(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 114502201 B
(45)授权公告日 2025.04.25

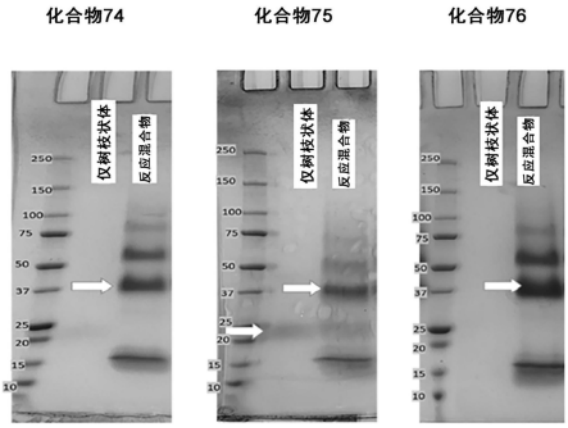
(21)申请号 202080064953.8
(22)申请日 2020.08.28
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114502201 A
(43)申请公布日 2022.05.13
(30)优先权数据
2019903152 2019.08.28 AU
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.03.16
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2020/050910 2020.08.28
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/035310 EN 2021.03.04
(73)专利权人 星药私人有限公司
地址 澳大利亚维多利亚州
(72)发明人 D·欧文 S·采盖 S·申古尔 P·雷塔诺 C·波特 A·约翰生 D·袁
(74)专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713
专利代理师 王思琪 刘小立
(51)Int.Cl.
A61K 47/56(2006.01)
A61K 47/60(2006.01)
C07K 16/32(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 39/44(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
(56)对比文件
CN 103796684 A,2014.05.14
CN 104781281 A,2015.07.15
审查员 李玉婷
权利要求书1页 说明书93页
序列表3页 附图24页

(54)发明名称

靶向性树枝状体缀合物

(57)摘要

本文提供了树枝状体-靶向剂缀合物,其包含树枝状体,所述树枝状体包含核心单元和赖氨酸或赖氨酸类似物结构单元、HER2靶向剂和治疗剂,所述HER2靶向剂是具有高达约80kDa的分子量并且包含抗原结合位点的肽部分,所述肽部分通过间隔子基团共价连接,所述治疗剂共价连接至所述树枝状体的表面结构单元。本文还提供了包含所述缀合物的组合物、和使用所述缀合物特别是用于治疗癌症的治疗方法。

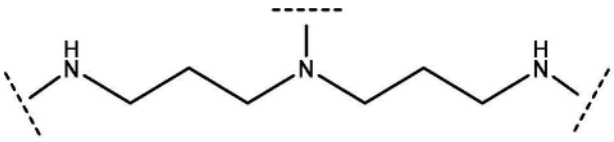


CN 114502201 B

1.一种树枝状体-靶向剂缀合物,其包含:

a)树枝状体,所述树枝状体包含

i)核心单元(C),其中所述核心单元包含下结构:



以及

;

ii)3至4代结构单元(BU),每个结构单元是赖氨酸残基;

其中所述核心单元经由酰胺键共价附接至至少两个结构单元,每个酰胺键在所述核心单元中存在的氮原子与结构单元中存在的酰基基团的碳原子之间形成;

b)HER2靶向剂,所述HER2靶向剂是具有重链可变(V_H)结构域、具有10kDa至16kDa的分子量并且包含抗原结合位点的单结构域抗体,并且其中所述HER2靶向剂包含来自氨基酸序列SEQ ID NO.1的互补决定区(CDR)1、2和3的氨基酸序列,所述HER2靶向剂通过间隔子基团共价连接至所述树枝状体的核心,所述间隔子基团包含聚乙二醇(PEG)基团;

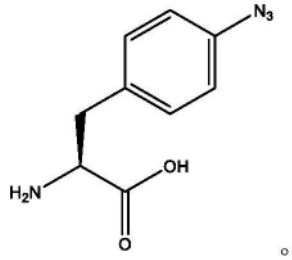
c)治疗剂,所述治疗剂通过包含肽基团的酶促可裂解接头共价连接至所述树枝状体的表面结构单元,其中所述治疗剂是澳瑞司他汀;以及

d)亲水性聚合物基团,所述亲水性聚合物基团共价连接至所述树枝状体的表面结构单元,其中所述亲水性聚合物基团是具有900至2300Da的平均分子量的PEG基团。

2.如权利要求1所述的缀合物,其中所述HER2靶向剂包含SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2或SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列。

3.如权利要求1所述的缀合物,其中所述靶向剂前体包含非天然氨基酸残基,

所述非天然氨基酸残基是以下的残基:



。

4.如权利要求1所述的缀合物,其中所述靶向剂经由所述靶向剂的C末端共价连接至所述间隔子基团。

5.如权利要求1所述的缀合物,其中所述治疗剂是单甲基澳瑞司他汀E。

6.如权利要求1所述的缀合物,其中所述可裂解接头包含Val-Cit-PAB基团。

7.如权利要求1所述的缀合物,其中所述树枝状体具有三代的结构单元。

8.一种药物组合物,其包含:

i)如权利要求1至7中任一项所述的缀合物;以及

ii)药学上可接受的赋形剂。

9.如权利要求1至7中任一项所述的缀合物、或如权利要求8所述的组合物在制造用于治疗癌症的药物中的用途。

10.如权利要求9所述的用途,其中所述癌症是卵巢癌、乳腺癌、胃癌、子宫癌或特征在于ERBB2基因的异常表达的另外癌症。

靶向性树枝状体缀合物

技术领域

[0001] 本公开总体上涉及可用于靶向过表达HER2的癌症的疗法。更具体地,本公开涉及通过树枝状体-靶向部分缀合物靶向递送治疗剂部分,所述缀合物包含HER2抗体片段或模拟物、和治疗剂部分诸如超细胞毒性剂(ultracytotoxic agent)的残基。

背景技术

[0002] 根据WHO,癌症是全世界第二大死亡原因,在2018年造成估计960万死亡。最常见的癌症形式是肺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、皮肤癌和胃癌。

[0003] 已经有许多努力来开发有效的肿瘤疗法。然而,寻找具有靶标处的足够效力、适当的药代动力学特性(使得它可以递送至作用位点)和足够的作用持续时间以及良好的安全性概况的新疗法的挑战是极其困难、耗时和昂贵的。

[0004] 单克隆抗体疗法诸如曲妥珠单抗(Herceptin®)和利妥昔单抗(Mabthera®)的开发构成一种具有显著成功的方法。例如,Herceptin®在1998年被批准,并且用于治疗HER2过表达乳腺癌和胃癌。所述抗体通过结合在一些癌症形式中过表达的HER2/ERBB2受体,并且阻断刺激癌细胞生长的信号而起作用。然而,Herceptin®有缺点。例如,已知的副作用包括心肌损伤和心力衰竭。Herceptin®即使在其癌症是HER2阳性的患者亚组中也并非完全有效,并且已经提出了若干种抗性机制(Pohlmann,Mayer和Mernaugh,2009)。

[0005] 另一种形成鲜明对比的治疗方法涉及使用对快速分裂细胞具有活性的细胞毒性剂。长期确立的实例是顺铂,其用于治疗各种癌症,包括卵巢癌、膀胱癌、睾丸癌和鳞状细胞癌。另一组细胞毒性剂是超细胞毒性剂,包括澳瑞司他汀(auristatin)诸如单甲基澳瑞司他汀E(MMAE),所述超细胞毒性剂是极其有效的药剂,但可能同时对一些患者引起严重毒性和损害副作用。因此,此类超细胞毒性剂不能凭借自身能力作为化学治疗剂安全地施用至患者。已经进行研究以鉴定利用此类超细胞毒性剂的手段,从而导致开发抗体药物缀合物诸如维布妥昔单抗(brentuximab vedotin)(Adcetris®),其含有通过线性接头缀合至布妥昔单抗(CD30抗体)的MMAE,并且被批准用于治疗霍奇金淋巴瘤和间变性大细胞淋巴瘤。

[0006] 由于治疗指数(即治疗效果与毒性的比率)差,许多药物候选物在临床试验中失败。这些失败的一些潜在原因包括缺乏效力、缺乏特异性、药物吸收/生物利用度差、无法控制生物分布、快速代谢和清除以及储存时不稳定。实际上,在实现必要的治疗性细胞毒性以杀伤癌细胞和将有害毒性和副作用减轻至可以被患者耐受的水平中取得平衡。

[0007] 已经研究了各种方法以试图改善具有次优特性的化合物治疗效果。例如,对于快速清除的化合物,可以开发持续释放配制品。化学治疗剂领域的一个这样的实例是产品Onivyde®(活性成分伊立替康的脂质体配制品),其与常规配制品相比具有大大降低的从血浆中消除的速率(Messerer等人,2004)。其他技术包括使用积存注射配制品(例如,Lupron Depot®)。还已经研究了树枝状体技术,以尝试改善药物活性剂的特性和规避配制困难,例如WO2012/167309描述了特别是含有难溶性药剂多西他赛的药物-树枝状体缀合物

的提供。

[0008] 尽管本领域中有这些和其他进展,但仍然需要开发在治疗诸如癌症的疾病方面是安全且有效的另外疗法。

[0009] 对本说明书中包括的文件、法令、材料、装置、制品等的任何讨论不应被视为承认任何或所有这些内容形成现有技术基础的一部分或者是本公开相关领域中的一般常识。

发明内容

[0010] 在第一方面,提供了树枝状体-靶向剂缀合物,其包含:

[0011] a)树枝状体,所述树枝状体包含

[0012] i)核心单元(C);以及

[0013] ii)结构单元(BU),每个结构单元是赖氨酸残基或其类似物;

[0014] 其中所述核心单元经由酰胺键共价附接至至少两个结构单元,每个酰胺键在所述核心单元中存在的氮原子与结构单元中存在的酰基基团的碳原子之间形成;

[0015] b)HER2靶向剂,所述HER2靶向剂是具有高达约80kDa的分子量并且包含抗原结合位点的肽部分,所述肽部分通过间隔子基团共价连接至所述树枝状体;

[0016] c)治疗剂,所述治疗剂共价连接至所述树枝状体的表面结构单元;以及

[0017] d)亲水性聚合物基团,所述亲水性聚合物基团共价连接至所述树枝状体的表面结构单元。

[0018] 在一些实施方案中,所述肽部分选自:重链抗体、Fab、Fv、scFv或单结构域抗体。在一些实施方案中,所述肽部分包含重链可变(V_H)结构域或由其组成。在一些实施方案中,所述肽部分包含轻链可变(V_L)结构域或由其组成。

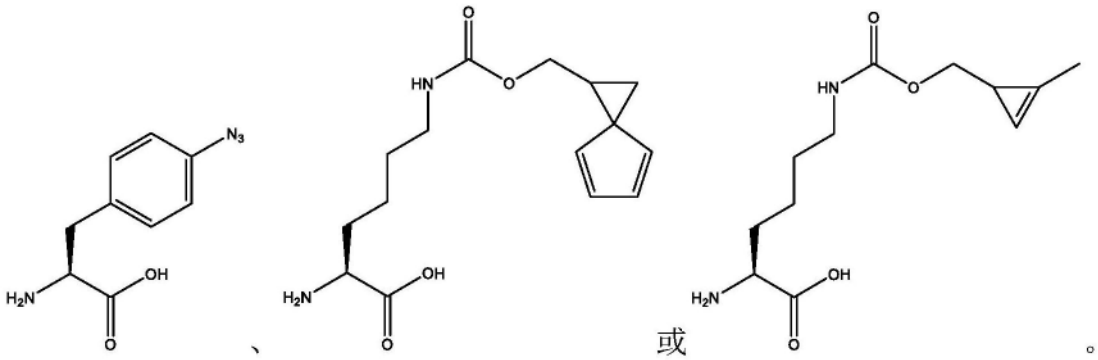
[0019] 在一些实施方案中,所述靶向剂具有约5kDa至约30kDa的分子量。在一些实施方案中,所述靶向剂具有约5kDa至约18kDa的分子量。在一些实施方案中,所述靶向剂具有约5kDa至约15kDa的分子量。在一些实施方案中,所述靶向剂具有约10kDa至约16kDa的分子量。在一些实施方案中,所述靶向剂具有约14kDa至约18kDa的分子量。

[0020] 在一些实施方案中,所述靶向剂包含少于120个氨基酸残基。

[0021] 在一些实施方案中,所述靶向剂包含如本文所定义的任一种氨基酸序列或由其组成。

[0022] 在一些实施方案中,一个靶向剂共价连接至所述树枝状体。在一些实施方案中,多于一个靶向剂共价连接至所述树枝状体。

[0023] 在一些实施方案中,所述靶向剂前体包含非天然氨基酸残基,所述非天然氨基酸残基具有包括反应性官能团的侧链。在一些实施方案中,所述非天然氨基酸残基是以下的残基:

[0024] 

[0025] 在一些实施方案中,所述靶向剂经由所述靶向部分的C末端共价连接至所述间隔子基团。

[0026] 在一些实施方案中,所述间隔子基团前体包含作为炔烃基团的反应性官能团。在一些实施方案中,所述炔烃基团是二苯并环辛炔基团。

[0027] 在一些实施方案中,所述间隔子基团共价附接至所述树枝状体的表面结构单元。在一些实施方案中,所述间隔子基团共价附接至所述核心单元。

[0028] 在一些实施方案中,所述靶向剂与所述间隔子基团之间的共价键已经通过靶向剂前体和间隔子基团前体上存在的互补反应性官能团之间的反应而形成。在一些实施方案中,所述间隔子基团包含烯烃基团。

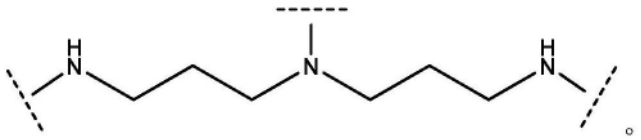
[0029] 在一些实施方案中,所述治疗剂是化学治疗剂。在一些实施方案中,所述治疗剂是细胞毒性剂。在一些实施方案中,治疗剂是超细胞毒性剂。在一些实施方案中,所述治疗剂是澳瑞司他汀或美登木素生物碱(maytansinoid)。在一些实施方案中,所述治疗剂是单甲基澳瑞司他汀E。在一些实施方案中,所述治疗剂是单甲基澳瑞司他汀F。在一些实施方案中,所述治疗剂是SN-38。在一些实施方案中,所述治疗剂是卡巴他赛。

[0030] 在一些实施方案中,所述治疗剂经由接头共价连接至所述树枝状体的表面结构单元。在一些实施方案中,所述治疗剂经由可裂解接头共价连接至所述树枝状体的表面结构单元。在一些实施方案中,所述可裂解接头包含Val-Cit-PAB基团。

[0031] 在一些实施方案中,所述缀合物包含共价连接至所述树枝状体的表面结构单元的亲水性聚合物基团。在一些实施方案中,所述亲水性聚合物基团是PEG基团,其共价连接至所述树枝状体的表面结构单元。在一些实施方案中,所述PEG基团具有在约500至约2500g/mol范围内的平均分子量。

[0032] 在一些实施方案中,所述间隔子基团包含PEG基团。

[0033] 在一些实施方案中,所述核心单元包含以下结构:

[0034] 

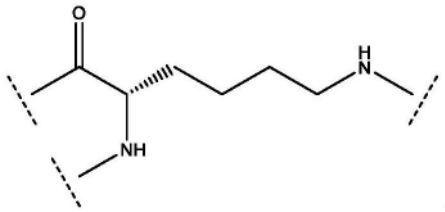
[0035] 在一些实施方案中,所述核心单元包含以下结构:

[0036] 

[0037] 在一些实施方案中,所述核心单元是BHALys。

[0038] 在一些实施方案中,所述树枝状体具有一至五代的结构单元。在一些实施方案中,所述树枝状体具有三至五代的结构单元。在一些实施方案中,所述树枝状体具有三代的结构单元。在一些实施方案中,所述树枝状体具有四代的结构单元。在一些实施方案中,所述树枝状体具有五代的结构单元。

[0039] 在一些实施方案中,所述结构单元各自是:

[0040] 

[0041] 在一些实施方案中,所述缀合物用于与另外的活性剂组合施用。

[0042] 在一些实施方案中,所述缀合物内化在HER2表达细胞内。

[0043] 在一些实施方案中,与等同剂量的游离治疗剂的施用相比,所述缀合物的施用导致降低的副作用。

[0044] 在一些实施方案中,与等同剂量的游离治疗剂的施用相比,所述缀合物的施用提供了释放的治疗剂的最大血浆浓度的至少50%降低。

[0045] 在第二方面,提供了组合物,其包含多种如本文所定义的缀合物。

[0046] 在第三方面,提供了药物组合物,其包含:

[0047] i)如本文所述的缀合物;以及

[0048] ii)药学上可接受的赋形剂。

[0049] 在一些实施方案中,将所述组合物配制用于肠胃外递送。

[0050] 在一些实施方案中,所述缀合物或组合物用于在治疗癌症中使用。

[0051] 在第四方面,提供了治疗癌症的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的如本文所述的缀合物或组合物。

[0052] 在第五方面,提供了如本文所述的缀合物或组合物在制造用于治疗癌症的药物中的用途。

[0053] 在一些实施方案中,所述癌症是卵巢癌、乳腺癌、胃癌、子宫癌或特征在于ERBB2基因的异常表达的另外癌症。

[0054] 在第六方面,提供了杀伤HER2表达细胞的方法,其包括:

[0055] 使如本文所定义的缀合物与HER2表达细胞接触,使得所述缀合物内化在所述细胞内,由此所述治疗剂杀伤所述HER2表达细胞。

[0056] 应当理解,本文描述了另外的方面、实施方案和实施例,其可以包括如上所述的一个或多个实施方案或特征。

附图说明

[0057] 图1示出了用考马斯蓝染色的化合物74、75和76的SDS Page分析。

[0058] 图2示出了化合物77和78的SDS Page和荧光成像分析。

[0059] 图3示出了化合物41(泳道A:粗制混合物;泳道B:纯化的缀合物)、42(泳道C:粗制混合物;泳道D:纯化的缀合物)、43(泳道E:粗制混合物;泳道F:纯化的缀合物)、44(泳道G:粗制混合物;泳道H:纯化的缀合物)和45(纯化的缀合物)的SDS Page和荧光成像分析。

[0060] 图4示出了在24h内化合物36(对照)和化合物41(靶向性)与MDA-MB-231、MDA-MB-231/HER2和SKOV-3细胞的平均荧光强度值。每次测量计数至少10,000个细胞。值是平均值±标准偏差(SD;n=3)。

[0061] 图5示出了在37℃下以3.33nM与HER2阳性细胞(MDA-MB-231/HER2)和HER2阴性细胞(MDA-MB-231)一起孵育的树枝状体在24h孵育内的流式细胞术分析。每次测量计数至少10,000个细胞。值是平均值±标准偏差(SD;n=3)。

[0062] 图6示出了用浓度为3.33nM的a)化合物36(对照)或b)化合物41(靶向性)处理24h的MDA-MB-231细胞的共聚焦显微镜图像。绿色荧光、蓝色荧光和红色荧光分别表示用AF-488-WGA染色的细胞膜、用DAPI染色的核以及用Cy5标记的树枝状体。比例尺=50μm。

[0063] 图7示出了用浓度为3.33nM的a)化合物36(对照)或b)化合物41(靶向性)处理24h的MDA-MB-231/HER2细胞的共聚焦显微镜图像。绿色荧光、蓝色荧光和红色荧光分别表示用AF-488-WGA染色的细胞膜、用DAPI染色的核以及用Cy5标记的树枝状体。比例尺=50μm。

[0064] 图8示出了用浓度为3.33nM的a)化合物36(对照)或b)化合物41(靶向性)处理24h的SKOV-3细胞的共聚焦显微镜图像。绿色荧光、蓝色荧光和红色荧光分别表示用AF-488-WGA染色的细胞膜、用DAPI染色的核以及用Cy5标记的树枝状体。比例尺=50μm。

[0065] 图9示出了在48h时牺牲之后3H标记的化合物40和化合物45树枝状体的肿瘤和血液分布数据。所有数据按组织质量归一化。所有数据表示平均值±SEM(n=5);(NS=不显著;*=p值<0.05)。

[0066] 图10示出了在48h时牺牲之后化合物36和41的代表性离体肿瘤分布。数据表示(左图)非靶向性树枝状体(化合物36)和(右图)靶向性树枝状体(化合物41)的典型视场。

[0067] 图11示出了显示靶向性树枝状体(化合物41)被摄入至肿瘤的核心和外周区域中,并且显示对照化合物36并非如此的图像。

[0068] 图12示出了针对接种有用以下项处理后的SKOV3细胞的小鼠的平均肿瘤体积随时间的图:媒介物、对照化合物36、靶向性缀合物41、Kadcyla®或Herceptin®。

[0069] 图13示出了针对接种有用以下项处理后的SKOV3细胞的小鼠的随时间的存活百分比:媒介物、对照化合物36、靶向性缀合物41、Kadcyla®或Herceptin®。

[0070] 图14示出了针对接种有用以下项处理后的SKOV3细胞的小鼠的随时间的平均重量变化%:媒介物、对照化合物36、靶向性缀合物41、Kadcyla®或Herceptin®。

[0071] 图15示出了具有单一(化合物90;MFI单一)或多个(化合物91;MFI多个)缀合的抗HER2纳米抗体的第4代树枝状体的内化动力学。

[0072] 图16示出了在与化合物91(多个2D3-树枝状体缀合物)在37℃下一起孵育a)1h、b)3h、c)6h或d)24h之后的SKOV-3的共聚焦显微镜图像。将化合物91用Cy5(品红)进行标记,将

细胞膜用AF488-WGA(绿色)进行染色,并且将核用Hoechst 33342(蓝色)进行标记。比例尺=30μM。

[0073] 图17示出了在与化合物90(单—2D3-树枝状体缀合物)在37℃下一起孵育a)1h、b)3h、c)6h或d)24h之后的SKOV-3的共聚焦显微镜图像。将化合物91用Cy5(品红)进行标记,将细胞膜用AF488-WGA(绿色)进行染色,并且将核用Hoechst 33342(蓝色)进行标记。比例尺=30μM。

[0074] 图18是本公开的化合物的放射TLC图像,其显示^{89}Zr结合至树枝状体。

[0075] 图19示出了对于化合物89、90和92,在9天内在(a)肾脏、(b)肝脏和(c)肿瘤中注射锆剂量百分比/克的图。

[0076] 图20示出了在4小时至9天时动物的放射标记缀合物PET图像的代表性最大强度投影。数据表示为贝可/体素(cm3)并且已经阈值处理以突出显示肿瘤摄入。

[0077] 图21示出了提供本公开的化合物在第2天和第9天时注射锆剂量/克的离体信号的肿瘤:器官比率的表。

[0078] 图22示出了提供本公开的化合物在第2天和第9天时离体肿瘤和器官中的注射锆剂量百分比/克的表。

[0079] 图23示出了在24h内化合物70(对照)和化合物78(靶向性)与MDA-MB-231/HER2细胞的流式细胞术分析和平均荧光强度值。

[0080] 图24示出了在24h内化合物70(对照)和化合物78(靶向性)与MDA-MB-231细胞的流式细胞术分析和平均荧光强度值。

[0081] 图25示出了关于SKOV-3细胞,在24h内化合物70(对照)和化合物78(靶向性)的流式细胞术分析和平均荧光强度值。

[0082] 序列表的说明

[0083] SEQ ID NO.1:2D3纳米抗体。

[0084] SEQ ID NO.2:具有N末端标签、TEV、C末端叠氮化物的2D3纳米抗体。

[0085] SEQ ID NO.3:具有C末端标签、TEV、叠氮化物的2D3纳米抗体。

具体实施方式

[0086] 一般定义

[0087] 除非另外明确定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语应被视为具有与本领域(例如,化学、生物化学、药物化学、聚合物化学等)的普通技术人员通常所理解的相同的含义。

[0088] 在本说明书通篇中,词语“包含(comprise)”或变型诸如“包含(comprise/comprising)”应理解为暗示包括所述要素、整数或步骤、或成组要素、整数或步骤,而非排除任何其他要素、整数或步骤、或成组要素、整数或步骤。如本文所用,术语“和/或”(例如,“X和/或Y”)应理解为意指“X和Y”或者“X或Y”,并且应被视为提供对于两种含义或对于任一种含义的明确支持。

[0089] 如本文所用,除非相反地声明,否则术语约是指指定值的+/-10%,更优选地+/-5%。

[0090] 除非上下文另外明确指出,否则如本文所用,术语“一个/种(a/an)”和“所述”包括

单数和复数方面。

[0091] 如本文所用,术语“受试者”是指易感HER2(人表皮生长因子受体2)相关疾病或病症的任何生物体。在一些实施方案中,受试者可以是动物。在一个实例中,受试者是哺乳动物。在一个实施方案中,受试者是人。在一个实施方案中,受试者是非人动物。在一个实施方案中,受试者患有癌症。在一个实施方案中,受试者患有HER2阳性癌症。

[0092] 如本文所用,术语“治疗”包括缓解与特定障碍或病症相关的症状。例如,如本文所用,术语“治疗癌症”包括缓解与癌症相关的症状。在一个实施方案中,术语“治疗癌症”是指癌性肿瘤大小的减小。在一个实施方案中,术语“治疗癌症”是指癌症的侵袭性的降低。在一个实施方案中,术语“治疗癌症”是指无进展存活期的增加。如本文所用,术语“无进展存活期”是指在治疗癌症期间和之后,患者伴随疾病即癌症活着,但不具有疾病复发或症状增加的时间长度。

[0093] 如本文所用,术语“预防”包括预防特定障碍或病症。例如,如本文所用,术语“预防癌症”是指防止与癌症相关的症状的发作或持续。在一个实施方案中,术语“预防癌症”是指减缓或停止癌症的进展。在一个实施方案中,术语“预防癌症”是指减缓或防止转移。

[0094] 如本文所用,术语“治疗有效量”是指含有治疗剂的缀合物的施用量足以在一定程度上缓解或预防所治疗的障碍或病症的一种或多种症状。结果可以是疾病或病症的体征、症状或病因的减轻和/或缓解或者生物系统的任何其他期望变化。在一个实施方案中,术语“治疗有效量”是指缀合物的施用量足以导致癌性肿瘤大小的减小。在一个实施方案中,术语“治疗有效量”是指缀合物的施用量足以导致无进展存活期的增加。如本文所用,术语“有效量”是指缀合物有效实现期望的药理学效果或治疗性改善而无过度不良副作用或实现期望的药理学效果或治疗性改善并具有减轻的副作用概况的量。治疗有效量可以例如通过包括但不限于剂量递增临床试验的常规实验来确定。术语“治疗有效量”包括例如预防有效量。在一个实施方案中,预防有效量是足以防止转移的量。应理解,“有效量”或“治疗有效量”可以由于以下方面的变化而在受试者之间变化:化合物的代谢以及受试者的年龄、体重、一般状况、所治疗的病症、所治疗的病症的严重程度以及处方医师的判断中的任一者。本领域普通技术人员可以使用常规实验来确定在任何个别情况下适当的“有效量”。

[0095] 如本文所用,术语“附接”是指化学组分之间通过共价键合的连接。术语“共价键合”与术语“共价附接”可互换使用。

[0096] 树枝状体

[0097] 在第一方面,提供了树枝状体-靶向剂缀合物,其包含:

[0098] a)树枝状体,所述树枝状体包含

[0099] i)核心单元(C);以及

[0100] ii)结构单元(BU),每个结构单元是赖氨酸残基或其类似物;

[0101] 其中所述核心单元经由酰胺键共价附接至至少两个结构单元,每个酰胺键在所述核心单元中存在的氮原子与结构单元中存在的酰基基团的碳原子之间形成;

[0102] b)HER2靶向剂,所述HER2靶向剂是具有高达约80kDa的分子量并且包含抗原结合位点的肽部分,所述肽部分通过间隔子基团共价连接至所述树枝状体;

[0103] c)治疗剂,所述治疗剂共价连接至所述树枝状体的表面结构单元;以及

[0104] d)亲水性聚合物基团,所述亲水性聚合物基团共价连接至所述树枝状体的表面结

构单元。

[0105] 已经在体外和体内测试中证明树枝状缀合物是高度有效的抗癌剂,并且在实验研究中相对于Herceptin®和Kadcycla® (HER2-美坦辛(emtansine)抗体-药物缀合物)展示出改善的作用。与Herceptin®自身相比,缀合物快速内化至HER2过表达癌细胞中。预期快速的内化特性有助于将高比例的经由缀合物施用的治疗剂递送至期望的作用位点。将治疗性部分特异性递送至靶细胞(在其中所述治疗性部分快速内化)的能力有助于降低与其他非癌性细胞暴露于细胞毒性剂相关的不希望的副作用(即,毒性)。这种方法在递送细胞毒性治疗性部分(例如,超细胞毒性治疗性部分)的情况(在所述情况中其在血浆中的自由循环可能具有毒性作用)下是特别有利的。

[0106] 如本文所用,术语“树枝状体”是指含有核心和附接至核心的树枝化基元(dendron)的分子。每个树枝化基元由数代的支化结构单元组成,从而产生具有随着每代结构单元而增加的支链数的支化结构。“缀合物”可以包括如本文所定义的药学上可接受的盐或溶剂化物。

[0107] 如本文所用,术语“结构单元”是指支化分子,其是具有三个官能团的赖氨酸残基或其类似物,一个官能团(例如,衍生自羧酸基团)用于附接至核心或前一代结构单元,并且至少两个官能团(例如,衍生自胺)用于附接至下一代结构单元或形成树枝状体分子的表面。

[0108] 本领域技术人员应当理解,缀合物可以以多种形式产生,所述多种形式例如包括盐形式(例如,在缀合物中存在可电离基团的情况下),以及不同的溶剂化物。应理解,本公开涉及所有此类形式的树枝状体-靶向部分缀合物。

[0109] 缀合物的合适盐包括与有机或无机酸或碱形成的盐。如本文所用,短语“药学上可接受的盐”是指药学上可接受的有机或无机盐。示例性酸加成盐包括但不限于硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸式柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、丹宁酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、富马酸盐、葡糖酸盐、葡糖醛酸盐、糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲烷磺酸盐、乙烷磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和双羟萘酸(即,1,1’-亚甲基-双-(2-羟基-3-萘甲酸))盐。示例性碱加成盐包括但不限于铵盐;碱金属盐,例如钾和钠的那些;碱土金属盐,例如钙和镁的那些;以及与有机碱的盐,所述有机碱例如二环已基胺,N-甲基-D-葡糖胺,吗啉,硫代吗啉,哌啶,吡咯烷,单-、二-或三-低级烷基胺(例如乙基-、叔丁基-、二乙基-、二异丙基-、三乙基-、三丁基-或二甲基-丙胺),或单-、二-或三-羟基低级烷基胺(例如单、二或三乙醇胺)。药学上可接受的盐可以涉及包括另一种分子,诸如乙酸根离子、琥珀酸根离子或其他抗衡离子。抗衡离子可以是使母体化合物上的电荷稳定的任何有机或无机部分。此外,药学上可接受的盐在其结构中可以具有多于一个带电荷的原子。多个带电荷的原子是药学上可接受的盐的一部分的情况可以具有多个抗衡离子。因此,药学上可接受的盐可以具有一个或多个带电荷的原子和/或一个或多个抗衡离子。还应当理解,非药学上可接受的盐也落入本公开的范围内,因为这些可用作在制备药学上可接受的盐中的中间体,或者可以在储存或运输过程中是有用的。

[0110] 有机和/或药物化学领域的技术人员应当理解,许多有机化合物可以与它们在其中发生反应或从其中沉淀或结晶的溶剂形成复合物。这些复合物被称为“溶剂化物”。例如,

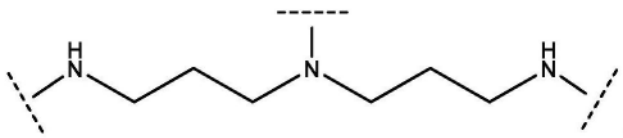
与水的复合物称为“水合物”。如本文所用,短语“药学上可接受的溶剂化物”或“溶剂化物”是指一个或多个溶剂分子和本公开的化合物的缔合。形成药学上可接受的溶剂化物的溶剂的实例包括但不限于水、异丙醇、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸和乙醇胺。

[0111] 核心单元

[0112] 树枝状体的核心单元(C)经由酰胺键共价附接至结构单元,每个酰胺键在核心单元中存在的氮原子与结构单元中存在的酰基基团的碳原子之间形成。因此,核心单元可以例如由包含氨基基团的核心单元前体形成。可以使用任何合适的含氨基分子作为核心单元前体。

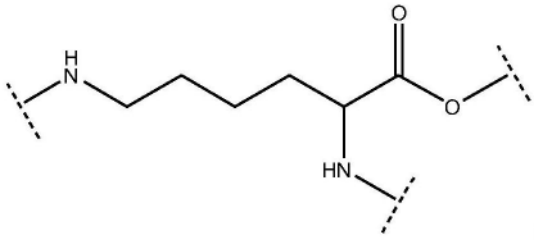
[0113] 通常,核心单元为用于共价附接结构单元的氮原子提供另外的官能性,例如,它可以包含用于通过间隔子基团附接靶向部分的官能团。换句话讲,HER2靶向剂通常通过间隔子基团共价连接至树枝状体的核心单元。在一些实施方案中,核心单元可从具有三个反应性氮原子(其中两个可用于附接结构单元,并且其中一个可用于附接间隔子基团)的前体衍生。

[0114] 在一些实施方案中,核心单元具有以下结构:

[0115] 

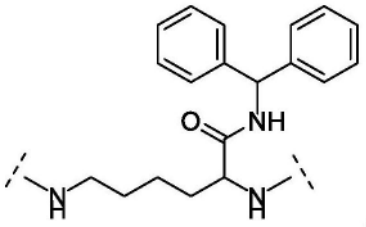
。

[0116] 在一些实施方案中,核心单元是具有三个附接点的赖氨酸分子,具有以下结构:

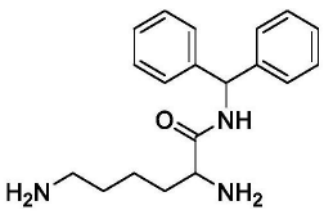
[0117] 

。

[0118] 在一些实施方案中,核心单元可从具有两个反应性氮原子(其可用于附接结构单元)的前体衍生。例如,在一些实施方案中,核心单元可从乙二胺、1,4-二氨基丁烷或1,6-二氨基己烷衍生。在一些实施方案中,核心单元具有以下结构:

[0119] 

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

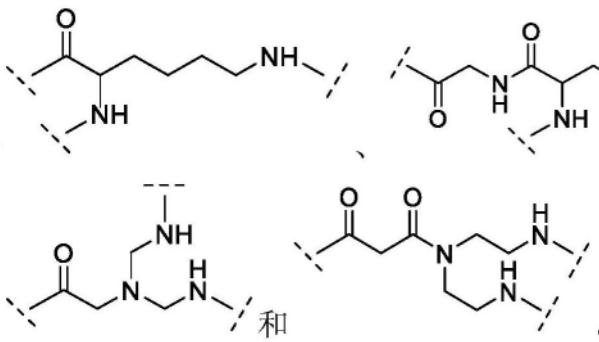
[0120] 

。

[0121] 在使用仅具有两个反应性氮原子的核心单元前体(诸如BHA-Lys)的情况下,通常将两个氨基基团用结构单元官能化,并且通常将间隔子基团(且因此靶向剂)经由表面结构单元附接。本发明的树枝状体-靶向剂缀合物允许多个末端基团以受控方式呈现在树枝状体-靶向剂缀合物的表面上。特别地,在使用赖氨酸结构单元的情况下,可以如下文所述预先确定靶向剂和/或亲水性聚合物基团和/或治疗剂在结构单元的α或ε氮原子上的放置。在一些优选的实施方案中,经由通过结构单元的附接在树枝状体的表面上提供亲水性聚合物基团、治疗剂和靶向剂。换句话讲,在那些实施方案中,核心单元不提供除了经由结构单元之外的用于靶向剂的附接点。应理解,在此类实施方案中,核心单元中存在的不用于共价附接至结构单元的任何官能团将是不反应的(即在缀合物已经暴露的条件下不起反应),或者将已经用合适的封端基团封端以防止进一步反应。这种核心单元的实例是上文讨论的BHA-Lys基团。

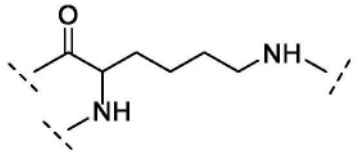
[0122] 结构单元

[0123] 结构单元(BU)是赖氨酸残基或其类似物,并且可以由合适的结构单元前体(例如含有适当的保护基团的赖氨酸或赖氨酸类似物)形成。赖氨酸类似物具有用于键合至后续代结构单元的两个氨基氮原子和用于键合至前一代结构单元或核心单元的酰基基团。合适的结构单元的实例包括


和

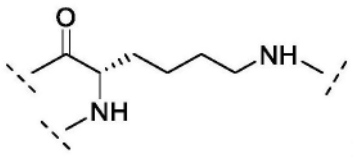
[0124] 其中每个结构单元的酰基基团提供了用于附接至核心或前一代结构单元的共价附接点;并且其中每个氮原子提供了用于共价附接至后续代结构单元或末端基团(诸如连接的治疗剂)的共价附接点。

[0125] 在一些优选的实施方案中,结构单元各自是:

[0126] 
;

[0127] 其中每个结构单元的酰基基团提供了用于附接至核心单元或前一代结构单元的共价附接点;并且其中每个氮原子提供了用于共价附接至后续代结构单元或末端基团(诸如连接的治疗剂)的共价附接点。

[0128] 在一些优选的实施方案中,结构单元各自是:

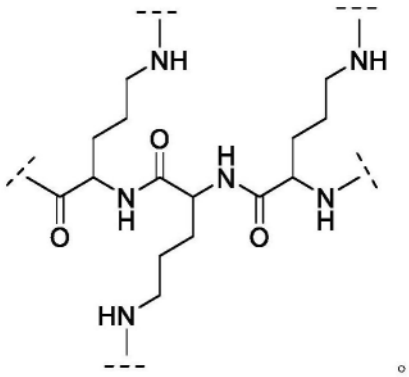
[0129] 
;

[0130] 其中每个结构单元的酰基基团提供了用于附接至核心或前一代结构单元的共价附接点;并且其中每个氮原子提供了用于共价附接至后续代结构单元或末端基团(诸如连接的治疗剂)的共价附接点。

[0131] 最外代结构单元($BU_{外}$)可以由如在如上所述的其他代结构单元(BU)中使用的赖氨酸或赖氨酸类似物结构单元形成。最外代结构单元($BU_{外}$)是树枝状体的核心单元的最外部的一代结构单元,即,没有进一步代的结构单元附接至最外代结构单元($BU_{外}$)。

[0132] 应当理解,树枝状体的树枝化基元可以例如通过相应地附接结构单元(BU)来合成至所需数量的代。在一些实施方案中,每一代结构单元(BU)可以由相同的结构单元形成,例如所有代的结构单元可以是赖氨酸结构单元。在一些其他实施方案中,一代或多代构建单元可以由不同于其他代结构单元的结构单元形成。

[0133] 树枝状体部分通常具有一至五代的结构单元。在一些实施方案中,树枝状体是一代结构单元树枝状体。在一些实施方案中,树枝状体是二代结构单元树枝状体。在一些实施方案中,树枝状体是三代结构单元树枝状体。在一些实施方案中,树枝状体是四代结构单元树枝状体。在一些实施方案中,树枝状体是五代结构单元树枝状体。例如,三代结构单元树枝状体是具有这样的结构的树枝状体,所述结构包括彼此共价连接的三个结构单元,例如在结构单元是赖氨酸的情况下,并且它可以包括以下亚结构:

[0134] 

[0135] 在一些实施方案中,树枝状体具有完全代的结构单元。例如,三代树枝状体具有三个完全代的结构单元。在核心具有两个反应性胺基团的情况下,这种三代树枝状体将包含14个结构单元(即核心单元+2BU+4BU+8BU)。然而,应当理解,由于用于产生树枝状体的合成方法的性质,为产生树枝状体进行的一个或多个反应可能未完全进行至完成。因此,在一些实施方案中,树枝状体可能包含不完全代的结构单元。例如,可以获得树枝状体的群体,其中树枝状体具有结构单元数/树枝状体的分布。在一些实施方案中,获得了树枝状体的群体,其具有至少8、或至少9、或至少10、或至少11、或至少12、或至少13的平均结构单元数/树枝状体。在一些实施方案中,获得了树枝状体的群体,其中至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的树枝状体具有10或更多个结构单元。在一些实施方案中,获得了树枝状体的群体,其中至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的树枝状体具有12或更多个结构单元。

[0136] 在一些实施方案中,每个树枝化基元(X)中的每一代结构单元可以由式$[BU]_2^{(b-1)}$表示,其中b是代数。具有三个完全代的结构单元的树枝化基元(X)表示为$[BU]_1$-$[BU]_2$-$[BU]_4$。

[0137] 靶向剂

[0138] 如本文所述的树枝状体-靶向剂缀合物包含HER2靶向剂,即靶向剂能够结合人表皮生长因子受体2(HER2,也称为ERBB2;基因ID号2064,NCBI)。如本文所述的HER2靶向剂可用于将所公开的树枝状体缀合物靶向至肿瘤和癌细胞。

[0139] 靶向剂包括具有高达约80kDa的分子量的肽部分,并且包含特异性结合分子(即HER2)和/或对所述分子具有亲和力的抗原结合位点。相互作用可以通过任何类型的键合或缔合(包括例如共价、离子和氢键合、范德华力)发生。

[0140] 在一个实施方案中,如本文所述的HER2靶向剂具有以下分子量:约3kDa至约80kDa、或约3kDa至约60kDa、或约3kDa至约50kDa、或约3kDa至约40kDa、或约3kDa至约30kDa、或约3kDa至约20kDa、或约3kDa至约15kDa、或约3kDa至约13kDa、或约5kDa至约15kDa、或约5kDa至约12kDa、或约5kDa至约10kDA。

[0141] 在一些实施方案中,HER2靶向剂具有约3kDa至约80kDa的分子量。在一些实施方案中,HER2靶向剂具有约3kDa至约60kDa的分子量。在一些实施方案中,HER2靶向剂具有约3kDa至约50kDa的分子量。在一些实施方案中,HER2靶向剂具有约3kDa至约40kDa的分子量。在一些实施方案中,HER2靶向剂具有约3kDa至约30kDa的分子量。在一些实施方案中,HER2靶向剂具有约3kDa至约20kDa的分子量。在一些实施方案中,HER2靶向剂具有约3kDa至约15kDa的分子量。在一些实施方案中,HER2靶向剂具有约3kDa至约13kDa的分子量。在一些实施方案中,HER2靶向剂具有约5kDa至约15kDa的分子量。在一些实施方案中,HER2靶向剂具有约5kDa至约12kDa的分子量。在一些实施方案中,HER2靶向剂具有约5kDa至约10kDa的分子量。

[0142] 如本文所述的“kDA”或“千道尔顿”是指由1000道尔顿组成的分子质量单位。

[0143] 在一些实施方案中,靶向剂是抗体片段。如本文所用,术语“抗体片段”应被视为意指能够特异性结合抗原的抗体的一部分或片段,包括例如如本文所定义的F_V、V_H、V_L或可变区。此术语应被理解为涵盖直接来源于抗体的片段以及使用重组手段产生的蛋白质。在一个实施方案中,抗体片段选自Fab、Fv、scFv、重链抗体、结构域抗体、重链抗体、双抗体或三抗体。

[0144] 如本文所用,术语“Fv”应被视为意指任何蛋白质,无论其由多个多肽或单一多肽(scFV)组成,其中V_L和V_H缔合并且形成具有抗原结合结构域(即能够特异性结合抗原)的复合物。形成抗原结合结构域的V_H和V_L可以在单一多肽链中或在不同的多肽链中。在一个实施方案中,本公开的Fv(以及本公开的任何蛋白质)可以具有多个抗原结合位点,其可以或可以不结合相同的抗原。此术语应被理解为涵盖直接来源于抗体的片段以及使用重组手段产生的蛋白质。在一些实例中,V_H未连接至重链恒定结构域CH1,并且/或者V_L未连接至轻链恒定结构域(CL),例如结构域抗体。示例性含Fv多肽或蛋白质包括Fab片段、Fab’片段、F(ab’)片段、scFv、双抗体、三抗体,“Fab片段”由免疫球蛋白的单价抗原结合片段组成,并且可以通过用木瓜蛋白酶消化整个抗体以产生由完整轻链和一部分重链组成的片段来产生,或者可以使用重组手段来产生。Fab片段通常包含V_H和C_H1以及V_L和C_L或由其组成。抗体的“Fab’片段”可以通过以下方式来获得:用胃蛋白酶处理整个抗体,之后进行还原,以产生由完整轻链和一部分重链(包含V_H和单一恒定结构域)组成的分子。每个以这种方式处理的抗体获得两个Fab’片段。Fab’片段还可以通过重组手段来产生。“单链Fv”或“scFv”是含有抗体的可变区片段(Fv)的重组分子,其中轻链的可变区和重链的可变区通过合适的柔性多肽接头

共价连接。

[0145] 在一些实施方案中,抗体片段选自:重链抗体、Fab、Fv、scFv或单结构域抗体。

[0146] 如本文所用,“单结构域抗体(sdAb)”(也称为“结构域抗体(dAb)”或“纳米抗体”)包含重链V_H或轻链V_L的单一可变区。在一个实施方案中,可变区是骆驼科动物衍生的。在一个实施方案中,可变区衍生自鲨鱼。在一个实施方案中,V_H是骆驼科动物衍生的V_H。

[0147] 在一些实施方案中,靶向剂是单结构域抗体。在一些实施方案中,靶向剂是VH单结构域抗体。在一些实施方案中,靶向剂是VL单结构域抗体。

[0148] 在一个实施方案中,单结构域抗体包含如描述于例如EP2215125A1、US20110028695、Hussack等人(2018)或Arezumand等人(2017)中的单结构域氨基酸序列。在一个实施方案中,单结构域抗体包含如描述于US20110028695中的单结构域氨基酸序列。在一些实施方案中,单结构域抗体是描述于Vaneycken等人(Vaneycken等人,(2011))中的纳米抗体。在一些实施方案中,单结构域抗体是2Rs15d(Vaneycken等人,(2011))。在一些实施方案中,单结构域抗体是2Rb17c(Vaneycken等人,(2011))。在一些实施方案中,单结构域抗体是1R59b(Vaneycken等人,(2011))。在一些实施方案中,单结构域抗体是2R5a(Vaneycken等人,(2011))。在一些实施方案中,单结构域抗体是1R136d(Vaneycken等人,(2011))。在一些实施方案中,单结构域抗体是1R143c(Vaneycken等人,(2011))。在一些实施方案中,单结构域抗体是C3(Wu等人,(2018))。在一些实施方案中,单结构域抗体是5F7GGC(Pruszynski等人,(2013))。在一个实施方案中,单结构域抗体是5F7,其包含与US20110028695中所示的氨基酸序列具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同源性的氨基酸序列。

[0149] 在一个实施方案中,单结构域抗体包含如实施例7中所公开的单结构域氨基酸序列。在一个实施方案中,单结构域抗体是2D3,其包含如US20110028695的SEQ ID NO:1986中所示的氨基酸序列。

[0150] 在一个实施方案中,单结构域抗体包含氨基酸序列

[0151] EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQVTVSS。

[0152] 在一些实施方案中,靶向剂不与曲妥珠单抗和/或帕妥珠单抗竞争HER2结合。在一些实施方案中,靶向剂与曲妥珠单抗和/或帕妥珠单抗竞争HER2结合。在一个实施方案中,靶向剂是2D3,并且靶向剂与曲妥珠单抗和/或帕妥珠单抗竞争HER2结合。在一些实施方案中,靶向剂结合HER2的细胞外结构域。在一些实施方案中,靶向剂结合HER2细胞外结构域I、II、III和/或IV。在一个实施方案中,靶向剂结合HER2细胞外结构域III。在一些实施方案中,靶向剂结合ErbB2的二聚化臂。在靶向剂结合ErbB2的二聚化臂的情况下,靶向剂可以与帕妥珠单抗竞争HER2结合。在一些实施方案中,靶向剂以下述结合亲和力结合HER2:至少1nM、至少2nM、至少5nM、至少10nM,如通过SPR研究确定的。

[0153] 在一些实施方案中,HER2靶向剂是单结构域抗体并且具有以下分子量:约4kDa至约80kDa、或约5kDa至约80kDa、或约5kDa至约60kDa、或约5kDa至约50kDa、或约5kDa至约40kDa、或约5kDa至约30kDa、或约5kDa至约20kDa、或约5kDa至约15kDa、或约5kDa至约12kDa、或约10kDa至约16kDa。

[0154] 在一些实施方案中,HER2靶向剂包含少于约500、少于约400、少于约300、少于约

200、少于约150、少于约140、少于约130、少于约120、少于约110、少于约100个氨基酸残基。在一些实施方案中,HER2靶向剂包含多于约50、多于约75、多于约100或多于约120个氨基酸残基。在一些实施方案中,HER2靶向剂包含少于120个氨基酸残基。在一些实施方案中,HER2靶向剂包含约100至约120个氨基酸残基。

[0155] 在一些实施方案中,HER2靶向剂是抗体或抗体片段的模拟物。如本文所用,术语“模拟物(mimetic/mimetics)”是指像抗体或抗体片段一样可以结合抗原,但在结构上不与抗体相关的化合物。该术语应理解为不涵盖如本文所述的抗体或抗体片段。该术语应理解为涵盖合成模拟物(体外产生)和使用重组手段产生的模拟物。该术语应理解为涵盖蛋白质模拟物。

[0156] 在一个实施方案中,模拟物选自:亲和体(affibody)、适配体、affilin、affimer、affitin、anticalin、avimer、α体、单体、DARPin、Fyomer、III型纤连蛋白衍生蛋白支架、植物胱抑素衍生蛋白支架和互补位模拟肽。像抗体一样,模拟物可以用作靶向部分。

[0157] 在一个实施方案中,模拟物衍生自以下蛋白支架之一:蛋白A的z结构域、γ-B晶状体蛋白、泛素、胱抑素、sac7d、三重螺旋、卷曲螺旋、脂质运载蛋白、环肽、膜受体的A结构域、锚蛋白重复基序、Fym的sh3结构域、蛋白酶抑制剂的Kunits结构域、纤连蛋白的III型结构域以及来自产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens)的IgG样热稳定碳水化合物结合模块家族32(CBM32)。

[0158] 在一个实施方案中,模拟物是约3kDa至约20kDa、或约4kDa至约18kDa、或约6kDa至约16kDa、或约6kDa至约14kDa、或约6kDa至约12kDa、或约6kDa至约10kDa、或约6kDa至约8kDa。在一个实施方案中,模拟物是约3kDa至约20kDa,在一个实施方案中,模拟物是约3kDa至约20kDa。在一个实施方案中,模拟物是约4kDa至约18kDa。在一个实施方案中,模拟物是约6kDa至约16kDa。在一个实施方案中,模拟物是约6kDa至约14kDa。在一个实施方案中,模拟物是约6kDa至约12kDa。在一个实施方案中,模拟物是约6kDa至约10kDa。在一个实施方案中,模拟物是约6kDa至约8kDa。

[0159] 在一些实施方案中,靶向剂是亲和体。如本文所用,术语“亲和体”是指基于称为“Z结构域”的长度为约58个氨基酸的三α螺旋束结构域的任何一类非常小(大约6kDa)的多肽抗体模拟物。通常,用于亲和体的支架基于蛋白A的B-结构域的修饰形式。亲和体的特征在于非常高的稳定性(耐受高达90℃的温度并且靶标亲和力在纳摩尔至皮摩尔的范围内)。参见例如Nord等人(1995),Protein Eng.,8:601-608。已知亲和体的实例包括例如针对HER2的亲和体(例如,抗HER2亲和体®,AFFIBODY AB,Bromma,Sweden;美国专利号7,993,650)。

[0160] 在一些实施方案中,靶向剂是亲和体并且具有在约3kDa至约10kDa、或约3kDa至约8kDa、或约4kDa至约8kDa、或约4kDa至约7kDa、或约5kDa至约7kDa、或约6kDa范围内的分子量。

[0161] 在一些实施方案中,靶向剂是亲和体并且具有少于80个氨基酸残基、或少于70个氨基酸残基、或少于65个氨基酸残基、或少于60个氨基酸残基。在一些实施方案中,靶向剂由40至80个氨基酸残基、或50至70个氨基酸残基、或55至65个氨基酸残基、或56至60个氨基酸残基、或约58个氨基酸残基组成。

[0162] 出于本公开的目的,术语“抗体”包括四链蛋白质,其包含例如两条轻链和两条重链,包括能够通过Fv特异性结合一种或几种密切相关抗原的重组或修饰抗体(例如,嵌合抗

