

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101321806 B

(45) 授权公告日 2011.01.26

(21) 申请号 200680045816.X

代理人 王达佐 韩克飞

(22) 申请日 2006.12.01

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C08G 69/10 (2006.01)

60/742,291 2005.12.05 US

(56) 对比文件

60/757,917 2006.01.10 US

EP 1279405 A, 2003.01.29, 权利要求 1-13.

60/790,735 2006.04.10 US

WO 03041642 A, 2003.05.22, 权利要求 1, 实

(85) PCT申请进入国家阶段日

施例 1-24.

2008.06.05

审查员 刘宏伟

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/045915 2006.12.01

(87) PCT申请的公布数据

W02007/067417 EN 2007.06.14

(73) 专利权人 日东电工株式会社

地址 日本大阪

(72) 发明人 俞磊 赵刚 桑·范

桑吉博·库马尔·达斯 冯中灵

付晓丽 王兴和

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

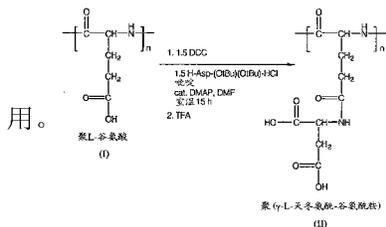
权利要求书 4 页 说明书 43 页 附图 27 页

(54) 发明名称

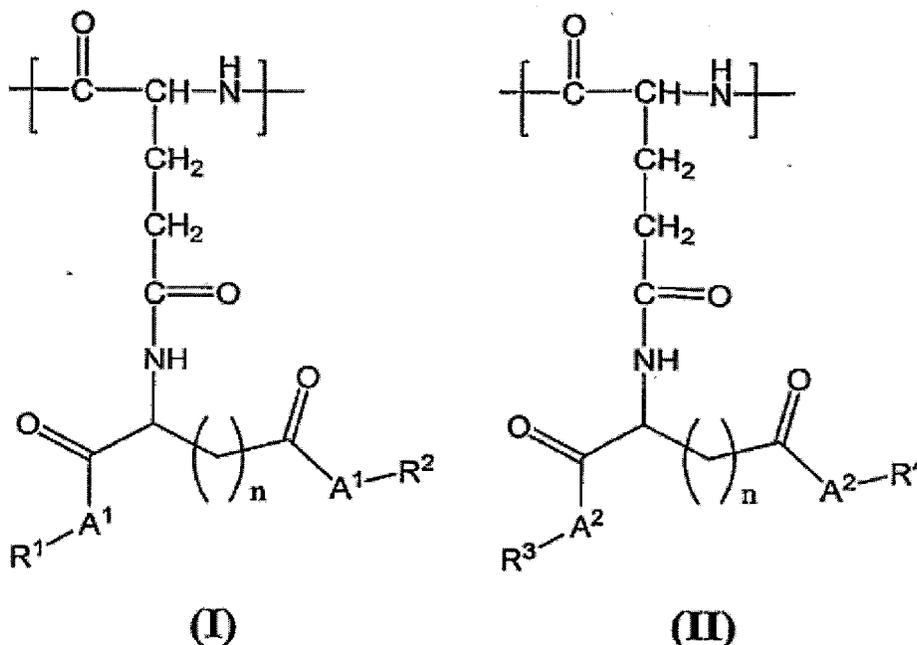
聚谷氨酸盐-氨基酸轭合物及方法

(57) 摘要

制备了包含通式 (I) 和 (II) 重复单元的多种生物可降解的聚谷氨酸盐-氨基酸。这样的聚合物可用于药物、生物分子和显像剂输送等各种应用。



1. 包含通式 (I) 重复单元和通式 (II) 重复单元的聚合物轭合物：



其中：

每一  $n$  独立地是 1 或 2；

每一  $A^1$  是氧或  $NR^5$ ；

每一  $A^2$  是氧；

$R^1$  和  $R^2$  各自独立地选自  $C_{1-10}$  烷基、 $C_{6-20}$  芳基、铵、碱金属、多配位基配体、具有受保护的氧原子的多配位基配体前体或包含药剂的化合物；

其中所述药剂选自抗癌药、靶向药剂、光学显像剂或磁共振显像剂；

其中  $R^1$  和  $R^2$  中的至少一个是包含药剂的基团；

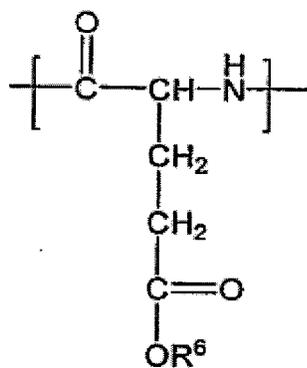
$R^3$  和  $R^4$  彼此独立地选自氢、铵或碱金属；

其中所述聚合物轭合物包含的药剂质量基于所述药剂与所述聚合物轭合物的质量比为 1% 至 50% 重量比；

$R^5$  为氢或  $C_{1-4}$  烷基；以及

其中选择所述药剂的量、所述通式 (I) 重复单元的百分比和所述通式 (II) 重复单元的百分比以使所述聚合物轭合物的溶解度大于包含基本相同量的所述药剂的对照聚谷氨酸轭合物的溶解度，当在 22°C 的 0.9 重量%的 NaCl 水溶液中包含至少 5mg/mL 的所述聚合物轭合物的测试聚合物轭合物溶液在较宽的 pH 范围内光学透明度大于对照测试聚谷氨酸轭合物溶液时所述聚合物轭合物的溶解度更大。

2. 如权利要求 1 所述的聚合物轭合物，其还包括通式 (III) 重复单元：



(III)

其中  $R^6$  是氢、铵或碱金属。

3. 如权利要求 1 所述的聚合物钇合物, 其中包含所述药剂的所述化合物还包括连接基团。

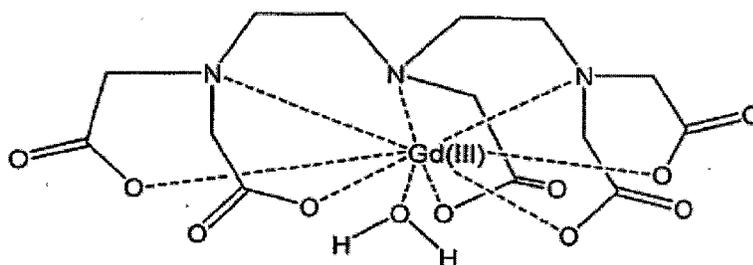
4. 如权利要求 1 或 2 所述的聚合物钇合物, 其中所述光学显像剂选自吡啶染料、香豆素染料、若丹明染料、咕吨染料、花青染料或芘染料。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的聚合物钇合物, 其中所述抗癌药选自紫杉烷类、喜树碱或阿霉素。

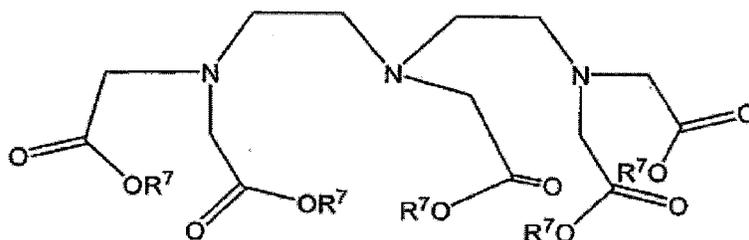
6. 如权利要求 5 所述的聚合物钇合物, 其中所述紫杉烷类选自紫杉醇。

7. 如权利要求 1 或 2 所述的聚合物钇合物, 其中所述磁共振显像剂包含 Gd(III) 化合物。

8. 如权利要求 7 所述的聚合物钇合物, 其中所述 Gd(III) 化合物包括:

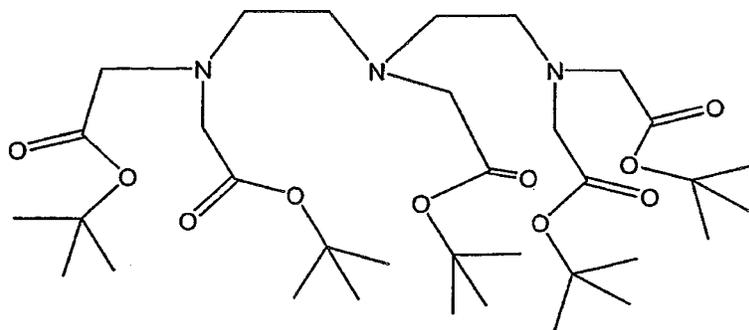


9. 如权利要求 1 或 2 所述的聚合物钇合物, 其中所述多配位基配体包含:



其中每一  $R^7$  独立地是氢、铵和碱金属。

10. 如权利要求 1 或 2 所述的聚合物钇合物, 其中所述具有受保护的氧原子的多配位基配体包含:

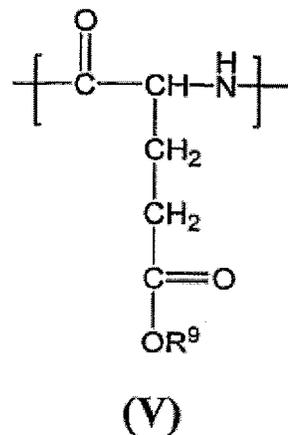
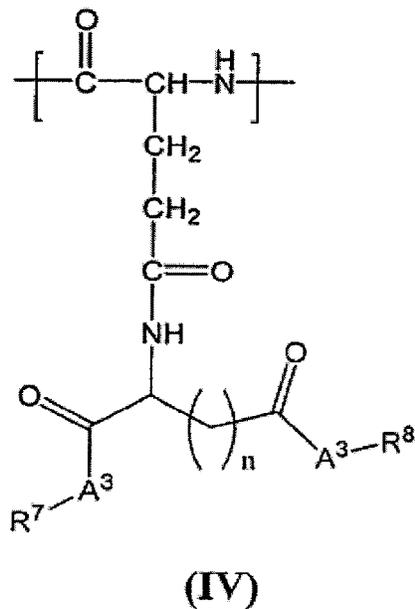


11. 如权利要求 1 或 2 所述的聚合物链合物, 其中至少一个  $n$  是 1。

12. 如权利要求 1 或 2 所述的聚合物链合物, 其中至少一个  $n$  是 2。

13. 权利要求 1 或 2 所述的聚合物链合物的制备方法, 其包括将聚合反应物溶解或部分溶解在溶剂中以形成溶解或部分溶解的聚合反应物; 以及使所述溶解或部分溶解的聚合反应物与第二反应物反应, 其中所述第二反应物包含所述多配位基配体、所述具有受保护的氧原子的多配位基配体前体和包含所述药剂的所述化合物中的至少一个;

其中所述聚合反应物包含选自通式 (IV) 重复单元和通式 (V) 重复单元的重复单元:



其中

每一  $n$  独立地是 1 或 2;

每一  $A^3$  是氧; 以及

$R^7$  和  $R^8$  各自独立地选自氢、铵或碱金属; 以及

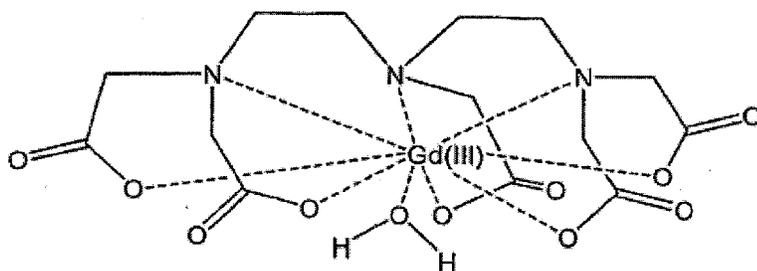
其中  $R^9$  是氢、铵或碱金属。

14. 如权利要求 13 所述的方法, 其中所述第二反应物包含选自羟基或胺基的取代基。

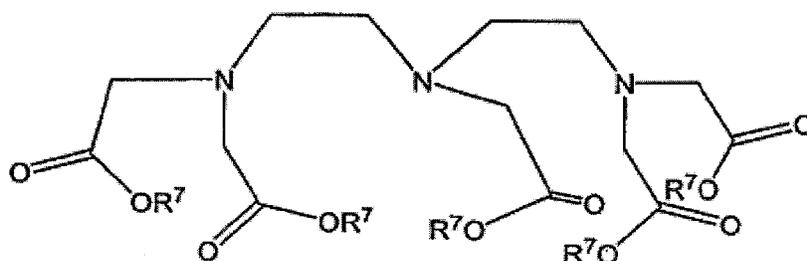
15. 如权利要求 13 所述的方法, 其中所述药剂选自抗癌药、靶向药剂、光学显像剂或磁共振显像剂。

16. 如权利要求 15 所述的方法, 其中所述光学显像剂选自吡啶染料、香豆素染料、若丹明染料、咕吨染料、花青染料或芘染料。

17. 如权利要求 15 所述的方法,其中所述抗癌药选自紫杉烷类、喜树碱或阿霉素。
18. 如权利要求 17 所述的方法,其中所述紫杉烷类选自紫杉醇。
19. 如权利要求 15 所述的方法,其中所述磁共振显像剂包含 Gd(III) 化合物。
20. 如权利要求 19 所述的方法,其中所述 Gd(III) 化合物包含:

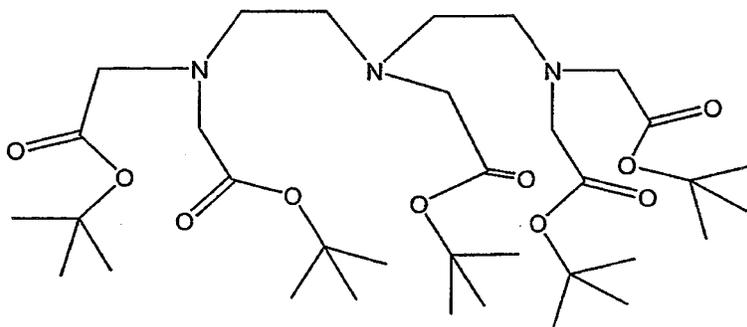


21. 如权利要求 13 所述的方法,其中所述多配位基配体包含:



其中每一  $R^7$  独立地是氢、铵或碱金属。

22. 如权利要求 13 所述的方法,其中所述具有受保护的氧原子的多配位基配体前体包含:



23. 如权利要求 13 所述的方法,其还包括在偶联剂的存在下使所述溶解或部分溶解的聚合反应物反应。

24. 如权利要求 13 所述的方法,其中所述溶剂是极性非质子溶剂。

25. 如权利要求 13 所述的方法,其还包括在催化剂的存在下使所述溶解或部分溶解的聚合反应物反应。

26. 药物组合物,其包含权利要求 1 或 2 所述的聚合物钆合物以及选自药物可接受的赋形剂、载体和稀释剂中的至少一种。

27. 包含权利要求 1 或 2 所述的聚合物钆合物的组合物在制备用于治疗或改善疾病或疾病状态的药物中的用途。

28. 包含权利要求 1 或 2 所述的聚合物钆合物的组合物在制备用于诊断疾病或疾病状态的药物中的用途。

## 聚谷氨酸盐 - 氨基酸轭合物及方法

[0001] 本申请要求于 2005 年 12 月 5 日提交的题为“聚谷氨酸盐 - 氨基酸及方法”的美国临时申请第 60/742,291 号、于 2006 年 1 月 10 日提交的题为“聚谷氨酸盐 - 天冬氨酸酯 - 紫杉烷类”的美国临时申请第 60/757,917 号和于 2006 年 4 月 10 日提交的题为“聚谷氨酸盐 - 天冬氨酸酯 - MRI 螯合物”的美国临时申请第 60/790,735 号的优先权,所有这些全部在此整体引入作为参考。

[0002] 发明背景

[0003] 发明领域

[0004] 本发明一般地涉及具有侧链官能团的生物相容性水溶性聚合物及其制备方法,并具体地涉及可用于药物、生物分子和显像剂输送等各种应用的聚谷氨酸盐氨基酸轭合物。

[0005] 相关领域描述

[0006] 已经使用多种体系来输送药物、生物分子和显像剂。例如,这样的体系包括胶囊、脂质体、微粒、纳米颗粒和聚合物。

[0007] 已经表征和研究了多种基于聚酯的生物可降解体系。聚乳酸 (PLA)、聚羟基乙酸 (PGA) 及其共聚物聚乳酸共羟基乙酸 (PLGA) 是用于药物输送应用的设计和性能的一些最充分表征的生物材料。参见 Uhrich, K. E. ;Cannizzaro, S. M. ;Langer, R. S. and Shakeshelf, K. M. “Polymeric Systems for Controlled Drug Release (用于药物控释的聚合物体系).” Chem. Rev. 1999, 99, 3181-3198 和 Panyam J, Labhasetwar V. “Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue (向细胞和组织输送药物和基因的生物可降解纳米颗粒).” Adv Drug Deliv Rev. 2003, 55, 329-47。另外,已经广泛使用甲基丙烯酸 2- 羟丙酯 (HPMA) 生产应用于药物输送的聚合物。也已经研究了基于聚原酸酯的生物可降解体系。参见 Heller, J. ;Barr, J. ;Ng, S. Y. ;Abdellauoi, K. S. and Gurny, R. “Poly(ortho esters): synthesis, characterization, properties and uses (聚(原酸酯):合成、表征、性能及应用).” Adv. Drug Del. Rev. 2002, 54, 1015-1039。也已经研究了聚酞体系。这样的聚酞体系通常是生物相容的并且可以在体内降解成相对无毒的化合物,该化合物作为代谢物从身体消除。参见 Kumar, N. ;Langer, R. S. and Domb, A. J. “Polyanhydrides: an overview (聚酞综述).” Adv. Drug Del. Rev. 2002, 54, 889-91。

[0008] 基于氨基酸的聚合物也已经被视为新生物材料的潜在来源。已经研究了具有良好生物相容性的聚氨基酸以输送低分子量化合物。已经确认了数量较少的聚谷氨酸和共聚物作为药物输送的候选物质。参见 Bourke, S. L. and Kohn, J. “Polymers derived from the amino acid L-tyrosine: polycarbonates, polyarylates and copolymers with poly(ethyleneglycol) (源自氨基酸 L-酪氨酸的聚合物:聚碳酸酯,多芳基化合物以及与聚(乙二醇)的共聚物).” Adv. Drug Del. Rev. , 2003, 55, 447-466。

[0009] 所给予的疏水性抗癌药和治疗蛋白及多肽的生物利用度通常很低。这样的低生物利用度可能是由于疏水性药物和水溶液的双相溶液的不相容性和 / 或这些分子通过酶降解从血液循环的快速消除。增加所给予蛋白及其它小分子药剂的效能的一项技术需要将所给予药剂与诸如聚乙二醇 (“PEG”) 分子的聚合物轭合,这能够在体内提供防止酶降解的保

护。这样的“PEG 化 (PEGylation)”通常改善循环时间并因此改善所给予药剂的生物利用度。

[0010] 然而,PEG 在某些方面有缺点。例如,因为 PEG 是线形聚合物,与支化聚合物相比,由 PEG 提供的空间保护有限。PEG 的另一缺点是它通常容易在其两端衍生化。这会限制能够与 PEG 辄合的其它功能性分子(例如有助于向特定组织输送蛋白或药物的那些)的数目。

[0011] 聚谷氨酸(PGA)是使疏水性抗癌药增溶的聚合物的另一选择。已经报道了多种与 PGA 辄合的抗癌药。参见 Chun Li. “Poly(L-glutamic acid)-anticancer drug conjugates(聚(L-谷氨酸)-抗癌药辄合物).” *Adv. Drug Del. Rev.*, 2002, 54, 695-713。然而,目前 FDA 没有批准任何一种。

[0012] 从太平洋紫杉树的树皮中提取的紫杉醇(Paclitaxel)(Wani et al. “Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *taxus brevifolia*(植物抗肿瘤剂. VI. 来自红豆杉的新抗白血病和抗肿瘤剂紫杉醇的分离和结构).” *J Am Chem Soc.* 1971, 93, 2325-7), 是 FDA 批准用于治疗卵巢癌和乳腺癌的药物。然而,与其它抗癌药相似,由于其疏水性和在水溶液中的难溶性,紫杉醇的生物利用度也低。使紫杉醇增溶的一种方式是将它配制在 Cremophor-EL 和无水乙醇(1 : 1, v/v)的混合物中(Sparreboom et al. “Cremophor EL-mediated Alteration of Paclitaxel Distribution in Human Blood: Clinical Pharmacokinetic Implications(人类血液中 Cremophor EL 介导的紫杉醇分布的改变:临床药物动力学推断).” *Cancer Research* 1999, 59, 1454-1457)。这样的药剂目前可以以 Taxol®商购(Bristol-Myers Squibb)。使紫杉醇增溶的另一方法是通过使用高速剪切均质化进行乳化((Constantinides et al. “Formulation Development and Antitumor Activity of a Filter-Sterilizable Emulsion of Paclitaxel(紫杉醇的可通过过滤器消毒的乳剂的配方开发和抗肿瘤活性).” *Pharmaceutical Research* 2000, 17, 175-182))。最近,已经在一些临床试验中提出聚合物-紫杉醇辄合物(Ruth Duncan “The Dawning era of polymer therapeutics(聚合物疗法的黎明时分).” *Nature Reviews Drug Discovery* 2003, 2, 347-360)。更近地,已经将紫杉醇与人白蛋白配制成纳米颗粒并已在临床研究中使用(Damascelli et al. “Intraarterial chemotherapy with polyoxyethylated castor oil free paclitaxel, incorporated in albumin nanoparticles (ABI-007): Phase II study of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck and anal canal: preliminary evidence of clinical activity(用并入到白蛋白纳米颗粒 (ABI-007) 中的不含聚氧乙烯化蓖麻油的紫杉醇进行的动脉内化疗:头颈和肛管鳞状细胞癌患者的 II 期研究:临床活性的初步证据).” *Cancer*. 2001, 92, 2592-602, 和 Ibrahim et al. “Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel(不含 Cremophor、蛋白稳定的紫杉醇纳米颗粒药剂 ABI-007 的 I 期及药物动力学研究).” *Clin Cancer Res.* 2002, 8, 1038-44)。这一药剂目前可以以 Abraxane®商购(American Pharmaceutical Partners, Inc.)。

[0013] 核磁共振成像(MRI)是疾病的诊断和进程确定中的重要工具,因为它是非侵入和非辐射的(参见 Bulte et al. “Magnetic resonance microscopy and histology of the

CNS(CNS 的核磁共振显微术和组织学).”Trends in Biotechnology 2002,20, S24-S28)。尽管能够获得组织的图像,但是具有造影剂的MRI显著改善其分辨率。然而,适用于MRI造影剂的顺磁金属离子通常有毒。降低毒性的方法之一是用诸如二亚乙基三胺五乙酸分子(DTPA)的多配位基分子与这些金属离子螯合。FDA在1988年批准Gd-DTPA用于临床用途,并且目前可以以Magnevist®商购。FDA批准了其它的Gd螯合物并可以商购,而很多其它的在开发之中(参见Caravan et al.“Gadolinium(III)Chelates asMRI Contrast agents: Structure, Dynamics, and Applications(作为MRI造影剂的钆(III)螯合物:结构,动力学和应用)。”Chem. Rev. 1999,99,2293-2352)。

[0014] 然而,由于缺乏特异性,Gd-DTPA对于靶向肿瘤组织并不理想。在经由IV注射给予Gd-DTPA时,其自发并且快速地扩散到组织的血管外空间。因此,通常需要大量的造影剂以产生合理的对比度图像。此外,它经由肾脏过滤很快消除。为了避免扩散和过滤,已经开发出大分子MRI造影剂(参见Caravan et al.“Gadolinium(III)Chelates asMRI Contrast agent:Structure,Dynamics,and Applications(作为MRI造影剂的钆(III)螯合物:结构,动力学和应用)。”Chem. Rev. 1999,99,2293-2352)。这些大分子MRI造影剂包括蛋白MRI螯合物(参见Laufferet al.“Preparation and Water Relaxation Properties of Proteins Labeledwith Paramagnetic Metal Chelates(用顺磁金属螯合物标记的蛋白的制备和水弛豫性能)。”Magn, Reson. Imaging 1985,3,11-16)、多糖MRI螯合物(参见Sirlin et al.“Gadolinium-DTPA-Dextran:A MacromolecularMR Blood Pool Contrast agent(钆-DTPA-右旋糖苷:大分子MR血池造影剂)。”Acad Radiol. 2004,11,1361-1369)和聚合物-MRI螯合物(参见Lu et al.“Poly(L-glutamic acid)Gd(III)-DOTA conjugate with aDegradable Spacer for Magnetic Resonance Imaging(用于核磁共振成像的具有可降解间隔区的聚(L-谷氨酸)Gd(III)-DOTA 轭合物)。”Bioconjugate Chem. 2003,14,715-719以及Wen et al.“Synthesis andCharacterization of Poly(L-glutamic acid)Gadolinium Chelate:A NewBiodegradable MRI Contrast agent(聚(L-谷氨酸)钆螯合物的合成与表征:新的生物可降解的MRI造影剂)。”Bioconjugate Chem. 2004,15,1408-1415)。

[0015] 最近,已经开发了组织特异性MRI造影剂(参见Weinmann et al.“Tissue-specific MR contrast agents(组织特异性MR造影剂)。”Eur. J. Radiol. 2003,46,33-44)。然而,尚未在临床应用中报道肿瘤特异性MRI造影剂。已经报道纳米尺寸的颗粒经由增强的渗透和滞留(EPR)效应而靶向肿瘤组织(参见Brannon-Peppas et al.“Nanoparticle and targetedsystems for cancer therapy(癌症治疗的纳米颗粒和靶向体系)。”ADDR2004,56,1649-1659)。

[0016] 发明概述

[0017] 相对疏水的显像剂和药物(如某些疏水性抗癌药、治疗蛋白和多肽)通常生物利用度低。据信该问题至少部分是由于这些显像剂和药物在水体系中的溶解度低。某些可以酶降解的药物生物利用度也低,因为它们在循环系统中降解较快而导致从身体快速消除。

[0018] 本发明人已经发现能够与诸如显像剂和/或药物的多种药剂轭合的一系列新颖的聚谷氨酸盐-氨基酸。在某些实施方案中,聚合物和所得轭合物优先在某些组织(如肿瘤组织)积聚,从而可用于向身体的特定部分(如肿瘤)输送药物(如抗癌药)和/或显

像剂。在某些实施方案中,聚合物和所得聚合物轭合物形成纳米颗粒,所述纳米颗粒通过将显像剂和 / 或药物以分子水平分散而使其在水体系中有效增溶,从而增加功能性和 / 或生物利用度。

[0019] 一实施方案提供包含如下所述的通式 (I) 重复单元和通式 (II) 重复单元的聚合物轭合物,其中:每一  $n$  独立地是 1 或 2;每一  $A^1$  是氧或  $NR^5$ ;每一  $A^2$  是氧; $R^1$  和  $R^2$  各自独立地选自  $C_{1-10}$  烷基、 $C_{6-20}$  芳基、铵、碱金属、多配位基配体、具有受保护的氧原子的多配位基配体前体或包含药剂的化合物;其中所述药剂选自抗癌药、靶向药、光学显像剂或磁共振显像剂;其中  $R^1$  和  $R^2$  中的至少一个是包含药剂的基团; $R^3$  和  $R^4$  各自独立地选自氢、铵或碱金属;其中所述聚合物轭合物包含的药剂质量基于药剂与聚合物轭合物的质量比为 1% 至 50% (重量 / 重量); $R^5$  为氢或  $C_{1-4}$  烷基;并且其中选择药剂的量、通式 (I) 重复单元的百分比和通式 (II) 重复单元的百分比以使聚合物轭合物的溶解度大于包含基本相同量药剂的对照聚谷氨酸轭合物的溶解度,当在 22°C 下在 0.9 重量%的 NaCl 水溶液中包含至少 5mg/mL 聚合物轭合物的测试聚合物轭合物溶液在较宽的 pH 范围内具有大于对照测试聚谷氨酸轭合物溶液的光学透明度时,所述聚合轭合物溶解度更大。

[0020] 另一实施方案提供上述聚合物轭合物的制备方法,包括将聚合反应物溶解或部分溶解在溶剂中以形成溶解或部分溶解的聚合反应物;以及使溶解或部分溶解的聚合反应物与第二反应物反应,其中所述第二反应物包含多配位基配体、具有受保护的氧原子的多配位基配体前体和包含药剂的化合物中的至少一种。

[0021] 另一实施方案提供药物组合物,其包含本文所述的聚合物轭合物,并且还包含药物可接受的赋形剂、载体和稀释剂中的至少一种。

[0022] 另一实施方案提供治疗或改善疾病或疾病状态的方法,包括向有需要的哺乳动物给予有效量的本文所述的聚合物轭合物。

[0023] 另一实施方案提供诊断疾病或疾病状态的方法,包括向哺乳动物给予有效量的本文所述的聚合物轭合物。

[0024] 另一实施方案提供本文所述的聚合物轭合物在制备用于治疗或改善疾病或疾病状态的药物中的用途。

[0025] 另一实施方案提供本文所述的聚合物轭合物在制备用于诊断疾病或疾病状态的药物中的用途。

[0026] 下文将更详细地描述这些和其它的实施方案。

[0027] 附图简述

[0028] 图 1 例示制备聚( $\gamma$ -L-天冬氨酰谷氨酰胺)的反应式。

[0029] 图 2 例示制备聚( $\gamma$ -L-天冬氨酰谷氨酰胺)-聚 L-谷氨酸的反应式。

[0030] 图 3 例示制备聚( $\gamma$ -L-天冬氨酰谷氨酰胺)的另一反应式。

[0031] 图 4 例示制备聚( $\gamma$ -L-谷氨酰基谷氨酰胺)的反应式。

[0032] 图 5 例示制备聚( $\gamma$ -L-谷氨酰基谷氨酰胺)-聚 L-谷氨酸的反应式。

[0033] 图 6 例示制备 PGA-97-A-德克萨斯红的反应式。

[0034] 图 7 例示制备 PGA-97-A-DTPA 的反应式。

[0035] 图 8 例示制备 PGA-97-A-DTPA-Gd(III) 的反应式。

[0036] 图 9 例示制备 PGA-A-PTX 的一般反应式。

- [0037] 图 10 例示制备 PGA-G-PTX 的一般反应式。
- [0038] 图 11 例示 C2'-紫杉醇-谷氨酸和 C7-紫杉醇-谷氨酸的化学结构及其 HPLC 和 LC-MS 时间。
- [0039] 图 12 例示制备 PGA-97-G-27 的反应式。
- [0040] 图 13 示出例示 PGA-44-A-20、PGA-97-A-20 和 PGA(97k)-PTX-20(对照)在若干不同浓度下对 B16F0 黑素瘤细胞增殖的效果的图。
- [0041] 图 14 示出例示 PGA-97-A-10、PGA(97k)-PTX-10、聚( $\gamma$ -L-天冬氨酰谷氨酰胺)钠盐和紫杉酚在若干不同药物浓度下对 B16F0 黑素瘤细胞增殖的效果的图。
- [0042] 图 15 示出例示在裸 nu/nu 小鼠中的 B16F0 黑素瘤肿瘤上 PGA-44-A-19 和紫杉酚的紫杉醇血浆浓度随时间变化的图。
- [0043] 图 16 示出例示在裸 nu/nu 小鼠中的 B16F0 黑素瘤肿瘤上 PGA-44-A-19 和紫杉酚的紫杉醇肿瘤浓度随时间变化的图。
- [0044] 图 17 示出例示在用 PGA-21-G-20、PGA-32-G-20、Abraxane 和生理盐水在各自的最大耐受剂量下处理裸 nu/nu 小鼠时的体重改变(%)随时间变化的图。
- [0045] 图 18 示出例示 PGA-21-G-20、PGA-32-G-20、Abraxane 和生理盐水在其各自的最大耐受剂量下对裸 nu/nu 小鼠中的 B16F0 转化的 EGF 黑素瘤肿瘤的抗肿瘤效果随时间变化的图。
- [0046] 图 19 示出例示在用 PGA-97-G-20、紫杉酚、Abraxane 和生理盐水在其各自的最大耐受剂量下处理裸 nu/nu 小鼠时的体重改变(%)随时间变化的图。
- [0047] 图 20 示出例示 PGA-97-G-20、紫杉酚、Abraxane 和生理盐水在其各自的最大耐受剂量下对裸 nu/nu 小鼠中的 B16F0 转化的 EGF 黑素瘤肿瘤的抗肿瘤效果随时间变化的图。
- [0048] 图 21 示出例示在用 PGA-32-G-20、PGA(32k)-PTX-20 和生理盐水在其各自的最大耐受剂量下处理裸 nu/nu 小鼠时的体重改变(%)随时间变化的图。
- [0049] 图 22 示出例示 PGA-32-G-20、PGA(32k)-PTX-20 和生理盐水在其各自的最大耐受剂量下对裸 nu/nu 小鼠中的 B16F0 转化的 EGF 黑素瘤肿瘤的抗肿瘤效果随时间变化的图。
- [0050] 图 23 示出例示磷酸盐缓冲液中在 2mg/mL 的聚合物-紫杉醇轭合物浓度下紫杉醇释放随时间变化的图。
- [0051] 图 24 示出例示血浆中 PGA-21-G-19、PGA-32-G-19、PGA-97-G-24 和紫杉酚的紫杉醇浓度随时间变化的图。
- [0052] 图 25 示出例示肿瘤中 PGA-21-G-19、PGA-32-G-19、PGA-97-G-24 和紫杉酚的紫杉醇浓度随时间变化的图。
- [0053] 图 26 示出例示 PGA-97-A-DTPA-Gd(III) 和 Omniscan™(钆双胺)对裸 nu/nu 小鼠中 B16F0 黑素瘤肿瘤的肿瘤积聚效果随时间变化的图。
- [0054] 图 27 例示 PGA-44-A-20 的冷冻断裂电子显微图象的复制图。
- [0055] 图 28 示出例示静态光散射(粒径)与 PGA-44-A-20 和 PGA-97-A-20 的浓度的关系图。
- [0056] 图 29 示出例示静态光散射(粒径)与 PGA-21-G-20 和 PGA-32-G-20 的浓度的关系图。
- [0057] 优选实施方案详述

