物的分子量是约9.0kDa。

[1268] 实施例38. 合成曲妥珠单抗-((EG2-MI (2.7%) - (10kDa PHF-BA (28%) - (Val-Cit-PABA-Array 520 (2.9%))

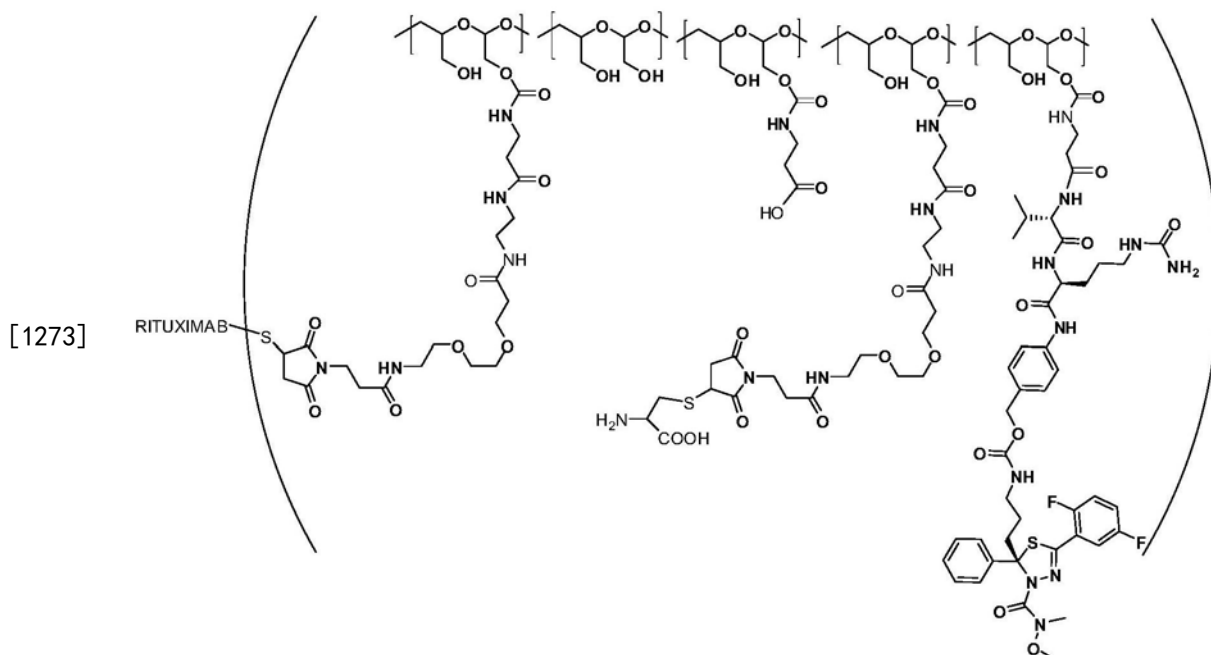
[1269]



[1270] 标题化合物使用在实施例4或实施例7中描述的程序制备,除了使用10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.7%) - (Val-Cit-PABA-Array 520) (2.9%) (55.6mg,以类似于实施例38中描述的方式制备)、曲妥珠单抗和TCEP:曲妥珠单抗2.5:1外。Array 520与曲妥珠单抗的比例是约4:1至约6:1。标题共轭物的分子量是约245kDa。PHF-药物共轭物与曲妥珠单抗的平均比例是约2:1至约4:1。

[1271] 其它PBRM-聚合物-药物共轭物用类似于上述程序的方法合成,包括如上所述的其它PBRM衍生物,例如,西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑珠单抗、林妥珠单抗、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。此外,具有不同比例的药物与PBRM的PBRM-聚合物-药物共轭物通过改变PBRM巯基的数目和药物-聚合物共轭物药物载荷而获得。

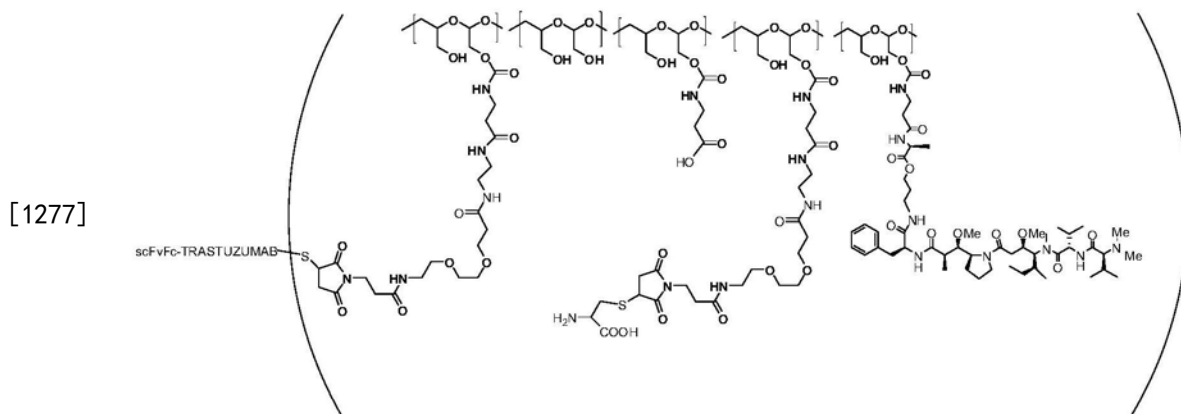
[1272] 实施例39.合成利妥昔单抗-(EG2-MI (2.7%) - (10kDa PHF-BA (28%) - (Val-Cit-PABA-Array 520 (2.9%))



[1274] 标题化合物采用描述于实施例38中的程序制备,除了使用利妥昔单抗和TCEP:利妥昔单抗2.5:1外。Array 520与利妥昔单抗的平均比例是约4:1至约6:1。标题共轭物的分子量是约231kDa。PHF-药物共轭物与曲妥珠单抗的平均比例是约2:1至约4:1。

[1275] 其它PBRM-聚合物-药物共轭物用类似于上述程序的方法合成,包括如上所述的其它PBRM衍生物,例如,西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑单抗、林妥珠单抗、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。此外,具有不同比例的药物与PBRM的PBRM-聚合物-药物共轭物通过改变PBRM巯基的数目和药物-聚合物共轭物药物载荷而获得。

[1276] 实施例40. 合成sc-FvFc-曲妥珠单抗-((EG2-MI (2.8%)-(10kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (8%))



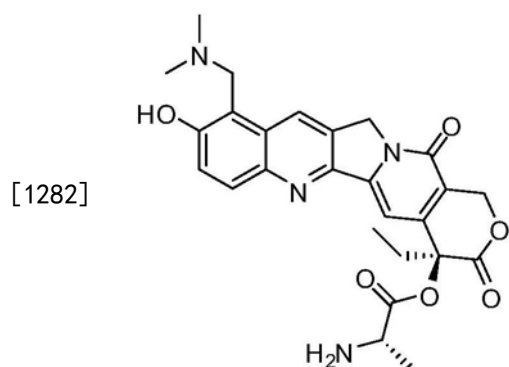
[1278] 标题化合物(“scFvFc-曲妥珠单抗聚合物药物共轭物”,或“曲妥珠单抗scADC”)以类似于如在实施例4或实施例7中描述的方式制备,除了使用10K PHF-BA (28%)-EG2-MI (2.8%)-AF-HPA-Ala (8%) (2.2mg,以类似于实施例3或实施例6中描述的方式制备)和scFvFc曲妥珠单抗抗体和TCEP:scFvFc曲妥珠单抗抗体3:1外。scFvFc曲妥珠单抗抗体(曲妥珠单抗单链抗体-Fc融合蛋白)的序列如在Olafsen等(Cancer Res.65(13):5907-16, 2005)中公开的在恒定区有3处修饰:铰链具有一个突变(C->S),以消除通常与常数轻链键

合的未配对的半胱氨酸 (Yang和Rader, scFv-Fc形式的单克隆抗体的克隆、表达和纯化 (Cloning, Expression, and Purification of Monoclonal Antibody in at scFv-Fc Format)。抗体方法和方案 (Antibody Methods and Protocols). Proetzel和Ebersback编辑, 2012)。两个其它的修饰也在IgG1序列中。Olafsen等2005, 创建了曲妥珠单抗-scFv-Fc (H310A, H435Q) 双突变以为了改进图像目的而缩短抗体片段的半衰期。修饰被恢复回到规范的IgG1序列。

[1279] AF-HPA与scFvFc曲妥珠单抗抗体的比例是约14:1至约19:1。标题共轭物的分子量是约182kDa。PHF-药物共轭物与scFvFc曲妥珠单抗抗体的平均比例是约2:1至约4:1。

[1280] 其它PBRM-聚合物-药物共轭物用类似于上述程序的方法合成, 包括其它PBRM衍生物, 例如, 西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑珠单抗、林妥珠单抗、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。此外, 具有不同比例的药物与PBRM的PBRM-聚合物-药物共轭物通过改变PBRM巯基的数目和药物-聚合物共轭物药物载荷而获得。

[1281] 实施例41. 托泊替康-丙氨酸

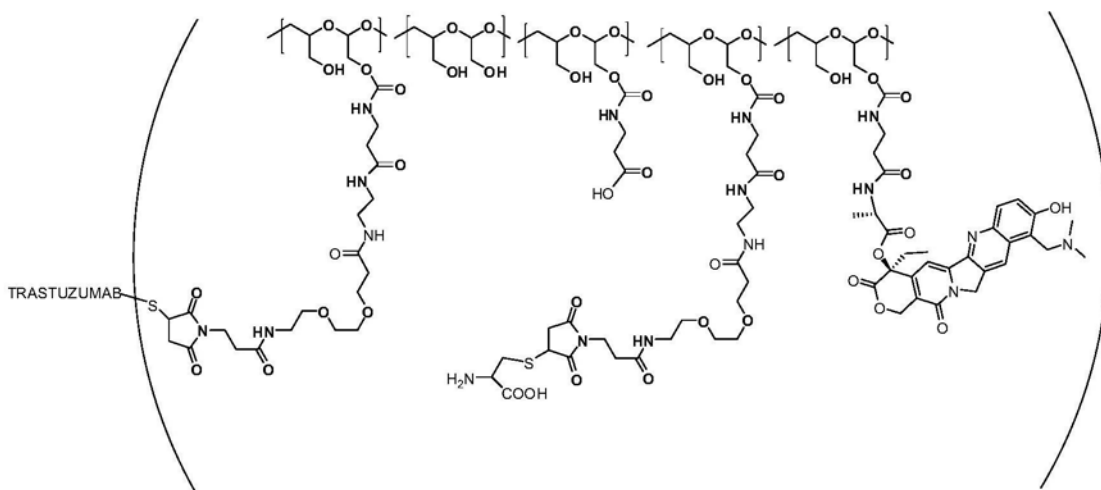


[1283] 使托泊替康 (0.500g, 1.19mmol)、BOC-ala-OH (0.449g, 2.37mmol) 和N,N-二甲基吡啶-4-胺 (0.145g, 1.19mmol) 溶于无水CH₂Cl₂ (5.93mL) 中。加入在无水CH₂Cl₂ (1mL) 中的N,N'-甲烷二亚基二环己胺 (methenediylidenedicyclohexylamine) (DCC) (0.580g, 2.81mmol) 并将混合物于室温下搅拌18小时。加入额外的DCC (300mg, 1.45mmol) 并将混合物搅拌48小时。经由过滤除去固体并用0.1N HCl (2x 5mL)、水 (5mL), 和盐水 (5mL) 洗涤溶液, 然后经MgSO₄干燥, 接着经RP-HPLC, 用0.1% TFA/CH₃CN:0.1% TFA/水 (combiflash, C18, 100G柱; 5min 0%B, 经20min升至100%B) 洗脱, 得到为固体的托泊替康-BOC-丙氨酸 (186.6mg, 0.315mmol, 26.5%得率)。

[1284] 使托泊替康-BOC-丙氨酸 (186.6mg, 0.315mmol) 溶于无水CH₂Cl₂ (1.5mL) 中。加入2,2,2-三氟乙酸 (1.205mL, 15.74mmol) 并将混合物于室温下搅拌1小时, 接着经RP-HPLC (C18, HPLC, 用0.1% TFA:AcN/0.1% TFA洗脱; Water), 得到标题化合物, 为橙色/黄色固体 (93.0mg, 0.189mmol, 60.0%得率)。

[1285] 实施例42. 合成曲妥珠单抗-((EG2-MI (2.4%) - (10kDa PHF-BA (22.3%) - (托泊替康丙氨酸) (6.5%))

[1286]



[1287] 共轭物A:曲妥珠单抗-(EG2-MI (2.4%)-(10kDa PHF-BA (22.3%)-(托泊替康丙氨酸) (6.5%))使用在实施例4或实施例7中描述的程序制备,除了使用10K PHF-BA (22.3%)EG2-MI (2.4%)-(托泊替康丙氨酸) (6.5%) (19.3mg,具有平均约4.2托泊替康分子/每聚合物链,使用描述于实施例3或实施例6中的程序制备)、曲妥珠单抗和TCEP:曲妥珠单抗3:1外。标题共轭物的分子量是约256kDa。托泊替康对曲妥珠单抗的平均比例是约19:1至约26:1。PHF-药物共轭物与曲妥珠单抗的平均比例是约2:1至约5:1。

