



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104383554 B

(45)授权公告日 2018.06.08

(21)申请号 201410658743.8

A61K 45/00(2006.01)

(22)申请日 2003.09.04

C08B 37/16(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61P 35/00(2006.01)

申请公布号 CN 104383554 A

A61P 9/00(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

(43)申请公布日 2015.03.04

(30)优先权数据

60/408,855 2002.09.06 US

60/422,830 2002.10.31 US

60/451,998 2003.03.04 US

(62)分案原申请数据

03824829.8 2003.09.04

(73)专利权人 天蓝制药公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 程建军 M·E·戴维斯 K·T·金

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

代理人 安佩东 黄革生

(51)Int.Cl.

A61K 47/69(2017.01)

(56)对比文件

CN 1308639 A,2001.08.15,

CN 1343205 A,2002.04.03,

Graziella Vecchio et al..“The Synthesis and Conformation of β -Cyclodextrins Functionalized with Enantiomers of Boc-Carnosine”.《Journal of Supramolecular Chemistry 1》.2001,第1卷(第2期),第87-95页.

Diego La Mendola et al..“Copper(II) Assisted Self-Assembly of Functionalized β -Cyclodextrins with β -Alanyl-L-histidine”.《Journal of Supramolecular Chemistry 1》.2001,第1卷(第3期),第147-151页.

审查员 王斯婷

权利要求书4页 说明书80页 附图7页

(54)发明名称

用于传递治疗剂的以环糊精为基础的聚合物

(57)摘要

本发明涉及用于传递治疗剂的以环糊精为基础的聚合物,具体地讲,本发明涉及新型的用作小分子治疗剂传递载体的包含环糊精的治疗性的高分子化合物组合物以及其药物组合物。当体内应用时,这些包含环糊精的聚合物改善了药物稳定性和溶解度,并降低了小分子治疗剂的毒性。此外,通过对各种连接基基团和靶向配体进行选择,这些聚合物给出了用于控制治疗剂的传递的方法。本发明还涉及用本文所述的治疗组合物对个体进行治疗的方法。

1. 一种经修饰的环糊精环或其盐, 其中恰好有两个羟基部分被选自半胱氨酸、色氨酸、谷氨酸、天门冬氨酸、赖氨酸和精氨酸的 α -氨基酸代替。

2. 权利要求1所述的修饰的环糊精环或盐, 其中两个羟基部分被氨基酸的氮或硫原子代替。

3. 权利要求1所述的修饰的环糊精环或盐, 其中的氨基酸是半胱氨酸。

4. 权利要求1所述的修饰的环糊精环或盐, 其中的氨基酸是boc保护谷氨酸。

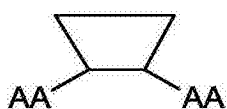
5. 权利要求1所述的修饰的环糊精环或盐, 其中的氨基酸包含在含有2至50个氨基酸残基的寡肽中。

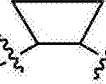
6. 权利要求5所述的修饰的环糊精环或盐, 其中的寡肽含有2至30个氨基酸残基。

7. 权利要求6所述的修饰的环糊精环或盐, 其中的寡肽含有2至15个氨基酸残基。

8. 权利要求1所述的修饰的环糊精环或盐, 其中的环糊精是 β -环糊精。

9. 下式的化合物或其盐:

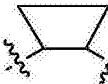


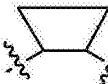
其中是环糊精, 其中各AA彼此独立地包含选自半胱氨酸、色氨酸、谷氨酸、天门冬氨酸、赖氨酸和精氨酸的 α -氨基酸。

10. 权利要求9所述的化合物或盐, 其中的氨基酸通过氨基酸的氮或硫原子与环糊精连接。

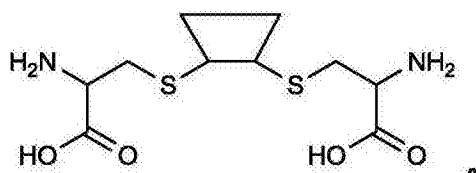
11. 权利要求9所述的化合物或盐, 其中的氨基酸是半胱氨酸。

12. 权利要求9所述的化合物或盐, 其中的氨基酸包含在含有2至50个氨基酸残基的寡肽中。

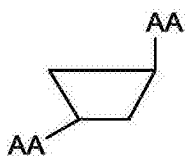
13. 权利要求9所述的化合物或盐, 其中是 β -环糊精。

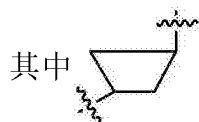
14. 权利要求9所述的化合物或盐, 其中以A、D构型连接。

15. 权利要求9所述的化合物或盐, 其中所述化合物是:



16. 下式的化合物或其盐:



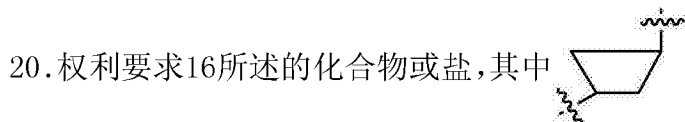


其中 是环糊精,其中各AA彼此独立地包含选自半胱氨酸、色氨酸、谷氨酸、天门冬氨酸、赖氨酸和精氨酸的 α -氨基酸。

17. 权利要求16所述的化合物或盐,其中的氨基酸通过氨基酸的氮或硫原子与环糊精连接。

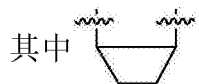
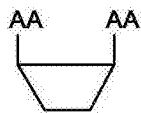
18. 权利要求16所述的化合物或盐,其中的氨基酸是半胱氨酸。

19. 权利要求16所述的化合物或盐,其中的氨基酸包含在含有2至50个氨基酸残基的寡肽中。



20. 权利要求16所述的化合物或盐,其中 是 β -环糊精。

21. 下式的化合物或其盐:

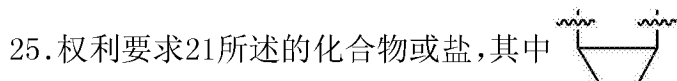


其中 是环糊精,其中各AA彼此独立地包含选自半胱氨酸、色氨酸、谷氨酸、天门冬氨酸、赖氨酸和精氨酸的 α -氨基酸。

22. 权利要求21所述的化合物或盐,其中的 α -氨基酸通过氨基酸的氮或硫原子与环糊精连接。

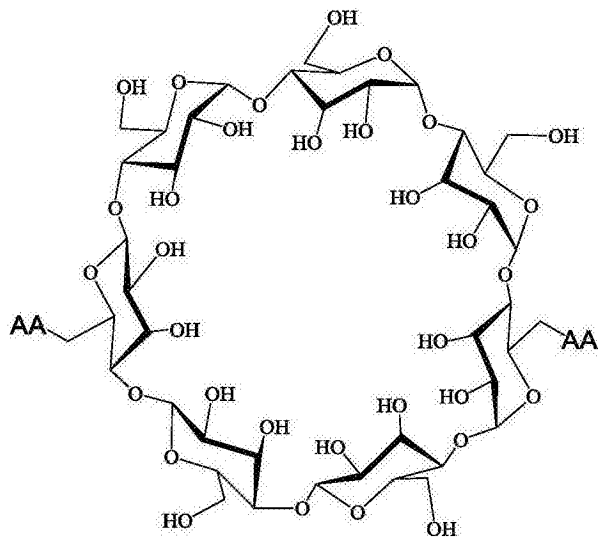
23. 权利要求21所述的化合物或盐,其中 α -氨基酸是半胱氨酸。

24. 权利要求21所述的化合物或盐,其中 α -氨基酸包含在含有2至50个氨基酸残基的寡肽中。



25. 权利要求21所述的化合物或盐,其中 是 β -环糊精。

26. 下式的化合物或其盐:



其中各AA彼此独立地包含选自半胱氨酸、色氨酸、谷氨酸、天门冬氨酸、赖氨酸和精氨酸

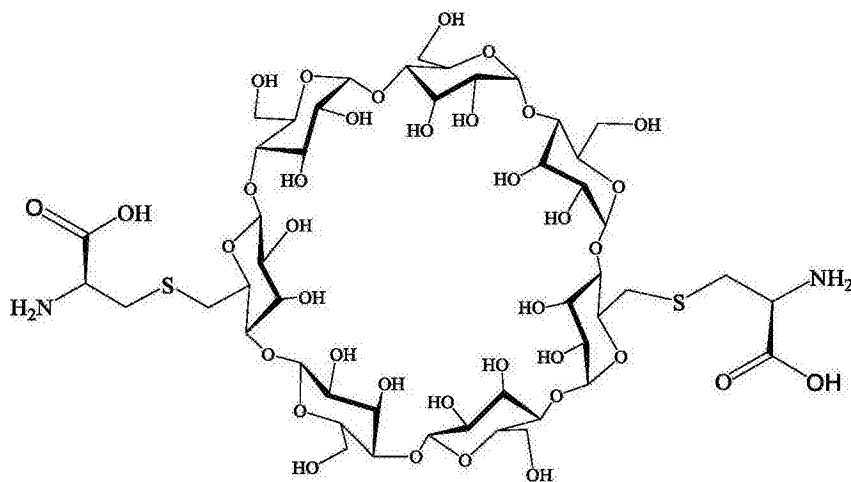
酸的 α -氨基酸。

27. 权利要求26所述的化合物或盐, 其中的 α -氨基酸通过 α -氨基酸的氮或硫原子与环糊精连接。

28. 权利要求26所述的化合物或盐, 其中的 α -氨基酸是半胱氨酸。

29. 权利要求26所述的化合物或盐, 其中的 α -氨基酸包含在含有2至50个氨基酸残基的寡肽中。

30. 权利要求26所述的化合物或盐, 其中所述化合物是:



31. 权利要求1所述的修饰的环糊精环的盐。

32. 权利要求9所述的化合物的盐。

33. 权利要求16所述的化合物的盐。

34. 权利要求21所述的化合物的盐。

35. 权利要求26所述的化合物的盐。

36. 包含权利要求1-8任意一项所述的修饰的环糊精环或其盐和溶剂的组合物。

37. 包含权利要求9所述的化合物或其盐和溶剂的组合物。

38. 包含权利要求16所述的化合物或其盐和溶剂的组合物。

39. 包含权利要求21所述的化合物或其盐和溶剂的组合物。

40. 包含权利要求26所述的化合物或其盐和溶剂的组合物。

41. 包含权利要求30所述的化合物或其盐和溶剂的组合物。

42. 权利要求36所述的组合物, 还包含活化的单体。

43. 权利要求37所述的组合物, 还包含活化的单体。

44. 权利要求38所述的组合物, 还包含活化的单体。

45. 权利要求39所述的组合物, 还包含活化的单体。

46. 权利要求40所述的组合物, 还包含活化的单体。

47. 权利要求41所述的组合物, 还包含活化的单体。

48. 权利要求42所述的组合物, 其中所述活化的单体包含活化的酯。

49. 权利要求43所述的组合物, 其中所述活化的单体包含活化的酯。

50. 权利要求44所述的组合物, 其中所述活化的单体包含活化的酯。

51. 权利要求45所述的组合物, 其中所述活化的单体包含活化的酯。

52. 权利要求46所述的组合物,其中所述活化的单体包含活化的酯。
53. 权利要求47所述的组合物,其中所述活化的单体包含活化的酯。
54. 权利要求1所述的修饰的环糊精环或盐,其中半胱氨酸与环糊精的A和D位置连接并且其中两个羟基部分被半胱氨酸的硫原子代替。
55. 权利要求1所述的修饰的环糊精环或盐,其中的环糊精是 β -环糊精并且其中两个羟基部分被半胱氨酸的硫原子代替。
56. 权利要求1所述的修饰的环糊精环或盐,其中两个羟基部分被半胱氨酸的硫原子代替。
57. 权利要求12所述的化合物或盐,其中的寡肽含有2至30个氨基酸残基。
58. 权利要求57所述的化合物或盐,其中的寡肽含有2至15个氨基酸残基。
59. 权利要求19所述的化合物或盐,其中的寡肽含有2至30个氨基酸残基。
60. 权利要求59所述的化合物或盐,其中的寡肽含有2至15个氨基酸残基。
61. 权利要求24所述的化合物或盐,其中的寡肽含有2至30个氨基酸残基。
62. 权利要求61所述的化合物或盐,其中的寡肽含有2至15个氨基酸残基。
63. 权利要求29所述的化合物或盐,其中的寡肽含有2至30个氨基酸残基。
64. 权利要求63所述的化合物或盐,其中的寡肽含有2至15个氨基酸残基。
65. 权利要求1所述的修饰的环糊精环或盐,其中的 α -氨基酸是谷氨酸。
66. 权利要求9所述的化合物或盐,其中的 α -氨基酸是谷氨酸。
67. 权利要求16所述的化合物或盐,其中的 α -氨基酸是谷氨酸。
68. 权利要求21所述的化合物或盐,其中的 α -氨基酸是谷氨酸。
69. 权利要求26所述的化合物或盐,其中的 α -氨基酸是谷氨酸。
70. 权利要求9所述的化合物或盐,其中的 α -氨基酸是boc保护的谷氨酸。
71. 权利要求16所述的化合物或盐,其中的 α -氨基酸是boc保护的谷氨酸。
72. 权利要求21所述的化合物或盐,其中的 α -氨基酸是boc保护的谷氨酸。
73. 权利要求26所述的化合物或盐,其中的 α -氨基酸是boc保护的谷氨酸。

用于传递治疗剂的以环糊精为基础的聚合物

[0001] 本申请为2011年10月26日提交的申请号为201110329366.X、发明名称为“用于传递治疗剂的以环糊精为基础的聚合物”的中国专利申请的分案申请,该中国专利申请201110329366.X则是2003年9月4日提交的申请号为PCT/US2003/027588、发明名称为“用于传递治疗剂的以环糊精为基础的聚合物”的国际申请的分案申请,该国际申请于2005年4月29日进入中国国家阶段,申请号为03824829.8。

背景技术

[0002] 由于其不良的药理学性质,一些小分子治疗剂如喜树碱的药物传递一直都很成问题。这些治疗剂的水溶性通常很低,其生物活性形式与无活性的形式之间存在平衡,或者这些物质的高全身浓度会导致毒副作用。解决其传递问题的一些方法是将所说的物质直接与水溶性聚合物如甲基丙烯酸羟丙基酯(HPMA)、聚乙二醇和聚-L-谷氨酸轂合到一起。在一些情况下,该类轂合物已经成功增溶或稳定了所说治疗剂的生物活性形式,或者得到了避免了与该物质的高全身浓度有关的并发症的缓释制剂。

[0003] 解决药物传递问题的另一种方法是在治疗剂和环糊精或其衍生物之间形成主体/客体包合物复合体。环糊精(α 、 β 、 γ)以及其氧化形式具有独特的物理-化学性质如良好的水溶性、低毒性和低免疫响应性。迄今为止,用环糊精进行的大多数药物传递研究一至聚焦于其形成超分子复合体的能力,其中环糊精与治疗剂分子形成主体/客体包合物复合体并且从而改变了这些客体分子的物理、化学和/或生物学性质。

[0004] US 5,276,088描述了一种通过将聚乙烯醇或纤维素或其衍生物与环糊精衍生物进行反应或者通过环糊精衍生物与醋酸乙烯酯或甲基丙烯酸甲酯的共聚反应来合成包含环糊精的聚合物的方法。

[0005] US 5,855,900描述了一种可生物降解的包含环糊精的聚合物。该专利公开了一种超分子结构可生物降解的聚合集合体,其包含多种药物修饰的 α 、 β 、 γ -环糊精和穿过环糊精结构空穴的线性聚合链。

[0006] 不断需要传递药理学性质差的小分子治疗剂如喜树碱、紫杉醇、阿霉素和环孢菌素A的新方法。

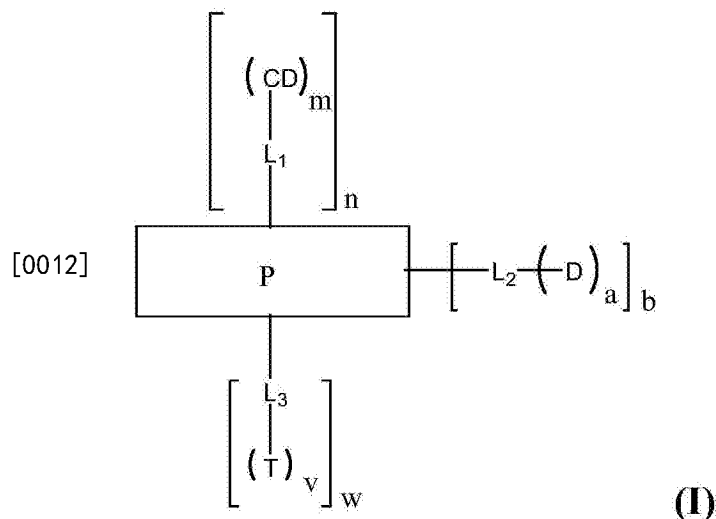
[0007] 本发明的概述

[0008] 本发明涉及作为传递治疗剂的载体的新型聚合物轂合物的组合物,其被定义为与治疗剂/生物活性剂共价偶联的聚合材料。一方面,本发明提供了水溶性的生物相容性聚合物轂合物,其含有通过可以在生理学条件下裂解从而释放生物活性部分的连接与生物活性部分共价连接的水溶性的生物相容性聚合物。在某些该类实施方案中,该聚合物包含与连接基部分交替的环状部分,所说的连接基部分将所说的环状结构连接到例如直链或支链聚合物上,优选将其连接到直链聚合物上。该聚合物可以是一种聚阳离子、聚阴离子或非离子聚合物。生物活性剂可以是一种治疗剂、诊断剂或助剂,优选其占所说轂合物的至少5%、10%、15%、20%、25%、30%或甚至35%重量。在某些实施方案中,药物的释放速率主要取决于水解速率。在某些其它实施方案中,药物释放速率主要取决于酶解。

[0009] 本发明提供了用于这些治疗剂的药物传递的包含环糊精的高分子化合物。本发明还提供了用于控制药物传递的化合物,其能以靶向的、可预测的和受控的速率释放治疗剂。

[0010] 因此,本发明的一个方面是一种包含环糊精部分、治疗剂、以及任选的配体靶向剂的聚合物轭合物。该聚合物可以是直链或支链的,并且可以通过包含环糊精的单体的缩聚反应、一种或多种包含环糊精的单体和一种或多种不包含环糊精部分的共聚单体之间的共聚反应来形成。此外,本发明还考虑通过将环糊精部分接枝到已经形成的聚合物上所形成的包含环糊精的聚合物。本发明所考虑的环糊精部分非限制性地包括 α 、 β 和 γ 环糊精以及其氧化形式。根据所需的药物/聚合物比例,该治疗剂可以在聚合步骤前通过任选的连接基被连接到单体上,或者可以随后通过一种任选的连接基被接枝到该聚合物上。同样,该靶向配体可以在聚合步骤之前通过一种任选的连接基被连接到一种单体上,或者可以随后通过一种任选的连接基被接枝到该聚合物上,或者可以以包含复合体或主体-客体相互作用的形式被连接到该聚合物上。

[0011] 为了进行进一步说明,本发明的一个实施方案是式I所示的高分子化合物:



[0013] 其中

[0014] P表示直链或支链的聚合物链;

[0015] CD表示环状部分如环糊精部分;

[0016] L_1 、 L_2 和 L_3 每次出现时可以各自独立地不存在或表示连接基基团;

[0017] D每次出现时各自独立地表示治疗剂或其前体药物;

[0018] T每次出现时各自独立地表示靶向配体或其前体;

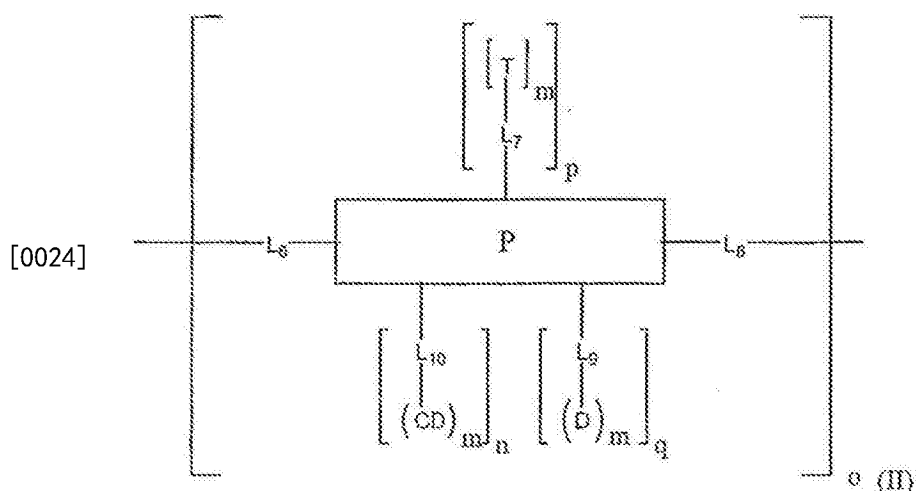
[0019] a、m和v每次出现时各自独立地表示1至10的整数(优选1至8,1至5,或甚至1至3);

[0020] b表示1至约30,000(优选<25,000、<20,000、<15,000、<10,000、<5,000、<1,000、<500、<100、<50、<25、<10,或甚至<5)的整数;和

[0021] n和w每次出现时各自独立地表示0至约30,000(优选<25,000、<20,000、<15,000、<10,000、<5,000、<1,000、<500、<100、<50、<25、<10,或甚至<5)的整数,

[0022] 其中该聚合物链包含环糊精部分或n至少是1。

[0023] 本发明的另一个实施方案是式II所示的化合物:



[0025] 其中

[0026] P表示聚合物的单体单元；

[0027] T每次出现时各自独立地表示靶向配体或其前体；

[0028] L6、L7、L8、L9和L10每次出现时可以各自独立地不存在或表示连接基基团；

[0029] CD每次出现时各自独立地表示环状部分如环糊精部分或其衍生物；

[0030] D每次出现时各自独立地表示治疗剂或其前体药物形式；

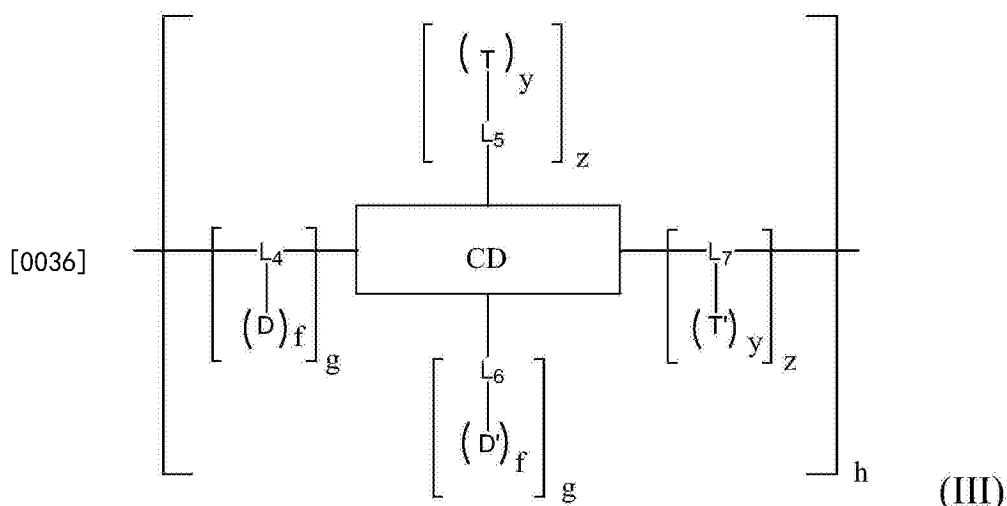
[0031] m每次出现时各自独立地表示1至10 (优选1至8, 1至5, 或甚至1至3) 的整数；

[0032] o表示1至约30,000 (优选<25,000、<20,000、<15,000、<10,000、<5,000、<1,000、<500、<100、<50、<25、<10, 或甚至<5) 的整数；和

[0033] p、n和q每次出现时各自独立地表示0至10 (优选0至8, 0至5, 0至3, 或甚至0至约2) 的整数，

[0034] 其中CD和D优选各自存在于该化合物的至少1个位置 (优选至少5、10、25、50或甚至>100个位置) 上。

[0035] 本发明的另一个实施方案是式III所示的化合物：



[0037] 其中

[0038] CD表示环状部分如环糊精部分或其衍生物；

[0039] L4、L5、L6和L7每次出现时可以各自独立地不存在或表示连接基基团；

[0040] D和D'每次出现时各自独立地表示相同或不同的治疗剂或其前体药物；

- [0041] T和T'每次出现时各自独立地表示相同或不同的靶向配体或其前体;
- [0042] f和y每次出现时各自独立地表示1至10 (优选1至8, 1至5, 或甚至1至3) 的整数;
- [0043] g和z每次出现时各自独立地表示0至10 (优选0至8, 0至5, 0至3, 或甚至0至约2) 的整数; 和
- [0044] h表示1至30,000 (优选<25,000、<20,000、<15,000、<10,000、<5,000、<1,000、<500、<100、<50、<25、<10, 或甚至<5) 的整数,
- [0045] 其中出现至少一次 (并且优选出现至少5、10或甚至至少20、50或>100次) 的g表示大于0的整数。
- [0046] 本发明另一方面是一种制备这里所描述的包含环糊精的治疗性聚合物的方法。
- [0047] 本发明另一方面是一种包含上面所讨论的化合物或聚合物的药物组合物。
- [0048] 本发明另一方面是一种包含这里所讨论的聚合物的药物剂型。
- [0049] 本发明另一方面是一种对个体进行治疗的方法, 其包括施用治疗有效量的本文所述的任何聚合物。
- [0050] 本发明另一方面是一种实施药学商务的方法, 其包括制造、许可或分销包含或涉及本文所述的任何聚合物的试剂盒。
- [0051] 在某些实施方案中, 当被体内应用时, 这些治疗性聚合物改善了这些治疗剂的药物稳定性和/或溶解度。此外, 通过各种连接基团中进行选择, 该聚合物给出了控制治疗剂和/或生物活性剂的释放或改善治疗剂/生物活性剂的体内安全性和/或治疗效力的方法。在某些实施方案中, 该聚合物是可生物侵蚀的或可生物降解的。
- [0052] 附图简要说明
- [0053] 图1显示了改变聚合物以协调其特性的策略。
- [0054] 图2证明了肽链长度 (tether length) 对负载药物CD的聚合物的药物释放速率的影响, 图中显示了肽连接基-CPT在PBS中的水解。
- [0055] 图3给出了系链的 (tethering) 喜树碱对增强喜树碱稳定性, 例如抑制内酯开环作用的影响, 图中显示了CPT、11和12在PBS (pH 7.4) 中的内酯不稳定性。
- [0056] 图4表明了pH 7.4KH₂PO₄缓冲液中对内酯开环作用进行的研究。
- [0057] 图5a和5b表明了通过调节聚合时间进行的聚合控制。
- [0058] 图6说明了在37℃下, 在pH范围为1.1至13.1的缓冲溶液中24小时后CPT从HG6和HGG6的释放。
- [0059] 图7显示了CD-BisCys-SS-Peg3400聚合物的降解HPLC分析。
- [0060] 图8显示了D5W、CPT、伊立替康、在其最高的无毒试验剂量 (18mg CPT/kg) 下的LGG10、以及其它三种与高MW聚合物的聚合物 (HGG6、HG6、HGG10) 在其MTD下在异种移植小鼠中肿瘤生长曲线与时间的函数关系。
- [0061] 图9给出了HGG6、HG6和HGG10在异种移植小鼠中的肿瘤生长中值曲线。
- [0062] 图10给出了各自以9mg CPT/kg给药的LGG10和HGG10在异种移植小鼠中的肿瘤生长中值曲线。
- [0063] 图11给出了D5W、CPT、伊立替康和三种包含高MW聚合物的聚合物在其MTD下在异种移植小鼠中平均体重 (MBW) 损失与时间的关系图。

[0064] 图12表明了CPT浓度 (ng/mg组织) 与异种移植小鼠肿瘤大小 (mg) 的相互关系。

[0065] 发明详述

[0066] I. 总述

[0067] 本发明涉及新型的用于传递治疗剂的包含环糊精的治疗性高分子化合物的组合物。在某些实施方案中,当被体内应用时,这些包含环糊精的聚合物改善了药物稳定性和/或溶解度和/或降低了毒性和/或改善了小分子治疗剂的效力。在某些实施方案中,可以用该聚合物传递治疗剂如喜树碱、紫杉酚、阿霉素和两性霉素。此外,通过对各种连接基基团和/或靶向配体进行选择,可以减少药物由该聚合物的释放速率以控制传递。本发明还涉及用本文所述的治疗组合物对个体进行治疗的方法。本发明还涉及用于进行药学商务的方法,其包括制造、许可或分销包含或涉及本文所述的高分子化合物的试剂盒。

[0068] 更一般地,本发明提供了水溶性的生物相容性聚合物轭合物,其含有通过可以在生理学条件下裂解从而释放生物活性部分的连接与生物活性部分共价连接的水溶性的生物相容性聚合物。在某些该类实施方案中,该聚合物包含与连接基部分交替的环状部分,所说的连接基部分将所说的环状结构连接到例如直链或支链聚合物上,优选将其连接到直链聚合物上。该环状部分可以是任何适宜的环状结构,如环糊精、冠醚(例如,18-冠-6、15-冠-5、12-冠-4等等)、环状寡肽(例如,包含5至10个氨基酸残基)、穴状配体或穴状化合物(例如,穴状配体[2.2.2]、穴状配体-2,1,1、以及其复合体)、杯芳烃或cavitands或其任何组合。该环状结构优选是(或者被改性成)水溶性的。在某些实施方案中,例如,在需要线性聚合物的情况中,对该环状结构进行选择从而使得在聚合条件下,各环状结构的恰好两个部分可以与该连接基部分进行反应,从而使得所得的聚合物包含一系列交替的环状部分和连接基部分(或基本上由其组成),如至少四个各类型的部分。适宜的双官能化环状部分包括许多可以通过商业途径获得和/或可以用所公开的方案来制备的物质。在某些实施方案中,轭合物在水中可溶解至至少0.1g/mL,优选至少0.25g/mL的浓度。

