



(21)申請案號：105102366

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 01 月 26 日

(51)Int. Cl.：

A61K47/34 (2006.01)

A61K47/48 (2006.01)

G01N33/52 (2006.01)

G01N33/533 (2006.01)

C08G73/00 (2006.01)

(30)優先權：2015/01/26 美國

62/108,034

(71)申請人：國立交通大學(中華民國) NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY (TW)

新竹市大學路 1001 號

(72)發明人：李耀坤 LI, YAW KUEN (TW)；沈模沅 SHEN, MO YUAN (TW)

(74)代理人：李世章；秦建譜

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：11 項 圖式數：4 共 26 頁

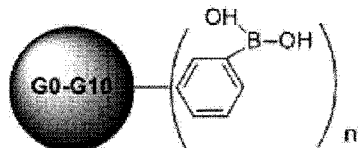
(54)名稱

樹狀化合物、具有功能性基團的樹狀化合物以及抗體

DENDRIMER, DENDRIMER HAVING FUNCTIONAL GROUP AND ANTIBODY

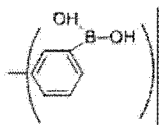
(57)摘要

一種樹狀化合物，以化學式(I)表示：

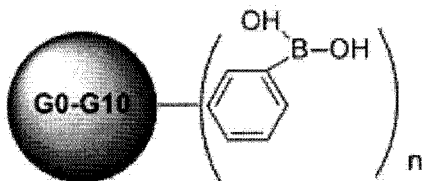


化學式(I)

其中 G0-G10 表示第 0 代至第 10 代的樹狀化合物(dendrimer)，樹狀化合物包含多個分支，各分

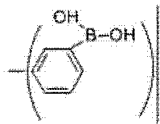
支包含末端基 ；以及 n 為 4 至 4096 的整數。

A dendrimer represented by formula (I):



formula (I);

wherein G0-G10 representing a generation 0-10 dendrimer, the dendrimer has a plurality of branches, and

each branch having a terminal group , wherein n is an integer of 4-4096.

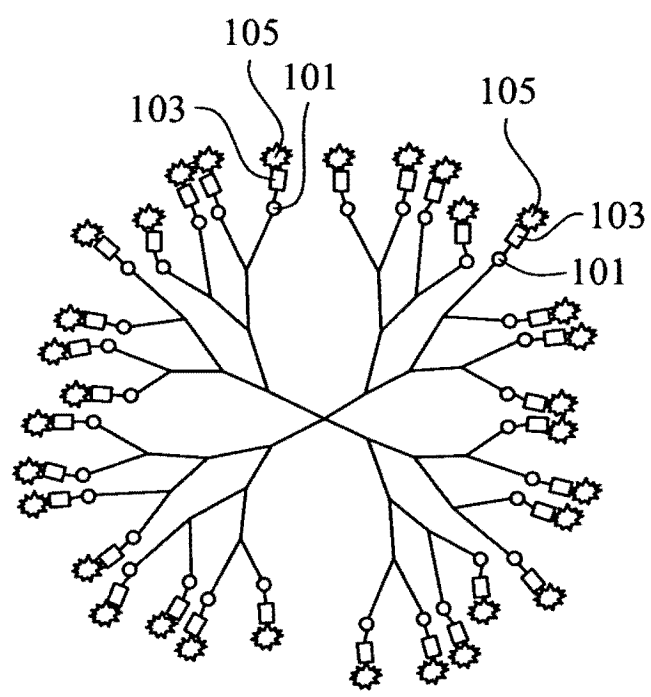
指定代表圖：

符號簡單說明：

101 . . . 胺基

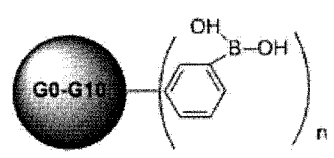
103 . . . 苯硼酸

105 . . . 多巴胺衍生物、藥物、螢光分子



第 1C 圖

特徵化學式：



其中 G0-G10 表示第 0 代至第 10 代的樹狀化合物 (dendrimer)，樹狀化合物包含多個分支，各分支包含末端

基 $\left(\text{C}_6\text{H}_4\text{B(OH)}_2 \right)_n$ ；以及 n 為 4 至 4096 的整數。

【發明摘要】

【中文發明名稱】樹狀化合物、具有功能性基團的樹狀化合物

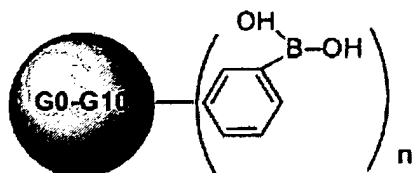
以及抗體

【英文發明名稱】DENDRIMER, DENDRIMER

HAVING FUNCTIONAL GROUP AND ANTIBODY

【中文】

一種樹狀化合物，以化學式(I)表示：



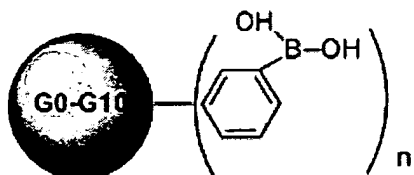
化學式(I)

其中 G0-G10 表示第 0 代至第 10 代的樹狀化合物 (dendrimer)，樹狀化合物包含多個分支，各分支包含末端

基 ；以及 n 為 4 至 4096 的整數。

【英文】

A dendrimer represented by formula (I):



formula (I);

wherein G0-G10 representing a generation 0-10 dendrimer, the dendrimer has a plurality of branches, and each branch having a terminal

group , wherein n is an integer of 4-4096.

【指定代表圖】 第(1C)圖

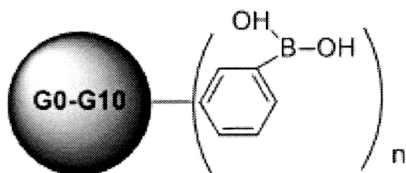
【代表圖之符號簡單說明】

101-胺基

103-苯硼酸

105-多巴胺衍生物、藥物、螢光分子

【特徵化學式】



其中 G0-G10 表示第 0 代至第 10 代的樹狀化合物 (dendrimer)，樹狀化合物包含多個分支，各分支包含末端

基 $\left(\text{C}_6\text{H}_4\text{B(OH)}_2 \right)$ ；以及 n 為 4 至 4096 的整數。

【發明說明書】

【中文發明名稱】樹狀化合物、具有功能性基團的樹狀化合物以及抗體

【英文發明名稱】DENDRIMER, DENDRIMER
HAVING FUNCTIONAL GROUP AND ANTIBODY

【技術領域】

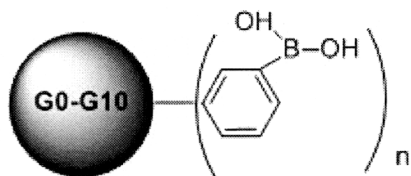
【0001】 本發明係有關一種樹狀化合物、具有功能性基團的樹狀化合物以及包含上述具有功能性基團的樹狀化合物的抗體。

【先前技術】

【0002】 樹狀化合物(dendrimer)是從中心延伸出許多像樹枝一般結構的支鏈的一種高分子聚合物。主要分成三個部分，分別為核心部分、從核心延伸的支鏈層和最外層的末端基團。樹狀化合物可使用發散法(divergent)或收斂法(convergent)合成。由於樹狀化合物的獨特性質引起相關領域普遍關注，主要包括以下幾個方面：結構規整、相對分子質量可以控制、具有大量的表面末端基團以及高度的幾何對稱性。而樹狀化合物最外層的末端基團提供了許多表面改質以及應用的可能，以解決或增強標靶藥物的投放以及免疫螢光染色的技術問題。

【發明內容】

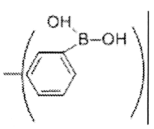
【0003】 根據本發明之多個實施方式，係提供一種樹狀化合物，其以化學式(I)表示：



化學

式(I)

其中 G0-G10 表示第 0 代至第 10 代的樹狀化合物 (dendrimer)，樹狀化合物包含多個分支，各分支包含末端

基 ；以及 n 為 4 至 4096 的一整數。

【0004】 在某些實施方式中，樹狀化合物為聚醯胺-胺樹狀化合物。

【0005】 根據本發明之多個實施方式，係提供一種聚醯胺-胺樹狀化合物，此聚醯胺-胺樹狀化合物包含多個分支，且各分支具有苯硼酸之末端基。

【0006】 本發明之多個實施方式，係提供一種具有功能性基團的樹狀化合物。此具有功能性基團的樹狀化合物包含一聚醯胺-胺樹狀化合物以及多個第一功能性基團。聚醯胺-胺樹狀化合物包含多個分支，且各分支具有苯硼酸末端基。所述第一功能性基團鍵結於至少一部分的所述苯硼酸末端基上。

