



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116966310 A

(43) 申请公布日 2023. 10. 31

(21) 申请号 202310954498.4

(22) 申请日 2015.05.14

(30) 优先权数据

61/993,110 2014.05.14 US

(62) 分案原申请数据

201580025099.3 2015.05.14

(71) 申请人 塔歌牧恩治疗公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 亚历克斯·利维斯兹奇

萨利姆·周博冉 亚力克赛·什尔

玛雅·齐格勒 阿拉·陶哈密

雅艾尔·蓝古特

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 陈文平 袁泉

(51) Int.Cl.

A61K 47/60 (2017.01)

C12N 15/117 (2010.01)

A61K 47/59 (2017.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 35/15 (2015.01)

A61K 35/17 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书5页 说明书30页

序列表(电子公布) 附图15页

(54) 发明名称

改善的聚乙烯亚胺聚乙二醇载体

(57) 摘要

提供双链RNA和聚合缀合物的多聚物,其中所述聚合缀合物由与一个或多个聚乙二醇(PEG)部分共价连接的线型聚乙烯亚胺组成,各PEG部分经接头与能够结合癌症抗原的靶向部分缀合。

1. 双链RNA (dsRNA) 和聚合缀合物的多聚物, 其中所述聚合缀合物由与一个或多个聚乙二醇 (PEG) 部分共价连接的线型聚乙烯亚胺 (LPEI) 组成, 各PEG部分经接头与能够结合癌症抗原的靶向部分缀合, 并且其中所述靶向部分是 $\text{HOO}(\text{CH}_2)_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-NH-CO-NH-CH}(\text{COOH})\text{-(CH}_2)_2\text{-CO-}$ (2-[3-(1,3-二羧基丙基) 脲基] 戊二酸 (DUPA) 残基), 条件是所述靶向部分不是小鼠EGF或序列YHWYGYTPQNVI (GE11) (SEQ ID NO:1) 的肽。

2. 双链RNA (dsRNA) 和聚合缀合物的多聚物, 其中所述聚合缀合物由与一个或多个聚乙二醇 (PEG) 部分共价连接的线型聚乙烯亚胺 (LPEI) 组成, 各PEG部分经接头与能够结合癌症抗原的靶向部分缀合, 并且其中所述靶向部分是hEGF, 条件是所述靶向部分不是小鼠EGF或序列YHWYGYTPQNVI (GE11) (SEQ ID NO:1) 的肽。

3. 双链RNA (dsRNA) 和聚合缀合物的多聚物, 其中所述聚合缀合物由与一个或多个聚乙二醇 (PEG) 部分共价连接的线型聚乙烯亚胺 (LPEI) 组成, 各PEG部分经接头与能够结合癌症抗原的靶向部分缀合, 并且其中所述靶向部分是HER2亲和体或EGFR亲和体, 条件是所述靶向部分不是小鼠EGF或序列YHWYGYTPQNVI (GE11) (SEQ ID NO:1) 的肽。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的多聚物, 其中所述dsRNA是聚肌胞苷酸双链RNA (聚I:C), 所述聚合缀合物由与一个PEG部分共价连接的LPEI组成 (LPEI-PEG 1:1) 或者与三个PEG部分共价结合的LPEI组成 (LPEI-PEG 1:3), 以及所述癌症抗原是表皮生长因子受体 (EGFR)、人表皮生长因子受体2 (HER2) 或前列腺表面膜抗原 (PSMA)。

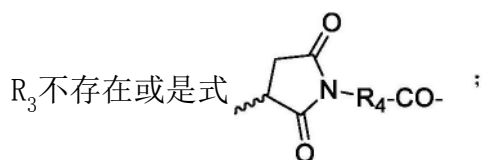
5. 如权利要求1至4中任一项所述的多聚物, 其中所述一个或多个PEG部分与所述LPEI各自独立地形成-NH-CO-键, 以及与所述接头各自独立地形成选自-NH-CO-、-CO-NH-、-S-C-、-S-S-、-O-CO-或-CO-O-的键, 并且优选地其中所述一个或多个PEG部分中的每一个与所述LPEI和所述接头形成-NH-CO-键。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的多聚物, 其中所述接头与所述靶向部分形成-S-S-键、NH-CO-键、-CO-NH-键、-S-C-键、O-CO-键、-CO-O-键或(-NH-CO-NH) 脲键, 其中优选地所述接头选自-CO-R₂-R_X-R₃或者由3至7个氨基酸残基组成肽部分,

其中

R₂选自: (C₁-C₈) 亚烷基、(C₂-C₈) 亚烯基、(C₂-C₈) 亚炔基、(C₆-C₁₀) 亚芳基-二基或亚杂芳基二基;

R_X不存在或为-S-;



R₄选自: (C₁-C₈) 亚烷基、(C₂-C₈) 亚烯基、(C₂-C₈) 亚炔基、(C₁-C₈) 亚烷基-(C₃-C₈) 亚环烷基、(C₂-C₈) 亚烯基-(C₃-C₈) 亚环烷基、(C₂-C₈) 亚炔基-(C₃-C₈) 亚环烷基、(C₆-C₁₀) 亚芳基-二基、亚杂芳基二基、(C₁-C₈) 亚烷基-(C₆-C₁₀) 亚芳基-二基或(C₁-C₈) 亚烷基-亚杂芳基二基;

其中所述(C₁-C₈) 亚烷基、(C₂-C₈) 亚烯基或(C₂-C₈) 亚炔基中的每一个被各自独立地选自以下的一个或多个基团独立取代: 卤素、-COR₅、-COOR₅、-OCOR₅、-OCON(R₅)₂、-CN、-NO₂、-SR₅、-OR₅、-N(R₅)₂、-CON(R₅)₂、-SO₂R₅、-SO₃H、-S(=O)R₅、(C₆-C₁₀) 芳基、(C₁-C₄) 亚烷基-(C₆-C₁₀) 芳基、杂芳基或(C₁-C₄) 亚烷基-杂芳基, 并且还被一个或多个相同或不同的选自S、O或N

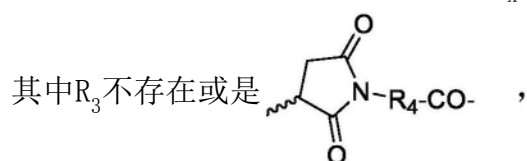
的杂原子,和/或各自独立地选自-NH-CO-、-CO-NH-、-N(R₅)-、-N(C₆-C₁₀芳基)-、(C₆-C₁₀)亚芳基-二基或亚杂芳基二基的至少一个基团任选间隔;以及

R₅是H或(C₁-C₈)烷基;并且

其中进一步优选地R₂选自(C₁-C₈)亚烷基,优选(C₁-C₄)亚烷基,所述R₂被各自独立地选自以下的一个或多个基团独立取代:卤素、-COH、-COOH、-OCOOH、-OCONH₂、-CN、-NO₂、-SH、-OH、-NH₂、-CONH₂、-SO₂H、-SO₃H、-S(=O)H、(C₆-C₁₀)芳基、(C₁-C₄)亚烷基-(C₆-C₁₀)芳基、杂芳基或(C₁-C₄)亚烷基-杂芳基,并且被一个或多个相同或不同的选自S、O或N的杂原子,和/或各自独立地选自-NH-CO-、-CO-NH-、-NH-、-N(C₁-C₈烷基)-、-N(C₆-C₁₀芳基)-、(C₆-C₁₀)亚芳基-二基或亚杂芳基二基的至少一个基团任选间隔;

并且其中还进一步优选地R₂选自(C₁-C₈)亚烷基,优选(C₁-C₄)亚烷基。

7.如权利要求6所述的多聚物,其中R_x是-S-;或

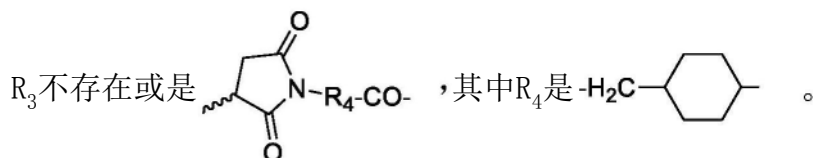


其中R₄是(C₁-C₈)亚烷基-(C₃-C₈)亚环烷基,优选(C₁-C₄)亚烷基-(C₅-C₆)亚环烷基;

并且其中优选地

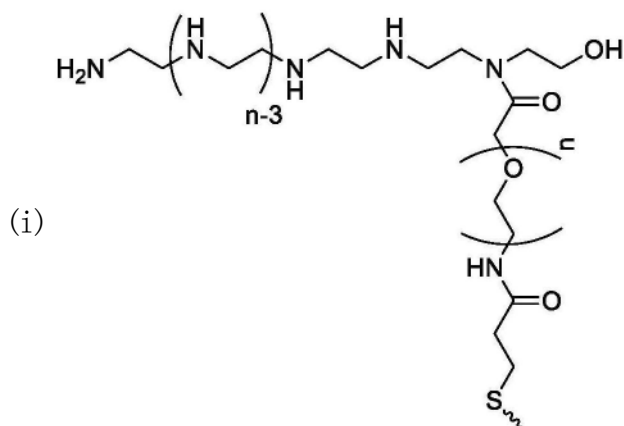
R₂是-CH₂-CH₂-;

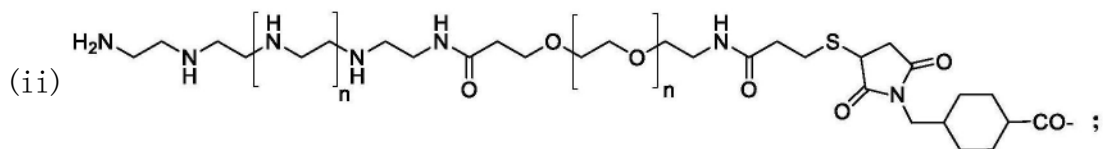
R_x是-S-;以及



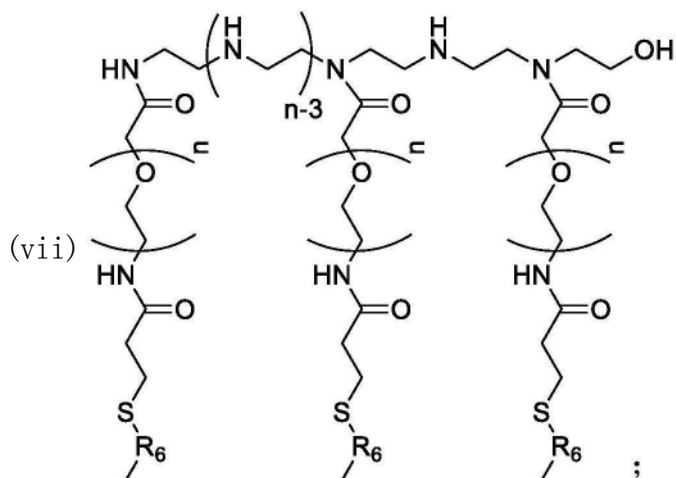
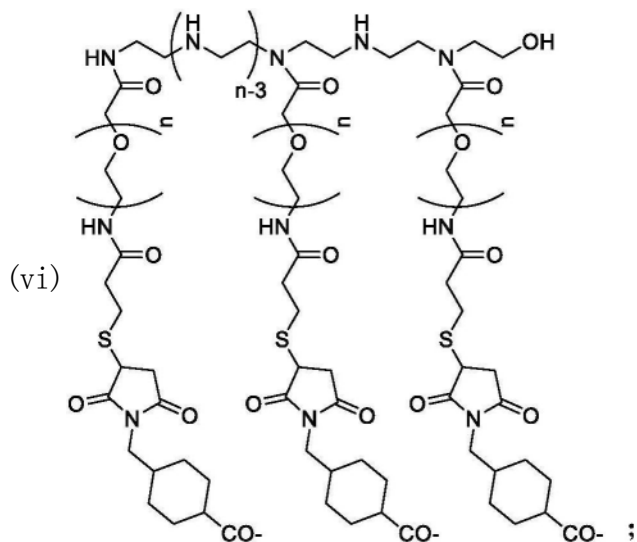
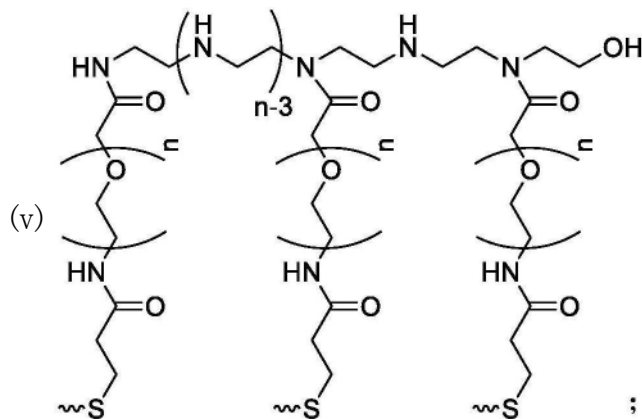
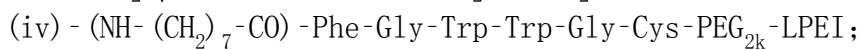
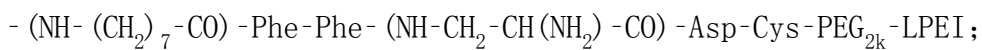
8.如权利要求6所述的多聚物,其中所述肽部分是-(NH-(CH₂)₇-CO)-Phe-Gly-Trp-Trp-Gly-Cys-(SEQ ID NO:2)或-(NH-(CH₂)₇-CO)-Phe-Phe-(NH-CH₂-CH(NH₂)-CO)-Asp-Cys-(SEQ ID NO:3),经其巯基与所述靶向部分连接。

9.如权利要求1至8中任一项所述的多聚物,其中所述聚合缀合物是与所述靶向部分连接的式(i)-(viii)的双缀合物:

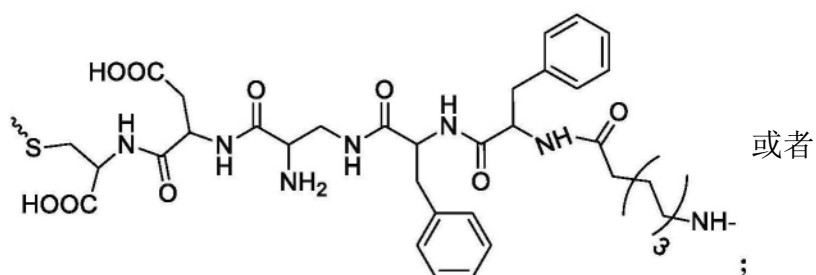




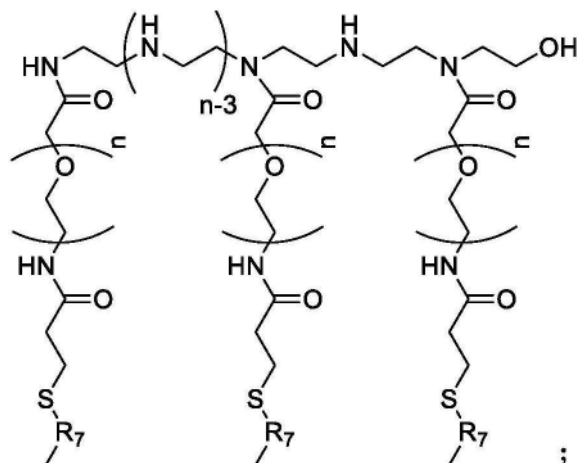
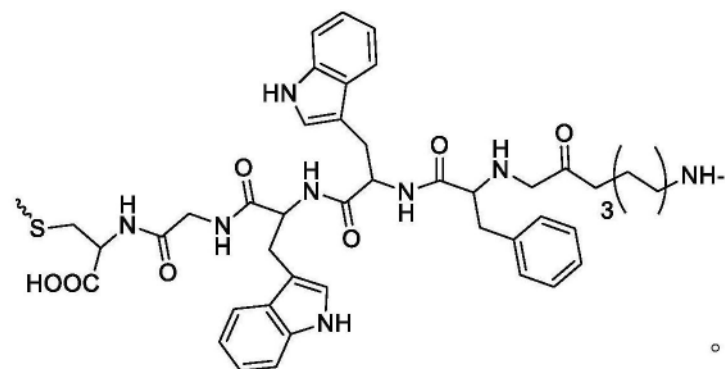
(iii)



其中R₆是



(viii)

其中R₇是

10. 如权利要求9所述的多聚物, 其中

(a) 所述靶向部分是HER2亲和体, 以及所述聚合缀合物是式9 (i) 的缀合物, 以及所述HER2亲和体经其巯基连接;

(b) 所述靶向部分是HER2亲和体, 以及所述聚合缀合物是式9 (v) 的缀合物, 以及所述HER2亲和体经其巯基连接;

(c) 所述靶向部分是EGFR亲和体, 以及所述聚合缀合物是式9 (i) 的缀合物, 以及所述EGFR亲和体经其巯基连接;

(d) 所述靶向部分是EGFR亲和体, 以及所述聚合缀合物是式9 (v) 的缀合物, 以及所述EGFR亲和体经其巯基连接;

(e) 所述靶向部分是hEGF, 以及所述聚合缀合物是式9 (ii) 的缀合物, 其中所述hEGF经其氨基基团连接;

(f) 所述靶向部分是hEGF, 以及所述聚合缀合物是式9 (vi) 的缀合物, 其中所述hEGF经其氨基基团连接;

(g) 所述靶向部分是 $\text{H00C}(\text{CH}_2)_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-NH-CO-NH-CH}(\text{COOH})\text{-(CH}_2)_2\text{-CO-}$ (DUPA残基), 以及所述聚合缀合物是式9(iii)的缀合物;

(h) 所述靶向部分是 $\text{H00C}(\text{CH}_2)_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-NH-CO-NH-CH}(\text{COOH})\text{-(CH}_2)_2\text{-CO-}$ (DUPA残基), 以及所述聚合缀合物是式9(vii)的缀合物;

(i) 所述靶向部分是 $\text{H00C}(\text{CH}_2)_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-NH-CO-NH-CH}(\text{COOH})\text{-(CH}_2)_2\text{-CO-}$ (DUPA残基), 以及所述聚合缀合物是式9(iv)的缀合物; 或者

(j) 所述靶向部分是 $\text{H00C}(\text{CH}_2)_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-NH-CO-NH-CH}(\text{COOH})\text{-(CH}_2)_2\text{-CO-}$ (DUPA残基), 以及所述聚合缀合物是式9(viii)的缀合物;

并且其中所述EGFR亲和体是如SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列, 以及所述HER2亲和体是如SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列。

11. 药物组合物, 其包含药学可接受的载体和权利要求1至10中任一项所述的多聚物。

12. 用于治疗选自以下癌症的权利要求1至10中任一项所述的多聚物或权利要求11所述的药物组合物: 以EGFR过表达的细胞为特点的癌症、以HER2过表达的细胞为特点的癌症和以PSMA过表达的细胞为特点的癌症例如前列腺癌。

13. 如权利要求12所述的多聚物, 其中所述以EGFR过表达的细胞为特点的癌症选自: 非小细胞肺癌、乳腺癌、恶性胶质瘤、头颈部鳞状细胞癌、结肠直肠癌、腺癌、卵巢癌、膀胱癌或前列腺癌、以及以上的转移性肿瘤, 其中优选地所述多聚物如在权利要求10(c)、10(d)、10(e)或10(f)中所限定的; 或其中所述以HER2过表达的细胞为特点的癌症选自: 乳腺癌、卵巢癌、胃癌和子宫癌的侵略性形成, 如子宫内膜浆液性癌, 或其中所述以HER2过表达的细胞为特点的癌症是耐赫赛汀/曲妥单抗的癌症, 其中优选地所述多聚物如在权利要求10(a)、(b)、(e)或(f)中所限定的; 或其中所述癌症是以PSMA过表达的细胞为特点的癌症例如前列腺癌以及所述多聚物如在权利要求10(g)、(h)、(i)或(j)中所限定的。

14. 权利要求1至10中任一项所述的多聚物在制备药物中的用途, 所述药物用于治疗癌症, 所述癌症选自: 以EGFR过表达的细胞为特点的癌症、以HER2过表达的细胞为特点的癌症和以PSMA过表达的细胞为特点的癌症例如前列腺癌, 包括向需要的对象施用所述的多聚物。

15. 药物组合物, 其包含药学可接受的载体和权利要求1至10中任一项所述的多聚物, 用于治疗选自以下癌症: 以EGFR过表达的细胞为特点的癌症、以HER2过表达的细胞为特点的癌症和以PSMA过表达的细胞为特点的癌症例如前列腺癌。

16. 与免疫细胞联合使用的权利要求12至13中任一项所述的多聚物, 权利要求14所述的用途, 或者权利要求15所述的药物组合物, 其中优选地所述免疫细胞是肿瘤浸润T细胞(T-TIL)、肿瘤特异性工程化T细胞或外周血单个核细胞(PBMC)。

改善的聚乙烯亚胺聚乙二醇载体

[0001] 本申请是申请日为2015年5月14日、申请号为201580025099.3、发明名称为“改善的聚乙烯亚胺聚乙二醇载体”的发明专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及与能够结合癌症抗原的靶向部分缀合的非病毒的基于聚乙烯亚胺的多聚物(polyplexes)。

[0003] 发明背景

[0004] 分子医学面临的障碍之一是治疗物质如DNA或RNA分子的靶向递送。新兴的策略是非病毒载体的构建,如阳离子聚合物和阳离子脂类,其结合并凝聚核酸。这些非病毒的阳离子载体相比于病毒基因载体具有许多优势,因为它们是非免疫原性的、非致癌的并且容易合成[1-4]。目前,正发展数种合成的聚阳离子聚合物用于核酸的递送。在这些聚合物中,聚乙烯亚胺(PEI)被认为是用于基因递送的最有希望的物质[5]。

[0005] PEI是水溶性的有机大分子,其可以以线型和分枝型结构的形式获得[6]。PEI随着广泛的pH改变其离子化的程度,因为它们骨架链中的每三个原子是可以质子化的氨基氮。PEI中大约55%的氮在生理pH下是质子化的[7]。它们具有高的阳离子电荷密度,因此能够与核酸形成非共价的复合体。而且,可以通过各种化学修饰改变它们的物理化学和生物特性[8]。基于PEI的复合体(也被称为多聚物(polyplexes))可被许多细胞类型内吞[9]。多聚物内化后,通过“质子海绵效应”促使内体释放和高效的基因转移[10]。PEI凝聚DNA的能力似乎是将大的DNA构建体递送进许多细胞类型中的重要因子。

