



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103491982 B

(45)授权公告日 2017.09.12

(21)申请号 201180061179.6

(22)申请日 2011.12.28

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103491982 A

(43)申请公布日 2014.01.01

(30)优先权数据

61/427,936 2010.12.29 US

13/336,028 2011.12.23 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.06.19

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/067588 2011.12.28

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/092373 EN 2012.07.05

(73)专利权人 箭头研究公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 D·B·罗泽玛 D·L·刘易斯

D·H·维基菲尔德 E·A·基塔斯

P·海德威格 J·A·沃尔夫

I·鲁尔 P·莫尔 T·霍夫曼

K·杨-霍夫曼 H·M·穆勒

G·奥托 A·V·布罗金

J·C·卡尔森 J·D·本森

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 韦东

(51)Int.Cl.

A61K 48/00(2006.01)

A61K 31/675(2006.01)

(56)对比文件

US 20080152661 A1, 2008.06.26, 第5-10、
49、64、66、77、78、82、175, 图2.

US 7091186 B2, 2006.08.15, 第4、15、16、25
栏.

审查员 温婧

权利要求书2页 说明书53页

序列表6页 附图5页

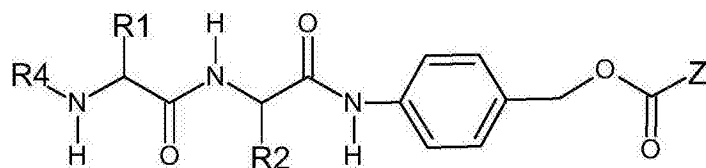
(54)发明名称

具有酶敏感性连接的多核苷酸体内递送偶
联物

(57)摘要

本发明涉及将RNA干扰(RNAi)多核苷酸体内
递送到细胞的组合物。所述组合物包括用酶可切
割二肽-酰胺苄基-碳酸盐掩蔽剂可逆修饰的两
亲膜活性多胺。修饰掩蔽所述聚合物的膜活性,
而可逆性提供生理应答性。所述可逆修饰的多胺
(动态聚偶联物或DPC)还共价连接RNAi多核苷酸
或与靶向的RNAi多核苷酸靶向分子偶联物共同
给予。

1. 一种用于可逆修饰两亲膜活性多胺的化合物, 所述化合物包含: 共价连接二肽-酰胺苄基-碳酸盐或酯的靶向配体, 其具有下式:



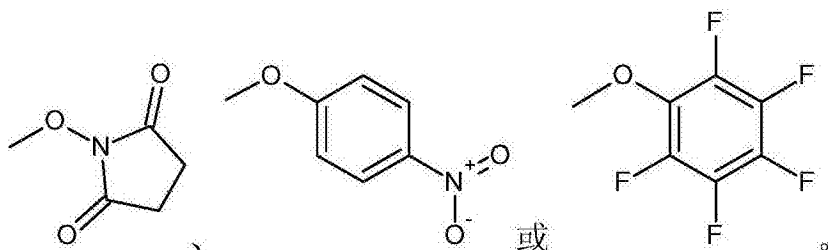
其中

R1是-CH₃,

R2是-(CH₂)₃-NH-C(=O)-NH₂,

R4不带电且包含靶向配体, 且

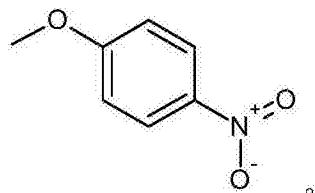
Z是



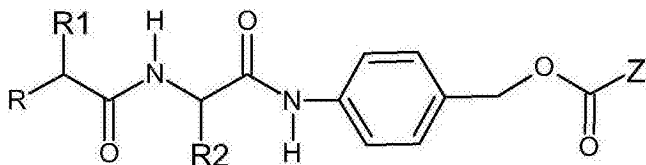
2. 如权利要求1所述的化合物, 其特征在于, 所述靶向配体包括去唾液酸糖蛋白受体 (ASGPr) 配体。

3. 如权利要求2所述的化合物, 其特征在于, 所述ASGPr配体选自: 乳糖、半乳糖、N-乙酰基半乳糖胺、半乳糖胺、N-甲酰基半乳糖胺、N-丙酰基半乳糖胺、N-正丁酰基半乳糖胺和N-异丁酰基半乳糖胺。

4. 如权利要求1所述的化合物, 其特征在于, Z是



5. 用于可逆修饰两亲膜活性多胺的化合物, 其包含如下所示的结构:



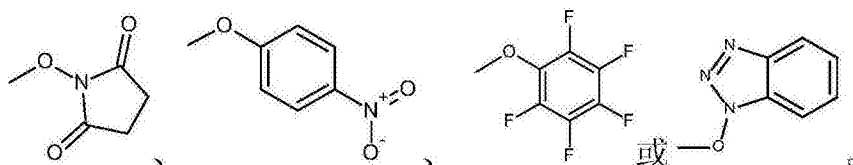
其中,

R包含位阻稳定剂,

R1是-CH₃、-CH₂-C₆H₅或-CH(CH₃)₂;

R2是-(CH₂)₃-NH-C(=O)-NH₂或-(CH₂)₃-C(=O)-NH₂; 并且

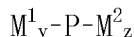
Z是



6. 如权利要求5所述的化合物,其特征在于,R为中性。

7. 如权利要求6所述的化合物,其特征在于,所述位阻稳定剂是聚乙二醇(PEG)。

8. 一种体内递送多核苷酸至细胞的递送聚合物,所述递送聚合物包含:



其中:

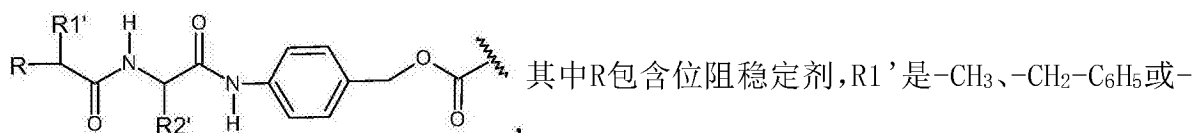
P是两亲膜活性多胺,

M^1 包含如下所示的结构:



其中R4不带电且包含靶向配体,R1是-CH₃、-CH₂-C₆H₅或-CH-(CH₃)₂,且R2是-(CH₂)₃-NH-C(O)-NH₂或-(CH₂)₃-C(O)-NH₂,其中所述不带电亲水氨基酸在中性pH下不带电,

M^2 包含如下所示的结构:



其中R包含位阻稳定剂,R1'是-CH₃、-CH₂-C₆H₅或-CH-(CH₃)₂,且R2'是-(CH₂)₃-NH-C(O)-NH₂或-(CH₂)₃-C(O)-NH₂,

y和z各是大于或等于零的整数,

y+z的值大于多胺P上伯胺的50%,通过不存在任何掩蔽剂时P上的胺含量来测定,并且所述递送聚合物 $M^1_y-P-M^2_z$ 不具膜活性

9. 如权利要求8所述的递送聚合物,其特征在于,所述位阻稳定剂是PEG。

10. 如权利要求8所述的递送聚合物,其特征在于,所述靶向配体包括细胞受体配体。

11. 如权利要求10所述的递送聚合物,其特征在于,所述细胞受体配体包括ASGPr配体。

12. 如权利要求11所述的递送聚合物,其特征在于,所述ASGPr配体选自:乳糖、半乳糖、N-乙酰基半乳糖胺、半乳糖胺、N-甲酰基半乳糖胺、N-丙酰基半乳糖胺、N-正丁酰基半乳糖胺和N-异丁酰基半乳糖胺。

13. 如权利要求8所述的递送聚合物,其特征在于,所述两亲膜活性多胺选自下组:随机、嵌段或交替合成聚合物。

14. 如权利要求8所述的递送聚合物,其特征在于,所述两亲膜活性多胺是蜂毒肽。

15. 如权利要求13-14中任一项所述的递送聚合物,其特征在于,所述两亲膜活性多胺还共价连接至所述多核苷酸。

16. 如权利要求8所述的递送聚合物,其特征在于,所述多核苷酸包括RNA干扰多核苷酸。

17. 如权利要求16所述的递送聚合物,其特征在于,所述RNA干扰多核苷酸选自:DNA、RNA、dsRNA、siRNA和miRNA。

具有酶敏感性连接的多核苷酸体内递送偶联物

背景技术

[0001] 将多核苷酸和其他基本不能穿透细胞膜的化合物递送到活细胞受到细胞复杂膜系统的限制。反义、RNAi和基因治疗中使用的药物是相对高亲水性的聚合物,且通常带较高负电荷。这些物理特征均严格限制其直接扩散穿过细胞膜。基于此原因,多核苷酸递送的主要障碍是将多核苷酸递送穿过细胞膜到达细胞质或细胞核。

[0002] 一种已经用于体内递送小核酸的方法是将所述核酸与小靶向分子或脂质或固醇结合。虽然已在这些偶联物中观察到一些递送和活性,但这些方法需要的核酸剂量非常大。

[0003] 还已开发大量转染试剂,其能实现体外将多核苷酸相当有效地递送到细胞。然而,用这些相同转染试剂体内递送多核苷酸很复杂且由于体内毒性、不利的血清相互作用和弱靶向而变得无效。体外作用良好的转染试剂、阳离子聚合物和脂质,通常形成大的阳离子静电颗粒并使细胞膜不稳定。体外转染试剂的正电荷有助于通过电荷之间(静电)的相互作用与核酸结合,因此形成核酸/转染试剂复合物。正电荷还有助于载剂与细胞非特异性结合以及膜融合、去稳定化或破坏。膜的去稳定化有利于递送基本不能渗透细胞膜的多核苷酸穿过细胞膜。虽然这些特性有利于核酸体外转移,但它们会造成体内毒性和靶向失效。阳离子电荷与血清组分相互作用,导致多核苷酸转染试剂相互作用的不稳定、较低的生物利用率和弱靶向。体外有效的转染试剂膜活性在体内常导致毒性。

[0004] 为了体内递送,载剂(核酸和结合的递送剂)应较小,直径低于100nm,优选低于50nm。低于20nm或低于10nm的甚至更小复合物会更有用。大于100nm的递送载剂体内很少能穿过血管细胞之外的细胞。静电相互作用形成的复合物在暴露于生理盐浓度或血清组分时倾向于聚集或瓦解。此外,体内递送载剂上的阳离子电荷导致不良血清相互作用和因此造成弱生物利用率。有趣的是,高负电荷还会通过干扰靶向所需的相互作用来抑制靶向的体内递送,即,靶向配体与细胞受体的结合。因此,体内分布和靶向需要接近中性的载剂。不经过仔细的调控,膜的破坏或去稳定活性在体内使用时有毒。用核酸递送平衡载剂毒性体外比体内更容易实现。

[0005] Rozema等在美国专利公开20080152661中提供了使用双取代马来酸酐修饰可逆调控膜活性多胺的膜破坏活性的方法。由马来酸酐和胺反应形成的马来酰胺酸连接在体内递送的合适pH范围内是pH不稳定的。该方法使膜活性聚合物能用于体内递送或核酸。我们目前提供修饰的具有二肽-酰胺苄基-氨基甲酸盐或酯(carbamate)连接的膜活性聚合物。所述二肽-酰胺苄基-氨基甲酸盐或酯连接是可逆且生理响应的。不同于通过双取代马来酸酐修饰形成的pH不稳定性马来酰胺酸连接,本文所述的聚合物修饰剂连接生成在体内循环中更稳定的可酶促切割的连接。

发明内容

[0006] 在一个优选的实施方式中,我们描述用于可逆修饰并抑制两亲性膜活性多胺的膜活性的掩蔽剂,所述掩蔽剂包括:连接二肽-酰胺苄基-碳酸盐或酯(carbonate)的位阻稳定剂或靶向配体,在本文中称为二肽掩蔽剂或蛋白酶可切割的掩蔽剂。所述二肽掩蔽剂具有

以下通式：

[0007] $R-A^1A^2$ -酰胺苄基-碳酸盐或酯。

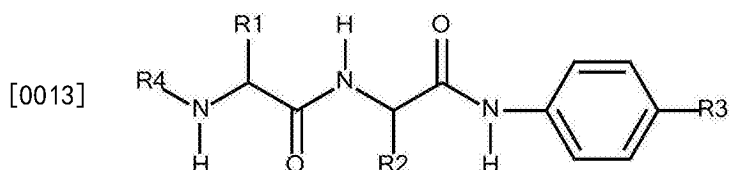
[0008] 式中,R是位阻稳定剂或靶向配体, A^1 是氨基酸, A^2 是氨基酸。所述掩蔽剂碳酸盐或酯和聚合物胺反应生成氨基甲酸盐或酯连接。所述掩蔽剂保持稳定,直到体内由内源蛋白酶切割二肽并因而从所述多胺切割位阻稳定剂或靶向配体。在二肽(A^2 和酰胺苄基之间)后的酶切割之后,所述酰胺苄基-氨基甲酸盐或酯自发重排,引起聚合物胺再生。优选R是中性的。更优选地,R不带电。优选的位阻稳定剂是聚乙二醇(PEG)。靶向配体可选自:半抗原例如地高辛、维生素例如生物素、抗体、单克隆抗体和细胞表面受体配体。靶向配体可通过接头(例如PEG接头)连接二肽。优选的细胞表面受体配体是去唾液酸糖蛋白受体(ASGPr)配体。优选的ASGPr配体是N-乙酰半乳糖胺(NAG)。优选的二肽由通过酰胺键连接疏水不带电氨基酸的疏水氨基酸组成。优选的酰胺苄基基团是对酰胺苄基基团。优选的碳酸盐或酯是活化的胺反应性碳酸盐或酯。

[0009] 在一个优选实施方式中,本发明涉及用于体内递送RNA干扰(RNAi)多核苷酸到细胞中的组合物,所述组合物包括:掩蔽的两亲性膜活性多胺(递送聚合物)以及RNAi多核苷酸,其中所述多胺通过用本文所述二肽掩蔽剂的可逆修饰来掩蔽。所述递送聚合物可共价连接所述RNAi多核苷酸。用于共价连接所述递送聚合物和RNAi多核苷酸的优选连接是生理不稳定连接。在一个实施方式中,该连接与所述二肽掩蔽剂连接彼此正交。或者,所述递送聚合物不与RNAi多核苷酸共价连接,而所述RNAi多核苷酸共价连接靶向分子。

[0010] 在一个优选的实施方式中,我们描述某一组合物,所述组合物包括:两亲膜活性多胺,其与以下物质共价连接:a)通过二肽-酰胺苄基-氨基甲酸盐或酯连接共价连接多个靶向配体或位阻稳定剂;和b)通过一个或多个可逆连接共价连接一个或多个多核苷酸。在一个实施方式中,二肽-酰胺苄基-氨基甲酸盐或酯连接与所述多核苷酸可逆共价连接彼此正交。向哺乳动物给予含所述多核苷酸-聚合物偶联物的药学上可接受运载体或稀释剂。

[0011] 在一个优选的实施方式中,我们描述某一组合物,所述组合物包括:a)通过二肽-酰胺苄基-氨基甲酸盐或酯连接与多个靶向配体或位阻稳定剂共价连接的两亲膜活性多胺;和b)与靶向基团共价连接的RNAi多核苷酸,所述靶向基团选自:具有20个或更多碳原子的疏水基团和半乳糖簇。在该实施方式中,所述RNAi多核苷酸不与所述修饰的两亲膜活性多胺共价连接。所述修饰的多胺和RNAi多核苷酸靶向基团偶联物分开合成,并可在单独容器或单一容器中提供。将溶于药学上可接受运载体或稀释剂的所述经修饰多胺和RNA多核苷酸靶向基团偶联物联合或分开地给予哺乳动物。

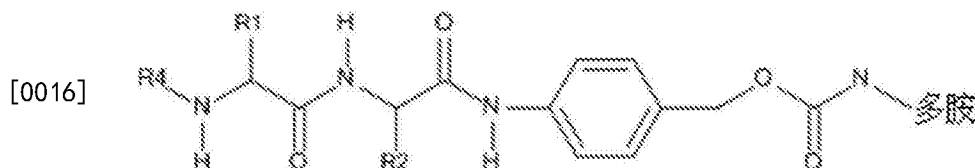
[0012] 优选的二肽掩蔽剂包括蛋白酶(肽酶)可切割的二肽-对酰胺苄基胺-反应性碳酸盐或酯衍生物。本发明的蛋白酶可切割掩蔽剂具有与酰胺苄基活化的碳酸盐或酯部分相连的二肽。靶向配体或位阻稳定剂连接二肽的氨基末端。酰胺苄基活化的碳酸盐或酯部分连接二肽的羧基末端。适用于本发明的蛋白酶可切割接头具有以下一般结构:



[0014] 式中,R4包含靶向配体或位阻稳定剂,R3包括胺反应性碳酸盐或酯部分,而R1和R2

是氨基酸侧链。优选的经活化碳酸酯是对硝基苯酚。然而,本领域已知的其它胺反应性碳酸盐或酯易取代所述对硝基苯酚。所述经活化碳酸盐或酯与胺的反应通过肽酶可切割的二肽-酰胺苄基-氨基甲酸盐或酯连接使靶向基团或位阻稳定剂连接膜活化多胺。所述氨基酸和所述酰胺苄基基团之间的酶切从所述聚合物去除R4,并触发引起聚合物胺再生的消除反应。

[0015] 本发明的二肽掩蔽剂可用于两亲膜活化性多胺的可逆修饰/抑制。通过所述二肽掩蔽剂的活化碳酸盐或酯和聚合物胺(尤其是伯胺基团)反应生成共价键。因此本文提供一种偶联物,所述偶联物包含本文所述的二肽-酰胺苄基-碳酸盐或酯掩蔽剂和双亲性膜活化多胺:



[0017] 如本发明所述的化合物一般可使用有机化学或药物化学领域技术人员已知的方法获得。结合附图,根据下述详细描述,本发明的其他目的、特征和优点显而易见。

附图说明

[0018] 图1.显示二肽掩蔽剂结构的示意图,其中:

[0019] R1和R2是氨基酸的R基团,

[0020] R4是位阻稳定剂的靶向配体,

[0021] X是-NH-、-O-或-CH2-,

[0022] Y是-NH-或-O-

[0023] R5是位于2、4或6位的-CH2-O-C(O)-O-Z,其中Z是碳酸盐或酯,和

[0024] R6是各位于2、3、4、5或6位(除了R5占据的位置)的独立的氢、烷基或卤素。

[0025] 图2.显示连接多胺的二肽掩蔽剂结构的示意图,其中:R1和R2是氨基酸的R基团,R4是位阻稳定剂的靶向配体,X是-NH-、-O-或-CH2-,Y是-NH-或-O-。

[0026] 图3.显示不同二肽掩蔽剂结构的示意图。

[0027] 图4.显示用二肽掩蔽剂相比两种基于马来酸酐的不同掩蔽剂修饰的聚合物的循环时间。

[0028] 发明详述

[0029] 描述用于可逆修饰和抑制两亲膜活性多胺的掩蔽剂,和由所述二肽掩蔽剂修饰多胺形成的递送聚合物。所述肽酶可切割连接在无酶情况下对水解稳定,呈电中性,并延长DPC在储存和体内循环中的稳定性。循环中改善的(更长)半衰期有助于增加配体介导的组织(例如肿瘤组织)中累积的可能。所述递送聚合物具体用于体内递送RNAi多核苷酸。RNAi多核苷酸的体内递送用于治疗性抑制(敲减)基因表达。

[0030] 所述二肽掩蔽剂具有以下通式:

[0031] $R-A^1A^2$ -酰胺苄基-氨基甲酸盐或酯。

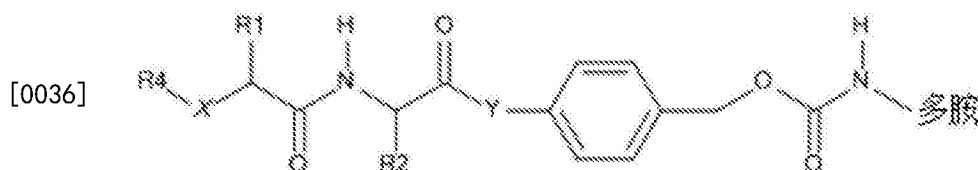
[0032] 式中,R是位阻稳定剂或靶向配体, A^1 是氨基酸, A^2 是氨基酸,碳酸盐或酯是活化的胺反应性碳酸盐或酯。R优选是不带电的。所述掩蔽剂碳酸盐或酯和聚合物胺反应生成氨基

甲酸酯连接。所述掩蔽剂保持稳定,直到在体内由内源蛋白酶切割二肽并因而从所述多胺切割位阻稳定剂或靶向配体。在二肽后(A²和酰胺苄基之间)的酶切割之后,所述酰胺苄基-氨基甲酸盐或酯自发重排,引起聚合物胺再生。优选的位阻稳定剂是聚乙二醇(PEG)。用于肝递送的优选靶向配体是ASGPr配体。优选的ASGPr配体是N-乙酰半乳糖胺(NAG)。优选的酰胺苄基基团是对酰胺苄基基团。

[0033] 所述二肽掩蔽剂的二肽(以A¹A²(或AA)表示)是通过酰胺键相连的氨基酸二聚体。包括α和β氨基酸在内氨基酸在生物学和化学领域中熟知且是含有氨基基团、羧酸基团和在不同氨基酸之间改变的侧链的分子。优选的氨基酸是具有通式H₂NCHRCOOH的α-氨基酸,其中R是有机取代基。优选的α氨基酸是天然产生的不带电氨基酸。在优选的二肽中,A¹是疏水氨基酸,A²是不带电亲水氨基酸。优选的疏水氨基酸是苯丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸或色氨酸。优选的不带电亲水氨基酸是天冬酰胺、谷氨酰胺或瓜氨酸。更优选的疏水氨基酸是苯丙氨酸或缬氨酸。更优选的不带电亲水氨基酸是瓜氨酸。尽管优选二肽,但在A¹和R之间也能插入额外氨基酸。还能通过消除氨基酸A¹而使用单个氨基酸替代二肽。本发明中使用的任何天然氨基酸在本文中以其常用缩写表示。尽管能使用带电的氨基酸,仍优选使用不带电的掩蔽剂。

[0034] 在一个优选的实施方式中,两亲膜活性多胺通过与本发明的二肽-酰胺苄基-碳酸盐或酯掩蔽剂反应来可逆修饰,以生成膜失活递送聚合物。所述二肽掩蔽剂能掩蔽所述聚合物不发生非特异性相互反应,增加循环时间,增强特异性相互反应,抑制毒性或改变所述聚合物的电荷。

[0035] 本发明的可逆掩蔽的聚合物包括以下结构:



[0037] 式中:

[0038] X是-NH-、-O-或-CH₂-

[0039] Y是-NH-或-O-

[0040] R₁优选是

[0041] -(CH₂)_k-苯基(k是1、2、3、4、5、6;k=1个苯丙氨酸),

[0042] -CH-(CH₃)₂(缬氨酸),

[0043] -CH-(CH₃)₂(亮氨酸),

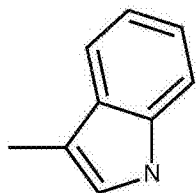
[0044] -CH-(CH₃)₂(异亮氨酸),

[0045] -CH₃(丙氨酸),

[0046] -(CH₂)₂-COOH(谷氨酸),

[0047] 或

[0048]



(色氨酸);

[0049] R²优选是

[0050] 氢(甘氨酸)

[0051] $-(CH_2)_3-NH-C(=O)-NH_2$ (瓜氨酸),[0052] $-(CH_2)_4-N-(CH_3)_2$ (赖氨酸 $(CH_3)_2$),[0053] $-(CH_2)_k-C(=O)-NH_2$; (k是1、2、3、4、5、6),[0054] $-CH_2-C(=O)-NH_2$ (天冬酰胺),[0055] $-(CH_2)_2-C(=O)-NH_2$ (谷氨酰胺),[0056] $-CH_2-C(=O)-NR^1R^2$ (天冬酰胺酰胺),[0057] $-(CH_2)_2-C(=O)-NR^1R^2$ (谷氨酸酰胺),[0058] $-CH_2-C(=O)-OR^1$ (天冬酰胺酯), 或[0059] $-(CH_2)_2-C(=O)-OR^1$ (谷氨酸酯),[0060] R¹和R²是烷基基团[0061] R⁴包括聚乙二醇或靶向配体; 和

[0062] 所述多胺是两亲膜活性多胺。

[0063] 上述结构指示连接所述聚合物的单个二肽掩蔽剂, 而在本发明实践中, 50%~90%或更多聚合物胺通过二肽掩蔽剂修饰。

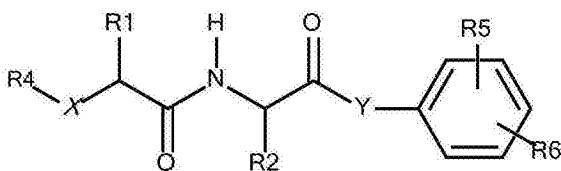
[0064] 在一个优选的实施方式中, 本发明的可逆掩蔽的聚合物包括以下结构:

[0065]

[0066] 式中, R¹、R²、R⁴和多胺如上所述。

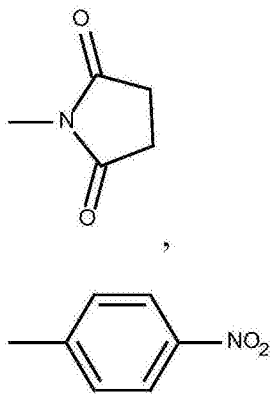
[0067] 本发明的可逆掩蔽的聚合物通过本发明的二肽掩蔽剂与所述聚合物上的胺反应形成。本发明的二肽掩蔽剂具有以下结构:

[0068]

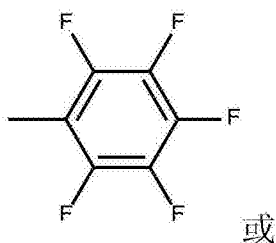


[0069] 式中:

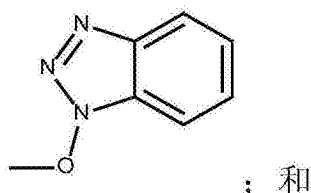
[0070] X、Y、R¹、R²和R⁴如上所述[0071] R⁵是位于2、4或6位的 $-CH_2-O-C(=O)-O-Z$, 其中Z是-卤化物,



[0072]



或

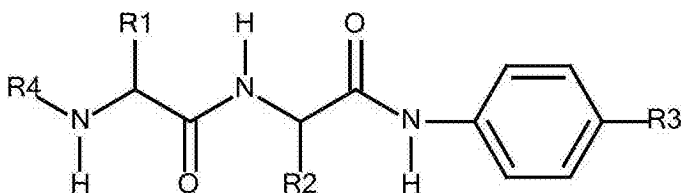


； 和

[0073] R6是各位于2、3、4、5或6位(除了R5占据的位置)的独立的氢、烷基、 $-(CH_2)_n-CH_3$ (其中 $n=0\sim 4$)、 $-(CH_2)-(CH_3)_2$ 或卤化物。

[0074] 在一个优选的实施方式中,如下所示,X是-NH-,Y是-NH-,R4不带电,R5位于第4位,R6是氢:

[0075]



[0076] 在另一个实施方式中,R4是:

[0077] $R-(O-CH_2-CH_2)_s-O-Y1-$, 其中

[0078] R是氢、甲基或乙基,而 $s=1\sim 150$ 的整数,

[0079] Y1是选自下表的接头:

[0080] $-O-Y2-NH-C(=O)-(CH_2)_2-C(=O)-$, 其中Y2是 $-(CH_2)_3-$

[0081] $-C(=O)-N-(CH_2-CH_2-O)_p-CH_2-CH_2-$ (p是1~20的整数)和 $-O-$ 。

[0082] 靶向配体可选自:半抗原、维生素、抗体、单克隆抗体和细胞表面受体配体。靶向配体可通过接头(例如PEG接头)连接二肽。

[0083] 适用于本发明的膜活性聚合物的非限制性例子先前已描述于美国专利公开20080152661、20090023890、20080287630和20110207799。合适的两亲膜活性多胺还可以是

小肽,例如蜂毒肽。

[0084] 聚合物胺使用本文所述的酶可切割性接头可逆修饰。若修饰基团的切割使所述胺再生,则所述胺为可逆修饰。如下所示,活化的掩蔽剂碳酸盐或酯和聚合物胺的反应使靶向配体或位阻稳定剂通过肽酶可切割性二肽-酰胺苄基氨基甲酸酯连接与所述聚合物相连:

[0085]



[0086] R^1 包含靶向配体(有或没有保护基团)或PEG,

[0087] R^2 是两亲膜活性多胺,

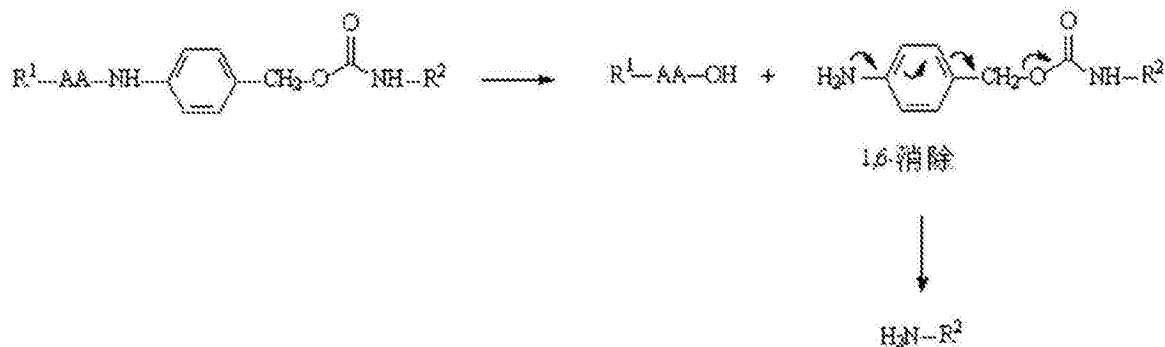
[0088] AA是二肽(有或没有保护基团),和

[0089] Z是胺反应性碳酸盐或酯。

[0090] 保护基团可以在所述二肽掩蔽剂的合成过程中使用。若存在保护基团,可以在所述两亲膜活性多胺修饰之前或之后去除所述保护基团。

[0091] 使用所述二肽掩蔽剂可逆修饰足够百分比的聚合物胺可抑制所述膜活性多胺的膜活性。用所述二肽掩蔽剂修饰聚合物胺还优选中和胺的电荷。所述二肽-酰胺苄基-氨基甲酸酯连接易被蛋白酶(或肽酶)切割。在蛋白酶存在下,切割酰替苄胺键,产生的中间体立刻发生1,6消除反应以释放游离聚合物:

[0092]



[0093] 在上述反应方案中,AA是二肽, R^1 包含靶向配体或位阻稳定剂, R^2 是两亲膜活性多胺。重要的是,所述游离聚合物未修饰并因此恢复膜活性。

[0094] 在所述掩蔽状态,可逆的掩蔽膜活性多胺未表现膜破坏活性。抑制膜活性并提供细胞靶向功能(即形成可逆掩蔽的膜活性聚合物(递送聚合物))可能需要用二肽掩蔽剂对多胺上超过50%、超过55%、超过60%、超过65%、超过70%、超过75%、超过80%或超过90%的胺进行可逆修饰。

[0095] 本发明还提供用于递送生物活性物质进入细胞的方法。更具体地,本发明涉及用于体内递送RNAi多核苷酸至哺乳动物细胞的化合物、组合物和方法。

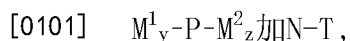
[0096] 在一个实施方式中,所述RNAi多核苷酸通过生理不稳定共价键连接本发明的递送聚合物。通过使用生理不稳定连接,所述多核苷酸能从所述聚合物中切割,释放所述多核苷酸以参与和细胞成分的功能性相互反应。

[0097] 本发明包含下述通式结构的偶联递送系统:



[0099] 式中, N是RNAi多核苷酸, L^1 是生理不稳定连接, P是两亲膜活性多胺, M^1 是通过二肽-酰胺苄基-氨基甲酸酯连接与P相连的靶向配体, M^2 是通过二肽-酰胺苄基-氨基甲酸酯连接与P相连的位阻稳定剂。y和z各为大于或等于0的整数, 前提是y+z的值大于50%、大于60%、大于70%、大于80%或大于90%的多胺P上伯胺, 如通过不存在任何掩蔽剂时P上的胺含量所测。在其未修饰状态中, P是膜活性多胺。递送聚合物 M^1_y -P- M^2_z 没有膜活性。通过结合 M^1 和/或 M^2 可逆修饰P伯胺可逆地抑制或灭活P的膜活性。应注意, 小的两亲膜活性多胺例如蜂毒肽, 包含少至3~5个伯胺。一定百分比的胺修饰意在反映聚合物群中胺的修饰百分比。切割 M^1 和 M^2 后, 所述多胺的胺再生, 因而使P恢复至其未修饰的膜活性状态。

[0100] 在另一个实施方式中, 体内共同给予所述RNAi多核苷酸和本发明的递送聚合物。因此, 本发明包括具有以下一般结构的组合物:



[0102] 式中, N是RNAi多核苷酸, T是靶向基团, P是两亲膜活性多胺, M^1 是通过二肽-酰胺苄基-氨基甲酸酯连接与P相连的靶向配体, M^2 是通过二肽-酰胺苄基-氨基甲酸酯连接与P相连的位阻稳定剂。y和z各为大于或等于0的整数, 前提是y+z的值大于50%、大于60%、大于70%、大于80%或大于90%的多胺P上伯胺, 如通过不存在任何掩蔽剂的情况下P上胺含量所测定。在其未修饰状态中, P是膜活性多胺。递送聚合物 M^1_y -P- M^2_z 没有膜活性。通过结合 M^1 和/或 M^2 可逆修饰P伯胺可逆地抑制或灭活P的膜活性。应注意, 小的两亲膜活性多胺例如蜂毒肽, 包含少至3~5个伯胺。因此, 一定百分比的胺修饰意在反映聚合物群中胺的修饰百分比。切割 M^1 和 M^2 后, 所述多胺的胺再生, 因而使P恢复至其未修饰的膜活性状态。使用本领域中的标准方法使N通过共价键连接T形成RNAi多核苷酸-靶向基团偶联物。优选的共价键是生理不稳定键N-T。所述递送聚合物和N-T分开合成或生产。T或N都不直接或间接与P、 M^1 或 M^2 共价连接。多核苷酸或多核苷酸偶联物与所述掩蔽或未掩蔽聚合物的静电或疏水连接不是体内肝脏递送多核苷酸所需。掩蔽聚合物和多核苷酸偶联物可在同一容器中或分开的容器中提供。其可在给予前合并、共同给予或依次给予。

[0103] 对于肝细胞递送, 无论RNAi多核苷酸是通过共价键连接递送聚合物还是与所述递送聚合物共同给予, y的值大于聚合物P上50%的伯胺且至多100%。因此, z的值大于或等于聚合物P上百分之零(0%)的伯胺, 但少于50%。

[0104] 对于肝肿瘤细胞递送, z的值大于多至聚合物P上100%的伯胺。在一个优选实施方式中, 对于肿瘤细胞递送, z的值大于50%、大于60%、大于70%、大于80%或大于90%的多胺P上伯胺, 而y是零。

[0105] 膜活性多胺能够破坏质膜或溶酶体/内吞体膜。所述膜活性是多核苷酸细胞递送的必要特征。然而, 所述聚合物体内给予时膜活性产生毒性。多胺还容易与许多阴离子组分体内相互作用, 导致不需要的生物分布。因此, 体内使用需要可逆掩蔽所述多胺的膜活性。

[0106] 掩蔽通过所述二肽掩蔽剂与膜活性多胺的可逆结合形成可逆掩蔽膜活性聚合物即递送聚合物来实现。除了抑制膜活性外, 所述掩蔽剂屏蔽聚合物免于非特异相互作用, 减少血清相互作用, 中和多胺以降低正电荷并形成近中性电荷的聚合物, 增加循环时间和/或

提供细胞特异性相互作用,即,靶向。

[0107] 所述掩蔽剂的基本特征是,所述掩蔽剂共同抑制所述聚合物的膜活性。掩蔽剂可屏蔽所述聚合物免于非特异相互作用(减少血清相互作用,增加循环时间)。所述膜活性多胺在未修饰(未掩蔽)状态时为膜活化,而在修饰(掩蔽)状态时非膜活化(灭活)。足够数量的掩蔽剂连接聚合物以实现所需水平的灭活。用合适的聚合物活性试验容易测定通过结合掩蔽剂的所需聚合物修饰水平。例如,若聚合物在给定试验中具有膜活性,则充分水平的掩蔽剂连接所述聚合物以在该试验中实现所需水平的膜活性抑制。掩蔽需要修饰所述聚合物群上 $\geq 50\%$ 、 $\geq 60\%$ 、 $\geq 70\%$ 、 $\geq 80\%$ 或 $\geq 90\%$ 的伯胺基团,如通过不存在任何掩蔽剂时的聚合物上伯胺量来检测。掩蔽剂的优选特征还包括其结合所述聚合物会降低聚合物的正电荷,从而形成更中性的递送聚合物。理想上所述掩蔽聚合物保持水溶性。

[0108] 存在过量掩蔽剂时,膜活性多胺可偶联掩蔽剂。给予递送聚合物前可从偶联的递送聚合物中去除过量的掩蔽剂。

[0109] 本文中所用的“位阻稳定剂”是非离子亲水聚合物(天然、合成或非天然),相对不含位阻稳定剂的聚合物,其阻止或抑制结合其的聚合物的分子内或分子间相互作用。位阻稳定剂阻碍结合其的聚合物参与静电相互作用。静电相互作用是两种或更多物质之间由于正电荷和负电荷之间的吸引力产生的非共价结合。

[0110] 位阻稳定剂能抑制与血液组分的相互作用,和因有的调理作用、噬菌作用以及被网状内皮系统摄入。

[0111] 因此位阻稳定剂能提高结合其的分子循环时间。位阻稳定剂还能抑制聚合物的聚集。优选的位阻稳定剂是聚乙二醇(PEG)或PEG衍生物。如本文所用,优选的PEG可具有约1~500个或2~25个乙二醇单体。如本文所用,优选的PEG的平均分子量为约85-20,000道尔顿(Da)、约85-1000Da。如本文所用,相对于水溶液中不含位阻稳定剂的聚合物,位阻稳定剂阻止或抑制结合其的聚合物的分子间或分子内相互作用。

[0112] “靶向配体”提高其结合的偶联物的药代动力学或生物分布特性以改良所述偶联物的细胞或组织特异分布和细胞特异摄取。为清楚起见,本文所用的术语“靶向配体”用于表示连接二肽掩蔽剂的靶向配体,而“靶向基团”是在RNAi多核苷酸-靶向基团偶联物中连接RNAi多核苷酸的靶向配体。靶向配体增强分子和靶细胞的连接。因此,靶向配体能增强其结合的偶联物的药代动力学或生物分布性质,以改良所述偶联物的细胞分布和细胞摄取。靶向配体与细胞或细胞受体的结合可引发内吞。靶向配体可以是单价的、二价的、三价的、四价的或具有更高价。靶向配体可以选自下组:对细胞表面分子有亲和性的化合物、细胞受体配体,抗体、单克隆抗体、抗体片段以及对细胞表面分子具有亲和性的抗体模拟物。优选的靶向配体包括细胞受体配体。已使用多种配体将药物和基因靶向细胞和特异性细胞受体。细胞受体配体可选自下组:碳水化合物、多糖、糖类(包括但不限于半乳糖、半乳糖衍生物、甘露糖和甘露糖衍生物)、维生素、叶酸、生物素、适体和肽(包括但不限于含RGD的肽、胰岛素、EGF和转铁蛋白)。

[0113] 对于肝细胞靶向,优选的靶向配体是对去唾液酸糖蛋白(ASGPr)有亲和性的糖类。采用半乳糖和半乳糖衍生物通过结合肝细胞表面表达的ASGPr以将分子体内靶向肝细胞。本文所用的“ASGPr靶向配体”包括半乳糖和对ASGPr的亲合性等于或超过半乳糖的半乳糖衍生物。半乳糖靶向配体与ASGPr的结合有助于递送聚合物对肝细胞的细胞特异靶向以及

递送聚合物内吞到肝细胞中。

[0114] ASGPr靶向配体可选自下组：乳糖、半乳糖、N-乙酰半乳糖胺(NAG)、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、N-乙酰基-半乳糖胺、N-丙酰基半乳糖胺、N-正丁酰基半乳糖胺、和N-异丁酰基-半乳糖胺(Iobst, S.T. 和Drickamer, K.J.B.C.1996, 271, 6686)。ASGPr靶向部分可为单体(如具有单一半乳糖胺)或多亚基(如具有多个半乳糖胺)。

[0115] 在一个实施方式中,所述膜活性多胺通过ASGPr靶向配体掩蔽剂结合多胺上 $\geq 50\%$ 、 $\geq 60\%$ 、 $\geq 70\%$ 、 $\geq 80\%$ 或 $\geq 90\%$ 的胺而被可逆掩蔽。在另一个实施方式中,所述膜活性多胺通过ASGPr靶向配体掩蔽剂和PEG掩蔽剂结合聚合物上 $\geq 50\%$ 、 $\geq 60\%$ 、 $\geq 70\%$ 、 $\geq 80\%$ 或 $\geq 90\%$ 的伯胺而被可逆掩蔽。当同时采用ASGPr靶向配体掩蔽剂和PEG掩蔽剂时,PEG和ASGPr靶向配体的比率是约0~4:1,更优选是约0.5~2:1。

[0116] 本领域熟知并了解“两亲性”的或两亲的聚合物,其具有亲水(极性,水溶性)和疏水(非极性,脂溶性,水不溶性)基团或部分。

[0117] “亲水基团”定性表述为所述化学部分偏好水。通常,所述化学基团为水溶性,且为水的氢键供体或受体。亲水基团可以带电或不带电。带电基团可带正电(阴离子)或带负电(阳离子)或二者(两性离子)。亲水基团的例子包括下述化学组分:碳水化合物、聚氧乙烯、某些肽、寡核苷酸、胺、酰胺、烷氧基酰胺、羧酸、硫磺和羟基。

[0118] “疏水基团”定性表述为所述化学部分避开水。通常这类化学基团非水溶性,且不倾向于形成氢键。亲脂基团溶于脂肪、油、脂质和非极性溶剂且只有很小或没有能力形成氢键。含两个(2)或更多碳原子的烃类、某些取代烃、胆固醇和胆固醇衍生物为疏水基团和化合物的示例。

[0119] 疏水基团优选烃类,仅包括碳和氢原子。然而,可允许保持疏水性且包括例如氟的非极性取代或非极性杂原子。所述术语包括脂族基团、芳族基团、酰基、烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、芳烯基和芳炔基,其各可为线性、分支或环形。所述术语疏水基团还包括:固醇、类固醇、胆固醇和类固醇及胆固醇的衍生物。

[0120] 如本文所用,涉及两性聚合物时,部分定义为当一个共价键断裂并由氢取代时衍生的分子。例如,丁胺中碳和氮键间断裂并由氢替代会产生氨(亲水)和丁烷(疏水)。若在氮-碳键处切割1,4-二氨基丁烷并用氢替代,所得分子再次是氨(2 $\times$)和丁烷。然而,1,4,-二氨基丁烷不视作两性,因为疏水部分的的形成需要两个键的断裂。

[0121] 如本文所用,表面活性聚合物降低水的表面张力和/或与其他相的界面张力,从而正吸附于液/气界面。表面活性特征通常是由于物质分子是两亲性或两性。

[0122] 如本文所用,“膜活性”聚合物是表面活化的两亲性聚合物,其能在生物膜上诱导一种或多种下述效果:膜变化或破坏从而使非膜透性分子进入细胞或穿过膜,在膜上形成孔,膜分裂,或所述膜的破坏或溶解。如本文所用,膜或细胞膜包括脂双层。膜的变化或破坏可用至少一种下述试验通过聚合物活性来进行功能性定义:红血细胞裂解(溶血)、脂质体泄漏、脂质体融合、细胞融合、细胞裂解、和内吞体释放。可引起细胞膜裂解的膜活性聚合物也称为膜裂解聚合物。优选在质膜上引起内吞体或溶酶体破坏的聚合物视作内吞体裂解性。膜活性聚合物对细胞膜的影响可以是短暂的。膜活性具有对膜的亲和性,并引起双层结构的变性或变形。膜活性聚合物还可为合成的或非天然两亲性聚合物。

[0123] 如本文所用,膜活性聚合物不同于称为细胞渗透肽的一类聚合物或由例如源自

HIV TAT蛋白的富含精氨酸的肽、触角肽、VP22肽、转运蛋白、富含精氨酸的人工肽、富含胍盐的人工小聚合物等化合物所代表的聚合物。虽然细胞渗透化合物看来能转运一些分子穿过膜,从脂双层的一侧到其另一侧,明显不需要胞吞也不需要破坏膜的完整性,但其机制尚不理解。

[0124] 多核苷酸递送到细胞中由膜活性聚合物介导,其破坏质膜或内囊泡膜(如内吞体或溶酶体)或使其不稳定,包括在膜上形成孔、或破坏内吞体或溶酶体囊泡从而允许所述囊泡的内含物释放到胞质中。

[0125] 本发明的两亲膜活性多胺共聚物是两种或多种单体物质共聚化的产物。在一个实施方式中,本发明的两亲膜活性异聚物具有一般结构:

[0126] $-(A)_a-(B)_b-$

[0127] 其中,A包括伯胺或仲胺官能侧基,B包括疏水侧基。 a 和 b 是 >0 的整数。所述聚合物可以是随机、嵌段或交替聚合物。允许额外单体掺入。

[0128] “内吞体裂解聚合物”是某种聚合物,所述聚合物响应内体特异性环境因子(例如存在裂解酶),能够引起内体破坏或裂解或使通常细胞膜不透性化合物(例如多核苷酸)从细胞内膜包裹的囊泡(例如内体或溶酶体)释放。在内体中,内吞体裂解聚合物的理化性质发生变化。该变化可为电荷、疏水性、或亲水性改变引起的所述聚合物溶解度或与其他化合物或膜相互作用的能力上的变化。考虑本发明的可逆掩蔽膜活性多胺是内吞体裂解聚合物。

[0129] “蜂毒肽”是蜂毒中天然产生的一种两亲膜活性小肽。蜂毒肽可从生物来源分离或可合成。合成的聚合物“由人”通过化学过程配制或生产且不是通过天然发生的生物过程产生。本文使用的蜂毒肽包括天然产生的蜂毒肽家族的多种蜜蜂毒液肽,所述蜂毒肽家族可在以下物种的毒液中找到:西方蜜蜂(*Apis mellifera*)、中国蜜蜂(*Apis cerana*)、额斑黄胡蜂(*Vespa maculifrons*)、大胡蜂(*Vespa magnifica*)、墨胸胡蜂(*Vespa velutina nigrithorax*)、马蜂属HQL-2001(*Polistes* sp.HQL-2001)、小蜜蜂(*Apis florae*)、大蜜蜂(*Apis dorsata*)、中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)、亚非马蜂(*Polistes hebraeus*)。本文使用的蜂毒肽还包括氨基酸序列与天然产生的蜂毒肽相同或类似的合成肽。具体而言,蜂毒肽氨基酸序列包括表1中所示的那些。合成的蜂毒肽可包含天然产生的L型氨基酸或对映体D型氨基酸(反(*inverso*))。然而,蜂毒肽应基本包括所有L型或所有D型氨基酸,但可以具有附加在氨基或羧基末端的相反立构中心的氨基酸。所述蜂毒肽氨基酸序列也可以是逆向的(逆(*reverso*))。逆蜂毒肽可以具有L型氨基酸或D型氨基酸(逆反)。两个蜂毒肽也可共价连接以形成蜂毒肽二聚物。蜂毒肽可具有非掩蔽剂的修饰基团,所述修饰基团连接氨基末端或羧基末端,增强组织靶向或促进体内循环。

[0130] 连接或“接头”是两种原子之间的联系,所述联系通过一种或多种共价键将一种化学基团或感兴趣的区段连接另一种化学基团或感兴趣的区段。例如,连接可使掩蔽剂或多核苷酸连接聚合物。不稳定连接包含不稳定键。连接可任选地包括增加两种相连原子之间距离的间隔子。间隔子还可增加连接的灵活性和/或长度。间隔子可包括但不限于:烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、芳烯基、芳炔基,其各可包括一种或多种杂原子、杂环、氨基酸、核苷酸和糖。间隔基团为本领域熟知,前述列表不意在限制本发明的范围。

[0131] “不稳定键”是除了与氢原子共价键之外的共价键,其能在不破坏或切割同一分子

中其他共价键的条件下被选择性破坏或切割。更具体地,不稳定键是在合适条件下比同一分子中不稳定共价键更不稳定(热力学)或更快速破坏(动力学)的共价键。分子内不稳定键的切割会形成两个分子。对于本领域技术人员,键的切割或不稳定通常用术语键切割的半衰期($t_{1/2}$) (切割一半键所需的时间)来讨论。因此,不稳定键涵盖与分子中其他键相比选择性切割更快的键。

[0132] 如本文所用,“生理不稳定键”是在哺乳动物体内正常遇到或类似于遇到的那些条件下能切割的不稳定键。选择生理不稳定键从而其存在于某些生理条件时发生化学转化(如切割)。

[0133] 如本文所用,细胞生理不稳定键是在哺乳动物细胞内条件下可切割的不稳定键。哺乳动物细胞内条件包括哺乳动物细胞内发现的或类似其内所遇到的化学条件如pH、温度、氧化或还原条件或试剂和盐浓度。哺乳动物细胞内条件还包括存在哺乳动物中正常出现的酶活性如蛋白水解酶或水解酶。细胞生理不稳定键还可响应给予药学上可接受的外源试剂而切割。

[0134] RNAi干扰靶向基团偶联物:靶向基团可以连接所述RNAi多核苷酸的3'或5'末端。对于siRNA多核苷酸,所述靶向部分可连接有义链或反义链,优选有义链。

[0135] 在一个实施方式中,所述靶向基团由疏水基团组成。更具体地,所述靶向基团由具有至少20个碳原子的疏水基团组成。用作多核苷酸靶向部分的疏水基团在本文中指疏水靶向部分。示例性合适疏水基团可选自下组:胆固醇、二胆固醇、生育酚、二生育酚、二癸基、双十二烷基、双十八烷基、双十二烷基、双十八烷基、类异戊二烯和胆酰胺(choleamide)。具有6个或更少碳原子的疏水基团没有多核苷酸靶向部分有效,而具有8-18个碳原子的疏水基团能递送更多的具有更大尺寸疏水基团(即碳原子数增加)的多核苷酸。没有共给予递送聚合物时,疏水靶向基团与RNAi多核苷酸的结合不提供有效的功能性体内RNAi多核苷酸递送。虽然已有人报道siRNA-胆固醇偶联物用于将siRNA(siRNA-胆固醇)体内递送到肝脏,但在没有任何额外递送载剂时,需要高浓度的siRNA且递送效率较差。与本文所述递送聚合物组合时,多核苷酸的递送显著改良。通过与本发明递送聚合物一起提供siRNA-胆固醇,siRNA-胆固醇的效率提高约100倍。

[0136] 用作多核苷酸靶向部分的疏水基团可选自下组:烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、芳烯基和芳炔基(其各可为线性、分支或环形)、胆固醇、胆固醇衍生物、固醇、类固醇和类固醇衍生物。疏水靶向基团优选烃类,仅包括碳和氢原子。然而,可允许保持疏水性的取代或杂原子,例如氟。所述疏水靶向基团还可使用本领域已知方法连接所述RNAi多核苷酸的3'或5'末端。对于具有2条链的RNAi多核苷酸,例如siRNA,所述疏水基团可连接任一链。

[0137] 在另一实施方式中,所述靶向基团包含半乳糖簇(半乳糖簇靶向部分)。如本文所用,“半乳糖簇”包含具有2~4种末端半乳糖衍生物分子。如本文所用,术语半乳糖衍生物包括半乳糖和对ASGPr的亲和性等于或超过半乳糖的半乳糖衍生物。末端半乳糖衍生物通过其C-1碳连接分子。优选的半乳糖簇具有各自对去唾液酸糖蛋白受体具有亲和性的3种末端半乳糖胺或半乳糖胺衍生物。更优选的半乳糖簇具有3种末端N-乙酰半乳糖胺。本领域其他常见术语包括三触角型(tri-antennary)半乳糖、三价半乳糖和半乳糖三聚体。已知三触角型半乳糖衍生物簇以比二触角型或单触角型半乳糖衍生物结构更强的亲和性结合ASGPr(Baenziger和Fiete,1980,Cell,22,611-620;Connolly等,1982,J.Biol.Chem.,257,939-

945)。需要多价以获得nM的和性。与递送聚合物共给予时,结合对去唾液酸糖蛋白受体具有亲和性的单半乳糖衍生物不能将RNAi多核苷酸功能性体内递送到肝细胞中。

[0138] 半乳糖簇含各自连接中央分支点的2~4种,优选3种半乳糖衍生物。所述半乳糖衍生物通过所述糖的C-1碳结合中央分支点。半乳糖衍生物优选通过接头或间隔子连接所述分支点。优选的间隔子是灵活的亲水间隔子(美国专利5885968;Biessen等J.Med.Chem.1995卷39第1538-1546页)。优选的灵活亲水间隔子是PEG间隔子。优选的PEG间隔子是PEG₃间隔子。分支点可为任何小分子,其允许所述三种半乳糖衍生物结合,还允许所述分支点结合RNAi多核苷酸。示例性分支点基团是二赖氨酸。二赖氨酸分子含三种胺基(可通过其结合三种半乳糖衍生物)和羧基反应基团(二赖氨酸可通过其结合RNAi多核苷酸)。分支点与RNAi多核苷酸的结合可通过接头或间隔子发生。优选的间隔子是灵活的亲水间隔子。优选的灵活亲水间隔子是PEG间隔子。优选的PEG间隔子是PEG₃间隔子(三个乙烯单元)。所述半乳糖簇还可使用本领域已知方法连接所述RNAi多核苷酸的3'或5'末端。对于具有2条链的RNAi多核苷酸,例如siRNA,所述半乳糖簇可连接任一链。美国专利公开20110207799描述了合适的半乳糖簇。

[0139] 术语“多核苷酸”,或核酸或多聚核酸是本领域术语,指含有至少两种核苷酸的聚合物。核苷酸是多核苷酸聚合物的单体单元。具有少于120个单体单元的多核苷酸常称为寡核苷酸。天然核酸具有去氧核糖-或核糖-磷酸酯主链。非天然或合成的多核苷酸是体外或在无细胞系统中聚合的多核苷酸且含有相同或相似的碱基但可含有天然核糖或脱氧核糖磷酸酯主链以外的主链类型。多核苷酸可用本领域已知的任何技术合成。本领域已知的多核苷酸主链包括:PNA(肽核酸)、硫代磷酸酯、磷酸二酰胺(phosphorodiamidates)、吗啉代、和天然核酸的其他磷酸主链变体。碱基包括嘌呤和嘧啶,其还包括天然化合物腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、肌苷和天然类似物。嘌呤和嘧啶的合成类似物包括但不限于将新反应基团置于核苷酸上的修饰,例如但不限于胺、乙醇、硫醇、羧酸酯和卤代烷。术语碱基包含任何已知的DNA和RNA碱基类似物。多核苷酸还可包括核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、合成的核苷酸或任何合适组合。多核苷酸可体外聚合,其可为重组体,包括嵌合序列或这些基团的衍生物。多核苷酸还可包括在5'末端和3'末端、或5'和3'末端均有的末端帽部分。所述帽部分可为但不限于倒置的脱氧脱碱基部分、倒置的脱氧胸腺嘧啶部分、胸苷部分、或3'甘油修饰。

[0140] “RNA干扰(RNAi)多核苷酸”是能诱导RNA干扰的分子,其通过与哺乳动物细胞的RNA干扰通路组成部分相互作用以序列特异方式降解或抑制转基因的信使RNA(mRNA)转录本翻译。两种主要RNAi多核苷酸是小(或短)干扰RNA(siRNA)和微RNA(miRNA)。RNAi多核苷酸可选自下组:siRNA、微RNA、双链RNA(dsRNA)、短发夹RNA(shRNA)和编码能诱导RNA干扰的表达盒。siRNA包括的双链结构通常含15-50个碱基对,优选21-25个碱基对,并具有与细胞内所表达靶基因或RNA中编码序列相同(完美互补的)或几乎相同(部分互补的)的核苷酸序列。siRNA还具有3'双核苷酸突出。siRNA可由形成发夹结构的两个退火多核苷酸或单核苷酸组成。本发明的siRNA分子包含有义区域和反义区域。在一个实施方式中,偶联物的siRNA从两种寡核苷酸片段中组装,其中一种片段包含所述siRNA分子反义链的核苷酸序列,且第二片段包含所述siRNA分子有义链的核苷酸序列。在另一实施方式中,有义链通过接头分子如多核苷酸接头或非核苷酸接头连接反义链。微RNA(miRNA)是约22个核苷酸长度的非编码

小RNA基因产物,指导其mRNA靶标的破坏或翻译抑制。若miRNA和靶mRNA之间是部分互补,则所述靶mRNA的翻译被抑制。若广泛互补,则所述靶mRNA被切割。对于miRNA,所述复合物结合通常位于mRNA 3'UTR的靶位点,其通常仅与所述miRNA部分同源。“种子区域”为miRNA 5'末端的一段约七(7)个连续核苷酸,与其靶标形成完美碱基配对——在miRNA特异性中起关键作用。RISC/miRNA复合物与mRNA的结合可导致蛋白翻译抑制或mRNA的切割和降解。近期数据表明若沿着全长miRNA和其靶标有完美同源性而不是仅在种子区域显示完美碱基配对,则mRNA切割优选发生(Pillai等,2007)。

[0141] RNAi多核苷酸表达盒可在细胞中转录产生小发夹RNA,其能作为siRNA、分离的有义和反义链线性siRNA或miRNA行使功能。RNA聚合酶III转录的DNA含有选自下表的启动子:U6启动子、H1启动子和tRNA启动子。RNA聚合酶II启动子包括U1、U2、U4和U5启动子、snRNA启动子、微RNA启动子和mRNA启动子。

[0142] 已知miRNA序列的列表可在研究组织维护的数据库中找到,如维尔康姆基金会桑格研究所(Wellcome Trust Sanger Institute)、宾州生物信息中心(Penn Center for Bioinformatics)、斯隆凯特林癌症纪念中心(Memorial Sloan Kettering Cancer Center)和欧洲分子生物实验室等。已知的有效siRNA序列和关联结合位点也在相关文献中充分记述。RNAi分子容易用本领域已知的技术设计和生产。此外,计算工具可用于增加发现有效和特异性序列基序的可能性(Pei等2006,Reynolds等2004,Khvorova等2003,Schwarz等2003,Ui-Tei等2004,Heale等2005,Chalk等2004,Amarzguioui等2004)。

[0143] 本发明的多核苷酸可被化学修饰。该化学修饰的非限制性示例包括:硫代磷酸酯核苷酸间连接、2'-O-甲基核糖核苷酸、2'-脱氧-2'-氟核糖核苷酸、2'-脱氧核糖核苷酸、“通用碱基”核苷酸、5-C-甲基核苷酸、和倒置脱氧脱碱基残基掺入。用于各种多核苷酸结构时,这些化学修饰显示在细胞中保持多核苷酸活性,同时增加这些化合物的血清稳定性。化学修饰的siRNA还可使人中干扰素活性激活的可能性最小化。