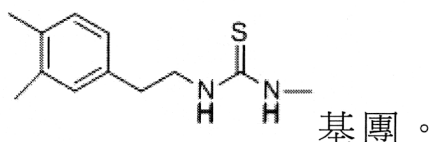
【0007】 在某些實施方式中，各第一功能性基團包含一藥物基團、一螢光基團、一胜肽基團或一多巴胺衍生物基團。

【0008】 在某些實施方式中，各第一功能性基團包含一藥物基團，且藥物基團為阿黴素。

【0009】 在某些實施方式中，各第一功能性基團包含一螢光基團，且螢光基團包含一螢光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 基團或一花青染劑 (Cyanine dye) 基團。

【0010】 在某些實施方式中，各第一功能性基團包含一胜肽基團，且胜肽基團對上皮細胞生長激素接受體 (EGFR) 具有辨識能力。

【0011】 在某些實施方式中，各第一功能性基團包含



【0012】 在某些實施方式中，所述之具有功能性基團的樹狀化合物更包含多個第二功能性基團，其中各第一功能性基團包含對抗原具辨識能力的一胜肽基團，且各第二功能性基團包含一藥物基團或一螢光基團。

【0013】 根據本發明之多個實施方式，係提供一種抗體。此抗體包含前述之具有功能性基團的樹狀化合物。

【0014】 為使本發明之上述及其他目的、特徵和優點更明顯易懂，下文特舉出較佳實施例，並配合所附圖示詳細說明如下。

【圖式簡單說明】

【0015】

第1A-1C圖繪示根據本發明某些實施方式之製備裝載螢光分子或藥物的樹狀化合物之示意圖。

第2A圖繪示根據本發明多個的實施方式之經抗體修飾之裝載螢光分子樹狀化合物的反應示意圖

第2B圖為本發明一實施例與習知技術的螢光比較照片。

第2C圖為根據本發明一實施例之經抗體修飾之裝載螢光分子樹狀化合物之沙雷氏桿菌免疫染色圖及明場圖。

第2D圖為根據本發明一實施例經抗體修飾之裝載螢光分子樹狀化合物之肺炎鏈球菌免疫染色圖及明場圖。

第3A-3C圖為根據本發明一實施例之經抗體修飾之樹狀化合物裝載螢光分子Cy5之螢光強度照片。

第3D圖為本發明一實施例之經抗體修飾之裝載螢光分子Cy5樹狀化合物之肺炎鏈球菌免疫染色螢光圖。

第3E圖為第3D圖之明場圖。

第3F圖為第3D圖和第3E圖之疊合圖。

第4圖為本發明一實施例之裝載阿黴素的PBA-樹狀化合物的螢光強度照片。

【實施方式】

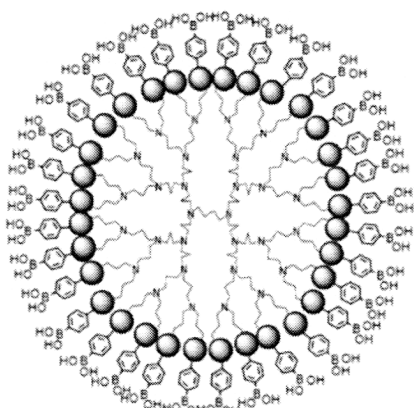
【0016】 以下將詳細討論本實施例的製造與使用，然而，應瞭解到，本發明提供實務的創新概念，其中可以用廣泛的各種特定內容呈現。底下討論的特定實施例僅為說明，並不能限制本發明的範圍。

【0017】 以下揭露提供了許多不同的實施方式或實施例，使描述之標的的各種特徵得以實現。下文描述了合成和應用的特定實例是爲了簡化本揭露。這些內容當然僅是例示而已，其意不在構成限制。

【0018】 以下提供數種關於具有高效率裝載螢光分子和藥物之生物修飾樹狀化合物及其形成之方法的實施例，其中說明形成生物修飾樹狀化合物之中間階段及各種不同實施例。

【0019】 第1A圖至第1C圖繪示根據本發明某些實施方式之製備裝載螢光分子或藥物的樹狀化合物之示意圖。首先，提供一種樹狀化合物，如第1A圖所示。樹狀化合物可例如爲具有數代 (Generation) 分支的聚醯胺 - 胺 (polyamidoamine, PAMAM) 樹狀化合物。具體的說，第0代G0爲中心基團，具有4個分支。從第0代的每一個分支衍生出兩個分支，而形成第1代G1的8個分支。從第1代的每一個分支再衍生出兩個分支，而形成第2代G2的16個分支。類似地，從第2代的每一個分支再衍生出兩個分支，而形成第2代G3有32個分支，依此類推。第1A圖繪示的樹狀化合物僅爲本發明的例示實施方式，其他的樹狀化合物仍可適用於本發明。根據本發明的多個實施方式，樹狀化合物可爲第0代、第1代、第2代、第3代、第4代、第5代、第5代、第7代、第8代、第9代或第10代的樹狀化合物(dendrimer)。在某些實施方式中，樹狀化合物的最外圍的分支連接基團101。在多個實施例中，基團101爲-NH₂基團。

【0020】 之後，如第1B圖所示，樹狀化合物與異硫氰酸酯苯硼酸(isothiocyanatophenylboronic acid)反應後在基團101上形成苯硼酸(phenylboronic acid,PBA)的末端基103，而形成具有苯硼酸末端基的樹狀化合物(PBA-樹狀化合物)。不同代數的樹狀化合物具有不同的分支數量。舉例而言，上述具有苯硼酸末端基的樹狀化合物可例如為以下化學式(II)表示之樹狀化合物。



化學式(II)

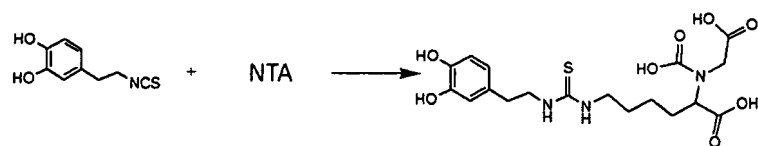
【0021】 以下敘述形成化學式(II)之樹狀化合物的具體實施例。首先，將含有1當量G3 PAMAM樹狀化合物的甲醇溶液和1mL四氫呋喃(THF)溶液混和，上述四氫呋喃溶液含有32當量的4-異硫氰酸酯苯硼酸(4-isothiocyanate phenylboronic acid) 和 32 當量的三甲胺(trimethylamine)。混和溶液在室溫下劇烈攪拌48小時。然後，使用薄層色層分析法(Thin layer chromatography, TLC)偵測其反應並且使用茚三酮染色圖像化。接著，加入2ml的乙醚於所得之溶液中，而得到白色沉澱的產物，此白色沉澱物即為化學式(II)所示之化合物。隨後以離心方式分離收集產物。

【0022】 接著，如第1C圖所示，在具有苯硼酸末端基的

樹狀化合物上裝載功能性基團105，根據本發明的多個實施方式，功能性基團105可例如為螢光分子及/或藥物。

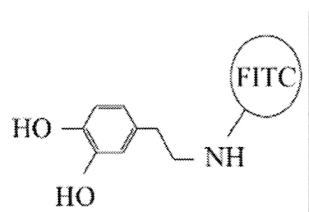
【0023】 在一些實施例中，可以使用多巴胺和藥物或螢光分子反應結合，而形成多巴胺衍生物，此包含藥物或螢光分子的多巴胺衍生物再與PBA-樹狀化合物反應結合，而得到具有功能性基團105的樹狀化合物。在另外某些實施例中，可以先讓多巴胺與其他化合物進行反應而得到如化學式(III)表示之多巴胺衍生物： 其中X為-COOH、-S-SR、-SH、-N₃、-NCS、-C≡CH、或順丁烯二醯亞胺(Maleimide)等各種官能基；其中R為烷基。化學式(III)之多巴胺衍生物和藥物或螢光分子反應結合之後，再與PBA-樹狀化合物的末端基反應，而得到具有功能性基團105的樹狀化合物。然而，本發明所屬技術領域中具通常知識者將可了解，上述實施例僅為說明之目的，並非用以限制本發明的範圍。