体、人源化抗体、灵长类化抗体、去免疫化抗体和半抗体、双特异性抗体)。抗体通常包含恒定结构域,其可以排列成恒定区或恒定片段或可结晶片段(Fc)。抗体的示例性形式包含作为其基本单元的四链结构。全长抗体包含共价连接的两个重链(约50-70kDa)和两个轻链(各自约23kDa)。轻链通常包含可变区和恒定结构域,并且在哺乳动物中是κ轻链或λ轻链。重链通常包含可变区和由铰链区连接至另外恒定结构域的一个或两个恒定结构域。哺乳动物的重链具有以下类型之一:α、δ、ε、γ或μ。每条轻链也共价连接至重链之一。例如,两条重链和重链与轻链通过链间二硫键和通过非共价相互作用保持在一起。链间二硫键的数目可在不同类型的抗体中变化。每条链具有N末端可变区(VH或VL,其中各自的长度为约110个氨基酸)和在C末端的一个或多个恒定结构域。轻链的恒定结构域(CL,其长度为约110个氨基酸)与重链的第一恒定结构域(CH,其长度为-330-440个氨基酸)对齐并且二硫键合至重链的第一恒定结构域。轻链可变区与重链可变区对齐。抗体重链可以包含2个或更多个另外的CH结构域(诸如CH2、CH3等)并且可以包含在CH1恒定结构域与CH2恒定结构域之间的铰链区。抗体可以具有任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。在一个实例中,抗体是人抗体或其去免疫化或种系化形式、或其亲和力成熟的形式。

[0163] 术语“全长抗体”或“整个抗体”可互换用于指呈基本上完整形式的抗体,与抗体的抗原结合片段相对。具体地,整个抗体包括具有重链和轻链(包括恒定区)的抗体。恒定区可以是野生型序列恒定区(例如,人野生型序列恒定区)或其氨基酸序列变体。

[0164] 如本文所用,术语“可变区”是指如本文所定义的抗体的轻链和/或重链或者仅重链抗体(例如,骆驼科动物抗体或软骨鱼免疫球蛋白新抗原受体(IgNAR))的部分,所述部分能够特异性结合抗原并且包括互补决定区(CDR)(即CDR1、CDR2和CDR3)和框架区“FR”的氨基酸序列。FR是不同于CDR残基的那些可变区残基。例如,可变区包含三个或四个FR(例如,FR1、FR2、FR3和任选的FR4)以及三个CDR。V_H是指重链的可变区。V_L是指轻链的可变区。

[0165] 如本文所用,术语“互补决定区”(同义词CDR,即CDR1、CDR2和CDR3)是指抗体可变区的如下氨基酸残基,其存在是特异性抗原结合的主要贡献因素。每个可变区通常具有三个CDR区,标识为CDR1、CDR2和CDR3。每个互补决定区可以包含来自如由Kabat等人,(1987和/或1991)定义的“互补决定区”的氨基酸残基。例如,在重链可变区中,CDRH1在残基31-35之间,CDRH2在残基50-65之间并且CDRH3在残基95-102之间。在轻链中,CDRL1在残基24-34之间,CDRL2在残基50-56之间并且CDRL3在残基89-97之间。这些CDR也可以包含多个插入物,例如如Kabat(1987和/或1991)中所述。本公开不限于如由Kabat编号系统定义的FR和CDR,但包括所有编号系统,包括Chothia和Lesk(1987)、Chothia等人(1989)和/或Al-Lazikani等人,(1997)的经典编号系统;Honnegher和Plükthun(2001)的编号系统;Giudicelli等人,(1997)中讨论的IMGT系统;或增强型Chothia编号方案(http://www.bioinfo.org.uk/mdex.html)。在一个实例中,CDR和/或FR根据Kabat编号系统定义。任选地,根据Kabat编号系统的重链CDR2不包含在本文列出的五个C末端氨基酸,或者那些氨基酸中的任何一个或多个被另一天然存在的氨基酸取代。在另外或替换性选择中,轻链CDR1不包含在本文列出的四个N末端氨基酸,或者那些氨基酸中的任何一个或多个被另一天然存在的氨基酸取代。就这一点而言,Padlan等人,1995确立了重链CDR2的五个C末端氨基酸和/或轻链CDR1的四个N末端氨基酸通常不参与抗原结合。在一个实例中,CDR和/或FR

根据Chothia编号系统定义。

[0166] 如本文所用,术语“Kabat编号系统”是指如Kabat(Kabat等人,1987和/或1991)中陈述的用于编号抗体可变区和鉴定CDR(高变区)的方案。

[0167] 如本文所用,术语“Chothia编号系统”是指如Chothia和Lesk(Chothia和Lesk,1987)或Al-Lazikani(Al-Lazikani等人,1997)中陈述的用于编码抗体可变区和鉴定CDR(结构环)的方案。

[0168] 如本文所用,术语“抗原结合结构域”应被视为意指能够特异性结合抗原(例如HER2)的化合物的区域。在一个实施方案中,化合物是蛋白质。在一个实施方案中,蛋白质是抗体或其片段。在一个实施方案中,抗体片段包括如本文所述的F_V、V_H或V_L中的一种或多种。

[0169] 如本文所用,关于蛋白质或其抗原结合结构域与抗原的相互作用的术语“结合(binds/binding)”意指相互作用依赖于抗原上特定结构(例如,抗原性决定子或表位)的存在。例如,抗体识别并结合特定蛋白质结构而非广泛结合蛋白质。如果抗体结合表位“A”,则在含有经标记的“A”和抗体的反应中,含有表位“A”的分子(或者游离的未标记A)的存在将会降低与抗体结合的经标记的A的量。

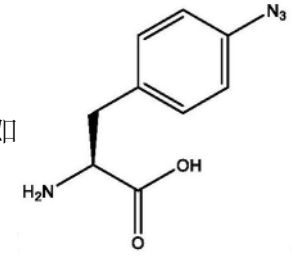
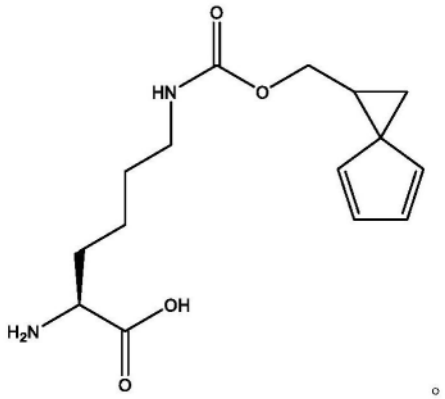
[0170] 如本文所用,术语“特异性结合(specifically binds/binds specifically)”或类似短语应被视为意指与用替代性抗原或细胞的情况相比,本公开的蛋白质以更久的持续时间和/或以更大的亲和力与特定抗原(诸如HER2)或表达所述特定抗原的细胞更频繁更快速地反应或缔合。例如,与结合其他抗原的情况相比,特异性结合抗原的蛋白质以更大的亲和力(例如,大20倍或40倍或60倍或80倍至100倍或150倍或200倍的亲和力)、亲合力,更容易地和/或以更久的持续时间结合该抗原。通过读取该定义还应理解,例如,特异性结合第一抗原的蛋白质可以或可以不特异性结合第二抗原。因此,“特异性结合”不一定要求排他性结合或与另一种抗原的不可检测结合,这由术语“选择性结合”释义。

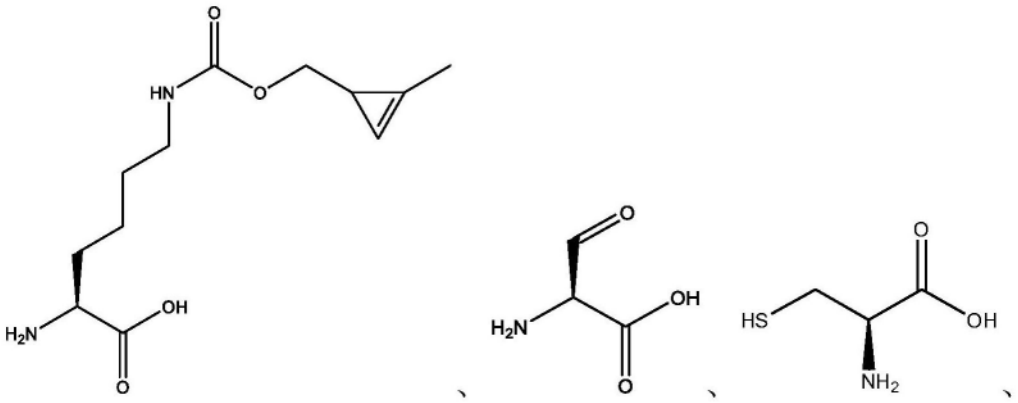
[0171] 在一些实施方案中,一个靶向剂共价连接至所述树枝状体。在一些实施方案中,多于一个靶向剂共价连接至所述树枝状体。在一些实施方案中,两个靶向剂共价连接至所述树枝状体。在一些实施方案中,三个靶向剂共价连接至所述树枝状体。在一些实施方案中,四个靶向剂共价连接至所述树枝状体。

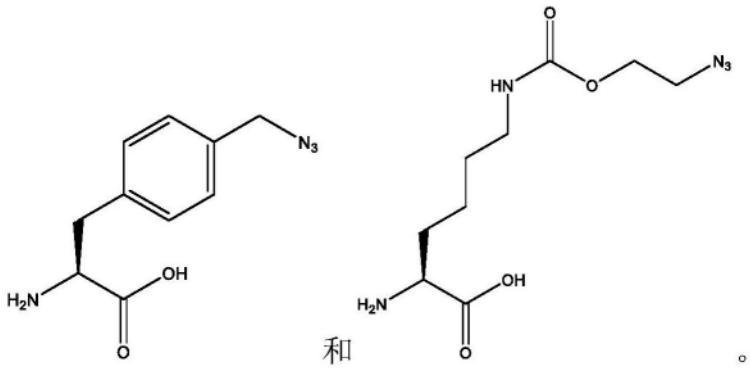
[0172] 靶向剂经由间隔子附接至缀合物的其余部分。在一些实施方案中,靶向剂与间隔子基团之间的共价附接或连接已经通过靶向剂前体和间隔子基团前体上存在的互补反应性官能团之间的反应而形成,根据用于制备缀合物的过程,间隔子基团前体在其与HER2靶向部分前体反应时可以或可以不附接至缀合物的其余部分。

[0173] 在一些实施方案中,所述靶向剂经由所述靶向部分的C末端共价连接至所述间隔子基团。

[0174] 靶向剂前体的共价附接位点可以例如是半胱氨酸、赖氨酸、N末端胺、酪氨酸、碳水化合物、非天然氨基酸或转氨酶(例如,转谷氨酰胺酶或分选酶A)或识别序列。用于共价附接至蛋白质的结合位点是本领域已知的(例如,Milla P.等人,2012)。可以使用经由计算机模拟晶体结构预测来鉴定靶向剂多肽序列内的位置以找出在结构上适于缀合的共价附接位点(例如,远离互补位、CDR、对于正确折叠和构象关键的特征和/或具有高度带电荷、极性或大体积侧基的残基)。根据这些候选位置,可以进行经验筛选以确定最佳保存功能同时允许稳健缀合的替代位点。在一个实施方案中,2D3位置选自由位置13、16、42和126(c末端)组

成的组。在一些实施方案中,靶向剂前体包含非天然氨基酸残基以用于附接至间隔子。非天然氨基酸残基可以具有有着反应性官能团的侧链,所述反应性官能团与间隔子基团前体的反应性官能团互补。在一些实施方案中,非天然氨基酸残基是含有叠氮化物基团的残基,例如其可以是4-叠氮基苯丙氨酸残基,例如  叠氮化物基团能够与可能存在于间隔子前体基团上的炔烃基团进行环加成反应。在一些实施方案中,非天然氨基酸是含二烯氨基酸,例如含螺环戊二烯氨基酸,诸如:  二烯基团能够与烯烃基团(诸如存在于马来酰亚胺上的那些)进行环加成(例如狄尔斯-阿尔德)反应。可以用于附接至间隔子的非天然氨基酸的另外实例包括含有羰基基团的那些(诸如酮)和含有甲基环丙烯基团的那些。非天然氨基酸的另外实例包括:

[0175] 

[0176]  和 。

[0177] 在一些实施方案中,所述靶向剂包含如本文所定义的任一种氨基酸序列或由其组成。

[0178] 间隔子基团

[0179] 如本文所用,术语“间隔子基团”是指用于将靶向剂附接至树枝状体的化学实体。即,间隔子基团(例如,通过共价附接)将靶向剂接合至树枝状体。间隔子基团旨在将靶向剂定位成使得其能够结合HER2受体而没有来自树枝状体的其他成分的过度有害干扰。

[0180] 如上所讨论,靶向剂例如可以通过树枝状体的核心共价附接至树枝状体。在一些实施方案中,所述间隔子基团共价附接至所述核心单元。在一些实施方案中,靶向剂通过树枝状体的核心共价附接至树枝状体。即,靶向剂(诸如抗体片段)通过间隔子基团共价附接至树枝状体的核心。如果树枝状体是空间拥挤的,则经由附接至树枝状体的核心的间隔子将靶向剂共价附接至树枝状体可能是有益的,其中间隔子基团可以具有足够长度以突出超过树枝状体的表面,从而允许靶向剂与其受体或类似物的体内结合。

[0181] 在一些其他实施方案中,靶向剂经由树枝状体的表面结构单元共价附接至树枝状体。在一些实施方案中,间隔子基团共价附接至表面结构单元。例如,靶向剂可以经由间隔子基团连接至赖氨酸残基的表面氮,例如通过赖氨酸残基的胺基团与包含靶向剂和间隔子基团的中间体上存在的羧酸基团之间形成的酰胺键。在一个实施方案中,靶向剂经由间隔子基团共价附接至赖氨酸残基的表面氮,由此在赖氨酸残基的胺基团与包含靶向剂和间隔子基团的中间体上存在的羧酸基团之间形成酰胺键

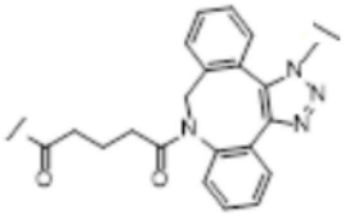
[0182] 示例性间隔子基团包括聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚芳基、肽、氨基酸、烷基和烯基链以及糖类(单糖、寡糖和多糖)或其残基。在一些实施方案中,间隔子基团包含PEG链,诸如2至60个乙烯氧基重复单元,例如2至20或20至48个重复单元。在一个实施方案中,PEG是8至36个重复单元。在另外的实施方案中,PEG是12、16、20、24或36个重复单元。

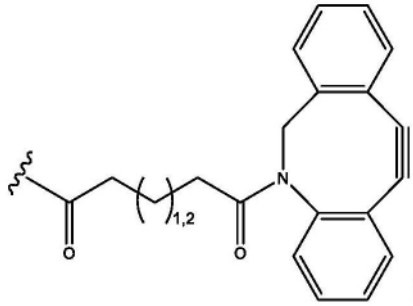
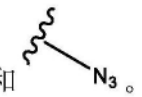
[0183] 在一些实施方案中,间隔子基团包含穿插有其他官能团的多个PEG基团。例如,间隔子基团可以包含经由例如可用于连接间隔子基团的部分的酰胺基团或其他官能团连接的PEG基团。

[0184] 为了将间隔子基团附接至靶向剂和/或树枝状体,间隔子基团前体可以包含一个或多个反应性官能团。在特定实施方案中,反应性官能团包括诸如以下的基团:羟基、羧基、活性酯(诸如NHS或五氟苯酚酯)、氨基、叠氮化物、马来酰亚胺(包括磺基-马来酰亚胺)、二烯(诸如环戊二烯,例如螺[2.4]庚-4,6-二烯基团)、四嗪、柠康酰亚胺(citraconimide)、含炔烃基团(包括BCN(二环[6.1.0]壬-4-烯-9-基)、DBCO(二苯并环辛炔-胺))、活化烯烃(诸如含甲基-环丙烯部分)、硫醇、羰基基团(诸如醛和酮)、烷氧胺、卤代乙酸酯、生物素、四嗪、含烯烃基团(包括TCO(反式环辛烯)、甲基-环丙烯基团)以及PTAD或其他酪氨酸反应性基团。

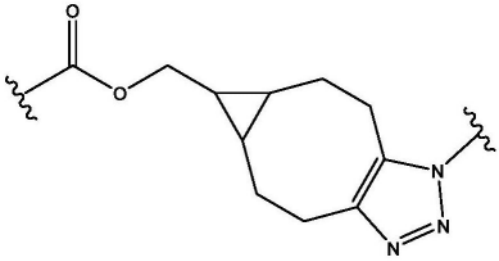
[0185] 例如,在一些实施方案中,间隔子基团中间体可以包含两个反应性基团,例如在每端一个,所述两个反应性基团是正交的,即反应性基团中的至少一个能够在其他反应性基团是稳定的并且基本上不反应的条件下与包含靶向剂的中间体或包含树枝状体的中间体上存在的互补基团反应,以将间隔子基团附接至缀合物的该成分。此举允许间隔子附接(例如,共价附接)至树枝状体或靶向剂,并且然后随后通过其他反应性基团与其余成分上存在的互补基团的反应,以便将靶向剂连接至树枝状体。

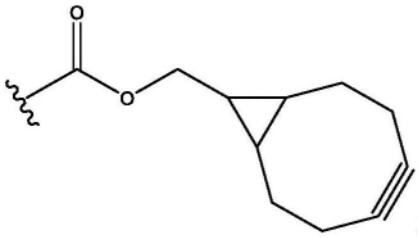
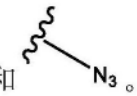
[0186] 在一些实施方案中,通过分别含有炔烃和叠氮化物基团的前体(例如含有靶向基团的中间体可以含有叠氮化物基团,并且含有间隔子基团的中间体可以含有炔烃基团)的反应将间隔子基团附接(例如,共价附接)至靶向剂。这种反应导致例如以下的含三唑基团的形成:

[0187]  并且所述含三唑基团可以通过具有以下结构的前体的反应形成:

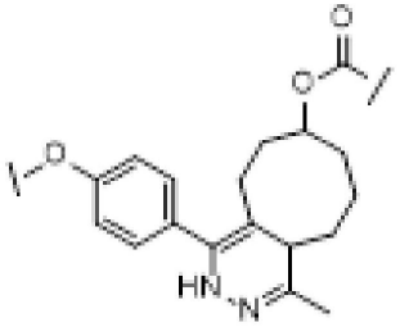
[0188]  和 。

[0189] 又如,间隔子基团可以经由例如以下的含三唑基团的形成附接:

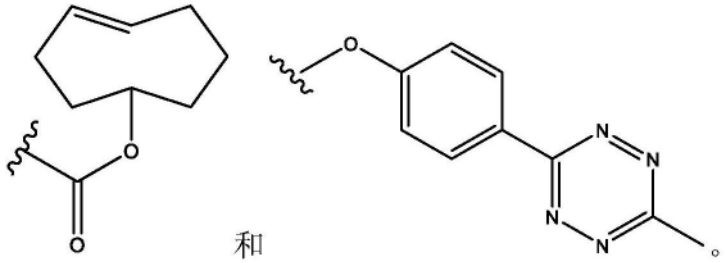
[0190]  并且所述含三唑基团可以通过具有以下结构的前体的反应形成:

[0191]  和 。

[0192] 在一些实施方案中,通过分别含烯烃(例如,应变烯烃诸如反式环辛烯)和四嗪基团的前体的反应将间隔子基团附接(例如,共价附接)至靶向剂。这种反应随着氮的逐出导致例如以下的含哒嗪基团的形成:

[0193] 

[0194] 并且所述含哒嗪基团可以通过具有以下结构的前体的反应形成：

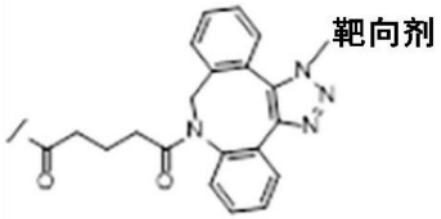
[0195]  和 。

[0196] 在一些实施方案中，通过分别含烯烃(例如，应变烯烃诸如甲基环丙烯)和四嗪基团的前体的反应将间隔子基团附接(例如，共价附接)至靶向剂。这种反应随着氮的逐出导致含哒嗪基团的形成。

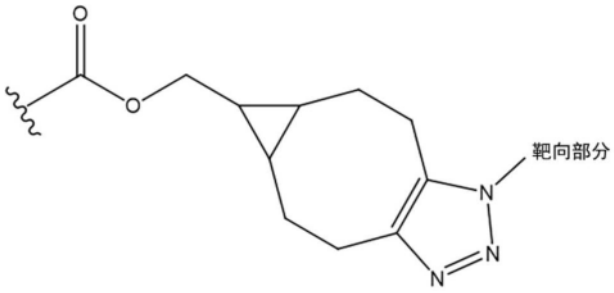
[0197] 为了将间隔子基团附接(例如，共价附接)至树枝状体，间隔子基团前体可以包含另外的官能团。例如，间隔子基团前体可以包含羧酸基团，其能够与形成核心单元前体的一部分的氨基基团反应(例如形成酰胺键)。

[0198] 在一些实施方案中，通过包含羧酸和胺基团的前体的反应将间隔子基团附接(例如，共价附接)至树枝状体，例如间隔子基团中间体可以含有可以与作为核心单元的一部分存在或从核心单元延伸的胺基团反应(例如形成酰胺键)的羧酸基团，并且通过分别含有炔烃和叠氮化物基团的前体的反应将间隔子基团附接至靶向剂(例如含有靶向基团的中间体可以含有叠氮化物基团，并且含有间隔子基团的中间体可以含有炔烃基团)。

[0199] 如上所讨论，靶向剂前体可以包含非天然氨基酸残基。在一些实施方案中，靶向剂包含非天然氨基酸残基。该非天然氨基酸残基可以例如是能够呈现反应性侧链的非天然氨基酸，其中反应性侧链带有与间隔子基团前体上存在的那些官能团互补的官能团。这样，互补官能团可以反应，并且因此可以发生靶向部分前体与间隔子基团前体的附接。在一些实施方案中，非天然氨基酸残基是4-叠氮基苯丙氨酸残基。在一些实施方案中，间隔子基团前体含有炔烃基团以用于缀合至含有非天然氨基酸残基靶向部分前体。在一些实施方案中，间隔子基团前体含有炔烃基团以用于缀合至含有4-叠氮基苯丙氨酸残基的靶向剂前体。在一些实施方案中，间隔子基团前体含有作为二苄基环辛烷基团的炔烃基团以用于缀合至含有4-叠氮基苯丙氨酸残基的靶向部分前体。在一些实施方案中，通过以下方式将间隔子基团的一端附接至靶向部分：DBCO基团与形成靶向部分的一部分的4-苯丙氨酸残基上的叠氮基部分的环加成反应，例如形成诸如以下的含三唑基因：

[0200] 

[0201] 或BCN((二环[6.1.0]壬-4-烯-9-基))基团与形成靶向部分的一部分的4-苯丙氨酸残基上的叠氮基部分的反应,例如形成诸如以下的含三唑基因:

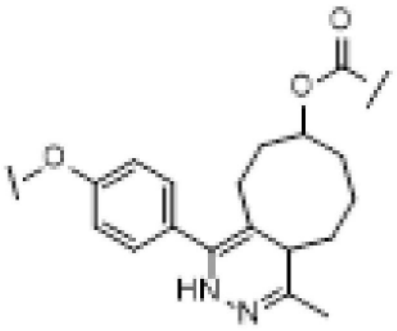
[0202] 

[0203] 在一些实施方案中,通过以下方式将间隔子基团的一端附接(例如,共价附接)至树枝状体:核心上存在的或表面结构单元上存在的氨基基团与间隔子基团上存在的羧基基团(例如,通过活化酯的反应)之间的酰胺化反应。在一些实施方案中,间隔子基团前体含有四嗪基团。在一些实施方案中,间隔子基团前体包含马来酰亚胺基团,例如以用于缀合至二烯(诸如环戊二烯,例如螺[2.4]庚-4,6-二烯基团)。

[0204] 在一些实施方案中,间隔子基团前体含有PEG链,所述PEG链具有用于接合至树枝状体的核心处的胺的反应性羧基基团和用于缀合至含有反应性炔烃部分的靶向剂前体的叠氮化物基团。在一些实施方案中,间隔子基团前体由PEG链组成,所述PEG链具有用于接合至树枝状体的核心处的羧基基团的反应性胺基团和用于缀合至含有反应性炔烃部分的靶向剂前体的叠氮化物基团。在一些实施方案中,间隔子基团前体由PEG链组成,所述PEG链具有用于接合至树枝状体的核心处的胺的反应性羧基基团和用于缀合至含有反应性硫醇部分的靶向剂前体的马来酰亚胺基团。在一些实施方案中,间隔子基团前体由PEG链组成,所述PEG链具有用于接合至树枝状体的核心处的羧基基团的反应性胺基团和用于缀合至含有反应性马来酰亚胺部分的靶向剂前体的硫醇或掩蔽硫醇基团。在一些实施方案中,间隔子基团前体含有PEG链,所述PEG链具有用于接合至树枝状体的核心处的胺的反应性羧基基团和用于缀合至含有反应性烯烃部分的靶向剂前体的四嗪基团。在一些实施方案中,间隔子基团前体含有PEG链,所述PEG链具有用于接合至树枝状体的核心处的胺的反应性羧基基团和用于缀合至含有反应性二烯(诸如环戊二烯,例如螺[2.4]庚-4,6-二烯基团)的靶向剂前体的马来酰亚胺基团。

[0205] 在一些实施方案中,靶向剂与树枝状体的连接可以通过以下方式实现:将第一间隔子基团附接(例如,共价附接)至靶向剂中间体,将第二间隔子基团附接(例如,共价附接)至树枝状体(例如树枝状体的核心),并且然后使第一间隔子基团和第二间隔子基团上存在的互补官能团一起反应,以便将靶向剂和树枝状体连接。这种方法可以提供树枝状体与靶向剂的容易连接。例如,第一间隔子基团中间体可以包含在一端的第一反应性基团,其与靶向剂上的反应性基团互补(例如,炔烃基团,其与叠氮化物基团互补,并且可以一起反应形成三唑基团);和第二反应性基团,其与第二间隔子基团上的反应性基团互补(例如含四嗪

基团,其与含反式环辛烯基团互补反应)。第二间隔子基团中间体可以例如包含在一端的第三反应性基团,其与树枝状体上的反应性基团互补反应(例如,羧酸基团,其与胺基团互补反应);和在另一端的第四反应性基团,其与第一间隔子基团中间体上的反应性基团互补反应(例如含反式环辛烯基团,其与四嗪基团互补反应)。例如,第一间隔子基团和第二间隔子基团可以经由这样的基团附接,所述基团通过反式环辛烯基团和四嗪基团的反应产生,并且包含以下结构:

[0206] 

。

[0207] 在一些实施方案中,靶向部分可以经由间隔子基团连接至树枝状体,所述树枝状体通过以下方式形成:靶向剂上存在的叠氮化物部分与在间隔子基团一端的含炔烃基团(例如DBCO、BCN)的反应,以及附接至树枝状体的四嗪部分与在间隔子基团的另一端的应变烯烃基团(例如,反式环辛烯)的反应。

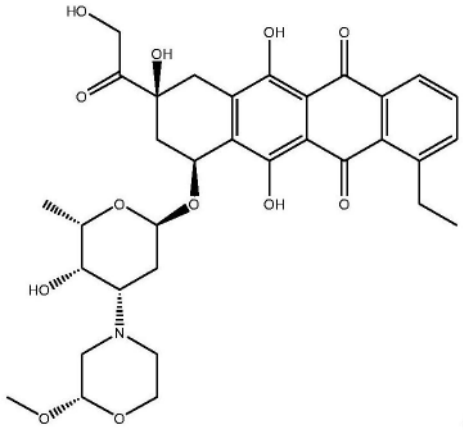
[0208] 使靶向剂前体与间隔子基团前体反应以便形成靶向剂与间隔子基团的附接。将间隔子基团前体附接至靶向剂前体的手段是本领域已知的。例如,用于共价附接至靶向剂前体的位点包括但不限于半胱氨酸残基、赖氨酸残基、C末端氨基酸残基、N末端胺、酪氨酸残基、碳水化合物、合适的非天然氨基酸残基或转氨酶或识别序列。用于共价附接至蛋白质(诸如靶向剂前体)的结合位点是本领域已知的(例如,Milla P.等人,2012)。例如,可以使间隔子基团前体与靶向剂前体在靶向剂的C末端反应,使得间隔子基团经由C末端附接至靶向剂。在一些实施方案中,靶向剂经由靶向剂的C末端附接至间隔子基团。在一个实施方案中,靶向剂经由靶向剂的C末端共价附接至或连接至间隔子基团。

[0209] 治疗剂

[0210] 如本文所用,术语“治疗剂”是指例如针对HER-2表达癌细胞发挥体内治疗效果的药剂。治疗剂的实例包括但不限于抗癌剂,也称为化学治疗剂、抗赘生剂和细胞毒性剂。在一些实施方案中,所述治疗剂是化学治疗剂。在一些实施方案中,所述治疗剂是细胞毒性剂。如本文所用,术语“细胞毒性剂”是指表现出化学治疗剂特性的药剂。抗癌剂的实例包括但不限于DNA烷基化剂和交联剂(例如,含铂剂诸如顺铂、奥沙利铂)、DNA损伤剂诸如PARP(聚ADP核糖聚合酶)抑制剂(例如奥拉帕尼(olaparib)、卢卡帕尼(rucaparib)、尼拉帕尼(niraparib)、他拉唑帕尼(talazoparib))、抗微管剂(例如,紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛)、拓扑异构酶抑制剂(例如,伊立替康、拓扑替康、SN-38、奈莫柔比星(nemorubicin))、蛋白酶体抑制剂(例如,硼替佐米)、酪氨酸蛋白激酶抑制剂(例如,伊马替尼、尼罗替尼)、EGF受体抑制剂(例如,吉非替尼、埃罗替尼)、细胞毒性抗生素(例如,蒽环类抗生素、博来霉素)、核糖核苷酸还原酶抑制剂(例如,吉西他滨)、抗代谢物(例如,甲氨蝶呤)、培美曲塞和抗有丝分裂剂。此类抗癌剂可以以治愈意图(即,为了消除癌症患者)或另外以减轻/缓和症状以便

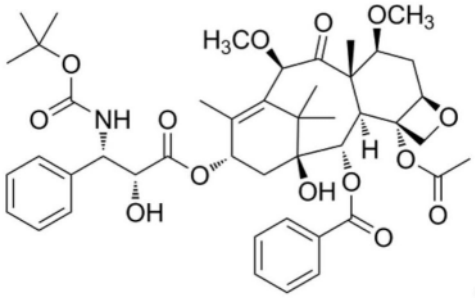
为患者提供更佳质量和延长寿命的意图用于治疗癌症。抗癌剂可以与癌症的其他非化学治疗剂治疗(即,放射疗法、手术/活检)结合使用。

[0211] 在一个实施方案中,细胞毒性剂是奈莫柔比星。奈莫柔比星的结构如下:

[0212] 

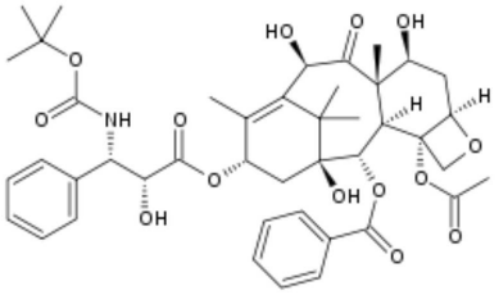
。

[0213] 在一个实施方案中,细胞毒性剂是卡巴他赛。卡巴他赛的结构如下:



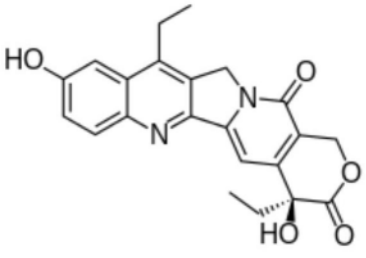
。

[0214] 在一个实施方案中,细胞毒性剂是多西他赛。多西他赛的结构如下:



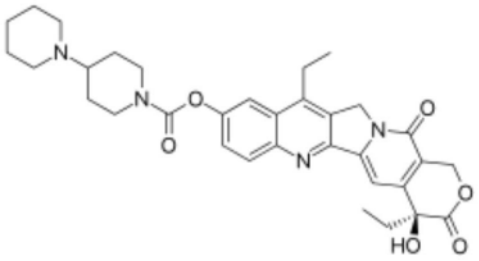
。

[0215] 在一个实施方案中,细胞毒性剂是SN-38。SN-38的结构如下:

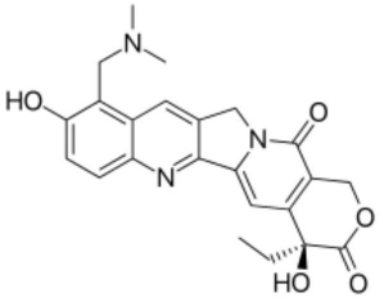
[0216] 

。

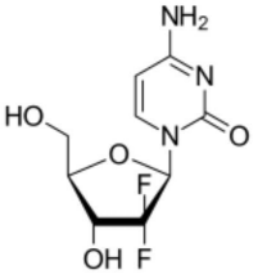
[0217] 在一个实施方案中,细胞毒性剂是伊立替康。伊立替康的结构如下:

[0218] 

[0219] 在一个实施方案中,细胞毒性剂是拓扑替康。拓扑替康的结构如下:

[0220] 

[0221] 在一个实施方案中,细胞毒性剂是吉西他滨。吉西他滨的结构如下:

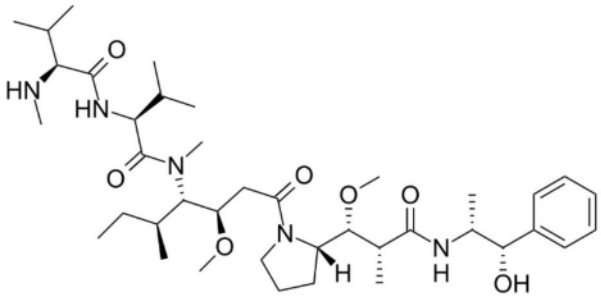
[0222] 

[0223] 在一些实施方案中,治疗剂是超细胞毒性剂。如本文所用,术语“超细胞毒性剂”是指表现出高度有效的化学治疗剂特性,但它们本身太具毒性而不能单独作为抗癌剂施用的药剂。即,超细胞毒性剂尽管展示出化学治疗剂特性,但通常不能安全施用至受试者,因为有害的毒性副作用超过化学治疗剂益处。

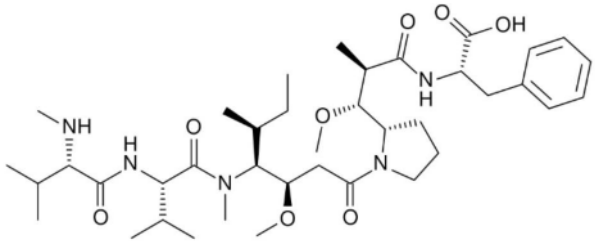
[0224] 超细胞毒性剂尤其包括例如奈莫柔比星、多拉司他汀(dolastatin)(例如,多拉司他汀-10、多拉司他汀-15)、澳瑞司他汀(例如,单甲基澳瑞司他汀-E、单甲基澳瑞司他汀-F)、美登木素生物碱(例如,美登素、默坦辛(mertansine)/美坦辛(DM1,拉夫坦辛(ravtansine)(DM4))、卡奇霉素(例如,卡奇霉素γ1)、埃斯培拉霉素(esperamicin)(例如,埃斯培拉霉素A1)和吡咯苯并二氮杂卓(PDB)。

[0225] 在一些实施方案中,治疗剂是澳瑞司他汀。在一些实施方案中,治疗剂是单甲基澳瑞司他汀。在一个实施方案中,治疗剂是单甲基澳瑞司他汀E(MMAE)。在一个实施方案中,治疗剂是单甲基澳瑞司他汀F(MMAF)。MMAE和MMAF两者应理解为通过阻断微管蛋白的聚合来抑制细胞分裂。

[0226] MMAE的化学结构如下:

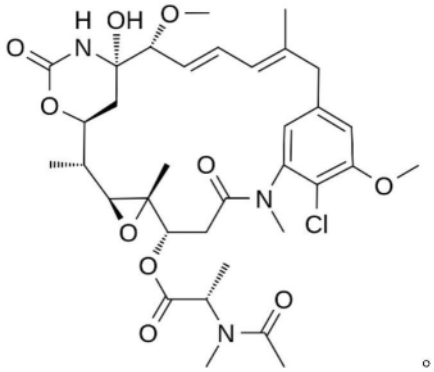
[0227] 

[0228] MMAF的化学结构如下：

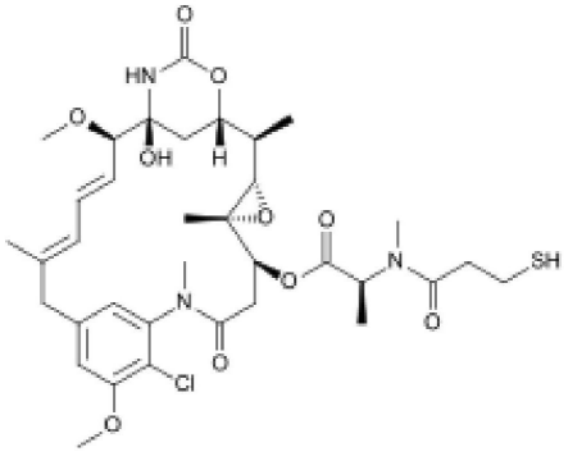
[0229] 

[0230] 在一些实施方案中,超细胞毒性剂是美登木素生物碱。在一个实施方案中,超细胞毒性剂是美登素。在一个实施方案中,超细胞毒性剂是安丝菌素。在一个实施方案中,超细胞毒性剂是美坦辛/默坦辛(DM1)。在一个实施方案中,超细胞毒性剂是拉夫坦辛(DM4)。美登木素生物碱被理解为通过结合微管蛋白来抑制微管的组装。

[0231] 美登素的化学结构如下：

[0232] 

[0233] 美坦辛/默坦辛的化学结构如下：

[0234] 

[0235] 在一些实施方案中,超细胞毒性剂具有小于100nM、或小于10nM、或小于5nM、或小

于3nM、或小于2nM、或小于1nM、或小于0.5nM的针对癌细胞系(例如SKBR3和/或HEK293细胞和/或MCF7细胞)的体外IC_{50}。MMAE和美坦辛的体外活性分别讨论于Abdollahpour-Alitappeh等人(2017)和Oroudjev等人(2010)中。

[0236] 应理解,树枝状体-靶向剂缀合物可以具有治疗剂/靶向剂的分布。例如,可能的是,树枝状体-靶向剂缀合物可以具有高达约8个治疗剂/靶向剂或甚至更多。

[0237] 由此,应当理解每个树枝状体-靶向剂缀合物质的治疗剂与靶向剂比率(DTR)可以在群体中变化。通常,希望产生具有高DTR的树枝状体-靶向剂缀合物。一般来讲,这导致更有效的疗法。然而,太高的DTR例如在治疗剂是超细胞毒性剂时可能导致不期望的毒性。

[0238] 在一些实施方案中,树枝状体-靶向剂缀合物具有大于2的DTR。在一些实施方案中,树枝状体-靶向剂缀合物具有大于4的DTR。在一些实施方案中,树枝状体-靶向剂缀合物具有大于8的DTR。在一些实施方案中,树枝状体-靶向剂缀合物具有大于14的DTR。在一些实施方案中,树枝状体-靶向剂缀合物具有大于26的DTR。

[0239] 在一些实施方案中,树枝状体-靶向剂缀合物具有在约1与约32之间的DTR。在一些实施方案中,树枝状体-靶向剂缀合物具有在约7与约32之间的DTR。在一些实施方案中,树枝状体-靶向剂缀合物是G5树枝状体并且具有在约26与约32之间的DTR。在一些实施方案中,树枝状体-靶向剂缀合物是G4树枝状体并且具有在约14与约16之间的DTR。在一些实施方案中,树枝状体-靶向剂缀合物是G3树枝状体并且具有在约6与约8之间的DTR。

[0240] 在多于一个靶向剂缀合至树枝状体的情况下,相对于具有唯一靶向剂的树枝状体-靶向剂缀合物,DTR将降低。在一些实施方案中,树枝状体-靶向剂缀合物具有在约2与约16之间的DTR。在一些实施方案中,树枝状体-靶向剂缀合物具有在约8与约16之间的DTR。在一些实施方案中,树枝状体-靶向剂缀合物是G5树枝状体并且具有在约4与约16之间的DTR。在一些实施方案中,树枝状体-靶向剂缀合物是G5树枝状体并且具有在约6与约16之间的DTR。在一些实施方案中,树枝状体-靶向剂缀合物是G4树枝状体并且具有在约4与约8之间的DTR。在一些实施方案中,树枝状体-靶向剂缀合物是G4树枝状体并且具有在约4与约8之间的DTR。在一些实施方案中,树枝状体-靶向剂缀合物是G3树枝状体并且具有在约2与约4之间的DTR。

[0241] 由于树枝状体-治疗剂携载多于一个治疗剂的能力,可能避免了对超细胞毒性剂的需要。例如,当与单一超细胞毒性剂(例如像MMAE)的递送相比时,在单一树枝状体上靶向递送多个细胞毒性剂(例如像多西他赛)的能力可以在治疗上同样或更加有效。超细胞毒性剂的避免可以是一种优点。

[0242] 接头

[0243] 在一些实施方案中,治疗剂经由接头附接至树枝状体。接头应优选地保留治疗剂的有利特性,并且在全身性循环中保持基本完整和无毒。接头基团可用于例如提供用于将药物活性剂附接至树枝状体的合适基团,例如其中药物活性剂中的可用官能性不适于直接附接至结构单元。接头基团还可以或替代地用于促进药物活性剂从树枝状支架的受控释放,从而将药物活性剂的治疗有效浓度和期望药代动力学概况提供合适(例如延长)的时间段。

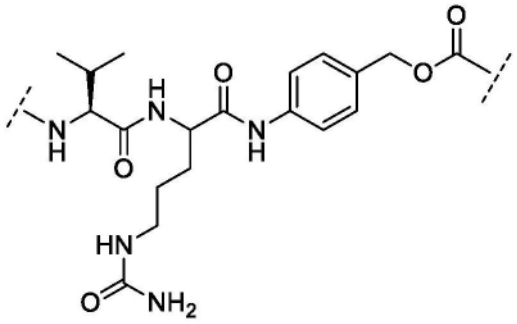
[0244] 接头的一端附接至治疗剂,并且接头的另一端附接至树枝状体。接头与树枝状体的附接点可以例如是至树枝状体的表面结构单元。

[0245] 本领域的技术人员应当理解可以使用多种合适接头中的任一种。接头应在全身性循环期间提供足够的稳定性,但允许在其作用位点处(例如一旦内化至癌细胞中)以活性形式快速且高效地释放细胞毒性药物。

[0246] 接头可以是不可裂解或可裂解接头。在一个实施方案中,接头是不可裂解接头。在一个实施方案中,接头是可裂解接头。可裂解接头(自身或与其至药物活性剂的连接结合)包含以下可裂解部分中的一种或多种:酯基团、腙基团、肟基团、亚胺基团或二硫化物基团。在一些实施方案中,接头是肿瘤环境可裂解的、酸不稳定性的、还原环境不稳定性的、水解不稳定性的或蛋白酶敏感性的。

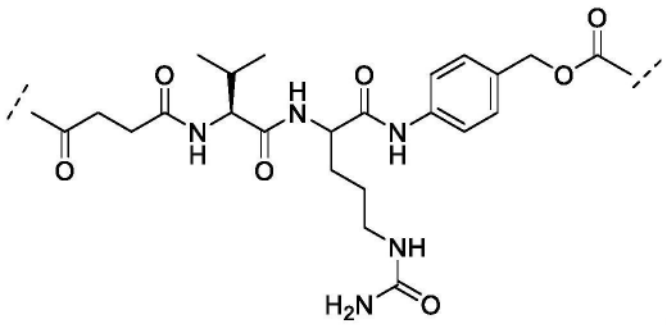
[0247] 化学不稳定性接头包括但不限于酸不稳定性接头(即,腙)和二硫化物接头。酶促可裂解接头包括但不限于肽接头和β-葡糖苷酸接头。肽接头的实例包括但不限于Val-Ala、Val-Cit、Phe-Lys、Phe-Arg、Phe-Cit、Val-Arg、Val-Cit、Ala-Arg和Ala-Cit。有利地预期肽接头及其肽键具有良好血清稳定性,因为溶酶体的蛋白分解酶在血液中具有低活性。Val-Ala、Val-Cit、Phe-Lys、Phe-Arg、Phe-Cit、Val-Arg、Val-Cit、Ala-Arg和Ala-Cit接头通过组织蛋白酶B快速水解。在一些实施方案中,接头是酶促可裂解接头。例如,在一些实施方案中,接头包含能够被酶识别和裂解的氨基酸残基。

[0248] 在一些实施方案中,接头包含肽基团。在一些实施方案中,接头包含含缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄醇基团(Val-Cit-PAB),例如具有以下结构:

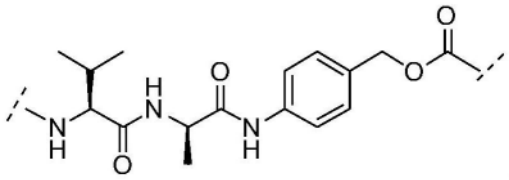
[0249] 

[0250] 例如,PAB基团可以经由羰基基团共价附接至治疗剂部分上存在的胺基团,从而形成氨基甲酸酯键,并且可以经由二酰基接头附接至外部结构单元上存在的胺基团,所述二酰基接头与缬氨酸氨基基团和外部结构单元上存在的胺基团形成酰胺键。

[0251] 在一些实施方案中,接头包含戊二酸-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄醇基团或由其组成,例如具有以下结构:

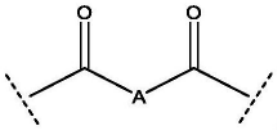
[0252] 

[0253] 在一些实施方案中,接头包含缬氨酸-丙氨酸-对氨基苄醇基团或由其组成,例如具有以下结构:

[0254] 。

[0255] 在一些实施方案中,药物活性剂包含羟基基团,并且药物活性剂的残基经由羟基基团的氧原子附接至接头。该方法允许经由酯基团附接至接头,并且已经发现此类酯基团在体内可裂解,从而以期望速率释放药物活性剂。

[0256] 在一些实施方案中,核心单元由包含氨基基团的核心单元前体形成,结构单元是赖氨酸残基或其类似物,药物活性剂包含羟基基团,药物活性剂的残基经由羟基基团的氧原子附接,使得在药物活性剂的残基与接头之间存在酯键,并且在接头与最外结构单元上存在的氮原子之间存在酰胺键。在一些实施方案中,药物活性剂包含羟基基团,药物活性剂的残基经由羟基基团的氧原子附接,并且可裂解接头是具有下式的二酰基接头基团:

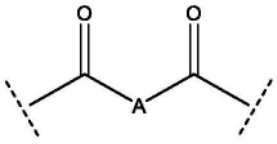
[0257] ,其中A是插入有O、S、S-S、NH或N(Me)的C_2-C_{10}亚烷基基团,或者其中A是选自由四氢呋喃、四氢噻吩、吡咯烷和N-甲基吡咯烷组成的组的杂环。

[0258] 如本文所用,术语“烷基”是指单价直链(即线性)或支链的饱和烃基团。在一个实例中,烷基基团含有1至10个碳原子((即C_{1-10}烷基)。在一个实例中,烷基基团含有1至6个碳原子(即C_{1-6}烷基)。烷基基团的实例包括甲基、乙基、丙基(例如正丙基、异丙基)、丁基(例如正丁基、仲丁基、叔丁基)、戊基和己基基团。

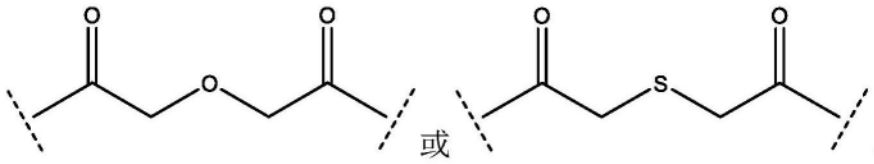
[0259] 如本文所用,术语“亚烷基”是指二价直链(即线性)或支链的饱和烃基团。在一个实例中,亚烷基基团含有2至10个碳原子((即C_{2-10}亚烷基)。在一个实例中,亚烷基基团含有2至6个碳原子(即C_{2-6}亚烷基)。亚烷基基团的实例包括例如-CH_2CH_2-、-$CH_2CH_2CH_2$-、-$CH_2CH(CH_3)$-、-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-$CH_2CH(CH_3)CH_2$-等。

[0260] 此类接头特别适于经由治疗剂中存在的羟基基团连接至治疗剂。在此类情况下,缀合物含有接头与治疗剂部分之间的酯键,并且含有接头与树枝状体部分之间的酰胺键。

[0261] 在一些实施方案中,药物活性剂包含羟基基团,药物活性剂的残基经由羟基基团的氧原子附接,并且可裂解接头是具有下式的二酰基接头基团:

[0262] ,其中A是插入有O、S、NH或N(Me)的C_2-C_{10}亚烷基基团。

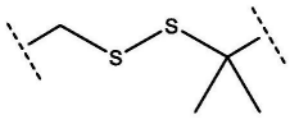
[0263] 在一些实施方案中,药物活性剂包含羟基基团,药物活性剂的残基经由羟基基团的氧原子附接,并且二酰基接头是

[0264] 。

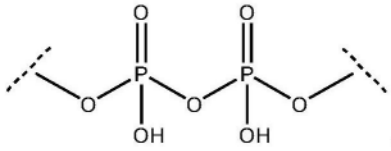
[0265] 可裂解接头的具体类型是含有二硫化物部分的可裂解接头。此类接头易受谷胱甘

肽的裂解。例如,该类型的接头可以包含经由插入有二硫化物部分的烷基链连接的两个酰基基团。

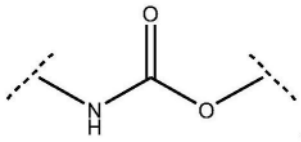
[0266] 在一些实施方案中,接头包含插入有二硫化物部分的烷基链,其中在二硫化物基团旁边的一个或两个碳原子被一或多个甲基基因取代。例如,在二硫化物基团旁边的一个碳原子可以被偕二甲基基团取代,例如接头可以包含以下基团:

[0267] 

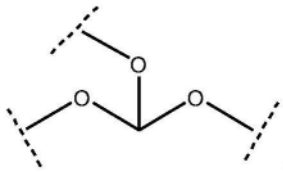
[0268] 可裂解接头的另一种具体类型是含有二磷酸酯部分的可裂解接头。此类接头易受溶酶体酸性焦磷酸酶和酸性磷酸酶的水解。在一些实施方案中,接头包含插入有二磷酸酯部分(也称为焦磷酸酯部分)的烷基链:

[0269] 

[0270] 可裂解接头的另一种具体类型是含有氨基甲酸酯部分的可裂解接头。此类接头具有活化前的高水解稳定性,和通过不同分子内机制进行的高效裂解。在一些实施方案中,接头包含插入有氨基甲酸酯部分的烷基链:

[0271] 

[0272] 可裂解接头的另一种具体类型是含有原酸酯部分的可裂解接头:

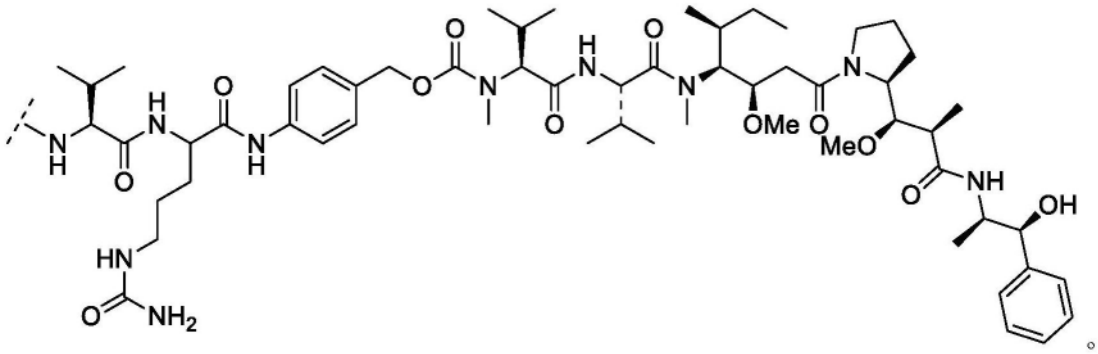
[0273] 