[0144] 在一个实施方式中,本发明的化学修饰RNAi多核苷酸包括具有两条链的双链体,其一或二者可化学修饰,其中各链为约19~约29核苷酸。在一个实施方式中,本发明的RNAi多核苷酸包括一种或多种修饰的核苷酸,同时保持在细胞内介导RNAi或在体外系统中重建的能力。RNAi多核苷酸可经修饰,其中化学修饰包括一个或多个(例如约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多)核苷酸。本发明的RNAi多核苷酸可包括修饰的核苷酸,其占某一百分比的RNAi多核苷酸中所存在核苷酸总数。同样,本发明的RNAi多核苷酸通常可在约5~约100%(如5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的核苷酸位置)的核苷酸位置上包括修饰的核苷酸。给定RNAi多核苷酸中存在的修饰核苷酸的实际百分比取决于所述RNAi多核苷酸中存在的核苷酸总数。若RNAi多核苷酸是单链,则修饰百分比可基于单链RNAi多核苷酸中存在的核苷酸总数。同样,若RNAi多核苷酸是双链,则修饰百分比可基于有义链、反义链或有义和反义链二者中存在的核苷酸总数。此外,给定RNAi多核苷酸中存在的修饰核苷酸的实际百分比还可取决于所述RNAi多核苷酸中存在的嘌呤和嘧啶核苷酸总数。例如,其中RNAi多核苷酸中存在的所有嘧啶核苷酸和/或所有嘌呤核苷酸经过修饰。

[0145] RNAi多核苷酸调控基因编码的RNA表达。由于多种基因可彼此共有一定程度的序列同源性,所以RNAi多核苷酸可设计为靶向具有足够序列同源性的一类基因。因此,RNAi多

核苷酸可包括与不同基因靶标之间共有或对特异基因靶标独特的序列互补的序列。因此，RNAi多核苷酸可设计为靶向具有数种基因之间同源性的RNA序列的保守区域，从而靶向基因家族中的数种基因（如不同基因同种型、剪接变体、突变基因等）。在另一实施方式中，RNAi多核苷酸可设计为靶向对单一基因中特异RNA序列独特的序列。

[0146] 术语“互补”指多核苷酸与另一多核苷酸序列通过常规沃森克里克或其他非常规类型形成氢键的能力。涉及本发明的多核苷酸分子时，多核苷酸分子与其靶标（有效结合位点）或互补序列的结合游离能量足以推进所述多核苷酸的相关功能，如酶的mRNA切割或翻译抑制。核酸分子结合游离能量的测定为本领域熟知（Frier等1986，Turner等1987）。互补百分比表示第一多核苷酸分子中毗连链的碱基百分比，所述分子可与第二多核苷酸序列（如十分之五、六、七、八、九、十即50%、60%、70%、80%、90%和100%互补）形成氢键（如沃森克里克碱基配对）。完美互补表示多核苷酸序列的毗连链中所有碱基与第二多核苷酸序列中相同数量的连续碱基形成氢键。

[0147] 抑制、下调或敲减基因表达表示如用所述基因转录的RNA水平或从所述RNA翻译的多肽、蛋白或蛋白亚基水平所测量，所述基因的表达低于没有阻断本发明多核苷酸偶联物时观察到的水平。用本发明组合物所递送多核苷酸进行的基因表达抑制、下调或敲减优选低于存在对照失活核酸（序列杂乱的核酸或钝化错配的核酸）时或所述多核苷酸未偶联掩蔽聚合物时观察到的水平。

[0148] 发现抗内体/溶酶体定位核酸酶（例如DNA酶II）降解的siRNA稳定大幅促进了靶向敲减。所述稳定可直接影响释放进入胞质的siRNA量，细胞RNAi组成部分位于所述胞质中。仅胞质中可用的siRNA部分会触发RNAi效应。

[0149] 除了较差药代动力学性质以外，siRNA在没有保护递送载体下如此给予进入循环时还易受生物环境中的核酸酶影响。因此，许多siRNA在胞外的组织和血流中或在细胞内摄取后（内体）快速降解。可以通过缺失2'-OH基团的核苷酸（例如2'-脱氧、2'-O-甲基（2'-OMe）或2'-脱氧-2'-氟（2'-F）核苷酸），并通过多核苷酸5'-末端非核苷酸部分，例如第一核苷酸间连接处的胆固醇、氨基烷基-接头或硫代磷酸酯来抑制核酸酶切割。优选地，所述RNAi多核苷酸链中缺乏任何2'-OH核苷酸，起始于2'-OMe核苷酸，5'-端通过硫代磷酸酯（PTO）键连接第二个核苷酸。

[0150] 使用以下设计时，可使siRNA显著稳定，其中，提供一种寡核苷酸，所述寡核苷酸具有以下修饰模式的反义链：5'-(w)-(Z1)-(Z2)-(Z3)_{na}-3'和以下修饰模式的正义链5'-(Z3)_{ns}-3'，其中

[0151] w是独立的5'-磷酸或5'-硫代磷酸或H，

[0152] Z1是独立的2'-修饰的核苷。

[0153] Z2是独立的2'-脱氧核苷或2'-氟-修饰的核苷，

[0154] Z3是独立的2'-修饰的核苷，

[0155] _{na}是8~23，_{ns}是8~25。

[0156] 在一个优选的实施方式中，所提供的寡核苷酸具有以下修饰模式的反义链：5'-(w)-(Z1)-(Z2)-(Z3)_{na}-3'和以下修饰模式的正义链：5'-(Z3)_{ns}-3'，其中，Z1是2'-氟-修饰的核苷或2'-脱氧-核苷，且所有剩余取代基以及变量_{na}和_{ns}具有上文所给的含义。

[0157] 在一个优选的实施方式中，所提供的寡核苷酸具有以下修饰模式的反义链：5'-

(w)-(Z1)-(Z2)-(Z3)_{na}-3'和以下修饰模式的正义链:5'-(Z3)_{ns}-3',其中,Z3是2'-O-甲基修饰的核苷、2'-氟-修饰的核苷或2-脱氧-核苷,且所有剩余取代基以及变量_{na}和_{ns}具有上文所给的含义。

[0158] 在一个优选的实施方式中,所提供的寡核苷酸具有以下修饰模式的反义链:5'-(w)-(Z1)-(Z2)-(Z3)_{na}-3'和以下修饰模式的正义链:5'-(Z3)_{ns}-3',其中,Z1是2'-氟-修饰的核苷或2-脱氧-核苷,Z3是2'-O-甲基修饰的核苷、2'-氟-修饰的核苷或2-脱氧-核苷,且所有剩余取代基以及变量_{na}和_{ns}具有上文所给的含义。

[0159] 所述具有新型修饰模式的寡核苷酸的核酸序列中的核苷可以由5'-3'磷酸二酯或5'-3'硫代磷酸酯连接。

[0160] 本文所用的“反义”链是与靶mRNA互补的siRNA链,所述siRNA链一旦解螺旋即可与所述mRNA结合。包含新型修饰模式的所述siRNA的正义链与所述反义链互补。

[0161] 原则上,在与其共价连接的RNAi多核苷酸和所述靶向部分或递送聚合物之间的核酸酶切割位点能通过正义链或反义链含有至少一个2'-OH核苷酸的3'-或5'-突出端引入。最终活性siRNA种类通过胞内核酸酶加工生成。此外,可以使用由碱基配对区域内的2'-OH核苷酸构成的限定切割位点。这可以使用与相反链互补的至少一个2'-OH核苷酸或通过引入至少一个错配2'-OH核苷酸或含有至少一个2'-OH核苷酸的发夹/凸出来完成。

[0162] 多核苷酸与递送聚合物的连接

[0163] 在一个实施方式中,所述RNAi多核苷酸通过生理不稳定键或接头连接递送聚合物。选择所述生理不稳定接头,从而在某些生理条件存在时发生化学转化(例如,切割)(例如,在胞质还原环境中切割二硫键)。通过切割生理不稳定连接从所述聚合物释放多核苷酸促进多核苷酸和合适细胞成分在活性方面的相互作用。

[0164] 所述多核苷酸聚合物偶联物通过共价连接所述多核苷酸和所述聚合物来形成。所述聚合物进行聚合或修饰,从而其包含反应基团A。所述多核苷酸还进行聚合或修饰,从而其包含反应基团B。选择反应基团A和B,从而其能使用本领域已知方法通过可逆共价连接而相互连接。

[0165] 所述多核苷酸和所述聚合物的偶联能在过量聚合物存在下进行。因为所述多核苷酸和所述聚合物在偶联过程中可带相反电荷,过量聚合物的存在能减少或消除所述偶联物的集聚。或者,能使用过量载体聚合物,例如聚阳离子。可在对动物或细胞培养物给予所述偶联物之前从所述偶联聚合物去除过量聚合物。或者,可将所述过量聚合物与所述偶联物共同给予动物或细胞培养物。

[0166] 体内给予

[0167] 药理学和毒理学中,给予途径是使药物、液体、毒剂或其他物质接触身体的途径。通常,用于治疗哺乳动物的药物和核酸给予方法为本领域熟知,且可用于给予本发明组合物。本发明化合物可通过任何合适途径在根据所述途径适当调整的制剂中应用,最优选肠胃外。因此,可通过注射,例如静脉内、肌肉内、皮内、皮下或腹膜内注射给予本发明化合物。因此,本发明还提供含有药学上可接受载体或赋形剂的药物组合物。

[0168] 给予的肠胃外途径包括脉管内(静脉内、动脉内)、肌肉内、实质内、皮内、真皮下(subdermal)、皮下(subcutaneous)、肿瘤内、腹膜内、鞘内、硬膜下、硬膜外和淋巴内注射,使用注射器和针或导管。本文所述脉管内表示称为脉管的管状结构内,其连接体内的组织

或器官。所述管状结构的腔内,体液流向或流自身体部分。体液的示例包括血液、脑脊液(CSF)、淋巴液或胆汁。脉管的示例包括冠状动脉、细动脉、毛细管、小静脉、窦状小管、静脉、淋巴管、胆管和唾液腺管或其他外分泌腺管。脉管内途径包括通过诸如动脉或静脉等血管的递送。血液循环系统提供药物的全身扩散。

[0169] 所述组合物在药学上可接受载体溶液中注射。药学上可接受指药理学/毒理学角度上哺乳动物可以接受的那些特性和/或物质。短语药学上可接受指给予哺乳动物时生理上可耐受且通常不产生过敏或其他不利或毒性反应的分子实体、组合物和特性。本文所用术语“药学上可接受”优选指被联邦或州政府管理机构批准,或美国药典或其它公认药典所列用于动物应用,更具体用于人。

[0170] 这些运载体还可包含佐剂,如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。可通过灭菌方法(同上)和纳入各种抗细菌和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯类、氯代丁醇和苯酚、山梨酸等确保防止微生物的出现。组合物中也可能需要包含等张剂,如糖、氯化钠等。此外,可通过加入能延迟吸收的物质,例如单硬脂酸铝和明胶来实现可注射药物形式的长期吸收。

[0171] 在一个实施方式中,共同给予RNAi多核苷酸-靶向基团偶联物与本发明的递送聚合物。共同给予表示将RNAi多核苷酸偶联物和递送聚合物给予哺乳动物,从而两者同时存在于该哺乳动物内。RNAi多核苷酸靶向基团偶联物和递送聚合物可同时给予或其可依次递送。对于同时给予,其可在给予前混合。对于依次给予,RNAi多核苷酸靶向部分偶联物或递送聚合物可先给予。

[0172] 治疗效果

[0173] RNAi多核苷酸可递送用于研究目的或用于在治疗细胞中产生变化。RNAi多核苷酸的体内递送用于研究试剂和各种治疗、诊断、靶标确认、基因组开发、基因工程改造和药物基因组应用。我们公开的RNAi多核苷酸递送引起肝细胞中内源基因表达的抑制。多核苷酸递送后测量的报告(标记)基因表达水平指示其他多核苷酸递送后基因表达水平相似的合理预期。本领域普通技术人员认为有益的治疗水平在疾病之间不同。例如,血友病A和B分别由X连锁的凝固因子VIII和IX缺陷引起。其临床过程受到因子VIII或IX的正常血清水平百分比极大影响:<2%、严重;2-5%,中度,和5-30%轻度。因此,严重患者中循环因子的正常水平从1%增加到2%可视为有益。高于6%的水平阻止自发流血但不阻止那些手术或损伤的继发性流血。相似地,基因的抑制不需要100%以提供治疗益处。基因治疗领域普通技术人员能基于标记基因结果的充分水平来合理预期疾病特异性基因表达的有益水平。血友病示例中,若标记基因以与因子VIII正常水平的2%体积相当的水平表达产生蛋白,则可合理预期编码因子VIII的基因还会以相似水平表达。因此,报告或标记基因通常用作细胞内蛋白表达的有用范例。

[0174] 肝脏是基因治疗最重要的靶组织,因为其在代谢(如各种血胆固醇过多中的脂蛋白代谢)和循环蛋白(如血友病中的凝固因子)分泌中起关键作用。此外,常见获得性疾病如慢性肝炎和硬化且也可能用基于多核苷酸的肝脏疗法治疗。影响或被肝脏影响的许多疾病或病症可通过敲减(抑制)肝脏中基因表达来治疗。该肝脏疾病和病症可选自含有以下的列表:肝癌(包括肝细胞癌,HCC)、病毒感染(包括肝炎)、代谢紊乱(包括高脂血症和糖尿病)、纤维症和急性肝损伤。

[0175] 可改变本发明药物组合物中活性成分的实际剂量水平,从而获得就具体患者、组

合物与给药方式有效实现所需治疗应答且对患者无毒性的活性成分量。所选剂量水平取决于多种药代动力学因素,包括所用的本发明特定组合物的活性,给药途径,给药时间,所用特定化合物的排泄率,治疗持续时间,与所用特定组合物联用的其他药物、化合物和/或材料,所治疗病人的年龄、性别、体重、病症、整体健康状况、先前病史以及医学领域熟知的类似因素。

[0176] 待给予的递送聚合物、RNAi多核苷酸-靶向基团偶联物或递送聚合物-RNAi多核苷酸偶联物的量(剂量)可凭经验确定。我们显示使用0.1-10mg/kg动物体重的siRNA和1.5-60mg/kg动物体重的递送聚合物能有效敲减基因表达。小鼠中的优选量为0.25-2.5mg/kg siRNA-偶联物和10-40mg/kg递送聚合物。更优选地,给予约1.5-20mg/kg递送组合物。RNAi多核苷酸偶联物的量容易提高,因为其通常在大剂量下无毒。

[0177] 如本文所用,体内表示生物体内部发生且更具体地表示与部分或死亡个体相反的完整、活多细胞生物体(动物)如哺乳动物的活组织中或其上进行的过程。

[0178] 如本文所用,“药物组合物”包含本发明的偶联物、药物运载体或稀释剂以及配制必需的任何其它介质或试剂。

[0179] 如本文所用,“药学上可接受的运载体”包括生理上相容的任何和所有溶剂,分散介质,包被,抗菌剂和抗真菌剂,等渗剂和吸收延迟剂,等等。优选地,所述运载体适于静脉内、肌肉内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮给予(例如,通过注射或输注)。

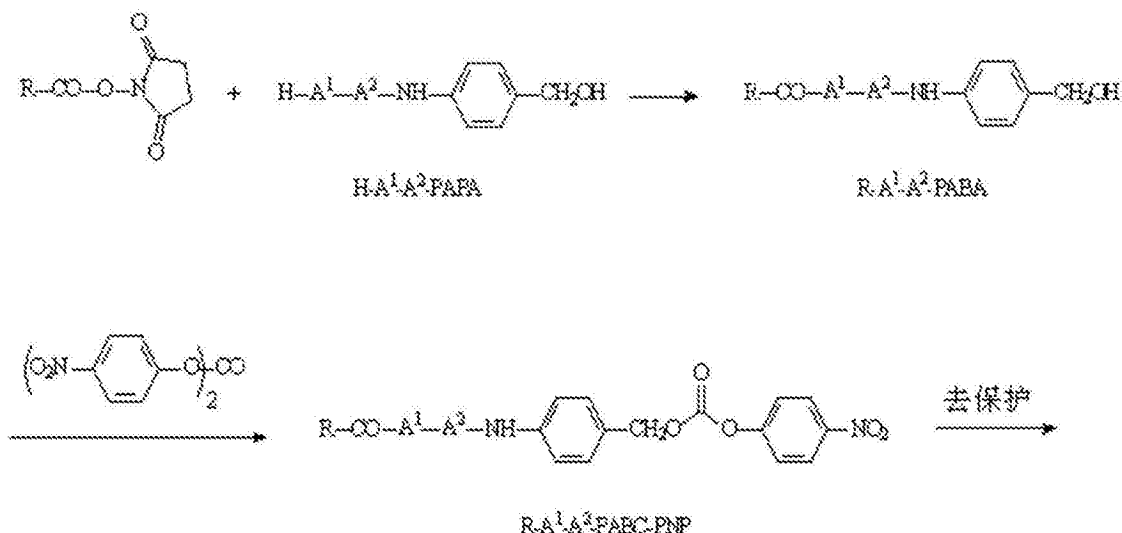
实施例

[0180] 实施例1.蛋白酶(肽酶)可切割性掩蔽剂的合成。

[0181] 除水性NaHCO₃中的氨基酸偶联和甲硅烷基基团去保护以外,所有反应皆在无水条件下使用新鲜无水溶剂完成。柱纯化在硅胶上使用指定洗脱剂完成。质谱(MS)使用电喷雾电离进行。

[0182] 在NAG和PEG(NAG-L-AA-PABC-PNP和PEG-AA-PABC-PNP)的活性对硝基苯基-对酰胺苄基碳酸酯衍生物的制备中,我们应用各PEG的NHS酯或含NAG的衍生物以酰化二肽-对酰胺苄醇前体的氨基末端。在接下来的步骤中,使苄基羟基基团转化成对硝基苯基碳酸酯,然后从氨基酸和NAG部分去除保护基团。在一些应用中,当对硝基苯基(PNP)碳酸酯用于某些聚合物的修饰时,在聚合物修饰前移除保护基团。

[0183]



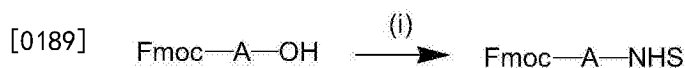
[0184] R包括ASGPr配体(受保护或未保护)或PEG,和

[0185] A¹和A²是氨基酸(受保护或未保护)

[0186] 该合成始于H-A¹A²-PABA(表1)衍生物的制备。这些加合物使用Dubowchik等.(2002)表述的合成方案加一些修饰获得。Fmoc保护的氨基酸Fmoc-A¹-OH通过在与二环己基碳二亚胺(DCC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)反应中转化成N-羟基琥珀酰亚胺酯(N-hydroxysuccinimide)(Fomc-A¹-NHS)而活化。这些反应性NHS酯在添加用以保持氨基基团反应性的水性NaHCO₃存在下与保护的氨基酸A²偶联。对于1e和1f(表1)的制备,使用市售可得五氟苯基酯(OPfp)替代NHS酯用于偶联。

[0187] Fmoc二肽1a-h的合成。

[0188] a) 从含NHS的相应氨基酸和DCC制备AA的NHS酯,其不需额外纯化即可使用。



[0190] 条件: (i) N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC), 0~20℃。

[0191] 对于Fmoc-Ala-NHS, 向含Fmoc-Ala-OH(412mg, 1.32mmol)和NHS(160mg, 1.38mmol)的DCM(13mL)冰冷溶液添加DCC(286mg, 1.38mmol), 搅拌30分钟, 然后在20℃持续16小时。滤出固体二环己基脲(DCU)并真空除去溶剂。

[0192] 对于Fmoc-Asn(DMCP)-NHS, 向含Fmoc-Asn(DMCP)-OH(298mg, 0.68mmol)和NHS(83mg, 0.72mmol)的DCM(13mL)冰冷溶液添加DCC(148mg, 0.72mmol), 搅拌30分钟, 然后在20℃持续16小时。滤出固体DCU并真空去除溶剂。

[0193] 对于Fmoc-Gly-NHS, Fmoc-Gly-OH(891mg, 3mmol)和NHS(380mg, 3.3mmol)在THF(10mL)中0℃搅拌5分钟, 然后用DCC(650mg, 3.15mmol)的THF溶液(5mL)处理。30分钟内移去冷却浴, 在20℃搅拌反应混合物10小时。滤出固体DCU, 用THF清洗并在旋转蒸发仪上去除溶剂。产物称重并溶于DME以制成0.2mM溶液。

[0194] 对于Fmoc-Glu(O-2PhiPr)-NHS, 向含Fmoc-Glu(O-2PhiPr)-OH(487mg, 1mmol)和NHS(127mg, 1.1mmol)的THF(5mL)冰冷溶液添加DCC(217mg, 1.05mmol), 搅拌15分钟, 然后在20℃持续10小时。如就Fmoc-Gly-NHS所述完成处理。

[0195] 对于Fmoc-Phe-NHS, 向含Fmoc-Phe-OH(2.11g, 5.45mmol)和NHS(664mg, 5.77mmol)

355.1 [M+1]⁺。

[0209] 对于Fmoc-Glu(O-2PhiPr)Gly-OH 1b, 甘氨酸(75mg, 1mmol)和NaHCO₃(84mg, 1mmol)溶于H₂O(2mL)、THF(4mL)和DME(5mL)的混合物。添加含Fmoc-Glu(O-2PhiPr)-NHS的DME(5mL, 1mmol)溶液并搅拌10小时。在旋转蒸发仪上去除所有挥发物, 添加20mL 0.1M MES缓冲液(pH=5), 然后添加EtOAc(25mL)。所述反应混合物在冰上搅拌, 并用5%KHSO₄溶液酸化至pH=5。产物用EtOAc萃取四次, 用pH=5的盐水冲洗, 干燥(Na₂SO₄), 浓缩并真空干燥。产量528mg(96%)。MS: 567[M+Na]⁺; 562[M+NH₄]⁺; 545.0[M+1]⁺; 427.1[M-2PhiPr]⁺。

[0210] 如上文就1b所述由Fmoc-Asn(DMCP)-NHS和H-Gly-OH制备Fmoc-Asn(DMCP)Gly-OH 1c。产率96%。MS: 987.4[2M+1]⁺; 516.3[M+Na]⁺; 494.4[M+1]⁺; 412.2[M-DMCP+1]⁺。

[0211] 如上文就1b所述由Fmoc-Phe-NHS和H-Lys(MMT)-OH制备Fmoc-PheLys(MMT)-OH 1d。产率94%。MS: 788.5[M+1]⁺, 273.1[M-MMT+1]⁺。

[0212] 对于Fmoc-PheCit-OH 1e:

[0213] i) 向含Fmoc-Phe-NHS(4.96g, 10.26mmol)的DME(40mL)添加含L-瓜氨酸(1.80g, 10.26mmol)和NaHCO₃(0.86g, 10.26mmol)的H₂O(40mL)和THF(20mL)的混合物溶液。搅拌所述反应物15小时。滤出活化的残余DCC并在旋转蒸发仪上去除有机溶剂。向所述残留物添加H₂O(100mL)和iPrOH(10mL)。用5%KHSO₄酸化所述混悬液至pH=3, 所述产物用EtOAc:iPrOH=9:1溶液(3×, 500mL)萃取, 用盐水:iPrOH=9:1(2×, 50mL)混合物清洗, 干燥(Na₂SO₄), 过滤并浓缩, 并用油泵干燥。用乙醚研磨获得纯产物1e。产量3.84g(68%)。MS: 545.6[M+Na]⁺; 528.5[M-H₂O]⁺; 306.3[M-Fmoc+H₂O]⁺。

[0214] ii) 向含H-Cit-OH(184mg, 1.05mmol)和NaHCO₃(88.2mg, 1.05mmol)的H₂O(2.6mL)溶液添加含Fmoc-Phe-OPfp(553mg, 1mmol)的THF(5mL)溶液。添加THF(2mL)使溶液均匀并搅拌10小时。在旋转蒸发仪上去除THF, 所述残留物用H₂O(10mL)和iPrOH(1mL)稀释并用3%HCl酸化至pH=1。所述产物用EtOAc:iPrOH=9:1的溶液萃取5次, 用盐水:iPrOH=9:1的混合物冲洗, 干燥(Na₂SO₄)并真空浓缩。用乙醚研磨获得313mg纯产物1e(57%)。

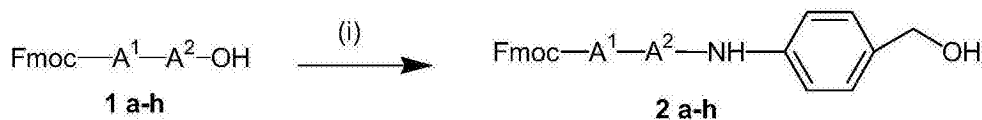
[0215] 如上文就1e-(a)所述由Fmoc-Ala-NHS和H-Cit-OH制备Fmoc-AlaCit-OH 1f。产率77%。MS: 959.8[2M+Na]⁺; 938.1[2M+1]⁺; 491.4[M+Na]⁺; 469.9[M+1]⁺。

[0216] 如上文就1b所述由Fmoc-Val-NHS和H-Cit-OH制备粗Fmoc-ValCit-OH 1g。最终纯化通过乙醚研磨完成。总产率76%。MS: 1060.3[2M+3Na]⁺; 1015.7[2M+Na]⁺; 519.7[M+Na]⁺; 497.9[M+1]⁺。

[0217] 如上文就1b所述由Fmoc-Ala-NHS和H-Asn(DMCP)-OH制备Fmoc-Ala-Asn(DMCP)-OH 1h。产率95%。MS: 530.2[M+Na]⁺; 508.2[M+1]⁺; 426.0[M-DMCP+1]⁺。

[0218] 与对氨基苄醇偶联, 制备Fmoc-AA-PABA和Fmoc-A-PABA 2a-m。

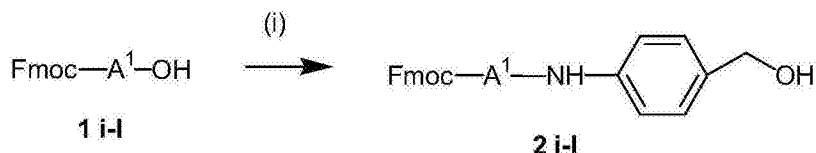
[0219] 在2-乙氧基-1-乙氧基羰基-1,2-二氢喹啉(EEDQ)存在下偶联产物1a-h与对氨基苄醇(PABA), 以形成2a-h。还制备了仅有一个氨基酸连接PABA部分的四种代表物3j-l。



$\text{A}^1 = \text{Gly}, \text{Glu}(2\text{PhiPr}), \text{Asn}(\text{DMCP}), \text{Phe}, \text{Ala}, \text{Val}.$

$\text{A}^2 = \text{Gly}, \text{Lys}(\text{MMT}), \text{Cit}, \text{Asn}(\text{DMCP}), \text{Lys}(\text{CH}_3)_2$

[0220]



$\text{A}^1 = \text{Lys}(\text{CH}_3)_2, \text{Leu}, \text{Asn}(\text{DMCP}), \text{Cit}$

[0221] 条件: (i) PABA、EEDQ、THF

[0222] 对于Fmoc-GlyGly-PABA 2a, 含1a (318mg, 0.9mmol) 和PABA (220mg, 1.8mmol) 的DCM (17mL) 和MeOH (6mL) 溶液用EEDQ (444mg, 1.8mmol) 搅拌10小时。在旋转蒸发仪上去除所有挥发物, 所述残留物用Et₂O研磨, 滤出产物并真空干燥。产量348mg (84%)。

[0223] 对于Fmoc-Glu (0-2PhiPr) Gly-PABA 2b, 含1b (524mg, 0.96mmol) 和PABA (142mg, 1.55mmol) 的DCM (10mL) 溶液用EEDQ (357mg, 1.44mmol) 搅拌10小时。如上文就2a所述完成处理。产量462mg (74%)。

[0224] 如上文就2a所述制备Fmoc-Asn (DMCP) Gly-PABA 2c。产率64%。MS: 621.5 [M+22]⁺; 599.3 [M+1]⁺。

[0225] 如上文就2b所述制备Fmoc-PheLys (MMT) -PABA 2d。产率70%。

[0226] 对于Fmoc-PheCit-PABA 2e, 含1e (5.98g, 10.97mmol) 和PABA (2.70g, 21.95mmol) 的DCM (150mL) 和MeOH (50mL) 溶液用EEDQ (5.43g, 21.95mmol) 处理并搅拌15小时。如上文就2a所述完成处理。产量6.14g (86%)。MS: 650.7 [M+1]⁺; 527.3 [M-PABA+1]⁺。

[0227] 对于Fmoc-AlaCit-PABA 2f, 含1f (2.89g, 6.17mmol) 和PABA (1.52g, 12.34mmol) 的DCM (45mL) 和MeOH (15mL) 溶液用EEDQ (3.05g, 12.34mmol) 处理并搅拌15小时。如上文就2a所述完成处理。产量4.56g (74%)。MS (ES, 负模式): 307.4 [M-263.6-1]⁻; 349.9 [M-Fmoc-1]⁻; 610, 608.4 [M+HCl-1]⁻。

[0228] 如上文就2b所述制备Fmoc-ValCit-PABA 2g。(98%)。

[0229] 如上文就2a所述制备Fmoc-AlaAsn (DMCP) -PABA 2h。产率59%。MS: 613.2 [M+1]⁺; 531.4 [M-DMCP+1]⁺; 408.2 [M-205+1]⁺。