[0006] 利用PEI作为递送载体的主要担忧是毒性,由于它们高的表面正电荷,其可以导致非特异性结合[11]。最近尝试改善非病毒载体的选择性和生物相容性。这导致用聚乙二醇(PEG)修饰PEI分子,为了屏蔽PEI颗粒[12]。异源双功能PEG基团与PEI的缀合促进PEI与靶配体的耦合,其向具有相应受体的细胞提供了高效的基因递送[12]。我们之前描述了靶载体的产生,其表明与EGF相连作为靶载体的分枝型PEI(brPEI-EGF)和线型PEI(LPEI)之间的差异[13,WO 2004/045491,WO 2010/073247]。当前的合成方法不令人满意,因此它们导致不足够的同源产物。因此迫切需要可以以可再生的方式将靶向部分与LPEI-PEG高效缀合的方法,以产生可靠地用于治疗癌症的方法中的均质批次的产物。

[0007] 发明概述

[0008] 在一个方面,本发明涉及双链RNA(dsRNA)和聚合缀合物的多聚物,其中所述聚合缀合物由与一个或多个聚乙二醇(PEG)部分共价连接的线型聚乙烯亚胺(LPEI)组成,各PEG部分经接头与能够结合癌症抗原的靶向部分缀合,条件是所述靶向部分不是小鼠EGF(mEGF)或序列YHWYGYTPQNVI(GE11)(SEQ ID NO:1)的肽。

[0009] 在另一方面,本发明提供药物组合物,其包含药学可接受的载体和如本文所述的发明的多聚物。

[0010] 而在另一方面,本发明提供用于治疗选自以下的癌症的如本文所述的发明的多聚物,或者包含所述多聚物的药物组合物:以EGFR过表达的细胞为特点的癌症、以HER2过表达

的细胞为特点的癌症和前列腺癌。

[0011] 在另一方面,本发明涉及用于治疗选自以下的癌症的方法:以EGFR过表达的细胞为特点的癌症、以HER2过表达的细胞为特点的癌症和前列腺癌,所述方法包括向需要的对象施用如本文所述的发明的多聚物。

[0012] 在又一方面,本发明涉及用于治疗癌症的包含药学可接受的载体和本发明的多聚物的药物组合物,所述癌症选自:以EGFR过表达的细胞为特点的癌症、以HER2过表达的细胞为特点的癌症和前列腺癌。

[0013] 可以将本发明的多聚物与免疫细胞联合使用。

[0014] 附图简述

[0015] 图1显示LPEI (-22kDa) 与NHS-PEG-OPSS (~2kDa) 的缀合主要产生两种聚乙二醇化程度不同的共聚合网络。共聚物LPEI- (PEG_{2k}-OPSS)₃ (“1:3双缀合物”) 平均由1摩尔LPEI和3摩尔PEG组成,而共聚物LPEI-PEG_{2k}-OPSS (“1:1双缀合物”) 平均由1摩尔比例的LPEI和1摩尔PEG组成(通过¹H-NMR分析测定LPEI:PEG的比例)。

[0016] 图2显示两种双缀合物(LPEI-PEG_{2k}-OPSS (1:1双缀合物) 和LPEI- (PEG_{2k}-OPSS)₃ (1:3双缀合物)) 的¹H-NMR分析。通过化学位移的存在指示PEG基团与LPEI的偶联,所述化学位移与位于3.7ppm (a) 的乙二醇氢和位于-3.0ppm (b) 的乙亚胺氢有关。这些峰的整数值提供PEG与LPEI的摩尔比,从中推理所阐述的1:1双缀合 (A) 和1:3双缀合 (B) 的结构。

[0017] 图3显示共聚合网络 (1:1双缀合物和1:3双缀合物) 与亲和体 (affibody) (“Her-2”) 通过二硫化物交换缀合的流程图,导致两种有差异的聚乙二醇化三缀合物的产生[20]。

[0018] 图4描述了纯化的亲和体、双缀合物和三缀合物在不存在和存在DTT情况下的SDS/PAGE。在存在DTT的情况下,亲和体从三缀合物释放,并且在纯化的亲和体旁边移动(稍微在10kDa上面)。

[0019] 图5显示使用DLS测量与在HBG缓冲液pH 7.4中的质粒pGreenfire 1复合的LPEI、双缀合物和三缀合物的颗粒大小。

[0020] 图6描述了与质粒pGreenfire 1复合的LPEI、双缀合物和三缀合物的 ξ 电位分布。通过DLS测量 ξ 电位,以及通过Smoluchowski方程式进行计算。

[0021] 图7A-B显示源自HBG缓冲液 (pH 7.4) 中进行测量的两种多聚物的原子力显微镜 (AFM) 图像。(A) 1:1三缀合物多聚物 (B) 1:3三缀合物多聚物。比例尺是1 μ m。

[0022] 图8描述了显示有差异的聚乙二醇化多聚物保护质粒pGreenFire1免受DNase I降解的琼脂糖凝胶。用或不用DNase I (2IU) 处理单独的1 μ g质粒 (pGreenFire1) 或者含1 μ g质粒 (pGreenFire1) 的1:1三缀合物多聚物和1:3三缀合物多聚物。超螺旋质粒 (s.c.), 开环质粒 (o.c.)。

[0023] 图9A-C显示使用分别含有LPEI:PEG比例为1:1和LPEI:PEG比例为1:3的1:1三缀合物多聚物和1:3三缀合物多聚物的pGFP-LUC的Her-2介导的基因转移。将10000BT474和MDA-MB-231乳腺癌细胞/孔用与pGFP-LUC (1 μ g/ml) 复合以产生两种多聚物的1:1三缀合物和1:3三缀合物处理48小时。HBS中的PEI氮/DNA磷酸盐比例为6 (N/P=6)。(A) 荧光素酶活性的测量表明MDA-MB-231细胞中的pGreenFire1递送相比于BT474显著降低,以及与1:1三缀合物相比,由1:3三缀合物多聚物介导的基因递送减少 (*p<0.001)。48小时之后以一式三份测量荧光素酶活性,将相对荧光素酶单位 (RLU) 显示为平均值+S.D。(B) 用多聚物处理的细胞的

荧光图像。以X10的放大倍数显示图像,并且代表所进行的三次实验。(C)亚甲蓝分析描述了相比于未处理(UT)细胞的细胞存活百分比。

[0024] 图10显示了与Poly1C复合的PEI-PEG-Her2亲和体(PPHA)抑制Her2过表达乳腺癌细胞BT474。复合的载体抑制Her2过表达细胞,包括耐赫赛汀/曲妥单抗的细胞。

[0025] 图11显示对在裸鼠中注射的过表达Her2的MCF7细胞的抑制。

[0026] 图12A-B显示(A)PEI-PEG-EGFR亲和体(PPE亲和体)的功效与(B)PPE的功效的比较。

[0027] 图13显示与未处理(UT)、pIC/PPE、pI/PPE、pI/PPEA和pIC/PPEA低(复合物中0.1 μ g/ μ l pIC)相比,Poly1C PPE亲和体在体内的活性。

[0028] 图14显示与应用如Schaffert D, Kiss M, Rödl W, Shir A, Levitzki A, Ogris M, Wagner E. (2011) Poly(I:C)-mediated tumor growth suppression in EGF-receptor overexpressing tumors using EGF-polyethylene glycol-linear polyethylenimine as carrier. Pharm Res. 28:731-41中所描述的Poly1C/mPPE(小鼠)相比,在应用不同浓度的Poly1C/LPEI-PEG-hEGF复合物之后存活的U87MG、U87MGwtEGFR细胞。

[0029] 图15显示PEI-PEG(PP)-DUPA(PPD)/Poly1C针对LNCaP和VCaP细胞高度有效。在96小时的暴露之后测量活力。

[0030] 图16A-B显示通过感染有Poly1C/PPD的LNCaP细胞导致细胞因子(A)IP-10和(B)趋化因子(RANTES)的产生。

[0031] 图17显示使LNCaP细胞适应的培养基刺激PBMC中细胞因子的表达。在24小时孵育之后测量表达。

[0032] 图18显示Poly1C/PPD处理的LNCaP细胞与不表达PSMA的PC3-荧光素酶细胞的共孵育经旁观者效应导致PC3-荧光素酶细胞多至70%的致死。添加健康的人PBMC强烈地增强效果,并且导致PC3细胞90%的致死。

[0033] 图19显示Poly1C/PPD对体内皮下的LNCaP肿瘤的作用。UT(未处理)。

[0034] 发明详述

[0035] 聚阳离子,特别是PEI,作为用于基因转染的物质被广泛地研究。当聚合的纳米颗粒复合体整体具有正电荷时,其允许它们与细胞表面上带负电荷的硫酸肝素蛋白聚糖结合,获得最佳的转染效力[28]。之前的研究表明,线型PEI(LPEI)在基因转染方面比分枝型PEI(brPEI)更有效[29-31][32,33,WO 2010/073247],但是LPEI具有更高的正电荷,并且因此更毒。将各种屏蔽体(如PEG[12]、聚-(环氧乙烷)-聚(环氧丙烷)-聚(环氧乙烷)(PEO-PP0-PEO)[18,34]和聚环氧乙烷[35])与阳离子聚合物缀合,试图降低正电荷和随后的毒性。的确,PEI与不同长度的PEG基团的屏蔽显著地降低了毒性,同时维持转染效率[12,11,36]。

[0036] 根据本发明,发现LPEI与PEG_{2K}的缀合产生了包含不同比例的LPEI与PEG_{2K}的双缀合共聚物。由于电荷的不同,使用阳离子交换层析可以将这些双缀合物彼此分开,所述电荷的不同反映了缀合的不同数量PEG_{2K}基团、¹H-NMR分析确认了所述双缀合物彼此的不同在于每LPEI单元平均的PEG_{2K}单元数,其中1:1双缀合物具有1:1的LPEI:PEG_{2K}比,以及1:3双缀合物具有1:3的LPEI:PEG_{2K}比。Her-2靶亲和体(affibody)与纯化的双缀合物中的每一个的缀合产生适当分子量的三缀合物产物,即,从1:1双缀合物,我们获得LPEI:PEG_{2K}:Her-2等于1:

1:1的“1:1三缀合物”，以及从1:3双缀合物，我们获得比例为1:3:3的“1:3三缀合物”。该方案使我们能够以可再生的方式获得均质的产物，靶亲和体与LPEI-PEG具有几乎完全的缀合。

[0037] 我们观察到，当双缀合物或三缀合物与质粒DNA复合时，聚乙二醇化强烈地影响多聚物颗粒的大小。1:3双缀合物多聚物和1:3三缀合多聚物的平均颗粒大小均大于1:1双缀合物多聚物和1:1三缀合物多聚物。我们相信，增加单条阳离子链上的聚乙二醇化的量导致空间位阻，其阻止聚合链将质粒凝聚为较小的颗粒。这与以下的发现一致：裸的LPEI多聚物具有最小的颗粒。而且，虽然1:1三缀合物和1:3三缀合物保护复合的质粒免受DNase I降解，但是1:3三缀合的多聚物提供更好的保护，可能是由于增加的空间位阻。

[0038] 之前的研究暗示：当与核酸复合时，增加与阳离子聚合物缀合的PEG单元的分子量导致获得的多聚物的表面电荷减少[13]。我们的数据表明，增加类似分子量的PEG基团的数量导致表面电荷的减少，如通过 ξ 电位分布所限定的。的确，与质粒复合的裸LPEI显示最高的表面电荷。这些结果支持了这样的观点：在化学载体中存在的中性实体越多，则表面电荷越少。意外地，与亲和体缀合的三缀合多聚物具有的表面电荷比双缀合多聚物少，其表明Her-2亲和体（其自身具有少量的正电荷）也减少颗粒的表面电荷。我们猜想，Her-2亲和体改变了颗粒的外形，用更多的靶向部分屏蔽表面上的电荷，导致表面电荷的减少。

[0039] 多聚物的形状对其作为药物递送候选物的性能具有显著的影响[37,38]，尽管还不知道哪一种多聚物形状对有效的药物递送是令人满意的。据我们所知，迄今为止还没有研究聚乙二醇化对多聚物形状的影响。在AFM图中，1:1三缀合物多聚物-其在基因递送中更有效-呈现形状均质性，而1:3三缀合物更异质，具有许多非对称的椭圆颗粒。

[0040] 利用阳离子聚合物进行的选择性基因转移仍是重要挑战。之前的研究显示，用EGF或运铁蛋白靶向LPEI和LPEI-PEG缀合物增加它们的选择性并减少在体外和体内的非特异性相互作用[39,40]。例如，为了检查我们的Her-2靶向1:1三缀合物和1:3三缀合物多聚物的选择性，我们使用了差异性表达Her-2的两种乳腺癌细胞。如通过荧光素酶活性和GFP表达所示，基因递送在BT474细胞中比在MDA-MB-231细胞中显著较高，所述BT474细胞高度表达Her-2受体，所述MDA-MB-231细胞在细胞表面上表达少于100倍的Her-2受体。因此，数据表明，1:1三缀合物和1:3三缀合物对于Her-2过表达细胞来说均是高度选择性的（图10）。

[0041] 之前的研究显示，高水平的聚乙二醇化可以导致基因转染降低[41]。这些结果与我们的观察一致：如通过荧光素酶活性和GFP表达所显示的，与较少聚乙二醇化的1:1三缀合多聚物相比，高度聚乙二醇化的1:3三缀合多聚物显示基因递送的明显减少。通过较少聚乙二醇化的1:1三缀合多聚物增加的基因递送伴有轻微的细胞毒性，最可能是由于其较高的表面电荷。

[0042] 参与该研究之前我们的工作假设是：增加每LPEI单位的靶向部分数将导致改善的基因递送和/或选择性。我们推断，1:3三缀合（每摩尔LPEI缀合3摩尔Her-2亲和体分子）将显示受体介导的颗粒内在化增加。然而，1:3三缀合多聚物显示较低的 ξ 电位、较大的颗粒大小和异质性、非球形的形状，其特征均可能促成实际观察到的转染效率的降低。我们的结果显示，较少聚乙二醇化的1:1三缀合物在向Her-2过表达细胞介导选择性且有效的基因递送方面优于较多聚乙二醇化的1:3三缀合物。

[0043] 根据本发明发现，基于LPEI的多聚物的聚乙二醇化导致表面电荷的减少、多聚物

大小增加以及形状异质性增加,并且这些特性对靶向的基因递送具有深厚影响。我们的简单合成允许以可再生形式纯化均质产物,目前可对其进行扩展以利用各种靶向部分产生不同的三聚合物。

[0044] 鉴于以上,在一个方面,本发明提供双链RNA(dsRNA)和聚合缀合物的多聚物,其中所述聚合缀合物由与一个或多个聚乙二醇(PEG)部分共价连接的线型聚乙烯亚胺(LPEI)组成,各PEG部分经接头与能够结合癌症抗原的靶向部分缀合,条件是所述靶向部分是不是mEGF或序列YHWYGYTPQNVI(GE11)(SEQ ID NO:1)的肽。

[0045] 在某些实施方案中,癌症抗原可以是但不限于,表皮生长因子受体(EGFR),人表皮生长因子受体2(HER2),前列腺表面膜抗原(PSMA),胰岛素样生长因子1受体(IGF1R),血管内皮生长因子受体(VEGFR),血小板源生长因子受体(PDGFR)或成纤维生长因子受体(FGFR)。所述靶向部分可以是天然的、自然的或修饰的配体或其旁系同源物(paralog),或者非天然的配体,如抗体、单链可变片段(scFv)或抗体模拟物(如针对癌症抗原中的任一种的亲本体)。亲本体是蛋白A的Z结构域(免疫球蛋白G结合结构域),并且通过位于涉及亲本蛋白结构域的结合活性的两个 α -螺旋处的13个氨基酸的随机化赋予泛素结合特性。

[0046] 在某些实施方案中,dsRNA是聚肌胞苷酸的双链RNA(聚I:C),聚合缀合物由与一个PEG部分共价连接的LPEI组成(LPEI-PEG 1:1)或与三个PEG部分共价连接的LPEI组成(LPEI-PEG 1:3),以及所述癌症抗原是EGFR、HER2或PSMA。

[0047] PEG的分子量的范围可以是2至8kDa,特别是2kDa;LPEI的分子量的范围可以是10至30kDa,特别是22kDa;以及本发明的多聚物的polyIC可以由各自包含至少22个,优选至少45个核糖核苷酸的RNA双链组成。在某些实施方案中,各条链具有的核糖核苷酸数范围在20至300内。

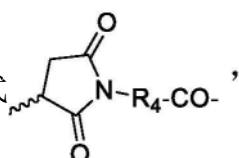
[0048] 在某些实施方案中,一个或多个PEG部分与LPEI各自独立地形成-NH-CO-键,以及与接头各自独立地形成选自-NH-CO-、-CO-NH-、-S-C-、-S-S-、-O-CO-或-CO-O-的键。具体而言,一个或多个PEG部分中的每一个与LPEI和接头形成-NH-CO-键。

[0049] 在某些实施方案中,接头与靶向部分形成-S-S-键、NH-CO-键、-CO-NH-键、-S-C-键、O-CO-键、-CO-O-键或(-NH-CO-NH)脲键。接头可以选自-CO-R₂-R_x-R₃或者由3至7个氨基酸残基组成的肽部分,其中

[0050] R₂选自(C₁-C₈)亚烷基、(C₂-C₈)亚烯基、(C₂-C₈)亚炔基、(C₆-C₁₀)亚芳基-二基或亚杂芳基二基;

[0051] R_x不存在或为-S-;

[0052] R₃不存在或为式



[0053] R₄选自:(C₁-C₈)亚烷基、(C₂-C₈)亚烯基、(C₂-C₈)亚炔基、(C₁-C₈)亚烷基-(C₃-C₈)亚环烷基、(C₂-C₈)亚烯基-(C₃-C₈)亚环烷基、(C₂-C₈)亚炔基-(C₃-C₈)亚环烷基、(C₆-C₁₀)亚芳基-二基、亚杂芳基二基、(C₁-C₈)亚烷基-(C₆-C₁₀)亚芳基-二基或(C₁-C₈)亚烷基-亚杂芳基二基;

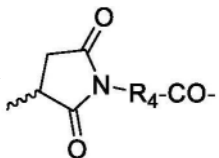
[0054] 其中所述(C₁-C₈)亚烷基、(C₂-C₈)亚烯基或(C₂-C₈)亚炔基中的每一个被各自独立

地选自以下的一个或多个基团独立取代: 卤素、 $-\text{COR}_5$ 、 $-\text{COOR}_5$ 、 $-\text{OCOR}_5$ 、 $-\text{OCON}(\text{R}_5)_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SR}_5$ 、 $-\text{OR}_5$ 、 $-\text{N}(\text{R}_5)_2$ 、 $-\text{CON}(\text{R}_5)_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}_5$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{S}(=\text{O})\text{R}_5$ 、 $(\text{C}_6-\text{C}_{10})$ 芳基、 (C_1-C_4) 亚烷基- $(\text{C}_6-\text{C}_{10})$ 芳基、杂芳基或 (C_1-C_4) 亚烷基-杂芳基, 以及被一个或多个相同或不同的选自 S、O 或 N 的杂原子和/或各自独立地选自 $-\text{NH}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}_5)-$ 、 $-\text{N}(\text{C}_6-\text{C}_{10}\text{芳基})-$ 、 $(\text{C}_6-\text{C}_{10})$ 亚芳基-二基或亚杂芳基二基的至少一个基团任选间隔; 以及

[0055] R_5 是 H 或 (C_1-C_8) 烷基。

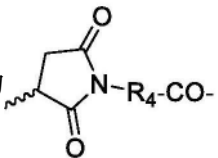
[0056] 在某些实施方案中, R_2 选自: (C_1-C_8) 亚烷基, 优选 (C_1-C_4) 亚烷基, 所述 R_2 被各自独立地选自以下的一个或多个基团独立取代: 卤素、 $-\text{COH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{OCOOH}$ 、 $-\text{OCONH}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{S}(=\text{O})\text{H}$ 、 $(\text{C}_6-\text{C}_{10})$ 芳基、 (C_1-C_4) 亚烷基- $(\text{C}_6-\text{C}_{10})$ 芳基、杂芳基或 (C_1-C_4) 亚烷基-杂芳基, 以及被一个或多个相同或不同的选自 S、O 或 N 的杂原子和/或各自独立地选自 $-\text{NH}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{N}(\text{C}_1-\text{C}_8\text{烷基})-$ 、 $-\text{N}(\text{C}_6-\text{C}_{10}\text{芳基})-$ 、 $(\text{C}_6-\text{C}_{10})$ 亚芳基-二基或亚杂芳基二基的至少一个基团任选间隔。具体而言, R_2 选自 (C_1-C_8) 亚烷基, 优选 (C_1-C_4) 亚烷基。

[0057] 在某些实施方案中, R_x 是 $-\text{S}-$ 。

[0058] 在某些实施方案中, R_3 不存在或为 , 其中

[0059] R_4 是 (C_1-C_8) 亚烷基- (C_3-C_8) 亚环烷基, 优选 (C_1-C_4) 亚烷基- (C_5-C_6) 亚环烷基。

[0060] 在某些实施方案中, 在如上所限定的多聚物中, R_2 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$; R_x 是 $-\text{S}-$; 以及 R_3 不

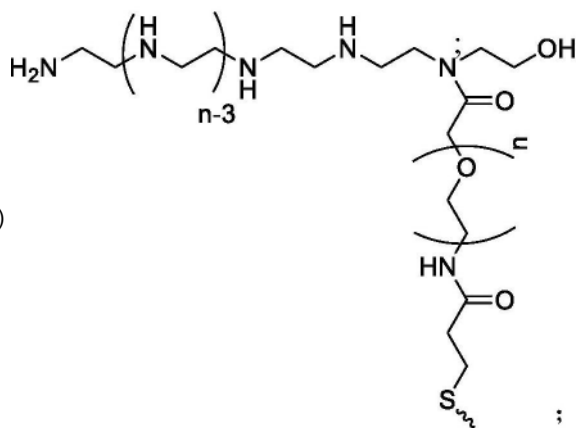
存在或者为 ,

[0061] 其中 R_4 是 $-\text{H}_2\text{C}-$ 。

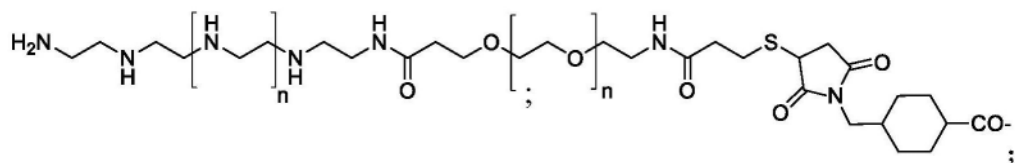
[0062] 在某些实施方案中, 接头是含有至少一个, 具体为两个或三个芳族氨基酸序列残基 (如苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸或高苯丙氨酸) 的肽部分。在某些实施方案中, 肽部分是 $-(\text{NH}-(\text{CH}_2)_7-\text{CO})-\text{Phe}-\text{Gly}-\text{Trp}-\text{Trp}-\text{Gly}-\text{Cys}-$ (SEQ ID NO:2) 或 $-(\text{NH}-(\text{CH}_2)_7-\text{CO})-\text{Phe}-\text{Phe}-$ $(\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO})-\text{Asp}-\text{Cys}-$ (SEQ ID NO:3), 所述肽部分经其巯基与靶向部分连接。