[0274] 不可裂解接头是连接基团,所述连接基团是在暴露于体内条件时在所需时间段内对裂解惰性或基本惰性的。不可裂解接头在生物条件下不被裂解。

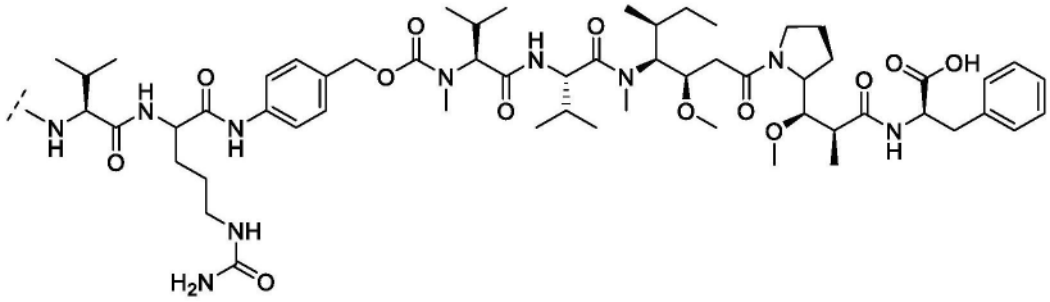
[0275] 实例包括通过亚烷基或环亚烷基基因(例如C_{1-10}亚烷基基团或C_{3-10}环亚烷基基团)桥接的二酰基接头。不可裂解接头的另外实例包括硫醚接头。不可裂解接头的具体实例是通过使用SMCC(琥珀酰亚胺4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯)形成的不可裂解接头。SMCC可以通过马来酰亚胺官能性与治疗剂部分上存在的或附接至治疗剂部分的硫醇基团进行反应,形成硫酯键。羧酸官能性可用于与外部结构单元上存在的氨基基团反应。

[0276] 在一些实施方案中,接头包含Val-Cit-PAB基团。在一些实施方案中,接头包含Val-Arg-PAB基团。在一些实施方案中,接头包含Val-Arg-触发子基团。在一些实施方案中,接头是Val-Ala-PAB-P-触发子基团。在一些实施方案中,接头是Val-Ala-PNB-P基团。

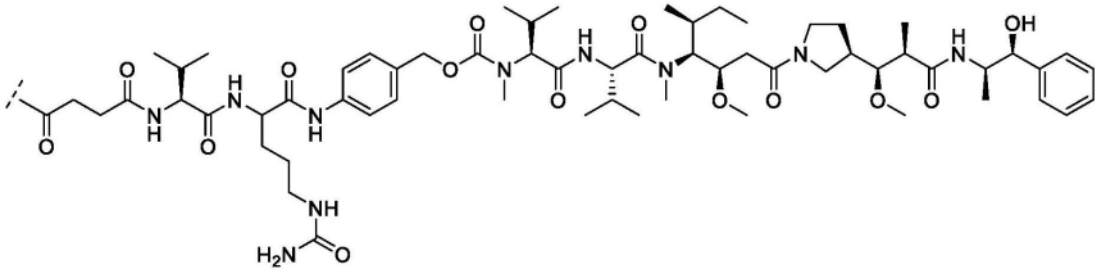
[0277] 在一个实施方案中,接头包含Val-Cit-PAB基团,治疗剂部分是MMAE,并且Val-Cit-PAB基团如下附接至治疗剂部分(即,Val-Cit-PAB-MMAE):

[0278] 

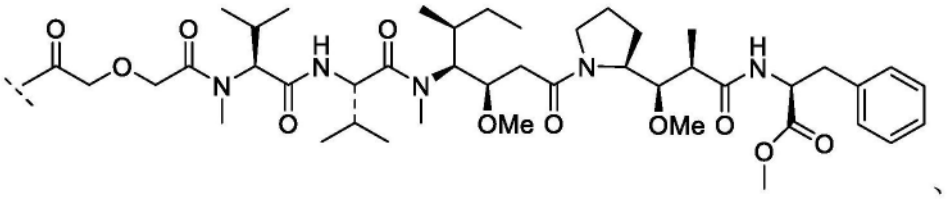
[0279] 在一个实施方案中,接头是Val-Cit-PAB基团,治疗剂部分是MMAF,并且Val-Cit-PAB基团如下附接至治疗剂部分(即,Val-Cit-PAB-MMAF):

[0280] 

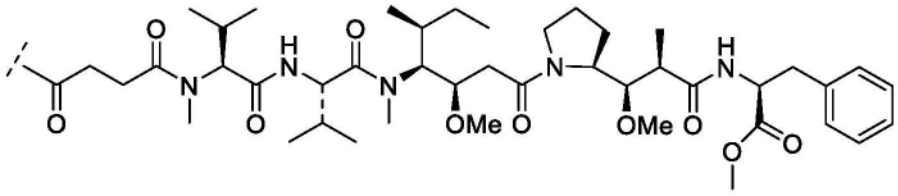
[0281] 在一个实施方案中,接头包含戊二酸-Val-Cit-PAB基团,治疗剂部分是MMAE,并且戊二酸-Val-Cit-PAB基团如下附接至治疗剂部分(即戊二酸-Val-Cit-PAB-MMAE):

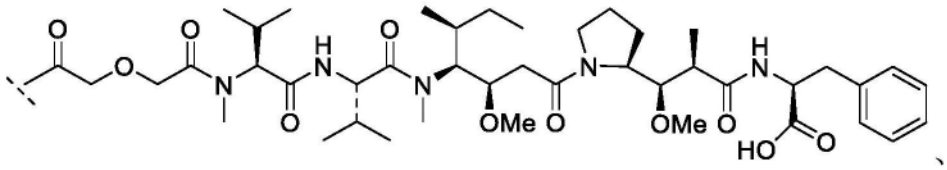
[0282] 

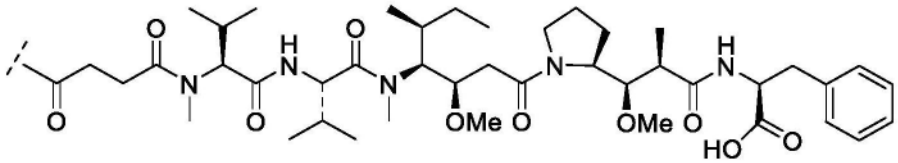
[0283] 在一个实施方案中,接头是DGA(二甘醇酸)或戊二酸基团,治疗剂部分是MMAF或其酯,例如:



[0284]







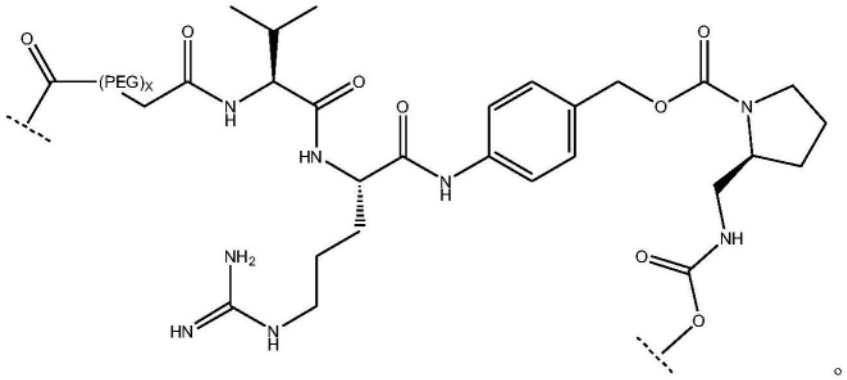
[0285] 在一些实施方案中,治疗剂通过连接子基团共价连接至树枝状体的表面结构单元。例如,治疗剂可以通过除接头基团之外的连接子基团共价连接至树枝状体的表面结构单元。连接子基团允许治疗剂以相对于树枝状体的表面的不同长度系接。例如,可以利用连接子基团延伸治疗剂相对于树枝状体的表面的距离。此举可以消除与空间位阻相关的任何潜在问题,所述空间位阻可能阻止接近可裂解接头,并且可能降低治疗剂与靶标相互作用的能力。在一些实施方案中,树枝状体-靶向剂缀合物包含通过接头基团和连接子基团共价连接至树枝状体的表面的治疗剂。在一些实施方案中,连接顺序是树枝状体-连接子-接头-治疗剂。在一些实施方案中,连接顺序是树枝状体-接头-连接子-治疗剂。

[0286] 连接子基团可以包含用于延伸治疗剂相对于树枝状体的表面的距离的任何化学部分。在一些实施方案中,连接子基团可以包含一个或多个亲水性聚合物基团。在一些实施方案中,连接子基团包含约1与约50之间个亲水性聚合物基团。在一些实施方案中,连接子基团包含PEG基团。在一些实施方案中,连接子基团包含PEOX基团。在一些实施方案中,连接子基团包含聚肌氨酸基团。在一些实施方案中,连接子基团包含多于一个、多于两个、多于四个、多于10个、多于20个、多于30个、多于40个、多于50个PEG部分。在一些实施方案中,连接子基团包含约1与约50之间个PEG部分。在一些实施方案中,连接子基团包含四个PEG部分。在一些实施方案中,连接子基团包含12个PEG部分。在一些实施方案中,连接子基团包含24个PEG部分。在一些实施方案中,连接子基团包含48个PEG部分。

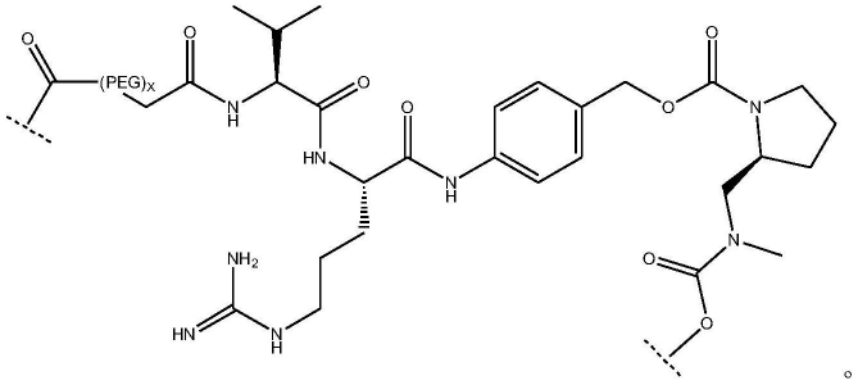
[0287] 在一些实施方案中,接头包含连接子基团,并且是$(PEG)_X$-Val-Arg-PAB-P-触发子-部分。X可以是如上所述的在约1与约50之间的数字。

[0288] 在一个实施方案中,接头包含连接子基团,并且是$(PEG)_9$-Val-Arg-PAB-P-触发

子-NHCO部分：

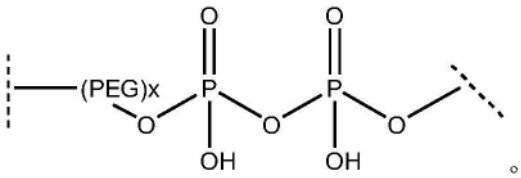
[0289] 

[0290] 在一个实施方案中，接头包含连接子基团，并且是$(PEG)_9$-Val-Arg-PAB-P-触发子-$N(CH_3)CO$部分：

[0291] 

[0292] 在一些实施方案中，接头包含连接子基团，并且是$(PEG)_X$-O-P(O)OH-O-P(O)OH-O-部分。同样，X可以是如上所述的在约1与约50之间的数字。

[0293] 在一个实施方案中，接头包含连接子基团，并且是$(PEG)_X$-O-P(O)OH-O-P(O)OH-O-部分：

[0294] 

[0295] 在一些实施方案中，接头包含连接子基团，并且是$(PEG)_X$-Val-Ala-PAB-P-触发子-部分。X可以是如上所述的在约1与约50之间的数字。在一个实施方案中，接头包含连接子基团，并且是$(PEG)_9$-Val-Ala-PAB-P-触发子-NHCO部分。

[0296] 特定接头，例如像$(PEG)_X$-Val-Arg-PAB-P-触发子-或$(PEG)_X$-O-P(O)OH-O-P(O)OH-O-的使用可以提供治疗剂的释放。

[0297] 在例如$(PEG)_X$-Val-Arg-PAB-P-触发子-NHCO、$(PEG)_X$-Val-Arg-PAB-P-触发子-$N(CH_3)CO$的情况下，初始通过细胞酶(诸如组织蛋白酶B)对二肽部分的裂解来活化接头，从而显示出自切除2-(氨基甲基)吡咯烷连接子。在分子内环化后，发生含羟基治疗剂的消除。示例性含羟基治疗剂包括卡巴他赛、多西他赛和SN-38。

[0298] 在$(PEG)_X$-O-P(O)OH-O-P(O)OH-O-部分的情况下，接头特异性且利落地裂解以提供含羟基药物，诸如卡巴他赛、多西他赛和SN-38，但还具有提供单磷酸药物的附加优势，所

述单磷酸药物是核苷酸抑制剂例如像吉西他滨的活性物质。

[0299] 药代动力学修饰基团

[0300] 缀合物包含共价连接至树枝状体的表面结构单元的多个亲水性聚合物基团,其可以修饰缀合物的药代动力学特性。亲水性聚合物基团可以例如提供改善的药代动力学特性。

[0301] 在一些实施方案中,树枝状体包含共价连接至树枝状体的表面结构单元的多个亲水性聚合物基团。术语"亲水性聚合物基团"通常是指在25℃下具有至少25mg/ml、更优选地至少50mg/ml并且还更优选地至少100mg/ml的水中溶解度的聚合物基团。

[0302] 在一些实施方案中,亲水性聚合物基团包含氨基酸、烷氧基或烷基(酰基)氨基基团的重复单元。在一些实施方案中,亲水性聚合物基团包含氨基酸(诸如肌氨酸)的重复单元。在一些实施方案中,亲水性聚合物基团包含烷氧基基团的重复单元(例如亲水性聚合物是PEG基团)。在一些实施方案中,亲水性聚合物包含烷基(酰基)氨基基团的重复单元(例如亲水性聚合物是PEOX基团)。

[0303] 在一些实施方案中,亲水性聚合物基团包含至少10个单体单元。在一些实施方案中,亲水性聚合物基团包含高达100个单体单元。在一些实施方案中,亲水性聚合物基团包含10至100或10至50个单体单元。

[0304] 在一些实施方案中,亲水性聚合物基团是PEG基团。PEG基团是聚乙二醇基团,即包含具有式-CH_2CH_2O-的重复单元的基团。用于产生本公开的树枝状体的PEG材料通常含有具有分子量的一些变化(即,±10%)的PEG的混合物,并且因此,在指定分子量的情况下,通常其是PEG组合物的平均分子量的近似值。例如,术语"$PEG_{\sim 2100}$"是指具有大约2100道尔顿的平均分子量(即±大约10%)的聚乙二醇(PEG_{1890}至PEG_{2310})。术语"$PEG_{\sim 2300}$"是指具有大约2300道尔顿的平均分子量(即±大约10%)的聚乙二醇(PEG_{2070}至PEG_{2530})。通常使用三种方法来计算MW平均值:数均分子量、重均分子量和z均分子量。如本文所用,短语"分子量"旨在是指可以使用本领域熟知的技术测量的重均分子量,所述技术包括但不限于NMR、质谱、基质辅助激光解吸电离飞行时间(MALDI-TOF)、凝胶渗透色谱或其他液相色谱技术、光散射技术、超速离心和粘度测定法。

[0305] 在一些实施方案中,PEG基团具有在500至2500道尔顿范围内的平均分子量。在一些实施方案中,PEG基团具有在800至1200道尔顿范围内的平均分子量。在一些实施方案中,PEG基团具有在900至1100道尔顿范围内的平均分子量。在一些实施方案中,PEG基团具有在1500至2500道尔顿范围内的平均分子量。在一些实施方案中,PEG基团具有在1900至2300道尔顿范围内的平均分子量。在一些实施方案中,PEG基团具有在2100至2500道尔顿范围内的平均分子量。

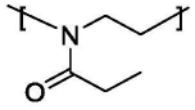
[0306] 在一些实施方案中,PEG基团具有约1100道尔顿的平均分子量。在一些实施方案中,PEG基团具有约2000道尔顿的平均分子量。在一些实施方案中,PEG基团具有约800、约900、约1000、约1100、约1200、约1300、约1400、约1500、约1600、约1700、约1800、约1900、约2000、约2100、约2200、约2300、约2400或约2500道尔顿的平均分子量。

[0307] 在一些实施方案中,PEG基团具有在约1.00与约1.50之间、在约1.00与约1.25之间或在约1.00与约1.10之间的多分散指数(PDI)。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"是指分子质量在给定聚合物样品中的分布量度。多分

散指数(PDI)等于重均分子量(M_w)除以数均分子量(M_n),并且指示单独分子质量在一批聚合物中的分布。多分散指数(PDI)具有等于或大于1的值,但当聚合物接近均匀变化的长度和平均分子量,多分散指数(PDI)将更接近1。

[0308] 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。

[0309] 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,树枝状体包含共价连接至树枝状体部分的表面结构单元的多个PEOX基团。PEOX基团是聚乙基噁唑啉基团,即包含具有下式的重复单元的基团:

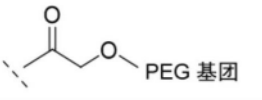
[0310] 。

[0311] PEOX基团如此命名是因为它们可以通过乙基噁唑啉的聚合产生。用于产生本公开的树枝状体的PEOX材料通常含有具有分子量的一些变化(即,±10%)的PEOX的混合物,并且因此,在指定分子量的情况下,通常其是PEOX组合物的平均分子量的近似值。在一些实施方案中,第二末端基团包含具有至少750道尔顿、至少1000道尔顿、或至少1500道尔顿的平均分子量的PEOX基团。在一些实施方案中,第二末端基团包含具有在750道尔顿至2500道尔顿、或1000道尔顿至2000道尔顿范围内的平均分子量的PEOX基团。如果需要,可以使用封端的PEOX基团。在一些实施方案中,PEOX基团是甲氧基封端的PEOX。

[0312] 在一些实施方案中,亲水性聚合物基团包含聚肌氨酸基团。在一些实施方案中,聚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含具有在750道尔顿至2500道尔顿、或1000道尔顿至2000道尔顿范围内的平均分子量的聚肌氨酸基团。

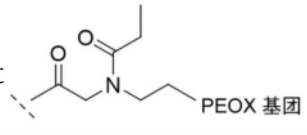
[0313] 亲水性聚合物基团可以经由任何合适手段附接至外部结构单元。在一些实施方案中,使用连接基团来将亲水性聚合物基团附接至外部结构单元。

[0314] 通常经由使用前体来附接亲水性聚合物基团,所述前体含有与胺基因反应的反应性基团,诸如反应性酰基基团(其可以形成酰胺键)、或醛(其可以在还原胺化条件下形成胺基团)。

[0315] 在一些实施方案中,经由PEG基团中存在的碳原子与PEG连接基团中存在的氧原子之间形成的醚键将PEG基团共价附接至PEG连接基团(L1),并且经由结构单元中存在的氮原子与PEG连接基团中存在的酰基基团的碳原子之间形成的酰胺键将每个PEG基团共价附接至结构单元。在一些实施方案中,L1-PEG基团各自是

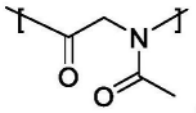
,并且其中PEG基团是具有在约500至2500道尔顿范围内的平均分子量的甲氧基封端的PEG。

[0316] 在一些实施方案中,经由PEOX基团中存在的氮原子与PEOX连接基团中存在的碳原子之间形成的键将PEOX基团共价附接至PEOX连接基团(L1′),并且经由结构单元中存在的氮原子与PEOX连接基团中存在的酰基基团的碳原子之间形成的酰胺键将每个PEOX基团共

价附接至结构单元。在一些实施方案中,L1'-PEOX基团各自是 

。

[0317] 在一些实施方案中,亲水性聚合物基团包含聚肌氨酸基团,即包含具有下式的重复单元的基团:

[0318] 

。

[0319] 在一些实施方案中,经由结构单元中存在的氮原子与聚肌氨酸基团中存在的酰基基团的碳原子之间形成的酰胺键将聚肌氨酸基团附接至结构单元。在一些实施方案中,亲水性聚合物基团包含具有至少750道尔顿、至少1000道尔顿、或至少1500道尔顿的平均分子量的聚肌氨酸基团。在一些实施方案中,第二末端基团包含具有在750道尔顿至2500道尔顿、或1000道尔顿至2000道尔顿范围内的平均分子量的聚肌氨酸基团。

[0320] 在许多情况下,已经在树枝状体表面处官能化的树枝状体的群体含有官能团的随机化学计量和拓扑结构。例如,含有例如64个反应性表面基团的树枝状体-靶向剂缀合物的群体与一个或多个反应性官能团的反应可以产生官能化树枝状体的广泛群体,其中一些树枝状体含有比其他树枝状体更高数量的官能团。在存在可用于与反应性官能团反应的多个不同表面基团的情况下,也可以获得具有不同表面拓扑结构的树枝状体的广泛分布。

[0321] 本发明的树枝状体-靶向剂缀合物、中间体和过程可以允许通过共价附接至表面结构单元而对治疗剂的高负载。也可以认为此类树枝状体-靶向剂缀合物促进在施用后在延长时间段内释放治疗有效水平的治疗剂,并且因此可以降低所需的施用频率和/或次数。本发明的树枝状体-靶向剂缀合物还可以允许将治疗剂靶向递送至其作用位点。因此,这种树枝状体-靶向部分剂可以降低脱靶活性,诸如细胞毒性活性。

[0322] 树枝状体-靶向剂缀合物的内化

[0323] 树枝状体-靶向剂缀合物提供了靶向的抗癌疗法。缀合物的有益特性被理解为至少部分地与所观察到的含有MMAE治疗剂的示例性缀合物向靶细胞中的快速内化相关联。在一些实施方案中,树枝状体-靶向剂缀合物内化在HER2表达细胞中。

[0324] 如本文所用,术语"内化"是指将树枝状体-靶向剂缀合物内吞至细胞中。树枝状体-靶向剂缀合物特异性找出并结合靶HER2表达癌细胞上的HER2受体并且快速内化的能力意指减少量的缀合物在血浆中循环。因此,结果是应当降低了治疗剂(诸如超细胞毒性部分像MMAE)在非过表达HER2的位点(例如肿瘤细胞)的位点处经受不期望的从树枝状体-靶向剂缀合物的裂解的机会,并且应当降低了与治疗剂在受试者中的非特异释放相关联的副作用或毒性的可能性。相比之下,等同剂量的治疗剂(诸如超细胞毒性部分)的施用可能对治疗剂不能单独地安全施用的点引起极其毒性。例如,应理解,MMAE和MMAF太具毒性而不能单独地安全施用至受试者。因此,认为树枝状体-靶向剂缀合物提供用于递送治疗剂,诸如超细胞毒性剂(包括MMAE和MMAF)的更安全手段。

[0325] 在一些实施方案中,与等同剂量的游离治疗剂的施用相比,缀合物的施用提供降低的副作用。在一些实施方案中,与等同剂量的游离治疗剂的施用相比,缀合物的施用提供治疗剂的血浆浓度(例如,Cmax,或在施用后指定时间点(例如,1h、6h、12h、24h、48h)时的浓

度))的至少10％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、或至少90％降低。

[0326] 在一些实施方案中,治疗剂是超细胞毒性剂(例如MMAE、MMAF),并且与等同剂量的游离治疗剂的施用相比,树枝状体-靶向剂缀合物的施用提供治疗剂的血浆浓度(例如,Cmax,或在施用后指定时间点(例如,1h、6h、12h、24h、48h)时的浓度)的至少10％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、或至少90％降低。

[0327] 因此,还提供了杀伤HER2表达细胞的方法,其包括:使如本文所定义的缀合物与HER2表达细胞接触,使得缀合物内化在细胞内,由此治疗剂杀伤HER2表达细胞。在一些实施方案中,治疗剂是超细胞毒性剂(例如MMAE、MMAF)。在一些实施方案中,缀合物(例如含超细胞毒性剂缀合物)通过内吞内化至细胞中。

[0328] 已经发现本公开的缀合物在体内癌症研究,即异种移植物研究中是有效的。认为相对小的大小(例如整个缀合物的低分子量)有助于渗透至肿瘤组织中,并且有助于疗法的有效性。因此,在一些实施方案中,缀合物的分子量在高达约120kDa、或高达约100kDa、或高达约80kDa、或高达约60kDa、或高达约50kDa、或高达约45kDa、或高达约40kDa的范围内。

[0329] 组合物

[0330] 在一些实施方案中,将树枝状体-靶向剂缀合物呈现为组合物、优选地药物组合物。

[0331] 应当理解,作为用于产生树枝状体的合成方法的性质的结果,在给定组合物中存在的树枝状体-靶向剂缀合物之间存在分子组成的一些变化。例如,如上文所讨论,用于产生树枝状体-靶向剂缀合物的一个或多个合成步骤可能未完全进行至完成,这可能导致并非全部包含相同数量的治疗剂部分、靶向剂,或含有不完全代的结构单元的树枝状体-靶向剂缀合物的存在。

[0332] 在一个实例中,组合物包含并非全部包含相同数量的治疗剂部分的多种树枝状体。在一个实例中,组合物包含并非全部包含相同数量的靶向剂的多种树枝状体。在一些实施方案中,组合物包含多种树枝状体-靶向剂缀合物,其中共价连接至树枝状体的靶向剂的平均数量是1。在一些实施方案中,组合物包含多种树枝状体-靶向剂缀合物,其中共价连接至树枝状体的靶向剂的平均数量是1.2。在一些实施方案中,组合物包含多种树枝状体-靶向剂缀合物,其中共价连接至树枝状体的靶向剂的平均数量在1与1.5之间。在一些实施方案中,组合物包含多种树枝状体-靶向剂缀合物,其中共价连接至树枝状体的靶向剂的平均数量在0.5与5之间。在一些实施方案中,组合物包含多种树枝状体-靶向剂缀合物,其中共价连接至树枝状体的靶向剂的平均数量在1与4之间。在一些实施方案中,组合物包含多种树枝状体-靶向剂缀合物,其中共价连接至树枝状体的靶向剂的平均数量在1与之间。在一些实施方案中,组合物包含多种树枝状体-靶向剂缀合物,其中共价连接至树枝状体的靶向剂的平均数量在1与1.5之间。因此,提供了组合物,其包含多种树枝状体-靶向剂缀合物或其药学上可接受的盐,其中树枝状体-靶向剂缀合物如本文所定义。在一些实施方案中,提供了用于治疗性用途的组合物,其包含树枝状体-靶向剂缀合物和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,将所述组合物配制用于肠胃外递送。在一些实施方案中,将所述组合物配制用于静脉内递送。在一些实施方案中,将所述组合物配制用于皮下递送。在一些实施方案中,将所述组合物配制用于肌内注射。

[0333] 本公开还提供了用于兽医和人医学用途的药物配制品或组合物,其包含本公开的缀合物或其药学上可接受的盐,以及一种或多种药学上可接受的载体和任选的任何其他治疗性成分、稳定剂等。

[0334] 因此,还提供了用于药物用途的组合物,其包含i)如本文所定义的缀合物;和ii)药学上可接受的赋形剂。

[0335] 赋形剂必须在与配制品/组合物的其他成份相容并且对其受者不过度有害的意义上是药学上可接受的。

[0336] 在一些实施方案中,组合物包含药学上可接受溶剂,诸如注射用水和/或药学上可接受的有机溶剂。

[0337] 本公开的组合物可以例如包含聚合物赋形剂/添加剂或载体,例如聚乙烯基吡咯烷酮、衍生化纤维素(诸如羟甲基纤维素、羟乙基纤维素和羟丙基甲基纤维素)、Ficoll(聚合物糖)、羟乙基淀粉(HES)、葡萄糖结合剂(例如,环糊精,诸如2-羟丙基-β-环糊精和磺基丁基醚-β-环糊精)、聚乙二醇和果胶。

[0338] 组合物可以进一步包含稀释剂、缓冲液、柠檬酸盐、海藻糖、粘合剂、崩解剂、增稠剂、润滑剂、防腐剂(包括抗氧化剂)、无机盐(例如,氯化钠)、抗微生物剂(例如,苯扎氯铵)、甜味剂、抗静电剂、山梨糖醇酯、脂质(例如,磷脂诸如卵磷脂和其他磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、脂肪酸和脂肪酯、类固醇(例如,胆固醇))和螯合剂(例如,EDTA、锌和其他此类合适的阳离子)。适于在根据本公开的组合物中使用的其他药物赋形剂和/或添加剂列出于以下文献中:"Remington:The Science&Practice of Pharmacy",第19版,Williams&Williams,(1995)和the"Physician's Desk Reference",第52版,Medical Economics,Montvale,N.J.(1998)以及"Handbook of Pharmaceutical Excipients",第三版,A.H.Kibbe编辑,Pharmaceutical Press,2000。

[0339] 例如可以将本公开的树枝状体-靶向剂缀合物配制在组合物中,所述组合物包括适于通过气雾剂吸入至肺、或肠胃外(包括腹膜内、静脉内、皮下或肌内注射)施用的那些。组合物可以方便地以单位剂型呈现,并且可以通过药学领域熟知的任何方法制备。所有方法包括将树枝状体-靶向剂缀合物与构成一种或多种辅助成分的载体联合的步骤。一般来讲,通过以下方式来制备组合物:将树枝状体-靶向剂缀合物与液体载体联合以形成溶液或悬浮液;或者可替代地,使树枝状体-靶向剂缀合物与适于形成固体、任选地微粒产品的配制组分联合,并且然后,如果需要,将产品成形为期望的递送形式。当为微粒时,本公开的固体配制品通常将包含大小在约1纳米至约500微米范围内的颗粒。一般来讲,对于旨在用于静脉内施用的固体配制品,颗粒的直径通常将在约1nm至约10微米的范围内。组合物可以含有本公开的树枝状体-靶向部分缀合物,其是具有低于1000nm,例如在5与1000nm,尤其是5与500nm、更尤其是5至400nm,诸如5至50nm之间并且尤其是在5与20nm之间的微粒直径的纳米微粒。在一个实例中,组合物含有平均大小在5与20nm之间的树枝状体-靶向部分缀合物。在一些实施方案中,树枝状体-靶向部分缀合物在组合物中是多分散的,其中PDI在1.01与1.8之间、尤其是在1.01与1.5之间、且更尤其是在1.01与1.2之间。在一个实例中,树枝状体-靶向剂缀合物在组合物中是单分散的。

[0340] 在一些优选的实施方案中,将所述组合物配制用于肠胃外递送。例如,在一个实施方案中,配制品可以是适于在注射前重构在水性媒介物中无菌的冻干组合物。

[0341] 在一些实施方案中,适于肠胃外施用的配制品方便地包含树枝状体-靶向剂缀合物的无菌水性制剂,例如可以将其配制为与受体的血液等渗。

[0342] 在一些实施方案中,将组合物配制用于作为化学疗法方案的一部分的肠胃外输注。

[0343] 在一些实施方案中,将所述组合物配制用于腹膜内递送。可以使用任何合适的递送手段。例如,在一些实施方案中,递送可以通过灌洗或气雾剂进行。在一个实施方案中,将组合物配制用于腹膜内递送,并且用于治疗腹膜腔中的癌症,所述癌症包括恶性上皮肿瘤(例如,卵巢癌)和腹膜癌病(例如胃肠癌尤其是结肠直肠癌、胃癌、妇科癌症和原发性腹膜赘生物)。

[0344] 还提供了药物配制品,其适于作为气雾剂通过吸入施用。这些配制品包括所期望树枝状体或其盐的溶液或悬浮液。可以将所期望配制品放置于小腔室中并且使其雾化。可以通过压缩空气或通过超声能量完成雾化以便形成包含树枝状体或其盐的多个液滴或固体颗粒。

[0345] 如下文所讨论,可以例如将本公开的树枝状体-靶向剂缀合物与一种或多种另外的药物活性剂组合施用。例如,可以将树枝状体-靶向剂缀合物连同另外的药物活性剂以组合物施用。

[0346] 另外的药物活性剂的实例包括化学治疗和细胞毒性剂、小分子细胞毒性剂、酪氨酸激酶抑制剂、检查点抑制剂、EGFR抑制剂、抗体疗法、紫杉烷和芳香酶抑制剂。

[0347] 本公开的树枝状体-靶向剂缀合物不仅可以与其他化学疗法药物一起施用,还可以连同适当的其他药物治疗以组合物施用。

[0348] 使用方法

[0349] 本文还提供了治疗癌症的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的如本文所定义的缀合物或包含如本文所定义的缀合物的药物组合物。

[0350] 本文还提供了如本文所定义的缀合物或包含如本文所定义的缀合物的组合物在制造用于治疗癌症的药物中的用途。

[0351] 本文还提供了如本文所定义的缀合物或包含如本文所定义的缀合物的药物组合物,用于在疗法中使用。本文还提供了如本文所定义的缀合物或包含如本文所定义的缀合物的药物组合物,用于在治疗癌症中使用。

[0352] 在一些实施方案中,将树枝状体-靶向剂缀合物用于治疗或预防癌症,例如用于抑制肿瘤的生长的方法中。在一些实施方案中,树枝状体-靶向剂缀合物用于在治疗癌症中使用。

[0353] 在一些实施方案中,癌症是实体肿瘤。癌症可以是原发性或转移性肿瘤。在一些实施方案中,癌症是原发性肿瘤。在一些实施方案中,癌症是转移性肿瘤。

[0354] 在一些实施方案中,癌症的特征在于HER2(也称为ERBB2)的异常表达或过表达。已知HER2的这种异常表达或过表达在例如以下癌症中发生:乳腺癌、睾丸癌、卵巢癌、胃癌(stomach cancer)、肺的腺癌、胃癌(gastric cancer)、胰腺癌、涎腺导管癌、食管癌和子宫癌(例如,子宫浆液性子宫内膜癌)。在一些实施方案中,癌症选自由以下组成的组:乳腺癌、睾丸癌、卵巢癌、胃癌、肺的腺癌、胃癌、胰腺癌、涎腺导管癌、食管癌和子宫癌(例如,子宫浆液性子宫内膜癌)。在一些实施方案中,癌症是乳腺癌。在一些实施方案中,癌症是睾丸癌。

在一些实施方案中,癌症是卵巢癌。在一些实施方案中,癌症是胃癌。在一些实施方案中,癌症是肺的腺癌。在一些实施方案中,癌症是胃癌。在一些实施方案中,癌症是胰腺癌。在一些实施方案中,癌症是涎腺导管癌。在一些实施方案中,癌症是食管癌。在一些实施方案中,癌症是子宫癌。

[0355] 因此,还提供了方法、用途、用于所述用途的树枝状体-靶向剂缀合物或组合物,其中癌症选自由以下组成的组:卵巢癌、乳腺癌、胃癌、子宫癌或特征在于HER2的异常表达或过表达(即,ERBB2)的另外癌症。

[0356] 组合

[0357] 尤其是在化学疗法期间,常常将药物与其他药物组合施用。因此,在一些实施方案中,将树枝状体-靶向剂缀合物与一种或多种另外的药物活性剂(例如,一种或多种另外的抗癌剂/药物)组合施用。可以同时、随后或单独施用树枝状体-靶向剂缀合物和一种或多种另外的药物活性剂。例如,它们可以作为相同组合物的一部分、或通过施用单独组合物来施用。一种或多种另外的药物活性剂可以例如是用于治疗结肠直肠癌、胃癌、胰腺癌、前列腺癌或乳腺癌的抗癌剂。另外的药物活性剂的实例包括化学治疗和细胞毒性剂、小分子细胞毒性剂、酪氨酸激酶抑制剂、检查点抑制剂、EGFR抑制剂、抗体疗法、紫杉烷和芳香酶抑制剂。

[0358] 剂量

[0359] 应当理解,术语“治疗有效量”是指树枝状体-靶向剂缀合物的施用量足以在一定程度上缓解或预防所治疗的障碍或病症的一种或多种症状。树枝状体-靶向剂缀合物的治疗有效量可以被称为基于例如所施用的树枝状体-靶向剂缀合物的量。可替代地,其可以基于树枝状体-靶向剂缀合物理论上能够递送的治疗剂的量,例如基于树枝状体-靶向剂缀合物上治疗剂的负载量来确定。

[0360] 树枝状体-靶向剂缀合物可以通过任何合适的途径来施用,包括例如,可以静脉内施用树枝状体-靶向剂缀合物。在一些实施方案中,将树枝状体-靶向剂缀合物作为IV团注递送。在一些实施方案中,将树枝状体-靶向剂缀合物在0.5至60分钟范围内、或在0.5至15分钟范围内、或在0.5至5分钟范围内的时间段内IV施用。在另一个实例中,可以腹膜内施用树枝状体-靶向剂缀合物。施用的途径可以例如靶向至受试者患有的疾病或障碍。例如,在一些实施方案中,疾病或障碍可以是腹内恶性肿瘤,诸如妇科或胃肠癌症,并且可以腹膜内施用树枝状体-靶向剂缀合物。在一些实施方案中,树枝状体-靶向剂缀合物可以用于治疗腹膜腔的癌症,诸如恶性上皮肿瘤(例如,卵巢癌)或腹膜癌病(例如胃肠癌,尤其是结肠直肠癌、胃癌、妇科癌症和原发性腹膜赘生物),并且腹膜内施用树枝状体-靶向部分缀合物。

[0361] 在一些实施方案中,所施用的树枝状体-靶向剂缀合物的量足以递送在2与100mg之间的活性剂/m^2、在2与50mg之间的活性剂/m^2、在2与40mg之间的活性剂/m^2、在2与30mg之间的活性剂/m^2、在2与25mg之间的活性剂/m^2、在2与20mg之间的活性剂/m^2、在5与50mg之间的活性剂/m^2、在10至40mg之间的活性剂/m^2、在15与35mg之间的活性剂/m^2、在10与20mg/m^2之间、在20与30mg/m^2之间或在25与35mg之间的活性剂/m^2。小鼠中10mg/kg的活性剂剂量应近似等同于30mg/m^2的人剂量(FDA指南2005)。(为了将人mg/kg剂量转化为mg/m^2,可以将数字乘以37,FDA指南2005)。

[0362] 在一些实施方案中,将治疗有效量的树枝状体-靶向剂缀合物以预定频率施用至

有需要的受试者。在一些实施方案中,根据剂量方案将树枝状体-靶向剂缀合物施用至有需要的受试者,在所述剂量方案中每一至四周施用一次树枝状体-靶向剂缀合物。在一些实施方案中,根据剂量方案将树枝状体-靶向剂缀合物施用至有需要的受试者,在所述剂量方案中每三至四周施用一次树枝状体-靶向剂缀合物。

[0363] 本公开的靶向性缀合物以受控方式提供治疗剂。通过控制治疗剂从缀合物的释放,也可以控制循环治疗剂(例如超细胞毒性剂)的水平。例如,治疗剂的最大血浆浓度可以大大低于由给药等同量的游离治疗剂产生的最大血浆浓度。在一些实施方案中,与等同剂量的游离治疗剂的施用相比,缀合物的施用导致释放的治疗剂的最大血浆浓度的至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、或至少80%降低。

[0364] 缀合物的制备

[0365] 可以使用任何合适合成途径,诸如实施例中所述的那些制备树枝状体-靶向剂。

[0366] 在一些实施方案中,树枝状体-靶向剂缀合物通过包括以下的方法产生:

[0367] 使第一中间体与第二中间体反应,

[0368] 所述第一中间体包含HER2靶向剂,所述HER2靶向剂是具有高达约80kDa的分子量并且包含抗原结合位点的肽部分,所述靶向剂共价附接至间隔子前体基团,并且所述间隔子前体基团包含第一反应性基团

[0369] 所述第二中间体是树枝状体,所述树枝状体包含

[0370] i)核心单元(C);以及

[0371] ii)结构单元(BU),每个结构单元是赖氨酸残基或其类似物;

[0372] 其中所述核心单元经由酰胺键共价附接至至少两个结构单元,每个酰胺键在所述核心单元中存在的氮原子与结构单元中存在的酰基基团的碳原子之间形成;

[0373] 治疗剂,所述治疗剂共价连接至所述树枝状体的表面结构单元;以及

[0374] 亲水性聚合物基团,所述亲水性聚合物基团共价连接至所述树枝状体的表面结构单元,所述第二中间体包含第二反应性基团

[0375] 其中所述第一反应性基团和所述第二反应性基团是互补的,使得它们适于彼此反应以便将所述HER2靶向剂共价连接至所述树枝状体。

[0376] 本公开还提供了可用于合成树枝状体-靶向剂缀合物的中间体。因此,还提供了用于制备树枝状体-靶向剂缀合物的中间体,所述中间体包含HER2靶向剂,所述HER2靶向剂是具有高达约80kDa的分子量并且包含抗原结合位点的肽部分,所述靶向剂共价附接至间隔子前体基团,并且所述间隔子前体基团包含适于与树枝状中间体上存在的互补反应性基团反应的反应性基团。

[0377] 在一些实施方案中,经由非天然氨基酸残基将靶向剂共价附接至间隔子前体基团。在一些实施方案中,经由三唑部分(例如通过含叠氮基非天然氨基酸(诸如叠氮基苯丙氨酸)与含炔烃基团(诸如DBCO[二苄基环辛炔])的反应产生)将靶向剂共价附接至间隔子前体基团。

[0378] 在一些实施方案中,间隔子前体基团包含一个或多个低聚物或聚合物基团,诸如PEG、PEOX或聚氨基酸(例如聚肌氨酸)基团。例如,其可以含有PEG基团,例如2至100个-CH_2CH_2O-单元的PEG基团。

[0379] 在一些实施方案中,间隔子前体基团上存在的反应性基团是烯烃基团,例如适于

与含四嗪基团反应的反应性烯烃。在一些实施方案中,反应性基团是反式环辛烯基团。

[0380] 本公开还涉及以下编号条款:

[0381] 1.一种树枝状体-靶向剂缀合物,其包含:

[0382] a)树枝状体,所述树枝状体包含

[0383] i)核心单元(C);以及

[0384] ii)结构单元(BU),每个结构单元是赖氨酸残基或其类似物;

[0385] 其中所述核心单元经由酰胺键共价附接至至少两个结构单元,每个酰胺键在所述核心单元中存在的氮原子与结构单元中存在的酰基基团的碳原子之间形成;

[0386] b)HER2靶向剂,所述HER2靶向剂是具有高达约80kDa的分子量并且包含抗原结合位点的肽部分,所述肽部分通过间隔子基团共价连接至所述树枝状体;

[0387] c)治疗剂,所述治疗剂共价连接至所述树枝状体的表面结构单元;以及

[0388] d)PEG或PEOX基团,所述基团共价连接至所述树枝状体的表面结构单元。

[0389] 2.根据条款1所述的缀合物,其中所述肽部分选自:重链抗体、Fab、Fv、scFv或单结构域抗体。

[0390] 3.根据条款1或条款2所述的缀合物,其中所述肽部分包含重链可变(V_H)结构域或由其组成。

[0391] 4.根据条款1至3中任一项所述的缀合物,其中所述肽部分包含轻链可变(V_L)结构域或由其组成。

[0392] 5.根据条款1至4中任一项所述的缀合物,其中所述靶向剂具有约5kDa至约30kDa的分子量。

[0393] 6.根据条款5所述的缀合物,其中所述靶向剂具有约5kDa至约15kDa的分子量。

[0394] 7.根据条款6所述的缀合物,其中所述靶向剂具有约10kDa至约16kDa的分子量。

[0395] 8.根据条款1至7中任一项所述的缀合物,其中所述靶向剂包含少于120个氨基酸残基。

[0396] 9.根据条款1至8中任一项所述的缀合物,其中所述靶向剂包含如本文所定义的任一种氨基酸序列或由其组成。

[0397] 10.根据条款1至9中任一项所述的缀合物,其中所述靶向剂与所述间隔子基团之间的共价键已经通过靶向剂前体和间隔子基团前体上存在的互补反应性官能团之间的反应而形成。

[0398] 11.根据条款10所述的缀合物,其中所述靶向剂前体包含非天然氨基酸残基,所述非天然氨基酸残基具有包括反应性官能团的侧链。

[0399] 12.根据条款11所述的缀合物,其中所述非天然氨基酸残基是4-叠氮基苯丙氨酸残基。

[0400] 13.根据条款1至12中任一项所述的缀合物,其中所述靶向剂经由所述靶向剂的C末端共价连接至所述间隔子基团。

[0401] 14.根据条款10至13中任一项所述的缀合物,其中所述间隔子基团前体包含作为炔烃基团的反应性官能团。

[0402] 15.根据条款14所述的缀合物,其中所述炔烃基团是二苯并环辛炔基团。

[0403] 16.根据条款1至15中任一项所述的缀合物,其中所述治疗剂是超细胞毒性剂。

[0404] 17.根据条款16所述的缀合物,其中所述治疗剂是澳瑞司他汀或美登木素生物碱。

[0405] 18.根据条款17所述的缀合物,其中所述治疗剂是单甲基澳瑞司他汀E。

[0406] 19.根据条款17所述的缀合物,其中所述治疗剂是单甲基澳瑞司他汀F。

[0407] 20.根据条款1至19中任一项所述的缀合物,其中所述治疗剂经由接头共价连接至所述树枝状体的表面结构单元。

[0408] 21.根据条款1至20中任一项所述的缀合物,其中所述治疗剂经由可裂解接头共价连接至所述树枝状体的表面结构单元。

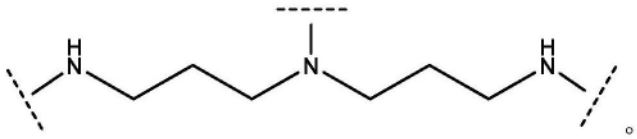
[0409] 22.根据条款21所述的缀合物,其中所述可裂解接头包含Val-Cit-PAB基团。

[0410] 23.根据条款1至22中任一项所述的缀合物,其中所述缀合物包含共价连接至所述树枝状体的表面结构单元的PEG基团。

[0411] 24.根据条款23所述的缀合物,其中所述PEG基团具有在约500至约2500g/mol范围内的平均分子量。

[0412] 25.根据条款1至24中任一项所述的缀合物,其中所述间隔子基团包含PEG基团。

[0413] 26.根据条款1至25中任一项所述的缀合物,其中所述核心单元包含以下结构:

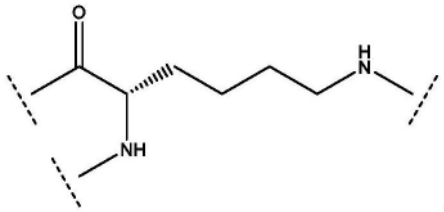
[0414] 

。

[0415] 27.根据条款1至26中任一项所述的缀合物,其中所述树枝状体具有一至五代的结构单元。

[0416] 28.根据条款27所述的缀合物,其中所述树枝状体具有三代的结构单元。

[0417] 29.根据条款1至28中任一项所述的缀合物,其中所述结构单元各自是:

[0418] 

。

[0419] 30.根据条款1至29中任一项所述的缀合物,其用于与另外的活性剂组合施用。

[0420] 31.根据条款1至30中任一项所述的缀合物,其中所述缀合物内化在HER2表达细胞中。

[0421] 32.根据条款1至31中任一项所述的缀合物,其中与等同剂量的游离治疗剂的施用相比,所述缀合物的施用导致降低的副作用。

[0422] 33.根据条款1至32中任一项所述的缀合物,其中与等同剂量的游离治疗剂的施用相比,所述缀合物的施用导致释放的治疗剂的最大血浆浓度的至少50%降低。

[0423] 34.一种组合物,其包含多种如条款1至33中任一项所定义的缀合物。

[0424] 35.一种药物组合物,其包含:

[0425] i)根据条款1至34中任一项所述的缀合物;以及

[0426] ii)药学上可接受的赋形剂。

[0427] 36.根据条款34或35所述的组合物,其中将所述组合物配制用于肠胃外递送。

[0428] 37.根据条款1至33中任一项所述的缀合物、或根据条款34至36中任一项所述的组

合物,用于在治疗癌症中使用。

[0429] 38.一种治疗癌症的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据条款1至33中任一项所述的缀合物或根据条款34至37中任一项所述的组合物。

[0430] 39.根据条款1至33中任一项所述的缀合物、或根据条款34至38中任一项所述的组合物在制造用于治疗癌症的药物中的用途。

[0431] 40.根据条款37至39中任一项所述的方法、用途或用于所述用途的缀合物或组合物,其中所述癌症是卵巢癌、乳腺癌、胃癌、子宫癌或特征在于ERBB2基因的异常表达的另外癌症。

[0432] 41.一种杀伤HER2表达细胞的方法,其包括:

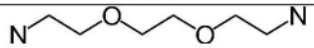
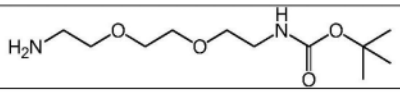
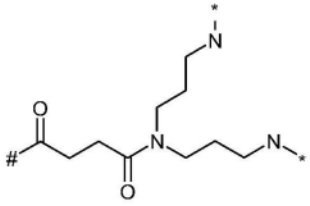
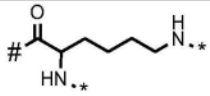
[0433] 使根据条款1至33中任一项所述的缀合物与HER2表达细胞接触,使得所述缀合物内化在所述细胞内,由此所述治疗剂杀伤所述HER2表达细胞。

[0434] 通过以下实施例进一步描述本公开。应理解,以下描述仅用于描述特定实施方案的目的,并不旨在对以上描述具有限制性。

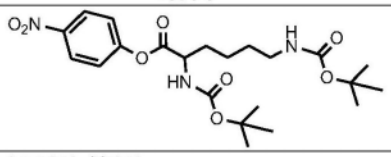
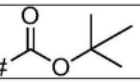
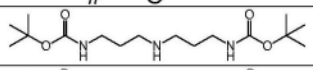
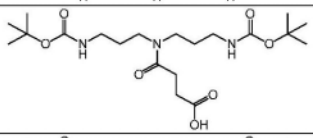
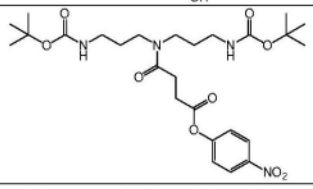
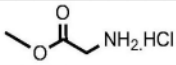
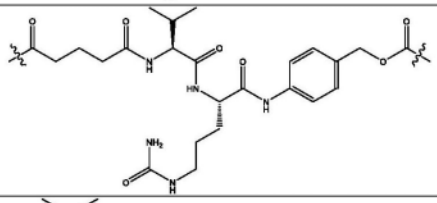
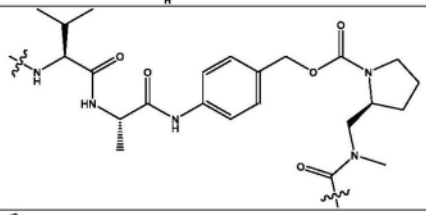
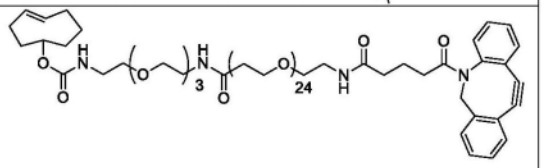
[0435] 实施例

[0436] 在本文中关于树枝状体缀合物合成使用以下命名:

[0437]

缩写	名称	结构[1]
NEOEOEN	2-[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]-乙胺	
[Boc] NEOEOEN	叔丁氧基羰基氨基-3,6-氧杂-8-氨基辛烷	
$Su(NPN)_2$		
Lys	赖氨酸	

[0438]

缩写	名称	结构[1]
DBL-oPNP	二 Boc 赖氨酸的对硝基苯活性酯	
NH_2.TFA	表示作为 TFA 盐的脱保护分子的表面胺基团	
Boc	叔丁氧基羰基	
$(NPN)_2$ $[Boc]_2$		
HO-Su$(NPN)_2$ $[Boc]_2$		
oPNPO-Su(NPN)$_2$ $[Boc]_2$		
MeOGly.HCl		
NHGlu-Val-Cit-PAB-MMAE 或 NHGlu-vc-PAB-		
Val-Ala-PAB-P-触发子-NMeCO		
DBCO-Glu-NHPEG$_{24}$CO-NHPEG$_3$-TCO / DBCO-PEG$_{12}$-TCO		

MeCN	乙腈
LCMS	液相色谱质谱
ESI MS	电喷雾质谱
UPA	独特连接点
Lys	赖氨酸
Boc	苄氧基羰基
PBS	磷酸盐缓冲盐水
DIPEA	二异丙基乙胺

[0439]