[0058] 术语“酯”在此以其通常的含义使用,并因此包括具有通式  $-(R)_n-COOR'$  的化学部分,其中 R 和 R' 独立地选自烷基、环烷基、芳基、杂芳基(通过环碳连接)或杂脂环基(通过环碳连接),并且其中 n 为 0 或 1。

[0059] 术语“酰胺”在此以其通常的含义使用,并因此包括具有通式  $-(R)_n-C(O)NHR'$  或  $-(R)_n-NHC(O)R'$  的化学部分,其中 R 和 R' 独立地选自烷基、环烷基、芳基、杂芳基(通过环碳连接)或杂脂环基(通过环碳连接),并且其中 n 为 0 或 1。酰胺可以被包括在连接于如本文所述的药物分子的氨基酸或肽分子中,从而形成药物前体。

[0060] 在此公开的化合物上的任何胺、羟基或羧基侧链都能够酯化或酰胺化。用来实现这一目标的操作和具体基团是本领域技术人员已知的,并且能够轻易地在诸如 Greene and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis* (有机合成中的保护基团), 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999 的参考文献来源中找到,在此将其整体引入作为参考。

[0061] 本文所用的“烷基”是指包含完全饱和(无双键或三键)的烃基团的直链或支链烃链。烷基可以含有 1 至 20 个碳原子(每当出现在本文中时,诸如“1 至 20”的数字范围是指给定范围内的每一整数;例如,“1 至 20 个碳原子”意为烷基可以由 1 个碳原子、2 个碳原子、3 个碳原子等等直至并包括 20 个碳原子组成,尽管本定义也包括没有指定数字范围的术语“烷基”的情况)。烷基也可以是具有 1 至 10 个碳原子的中等大小的烷基。烷基也可以是具有 1 至 5 个碳原子的低级烷基。可以将化合物的烷基指定为“ $C_1-C_4$  烷基”或类似的指定。仅以实例的方式,“ $C_1-C_4$  烷基”表明在烷基链中有一至四个碳原子,即,烷基链选自甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基或叔丁基。典型的烷基包括但绝不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、己基等。

[0062] 烷基可以被取代或不被取代。被取代时,取代基是一个或多个基团,其各自独立地选自烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基、杂脂环基、芳烷基、杂芳烷基、(杂脂环基)烷基、羟基、受保护的羟基、烷氧基、芳氧基、酰基、酯、巯基、烷硫基、芳硫基、氰基、卤素、羰基、硫代羰基、O-氨基甲酰基、N-氨基甲酰基、O-硫代氨基甲酰基、N-硫代氨基甲酰基、C-酰胺基、N-酰胺基、S-亚磺酰胺基、N-亚磺酰胺基、C-羧基、受保护的 C-羧基、O-羧基、异氰酸基、硫氰酸基(thiocyanato)、异硫氰酸基(isothiocyanato)、硝基、甲硅烷基、亚氧硫基、亚硫酰基、磺酰基、卤烷基、卤烷氧基、三卤代甲烷磺酰基、三卤代甲烷亚磺酰胺基或包括单和双取代氨基及其受保护的衍生物的氨基。每当取代基被描述为“被任选地取代”时,该取代基可以用上述取代基之一取代。

[0063] “顺磁金属螯合物”是其中配体与顺磁金属离子结合的络合物。实例包括,但不限于,1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)-Gd(III)、DOTA-钇-88、DOTA-镱-111、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)-Gd(III)、DTPA-钇-88、DTPA-镱-111。

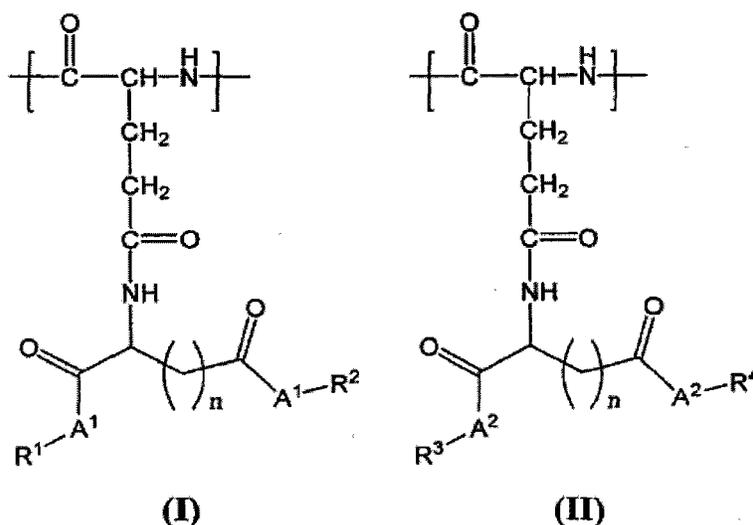
[0064] “多配位基配体”是本身能够经由两个或多个连接点通过例如配位共价键与金属离子结合的配体。多配位基配体的实例包括,但不限于二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)、(1,2-亚乙基二氨基)四乙酸盐(EDTA)、乙二胺、2,2'-二吡啶(bipy)、1,10-菲咯啉(phen)、1,2-双(联苯膦基)乙烷(DPPE)、2,4-戊烷二酮(acac)和草酸盐(ox)。

[0065] “具有受保护的氧原子的多配位基配体前体”是用适当的保护基团保护的、包含氧原子的多配位基配体,所述氧原子如羧基的单键结合氧原子。适当的保护基团包括但不限

于低级烷基、苄基和甲硅烷基。

[0066] 一实施方案提供包含通式 (I) 重复单元和通式 (II) 重复单元的聚合物轭合物：

[0067]



[0068] 其中每一  $n$  独立地是 1 或 2, 每一  $\text{A}^1$  是氧或  $\text{NR}^5$ , 每一  $\text{A}^2$  是氧,  $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  各自独立地选自任选取代的  $\text{C}_{1-10}$  烷基、任选取代的  $\text{C}_{6-20}$  芳基、铵、碱金属、多配位基配体、具有受保护的氧原子的多配位基配体或包含药剂的化合物。碱金属的实例包括锂 (Li)、钠 (Na)、钾 (K)、铷 (Rb) 和铯 (Cs)。在一实施方案中, 碱金属是钠。

[0069] 药剂可以包含任意数目的活性化合物。例如, 药剂可以选自抗癌药、靶向药剂、光学显像剂或磁共振显像剂。 $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  基团中的至少一个是包含所述药剂的基团。通式 (II) 重复单元可以包含或不包含药剂。在一实施方案中,  $\text{R}^3$  和  $\text{R}^4$  各自独立地选自氢、铵或碱金属。在另一实施方案中,  $\text{R}^5$  是氢原子或  $\text{C}_{1-4}$  烷基。

[0070] 聚合物轭合物中存在的药剂的量能够在很宽的范围内变化。在一实施方案中, 聚合物轭合物包含基于药剂与聚合物轭合物质量比约 1% 至约 50% (重量/重量) 的药剂。在另一实施方案中, 聚合物轭合物包含基于药剂与聚合物轭合物质量比约 5% 至约 40% (重量/重量) 的药剂。在另一实施方案中, 聚合物轭合物包含基于药剂与聚合物轭合物质量比约 10% 至约 30% (重量/重量) 的药剂。

[0071] 现已发现, 可以选择药剂的量以及通式 (I) 和通式 (II) 重复单元的百分数以有利地控制所得聚合物轭合物的溶解性。例如, 在优选的实施方案中, 选择药剂的量以及通式 (I) 和通式 (II) 重复单元的百分数, 使得聚合物轭合物在所关注的具体 pH 和 / 或 pH 范围内可溶 (或难溶)。在某些实施方案中, 也选择聚合物的分子量以控制溶解度。下文提供的实施例例示了通过适当选择药剂、通式 (I) 和通式 (II) 重复单元的百分数以及分子量来控制溶解度。得知本文提供的指导的本领域技术人员能够使用常规试验确定导致具有期望溶解度特性的聚合物轭合物的适当的药剂量和通式 (I) 和通式 (II) 重复单元百分数。取决于应用, 对溶解度进行这样的控制可以是有利的。例如, 本文提供的聚合物轭合物的实施方案可用于为用别的方式溶解度低的抗癌药的提供改善的向选定组织的输送, 优选减少不期望的副作用, 和 / 或减少个体需要服用抗癌药的频率。

[0072] 优选对药剂量和通式 (I) 和通式 (II) 重复单元百分数进行选择以使聚合物轭合

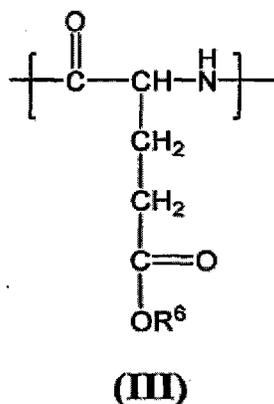
物的溶解度大于包含基本相同量的相同药剂的对照聚谷氨酸铎合物的溶解度。在一实施方案中,聚合物铎合物的溶解度大于对照聚谷氨酸铎合物的溶解度。通过形成在约 22°C 的 0.9 重量%的 NaCl 水溶液中包含至少 5mg/mL 的聚合物铎合物的聚合物铎合物溶液,并测定光学透明度来测量溶解度。光学透明度可以用比浊法测定,例如通过肉眼观察或通过本领域技术人员已知的适当的仪器方法。将所得溶解度与类似形成的聚谷氨酸铎合物溶液的溶解度进行比较显示溶解度的改善,其证据是在较宽的 pH 值范围内更大的光学透明度。因此,当在约 22°C 的 0.9 重量%的 NaCl 水溶液中包含至少 5mg/mL 的聚合物铎合物的测试聚合物铎合物溶液在较宽的 pH 值范围内光学透明度大于对照测试聚谷氨酸铎合物溶液的光学透明度时,聚合物铎合物的溶解度大于包含基本相同量的药剂的对照聚谷氨酸铎合物的溶解度。本领域技术人员会理解,“对照”聚谷氨酸铎合物是这样的对照物质,其中铎合物的聚合部分的分子量同与其相比较的对象聚合物铎合物(包含通式 (I) 重复单元和通式 (II) 重复单元)大致相同。

[0073] 聚合物铎合物能够含有一个或多个手性碳原子。手性碳原子(可以用星号 \* 标出)能够具有右侧(右手)或左侧(左手)构型,并且重复单元因此可以是外消旋的、对映异构的或对映异构富集的。除非另有说明,本文中其它位置所用的符号“n”和“\*” (代表手性碳)与上述含义相同。

[0074] 包含通式 (I) 重复单元和通式 (II) 重复单元的聚合物是包含两个或多个不同的通式 (I) 和通式 (II) 重复单元的共聚物。此外,包含通式 (I) 重复单元和通式 (II) 重复单元的聚合物可以是包含非通式 (I) 和非通式 (II) 其它重复单元的共聚物。聚合物中通式 (I) 重复单元和通式 (II) 重复单元的数目不受限制,但优选为约 50 至约 5,000,并优选为约 100 至约 2,000。

[0075] 具有通式 (I) 重复单元和通式 (II) 重复单元的聚合物铎合物中可包括多种其它重复单元。在一实施方案中,聚合物铎合物还包括通式 (III) 重复单元:

[0076]



[0077] 其中  $R^6$  基团是氢、铵或碱金属。当  $R^6$  基团是氢时,通式 (III) 重复单元是谷氨酸重复单元。

[0078] 包含药剂的化合物可以以多种不同方式与聚合物铎合。在一实施方案中,包含药剂的化合物能够直接连接于重复单元。在另一实施方案中,包含药剂的化合物还包含连接基团,连接基团是将药剂(或包含药剂的化合物)连接于聚合物的基团。连接基团可以较小。例如,连接基团可以包含胺、酰胺、醚、酯、羟基、羰基或硫醇基。或者,连接基团可以较

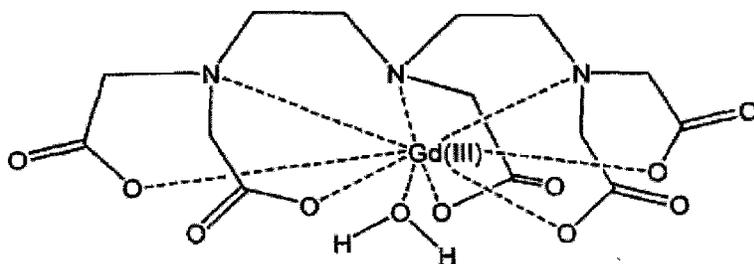
大。例如,连接基团可以包含烷基、烷氧基、芳基、芳基(C<sub>1-6</sub>烷基)、杂芳基或杂芳基(C<sub>1-6</sub>烷基)。

[0079] 药剂可以包括任何类型的活性化合物。在一实施方案中,药剂可以是光学显像剂。在优选实施方案中,光学显像剂选自吡啶染料、香豆素染料、若丹明染料、咕吨染料、花青染料和芘染料的一个或多个。例如,具体的光学显像剂可以包括可商购的或易于通过本领域技术人员已知的方法制备的德克萨斯红、Alexa Fluor®染料、BODIPY®染料、荧光素、Oregon Green®染料和 Rhodamine Green™ 染料。

[0080] 在另一实施方案中,药剂包含抗癌药。在一实施方案中,抗癌药可选自紫杉烷类、喜树碱或阿霉素。当药剂包含紫杉烷类时,优选紫杉烷类是紫杉醇或多西紫杉醇。紫杉醇可以经由紫杉醇的 C2' 碳在氧原子处与通式 (I) 重复单元或通式 (II) 重复单元辄合。或者或此外,紫杉醇可以经由紫杉醇的 C7 碳在氧原子处与通式 (I) 重复单元或通式 (II) 重复单元辄合。

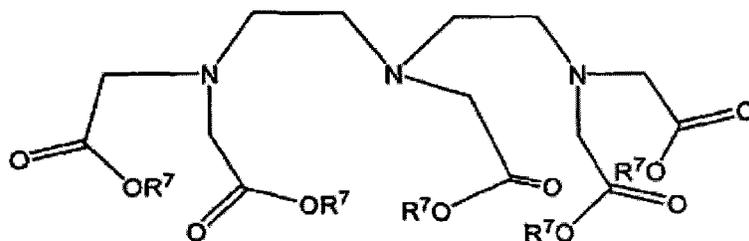
[0081] 在另一实施方案中,药剂包含磁共振显像剂。在一实施方案中,磁共振显像剂包含顺磁金属化合物。例如,磁共振显像剂可以包含 Gd(III) 化合物。在这样的例子中,Gd(III) 化合物可以是:

[0082]



[0083] 在另一实施方案中,药剂包含多配位基配体。在一实施方案中,多配位基配体可以能够与顺磁金属反应形成磁共振显像剂。例如,多配位基配体可以包含若干羧酸和 / 或羧酸盐基团。在一实施方案中,多配位基配体包含如下结构的化合物:

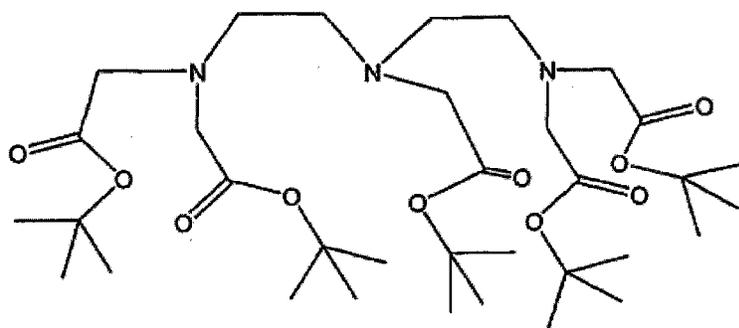
[0084]



[0085] 其中每一 R<sup>7</sup> 独立地选自氢、铵或碱金属。

[0086] 在另一实施方案中,药剂包含多配位基配体前体。在这样的实施方案中,多配位基配体的氧原子被适当的保护基团所保护。适当的保护基团包括但不限于低级烷基、苄基和甲硅烷基。具有保护基团的多配位基配体前体的实例提供如下:

[0087]



[0088] 基于重复单元总数, 聚合物轭合物中通式 (I) 重复单元的百分数可以在很宽的范围内变化。在一实施方案中, 基于通式 (I) 和 (II) 重复单元的总摩尔数, 聚合物可以包含约 1 摩尔% 至约 99 摩尔% 的通式 (I) 重复单元。在另一实施方案中, 基于通式 (I) 和 (II) 重复单元的总摩尔数, 聚合物可以包含约 1 摩尔% 至约 50 摩尔% 的通式 (I) 重复单元。在另一实施方案中, 基于通式 (I) 和 (II) 重复单元的总摩尔数, 聚合物可以包含约 1 摩尔% 至约 30 摩尔% 的通式 (I) 重复单元。在另一实施方案中, 基于通式 (I) 和 (II) 重复单元的总摩尔数, 聚合物可以包含约 1 摩尔% 至约 20 摩尔% 的通式 (I) 重复单元。在另一实施方案中, 基于通式 (I) 和 (II) 重复单元的总摩尔数, 聚合物可以包含约 1 摩尔% 至约 10 摩尔% 的通式 (I) 重复单元。

[0089] 除了通式 (I) 和 (II) 重复单元, 聚合物轭合物可以包含多种其它的重复单元。例如, 在一实施方案中, 聚合物轭合物包含通式 (III) 重复单元。基于包含通式 (I)、(II) 和 (III) 重复单元的聚合物轭合物中的重复单元总数, 通式 (I) 重复单元的百分数可以在很宽的范围内变化。在一实施方案中, 基于通式 (I)、(II) 和 (III) 重复单元的总摩尔数, 聚合物轭合物可以包含约 1 摩尔% 至约 99 摩尔% 的通式 (I) 重复单元。在另一实施方案中, 基于通式 (I)、(II) 和 (III) 重复单元的总摩尔数, 聚合物轭合物可以包含约 1 摩尔% 至约 50 摩尔% 的通式 (I) 重复单元。在另一实施方案中, 基于通式 (I)、(II) 和 (III) 重复单元的总摩尔数, 聚合物轭合物可以包含约 1 摩尔% 至约 30 摩尔% 的通式 (I) 重复单元。在另一实施方案中, 基于通式 (I)、(II) 和 (III) 重复单元的总摩尔数, 聚合物轭合物可以包含约 1 摩尔% 至约 20 摩尔% 的通式 (I) 重复单元。在另一实施方案中, 基于通式 (I)、(II) 和 (III) 重复单元的总摩尔数, 聚合物轭合物可以包含约 1 摩尔% 至约 10 摩尔% 的通式 (I) 重复单元。

[0090] 在一实施方案中, 通式 (I) 重复单元和通式 (II) 重复单元中的至少一  $n$  为 1。在另一实施方案中, 通式 (I) 重复单元和通式 (II) 重复单元中的至少一  $n$  为 2。

[0091] 在一实施方案中, 选择聚合物轭合物中的药剂量、通式 (I) 重复单元和通式 (II) 重复单元的百分数, 以使聚合物轭合物的溶解度大于包含基本相同量的药剂的对照聚谷氨酸轭合物的溶解度。包含通式 (I) 和通式 (II) 重复单元的聚合物轭合物的溶解度大于对照聚谷氨酸轭合物的溶解度的 pH 值范围可以窄或宽。如上指出的那样, 通过形成在约 22°C 的 0.9 重量% 的 NaCl 水溶液中包含至少 5mg/mL 的聚合物轭合物的聚合物轭合物溶液, 并测定光学透明度来测量溶解度。在一实施方案中, 聚合物轭合物在至少约三个 pH 单位的 pH 范围内可溶。在另一实施方案中, 聚合物轭合物在至少约八个 pH 单位的 pH 范围内可溶。在另一实施方案中, 聚合物轭合物在至少约九个 pH 单位的 pH 范围内可溶。在另一实施方案

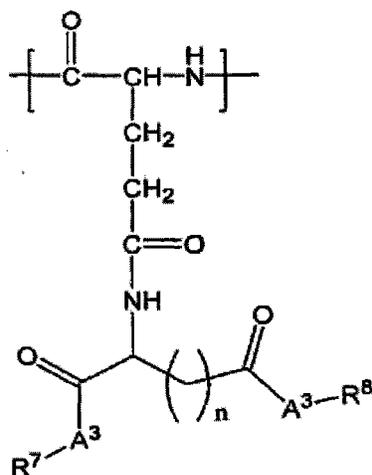
中,聚合物羧合物可溶的 pH 范围包括约 2 至约 5 范围内的至少一 pH 值,例如 pH = 2、pH = 3、pH = 4 和 / 或 pH = 5。优选地,聚合物羧合物可溶的 pH 范围比对照聚谷氨酸羧合物可溶的 pH 范围宽。例如,在一实施方案中,聚合物羧合物可溶的 pH 范围比对照聚谷氨酸羧合物可溶的 pH 范围宽至少约一个 pH 单位,优选宽至少约二个 pH 单位。

[0092] 置于溶液中以测量溶解度的聚合物羧合物的量也能够较大地变化。在一实施方案中,在测试聚合物羧合物溶液包含至少约 5mg/mL 聚合物羧合物时测定溶解度。在另一实施方案中,在测试聚合物羧合物溶液包含至少约 10mg/mL 聚合物羧合物时测定溶解度。在另一实施方案中,在测试聚合物羧合物溶液包含至少约 25mg/mL 聚合物羧合物时测定溶解度。在另一实施方案中,在测试聚合物羧合物溶液包含至少约 100mg/mL 聚合物羧合物时测定溶解度。在另一实施方案中,在测试聚合物羧合物溶液包含至少约 150mg/mL 聚合物羧合物时测定溶解度。本领域技术人员会理解,对照聚谷氨酸羧合物是在与测试聚合物羧合物大约相同的浓度下测试的。

[0093] 包含通式 (I) 重复单元和通式 (II) 重复单元的聚合物可以以多种方式制备。在一实施方案中,将聚合反应物溶解或部分溶解在溶液中以形成溶解或部分溶解的聚合反应物。然后使溶解或部分溶解的聚合反应物与第二反应物反应形成中间产物,或在某些实施方案中,形成包含通式 (I) 重复单元和通式 (II) 重复单元的聚合物。

[0094] 聚合反应物可以包含任何能够形成包含通式 (I) 重复单元和通式 (II) 重复单元的聚合物的适当的物质。在一实施方案中,聚合反应物包含通式 (IV) 重复单元。

[0095]

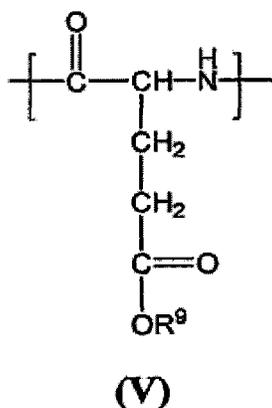


(IV)

[0096] 其中每一 n 独立地是 1 或 2,每一 A<sup>3</sup> 是氧,并且 R<sup>7</sup> 和 R<sup>8</sup> 各自独立地选自氢、铵或碱金属。

[0097] 在一实施方案中,聚合反应物可以包含通式 (V) 重复单元:

[0098]



[0099] 其中  $\text{R}^9$  是氢、铵或碱金属。

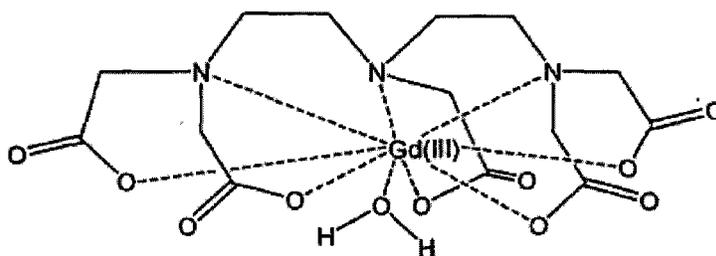
[0100] 第二反应物可以是多种化合物。在一实施方案中，第二反应物包含多配位基配体、具有受保护的氧原子的多配位基配体前体和包含药剂的化合物中的至少一个。在一实施方案中，第二反应物可包含取代基。取代基可选自羟基或胺基。

[0101] 在一实施方案中，第二反应物包含含有药剂的化合物。药剂可以是任何活性化合物。例如，包含药剂的化合物可选自抗癌药、靶向药剂、光学显像剂或磁共振显像剂。在一实施方案中，光学显像剂可以选自吡啶染料、香豆素染料、若丹明染料、咕吨染料、花青染料或芘染料。在另一实施方案中，抗癌药能够选自紫杉烷类、喜树碱或阿霉素。在优选实施方案中，抗癌药可以包含紫杉烷类，并且紫杉烷类可选自紫杉醇或多西紫杉醇。

[0102] 紫杉醇可以以多种方式与聚合物轭合。在一实施方案中，紫杉醇在连接于  $\text{C}2'$  上的氧原子处与通式 (I) 重复单元轭合。在另一实施方案中，紫杉醇在连接于  $\text{C}7$  上的氧原子处与通式 (I) 重复单元轭合。

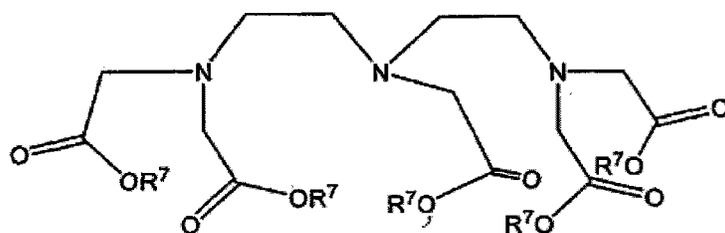
[0103] 在一实施方案中，包含药剂的化合物包括磁共振显像剂。在另一实施方案中，磁共振显像剂包含顺磁金属化合物。优选地，包含药剂的化合物包括  $\text{Gd(III)}$  化合物。例如，包含药剂的化合物可以包含如下结构：

[0104]



[0105] 在一实施方案中，多配位基配体可以与聚合物轭合。可以使用任何适当的多配位基配体。在一实施方案中，多配位基配体可以能够与顺磁金属反应形成磁共振显像剂。例如，多配位基配体可以包含若干羧酸和 / 或羧酸盐基团。例如，聚合物可以与如下结构的多配位基配体轭合：

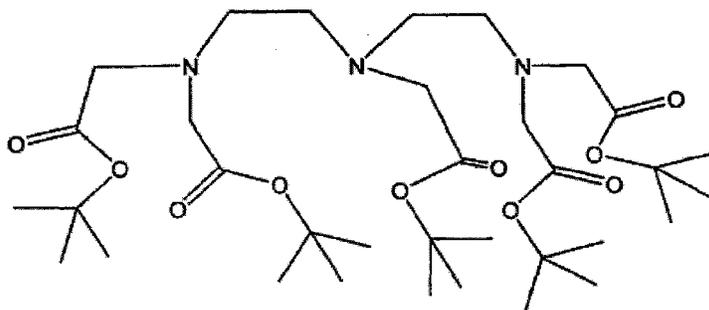
[0106]



[0107] 其中每一 R<sup>7</sup> 独立地是氢、铵或碱金属。

[0108] 在另一实施方案中,具有保护基团的多配位基配体前体可以与聚合物轭合。这样的前体具有受适当的保护基团保护的氧原子。适当的保护基团包括但不限于低级烷基、苄基和甲硅烷基。具有保护基团的多配位基配体前体的一实例提供如下:

[0109]



[0110] 在一实施方案中,聚合物轭合物的制备方法包括使溶解或部分溶解的聚合反应物与第二反应物在偶联剂的存在下反应。可以使用任何适当的偶联剂。在一实施方案中,偶联剂选自 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺 (EDC)、1,3-二环己基碳二亚胺 (DCC)、1,1'-羰基-二咪唑 (CDI)、N,N'-琥珀酰亚氨基碳酸酯 (DSC)、六氟磷酸 N-[(二甲氨基)-1H-1,2,3-三唑并-[4,5-b]吡啶-1-基-亚甲基]-N-甲基甲铵盐 N-氧化物 (HATU)、六氟磷酸 2-[(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基铵盐 (HBTU)、六氟磷酸 2-[(6-氯-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基铵盐 (HCTU)、六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧-三吡咯烷基磷盐 (PyBOP<sup>®</sup>)、六氟磷酸溴代-三吡咯烷基磷盐 (PyBroP<sup>®</sup>)、四氟硼酸 2-[(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基铵盐 (TBTU) 或六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧-三(二甲氨基)磷盐 (BOP)。

[0111] 可以使用允许反应发生的任何适当的溶剂。在一实施方案中,溶剂可以是极性非质子溶剂。例如,溶剂可选自 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)、二甲亚砜 (DMSO)、N-甲基-2-吡啶酮 (NMP) 或 N,N-二甲基乙酰胺 (DMAc)。

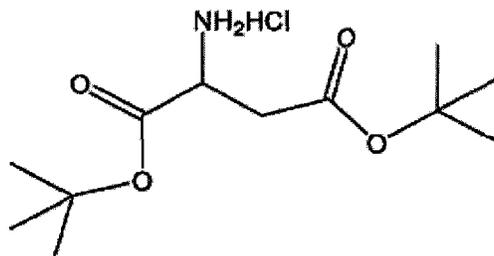
[0112] 在另一实施方案中,反应还可以包括在催化剂的存在下使溶解或部分溶解的聚合反应物反应。可以使用促进反应的任何催化剂。在一实施方案中,催化剂可包含 4-二甲氨基吡啶 (DMAP)。

[0113] 在一实施方案中,包含通式 (I) 重复单元和通式 (II) 重复单元的聚合物能够由聚谷氨酸和诸如天冬氨酸和 / 或谷氨酸的氨基酸开始制备。或者,在另一实施方案中,聚合物可以通过首先将起始聚谷氨酸物质转化成其盐形式来制备。聚谷氨酸的盐形式能够通过使聚谷氨酸与诸如碳酸氢钠的适当的碱反应来获得。聚谷氨酸的侧链羧酸基团能够连接氨基酸部分。聚谷氨酸的重均分子量不受限制,但优选为约 10,000 至约 500,000 道尔顿,且更

优选为约 25,000 至约 300,000 道尔顿。这样的反应可以用来制备聚(γ-L-天冬氨酰-谷氨酰胺)或聚(γ-L-谷氨酰基-谷氨酰胺)。

[0114] 在一实施方案中,在连接到聚谷氨酸上之前,氨基酸受保护基保护。适于该反应的受保护的氨基酸部分的一实例是如下所示的 L-天冬氨酸二叔丁酯盐酸盐:

[0115]



[0116] L-天冬氨酸二叔丁酯盐酸盐

[0117] 聚谷氨酸与氨基酸的反应可以在任何适当的溶剂的存在下发生。在一实施方案中,溶剂可以是非质子溶剂。在优选实施方案中,溶剂是 N, N' - 二甲基甲酰胺。

[0118] 在一实施方案中,能够使用诸如 EDC、DCC、CDI、DSC、HATU、HBTU、HCTU、PyBOP<sup>®</sup>、PyBroP<sup>®</sup>、TBTU 和 BOP 的偶联剂。在其它实施方案中,能够使用催化剂(例如, DMAP)使谷氨酰胺和氨基酸反应。

[0119] 反应完成后,如果氨基酸的氧原子被保护,能够使用已知方法如使用适当的酸(例如三氟乙酸)除去保护基团。若需要,得自使聚谷氨酸与氨基酸反应的聚合物的盐形式能够通过用诸如碳酸氢钠溶液的适当的碱溶液处理聚合物的酸形式来形成。

[0120] 可以通过本领域技术人员已知的方法回收和/或纯化聚合物。例如,可以通过诸如旋转蒸发的适当的方法除去溶剂。此外,可以将反应混合物过滤入酸性水溶液中以诱导沉淀。然后能够将所得沉淀过滤并用水洗涤。

[0121] 在一实施方案中,包含通式 (I) 重复单元和通式 (II) 重复单元的聚合物还能够包括如上所述的通式 (III) 重复单元。形成包含通式 (I)、(II) 和 (III) 重复单元的聚合物的方法之一是通过由聚谷氨酸开始并使之与诸如天冬氨酸和/或谷氨酸的氨基酸反应,其量为基于聚谷氨酸小于 1.0 当量的氨基酸。例如,在一实施方案中,能够用聚谷氨酸与 0.7 当量的基于聚谷氨酸的氨基酸反应,使得所得聚合物中约 70% 的重复单元包含氨基酸。如上文所讨论的,能够用适当的保护基团保护氨基酸的氧原子。在一实施方案中,氨基酸可以是 L-天冬氨酸或 L-谷氨酸。在另一实施方案中,能够用叔丁基保护氨基酸的氧原子。若氨基酸的氧原子被保护,则能够用已知方法如适当的酸(例如三氟乙酸)除去保护基团。