[0063] 在某些实施方案中, 聚合缀合物是式 (i) - (viii) 的双缀合物, 其与靶向部分/部分连接:

[0064] (i)

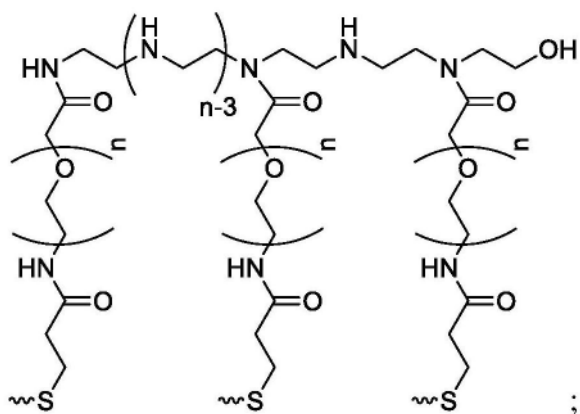


[0065] (ii)

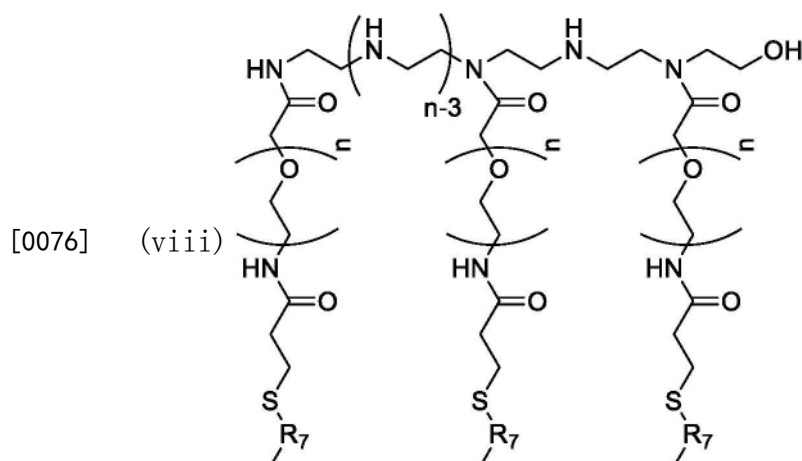
[0066] (iii) - $\text{(NH-(CH}_2\text{)}_7\text{-CO)-Phe-Phe-(NH-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-CO)-Asp-Cys-PEG}_{2k}\text{-LPEI}$;[0067] (iv) - $\text{(NH-(CH}_2\text{)}_7\text{-CO)-Phe-Gly-Trp-Trp-Gly-Cys-PEG}_{2k}\text{-LPEI}$;

[0068] (v)

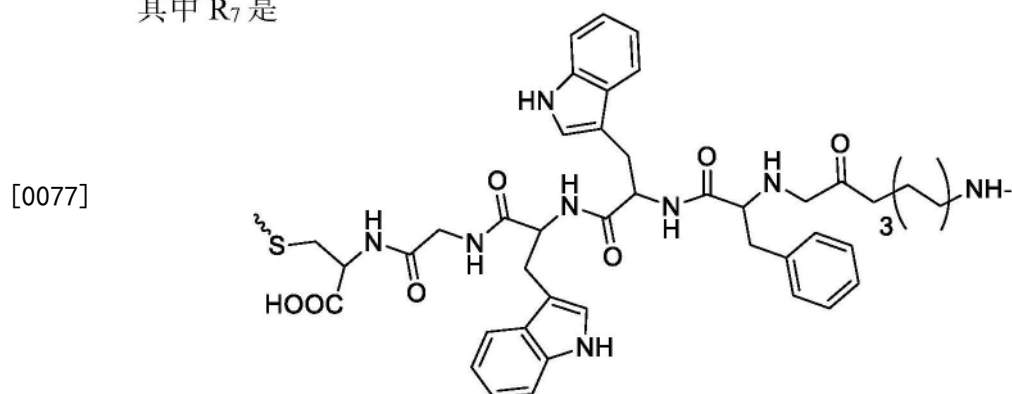
[0069]



[0070] (vi)



其中 R_7 是



[0078] 在具体的实施方案中,所述多聚物选自:

[0079] (a) 这样的多聚物,其中靶向部分是HER2亲和体,以及聚合缀合物是上文的式(i),以及HER2亲和体经其巯基连接,在本文也被称为LPEI-PEG_{2k}-HER2;

[0080] (b) 这样的多聚物,其中靶向部分是HER2亲和体,以及聚合缀合物是上文的式(v),以及HER2亲和体经其巯基连接,在本文也被称为LPEI-(PEG_{2k}-HER2)₃;

[0081] (c) 这样的多聚物,其中靶向部分是EGFR亲和体,以及聚合缀合物是上文的式(i),以及EGFR亲和体经其巯基连接,在本文也被称为LPEI-PEG_{2k}-EGFR;

[0082] (d) 这样的多聚物,其中靶向部分是EGFR亲和体,以及聚合缀合物是上文的式(v),以及EGFR亲和体经其巯基连接,在本文也被称为LPEI-(PEG_{2k}-EGFR)₃;

[0083] (e) 这样的多聚物,其中靶向部分是人EGF(hEGF),以及聚合缀合物是上文的式(ii),其中hEGF经其氨基基团连接,在本文也被称为LPEI-PEG_{2k}-hEGF;

[0084] (f) 这样的多聚物,其中靶向部分是hEGF,以及聚合缀合物是上文的式(vi),其中hEGF经其氨基基团连接,在本文也被称为LPEI-(PEG_{2k}-hEGF)₃;

[0085] (g) 这样的多聚物,其中靶向部分是HOOCH₂(CH₂)₂-CH(COOH)-NH-CO-NH-CH(COOH)-(CH₂)₂-CO-(DUPA残基),以及聚合缀合物是上文的式(iii);

[0086] (h) 这样的多聚物,其中靶向部分是HOOCH₂(CH₂)₂-CH(COOH)-NH-CO-NH-CH(COOH)-(CH₂)₂-CO-(DUPA残基),以及聚合缀合物是上文的式(vii);

[0087] (i) 这样的多聚物,其中靶向部分是HOOCH₂(CH₂)₂-CH(COOH)-NH-CO-NH-CH(COOH)-(CH₂)₂-CO-(DUPA残基),以及聚合缀合物是上文的式(iv);或者

[0088] (j) 这样的多聚物,其中靶向部分是HOOCH₂(CH₂)₂-CH(COOH)-NH-CO-NH-CH(COOH)-

(CH₂)₂-CO- (DUPA残基), 以及聚合缀合物是上文的式(viii)。

[0089] 通过本发明的多聚物形成的纳米颗粒的大小范围可以是120至150nm, 特别是135-148nm或142nm。

[0090] 制备本发明中使用的聚合缀合物的方法的非限制性实例在下文的实施例中示例。

[0091] 在某些具体的实施方案中, EGFR亲和体是如SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列, HER2亲和体是如SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列, 以及hEGF是如SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列。

[0092] 在另一方面, 本发明涉及药物组合物, 其包含药学可接受的载体和如上所限定的多聚物。

[0093] 而在另一方面, 本发明提供用于治疗选自以下癌症的本文所述发明的多聚物, 或包含所述多聚物的药物组合物: 以EGFR过表达的细胞为特点的疾病、以HER2过表达的细胞为特点的疾病和前列腺癌。

[0094] 在某些实施方案中, 以EGFR过表达的细胞为特点的疾病选自: 非小细胞肺癌、乳腺癌、恶性胶质瘤、头颈部鳞状细胞癌、结肠直肠癌、腺癌、卵巢癌、膀胱癌或前列腺癌以及它们的转移性肿瘤。在某些实施方案中, 用于治疗以EGFR过表达的细胞为特点的疾病的多聚物选自上文限定的(c)、(d)、(e)或(f)的多聚物。

[0095] 在某些实施方案中, 以HER2过表达的细胞为特点的疾病选自: 乳腺癌、卵巢癌、胃癌以及子宫癌的侵略性形成, 如子宫内膜浆液性癌。在某些实施方案中, Her2过表达的细胞是耐赫赛汀/曲妥单抗的细胞。因此, 本发明的多聚物可以用于治疗耐赫赛汀/曲妥单抗的疾病, 即包含对赫赛汀/曲妥单抗的暴露不响应或较少程度响应的细胞的疾病。

[0096] 具体而言, 用于治疗以HER2过表达的细胞为特点的疾病的多聚物选自上文限定的多聚物(a)、(b)、(e)或(f)。

[0097] 在某些实施方案中, 癌症是前列腺癌, 以及用于治疗前列腺癌的多聚物选自上文限定的(g)、(h)、(i)或(j)。

[0098] 在另一方面, 本发明涉及治疗选自以下癌症的方法: 以EGFR过表达的细胞为特点的疾病、以HER2过表达的细胞为特点的疾病和前列腺癌, 所述方法包括向需要的对象施用如本文所述发明的多聚物。

[0099] 在又一方面, 本发明涉及用于治疗选自以下癌症的药物组合物: 以EGFR过表达的细胞为特点的疾病、以HER2过表达的细胞为特点的疾病和前列腺癌, 所述药物组合物包含药学可接受的载体和本发明的多聚物。

[0100] 而在又一方面中, 本发明涉及用于与免疫细胞联合使用的本发明的多聚物、方法或药物组合物。

[0101] 而在又一方面中, 本发明涉及如上的本文所述的多聚物, 其中dsRNA被DNA分子(如包含与控制元件(如合适的启动子和终止子)可操作连接的蛋白编码核酸序列的质粒)代替。

[0102] 在某些实施方案中, 免疫细胞是肿瘤浸润T细胞(T-TIL)、肿瘤特异性工程化T细胞或外周血单个核细胞(PBMC)。

[0103] 本文使用的术语“多聚物(polyplexes)”指核酸和聚合物之间的复合物。将核酸经非共价或共价键特别是静电键与聚合物结合。术语“多聚物”指有益于将核酸携带并递送进

细胞的载体,即非病毒载体。

[0104] 术语“患者”、“对象”或“个体”可互换地使用并且指人或非人的动物。

[0105] 本文使用的术语“(C₁-C₈) 烷基”通常意指具有1-8个碳原子的直链或支链烃自由基,并且包括例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、2,2-二甲丙基、正己基、正庚基、正辛基等。

[0106] 术语“(C₁-C₈) 亚烷基”指具有1-8个碳原子的直链或支链二价烃自由基并且包括例如亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚丁基、亚戊基、亚己基、亚庚基、亚辛基等。术语“(C₂-C₈) 亚烯基”和“(C₂-C₈) 亚炔基”通常分别意指具有2-8个碳原子和一个或多个双键或三键的直链或支链二价烃自由基。此类自由基的非限制性实例包括亚乙烯基、亚丙烯基、1-和2-亚丁烯基、1-和2-亚戊烯基、1-,2-和3-亚己烯基、1-,2-和3-亚庚烯基、1-,2-,3-和4-亚辛烯基、亚乙炔基、亚丙炔基、1-和2-亚丁炔基、2-甲基亚丙基、1-和2-亚戊炔基、2-甲基亚丁基、1-,2-和3-亚己炔基、1-,2-和3-亚庚炔基、1-,2-,3-和4-亚辛炔基等。

[0107] 术语“(C₆-C₁₀) 芳基”表示具有6-10个碳原子的芳香碳环基团,其由单环或稠合多环组成,如但不限于苯基和萘基;术语“(C₆-C₁₀) 亚芳基-二基”表示具有6-10个碳原子的二价芳香碳环基团,其由单环或稠合多环组成,如但不限于,亚苯基和亚萘基。

[0108] 术语“杂芳基”指源自含有一个至三个优选1-2个选自N、O或S的杂原子的5-10元单环或多环杂芳香环的自由基。单环杂芳基的实例包括但不限于,吡咯基、呋喃基、噻吩基、噻嗪基、吡啶基、吡嗪基、咪唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、异噻唑基、吡啶基、嘧啶基、1,2,3-三嗪基、1,3,4-三嗪基和1,3,5-三嗪基。多环杂芳基自由基优选包含两个环,如但不限于,苯并呋喃基、异苯并呋喃基、苯并噻吩基、吲哚基、喹啉基、异喹啉基、咪唑并[1,2-a]吡啶基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、吡啶并[1,2-a]嘧啶基和1,3-苯并二氧杂环乙烯基。杂芳基可以被一个或多个基团任选取代,所述一个或多个基团各自独立地选自:卤素、-OH、-COOH、-CN、-NO₂、-SH或-CONH₂,应当理解,当多环杂芳基被取代时,取代可以在任何碳环和/或杂环环上。术语“杂亚芳基二基”表示源自本文所定义的“杂芳基”通过从任何环原子移除两个氢原子的二价自由基。

[0109] 本文使用的术语“卤素”指氟、氯、溴或碘。

[0110] 术语“(C₃-C₈) 亚环烷基”表示含有三个至八个碳的单环或双环饱和二价环烃自由基。此类自由基的非限制性实例包括1,2-环丙烷-二基、1,2-环丁烷-二基、1,3-环丁烷-二基、1,2-环戊烷-二基、1,3-环戊烷-二基、1,2-环己烷-二基、1,3-环己烷-二基、1,4-环己烷-二基、1,2-环庚烷-二基、1,3-环庚烷-二基、1,4-环庚烷-二基、1,2-环辛烷-二基、1,3-环辛烷-二基、1,4-环辛烷-二基、1,5-环辛烷-二基等。

[0111] 本文使用的术语“氨基酸残基”指任何天然或合成的(即,非天然)L-和D-立体异构体的氨基酸残基。虽然天然氨基酸是通常在蛋白中存在的二十种氨基酸残基中的任一种,但是术语合成的/非天然的氨基酸指不是二十种天然氨基酸之一的任何氨基酸,修饰的氨基酸和/或其类似物。天然氨基酸的非限制性实例包括甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、缬氨酸、苯基丙氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、精氨酸、组氨酸、脯氨酸、丝氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸和色氨酸。非天然氨基酸的实例包括但不限于鸟氨酸、高赖氨酸、2,4-二氨基丁酸(DABA)、2,3-二氨基丙酸(DAP)、8-氨基辛酸(EAO)、高苯丙氨酸、高缬氨酸、高亮氨酸等。

[0112] 根据本发明,使用一种或多种生理可接受的载体和/或赋形剂,可以以常规的方式配制药组合物。在与组合物的其它成分兼容的意义上来说,载体必须是“可接受的”,并且不会有害于其接受者。

[0113] 将下述示例的载体、施用模式、剂型等列为已知的可能性,从中可以选择载体、施用模式、剂型等用于本发明使用。然而,本领域技术人员将理解,应当首先测试所选的任何给予制剂和施用模式以确定其是否能实现期望结果。

[0114] 施用的方法包括但不限于,肠胃外途径,例如静脉内途径、腹膜内途径、肌肉内途径、皮下途径、粘膜途径(例如经口、鼻内、颊内、阴道、直肠、眼内)、囊内途径、局部途径和皮肤内途径。施用可以是全身的或局部的。在某些实施方案中,药物组合物适于脑内施用。

[0115] 术语“载体”指稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物,活性物质与其一起施用。药物组合物中的载体可以包含粘合剂,如微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮(聚维酮或聚乙烯吡咯酮)、黄耆胶、明胶、淀粉、乳糖或乳糖一水合物;崩解剂,如藻酸、玉米淀粉等;润滑剂或表面活性剂,如硬脂酸镁或十二烷基硫酸钠;以及润滑剂,如胶质二氧化硅。

[0116] 可以配制组合物,用于通过注射,例如通过单次快速静脉注射或持续输注进行肠胃外施用。用于注射的制剂可以以单位剂型存在,例如,在添加防腐剂的安瓿或在多剂量容器中。组合物可以采用悬液、溶液或者在油或水介质的乳剂的形式,并且可以含有配方剂,如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。可选地,活性成分可以是粉末形式,在使用之前用合适的介质例如无菌无热原水制备。

[0117] 对于通过吸入进行的施用,例如对于鼻内施用,使用合适的推进剂,例如,二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它合适的气体将本发明的组合物以气溶胶喷雾呈现的形式从加压包或喷雾器便利地递送。在加压气溶胶的情况下,通过提供阀确定剂量单位以递送计量量。可以配制用于吸入器或吹入器的例如明胶的胶囊和药筒,其含有所述化合物和合适的粉末基底(如乳糖或淀粉)的粉末混合物。

[0118] 在某些实施方案中,将药物组合物配制为用于通过如上所述的任何已知的方法进行施用。本文考虑的具体施用方法是静脉内和脑内(大脑内)施用。

[0119] 可以将以上限定的实施方案中任一种的药物组合物配制为用于静脉内施用、脑内(大脑内)施用、经口施用、皮内施用、肌肉内施用、皮下施用、经皮施用、经粘膜施用、鼻内施用或眼内施用。

[0120] 现在,将通过下述非限制性实施例描述本发明。

实施例

[0121] 材料和方法(M&M)

[0122] 化学药品

[0123] 分子量为~2kDa的NHS-PEG-OPSS(邻-吡啶基二硫化物-聚乙二醇-N-羧基琥珀酰亚胺酯),也被称为PDP-PEG-NHS(PDP:吡啶基二硫基丙酸酯)购自Creative PEGworks(Winston,USA)。平均分子量(Mn)为~50kDa的聚(2-乙基-2-噁唑啉)以及无水二甲基亚砜(DMSO)购自Sigma Aldrich(Israel)。纯乙醇购自Romical(Israel)。使用所有的溶剂而不需要进一步纯化。

[0124] ~22kDa LPEI的合成(游离基形式)

[0125] 如以前所述[16],合成线型聚乙烯亚胺(LPEI)的阳离子聚合物。简言之,用100ml浓缩HCl(37%)使8.0g(0.16mmol)聚(2-乙基-2-噁唑啉)水解,并且回流48小时,产生白色沉淀。将过量的HCl减压移除,将剩余的固体溶于50ml水并且冷冻干燥(5g,78%,¹H-NMR, D₂O-d₆,400MHz:singlet 3.5ppm)。通过添加NaOH水溶液(3M),将得到的LPEI盐酸盐(4.5g)制备为碱性的,以及将得到的白色沉淀进行过滤并用水洗涤直至中性。然后将固体溶于水并进一步冻干以产生白色固体(2g,81%)。

[0126] LPEI-PEG_{2k}-OPSS双缀合物的合成

[0127] 将174mg(8μmol)LPEI溶于2.7ml纯EtOH,并且在室温下搅拌15分钟。将5倍摩尔过量的OPPS-PEG_{2k}-CONHS(79mg,39.5μmol)溶于500μL无水DMSO并且将一小部分加入LPEI混合物。在环境温度下,在旋涡搅拌器上将反应混合物以~800rpm搅拌3小时。使用装填MacroPrep High S树脂的HR10/10柱(BioRad),通过阳离子交换色谱将不同的PEG取代LPEI分开。使用装备有Vydac C-8单体5μm分析柱(300 Å,4.6x 150mm)的逆相HPLC,使用5%-95%乙腈的线性梯度,在25分钟内以1ml/min的流速评估双缀合物的洗脱级分的纯度。将95%纯度或更高纯度的级分合并。合并级分针对20mM HEPES pH7.4进一步透析。通过¹H-NMR测定双缀合物中与LPEI缀合的PEG_{2k}基团的比例。使用来自聚乙烯-(CH₂-CH₂-O)-和来自LPEI-(CH₂-CH₂-NH)-的氢的整数值来测定两个缀合共聚物之间的比例。在从阳离子交换获得的各种产物中,选择两种产物(LPEI-PEG_{2k}-OPSS(1:1双缀合物,LPEI与PEG的摩尔比为~1:1)和LPEI-(PEG_{2k})₃-(OPSS)₃(1:3双缀合物,摩尔比为~1:3)),用于产生三缀合物。使用铜分析来评价共聚物浓度[17]。简言之,将共聚物与CuSO₄(23mg溶于100ml乙酸盐缓冲液)孵育20分钟并且测量它们在285nm处的吸光值。

[0128] 蛋白的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

[0129] 将样本(30μL)在含或不含100mM DTT的SDS蛋白样本缓冲液稀释,然后施加至Tricine胶(13%聚丙烯酰胺)。使用负极缓冲液(0.1M Tris,0.1M Tricine和0.1%SDS pH 8.25)和正极缓冲液(0.21M Tris pH 8.9)进行电泳,然后用InstantBlue™染色使蛋白条带显现。

[0130] 亲和体表达和纯化

[0131] 将Her-2亲和体基因克隆进质粒pET28a,其产生编码Z:2891亲和体的载体,所述亲和体与N-端的六组氨酸(His6)标签和C端处的Cys残基融合。所述亲和体如下所述在大肠杆菌BL21(DE3)中表达:使细胞于37℃生长至OD₆₀₀~0.7。添加IPTG在最终浓度为0.5mM,随后于30℃孵育4小时。将细胞球储存于-80℃。为了纯化亲和体,将细胞球在缓冲液A(20mM HEPES pH 7.4,500mM NaCl,10%甘油,10mM咪唑和2mMβ-巯基乙醇)中重悬,并且根据生产商的说明书,使用微流化器处理器M-110EHI进行破坏。通过于4℃,12,000Xg离心10分钟,回收可溶级分。将得到的级分装载在Ni亲和柱(Clontech,Mountain View,CA)上。将柱用缓冲液A洗涤14个柱体积(cv)。其后,使用增加浓度的缓冲液B(20mM HEPES pH 7.4,500mM NaCl,10%甘油,500mM咪唑和2mMβ-巯基乙醇);5cv的6%缓冲液B,1.5cv的10%缓冲液B,2cv的30%缓冲液B进行分步梯度洗脱。将结合蛋白用5cv的100%缓冲液B进行洗脱(蛋白纯化设备,Wolfson centre,Israel)。然后将洗脱级分用超过滤器(截留3kDa)浓缩,并且装载在制备级的凝胶过滤柱Superdex 30(120ml)(GE healthcare)上。将纯化的蛋白通过SDS-PAGE进一步分析并且使用蛋白印记分析,用抗亲和体抗体(Abcam)进行确认。通过如前所述

