



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114585389 A

(43) 申请公布日 2022. 06. 03

(21) 申请号 202080072371.4

(22) 申请日 2020.09.25

(30) 优先权数据

2019903628 2019.09.26 AU

2019904094 2019.10.30 AU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.04.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2020/051028 2020.09.25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/056077 EN 2021.04.01

(71) 申请人 星法马私人有限公司

地址 澳大利亚维多利亚

(72) 发明人 D·J·欧文 R·帕塔克

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

专利代理师 肖轶 庞东成

(51) Int.Cl.

A61K 47/64 (2006.01)

A61K 31/7072 (2006.01)

A61K 31/337 (2006.01)

C08G 69/10 (2006.01)

C08G 83/00 (2006.01)

A61K 49/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

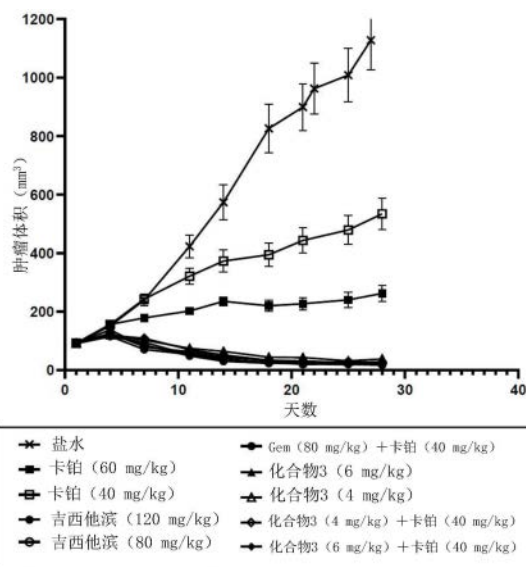
权利要求书7页 说明书64页 附图5页

(54) 发明名称

治疗性树枝状大分子

(57) 摘要

本文提供了树枝状大分子,其包括核心单元、作为赖氨酸残基或其类似物的五代构建单元,各自包括核苷类似物各自包括核苷类似物的残基的多个第一端基和各自包括亲水性聚合物基团的多个第二端基。本文还提供了包括树枝状大分子的药物组合物,以及树枝状大分子在治疗病症如癌症中的方法和用途。



1. 一种树枝状大分子,其包括:

i) 核心单元 (C); 以及

ii) 构建单元 (BU), 每个构建单元是赖氨酸残基或其类似物;

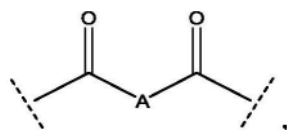
其中所述核心单元经由酰胺键共价连接至两个构建单元, 每个酰胺键在所述核心单元中存在的氮原子与构建单元中存在的酰基的所述碳原子之间形成;

所述树枝状大分子是五代构建单元树枝状大分子;

其中不同代的构建单元通过在一个构建单元中存在的氮原子和另一个构建单元中存在的酰基的所述碳原子之间形成的酰胺键彼此共价连接;

所述树枝状大分子进一步包括:

iii) 多个第一端基 (T1), 各自包括核苷类似物的残基, 其具有与下式的二酰基连接基团共价连接的羟基:



其中A为被至少一个O、S、NH或N(Me) 间隔的C₂-C₁₀亚烷基, 或其中A

为选自四氢呋喃、四氢噻吩、吡咯烷和N-甲基吡咯烷组成的组的杂环; 以及

iv) 多个第二端基 (T2), 其各自包括亲水性聚合物基团;

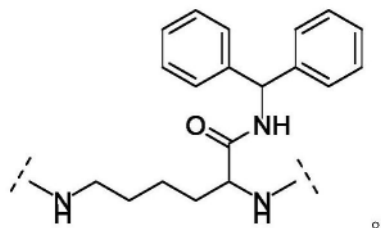
或其药学上可接受的盐。

2. 根据权利要求1所述的树枝状大分子, 其中, 所述核苷类似物选自吉西他滨、阿糖胞苷和阿扎胞苷组成的组。

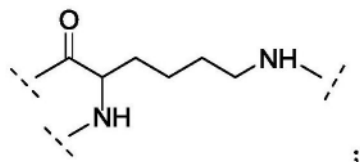
3. 根据权利要求2所述的树枝状大分子, 其中, 所述核苷类似物是吉西他滨。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的树枝状大分子, 其中, 所述核心单元由包括两个氨基的核心单元前体形成。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的树枝状大分子, 其中, 所述核心单元是:



6. 根据权利要求1至5中任一项所述的树枝状大分子, 其中, 所述构建单元各自为:

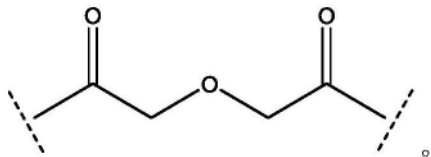


其中每个构建单元的所述酰基提供用于连接至所述核心或连接至前一代构建单元的共价连接点; 并且其中每个氮原子提供共价连接点, 用于共价连接至后续代构建单元、第一端基或第二端基。

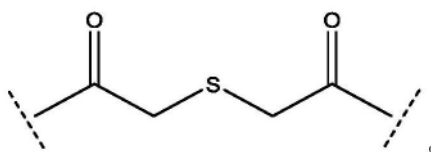
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的树枝状大分子, 其中, 所述二酰基连接基团选自以下组成的组:



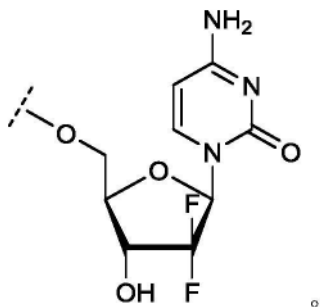
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的树枝状大分子,其中,所述二酰基连接基团是



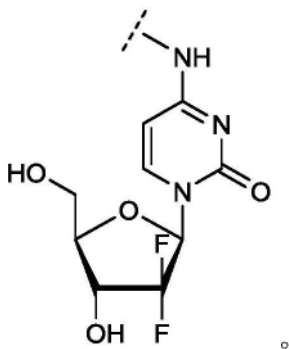
9. 根据权利要求1至7中任一项所述的树枝状大分子,其中,所述二酰基连接基团是



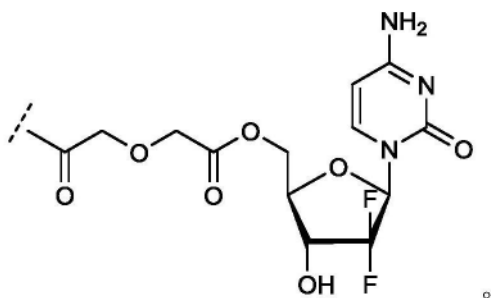
10. 根据权利要求1至9中任一项所述的树枝状大分子,其中,所述核苷类似物是吉西他滨并且共价连接至如下所示的所述二酰基连接基团:



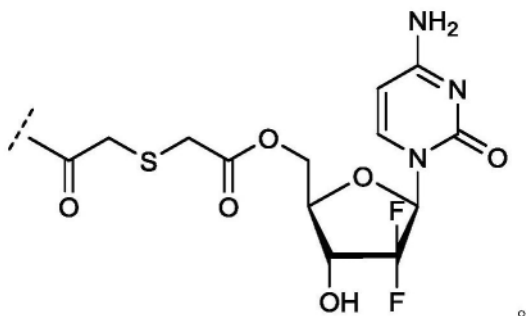
11. 根据权利要求1至9中任一项所述的树枝状大分子,其中,所述核苷类似物是吉西他滨并且共价连接至如下所示的所述二酰基连接基团:



12. 根据权利要求10所述的树枝状大分子,其中,所述第一端基是:



13. 根据权利要求10所述的树枝状大分子, 其中, 所述第一端基是:

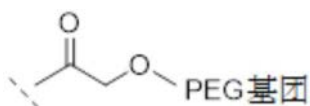


14. 根据权利要求1至13中任一项所述的树枝状大分子, 其中, 所述亲水性聚合基团选自聚乙二醇 (PEG)、聚乙基恶唑啉 (PEOX) 和聚肌氨酸组成的组。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的树枝状大分子, 其中, 所述第二端基包括平均分子量为至少500道尔顿的PEG基团。

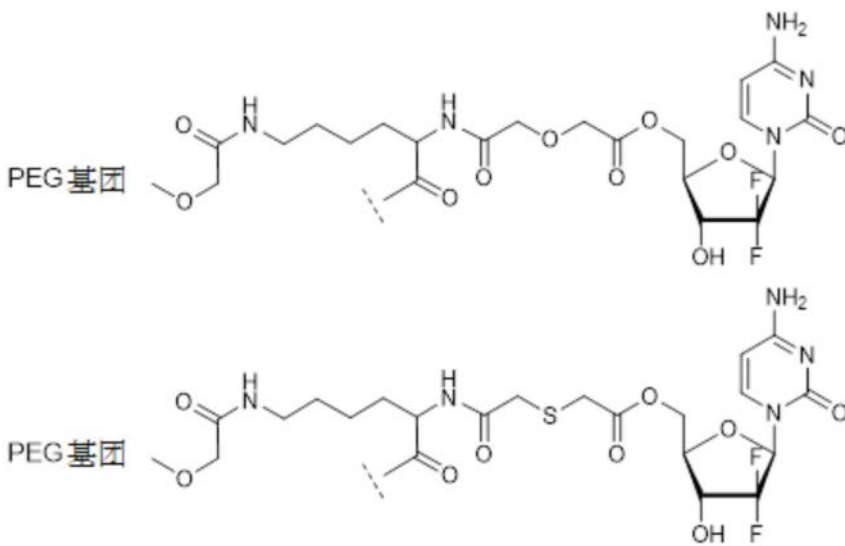
16. 根据权利要求1至15中任一项所述的树枝状大分子, 其中, 所述第二端基各自包括经由醚键共价连接至PEG连接基团 (L1) 的PEG基团, 所述醚键形成于所述PEG基团中存在的碳原子与所述PEG连接基团中存在的氧原子之间, 并且每个第二端基通过在构建单元中存在的氮原子和所述PEG连接基团中存在的酰基的所述碳原子之间形成的酰胺键与构建单元共价连接。

17. 根据权利要求16所述的树枝状大分子, 其中, 所述第二端基各自为



并且其中所述PEG基团是平均分子量在500至2500道尔顿范围内的甲氧基封端的PEG。

18. 根据权利要求17所述的树枝状大分子, 其中, 所述树枝状大分子包括表面单元, 所述表面单元包括连接至第一端基和第二端基的外部构建单元, 所述表面单元具有以下结构:



并且其中所述PEG基团是平均分子量在500至2500道尔顿范围内的甲氧基封端的PEG。

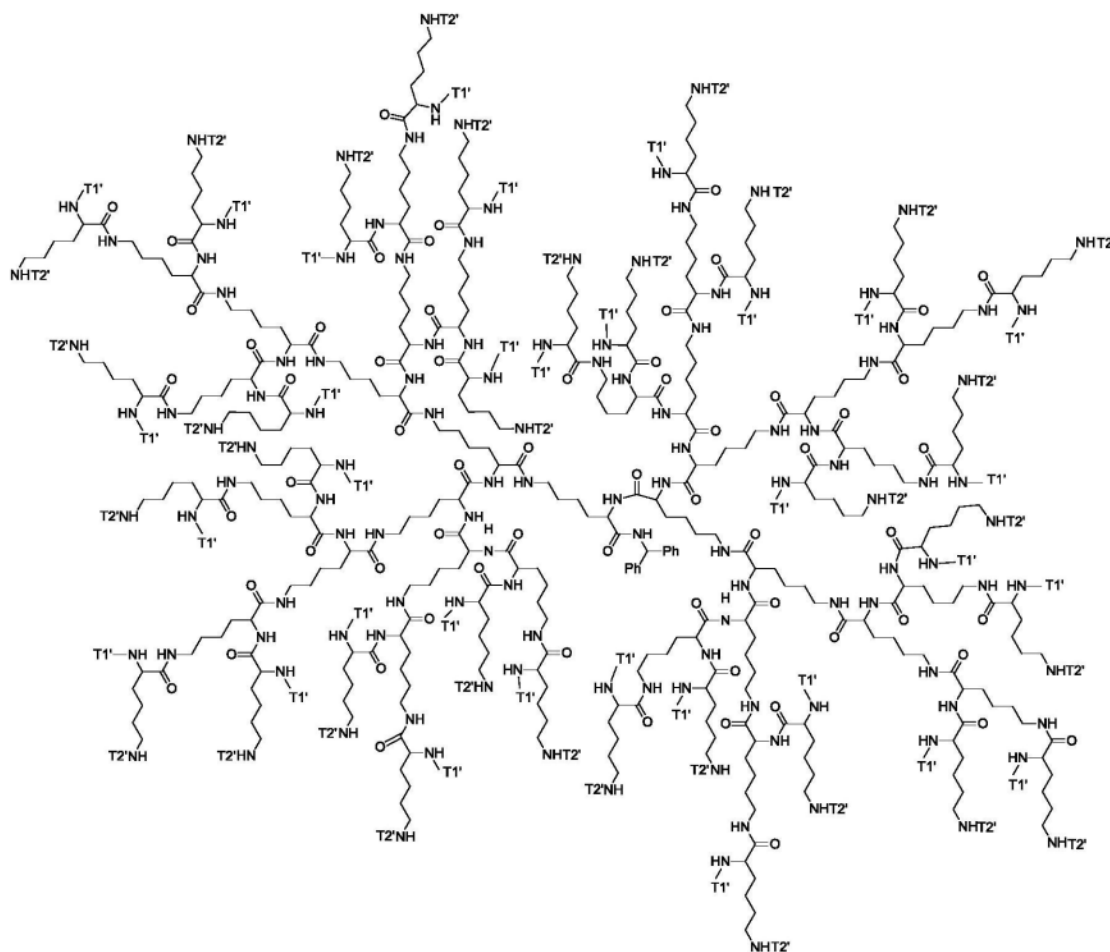
19. 根据权利要求18所述的树枝状大分子, 其中, 所述树枝状大分子具有28至32个表面单元。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的树枝状大分子, 其中, 存在于所述外部构建单元中的所述氮原子的至少40%各自共价连接至第一端基; 存在于所述外部构建单元中的所述氮原子的至少40%各自共价连接至第二端基。

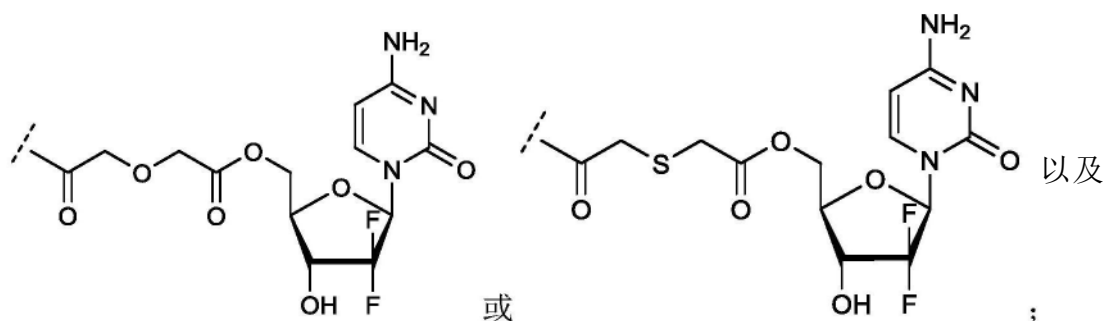
21. 根据权利要求1至18或20中任一项所述的树枝状大分子, 其中, 所述五代构建单元是完整代, 并且其中所述外构建单元提供64个氮原子用于共价连接至第一端基或第二端基, 其中24至32个第一端基共价连接至所述氮原子之一, 并且其中24至32个第二端基各自共价连接至所述氮原子之一。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的树枝状大分子, 其中, 当所述树枝状大分子暴露于pH7.4和37°C的PBS时, 在24h后, 所述核苷类似物的所述残基的约20%至约90%从所述树枝状大分子释放。

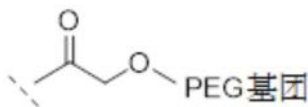
23. 根据权利要求1至22中任一项所述的树枝状大分子, 其中, 所述树枝状大分子是:



其中T1'表示第一端基, 其为



T2'表示第二端基,其为



其中所述PEG基团是平均分子量在500至2500道尔顿范围内的甲氧基封端的PEG,或T2'表示H,并且其中少于5个T2'是H。

24. 根据权利要求1至23中任一项的树枝状大分子,其中,所述第二端基包括平均分子量为1900至2300道尔顿的PEG基团。

25. 一种药物组合物,其包括:

i) 根据权利要求1至24中任一项所述的树枝状大分子,或其药学上可接受的盐;和ii) 药学上可接受的赋形剂。

26. 一种根据权利要求1至24中任一项所述的树枝状大分子或一种根据权利要求25所述的药物组合物,其用于治疗癌症。

27. 一种治疗癌症的方法,其包括向有需要的受试对象施用治疗有效量的根据权利要求1至24中任一项所述的树枝状大分子或根据权利要求25或权利要求26所述的药物组合物。

28. 根据权利要求1至24中任一项所述的树枝状大分子或权利要求25至27中任一项所述的组合物在所述制备用于治疗癌症的药物中的用途。

29. 根据权利要求26至28中任一项所述的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物,其中,所述癌症选自乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、上消化道癌(例如胰腺癌)和膀胱癌组成的组。

30. 根据权利要求26至29中任一项所述的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物,其中,施用的树枝状大分子的所述量足以递送5mg至200mg核苷类似物/ m^2 的活性剂的量。

31. 根据权利要求26至30中任一项所述的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物,其中,所述树枝状大分子与其它抗癌剂联合施用。

32. 根据权利要求31所述的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物,其中,所述其它抗癌剂选自含铂药剂、紫杉烷类、免疫肿瘤药剂、PARP抑制剂、拓扑异构酶I抑制剂、抗体、抗叶酸剂、酪氨酸激酶抑制剂、蒽环类和长春花生物碱组成的组。

33. 根据权利要求32所述的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物,其中,所述树枝状大分子与另外的抗癌剂联合施用,所述另外的抗癌剂选自卡培他滨、Nab-紫杉醇(例如Abraxane[®])、多西他赛、卡巴他赛、多柔比星、长春地辛、伊立替康、亚叶酸、5-氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、培美曲塞、拉帕替尼、尼达尼布、舒尼替尼、奥拉帕尼、尼拉帕尼、卡铂、紫杉醇、SN38、顺铂、奥沙利铂、紫杉醇、厄洛替尼和伊立替康组成的组。

34. 根据权利要求30所述的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物,其中,所述树枝状大分子与第二树枝状大分子联合施用,并且其中所述第二树枝状大分子包括:

i) 核心单元(C);以及

ii) 构建单元(BU),每个构建单元是赖氨酸残基或其类似物;

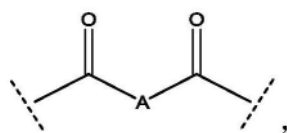
其中所述核心单元经由酰胺键共价连接至两个构建单元,每个酰胺键在所述核心单元中存在的氮原子与构建单元中存在的酰基的所述碳原子之间形成;

所述树枝状大分子是五代构建单元树枝状大分子；

其中不同代的构建单元通过在一个构建单元中存在的氮原子和另一个构建单元中存在的酰基的所述碳原子之间形成的酰胺键彼此共价连接；

所述树枝状大分子进一步包括：

iii) 多个第一端基 (T1)，其各自包括肿瘤药剂的残基，所述肿瘤药剂具有与下式的二酰基连接基团共价连接的羟基：



其中A为被至少一个O、S、NH或N(Me)间隔的C₂-C₁₀亚烷基，或其中A

为选自四氢呋喃、四氢噻吩、吡咯烷和N-甲基吡咯烷组成的组的杂环；以及

iv) 多个第二端基 (T2)，其各自包括亲水性聚合物基团；

或其药学上可接受的盐。

35. 根据权利要求34所述的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物，其中，所述肿瘤药剂是紫杉烷。

36. 根据权利要求35所述的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物，其中，所述紫杉烷选自多西他赛、紫杉醇和卡巴他赛组成的组。

37. 根据权利要求34至36中任一项所述的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物，其中，所述紫杉烷是多西他赛。

38. 根据权利要求34所述的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物，其中，所述肿瘤药剂是拓扑异构酶I抑制剂。

39. 根据权利要求38所述的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物，其中，所述拓扑异构酶I抑制剂是SN-38。

40. 根据权利要求34至39中任一项所述的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物，其中，所述树枝状大分子与其它抗癌剂联合施用。

41. 根据权利要求40所述的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物，其中，所述其它抗癌剂选自含铂药剂、紫杉烷类、免疫肿瘤药剂、PARP抑制剂、拓扑异构酶I抑制剂、抗体、抗叶酸剂、酪氨酸激酶抑制剂、蒽环类和长春花生物碱组成的组。

42. 根据权利要求41所述的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物，其中，所述另外的抗癌剂选自卡培他滨、Nab-紫杉醇（例如Abraxane®）、多西他赛、卡巴他赛、多柔比星、长春地辛、伊立替康、亚叶酸、5-氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、培美曲塞、拉帕替尼、尼达尼布、舒尼替尼、奥拉帕尼、尼拉帕尼、卡铂、紫杉醇、SN38、顺铂、奥沙利铂、紫杉醇、厄洛替尼和伊立替康组成的组。

43. 根据权利要求34至42中任一项所述的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物，其中，与等剂量的游离核苷类似物给药相比，所述树枝状大分子给药提高了临床疗效。

44. 根据权利要求34至43中任一项所述的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物，其中，与等剂量的游离核苷类似物给药相比，所述树枝状大分子给药提供降低的副作用和/或毒性。

45. 根据权利要求34至44中任一项所述的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物，其中，与等剂量的游离核苷类似物给药相比，所述树枝状大分子给药在给药后的延长时间

内提供治疗有效的吉西他滨血浆浓度水平。

治疗性树枝状大分子

技术领域

[0001] 本发明涉及通过药物-树枝状大分子缀合物递送基于核苷类似物的肿瘤药剂。药物-树枝状大分子缀合物包括包括核心和构建单元的树枝状大分子,其中最外一代的构建单元包括经由可裂解连接基团连接的一种或多种核苷类似物肿瘤药剂。本发明还涉及包括药物-树枝状大分子缀合物的药物组合物和治疗方法,以及用于产生包括基于核苷类似物的肿瘤药剂的药物-树枝状大分子缀合物的方法和合成中间体。

背景技术

[0002] 肿瘤药剂是一类重要的药物,近几十年来在癌症的化疗治疗中取得了显著进展。然而,肿瘤药剂的治疗应用往往受到与其制剂和递送有关的困难的阻碍,包括较差的药代动力学特性,如快速代谢和/或排泄,和/或缺乏作用部位的靶向性。此外,许多肿瘤药剂都与严重的副作用有关,提供了一个狭窄的治疗窗口,限制了可以使用的给药方案,并可能降低治疗的疗效。

[0003] 核苷类似物如吉西他滨已显示可有效治疗一些癌症,包括卵巢癌、乳腺癌和肺癌。吉西他滨通过掺入快速分裂的细胞如癌细胞的DNA和RNA中,并干扰它们的生长和修复而起作用。然而,作为一种药物制剂,吉西他滨也有缺点,因为它在体内被胞苷脱氨酶快速代谢,而且还需要进行肾脏清除(Ciccolini等人,癌症化学药物(Cancer Chemother Pharmacol),2016,78,p1-12),需要高剂量。吉西他滨治疗还与许多副作用有关,包括肺毒性和呼吸衰竭,溶血性尿毒症,肾损伤,严重肝毒性,毛细血管渗漏综合征和可逆性后部脑病综合征(参见例如Gemzar®的处方信息)。

[0004] 为了克服这些困难中的一些,可以特别配制肿瘤药剂以尝试和对抗药物本身的限制。例如,在吉西他滨的情况下,研究的方法包括将药物活性剂包封在脂质体和胶束中。

[0005] 尽管如此,仍然需要替代的和/或改进的肿瘤治疗。

发明内容

[0006] 已发现核苷类似物-树枝状大分子缀合物具有令人惊讶的性质,使得提供有效治疗所需的核苷类似物的量(作为缀合物的一部分)与游离药物相比显著减少。本发明的缀合物促进核苷类似物的控制释放,并且预期缀合物的使用具有降低的副作用和/或增强的功效。

[0007] 在第一方面,提供了树枝状大分子,其包括:

[0008] i) 核心单元(C);以及

[0009] ii) 构建单元(BU),每个构建单元是赖氨酸残基或其类似物;

[0010] 其中核心单元经由酰胺键共价连接至两个构建单元,每个酰胺键在核心单元中存在的氮原子与构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成;

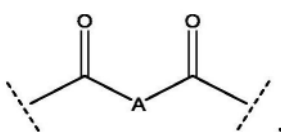
[0011] 树枝状大分子是五代构建单元树枝状大分子;

[0012] 其中不同代的构建单元通过在一个构建单元中存在的氮原子和另一个构建单元

中存在的酰基的碳原子之间形成的酰胺键彼此共价连接；

[0013] 树枝状大分子进一步包括：

[0014] iii) 多个第一端基(T1)，各自包括核苷类似物的残基，其具有与下式的二酰基连接基团共价连接的羟基：

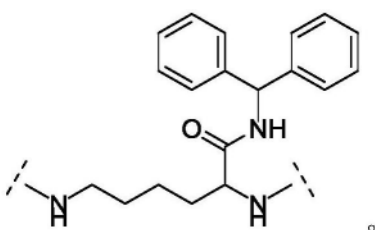
[0015]  其中A为被至少一个O、S、NH或N(Me)间隔的C₂-C₁₀亚烷基，或

其中A为选自四氢呋喃、四氢噻吩、吡咯烷和N-甲基吡咯烷组成的组的杂环；以及

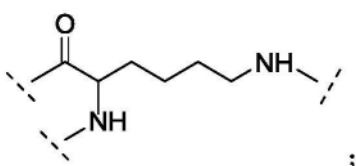
[0016] iv) 多个第二端基(T2)，其各自包括亲水性聚合物基团；

[0017] 或其药学上可接受的盐。

[0018] 在一些实施方案中，核苷类似物选自吉西他滨、阿糖胞苷和阿扎胞苷组成的组。在一些实施方案中，核苷类似物是吉西他滨。在一些实施方案中，核心单元由包括两个氨基的核心单元前体形成。在一些实施方案中，核心单元是：

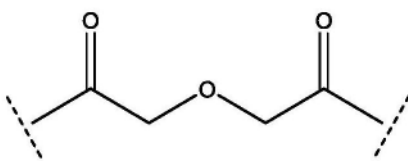
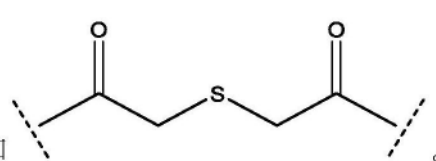
[0019] 。

[0020] 在一些实施方案中，构建单元各自是：

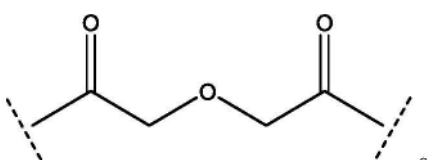
[0021] ；

[0022] 其中每个构建单元的酰基提供用于连接至核心或连接至前一代构建单元的共价连接点；并且其中每个氮原子提供共价连接点，用于共价连接至后续代构建单元、第一端基或第二端基。

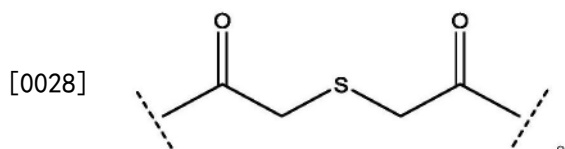
[0023] 在一些实施方案中，二酰基连接基团选自以下组成的组：

[0024]  和 。

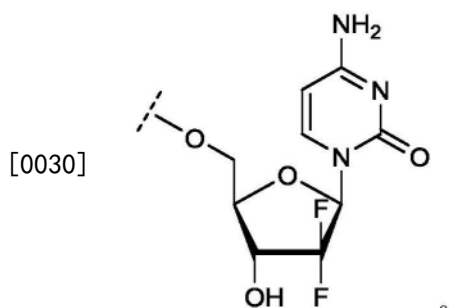
[0025] 在一些实施方案中，二酰基连接基团是：

[0026] 。

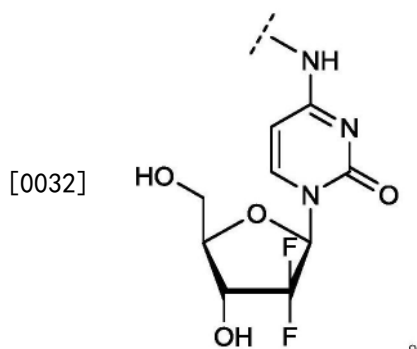
[0027] 在一些实施方案中，二酰基连接基团是：



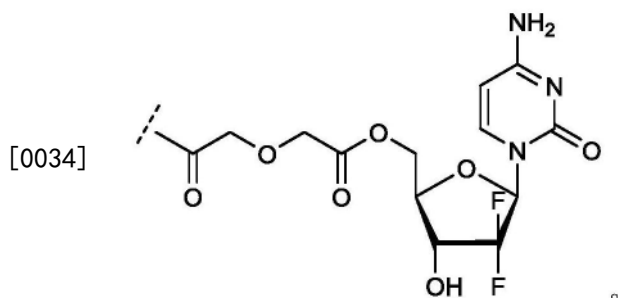
[0029] 在一些实施方案中,核苷类似物是吉西他滨并且共价连接至如下所示的二酰基连接基团:



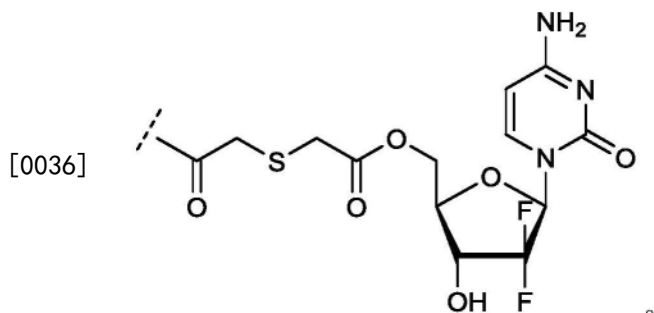
[0031] 在一些实施方案中,核苷类似物是吉西他滨并且共价连接至如下所示的二酰基连接基团:



[0033] 在一些实施方案中,第一端基是:

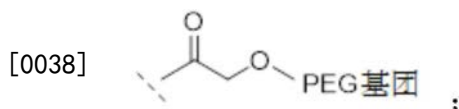


[0035] 在一些实施方案中,第一端基是:



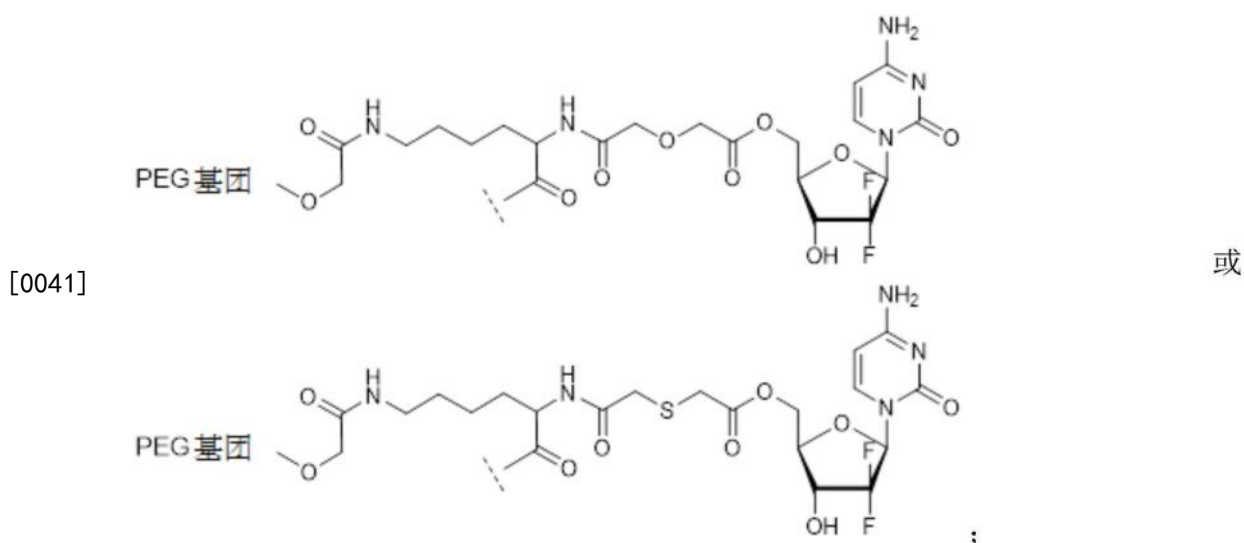
[0037] 在一些实施方案中,亲水性聚合基团选自聚乙二醇 (PEG)、聚乙基恶唑啉 (PEOX) 和