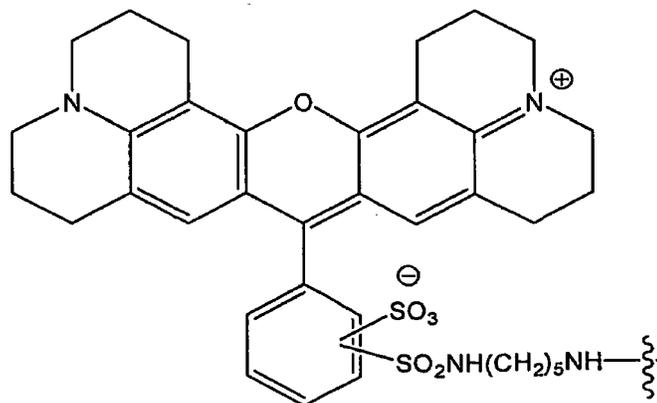
[0122] 包含药剂、多配位基配体和/或具有受保护的氧原子的多配位基配体前体的基团与聚合物酸或其盐形式的辄合可以以多种方式进行,例如,通过将包含药剂、多配位基配体和/或具有受保护的氧原子的多配位基配体前体的基团共价结合到各种聚合物上。前述基团与得自聚谷氨酸和/或盐的聚合物辄合的方法之一是使用加热(例如通过使用微波方法加热)。或者,辄合可以在室温下进行。可使用本领域技术人员公知和/或本文所述的适当的溶剂、偶联剂、催化剂和/或缓冲液以形成聚合物辄合物。对于聚谷氨酸,得自聚谷氨酸和/或盐和氨基酸的聚合物的盐或酸形式均能用作形成聚合物辄合物的起始原料。

[0123] 能够与得自聚谷氨酸和/或盐和氨基酸的聚合物辄合的适当的药剂包括但不限于

于光学药剂、抗癌药、靶向药剂、磁共振显像剂（如顺磁金属化合物）、多配位基配体和具有受保护的氧原子的多配位基配体前体。

[0124] 在一实施方案中，得自聚谷氨酸和 / 或盐和氨基酸的聚合物能够与光学药剂轭合。在一实施方案中，光学药剂能够是德克萨斯红 -NH<sub>2</sub>。

[0125]



[0126] 德克萨斯红 -NH<sub>2</sub>

[0127] 在一具体实施方案中，包含至少一个通式 (I) 重复单元和至少一个通式 (II) 重复单元的聚合物可以与 DCC、德克萨斯红 -NH<sub>2</sub> 染料、吡啶和 4-二甲氨基吡啶反应。使用微波方法加热混合物。在一实施方案中，将反应加热到约 100°C 至 150°C 的温度。在另一实施方案中，物质的加热时间为 5 分钟至 40 分钟。若需要，能够将反应冷却至室温。能够使用本领域技术人员已知的适当方法分离和 / 或纯化聚合物轭合物。例如，能够将反应混合物过滤入酸性水溶液中。然后将形成的任何沉淀过滤并用水洗涤。任选地，能够用任何适当方法纯化沉淀。例如，能够将沉淀转移至丙酮中溶解，并将所得溶液再次过滤入碳酸氢钠溶液中。若需要，能够将所得反应溶液在水中用纤维素膜透析并能够将聚合物冻干并分离。

[0128] 如下文的实施例所例示的，可以使用包含德克萨斯红染料的轭合物向选定组织输送显像剂。例如可以如下文所例示的，使上述聚合物在水溶液中形成纳米颗粒。

[0129] 在一实施方案中，能够使得自聚谷氨酸和 / 或盐和氨基酸的聚合物与抗癌药轭合。在一实施方案中，抗癌药能够是紫杉烷类、喜树碱和 / 或阿霉素。在优选实施方案中，抗癌药是诸如紫杉醇或多西紫杉醇的紫杉烷类。

[0130] 在一实施方案中，与聚合物轭合的抗肿瘤药物是紫杉醇。在一实施方案中，紫杉醇可以在 C2' 氧原子处与聚合物连接。在另一实施方案中，紫杉醇可以在 C7 氧原子处与聚合物连接。在另一实施方案中，聚合物链包含仅通过 C2' 氧原子与聚合物连接的紫杉醇。在另一实施方案中，聚合物链包含仅通过 C7 氧原子与聚合物连接的紫杉醇。在另一实施方案中，聚合物包含 C2' 轭合的紫杉醇基团和 C7 轭合的紫杉醇基团。

[0131] 能够使用上述关于德克萨斯红的方法将抗癌药与得自聚谷氨酸和 / 或盐和氨基酸的聚合物轭合。

[0132] 在一实施方案中，优选在偶联剂（例如，EDC 和 / 或 DCC）和催化剂（例如 DMAP）的存在下，能够使紫杉醇与得自聚谷氨酸和 / 或盐和氨基酸的聚合物在溶剂（例如非质子溶剂，如 DMF）中反应。可使用其它药剂如吡啶或羟基苯并三唑。在一实施方案中，反应可以在 0.5 至 2 天的时间段内进行。能够使用本领域技术人员已知的适当方法分离和 / 或纯化

聚合物轭合物。例如,能够将反应混合物倾入酸性溶液以形成沉淀。然后将形成的任何沉淀过滤并用水洗涤。任选地,能够用任何适当的方法纯化沉淀。例如,能够将沉淀转移至丙酮中溶解,并将所得溶液再次过滤入碳酸氢钠溶液中。若需要,能够将所得反应溶液在水中用纤维素膜透析并能够将聚合物冻干并分离。所得聚合物中紫杉醇的含量可通过 UV 光谱法测定。

[0133] 或者,能够使包含药剂的化合物与诸如谷氨酸和 / 或天冬氨酸的氨基酸反应,其中使包含药剂的化合物与氨基酸偶联(如共价结合)。然后能够使氨基酸-药剂化合物与聚谷氨酸或其盐反应以形成聚合物轭合物。在一实施方案中,使紫杉醇与谷氨酸反应形成化合物,其中紫杉醇与谷氨酸的侧链羧酸基团共价结合。然后能够使谷氨酸-紫杉醇化合物与聚谷氨酸或其盐反应形成聚合物轭合物。在一实施方案中,使紫杉醇与天冬氨酸反应形成化合物,其中紫杉醇与天冬氨酸的侧链羧酸基团共价结合。然后能够使天冬氨酸-紫杉醇化合物与聚谷氨酸或其盐反应形成聚合物轭合物。若需要,能够用已知的分离方法(如 HPLC)将通过 C2' 氧连接到氨基酸上的紫杉醇与通过 C7 氧连接到氨基酸上的紫杉醇分离。

[0134] 形成聚合物轭合物之后,还可以测量没有与聚合物共价结合的任何游离量的药剂。例如,可以用薄层色谱(TLC)证实基本不存在保留在与紫杉醇轭合的聚合物的组合物中的游离紫杉醇。

[0135] 在一实施方案中,能够使得自聚谷氨酸和 / 或盐和氨基酸的聚合物与多配位基配体轭合。适当的多配位基配体包括但不限于二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)、(1,2-亚乙基二氨基)四乙酸酯(EDTA)、乙二胺、2,2'-二吡啶(bipy)、1,10-菲咯啉(phen)、1,2-双(联苯膦基)乙烷(DPPE)、2,4-戊烷二酮(acac)和草酸盐(ox)。能够使用如本领域技术人员公知的和 / 或本文所述的适当溶剂、偶联剂、催化剂和 / 或缓冲液以形成聚合物轭合物。在另一实施方案中,能够使得自聚谷氨酸和 / 或盐和氨基酸的聚合物与具有受保护的氧原子的多配位基配体前体轭合。对于聚谷氨酸,得自聚谷氨酸和 / 或盐和氨基酸的聚合物的盐或酸形式均能用作形成聚合物轭合物的起始原料。

[0136] 在一实施方案中,多配位基配体包含 DTPA。在一实施方案中,优选在偶联剂(如 DCC)和催化剂(如 DMAP)的存在下,能够使诸如 DTPA 的多配位基配体(含或不含受保护的氧原子)与得自聚谷氨酸和 / 或盐和氨基酸的聚合物在溶剂(例如非质子溶剂如 DMF)中反应。若存在保护基团,能够使用适当的方法除去。例如,能够使用诸如三氟乙酸的酸处理聚合物轭合物,所述聚合物轭合物包含具有受保护的氧原子的多配位基配体前体,如具有受叔丁基保护的氧原子的 DTPA。除去保护基团之后,能够通过旋转蒸发除去酸。在一实施方案中,能够用适当的碱处理 DTPA 以除去羧酸-OH 基团上的氢原子。在某些实施方案中,碱是碳酸氢钠。

[0137] 在一实施方案中,能够使得自聚谷氨酸和 / 或盐和氨基酸的聚合物与磁共振显像剂轭合。在一实施方案中,磁共振显像剂包含 Gd(III) 化合物。形成磁共振显像剂的方法之一是通过使顺磁金属与包含多配位基配体的聚合物轭合物反应。适当的顺磁金属包括但不限于 Gd(III)、钆-111 和钷-88。例如,能够在缓冲溶液中用 Gd(III) 处理包含 DTPA 的聚合物轭合物数小时的时间。能够使用本领域技术人员已知的方法分离和 / 或纯化聚合物轭合物。例如,能够将所得反应溶液在水中用纤维素膜透析并能够将聚合物冻干并

分离。顺磁金属的量可以通过电感耦合等离子体 - 光发射光谱 (ICP-OES) 测量来定量。

[0138] 例如在下文的实施例中所例示的, 聚合物轭合物可用于向选定组织输送显像剂和 / 或药物。例如下文所例示的, 可以使上述聚合物在水溶液中形成纳米颗粒。可以使包含聚合物和药物的轭合物以类似方式形成纳米颗粒。这样的纳米颗粒可用于向选定组织优先输送药物。

#### [0139] 药物组合物

[0140] 在某些实施方案中, 提供了本文公开的化合物 (例如, 聚合物轭合物和 / 或其包含的药剂) 的前药、代谢物、立体异构体、水合物、溶剂化物、多晶形物和药物可接受的盐。

[0141] “前药”是指在体内转化成母体药物的药剂。前药通常是有用的, 因为在某些情形下它们比母体药物更容易给药。例如, 它们可以通过口服给药获得生物利用而母体药物不可以。前药还可以具有与母体药物相比改善的溶解度。非限制性的前药实例可以是这样的化合物, 其作为酯 (“前药”) 给药以有助于转运通过细胞膜, 因为在所述细胞膜处水溶性对活性是不利的; 但是所述酯一旦进入细胞内就代谢水解为活性体羧酸, 因为在细胞内水溶性是有利的。前药的另一实例可以是与酸基团结合的短肽 (聚氨基酸), 肽被代谢后暴露活性部分。在例如 Design of Prodrugs (前药设计), (ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985) 中描述了选择和制备适当的前药衍生物的常规方法, 在此将其整体引入作为参考。

[0142] 术语“前药酯”是指通过加入若干种在生理条件下水解的酯形成基团中的任一种而形成的本文公开的化合物的衍生物。前药酯基团的实例包括特戊酰氧基甲基、乙酰氧基甲基、2- 苯并 [c] 呋喃酮基、2,3- 二氢化茛基和甲氧基甲基, 以及本领域已知的其它这样的基团, 包括 (5-R-2- 氧代 -1,3- 二氧杂环戊烯 -4- 基) 甲基。在例如 T. Higuchi and V. Stella, in “Pro-drugs as Novel Delivery Systems (作为新释药系统的前药)”, Vol. 14, A. C. S. Symposium Series, American Chemical Society (1975) 和 “Bioreversible Carriers in Drug Design: Theory and Application (药物设计中的生物可逆载体: 理论和应用)”, edited by E. B. Roche, Pergamon Press: New York, 14-21 (1987) (提供可用作含羧基化合物的前药的酯的实例) 中能够找到前药酯基团的其它实例。每一上述参考文献均以参考的方式整体并入本文。

[0143] 术语“药物可接受的盐”是指对其所给予的有机体不引起显著刺激性并且不使化合物失去生物活性和性质的化合物的盐。在某些实施方案中, 盐是化合物的酸加合盐。药物盐能够通过使化合物与诸如氢卤酸 (如盐酸或氢溴酸)、硫酸、硝酸、磷酸等的无机酸反应而获得。药物盐也能够通过使化合物与诸如脂肪族或芳香族羧酸或磺酸的有机酸反应而获得, 所述有机酸例如乙酸、琥珀酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、烟酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸或萘磺酸。药物盐也能够通过使化合物与碱反应形成盐来获得, 所述盐如铵盐; 诸如钠盐或钾盐的碱金属盐; 诸如钙或镁盐的碱土金属盐; 诸如二环己胺、N- 甲基 -D- 葡萄糖胺、三 (羟甲基) 甲胺、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷基胺、环己胺、三乙醇胺、乙二胺的有机碱的盐; 以及与诸如精氨酸、赖氨酸等氨基酸的盐。

[0144] 若药物制剂的生产涉及亲密混合药物赋形剂和盐形式的活性成分, 则可以期望使用非碱性的药物赋形剂即酸性或中性赋形剂。

[0145] 在各种实施方案中, 本文公开的化合物 (例如聚合物轭合物和 / 或其包含的药剂) 能够单独使用、与本文公开的其它化合物组合使用或与在本文公开的治疗领域中有活性的

一种或多种其它药剂组合使用。

[0146] 另一方面,本公开内容涉及药物组合物,其包括一种或多种生理可接受的表面活性剂、载体、稀释剂、赋形剂、流平剂、助悬剂、成膜物质和包被助剂,或其组合;和本文公开的化合物(例如聚合物轭合物和/或其包含的药剂)。用于治疗的可接受的载体或稀释剂在制药领域是公知的,并描述在例如Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿制药学),18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA(1990)中,将其以参考的方式整体并入本文。在药物组合物中可以提供防腐剂、稳定剂、染料、甜味剂、香料、矫味剂等。例如,苯甲酸钠、抗坏血酸和对羟基苯甲酸酯可作为防腐剂加入。此外,可以使用抗氧化剂和助悬剂。在各种实施方案中,醇、酯、硫酸处理的脂肪醇等可用作表面活性剂;蔗糖、葡萄糖、乳糖、淀粉、结晶纤维素、甘露醇、轻无水硅酸盐、铝酸镁、铝酸甲基硅酸镁、合成硅酸铝、碳酸钙、碳酸氢钠、磷酸氢钙、羧甲基纤维素钙等可用作赋形剂;硬脂酸镁、滑石、硬化油等可用作流平剂;椰子油、橄榄油、芝麻油、花生油、大豆油可用作助悬剂或润滑剂;作为诸如纤维素或糖的碳水化合物的衍生物的邻苯二甲酸醋酸纤维素或作为聚乙烯衍生物的甲基乙酸酯-甲基丙烯酸酯共聚物可用作助悬剂;以及诸如邻苯二甲酸酯等的增塑剂可用作助悬剂。

[0147] 术语“药物组合物”是指本文公开的化合物(如聚合物轭合物和/或其包含的药剂)与诸如稀释剂或载体的其它化学组分的混合物。药物组合物有助于向有机体的给予化合物。该领域中有多种给予化合物的技术,包括但不限于口服、注射、气雾剂、肠道外和局部给药。药物组合物也能够通过使化合物与无机或有机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、对苯甲磺酸、水杨酸等反应而获得。

[0148] 术语“载体”是指有助于化合物进入细胞或组织的化学物质。例如二甲亚砜(DMSO)是常用载体,因为它有助于许多有机化合物吸收进入有机体的细胞或组织。

[0149] 术语“稀释剂”是指会溶解所关注的化合物(如聚合物轭合物和/或其包含的药剂)并且使所述化合物的生物活性形式稳定的稀释在水中的化合物。本领域中使用溶解在缓冲液中的盐作为稀释剂。一常用的缓冲液是磷酸盐缓冲的生理盐水,因为它模仿人类血液的盐条件。由于缓冲盐能够在低浓度下控制溶液的pH,被缓冲的稀释剂很少改变化合物的生物活性。术语“生理可接受”是指不使化合物失去生物活性和性质的载体或稀释剂。

[0150] 能够将本文所述的药物组合物本身给予人类患者,或者在组合治疗中将它们与其它活性成分混合的药物组合物给予人类患者,或者将它们以与适当的载体或赋形剂混合的药物组合物给予人类患者。本申请的化合物的配制和给药技术可以在Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿制药学),18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA(1990)中找到。

[0151] 适当的给药途径可以包括例如口服、直肠、透粘膜、局部、或肠内给药;肠道外释放,包括肌肉内、皮下、静脉内、脊髓内注射,以及鞘内、直接心室内、腹膜内、鼻内或眼内注射。化合物(如聚合物轭合物和/或其包含的药剂)也能够以缓释或控释剂型给药,包括积存注射、渗透泵、丸剂、透皮(包括电迁移)贴剂等用于以预定速率延时和/或定时、脉冲给药。

[0152] 本发明的药物组合物可以以其已知的方式生产,例如,通过常规的混合、溶解、造粒、制糖衣丸、研磨、乳化、包囊、包埋或压片方法。

[0153] 因此用于本发明用途的药物组合物可以以常规方式使用包含赋形剂和助剂的一

种或多种生理可接受的载体配制,所述赋形剂助剂有助于处理活性化合物使之进入能够药用的制剂中。适当的配方依赖于所选的给药途径。可以使用任何适当的并且为本领域诸如以上的 Remington's Pharmaceutical Sciences (雷明顿制药学) 中所理解的公知技术、载体和赋形剂。

[0154] 能够将可注射药物制备成常规形式,可作为液体溶液或混悬液、适用于注射前的溶液或液体中混悬液的固体形式、或乳液。适当的赋形剂例如是水、生理盐水、右旋糖、甘露醇、乳糖、卵磷脂、白蛋白、谷氨酸钠、盐酸半胱氨酸等。此外,若需要,可注射的药物组合物可以含有少量无毒的辅助物质,如润湿剂、pH 缓冲剂等。生理相容的缓冲液包括但不限于 Hanks 溶液、Ringer 溶液或生理盐水缓冲液。若需要,可使用吸收促进剂(例如脂质体)。

[0155] 对于透粘膜给药,可以在制剂中使用对待渗透的屏障合适的渗透剂。

[0156] 用于通过诸如团注或连续输注进行肠胃外给药的药物制剂包括可水溶形式的活性化合物的水溶液。此外,可以将活性化合物的混悬液制备成适当的油性注射混悬液。适当的亲脂性溶剂或介质包括脂肪油如芝麻油;或其它有机油如大豆油、柚子油或杏仁油;或合成脂肪酸酯如油酸乙酯、或甘油三酯;或脂质体。水性注射混悬液可以含有增加混悬液粘性的物质,如羧甲基纤维素钠、山梨醇或右旋糖酐。任选地,混悬液还可以含有适当的稳定剂或增加化合物溶解度以允许制备高度浓缩溶液的药剂。注射用制剂可以是单位剂型,例如在安瓿中或与加入的防腐剂在多剂量容器中。组合物可以在油性或水性介质中采取诸如混悬液、溶液或乳液的形式,并可含有诸如助悬剂、稳定剂和/或分散剂的配方(formulatory)剂。或者,活性成分可以是粉末形式用于在使用前与诸如无菌无热原水的适当介质组合。

[0157] 对于口服给药,能够很容易通过将活性化合物与本领域公知的药物可接受载体组合而配制化合物。这样的载体使本发明的化合物能够被配制成片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊、液体剂、凝胶、糖浆、悬浮液等用于待治疗患者口服摄取。能够通过将活性化合物与固体赋形剂组合、任选地研磨所得混合物并在加入适当的助剂(若需要)之后处理颗粒混合物以获得片剂或糖衣丸核来获得用于口服使用的药物制剂。特别地,适当的赋形剂是填充剂如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇;纤维素制剂如玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、土豆淀粉、白明胶、树脂黄芪胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。若需要,可加入崩解剂如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐如海藻酸钠。提供具有适当的包衣的糖衣丸核。为此,可使用浓缩的糖溶液,其可任选地含有阿拉伯树胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波普凝胶、聚乙二醇,和/或二氧化钛、漆溶液,以及适当的有机溶剂或溶剂混合物。可以向片剂或糖衣丸包衣中加入染料或颜料以识别或表征活性化合物剂量的不同组合。为此,可使用浓缩的糖溶液,其可任选地含有阿拉伯树胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波普凝胶、聚乙二醇,和/或二氧化钛、漆溶液,以及适当的有机溶剂或溶剂混合物。可以向片剂或糖衣丸包衣中加入染料或颜料以识别或表征活性化合物剂量的不同组合。

[0158] 能够口服使用的药用制剂包括由白明胶制成的推入配合胶囊,以及由白明胶和诸如甘油和山梨醇的增塑剂制成的柔软密封胶囊。推入配合胶囊能够含有与诸如乳糖的填充剂、诸如淀粉的粘合剂和/或诸如滑石或硬脂酸镁的润滑剂以及任选的稳定剂混合的活性成分。在软胶囊中,可将活性化合物溶解或混悬在诸如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇的

适当液体中。此外,可以加入稳定剂。所有口服给药制剂的剂量应当适于这样的给药方式。

[0159] 对于口腔给药,组合物可以采取以常规方式配制的片剂或锭剂形式。

[0160] 对于吸入给药,使用适当的推进剂将用于本发明用途的化合物以来自加压包或喷雾器的气溶胶喷雾表现的形式方便地输送,所述适当的推进剂例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它适当的气体。在加压气溶胶的情况下,可以通过提供定量输送阀门来确定剂量单元。在吸入器或吹药器中使用的例如白明胶的胶囊或筒可以配制成含有化合物和诸如乳糖或淀粉的适当粉末基质(base)的粉末混合物。

[0161] 本文还公开了制药领域公知的用于包括眼内、鼻内和耳内输送的各种药物组合物。这些用途的适当渗透剂是本领域公知的。眼内输送的药物组合物包括活性化合物的水性滴眼液,其为可水溶形式如滴眼液、或结冷胶形式(Shedden et al., Clin. Ther., 23(3): 440-50(2001))或水凝胶形式(Mayer et al., Ophthalmologica, 210(2):101-3(1996));眼用软膏;眼用混悬液如微粒、悬浮于液体载体介质中的含药小聚合颗粒(Joshi, A., J Ocul. Pharmacol, 10(1):29-45(1994))、脂溶制剂(Aim et al., Prog. Clin. Biol. Res., 312:447-58(1989))和微球(Mordenti, Toxicol. Sci, 52(1):101-6(1999));以及眼用膜剂。所有上述参考文献在此都整体引入作为参考。最通常并优选将这样适当的药物制剂配制成无菌、等渗和缓冲使之稳定舒适。鼻内输送的药物组合物还可以包括滴剂和喷雾剂,其通常制备为在许多方面模仿鼻分泌物以确保正常纤毛作用的维持。如在整体引入作为参考的 Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿制药学), 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA(1990)中公开的以及本领域技术人员公知的,适当的配方最通常并优选等渗、稍微缓冲以维持 5.5 至 6.5 的 pH, 并且最通常并优选包括抗微生物防腐剂和适当的药物稳定剂。耳内输送的药物制剂包括在耳中局部应用的混悬液和软膏。这样的耳制剂的常用溶剂包括甘油和水。

[0162] 也可以将化合物配制在诸如栓剂或保留灌肠剂的直肠组合物中,例如含有诸如可可油或其它甘油酯的常规栓剂基质。

[0163] 除前述制剂外,也可以将化合物配制成积存制剂。这样的长效制剂可以通过植入(如皮下或肌肉内)或肌肉内注射给药。因此,例如,化合物可以与适当的聚合或疏水物质配制(例如作为可接受的油中的乳剂)或与离子交换树脂配制,或配制为难溶衍生物,如难溶盐。

[0164] 对于疏水化合物,适当的药物载体可以是助溶剂体系,其包含苯醇、非极性表面活性剂、可与水混溶的聚合物和水相。所用的常见助溶剂体系是 VPD 助溶剂系统,其为 3% w/v 苯醇、8% w/v 非极性表面活性剂 Polysorbate 80™ 和 65% w/v 聚乙二醇 300 的溶液,用纯乙醇补足体积。自然,可以大幅度改变助溶剂体系的比例而不破坏其溶解性和毒性特征。此外,可以改变助溶剂成分本身:例如,可以用其它的低毒非极性表面活性剂代替 POLYSORBATE 80™;可以改变聚乙二醇的片段大小;其它生物相容的聚合物可以取代聚乙二醇,如聚乙稀吡咯烷酮;并且其它糖或多糖可以取代右旋糖。

[0165] 或者,可以使用疏水药物化合物的其它输送系统。脂质体和乳剂是疏水药物输送介质或载体众所周知的实例。可以使用某些有机溶剂如二甲亚砜,尽管通常要以毒性较大为代价。或者,可以用缓释系统如含有治疗剂的固体疏水聚合物的半渗透基质输送化合物。各种缓释材料已经建立并为本领域技术人员所熟知。根据其化学性质,缓释胶囊可以释放

药物数小时或数周,高至超过 100 天。根据治疗剂的化学性质和生物稳定性,可以使用其它策略稳定蛋白。

[0166] 打算细胞内给药的药剂可以用本领域普通技术人员已知的技术给药。例如,可以将这样的药剂封入脂质体。将脂质体形成时存在于水溶液中的所有分子并入水性内部。脂质体内容物都被保护不受外部微环境的影响,而且因为脂质体与细胞膜融合而被有效地输送入细胞的细胞质内。可以用组织特异性抗体包被脂质体。期望的器官会靶向并选择性吸收脂质体。或者,小的疏水有机分子可以直接细胞内给药。

[0167] 可以将其它治疗剂或诊断剂并入药物组合物。或者或此外,可以将药物组合物与含有其它治疗剂或诊断剂的其它组合物组合。

#### [0168] 给药方法

[0169] 可以通过任何适当方法将化合物或药物组合物给予患者。给药方法的非限制性实例包括:(a) 通过口服途径给药,包括以胶囊、片剂、颗粒、喷雾剂、糖浆或其它这样的形式给药;(b) 通过如直肠、阴道、尿道内、眼内、鼻内或耳内的非口服途径给药,包括作为水混悬液或油药剂等或作为滴剂、喷雾剂、栓剂、软膏、油膏等给药;(c) 通过皮下、腹膜内、静脉内、肌肉内、皮内、眶内、囊内、脊柱内、胸骨内等注射,包括输液泵输送;(d) 局部给药如通过在肾脏或心脏区域直接注射,如通过积存植入;以及(e) 局部给药;本领域技术人员认为适当的使活性化合物与活组织接触的方法。

[0170] 适于给药的药物组合物包括含有有效量的活性成分以实现其预期目的的组合物。作为剂量而要求的本文公开的化合物的治疗有效量会取决于给药途径、所治疗的包括人在内的动物类型和所考虑的具体动物的身体特征。能够调整剂量以实现期望效果,但是会取决于诸如体重、饮食、同时使用的药物的因素,以及医药领域技术人员会认可的其它因素。更具体地,治疗有效量是指有效地预防、缓解或改善疾病症状或延长所治疗对象存活时间的化合物的量。治疗有效量的测量完全在本领域技术人员的能力之内,尤其是根据本文提供的详细公开内容。

[0171] 对本领域技术人员显而易见,待给予的体内有用剂量和具体给药模式会根据年龄、体重和所治疗的哺乳动物种类、使用的具体化合物以及使用这些化合物的具体用途而变化。有效剂量水平即实现期望结果必需的剂量水平的测定能够由本领域技术人员使用常规药理学方法完成。通常,产物的人体临床应用开始于较低的剂量水平,增加剂量水平直至达到期望效果。或者,能够用可接受的体外研究使用确立的药理学方法来确定通过本发明的方法鉴定的组合物的有用剂量和给药途径。

[0172] 在非人类的动物研究中,潜在产物的应用开始与较高的剂量水平,降低剂量水平直至不再达到期望效果或不良副作用消失。根据期望效果和治疗表现,剂量可以大幅度变化。通常,剂量可以为约  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  至  $100\text{mg}/\text{kg}$  体重,优选为约  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$  至  $10\text{mg}/\text{kg}$  体重。或者可以如本领域技术人员理解的那样,根据患者的表面积计算。

[0173] 本发明的药物组合物的准确制剂、给药途径和剂量能够由个体医师根据患者情况进行选择。(参见例如, Fingl et al. 1975, "The Pharmacological Basis of Therapeutics (治疗学的药理学基础)" 中,其整体在此引入作为参考,具体参考 Ch. 1, p. 1)。通常,向患者给予的剂量范围能够是约 0.5 至  $1000\text{mg}/\text{kg}$  患者体重。根据患者的需要,剂量可以是单独的一个或在一日或多日过程中所给予的两个或多个的系列。当对于至

少某种条件已确立了化合物的人体剂量的情况下,本发明会使用那些相同的剂量,或确立的人体剂量的约 0.1% 至 500%、优选约 25% 至 250% 的剂量。没有确立人体剂量时,如对于新发现的药物组合物的情形,适当的人体剂量能够从 ED<sub>50</sub> 或 ID<sub>50</sub> 值或从来自体外或体内研究的其它适当值推断,如通过动物中的毒性研究和有效性研究所定性的那些值。

[0174] 应当指出,主治医师会知道如何以及何时由于毒性或器官功能失常而停止、中断或调整给药。相反,主治医师也会知道如果临床响应不够则将治疗调整至较高水平(排除毒性)。在所关注的疾病的治疗中给药剂量的大小会随着待治疗疾病的严重程度和给药途径而变化。疾病的严重程度可以通过例如标准预后评价方法部分地评价。此外,剂量和可能的剂量频率也会根据个体患者的年龄、体重和响应而变化。与如上讨论相当的程序可以用于兽医学。

[0175] 虽然准确的剂量会根据不同的药物来确定,但是在多数情况下,能够对剂量做出某些归纳。成人患者的日剂量可以是,例如,每一活性成分 0.1mg 至 2000mg 的口服剂量,优选 1mg 至 500mg,例如 5 至 200mg。在其它实施方案中,使用的每一活性成分的静脉内、皮下或肌肉内剂量为 0.01mg 至 100mg,优选 0.1mg 至 60mg,例如 1mg 至 40mg。在给予药物可接受盐的情况下,剂量可以游离碱来计算。在某些实施方案中,组合物每日给药 1 至 4 次。或者本发明的组合物可以通过连续静脉输注给药,优选每一活性成分的剂量高至每天 1000mg。本领域技术人员会理解,在某些情形下,为了有效和侵略性地治疗特别严重的疾病或感染,可能必须以超过或甚至远超过上述优选剂量范围的量给予本文公开的化合物。在某些实施方案中,在持续治疗期内给予化合物,例如一周或更长,或数月或数年。

[0176] 可以独立地调整剂量和间隔以提供足以维持调节效果或最低有效浓度(MEC)的活性部分的血浆水平。MEC 会随每一化合物而变化但是能够从体外数据估算。达到 MEC 必需的剂量取决于个体特征和给药途径。然而,HPLC 测定和生物测定能够用来测定血浆浓度。

[0177] 剂量间隔也能够用 MEC 值确定。应当使用维持血浆水平在 10% 至 90% 的时间内、优选在 30% 至 90% 的时间内、并且最优选在 50% 至 90% 的时间内高于 MEC 的方案给予组合物。

[0178] 在局部给药或选择性吸收的情况下,药物的有效局部浓度可以与血浆浓度无关。

[0179] 所给予的组合物量可以依赖于待治疗的个体,依赖于个体的体重、疾病的严重程度、给药方式和处方医师的判断。

[0180] 能够使用已知方法评价本文公开的化合物(如聚合物轭合物和/或其包含的药剂)的效能和毒性。例如,具体化合物或具有某些相同化学部分的化合物子集的毒理学可以通过测定对细胞系如哺乳动物优选人细胞系的体外毒性来建立。这种研究的结果通常预示在动物如哺乳动物,或更具体地,人中的毒性。或者,可以用已知方法测定具体化合物在动物模型如小鼠、大鼠、兔或猴中的毒性。具体化合物的效能可以用若干公认方法确定,如体外方法、动物模型或人体临床试验。几乎每一类疾病状态都存在公认的体外模型,所述疾病状态包括但不限于癌、心血管疾病和各种免疫功能失常。类似地,可以用可接受的动物模型来确立治疗这样的疾病状态的化学物质的效能。当选择测定效能的模型时,现有技术能够引导技术人员选择适当的模型、剂量、给药途径和方案。当然,也能够使用人体临床试验来测定化合物在人体中的效能。

[0181] 若需要,可将组合物装在可以含有一个或多个含有活性成分的单位剂量形式的包

或分配装置中。包可以包含例如金属或塑料薄片,如水泡眼包装。包或分散装置可以伴有给药说明书。块或分散装置还可以伴有与容器有关的告示,其形式由管理药物的生产、使用或销售的政府机构规定,所述告示反映出该机构批准该药物形式用于人体或兽医给药。这样的告示可以是例如美国食品药品监督管理局批准用于处方药的标签,或批准的产品插页。也可以制备包含配制在相容的药物载体中的本发明化合物的组合物,将其置于适当的容器中并标示用于治疗所示的疾病状态。

[0182] 实施例

[0183] 提供以下实施例的目的是进一步描述本文所述的实施方案,而不是限制本发明的范围。

[0184] 材料:

[0185] 具有不同分子量的聚 L- 谷氨酸钠 (基于多角度光散射 (MALS) 的平均分子量为 41,400 (PGA (97k))、17,600 (PGA (44k))、16,000 (PGA (32k)) 和 10,900 (PGA (21k)) 道尔顿)、1,3- 二环己基碳二亚胺 (DCC)、N-(3- 二甲氨基丙基)-N'- 乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC)、羟基苯并三唑 (HOBt)、吡啶、4- 二甲氨基吡啶 (DMAP)、N, N'- 二甲基甲酰胺 (DMF)、醋酸钆、氯仿和碳酸氢钠购自 Sigma-Aldrich 化学公司。用 2N 盐酸溶液将聚 L- 谷氨酸盐转化成聚 L- 谷氨酸。三氟乙酸 (TFA) 购自 Bioscience。Omniscan™ (钆双胺) 购自 GE healthcare。

