

[19] Patents Registry
The Hong Kong Special Administrative Region
香港特別行政區
專利註冊處

[11] 1127490 B
CN 101400730 B

[12]

STANDARD PATENT SPECIFICATION
標準專利說明書

[21] Application No. 申請編號
09105164.0

[51] Int.Cl.⁸ C08K C08F

[22] Date of filing 提交日期
09.06.2009

[54] SOLUBILIZATION AND TARGETED DELIVERY OF DRUGS WITH SELF-ASSEMBLING AMPHIPHILIC POLYMERS 使用自組裝兩性聚合物增溶和靶向遞送藥物

[43] Date of publication of application 申請發表日期
25.09.2009

[45] Publication of the grant of the patent 批予專利的發表日期
12.04.2013

CN Application No. & Date 中國專利申請編號及日期
CN 200680053919.0 19.01.2006

CN Publication No. & Date 中國專利申請發表編號及日期
CN 101400730 01.04.2009

Date of Grant in Designated Patent Office 指定專利當局批予專利日期
17.10.2012

[73] Proprietor 專利所有人
ALLEXCEL, INC.

135 WOOD STREET WEST HAVEN
CT 06516
UNITED STATES/UNITED STATES OF AMERICA

[72] Inventor 發明人

DIWAN, ANIL
ONTON, ANN, LOUISE
TATAKE, JAYANT, G.

[74] Agent and / or address for service 代理人及/或送達地址

China Patent Agent (H.K.) Ltd.
22/F, Great Eagle Centre
23 Harbour Road, Wanchai
Hong Kong
中國專利代理(香港)有限公司
香港灣仔港灣道 23 號
鷹君中心 22 樓



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101400730 B

(45) 授权公告日 2012. 10. 17

(21) 申请号 200680053919. 0

(22) 申请日 2006. 01. 19

(85) PCT申请进入国家阶段日
2008. 09. 19

(86) PCT申请的申请数据
PCT/US2006/001820 2006. 01. 19

(87) PCT申请的公布数据
WO2007/084126 EN 2007. 07. 26

(73) 专利权人 阿列克斯塞尔公司
地址 美国康涅狄格州

(72) 发明人 A·迪万 A·L·安顿
J·G·塔塔克

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
代理人 李进 李连涛

(51) Int. Cl.
C08K 5/05 (2006. 01)
C08F 8/34 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 5919442 A, 1999. 07. 06, 说明书第 3 栏第 34 行至第 20 栏第 14 行, 实施例 1-18.

CN 1329632 A, 2002. 01. 02, 说明书第 1 页第 2 段至第 10 页第 4 段.

US 6521736 B2, 2003. 02. 18, 说明书第 1 栏第 24 行至第 11 栏第 40 行.

US 2003/0072734 A1, 2003. 04. 17, 说明书第 [0001]-[0133] 段.

审查员 李胤

权利要求书 5 页 说明书 28 页 附图 2 页

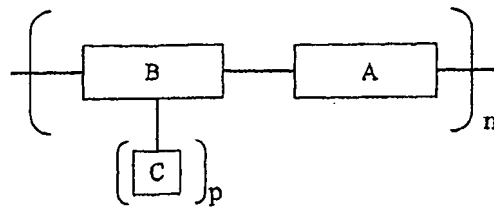
(54) 发明名称

使用自组装两性聚合物增溶和靶向递送药物

(57) 摘要

本发明提供了包含亲水骨架和作为疏水组分的脂肪族侧基的可生物降解的两性共聚物。此聚合物在水性环境中形成纳米级分子聚集体, 所述分子聚集体具有可以增溶如药物、维生素、染料和显像剂的不溶性有机化合物的疏水性内核。可选择性地, 此聚合物的特点在于为抗体、配体和其它用于靶向递送药物和显像剂的靶向部分提供连接位点的反应性官能团。

1. 一种基本由以下结构组成的梳型聚合物：

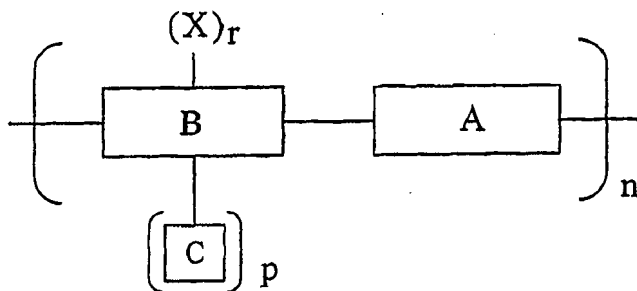


该聚合物包含由交替的分支点部分 B 和亲水的水溶性聚合物链段 A 形成的骨架；并具有与各分支点部分相连接的疏水性侧链 C，其中各侧链 C 分别选自于可选择性地经一个或多个亲水取代基取代的直链烃、可选择性地经一个或多个亲水取代基取代的多环烃、疏水性氨基酸、肽和聚合物；其中 n 的范围从 3 至 100；p 的平均范围是 $1 < p \leq 4$ 。

2. 如权利要求 1 所述的聚合物，其中 p 的平均范围为 2 至 4。

3. 如权利要求 1 所述的聚合物，其中 p 的平均范围是 $1.5 \leq p \leq 2$ 。

4. 如权利要求 1 所述的聚合物，其进一步包含与各分支点部分相连的一个或多个反应性官能团 X，并基本由以下结构组成：



其中，r 的平均范围为 1 至 4。

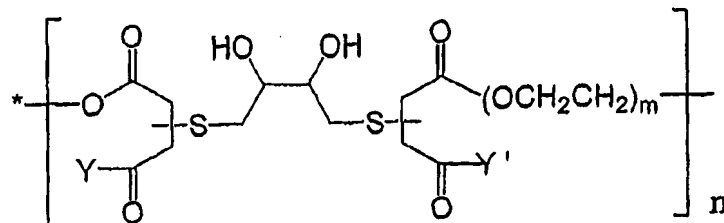
5. 如权利要求 1 至 4 任一项所述的聚合物，其中水溶性聚合物链段 A 选自于聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙烯亚胺、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚糖和其共聚物。

6. 如权利要求 5 所述的聚合物，其中聚合物链段 A 选自于聚乙二醇、聚丙二醇及其共聚物。

7. 如权利要求 6 所述的聚合物，其中聚合物链段 A 是聚乙二醇。

8. 如权利要求 7 所述的聚合物，其中聚合物链段 A 的平均长度在 4 至 700 个单体单位之间。

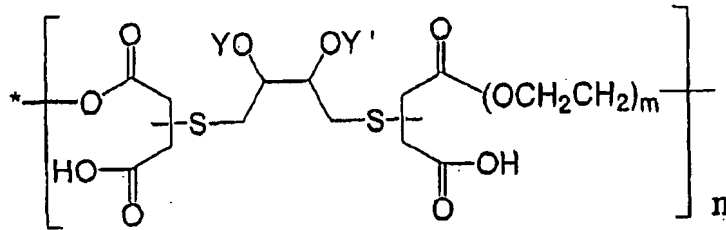
9. 如权利要求 4 所述的聚合物，该聚合物具有以下结构，



其中，m 为 4-700，且 Y 和 Y' 分别选自于 R、OR、COOR、SR、NHR、NRR'、ONHR、NHOR、NRNH₂、NHNHR、NRNHR' 和 NHNRR'，其中 R 和 R' 分别选自于可选择性地经一个或多个亲水取代基取

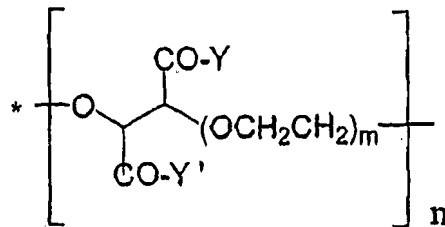
代的直链烃、可选择性地经一个或多个亲水取代基取代的多环烃、疏水性氨基酸、肽和聚合物。

10. 如权利要求 4 所述的聚合物,该聚合物具有以下结构,



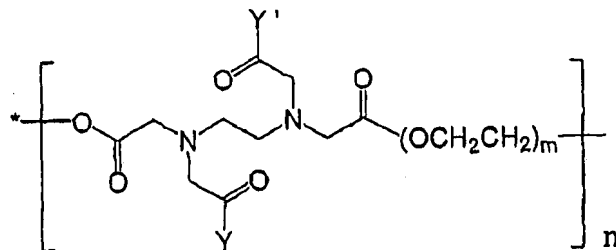
其中, m 为 4-700, 且 Y 和 Y' 分别选自于 R 、 COR 、 $COOR$ 、 $CONHR$ 、 $CONRR'$ 、 $CONHOR$ 、 $CONRNH_2$ 、 $CONHNHR$ 、 $CONRNHR'$ 和 $CONHNRR'$, 其中 R 和 R' 分别选自于可选择性地经一个或多个亲水取代基取代的直链烃、可选择性地经一个或多个亲水取代基取代的多环烃、疏水性氨基酸、肽和聚合物。

11. 如权利要求 1 所述的聚合物,该聚合物具有以下结构,



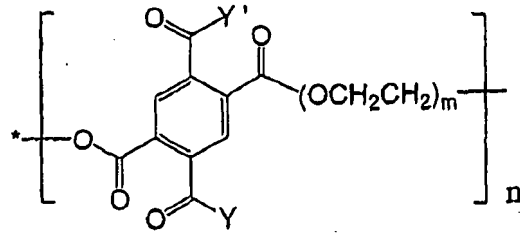
其中, m 为 4-700, 且 Y 和 Y' 分别选自于 R 、 OR 、 $COOR$ 、 SR 、 NHR 、 NRR' 、 $ONHR$ 、 $NHOR$ 、 $NRNH_2$ 、 $NHNHR$ 、 $NRNHR'$ 和 $NHNRR'$, 其中 R 和 R' 分别选自于可选择性地经一个或多个亲水取代基取代的直链烃、可选择性地经一个或多个亲水取代基取代的多环烃、疏水性氨基酸、肽和聚合物。

12. 如权利要求 3 所述的聚合物,该聚合物具有以下结构,



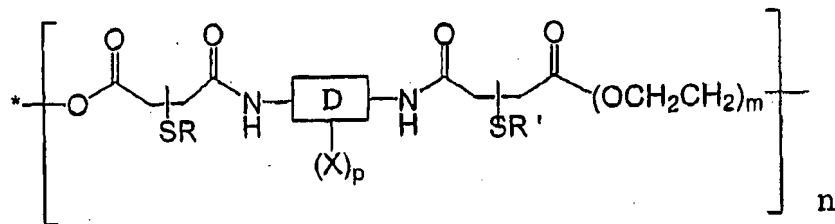
其中, m 为 4-700, 且 Y 和 Y' 分别选自于 R 、 OR 、 $COOR$ 、 SR 、 NHR 、 NRR' 、 $ONHR$ 、 $NHOR$ 、 $NRNH_2$ 、 $NHNHR$ 、 $NRNHR'$ 和 $NHNRR'$, 其中 R 和 R' 分别选自于可选择性地经一个或多个亲水取代基取代的直链烃、可选择性地经一个或多个亲水取代基取代的多环烃、疏水性氨基酸、肽和聚合物。

13. 如权利要求 3 所述的聚合物,该聚合物具有以下结构,

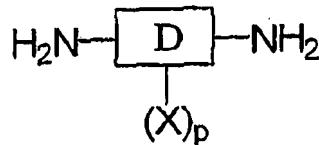


其中, m 为 4-700, 且 Y 和 Y' 分别选自于 R 、 OR 、 $COOR$ 、 SR 、 NHR 、 NRR' 、 $ONHR$ 、 $NHOR$ 、 $NRNH_2$ 、 $NHNHR$ 、 $NRNHR'$ 和 $NHNRR'$, 其中 R 和 R' 分别选自于可选择性地经一个或多个亲水取代基取代的直链烃、可选择性地经一个或多个亲水取代基取代的多环烃、疏水性氨基酸、肽和聚合物。

14. 如权利要求 3 所述的聚合物, 该聚合物具有以下结构

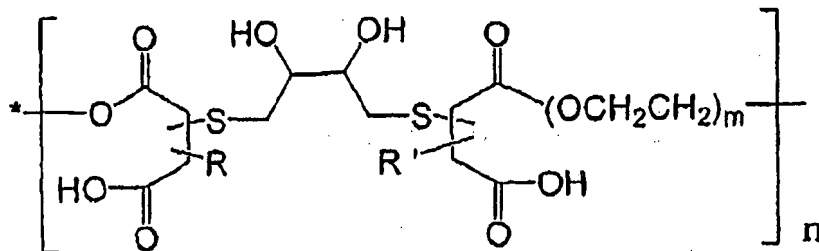


其中, 部分 D 衍生自具有以下一般结构的二胺,



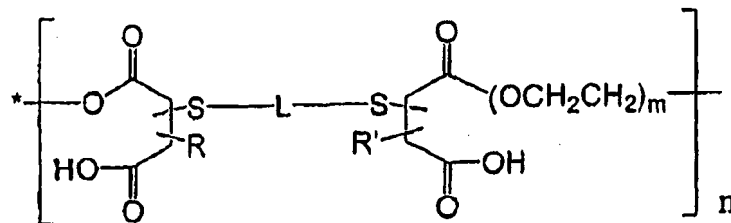
每个 X 分别为反应性官能团, p 是 0-4, 且 m 是 4-700; 其中 R 和 R' 分别选自于可选择性地经一个或多个亲水取代基取代的直链烃、可选择性地经一个或多个亲水取代基取代的多环烃、疏水性氨基酸、肽和聚合物。

15. 如权利要求 4 所述的聚合物, 该聚合物具有以下结构,



其中 m 是 4-700, 且 R 和 R' 分别选自于可选择性地经一个或多个亲水取代基取代的直链烃、可选择性地经一个或多个亲水取代基取代的多环烃、疏水性氨基酸、肽和聚合物。

16. 如权利要求 4 所述的聚合物, 该聚合物具有以下结构,

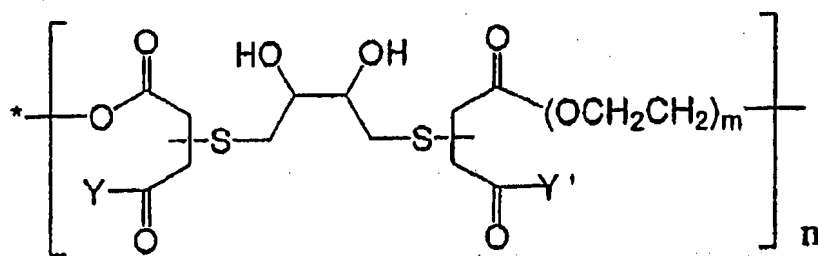


其中 m 是 4-700, L 是亚苯基、 C_2-C_6 亚烷基或苯二亚甲基, 且 R 和 R' 分别选自于可选择性地经一个或多个亲水取代基取代的直链烃、可选择性地经一个或多个亲水取代基取代的多环烃、疏水性氨基酸、肽和聚合物。

17. 一种通过聚乙二醇与马来酸酐的化学反应以及所得材料与二硫苏糖醇的化学反应得来的组合物, 所述聚乙二醇与马来酸酐的化学反应导致聚乙二醇的末端羟基基团被马来酸酐基本完全酯化。