聚肌氨酸组成的组。在一些实施方案中,第二端基包括平均分子量为至少500道尔顿的PEG基团。在一些实施方案中,第二端基包括平均分子量为1900至2300道尔顿的PEG基团。在一些实施方案中,第二端基各自包括经由醚键共价连接至PEG连接基团(L1)的PEG基团,醚键形成于PEG基团中存在的碳原子与PEG连接基团中存在的氧原子之间,并且每个第二端基通过在构建单元中存在的氮原子和PEG连接基团中存在的酰基的碳原子之间形成的酰胺键与构建单元共价连接。在一些实施方案中,第二端基是:



[0039] 并且其中PEG基团是平均分子量在500至2500道尔顿范围内的甲氧基封端的PEG。

[0040] 在一些实施方案中,树枝状大分子包括表面单元,表面单元包括连接至第一端基和第二端基的外部构建单元,表面单元具有以下结构:

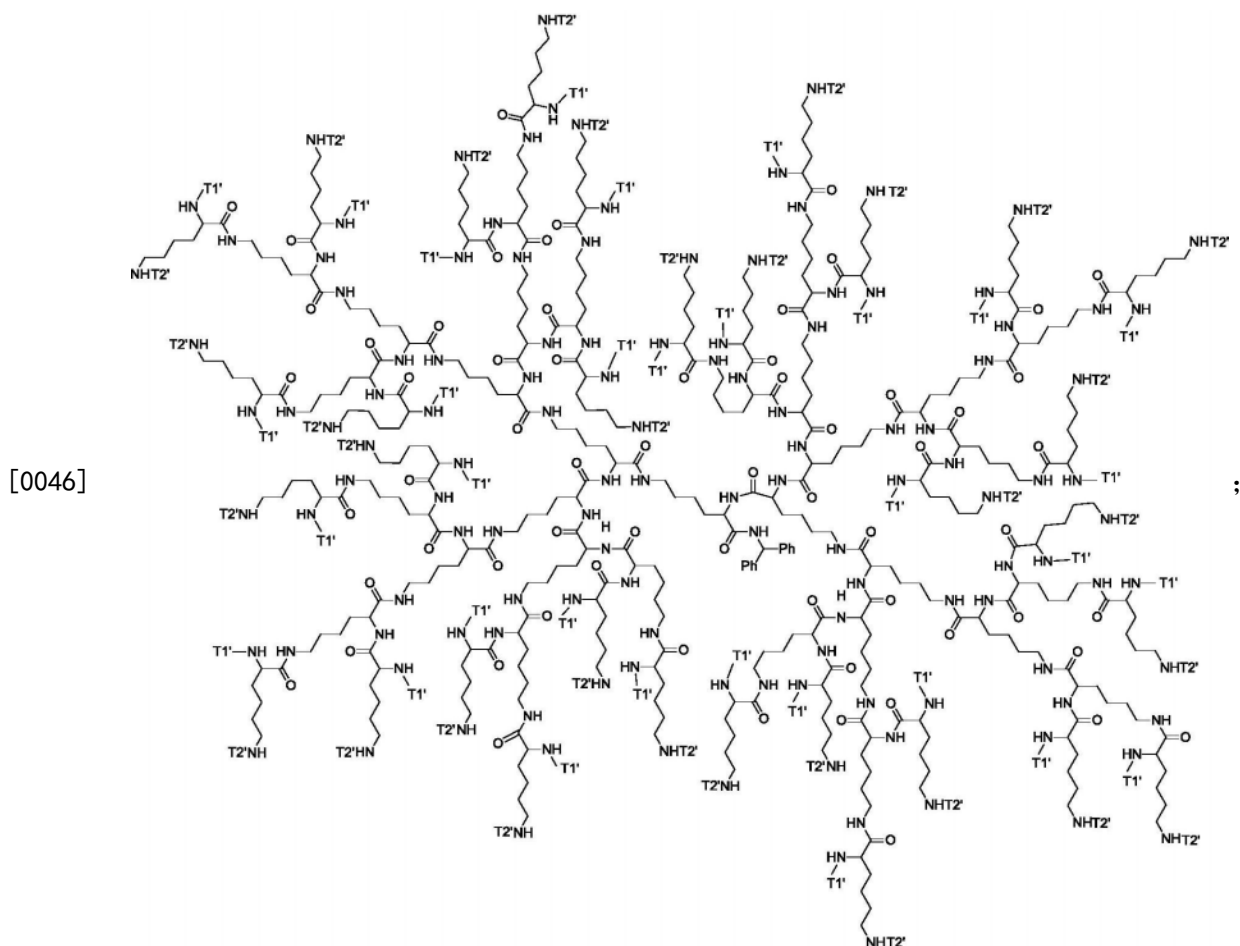


[0042] 并且其中PEG基团是平均分子量在500至2500道尔顿范围内的甲氧基封端的PEG。

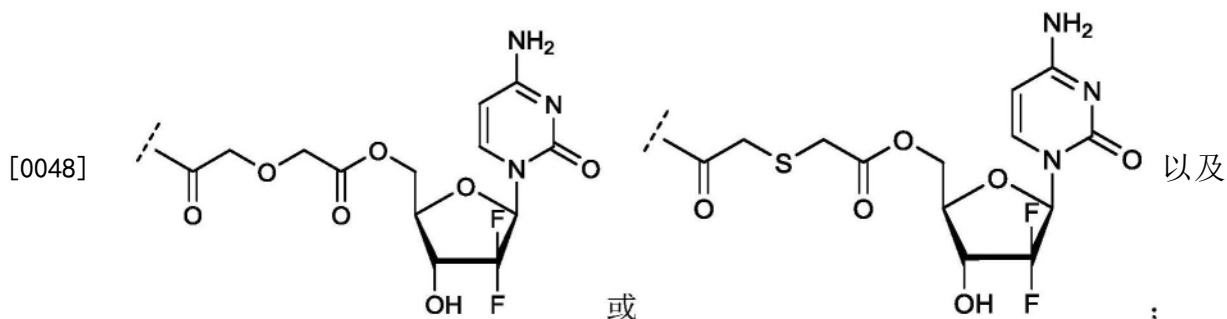
[0043] 在一些实施方案中,树枝状大分子具有28至32个表面单元。在一些实施方案中,存在于外部构建单元中的氮原子的至少40%各自共价连接至第一端基;存在于外部构建单元中的氮原子的至少40%各自共价连接至第二端基。在一些实施方案中,五代构建单元是完整代,并且其中外构建单元提供64个氮原子用于共价连接至第一端基或第二端基,其中24至32个第一端基共价连接至氮原子之一,并且其中24至32个第二端基各自共价连接至氮原子之一。

[0044] 在一些实施方案中,当树枝状大分子暴露于pH7.4和37℃的PBS时,在24h后,核苷类似物的残基的约20%至约90%从树枝状大分子释放。

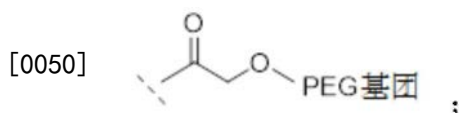
[0045] 在一些实施方案中,树枝状大分子是:



[0047] 其中T1'表示第一端基,其为



[0049] T2'表示第二端基,其为:



[0051] 其中PEG基团是平均分子量在500至2500道尔顿范围内的甲氧基封端的PEG,或T2'表示H,并且其中少于5个T2'是H。

[0052] 在另一方面,提供了药物组合物,其包括:i)如本文的树枝状大分子或其药学上可接受的盐;和ii)药学上可接受的赋形剂。

[0053] 在另一方面,提供了用于治疗癌症的如本文的树枝状大分子或如本文所述的药物组合物。

[0054] 在另一方面,提供了治疗癌症的方法,其包括向有需要的受试对象施用治疗有效

量的如本文所述的树枝状大分子或如本文所述的药物组合物。

[0055] 在另一方面,提供了如本文所述的树枝状大分子或如本文所述的组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

[0056] 在一些实施方案中,癌症选自乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、上消化道癌(例如胰腺癌)和膀胱癌组成的组。在一些实施方案中,施用的树枝状大分子的量足以递送5mg至200mg核苷类似物/m²的活性剂的量。在一些实施方案中,树枝状大分子与另外的抗癌剂联合施用。在一些实施方案中,其它抗癌剂选自含铂药剂、紫杉烷类、免疫肿瘤药剂、PARP抑制剂、拓扑异构酶I抑制剂、抗体、抗叶酸剂、酪氨酸激酶抑制剂、葱环类和长春花生物碱组成的组。在一些实施方案中,另外的抗癌剂选自卡培他滨、Nab-紫杉醇(例如Abraxane[®])、多西他赛、卡巴他赛、多柔比星、长春地辛、伊立替康、亚叶酸、5-氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、培美曲塞、拉帕替尼、尼达尼布、舒尼替尼、奥拉帕尼、尼拉帕尼、卡铂、紫杉醇、SN38、顺铂、奥沙利铂、紫杉醇、厄洛替尼和伊立替康组成的组。

[0057] 在一些实施方案中,树枝状大分子与第二树枝状大分子联合施用,其中第二树枝状大分子包括:

[0058] i) 核心单元(C);以及

[0059] ii) 构建单元(BU),每个构建单元是赖氨酸残基或其类似物;

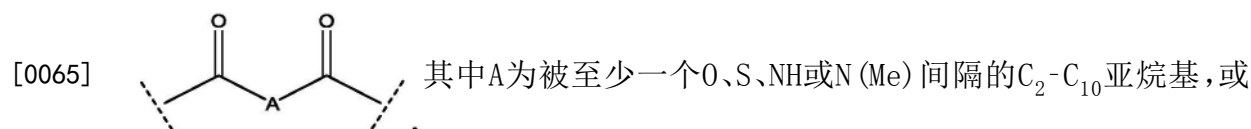
[0060] 其中核心单元经由酰胺键共价连接至两个构建单元,每个酰胺键在核心单元中存在的氮原子与构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成;

[0061] 树枝状大分子是五代构建单元树枝状大分子;

[0062] 其中不同代的构建单元通过在一个构建单元中存在的氮原子和另一个构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成的酰胺键彼此共价连接;

[0063] 树枝状大分子进一步包括:

[0064] iii) 多个第一端基(T1),其各自包括肿瘤药剂的残基,肿瘤药剂具有与下式的二酰基连接基团共价连接的羟基:



其中A为选自四氢呋喃、四氢噻吩、吡咯烷和N-甲基吡咯烷组成的组的杂环;以及

[0066] iv) 多个第二端基(T2),其各自包括亲水性聚合物基团;或其药学上可接受的盐。

[0067] 在一些实施方案中,肿瘤药剂是紫杉烷。在一些实施方案中,紫杉烷选自多西他赛、紫杉醇和卡巴他赛组成的组。在一些实施方案中,紫杉烷是多西他赛。在一些实施方案中,肿瘤药剂是拓扑异构酶I抑制剂。在一些实施方案中,拓扑异构酶I抑制剂是SN-38。

[0068] 在一些实施方案中,与相等剂量的游离核苷类似物给药相比,树枝状大分子给药提供增强的临床功效。在一些实施方案中,与相等剂量的游离核苷类似物给药相比,树枝状大分子给药提供降低的副作用和/或毒性。在一些实施方案中,与等剂量的游离核苷类似物给药相比,树枝状大分子给药在给药后的延长时间内提供治疗有效的吉西他滨血浆浓度水平。

附图说明

[0069] 图1显示在pH7.4和37℃的PBS中从树枝状大分子释放的吉西他滨的量(%)。

[0070] 图2显示在pH4.5和37℃的1%柠檬酸盐缓冲液中从树枝状大分子释放的吉西他滨的量(%)。

[0071] 图3显示了血浆释放研究的结果,证明了吉西他滨在给药后从树枝状大分子的释放速率(%)。

[0072] 图4显示树枝状大分子针对CAPAN-1肿瘤异种移植物的抗肿瘤功效(以平均肿瘤体积测量)。

[0073] 图5显示了基于每周一次和每周两次给药间隔的树枝状大分子针对CAPAN-1肿瘤异种移植物的抗肿瘤功效(以平均肿瘤体积测量)。

[0074] 图6显示单独或与Abraxane®或DEP-DTX联合的树枝状大分子对CAPAN-1肿瘤异种移植物的抗肿瘤功效。

[0075] 图7显示树枝状大分子针对CAPAN-1肿瘤异种移植物的抗肿瘤功效(以平均肿瘤体积测量)。

[0076] 图8显示树枝状大分子针对A549肿瘤异种移植物的抗肿瘤功效(以平均肿瘤体积测量)。

[0077] 图9显示单独或与卡铂联合的树枝状大分子对OVCAR-3肿瘤异种移植物的抗肿瘤功效(以平均肿瘤体积测量)。

具体实施方式

[0078] 一般定义

[0079] 除非另外具体定义,否则本文使用的所有技术和科学术语应被认为具有与本领域普通技术人员通常理解的相同含义(例如,化学、生物化学、药物化学、聚合物化学等)。

[0080] 如本文所用,术语“和/或”,例如“X和/或Y”应理解为意指“X和Y”或“X或Y”,并且应理解为提供对两种含义或任一种含义的明确支持。

[0081] 如本文所用,除非有相反说明,术语“约”是指指定值的+/-20%,更优选+/-10%。

[0082] 如本文所用,单数形式“一(a)”,“一(an)”和“所述”包括复数方面,除非上下文另外明确指出。

[0083] 在整个说明书中,词语“包括(comprise)”或诸如“包括(comprises)”或“包括(comprising)”的变体将被理解为暗示包括的要素、整数或步骤,或要素、整数或步骤的组,但不排除任何其它要素、整数或步骤,或要素、整数或步骤的组。

[0084] 如本文所用,术语“受试对象”是指易患疾病或病症的任何生物体。在一个实施方案中,疾病或病症是癌症。例如,受试对象可以是哺乳动物、灵长类动物、家畜(例如绵羊、母牛、马、猪)、伴侣动物(例如狗、猫)或实验室动物(例如小鼠、兔、大鼠、豚鼠、仓鼠)。在一个实例中,受试对象是哺乳动物。在一个实施方案中,受试对象是人。

[0085] 如本文所用,术语“治疗”包括减轻与特定病症或病状相关的症状和消除症状。例如,如本文所用,术语“治疗癌症”是指减轻与癌症相关的症状并消除症状。在一个实施方案中,术语“治疗癌症”是指减小癌性肿瘤大小。在一个实施方案中,术语“治疗癌症”是指无进展生存期的增加。如本文所用,术语“无进展生存期”是指在治疗癌症期间和之后患者患有

疾病(即癌症),但不具有疾病症状的复发或增加的时间长度。

[0086] 如本领域技术人员所理解的,树枝状大分子将以治疗有效量施用。如本文所用的术语“治疗有效量”是指以足以在一定程度上减轻或预防所治疗的障碍或病症的一种或多种症状的量施用的树枝状大分子。结果可以是疾病或病症的体征、症状或原因的减少和/或减轻,或生物系统的任何其它期望的改变。在一个实施方案中,术语“治疗有效量”是指以足以导致癌性肿瘤尺寸减小的量施用的树枝状大分子。在一个实施方案中,术语“治疗有效量”是指以足以导致无进展生存期增加的量施用的树枝状大分子。如本文所用的术语“有效量”是指有效实现所需药理作用或治疗改善而没有不适当的不良副作用或实现所需药理作用或治疗改善而副作用降低的树枝状大分子的量。仅举例而言,治疗有效量可通过常规实验测定,包括但不限于剂量递增临床试验。术语“治疗有效量”包括例如预防有效量。在一个实施方案中,预防有效量是足以预防转移的量。应理解,由于化合物的代谢和受试对象的年龄、体重、一般状况,所治疗的状况,所治疗的状况的严重性和处方医师的判断中的任一项的变化,“有效量”或“治疗有效量”可因受试对象而异。因此,不总是可能指定精确的“有效量”。然而,在任何个别情况下的适当的“有效量”可以由本领域普通技术人员使用常规实验来确定。当组合使用多于一种治疗剂时,每种治疗剂的“治疗有效量”可以是指当单独使用时治疗有效的治疗剂的量,或者可以是指由于其与一种或多种另外的治疗剂组合而治疗有效的减少的量。

[0087] 树枝状大分子的合适盐包括与有机或无机酸或碱形成的那些盐。如本文所用,短语“药学上可接受的盐”是指药学上可接受的有机或无机盐。示例性酸加成盐包括但不限于硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸式柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、鞣酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、富马酸盐、葡糖酸盐、葡糖醛酸盐、糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和双羟萘酸盐(即1,1'-亚甲基-双-(2-羟基-3-萘甲酸盐))盐。示例性的碱加成盐包括但不限于铵盐、碱金属盐,例如钾和钠的那些、碱土金属盐,例如钙和镁的那些、以及与有机碱的盐,例如二环己基胺、N-甲基-D-葡糖胺、吗啉、硫代吗啉、哌啶、吡咯烷、单-、二-或三-低级烷基胺、例如乙基-、叔丁基-、二乙基-、二异丙基-、三乙基-、三丁基-或二甲基-丙胺、或单-、二-或三羟基低级烷基胺、例如单-、二-或三乙醇胺。药学上可接受的盐可涉及包括另一分子,例如乙酸根离子、琥珀酸根离子或其它抗衡离子。抗衡离子可以是稳定母体化合物上的电荷的任何有机或无机部分。此外,药学上可接受的盐在其结构中可具有多于一个带电原子。其中多个带电原子是药学上可接受的盐的一部分的情况可具有多个抗衡离子。因此,药学上可接受的盐可具有一个或多个带电原子和/或一个或多个抗衡离子。还应当理解,非药学上可接受的盐也落入本发明的范围内,因为这些可用作制备药学上可接受的盐的中间体或可用于储存或运输过程中。

[0088] 有机和/或药物化学领域的技术人员将理解许多有机化合物可以与它们在其中反应或从其中沉淀或结晶的溶剂形成络合物。这些复合物称为“溶剂合物”。例如,与水的复合物称为“水合物”。如本文所用,短语“药学上可接受的溶剂化物”或“溶剂化物”是指一种或多种溶剂分子与本发明的化合物的缔合。形成药学上可接受的溶剂化物的溶剂的实例包括但不限于水、异丙醇、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸和乙醇胺。

[0089] 如本文所用,术语“树枝状大分子”是指含有核心和附接到核心的树突的分子。每个树突由几代分支的构建单元组成,导致分支结构的分支数目随着每代构建单元而增加。“树枝状大分子”,包括药物-树枝状大分子缀合物,可以包括如上定义的药学上可接受的盐或溶剂化物。

[0090] 如本文所用,术语“构建单元”是指为赖氨酸残基或其类似物的支化分子,其具有三个官能团,一个用于连接至核心或前一代构建单元,且至少两个官能团用于连接至下一代构建单元或形成树枝状大分子分子的表面。

[0091] 如本文所用,术语“连接”是指化学组分之间通过共价键合。如本文所用,术语“共价键合”是指通过在原子之间共享一个或多个电子,尤其是电子对形成的化学键。术语“共价键合”可与术语“共价连接”互换使用。

[0092] 树枝状大分子

[0093] 在第一方面,提供了树枝状大分子,其包括:

[0094] i) 核心单元(C);以及

[0095] ii) 构建单元(BU),每个构建单元是赖氨酸残基或其类似物;

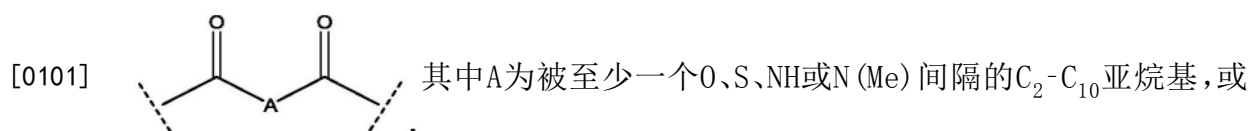
[0096] 其中核心单元经由酰胺键共价连接至两个构建单元,每个酰胺键在核心单元中存在的氮原子与构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成;

[0097] 树枝状大分子是五代构建单元树枝状大分子;

[0098] 其中不同代的构建单元通过在一个构建单元中存在的氮原子和另一个构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成的酰胺键彼此共价连接;

[0099] 树枝状大分子进一步包括:

[0100] iii) 多个第一端基(T1),各自包括核苷类似物的残基,其具有与下式的二酰基连接基团共价连接的羟基:



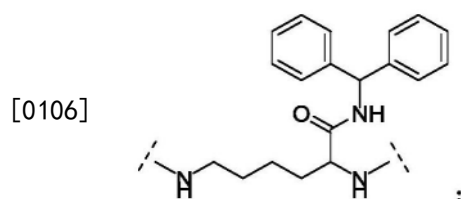
其中A为选自四氢呋喃、四氢噻吩、吡咯烷和N-甲基吡咯烷组成的组的杂环;以及

[0102] iv) 多个第二端基(T2),其各自包括亲水性聚合物基团;

[0103] 或其药学上可接受的盐。

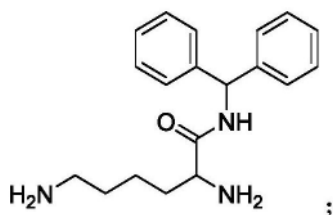
[0104] 核心单元

[0105] 树枝状大分子的核心单元经由酰胺键共价连接至两个构建单元,每个酰胺键在核心单元中存在的氮原子与构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成。因此,核心单元可以例如由包括两个氨基的核心单元前体形成。任何合适的含二氨基分子可用作核心单元前体。在一些实施方案中,核心单元是:



[0107] 并且可以例如由核心单元前体形成:

[0108]

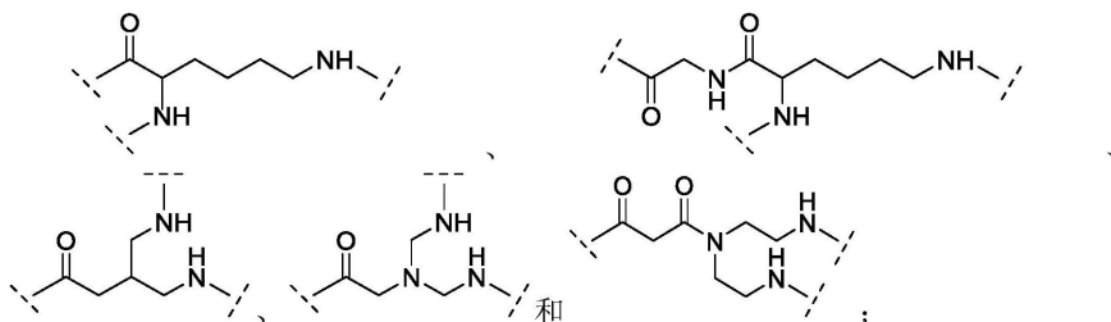


[0109] 具有两个反应性(氨基)氮。

[0110] 构建单元

[0111] 构建单元(BU)是赖氨酸残基或其类似物,并且可以由合适的构建单元前体形成,例如赖氨酸或含有适当保护基的赖氨酸类似物。赖氨酸类似物具有两个用于与后一代构建单元键合的氨基氮原子和用于与前一代构建单元或核心键合的酰基。合适的构建单元的实例包括:

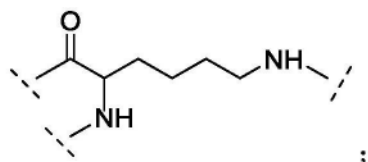
[0112]



[0113] 其中每个构建单元的酰基提供用于连接至核心或连接至前一代构建单元的共价连接点;并且其中每个氮原子提供共价连接点,用于共价连接至后续代构建单元、第一端基或第二端基。

[0114] 在一些优选的实施方案中,构建单元各自是:

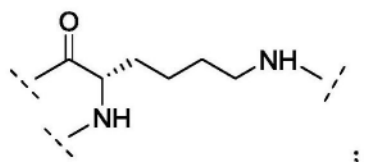
[0115]



[0116] 其中每个构建单元的酰基提供用于连接至核心或连接至前一代构建单元的共价连接点;并且其中每个氮原子提供共价连接点,用于共价连接至后续代构建单元、第一端基或第二端基。

[0117] 在一些优选的实施方案中,构建单元各自是:

[0118]



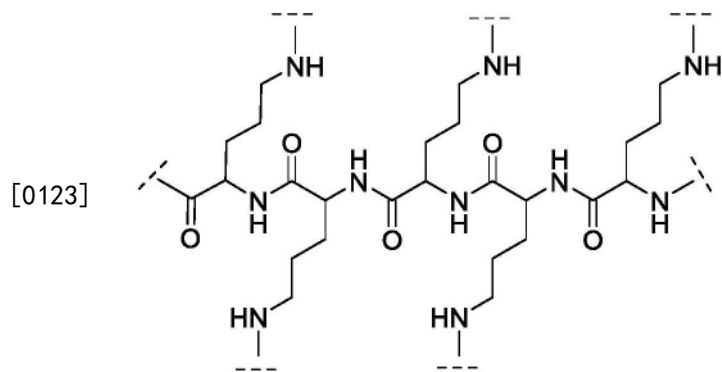
[0119] 其中每个构建单元的酰基提供用于连接至核心或连接至前一代构建单元的共价连接点;并且其中每个氮原子提供共价连接点,用于共价连接至后续代构建单元、第一端基或第二端基。

[0120] 构建单元的最外代(BU_{gt})可以由赖氨酸或赖氨酸类似物构建单元形成,如在如上所述的构建单元(BU)的其它代中使用的。最外面一代的构建单元(BU_{gt})是距离树枝状大分

子的核最外面的构建单元,即没有另外一代的构建单元连接到最外面一代的构建单元($BU_{\text{外}}$)。

[0121] 应当理解,树枝状大分子的树突可以例如通过相应地连接构建单元(BU)合成为所需数目的代。在一些实施方案中,构建单元(BU)的每一代可以由相同的构建单元形成,例如构建单元的所有代可以是赖氨酸构建单元。在一些其它实施方案中,一代或多代构建单元可由与其它代构建单元不同的构建单元形成。

[0122] 树枝状大分子是五代构建单元树枝状大分子。五代构建单元树枝状大分子是具有包括五个与另一个共价连接的构建单元的结构树枝状大分子,例如在构建单元是赖氨酸的情况下,其可包括亚结构:



[0124] 在一些实施方案中,树枝状大分子具有五完整代的构建单元。对于具有两个反应性胺基的核,这样的树枝状大分子将包括62个构建单元(即核心单元+2BU+4BU+8BU+16BU+32BU)。然而,应当理解,由于制备树枝状大分子的合成方法的性质,制备树枝状大分子所进行的一个或多个反应可能没有完全完成。因此,在一些实施方案中,树枝状大分子可包括不完整代的构建单元。例如,可以获得树枝状大分子的群体,其中树枝状大分子具有每个树枝状大分子的构建单元数目的分布。在一些实施方案中,获得树枝状大分子群体,其具有至少55、或至少56、或至少57、或至少58、或至少59、或至少60的每个树枝状大分子的构建单元的平均数。在一些实施方案中,获得树枝状大分子群体,其中至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的树枝状大分子具有55个或更多个构建单元。在一些实施方案中,获得树枝状大分子群体,其中至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的树枝状大分子具有60个或更多个构建单元。

[0125] 核心的每个反应性(氨基)基团代表包括一代或多代构建单元的树突的结合位点。芯具有两个反应性(氨基)基团和两个树突,用于产生待连接的构建单元。

[0126] 在一些实施方案中,每个树突(X)中构建单元的每个代可由式 $[BU]_2(b-1)$ 表示,其中b为代数。具有五代完整构建单元的树突(X)表示为 $[BU]_1-[BU]_2-[BU]_4-[BU]_8-[BU]_{16}$ 。

[0127] 核苷类似物

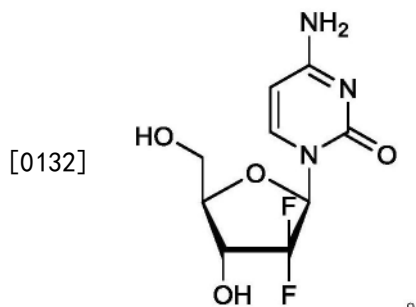
[0128] 树枝状大分子包括核苷类似物的残基。核苷类似物是一组用于诸如癌症治疗的治疗剂。核苷类似物含有一个或多个羟基,其可用于通过连接基团将核苷类似物连接到树枝状大分子上。在一些实施方案中,除羟基外,核苷类似物还可含有可用于连接树枝状大分子的其它基团。类似地,核苷类似物可含有一个或多个可用于将核苷类似物连接至连接基团(例如,二酰基连接基团)的氨基。

[0129] 核苷类似物的实例包括嘧啶核苷类似物,例如吉西他滨、脱氧胞苷、阿糖胞苷、5'-

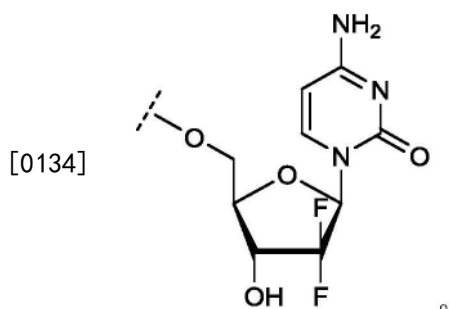
氮杂-胞苷(也称为阿扎胞苷)、卡培他滨和地西他滨。其它实例包括嘌呤核苷类似物,如克拉屈滨、氯法拉滨、氟达拉滨、去氧氟尿苷、呋咯地辛、奈拉滨和喷司他丁。

[0130] 在一些实施方案中,该核苷类似物是嘧啶核苷类似物。在一些实施方案中,核苷类似物是抗癌核苷类似物。在一些实施方案中,核苷类似物是吉西他滨、阿扎胞苷或阿糖胞苷。

[0131] 在一个实施方案中,核苷类似物是吉西他滨。吉西他滨是具有以下结构的肿瘤药剂:

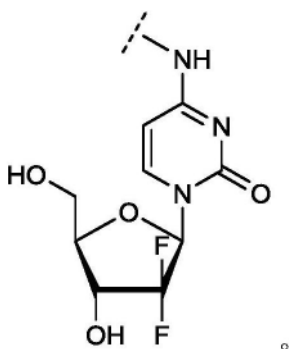


[0133] 在一些实施方案中,具有活性的核苷类似物的残基通过核苷类似物的3'-或5'-位与二酰基连接基团连接。在一些实施方案中,具有活性的核苷类似物的残基具有亚结构:3'-连接的嘧啶核苷类似物。在一些实施方案中,具有活性的核苷类似物的残基具有亚结构:5'-连接的嘧啶核苷类似物。在一些实施方案中,具有活性的核苷类似物的残基具有亚结构:3'-连接的嘌呤核苷类似物。在一些实施方案中,具有活性的核苷类似物的残基具有亚结构:5'-连接的嘌呤核苷类似物。在一些实施方案中,核苷类似物是通过5'羟基连接的抗癌核苷类似物。在一些实施方案中,核苷类似物是吉西他滨、氮杂胞苷或阿糖胞苷,其通过5'羟基连接的。在一个实施方案中,核苷类似物是通过5'羟基连接的吉西他滨。换言之,在该实施方案中,核苷类似物如下所示共价连接:



[0135] 在一些实施方案中,具有活性的核苷类似物的残基具有氨基,并且具有活性的核苷类似物的残基通过氨基与二酰基连接基团连接。在一些实施方案中,核苷类似物是通过氨基连接的吉西他滨。换言之,在该实施方案中,核苷类似物如下所示共价连接:

[0136]

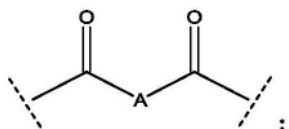


[0137] 在体内给药时,通常树枝状大分子释放核苷类似物(例如吉西他滨)。

[0138] 连接基团

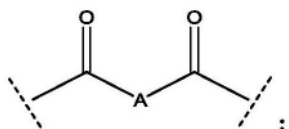
[0139] 具有活性的核苷类似物的残基共价连接的二酰基连接基团基团共价连接:

[0140]