【0024】 在另一實施例中，使用異硫氰基多巴胺與氮基三乙酸(NTA)反應形成多巴胺衍生物，如以下反應式(1)所示。之後，此多巴胺衍生物再與PBA-樹狀化合物的末端基反應。



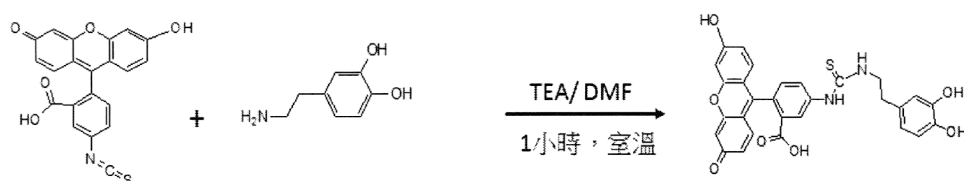
反應式(1)

【0025】 第2A圖繪示根據本發明多個的實施方式之經抗體修飾之裝載螢光分子樹狀化合物的反應示意圖。在一實施例中，多巴胺和螢光染劑FITC形成多巴胺衍生物



，此多巴胺衍生物(即-多巴胺-FITC)再和具有苯硼酸末端基的樹狀化合物反應，使該樹狀化合物裝載螢光基團。之後，該裝載螢光基團的樹狀化合物再與抗體107接合，而具有抗原辨識能力，從而得到經抗體修飾之裝載螢光分子樹狀化合物111。在一實施例中，1當量的螢光胜肽(FITC)和1當量的多巴胺反應，再加入二甲基甲醯胺(TEA)和三乙胺(DMF)於室溫中反應1小時後，可得到多巴胺-FITC，如以下反應式(2)所示。

反應式(2)



【0026】 根據本發明的各種實施方式，PBA樹狀化合物可以在連接醣蛋白(例如抗體)之前或之後，再與多巴胺衍生物接合。在某些實施例中，PBA樹狀化合物也可以和重組蛋白(例如His-tag、Halo-tag蛋白)、胜肽或醣類連接。

【0027】 在某些實施方式中，可以先將抗體和具有苯硼酸末端基的第三代樹狀化合物(PBA-G3)進行反應，之後再與多巴胺-FITC進行反應。在另外某些實施方式中，可以同時將抗體、PBA-G3樹狀化合物和多巴胺-FITC一起進行反應，但必須先計算合適的多巴胺-FITC當量數。末端基為苯

硼酸之樹狀化合物，例如具有苯硼酸末端基的第三代樹狀化合物(PBA-G3 dendrimer)，可和抗體上的醣基團(glycol moiety)反應，部分的苯硼酸末端基和醣基團接合，其餘苯硼酸末端基可以和多巴胺-FITC反應接合。每個抗體可與兩個裝載FITC螢光分子的PBA-G3樹狀化合物接合。在一實施例中，取50 μ L抗體溶液(0.91 mg/mL於磷酸鹽緩衝液中)與PBA-G3樹狀化合物混和，在4°C下反應16小時。上述抗體和PBA-G3樹狀化合物的所得溶液中加入多巴胺-FITC之磷酸鹽緩衝液(125 μ L, 2.3 mM)於，待反應完畢後再震盪反應1小時。在4°C下，以磷酸鹽緩衝液溶液進行1000倍稀釋透析，重複三次，每次2小時。純化所得之修飾抗體(抗體-樹狀化合物-FITC)以紫外光可見光光譜儀(UV-vis spect[r]ophotometer)進行定量分析，所得結果為每一抗體上面，平均接合了28+/-2個FITC螢光基團。

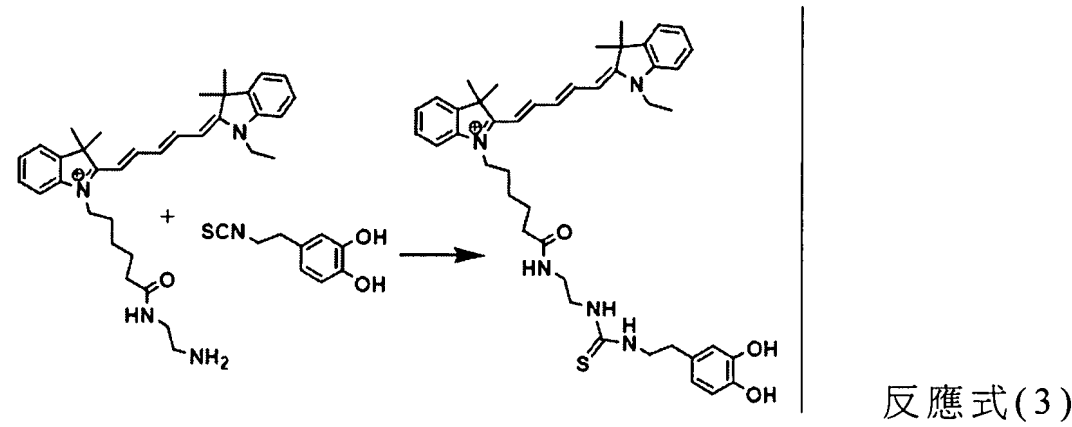
【0028】 習知方法是直接將FITC螢光分子接合到抗體上，但是FITC會反應於任何有-NH₂的地方並與其產生鍵結，因此有可能會影響抗體的鍵結以及對於抗原的辨識能力。在習知技術中，單一抗體可連接的FITC螢光分子數量不等，通常在較佳條件下可修飾約3-5個分子。根據本發明的某些實施方式，每一抗體上平均可接合28+/-2個FITC，大幅增強螢光強度，而且不影響抗體的辨識能力。

【0029】 第2B圖為本發明一實施例與習知技術的螢光比較照片。第2B圖左方樣品為傳統碳二亞胺(NHS)/ 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳醯二亞胺(EDC)方法。右方樣

品為本發明提供之經抗體修飾之裝載螢光分子樹狀化合物所發出的螢光，可以明顯觀察到本發明的實施例的螢光強度高出許多。

【0030】 第2C圖左方為根據本發明一實施例之經抗體修飾之裝載螢光分子樹狀化合物之沙雷氏桿菌免疫染色圖，右方為明場圖。第2D圖為根據本發明一實施例經抗體修飾之裝載螢光分子樹狀化合物之肺炎鏈球菌免疫染色圖，右方為明場圖。在關於第2C及2D圖的實施例中，使用對肺炎鏈球菌具有辨識能力的抗體，因此第2C圖為控制組，第2D圖為實驗組。如第2C及2D圖所示，第2C圖中的左方並無任何螢光，而第2D圖左方呈現出明顯的螢光，所以根據本發明的實施例能夠明確辨識肺炎鏈球菌，仍然具有生物專一性。因此，根據本發明實施例之裝載螢光分子樹狀化合物對抗體的辨識能力並不會造成不利的影響。

【0031】 在某些實施方式中，可使用花青染劑(Cyanine dye, Cy)當作另一種螢光染劑，例如Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5和Cy7。在一實施例中，使用Cy5和多巴胺-NCS進行反應製備多巴胺-Cy5，如以下反應式(3)所示。



【0032】 在某些實施方式中，PBA-G3樹狀化合物可和

抗體上的醣基團反應，部分末端基和醣基團接合，其餘末端基可以和多巴胺-Cy5反應接合。每個抗體可與兩個裝載螢光分子Cy5的PBA-G3樹狀化合物接合。在一實施例中，將已經和PBA-G3樹狀化合物反應的抗體($6.67\ \mu\text{M}$)與多巴胺-Cy5混合(最後濃度為 1.2mM)，以得到「抗體-樹狀化合物-Cy5」的複合物。然後，以紫外光可見光光譜儀量測每個抗體上連接的Cy5數量，實驗結果顯示每個抗體上有31個Cy5分子。在又一實施例中，PBA-G3樹狀化合物先裝載Cy5，之後將裝載有Cy5的PBA-G3樹狀化合物固定於抗體上。

【0033】 第3A-3C圖為根據本發明一實施例之經抗體修飾之樹狀化合物裝載螢光分子Cy5之螢光強度照片。第3A圖為未稀釋之原液，第3B圖為稀釋10倍，第3C圖為稀釋100倍。在稀釋100倍後仍具相當的螢光強度。第3D圖為本發明一實施例之經抗體修飾之裝載螢光分子Cy5樹狀化合物之肺炎鏈球菌免疫染色螢光圖，第3E圖為第3D圖之明場圖，第3F圖為第3D圖和第3E圖之疊合圖。由疊合圖可證實本發明所提供之方法具有生物專一性和辨識能力。