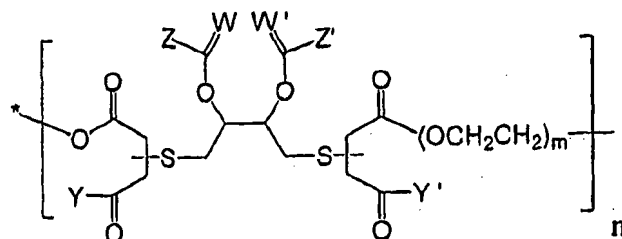
18. 一种通过聚丙二醇与马来酸酐的化学反应以及所得材料与二硫苏糖醇的化学反应得来的组合物, 所述聚丙二醇与马来酸酐的化学反应导致聚丙二醇的末端羟基基团被马来酸酐基本完全酯化。

19. 一种具有以下结构的聚合物,



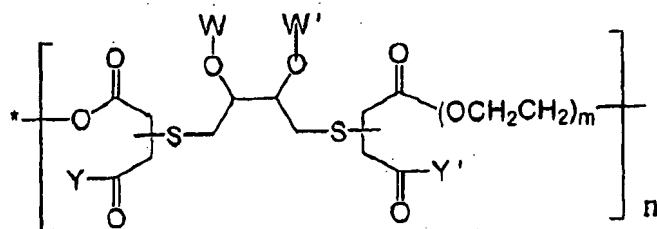
其中, m 是 4 至 700 且 n 是 3 至 100, 并且, 其中在出现的每个具有所示结构的单体单位中, Y 和 Y' 分别选自于 OH 、 $COOH$ 、 SH 、 NH_2 、 NHR 、 ONH_2 、 $NHOH$ 、 $NHNH_2$ 和 $NRNH_2$, 其中 R 选自于 C_1 至 C_5 烷基、 $(CH_2)_kOH$ 、 $(CH_2)_kCOOH$ 、 $(CH_2)_kSH$ 、 $(CH_2)_kNH_2$ 、 $(CH_2)_kONH_2$ 、 $(CH_2)_kNHOH$ 和 $(CH_2)_kNHNH_2$, 其中 k 为 2 至 5。

20. 一种具有以下结构的聚合物,



其中, m 是 4 至 700 且 n 是 3 至 1000, 并且, 其中在出现的每个具有所示结构的单体单位中, Y 和 Y' 分别选自于 OH 、 $COOH$ 、 SH 、 NH_2 、 NHR 、 ONH_2 、 $NHOH$ 、 $NHNH_2$ 和 $NRNH_2$, 其中 R 选自于 C_1 至 C_5 烷基、 $(CH_2)_kOH$ 、 $(CH_2)_kCOOH$ 、 $(CH_2)_kSH$ 、 $(CH_2)_kNH_2$ 、 $(CH_2)_kONH_2$ 、 $(CH_2)_kNHOH$ 和 $(CH_2)_kNHNH_2$, 其中 k 为 2 至 5; W 和 W' 分别为 O 或 H_2 , 并且, 其中在每个出现的单体单位中, Z 和 Z' 分别选自于可选择性地经一个或多个亲水取代基取代的直链烃、可选择性地经一个或多个亲水取代基取代的多环烃、疏水性氨基酸、肽和聚合物。

21. 一种具有以下结构的聚合物,



其中, m 是 4-700, 且 Y 和 Y' 分别选自于 R 、 OR 、 $COOR$ 、 SR 、 NHR 、 NRR' 、 $ONHR$ 、 $NHOR$ 、 $NRNH_2$ 、 $NINIR$ 、 $NRNIIR'$ 和 $NINRR'$, 其中 R 和 R' 分别选自于可选择性地经一个或多个亲水取代基取代的直链烃、可选择性地经一个或多个亲水取代基取代的多环烃、疏水性氨基酸、肽和聚合物; 并且, 其中每个出现的单体单位中, W 和 W' 分别选自于 H 、 $-COCH=CH_2$ 、 $-COC(CH_3)=CH_2$ 、 $COCH=CHCO_2H$ 和 $-COC(CH_3)=CHCO_2H$ 。

22. 一种含有如权利要求 1 至 9 任一项所述的聚合物的药用组合物, 所述药用组合物进一步含有有效量的药理活性剂。

23. 一种增加水性溶剂中物质溶解性的方法, 所述方法包含使所述物质与权利要求 1 或 2 所述的聚合物相接触以形成所述物质与所述聚合物的水溶性复合物。

24. 一种增加非水性溶剂中物质溶解性的方法, 所述方法包含使所述物质与权利要求 1 或 2 所述的聚合物相接触以形成所述物质与所述聚合物的复合物, 所述复合物可溶于非水性溶剂中。

25. 如权利要求 23 或 24 所述的方法, 其中所述物质选自营养剂、药物、染料、核酸复合物和显像剂。

26. 如权利要求 24 所述的方法, 其中所述物质为药物。

27. 一种在权利要求 4 所述聚合物中产生对于生物靶标的结合亲和性的方法, 该方法包含将靶向部分连接到聚合物上一个或多个反应性官能团 X 的步骤。

28. 如权利要求 27 所述的方法, 其中所述生物靶标是细胞或病毒的表面。

29. 如权利要求 28 所述的方法, 其中所述靶向部分选自于受体特异性配体、抗体、抗体片段、包含 RGD 氨基酸序列的肽、包含 YISRGR 基序的肽、生长因子、唾液酸衍生物、 N -乙酰神经氨酸衍生物; 叶酸、甲氨蝶呤、蝶酸、雌二醇、雌三醇、睾酮、甘露糖-6-磷酸、糖、维生素、色氨酸、氨基烷基金刚烷、FuzeonTM、PRO-542、BMS-488043、唾液酸、2-脱氧-2,3-双脱氢- N -乙酰神经氨酸、4-胍基-Neu5Ac2en(扎那米韦)、奥司他韦和 RWJ-270201。

30. 如权利要求 27 所述的方法, 其中所述靶向部分是单克隆抗体或抗体片段。

31. 如权利要求 25 所述的方法, 其中所述物质是维生素。

使用自组装两性聚合物增溶和靶向递送药物

[0001] 技术领域

[0002] 本发明涉及两性聚合物的领域,特别是生物相容的形成胶束的梳型聚合物。本发明还涉及药物增溶和靶向给药的领域。

背景技术

[0003] 近年来,由于包含疏水链段和亲水链段的两性嵌段共聚物具有随周边溶剂的改变而自组装成多种纳米结构的能力,人们已对其进行了深入研究。参见 Cameron 等, *Can. J. Chem. /Rev. Can. Chim.* 77 :1311-1326(1999)。在水溶液中,两性聚合物的疏水段倾向于进行自组装以避免与水接触并使系统的自由界面能最小化。同时,亲水链段在水环境中形成水合的“晕状结构 (corona)”,因此聚集体维持热力学稳定的结构。结果得到具有疏水核心和亲水外晕的聚合物聚集体颗粒的稳定乳胶状胶体悬浮液。

[0004] 梳型两性共聚物与嵌段共聚物的不同之处在于其骨架主要为疏水的或亲水的,而相反极性的聚合物链悬挂在骨架上而不是并入骨架中。已经由疏水性骨架和亲水性分枝 (Mayes 等,美国专利第 6,399,700 号),以及由亲水性骨架和疏水性分枝 (Watterson 等,美国专利第 6,521,736 号) 制备梳型共聚物。前者用于向细胞表面受体提供多价配基呈递,而后者用于增溶药物并将其传递至细胞。

[0005] 已经将两性聚合物聚集体作为增溶不溶性药物的载体、靶向给药载体以及基因传递系统进行研究。由于链缠结和 / 或内部疏水区的结晶化,它们具有比传统的低分子量胶束更稳定的结构。载体的聚合物性质使聚集体相对少地受到降解的影响,而当普通脂质体被稀释到其临界胶束浓度以下时会产生降解。它们相对于传统脂质体给药组合物的优势还在于不存在双层膜,从而使其更易与细胞膜融合并将其有效载荷直接传递到细胞。

[0006] 由于聚乙二醇 (PEG) 卓越的生物相容性以及 PEG 包被的“隐形 (stealth)”颗粒逃避网状内皮系统的显著能力,包含 PEG 的胶束、脂质体以及聚合物已被广泛地考虑作为用于给药系统的材料。有很多关于使用聚乙二醇 (PEG) 作为 PEG- 脂质 (形成脂质体和胶束) 的亲水组分的报道;参见,例如 Krishnadas 等, *Pharm. Res.* 20:297-302(2003)。也已经将自组装成更坚固的“聚合物组装聚集体 (polyersomes)”的自组装两性嵌段共聚物作为药物增溶和递送载体进行了研究 (Photos 等, *J. Controlled Release*, 90:323-334(2003))。还可参见 Gref 等 *Int. Symp. Controlled Release Mater.* 20:131(1993); Kwon 等, *Langmuir*, 9:945(1993); Kabanov 等, *J. Controlled Release*, 22:141(1992); Allen 等, *J. Controlled Release*, 63:275(2000); Inoue 等, *J. Controlled Release*, 51:221(1998); Yu 和 Eisenberg, *Macromolecules*, 29:6359(1996); Discher 等, *Science*, 284:113(1999); Kim 等,美国专利第 6,322,805 号; Seo 等,美国专利第 6,616,941 号和 Seo 等,欧洲专利第 EP0583955 号。也有关于聚乙烯亚胺 (PET) 在此功能上的用途的报道,其集中于对寡核苷酸的传递 (Nam 等,美国专利第 6,569,528 号; Wagner 等,美国专利公开第 20040248842 号)。类似地, Luo 等在 *Macromolecules* 35:3456(2002) 中描述了适于传递多聚核苷酸的 PEG- 结合的聚酰胺胺 (“PAMAM”) 树枝状分子。

[0007] 除了需要增溶、分散和传递药物,还需要特异性地导向靶组织、肿瘤或器官的靶向给药系统。这通常是通过对靶点处细胞壁具有特异亲和力的抗体或其它配体的连接而完成的。然而,除了聚合物链末端之外,PEG 缺少官能团,而且大多数末端基团不可避免地被与其它嵌段共聚物组分的连接键占据。因此,向 PEG 嵌段共聚物连接如抗体或细胞粘附分子的靶向部分通常被限制于非 PEG 链段,遗憾的是,非 PEG 链段并不是共聚物中通常暴露在自组装聚集体外晕的部分。

[0008] 造成嵌段共聚物自组装成聚合物聚集体的相分离现象可容易地逆转,并且人们已尝试通过交联疏水内核以提高聚集体的稳定性(参见欧洲专利第 EP0552802 号)。人们也已尝试将药物共价连接到嵌段共聚物的疏水组分(Park 和 Yoo,美国专利第 6,623,729 号;欧洲专利第 EP0397307 号)。

[0009] 仍然需要一种稳定的、可生物降解的、可根据要求将靶向部分连接到聚集体外部并且有效地将药物传递到所需细胞靶标的给药系统。

发明内容

[0010] 本发明提供了生物相容的梳型聚合物分子,所述梳型聚合物分子包含具有分支点部分的亲水骨架以及与这些分支点部分连接的疏水性分枝。本发明提供了由此类聚合物形成的聚合物聚集体的水性悬浮液,并提供了通过将不溶性或微溶性有机化合物(例如药物、染料、维生素和类似物)并入聚合物聚集体的疏水内核而使这样的化合物增溶的方法。用于将不溶于水的有机物增溶于水性溶剂的方法主要包括使不溶于水的有机物在水性或混合的水性溶剂中与本发明的聚合物相接触。

[0011] 在具体实施方案中,分支点部分进一步包含可作为靶向部分连接点的反应性官能团。在特别优选的实施方案中,例如配体或抗体的靶向部分与本发明聚合物的分支点部分共价连接,且药物并入聚集体的内核以形成靶向药物配合物。

[0012] 本发明进一步提供了制备梳型聚合物、聚集体和所述靶向药物配合物的方法。本发明的聚合物可自组装成为聚合物聚集体,所述聚合物聚集体可在体内高效地增溶、分散及传递药物,无毒,具有生物相容性和稳定性,并且能够在其外表面具有多细胞靶向部分。

附图说明

[0013] 图 1 显示将 20ul 溶于去离子水的三种亲脂染料(A,苏丹 IV;B,二氯荧光素;C,醇溶曙红 Y)饱和溶液样品,点样在硅胶 TLC 板上。上一行:含有 50mg/ml 实施例 1 的 π -聚合物;下一行:不含 π -聚合物。

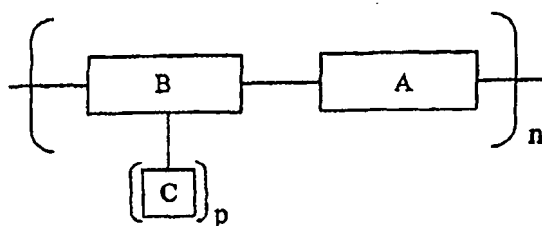
[0014] 图 2 显示将 50ul 溶于去离子水的四种不溶性药物(第 1 行,红紫素;第 2 行,喜树碱;第 3 行,两性霉素 B;第 4 行,阿霉素)饱和溶液样品,点样在硅胶 TLC 板上。A 列,叶酸化聚合物 A;B 列,聚合物 A;C 列,不含聚合物。每个点周围的三个铅笔记号说明了溶剂在板上的延展范围。A 列和 B 列的中圈在硅胶中均匀地扩散,表明溶液的澄清性;C 列的中圈主要由固体沉淀物组成。

具体实施方式

[0015] 本发明的聚合物(本文中称作“ π -聚合物”)具有梳型结构,所述梳型结构具有

由交替的分支点部分 B 和亲水的水溶性聚合物链段 A 形成的骨架,并具有与各分支点部分相连接的多个疏水性侧链 C。它们基本由式 1 所示的结构组成。侧链 C 为相对较短的疏水部分,可以是脂肪族分子、链或寡聚物。 p 的理想值为整数 2、3 或 4。实际上,通常以非理想效率通过化学反应引入侧链,从而造成在所制备的聚合物整体中, p 的平均值并不是理想的整数。如下文所述,也可以通过设计而获得非整数平均值。因此本发明聚合物中 p 的平均值为大于 1 且不超过 4 ($1 < p \leq 4$)。在优选实施方案中, p 的范围在约 2 至 4 之间,且最优选 $1.5 < p \leq 2$ 。

[0016]



1

[0017] 骨架聚合物链段 A 选自亲水的和 / 或水溶性聚合物链,包括但不限于聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙烯亚胺、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚糖和类似物。优选地,聚合物单元 A 为式 $-(CH_2CH_2O)_m-$ 的聚乙二醇链,其中 m 在 1 至 10,000 之间,优选 3 至 3,000 之间,可以为 4 至 700。没有对聚合物链的末端官能团进行表征,这与本发明无关。