[0141] 其中A为被至少一个O、S、NH或N(Me)间隔的C₂-C₁₀亚烷基,或其中A为选自四氢呋喃、四氢噻吩、吡咯烷和N-甲基吡咯烷组成的组的杂环。[0142] 如本文所用,术语“烷基”是指大小为1至10个碳原子的直链(即直链)或支链烃(即C₁₋₁₀烷基)。因此,烷基部分包括,除非明确限于较小的基团,大小范围例如约1至约6个碳原子或更大的部分,如甲基、乙基、正丙基、异丙基和/或丁基、戊基、己基和更高级的异构体。在一个实例中,烷基部分具有1至10个碳原子(即C₁₋₁₀烷基)。在另一个实例中,烷基部分具有2至4个碳原子,优选4个碳原子。[0143] 如本文所用,术语“亚烷基”是指大小为1至10个碳原子的直链(即直链)或支链烃(即C₁₋₁₀亚烷基)。因此,亚烷基部分包括例如-CH₂-、-CH₂CH₂-、-CH₂CH₂CH₂-、-CH₂CH(CH₃)-、-CH₂CH₂CH₂CH₂-、-CH₂CH(CH₃)CH₂-等。

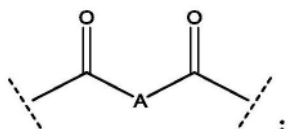
[0144] 在一些实施方案中,二酰基连接基团是:

[0145]

[0146] 其中A为被至少一个O、S、NH或N(Me)间隔的C₂-C₁₀亚烷基(例如直链或支链)。

[0147] 在一些实施方案中,二酰基连接基团是:

[0148]

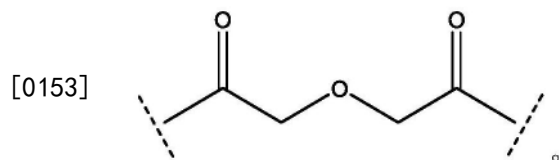
[0149] 其中A为被至少一个O、S、NH或N(Me)间隔的C₂-C₆亚烷基(例如直链或支链)。

[0150] 在一些实施方案中,二酰基连接基团选自以下组成的组:

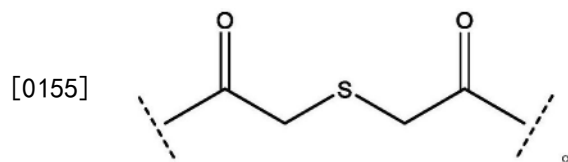
[0151]



[0152] 在一些实施方案中,二酰基连接基团是:

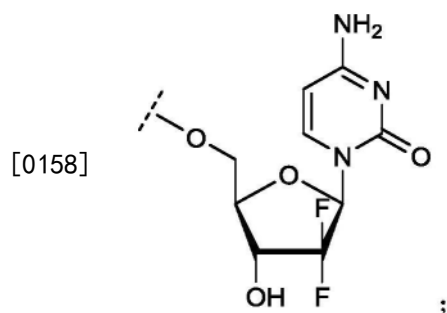


[0154] 在一些实施方案中,二酰基连接基团是:

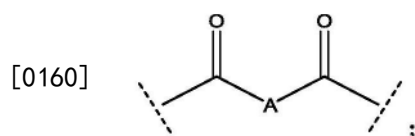


[0156] 具有活性的核苷类似物的残基通常通过在作为核苷类似物活性侧链的一部分存在的氧原子和作为二酰基连接基团的一部分存在的酰基的碳原子之间形成的键与二酰基连接基团共价连接。二酰基连接基团的其它酰基与外部构建单元中存在的氮原子形成酰胺键。

[0157] 在一些实施方案中,核苷类似物是吉西他滨并且共价连接至如下所示的二酰基连接基团:

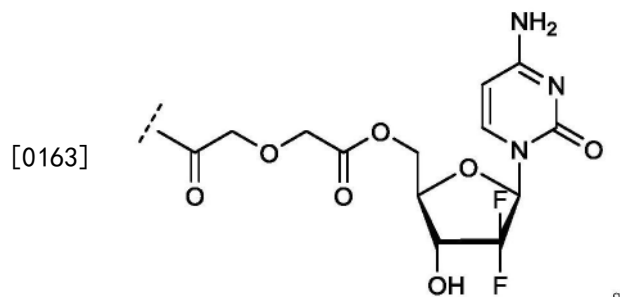


[0159] 并且其中二酰基连接基团是:

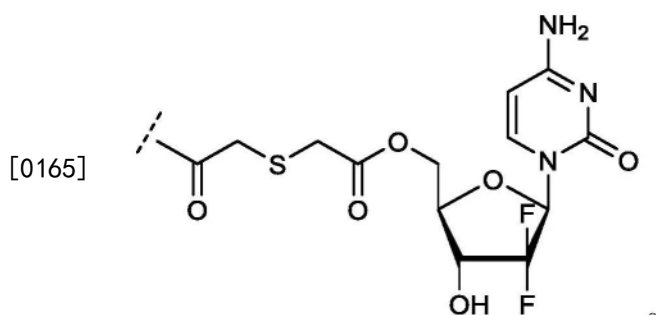


[0161] 其中A为被O、S、NH或N(Me)间隔的C₂-C₁₀亚烷基,或其中A为选自四氢呋喃、四氢噻吩、吡咯烷和N-甲基吡咯烷组成的组的杂环。

[0162] 在一些实施方案中,第一端基是:



[0164] 在一些实施方案中,第一端基是:



[0166] 本发明人已经发现,通过特定的可裂解连接基团与核苷类似物结构中存在的特定羟基的组合,可以实现核苷类似物活性的受控和一致的释放,导致良好的生物活性和良好的药代动力学性质。例如,核苷类似物的3'位通常比5'位更有空间位阻。然而,已经鉴定了以所需速率从树枝状大分子释放药物的连接基团,其可以高收率与有活性的核苷类似物缀合,并且其还可以用于实现将有活性的核苷类似物良好水平地装载到树枝状大分子上。

[0167] 虽然具有活性的核苷类似物的残基通常通过在作为具有活性的核苷类似物的一部分存在的氧原子之间形成的键与二酰基连接基团共价连接,但该键也可通过另一合适的原子形成,例如当具有活性的核苷类似物含有氨基时,该键可通过存在于氨基中的氮原子形成。

[0168] 第二端基

[0169] 树枝状大分子包括多个第二端基(T2),其各自包括亲水性聚合物基团。第二端基T2是药代动力学调节剂。药代动力学调节剂是可以改变或调节树枝状大分子或树枝状大分子递送的药物活性剂(即吉西他滨)的药代动力学特征的试剂。药代动力学调节剂可以调节药物活性剂的树枝状大分子的吸收、分布、代谢、排泄和/或毒性。药代动力学调节剂(T2)可以通过减慢或增加活性剂通过化学(例如水解)或酶降解途径从树枝状大分子释放的速率来影响药物活性剂的释放速率。药代动力学调节剂(T2)可以改变树枝状大分子的溶解度曲线,增加或降低树枝状大分子在药学上可接受的载体中的溶解度。药代动力学调节剂(T2)可以帮助树枝状大分子将药物活性剂递送至特定组织(例如肿瘤)。药代动力学调节剂(T2)可以通过降低树枝状大分子的清除率延长药物活性剂的半衰期。

[0170] 术语“亲水性聚合物基团”通常是指在25℃下在水中具有至少25mg/ml,更优选至少50mg/ml,并且还更优选至少100mg/ml的溶解度的聚合物基团。在一些实施方案中,亲水性聚合基团包括氨基酸、烷氧基或烷基(酰基)氨基的重复单元。在一些实施方案中,亲水性聚合基团包括氨基酸如肌氨酸的重复单元。在一些实施方案中,亲水性聚合物基团包括烷氧基的重复单元(例如,亲水性聚合物是PEG基团)。在一些实施方案中,亲水性聚合物包括烷基(酰基)氨基的重复单元(例如,亲水性聚合物为PEOX基团)。在一些实施方案中,亲水性聚合物基团是PEG基团。在一些实施方案中,亲水性聚合物基团是PEOX基团。在一些实施方案中,亲水性聚合基团是聚肌氨酸基团。

[0171] 在一些实施方案中,亲水性聚合物基团包括至少10个单体单元。在一些实施方案中,亲水性聚合物基团包括至多100个单体单元。在一些实施方案中,亲水性聚合物基团包括10至100,或10至50个单体单元。

[0172] 在一个实施方案中,第二端基包括PEG基团(即,亲水性聚合物基团是PEG基团)。PEG基团是聚乙二醇基团,即包括式-CH₂CH₂O-的重复单元的基团。用于产生本发明的树枝状

大分子的PEG材料通常含有分子量具有一定变化(即, $\pm 10\%$)的PEG的混合物,并且因此指定的分子量通常是PEG组合物的平均分子量的近似值。例如,术语“PEG_{~2100}”是指平均分子量为约2100道尔顿,即 $\pm 10\%$ (即, PEG₁₈₉₀至PEG₂₃₁₀)的聚乙二醇。术语“PEG_{~2300}”是指平均分子量为约2300道尔顿,即 $\pm 10\%$ (即, PEG₂₀₇₀至PEG₂₅₃₀)的聚乙二醇。通常使用三种方法计算MW平均值:数均分子量、重均分子量和z均分子量。如本文所用,短语“分子量”旨在是指可以使用本领域熟知的技术测量的重均分子量,技术包括但不限于NMR、质谱分析、基质辅助激光解吸电离飞行时间(MALDI-TOF)、凝胶渗透色谱或其它液相色谱技术、光散射技术、超速离心和粘度测定法。

[0173] 在一些实施方案中,第二端基包括平均分子量为约200至5000道尔顿的PEG基团。在一些实施方案中,第二端基包括具有至少500道尔顿的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,第二端基包括具有至少750道尔顿的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,第二端基包括平均分子量为500至2500道尔顿的PEG基团。

[0174] 在一些实施方案中,第二端基包括平均分子量为1900至2300道尔顿的PEG基团。在一些实施方案中,第二端基包括平均分子量为2000至2200道尔顿的PEG基团。在一些实施方案中,第二端基包括具有约2100道尔顿的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,第二端基包括平均分子量为约1900、约2000、约2100、约2200、约2300、约2400或约2500道尔顿的PEG基团。

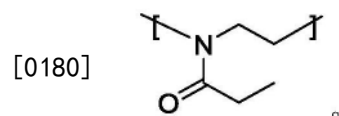
[0175] 在一些实施方案中,第二端基包括平均分子量为1000至1200道尔顿的PEG基团。在一些实施方案中,第二端基包括具有约1100道尔顿的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,第二端基包括具有约1000、约1100或约1200道尔顿的平均分子量的PEG基团。

[0176] 在一些实施方案中,第二端基包括平均分子量为500至650道尔顿的PEG基团。在一些实施方案中,第二端基包括具有约570道尔顿的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,第二端基包括具有约500、约530、约550、约570、约590、约610、约630或约650道尔顿的平均分子量的PEG基团。

[0177] 在一些实施方案中,PEG基团的多分散指数(PDI)为约1.00至约1.50、约1.00至约1.25、或约1.00至约1.10。在一些实施方案中,PEG基团具有约1.05的多分散指数(PDI)。术语“多分散指数”是指给定聚合物样品中分子量分布的量度。多分散指数(PDI)等于重均分子量(M_w)除以数均分子量(M_n),并表示一批聚合物中单个分子量的分布。多分散指数(PDI)具有等于或大于1的值,但是当聚合物接近均匀的链长和平均分子量时,多分散指数(PDI)将更接近1。

[0178] 当第二端基包括PEG基团时,PEG基团可以是直链或支链的。如果需要,可以使用封端的PEG基团。在一些实施方案中,PEG基团是甲氧基封端的PEG。

[0179] 在一个实施方案中,第二端基包括PEOX基团(即,亲水性聚合物基团为PEOX基团)。PEOX基团是聚乙基恶唑啉基团,即包括下式的重复单元的基团:



[0181] PEOX基团是如此命名的,因为它们可以通过乙基恶唑啉的聚合产生。用于制备本发明的树枝状大分子的PEOX材料通常包括具有一定分子量变化(即, $\pm 10\%$)的PEOX的混合

物,并且因此,当指定分子量时,其通常为PEOX组合物的平均分子量的近似值。在一些实施方案中,第二端基包括具有至少750道尔顿、至少1000道尔顿或至少1500道尔顿的平均分子量的PEOX基团。在一些实施方案中,第二端基包括平均分子量在750道尔顿至2500道尔顿、或1000道尔顿至2000道尔顿范围内的PEOX基团。如果需要,可以使用封端的PEOX基团。在一些实施方案中,PEOX基团是甲氧基封端的PEOX。

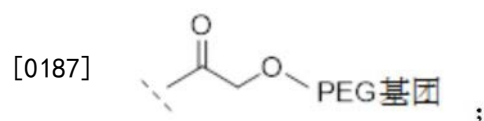
[0182] 在一些实施方案中,亲水性聚合基团包括多肌氨酸基团。在一些实施方案中,多肌氨酸基团具有至少750道尔顿、至少1000道尔顿或至少1500道尔顿的平均分子量。在一些实施方案中,亲水性聚合物基团包括平均分子量在750道尔顿至2500道尔顿、或1000道尔顿至2000道尔顿范围内的聚肌氨酸基团。

[0183] 亲水性聚合物基团可以通过任何合适的方式连接到外部构建单元。在一些实施方案中,使用连接基团将亲水性聚合物基团连接到外部构建单元。

[0184] 第二端基可以通过任何合适的方法连接到外部构建单元。在一些实施方案中,连接基团用于将亲水性聚合物基团(例如,PEG基团、PEOX基团或聚肌氨酸基团)连接至外部构建单元。

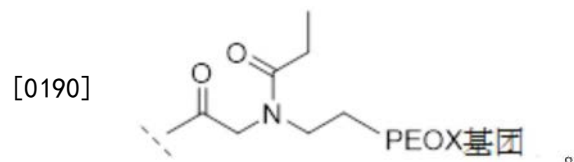
[0185] 第二端基通常通过使用第二端基前体连接,第二端基前体包括与胺基反应的反应性基团,例如反应性酰基(其可形成酰胺键)或醛(其可在还原胺化条件下形成胺基)。

[0186] 在一些实施方案中,第二端基各自包括经由醚键共价连接至PEG连接基团(L1)的PEG基团,醚键形成于PEG基团中存在的碳原子与PEG连接基团中存在的氧原子之间,并且每个第二端基通过在构建单元中存在的氮原子和PEG连接基团中存在的酰基的碳原子之间形成的酰胺键与构建单元共价连接。在一些实施方案中,第二端基是:

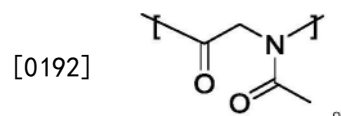


[0188] 并且其中PEG基团是平均分子量在约500至2500道尔顿范围内的甲氧基封端的PEG。

[0189] 在一些实施方案中,第二端基各自包括经由键共价连接至PEOX连接基团(L1')的PEOX基团,键形成于PEOX基团中存在的氮原子与PEOX连接基团中存在的碳原子之间,并且每个第二端基通过在构建单元中存在的氮原子和PEOX连接基团中存在的酰基的碳原子之间形成的酰胺键与构建单元共价连接。在一些实施方案中,第二端基是:



[0191] 在一些实施方案中,第二端基各自包括多肌氨酸基团,即包括下式的重复单元的基团:



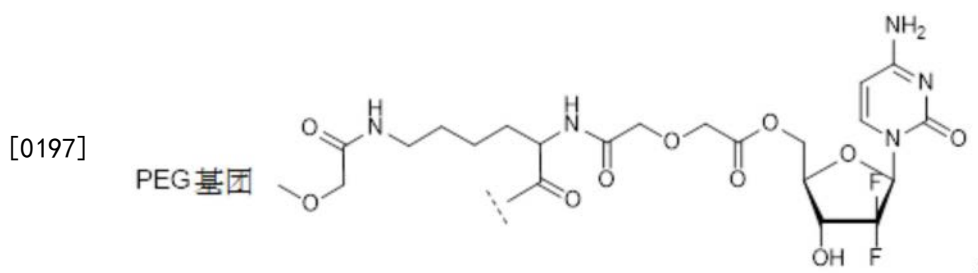
[0193] 在一些实施方案中,多肌氨酸基团通过在构建单元中存在的氮原子和多肌氨酸基团中存在的酰基的碳原子之间形成的酰胺键与构建单元连接。在一些实施方案中,亲水性

聚合物基团包括平均分子量为至少750道尔顿、至少1000道尔顿或至少1500道尔顿的聚肌氨酸基团。在一些实施方案中,第二端基包括平均分子量在750道尔顿至2500道尔顿、或1000道尔顿至2000道尔顿范围内的聚肌氨酸基团。

[0194] 在本发明的树枝状大分子中,通常存在于外部构建单元中的至少三分之一的氮原子各自共价连接至第一端基;存在于外部构建单元中的氮原子的至少三分之一各自共价连接至第二端基。

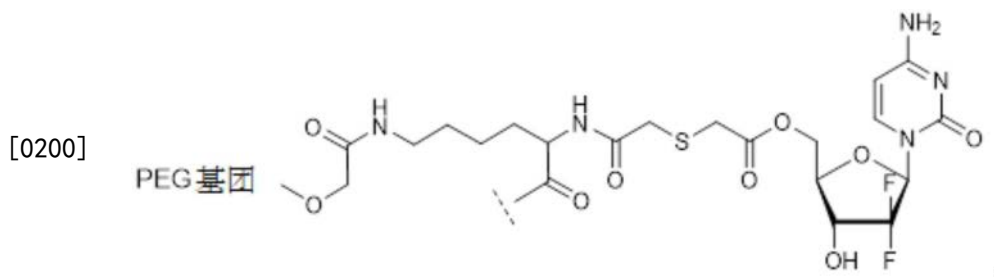
[0195] 在一些实施方案中,树枝状大分子具有受控的化学计量和/或拓扑结构。例如,树枝状大分子通常使用允许高度控制树枝状大分子上存在的第一和第二端基的数目和排列的合成方法来生产。在一些实施方案中,每个官能化的外部构建单元包括一个第一端基和一个第二端基。

[0196] 在一些实施方案中,树枝状大分子包括表面单元,表面单元包括连接至第一端基和第二端基的外部构建单元,表面单元具有以下结构:



[0198] 并且其中PEG基团是平均分子量在约500至2500道尔顿(例如约2000至2400道尔顿)范围内的甲氧基封端的PEG。

[0199] 在一些实施方案中,树枝状大分子包括表面单元,表面单元包括连接至第一端基和第二端基的外部构建单元,表面单元具有以下结构:



[0201] 并且其中PEG基团是平均分子量在约500至2500道尔顿(例如约2000至2400道尔顿)范围内的甲氧基封端的PEG。

[0202] 在一些实施方案中,树枝状大分子具有28至32个表面单元。在一些实施方案中,树枝状大分子具有30至32个表面单元。

[0203] 在一些实施方案中,存在于外部构建单元中的氮原子的至少40%各自共价连接至第一端基。在一些实施方案中,存在于外部构建单元中的氮原子的至少45%各自共价连接至第一端基。在一些实施方案中,存在于外部构建单元中的氮原子的约50%各自共价连接至第一端基。

[0204] 在一些实施方案中,存在于外部构建单元中的氮原子的至少40%各自共价连接至第二端基。在一些实施方案中,存在于外部构建单元中的氮原子的至少45%各自共价连接至第二端基。在一些实施方案中,存在于外部构建单元中的氮原子的约50%各自共价连接至第二端基。

至第二端基。

[0205] 在一些实施方案中,存在于外部构建单元中的氮原子的至少40%各自共价连接至第一端基;存在于外部构建单元中的氮原子的至少40%各自共价连接至第二端基。在一些实施方案中,存在于外部构建单元中的氮原子的至少45%各自共价连接至第一端基;存在于外部构建单元中的氮原子的至少45%各自共价连接至第二端基。在一些实施方案中,存在于外部构建单元中的氮原子的约50%各自共价连接至第一端基;存在于外部构建单元中的氮原子的约50%各自共价连接至第二端基。

[0206] 在一些实施方案中,五代构建单元是完整代,并且其中外构建单元提供64个氮原子用于共价连接至第一端基或第二端基,其中24至32个第一端基共价连接至氮原子之一,并且其中24至32个第二端基各自共价连接至氮原子之一。

[0207] 在一些实施方案中,26至32个或28至32个第一端基各自共价连接至氮原子之一。在一些实施方案中,29至31个第一端基各自共价连接至氮原子之一。在一些实施方案中,26至32、或28至32个第二端基各自共价连接至氮原子之一。在一些实施方案中,29至31个第二端基各自共价连接至氮原子之一。

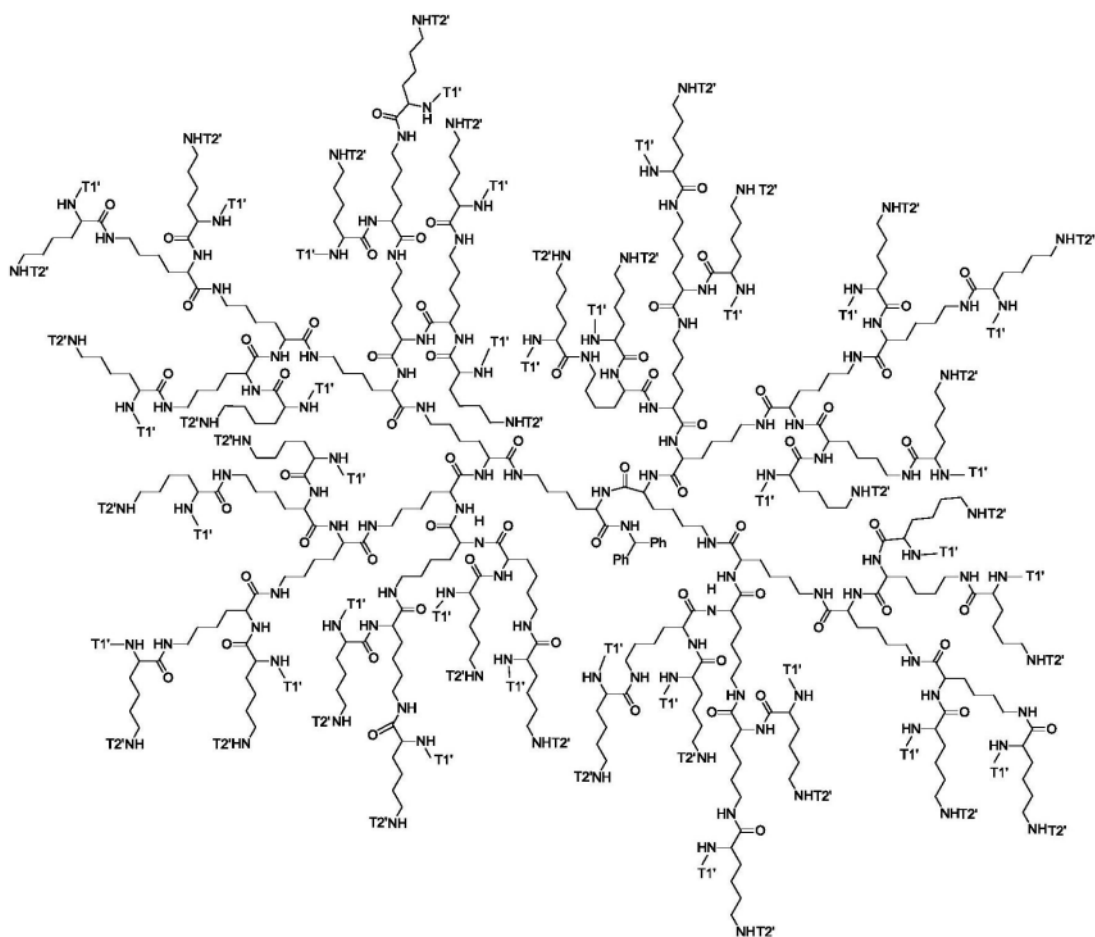
[0208] 在一些实施方案中,第一端基包括小于20%w/w的树枝状大分子,或小于15%w/w的树枝状大分子,或小于10%w/w的树枝状大分子,或5至30%w/w的树枝状大分子,或8至15%w/w的树枝状大分子,例如通过¹H NMR测量。

[0209] 在一些实施方案中,外构建单元中存在的不超过四分之一的氮原子是未取代的。在一些实施方案中,外构建单元中存在的氮原子中不超过五分之一未被取代。在一些实施方案中,外构建单元中存在的氮原子中不超过六分之一的氮原子未被取代。在一些实施方案中,存在于外构建单元中的不超过八分之一的氮原子是未取代的。在一些实施方案中,外构建单元中存在的氮原子中不超过十分之一的氮原子未被取代。

[0210] 在一些实施方案中,存在于外构建单元中的不超过20个氮原子是未取代的。在一些实施方案中,存在于外构建单元中的不超过10个氮原子是未取代的。在一些实施方案中,存在于外构建单元中的不超过5个氮原子是未取代的。在一些实施方案中,存在于外构建单元中的不超过3个氮原子是未取代的。在一些实施方案中,存在于外构建单元中的不超过2个氮原子是未取代的。在一些实施方案中,存在于构建单元的外一代中的不超过1个氮原子是未取代的。在一些实施方案中,存在于构建单元的外一代中的基本上所有氮原子被取代。

[0211] 在一些实施方案中,树枝状大分子是:

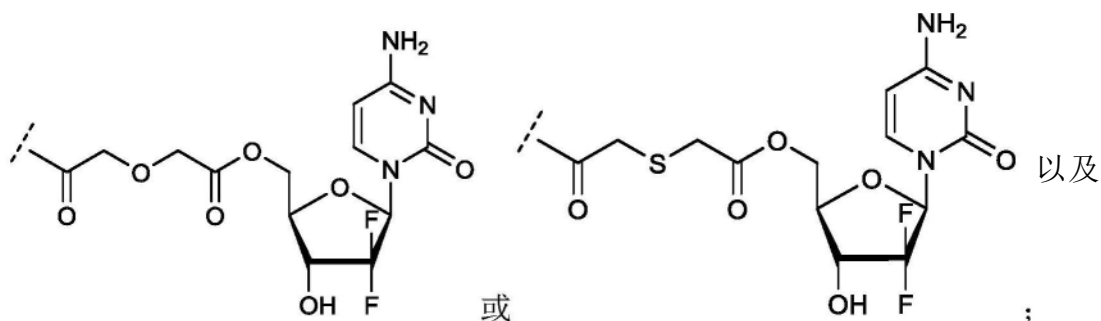
[0212]



;

[0213] 其中T1'表示第一端基,其为:

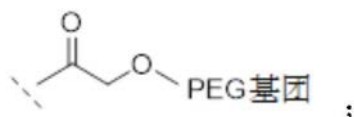
[0214]



;

[0215] T2'表示第二端基,其为:

[0216]



;

[0217] 其中PEG基团是平均分子量在500至2500道尔顿范围内的甲氧基封端的PEG,或T2'表示H,并且其中少于5个T2'是H。

[0218] 在一些实施方案中,树枝状大分子具有25至300kDa、或40至300kDa、或75至200kDa、或90至150kDa的分子量。在一些实施方案中,树枝状大分子具有35至100kDa的分子量。在一个实例中,树枝状大分子具有在35至45kDa范围内,或在50至60kDa范围内,或在85至95kDa范围内的分子量。

[0219] 在一些实施方案中,体外半衰期是50%的药物从树枝状大分子释放的点。在一些

实施方案中,体外半衰期可通过使用拟合至一级释放模型的最小二乘法来确定。

[0220] 在一些实施方案中,核苷类似物(例如吉西他滨)在pH7.4和37℃的PBS(磷酸盐缓冲盐水)中从树枝状大分子释放的体外半衰期在2至50h的范围内。在一些实施方案中,在pH7.4和37℃的PBS中从树枝状大分子释放的核苷类似物(例如吉西他滨)的体外半衰期在5至50h、或10至50h、或5至40h、或5至30h、或10至30h的范围内。在一些实施方案中,核苷类似物(例如吉西他滨)在pH7.4和37℃的PBS中从树枝状大分子释放的体外半衰期在2至10h的范围内。在一些实施方案中,核苷类似物(例如吉西他滨)在pH7.4和37℃的PBS中从树枝状大分子释放的体外半衰期在20至40h的范围内。

[0221] 在一些实施方案中,在pH7.4和37℃的PBS(磷酸盐缓冲盐水)中24h后从树枝状大分子释放的核苷类似物(例如吉西他滨)的百分比在总吉西他滨的20至100%的范围内。在一些实施方案中,在pH7.4和37℃的PBS中从树枝状大分子释放的核苷类似物(例如吉西他滨)的百分比在40至80%的范围内。在一些实施方案中,在pH7.4和37℃的PBS中从树枝状大分子释放的核苷类似物(例如吉西他滨)的百分比在40至60%的范围内。在一些实施方案中,在pH7.4和37℃的PBS中从树枝状大分子释放的核苷类似物(例如吉西他滨)的百分比在70至90%的范围内。

[0222] 在一些实施方案中,在柠檬酸盐缓冲液(0.1M,pH4.5)中,在37℃从树枝状大分子释放的核苷类似物(例如吉西他滨)的体外半衰期在1至20天的范围内。在一些实施方案中,在柠檬酸盐缓冲液(0.1M,pH4.5)中,在37℃从树枝状大分子释放的核苷类似物(例如吉西他滨)的体外半衰期在5至10天的范围内。在一些实施方案中,在柠檬酸盐缓冲液(0.1M,pH4.5)中,在37℃从树枝状大分子释放的核苷类似物(例如吉西他滨)的体外半衰期在8至15天的范围内。在一些实施方案中,在柠檬酸盐缓冲液(0.1M,pH4.5)中,在37℃从树枝状大分子释放的核苷类似物(例如吉西他滨)的体外半衰期在10至20天的范围内。

[0223] 在一些实施方案中,在37℃下在柠檬酸盐缓冲液(0.1M,pH4.5)中24h后从树枝状大分子释放的核苷类似物(例如吉西他滨)的百分比在总吉西他滨的1至30%的范围内。在一些实施方案中,在37℃下在柠檬酸盐缓冲液(0.1M,pH4.5)中从树枝状大分子释放的核苷类似物(例如吉西他滨)百分比在1至20%的范围内。在一些实施方案中,在37℃下在柠檬酸盐缓冲液(0.1M,pH4.5)中从树枝状大分子释放的核苷类似物(例如吉西他滨)百分比在10至20%的范围内。在一些实施方案中,在37℃下在柠檬酸盐缓冲液(0.1M,pH4.5)中从树枝状大分子释放的核苷类似物(例如吉西他滨)百分比在1至5%的范围内。

[0224] 在一些实施方案中,树枝状大分子是下文实施例中描述的树枝状大分子中的任一种(不包括任何对比实施例)。

[0225] 组合物

[0226] 在一些实施方案中,树枝状大分子作为组合物,优选药物组合物存在。

[0227] 应当理解,由于用于生产树枝状大分子的合成方法的性质,在给定组合物中存在的树枝状大分子之间的分子组成可能存在一些变化。例如,如上所述,用于制备树枝状大分子的一个或多个合成步骤可以不完全进行至完成,这可能导致树枝状大分子的存在,树枝状大分子不全部包括相同数目的第一端基或第二端基,或者包括不完全生成的构建单元。

[0228] 因此,提供了包括多种树枝状大分子或其药学上可接受的盐的组合物,

[0229] 其中树枝状大分子如本文所定义,

[0230] 组合物中每个树枝状大分子的第一端基的平均数在24至32的范围内

[0231] 组合物中每个树枝状大分子的第二端基的平均数在24至32的范围内。

[0232] 在一些实施方案中,每个树枝状大分子的第一端基的平均数在28至32的范围内,并且其中每个树枝状大分子的第二端基的平均数在28至32的范围内。在一些实施方案中,每个树枝状大分子的第一端基的平均数在29至32的范围内,并且其中每个树枝状大分子的第二端基的平均数在29至32的范围内。在一些实施方案中,每个树枝状大分子的第一端基的平均数在30至32的范围内,并且其中每个树枝状大分子的第二端基的平均数在30至32的范围内。在一些实施方案中,组合物是药物组合物,并且组合物包括药学上可接受的赋形剂。

[0233] 在一些实施方案中,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的树枝状大分子含有至少24个第一端基。在一些实施方案中,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的树枝状大分子含有至少26个第一端基。在一些实施方案中,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的树枝状大分子含有至少28个第一端基。

[0234] 在一些实施方案中,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的树枝状大分子含有至少28个第二端基。在一些实施方案中,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的树枝状大分子含有至少29个第二端基。

[0235] 在一些实施方案中,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的树枝状大分子含有至少24个第一端基和至少28个第二端基。在一些实施方案中,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的树枝状大分子含有至少26个第一端基和至少29个第二端基。

[0236] 本发明还提供了用于兽医和人类医疗用途两者的药物组合物,其包括本发明的树枝状大分子或其药学上可接受的盐,与一种或多种药学上可接受的载体,和任选地任何其它治疗成分、稳定剂等。载体在与制剂的其它成分相容的意义上必须是药学上可接受的,并且对其接受者不过度有害。在一些实施方案中,组合物是药物组合物,并且其中组合物包括药学上可接受的赋形剂。