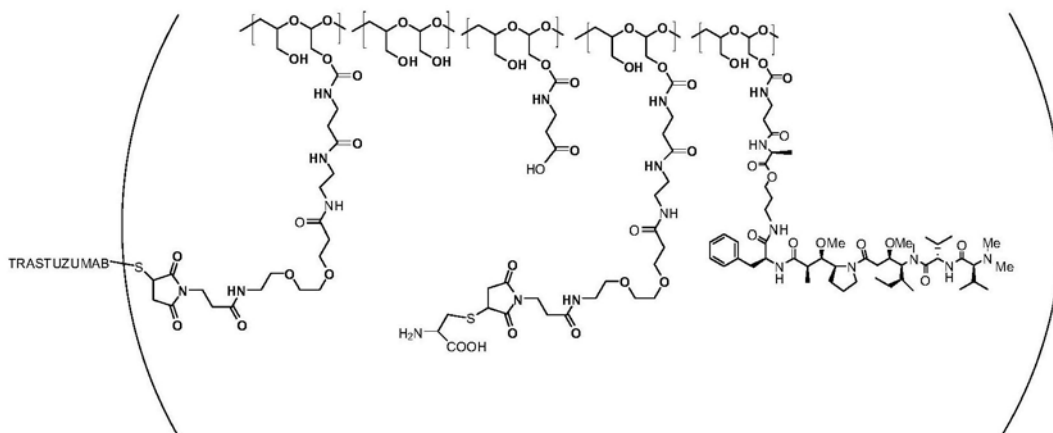
[1288] 共轭物B:利妥昔单抗-(EG2-MI (2.4%)-(10kDa PHF-BA (22.3%)-(托泊替康丙氨酸) (13%))通过上述的程序中取代还原的利妥昔单抗来制备。标题共轭物的分子量是约212kDa。PHF-药物共轭物与利妥昔单抗的平均比例是约16:1至约22:1。

[1289] 曲妥珠单抗-(EG2-MI)-(10kDa PHF-BA)-(托泊替康缬氨酸)使用上述的程序制备,除了采用描述于实施例41中的程序制备的10K PHF-BA EG2-MI-(托泊替康缬氨酸)外。

[1290] 其它PBRM-药物共轭物用类似于上述程序的方法合成,包括如上所述的其它PBRM衍生物,例如,西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑珠单抗、林妥珠单抗、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。此外,具有不同比例的药物与PBRM的PBRM-药物共轭物通过改变PBRM巯基和药物载荷的数目而获得。

[1291] 实施例43.合成曲妥珠单抗-(EG2-MI (2.8%)-(10kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (7.3%))

[1292]



[1293] 标题化合物使用在实施例4或实施例7中描述的程序制备,除了使用10K PHF-BA (28%)EG2-MI (2.8%)-(HPV-Ala (7.2%)) (8.36mg,以类似于实施例3或实施例6中描述的方

式制备)、曲妥珠单抗和TCEP:曲妥珠单抗2.5:1外。

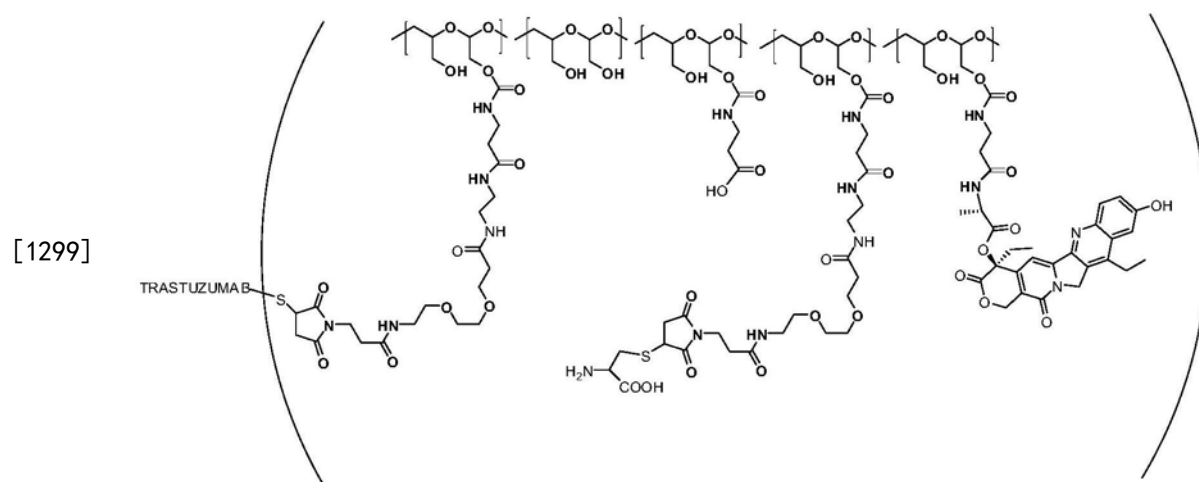
[1294] 共轭物A:曲妥珠单抗-((EG2-MI (2.8%)-(10kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-A1a (7.3%)))。AF-HPA与曲妥珠单抗的比例是约6:1至约9:1。标题共轭物的分子量是约183kDa。PHF-药物共轭物与曲妥珠单抗的平均比例是约2:1至约4:1。

[1295] 共轭物B:曲妥珠单抗-((EG2-MI (2.5%)-(10kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-A1a (8.4%)))以类似于如以上对该实施例描述的方式制备,除了使用10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.5%)-(HPV-A1a (8.4%)) (以类似于实施例3或实施例6中描述的方式制备)、曲妥珠单抗和TCEP:曲妥珠单抗3.5:1外。AF-HPA与曲妥珠单抗的比例是约12:1至约17:1。标题共轭物的分子量是约218kDa。PHF-药物共轭物与曲妥珠单抗的平均比例是约2:1至约4:1。

[1296] 共轭物C:曲妥珠单抗-((EG2-MI (2.5%)-(10kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-A1a (8.4%)))以类似于如在该实施例中描述的方式制备,除了使用10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.8%)-(HPV-A1a (8.4%)) (以类似于实施例3或实施例6中描述的方式制备)、曲妥珠单抗和TCEP:曲妥珠单抗2.75:1外。AF-HPA与曲妥珠单抗的比例是约12:1至约16:1。标题共轭物的分子量是约247kDa。PHF-药物共轭物与曲妥珠单抗的平均比例是约2:1至约4:1。

[1297] 其它PBRM-聚合物-药物共轭物用类似于上述的程序的方法合成,包括其它PBRM衍生物,例如,西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑珠单抗、林妥珠单抗、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。此外,具有不同比例的药物与PBRM的PBRM-聚合物-药物共轭物通过改变PBRM巯基的数目和药物-聚合物共轭物药物载荷而获得。

[1298] 实施例44.合成曲妥珠单抗-((EG2-MI)-(10kDa PHF-BA)-(SN38丙氨酸)



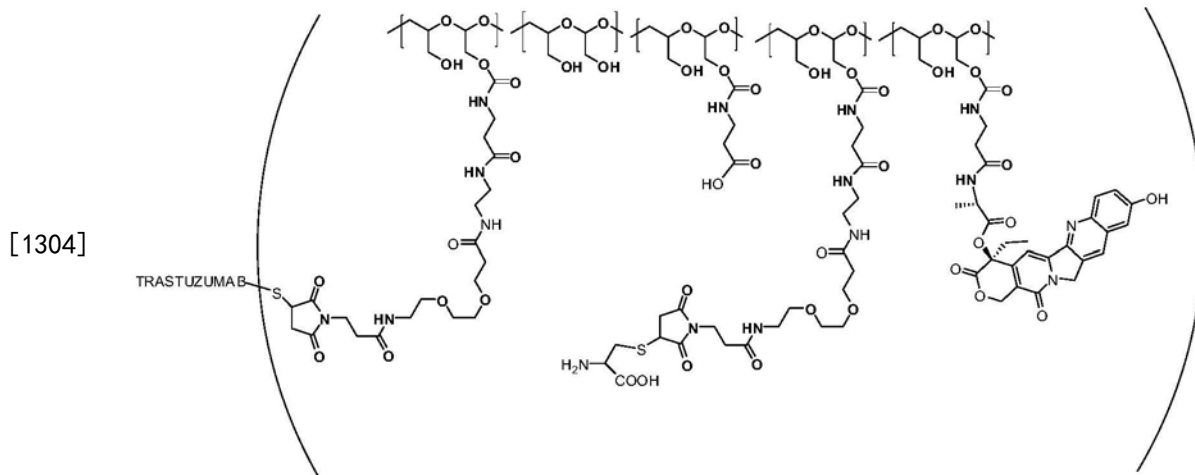
[1300] 标题化合物采用描述于实施例42中的程序制备,除了使用采用描述于实施例42和41中的程序制备的10K PHF-BA EG2-MI-(SN38丙氨酸)外。

[1301] 曲妥珠单抗-((EG2-MI)-(10kDa PHF-BA)-(SN-38缬氨酸)使用上述的程序制备,除了使用采用描述于实施例42和41中的程序制备的10K PHF-BA EG2-MI-(SN-38缬氨酸)外。

[1302] 其它PBRM-聚合物-药物共轭物用类似于上述的程序的方法合成,包括其它PBRM衍生物,例如,西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑珠单抗、林妥珠单抗、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。此外,具有不同比例的药物与PBRM的

PBRM-聚合物-药物共轭物通过改变PBRM巯基的数目和药物-聚合物共轭物药物载荷而获得。

[1303] 实施例45. 合成曲妥珠单抗-((EG2-MI)-(10kDa PHF-BA)-(喜树碱-丙氨酸))



[1305] 标题化合物可采用描述于实施例42中的程序制备,除了使用采用描述于实施例42和41中的程序制备的10K PHF-BA EG2-MI-(喜树碱丙氨酸)外。

[1306] 曲妥珠单抗-((EG2-MI)-(10kDa PHF-BA)-(喜树碱缬氨酸))使用上述程序制备,除了使用采用描述于实施例41和42中的程序制备的10K PHF-BA EG2-MI-(喜树碱缬氨酸)外。

[1307] 其它PBRM-聚合物-药物共轭物用类似于上述的程序合成,包括其它PBRM衍生物,例如,西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐珠单抗、尼妥珠单抗、吉姆单抗、阿仑珠单抗、林妥珠单抗、抗-5T4或抗-间皮素抗体的部分还原的形式。此外,具有不同比例的药物与PBRM的PBRM-聚合物-药物共轭物通过改变PBRM巯基的数目和药物-聚合物共轭物药物载荷而获得。

[1308] 实施例46. 用于PBRM-聚合物-药物共轭物的细胞存活力分析

[1309] 使用Cell Titer-Glo (Promega Corp) 对PBRM-聚合物-药物共轭物的抗增殖特性在体外肿瘤细胞系进行评估。将细胞置于黑壁96-孔板内,并且在5%CO₂的湿润气氛中,在37℃下,使其附着过夜。以每孔5,000个细胞的密度,平板培养SKBR3、BT474、NCI-N87细胞(HER2表达细胞)、MCF7细胞(HER2低表达水平细胞)和JIMT1细胞(HER2培养基表达水平细胞)。第二天,用50μL新鲜的培养基替代培养基,并且将50μL的两份(2x)的PBRM-聚合物-药物共轭物的储备物、药物聚合物共轭物或药物加入到适当的孔中,混合并孵育72h。在室温下,将Cell Titer-Glo试剂添加至各孔中,并且在10min后使用SpectraMax M5平板读出仪(Molecular Devices)测量发光信号。使用SoftMax Pro软件生成剂量反应曲线。从四参数曲线拟合(four-parameter curve fitting)确定IC₅₀值。

[1310] CD33表达细胞HL-60以每孔5,000个细胞的密度通过并在同一天用PBRM-聚合物-药物共轭物处理。72h培养后,使用相同的上述程序分析细胞。

[1311] OVCAR-3、TF-1α和HCT-15表达细胞经平板培养并使用相同的上述程序分析。

[1312] 平板培养5T4表达细胞系A431(A431,一种从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(ATCC),Manassas Virginia US,以登录号ATCC®CRL-1555获得的表皮样癌细胞系);PC3(一种人前列腺细胞系,ATCC®CRL-1435)、MDAMB231-5T40E和靶标阴性对照细胞系LLC1表达细胞(对5T4表达为阴性的肺细胞癌细胞)并使用相同的上

述程序分析。“MDAMB231-5T40E”指重组MDA-MB-231细胞过度表达5T4(经稳定转染生成;公开于2013年6月17日提交的美国临时申请号61/835,858中,其通过引用结合到本文中)。

[1313] 表I-III是PBRM-聚合物-药物共轭物在HER2表达细胞(表I)、CD33表达细胞(表II)或者5T4表达细胞(表III)中的抗增殖性质的示例性结果。

[1314] 表IV是药物、AF-HPA在OVCAR-3和TF-1 α 细胞系中的抗增殖特性的示例性结果。

[1315] 表I列出PBRM-聚合物-药物共轭物曲妥珠单抗-(EG2-MI (3%))-(10kDa PHF-BA (30%))-(AF-HPA-Ala (8%)), (AF-HPA:曲妥珠单抗约12:1-17:1), 实施例4;曲妥珠单抗-(EG2-MI (2%))-(10kDa PHF-BA (30%))-(AF-HPA-Ala (9%)), (AF-HPA:曲妥珠单抗约16:1至约21:1), 实施例7;曲妥珠单抗-(EG2-MI (1%))-(10kDa PHF-GA (29%))-(AF-HPA-Ala (6%)), (AF-HPA:曲妥珠单抗约18:1至约23:1), 实施例13;曲妥珠单抗-(EG2-MI (2%))-(10kDa PHF-BA (28%))-(AF-HPA-Ala (9%)), (AF-HPA:曲妥珠单抗约10:1至约15:1), 实施例14;曲妥珠单抗-(EG2-MI (2%))-(10kDa PHF-BA (28%))-(AF-HPA-Ala (9%)), (AF-HPA:曲妥珠单抗约11:1至约16:1), 实施例15;和利妥昔单抗-(EG2-MI (2%))-(10kDa PHF-BA (28%))-(AF-HPA-Ala (9%)), (AF-HPA:曲妥珠单抗约13:1至约18:1), 实施例16;曲妥珠单抗-(EG2-MI (2%))-(10kDa PHF-BA (28%))-(AF-HPA-Ala (9%)), (AF-HPA:曲妥珠单抗约5:1至约10:1), 实施例17;曲妥珠单抗-(EG2-MI (2%))-(10kDa PHF-BA (28%))-(AF-HPA-Ala (9%)), (AF-HPA:曲妥珠单抗约19:1至约24:1), 实施例18A; (AF-HPA:曲妥珠单抗约20:1至约25:1), 实施例18B; (AF-HPA:曲妥珠单抗约23:1至约28:1), 实施例18C;曲妥珠单抗-(EG2-MI (2.7%))-(10 kDa PHF-BA (30%))-(HPV-Ala (14%)), 实施例20A;曲妥珠单抗-(EG2-MI (2.7%))-(10 kDa PHF-BA (30%))-(HPV-Ala (7.7%)), 实施例20B;曲妥珠单抗-(EG2-MI (3.5%))-(10 kDa PHF-BA (30%))-(HPV-Ala (4.3%)), 实施例20C;sc-FvFc-曲妥珠单抗-(EG2-MI (2.8%))-(10 kDa PHF-BA (28%))-(AF-HPA-Ala (8%)), 实施例40;曲妥珠单抗-(EG2-MI (2.8%))-(10 kDa PHF-BA (28%))-(AF-HPA-Ala (7.3%)) AF-HPA:曲妥珠单抗约6:1至约9:1, 实施例43A;曲妥珠单抗-(EG2-MI (2.5%))-(10 kDa PHF-BA (28%))-(AF-HPA-Ala (8.4%)), AF-HPA:曲妥珠单抗约12:1至约16:1, 实施例43C;游离药物 (AF-HPA);和Kadcyla®的结果。