[0186] L- 天冬氨酸 β- 叔丁酯 α- 叔丁酯盐酸盐 (H-Asp(OtBu)-OtBu • HCl)、L- 谷氨酸二叔丁酯盐酸盐 (H-Glu(OtBu)-OtBu • HCl)、N-α-CBZ-L- 谷氨酸 α- 苄基酯 (Z-Glu-OBzl) 购自 Novabiochem (La Jolla, CA)。紫杉醇购自 PolyMed (Houston, Texas)。<sup>3</sup>H- 紫杉醇购自 Moravek Biochemicals, Inc.。用于细胞毒性 MTT 测试 (细胞生存能力) 的磺酰罗丹明 B 染料购自 Molecular Imaging Products Company (Michigan)。化学制品 p-NH<sub>2</sub>-Bn-DPTA- 五 (叔丁酯) 购自 Macrocyclics (Dallas, Texas)。TexasRed® 尸胺 (德克萨斯红 -NH<sub>2</sub> 染料) 购自 Molecular Probe。牛血清购自 Sigma。将其在 10,000rpm 下离心以除去任何颗粒物质。

[0187] <sup>1</sup>H NMR 得自 Joel (400MHz), 粒径通过 ZetalPals (Brookhaven Instruments Corporation) 测定。微波化学在 Biotage 中进行。聚合物的分子量通过与多角度光散射 (MALS) (Wyatt Corporation) 检测器组合的体积排除色谱 (SEC) 测定:

[0188] SEC-MALS 分析条件:

[0189] ■ HPLC 系统: Agilent 1200

[0190] ■ 柱: Shodex SB 806M HQ

[0191] (普鲁兰多糖的排除限制是 20,000,000, 粒径:

[0192] 13 微米, 尺寸 (mm) ID × 长度为 8.0 × 300)

[0193] ■ 流动相: 1 × DPBS 或 1% LiBr 的 DPBS 溶液 (pH 7.0)

[0194] ■ 流速: 1ml/min

[0195] ■ MALS 检测器: 来自 Wyatt 的 DAWN HELEOS

[0196] ■ DRI 检测器: 来自 Wyatt 的 Optilab rEX

[0197] ■ 在线粘度计: 来自 Wyatt 的 ViscoStar

[0198] ■ 软件: 来自 Wyatt 的 ASTRA 5.1.9

[0199] ■ 样品浓度: 1mg/ml 至 2mg/ml

[0200] ■进样体积： 100  $\mu$  l

[0201] 测量中使用的聚合物 dn/dc 值为 0.185。

[0202] BSA 用作允许实际样品前的对照。

[0203] 使用上述系统和条件（下文中称为具有 MALS 检测器的 Heleos 系统），试验发现起始聚合物（Sigma-Aldrich 用其具有 MALS 的系统报道的 41,400、17,600、16,000 和 10,900 道尔顿平均分子量的聚 L-谷氨酸钠盐）的平均分子量分别为 49,000、19,800、19,450 和 9,400 道尔顿。

[0204] 用紫外/可见分光光度计 (Lambda Bio 40, PerkinElmer) 基于用甲醇中已知浓度的紫杉醇产生的标准曲线 ( $\lambda = 228\text{nm}$ ) 估算聚合物-紫杉醇复合物中紫杉醇的含量。

[0205] 根据以前的报道进行聚 L-谷氨酸盐-紫杉醇复合物 (PGA-PTX) 的合成。参见 See Li et al. "Complete Regression of Well-established tumors using a novel water-soluble poly(L-glutamic acid)-paclitaxel conjugate (用新型水溶性聚(L-谷氨酸)-紫杉醇复合物使充分确立的肿瘤完全衰退)." *Cancer Research* 1998, 55, 2404-2409, 其内容整体在此引入作为参考。由平均分子量分别为 49,000 和 19,450 道尔顿的聚谷氨酸制备的 PGA(97k)-PTX-20 和 PGA(32k)-PTX-20 中紫杉醇的量通过紫外分光光度计在  $\lambda = 229\text{nm}$  下定量为 20% 重量比。通过降低紫杉醇的量,对于由平均分子量为 49,000 道尔顿的聚谷氨酸得到的 PGA(97k)-PTX-10 获得基于总重的 10% 重量比。

[0206] 实施例 1

[0207] 根据图 1 例示的一般反应式如下制备聚( $\gamma$ -L-天冬氨酰-谷氨酰胺)：

[0208] 将基于具有 MALS 检测器的 Heleos 系统的平均分子量为 49,000 道尔顿的聚谷氨酸 (0.75g) 部分地加入 100mL 二氯甲烷 (DCM) 中。加入 DCC (8.7mL, 1M 的 DCM 溶液) 并搅拌 20 分钟。然后通过旋转蒸发除去 DCM, 并用 DMF (80mL) 溶解残余物。加入 H-asp(OtBu)-(OtBu) (2.44g)、吡啶 (4mL) 和 DMAP (0.1g) 并在室温下搅拌反应混合物 15 至 24 小时。将反应混合物过滤入酸性水溶液中 (500mL, 基于 pH 试纸的 pH 小于 2)。形成白色沉淀, 过滤并用水洗涤。然后将白色沉淀溶解在丙酮 (100mL) 中。将溶液通过 0.2  $\mu$  m 过滤器过滤, 并通过旋转蒸发除去丙酮。通过  $^1\text{H-NMR}$  由 1.4ppm 处 O-tBu 峰的存在证实了中间体聚合物的结构。

[0209] 在 DCM 中用 95% 的三氟乙酸 (TFA) 处理中间体聚合物 5 至 8 小时。然后加入 DCM 直到沉淀形成。除去溶剂, 残余物用更多的 DCM 洗涤。将残余物置于真空中以除去 DCM。将残余物重新溶解在甲醇和水中然后用半透膜纤维素 (分子量截止 10,000 道尔顿) 在反渗透水中透析过夜 (换水 4 次)。聚( $\gamma$ -L-天冬氨酰-谷氨酰胺) 透析后在水中 pH 为 7 时基本上光学透明。冷冻干燥后获得聚( $\gamma$ -L-天冬氨酰-谷氨酰胺) (1.2g) 白色粉末。通过  $^1\text{H-NMR}$  由 1.4ppm 处 O-tBu 峰的消失证实了聚合物。

[0210] 实施例 2

[0211] 根据图 2 例示的一般反应式如下制备聚( $\gamma$ -L-天冬氨酰-谷氨酰胺)-聚 L-谷氨酸：

[0212] 将基于具有 MALS 检测器的 Heleos 系统的平均分子量为 49,000 道尔顿的聚谷氨酸 (0.075g) 部分地溶解于 DMF (3mL) 中。然后加入 DCC (130mg)、H-asp(OtBu)-(OtBu) (0.11g)、吡啶 (200  $\mu$  L) 和 DMAP (0.010g)。在 120  $^{\circ}\text{C}$  下用微波方法使反应进行 30 分钟。然后将反应冷却至室温。在通过用薄层柱 (TLC, 乙酸乙酯中的  $R_f = 0.4$ ) 监测到

H-asp(OtBu)-(OtBu) 完全消失后,反应完成。完成后,将反应混合物过滤入酸性水溶液中(500mL,基于 pH 试纸的 pH 小于 2)。形成白色沉淀,过滤并用水洗涤。然后将白色沉淀溶解在丙酮(50mL)中。将溶液过滤入碳酸氢钠溶液(0.5M)中然后用半透膜纤维素(分子量截止 10,000 道尔顿)在反渗透水中透析过夜(换水 4 次)。冷冻干燥后获得白色中间体聚合物。通过  $^1\text{H-NMR}$  由 1.4ppm 处 O-tBu 峰的存在证实了中间体聚合物的结构。

[0213] 然后在 DCM 中用 95% 的三氟乙酸(TFA)处理中间体聚合物 5 小时。加入 DCM 直到沉淀形成。然后除去溶剂,残余物用另外的 DCM 洗涤。将残余物置于真空中以除去 DCM。将残余物重新溶解在甲醇和水中并用半透膜纤维素(分子量截止 10,000 道尔顿)在反渗透水中透析过夜(换水 4 次)。冷冻干燥后获得聚( $\gamma$ -L-天冬氨酰-谷氨酰胺)-聚 L-谷氨酸(0.10g)白色粉末。通过  $^1\text{H-NMR}$  由 1.4ppm 处 OtBu 基团的峰的消失证实了聚合物的结构。

#### [0214] 实施例 3

[0215] 根据图 3 例示的一般反应式如下制备聚( $\gamma$ -L-天冬氨酰-谷氨酰胺):

[0216] 将基于具有 MALS 检测器的 Heleos 系统的平均分子量为 49,000 道尔顿的聚谷氨酸钠盐(10.0g)、EDC(33.8g)、HOBt(15.9g)和 H-asp(OtBu)-(OtBu)-HCl(32.0g)在 DMF(700mL)中混合。将反应混合物在室温下搅拌 15 至 24 小时,然后倾入水溶液中。形成白色沉淀,过滤并用水洗涤。然后将中间体聚合物冷冻干燥。通过  $^1\text{H-NMR}$  由 1.4ppm 处 OtBu 峰的存在证实了中间体聚合物的结构。

[0217] 用 TFA(200mL)处理中间体聚合物 5 小时。然后通过旋转蒸发部分除去 TFA。向残余物中加入水并将残余物用半透膜纤维素(分子量截止 10,000 道尔顿)在反渗透水中透析过夜(换水 4 次)。聚-( $\gamma$ -L-天冬氨酰-谷氨酰胺)透析后在水中 pH 为 7 时是透明的。冷冻干燥后获得聚( $\gamma$ -L-天冬氨酰-谷氨酰胺)(15.0g)白色粉末。通过  $^1\text{H-NMR}$  由 1.4ppm 处 O-tBu 峰的消失证实了聚合物的结构。测定聚( $\gamma$ -L-天冬氨酰-谷氨酰胺)的平均分子量,结果为 99,400 道尔顿。

#### [0218] 实施例 3a-3b

[0219] 用实施例 3 的操作具有不同平均分子量(基于具有 MALS 检测器的 Heleos 系统为 19,800 和 9,400 道尔顿)的起始聚谷氨酸钠盐进行聚( $\gamma$ -L-天冬氨酰-谷氨酰胺)的合成,测定所得聚合物聚( $\gamma$ -L-天冬氨酰-谷氨酰胺)的平均分子量,结果分别为 39,700 和 17,700 道尔顿。

#### [0220] 实施例 4

[0221] 根据图 4 例示的一般反应式如下制备聚( $\gamma$ -L-谷氨酰-谷氨酰胺):

[0222] 将基于具有 MALS 检测器的 Heleos 系统的平均分子量为 19,800 道尔顿的聚谷氨酸钠盐(0.40g)、EDC(1.60g)、HOBt(0.72g)和 H-glu(OtBu)-(OtBu)-HCl(1.51g)在 DMF(30mL)中混合。将反应混合物在室温下搅拌 15 至 24 小时,然后倾入蒸馏水溶液(200mL)中。形成白色沉淀,过滤并用水洗涤。然后将中间体聚合物冷冻干燥。通过  $^1\text{H-NMR}$  由 1.4ppm 处 O-tBu 峰的存在证实了中间体聚合物的结构。

[0223] 用 TFA(20mL)处理中间体聚合物 5 至 8 小时。然后通过旋转蒸发部分除去 TFA。向残余物中加入水并将残余物用半透膜纤维素(分子量截止 10,000 道尔顿)在反渗透水中透析过夜(换水 4 次)。聚( $\gamma$ -L-谷氨酰基谷氨酰胺)透析后在水中 pH 为 7 时是透明的。

冷冻干燥后获得聚( $\gamma$ -L-谷氨酰-谷氨酰胺)(0.6g)白色粉末。通过 $^1\text{H-NMR}$ 由1.4ppm处0-tBu峰的消失证实了聚合物的结构。测定聚( $\gamma$ -L-谷氨酰-谷氨酰胺)的分子量,结果为38,390道尔顿。

[0224] 实施例 4a-4c

[0225] 用实施例4的操作具有不同平均分子量(基于具有MALS检测器的Heleos系统为49,000、19,450和10,900道尔顿)的聚谷氨酸钠盐进行聚( $\gamma$ -L-谷氨酰基谷氨酰胺)的合成。测定所得聚合物聚( $\gamma$ -L-谷氨酰-谷氨酰胺)的平均分子量,结果分别为110,800、37,400和19,800道尔顿。

[0226] 实施例 5

[0227] 根据图5例示的一般反应式如下制备聚( $\gamma$ -L-谷氨酰-谷氨酰胺)-聚L-谷氨酸:

[0228] 将基于具有MALS检测器的Heleos系统的平均分子量为49,000道尔顿的聚谷氨酸钠盐(0.50g)、EDC(0.26g)、HOBt(0.11g)和H-glu(OtBu)-(OtBu)-HCl(0.05g)在DMF(30mL)中混合。将反应混合物在室温下搅拌15至24小时,然后倾入水溶液(500mL)中。形成白色沉淀,过滤并用水洗涤。然后将中间体聚合物冷冻干燥。通过 $^1\text{H-NMR}$ 由1.4ppm处0-tBu峰的存在证实了中间体聚合物的结构。

[0229] 用TFA(20mL)处理中间体聚合物5至8小时。然后通过旋转蒸发部分除去TFA。向残余物中加入水并将残余物用半透膜纤维素(分子量截止10,000道尔顿)在反渗透水中透析过夜(换水4次)。聚( $\gamma$ -L-谷氨酰-谷氨酰胺)-聚L-谷氨酸透析后在水中pH为7时是透明的。冷冻干燥后获得聚( $\gamma$ -L-谷氨酰-谷氨酰胺)-聚L-谷氨酸(0.25g)白色粉末。通过 $^1\text{H-NMR}$ 由1.4ppm处0-tBu峰的消失证实了聚合物的结构。测定聚( $\gamma$ -L-谷氨酰-谷氨酰胺)的平均分子量,结果为57,400道尔顿。

[0230] 实施例 6

[0231] 根据图6例示的一般反应式如下制备本文称为PGA-97-A-德克萨斯红的聚合物轭合物:

[0232] 将平均分子量为99,400道尔顿的聚谷氨酸钠盐(100mg)部分地溶解在DMF(3mL)中。加入无水DCC(130mg)、德克萨斯红-NH<sub>2</sub>染料(15mg)、吡啶(200 $\mu$ L)和DMAP(10mg)。在120 $^{\circ}\text{C}$ 下用微波方法使反应进行30分钟。然后将反应冷却至室温。将反应混合物过滤入酸性水溶液(200mL,基于pH试纸的pH小于2)中。形成紫色沉淀,过滤并用水洗涤。然后将紫色沉淀溶解在丙酮(50mL)中。将溶液过滤入碳酸氢钠溶液(0.5M)中并用半透膜纤维素(分子量截止10,000道尔顿)在反渗透水中透析过夜(换水4次)。冷冻干燥后获得PGA-97-A-德克萨斯红(80mg)紫色固体。

[0233] 实施例 7

[0234] 根据图7例示的一般反应式如下制备本文称为PGA-97-A-DTPA的聚合物轭合物:

[0235] 将平均分子量为99,400道尔顿的聚( $\gamma$ -L-天冬氨酰-谷氨酰胺)(100mg)溶解于DMF(5mL)中。然后向溶液中加入DCC(200mg)。将DMF(5mL)中的p-NH<sub>2</sub>-Bn-DTPA-五(叔丁酯)(400mg)也加入到反应混合物中。然后加入无水吡啶(300 $\mu$ L)和催化剂DMAP(20mg)。搅拌混合物并在微波条件下加热至高达120 $^{\circ}\text{C}$ 并保持30分钟。然后将反应混合物冷却至室温,并形成一些沉淀。将沉淀过滤并在水中稀释的盐酸将上清液酸化至pH约2。含有中

间体聚合物的溶液用纤维素膜（分子量截止 10,000 道尔顿）在水中透析 2 天，并将中间体聚合物冷冻干燥。用  $^1\text{H-NMR}$  证实中间体聚合物的结构。

[0236] 用 TFA 处理中间体聚合物 4 小时。然后通过旋转蒸发除去 TFA。将残余物溶解于水中并将溶液用纤维素膜（分子量截止 10,000 道尔顿）透析。聚（ $\gamma$ -L-谷氨酰基谷氨酰胺）-聚-L-谷氨酸透析后在水中 pH 为 7 时是透明的。然后将聚合物冷冻干燥。通过  $^1\text{H-NMR}$  证实 PGA-97-A-DTPA 的结构。

#### [0237] 实施例 8

[0238] 根据图 8 例示的一般反应式如下制备本文称为 PGA-97-A-DTPA-Gd(III) 的聚合物轭合物：

[0239] 将实施例 7 获得的 PGA-97-A-DTPA 在缓冲液中用醋酸 Gd(III) 处理 4 小时。在水中用纤维素膜（分子量截止 10,000 道尔顿）透析反应溶液 3 天并冷冻干燥，获得聚合物（86mg）。通过电感耦合等离子体-光发射光谱（ICP-OES）测定对 Gd(III) 进行定量。结果发现 Gd(III) 的存在量根据钆 ICP 标准（Ricca Chemical Company, Arlington, Texas (Cat No. PGD1KN-500)）为聚合物重量的 7% 重量比。

#### [0240] 实施例 9

[0241] 根据图 9 例示的一般反应式如下制备本文称为 PGA-97-A-10 的聚合物轭合物：

[0242] 将平均分子量为 99,400 道尔顿的聚（ $\gamma$ -L-天冬氨酰-谷氨酰胺）（351mg）部分地溶解于 DMF（40mL）中。分别向溶液中加入 DCC（120mg）和紫杉醇（44mg）。然后向混合物中加入 DMF（10mL）和催化量的 DMAP（100mg）。将反应混合物在室温下搅拌 1 天。用 TLC 确认游离紫杉醇的消失来证实反应的完成。将混合物倾入氯仿（300mL）中并形成沉淀。过滤后获得残余物，然后将残余物再次溶解在甲醇中。加入 0.2N 盐酸水溶液诱导沉淀并在 10,000rpm 下离心，然后分离残余物。然后将残余物再次溶解在 0.5M 碳酸氢钠溶液中。将聚合物溶液在去离子水中用纤维素膜（分子量截止 10,000 道尔顿）在反渗透水中透析 1 天。获得澄清溶液并冷冻干燥。获得 PGA-97-A-10（340mg）并用  $^1\text{H-NMR}$  证实。PGA-97-A-10 中紫杉醇的含量通过 UV 光谱法测定为 10% 重量比。游离紫杉醇的消失也通过 TLC 证实。

#### [0243] 实施例 10

[0244] 根据图 10 例示的一般反应式如下制备本文称为 PGA-97-A-20 的聚合物轭合物：

[0245] 将平均分子量为 99,400 道尔顿的聚（ $\gamma$ -L-天冬氨酰-谷氨酰胺）（750mg）部分的溶解于 DMF（50mL）中。分别向溶液中加入 EDC（450mg）和紫杉醇（210mg）。将用作催化剂的 DMAP（100mg）加入混合物中。反应混合物在室温下搅拌 1 天。用 TLC 证实反应的完成。将混合物倾入 0.2N 盐酸水溶液（300mL）中。沉淀形成，并在 10,000rpm 下离心后收集。将残余物再次溶解在 0.5M 碳酸氢钠溶液中。将聚合物溶液在去离子水中用纤维素膜（分子量截止 10,000 道尔顿）在反渗透水中透析 1 天（换水 4 次）。获得澄清溶液并冷冻干燥。获得 PGA-97-A-20（700mg）并用  $^1\text{H-NMR}$  证实结构。PGA-97-A-20 中紫杉醇的含量通过 UV 光谱法测定为 20% 重量比。

#### [0246] 实施例 10a-10b

[0247] 用实施例 10 的操作平均分子量分别为 39,700 和 17,700 道尔顿的聚（ $\gamma$ -L-天冬氨酰-谷氨酰胺）聚合物合成本文称为 PGA-44-A-20 和 PGA-21-A-20 的聚合物轭合物。用 UV 光谱法测定聚合物中紫杉醇的含量为 20% 重量比。

[0248] 实施例 10c

[0249] 用实施例 10 的操作平均分子量为 39,700 道尔顿的聚( $\gamma$ -L-天冬氨酰-谷氨酰胺)合成本文称为 PGA-44-A-19 的聚合物轭合物,对操作的变化是加入紫杉醇和<sup>3</sup>H-紫杉醇的混合物,而不是仅加入紫杉醇。用 UV 光谱法测定聚合物中紫杉醇的含量为 19%重量比。

[0250] 实施例 11

[0251] 根据图 11 例示的一般反应式如下制备本文称为 PGA-97-G-20 的聚合物轭合物:

[0252] 将平均分子量为 110,800 道尔顿的聚( $\gamma$ -L-谷氨酰-谷氨酰胺)(1.0g)部分地溶解于 DMF(55mL)中。向混合物中分别加入 EDC(600mg)和紫杉醇(282mg)。将用作催化剂的 DMAP(300mg)加入混合物中。反应混合物在室温下搅拌 1 天。用 TLC 证实反应的完成。将混合物倾入 0.2N 稀释的盐酸水溶液(300mL)中。沉淀形成,并在 10,000rpm 下离心后收集。将残余物再次溶解在 0.5M 碳酸氢钠溶液中。将聚合物溶液在去离子水中用纤维素膜(分子量截止 10,000 道尔顿)在反渗透水中透析 1 天(换水 4 次)。获得澄清溶液并冷冻干燥。获得 PGA-97-G-20(1.1g)并用<sup>1</sup>H-NMR 证实结构。PGA-97-G-20 中紫杉醇的含量通过 UV 光谱法测定为 20%重量比。

[0253] 实施例 11a-11c

[0254] 用实施例 11 的操作平均分子量分别为 38,390、37,400 和 19,800 道尔顿的聚( $\gamma$ -L-谷氨酰-谷氨酰胺)聚合物合成本文称为 PGA-44-G-20、PGA-32-G-20 和 PGA-21-G-20 的聚合物轭合物。每一聚合物中紫杉醇的含量用 UV 光谱法测定为 20%重量比。通过增加紫杉醇的量,实现了较高的紫杉醇负载。例如,使用实施例 11 的操作平均分子量为 37,400 道尔顿的聚( $\gamma$ -L-谷氨酰-谷氨酰胺)聚合物制备了 PGA-32-G-40。紫杉醇的含量通过 UV 光谱法测定为 40%重量比。

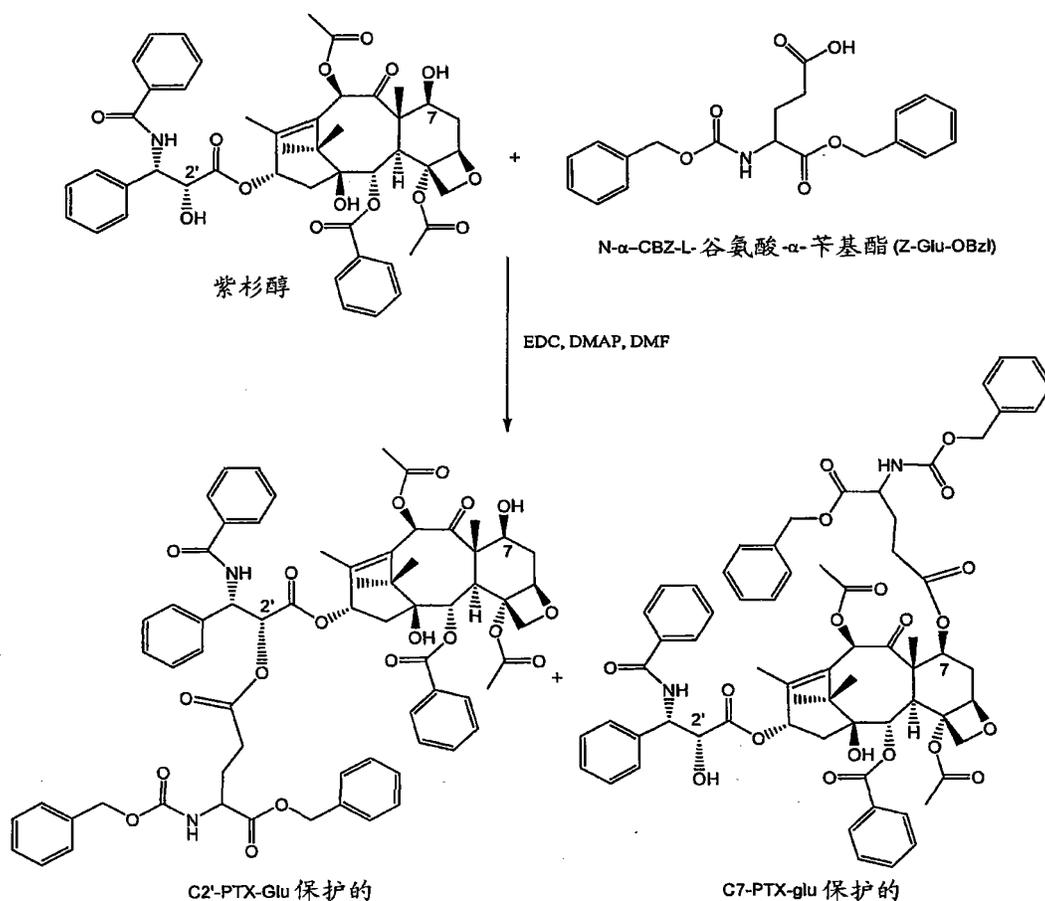
[0255] 实施例 12a-12c

[0256] 用实施例 11 的操作平均分子量分别为 11,800、37,400 和 19,800 道尔顿的聚( $\gamma$ -L-谷氨酰-谷氨酰胺)聚合物合成本文称为 PGA-97-G-24、PGA-32-G-19 和 PGA-21-G-19 的聚合物轭合物,对操作的变化是加入紫杉醇和<sup>3</sup>H-紫杉醇的混合物而不是仅加入紫杉醇。PGA-97-G-24、PGA-32-G-19 和 PGA-21-G-19 中紫杉醇的含量通过 UV 光谱法分别测定为 24%重量比、19%重量比和 19%重量比。

[0257] 实施例 13

[0258] 合成 C2'-PTX-Glu 保护的和 C7-PTX-glu 保护的

[0259]

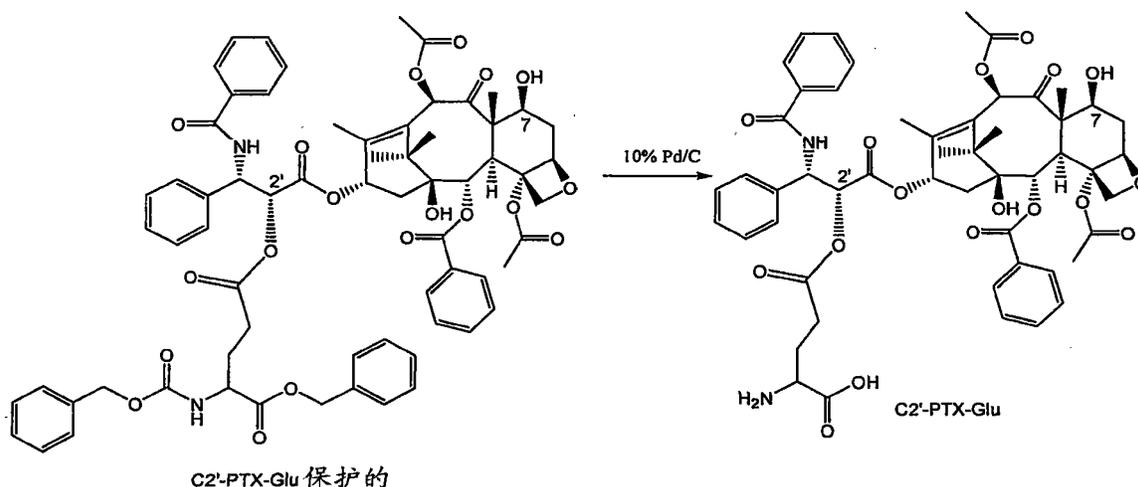


[0260] 将 Z-Glu-OBzl (2.6g)、紫杉醇 (2.0g)、EDC (1.5g) 和 DMAP (300mg) 在 DMF (20mL) 中混合并搅拌 15 小时。通过 TLC 的测定表明混合物中没有游离紫杉醇留下。然后将混合物倾入 0.2N 的盐酸水溶液 (100mL) 中并将有机物萃取如乙酸乙酯 (2 $\times$ 50mL)。将有机相合并,并用 0.5M 碳酸氢钠 (100mL) 洗涤。然后将有机相用无水硫酸钠干燥。通过旋转蒸发除去乙酸乙酯,并将产物用硅胶色谱纯化 (己烷:乙酸乙酯,1:1)。<sup>1</sup>H-NMR 证实所得产物是 C2'-PTX-Glu 保护的 (2.2g) 和 C7-PTX-glu 保护的 (0.42g)。

[0261] 实施例 13a

[0262] C2'-PTX-Glu 的合成

[0263]

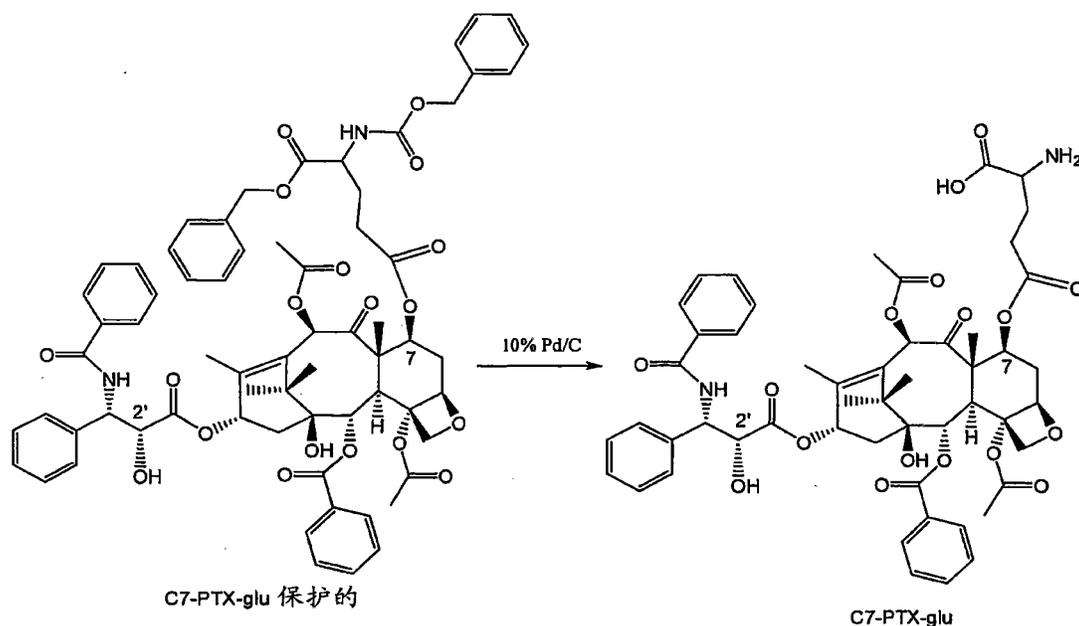


[0264] 将 C2'-PTX-Glu 保护的 (2.2g) 和 10% Pd/C(0.20g) 在脱氧的甲醇 (150mL) 中搅拌。用气球引入氢气。将反应氢化 4 小时。用 TLC 证实反应的完成。将溶液通过 0.2  $\mu$ m 过滤器过滤。溶液澄清并通过旋转蒸发除去甲醇。将粗产物通过反相 HPLC 用梯度的水和乙腈进一步纯化。HPLC 纯化和冷冻干燥后获得 C2'-PTX-Glu (600mg), 并用 LC-MS 证实该产物。结果如图 11 所示。C2'-PTX-Glu 的 HPLC 时间为约 32 分钟, LC-MS 时间为约 6.2 分钟。

[0265] 实施例 13b

[0266] C7-PTX-Glu 的合成

[0267]



[0268] 将 C7-PTX-Glu 保护的 (250mg) 和 10% Pd/C(0.20g) 在脱氧的甲醇溶液 (150mL) 中搅拌。用气球将氢气引入溶液, 并将反应氢化 4 小时。通过 TLC 测试显示反应完成后, 将溶液通过 0.2  $\mu$ m 过滤器过滤。溶液澄清并通过旋转蒸发除去甲醇。粗产物通过反相 HPLC 用梯度水和乙腈进一步纯化。HPLC 纯化和冷冻干燥后获得 C7-PTX-Glu (30mg), 并用 LC-MS

证实该产物。结果如图 11 所示。C7-PTX-Glu 的 HPLC 时间为约 35 分钟, LC-MS 时间为约 6.4 分钟。

[0269] 实施例 14

[0270] 根据图 12 例示的一般反应式如下制备本文称为 PGA-97-G-27 的聚合物轭合物:

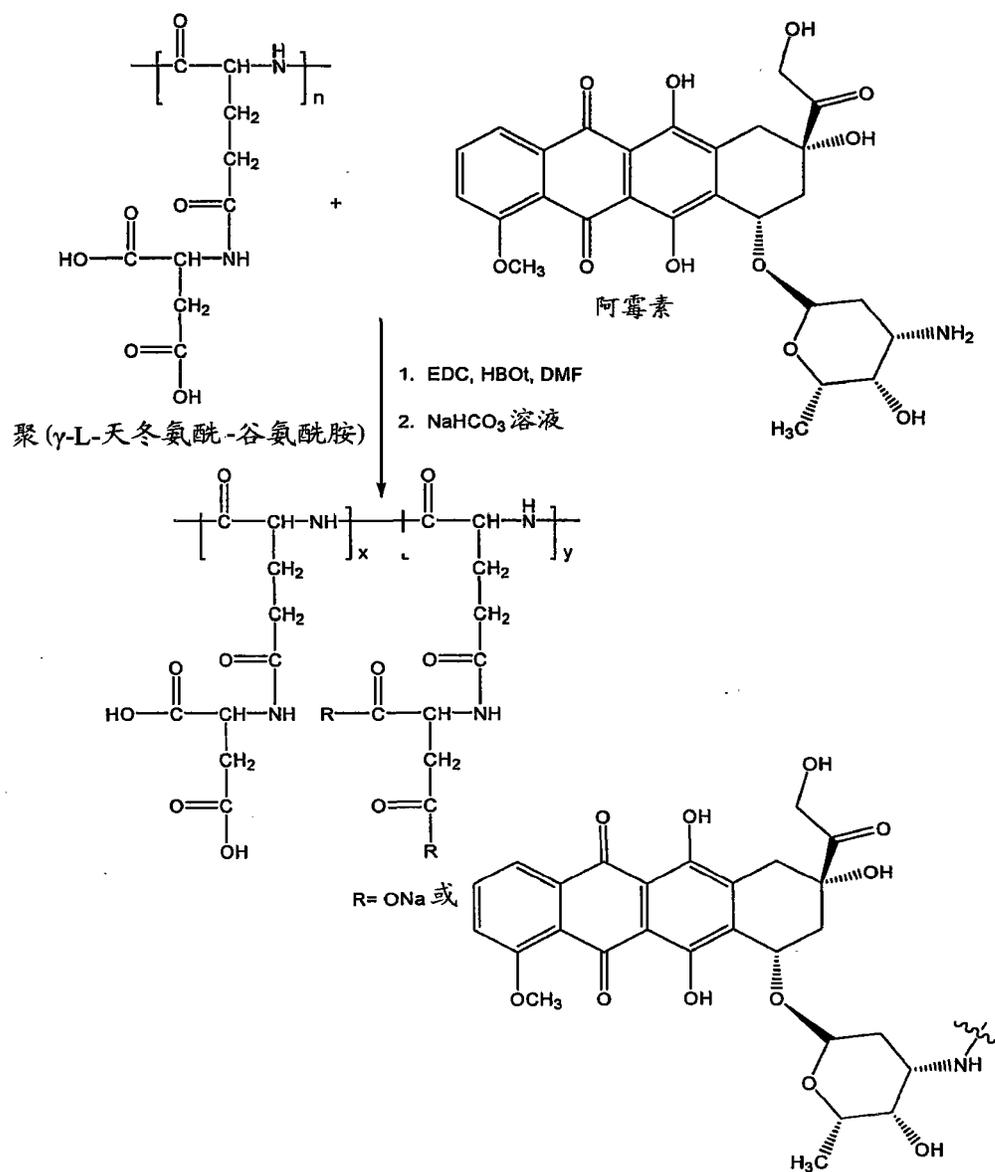
[0271] 将聚 L-谷氨酸 (210mg) 溶于 DMF (10mL) 中。向混合物中加入 EDC (65% 摩尔比) 和 NHS (65% 摩尔比) 并搅拌 15 小时。然后向混合物中加入 C2'-PTX-Glu (105mg) 的 DMF (2mL) 溶液。接着, 加入 0.5M 碳酸氢钠溶液 (3mL)。将反应混合物搅拌 3 小时, 然后倾入稀释的 0.2N 盐酸水溶液 (300mL) 中。沉淀形成并在 10,000rpm 下离心后收集。

[0272] 然后将残余物再次溶解在 0.5M 碳酸氢钠溶液中。将聚合物溶液在去离子水中用纤维素膜 (截止 10,000 道尔顿) 在反渗透水中透析 1 天 (换水 4 次)。获得澄清溶液并冷冻干燥。所得产物是 PGA-97-G-27 (1.1g) 并用 <sup>1</sup>H-NMR 证实。PGA-97-G-27 中紫杉醇的含量通过 UV 光谱法测定为 27% 重量比。

[0273] 实施例 15

[0274] PGA-97-G-阿霉素的合成

[0275]

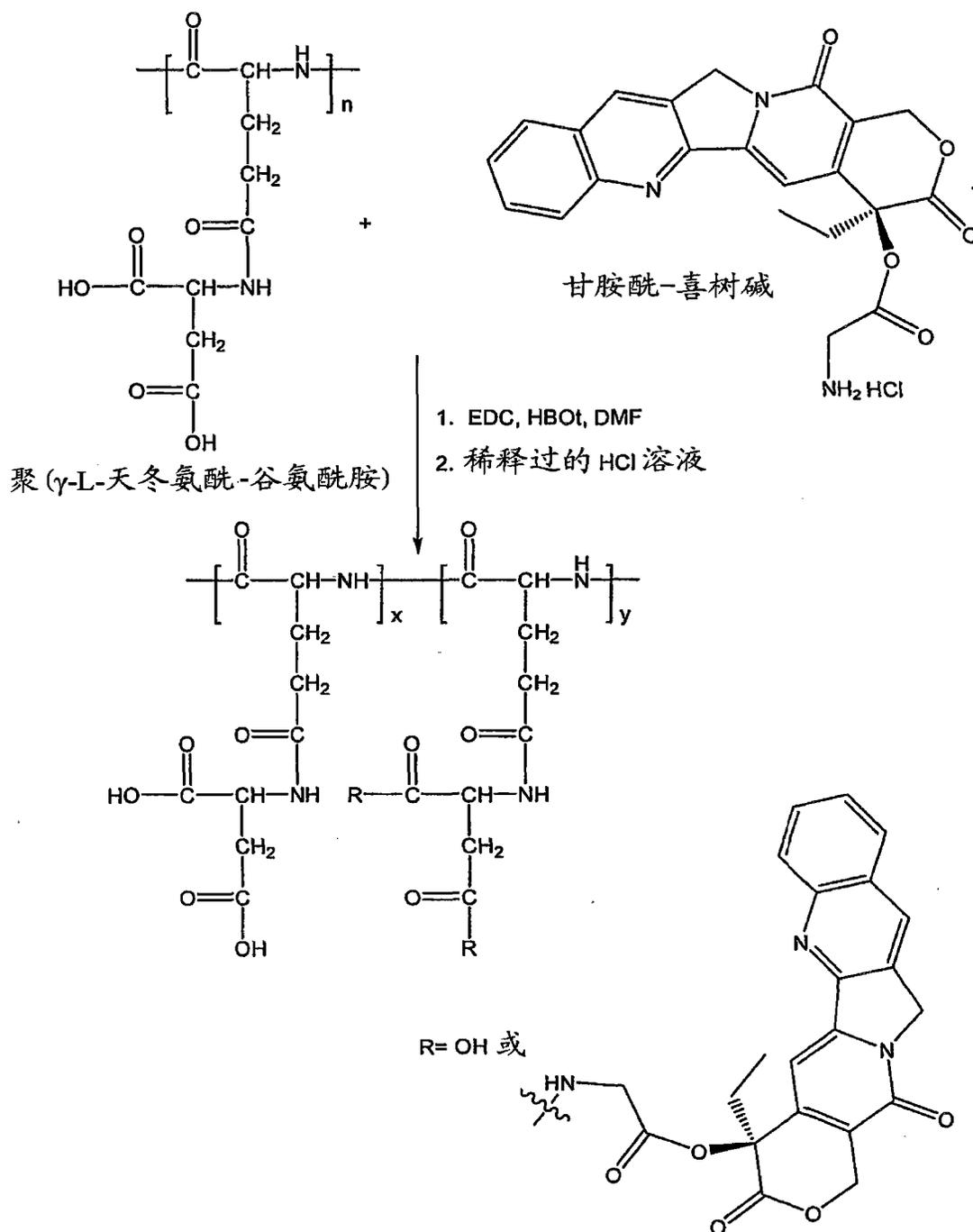


[0276] 将聚( $\gamma$ -L-天冬氨酰-谷氨酰胺)(70mg)、阿霉素(30mg)、EDC(50mg)和HOBt(15mg)溶于DMF(4mL)中。在120℃下将混合物在微波中放置10分钟。然后倾入0.2N盐酸溶液中。沉淀形成并收集。将残余物再次溶解在稀释的0.5M碳酸氢钠溶液中并在去离子水中用纤维素膜(截止10,000道尔顿)在反渗透水中透析1天(换水4次)。获得澄清红色溶液并冷冻干燥。所得产物PGA-97-G-阿霉素(80mg)的结构用<sup>1</sup>H-NMR证实。

[0277] 实施例 16

[0278] PGA-97-G-喜树碱的合成

[0279]



[0280] 将聚( $\gamma$ -L-天冬氨酰-谷氨酰胺)(70mg)、甘氨酰-喜树碱(30mg)、EDC(50mg)和HOBt(15mg)溶于DMF(4mL)中。在120℃下将混合物在微波中加热10分钟。将混合物倾入DCM(150mL)溶液中,并形成沉淀。将残余物在稀释的0.2N盐酸溶液中超声处理15分钟。将所得固体过滤、用蒸馏水洗涤然后冷冻干燥。收集PGA-97-G-喜树碱(50mg),为浅黄色固体。

[0281]

#### 实施例 17

[0282] 溶解度

[0283] 在不同 pH 水平下测试各种聚合物的溶解度并与平均分子量为 19,800 的聚 L-谷

氨酸对照 (PGA-19, 800) 进行比较。所测试的聚合物是平均分子量为 19, 800 的聚 (γ-谷氨酰基)-聚 L-谷氨酰胺 (PGPG-19, 800); 平均分子量为 37, 400 的聚 (γ-谷氨酰基)-聚 L-谷氨酰胺 (PGPG-37, 400); 由起始聚合物 PGA-19, 800 制备并且紫杉醇含量为 20% 重量比的聚 L-谷氨酸盐-紫杉醇-20% (PGA(32k)-PTX-20); 由起始聚合物聚 (γ-谷氨酰基)-聚 L-谷氨酰胺-19, 800 制备并且紫杉醇含量为 20% 重量比的 PGA-21-G-20 和由起始聚合物聚 (γ-谷氨酰基)-聚 L-谷氨酰胺-37, 400 制备并且紫杉醇含量为 20% 重量比的 PGA-32-G-20。

[0284] 将每一聚合物 (5mg) 加入 pH 缓冲液 (1mL) 中并超声处理 2 分钟。然后将混合物在室温下放置 30 分钟。用肉眼观测溶解度并用 1 至 10 的等级记录, 其中, 1 为高度不溶, 5 为絮状悬浮, 10 为高度澄清溶液。结果如下面的表 1 所示。

[0285] 表 1- 溶解度

[0286]

| pH \ 聚合物        | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 7.4 |
|-----------------|----|----|----|----|----|----|-----|
| PGA-19,800      | 1  | 1  | 2  | 4  | 10 | 10 | 10  |
| PGPG-19,800     | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10  |
| PGPG-37,400     | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10  |
| PGA(32k)-PTX-20 | 1  | 1  | 2  | 10 | 10 | 10 | 10  |
| PGA-21-G-20     | 2  | 4  | 10 | 10 | 10 | 10 | 10  |
| PGA-32-G-20     | 2  | 4  | 10 | 10 | 10 | 10 | 10  |

[0287] 实施例 18a

[0288] 细胞培养和制备

[0289] B16F0 细胞购自 ATCC (CRL-6322, ATCC 美国典型微生物菌种保藏中心, Rockville, MD) 并用 10% 牛血清和 100 单位 /mL 青霉素在 Dulbecco 修饰的 Eagle 培养基 (DMEM) 中生长。细胞于 37°C 下在 5% 的 CO<sub>2</sub> 环境中生长。将培养基除去并丢弃。用 Dulbecco 磷酸盐缓冲液 (DPBS) 淋洗细胞, 加入胰岛素-乙二胺四乙酸 (EDTA) 溶液 (0.5mL), 并在倒置显微镜下观察以确保它们被分散。加入完全生长培养基 (6.0mL 至 8.0mL) 并小心抽吸以吸出细胞。将适当等份的细胞混悬液转移至新培养板中。在进一步试验前允许细胞于 37°C 下在 5% 的 CO<sub>2</sub> 中生长 24 小时。

[0290] 实施例 18b

[0291] 体外细胞吸收研究

[0292] 将 PGA-97-A-德克萨斯红和德克萨斯红染料 (TR) 分别溶解在 DPBS 中。将两种含有染料的溶液都以 0.1 μM 至 10 μM 的最终浓度加入细胞中。将含有化合物的细胞在 37°C 下孵育 8 至 24 小时, 之后将细胞用 DPBS 洗涤三次。在 OLYMPUS 荧光显微镜下检查处理过的细胞, 并分别在 591nm 和 612nm 处测定激发和发射波长。结果显示细胞确实从 PGA-97-A-德克萨斯红中吸收德克萨斯红染料, 但不从单独的德克萨斯红中吸收。

[0293] 含有大致相同数目的 B16F0 黑素瘤细胞的三个样品容器分别与 1  $\mu$ M 的 PGA-97-A- 德克萨斯红、0.1  $\mu$ M 的 PGA-97-A- 德克萨斯红以及 10  $\mu$ M 单独的德克萨斯红孵育 24 小时。用 Olympus 荧光显微镜系统上的照相机拍摄每一容器的体外细胞吸收的照片。在含有 1  $\mu$ M 的 PGA-97-A- 德克萨斯红的样品的照片中,约 30% 的细胞是红色的。在含有 0.1  $\mu$ M 的 PGA-97-A- 德克萨斯红的样品的照片中,约 10% 的细胞是红色的。在含有 10  $\mu$ M 单独的德克萨斯红的样品的照片中,0% 的细胞是红色的。这些结果显示细胞从 PGA-97-A- 德克萨斯红中吸收染料,但不从单独的德克萨斯红中吸收染料。聚合物对细胞间药物输送是有效的。

[0294] 实施例 18c

[0295] 还通过共聚焦显微镜 (Olympus FV1000) 证实了细胞吸收。将细胞核用 Hoechst 33342 染色 5 至 20 分钟,用 DPBS 洗涤 2 至 3 次并在激光扫描共聚焦显微镜下观察。分别在 405nm 和 461nm 处测定 Hoechst33342 的激发波长和发射波长。用 543nm 激光激发德克萨斯红 (TR),并于 37°C 在 5% CO<sub>2</sub> 的环境中在 615nm 处检测。结果显示,暴露 24 小时之后,PGA-97-A- 德克萨斯红中的德克萨斯红染料被 B16F0 细胞吸收。PGA-97-A- 德克萨斯红中的德克萨斯红染料在细胞质中被发现,而被细胞核排斥。

[0296] 用共聚焦显微镜 (Olympus FV1000) 拍摄显示 1  $\mu$ M 下 PGA-97-A- 德克萨斯红的体外细胞吸收的照片,以比较细胞质中的吸收和细胞核中的吸收。照片显示 PGA-97-A- 德克萨斯红在暴露 24 小时后被吸收。PGA-97-A- 德克萨斯红在细胞质中被发现,而被细胞核排斥。

[0297] 实施例 19

[0298] 同源肿瘤模型

[0299] 动物: Nu/nu 小鼠,雌性,6 至 8 周 (22g 至 25g)。通过向右股皮下注射  $2 \times 10^5$  鼠黑素瘤细胞 (B16F0) 产生孤立性肿瘤。5-7 天后当肿瘤达到约 500mm<sup>3</sup> 时,向肿瘤皮下注射 PGA-97-A- 德克萨斯红或德克萨斯红染料。

[0300] 实施例 20

[0301] PGA-97-A- 德克萨斯红或 TR 给药及冰冻切片

[0302] 在向动物给药前将 PGA-97-A- 德克萨斯红和德克萨斯红各自溶解在 DPBS 中并通过 0.2  $\mu$ m 过滤器过滤。使用实施例 19 中的同源肿瘤模型向肿瘤静脉内注射 100  $\mu$ l PGA-97-A- 德克萨斯红 (TR 负载为 2.5%) 和 0.1mM 至 10mM 的德克萨斯红。将肿瘤切开,在最佳切割温度下植入并在液氮中冷冻。制作冰冻切片 (6  $\mu$ m 至 15  $\mu$ m) 并在冰上用含有 0.03M 蔗糖的 4% 多聚甲醛固定 10 至 30 分钟。用 DPBS 洗涤切片两次,用 Hoechst 33342 (1  $\mu$ g/ml) 染色 10 分钟并再次用 DPBS 洗涤。然后将所述切片用荧光固定介质 (DakoCytomation) 固定并用盖片覆盖。在激光扫描共聚焦显微镜下观察肿瘤的冰冻切片。图像显示,在将 PGA-97-A- 德克萨斯红静脉内给药 24 小时后,来自 PGA-97-A- 德克萨斯红的德克萨斯红染料在体内向肿瘤细胞中聚集,但对于单独的德克萨斯红染料未显示该现象。

[0303] 拍摄了 PGA-97-A- 德克萨斯红和单独的德克萨斯红染料的体内肿瘤组织吸收的冰冻切片的照片。对于每一染料,拍摄三个不同的横截面,总共 6 个图像。单独的德克萨斯红染料的不同横截面的三张照片经观察为绿色、橙黄色和基本黑色。PGA-97-A- 德克萨斯红

的不同横截面的三张照片经观察为绿色、橙黄色和某些红色区域。在其中一张照片的肿瘤组织中观察到了来自 PGA-97-A- 德克萨斯红的德克萨斯红染料。另一方面,在单独的德克萨斯红的类似照片中并没有观察到德克萨斯红染料。这些结果显示,在将 PGA-97-A- 德克萨斯红静脉内给药 24 小时后,来自 PGA-97-A- 德克萨斯红的德克萨斯红染料在体内向肿瘤细胞中聚集,但对于单独的德克萨斯红染料未显示该现象。

[0304] 此外,在沿肿瘤血管的内皮细胞中也能够看到来自 PGA-97-A- 德克萨斯红的德克萨斯红染料。拍摄了该肿瘤组织另一冷冻切片的另外的照片。将 PGA-97-A- 德克萨斯红在尾部静脉进行静脉内给药 24 小时后沿血管观察到了红色染料。结果显示在沿肿瘤血管的内皮细胞中能够看到 PGA-97-A- 德克萨斯红。

[0305] 实施例 21

[0306] 体外细胞毒性 MTT 研究

[0307] 在若干不同的药物浓度下评价本文所述的含紫杉醇的聚合物轭合物对 B16F0 黑素瘤细胞增殖的影响。如 Monks et al. JNCI 1991,83,757-766 中所报道的进行细胞毒性 MTT 测定,其整体在此引入作为参考。如实施例 10a,从基于具有 MALS 检测器的 Heleos 系统的平均分子量为 39,700 道尔顿的聚(γ-L-天冬氨酰-谷氨酰胺)制备 PGA-44-A-20,并且聚合物中紫杉醇的重量百分数为 20%重量比。如实施例 10,从基于具有 MALS 检测器的 Heleos 系统的平均分子量为 99,400 道尔顿的聚(γ-L-天冬氨酰-谷氨酰胺)制备 PGA-97-A-20,并且聚合物中紫杉醇的重量百分数为 20%重量比。PGA(97k)-PTX-20 用作本实施例的对照聚合物并根据以前的文献操作(参见 Li et al,“Complete Regression of Well-established tumors using a novel watersoluble poly(L-glutamic acid)-paclitaxel conjugates(用新型水溶性聚(L-谷氨酸)-紫杉醇轭合物使充分确立的肿瘤完全衰退)。”Cancer Research 1998,58,2404-2409)从基于具有 MALS 检测器的 Heleos 系统的平均分子量为 49,000 道尔顿的聚(L-谷氨酸)来制备,聚合物中紫杉醇的重量百分数为 20%重量比。结果示于图 13。如图 13 所示,随着药物浓度的增加,黑素瘤细胞的存活率降低。这些结果表明 PGA-44-A-20 和 PGA-97-A-20 是有效的抗癌剂。

[0308] 实施例 22

[0309] 体外细胞毒性 MTT 研究

[0310] 将含有紫杉醇的聚合物轭合物与不含紫杉醇的对照聚合物和不含聚合物的紫杉酚对照相比较以观察其在若干不同的药物浓度下对 B16F0 黑素瘤细胞增殖的影响。如 Monks et al. JNCI 1991,83,757-766 中所报道的进行细胞毒性 MTT 测定。如实施例 9,从基于具有 MALS 检测器的 Heleos 系统的平均分子量为 99,400 道尔顿的聚(γ-L-天冬氨酰-谷氨酰胺)制备 PGA-97-A-10,并且聚合物中紫杉醇的重量百分数为 10%重量比。PGA(97k)-PTX-10 用作本实施例的对照聚合物并根据以前的文献(Li et al,“Complete Regression of Well-established tumors using a novel water soluble poly(L-glutamic acid)-paclitaxel conjugates(用新型水溶性聚(L-谷氨酸)-紫杉醇轭合物使充分确立的肿瘤完全衰退)。”Cancer Research 1998,58,2404-2409)从基于具有 MALS 检测器的 Heleos 系统的平均分子量为 49,000 道尔顿的聚 L-谷氨酸制备,聚合物中紫杉醇的重量百分数为 10%重量比。不含紫杉醇的聚合物是聚(γ-L-天冬氨酰-谷氨酰胺)钠盐。

[0311] 结果如图 14 所示。不含抗肿瘤药物的钠盐聚合物对黑素瘤细胞存活率的影响很小。此外, PGA-97-A-10 与含有抗肿瘤药物的对照聚合物满意地相比。如图 14 所示, PGA-97-A-10 作为有效的抗癌剂起作用。

[0312] 实施例 23

[0313] 用于药物动力学研究的动物和肿瘤模型

[0314] 裸小鼠 (6 至 7 周, 体重 25g 至 30g, 雌性) 购自 Charles River Lab (Willington, MA)。B16F0 细胞系购自 ATCC (CRL-6322, ATCC 美国典型微生物菌种保藏中心, Rockville, MD)。在添加有 10% 胎牛血清、 $2 \mu\text{M}$  谷氨酰胺、 $1\text{mM}$  非必需氨基酸、 $1\text{mM}$  丙酮酸钠、 $100\text{U/ml}$  青霉素和  $100 \mu\text{g/ml}$  链霉素的 DMEM 中培养 B 16F0 细胞。对从组织培养液中采集的 B16F0 细胞进行计数并重新悬浮至  $5 \times 10^6$  每 mL 的浓度。使用 TB 注射器对每一小鼠经由皮下注射给予  $0.4\text{mL}$  (总共  $2 \times 10^6$  细胞)。在每一动物的右肩、左肩、右臀、左臀处接种四个肿瘤。

[0315] 实施例 23a

[0316] 当来自实施例 23 的小鼠的整个群体的平均肿瘤体积达到  $200\text{mm}^3$  至  $300\text{mm}^3$  (直径  $6\text{mm}$  至  $8\text{mm}$ ) 时, 每一患肿瘤的动物经由尾部静脉接受单一 IV 团注  $^3\text{H}$ - 紫杉酚 (对照) 或 PGA-44-A-19。

[0317] 如实施例 10c, 从基于具有 MALS 检测器的 Heleos 系统的平均分子量为 99,400 道尔顿的聚 ( $\gamma$ -L- 天冬氨酰 - 谷氨酰胺) 制备 PGA-44-A-19, 并且聚合物中紫杉醇的重量百分比为 19% 重量比。本实施例的对照是紫杉酚。游离  $^3\text{H}$ - 紫杉酚 (对照) 和 PGA-44-A-19 的剂量是  $20\text{mg}$  紫杉醇当量 /kg。对于每一药物, 在多个时间点麻醉 4 个小鼠的组 (每一单位为小时): 0 (即 IV 注射后尽快)、0.083、0.25、1.0、2.0、4.0、8.0、48、72、96、120 和 144。将通过心脏或眼球后穿刺收集的  $0.5\text{mL}$  血液置于肝素化的管中。此后, 在从麻醉中苏醒之前将小鼠处死。将每一小鼠的血液样品在  $11,000\text{rpm}$  下离心。采集血液样品的上层血浆 ( $0.2\text{mL}$  至  $0.3\text{mL}$ ) 并转移到新的小瓶中。将每一样品的  $0.1\text{mL}$  血浆分别转移到新的  $10\text{mL}$  小瓶中, 向小瓶中加入液体闪烁溶液 ( $5\text{mL}$ )。使用液体闪烁 LS6500 计数系统 (Beckman) 分析并用每一样品的标准曲线计算紫杉醇的含量。结果如图 15 所示。PGA-44-A-19 的紫杉醇浓度在较长时期内维持较高。这些结果表明 PGA-44-A-19 中的紫杉醇与单独的紫杉酚相比在血液循环中有更长期的效果。

[0318] 实施例 24

[0319] 当来自实施例 23 的小鼠的整个群体的平均肿瘤体积达到  $200\text{mm}^3$  至  $300\text{mm}^3$  (直径  $6\text{--}8\text{mm}$ ) 时, 每一患肿瘤的动物 (裸 nu/nu 小鼠) 经由尾部静脉接受单一 IV 团注  $^3\text{H}$ - 紫杉酚 (对照) 或 PGA-44-A-19。

[0320] 如实施例 10c, 从基于具有 MALS 检测器的 Heleos 系统的平均分子量为 39,700 道尔顿的聚 ( $\gamma$ -L- 天冬氨酰 - 谷氨酰胺) 制备 PGA-44-A-19, 并且聚合物中紫杉醇的重量百分比为 19% 重量比。游离  $^3\text{H}$ - 紫杉酚 (对照) 和 PGA-44-A-19 的剂量是  $20\text{mg}$  紫杉醇当量 /kg。对于每一药物, 在多个时间点麻醉 4 个小鼠的组 (每一单位为小时): 0 (即 IV 注射后尽快)、0.083、0.25、1.0、2.0、4.0、8.0、48、72、96、120 和 144。独立地获取两臀和两肩的肿瘤。此后, 在从麻醉中苏醒之前将小鼠处死。将约  $80\text{mg}$  至  $180\text{mg}$  的每一肿瘤置于闪烁瓶中, 并用 Soluene (组织增溶剂) ( $1\text{mL}$ ) 消化肿瘤。然后, 将  $0.1\text{mL}$  被消化的组织转移至  $10\text{mL}$  小瓶中, 向小瓶中加入液体闪烁液 ( $5\text{mL}$ )。使用液体闪烁 LS6500 计数系统 (Beckman) 分析并

用每一样品的标准曲线计算紫杉醇的含量。将 PGA-44-A-19 与紫杉酚对照进行比较。结果如图 16 所示。PGA-44-A-19 的紫杉醇肿瘤聚集在较长时期内维持较高。这些结果表明来自 PGA-44-A-19 的紫杉醇与单独的紫杉酚相比在肿瘤中具有改善的聚集。

[0321] 实施例 25

[0322] 用于体内效能研究的动物与肿瘤模型

[0323] 裸小鼠 (6 至 8 周, 体重 21g 至 25g, 雄性) 购自 Charles River Lab (Willington, MA)。B16-F0-EGFP 稳定细胞保持在添加有 10% 牛血清、100U/ml 青霉素和 100  $\mu$ g/ml 链霉素的 DMEM 中培养。接种前将细胞分裂 48 小时使得在采集时它们在对数生长期。使用胰岛素-EDTA 从组织培养液采集细胞, 并在血细胞计数器中在台盼蓝的存在下进行计数以测定存活细胞的数目。在没有血浆的 DMEM 培养基中将细胞悬浮至  $5 \times 10^6$  每 ml 的浓度。通过注射 0.1ml 肿瘤细胞混悬液而使用 1cc 胰岛素注射器在  $5 \times 10^6$  每 ml 的浓度下在每一肩和每一臀上接种肿瘤细胞混悬液 (每一小鼠 4 处)。

[0324] 在接种肿瘤的当天, 将小鼠顺序置于 6 组中的一组并将 3 只饲养在笼子中, 总共 12 只笼子。在接种肿瘤时的麻醉下对每一小鼠进行耳穿孔使得在整个试验中能够独特地识别。将每一只笼子用药物、对其含有的动物给予的药物剂量及其含有的动物的数目来标记。

[0325] 实施例 25a

[0326] 测定了根据实施例 11a-11c 制备的聚合物在最大耐受剂量 (MTD) 下的重量减轻毒性。MTD 在此被定义为在两周内产生最大 15% 体重减轻的剂量。如实施例 11c 和 11b 所公开的方法, 从基于具有 MALS 检测器的 Heleos 系统的平均分子量分别为 19,800 和 37,400 道尔顿的起始聚 ( $\gamma$ -L-谷氨酰-谷氨酰胺) 聚合物分别制备 PGA-21-G-20 和 PGA-32-G-20, 并且每一聚合物中紫杉醇的重量百分数为 20%。将 PGA-21-G-20 和 PGA-32-G-20 以 50mg/ml 溶解在生理盐水中。本实施例的对照抗癌药是被 FDA 批准为抗癌药的 Abraxane。生理盐水也用作无抗肿瘤药物的阴性对照。从每一动物的体重测定所注射药物的实际量。当小鼠的全部群体的平均肿瘤尺寸达到约  $15\text{mm}^3$  至约  $50\text{mm}^3$  (肿瘤尺寸从公式  $(w^2 \times l)/2$  估计, 其中“l”是肿瘤的最长直径且“w”是以毫米为单位测量的垂直于最长直径的直径) 时, 将首剂药物给予小鼠。小鼠在连续两天中经尾部静脉注射无麻醉地给药接受 2 剂药物。储库溶液在注射当天新鲜制备。将储库溶液吸入 1-cc 注射器中并静脉注射。将小鼠称重, 精确至 0.1g。与在 100mg/kg 紫杉醇当量的剂量下的 Abraxane 相比, 用 175mg/kg 剂量下的 PGA-21-G-20 和 150mg/kg 剂量下的 PGA-32-G-20 的较高剂量注射裸 nu/nu 小鼠。随时间 (天) 独立地观察并记录每一药物治疗后的体重改变 (%)。结果如图 17 所示。PGA-21-G-20 在高得多的剂量下显示很小的体重减轻。PGA-32-G-20 在高得多的剂量下显示与 Abraxane 相当的体重减轻。这些结果表明与抗癌药联合的本发明的优选聚合物对小鼠毒性较小。

[0327] 实施例 26

[0328] 体内效能研究

[0329] 测定了 PGA-21-G-20、PGA-32-G-20 和 Abraxane 在最大耐受剂量 (MTD) 下在如实施例 25 所述的裸 nu/nu 小鼠中对 B16F0-EGF 黑色素瘤肿瘤的抗肿瘤效果, 以生理盐水为阴性对照。将 PGA-21-G-20 和 PGA-32-G-20 以 50mg/ml 溶于生理盐水中。本实施例的对照抗癌药是 FDA 批准为抗癌药的 Abraxane。生理盐水用作不含抗肿瘤药物的另一对照。从每一动物的体重测定所注射药物的实际量。在研究中的小鼠的全部群体的平均肿瘤尺寸达到  $15\text{mm}^3$

至 50mm<sup>3</sup> 时给予小鼠首剂药物。小鼠在连续两天中经尾部静脉注射无麻醉地给药接受 2 剂药物。储库溶液在注射当天新鲜制备。将储库溶液吸入 1-cc 注射器中并静脉注射。测量肿瘤尺寸,精确至 0.1mm。与在 100mg/kg 紫杉醇当量的剂量下的 Abraxane 相比,用 175mg/kg 剂量下的 PGA-21-G-20 和 150mg/kg 剂量下的 PGA-32-G-20 的较高剂量注射裸 nu/nu 小鼠。随时间(天)独立地观察并记录每一药物治疗后的肿瘤体积改变(%)。结果如图 18 所示。PGA-21-G-20 和 PGA-32-G-20 都显著抑制了肿瘤生长。这些结果表明与抗癌药联合的本发明的优选聚合物是有效的抗癌剂。

#### [0330] 实施例 27

[0331] 测定了根据实施例 11 制备的聚合物在 MTD 下的重量减轻毒性。根据实施例 11 所描述的方法制备 PGA-97-G-20。起始原料是基于我们具有 MALS 检测器的 Heleos 系统的平均分子量为 110,800 道尔顿的聚(γ-L-谷氨酰-谷氨酰胺)。聚合物中紫杉醇的重量百分数是 20%。将 PGA-97-G-20 以 50mg/mL 溶于生理盐水中。本实施例的对照抗癌药是 FDA 批准为抗癌药的紫杉酚和 Abraxane。生理盐水用作不含抗肿瘤药物的阴性对照。从每一动物的体重测定所注射药物的实际量。在研究中的小鼠的全部群体的平均肿瘤尺寸达到 15mm<sup>3</sup> 至 50mm<sup>3</sup> 时给予小鼠首剂药物。小鼠在连续两天中经尾部静脉注射无麻醉地接受 2 剂药物。储库溶液在注射当天新鲜制备。将药物储库溶液吸入 1-cc 注射器中并静脉注射。将小鼠称重,精确至 0.1g。与在其紫杉醇当量下的 Abraxane(100mg/kg) 和紫杉酚(50mg/kg) 相比,用更高剂量(60mg/kg) 的 PGA-97-G-20 注射裸 nu/nu 小鼠。随时间(天)独立地观察并记录每一药物治疗后的体重改变(%)。结果如图 19 所示。如图 19 所示,PGA-97-G-20 在高得多的剂量下显示与对照相当的体重减轻。这些结果表明与抗癌药联合的本发明的优选聚合物与临床批准的药物毒性相当。