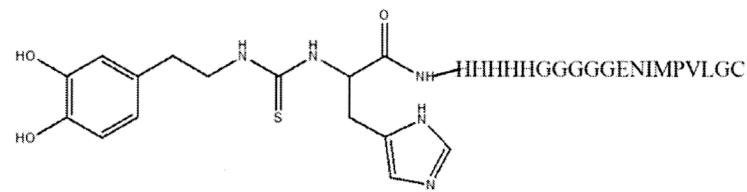
【0034】 在某些實施方式中，PBA-G3樹狀化合物可以裝載抗癌藥物，並結合在抗體上。在一實施例中，抗癌藥物為阿黴素(doxorubicin, DOX)，其擁有自體螢光。取1當量的PBA-G3樹狀化合物和20當量的阿黴素混合於二甲基亞砜(DMSO)中，在室溫中劇烈攪拌該混和溶液2小時。再加入甲醇於該混和溶液中，而得到的粉紅色沉澱物(即為產

物)。接著，以離心分離收集產物，而得到裝載阿黴素的PBA-樹狀化合物。第4圖為裝載阿黴素的PBA-樹狀化合物的螢光強度照片。將裝載阿黴素抗癌藥物的PBA-G3樹狀化合物固定於賀癌平(herceptin)抗體上，此抗體會辨識乳癌細胞。實驗結果顯示一個PBA-G3樹狀化合物平均可裝載約30個阿黴素分子。在另一實施例中，PBA-G3樹狀化合物先裝載阿黴素，之後將裝載阿黴素的PBA-G3樹狀化合物固定於賀癌平抗體上。

【0035】 在某些實施方式中，PBA-樹狀化合物可以裝載胜肽(peptide)。例如，以異硫氰基多巴胺和胜肽反應形成具有胜肽的多巴胺衍生物。此胜肽的功能可以是治療製劑或具有辨識抗原或細菌的能力。如果上述功能為治療製劑，則實行方法如同上述關於阿黴素的實施例。如果上述功能為具備辨識抗原或細菌的能力，則裝載胜肽的PBA-樹狀化合物不需再與抗體連接，以約3~5個苯硼酸末端基與具有胜肽之多巴胺衍生物結合即可，其他末端基可以裝載藥物或螢光分子。在一實施例中，PBA-G3樹狀化合物可裝載針對上皮細胞生長激素接受體(EGFR)辨識的胜肽。在肺癌、乳癌及大腸癌中，癌細胞常會有EGFR的異常增生，因而引起其下游傳導因子的活化而造成癌細胞大量增殖。所以，可利用PBA-樹狀化合物裝載具有辨識EGFR的胜肽及能阻斷EGFR訊息傳導的藥物，達到標靶治療效果。

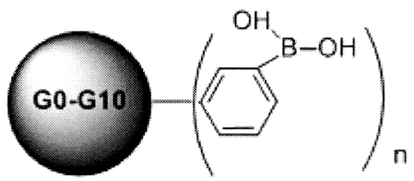
【0036】 在另一實施例中，使用能辨識肺炎鏈球菌的S7胜肽。例如，將1當量的S7胜肽與1當量的異硫氰基多巴胺

反應，即可得到如化學式(IV)表示之多巴胺衍生物。將1當量的PBA-G3樹狀化合物與4當量的化學式(IV)之多巴胺衍生物和28當量的多巴胺-FITC反應，即可得到部分末端基為S7 胜肽和部分末端基為螢光分子的樹狀化合物。此樹狀化合物不須經抗體修飾，因為其裝載的S7胜肽具有辨識肺炎鏈球菌的能力。



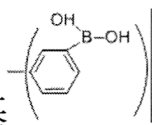
化學式(IV)

【0037】 依據本發明的各種實施方式，提供一種新穎的樹狀化合物，以化學式(I)表示：



化學式(I)

其中 G0-G10 表示第 0 代至第 10 代的樹狀化合物(dendrimer)，該

樹狀化合物包含多個分支，各該分支包含末端基 ；以及
n 為 4 至 4096 的一整數。

【0038】 本發明之實施例的優點是提供生物修飾的樹狀化合物，其中可高效率裝載藥物或螢光分子。

【0039】 以上概述數個實施例使熟悉此項技藝人士得以更加理解此揭露之各個部分。熟悉此項技藝人士應可理解並得以此為基礎據以設計或修正其他合成及結構以實施與此同樣之目的且/或具與此介紹相同優點之實施例。熟悉此項

技藝人士者亦可理解在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作任意之置換、替代及更動。

【符號說明】

【0040】

101-胺基

103-苯硼酸

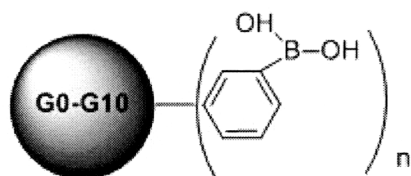
105-多巴胺衍生物、藥物、螢光分子

107-抗體

111-包含具有功能性基團的樹狀化合物之抗體

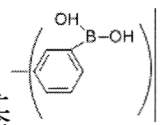
【發明申請專利範圍】

【第 1 項】一種樹狀化合物，以化學式(I)表示：



化學式(I)

其中 G0-G10 表示第 0 代至第 10 代的樹狀化合物(dendrimer)，該

樹狀化合物包含多個分支，各該分支包含末端基 ；以及
n 為 4 至 4096 的一整數。

【第 2 項】如申請專利範圍第 1 項所述之樹狀化合物，
其中該樹狀化合物為聚醯胺-胺樹狀化合物。

【第 3 項】一種聚醯胺-胺樹狀化合物，包含多個分支，且各
該分支具有苯硼酸之末端基。

【第 4 項】一種具有功能性基團的樹狀化合物，包含：
一聚醯胺-胺樹狀化合物，包含多個分支，且各該分支具有苯硼
酸末端基；以及

多個第一功能性基團，鍵結於至少一部分的所述苯硼
酸末端基上。

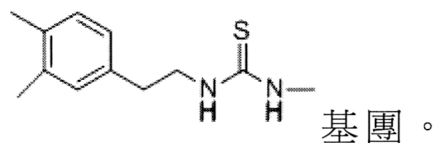
【第 5 項】如申請專利範圍第 4 項所述之具有功能性
基團的樹狀化合物，其中各該第一功能性基團包含一藥物基
團、一螢光基團、一胜肽基團或一多巴胺衍生物基團。

【第 6 項】如申請專利範圍第 4 項所述之具有功能性基團的樹狀化合物，其中各該第一功能性基團包含一藥物基團，且該藥物基團為阿黴素。

【第 7 項】如申請專利範圍第 4 項所述之具有功能性基團的樹狀化合物，其中各該第一功能性基團包含一螢光基團，且該螢光基團包含一螢光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 基團或一花青染劑 (Cyanine dye) 基團。

【第 8 項】如申請專利範圍第 4 項所述之具有功能性基團的樹狀化合物，其中各該第一功能性基團包含一胜肽基團，且該胜肽基團對上皮細胞生長激素接受體 (EGFR) 具有辨識能力。

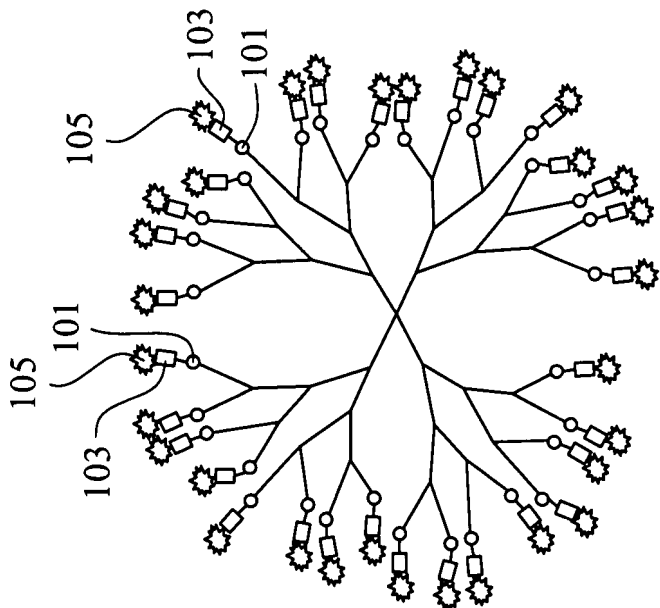
【第 9 項】如申請專利範圍第 4 項所述之具有功能性基團的樹狀化合物，其中各該第一功能性基團包含