PEG	聚乙二醇
NH-PEG 也称为 NH-COPEG-OMe	NH-CO 聚乙二醇-OMe
PyBop	苯并三唑-1-基-氧基三-吡咯烷基鏻六氟磷酸盐
SEC	尺寸排阻色谱
TFA	三氟乙酸
NMM	N-甲基吗啉
HPLC	高效液相色谱
DMF	二甲基甲酰胺
DBL-oPNP	二-Boc-(*L*)-赖氨酸对硝基苯酯
NHFmoc	NH-芴基甲氧基羰基
NHBoc	NH-叔丁氧基羰基
MMAE	单甲基澳瑞司他汀 E
MMAF（OMe）	单甲基澳瑞司他汀 F（甲基酯）
$N(PNBoc)_2$	二 Boc 二亚丙基三胺
TEA	三乙胺
NMR	核磁共振
N_2	氮
D_2O	氧化氘
CD_3OD	氘代甲醇
Glu	谷氨酸衍生物
Val	缬氨酸
Arg	精氨酸
Ala	丙氨酸
Cit	瓜氨酸
PAB	对氨基苄基氨基甲酸酯
DGA	二甘醇酸
R_t	保留时间
DMAP	4-(二甲基氨基)吡啶
NHS	N-羟基琥珀酰亚胺
DCM	二氯甲烷
EtOAc	乙酸乙酯
THF	四氢呋喃
N3	叠氮化物
MAL	马来酰亚胺
BCN	含二环壬炔接头
MAL-EDA-BCN	马来酰亚胺基-乙二胺-二环壬炔
DBCO	含二苄基环辛炔的接头
UPA	具有附接或可以附接接头或靶向剂的选择连接点的树枝状体
BCN 三唑并	二环[6,1,0]壬炔-[1,2,3]三唑并
DBCO 三唑并	二苯并环辛炔-[1,2,3]三唑并
MPED	N-(3-马来酰亚胺基丙酸)-乙二胺

[0440]

DTX	多西他赛
t-BuOH	叔丁醇
TBTA	三[(1-苄基-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)甲基]胺
DFO	去铁胺
CTX	卡巴他赛
SN-38	7-乙基-10-羟基喜树碱

[0441] HPLC MS(质谱)和NMR设备细节:

[0442] HPLC-Waters 2795,具有2996二极管阵列检测器(DAD)

[0443] MS-Waters ZQ4000,具有ESI探针、入口流量分流以对MS产生约50μL/min。

[0444] 以如所指示的正或负电喷雾电离模式获取质谱数据。使用如在由Waters Corporation提供的MassLynx软件v4.0中实现的极大熵方法(MaxEnt)解卷积原始数据。在实验细节中报告的数据对应于在解卷积至理论零电荷状态之后的观察值。

[0445] NMR-300MHz Bruker。

[0446] 羧基反应性树枝状体支架的制备先前已经特别描述于WO2007/082331、WO2008/017125、WO2012/167309和WO2015/184510中。本领域技术人员可以使用或改编这些方法来制备本文概述的各种树枝状体。

[0447] 在以下实施例中,式中的[Lys]是指树枝状体的表面层上的赖氨酸结构单元。

[0448] 实施例1

[0449] 一般程序A.Boc脱保护

[0450] 向Boc化合物(1.0当量)在水中的冰冷却的搅拌悬浮液中添加TFA(40-200当量/Boc基团)。在5分钟后,移除冰浴并且将反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且将剩余的水性溶液进一步用水稀释并冻干,产生定量产率的脱保护产物。

[0451] 一般程序B.在树枝状体表面上添加赖氨酸层。

[0452] 在氮气气氛下向TFA树枝状体(1.0当量)在DMF中的搅拌溶液中添加TEA(6.0当量/NH_2),之后添加DBL-oPNP(2.0当量/NH_2)。将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且将所得粗制物质使用标准方法纯化。

[0453] 一般程序C.使用HO-Lys-(α-NHBoc)(ε-$NHPEG_{1100}$)楔形物对树枝状体表面聚乙二醇化。

[0454] 在氮气气氛下向TFA树枝状体(1.0当量)在DMF中的搅拌溶液中添加PyBOP(2.0当量/NH_2)和DIPEA(8.0当量/NH_2)。在10分钟后,添加HO-Lys-(α-NHBoc)(ε-$NHPEG_{1100}$)(1.35当量/NH_2)在DMF中的溶液,并且将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且将所得粗制物质使用标准方法纯化。

[0455] 一般程序D.用HO-Lys-(α-NHBoc)(ε-NHFmoc)楔形物封端树枝状体表面,之后进行Fmoc脱保护

[0456] 步骤1:向HO-Lys-(α-NHBoc)(ε-NHFmoc)(1.5当量/NH_2)和NMM(2.5当量/NH_2)在DMF中的搅拌溶液中添加PyBOP(1.4当量/NH_2)。将随后反应混合物在室温下搅拌15min,然后添加TFA-树枝状体(1.0当量)和NMM(2.5当量/NH_2)在DMF中的溶液。将随后反应混合物在室温下搅拌1小时,然后缓慢添加至冰冷的MeCN并且搅拌15min。将所得固体通过过滤收集并且用MeCN(3x)洗涤,然后冻干。

[0457] 步骤2:向Fmoc/Boc树枝状体(1.0当量)在DMF中的溶液中添加哌啶(21当量/Fmoc)。使溶液在室温下搅拌90分钟,然后缓慢添加至冰冷的Et_2O。在15min后,将沉淀的固体通过过滤收集、用Et_2O洗涤、溶解于H_2O中并且冻干。

[0458] 一般程序E.用DGA-多柔比星(Dox)或DGA-奈莫柔比星(Nemo)封端树枝状体表面

[0459] DGA-3'-NH-多柔比星

[0460] 步骤1:在室温下将DMAP(2.5当量)在DMF中的溶液添加至Dox.HCl(1.0当量)在DMF中的搅拌溶液。在5分钟后,添加DGA(0.9当量)在DMF中的溶液。反应在3小时内完成。

[0461] 步骤2:向以上反应混合物中添加PyBOP(2.0当量/树枝状体NH_2),之后添加TFA-树枝状体(叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_4$[(α-NH_2.TFA)(ε-NHPEG$_{1100}$)]$_4$或叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_8$[(α-NH_2.TFA)(ε-NHPEG$_{1100}$)]$_8$)(1.0当量)和DIPEA(6.0当量/树枝状体NH_2)在DMF中的溶液。将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且将所得粗制物质通过SEC纯化。

[0462] DGA-14-O-奈莫柔比星

[0463] 步骤1:在室温下将DMAP(2.5当量)在DMF中的溶液添加至奈莫柔比星(1.0当量)在DMF中的搅拌溶液。在5分钟后,添加DGA(0.9当量)在DMF中的溶液。反应在3小时内完成。

[0464] 步骤2:向以上反应混合物中添加PyBOP(2.0当量/树枝状体NH_2),之后添加TFA-树枝状体(叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_2$[Lys]$_4$[(α-NH_2.TFA)(ε-NHPEG$_{1100}$)]$_4$或叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH_2.TFA)(ε-NHPEG$_{1100}$)]$_8$)(1.0当量)和DIPEA(6.0当量/树枝状体NH_2)在DMF中的溶液。将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且将所得粗制物质通过SEC纯化。

[0465] 一般程序F.用Glu-vc-PAB-MMAE或DGA-MMAF(OMe)封端树枝状体表面

[0466] 在室温下将叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_8$[(α-NH_2.TFA)(ε-NHPEG$_{570/1100/2000}$)]$_8$(1.0当量)溶解于DMF和NMM(5.0当量/NH_2)的混合物中。将该溶液添加至HO-Glu-vc-PAB-MMAE或DGA-MMAF(OMe)(1.2当量/NH_2)和PyBOP(2.0当量/NH_2)并且在室温下静置。将所得粗制物质通过SEC纯化。

[0467] 一般程序G.亲和体与Dox/Pt(IV)-乙酸酯/MMAE/MMAF树枝状体的缀合

[0468] 步骤1:将亲和体蛋白(1.0mg/mL PBS)的溶液用TCEP(50mM,39.0当量)处理,并且在室温下将反应混合物在650rpm下摇动2小时。将所得溶液通过SEC纯化。

[0469] 步骤2:将收集的渗透物用马来酰亚胺-二环[6.1.0]壬炔(Mal-BCN)(20.0当量)在DMSO中的溶液处理。在室温下将随后反应混合物在650rpm下摇动2小时。将所得溶液通过SEC纯化。

[0470] 步骤3:将亲和体-BCN溶液用叠氮基

[0471] -PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_4$[(α-DGA-3′-NH-Dox)(ε-NHPEG$_{1100}$)]$_4$在PBS(858μM)中的溶液或叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_8$[(α-DGA-3′-NH-Dox)(ε-NHPEG$_{1100}$)]$_8$(580μM,在PBS中)或叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-Pt(IV)-乙酸酯)(ε-NHPEG$_{1100}$)]$_8$(903μM,在PBS中)或叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_8$[(α-Glu-vc-PAB-MMAE)(ε-NHPEG$_{570/1100/2000}$)]$_8$(240μM,在PBS中)或叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_8$[(α-DGA-MMAF(OMe))(ε-NHPEG$_{570/1100/2000}$)]$_8$(365μM,在PBS中)(1.3当量亲和体-BCN/树枝状体)处理。在室温下将随后反应混合物在650rpm下摇动过夜,并且然后用DBCO琼脂糖(5.0当量/树枝状体)的9.38mM(30% EtOH/水)

溶液处理。在室温下将随后悬浮液在1200rpm下摇动过夜。将悬浮液使用SEC纯化。

[0472] 一般程序H.纳米抗体与MMAE树枝状体的缀合

[0473] 步骤1:通过将接头(1mg)溶解于20:80(DMSO/10mM PBS,1mL)中来制备接头(BCN-PEG_2NH-Glu-NHPEG_{24}CO-NHPEG_3-TCO或DBCO-Glu-NHPEG_{24}CO-NHPEG_3-TCO)的溶液。

[0474] 步骤2:将TCO-接头溶液(1当量)添加至四嗪官能化树枝状体(例如Tz-MMAE-树枝状体或BHA-Tz-MMAE-树枝状体)(1.0当量,8mg/mL)在PBS(1)中的溶液。使反应混合物在室温下静置30min。通过粉红色四嗪颜色的消失来指示反应的完成。通过HPLC监测反应。

[0475] 步骤3:一旦完成反应,就将内容物用PBS稀释(至最终体积为0.5mL)。将BCN/DBCO-MMAE-树枝状体(1.0当量)的一部分添加至纳米抗体-叠氮化物(1.0当量,9.2mg/ml)在Tris缓冲液(20mM,1mL)中的溶液。将所得溶液在RT下静置7h,然后在4℃下静置过夜。通过阴离子交换色谱然后通过SEC进行纳米抗体-树枝状体构建体的纯化。

[0476] 实施例1a中间体的合成

[0477] 1.1叠氮基-PEG_{24}-CO[N$(PNBoc)_2$]化合物1

[0478] 在N_2气氛下向叠氮基-PEG_{24}-酸(2.00g,1.71mmol)和PyBOP(1.33g,2.56mmol)在DMF(20mL)中的搅拌溶液中添加NMM(563μL,5.12mmol)。在10min后,添加N$(PNBoc)_2$(622mg,1.88mmol)在DMF(5mL)中的溶液,并且将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且将所得油状物溶解于MeCN中并且通过制备性HPLC(27%-50%-70% MeCN,R_t 47-50min)纯化,产生淡黄色油状固体(1.37g,54%)。^{1}H-NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.44(m,18H);1.65-1.84(m,4H);2.63(t,J 6.3Hz,2H);3.05(dt,J6.9和14.7Hz,4H);3.36-3.41(m,6H);3.60-3.78(m,98H)。LCMS(亲性(philic)法,甲酸缓冲液)R_t=9.32min。ESIMS(+ve)1486.3$[M]^+$;$C_{67}H_{132}N_6O_{29}[M]^+$的计算m/z:1486.8。

[0479] 1.2叠氮基-PEG_{24}-CO[N$(PNH_2.TFA)_2$],化合物2

[0480] 根据一般程序A使用叠氮基-PEG_{24}-CO[N$(PNBoc)_2$](1.37g,922μmol)制备。获得呈淡黄色油状物的冻干产物(1.67g,119%)。^{1}H-NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):1.88-2.06(m,4H);2.74(t,J 6.0Hz,2H);2.96(t,J 7.2Hz,2H);3.04(明显t,J 7.5Hz,2H);3.42-3.52(m,6H);

[0481] 3.67-3.95(m,93H)。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)R_t=8.47min,ESIMS(+ve)1286.0$[M]^+$;$C_{57}H_{116}N_6O_{25}[M]^+$的计算m/z=1286.6。

[0482] 1.3叠氮基-PEG_{24}-CO[N$(PN)_2$][Lys]$_2$[Boc]$_4$,G1,化合物3

[0483] 根据一般程序B使用叠氮基-PEG_{24}-CO[N$(PNH_2.TFA)_2$](186mg,145μmol)制备。将粗制物质溶解于MeCN中并且通过制备性HPLC(30%-80% MeCN,R_t 33.5-36min)纯化,产生淡黄色油状物(224mg,80%)。^{1}H-NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.22-1.87(m,56H);2.64(t,J 6.0Hz,2H);3.03(t,J 6.6Hz,4H);3.13-3.23(m,4H),3.36-3.45(m,6H);3.60-3.69(m,100H);3.77(t,J 6.0Hz,2H);3.85-3.88(m,1H);3.92-4.02(m,2H)。LCMS(疏性(phobic)法,甲酸缓冲液)R_t=6.74min;ESIMS(+ve)1942.4,$[M]^+$;$C_{89}H_{172}N_{10}O_{35}^+[M+H]^+$的计算m/z=1942.4。

[0484] 1.4叠氮基-PEG_{24}-CO[N$(PN)_2$][Lys]$_2$[NH_2.TFA]$_4$,G1,化合物4

[0485] 根据一般程序A使用叠氮基-PEG_{24}-CO[N$(PN)_2$[Lys]$_2$[Boc]$_4$(220mg,113μmol)制备。获得呈淡黄色油状物的冻干产物(251mg,111%)。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)R_t=6.49min,ESIMS(+ve)1542.1$[M]^+$;$C_{69}H_{140}N_{10}O_{27}[M]^+$的计算m/z=1541.90。

[0486] 1.5叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[(α-Boc)(ε-$NHPEG_{1100}$)]$_4$,G2,化合物5

[0487] 根据一般程序C使用叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_2$[NH_2.TFA]$_4$(120mg,60.1μmol)制备。将粗制物质溶解于MeCN/H_2O(1:1)中并且通过制备性HPLC(20%-70% MeCN,R_t 31-32.5min)纯化,产生呈淡黄色油状物的产物(244mg,59%)。^{1}H-NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.24-1.91(m,74H);2.42-2.47(m,8H);2.62-2.66(m,2H);3.13-3.25(m,12H);3.36(s,12H);3.52-3.78(m,490H);3.85-3.88(m,4H);3.94-4.11(m,4H);4.25-4.31(m,2H)。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)R_t=8.70min;ESIMS(+ve)1714.0$[M+4H]^{4+}$/4,1371.7$[M+5H]^{5+}$/5;1143.0

[0488] $[M+6H]^{6+}$/6,980.0$[M+7H]^{7+}$/7。转换为6852。

[0489] 1.6叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[(α-NH_2.TFA)(ε-$NHPEG_{1100}$)]$_4$,G2,化合物6

[0490] 根据一般程序A使用叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_4$[(α-Boc)(ε-$NHPEG_{1100}$)]$_4$(244mg,35.6μmol)制备。将粗制冻干物质重溶解于水中并且通过制备性HPLC(22%-70% MeCN,.01%TFA,R_t 27min)纯化,产生呈淡黄色粘性固体的产物(173mg,67%)。^{1}H-NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):1.31-1.98(m,40H);2.51-2.56(m,8H);2.72(宽t,J 6.0Hz,2H);3.16-3.30(m,16H);3.40(s,12H);3.46-3.53(m,4H);3.62-3.97(m,490H);4.03(t,J 6.6Hz,2H);4.24-4.29(m,2H)。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)R_t=9.85min;ESIMS(+ve)1614.1$[M+4H]^{4+}$/4,1291.6$[M+5H]^{5+}$/5;1076.5$[M+6H]^{6+}$/6。转换为6452。

[0491] 1.7叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[Boc]$_8$,G2,化合物7

[0492] 根据一般程序B使用叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[NH_2.TFA]$_4$(117mg,58.6μmol)制备。获得呈淡黄色油状物的粗制物质(167mg,100%)。LCMS(疏性法4.1a,甲酸缓冲液)R_t=8.35min;ESIMS(+ve)1328.6$[M+2H]^{2+}$/2-Boc;$C_{133}H_{252}N_{18}O_{47}[M]^+$的计算m/z=2855.6。

[0493] 1.8叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[NH_2.TFA]$_8$,G2,化合物8

[0494] 根据一般程序A使用叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[Boc]$_4$(167mg,58.6μmol)制备。将粗制水性溶液通过制备性HPLC(10%-60% MeCN,0.1% TFA缓冲液;R_t 27-29min)纯化,产生呈非常淡的黄色粘性固体的产物(124mg,71%,经2步)。^{1}H-NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):1.30-1.96(m,42H);2.71(t,J 6.0Hz,2H);2.98-3.04(m,8H);3.13-3.30(m,8H);3.36-3.53(m,7H);3.68-3.84(m,100H);3.93(t,J 6.6Hz,2H);4.04(t,J 6.6Hz,2H);4.25(t,J 7.2Hz,2H)。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)R_t=7.76min,ESIMS(+ve)1028.3$[M+2H]^{2+}$/2,685.9$[M+3H]^{3+}$/3;$C_{93}H_{190}N_{18}O_{31}{}^{2+}[M+2H]^{2+}$/2的计算m/z:1028.3,$C_{93}H_{191}N_{18}O_{31}{}^{3+}[M+3H]^{3+}$/3的计算m/z:685.9。

[0495] 1.9叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-Boc)(ε-NHPEG1100)]$_8$,G3,化合物9

[0496] 根据一般程序C使用叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[NH_2.TFA]$_8$(123mg,41.5μmol)制备,产生呈棕色油状物的粗制物质。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)R_t=11.52min,ESIMS(+ve)2113$[M+6H]^{6+}$/6,1812$[M+7H]^{7+}$/7,1585$[M+8H]^{8+}$/8,1409$[M+9H]^{9+}$/9,1268$[M+10H]^{10+}$/10,1153$[M+11H]^{11+}$/11,1057$[M+12H]^{12+}$/12。转换为12 673。

[0497] 1.10叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-TFA)(ε-$NHPEG_{1100}$)]$_8$,G3,化合物10

[0498] 根据一般程序A使用叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-Boc)(ε-$NHPEG_{1100}$)]$_8$(526mg,41.5μmol)制备。将粗制水性溶液通过制备性HPLC(3%-60% MeCN,0.1% TFA缓冲液;R_t 38-39min)纯化,产生呈淡黄色粘性固体的产物(359mg,68%,经2步)。LCMS(亲性法,

TFA缓冲液)R_t=10.27min。转换为11 880。

[0499] 1.11叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-Boc)(ε-Fmoc)]$_8$,G3,化合物11

[0500] 根据一般程序D使用叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[NH_2.TFA]$_8$(105mg,35.4μmol)制备。获得呈白色固体的产物(166mg,83%)。^{1}H-NMR(300MHz,d_6-DMSO)δ(ppm):1.23-1.49(m,160H);2.73-2.95(m,36H);3.44-3.60(m,94H);3.83(m,8H);4.05-4.28(m,29H);6.33-6.90(m,8H,NH);7.24-7.87(m,84H)。

[0501] 1.12叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-Boc)(ε-NH_2)]$_8$,G3,化合物12

[0502] 根据一般程序D使用叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-Boc)(ε-Fmoc)]$_8$(169mg,29.9μmol)制备,产生蓬松固体(95mg,82%)。^{1}H-NMR(300MHz,d_4-MeOH)δ(ppm):1.46-1.49(m,160H);2.69(brs,14H);3.09-3.19(m,18H);3.38-3.41(m,8H);3.55-3.78(m,96H),3.89-4.33(m,14H)。

[0503] 1.13叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-Boc)(ε-NHPEG$_{570}$)]$_8$,G3,化合物13和叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH_2.TFA)(ε-NHPEG$_{570}$)]$_8$,G3,化合物14

[0504] 向mPEG$_{570}$-CO_2H(205mg,348μmol)、NMM(60μL,546μmol)和PyBOP(171mg,329μmol)在DMF(1.5mL)中的溶液中添加在DMF(0.5mL)中的叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-Boc)(ε-NH_2)]$_8$。使随后反应混合物在室温下搅拌过夜,然后真空浓缩,溶解于水中,用TFA处理并且在室温下搅拌过夜。将混合物浓缩并且溶解于水中,然后使用Millipore离心过滤单元(3K MWCO再生纤维素)纯化并且冷冻干燥,产生呈灰白色蓬松物质的产物(68%,经2步)。^{1}H-NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):1.33-1.90(m,88H);2.51-2.55(m,16H);2.67-2.75(m,4H),3.16-3.23(m,32H);3.40-3.53(m,32H),3.62-4.03(m,470H);4.21-4.39(m,7H)。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)R_t=7.50min。

[0505] 1.14叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-Boc)(ε-NHPEG$_{2000}$)]$_8$,G3,化合物15

[0506] 向叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_8$[(α-Boc)(ε-NH_2)]$_8$(95.0mg,24.5μmol)在DMF(4mL)中的搅拌溶液中添加DIPEA(85μL,488μmol),之后添加mPEG$_{2000}$-NHS(720mg,313μmol)。使随后反应混合物在室温下搅拌过夜。将粗制残余物溶解于水中并且通过超滤(5K,Pall PES膜)纯化。收集渗余物并且将其冷冻干燥,产生灰白色蓬松物质(76%)。^{1}H-NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):1.33-1.63(m,160H);3.05-3.15(m,35H);3.29(s,24H);3.35-3.96(m,1370H);4.13-4.19(m,6H)。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)R_t=11.24min。

[0507] 1.15叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH_2.TFA)(ε-NHPEG$_{2000}$)]$_8$,G3,化合物16

[0508] 根据一般程序A使用叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-Boc)(ε-NHPEG$_{2000}$)]$_8$(40.0mg,1.87μmol)制备,产生呈灰白色蓬松物质的产物(35mg,88%)。^{1}H-NMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):1.28-1.79(m,88H);2.51-2.58(m,4H);3.04-3.18(m,35H);3.28(s,24H);3.35-3.97(m,1348H),4.14-4.25(m,6H)。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)R_t=9.12min。

[0509] 1.16(MeTzPh)-PEG_{24}-CO[N(PNBoc)$_2$]化合物46

[0510] 在N_2气氛下向(MeTzPh)-PEG_{24}-CO_2H(0.402g,0.305mmol)、PyBOP(0.205g,0.394mmol)和NMM(130μL,1.18mmol)在DMF(3mL)中的搅拌溶液中添加NH(PNBoc)$_2$(0.147g,0.444mmol)。将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且将所得油状物在硅胶色谱(5%至10% MeOH/DCM)上纯化,产生呈红色残余物的所需产物化合物106(0.474g,95%)。^{1}HNMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.43-1.44(m,18H);1.64-1.80(m,4H);2.63

(t,J 6.0Hz,2H);3.00(s,3H);3.02-3.09(m,4H);3.34-3.40(m,4H),3.58-3.77(m,99H);3.88-3.91(m,2H);4.25-4.28(m,2H);7.15-7.20(m,2H);8.46-8.51(m,2H)。LCMS(疏性法,甲酸缓冲液)RT=6.20min。ESIMS(+ve)1631.0[M+H]+;$C_{76}H_{140}N_7O_{30}$[M+H]$^+$的计算m/z:1631.0。

[0511] 1.17(MeTzPh)-PEG_{24}-CO[N(PNH_2.HCl)$_2$]化合物47

[0512] 向在冰/水浴中的(MeTzPh)-PEG_{24}-CO[N(PNBoc)$_2$]化合物1(0.420g,0.258mmol)中缓慢添加1.25M HCl/MeOH溶液(8mL,10.0mmol)。在5min后,移除冰浴并且使随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,产生呈红色残余物的产物化合物107(0.388g,100%)。^{1}HNMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.91-2.07(m,4H);2.68(t,J 6.0Hz,2H);2.94-3.09(m,7H);3.53-3.80(m,108H);3.88-3.91(m,2H);4.25-4.28(m,2H);7.16-7.20(m,2H);8.47-8.51(m,2H)。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)RT=8.12min。ESIMS(+ve)1430.9[M+H]$^+$;

[0513] $C_{66}H_{124}N_7O_{26}$[M+H]$^+$的计算m/z:1430.8.

[0514] 1.18(MeTzPh)-PEG_4CO-NH-PEG_{24}-CO[N(PNH_2.HCl)$_2$]化合物48

[0515] 向H_2N-PEG_{24}-CO[N(PNBoc)$_2$](0.418g,0.286mmol)在DMF(2.0mL)中的搅拌溶液中添加(MeTzPh)-PEG_4-CO_2H(0.15g,0.344mmol)、PyBOP(0.178g,0.342mmol)和NMM(80μL,0.727mmol)。将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且将所得油状物在冰/水浴中冷却,然后缓慢添加1.25M HCl/MeOH溶液(10.0mL,12.5mmol)。在5min后,移除冰浴并且使随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且将所得油状物溶解于MeCN/H2O(8mL,1:1)中并且通过制备性HPLC(10%-50% MeCN,0.1%甲酸缓冲液,RT 35min)纯化,产生红色固体化合物108(1.37g,54%)。^{1}HNMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.91-2.04(m,4H);2.43(t,J 6.0Hz,2H);2.68(t,J 6.0Hz,2H);2.94-3.07(m,4H);3.00(s,3H);3.35(t,J 6.0Hz,2H);3.51-3.80(m,119H);3.88-3.91(m,2H);4.25-4.28(m,2H);7.16-7.20(m,2H);8.46-8.51(m,2H)。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)RT=8.15min。ESIMS(+ve)1677.9[M+H]$^+$;$C_{77}H_{145}N_8O_{31}$[M+H]$^+$的计算m/z:1678.0。

[0516] 1.19(MeTzPh)-PEG_4CO-NHPEG_{24}-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_2$[NHBoc]$_4$G1化合物49

[0517] 在N_2气氛下向(MeTzPh)-PEG_4CO-NHPEG_{24}-CO[N(PNH_2.HCl)$_2$]化合物48(0.195g,0.111mmol)和DBL-oPNP(0.146g,0.312mmol)在DMF(3.0mL)中的搅拌溶液中添加NMM(125μL,0.864mmol)。然后将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且将所得油状残余物通过硅胶柱色谱(5%-10%-15% MeOH/DCM)纯化,产生呈红色油状物的所需产物化合物109(0.186g,72%)。^{1}HNMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.28-1.87(m,56H);2.43(t,J 6.0Hz,2H);2.63(t,J 6.0Hz,4H);3.00(s,3H);3.02-3.06(m,4H);3.10-3.21(m,4H);).3.35-3.41(m,6H);3.51-3.78(m,110H);3.84-3.99(m,4H);4.25-4.28(m,4H);7.15-7.20(m,2H);8.47-8.51(m,2H)。LCMS(疏性法,甲酸缓冲液)RT=6.68min;ESIMS(+ve)2335.3,[M+H]$^+$;$C_{109}H_{201}N_{12}O_41$+[M+H]$^+$的计算m/z=2335.4。

[0518] 1.20(MeTzPh)-PEG_4CO-NHPEG_{24}-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_2$[NH_2.HCl]$_4$G1化合物50

[0519] 向冰冷却的(MeTzPh)-PEG_4CO-NHPEG_{24}-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_2$[NHBoc]$_4$化合物49(0.215g,0.0921mmol)中缓慢添加1.25M HCl/MeOH(6.0mL,7.50mmol)的溶液。在5min后,移除冰浴并且使随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,产生呈红色油状物的产物化合物110(0.208g,108%)。%)。^{1}HNMR(300MHz,CD3OD)δ(ppm):1.51-1.99(m,20H);

2.47(t,J 6.0Hz,2H);2.67(t,J 6.0Hz,4H);2.90-3.04(m,7H);3.35-3.41(m,7H);3.51-3.78(m,106H);4.25-4.28(m,2H);7.17-7.20(m,2H);8.47-8.51(m,2H);LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)RT=7.28min,ESIMS(+ve)1934.9$[M+H]^+$;$C_{89}H_{169}N_{12}O_{33}[M]^+$的计算m/z=1935.2。

[0520] 1.21(MeTzPh)-PEG_4CO-NHPEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[NHBoc]$_8$G2化合物51

[0521] 在N2气氛下向(MeTzPh)-PEG_4CO-NHPEG_{24}-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_2$[NH_2.HCl]$_4$化合物50(0.192g,0.0822mmol)和DBL-oPNP(参考文献1)(0.215g,0.460mmol)在DMF(3.0mL)中的搅拌溶液中添加NMM(215μL,0.1.96mmol)。然后将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且将所得油状残余物在硅胶色谱(5%-10%-15% MeOH/DCM)上纯化,产生呈红色油状物的所需产物化合物51(0.231g,87%)。^{1}HNMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.28-1.87(m,140H);2.44(t,J 6.0Hz,2H);2.63(t,J 6.0Hz,2H);3.00(s,3H);3.02-3.06(m,10H);3.10-3.21(m,16kH);).3.33-3.40(m,8kH);3.51-3.77(m,120H);3.84-3.99(m,14H);3.94-4.10(m,4H);4.25-4.28(m,4H);7.15-7.20(m,2H);8.47-8.52(m,2H)。LCMS(疏性法,甲酸缓冲液)RT=8.15min;ESIMS(+ve)$[M+2]^+$=1624.5;[(M-3Boc)+3]=1016.6;$C_{153}H_{281}N_{20}O_{53}{}^+$[M+H]$^+$的计算m/z=3247.99。

[0522] 1.22(MeTzPh)-PEG_4CO-NHPEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[NH_2.HCl]$_8$G2化合物52

[0523] 向冰冷却的(MeTzPh)-PEG_4CO-NHPEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[NHBoc]$_8$化合物51(0.231g,0.0711mmol)中缓慢添加1.25M HCl/MeOH(9.0mL,11.3mmol)的溶液。在5min后,移除冰浴并且使随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,产生呈红色油状物的产物化合物51(0.226g,100%)。^{1}HNMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.51-1.96(m,40H);2.53(t,J 6.0Hz,2H);2.96-3.04(m,10H);3.15-3.20(m,8H);3.39-3.45(m,7H);3.54-4.10(m,102H);4.25-4.28(m,2H);7.17-7.20(m,2H);8.48-8.51(m,2H);LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)RT=6.38min,ESIMS(+ve)2447.6$[M+H]^+$;$C_{113}H_{217}N_{20}O_{37}[M+H]^+$的计算m/z=2447.6。

[0524] 1.23(MeTzPh)-PEG_4CO-NHPEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH_2.HCl)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_8$G3化合物53

[0525] 在N_2气氛下向HO-Lys(α-NHBoc)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)(0.541g,0.402mmol)和PyBOP(0.195g,0.375mmol)在DMF(2mL)中的搅拌溶液中添加NMM(225μL,2.96mmol)。在10min后,将该溶液添加至在DMF(1mL)中的(MeTzPh)-PEG_4CO-NHPEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[NH_2.HCl]$_8$化合物52(0.109g,0.0398mmol)。将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且将所得粗制物在冰/水浴中冷却。向冷却的残余物中缓慢添加1.25M(8.0mL,10mmol)。在10min后,移除冷浴,并且将反应物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,然后溶解于H_2O(16mL)中。将溶液使用Millipore Amicon Ultra-15离心过滤器单元(4个单元x 10kDa MWCO单元)通过离心*纯化。将渗余物冷冻干燥过夜,产生呈红色固体的产物化合物53(0.327g,65%)。^{1}HNMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.40-1.87(m,88H);2.49-2.56(m,18H);2.68-2.72(m,2H);3.08(s,3H);3.17-3.30(m30H);3.37-3.51(m,10H);3.41(s,24H);3.59-4.01(m,816H);4.25-4.40(m,8H);7.29-7.33(m,2H);8.44-8.49(m,2H);LCMS(亲性法,TFA缓冲液)RT=10.28min。

[0526] *[将单元用H_2O(5mL)预冲洗,并且在4000rpm下旋转5min。重复该过程。将粗制溶液通过0.45μm注射器过滤器过滤,然后放置于离心单元中。然后将单元在4000rpm下旋转15min。然后将渗余物用H_2O(4mL)稀释,然后再在4000rpm下旋转15min。将该过程重复8次。]

[0527] 1.24(MeTzPh)-PEG_4CO-NHPEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[NH_2.HCl]$_{16}$G3化合物54

[0528] 在N_2气氛下向(MeTzPh)-PEG_4CO-NHPEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[NH_2.HCl]$_8$化合物52(0.098g,0.0358mmol)和DBL-oPNP(0.207g,0.443mmol)在DMF(2.0mL)中的搅拌溶液中添加NMM(190μL,1.973mmol)。然后将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且将所得油状残余物在硅胶色谱(5%-10%-15% MeOH/DCM)上纯化,产生呈红色油状物的Boc保护产物(0.128g,70%)。将纯化物质在冰/水浴中冷却,然后缓慢添加1.25M HCl/MeOH(6.5mL,8.5mmol)的溶液。在5min后,移除冰浴并且使随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,产生呈红色油状物的产物化合物54(0.107g,100%)。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)RT=7.48min,ESIMS(+ve)3471$[M+H]^+$;计算m/z$[M+H]^+$=3472。

[0529] 1.25(MeTzPh)-PEG_4CO-NHPEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_{16}$[(α-NH_2.HCl)(ε-NH-COPEG_{1100})]$_{16}$G4化合物55

[0530] 在N_2气氛下向HO-Lys(α-NHBoc)(ε-NH-COPEG_{1100})(0.107g,0.132mmol)和PyBOP(0.065g,0.125mmol)在DMF(1.5mL)中的搅拌溶液中添加NMM(50μL,0.455mmol)。在10min后,将该溶液添加至(MeTzPh)-PEG_4-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[NH_2.HCl]$_{16}$化合物54(0.0221g,0.00545mmol)。将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且将所得粗制物在冰/水浴中冷却。向冷却的残余物中缓慢添加1.25M HCl/MeOH(1.5mL,1.88mmol)。在10min后,移除冷浴,并且将反应物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,然后溶解于H_2O(5mL)中。将溶液使用Millipore Amicon Ultra-15离心过滤器单元(10kDa MWCO)通过离心纯化。将渗余物冷冻干燥过夜,并且在Gilson[单一梯度60min,10>60% ACN(0.1%TFA缓冲液,RT 36min]上进一步纯化,产生呈黄色固体的产物化合物55(0.021g,25%)。^{1}HNMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.28-1.87(m,184H);2.42-249(m,35H);3.00(s,3H);3.12-3.23(m 60H);3.34-3.40(m,63H);3.52-4.01(m,826H);4.25-4.39(m,16H);7.17-7.20(m,2H);8.48-8.51(m,2H);LCMS(亲性法,TFA缓冲液)RT=8.96min。ESIMS(+ve)2095$[M+7H]^+$;1834$[M+8H]^+$;1630$[M+9H]^+$。

[0531] 1.26(MeTzPh)-PEG_4CO-NHPEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_{16}$[NH_2.TFA]$_{32}$G4化合物56

[0532] 根据化合物54制备并且使用TFA/AcOH脱保护,产生呈红色固体的化合物56(0.078g,78%)。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)RT=7.74min。ESIMS(+ve)2095$[M+7H]^+$;1834$[M+8H]^+$;1630$[M+9H]^+$。

[0533] 1.27(MeTzPh)-PEG_4CO-NHPEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_{32}$[(α-NH_2.TFA)(ε-NH-COPEG_{1100})]$_{32}$G5化合物57

[0534] 在N_2气氛下向HO-Lys(α-NHBoc)(ε-NH-COPEG_{1100})(0.476g,0.354mmol)和PyBOP(0.170g,0.327mmol)在DMF(3.0mL)中的搅拌溶液中添加NMM(180μL,0.500mmol)。在10min后,将该溶液添加至(MeTzPh)-PEG_4CO-NHPEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_{16}$[NH_2.TFA]$_{32}$化合物56(0.078g,0.00850mmol)。将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。真空移除挥发物,并且将所得粗制物溶解于H_2O(1.0mL)中并且缓慢添加TFA(1.0mL)。将反应物在室温下搅拌过夜。将反应物用H_2O(12mL)稀释,并且使用Millipore Amicon Ultra-15离心过滤器单元(10kDa MWCO)通过离心纯化。将渗余物冷冻干燥过夜,产生呈粉红色固体的产物化合物57(0.374g,91%)。1HNMR(300MHz,D2O)δ(ppm):1.41-1.87(m,376H);2.52-2.56(m,64H);3.09(s,3H);3.17-3.24(m,126H);3.41(s,93H)3.48-3.98(m,2960H);4.27-4.39(m,32H);7.30-7.33(m,

2H);8.46-8.49(m,2H);HPLC分析(亲性法,甲酸铵作为缓冲液)RT＝8.60min。

[0535] 1.28

[0536] (MeTzPh)PEG_4CO-NHPEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_7$)(ε-NH-COPEG_{1100})$_8$],G3,化合物37

[0537] 将Cy5-NHS酯的溶液(1.0mL的在DMF中的1mg/mL溶液;1.0mg,1.59μmol)添加至含有在DMF(0.5mL)中的(MeTzPh)PEG_4CO-NHPEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[((α-NH_2.HCl)$_8$)(ε-NH-COPEG_{1100})$_8$],化合物53(20mg,1.59μmol)的小瓶。向该溶液中添加NMM(10μL,91.0μmol),并且将随后反应混合物避光并且在RT下搅拌。在3.5h后,添加乙酸酐(20μL,212μmol),并且将反应混合物搅拌过夜。将反应混合物减压浓缩,然后溶解于MQ水(5mL)中并且分为两份以用于通过两个(预平衡)PD10柱进行纯化。一旦样品进入柱床,将样品用3.5mL MQ水洗脱,并且收集滤液。将滤液合并并且冷冻干燥过夜。冻干产生呈亮蓝色粉末的标题产物(19.3mg(93%))。HPLC(C8 XBridge,3x 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),214nm,0.4mL/min,Rt(min)＝8.30。

[0538] 1.29

[0539] (MeTzPh)PEG_4CO-NHPEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_{16}$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_{15}$)(ε-NH-COPEG_{1100})$_{16}$],G4,化合物38

[0540] 将Cy5-NHS酯(520μL的在DMF中的1mg/mL溶液;0.52mg,844nmol)的溶液添加至含有在DMF(1.0mL)中的(MeTzPh)PEG_4CO-NHPEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_{16}$[((α-NH_2.HCl)$_{16}$)(ε-NH-COPEG_{1100})$_{16}$],化合物55(20mg,844nmol)的小瓶。向该溶液中添加NMM(10μL,94.5μmol),并且将随后反应混合物避光并且在RT下搅拌。在3.5h后,添加乙酸酐(20μL,230μmol),并且将反应混合物搅拌过夜。将反应混合物减压浓缩,然后溶解于MQ水(5mL)中并且分为两份以用于通过两个(预平衡)PD10柱进行纯化。一旦样品进入柱床,将样品用3.5mL MQ水洗脱,并且收集滤液。将滤液合并并且冷冻干燥过夜。冻干产生呈亮蓝色粉末的标题产物(19.9mg(98%))。HPLC(C8 XBridge,3x 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),214nm,0.4mL/min,Rt(min)＝8.40

[0541] 1.30

[0542] (MeTzPh)PEG_4CO-NHPEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_{32}$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$)(ε-NH-COPEG_{1100})$_{32}$],G5,化合物39

[0543] 将Cy5-NHS酯的溶液(300μL的在DMF中的1mg/mL溶液;0.30mg,487nmol)添加至含有在DMF(1.2mL)中的(MeTzPh)PEG_4CO-NHPEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_{32}$[(α-NH_2.HCl)$_{32}$(ε-NH-COPEG_{1100})$_{32}$],化合物57(20mg,435nmol)的小瓶。向该溶液中添加NMM(11μL,97.5μmol),并且将随后反应混合物避光并且在RT下搅拌。在3.5h后,添加乙酸酐(22μL,237μmol),并且将反应混合物搅拌过夜。将反应混合物减压浓缩,然后溶解于MQ水(5mL)中并且分为两份以用于通过两个(预平衡)PD10柱进行纯化。一旦样品进入柱床,将样品用3.5mL MQ水洗脱,并且收集滤液。将滤液合并并且冷冻干燥过夜。冻干产生呈亮蓝色粉末的标题产物(18.7mg(91%))。HPLC(C8 XBridge,3x 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),214nm,0.4mL/min,Rt

(min)＝8.50。

[0544] 1.31卡巴他赛(CTX)-2'-OCOO-oPNP酯,化合物58

[0545] 向卡巴他赛(CTX,111.0mg,0.132mmol)在DMF(3mL)中的溶液中添加三乙胺(37.0μL,0.264mmol)、DMAP(1.64mg,0.013mmol)和氯甲酸对硝基苯酯(24.0mg,0.12mmol)。将混合物在室温下搅拌2h。减压移除溶剂,并且将获得的残余物使用硅胶柱色谱(使用0:100至50:50(乙酸乙酯:己烷)的梯度)纯化,产生呈白色固体的标题化合物(28mg,21％)。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)Rt＝6.55min。ESIMS(+ve)1001[M]+;$C_{52}H_{60}N_2O_{18}$[M]+的计算m/z:1001

[0546] 1.32Fmoc-Val-Ala-PAB-P-触发子-(NMeBoc),化合物59

[0547] 可以如Dal Corso等人Angew.Chem Int.Ed.2020,59,4176-4181中所述那样获得化合物。其也可以如下制备。将Fmoc-Val-Ala-PAB-O-oPNP酯(Iris Biotech,127.0mg,0.186mmol)和(S)-叔丁基甲基(吡咯烷-2-基甲基)氨基甲酸酯(Ascension Chemical,42.0mg,0.195mmol)溶解于圆底烧瓶中,之后添加THF(5mL)。在惰性气氛下在室温下将反应混合物搅拌2h。反应混合物的LCMS分析显示出标题化合物的形成。减压移除溶剂,并且将获得的产物不经纯化用于下一反应。LCMS(亲性法,TFA缓冲液),Rt＝6.60min。ESIMS(+ve)756[M]+1;$C_{42}H_{53}N_5O_8$[M]+1的计算m/z:756]

[0548] 1.33TFA.NH_2-Val-Ala-PAB-P-触发子-(NMeBoc),化合物60

[0549] 在0℃下向化合物59(141.0mg,0.186mmol)在DMF(3mL)中的搅拌溶液中添加哌啶(0.6mL,6.07mmo),并且将反应混合物搅拌1h。减压移除溶剂,并且将获得的残余物溶解于乙腈中并且使用制备性HPLC(40％-90％ MeCN,0.05％ TFA缓冲液,RT约45min)纯化,在冻干后产生呈无色液体的标题化合物(63.0mg,52％)。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)ESIMS(+ve)556[M]+Na;$C_{27}H_{43}N_5O_6$[M]+Na的计算m/z:556;^{1}H-NMR(300MHz,MeOD)δ(ppm):7.62-7.51(m,2H),7.44-7.25(m,2H),5.18-4.98(bs,2H),4.56(q,J＝9.0Hz,1H),4.13(bs,1H),3.72(d,J＝6.0Hz,1H),3.51-3.36(m,2H),2.89(s,1H),2.73(bs,1H),2.35 -2.13(m,1H),2.05-1.70(m,4H),1.59-1.36(m,11H),1.18-1.00(m,6H)。

[0550] 1.34COOH-PEG_9-Val-Ala-PAB-P-触发子-(NMeBoc),化合物61

[0551] 向化合物60(52.0mg,0.081mmol)在乙腈(2mL)中的搅拌溶液中添加DIPEA(87.2μL,0.50mmol),并且将反应混合物冷却至0℃。将COOH-PEG_9-NHS酯(Iris Biotech;86.0mg,0.139mmol)添加至反应混合物,并且将反应混合物在室温下搅拌16h。反应混合物的LCMS分析显示出产物的形成LCMS(亲性法,TFA缓冲液;在15min内5％-60％乙腈),Rt＝11.32min。ESIMS(+ve)1048[M]+H_2O;$C_{49}H_{83}N_5O_{18}$[M]+H_2O的计算m/z:1048]。减压移除溶剂,并且将获得的产物不经纯化用于下一反应。

[0552] 1.35COOH-PEG_9-Val-Ala--PAB-P-触发子-(NMe.TFA),化合物62

[0553] 在0℃下向化合物61(84.0mg,0.081mmol)在二氯甲烷(2mL)中的搅拌溶液中添加TFA(0.5mL,6.mmol),并且将反应混合物在室温下搅拌1h。减压移除溶剂,并且将获得的残余物溶解于乙腈中,使用制备性HPLC(5％-70％乙腈,0.05％ TFA缓冲液,RT 32-33min)纯化,在冻干后产生呈稠的无色液体的标题化合物(87.0mg,100％)。LCMS(亲性法,FA缓冲液)ESIMS(+ve)930[M]+1;$C_{45}H_{77}N_5O_{15}$[M]+1的计算m/z:930;^{1}H-NMR(300MHz,MeOD)δ(ppm):7.64(d,J＝9.0Hz,2H),7.37(d,J＝9.0Hz,2H),5.13(d,J＝9.0Hz,1H),4.61-4.40(m,2H),4.19(d,J＝6.0Hz,1H),3.85(t,J＝6.0Hz,1H),3.79-3.69(m,4H),3.69-3.51(m,35H),3.17-

3.05(m,2H),2.85(s,1H),2.76-2.68(m,3H),2.92(t,J=6.0Hz,1H),2.62-2.45(m,4H),2.27 -1.84(m,4H),1.46(d,J=9.0Hz,2H),1.08-0.92(m,6H)。

[0554] 1.36COOH-PEG_9-Val-Ala-PAB-P-触发子-NMeCO-CTX,化合物63

[0555] 向化合物46(28.0mg,0.027mmol)在DMF(3mL)中的溶液中添加DIPEA(9.40μL,0.54mmol)和化合物51(27.3mg,0.027mmol)。将混合物在室温下搅拌16h。减压移除溶剂,并且将获得的残余物溶解于乙腈(2mL)中。将该溶液通过制备性HPLC(5%-60% ACN,Rt 32.2-34.3min)纯化,在冻干后产生呈白色固体的标题产物(26mg,56%)。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)Rt=5.57min。ESIMS(+ve)1792[M]+;$C_{90}H_{130}N_6O_{31}$[M]+的计算m/z:1792

[0556] 实施例1b BCN和DBCO接头的合成

[0557] 1.37BCN-PEG_2-Glu-CO-NH$PEG_{24}CO_2H$,化合物31

[0558] 向NH_2-PEG_{24}-COOH(93.7mg,0.082mmol)在水/THF混合物(1:1,4mL)中的溶液中添加碳酸氢钠(15.2mg,0.181mmol)。将混合物在室温下搅拌5min,然后添加BCN-PEG_2-NHS酯(50mg,0.093mmol)在THF(2mL)中的溶液。将所得反应混合物在RT下搅拌15h。然后减压移除挥发物,并且将ACN(2.5mL)添加至所得水性悬浮液。将该溶液通过制备性HPLC(5%-60% ACN,Rf 32.2-34.3min)纯化,在冻干后产生呈白色固体的标题产物(42mg,33%)^{1}H-NMR(300MHz,D2O)δ(ppm):0.85-0.92(m,2H);1.25-1.35(m,1H);1.43-1.57(m,2H);1.73-1.83(m,2H);2.09-2.25(m,9H);2.39(t,J=9.0Hz,2H);3.21-3.31(m,6H);3.35-3.85(m,106H);4.10(d,J=9.0Hz,2H)。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)Rt=10.28min;ESIMS(+ve)m/z 1566.7[M]+。

[0559] 1.38BCN-PEG_2-Glu-CO-NHPEG_{24}CO-NHPEG_3-TCO,化合物32

[0560] 向BCN-PEG_2-Glu-CO-NHPEG_{24}-COOH化合物31(10.0mg,0.006mmol)在DMF(3.0mL)中的搅拌溶液中添加PyBOP(3.64mg,0.007mmol)、NMM(1.31μL,0.012mmol),之后添加TCO-PEG_3-NH_2(2.41mg,0.007mmol)。将随后反应混合物在室温下搅拌过夜。然后减压移除溶剂,并且将所得残余物溶解于ACN(2mL)中,然后通过0.45μm过滤器过滤。将收集的滤液通过制备性HPLC(30%-50% ACN Rt 40-42min)纯化,并且减压浓缩含产物级分以移除ACN。将剩余的水性溶液冻干过夜,产生呈白色固体的标题产物(4.7mg,39%)。^{1}H-NMR(300MHz,CD3OD)δ(ppm):0.89-1.05(m,2H),1.26-1.48(m,2H),1.52-1.79(m,5H),1.83-2.06(m,6H),2.11-2.39(m,12H),2.48(t,2H,J=6.0Hz),3.35-3.44(m,6H),3.47-3.79(m,102H),3.83-3.92(m,1H),4.16(d,2H,J=6.0Hz),4.26-4.41(m,1H),4.58(bs,10H),5.39-5.74(m,3H)。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)Rt=11.0min。ESIMS(+ve)1894.0[M]+;

[0561] C90H165N5O36[M]+的计算m/z:1894.2

[0562] 1.39DBCO-Glu-NHPEG_{24}CO-NHPEG_3-TCO,化合物33

[0563] 向DBCO-Glu-NHPEG_{24}COOPFP(50.0mg,0.031mmol)在DMF(3mL)中的搅拌溶液中添加TCO-PEG_3-NH_2(10.7mg,0.031mmol),之后添加NMM(4.08μL,0.037mmol)。将随后反应混合物在室温下搅拌3h,然后减压浓缩。将所得残余物溶解于ACN(2mL)中,通过0.45μm过滤器过滤并且将滤液通过制备性HPLC(40%-70% ACN Rt 27-29min)纯化。减压浓缩含产物级分以移除ACN,并且将剩余的水性溶液冻干过夜,产生呈粘性无色液体的标题产物(25.0mg,42%)。^{1}H-NMR(300MHz,CD3OD)δ(ppm):1.31-1.62(m,4H),1.60-1.83(m,6H),1.92-2.16(m,4H),2.25(t,2H,J=6.0Hz),2.91-3.03(m,4H),3.12-3.58(m,78H),3.59-3.69(m,1H),4.01

-4.18(m,1H),4.92(d,2H,J＝15H),5.15-5.49(m,3H),6.95-7.59(m,8H)。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)Rt＝7.0min。ESIMS(+ve)1775.0.0[M]+;C88H148N4O32[M]+的计算m/z:1775.12

[0564] 1.40MeTzPh-PEG_4PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-Cy5)$_1$(α-NHAc)$_7$(ε-$NHPEG_{1100}$)$_8$],G3,化合物37

[0565] 将Cy5-NHS酯(1.0mL的在DMF中的1mg/mL溶液;1.0mg,1.59μmol)的溶液添加至含有在DMF(0.5mL)中的MeTzPh-PEG_4PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$(α-NH_2)$_8$(ε-$NHPEG_{1100}$)$_8$](20mg,1.59μmol)的小瓶。向该溶液中添加NMM(10μL,91.0μmol),并且将随后反应混合物避光并且在RT下搅拌。在3.5h后,添加乙酸酐(20μL,212μmol),并且将反应混合物搅拌过夜。将反应混合物减压浓缩,然后溶解于MQ水(5mL)中并且分为两份以用于通过两个(预平衡)PD10柱进行纯化。一旦样品进入柱床,将样品用3.5mL MQ水洗脱,并且收集滤液。将滤液合并并且冷冻干燥过夜。冻干产生呈亮蓝色粉末的标题产物(19.3mg(93%))。HPLC(C8 XBridge,3x 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),214nm,0.4mL/min,Rt(min)＝8.30。

[0566] 1.41MeTzPh-PEG_4PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_{16}$[(α-Cy5)$_1$(α-NHAc)$_{15}$(ε-$NHPEG_{1100}$)$_{16}$],G4,化合物38

[0567] 将Cy5-NHS酯(520μL的在DMF中的1mg/mL溶液;0.52mg,844nmol)的溶液添加至含有在DMF(1.0mL)中的MeTzPh-PEG_4PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_{16}$[(α-NH_2)$_{16}$(ε-$NHPEG_{1100}$)$_{16}$](20mg,844nmol)的小瓶。向该溶液中添加NMM(10μL,94.5μmol),并且将随后反应混合物避光并且在RT下搅拌。在3.5h后,添加乙酸酐(20μL,230μmol),并且将反应混合物搅拌过夜。将反应混合物减压浓缩,然后溶解于MQ水(5mL)中并且分为两份以用于通过两个(预平衡)PD10柱进行纯化。一旦样品进入柱床,将样品用3.5mL MQ水洗脱,并且收集滤液。将滤液合并并且冷冻干燥过夜。冻干产生呈亮蓝色粉末的标题产物(19.9mg(98%))。HPLC(C8 XBridge,3x 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),214nm,0.4mL/min,Rt(min)＝8.40。

[0568] 1.42MeTzPh-PEG_4PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_{32}$[(α-Cy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$(ε-$NHPEG_{1100}$)$_{32}$],G5,化合物39