[0230] 对于Fmoc-Lys (CH₃)₂-PABA 2i, Fmoc-Lys (CH₃)₂-OH·HCl 盐 (433mg, 1mmol) 和PABA (246mg, 2mmol) 溶于DCM (10mL) 和MeOH (1.5mL), 冷却至5℃, 然后添加EEDQ (495mg, 2mmol)。撤去冷却浴, 在室温下搅拌该混合物10小时。在旋转蒸发仪上去除所有挥发物, 残留物用Et₂O研磨, 滤出粗产物。所述粗产物重新溶于DCM (2mL) 和MeOH (1mL) 的混合物并通过逐滴添加至Et₂O (40mL) 再次沉淀。过滤产物并真空干燥。产量448mg (83%)。

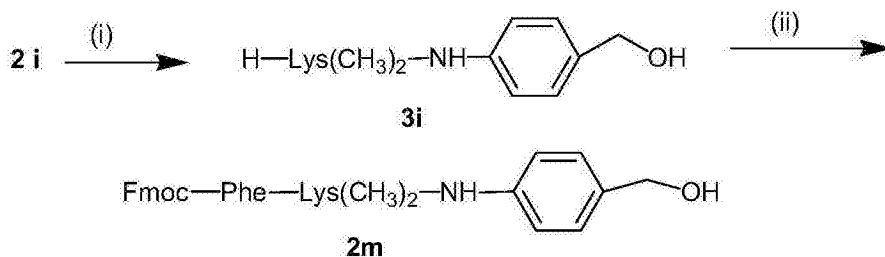
[0231] 对于Fmoc-Leu-PABA 2j, 含Fmoc-Leu-OH (353mg, 1mmol)、EEDQ (495mg, 2mmol) 和PABA (222mg, 1.8mmol) 的DCM (10mL) 溶液搅拌10小时。在旋转蒸发仪上去除所有挥发物, 残留物溶于Et₂O (40mL), 在干冰上冷冻2小时, 并通过离心分离固体。所得粗材料在柱上纯化,

洗脱剂梯度为含MeOH(1-2%)的CHCl₃。产量444mg(97%)。MS:459.4[M+1]⁺。

[0232] 如上文就2j所述制备Fmoc-Asn(DMCP)-PABA 2k。在去除DCM后的处理中,残余物用Et₂O研磨,冷冻至0℃并滤出粗产物,而不用柱纯化。重复该处理一次,然后真空干燥。产率77%。MS:542.5[M+1]⁺。

[0233] 对于Fmoc-Cit-PABA 2l,用EEDQ(430mg,1.74mmol)处理含Fmoc-Cit-OH(345.7mg,0.87mmol)和PABA(214mg,1.74mmol)的DCM(10mL)和MeOH(4mL)溶液并搅拌15小时。所述固体产物用乙醚研磨三次,滤出产物并干燥。产量288mg(67%)。MS:502.3[M+1]⁺;485.5[M-H₂O+1]⁺;263[M-Fmoc-H₂O+1]⁺;179.0[M-306+1]⁺;120.2[M-365.3+1]⁺。

[0234] 使用不同方案制备产物2m:H-Lys(CH₃)₂-PABA衍生物3偶联Fmoc-Phe-NHS。



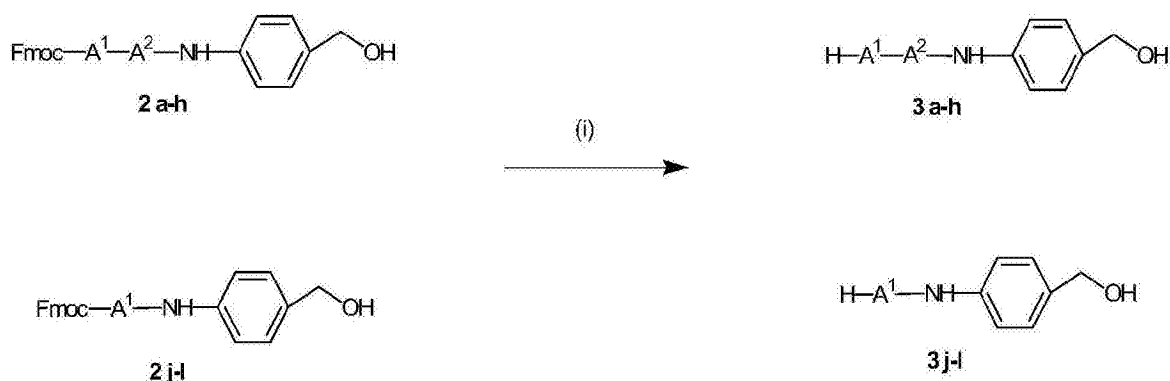
[0235]

[0236] 条件:(i)含三乙胺(Et₃N)的DMF,10小时。(ii)Fmoc-Phe-NHS、二异丙基乙胺(DIEA)、DMF。

[0237] 对于Fmoc-PheLys(CH₃)-PABA 2m,Fmoc-Lys(CH₃)₂-PABA(2i)(448mg,0.83mmol)通过用含Et₃N(3.5mL)的DMF(11mL)搅拌10小时脱去Fmoc保护。在旋转蒸发仪上以40℃/油泵真空去除所有挥发物以获得粗产物3i。该产物溶于DMF(7mL),添加Fmoc-Phe-NHS(482mg,0.996mmol)然后DIEA(0.42mL,2.2mmol),并搅拌该混合物10小时。在旋转蒸发仪上以40℃/油泵真空去除有DIEA的溶剂以获得粗2m,其无需额外纯化即可使用。MS:549.4[M+1]⁺。

[0238] H-AA-PABA 3a-h,m和H-A-PABA 3j-l的制备。

[0239]



[0240] 条件:(i)含Et₃N的DMF,10小时。

[0241] 如上文就3i所述用含Et₃N的DMF处理Fmoc-衍生物2a-h,j-l,然后浓缩并真空干燥。所述粗产物溶于DMF以制得0.1M溶液,其无需额外纯化即可使用。

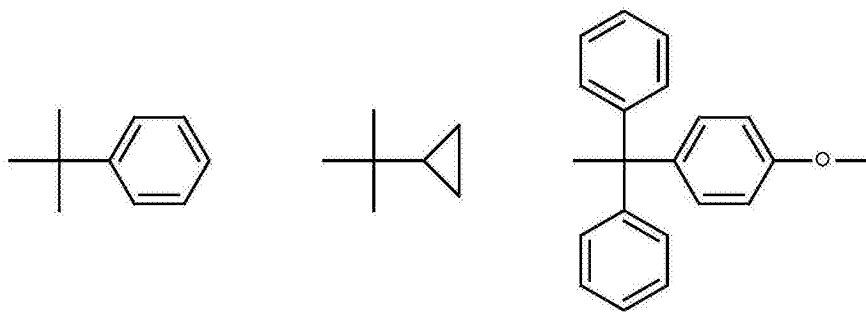
[0242] 表1.H-AA-PABA(1-3)的中间体

[0243]

	A ¹	A ²
1,2,3a	Gly	Gly

1,2,3b	Glu (2PhiPr)	Gly
1,2,3c	Asn (DMCP)	Gly
1,2,3d	Phe	Lys (MMT)
1,2,3e	Phe	Cit
1,2,3f	Ala	Cit
1,2,3g	Val	Cit
1,2,3h	Ala	Asn (DMCP)
1,2,3i	Lys (CH ₃) ₂	
1,2,3j	Leu	-
1,2,3k	Asn (DMCP)	-
1,2,3l	Cit	-
2,3m	Phe	Lys (CH ₃) ₂

[0244]



2PhiPr

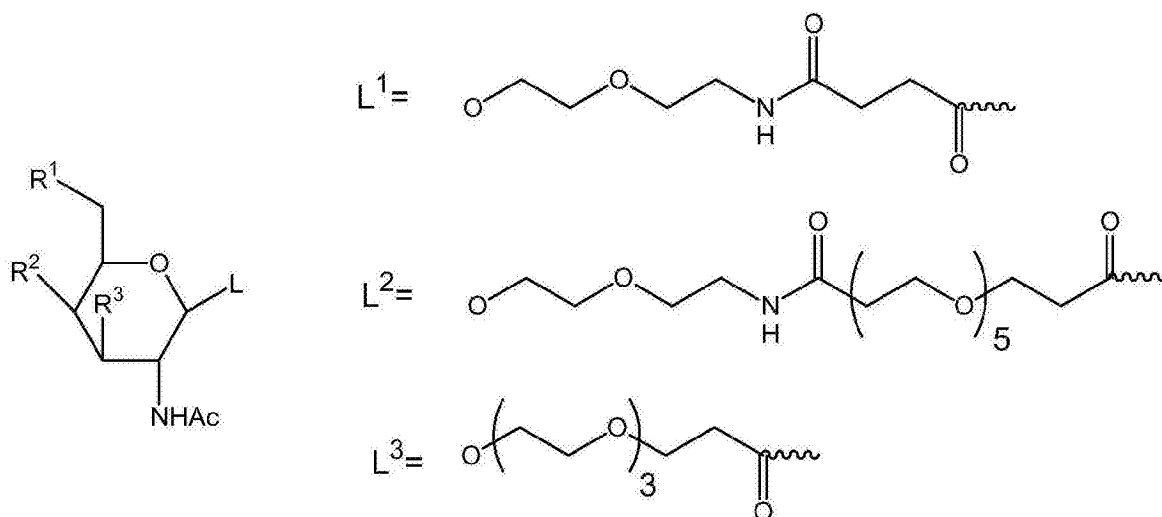
DMCP

MMP

[0245] 蛋白酶可切割的NAG-掩蔽试剂的制备。

[0246] NAG (R¹, R², R³) -L-AA-PABC-PNP (表2、3) 的制备

[0247]

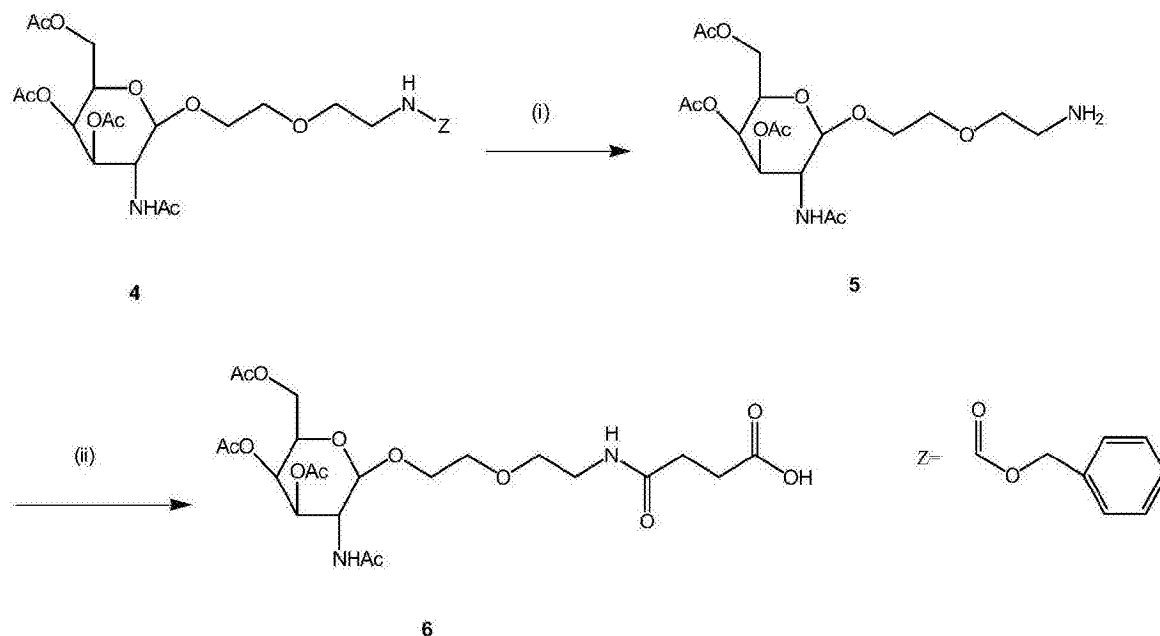


[0248] 制备NAG (R¹, R², R³) -L-AA-PABC-PNP, 其中R¹、R²和R³是保护基团, L是半乳糖胺部分 (NAG) 和二肽 (AA) 之间的连接, 所述制备始于NAG-L-CO₂H酸6, 10a, b, 13和17的制备, 所述NAG-L-CO₂H酸在转化成NHS酯之后用于酰化H-AA-PABA 2。在为碱敏感聚合物设计的碳酸酯21a-f中, 聚合物修饰前必须移除保护基团。为此, 在10a, b, 13和17的制备中, 用不稳定三乙

基甲硅烷基 (TES) 和叔丁基二甲基硅烷基 (TBDMS) 基团替代GAL部分的Ac-保护基团。那些基团可以使用溶于水的70%三氟乙酸溶液在0℃移除而不损坏碱敏感PNP-碳酸酯部分。

[0249] a) 在NAG-L¹-CO₂H 6 (其中R¹=R²=R³=Z保护的OAc) 的制备中, 对NAG-四乙酸4[3-5]进行Z-脱保护 (H₂/Pd/C (10%)、MeOH、CHCl₃ (20%)) 以获得NAG-胺5, 然后用琥珀酸酐对其酰化。(琥珀酸酐、Et₃N、DCM, 1小时)。

[0250]



[0251] 条件: (i) H₂/Pd/C (10%)、MeOH、CHCl₃、(20%), (ii) 琥珀酸酐、Et₃N、CDM、1小时。

[0252] NAG-胺5: 对于5的制备, 在10%Pd/C (674mg) 存在下, 于1个大气压下氢化含NAG 4 (6.74g, 11.85mmol) 的MeOH (144mL) 和CHCl₃ (36mL) 溶液10小时。通过硅藻土滤出催化剂, 所述产物浓缩并真空干燥。产量5.04g (98%)。

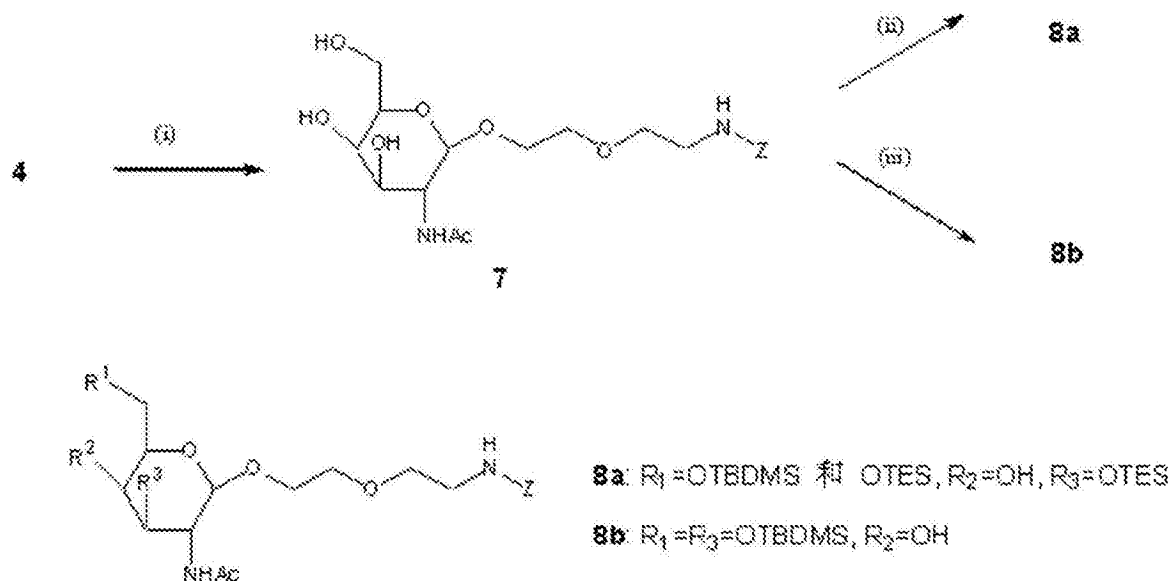
[0253] NAG-L¹-OH 6: 对于6的制备, 向含NAG-胺5 (4g, 9.15mmol) 的DCM (50mL) 添加琥珀酸酐 (966mg, 9.65mmol) 的DCM (30mL) 溶液, 然后添加Et₃N (1.964mL, 14mmol)。1小时后, 浓缩并真空干燥该反应混合物。所述产物在柱上纯化, 洗脱剂梯度为含MeOH (5-7%) 的CHCl₃。产量3.1g (63%)。MS: 535.3 [M+1]⁺; 330.3 [去糖基化产物]⁺。

[0254] b) 有易去除甲硅烷基醚保护基团的NAG衍生物通过在含三乙胺的水性甲醇混合物中对4进行O-脱乙酰化, 然后用三烷基氯硅烷处理来制备。

[0255] i) NAG-L¹-OH 10a, b. 10a: R¹=OTES和OTBDMS, R²=OH, R³=OTES; 10b: R¹=R³=OTBDMS, R²=OH。

[0256] NAG 8a, b的制备。

[0257]

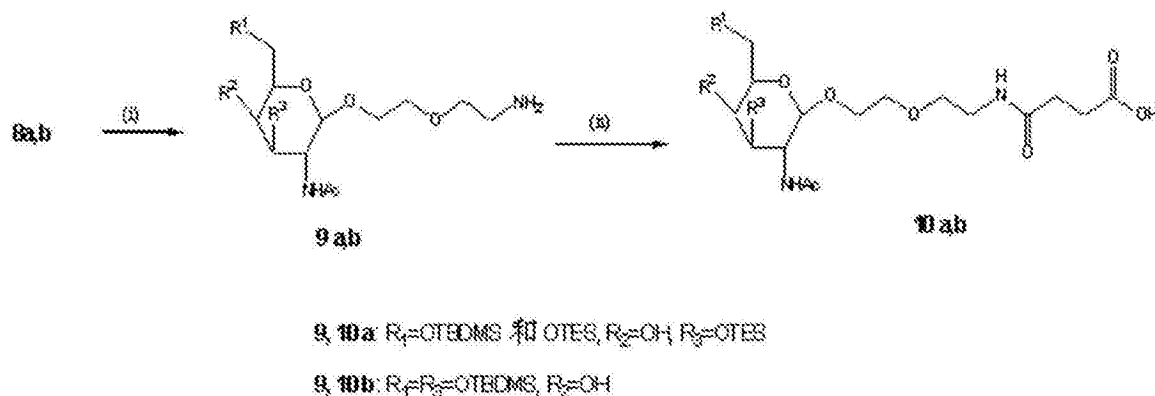


[0258] 条件: (i) Et_3N 、 MeOH 、 H_2O (5:7:6) 10小时。(ii) TBDMSCl (1当量)、咪唑, 1小时, 随后 TESCl (3当量), 在 DMF 内10小时。(iii) TBDMSCl (3当量), 咪唑, 在 DMF 内10小时。

[0259] NAG衍生物7。

[0260] 10a,b的制备。

[0261]



[0262] 条件: (i) H_2 、 Pd/C (10%)、 THF 。(ii) 珀酸酐、 Et_3N 、 DCM , 1小时。

[0263] 对于7的制备, NAG 4 (2g, 3.52mmol) 通过在 MeOH (10mL)、 H_2O (32mL) 和 Et_3N (25mL) 溶液中搅拌10小时来O-去乙酰化。在旋转蒸发仪上40℃去除所有挥发物, 通过从所述反应混合物两次蒸发甲苯来干燥残留物。在后续步骤中直接使用产物7。MS: 544.3 $[\text{M} + \text{Et}_3\text{N} + 1]^+$; 443.7 $[\text{M} + 1]^+$; 204 [去糖基化产物] $^+$ 。

[0264] 对于8a的制备, 用咪唑 (718mg, 10.54mmol) 和 TBDMSCl (265mg, 1.76mmol) 处理含产物7 (1.76mmol) 的 DMF (15mL), 搅拌2小时, 然后冷却反应混合物至0℃。添加 TESCl (531mg, 3.52mmol), 搅拌10小时, 浓缩并真空干燥。所述残留物吸收于 EtOAc (110mL) 和 H_2O (30mL) 的混合物中。分离有机层, 冷却至5℃, 用柠檬酸 (5%)、 H_2O 、 NaHCO_3 清洗, 并干燥 (Na_2SO_4)。使粗产物过柱 (洗脱剂为含2% MeOH 的 CHCl_3) 以获得 TBDMS 和 TES 双Si保护的NAG衍生物8a的混合物。产量575mg (49%)。MS: 672.0 $[\text{M} + 1]^+$; 432.5 [去糖基化产物] $^+$ 。

[0265] 对于8b的制备, 使含7 (1.76mmol) 的 DMF (15mL) 溶液与咪唑 (718mg, 10.56mmol) 和

TBDMSCl (1.061g, 7mmol) 搅拌10小时。如上文就制备8a所述处理反应混合物。柱纯化后的产量为767mg (65%)。M: 672.0 [M+1]⁺; 432.7 [去糖基化产物]⁺。

[0266] 产物10a按照下文就10b所述方法制备为TBDMS和TES双Si保护的NAG衍生物的混合物。

[0267] 对于10b的制备, 在Pc/C 10% (150mg) 存在下于1个大气压下在THF (20mL) 内氢化化合物8b (920mg, 1.37mmol) 10小时。通过硅藻土滤出催化剂, 浓缩所述产物9b并真空干燥。

[0268] 所述NAG-胺9b无需额外纯化即溶于DCM (12mL), 添加含琥珀酸酐溶液 (140mg, 1.40mmol) 的DCM (7mL), 然后添加Et₃N (0.236mL, 1.676mmol) 并搅拌2小时。

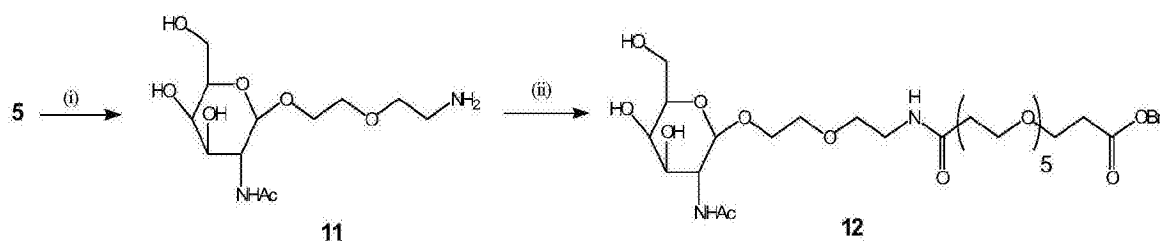
[0269] 在旋转蒸发仪上去除溶剂, 产物在柱上纯化, 洗脱剂为含1% AcOH、10% MeOH的CHCl₃。产量614mg (72%)。

[0270] i) NAG-L²-OH 13。R¹=R³=OTBDMS, R²=OH。NAG衍生物含有较长PEG间隔子。

[0271] 对于含较长PEG间隔子的类似物, 前体5首先进行乙酰基脱保护以生成11 (Et₃N、MeOH、H₂O (5:7:6) 10小时)。然后, 用双dPEG₅半苄基半NHS酯 (Quanta产品号#10237) 酰化11以生成苄酯12 (NHS-PEG₅-CO₂Bn、Et₃N、DCM)。然后用TBDMSCl (TBDMSCl (3当量), 咪唑, DMF中10小时) 使12双甲硅烷基化, 并通过氢化反应 (H₂, Pd/C (10%), THF) 去苄基化以生成酸13。

[0272] NAG-衍生物12的制备。

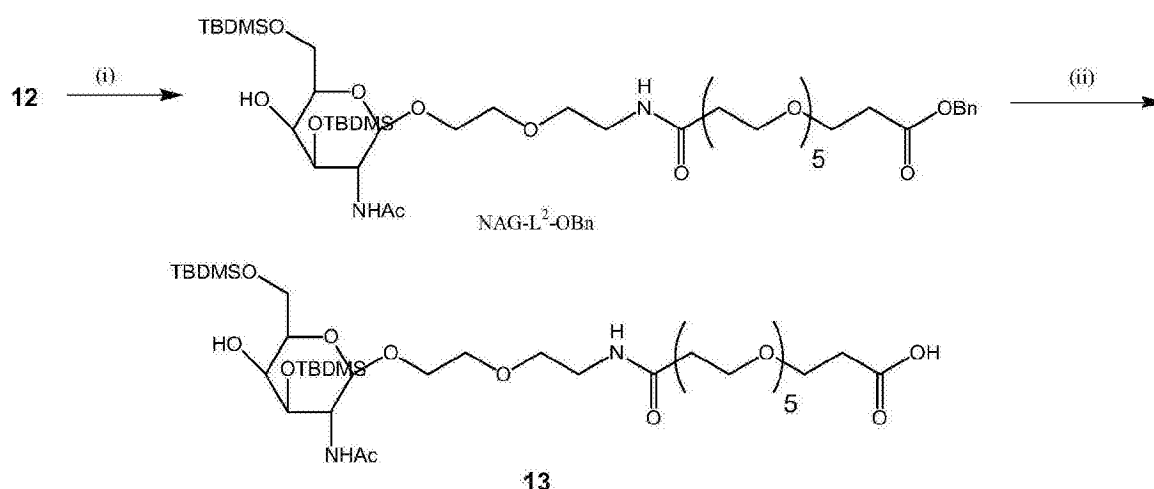
[0273]



[0274] 条件: (i) Et₃N、MeOH、H₂O (5:7:6) 10小时。(ii) NHS-PEG₅-CO₂Bn、Et₃N、DCM。

[0275] NAG-L²-OH 13的制备。

[0276]



[0277] 条件: TBDMSCl (3当量), 咪唑, DMF内10小时。(vi) H₂, Pd/C (10%), THF。

[0278] NAG-PEG₈-SA苄酯12。对于NAG-胺11的制备, 如就前体7 (8a, b的方法) 所述使NAG-胺5 (0.381mmol) 发生O-脱乙酰。产物11在旋转蒸发仪上通过两次蒸发甲苯干燥, 并溶于DMF

(25mL)。向反应混合物添加双-dPEG₅半苄基半NHS酯(200mg, 0.381mmol), 然后添加DIEA(0.079mL, 0.457mmol), 搅拌8小时, 并在旋转蒸发仪上以40℃/油泵真空泵浓缩。粗产物12无需额外纯化即可用于下一步骤。MS: 719.4[M+1]⁺; 516.4[去糖基化产物]⁺。

[0279] 对于NAG-L²-OBn的制备, 干燥产物12溶于DMF(5mL), 用TBDMSCl(230mg, 1.524mmol)然后咪唑(156mg, 2.29mmol)处理。搅拌所述反应混合物10小时, 在旋转蒸发仪上以40℃/油泵真空去除所有挥发物, 然后所述残留物吸收于EtOAc(85mL), 并用HCl(1%)、H₂O清洗。合并水且用EtOAc反萃取。合并的有机溶液进行干燥(Na₂SO₄), 浓缩并在柱上纯化, 洗脱梯度为含MeOH(3-6%)的CHCl₃。苄酯产量291mg(80%)。MS: 965.3[M+NH₄]⁺; 948.0[M+1]⁺; 516.4[去糖基化产物]⁺。

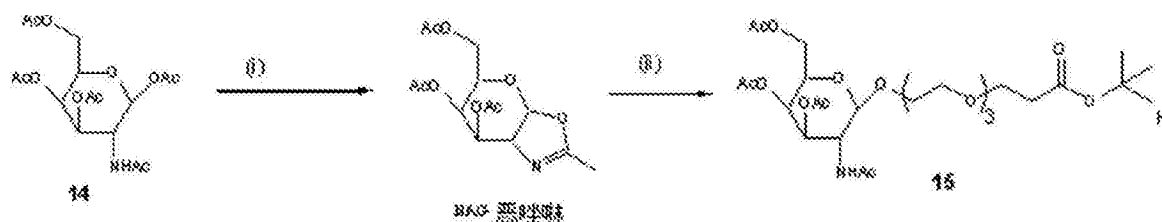
[0280] 对于NAG-L²-OH 13的制备, 酯NAG-L²-OBn按就9b(10b方法)所述进行氢化。产率98%。MS: 858.0[M+1]⁺; 426.1[去糖基化产物]⁺。该产物无需额外纯化即可使用。

[0281] iii) NAG-L³-OH 17。R¹=R³=OTBDMS, R²=OH。NAG衍生物含较长PEG间隔子。

[0282] 制备17是通过用PEG₄单-tBu酯(TMSOTf、DCE/HO-PEG₄-CO₂tBu、SnCl₄、DCM)使五乙酸酯14[3-5]糖基化以产生15。水解15(HCO₂H, 10小时)以获得酸16, 然后使酸16O-脱乙酰化(Et₃N、MeOH、H₂O(5:7:6) 10h), 然后用TBDMSCl(TBDMSCl(3当量), 咪唑, DMF中10小时)处理以获得双甲硅烷基化的NAG-酸17。

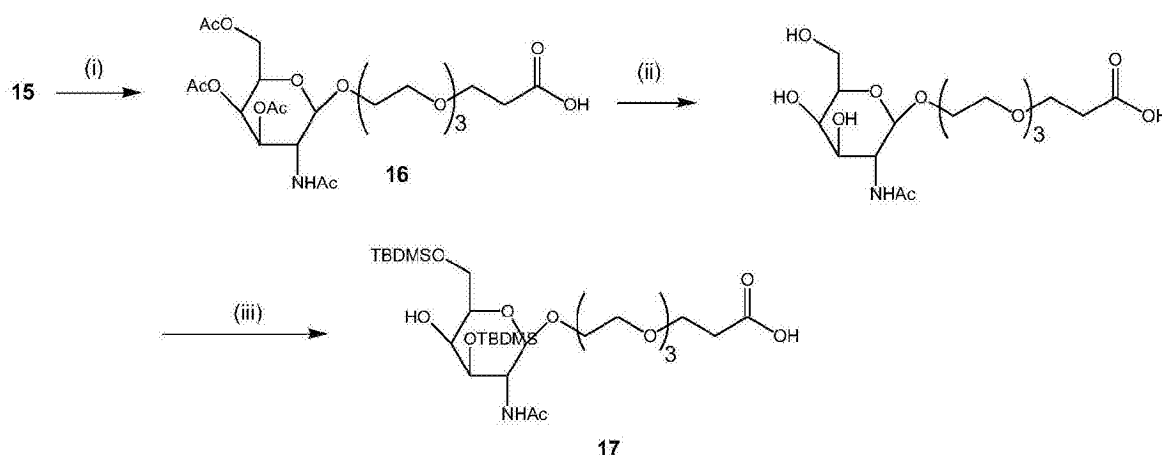
[0283] 酯NAG(OAc)₃-L³-O-tBu 15的制备。

[0284]