[0237] 组合物可例如含有溶剂,诸如水(例如注射用水)或药学上可接受的有机溶剂。

[0238] 组合物还可包括稀释剂、缓冲液、柠檬酸盐、海藻糖、粘合剂、崩解剂、增稠剂、润滑剂、防腐剂(包括抗氧化剂)、无机盐(例如氯化钠)、抗微生物剂(例如苯扎氯铵)、甜味剂、抗静电剂、脱水山梨聚糖酯、脂质(例如磷脂如卵磷脂和其它磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、脂肪酸和脂肪酯、类固醇(例如胆固醇))和螯合剂(例如EDTA、锌和其它此类合适的阳离子)。

[0239] 本发明的组合物还可包括聚合赋形剂/添加剂或载体(carrier),例如聚乙烯吡咯烷酮、衍生纤维素例如羟甲基纤维素、羟乙基纤维素和羟丙基甲基纤维素、Ficolls(一种聚糖)、羟乙基淀粉(HES)、葡萄糖结合剂(例如环糊精等如2-羟丙基- β -环糊精和磺丁基醚- β -环糊精)、聚乙二醇和果胶。

[0240] 适用于根据本发明的组合物的其它药物赋形剂和/或添加剂列于“《雷明顿:药学的科学与实践》(Remington:The Science&Practice of Pharmacy)”,第19版,Williams&Williams,(1995),以及“《医师手册》(Physician's Desk Reference)”,第52版,《医学经济学》(1998),以及“《药物辅料手册》(Handbook of Pharmaceutical Excipients)”,第三版,

A.H.Kibbe, 药 学 出 版 社, 2000。

[0241] 本 发 明 的 树 枝 状 大 分 子 可 以 配 制 成 组 合 物, 组 合 物 包 括 适 于 通 过 气 雾 剂 或 肠 胃 外 (包 括 腹 膜 内、静 脉 内、皮 下 或 肌 内 注 射) 给 药 吸 入 至 肺 的 那 些。

[0242] 组 合 物 可 以 方 便 地 以 单 位 剂 型 存 在, 并 且 可 以 通 过 药 学 领 域 熟 知 的 任 何 方 法 制 备。所 有 方 法 包 括 使 树 枝 状 大 分 子 与 构 成 一 种 或 多 种 辅 助 成 分 的 载 体 结 合 的 步 骤。

[0243] 通 常, 通 过 使 树 枝 状 大 分 子 与 液 体 载 体 缔 合 以 形 成 溶 液 或 悬 浮 液, 或 可 选 地, 使 树 枝 状 大 分 子 与 适 合 于 形 成 固 体, 任 选 地 颗 粒 产 物 的 制 剂 组 分 缔 合, 然 后 如 果 需 要, 使 产 物 成 形 为 期 望 的 递 送 形 式 来 制 备 组 合 物。

[0244] 当 为 微 粒 时, 本 发 明 的 固 体 制 剂 通 常 将 包 括 尺 寸 范 围 为 约 1 纳 米 至 约 500 微 米 的 颗 粒。通 常, 对 于 用 于 静 脉 内 给 药 的 固 体 制 剂, 颗 粒 的 直 径 通 常 为 约 1nm 至 约 10 微 米。组 合 物 可 以 含 有 本 发 明 的 树 枝 状 大 分 子, 树 枝 状 大 分 子 是 具 有 低 于 1000nm, 例 如 5 至 1000nm, 尤 其 是 5 至 500nm, 更 尤 其 是 5 至 400nm, 例 如 5 至 50nm 和 尤 其 是 5 至 20nm 的 颗 粒 直 径 的 纳 米 颗 粒。在 一 个 实 例 中, 该 组 合 物 含 有 平 均 尺 寸 为 5 至 20nm 的 树 枝 状 大 分 子。在 一 些 实 施 方 案 中, 树 枝 状 大 分 子 多 分 散 在 组 合 物 中, PDI 为 1.01 至 1.8, 特 别 是 1.01 至 1.5, 更 特 别 是 1.01 至 1.2。在 一 个 实 例 中, 树 枝 状 大 分 子 在 组 合 物 中 是 单 分 散 的。

[0245] 在 一 些 优 选 的 实 施 方 案 中, 组 合 物 被 配 制 用 于 肠 胃 外 递 送。在 一 些 实 施 方 案 中, 组 合 物 被 配 制 用 于 静 脉 内 递 送。例 如, 在 一 个 实 施 方 案 中, 制 剂 可 以 是 无 菌 的 冻 干 组 合 物, 其 适 于 在 注 射 前 在 水 性 溶 媒 中 重 构。

[0246] 在 一 个 实 施 方 案 中, 适 于 肠 胃 外 给 药 的 组 合 物 方 便 地 包 括 树 枝 状 大 分 子 的 无 菌 水 性 制 剂, 其 可 例 如 配 制 成 与 接 受 者 的 血 液 等 渗。

[0247] 还 提 供 了 适 于 作 为 气 雾 剂 通 过 吸 入 给 药 的 药 物 组 合 物。这 些 制 剂 包 括 所 需 树 枝 状 大 分 子 或 其 盐 的 溶 液 或 悬 浮 液。所 需 制 剂 可 置 于 小 室 内 并 雾 化。雾 化 可 以 通 过 压 缩 空 气 或 通 过 超 声 能 量 来 实 现, 以 形 成 包 括 树 枝 状 大 分 子 或 其 盐 的 多 个 液 滴 或 固 体 颗 粒。

[0248] 如 下 所 述, 本 发 明 的 树 枝 状 大 分 子 可 例 如 与 一 种 或 多 种 另 外 的 药 物 活 性 剂 联 合 施 用。因 此, 在 一 些 实 施 方 案 中, 组 合 物 包 括 如 本 文 定 义 的 树 枝 状 大 分 子 或 其 药 学 上 可 接 受 的 盐, 一 种 或 多 种 药 学 上 可 接 受 的 载 体 和 一 种 或 多 种 另 外 的 药 学 活 性 剂, 例 如 另 外 的 肿 瘤 药 剂 或 肿 瘤 学 药 物。在 一 些 实 施 方 案 中, 另 外 的 活 性 成 分 是 用 于 治 疗 前 列 腺 癌 或 乳 腺 癌 的 抗 癌 剂。

[0249] 在 一 些 实 施 方 案 中, 另 外 的 药 物 活 性 剂 是 化 学 治 疗 剂、细 胞 毒 类 药 物 或 抗 体 疗 法。在 一 些 实 施 方 案 中, 另 外 的 药 物 活 性 剂 是 MAPK/ERK 信 号 传 导 通 路 抑 制 剂。

[0250] 在 一 些 实 施 方 案 中, 另 外 的 药 物 活 性 剂 是 另 外 的 抗 癌 剂。其 它 抗 癌 剂 的 实 例 包 括 但 不 限 于 含 铂 药 剂、紫 杉 烷 类、免 疫 肿 瘤 药 剂、PARP 抑 制 剂、拓 扑 异 构 酶 I 抑 制 剂、抗 体、抗 叶 酸 剂、酪 氨 酸 激 酶 抑 制 剂、蒽 环 类 和 长 春 花 生 物 碱 组 成 的 组。

[0251] 在 一 些 实 施 方 案 中, 另 外 的 抗 癌 剂 选 自 卡 培 他 滨、Nab- 紫 杉 醇 (例 如 **Abraxane[®]**)、多 西 他 赛、卡 巴 他 赛、多 柔 比 星、长 春 地 辛、伊 立 替 康、亚 叶 酸、5- 氟 尿 嘧 啶、甲 氨 蝶 呤、培 美 曲 塞、拉 帕 替 尼、尼 达 尼 布、舒 尼 替 尼、奥 拉 帕 尼、尼 拉 帕 尼、卡 铂、紫 杉 醇、SN38、顺 铂、奥 沙 利 铂、紫 杉 醇、厄 洛 替 尼 和 伊 立 替 康 组 成 的 组。

[0252] 其 它 药 物 活 性 剂 的 其 它 实 例 包 括 抗 CD20 剂, 例 如 抗 体 如 利 妥 昔 单 抗 (**Rituxan[®]**)。

[0253] 其 它 药 物 活 性 剂 的 其 它 实 例 包 括 免 疫 肿 瘤 药 剂, 例 如 PD-1 抑 制 剂、PD-L1 抑 制 剂 或

CTLA4抑制剂、例如派姆单抗(Keytruda[®])、纳武单抗(Opdivo[®])、德瓦鲁单抗(Imfinzi[®])、阿特殊单抗(Tecentriq[®])、阿维鲁单抗(Bavencio[®])和易普利姆玛(Yervoy[®])。

[0254] 在一些实施方案中,组合物被配制用于作为化疗方案的一部分的肠胃外输注。

[0255] 使用方法

[0256] 本发明的树枝状大分子可用于治疗或预防未修饰的药物活性剂可用于治疗或预防的任何疾病、病症或症状。因此,还提供了用于治疗的本文的树枝状大分子或药物组合物。

[0257] 在一些实施方案中,树枝状大分子或包括树枝状大分子的药物组合物用于治疗或预防癌症的方法中,例如用于抑制肿瘤生长。在一些实施方案中,树枝状大分子用于治疗癌症。还提供了治疗癌症的方法,其包括向有需要的受试对象施用治疗有效量的树枝状大分子或包括树枝状大分子的药物组合物。还提供了本文定义的树枝状大分子或本文定义的组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

[0258] 在一些实施方案中,癌症是实体瘤。癌症可以是原发性或转移性肿瘤。在一些实施方案中,癌症是原发性肿瘤。在一些实施方案中,癌症是转移性肿瘤。

[0259] 在一些实施方案中,癌症选自乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、膀胱癌、上消化道癌、食管癌、胃癌、小肠癌、肝癌、胆道系统癌、肉瘤、卵巢癌、胆囊癌、胆道癌、前列腺癌和鼻咽癌组成的组。在一些实施方案中,癌症是乳腺癌。在一些实施方案中,癌症是卵巢癌。在一些实施方案中,癌症是非小细胞肺癌。在一些实施方案中,癌症是胰腺癌。在一些实施方案中,癌症是膀胱癌。在一些实施方案中,癌症是上消化道癌。在一些实施方案中,癌症是食管癌。在一些实施方案中,癌症是胃癌。在一些实施方案中,癌症是小肠癌。在一些实施方案中,癌症是肝癌。在一些实施方案中,癌症是胆道系统的癌症。在一些实施方案中,癌症是肉瘤。在一些实施方案中,癌症是卵巢癌。在一些实施方案中,癌症是胆囊癌。在一些实施方案中,癌症是胆道癌。在一些实施方案中,癌症是鼻咽癌。

[0260] 组合

[0261] 药物通常与其它药物在联合治疗中共同施用,特别是在化疗期间。因此,在一些实施方案中,树枝状大分子与一种或多种另外的药物活性剂联合施用,例如一种或多种另外的抗癌剂/肿瘤药剂。树枝状大分子和一种或多种其它药物活性剂可同时,随后或分开施用。例如,它们可以作为相同组合物的一部分施用,或通过单独组合物的给药。一种或多种另外的药物活性剂可以例如是用于治疗前列腺癌或乳腺癌的抗癌剂。其它药物活性剂的实例包括但不限于化学治疗剂和细胞毒类药物、抗体疗法和MAPK/ERK信号传导通路抑制剂。

[0262] 其它药物活性剂的实例包括但不限于含铂药剂、紫杉烷类、免疫肿瘤药剂、PARP抑制剂、拓扑异构酶I抑制剂、抗体、抗叶酸剂、酪氨酸激酶抑制剂、蒽环类和长春花生物碱组成的组。

[0263] 在一些实施方案中,树枝状大分子与选自卡培他滨、Nab-紫杉醇(例如Abraxane[®])、多西他赛、卡巴他赛、多柔比星、长春地辛、伊立替康、亚叶酸、5-氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、培美曲塞、拉帕替尼、尼达尼布、舒尼替尼、奥拉帕尼、尼拉帕尼、卡铂、紫杉醇、SN38、顺铂、奥沙利铂、紫杉醇、厄洛替尼和伊立替康组成的组的其它抗癌剂联合施用。

[0264] 在一些实施方案中,另外的药物活性剂是抗CD20剂,例如抗体诸如利妥昔单抗

(Rituxan[®])。

[0265] 在一些实施方案中,另外的药物活性剂是免疫肿瘤药剂,例如PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂或CTLA4抑制剂、例如派姆单抗(Keytruda[®])、纳武单抗(Opdivo[®])、德瓦鲁单抗(Imfinzi[®])、阿特珠单抗(Tecentriq[®])、阿维鲁单抗(Bavencio[®])和易普利姆玛(Yervoy[®])。

[0266] 树枝状大分子组合

[0267] 如实例所证明的,当与含有肿瘤学药物的树枝状大分子(例如,含有紫杉烷的树枝状大分子)联合施用,本发明的树枝状大分子是有效的。因此,在一些实施方案中,树枝状大分子与第二种树枝状大分子联合施用,第二种树枝状大分子包括:

[0268] i) 核心单元(C);以及

[0269] ii) 构建单元(BU),每个构建单元是赖氨酸残基或其类似物;

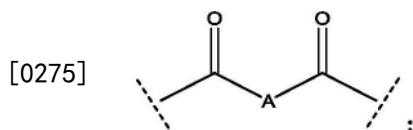
[0270] 其中核心单元经由酰胺键共价连接至两个构建单元,每个酰胺键在核心单元中存在的氮原子与构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成;

[0271] 树枝状大分子是五代构建单元树枝状大分子;

[0272] 其中不同代的构建单元通过在一个构建单元中存在的氮原子和另一个构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成的酰胺键彼此共价连接;

[0273] 树枝状大分子进一步包括:

[0274] iii) 多个第一端基(T1),其各自包括肿瘤药剂的残基,肿瘤药剂具有与下式的二酰基连接基团共价连接的羟基:



[0276] 其中A为被至少一个O、S、NH或N(Me)间隔的C₂-C₁₀亚烷基,或其中A为选自四氢呋喃、四氢噻吩、吡咯烷和N-甲基吡咯烷组成的组的杂环;以及

[0277] iv) 多个第二端基(T2),其各自包括亲水性聚合物基团;

[0278] 或其药学上可接受的盐。

[0279] 第二树枝状大分子的核心单元(C)如上所述针对第一树枝状大分子。

[0280] 第二树枝状大分子的构建单元(BU)如上所述针对第一树枝状大分子。

[0281] 第二树枝状大分子的二酰基连接基团如上所述关于第一树枝状大分子。

[0282] 第二树枝状大分子的第二端基如上所述用于第一树枝状大分子。

[0283] 在一些实施方案中,肿瘤药剂是紫杉烷。

[0284] 含紫杉烷的树枝状大分子描述于例如W02012/167309、US2018/0326081和W02020/014750A1中,其内容通过引用并入本文。

[0285] 第二树枝状大分子的紫杉烷可以选自表现出化疗活性的任何紫杉烷。在一些实施方案中,紫杉烷选自多西他赛、紫杉醇和卡巴他赛组成的组。在一些实施方案中,紫杉烷是多西他赛。在一些实施方案中,紫杉烷是紫杉醇。在一些实施方案中,紫杉烷是卡巴他赛。

[0286] 紫杉烷可以通过在作为紫杉烷的一部分存在的氧原子和作为连接基团的一部分存在的酰基的碳原子之间形成的酯键与二乙醇酰基或硫二乙醇酰基连接基团共价连接。

[0287] 在一些实施方案中,第二树枝状大分子包括:

[0288] i) 核心单元 (C) ;以及

[0289] ii) 构建单元 (BU) ,每个构建单元是赖氨酸残基;

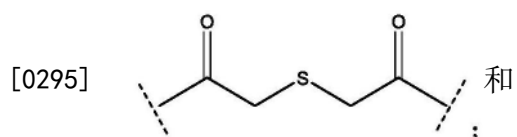
[0290] 其中核心单元经由酰胺键共价连接至两个构建单元,每个酰胺键在核心单元中存在的氮原子与构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成;

[0291] 树枝状大分子是五代构建单元树枝状大分子;

[0292] 其中不同代的构建单元通过在一个构建单元中存在的氮原子和另一个构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成的酰胺键彼此共价连接;

[0293] 树枝状大分子进一步包括:

[0294] iii) 多个第一端基 (T1) ,其各自包括多西他赛的残基,多西他赛具有羟基,其共价连接至下式的二酰基连接基团:



[0296] iv) 多个第二端基 (T2) ,其各自包括PEG;

[0297] 或其药学上可接受的盐。

[0298] 在一些实施方案中,第二树枝状大分子包括:

[0299] i) 核心单元 (C) ;以及

[0300] ii) 构建单元 (BU) ,每个构建单元是赖氨酸残基;

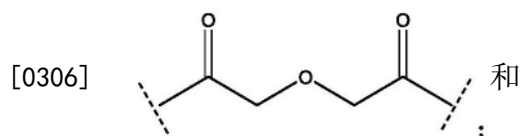
[0301] 其中核心单元经由酰胺键共价连接至两个构建单元,每个酰胺键在核心单元中存在的氮原子与构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成;

[0302] 树枝状大分子是五代构建单元树枝状大分子;

[0303] 其中不同代的构建单元通过在一个构建单元中存在的氮原子和另一个构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成的酰胺键彼此共价连接;

[0304] 树枝状大分子进一步包括:

[0305] iii) 多个第一端基 (T1) ,其各自包括多西他赛的残基,多西他赛具有羟基,其共价连接至下式的二酰基连接基团:



[0307] iv) 多个第二端基 (T2) ,其各自包括PEG;

[0308] 或其药学上可接受的盐。

[0309] 在一些实施方案中,第二树枝状大分子包括:

[0310] i) 核心单元 (C) ;以及

[0311] ii) 构建单元 (BU) ,每个构建单元是赖氨酸残基;

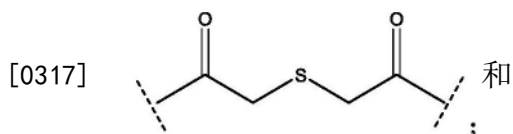
[0312] 其中核心单元经由酰胺键共价连接至两个构建单元,每个酰胺键在核心单元中存在的氮原子与构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成;

[0313] 树枝状大分子是五代构建单元树枝状大分子;

[0314] 其中不同代的构建单元通过在一个构建单元中存在的氮原子和另一个构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成的酰胺键彼此共价连接;

[0315] 树枝状大分子进一步包括：

[0316] iii) 多个第一端基 (T1)，其各自包括卡巴他赛的残基，卡巴他赛具有羟基，其共价连接至下式的二酰基连接基团：



[0318] iv) 多个第二端基 (T2)，其各自包括PEG；

[0319] 或其药学上可接受的盐。

[0320] 在一些实施方案中，第二树枝状大分子包括：

[0321] i) 核心单元 (C)；以及

[0322] ii) 构建单元 (BU)，每个构建单元是赖氨酸残基；

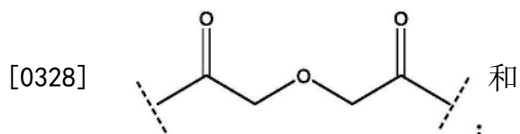
[0323] 其中核心单元经由酰胺键共价连接至两个构建单元，每个酰胺键在核心单元中存在的氮原子与构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成；

[0324] 树枝状大分子是五代构建单元树枝状大分子；

[0325] 其中不同代的构建单元通过在一个构建单元中存在的氮原子和另一个构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成的酰胺键彼此共价连接；

[0326] 树枝状大分子进一步包括：

[0327] iii) 多个第一端基 (T1)，其各自包括卡巴他赛的残基，卡巴他赛具有羟基，其共价连接至下式的二酰基连接基团：



[0329] iv) 多个第二端基 (T2)，其各自包括PEG；

[0330] 或其药学上可接受的盐。

[0331] 在一些实施方案中，肿瘤药剂是拓扑异构酶I抑制剂，例如喜树碱活性物质。

[0332] 含有喜树碱活性物质的树枝状大分子描述于例如W02020/102852A1中，其内容通过引用并入本文。

[0333] 在一些实施方案中，拓扑异构酶I抑制剂是喜树碱活性物质，例如SN38。

[0334] 喜树碱活性物质 (例如，SN38) 可以例如通过在作为喜树碱活性物质的一部分存在的氧原子和作为连接基团的一部分存在的酰基的碳原子之间形成的酯键与二乙醇酰基或硫二乙醇酰基连接基团共价连接。

[0335] 在一些实施方案中，第二树枝状大分子包括：

[0336] i) 核心单元 (C)；以及

[0337] ii) 构建单元 (BU)，每个构建单元是赖氨酸残基；

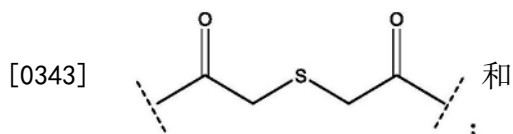
[0338] 其中核心单元经由酰胺键共价连接至两个构建单元，每个酰胺键在核心单元中存在的氮原子与构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成；

[0339] 树枝状大分子是五代构建单元树枝状大分子；

[0340] 其中不同代的构建单元通过在一个构建单元中存在的氮原子和另一个构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成的酰胺键彼此共价连接；

[0341] 树枝状大分子进一步包括：

[0342] iii) 多个第一端基 (T1)，其各自包括SN38的残基，SN38具有羟基，其共价连接至下式的二酰基连接基团：



[0344] iv) 多个第二端基 (T2)，其各自包括PEG；

[0345] 或其药学上可接受的盐。

[0346] 在一些实施方案中，第二树枝状大分子包括：

[0347] i) 核心单元 (C)；以及

[0348] ii) 构建单元 (BU)，每个构建单元是赖氨酸残基；

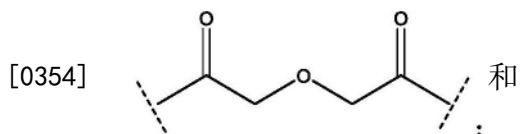
[0349] 其中核心单元经由酰胺键共价连接至两个构建单元，每个酰胺键在核心单元中存在的氮原子与构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成；

[0350] 树枝状大分子是五代构建单元树枝状大分子；

[0351] 其中不同代的构建单元通过在一个构建单元中存在的氮原子和另一个构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成的酰胺键彼此共价连接；

[0352] 树枝状大分子进一步包括：

[0353] iii) 多个第一端基 (T1)，其各自包括喜树碱活性物质 (例如SN38) 的残基，喜树碱活性物质具有羟基，其共价连接到下式的二酰基连接基团：



[0355] iv) 多个第二端基 (T2)，其各自包括PEG；

[0356] 或其药学上可接受的盐。

[0357] 因此，在一些实施方案中，提供了如本文所述的方法、用途或使用的组合物，其中树枝状大分子与如上所述的第二树枝状大分子联合施用。

[0358] 剂量

[0359] 应当理解，治疗有效量是指以足以在一定程度上减轻或预防所治疗的障碍或病症的一种或多种症状的量施用的树枝状大分子。树枝状大分子的治疗有效量可以基于例如施用的树枝状大分子的量来提及。或者，其可以基于树枝状大分子理论上能够递送的核苷类似物活性物 (例如吉西他滨) 的量来确定，例如基于树枝状大分子上核苷类似物活性物的载量。

[0360] 即，树枝状大分子-药物缀合物的治疗有效量可基于例如施用的树枝状大分子-药物缀合物的量来提及。或者，其可以基于树枝状大分子-药物缀合物在理论上能够递送的活性剂 (包括吉西他滨核苷的药物部分) 的量来确定，例如基于树枝状大分子上药物部分的载量。

[0361] 如本文所用，术语“未缀合的”和“释放的”是指已经从树枝状大分子解离或裂解的药物部分。这种解离或裂解可在药物-树枝状大分子缀合物给药后在体内发生。

[0362] 树枝状大分子可以通过任何合适的途径施用。给药途径可以例如靶向受试对象所

患有的疾病或病症。受试对象通常是人,但应当理解树枝状大分子也可用于治疗非人动物的病症。

[0363] 在一些实施方案中,树枝状大分子静脉内施用。吉西他滨本身通常在30min内作为IV输注施用。在一些实施方案中,树枝状大分子以IV推注递送。在一些实施方案中,在0.5至15min,或0.5至5min的时间段内IV施用树枝状大分子。

[0364] 在一些实施方案中,树枝状大分子可以腹膜内施用。例如,疾病或病症可以是腹腔内恶性肿瘤,例如妇科或胃肠癌,并且树枝状大分子可以腹膜内施用。在一些实施方案中,树枝状大分子可用于治疗腹膜腔的癌症,例如恶性上皮肿瘤(例如卵巢癌)或腹膜癌病(例如胃肠尤其是结肠直肠癌、胃癌、妇科癌症和原发性腹膜肿瘤),且树枝状大分子腹膜内施用。

[0365] 吉西他滨本身通常以7天的间隔施用,例如在给药周期的第1天和第8天、或第1天、第8天和第15天、或每周一次。

[0366] 在一些实施方案中,树枝状大分子以至少10天给药间隔、至少14天给药间隔、至少21天给药间隔或至少28天给药间隔施用。

[0367] 当向患者施用一定剂量的吉西他滨时,典型的剂量为 $1000\text{mg}/\text{m}^2$ 或 $1250\text{mg}/\text{m}^2$ 。

[0368] 在一些实施方案中,施用的树枝状大分子的量足以递送在1至1500mg的核苷类似物(例如,吉西他滨)/ m^2 范围内,在1至1250mg的核苷类似物(例如,吉西他滨)/ m^2 范围内,在1至500mg,在1至400mg,在1至300mg,在5至200mg,在500至1250mg的核苷类似物(例如,吉西他滨)/ m^2 范围内,在2至1000mg的核苷类似物(例如,吉西他滨)/ m^2 范围内,在5至500mg的核苷类似物(例如,吉西他滨)/ m^2 范围内,在5至100mg的核苷类似物(例如,吉西他滨)/ m^2 范围内,在20至500mg的核苷类似物(例如,吉西他滨)/ m^2 范围内,在20至200mg的核苷类似物(例如,吉西他滨)/ m^2 范围内,在50至200mg的核苷类似物(例如,吉西他滨)/ m^2 范围内,在50至100mg的核苷类似物(例如,吉西他滨)/ m^2 范围内,在75至125mg的核苷类似物(例如,吉西他滨)/ m^2 范围内,或在50至75mg的核苷类似物(例如,吉西他滨)/ m^2 范围内的释放的活性剂的量。

[0369] 在一些实施方案中,以预定频率向有需要的受试对象施用治疗有效量的树枝状大分子。在一些实施方案中,根据其中树枝状大分子每1至4周施用一次的给药方案向有需要的受试对象施用树枝状大分子。在一些实施方案中,根据其中树枝状大分子每3至4周施用一次的给药方案向有需要的受试对象施用树枝状大分子。

[0370] 在一些实施方案中,树枝状大分子或药物组合物作为快速输注或作为推注施用。在一些实施方案中,输注时间小于1h、小于30min或小于20min,或输注时间为20min、15min或10min。在一些实施方案中,给药可以是推注,例如在5s至5min内。

[0371] 本发明的树枝状大分子的使用可以提供体内包括核苷类似物残基的药物部分的控制释放,并且可以允许以单剂量大量缀合药物给药的部分,其然后随时间逐渐释放。

[0372] 在一些实施方案中,树枝状大分子将在延长的时间内提供核苷类似物残基的治疗水平,因此可以比游离核苷类似物更不频繁地施用。例如,树枝状大分子可以每两天一次、或每三天一次、或每七天一次、或每十天一次、或每两周一次、或每三周一次、或每四周一次、或每月一次施用。在一些实施方案中,单剂量的树枝状大分子在至少6h、至少12h、至少24h、至少两天、至少三天、至少四天、至少五天、至少六天、至少七天的时间内提供治疗有效

量的包括核苷类似物残基的药物部分。在一些实施方案中,单剂量的树枝状大分子在约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天、约10天或约14天的时间内提供治疗有效量的核苷类似物残基。

[0373] 在一些实施方案中,当在pH7.4和37℃下暴露于PBS时,树枝状大分子在24h后释放约5%与90%之间、约10%与约90%之间、约5%与80%之间、约10%与80%之间、约20%与80%之间、约20%与70%之间或约30%与60%之间的核苷类似物残基。在一些实施方案中,当在pH7.4和37℃下暴露于PBS时,树枝状大分子在24h后释放至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%的核苷类似物残基。

[0374] 在一些实施方案中,当暴露于pH4.5和37℃的1%柠檬酸盐缓冲液时,24h后树枝状大分子释放约5%至30%、约5%至25%、约5%至20%、约5%至10%的核苷类似物残基。在一些实施方案中,当在pH4.5和37℃下暴露于1%柠檬酸盐缓冲液时,树枝状大分子在24h后释放小于约5%、小于约10%、小于约20%、小于约30%的核苷类似物残基。

[0375] 药代动力学、疗效和副作用

[0376] 已经令人惊讶地发现,本发明的树枝状大分子在体内提供良好的治疗和药代动力学性质。

[0377] 如本文所用,术语“游离”是指药物,例如吉西他滨,其先前未缀合至树枝状大分子。例如,游离吉西他滨的直接给药指的是吉西他滨分子的直接给药,吉西他滨分子不是以与树枝状大分子缀合的形式给药。这种疗法的一个实例是Gemzar®。

[0378] 如本文所用,术语“未缀合的”和“释放的”是指药物,例如吉西他滨,其已经从树枝状大分子解离或裂解。这种解离或裂解可在药物-树枝状大分子缀合物给药后在体内发生。例如,可以在包括吉西他滨作为核苷类似物的树枝状大分子给药,和在等量的未缀合药物(例如Gemzar®)给药后进行比较。

[0379] 本文中的术语“当量”或“当量剂量”是指一定剂量的树枝状大分子给药,如果作为树枝状大分子的一部分存在的所有核苷类似物都被释放,则将提供与施用的一定剂量的未缀合药物中相同摩尔数的核苷类似物活性。

[0380] 在一些实施方案中,与相等剂量的游离核苷类似物(例如吉西他滨)给药相比,树枝状大分子给药提供增强的临床功效。提高临床疗效可能包括以下任何一项或多项:提高存活率、降低死亡率、延长预期寿命和减缓癌症进展速度。

[0381] 在一些实施方案中,与等量的未缀合药物给药相比,本发明的树枝状大分子提供更低的最大浓度(C_{最大})、增加的核苷类似物(例如吉西他滨)的治疗有效血浆浓度的持续时间,和/或降低的毒性。

[0382] 在一些实施方案中,与等量的未缀合药物给药相比,施用树枝状大分子提供更低的核苷类似物(例如吉西他滨)最大浓度(C_{最大})。在一些实施方案中,树枝状大分子给药后实现的核苷类似物(例如吉西他滨)的C_{最大}小于等量的未缀合药物给药后实现的C_{最大}的50%、40%、30%、20%、10%、5%或2%。

[0383] 在一些实施方案中,与相等剂量的游离吉西他滨给药相比,树枝状大分子给药在给药后提供治疗有效的核苷类似物(例如吉西他滨)血浆浓度水平持续延长的时间段。在一些实施方案中,树枝状大分子的给药提供核苷类似物(例如吉西他滨)的治疗有效血浆浓度

水平至少两倍长、或至少三倍长、或至少四倍长、或至少五倍长，只要在给予等剂量的游离核苷类似物后达到核苷类似物的治疗有效血浆浓度的时间段。

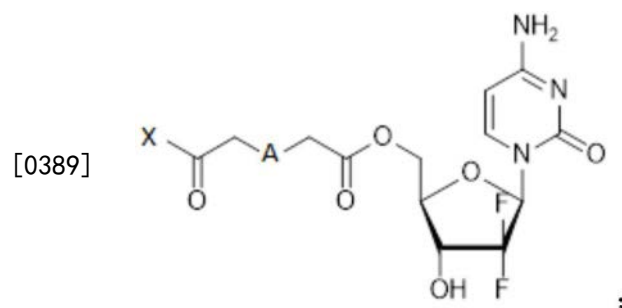
[0384] 肿瘤学药物通常具有由于脱靶毒性引起的显著副作用。在核苷类似物如吉西他滨的情况下，已知的副作用包括肺毒性和呼吸衰竭、溶血性尿毒症综合征、肾损伤、严重肝毒性、毛细血管渗漏综合征和可逆性后部脑病综合征。