[0569] 将Cy5-NHS酯(300μL的在DMF中的1mg/mL溶液;0.30mg,487nmol)的溶液添加至含有在DMF(1.2mL)中的MeTzPh-PEG_4PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_{32}$[(α-NH_2)$_{32}$(ε-$NHPEG_{1100}$)$_{32}$](20mg,435nmol)的小瓶。向该溶液中添加NMM(11μL,97.5μmol),并且将随后反应混合物避光并且在RT下搅拌。在3.5h后,添加乙酸酐(22μL,237μmol),并且将反应混合物搅拌过夜。将反应混合物减压浓缩,然后溶解于MQ水(5mL)中并且分为两份以用于通过两个(预平衡)PD10柱进行纯化。一旦样品进入柱床,将样品用3.5mL MQ水洗脱,并且收集滤液。将滤液合并并且冷冻干燥过夜。冻干产生呈亮蓝色粉末的标题产物(18.7mg(91%))。HPLC(C8 XBridge,3x 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),214nm,0.4mL/min,Rt(min)＝8.50。

[0570] 1.43

[0571] BHA[Lys]$_4$[((α-NH-$COPEG_{24}$NH-$COPEG_4$(PhTzMe))$_{1-3}$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH_2)$_{0-2}$)(ε-NH-$COPEG_{1000}$)$_4$],G2,化合物99

[0572] 根据一般程序C使用

[0573] $BHA[Lys]_4[(\alpha\text{-}NH\text{-}COPEG_{24}NH\text{-}COPEG_4(PhTzMe))_{1\text{-}3}(\alpha\text{-}NH_2)_{1\text{-}3})(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{1000})_4]$,G2,化合物107(3.0mg,0.414μmol)和HO-Lys[(α-Cy5)(ε-DFO)]化合物108(0.56mg,0.414μmol)制备,并且通过旋转柱(10kDa MW截止值,用10x 450μL MQ水洗涤)纯化,产生所需产物化合物99(最终浓度为300μL MQ水中3.56mg)。

[0574] 1.44

[0575] $BHA[Lys]_8[((\alpha\text{-}NH\text{-}COPEG_{24}NH\text{-}COPEG_4(PhTzMe))_{1\text{-}4}(\alpha\text{-}Lys(\alpha\text{-}NHCy5)(\varepsilon\text{-}NHDFO))_1(\alpha\text{-}NH_2)_{3\text{-}6})(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{412})_8]$,G3,化合物100

[0576] 根据一般程序C使用

[0577] $BHA[Lys]_8[((\alpha\text{-}NHCOPEG_{24}NH\text{-}COPEG_4(PhTzMe))_{1\text{-}4}(\alpha\text{-}NH_2)_{4\text{-}7}))(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{412})_8]$,G3,化合物109(2.97mg,0.452μmol)和HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NHDFO)]化合物40(0.61mg,0.452μmol)制备,并且通过旋转柱(10kDa MW截止值,用10x 450μL MQ水洗涤)纯化,产生产物化合物100(最终浓度为300μL MQ水中3.60mg)。

[0578] 1.45

[0579] $BHA[Lys]_8[((\alpha\text{-}NH\text{-}COPEG_{24}NH\text{-}COPEG_4(PhTzMe))_1(\alpha\text{-}Lys(\alpha\text{-}NHCy5)(\varepsilon\text{-}NHDFO))_1(\alpha\text{-}NH_2)_6)(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{1000})_8]$,G3,化合物101

[0580] 根据一般程序C使用

[0581] $BHA[Lys]_8[((\alpha\text{-}NHCOPEG_{24}NH\text{-}COPEG_4(PhTzMe))_1(\alpha\text{-}NH_2)_7)(\varepsilon\text{-}NHCOPEG_{1000})_8]$,G3,化合物110(3.14mg,0.234μmol)和HO-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)化合物108(0.32mg,0.234μmol)制备,并且通过旋转柱(10kDa MW截止值,用10x 450μL MQ水洗涤)纯化,并且通过旋转柱(10kDa MW截止值,用10x 450μL MQ水洗涤)纯化,产生产物化合物27(最终浓度为300μL MQ水中3.45mg)。

[0582] 1.46

[0583] $BHA[Lys]_{16}[((\alpha\text{-}NH\text{-}COPEG_{24}NH\text{-}COPEG_4(PhTzMe))_1(\alpha\text{-}Lys(\alpha\text{-}NHCy5)(\varepsilon\text{-}NHDFO))_1(\alpha\text{-}NH_2)_{14})(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{1000})_{16}]$,G4,化合物102

[0584] 根据一般程序C使用

[0585] $BHA[Lys]_{16}[((\alpha\text{-}NH\text{-}COPEG_{24}NH\text{-}COPEG_4(PhTzMe))_1(\alpha\text{-}NH_2)_{15})(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{1000})_{16}]$,G4,化合物111(11.8mg,0.454μmol)和HO-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)化合物108(0.62mg,0.454μmol)制备,并且通过旋转柱(10kDa MW截止值,用10x 450μL MQ水洗涤)纯化,产生9.3mg呈蓝色固体的化合物28(在冻干后)。

[0586] 1.47

[0587] $BHA[Lys]_{32}[((\alpha\text{-}NH\text{-}COPEG_{24}NH\text{-}COPEG_4(PhTzMe))_{1\text{-}4}(\alpha\text{-}Lys(\alpha\text{-}NHCy5)(\varepsilon\text{-}NHDFO))_1(\alpha\text{-}NH_2)_{27\text{-}30})(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{1000})_{32}]$,G5,化合物103

[0588] 根据一般程序C使用

[0589] $BHA[Lys]_{16}[((\alpha\text{-}NH\text{-}COPEG_{24}NH\text{-}COPEG_4(PhTzMe))_{1\text{-}4}(\alpha\text{-}NH_2)_{27\text{-}30})(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{1000})_{32}]$,G4,化合物112(1.9mg,0.271μmol)和HO-Lys(α-Cy5)(ε-DFO)化合物108(0.37mg,0.271μmol)制备,并且通过旋转柱(10kDa MW截止值,用10x 450μL MQ水洗涤)纯化,在冻干后产生8.4mg呈蓝色固体的产物化合物103。

[0590] 1.48

[0591] $BHA[Lys]_4[((\alpha\text{-}Lys(\alpha\text{-}NHCy5)(\alpha\text{-}NHDFO))_1(\alpha\text{-}NH_2)_3)(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{24}NH\text{-}COPEG_4$

$(PhTzMe)_4$],G2,化合物105

[0592] 向BHA[Lys]$_4$[(α-NH_2.HCl)$_4$(ε-NH-$COPEG_{24}$NH-$COPEG_4$(PhTzMe)$_4$],G2,化合物113(11.0mg,0.0015mmol)在RT下在DMF(3mL)中的搅拌溶液中添加NMM(3.32μL,0.039mmol)、HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NHDFO)]化合物108(2.06mg,0.0015mmol)和PyBOP(1.18mg,0.0022mmol)。在18h后,减压移除挥发物,并且将蓝色固体残余物溶解于MQ水中,并且过滤(0.45μm acrodisc注射器过滤器)溶液。将滤液通过旋转柱(Amicon Ultra,0.5mL,3kDa MW截止值)浓缩,并且将渗余物用MQ水(10x 450μL)重复洗涤,产生化合物24(在MQ水中浓度10mg/mL;1.3mL。LCMS(亲性法,TFA缓冲液),梯度:在8min内20%至90%乙腈;Rt=5.64min;1HNMR(300MHz,D2O)δ(ppm):8.52(d,8H,J=9.0Hz),8.32(s,1H),8.29-8.17(m,2H),7.78-7.70(m,2H),7.69-7.62(m,2H),7.57-7.47(m,2H),7.48-7.25(m,16H),7.21(d,8H,J=9.9Hz),7.15-7.08(m,1H),7.06-7.00(m,1H),6.70-6.60(m,2H),6.21-6.12(m,2H),4.37-4.20(m,14H),4.18-4.06(m,8H),3.98-3.50(m,480H),3.48-3.34(m,15H),3.27-3.06(m,18H),3.06-2.97(m,19H),2.88(s,8H),2.54-2.40(m,19H),2.08-1.98(m,28H),1.93-1.12(m,99H),1.00-0.82(m,8H)。

[0593] 1.49BHA[Lys]$_4$[((α-NH-$COPEG_{24}$NH-$COPEG_4$(PhTzMe))$_1$(α-NH_2)$_3$)(ε-NH-$COPEG_{1000}$)$_4$],G2,化合物107

[0594] 根据一般程序C使用BHA[Lys]$_4$[(α-NH2.TFA)$_4$(ε-NH-$COPEG_{1000}$)$_4$](50.0mg,0.007mmol)和HOOCPEG_{24}NH-$COPEG_4$(PhTzMe)(点击化学工具,13.39mg,0.010mmol)制备,不同的是将反应容器包在箔中以挡光,并且将残余物通过SEC(Sephadex™LH-20)(使用甲醇作为洗脱液)纯化,产生产物化合物107(44.00mg,77%);^{1}HNMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):8.42-8.26(m,2H),7.44-7.11(m,12H),6.04(bs,1H),4.44-4.07(m,8H),4.07-3.37(m,556H),3.33(s,12H),3.25-2.90(m,17H),2.62-2.43(m,2H),1.96-0.97(m,48H);HPLC(C8 XBridge,3x 100mm)梯度(甲酸盐缓冲液):5% ACN/H20(0-1min),5-80% ACN(1-7min),80% ACN(7-12min),80-5% ACN(12-13min),5% ACN(13-15min),214nm,0.4mL/min,Rt(min)=8.08-9.01。

[0595] 1.50BHA[Lys]$_8$[((α-NH-$COPEG_{24}$NH-$COPEG_4$(PhTzMe))$_1$(α-NH_2)$_7$)(ε-NH-$COPEG_{412}$)$_8$],G3,化合物109

[0596] 根据一般程序C使用BHA[Lys]$_8$[(α-NH_2.TFA)$_8$(ε-NH-$COPEG_{412}$)$_8$](50.0mg,0.008mmol)和HOOC-PEG_{24}NH-$COPEG_4$(PhTzMe)(点击化学工具;11.2mg,0.008mmol)制备,不同的是将反应容器包在箔中以挡光,并且将残余物通过SEC(Sephadex™LH-20)(使用甲醇作为洗脱液)纯化,产生产物化合物109(29mg,55%);^{1}HNMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):8.43-8.20(m,2H),7.50-7.09(m,10H),6.03(bs,1H),4.41-4.05(m,10H),4.01-3.41(m,258H),3.31(s,16H),3.24-2.83(m,28H),2.41(bs,13H),2.00-0.98(m,75H);HPLC(C8 XBridge,3x 100mm)梯度(甲酸盐缓冲液):5% ACN/H_2O(0-1min),5-80% ACN(1-7min),80% ACN(7-12min),80-5% ACN(12-13min),5% ACN(13-15min),214nm,0.4mL/min,R_t=8.16-8.93min。

[0597] 1.51BHA[Lys]$_8$[((α-NH-$COPEG_{24}$NH-$COPEG_4$(PhTzMe))$_1$(α-NH_2)$_7$)(ε-NH-$COPEG_{1000}$)$_8$],G3,化合物110

[0598] 根据一般程序C使用BHA[Lys]$_8$[(α-NH_2.TFA)$_8$(ε-NH-$COPEG_{1000}$)$_8$](100.0mg,

0.007mmol)和$HOOCPEG_{24}NH$-$COPEG_4$(PhTzMe)(点击化学工具;15.97mg,0.010mmol)制备,不同的是将反应容器包在箔中以挡光,并且将残余物通过SEC(Sephadex™LH-20)(使用甲醇作为洗脱液)纯化,产生产物化合物19(SPL-9248)(69mg,66%);^{1}HNMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):8.45-8.25(m,2H),7.47-7.07(m,12H),6.07(bs,1H),4.45-4.05(m,12H),4.04-3.37(m,936H),3.32(s,25H),3.23-2.88(m,32H),2.59-2.32(m,6H),1.90-0.98(m,90H);HPLC(C8XBridge,3x 100mm)梯度(甲酸盐缓冲液):5% ACN/H2O(0-1min),5-80% ACN(1-7min),80%ACN(7-12min),80-5% ACN(12-13min),5% ACN(13-15min),214nm,0.4mL/min,R_t=8.21-9.15min。

[0599] 1.52$BHA[Lys]_{16}[((\alpha\text{-}NH\text{-}COPEG_{24}NH\text{-}COPEG_4(PhTzMe))_1(\alpha\text{-}NH_2)_{15})(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{1000})_{16}]$,G4,化合物111

[0600] 根据一般程序C使用$BHALys[Lys]_2[Lys]_4[Lys]_8[Lys]_{16}[(\alpha\text{-}NH_2.TFA)_{16}(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{1000})_{16}]$(参考文献1)(100.0mg,0.004mmol)和$HOOCPEG_{24}NH$-$COPEG_4$(PhTzMe)(点击化学工具;6.74mg,0.005mmol)制备,不同的是将反应容器包在箔中以挡光,并且将残余物通过SEC(Sephadex™LH-20)(使用甲醇作为洗脱液)纯化,产生产物化合物111(63mg,65%);^{1}HNMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):8.45-8.28(m,2H),7.47-7.07(m,12H),6.03(bs,1H),4.40-4.08(m,23H),4.06-3.38(m,1906H),3.33(s,56H),3.29-2.91(m,78H),2.63-2.45(m,3H),1.98-0.98(m,200H);HPLC(C8 XBridge,3x 100mm)梯度(甲酸盐缓冲液):5% ACN/H2O(0-1min),5-80% ACN(1-7min),80% ACN(7-12min),80-5% ACN(12-13min),5% ACN(13-15min),243nm,0.4mL/min,R_t=8.51-9.02min。

[0601] 1.53

[0602] $BHA[Lys]_{32}[((\alpha\text{-}NH\text{-}COPEG_{24}NH\text{-}COPEG_4(PhTzMe))_{1\text{-}4}(\alpha\text{-}NH_2)_{28\text{-}31})(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{1000})_{32}]$,G5,化合物112

[0603] 根据一般程序C使用$BHA[Lys]_{32}[(\alpha\text{-}NH_2.TFA)_{32}(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{1000})_{32}]$(100.0mg,0.002mmol)和$HOOCPEG_{24}NH$-$COPEG_4$(PhTzMe)(点击化学工具;3.38mg,0.005mmol)制备,不同的是将反应容器包在箔中以挡光,并且将残余物通过SEC(Sephadex™LH-20)(使用甲醇作为洗脱液)纯化,产生产物化合物21(68mg,72%);^{1}HNMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):8.44-8.29(m,2H),7.44-7.09(m,12H),6.02(bs,1H),4.37-4.11(m,31H),4.08-3.37(m,2937H),3.32(s,83H),3.27-2.88(m,116H),2.59-2.42(m,3H),2.18-0.92(m,313H);HPLC(C8 XBridge,3x 100mm)梯度(甲酸盐缓冲液):5% ACN/H2O(0-1min),5-80% ACN(1-7min),80% ACN(7-12min),80-5% ACN(12-13min),5% ACN(13-15min),214nm,0.4mL/min,R_t=8.77min。

[0604] 1.54$BHA[Lys]_4[(\alpha\text{-}NHBoc)_4(\varepsilon\text{-}NH\text{-}COPEG_{24}NH\text{-}COPEG_4(PhTzMe)_4]$,G2,化合物113

[0605] 向$BHA[Lys]_4[(\alpha\text{-}NHBoc)_4(\varepsilon\text{-}NH_2)_4]$(46.0mg,0.031mmol)在RT下在DMF中的搅拌溶液中添加NMM(68.0μL,0.620mmol)、$HOOCPEG_{24}NH$-$COPEG_4$(PhTzMe)(点击化学工具;43.0mg,0.155mmol)和PyBOP(81.0mg,0.155mmol)。在16h后,将反应混合物溶解于ACN:MQ水(3mL,1:1v/v)中,并且过滤(0.45μm acrodisc注射器过滤器)溶液。将滤液通过制备性HPLC(在60min内30%-80% ACN,流动相:MQ水和乙腈,R_t 33.0-36.0min)纯化,产生呈粉红色固体的化合物22(52mg(22%))。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)R_t=5.66min;^{1}HNMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):8.52(d,8H,J=9.0Hz),7.40-7.26(m,10H),7.20(d,8H,J=9.0Hz),6.23-6.17(m,1H),4.36-4.21(m,10H),3.99-3.83(m,13H),3.82-3.46(m,487H),3.46-3.32(m,22H),

3.27-3.02(m,15H),3.02(s,12H),2.54-2.38(m,17H),1.92-1.14(m,89H)。

[0606] 1.55BHA[Lys]$_4$[(α-NH$_2$.HCl)$_4$(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)$_4$],G2,化合物114

[0607] 向BHA[Lys]$_4$[(α-NHBoc)$_4$(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)$_4$],G2,化合物113(48.0mg)在甲醇(2mL)中的搅拌溶液中添加3M HCl在甲醇(2mL)中的溶液,并且将反应混合物在室温下搅拌20h。减压移除挥发物,产生呈粉红色固体的BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[(α-NH$_2$.HCl)$_4$(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)$_4$],G2,化合物23(41.0mg(91%))。LCMS(亲性法,TFA缓冲液),梯度:在8min内20%至90%乙腈;R$_t$=5.27min。

[0608] 1.56HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NHDFO)],化合物108

[0609] 向化合物115(20.0mg,0.032mmol)在DMSO(5mL)中的搅拌溶液中添加DIPEA(32μL,0.224mmol),之后添加p-SCN-去铁胺(Macrocyclics,24.0mg,0.032mmol)。将反应混合物在室温下搅拌4h,并且然后通过将氮气流在溶液上吹若干小时来浓缩。然后将获得的残余物通过制备性HPLC(在MQ水+0.1% TFA中的30%-60% ACN(60min,Rt 39-42min))纯化,产生呈蓝色固体的产物化合物108(15mg(34%))。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)R$_t$=5.93min;ESIMS(+ve)1364[M]$^+$;$C_{71}H_{103}N_{12}O_{11}S_2$[M]$^+$的计算m/z=1364 ^{1}HNMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):8.25(t,2H,J=12.0Hz),7.56-7.18(m,9H),6.65(t,1H,J=12.0Hz),6.37-6.15(m,2H),4.43-4.32(m,1H),4.11(t,2H,J=6.0Hz),3.70-3.46(m,8H),3.22-3.10(m,3H),2.86-2.69(m,3H),2.56-2.38(m,3H),2.31(t,2H,J=6.0Hz),2.11(s,2H),1.96-1.18(m,32H)。

[0610] 1.57HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH$_2$)],化合物115

[0611] 向化合物116(36mg;0.043mmol)在DMF(4mL)中的搅拌溶液中添加哌啶(1.5mL),并且将反应混合物在室温下搅拌1h。减压移除溶剂,并且将残余物通过制备性HPLC(在MQ水+0.1%甲酸中的20%-90% ACN(60min,Rt 32.0-33.0min))纯化,产生呈蓝色固体的产物化合物59(12mg(44%))。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)R$_t$=7.65min;ESIMS(+ve)611[M]$^+$;$C_{38}H_{51}N_4O_3$[M]$^+$的计算m/z=611。

[0612] 1.58HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NHDFO)]楔形物,化合物116的合成

[0613] 向HO-Lys[(α-NH$_2$.TFA)(ε-NHFmoc)](57.0mg,0.118mmol)在DMF(5mL)中的搅拌溶液中添加NMM(52μL,0.472mmol)和花菁5NHS酯(Lumiprobes,40.0mg,0.059mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜,接着真空移除挥发物。将残余物溶解于ACN:MQ水(3mL,1:1v/v)中,并且过滤(0.45μm acrodisc注射器过滤器)溶液。将滤液通过制备性HPLC(在MQ水+0.1%甲酸中的20%-90% ACN(60min,R$_t$ 39.0-42.0min))纯化,产生呈蓝色固体的化合物58(33mg(67%))。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)R$_t$=10.54min;ESIMS(+ve)833[M]$^+$;$C_{53}H_{61}N_4O_5$[M]$^+$的计算m/z=833.46 ^{1}HNMR(300MHz,D_2O)δ(ppm):8.21(t,2H,J=15.0Hz),7.79(d,2H,J=6.0Hz),7.63(d,2H,J=6.0Hz),7.49-7.24(m,10H),6.61(t,1H,J=12.0Hz),6.29-6.22(m,2H),4.49-4.26(m,2H),.18(t,1H,J=6.0Hz),4.07(t,2H,J=6.0Hz),3.68-3.60(m,2H),3.60(s,3H),3.12(t,2H,J=6.0Hz),2.28(t,2H,J=6.0Hz),1.94-1.61(m,6H),1.71(s,12H),1.62-1.19(m,6H)。

[0614] 实施例2树枝状体药物缀合物的合成

[0615] 2.1叠氮基-PEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[(α-NH-DGA-3'-NH-Dox)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)]$_4$,G2,化合物17

[0616] 根据一般程序E使用叠氮基-PEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[(α-NH$_2$.TFA)(ε-

$NHPEG_{1100}$)]$_4$(50.0mg,7.24μmol)制备,产生暗红色油状物固体(58mg,89%)。^{1}H-NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):0.69-2.17(m,68H);2.30-2.50(m,8H);2.56-2.68(m,2H);3.02-3.24(m,8H);3.38-3.41(m,24H);3.52-4.56(m,520H);4.69-4.77(m,12H);5.19-5.57(m,4H);7.15-8.14(m,12H)。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)R_t=11.23min。ESIMS(+ve)转换为9016。

[0617] 2.2叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[(α-NH-DGA-14-O-Nemo)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_4$,G2,化合物64

[0618] 根据一般程序E使用叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[(α-NH_2.TFA)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_4$(50.0mg,7.24μmol)制备,产生暗红色油状物固体(58mg,89%)。^{1}H-NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):0.69-2.17(m,68H);2.30-2.50(m,8H);2.56-2.68(m,2H);3.02-3.24(m,8H);3.38-3.41(m,24H);3.52-4.56(m,520H);4.69-4.77(m,12H);5.19-5.57(m,4H);7.15-8.14(m,12H)。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)R_t=11.23min。ESIMS(+ve)转换为9016。

[0619] 2.3叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH-DGA-3'-NH-Dox)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_8$,G3,化合物18

[0620] 根据一般程序E使用叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH_2.TFA)(ε-$NHPEG_{1100}$)]$_8$(50.0mg,3.91μmol)制备,产生暗红色油状物固体(50mg,75%)。^{1}H-NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):0.88-1.93(m,120H);2.33-2.51(m,16H);2.58-2.72(m,2H);3.04-3.24(m,8H);3.35-3.41(m,76H);3.52-4.61(m,964H);5.27-5.45(m,8H);7.13-8.13(m,24H)。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)R_t=11.30min

[0621] 2.4叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH-DGA-14-O-Nemo)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_8$,G3,化合物65

[0622] 根据一般程序E使用叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH_2.TFA)$_8$(ε-NH-$COPEG_{1100}$)$_8$](50.0mg,3.91μmol)制备,产生暗红色油状物固体(50mg,75%)。^{1}H-NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):0.88-1.93(m,120H);2.33-2.51(m,16H);2.58-2.72(m,2H);3.04-3.24(m,8H);3.35-3.41(m,76H);3.52-4.61(m,964H);5.27-5.45(m,8H);7.13-8.13(m,24H)。LCMS(亲性法,甲酸缓冲液)R_t=11.30min

[0623] 2.5叠氮基

[0624] -PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)$_8$(ε-NH-$COPEG_{570}$)$_8$],G3,化合物19

[0625] 根据一般程序F使用叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH_2.TFA)$_8$(ε-NH-$COPEG_{570}$)$_8$](7.2mg,842nmol)和HO-Glu-vc-PAB-MMAE(10.0mg,8.08μmol)制备,产生14.6mg/3.5mL(240μM)的产物浓度。

[0626] 2.6叠氮基

[0627] -PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)$_8$(ε-NH-$COPEG_{1100}$)$_8$],G3,化合物20

[0628] 根据一般程序F使用叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH_2.TFA)$_8$(ε-NH-$COPEG_{1100}$)$_8$](10.8mg,842nmol)和HO-Glu-vc-PAB-MMAE(10.0mg,8.08μmol)制备,产生18mg/3.5mL(240μM)的产物浓度。

[0629] 2.7叠氮基-$PEG_{24}CO$-[N(PN)$_2$[Lys]$_8$[(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)$_8$(ε-NH-$COPEG_{2000}$)$_8$],G3,化合物21

[0630] 根据一般程序F使用叠氮基

[0631] -$PEG_{24}CO$-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH_2.TFA)$_8$(ε-NH-$COPEG_{2000}$)$_8$](18.1mg,842nmol)和HO-Glu-vc-PAB-MMAE(10.0mg,8.08μmol)制备,产生25.5mg/3.5mL(240μM)的产物浓度。

[0632] 2.8叠氮基

[0633] -$PEG_{24}CO$-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH-DGA-MMAF(OMe))$_8$(ε-NH-$COPEG_{1100}$)$_8$],G3,化合物22

[0634] 根据一般程序F使用叠氮基

[0635] -$PEG_{24}CO$-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH_2.TFA)(ε-NH0-$COPEG_{1100}$)]$_8$(16.3mg,1.28μmol)和DGA-MMAF(OMe)(10.6mg,12.3μmol)制备,产生23.8mg/3.5mL(365μM)的产物浓度。

[0636] 2.9叠氮基-$PEG_{24}CO$-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH-DGA-Pt(IV)乙酸酯))(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_8$,G3,化合物23

[0637] 向叠氮基-$PEG_{24}CO$-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH_2.TFA)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_8$(SPL 19和SPL 32)(22.4mg,1.75μmol)在DMF(0.5mL)中的搅拌溶液中添加NMM(7.4μL,67.3μmol)。然后将所得溶液添加至乙酸酯-二甘醇酸-1R,2R-环已烷-1,2-二胺-草酸铂(IV)(10.4mg,17.7μmol)和PyBOP(8.74mg,16.8μmol)在DMF(0.5mL)中的搅拌溶液。将随后反应混合物避光并且在室温下搅拌过夜,然后通过SEC纯化,产生呈灰白色固体的产物(24mg,86%)。^{1}H-NMR(300MHz,CD_3OD)δ(ppm):1.28-1.89(m,128H),2.07(s,23H),2.24-3.01(m,57H),3.12-3.26(m,22H),3.37(s,25H),3.39-3.90(m,768H),4.04-4.69(m,80H)。LCMS(亲性法,TFA缓冲液)R_t=10.63min。ICP-OES:确定Pt%9.0%,这表明在大分子上存在7个含Pt部分。确定缀合物的实际分子量为16.1kDa。

[0638] 2.10BHA[Lys]$_8$[((α-NH-$COPEG_{24}$NH-$COPEG_4$(PhMeTz))$_{1-4}$(α-NH_2)$_{4-7}$)(ε-NH-$COPEG_{1000}$)$_8$],G3,化合物34

[0639] 在RT下制备BHA[Lys]$_8$[(αNH_2.TFA)$_8$(ε-NH-$COPEG_{1000}$)$_8$](100mg,0.00786mmol,1.0当量)在DMF(300μL)中的搅拌溶液。向该搅拌溶液中添加(MeTzPh)PEG_4CO-NH$PEG_{24}CO_2H$(点击化学工具;16mg,0.01mmol,1.3当量)、PyBOP(8mg,0.013mmol,1.6当量)和DMF(200μL)。将反应混合物搅拌3min,然后添加NMM(40mg,50μL,0.38mmol,48当量)。将内容物避光并且在RT下搅拌过夜。将反应混合物用MQ水稀释并且冻干过夜。将冻干物质溶解于MeOH(1mL)中,并且通过SEC(400滴/管,MeOH sephadex LH20,35滴/min)纯化。将含产物级分通过HPLC检查并且以2个不同级分收集。减压浓缩每个级分,然后将所得残余物溶解于MQ水中,过滤(0.45μm acrodisc过滤器)并且冷冻干燥,产生呈粉红色固体的标题产物(69mg,66%)。

[0640] HPLC(C8 Xbridge,3x 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),214nm,0.4mL/min,Rf(min)=8.4(宽峰)。^{1}H-NMR(300MHz,D2O)δ(ppm):1.00-2.00(m,90H),2.51(t,3H),2.60(br s,3H),3.00-3.12(m,6H),3.12-3.35(br s,27H),3.35-3.45(m,26H),3.45-4.15(m,937H),4.15-4.45(m,12H),6.12(s,1H),7.15-7.50(m,12H),8.40-8.50(m,2H)。

[0641] 2.11BHA[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_2$-BCN)$_{1-4}$(α-NH$_2$)$_{4-7}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_8$],G3,化合物35

[0642] 在RT下制备BCN-PEG$_2$CO-NHPEG$_{24}$-CO$_2$H化合物31(9.6mg,0.006mmol,1.3当量)在DMF(200μL)中的搅拌溶液。向该搅拌溶液中添加PyBOP(4mg,0.008mmol,1.6当量)和NMM(23mg,25μL,0.226mmol,48当量)并且在5min后,添加BHA[Lys]$_8$[(α-NH$_2$.TFA)$_8$(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_8$](60mg,0.006mmol,1.0当量),之后添加DMF(200μL)。将内容物避光并且在RT下搅拌过夜。将反应混合物用ACN(10mL)稀释,然后通过SEC(400滴/管,ACN sephadex LH20,35滴/min)纯化。将含产物级分通过HPLC检查,收集,过滤(0.45μm acrodisc过滤器),减压浓缩并且冷冻干燥过夜,产生呈淡黄色固体的标题化合物(58mg,产率92%)。

[0643] HPLC(C8 Xbridge,3x 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),214nm,0.4mL/min,Rf(min)=8.43(宽峰)。^{1}H-NMR(300MHz,MeOD)δ(ppm):0.75-1.12(m,15H)1.12-2.15(m,95H),2.15-2.35(m,7H),2.55(br s,3H),3.00-3.35(m,90H),3.35-3.38(s,17H),3.38-4.09(m,592H),4.13(d,2H),4.18-4.63(br s,7H),6.18(s,0.9H),7.12-7.48(m,7H)。

[0644] 2.12

[0645] (MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[((α-NH-Cy5)$_{1-4}$(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)$_{4-7}$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$],G3,化合物36

[0646] 将Cy5-NHS的溶液(214μL的在DMF中的4.2mg/mL溶液;1.43μmol,1.0当量)添加至纯的(MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH$_2$.HCl)$_8$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]化合物8(18mg,1.43μmol)。一旦完全溶解,就添加NMM(10μL,91.0μmol),并且将随后反应混合物搅拌并避光。在2h后,将NMM(10μL,91.0μmol)和PyBOP(7.3mg,14.0μmol)添加至树枝状体溶液,之后添加Glu-VC-PAB-MMAE在DMF中的溶液(290μL 60mg/mL溶液,14.0μmol,9.8当量)。将随后反应混合物避光并且在RT下搅拌过夜。

[0647] 将反应混合物用PBS(2.0mL)稀释,以产生2.5mL的最终体积。然后将稀释的溶液通过PD10脱盐柱(用PBS预平衡)。一旦全部溶液进入了柱床,就添加PBS(3.5mL)以洗脱产物(其显现为蓝色条带)。构建体在PBS中的最终理论浓度=8.7mg/mL。将物质在-80℃下冷冻储存。HPLC(C8 Xbridge,3x 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),214nm,0.4mL/min,Rt(min)=95-10min(宽峰);83%缀合物相关峰,具有17% MMAE/MMAE-接头。

[0648] 2.13

[0649] (MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[^{3}H-Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)$_8$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$],G3,化合物40

[0650] 向

[0651] (MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[^{3}H-Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH$_2$.HCl)$_8$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$](使用用于合成化合物53的方法制备)(36.8mg,2.93μmol)在NMM/DMF(7.8μL/0.5mL)中的溶液中添加固体PyBOP(24.7mg,47.5μmol)。一旦完全溶解,就将树枝状体溶液添加至HO-Glu-VC-PAB-MMAE(40mg,32.3μmol)在NMM/DMF(7.8μL/0.5mL)中的溶液。将随后反应混合物避光并且在RT下搅拌过夜。

[0652] 将反应混合物用PBS(4.0mL)稀释,以产生5mL的最终体积。然后将稀释的溶液通过

两个PD10脱盐柱(用PBS预平衡,2.5mL通过每个柱)。一旦全部溶液进入了柱床,就将PBS(3.5mL)添加至每个柱以洗脱产物。将所得粗制混合物使用再生纤维素Amicon Ultra-0.5mL离心单元(10K MWCO)进一步纯化。构建体在PBS中的最终理论浓度=29-30mg/mL。将物质在-20℃下冷冻储存。HPLC(C8 Xbridge,3x 100mm)梯度:5% ACN/H_2O(0-1min),5-80% ACN(1-7min),80% ACN(7-12min),80-5% ACN(12-13min),5% ACN(13-15min),214nm,0.4mL/min,Rt(min)=9.5-12min(宽峰);91.4%缀合物相关峰,具有8.6% MMAE/MMAE-接头相关峰。

[0653] 2.14

[0654] (MeTzPh)PEG_4CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[((α-NH-DFO)$_2$(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)$_6$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$],G3化合物66

[0655] 在RT下制备p-SCN-去铁胺(2.1mg,2.79μmol)在DMSO(100μL)中的搅拌溶液。向该搅拌溶液中添加在DMF(200μL)中的(MeTzPh)PEG_4CO-NHPEG$_{24}$CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH_2.HCl)$_8$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]化合物53(17.0mg,1.35μmol)。将随后反应混合物搅拌3min,然后添加NMM(10μL,91.0μmol)。将所得溶液避光并且在RT下搅拌4h。添加PyBOP(7.0mg,13.5μmol),并且在5min后,将反应混合物添加至纯的HO-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE(9.76mg,7.89μmol)。将随后反应混合物静置过夜。将反应混合物用PBS缓冲液(4.5mL)稀释并且跨4个Amicon超离心过滤器(10K MWCO)划分,并且离心(14K rcf,15min)过滤器。将渗余物在PBS中渗滤(400μL,14K rcf,15min x 10次)。将渗余物合并,产生粉红色溶液,近似浓度为2mL中16mg化合物67。HPLC(C8 XBridge,3x 100mm)梯度:5% ACN/H_2O(0-1min),5-80% ACN(1-7min),80% ACN(7-12min),80-5% ACN(12-13min),5% ACN(13-15min),214nm,0.4mL/min,Rt(min)=8.7-9.8min(宽峰)。

[0656] 2.15

[0657] BHA[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))$_1$(α-NH-DFO)$_2$(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMA E)$_5$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$],G3,化合物67

[0658] 在RT下制备p-SCN-去铁胺(2.0mg,2.66μmol)在DMSO(100μL)中的搅拌溶液。向该搅拌溶液中添加在DMF(200μL)中的BHALys[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))$_1$(α-NH_2)$_7$)(ε-NHPEG$_{1100}$)$_8$]化合物34(17.0mg,1.27μmol)。将随后反应混合物搅拌3min,然后添加NMM(10μL,91.0μmol)。将所得溶液避光并且在RT下搅拌4h。添加PyBOP(7.0mg,13.5μmol),并且在5min后,将反应混合物添加至纯的HO-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE(9.17mg,7.41μmol)。将随后反应混合物静置过夜。将反应混合物用PBS缓冲液(4.5mL)稀释并且跨4个Amicon超离心过滤器(10K MWCO)划分,并且离心(14K rcf,15min)过滤器。将渗余物在PBS中渗滤(400μL,14K rcf,15min x 10次)。将渗余物合并,产生粉红色溶液,近似浓度为2mL中16mg化合物68。HPLC(C8 XBridge,3x 100mm)梯度:5% ACN/H_2O(0-1min),5-80% ACN(1-7min),80% ACN(7-12min),80-5% ACN(12-13min),5% ACN(13-15min),214nm,0.4mL/min,Rt(min)=9.3-9.7min(宽峰)。

[0659] 2.16

[0660] (MeTzPh)PEG_4CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[((α-NH-Cy5)$_1$(α-NH-Glu-SN38)$_7$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$],G3化合物68

[0661] 向(MeTzPh)PEG_4CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[((α-NH_2.HCl)$_8$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]

化合物53(10mg,0.75μmol)在DMF(2mL)中的搅拌溶液中添加NMM(4.0μL,36.0μmmol)和磺基Cy5 NHS酯(0.58mg,0.75μmol)。将反应混合物在室温下搅拌2h。将SN38-Glu-COOH(WO2020/102852)(3.94mg,7.8μmmol)和PyBOP(4.05mg,7.8μmmol)添加至反应混合物,并且将反应混合物在室温下再搅拌20h。减压移除溶剂,并且将获得的残余物使用尺寸排阻色谱(Sephadex LH 20)(使用乙腈作为流动相)纯化,产生呈蓝色固体的标题化合物(6.0mg)。反应混合物的UPLC-TOF分析确认了Cy5 NHS酯和SN-38-Glu-COOH在树枝状体上的随机添加。UPLC-TOF(亲性法,TFA缓冲液)Rt=84.80-5.80min。

[0662] 2.17

[0663] BHA[Lys]$_{32}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))$_{1-4}$(α-NH$_2$)$_{28-31}$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_{32}$],G5,化合物69

[0664] 根据一般程序C使用BHALys[Lys]$_{32}$[(α-NH$_2$.TFA)$_{32}$(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{32}$](100.0mg,0.002mmol)和HOOCPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)(点击化学工具;3.38mg,0.005mmol)制备,不同的是将反应容器包在箔中以挡光,并且将残余物通过SEC(Sephadex™LH-20)(使用甲醇作为洗脱液)纯化,产生产物化合物69(68mg,72%);^{1}HNMR(300MHz,D$_2$O)δ(ppm):8.44-8.29(m,2H),7.44-7.09(m,12H),6.02(bs,1H),4.37-4.11(m,31H),4.08-3.37(m,2937H),3.32(s,83H),3.27-2.88(m,116H),2.59-2.42(m,3H),2.18-0.92(m,313H);HPLC(C8 XBridge,3x 100mm)梯度(甲酸盐缓冲液):5% ACN/H2O(0-1min),5-80% ACN(1-7min),80% ACN(7-12min),80-5% ACN(12-13min),5% ACN(13-15min),214nm,0.4mL/min,R$_t$=8.77min。

[0665] 2.18

[0666] BHA[Lys]$_{32}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))$_{1-4}$(α-NHCy5)$_1$(α-NH-COPEG$_9$-Val-Ala-PAB-P-触发子-NMeCO-CTX)$_{22}$)(α-NH$_2$)$_{5-8}$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_{32}$],G5,化合物70

[0667] 向BHA[Lys]$_{32}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))$_{1-4}$((α-NH$_2$)$_{28-31}$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_{32}$]化合物69(20.0mg,0.4μmol)在DMF中的搅拌溶液中添加NMM(8.0μL,72μmol),之后添加Cy5-NHS酯(0.26mg,0.4μmol),并且将反应混合物在室温下搅拌过夜。将化合物63(25.7mg,14.4μmol)和PyBOP添加至反应混合物,并且将混合物在室温下再搅拌20h。减压移除溶剂,并且将粗制残余物溶解于乙腈(2mL)中,并且通过0.45μM过滤器过滤所获得的溶液。将滤液收集并且使用尺寸排阻色谱(Sephadex LH20)(使用乙腈作为溶剂)纯化,产生呈蓝色固体的标题化合物(27mg;75%)。^{1}HNMR(300MHz,MeOD)δ(ppm):8.52(d,2H,J=9.0Hz),8.25-7.05(m,329H),6.39-5.89(m,23H),5.73-4.94(m,141H),4.64-4.05(m,161H),4.05-3.36(m,4026H),3.18-2.22(m,323H),2.18-0.56(m,1362H);HPLC(C8 XBridge,3x 100mm)梯度(甲酸盐缓冲液):75% ACN/H$_2$O(0-1min),75-90% ACN(1-7min),90% ACN(7-12min),90-75% ACN(12-13min),75% ACN(13-15min),214nm,0.4mL/min,Rt(min)=8.90-9.10。

[0668] 实施例3靶向性树枝状体缀合物的合成

[0669] 3.1亲和体-MPED-BCN-三唑并

[0670] -PEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[(α-NH-DGA-3'NH-Dox)$_{1-4}$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)]$_4$,G2,化合物24

[0671] 根据一般程序G使用亲和体-BCN(900μL)和叠氮基

[0672] -PEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[(α-NH-DGA-3'-NH-Dox)$_{1-4}$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)]$_4$(300μL

858μM溶液)(亲和体-BCN:DGA-Dox树枝状体摩尔比;1:3)制备。SDS-PAGE分析显示出约19kDa的对应于亲和体-树枝状体缀合物的条带(700nm)。

[0673] 3.2亲和体

[0674] -BCN/N_3-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[(α-NH-DGA-14-O-Nemo)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_4$,G2,化合物71

[0675] 根据一般程序G使用亲和体-BCN(900μL)和叠氮基

[0676] -PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[(α-NH-14-O-DGA-Nemo)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_4$(300μL 858μM溶液)(亲和体-BCN:DGA-Nemo树枝状体摩尔比;1:3)制备。SDS-PAGE分析显示出约19kDa的对应于亲和体-树枝状体缀合物的条带(700nm)。

[0677] 3.3亲和体-MPED-BCN-三唑并

[0678] -PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH-DGA-3'-NH-Dox)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_8$,G3,化合物25

[0679] 根据一般程序G使用亲和体-BCN(105μL)和叠氮基

[0680] -PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH-DGA-3'-NH-Dox)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_8$(35μL 580μM溶液)(亲和体-BCN:DGA-Dox树枝状体摩尔比;1:1)制备。SDS-PAGE分析显示出约27kDa的对应于亲和体-树枝状体缀合物的条带(700nm)。估计缀合物产率为80%,这通过添加叠氮化物IR染料800CW并且在800nm下测量荧光来计算。

[0681] 3.4亲和体

[0682] -BCN/N_3-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH-DGA-14-O-Nemo)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_8$,G3,化合物72

[0683] 根据一般程序G使用亲和体-BCN(105μL)和叠氮基

[0684] -PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH-DGA-14-O-Nemo)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_8$(35μL 580μM溶液)(亲和体-BCN:DGA-Nemo树枝状体摩尔比;1:1)制备。SDS-PAGE分析显示出约27kDa的对应于亲和体-树枝状体缀合物的条带(700nm)。估计缀合物产率为80%,这通过添加叠氮化物IR染料800CW并且在800nm下测量荧光来计算。

[0685] 3.5亲和体

[0686] -BCN/N_3-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)$_8$(ε-NH-$COPEG_{1100}$)$_8$],G3,化合物26

[0687] 根据一般程序G使用亲和体BCN(2.0mg,286nmol,在1.0mg/mL PBS下)和叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH-Glu-vc-PAB-MMAE)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_8$(1.0mL 240μM溶液)制备。冻干纯化物质产生白色蓬松粉末(2.19mg,31%)。SDS-PAGE分析显示出约30kDa的对应于亲和体-树枝状体缀合物的条带(700nm)。

[0688] 3.6亲和体

[0689] -BCN/N_3-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)$_8$(ε-NH-$COPEG_{2000}$)$_8$],G3,化合物27(SPL 40中的化合物78)

[0690] 根据一般程序G使用亲和体BCN(1.0mg,143nmol,在1.0mg/mL PBS下)和叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH-Glu-vc-PAB-MMAE)(ε-NH-$COPEG_{2000}$)]$_8$(250μL 233μM溶液)制备。SDS-PAGE分析显示出约40kDa的对应于亲和体-树枝状体缀合物的条带(700nm)。

[0691] 3.7亲和体-BCN/N_3-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH-DGA-Pt(IV)-乙酸酯)(ε-NH-

$COPEG_{1100}$)]$_8$,G3,化合物28

[0692] 根据一般程序G使用亲和体BCN(5.0mg,715nmol,在1.0mg/mL PBS下)和叠氮基-$PEG_{24}CO$-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH-DGA-Pt(IV)-乙酸酯)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_8$(600μL 903μM溶液)制备。冻干纯化物质产生白色蓬松粉末(5.90mg,47%)。SDS-PAGE分析显示出约30kDa的对应于亲和体-树枝状体缀合物的条带(700nm)。

[0693] 3.8Fab-三唑并DBCO-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_4$[(α-DGA-3′-NH-Dox)(ε-NHPEG_{1100})]$_4$G2-Dox/PEG1100树枝状体,化合物29

[0694] 将叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_4$[(α-NH-DGA-3'-NH-Dox)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_4$的溶液(10μL的在PBS中的500μM溶液)添加至Fab-DBCO*的溶液(40μL的在HEPES缓冲液中的13.4μM溶液)。将随后反应混合物在室温下摇动(650rpm)过夜,产生Fab-叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_4$[(α-NH-DGA-3'NH-Dox)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_4$。进行SDS-PAGE分析并且使用Odyssey扫描器在700nm和800nm下扫描。在700nm下扫描时的SDS-PAGE显示出对应于50kDa的DBCO-Fab条带和在约65kDa处的预期Fab-[树枝状体-Dox/PEG_{1100}]$_2$,化合物30。

[0695] 3.9Fab-DBCO/N_3-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$[Lys]$_4$[(α-NH-DGA-14-O-Nemo)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_4$,化合物73

[0696] 将叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$[Lys]$_4$[(α-NH-DGA-14-O-Nemo)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_4$的溶液(10μL的在PBS中的500μM溶液)添加至Fab-DBCO*的溶液(40μL的在HEPES缓冲液中的13.4μM溶液)。将随后反应混合物在室温下摇动(650rpm)过夜,产生Fab-DBCO/N_3-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$[Lys]$_4$[(α-NH-DGA-14-O-Nemo)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_4$。进行SDS-PAGE分析并且使用Odyssey扫描器在700nm和800nm下扫描。在700nm下扫描时的SDS-PAGE显示出对应于50kDa的DBCO-Fab条带和在约65kDa处的预期Fab-[树枝状体-Nemo/PEG_{1100}]$_2$,化合物30。

[0697] 3.10亲和体

[0698] -BCN/N_3-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH-DGA-MMAF(OMe)$_8$(ε-NH-$COPEG_{1100}$)$_8$],G3,化合物30

[0699] 根据一般程序G使用亲和体BCN(2.0mg,286nmol,在1.0mg/mL PBS下)和叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH-DGA-MMAF(OMe))(ε-NH-$COPEG_{1100}$)]$_8$(600μL 365μM溶液)制备。冻干纯化物质产生白色蓬松粉末(2.06mg,33%)。SDS-PAGE分析显示出约30kDa的对应于亲和体-树枝状体缀合物的条带(700nm)。

[0700] 3.11纳米抗体

[0701] -PEG_{12}-TCO-MePhTz-PEG_4-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH-Cy5)$_1$(α-NH-Glu-VC-PAB-MMAE)$_7$(ε-NH-$COPEG_{1100}$)$_8$],化合物41

[0702] 根据以下实施例4使用DBCO-PEG_{12}-TCO和纳米抗体2D3 N末端标签、TEV、C末端叠氮化物制备纳米抗体构建体。

[0703] 3.12纳米抗体

[0704] -PEG_{12}-TCO-MePhTz-PEG_4-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH-Cy5)$_1$(α-NH-Glu-VC-PAB-MMAE)$_7$(ε-NH-$COPEG_{1100}$)$_8$],化合物42

[0705] 根据以下实施例4使用DBCO-PEG_{12}-TCO和纳米抗体2D3 N末端标签、TEV、C末端叠氮化物制备纳米抗体构建体。

[0706] 3.13纳米抗体

[0707] -PEG_{12}-TCO-MeTzPh-PEG_4PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_{16}$[(α-NH-Cy5)$_1$(α-NHAc)$_{15}$(ε-NH-$COPEG_{1100}$)$_{16}$],化合物43

[0708] 根据以下实施例4使用DBCO-PEG_{12}-TCO和纳米抗体2D3 N末端标签、TEV、C末端叠氮化物制备纳米抗体构建体

[0709] 3.14纳米抗体

[0710] -PEG_{12}-TCO-MeTzPh-PEG_4PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_{32}$[(α-NH-Cy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$(ε-NH-$COPEG_{1100}$)$_{32}$],化合物44

[0711] 根据以下实施例4使用DBCO-PEG_{12}-TCO和纳米抗体2D3 N末端标签、TEV、C末端叠氮化物制备纳米抗体构建体

[0712] 3.15纳米抗体

[0713] -PEG_{12}-TCO-MeTzPh-PEG_4PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][3H-Lys]$_4$[Lys(α-NH-Glu-VC-PAB-MMAE)$_8$(ε-NH-$COPEG_{1100}$)$_8$],化合物45

[0714] 根据以下实施例4使用DBCO-PEG_{12}-TCO和纳米抗体2D3 N末端标签、TEV、C末端叠氮化物制备纳米抗体构建体

[0715] 3.16纳米抗体

[0716] -N_3/DBCO-Glu-$NHPEG_{24}CO$-$NHPEG_3$-TCO/(MeTzPh)PEG_4CO-$NHPEG_{24}CO$-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[((α-NH-DFO)$_2$(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)$_6$)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)$_8$],化合物74

[0717] 使用一般程序H使用DBCO-Glu-$NHPEG_{24}CO$-$NHPEG_3$-TCO接头化合物33(1当量)、四嗪树枝状体(MeTzPh)PEG_4CO-$NHPEG_{24}CO$-[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-DFO)$_2$(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)$_6$)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)$_8$],化合物66(1当量)和纳米抗体-N_3(“纳米抗体-N3-C末端标签”)(1当量)制备SDS-PAGE分析显示出约37kDa的对应于纳米抗体-树枝状体缀合物的条带(图1)。

[0718] 3.17纳米抗体

[0719] -N_3/BCN-$NHPEG_2$-Glu-$NHPEG_{24}CO$-$NHPEG_3$-TCO/(MeTzPh)PEG_4CO-$NHPEG_{24}CO$-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[((α-NH-DFO)$_2$(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)$_6$)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)$_8$],化合物75

[0720] 使用一般程序H使用BCN-$NHPEG_2$-Glu-$NHPEG_{24}CONHPEG_3$-TCO接头化合物32(1当量)、四嗪树枝状体(MeTzPh)PEG_4CO-$NHPEG_{24}CO$-[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-DFO)$_2$(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)$_6$)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)$_8$],化合物66(1当量)和纳米抗体-N_3(“纳米抗体-N3-C末端标签”)(1当量)制备SDS-PAGE分析显示出约37kDa的对应于纳米抗体-树枝状体缀合物的条带(图1)。

[0721] 3.18

[0722] BHA[Lys]$_8$[((α-NH-$COPEG_{24}$NH-$COPEG_4$(PhMeTz)/TCO-PEG_3NH-$COPEG_{24}$NH-Glu-DBCO/N_3-纳米抗体)$_1$(α-NH-DFO)$_2$(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)$_5$)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)$_8$],G3,化合物76

[0723] 使用一般程序H使用DBCO-Glu-$NHPEG_{24}CO$-$NHPEG_3$-TCO接头化合物33(1当量)、四嗪树枝状体

[0724] BHA[Lys]$_8$[((α-NH-$COPEG_{24}$NH-$COPEG_4$(PhMeTz))$_1$(α-NH-DFO)$_2$(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)$_5$)(ε-NH-$COPEG_{1100}$)$_8$],化合物67(1当量)和纳米抗体-N_3(“纳米抗体-N3-C末

端标签”)(1当量)制备SDS-PAGE分析显示出约37kDa的对应于纳米抗体-树枝状体缀合物的条带(图1)。

[0725] 3.19纳米抗体

[0726] -N_3/DBCO-Glu-NHPEG$_{24}$CO-NHPEG$_3$-TCO/(MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[((α-NH-Cy5)$_1$(α-NH-Glu-10-O-SN38)$_7$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$],化合物77

[0727] 使用一般程序H使用DBCO-Glu-NHPEG$_{24}$CO-NHPEG$_3$-TCO接头化合物33(1当量)、四嗪树枝状体(MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[((α-NH-Cy5)$_1$(α-NH-Glu-10-O-SN38)$_7$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$],化合物68(1当量)和纳米抗体-N_3(“纳米抗体-N3-C末端标签”)(1当量)制备SDS-PAGE分析显示出约37kDa的对应于纳米抗体-树枝状体缀合物的条带(图2)。

[0728] 3.20

[0729] BHA[Lys]$_{32}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N_3-纳米抗体)$_{1-4}$(α-NHCy5)$_1$(α-NH-COPEG$_9$-Val-Ala-PAB-P-触发子-NMeCO-CTX)$_{22}$)(α-NH$_2$)$_{5-8}$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_{32}$],G5,化合物78