[0069] 该聚合物可以是聚阳离子、聚阴离子或非离子聚合物。聚阳离子或聚阴离子聚合物具有至少一种分别带有正电荷或负电荷的部位。在某些该类实施方案中,该连接基部分和环状部分中的至少一种包含该类荷电部位,从而使得该部分每次出现时都包括荷电部位。

[0070] 生物活性剂可以是治疗剂、诊断剂或助剂(如放射致敏剂或单独给药没有显著活性但是可以增强另一种治疗剂的活性的化合物),其优选占该轭合物的至少5%、10%、15%、20%、25%、30%或甚至35%重量。在优选的实施方案中,将该聚合物给药于患者使得可以在至少6小时,优选至少12或18小时的时期内释放所说的生物活性剂。例如,该活性剂可以在6小时至一个月、6小时至两周、6小时至3天等等的时间范围内被释放。在某些实施方案中,药物释放的速率主要取决于水解速率(与酶解截然不同),例如,在存在水解酶的情况下,释放速率改变的因子小于5,优选小2。在其它实施方案中,药物的释放速率可能主要取决于酶解速率。

[0071] 本发明的聚合轭合物可用于改善生物活性剂/治疗剂的溶解度和/或稳定性、降低药物-药物相互作用、降低与包括血浆蛋白在内的血液元素的相互作用、降低或消除免疫原性、保护所说的活性剂不被代谢、调控药物释放动力学、改善循环时间、改善药物半衰期(例如,在血清或所选择的组织,如肿瘤中的半衰期)、降低毒性、改善功效、将不同种属、种族

和/或人种个体之间的药物代谢标准化和/或为特定的细胞或组织提供靶向传递。溶解性差和/或有毒的化合物与其可以通过混入到本发明的高分子化合物中获益。

[0072] II. 定义

[0073] (a) 一般术语

[0074] 这里所用的术语‘助剂’是一种其本身几乎没有或没有治疗价值,但是增加了治疗剂效力的化合物。助剂的实例包括放射致敏剂、转染-增强剂(如氯奎以及其类似物)、趋化剂和化学引诱剂、调节细胞粘附力和/或细胞运动性的肽、细胞透化剂、多重耐药性抑制剂和/或流出泵等等。

[0075] 这里所用的术语“激动剂”指的是可以模拟或上调(例如,加强或补充)感兴趣的蛋白的生物活性的物质或有助于或可促进(例如,加强或补充)多肽之间或多肽和另一种分子(例如,类固醇、激素、核酸、小分子等等)之间的相互作用的物质。激动剂可以是一种野生型蛋白或其具有至少一种该野生型蛋白的生物活性的衍生物。激动剂还可以是可上调基因表达或增加蛋白的至少一种生物活性的小分子。激动剂还可以是可增加感兴趣的多肽与另一种分子,例如,目标肽或核酸之间的相互作用的蛋白或小分子。

[0076] 这里所用的“拮抗剂”指的是可以下调(例如,禁止或抑制)感兴趣的蛋白的生物活性的物质或可抑制/禁止或降低(例如,去稳定或减少)多肽或其它分子(例如类固醇、激素、核酸等等)之间的相互作用的物质。拮抗剂还可以是可下调感兴趣的基因的表达或降低野生型蛋白的存在量的化合物。拮抗剂还可以是可减少或抑制感兴趣的多肽与另外的小分子,例如,目标肽或核酸的相互作用的蛋白或小分子。

[0077] 当涉及聚合物时所用的术语“生物相容性聚合物”和“生物相容性”涉及现有技术中公认的聚合物。例如,可生物降解的聚合物包括其本身对主体(例如,动物或人)无毒,也不会以在主体体内产生毒性浓度的单体或寡聚子单元或其它副产品的速率降解(如果该聚合物降解的话)。在本发明的某些实施方案中,生物降解一般包括聚合物在生物体中降解成例如已知实际上无毒的其单体子单元。但是,由该类降解产生的中间的寡聚产品可能具有不同的毒理学性质,或者生物降解可能涉及产生除该聚合物的单体子单元之外的分子的氧化或其它生物化学反应。因此,在某些实施方案中,可以在一种或多种毒性分析后确定用于体内应用,如植入或注射到患者体内的可生物降解聚合物的毒性。任何主题组合物不一定都具有被认为是生物相容性的100%的纯度。因此,一种主题组合物可包含99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%、75%或甚至更少的生物相容性聚合物,例如,包括本文所述的聚合物和其它材料和赋形剂,并且仍然是生物相容性的。

[0078] 为了确定一种聚合物或其它材料是否是生物相容性的,其必需进行毒性分析。该类分析在现有技术中是众所周知的。该类分析的一个实例可以使用活的癌细胞,如GT3TKB肿瘤细胞以下面的方式来进行:将样品在37℃下在1M NaOH中降解至观察到完全降解。然后,将该溶液用1M HCl中和。将约200μL各种浓度的降解了的样品产物放置到96-孔组织培养板中并用人胃癌细胞(GT3TKB)以 10^4 /孔的密度对其接种。将该降解了的样品产物与该GT3TKB细胞一起培养48小时。可以用相对生长%对组织培养孔中被降解的样品的浓度对该分析的结果作图。此外,还可以用众所周知的用于证实其在皮下植入部位不会产生显著水平的刺激或炎症的体内试验,例如皮下植入到大鼠体内对来本发明的聚合物和制剂进行评估。

[0079] 术语“可生物降解的”在现有技术中是公知的,并且包括在应用过程中会降解的聚合物、组合物和制剂,如本文所述的这些物质。可生物降解的聚合物一般与不可生物降解的聚合物不同,前者可以在应用期间降解。在某些实施方案中,该类使用涉及体内应用,如在体内治疗中的应用,并且在其它某些实施方案中,该类应用涉及体外应用。一般而言,归于生物降解的降解涉及可生物降解的聚合物降解成其组成子单元的降解,或消化,例如,该聚合物通过生物化学过程被降解成更小的非高分子的子单元的消化。在某些实施方案中,通常可以确定两种不同类型的生物降解。例如,一种类型的生物降解可能涉及聚合物主链中键(不管是共价键还是其它键)的裂解。在该类生物降解中,一般产生单体和低聚物,并且更典型地,该类生物降解是通过连接聚合物的一个或多个子单元的键的裂解发生的。相反,另一种类型的生物降解可能涉及内部至侧链的或将侧链连接到该聚合物主链上的键(不管是共价键还是其它键)的裂解。例如,通过生物降解可以将作为侧链连接到该聚合物主链上的治疗剂或其它化学部分释放出来。在某些实施方案中,在聚合物的应用过程中可能发生该生物降解的一种或另一种一般类型,或两种同时发生。

[0080] 这里所用的术语“生物降解”包括两种一般类型的生物降解。可生物降解的聚合物的降解速率常常部分取决于各种因素,包括负责任何降解的键的化学特性、分子量、结晶性、生物稳定性和该类聚合物的交联程度、植入物的物理特性(例如,形状和大小)和给药的方式和位置。例如,分子量越高、结晶度越高和/或生物稳定性越高,可生物降解的聚合物的生物降解通常就越慢。术语“可生物降解的”涵盖了也被称为“可生物侵蚀的”材料和方法。

[0081] 在其中所说的可生物降解的聚合物还带有治疗剂或与其结合的其它材料的某些实施方案中,该类聚合物的生物降解速率的特征在于该类材料的释放速率。在该类情况中,生物降解速率可能不仅取决于该聚合物的化学特性和物理特性,而且还取决于其中所包含材料的特性。该组合物的降解不仅包括分子内键的裂解,例如通过氧化和/或水解进行裂解,而且还包括分子间键的瓦解,如通过与外来包含主体竞争形成复合体而产生的主体/客体复合体的解离。

[0082] 在某些实施方案中,本发明的聚合体制剂可以在所需应用中在可接受的时期内生物降解。在某些实施方案中,如在体内治疗中,在与pH为6至8的温度为25至37℃的生理学溶液接触时,该类降解通常发生在小于约5年、一年、六个月、三个月、一个月、十五天、五天、三天或甚至一天的时间内。在其它实施方案中,根据所需的应用,该聚合物在约一小时至几星期的时期内降解。

[0083] 这里所用的术语“可生物侵蚀的”指的是可以在所需的时期内持续向靶组织传递有效量治疗剂的聚合物。因此,在一方面,在位于主体组织等等的生物学环境中时,本发明的聚合物暴露在水解酶和氧化性物质之下,并且与主体的炎症响应成比例。其通过共价连接键的断裂使所说的治疗剂释放出来。因此,在某些实施方案中,如上文所述的那样,本发明的材料在降解时利用了哺乳动物固有的伤口愈合修复过程。

[0084] 已经对可生物降解的聚合物——聚乳酸、聚乙醇酸和聚乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)的纳米微粒制剂进行了广泛研究。这些聚合物是在被植入到体内时经历简单水解的聚酯。该类水解的产物是可生物相容的和可代谢的部分(例如,乳酸和乙醇酸),其最后通过柠檬酸循环从体内被除去。聚合物生物降解产物是以十分低的速率形成的,因此不会影响正常的细胞功能。使用这些聚合物的一些植入研究已经证明了其在药物传递应用中的安全

性,其是以基质(matrices)、微球、骨植入材料、手术缝合线的形式被应用的,并且还用于长效的避孕药应用。这些聚合物还可用于作用于人造器官的移植材料,并且最近还被用作组织工程学研究中的基底膜。Nature Med.824-826 (1996)。因此,这些聚合物已经在各种应用中历经考验并且已经证明其对于人的应用而言是安全的。最重要的是,这些聚合物已经被FDA批准用于人。

[0085] 当用这些聚合物来体内传递药理学活性物质时,这些聚合物本身必需无毒并且在该聚合物被体液侵蚀时其降解成无毒的降解产物。但是,许多合成的可生物降解的聚合物在体内侵蚀时产生对周围组织有不利相互作用的低聚物和单体。D.F.Williams, J.Mater.Sci.1233 (1982)。为了将完整聚合物载体以及其降解产物的毒性最小化,已经以天然存在的代谢物为基础设计了一些聚合物。该类聚合物中进行了最广泛研究的实例可能是得自乳酸或乙醇酸的聚酯和得自氨基酸的聚酰胺。

[0086] 许多可生物侵蚀的或可生物降解的聚合物是已知的并且可用于控制药物的释放。该类聚合物在,例如,US 4,291,013;US 4,347,234;US 4,525,495;US 4,570,629;US 4,572,832;US 4,587,268;US 4,638,045;US 4,675,381;US 4,745,160;和US 5,219,980中进行了描述。

[0087] 生物可水解的键(例如,酯、酰胺、碳酸酯、氨基甲酸酯或亚胺)指的是在生理学条件下可裂解的键(例如,酯裂解形成羟基和羧酸)。生理学条件包括消化道(例如,胃、肠等等)的酸性和碱性环境、肿瘤的酸性环境、酶解、代谢和其它生物学过程,并且优选指的是脊椎动物如哺乳动物体内的生理学条件。

[0088] 这里所用的术语“共聚单体A前体”、“连接基”“连接基基团”和“连接基部分”指的是在与环糊精单体前体或其它适宜的环状部分反应时将两个该类部分连接到一起的任何直链或支链、对称或不对称的化合物。在某些实施方案中,共聚单体A前体是一种包含至少两个官能团的化合物,通过与其反应而实现与环糊精单体的连接。各共聚单体A前体的官能团可以是相同或不同的、末端或内部的,其实例非限制性地包括氨基、酸、咪唑、羟基、巯基、酰卤、-C=C-或-C≡C-以及其衍生物。在优选的实施方案中,所说的两个官能团可以相同并且可以位于该共聚单体的末端。在某些实施方案中,共聚单体A前体包含一个或多个具有至少一个可以通过其进行反应的官能团的侧基,从而可以实现治疗剂或靶向配体的连接,或者可以实现支化聚合。各共聚单体A前体的侧基的官能团可以是相同或不同的、末端或内部的,其实例非限制性地包括氨基、酸、咪唑、羟基、巯基、酰卤、乙烯和乙炔基以及其衍生物。在某些实施方案中,该侧基是(未)被取代的任选地在链或环中包含一个或多个杂原子例如N、O、S的支链、环状或直链C1-C10(优选C1-C6)烷基或芳基烷基。

[0089] 在共聚单体A前体与环糊精单体前体共聚反应时,可以通过将一个环糊精单体的伯羟基侧与另一个环糊精单体的伯羟基侧相结合、将一个环糊精单体的仲羟基侧与另一个环糊精单体的仲羟基侧相结合或通过将一个环糊精单体的伯羟基侧与另一个环糊精单体的仲羟基侧相结合来将两种环糊精单体连接起来。因此,该类键合的组合可存在于最终的共聚物中。最终共聚物的共聚单体A前体和共聚单体A都可以是中性、阳离子性(例如,包含质子化基团,如例如季铵基团)或阴离子性(例如,包含去质子化基团,如,例如,硫酸根、磷酸根、硼酸根或羧酸根)。可以通过调节pH条件来调节该共聚物共聚单体A的电荷。适宜共聚单体A前体的实例非限制性地包括琥珀酰亚胺(例如,二巯基双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)DSP

和双琥珀酰亚胺基辛二酸酯(DSS)、谷氨酸酯和天门冬氨酸酯)。

[0090] 本发明包含环糊精的聚合物可以是线性、支链或接枝的。这里所用的术语“包含环糊精的线性聚合物”指的是包含被插入到聚合物链内部的(α 、 β 或 γ)环糊精分子或其衍生物的聚合物。这里所用的术语“包含环糊精的接枝聚合物”指的是包含悬挂在该聚合物链外的(α 、 β 或 γ)环糊精分子或其衍生物的聚合物。这里所用的术语“接枝聚合物”指的是沿着聚合物的主链以悬挂基团的形式连接有另外的部分的聚合物分子。术语“接枝聚合”指的是其中将侧链接枝到聚合物主链上的聚合反应,所说的侧链包含一种或多种其它单体。所得接枝共聚物的性质如,例如,溶解度、熔点、吸水性、润湿性、机械性能、吸附行为等等随着所接枝单体的类型和数量与初始聚合物的这些性质有着较大或较小的差异。这里所用的术语“接枝比”指的是以该聚合物的重量为基础的被接枝单体数量的重量百分比。这里所用的包含环糊精的支链聚合物指的是具有多个分支点的聚合物主链,其中各分支点也是另一条聚合物主链的起点,并且聚合物主链的各段可以具有许多被插入到或接枝到该链上的(α 、 β 或 γ)环糊精分子或其衍生物。

[0091] 术语“环糊精部分”指的是可以为其氧化或还原形式的(α 、 β 或 γ)环糊精分子或其衍生物。环糊精部分可以包含任意的连接基。还可以通过任意的连接基进一步向这些部分中连接任意的治疗剂和/或靶向配体。该键合可以是共价的(任意地通过可生物水解的键,例如,酯、酰胺、氨基甲酸酯和碳酸酯键连接)或者可以是环糊精衍生物和治疗剂和/或靶向配体或各任意的连接基之间的主体-客体复合体。环糊精部分可进一步包含一种或多种直接(即通过碳水化合物键合)或通过连接基基团连接到该环状核上的碳水化合物部分,优选简单的碳水化合物部分如半乳糖。

[0092] 术语“ED₅₀”指的是产生其最大响应或作用50%的响应或作用的药物剂量。

[0093] 在涉及对个体进行治疗的方法时,各化合物的‘有效量’指的是制剂中治疗剂的量,当以所需剂量方案的一部分应用时,根据临床可接受的标准,其可以提供治疗或预防特定病症的益处。

[0094] 术语“健康护理人员”指的是为个人、团体等等提供健康护理服务的个体或组织。“健康护理人员”的实例包括医生、医院、继续护理退休团体、熟练的护理机构、亚急性护理机构、诊所、多科诊所、独立的急救中心、家庭保健服务机构和HMO's。

[0095] 这里所用的“说明”指的是描述附属于试剂盒的相关材料或与之有关的操作的文件。这些材料可包括任何下面物质的组合:背景信息、组分以及其来源信息(购买信息等等)的列表、使用该试剂盒的简单或详细方案、故障检查、参考资料、技术支持和任何其它相关文件。这些说明可以与试剂盒一起被提供,或者可以以独立的组成部分被提供,其可以为纸件形式或者在计算机可读存储设备上提供或为可以从国际互联网上下载的电子形式,或者可以为录音介绍的形式。这些说明可以包含一种或多种文件,并且包括未来可能有的最新资料。

[0096] 这里所用的“试剂盒”指的是至少两种组成该试剂盒的组分的集合。该组分一起组成了用于给定目的的功能单位。各组成部分可以在物理上被包装在一起或者被独立包装。例如,包含用于使用该试剂盒的说明的试剂盒可以包含或不包含其它各组成部分的说明。或者,该说明可以以独立的组成部分的形式提供,其可以为纸件形式或可以从国际互联网上下载的电子形式,或者可以为录音介绍的形式。

[0097] 术语“LD₅₀”指的是50%试验个体死亡的药物剂量。

[0098] 用主题方法治疗的“患者”或“个体”指的是人或非人的个体。

[0099] 本发明的“聚合反应”包括游离基、阴离子和阳离子机理,以及双官能分子的反应(与尼龙的形成相似,例如,将分别带有两个或多个不同的可彼此反应的反应部分的分子进行反应(但是优选通过空间、构象或其它约束限制分子内反应),或者将两种或多种不同的化合物进行反应,各化合物带有两个或多个仅与不同化合物的反应部分反应(即,分子间的反应)的反应部分)、以及金属催化的聚合反应,如本领域技术人员公知的烯烃交换、以及其它聚合反应。

[0100] 术语“预防或治疗性”处理在现有技术中是公知的,并且包括给主体施用一种或多种主题组合物。如果在临床上表现出不希望的情况(例如主体动物的疾病或其它不希望的状态)前进行给药,则该处理是预防性的,即,其保护主体不形成不希望的情况,而如果在表现出不希望的情况后给药,则该处理是治疗性的(即,用以减少、改善或稳定已经存在的不希望的情况或其副作用)。

[0101] 术语“防止”是本领域公知的,并且当用于一种情况,如局部复发(例如,疼痛)、疾病如癌症、综合症状如心衰或任何其它医学情况时,其在本领域可以被充分理解,并且包括使用一种相对于未使用该组合物的个体而言可以降低个体医学情况的症状的频率或延迟其出现的组合物。因此,癌症的预防包括,例如,降低接受预防性处理的患者群中可察觉的癌生长的数量(相对于未进行处理的对照群体而言)和/或延迟进行了处理的群体中可探测的癌生长的出现(相对于未进行处理的对照而言),例如,其以统计学和/或临床显著的数量被降低或延迟。感染的预防包括例如相对于未进行处理的对照群体而言,降低了进行了处理的群体诊断出感染的数量和/或延迟了其症状发作。疼痛的预防包括例如相对于未进行处理的对照群体而言,降低了进行了处理的群体中个体经历疼痛感觉的频率或者延迟了其经历的疼痛感觉。

[0102] 本文所述的术语“治疗剂”包括当给药于生物体(人或非人的动物)时通过局部和/或全身作用诱导了所需的药理学、致免疫性和/或生理学作用的任何合成或天然的生物学活性化合物或组合物。因此,该术语包括一般被称为药物、疫苗和生物药剂(包括分子如蛋白、肽、激素、核酸、基因构建体等等)的化合物或化学品。更具体地,术语“治疗剂”包括用于所有主要治疗领域的化合物或组合物,非限制性地包括助剂;抗感染剂如抗生素和抗病毒剂;镇痛剂和镇痛剂组合、减食欲剂、抗炎剂、抗癫痫剂、局部和全身麻醉剂、安眠剂、镇静剂、抗精神病药物、精神抑制剂、抗抑郁剂、抗焦虑剂、拮抗剂、神经阻滞剂、抗胆碱能药和拟胆碱能药、抗毒蕈碱药和毒蕈碱药、抗肾上腺素能药、抗心律失常药、抗高血压药、激素和营养物、抗关节炎药、止喘药、抗惊厥药、抗组胺药、止恶心药、抗肿瘤药、止痒剂、退热剂;镇痉剂、心血管制剂(包括钙通道阻滞剂、 β -阻滞剂、 β -激动剂和抗心律失常药)、抗高血压药、利尿剂、血管舒张药;中枢神经系统兴奋剂;咳嗽和感冒制剂;减充血剂;诊断剂;激素;骨生长促进剂和骨再吸收抑制剂;免疫抑制剂;肌肉松弛药;精神兴奋剂;镇静剂;安定药;蛋白、肽、以及其片段(无论是天然的、化学合成的还是重组产生的);和核酸分子(两个或多个核苷酸(核糖核苷酸(RNA)或脱氧核糖核苷酸(DNA),包括双链和单链分子)的聚合形式、基因构建体、表达载体、反义分子等等)、小分子(例如,阿霉素)和其它生物活性大分子如,例如,蛋白和酶。这些活性剂可以是医学(包括兽医)应用和农业如植物以及其它领域所用的生物

学活性剂。术语治疗剂还非限制性地包括药物；维生素；矿物补充物；用于治疗、预防、诊断、治愈或减轻疾病的物质；或影响机体结构或功能的物质；或在被放置到预定的生理学环境中后变得有生物活性或者生物学活性更强的前体药物。

[0103] 这里所用的术语“低水溶性”指的是在水中溶解度差的水不溶性化合物，即在生理学pH(6.5-7.4)下在水中的溶解度<5mg/ml的物质。其水溶性优选<1mg/ml，更优选<0.1mg/ml。希望在分散体形式时该药物在水中是稳定的；否则的话，需要使用冷冻干燥或喷雾干燥的固体形式。

[0104] 一些优选的水不溶性药物的实例包括免疫抑制剂如环孢菌素类物质，包括环孢菌素(环孢菌素A)、免疫活化剂、抗病毒和抗真菌剂、抗肿瘤药、镇痛剂和抗炎剂、抗生素、抗癫痫剂、麻醉剂、安眠剂、镇静剂、抗精神病药物、精神抑制剂、抗抑郁剂、抗焦虑剂、抗惊厥剂、拮抗剂、神经阻滞剂、抗胆碱能药和拟胆碱能药、抗毒蕈碱药和毒蕈碱药、抗肾上腺素能药和抗心律失常药、抗高血压药、激素和营养物。对这些物质和其它适宜药物的详细描述可见 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, 1990, Mack Publishing Co. Philadelphia, Pa.

[0105] 术语“治疗指数”指的是被定义为LD₅₀/ED₅₀的药物治疗指数。

[0106] 在涉及治疗方法时，化合物的“治疗有效量”指的是当作为给药于哺乳动物、优选人的所需剂量方案的一部分进行给药时，根据待处理病症或情况或美容目的的临床可接受的标准，例如在适用于任何医学处理的合理的益处/风险比下可以缓解症状、改善情况或减缓疾病情况出现的制剂中的化合物的量。

[0107] 在涉及治疗方法时，化合物的“治疗有效的日剂量”指的是当作为给药于哺乳动物、优选人的所需日剂量方案的一部分进行给药时，根据待处理病症或情况或美容目的的临床可接受的标准，例如在适用于任何医学处理的合理的益处/风险比下可以缓解症状、改善情况或减缓疾病情况出现的制剂中的化合物的量。

[0108] (b) 化学术语

[0109] 脂族链包括下面所定义类型的烷基、链烯基和炔基。直脂族链被限定为无分支碳链的基团。这里所用的术语“脂族基团”指的是直链、支链或环状脂族烃基并且包括饱和和不饱和的脂族基团，如烷基、链烯基和炔基。

[0110] 烷基指的是具有所指定碳原子数的或者在没有具体指定时具有最多30个碳原子的全饱和支链或直链的碳链基团。例如，1至8个碳原子的烷基指甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基和辛基等基团，以及这些基团的位置异构体。10至30个碳原子的烷基包括癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基、十九烷基、二十烷基、二十一烷基、二十二烷基、二十三烷基和二十四烷基。在优选的实施方案中，直链或支链烷基在其主链上具有30或更少数目的碳原子(例如，对于直链而言为C1-C30，对于支链而言为C3-C30)，并且更优选20或更少。同样，优选的环烷基在其环结构中具有3-10个碳原子，并且更优选在环结构中具有5、6或7个碳原子。

[0111] 此外，在说明书、实施例以及权利要求中所用的术语“烷基”(或“低级烷基”)既包括“未取代的烷基”，又包括“取代的烷基”，后者指的是具有代替该烃主链一个或多个碳上的氢的取代基的烷基部分。所述类取代基可以包括，例如，卤素、羟基、羰基(如羧基、烷氧基羰基、甲酰基或酰基)、硫代羰基(如硫代酸酯、硫代乙酸酯或硫代甲酸酯)、烷氧基、磷酰基、

磷酸酯、麟酸酯、次麟酸酯、氨基、酰氨基、脒、氰基、硝基、巯基、烷硫基、硫酸酯、磺酸酯、氨磺酰基、磺酰氨基、磺酰基、杂环基、芳烷基或芳族或杂芳族部分。本领域技术人员应当清楚的是,如果适宜的话,该烃链上的取代部分本身可以被取代。例如,取代的烷基的取代基可以包括取代和未取代形式的氨基、叠氮基、亚氨基、酰氨基、磷酰基(包括麟酸酯和次麟酸酯)、磺酰基(包括硫酸酯、磺酰氨基、氨磺酰基和磺酸酯)和甲硅烷基,以及醚类、烷硫基、羰基(包括酮类、醛类、羧酸酯和酯)、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CN}$ 等等。在下面对取代的烷基的实例进行了描述。环烷基可进一步被烷基、链烯基、烷氧基、烷硫基、氨基烷基、羰基-取代的烷基、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CN}$ 等等取代。

[0112] 除非具体指定了碳数,否则这里所用的“低级烷基”指的是上面所定义的但是在其主链结构上具有1至10个碳原子,更优选1至6个碳原子的烷基如甲基、乙基、正-丙基、异丙基、正-丁基、异丁基、仲-丁基和叔-丁基。同样,“低级链烯基”和“低级炔基”具有相似的链长度。

[0113] 在本申请中,优选的烷基是低级烷基。在优选的实施方案中,这里被称为烷基的取代基是低级烷基。

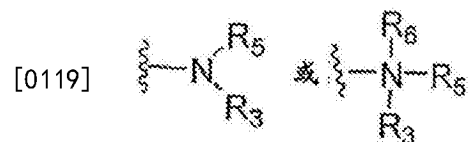
[0114] 术语“烷硫基”指的是具有连接到其上的硫基团的上面所定义的烷基。在优选的实施方案中,“烷硫基”部分是由 $-(\text{S})$ -烷基、 $-(\text{S})$ -链烯基、 $-(\text{S})$ -炔基和 $-(\text{S})-(\text{CH}_2)_m-\text{R}_1$ 中的一种表示的,其中 R_1 的定义如下所述。典型的烷硫基包括甲硫基、乙硫基等等。

[0115] 链烯基指的是具有所指定碳原子数或如果没有指明碳原子数限度的话具有最多26个碳原子的任何支链或直链的不饱和碳链;并且在该基团中具有1个或多个双键。6至26个碳原子的链烯基的实例有为其各种异构体形式的己烯基、庚烯基、辛烯基、壬烯基、癸烯基、十一碳烯基、十二碳烯基、十三碳烯基、十四碳烯基、十五碳烯基、十六碳烯基、十七碳烯基、十八碳烯基、十九碳烯基、二十碳烯基、二十一碳烯基、二十二碳烯基、二十三碳烯基和二十四碳烯基,其中的不饱和键可以位于该基团中的任何位置并且双键可以具有(Z)或(E)构型。

[0116] 炔基指的是链烯基范围内的烃基,但是在该基团内具有1或多个三键。

[0117] 这里所用的术语“烷氧基”指的是下面所定义的具有连接到其上的氧基的烷基。典型的烷氧基包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、叔-丁氧基等等。“醚”是通过氧被共价连接起来的两个烃。因此,使该烷基成为一种醚的烷基的取代基是烷氧基或类似于烷氧基,如可以由 $-O$ -烷基、 $-O$ -链烯基、 $-O$ -炔基、 $-O-(\text{CH}_2)_m-\text{R}_1$ 中的一种来表示,其中 m 和 R_1 如下所述。

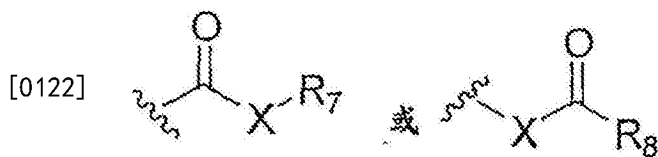
[0118] 术语“胺”和“氨基”在本领域是公知的并且指的是未取代和取代的胺,例如,可以由下面的通式所表示的部分:



[0120] 其中 R_3 、 R_5 和 R_6 各自独立地表示氢、烷基、链烯基、 $-(\text{CH}_2)_m-\text{R}_1$,或 R_3 和 R_5 和与其相连的N原子合在一起形成在环结构中具有4至8个原子的杂环; R_1 表示链烯基、芳基、环烷基、环烯基、杂环基或多环基;并且 m 是0或1至8的整数。在优选的实施方案中, R_3 或 R_5 中仅有一个可以是羰基,例如, R_3 、 R_5 和氮一起不形成酰亚胺。在更优选的实施方案中, R_3 和 R_5 (和任选的 R_6)各自独立地表示氢、烷基、链烯基或 $-(\text{CH}_2)_m-\text{R}_1$ 。因此,这里所用的术语“烷基胺”指的是

具有连接到其上的取代或未取代的烷基的上面所定义的胺基团,即, R_3 和 R_5 中至少有一个是烷基。在某些实施方案中,氨基或烷基胺是碱性的,即,其具有 >7.00 的 pK_a 。相对于水而言,该官能团的质子化形式具有高于 7.00 的 pK_a 。

[0121] 术语“羰基”在本领域是公知的并且包括可以由下述通式表示的基团:



[0123] 其中X是键或表示氧或硫,并且R₇表示氢、烷基、链烯基、-(CH₂)_m-R₁,或其可药用的盐,R₈表示氢、烷基、链烯基或-(CH₂)_m-R₁,其中m和R₁的定义如上所述。在X是氧并且R₇或R₈不是氢的情况下,该式表示一种“酯”。在X是氧,并且R₇具有上述定义的情况下,该部分在这里被称为羧基,并且特别是当R₇是氢时,该式表示一种“羧酸”。在X是氧,并且R₈是氢的情况下,该式表示一种“甲酸酯”。一般而言,在上式的氧原子被硫代替的情况下,该式表示一种“硫代羰基”基团。在X是硫并且R₇或R₈不是氢的情况下,该式表示一种“硫代酸酯”基团。在X是硫并且R₇是氢的情况下,该式表示一种“硫代羧酸”基团。在X是硫并且R₈是氢的情况下,该式表示一种“硫代甲酸酯”基团。另一方面,在X是键,并且R₇不是氢的情况下,上时表示一种“酮基”。在X是键,并且R₇是氢的情况下,上时表示一种“醛”基。

[0124] 术语“被衍生化”指的是对分子进行化学修饰。该化学修饰可以是人工的如药物的形成,天然的如代谢物的形成。本领域普通技术人员将易于意识到有许多方法可以对分子进行修饰,如氧化、还原、亲电/亲核取代、烷基化、酯/酰胺形成等等。例如,在被共价连接到所说的聚合物基质上之前,可以用胺化、甲苯磺酰化或碘化来对本发明的环糊精进行化学修饰。同样,可以通过制备前体药物(例如,甘氨酸-喜树碱)来对治疗剂进行化学修饰。

[0125] 术语“杂环基”或“杂环基团”指的是3-至10-元环结构，更优选3-至7-元环，其环结构包含1至4个杂原子。这些杂环还可以是多环。杂环基包括，例如，噻吩、噻蒎、呋喃、吡喃、异苯并呋喃、色烯、氧杂蒎、phenoxathiin、吡咯、咪唑、吡唑、异噻唑、异恶唑、吡啶、吡嗪、嘧啶、哒嗪、吲嗪、异吲哚、吲哚、吲唑、嘌呤、喹啉、异喹啉、喹啉、酞嗪、萘啶、喹喔啉、喹唑啉、噌啉、蝶啶、咔唑、咔琳、菲啶、吡啶、嘧啶、菲咯琳、吩嗪、吩砒嗪、吩噻嗪、呋咱、吩恶嗪、吡咯烷、氧杂环戊烷、硫杂环戊烷、恶唑、哌啶、哌嗪、吗啉、内酯、内酰胺如氮杂环丁酮和吡咯烷酮、磺内酰胺、磺酸内酯等等。该杂环可以在一个或多个位置上被上述的取代基所取代，所说的取代基如例如卤素、烷基、芳烷基、链烯基、炔基、环烷基、羟基、氨基、硝基、巯基、亚氨基、酰氨基、磷酸酯、膦酸酯、次膦酸酯、羰基、羧基、甲硅烷基、氨磺酰基、亚磺酰基、醚、烷硫基、磺酰基、酮、醛、酯、杂环基、芳族或杂芳族部分、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 等。

[0126] 这里所用的术语“取代的”包括有机化合物所有可能的取代基。在更广义上, 允许的取代基包括开链式和环状、支链和直链的、碳环和杂环的、芳族和非芳族的有机化合物的取代基。说明性取代基的实例包括例如上述这些基团。对于适宜的有机化合物, 允许的取代基可以是一种或多种并且是相同或不同的。对于本发明的目的而言, 杂原子如氮可以具有氢取代基和/或任何允许的可以满足该杂原子的化合价的本文所述的有机化合物的取代基。这些允许的有机化合物的取代基不以任何方式对本发明形成限制。

[0127] 术语“烃基”指的是包含具有最多26个碳原子的碳链或环的单价烃基团,所说的碳

上可以连接有氢原子。该术语包括烷基、环烷基、链烯基、炔基和芳基、具有饱和和不饱和键混合物的基团、碳环,并且包括所述基团的组合。其可以指直链、支链、环状结构或其组合。

[0128] 术语“亚烃基”指的是二价烃基。典型实例包括亚烷基、亚苯基或亚环己基。该亚烃基链优选是全饱和的和/或具有1-10个碳原子的链。

[0129] 这里所用的术语“硝基”指的是 $-NO_2$;术语“卤素”指的是 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 或 $-I$;术语“巯基”指的是 $-SH$;术语“羟基”指的是 $-OH$;并且术语“磺酰基”指的是 $-SO_2-$ 。

[0130] 应当清楚的是,“取代基”或“被……取代”包括的暗含条件是该类取代基与被取代原子和取代基所允许的化学价相一致,并且该取代基可以产生稳定的化合物,例如,其不会自动进行转化如通过重排、环化、消除等等来进行转化。

[0131] 可以对链烯基和炔基进行类似取代从而产生例如,氨基链烯基、氨基炔基、酰氨基链烯基、酰氨基炔基、亚氨基链烯基、亚氨基炔基、链烯硫基、炔硫基、羰基-取代的链烯基或炔基。

[0132] 当在任何结构中出现一次以上时,这里所用的各种表述例如烷基、m、n等等的定义与其在同一结构中的其它定义是彼此独立的。

[0133] 术语三氟甲磺酰基、甲苯磺酰基、甲磺酰基和九氟丁磺酰基在本领域是公知的并且分别指的是三氟甲磺酰基、对-甲苯磺酰基、甲磺酰基和九氟丁磺酰基。术语三氟甲磺酸酯、甲苯磺酸酯、甲磺酸酯和九氟丁磺酸酯在本领域是公知的并且分别指三氟甲磺酸酯、对-甲苯磺酸酯、甲磺酸酯和九氟丁磺酸酯官能基和包含所说基团的分子。

[0134] 缩写Me、Et、Ph、Ms分别表示甲基、乙基、苯基和甲磺酰基。Journal of Organic Chemistry各卷第一次发行中给出了本领域普通技术人员所用缩写更全面的列表;该列表一般存在于标题为标准缩写列表的表中。所说列表中所包含的缩写以及有机化学领域普通技术人员所用的所有缩写在这里都被引入作为参考。

[0135] 本发明的某些化合物可以以几何或立体异构形式存在。本发明包括所有该类化合物,包括顺式-和反式-异构体、(R)-和(S)-对映异构体、非对映异构体、(d)-异构体、(l)-异构体、其外消旋混合物和其它混合物,这些都落在本发明的范围内。在取代基如烷基中可以存在另外的不对称碳原子。所有该类异构体以及其混合物都包括在本发明的范围内。

[0136] 例如,如果需要本发明化合物的特定对映异构体,则可以通过不对称合成来制备,或者通过用手性助剂衍生化,其中将所得的非对映异构的混合物分离出来并将该辅助基团裂解下来从而提供所需的纯对映异构体。或者,在该分子包含碱性官能团如氨基或酸性官能团如羧基的情况中,可以用适宜的光学活性酸或碱来形成非对映异构的盐,然后用现有技术中众所周知的分级结晶或色谱法将所形成的非对映异构体拆分,随后可以回收纯对映异构体。

[0137] 所考虑的上述化合物的等同物包括与其相当并且具有与其性质相同的一般性质的其它化合物,其中对取代基进行了一种或多种不会对化合物的功效产生不利影响的简单变化。一般而言,本发明的化合物可以用常规反应流程如下面所述的流程所述的方法或者其变型,用易于获得的起始材料、试剂和常规合成操作来进行制备。在这些反应中,其还可以使用本身已知但是这里没有提及的变型。

[0138] 对于本发明的目的而言,根据化学和物理手册,第67版,1986-87内封面上的CAS版元素周期表对这些化学元素进行确定。对于本发明的目的而言,术语“烃”还包括具有至少

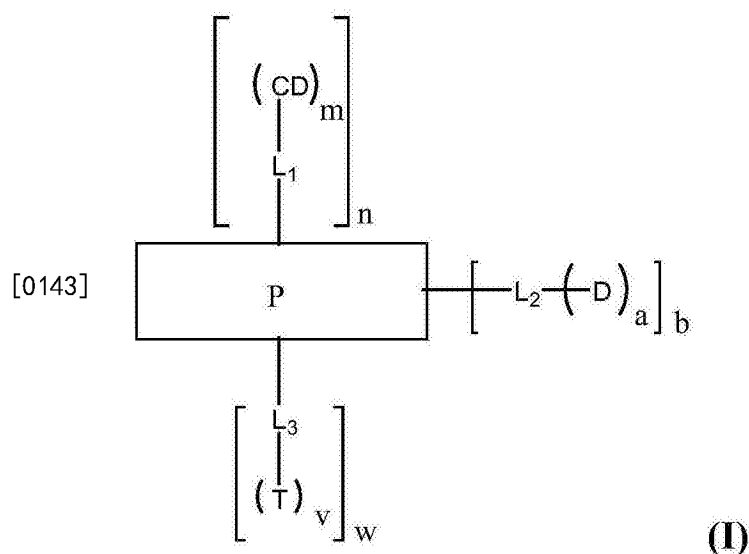
一个氢和一个碳原子的所有可允许的化合物。在广义上讲,所说的可允许的烃包括开链式和环状、支链和直链的、碳环和杂环的、芳族和非芳族的取代或未取代的有机化合物。

[0139] III.方法和组合物的应用实例

[0140] (a) 组合物实例

[0141] 本发明包括聚合物轭合物,如包含环糊精的聚合物轭合物,其中共价连接了一种或多种治疗剂/生物活性剂。在某些实施方案中,该治疗剂是小分子、大分子、抗体、肽、蛋白、酶、核酸或具有治疗功能的聚合物。该聚合物包括直链或支链的包含环糊精的聚合物和用环糊精接枝的聚合物。在US 6,509,223,公开的US申请20020151523和申请序号为60/417373和10/372723的US专利申请中教导了可以如本文所述进行修饰的包含环糊精的聚合物的实例。这些聚合物可用作传递小分子治疗剂的载体,并且可以改善药物稳定性和体内使用时的溶解度。

[0142] 因此,本发明的一个实施方案是式I所示的高分子化合物:



[0144] 其中

[0145] P表示直链或支链的聚合物链;

[0146] CD表示环状部分如环糊精部分;

[0147] L_1 、 L_2 和 L_3 每次出现时可以各自独立地不存在或表示连接基团;

[0148] D每次出现时各自独立地表示治疗剂或其前体药物;

[0149] T每次出现时各自独立地表示靶向配体或其前体;

[0150] a、m和v每次出现时各自独立地表示1至10的整数(优选1至8,1至5,或甚至1至3);

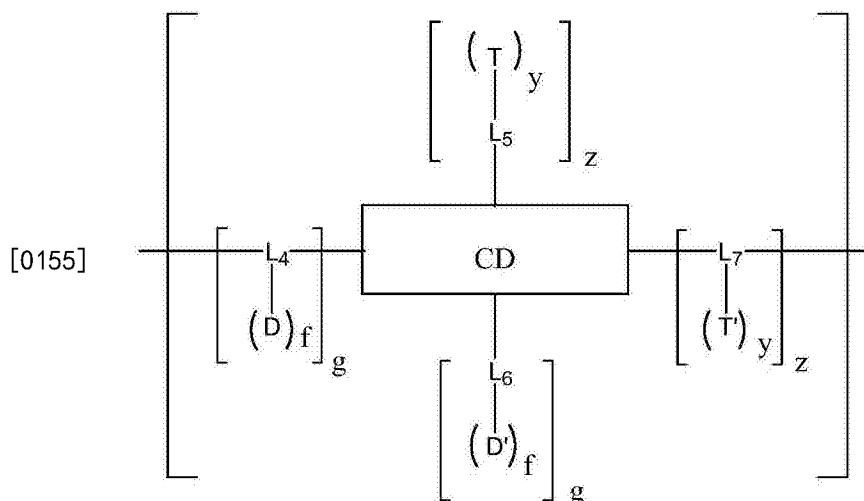
[0151] b表示1至约30,000(优选<25,000、<20,000、<15,000、<10,000、<5,000、<1,000、<500、<100、<50、<25、<10,或甚至<5)的整数;和

[0152] n和w每次出现时各自独立地表示0至约30,000(优选<25,000、<20,000、<15,000、<10,000、<5,000、<1,000、<500、<100、<50、<25、<10,或甚至<5)的整数,

[0153] 其中P包含环糊精部分或者n至少是1。

[0154] 在某些实施方案中,与接枝到聚合物链的悬挂基团上的环糊精部分相反,P在聚合物链中包含多个环糊精部分。因此,在某些实施方案中,式I的聚合物链还包含n'个单位的U,其中n'表示1至约30,000(优选<25,000、<20,000、<15,000、<10,000、<5,000、<1,000、<

500、<100、<50、<25、<10,或甚至<5)的整数;并且U如下面的通式所示:



[0156] 其中

[0157] CD表示环状部分,如环糊精部分或其衍生物;

[0158] L₄、L₅、L₆和L₇每次出现时可以各自独立地不存在或表示连接基基团;

[0159] D和D'每次出现时各自独立地表示相同或不同的治疗剂或其前体药物形式;

[0160] T和T'每次出现时各自独立地表示相同或不同的靶向配体或其前体;

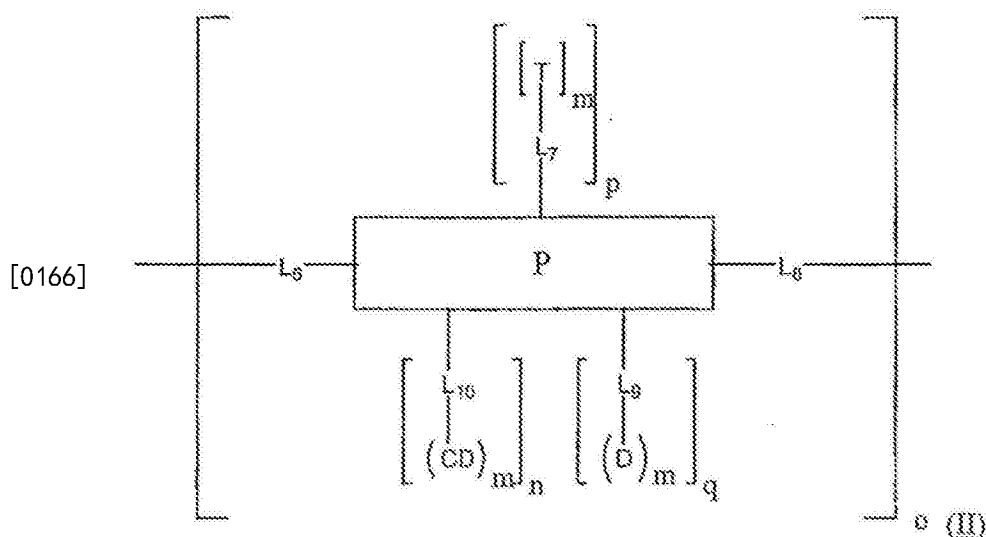
[0161] f和y每次出现时各自独立地表示1至10的整数;和

[0162] g和z每次出现时各自独立地表示0至10的整数。

[0163] 在优选的实施方案中,L₄和L₇表示连接基基团。

[0164] 在某些实施方案中,该聚合物可选自多糖类物质、其它非蛋白性可生物降解的聚合物以及其组合,其包含至少一个末端羟基,如聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇(PEG)、聚琥珀酸酐、聚癸酸、PEG-磷酸酯、聚谷氨酸酯、聚乙烯亚胺、马来酸酐二乙烯醚(DIVMA)、纤维素、支链淀粉、菊粉、聚乙烯醇(PVA)、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺(HPMA)、葡聚糖和羟乙基淀粉(HES),并且具有任选的用于接枝治疗剂、靶向配体和/或环糊精部分的侧基。在某些实施方案中,该聚合物可以是可生物降解的如聚(乳酸)、聚(乙醇酸)、聚(烷基2-氰基丙烯酸酯)、聚酐和聚原酸酯,或可生物侵蚀的聚合物如聚丙交酯-乙交酯共聚物以及其衍生物、非肽性聚氨基酸、聚亚氨基碳酸酯、聚α-氨基酸、聚烷基-氰基-丙烯酸酯、聚磷脂或酰氧基甲基聚天门冬氨酸酯和聚谷氨酸酯共聚物以及其混合物。

[0165] 本发明的另一个实施方案是通式II所示的高分子化合物:



[0167] 其中

[0168] P表示聚合物的单体单元；

[0169] T每次出现时各自独立地表示靶向配体或其前体；

[0170] L₆、L₇、L₈、L₉和L₁₀每次出现时可以各自独立地不存在或表示连接基团；

[0171] CD每次出现时各自独立地表示环糊精部分或其衍生物；

[0172] D每次出现时各自独立地表示治疗剂或其前体药物形式；

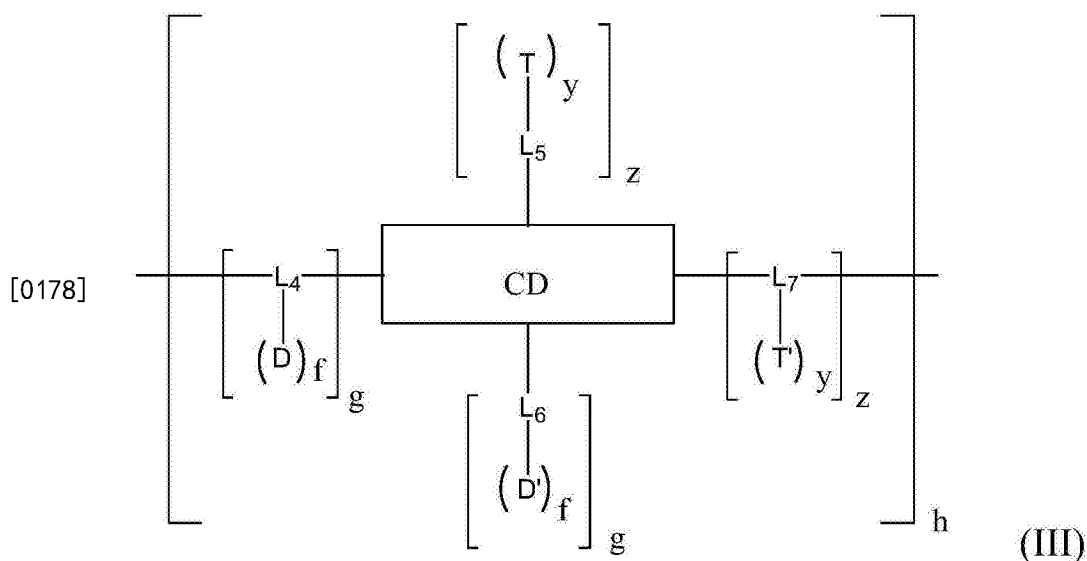
[0173] m每次出现时各自独立地表示1至10 (优选1至8, 1至5, 或甚至1至3) 的整数；

[0174] o表示1至约30,000 (优选<25,000、<20,000、<15,000、<10,000、<5,000、<1,000、<500、<100、<50、<25、<10, 或甚至<5) 的整数；和

[0175] p、n和q每次出现时各自独立地表示0至10 (优选0至8, 0至5, 0至3, 或甚至0至约2) 的整数，

[0176] 其中CD和D优选各自存在于该化合物的至少1个位置上 (优选至少5、10、25, 或甚至50或100个位置上)。

[0177] 本发明的另一个实施方案是下式所示的化合物



[0179] 其中

- [0180] CD表示环状部分,如环糊精部分,或其衍生物;
- [0181] L₄、L₅、L₆和L₇每次出现时可以各自独立地不存在或表示连接基基团;
- [0182] D和D'每次出现时各自独立地表示相同或不同的治疗剂或其前体药物;
- [0183] T和T'每次出现时各自独立地表示相同或不同的靶向配体或其前体;
- [0184] f和y每次出现时各自独立地表示1至10(优选1至8,1至5,或甚至1至3)的整数;
- [0185] g和z每次出现时各自独立地表示0至10(优选0至8,0至5,0至3,或甚至0至约2)的整数;和
- [0186] h表示1至30,000(优选<25,000、<20,000、<15,000、<10,000、<5,000、<1,000、<500、<100、<50、<25、<10,或甚至<5)的整数,
- [0187] 其中出现至少一次(并且优选出现至少5、10或甚至至少20、50或100次)的g表示大于0的整数。
- [0188] 在优选的实施方案中,L₄和L₇表示连接基基团。
- [0189] 在某些实施方案中,基础的聚合物是线性的包含环糊精的聚合物,例如,该聚合物主链包括环糊精部分。例如,该聚合物可以是通过提供至少一种被修饰为在恰好两个位置的各位置上带有一种反应性位点的环糊精衍生物并将该环糊精衍生物与恰好具有两个能与所说的反应位点在聚合反应条件下形成共价键的反应部分的连接基进行反应所制得的水溶性线性环糊精聚合物,所说的聚合反应条件可以促进反应位点与反应部位进行反应形成所说连接基和环糊精衍生物之间的共价键,从而制得一种包含交替的环糊精衍生物和连接基单位的线性聚合物。或者,该聚合物可以是一种具有线性聚合物主链的水溶性线性环糊精聚合物,该聚合物在所说的线性聚合物主链中具有多个取代或未取代的环糊精部分和连接基部分,其中除位于聚合物链终点上的环糊精部位外的各环糊精部分被连接到两个所说连接基部分上,各连接基部分共价连接两个环糊精部分。在又一个实施方案中,该聚合物是包含多个由多个连接基部分共价连接到一起的环糊精部分的水溶性线性环糊精聚合物,其中除位于聚合物链终点上的环糊精部分外,各环糊精部分被连接到两个连接基部分上从而形成一种线性环糊精聚合物。
- [0190] 连接基基团可以是亚烷基链、聚乙二醇(PEG)链、聚琥珀酸酐、聚-L-谷氨酸、聚(乙烯亚胺)、低聚糖、氨基酸链或任何其它适宜的键合。在某些实施方案中,该连接基基团本身在生理学条件下是稳定的,如亚烷基链,或者其可以在生理学条件下裂解,如被酶裂解(例如,该键合包含是肽酶底物的肽序列),或者被水解(例如,该键合包含可水解的基团,如酯或硫代酸酯)。当从所说的部分裂解下来时,该连接基基团可能是生物学上无活性的,如PEG、聚乙醇酸或聚乳酸链,或者可能是有生物活性的,如可以结合受体、使酶灭活等等的寡肽或多肽。各种生物可相容和/或生物可侵蚀的低聚的连接基基团在本领域是已知的,并且该键的选择可能会影响该材料的最终性质,如当被植入时其是否持久、在植入后其是否会逐渐变形或萎缩,或其是否会逐渐被机体降解和吸收。可以用任何适宜的键或官能团(包括碳碳键、酯、醚、酰胺、胺、碳酸酯、氨基甲酸酯、磺酰胺等等)将该连接基基团连接到该部分上。
- [0191] 在某些实施方案中,本发明的连接基基团表示其中一个或多个亚甲基任选地被基团Y取代(条件是Y基团互不相邻)的亚烃基,其中各Y每次出现时各自独立地选自取代或未取代的芳基、杂芳基、环烷基、杂环烷基或-O-、C(=X)(其中X是NR₁、O或S)、-OC(O)-、-C(=

O) O、-NR₁-、-NR₁CO-、-C(O)NR₁-、-S(O)_n- (其中n是0、1或2)、-OC(O)-NR₁-、-NR₁-C(O)-NR₁-、-NR₁-C(NR₁)-NR₁-和-B(OR₁)-; R₁每次出现时各自独立地表示H或低级烷基。

[0192] 在某些实施方案中,该连接基基团表示被衍生化或未被衍生化的氨基酸。在某些实施方案中,具有一个或多个末端羧基的连接基基团可以轭合到该聚合物上。在某些实施方案中,可以通过将其与治疗剂、靶向部分或环糊精部分通过(硫)酯或酰胺键共价连接而将这些末端羧基中的一个或多个封端。还是在另外的实施方案中,可以向该聚合物中混入具有一个或多个末端羟基、巯基或氨基的连接基基团。在优选的实施方案中,可以通过将其经由(硫)酯、酰胺、碳酸酯、氨基甲酸酯、硫代碳酸酯或硫代氨基甲酸酯键共价连接到治疗剂、靶部分或环糊精部分上而将这些末端羟基中的一个或多个封端。在某些实施方案中,这些(硫)酯、酰胺、(硫代)碳酸酯或(硫代)氨基甲酸酯键可以是可生物水解的,即,可在生理学条件下被水解。

[0193] 在某些实施方案中,上述的聚合物具有小于约3,或甚至小于约2的多分散性。

[0194] 在某些实施方案中,该治疗剂是小分子、肽、蛋白或具有治疗功效的聚合物。在某些实施方案中,所说的治疗剂是抗癌药(如喜树碱或相关衍生物)、抗真菌剂、抗细菌剂、抗霉菌剂或抗病毒治疗剂。在某些实施方案中,该物质是受体激动剂。在某些实施方案中,该物质是受体拮抗剂。在某些实施方案中,该治疗剂是蛋白酶抑制剂。

[0195] 此外,本发明的聚合物可包含一种治疗剂,或者可以包含一种以上的治疗剂。例如,可以通过任意的连接基将两种或多种不同的癌症药物、或癌症药物和免疫抑制剂、或抗生素和抗炎剂接枝到该聚合物上。对于不同的药物而言,通过选择不同的连接基可以减缓各药物的释放以获得最大的剂量和功效。

[0196] 本发明的一个实施方案通过将所说的治疗剂与包含环糊精的聚合物共价轭合而改善了某些疏水性小分子治疗剂的传递。该类轭合改善了水溶性,并因此改善了治疗剂的生物利用度。因此,在本发明的一个实施方案中,该治疗剂是log P>0.4、>0.6、>0.8、>1、>2、>3、>4,或甚至>5的疏水性化合物。在其它实施方案中,在将所说的轭合物连接到所说的聚合物上之前,可以将疏水性治疗剂如喜树碱与另一种化合物如氨基酸轭合。在流程V中说明了氨基酸衍生化的喜树碱分子的实例。

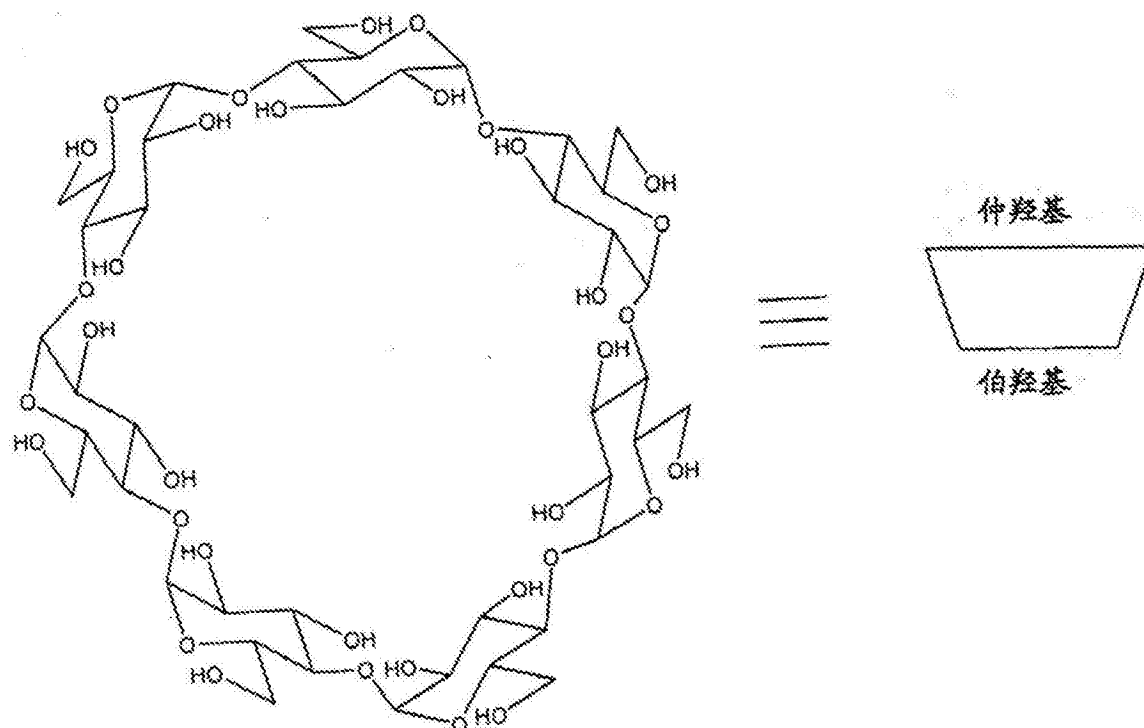
[0197] 本发明的聚合物轭合物具有10,000至500,000;30,000至200,000;或甚至70,000至150,000amu的分子量。

[0198] 在某些实施方案中,所说的环糊精部分占该环糊精修饰的聚合物的至少约2%、5%或10%重量,高至20%、30%、50%或甚至80%重量。在某些实施方案中,所说的治疗剂或靶向配体占该环糊精修饰的聚合物重量的至少约1%、5%、10%或15%、20%、25%、30%或甚至35%。数均分子量(Mn)也可以在很宽的范围内变化,但是通常为约1,000至约500,000道尔顿,优选约5000至约200,000道尔顿并且更优选约10,000至约100,000。Mn最优选地在约12,000至65,000道尔顿之间变化。在某些其它实施方案中,Mn在约3000至150,000道尔顿之间变化。在给定的主题聚合物样品中,可能存在很宽范围的分子量。例如,所说样品中的分子可能具有相差因子为2、5、10、20、50、100或更高的分子量,或者具有相差因子为2、5、10、20、50、100或更高的平均分子量的分子量。环糊精部分的实例包括基本由7至9个糖部分组成的环状结构,如环糊精和氧化的环糊精。环糊精部分任选地包含一种在所说的环状结构和聚合物主链之间形成一种共价键的连接基部分,其在链如烷基链中优选具有1至20个