[0385] 药物的毒性是指对生物体造成损害的程度，并且通过其对靶标的作用来测量。在肿瘤学中，动物模型中毒性的一种此类测量是体重减轻，其确定最大耐受剂量 (MTD)。在人类中，毒性通常由特定的不良事件 (AE) 确定，其通常确定剂量限制性毒性。应当理解，通常在肿瘤学中，存在狭窄的治疗窗，并且脱靶毒性被认为是杀死肿瘤细胞的正常副作用。在一些实施方案中，与相等剂量的游离核苷类似物 (例如吉西他滨) 给药相比，树枝状大分子给药提供降低的毒性和/或副作用。

[0386] 树枝状大分子合成

[0387] 本发明的树枝状大分子可以通过任何合适的方法制备，例如通过使含有核苷类似物的前体与已经含有PEG基团的树枝状中间体反应以引入药物活性剂；通过使含PEG的前体与已经含有核苷类似物残基的树枝状中间体反应；或通过使包括赖氨酸残基，核苷类似物残基和PEG基团的中间体与树枝状中间体反应。因此，提供了用于生产如本文所定义的树枝状大分子的方法，其包括：

[0388] a) 使核苷类似物中间体反应，核苷类似物中间体为：



[0390] 其中A是O或S，X是-OH或离去基团 (例如活性酯)，或其中X与其所连接的C (O) 基团一起形成羧酸盐；

[0391] 树枝状中间体，其包括：

[0392] i) 核心单元 (C)；以及

[0393] ii) 构建单元 (BU)，每个构建单元是赖氨酸残基或其类似物；

[0394] 其中核心单元经由酰胺键共价连接至两个构建单元，每个酰胺键在核心单元中存在的氮原子与构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成；

[0395] 树枝状大分子是五代构建单元树枝状大分子；

[0396] 其中不同代的构建单元通过在一个构建单元中存在的氮原子和另一个构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成的酰胺键彼此共价连接；

[0397] 树枝状大分子进一步包括：

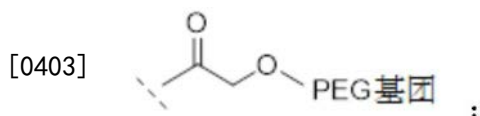
[0398] 多个第二端基 (T2)，其各自包括亲水性聚合物基团 (例如PEG、PEOX或聚肌氨酸基团)；

[0399] 或其盐；

[0400] 在酰胺偶联条件下;

[0401] 或

[0402] b) 使PEG中间体反应, PEG中间体为:



[0404] 其中PEG基团是含PEG的基团, 并且

[0405] X是-OH或离去基团(例如活性酯), 或其中X与其所连接的C(O)基团一起形成羧酸盐;

[0406] 树枝状中间体, 其包括:

[0407] i) 核心单元(C); 以及

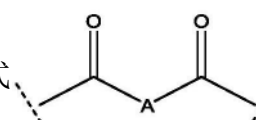
[0408] ii) 构建单元(BU), 每个构建单元是赖氨酸残基或其类似物;

[0409] 其中核心单元经由酰胺键共价连接至两个构建单元, 每个酰胺键在核心单元中存在的氮原子与构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成;

[0410] 树枝状大分子是五代构建单元树枝状大分子;

[0411] 其中不同代的构建单元通过在一个构建单元中存在的氮原子和另一个构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成的酰胺键彼此共价连接;

[0412] 树枝状大分子进一步包括:

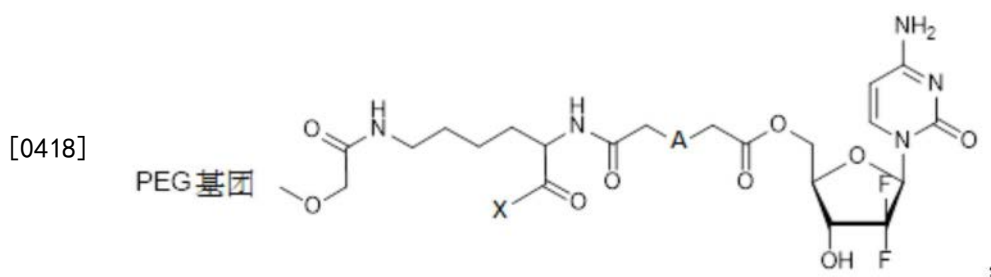
[0413] 多个第一端基(T1), 其各自包括共价连接到式  的连接基团的核苷类似物残基, 其中A是-CH₂OCH₂-或-CH₂SCH₂-;

[0414] 或其盐;

[0415] 在酰胺偶联条件下;

[0416] 或

[0417] c) 使表面单元中间体反应, 表面单元中间体为:



[0419] 其中PEG基团是含PEG的基团, A是O或S

[0420] X是-OH或离去基团(例如活性酯), 或其中X与其所连接的C(O)基团一起形成羧酸盐;

[0421] 树枝状中间体, 其包括:

[0422] i) 核心单元(C); 以及

[0423] ii) 构建单元(BU), 每个构建单元是赖氨酸残基或其类似物;

[0424] 其中核心单元经由酰胺键共价连接至两个构建单元, 每个酰胺键在核心单元中存

在的氮原子与构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成；

[0425] 树枝状中间体为四代构建单元树枝状中间体；

[0426] 其中不同代的构建单元通过在一个构建单元中存在的氮原子和另一个构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成的酰胺键彼此共价连接；

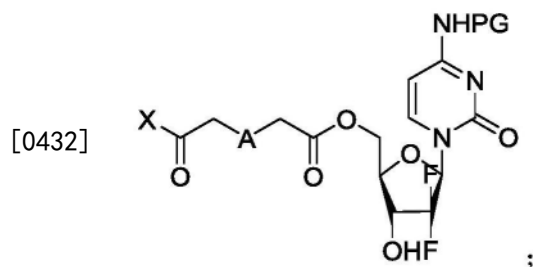
[0427] 并且其中树枝状中间体的外部构建单元中存在的氮原子未被取代；

[0428] 或其盐；

[0429] 在酰胺偶联条件下；

[0430] 或

[0431] d) 使核苷类似物中间体反应，核苷类似物中间体为：



[0433] 其中A是O或S,PG是胺保护基,X是-OH或离去基团(例如活性酯),或其中X与其所连接的C(O)基团一起形成羧酸盐；

[0434] 树枝状中间体,其包括：

[0435] i) 核心单元(C)；以及

[0436] ii) 构建单元(BU),每个构建单元是赖氨酸残基或其类似物；

[0437] 其中核心单元经由酰胺键共价连接至两个构建单元,每个酰胺键在核心单元中存在的氮原子与构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成；

[0438] 树枝状大分子是五代构建单元树枝状大分子；

[0439] 其中不同代的构建单元通过在一个构建单元中存在的氮原子和另一个构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成的酰胺键彼此共价连接；

[0440] 树枝状大分子进一步包括：

[0441] 多个第二端基(T2),其各自包括亲水性聚合物基团(例如PEG、PEOX或聚肌氨酸基团)；

[0442] 或其盐；

[0443] 在酰胺偶联条件下；以及

[0444] 使PG脱保护以形成盐形式的产物；以及

[0445] 任选地将产物从盐转化为另一种盐或游离碱。

[0446] 方法变体a)、b)、c)和d)涉及通过-C(O)X基团与树枝状中间体中存在的胺基团的反应形成酰胺键。可以使用任何合适的酰胺形成条件,也称为酰胺偶联条件。典型条件的实例包括在合适的温度(例如环境温度,例如15至30℃)下使用合适的溶剂(例如二甲基甲酰胺),任选使用合适的碱。当X是离去基团时,可以使用任何合适的离去基团,例如活化酯。当X为-OH基团或当X与其所连接的C(O)基团一起形成羧酸盐时,该基团通常在与树枝状中间体反应之前转化为合适的离去基团,例如通过使用合适的酰胺偶联试剂如PyBOP。

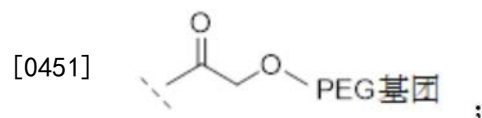
[0447] 可以使用任何合适的分离和/或纯化技术,例如树枝状大分子可以通过溶解在合

适的溶剂(例如THF)中并通过加入到反溶剂(例如MTBE)中沉淀来获得。

[0448] 变体a)中使用的核苷类似物中间体本身可以例如通过核苷类似物或其保护形式(例如吉西他滨)与二羟乙酐或硫代二羟乙酐反应获得,例如在合适的溶剂如二氯甲烷和合适的碱如三乙胺存在下。

[0449] 在变体c)中使用的表面单元中间体本身可以例如通过以下获得:

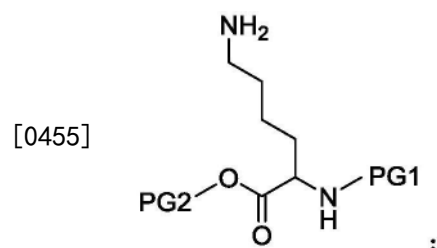
[0450] i) 使PEG中间体反应,PEG中间体为:



[0452] 其中PEG基团是含PEG的基团,并且

[0453] X是-OH或离去基团,或其中X与其所连接的C(O)基团一起形成羧酸盐;

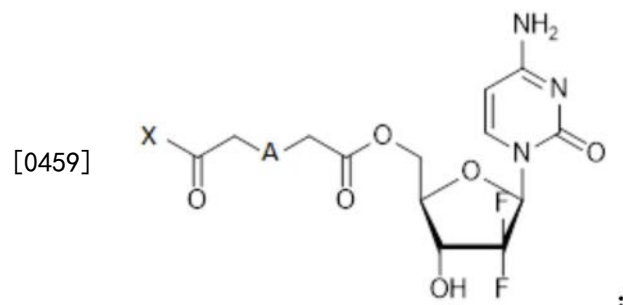
[0454] 和:



[0456] 其中PG1是胺保护基(例如Boc或Cbz基团),且PG2不存在或为酸保护基(例如甲酯或苄酯);

[0457] ii) 使PG1脱保护;

[0458] iii) 使步骤ii)的产物与核苷类似物中间体反应,核苷类似物中间体为:



[0460] 其中A是O或S,X是-OH或离去基团(例如活性酯),或其中X与其所连接的C(O)基团一起形成羧酸盐;以及

[0461] iv) 使PG2(如果存在)脱保护。

[0462] 变体a)中使用的树枝状中间体本身可以通过例如顺序方法获得,顺序方法包括:

[0463] i) 含有氨基的核心单元(C)与含有-C(O)X基团(其中X是-OH或离去基团(例如活性酯))或-CO(X)的被保护的赖氨酸或其类似物的构建单元反应形成羧酸盐,并且其中存在于赖氨酸或其类似物中的氨基被保护,以在核心单元和构建单元之间形成酰胺键;

[0464] ii) 使构建单元上存在的保护基脱保护;

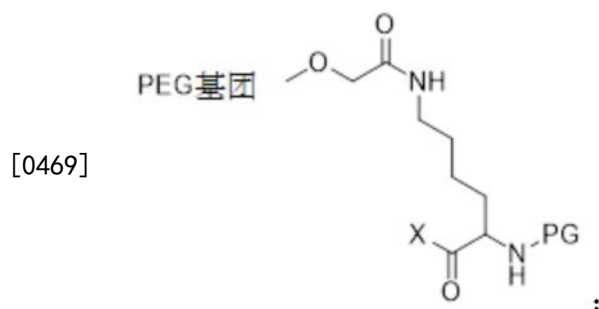
[0465] iii) 使存在于构建单元上的游离氨基与被保护的赖氨酸或其类似物的另外的构建单元反应,另外的构建单元含有-C(O)X基团,其中X是-OH或离去基团(例如活性酯)或-CO(X),形成羧酸盐,并且其中存在于赖氨酸或其类似物中的氨基被保护,以在不同代的构建

单元之间形成酰胺键；

[0466] iv) 使构建单元上存在的保护基脱保护；

[0467] v) 重复步骤iii) 和iv)，直到产生四代构建单元；

[0468] vi) 使存在于构建单元上的游离氨基与以下反应：



[0470] 其中PG是保护基，且其中X为-OH或离去基团（例如活性酯），或其中X与其所连接的C(O)基团一起形成羧酸盐，以在其间形成酰胺键；以及

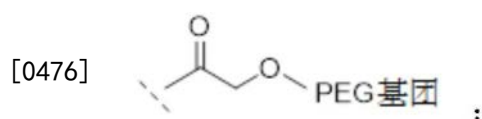
[0471] vii) 使保护基PG脱保护。

[0472] 可替代地，在变体a) 中使用的树枝状中间体可以例如通过进行如上所述的步骤i) 至v) 来获得，并且：

[0473] vi) 使存在于构建单元上的游离氨基与包括-C(O)X基团的被保护的赖氨酸或其类似物的构建单元之间形成酰胺键，另外的构建单元含有-C(O)X基团，其中X是-OH或离去基团（例如活性酯）或-CO(X)，形成羧酸盐，并且其中存在于赖氨酸或其类似物中的氨基被正交保护；

[0474] vii) 使第一组氨基保护基脱保护；

[0475] viii) 使存在于构建单元上的游离氨基与以下反应：



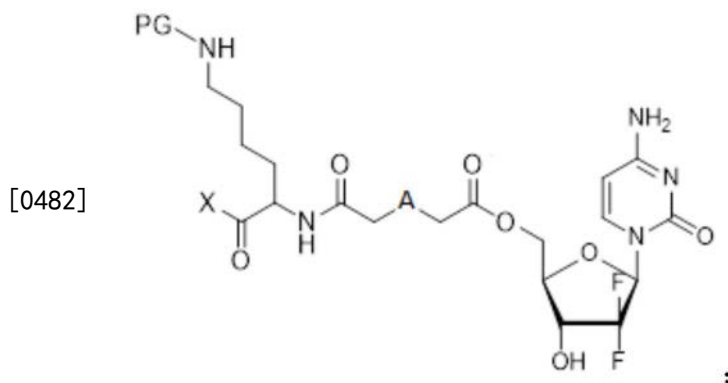
[0477] 其中PEG基团是含PEG的基团，并且X是-OH或离去基团（例如活性酯），或其中X与其所连接的C(O)基团一起形成羧酸盐；

[0478] ix) 使第二组氨基保护基脱保护。

[0479] 第一和第二组氨基保护基团可以是例如Fmoc和Boc基团。在一些实施方案中，步骤vii) 包括使第一组氨基保护基脱保护，第一组氨基保护基为Fmoc基团，例如其保护赖氨酸ε-氨基，且步骤ix) 包括使第二组氨基保护基脱保护，第二组氨基保护基为Boc基团，例如其保护赖氨酸构建单元α-氨基。

[0480] 变体b) 中使用的树枝状中间体本身可以例如通过进行如上所述关于变体a) 的步骤i) 至v) 来获得，并且：

[0481] vi) 使存在于构建单元上的游离氨基与以下反应：



[0483] 其中A为O或S,PG为保护基,且其中X为-OH或离去基团(例如活性酯),或其中X与其所连接的C(O)基团一起形成羧酸盐,以在其间形成酰胺键;以及

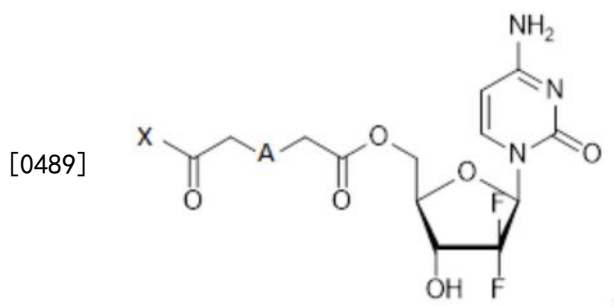
[0484] vii) 使保护基PG脱保护。

[0485] 可替代地,在变体b)中使用的树枝状中间体可以例如通过进行如上所述的步骤i)至v)来获得,并且:

[0486] vi) 使存在于构建单元上的游离氨基与包括-C(O)X基团的被保护的赖氨酸或其类似物的构建单元之间形成酰胺键,另外的构建单元含有-C(O)X基团,其中X是-OH或离去基团(例如活性酯)或-CO(X),形成羧酸盐,并且其中存在于赖氨酸或其类似物中的氨基被正交保护;

[0487] vii) 使第一组氨基保护基脱保护;

[0488] viii) 使存在于构建单元上的游离氨基与以下反应:

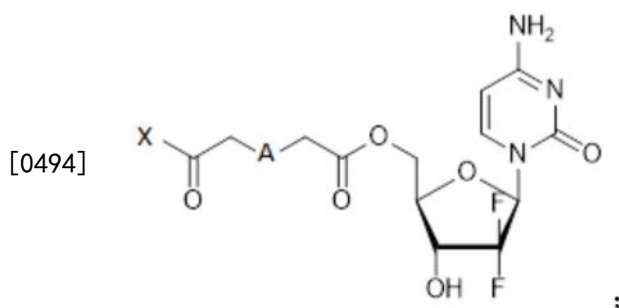


[0490] 其中A是O或S,X是-OH或离去基团(例如活性酯),或其中X与其所连接的C(O)基团一起形成羧酸盐;

[0491] vii) 使第二组氨基保护基脱保护。

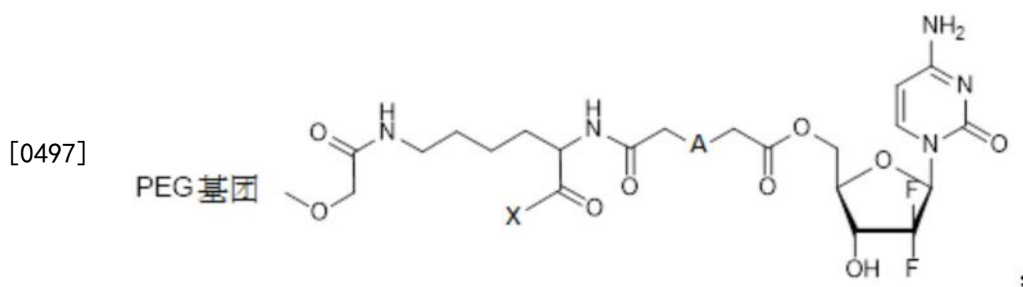
[0492] 在变体c)中使用的树枝状中间体本身可以例如通过进行如上所述关于变体a)的步骤i)至v)来获得。

[0493] 本发明还提供了用于制备树枝状大分子的合成中间体。因此,还提供了用于制备树枝状大分子的中间体,其为:



[0495] 其中A为O或S,X为-OH或离去基团(例如活性酯),或其中X与其所连接的C(O)基团一起形成羧酸盐。这样的中间体可以例如如上所述制备。

[0496] 还提供了用于生产树枝状大分子的中间体,其为:



[0498] 其中PEG基团是含PEG的基团,A是O或S

[0499] X是-OH或离去基团(例如活性酯),或其中X与其所连接的C(O)基团一起形成羧酸盐。这样的中间体可以例如如上所述制备。

[0500] 氨基(例如boc基团)的脱保护使用本领域已知的合适试剂和条件进行。关于上述变体d),在一些实施方案中,利用酸性条件进行boc保护基的脱保护。在一些实施方案中,利用三氟乙酸(TFA)条件进行boc保护基的脱保护。作为脱保护条件的结果,脱保护反应的所得产物可以盐形式存在。例如,脱保护反应的所得产物可以作为三氟乙酸盐(TFA盐)存在。

[0501] 在一些情况下,期望获得不含盐(即,作为游离碱)或交换盐(例如,从TFA盐到HCl盐)的树枝状大分子。

[0502] 因此,在一些实施方案中,提供了用于生产如本文所定义的树枝状大分子的方法,其包括

[0503] i) 获得盐形式的树枝状大分子;

[0504] ii) 使树枝状大分子与离子交换树脂接触并将盐与缀合物分离

[0505] iii) 将树枝状大分子与离子交换树脂分离。

[0506] 在一些实施方案中,脱保护反应的产物从盐转化为游离碱。在一些实施方案中,脱保护反应的产物从一种特定的盐转化为另一种特定的盐。在一些实施方案中,脱保护反应的产物从TFA盐转化为游离碱。在一些实施方案中,脱保护反应的产物从TFA盐转化为HCl盐。离子交换树脂是用作离子交换介质的树脂或聚合物的不溶性基质。离子交换树脂可用于例如分离,纯化和净化过程。离子交换树脂的实例包括但不限于 **AmberLyst[®]** (具有磺酸官能团的苯乙烯-二乙烯基苯基质) 和 **AmberLite[®]** (具有磺酸官能团的苯乙烯-二乙烯基苯基质)。在一些实施方案中,离子交换树脂是 **AmberLyst[®]**。在一些实施方案中,离子交换树脂是 **AmberLite[®]**。在一些实施方案中,离子交换树脂是 **AmberLyst[®]A21**。

[0507] 在一些实施方案中,提供了将树枝状大分子盐转化为其游离碱形式的方法,其包括:

[0508] i) 使树枝状大分子盐与离子交换树脂接触一段时间;以及

[0509] ii) 将离子交换树脂与树枝状大分子分离以获得游离碱形式的树枝状大分子。

[0510] 在一些实施方案中,通过使产物通过包括离子交换树脂的柱,使脱保护反应的产物与离子交换树脂接触。在一些实施方案中,通过将产物与离子交换树脂一起在溶剂中搅拌一段时间使脱保护反应的产物与离子交换树脂接触。本领域技术人员将理解,可以使用各种合适的溶剂,包括例如二氯甲烷(DCM)。可以将产物与离子交换树脂一起搅拌足够的时间以形成游离碱或盐交换的产物。在一些实施方案中,将产物与离子交换树脂一起搅拌约10min、约30min、约1h、约12h或约24h。搅拌后,可以过滤离子交换树脂以提供游离碱或盐交换的产物。从这里,树枝状大分子产物可以通过本领域已知的许多方法获得。

[0511] 在一些实施方案中,树枝状大分子作为盐获得。在一些实施方案中,树枝状大分子作为TFA盐获得。在一些实施方案中,树枝状大分子作为游离碱获得。在一些实施方案中,树枝状大分子作为盐酸(HCl)盐获得。

[0512] 本发明还涉及以下编号的条款:

[0513] 1. 一种树枝状大分子,其包括:

[0514] i) 核心单元(C);以及

[0515] ii) 构建单元(BU),每个构建单元是赖氨酸残基或其类似物;

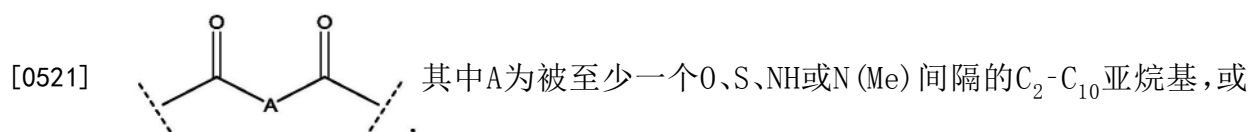
[0516] 其中核心单元经由酰胺键共价连接至两个构建单元,每个酰胺键在核心单元中存在的氮原子与构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成;

[0517] 树枝状大分子是五代构建单元树枝状大分子;

[0518] 其中不同代的构建单元通过在一个构建单元中存在的氮原子和另一个构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成的酰胺键彼此共价连接;

[0519] 树枝状大分子进一步包括:

[0520] iii) 多个第一端基(T1),各自包括核苷类似物的残基,其具有与下式的二酰基连接基团共价连接的羟基:



其中A为选自四氢呋喃、四氢噻吩、吡咯烷和N-甲基吡咯烷组成的组的杂环;以及

[0522] iv) 多个第二端基(T2),其各自包括PEG或PEOX基团;

[0523] 或其药学上可接受的盐。

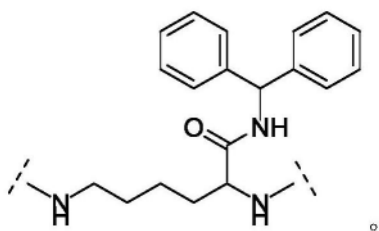
[0524] 2. 根据条款1的树枝状大分子,其中核苷类似物选自吉西他滨和阿糖胞苷组成的组。

[0525] 3. 根据条款2的树枝状大分子,其中核苷类似物是吉西他滨。

[0526] 4. 根据条款1至3中任一项的树枝状大分子,其中核心单元由包括两个氨基的核心单元前体形成。

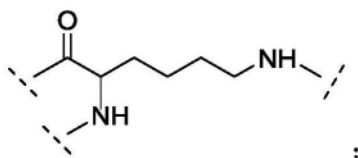
[0527] 5. 根据条款1至4中任一项的树枝状大分子,其中核心单元是:

[0528]



[0529] 6. 根据条款1至5中任一项的树枝状大分子,其中构建单元各自为:

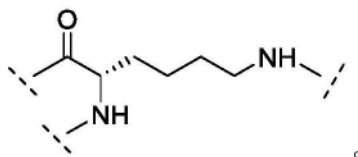
[0530]



[0531] 其中每个构建单元的酰基提供用于连接至核心或连接至前一代构建单元的共价连接点;并且其中每个氮原子提供共价连接点,用于共价连接至后续代构建单元、第一端基或第二端基。

[0532] 7. 根据条款6的树枝状大分子,其中构建单元各自为:

[0533]



[0534] 8. 根据条款1至7中任一项的树枝状大分子,其中树枝状大分子具有五个完整代的构建单元。

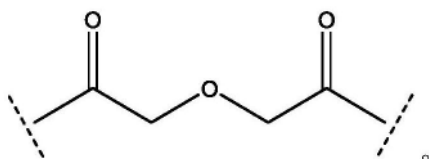
[0535] 9. 根据条款1至8中任一项的树枝状大分子,其中二酰基连接基团选自以下组成的组:

[0536]



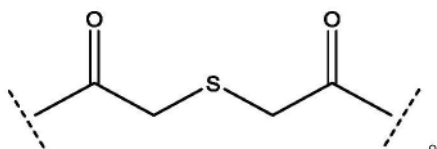
[0537] 10. 根据条款1至9中任一项的树枝状大分子,其中二酰基连接基团是:

[0538]

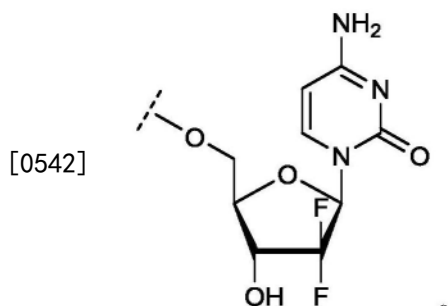


[0539] 11. 根据条款1至9中任一项的树枝状大分子,其中二酰基连接基团是:

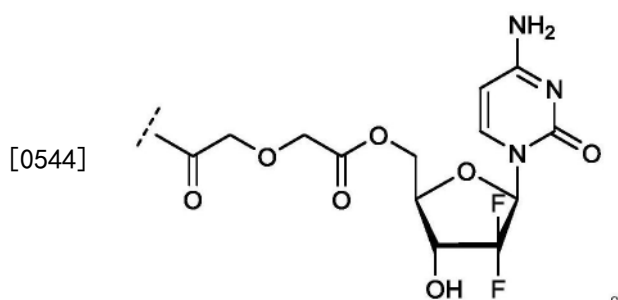
[0540]



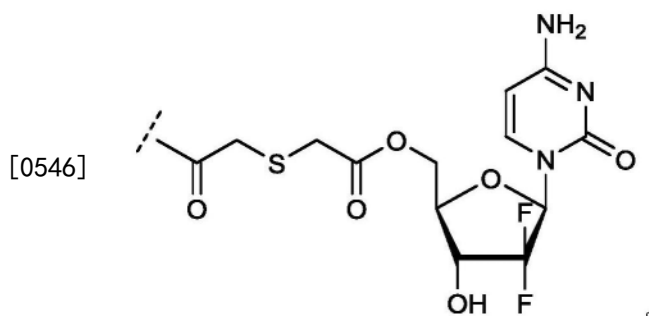
[0541] 12. 根据条款1至10中任一项的树枝状大分子,其中核苷类似物是吉西他滨并且共价连接至以下所示的二酰基连接基团:



[0543] 13. 根据条款12的树枝状大分子,其中第一端基是:



[0545] 14. 根据条款12的树枝状大分子,其中第一端基是:



[0547] 15. 根据条款1至14中任一项的树枝状大分子,其中第二端基包括平均分子量为至少500道尔顿的PEG基团。

[0548] 16. 根据条款15的树枝状大分子,其中第二端基包括平均分子量为500至2500道尔顿的PEG基团。

[0549] 17. 根据条款16的树枝状大分子,其中第二端基包括平均分子量为1900至2300道尔顿的PEG基团。

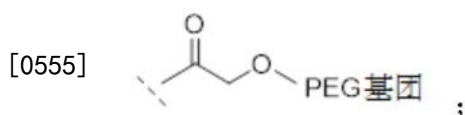
[0550] 18. 根据条款16的树枝状大分子,其中第二端基包括平均分子量为1000至1200道尔顿的PEG基团。

[0551] 19. 根据条款16的树枝状大分子,其中第二端基包括平均分子量为500至650道尔顿的PEG基团。

[0552] 20. 根据条款1至19中任一项的树枝状大分子,其中PEG基团是甲氧基封端的PEG。

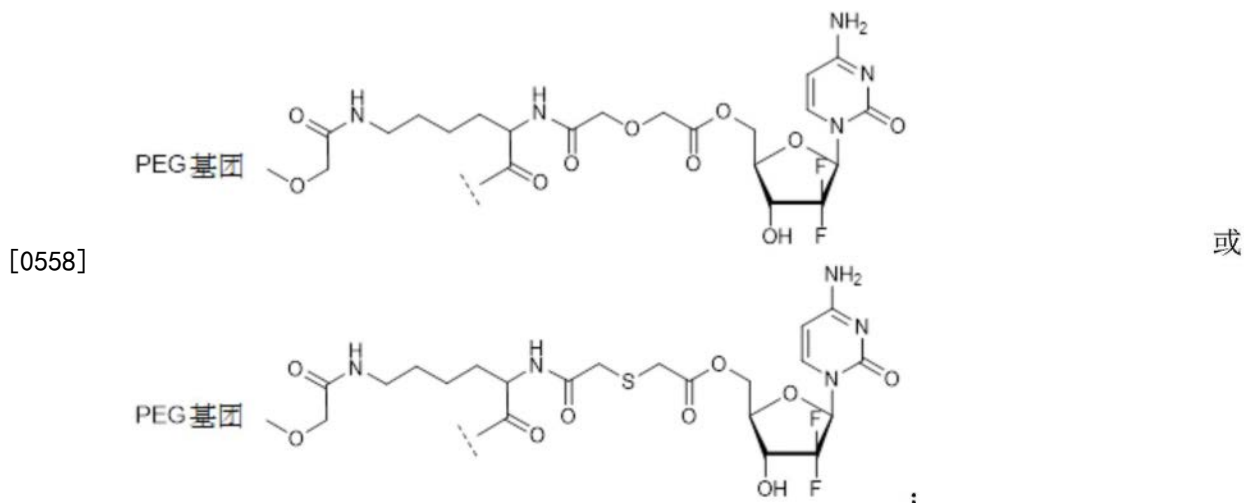
[0553] 21. 根据条款1至20中任一项的树枝状大分子,其中第二端基各自包括经由醚键共价连接至PEG连接基团(L1)的PEG基团,醚键形成于PEG基团中存在的碳原子与PEG连接基团中存在的氧原子之间,并且每个第二端基通过在构建单元中存在的氮原子和PEG连接基团中存在的酰基的碳原子之间形成的酰胺键与构建单元共价连接。

[0554] 22. 根据条款21的树枝状大分子,其中第二端基各自为:



[0556] 并且其中PEG基团是平均分子量在500至2500道尔顿范围内的甲氧基封端的PEG。

[0557] 23. 根据条款22的树枝状大分子, 其中树枝状大分子包括表面单元, 表面单元包括连接至第一端基和第二端基的外部构建单元, 表面单元具有以下结构:



[0559] 并且其中PEG基团是平均分子量在500至2500道尔顿范围内的甲氧基封端的PEG。

[0560] 24. 根据条款23的树枝状大分子, 其中PEG具有2000至2400道尔顿的平均分子量。

[0561] 25. 根据条款24的树枝状大分子, 其中树枝状大分子具有28至32个表面单元。

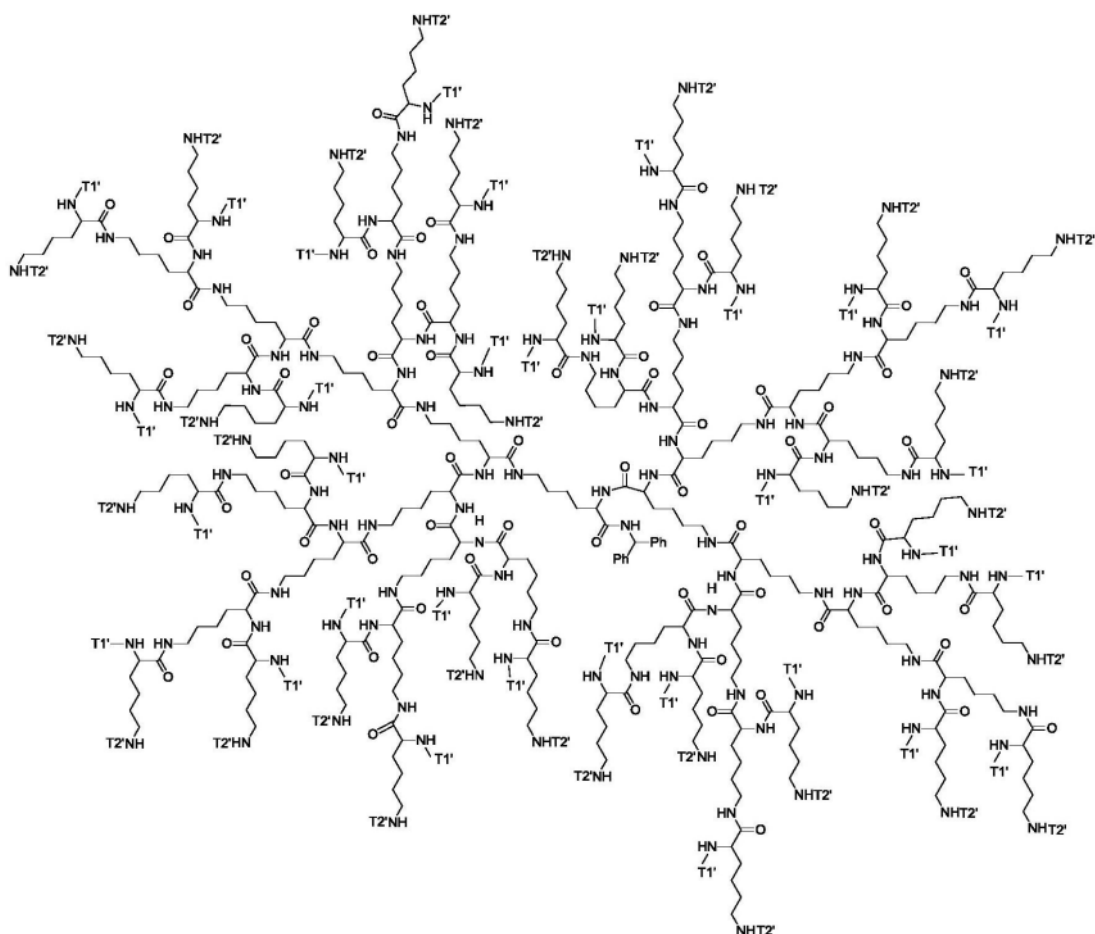
[0562] 26. 根据条款1至25中任一项的树枝状大分子, 其中存在于外部构建单元中的氮原子的至少40%各自共价连接至第一端基; 存在于外部构建单元中的氮原子的至少40%各自共价连接至第二端基。

[0563] 27. 根据条款1至26中任一项的树枝状大分子, 其中五代构建单元是完整代, 并且其中外构建单元提供64个氮原子用于共价连接至第一端基或第二端基, 其中24至32个第一端基共价连接至氮原子之一, 并且其中24至32个第二端基各自共价连接至氮原子之一。

[0564] 28. 根据条款1至27中任一项的树枝状大分子, 其中存在于外构建单元中的不超过五分之一的氮原子是未取代的。

[0565] 29. 根据条款1至28中任一项的树枝状大分子, 其中树枝状大分子是:

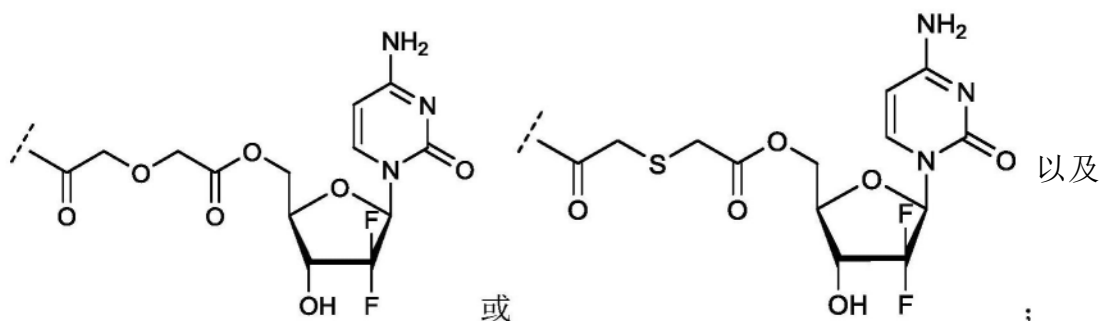
[0566]



;

[0567] 其中T1'表示第一端基,其为:

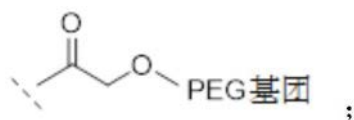
[0568]



;

[0569] T2'表示第二端基,其为:

[0570]



;

[0571] 其中PEG基团是平均分子量在500至2500道尔顿范围内的甲氧基封端的PEG,或T2'表示H,并且其中少于5个T2'是H。

[0572] 30. 一种组合物,其包括多种树枝状大分子或其药学上可接受的盐,

[0573] 其中树枝状大分子根据条款1至29中任一项所定义,

[0574] 组合物中每个树枝状大分子的第一端基的平均数在24至32的范围内

[0575] 组合物中每个树枝状大分子的第二端基的平均数在24至32的范围内。

[0576] 31. 一种药物组合物,其包括:

[0577] i) 根据条款1至29中任一项所定义的树枝状大分子或其药学上可接受的盐;和ii) 药学上可接受的赋形剂。

[0578] 32. 根据条款31的药物组合物, 其中组合物被配制用于肠胃外递送。

[0579] 33. 根据条款31或32的药物组合物, 其中组合物被配制用于静脉内递送。

[0580] 34. 根据条款1至29中任一项的树枝状大分子或根据条款31至33中任一项的药物组合物, 其用于治疗。

[0581] 35. 根据条款1至29中任一项的树枝状大分子或根据条款31至33中任一项的药物, 其用于治疗癌症。

[0582] 36. 一种治疗癌症的方法, 其包括向有需要的受试对象施用治疗有效量的根据条款1至29中任一项的树枝状大分子或根据条款31至33中任一项的药物组合物。

[0583] 37. 根据条款1至29中任一项的树枝状大分子或根据条款31至33中任一项的组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

[0584] 38. 根据条款35至37中任一项的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物, 其中, 癌症选自乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、上消化道癌(例如胰腺癌)和膀胱癌组成的组。

[0585] 39. 根据条款35至38中任一项的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物, 其中, 施用的树枝状大分子的量足以递送1至1250mg核苷类似物/ m^2 的活性剂的量。

[0586] 40. 根据条款35至39中任一项的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物, 其中, 树枝状大分子与其它抗癌药物联合施用。

[0587] 41. 根据条款40的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物, 其中, 树枝状大分子与第二树枝状大分子联合施用, 并且其中第二树枝状大分子包括:

[0588] i) 核心单元(C); 以及

[0589] ii) 构建单元(BU), 每个构建单元是赖氨酸残基或其类似物;

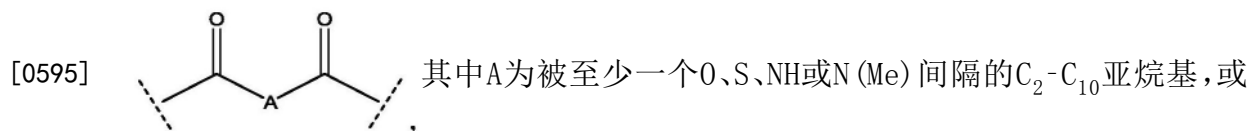
[0590] 其中核心单元经由酰胺键共价连接至两个构建单元, 每个酰胺键在核心单元中存在的氮原子与构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成;

[0591] 树枝状大分子是五代构建单元树枝状大分子;

[0592] 其中不同代的构建单元通过在一个构建单元中存在的氮原子和另一个构建单元中存在的酰基的碳原子之间形成的酰胺键彼此共价连接;

[0593] 树枝状大分子进一步包括:

[0594] iii) 多个第一端基(T1), 其各自包括紫杉烷的残基, 紫杉烷具有羟基, 其共价连接至下式的二酰基连接基团:



其中A为选自四氢呋喃、四氢噻吩、吡咯烷和N-甲基吡咯烷组成的组的杂环; 以及

[0596] iv) 多个第二端基(T2), 其各自包括PEG或PEOX基团;

[0597] 或其药学上可接受的盐。

[0598] 42. 根据条款41的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物, 其中紫杉烷选自多西他赛、紫杉醇和卡巴他赛组成的组。

[0599] 43. 根据条款42的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物, 其中紫杉烷是多西

他赛。

[0600] 44. 根据条款40的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物,其中树枝状大分子与选自含铂药剂、紫杉烷、PARP抑制剂、长春花生物碱、拓扑异构酶I抑制剂和蒽环类组成的组的其它抗癌药物联合施用。

[0601] 45. 根据条款44的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物,其中树枝状大分子与选自卡铂、顺铂、奥沙利铂、紫杉醇、Nab-紫杉醇、长春地辛、多柔比星、伊立替康、SN38和厄洛替尼组成的组的另外的抗癌药物联合施用。

[0602] 46. 根据条款35至45中任一项的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物,其中,与等剂量的游离核苷类似物给药相比,树枝状大分子给药提高了临床疗效。

[0603] 47. 根据条款35至46中任一项的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物,其中,与等剂量的游离核苷类似物给药相比,树枝状大分子给药提供降低的副作用和/或毒性。

[0604] 48. 根据条款35至47中任一项的方法、用途或使用的树枝状大分子或组合物,其中,与等剂量的游离核苷类似物给药相比,树枝状大分子给药在给药后的延长时间内提供治疗有效的吉西他滨血浆浓度水平。

[0605] 现在将参考以下实施例描述本发明,实施例说明本发明的一些具体方面。然而,应当理解,本发明的以下描述的特殊性并不取代本发明的前述描述的一般性。

[0606] 实施例

[0607] 在以下实施例中表示的树枝状大分子包括在树枝状大分子的最外代中的核心和构建单元。没有描述表面下的代。例如,树枝状大分子BHALys[Lys]₃₂代表具有式BHALys[Lys]₂[Lys]₄[Lys]₈[Lys]₁₆[Lys]₃₂的5代树枝状大分子。

[0608] 32 $\ddagger$ 涉及可用于例如用PEG_{~2100}取代的树枝状大分子上 ϵ 表面氨基的数目。通过¹H NMR实验测定与BHALys[Lys]₃₂连接的PEG_{~2100}基团的实际平均数。

[0609] **BHALys[Lys]₃₂[α -NH₂TFA]₃₂[ϵ -PEG_{~2100}]_{32 $\ddagger$} 的合成**

[0610] BHALys[Lys]₃₂[α -NH₂TFA]₃₂[ϵ -PEG_{~2100}]_{32 $\ddagger$} 通过与描述于例如W02020/014750A1和W02020/102852A1中的那些类似的方法制备,其全部内容通过引用并入本文。

[0611] **BHALys[Lys]₃₂[α -NH₂TFA]₃₂[ϵ -PEG_{~570}]_{32 $\ddagger$} 的合成**

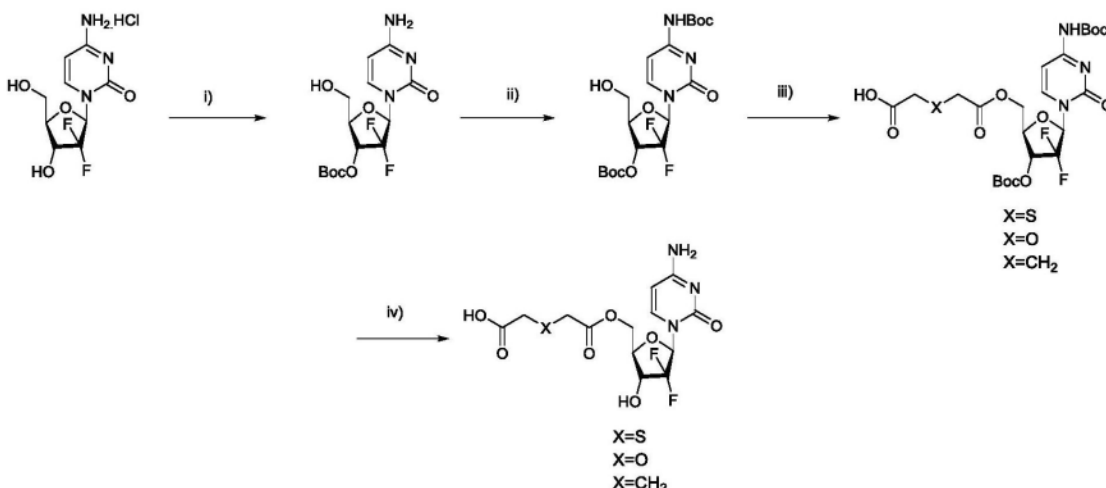
[0612] 标题化合物以与如上所述的BHALys[Lys]₃₂[α -NH₂TFA]₃₂[ϵ -PEG_{~2100}]_{32 $\ddagger$} 类似的方式制备,但使用NHS-PEG_{~570}代替NHS-PEG_{~2100}。¹H NMR (300MHz, MeOD) 7.35-7.31 (m, 10H), 6.19 (s, 1H), 4.41-4.04 (m, 53H), 3.91-3.55 (m, 1431H), 3.43-3.37 (m, 103H), 3.25-3.14 (m, 117H), 2.50-3.47 (m, 61H), 1.88-1.46 (m, 378H)。30PEG₅₇₀/树枝状大分子。通过¹H NMR光谱对每个树枝状大分子的PEG₅₇₀分子的量进行定量,显示每个树枝状大分子平均含30个PEG₅₇₀分子。

[0613] **BHALys[Lys]₃₂[α -NH₂TFA]₃₂[ϵ -PEG_{~1100}]_{32 $\ddagger$} 的合成**

[0614] 标题化合物以与如上所述的BHALys[Lys]₃₂[α -NH₂TFA]₃₂[ϵ -PEG_{~2100}]_{32 $\ddagger$} 类似的方式制备,但使用NHS-PEG_{~1100}代替NHS-PEG_{~2100}。¹H NMR (300MHz, MeOD) 8.12-8.01 (m, 21H), 7.38-7.30 (m, 13H), 6.09 (s, 3H), 4.35 (s, 39H), 4.04-3.54 (m, 2858H), 3.38 (s, 93H), 3.23-3.09 (m, 104H), 2.50-2.48 (m, 64H), 1.90-1.32 (m, 378H)。

[0615] 连接基团-吉西他滨的合成

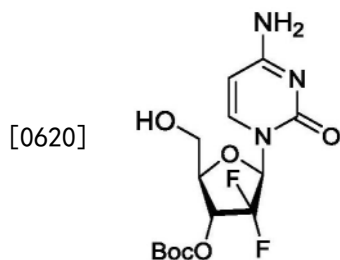
[0616] 药物连接基团中间体(0-连接的)的一般合成



[0617]

[0618] 方案:i) Boc_2O , 二恶烷, Na_2CO_3 , 室温; ii) Boc_2O , 二恶烷, $37^\circ C$, 3d; iii) 酸酐, DIPEA, DCM, 室温; iv) TFA, DCM。

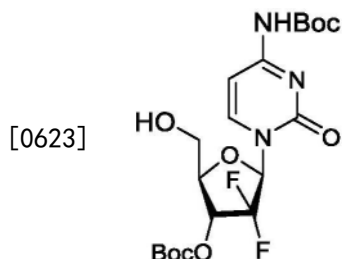
[0619] (2R, 3R, 5R) -5- (4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基) -4,4-二氟-2- (羟基甲基) 四氢呋喃-3-基碳酸叔丁酯的合成



[0620]

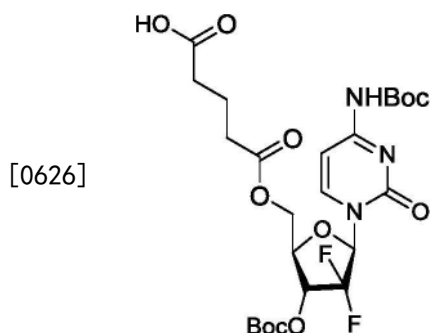
[0621] 在室温下向二恶烷 (240mL) 和水 (60mL) 中的盐酸吉西他滨 (5.0g, 0.017mol, 1.0当量) 的剧烈搅拌的悬浮液中添加碳酸钠 (8.83g, 0.083mol, 5.0当量), 随后经1min逐滴添加二碳酸二叔丁酯 (3.99g, 0.018mol, 1.1当量)。将反应混合物在室温下搅拌。搅拌18h后, 通过TLC (4:4:1DCM:丙酮:EtOH v/v, UV vis) 分析反应混合物, 显示存在原料, 因此一次性加入另一份二碳酸二叔丁酯 (2.00g, 9.2mmol) 并继续搅拌。搅拌3天后, 用水 (150mL) 稀释反应混合物, 然后过滤。将固体用EtOAc (200mL) 洗涤, 并将合并的滤液用EtOAc ($2 \times 200mL$) 萃取。然后将合并的有机物用盐水 (300mL) 洗涤, 干燥 ($MgSO_4$) 并将挥发物真空浓缩, 得到白色泡沫。将泡沫再溶解于最少量的DCM:丙酮 (1:1v/v, $\sim 10mL$) 中。固体在室温下开始从溶液中结晶。然后将得到的悬浮液在冷室 ($4^\circ C$) 中保持过夜, 过滤, 得到产物, 为白色固体 (3.89g, 58%)。LCMS (亲甲酸): t_R (min) = 7.85 ESI (+ve) $m/z = 364$ ($M+H^+$)。 ^1H NMR (300MHz, $(CD_3)_2S=O$) δ 7.66 (d, $J=7.56Hz$, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 6.22 (t, $J=9.16Hz$, 1H), 5.85 (d, $J=7.14Hz$, 1H), 5.76 (s, 1H), 5.34 (t, $J=5.88Hz$, 1H), 5.22-5.13 (m, 1H), 4.17-4.12 (m, 1H), 3.78-3.61 (m, 2H), 2.52-2.50 (m, 1H), 1.46 (s, 9H)。

[0622] (1- ((2R, 4R, 5R) -4- ((叔丁氧基羰基) 氧基) -3,3-二氟-5- (羟基甲基) 四氢呋喃-2-基) -2-氧代-1,2-二氢嘧啶-4-基) 氨基甲酸叔丁酯的合成



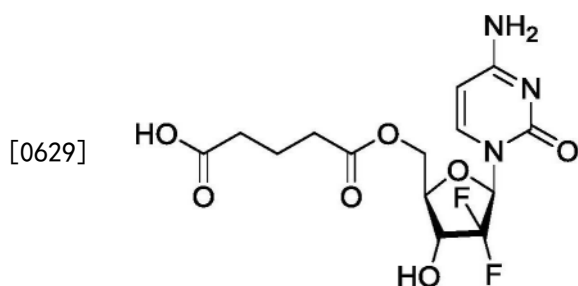
[0624] 将二碳酸二叔丁酯(7.2g,33.1mmol,10.0当量)添加至130mL二恶烷中(2R,3R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-4,4-二氟-2-(羟基甲基)四氢呋喃-3-基碳酸叔丁酯(1.2g,3.3mmol,1.0当量)的溶液中且在37℃下加热反应混合物3天。TLC分析(DCM:丙酮:EtOH=10:10:1v/v)的反应混合物显示形成新的非极性点,没有剩余原料。将粗反应混合物在减压下浓缩并通过柱色谱法纯化DCM:丙酮(1:3至1:1v/v梯度洗脱),得到所需产物,为白色固体(1.4g,92%)。¹H NMR(300MHz,(CD₃)₂CO) δ8.22(d,1H,J=6.00Hz),7.28(d,1H,J=6.20Hz),6.37(t,1H,J=9.00Hz),5.40-5.31(m,1H),4.33-4.28(m,1H),4.02(dd,1H,J=3.00,15.0Hz),3.85(dd,1H,J=3.00,12.0Hz),1.53(s,9H),1.51(s,9H)。

[0625] 合成5-(((2R,3R,5R)-5-(4-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3-((叔丁氧基羰基)氧基)-4,4-二氟四氢呋喃-2-基)甲氧基)-5-氧代戊酸



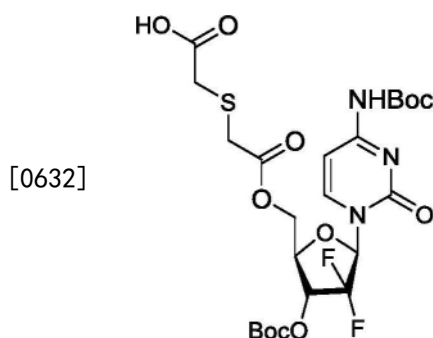
[0627] 在氮气气氛下在0℃向无水DMF(2mL)中(1-((2R,4R,5R)-4-((叔丁氧基羰基)氧基)-3,3-二氟-5-(羟基甲基)四氢呋喃-2-基)-2-氧代-1,2-二氢嘧啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(200mg,0.43mmol)的搅拌溶液中加入DIPEA(0.4mL,2.15mmol),然后加入戊二酸酐(100mg,0.86mmol)。将反应混合物缓慢温热至室温。在室温下搅拌4h后,真空除去挥发物并将残余物溶于乙酸乙酯(20mL)中,然后将有机物用10%NaHCO₃(2×10mL)水溶液,水(2×20mL),盐水(20mL)洗涤并干燥(Na₂SO₄)。真空除去挥发物,残余物通过硅胶柱色谱法纯化,用DCM:MeOH洗脱,得到5-(((2R,3R,5R)-5-(4-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3-((叔丁氧基羰基)氧基)-4,4-二氟四氢呋喃-2-基)甲氧基)-5-氧代戊酸,为白色固体(130mg,54%)。LCMS(亲TFA) t_R=10.8min,m/z(578)。¹H NMR(300MHz,(CD₃)₂S=O) 12.00(bs,1H),10.59(bs,1H),7.98(d,J=9Hz,1H),7.12(d,J=9Hz,1H),6.30(t,J=9Hz,1H),5.38-5.18(m,1H),4.51-4.32(m,3H),2.41(t,J=6Hz,2H),2.27(t,J=6Hz,2H),1.83-1.66(m,2H),1.47(s,18H)。

[0628] 5-(((2R,3R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-4,4-二氟-3-羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)-5-氧代戊酸的合成



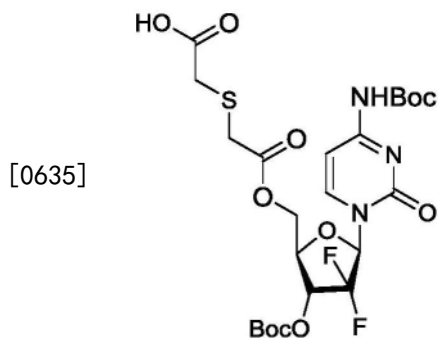
[0630] 在0℃下在氮气下向无水DCM(2mL)中5-(((2R,3R,5R)-5-(4-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3-((叔丁氧基羰基)氧基)-4,4-二氟四氢呋喃-2-基)甲氧基)-5-氧代戊酸(30mg,0.055mmol)的搅拌溶液中添加TFA(2mL)(逐滴)。一旦加入完成,将反应混合物温热至室温。4h后,真空除去挥发物,将残余物用乙醚/石油醚(~20mL,1:1v/v)研磨,然后溶解在水中并冷冻干燥,得到产物,为白色固体(15mg,75%)。LCMS(亲TFA) t_R = 5.43min; m/z = 380。¹H NMR(300MHz, CD₃OD) δ 7.90(d, J = 9Hz, 1H), 6.23-6.17(m, 1H), 4.45(bd, J = 6Hz, 1H), 4.30-4.16(m, 1H), 3.49(dd, J = 6, 9Hz, 2H), 2.48(t, J = 6Hz, 1H), 2.40-2.33(m, 2H), 1.96-1.83(m, 1H), 1.18(t, J = 6Hz, 2H)。

[0631] 2-((2-(((2R,3R,5R)-5-(4-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3-((叔丁氧基羰基)氧基)-4,4-二氟四氢呋喃-2-基)甲氧基)-2-氧代乙基)硫代)乙酸



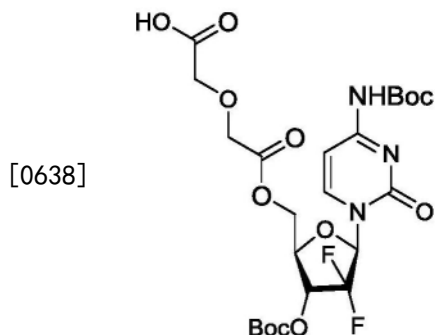
[0633] 在0℃向DCM(15mL)中(1-((2R,4R,5R)-4-((叔丁氧基羰基)氧基)-3,3-二氟-5-(羟基甲基)四氢呋喃-2-基)-2-氧代-1,2-二氢嘧啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(0.4g, 0.86mmol, 1.0当量)的搅拌溶液中添加DIPEA(0.19mL, 1.04mmol, 1.2当量),随后添加硫二羧乙酐(0.11g, 0.86mmol, 1.0当量)。将反应混合物搅拌10min,然后温热至室温并搅拌2h。加入DCM(100mL)并将有机物用pH3的缓冲溶液(3×100mL)洗涤或直到水相保持在pH3。将有机物用盐水(100mL)洗涤,干燥(MgSO₄)并真空浓缩。将残余物用MeOH:DCM(0:100至1:19v/v梯度洗脱)通过硅胶柱色谱法纯化,得到产物,为白色固体(0.34g, 66%)。¹H NMR(300MHz, CD₃OD) δ 8.04(d, J = 4.0Hz, 1H), 7.38(d, J = 3.5Hz, 1H), 6.35(t, J = 9.0Hz, 1H), 5.33-5.25(m, 1H), 4.55-4.45(m, 3H), 3.54(s, 2H), 3.43(s, 2H), 1.55, 1.52(s, 18H)。¹H NMR(300MHz, (CD₃)₂S=O) δ 12.67(bs, 1H), 10.57(bs, 1H), 8.00(d, J = 6.0Hz, 1H), 7.12(d, J = 6.0Hz, 1H), 6.32(t, J = 9.0Hz, 1H), 5.30(bs, 1H), 4.54-4.35(m, 3H), 3.5(s, 2H), 3.39(s, 2H), 1.47(s, 18H)。

[0634] 2-((2-(((2R,3R,5R)-5-(4-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3-((叔丁氧基羰基)氧基)-4,4-二氟四氢呋喃-2-基)甲氧基)-2-氧代乙基)硫代)乙酸的替代合成



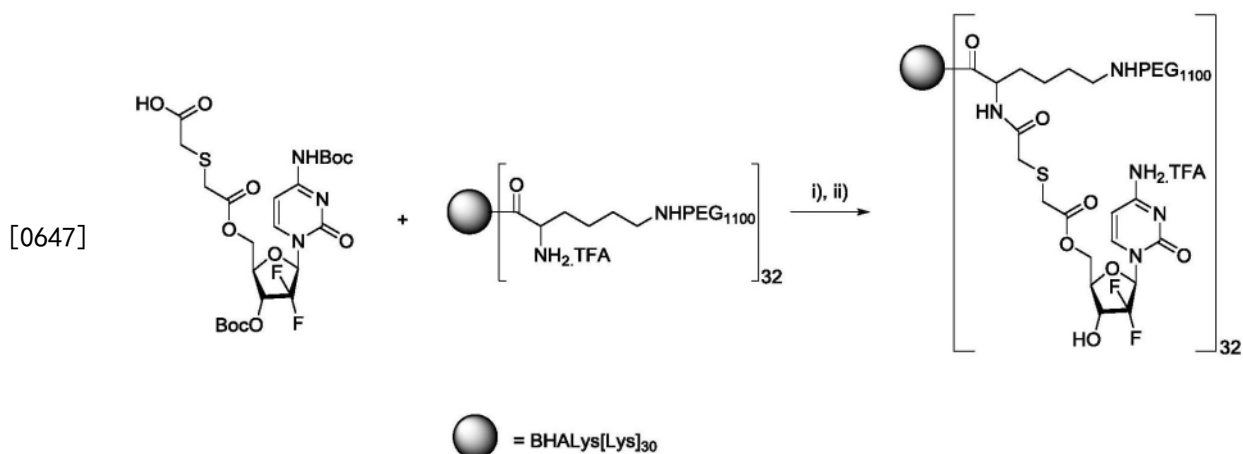
[0636] 向DCM(40mL)中(1-((2R,4R,5R)-4-((叔丁氧基羰基)氧基)-3,3-二氟-5-(羟基甲基)四氢呋喃-2-基)-2-氧代-1,2-二氢嘧啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(4.01g,8.65mmol)的搅拌溶液中添加NMM(1.40mL,1.27mmol),随后添加硫二羧乙酐(1.59g,1.20mmol)。将反应混合物在室温搅拌过夜,然后用DCM(20mL)稀释。将有机层用pH3的缓冲溶液(2×60mL,用1M HCl调节至pH3)洗涤或直至水相保持在pH3,然后用盐水(60mL)洗涤,用Na₂SO₄干燥并真空浓缩,得到产物,为白色片状固体(4.85g,94%)。¹H NMR(300MHz,(CD₃)₂S=O) 12.62(bs,1H), 10.59(bs,1H), 8.00(d,J=9.0Hz,1H), 7.12(d,J=6.0Hz,1H), 6.31(t,J=9.0Hz,1H), 5.34-5.25(m,1H), 4.51-4.38(m,3H), 3.52(s,2H), 3.39(s,2H), 1.46(s,18H)。HPLC(C8 Xbridge,3×100mm)梯度:5%ACN/H₂O(0-1min),5-80%ACN(1-7min),80%ACN(7-12min),80-5%ACN(12-13min),5%ACN(13-15min),243nm,10mM甲酸铵缓冲液,0.4mL/min,室温(min)=7.69min(宽峰),纯度96.4%。

[0637] 2-((2-(((2R,3R,5R)-5-(4-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3-((叔丁氧基羰基)氧基)-4,4-二氟四氢呋喃-2-基)甲氧基)-2-氧代乙氧基)乙酸的合成



[0639] 在0℃向DCM(15mL)中(1-((2R,4R,5R)-4-((叔丁氧基羰基)氧基)-3,3-二氟-5-(羟基甲基)四氢呋喃-2-基)-2-氧代-1,2-二氢嘧啶-4-基)氨基甲酸叔丁酯(0.43g,0.93mmol,1.0当量)的搅拌溶液中添加DIPEA(0.25mL,1.39mmol,1.5当量),随后添加二羧乙酐(0.13g,1.11mmol,1.0当量)。将反应混合物搅拌10min,然后温热至室温并搅拌2h。加入DCM(100mL)并将有机物用pH3的缓冲溶液(3×100mL)洗涤或直到水相保持在pH3。将有机物用盐水(100mL)洗涤,干燥(MgSO₄)并真空浓缩得到浅黄色固体状产物(0.53g,98%)。¹H NMR(300MHz,(CD₃)₂S=O) 12.72(bs,1H), 10.59(bs,1H), 8.00(d,J=9.0Hz,1H), 7.10(d,J=6.0Hz,1H), 6.31(t,J=9.0Hz,1H), 5.31(bs,1H), 4.54-4.39(m,3H), 4.28(s,2H), 4.13(s,2H), 1.47(s,18H)。

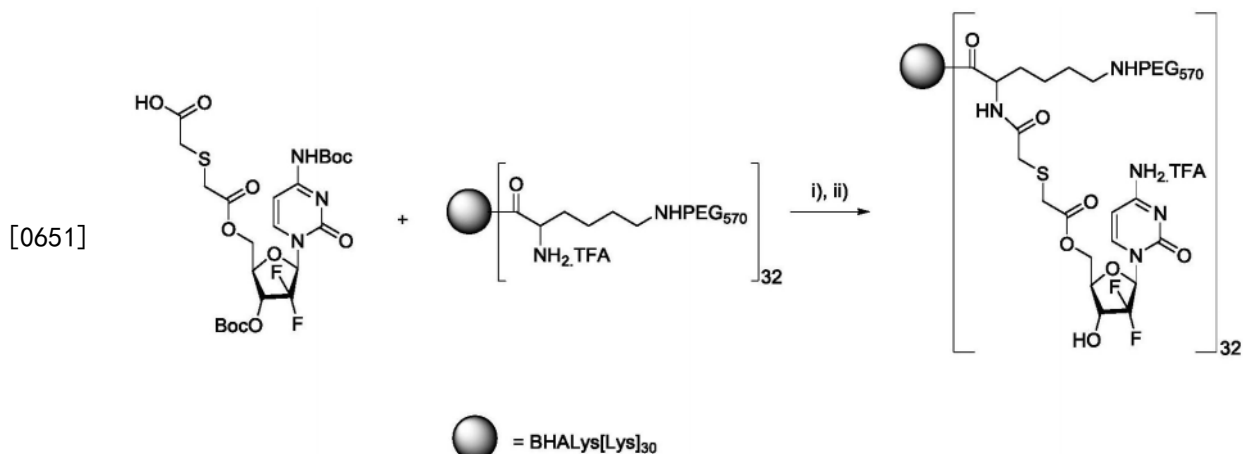
[0640] 2-((2-(((2R,3R,5R)-5-(4-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3-((叔丁氧基羰基)氧基)-4,4-二氟四氢呋喃-2-基)甲氧基)-2-氧代乙氧基)乙酸的替代合