[1316] 表I

[1317]

	BT474 IC₅₀ (nmol/L)	SKBR3 IC₅₀ (nmol/L)	N87 IC₅₀ (nmol/L)	MCF7 IC₅₀ (nmol/L)	JIMT1 IC₅₀ (nmol/L)
实施例 4	0.05	0.02	0.03	40	0.14
实施例 7	0.03	0.01	0.05	3.6	0.11
实施例 13	0.12	0.03	0.05	7.7	0.28
实施例 14	0.07	0.02	0.11	28.9	0.13
实施例 15	0.05	0.01	0.11	23.5	0.12
实施例 16	3.04	1.44	5.23	27.9	1.88
实施例 17	0.03	0.03	0.43	28.8	0.06
实施例 18A	0.04	0.02	0.06	9.6	0.16
实施例 18B	0.05	0.01	0.04	33	0.12
实施例 18C	0.03	0.02	0.06	3.8	0.18
实施例 20A	0.01	0.07	0.31	2.86	0.67
实施例 20B	0.15	0.79	4.07	100	6.51
实施例 20C	0.76	0.79	4.49	10	9.73
实施例 40	ND	0.02	0.10	>100	0.90
实施例 43A	0.03	0.03	0.43	28.84	0.60
实施例 43C	0.10	0.02	0.09	>100	0.64
AF-HPA (毒素当量)	1.01	0.40	0.42	4.4	0.86
Kadcyla®	2.40	0.23	0.09	38.6	18.0

[1318] ND=未测出

[1319] 表I中的结果显示,对于HER2表达细胞系SKBR3、BT474、N87和JIMT1,PBRM-聚合物-药物共轭物(实施例4、实施例7、实施例13-15、实施例17、实施例18A-18C、实施例20A、实施例43A和实施例43C)显示了如与低HER2表达细胞系MCF7比较和如与对照PBRM-聚合物-药物共轭物(实施例16)或Kadcyla®比较的更高的抗增殖活性。

[1320] 表II列出林妥珠单抗-(EG2-MI (2%)-(10kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-A1a (9%)), (AF-HPA:林妥珠单抗约10:1至约15:1),实施例8;和利妥昔单抗-(EG2-MI (3%)-(10kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-A1a (8%)) (AF-HPA:利妥昔单抗约13:1至约18:1),实施例9;和游离药物(AF-HPA)的结果。

[1321] 表II

	HL-60 IC₅₀ (nmol/L)
实施例 8	0.77
实施例 9	6.74
AF-HPA	4.8

[1322] 表II的结果显示,对于CD33表达细胞系HL-60,PBRM-聚合物-药物共轭物(实施例8)表现出与对照PBRM-聚合物-药物共轭物(实施例9)比较的更高的抗增殖活性。

[1324] 表III列出PBRM-聚合物-药物共轭物抗-5T4-(EG2-MI (3%)-(10kDa PHF-BA

(30%) - (AF-HPA-Ala (8%)) , (AF-HPA: 抗-5T4约12:1至约18:1) , 实施例10; 和利妥昔单抗- (EG2-MI (3%) - (10kDa PHF-BA (30%) - (AF-HPA-Ala (8%))) , (AF-HPA: 利妥昔单抗约13:1至约18:1) , 实施例9; 和游离药物 (AF-HPA) 的结果。

[1325] 表III

[1326]

	A431 IC₅₀ (nmol/L)	PC3 IC₅₀ (nmol/L)	LLC1 IC₅₀ (nmol/L)	MDAMB231OE IC₅₀ (nmol/L)
实施例 10	0.3, 0.3*	0.6	16.9, >100*	0.04
实施例 9	1.8, 0.9*	9.3	5.3, 33*	ND
AF-HPA	0.7, 0.9*	2.5	1.6, >100*	ND

[1327] ND: 未测出。

[1328] *来自两次不同实验的结果。

[1329] 表III的结果显示, 对于5T4表达细胞系A431、PC3和MDAMB231OE, PBRM-聚合物-药物共轭物 (实施例10) 表现出相对于对照PBRM-药物共轭物 (实施例9) 和非-表达靶标细胞LLC1的更高的抗增殖活性。

[1330] 表IV列出游离药物 (AF-HPA) 的结果。

[1331] 表IV

[1332]

	OVCAR3 IC₅₀ (nmol/L)	TF-1 α IC₅₀ (nmol/L)
AF-HPA	0.8	13.8

[1333] 实施例47. 通过BIAcore表面等离子共振 (SPR) 的配体结合研究

[1334] PBRM-聚合物-药物共轭物与固定化受体的动力学结合通过BIAcore SPR测定。PBRM-聚合物-药物共轭物中的PBRM和单独的PBRM的结合常数可使用标准BIAcore程序测定。

[1335] 使用标准胺偶合化学, 将hErbB2在三个流动通道中, 以三个类似的密度, 固定于表面等离子共振传感器芯片表面。曲妥珠单抗容易地结合至固定的hErbB2, 从而证明两个结合伙伴都是活性的。使用装备有GLC感应芯片并且采用运行缓冲液平衡的BioRad ProteOn XPR36光学生物传感器, 于25°C下测量PBRM-聚合物-药物共轭物和PBRM的结合参数 k_a (缔合或亲和速率常数) 和 K_D (解离常数)。

[1336] 结果显示, PBRM-聚合物-药物共轭物中的PBRM被PBRM受体识别并且PBRM-聚合物-药物共轭物的PBRM的结合相对于未共轭的PBRM未受到显著的影响。

[1337] 实施例48. FACS结合分析法

[1338] PBRM-聚合物-药物共轭物曲妥珠单抗- ((EG2-MI (3%)) - (10kDa PHF-BA (30%) - (AF-HPA-Ala (8%))) , (AF-HPA: 曲妥珠单抗约12:1-17:1) , 实施例4的细胞表面结合, 使用MACSQuant®分析仪10位数字台面 (MACSQuant® Analyzer 10digital bench top) 流式细胞仪在不同的人癌症细胞系中评估。100,000个细胞在冰上的6%山羊血清中培养。将PBRM聚合物药物共轭物或未共轭的PBRM加入到细胞中并在冰上培养3小时, 然后细胞用冰冷却的PBS洗涤并与二次荧光标记抗体在冰上培养1小时。完成后将细胞用PBS洗涤, 用1%多聚甲醛固定并通过流式细胞仪分析。PBRM聚合物药物共轭物的细胞表面结合通过滴

定法测定并与非-共轭的PBRM的细胞表面结合比较。

[1339] 表V给出PBRM-聚合物-药物共轭物曲妥珠单抗-(EG2-MI (3%))-(10kDa PHF-BA (30%))-(AF-HPA-Ala (8%)) , (AF-HPA:曲妥珠单抗约12:1-17:1), 实施例4, 和曲妥珠单抗单独对JIMT-1细胞的结合常数 (K_d)。

[1340] 表V

[1341]

	K_d (nM)
实施例4	2.16
曲妥珠单抗	0.92

[1342] 结果显示,PBRM-聚合物-药物共轭物中的PBRM的细胞表面结合与未共轭的PBRM的细胞表面结合相当。

[1343] 可测定在其它PBRM-聚合物-药物共轭物中的PBRM与其它人癌症细胞的细胞表面结合并且应该是与未共轭的PBRM的细胞表面结合相当的。

[1344] 实施例49.通过BIAcore表面等离子共振 (SPR) 的配体结合研究

[1345] PBRM-聚合物-药物共轭物与固定化受体的动力学结合通过BIAcore SPR测定。PBRM-聚合物-药物共轭物如曲妥珠单抗-(EG2-MI (3%))-(10kDa PHF-BA (30%))-(AF-HPA-Ala (8%)) , (AF-HPA:曲妥珠单抗约12:1-17:1), 实施例4;曲妥珠单抗-(EG2-MI (2%))-(10kDa PHF-BA (30%))-(AF-HPA-Ala (9%)) , (AF-HPA:曲妥珠单抗约16:1至约21:1), 实施例7,曲妥珠单抗-(EG2-MI (2%))-(10kDa PHF-BA (28%))-(AF-HPA-Ala (9%)) , (AF-HPA:曲妥珠单抗约5:1-10:1), 实施例17;和曲妥珠单抗-(EG2-MI (2%))-(10kDa PHF-BA (28%))-(AF-HPA-Ala (9%)) , (AF-HPA:曲妥珠单抗约19:1-24:1), 实施例18A; (AF-HPA:曲妥珠单抗约20:1-25:1), 实施例18B; (AF-HPA:曲妥珠单抗约23:1-28:1), 实施例18C中的PBRM的结合常数;在PBRM-药物共轭物中的PBRM(即, **Kadcyla®**) 和PBRM(即, 曲妥珠单抗) 单独的结合常数使用标准BIAcore程序测定。

[1346] 使用标准胺偶合化学,将hErbB2在三个流动通道中,以三个类似的密度,固定于表面等离子共振传感器芯片表面。曲妥珠单抗容易地结合至固定的hErbB2,从而证明两个结合伙伴都是活性的。表VI提供使用装备有GLC感应芯片并且采用运行缓冲液平衡的BioRad ProteOn XPR36光学生物传感器,于25℃下测量实施例4和实施例7和曲妥珠单抗的共轭物的结合参数 k_a (缔合或亲和速率常数)、 k_d (解离速率常数) 和 K_D (解离常数)。

[1347] 表VI

[1348]

	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
曲妥珠单抗	$9.90 \pm 0.1 \times 10^5$	$2.60 \pm 0.1 \times 10^{-5}$	26.2 ± 0.1
Kadcyla®	$4.61 \pm 0.2 \times 10^5$	$3.17 \pm 0.9 \times 10^{-5}$	68.7 ± 0.3
实施例 4	$4.61 \pm 0.3 \times 10^5$	$2.60 \pm 0.9 \times 10^{-5}$	56.3 ± 0.3
实施例 7	$5.3 \pm 0.3 \times 10^5$	$2.43 \pm 0.1 \times 10^{-5}$	45.9 ± 0.3
实施例 14	$3.91 \pm 0.3 \times 10^5$	$2.56 \pm 0.1 \times 10^{-5}$	65.5 ± 0.5
实施例 17	$8.30 \pm 0.2 \times 10^5$	$2.32 \pm 0.2 \times 10^{-5}$	28.0 ± 0.1
实施例 18A	$4.67 \pm 0.7 \times 10^5$	$2.07 \pm 0.2 \times 10^{-5}$	44.4 ± 0.6
实施例 18B	$3.05 \pm 0.2 \times 10^5$	$2.46 \pm 0.1 \times 10^{-5}$	80.7 ± 0.6
实施例 18C	$4.25 \pm 0.5 \times 10^5$	$2.03 \pm 0.1 \times 10^{-5}$	47.7 ± 0.5

[1349] 结果显示,PBRM-聚合物-药物共轭物中的PBRM被PBRM受体识别。

[1350] 实施例50. 体内效果、药代动力学和生物分布的研究

[1351] 使用小鼠和大鼠的皮下和原位异种移植物模型以评估蛋白质药物共轭物的效果和药代动力学。

[1352] 通过尾静脉注射来静脉内 (IV) 或腹膜内给予受试体,连同适当的对照品。在指定的时间,通过末端心脏穿刺收集血液样品,以评定受试体的循环水平。将样品在室温下保持30min,以使其凝结,然后在4℃下,以1,000x g离心10分钟,并且立即在-80℃下冷冻。使用ELISA测量血清样品内的总PBRM浓度。通过LC/MS/MS方法测定循环药物浓度(共轭的和游离的)。

[1353] 使用数字式测径器测量肿瘤的尺寸,以评定PBRM-聚合物-药物共轭物的效力。计算肿瘤体积并且用于确定肿瘤生长的延迟。

[1354] 收取肿瘤和主要器官,如肝、肾、脾、肺、心、肌肉和脑,立即冷冻于液态氮中,储存在-80℃下,用于药物生物分布的测定。通过标准方法,例如,ELISA或LC/MS/MS方法,分别测定组织匀浆内的PBRM和/或药物水平。

[1355] 实施例51. 给予PBRM-聚合物-药物共轭物后的小鼠组织分布

[1356] 用BT474肿瘤皮下接种雌性CB-17SCID小鼠(每组n=4只)。媒介或PBRM-聚合物-药物共轭物:曲妥珠单抗-(EG2-MI(3%))-(10kDa PHF-BA(30%)-(AF-HPA-A1a(8%))), (AF-HPA:曲妥珠单抗约12:1至约17:1),实施例4,以5mg/kg;和曲妥珠单抗-(EG2-MI(1%))-(10kDa PHF-GA(29%)-(AF-HPA-A1a(6%))), (AF-HPA:曲妥珠单抗约18:1至约23:1),实施例13,以5mg/kg作为1天单次剂量经IV给予。