原子,包括二元羧酸衍生物(如戊二酸衍生物、琥珀酸衍生物等等),和杂烷基链,如低聚乙二醇链。

[0199] 环糊精是一种含有以 α -(1,4)键连接的天然D-(+)-吡喃葡萄糖单元的环状多糖。最常见的环糊精是分别包含6、7或8个吡喃葡萄糖单元的 α -环糊精、 β -环糊精和 γ -环糊精。环糊精的环状性质在结构上形成了一种具有内部的非极性或疏水性腔的环形曲面或环形室样形状,仲羟基位于所说环糊精环形曲面的一侧并且伯羟基位于另一侧。因此,用(β)-环糊精作为实例,环糊精常常如下所示。

[0200]



[0201] 包含仲羟基的一侧比包含伯羟基的一侧的直径更宽。本发明考虑在该伯和/或仲羟基上与环糊精部分共价键合。环糊精内部空穴的疏水性使得可以形成各种化合物、如金刚烷的主体-客体包含复合体。(Comprehensive Supramolecular Chemistry,第3卷,J.L.Atwood等人编,Pergamon Press(1996);T.Cserhati,Analytical Biochemistry,225:328-332(1995);Husain等人,Applied Spectroscopy,46:652-658(1992);FR 2665169)。在Suh,J.和Noh,Y.,Bioorg.Med.Chem.Lett.1998,8,1327-1330中描述了对聚合物进行修饰的另外的方法。

[0202] 在某些实施方案中,本发明考虑包含环糊精的线性水溶性聚合物,其中多种生物活性部分通过可以在生物学条件下裂解从而释放所说生物活性部分的连接共价连接到所说的聚合物上,其中将该聚合物给药于患者使得可以在至少2、3、5、6、8、10、15、20、24、36、48或甚至72小时的时间内释放所说的生物活性剂。

[0203] 在某些实施方案中,本发明考虑通过在治疗剂和/或靶向配体与聚合物之间引入各种连接基团来减缓所说治疗剂的释放速率。因此,在某些实施方案中,本发明的聚合治疗剂是用于控制治疗剂的传递的组合物。本领域技术人员还将意识到通过用放射性核素所说的治疗剂和/或靶向配体进行标记,或者通过形成NMR活性核,例如,钆、钆或镧复合体,本发

明的聚合物可以获得双重的诊断/治疗功用。

[0204] 在其它实施方案中,该高分子化合物稳定了在活性和无活性形式之间存在平衡的治疗剂的生物活性形式。例如,将治疗剂与本发明的聚合物轭合可以将所说物质两种互变异构形式间的平衡移向生物活性的互变异构体。在其它实施方案中,该高分子化合物可能会减弱治疗剂内酯形式和酸性形式之间的平衡。

[0205] 一种测定分子量的方法是凝胶渗透色谱法(“GPC”),例如,混合充填柱、CH₂Cl₂溶剂、光散射检测器和离线dn/dc。其它方法也是本领域已知的。

[0206] 在其它实施方案中,本发明的聚合物轭合物可以是一种柔顺的或可流动的物质。当所用聚合物本身可流动时,本发明的聚合物组合物即使在粘稠状态时也不需要包含可生物降解的溶剂以使其可流动,尽管仍然可能存在痕量或残余数量可生物降解的溶剂。

[0207] 虽然可将可生物降解的聚合物或生物学活性剂溶解于少量无毒溶剂中以更有效地产生生物学活性剂在柔顺或可流动组合物中的无定形单片分布状态或细分散体,但在优选的实施方案中,本发明的优点是不需要用溶剂来形成可流动的组合物。此外,优选避免使用溶剂,这是因为一旦将包含溶剂的聚合物组合物完全或部分放到体内时,该溶剂就会从聚合物中分散或扩散出来并且必需由机体对其进行处理和消除,在当疾病(和/或对疾病进行的其它治疗)可能已经对机体清除能力产生有害影响时,这又额外增加了机体清除能力的负担。

[0208] 但是,当用溶剂来促进混合或维持本发明聚合物轭合物的流动性时,所说的溶剂应当是无毒的,或者应当是可生物降解的,并且应当以相对小的量使用。在任何既使仅被部分放置到活体内的材料中都不应当使用有毒的溶剂。所述溶剂还必需在给药部位不能造成明显的组织刺激或坏死。

[0209] 当使用时,适宜的可生物降解的溶剂的实例包括N-甲基-2-吡咯烷酮、2-吡咯烷酮、乙醇、丙二醇、丙酮、乙酸甲酯、乙酸乙酯、甲乙酮、二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、四氢呋喃、己内酰胺、油酸或1-十二烷基氮杂环庚酮。鉴于其溶剂化能力以及其生物相容性,优选的溶剂包括N-甲基吡咯烷酮、2-吡咯烷酮、二甲基亚砷和丙酮。

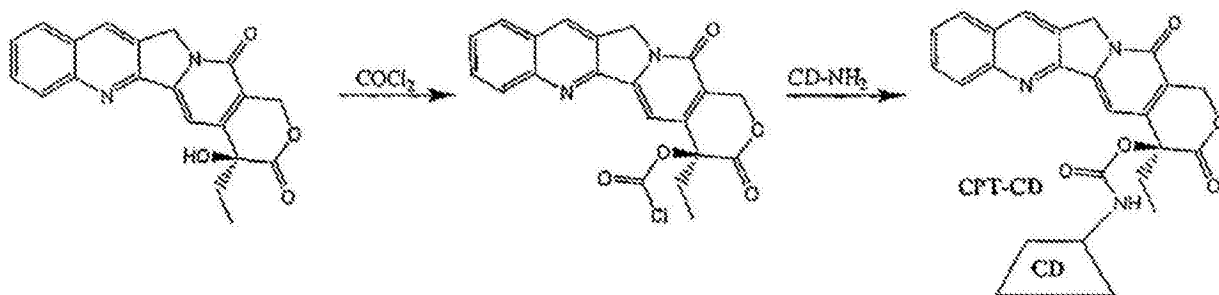
[0210] 在某些实施方案中,该主题聚合物轭合物可溶解于一种或多种常用的有机溶剂中以易于进行制造和加工。常用的有机溶剂包括诸如氯仿、二氯甲烷、二氯乙烷、2-丁酮、乙酸丁酯、丁酸乙酯、丙酮、乙酸乙酯、二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、二甲基甲酰胺和二甲基亚砷。

[0211] 本发明一方面考虑将一种疏水性治疗剂如(S)-20-喜树碱连接到直链或支链的包含环糊精的聚合物上以更好地进行药物的传递。已发现(S)-20-喜树碱(CPT)(一种在20世纪50年代后期从*Camptitheca accuminata*分离出来的生物碱)通过在细胞周期的S-相中抑制拓扑异构酶I的作用而表现出抗癌活性。但是,其在人癌症治疗中的应用由于一些因素,尤其是其与人血清白蛋白之间不希望发生的相互作用、生物活性内酯形式的不稳定性和水溶性差而受到了限制。为了克服这一问题,已经研制了许多CPT类似物来改善内酯稳定性和水溶性。托泊替康和伊立替康是已经被FDA批准用于人类癌症治疗的CPT类似物。本发明公开了各种类型的其中(S)-20-喜树碱被共价连接到所说聚合物上的线性、支链或接枝的包含环糊精的聚合物。在某些实施方案中,该药物通过选自酯、酰胺、氨基甲酸酯或碳酸酯的可生物水解的键被共价连接。

[0212] 用于将衍生化CD共价结合到20(S)-喜树碱上的合成流程的实例如流程I所示。

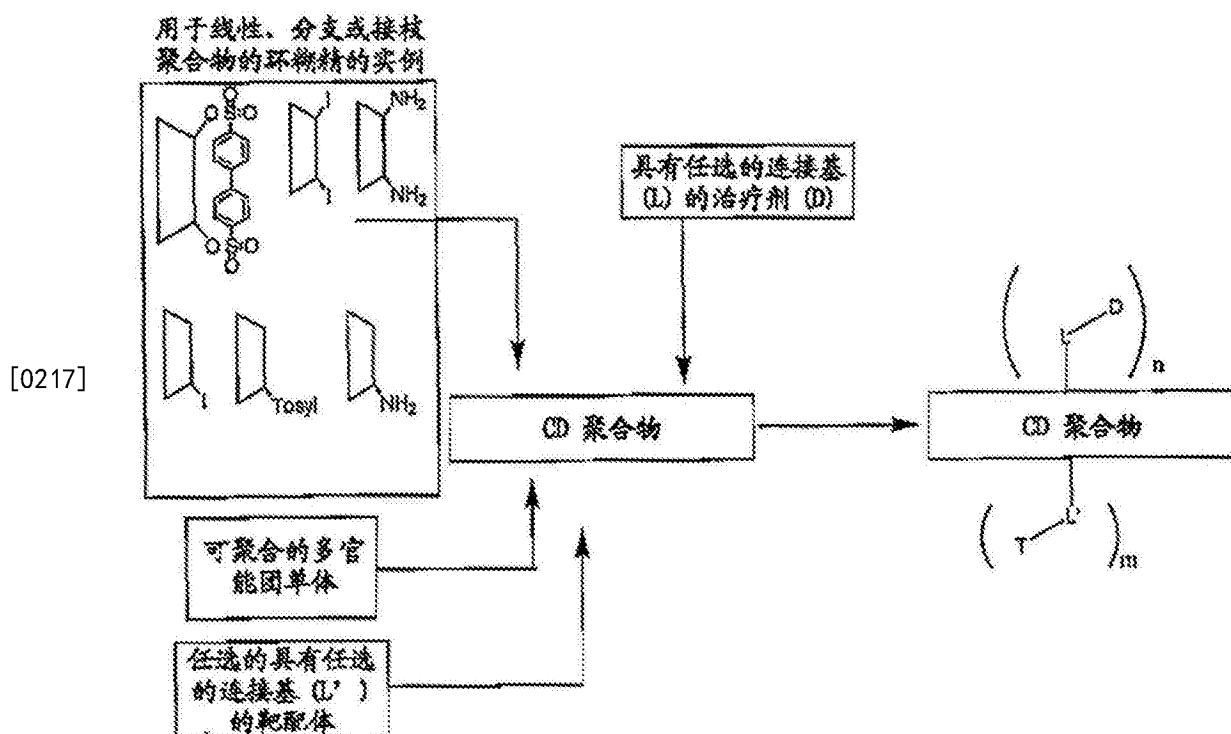
[0213] 流程I

[0214]



[0215] 不想对本发明的范围进行任何限制,合成用于负载治疗剂如喜树碱和任选的靶向配体的线性、支链或接枝的包含环糊精的聚合物(CD聚合物)的一般策略如流程II所示。

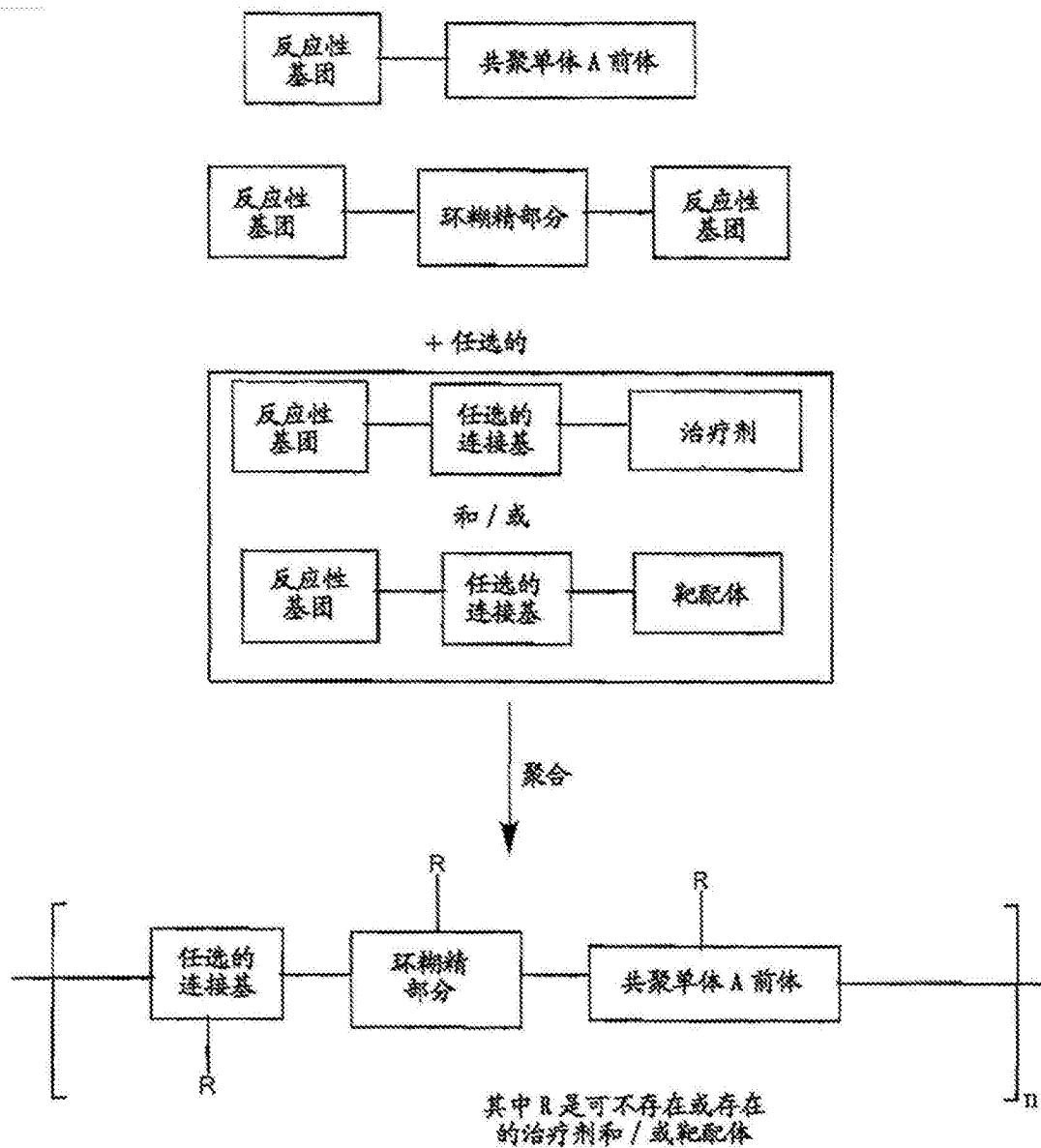
[0216] 流程II



[0218] 为了进一步进行说明(不想对本发明的范围进行任何限制),共聚单体A前体、环糊精部分、治疗剂和/或靶向配体可以如流程IIa-IIb所示被装配到一起。注意,在流程IIa-b中,在任何给定的反应中可以有一种以上相同类型或不同类型的共聚单体A前体、环糊精部分、治疗剂或靶向配体。此外,在聚合反应前,可以在一步或多步独立步骤中将一种或多种共聚单体A前体、环糊精部分、治疗剂或靶向配体彼此共价连接。

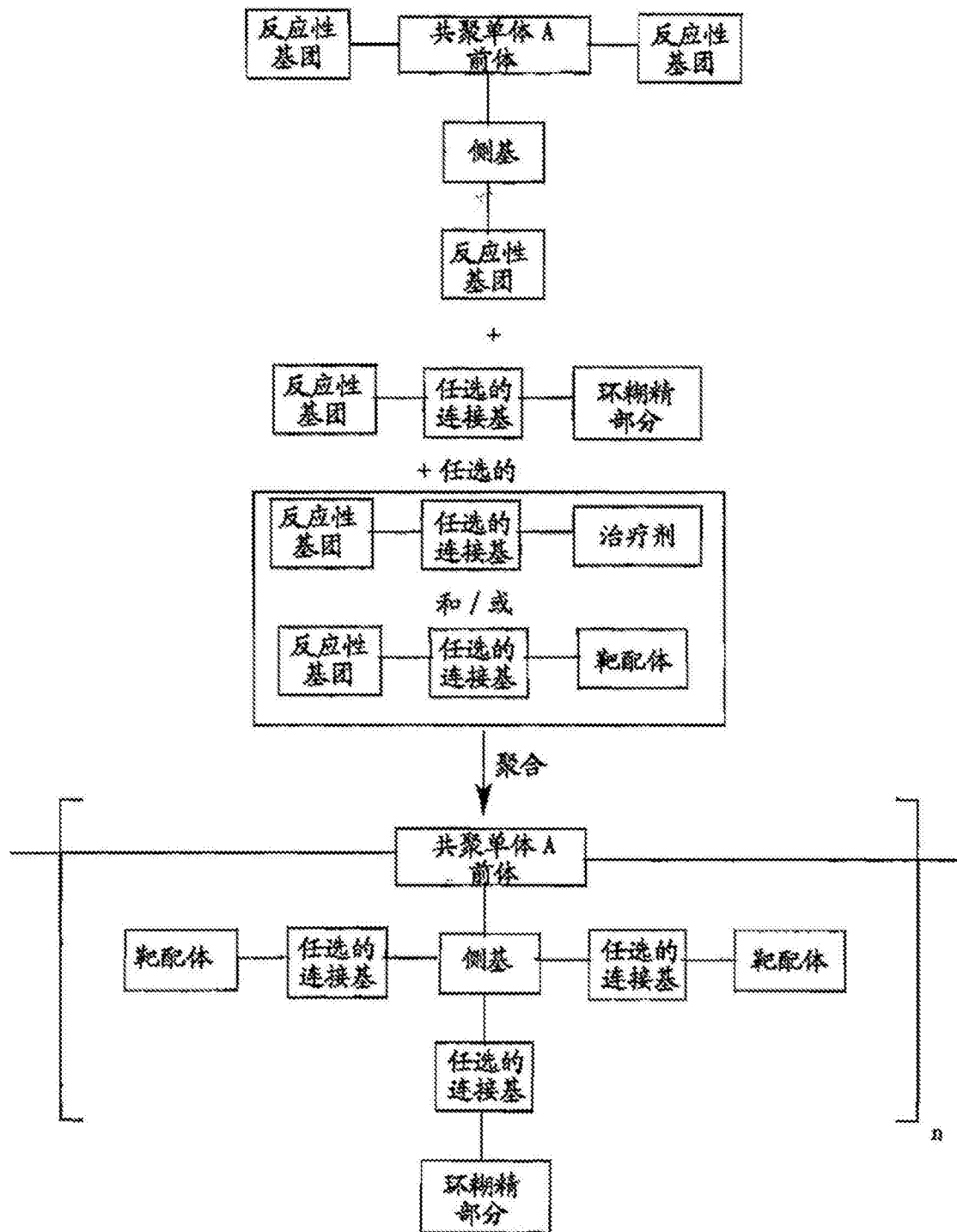
[0219] 流程IIa: 用于接枝聚合物的基本方案。所说的共聚单体A前体、环糊精部分、治疗剂和靶向配体的定义如上所述。此外,为了完成聚合反应,本领域技术人员可以从各种反应性基团,例如羧基、羟基、卤化物、胺和活化乙烯、乙炔或芳族基团中进行选择。在“高等有机化学:反应,机理和结构”,第5版,2000中公开了反应性基团的另外的实例。

[0220]



[0221] 流程IIb:制备线性的包含环糊精的聚合物的基本方案。本领域技术人员将意识到通过对具有多个反应性基团的共聚单体A前体进行选择可以得到聚合物分支。

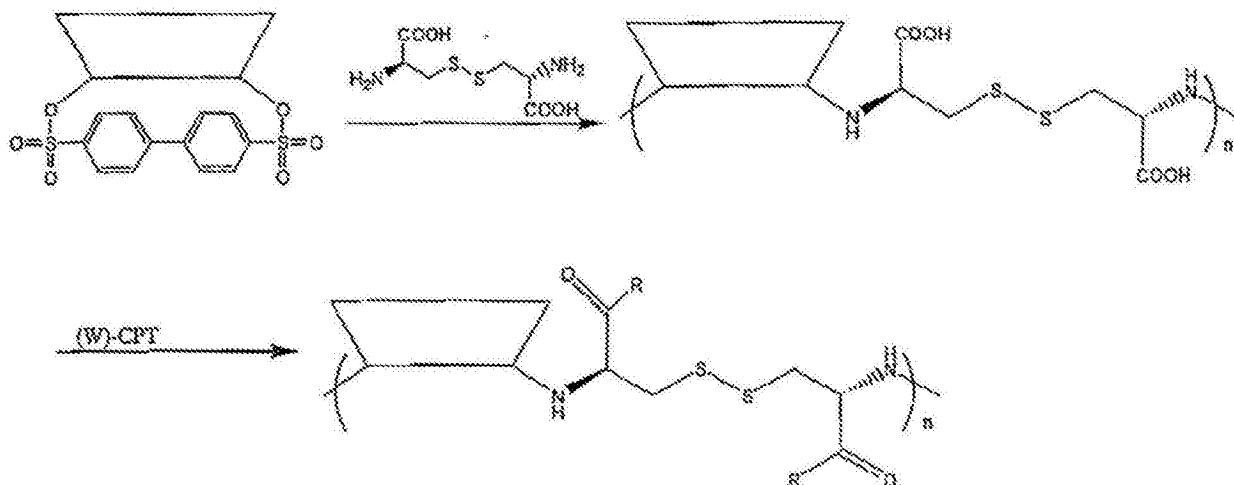
[0222]



[0223] 用于合成线性环糊精-CPT聚合物的不同方法的实例如流程III-VIII所示。

[0224] 流程III

[0225]



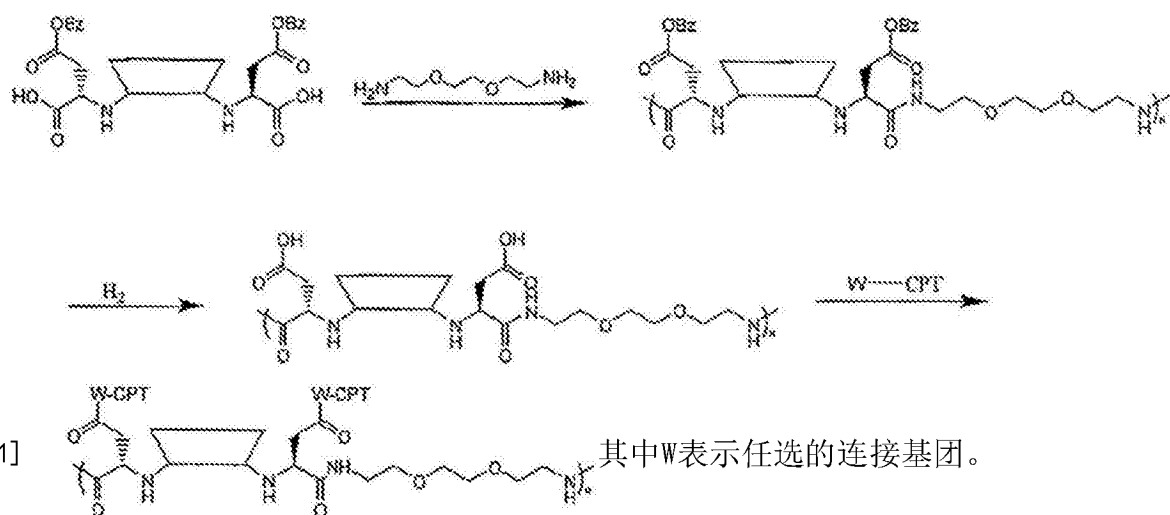
[0226] 其中

[0227] W表示任意的连接基团；

[0228] R表示W-CPT或H。

[0229] 流程IV

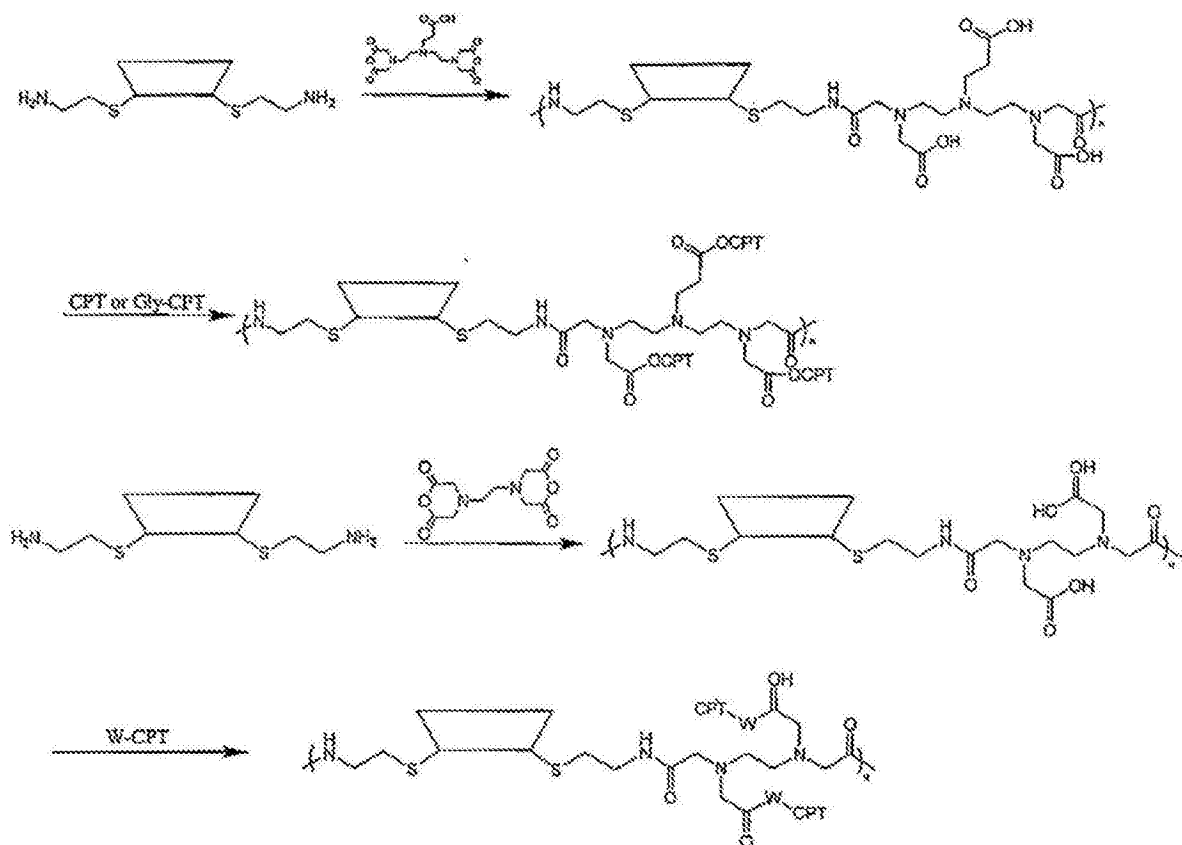
[0230]



[0231] 其中W表示任意的连接基团。

[0232] 流程V

[0233]

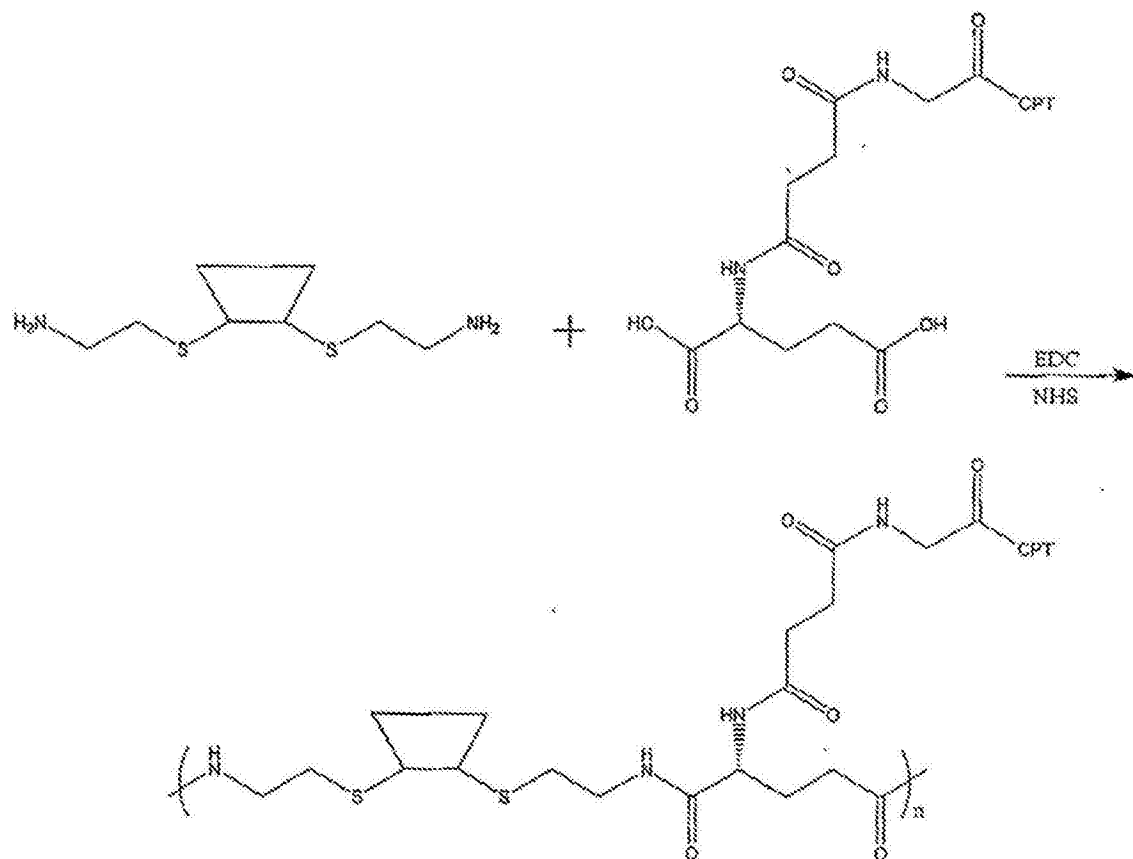


[0234] 其中

[0235] W表示任意的连接基团,例如甘氨酸基残基

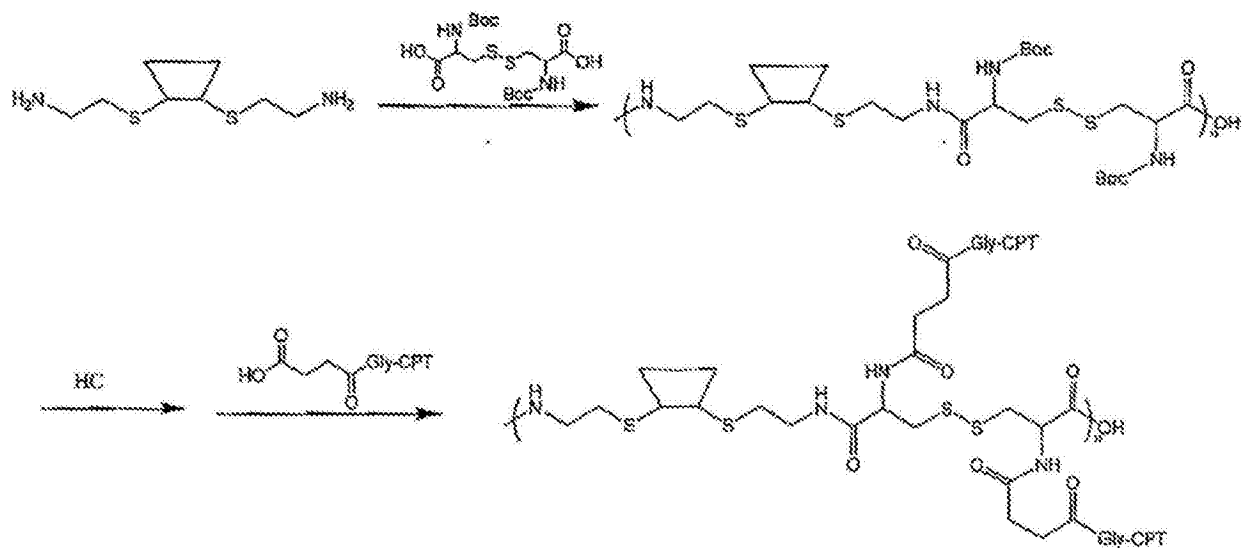
[0236] 流程VI

[0237]