的逆相HPLC(Merck-Hitachi L-7100型)进一步评估纯度。

[0132] PEI-PEG-配体亲和体(1:1三缀合物和1:3三缀合物)的合成

[0133] 将4.97mg各双缀合物(1:1和1:3)溶于940 μ l 20mM HEPES pH7.4。然后,将含3.4mg Her-2亲和体的HBS逐滴添加至所述反应物。将4ml 20mM HEPES加上700 μ l乙腈(HPLC级)加入反应混合物,用于增加溶解度。将反应物于室温进一步旋涡(800rpm),直到 A_{343} 显示完全的反转。通过阳离子交换色谱,在装填MacroPrep High S树脂(BioRad)的HR10/10柱上(使用20mM HEPES pH 7.4的三步梯度洗脱至含3M NaCl的20mM HEPES)上纯化得到的三缀合物。将洗脱级分引至分析RP-HPLC以评估三缀合物的纯度,将95%纯度和更高纯度的级分合并,并且保存在-80 $^{\circ}$ C。通过铜分析(如上)测定三缀合物的浓度。使用Nano-Drop 2000,通过 A_{280} 测定缀合的蛋白的量。

[0134] 缀合靶向蛋白的化学载体的验证和纯度。

[0135] 使三缀合物在SDS-PAGE上电泳,并且用InstantBlueTM染色,以确认亲和体与LPEI-PEG_{2k}的缀合。通过逆相HPLC,使用Vydac C-8单体5 μ m分析柱(300 $\text{\AA}$, 4.6x 150mm)以1ml/min的流速,同时于220nm处进行监测来确认三缀合物的纯度。对于HPLC分析,使用含0.1% TFA的三重蒸馏水(TDW)作为流动相,在25分钟内,用乙腈(5%-95%)进行梯度洗脱。

[0136] 多聚物的形成

[0137] 将编码萤火虫荧光素酶和GFP的质粒pGreenFire1(系统Biosciences, Inc)在大肠杆菌中扩增,并且根据生产商的实验指南,通过Qiagen Plasmid Maxi试剂盒(Qiagen, Valencia, CA, USA)纯化。将1:1三缀合物或1:3三缀合物与质粒以N/P=6的比例在HEPES葡萄糖缓冲液中复合(其中N=来自LPEI的氮,以及P=来自DNA的磷),其产生两种多聚物。为了允许多聚物颗粒的完全形成,将样本于室温孵育30分钟。多聚物样本中的最终质粒浓度是100 μ g/ml,然而对于DNase保护和荧光素酶分析,质粒的最终浓度是10 μ g/ml。

[0138] ξ -电位和大小测量

[0139] 使用体积分布计算,使用Nano-ZS Zetasizer(Malvern, UK),通过动态光散射,于25 $^{\circ}$ C测量在HBG缓冲液中分散之后获得的多聚物颗粒的大小。仪器配有633nm的激光,并且通过背散射技术(NIBS,非侵入式背散射),于173 $^{\circ}$ 检测光散射。将各样本运行三次。还使用Nano-ZS Zetasizer(Malvern, UK),于25 $^{\circ}$ C进行 ζ 电位测量。将多聚物在HBG缓冲液(pH 7.4)中孵育之后评价 ζ 电位。于17 $^{\circ}$ 检测来自移动颗粒的光散射,并且使用Smoluchowski模型测定Henry函数值。

[0140] 原子力显微镜

[0141] 对于AFM测量,将多聚物置于新解理云母片(V1 12mm, Ted Pella USA)上。使用商业化的AFM(具有QITM模型的Nano Wizard[®]3(JPK仪器, Berlin, Germany)),于25 $^{\circ}$ C,在HBG缓冲液中进行成像。通过热波动方法(包括在AFM软件中)校准弹簧常数范围为10至30pN nm⁻¹的Si3N4(MSNL-10系列, Bruker)悬臂,具有大约10%的绝对不确定性。QITM的设置如下所示: Z-长度:0.1 μ m;作用力:0.5nN;速度:50 μ m/s。

[0142] DNase保护分析

[0143] 如前所述[18]进行DNase I保护分析。简言之,在HBS溶液中,将单独的1 μ g pGreenFire1 DNA与1:1多聚物或1:3多聚物在50 μ l的最终体积中混合。于室温孵育30分钟后,将2 μ l DNase I(2单位)或PBS添加至10 μ l的各样本中,并且于37 $^{\circ}$ C孵育15分钟。通过添

加5 μ L 100mM EDTA,于室温持续10分钟来终止DNase I的活性。为了使质粒从三缀合物分离,添加10 μ L 5mg/mL肝素(Sigma,St.Louis,MO),然后将管于RT孵育2小时。使样本在0.8%琼脂糖凝胶上电泳,并且用溴化乙锭染色。使用Gel Doc EZ成像仪(Bio Rad Laboratories,Inc)获得图像。

[0144] 细胞培养

[0145] 将Her-2过表达的BT474细胞在补充有10%胎牛血清(FBS)、 10^4 U/L青霉素和10mg/L链霉素的RPMI培养基中于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂下培养。将MDA-MB-231人乳腺癌细胞在补充有10%FBS、 10^4 U/L青霉素和10mg/L链霉素的Leibovitz L-15培养基中于37 $^{\circ}$ C无CO₂的情况下培养。细胞系来自ATCC,以及细胞培养试剂来自生物Industries,Bet Ha'emek,Israel。

[0146] 荧光素酶分析和共焦显微镜

[0147] 将10000BT474 and MDA-MB-231细胞一式三份接种在96-孔板上。将细胞用与质粒复合的1:1三缀合物和1:3三缀合物处理48小时,处理之后,将细胞用PBS洗涤,并且每孔用30 μ L细胞裂解缓冲液(Promega,Mannheim,Germany)裂解。根据生产商的建议,使用荧光素酶分析系统(Promega),在25 μ L裂解物样本中测量荧光素酶活性。使用LuminoskanTMAscent微孔板发光仪(Thermo Scientific)进行测量。将相对光单位(RLU)的数值呈现为来自一式三份样本的荧光素酶活性的平均值和标准偏差。使用共焦显微镜(FV-12000lympus)来显现GFP,所述GFP被用来反映质粒pGreenFire1的内化。在 $\times 10$ 放大倍数下拍摄照片。

[0148] 细胞活力的定量

[0149] 如之前所述[19],通过比色分析的方法,使用亚甲蓝,测量细胞活力。简言之,将10000BT474和MDA-MB-231细胞以一式三份接种在96孔板中。将细胞用含1 μ g/mL pGreenFire1的1:1多聚物和1:3多聚物处理。处理后48小时,将细胞固定在于PBS(pH 7.4)中的1%甲醛内,用DDW洗涤,然后用亚甲蓝在硼酸盐缓冲液中的1%(wt/vol)溶液染色1小时。其后,用0.1M HCl萃取染色液,并且在酶标仪(ELx800 BIO-TEX仪器股份有限公司)中,于630nm处读取染色液的光学密度。

[0150] 实施例1-硫醇反应共聚物的合成。

[0151] 3.1.之前的研究已表明LPEI的聚乙二醇化以及其与EGFR靶向部分的缀合[13]。然而,单条LPEI链上的聚乙二醇化的量还未被完全表征。为了产生差异化的聚乙二醇化共聚物,将LPEI上的仲胺与PEG上的末端NHS酯正交保护基缀合。N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯与LPEI上的仲骨架胺自发反应,提供LPEI的有效聚乙二醇化。而且,NHS-PEG OPSS与PEI的胺反应导致稳定不可逆的酰胺键的形成(图1)。

[0152] 通过阳离子交换色谱纯化聚乙二醇化产物。在NaCl的最高浓度处洗脱出两个峰,一个在120mS/cm处,另一个在132mS/cm处(数据未示出)。推测两个产物的LPEI:PEG比值不同,因此它们的净正电荷不同。使用PEG(-CH₂-CH₂-O-)上氢原子的相对整数值(图2)和LPEI(-CH₂-CH₂-NH-)上的氢原子的整数值(图2)分析¹H-NMR光谱。该分析表示,在第一峰中洗脱出的材料由这样的共聚物组成:其中各摩尔的LPEI与大约三摩尔的PEG缀合。该产物被命名为LPEI-(PEG_{2k})₃-(OPSS)₃(“1:3双缀合物”)。第二峰由这样的共聚物组成:其中PEG与LPEI缀合的摩尔相等,并且被命名为LPEI-PEG_{2k}-OPSS(“1:1双缀合物”) (图2)。

[0153] 实施例2.三缀合物,LPEI-PEG_{2k}-Her2亲和体(1:1三缀合物)&LPEI-(PEG_{2k})₃-(Her2)₃亲和体(1:3三缀合物)的合成

[0154] 本研究的最初目的是开发靶向Her-2过表达肿瘤细胞的阳离子聚合物。因为Her-2是“孤儿受体”，使用靶向Her-2受体的亲和体分子(而不是配体)来产生Her-2靶向三缀合物。我们表达并纯化了C-末端具有Cys残基的Her-2亲和体以允许进一步缀合。通过Her-2亲和体的末端Cys残基，将硫醇反应共聚物(1:1双缀合物和1:3双缀合物)与Her-2亲和体缀合，分别产生1:1三缀合物和1:3三缀合物(图3)。为了产生三缀合物，所述反应必须在低浓度亲和体(为了防止聚集)且在作为有机极性溶剂用于增加溶解度的10%乙腈(ACN)的存在下进行。两种三缀合物反应的反应产率大约是33%，如通过铜分析所测定的。为了确认亲和体与双缀合物的缀合，用DTT还原三缀合物产物，并且在SDS-PAGE上分离。考马斯亮蓝染色确认了还原的三缀合物释放亲和体(图4)。通过测量 A_{280} ，测定三缀合物中存在的Her-2亲和体的量。使用铜分析，我们定量了LPEI。如上所述， ^1H -NMR分析显示，纯化的双缀合物中LPEI:PEG的比例是1:1或1:3。比较Her-2亲和体和LPEI的摩尔比，我们测定1:1三缀合物中Her-2亲和体与LPEI的平均比是1:1，以及在1:3三缀合物中，平均比是3:1。因此，我们断定，实现了亲和体与LPEI-PEG的几乎完全缀合。

[0155] 为了产生多聚物，将纯的双缀合物和三缀合物(1:1和1:3)与质粒DNA复合，如材料和方法中所述(图3)。

[0156] 实施例3. 多聚物的 ξ 电位和大小

[0157] 关于大小和表面电荷，使用动态光散射(DLS)，我们进一步表征了多聚物。多聚物的大小对于其递送特性具有显著的影响[21]。为了研究靶配体对多聚物的大小的影响，我们决定将1:1双缀合物和1:3双缀合物二者与质粒复合并且测量它们的大小。1:1双缀合物的平均颗粒大小为 $115.2 \pm 8.2\text{nm}$ ，1:3双缀合物的平均颗粒大小为 $253.1 \pm 9.5\text{nm}$ 。由1:1三缀合物与质粒产生的多聚物的平均颗粒大小为 $141 \pm 5.8\text{nm}$ ，而与质粒复合的1:3三缀合物的平均颗粒大小为 $256 \pm 24.2\text{nm}$ (图5)。在通过将质粒与单独的LPEI复合产生的多聚物中得到最小的颗粒($73.9 \pm 3.0\text{nm}$)。亲和体与双缀合物的缀合对颗粒大小只有较少的影响。然而，PEG基团的数量不影响颗粒大小，其表示PEG基团引起空间位阻，干扰与质粒的凝聚。

[0158] 正的表面电荷促进多聚物与带负电的细胞表面的结合，但是过多的正电荷可以导致非特异性结合和显著的毒性[12]。图6中呈现的各种复合物的 ξ 电位与之前的研究一致，之前的研究显示，随着PEG单元数量的增加， ξ 电位降低[13]。为了评估PEG基团对我们化学载体的表面电荷的影响，我们测量了通过质粒DNA与前体1:1双缀合物和1:3双缀合物，以及1:1三缀合物和1:3三缀合物的复合所形成的多聚物的 ξ 电位。1:1双缀合物多聚物的 ξ 电位为 $27.0 \pm 0.1\text{mV}$ ，1:3双缀合物多聚物的平均 ξ 电位为 $20.0 \pm 1.0\text{mV}$ 。1:1三缀合物多聚物显示平均值为 $17.1 \pm 0.7\text{mV}$ 的 ξ 电位，而1:3三缀合物多聚物显示 $10.2 \pm 0.44\text{mV}$ 的平均值(图6)。和大小不同，多聚物的 ξ 电位受PEG基团的数量和Her-2亲和体的缀合二者的影响。尽管用裸的LPEI获得最小、大多数带正电的多聚物，但是这些颗粒极毒[22]。我们期待，PEG基团和靶向部分的添加将减少毒性，但是因为多聚物的大小仍然相对较小，我们希望它们作为核酸递送载体的效率将不受连累。

[0159] 实施例4. 使用原子力显微镜评估多聚物形状。

[0160] 颗粒形状的重要性及其对递送特性的影响正得到公认[23]。使用原子力显微镜(AFM)，我们分析了用三缀合物获得的多聚物在溶液中的形态学。1:1三缀合物多聚物和1:3三缀合物多聚物的直径均为纳米大小的范围(图7A-B)，与通过DLS获得的结果一致。1:1三

缀合物多聚物主要显示为椭圆颗粒。大多数颗粒的直径范围为101nm至178nm,平均颗粒直径为142nm。几乎没有颗粒异常大,某些甚至达到>250nm(图7A)。1:3三缀合物多聚物的形状更异质,而且,产生大的聚集体,具有不明确的颗粒形状(图7B)。这些颗粒的长度范围为150nm至650nm,平均颗粒长度为312nm,以及它们的宽度范围为85nm至400nm,平均宽度为175nm。

[0161] 实施例5.DNase保护分析。

[0162] 成功的体内基因递送取决于有效保护抵抗核酸酶。为了确定三缀合物保护质粒免受降解且能够进行有效基因递送的能力,将多聚物用DNase I处理并且使用凝胶电泳进行分析。如图8所示,在与2个单位的DNase I孵育10分钟后,裸的质粒pGreenFire1 DNA被完全地降解。相比之下,当通过将质粒与三缀合物混合而产生多聚物时,保护质粒免受DNase I的降解。对于1:3三缀合物多聚物而言,观察到质粒的完全保护,而对于1:1三缀合物多聚物而言,发生一些切割,如质粒从超螺旋(s.c.)至开环(o.c.)形状的变化所示。通过1:3三缀合物多聚物赋予的较强保护抵抗DNase I可能归因于这些复合物中另外的PEG-蛋白单元提供的空间位阻的增加。的确,之前的研究显示,PEI的聚乙二醇化可以使多聚物稳定,并且通过妨碍它们与酶和血清因子的作用增加它们在血液中的循环[24,25]。

[0163] 实施例6.靶三缀合物多聚物的生物活性

[0164] 多聚物大小和 ξ 电位影响靶DNA递送和基因表达的效率,但是大小的影响似乎取决于具体的缀合物[2][21]。为了评价1:1三缀合物多聚物和1:3三缀合物多聚物的特异性和转染效率,使用差异表达Her-2的两种乳腺癌细胞系。用pGreenFire1形成1:1三缀合物和1:3三缀合物的多聚物,并且将其转染进MDA-MB-231细胞(表达大约 9×10^3 个Her-2受体/细胞[26])和BT474细胞(表达大约 1×10^6 个Her-2受体/细胞[27])。转染之后48小时,观察到有差异的荧光素酶活性。在BT474细胞中,1:1三缀合物多聚物和1:3三缀合物多聚物均产生比在MDA-MB-231中高超过300倍的荧光素酶活性(* $p < 0.001$) (图9A)。通过GFP的表达确认向BT474的更高效基因递送,如通过共焦显微镜所看到的(图9B)。这些结果显示,多聚物的选择性取决于Her-2的表达。

[0165] 通过1:1三缀合物多聚物向BT474细胞的靶向递送比1:3三缀合物多聚物的递送高效10倍多(图9A,B),甚至尽管1:3三缀合物具有更多的靶向部分。这可能反映了 ξ 电位越高,1:1三缀合物多聚物的大小越小。

[0166] 带正电荷的LPEI基化学载体与明显的毒性相关。因此,我们进一步测试了在用1:1三缀合物多聚物和1:3三缀合物多聚物处理之后存活的MDA-MB-231和BT474细胞。在亚甲蓝分析中,两种多聚物均未显示在MDA-MB-231细胞中的细胞毒性作用。在用1:3三缀合物多聚物处理的BT474细胞中观察到类似的结果。然而,在用1:1三缀合物多聚物处理的BT474中观察到细胞毒性的轻微增加(图9C)。总之,这些结果显示,1:1三缀合物多聚物的小的尺寸和较高的 ξ 电位赋予了高效的靶向递送特性,毒性仅有轻微的增加。因此,1:1三缀合物的多聚物在基因递送方面优于更多屏蔽的1:3三缀合物多聚物。

[0167] 实施例7.PEI-PEG-Her2亲和体的抗肿瘤活性

[0168] 与聚肌苷/聚胞苷(PolyIC)复合的PEI-PEG-Her2亲和体(PPHA)具有强烈的抗肿瘤活性。发现过表达Her-2的乳腺癌细胞系被PEI-PEG-Her2亲和体与PolyIC的复合物很强烈地抑制。还观察到对耐曲妥单抗的Her2过表达乳腺癌细胞系的强烈抑制。

[0169] 图10显示载体/多聚物抑制Her2过表达细胞,包括耐赫赛汀/曲妥单抗的细胞。

[0170] 将 0.5×10^6 个MCF-7HER-2细胞皮下注射进裸鼠。在肿瘤达到 100mm^3 的平均值之后,开始处理。每24小时静脉注射 1mg/kg pIC/PPHA。将曲妥单抗一周一次(通过箭头指示)静脉施用至两组小鼠。一周两次测量肿瘤的生长。如图11中所示例的,在小鼠模型(其中将这些细胞系植入裸鼠)中,发现复合物PolyIC/PPHA具有强烈的抗肿瘤活性。

[0171] 实施例8.LPEI-PEG-EGFR亲和体的合成

[0172] 5mg ($2 \times 10^{-4}\text{mmol}$) LPEI-PEG_{2k}-OPSS(1:1双缀合物)溶于 1ml 20mM HEPES pH 7.4。然后,将含 3.4mg ($3.8 \times 10^{-4}\text{mmol}$, $\sim 2\text{eq}$) EGFR亲和体的HBS逐滴添加至所述反应物。将 4mL 20mM HEPES加上 $700\mu\text{L}$ 乙腈(HPLC级)加入反应混合物用于增加溶解性。将反应物于室温且黑暗条件下进一步旋涡(800rpm),直到 A_{343} 显示完全反转。通过阳离子交换色谱,在装填MacroPrep High S树脂(BioRad)的HR10/10柱上纯化得到的三缀合物(使用 20mM HEPES pH 7.4的三步梯度洗脱至含 3M NaCl的 20mM HEPES)。将洗脱级分引入分析型RP-HPLC以评估LPEI-PEG-EGFR三缀合物的纯度,将具有95%纯度和更高纯度的级分合并,并且保存于 -80°C 。通过铜分析测定三缀合物的浓度。使用Nano-Drop 2000,通过 A_{280} 测定缀合的蛋白的量。

[0173] 实施例9.PEI-PEG-EGFR亲和体的抗肿瘤活性

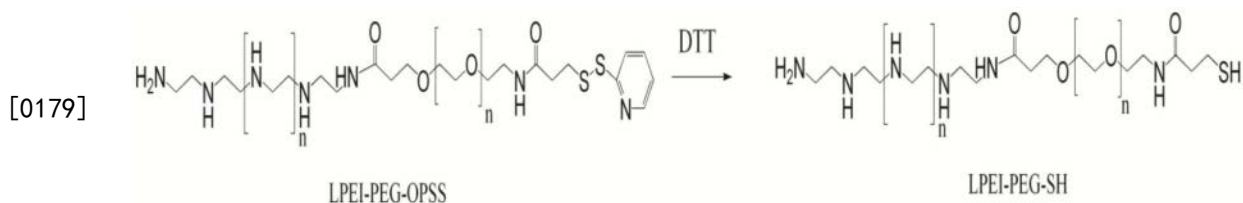
[0174] 与PolyIC复合的PEI-PEG-EGFR亲和体(PPEA)具有强烈的抗肿瘤活性。发现过表达EGFR的各种细胞系被与聚肌苷/聚胞苷(PolyIC)复合的PEI-PEG-EGFR亲和体(PPEA)的复合物强烈地抑制。可以看出,PPEA的功效高于PPE的功效(图12)。

[0175] 在将这些细胞系植入裸鼠的小鼠模型中,发现复合物PolyIC/PPEA具有强烈的抗肿瘤活性。

[0176] 用2百万个A431细胞皮下注射六十五只5周龄的雌性裸鼠。七天后,肿瘤的平均体积为 136mm^3 ,并且将小鼠如下所述分为6组(7-8只小鼠/组):UT;pIC/PPEA,对于 25gr 小鼠, $0.75\text{mg/kg}=250\mu\text{L}$ pIC,IC,6次/周;pI/PPEA, 0.75mg/kg IV,6/周;pIC/PPEA低,对于 25gr 小鼠, $0.1\text{mg/kg}=250\mu\text{L}$ $0.01\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pIC,IC,6次/周。将pIC、pI和PPE以及PPEA在混合前稀释以获得复合物中的pIC低于通常($0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$)浓度。图13显示体内PolyIC/PPEffibody的活性。再一次,PPEA/PolyIC的功效高于PolyIC/PPE的功效。