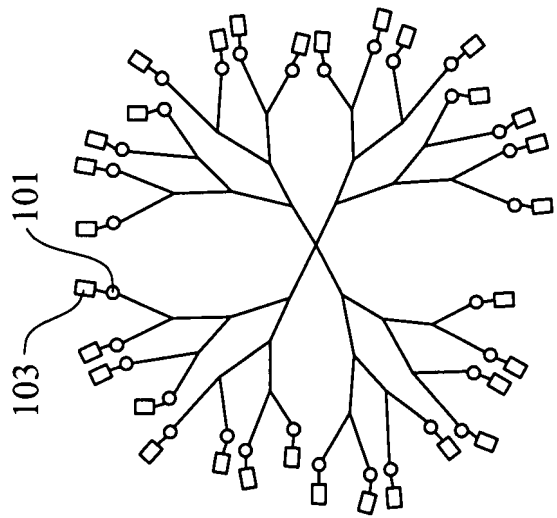
【第 10 項】如申請專利範圍第 4 項所述之具有功能性基團的樹狀化合物，更包含多個第二功能性基團，其中各該第一功能性基團包含對抗原具辨識能力的一胜肽基團，且各該第二功能性基團包含一藥物基團或一螢光基團。

【第 11 項】一種抗體，包含如申請專利範圍第 4 項所述之具有功能性基團的樹狀化合物。

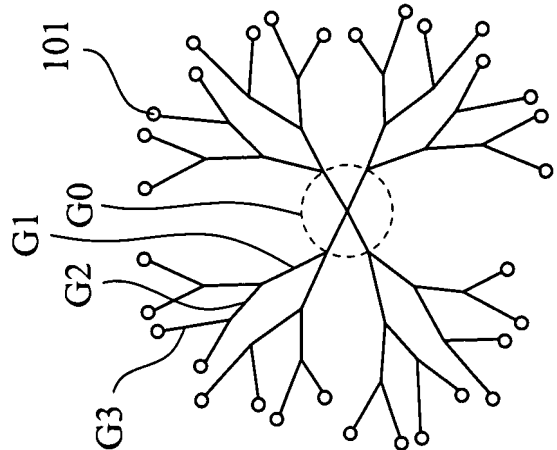
圖式



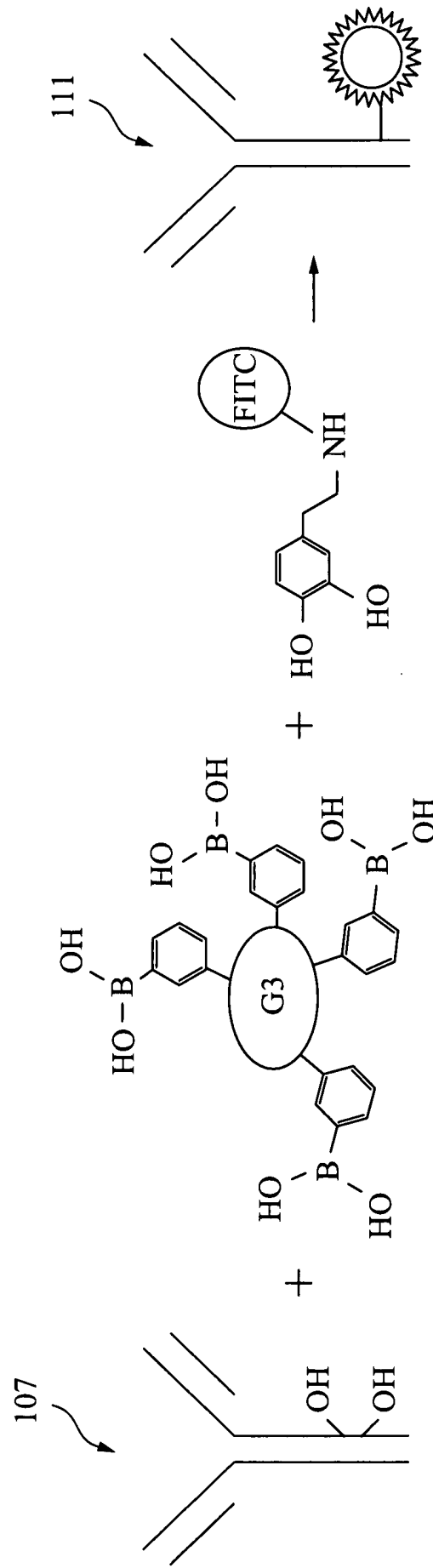
第 1C 圖



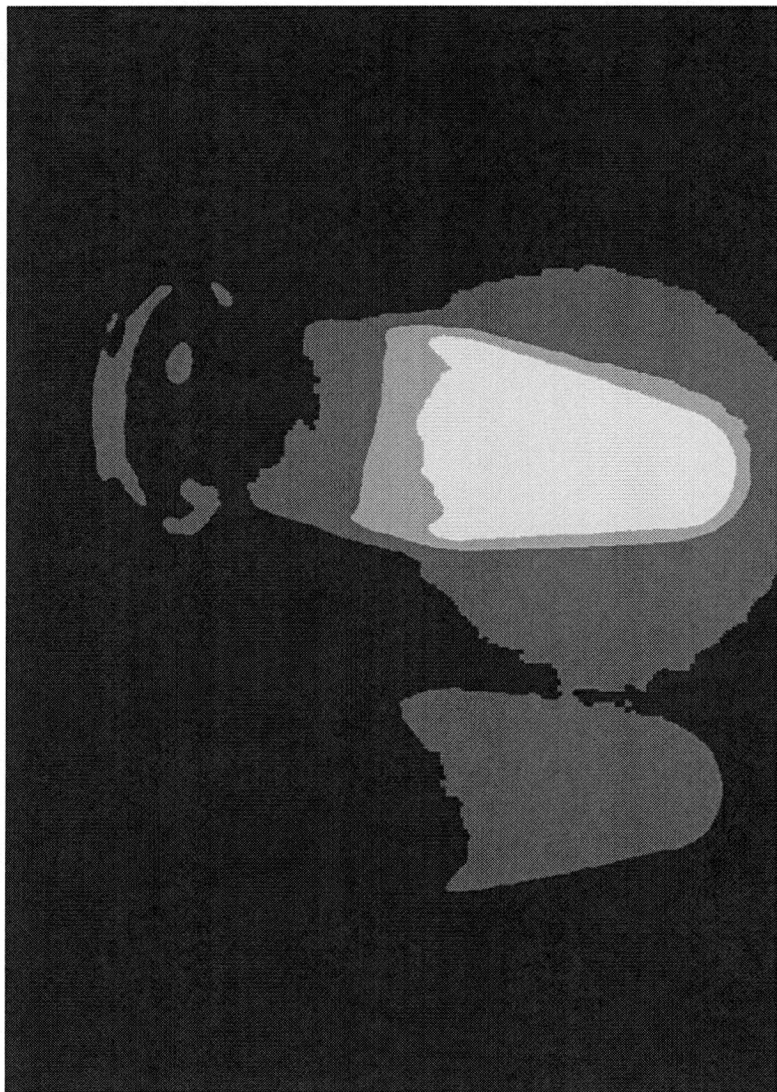
第 1B 圖



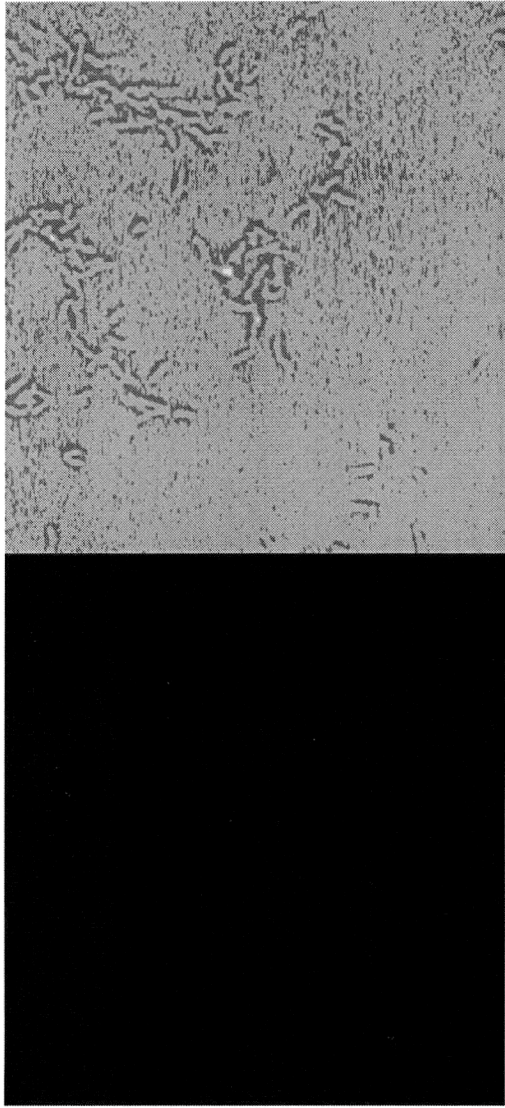
第 1A 圖



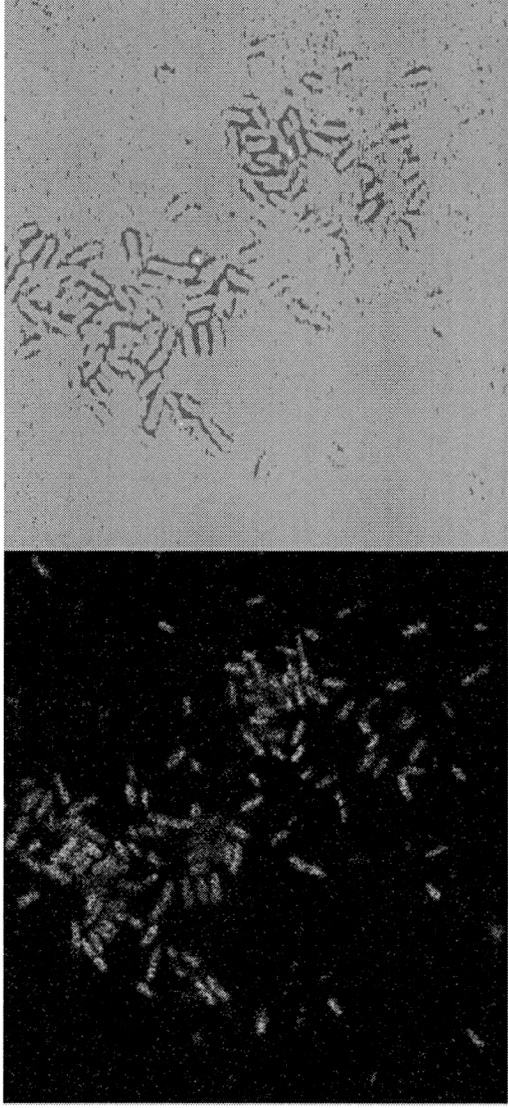
第 2A 圖



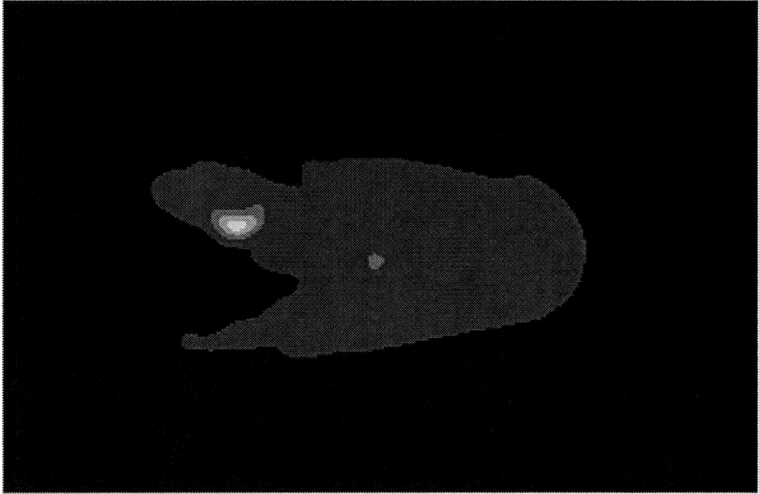
第 2B 圖



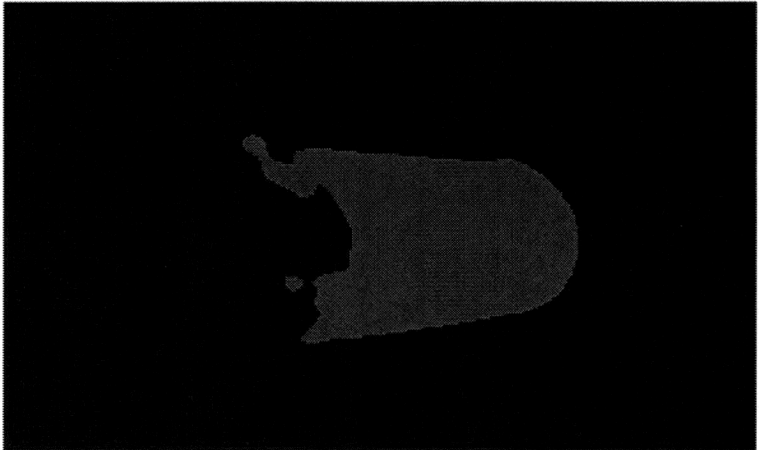
第 2C 圖



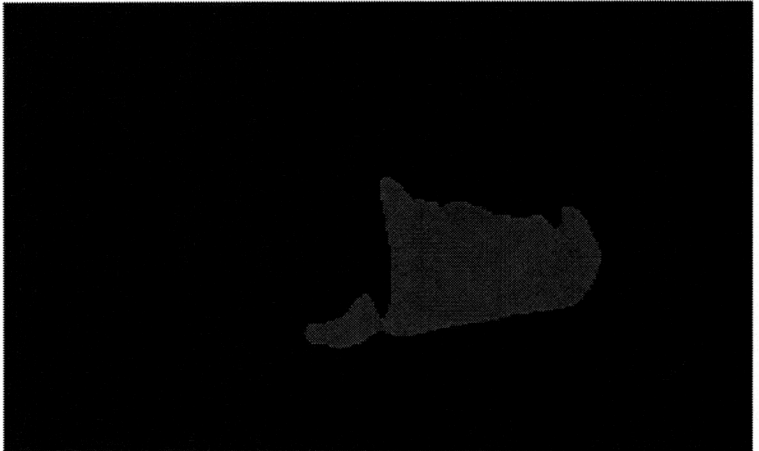
第 2D 圖



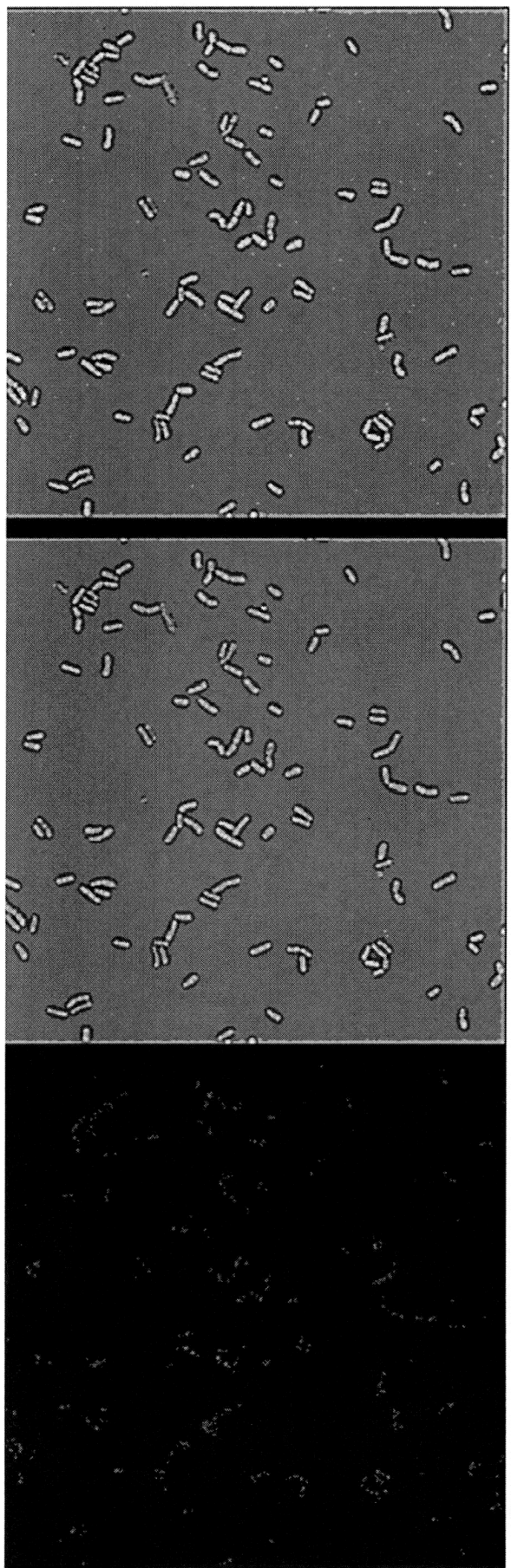
第 3A 圖



第 3B 圖



第 3C 圖



第 3D 圖

第 3E 圖

第 3F 圖

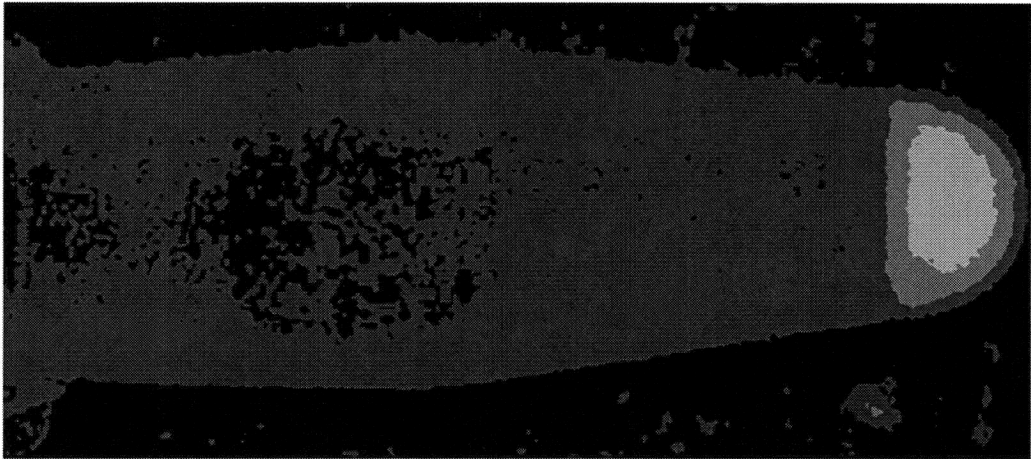
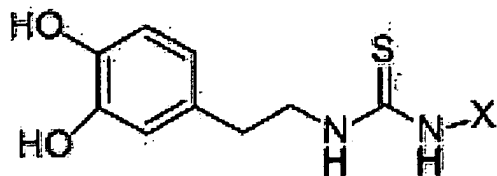


圖
4
錄

樹狀化合物上裝載功能性基團105，根據本發明的多個實施方式，功能性基團105可例如為螢光分子及/或藥物。

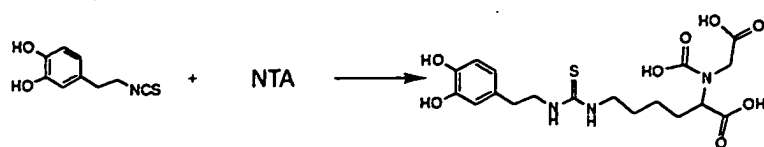