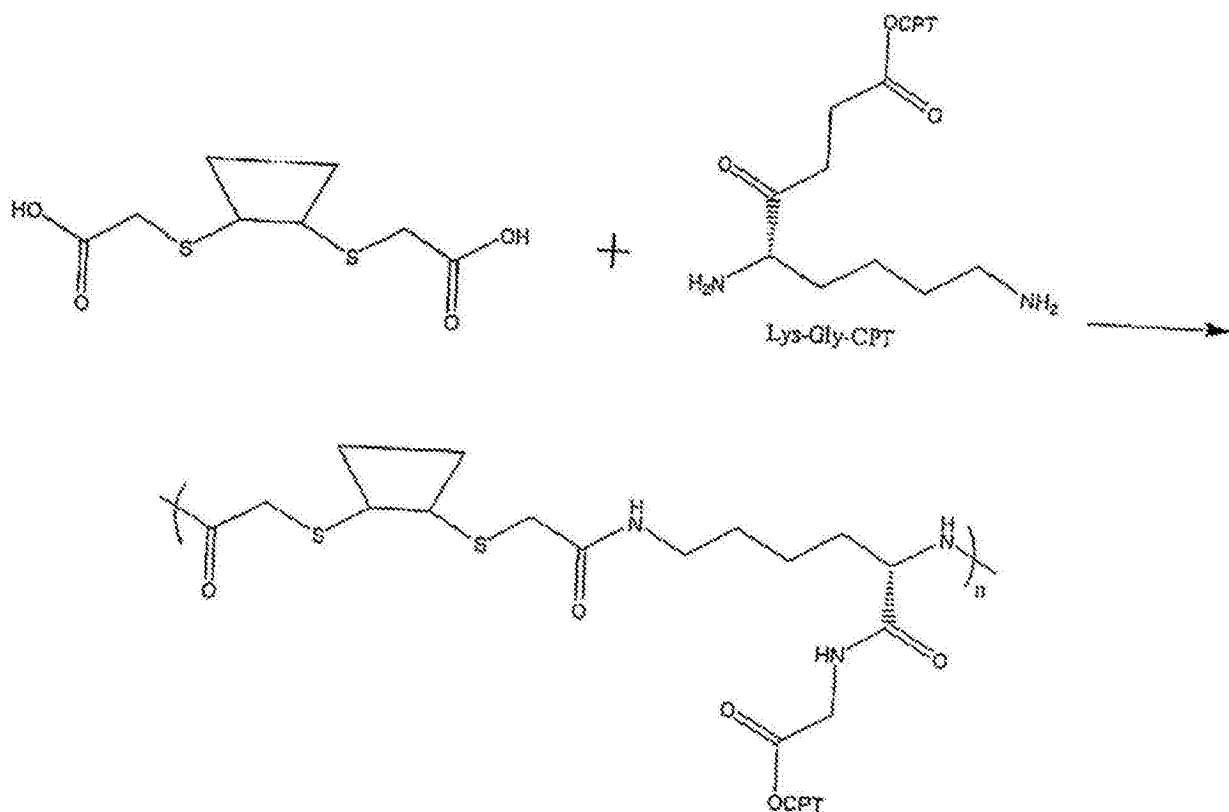
[0238] 流程VII

[0239]



[0240] 流程VIII

[0241]

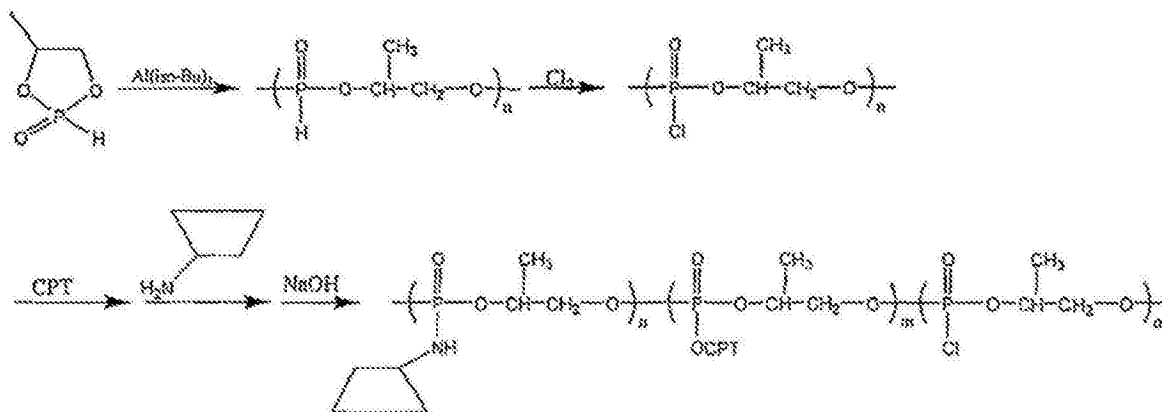


[0242] 将环糊精接枝到包含CPT的聚合物亚基侧链上的实例如流程IX-XII所示。各亚基可以重复任意次,并且一种亚基可以以与另一种亚基的出现频率基本相同的频率、更高或更低的频率出现,从而使得两种亚基可以以大约相同的量或不同的量存在,其可以略有差异或相差很大,例如一种亚基以几乎排除另一种亚基的量存在。

[0243] 在某些情况中,该聚合物是无规共聚物,其中不同的亚基和/或其它单体单元随机分布在整個聚合物链中。因此,在出现式 $X_m-Y_n-Z_o$ 的情况中(其中X、Y和Z是聚合物亚基),这些亚基可以随机散布在该聚合物主链中。术语“随机”部分地指的是其中在具有一种以上单体类型的聚合物中,单体单元的分布或引入不被合成方案指挥或直接控制,而是由该聚合物系统的固有性质,如亚基的反应性、数量以及该合成反应的其它特性或其它制造、加工或处理方法所引起的。

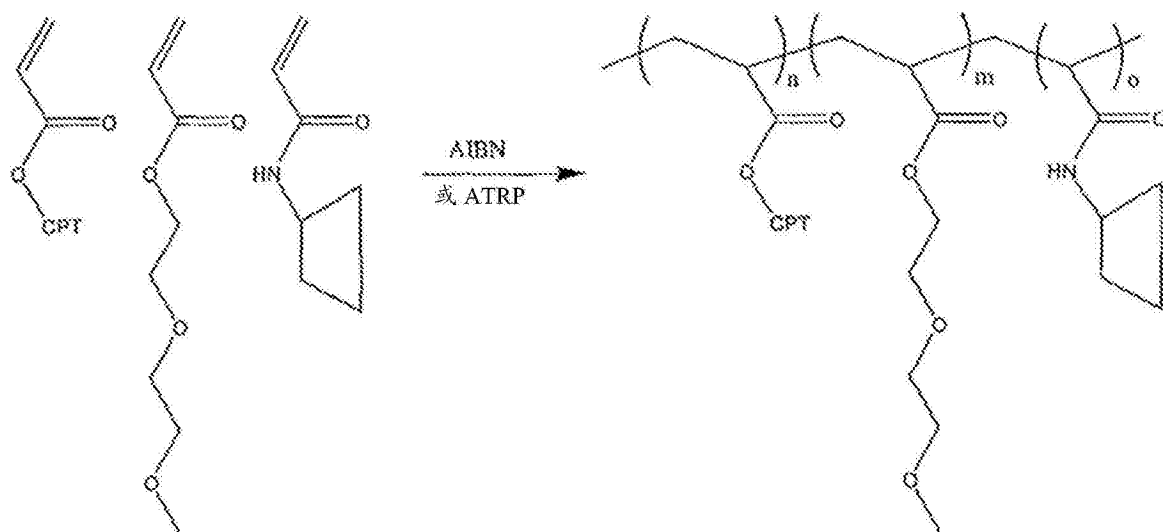
[0244] 流程IX

[0245]



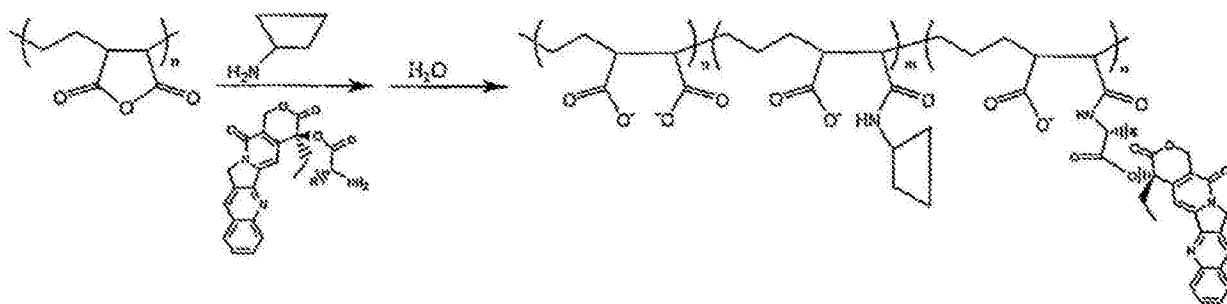
[0246] 流程X

[0247]



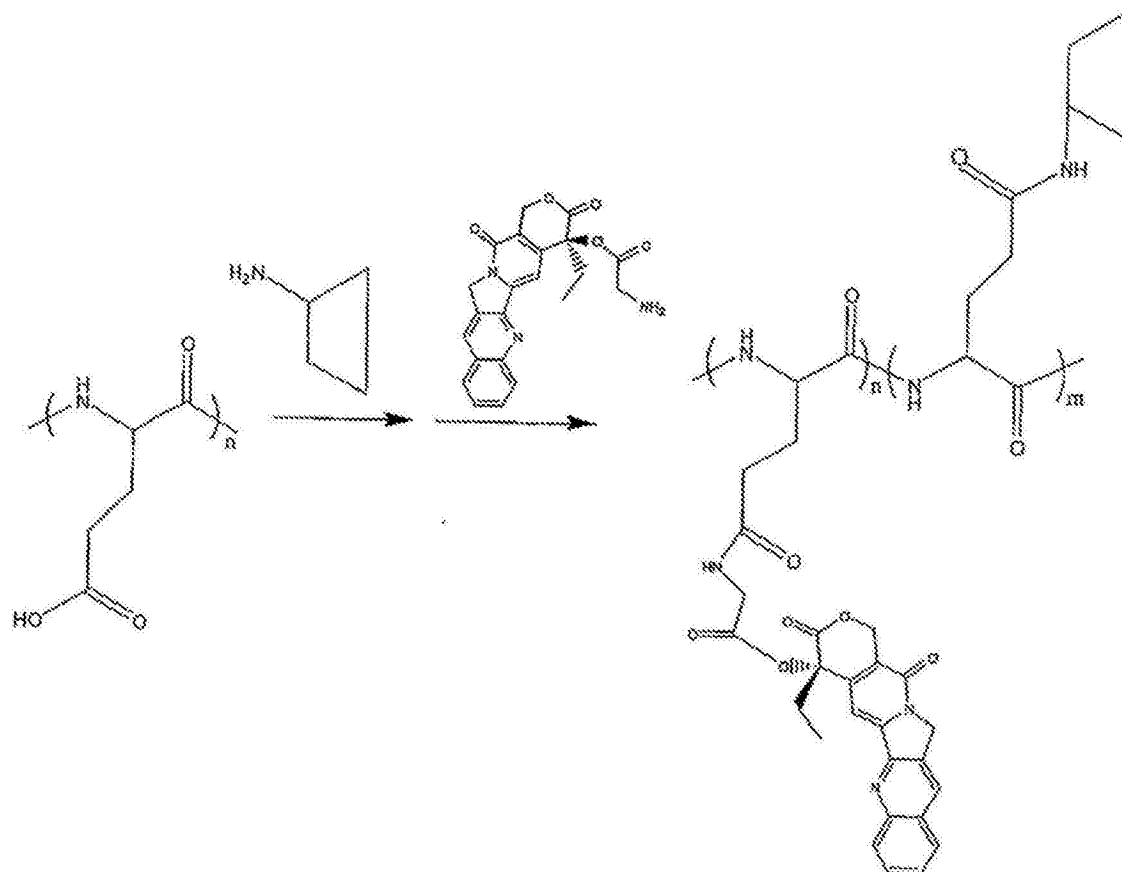
[0248] 流程XI

[0249]



[0250] 流程XII

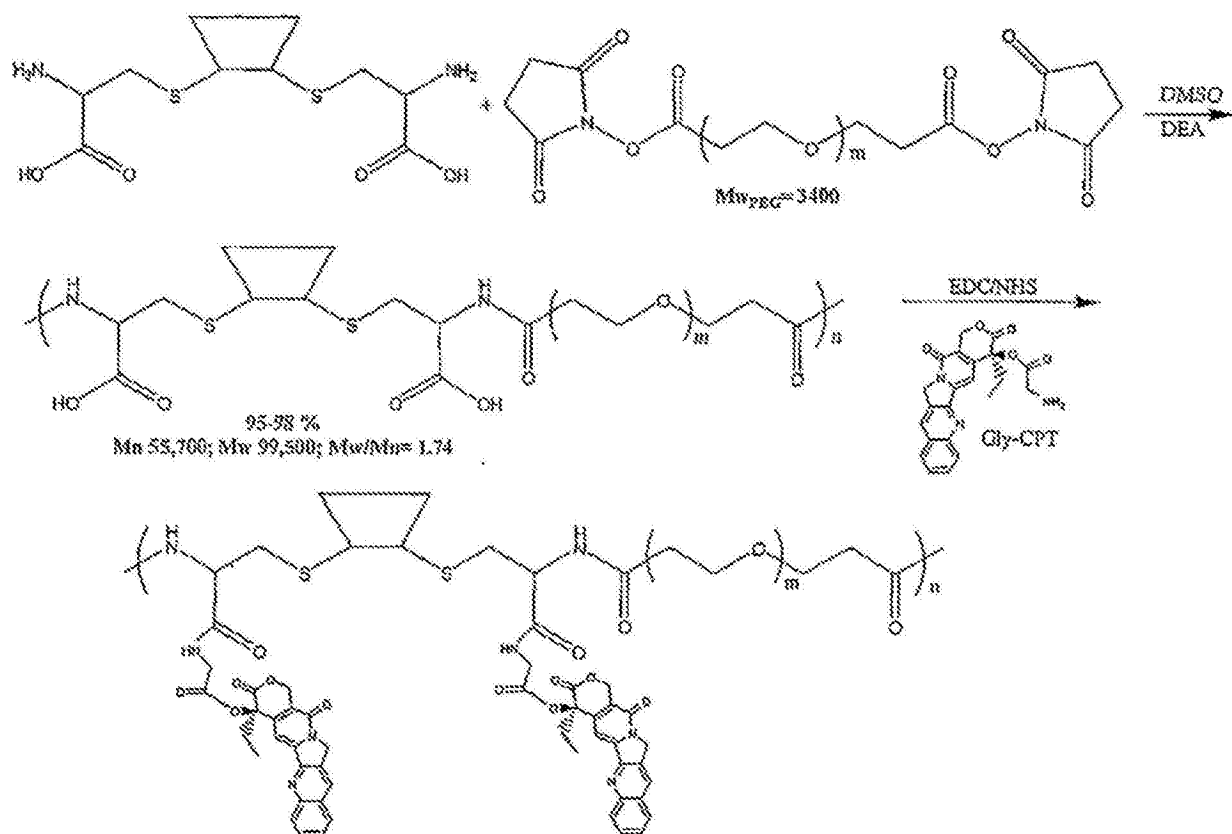
[0251]



[0252] 本发明还考虑如流程XIII-XIV所示的用CD-二半胱氨酸单体和二-NHS酯如PEG-DiSPA或PEG-BTC合成的CD-聚合物。

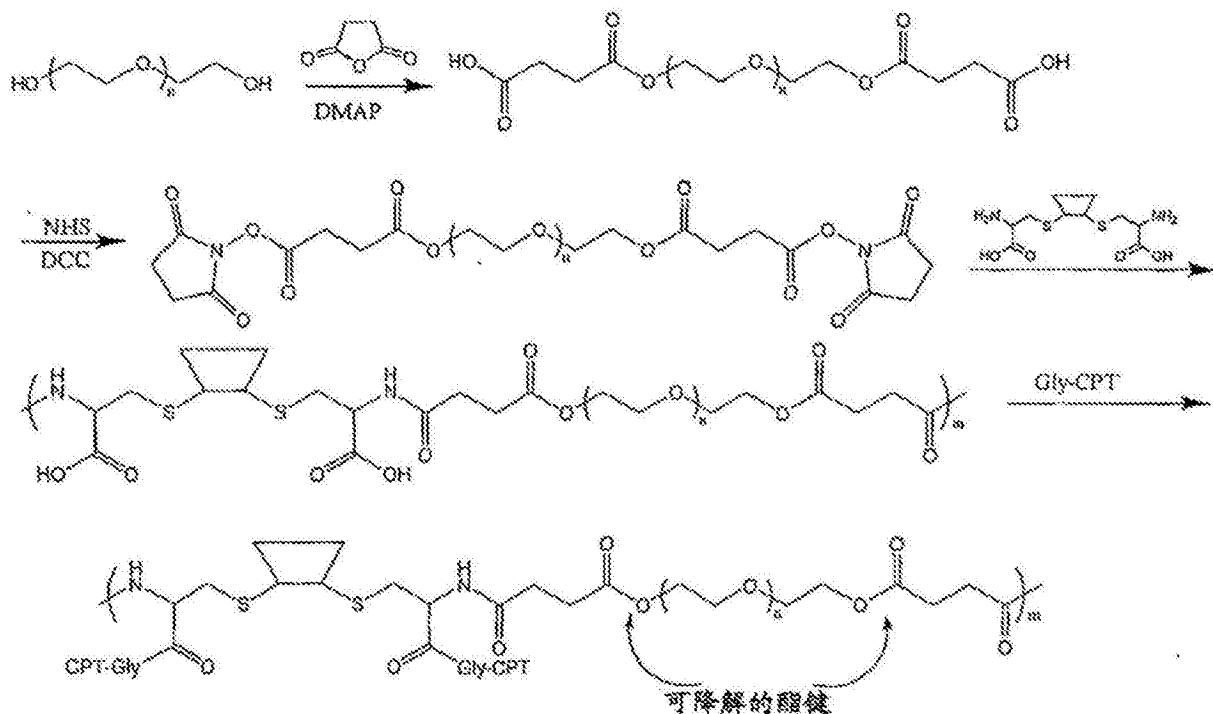
[0253] 流程XIII

[0254]



[0255] 流程XIV

[0256]



[0257] 在某些实施方案中,如图1所示,本发明公开了多种增加药物负载量的策略。

[0258] (b) 靶向配体

[0259] 如上所述,本发明一方面考虑将治疗剂连接到本文所述的聚合物轭合物上。

[0260] 在某些实施方案中,聚合物轭合物还包含一种靶向配体。因此,在某些实施方案中,将受体、细胞和/或组织-靶向配体或其前体连接到聚合物轭合物上。这里所用的术语“靶向配体”指的是可以促进本发明组合物在体内或体外靶向于受体、细胞和/或组织的任何材料或物质。该靶向配体可以是合成、半合成或天然的。可以作为靶向配体的材料或物质包括,例如,蛋白,包括抗体、抗体片断、激素、激素类似物、糖蛋白和凝集素、肽、多肽、氨基酸、糖(sugars)、糖类(saccharides)(包括单糖和多糖)、碳水化合物、小分子、维生素、甾族化合物、甾族化合物类似物、激素、辅因子、生物活性剂和遗传物质(包括核苷、核苷酸、核苷酸构建体和多核苷酸)。涉及靶向配体时,这里所用的术语“前体”指的是可以转化成靶向配体的任何材料或物质。该类转化可包括,例如,将前体固定在靶向配体上。靶向前体部分的实例包括马来酰亚胺基、二硫化物基,如邻-吡啶基二硫化物、乙烯基砷基、叠氮基和 α -碘乙酰基。可以用各种方法来完成所说靶向配体或其前体与聚合物的连接,所说方法非限制性地包括共价连接,或形成主体-客体复合体。在某些实施方案中,在所说配体或其前体和聚合物之间可以存在任意的连接基基团,其中所说的连接基基团通过螯合作用、共价连接或形成主体客体复合体被连接到所说的共聚物上。例如,连接基基团的一个末端可以被连接到靶向配体上,而另一端可以被连接到金刚烷基团或与环糊精部分形成主体客体复合体的其它该类疏水性部分上。因此,所说的靶向配体可以被连接到接枝的环糊精部分上、被连接到聚合物链内的环糊精部分上或该聚合物链本身上。每个聚合物链的靶向配体数可以根据多种因素变化,所说因素非限制性地包括治疗剂的特性、疾病的性质、聚合物链的类型。可能的连接基基团的结构与本申请中其它地方所定义的连接基基团相同。

[0261] (c) 药物组合物、制剂和剂量

[0262] 本发明的生物相容性聚合物组合物包含生物相容性和任意的可生物降解的聚合物,例如具有上述结构式之一所示的重复单体单元的聚合物,任意地包含上述或本领域已知的任何其它生物相容性和任意的可生物降解的聚合物。在某些实施方案中,该组合物是不致热的,例如不会触发患者体温升高到高于临床上可接受的值。

[0263] 该主题组合物可包含“药(drug)”、“治疗剂”或“药物(medicament)”或“生物活性剂”,其是可在人或动物体起局部或全身作用的生物学、生理学或药理学活性物质。例如,主题组合物可包含上面所讨论的任何其它化合物。

[0264] 可以使用能从聚合物基质释放到毗邻组织或液体中的各种形式的药物或生物学活性物质。其可以是疏水性分子、中性分子、极性分子或能形成氢键的分子复合体。其可以是醚、酯、酰胺等形式,包括当注射到人或动物体时可以被生物学活化,例如通过酯或酰胺的裂解被活化的前体药物。主题组合物中的治疗剂可以随着所说组合物目的的不同而进行广泛变化。

[0265] 可以向本发明的聚合物中混入本领域公知的增塑剂和稳定剂。在某些实施方案中,为了其生物相容性而对添加剂如增塑剂和稳定剂进行选择。在某些实施方案中,所说的添加剂是肺表面活性物质,如1,2-二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)和L- α -磷脂酰胆碱(PC)。

[0266] 本发明的组合物还可包含一种或多种辅助物质,如填充剂、增稠剂等。在其它实施方案中,聚合物基质可具有作为助剂的材料。该类另外的材料可能影响所得聚合物基质的特性。

[0267] 例如,该聚合物基质可具有填充剂,如牛血清白蛋白(BSA)或鼠血清白蛋白(MSA)。

在某些实施方案中,填充剂的量可以为聚合物基质的约0.1至约50%重量或更高,或约2.5%、5%、10%、25%或40%。混入该类填充剂可能会影响聚合物材料的生物降解和/或任何被包封物质的缓释速率。在本发明的某些实施方案中可以使用本领域技术人员公知的其它填充剂,如碳水化合物、糖(sugars)、淀粉、糖类物质(saccharides)、纤维素和多糖(包括甘露糖和蔗糖)。

[0268] 在其它实施方案中,滚圆增强剂有助于通常为球形的主题聚合物基质的制备。一些物质如玉米蛋白、微晶纤维素或与羧甲基纤维素钠共同处理的微晶纤维素可赋予所说的主题组合物可塑性以及植入强度和完整性。在特定的实施方案中,在滚圆期间,是刚性而不是塑性的挤出物会导致形成哑铃型植入物和/或高比例的细粉,并为塑性而不是刚性的挤出物则倾向于聚结并形成很大的植入物。在该类实施方案中,需要在刚性和塑性之间寻求一种平衡。制剂中滚圆增强剂的百分比一般为10至90% (w/w)。

[0269] 在某些实施方案中,主题组合物包含赋形剂。可以根据其熔点、在所选溶剂(例如可溶解聚合物和/或治疗剂的溶剂)中的溶解度以及所得微粒的特性来选择特定的赋形剂。

[0270] 赋形剂在主题组合物中可以占一定的百分比,约5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%或更高。

[0271] 可以向主题组合物中混入缓冲剂,酸性物质和碱性物质以调节其pH。还可以包含用来增加由聚合物基质释放的物质的扩散距离的物质。

[0272] 崩解剂是在存在液体时可以促进主题组合物崩解的物质。崩解剂在植入物中最常用,其中崩解剂的功能是抵销或中和主题制剂中所用的任何粘合材料的作用。崩解机理通常涉及不溶性材料的吸水和膨胀。

[0273] 崩解剂的实例包括交联羧甲基纤维素钠和交联聚维酮,在某些实施方案中,其可以以总基质重量约1-20%的量被混入到聚合物基质中。在其它情况中,还可以加入可溶性填充剂如糖(甘露醇和乳糖)来促进植入物的崩解。

[0274] 对于特定的处理方案而言,可以使用其它材料来促进或控制所需治疗剂的释放速率。例如,如果对于特定的应用而言缓释太慢,则可以加入成孔剂来在基质中产生另外的孔。可以用任何生物相容性水溶性材料作为成孔剂。在聚合物系统产生一些孔和微孔管道时,其能从所形成的聚合物系统中溶解、扩散或分散出来。组合物中成孔剂的量(以及如果适宜的话该类成孔剂分散微粒的大小)将影响聚合物系统中孔的大小和数目。

[0275] 成孔剂包括在水和体液中基本可混溶并且可以从正在形成和已经形成的基质中散逸到水性介质或体液中的任何可药用的有机或无机物质或可迅速降解成水溶性物质的水不混溶性物质。

[0276] 适宜的成孔剂包括,例如,糖如蔗糖和葡萄糖,盐如氯化钠和碳酸钠,以及聚合物如羟基丙基纤维素、羧甲基纤维素、聚乙二醇和PVP。通过改变混入到聚合物系统中的成孔剂的分子量和百分比,孔的大小和程度可以在很宽的范围内变化。

[0277] 可以通过以一些方式将适宜化合物连接到所说基质的表面来改变任何主题聚合基质的电荷、亲油性或亲水性。例如,可以用表面活性剂来增强溶解性差或疏水性组合物的润湿性。适宜表面活性剂的实例包括葡聚糖、聚山梨醇酯类物质和月桂基硫酸钠。一般以低浓度来使用表面活性剂,其用量一般小于约5%。

[0278] 粘合剂是可以混入到聚合制剂中以约束并维持基质完整性的粘合材料。粘合剂可

以以干粉或溶液形式加入。可以用糖和天然以及合成聚合物作为粘合剂。

[0279] 特定作为粘合剂加入的物质的含量一般为该基质制剂的约0.5%–15%w/w。也可用作滚圆增强剂的某些材料,如微晶纤维素也具有另外的粘合特性。

[0280] 可以使用各种包衣来改变该基质的性质。

[0281] 三种示例性包衣为密封衣、有光包衣和肠衣。可以用具有各种溶解或侵蚀性的其它类型的包衣来进一步改变主题基质的行为,并且该类包衣对于本领域普通技术人员而言是易于获知的。

[0282] 在涂覆含水肠衣过程中,密封衣可以防止该基质过分吸水。有光包衣通常改善了最终基质的操作性。可以用水溶性材料如羟丙基纤维素来对植入物进行密封包衣和有光包衣。通常将密封包衣和有光包衣喷洒到该基质上直至对密封包衣而言得到约0.5%至约5%,常常为约1%的增重,对有光包衣而言得到约3%的增重。

[0283] 肠衣由在胃的低pH(小于3.0)中不溶而在小肠的高pH(高于4.0)中可溶的聚合物组成。可以使用聚合物如EUDRAGIT™,RohmTech,Inc.,Malden,Mass.,和AQUATERIC™,FMC Corp.,Philadelphia,Penn.,并使其以薄膜的形式从水溶液或混悬液中或通过喷雾干燥法成层到植入物上。该肠衣一般喷雾至约1%至约30%,优选约10至约15%的增重并且可包含包衣助剂如增塑剂、表面活性剂、降低包衣过程中植入物的粘性的分隔剂和包衣渗透性调节剂。

[0284] 本发明的组合物还可以包含一种或多种任选的添加剂如纤维增强剂、着色剂、香料、橡胶改性剂、变调剂等等。实际上,这些任选的添加剂均应能与所得的聚合物及其所需应用相容。适宜的纤维增强剂的实例包括PGA微原纤维、胶原微原纤维、纤维素类微原纤维和烯属微原纤维。在组合物中所用的这些任选添加剂的量是获得所需效果所必需的量。