[1357] 在给药后48小时,处死小鼠并经末端心脏收集血液。收取器官:左肾、肝、肺、骨骼肌、脾和肿瘤,立即冷冻于液态氮中,储存在-80℃下,直至用于共轭的、游离的AF-HPA和AF的分析。

[1358] 表VII、VIII和VIII A给出共轭的药物(共轭的AF-HPA,即,PBRM-PHF-AF-HPA);未共轭的(游离)药物(即,AF-HPA和AF);游离的AF-HPA和游离AF在不同的组织中的浓度。浓度报告为ngAF-HPA(和/或AF)当量/g组织,作为均值±标准偏差。

[1359] 表VII

[1360] 共轭的AF-HPA浓度

[1361]

组织	实施例4	实施例13
----	------	-------

肿瘤	476±52	371±16
肝	200±57	100±17
脾	127±97	77±18
肾	190±15	137±4
肌肉	39±22	16±86
血浆	2218±182	1720±501

[1362] 表VIII

[1363] 未共轭的AF-HPA和AF的总浓度

[1364]

组织	实施例4	实施例13
肿瘤	93.6±25.5	82.9±23.9
肝	11.0±2.3	3.4±1.1
脾	9.9±2.2	6.6±1.3
肾	9.0±2.1	0.7±0.0
肌肉	0.2±0.0	ND
血浆	0.4±0.02	0.3±0.02

[1365] 表VIII A

[1366] 未共轭的AF-HPA和未共轭的AF的浓度

[1367]

	实施例 4		实施例 13	
组织	AF	AF-HPA	AF	AF-HPA
肿瘤	67.3±17.5	21.6±6.8	56.3±16.2	22.3±6.8
肝	8.4±1.5	2.0±0.7	5.0±1.3	1.6±1.2
肺	2.4±0.7	1.2±0.1	1.5±0.4	0.9±0.2
脾	7.9±1.9	1.4±0.2	5.5±1.0	0.9±0.1
肾	7.9±1.9	0.5±0.1	0.7±0.0	ND
肌肉	0.5±0.1	0.1±0.03	ND	ND
血浆	ND	0.4±0.02	ND	0.3±0.02

[1368] ND=未测出

[1369] 结果显示,在组织中释放的未共轭的AF-HPA被进一步代谢为AF,而在血浆中的未共轭的AF-HPA未转化为AF。

[1370] 实施例52.对给予PBRM-聚合物-药物共轭物的肿瘤生长应答

[1371] 雌性CB-17SCID小鼠用BT474肿瘤(每组n=10)或JIMT-1细胞(每组n=10)或NCI-N87细胞(每组n=10)皮下接种。雌性NCr nu/nu小鼠用HL-60细胞(每组n=10)皮下接种。试验化合物或媒介作为1天单次剂量经IV给予。使用数字式测径器,在图1-9中在指示的时间测量肿瘤尺寸。计算肿瘤体积并且将其用于确定肿瘤生长的延迟。当肿瘤的尺寸达到1000mm³时,处死小鼠。对于每一组,肿瘤体积作为均值±SEM报告。

[1372] 图1提供在用BT474肿瘤皮下接种的小鼠(每组n=10)中,在作为第1天单次剂量经IV给予以下物质后的肿瘤应答的结果:媒介;PBRM(曲妥珠单抗),以10mg/kg;PBRM-聚合物-药物共轭物曲妥珠单抗-(EG2-MI(3%))-(10kDa PHF-BA(30%))-(AF-HPA-Ala(8%)),

(AF-HPA:曲妥珠单抗约12:1至约17:1),实施例4,以2.5mg/kg和5mg/kg;或曲妥珠单抗-(EG2-MI (1%))-(10kDa PHF-GA (29%))-(AF-HPA-A1a (6%)), (AF-HPA:曲妥珠单抗约18:1至约23:1),实施例13,以2.5mg/kg和5mg/kg。结果显示,对于实施例4和13,在5mg/kg剂量下具有100%消退的肿瘤体积减小,以及分别为100%和80%的无肿瘤存活。媒介和单独的曲妥珠单抗,显示出肿瘤体积的增加。对HER2 (曲妥珠单抗) 有特异性的PBRM与药物聚合物共轭物的共轭对于减小肿瘤体积是必要的,因为单独的PBRM未显示出肿瘤体积的减小)。

[1373] 图2提供在用JIMT-1细胞皮下接种的小鼠(每组n=10)中,在IV给予以下物质后的肿瘤应答结果:媒介;PBRM(曲妥珠单抗),以10mg/kg;PBRM-聚合物-药物共轭物曲妥珠单抗-(EG2-MI (3%))-(10kDa PHF-BA (30%))-(AF-HPA-A1a (8%)), (AF-HPA:曲妥珠单抗约12:1至约17:1),实施例4,以2.5mg/kg;或曲妥珠单抗-(EG2-MI (2%))-(10kDa PHF-BA (30%))-(AF-HPA-A1a (9%)), (AF-HPA:曲妥珠单抗约16:1至约21:1),实施例7,以2.5mg/kg。结果显示,对于实施例4和7二者,肿瘤体积减小。特别地,在给予描述于实施例4中的共轭物的试验组中,在2.5剂量下有100%消退,包括9只完全消退(1只动物死于非-治疗-相关的死亡)和3只无肿瘤存活动物。在给予描述于实施例7的共轭物的试验组中,有100%消退,包括完全消退,所有均保持无肿瘤(两只动物在研究结束时,由于非-治疗-相关的死亡而死于无肿瘤)。媒介和单独的曲妥珠单抗显示出肿瘤体积的增加。对于HER2 (曲妥珠单抗) 有特异性的PBRM与药物聚合物共轭物的共轭对于减小肿瘤体积是必要的,因为单独的PBRM未显示出肿瘤体积的减小)。

[1374] 用HL-60细胞皮下接种雌性NCr nu/nu小鼠(每组n=10)。试验化合物或媒介作为第1天单次剂量经IV给予。使用数字式测径器,在图3中指示的时间测量肿瘤尺寸。计算肿瘤体积并且将其用于确定肿瘤生长的延迟。当肿瘤达到2000mm³的体积时,处死小鼠。对于每一组,肿瘤体积作为均值±SEM报告。

[1375] 图3提供在皮下接种HL-60细胞(每组n=10)的小鼠中,在作为第1天单次剂量经IV给予以下物质后的肿瘤应答结果:媒介;PBRM(林妥珠单抗),以20mg/kg;或PBRM-聚合物-药物共轭物林妥珠单抗-(EG2-MI (2%))-(10kDa PHF-BA (30%))-(AF-HPA-A1a (9%)), (AF-HPA:林妥珠单抗约10:1至约15:1),实施例8,20mg/kg。结果显示出实施例8的肿瘤体积的减小,具有在第44天的100%消退和70%无肿瘤存活。媒介,和单独的林妥珠单抗,显示出肿瘤体积的增加。对CD33 (林妥珠单抗) 有特异性的PBRM对药物聚合物共轭物的共轭对于减小肿瘤体积是必要的,因为单独的PBRM未显示出肿瘤体积的减小。

[1376] 图4提供在用JIMT-1细胞皮下接种的小鼠(每组n=10)中,在作为第1天单次剂量经IV给予以下物质后的肿瘤应答结果:媒介;PBRM(曲妥珠单抗),以20mg/kg; **Kadcyla®** (PBRM-药物共轭物),以20mg/kg;或PBRM-聚合物-药物共轭物曲妥珠单抗-(EG2-MI (2%))-(10kDa PHF-BA (28%))-(AF-HPA-A1a (9%)), (AF-HPA:曲妥珠单抗约10:1至约15:1),实施例14,以2mg/kg、0.67mg/kg或0.3mg/kg。结果显示出实施例14的肿瘤体积减小,在2.0剂量下具有100%消退和100%无肿瘤存活。媒介、**Kadcyla®**和单独的曲妥珠单抗,显示出肿瘤体积的增加。对HER2 (曲妥珠单抗) 有特异性的PBRM与药物聚合物共轭物的共轭对于减小肿瘤体积是必要的,因为单独的PBRM未显示出肿瘤体积的减小。

[1377] 图5提供在皮下接种NCI-N87细胞(每组n=10)的小鼠中,作为第1天单次剂量经IV

给予以下物质后的肿瘤应答结果:媒介,或PBRM-聚合物-药物共轭物曲妥珠单抗-(EG2-MI (2%))-(10kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-A1a (9%))), (AF-HPA:曲妥珠单抗约11:1至约16:1),实施例15,以3mg/kg、1mg/kg或0.3mg/kg。结果显示PBRM-聚合物-药物共轭物(实施例15)的剂量反应,在最高剂量3mg/kg显示出肿瘤体积的完全消退,伴有100%的完全反应性。在中等剂量1mg/kg下,10只动物中有7只动物部分消退和1只完全消退。

[1378] 图6提供在皮下接种NCI-N87细胞(每组n=10)的小鼠中,在作为第1天单次剂量经IV给予以下物质后的肿瘤应答结果:媒介,PBRM-聚合物-药物共轭物曲妥珠单抗-(EG2-MI (2%))-(10kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-A1a (9%))), (AF-HPA:曲妥珠单抗约11:1至约16:1),实施例14,以0.67mg/kg或利妥昔单抗-(EG2-MI (2%))-(10kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-A1a (9%))), (AF-HPA:曲妥珠单抗约13.7至约18.7),实施例16,以3mg/kg。结果显示PBRM-聚合物-药物共轭物(实施例14)的肿瘤生长延迟反应。媒介或利妥昔单抗-药物聚合物共轭物(实施例16)在剂量3mg/kg下对肿瘤生长无效果。

[1379] 图7提供在皮下接种NCI-N87细胞(每组n=10)的小鼠中,在作为第1天单次剂量经IV给予以下物质后的肿瘤应答结果:媒介,PBRM-聚合物-药物共轭物曲妥珠单抗-(EG2-MI (2.7%))-(10kDa PHF-BA (28%)-(叔丁基甘氨酸AF-HPA) (7.5%))), (AF-HPA:曲妥珠单抗约4:1至约6:1) 实施例33,以0.67mg/kg;曲妥珠单抗-(EG2-MI (2.8%))-(10kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-A1a (7.3%))) (AF-HPA:曲妥珠单抗约6:1至约9:1),实施例43A,以1mg/kg;或曲妥珠单抗-(EG2-MI (2.5%))-(10kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-A1a (8.4%))), (AF-HPA:曲妥珠单抗约12:1至约16:1),实施例43C,以0.67mg/kg或3mg/kg。结果显示PBRM-聚合物-药物共轭物实施例43C在0.67mg/kg剂量和3mg/kg剂量下的肿瘤生长延迟反应,显示了在第115天时的90%的无肿瘤存活。

[1380] 图8提供在皮下接种NCI-N87细胞(每组n=10)的小鼠中,在作为第1天单次剂量经IV给予以下物质后的肿瘤应答结果:媒介,聚合物-药物共轭物10K PHF-BA (30%)-AF-HPA-A1a (9.5%),实施例5A,以20.22mg/kg;或PBRM-聚合物-药物共轭物曲妥珠单抗-(EG2-MI (2.7%))-(10kDa PHF-BA (28%)-(缬氨酸-酰氧基异丙氧基-MMAE) (9%))), (MMAE:曲妥珠单抗约12:1至约16.5:1) 实施例30B,以2mg/kg;利妥昔单抗-(EG2-MI (2.7%))-(10kDa PHF-BA (28%)-(缬氨酸-酰氧基异丙氧基-MMAE) (9%))) (MMAE:利妥昔单抗约9.5:1至约13:1),实施例30C,以2mg/kg;sc-FvFc-曲妥珠单抗-(EG2-MI (2.8%))-(10kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-A1a (8.1%))), (AF-HPA:scFvFc曲妥珠单抗抗体约14:1至约19:1),实施例40,以0.67mg/kg;或曲妥珠单抗-(EG2-MI (2.5%))-(10kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-A1a (8.4%))), (AF-HPA:曲妥珠单抗约12:1至约17:1),实施例43B,以1mg/kg;或每周给予曲妥珠单抗-(EG2-MI (2.65%))-(10kDa PHF-BA (28%)-(Val-Cit-PABA-Arry 520 (2.9%))), (Arry 520:曲妥珠单抗约4:1至约6:1),实施例38(10mg/kg)一次,历时3周;或每周给予利妥昔单抗-(EG2-MI (2.65%))-(10kDa PHF-BA (28%)-(Val-Cit-PABA-Arry 520 (2.9%))), (Arry 520:曲妥珠单抗约4:1至约6:1),实施例39(10mg/kg)一次,历时3周。结果显示PBRM-聚合物-药物共轭物(实施例40和实施例43B)的肿瘤生长延迟反应。

[1381] 图9提供在用JIMT-1细胞皮下接种的小鼠(每组n=10)中,在作为第1天单次剂量经IV给予以下物质后的肿瘤应答结果:媒介,或sc-FvFc-曲妥珠单抗-(EG2-MI (2.8%))-(10kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-A1a (8.1%))), (AF-HPA:scFvFc曲妥珠单抗抗体约14:1至

约19:1), 实施例40, 以1mg/kg; 或曲妥珠单抗-((EG2-MI (2.5%)-(10kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (8.4%))), (AF-HPA:曲妥珠单抗约12:1至约16:1), 实施例43C, 以2mg/kg。

[1382] 实施例53. 在给予PBRM-聚合物-药物共轭物后的小鼠血浆PK

[1383] 在初始给药前, 允许雌性CD-1小鼠适应至少4天。所有小鼠自由给予常规饲料和水并且在给予化合物之前不禁食。试验化合物或媒介作为1天单次剂量经IV给予。

[1384] 用媒介 (n=3) 或用PBRM-聚合物-药物共轭物, 曲妥珠单抗-((EG2-MI (3%)-(10kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-Ala (8%))), (AF-HPA:曲妥珠单抗约12:1至约17:1), 实施例4, 以5mg/kg经静脉内注射给予小鼠 (每组n=3)。在给药后5min、1h、3h、6h、24h、48h、72h、7天和14天收集血浆。在给药1天前和在给药的1、7和14天测量体重。观察所有动物在整个14天时期的死亡率或发病率。