[0285] 条件: (i) 三甲硅基三氟甲磺酸酯(TMSOTf), 二氯乙烷(DCE)。(ii) 12-羟基-4,7,10-三氧杂十二酸叔丁酯(HO-PEG₄-CO₂tBu), SnCl₄, 二氯甲烷(DCM)。

[0286]



[0287] 条件: (i) HCO₂H, 10小时。(ii) Et₃N、MeOH、H₂O(5:7:6) 10小时。(iii) TBDMSCl(3当量), 咪唑, DMF内10小时。

[0288] 对于酯NAG(OAc)₃-L³-O-tBu 15, 通过两次甲苯蒸发来干燥半乳糖胺14的五乙酰衍

生物(10g, 25.64mmol)。所得白色玻璃用含TMSTf(5.18mL, 28.6mmol)的DCE(223mL)处理, 60℃搅拌16小时。使反应混合物冷却至0℃, 用TEA(2.6mL)淬灭, 用CHCl₃(300mL)稀释并用NaHCO₃溶液和盐水洗涤两次。分离的有机溶液用MgSO₄处理, 浓缩并真空干燥。所述粗恶唑啉衍生物无需额外纯化即可使用。产量8.14g(96%)。MS: 368.1[M+K]⁺; 352.2[M+Na]⁺; 330.2[M+1]⁺。

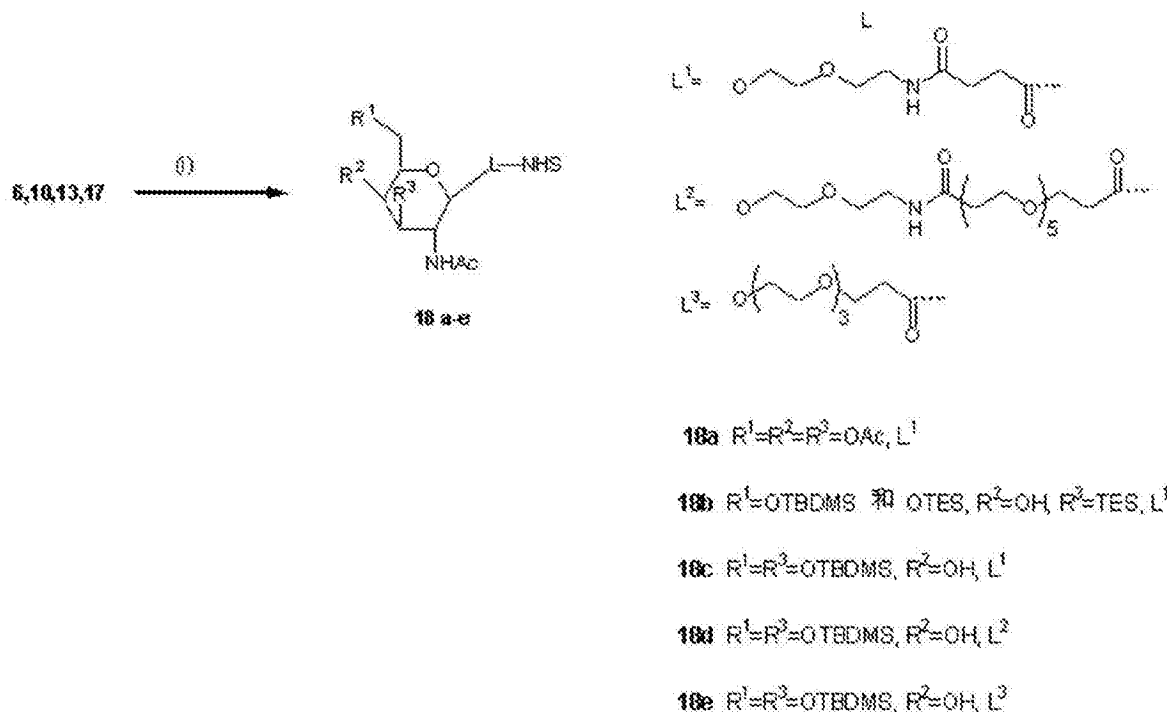
[0289] 向含恶唑啉衍生物(5.28g, 16mmol)、12-羟基-4,7,10-三氧杂十二酸叔丁酯(5.12g, 18.4mmol)和CaSO₄(20g)的DCM(270mL)搅拌混合物逐滴添加SnCl₄(0.84mL, 0.84mmol)。搅拌该溶液16小时, 过滤, 用CHCl₃(250mL)稀释, 用NaHCO₃溶液和盐水洗涤两次。产物用MgSO₄干燥, 并浓缩。所述粗制品在柱上纯化, 洗脱剂梯度为含MeOH(0-7%)的乙酸乙酯。产量4.83g(50%)。MS: 630.8[M+Na]⁺; 625.5[M+NH₄]⁺; 608.4[M+1]⁺; 552.6[M-t-Bu+1]⁺; 330.2[去糖基化产物]⁺。

[0290] 对于NAG(OAc)₃-L³-OH 16, 叔丁酯15(1.99g, 3.27mmol)在纯甲酸(54mL)中搅拌16小时, 真空去除所有挥发物, 然后三次甲苯蒸发。产物用真空油泵干燥2小时, 无需额外纯化即可使用。产量1.77g(98%)。MS: 330.2[去糖基化产物]⁺; 590.4[M+K]⁺; 574.6[M+Na]⁺; 569.6[M+NH₄]⁺; 552.6[M+1]⁺。

[0291] 对于NAG(R¹, R², R³)-L³-OH 17(R¹=R³=OTBDMS, R²=OH), 使产物16O-脱乙酰化, 用TBDMSCl处理(按8b制备方法), 并在柱上纯化, 洗脱剂为含3%MeOH、0.5%AcOH的CHCl₃。产率18%。MS: 1228.7[M+1]⁺, 796.7[去糖基化产物]⁺。

[0292] 所有五种获得的酸6, 10a, b, 13, 17在与NHS和DCC(NHS、DCC、DCM, 10小时)的反应中转化成NHS酯18a-e。

[0293]



[0294] 条件: (i) NHS, DCC, DCM, 10小时。

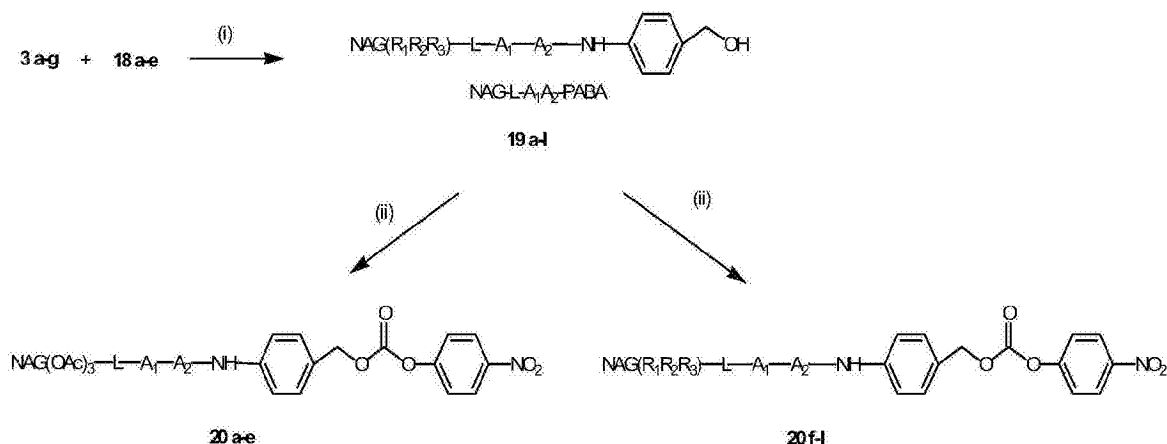
[0295] 对于NAG-L-NHS 18a-e的制备, 使用下文就18c所述的方法。对于产物18c, 用DCC(219mg, 1.061mmol)处理含10b(614mg, 0.964mmol)和NHS(122mg, 1.061mmol)的DCM(15mL)

冰冷溶液,在冰上搅拌30分钟,在20℃持续8小时。反应混合物冷却至0℃,滤出DCU,浓缩残留物并真空干燥。所述粗产物溶于DMF以制得0.05M溶液,其无需额外纯化即可使用。

[0296] 产物18b-e如就18a所述制备。

[0297] c) 20a-1的形成,用羟基保护的NAG-衍生物18a-e的NHS酯使3a-h酰化(DIEA,DMF,5-10h)以提供19a-1。然后用5当量的双(对硝基苯基)碳酸酯处理产物19a-1((PNP)₂CO)((PNP)₂CO、二噁烷或DCM,40-50℃,15-24h)以产生O-乙酰基保护的PNP碳酸酯衍生物20a-1。产物20a-e直接用于肽修饰。修饰后在用TFA和Et₃N连续处理DPC过程中从氨基酸脱去乙酰基团和保护基团2PhIPr、DMCP、MMT。

[0298]



[0299] 条件:(i) DIEA、DMF,5-10小时。(ii) (PNP)₂CO、二噁烷或DCM,25-60℃,16-48小时。

[0300] NAG(R¹R²R³)-L-AA-PABA 19a-1。

[0301] 对于产物19a(R¹=R²=R³=OAc,L=L¹,AA=GlyGly),用0.1M 3a(0.282mmol)的DMF和DIEA(59μL,0.338mmol)溶液处理含NAG-NHS酯18a的DMF溶液(0.05M)(0.282mmol)。3小时内,在旋转蒸发仪上以40℃/油泵真空去除所有挥发物,用Et₂O研磨并在柱上纯化,洗脱剂梯度:EtOAc:CHCl₃:MeOH=8:7:5~8:7:6。产量114mg(53%)。MS:754.4[M+1]⁺。

[0302] 产物19b(R¹=R²=R³=OAc,L=L¹,AA=Glu(2PhIPr)Gly)如就19a所述制备,并在柱上纯化,洗脱剂EtOAc:CHCl₃:MeOH=8:7:3。产率64%。MS:944.5[M+1]⁺。

[0303] 对于产物19c(R¹=R²=R³=OAc,L=L¹AA=Asn(DMCP)Gly),向含3c(0.43mmol)和DIEA(83μL,0.476mmol)的DMF(2.15mL)溶液添加含18a(0.43mmol)的DMF(2.15mL)溶液。搅拌所述混合物16小时,过滤并在旋转蒸发仪上以40℃/油泵真空去除所有挥发物。所述粗产物用Et₂O研磨并在柱上纯化,洗脱剂CHCl₃:丙酮:MeOH(5:5:1)。产量242mg(62%)。MS:915.3[M+Na]⁺;910.6[M+NH₄]⁺;893.6[M+1]⁺。

[0304] 产物19d(R¹=R²=R³=OAc,L=L¹AA=PheLys(MMT))如就19a所述制备,在柱上纯化,洗脱剂为含MeOH(5-6%)的CHCl₃。产率56%。MS:1187.9[M+1]⁺。

[0305] 对于产物19e(R¹=R²=R³=OAc,L=L¹,AA=PheCit),向含3e(0.57mmol)和DIEA(119μL,0.684mmol)的DMF(3mL)溶液添加含18a(0.57mmol)的DMF(3mL)溶液。搅拌所述混合物16小时,过滤并在旋转蒸发仪上以40℃/油泵真空去除所有挥发物。粗产物由CHCl₃:MeOH(5mL)沉淀入Et₂O(45mL),不需额外纯化即可使用。产量392mg(73%)。MS:966.8[M+Na]⁺;944.7[M+1]⁺;926.8[M-H₂O]⁺;821.5[M-PABA+1]⁺;615.6[M-NAcGal+1]⁺;492.3[M-PABA-

NACGal+1]⁺。

[0306] 产物19f ($R^1=R^3=OTBDMS, R^2=OH, L=L^1, AA=AlaCit$) 如19e所述制备, 无需额外纯化即可使用。产率50%。MS: 993.2[M+Na]⁺; 971.0[M+1]⁺; 539.6[去糖基化产物]⁺。

[0307] 产物19g ($R^1=R^3=OTBDMS, R^2=OH, L=L^1, AA=ValCit$) 如就19f所述制备, 无需额外纯化即可用于下一步骤。产率67%: 998.9[M+1]⁺。

[0308] 产物19h ($R^1=R^3=OTBDMS, R^2=OH, L=L^1, AA=Glu(2PhiPr)Gly$) 如就19a所述制备, 并在柱上纯化, 洗脱剂为含NH₄OH 3%和MeOH 7.5%的DCM溶液。产率15%。MS: 1047.2[M+1]⁺, 615.7, 432.6[去糖基化产物]⁺。

[0309] 产物19i ($R^1=R^3=OTBDMS, R^2=OH, L=L^1, AA=PheCit$) 如制备19e所述制备, 无需额外纯化即可使用。产率为50%。MS: 1068.7[M+Na]⁺; 1047.3[M+1]⁺; 615.4[去糖基化产物]⁺; 432.5[去糖基化产物]⁺。

[0310] 产物19j ($R^1=OTBDMS$ 和 $OTES, R^2=OH, R^3=OTES, L=L^1, AA=PheCit$) 如就制备19e所述从3e和18b制备为C-3和C-60-TBDMS及O-TES保护的NAG衍生物的混合物形式, 且无需额外纯化即可用于下一步骤。产率76%。MS: 1047.4[M+1]⁺, 615.8[去糖基化产物]⁺。

[0311] 产物19k ($R^1=R^3=OTBDMS, R^2=OH, L=L^2, AA=PheCit$) 如就19e所述制备, 无需额外纯化即可用于下一步骤。产率67%。1268.2[M+1]⁺; 835.9[去糖基化产物]⁺。

[0312] 产物19l ($R^1=R^3=OTBDMS, R^2=OH, L=L^3, AA=PheCit$) 如就19e所述制备, 在柱上纯化, 洗脱剂为含5%MeOH的CHCl₃溶液。产率60%。MS: 1064.0[M+1]⁺; 632.7[去糖基化产物]⁺。

[0313] NAG-AA-PABC-PNP 20a-1

[0314] 对于产物20a ($R^1=R^2=R^3=OAc, L=L^1, AA=GlyGly$), 含19a (100mg, 0.132mmol)、(PNP)₂CO (202mg, 0.663mmol) 和DIEA (0.07mL, 0.396mmol) 的二噁烷 (5mL) 混悬液在40℃避光搅拌8小时。添加另一部分 (PNP)₂CO (121mg, 0.397mmol) 和DIEA (0.04mL, 0.226mmol) 并再在40℃持续搅拌8小时。在旋转蒸发仪上去除所有挥发物, 所述产物在柱上纯化, 洗脱剂: CHCl₃:EtOAc:MeOH=7:8:3。产量84mg (69%)。

[0315] 对于产物20b ($R^1=R^2=R^3=OAc, L=L^1, AA=Glu(2PhiPr)Gly$), 含19b (160mg, 0.169mmol)、(PNP)₂CO (258mg, 0.847mmol) 和DIEA (0.09mL, 0.507mmol) 的DCM (10mL) 溶液避光搅拌10小时, 在旋转蒸发仪上浓缩, 所述产物在柱上纯化, 洗脱剂: 含5-6%MeOH的CHCl₃溶液。产量174mg (92%)。

[0316] 对于产物20c ($R^1=R^2=R^3=OAc, L=L^1, AA=Asn(DMCP)Gly$), 含19c (127mg, 0.142mmol)、(PNP)₂CO (216mg, 0.710mmol) 和DIEA (74μL, 0.426mmol) 的DCM (5mL) 溶液避光搅拌16小时, 在旋转蒸发仪上浓缩, 所述产物在柱上纯化, 洗脱剂: CHCl₃:EtOAc:MeOH (7:2.2:0.8)。产量110.6mg (74%)。MS: 1080.9[M+Na]⁺; 1058.7[M+1]⁺。

[0317] 产物20d ($R^1=R^2=R^3=OAc, L=L^1, AA=PheLys(MMT)$) 如就20b所述制备, 并在柱上纯化, 洗脱剂: CHCl₃:EtOAc:MeOH=9:7:1。产量76mg (47%)。

[0318] 对于产物20e ($R^1=R^2=R^3=OAc, L=L^1, AA=PheCit$), 含19e (164mg, 0.173mmol)、(PNP)₂CO (528mg, 1.73mmol) 和DIEA (182μL, 1.04mmol) 的二噁烷 (17mL) 溶液在60℃避光搅拌16小时, 并在旋转蒸发仪上去除所有挥发物。残留DIEA通过在旋转蒸发仪上以40℃/油泵真空进行两次连续DMF蒸发去除, 所述产物在柱上纯化, 洗脱剂: CHCl₃:EtOAc:MeOH (8:1.5:

0.5), 随后CHCl₃:MeOH (7:1)。产量85mg (44%)。MS: 1132.0 [M+Na]⁺; 1110.1 [M+1]⁺; 780.8 [去糖基化产物]⁺。

[0319] 产物20f (R¹=R³=OTBDMS, R²=OH, L=L¹, AA=AlaCit) 如就20e所述制备, 并在柱上纯化, 洗脱剂: CHCl₃:EtOAc:MeOH=9:10:1。产量153mg (36%)。

[0320] 产物20g (R¹=R³=OTBDMS, R²=OH, L=L¹, AA=ValCit) 如就20e所述制备, 并在柱上纯化, 洗脱剂: CHCl₃:EtOAc:MeOH=16:3:1。产率44%。MS: 1164.5 [M+1]⁺。

[0321] 产物20h (R¹=R³=OTBDMS, R²=OH, L=L¹, AA=Glu (2PhiPr) Gly) 如就20b所述制备, 并在柱上纯化, 洗脱剂: CHCl₃:EtOAc:MeOH=8:7:1。产率77%。

[0322] 对于产物20i (R¹=R³=OTBDMS, R²=OH, L=L¹, AA=PheCit), 含19i (316mg, 0.297mmol)、(PNP)₂CO (913mg, 2.97mmol) 和DIEA (310μL, 1.78mmol) 的二噁烷 (7mL) 溶液在65℃避光搅拌40小时, 并在旋转蒸发仪上去除所有挥发物。残留DIEA通过在旋转蒸发仪上以40℃/油泵真空进行两次连续DMF蒸发去除, 所述产物在柱上纯化, 洗脱剂: CHCl₃:EtOAc:MeOH (8:1.5:0.5), 随后CHCl₃:MeOH (92:08)。产量297mg (81%)。MS: 1246.7 [M+NH₄]⁺; 1228.7 [M+1]⁺; 797.6 [去糖基化产物]⁺; 432.7 [去糖基化产物]⁺。

[0323] 产物20j (R¹=OTBDMS和OTES, R²=OH, R³=OTES, L=L¹, AA=PheCit) 如就20e所述制备为C-3和C-60-TBDMS及O-TES保护的NAG衍生物的混合物形式, 并在柱上纯化, 洗脱剂: CHCl₃:EtOAc:MeOH=16:3:1, 随后是含10% MeOH的CHCl₃。产率50%。MS: 1212.0 [M+1]⁺, 480.0 [去糖基化产物]⁺。

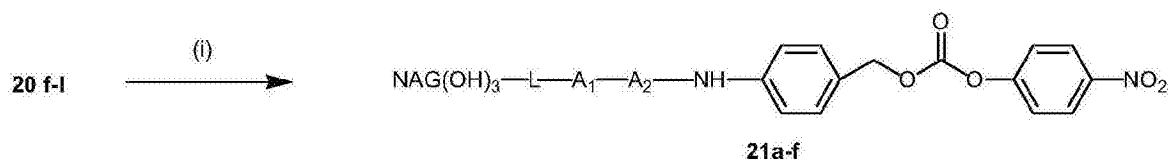
[0324] 产物20k (R¹=R³=OTBDMS, R²=OH, L=L², AA=PheCit) 如就20e所述制备, 在柱上纯化, 洗脱剂: 含MeOH (8-10%) 的CHCl₃。产率85%。产物直接用于下一步骤。

[0325] 对于产物20l (R¹=R³=OTBDMS, R²=OH, L=L³, AA=PheCit), 含19l (316mg, 297mmol)、(PNP)₂CO (912mg, 3mmol) 和DIEA (0.31mL, 1.78mmol) 的二噁烷 (8mL) 溶液在氩气氛下于60℃避光搅拌48小时。在旋转蒸发仪上去除所有挥发物, 所述产物在柱上纯化, 洗脱剂: CHCl₃:EtOAc:MeOH=16:3:1。产量297mg (81%)。

[0326] NAG-L-AA-PABC-PNP 21a-f (R¹=R²=R³=OH), 对20f-1去保护

[0327] 21a-f的形成。对于碱敏感聚丙烯酸酯的修饰, 在连接聚合物之前通过用TFA:H₂O=3:1混合物处理20f-1 (TFA/H₂O=3:1, 5℃, 2-3小时) 来去除NAG和二肽AA上的保护基团, 以提供NAG-二肽掩蔽试剂21a-f。

[0328]



[0329] 条件: TFA/H₂O=3:1, 5℃, 2-3小时

[0330] 对于产物21a (AA=AlaCit, L=L¹), 化合物20f (150mg, 0.132mmol) 在冰冷TFA:H₂O=3:1溶液 (2mL) 中搅拌4小时, 并逐滴添加至搅拌中的Et₂O (20mL)。分离沉淀物, 通过在旋转蒸发仪/30℃上蒸发甲苯来干燥, 然后真空干燥。产量112mg (94%)。MS: 907.2 [M+1]⁺; 704.4 [去糖基化产物]⁺。

[0331] 对于产物21b (AA=ValCit, L=L¹), 化合物20g (305mg, 0.26mmol) 在冰冷TFA:H₂O=

3:1溶液 (5mL) 中搅拌1小时,然后逐滴添加至搅拌中的Et₂O (45mL)。分离固体产物,通过在旋转蒸发仪/30℃上蒸发甲苯来干燥,然后真空干燥。产量193mg (79%)。MS:935.8[M+1]⁺, 732.7[去糖基化产物]⁺。

[0332] 产物21c (AA=GluGly, L=L¹) 如就21b所述制备。产量55mg (98%)。MS:865.5[M+1]⁺, 662.3[去糖基化产物]⁺。

[0333] 产物21d (AA=PheCit, L=L¹) 如就21b所述制备。MS:983.7[M+1]⁺, 780.9[去糖基化产物]⁺。

[0334] 对于产物21e (AA=PheCit, L=L²), 化合物20k在就21b所述条件下于冰冷TFA:H₂O = 3:1溶液 (5mL) 中搅拌1.5小时。从19k计算产率为25%。MS:1203.9[M+1]⁺, 1001.0[去糖基化产物]⁺。

[0335] 产物21f (AA=PheCit, L=L³) 采用在就21b所述条件下的3小时去保护从20i制备。产率75%。MS:1203.9[M+1]⁺, 1001.0[去糖基化产物]⁺。

[0336] 表2. 中间体NAG-L-AA-PABA (19) 和NAG-L-AA_PABC (20)

[0337]

化合物	A ₁	A ₂	L	R ₁	R ₂	R ₃
19a	Gly	Gly	L ₁	OAc	OAc	OAc
19b	Glu(2PhiPr)	Gly	L ₁	OAc	OAc	OAc
19c	Asn(DMCP)	Gly	L ₁	OAc	OAc	OAc
19d	Phe	Lys(MMT)	L ₁	OAc	OAc	OAc
19e	Phe	Cit	L ₁	OAc	OAc	OAc
19, 20f	Ala	Cit	L ₁	OTBDMS	OH	OTBDMS
19, 20g	Val	Cit	L ₁	OTBDMS	OH	OTBDMS
19, 20h	Glu(2PhiPr)	Gly	L ₁	OTBDMS	OH	OTBDMS
19, 20i	Phe	Cit	L ₁	OTBDMS	OH	OTBDMS
19, 20j	Phe	Cit	L ₁	OTBDMS, TES	OH	OTES
19, 20k	Phe	Cit	L ₂	OTBDMS	OH	OTBDMS
19, 20l	Phe	Cit	L ₃	OTBDMS	OH	OTBDMS

[0338] 表3. 用于DPC制备的终NAG-L-A₁A₂-PABC (20, 21)

[0339]

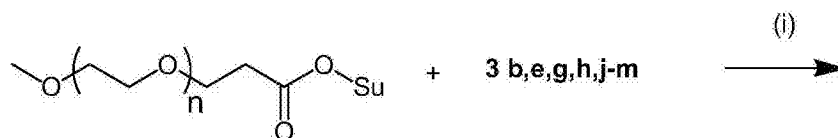
化合物	A ₁	A ₂	L
20a	Gly	Gly	L ₁
20b	Glu	Gly	L ₁
20c	Asn	Gly	L ₁
20d	Phe	Lys	L ₁

20e	Phe	Cit	L ₁
21a	Ala	Cit	L ₁
21b	Val	Cit	L ₁
21c	Glu	Gly	L ₁
21d	Phe	Cit	L ₁
21e	Phe	Cit	L ₂
21f	Phe	Cit	L ₃

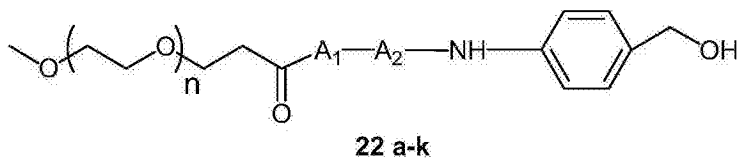
[0340] 蛋白酶可切割的PEG-掩蔽试剂的制备。

[0341] 用PEG-酸的NHS酯使H-AA-PABA 3b,e,g,h,j,k-m中的任何氨基基团酰化(DIEA, DMF, 5-10h)以产生22a-k。然后,产物22a-k中的羟基基团转化成对硝基苯基碳酸酯(PNP)₂CO、二噁烷或THF, 40-60℃, 10h)以产生23a-k。对于23a,d,g,通过用水性TFA处理从Asn和Glu去除保护基团(TFA/H₂O=3:1, 5℃, 2-3小时)以获得所需产物24a-c。(通过将23a,d,g转变成24a,d,g能保持一致性吗?)而且,就NAG和PEG形式之间的各字母而言氨基酸之间有一致性吗?