[0285] 正如在本领域中众所周知的那样,根据被治疗的病症以及患者的年龄、情况和体重,本文所述的治疗性聚合物组合物可以以各种药物制剂的形式进行给药。例如,在化合物被口服给药的情况下,其可以被制备成片剂、胶囊、颗粒、粉末或糖浆的形式;或者对于胃肠外给药而言,其可以被制备成注射剂(静脉内、肌内或皮下注射)、滴注制剂或栓剂形式。对于通过眼睛粘膜途径进行的应用而言,其可以被制备成滴眼剂或眼用软膏。这些制剂可以用常规方法来进行制备,并且,如果需要的话,可以将活性成分与任何常规添加剂,如赋形剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、矫味剂、增溶剂、助悬剂、乳化剂或包衣剂混合。虽然剂量将根据患者的症状、年龄和体重、被治疗或预防病症的性质和严重程度、药物的给药途径和形式而变化,但是对于成人患者而言,推荐日剂量一般为0.01至2000mg治疗剂,并且其可以以单剂量或分割剂量的形式被给药。

[0286] 对给定患者而言,产生最有效的治疗功效的治疗性聚合物组合物的精确给药时间和/或数量将取决于特定化合物的活性、药物动力学和生物利用度、患者的生理学情况(包括年龄、性别、疾病类型和阶段、一般身体情况、对给定药物剂量和类型的响应能力)、给药途径等等。总之,可以用上面的方针作为对治疗进行微调的基础,例如可用于确定最佳给药时间和/或数量,其顶多只需要由对患者进行监测和对剂量和/或时间进行调整所组成的常规实验。

[0287] 这里所用的短语“可药用的”指的是在合理的医学判断范围内适于与人类和动物的组织进行接触而没有过分的毒性、刺激性、变应性响应或其它问题或并发症并同时具有

合理的益处/风险比的治疗性聚合物轭合物、材料、组合物和/或剂型。

[0288] 这里所用的短语“可药用的载体”指的是在将主题化学品从一个器官或机体的一部分运载或转运到另一个器官或机体的另一部分时所涉及的可药用的材料、组合物或载体,如液态或固态填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或封装材料。各载体在与制剂的其它组分相容的方面必需是“可接受的”并且对患者无害。可作为可药用载体的材料的一些实例包括:(1)糖,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;(4)粉状黄蓍胶;(5)麦芽;(6)明胶;(7)滑石粉;(8)赋形剂,如可可豆脂和栓剂蜡类物质;(9)油类物质,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和豆油;(10)二醇类物质,如丙二醇;(11)多元醇,如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;(12)酯,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)藻酸;(16)无热源的水;(17)等渗盐水;(18)林格氏溶液;(19)乙醇;(20)磷酸盐缓冲溶液;和(21)药物制剂中使用的其它可相容的无毒物质。

[0289] 术语“可药用的盐”指的是该治疗性聚合物轭合物相对无毒的无机和有机酸加成盐。这些盐可以在该治疗性聚合物轭合物的最后分离和纯化过程中就地制备,或者可以通过单独将游离碱形式的纯化了的聚合物与适宜的有机或无机酸进行反应并将由此形成的盐分离出来来进行制备。代表性的盐包括氢溴化物、盐酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、硝酸盐、醋酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲苯磺酸盐、枸橼酸盐、马来酸盐、富马酸盐、酒石酸盐、茶甲酸盐、甲磺酸盐、葡庚酸盐、乳二糖酸盐和月桂基磺酸盐等等。(参见例如,Berge等人(1977)“药用盐”,J.Pharm.Sci.66:1-19)

[0290] 在其它情况中,本发明方法中所用的治疗性聚合物轭合物可能包含一种或多种酸性官能团,因此,能与可药用的碱形成可药用的盐。这些情况中的术语“可药用的盐”指的是聚合物的相对无毒的无机和有机碱加成盐。这些盐同样可以在该聚合物的最后分离和纯化过程中制备,或者可以通过单独将游离酸形式的纯化了的聚合物与适宜的碱如可药用的金属阳离子的氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐、与氨水或可药用的有机伯、仲或叔胺进行反应来进行制备。代表性的碱金属或碱土金属盐包括锂、钠、钾、钙、镁和铝盐等。用于形成碱加成盐的代表性的有机胺包括乙胺、二乙胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪等(参见,例如,Berge等人,同上)。

[0291] 在该组合物中还可以存在润湿剂、乳化剂和润滑剂,如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁,以及着色剂、脱膜剂、包衣剂、甜味剂、矫味剂和香料、防腐剂和抗氧化剂。

[0292] 可药用抗氧化剂的实例包括:(1)水溶性抗氧化剂,如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等等;(2)油溶性抗氧化剂,如抗坏血酸棕榈酸酯、丁羟基茴香醚(BHA)、丁羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等等;和(3)金属螯合剂,如枸橼酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等等。

[0293] 可用于本发明方法的制剂包括适于口服给药、鼻给药、局部给药(包括眼睛、耳、颊和舌下给药)、直肠给药、阴道给药、气雾剂和/或胃肠外给药的制剂。该制剂可以方便地以单位剂型的形式存在并且可以用药学领域任何众所周知的方法来进行制备。可以与载体材料联合从而制备单剂量形式的活性成分的量将根据被治疗的主体、特定的给药方式而变化。可以与载体材料相结合从而制备单剂量形式的活性成分的量一般是可以产生治疗效果

的化合物的量。一般而言,在一百份中,活性成分的量可以为约百分之一至约百分之九十九,优选约5%至约70%,最优选约10%至约30%。

[0294] 制备这些制剂或组合物的方法包括将治疗性聚合物轭合物与载体和任选的一种或多种辅助成分混合到一起的步骤。一般而言,该制剂是通过使治疗性聚合物轭合物与液体载体或细分散的固体载体或二者均匀、紧密地混合,然后,如果需要的话,将该产品成形来制备的。

[0295] 适于口服给药的制剂可以是胶囊、扁囊剂、丸剂、片剂、胶状物、锭剂(使用有滋味的基质,通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)、粉剂、颗粒或者可以是在水性或非水性液体中的溶液或混悬液形式,或者可以是水包油或油包水液体乳剂,或者为酏剂或糖浆形式,或者为软锭剂(使用惰性基质,如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶)和/或漱口剂等形式,其各自包含预定量的作为活性成分的治疗性聚合物轭合物。化合物还可以以大丸剂、干药糖剂或糊剂的形式被给药。

[0296] 可以通过压缩或模塑来制备片剂,其可任选地含有一种或多种辅助成分。压缩片可以用粘合剂(例如明胶或羟丙基甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如羟乙酸淀粉钠或交联羧甲基纤维素钠)、表面活性物质或分散剂来进行制备。模塑片可以通过在适宜的机器中将用惰性液体稀释剂润湿的粉状肽或拟肽的混合物模塑来进行制备。

[0297] 可以任选地对片剂或其它固体剂型,如糖锭剂、胶囊、丸剂和颗粒刻痕或者用包衣和壳体如肠衣和药物制剂领域众所周知的其它包衣来进行制备。还可以将其制备成可以提供活性成分的缓释或控释的形式,其可以使用例如用于提供所需释放特性的各种比例的羟丙基甲基纤维素、其它聚合物基质、脂质体和/或微球。可以通过例如用截留细菌的滤器进行过滤或通过在使用前能即时溶解于无菌水或其它无菌可注射介质中的无菌固体组合物中混入灭菌剂来对其灭菌。这些组合物还可以任选地包含不透明剂并且可以是仅在或优选在胃肠道的某些部分释放活性成分的组合物,并且所说的组合物可以任选地以延迟的方式释放活性成分。可以使用的植入组合物的实例包括聚合性物质和蜡类物质。该活性成分还可以是微囊化形式,如果适宜的话,其可具有一种或多种上述赋形剂。

[0298] 用于口服给药的液体剂型包括可药用的乳剂、微乳、溶液、混悬液、糖浆和酏剂。除活性成分外,该液体剂型还可以包含本领域常用的惰性稀释剂,如,例如,水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂,如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苄醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油类(特别是棉籽油、花生油、玉米油、胚油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨醇脂肪酸酯、以及其混合物。

[0299] 除惰性稀释剂外,该口服组合物还可以包含助剂如润湿剂、乳化剂和助悬剂、甜味剂、矫味剂、着色剂、香料和防腐剂。

[0300] 除活性治疗性聚合物轭合物外,混悬液还可以包含助悬剂,例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇和脱水山梨醇酯、微晶纤维素、aluminum metahydroxide、膨润土、琼脂和黄蓍胶、以及其混合物。

[0301] 用于直肠或阴道给药的制剂可以以栓剂的形式存在,其可以通过将一种或多种治疗性聚合物轭合物与一种或多种适宜的非刺激性赋形剂或载体(包括例如可可脂、聚乙二醇、栓剂蜡或水杨酸酯)混合来进行制备,并且其在室温下是固体,但是在体温下是液体,因此,其将在直肠或阴道腔中熔化并释放活性物质。

[0302] 适于阴道给药的制剂还包括包含本领域已知的适宜载体的阴道栓、塞子、霜、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾制剂。

[0303] 用于治疗性聚合物轭合物的局部或经皮给药的剂型包括粉剂、喷雾剂、软膏、糊剂、霜、洗剂、凝胶、溶液、贴剂和吸入剂。可以将活性组分在无菌条件下与可药用载体和可能需要的任何防腐剂、缓冲液或推进剂混合。

[0304] 除配体外，软膏、糊剂、霜和凝胶还包含赋形剂，如动物和植物脂肪、油类、蜡类、石蜡、淀粉、黄蓍胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅氧烷类物质、皂土、硅酸、滑石粉和氧化锌或其混合物。

[0305] 除治疗性聚合物轭合物外，粉剂和喷雾剂还可以包含赋形剂如乳糖、滑石粉、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末或这些物质的混合物。喷雾剂还可以包含常规的推进剂，如氯氟烃类物质和易挥发的未取代的烃，如丁烷和丙烷。

[0306] 或者，该治疗性聚合物轭合物可以通过气雾剂来给药。其可以通过制备一种包含所说化合物的含水气溶胶、脂质体制剂或固体微粒来完成。可以使用非水性（例如，碳氟化合物推进剂）混悬液。优选声波雾化器，因为其可以使活性剂与剪切（其可能导致化合物的降解）的接触最小化。

[0307] 含水气雾剂一般是通过配制活性剂与常规可药用载体和稳定剂的水性溶液或混悬液来进行制备的。所说的载体和稳定剂可以随着特定化合物的需要而变化，但是一般包括非离子表面活性剂（吐温、普朗尼克或聚乙二醇）、无害的蛋白如血清白蛋白、脱水山梨醇酯、油酸、卵磷脂、氨基酸如甘氨酸、缓冲剂、盐类、糖或糖醇。气雾剂一般是由等渗溶液制备的。

[0308] 经皮贴剂具有可以为机体提供治疗性聚合物轭合物的受控传递的附加优点。该类剂型可以通过将活性剂溶解或分散于适当介质中进行制备。还可以用吸收促进剂来增加配体通过皮肤的流量。可以通过提供一种控速膜或将拟肽分散于聚合物基质或凝胶中来控制该流动的速率。

[0309] 眼用制剂、眼膏、粉剂、溶液等也在本发明的范围内。

[0310] 适于胃肠外给药的本发明的药物组合物包含一种或多种治疗性聚合物轭合物和一种或多种可药用的等渗无菌水性或非水性溶液、分散体、混悬液或乳剂，或可以是在临用前可以被重组成为可注射的无菌溶液或分散体的无菌粉末，其可以包含抗氧化剂、缓冲剂、制菌剂、可以使该制剂与使用者的血液等渗的溶质或助悬剂或增稠剂。

[0311] 可用于本发明药物组合物的适宜水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇（如甘油、丙二醇、聚乙二醇等）以及其适宜的混合物、植物油，如橄榄油，和可注射的有机酯，如油酸乙酯。例如，可以通过使用包衣材料，如卵磷脂、通过在分散体的情况中维持所需的粒度和通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。

[0312] 这些组合物还可以包含助剂如防腐剂、润湿剂、润滑剂和分散剂。可以通过包含各种抗菌和抗真菌剂例如尼泊金酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等来确保防止微生物的作用。其还希望在该组合物中包含等渗剂，如糖、氯化钠等等。此外，可以通过包含可延迟吸收的物质如单硬脂酸铝和明胶来使得可注射的药物形式被延续吸收。

[0313] 在一些情况中，为了延长药物的作用，希望由皮下或肌肉注射来减缓药物的吸收。可以通过使用水溶性差的晶体或无定形材料的液体混悬液来实现这一点。然后，药物的吸

收速率取决于其溶解速率,其溶解速率又取决于晶体大小和晶型。或者,可以通过将药物溶解或混悬于油性基质中来延迟胃肠外给药的药物形式的吸收。

[0314] 可以通过形成在可生物降解的聚合物如聚丙交酯-聚乙交酯中的微囊化的治疗性聚合物-聚合物基质来制备可注射的储库形式。可以根据药物与聚合物的比例、以及所用特定聚合物的性质来控制药物的释放速率。其它可生物降解的聚合物的实例包括聚(原酸酯类)和聚(酞类)。还可以通过将药物捕获到可以与机体组织相容的脂质体或微乳中来制备可注射的储库制。

[0315] 当本发明的治疗性聚合物-聚合物以药物的形式被给药于人和动物时,其可以以本身的形式或包含例如0.1至99.5% (更优选0.5至90%) 活性成分和可药用载体的药物组合物形式被给药。

[0316] 活性剂的制剂可以被口服、胃肠外、局部或直肠给药。其当然是以适于各给药途径的形式被给药的。例如,其可以以片剂或胶囊的形式被给药、通过注射剂、吸入剂、眼睛洗剂、软膏、栓剂、输液被给药;通过洗剂或软膏被局部给药;以及通过栓剂被直肠给药。优选口服给药。

[0317] 这里所用的短语“胃肠外给药”指的是除肠内和局部给药之外的给药方式,其通常是通过注射来进行的,并且非限制性地包括静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管的、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内和胸骨内注射和输注。

[0318] 这里所用的短语“全身给药”、“外周给药”指的是治疗性聚合物-聚合物、药物或其它物质除直接给药到中枢神经系统内以外的给药,从而使得其进入到患者的系统中并进行代谢和其它过程,例如皮下给药。

[0319] 可以用任何适宜的给药途径将这些治疗性聚合物-聚合物给药于人和其它动物以进行治疗,所说的适宜的给药途径包括口服给药、鼻给药(例如通过喷雾剂来进行鼻给药)、直肠给药、阴道内给药、胃肠外给药、脑池内给药和局部给药(例如通过粉剂、软膏或滴剂来给药),包括颊给药和舌下给药。

[0320] 不管所选择的给药途径是什么,均可以用本领域技术人员公知的常规方法将可以以适宜的水化形式使用的本发明的治疗性聚合物-聚合物和/或药物组合物制备成可药用的剂型。

[0321] 本发明药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以不同,以获得在对于特定患者、组合物、以及给药途径而言可以有效获得所需治疗响应的同时对患者无毒的活性成分量。

[0322] (c) 主题组合物的物理结构

[0323] 该主题聚合物可以被成形为各种形状。例如,在某些实施方案中,主题聚合物基质可以以微粒或纳米微粒的形式存在。微球一般包含混有药物的可生物降解的聚合物基质。可以用本领域技术人员公知的许多技术来形成微球。形成微球的技术非限制性地包括, (a) 通过乳化和随后的有机溶剂蒸发进行的相分离(包括复杂的乳化方法如水包油乳剂、油包水乳剂和水-油-水乳剂); (b) 凝聚-相分离; (c) 熔化分散; (d) 界面沉积; (e) 原位聚合; (f) 喷雾干燥和喷雾冻凝; (g) 空气悬浮包衣; 和 (h) 锅包衣以及喷雾包衣。在例如, US 4,652,441; US 5,100,669; US 4,526,938; WO 93/24150; EPA 0258780A2; US 4,438,253; 和 US 5,

330,768中公开了这些方法以及微球的特性,这些文件的全部公开内容在这里都被引入作为参考。

[0324] 为了制备本发明的微球,可以根据传递基质的所需应用来使用一些方法。适宜的方法非限制性地包括喷雾干燥、冷冻干燥、风干、真空干燥、流化床干燥、研磨、共沉淀和临界流体萃取。在喷雾干燥、冷冻干燥、风干、真空干燥、流化床干燥和临界流体萃取的情况中,首先在水性条件下将一些组分(稳定的多元醇、生物活性剂、缓冲剂等)溶解或混悬。在研磨的情况中,用本领域中任何公知的方法将组分以干燥形式混合并研磨。在共沉淀的情况中,将组分在有机条件下混合并如下所述那样进行处理。可以用喷雾干燥来使稳定的多元醇负载生物活性剂。将组分在水性条件下混合并用精密喷嘴对其干燥从而在干燥室中产生出十分均匀的小滴。适宜的喷雾干燥机非限制性地包括Buchi、NIRO、APV和Lab-plant喷雾干燥器,其根据制造商的说明使用。

[0325] 可以用扫描电子显微镜来测定微粒和纳米微粒的形状。在某些实施方案中,采用球形的纳米微粒以在血流中进行循环。如果需要的话,可以用已知的技术将该微粒制造成更适于特定应用的其它形状。

[0326] 除治疗剂的细胞内传递外,该主题组合物的颗粒如微粒或纳米微粒还可以被胞吞,从而使得其可以接近所说的细胞。该类胞吞过程的频率同样取决于颗粒的大小。

[0327] 在某些实施方案中,可以使用可确定所说聚合物基质形状并为该聚合物基质提供刚性和结构强度的固体物质。例如,可以将聚合物成形在用于植入的网状物或其它织物上。还可以将聚合物构造成适于在机体组织内支持一些开放区域或用于将流体从一种体腔引入到另一种体腔中的支架或分流器的形式。此外,还可以将聚合物构造成适于从手术后部位除去流体的导液装置或管子,并且在一些实施方案中,被构造为本领域常见的具有闭合部分的引流系统如Jackson-Pratt导液装置等等。

[0328] 对于制备用于植入的模塑或压制物品的可能性而言该聚合物的机械性质可能很重要。例如,玻璃转化温度可以在很宽的范围内变化,但是其必需大大低于分解温度以适于用常规的制造技术,如压缩模塑、挤出或注射成型来进行制造。

[0329] (d) 生物降解性和释放特性

[0330] 在某些实施方案中,在与体液接触时,本发明的聚合物和掺合物会逐渐水解。其中,可生物降解聚合物的体内寿命取决于其分子量、结晶性、生物稳定性和交联度。一般而言,分子量越高、结晶度越高、并且生物稳定性越高,生物降解就越慢。

[0331] 如果用治疗剂或其它材料来配制主题组合物,与从等渗盐水溶液的释放相比,一般可以产生该类物质或其它材料的缓释或长期释放。该类释放特性可以导致与聚合物结合的所说物质或任何其它材料的有效量(例如约0.0001mg/kg/小时至约10mg/kg/小时)的长期传递(在1至约2,000小时,或者约2至约800小时的时期内)。

[0332] 许多因素都可能会影响本发明聚合物的所需的水解速率、所得固体基质的所需的柔软性和灵活性、生物活性剂的释放速率和程度。该类因素中的一些包括各种亚基的选择/特性、单体亚基的对映异构体或非对映异构体纯度、在聚合物中所发现的亚基的均匀性、以及该聚合物的长度。例如,本发明考虑具有各种键合的杂聚物和/或在该聚合物中包含其它单体元素以控制例如该基质的生物降解速率。

[0333] 为了进一步进行说明,通过调节所说聚合物的主链或侧链的疏水性同时维持任何

该类聚合物对所需应用的足够的生物降解能力,可以获得很宽的降解速率范围。可以通过改变该聚合物的各种官能团来获得该结果。例如,因为促进了裂解而阻止了水渗透,所以疏水性主链和亲水性键合的组合产生了不均匀的降解。

[0334] 在可用于测定本发明聚合物基质中负载的治疗剂或其它材料的释放速率的领域中通常可接受的一种方案包括本领域公知的测定法——在37℃下使任何该类基质在0.1M PBS溶液(pH 7.4)中降解。对于本发明的目的而言,这里所用的术语“PBS方案”指的是该类方案。

[0335] 在某些情况中,可以通过使其进行该类方案来对本发明不同聚合物系统的释放速率进行比较。在某些情况中,可能必需用相同的方式对聚合物系统进行加工以使得可以对不同系统进行直接和相对准确的比较。例如,本发明讲述了一些形成本发明聚合物基质的不同方法。该类比较可以显示一种聚合物系统以比另一种聚合物系统的释放快约2或更低至约1000或更高倍的速率释放所混有的物质。

[0336] 或者,一种比较可能表明速率差异为约3、5、7、10、25、50、100、250、500或750倍。本发明和释放速率方案可能考虑更高的速率差异。

[0337] 在某些实施方案中,当以某种方式进行制备时,本发明聚合物系统的释放速率可能显示为单-或双-相的。

[0338] 混入到通常以微球形式被提供的聚合物基质中的任何物质的释放特征在某些情况中为最初的释放速率增加,其可以释放所混入的任何物质的约5至约50%或更多,或者约10、15、20、25、30或40%,然后为较低的释放速率。

[0339] 还可以用每天每mg聚合物基质所释放的该类材料的量来对任何被混入材料的释放速率进行描述。例如,在某些实施方案中,该释放速率可以为每天每mg聚合物系统约1ng或更低的被混入的任何材料至约500或更多ng/天/mg。或者,该释放速率可以为约0.05、0.5、5、10、25、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450或500ng/天/mg。还是在其它实施方案中,任何被混入材料的释放速率可以为10,000ng/天/mg,或更高。在某些情况中,被混入并且具有该类释放速率特征的材料可包括治疗剂、填充剂以及其它物质。

[0340] 另一方面,得自本发明任何聚合物基质的任何材料的释放速率可被表示为该类物质在该类基质中的半衰期。

[0341] 除涉及用于体外测定释放速率的实施方案外,在可体内测定聚合物系统释放速率的情况中,本发明也考虑体内方案。用于测定任何材料从本发明系统的聚合物中释放的其它测定在现有技术中是已知的。

[0342] (e) 植入物和传递系统

[0343] 就其最简单的形式而言,治疗剂的可生物降解的传递系统由该类治疗剂在聚合物基质中的分散体所组成。在其它实施方案中,将包含主题组合物的制品用于植入、注射或者完全或部分放置到体内。特别重要的是当被植入或注射到脉管组织中时,该制品产生最小程度的组织刺激。

[0344] 可以用本领域公知的各种方法来制备可生物降解的传递系统及其制品。可以用常规的挤压成型或注射成型技术来熔化加工该主题聚合物,或者可以通过溶解于适宜的溶剂中,然后形成装置,随后通过蒸发或提取除去所说的溶剂来制备这些产品。

[0345] 在系统或植入物品被放置时,应保持至少部分与生物流体如血液、内部器官分泌

物、粘膜、脑脊髓液等等进行接触以使得任何被包封的治疗剂可以被缓释。

[0346] (f) 制造方法

[0347] 本发明的化合物一般可以用下面两种方法之一来进行制备:可以将带有治疗剂、靶向配体和/或环糊精部分的单体聚合,或者可以用治疗剂、靶向配体和/或环糊精部分对聚合物主链进行衍生化处理。

[0348] 因此,在一个实施方案中,本发明考虑通过将单体M-L-CD和M-L-D(和,任选的,M-L-T)反应来合成本发明的化合物,其中

[0349] CD表示环状部分,如环糊精分子或其衍生物;

[0350] L每次出现时可以各自独立地不存在或表示连接基基团;

[0351] D每次出现时各自独立地表示相同或不同的治疗剂或其前体药物;

[0352] T每次出现时各自独立地表示相同或不同的靶向配体或其前体;和

[0353] M表示带有一个或多个反应性部分的单体亚基,所述反应性部分能够在可使单体聚合的条件下与该反应混合物中的单体中的一种或多种其它M进行聚合反应。

[0354] 在某些实施方案中,该反应混合物进一步包含不带有CD、T或D部分的单体,例如,以将该聚合物中被衍生化的单体单元间隔开。

[0355] 在另一种供选择的实施方案中,本发明考虑通过将聚合物P(带有多个反应性基团,如羧酸、醇、硫醇、胺、环氧化物等等)与接枝剂X-L-CD和Y-L-D(和,任选的,Z-L-T)进行反应来合成本发明的化合物,其中

[0356] CD表示环状部分,如环糊精分子或其衍生物;

[0357] L每次出现时可以各自独立地不存在或表示连接基基团;

[0358] D每次出现时各自独立地表示相同或不同的治疗剂或其前体药物;

[0359] T每次出现时各自独立地表示相同或不同的靶向配体或其前体;

[0360] X每次出现时各自独立地表示能与该聚合物的反应性基团形成共价键的反应性基团,如羧酸、醇、硫醇、胺、环氧化物等等;和

[0361] Y和Z每次出现时各自独立地表示在可以使接枝剂与所说的聚合物或接枝到所说聚合物上的部分形成共价键和/或包含复合体的条件下(视情况而定)能与该聚合物的反应性基团形成共价键或与接枝到该聚合物上的CD部分形成包含复合体的包含主体或反应性基团,如羧酸、醇、硫醇、胺、环氧化物等。

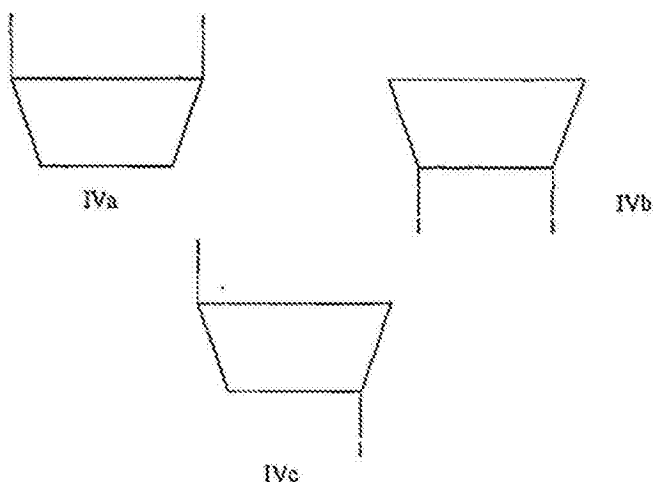
[0362] 例如,如果该聚合物包含醇、硫醇或胺作为反应性基团的话,则所说的接枝剂可能包含可以与之反应的反应性基团,如异氰酸酯、异硫氰酸酯、酰氯、酸酐、环氧化物、烯酮类、磺酰氯、活化的羧酸(例如,用活化剂如PyBrOP、羰基二咪唑或与羧酸反应形成一种对于亲核攻击敏感的部分的其它试剂进行处理的羧酸)或本领域技术人员公知的其它亲电性部分。在某些实施方案中,正如本领域技术人员理解的那样,需要用催化剂(例如,路易斯酸、过渡金属催化剂、胺碱等等)来使反应发生。

[0363] 在某些实施方案中,将不同的接枝剂同时或基本同时与该聚合物进行反应(例如,在一罐式反应中进行反应),或者相继与所说的聚合物进行反应(任选地在这些反应之间进行纯化和/或洗涤步骤)。

[0364] 本发明另一方面是一种制备式I-III所示的直链或支链的包含环糊精的聚合物的方法。

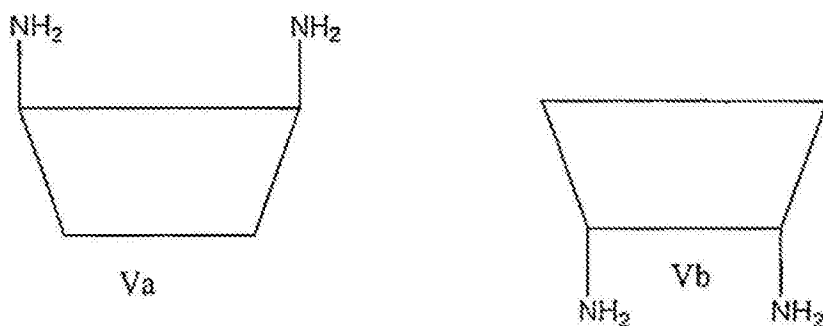
[0365] 虽然下面的讨论集中于线性环糊精分子的制备,但是本领域技术人员将易于意识到,通过选择适宜的共聚单体A前体,所述的方法可适于制备分支的聚合物。

[0366] 因此,本发明的一个实施方案是一种制备线性环糊精共聚物的方法。根据本发明,可以通过将被适宜的离去基团二取代的环糊精单体前体与能置换该离去基团的共聚单体A前体共聚来制备本发明的线性环糊精共聚物。该离去基团可以相同或不同,可以是本领域公知的在共聚反应时可以被共聚单体A前体置换的任何离去基团。在一个优选的实施方案中,可以通过将环糊精单体前体碘化从而形成一种双碘化的环糊精单体前体并将该双碘化的环糊精单体前体与一种共聚单体A前体共聚从而形成一种具有上述式II或III的重复单元或其组合的线性环糊精共聚物来进行制备。虽然下面所列的实施例讨论了被碘化的环糊精部分,但本领域技术人员将易于意识到本发明考虑并包括其中不是存在碘而是存在其它离去基团如烷基和芳基磺酸酯的环糊精部分。在一个优选的实施方案中,制备本发明线性环糊精共聚物的方法是将上述环糊精单体前体碘化从而形成一种式IVa、IVb、IVc的双碘化的环糊精单体前体或其混合物:

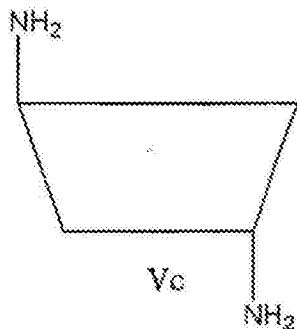


[0368] 该双碘化的环糊精可以用本领域公知的任何方法来进行制备。(Tabushi等人J. Am. Chem. 106, 5267-5270 (1984); Tabushi等人J. Am. Chem. 106, 4580-4584 (1984))。例如,可以将 β -环糊精与联苯-4,4'-二磺酰氯在存在无水吡啶的情况下进行反应,从而形成联苯-4,4'-二磺酰氯封端的 β -环糊精,然后可以将其与碘化钾反应,从而制得二碘- β -环糊精。该环糊精单体前体仅在两个位置被碘化。如上所述,通过将该双碘化的环糊精单体前体与共聚单体A前体共聚,可以制备具有上述式Ia、Ib的重复单元或其组合的线性环糊精聚合物。如果适宜的话,可以用其它公知的离去基团代替碘或碘基。