【0023】 在一些實施例中，可以使用多巴胺和藥物或螢光分子反應結合，而形成多巴胺衍生物，此包含藥物或螢光分子的多巴胺衍生物再與PBA-樹狀化合物反應結合，而得到具有功能性基團105的樹狀化合物。在另外某些實施例中，可以先讓多巴胺與其他化合物進行反應而得到如化學式(III)表示之多巴胺衍生物：



化學式(III)；

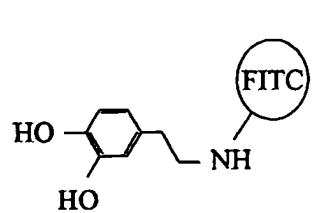
其中X為 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{S}-\text{SR}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{NCS}$ 、 $-\text{C}\equiv\text{CH}$ 、或順丁烯二醯亞胺(Maleimide)等各種官能基；其中R為烷基。化學式(III)之多巴胺衍生物和藥物或螢光分子反應結合之後，再與PBA-樹狀化合物的末端基反應，而得到具有功能性基團105的樹狀化合物。然而，本發明所屬技術領域中具通常知識者將可了解，上述實施例僅為說明之目的，並非用以限制本發明的範圍。

【0024】 在另一實施例中，使用異硫氰基多巴胺與氮基三乙酸(NTA)反應形成多巴胺衍生物，如以下反應式(1)所示。之後，此多巴胺衍生物再與PBA-樹狀化合物的末端基反應。



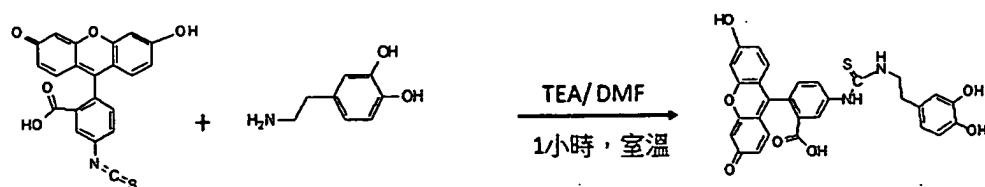
反應式(1)

【0025】 第2A圖繪示根據本發明多個的實施方式之經抗體修飾之裝載螢光分子樹狀化合物的反應示意圖。在一實施例中，多巴胺和螢光染劑FITC形成多巴胺衍生物



，此多巴胺衍生物(即-多巴胺-FITC)再和具有苯硼酸末端基的樹狀化合物反應，使該樹狀化合物裝載螢光基團。之後，該裝載螢光基團的樹狀化合物再與抗體107接合，而具有抗原辨識能力，從而得到經抗體修飾之裝載螢光分子樹狀化合物111。在一實施例中，1當量的螢光胜肽(FITC)和1當量的多巴胺反應，再加入二甲基甲醯胺(TEA)和三乙胺(DMF)於室溫中反應1小時後，可得到多巴胺-FITC，如以下反應式(2)所示。