[0730] 使用一般程序H使用DBCO-Glu-NHPEG$_{24}$CO-NHPEG$_3$-TCO接头化合物33(1当量)、四嗪树枝状体

[0731] BHA[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))$_{1-4}$(α-NHCy5)$_1$(α-NH-COPEG9-Val-Ala-PAB-P-触发子-NMeCO-CTX)$_{22}$(NH$_2$)$_{5-8}$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_{32}$],化合物70(1当量)和纳米抗体-N_3(“纳米抗体-N3-C末端标签”)(1当量)制备SDS-PAGE分析显示出约95kDa的对应于纳米抗体-树枝状体缀合物的条带(图2)

[0732] 3.21

[0733] BHA[Lys]$_4$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N_3-纳米抗体)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_2$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_4$],G2,化合物86和BHA[Lys]$_4$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N_3-纳米抗体)$_{2-3}$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$))$_{0-1}$(ε-NHCOPEG$_{1000}$)$_4$],G2,化合物87

[0734] 根据一般程序H使用

[0735] BHA[Lys]$_4$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_1$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_4$],G2,化合物99制备,不同的是:

[0736] 步骤1:将TCO接头溶液80在纯DMSO中制备

[0737] 步骤2:将树枝状体溶解于pH 8下的Tris缓冲液中,并且在TCO接头与树枝状体完成反应(UPLC或LCMS)后,将反应混合物用Tris缓冲液稀释,使得DMSO的最终浓度≤5%(v/v),并且通过离心超滤(Amicon,0.5mL再生纤维素膜,10kDa MWCO)纯化。

[0738] 纯化方法与用于纯化化合物74和76的方法相同,产生纳米抗体-树枝状体缀合物化合物86(232μg;0.45μg/μL,在pH 8下的HEPES缓冲液中)和纳米抗体-树枝状体缀合物化合物87(60μg;0.30μg/μL,在pH 8下的HEPES缓冲液中。

[0739] 3.22

[0740] BHA[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N_3-纳米抗体)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_6$)(ε-NH-COPEG$_{412}$)$_8$],G3,化合物88和BHA[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N_3-

纳米抗体)$_{2-4}$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{3-5}$(ε-NH-COPEG$_{412}$)$_8$],G3化合物88a

[0741] 根据一般程序H使用

[0742] BHA[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))$_{1-4}$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{3-6}$)(ε-NH-COPEG$_{412}$)$_8$],G3,化合物100制备,不同的是:

[0743] 步骤1:将TCO接头化合物80溶液在纯DMSO中制备

[0744] 步骤2:将树枝状体溶解于pH 8下的Tris缓冲液中,并且在TCO接头与树枝状体完成反应(UPLC或LCMS)后,将反应混合物用Tris缓冲液稀释,使得DMSO的最终浓度≤5%(v/v),并且通过离心超滤(Amicon,0.5mL再生纤维素膜,10kDa MWCO)纯化

[0745] 纯化方法与用于纯化化合物74和76的方法相同,产生纳米抗体-树枝状体缀合物化合物88(140μg;1.48μg/μL,在pH 8下的HEPES缓冲液中)和化合物88a(不纯)。

[0746] 3.23

[0747] BHA[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_6$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_8$],G3,化合物89和BHA[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体)$_{2-4}$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{3-5}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_8$],G3,化合物89a

[0748] 根据一般程序H使用

[0749] BHA[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))$_{1-4}$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{3-6}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_8$],G3,化合物101制备,不同的是:

[0750] 步骤1:将TCO接头(化合物80)溶液在纯DMSO中制备

[0751] 步骤2:将树枝状体溶解于pH 8下的Tris缓冲液中,并且在TCO接头与树枝状体完成反应(UPLC或LCMS)后,将反应混合物用Tris缓冲液稀释,使得DMSO的最终浓度≤5%(v/v),并且通过离心超滤(Amicon,0.5mL再生纤维素膜,10kDa MWCO)纯化

[0752] 纯化方法与用于纯化化合物74和76的方法相同,产生纳米抗体-树枝状体缀合物化合物89(249μg;2.68μg/μL,在pH 8下的HEPES缓冲液中)和化合物89a(不纯)。

[0753] 3.24

[0754] BHA[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{14}$(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{16}$],G4,化合物90和BHA[Lys]$_{16}$[((a-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体)$_{2-4}$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{11-13}$(ε-NHCOPEG$_{1000}$)$_{16}$],G4,化合物91

[0755] 根据一般程序H使用

[0756] BHA[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{14}$(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{16}$],G4,化合物102制备,不同的是:

[0757] 步骤1:将TCO接头(化合物80)溶液在纯DMSO中制备

[0758] 步骤2:将树枝状体溶解于pH 8下的Tris缓冲液中,并且在TCO接头与树枝状体完成反应(UPLC或LCMS)后,将反应混合物用Tris缓冲液稀释,使得DMSO的最终浓度≤5%(v/v),并且通过离心超滤(Amicon,0.5mL再生纤维素膜,10kDa MWCO)纯化

[0759] 纯化方法与用于纯化化合物74和76的方法相同,产生纳米抗体-树枝状体缀合物化合物90(203μg;0.975μg/μL和0.556μg/μL,在pH 8下的HEPES缓冲液中)和化合物91(101μ

g;0.34μg/μL,在pH 8下的HEPES缓冲液中)。

[0760] 3.25

[0761] BHA[Lys]$_{32}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{30}$(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{32}$],G5,化合物92和BHA[Lys]$_{32}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体)$_{2-4}$[α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)]$_1$(α-NH$_2$)$_{27-29}$(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{32}$],G5,化合物93

[0762] 根据一般程序H使用

[0763] BHA[Lys]$_{32}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))$_{1-4}$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{27-30}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{32}$],G5,化合物103制备,不同的是:

[0764] 步骤1:将TCO接头化合物80溶液在纯DMSO中制备

[0765] 步骤2:将树枝状体溶解于pH 8下的Tris缓冲液中,并且在TCO接头与树枝状体完成反应(UPLC或LCMS)后,将反应混合物用Tris缓冲液稀释,使得DMSO的最终浓度≤5%(v/v),并且通过离心超滤(Amicon,0.5mL再生纤维素膜,10kDa MWCO)纯化

[0766] 纯化方法与用于纯化化合物74和76的方法相同,产生纳米抗体-树枝状体缀合物化合物92(370μg;3.66μg/μL,在pH 8下的HEPES缓冲液中)和产物化合物93(177μg;1.72μg/μL,在pH 8下的HEPES缓冲液中)。

[0767] 3.26

[0768] BHA[Lys]$_4$[(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_3$)(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))$_2$)(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体)$_2$],G2,化合物94a、

[0769] BHA[Lys]$_4$[(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_3$)(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))$_1$(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体)$_3$],G2,化合物94和

[0770] BHA[Lys]$_4$[(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_3$)(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体)$_4$],G2,化合物95

[0771] 根据一般程序H使用

[0772] BHA[Lys]$_4$[(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_3$)(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))$_4$],G2树枝状体,化合物24制备,不同的是:

[0773] 步骤1:将TCO接头化合物51溶液在水中制备

[0774] 步骤2:将树枝状体溶解于MQ水中。

[0775] 纯化方法与用于纯化化合物74和76的方法相同,产生作为不可分离混合物的纳米抗体-树枝状体缀合物化合物95和化合物94(最终浓度为pH 8下的HEPES缓冲液中294ug)。

[0776] 还通过以下方式来制备:将DBCO-Glu-NHPEG$_{24}$CO-NHPEG$_3$-TCO化合物80的溶液(57μL的在MQ水中的10mg/mL溶液,0.322μmol)添加至纳米抗体-N$_3$(“纳米抗体-N3-C末端标签”)的溶液(2.5mg,0.161μmol,在pH 8下的900μL Tris缓冲液中。将反应混合物在RT下静置2d,接着然后将反应混合物通过使用Tris缓冲液(pH 8)的离心超滤(Amicon,0.5mL再生纤维素膜,10kDa MWCO;10x 450μL)纯化。向该溶液中添加化合物105的溶液(230.0μg,在500μL MQ水中;0.026umol),并且将反应混合物在RT下静置过夜。纯化方法与用于纯化化合物74和76

的方法相同,产生作为不可分离混合物的纳米抗体-树枝状体化合物95、化合物94a和化合物94(最终浓度为pH 8下的HEPES缓冲液中124μg)。

[0777] 3.27BHA[Lys]$_4$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)/TCO-PEG$_8$-纳米抗体)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)$_1$(ε-NHDFO)$_1$)$_1$(α-NH$_2$)$_2$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_4$],G2,化合物97

[0778] 通过将2.0mg溶解于1mL DMSO(1.0mL)中来制备二溴马来酰亚胺接头化合物106的溶液。将TCEP的溶液(0.5M,在PBS pH 7中)(2.3μL,1.174μmmol)添加至纳米抗体("纳米抗体-N3-C末端标签")(化合物79)的溶液(1.0mg,0.058μmmol,在715μL pH 8下的Tris缓冲液中)。将反应混合物在37℃下加热1h,接着添加DMSO(673μL),之后添加接头化合物57(93.0μg,0.117μmmol)在DMSO(47.0μL)中的溶液。在1.5h后,将反应混合物冷却至RT并且离心,接着将化合物99的溶液(100μg,17μL,1.78mg,在300μL MQ水中)添加至沉淀物,并且将溶液在4℃下静置过夜。纯化方法与用于纯化化合物74和76的方法相同,产生呈pH 8下的Tris缓冲液中的溶液的化合物97(29μg)(最终浓度=1.78mg/mL)。

[0779] 3.28BHA[Lys]$_4$[((α-NH-COPEG$_{24}$-NH-COPEG$_4$(PhTzMe)/TCO-PEG$_3$-纳米抗体)$_{1-3}$(α-Lys(α-NHCy5)$_1$(ε-NHDFO)$_1$)$_1$(α-NH$_2$)$_{0-2}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_4$],G2,化合物98

[0780] 将TCO-PEG$_3$-醛(Conju-Probe)接头溶液(0.7mg,1.46μmol)在DMSO(50μL)中的溶液添加至纳米抗体("纳米抗体-N3-C末端标签")(化合物79)的溶液(931μL 1.07mg/mL储备溶液,在pH 6.5下的PBS缓冲液中),之后添加NaBH$_3$CN(0.09mg,1.5μmol)在水中(19μL)中的溶液。将反应混合物冷却至4℃,并且通过UPLC分析监测反应。在16h后,将反应混合物用PBS缓冲液(pH 6.5)稀释至2.0mL的总体积,并且然后通过使用PBS缓冲液(pH 6.5)的离心超滤(Amicon,0.5mL再生纤维素膜,10kDa MWCO;14x 450μL)纯化UPLC:在15min内5-20-30ACN%,使用0.01% TFA缓冲液;纳米抗体(化合物79)Rt=8.46min,具有m/z 13802;产物:9.99min,具有m/z 14263。向纳米抗体-PEG$_3$-TCO溶液(500μL PBS pH 6.5)中添加G2树枝状体化合物107(179μg,0.020μmol)在MQ水(15μL)中的溶液。在4℃下静置过夜之后,将反应混合物使用用于纯化化合物74和76的相同方法纯化,产生呈pH 8下的Tris缓冲液中的溶液的化合物98(12μg)(最终浓度=575μg/mL)。

[0781]

表 1.制备的化合物的表

化合物#	化合物描述
1	叠氮基-PEG$_{24}$-CO[N(PNBoc)$_2$]
2	叠氮基-PEG$_{24}$-CO[N(PNH$_2$.TFA)$_2$]
3	叠氮基-PEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Boc]$_4$
4	叠氮基-PEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[NH$_2$.TFA]$_4$
5	叠氮基-PEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[(α-Boc)(ε-NHPEG$_{1100}$)]$_4$
6	叠氮基-PEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[(α-NH$_2$.TFA)(ε-NHPEG$_{1100}$)]$_4$
7	叠氮基-PEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[Boc]$_8$

[0782]

8	叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[NH_2.TFA]$_8$
9	叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-Boc)(ε-NHPEG$_{1100}$)]$_8$
10	叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH_2.TFA)(ε-NHPEG$_{1100}$)]$_8$
11	叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-Boc)(ε-Fmoc)]$_8$
12	叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-Boc)(ε-NH_2)]$_8$
13	叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-Boc)(ε-NHPEG$_{570}$)]$_8$
14	叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH_2.TFA)(ε-NHPEG$_{570}$)]$_8$
15	叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-Boc)(ε-NHPEG$_{2000}$)]$_8$
16	叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH_2.TFA)(ε-NHPEG$_{2000}$)]$_8$
17	叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[(α-NH-DGA-3'-NH-Dox)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)]$_4$ / 叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[(α-DGA-Dox)(ε-NHPEG$_{1100}$)]$_4$ G2
18	叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[(α-NH-DGA-14-O-Nemo)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)]$_4$ / 叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-DGA-Nemo)(ε-NHPEG$_{1100}$)]$_8$ G3
19	叠氮基 -PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHGlu-Val-Cit-PAB-MMAE)$_8$(ε-NH-COPEG$_{570}$)$_8$]，G3 / 叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-Glu-vc-PAB-MMAE)(ε-NHPEG$_{570}$)]$_8$ G3
20	叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[α-NHGlu-Val-Cit--PAB-MMAE)$_8$(ε -NH-COPEG$_{1100}$)$_8$] / 叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-Glu-vc-PAB-MMAE)(ε-NHPEG$_{1100}$)]$_8$ G3
21	叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$[Lys]$_8$[(α-NHGlu-Val-Cit-PAB-MMAE)$_8$(ε-NH-COPEG$_{2000}$)$_8$] / 叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-Glu-vc-PAB-MMAE)(ε-NHPEG$_{2000}$)]$_8$ G3
22	叠氮基 -PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHDGA-MMAF(OMe))$_8$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$] / 叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-DGA-MMAF(OMe))(ε-NHPEG$_{1100}$)]$_8$ G3
23	叠氮基-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NHDGA-Pt(IV)乙酸酯))(ε-NH-COPEG$_{1100}$)]$_8$，G3， / 叠氮基-PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-Pt(IV)-乙酸酯)(ε-NHPEG$_{1100}$)]$_8$ G3
24	亲和体-MPED-BCN-三唑并 -PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[(α-DGA-3′-NH-Dox)$_{1-4}$(ε-NHPEG$_{1100}$)]$_4$ / 亲和体-G2-DGA-Dox/PEG_{1100}树枝状体缀合物
25	亲和体-MPED-BCN-三唑并 -PEG_{24}-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-DGA-3′-NH-Dox)(ε-NHPEG$_{1100}$)]$_8$，G3 / 亲和体-G3-DGA-Dox/PEG_{1100}树枝状体缀合物
26	亲和体 -BCN/N_3-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)$_8$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$] / 亲和体-G3-MMAE/PEG_{1100}树枝状体缀合物
27	亲和体 -BCN/N_3-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)$_8$(ε-NH-COPEG$_{2000}$)$_8$] / 亲和体-G3-MMAE/PEG_{2000}树枝状体缀合物
28	亲和体-BCN/N_3-PEG_{24}CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH-DGA-Pt(IV)-乙酸

[0783]

	酯)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)]$_8$，G3 / 亲和体-G3-Pt(IV)-乙酸酯/PEG$_{1100}$树枝状体缀合物
29	Fab-三唑并 DBCO-PEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_4$[(α-DGA-3′-NH-Dox)(ε-NHPEG$_{1100}$)]$_4$ G2-Dox/PEG1100 树枝状体 / Fab-G2-多柔比星/PEG$_{1100}$树枝状体缀合物
30	亲和体 -BCN/N$_3$-PEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NHDGA-MMAF(OMe)$_8$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$] / 亲和体-G3-MMAF/PEG$_{1100}$树枝状体缀合物
31	BCN-PEG$_2$-Glu-CO-NHPEG$_{24}$CO$_2$H / BCN-PEG$_2$-Glu-PEG$_{24}$-CO$_2$H
32	BCN-PEG$_2$-Glu-CO-NHPEG$_{24}$CO-NHPEG$_3$-TCO / BCN-PEG$_2$-Glu-PEG$_{24}$-PEG$_3$-TCO
33	DBCO-Glu-NHPEG$_{24}$CO-NHPEG$_3$-TCO / DBCO-Glu-PEG$_{24}$-PEG$_3$-TCO
34	BHA[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))$_{1\text{-}4}$(α-NH$_2$)$_{4\text{-}7}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_8$]，G3 / BHA-[Lys]$_8$[(α-(MeTzPh-PEG$_4$-PEG$_{24}$)$_1$(α-NH$_2$)$_7$(ε-NHPEG$_{1000}$)$_8$]
35	BHA[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_2$-BCN)$_{1\text{-}4}$(α-NH$_2$)$_{4\text{-}7}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_8$]，G3 / BHA-[Lys]$_8$[(α-(BCN-PEG$_3$-Glu-PEG$_{24}$)$_1$(α-NH$_2$)$_7$(ε-NHPEG$_{1000}$)$_8$]
36	(MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[((α-NH-Cy5)$_{1\text{-}4}$(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)$_{4\text{-}7}$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$] / MePhTz-PEG$_4$-PEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-(Cy5)$_1$(α-Glu-VC-PAB-MMAE)$_7$(ε-NHPEG$_{1100}$)$_8$]
37	MeTzPh-PEG$_4$PEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-Cy5)$_1$(α-NHAc)$_7$(ε-NHPEG$_{1100}$)$_8$] / MeTzPh-PEG$_4$PEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-Cy5)$_1$(α-NHAc)$_7$(ε-NHPEG$_{1100}$)$_8$]
38	(MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_{16}$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_{15}$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_{16}$] / MeTzPh-PEG$_4$PEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_{16}$[(α-Cy5)$_1$(α-NHAc)$_{15}$(ε-NHPEG$_{1100}$)$_{16}$]
39	(MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_{32}$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_{32}$/ / MeTzPh-PEG$_4$PEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_{32}$[(α-Cy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$(ε-NHPEG$_{1100}$)$_{32}$]
40	(MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_2$[^{3}H-Lys]$_4$[Lys]$_8$[(α-NH-Glu-Val-Cit-PAB-MMAE)$_8$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$] / MeTzPh-PEG$_4$PEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][3H-Lys]$_4$[Lys(α-Glu-VC-PAB-MMAE)$_8$(ε-NHPEG$_{1100}$)$_8$]
41	纳米抗体 -PEG$_{12}$-TCO-MePhTz-PEG$_4$-PEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-(Cy5)$_1$(α-Glu-VC-PAB-MMAE)$_7$(ε-NHPEG$_{1100}$)$_8$]
42	纳米抗体 -PEG$_{12}$-TCO-MePhTz-PEG$_4$-PEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-(Cy5)$_1$(α-Glu-VC-PAB-MMAE)$_7$(ε-NHPEG$_{1100}$)$_8$
43	纳米抗体-PEG$_{12}$-TCO-MeTzPh-PEG$_4$PEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_{16}$[(α-Cy5)$_1$(α-NHAc)$_{15}$

	(ε-NHPEG$_{1100}$)$_{16}$]
44	纳米抗体-PEG$_{12}$-TCO MeTzPh-PEG$_4$PEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_{32}$[(α-Cy5)$_1$(α-NHAc)$_{31}$(ε-NHPEG$_{1100}$)$_{32}$
45	纳米抗体-PEG$_{12}$-TCO MeTzPh-PEG$_4$PEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][3H-Lys]$_4$[Lys(α-Glu-VC-PAB-MMAE)$_8$(ε-NHPEG$_{1100}$)$_8$]
46	(MeTzPh)-PEG$_{24}$-CO[N(PNBoc)$_2$]
47	(MeTzPh)-PEG$_{24}$-CO[N(PNH$_2$.HCl)$_2$]
48	(MeTzPh)-PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$-CO[N(PNH$_2$.HCl)$_2$]
49	((MeTzPh)-PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_2$[NHBoc]$_4$
50	((MeTzPh)-PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$[Lys]$_2$[NH$_2$.HCl]$_4$
51	(MeTzPh)-PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[NHBoc]$_8$
52	(MeTzPh)-PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[NH$_2$.HCl]$_8$
53	(MeTzPh)-PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH$_2$.HCl)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)]$_8$
54	(MeTzPh)-PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[NH$_2$.HCl]$_{16}$
55	(MeTzPh)-PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_{16}$[(α-NH$_2$.HCl)(ε-NH-CO PEG$_{1100}$)]$_{16}$
56	(MeTzPh)-PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_{16}$[NH$_2$.TFA]$_{32}$
57	(MeTzPh)-PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$-CO[N(PN)$_2$][Lys]$_{32}$[(α-NH$_2$.TFA)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)]$_{32}$
58	卡巴他赛(CTX)-2'-OCOO-oPNP 酯
59	Fmoc-Val-Ala-PAB-P-触发子-(NMeBoc)
60	TFA.NH$_2$-Val-Ala-PAB-P-触发子-(NMeBoc)
61	COOH-PEG$_9$-Val-Ala-PAB-P-触发子-(NMeBoc)
62	COOH-PEG$_9$-Val-Ala-PAB-P-触发子-(NMe.TFA)
63	COOH-PEG$_9$-Val-Arg-PAB-P-触发子-NMeCO-CTX
46	叠氮基-PEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[(α-NHDGA-14-O-Nemo)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)]$_4$
65	叠氮基-PEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH-DGA-14-O-Nemo)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)]$_8$
[0784] 66	(MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NHDFO)$_2$(α-NHGlu-Val-Cit-PAB-MMAE)$_6$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]
67	BHA[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))$_1$(α-NHDFO)$_2$(α-NHGlu-Val-Cit-PAB-MMAE)$_5$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]
68	(MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHGlu-SN38)$_7$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]
69	BHA[Lys]$_{32}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))$_{1\text{-}4}$(α-NH$_2$)$_{28\text{-}31}$(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_{32}$]
70	BHA[Lys]$_{32}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))$_{1\text{-}4}$(α-NHCy5)$_1$(α-NH-COPEG$_9$-Val-Arg-PAB-P-触发子-NHCO-CTX)$_{22}$) (α-NH$_2$)$_{5\text{-}8}$ (ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_{32}$]
71	亲和体-BCN/N$_3$-PEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_4$[(α-NHDGA-14-O-Nemo)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)]$_4$
72	亲和体-BCN/N$_3$-PEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[(α-NH-DGA-14-O-Nemo)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)]$_8$
73	Fab-DBCO/N$_3$-PEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$[Lys]$_4$[(α-NHDGA-14-O-Nemo)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)] / G2-Nemo/PEG1100 树枝状体
74	纳米抗体 -N$_3$/DBCO-Glu-NHPEG$_{24}$CO-NHPEG$_3$-TCO/(MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[((α-NHDFO)$_2$(α-NHGlu-Val-Cit-PAB-MMAE)$_6$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]
75	纳米抗体 -N$_3$/BCN-NHPEG$_2$-Glu-NHPEG$_{24}$CO-NHPEG$_3$-TCO/(MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[((α-NHDFO)$_2$(α-NHGlu-Val-Cit-PAB-MMAE)$_6$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]
76	BHA[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体)$_1$(α-NHDFO)$_2$(α-NHGlu-Val-Cit-PAB-MMAE)$_5$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]
77	纳米抗体 -N$_3$/DBCO-Glu-NHPEG$_{24}$CO-NHPEG$_3$-TCO/(MeTzPh)PEG$_4$CO-NHPEG$_{24}$CO-[N(PN)$_2$][Lys]$_8$[((α-NHCy5)$_1$(α-NHGlu-SN38)$_7$)(ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_8$]
78	BHA[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体)$_{1\text{-}4}$(α-NHCy5)$_1$(α-NH-COPEG$_9$-Val-Arg-PAB-P-

[0785]

	触发子-NHCO-CTX)$_{22}$) (α-NH$_2$)$_{5-8}$ (ε-NH-COPEG$_{1100}$)$_{32}$]
79	*纳米抗体（普通的）* GGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYENLYFQ**G** EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSC AASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRNNANN TLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQVTVSS
80	DBCO-Glu-NHPEG$_{24}$CO-NHPEG$_3$-TCO / DBCO-PEG$_{12}$-TCO
81	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)/TCO-PEG$_3$NH-COPE G$_{24}$NH-Glu-DBCO)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_6$)(ε-NH-COPEG$_{412}$)$_8$]，G3
82	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH -Glu-DBCO))$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_2$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_4$]，G2
83	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)/TCO-PEG$_3$NH-COPE G$_{24}$NH-Glu-DBCO)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_6$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_8$]，G3
84	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{14}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{16}$]，G4
85	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[Lys]$_{16}$[Lys]$_{32}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)/TCO-PE G$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{30}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{32}$]，G5
86	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$N H-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_2$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_4$]，G2 （使用“纳米抗体-N3-C 末端标签”）
87	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$N H-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体)$_{2-3}$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$))$_{0-1}$(ε-NHCOPEG$_{1000}$)$_4$]，G2 （使用“纳米抗体-N3-C 末端标签”）
88	BHALys[Lys]$_2$[Lys]$_4$[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPE G$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_6$)(ε-NH-COPEG$_{412}$)$_8$]，G3 （使用“纳米抗体-N3-C 末端标签”）
88a	BHA[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DB CO/N$_3$-纳米抗体)$_{2-4}$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{3-5}$)(ε-NH-COPEG$_{412}$)$_8$]，G3
89	BHA[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DB CO/N$_3$-纳米抗体)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_6$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_8$]，G3
89a	BHA[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DB CO/N$_3$-纳米抗体)$_{2-4}$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{3-5}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_8$]，G3，化合物 89a
90	BHA[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-D BCO/N$_3$-纳米抗体)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{14}$(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{16}$]，G4
91	BHA[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-D BCO/N$_3$-纳米抗体)$_{2-4}$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{11-13}$(ε-NHCOPEG$_{1000}$)$_{16}$]，G4
92	BHA[Lys]$_{32}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-D BCO/N$_3$-纳米抗体)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{30}$(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{32}$]，G5
93	BHA[Lys]$_{32}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-D BCO/N$_3$-纳米抗体)$_{2-4}$[α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO)]$_1$(α-NH$_2$)$_{27-29}$(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{32}$]，G5
94	BHA[Lys]$_4$[(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_3$)(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeT z))$_1$(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体)$_3$]，G2
94a	BHA[Lys]$_4$[(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_3$)(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeT z))$_2$)(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz))/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-

[0786]

	纳米抗体)$_2$]，G2，
95	BHA[Lys]$_4$[(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_3$)(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhMeTz)/TCO-PEG$_3$NH-COPEG$_{24}$NH-Glu-DBCO/N$_3$-纳米抗体)$_4$]，G2
96	DBCO-Glu-NHPEG$_{24}$CO-NHPEG$_3$-TCO / DBCO-PEG$_{12}$-TCO
97	BHA[Lys]$_4$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)/TCO-PEG$_8$-纳米抗体)$_1$(α-Lys(α-NHCy5)$_1$(ε-NHDFO)$_1$)$_1$(α-NH$_2$)$_2$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_4$]，G2
98	BHA[Lys]$_4$[((α-NH-COPEG$_{24}$-NH-COPEG$_4$(PhTzMe)/TCO-PEG$_3$-纳米抗体)$_{1-3}$(α-Lys(α-NHCy5)$_1$(ε-NHDFO)$_1$)$_1$(α-NH$_2$)$_{0-2}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_4$]，G2
99	BHA[Lys]$_4$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_{1-3}$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{0-2}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_4$]，G2
100	BHA[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_{1-4}$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{3-6}$)(ε-NH-COPEG$_{412}$)$_8$]，G3
101	BHA[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε -NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_6$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_8$]，G3
102	BHA[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_1$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{14}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{16}$]，G4
103	BHA[Lys]$_{32}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_{1-4}$(α-Lys(α-NHCy5)(ε-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_{27-30}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{32}$]，G5
104	纳米抗体-N3-C 末端标签/DBCO-DFO
105	BHA[Lys]$_4$[((α-Lys(α-NHCy5)(α-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_3$)(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)$_4$]，G2
106	BHA[Lys]$_4$[((α-Lys(α-NHCy5)(α-NHDFO))$_1$(α-NH$_2$)$_3$)(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)$_4$]，G2
107	BHA[Lys]$_4$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_1$(α-NH$_2$)$_3$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_4$]，G2
108	HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NHDFO)]
109	BHA[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_1$(α-NH$_2$)$_7$)(ε-NH-COPEG$_{412}$)$_8$]，G3
110	BHA[Lys]$_8$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_1$(α-NH$_2$)$_7$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_8$]，G3
111	BHA[Lys]$_{16}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_1$(α-NH$_2$)$_{15}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{16}$]，G4
112	BHA[Lys]$_{32}$[((α-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe))$_{1-4}$(α-NH$_2$)$_{28-31}$)(ε-NH-COPEG$_{1000}$)$_{32}$]，G5
113	BHA[Lys]$_4$[(α-NHBoc)$_4$(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)$_4$]，G2
114	BHA[Lys]$_4$[(α-NH$_2$.HCl)$_4$(ε-NH-COPEG$_{24}$NH-COPEG$_4$(PhTzMe)$_4$]，G2
115	HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NH$_2$)]
116	HO-Lys[(α-NHCy5)(ε-NHDFO)]楔形物

[0787] 实施例4:HER2靶向性树枝状体缀合物的合成

[0788] a)纳米抗体序列信息

[0789] 纳米抗体2D3序列化合物79

[0790] EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQVTVSS

[0791] 纳米抗体2D3 N末端标签、TEV、C末端叠氮化物(“N末端标签-纳米抗体-N3”)

[0792] GGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYENLYFQGEVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAA SGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQM NSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQVTVSS#

[0793] 纳米抗体2D3,具有C末端标签、TEV、叠氮化物(“纳米抗体-N3-C末端标签”)

[0794] EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEWVSSINWSGTH TDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQ GTQVTVSS#ENLYFQGHHHHHH

[0795] 其中#＝非天然氨基酸。

[0796] b)纳米抗体-N3表达质粒

[0797] 使用标准分子生物学技术将抗HER2纳米抗体克隆2D3的编码序列(US20110028695A1SEQ ID NO:1986)插入至表达质粒pET-His6-TEV-1B(Addgene plasmid 29653)中。合成大肠杆菌K12密码子优化的DNA序列,并且然后将其克隆至质粒pET-His6-TEV-1B中。

[0798] 为了将非天然氨基酸掺入至重组蛋白中,将琥珀终止密码子(TAG)框内插入在纳米抗体编码序列的最后位置处,之后接着是用于翻译终止的赭石终止密码子(TAA)或蛋白石终止密码子(TGA)。在使用C末端his6标签的情况下,将琥珀终止密码子(TAG)插入在纳米抗体编码序列的最后位置,并且然后将编码TEV蛋白酶裂解位点的序列和6his标签之后是用于翻译终止的赭石终止密码子(TAA)或蛋白石终止密码子(TGA)附加至该序列。

[0799] c)纳米抗体-N3的表达和纯化

[0800] 将抗HER2纳米抗体2D3表达在大肠杆菌菌株B95(DE3)(Mukai等人,Scientific Reports(2015),5,9699)中进行,将所述大肠杆菌菌株用纳米抗体表达质粒和正交对表达质粒pEVOL-pAcFRS.2.t1转化(Amiram等人,Nat.Biotechnol(2015),33(12)。在37℃下将细胞在容纳于带挡板摇瓶中的极品肉汤(25g/L胰蛋白胨、30g/L酵母和5g/L甘油、0.017M KH_2PO_4、0.072M K_2HPO_4)中培养,直到达到OD_{600} 0.7-1.0的细胞密度。通过添加1.5mM IPTG和0.05%w/v L-(+)-阿拉伯糖以及添加1.5mM对叠氮基-苯丙氨酸诱导重组蛋白表达,并且使其在25℃下进行20小时。通过离心收获细菌并且通过高压均化产生细胞裂解物,之后添加蛋白酶抑制剂混合物、溶菌酶和DNA酶处理。可以将不溶性物质溶解于重折叠缓冲液(6M盐酸胍、50mM NaH2PO4、300mM NaCl、20mM咪唑、pH 8)中。在通过高速离心澄清化和通过0.45μM膜过滤器过滤后,将his6标签化纳米抗体通过固定化金属亲和色谱(IMAC)使用装入镍的次氮基三乙酸琼脂糖纯化。通过以下方式实现柱上重折叠:首先用柱体积的3M盐酸胍、50mM NaH_2PO_4、300mM NaCl、20mM咪唑、pH 8;之后用两体积的50mM NaH_2PO_4、300mM NaCl、20mM咪唑、pH 8洗涤结合蛋白。将结合蛋白用2柱体积的50mM NaH_2PO_4、300mM NaCl、250mM咪唑、pH 8洗脱。在IMAC后,将纳米抗体-N3通过阴离子交换色谱使用HiTrap Q HP柱(GE Healthcare,目录17115301)进一步纯化。使用Tris缓冲液(20mM,pH 8)进行结合和洗涤步骤,并且使用0%至50%的1M NaCl缓冲液(1M NaCl、20mM Tris、pH 8)的梯度进行洗脱。使用Amicon 10k MWCO过滤器单元(Merck,目录UFC901008)将获得的相关纳米抗体级分缓冲液交换至20mM Tris(pH 8)中。

[0801] d)纳米抗体-N3-C末端标签与树枝状体的缀合

[0802] 根据针对化合物74和76所述的程序使用生物正交点击化学将纳米抗体-N3-C末端标签缀合至树枝状体化合物81-85以产生化合物86-95,不同的是使用了接头

[0803] DBCO-Glu-$NHPEG_{24}$CO-$NHPEG_3$-TCO(化合物51,点击化学工具)。

[0804] 针对化合物41至45运行凝胶,其显示出适当MW处的针对纳米抗体-树枝状体缀合物的条带。使用非还原十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)确认每种纳米抗体-树枝状体缀合物的纯度(图3)。在4%-15%聚丙烯酰胺凝胶(Bio-rad,目录4561086)上电泳分离后,当使用Typhoon生物分子成像仪(GE Healthcare)成像时,纳米抗体-树枝状体缀合物显现为大致对应于树枝状体加纳米抗体附加质量的大小的荧光条带。随后用考马斯亮蓝(CBB)染色显示出纳米抗体在相同位置处的存在。通过CBB没有显示出其他条带,这表

明未反应纳米抗体的存在和制剂纯度。

[0805] 实施例5亲和体-MMAE树枝状体与Erb2 ECD的SPR结合研究

[0806] ErbB2-ECD的直接固定化

[0807] 使用ProteOn XPR36仪器,将ErbB2-ECD在25℃下固定化至GLC传感器芯片表面(Bio-Rad)上,使用HBS-P+运行缓冲液(10mM HEPES、pH 7.4、150mM NaCl、0.05％ Tween20)。将Bio-Rad的胺偶联试剂盒中所述的标准胺偶联方法用于该固定化。用EDC(0.5mM)和磺基-NHS(0.125mM)的50:50混合物活化泳道1。将ErbB2蛋白在10mM乙酸钠(pH 5.0)中稀释至2mg/mL,并且注射在活化表面通道上。用1M乙醇胺-HCl(pH 8.5)封闭任何剩余的活化位点。观察到大约590RU(1RU＝1pg蛋白质/mm^2)的平均响应水平下的蛋白质偶联。

[0808] SPR实验分析

[0809] 所有SPR结合实验在25℃下使用HBS-EP+/BSA(10mM HEPES、pH 7.4、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05％ Tween20、0.1mg/ml BSA)作为仪器运行缓冲液(RB)进行。在固定化程序后,将各种浓度的抗ErbB2亲和体及其MMAE-树枝状体缀合物以60μl/min注射在固定化ErbB2蛋白上,并且监测其缔合持续90秒。随后将运行缓冲液注射在结合Ab-ErbB2复合物上,并且监测解离长达60min。Herceptin和亲和体对照在适度的时间框(≤60min)内未能与运行缓冲液中的芯表面解离。所有结合测量以一式三份进行。

[0810] SPR数据处理和分析

[0811] 使用Scrubber-Pro软件(www.biologic.com.au)处理收集的实验数据。通过将每组实验数据拟合至Langmuir 1:1结合模型来推导动力学参数(ka＝缔合速率常数并且kd＝解离速率常数)和平衡解离常数(K_D＝k_d/k_a)。将所有结合参数报告为平均值+/-标准偏差。

[0812] SPR结果

[0813] 亲和体-MMAE-树枝状体缀合物以产生经典动力学结合谱的过程特异性结合ErbB2蛋白。随后使用剂量应答方法进行亲和体-MMAE-树枝状体缀合物的动力学结合分析。从SPR传感图推导的动力学速率和亲和力参数汇总于下面。需注意,亲和体是二聚体,并且因此其结合常数低于将对于树枝状体缀合物中使用的单体亲和体观察到的结合常数。对于化合物20和21未观察到结合。结果清楚指示了亲和体-树枝状体靶标的纳摩尔特异性结合,但相比于天然亲和体以减少量。

[0814] 表2SPR结合研究

[0815]

	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)x10^4	k_d (s^{-1})x10^{-4}	K_D
Herceptin	230 ± 10	0.1 ± 0.0	4.3 ± 0.1（pM）
亲和体	190 ± 30	5.1 ± 0.2	266 ± 46（pM）
化合物 26（亲和体-MMAE-PEG 1100）	2.5 ± 0.2	13.0 ± 00.1	50 ± 5（nM）
化合物 27（亲和体-MMAE-PEG 2000）	3.2 ± 0.2	11.4 ± 00.3	36 ± 3（nM）
化合物 20（G3-MMAE-PEG 1100）	-	-	-
化合物 21（G3-MMAE-PEG 2000）	-	-	-

[0816] 实施例6亲和体-MMAE树枝状体的细胞生长抑制(SRB测定)

[0817] 在72小时后针对各种癌症细胞系使用磺酰罗丹明B(SRB)测定[Voigt W."Sulforhodamine B assay and chemosensitivity"Methods Mol.Med.2005,110,39-48.]确定$HER2^-$(ES2)和$HER2^+$(SKOV3)细胞系的细胞生长抑制,其中每个实验以一式两份运行。GI50是根据NCI标准方案将总细胞生长抑制50%所需的浓度。

[0818] 将所有化合物基于等同药物负载量测试。结构显示,PEG 1100靶向性树枝状体缀合物在抑制细胞生长方面比具有PEG 2000表面的树枝状体更有效。在该测定中单独亲和体在HER2+或HER2-细胞系中无效。

[0819] 表3$HER2^-$(ES2)和$HER2^+$(SKOV3)细胞的细胞生长抑制

[0820]

测试的化合物	使用的溶剂	ES2 细胞系	SKOV3 细胞系
		GI_{50}（nM）	GI_{50}（nM）
MMAE	DMSO	<5、2	<5、0.6
MMAE-Cit-Val-PAB	DMSO	320、>500	201、330
亲和体	PBS	>500、>500	>500、>500
化合物 26	PBS	248、250	4、5
化合物 27	PBS	>100	>500

[0821] 实施例7亲和体-MMAE树枝状体在体内的耐受性

[0822] 每周一次向各组小鼠施用树枝状体(在PBS中的0.1-0.3ml溶液)的静脉内注射,持续3周(第1、8和15天)。每日称重小鼠并且观察毒性的征象。在最终药物剂量后监测动物长达10天。立即处死超过伦理终点(≥20%体重减轻,总体健康状况差)的任何小鼠,并且记录观察结果。

[0823] 1mg/kg下的化合物26在裸SCID小鼠和balb/c小鼠两者中均耐受良好,其中没有动物因健康状况差而需要被处死。

[0824] 实施例8:缀合物的体外功效

[0825] 使用的细胞系的描述:

[0826]

细胞系	癌症类型	Her2 状态	报告的 Her2 受体密度/细胞	EGFR（Her1）密度	Her 3 状态
MDA-MB-231	乳腺	1+		200,000	**低/中等**
SKOV-3	卵巢	2+/3+	3-700,000	50,000	**低**
SK-BR-3	乳腺	3+	~1,500,000		**中等**
NCI-N87	胃	3+	~1,300,000		**低**
OE19	食管	3+	>1,000,000		

[0827] GI_{50}结果:

[0828] 使用MTT测定评价Herceptin®、Kadcyla®、拉帕替尼、化合物36(对照)和2D3纳米抗体靶向性树枝状体(化合物41)对MDA-MB-231、SKOV-3、SK-Br-3、NCI-N87和OE-19细胞的细胞毒性。将细胞以5x 103的密度接种于96孔板中并且孵育过夜。然后将细胞用测试组合

物的1对数单位连续稀释液处理72h(对Herceptin为六天)。在孵育的最终2h期间添加10％培养基体积的MTT(噻唑基蓝四唑鎓溴化物(Merck,目录号M5655,5mg/ml无菌溶液)。MTT在活细胞中的还原产生不溶性紫色甲瓒代谢物。孵育2h后,将所有培养基从测定板移除,添加100μl DMSO并且对板立即读取570nm下的吸光度。GI_{50}定义为将细胞生长/增殖抑制50％的浓度。在GraphPad Prism 7.02中通过4参数非线性曲线拟合从空白校正剂量-应答曲线确定细胞活力和随后的GI_{50}值。结果证明,本公开的示例性缀合物特别是针对过表达HER2的细胞系(诸如SK-BR-3、NCI-N87和OE19)具有有效细胞毒性作用。

[0829] IC 50结果

[0830]

	Herceptin (=3)	Kadcyla* (=3)	拉帕替尼 (=2)	化合物 41 (=2)	化合物 36 (=2)
	生长抑制%	GI_{50} nM	GI_{50} nM	GI_{50} nM	GI_{50} nM
MDA-MB-231	**1.7**	**22.9**	**112,000**	**172**	**12,470**
SKOV-3	**10**	**50.7**	**7,200**	**13.1**	**1600**
SK-BR-3	**51**	**0.04**	**138**	**0.83**	**948**
NCI-N87	**52**	**0.10**	**8.1**	**0.61**	**2040**
OE19	**62**	**0.06**	**200**	**1.67**	**6120**

[0831] *基于估计重量ADC;#基于MMAE药物当量

[0832] 用于成对高/低HER2细胞系的HER2+MDA-MB-231乳腺癌细胞系的产生

[0833] 根据制造商的说明书使用Lipofectamine 3000将MDA-MB-231乳腺癌细胞用质粒HER2WT(Addgene,16257)转染。在500ug/ml遗传霉素(Thermo Fisher,目录10131035)的存在下传代之后,将具有HER2 WT的稳定过表达的细胞通过荧光活化单细胞分选使用MoFlo Astrios(Beckman Coulter)分离。将从该过程分离的克隆性细胞群体在遗传霉素中进一步传代,然后针对转基因表达进行第二轮细胞分选和筛选。然后将选择的克隆进一步扩增,并且将该细胞系(也称为MDA-MB-231/HER2)的储备液冷冻保存以产生稳定转导细胞的主储备液。

[0834] IC50产生低/高表达MDA-MB-231模型:

[0835] 经由alamarBlue测定评价化合物36(对照)和化合物41(靶向性)对MDA-MB-231和MDA-MB-231/HER2转染细胞的细胞毒性。将细胞以5x 10^3的密度接种于96孔板中并且孵育过夜。然后将细胞用指定浓度的测试组合物处理48h。在孵育的最终4h期间添加alamarBlue(Thermo Fisher,DAL1025)。alamarBlue在活细胞中的还原产生可以在读板仪(560nm激发/610nm发射)上读取的红色荧光代谢物。在GraphPad Prism 7.02中通过4参数非线性曲线拟合、可变斜率(四参数)从空白校正剂量-应答曲线确定细胞活力和随后的IC_{50}。下表示出了化合物36(对照)和化合物41(靶向性)与MDA-MB-231和MDA-MB-231/HER2细胞的IC_{50}值。MDA-MB-231/HER2关于化合物36(对照)和化合物41(靶向性)的IC_{50}值分别为2.842μM和13.55nM。相比于化合物36(对照),化合物41(靶向性)在MDA-MB-231/HER2细胞生长抑制方面是大约140倍增加。

[0836] 下文提供了在不同MMAE浓度下,化合物36(对照)对MDA-MB-231和MDA-MB-231/HER2的剂量应答曲线和IC_{50}值。值是平均值±标准偏差(sd;n＝4):

[0837]

	化合物36（*细胞活力%*）	
MMAE浓度（*M*）	MDA-MB-231	MDA-MB-231/HER2
5×10^{-5}	81.1 ± 5.4	49.9 ± 15.0
1×10^{-5}	94.2 ± 12.1	61.6 ± 3.1
1×10^{-6}	94.4 ± 8.2	78.2 ± 9.1
1×10^{-7}	94.2 ± 12.5	96.1 ± 3.6
1×10^{-8}	96.6 ± 11.7	95.4 ± 7.6
IC_{50}	不确定	2.842 μM

[0838] 在不同MMAE浓度下,化合物41(靶向性)对MDA-MB-231和MDA-MB-231/HER2的剂量应答曲线和IC_{50}值。值是平均值±标准偏差(sd;n=4):

[0839]

	化合物41（*细胞活力%*）	
MMAE浓度（*M*）	MDA-MB-231	MDA-MB-231/HER2
1×10^{-6}	-	5.25 ± 1.24
1×10^{-7}	-	10.9 ± 2.4
2.5×10^{-8}	49.7 ± 2.7	27.4 ± 1.3
1×10^{-8}	67.2 ± 3.0	57.8 ± 2.3
1×10^{-9}	81.0 ± 1.8	80.0 ± 3.3
1×10^{-10}	87.6 ± 4.2	91.1 ± 2.5
1×10^{-11}	96.1 ± 5.6	90.0 ± 3.0
IC_{50}	不确定	13.55 nM

[0840] 实施例9:2D3-树枝状体缀合物与HER2+细胞的结合

[0841] 使用用花菁5(Cy5)标记的不同大小的纳米抗体-树枝状体缀合物,化合物42、43和44来相对于非靶向性化合物37、38和39(G3、G4和G5)展示与HER2+人细胞系的结合。在37℃下在5% CO_2加湿气氛下将HER2表达人转移性癌细胞系MDA-MB-453(ATCC HTB-131)和HER2阴性上皮腺癌细胞系MDA-MB-231(ATCC HTB-26)维持在含有10% FBS和青霉素-链霉素(100U/mL)的杜尔贝科氏改良伊格尔培养基(DMEM)中,并且在汇合前使用胰蛋白酶继代培养。在37℃下在5% CO_2加湿气氛下将人腺癌细胞系SKOV-3(ATCC®HTB-77)细胞维持在添加有10%(v/v)FBS和青霉素-链霉素(100U/mL)的RPMI培养基中,并且在汇合前继代培养。

[0842] 为了通过荧光显微镜术测量细胞缔合,将细胞以$1x\ 10^5$个细胞/孔接种于8孔腔室玻片中,并且使其附着过夜。第二天,将未缀合的树枝状体化合物37、38和39(对照)或纳米抗体树枝状体化合物42、43和44添加至培养基至最终浓度为0.5ug/ml,并且在冰上孵育1小时。将细胞染色以可视化质膜(麦胚凝集素-alexa fluor 488)和核(Hoechst 33342)。将细胞用400ul补充有10% FBS的冷却Fluorobrite培养基洗涤三次。将细胞使用Olympus IX83显微镜成像,所述显微镜具有40×0.9NA空气物镜,所述物镜具有标准"Pinkel"DAPI/FITC/CY5滤光片组。

[0843] 为了通过流式细胞术测量细胞缔合,将悬浮细胞以$1x\ 10^5$个细胞/孔添加至96孔测定板。在冰上与纳米抗体-树枝状体或未缀合的树枝状体孵育1小时后,将细胞用200ul含有10%FBS的DMEM洗涤三次以移除未结合的树枝状体。然后将细胞重悬于补充有10% FBS的冷却Fluorobrite培养基中,并且使用642nm激发和661-691nm之间收集的发射测量Cy5荧光。为了测量内化动力学,在37℃下将纳米抗体-树枝状体与细胞一起孵育24、4、1、0.5和0.1小时,然后通过洗涤移除未结合的纳米抗体-树枝状体并且通过流式细胞术分析。

[0844] 体外缔合研究

[0845] 在37℃下在5％ CO_2加湿气氛中将MDA-MB-231、MDA-MB-231/HER2(HER2敲入)(如上所述)或SKOV-3细胞接种于24孔板(1×10^5个细胞/孔)中的500μL添加有10％(v/v)胎牛血清(FBS)的适当生长培养基中,并且与3.33nM下的化合物36或41一起孵育,其中孵育时间从1至24h变化。在孵育后,通过用DPBS轻轻洗涤三次(300μL/孔)来从粘附细胞移除非结合/非缔合颗粒。通过在室温下用无酚红TrypLE™ Express酶(1X)(150μL/孔)处理5-10min来从板移除细胞。然后将板放置于冰上。然后通过采集来自Cy5的信号通过流式细胞术确定样品的细胞结合和缔合。

[0846] 流式细胞术:

[0847] 结果显示,纳米抗体-树枝状体化合物42、43和44结合HER2阳性MDA-MB-453细胞。未缀合的树枝状体化合物37、38和39未结合MDA-MB-453细胞。所示的数据是一式三份孔中处理的细胞的平均MFI,具有标准偏差。将ANOVA和Dunnett多重比较检验用于统计分析。

[0848] 与树枝状体一起孵育的细胞的平均荧光强度(Cy5):

[0849]

测试的化合物	MFI	ANOVA
仅细胞	3.047±0.02	-
37	3.097±0.01	NS
38	6.827±0.07	NS
39	4.349±0.08	NS
42	50.83±14.98	<0.0001
43	158.4±6.611	<0.0001
44	176.9±4.041	<0.0001

[0850] 流式细胞术结果

[0851] 结果清楚地指示在24h内化合物36(对照)对所有三种细胞系的最小结合。化合物41(靶向性)显示出与细胞系的HER2受体表达水平相关的增加结合。到24h,流式细胞术显示与用化合物36处理的细胞(16.05±1.89)相比,用化合物41处理的MDA-MB-231/HER2细胞(146.1±9.6)显示出强大约9倍的荧光。另外,与用化合物36处理的细胞(16.4±6.86)相比,用化合物41处理的SKOV-3细胞(277.5±5.9)显示出强大约16倍的荧光。结果示出于图4中。

[0852] 树枝状体大小G3至G5:

[0853] 测试另外的树枝状体代:分别未缀合至和缀合至2D3的化合物37和42(G3)、化合物38和43(G4)以及化合物39和44(G5)。未缀合的对照树枝状体化合物37、38和39具有显著更低的与MDA-MB-231(HER2阴性)和MDA-MB-231/HER2(HER2阳性)的缔合。2D3缀合的树枝状体42、43和44在24h内具有显著的与MDA-MB-231/HER2的缔合,其中化合物44(G5)具有最高百分比的细胞缔合(73.47％±0.92),第二是化合物42(G3,60.73±0.21)和化合物43(G4,56.27±1.02)。无论树枝状体代如何,与树枝状体缀合的2D3 HER2-纳米抗体大幅度改善对过表达HER2受体的细胞的结合。

[0854] 在24h内化合物42(G3)、化合物43(G4)和化合物44(G5)与MDA-MB-231和MDA-MB-231/HER2细胞的细胞缔合百分比值。值是平均值±标准偏差(SD;n=3):

[0855]

MDA-MB-231/HER2							
时间（*h*）	化合物42	化合物43	化合物44	化合物86	化合物89	化合物90	化合物92
0.25	0.67±0.12	0.57±0.12	0.43±0.40	-	-	-	-
0.5	0.60±0.0	0.67±0.15	0.70±0.10	189.7±9.074	218.3±16.5	157.3±7.02	165.3±31.5
0.75	-	-	-	-	-	-	-
1	2.57±0.64	0.77±0.15	2.80±0.61	-	-	-	-
2	17.43±4.	6.13±2.60	17.97±2.2	-	-	-	-
	15		0				
4	50.63±0.15	36.03±2.36	59.77±4.13	-	-	-	-
24	60.73±0.21	56.27±1.02	73.47±0.92	-	-	-	-

MDA-MB-231/HER2						
时间（*h*）	化合物97	化合物98	化合物82	化合物83	化合物84	化合物185
0.25	-	-	-	-	-	-
0.5	-	-	14.83±1.60	43.23±3.48	16.7±2.48	25.6±0.43
0.75	14.97 ± 0.7	82.5	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-

[0856]

MDA-MB-231							
时间（*h*）	化合物42	化合物43	化合物44	化合物86	化合物89	化合物90	化合物92
0.25	1.07±0.38	0.87±0.25	0.53±0.50	-	-	-	-
0.5	0.87±0.12	0.53±0.15	1.03±0.32	30.77±0.50	25.07±3.91	20.03±2.73	17.47±1.62
0.75	-	-	-	-	-	-	-
1	0.80±0.20	1.00±0.44	1.37±0.59	-	-	-	-
2	1.13±0.21	0.77±0.31	0.73±0.49	-	-	-	-
4	0.93±0.45	0.83±0.21	0.67±0.25	-	-	-	-
24	0.83±0.06	0.87±0.06	0.80±0.10	-	-	-	-

MDA-MB-231						
时间（*h*）	化合物97	化合物98	化合物82	化合物83	化合物84	化合物85
0.25	-	-	-	-	-	-
0.5	-	-	23.3±3.98	42.8±2.78	20.23±0.63	33.23±2.2
0.75	13.36 ± 2.82	0.15 ± 0.07				
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-