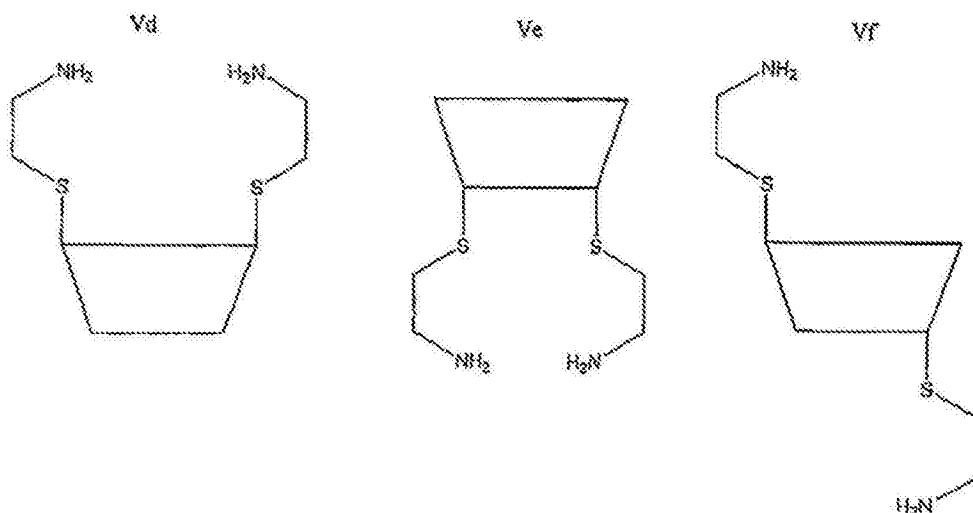
[0369] 根据本发明,如上所述的那样,所说的碘基或其它适宜的离去基团也可以被允许与共聚单体A前体进行反应的基团所代替。例如,式IVa、IVb、IVc的双碘化的环糊精单体前体或其混合物可以被胺化从而形成一种式Va、Vb、Vc的二胺化环糊精单体前体或其混合物:



[0370]



[0371] 该二胺化的环糊精单体前体可以用现有技术中已知的任何方法来进行制备。(Tabushi等人Tetrahedron Lett.18:11527-1530 (1977);Mungall等人,J.Org.Chem.1659-1662 (1975))。例如,可将二碘-β-环糊精与叠氮化钠反应,然后将其还原形成二氨基-β-环糊精)。该环糊精单体前体可以仅在两个位置被胺化。然后,可以如上所述那样将该二胺化的环糊精单体前体与共聚单体A前体共聚,从而制得一种具有如上所述的式II-III的重复单元或其组合的线性环糊精共聚物。但是,二胺化的环糊精单体前体的该氨基官能团不必直接连接到所说的环糊精部分上。或者,可以通过用适宜的碱如金属氢化物、碱金属碳酸盐或碱土金属碳酸盐或叔胺,用包含氨基的部分如例如HSCH₂CH₂NH₂ (或更一般地是用HW-(CR₁R₂)_n-WH表示的双-亲核性分子(其中W每次出现时各自独立地表示O、S或NR₁;R₁和R₂每次出现时各自独立地表示H、(未)取代的烷基、(未)取代的芳基、(未)取代的杂烷基、(未)取代的杂芳基))置换环糊精单体前体的碘或其它适宜离去基团来引入氨基官能团或其它亲核性官能团,从而形成式Vd、Ve、Vf的二胺化的环糊精单体前体或其混合物:

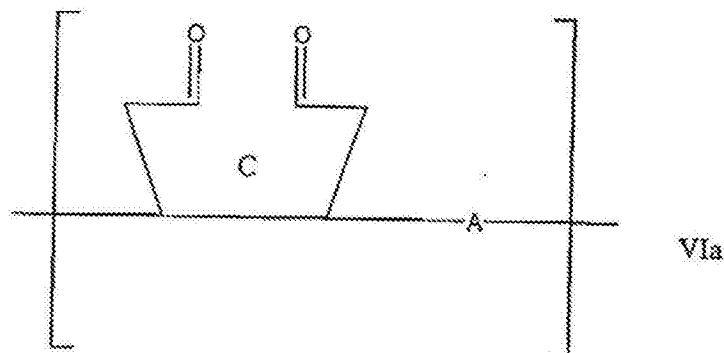


[0372]

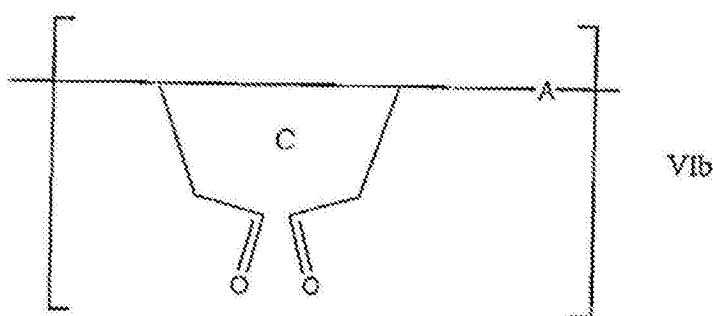
[0373] 本发明的被氧化的包含环糊精的线性共聚物还可以通过如下所述那样对一种被还原的本发明的包含环糊精的线性共聚物进行氧化来制备。只要共聚单体A不包含氧化敏

感部分或基团,如例如硫醇,就可以进行该方法。

[0374] 根据本发明,可以对本发明的线性环糊精共聚物进行氧化以向该共聚物中引入至少一种氧化的环糊精单体,从而使得被氧化的环糊精单体是该聚合物主链的一种固有部分。包含至少一种被氧化的环糊精单体的线性环糊精共聚物被定义为线性氧化环糊精共聚物或包含被氧化的环糊精的线性聚合物。该环糊精单体可以在环糊精部分的仲羟基或伯羟基上被氧化。如果在本发明的线性氧化环糊精共聚物中存在一种以上的氧化环糊精单体,则可以在伯羟基侧、仲羟基侧或伯醇和仲羟基侧存在相同或不同的被氧化的环糊精单体。为了进行说明,具有被氧化的仲羟基的线性氧化环糊精共聚物例如具有式VIa或VIb的至少一种单元:



[0375]

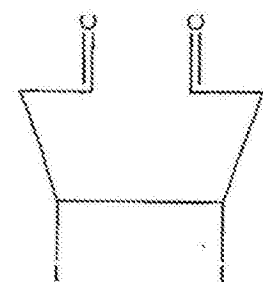


[0376] 在式VIa和VIb中,C是取代或未取代的被氧化的环糊精单体并且A是一种被连接,例如共价连接到被氧化的环糊精C上的共聚单体。在式VIa和VIb中,仲羟基的氧化还导致了环糊精部分的开环和醛基的形成。

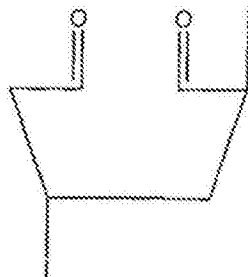
[0377] 可以通过上述的线性环糊精共聚物的氧化来制备线性氧化环糊精共聚物。本发明的线性环糊精共聚物的氧化可以用本领域公知的氧化技术来完成。(Hisamatsu等人, Starch 44:188-191 (1992))。优选使用抗氧剂如,例如,高碘酸钠。本领域技术人员应当清楚的是,在标准的氧化条件下,氧化度可以变化或者每一种共聚物都可以不同。因此,在本发明的一个实施方案中,本发明的线性氧化共聚物可以包含一种氧化的环糊精单体。在另一个实施方案中,该共聚物的基本上所有的环糊精单体都被氧化。

[0378] 如上所述的那样,制备本发明线性氧化环糊精共聚物的另一种方法包括将二碘化或二胺化的环糊精单体前体进行氧化从而形成一种氧化的二碘化或二胺化的环糊精单体前体并将该氧化的二碘化或二胺化的环糊精单体前体与共聚单体A前体进行共聚反应。在一个优选的实施方案中,式VIIa、VIIb、VIIc的氧化的二碘化环糊精单体前体或其混合物:

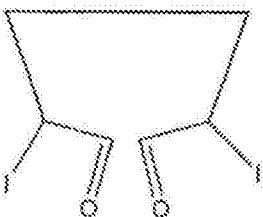
[0379]



VIIa



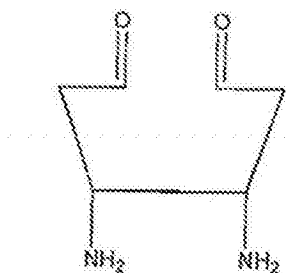
VIIc



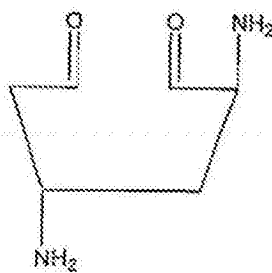
VIIb

[0380] 可以通过上述式Iva、IVb、IVc的二碘化的环糊精单体前体或其混合物的氧化来进行制备。在另一个优选的实施方案中,式VIIIa、VIIIb、VIIIc的氧化的二胺化环糊精单体前体或其混合物:

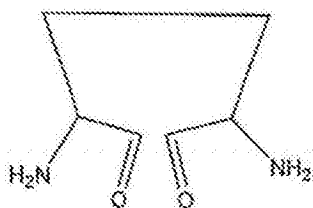
[0381]



VIIIa

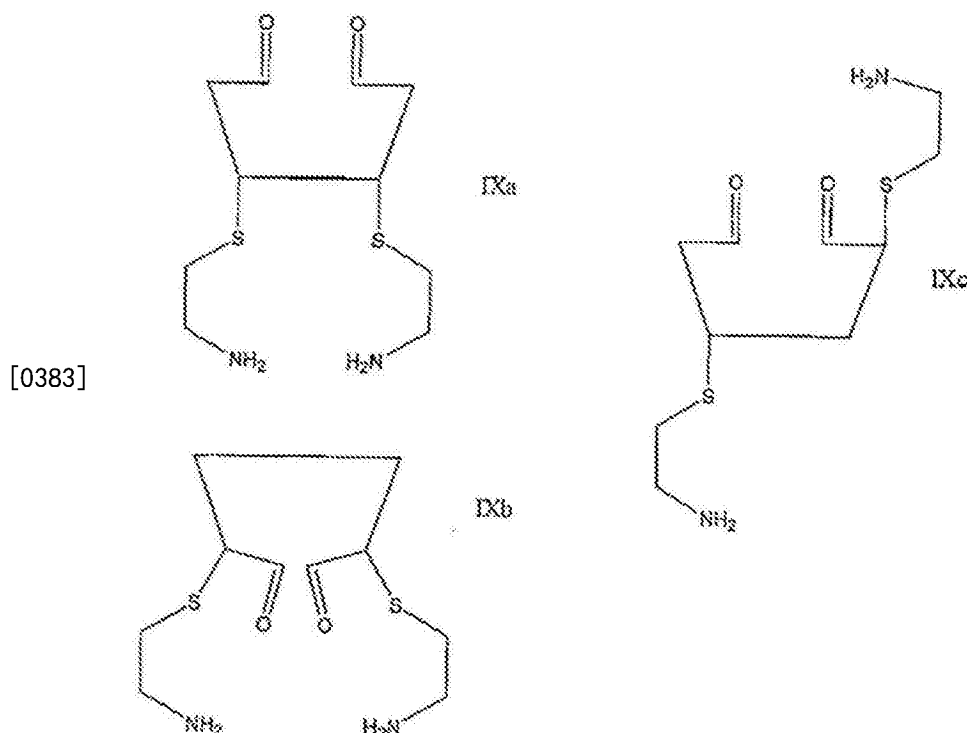


VIIIc



VIIIb

[0382] 可以通过上述式VIIa、VIIb、VIIc的被氧化的二碘化环糊精单体前体或其混合物的胺化来进行制备。还是在另一个优选的实施方案中,式IXa、IXb、IXc的被氧化的二胺化环糊精单体前体或其混合物:



[0384] 可以通过用适宜的碱如金属氢化物、碱金属碳酸盐或碱土金属碳酸盐或叔胺,用包含氨基或其它亲核基团的部分如例如 $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ (或更一般地用 $\text{HW}-(\text{CR}_1\text{R}_2)_n-\text{WH}$ 表示的双-亲核性分子(其中W每次出现时各自独立地表示O、S或 NR_1 ; R_1 和 R_2 每次出现时各自独立地表示H、(未)取代的烷基、(未)取代的芳基、(未)取代的杂烷基、(未)取代的杂芳基))置换被氧化的环糊精单体前体的碘或其它适宜的离去基团来进行制备。

[0385] 或者,如上所述的被氧化的二碘化或二胺化的环糊精单体前体可以通过将环糊精单体前体氧化从而形成一种被氧化的环糊精单体前体,然后如上所述的那样将该被氧化的环糊精单体二碘化和/或二胺化来进行制备。如上面所讨论的那样,可以用除碘基之外的其它离去基团和其它包含氨基的官能团对该环糊精部分进行修饰。然后,如上所述的那样,可将该被氧化的二碘化或二胺化的环糊精单体前体与共聚单体A前体共聚从而形成本发明线性的氧化环糊精共聚物。

[0386] 还可以通过给该共聚物连接至少一种配体来对该线性氧化环糊精共聚物进一步进行修饰。该配体如上所述。

[0387] 根据本发明,可以将线性环糊精共聚物或线性氧化环糊精共聚物连接或接枝到一种底物上。该底物可以是本领域技术人员公认的任何底物。在本发明的另一个优选实施方案中,可以将线性环糊精共聚物或线性氧化环糊精共聚物分别与一种聚合物交联从而形成一种交联的环糊精共聚物或交联的氧化环糊精共聚物。该聚合物可以是能与本发明的线性或线性氧化环糊精共聚物交联的任何聚合物(例如,聚乙二醇(PEG)聚合物、聚乙烯聚合物)。该聚合物也可以是相同或不同的线性环糊精共聚物或线性氧化环糊精共聚物。因此,例如,可以将一种线性环糊精共聚物与任何聚合物交联,所说的聚合物非限制性地包括其本身、另一种线性环糊精共聚物、以及线性氧化环糊精共聚物。本发明的一种交联的线性环糊精共聚物可以通过将一种线性环糊精共聚物与聚合物在存在交联剂的情况下进行反应来进行制备。本发明交联的线性氧化环糊精共聚物可以通过将一种线性氧化环糊精共聚物

与聚合物在存在适宜交联剂的情况下进行反应来进行制备。所说的交联剂可以是本领域已知的任何交联剂。交联剂的实例包括二酰肼和二硫化物。在一个优选的实施方案中,该交联剂是不稳定的基团,从而使得如果需要的话可以将交联共聚物解交联。

[0388] 可以用现有技术中已知的任何方法来对本发明的线性环糊精共聚物和线性氧化环糊精共聚物的特性进行描述。该类定性方法或技术非限制性地包括凝胶渗透色谱法(GPC)、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF Mass spec)、 ^1H 和 ^{13}C NMR、光散射和滴定法。

[0389] 本发明还提供了一种包含至少一种上述的本发明的线性环糊精共聚物和至少一种线性氧化环糊精共聚物的环糊精组合物。因此,可以如上所述那样将线性环糊精共聚物和线性氧化环糊精共聚物之一或二者与另一种聚合物交联和/或结合到一种配体上。本发明的治疗组合物包含治疗剂和本发明的线性环糊精共聚物或线性氧化环糊精共聚物,包括交联共聚物。线性环糊精共聚物、线性氧化环糊精共聚物以及其交联的衍生物如上所述。所说的治疗剂可以是包括本领域已知的治疗剂在内的任何合成或天然存在的生物学活性治疗剂。适宜治疗剂的实例非限制性地包括抗生素、甾族化合物、多核苷酸(例如,基因组DNA、cDNA、mRNA、双链RNA和反义寡核苷酸)、质粒、肽、肽片断、小分子(例如,阿霉素)和其它生物活性大分子如,例如,蛋白和酶类物质。

[0390] (g) 商业方法

[0391] 本发明另一方面提供了某些商业方法。具体地讲,实施本发明的方法使得可以得到新型的治疗组合物以及其改良的制剂。当与一种或多种另外的步骤相结合时,该技术步骤提供了进行药学或优选生命科学商业的新方法。例如,可以对用本发明的方法制备的该类治疗剂在各种疾病模型中作为治疗剂的功效进行试验,然后,在制备、包装和随后将所得的制剂上市以用于治疗疾病前对该治疗组合物的可能毒性和其它安全性进行试验。或者,许可第三方开发和销售所述制剂或进行所述步骤的权力。

[0392] 因此,在某些实施方案中,本发明提供了进行药学商务的方法,其包括:

[0393] a. 制造一种包含权利要求1-4中任意一项所述的化合物的药物组合物的制剂或试剂盒;和

[0394] b. 向健康护理人员推广介绍在疾病或病症的治疗中用所说的制剂或试剂盒获益。

[0395] 在其它实施方案中,本发明公开了一种进行药学商务的方法,其包括:

[0396] a. 提供一种销售权利要求1-4中任意一项所述的化合物的药物组合物的分销网络;和

[0397] b. 为患者或医生提供用所说的制剂来治疗疾病或病症的说明材料。

[0398] 在某些实施方案中,本发明提供了一种进行药学商务的方法,其包括:

[0399] a. 确定如权利要求1-4中任意一项所述化合物的药物组合物的适宜制剂和剂量;

[0400] b. 就在动物中的功效和毒性而言,确定步骤(a)中所确定的制剂的治疗特性;和

[0401] c. 提供用于销售在步骤(b)中确定的具有可接受的治疗特性的制剂的分销网络。

[0402] 该实施方案的另一个步骤包括提供用于向健康护理人员推广介绍所说制剂的销售团队。

[0403] 还是在一个其它实施方案中,本发明提供了一种进行药学商务的方法,其包括:

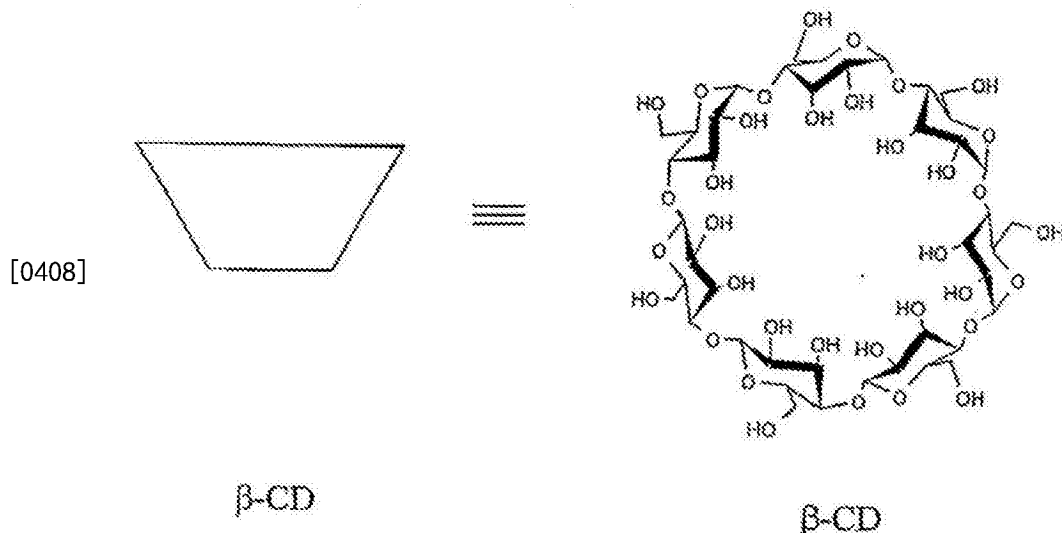
[0404] a. 确定如权利要求1-4中任意一项所述化合物的药物组合物的适宜制剂和剂量;

和

[0405] b. 许可第三方对该制剂进一步进行开发和销售的权力。

[0406] 例证

[0407] 材料。在使用前,将β-环糊精,“β-CD”,(Cerestar USA, Inc. of Hammond, IN) 在120℃下真空(<0.1mTorr)干燥12小时。

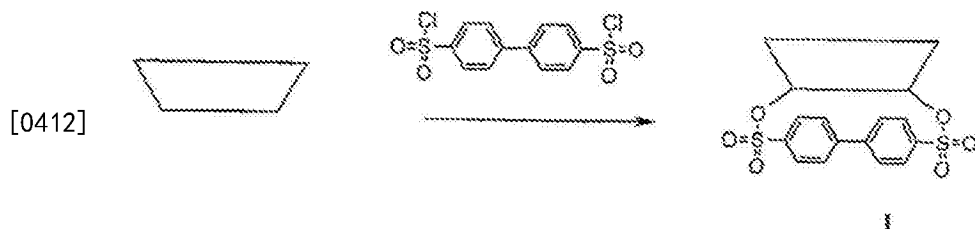


[0409] 所有无水溶剂、HPLC级溶剂和其它常用有机溶剂都购自供应商并且不需要进行进一步纯化就使用。将联苯-4,4'-二磺酰氯 (Aldrich Chemical Company, Inc. of Milwaukee, WI) 用氯仿/己烷重结晶。用研钵和研棒将碘化钾粉化并将其在烘箱中在200℃下进行干燥。聚乙二醇二丙酸琥珀酰亚胺 (dipropanoicsuccinimide) (PEG-DiSPA, MW 3400)、聚乙二醇二丁酸琥珀酰亚胺 (dibutanoicsuccinimide) (PEG-DiSBA, MW 3400) 和聚乙二醇二苯并三唑碳酸酯 (PEG-DiBTC, MW 3400) 购自Nektar (Huntsville, AL)。聚乙二醇二-对-硝基苯酚碳酸酯 (PEG-DiNPC, MW 3400) 得自Sigma (St. Louis, MO)。CPT购自Boehringer Ingelheim (Ingelheim, 德国)。人血浆购自Sigma并用DI水重构。小鼠血浆是通过离心除去采自BALB/C雌性小鼠 (Charles River) 的新鲜血样的血细胞来进行制备的。^{6A}, ^{6D}-二碘-^{6A}, ^{6D}-二脱氧-β-环糊精 (CDDI, 流程2) 是根据Hwang等人之前所报道的方法来合成的 (Bioconjugate Chem. 12, 280-290)。去离子水 (18-MΩ-cm) 是通过使自制去离子水通过Barnstead E-pure纯化系统来获得的。NMR谱是在Bruker AMX 500MHz或Varian 300MHz光谱仪上进行记录的。质谱 (MS) 分析是用配有LCQ离子阱 (Thermo Finnigan) 并配有电喷雾离子源的电喷雾质谱仪或MALDI-TOF质谱仪 (Voyager DE-PRO, Applied Biosystems) 来进行的。在配有Hitachi L-6200 Intelligent泵、Anspect RI检测器 (ERC-7512, Erma, Inc.)、Precision Detectors DLS检测器 (PD 2020) 和双凝胶渗透柱 (PL-aquagel-OH-408μm 300mm x 7.5mm, Polymer Laboratory) (用聚乙二醇标准品校准并用浓度为20-50mg/mL的PBS (1x) 在环境温度下以0.7mL/分钟的流速进行洗脱) 的GPC系统上对该聚合物的MW进行分析。在配有UV检测器 (System Gold 168 Detector, Beckman Coulter) 和蒸发光散射 (ELS) 检测器 (Sedex 75, Sedere, 法国) 的HPLC系统上用C-18反相柱来对CD衍生物进行分析。在配有荧光检测器 (FD-500, GTI/Spectro Vision, Groton Technology, Inc.) 的使用C-18反相柱 (HIRPB-4438, 4.6x150mm, Richard Scientific) 的HPLC系统上对CPT、CPT衍生物和聚合

物-CPT 衍合物进行分析(用磷酸钾缓冲液(pH 4.1)和乙腈进行梯度洗脱)。荧光检测器的激发和发射波长分别设定在370nm和440nm上。

[0410] 实施例1:联苯-4,4'-二磺酰基-A,D-封端的 β -环糊精,1 (Tabushi等人, J. Am. Chem. Soc. 106, 5267-5270 (1984))

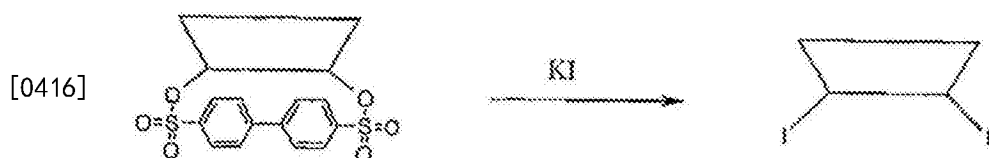
[0411] 流程XV



[0413] 向配有磁力搅拌棒、Schlenk适配器和隔膜的500mL圆底烧瓶中加入7.92g (6.98mmol) 干燥 β -环糊精和250mL无水吡啶 (Aldrich Chemical Company, Inc.)。将所得的溶液在氮气下在50℃进行搅拌,同时以15分钟的时间间隔将2.204g (6.28mmol) 联苯-4,4'-二磺酰氯分成四等份加入到其中。将其在50℃下再搅拌3小时后,真空除去溶剂并将残余物用反相色谱进行处理,用0-40%的乙腈水溶液进行梯度洗脱。用高效液相色谱 (HPLC) 对这些级分进行分析并将适宜的级分合并。在用旋转蒸发器除去大量乙腈后,将所得的水性混悬液冷冻干燥至干燥。得到3.39g (38%) 无色固体形式的1。

[0414] 实施例2:6^A,6^D-二碘-6^A,6^D-二脱氧- β -环糊精,2 (Tabushi等人J. Am. Chem. 106, 4580-4584 (1984))

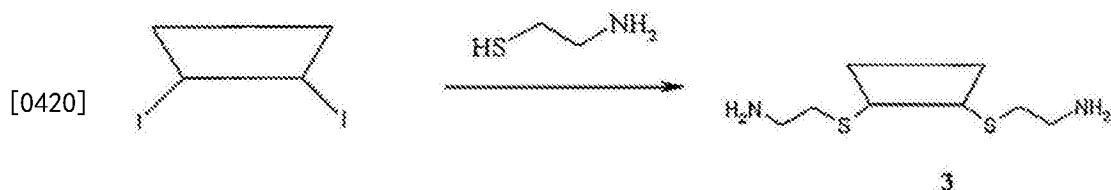
[0415] 流程XVI



[0417] 向配有磁力搅拌棒、Schlenk适配器和隔膜的40mL离心管中加入1.02g (7.2mmol) 1、3.54g (21.3mmol) 粉状的干燥碘化钾 (Aldrich) 和15mL无水的N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) (Aldrich)。将所得的混悬液在80℃下在氮气下搅拌2小时。在冷却至室温后,通过过滤将固体分离出来并收集上清液。用第二份无水DMF对该固体沉淀进行洗涤并将上清液合并,然后将其真空干燥。然后,将残余物溶解于14mL水中并将其在冰浴上冷却,然后在迅速搅拌下向其中加入0.75mL (7.3mmol) 四氯乙烯 (Aldrich)。将沉淀出来的产物用中号玻璃漏斗过滤并用小份丙酮对其进行洗涤,然后将其在真空下用P₂O₅干燥14小时。得到0.90g (92%) 白色固体形式的2。

[0418] 实施例3:6^A,6^D-二-(2-氨基乙硫基)-6^A,6^D-二脱氧- β -环糊精,3 (Tabushi, I; Shimokawa, K; Fugita, K. Tetrahedron Lett. 1977, 1527-1530)

[0419] 流程XVII



[0421] 向配有磁力搅拌棒和隔膜的25mL Schlenk烧瓶中加入0.91mL (7.37mmol) 0.81M 2-氨基乙基硫醇钠的乙醇溶液。(Fieser, L.F.; Fieser, M. 有机合成的试剂; Wiley: 纽约, 1967; 第3卷, 265-266页)。将溶液蒸发至干并将固体重新溶解于5mL无水DMF (Aldrich) 中。向其中加入 $6^A, 6^D$ -二碘- $6^A, 6^D$ -二脱氧- β -环糊精(2) (100mg, 7.38×10^{-5} mol) 并将所得的混悬液在60℃下在氮气下搅拌2小时。在冷却至室温后, 将该溶液真空浓缩并将残余物重新溶解于水中。在用0.1N HCl酸化后, 将该溶液施加到Toyopearl SP-650M离子交换柱(NH_4^+ 型) 上并将产物用0至0.4M碳酸氢铵梯度洗脱。将适宜的级分合并并将其冷冻干燥至干燥。得到80mg (79%) 白色粉末形式的3。

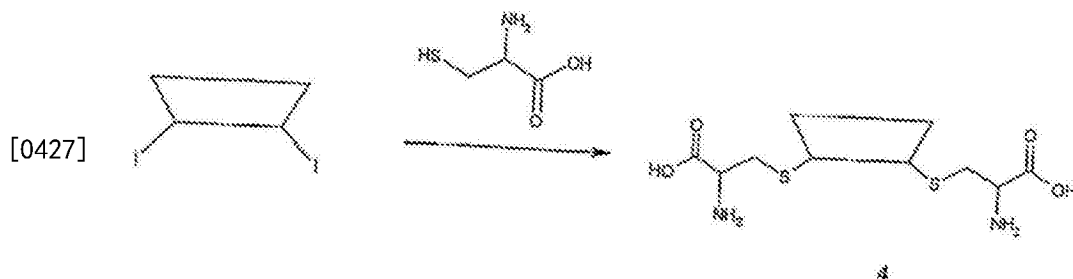
[0422] 合成二巯乙胺 β -CD3的另一种方法

[0423] 向在100mL脱气了的水中的4.69g (3.17mmol) 2的溶液中加入0.489g (6.34mmol) 新升华的巯乙胺。将该溶液在回流下搅拌2小时。在冷却至室温并用1N HCl酸化后, 将该溶液施加到Toyopearl SP-650M离子交换柱(NH_4^+ 型) 上并用0至0.2M碳酸氢铵对产物梯度洗脱。将适宜的级分合并并将其冷冻干燥至干燥。该方法得到1.87g (收率为39%) 白色固体。用TLC(硅胶, n-PrOH-AcOEt-H₂O-NH₃aq 5/3/3/1, 用茚三酮检测) 对该固体定性, 该固体表现出与3相一致的主要斑点。用PerSeptive Biosystems, Inc提供的2meter ELITE仪器记录基质辅助激光解吸/电离(MALDI) 飞行时间(TOF) 质谱。3的MALDI-TOF m/z: 计算值: 1252, 实测值: 1253.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1275.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1291.4 $[\text{M}+\text{K}]^+$ 。