[0177] 实施例10.LPEI-PEG-h/mEGF的合成

[0178] 10.1.LPEI-PEG-SH中间体的合成

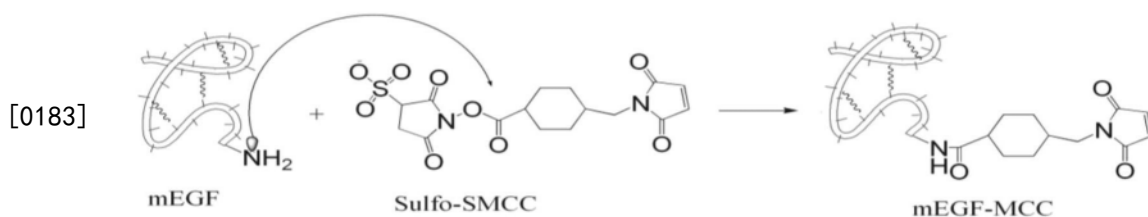


[0180] 向含 5mg LPEI-PEG-OPSS($0.2\mu\text{mol}$,根据 24000g/mol)的 5mL 20mM HEPES(pH 7.4)缓冲液添加50倍摩尔过量的二硫苏糖醇(DTT; 0.1mmol , 1.5mg),并且在 15mL 塑料离心管中通过旋涡于室温混合20分钟。使用 5mL 样本环,将还原的双缀合物在Sephadex G-25柱(20mL , $4 \times 5\text{mL}$)上分离,并且用 20mM HEPES(pH 7.4)以 1.0mL/min 的流速进行洗脱,以及通过HPLC,使用与上述相同的条件和方法进行分析。

[0181] 使用Ellman's分析来评价LPEI-PEG-SH中间体中硫氢基的浓度。SH基的浓度与由

游离的硫醇释放的发色团6-硝基-3-硫代环己基-1,4-二烯-1-羧酸的浓度成正比,所述游离的硫醇与Ellman's试剂定量反应。经由于412nm处的吸光值测量发色团,而不受样本或Ellman's试剂的任何干扰。

[0182] 10.2m/hEGF-MCC中间体的合成

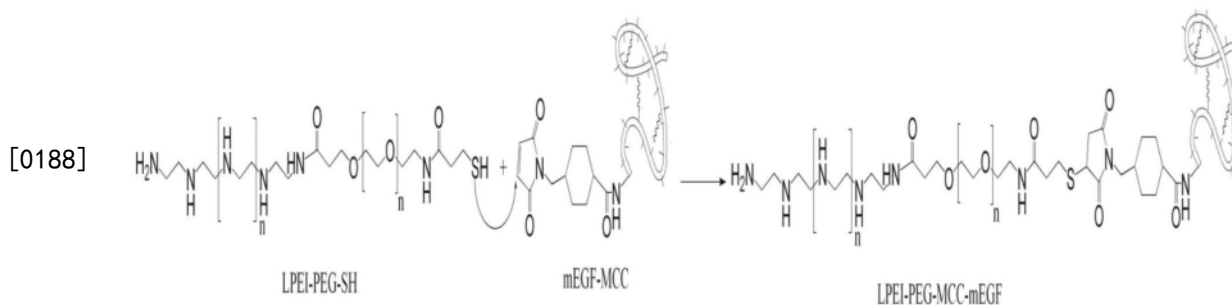


[0184] 合成概要.将h/mEGF(人/小鼠表皮生长因子)修饰成h/mEGF-MCC(EGF-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸;MCC)并且进行纯化以稍后用于与LPEI-PEG-SH的缀合。通过连接MCC基团活化h/mEGF防止蛋白被DTT还原,并且允许避免h/mEGF对粗糙条件的暴露。该方式改善缀合反应效率,而且-EGF-MCC是稳定的材料,其可以于-80℃储存数周。

[0185] hEGF-MCC的合成:将1mg hEGF(160nmol)在0.5ml水中复溶,然后用氩气脱气。使用nano-drop 2000,于280nm处测定hEGF的量。将溶液添加至0.5mL 200mM乙酸钠缓冲液pH 6.0和60%乙醇,同时剧烈混合。在氩气的情况下,将溶液与在0.5mL 100%乙醇中的10当量4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸3-硫代-N-羟基琥珀酰亚胺酯钠盐(Sulfo-SMCC)混合。稍微酸性pH的反应混合物(pH 6)是必需的,以选择性地修饰hEGF的N-端氨基。于室温4小时之后,通过透析袋(3.5ka截留),针对HBS(100mM)纯化功能化的肽,在1L中透析三次,每次1小时,然后在1L中透析过夜。使用HPLC-质谱(MS)分析hEGF-MCC,其分子量为6435.7g/mol,其显示,硫代-SMCC与hEGF存在一个缀合。使用装配逆相C-18柱(phenomenex,Aeris, 3.6μm,2.1mm x 50mm,100Å⁰)的Thermo SCIENTIFIC/LCQ FLEET进行HPLC-MS分析。

[0186] mEGF-MCC的合成:将0.5mg(0.088μmol总量)鼠EGF(PeproTech)溶于2100μL 20mM HEPES缓冲液,形成清澈的粘性溶液。将1mg硫代-SMCC(30eq.,Ornat,IL)溶于0.9mL纯EtOH并且与EGF溶液缓慢混合以在3.0ml总体积中达到30% EtOH的最终浓度。简短的混合导致清澈的溶液。将反应容器于环境温度震荡4小时。所述时间段之后,溶液保持清澈。首先将mEGF-MCC在Sephadex G-25柱(4x5ml)上分离,并且用20mM HEPES,pH 7.4以1.0ml/min的流速进行洗脱,进一步洗脱,通过HPLC,使用与如上所述用于LPEI-PEG-OPSS的相同条件和标准方法进行分析。

[0187] 10.3LPEI-PEG-h/mEGF的合成



[0189] LPEI-PEG-SH混合。最初将反应混合物于室温搅拌2小时,然后在缓慢震动的情况下于+4℃孵育4天。通过阳离子交换色谱(在10/1cm Tricorn GE Healthcare柱中的7.8cm

MacroPrep High S树脂(BioRad)),使用经A18缓冲进口的梯度泵,以0.5ml/min的流速并且使用溶剂A:20mM HEPES pH 7.4和溶剂B:20mM HEPES pH 7.4NaCl 3.0M分离反应产物(LPEI-PEG-hEGF或LPEI-PEG-mEGF)。通过HPLC分析纯化的LPEI-PEG-hEGF或LPEI-PEG-mEGF三级合物,并且通过“铜分析”和EGF光度分析进行定量以相应地测量[LPEI]和[EGF]的浓度。

[0190] 10.4LPEI-PEG-hEGF的生物活性。

[0191] 使用我们通过采用的细胞分析,我们比较了PolyIC/LPEI-PEG-hEGF复合物(PPEm)与在Schaffert D,Kiss M,Rödl W,Shir A,Levitzki A,Ogris M,Wagner E.,2011(Poly(I:C)-mediated tumor growth suppression in EGF-receptor overexpressing tumors using EGF-polyethylene glycol-linear polyethylenimine as carrier.Pharm Res.28:731-41)中所述描述的PolyIC/mPPE(小鼠)的活性。可以看出,新HEGF缀合物在杀死EGFR过表达细胞方面更有效(图14)。在它们的表面表达适度量的EGFR分子的细胞(U87MG细胞表达80,000个EGFR/细胞)对处理的敏感性比过表达大量的细胞(U87MGwtEGFR细胞表达1,000,000个EGFR/细胞)低。

[0192] 实施例11.DUPA类似物-DyLight 680的合成

[0193] 使用标准的Fmoc固相肽合成(SPPS)方法在作为固体支持物的Fmoc-Cys(trt)树脂上合成肽。溶胀:将树脂在二氯甲烷中溶胀至少2小时。Fmoc的移除:首先用20%哌啶在二甲基甲酰胺(DMF)中的溶液处理树脂(2x 20分钟),然后用DMF洗涤(5x 2分钟)。Fmoc-Asp(OtBu)-OH的偶联:将3当量Fmoc-Asp(OtBu)-OH,3当量(1-[二(二甲氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑[4,5-b]吡啶盐3-氧化六氟磷酸酯)(HATU)溶于15mL DMF,并且将8当量N,N-二异丙基乙胺(DIEA或DIPEA)添加至混合物。将溶液于室温混合(预活化)10分钟,然后添加至树脂,持续1小时。为了确保天冬氨酸的完全偶联,用新混合物将偶联重复两次。进行Keiser测试以确保完全偶联。将树脂用DMF(3x 2分钟)和二氯甲烷(DCM)(2x 2分钟)洗涤。加帽:将树脂用乙酸酐(10当量)和DIPEA(8当量)在DMF中的溶液处理20分钟并且用DMF洗涤(3x 2分钟)。Fmoc的移除:首先用20%哌啶在DMF中的溶液处理树脂(2x 20分钟),然后用DMF洗涤(5x 2分钟)。Fmoc-二氨基丙酸(DAP)的偶联:3当量Fmoc-二氨基丙酸(DAP),3当量HATU和8当量DIEA溶于15mL DMF。将溶液于室温混合(与活化)10分钟,然后将其添加至树脂,持续1小时。进行Keiser测试以确保完全偶联。将树脂用DMF(3x 2分钟)和DCM(2x 2分钟)洗涤。肽的延长:将下述化合物按下述顺序与树脂偶联:(1) Fmoc-Phe-OH, (2) Fmoc-Phe-OH, (3) Fmoc-8-氨基辛酸(EAO),和(4) OtBu-Glu(Fmoc)-OH。Fmoc的移除:用20%哌啶在DMF中的溶液处理树脂(2x 20分钟),然后用DMF(5x2分钟)和DCM(3x 2分钟)洗涤。DUPA配体的偶联:将0.9mL三乙胺(6.6mmol)与含0.9克(3mmol)L-谷氨酸二叔丁酯盐酸盐的15mL DCM合并。于0℃,在45分钟内将该溶液逐滴添加至5mL DCM和三光气(0.35g,1.1mmol)的溶液。在搅拌另外50分钟后,将混合物与另外0.9mL三乙胺添加至树脂。将具有树脂的反应混合物震荡3小时,并且用DMF洗涤(3x 2分钟)。完全切割:将树脂用DCM洗涤(3x 2分钟)并且真空干燥。于0℃,添加2.5% TDW和2.5%三异丙基硅烷在三氟乙酸(TFA)中的溶液。反应于室温进行4小时,过滤并用乙醚/己烷1:1的冷溶液处理,以及通过离心将肽沉淀。将粗肽溶于乙腈/TDW 1:1溶液并冻干。通过制备型逆相(RP)HPLC纯化粗品。DyLight 680偶联:在氩气氛下,将1mg DyLight™ 680(Life Technologies,Cat.No.46418)溶于含50当量无水二异丙基乙胺

的无水二甲亚砜(DMSO;100 μ L)。将溶于无水DMSO(100 μ L)的两倍摩尔过量的DUPA肽接头添加至以上混合物并且于室温搅拌。通过液相色谱-质谱联用(LC-MS)确认产物的形成。然后通过制备型RP-HPLC纯化粗DUPA近红外(NIR)探针。

[0194] 实施例12.Dupa类似物-药物先导的合成

[0195] 使用标准Fmoc SPPS程序,在作为固体支持物的Fmoc-Cys(trt) wang树脂上合成肽。溶胀:将树脂在二氯甲烷中溶胀至少2小时。Fmoc移除:用20%哌啶在DMF中的溶液处理树脂(2x 20分钟),然后用DMF洗涤(5x 2分钟)。Fmoc-Gly-OH的偶联:将3当量Fmoc-Gly-OH和3当量HATU溶于15mL DMF,随后添加8当量DIEA。将溶液于室温混合(预活化)10分钟,然后将其添加至树脂,持续1小时。用新混合物重复两次偶联。进行Keiser测试以确保完全偶联。将树脂用DMF(3x 2分钟)和DCM(2x 2分钟)洗涤。加帽:将树脂用乙酸酐(10当量)和DIPEA(8当量)在DMF中的溶液处理20分钟,并且用DMF洗涤(3x 2分钟)。Fmoc的移除:用20%哌啶在DMF中的溶液处理树脂(2x 20分钟),然后用DMF洗涤(5x 2分钟)。Fmoc-Trp(Boc)-OH的偶联:将3当量Fmoc-Trp(Boc)-OH,3当量HATU和8当量DIEA溶液15ml DMF。将溶液于室温混合(预活化)10分钟,然后将其添加至树脂,持续1小时。进行Keiser测试以确保完全偶联。将树脂用DMF(3x 2分钟)和DCM(2x 2分钟)洗涤。肽的延长:将下述化合物按下述顺序与树脂偶联:(1)Fmoc-Trp(Boc)-OH,(2)Fmoc-Gly-OH,(3)Fmoc-Phe-OH,(4)Fmoc-8-氨基辛酸(EAO)和(5)OtBu-Glu(Fmoc)-OH。Fmoc的移除:用20%哌啶在DMF中的溶液处理树脂(2x 20分钟),然后用DMF(5x 2分钟)和DCM(3x 2分钟)洗涤。DUPA配体的偶联:将0.9mL三乙胺(6.6mmol)与含0.9克(3mmol)L-谷氨酸二叔丁酯盐酸盐的15mL DCM合并。于0 $^{\circ}$ C,在45分钟内,将该溶液逐滴添加至5mL DCM和三光气(0.35g,1.1mmol)的溶液。搅拌另外50分钟后,将混合物与另外0.9mL三乙胺添加至树脂。将具有树脂的反应混合物震荡3小时,并且用DMF洗涤(3x 2分钟)。完全切割:将树脂用DCM洗涤(3x 2分钟),并且真空下干燥。添加0 $^{\circ}$ C的2.5% TDW和2.5%三异丙基硅烷在三氟乙酸(TFA)中的溶液。反应于室温进行4小时,过滤并用乙醚/己烷1:1的冷溶液处理,并且通过离心沉淀含有DUPA类似物的肽。将粗肽溶于乙腈/TDW 1:1溶液并冻干。通过制备型RP-HPLC纯化粗品。PEI-PEG-DUPA类似物的合成:将4.37mg(1.2×10^{-4} mmol)1:1双缀合物或1:3双缀合物(如本文上述的实施例1中所说明的制备)溶于940 μ L 20mM HEPES pH 7.4。然后,将以1:1的比例溶于2mL乙腈(ACN;HPLC级)/(20mM HEPES pH 7.4)的1mg(9.1×10^{-4} mmol, $\sim$ 5当量)DUPA类似物逐滴添加至反应物。然后,为了达到ACN在反应物中大约 $\sim$ 10%总浓度,将4mL 20mM的添加物引入反应混合物。于室温黑暗条件下将反应进一步旋涡(800rpm)直到波长343(A_{343})处的吸光值显示完全的反转。通过阳离子交换色谱,在装填MacroPrep High S树脂(BioRad)的HR10/10柱上纯化得到的三缀合物(使用20mM HEPES pH 7.4的三步梯度洗脱至含3M NaCl的20mM HEPES)。将洗脱级分引入分析型RP-HPLC以评估三缀合物的纯度。将具有95%纯度和更高纯度的级分合并并且于-80 $^{\circ}$ C保存。通过铜分析测定三缀合物的浓度。通过发色团(Trp氨基酸)的吸光值测定缀合的DUPA类似物的量。

[0196] 实施例13.PolyIC/LPEI-PEG-DUPA靶向前列腺癌。

[0197] 前列腺表面膜抗原(PSMA)在转移性前列腺癌中过表达。其还存在于大多数固体肿瘤的新血管系统中。因为PSMA基于配体的结合被内化,所以我们选择其作为靶标,设计并合成PolyIC PSMA靶向载体。的确,DUPA-Daylight680被内化至PSMA过表达细胞(LNCaP),但不

被内化至MCF7(过表达Her2)(未显示)。

[0198] 图15显示PEI-PEG-DUPA(PPD)/PolyIC针对LNCaP和VCaP细胞高度有效。96小时的暴露之后测量活力。PPD还诱导细胞因子的产生(图16)。在图17中,表明使LNCaP细胞适应的培养基刺激在条件培养基中生长的PBMC中细胞因子INF- γ 、IL-2和TNF- α 的表达。然后显示,PolyIC/PPD处理的LNCaP细胞与不表达PSMA的PC3-荧光素酶细胞的共孵育经旁观者效应导致PC3-荧光素酶细胞多至70%的致死。健康的人PBMC的添加强烈地增强效果并导致PC3细胞90%的致死(图18)。

[0199] 实施例14.癌症的体内处理。

[0200] 当在SCID小鼠中测试时,PolyIC/PPD具有显著的抗肿瘤效果(图19)。由于实验小鼠中免疫系统的缺乏,肿瘤抑制是不完全的。

[0201] 优选的实施方式

[0202] 1.双链RNA(dsRNA)和聚合缀合物的多聚物,其中所述聚合缀合物由与一个或多个聚乙二醇(PEG)部分共价连接的线型聚乙烯亚胺(LPEI)组成,各PEG部分经接头与能够结合癌症抗原的靶向部分缀合,条件是所述靶向部分不是小鼠EGF或序列YHWYGYTPQNV(SEQ ID NO:1)的肽。

[0203] 2.如项目1所述的多聚物,其中所述dsRNA是聚肌胞苷酸双链RNA(聚I:C),所述聚合缀合物由与一个PEG部分共价连接的LPEI组成(LPEI-PEG 1:1)或者与三个PEG部分共价结合的LPEI组成(LPEI-PEG 1:3),以及所述癌症抗原是表皮生长因子受体(EGFR)、人表皮生长因子受体2(HER2)或前列腺表面膜抗原(PSMA)。

[0204] 3.如项目1所述的多聚物,其中所述一个或多个PEG部分与所述LPEI各自独立地形成-NH-CO-键,以及与所述接头各自独立地形成选自-NH-CO-、-CO-NH-、-S-C-、-S-S-、-O-CO-或-CO-O-的键。

[0205] 4.如项目3所述的多聚物,其中所述一个或多个PEG部分中的每一个与所述LPEI和所述接头形成-NH-CO-键。

[0206] 5.如项目1至4中任一项所述的多聚物,其中所述接头与所述靶向部分形成-S-S-键、NH-CO-键、-CO-NH-键、-S-C-键、O-CO-键、-CO-O-键或(-NH-CO-NH)脲键。

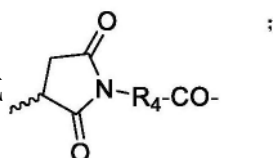
[0207] 6.如项目5所述的多聚物,其中所述接头选自-CO-R₂-R_x-R₃或者由3至7个氨基酸残基组成肽部分,

[0208] 其中

[0209] R₂选自:(C₁-C₈)亚烷基、(C₂-C₈)亚烯基、(C₂-C₈)亚炔基、(C₆-C₁₀)亚芳基-二基或亚杂芳基二基;

[0210] R_x不存在或为-S-;

[0211] R₃不存在或是式



[0212] R₄选自:(C₁-C₈)亚烷基、(C₂-C₈)亚烯基、(C₂-C₈)亚炔基、(C₁-C₈)亚烷基-(C₃-C₈)亚环烷基、(C₂-C₈)亚烯基-(C₃-C₈)亚环烷基、(C₂-C₈)亚炔基-(C₃-C₈)亚环烷基、(C₆-C₁₀)亚芳基-二基、亚杂芳基二基、(C₁-C₈)亚烷基-(C₆-C₁₀)亚芳基-二基或(C₁-C₈)亚烷基-亚杂芳基

二基；

[0213] 其中所述(C₁-C₈)亚烷基、(C₂-C₈)亚烯基或(C₂-C₈)亚炔基中的每一个被各自独立地选自以下的一个或多个基团独立取代：卤素、-COR₅、-COOR₅、-OCOR₅、-OCON(R₅)₂、-CN、-NO₂、-SR₅、-OR₅、-N(R₅)₂、-CON(R₅)₂、-SO₂R₅、-SO₃H、-S(=O)R₅、(C₆-C₁₀)芳基、(C₁-C₄)亚烷基-(C₆-C₁₀)芳基、杂芳基或(C₁-C₄)亚烷基-杂芳基，并且还被一个或多个相同或不同的选自S、O或N的杂原子，和/或各自独立地选自-NH-CO-、-CO-NH-、-N(R₅)-、-N(C₆-C₁₀芳基)-、(C₆-C₁₀)亚芳基-二基或亚杂芳基二基的至少一个基团任选间隔；以及

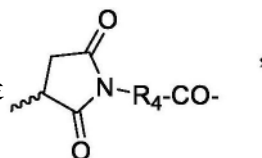
[0214] R₅是H或(C₁-C₈)烷基。

[0215] 7. 如项目6所述的多聚物，其中R₂选自(C₁-C₈)亚烷基，优选(C₁-C₄)亚烷基，所述R₂被各自独立地选自以下的一个或多个基团独立取代：卤素、-COH、-COOH、-OCOOH、-OCONH₂、-CN、-NO₂、-SH、-OH、-NH₂、-CONH₂、-SO₂H、-SO₃H、-S(=O)H、(C₆-C₁₀)芳基、(C₁-C₄)亚烷基-(C₆-C₁₀)芳基、杂芳基或(C₁-C₄)亚烷基-杂芳基，并且被一个或多个相同或不同的选自S、O或N的杂原子，和/或各自独立地选自-NH-CO-、-CO-NH-、-NH-、-N(C₁-C₈烷基)-、-N(C₆-C₁₀芳基)-、(C₆-C₁₀)亚芳基-二基或亚杂芳基二基的至少一个基团任选间隔。

[0216] 8. 如项目7所述的多聚物，其中R₂选自(C₁-C₈)亚烷基，优选(C₁-C₄)亚烷基。

[0217] 9. 如项目6所述的多聚物，其中R_x是-S-。

[0218] 10. 如项目6所述的多聚物，其中R₃不存在或是



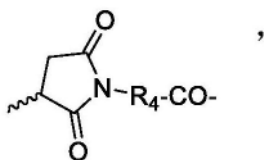
[0219] 其中R₄是(C₁-C₈)亚烷基-(C₃-C₈)亚环烷基，优选(C₁-C₄)亚烷基-(C₅-C₆)亚环烷基。