[0018] 在制造不同等级的聚乙二醇时,已知在工业上使二价连接部分(例如,双酚 A 二缩水甘油醚)与两个聚乙二醇链相连从而有效地加倍聚合物分子量同时保持相对窄的分子量范围。因此,所得“聚乙二醇”分子在聚合物链中点处被非二醇连接部分所打断(参见,例如聚乙二醇-双酚 A 二缩水甘油醚加成物, CAS 登录号 37225-26-6)。高级寡聚物,即那些具有被两个双酚 A 二缩水甘油醚部分所分隔的三个 PEG 链的分子也是已知的,参见例如国际专利申请 W000/24008。因此,本文所使用的术语“聚乙二醇”和“聚丙二醇”涵盖了并入非二醇连接单位的聚乙二醇和聚丙二醇聚合物链,所述非二醇连接单位包括但不限于双酚 A 二缩水甘油醚、双酚 B 二缩水甘油醚、双酚 S 二缩水甘油醚、对苯二酚二缩水甘油醚和类似物。为了本说明书的目的,任何此类连接部分不计作“单体单位”。

[0019] 最优选地,聚合物链段 A 的平均长度在 20 至 50 单体单位之间。聚乙二醇链的一个或两个末端可以被适于作为其它部分衔接物的官能团所取代,所述官能团包括但不限于氨基、巯基、丙烯酸酯、丙烯酰胺、马来酸酯、马来酰亚胺和类似物。 n 值的范围在 1 至 1000 之间,优选在 3 至 100 之间。 n -聚合物的总分子量的范围是 1,000 至 100,000 道尔顿或更高;优选 2,000 道尔顿以上,且更优选 7,000 道尔顿以上。

[0020] 疏水部分 C 可以相同或不同,并且可以是,例如直链烃(选择性地被一个或多个亲水取代基取代)、多环烃(选择性地被一个或多个亲水取代基取代)、疏水性的氨基酸、肽和聚合物。适合的亲水取代基包括但不限于羟基、醚、氰基和酰胺官能团。特别地,设想的取代基为具有 ω -羟基、 ω -氰基、 ω -酰氨基或 ω -烷氧基取代基的 C_8 至 C_{20} 烷基基团。在本文中,术语“取代基”包括使用杂原子(例如 O、N 或 S)取代部分 C 的烃链或环系统中的碳原子。因此,醚键和酰胺键以及杂环均可并入 C 中。

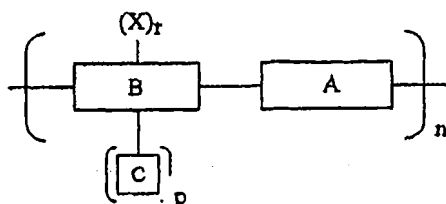
[0021] 疏水部分 C 优选为相对较短 (C_8 - C_{20}) 的脂肪族链,但也可以是较短的寡聚物。适合

的寡聚物包括寡聚羧酸,例如,聚乙醇酸、聚(DL-乳酸)、聚(L-乳酸)和聚乙醇酸和聚乳酸羧酸的共聚物,以及聚氨基酸、聚酸酐、聚原酸酯和聚磷酸酯,聚内酯,例如聚(ϵ -己内酯)、聚(δ -戊内酯)、聚(γ -丁内酯)和聚(β -羟基丁酸酯)。C部分也可以选自疏水分子,例如胆固醇、胆酸、石胆酸,疏水肽和类似物。各C部分的分子量大于40,优选在50和1,000之间,且最优选在100和500之间。通常,当处于分子形式C-H时不明显溶于水的任何C部分都被认为适用于本发明。

[0022] 本发明梳型聚合物的显著特点在侧链C并不是规律而均匀地沿聚合物链分布,而是出现在团簇 $[C]_p$ 中。这些团簇几乎规律地沿聚合物链彼此隔开,这依赖于聚合物单元A的单分散程度。因此,连接于共同分枝部分B的两个侧链C之间的距离不同于连接于不同分枝部分的两个侧链之间的距离。

[0023] 在本发明的第二个实施方案中,分枝点部分B还包含一个或多个反应性官能团X,且聚合物基本由式2所示的结构组成。

[0024]



2

[0025] 式2中,单个反应性基团X可以相同或不同,并可在聚合物2组装过程中根据需要选择性被封闭或保护。r的平均值可在0(没有X基团)至约4的范围内。特别地,反应性基团可选自于本领域已知可用于在分子之间形成共价键的官能团。基团X作为药物分子、组织或细胞靶向部分、病毒靶向部分或基质连接部分(例如用于涂覆支架或其它医疗器械表面的目的)的连接位点。在特定实施方案中,可以为单一连接位点X。在另一个实施方案中,可以有三种或四种不同类型的反应性基团。基质连接部分可通过共价键、特异性非共价相互作用(例如,抗体-抗原),或非特异性相互作用(例如,通过离子配对或“疏水”相互作用)连接到基质上。合适的反应性基团X包括但不限于-OH、-NH₂、-SH、-CHO、-NHNH₂、-COOH、-CONHNH₂、卤酰基、乙酰乙酰基、-CN、-OCN、-SCN、-NCO、-NCS及类似物;反应性双键,例如乙烯基、丙烯酸基、烯丙基、马来酸基、苯乙烯基和类似物;以及带有反应性三键的基团,例如乙炔羧基和乙炔甲酰氨基(适合于迈克尔(Michael)加成反应、狄尔斯-阿尔德(Diels-Alder)反应和自由基加成反应)。

[0026] 细胞靶向部分的实例包括但不限于受体特异性配体、抗体和其它靶向部分,例如带有精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸(RGD)氨基酸序列或酪氨酸-异亮氨酸-丝氨酸-精氨酸-甘氨酸(YISRG)基序的肽;生长因子,包括表皮生长因子、血管内皮生长因子和成纤维细胞生长因子;病毒表面配体,例如唾液酸和N-乙酰神经氨酸衍生物;细胞受体配体,例如叶酸、甲氨蝶呤、蝶酸、雌二醇、雌三醇、睾酮及其它激素;甘露糖-6-磷酸、糖、维生素、色氨酸及类似物。抗体优选为抗细胞特异性表面抗原的单克隆抗体;适合的靶向部分不但包括完整抗体,而且还包括含有活性抗原结合序列的抗体片段,例如Fab'2片段、Fab'片段或此类抗体活性抗原结合序列的短肽类似物。

[0027] 病毒靶向部分的实例包括与病毒结合的小分子配体,例如氨基烷基金刚烷、Fuzeon™、PRO-542、BMS-488043、唾液酸-2-脱氧-2,3-双脱氢-N-乙酰神经氨酸、4-胍基-Neu5Ac2en(扎那米韦, zanamivir)、奥司他韦(oseltamivir)、RWJ-270201和类似物;与病毒表面结合的寡肽、寡糖和糖肽,以及抗病毒特异性表面抗原的抗体和抗体片段。在优选的实施方案中,本发明提供了负载有病毒神经氨酸酶或红血球凝集素配体的 π -聚合物。已确定此类聚合物本身具有抗病毒性质;参见,例如 T. Masuda 等, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 51:1386-98 (2003); M. Itoh 等, *Virology* 212:340-7 (1995) 和 Reece 等, 美国专利第 6,680,054 号 (2004)。可以选择性地向本发明抗病毒聚合物以及聚合物聚集体的疏水核心加载一种或多种传统抗病毒药物,所述传统抗病毒药物有利地在病毒颗粒附近释放。

[0028] 其它适于药用的连接基团可以是影响如激素或激素激动剂或拮抗剂的生物过程的小型化学品、肽、抗体或抗体片段、酶或活性药物成分;干扰病毒结合的物质;进入细胞内后干扰细胞周期或细胞过程的物质及类似物。可靶向单细胞和多细胞生物的细胞,所述生物包括细菌、真菌、高等动物和植物。可将生物素连接于 π -聚合物,并将其用作亲和素-和链霉亲和素-偶联蛋白质、肽和其它靶向或药理活性剂(例如,抗体、生长激素、显像剂和类似物)的连接位点。

[0029] “基质”是指有机或无机物质、表面和沉积物,例如玻璃、硅石或金属表面,细胞外基质、蛋白质沉淀物(例如多种淀粉样斑)、细胞表面、病毒表面以及详细表征或尚未详细表征的普通均质或异质表面,包括朊病毒。

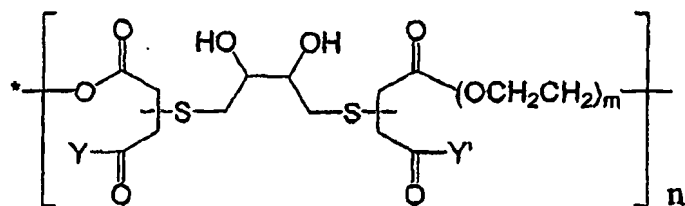
[0030] 玻璃或硅石基质连接部分的实例包括多种卤代硅烷、烷氧基硅烷、酰基硅烷以及具有此类官能团的化学品,包括聚合物。可根据基质的具体物化性质来设计其它连接基团。适合的连接部分,例如用于涂覆支架的那些连接部分为本领域的技术人员所熟知。

[0031] 在本发明的第三方面,分枝点部分 B 与聚合物链上其它分枝点部分相连以形成交联水凝胶结构。可以通过使聚合物与含有同官能团或异官能团的多官能部分相反应而实现这样的交联,所述官能团中至少一个与位于第一分枝点部分上的 X 或在 C 上反应性基团相反应,且所述官能团中至少一个与第二分枝点部分的 X 或存在于 C 上的反应性官能团相反应。也可以通过与聚合物链 A 的末端官能团连接而进行交联。此类交联聚合物可选择性地含有适合药物分子或靶向部分连接的反应性官能团。

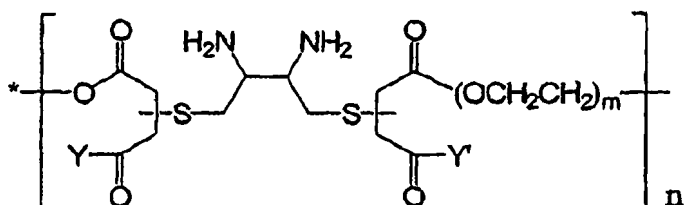
[0032] 分枝点部分 B 通常衍生自具有多个反应性基团的多官能分子,其中两个反应性基团适合连接亲水性聚合物单位 A,且两个反应性基团适合连接疏水部分 C。部分 B 可选择性地具有附加的上述反应性基团 X。

[0033] 特别优选的分枝点部分为二硫苏糖醇(DTT)、二硫赤藓糖醇(DTE)或 2,3-二氨基丁烷-1,4-二硫醇与两个马来酸分子的结合物。此分枝点部分与作为部分 A 的聚乙二醇的结合产生了式 3 和式 3a 的聚合物骨架。

[0034]



3



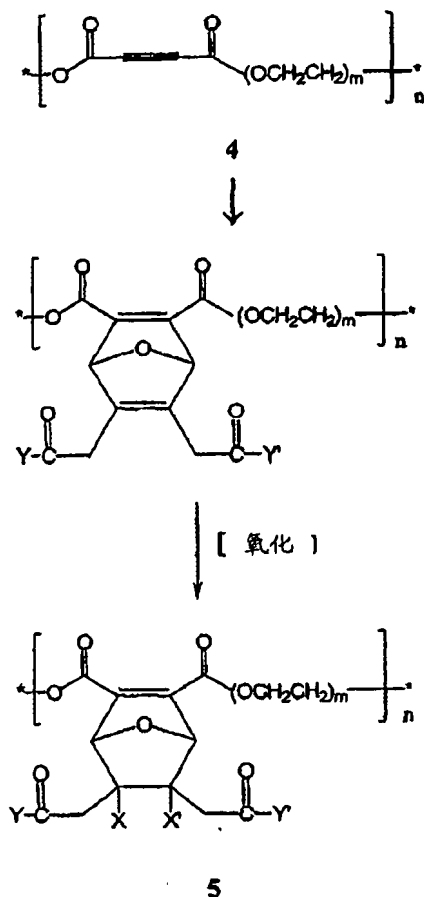
3a

[0035] 其中, Y 和 Y' 相同或不同, 且优选自 OH、NH₂、ONH₂、NHOH 和 NHNH₂。在一个优选的实施方案中, 反应性基团 X 为二硫醇的羟基或氨基基团, 作为靶向部分或药物部分的连接位点, 而官能团 Y 和 Y' 作为 C 部分的连接位点。或者, 基团 Y 和 Y' 作为连接位点, 而羟基或氨基基团用于连接 C 部分。

[0036] 式 3 和式 3a 意在表明每个硫原子可分别连接于 PEG 酯羰基的 α 或 β 位。本发明涵盖了单一异构体组合物以及在一个或两个 C-S 键的区域异构体的混合物。此外, 由于式 1 中的四个不对称碳原子, 本发明涵盖了所有手性异构体、内消旋异构体和非对映异构体及其混合物。

[0037] 乙炔二羧酸和呋喃的狄尔斯-阿尔德反应加成物也可作为合适的分枝点部分。例如, 已知衍生自 PEG 和乙炔二羧酸的聚酯 4 经过了与呋喃的狄尔斯-阿尔德反应 (M. Delerba 等, *Macromol Rapid Commun.* 18(8):723-728(1997))。

[0038]

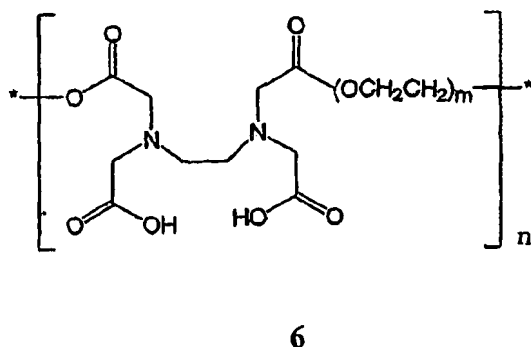


[0039] 方案 1

[0040] 因此,其可与 3,4-二取代呋喃进行狄尔斯-阿尔德反应以产生如图 5 所示的种类,且可以通过羟基化作用或环氧化作用对聚合物 5 进行修饰以提供反应性基团(例如,方案 1 中 X 和 X')。

[0041] 同样,PEG 与乙二胺四乙酸二酐反应可提供式 6 的聚酯:

[0042]



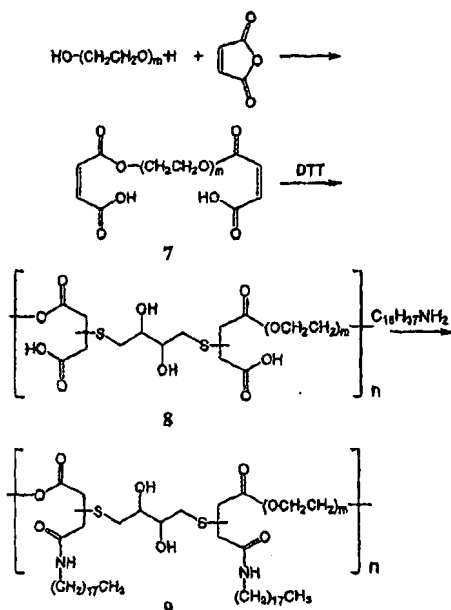
[0043] 其它适合的分枝点部分可衍生自酒石酸、乙炔二羧酸、次氨基三乙酸、3,4,3',4'-二苯砜四羧酸二酐、3,4,3',4'-二苯醚四羧酸二酐、均苯四酸二酐、链烷二硫醇(例如 1,2-乙二硫醇和 1,4-丁二硫醇)、双(2-巯基乙基)醚、2-巯基乙基硫醚、二巯基丙醇、二巯基嘌呤、二巯基噻二唑、二巯基琥珀酸、苯二甲硫醇、苯二硫醇、二卤化苯二甲硫醇、二卤化 4,4'-硫代双苯硫醇和类似物。