[0648] 方案:i) PyBOP,NMM,DMF,室温;ii) TFA:DCM(1:1v/v),室温。

[0649] 向DMF(10mL)中2-((2-(((2R,3R,5R)-5-(4-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3-((叔丁氧基羰基)氧基)-4,4-二氟四氢呋喃-2-基)甲氧基)-2-氧代乙基)硫代)乙酸(0.11g,0.18mmol)的溶液中添加PyBOP(0.10g,0.18mmol),随后添加DMF(20mL)中树枝状大分子(0.2g,0.004mmol)和DIPEA(0.06mL,0.34mmol)的溶液。通过HPLC分析监测反应混合物并在室温下搅拌过夜。然后将反应混合物真空浓缩并将残余物溶于TFA:DCM(10mL,1:1v/v)中并在室温下搅拌过夜。真空除去挥发物,并将残余物在Sephadex® LH-20(高~35cm,直径~2.5cm)上通过尺寸排阻色谱纯化,用乙腈洗脱(速率~1滴/s,级分大小=400滴)。通过HPLC分析所有级分,合并含有所需产物的那些,真空浓缩,得到产物,为浅黄色蜡状固体(216mg,86%)。¹H NMR(300MHz,CD₃OD) δ7.92(s,33H),7.29(s,12H),6.28-6.26(m,60H),4.59-4.22(m,210H),3.90-3.54(m,2964H),3.43-3.38(m,150H),3.20(s,111H),2.47-2.45(m,64H),1.83-1.31(m,379H)。通过¹H NMR光谱对每个树枝状大分子的吉西他滨分子的量进行定量,显示每个树枝状大分子平均含30个吉西他滨分子或15%wt.吉西他滨。

[0650] 实施例2:[BHA Lys][Lys]₃₀[Lys]₃₂[(α-NH-TDA-吉西他滨)₃₂(ε-NHPEG₅₇₀)₃₂](化合物2)

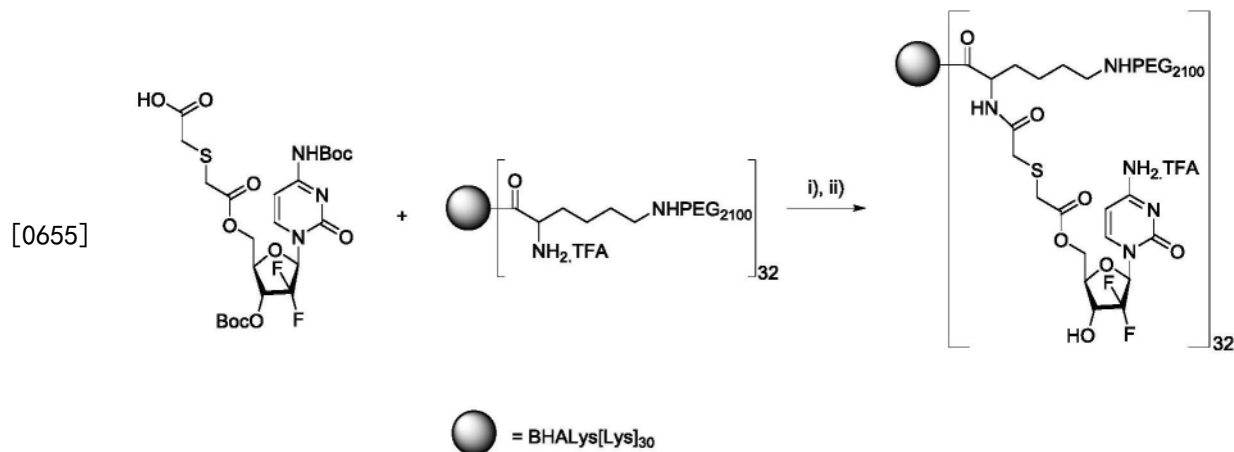


[0652] 方案:i) PyBOP,NMM,DMF,室温;ii) TFA:DCM(1:1v/v),室温。

[0653] 以与上述实施例1类似的方式,使用2-((2-(((2R,3R,5R)-5-(4-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3-((叔丁氧基羰基)氧基)-4,4-二氟四氢呋喃-2-基)甲氧基)-2-氧代乙基)硫代)乙酸(0.29g,0.49mmol)和树枝状大分子(0.3g,0.01mmol)来合成呈

浅黄色蜡状固体的产物 (305mg, 65%)。¹H NMR (300MHz, CD₃OD) δ 7.95 (s, 39H), 7.29 (s, 10H), 6.29-6.25 (m, 58H), 4.60-4.26 (183H), 3.88-3.44 (m, 1568H), 3.37 (s, 103H), 3.20-3.09 (m, 113H), 2.47 (s, 64H), 1.82-1.17 (m, 388H)。通过¹H NMR光谱对每个树枝状大分子的吉西他滨分子的量进行定量, 显示每个树枝状大分子平均含29个吉西他滨分子或17%wt. 吉西他滨。

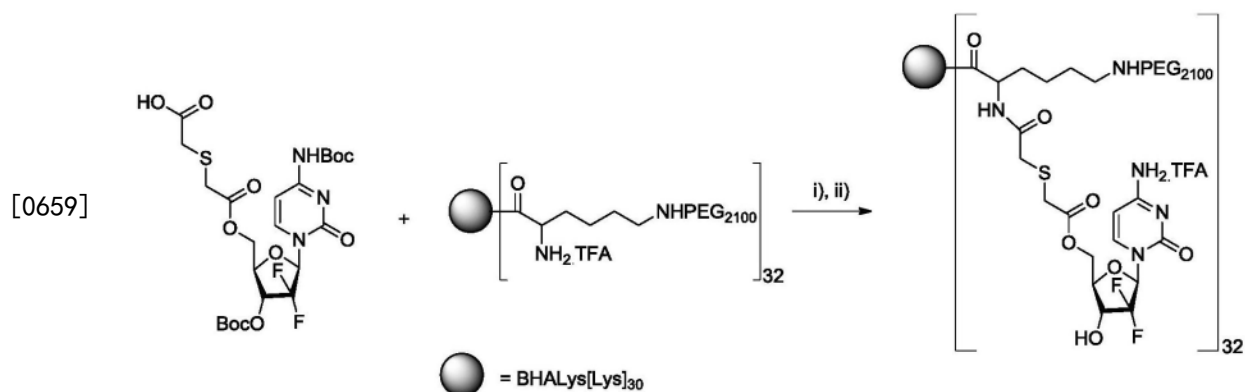
[0654] 实施例3: [BHA Lys] [Lys]₃₀ [Lys]₃₂ [(α-NH-TDA-吉西他滨)₃₂ (ε-NHPEG~₂₁₀₀)₃₂] (化合物3)



[0656] 方案: i) PyBOP, NMM, DMF, 室温; ii) TFA: DCM (1:1v/v), 室温。

[0657] 以与上述实施例1类似的方式, 使用2-((2-(((2R,3R,5R)-5-(4-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3-((叔丁氧基羰基)氧基)-4,4-二氟四氢呋喃-2-基)甲氧基)-2-氧代乙基)硫代)乙酸 (0.22g, 0.371mmol) 和树枝状大分子 (0.73g, 0.01mmol) 来合成呈类白色固体的产物 (520mg, 80%, 多于两步)。¹H NMR (300MHz, CD₃OD) δ 7.77 (bs, 28H), 7.27 (bs, 10H), 6.40-5.99 (m, 50H), 4.72-4.13 (m, 161H), 4.01 (s, 71H), 3.91-3.84 (m, 41H), 3.78-3.54 (m, 5818H), 3.45-3.39 (m, 67H), 3.38 (s, 96H), 3.25 (bs, 86H), 2.14-0.99 (m, 383H)。通过¹H NMR光谱对每个树枝状大分子的吉西他滨分子的量进行定量, 显示每个树枝状大分子平均含25个吉西他滨分子或7.8%wt. 吉西他滨, 而通过HPLC分析对每个树枝状大分子的吉西他滨分子的量进行定量, 显示每个树枝状大分子平均含27个吉西他滨分子或8.4%wt. 吉西他滨。

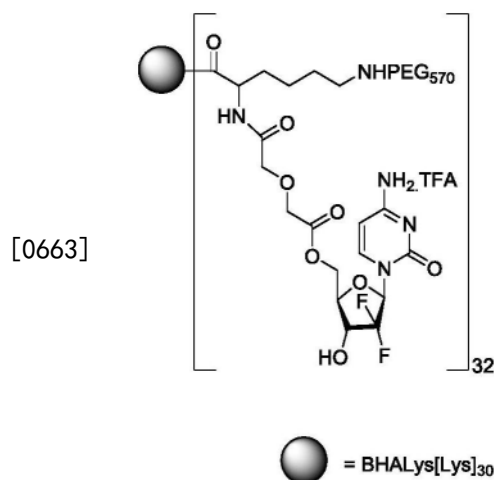
[0658] 实施例3A: [BHA Lys] [Lys]₃₀ [Lys]₃₂ [(α-NH-TDA-吉西他滨)₃₂ (ε-NHPEG~₂₁₀₀)₃₂] (化合物3)



[0660] 方案: i) PyBOP, NMM, DMF, 室温; ii) TFA: DCM (1:1v/v), 室温。

[0661] 向DMF (80mL) 中2-((2-(((2R,3R,5R)-5-(4-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3-((叔丁氧基羰基)氧基)-4,4-二氟四氢呋喃-2-基)甲氧基)-2-氧代乙基)硫代)乙酸 (4.38g, 7.36mmol) 的溶液中添加固体PyBOP (4.58g, 8.80mmol), 随后添加固体SPL8731 (14.5g, 0.191mmol)。最后, 加入NMM (5.40mL, 49.1mmol) 并将反应在室温搅拌过夜。将反应混合物用ACN (1:1) 稀释并通过用30kDa再生纤维素Pellicon3® 0.11m²膜超滤来纯化。在30渗透体积的ACN之后, 将渗余物在真空中浓缩以得到呈浅棕色残余物的产物 (17.7g, 102%)。HPLC (C8 Xbridge, 3×100mm) 梯度: 5% ACN/H₂O (0–1min), 5–80% ACN (1–7min), 80% ACN (7–12min), 80–5% ACN (12–13min), 5% ACN (13–15min), 243nm, 10mM甲酸铵缓冲液, 0.4mL/min, 室温 (min) = 9.07min (宽峰), 纯度100%。然后将残余物溶于冷却至0℃的DCM (26mL) 中并缓慢加入TFA (26mL)。然后将反应混合物在室温搅拌过夜, 然后缓慢加入冰冷的MTBE (340mL) 中。通过真空过滤获得所得固体, 得到呈自由流动白色固体状的产物 (16.2g, 98%)。¹H NMR (300MHz, CD₃OD) δ 7.91 (brs, 28H), 6.30–6.20 (m, 56H), 4.53–4.26 (m, 156H), 4.00–3.39 (m, 5427H), 3.37 (s, 96H), 3.28–3.07 (m, 113H), 1.98–1.12 (m, 378H)。HPLC (C8 Xbridge, 3×100mm) 梯度: 5% ACN/H₂O (0–1min), 5–80% ACN (1–7min), 80% ACN (7–12min), 80–5% ACN (12–13min), 5% ACN (13–15min), 243nm, 10mM甲酸铵缓冲液, 0.4mL/min, 室温 (min) = 8.79min (宽峰)。纯度100%。通过HPLC进行的TFA分析得到TFA水平为55505ppm (5.55%)。

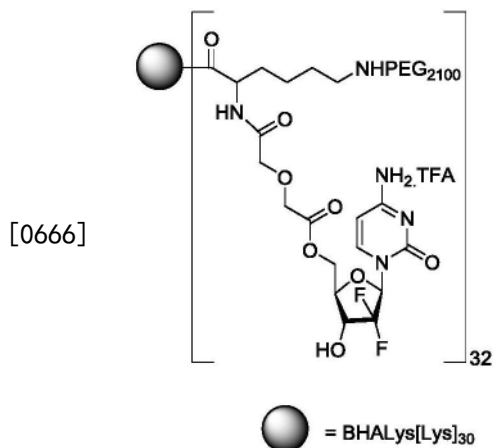
[0662] 实施例4: [BHA Lys][Lys]₃₀[Lys]₃₂[(α-NH-DGA-吉西他滨)₃₂(ε-NHPEG~₅₇₀)₃₂] (化合物4)



[0664] 以与上述实施例1类似的方式, 使用2-((2-(((2R,3R,5R)-5-(4-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3-((叔丁氧基羰基)氧基)-4,4-二氟四氢呋喃-2-基)甲氧基)-2-氧代乙氧基)乙酸 (0.28g, 0.49mmol) 和树枝状大分子 (0.3g, 0.01mmol) 来合成呈浅黄色蜡状固体的产物 (223mg, 61%)。¹H NMR (300MHz, CD₃OD) δ 7.76 (d, J=6Hz, 28H), 7.28 (s, 9H), 6.25–6.06 (m, 56H), 4.62–4.20 (m, 315H), 3.88–3.54 (m, 1525H), 3.37 (s, 104H), 3.19 (s, 120H), 2.46 (s, 64H), 1.82–1.43 (m, 388H)。通过¹H NMR光谱对每个树枝状大分子的吉西他滨分子的量进行定量, 显示每个树枝状大分子平均含28个吉西他滨分子或17%wt. 吉西他滨。

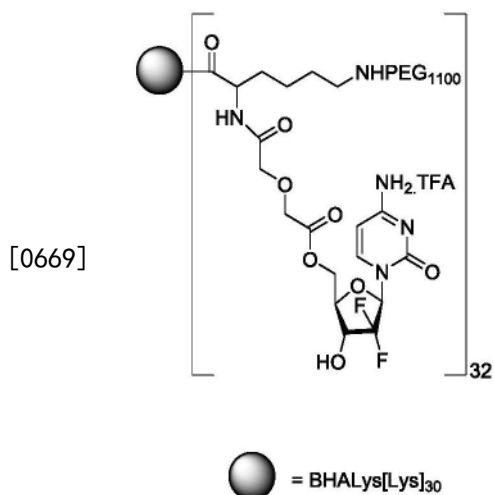
[0665] 实施例4A: [BHA Lys][Lys]₃₀[Lys]₃₂[(α-NH-DGA-吉西他滨)₃₂(ε-NHPEG~₂₁₀₀)₃₂]

(化合物6)



[0667] 以与上述实施例4类似的方式,使用2-(2-((2R,3R,5R)-5-(4-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3-((叔丁氧基羰基)氧基)-4,4-二氟四氢呋喃-2-基)甲氧基)-2-氧代乙氧基)乙酸(4.56g,7.87mmol)和SPL8731(15.5g,0.204mmol)来合成呈浅棕色残余物的中间体。HPLC(C8 Xbridge,3×100mm)梯度:5%ACN/H₂O(0—1min),5—80%ACN(1—7min),80%ACN(7—12min),80—5%ACN(12—13min),5%ACN(13—15min),243nm,10mM甲酸铵缓冲液,0.4mL/min,室温(min)=8.68min(宽峰),纯度100%。在TFA/DCM(1:1,56mL)中脱保护并在MTBE(380mL)中沉淀后,得到最终产物,为白色固体(16.7g,99%,2步)。¹H NMR(300MHz,CD₃OD)δ7.89(brs,32H),6.30-6.17(m,64H),4.69-4.14(m,300H),4.00-3.39(m,5576H),3.37(s,93H),3.28-3.04(m,106H),1.94-1.04(m,378H)。HPLC(C8 Xbridge,3×100mm)梯度:5%ACN/H₂O(0—1min),5—80%ACN(1—7min),80%ACN(7—12min),80—5%ACN(12—13min),5%ACN(13—15min),243nm,10mM甲酸铵缓冲液,0.4mL/min,室温(min)=8.52min(宽峰)。纯度100%。通过HPLC进行的TFA分析得到TFA水平为71591ppm(7.16%)。

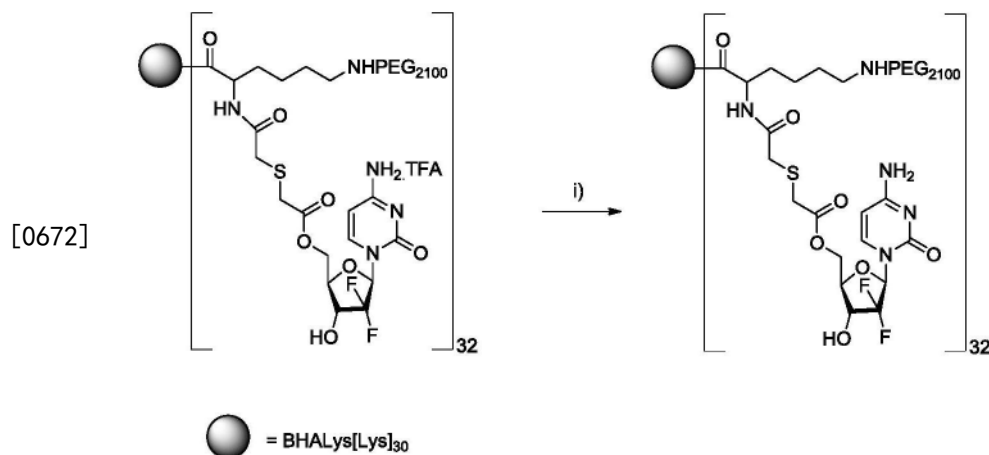
[0668] 实施例5: [BHA-Lys]₁[Lys]₃₀[Lys]₃₂[(α-NH-DGA-吉西他滨)₃₂(ε-NHPEG~₁₁₀₀)₃₂]₁
(化合物5)



[0670] 以与上述实施例1类似的方式,使用2-(2-(((2R,3R,5R)-5-(4-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3-((叔丁氧基羰基)氧基)-4,4-二氟四氢呋喃-2-基)甲氧基)-2-氧代乙氧基)乙酸(0.11g,0.18mmol)和树枝状大分子(0.2g,0.004mmol)来合成呈浅

黄色蜡状固体的产物 (220mg, 83%)。 ^1H NMR (300MHz, CD_3OD) δ 7.89 (s, 35H), 7.29 (s, 9H), 6.27-6.21 (m, 56H), 4.64-4.20 (m, 306H), 3.90-3.54 (m, 2978H), 3.43-3.40 (m, 116H), 3.20-3.09 (m, 101H), 2.47-2.45 (m, 64H), 1.86-1.31 (m, 371)。通过 ^1H NMR光谱对每个树枝状大分子的吉西他滨分子的量进行定量, 显示每个树枝状大分子平均含29个吉西他滨分子或14% wt. 吉西他滨。

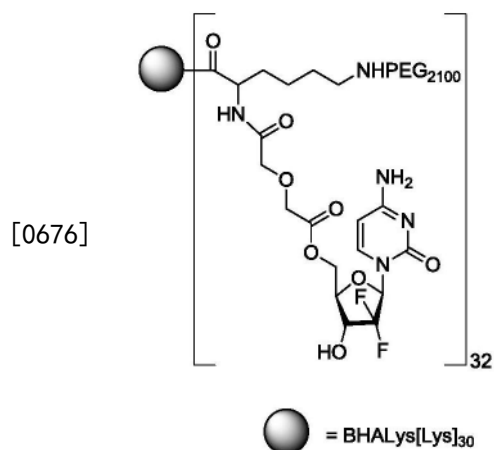
[0671] 实施例5B: $[\text{BHALys}][\text{Lys}]_{30}[\text{Lys}]_{32}[(\alpha\text{-NH-TDA-吉西他滨})_{32}(\epsilon\text{-NHPEG}\sim_{2100})_{32}]$ (化合物3)



[0673] 方案: i) AmberLyst®A21离子交换树脂, DCM, 室温

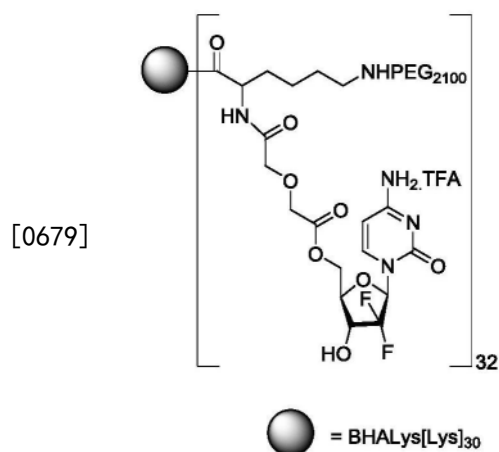
[0674] 向DCM (160mL) 中SPL9133.TFA (16.0g, 0.182mmol) 的溶液中加入 AmberLyst®A21 离子交换树脂 (32.0g, 50g/mmol), 并将所得悬浮液在室温下搅拌过夜。滤出反应以除去树脂, 真空浓缩有机层, 得到浅棕色残余物。将残余物溶于THF (60mL) 中, 然后缓慢加入到冰冷的MTBE (320mL) 中, 通过真空过滤收集所得固体, 得到产物, 为白色粉末 (13.6g, 89%)。HPLC: 柱: Agilent ZORBAX 300 Extend-C18柱, 300 Å, 5μm, 4.6mm × 250mm, 梯度: 0%MPB (0-1min), 0-90%MPB (1-8min), 90%MPB (8-10min), 90-0%MPB (10-11min), 0%ACN (11-18min), 275nm, [MPA: H_2O 中 0.01% TFA; MPB: ACN 中 0.01% TFA], 1mL/min, R_t (min) = 7.80min, 纯度99.98%。 ^1H NMR (300MHz, CD_3OD) δ 7.73-7.60 (m, 30H), 6.37-6.00 (m, 62H), 4.64-4.3.95 (m, 253H), 3.89-3.38 (m, 5954H), 3.36 (s, 96H), 3.27-3.07 (m, 132H), 2.04-0.97 (m, 378H)。通过HPLC进行的TFA分析得到TFA水平为257ppm (0.0257%)。通过HPLC分析定量每个树枝状大分子的吉西他滨分子的量得到9.87%w/w的载量, 其等于每个树枝状大分子32个吉西他滨分子的平均值。

[0675] 实施例5C: $[\text{BHALys}][\text{Lys}]_{30}[\text{Lys}]_{32}[(\alpha\text{-NH-DGA-吉西他滨})_{32}(\epsilon\text{-NHPEG}\sim_{2100})_{32}]$ (化合物6)



[0677] 以类似于上述实施例5B的方式,用AmberLyst®A21离子交换树脂(32.2g,50g/mmol)处理在DCM(160mL)中的SPL9134.TFA(16.0g,0.183mmol),沉淀后得到分离的产物,为白色固体(12.2g,79%)。HPLC:柱:Agilent ZORBAX 300Extend-C18柱,300 Å,5μm,4.6mm×250mm,梯度:0%MPB(0-1min),0-90%MPB(1-8min),90%MPB(8-10min),90-0%MPB(10-11min),0%ACN(11-18min),275nm,[MPA:H₂O中0.01%TFA;MPB:ACN中0.01%TFA],1mL/min,Rt(min)=7.78min,纯度99.96%。¹H NMR(300MHz,CD₃OD) δ7.67-7.55(m,30H),6.30-6.00(m,60H),4.64-4.09(m,300H),4.02-3.38(m,5552H),3.36(s,93H),3.27-2.94(m,120H),2.09-0.96(m,378H)。通过TFA分析(HPLC分析)得到TFA的水平为395ppm(0.0395%)。通过(HPLC分析)定量每个树枝状大分子的吉西他滨分子的量得到9.67%w/w的载量,其等于每个树枝状大分子31个吉西他滨分子的平均值。

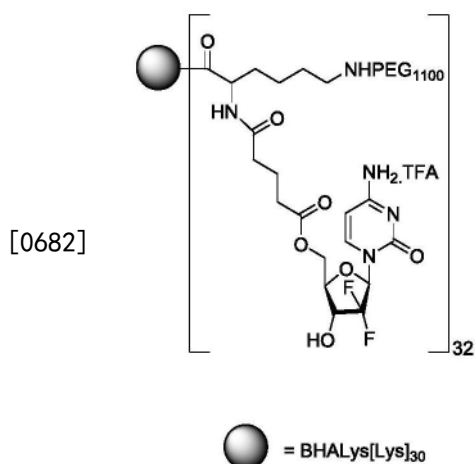
[0678] 实施例6:[BHA Lys][Lys]₃₀[Lys]₃₂[(α-NH-DGA-吉西他滨)₃₂(ε-NHPEG~₂₁₀₀)₃₂](化合物6)



[0680] 以与上述实施例1类似的方式,使用2-(2-(((2R,3R,5R)-5-(4-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3-(((叔丁氧基羰基)氧基)-4,4-二氟四氢呋喃-2-基)甲氧基)-2-氧代乙氧基)乙酸(0.10g,0.177mmol)和树枝状大分子(0.35g,0.005mmol)来合成呈白色固体的产物(204mg,75%,两步)。¹H NMR(300MHz,CD₃OD) δ7.73(bs,26H),7.26(bs,10H),6.37-5.99(m,56H),4.69-4.11(m,277H),4.01(s,76H),3.89(s,51H),3.84-3.75(m,5352H),3.42(m,45H),3.38(s,97H),3.26(bs,78H),2.17-1.02(m,384H)。通过¹H NMR光谱对每个树枝状大分子的吉西他滨分子的量进行定量,显示每个树枝状大分子平均含28个吉

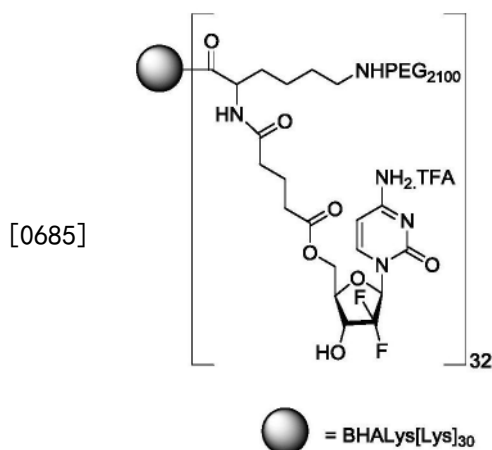
西他滨分子或8.8%wt. 吉西他滨, 而通过HPLC分析进行定量, 显示每个树枝状大分子平均含32个吉西他滨分子或9.9%wt. 吉西他滨。

[0681] 实施例7: [BHALys][Lys]₃₀[Lys]₃₂[(α-NH-Glu-吉西他滨)₃₂(ε-NHPEG~₁₁₀₀)₃₂] (化合物7)



[0683] 以与以上实施例1类似的方式, 将5-(((2R,3R,5R)-5-(4-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3-((叔丁氧基羰基)氧基)-4,4-二氟四氢呋喃-2-基)甲氧基)-5-氧代戊酸(28mg, 0.049mmol) 和树枝状大分子10(40mg, 1.03μmol) (0.025mL, 0.127mmol) 用于合成作为白色半固体的[BHALys][Lys]₃₀[Lys]₃₂[(α-NH-Glu-吉西他滨)₃₂(ε-NHPEG~₁₁₀₀)₃₂] (20mg, 50%)。¹H NMR (300MHz, CD₃OD) δ7.5-7.7 (m, 20H), 7.2-7.4 (m, 10H), 5.8-6.0 (m, 20H), 6.2-6.4 (m, 20H), 4.14-4.70 (m, 52H), 3.44-4.12 (m, 2806H), 3.2-3.4 (m, 214H), 2.7-3.2 (m, 161H), 2.1-2.7 (m, 88H), 0.89-2.25 (m, 370H)。

[0684] 实施例8: [BHALys][Lys]₃₀[Lys]₃₂[(α-NH-Glu-吉西他滨)₃₂(ε-NHPEG~₂₁₀₀)₃₂] (化合物8)



[0686] 以与上述实施例1类似的方式, 使用5-(((2R,3R,5R)-5-(4-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3-((叔丁氧基羰基)氧基)-4,4-二氟四氢呋喃-2-基)甲氧基)-5-戊酮酸(0.20g, 0.355mmol) 和树枝状大分子(0.7g, 0.01mmol) 来合成呈白色固体的产物(286mg, 63%, 多于两步)。¹H NMR (300MHz, CD₃OD) δ7.77 (bs, 27H), 7.25 (bs, 11H), 6.22 (bs, 56H), 4.64-4.11 (m, 177H), 4.02 (s, 78H), 3.90 (s, 46H), 3.83-3.46 (m, 5365H), 3.43 (bs, 34H), 3.39 (s, 97H), 3.26 (bs, 79H), 2.69-2.13 (m, 122H), 2.10-0.95 (m, 485H)。通过¹H

NMR光谱和HPLC分析对每个树枝状大分子的吉西他滨分子的量进行定量,显示每个树枝状大分子平均含28个吉西他滨分子或8.8%wt.吉西他滨。

[0687] 实施例9:PBS、柠檬酸盐缓冲液和血浆中的对比连接基团释放速率

[0688] (i) 在PBS和柠檬酸盐缓冲液中吉西他滨从树枝状大分子的释放

[0689] 进行研究以确定吉西他滨在PBS和柠檬酸盐缓冲液中从树枝状大分子化合物释放的速率。将本发明的吉西他滨缀合的树枝状大分子和对比实施例树枝状大分子各自溶解于PBS缓冲液(2mL,10mM,pH7.4)或柠檬酸盐缓冲液(2mL,0.1M,pH4.5)中并保持在37℃。然后通过HPLC上注射5μL溶液来分析样品。在不同的时间点,通过HPLC分析样品。HPLC(C8 XBridge,3×100mm)梯度:5%ACN/H₂O(0—1min),5—80%ACN(1—7min),80%ACN(7—12min),80—5%ACN(12—13min),5%ACN(13—15min),243nm,10mM甲酸铵缓冲液,0.4mL/min。

[0690] 结果示于图1(PBS)和图2(柠檬酸盐缓冲液)中,并且指示释放的%吉西他滨,并且示于下表中:

[0691] (a) %吉西他滨在PBS中释放(pH7.4;37℃):

时间(h)	%吉西他滨在 PBS 中释放		
	8	3	6
0	0	0	0
0.08	7.04	3.95	4.06
2	7.83	11.23	22.07
4	8.09	16.6	35.48
6	8.05	21.99	44.46
8	8.29	25.64	51.97
10	8.79	30.03	58.3
12	9.08	33.17	63.5
24	12.43	46.36	80.11
26	12.68	48.07	81.61
28	13.47	51.24	83.04
30	13.11	53.41	84.51
32	14.12	54.48	84.76
34	14.34	55.8	86.95
36	15.01	57.52	87.28

[0693] (b) %吉西他滨在柠檬酸盐缓冲液中释放(pH4.5;37℃):

[0694]

	%吉西他滨在柠檬酸盐缓冲液中释放		
时间 (h)	8	3	6
0	0	0	0
0.08	5.93	4.42	4.27
2	6.14	5.21	5.33
4	5.36	5.51	5.93
6	5.38	4.92	6.87
8	5.71	5.61	7.28
10	5.43	5.39	8.3
12	5.79	5.94	9.11
24	6.65	7.53	13.16
26	6.49	7.52	13.13
28	6.95	7.75	13.76
30	6.18	7.71	14.68
32	6.29	7.48	15.01
34	6.17	7.72	15.65
36	6.28	8.19	16.46

[0695] (ii) 血浆释放研究

[0696] 将人血浆在冰浴中解冻,然后在4℃下以13.2K rpm离心10min,并通过0.2μm过滤器过滤上清液(将蛋白质/酶团块留在微量离心管中)。将血浆置于3%CO₂,42%相对湿度的CO₂培养箱中,使pH达到7.4。

[0697] 将盐酸吉西他滨(28.5mg)溶解于Milli Q水中,并将所得原液转移至5mL容量瓶中,并稀释以提供操作标准溶液。将操作标准溶液在4℃下以13.2K rpm离心10min。

[0698] 通过将1mL血浆(离心并过滤)加入到0.2mL树枝状大分子溶液(在miliQ水中约2mg/mL吉西他滨当量)中进行血浆释放研究,例如树枝状大分子和对比物。将混合物涡旋(30s),然后在37℃5%CO₂孵育。在不同的时间点除去等分试样(0.1mL)并加入到ACN(0.2mL)中。将所得混合物涡旋(30s),离心(10min,4℃),过滤并通过HPLC(C8 Xbridge,3×100mm,3.5 Å,0.4mL/min,梯度:5%ACN/H₂O)(0-1min),5-80%ACN(1-7min),80%ACN(7-12min),80-5%ACN(12-13min),5%ACN(13-15min),100mM甲酸铵缓冲液,柱温50℃,样品盘4℃,260nm。结果如图3所示。

[0699]

人血浆%释放			
时间 (h)	8	3	6
0	-0.17	1.81	0.49
2	0.22	3.73	9.94
4	-1.99	6.31	18.18
6	3.02	17.74	39.84
24	6.19	34.83	71.13
30	5.39	37.86	77.98

[0700] 上述结果证明了吉西他滨在给药后从树枝状大分子的相对释放速率。

[0701] 实施例10:吉西他滨-树枝状大分子缀合物的GI₅₀

[0702] 使用alamarBlue活性测定(Thermo Fisher,DAL1025)进行研究以确定示例性树枝状大分子抑制癌细胞系生长的能力。GI₅₀是抑制50%细胞生长所需的浓度。

[0703] 评价化合物对MDA-MB-231、A549、H460、BxPC3和CAPAN-1细胞的细胞毒性的活力。将细胞以 $1.2-5 \times 10^3$ 个细胞的密度(取决于细胞生长速率)接种在96孔板中并孵育过夜。然后用连续稀释的测试组合物处理细胞72h(MDA-MB-231, A549和H460系)或144h(BxPC3和CAPAN-1系)。对于细胞活力分析,在孵育的最后6-8h期间加入10%培养基体积的alar Blue。活细胞中alar Blue的还原产生红色荧光代谢物,其可在平板读数器上读取(560nm激发/610nm发射)。在GraphPad Prism中用4-参数非线性曲线拟合由空白校正剂量-反应曲线测定细胞活力和随后的GI₅₀值。结果证明本发明的示例性树枝状大分子具有有效的细胞毒性作用。

[0704] 吉西他滨化合物的GI₅₀表:

GI ₅₀ 值以 μM 吉西他滨给出	MDA-MB-231	A549	H460	BxPC-3	CAPAN-1
化合物	72 h	72 h	72 h	144 h	144 h
吉西他滨	0.004	0.011	0.042	0.009	0.009
8	0.103	0.5			
3	0.007	0.05	0.077	0.008	0.008
6	0.005	0.045	0.056	0.001	0.006
9 (对比实施例)	0.843	4.91			
1		0.051	0.215	0.007	0.033
4	0.003	0.031	0.061	0.013	0.011
2	0.004	0.034	0.412	0.007	0.021
5	0.003	0.044	0.046	0.007	0.003

[0706] 实施例11:吉西他滨-树枝状大分子缀合物的体内功效

[0707] 进行CAPAN-1(人胰腺癌细胞系)小鼠异种移植胰腺癌模型研究以评估与吉西他滨相比示例性树枝状大分子的抗肿瘤功效性质。

[0708] 化合物1、4、2和5通过在给药前即刻溶解于无菌盐水溶液中来制备。在给药前将吉西他滨(DBL™吉西他滨注射液, Hospira Pty Ltd.)进一步稀释在盐水溶液中。

[0709] 雌性NOD-SCID白介素-2受体 γ 链缺失小鼠(9周龄)在肋腹皮下接种PBS溶液:基质胶(1:1)中的 5×10^6 CAPAN-1细胞。将小鼠称重并使用电子卡尺每周测量肿瘤两次。肿瘤体积(mm^3)计算为长度(mm)/2 $\times$ 宽度(mm)²。在植入后第17天,将具有相似大小肿瘤(平均肿瘤体积100 mm^3)的小鼠随机分成6组,每组10只动物。

[0710] 通过尾静脉i.v.注射施用化合物,每周两次,0.1ml/10g体重,持续3周。各组如下给药:

[0711] 1. 盐水-溶媒

[0712] 2. 吉西他滨(120mg/kg, i.v.)