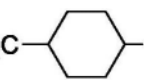
[0220] 11. 如项目6至10中任一项所述的多聚物，其中

[0221] R₂是-CH₂-CH₂-；

[0222] R_x是-S-；以及

[0223] R₃不存在或是

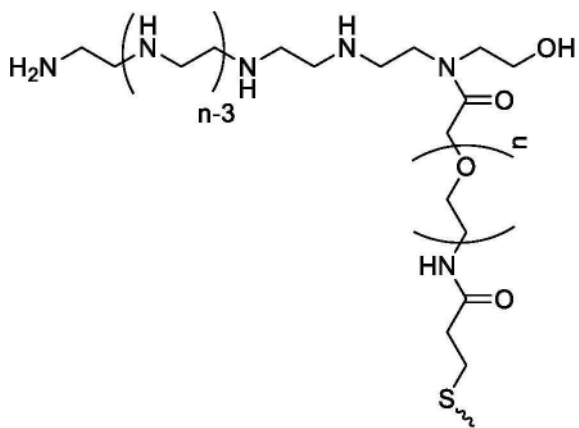


其中R₄是-H₂C-。

[0224] 12. 如项目6所述的多聚物，其中所述肽部分是-(NH-(CH₂)₇-CO)-Phe-Gly-Trp-Trp-Gly-Cys-(SEQ ID NO:2)或-(NH-(CH₂)₇-CO)-Phe-Phe-(NH-CH₂-CH(NH₂)-CO)-Asp-Cys-(SEQ ID NO:3)，经其巯基与所述靶向部分连接。

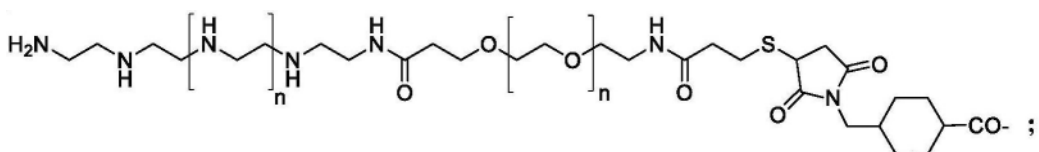
[0225] 13. 如项目1至12中任一项所述的多聚物，其中所述聚合缀合物是与所述靶向部分连接的式(i)-(viii)的双缀合物：

[0226] (i)

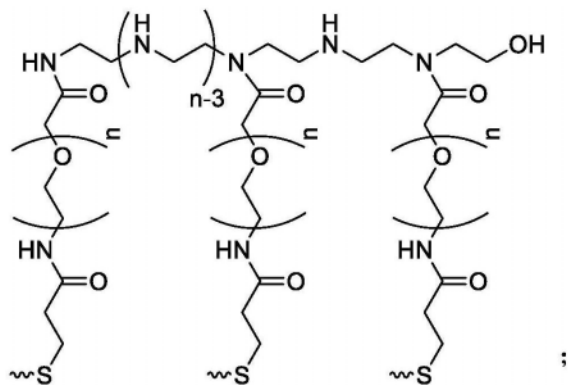


[0227] (ii)

[0228]

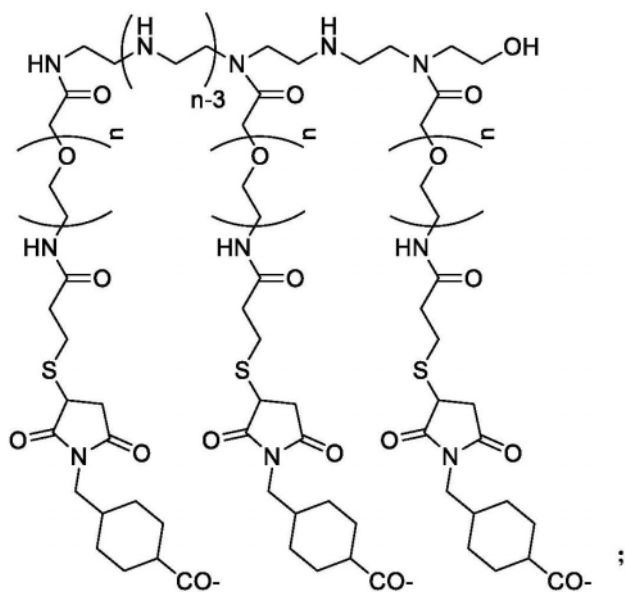
[0229] (iii) - (NH- (CH₂)₇-CO) -Phe-Phe- (NH-CH₂-CH(NH₂)-CO) -Asp-Cys-PEG_{2k}-LPEI;[0230] (iv) - (NH- (CH₂)₇-CO) -Phe-Gly-Trp-Trp-Gly-Cys-PEG_{2k}-LPEI;

[0231] (v)



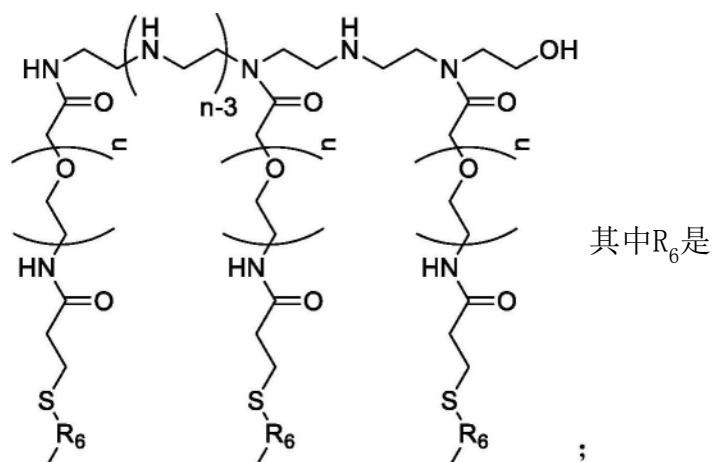
[0232] (vi)

[0233]

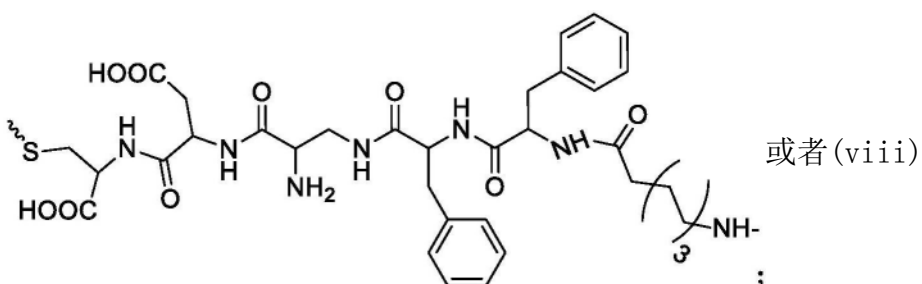


[0234]

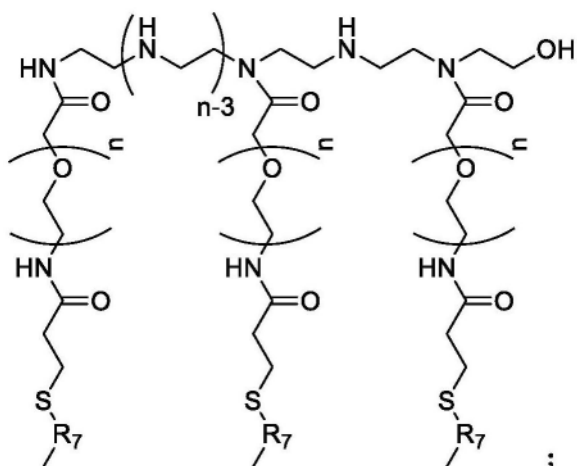
(vii)



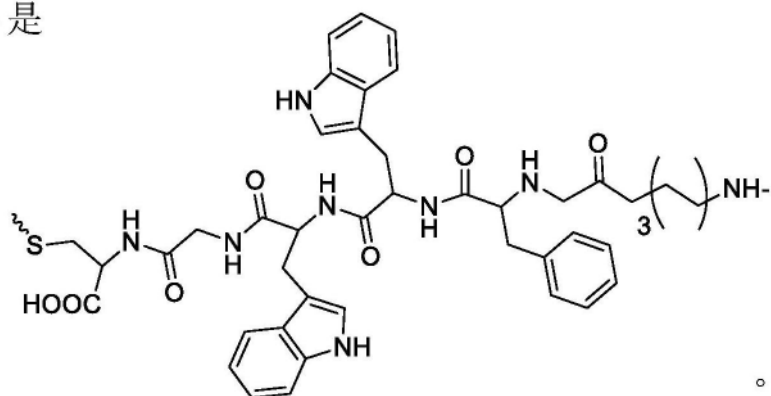
[0235]



[0236]

其中 R_7 是

[0237]



[0238] 14. 如项目13所述的多聚物, 其中

[0239] (a) 所述靶向部分是HER2亲和体, 以及所述聚合缀合物是式13(i)的缀合物, 以及所述HER2亲和体经其巯基连接;

[0240] (b) 所述靶向部分是HER2亲和体, 以及所述聚合缀合物是式13(v)的缀合物, 以及

所述HER2亲和体经其巯基连接；

[0241] (c) 所述靶向部分是EGFR亲和体,以及所述聚合缀合物是式13(i)的缀合物,以及所述EGFR亲和体经其巯基连接；

[0242] (d) 所述靶向部分是EGFR亲和体,以及所述聚合缀合物是式13(v)的缀合物,以及所述EGFR亲和体经其巯基连接；

[0243] (e) 所述靶向部分是hEGF,以及所述聚合缀合物是式13(ii)的缀合物,其中所述hEGF经其氨基基团连接；

[0244] (f) 所述靶向部分是hEGF,以及所述聚合缀合物是式13(vi)的缀合物,其中所述hEGF经其氨基基团连接；

[0245] (g) 所述靶向部分是 $\text{H00C}(\text{CH}_2)_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-NH-CO-NH-CH}(\text{COOH})\text{-(CH}_2)_2\text{-CO-}$ (DUPA残基),以及所述聚合缀合物是式13(iii)的缀合物；

[0246] (h) 所述靶向部分是 $\text{H00C}(\text{CH}_2)_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-NH-CO-NH-CH}(\text{COOH})\text{-(CH}_2)_2\text{-CO-}$ (DUPA残基),以及所述聚合缀合物是式13(vii)的缀合物；

[0247] (i) 所述靶向部分是 $\text{H00C}(\text{CH}_2)_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-NH-CO-NH-CH}(\text{COOH})\text{-(CH}_2)_2\text{-CO-}$ (DUPA残基),以及所述聚合缀合物是式13(iv)的缀合物;或者

[0248] (j) 所述靶向部分是 $\text{H00C}(\text{CH}_2)_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-NH-CO-NH-CH}(\text{COOH})\text{-(CH}_2)_2\text{-CO-}$ (DUPA残基),以及所述聚合缀合物是式13(viii)的缀合物。

[0249] 15. 如项目14所述的多聚物,其中所述EGFR亲和体是如SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列,以及所述HER2亲和体是如SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列。

[0250] 16. 药物组合物,其包含药学可接受的载体和项目1至15中任一项所述的多聚物。

[0251] 17. 用于治疗选自以下癌症的项目2至15中任一项所述的多聚物或项目16所述的药物组合物:以EGFR过表达的细胞为特点的癌症、以HER2过表达的细胞为特点的癌症和前列腺癌。

[0252] 18. 如项目17所述的多聚物,其中所述以EGFR过表达的细胞为特点的癌症选自:非小细胞肺癌、乳腺癌、恶性胶质瘤、头颈部鳞状细胞癌、结肠直肠癌、腺癌、卵巢癌、膀胱癌或前列腺癌、以及以上的转移性肿瘤。

[0253] 19. 如项目18所述的多聚物,其中所述多聚物如在项目14(c)、14(d)、14(e)或14(f)中所限定的。

[0254] 20. 如项目17所述的多聚物,其中所述以HER2过表达的细胞为特点的癌症选自:乳腺癌、卵巢癌、胃癌和子宫癌的侵略性形成,如子宫内膜浆液性癌。

[0255] 21. 如项目20所述的多聚物,其中所述以HER2过表达的细胞为特点的癌症是耐赫赛汀/曲妥单抗的癌症。

[0256] 22. 如项目20或21所述的多聚物,其中所述多聚物如在项目14(a)、(b)、(e)或(f)中所限定的。

[0257] 23. 如项目17所述的多聚物,其中所述癌症是前列腺癌以及所述多聚物如在项目14(g)、(h)、(i)或(j)中所限定的。

[0258] 24. 用于治疗癌症的方法,所述癌症选自:以EGFR过表达的细胞为特点的癌症、通过HER2-过表达细胞表征的癌症和前列腺癌,所述方法包括向需要的对象施用项目2至15中任一项所述的多聚物。

[0259] 25. 药物组合物,其包含药学可接受的载体和项目2至15中任一项所述的多聚物,用于治疗选自以下癌症:以EGFR过表达的细胞为特点的癌症、以HER2过表达的细胞为特点的癌症和前列腺癌,所述药物组合物。

[0260] 26. 与免疫细胞联合使用的项目17至23中任一项所述的多聚物,项目24所述的方法,或者项目25所述的药物组合物。

[0261] 27. 如项目26所述的多聚物、方法或药物组合物,其中所述免疫细胞是肿瘤浸润T细胞(T-TIL)、肿瘤特异性工程化T细胞或外周血单个核细胞(PBMC)。

[0262] 参考文献

[0263] 1.Boussif,O.,et al.,A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo:polyethylenimine.Proc Natl Acad Sci U S A,1995.92(16):p.7297-301.

[0264] 2.Wagner,E.,et al.,Transferrin-polycation-DNA complexes:the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells.Proc Natl Acad Sci U S A,1991.88(10):p.4255-9.

[0265] 3.Little,S.R.,et al.,Poly-beta amino ester-containing microparticles enhance the activity of nonviral genetic vaccines.Proc Natl Acad Sci U SA, 2004.101(26):p.9534-9.

[0266] 4.Davis,M.E.,Z.G.Chen,and D.M.Shin,Nanoparticle therapeutics:an emerging treatment modality for cancer.Nat Rev Drug Discov,2008.7(9):p.771-82.

[0267] 5.Remy,J.S.,et al.,Targeted gene transfer into hepatoma cells withlipopolyamine-condensed DNA particles presenting galactose ligands:astage toward artificial viruses.Proc Natl Acad Sci U S A,1995.92(5):p.1744-8.

[0268] 6.Jager,M.,et al.,Branched and linear poly(ethylene imine)-basedconjugates:synthetic modification,characterization,and application.Chem Soc Rev,2012.41(13):p.4755-67.

[0269] 7.Ziebarth,J.D.and Y.Wang,Understanding the protonationbehavior of linear polyethylenimine in solutions through Monte Carlosimulations.Biomacromolecules,2010.11(1):p.29-38.

[0270] 8.Hobel,S.,et al.,Maltose-and maltotriose-modified,hyperbranched poly(ethylene imine)s(OM-PEIs):Physicochemical andbiological properties of DNA and siRNA complexes.J Control Release,2011.149(2):p.146-58.

[0271] 9.Rejman,J.,A.Bragonzi,and M.Conese,Role of clathrin-andcaveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo-andpolyplexes.Mol Ther,2005.12(3):p.468-74.

[0272] 10.Behr,J.P.,The proton sponge:A trick to enter cells the virusesdid not exploit.Chimia,1997.51(1-2):p.34-36.

[0273] 11.Suh,J.,H.J.Paik,and B.K.Hwang,Ionization ofPoly(Ethylenimine)and Poly(Allylamine)at Various Phs.BioorganicChemistry,1994.22(3):p.318-327.

- [0274] 12.Ogris,M.,et al.,PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes:reduced interaction with blood components,extended circulation in bloodand potential for systemic gene delivery.Gene Ther,1999.6(4):p.595-605.
- [0275] 13.Schaffert,D.,et al.,Poly (I:C) -mediated tumor growthsuppression in EGF-receptor overexpressing tumors usingEGF-polyethylene glycol-linear polyethylenimine as carrier.Pharm Res,2011.28(4):p.731-41.
- [0276] 14.Nilsson,B.,et al.,A synthetic IgG-binding domain based onstaphylococcal protein A.Protein Eng,1987.1(2):p.107-13.
- [0277] 15.Lofblom,J.,et al.,affibody molecules:engineered proteins fortherapeutic,diagnostic and biotechnological applications.FEBS Lett, 2010.584(12):p.2670-80.
- [0278] 16.Brissault,B.,et al.,Synthesis,characterization,and genettransfer application of poly(ethylene glycol-b-ethylenimine)with highmolar mass polyamine block.Biomacromolecules,2006.7(10):p.2863-70.
- [0279] 17.Ungaro,F.,et al.,Spectrophotometric determination ofpolyethylenimine in the presence of an oligonucleotide for thecharacterization of controlled release formulations.J Pharm Biomed Anal, 2003.31(1):p.143-9.
- [0280] 18.Gebhart,C.L.,et al.,Design and formulation of polyplexesbased on pluronic-polyethyleneimine conjugates for gene transfer.Bioconjug Chem, 2002.13(5):p.937-44.
- [0281] 19.Dent,M.F.,et al.,The methylene blue colorimetric microassayfor determining cell line response to growth factors.Cytotechnology,1995.17(1): p.27-33.
- [0282] 20.Eigenbrot,C.,et al.,Structural basis forhigh-affinityHer2receptor binding by an engineered protein.Proc NatlAcad Sci U S A,2010.107(34): p.15039-44.
- [0283] 21.Ogris,M.,et al.,The size of DNA/transferrin-PEI complexes isan important factor for gene expression in cultured cells.Gene Ther,1998.5(10): p.1425-33.
- [0284] 22.Chollet,P.,et al.,Side-effects of a systemic injection of linearpolyethylenimine-DNA complexes.J Gene Med,2002.4(1):p.84-91.
- [0285] 23.Champion,J.A.,Y.K.Katare,and S.Mitragotri,Particle shape:A new design parameter for micro-and nanoscale drug delivery carriers.Journal of Controlled Release,2007.121(1-2):p.3-9.
- [0286] 24.Kleemann,E.,et al.,Nano-carriers for DNA delivery to thelung based upon a TAT-derived peptide covalently coupled to PEG-PEI.JControl Release, 2005.109(1-3):p.299-316.
- [0287] 25.Rudolph,C.,et al.,Nonviral gene delivery to the lung

with copolymer-protected and transferrin-modified polyethylenimine. *Biochim Biophys Acta*, 2002.1573(1):p.75-83.

[0288] 26. Aguilar, Z., et al., Biologic effects of heregulin/neurodifferentiation factor on normal and malignant human breast and ovarian epithelial cells. *Oncogene*, 1999.18(44):p.6050-62.

[0289] 27. Park, J.W., et al., Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery. *Clin Cancer Res*, 2002.8(4):p.1172-81.

[0290] 28. Rabenstein, D.L., Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat Prod Rep*, 2002.19(3):p.312-31.

[0291] 29. Seib, F.P., A.T. Jones, and R. Duncan, Comparison of the endocytic properties of linear and branched PEIs, and cationic PAMAM dendrimers in B16f10 melanoma cells. *J Control Release*, 2007.117(3):p.291-300.

[0292] 30. Jeong, G.J., et al., Biodistribution and tissue expression kinetics of plasmid DNA complexed with polyethylenimines of different molecular weight and structure. *J Control Release*, 2007.118(1):p.118-25.

[0293] 31. Kawakami, S., et al., Evaluation of proinflammatory cytokine production induced by linear and branched polyethylenimine/plasmid DNA complexes in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006.317(3):p.1382-90.

[0294] 32. Goula, D., et al., Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung. *Gene Ther*, 1998.5(9):p.1291-5.

[0295] 33. Bragonzi, A., et al., Comparison between cationic polymers and lipids in mediating systemic gene delivery to the lungs. *Gene Ther*, 1999.6(12):p.1995-2004.

[0296] 34. Lee, K., et al., Pluronic/polyethylenimine shell crosslinked nanocapsules with embedded magnetite nanocrystals for magnetically triggered delivery of siRNA. *Macromol Biosci*, 2010.10(3):p.239-45.

[0297] 35. Zheng, M., et al., Poly(ethylene oxide) grafted with short polyethylenimine gives DNA polyplexes with superior colloidal stability, low cytotoxicity, and potent in vitro gene transfection under serum conditions. *Biomacromolecules*, 2012.13(3):p.881-8.

[0298] 36. Petersen, H., et al., Polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) copolymers: influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system. *Bioconjug Chem*, 2002.13(4):p.845-54.

[0299] 37. Champion, J.A., Y.K. Katare, and S. Mitragotri, Particle shape: a new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. *J Control Release*, 2007.121(1-2):p.3-9.

[0300] 38. Liu, Y., et al., The shape of things to come: importance of design in nanotechnology for drug delivery. *Ther Deliv*, 2012.3(2):p.181-94.