[0342] PEG_n-AA-PABA 22a-k的制备。



[0343]



PEG-AA(Prot)-PABA

[0344] 条件:(i) DIEA、DMF, 5-10小时。

[0345] 产物22a (n=11, AA=GluGly)。含0.1M 3b的DMF (3.5mL, 0.35mmol) 溶液与PEG₁₁-NHS酯 (240mg, 0.35mmol) 和DIEA (0.061mL, 0.35mmol) 搅拌10小时。在旋转蒸发仪上以40℃/油泵去除所有挥发物,所述产物在柱上纯化,洗脱剂:CHCl₃:MeOH:AcOH=38:2:1。产量274mg (78%)。MS:1015.6 [M+NH₄]⁺, 998.7 [M+1]⁺。

[0346] 产物22b (n=11, AA=PheCit)。向含3e (0.88mmol) 和DIEA (167μL, 0.96mmol) 的DMF (3mL) 溶液添加含PEG₁₁-NHS酯 (0.80mmol) 的DMF (3mL) 溶液。搅拌所述混合物16小时,过滤并在旋转蒸发仪上以40℃/油泵真空去除所有挥发物。粗产物由CHCl₃:MeOH (5mL) 沉淀入Et₂O (45mL),然后在柱上纯化,洗脱剂梯度为含MeOH (10-16%) 的CHCl₃。产量420mg (53%)。MS: 1015.9 [M+H₂O]⁺; 998.8 [M+1]⁺; 981.1 [M-H₂O]⁺。

[0347] 产物22c (n=11, AA=ValCit)。产物22f如就22a所述从粗产物3g (获自300mg, 0.5mmol的2g)、PEG₁₁-NHS酯 (298mg, 0.435mmol) 和DIEA (0.09mL, 0.522mmol) 制备。在旋转蒸发仪上以40℃/油泵浓缩之后,所述产物悬浮在MeOH:DCM=1:1的混合物 (6mL) 中,超声处理,过滤并在Et₂O (50mL) 中沉淀。分离所述固体并重复所述步骤一遍。真空去除残留溶剂。

产量283mg (60%)。MS:951.5[M+1]⁺。

[0348] 产物22d (n=11, AA=AlaAsn (DMCP))。向含3h (0.56mmol) 和DIEA (116μL, 0.67mmol) 的DMF (3mL) 溶液添加含PEG₁₁-NHS酯 (0.56mmol) 的DMF (3mL) 溶液。搅拌所述混合物16小时, 过滤并在旋转蒸发仪上以40℃/油泵真空去除所有挥发物。残留物溶于CHCl₃:MeOH=1:1的混合物 (5mL) 中, 并在冷 (0℃) Et₂O (45mL) 中沉淀。所述固体在柱上纯化, 洗脱剂梯度为含MeOH (3-14%) 的DCM。产量261mg (49%)。MS:983.7[M+Na]⁺; 979.1[M+NH₄]⁺; 961.8[M+1]⁺; 943.9[M-H₂O+1]⁺。

[0349] 产物22e (n=11, AA=PheLys (Me₂))。产物22e如就22a所述制备。纯化使用HPLC柱 Nucleodur C-18, 250×4.6完成, 洗脱剂ACN-H₂O (0.1% TFA), 倾斜梯度15-30%。MS:998.1[M+1]⁺。分离的产物在Dowex 1×8树脂上去盐, 洗脱剂H₂O。产率40%。

[0350] 产物22f (n=11, AA=Leu)。产物22f如就22a所述制备, 并在柱上纯化, 洗脱剂: CHCl₃:EtOAc:MeOH:AcOH=9:7:2:0.04。产率48%。MS:824.9[M+NH₄]⁺。

[0351] 产物22g (n=11, AA=Asn (DMCP))。粗产物3k (获自419mg, 0.77mmol的2k)、PEG₁₁NHS酯 (200mg, 0.292mmol) 和DIEA (0.06mL, 0.35mmol) 在DCM (5mL) 中搅拌10小时。在旋转蒸发仪上去除溶剂, 在柱上纯化所述产物, 洗脱剂: CHCl₃:EtOAc:MeOH:AcOH=4.5:3.5:1:0.02。产量254mg (37%)。MS:891.1[M+1]⁺。

[0352] 产物22h (n=11 AA=Cit)。向含3l (0.50mmol) 和DIEA (104μL, 0.60mmol) 的DMF (2.5mL) 溶液添加含PEG₁₁-NHS酯 (0.50mmol) 的DMF (2.5mL) 溶液。搅拌所述混合物16小时, 过滤并在旋转蒸发仪上以40℃/油泵真空去除所有挥发物。残留物溶于CHCl₃:MeOH=1:1的混合物 (5mL) 中, 并在Et₂O (45mL) 中沉淀。再重复沉淀两次, 所述产物无需额外纯化即可使用。产量340mg (80%)。MS:869.4[M+NH₄]⁺; 851.9[M+1]⁺。

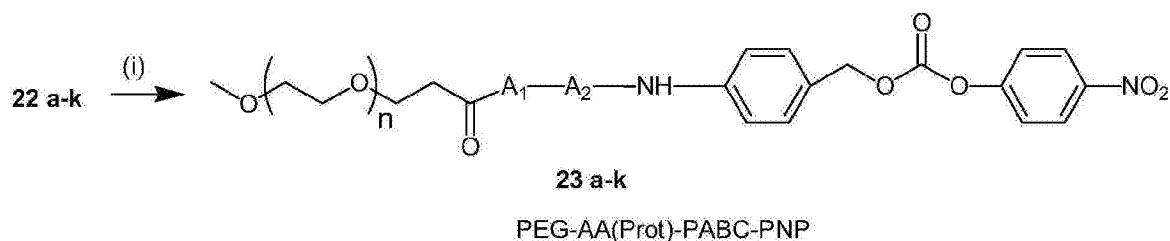
[0353] 产物22i (n=23, AA=PheCit)。向含3e (0.72mmol) 和DIEA (130μL, 0.74mmol) 的DMF (3mL) 溶液添加含PEG₁₁-NHS酯 (0.60mmol) 的DMF (3mL) 溶液。搅拌所述混合物16小时, 过滤并在旋转蒸发仪上以40℃/油泵真空去除所有挥发物。残留物溶于CHCl₃:MeOH=1:1的混合物 (5mL) 中, 并在Et₂O (45mL) 中沉淀。所述固体产物在柱上纯化, 洗脱剂梯度为含MeOH (7-12%) 的CHCl₃。产量487mg (53%)。MS:1555.2[M+Na]⁺; 1544.7[M+NH₄]⁺; 1527.7[M+1]⁺。

[0354] 产物22j (PEG平均MW 1000, AA=PheCit)。mPEG-1000-醇 (Fluka) (0.173g, 0.173mmol)、N,N-二琥珀酰亚胺基碳酸酯 (62mg, 0.242mmol) 和TEA (0.101mL, 0.726mmol) 的混合物在MeCN (1mL) 中搅拌16小时。在旋转蒸发仪上去除所有挥发物, 所述粗残留物溶于CHCl₃ (10mL) 中。有机层用H₂O (1mL, pH=5)、盐水依次洗涤, Na₂SO₄干燥, 并浓缩以获得PEG-1000-NHS碳酸酯。该产物与含3e (0.121mmol) 和DIEA (30μL, 0.173mmol) 的DMF (1mL) 搅拌16小时, 过滤, 并在旋转蒸发仪上以40℃/油泵真空去除所有挥发物。残留物溶于CHCl₃:MeOH=1:1的混合物 (5mL) 中, 并在Et₂O (45mL) 中沉淀。再重复沉淀两次, 所得产物无需额外纯化即可使用。产量134mg (79%)。

[0355] 产物22k (n=23, AA=ValCit)。向含3g (1.0mmol) 和DIEA (183μL, 1.04mmol) 的DMF (4mL) 溶液添加含PEG₂₃-NHS酯 (0.87mmol) 的DMF (4mL) 溶液。搅拌所述混合物16小时, 过滤并在旋转蒸发仪上以40℃/油泵真空去除所有挥发物。残留物溶于CHCl₃:MeOH=1:1的混合物 (5mL) 中, 并在Et₂O (45mL) 中沉淀。再重复沉淀两次, 所述产物无需额外纯化即可使用。产量1.0g (77%)。MS:1496.1[M+NH₄]⁺; 1479.3[M+1]⁺。

[0356] PEG-AA-PABC-PNP 23a-k

[0357]



[0358] 条件: (i) (PNP)₂CO, 二噁烷或THF, 40-60℃, 10小时。

[0359] 对于产物23a (n=11, AA=Glu (2PhiPr) Gly), 含产物22a (274mg, 0.274mmol) 的DCM (15mL) 与 (PNP)₂CO (418mg, 1.372mmol) 和DIEA (0.143mL, 0.823mmol) 避光搅拌15小时。在旋转蒸发仪上去除溶剂, 在柱上纯化所述产物, 洗脱剂为含4% MeOH, 0.2% AcOH的CHCl₃。产量260mg (81%)。MS: 1180.7 [M+NH₄]⁺。

[0360] 对于产物23b (n=11, AA=PheCit), 含22b (419mg, 0.42mmol)、(PNP)₂CO (766mg, 2.52mmol) 和DIEA (263μL, 1.52mmol) 的二噁烷 (4mL) 溶液在50℃避光搅拌15小时, 并在旋转蒸发仪上去除所有挥发物。残留DIEA通过在旋转蒸发仪上以40℃/油泵真空进行两次连续DMF蒸发来去除, 所述产物在柱上纯化, 洗脱剂: CHCl₃:EtOAc:MeOH (4.5:5:0.5), 随后CHCl₃:MeOH (9:1)。产量390mg (80%)。MS: 1181.2 [M+NH₄]⁺, 1164.2 [M+1]⁺。

[0361] 对于产物23c (n=11, AA=ValCit), 含22c (273mg, 0.287mmol)、(PNP)₂CO (874mg, 2.88mmol) 和DIEA (0.3mL, 1.72mmol) 的1,4-二噁烷 (22mL) 溶液在50℃避光搅拌24小时。在旋转蒸发仪上以40℃/油泵去除溶剂, 并在柱上纯化所述产物, 洗脱剂: CHCl₃:EtOAc:MeOH = 16:3:1 随后是含12-15% MeOH的CHCl₃。产量163mg (51%)。MS: 1116.0 [M+1]⁺。

[0362] 产物23d如就制备23b所述制备。在柱上纯化所述产物, 洗脱剂CHCl₃:EtOAc:MeOH (9:2:1)。产率77%。MS: 1144.0 [M+NH₄]⁺; 1127.3 [M+1]⁺。

[0363] 产物23e (n=11, AA=PheLys (Me)₂) 如就23a所述制备并在柱上纯化, 洗脱剂: 10% MeOH, 含0.2% AcOH的CHCl₃。产率63%。MS: 1163.1 [M+1]⁺。

[0364] 产物23f (n=11, AA=Leu) 如就23c所述制备, 仅使用5当量的 (PNP)₂CO和3当量的DIEA, 加热24小时应用。所述产物在柱上纯化, 洗脱剂梯度为含MeOH (7-12%) 的CHCl₃。产率75%。MS: 972 [M+1]⁺。

[0365] 产物23g (n=11, AA=Asn (DMCP)) 如就23f所述制备, 所述粗产物无需额外纯化即可用于后续步骤。MS: 1073.4 [M+18]⁺。

[0366] 对于产物23h (n=11, AA=Cit), 含22h (340mg, 0.40mmol)、(PNP)₂CO (608mg, 2.00mmol) 和DIEA (208μL, 1.20mmol) 的DCM (4mL) 溶液在30℃避光搅拌15小时, 并在旋转蒸发仪上去除所有挥发物。残留的DIEA通过在旋转蒸发仪上以40℃/油泵真空进行两次连续DMF蒸发来去除, 所述产物在柱上纯化, 洗脱剂: CHCl₃:EtOAc:MeOH (7:2.5:0.5), 随后是含MeOH (8-14%) 的CHCl₃梯度。产量390mg (80%)。MS: 1034.3 [M+NH₄]⁺; 1016.9 [M+1]⁺。

[0367] 产物23i (n=23, AA=PheCit) 如制备23b所述制备, 并在柱上纯化, 洗脱剂CHCl₃:EtOAc:MeOH (4.5:5:0.5), 随后是含MeOH (6-12%) 的CHCl₃梯度。产率为86%。MS: 1711.4 [M+NH₄]⁺; 1694.4 [M+1]⁺。

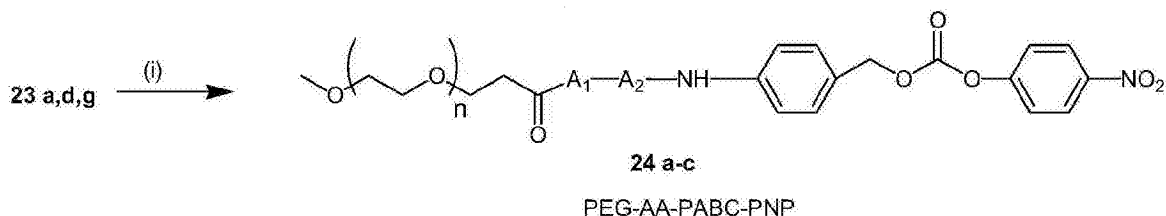
[0368] 产物23j (PEG 1000K AA=PheCit) 如制备23b所述制备, 并在柱上纯化, 洗脱剂

$\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}:\text{MeOH}$ (4.5:5:0.5), 随后是含 MeOH (6-12%) 的 CHCl_3 梯度。产率为72%。

[0369] 产物23k ($n=23$, AA=ValCit) 如制备23b所述制备, 并用HPLC纯化产物。柱: Luna (菲罗门公司 (Phenomenex)) 5u, C-8, 100A。流动相: $\text{ACN}-\text{H}_2\text{O}$ ($\text{F}_3\text{CO}_2\text{H}$ 0.01%), ACN 梯度30-37%, 31分钟。产量: 530mg (48%)。MS: 1666.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 1644.2 $[\text{M}+1]^+$ 。

[0370] PEG-AA-PABC-PNP 24a-c, AA去保护。

[0371]



[0372] 条件: (i) $\text{TFA}/\text{H}_2\text{O}=3:1$, 5°C , 2-3小时。

[0373] 产物24a ($n=11$, AA=GluGly)。产物23a (250mg, 0.215mmol) 在3% TFA的 CHCl_3 (16mL) 溶液中搅拌35分钟, 在旋转蒸发仪上浓缩并真空干燥。产量224mg (100%)。MS: 1062.6 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$; 1045.9 $[\text{M}+1]^+$ 。

[0374] 产物24b ($n=11$, AA=AlaAsn-PABC-PNP)。化合物23d在 $\text{TFA}:\text{DCM}$ (3:1) 的混合物中搅拌1.5小时, 在旋转蒸发仪上 20°C 去除所有挥发物。所述产物在柱上纯化, 洗脱剂梯度是含 MeOH (6-12%) 的 CHCl_3 。产率30%。MS: 1066.7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1062.0 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$; 1045.2 $[\text{M}+1]^+$ 。

[0375] 产物24c ($n=11$, AA=Asn)。装有23g (160mg, 0.143mmol) 的反应烧瓶冷冻至 0°C , 然后添加冷的 $\text{TFA}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1) (12.5mL) 混合物。所述混合物搅拌1.5小时, 并用冷 H_2O (50mL) 稀释。搅拌在 20°C 持续20分钟。滤出沉淀物并用 H_2O 冲洗。在旋转蒸发器上 40°C 去除所有挥发物, 在柱上纯化所述产物, 洗脱剂: $\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}:\text{MeOH}:\text{AcOH}=4.5:3.5:1.2:0.02$ 。产量43mg (30%)。MS: 974.0 $[\text{M}+1]^+$ 。

[0376] 表4. 用于DPC制备的终PEG-L- A_1A_2 -PABC

[0377]

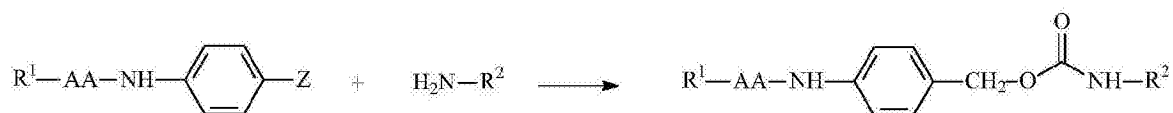
化合物		AA		尺寸
PEG _n -AA-PAB A	PEG _n -AA-(PNP)	A ¹	A ²	
22	23a	Glu(2PhiPr)	Gly	n = 11
22	23b	Phe	Cit	n = 11
22	23c	Val	Cit	n = 11
22	23d	Ala	Asn(DMCP)	n = 11
22	23e	Phe	Lys(CH ₃) ₂	n = 11
22	23f	Leu	-	n = 11
22	23g	Asn(DMCP)	-	n = 11
22	23h	Cit	-	n = 11
22	23i	Phe	Cit	n = 23
22	23j	Phe	Cit	1 kDa
22	23k	Val	Cit	n = 23
	24a	Glu	Gly	n = 11
	24b	Ala	Asn	n = 11
	24c	Asn	-	n = 11

[0378] 实施例2.蛋白酶可切割的掩蔽剂与含胺聚合物的连接——对酰胺苄基氨基甲酸酯连接的形成。

[0379] A.用蛋白酶可切割的掩蔽剂修饰蜂毒肽。通过添加2-6×mg胺反应性对硝基苯基碳酸酯或含NAG的蛋白酶可切割底物的N-羟基琥珀酰亚胺碳酸酯衍生物来掩蔽1×mg蜂毒肽和10×mg HEPES碱(1-10mg/mL的肽)。然后所述溶液在注入动物前室温(RT)至少孵育1小时。

[0380] B.用蛋白酶可切割的掩蔽剂修饰多胺。使活化的(胺反应性)对酰胺苄醇衍生物的碳酸酯与两亲膜活性多胺的氨基基团在H₂O中(pH>8)反应以生成对酰胺苄基氨基甲酸酯。

[0381]



[0382] R¹包括ASGPr配体(受保护或未保护的)或PEG,

[0383] R²是两亲膜活性多胺,

[0384] AA是二肽(受保护或未保护的),和

[0385] Z是胺反应性碳酸盐或酯。

[0386] 向 $\times$ mg聚合物添加含 $12\times$ mg HEPES游离碱的等张葡萄糖。向缓冲的聚合物溶液添加含 $2\times\sim 16\times$ mg 200mg/ml二肽掩蔽剂的DMF。在一些应用中,所述聚合物用 $2\times$ mg二肽掩蔽剂修饰,然后连接siRNA。然后,用 $6\times\sim 8\times$ mg二肽掩蔽剂进一步修饰所述聚合物-siRNA偶联物。

[0387] 实施例3.siRNA.siRNA具有以下序列:

[0388] 因子VII siRNA

[0389] 正义:(Chol)-5'GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)3'(Seq ID 1)

[0390] 反义:5'pdTsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcdTsdT 3'(Seq ID 2)

[0391] 或

[0392] 正义:5'GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfdTsdT 3'(Seq ID 3)

[0393] 反义:5'GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsdT 3'(Seq ID 4)

[0394] 或

[0395] 正义:(NH₂C₆)GfuUfgGfuGfaAfuGfgAfgCfuCfaGf(invdt)3'(Seq ID 5)

[0396] 反义:pCfsUfgAfgCfuCfcAfuUfcAfcCfaAfcTsdT 3'(Seq ID 6)

[0397] 或

[0398] 正义:5'(NH₂C₆)uGuGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)3'(Seq ID 23)

[0399] 反义:5'pdTsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcdTsdT 3'(Seq ID 24)

[0400] 因子VII siRNA(灵长类)

[0401] 正义:(chol)-5'uuAGGfuUfgGfuGfaAfuGfgAfgCfuCfaGf(invdt)3'(Seq ID 7)

[0402] 反义:5'pCfsUfgAfgCfuCfcAfuUfcAfcCfaAfcTsdT 3'(Seq ID 8)

[0403] ApoB siRNA:

[0404] 正义:(cholC6SSC6)-5'GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA 3'(Seq ID 9)

[0405] 反义:5'uuGGAUCAAAuAuAAGAuUCscsU 3'(Seq ID 10)

[0406] AhaI siRNA:

[0407] 正义:(NH₂C₆)GfgAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUf(invdt)3'(Seq ID 11)

[0408] 反义:pdAsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfdTsdT 3'(Seq ID 12)

[0409] Luc siRNA

[0410] 正义:(chol)5'-uAuCfuUfaCfGcfuGfaGfuAfcUfuCfGfAf(invdt)-3'(Seq ID 13)

[0411] 反义:5'-UfcGfaAfgUfaCfuCfaGfcGfuAfaGfdTsdT-3'(Seq ID 14)

[0412] 或

[0413] 正义:(NH₂C₆)cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT 3'(Seq ID 15)

[0414] 反义:UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT 3'(Seq ID 16)

[0415] Eg5-KSP

[0416] 正义:(NH₂C₆)UfcGfaGfaAfuCfuAfaAfcUfaAfcUf(invdt)3'(Seq ID 17)

[0417] 反义:pAfGfuUfaGfuUfuAfgAfuUfcUfcGfadTsdT 3'(Seq ID 18)

[0418] 或

[0419] 正义:AGUuAGUuAGAUUCUGAdTsdT 3'(Seq ID 19)

[0420] 反义:(NH₂C₆)ucGAGAAucuAAAcuAAcudTsdT 3'(Seq ID 20)

[0421] EGFP

[0422] 正义:5' (NH₂C₆) AuAucAuGGccGAcAAGcAdTsdT 3' (Seq ID 21)

[0423] 反义:5' UGCUUGUCGGCcAUGAuAudTsdT 3' (Seq ID 22)

[0424] 小写=2'-O-CH₃取代

[0425] s=硫代磷酸酯连接

[0426] 核苷酸后的f=2'-F取代

[0427] 核苷酸前的d=2'-脱氧

[0428] 用常规亚磷酰胺化学法在固相上进行RNA合成,使用ÄKTA Oligopilot 100 (德国弗赖堡的通用电气医疗集团) 和可控多孔玻璃 (CPG) 作为固体支持物。

[0429] 实施例4. RNAi多核苷酸体内给予和肝细胞递送。如上所述制备DPC。

[0430] 6-8周龄小鼠 (C57BL/6或ICR品系,各约18~20g) 获自HSD公司 (Harlan Sprague Dawley, 印第安纳州印第安纳波利斯)。注射前至少饲养小鼠2天。用哈兰 (Harlan) Teklad啮齿动物饲料进行自由进食 (哈兰公司 (Harlan), 威斯康星州麦迪逊)。如本文所述合成DPC。偶联物溶液 (0.4mL) 通过输注而注入尾静脉。所述组合物生理条件下可溶且不聚集。预期注射到其他脉管中 (如眼球后注射) 是等效的。175-200g的Wistar Han大鼠获自查尔斯河实验室 (Charles River) (马萨诸塞州威尔明顿)。注射前饲养大鼠至少1周。对大鼠注射的体积通常是1mL。除非另有说明,在注射后48小时采集血清样品和/或收获肝脏样品。

[0431] 测定血清ApoB水平。小鼠禁食4小时 (大鼠16小时) 然后通过下颌下出血收集血清。大鼠血液收集自颈静脉。用标准夹心ELISA方法测定血清ApoB蛋白水平。简言之,多克隆山羊抗小鼠ApoB抗体和兔抗小鼠ApoB抗体 (生物设计国际公司 (Biodesign International)) 分别用作捕获和检测抗体。之后应用HRP偶联的山羊抗兔IgG抗体 (西格玛 (Sigma)) 以结合ApoB/抗体复合物。然后通过Tecan Safire2 (欧洲奥地利) 酶标仪测量450nm处四甲基联苯胺 (TMB, 西格玛) 比色显影的吸光度。

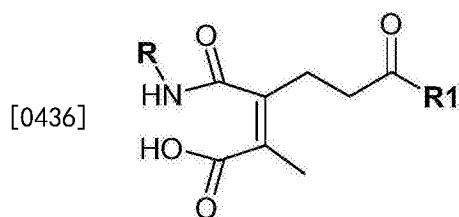
[0432] 血浆因子VII (F7) 活性测量。(小鼠通过下颌下出血或大鼠通过颈静脉) 收集血液 (9体积) 制备动物的血浆样品,按照标准程序装入含0.109mol/L柠檬酸钠抗凝血剂 (1体积) 的微量离心管中。血浆F7活性使用BIOPHEN VII试剂盒 (俄亥俄州梅森的海丰生物医药公司 (Hyphen BioMed) /阿尼拉公司 (Aniara)) 用生色法按照生产商推荐测量。比色显影的吸光度通过Tecan Safire2酶标仪在405nm处测量。

[0433] 实施例5. 使用用二肽可切割性掩蔽剂可逆修饰的两亲膜活性聚丙烯酸多胺体内递送siRNA至肝细胞。

[0434] 用活化的二硫化物试剂琥珀酰亚胺氧羰基- α -甲基- α (2-吡啶基-二硫代) 甲苯 (SMPT) (皮尔斯公司 (Pierce)) 0.5wt% 修饰含聚丙烯酸酯Ant-41658-111的100mM pH 7.5 HEPES缓冲液,以获得用于后续连接siRNA的硫醇反应性基团。然后,使所述硫醇反应性聚合物在60mg/mL HEPES碱中稀释至5mg/mL。向该溶液添加10mg/mL各种所述酶可切割性掩蔽剂。所述量代表1聚合物胺与2遮蔽剂的摩尔比。对于该聚合物修饰反应,优选摩尔比是聚合物胺/掩蔽剂=1:1~1:5。更优选的比率是1:2~1:4。更优选的比率是1:2。一小时后,向聚合物溶液添加乙酸酯保护的硫醇内源啮齿类动物因子VII siRNA (0.1~0.2重量当量,相对于聚合物)。孵育过夜后,通过添加马来酸酐的N-乙酰半乳糖胺衍生物 (NAG-CDM; 表5) 进一步修饰偶联物。添加25mg/mL的NAG-CDM,并孵育30分钟~4小时。

[0435] 对于NAG-CDM聚合物修饰,从0.1%冰醋酸水溶液冻干NAG-CDM。向所述干燥的NAG-

CDM添加聚合物溶液。在酞完全溶解后,所述溶液在室温孵育至少30分钟,然后给予动物。d NAG-CDM与所述聚合物反应生成:



[0437] 式中,R是所述聚合物,R1包括ASGPr配体(例如N-乙酰半乳糖胺)。

[0438] 如表5所示,用二肽试剂掩蔽的DPC处理的动物内,因子VII表达减少了49~85%。

[0439] 表5.用PEG-AA-对硝基苯基氨基甲酸酯+NAG-CDM-DPC处理的小鼠中体内因子VII的敲减。

[0440]

二肽掩蔽剂	聚合物剂 量(mg/kg) a	siRNA剂 量(mg/kg) a	% 因子 VII 活性 b
PEG12-AlaAsn	15	2	32
PEG12-PheCit	15	2	15
PEG12-AsnGly	15	2	51
PEG24-PheCit	1.5	0.25	23
PEG12-Asn	1.5	0.25	34
PEG24-ValCit	1.5	0.25	23

[0441] ^amg聚合物或siRNA/kg动物体重

[0442] ^b相对于首次接受试验的对照

[0443] 实施例6.使用NAG/PEG-AA-对硝基苯基氨基甲酸聚(丙烯酸酯)DPC的体内siRNA递送。

[0444] A) PEG+NAG修饰。用来自皮尔斯公司(Pierce)的经活化二硫化物试剂琥珀酰亚胺氧羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫代) 甲苯(SMPT) 0.5wt%修饰含聚丙烯酸酯Ant-41658-111的100mM pH 7.5HEPES缓冲液。所述硫醇反应性聚合物在60mg/mL HEPES碱中稀释至5mg/mL。向该溶液添加10mg/mL的多种PEG-AA-对硝基苯基碳酸酯掩蔽剂。一小时后,向聚合物溶液添加乙酸酯保护的硫醇因子VII siRNA(聚合物与siRNA的比例范围是5-10~1)。孵育过夜后,NAG-AA-对硝基苯基碳酸酯掩蔽剂添加至40mg/mL。孵育至少30分钟但不超过4小时后,将所述DPC注射入20g ICR小鼠尾静脉中。注射后48小时,收获血清样品并检测因子VII水平。

[0445] B) NAG单独修饰。用来自皮尔斯公司(Pierce)的经活化二硫化物试剂琥珀酰亚胺氧羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫代) 甲苯(SMPT) 0.5wt%修饰含聚丙烯酸酯Ant-41658-111的100mM pH 7.5HEPES缓冲液。所述硫醇反应性聚合物在60mg/mL HEPES碱中稀释至

5mg/mL。向聚合物溶液添加乙酸酯保护的硫醇siRNA因子VII (聚合物与siRNA的比例范围是5-10~1)。孵育过夜后,NAG-AA-对硝基苯基碳酸酯掩蔽剂添加至50mg/mL。孵育至少30分钟但不超过4小时后,将所述偶联聚合物的siRNA注入20gm ICR小鼠尾静脉中。注射后48小时,收获血清样品并检测因子VII水平。

[0446] 表6.用PEG/NAG-AA-对硝基苯基氨基甲酸酯DPC处理的小鼠中体内因子VII的敲减
[0447]

掩蔽剂	量 ^c	聚合物剂量 (mg/kg) ^a	siRNA剂量 (mg/kg) ^a	%因子VII 活性 ^b
12 单位 PEG12-PheCit 随后 NAG-PEG4-PheCit	2× 8×	15	2	27
24 单位 PEG24-PheCit 随后 NAG-PEG4-PheCit	2× 8×	15	2	27
PEG24-PheCit 随后 NAG-PEG4-PheCit	2× 8×	1.5	2.5	23
NAG-PEG4-PheCit	10×	15	2	44
NAG-PEG2-GluGly	10×	1.5	2.5	27
NAG-PEG2-PheCit	10×	1.5	2.5	72

[0448] ^amg聚合物或siRNA/kg动物体重

[0449] ^b相对于首次接受试验的对照

[0450] ^c体重当量

[0451] 实施例7.使用NAG/PEG-AA-对硝基苯基氨基甲酸酯聚(乙烯基醚)DPC的体内siRNA递送。

[0452] 用10×重量当量二肽可切割性掩蔽剂按上文就聚丙烯酸酯Ant-41658-111所述修饰两亲膜活性聚(乙烯基醚)多胺DW1360,除了所述掩蔽剂在聚合物修饰过程中保留受保护基团。在聚合物修饰后,通过在30体积%三乙基胺、50%甲醇和20%水的溶液存在下孵育去除TFA和NAG乙酸酯保护基团从而去除氨基酸保护基团。所述乙酸酯去保护溶液通过旋转蒸发去除。将所掩蔽的聚合物与胆固醇-ApoB siRNA偶联物共同注入小鼠。

[0453] 表7.用NAG-AA-对硝基苯基氨基甲酸酯聚(乙烯基醚)和胆固醇-ApoB siRNA偶联物共同注射的小鼠中体内ApoB的敲减。

聚合物掩蔽剂	聚合物剂量 (mg/kg) ^a	siRNA剂量 (mg/kg) ^a	% ApoB ^b
NAG-AsnGly	25	5	67
NAG-PheLys	25	5	70
NAG-GluGly	25	5	48

[0454]

[0455] ^amg聚合物或siRNA/kg动物体重

[0456] ^b相对于首次接受试验的对照

[0457] 实施例8. 使用小鼠内蜂毒肽递送肽、酶可切割掩蔽剂的ApoB siRNA递送后内源ApoB水平的体内敲减。

[0458] 如上所述用所示量的酶可切割掩蔽剂可逆修饰蜂毒肽。然后, 用200-300μg掩蔽的蜂毒肽与50-100μg ApoB siRNA-胆固醇偶联物共同注射。如上所述测定对ApoB水平的影响。肽酶可切割的二肽-酰胺苄基氨基甲酸酯修饰的蜂毒肽是有效的siRNA递送肽。优选联用D形式的蜂毒肽与酶可切割掩蔽剂。相同水平的靶基因敲减需要更多肽, 因为所述肽掩蔽更加稳定, 治疗指数没有改变或改善(相比于使用CDM-NAG的相同肽的掩蔽)。

[0459] 表8. 用因子VII-siRNA胆固醇偶联物和G1L-蜂毒肽(D形式)(Seq ID 25)处理的小鼠内正常肝细胞中因子VII活性的抑制, 所述G1L-蜂毒肽用所示酶可切割掩蔽剂可逆抑制。

[0460]

肽	NAG-连接		μg	μg	百分数 敲减
	量 ^a	类型	肽	siRNA	
G1L d-Mel (Seq ID 25)	5×	CDM-NAG	200	100	97
	5×	NAG-AlaCit	200	50	96
	5×	NAG-GluGly	200	50	96
	5×	NAG-PEG ₄ -PheCit	200	50	94
	5×	NAG-PEG ₇ -PheCit	200	50	86
	5×	CDM-NAG	300	50	98
	2×	NAG-GluGly	300	50	95
	4×	NAG-GluGly	300	50	95
	6×	NAG-GluGly	300	50	82