[0044] 在 Y 和 Y' 为 OH 的情况下,疏水基团 C 可以通过对羧酸基团酰胺化或酯化反应而

与聚合物连接。优选地,疏水基团 C 为相对较小 (C_8-C_{20}) 且主要为烃部分,并且可以是直链或支链或含有一个或多个环。实例包括但不限于共价连接的十二胺、十五胺、胆固醇和胆酸部分。虽然出于便捷考虑,本发明的聚合物表现为具有至多两个不同的疏水侧链,需要了解的是,可使用两种或多种疏水化合物的混合物向特定聚合物引入多种疏水侧链。

[0045] 在一个具体实施例中,通过聚乙二醇与马来酸酐反应形成聚酯 7,随后使其与二硫苏糖醇反应生成 8 来制备式 2 的聚合物 (其中 $X = OH$ 且 $r = 2$)。随后,使用十八胺酰胺化酸 7 以形成所需的梳型聚合物 9 (方案 2)。式 9 所示衍生自 DTT 的酰胺梳型聚合物在本文中被称作“ π -聚合物 A”;方案 2 中的特定聚合物 9 可称为“ C_{18} - π -聚合物 A”。

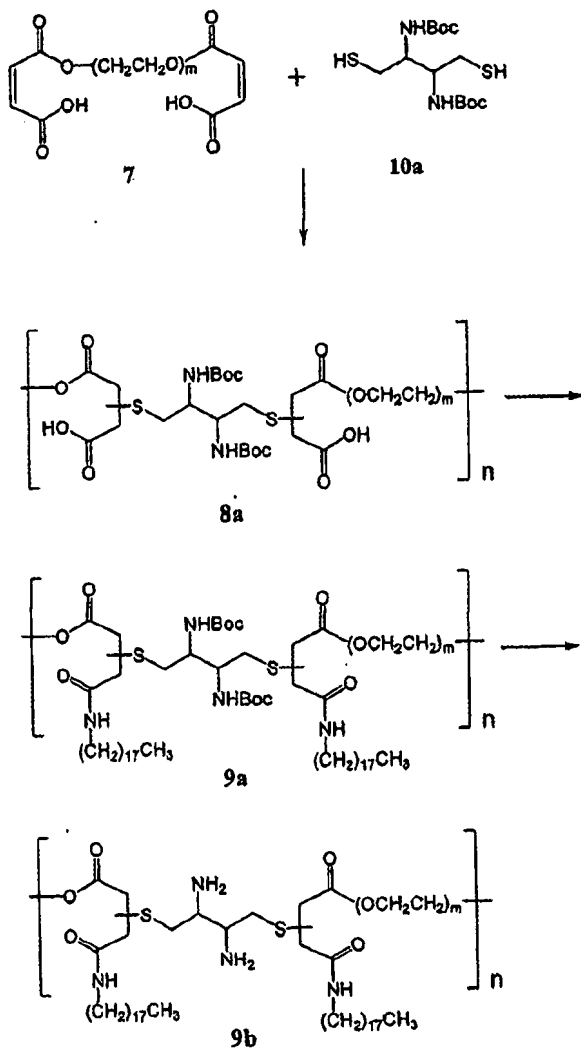
[0046]



[0047] 方案 2

[0048] 使用 2,3-双(叔丁氧羰基氨基)丁烷-1,4-二硫醇(按 DuPriest 等,美国专利第 4,755,528 号的方法制备)代替二硫苏糖醇,在脱保护后,产生相应的氨基-官能化的 π -聚合物 9b (方案 3)。

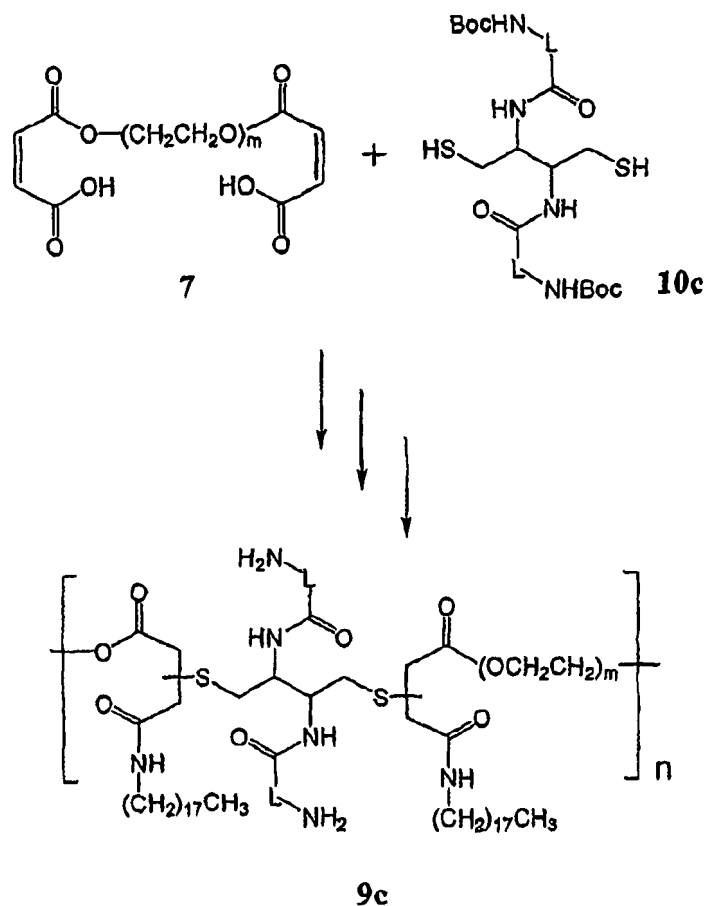
[0049]



[0050] 方案 3

[0051] 使用丁烷二硫醇 10c 同样可以产生总体结构 9c 的聚合物, 其中使用间隔基团 L 以便随后连接靶向部分 (方案 1)。间隔基团 L 可以是任何本领域已知用于使配体或标签与底物分子相连接的间隔基团, 包括但不限于 C_2 至 C_{20} 亚烷基和寡聚 (乙二醇) 间隔基。

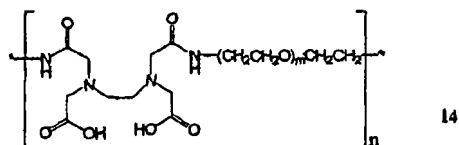
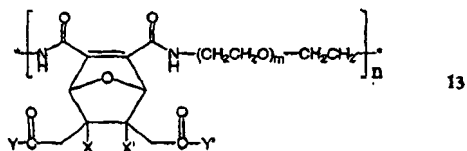
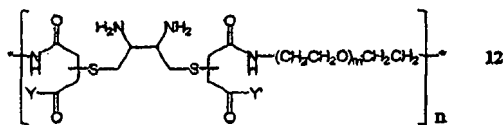
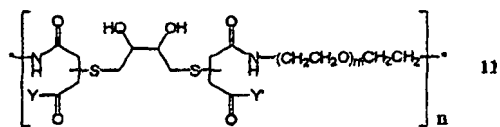
[0052]



[0053] 方案 4

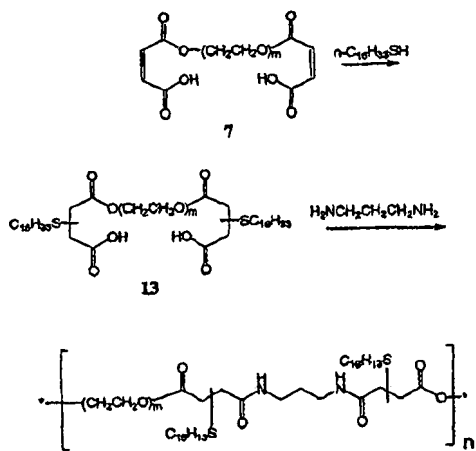
[0054] 在另一个实施方案中,可使用带有末端氨基基团的 PEG 聚合物制备如下列结构 10-14 中所示在单元 A 和单元 B 之间具有酰胺键的实例。可通过 PEG 二胺 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 与合适的环酐反应而对每种此类聚酰胺进行衍生化:

[0055]



[0056] 在温和条件下,上述酰胺酸为预期产物。预期经加热,可形成酰亚胺,从而使聚合物具有较少的反应性基团,但仍适于连接疏水性 C 部分。或者,可以将侧链 C 添加到聚合物 A 链段的末端,且可以在聚合过程中引入分枝点部分(方案 5)。

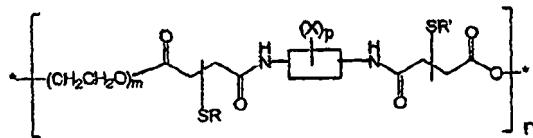
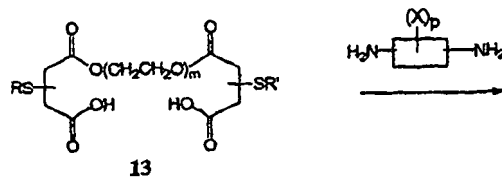
[0057]



[0058] 方案 5

[0059] 除了如方案 5 所示的 1,3-丙二胺的简单二胺之外,也可使用具有(可 选择性地遮蔽的)反应性官能团 X 的二胺,使聚合物 15 适合于靶向部分的连接(方案 6)。在下式中, p 可在 0-4 的范围,且各 X 基团独立地与任何其它可能存在的 X 基团相同或不同。反应性 X 基团不一定是侧基,而可以是,例如组成二胺的原子链中的 NH 基团,如单体 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$ 。

[0060]



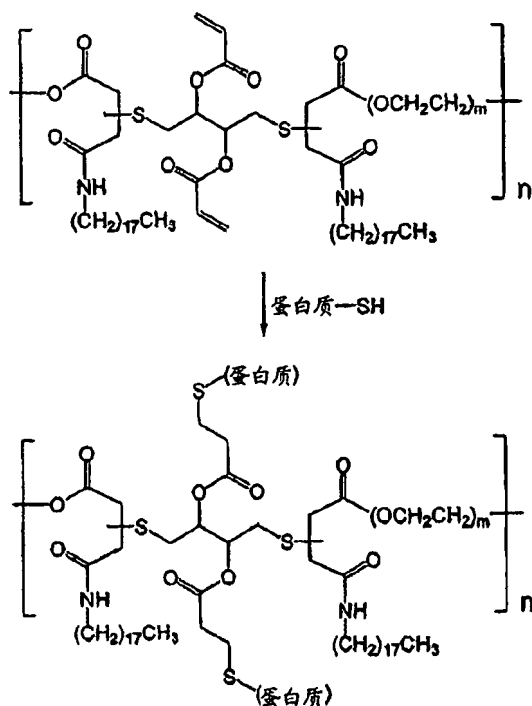
[0061] 方案 6

[0062] 按上述方案制备的某些 π -聚合物带有适合进一步衍生化的反应性基团 X, 从而连接靶向部分, 例如小分子、肽、核苷酸、糖、抗体等, 或者通过双官能或多官能交联剂使聚合物链交联。在具体实施方案中, 对聚合物链上的反应性基团进行部分衍生化以产生具有多种不同反应性基团的 π -聚合物, 这些反应性基团使得多种靶向和药物部分可以连接到一种聚合物链上。因此, 实施例 1 的 π -聚合物与亚化学计量的丙烯酰氯 (或马来酸酐) 的加成反应可提供带有丙烯酰 (或马来酰) 基团和残余羟基基团的聚合物。随后, 亚化学剂量巯基羧酸 (例如, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_3-\text{COOH}$) 的迈克尔加成反应可提供带有羟基、丙烯酰基和羧基基团的聚合物。除了由亚化学计量试剂所留下的剩余反应性基团之外, 半胱氨酸的加成反应可引入氨基和羧基基团。

[0063] 另一种获得多官能 π -聚合物的方法包括精心去除部分疏水链 C。例如, 可以通过简单手段限制酰化步骤中形成侧链的烷基胺的量, 制备具有未反应的羧酸基团的实施例 1 的 π -聚合物。还有一种方法与胺混合物的酰胺化反应, 所述胺混合物的一部分含有反应性基团 X。此外, 在适宜的条件 (步骤 A 中马来酸酐过量和步骤 B 中 DTT 过量) 下, 可产生具有所需的自由硫醇基团群的聚合物制备物。

[0064] 通过设计, 实施例 1 的 π -聚合物在骨架中含有衍生自 DTT 部分的羟基基团, 所述羟基基团起反应性基团 X 的作用。在存在有碳酸盐 / 碳酸氢盐缓冲液的水性介质中, 使用丙烯酰氯或甲基丙烯酰氯对这些基团进行酯化反应可导致 -OH 基团上的丙烯酰基取代反应。丙烯酸酯聚合物易于发生自由基聚合反应 (存在或不存在额外的自由基单体, 例如丙烯酸化合物或如双丙烯酸化合物的交联剂) 而得到适于药物控释 (作为聚合物库或贮存处) 和局部给药 (例如皮肤贴片或软膏) 的水凝胶。

[0065]



[0066] 方案 7

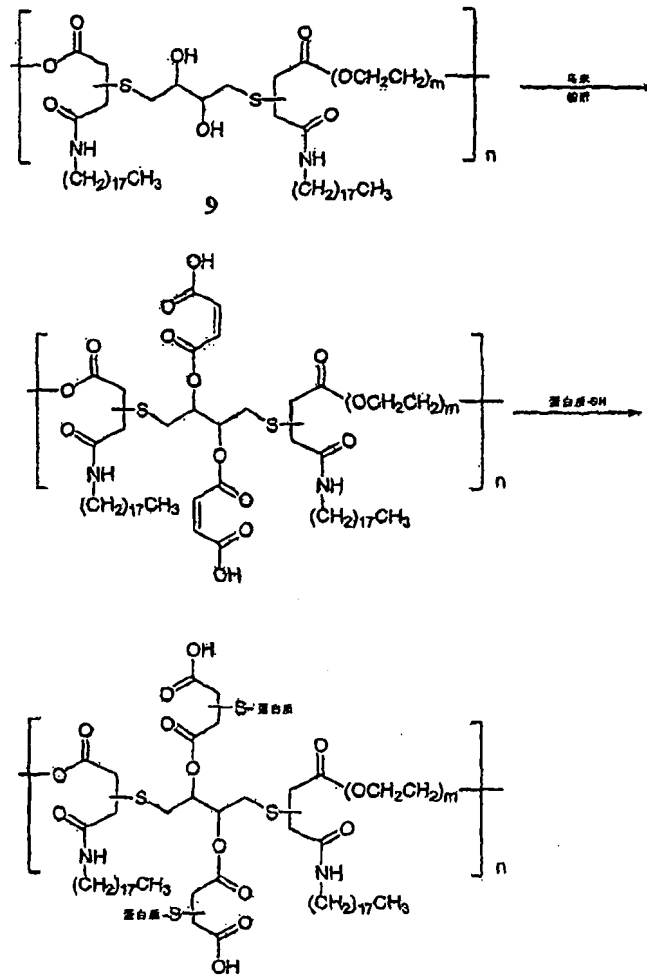
[0067] 丙烯酰基团也可以进行迈克尔加成反应,特别是与巯基,例如与蛋白质、酶、肽、抗体、Fab' 2 片段或 Fab' 片段中半胱氨酸残基的巯基,或其它靶向部分的巯基进行迈克尔加成反应(方案 7)。也可以使用马来酸酐酯化干燥后的带有反应性羟基基团的 π -聚合物,使其与马来酸酯基团(迈克尔反应受体)相连接,同时产生自由羧基基团。在所得的聚合物中,马来酸双键可用于迈克尔加成反应,特别是与巯基,例如与蛋白质、酶、肽、抗体、Fab' 2 片段或 Fab' 片段中半胱氨酸残基的巯基,或其它靶向部分的巯基进行迈克尔加成反应(方案 8),且羧基基团可以用于偶联药物或配体的氨基基团,或者蛋白质和肽中的赖氨酸残基。