[1385] 共轭的AF-HPA和未共轭的 (游离) 药物 (如AF-HPA和AF) 浓度通过LC/MS分析法测定。总曲妥珠单抗浓度通过ELISA测定。

[1386] 图10中的结果显示, 曲妥珠单抗具有~100µg/mL的血浆浓度和~12天的半衰期, 而未共轭的AF-HPA和AF具有<1ng/mL的总血浆浓度。PBRM-聚合物-药物共轭物具有>5天的半衰期, 伴有~300ug • day/mL的AUC_{0to inf}。

[1387] 实施例54. 给予PBRM-聚合物-药物共轭物后的小鼠血浆PK

[1388] 在初始给药前, 允许雌性CD-1小鼠适应至少4天。所有小鼠自由给予常规饲料和水并且在给予化合物之前不禁食。试验化合物或媒介作为1天单次剂量经IV给予。

[1389] 用媒介 (n=3) 或用如于实施例4、7、18A、18B和18C所述的PBRM-聚合物-药物共轭物静脉内注射给予小鼠。在给药后5min、1h、3h、6h、24h、48h、72h、7天和14天收集血浆。在给药1天前和在给药的1、7和14天测量体重。观察所有动物在整个14天时期的死亡率或发病率。

[1390] 总AF-HPA (共轭的AF-HPA和未共轭的 (游离) 药物 (如AF-HPA和AF) 浓度通过LC-MS/MS分析法测定。

[1391] 表IX

[1392] 血浆PK

[1393]

试验样品	AF-HPA 与曲妥珠单抗的比例	T _{1/2} (hr)	AUC ₀₋₃₃₆ (µg•hr/mL)
实施例 4	约 12:1-约 17:1	125	20.1
实施例 7	约 16:1-约 21:1	136	22.9
实施例 18A	约 19:1-约 24:1。	154	19.4
实施例 18B	约 20:1-约 25:1。	139	22.7
实施例 18C	约 23:1-约 28:1	119	25.1

[1394] 表IX中的结果显示, PBRM-聚合物-药物共轭物具有~120-154小时 (~5-6.4天) 的半衰期, 伴有~19-25µg • hr/mL的AUC₀₋₃₃₆并且独立于AF-HPA与PBRM-聚合物-药物共轭物的曲妥珠单抗的比例。

[1395] 实施例55: PBRM-聚合物药物共轭物 (MTD研究) 的耐受性

[1396] 估算PBRM-聚合物药物共轭物在CD-1雌性小鼠中的耐受性。以20mg/kg、40mg/kg、

60mg/kg的剂量作为单一IV剂量给予PBRM-聚合物-药物共轭物,实施例4(每组n=6)。媒介对照组接受生理盐水。监测动物的临床体征历时21天的时段。所有研究动物各自的体重在0天记录(基线),持续前五天的每一天,其后大约每隔一天记录。结果概述于表X中。

[1397] 表X

[1398]

组	剂量 (mg/kg)	在第 7 天相对于 其自身基线的 %变化	在第 21 天相对于 其自身基线的 %变化	死亡率或发病率
1	媒介	-1%	+ 7.3%	无
2	20	+ 3.7%	+ 14.8%	无
3	40	-20%	+ 10.8%	1 只动物在损失 12%的体 重时于第 7 天死亡
4	60	-28%	NA	4 只动物在第 9 天时濒临死 亡和被处死

[1399] 20mg/kg剂量耐受良好,在该组的任何小鼠中未观察到体重损失。在40mg/kg剂量下,在第7天观察到~20%的最大体重损失。在该组的1只动物被发现在第7天死亡并在死亡前一天具有~12%的体重损失。在研究结束时(第21天),在该研究组中的所有存活的动物(6只中的5只)获得相对于对照组的体重增加。60mg/kg剂量明显地超过最大耐受剂量,因为在该组中的所有动物在第7天具有显著的体重损失并在第9天濒临死亡和被处死。

[1400] 结果显示,对于小鼠的最大耐受剂量是在20和40mg/kg之间。

[1401] 实施例56:奥瑞斯他汀F-羟基丙基酰胺(MTD研究)的耐受性

[1402] 奥瑞斯他汀F-羟基丙基酰胺(AF-HPA)的耐受性在CD-1雌性小鼠中评估。AF-HPA(以类似于US 13/493,899,现在为US专利8,685,383,实施例48中描述的方式制备)以1.6mg/kg、3.2mg/kg、4.7mg/kg的剂量(每组n=6)作为单一IV剂量给予。媒介对照组接受生理盐水。监测动物的临床体征历时21天的时段。所有研究动物各自的体重在0天记录(基线),持续前五天的每一天,其后大约每隔一天记录。结果概述于表XI中。

[1403] 表XI

[1404]

组	剂量 (mg/kg)	在第 7 天相对于其 自身基线的%变化	在第 21 天相对于其 自身基线的%变化	死亡率或发病率
1	媒介	-1%	+ 7.3%	无
2	1.6	11.6%	+5.5%	无
3	3.2	-20%	+ 10.8%	1 只动物在第 7 天死亡, 3 只动物在第 7 天濒临死亡和 被处死。两只存活
4	4.7	-28%	NA	1 只动物在第 3 天死亡, 1 只动物在第 3 天濒临死亡和 被处死, 3 只动物在第 4 天 和 1 只动物在第 5 天濒临死 亡和被处死。无存活。

[1405] 1.6mg/kg剂量是可接受地耐受的,在第7天观察到11.6%的体重损失。动物在第21天完全恢复,伴有相对于该组基线的5.5%体重增加。在3.2mg/kg剂量下,1只动物在第7天死亡,3只动物在第7天濒临死亡和被处死。在研究结束时(第21天),6只动物中的2只存活。4.7mg/kg剂量明显地超过最大耐受剂量,因为在该组中的所有动物或者死亡,或者濒临死亡和被处死。

[1406] 实施例57.抗-5T4scFvFc聚合物药物共轭物结合于人5T4(细胞外域)的亲合力和动力学通过表面等离子共振评估

[1407] 以类似于在实施例10中描述的方式制备的抗-5T4scFvFc聚合物药物共轭物与5T4抗原结合的亲合力和动力学参数使用得自GE Healthcare的BIAcore T200器械,通过表面等离子体共振测量。5T4-ECD-Fc抗原(融合于人IgG1亚型的Fc域的人5T4细胞外域)通过胺偶合方法,使用作为试剂盒提供的试剂(GE Healthcare)共价固定于BIAcore CM5传感器芯片上。在该结合研究中,抗-5T4scFvFc聚合物药物共轭物或对照蛋白质在BIAcore运行缓冲液HBS-EP+ (补充有EDTA和P20的HEPES缓冲的盐水)中被系列稀释至浓度系列并流经固定化抗原持续一个固定的时间段以允许结合,接着仅通过运行缓冲液流以解离抗原,最后使用低pH溶液(10mM甘氨酸-HCl, pH 2)再生表面。所有BIAcore试剂购自GE Healthcare。生成的数据曲线被称为传感图(sensorgrams)并构成原结合数据。将数据拟合1:1Langmuir结合模型,使用BIAevaluation软件(GE Healthcare),估算亲和力/动力学参数例如缔合速率、解离速率和亲和力。亲和力估算值是多次测量的平均值。

[1408] 如在图11中说明的,抗-5T4scFvFc聚合物药物共轭物(实施例10)以高亲和力($K_D < 30\text{pM}$)结合于人5T4细胞外域。该值与对非-共轭的抗-5T4scFvFc测定的值类似。

[1409] 实施例58.抗-5T4scFvFc聚合物药物共轭物与细胞表面5T4抗原的结合

[1410] 抗-5T4scFvFc聚合物药物共轭物(抗-5T4scADC)(实施例10)的细胞表面结合使用FACS Calibre流式细胞仪(Beckton Dickinson)在各种人癌细胞系中评价。抗-5T4scFvFc聚合物药物共轭物的细胞表面结合通过滴定法测定并与对非-共轭的抗-5T4scFvFc抗体测量的细胞表面结合比较。

[1411] 5T4过度表达重组体MDA-MB-231(MDA-MB-231-5T4OE),MDA-MB-231(对5T4阴性的;得自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),Manassas Virginia US,在登录号HTB-26下)和A431(天然地表达5T4)细胞(A431,得自美国典型培养物保藏中心,Manassas Virginia US,在登录号CRL-1555下)被用于抗-5T4scFvFc聚合物药物共轭物和非-共轭的抗-5T4scFvFc的滴定。使用0.5mM PBS/EDTA缓冲液,从培养烧瓶分离指数生长细胞。细胞用PBS洗涤两次并与抗-5T4scFvFc、抗-5T4scADC,或非-结合scFvFc融合蛋白(0.01-10 $\mu\text{g/mL}$)一起在1%BSA-PBS中于室温下培养1h。用PBS洗涤三次细胞并与抗-Fc特异性-FITC抗体一起于4 $^{\circ}\text{C}$ 培养45min。在培养抗-Fc特异性FITC抗体后,细胞用PBS洗涤三次并使用流式细胞仪(FACS Calibre,Becton Dickinson)分析。测定样品的中位数荧光强度(MFI)。

[1412] 对于抗-5T4scFvFc聚合物药物共轭物(实施例10)的特异性剂量-依赖性细胞表面结合与非-共轭的抗-5T4scFvFc的特异性剂量-依赖性细胞表面结合在两种A431和5T4过度表达MDA-MB-231细胞中相当。非相关的scFvFc融合蛋白的结合在5 $\mu\text{g/mL}$ 时低200-倍。此外,MDA-MB-231细胞(其对5T4表达是阴性的)未显示出对抗-5T4scFvFc或者共轭的抗-

5T4scFvFc ADC的任何细胞表面结合。

[1413] 实施例59. 抗-5T4scFvFc聚合物药物共轭物的体内效果

[1414] 材料: BD 1mL注射器(271/2规格)、无菌培养基、无菌磷酸盐缓冲的盐水、Matrigel-BD Biosciences(分类号354248)、无菌棉塞、无菌Eppendorf试管(1.5mL, 2mL)、移液管、滤纸、70%乙醇/异丙醇、游标卡尺(Mitutoyo)。所用的所有其它必需的项目具有分析级。

[1415] 动物: 无胸腺的雌性裸鼠(Hsd:无胸腺的Nude-Foxn1^{nu}) (5-6周龄, 体重20-22g) 从Harlan, Netherlands获得。遵照控制和监督动物实验目的委员会的规章(Regulations of Committee for the Purpose of Control and Supervision of Experiments on Animals) (CPCSEA) (印度政府和实验室动物护理评估与鉴定协会(Government of India and Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) (AAALAC) 规定照看动物。用于执行动物实验的‘形式B’由动物伦理委员会批准审查和批准。

[1416] 居住和饲养: 动物维持在控制的环境中: 22±3℃温度, 50±20%湿度, 各12小时的光/暗循环和15-20新鲜空气变化/小时。动物分组关养和高压蒸煮玉米芯用作垫层材料。在研究期间, 用经过认证的辐照的实验室啮齿动物饲料自由喂饲动物。

[1417] 动物&动物鉴定的准备: 使动物保持在驯化实验室中持续5天的时期。动物分别编号, 笼卡指示实验, 研究号、肿瘤植入的日期、随机化日期、肿瘤类型、小鼠品系、性别, 和各小鼠数目被显示到相应的笼子里。随机化后, 加入组别、试验化合物、剂量、进度表和给予途径。

[1418] 肿瘤细胞的准备: 所有程序在无菌技术后在层流罩中进行。选择用于研究的癌细胞(a) A431 (表皮状), (b) 过度表达5T4 (MDA-MB-231 5T4++) (5T40E) 的重组体MDA-MB-231 (乳腺), 和(c) 具有70-80%融合和>90%的生存率的H1975 (非小细胞肺癌)。使5X10⁶个细胞再悬浮于200μl PBS或含有50%的保持于冰上的基底膜的无血清培养基中。

[1419] 细胞的皮下注射: 使用被关养在单独的通风笼(Individual Ventilated Cages) (IVCs) 内的裸鼠(Hsd:无胸腺Nude-Foxn1^{nu})。通过在动物的腹侧或背上皮下注射, 使癌细胞系在动物中繁殖。监测植入区域的肿瘤生长。一旦肿瘤可被触及并达到所需体积(TV≈150mm³), 基于肿瘤体积使动物随机化编组并开始给药。肿瘤体积用卡尺在随机编组的那天(0天)经二维测量确定, 然后每3天一次(即在小鼠称重的同一天)测定。使用游标卡尺测量肿瘤的长度(L)和宽度(W)。肿瘤体积(TV)使用下式计算:

[1420] 肿瘤体积(mm³) = L X W²/2,

[1421] 其中, L=长度(mm); W=宽度(mm)。

[1422] 使抗-5T4scFvFc聚合物药物共轭物(实施例10)溶于无菌1x PBS中, 这产生在所有制备的浓度的澄清溶液并经由尾静脉静脉内给予。试验项目是在给予的当天新鲜制备的且剂量体积保持在5mL/kg体重。对于每组分别使用新的注射器和针头。

[1423] 体重: 笼侧观察, 在研究期间每3天一次测量体重。计算各小鼠的体重%变化。

[1424] 抗肿瘤活性: 将抗肿瘤活性评估为对比于媒介对照组的最大肿瘤体积抑制。数据评估使用统计学软件Graph pad版本5进行。

[1425] 从试验的均值TV值对比对照组的比例乘以100%, 如下计算%试验/对照值(%T/C): 在特定天的肿瘤抑制(T/C, %): T/C(X天) = (试验组在X天的均值TV-试验组在0天的均

值TV)/(对照组在X天的均值TV-对照组在0天的均值TV) x 100%

[1426] 在实验期间对特定试验组记录的最小(或最佳)%T/C值表示对于各自治疗的最大抗肿瘤活性。TV=肿瘤体积(mm³)