- [0301] 39.Kloeckner,J.,et al.,Photochemically enhanced gene delivery of EGF receptor-targeted DNA polyplexes.J Drug Target,2004.12(4):p.205-13.
- [0302] 40.Kircheis,R.,et al.,Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application.Gene Ther,2001.8(1):p.28-40.
- [0303] 41.Ogris,M.,et al.,DNA/polyethylenimine transfection particles: influence of ligands,polymer size,and PEGylation on internalization and gene expression.AAPS PharmSci,2001.3(3):p.E21。

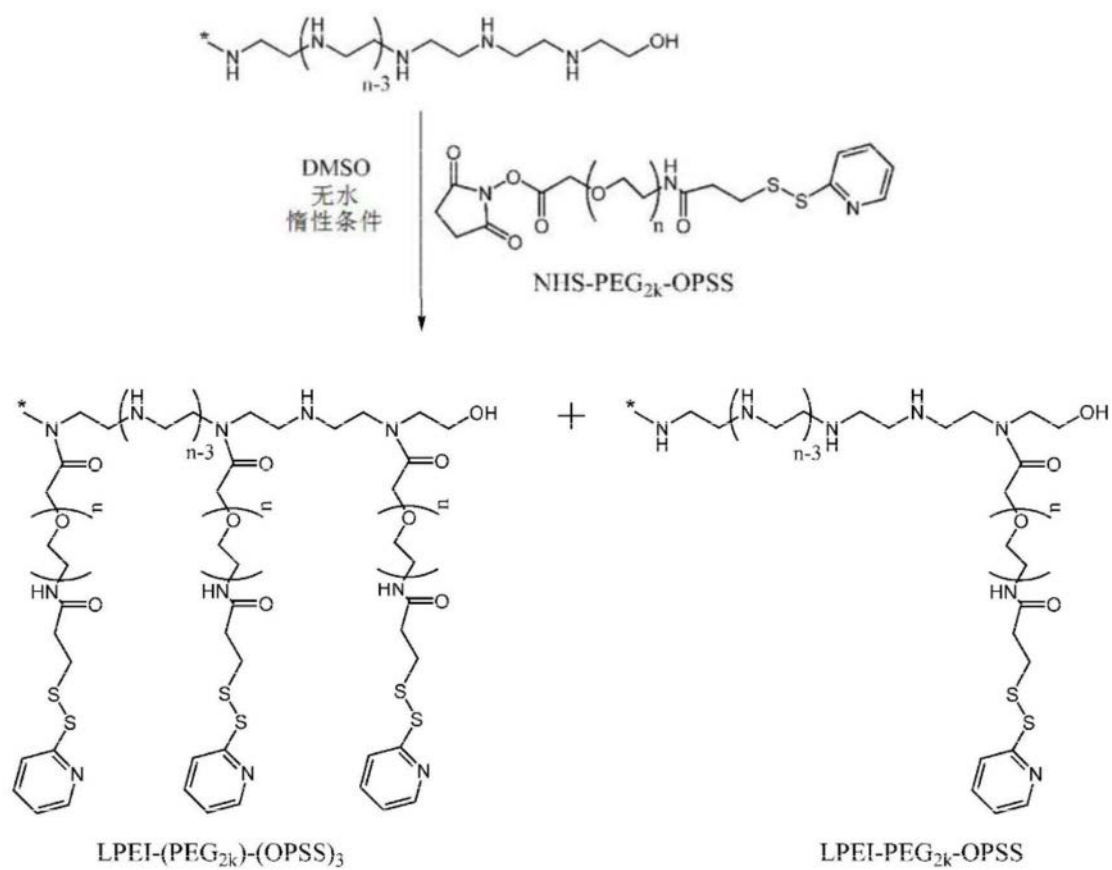


图1

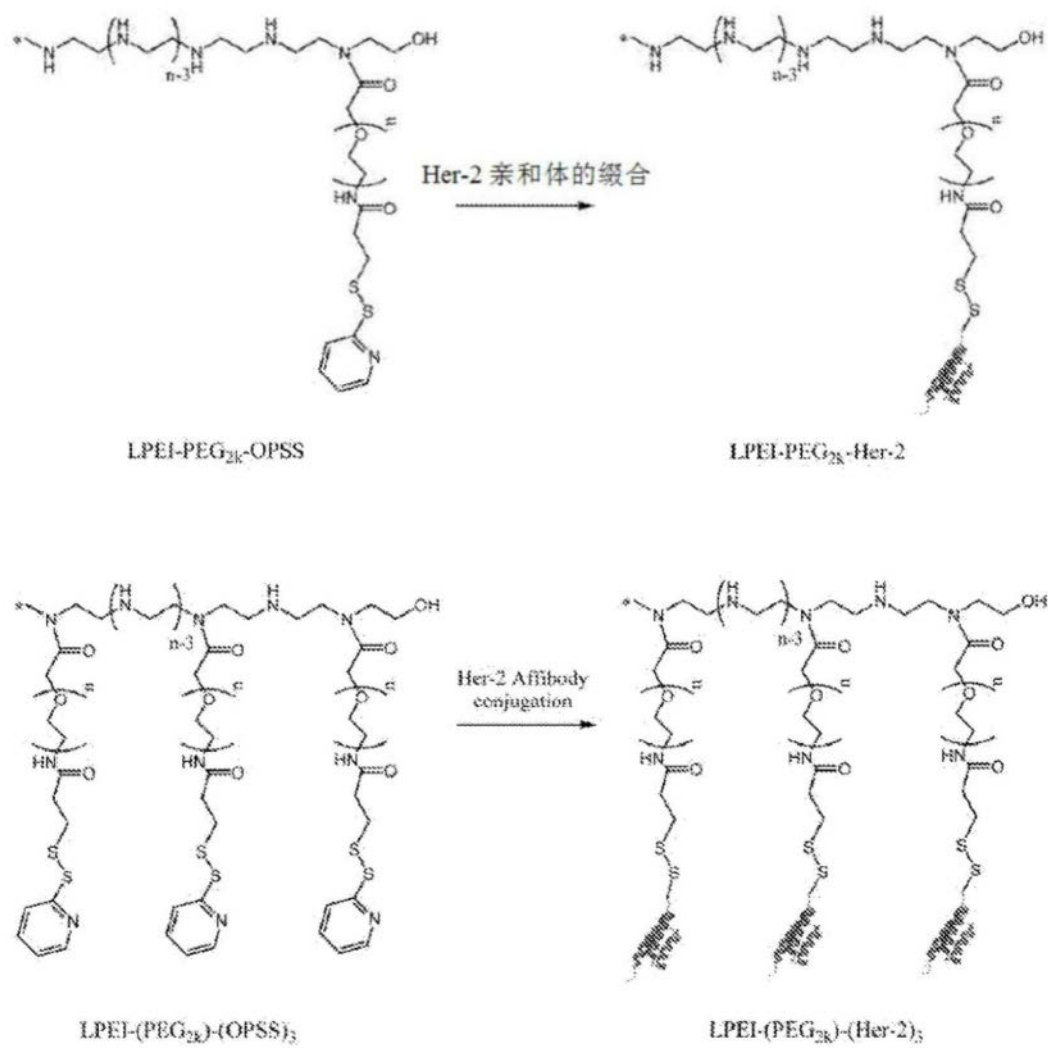


图3

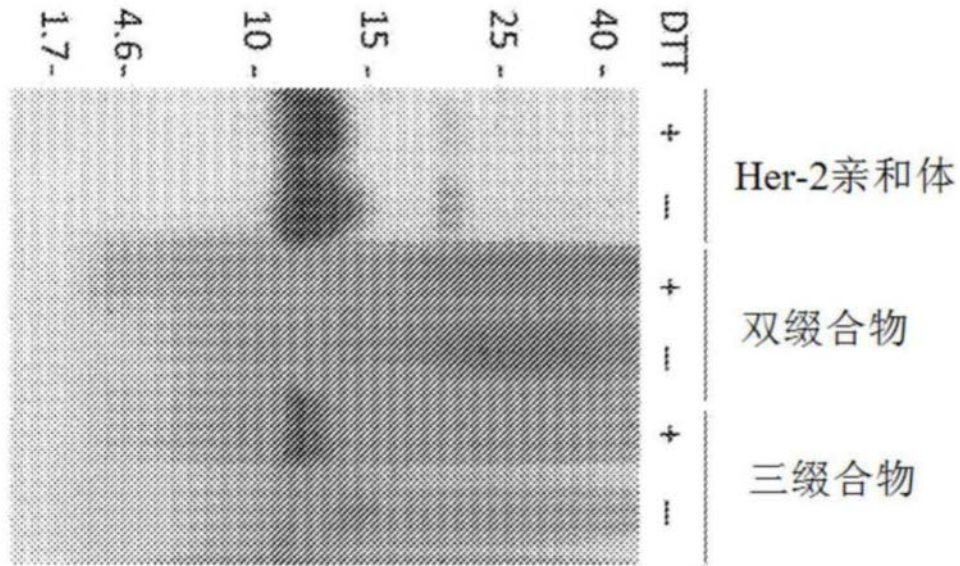


图4

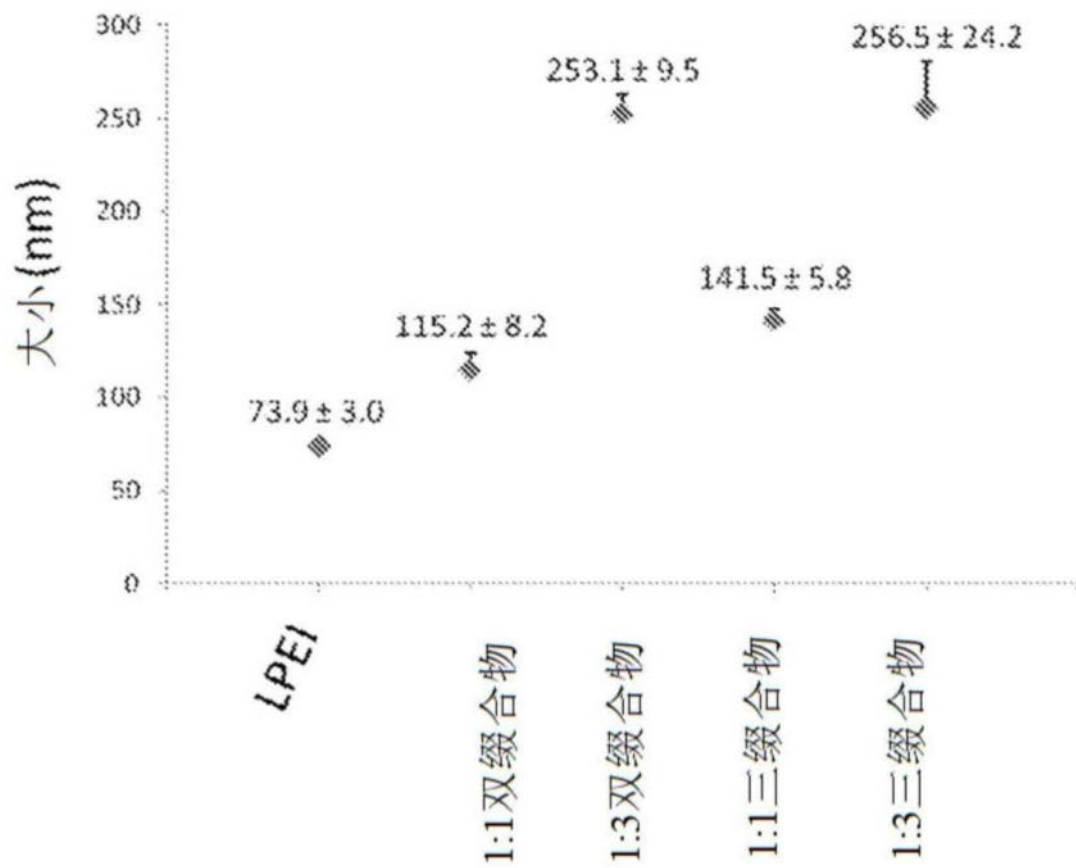


图5

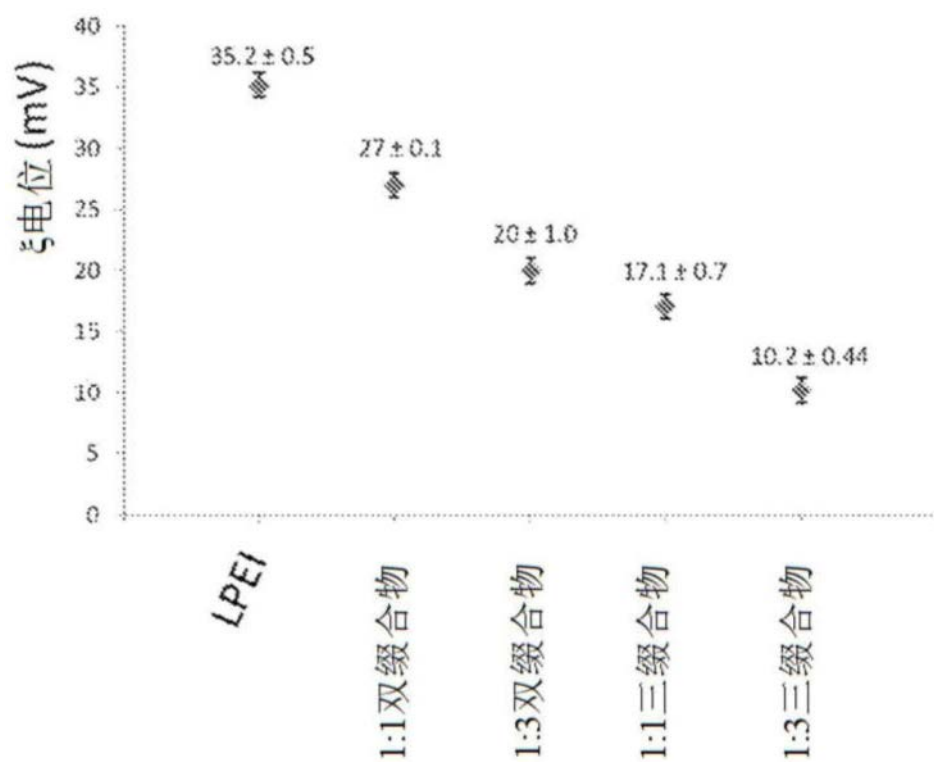


图6

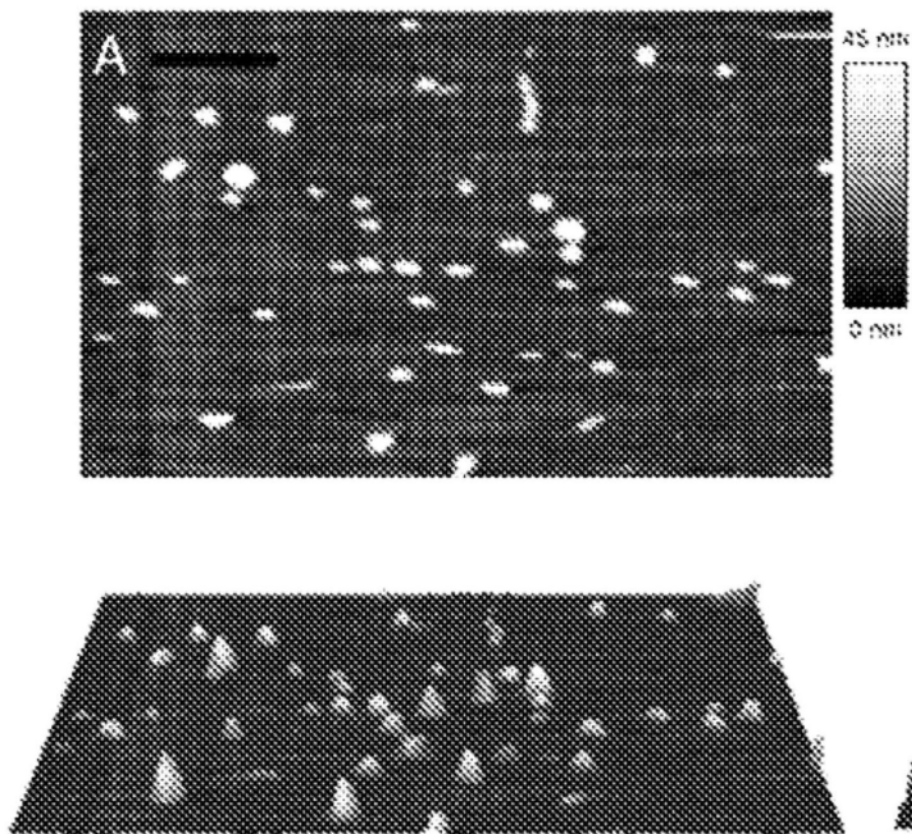


图7A

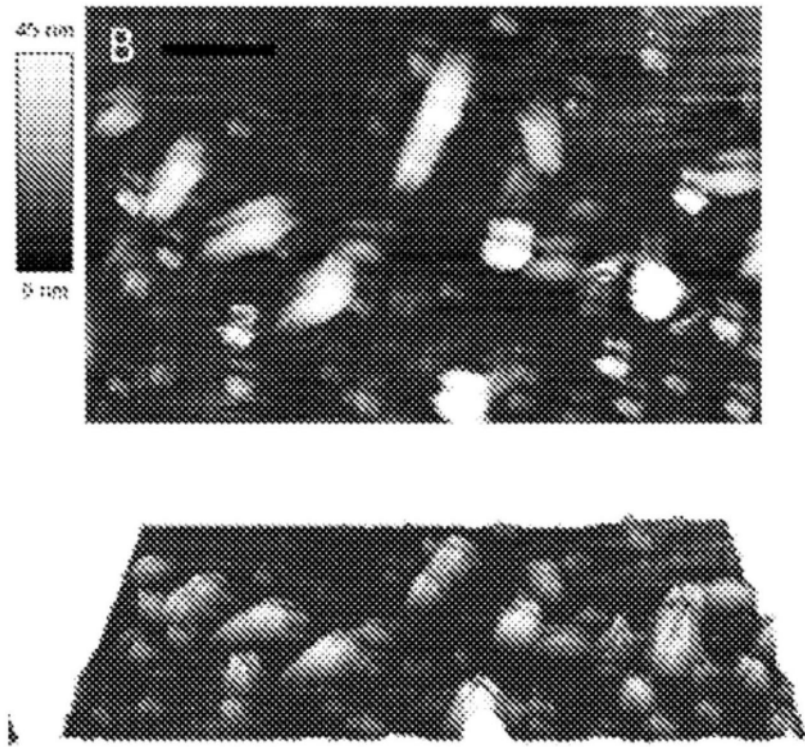