[0461] ^a用于遮蔽反应的遮蔽剂/蜂毒肽胺的量

[0462] 实施例9. 使用蛋白酶可切割DPC的肿瘤靶向。

[0463] A) 靶基因敲减检测。下述所有研究中, siRNA具有Aha1基因转录物(靶基因)特异性。使用针对增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的siRNA作为脱靶对照。所述Aha1siRNA与Aha1中的序列基序互补, 所述序列基序在人和小鼠基因中100%同源。因此, 递送Aha1siRNA进入人异种移植物的宿主细胞或肿瘤细胞导致mRNA切割和降解。使用小鼠和人Aha1基因内不同的序列基序, 设计PCR引物从而能够定量检测含有不同细胞类型混合群的组织样品中人Aha1和小鼠Aha1mRNA水平。在siRNA递送后24、48或72小时, 获取连接一些健康小鼠肝组织的肿瘤, 并在Tri-Reagent(英杰公司(Invitrogen))中加工处理以用于总RNA分离。然后通过qPCR实验使用人Cyc-A和小鼠β-肌动蛋白作为内参基因检测人和小鼠Aha1mRNA水平。认为模拟注射的动物或接受脱靶对照GFP siRNA的小鼠内的Aha1mRNA水平为100%。结果表示为相对于对照的Aha1mRNA水平百分数并示于下表。

[0464] B) 原位移植肝细胞癌(HCC)肿瘤模型小鼠。用两种表达载体(人分泌型胎盘碱性磷酸酶(SEAP)载体pMIR85和新霉素/卡那霉素抗性基因载体pMIR3)共转染HegG2、Hep3B或

HuH7肝细胞癌细胞,以发展具有稳定SEAP表达的细胞系。细胞在补充有10%FBS和300ug/ml G418的DMEM中生长,收集,计数,然后与基质胶(BD生物科学公司(BD Biosciences))混合(50%体积)。用约3%异氟烷麻醉无胸腺裸小鼠或Scid beige小鼠,并放置成胸骨卧式位置。在紧邻剑状突起下方割开一个1~2cm的腹部正中小切口。使用湿棉拭子轻轻取出肝左叶。轻轻牵拉所述肝左叶并将注射针插入该左叶中部。该注射针在肝包膜斜向下约0.5cm插入。使用注射泵将包含100,000个细胞的10 μ l细胞/基质胶混合物注入所述肝脏。使所述针头在所述肝中停留一段时间(15~20秒)以确保注射完成。将SEAP-HepG2细胞注入无胸腺裸小鼠。将SEAP-Hep3B和SEAP-HuH7细胞注入Scid beige小鼠。然后从所述肝脏由针头移出注射器,将棉拭子置于注射位点上以防止细胞泄漏或流血。所述基质胶/细胞混合物形成可见的聚集体,且在移出针头之后不消失。然后轻轻将所述肝叶放回腹腔,闭合腹壁。肿瘤移植后每周收集一次血清并进行SEAP实验以监测肿瘤生长。对于大多数研究,预计肿瘤测量约为4~8mm(基于SEAP值)时,使用移植后4~5周的荷瘤小鼠。

[0465] C) 结直肠转移性肿瘤模型。HT29细胞在补充有10%FBS的McCoy's 5a培养基中生长,收集,计数,然后与基质胶(BD生物科学公司(BD Biosciences))混合(50%体积)。用约3%异氟烷麻醉无胸腺裸小鼠,并放置成胸骨卧式位置。在紧邻剑状突起下方割开一个1~2cm的腹部正中小切口。使用湿棉拭子轻轻取出肝左叶。轻轻牵拉所述肝左叶并将注射针插入该左叶中部。该注射针在肝包膜斜向下约0.5cm插入。使用注射泵将包含40,000个细胞的5 μ l细胞/基质胶混合物注入所述肝脏。使所述针头在所述肝中停留一段时间(15~20秒)以确保注射完成。然后从所述肝脏移出注射器,将棉拭子置于注射位点上以防止细胞泄漏或流血。所述基质胶/细胞混合物形成可见的聚集体,且在移出针头之后不消失。然后轻轻将所述肝叶放回腹腔,闭合腹壁。使用移植后4~5周的荷瘤小鼠。

[0466] 实施例10. PEG₂₄-Val-Cit DPC给予后HepG2-SEAP原位移植肝细胞癌(HCC)模型内靶基因表达的体内敲减。

[0467] 如上所述用18 $\times$ 过重PEG₂₄-Phe-Cit掩蔽剂(或PEG₂₄-Val-Cit掩蔽剂)或用7 $\times$ PEG₅₅₀-CDM修饰(掩蔽)(2011062805) Ant-129-1聚合物DPC。如上所述使Aha1-siRNA(RD-09070)或GFP-siRNA(RD-05814;脱靶对照)连接所述聚合物(4:1重量比)。递送前,DPC无需通过凝胶过滤纯化,不添加靶向配体。通过尾静脉注射给予含320 μ g(聚合物重量)DPC偶联物的200 μ l等张葡萄糖/动物(n=3/组)。24小时后,动物接受第二次含320 μ g(聚合物重量)DPC偶联物的200 μ l等张葡萄糖注射。第二次注射后48小时,收集血清样品以通过测量肝酶(ALT和AST)和血尿氮(BUN)水平,随后是组织收获和qPCR分析来评价毒性。

[0468] 使用PEG₂₄-Val-Cit-Ant-129-1-siRNA DPC递送Aha1siRNA,引起人肿瘤细胞内Aha1基因的46%敲减(表9)。与人Aha1敲减水平相反,小鼠Aha1响应PEG₂₄-Val-Cit-Ant-129-1-siRNA DPC给予而敲减70%(表1)。相比用双取代马来酸酐掩蔽剂(PEG550-CDM)生成的相似DPC,内源性肝细胞Aha1敲减下降。如ALT、AST和BUN水平所示,PEG₂₄-Val-Cit DPC耐受良好且不显示毒性(见表)。

[0469] 表9. 由马来酸酐修饰相比肽可切割修饰的Aha1siRNA DPC的HepG2肝肿瘤模型中的Aha1敲减。

[0470]

	对照 siRNA	PEG ₅₅₀ -CDM DPC	PEG ₂₄ -Val-Cit DPC
		Aha1 siRNA	Aha1 siRNA
人 Aha1 水平 (肿瘤)	100 ± 8.0	54.4 ± 7.3	54.9 ± 7.6
小鼠 Aha1 水平 (肝细胞)	100 ± 9.2	7.5 ± 0.9	30.4 ± 3.1

[0471] 表10. 给予马来酸酐修饰或肽可切割修饰的Aha1siRNA DPC后的血液化学毒性标志物。

[0472]

		PEG ₅₅₀ -CDM DPC	PEG ₂₄ -Val-Cit DPC
	对照siRNA	Aha1siRNA	Aha1siRNA
ALT	44.3 ± 5.1	58.0 ± 37.5	35.0 ± 11.3
AST	81.7 ± 4.0	102.3 ± 57.5	67.7 ± 14.4
BUN	25.3 ± 4.2	23.0 ± 3.5	21.3 ± 1.2

[0473] 实施例11. 用双特异性抗体 (bsAb) -靶向的DPC (2011090701) 的靶向基因表达敲减。

[0474] 如上所述用5×Dig-PheCit (Dig-FCit) 掩蔽剂修饰Ant-129-1聚合物。然后使siRNA连接所述偶联物。最后, 用8× (重量) PEG₁₂-FCit进一步修饰Dig-FCit-Ant-129-1-siRNA偶联物。Aha1-siRNA (RD-09070) 或GFP siRNA (RD-05814) 以4:1的聚合物:siRNA重量比连接。在Sephadex G50离心柱上纯化PEG₁₂-FCit DPC以去除未结合的试剂。

[0475] 制备对硫酸乙酰肝素蛋白多糖磷脂酰基醇蛋白聚糖-3 (GPC3) 和地高辛 (Dig) 特异的细胞靶向双特异性抗体 (bsAb), GPC3是已知在HepG2-SEAP细胞中高表达的细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白多糖。作为对照, 制备对蛋白CD33 (骨髓源性造血肝细胞标志物) 和Dig特异的特异性抗体。HepG2-SEAP细胞不表达CD33。以1.25:1的重量比复合BsAb和修饰的DPC以提供预估的1:1摩尔比。递送之前, 复合物在PBS中形成至少30分钟。

[0476] 对HepG2-SEAP荷瘤小鼠给予DPC (含或不含bsAb靶向试剂)。每只动物 (n=3/组) 接受250μg (聚合物重量) 的单一剂量DPC。将含DPC的200μL无菌PBS注射进入小鼠尾静脉。48小时后收获血清和组织样品并如上所述分析。如表11所示, 单一剂量的bsAb靶向DPC (250μg聚合物, 62.5μg siRNA) 引起21-32%的靶基因敲减。

[0477] 表11. 通过使用双特异性抗体靶向的肽可切割掩蔽剂所修饰Aha1siRNA DPC的HepG2肝肿瘤模型中的Aha1敲减。

[0478]

	Dig-FCit + PEG ₁₂ -FCit 掩蔽剂			
			GPC-Dig bsAb	CD33-Dig bsAb
	对照 siRNA	Aha1 siRNA		
人 Aha1 水平 (肿瘤)	100 ± 10.1	78.6 ± 11.5	72.7 ± 2.4	68.1 ± 6.4
小鼠 Aha1 水平 (肝细胞)	100 ± 9.5	65.1 ± 8.1	73.7 ± 10.5	91.3 ± 8.3

[0479] 实施例12.用双特异性抗体(bsAb)-靶向DPC的靶向基因表达敲减。

[0480] 如上所述制备DPC,除了a)使用PEG₂₄-FCit替代PEG₁₂-FCit和b)使用Dig-PEG₁₂-NHS连接Dig与所述聚合物。PEG₂₄-FCit DPC相较于PEG₁₂-FCit DPC聚集较少,且更小,同源性更高。除了是稳定连接以外,Dig-PEG₁₂-NHS还包含较长PEG。DPC与bsAb复合并如上所述注入动物。在注射后24或48小时收获血清和组织。如表12所示,注射后24小时,单一剂量的DPC(250 μg聚合物重量)引起人Aha1敲减46-56%。

[0481] 表12.通过使用PEG长度增加的肽可切割掩蔽剂所修饰Aha1siRNA DPC的HepG2肝肿瘤模型中的Aha1敲减。

[0482]	Dig-PEG ₁₂ -NHS + PEG ₂₄ -FCit 掩蔽剂		
	GPC-Dig bsAb		CD33-Dig bsAb
	对照 siRNA	Aha1 siRNA	
人 Aha1 水平 (肿瘤)	100 ± 3.1	54.1 ± 15.1	43.5 ± 6.6

[0483] 实施例13.通过bsAb靶向的DPC将DPC靶向至人结直肠腺癌转移性肝肿瘤组织。

[0484] Ant-129-1聚合物用5×摩尔过量Dig-PEG₁₂-NHS和8×重量过量PEG₂₄-FCit修饰。Aha1siRNA或GFP siRNA以4:1的聚合物:siRNA重量比连接所述修饰的聚合物。在Sephadex G50离心柱上纯化DPC以去除未结合的试剂。注射之前,Dig-DPC与等摩尔量的IGF1R-Dig bsAb或CD33-Dig bsAb或bsAb在无菌PBS中复合至少30分钟。对含有HT29肿瘤细胞(人结直肠腺癌;ATCC号HTB-38)的动物注射所述DPC。HT29细胞过表达胰岛素样生长因子1受体蛋白(IGF1R),且能结合并内化IGF1R-Dig双特异性抗体。动物(n=3)接受DPC(320μg聚合物)。24小时后重复注射。在第二次剂量后48小时收集血清和组织样品。肿瘤细胞中人Aha1的敲减是26-38%(表13)。相比于CDM-DPC,FCit-DPC显示较少脱靶肝Aha1敲减(78-83%相比于24-36%)。FCit-DPC还显示相较于CDM-DPC减少的肝累积。

[0485] 表13.通过二肽可切割Aha1siRNA DPC的HT29结直肠腺癌转移性肝肿瘤中的Aha1敲减。

[0486]

	Ant-129-1 聚合物			
	Dig-PEG ₁₂ -NHS + PEG ₂₄ -FCit 掩蔽剂			
	IGF1R-Dig bsAb		CD33-Dig bsAb	
	对照 siRNA	Aha1 siRNA		
人 Aha1 水平 (肿瘤)	100 ± 4.9	72.3 ± 6.1	73.7 ± 3.2	62.0 ± 9.0
小鼠 Aha1 水平 (肝)	100.0 ± 11	64.0 ± 5.0	75.7 ± 11	66.6 ± 5.8

[0487] 实施例14.肝肿瘤中内源性Aha1的体内敲减。

[0488] 400μg Lau41648-106用8×(重量)PEG₁₂-ValCit或16×PEG₂₄-PheCit修饰。如上所述使100μg Aha1siRNA或100μg Eg5对照siRNA连接所述修饰的聚合物。对包含Hep3B-SEAP肿瘤细胞的动物注射所述DPC。在注射后48小时收集血清和组织样品。肿瘤细胞中人Aha1的敲减是26-38%。

[0489] 表14.通过二肽可切割Aha1siRNA DPC的Hep3B-SEAP肝肿瘤中的Aha1敲减。

[0490]	聚合物 (400 μg)	修饰	siRNA (100 μg)	Aha1 KD
	Lau41648-106	8× PEG12-ValCit	Aha1	38 ± 0.02 %
		16× PEG24-Phecit	Aha1	41 ± 0.07 %
			EG5	13 ± 0.11 %

[0491] 实施例15.体内循环和掩蔽聚合物的组织靶向。

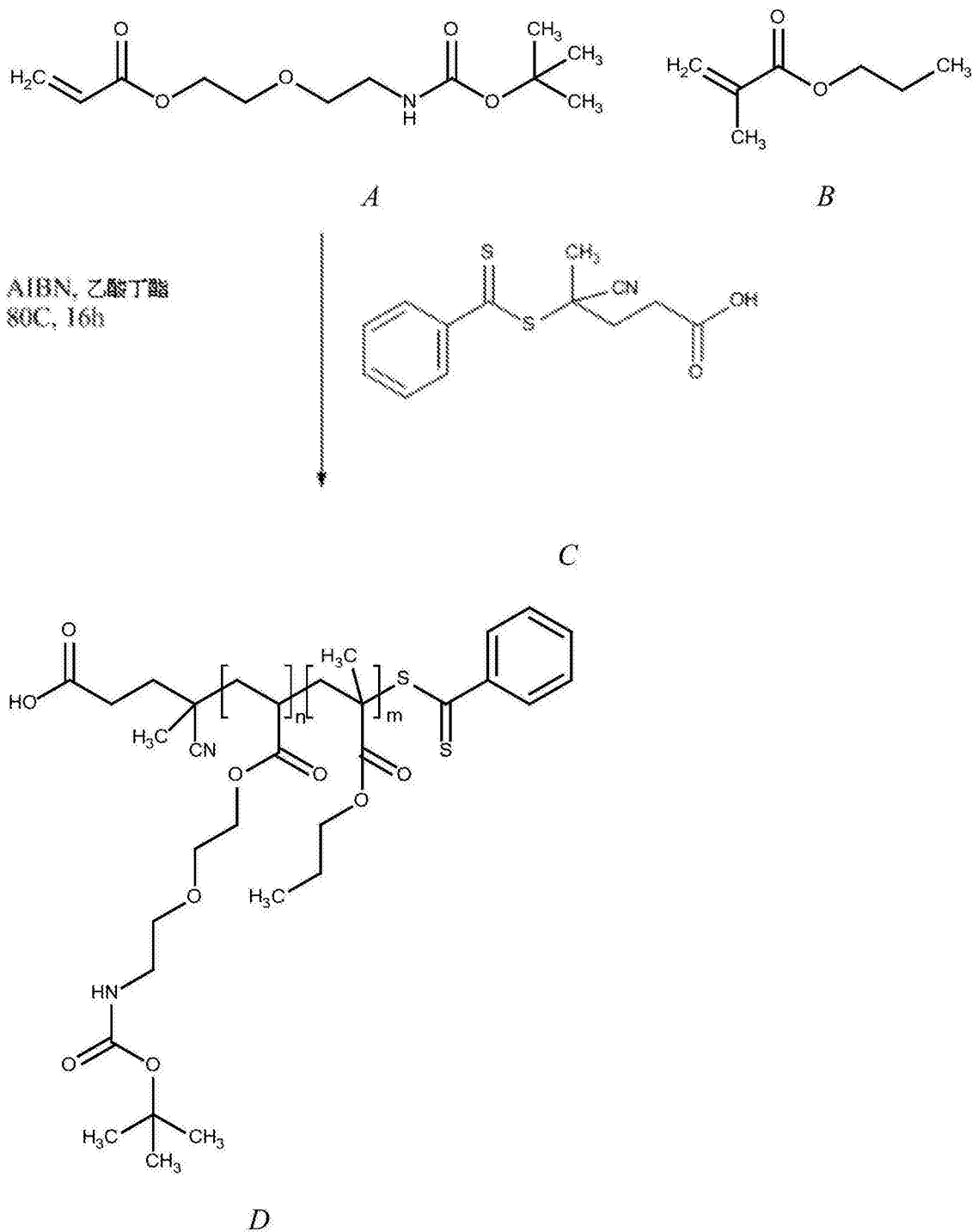
[0492] 在室温下用含¹²⁵I-鲍尔通亨特 (Bolton-Hunter) (BH) 试剂 (50μCi) 的50mM HEPES (pH 8.0) 缓冲液处理Lau24AB聚丙烯酸酯 (100μg) 1小时。在2mL Sephadex QEA离心柱内于水中纯化所标记的聚合物。在4℃保存经标记聚合物的溶液。未标记的聚合物补充有¹²⁵I-标记的聚合物以注射约1mg聚合物,每200g大鼠具有0.2μCi。如上所述用PEG₂₄-FCit或PEG-CDM (2mg/ml聚丙烯酸酯,14mg/ml PEG-CDM试剂,14mg/ml NAG-PEG-CDM试剂,16mg/ml PEG₂₄-FCit试剂) 修饰标记和未标记聚合物的混合物 (以约3.5只动物计算)。孵育1小时。然后,用等张葡萄糖稀释所述反应混合物以生成每动物1ml体积的注射剂量。注射3只动物/组。在给定时间使动物放血 (0.1-0.2ml)。通过γ计数器计数测定样品中存在的聚合物量。如图4所示,用蛋白酶可切割掩蔽剂修饰的聚合物从血清中的清除不如用pH不稳定马来酸酐掩蔽剂掩蔽的聚合物迅速。增加循环时间有利于靶向非肝组织。

[0493] 实施例16.两亲膜活性聚合物的合成。

[0494] A) 聚(丙烯酸乙酯)

[0495] i) N-Boc-乙基乙氧基丙烯酸酯和甲基丙烯酸丙酯的RAFT共聚合反应:

[0496]



[0497] 式中:A是**boc**保护的乙基-乙氧基氨基丙烯酸酯

[0498] B是甲基丙烯酸丙酯

[0499] C是RAFT试剂CPCPA (4-氰基-4-(硫代苯甲酰)戊酸)

[0500] n和m是整数。

[0501] 合成后去除boc保护基团,生成胺单体。

[0502] 对于其它膜活性聚合物,A还可以是受保护的乙基、丙基或丁基氨基丙烯酸酯。B可以是高疏水性(10-24个碳原子,显示C18)丙烯酸酯,低疏水性(1-6个碳原子,显示C4)丙烯

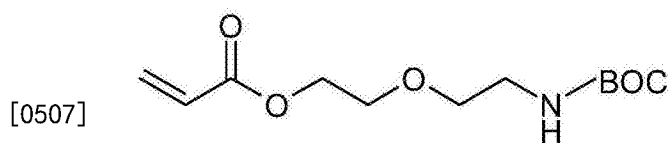
酸酯或低疏水性丙烯酸酯和高疏水性丙烯酸酯的组合。

[0503] 由丙烯酸胺酯/C3甲基丙烯酸酯组成的共聚物如下合成。对单体和RAFT试剂称重并以所示比例放入乙酸丁酯。添加AIBN(偶氮二异丁腈)并通过室温反应1小时来鼓泡氮。然后将该反应混合物置入80℃油浴15小时。然后,所述聚合物用己烷沉淀,并用DCM/己烷溶剂系统进一步分级沉淀(参见下文)。然后,减压干燥所述聚合物。所述聚合物在室温下用7mL 2M HCl在乙酸中处理30分钟以去保护。30分钟后,向反应混合物添加15mL水,并将所述混合物转移至3.5kDaMWC0透析管。使所述聚合物对NaCl透析过夜,然后于另一天对dH₂O透析过夜。然后通过冻干除水,并使所述聚合物溶于dH₂O中。

[0504] (Ant 41658-111)的单体合成。2,2'-偶氮二(2-甲基丙腈(AIBN,基团引发剂)、4-氰基-4-(硫代苯甲酰)戊酸(CPCPA,RAFT试剂)和乙酸丁酯购自西格玛奥德里奇公司(Sigma Aldrich)。过滤甲基丙烯酸丙酯单体(阿法埃莎公司(Alfa Aesar))以去除抑制剂。

[0505] 在配有搅拌棒的2L圆底烧瓶中将2-(2-氨基乙氧基)乙醇(21.1g, 202.9mmol(西格玛奥德里奇公司(Sigma Aldrich)))溶于350mL二氯甲烷。在单独的1L烧瓶中,BOC酐(36.6g, 169.1mmol)溶于660mL二氯甲烷。2L圆底烧瓶装上额外漏斗并将BOC酐溶液在6小时内加入烧瓶中。该反应搅拌过夜。在2L分液漏斗中,用各300mL的10%柠檬酸、10%K₂CO₃、饱和NaHCO₃和饱和NaCl清洗产物。产物BOC保护的2-(2-氨基乙氧基)乙醇用Na₂SO₄干燥、重力过滤、并用旋转蒸发和高真空蒸发DCM。

[0506] 向配有搅拌棒并用氩气吹扫的500mL底烧瓶中加入BOC保护的2-(2-氨基乙氧基)乙醇(27.836g, 135.8mmol),然后加入240mL无水二氯甲烷。加入二异丙基乙基胺(35.5mL, 203.7mmol),并将该系统置于干冰/丙酮浴中。用10mL二氯甲烷稀释烯丙酰氯(12.1mL, 149.4mmol),并逐滴加入到氩气吹扫系统中。该系统保持在氩气下,并降至室温和搅拌过夜。各用100mL的dH₂O、10%柠檬酸、10%K₂CO₃、饱和NaHCO₃和饱和NaCl清洗产物。产物BOC-氨基乙氧基丙烯酸乙酯(BAEEA)用Na₂SO₄干燥、重力过滤、并用旋转蒸发来蒸发DCM。在29cm二氧化硅上用直径7.5cm柱通过柱色谱纯化所述产物。所用溶剂系统为己烷中的30%乙酸乙酯。R_f:0.30。收集组分并用旋转蒸发和高真空移除溶剂。所得BAEEA产率为74%。BAEEA在冰箱内保存。



BAEEA

[0508] 聚合物Ant-41658-111:制备含AIBN(1.00mg/mL)和RAFT试剂(4-氰基-4-(硫代苯甲酰)戊酸(CPCPA), 10.0mg/mL)的乙酸丁酯溶液。单体摩尔进料比是75BAEEA:25甲基丙烯酸丙酯(CAS:2210-28-8),含有0.108CPCPA RAFT试剂和0.016AIBN催化剂(0.00562总摩尔量)。

[0509] 向20mL配有搅拌棒的小玻璃瓶添加BAEEA(1.09g, 4.21mmol)(A)、甲基丙烯酸丙酯(.180g, 1.41mmol)(B)、CPCPA溶液(.170mL, .00609mmol)(C)、AIBN溶液(.150mL, .000915mmol)和乙酸丁酯(5.68mL)。所述小瓶用橡皮盖密封,用一长注射器针头鼓泡氮,另一短注射器针头作为出口,持续1小时。移出所述注射器针头,用油浴加热该系统至80℃持

续15小时。使所述溶液冷却至室温,并转移至50mL离心管,然后向所述溶液添加己烷(35mL)。以4,400rpm离心该溶液2分钟。小心倒出上清层,并用己烷冲洗底部(固体或胶状)层。然后,使该底层重新溶于DCM(7mL),在己烷(35mL)中沉淀并再离心一次。倒出上清,用己烷冲洗底层,然后使聚合物减压干燥数小时。分子量通过MALS获得:73,000 (PDI 1.7);聚合物组成使用 ^1H NMR获得:69:31胺:烷基(Amine:Alkyl)。

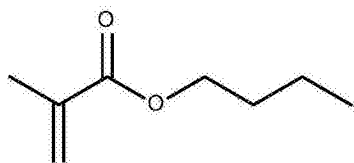
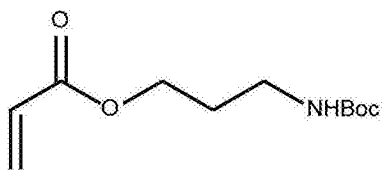
[0510] 分级沉淀。干燥的沉淀产物溶于DCM(100mg/mL)。添加己烷直至刚过浊点(~20mL)。离心所得乳白状溶液。提取底层(呈现约60%聚合物的稠厚液体)并用己烷充分沉淀。残留的上层溶液也通过进一步添加己烷来充分沉淀。对两部分离心,之后分离所述聚合物并真空干燥。组分1:MW 87,000 (PDI 1.5);组分2:MW 52,000 (PDI 1.5-1.6)。

[0511] MALS分析。约10mg聚合物溶于0.5mL的89.8%二氯甲烷、10%四氢呋喃、0.2%三乙基胺中。用连接岛津公司(Shimadzu) Prominence HPLC的Wyatt Helos II多角度光散射检测器测量分子量和多分散性(PDI),使用Jordi $5\mu\text{m} 7.8\times 300$ 混合床LS DVB柱。粗聚合物:MW:73,000 (PDI 1.7),组分1:MW 87,000 (PDI:1.5),组分2:MW 52,000 (PDI 1.5-1.6)。

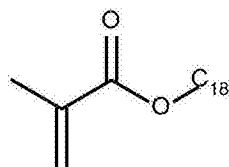
[0512] 纯化的BOC-保护聚合物与醋酸(7mL)中的2M HCl反应0.5小时以去除BOC保护基团并产生胺。将15mL dH₂O加入反应,所述溶液转移到截留3500MW的纤维素透析袋中,用高盐透析24小时,然后用dH₂O透析18小时。所述内容物冻干,然后以20mg/mL的浓度溶于DI H₂O。聚合物溶液保存于2~8℃。

[0513] ii) 如上所述制备聚合物Lau24B,除了单体进料率是72.5BAEEA:27.5丙基异丁烯酸酯。

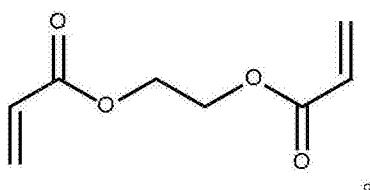
[0514] iii) 基本如上所述制备Ant-129-1,除了使用以下单体:



[0515]



, 和



[0516] 表15.Ant-129-1聚合物合成反应物。

[0517]

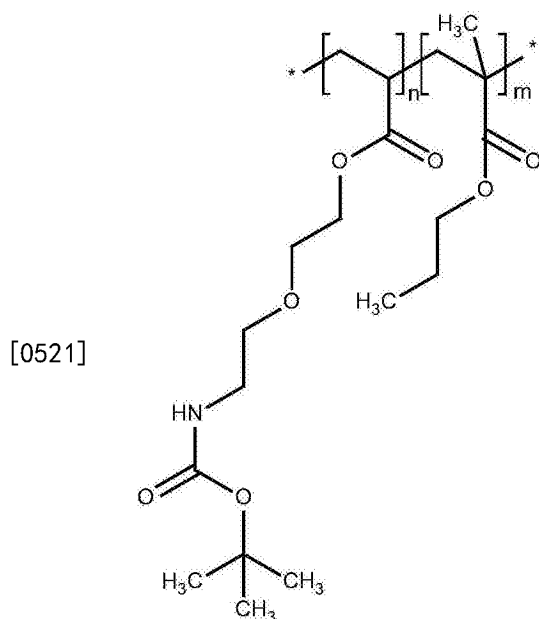
	MW (g/mol)	mol%	摩尔	质量 (g)	体积 (ml)	反应摩尔
单体						
N-Boc-氨基-丙烯酸丙酯	229.27	70	3.94×10^{-3}	0.9031		0.005627
甲基丙烯酸丁酯	142.2	25	1.41×10^{-3}	0.2000	0.224	0.005627
C18甲基丙烯酸酯	338.54	5	2.81×10^{-4}	0.0952		0.005627
乙二醇二丙烯酸酯	170.16	5	2.81×10^{-4}	0.0479	0.44	0.005627
其它试剂						
CPCPA (RAFT试剂)	279.38	0.213	1.2×10^{-5}	0.0033	0.335	0.005627
AIBN (引发剂)	164.21	0.032	1.8×10^{-6}	0.0003	0.295	0.005627
乙酸丁酯					5.272	
目标分子量	100000					
总单位/CTA	469.56					
%CTA	0.213					