[1427] 肿瘤生长抑制(TGI):TGI使用下式计算:

[1428] $TGI = (1 - T/C) \times 100$

[1429] 其中,T=(试验组在X天的均值TV-试验组在0天的均值TV)和C=(对照组在X天的均值TV-对照组在0天的均值TV)

[1430] 临床体征:发病率&死亡率:在研究期间每3天一次分别观察动物的可察觉的一般临床体征。核查所有动物的发病率和死亡率。

[1431] 统计学分析:为评价肿瘤抑制的统计学意义,双向ANOVA,接着使用GraphPad Prism v5进行Bonferroni事后检验。p值<0.05表明各组间的统计学意义的显著差别。

[1432] 结果:

[1433] A431-皮下异种移植抗肿瘤活性:

[1434] 在使用A431细胞系的异种移植实验[“A431肿瘤异种移植物作为测试表皮生长因子-受体拮抗剂的体内模型的特征鉴定(Characterization of the A431 tumor xenograft as an in vivo model for testing epidermal growth factor-receptor antagonists)”,S.Robinson等,Int.J.Oncol.1992,1(3):293-8]中,以类似于在实施例10中描述的方式制备的抗-5T4scADC经IV以下列剂量给予携带肿瘤的小鼠:10mg/kg,单次剂量;1mg/kg,Q4D x 4;3mg/kg,Q4D x 4;和6mg/kg,Q4D x 4。“Q4D x 4”意指每4天给药一次,持续总共4个剂量。另一组携带肿瘤的小鼠给予未共轭的抗-5T4scFvFc(10mg/kg IV,Q4D x 4)。在这个研究中,抗-5T4scADC疗法证实了当以上述剂量水平作为单次剂量或重复剂量给予时,对抗A431癌异种移植物的强烈的抗肿瘤活性(图12)。用抗-5T4scADC以单次剂量(10mg/kg IV)治疗导致在第24天的-4%的最佳T/C值。对于10mg/kg IV单次剂量组的%肿瘤生长抑制(TGI)被发现为104%(第24天,p<0.001)。在重复剂量组中的最佳T/C值(1mg/kg、3mg/kg和6mg/kg IV,Q4D x 4)被发现在第24天分别为-2%、-4%&-3%。此外,对于重复剂量组(1mg/kg、3mg/kg和6mg/kg IV,Q4D x 4)的%肿瘤生长抑制(TGI)被发现分别为102%(第24天,p<0.001)、104%(第24天,p<0.001)和103%(第24天,p<0.001)。在单次剂量和重复剂量抗-5T4scADC治疗组之间没有显著的差异。以10mg/kg IV的剂量(Q4D x 4)给予非-共轭的抗-5T4scFvFc不引起A431异种移植的肿瘤体积的任何显著的%减小。在第24天的%T/C值被发现为87%。媒介-处理组和抗-5T4ScFvFc-治疗组之间的肿瘤尺寸的差异没有统计学意义,并且在该剂量的%肿瘤生长抑制(TGI)被发现为13%(第24天)。治疗方案后,观察抗-5T4scADC试验组中的动物直至第90天,此时该研究结束。在以6mpk,i.v.,Q4D x 4治疗的抗-5T4scADC重复-剂量组中,到第24天没有治疗-相关的严重体重损失和死亡率(7/10动物);观察该剂量组中存活的动物直至第90天。在所有的抗-5T4scADC治疗组中观察到完全的肿瘤生长消退且没有肿瘤再生长的迹象直至研究期结束(包括在6mpk,i.v.,Q4D x 4剂量组中的3/10)。

[1435] MDA-MB-231 5T4+-皮下异种移植抗肿瘤活性:

[1436] 在使用MDA-MB-231-5T40E的异种移植的实验中,以类似于在实施例10中描述的方式制备的抗-5T4scADC以下列剂量给予携带肿瘤的小鼠:10mg/kg IV,单次剂量;1mg/kg

IV, Q4D x 4; 3mg/kg IV, Q4D x 4; 和6mg/kg IV, Q4D x 4。各个组给予未共轭的抗-5T4scFvFc (10mg/kg IV, Q4D x 4)。在这个研究中, 抗-5T4scADC疗法证实了当以上述剂量水平作为单次剂量或重复剂量给予时, 对抗MDA-MB-231-5T40E异种移植物的强烈的抗肿瘤活性(图13)。用抗-5T4scADC以单次剂量(10mg/kg IV)治疗导致在第18天的最佳T/C值-25%。对于10mg/kg IV单次剂量组的%肿瘤生长抑制(TGI)被发现为125% (第18天, $p < 0.001$)。在重复剂量组(1mg/kg、3mg/kg和6mg/kg IV, Q4D x 4)中的最佳T/C值在第18天被发现分别为-26%、-32%和-38%。此外, 对于重复剂量组(1mg/kg、3mg/kg和6mg/kg IV, Q4D x 4)的%肿瘤生长抑制(TGI)被发现分别为126% (第18天, $p < 0.001$)、132% (第18天, $p < 0.001$)和138% (第18天, $p < 0.001$)。在单次剂量和重复剂量抗-5T4scADC治疗组之间没有显著的差异。非-共轭的抗-5T4scFvFc疗法在剂量10mg/kg IV, Q4D x 4时显示出对抗MDA-MB-231-5T40E异种移植物的适度的抗肿瘤活性。在第18天的%T/C值被发现为45%, 并且在该剂量的肿瘤生长抑制(TGI)是55% (第18天, $p < 0.001$)。此外, 在第66天对于媒介对照组的平均肿瘤体积被发现是1763mm³。在抗-5T4scADC重复剂量组(1mpk, 3mpk, i.v; Q4D x 4)和单次剂量组(10mpk, i.v)中, 从第45天直至第90天肿瘤生长完全消退, 此时结束该研究。在上述抗-5T4scADC治疗组中直至研究期结束未有肿瘤再生长的迹象。然而, 在以6mpk, i.v, Q4D x 4治疗的抗-5T4scADC重复-剂量组中, 到第21天存在治疗-相关的严重体重损失和死亡率(10/10)。未共轭的抗-5T4scFvFc抗体治疗组在第72天的均值肿瘤体积被发现为1502mm³。该抗体-治疗组在第66天的%T/C值被发现是60%, 而在该剂量的肿瘤生长抑制(TGI)是40% (第66天, $p < 0.001$)。

[1437] H1975-皮下异种移植抗肿瘤活性:

[1438] 在以类似的方式, 用H1975肺癌细胞系进行的异种移植实验中, 以如描述于实施例10中的类似的方式制备的抗-5T4scADC经IV以下列剂量给予携带肿瘤的小鼠(每组n=5只小鼠, 初始肿瘤体积~150mm³): 0.3mg/kg, Q4D x 4; 1mg/kg, Q4D x 4; 和3mg/kg, Q4D x 4。各组给予(3mg/kg IV, Q4D x 4)未共轭的抗-5T4scFvFc抗体。当以上述剂量水平作为重复剂量给予时, 用抗-5T4scADC (0.3&1mg/kg, i.v; Q4D x 4)治疗导致H1975肿瘤异种移植物的部分消退(在第39天)。用抗-5T4scADC以3mg/kg, i.v; Q4D x 4治疗导致H1975肿瘤异种移植物的完全消退(在第39天)。用抗-5T4scADC以0.3, 1&3mpk, i.v; Q4D x 4治疗分别导致在第39天的最佳T/C值-0.7%、-4%和-5%, 并且%肿瘤生长抑制(TGI)被发现为101%、104%和完全消退(CR) (第39天, $p < 0.001$)。用未共轭的抗-5T4scFvFc抗体治疗导致在第39天的差的抗肿瘤活性(88%的%T/C值), 以及%TGI是12%。治疗方案后, 观察该试验组中的动物直至第81天, 此时结束该研究。在第60天, 抗-5T4scADC疗法(0.3mg/kg, i.v; Q4D x 4)在携带H1975异种移植物的裸鼠中证实完全消退(3/5), 而在2只动物中从第39天起直至第60天观察到肿瘤再生长, 此时处死该组中的动物。然而在第81天, 用抗-5T4scADC (1&3mg/kg, i.v; Q4D x 4)的疗法在携带H1975异种移植物的裸鼠中导致完全消退(5/5; 第81天)。

[1439] NCI-N87-皮下异种移植抗肿瘤活性:

[1440] 以类似于上述肿瘤异种移植研究的方式, 用NCI-N87(胃癌)细胞系进行异种移植实验。以如描述于实施例10中的类似的方式制备的抗-5T4scADC以下列剂量经IV给予携带肿瘤的SCID小鼠(每组n=10只小鼠, 初始肿瘤体积~135mm³): 3mg/kg, 单次剂量; 和3mg/kg, Q4D x 3。各组给予(3mg/kg IV, Q4D x 3)未共轭的抗-5T4scFvFc抗体。在抗-5T4scADC

3mg/kg单次剂量组中判定一只非-治疗相关的死亡,并且将该动物的数据从分析中排除。在第19天,抗-5T4scADC治疗组在3mg/kg,单次剂量和3mg/kg,Q4D x 3显示出分别为92和87%的肿瘤生长抑制。两种抗-5T4scADC治疗组具有100%的完全消退,这被持续至第75天研究结束时。用未共轭的抗-5T4scFvFc抗体治疗导致差的抗肿瘤活性,在第19天肿瘤生长抑制值为14%;该治疗组中的所有动物到第56天时达到800mm³的肿瘤体积终结点。

[1441] 将本申请所提到的所有出版物,包括,例如,非-专利文献、专利申请,和专利通过引用为了所有的目的而结合到本文中。本发明可在不脱离其精神和实质特性的情况下,以其它的特定形式体现。因此,就所有方面而言,上述实施方案均被视为示例性的而非限制本文所描述的发明。因而,本发明的范围由随附的权利要求书而非上述说明书来指定,并且落入权利要求书中的等同的意义和范围内的所有变化都意欲囊括于本发明的范围内。