[0713] 3. 1 (2mg/kg, i.v.)

[0714] 4. 4 (5mg/kg, i.v.)

[0715] 5. 2 (5mg/kg, i.v.)

[0716] 6. 5 (3mg/kg, i.v.)

[0717] 在第29天(其中所有对照动物保留在研究中)使用单向ANOVA和Dunnett多重比较检验分析肿瘤生长抑制。吉西他滨和DEP-吉西他滨的肿瘤生长曲线在47天内(当所有治疗

组动物保持在肿瘤相关终点研究中时)使用混合效应模型进行比较,随后进行Tukey's多重比较检验。由于非肿瘤相关的终点(一个来自吉西他滨和一个来自SPL-9138治疗组),在第47天之前丢失两只小鼠。使用GraphPad Prism 8.1进行所有统计分析。

[0718] 图4显示了针对CAPAN-1肿瘤异种移植物的治疗的抗肿瘤功效。每周两次测定肿瘤体积,并表示为平均肿瘤体积($\pm$ SEM)。如图4、4、2、5所示,在给药研究期间,该药可诱导CAPAN-1肿瘤完全停滞,并显著延长生存期,超过吉西他滨。 $P<0.0001$ (Kaplan-Meier生存曲线的Mantel Cox回归分析)。

[0719]	治疗	肿瘤生长抑制(%) v 溶媒	P(与溶媒)
	吉西他滨	84	<0.0001
	1	75	<0.0001
	4	91	<0.0001
	2	94	<0.0001
	5	94	<0.0001

[0720] 实施例12:吉西他滨-树枝状大分子缀合物的给药方案研究

[0721] 建立了CAPAN-1(人胰腺癌细胞系)小鼠移植胰腺癌模型,以评估示例性树枝状大分子每周给药与双周给药的效果。

[0722] 如上所述制备化合物1。如上所述接种小鼠并确定肿瘤大小。在植入后第17天,将具有相似大小肿瘤(平均肿瘤体积 140mm^3)的小鼠随机分成2组,每组5只动物:

[0723] 1.1 (5mg/kg, i.v.) 每周,持续3周;以及

[0724] 2.1 (2mg/kg, i.v.) 每两周,持续3周。

[0725] 图5显示了针对CAPAN-1肿瘤异种移植物的治疗的抗肿瘤功效。每周两次测定肿瘤体积,并表示为平均肿瘤体积($\pm$ SEM)。每周给予5mg/kg的化合物1比每两周给予2mg/kg的化合物1更有效地抑制肿瘤生长。

[0726] 实施例13a:吉西他滨-树枝状大分子缀合物与 *Abraxane*[®] 的异种移植物的体内功效研究

[0727] 使用CAPAN-1(人胰腺癌细胞系)小鼠异种移植胰腺癌模型来评估3和6单独或与 *Abraxane*[®] (白蛋白结合的紫杉醇)组合与吉西他滨单独或与 *Abraxane*[®] 组合相比的抗肿瘤功效特性。如上所述接种小鼠并确定肿瘤大小。在植入后第19天,将具有相似大小肿瘤(平均肿瘤体积 100mm^3)的小鼠随机分成7组,每组10只动物。如上所述制备吉西他滨,3和6。在给药前立即将 *Abraxane*[®] 溶于盐溶液中。

[0728] 在第1、10和17天经尾静脉i.v.注入0.1ml/10g体重的 *Abraxane*[®]、吉西他滨和树枝状大分子。

[0729]

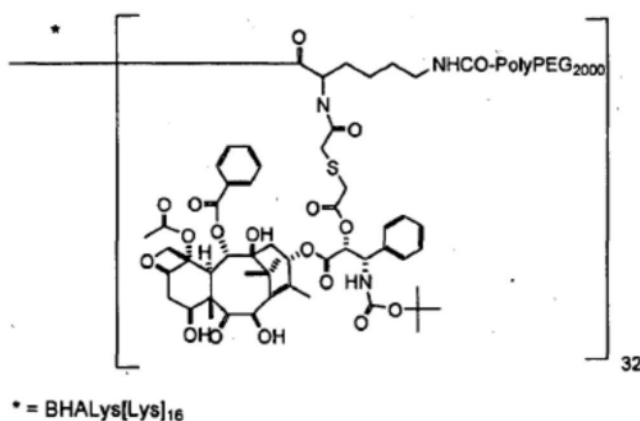
治疗	剂量
溶媒	
吉西他滨	120 mg/kg
Abraxane [®]	40 mg/kg
吉西他滨 + Abraxane [®]	吉西他滨 120 mg/kg + Abraxane [®] 40 mg/kg
3	6.5 mg/kg
6*	4 mg/kg
6* + Abraxane [®]	6 4 mg/kg + Abraxane [®] 40 mg/kg

[0730] *化合物6在第1天以5mg/kg施用,在第10和17天以4mg/kg施用。

[0731] 实施例13b: 吉西他滨-树枝状大分子缀合物与多西他赛-树枝状大分子的异种移植物的体内功效研究

[0732] 在实施例13a的扩展中,准备另外两组小鼠并给药以评估与核苷类似物-树枝状大分子(例如6)组合的紫杉烷-树枝状大分子的抗肿瘤功效特性。如上所述接种小鼠并确定肿瘤大小。DEP-DTX、多西他赛-树枝状大分子缀合物,如W02012167309的实施例19中制备,并且具有结构BHA Lys [Lys]₃₂ [(α-TDA-DTX)₃₂ (ε-PolyPEG₂₀₀₀)₃₂]:

[0733]



[0734] 每周通过尾静脉i.v.注射施用树枝状大分子,0.1ml/10g体重,持续3周。

[0735]

治疗	剂量
DEP-DTX	24mg/kg
6*+DEP-DTX	6 4mg/kg+DEP-DTX 10mg/kg

[0736] *化合物6在第1天以5mg/kg施用,在第10和17天以4mg/kg施用

[0737] 实施例13a和b的结果

[0738] 在第29天(其中没有对照动物保留在研究中)使用单向ANOVA和Dunnett多重比较检验分析肿瘤生长抑制。使用GraphPad Prism 8.1进行所有统计分析。

[0739]

治疗	第 29 天的肿瘤生长抑制 (%) v 溶媒	P (vs 溶媒)
吉西他滨	59	P<0.001
Abraxane [®]	92	P<0.001
吉西他滨 + Abraxane [®]	95	P<0.001
3	103	P<0.001
6	83	P<0.001
6 + Abraxane [®]	108	P<0.001
DEP-DTX	108	P<0.001
6 + DEP-DTX	107	P<0.001

[0740] 在第29天,与给药研究相比,3在CAPAN-1肿瘤中比吉西他滨显著更有效;并且与单独的药剂(P=0.0001)或吉西他滨与Abraxane[®](P=0.005)相比,Abraxane[®]和6的组合显著更有效,并且诱导完全肿瘤消退(P<0.0001)。DEP-DTX和6的组合比单独的6更有效并诱导完全肿瘤消退(P<0.0001)。

[0741] 图6显示了在实验结束时第82天对CAPAN-1肿瘤异种移植物的治疗的抗肿瘤功效。每周两次测定肿瘤体积,并表示为平均肿瘤体积(±SEM)。曲线图会一直显示,直到每组中的第一只老鼠到达肿瘤终点。

[0742] 如图6所示,在给药研究中,3在CAPAN-1肿瘤中比吉西他滨更有效,并且也比吉西他滨和Abraxane[®]的组合更有效。

[0743] Abraxane[®]和6的组合比单独的药剂或吉西他滨与Abraxane[®]的组合更有效。DEP-DTX和6的组合比单独的6和任何其它组更有效。

[0744] 一般来说,化合物的耐受性很好,在最初的两周内,与给药对应的体重下降最小,随后恢复和继而体重增加。由于在Abraxane[®]加6第一次给药后体重开始快速减轻,在第8天从实验中移除一只小鼠。所有组中的最大体重减轻低于10%,除了接受5mg/kg的6和Abraxane[®]的组显示平均体重减轻10.27%。

[0745] 实施例14:两种吉西他滨-树枝状大分子缀合物的异种移植植物在胰腺癌小鼠异种移植植物模型中的体内功效研究。

[0746] 使用CAPAN-1(人胰腺癌细胞系)小鼠异种移植胰腺癌模型评估3和6的抗肿瘤功效特性。接种NSG(NOD-SCID白介素-2受体 γ 链缺失)小鼠,并如上所述确定肿瘤大小。在植入后第24天,将具有相似大小肿瘤(平均肿瘤体积100mm³)的小鼠对于每种肿瘤类型随机分成4组,每组10只动物。如上所述制备吉西他滨,3和6。

[0747] 吉西他滨每周施用两次,树枝状大分子每周以0.1ml/10g体重通过尾静脉i.v.注射施用3周。

[0748]

治疗	剂量
溶媒/盐水	
吉西他滨	120mg/kg

3	6mg/kg
6	5mg/kg

[0749] 图7显示了针对CAPAN-1肿瘤异种移植物的治疗的抗肿瘤功效。每周两次测定肿瘤体积,并表示为平均肿瘤体积($\pm$ SEM)。如图7所示,在本研究中,3在CAPAN-1肿瘤中比吉西他滨或6显著更有效。

[0750] 实施例15:两种吉西他滨-树枝状大分子缀合物的异种移植物在肺腺癌小鼠异种移植物模型中的体内功效研究。

[0751] 使用A549(人腺癌人肺泡基底上皮)细胞系来评估3的抗肿瘤功效特性。如上所述接种NSG小鼠并确定肿瘤大小。在植入后第30天,将具有相似大小肿瘤(平均肿瘤体积 100mm^3)的小鼠对于每种肿瘤类型随机分成4组,每组10只动物。如上所述制备吉西他滨和3。

[0752] 吉西他滨每周施用两次,树枝状大分子每周以 $0.1\text{ml}/10\text{g}$ 体重通过尾静脉i.v.注射施用3周。

[0753]	治疗	剂量
	溶媒/盐水	
	吉西他滨	120mg/kg
	3	6mg/kg

[0754] 图8显示了针对A549肿瘤异种移植物的治疗的抗肿瘤功效。每周两次测定肿瘤体积,并表示为平均肿瘤体积($\pm$ SEM)。如图8所示,在整个研究中,3在A549肿瘤中比吉西他滨更有效。

[0755] 实施例16:吉西他滨-树枝状大分子缀合物与卡铂的异种移植物的体内功效研究

[0756] 使用OVCAR-3(人卵巢癌细胞系)小鼠异种移植癌症模型来评估3单独或与卡铂组合与吉西他滨单独或与卡铂组合相比的抗肿瘤功效特性。如上所述接种NSG小鼠并确定肿瘤大小。在植入后第29天,将具有相似大小肿瘤(平均肿瘤体积 100mm^3)的小鼠随机分成10组,每组10只动物。如上所述制备吉西他滨和3。将DBL卡铂(赫士睿)溶于盐水溶液中,并在给药前立即在5%葡萄糖中进一步稀释。

[0757] 吉西他滨每周施用两次,树枝状大分子和卡铂每周以 $0.1\text{ml}/10\text{g}$ 体重通过尾静脉i.v.注射施用3周。

[0758]	治疗	剂量
	溶媒/盐水	
	吉西他滨+葡萄糖溶媒	80mg/kg
	吉西他滨	120mg/kg
	卡铂+盐水溶媒	40mg/kg
	卡铂	60mg/kg
	3+葡萄糖溶媒	4mg/kg
	3	6mg/kg
	吉西他滨+卡铂	吉西他滨80mg/kg+卡铂40mg/kg
	3+卡铂	3 4mg/kg+卡铂40mg/kg
	3+卡铂	3 6mg/kg+卡铂40mg/kg

[0759] 图9显示了针对OVCAR-1肿瘤异种移植物的治疗的抗肿瘤功效。每周两次测定肿瘤体积,并表示为平均肿瘤体积($\pm$ SEM)。如图9所示,在OVCAR-1肿瘤中,(i) 4mg/kg和6mg/kg的3比吉西他滨更有效,(ii) 3和卡铂与单独的吉西他滨或卡铂一样或更有效。

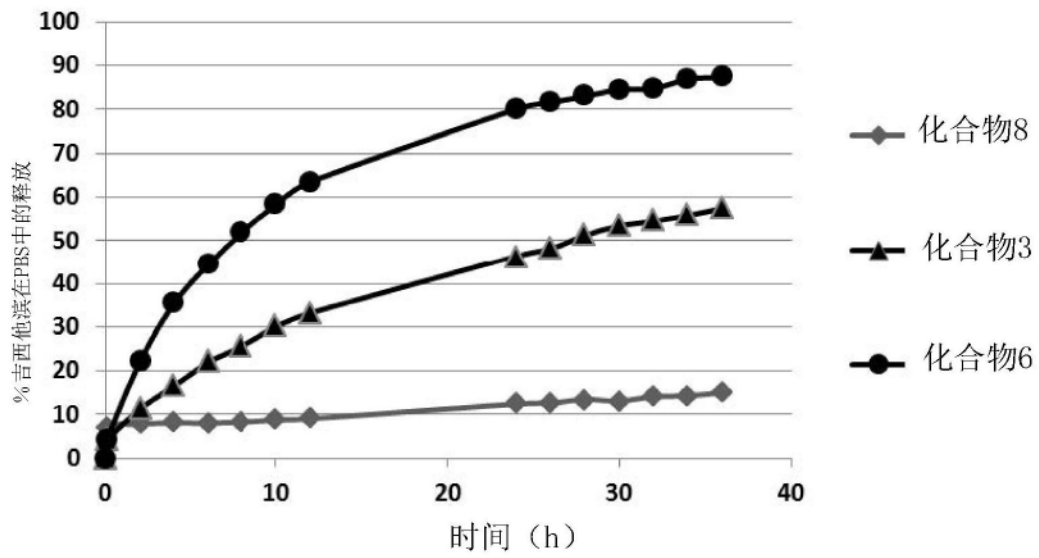


图1

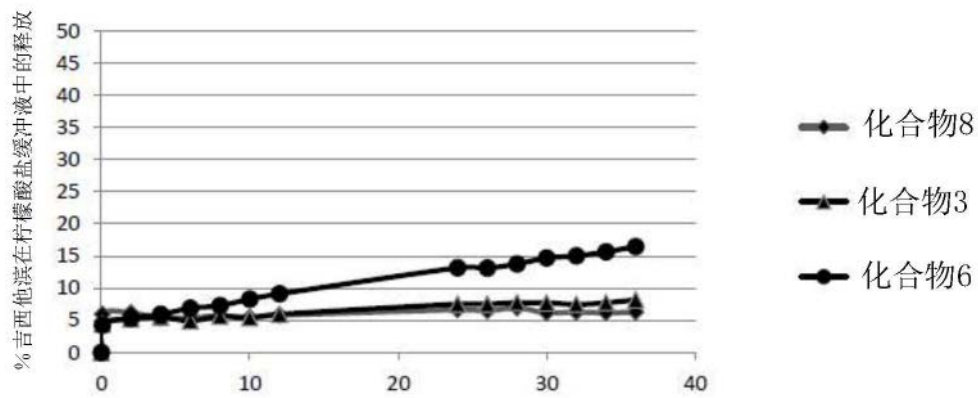


图2

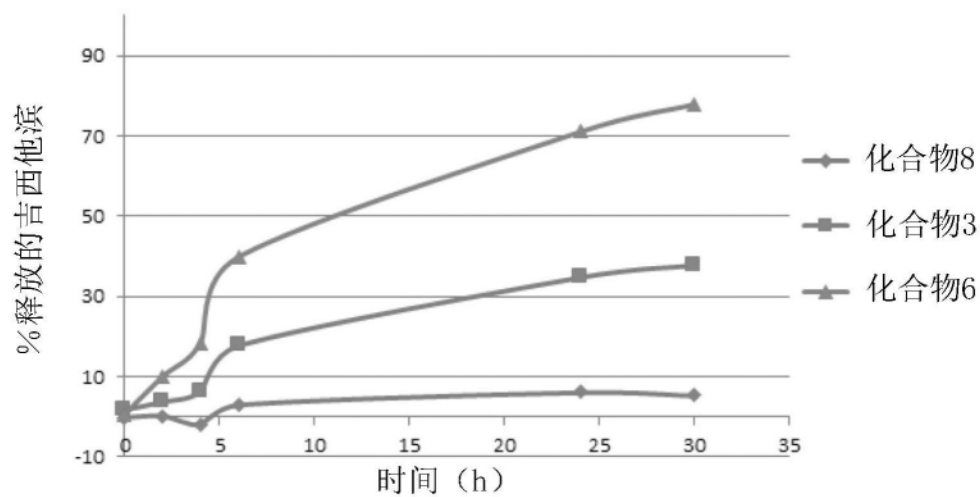


图3

平均TV

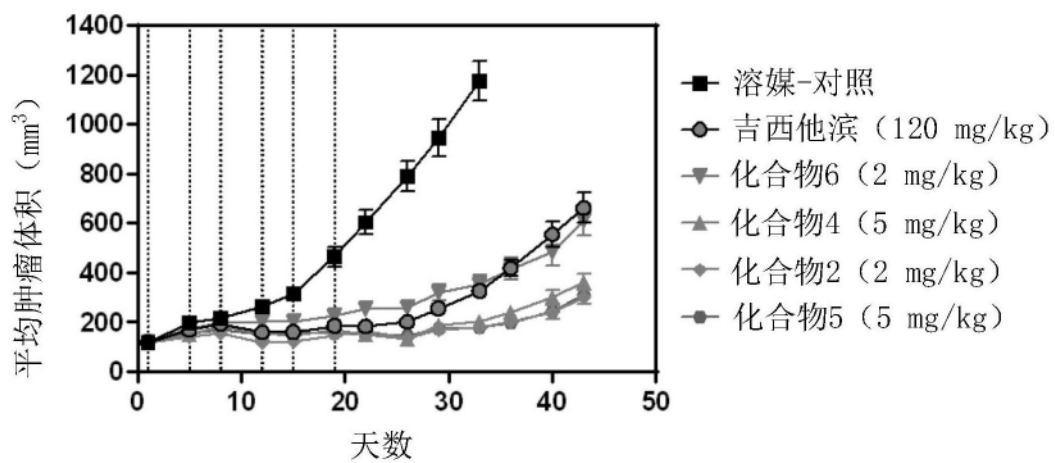


图4

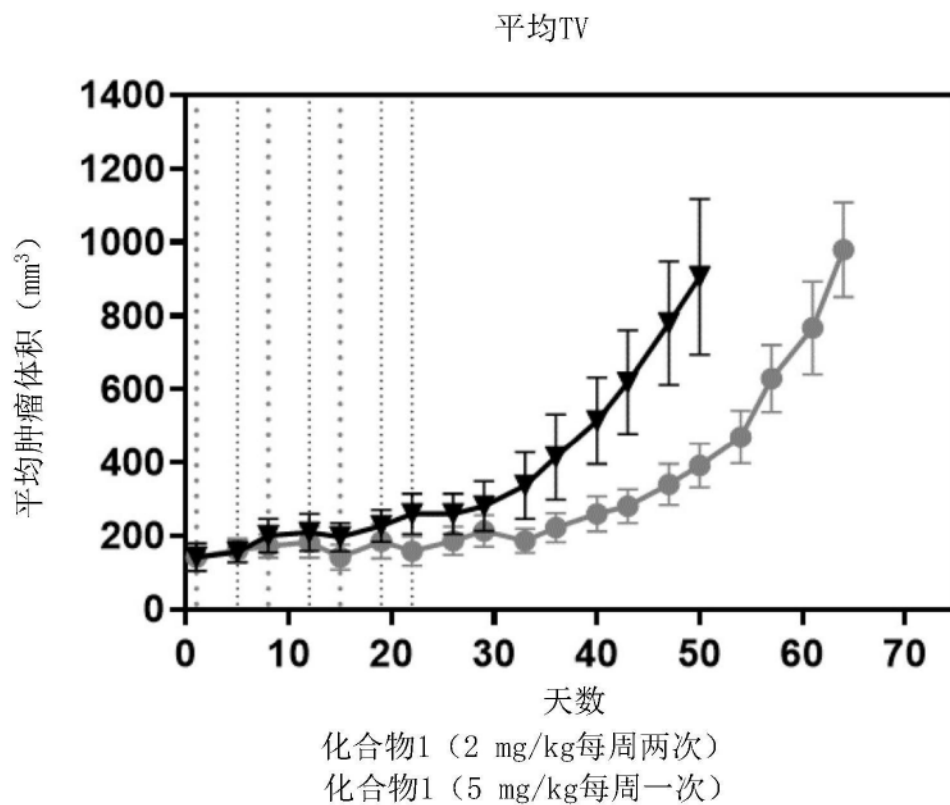


图5

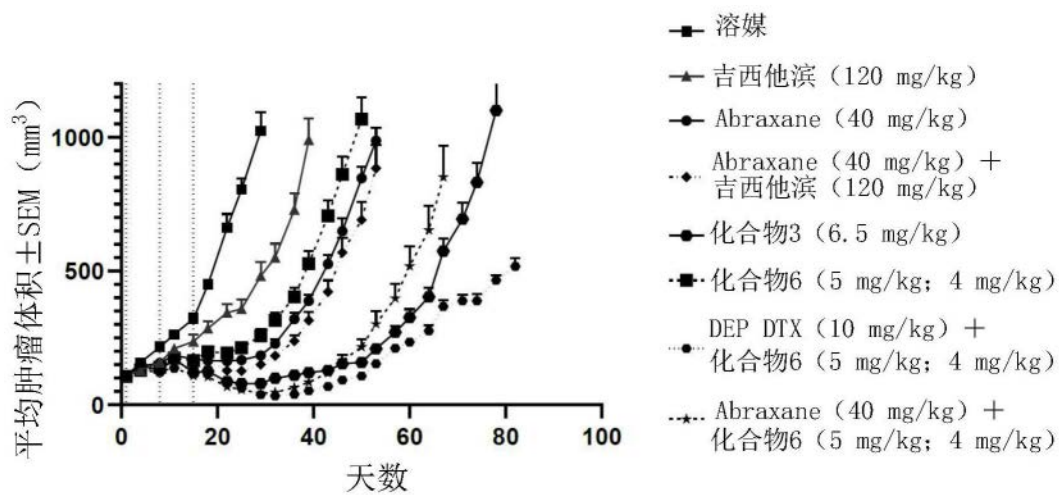


图6

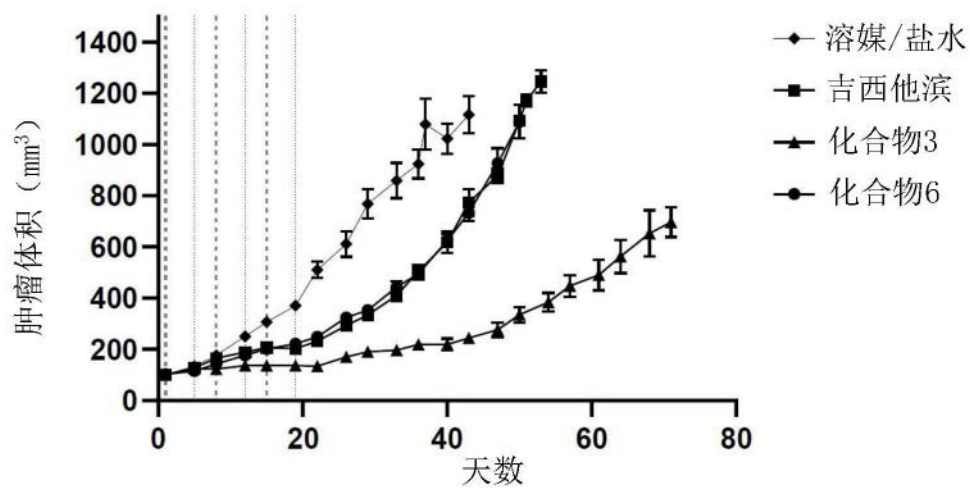


图7

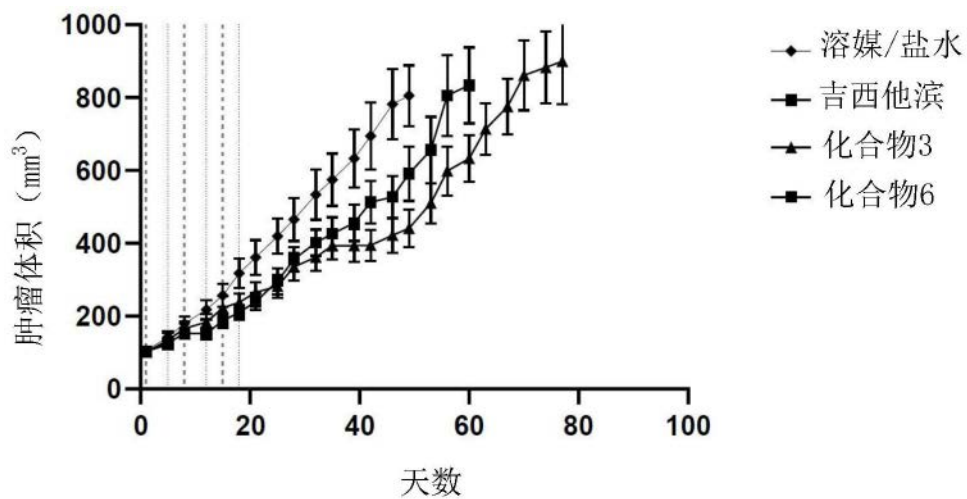


图8

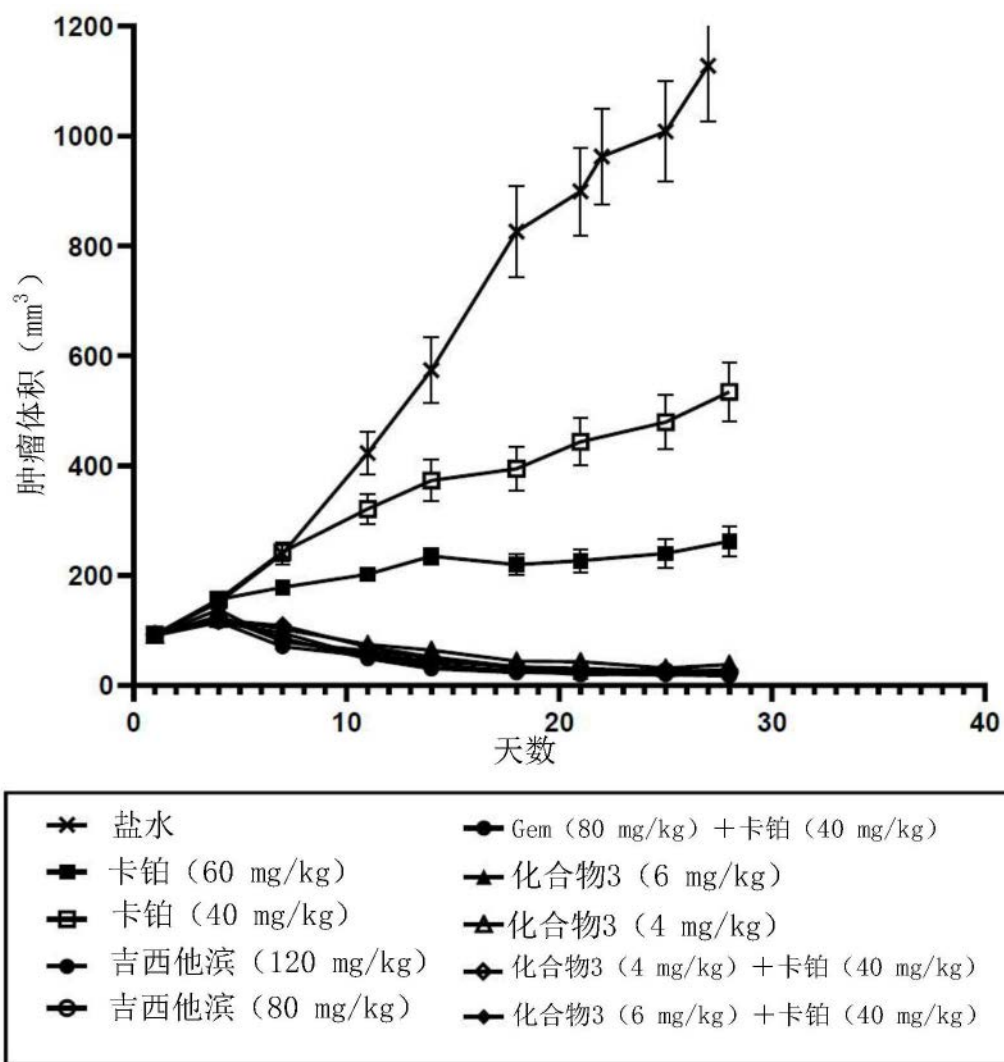


图9