反應式(2)



【0026】 根據本發明的各種實施方式，PBA樹狀化合物可以在連接醣蛋白(例如抗體)之前或之後，再與多巴胺衍生物接合。在某些實施例中，PBA樹狀化合物也可以和重組

蛋白(例如His-tag、Halo-tag蛋白)、胜肽或醣類連接。

【0027】 在某些實施方式中，可以先將抗體和具有苯硼酸末端基的第三代樹狀化合物(PBA-G3)進行反應，之後再與多巴胺-FITC進行反應。在另外某些實施方式中，可以同時將抗體、PBA-G3樹狀化合物和多巴胺-FITC一起進行反應，但必須先計算合適的多巴胺-FITC當量數。末端基為苯硼酸之樹狀化合物，例如具有苯硼酸末端基的第三代樹狀化合物(PBA-G3 dendrimer)，可和抗體上的醣基團(glycol moiety)反應，部分的苯硼酸末端基和醣基團接合，其餘苯硼酸末端基可以和多巴胺-FITC反應接合。每個抗體可與兩個裝載FITC螢光分子的PBA-G3樹狀化合物接合。在一實施例中，取50 μ L抗體溶液(0.91 mg/mL於磷酸鹽緩衝液中)與PBA-G3樹狀化合物混和，在4°C下反應16小時。上述抗體和PBA-G3樹狀化合物的所得溶液中加入多巴胺-FITC之磷酸鹽緩衝液(125 μ l, 2.3 mM)於，待反應完畢後再震盪反應1小時。在4°C下，以磷酸鹽緩衝液溶液進行1000倍稀釋透析，重複三次，每次2小時。純化所得之修飾抗體(抗體-樹狀化合物-FITC)以紫外光可見光光譜儀(UV-vis spect[r]ophotometer)進行定量分析，所得結果為每一抗體上面，平均接合了28+/-2個FITC螢光基團。

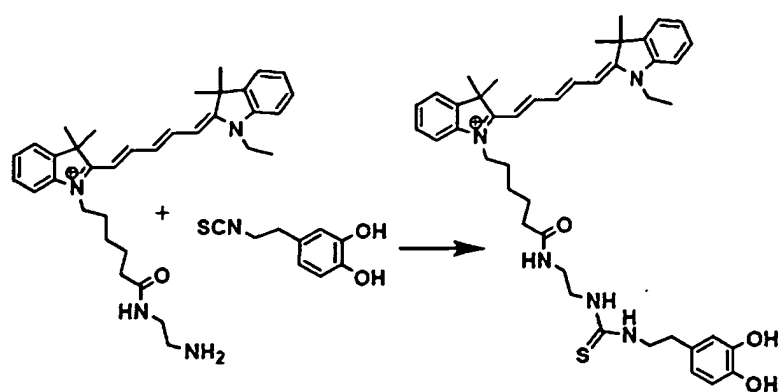
【0028】 習知方法是直接將FITC螢光分子接合到抗體上，但是FITC會反應於任何有-NH₂的地方並與其產生鍵結，因此有可能會影響抗體的鍵結以及對於抗原的辨識能力。在習知技術中，單一抗體可連接的FITC螢光分子數量