[0857]

4	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-

[0858] 在24h内化合物37(G3)、化合物38(G4)和化合物39(G5)与MDA-MB-231和MDA-MB-231/HER2细胞的细胞缔合百分比值。值是平均值±标准偏差(SD;n=3):

[0859]

	MDA-MB-231/HER2		
时间(*h*)	化合物 37	化合物 38	化合物 39
1	2.47 ± 0.81	0.90 ± 0.35	1.07 ± 0.35
2	1.00 ± 0.26	0.50 ± 0.10	0.83 ± 0.31
4	1.07 ± 0.64	0.50 ± 0.35	0.47 ± 0.21
24	0.60 ± 0.17	0.37 ± 0.15	0.53 ± 0.49
	MDA-MB-231		
时间(*h*)	化合物 37	化合物 38	化合物 39
1	1.10 ± 0.35	0.80 ± 0.10	0.97 ± 0.12
2	1.23 ± 0.47	0.77 ± 0.06	1.07 ± 0.21
4	0.83 ± 0.15	0.60 ± 0.10	0.87 ± 0.15
24	0.73 ± 0.06	0.60 ± 0.17	0.57 ± 0.06

[0860] 在24h内化合物42(G3)、化合物43(G4)和化合物44(G5)与MDA-MB-231和MDA-MB-231/HER2细胞的平均荧光强度值。值是平均值±标准偏差(SD;n=3):

	MDA-MB-231		
时间(h)	2D3-化合物42	2D3-化合物43	2D3-化合物44
0.25	245.7 ± 17.5	227.3 ± 14.0	194.7 ± 95.8
0.5	228.0 ± 4.6	222.7 ± 2.1	245.0 ± 4.0
1	237.0 ± 9.2	229.7 ± 6.4	253.7 ± 12.9
2	241.0 ± 18.2	235.7 ± 4.0	233.3 ± 9.7
4	250.0 ± 5.8	246.3 ± 5.5	247.0 ± 10.6
24	224.3 ± 5.1	219.0 ± 4.6	223.0 ± 4.4

[0861]

	MDA-MB-231/HER2		
时间(h)	2D3-化合物42	2D3-化合物43	2D3-化合物44
0.25	235.0 ± 7.0	215.3 ± 14.0	207.0 ± 51.6
0.5	226.3 ± 8.7	224.3 ± 2.9	237.0 ± 9.5
1	294.3 ± 15.6	241.0 ± 11.5	295.0 ± 4.0
2	445.0 ± 33.2	342.3 ± 22.2	435.7 ± 16.3
4	799.7 ± 18.0	611.3 ± 35.2	1,038 ± 127.6
24	1,110 ± 27.8	1,012 ± 45.6	2,749 ± 88.1

[0862] 在24h内化合物37(G3)、化合物38(G4)和化合物39(G5)与MDA-MB-231和MDA-MB-231/HER2细胞的平均荧光强度值。值是平均值±标准偏差(SD;n=3):

[0863]

	MDA-MB-231/HER2		
时间（h）	化合物 37	化合物 38	化合物 39
1	293.0 ± 8.5	269.0 ± 19.8	257.5 ± 12.0
2	268.0 ± 11.3	225.0 ± 5.7	249.0 ± 15.6
4	241.5 ± 17.7	198.0 ± 2.8	207.0 ± 2.8
24	206.0 ± 2.8	175.5 ± 0.7	207.5 ± 40.3

[0864]

	MDA-MB-231		
时间（h）	化合物 37	化合物 38	化合物 39
1	258.3 ± 19.6	239.3 ± 1.2	252.0 ± 6.0
2	256.7 ± 24.8	230.7 ± 2.3	249.0 ± 8.7
4	221.3 ± 3.5	217.3 ± 3.2	247.3 ± 7.2
24	215.3 ± 4.9	195.7 ± 0.6	196.3 ± 3.1

[0865] 缀合物的流式细胞术结果示出于图5中。

[0866] 实施例10:证明缀合物内化至HER2过表达细胞中的研究

[0867] 共聚焦细胞摄入

[0868] 将MDA-MB-231、MDA-MB-231/HER2和SKOV-3细胞以1.0×10^4个细胞/孔铺板至μ-玻片8孔腔室盖玻片(ibidi)中,并且使其在37℃、5% CO_2下附着过夜。然后添加化合物36和41(3.33nM),并且使其孵育1、3、6和24小时。将细胞洗涤并且然后在室温下用1%多聚甲醛固定20min。在室温下将细胞膜用在DPBS中的Alexa Fluor 488-麦胚凝集素(AF488-WGA,5μg mL^{-1})染色10min。在室温下将细胞核用在DPBS中的4′,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI,2μg mL^{-1})复染10min。使用共聚焦显微镜(Leica SP8)收集荧光图像和光学切面。用Fiji(Image J 1.52n)处理图像。

[0869] 共聚焦显微镜图像示出于图6至8中。共聚焦图像显示出在24h孵育后少量图6a)化合物36和图6b)41与MDA-MB-231缔合。然而,靶向性化合物41在24h孵育后被MDA-MB-231/HER2和SKOV-3细胞内化(图7a和8a),化合物36并非如此(图7b和8b)。

[0870] 实施例11氚标记的MMAE缀合的树枝状体(化合物40和45)的肿瘤分布

[0871] 将MDA-MB-231/HER2细胞(5x 10^6个细胞,在50μL PBS:Matrigel中)皮下移植至雌性NOD/SCID小鼠(5-7周龄)的第4乳腺脂肪垫中。使实体肿瘤生长至100mm^3(大约3-4周)。将小鼠分为两个不同组,每组中由六只小鼠组成。然后在异氟烷镇定下经由尾静脉注射化合物40(对照组)或化合物45(靶向性组)(0.5μCi,在100μL中,PBS pH 7)。48h后用异氟烷麻醉小鼠,并且紧临颈椎脱位前经由心脏穿刺收集血液。随后取出选择的器官(包括肿瘤、肝脏、脾脏、肾脏、胰腺、肺、心脏和脑),称重并且针对氚(^3H)生物分布进行处理。

[0872] 结果示出于图9中。与未缀合的对照化合物40(1.88%剂量/g±0.28)相比,靶向性树枝状体化合物45在HER2阳性肿瘤中在更大程度上累积(3.53%剂量/g±0.43),这等同于肿瘤摄入的大约80%的增加($p<0.05$)。血液浓度的差异在靶向性树枝状体与对照树枝状体之间不显著,分别为4.52%剂量/g±0.24和3.69%剂量/g±0.31。由于药代动力学的差异不太可能影响肿瘤保留,因此2D3 HER2-纳米抗体靶向改善树枝状体保留。

[0873] 实施例12Cy5标记的MMAE缀合的树枝状体(化合物36和41)在SKOV3肿瘤模型中的

功效和肿瘤摄入的共聚焦成像

[0874] 在侧腹上向雌性NOD SCID小鼠(年龄8周)皮下接种在PBS:Matrigel(1:1)中的3x 10^6个SKOV3细胞。使实体肿瘤生长至200mm^3(大约3周)。将小鼠分为两个不同组,然后在异氟烷镇定下经由尾静脉注射化合物36(对照组)或化合物41(靶向性组)(0.5mg/kg MMAE当量,在250μL中,PBS pH 7)、Kadcyla®(40mg/kg)和Herceptin®(40mg/kg)。

[0875] (a)共聚焦成像

[0876] 48h后用异氟烷麻醉小鼠,并且紧临颈椎脱位前经由心脏穿刺收集血液(n=2/组)。随后取出肿瘤,将其在4%多聚甲醛中固定过夜,在PBS中洗涤并且包埋在琼脂糖中。然后将肿瘤振动切片机切片至100μm,其中将切片针对核(DAPI,浓度,时间,供应商)和血管(CD31,浓度,时间,供应商)进行染色。使用共聚焦显微镜(Leica SP8)收集荧光图像和光学切面。结果示出于图10和图11中。靶向性树枝状体(化合物41)显示出在肿瘤的核心和外周区域中的摄入,化合物36并未如此。

[0877] (b)缀合物的功效

[0878] 以定期间隔获取肿瘤测量(n=6/组),直到满足伦理终点。将结果示出于图12(平均肿瘤体积随时间的图)、图13(存活期随时间的图)和图14(平均重量变化随时间的图)中。与化合物36、Herceptin®和Kadcyla®相比,靶向性树枝状体化合物41显示出完全的肿瘤消退。

[0879] 实施例13.在MDA-MB-231/HER2+细胞系中4代多个纳米抗体树枝状体内化的动力学

[0880] 使用与1个(单一纳米抗体)或2至4个(多个纳米抗体)抗HER2 2D3纳米抗体缀合的具有铁载体衍生的螯合剂去铁胺(DFO)的4代、Cy5标记的纳米抗体-树枝状体缀合物,如上文所述分离的化合物90和91来比较在每个树枝状体附接不同纳米抗体数的情况下与HER2+人细胞系的结合。

[0881] 在37℃下在5% CO_2加湿气氛下将具有HER2敲入的上皮腺癌细胞系MDA-MB-231/HER2(如上所述)维持在含有10% FBS和青霉素-链霉素(100U mL^{-1})的杜尔贝科氏改良伊格尔培养基(DMEM)中。

[0882] 为了通过流式细胞术测量细胞结合,将20,000个细胞/孔过夜铺板至96孔培养板中的补充有10% FBS的DMEM培养基中。将单一或多个纳米抗体树枝状体以3、6、12和30nM添加至细胞,并且在37C下孵育0.5、1、2、4和6小时。将以相同方式制备的对照细胞预冷却并且在冰上与30nM单一和多个纳米抗体树枝状体一起孵育6小时。

[0883] 在与纳米抗体缀合的树枝状体细胞一起孵育后,将细胞用补充有1%牛血清白蛋白的冰冷PBS洗涤三次以移除未结合的树枝状体,并且使用无酚红TrypLE™ Express酶(1X)(Gibco,12604013)从板释放。将细胞重悬于冷却的DPBS中以用于通过流式细胞术(Stratedigm S1000EON,California)进行分析,其中通过采集来自Cy5的信号测量树枝状体的存在。为了估计每个浓度和时间点下内化树枝状体的量,将在冰上与树枝状体一起孵育的细胞的Cy5信号视为假设没有内化情况下的最大表面结合树枝状体。将该信号从在37C下孵育的细胞中测量的信号(其表示表面结合和内化树枝状体)中减去,以分离仅来自内化树枝状体的信号(参见图15)。

[0884] 在低浓度下,与单一(化合物90)情况下的相比,多个(化合物91)缀合的抗HER2纳

米抗体树枝状体更快内化。在更高浓度下,化合物90在约2小时后显示出比化合物91更高的内化水平。

[0885] 实施例14.具有单一和多个纳米抗体的缀合物在HER2高细胞系中的共聚焦成像

[0886] 将HER2高SKOV-3细胞以1.0×10^4个细胞/孔铺板至μ-玻片8孔腔室盖玻片(ibidi)中,并且使其在37℃、5% CO_2下附着过夜。然后添加化合物91(多个2D3-树枝状体缀合物)和化合物90(单一2D3-树枝状体缀合物)(3.33nM),并且使其孵育1、3、6和24小时。将细胞用DPBS洗涤并且然后在室温下用1%多聚甲醛固定20min。在室温下将细胞膜用在DPBS中的麦胚凝集素的Alexa Fluor488®缀合物(AF488-WGA,5μg mL^{-1})染色10min。在室温下将细胞核用在PBS中的Hoechst 33342(2μg mL^{-1})复染10min。使用共聚焦显微镜(Leica SP8)收集荧光图像和光学切面。用Fiji(ImageJ 1.52p)处理图像。

[0887] 共聚焦显微镜图像示出于图16和17中。在孵育24h后,化合物90和91两者在SKOV-3细胞的情况下均结合并内化。值得注意地,与化合物90相比,化合物91在3和6h时间点时显示出更大程度的结合和内化。

[0888] 在该浓度下多个(化合物91)缀合的抗HER2纳米抗体G4树枝状体比单一纳米抗体G4树枝状体(化合物90)更快内化,并且差异可以看到至6小时,但到24小时,它们未显现不同。

[0889] 实施例15.用靶向性含Zr放射性核素树枝状体-SKOV3乳腺癌异种移植物的成像研究

[0890] 研究了89Zr标记的HER2靶向性和非靶向性树枝状体构建体在卵巢癌的SKOV3鼠类异种移植物模型中的累积。通过PET-CT测量生物分布直至注射后9天,并且在第2天和第9天(在可用的情况下)通过离体γ闪烁成像切除器官进行验证。本研究分3部分进行。

[0891] 肿瘤引发和生长

[0892] 将5x 10^6个SKOV3细胞(在50μL 50:50matrigel:PBS中)SC注射至健康雌性NOD-SCID(约20g)8周龄小鼠的右侧腹中。在注射成像化合物前,使肿瘤生长4周。

[0893] 在成像时,所有肿瘤均是可触及的,在成像实验时具有约3-5mm的大小。

[0894] 研究化合物

[0895] 将下表中的化合物如下所述标记。

[0896] 表.研究化合物

[0897]

化合物编号	非靶向性	化合物编号	靶向性
		104	DFO-NB
99	BHA-G2-PEG_{1000}	86	BHA-G2-PEG_{1000}+NB
		86	BHA-G3-PEG_{1000}+NB + 赖氨酸预负载对照
100	BHA-G3-PEG_{412}	88	BHA-G3-PEG_{412}+NB
101	BHA-G3-PEG_{1000}	89	BHA-G3-PEG_{1000}+NB
102	BHA-G4-PEG_{1000}	90	BHA-G4-PEG_{1000}+NB
102	BHA-G4-PEG_{1000}	90	BHA-G4-PEG_{1000}+NB
103	BHA-G5-PEG_{1000}	92	BHA-G5-PEG_{1000}+NB

[0898] #=重复

[0899] 用Zr-89放射标记研究化合物和放射TLC分析

[0900] 在37℃下将所有构建体(根据需要预处理以移除铁:

[0901] http://jnm.snmjournals.org/content/44/8/1271.long)与在0.1M pH 7.4HEPES缓冲液中的对于树枝状体过量(关于过量参见表1)的^{89}Zr一起孵育45分钟。获取每种溶液的样品并且将其与50mM DTPA1:1混合。将5uL的每种溶液点样在TLC纸(用硅胶浸渍的Agilent iTLC-SG玻璃微纤维色谱纸)上,并且用50:50$H_2$0:乙醇运行。然后在Eckert&Ziegler微型扫描和流式计数iTLC阅读器上成像板。必要时,通过根据制造商方案使用7K MWCO Zeba旋转柱(Thermo Scientific)进行纯化来移除未结合的锆。所有样品均显示出>95%标记。为了质量控制,进行对照实验以监测游离^{89}Zr和与DTPA结合的^{89}Zr的洗脱行为,并且也在具有和不具有DTPA的情况下运行样品以检查用^{89}Zr标记的任何未结合的螯合剂。在图18中示出了代表性放射TLC图像,其显示所有^{89}Zr与树枝状体结合并且没有游离^{89}Zr。下面包括了放射TLC:

[0902]

标识符	面积	峰值%	Max. mm	起 始 mm	结 束 mm	最大值	总计%	Rf	质 心 mm
化合物	55460	97.76	120	96	140	5815	33.5	0.61	118.44
Zr89	1272	2.24	156	148	168	318	77	0.81	156.1

[0903] 研究注射细节

[0904] 对于体内成像实验,将研究化合物以100uL经由尾静脉(29G针头;大约1.5至3.5MBq)注射至两只小鼠中,以监测各种时间点下的肿瘤累积和生物分布。通过γ计数进行离体定量,以确定注射后9天的器官分布。对于生物分布实验,将构建体注射至两只小鼠中以通过γ计数监测注射后48h时的离体肿瘤累积和生物分布。

[0905] 结果

[0906] PET-CT成像

[0907] 使用30-90分钟静态采集获取注射后4h、24h、48h、5d、7d和9d时的图像。使用有序子集预期最大化(OSEM2D)算法重建PET图像并且使用Inveon研究工作场所软件(IRW 4.1)(Siemens)进行分析,这允许CT和PET图像的融合和感兴趣区域(ROI)的定义。使用IRW软件(Siemens)比对每只单独动物的CT和PET数据集,以确保感兴趣器官的良好重叠。使用通过扫描填充有已知活性的89Zr的圆柱形体模而获得的转换因子来将活性/体素转换为nci/cc以考虑PET扫描仪效率。然后将活性浓度表示为衰减校正的注射活性百分比/cm^{3}组织,其可以近似为注射剂量百分比/g(%ID/g)。将结果在图19中示出为对于化合物89、90和92,在9天内在(a)肾脏、(b)肝脏和(c)肿瘤中注射锆剂量百分比/克的图。代表性PET图像示出于图20中。放射标记缀合物的代表性最大强度投影。所有PET数据表示为贝可/体素(cm3)并且已经阈值处理以突出显示肿瘤摄入。

[0908] 在注射后2天和9天,取出器官并且通过离体γ分析定量信号强度并且进行成像。此外,在48小时时选出n=2只/队列并且通过γ分析评价生物分布。离体生物分布结果示出于图21的表中,其提供了在第2天和第9天时注射剂量/g的离体信号的肿瘤:器官比率。

[0909] 结果显示出靶向性相比于非靶向性的更高肿瘤:血液比率,特别是在第2天在化合物88中(小G3树枝体)。到第9天,靶向性相比于非靶向性的肿瘤:血液比率更佳,并且特别是对于化合物90和92(较大的G4和G5树枝状体)。

[0910] 离体肿瘤和器官中注射Zr剂量百分比/克也示出于图22的表中。

[0911] 结果显示出靶向性相比于非靶向性的更高肿瘤中信号,特别是在2天对于化合物

90和92(更大的G4和G5树枝状体)以及在第9天对于化合物89(G3树枝状体)。

[0912] 结论

[0913] 1.树枝状体越大,肿瘤累积越佳。2D3显示出快速的清除和低累积。

[0914] 2.相比于非靶向性树枝状体,靶向性疗法导致更高的肿瘤累积。

[0915] 3.与其他小树枝状体相比,化合物88(G3 1K-纳米抗体)显示出显著增强的肿瘤中信号。

[0916] 4.化合物90和92(G4和G5纳米抗体)在48h时显示出>12% ID/g,并且在第9天时分别显示出>4%和>8%。。

[0917] 5.小的含纳米抗体树枝状体和单独的纳米抗体具有更高的肾脏保留。没有观察到清除器官中的不寻常累积,其中肝脏和脾脏信号显示出如通常对于类似系统观察到的预期浓度范围。

[0918] 实施例16:具有或不具有卡巴他赛的G5,PEG_{1000}树枝状体的体外缔合研究

[0919] 在37℃下在5% CO_2加湿气氛中将MDA-MB-231、MDA-MB-231/HER2(HER2敲入)或SKOV-3细胞接种于24孔板(1×10^5个细胞/孔)中的500μL添加有10%(v/v)胎牛血清(FBS)和1%(v/v)青霉素-链霉素的适当生长培养基中,并且与3.33nM下的化合物70(G5,PEG1000,CTX)或78(2D3,G5,PEG1000,CTX)一起孵育,其中孵育时间从1至24h变化。在孵育后,通过用DPBS轻轻洗涤三次(300μL/孔)来从粘附细胞移除非结合/非缔合颗粒。通过在室温下用无酚红TrypLE™ Express酶(1X)(150μL/孔)处理5-10min来从板移除细胞。然后将板放置于冰上。然后通过采集来自Cy5的信号通过流式细胞术确定样品的细胞结合和缔合。

[0920] 流式细胞术结果

[0921] 结果清楚地指示在24h内化合物70(对照)对所有三种细胞系的最小结合。化合物78(靶向性)显示出与细胞系的HER2受体表达水平相关的增加结合。到24h,流式细胞术显示与用化合物70(对照)处理的细胞(12.4±0.64)相比,用化合物78(靶向性)处理的MDA-MB-231/HER2细胞(4,269±322)显示出强大约340倍的荧光。另外,与用化合物70(对照)处理的细胞(11.4±0.42)相比,用化合物78(靶向性)处理的SKOV-3细胞(1,817±60.8)显示出强大约160倍的荧光。结果示出于图23-25中。

[0922] 在24h内化合物70(对照)和化合物78(靶向性)与MDA-MB-231、MDA-MB-231/HER2和SKOV-3细胞的平均荧光强度(MFI)值。值是平均值±标准偏差(SD;n=2):

	MDA-MB-231	
时间（h）	化合物 70（对照）	化合物 78（靶向性）
1	1.00 ± 0.14	36.7 ± 0.85
3	4.10 ± 0.71	64.8 ± 31.5
6	5.65 ± 0.64	125 ± 2.12
24	13.4 ± 0.07	197 ± 0.71

[0923]

	MDA-MB-231/HER2（HER2 敲入）	
时间（h）	化合物 70（对照）	化合物 78（靶向性）
1	0.77 ± 0.06	755.7 ± 3.54
3	7.72 ± 4.17	2,460 ± 17.7
6	5.82 ± 0.07	3,567 ± 33.2
24	12.4 ± 0.64	4,269 ± 322

	SKOV-3	
时间（h）	化合物 70（对照）	化合物 78（靶向性）
1	1.00 ± 0.29	625.8 ± 0.71
3	3.46 ± 0.69	1,422 ± 0.71
6	3.90 ± 0.10	1,621 ± 1.41
24	11.4 ± 0.42	1,817 ± 60.8

[0924] 本领域技术人员应当理解,在不脱离本公开的广泛总体范围的情况下,可以对上述实施方案进行各种变化和/或修改。因此,本发明的实施方案在所有方面都被认为是说明性的而非限制性的。

[0925] 参考文献

[0926] Abdollahpour-Alitappeh等(2017)Novelty in Biomedicine 4:145-151.

[0927] Al-Lazikani等.(1997)J Mol Biol 273:927-948.

[0928] Arezumand等.(2017)Front Immunol 8:1746.

[0929] Bethesda,Md.,1987and 1991.

[0930] Chetterjee等.(2013)Biochemistry 52(10).

[0931] Chothia and Lesk(1987)J Mol Biol 196:901 -917.

[0932] Chothia等.(1989)Nature 342:877-883.

[0933] Giudicelli等.(1997)Nucleic Acids Res 25:206-211.

[0934] Honnegher and Plükthun(2001)J Mol Biol 309:657-670.

[0935] Hussack等.(2018)BMC Res notes 11(1):866.

[0936] Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest,National Institutes of Health,

[0937] Messerer等.(2004)Clin.Cancer Res 10(19):6638-6649.

[0938] Milla等.(2012)Current Drug Metabolism 13(1):105-119.

[0939] Mukai等.(2015)Scientific Reports 5:9699.

[0940] Nord等.(1995)Protein Eng 8:601-608.

[0941] Oroudjev等.(2010)Mol Can Thera 9:2700-2713.

[0942] Owen等.(2011)WO2012167309.

[0943] Padlan等.(1995)FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol 9:133-9.

[0944] Pohlmann等.(2009)Clin Cancer Research 15(24):7479-7491.

[0945] Pruszynski等.(2013)Nucl Med Biol 40(1):52-59.

[0946] Revets等.(2011)US Application No.20110028695

[0947] Vaneycken等.(2011)FASEB J 25(7):2433-2446.

[0948] Verel等.(2003)J Nucl Med 44(8):1271-1281.

[0949] Voigt(2015)Methods Mol Med 110:39-48.

[0950] Wu等.(2018)Translational Oncology 11(2):366-373.

[0001] 序列表

[0002] <110> 星药私人有限公司

[0003] <120> 靶向性树枝状体缀合物

[0004] <130> 530387PCT

[0005] <160> 3

[0006] <170> PatentIn version 3.5

[0007] <210> 1

[0008] <211> 124

[0009] <212> PRT

[0010] <213> 人工序列

[0011] <220>

[0012] <223> 2D3纳米抗体序列

[0013] <400> 1

[0014] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0015] 1 5 10 15

[0016] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

[0017] 20 25 30

[0018] Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0019] 35 40 45

[0020] Ser Ser Ile Asn Trp Ser Gly Thr His Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

[0021] 50 55 60

[0022] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Asn Asn Thr Leu Tyr

[0023] 65 70 75 80

[0024] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0025] 85 90 95

[0026] Ala Lys Asn Trp Arg Asp Ala Gly Thr Thr Trp Phe Glu Lys Ser Gly

[0027] 100 105 110

[0028] Ser Ala Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

[0029] 115 120

[0030] <210> 2

[0031] <211> 157

[0032] <212> PRT

[0033] <213> 人工序列

[0034] <220>

[0035] <223> 2D3纳米抗体 N末端标签，TEV，C末端叠氮化物

[0036] <220>

[0037] <221> X

[0038] <222> (157)..(157)

[0039] <223> 是非天然氨基酸

[0040] <400> 2

[0041] Gly Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr Gly

[0042] 1 5 10 15

[0043] Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly

[0044] 20 25 30

[0045] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0046] 35 40 45

[0047] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

[0048] 50 55 60

[0049] Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0050] 65 70 75 80

[0051] Ser Ser Ile Asn Trp Ser Gly Thr His Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

[0052] 85 90 95

[0053] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Asn Asn Thr Leu Tyr

[0054] 100 105 110

[0055] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0056] 115 120 125

[0057] Ala Lys Asn Trp Arg Asp Ala Gly Thr Thr Trp Phe Glu Lys Ser Gly

[0058] 130 135 140

[0059] Ser Ala Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Xaa

[0060] 145 150 155

[0061] <210> 3

[0062] <211> 138

[0063] <212> PRT

[0064] <213> 人工序列

[0065] <220>

[0066] <223> 2D3纳米抗体，具有C末端标签，TEV，叠氮化物

[0067] <220>

[0068] <221> X

[0069] <222> (125)..(125)

[0070] <223> 是非天然氨基酸

[0071] <400> 3

[0072] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0073] 1 5 10 15

[0074] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

[0075] 20 25 30

[0076] Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0077] 35 40 45

[0078] Ser Ser Ile Asn Trp Ser Gly Thr His Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

[0079] 50 55 60

[0080] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Asn Asn Thr Leu Tyr

[0081] 65 70 75 80

[0082] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0083] 85 90 95

[0084] Ala Lys Asn Trp Arg Asp Ala Gly Thr Thr Trp Phe Glu Lys Ser Gly

[0085] 100 105 110

[0086] Ser Ala Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Xaa Glu Asn Leu

[0087] 115 120 125

[0088] Tyr Phe Gln Gly His His His His His His

[0089] 130 135

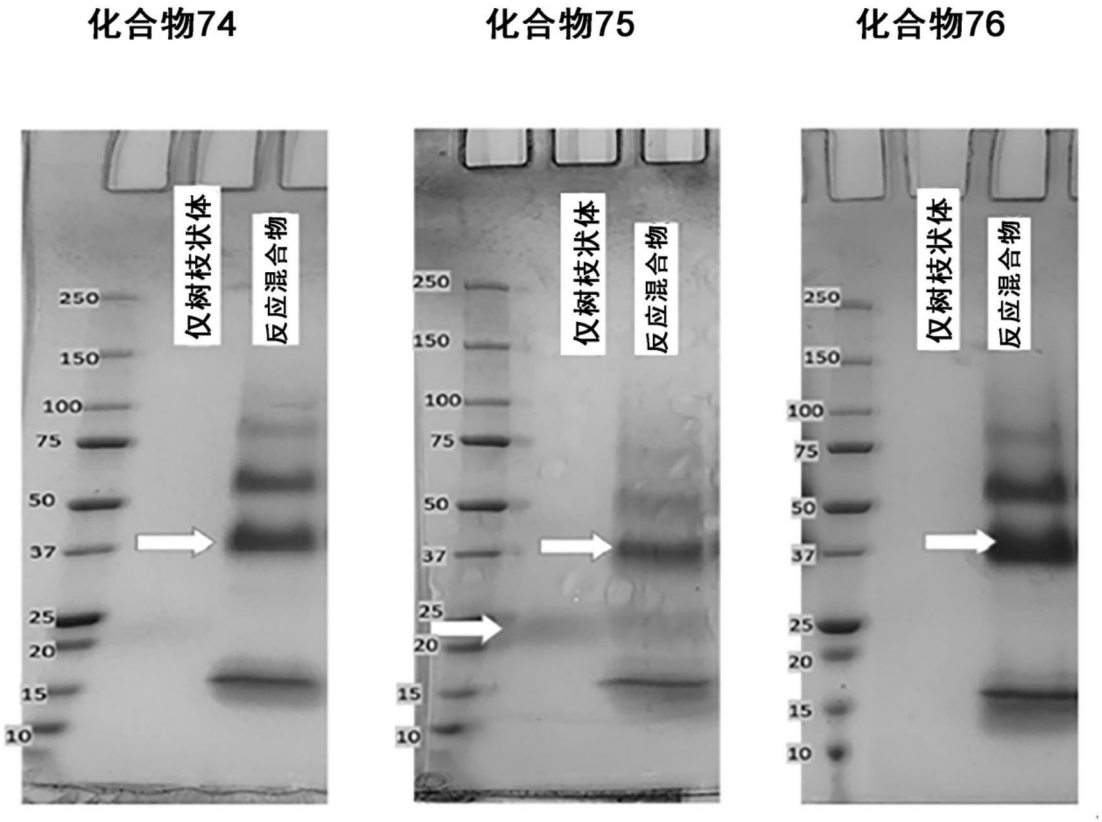


图1

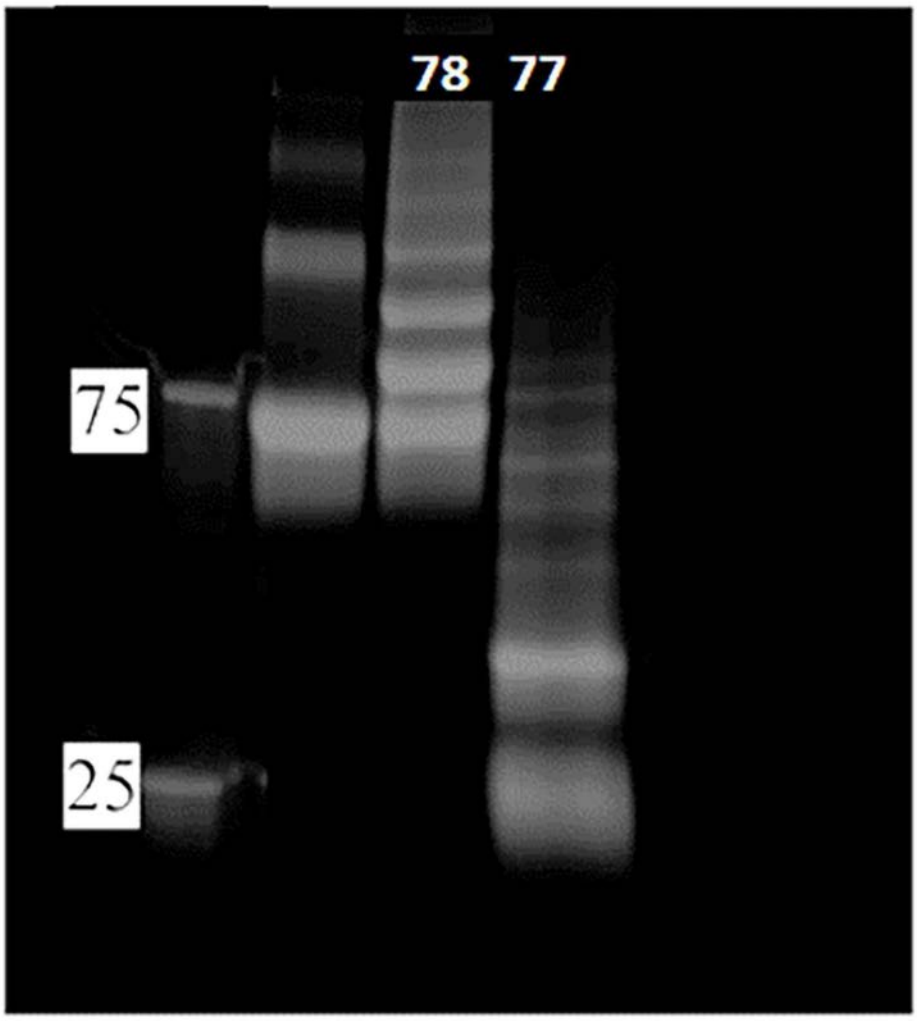


图2

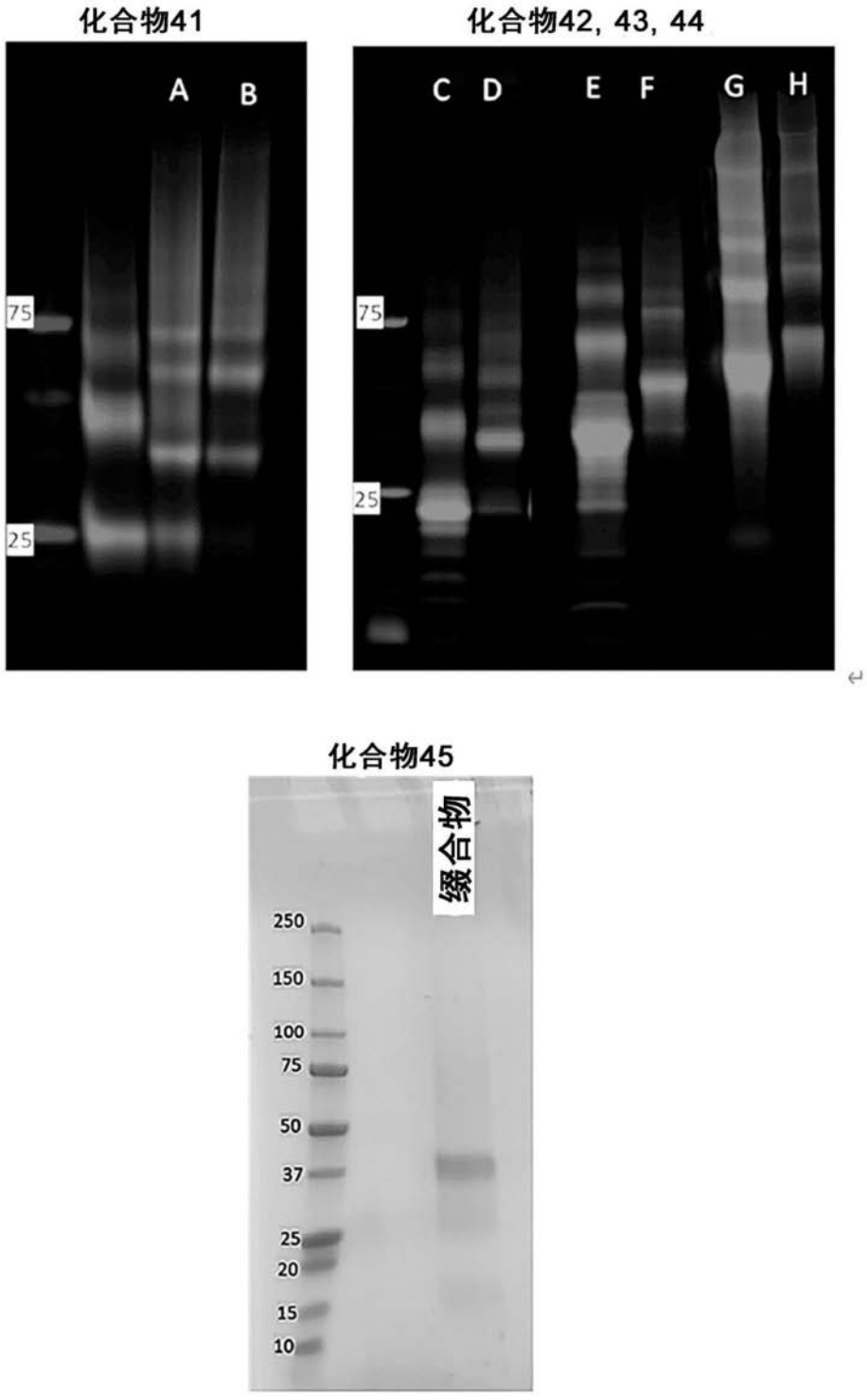

化合物41
A
B
75
25
化合物42, 43, 44
C
D
E
F
G
H
75
25
化合物45
缀合物
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10

图3

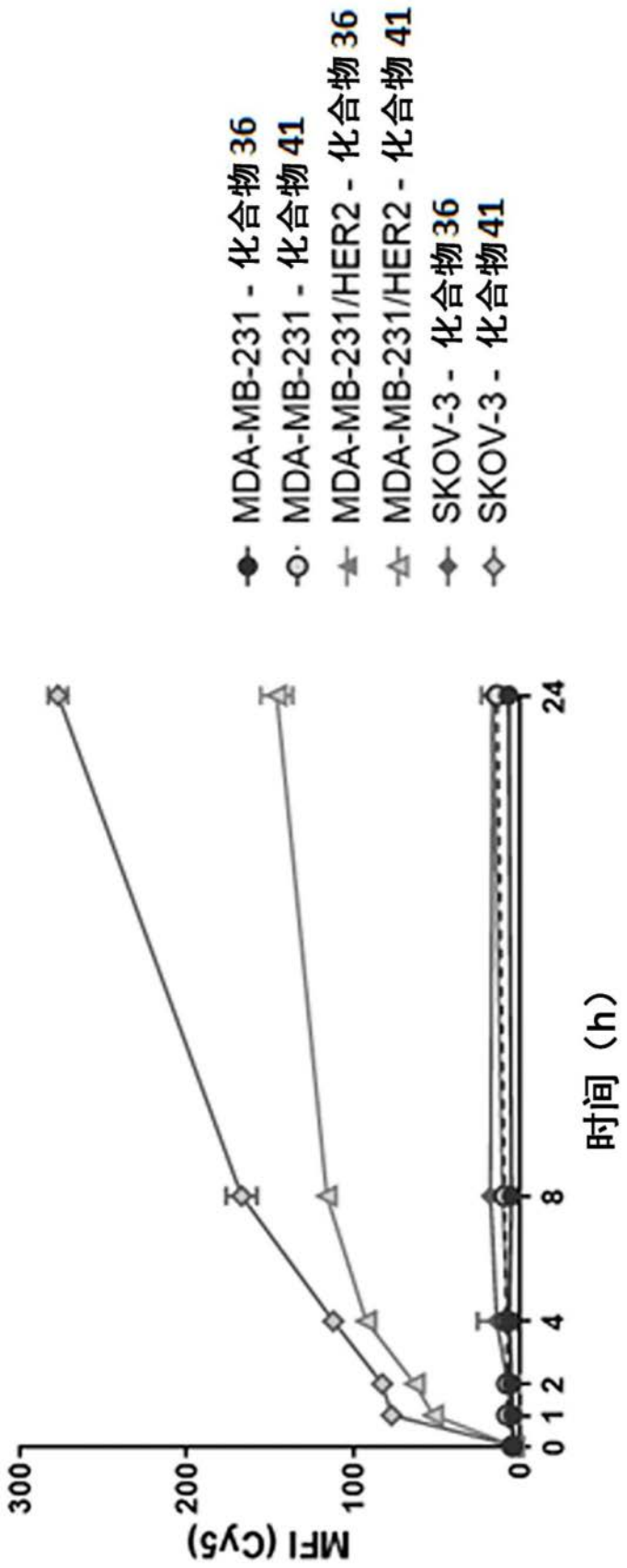

MDA-MB-231 - 化合物36
MDA-MB-231 - 化合物41
MDA-MB-231/HER2 - 化合物36
MDA-MB-231/HER2 - 化合物41
SKOV-3 - 化合物36
SKOV-3 - 化合物41
MFI (Cy5)
300
200
100
0
0 1 2 4 8 24
时间（h）

图4

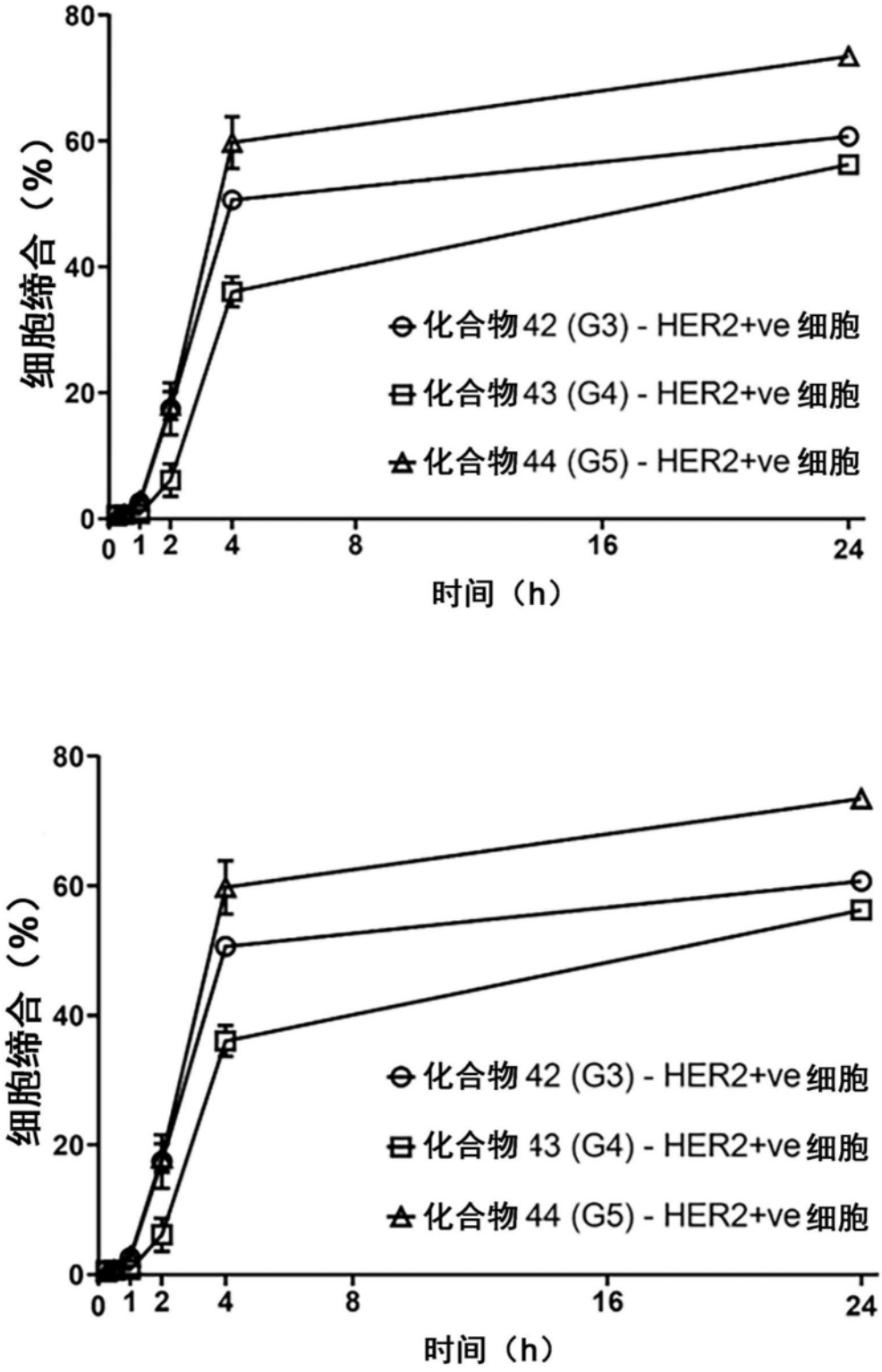

细胞缔合（%）
80
60
40
20
0
0 1 2 4 8 16 24
时间（h）
化合物42 (G3) - HER2+ve 细胞
化合物43 (G4) - HER2+ve 细胞
化合物44 (G5) - HER2+ve 细胞
细胞缔合（%）
80
60
40
20
0
0 1 2 4 8 16 24
时间（h）
化合物 42 (G3) - HER2+ve 细胞
化合物 43 (G4) - HER2+ve 细胞
化合物 44 (G5) - HER2+ve 细胞

图5

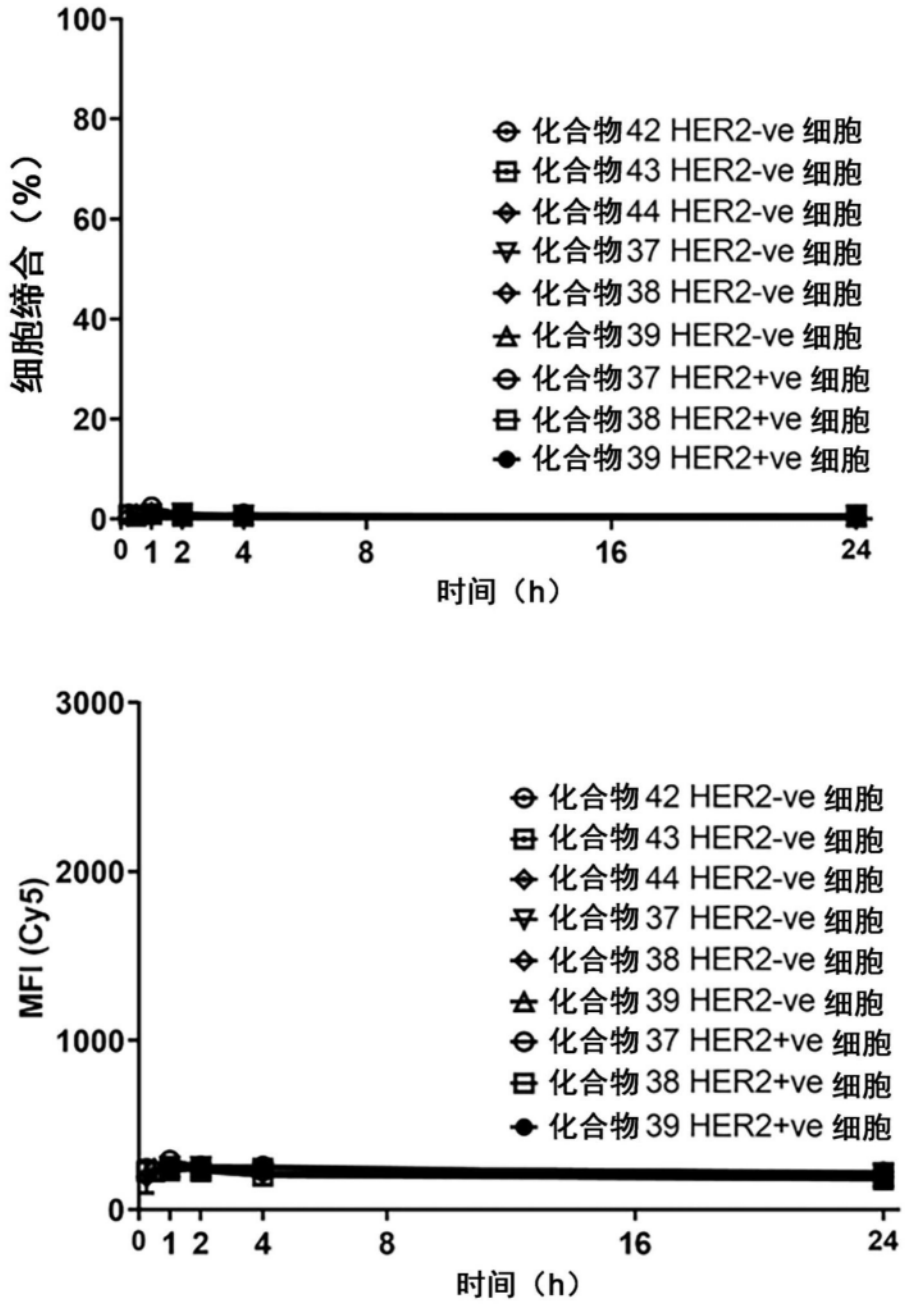

细胞缔合（%）
100
80
60
40
20
0
0 1 2 4 8 16 24
时间（h）
化合物42 HER2-ve 细胞
化合物43 HER2-ve 细胞
化合物44 HER2-ve 细胞
化合物37 HER2-ve 细胞
化合物38 HER2-ve 细胞
化合物39 HER2-ve 细胞
化合物37 HER2+ve 细胞
化合物38 HER2+ve 细胞
化合物39 HER2+ve 细胞
MFI (Cy5)
3000
2000
1000
0
0 1 2 4 8 16 24
时间（h）
化合物42 HER2-ve 细胞
化合物43 HER2-ve 细胞
化合物44 HER2-ve 细胞
化合物37 HER2-ve 细胞
化合物38 HER2-ve 细胞
化合物39 HER2-ve 细胞
化合物37 HER2+ve 细胞
化合物38 HER2+ve 细胞
化合物39 HER2+ve 细胞

图5(续)

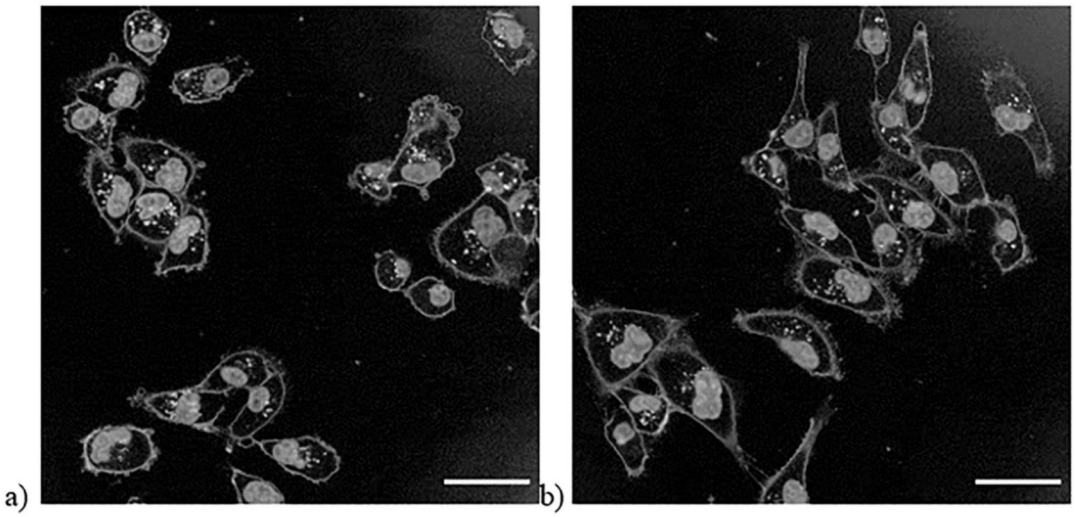


图6

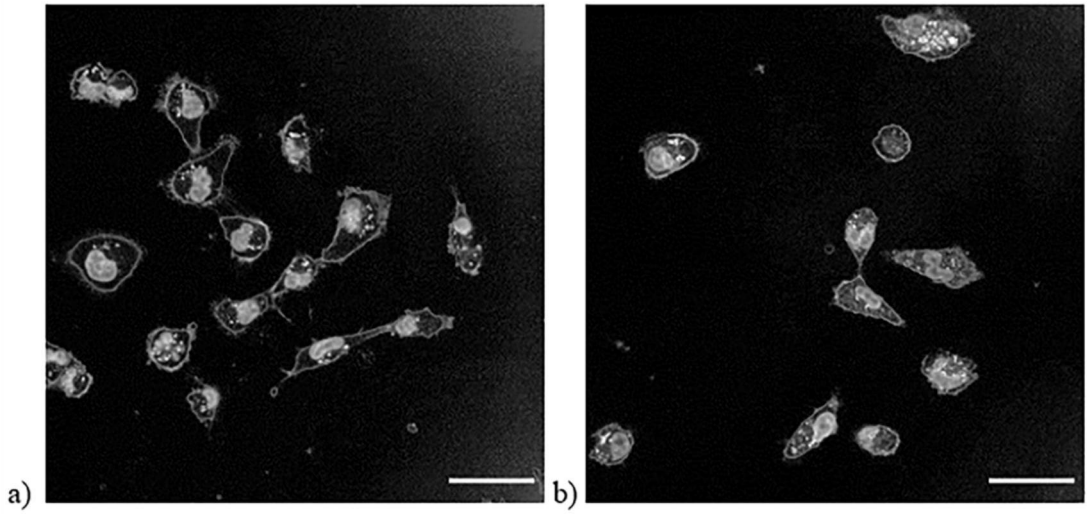


图7

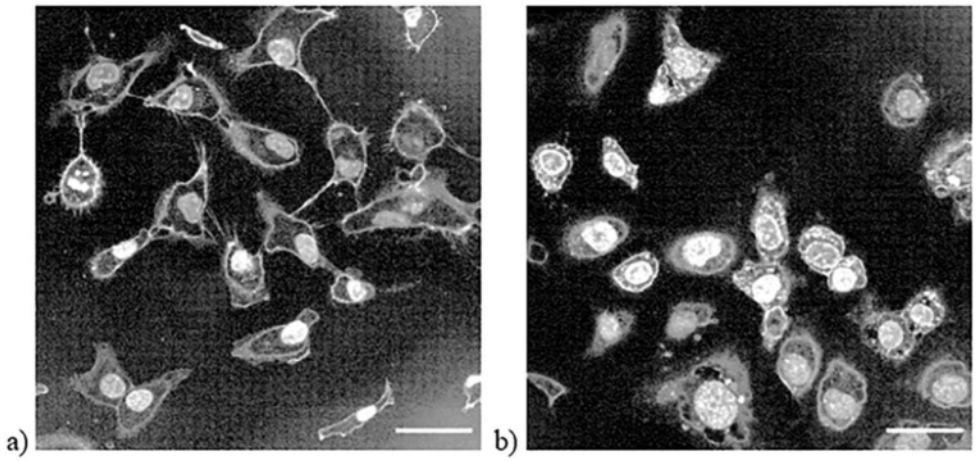

a)
b)