[0518] 对于N-Boc-氨基-丙烯酸丙酯 (BAPA), 在配有搅拌棒并用氩气吹扫的500mL圆底烧瓶中添加3-(BOC-氨基) 1-丙醇 (TCI) (135.8mmol), 然后添加240mL无水二氯甲烷。加入双异丙基乙基胺 (203.7mmol), 并将该系统置于干冰/丙酮浴中。用10mL二氯甲烷稀释烯丙酰氯 (149.4mmol), 并逐滴加入到氩气吹扫系统中。该系统保持在氩气下, 并达到室温和搅拌过夜。各用100mL的dH₂O、10%柠檬酸、10%K₂CO₃、饱和NaHCO₃和饱和NaCl清洗产物。产物BOC-氨基丙烯酸丙酯 (BAPA) 用Na₂SO₄干燥、重力过滤、并用旋转蒸发来蒸发DCM。在29cm二氧化硅上用直径7.5cm柱通过柱色谱纯化所述产物。所用溶剂系统为己烷中的30%乙酸乙酯。R_f: 0.30。收集组分并用旋转蒸发和高真空移除溶剂。所得BAPA产率为74%。BAPA在冰箱内保存。

[0519] iv) N-Boc-乙基乙氧基丙烯酸酯和甲基丙烯酸丙酯的无规共聚反应。由丙烯酸胺酯/C_n甲基丙烯酸酯组成的共聚物如下合成。对所述单体称重并以所示比率加入二噁烷。添加AIBN (偶氮二异丁腈) 并通过室温反应1小时来鼓泡氮。然后将该反应混合物置入60℃油浴3小时。然后, 减压干燥所述聚合物。通过GPC纯化所得聚合物。之后, 所述聚合物部分在室温下用7ml 2M HCl在乙酸中处理30分钟以去保护。30分钟后, 向反应混合物添加15mL水, 并将所述混合物转移至3.5kDa MWC0透析管。所述聚合物用NaCl透析过夜, 然后于另一天用dH₂O透析过夜。随后通过冻干除水, 所述聚合物溶于dH₂O中。

[0520] 聚合物Lau41648-106。单体摩尔进料比是80BAEEA:20甲基丙烯酸丙酯 (CAS:2210-28-8) 和3%AIBN催化剂 (基于总单体摩尔)。向配有搅拌棒的50mL玻璃试管添加BAEEA (6.53g, 25.2mmol) (A)、甲基丙烯酸丙酯 (0.808g, 6.3mmol) (B)、AIBN (0.155g, 0.945mmol) 和二噁烷 (34.5ml)。化合物A和B按上面实施例16Ai所述制备。反应重复三次。使用长吸管向

各溶液鼓泡氮1小时。移去所述吸管并将各管仔细盖好。然后使用油浴在60℃加热各溶液3小时。使各溶液冷却至室温并合并在圆底内。减压干燥所述粗聚合物。分子量通过MALS获得:55,000 (PDI 2.1); 聚合物组成使用 ^1H NMR获得:74:26胺:烷基 (Amine:Alkyl)。



Lau41648-106

[0522] GPC分级分离。所干燥的粗聚合物以50mg/mL加入75%二氯甲烷、25%四氢呋喃和0.2%三乙胺。然后在Jordi Gel DVB10⁴ Å-500mm/22mm柱上用5ml/min的流速注射10mL来分级分离所述聚合物。从15~17分钟收集早期组分,从17~19分钟收集晚期组分。组分15-17:Mw 138,000 (PDI 1.1); 组分17-19:Mw64,000 (PDI 1.2)。

[0523] MALS分析。约10mg聚合物溶于0.5mL的89.8%二氯甲烷、10%四氢呋喃、0.2%三乙胺中。用连接岛津公司 (Shimadzu) Prominence HPLC的Wyatt Helos II多角度光散射检测器测量分子量和多分散性 (PDI), 使用Jordi 5μ7.8×300混合床LS DVB柱。粗聚合物:MW: 55,000 (PDI 2.1), 组分15-17:MW 138,000 (PDI:1.1), 组分17-19:MW 64,000 (PDI 1.2)。

[0524] 纯化的BOC-保护聚合物与醋酸 (7mL) 中的2M HCl反应0.5小时去除BOC保护基团并产生胺。将15mL dH₂O加入反应, 所述溶液转移到截留3500MW的纤维素透析袋中, 用高盐透析24小时, 然后用dH₂O透析18小时。所述内容物冻干, 然后以20mg/mL的浓度溶于DI H₂O。聚合物溶液保存于2~8℃。

[0525] v) 合成水溶性、两亲性、膜活性聚 (乙烯基醚) 多胺三元共聚物在氮气层保护下将X mol%的胺保护乙烯基醚 (如2-乙烯氧基乙基邻苯二甲酰亚胺) 加入经烘箱干燥圆底烧瓶中的无水二氯甲烷内。向此溶液中加入Y mol%的低疏水性基团 (如丙基、丁基) 乙烯基醚和任选的Z mol%高疏水性基团 (如十二烷基、十八烷基) 乙烯基醚 (图1)。将所述溶液置于-50~-78℃浴中, 使2-乙烯氧基乙基邻苯二甲酰亚胺沉淀。向此溶液中加入10mol% BF₃ · (OCH₂CH₃)₂然后在-50~-78℃反应2-3小时。添加含氢氧化铵的甲醇溶液终止聚合。聚合物减压干燥然后于1,4-二噁烷/甲醇 (2/1) 中析出。每邻苯二甲酰亚胺加入20mol当量的肼以移除胺上的保护基团。溶液回流3小时然后减压干燥。得到的固体溶于0.5mol/L HCl并回流15分钟以形成聚合物的盐酸盐, 用蒸馏水稀释, 并再回流1小时。然后用NaOH中和所述溶液, 冷

却至室温 (RT)、转移到分子纤维素透析袋中,用蒸馏水透析,然后冻干。可用尺寸排阻或其他色谱进一步纯化所述聚合物。聚合物的分子量用柱根据标准过程评估,包括分析尺寸排阻色谱和多角度光散射 (SEC-MALS) 尺寸排阻色谱。

[0526] 聚合物DW1360。从2-乙烯氧基乙基邻苯二甲酰亚胺 (5g, 23.02mmol)、丁基乙烯基醚 (0.665g, 6.58mmol)、和十八烷基乙烯基醚 (0.488g, 1.64mmol) 单体合成胺/丁基/十八烷基聚(乙烯基醚)三元共聚物。在氩气层下将2-乙烯氧基乙基邻苯二甲酰亚胺加入含磁力搅拌棒的200mL经烘箱干燥圆底烧瓶中的36mL无水二氯甲烷内。向此溶液中加入丁基乙烯基醚和正十八烷基乙烯基醚。室温下 (RT) 所述单体完全溶解获得澄清的匀质溶液。然后将含澄清溶液的反应容器置于通过加入干冰到ACS级变性酒精和乙二醇的1:1溶液而生成的-50℃浴中,能形成邻苯二甲酰亚胺单体的可见沉淀。冷却约1.5分钟后,加入 $\text{BF}_3 \cdot (\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ (0.058g, 0.411mmol) 以起始聚合反应。聚合开始后邻苯二甲酰亚胺单体溶解。-50℃进行反应3小时。通过添加5mL溶于甲醇的1%氢氧化铵停止聚合。然后通过旋转蒸发移除溶剂。

[0527] 然后所述聚合物在30mL 1,4-二噁烷/甲醇 (2/1) 中溶解。向此溶液中加入肼 (0.147g, 46mmol) 并将混合物加热回流3小时。然后用旋转蒸发移除溶剂,得到的固体在20mL 0.5mol/L HCl中析出并回流15分钟,用20mL蒸馏水稀释,并再回流1小时。然后用NaOH中和所述溶液,冷却至室温、转移到3,500分子量的纤维素透析袋中,用蒸馏水透析24小时 (2×20L),然后冻干。

[0528] B) 蜂毒肽。所有蜂毒肽使用本领域的肽合成技术标准制备。合适的蜂毒肽可以是全部L型氨基酸,全部D型氨基酸(反)。不依赖于L或D型,所述蜂毒肽序列可以是逆向的(逆)。

序列表

<110> 箭头研究公司 (ARROWHEAD RESEARCH CORPORATION)

D·罗泽玛 (Rozema, David)

D·刘易斯 (Lewis, David)

E·基塔斯 (Kitas, Eric)

A·布罗金 (Blokhin, Andrei)

J·卡尔森 (Carlson, Jeffrey)

J·本森 (Benson, Jonathan)

P·海德威格 (Hadwiger, Philipp)

I·鲁尔 (Roehl, Ingo)

T·霍夫曼 (Hoffman, Torsten)

K·杨-霍夫曼 (Jahn-Hofmann, Kerstin)

H·M·穆勒 (Martin Mueller, Hans)

P·莫尔 (Mohr, Peter)

G·奥托 (Ott, Guenther)

D·维基菲尔德 (Wakefield, Darren)

J·沃尔夫 (Wolff, Jon)

<120> 具有酶敏感性连接的多核苷酸体内递送偶联物

[0001] <130> 27189 US1

<160> 25

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 1

gcaaaggcgu gccaacucac

20

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 2

tgagugggca cgecuuugct t

21

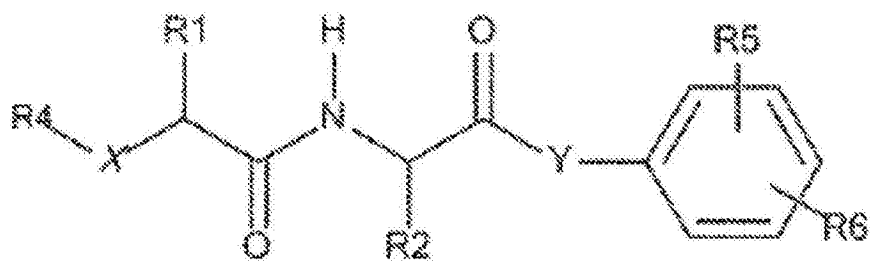
	<210> 3	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠	
	<400> 3	
	ggaucaucuc aagucuuact t	21
	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠	
	<400> 4	
	guaagacuug agaugaucct t	21
	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> DNA	
[0002]	<213> 小家鼠	
	<400> 5	
	guuggugaau ggagcucagt	20
	<210> 6	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠	
	<400> 6	
	cugagcucca uucaccaact t	21
	<210> 7	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 长尾猴	
	<400> 7	
	uuagguuggu gauggagcu cagt	24

[0003]	<210>	8	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	长尾猴	
	<400>	8	
	cugagcucca uucaccaact t		21
	<210>	9	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	小家鼠	
	<400>	9	
	ggaauuuuau auuugaucca a		21
	<210>	10	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	小家鼠	
	<400>	10	
	uuggauctaaa uauaagauuc ccu		23
	<210>	11	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	小家鼠	
	<400>	11	
	ggaugaagug gagaunagut		20
	<210>	12	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	小家鼠	
	<400>	12	

	acuaaucucc acuucaucct t	21
	<210> 13	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 北美萤火虫	
	<400> 13	
	uaucuuacgc ugaguacuuc gat	23
	<210> 14	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 北美萤火虫	
	<400> 14	
	ucgaaguacu cagcguaagt t	21
[0004]	<210> 15	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 北美萤火虫	
	<400> 15	
	cuuacgcuga guacuucgat t	21
	<210> 16	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 北美萤火虫	
	<400> 16	
	ucgaaguacu cagcguaagt t	21
	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠	

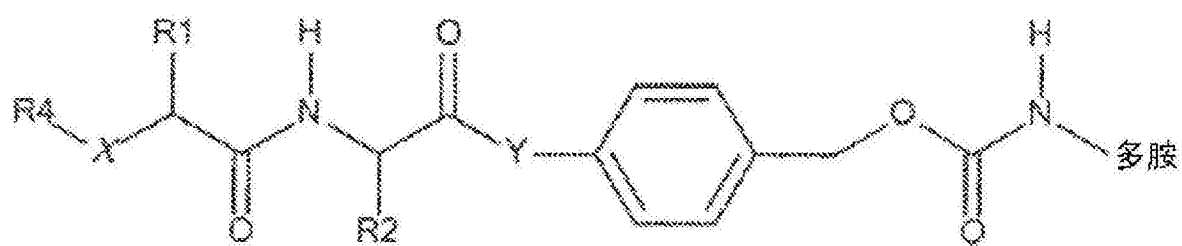
	<400> 17	
	ucgagaaucu aaacuaacut	20
	<210> 18	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠	
	<400> 18	
	aguuaguuua gauucucgat t	21
	<210> 19	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠	
	<400> 19	
	aguuaguuua gauucucgat t	21
[0005]	<210> 20	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠	
	<400> 20	
	ucgagaaucu aaacuaacut t	21
	<210> 21	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 维多利亚多管水母	
	<400> 21	
	ccacaugaag cagcagacu u	21
	<210> 22	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 维多利亚多管水母	

	<400> 22	
	aagucgugcu gcuucaugug guc	23
	<210> 23	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠	
	<400> 23	
	ugugcaaagg cgugccaacu cat	23
	<210> 24	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠	
[0006]	<400> 24	
	tgaguuggca cgccuuuget t	21
	<210> 25	
	<211> 26	
	<212> PRT	
	<213> 小蜜蜂	
	<400> 25	
	Leu Ile Gly Ala Ile Leu Lys Val Leu Ala Thr Gly Leu Pro Thr Leu	
	1 5 10 15	
	Ile Ser Trp Ile Lys Asn Lys Arg Lys Gln	
	20 25	



二肽掩蔽剂

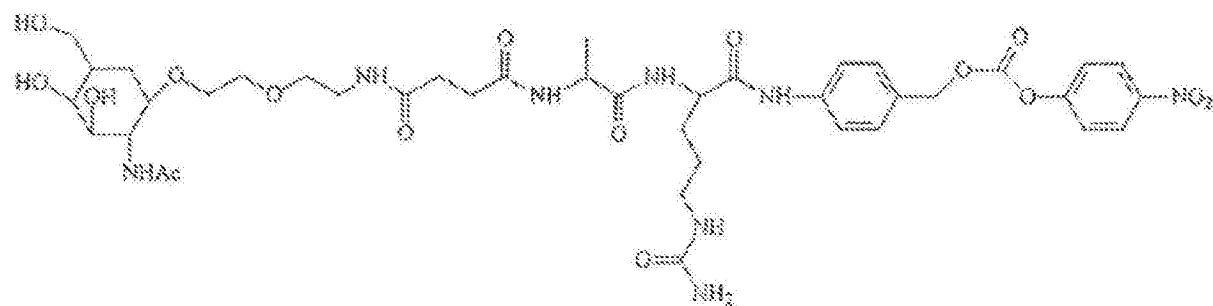
图1



连接多胺的二肽掩蔽剂

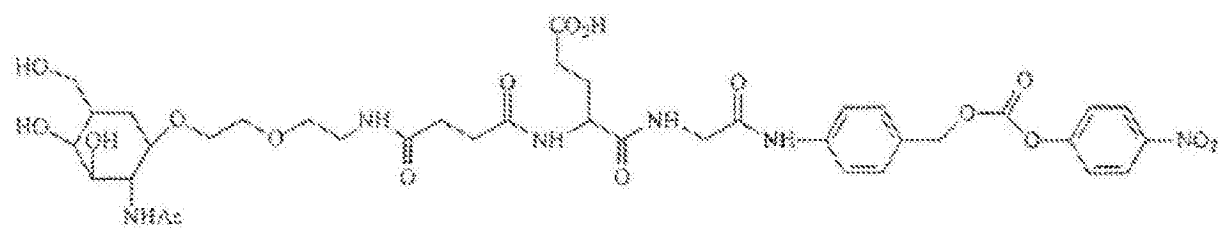
图2

A.



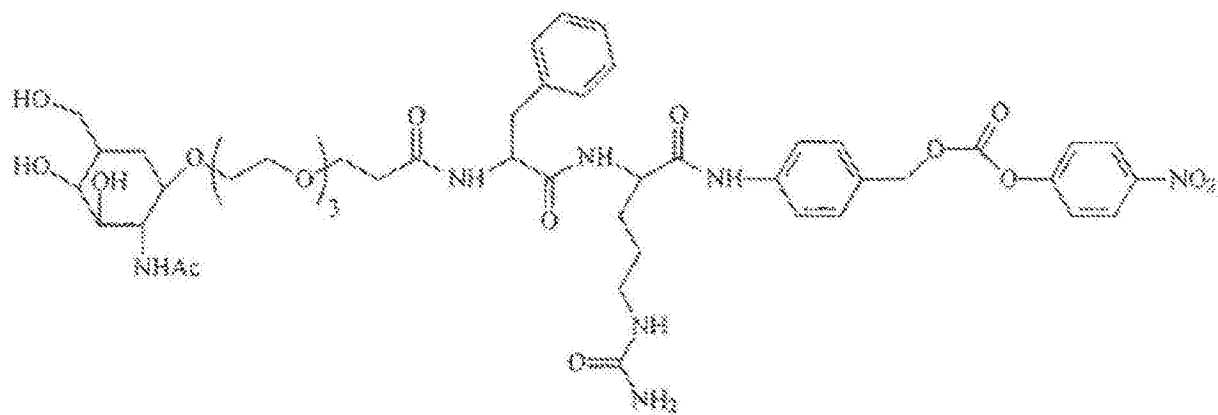
NAG-AlaClt-PABC-PNP

B.



NAG-GluGly-PABC-PNP

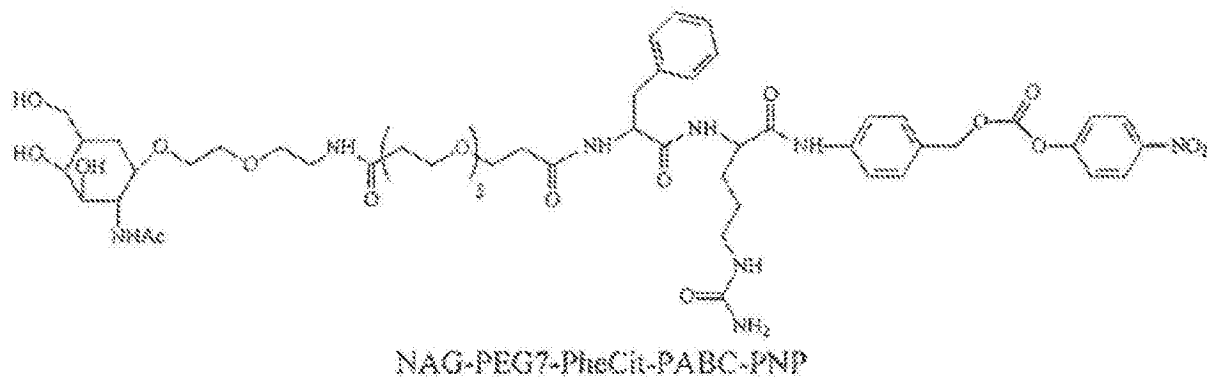
C.



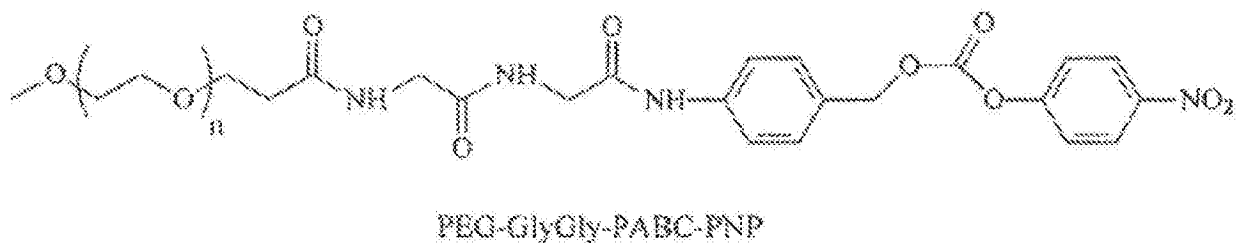
NAG-PEG4-PhcClt-PABC-PNP

图3

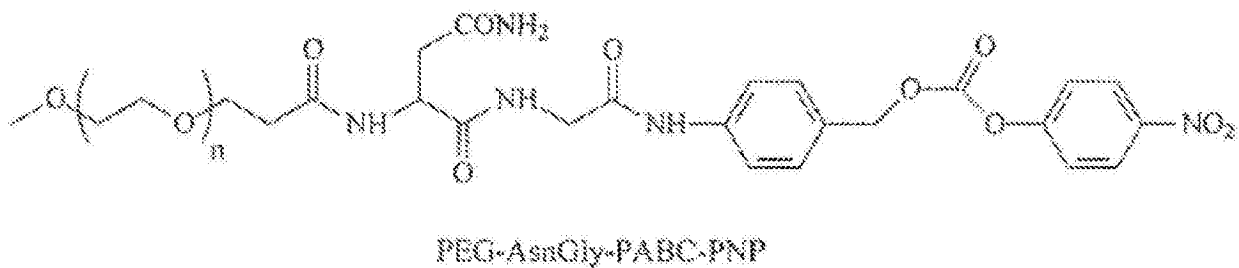
D.



E.



F.



G.

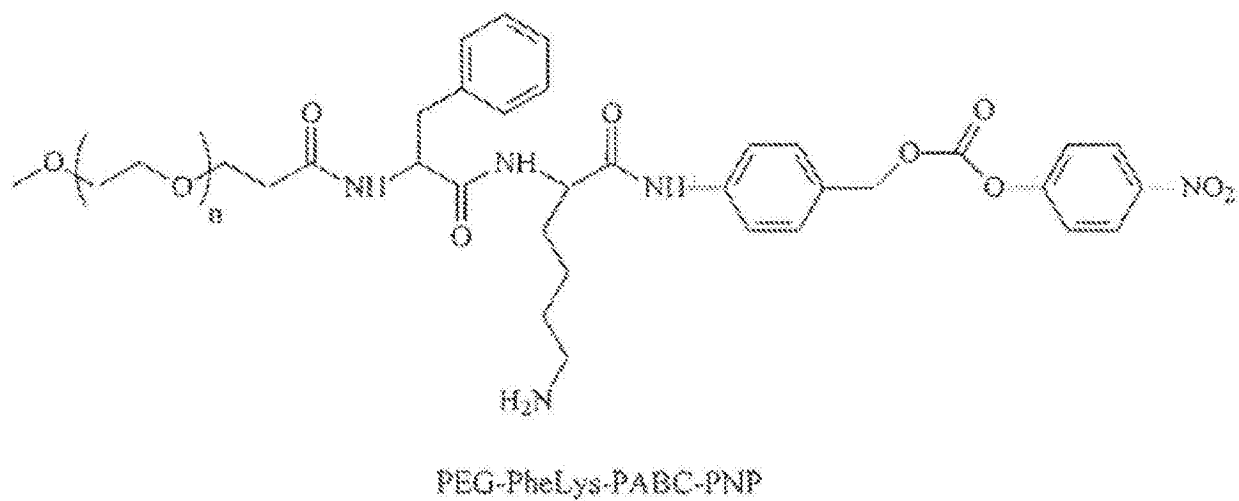
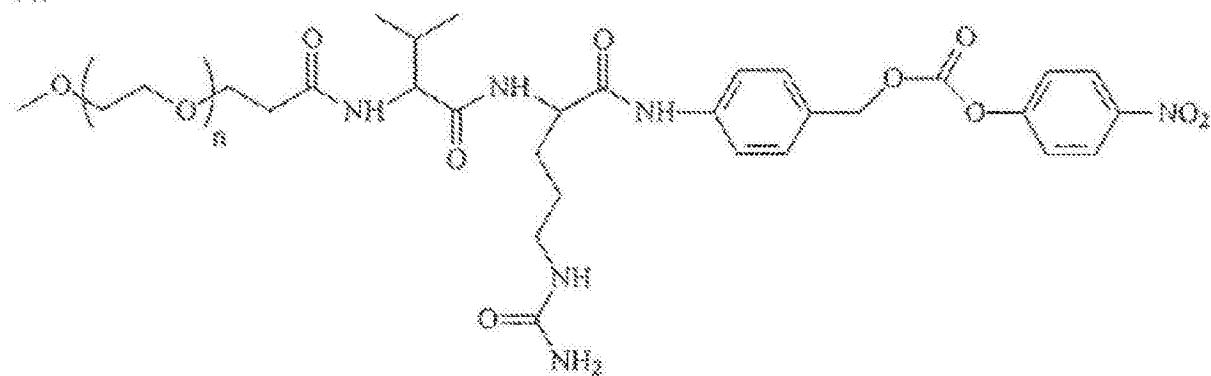


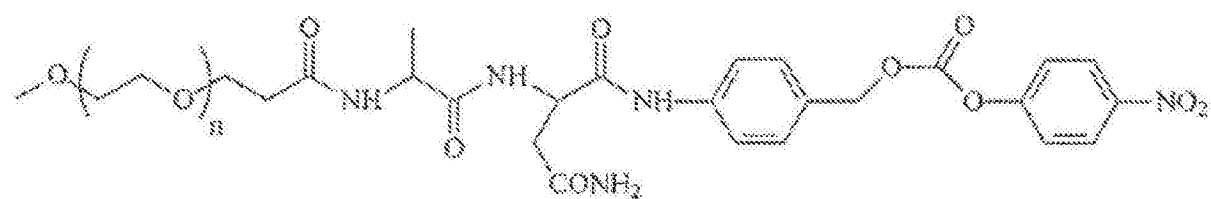
图3(续)

H.



PEG-ValCit-PABC-PNP

I.



PEG-AlaAsn-PABC-PNP

J.

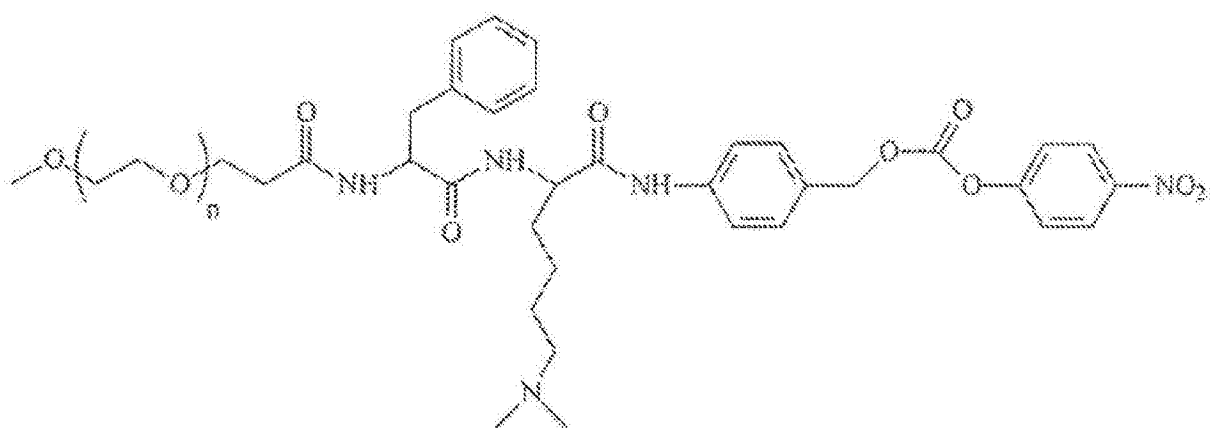
PEG-PheLys(CH₂)₃-PABC-PNP

图3(续)

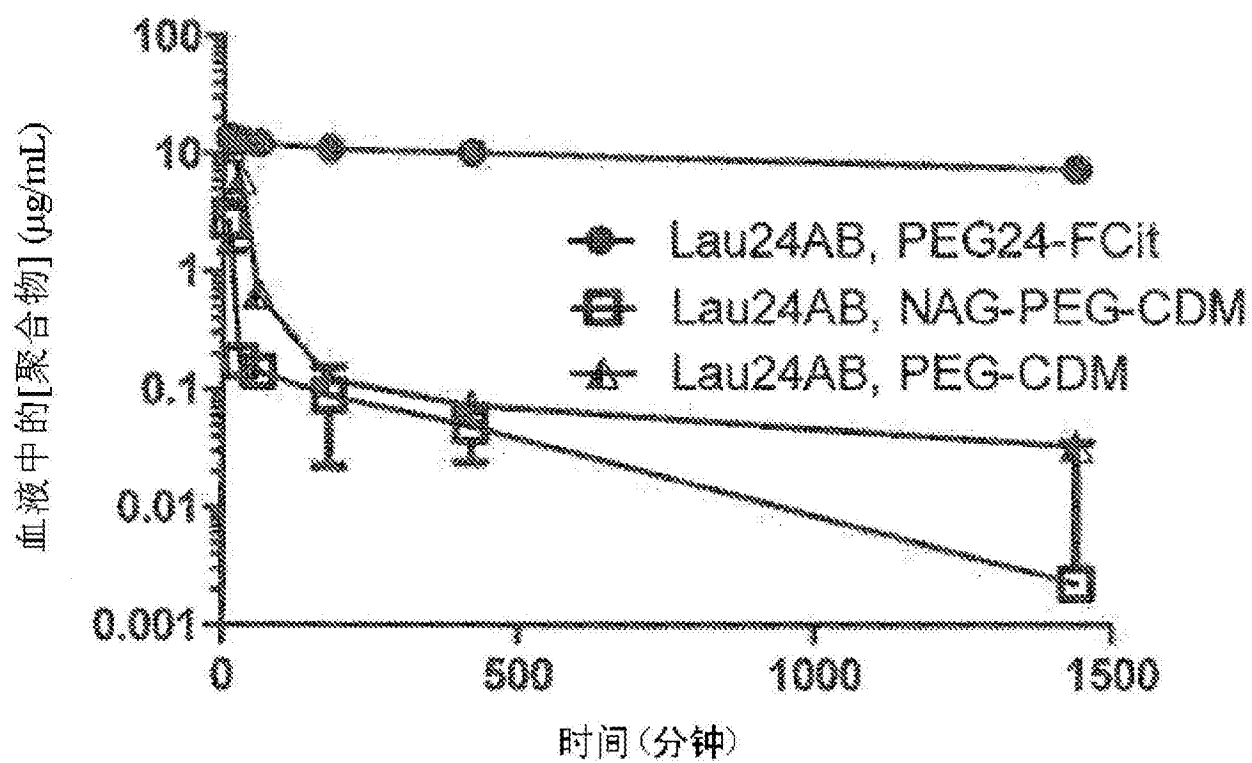


图4