不等，通常在較佳條件下可修飾約3-5個分子。根據本發明的某些實施方式，每一抗體上平均可接合 28 ± 2 個FITC，大幅增強螢光強度，而且不影響抗體的辨識能力。

【0029】 第2B圖為本發明一實施例與習知技術的螢光比較照片。第2B圖左方樣品為傳統碳二亞胺(NHS)/ 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳醯二亞胺(EDC)方法。右方樣品為本發明提供之經抗體修飾之裝載螢光分子樹狀化合物所發出的螢光，可以明顯觀察到本發明的實施例的螢光強度高出許多。

【0030】 第2C圖左方為根據本發明一實施例之經抗體修飾之裝載螢光分子樹狀化合物之沙雷氏桿菌免疫染色圖，右方為明場圖。第2D圖為根據本發明一實施例經抗體修飾之裝載螢光分子樹狀化合物之肺炎鏈球菌免疫染色圖，右方為明場圖。在關於第2C及2D圖的實施例中，使用對肺炎鏈球菌具有辨識能力的抗體，因此第2C圖為控制組，第2D圖為實驗組。如第2C及2D圖所示，第2C圖中的左方並無任何螢光，而第2D圖左方呈現出明顯的螢光，所以根據本發明的實施例能夠明確辨識肺炎鏈球菌，仍然具有生物專一性。因此，根據本發明實施例之裝載螢光分子樹狀化合物對抗體的辨識能力並不會造成不利的影響。

【0031】 在某些實施方式中，可使用花青染劑(Cyanine dye, Cy)當作另一種螢光染劑，例如Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5和Cy7。在一實施例中，使用Cy5和多巴胺-NCS進行反應製備多巴胺-Cy5，如以下反應式(3)所示。



反應式(3)

【0032】 在某些實施方式中，PBA-G3樹狀化合物可和抗體上的醣基團反應，部分末端基和醣基團接合，其餘末端基可以和多巴胺-Cy5反應接合。每個抗體可與兩個裝載螢光分子Cy5的PBA-G3樹狀化合物接合。在一實施例中，將已經和PBA-G3樹狀化合物反應的抗體(6.67 μ M)與多巴胺-Cy5混合(最後濃度為1.2mM)，以得到「抗體-樹狀化合物-Cy5」的複合物。然後，以紫外光可見光光譜儀量測每個抗體上連接的Cy5數量，實驗結果顯示每個抗體上有31個Cy5分子。在又一實施例中，PBA-G3樹狀化合物先裝載Cy5，之後將裝載有Cy5的PBA-G3樹狀化合物固定於抗體上。

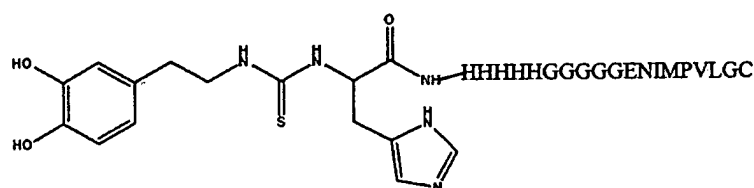
【0033】 第3A-3C圖為根據本發明一實施例之經抗體修飾之樹狀化合物裝載螢光分子Cy5之螢光強度照片。第3A圖為未稀釋之原液，第3B圖為稀釋10倍，第3C圖為稀釋100倍。在稀釋100倍後仍具相當的螢光強度。第3D圖為本發明一實施例之經抗體修飾之裝載螢光分子Cy5樹狀化合物之肺炎鏈球菌免疫染色螢光圖，第3E圖為第3D圖之明場圖，第3F圖為第3D圖和第3E圖之疊合圖。由疊合圖可證實本發明所提供之方法具有生物專一性和辨識能力。

【0034】 在某些實施方式中，PBA-G3樹狀化合物可以裝載抗癌藥物，並結合在抗體上。在一實施例中，抗癌藥物為阿黴素(doxorubicin, DOX)，其擁有自體螢光。取1當量的PBA-G3樹狀化合物和20當量的阿黴素混合於二甲基亞砒(DMSO)中，在室溫中劇烈攪拌該混和溶液2小時。再加入甲醇於該混和溶液中，而得到的粉紅色沉澱物(即為產物)。接著，以離心分離收集產物，而得到裝載阿黴素的PBA-樹狀化合物。第4圖為裝載阿黴素的PBA-樹狀化合物的螢光強度照片。將裝載阿黴素抗癌藥物的PBA-G3樹狀化合物固定於賀癌平(herceptin)抗體上，此抗體會辨識乳癌細胞。實驗結果顯示一個PBA-G3樹狀化合物平均可裝載約30個阿黴素分子。在另一實施例中，PBA-G3樹狀化合物先裝載阿黴素，之後將裝載阿黴素的PBA-G3樹狀化合物固定於賀癌平抗體上。

【0035】 在某些實施方式中，PBA-樹狀化合物可以裝載胜肽(peptide)。例如，以異硫氰基多巴胺和胜肽反應形成具有胜肽的多巴胺衍生物。此胜肽的功能可以是治療製劑或具有辨識抗原或細菌的能力。如果上述功能為治療製劑，則實行方法如同上述關於阿黴素的實施例。如果上述功能為具備辨識抗原或細菌的能力，則裝載胜肽的PBA-樹狀化合物不需再與抗體連接，以約3~5個苯硼酸末端基與具有胜肽之多巴胺衍生物結合即可，其他末端基可以裝載藥物或螢光分子。在一實施例中，PBA-G3樹狀化合物可裝載針對上皮細胞生長激素接受體(EGFR)辨識的胜肽。在肺癌、乳癌及大

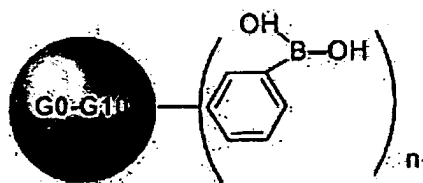
腸癌中，癌細胞常會有EGFR的異常增生，因而引起其下游傳導因子的活化而造成癌細胞大量增殖。所以，可利用PBA-樹狀化合物裝載具有辨識EGFR的胜肽及能阻斷EGFR訊息傳導的藥物，達到標靶治療效果。

【0036】 在另一實施例中，使用能辨識肺炎鏈球菌的S7胜肽。例如，將1當量的S7胜肽與1當量的異硫氰基多巴胺反應，即可得到如化學式(IV)表示之多巴胺衍生物。將1當量的PBA-G3樹狀化合物與4當量的化學式(IV)之多巴胺衍生物和28當量的多巴胺-FITC反應，即可得到部分末端基為S7胜肽和部分末端基為螢光分子的樹狀化合物。此樹狀化合物不須經抗體修飾，因為其裝載的S7胜肽具有辨識肺炎鏈球菌的能力。



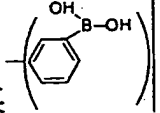
化學式(IV)

【0037】 依據本發明的各種實施方式，提供一種新穎的樹狀化合物，以化學式(I)表示：



化學式(I)

其中 G0-G10 表示第 0 代至第 10 代的樹狀化合物(dendrimer)，該

樹狀化合物包含多個分支，各該分支包含末端基 ；以及

n 為 4 至 4096 的一整數。

【0038】 本發明之實施例的優點是提供生物修飾的樹狀化合物，其中可高效率裝載藥物或螢光分子。

【0039】 以上概述數個實施例使熟悉此項技藝人士得以更加理解此揭露之各個部分。熟悉此項技藝人士應可理解並得以此為基礎據以設計或修正其他合成及結構以實施與此同樣之目的且/或具與此介紹相同優點之實施例。熟悉此項技藝人士者亦可理解在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作任意之置換、替代及更動。

【符號說明】

【0040】

101-胺基

103-苯硼酸

105-多巴胺衍生物、藥物、螢光分子

107-抗體

111-包含具有功能性基團的樹狀化合物之抗體