#### [0332] 实施例 28

##### [0333] 体内效能研究

[0334] 测定了 PGA-97-G-20、紫杉酚和 Abraxane 在最大耐受剂量(MTD)下在裸 nu/nu 小鼠中对 B16F0-EGF 黑素瘤肿瘤随时间变化的抗肿瘤效果,以生理盐水为阴性对照。将 PGA-97-G-20 以 50mg/mL 溶于生理盐水中。本实施例的对照抗癌药是 FDA 批准为抗癌药的紫杉酚和 Abraxane。生理盐水用作不含抗肿瘤药物的阴性对照。从每一动物的体重测定所注射药物的实际量。在研究中的小鼠的全部群体的平均肿瘤尺寸达到 15mm<sup>3</sup> 至 50mm<sup>3</sup> 时给予小鼠首剂药物。小鼠在下一天经 IV 尾部静脉注射无麻醉地接受 2 剂药物。储库溶液在注射当天新鲜制备。将药物储库溶液吸入 1-cc 注射器中并静脉注射。测量肿瘤尺寸,精确至 0.1mm。与在其紫杉醇当量下的 100mg/kg 剂量下的 Abraxane 和 50mg/kg 剂量下的紫杉酚相比,用 60mg/kg 剂量下的 PGA-97-G-20 的较高剂量注射裸 nu/nu 小鼠。随时间(天)独立地观察并记录每一药物治疗后的肿瘤体积改变(%)。结果如图 20 所示。如图 20 所示,与紫杉酚和 Abraxane 相比,PGA-97-G-20 对肿瘤生长有显著影响并具有更好的性能。这些结果表明与抗癌药联合的本发明的优选聚合物是有效的抗癌剂。

#### [0335] 实施例 29

[0336] 测定了含有紫杉醇的聚合物在最大耐受剂量下相对于与紫杉醇联合的聚谷氨酸的重量减轻毒性。根据实施例 11b 所描述的方法制备 PGA-32-G-20。起始原料是基于具有 MALS 检测器的 Heleos 系统的平均分子量为 37,400 道尔顿的聚(γ-L-谷氨酰-谷

氨酰胺), 并且每一聚合物中紫杉醇的重量百分数是 20%。将 PGA-32-G-20 与分子量为 19,450 道尔顿(基于具有 MALS 检测器的 Heleos 系统)的与紫杉醇轭合使得聚合物中紫杉醇的重量百分数为 20%的聚谷氨酸对照(PGA(32k)-PTX-20)进行比较。生理盐水用作不含抗肿瘤药物的对照。从每一动物的体重测定所注射药物的实际量。在研究中的小鼠的全部群体的平均肿瘤尺寸达到  $15\text{mm}^3$  至  $50\text{mm}^3$  时给予小鼠首剂药物。小鼠在下一天经 IV 尾部静脉注射无麻醉地接受 2 剂药物。储库溶液在注射当天新鲜制备。将药物储库溶液吸入 1-cc 注射器中并静脉注射。将小鼠称重,精确至 0.1g。与在 100mg/kg 紫杉醇当量的剂量下的 PGA(32k)-PTX-20 相比,用 125mg/kg 的较高剂量的 PGA-32-G-20 注射裸 nu/nu 小鼠。随时间(天)独立地观察并记录每一药物治疗后的体重改变(%)。结果如图 21 所示。PGA-32-G-20 在高得多的剂量下显示与对照相当的体重减轻。这些结果表明与抗癌药轭合的本发明的优选聚合物与研究药物的毒性相当。

#### [0337] 实施例 30

##### [0338] 体内效能研究

[0339] 测定了 PGA-32-G-20 和 PGA(32k)-PTX-20 在最大耐受剂量(MTD)下在裸 nu/nu 小鼠中对 B16F0-EGF 黑素瘤肿瘤随时间变化的抗肿瘤效果,以生理盐水为阴性对照。将 PGA-32-G-20 和 PGA(32k)-PTX-20 以 50mg/mL 溶于生理盐水中。从每一动物的体重测定所注射药物的实际量。在研究中的小鼠的全部群体的平均肿瘤尺寸达到  $15\text{mm}^3$  至  $50\text{mm}^3$  时给予首剂药物。小鼠在下一天经 IV 尾部静脉注射无麻醉地给药接受 2 剂药物。储库溶液在注射当天新鲜制备。将药物储库溶液吸入 1-cc 注射器中并静脉注射。将小鼠称重,精确至 0.1g。与在 100mg/kg 紫杉醇当量的剂量下的 PGA(32k)-PTX-20 相比,用 125mg/kg 剂量下的 PGA-32-G-20 的较高剂量注射裸 nu/nu 小鼠。测量肿瘤尺寸,精确到 0.1mm。随时间(天)独立地观察并记录每一药物治疗后的肿瘤体积改变(%)。结果如图 22 所示。与 PGA(32k)-PTX-20 相比,PGA-32-G-20 对肿瘤生长有显著影响并具有更好的性能。这些结果表明与抗癌药轭合的本发明的优选聚合物是有效的抗癌剂。

#### [0340] 实施例 31

[0341] 测试了聚合物轭合物以确定紫杉醇释放速率与选择不同分子量的聚合物的关联。将 PGA-21-G-20、PGA-32-G-20、PGA-97-G-20 和 PGA(97k)-PTX-20 对照以 2mg/mL 的浓度置于磷酸盐缓冲液中并测定释放速率。在  $37^\circ\text{C}$  下孵育聚合物-紫杉醇轭合物的溶液。在不同时间点取出  $50\ \mu\text{l}$  的等份并冷冻。然后用 LC-MS 分析所有的等份。测定 HPLC 图谱上释放药物峰的积分面积。从标准曲线计算释放的紫杉醇的量。结果如图 23 所示,并显示随着聚合物轭合物的分子量增加,释放的紫杉醇的百分比减少。这些结果表明能够通过选择聚合物的不同分子量来控制紫杉醇的释放速率。

#### [0342] 实施例 32

##### [0343] 用于药物动力学的动物和肿瘤模型

[0344] 裸小鼠(6至7周龄,体重 25g 至 30g,雌性)购自 Charles River Lab(Willington, MA)。B16F0 细胞系购自 ATCC(CRL-6322, ATCC 美国典型微生物菌种保藏中心, Rockville, MD)。在添加有 10%胎牛血清、 $2\ \mu\text{M}$  谷氨酰胺、1mM 非必需氨基酸、1mM 丙酮酸钠、100U/ml 青霉素和  $100\ \mu\text{g/ml}$  链霉素的 DMEM 中培养 B16F0 细胞。对从组织培养液采集的 B16F0 细胞进行计数并重新悬浮至  $5 \times 10^6$  每 mL 的浓度。使用 TB 注射器对每一小鼠经由皮下注射给

予 0.4mL ( 总共  $2 \times 10^6$  细胞 )。在每一动物的右肩、左肩、右臀、左臀处接种四个肿瘤。

[0345] 实施例 32a

[0346] 相对于紫杉酚对照测试各种与药物轭合的聚合物以确定血浆中紫杉醇浓度随时间的变化。当来自实施例 32 的小鼠的整个群体的平均肿瘤体积达到  $200\text{mm}^3$  至  $300\text{mm}^3$  ( 直径 6mm 至 8mm ) 时,每一患肿瘤的动物经由尾部静脉接受单一 IV 团注  $^3\text{H}$ - 紫杉酚 ( 对照 )、PGA-21-A-19、PGA-32-A-19 和 PGA-97-A-24。

[0347] 从分子量为 19,800 道尔顿的反应物聚合物聚 (  $\gamma$ -L- 谷氨酰 - 谷氨酰胺 ) 制备 PGA-21-G-19, 并且聚合物中紫杉醇的重量百分数为 19% 重量比。从分子量为 37,400 道尔顿的反应物聚合物聚 (  $\gamma$ -L- 谷氨酰 - 谷氨酰胺 ) 制备 PGA-32-G-19, 并且聚合物中紫杉醇的重量百分数为 19% 重量比。从分子量为 110,800 道尔顿的反应物聚合物聚 (  $\gamma$ -L- 谷氨酰 - 谷氨酰胺 ) 制备 PGA-97-G-24, 并且聚合物中紫杉醇的重量百分数为 24% 重量比。

[0348] 游离  $^3\text{H}$ - 紫杉酚 ( 对照 )、PGA-21-A-19、PGA-32-A-19 和 PGA-97-A-24 的剂量是 20mg 紫杉醇当量 /kg。对于每一药物,在多个时间点麻醉 4 个小鼠的组 ( 每一单位为小时 ) : 0 ( 即 IV 注射后尽快 )、1.0、2.0、4.0 和 24。将通过心脏或眼球后穿刺获得的 0.5mL 血液置于肝素化的管中。此后,在从麻醉中苏醒之前将小鼠处死。将每一小鼠的血液样品在 11,000rpm 下离心。采集血液样品的上层血浆 ( 0.2mL 至 0.3mL ) 并转移到新的小瓶中。将每一样品的 0.1mL 血浆分别转移到新的 10-mL 小瓶中,向小瓶中加入液体闪烁溶液 ( 5mL )。使用液体闪烁 LS6500 计数系统 ( Beckman ) 分析并用每一样品的标准曲线计算紫杉醇的含量。结果如图 24 所示。这些结果显示本发明的优选聚合物轭合物中的紫杉醇药物与紫杉酚相比在血浆中有更长的持续期。

[0349] 实施例 33

[0350] 相对于紫杉酚对照测试各种与药物轭合的聚合物以确定肿瘤中紫杉醇浓度随时间的变化。当来自实施例 32 的小鼠的整个群体的平均肿瘤体积达到  $200\text{mm}^3$  至  $300\text{mm}^3$  ( 直径 6mm 至 8mm ) 时,每一患肿瘤的动物经由尾部静脉接受单一 IV 团注  $^3\text{H}$ - 紫杉酚 ( 对照 )、PGA-21-A-19、PGA-32-A-19 和 PGA-97-A-24。

[0351] 从分子量为 19,800 道尔顿的反应物聚合物聚 (  $\gamma$ -L- 谷氨酰 - 谷氨酰胺 ) 制备 PGA-21-G-19, 并且聚合物中紫杉醇的重量百分数为 19% 重量比。从分子量为 37,400 道尔顿的反应物聚合物聚 (  $\gamma$ -L- 谷氨酰 - 谷氨酰胺 ) 制备 PGA-32-G-19, 并且聚合物中紫杉醇的重量百分数为 19% 重量比。从分子量为 110,800 道尔顿的反应物聚合物聚 (  $\gamma$ -L- 谷氨酰 - 谷氨酰胺 ) 制备 PGA-97-G-24, 并且聚合物中紫杉醇的重量百分数为 24% 重量比。

[0352] 游离  $^3\text{H}$ - 紫杉酚 ( 对照 )、PGA-21-A-19、PGA-32-A-19 和 PGA-97-A-24 的剂量是 20mg 紫杉醇当量 /kg。对于每一药物,在多个时间点麻醉 4 个小鼠的组 ( 每一单位为小时 ) : 0 ( 即 IV 注射后尽快 )、1.0、2.0、4.0 和 24。独立地从两臀和两肩收集肿瘤。此后,在从麻醉中苏醒之前将小鼠处死。将大约 80mg 至 180mg 的每一肿瘤放在闪光管中,并用 Soluene ( 组织增溶剂 ) ( 1mL ) 消化肿瘤。然后,将 0.1mL 被消化组织转移到新的 10-mL 小瓶中,向小瓶中加入液体闪烁液 ( 5mL )。使用液体闪烁 LS6500 计数系统 ( Beckman ) 分析并用每一样品的标准曲线计算紫杉醇的含量。结果如图 25 所示。这些结果显示本发明的优选聚合物轭合物中的紫杉醇药物与紫杉酚相比随时间更浓缩在肿瘤中。

[0353] 实施例 34

[0354] 动物和肿瘤模型

[0355] 裸小鼠(6至7周龄,体重25g至30g,雄性)购自Charles River Lab(Willington, MA)。B16F0细胞系购自ATCC(CRL-6322, ATCC美国典型微生物菌种保藏中心, Rockville, MD)。在添加有10%胎牛血清、2 $\mu$ M谷氨酰胺、1mM非必需氨基酸、1mM丙酮酸钠、100U/ml青霉素和100 $\mu$ g/ml链霉素的RPMI 1640中培养B16F0细胞。对从组织培养液采集的B16细胞进行计数并重新悬浮至5 $\times$ 10<sup>6</sup>每mL的浓度。使用TB注射器对每一小鼠经由皮下注射给予0.2mL(总共1 $\times$ 10<sup>6</sup>细胞)。在每一动物的右臀处接种一肿瘤。接种之前剃去肿瘤接种位置的毛使得在随着肿瘤生长时更容易测量。

[0356] 实施例 35[0357] 肿瘤聚集的磁共振图像

[0358] 造影前和造影后使用膝关节线圈在GE 3T MR扫描仪上获得小鼠的图像。以下的成像参数为TE:minful、TR = 250ms、FOV:8和24片/板和冠状切片厚度1.0mm。如实施例7-8,从基于具有MALS检测器的Heleos系统的平均分子量为99,400道尔顿的聚( $\gamma$ -L-天冬氨酰-谷氨酰胺)制备PGA-97-A-DTPA-Gd(III)。本实施例的对照物质是Omniscan-Gd(III)-(DTPA-BMA(0.1mmol Gd(III)/kg)。PGA-97-A-DTPA-Gd(III)的注射剂量是0.1mmol Gd(III)/kg。Omniscan™的注射剂量是0.1mmol Gd(III)/kg。经由尾部静脉向麻醉的小鼠注射两化合物并在注射前和造影剂注射后的6分钟至4小时获取图像。MRI的结果示于图26。如图26所示,在肿瘤组织中聚集的PGA-97-A-DTPA-Gd(III)螯合物的量大于小分子Omniscan-Gd(III)。这些结果表明PGA-97-A-DTPA-Gd(III)螯合物具有增加的特异性和保留。

[0359] 实施例 36[0360] 纳米颗粒形成的研究

[0361] 除非另有说明,将各种溶液(通过0.2 $\mu$ m过滤器过滤)加入到分子量为99,400道尔顿的聚( $\gamma$ -L-天冬氨酰-谷氨酰胺)上至1mg/mL。均匀溶解所有的溶液。通过光散射ZetalPals(Brookhaven InstrumentCorporation)测量粒径、多分散性和基线指数。结果总结于表2中。MilliQ水是指通过具有0.2 $\mu$ m过滤器的转移系统过滤的水。

[0362] 表 2. 聚谷氨酸盐-天冬氨酸形成纳米颗粒

[0363]

|                                    | 有效直径    | 多分散性  | 基线指数 |
|------------------------------------|---------|-------|------|
| MilliQ 水                           | 244.8nm | 0.264 | 9.6  |
| MilliQ 水 (0.1mg/mL)                | 198.0nm | 0.176 | 8.6  |
| MilliQ 水 (0.1M NaNO <sub>3</sub> ) | 169.4nm | 0.336 | 10.0 |
| PBS(pH 7.4)                        | 138.8nm | 0.345 | 7.8  |
| PBS(pH 5.0)                        | 141.0nm | 0.325 | 9.9  |

[0364]

实施例 37

[0365] PGA-97-A-10 的纳米颗粒的形成

[0366] 将 PGA-97-A-10 以各种浓度溶解在去离子水中。通过光散射 (ZetalPals, Brookhaven Instrument Corporation) 测量粒径、多分散性和基线指数。结果如下面的表 3 所示。

[0367] 表 3- 去离子水中 PGA-97-A-10 纳米颗粒的形成

| [0368] | <u>浓度 (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</u> | <u>尺寸 (nm)</u> | <u>多分散性</u> | <u>基线指数</u> |
|--------|---|----------------|-------------|-------------|
| [0369] | 722                                     | 438.9          | 0.133       | 9.7         |
| [0370] | 289                                     | 379.0          | 0.169       | 8.8         |
| [0371] | 100                                     | 357.5          | 0.226       | 9.1         |
| [0372] | 50                                      | 309.4          | 0.215       | 9.5         |
| [0373] | 10                                      | 209.6          | 0.220       | 9.3         |
| [0374] | 5                                       | 194.9          | 0.208       | 8.1         |
| [0375] | 1                                       | 178.0          | 0.172       | 7.4         |
| [0376] | 0.5                                     | N/A            | 0.122       | 0           |

[0377] 实施例 38

[0378] 由 Nano Analytical Laboratory (纳米分析实验室) (San Francisco, CA) 拍摄与药物轭合的聚合物的冷冻断裂电镜图像。聚合物是从分子量为 39,700 的聚 ( $\gamma$ -L- 天冬氨酰 - 谷氨酰胺) 制备并且紫杉醇的重量百分数为 20% 的 PGA-44-A-20。超声处理 (约 5min) 之后将它在生理盐水中配制成 1mg/mL 的浓度。此后, 将它包在封口膜中并立即送到公司 (总共约一天的运输)。到达后, 将它储存在 4°C。然后将聚合物放置在生理盐水溶液中以确定是否会形成纳米颗粒。电子显微图像的复制如图 27 所示。从图像中能够看出, 在将聚合物轭合物置于水溶液中时形成本发明优选的与药物轭合的聚合物的纳米颗粒。

[0379] 实施例 39

[0380] 测试与药物轭合的聚合物的颗粒以确定各种药物浓度下的稳定性。PGA-44-A-20 和 PGA-97-A-20 在各种药物浓度下形成颗粒并测定粒径。结果如图 28 所示。甚至在药物浓度增加时颗粒仍在纳米粒径范围内并且是稳定的。这些结果表明能够在很宽的药物浓度范围内形成稳定的纳米颗粒。

[0381] 实施例 40

[0382] 测试与药物轭合的聚合物颗粒以确定在各种药物浓度下的稳定性。PGA-21-G-20 和 PGA-32-G-20 在各种药物浓度下形成颗粒并测定粒径。结果如图 29 所示。甚至在药物浓度增加时颗粒仍在纳米粒径范围内并且是稳定的。这些结果进一步表明能够在很宽的药物浓度范围内形成稳定的纳米颗粒。

[0383] 本领域技术人员会理解, 能够做出许多不同的修改而不偏离本发明的精神。因此, 应当清楚地理解, 本发明的形式仅是示例性的而非旨在限制本发明的范围。

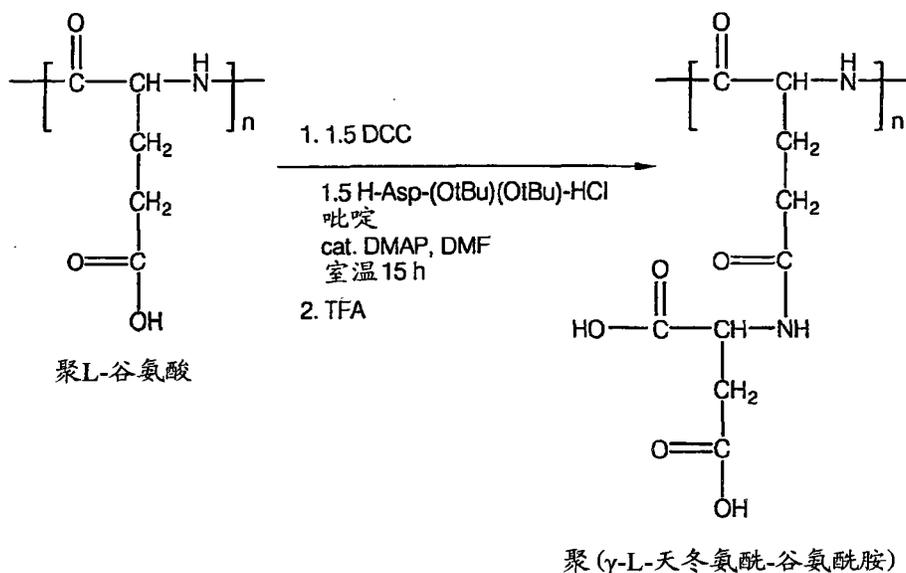


图 1

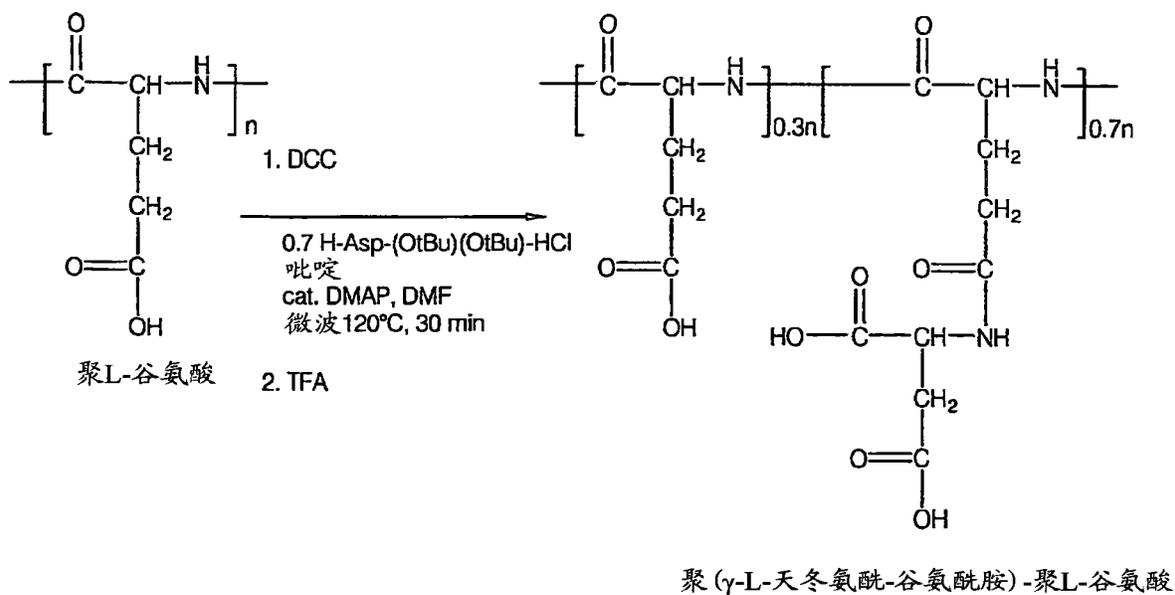


图 2

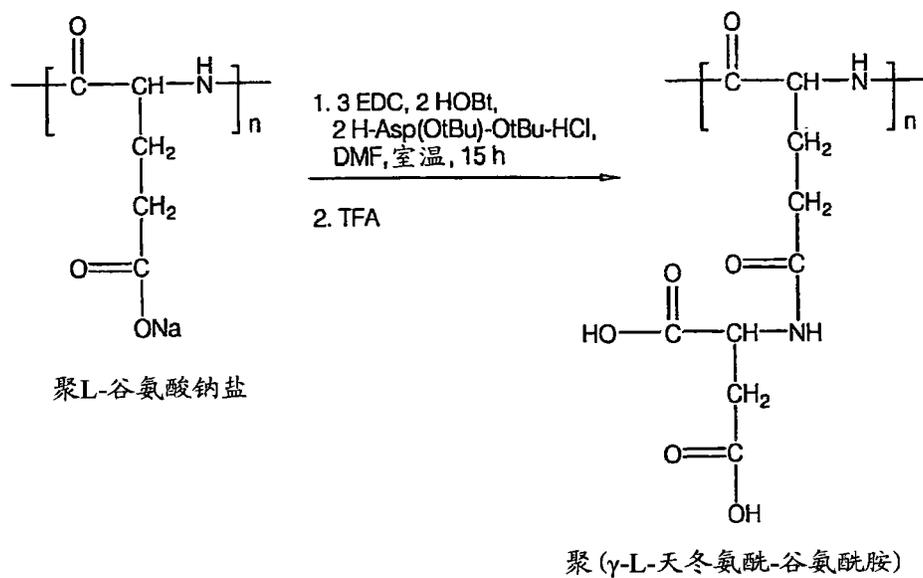


图 3

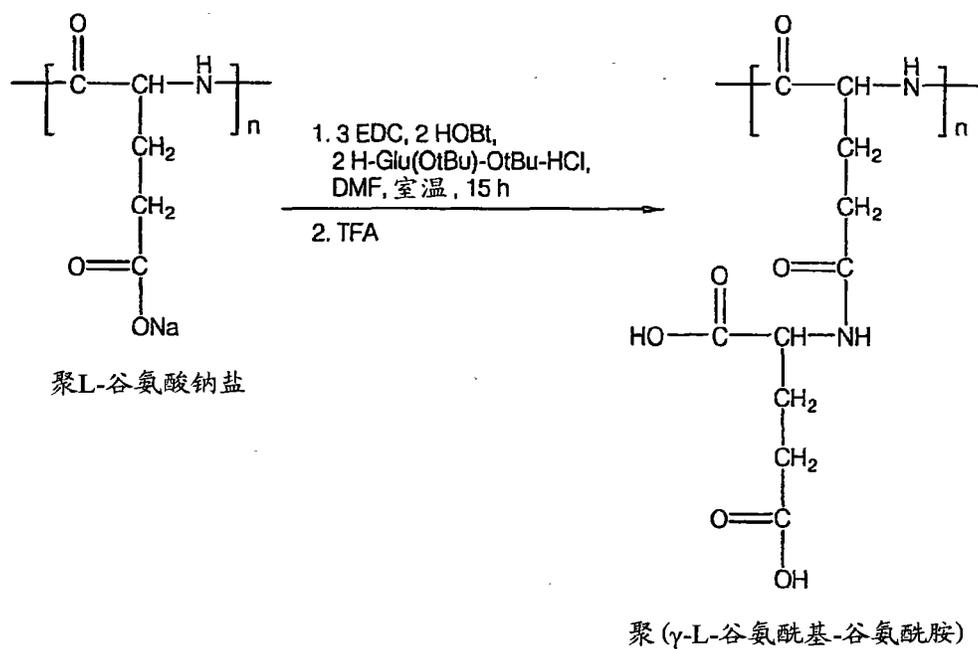


图 4

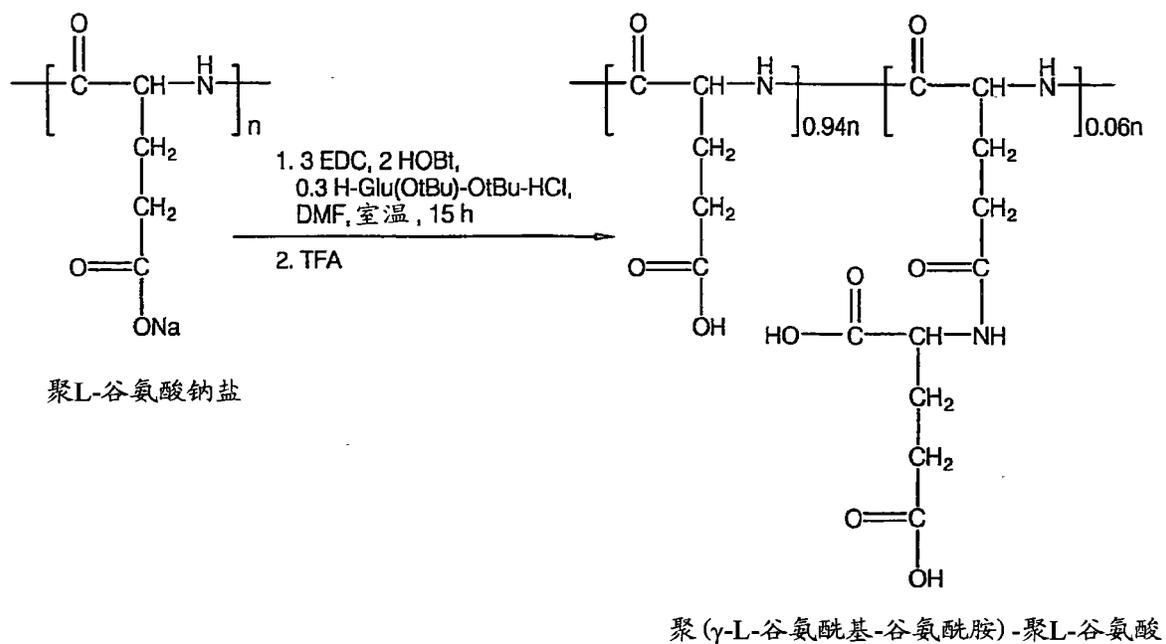
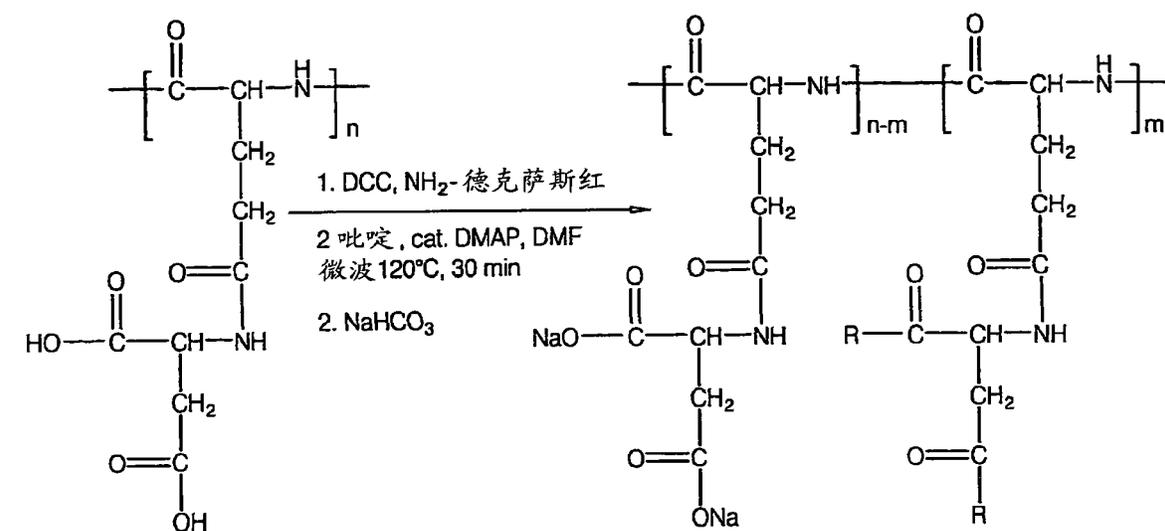
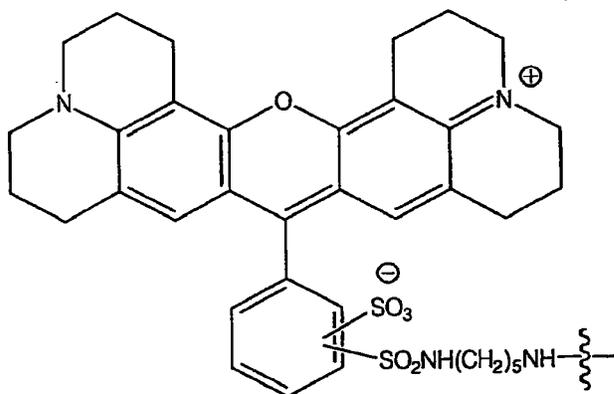


图 5



聚(γ-L-天冬氨酰-谷氨酰胺)

PGA-97-A-德克萨斯红  
(R = NH-德克萨斯红或 ONa)