[0068] 可进一步通过酰胺化反应向新引入的(或先前可用的)羧基基团连接不同的部分。这样,即使在饱和反应条件(即,将要连接的部分化学计量上过量)下也可以连接至少两种不同的靶向部分。

[0069] 可使用胺在典型的偶联条件下酰胺化具有羧酸酯基团侧链的聚合物,也可以通过 Curtius 重排反应将其转化为异氰酸酯基团,并随后与胺或醇类偶联而分别形成脲或氨基甲酸酯。可使用此类反应引入疏水基团 C 或连接靶向部分。

[0070] 可以通过反应性基团之一至少部分地与二胺反应,将游离胺引入聚合物中。必须对二胺进行选择以使其中一个氨基基团得到保护或者在反应条件下不反应。后者大多通过在 pH 约为 7.5 时使用乙二胺完成,因为两个氨基基团的 pKa 值有很大不同。优选地,此酰胺化反应在引入疏水性侧链基团之后作为单独的步骤进行。随后,可以通过此游离胺的酰胺化反应连接具有羧基基团的肽或其它分子。

[0071]



[0072] 方案 8

[0073] 这样,即使在饱和条件下,也可以将多至 3 种不同肽或其它靶向部分连接到 π 聚合物上:一个通过巯基,一个通过胺或羟基,一个通过羧酸基团。

[0074] 也可以通过与氮丙啶或卤化烷基胺(例如溴乙胺或氯乙胺)的反应将羟基和巯基基团转化为伯胺。半胱胺的酰胺化反应可引入二硫化物,其可以直接与肽或抗体的半胱氨酸反应从而连接肽或抗体;或使用例如氨基乙硫醇或 DDT 先将其还原,随后进一步与肽或抗体反应。

[0075] 通过进行部分反应,人们可以向本发明的聚合物引入附加的反应性官能团,包括但不限于(1) 硫醇反应性基团,例如丙烯酸或马来酸衍生物,(2) 羧酸反应性基团,例如氨基或羟基,(3) 胺反应性基团,例如羧基,和(4) 二硫化物反应性基团,例如巯基。每个聚合物分子中此类附加官能团的数目在 $1/r$ 至若干倍 r 的范围之间,这取决于所使用的试剂及使用的量。

[0076] 或者,可以连接两个或多个特异配体以改善与例如病毒或细胞表面结合的特异性。也可以使用两个或多个特异配体以促成不同细胞靶之间的相互作用,例如,一个配体可靶向病毒颗粒,而另一个配体可利于结合吞噬细胞,这样将病毒颗粒带到吞噬细胞附近或与其相接触并促进吞噬作用。

[0077] 此类衍生化作用可以通过连接不同的官能团(例如,胺、羧酸和硫醇)将三种或多种不同靶向和/或治疗性部分与聚合物相连接。因此,人们可以将组织特异性靶向剂、显像

剂和治疗剂与单一聚合物相连,并随后通过聚合物的自组装获得靶向治疗剂,所述靶向治疗剂的分布和靶向效率可受到监控。

[0078] 将配体与本发明聚合物的重复单元相连接提供了配体在聚合物链和纳米颗粒表面上的多价展示 (multivalent display)。多价展示通常会导致对靶标亲和力显著增加。例如,多价抗体清除其靶标的效果比正常二价抗体的效果高出很多。已知糖结合蛋白和糖类在自然状态下是多价的,并且其单价状态不起作用。相似地,多价肽和糖靶向部分比单独的单体明显更为高效。由于与聚合物相连接而增加的 MW 造成肽和其它配体的肾清除率的下降。此外,PEG 骨架对肽的益处与 PEG 化类似,包括逃避免疫监视。

[0079] 此外,与单价靶向部分相比,多价靶向部分可明显更有效地修饰及中和多价靶标(例如,病毒颗粒)。以多价形式展示多个(不同的)肽的能力将导致特异性的增强。例如,可以通过连接对应于 CD4 结合区的肽和对应于病毒 CCR-5 或 CXCR-4 结合区的另一肽,以及可能的对应于其它受体(分别为 CXCR-4 或 CCR-5)的第二多肽来构建真正 HIV- 特异性(HIV 病毒结合的)聚合物。此聚合物可以完全掩蔽病毒的结合区并使病毒无法连接到细胞上从而失去感染性。此外,聚合物的表面活性剂性质可通过结合而造成病毒结构自身的不稳定。可以使用干扰相同结合形式(CD4, CCR-5, CXCR-4)的小分子或肽和小分子(优选具有互补活性)的混合物来代替肽。所得聚合物可使任何游离病毒无效,因此通过将它们用作避孕套润滑剂组分或类似物可以理想地阻止感染传播。此外,此类聚合物可以注射到患者体内以减少 HIV 载量。

[0080] 通常,在使用如 DTT 的多官能试剂时,可以通过羧酸与 DTT 的酯化反应或类似的副反应产生聚合物链的部分交联。PEG 链中心区的仲羟基基团(例如,与双酚 A 二缩水甘油醚残基结合的那些),如果出现在 PEG 原料中,也会导致交联反应。所得交联水凝胶结构也是有用的材料。例如,通过适当地增加此交联程度或通过使用可选的交联剂(例如双环氧乙烷)进行明确的交联,能够制造可用作药物存储库的柔性水凝胶材料。通过对材料进行适当地修饰(例如,缩短 PEG 长度、增加开放性羧基基团(open carboxylic group)以及并入合适的丙烯酸基团),能够制造可以作为存储库的直链或交联的水凝胶材料,所述水凝胶材料可以通过固定在如支架等器械上或被用于粘性贴片或皮下插入贴片的衬垫等器械吸收而得到支撑。通常,此类交联材料适合于控制释放而不是增强释放或靶向释放。

[0081] 本发明的梳型聚合物可用于在水性溶剂系统中增溶微溶于水的物质。在水性溶剂中增溶物质的方法包括在水存在时使微溶物质与本发明的梳型聚合物相接触,以形成此物质与聚合物的水溶性复合物。或者,使聚合物与要增溶的物质在两相水-有机乳剂中相结合,并通过蒸发除去有机溶剂。例示性方法描述于美国专利第 6,838,089 号,通过引用并入本文。据信在大多数情况下,聚合物自组装成纳米颗粒,所述纳米颗粒具有溶解在疏水 C 链中的微溶物质,所述疏水 C 链在颗粒核心处接合,同时 A 链段形成亲水外晕,所述亲水外晕可充分地降低界面自由能以保持颗粒水性悬浮液的稳定。

[0082] 在一些情况下,微溶物质可能并没有在内核中完全溶解,而是作为被 C 链包围并悬浮的固体纳米颗粒存在于颗粒核心中。为了本发明的目的,这是一个程度差异,因为本发明的实施并不依赖于链 C 与微溶物质间特定的混合程度。在一些情况下,物质以分子水平溶解在 C 链之间,然而在其它情况下,可以出现与 C-链环境任意程度的相分离。在一些情况下,可以预计由于温度的作用,此系统可从一种状态转化成另一种状态。

[0083] 可以通过修饰疏水部分 C 对聚合颗粒疏水内核的溶剂化能力进行改进。适合的修饰包括但不限于引入一个或多个亲水性取代基（例如，羟基、醚、酰胺和氰基官能团）以增大疏水内核的极性和 / 或极化率。

[0084] 可以通过这些聚合物增溶的微溶物质包括脂溶性维生素和营养品，包括但不限于维生素 A、D、E 和 K，胡萝卜素、胆钙化醇和辅酶 Q；不溶性药物，例如多西紫杉醇、两性霉素 B、制霉菌素、紫杉醇、阿霉素、表阿霉素、鲁吡替康、替尼泊甙、足叶乙甙、柔红霉素、甲氨蝶呤、丝裂霉素 C、环胞菌素、伊立替康代谢物 (SN-38)、他汀类和类固醇；染料、光动力剂和显像剂，以及核酸、核酸类似物和核酸复合体。核酸类似物包括的种类例如硫代磷酸盐（酯）和肽核酸；核酸复合体为寡聚核酸和基本电中和量的阳离子或多阳离子类物质的离子复合物。

[0085] 为了本公开的目的，认为中性 pH 下不溶性的药物为“微溶”，因为在很多情况下需要中性的药物组合物。例如，环丙沙星在 pH 低于 4.5 时可溶于水，但在制备用于眼给药的药物时，此 pH 值的刺激性非常高。本发明的聚合物可在 pH7 时在生理盐水中增溶环丙沙星。并且，为了本发明的目的，应该将“微溶”理解为涉及具备以下条件的任何物质：其在水性介质中的溶解度使得溶解度的增加可得到改进的或更有用的组合物。因此，在静脉给药单位剂量为 5g 时，中等溶解性（例如，达到 2g/ 升的溶解性）的药物为“微溶”。

[0086] 本发明聚合物增溶药物活性种类的能力使得本发明也可提供包含本发明的一种或多种 π - 聚合物和治疗有效量的一种或多种药物活性剂的药用组合物。本发明的聚合物可以使在其它情况下无效量的药物活性剂有效。因此，为了本公开的目的，“治疗有效量”是使组合物整体有效的药物量。

[0087] 本文中所有提到的专利、专利申请以及公开均通过引用完整地并入本文。

[0088] 实施例

[0089] 1. 一般过程

[0090] 本发明也提供用于制备本发明的梳状聚合物的方法。通过下面描述的过程，有机合成领域的技术人员将很容易地实行这些聚合物的合成。主要起始材料是聚乙二醇，其优选在使用前干燥。通过在真空中高温下搅拌熔化的 PEG，直到泡沫停止产生，可容易地进行干燥。这可花费 8-12 小时，这取决于 PEG 的质量。在干燥后，PEG 可被长期地储存在氩气中。商业可获得的工业或研究级 PEG 可被使用以制造本发明的聚合物，例如具有 1430-1570 分子量分布的商业的多分散“PEG1500”。这种物质可掺入双酚 A 二缩水甘油醚，其在 PEG 链的中间引入仲羟基。为了确保本发明的聚合物具有最可重复性和一致性特性，PEG 优选不含双酚 A，并且是低分散度的。最优选的是 >95% 单分散性的 PEG 聚合物，例如从 Nektar Therapeutics (以前, Shearwater Polymers), Huntsville AL 和 Polypure AS, Oslo, Norway 商业可获得的 PEG 聚合物。特别优选的 PEG 的一个实例是来自 Polypure 的“PEG-28”，其为 >95% 的 $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{28}\text{H}$ ，分子量 1252。

[0091] 所有反应在惰性气氛如氮气或氩气中实行，伴随磁或优选机械搅拌。

[0092] 在步骤 A，熔化干燥的 PEG，并伴随搅拌加入马来酸酐（每摩尔 PEG，2 摩尔）。马来酸酐的量应该与 PEG 末端羟基基团的数目尽可能接近的匹配。马来酸酐不足将导致羟基-封端的聚合物链，反之，过量的马来酸酐将在下一步骤中消耗羟基基团，这导致过早的链封端和末端羧基。反应温度不是关键的，该方法可在 45°C 和 100°C 之间的温度下合宜地

实行。优选的反应温度在 65°C 和 90°C 之间。如果使用高温,马来酸酐倾向升华,应采取步骤确保马来酸酐保持在溶液中。最小化顶空和将反应容器浸没在油浴中是有效的方法。

[0093] 取决于选择的温度,反应可以在 2 小时或更少的时间内完成,或者反应可被进行过夜。可以通过硅胶板上的 TLC 监控反应,并且继续进行直到马来酸酐消失以后。视觉对比、UV 和碘染色都可被用来检查 TLC 板。

[0094] 在步骤 B 中,在步骤 A 中产生的粗制 PEG 二-马来酸酯被与二硫苏糖醇 (DTT) 和 N, N, N', N' - 四甲基乙二胺 (TEMED) 组合 (如果需要流动,加入水),在 70°C 下,搅拌混合物。在 30 分钟内完成反应,如粘度的快速增加所表明的。如果使用了多于或少于最佳量的 DTT,那么将减小产物的分子量。如果需要,通过用较低效的叔胺碱如 TEA 替代 TEMED,也可减小产物的分子量。

[0095] 在步骤 C 中,将足量的水加入到反应混合物以减少粘度,并且相对于聚合物中每摩尔羧酸基团加入 0.1mol N-羟基丁二酰亚胺 (NHS) 和 1.05mol 十六胺 (这个量 NHS 表现最佳地最小化了副反应的程度)。然后,分步加入过量的 N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺 (EDC) (每摩尔羧酸基团 1.4mol EDC),根据需要加入额外的水以保持搅拌。反应混合物的 pH 被保持在 7 以上,并优选在 9 到 11 之间,以优化烷基胺的反应性。含有十二烷基胺,该反应可在大约 40 ~ 45°C 下进行,反之含有十八烷基胺,温度在大约 55°C - 57°C。反应通过 TLC 监测,直到观察到恒定水平的剩余烷基胺,这通常在反应过夜之后。

[0096] 将反应混合物酸化到 pH 大约 3.0 到大约 4.5,并且在室温下搅拌大约 24 小时,以破坏未反应的 EDC,然后使用 1N NaOH 将其滴定至 pH7.0。最终的反应混合物在大约 800xg 下离心 1 到 3 小时,以除去固体污染物和副产物。

[0097] 离心后,在 GPC 柱 (Toyopearl™、Sephadex™、Sephacryl™、Biogel™ 等) 上可对上清液色谱分析。然而,π 聚合物是两性分子的物质,并且将对大多数 GPC 柱填充物表现亲和性,这使除去污染物变复杂。可选的,可在大孔疏水相互作用柱 (例如 TOYOPEARL™ Phenyl650C, Tosoh Biosciences, Montgomeryville, PA, U. S. A.) 上对聚合物色谱分析,用甲醇/水梯度进行洗脱。优选地,反应混合物针对数种酸化的和中性的水的变化进行透析,以除去低分子量起始材料和反应副产物。