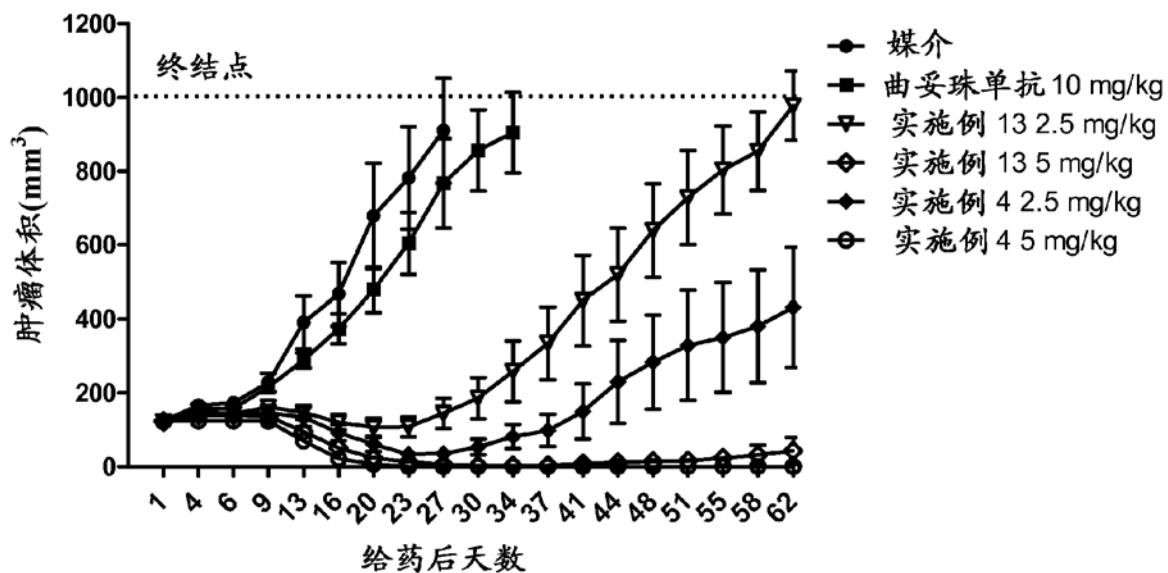


图 1

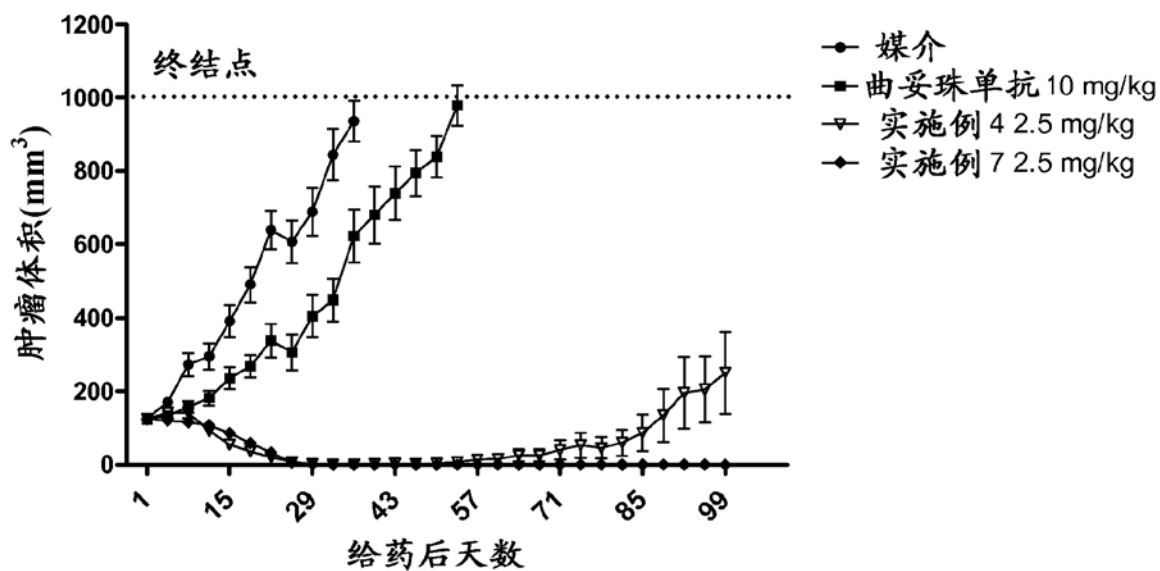


图 2

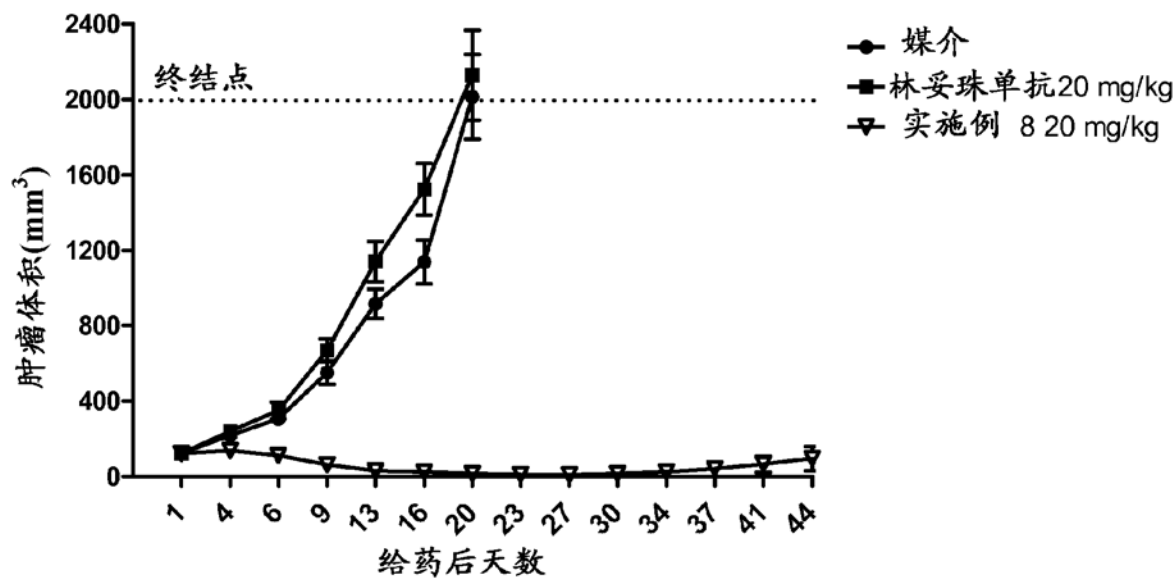


图 3

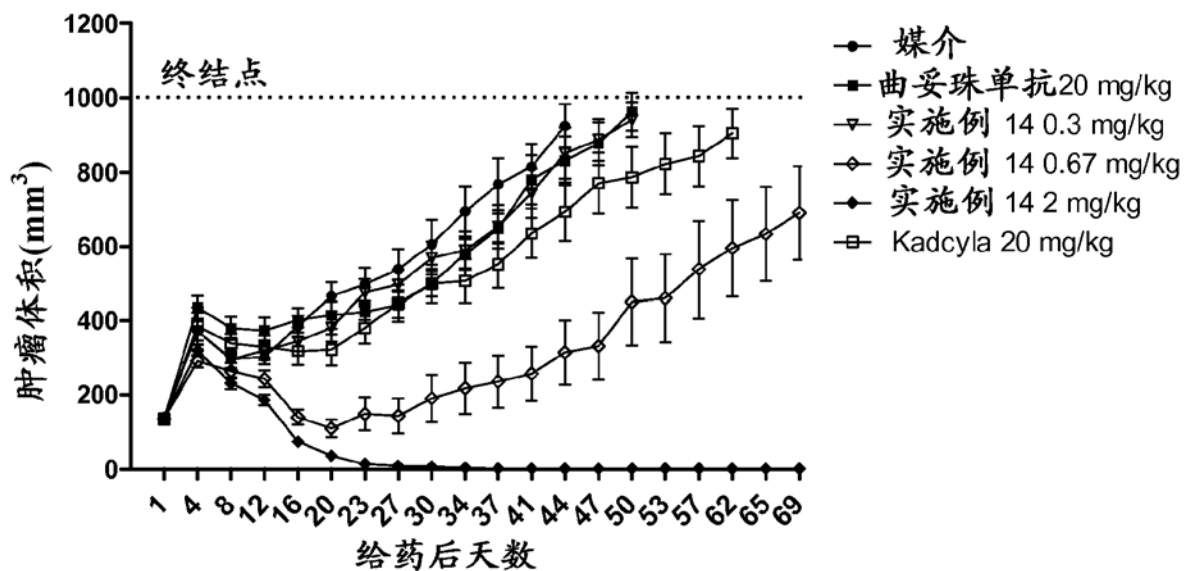


图 4

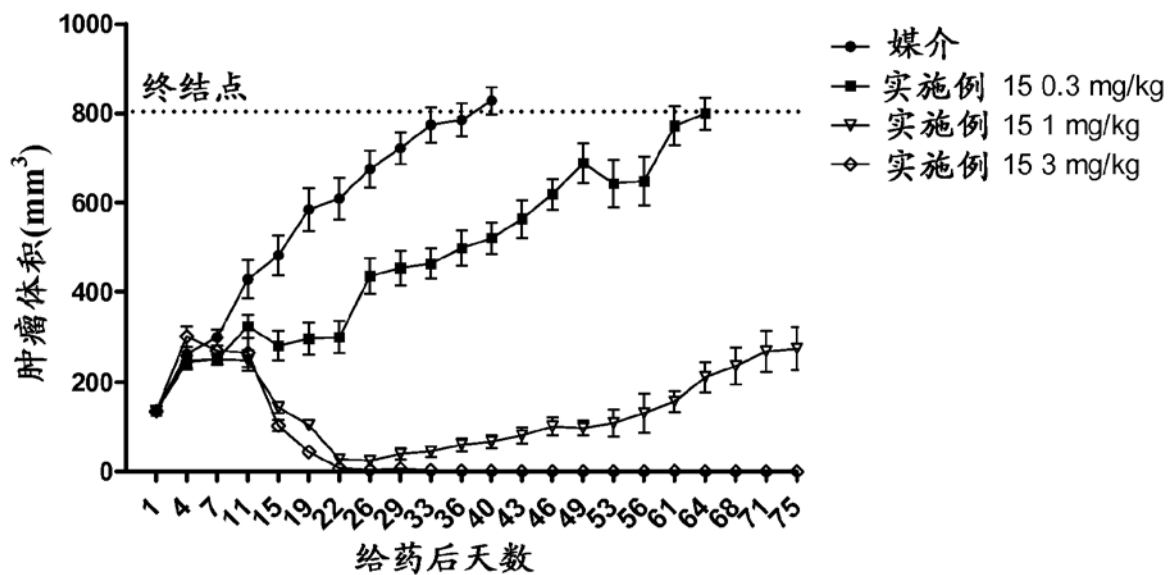


图 5

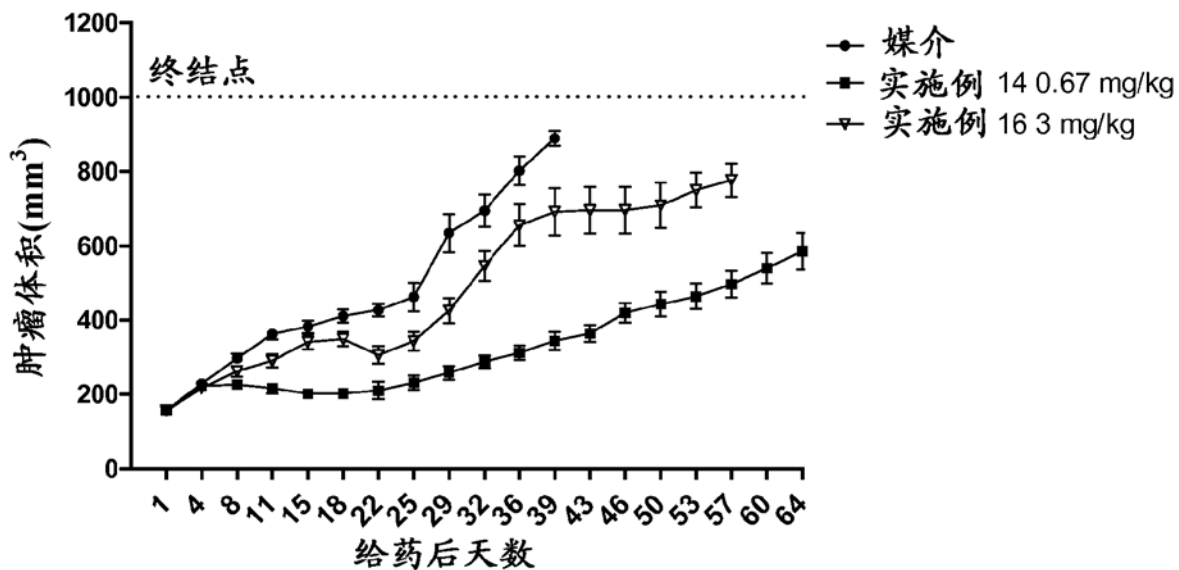


图 6

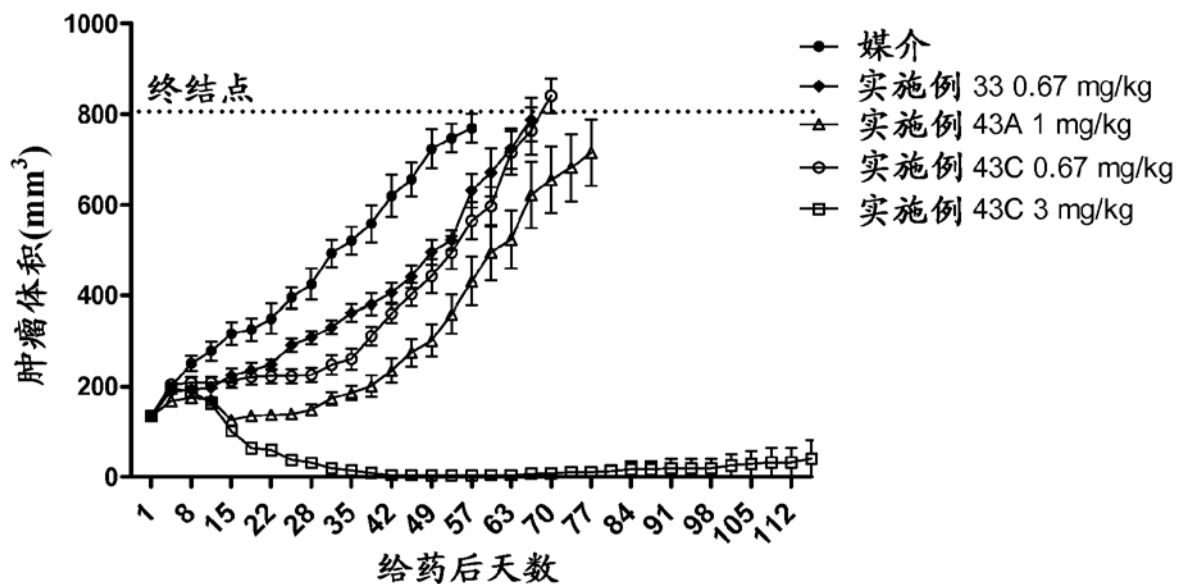


图 7

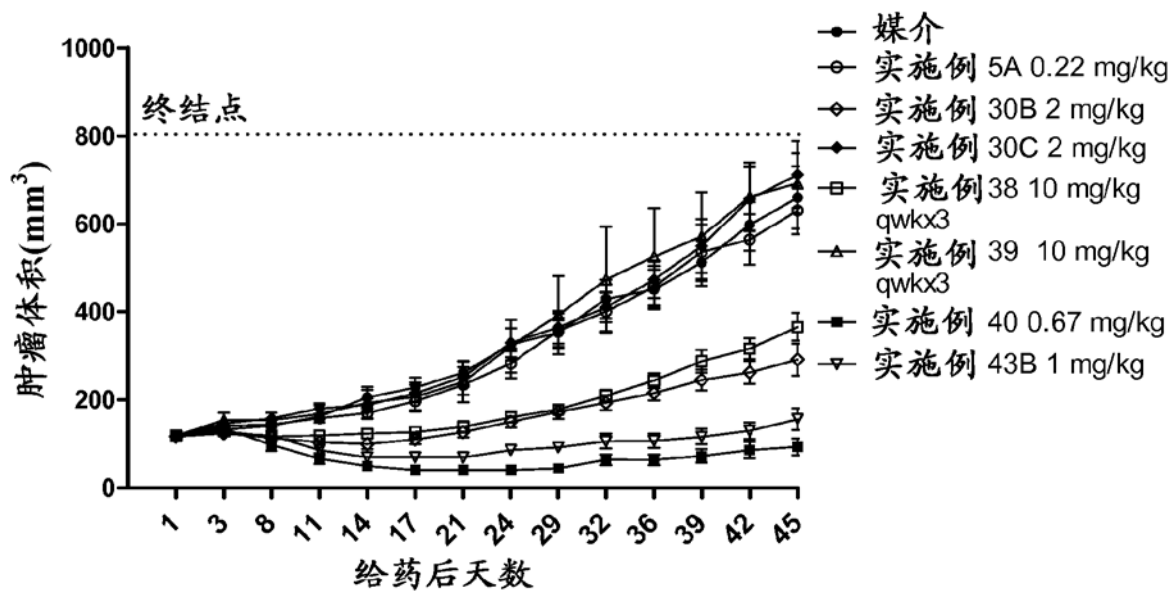