德克萨斯红-NH

图 6

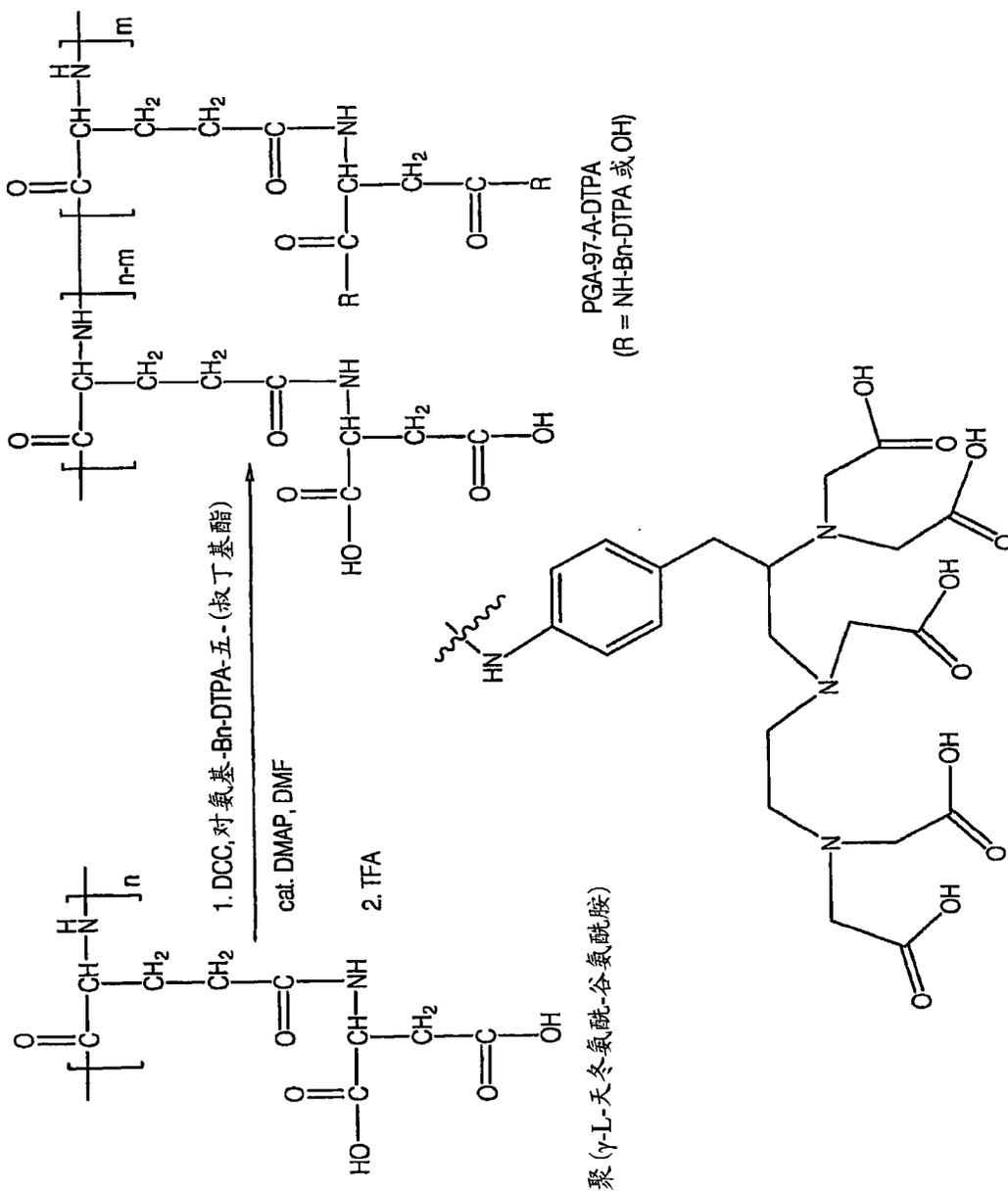


图 7

NH-Bn-DTPA



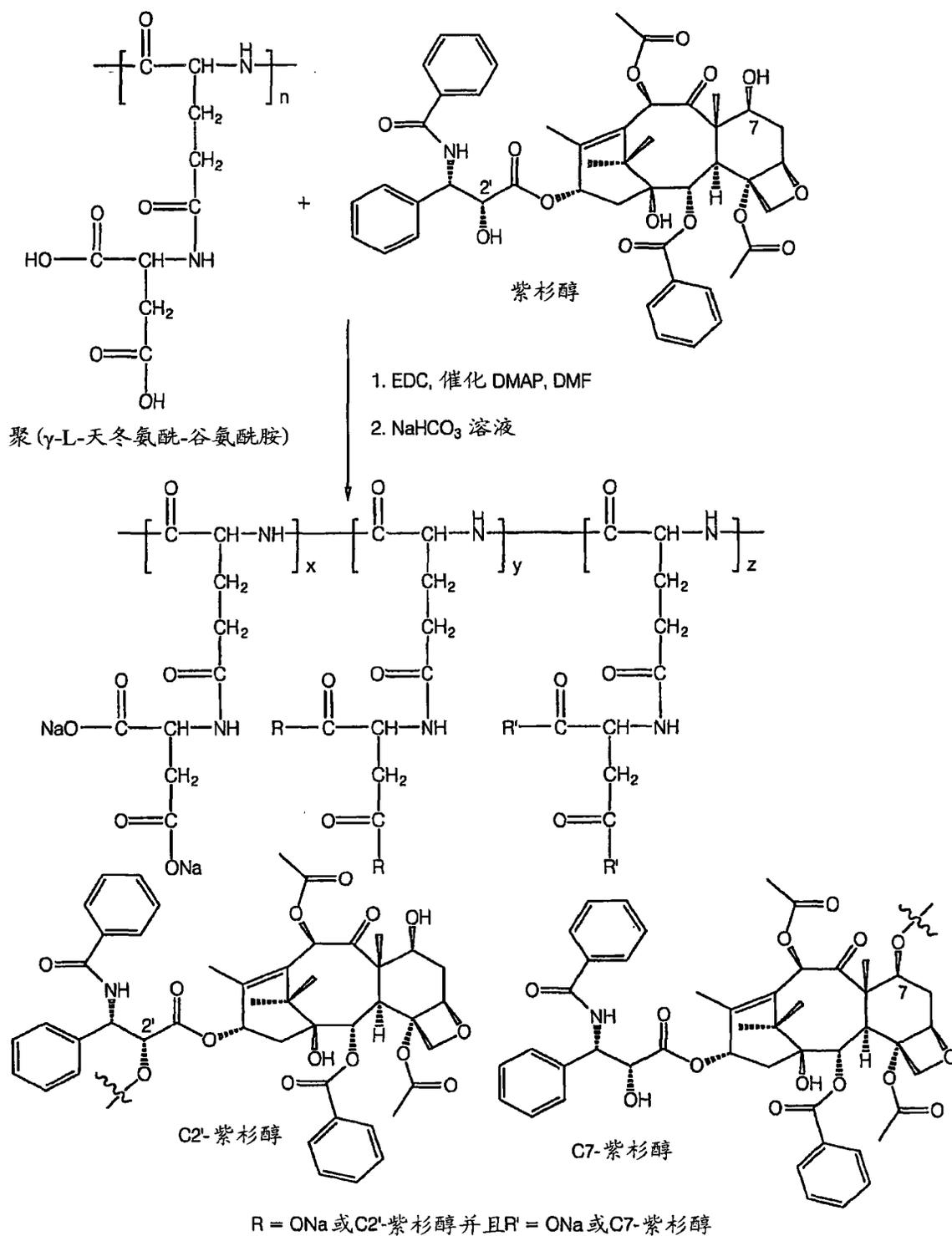


图 9

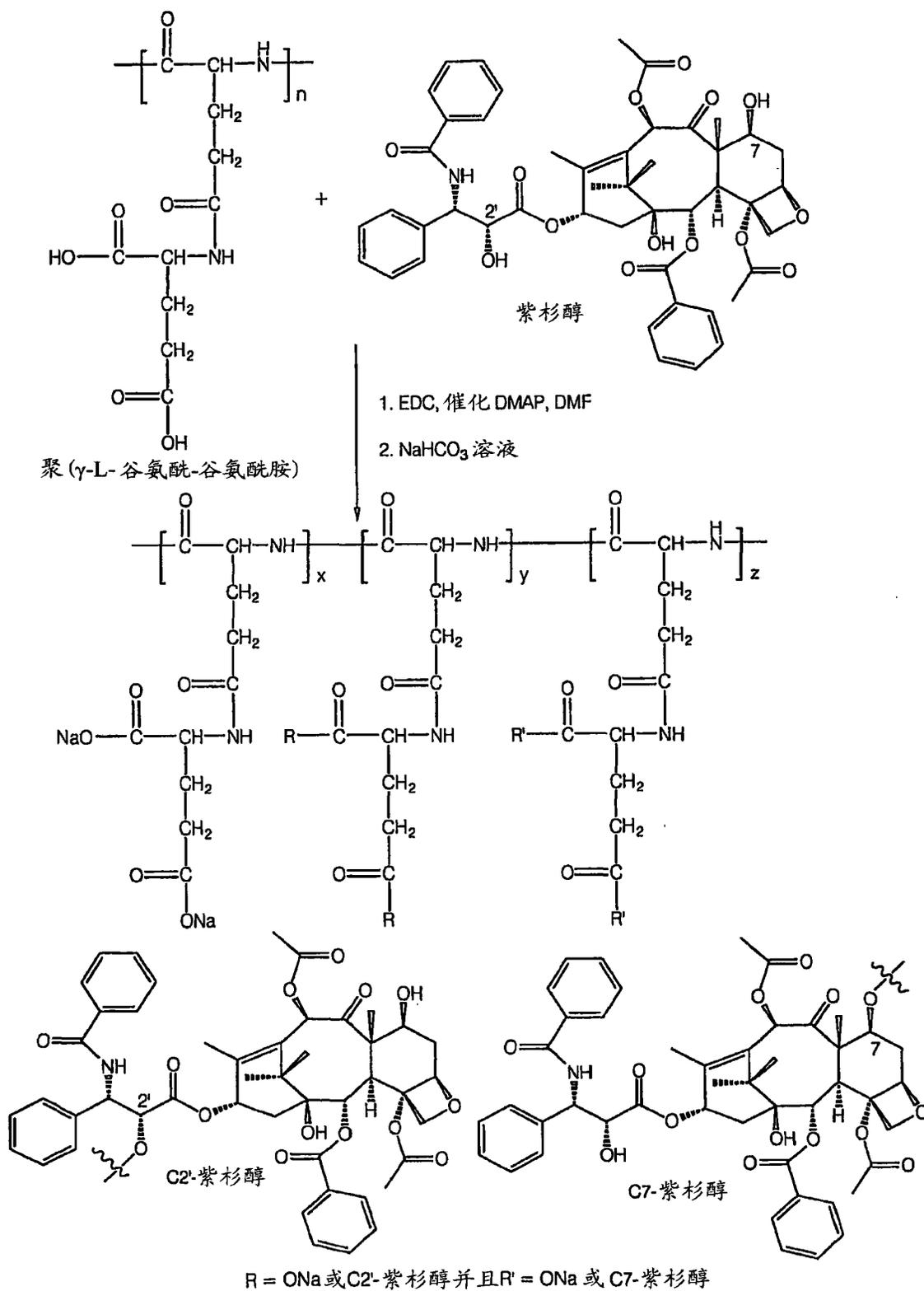
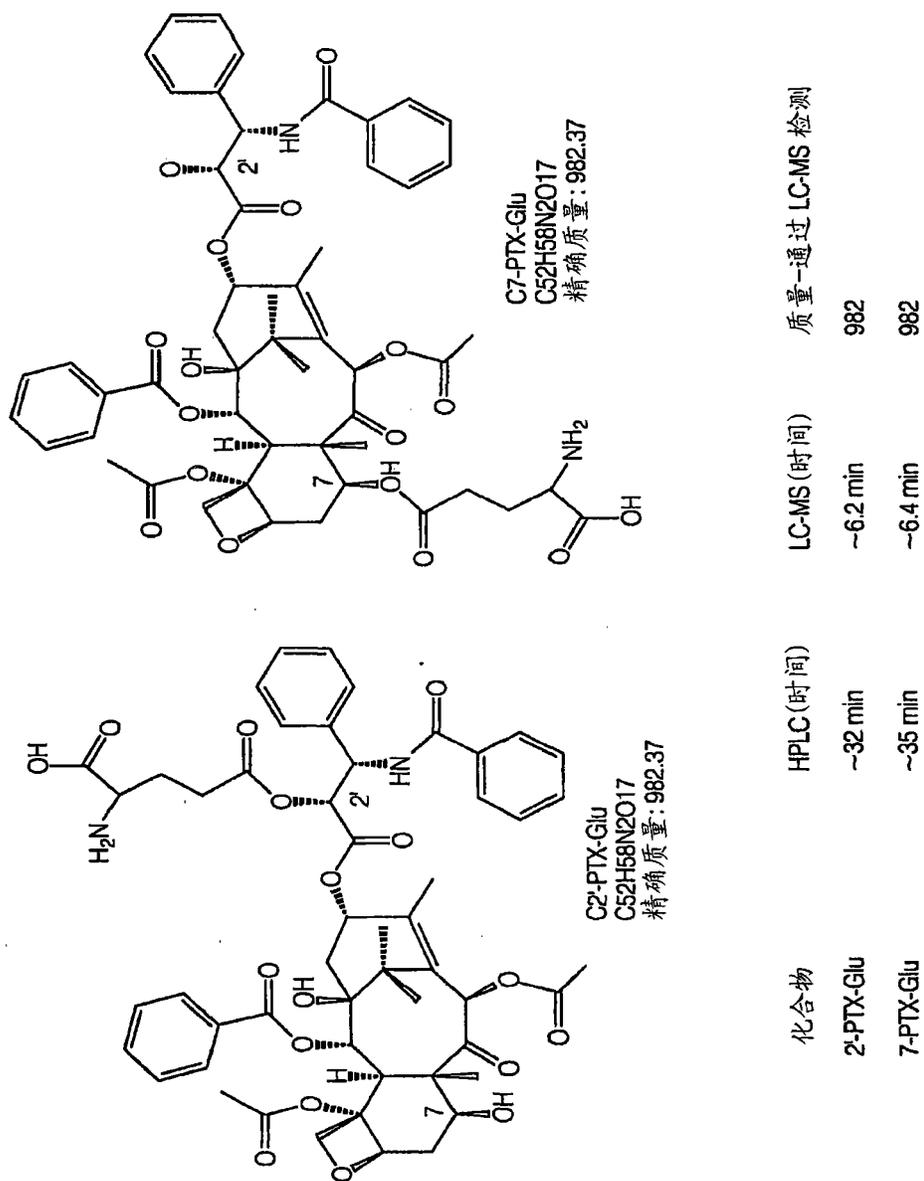