[0098] 反应混合物也可用丁酮、异丙醇、丁醇或其它极性有机溶剂提取,以除去有机杂质,但是大量的两性分子聚合物被损失在提取溶剂中。优选地,反应混合物经过使用适当膜的超滤以将产物分为分子量等级,如 5kDa 到 10kDa; 10kDa 到 30kDa; 30kDa 到 50kDa 等,这取决于使用的滤过膜的截流 (cutoff)。聚合物的水溶液可经过死端式过滤,以便产生无菌或无病毒的溶液,这取决于滤过膜或介质的选择。

[0099] 2. π-聚合物的合成

[0100] 实施例 1: PEG-二(烷基酰胺基琥珀酰)二硫醚中等分子量聚合物 (C16-π-聚合物 A)

[0101] 在真空中 80°C 下,干燥聚乙二醇 (PEG-1500, Sigma Chemical Co.), 直到气泡停止产生 (8-12 小时,这取决于 PEG 的质量)。干燥的 PEG 可被长期地储存在氩气下的干燥环境中。

[0102] 在氩气中,油浴上融化干燥的 PEG,并且伴随搅拌逐步加入马来酸酐 (每摩尔 PEG2 摩尔,做了对杂质的校正)。在氩气中 90°C 下,搅拌该混合物。因为马来酸酐倾向升华,最

小化了顶空,并且将整个反应容器保持在反应温度下。容器壁上任何冷凝的马来酸酐被刮回到反应混合物中。反应过程通过硅胶板上的 TLC 监控,分别使用乙醇和己烷作为溶剂,进行 UV 观察和碘染色。在马来酸酐消失后继续反应一小时。

[0103] 用两体积的水稀释粗制的 PEG-二马来酸酯。然后,在搅拌下,将二硫苏糖醇 (DTT, 每当量 PEG, 1.01 当量) 和 N,N,N',N'-四甲基乙二胺 (TEMED, 1.02 当量) 的水溶液 (每体积 TEMED, 2 体积水) 加入到反应混合物中。在 70°C 下、氩气中搅拌反应 2.5hr, 留在室温下过夜, 然后再次在 70°C 下搅拌 2 小时。TLC 监控反应, 并且在 DTT 完全消失后判定反应完成。

[0104] 将水加入到上述反应混合物以减少粘度, 直到混合物可以被搅拌 (大约 25% 固体), 在 65°C 下、氩气中搅拌混合物, 并且加入 N-羟基丁二酰亚胺 (每摩尔在 PEG-二马来酸酯-DTT 聚合物中的羧酸基团加 0.1 摩尔), 然后加入十六烷胺 (每摩尔在聚合物中的羧酸基团加 1.05 摩尔) 和 N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺 (EDC, 每摩尔在聚合物中的羧酸基团加 0.56 摩尔)。在氩气中, 搅拌混合物 1 小时, 加入第二份 EDC (每摩尔在聚合物中的羧酸基团加 0.56 摩尔)。另一个小时后, 进一步加入第三份 EDC (每摩尔在聚合物中的羧酸基团加 0.28 摩尔, 总共每摩尔羧酸加 1.4mol EDC), 以补充 EDC 水解的损失。当加入的固体使悬浮液很难搅拌时, 根据需要加入额外的水以保持流动性, 并且当需要时通过加入 1N NaOH 将 pH 保持在 8 到 10 之间。在 65°C 下、氩气中搅拌混合物过夜, TLC 监控 (二氧化硅、乙醇), 直到烷基胺表现达到稳定的浓度, 然后搅拌另外 4 小时。然后, 用 1N HCl 酸化反应混合物至 pH 大约 4.5, 搅拌 24 小时以破坏未反应的 EDC, 并且通过逐滴加入 1N NaOH, 调节到 pH7.0。含有十二烷胺, 该反应在大约 40-45°C 下进行, 反之含有十八烷胺, 温度优选为 55°C -57°C。

[0105] 将混合物转移到离心管中, 并且在台式离心机中在大约 800xg 下旋转 2 小时以分离残留固体。在离心后, 用异丙醇提取反应混合物, 以除去有机杂质。优选超滤作为异丙醇提取的替代方法。

[0106] 通过该方法, 下列氨基化合物被连接到聚合物:

[0107] 实施例 1a: 十一烷胺

[0108] 实施例 1b: 十八烷胺

[0109] 实施例 1c: 4-壬基苄胺

[0110] 实施例 1d: 3-[(4-苯氧基)苯基]丙胺

[0111] 实施例 2: PEG-二(烷基酰胺基琥珀酰)二硫醚高分子量聚合物

[0112] 按照在实施例 1 中列出的方法, 除了使用每摩尔马来酸酐 0.55mol DTT 和 0.55mol TEMED。因为粘度增长很快, 需要强力搅拌。表明大部分反应在 5-10 分钟内完成, 然后, 随着温度由 55°C 升高到 80°C, 通过接下来 4 小时, 缓慢完成反应。

[0113] 实施例 3: PEG-二(烷基酰胺基琥珀酰)二硫醚聚合物

[0114] 按照在实施例 1 中列出的方法, 除了每摩尔在聚合物中的羧酸基团使用 1.5mol 十二烷胺。加入 N-羟基丁二酰亚胺 (NHS, 每摩尔羧酸基团 1.0mol) 和 1,1'-羰基二咪唑 (CDI, 每摩尔羧酸基团 3.0mol), 然后在 80°C 下, 搅拌反应 4 小时, 并如上所述进行后处理。

[0115] 通过该方法, 下列氨基化合物被连接到聚合物:

[0116] 实施例 3a: 十一烷胺

- [0117] 实施例 3b :十四烷胺
- [0118] 实施例 3c :十八烷胺
- [0119] 实施例 3d :脱氢松香基胺
- [0120] 实施例 3e :胆固醇 2- 氨基乙醚
- [0121] 实施例 3f :10- 苯氧基癸胺
- [0122] 实施例 3g :癸二酸酰肼
- [0123] 实施例 3h :油酸酰肼
- [0124] 实施例 3i :脱氢松香酸酰肼
- [0125] 实施例 3j :胆酸酰肼
- [0126] 实施例 3k :棕榈酸酰肼
- [0127] 实施例 4 :PEG-(烷基酰胺基琥珀酸酯) 共聚物
- [0128] 在 0℃ 下、氩气中,冷却无水的二乙醚 (10ml) 中的 PEG (6.66mmol) 和三乙胺 (2.32ml, 16.65mmol) 的溶液,并且用甲磺酰氯 (1.03ml, 13.32mmol) 对其逐滴处理。在 0℃ 下,连续搅拌 1 小时,然后在室温下搅拌 2 小时。蒸发醚,并将无水的丙酮 (15ml) 加入到剩余物中,以便沉淀三乙胺氯化物,其被从溶液过滤。将滤液用溴化锂 (2.31g, 26.64mmol) 处理,并加热至回流 20 小时。然后用己烷稀释混合物,并通过覆盖有 Celite™ (0.5cm) 的二氧化硅 (3cm) 短柱过滤,并用己烷洗脱。干燥滤液,过滤并蒸发以留下 α, ω -二溴-PEG, 一种油状物。
- [0129] 通过 Godjoian et al., tetrahedron Letters, 37 :433-6(1996) 的方法将 α, ω -二溴-PEG 与一当量的 2,2-二丁基-4,5-二(甲氧基羰基)-1,3,2-二氧杂锡杂环戊烷 (dioxastannolane) 反应。所形成的二甲基酒石酸-PEG 聚醚使用甲醇中的 KOH 皂化,然后用十二烷胺或十六烷胺对其酰胺化,如上面在实施例 1 和 3 中所述,或者用实施例 3a-3k 中的胺对其酰胺化。
- [0130] 实施例 5 :PEG 与 EDTA 二酐的共聚合
- [0131] 通过实施例 1 中描述的方法,将无水 PEG 与 1,2-乙二胺四乙酸二酐反应,然后,如在实施例 1 用十二烷胺或如在实施例 3 用十六烷胺对其酰胺化,或者用实施例 3a-3k 中的胺对其酰胺化。
- [0132] 以相同方式,下列的二酐与 PEG 共聚合,并接下来对其酰胺化 :
- [0133] 实施例 5a :萘四羧酸二酐
- [0134] 实施例 5b :二萘嵌苯四羧酸二酐
- [0135] 实施例 5c :苯甲酮四羧酸二酐
- [0136] 实施例 5d :4,4'-(六氟异亚丙基)双邻苯二甲酸酐
- [0137] 实施例 5e :丁烷四羧酸二酐
- [0138] 实施例 5f :双环(2,2,2)辛-7-烯-2,3,5,6-四羧酸二酐
- [0139] 实施例 5g :二亚乙基四胺五乙酸二酐
- [0140] 实施例 5h :3,4,3',4'-二苯基砒四羧酸二酐
- [0141] 实施例 5i :3,4,3',4'-二苯基醚四羧酸二酐
- [0142] 实施例 5j :苯均四酸二酐
- [0143] 实施例 6A :具有侧链硫醚的 PEG-二胺共聚物

[0144] 使用在实施例 1 中用于 DTT 的相同的步骤,将如实施例 1 中制备的 PEG 二马来酸酯与十二烷硫醇(每当量 PEG 二马来酸酯,两当量)反应。当没有聚合作用发生时,不需要稀释,并且在熔化的 PEG-二马来酸酯中进行反应。加入 TEMED 催化剂,然后加入硫醇。反应后,起始材料消失,使用 TLC 监测。最高可以使用蒸发导致的烷基硫醇的损失显著时的温度(高达大约 100°C)。可使用轻微过量的烷基硫醇来充分饱和马来酸基团。通过充氮气和氩气和/或在真空中加热,在反应最后,过量烷基硫醇被驱除,直到通过气味或通过 TLC 检测不到烷基硫醇。

[0145] 通过该方法,下列硫醇被连接到 PEG 二马来酸酯:

[0146] 实施例 6Aa: 巯基琥珀酸二-t-丁酯

[0147] 实施例 6Ab: 十四烷硫醇

[0148] 实施例 6Ac: 十六烷硫醇

[0149] 实施例 6Ad: 2-巯基乙烷磺酸

[0150] 实施例 6Ae: 3-巯基丙烷磺酸

[0151] 实施例 6Af: 6-巯基己酸-t-丁酯

[0152] 实施例 6Ag: 4-巯基苯甲酸-t-丁酯

[0153] 实施例 6Ah: 巯基乙酸-t-丁酯

[0154] 实施例 6Ai: 4-(t-丁氧基羰基氨基)丁烷硫醇

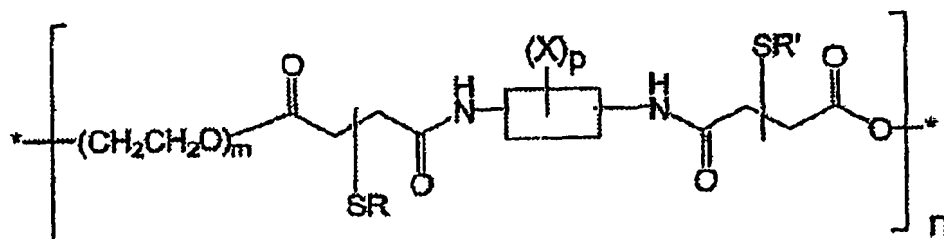
[0155] 实施例 6Aj: 3-(t-丁氧基羰基氨基)苄硫醇

[0156] 实施例 6Ak: 4-癸基苄硫醇

[0157] 具有活性官能团的硫醇适合用于连接 C 链,和/或活性官能团可作为对靶向部分的连接点(X)。

[0158] 实施例 6B: PEG-二胺与侧链硫醚的共聚物

[0159]



[0160] 使用与用于实施例 1 的十二烷胺的相同方法,用 1,4-二氨基丁烷(每两当量 COOH 基团,一当量的二胺)对实施例 6A 中获得的硫醇加合物酰胺化,当需要时用水稀释以保持反应混合物的流动性。当需要时,加入另外的 EDC 等分样以确保完全的聚合作用。通过该方法,实施例 6A 和 6Aa 到 6Ak 的硫醇加合物被转化为 PEG-二氨基丁烷聚酰胺。

[0161] 通过该方法,下列二胺可被转化为 PEG 聚酰胺(BOC = t-丁氧基羰基):

[0162] 实施例 6Ba: 2-(O-BOC)-1,3-二氨基-2-丙醇

[0163] 实施例 6Bb: N', N''-二(BOC)六亚乙基四胺

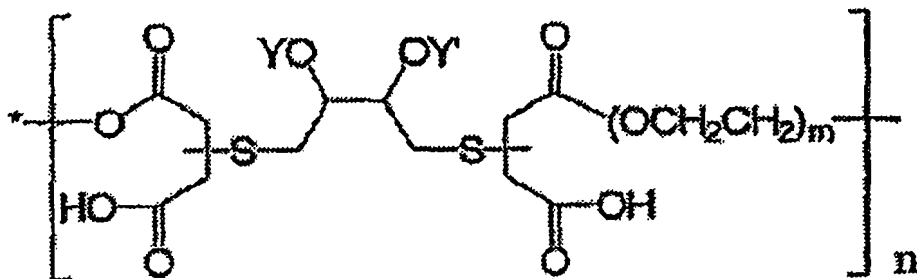
[0164] 实施例 6Bc: N', N''-二(BOC)精胺

[0165] 实施例 6Bd: N'-BOC 亚精胺

[0166] 实施例 6Be: N', N'', N'''-三(BOC)五亚乙基六胺

[0167] 实施例 6Bf: 胍基丁胺

- [0168] 实施例 6Bg : 赖氨酸 t- 丁酯
 [0169] 实施例 6Bh : 1,6- 二氨基己烷
 [0170] 实施例 6Bi : 1,4- 苯二胺
 [0171] 实施例 6Bj : 1,3- 苯二胺
 [0172] 实施例 6Bk : 1,4- 二氨基丁烷 -2,3- 二醇丙酮化合物
 [0173] 实施例 7 : PEG- 二 (烷基琥珀酸酯) 二硫醚
 [0174]



[0175] 通过 S. Sasaki et al., Chem. Pharm. Bull. 33(10):4247-4266(1985) 的方法的改良制备 DTT (间 -2,3- 二 (十六烷氧基) 丁烷 -1,4- 二硫醇) 的 2,3- 二 -O- 十六烷基醚。通过实施例 1 的方法,其被加入到 PEG- 二马来酸酯。

[0176] 通过该方法,下列醚二硫醇被连接到 PEG 聚合物 :

- [0177] 实施例 7a : 间 -2,3- 二 (n- 丁氧基) 丁烷 -1,4- 二硫醇
 [0178] 实施例 7b : 间 -2,3- 二 (4- 壬基苯基甲氧基) 丁烷 -1,4- 二硫醇
 [0179] 实施例 7c : 间 -2,3- 二 (联苯基 -4- 甲氧基) 丁烷 -1,4- 二硫醇
 [0180] 实施例 7d : 4,6- 二 (癸氧基) 苯 -1,3- 二甲硫醇
 [0181] 实施例 7e : 4,5- 二 (癸氧基) 苯 -1,2- 二甲硫醇
 [0182] 实施例 7f : 3,4- 二 (癸氧基) 噻吩 -2,5- 二甲硫醇
 [0183] 实施例 8A : 取代的 PEG 琥珀酸酯