图 8

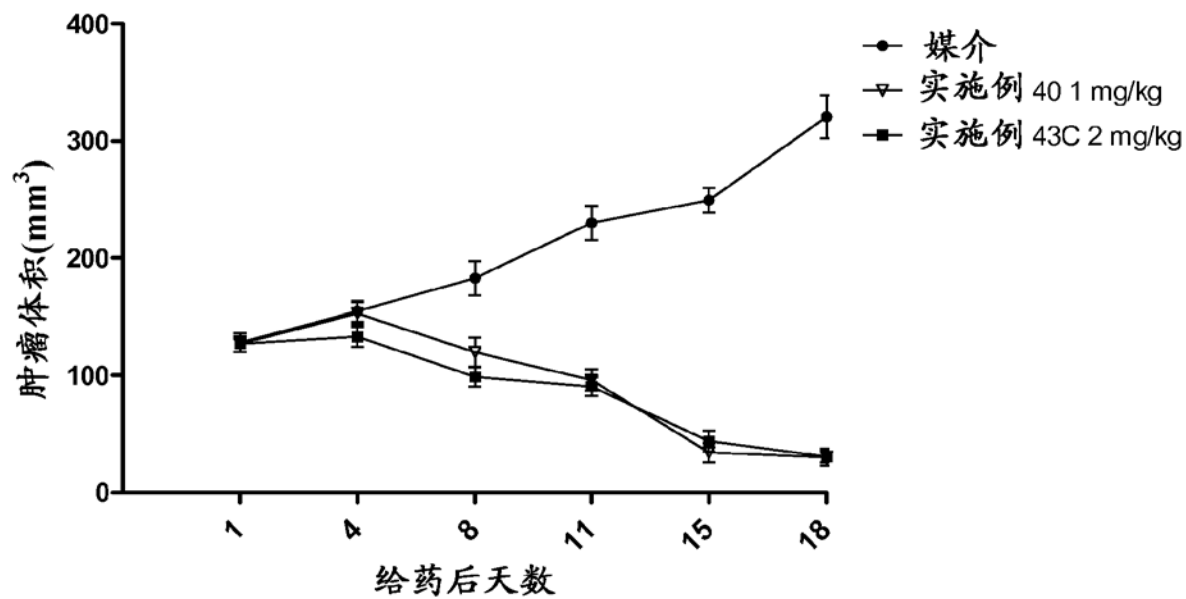


图 9

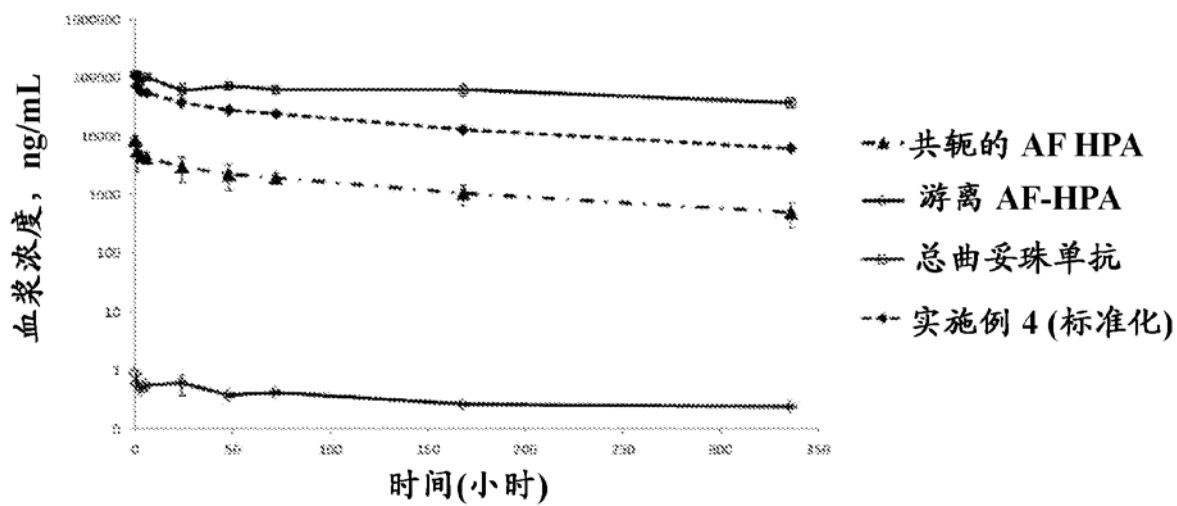
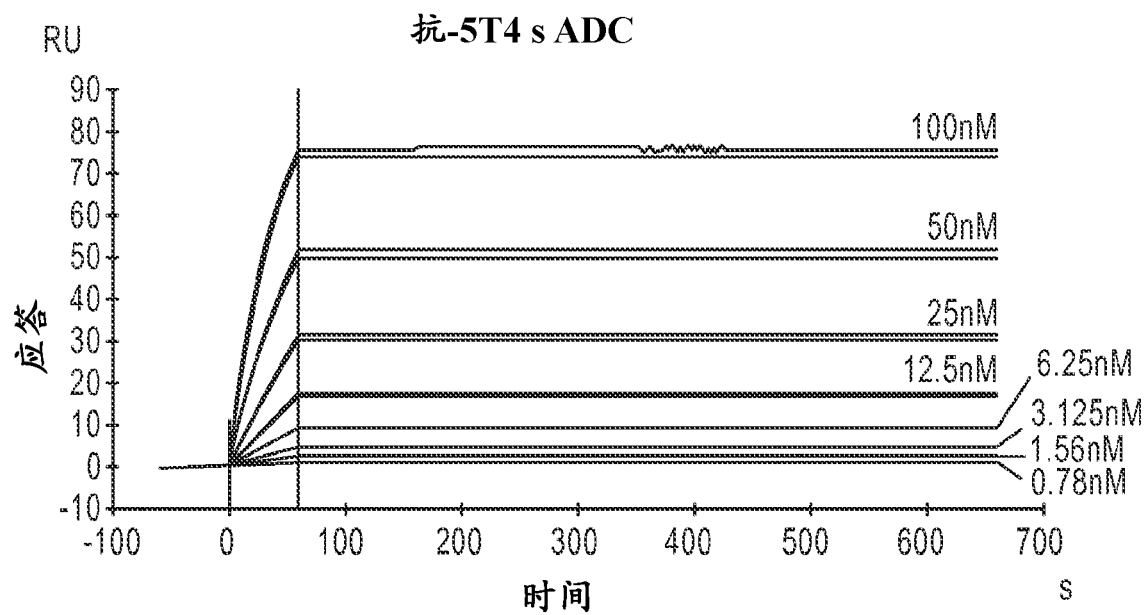


图 10



参数	
缔合速率(K_{on})	2.68×10^5
解离速率(K_{off})	6.43×10^{-7}
亲和力(K_D)	$< 30 \text{ pM}$

$$\chi^2 = 1.87$$

图 11

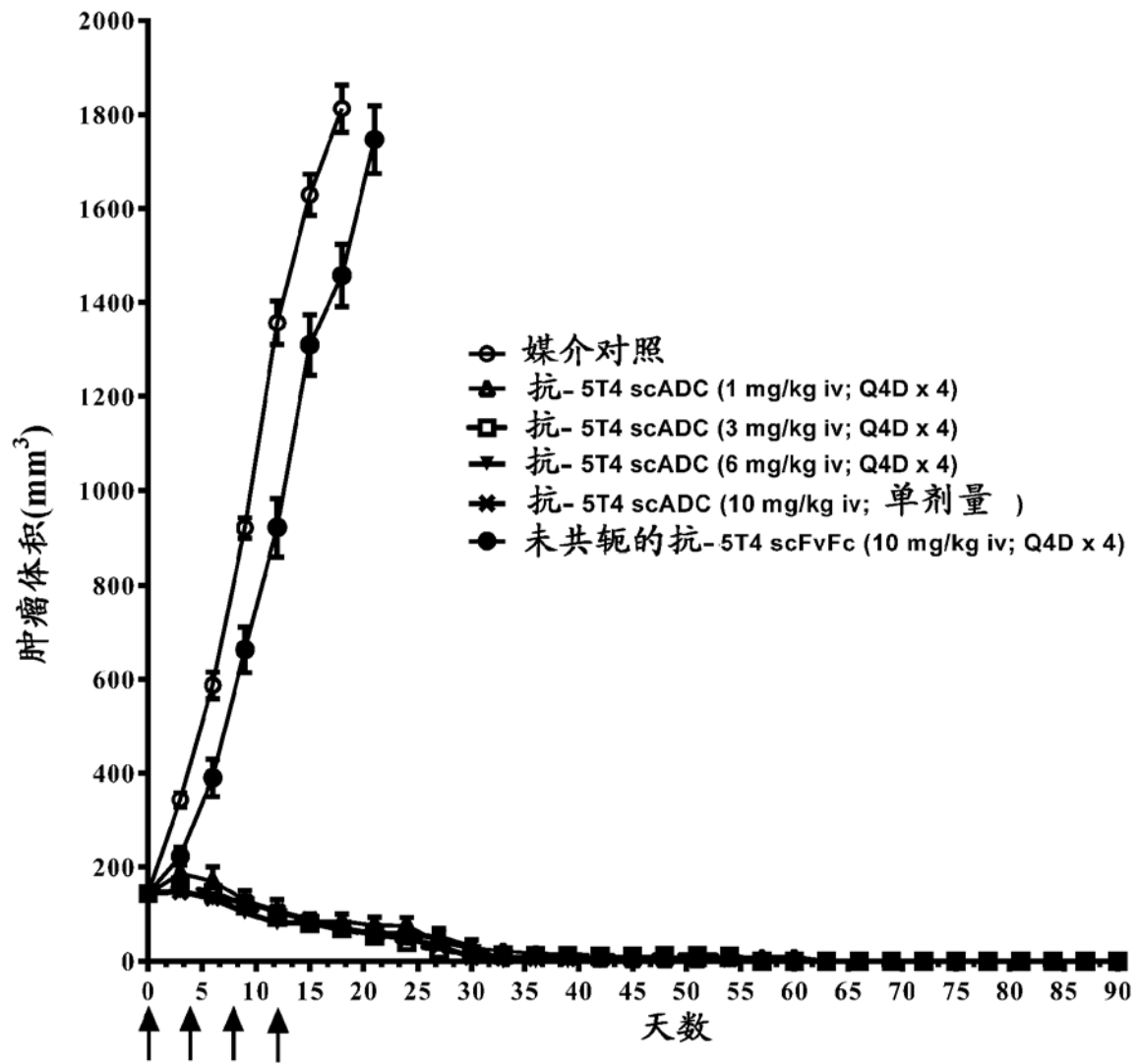


图 12

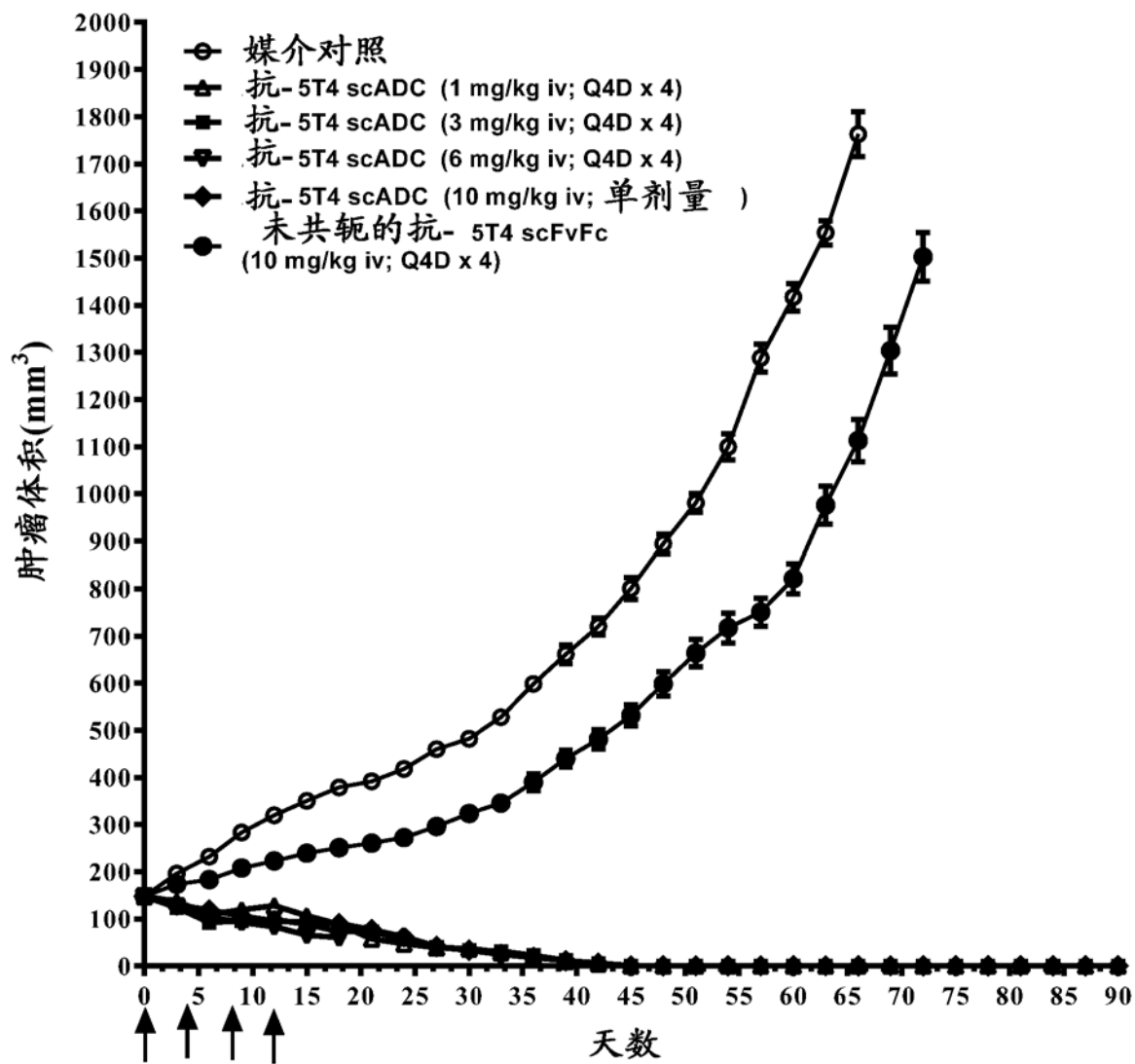


图 13