图8

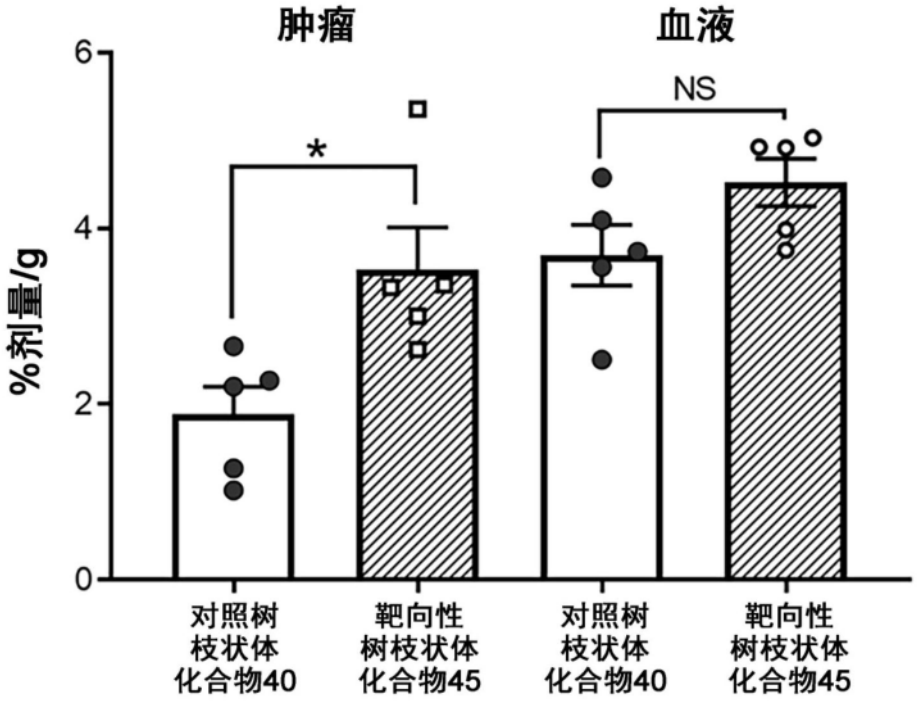

肿瘤
血液
NS
*
%剂量/g
6
4
2
0
对照树枝状体化合物40
靶向性树枝状体化合物45
对照树枝状体化合物40
靶向性树枝状体化合物45

图9

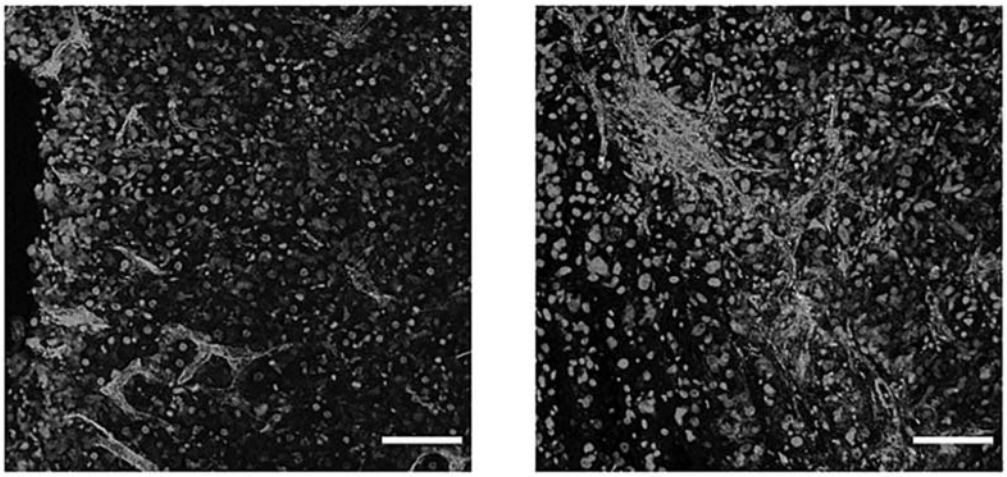


图10

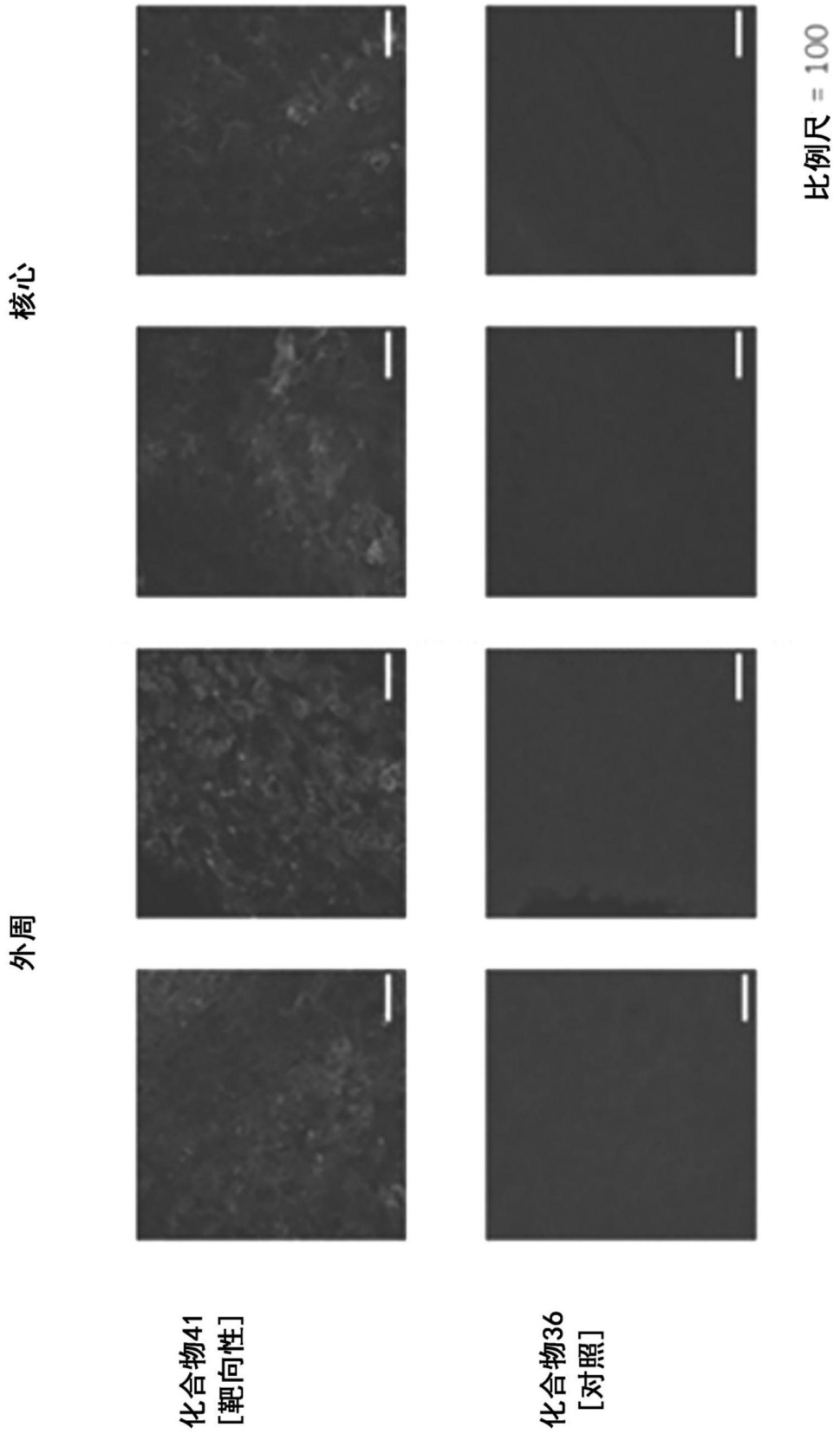


图11

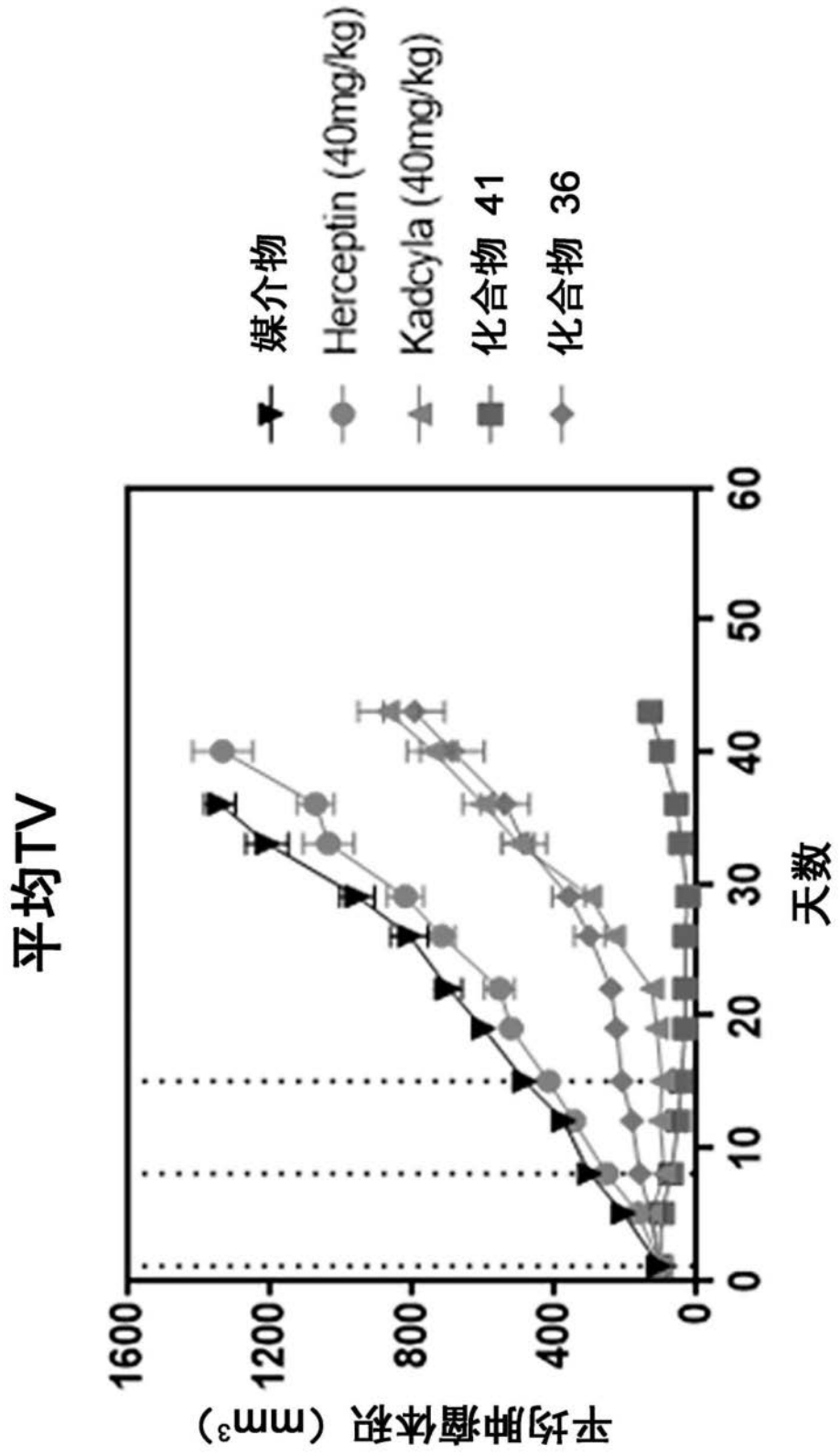

媒介物
Herceptin (40mg/kg)
Kadcyla (40mg/kg)
化合物 41
化合物 36
平均TV
天数
平均肿瘤体积 (mm³)
0
10
20
30
40
50
60
400
800
1200
1600

图12

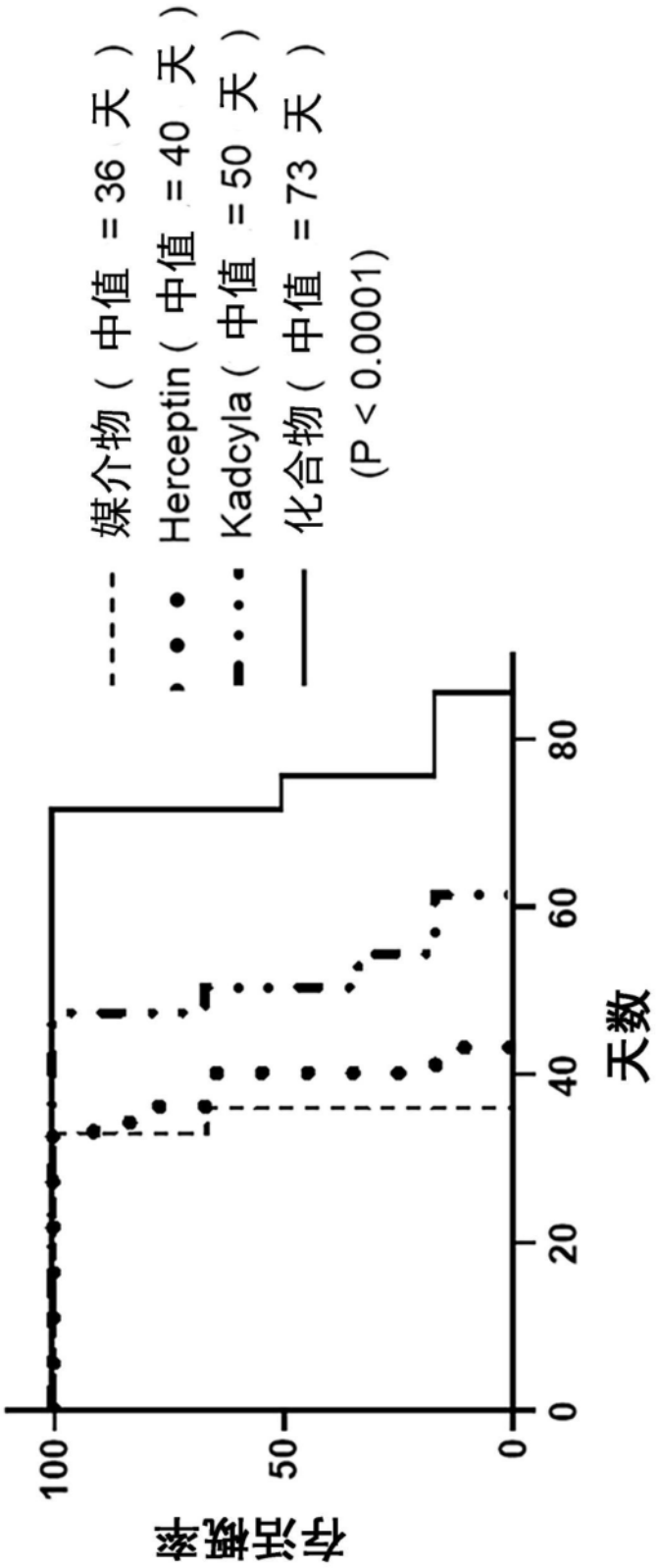

媒介物（中值 = 36 天）
Herceptin（中值 = 40 天）
Kadcyla（中值 = 50 天）
化合物（中值 = 73 天）
(P < 0.0001)
存活概率
100
50
0
0
20
40
60
80
天数

图13

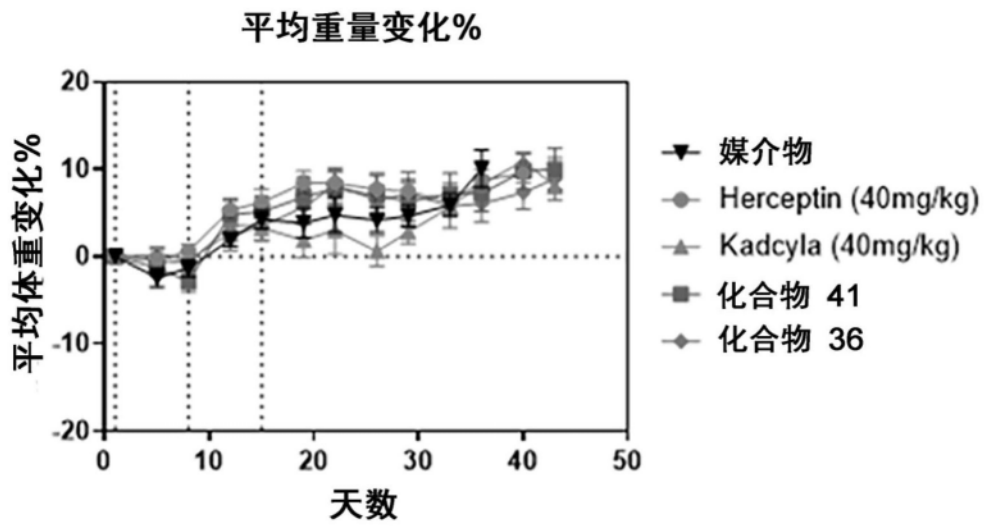

平均重量变化%
平均体重变化%
20
10
0
-10
-20
0
10
20
30
40
50
天数
媒介物
Herceptin (40mg/kg)
Kadcyla (40mg/kg)
化合物 41
化合物 36

图14

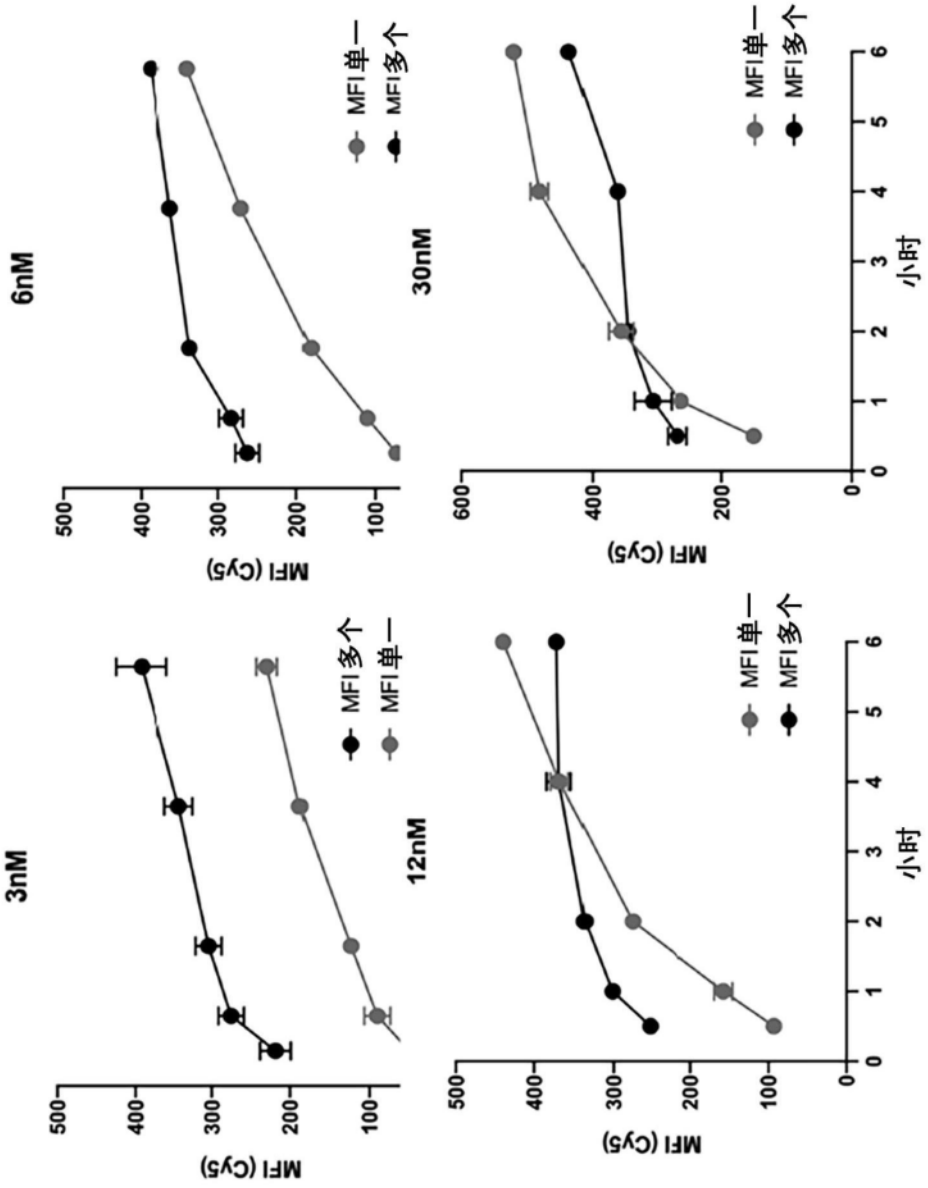

6nM
30nM
3nM
12nM
MFI单一
MFI多个
MFI (Cy5)
小时
0
1
2
3
4
5
6
100
200
300
400
500
600

图15

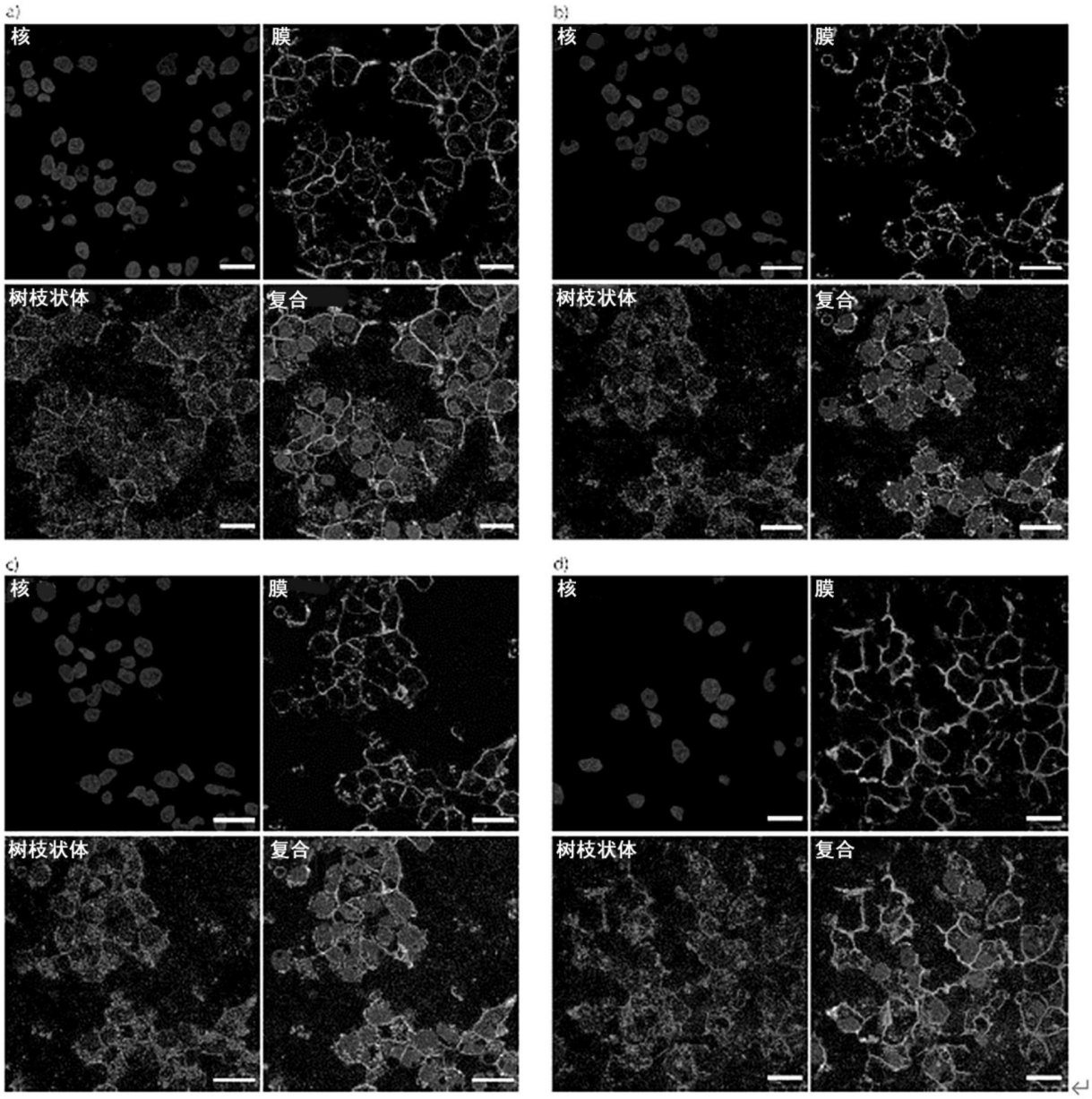


图16

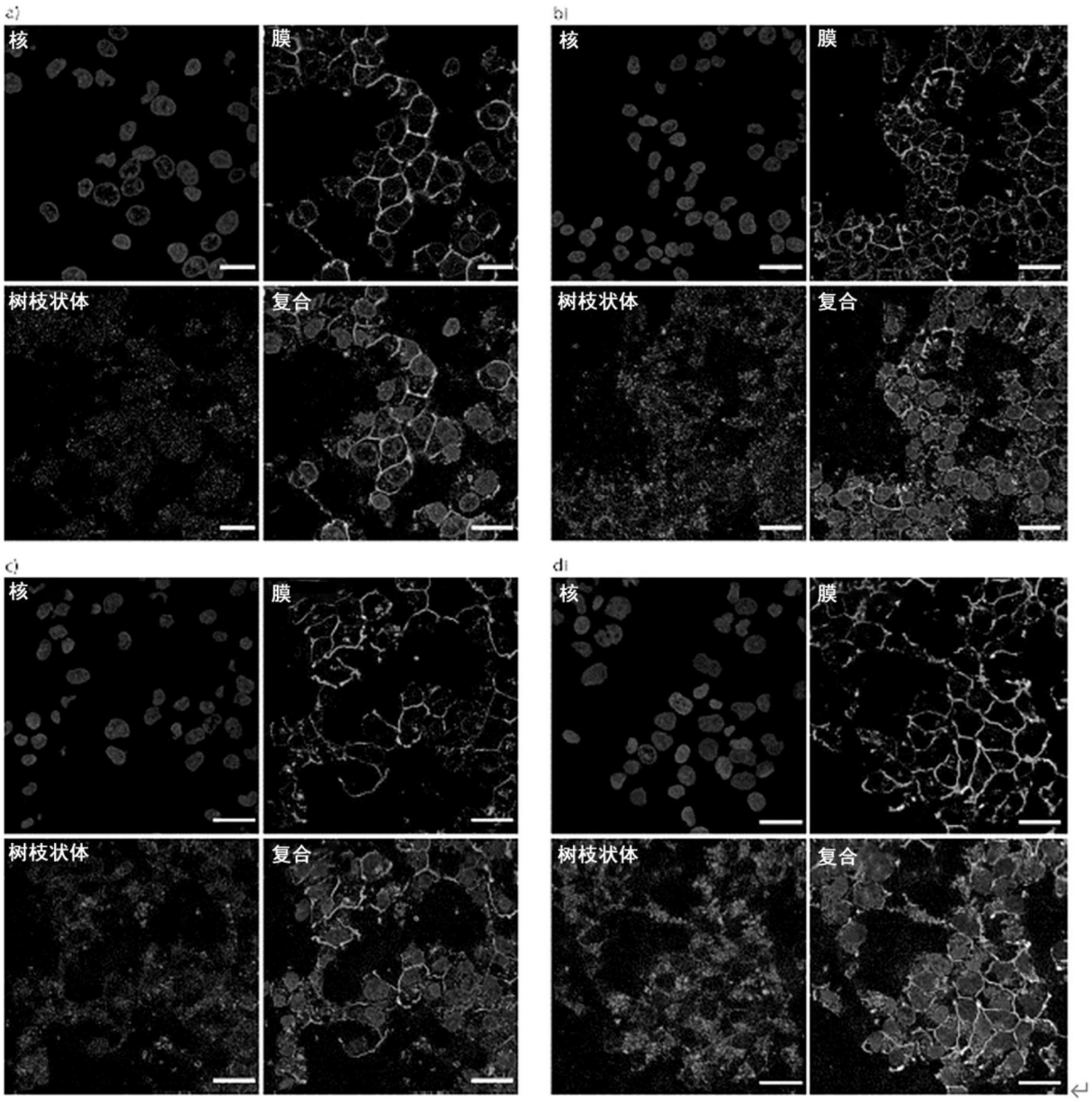


图17

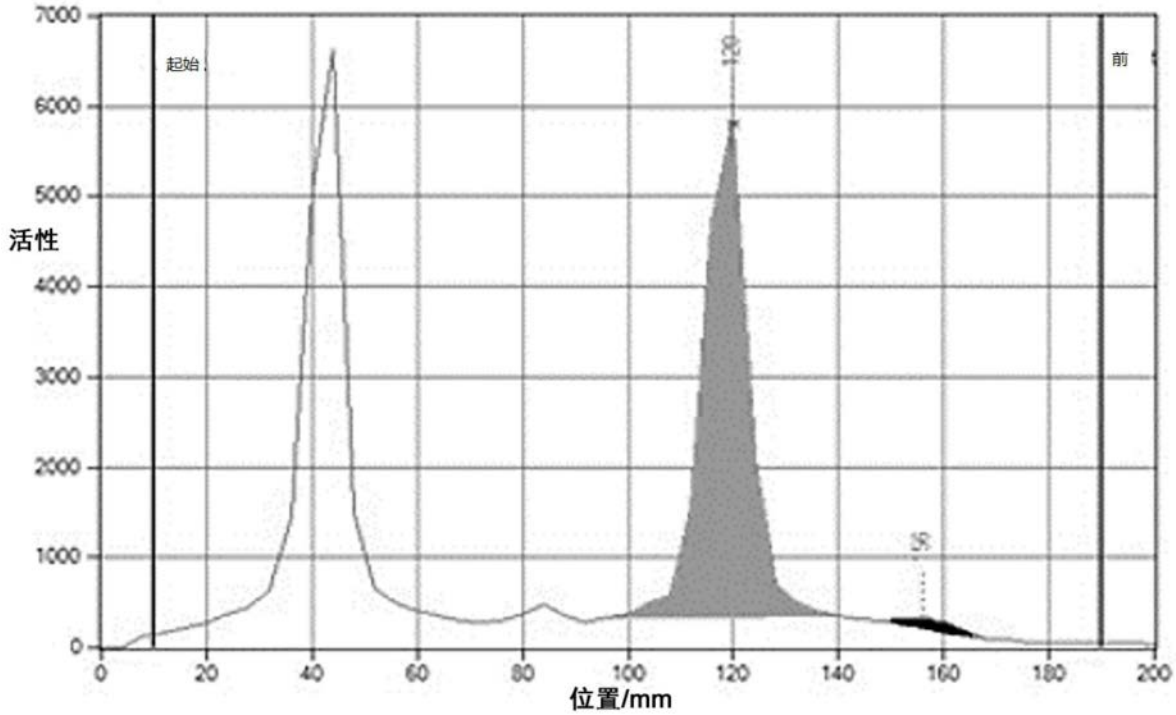
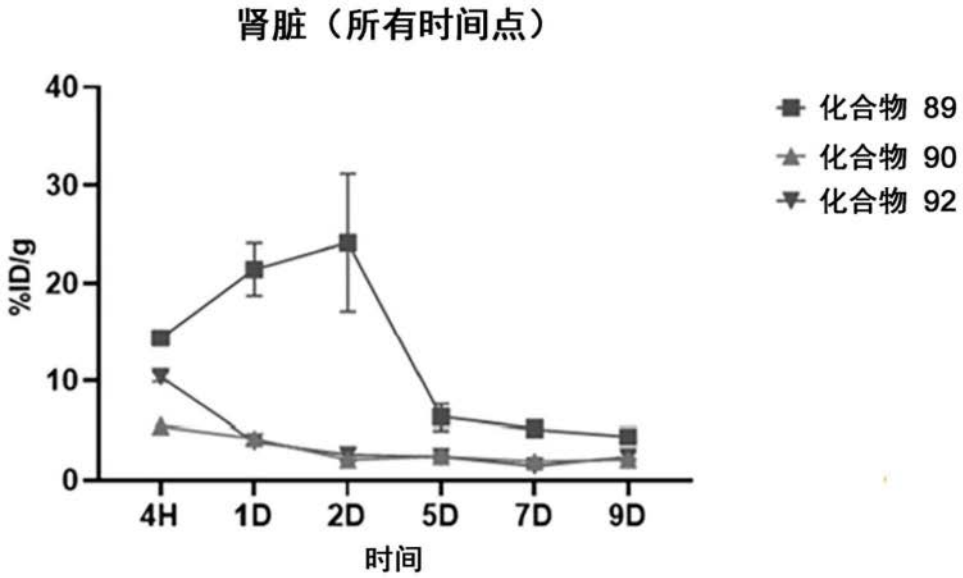
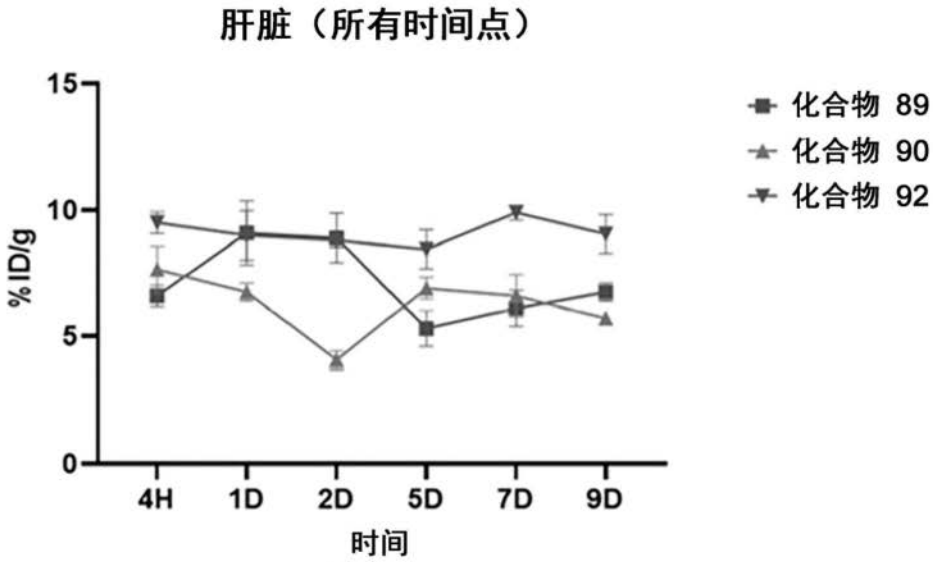

7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
活性
起始
120
SR
前
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
位置/mm

图18


肾脏（所有时间点）
40
30
20
10
0
%ID/g
4H
1D
2D
5D
7D
9D
时间
化合物 89
化合物 90
化合物 92

图A


肝脏（所有时间点）
15
10
5
0
%ID/g
4H
1D
2D
5D
7D
9D
时间
化合物 89
化合物 90
化合物 92

图B

图19

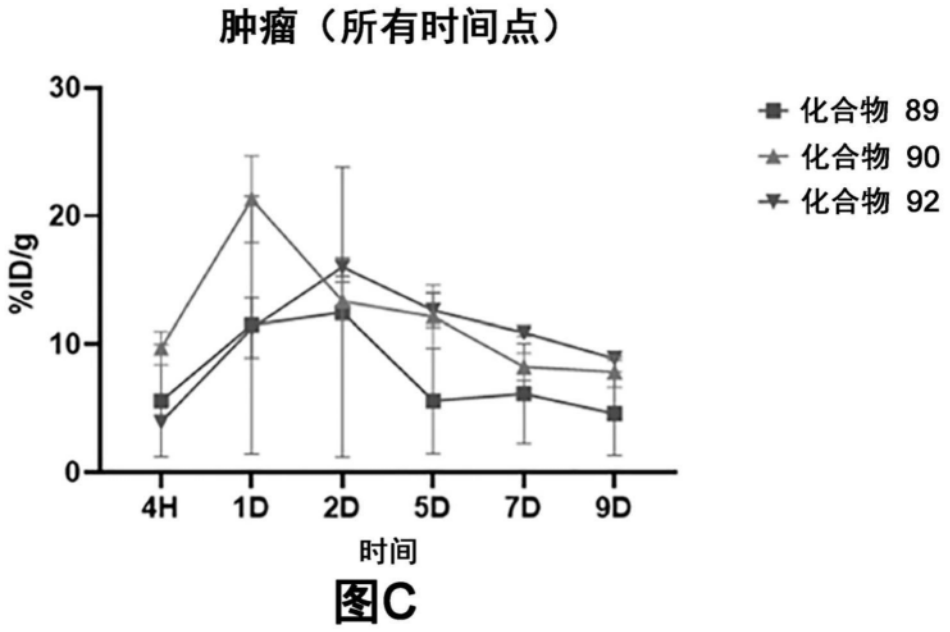


图19(续)

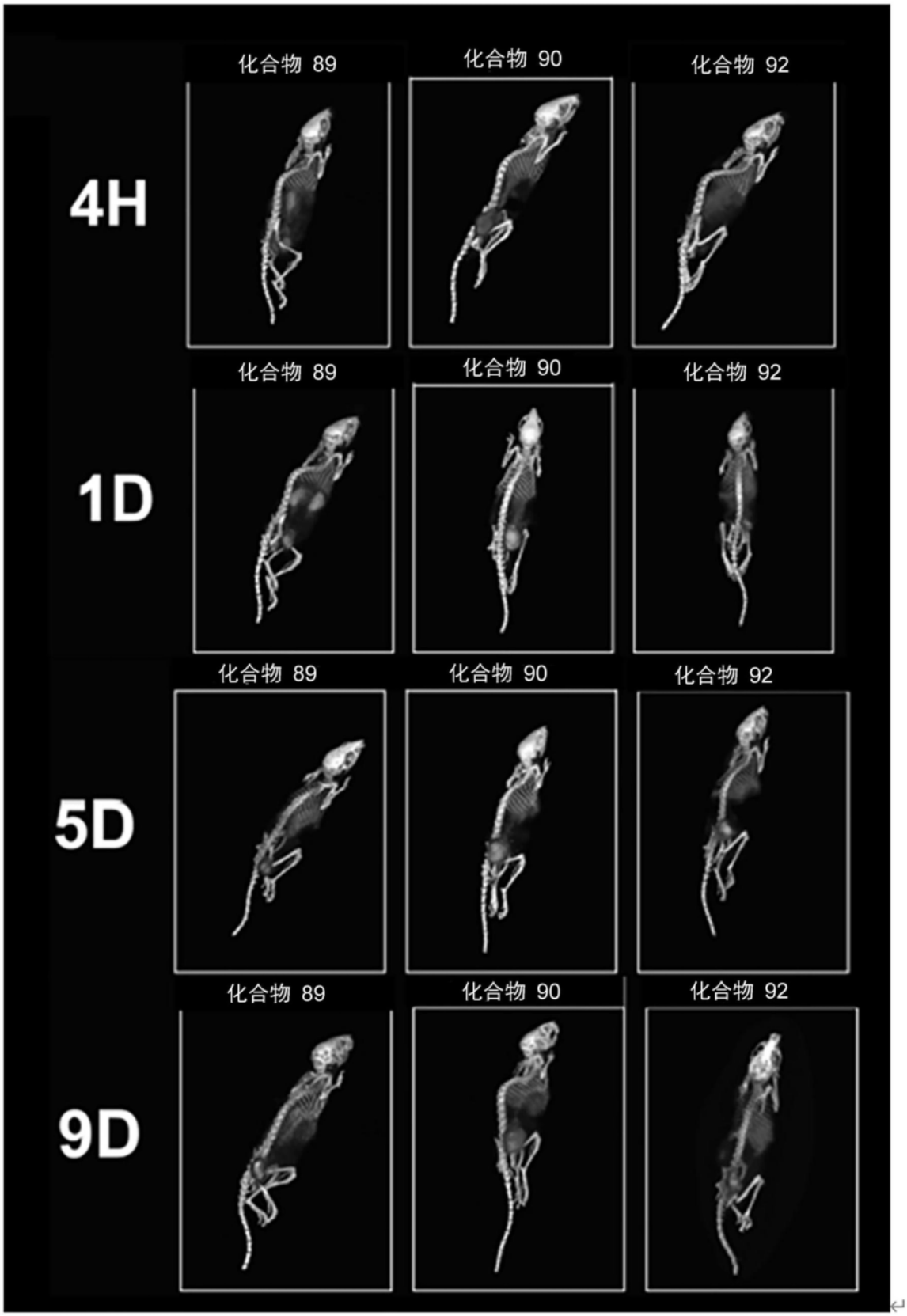

化合物 89
化合物 90
化合物 92
4H
化合物 89
化合物 90
化合物 92
1D
化合物 89
化合物 90
化合物 92
5D
化合物 89
化合物 90
化合物 92
9D

图20

器官	时间/天	树枝状体/器官比率值											
		NB (16 kDa)	*G2 (10.2 kDa)*	*G2 + NB (25.7 kDa)*	*G3-P412 (9.6 kDa)*	*G3-P412 + NB (25.1 kDa)*	*G3-P1K (16.4 kDa)*	*G3-P1K + NB (31.9 kDa)*	*G4 (27.9 kDa)*	*G4 + NB (43.4 kDa)*	*(G4 + NB) + 10 x NB (43.4 kDa)*	*G4 + 2-4 NB (多个 NB) (60.3 kDa)*	*G5 (51.4kDa)*	*G5 + NB (66.8 kDa)*
		104	*99*	*86*	*100*	*88*	*101*	*87*	*102*	*90*	*90*	*91*	*103*	*92*
肿瘤:血液	2	17.17	1.02	13.04	1.70	24.30	0.91	4.87	1.66	3.87	3.58	4.43	0.69	7.14
	9	1.24	6.57	10.58	0.74	1.67	7.76	25.86	21.92	56.95	32.30	12.62	13.68	325.01
肿瘤:肝脏	2	4.51	0.20	0.94	0.04	0.31	0.28	0.96	0.67	2.09	1.78	1.19	0.75	1.63
	9	1.36	0.11	0.28	0.01	0.05	0.15	0.71	0.29	0.66	0.52	0.27	0.37	1.09
肿瘤:脾脏	2	2.56	0.29	1.09	0.13	1.16	0.33	1.12	0.35	1.41	0.95	0.83	0.29	1.12
	9	0.10	0.11	0.23	0.01	0.05	0.04	0.25	0.05	0.21	0.16	0.07	0.07	0.09
肿瘤:肾脏	2	0.01	0.73	0.10	0.06	0.03	0.69	0.24	2.05	5.21	3.87	3.40	2.22	7.15
	9	0.00	0.82	0.06	0.05	0.01	0.51	1.15	2.03	2.99	3.07	1.43	2.29	6.36

图21

		树枝状体/%注射剂量.克-1												
器官	时间/天	NB (16 kDa)	G2 (10.2 kDa)	G2 + NB (25.7 kDa)	G3-P412 (9.6 kDa)	G3-P412 + NB (25.1 kDa)	G3-P1K (16.4 kDa)	G3-P1K + NB (31.9 kDa)	G4 (27.9 kDa)	G4 + NB (43.4 kDa)	(G4 + NB) + 10 x NB (43.4 kDa)	G4 + 2-4 NB (多个 NB) (60.3 kDa)	G5 (51.4kDa)	G5 + NB (66.8 kDa)
化合物		104	99	86	100	88	101	87	102	90	90	91	103	92
肿瘤	2	1.05	1.74	2.70	0.71	2.28	2.67	4.78	3.96	12.53	12.64	7.85	4.04	11.96
	9	0.31	0.78	1.06	0.25	0.31	1.53	4.56	1.72	4.15	4.55	2.70	3.31	8.18
肝脏	2	0.23	8.70	3.06	18.25	7.82	9.62	5.22	5.85	6.05	7.34	6.73	5.48	7.29
	9	0.23	7.18	3.71	20.85	6.02	10.10	6.44	5.85	7.34	8.72	10.23	9.59	7.56
脾脏	2	0.53	5.83	2.96	5.51	2.14	8.12	4.27	11.13	8.98	13.06	9.46	16.45	10.65
	9	0.00	7.38	4.47	35.24	6.88	47.73	18.02	34.23	21.52	30.23	37.09	45.59	87.39
肾脏	2	109.01	2.36	28.56	11.23	79.08	4.05	20.07	1.93	2.47	3.29	2.33	1.87	1.66
	9	62.22	0.93	17.03	5.36	55.61	3.11	4.06	0.85	1.44	1.57	1.91	1.43	1.29
心脏	2	0.10	1.42	0.61	1.39	0.49	1.91	1.29	1.53	2.62	3.18	1.98	3.08	3.33
	9	0.00	0.64	0.52	0.92	0.28	1.23	0.81	1.11	1.36	1.35	1.72	1.83	1.99
肺	2	0.11	1.25	0.54	4.95	0.58	4.36	2.31	1.39	2.82	2.80	1.72	2.71	2.86
	9	0.00	0.44	0.38	2.78	0.55	3.55	1.33	1.06	1.32	1.24	1.38	1.12	1.43
骨	2	0.26	1.04	0.63	0.98	0.63	0.93	1.75	1.31	2.17	3.03	2.27	1.70	8.07
	9	0.00	0.28	0.34	0.58	-0.53	0.79	0.54	1.54	1.78	1.78	3.77	1.30	2.72
血液	2	0.08	1.67	0.22	0.42	0.09	3.05	1.03	2.37	3.40	3.51	1.81	5.97	2.75
	9	0.00	0.00	-0.26	-0.45	-0.29	-0.20	-0.18	0.08	-0.19	-0.21	-0.22	0.04	0.00
胃肠道	2	0.04	0.87	0.37	1.17	0.34	1.01	0.67	0.68	1.04	1.35	0.96	0.85	0.89
	9	0.11	0.31	0.32	0.80	0.29	0.77	0.52	0.37	0.46	0.57	0.64	0.63	0.62
尾部	2	0.07	1.78	0.71	2.36	0.69	1.14	0.71	0.93	2.26	2.14	0.90	1.47	1.47
	9	0.03	2.56	1.76	0.58	1.50	0.99	1.32	2.53	1.12	1.29	1.03	1.03	1.14

图22

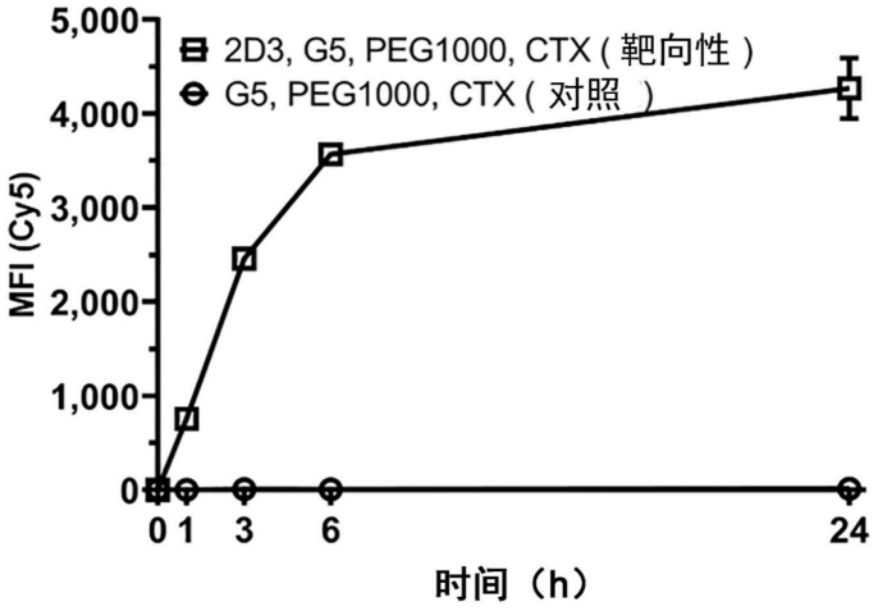

5,000
4,000
3,000
2,000
1,000
0
MFI (Cy5)
2D3, G5, PEG1000, CTX (靶向性)
G5, PEG1000, CTX (对照)
0 1 3 6 24
时间（h）

图23

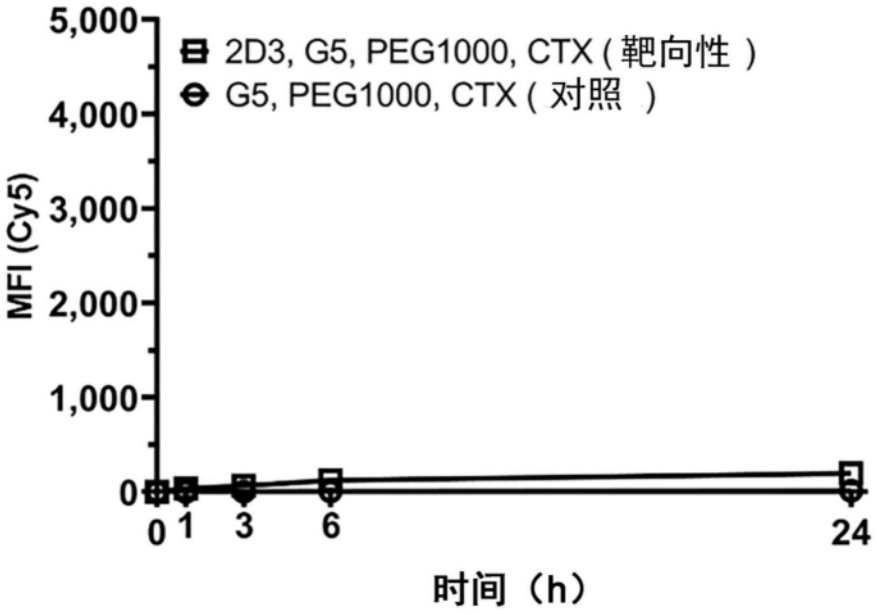

5,000
4,000
3,000
2,000
1,000
0
MFI (Cy5)
2D3, G5, PEG1000, CTX (靶向性)
G5, PEG1000, CTX (对照)
0 1 3 6 24
时间（h）

图24

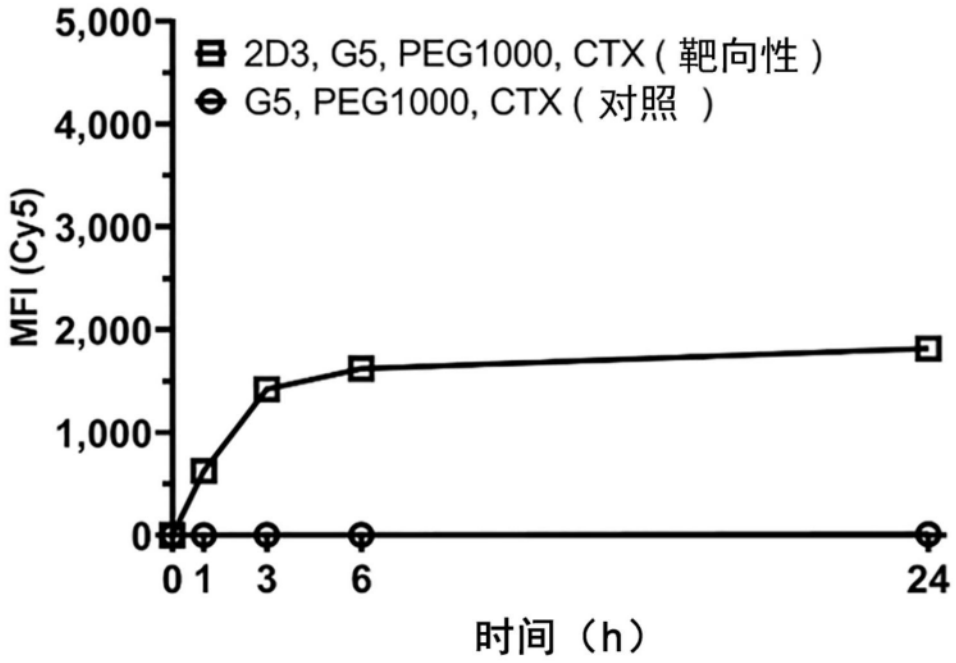

5,000
4,000
3,000
2,000
1,000
0
MFI (Cy5)
2D3, G5, PEG1000, CTX (靶向性)
G5, PEG1000, CTX (对照)
0 1 3 6 24
时间（h）

图25