[0184] 按照实施例 1 的方法,除了 2- 十二烯 -1- 基琥珀酸酐被使用代替马来酸酐。十二烯基取代基在最终聚合物中提供侧链 C 链。

[0185] 通过该方法,下列取代的琥珀酸酐用 PEG 酯化 :

- [0186] 实施例 8Aa : 异丁烯基琥珀酸酐
 [0187] 实施例 8Ab : 2- 辛烯 -1- 基琥珀酸酐
 [0188] 实施例 8Ac : 十八烯基琥珀酸酐
 [0189] 实施例 8Ad : 3- 氧杂二环 - 己烷 -2,4- 二酮
 [0190] 实施例 8Ae : 环己烷二羧酸酐
 [0191] 实施例 8Af : 邻苯二甲酸酐
 [0192] 实施例 8Ag : 4- 癸基邻苯二甲酸酐
 [0193] 实施例 8Ah : 六氟甲基邻苯二甲酸酐
 [0194] 实施例 8Ai : 四氢邻苯二甲酸酐
 [0195] 实施例 8Aj : 降冰片烯二羧酸酐
 [0196] 实施例 8Ak : 斑蝥素
 [0197] 实施例 8Al : 双环辛烯二羧酸酐

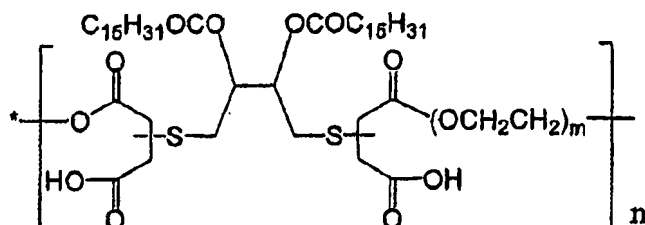
- [0198] 实施例 8Am :外 -3,6- 环氧 -1,2,3,6- 四氢邻苯二甲酸酐
- [0199] 实施例 8An :S- 乙酰基巯基琥珀酸酐
- [0200] 实施例 8B :具有侧链烷基的 PEG- 二 (烷基酰胺基琥珀酰) 二硫醚
- [0201] 根据实施例 1 的方法,按照在实施例 8A 和 8Aa 到 8An 中描述获得的取代的 PEG 琥珀酸酯与 DTT 反应。
- [0202] 通过该方法,下列二硫醇与按照在实施例 8A 和 8Aa 到 8An 中描述获得的任意的取代的 PEG 琥珀酸酯反应 :
- [0203] 实施例 8Ba :乙烷 -1,2- 二硫醇
- [0204] 实施例 8Bb :丙烷 -1,3- 二硫醇
- [0205] 实施例 8Bc :丁烷 -1,4- 二硫醇
- [0206] 实施例 8Bd :戊烷 -1,5- 二硫醇
- [0207] 实施例 8Be :己烷 -1,6- 二硫醇
- [0208] 实施例 8Bf :1,4- 苯二硫醇
- [0209] 实施例 8Bg :1,3- 苯二硫醇
- [0210] 实施例 8Bh :1,4- 苯二甲硫醇
- [0211] 实施例 8Bi :1,3- 苯二甲硫醇
- [0212] 实施例 8Bj :1,2- 苯二甲硫醇
- [0213] 实施例 8C :具有侧链烷基的 PEG- 二胺的共聚物
- [0214] 根据实施例 6B 的方法,按照在实施例 8A 中描述获得的取代的 PEG 琥珀酸酯与 1,4- 二氨基丁烷共聚合。
- [0215] 通过该方法,下列二胺与按照在实施例 8A 和 8Aa 到 8An 中描述获得的任意的取代的 PEG 琥珀酸酯共聚合 :
- [0216] 实施例 8Ca :20-BOC1,3- 二氨基 -2- 丙醇
- [0217] 实施例 8Cb :N', N'' - 二 (BOC) 六亚乙基四胺
- [0218] 实施例 8Cc :N', N'' - 二 (BOC) 精胺
- [0219] 实施例 8Cd :N' -BOC 亚精胺
- [0220] 实施例 8Ce :N', N'', N''' - 三 (BOC) 五亚乙基六胺
- [0221] 实施例 8Cf :胍基丁胺
- [0222] 实施例 8Cg :赖氨酸 t- 丁酯
- [0223] 实施例 8Ch :1,6- 二氨基己烷
- [0224] 实施例 8Ci :1,4- 苯二胺
- [0225] 实施例 8Cj :1,3- 苯二胺
- [0226] 实施例 8Ck :1,4- 二氨基丁烷 -2,3- 二醇丙酮化合物
- [0227] 实施例 9 :使用取代酸的 PEG 酯交换反应
- [0228] PEG 二甲苯磺酸酯 :在氩气中,向 1mol 的 PEG (溶于 DMF 或其熔融物) 添加 2.1mol 对甲苯磺酰氯 (5% 摩尔过量) 并搅拌。向此反应混合物中添加 2.2mol 四甲基乙二胺 (TEMED)。随后,在 45°C 反应 2 小时。使用乙酸乙酯、甲苯或乙醇作为 TLC 溶剂通过 TLC 分离产物。使用甲苯从反应混合物中提取 PEG 二甲苯磺酸酯。也可以使用其它磺酰化剂,例如甲磺酰氯 (参见实施例 4)、三氟甲磺酸酐或三氟代乙烷磺酰氯 (tresyl chloride) 代替

甲苯磺酰氯 (参见美国专利申请 10/397332, 公开号 20040006051)。

[0229] PEG 二甲苯磺酸酯的聚酯化反应:在氩气中,向 1mol 的熔融 PEG 二甲苯磺酸酯中添加 1mol 的 S, S' - 二癸基 - 间 -2,3- 二巯基琥珀酸和 2mol 的 TEMED, 并搅拌。必要时加入 DMF 以保持流动性。将反应混合物加热至 80°C 并搅拌 24 小时或至 TLC 显示完成。

[0230] 实施例 10:中等分子量聚合物 PEG-二(琥珀酰)-二-(O-酰化)硫醚 (C16- π -聚合物 B)

[0231]



[0232] 将按实施例 1 制备的 PEG-二马来酸酯 (10.24g, 6.1mmol) 放置在 125ml 干燥烧瓶中并在氩气中加热至 70°C 以熔化 PEG-二马来酸酯。在搅拌下,向此熔化物质中添加水 (10mL) 以及 DTT (0.961g, 6.168mmol) 和 TEMED (0.723g, 6.166mmol) 的水 (3mL) 溶液。将溶液在 70°C 搅拌约 4 小时。真空脱水得到产率约为 90% 的聚合物固体。

[0233] 在氩气中,将干燥的聚合物 (5g, 2.7mmol) 加热至 70-90°C 以使其熔化, 并加入 TEMED (0.635g, 5.5mmol)。在搅拌下加入棕榈酰氯 (1.689g, 5.5mmol), 并在氩气中将混合物搅拌过夜。(可以改变聚合物与酰氯的比例以获得 0-100% 化学计量的取代度。) 向反应混合物中添加水以分离“C16- π -聚合物 B”。

[0234] 通过此方法使用二(琥珀酰)PEG-DTT 共聚物的羟基酯化下列酸:

[0235] 实施例 10a:油酸

[0236] 实施例 10b:胆固醇琥珀酸酯

[0237] 实施例 10c:联苯-4-羧酸

[0238] 实施例 10d:4-辛基苯基乙酸

[0239] 实施例 10e:十六碳-6-炔酸

[0240] 作为使用酰基卤的替代选择,也可以使用 1,3-双(2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-基甲基)碳二亚胺 (BDDC) 活化 π -聚合物中衍生自 DTT 的羟基并直接与羧酸偶联;参见 Handbook of Reagents for Organic Synthesis, Reagents for Glycoside, Nucleotide, and Peptide synthesis, Ed. David Crich, Wiley, 2005p107-108 及其参考文献。

[0241] 实施例 11:C16- π -聚合物 A 的二马来酸酯

[0242] 通过马来酸酐与聚合物 A 羟基基团的反应制备聚合物 A 二马来酸酯。可使用引入的活性双键向聚合物添加含巯基的配体。可以改变聚合物 A 与马来酸酐的比例以获得在 0-100% 全化学计量酯化反应内变化的取代度。

[0243] 在干燥研钵中研磨 C16- π -聚合物 A (2g) 和马来酸酐 (0.85g), 并将其转移到 50mL 圆底烧瓶中。在氩气中,将烧瓶加热至 90°C, 并搅拌 2-3 小时。随后,用水将固体反应混合物转移到透析袋中 (截留分子量 3.5kDa) 并使用水透析以除去过量的马来酸和低分子量副产品。随后,将透析滞留物从透析袋中移出并于 60°C 干燥至恒重, 以获得 C16- π -聚合

物 A 二马来酸酯 (1.79g)。

[0244] 实施例 12 : C16- π - 聚合物 A 二马来酸酯的半胱氨酸加成物

[0245] 向水 (5mL) 中添加粉末状 C16- π - 聚合物 A 的二马来酸酯 (实施例 11) (253mg), 并剧烈搅拌混合物。向反应混合物中添加半胱氨酸 (24mg) 和 TEMED (30.5 μ L), 并室温中于氩气中搅拌混合物。使用 TLC (硅胶板, 正丁醇 - 乙酸 - 水, 3:1:1) 和茚三酮测试来监测反应进程。反应混合物表现出与聚合物共迁移的茚三酮阳性斑点。半胱氨酸也给出茚三酮阳性斑点, 而起始聚合物对茚三酮则不会显出颜色。

[0246] 3. 使用 π - 聚合物增溶不溶性或微溶性物质

[0247] 实施例 1 : 增溶染料

[0248] 在独立的容器中 (AllExcel, Inc., West Haven, CT 生产的 FlexExcel™ 透明聚丙烯称量皿, WB2.5 型), 向经过离心以除去不溶性物质 (而没有进行其它的纯化) 的 50mg/mL PEG1500-琥珀酰-DTT-双-C16-酰胺共聚物 (C16- 聚合物 A, 实施例 1) 水溶液的 1.0mL 等分试样中添加过量的染料曙红 Y、二氯荧光素和苏丹 IV, 并将各组分一同搅拌以形成糊状物。随后, 将容器底部放置在使用耐水双面胶纸的小型超声波首饰清洁池的底板上。向清洁池中加入刚好足够的水以使称量皿高度的约 1/3 浸入水中。进行 15 分钟的分步超声, 每步 5 分钟。将液体转移至离心管, 在台式离心机中两次离心 30 分钟以除去未溶解的染料颗粒。将上清液转移到清洁离心管中重新离心以除去携带的固体。以同样的方式处理蒸馏水 (与聚合物溶液的量相同) 中的等量染料的悬浮液以作为对照。将所得溶液点样在 (25 μ L) TLC 板上以形成源自液滴的环。将此斑点的强度与由乙醇或乙醇 / 水制备的标准染料溶液形成的斑点强度进行比较, 以测定近似的浓度; 所述斑点显示于图 1 中。通过在室温下将适量染料溶于 1 升或更多去离子水 (未缓冲) 中, 并进一步根据需要添加 (即滴加) 水以获得饱和溶液来测定染料在水中的溶解度。

[0249] 相对于在 H₂O (苏丹 IV 在中性 pH 不能溶解) 中 0.000mg/ml 的浓度, 在 50mg/ml 聚合物中苏丹 IV 的浓度约为 0.2mg/ml。相对于在 H₂O 中 0.010mg/ml 的浓度, 在 50mg/ml 聚合物中二氯荧光素的浓度约为 5mg/ml。相对于在 H₂O 中 0.007mg/ml 的浓度, 在 50mg/ml 聚合物中曙红 Y 的浓度约为 5mg/ml。经计算, 对苏丹 IV、二氯荧光素和曙红 Y 的有效负载率 (每单位聚合物量的载药量, g/g) 分别约为 1:250、1:10 和 1:10。

[0250] 对于与药物活性物质物化性质类似的极性化合物, 1:10 的有效负载率高于由脂质体、环式糊精、Cremophor™, 或洗涤剂或其它增溶体系所通常能获得的有效负载率。曙红 Y 是一种高效光活性单线态氧生成剂, 而可预期由实施例 1 聚合物制备的曙红 Y 的此类浓缩溶液具有作为光活性细胞毒剂的药理活性。

[0251] 二氯荧光素在聚合物溶液 (红黄 / 橙色) 中相对于在水中 (黄绿色) 荧光光谱的变化为视觉可见的, 并且说明染料并非处在水性环境中, 而是被微胶囊化在自组装聚合物颗粒内核的有机环境中。荧光光谱的变化的确已经被用于测定微环境极性的变化的方法 (例如, “脂质探针”)。相对于在乙醇溶液为红色且悬浮于水中时为棕色粉末, 苏丹 IV 聚合物溶液的颜色为棕红色。曙红 Y 没有表现出显著的视觉变化 (水中为粉色而在聚合物溶液中为粉红色)。

[0252] 实施例 2 : 增溶药物相关物质

[0253] 选择红紫素、两性霉素 B、喜树碱和阿霉素作为代表性的微溶性活性药物成分

(API)。两性霉素 B 作为可注射抗真菌药在脂质体制剂中使用,而喜树碱和阿霉素为抗癌药。红紫素是具有药用潜力的 DNA 嵌入式染料,而曙红 Y 是在光动力疗法中具有潜在用途的光活性单线态氧生成剂。使用 C16- π -聚合物 A、C18- π -聚合物 B 和 / 或 C16- π -聚合物 A-叶酸结合物(见下)将各 API 增溶于水。按上述处理染料的方法,通过将增溶的 API 和未增溶的对照点样在 TLC 板上来说明增溶作用。

[0254] 用水重构干燥的聚合物,加热,搅拌并进行必要的超声处理。当溶液粘度过高时,进行稀释。所使用的 C16- π -聚合物 A 为 10% w/v,所使用叶酸化 C16- π -聚合物 A 为 5% w/v,且所使用的 C18- π -聚合物 B 为 2% w/v。

[0255] 将药物 (20mg) 直接加入到 1mL 聚合物溶液中,所得 C16- π -聚合物 A、叶酸化 C16- π -聚合物 A 和 C18- π -聚合物 B 与 API 的质量比(除阿霉素之外,见下)分别为 5:1、2.5:1 和 1:1。以低功率将混合物超声处理 1 小时,随后以 2000xg 离心两次以除去未溶解的固体。固体球团的量不显著。将溶液点样到硅胶 TLC 板上显示药物被增溶,其迁移比溶剂前缘迟缓(图 2)。

[0256] 按 C16- π -聚合物 A 与阿霉素盐酸盐质量比 10:1,或按叶酸化 C16- π -聚合物 A 与阿霉素质量比 5:1 使阿霉素盐酸盐与上述聚合物结合,随后加入足量 3M 乙酸钠以中和阿霉素盐酸盐。将混合物剧烈振荡 24 小时,并随后以 2000xg 离心两次以除去未溶解的固体。固体球团的量不显著。