图 10



两化合物的HPLC柱和条件相同。  
两化合物的LC-MS柱和条件相同。

图 11

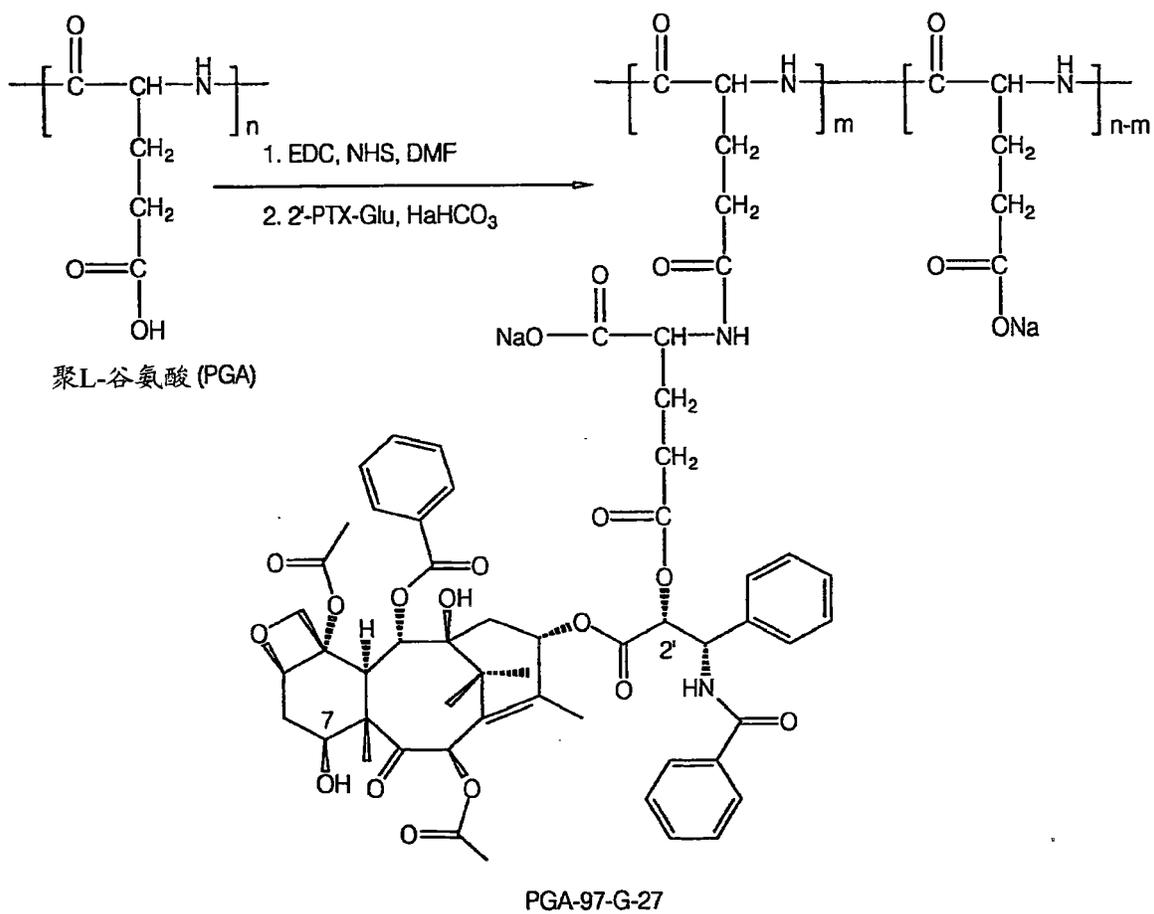


图 12

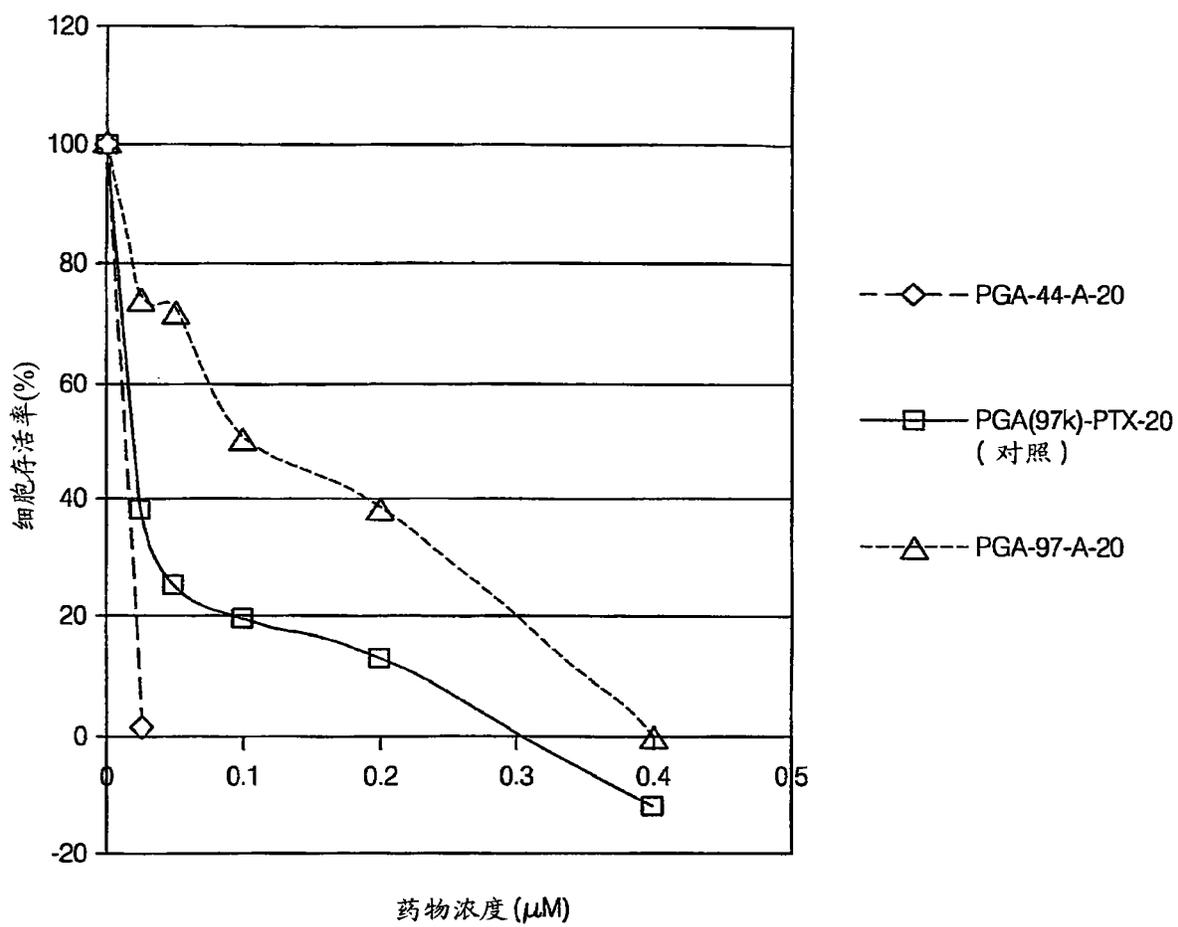


图 13

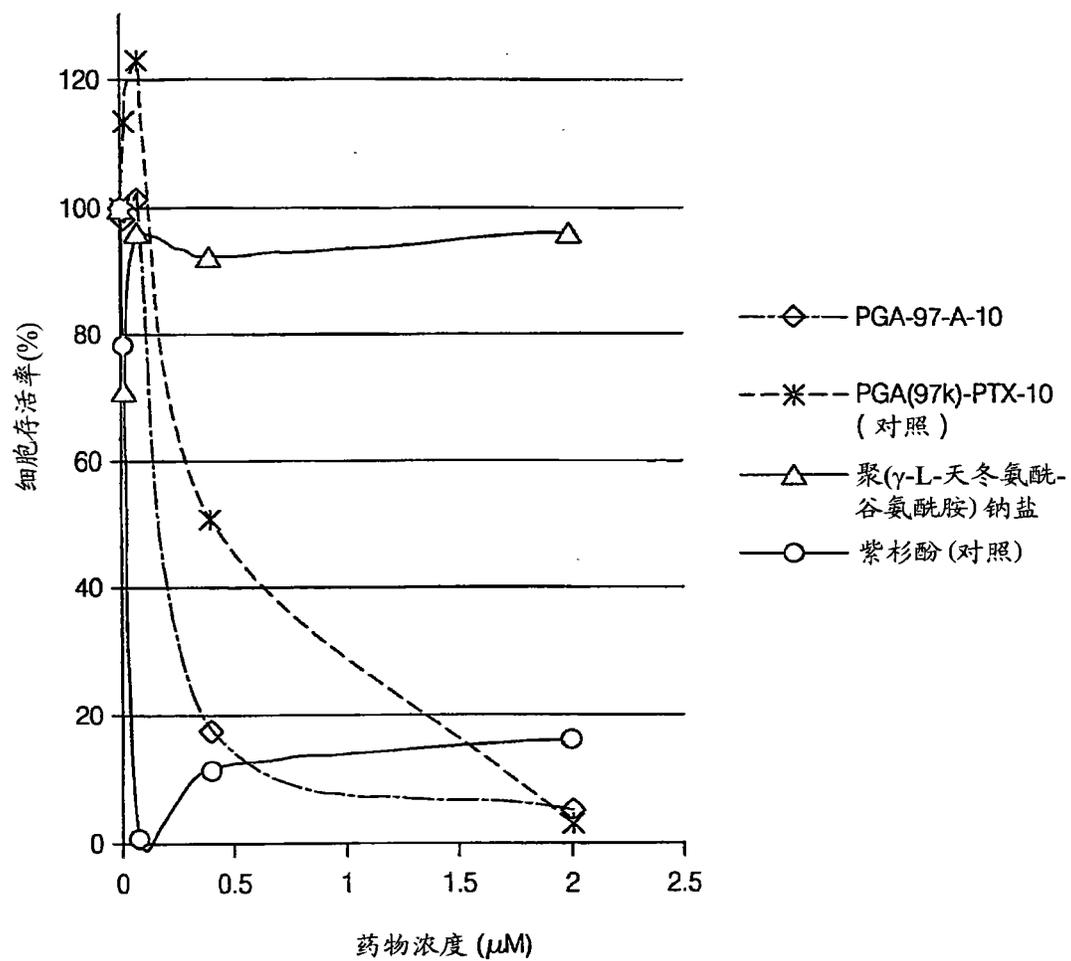


图 14

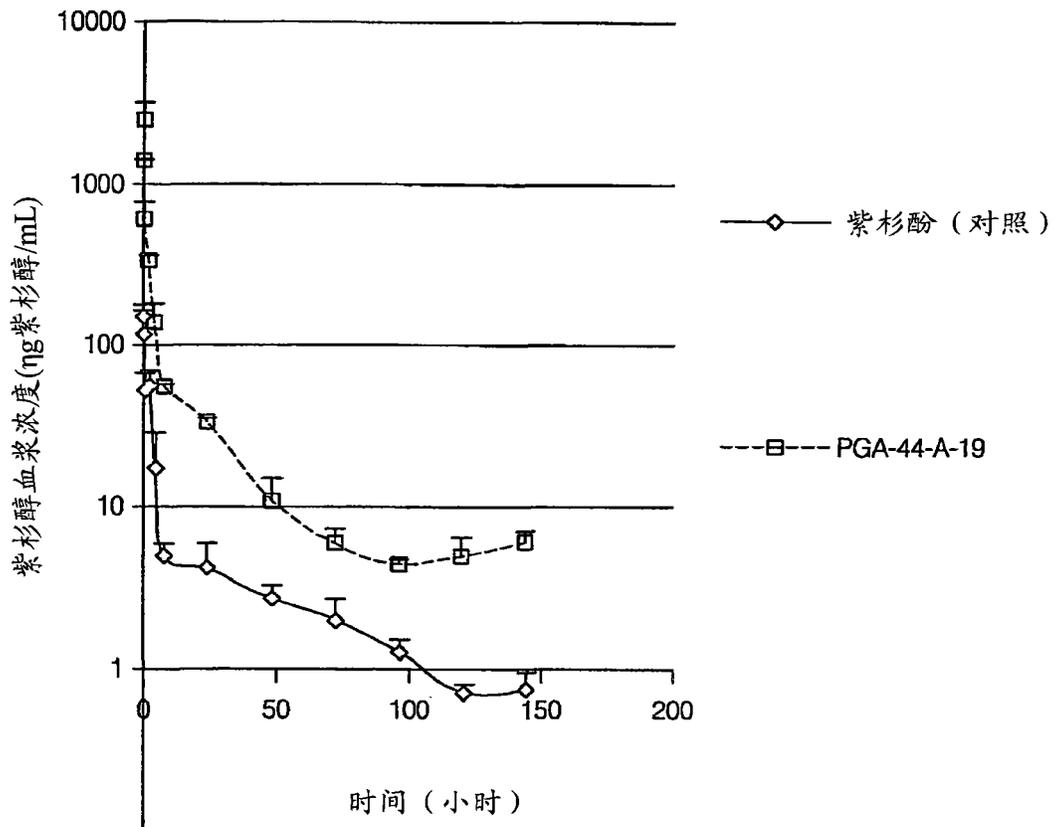


图 15

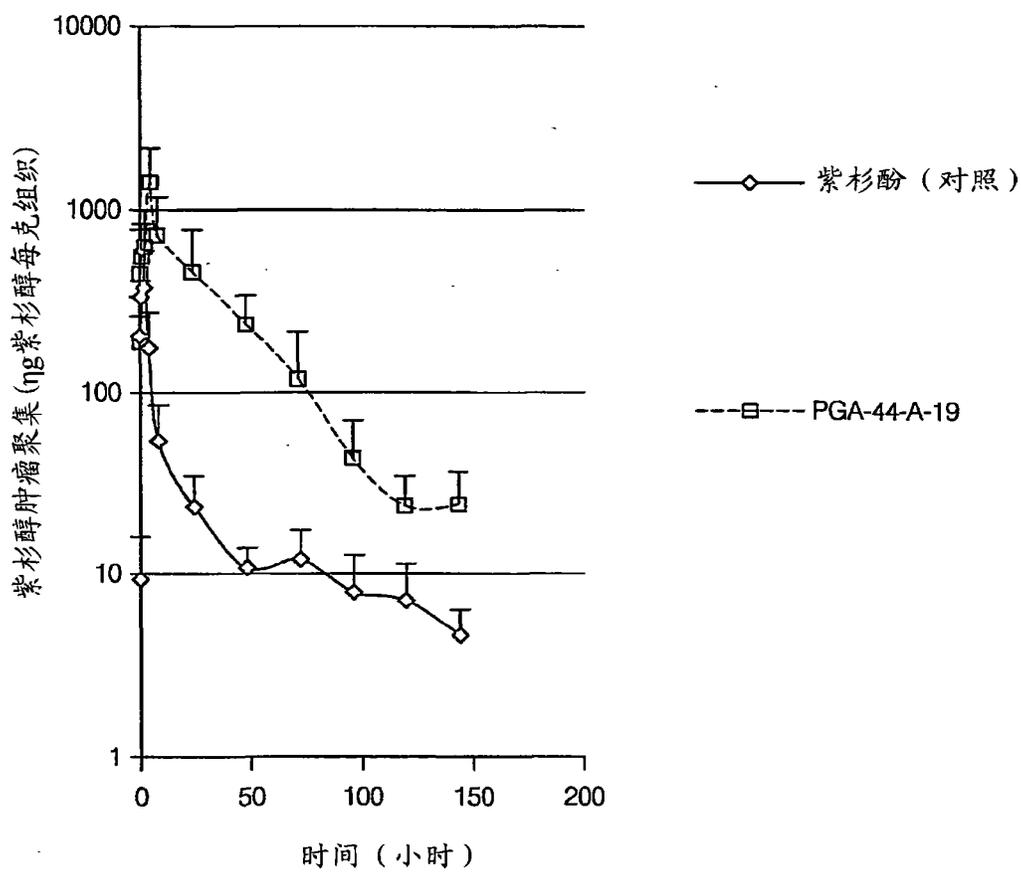


图 16

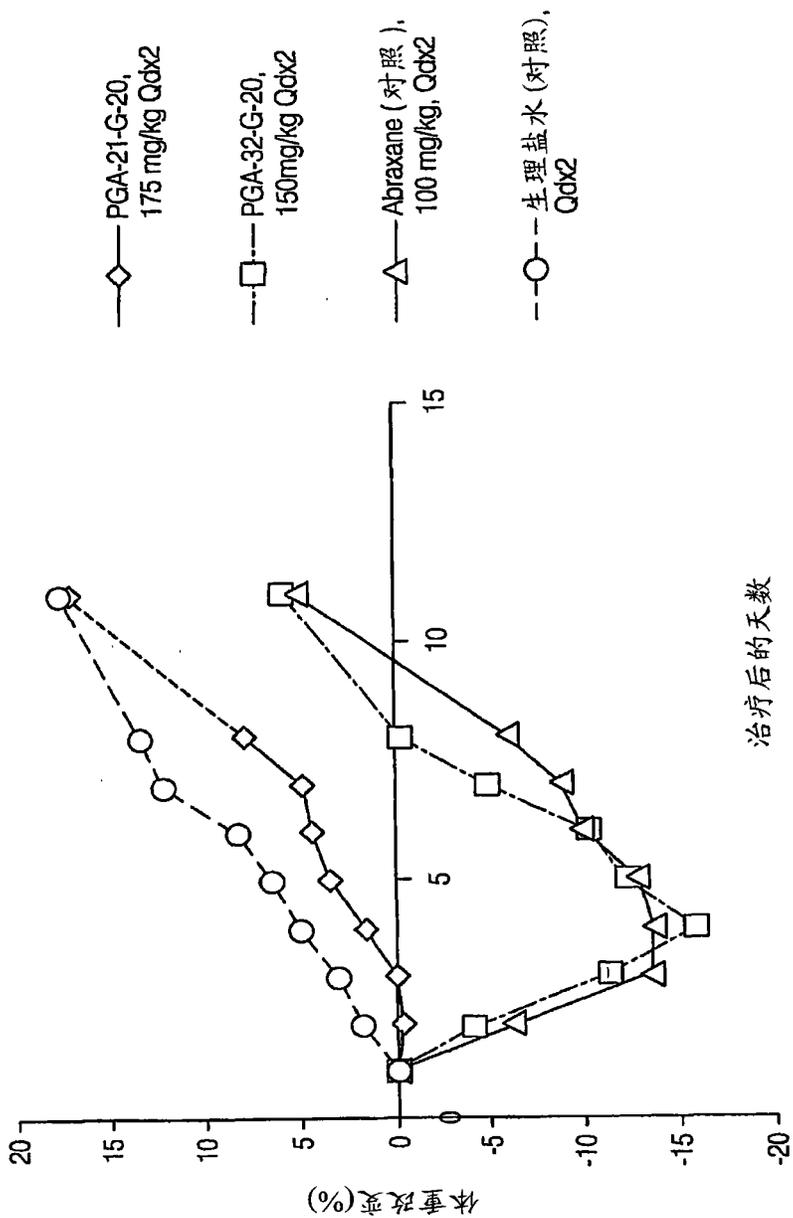


图 17

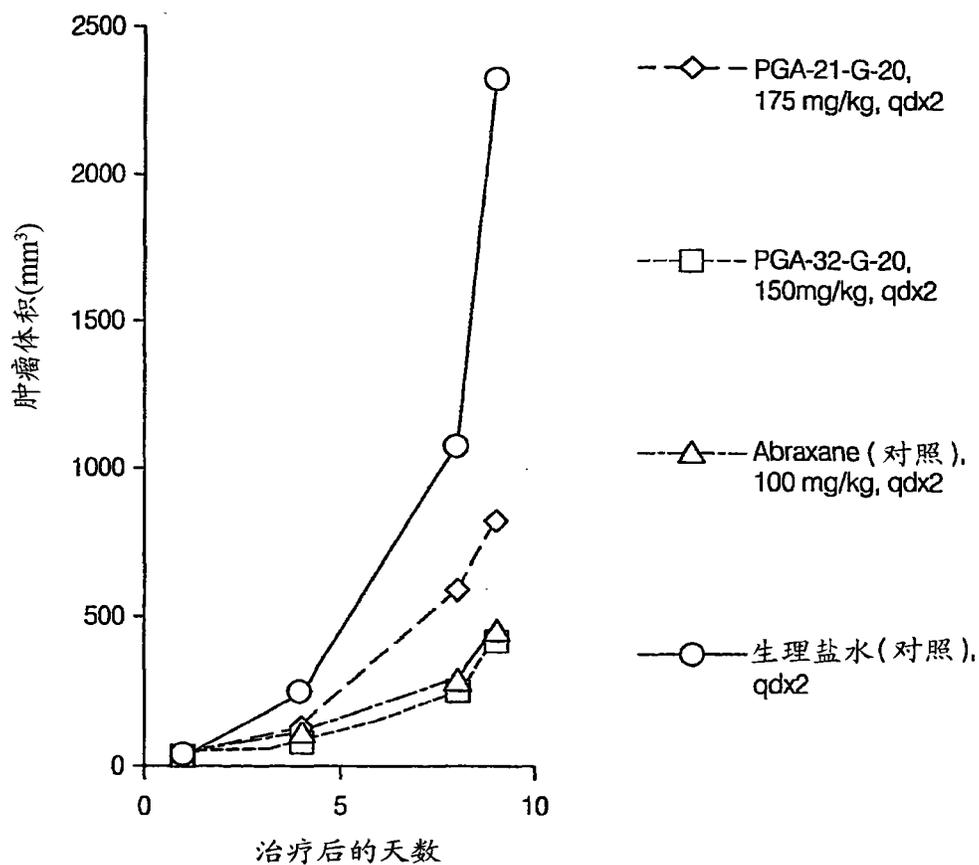


图 18

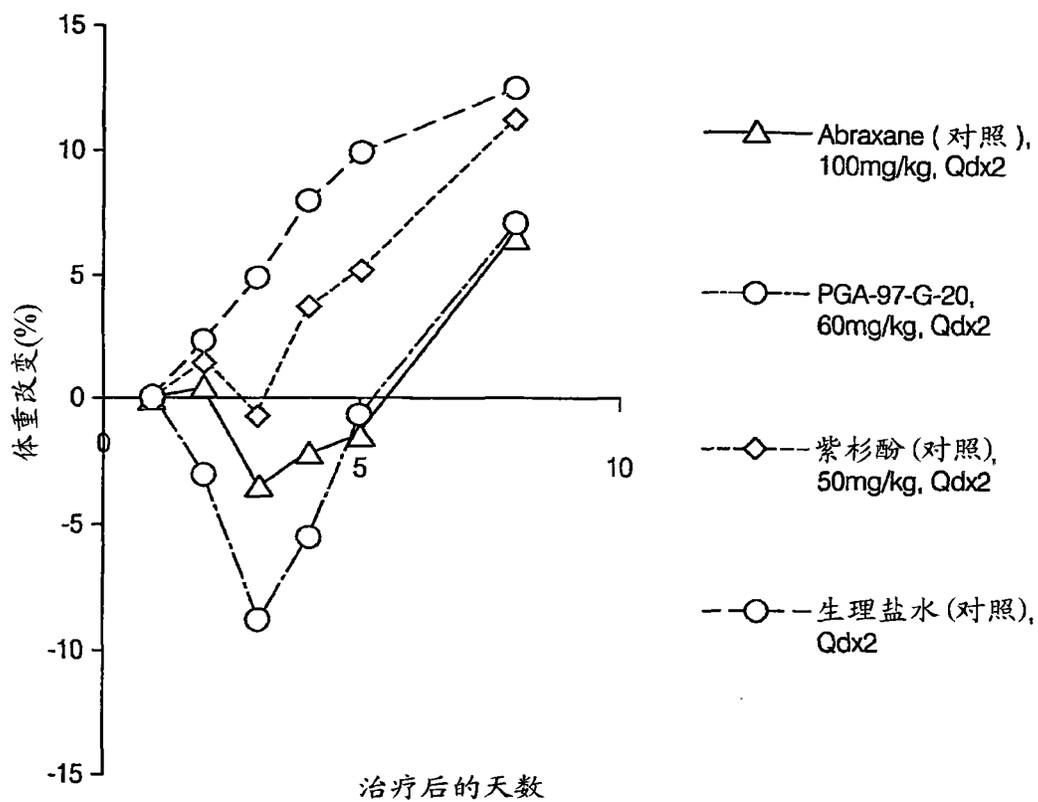


图 19

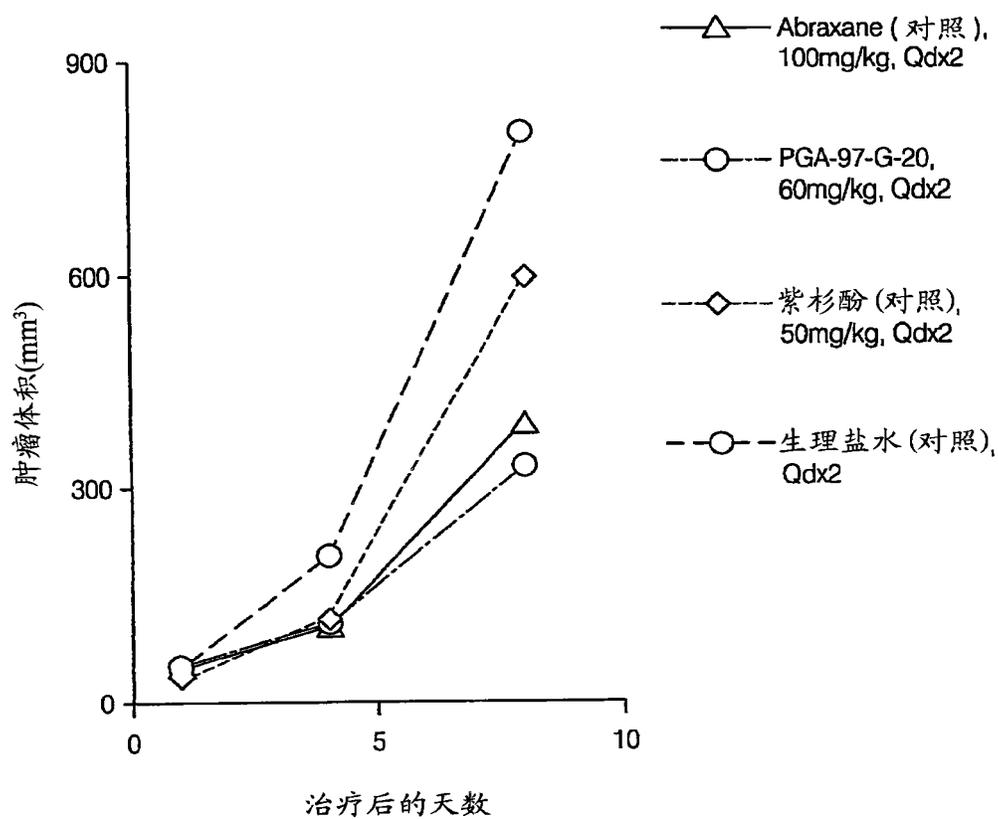


图 20

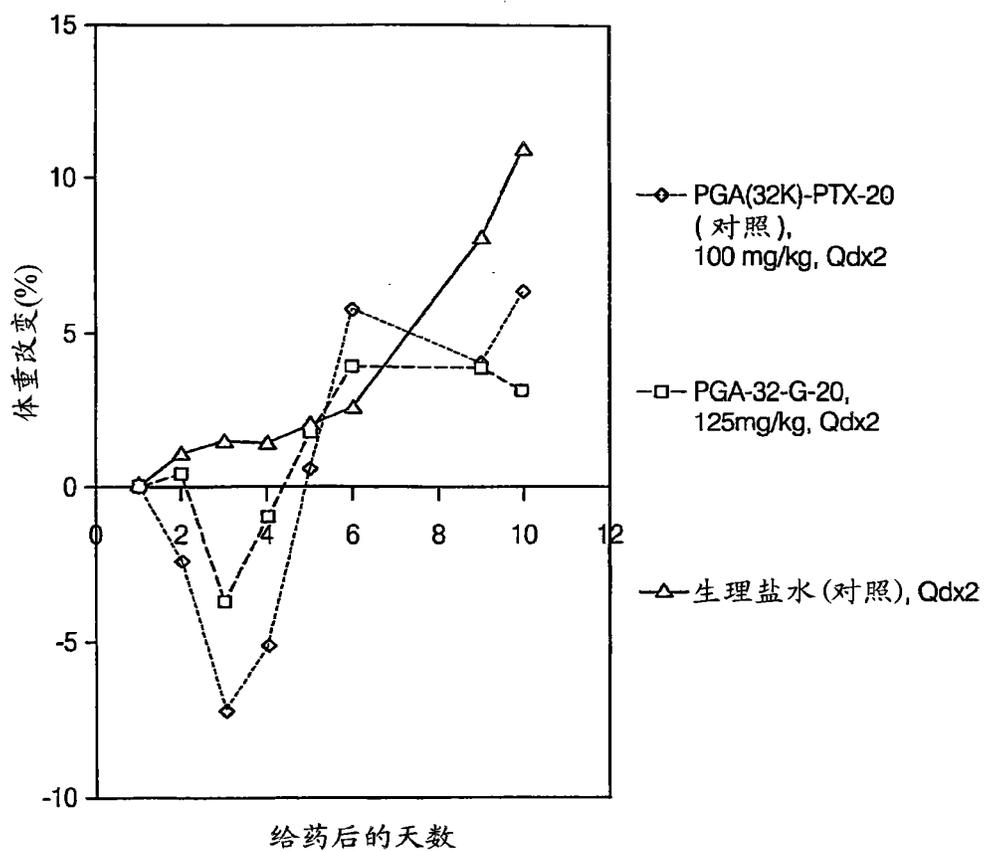


图 21

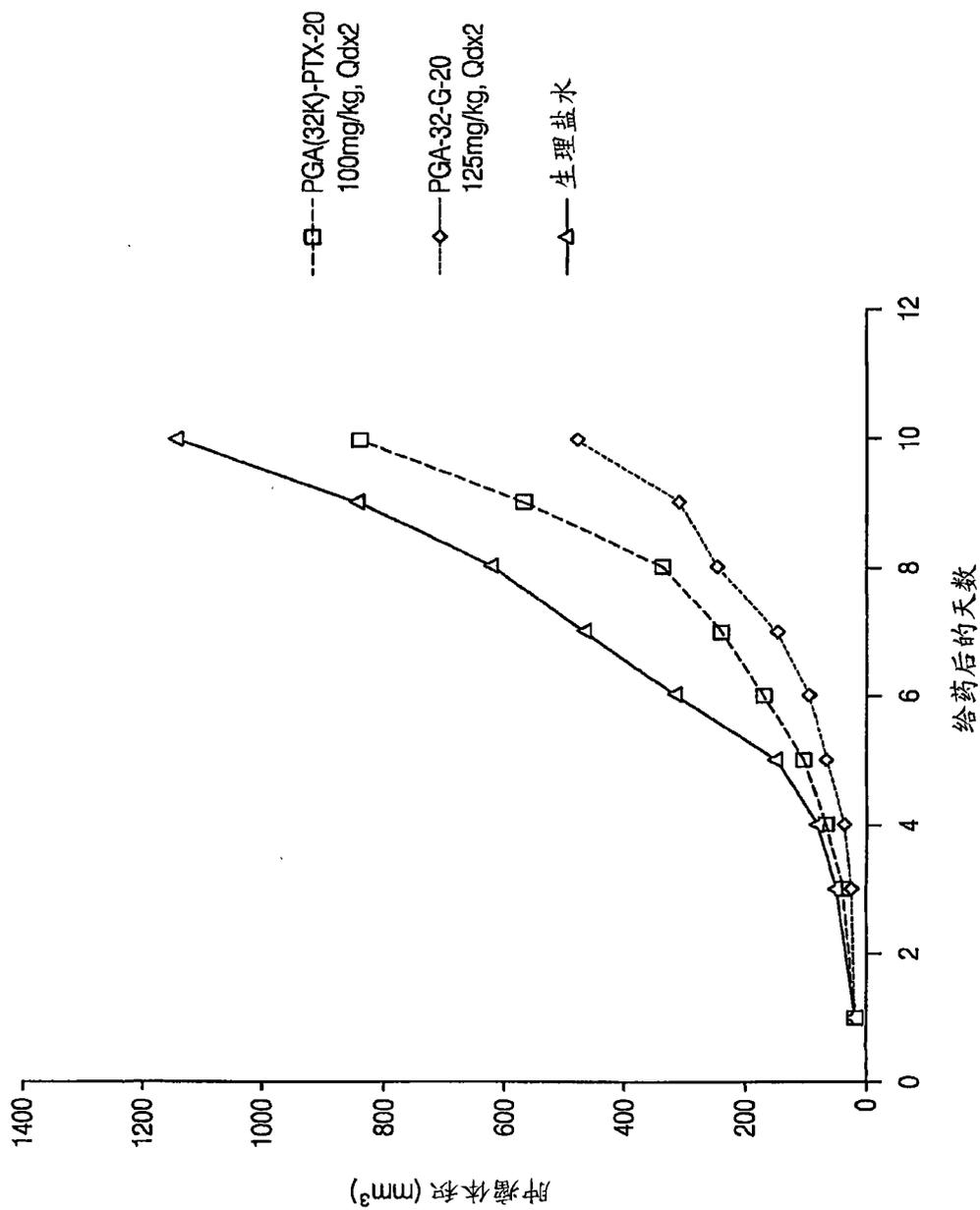


图 22

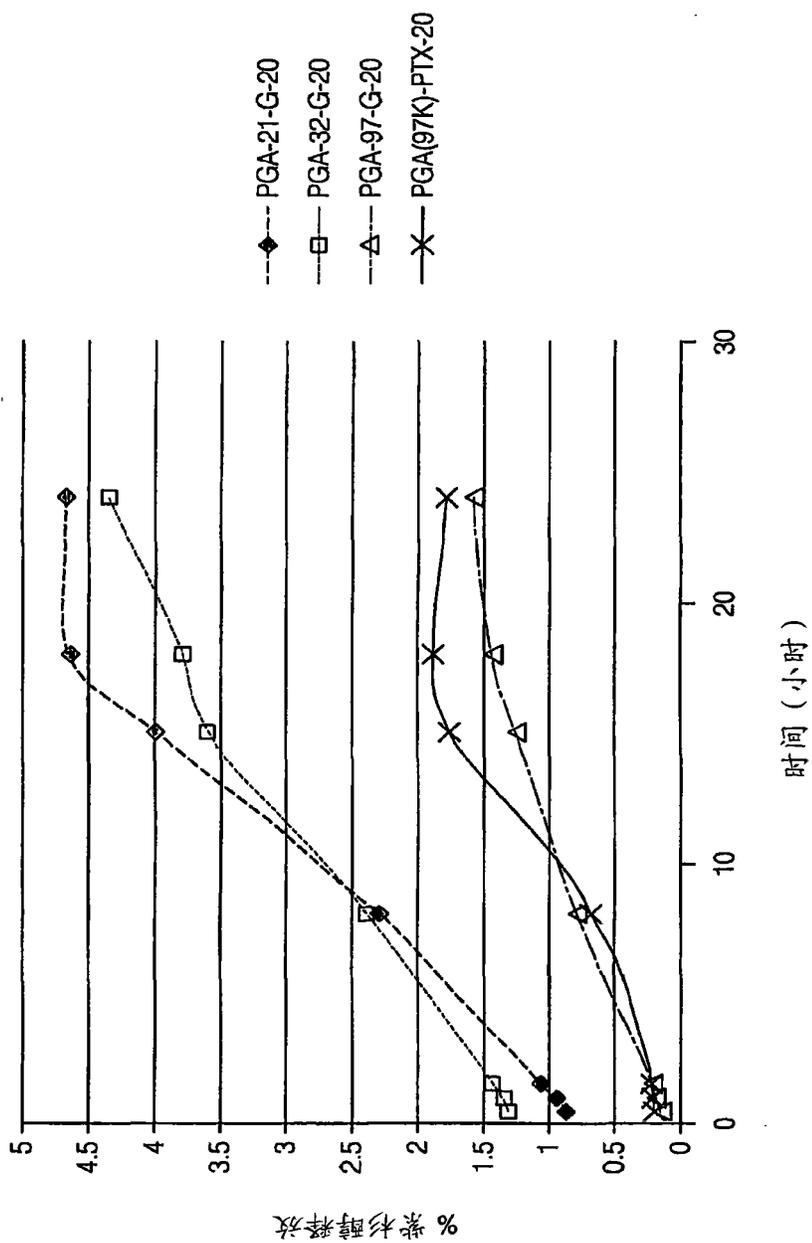


图 23

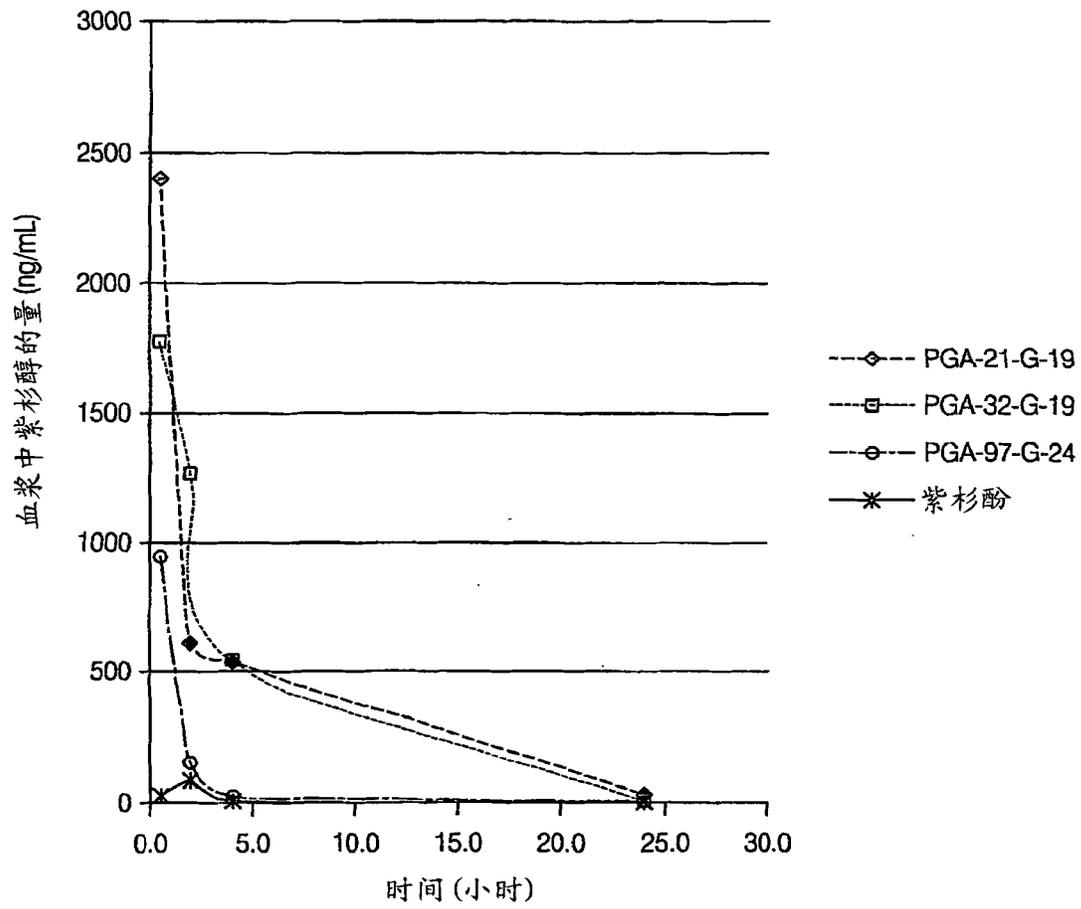


图 24

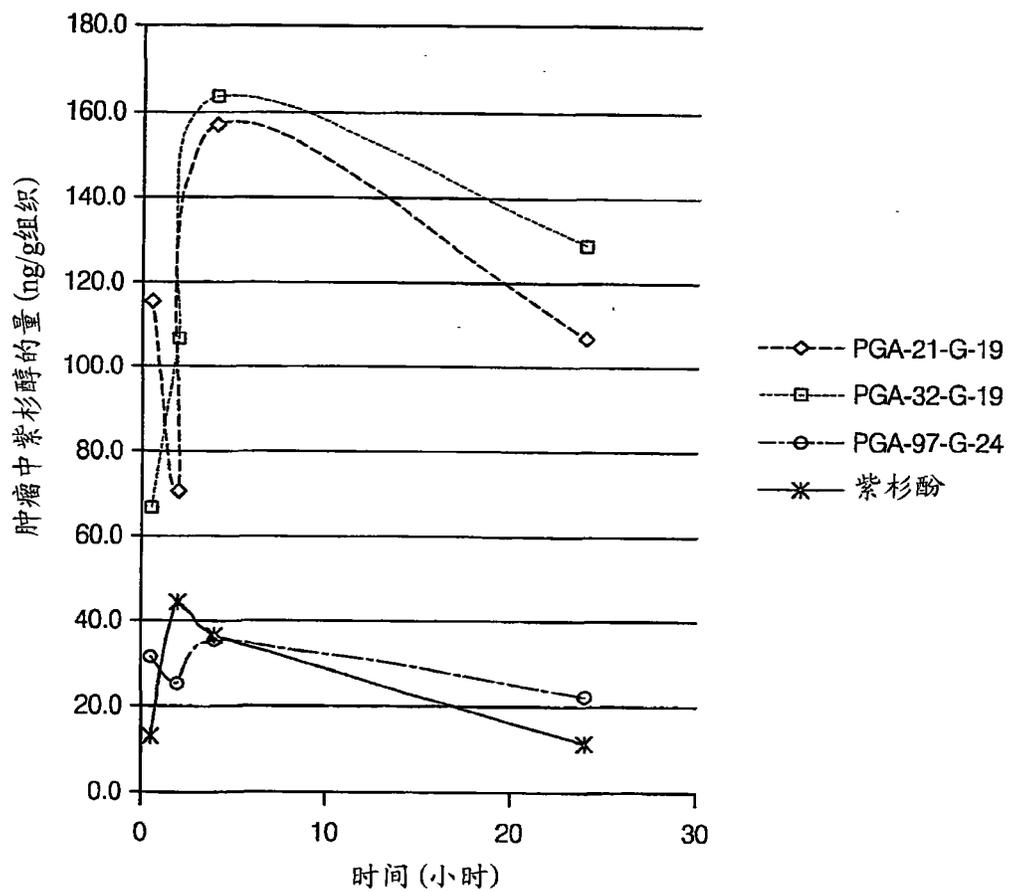


图 25

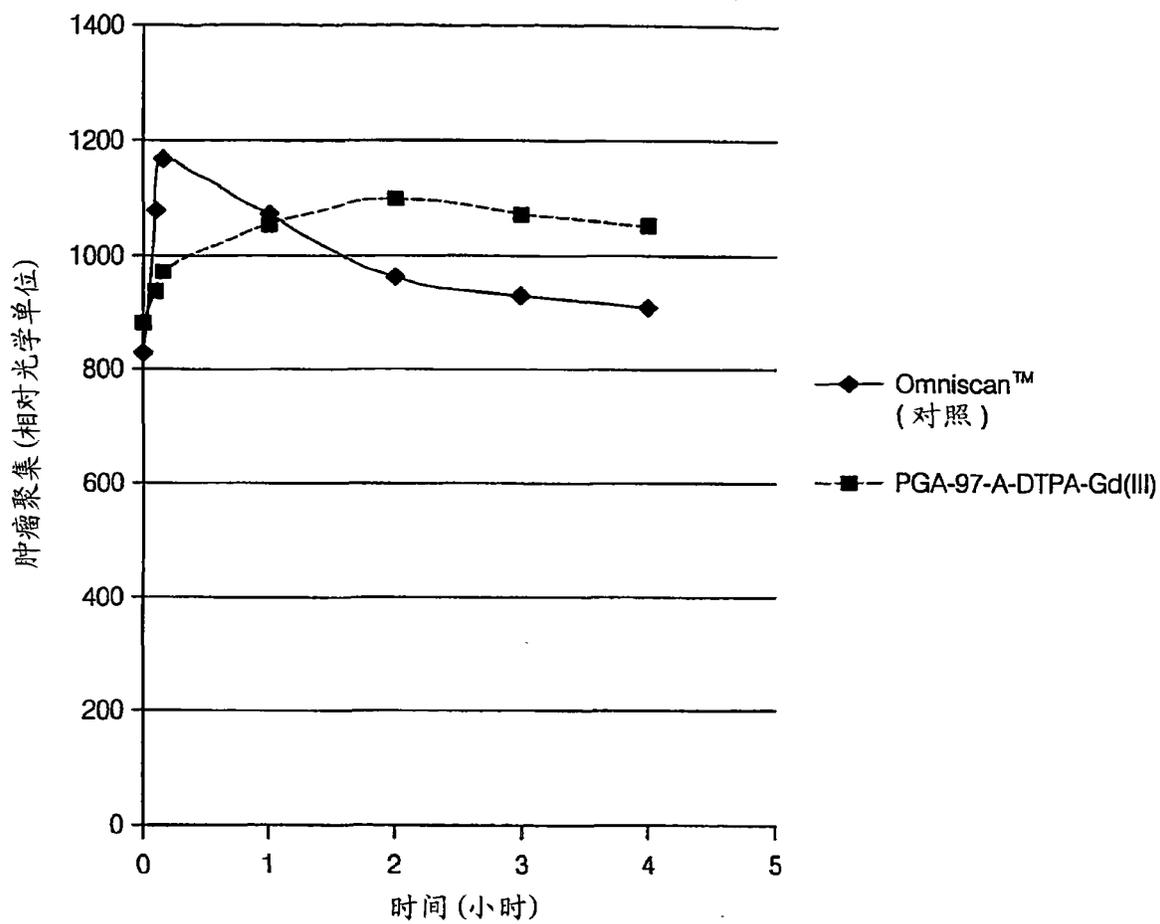


图 26

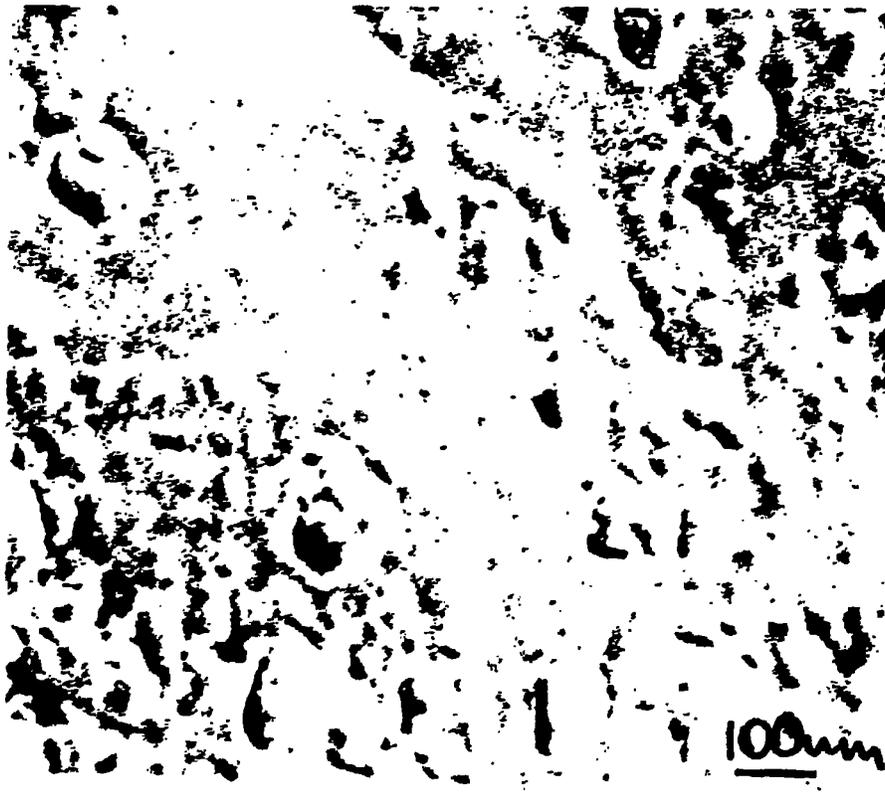


图 27

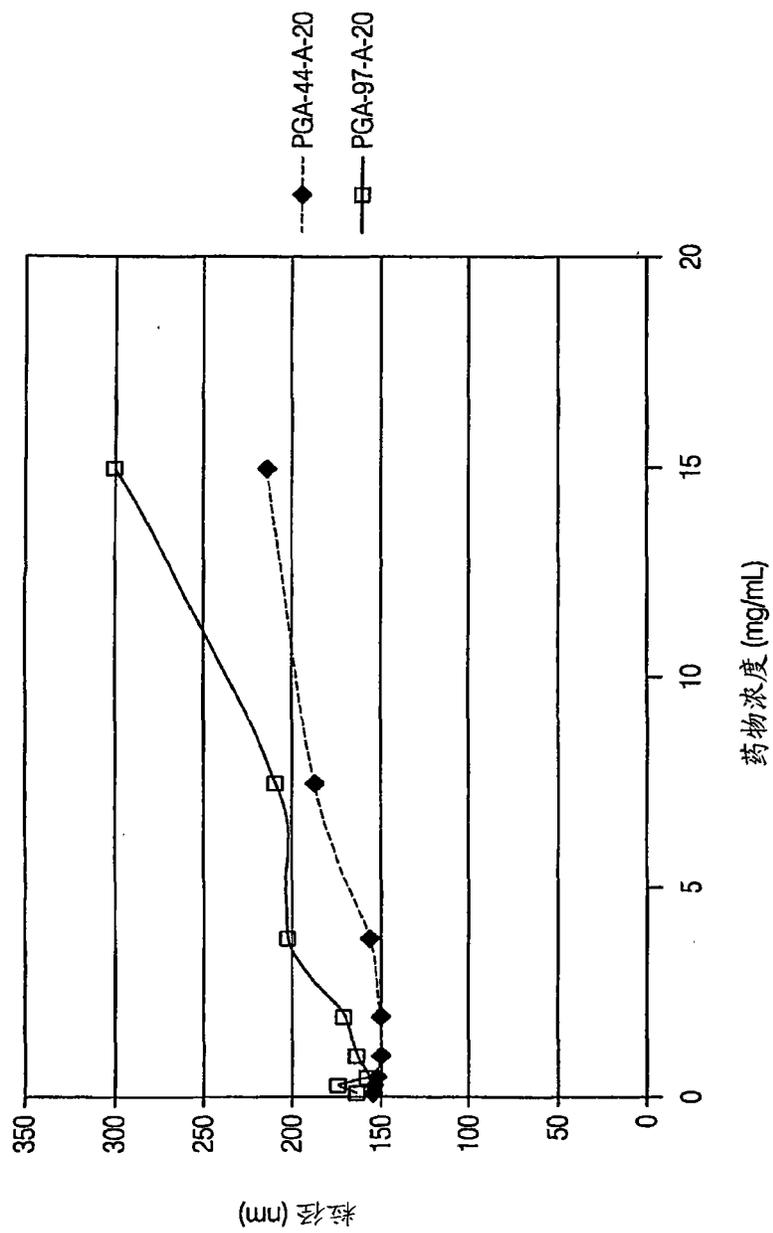


图 28

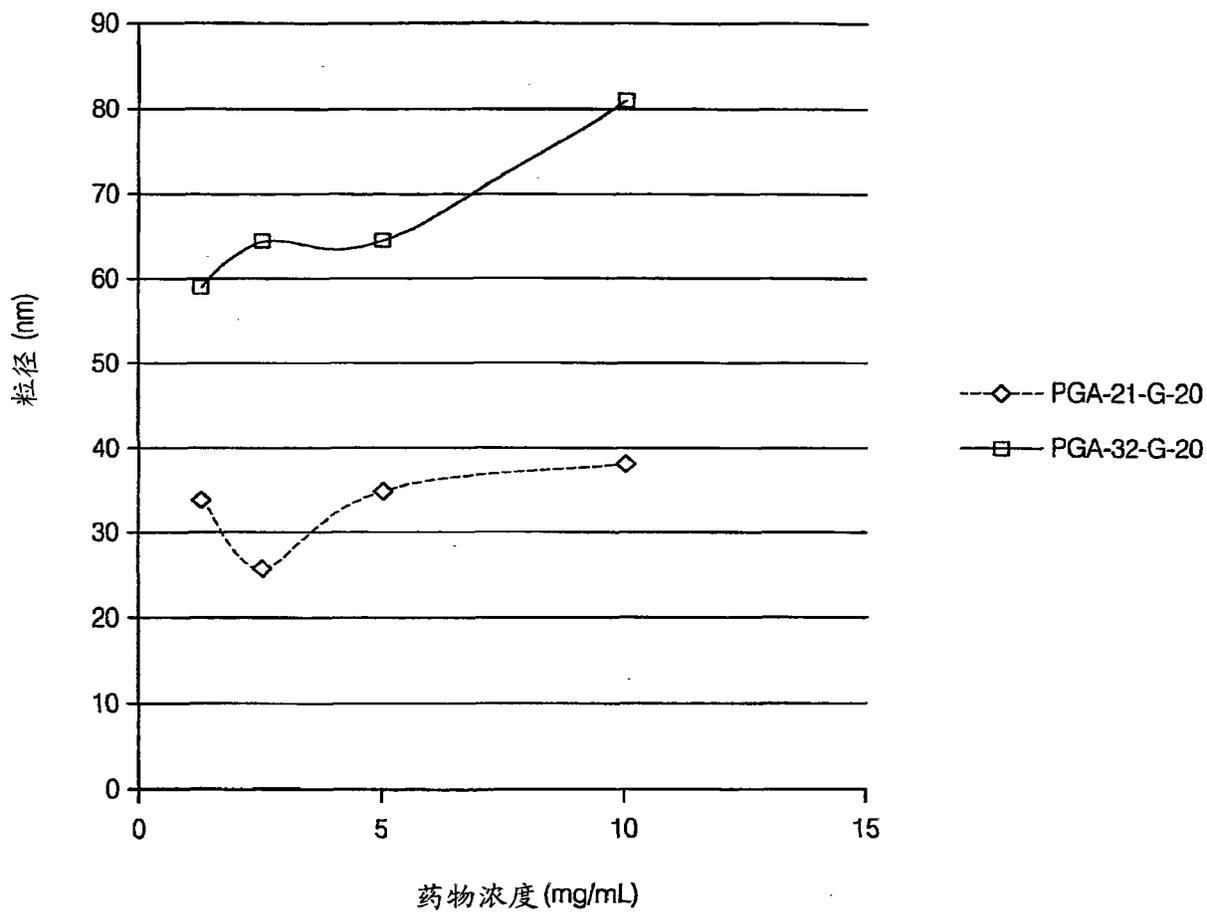


图 29