图7B

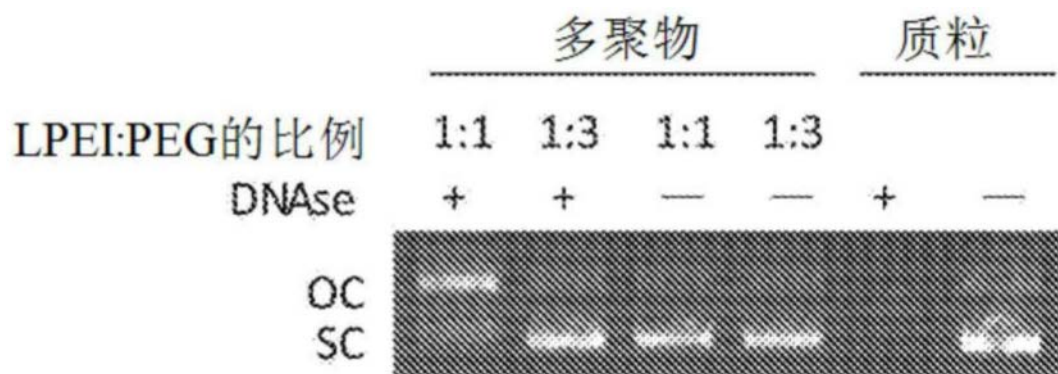


图8

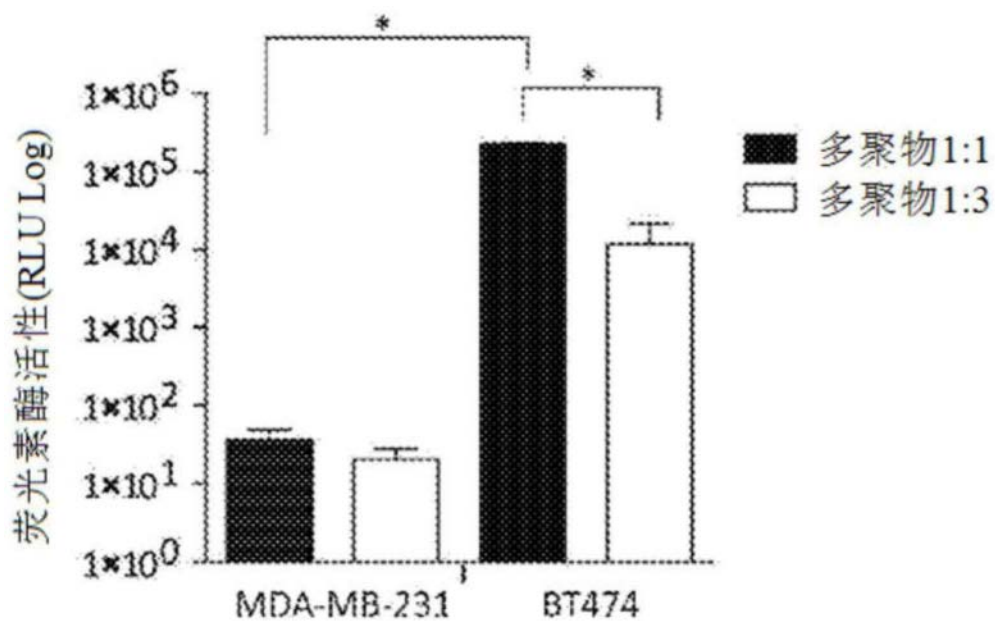


图9A

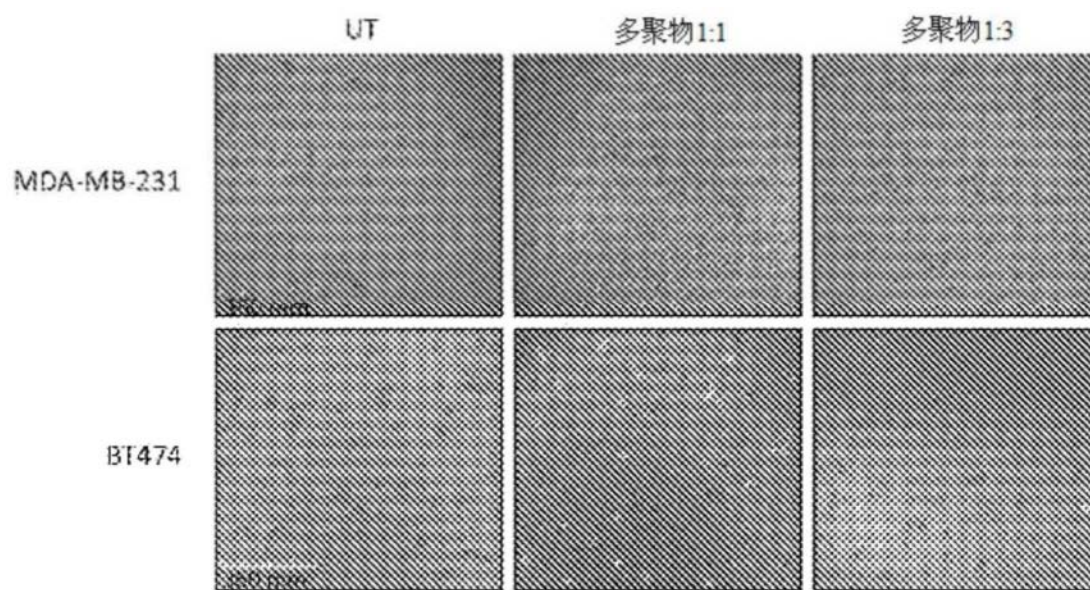


图9B

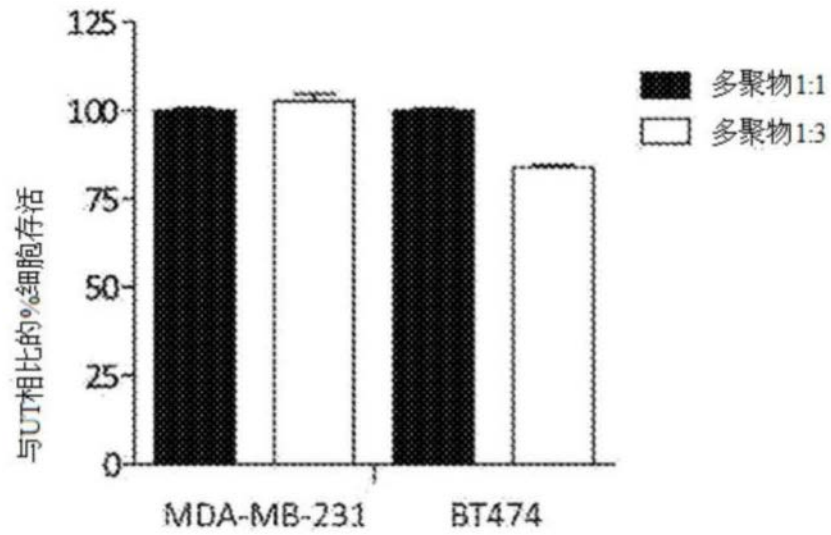


图9C

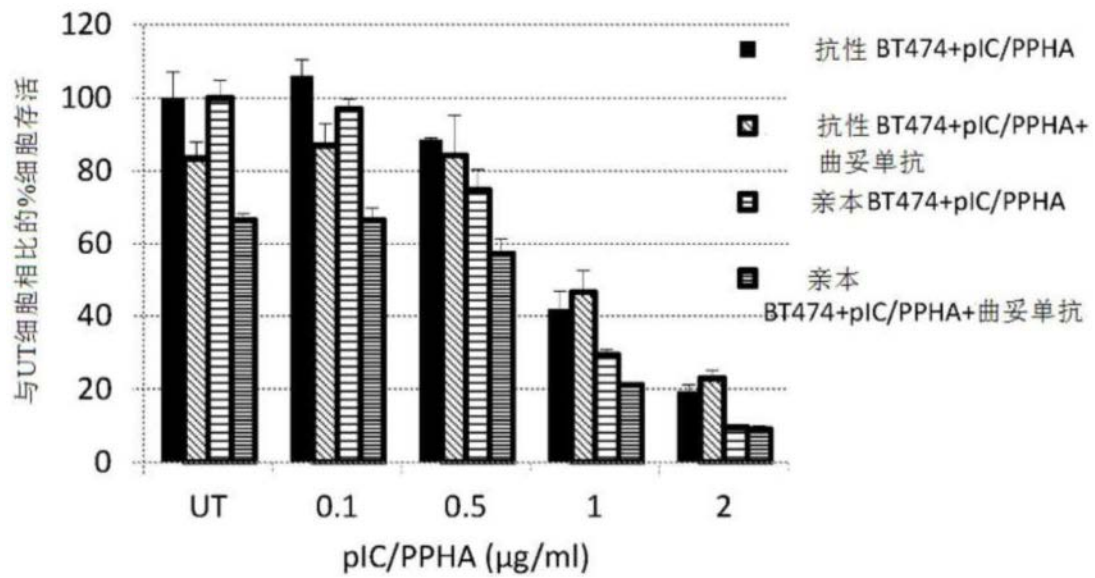


图10

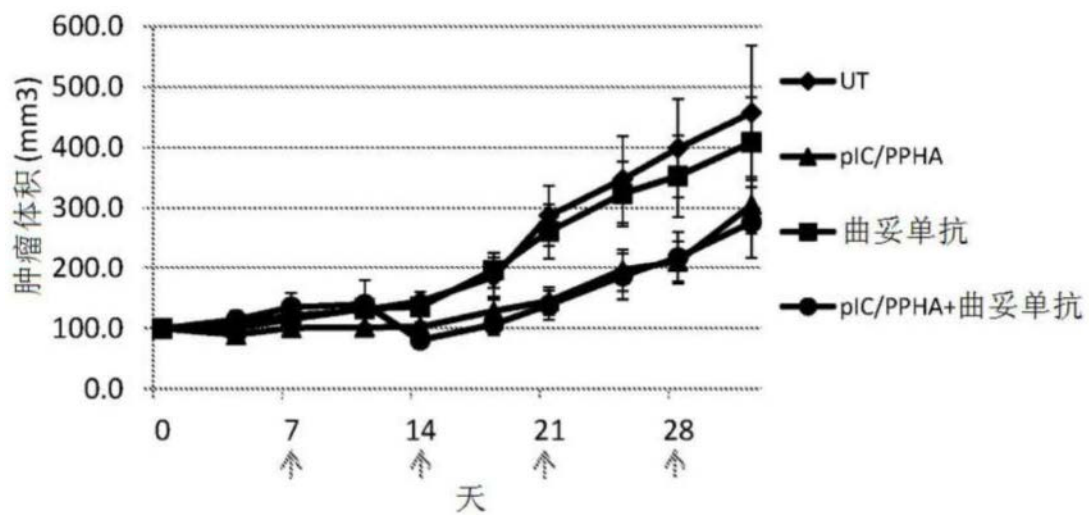


图11

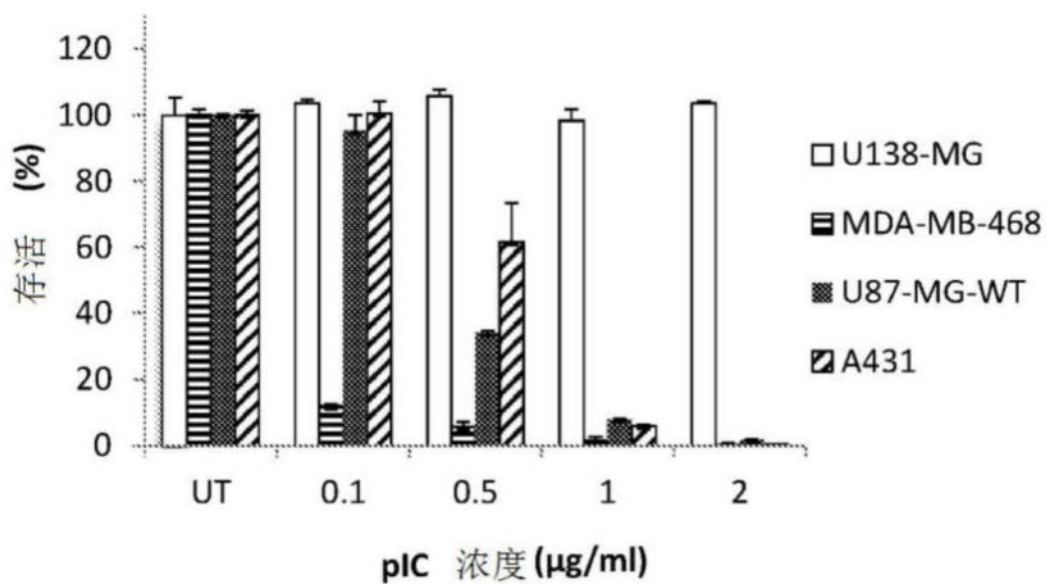


图12A

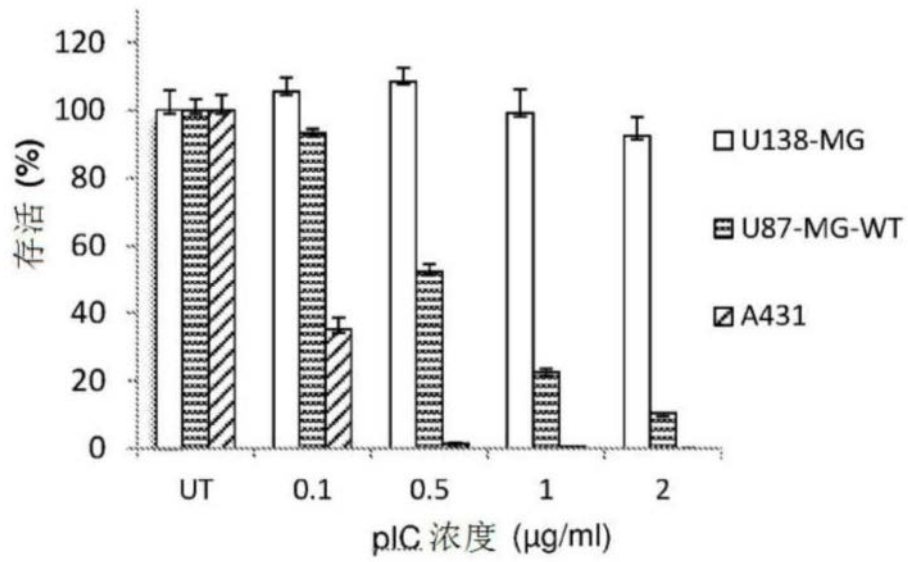


图12B

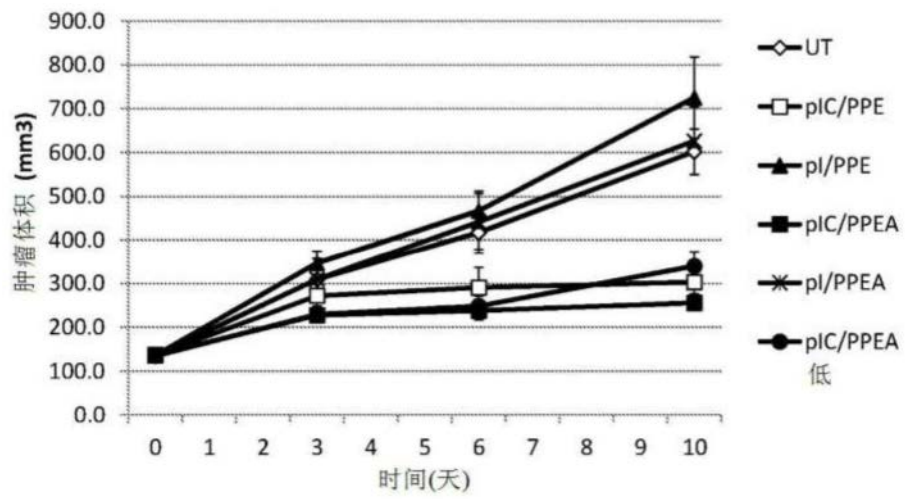


图13

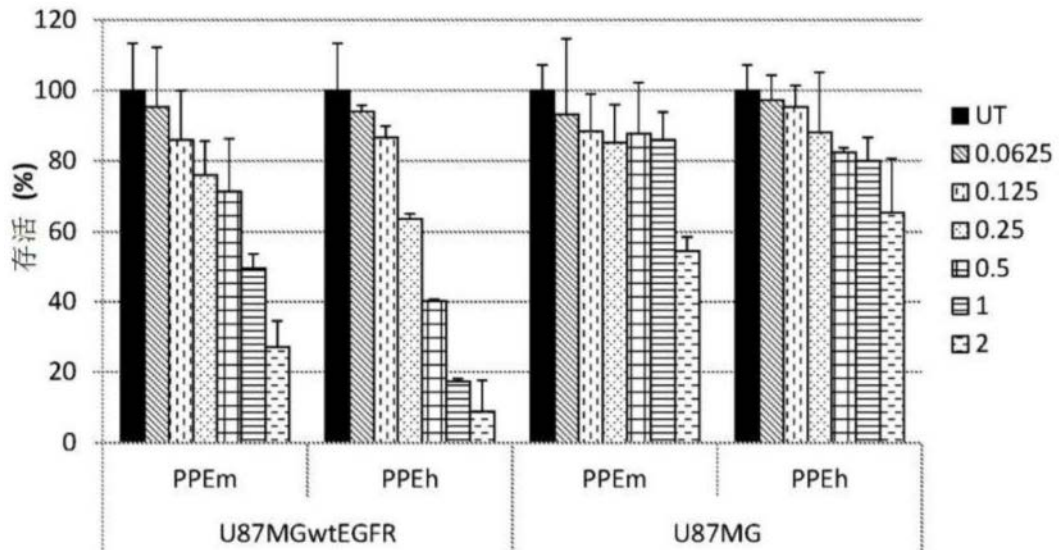


图14

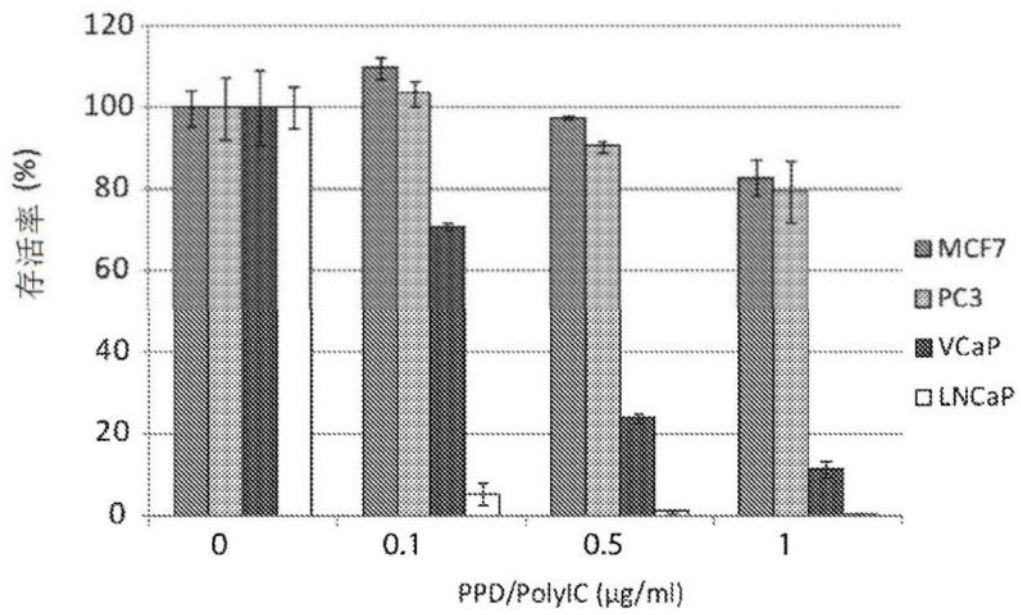


图15

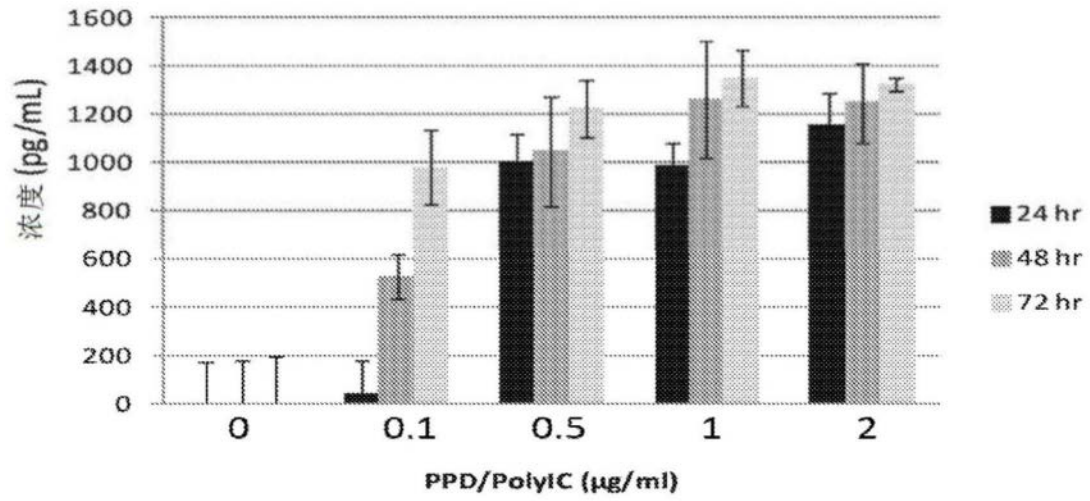


图16A

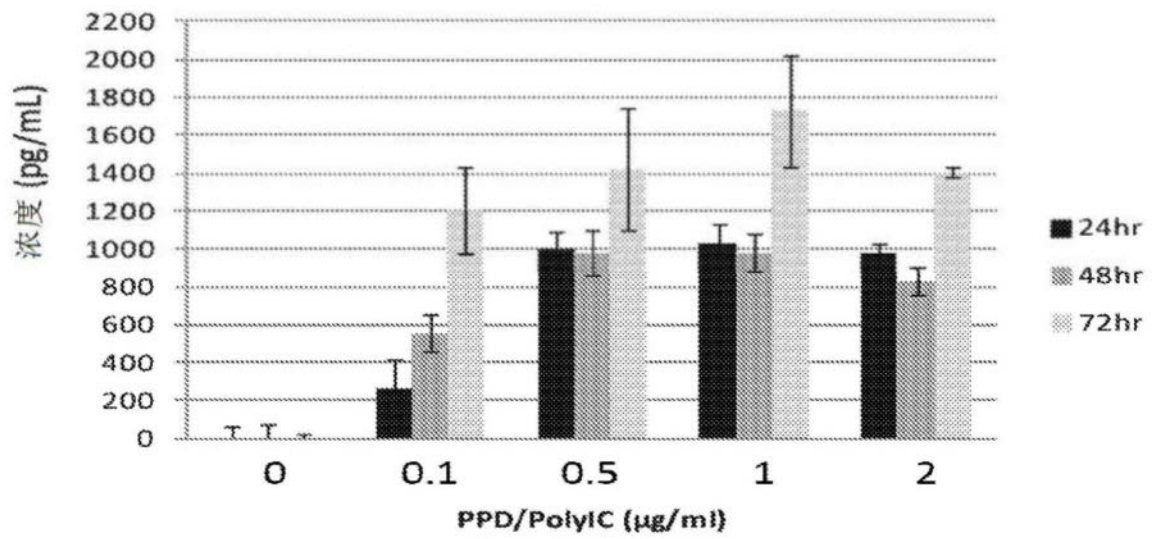


图16B

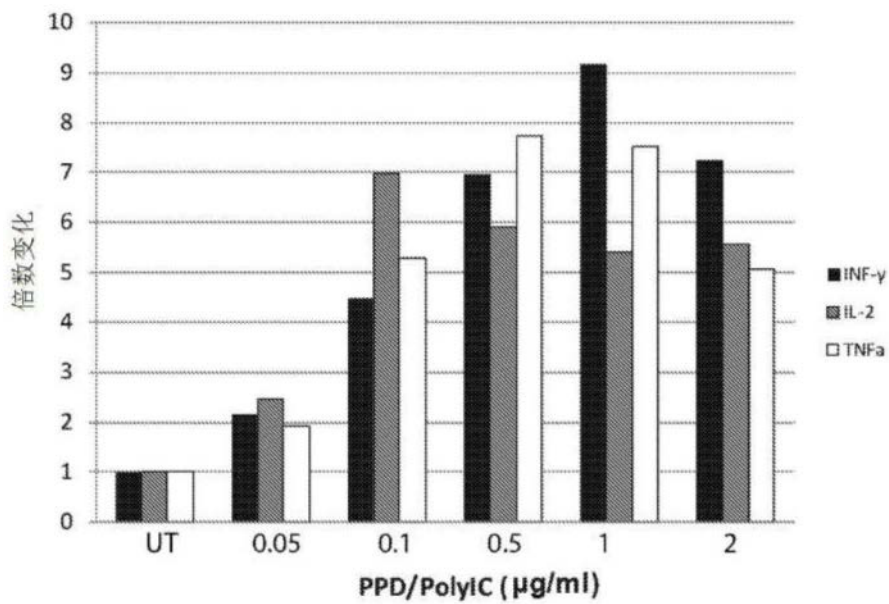


图17

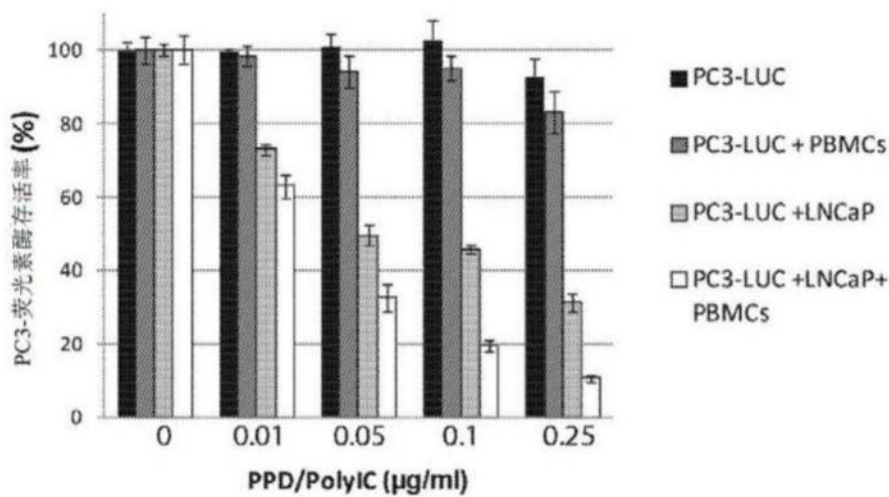


图18

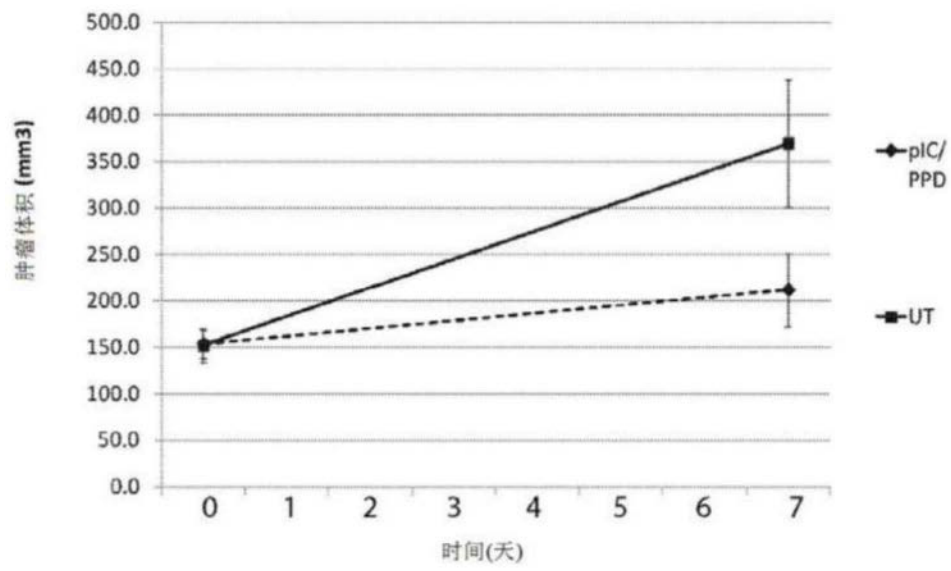


图19