[0257] 增溶的 API 与聚合物的质量比显示于表 1 中。没有做使聚合物负载最大化的尝试,因此这些比例体现了聚合物可增溶 API 量的下限。

[0258] 将每种溶液的 50ul 样品点样在 Bakerflex™ 硅胶 TLC 板上并使其扩散。水性溶液形成了圆圈的外边界,而带有微胶囊化物质的聚合物的迁移形成了内圈(图 2)。在所有情况下,完全水性区外围边缘处的 API 极少,这说明成功的增溶以及最少的微胶囊化物质泄露。

[0259] 表 1:API 的增溶

[0260] 聚合物:底物质量比

[0261]

	C16- π -聚合物 A 10% w/v	叶酸化 C16- π -聚合物 A 5% w/v	C18- π -聚合物 B 2% w/v
红紫素	5:1	2.5:1	未测试
喜树碱	5:1	2.5:1	未测试
两性霉素 B	5:1	2.5:1	未测试
阿霉素	10:1	5:1	未测试
曙红 Y	未测试	未测试	1:1

[0262] 4. π -聚合物的生物相容性

[0263] 实施例 1:对局部润肤剂、乳剂或膏剂的适用性

[0264] 发明人将实施例 1 聚合物的含油蜡浓缩物擦在腕关节内皮肤上,并观察其吸收情况。物质的吸收类似于含蜡的药理学乳剂,伴有该区域的轻微软化。没有观察到基于此单一局部给药的速发型或迟发型变态反应,例如发红、皮疹或瘙痒。

[0265] 这些聚合物在室温下多为吸湿性蜡,并具有约 45°C 至 60°C 或更高的预期 mp,这取决于组合物。由更低分子量 PEG 制备的聚合物在室温下甚至为液体。一些聚合物在室温下为固体,而在体温下融解。因此,这些 π -聚合物的性质使其可以成为制造洗液、乳剂、药

膏、润肤剂和其它给药方式的优良底物,可通过 π -聚合物本身或与多种物质(包括活性药剂)的混合物进行制备。

[0266] 实施例 2:对胃肠外给药的适用性

[0267] 在磷酸盐缓冲液中制备实施例 1 聚合物的水溶液,并随后通过 0.22 μ m 过滤器过滤到无菌管中。

[0268] 使用最大耐药量的试验方案,其中以 10ml 每千克体重的量向 CD-1 小鼠尾静脉注射多达 5% w/v 聚合物的水溶液。连续观察小鼠 12 小时,随后每 2 小时观察一次,并根据其分组直至观察 48 至 72 小时。采集血样并进行分析。处死一些小鼠并首先进行大体组织学检查。随后对选定切片进行显微组织学观察。

[0269] 没有发现到对照小鼠与处理小鼠在血液化学方面的明显差别。在多个器官的大体组织学检查中,没有发现与对照动物相比的明显差别或伤害,所述多个器官包括心脏、肺、肾脏、脾、肝脏、肠、胃、膀胱、皮肤、肌肉、骨骼、大脑和淋巴结。对来自不同动物组的多个样本的研究观察到相同的结果。在所检查组织的细胞组织结构中未发现明显差别。一些肾脏组织显示出随暴露于聚合物的时间而减少的脱落物。这说明脱落物为临时状态,并且随时间进展可恢复正常。

[0270] 总之,所述聚合物可作为注射制剂和其它胃肠外制剂中的药剂安全地用于医疗用途。有理由预期,所述化合物可安全地用于口服液、囊片和片剂、喷鼻剂、口腔/支气管气雾剂、舌下给药、皮肤用乳霜/洗液/贴片、眼药水、其它局部给药途径和其它服用途径。

[0271] 5. 靶向部分与 π -聚合物的连接

[0272] 实施例 1:通过形成酰胺键将半乳糖胺与 C16- π -聚合物 B 相连接

[0273] 半乳糖胺(GA)靶向于肝细胞去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR),而具有共价键连接的半乳糖胺的聚合物被运送到肝脏;参见 L. Seymour 等, "Hepatic Drug Targeting: Phase I Evaluation of Polymer-Bound Doxorubicin(肝脏药物靶向:聚合物结合阿霉素的 I 期评价)" J Clin. Oncology, 20(6):1668-1676(2002) 和其中的参考文献。

[0274] 将 C16- π -聚合物 B(上文合成方法的实施例 10)(461mg, 每重复单位 0.2mmol 当量 COOH) 分散于 14mL 水,并向此分散液中添加 EDC HCl(0.485mmol) 和 N-羟基琥珀酰亚胺(0.464mmol)。将混合物在室温下搅拌 15 分钟并加入半乳糖胺盐酸盐(0.386mmol) 和 TEMED(0.387mmol) 的 1mL 水溶液。搅拌溶液,使用 1-丁醇-乙酸-水(3:1:1) 展开在硅胶上进行 TLC,监测反应。加入额外量的 TEMED(0.079mmol)、NHS(0.078mmol) 和 EDC HCl(0.193mmol) 以推动反应完成。当 TLC 显示出稳态 GA 消耗时,使用 3x1000ml 去离子水对反应混合物进行透析(膜截留分子量 3500Da) 以除去低分子量反应物和副产品。取出透析滞留物并在 60 $^{\circ}$ C 干燥至恒重(348mg)。

[0275] 产物的 TLC 显示没有游离的 GA(茛三酮阴性)。使用 6N HCL 在 100 $^{\circ}$ C 水解产品样品以水解结合的 GA。TLC 分析显示存在 GA(茛三酮阳性), Rf 与参考 GA 相同。

[0276] 实施例 2:叶酸与 C18- π -聚合物 A 的连接

[0277] 在通有氩气流(BDDC 非常粘稠并具有类似于蜂蜜的稠度,且难以操作)的 125ml 圆底烧瓶中称出 BDDC(2.44g, 8.56mmol)。向烧瓶中加入 C18- π -聚合物 A(10g, 4.28mmol), 将混合物加热至 70 $^{\circ}$ C,并使反应物共同搅拌约 30 分钟。加入叶酸(3g)后加入足量 THF 以使搅拌变得可能。在防止湿气进入的条件下,将反应物在 40-70 $^{\circ}$ C 搅拌过夜。随后蒸发 THF

并加入水 (80mL), 并将混合物在 50°C 继续搅拌 2 小时。冷却至室温后, 将混合物转移到截留分子量 3500Da 的透析管区域中, 并使用 0.1N HCl (2x2000ml)、水 (2000ml)、5% 碳酸钠 (2x2000ml) 和水 (4x2000ml) 进行透析以除去未反应的试剂和副产品。取出亮黄橙色的透析滞留物。将一部分蒸发至恒重以测定固体浓度, 并用于上述增溶试验。

[0278] 实施例 3: N-乙酰神经氨酸 (NANA) 与 C16- π -聚合物 B 的连接

[0279] 神经氨酸衍生物有希望被用于流感病毒的靶向部分, 因为已知红血球凝集素和神经氨酸酶外壳蛋白均与唾液酸相结合。

[0280] 将 BDDC (2.44g, 8.56mmol) 与 C18- π -聚合物 A (10g, 4.28mmol) 结合并加热至 70°C, 并在氩气下共同搅拌约 30 分钟。加入 N-乙酰神经氨酸 (3g), 随后根据需要加入 THF 以维持流动性。在防止湿气进入的条件下, 将反应物在 40-70°C 搅拌过夜。加入水 (80mL), 并将混合物在 50°C 继续搅拌 2 小时。冷却至室温后, 使用截留分子量为 3.5kDa 的膜, 以及 0.1N HCl, 5% NaHCO₃ 和水 (各 2x2000ml) 透析混合物。

[0281] 实施例 4: β -O-甲基神经氨酸 (MNA) 与 C16- π -聚合物 B 的连接

[0282] 将 C16- π -聚合物 B (基于 COOH 为 43 微摩尔, 于 1ml 水中) 与 40 微摩尔的神经氨酸 β -甲基糖苷 (Toronto Research Chemicals) 一起混合, 并依次加入 0.1mL 水中的 40 微摩尔 NHS 和 0.1mL 水中的 40 微摩尔 EDC 盐酸盐。将反应混合物在室温下振荡 48 小时, 并使用异丙醇-醋酸乙酯-水 (4:3:2) 在硅胶上进行 TLC 分析。在 130°C 使用 0.2% 地衣酚的 70% 硫酸溶液进行检查, 没有发生起始聚合物的颜色反应, 但反应混合物的 TLC 则给出了与聚合物共迁移的紫色斑点。

[0283] 实施例 5: 扎那米韦与 C16- π -聚合物 B 的连接

[0284] 扎那米韦 (GG167) 为强力病毒神经氨酸酶抑制剂, 且负载此多价配体分子的聚合物是流感病毒的复制抑制剂。

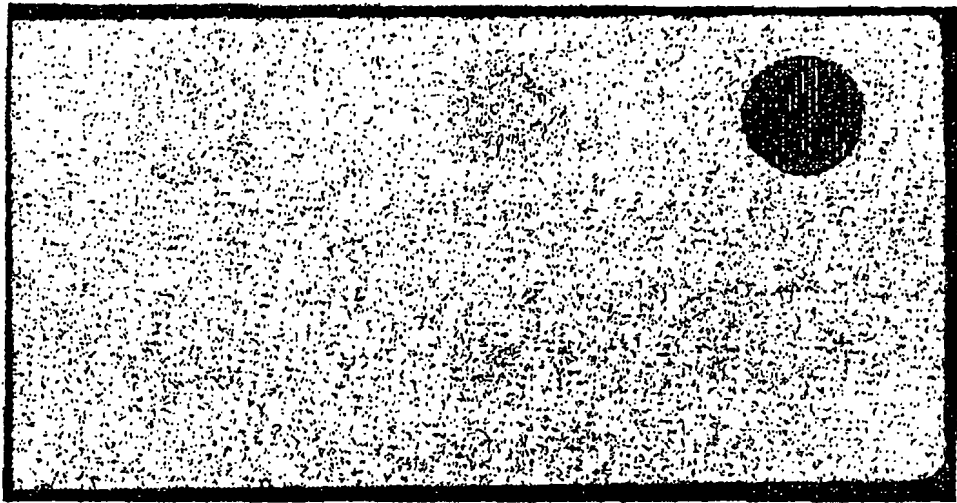
[0285] 将 C16- π -聚合物 B (920mg) 分散于 30mL 水, 并向此分散体中添加 EDC HCl (1.2mmol) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (1.1mmol)。将此混合物在室温下搅拌 20 分钟, 并加入溶于 1ml 水的 5-乙酰氨基-7-(6'-氨基己基)-氨基甲酰氧-4-胍基-2,3,4,5-四脱氧-D-甘油-D-半乳糖-壬-2-烯吡喃糖酮酸的三氟乙酸盐 (5-acetamido-7-(6'-amino hexyl)-carbamyloxy-4-guanidino-2,3,4,5-tetradeoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-enopyranosonic acid) (美国专利第 6,242,582 号和第 6,680,054 号) (0.39g, 0.67mmol) 和 TEMED (0.67mmol) 的溶液。将溶液在室温下搅拌, 反应由 TLC 监测。使用 3500kDa 截留分子量的膜和 3x1000ml 去离子水透析反应混合物以除去低分子量反应物和副产品。取出透析滞留物并在 60°C 干燥至恒重。通过比色分析法测定胍基团来测定糖加入水平 (Can. J. Chem., 36:1511(1958))。可根据 Potier 等, Anal. Biochem., 29287(1979) 的方法进行神经氨酸酶检测。

[0286] 实施例 6: Fab 片段与 C16- π -聚合物 A 二马来酸酯的连接

[0287] 抗表面糖蛋白高分子量黑色素瘤相关抗原 (HMW-MAA) 的单链可变区抗体 (scFv) 靶向于黑色素瘤细胞; 参见 F. Martin 等, J. Virology, 73:6923-6929(1999)。

[0288] 根据厂商的方法, 使用固化的 TCEP 二硫化物还原胶体 (Immobilized TCEP Disulfide Reducing Gel) (Pierce 生物科技, 美国伊利诺斯州罗克福德市) 还原此抗体片段中的二硫键, 并通过合成方法部分中实施例 12 的方法与 C16- π -聚合物 A 二马来酸酯反

应。



A

B

C

图 1

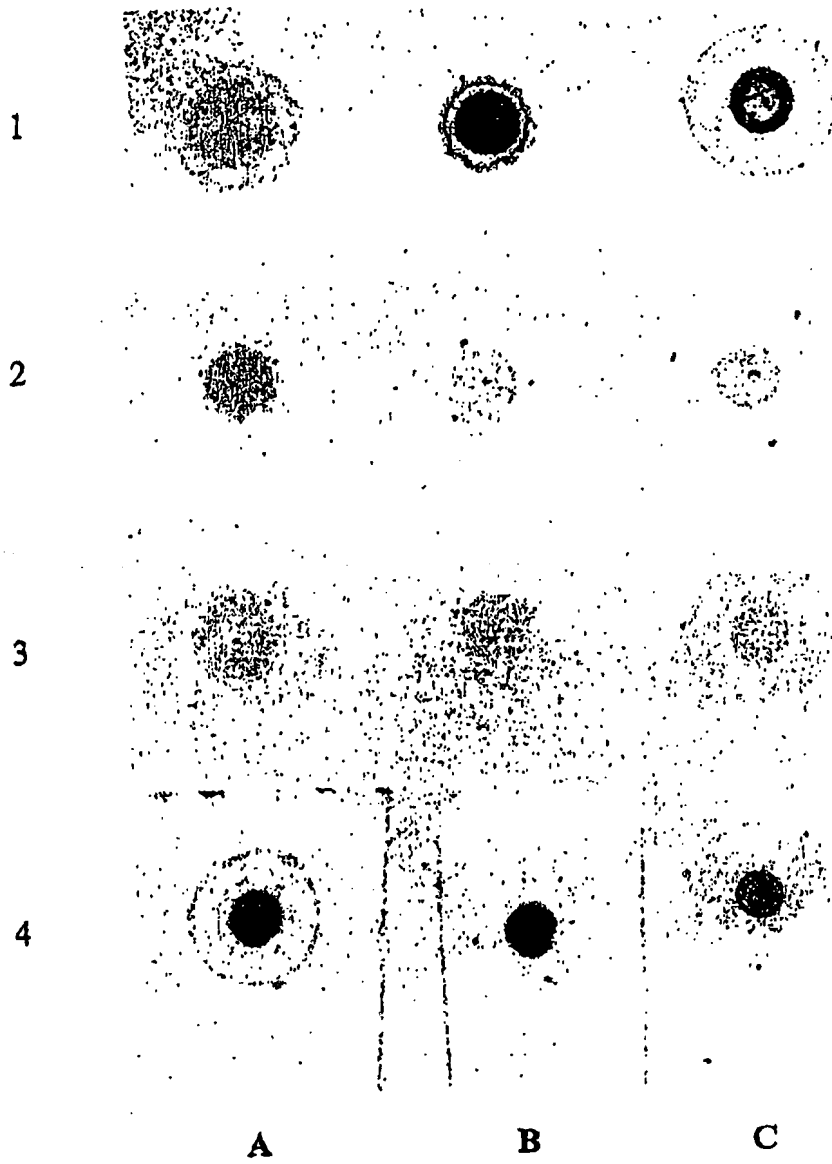


图 2