[0424] ^{13}C NMR (Bruker 500MHz, D₂O) δ ppm: 32.1 (S-CH₂) 和38.8 (CH₂-NH₂), 32.9 (与S毗邻的C6), 60.2 (与OH毗邻的C6), 70.8, 71.4, 72.5 (C2, C3, C5), 81.8 (C4), 101.7 (C1)。

[0425] 实施例4: $6^A, 6^D$ -二-(2-氨基-2-羧基乙硫基)- $6^A, 6^D$ -二脱氧- β -环糊精, 4 (CD-BisCys)

[0426] 流程XVIII

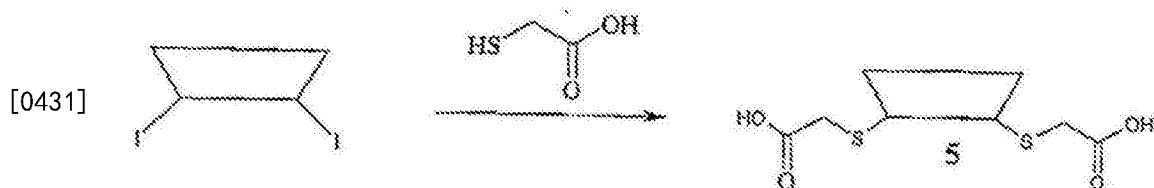


[0428] 将167mL 0.1M碳酸钠缓冲液在配有磁力搅拌棒、冷凝器和隔膜的500mL双颈圆底烧瓶中脱气45分钟。向该溶液中加入1.96g (16.2mmol) L-半胱氨酸和10.0g (73.8mmol) 二碘, 脱氧- β -环糊精2。将所得的混悬液在回流温度下加热4.5小时直至该溶液变澄清(无色)。然后, 将该溶液冷却至室温并用1N HCl将其酸化至pH 3。通过缓慢加入丙酮(该溶液的3倍重量比) 使产物沉淀。得到9.0g 包含CD-二半胱氨酸(90.0%)、未反应的环糊精、CD-单-半胱氨酸和胱氨酸的粗品。将所得的固体用阴离子交换柱色谱(SuperQ650M, Tosoh Bioscience) 进行纯化, 用0-0.4M碳酸氢铵梯度洗脱。用HPLC对所有的级分进行分析。将所需的级分合并, 然后在真空下将溶剂减少至100mL。通过加入丙酮或甲醇(溶液的3倍重量比) 使终产物沉淀。以60-90%的收率得到4。 ^1H NMR (D₂O) δ 5.08 (m, 7H, CD-2-CH), 3.79-3.94 (m, 30H, CD-3, 4-CH, CD-CH₂, Cys-CH), 3.49-3.62 (m, 14H, CD-5, 6-CH), 2.2-3.30 (m, 4H, CyS-CH₂)。 ^{13}C NMR (D₂O) δ 172.3, 101.9, 83.9, 81.6, 81.5, 73.3, 72.2, 72.0, 60.7, 54.0, 34.0,

30.6。ESI/MS (m/z): 1342 $[M]^+$, 1364 $[M+Na]^+$ 。用HPLC来确定4的纯度。

[0429] 实施例5: 6^A, 6^D-二-(羧基甲硫基)-6^A, 6^D-二脱氧-β-环糊精, 5 (CDDM)

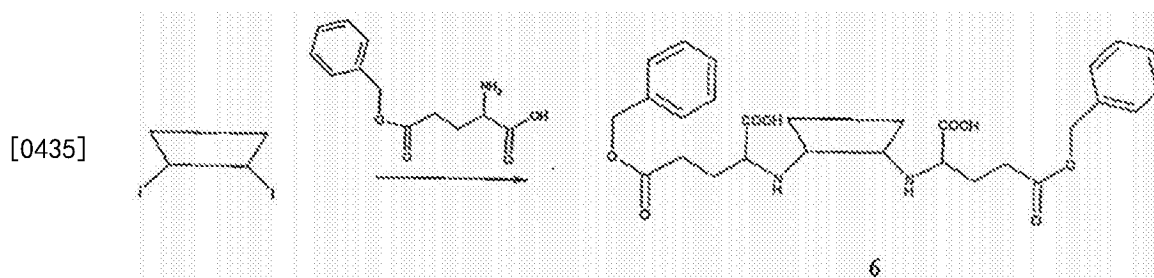
[0430] 流程IXI



[0432] 将50mL 0.1M碳酸钠溶液在配有磁力搅拌棒、冷凝器和隔膜的100mL3颈圆底烧瓶中脱气2小时。向该烧瓶中注射巯基乙酸(0.46mL, 6.64mmol)并用1N氢氧化钠将该溶液的pH调至9.3。向所得的溶液中加入3.00g (2.21mmol) 二-碘-β-环糊精2并将其在80℃下加热1小时。每隔一小时将该溶液的温度增加10℃直至其达到100℃。将其回流3小时后,将澄清无色的溶液冷却至室温并用1N HCl将其酸化至pH 3.5。通过缓慢加入丙酮(该溶液的3倍重量比)得到粗品。将所得的固体用阴离子交换柱色谱进行处理,用0-0.4M碳酸氢铵溶液梯度洗脱。得到1.8g (63.4%) 无色固体形式的5。ESI/MS (m/z): 1281 $[M]^-$ 。用HPLC来确定该化合物的纯度。

[0433] 实施例6: CD-二(谷氨酸-γ-苄酯) 6

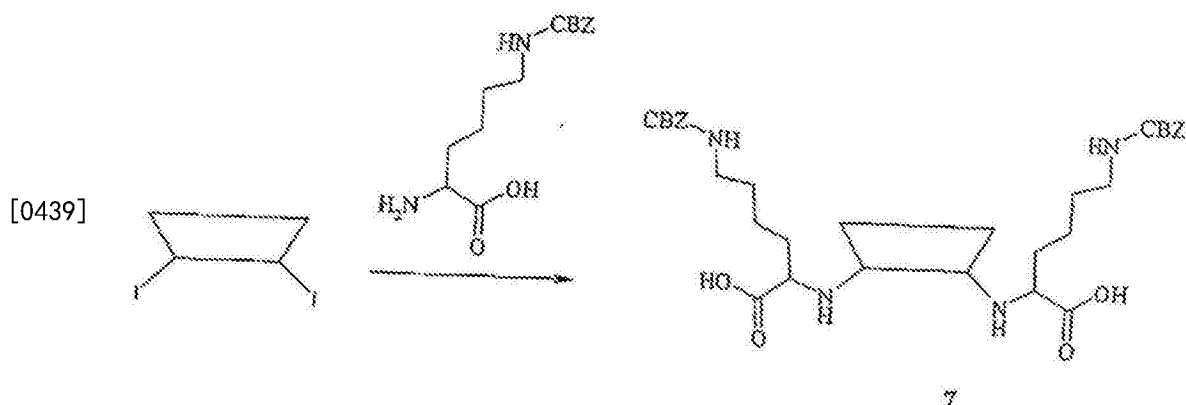
[0434] 流程XX



[0436] 向配有磁力搅拌棒和冷凝器以及隔膜的50mL圆底烧瓶中加入在5mL脱气了的0.1M碳酸氢钠溶液中的0.101g (0.425mmol) H-Glu(Obz1)-OH和0.15g (0.106mmol) 二-碘-β-环糊精2。将该溶液混合物在100℃下加热2小时。然后,将该溶液冷却至室温并酸化至pH 4,然后将其在MWCO 500膜中透析24小时。6的收率为0.142g (83.6%)。

[0437] 实施例7: CD-BiLys (Z) 7

[0438] 流程XXI

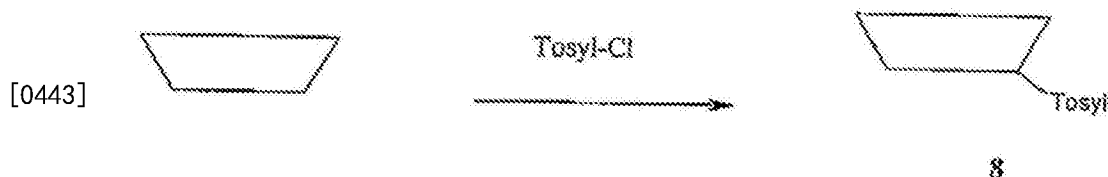


[0440] 向配有磁力搅拌棒和冷凝器以及隔膜的50mL圆底烧瓶中加入在5mL脱气了的0.1M

碳酸钠溶液中的0.124g (0.443mmol) H-赖氨酸 (Z)-OH和0.15g (0.111mmol) 二-碘-β-环糊精2。将该溶液混合物在100℃下加热4小时。然后将该溶液过滤并将滤液的pH调至8.5,然后将其在MWC0 500膜中透析24小时。7的收率为0.124g (68.9%)。

[0441] 实施例8:β-环糊精-甲苯磺酸酯,8的合成 (Melton,L.D.,和Slessor,K.N., Carbohydrate Research,18,29页 (1971))

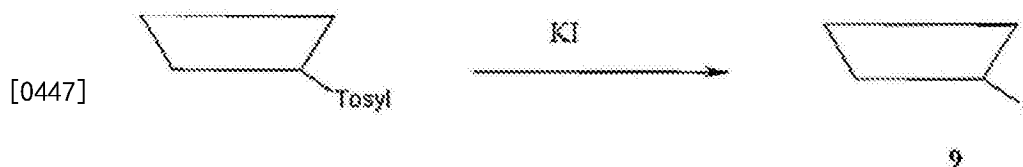
[0442] 流程XXII



[0444] 向配有磁力搅拌棒、真空适配器和隔膜的500mL圆底烧瓶中加入干燥β-环糊精 (8.530g,7.51mmol) 和200mL干燥吡啶的溶液。将该溶液冷却至0℃,然后向其中加入1.29g (6.76mmol) 甲苯磺酰氯。使所得的溶液加温至室温过夜。在真空下尽可能地除去吡啶。然后,将所得的残余物用40mL热水重结晶两次,得到7.54 (88%) 白色结晶固体8。

[0445] 实施例9:碘-β-环糊精,9的合成

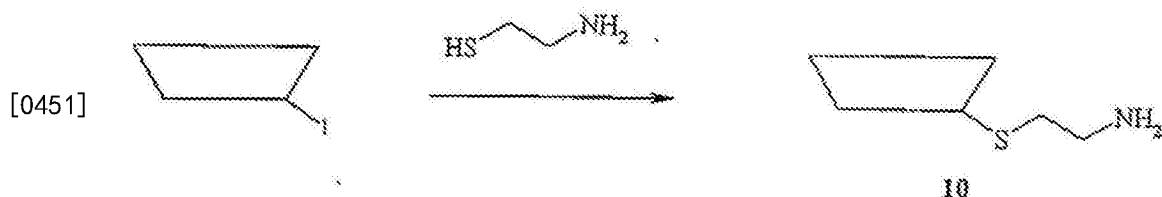
[0446] 流程XXIII



[0448] 向配有磁力搅拌棒和Schlenk适配器的圆底烧瓶中加入8、15当量碘化钾和DMF。将所得的混合物在80℃下加热3小时,其后使该反应冷却至室温。然后,将该混合物过滤以除去沉淀并将滤液蒸发至干燥,然后在0℃下将其重新溶解于水中。向其中加入四氯乙烯并将所得的浆液在0℃下剧烈搅拌20分钟。在中号玻璃漏斗上收集固体9,用丙酮研磨并将其与P₂O₅一起存放。

[0449] 实施例10:巯乙胺-β-环糊精,10的制备

[0450] 流程XXIV

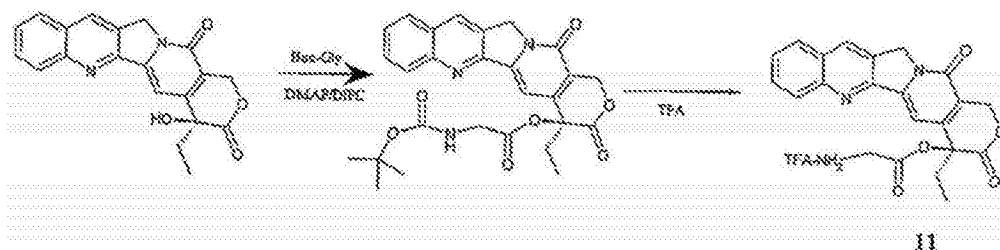


[0452] 向9在100mL进行了脱气的水中的溶液中加入1当量新升华的巯乙胺。将该溶液在回流下搅拌2小时。在冷却至室温并用1N HCl酸化后,将该溶液施加到Toyopearl SP-650M离子交换柱(NH₄⁺型)上并将产物用碳酸氢铵梯度洗脱。将适宜的级分合并并冷冻干燥至干燥,得到10。

[0453] 实施例11:Gly-CPT 11的合成 (Greenwald等人,Bioorg.Med.Chem.,1998,6,551-562)

[0454] 流程XXV

[0455]

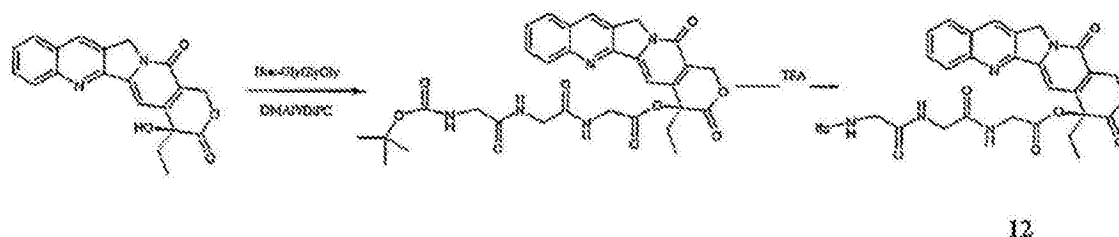


[0456] 在室温下将t-Boc-甘氨酸(0.9g, 4.7mmol)溶解于350mL无水二氯甲烷中,并在0℃下向该溶液中加入DIPC(0.75mL, 4.7mmol)、DMAP(382mg, 3.13mmol)和喜树碱(0.55g, 1.57mmol)。使该反应混合物加温至室温并将其在室温下放置16小时。将该溶液用0.1N HCl洗涤,干燥并减压蒸发,得到一种白色固体,将其用甲醇重结晶,得到t-Boc-甘氨酸的喜树碱-20-酯:¹HNMR(DMSO-d₆) 7.5-8.8(m), 7.3(s), 5.5(s), 5.3(s), 4(m), 2.1(m), 1.6(s), 1.3(d), 0.9(t)。将t-Boc-甘氨酸的喜树碱-20-酯(0.595g, 1.06mmol)溶解于二氯甲烷(7.5mL)和TFA(7.5mL)的混合物中并将其在室温下搅拌1小时。除去溶剂并将残余物用二氯甲烷和乙醚重结晶,得到0.45g 11。¹HNMR(DMSO-d₆) δ7.7-8.5(m), 7.2(s), 5.6(s), 5.4(s), 4.4(m), 2.2(m), 1.6(d), 1.0(t), ¹³CNMR(DMSO-d₆) δ168.6, 166.6, 156.5, 152.2, 147.9, 146.2, 144.3, 131.9, 130.6, 129.7, 128.8, 128.6, 128.0, 127.8, 119.0, 95.0, 77.6, 66.6, 50.5, 47.9, 30.2, 15.9, 7.9。ESI/MS(m/z) 预期值405;实测值406(M+H)。

[0457] 实施例12:GlyGlyGly-CPT 12的合成

[0458] 流程XXVI

[0459]



[0460] 在室温下将t-Boc-GlyGlyGly(1.359g, 4.7mmol)溶解于350mL无水二氯甲烷中并在0℃下向该溶液中加入DIPC(0.75mL, 4.7mmol)、DMAP(382mg, 3.13mmol)和喜树碱(0.55g, 1.57mmol)。使该反应混合物加温至室温并将其在室温下放置16小时。将该溶液用0.1N HCl洗涤,干燥并将其减压蒸发,得到一种白色固体,将其用甲醇重结晶,得到t-Boc-GlyGlyGly的喜树碱-20-酯:¹HNMR(DMSO-) δ8.40(s), 8.25(d), 7.91(d), 7.78(m), 7.65(t), 7.26(s), 7.05(br, s), 5.65(d), 5.40(d), 5.25(s), 5.10(br, s), 3.75-4.42(m), 2.15-2.35(m), 1.45(s), 0.95(t)。将t-Boc-GlyGlyGly的喜树碱-20-酯(1.5g, 1.06mmol)溶解于二氯甲烷(10mL)和TFA(10mL)的混合物中,并将其在室温下搅拌1小时。在真空下除去溶剂并将残余物重新溶解于二氯甲烷中。将该溶液倾倒入乙醚中,立即产生沉淀(黄色)。将沉淀滤出并用冷乙醚对其进行洗涤,得到1.31g 12。¹HNMR(DMSO-d₆) δ8.79(s), 7.75-8.61(m), 7.10(s), 5.55(s), 3.90-4.37(m), 3.86(s), 3.54(s), 2.11-2.23(m), 0.95(t)。ESI/MS(m/z) 预期值519;实测值520(M+H)。

[0461] CPT-肽酯键的稳定性

[0462] 在室温下将11和12溶解于PBS缓冲液(pH 7.4)中从而制得一种约500μg/mL的溶

液。将该溶液进一步用8.5% H_3PO_4 稀释至 $10\mu\text{g/mL}$ 。用配有 C_{18}RP (反相) 柱和荧光检测器的 HPLC 对水解速率进行分析, 用 50/50 (v/v) 乙腈/磷酸钾缓冲液 (pH 4.1) 进行洗脱。将 11 (或 12) 和所释放的 CPT (内酯形式) 的峰积分。酯键在水溶液中的稳定性是肽-长度依赖性的。因此, 可以通过调节肽长度来调节药物释放速率 (水解速率)。见图 2。

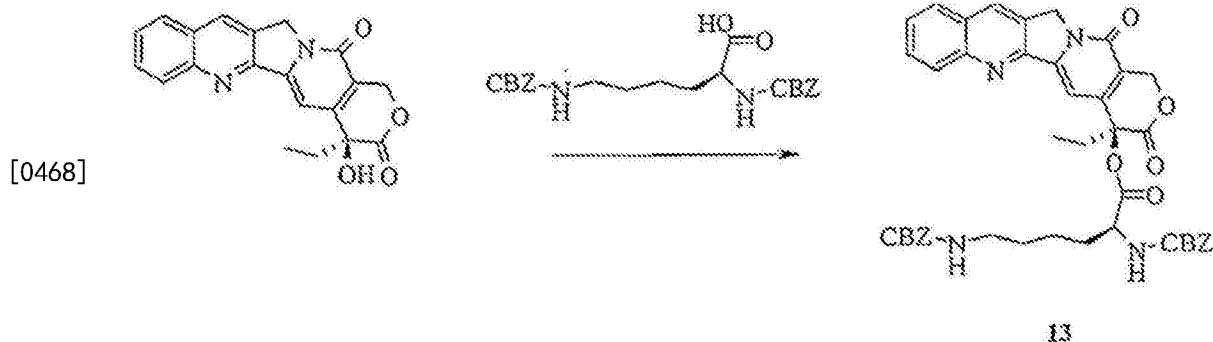
[0463] CPT、11 和 12 在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中的内酯稳定性

[0464] 将 CPT、11 或 12 以 1mg/mL 的浓度溶解于 DMSO 中, 然后用 PBS (1x, pH 7.4) 将其稀释至 $1\mu\text{g/mL}$ 。在室温下, 以所选择的时间间隔将 $30\mu\text{L}$ 该溶液注射到所说的 HPLC 中。对得自 CPT 的 CPT 内酯形式、11 或 12 的峰面积积分。

[0465] 在 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 中对 11、12 和 CPT 的内酯开环速率进行研究。对开环而言, 11 和 12 都十分稳定, 在整个研究过程中 (7 小时) 没有探测到 11 和 12 的羧酸盐形式。另一方面, 在相同的时间内, 60% 以上的 CPT 内酯形式转化成其羧酸盐形式。(见图 3)

[0466] 实施例 13: Lys (BisCBZ) -CPT 13 的合成

[0467] 流程 XXVII



[0469] 在室温下将 N,N-BisCBZ-赖氨酸 (311mg, 0.75mmol) 溶解于 56mL 无水二氯甲烷中。在 0°C 下, 向该溶液中加入 DIPC (0.12mL, 0.75mmol)、DMAP (0.61mg, 0.5mmol) 和喜树碱 (0.087g, 0.25mmol)。使该反应混合物加温至室温并将其在室温下放置 16 小时。将该溶液用 0.1N HCl 洗涤, 干燥, 减压蒸发, 得到一种浅黄色固体, 将其用甲醇重结晶, 得到 N,N-BisCBZ-Lys13 的喜树碱-20-酯。根据 TLC 和 HPLC 分析, 13 的纯度是令人满意的。

[0470] 13 在水溶液中水解很慢, 用配有 UV 检测器的 HPLC 检测不到其水解。不仅可以如实施例 12 所示那样通过调节肽的长度来调节 CPT-肽连接基酯键的水解速率, 而且还可以用直接与 CPT 的 20-OH 相连的不同的氨基酸来进行调节。

[0471] 也在 PBS 缓冲液中对 CPT 和 13 的内酯形式向羧酸盐形式的转化进行了研究。发现化合物 13 的内酯形式向羧酸盐形式的转化比游离 CPT 的转化慢得多, 表明可以通过在其 20 位上与 CPT 的 -OH 形成酯来稳定内酯形式 (药物活性形式)。(见图 4)

[0472] 实施例 14: Lys-Gly-CPT 14 的合成

[0473] 将 11 溶解于氯仿中。向其中加入 N,N-BiBoc-Lys-NHS (1.0 当量), 然后加入三乙胺 (1.0 当量)。将该混合物在室温下搅拌 16 小时并用水提取两次, 然后用 MgSO_4 干燥。在高真空下除去溶剂, 得到 N,N-BiBoc-Lys-Gly-CPT。向该化合物中加入等体积 CH_2Cl_2 和 TFA 的混合物并将其在室温下搅拌 1 小时。然后, 在真空下除去溶剂。将残余物重新溶解于 CHCl_3 中。向该溶液中加入乙醚以产生产物 14。将沉淀用乙醚洗涤数次, 然后将其真空干燥。将其用硅胶柱色谱纯化, 得到纯的 TFA 盐形式的 14。

[0474] 实施例15: Suc-Gly-CPT 15的合成

[0475] 将琥珀酸酐的溶液与在无水CHCl₃中的11 (1当量) 在存在催化量DMAP和DIEA (1当量) 的情况下进行混合。将该混合物在室温下搅拌24小时, 得到15。通过结晶将15纯化。

[0476] 实施例16: Glu-Suc-Gly-CPT 16的合成

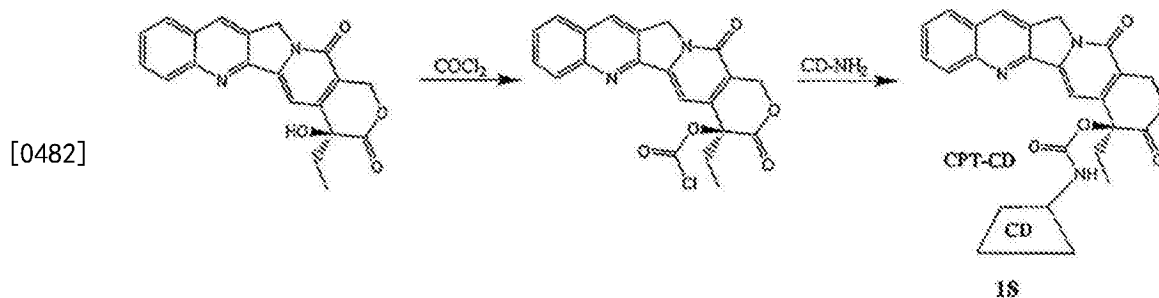
[0477] 用传统的DCC/NHS方法将15转化成其NHS酯。然后, 将该15的NHS酯与谷氨酸 (1.0当量) 在DMSO中在存在三乙胺的情况下进行反应。将该溶液加入到乙醚中以使16沉淀。通过结晶将16纯化。

[0478] 实施例17: Glu-Bis (GlyCPT) 17的合成

[0479] 将11和Boc-Glu (NHS) -NHS (0.4当量) 在CHCl₃中在氩气下混合, 然后向该混合物中加入三乙胺 (1当量)。将该溶液在室温下搅拌16小时, 然后用酸性水对其进行洗涤。将有机层干燥, 然后在真空下除去溶剂。将所得的化合物用硅胶柱色谱进行纯化。然后, 将该进行了纯化的化合物溶解于TFA和CH₂Cl₂的等体积混合物中。将该混合物在室温下搅拌1小时, 然后将其倾倒入乙醚中。将沉淀17用乙醚洗涤并将其在真空下干燥。

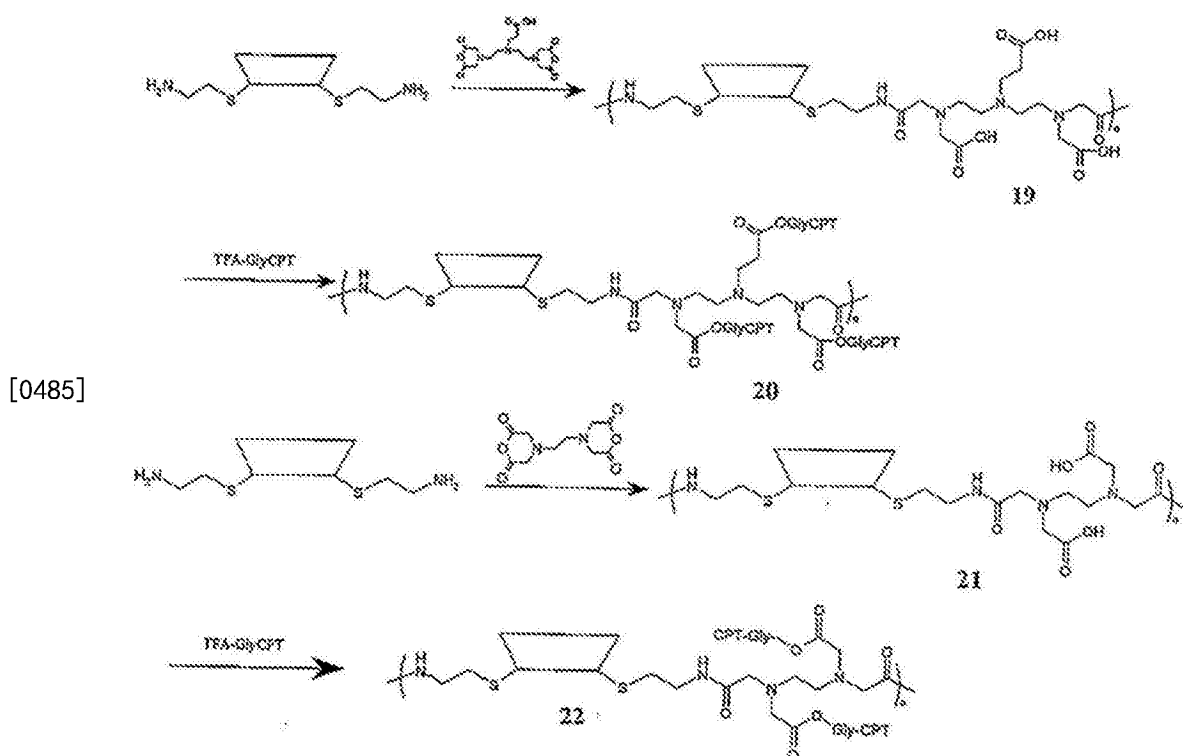
[0480] 实施例18环糊精-喜树碱18的合成

[0481] 流程XXVIII



[0483] 将CPT (197mg, 0.566mmol) 抽真空30分钟。在氩气下加入无水氯仿 (100mL)。在0℃下向其中加入光气 (1.34mL, 20%的甲苯溶液)。除去冰浴, 然后将该溶液加温至室温。两小时后, 在高真空下除去溶剂。向该残余物中加入无水DMSO (50mL), 然后加入200mg CD-NH₂ (Cyclodextrin Technology, Inc.) 和三乙胺 (4mL, 过量)。16小时后, 将该溶液倾倒入200mL乙醚中。将该沉淀用乙醚充分洗涤, 然后干燥。得到167mg黄色粉末 (18) (收率为62%)。18的TLC分析 (硅胶): R_f=0 (用CHCl₃/MeOH v/v=5/1展开)。CPT的TLC分析: R_f=0.65 (用CHCl₃/MeOH v/v=5/1展开)。在水中的溶解度: >10mg/mL。这表明当与环糊精分子共价连接时, CPT在水中的溶解度大大增加 (游离CPT在水中的溶解度<0.004mg/mL)。

[0484] 实施例19: CDDC-二酐共聚物19、21以及其CPT轭合物20、22的合成流程XXIX



[0486] A: 将乙二胺四乙酸二酐 (25.6mg, 0.1mmol) 和CDDC (3, 125.3mg, 0.1mmol) 溶解于2mL无水DMSO中。将该溶液在50℃下加热72小时。向该混合物中加入水, 然后加入1N NaOH使pH为大约12。将该聚合物在10,000MWC膜中透析24小时。在透析膜中观察到沉淀。除去固体并将剩余的溶液在10,000MWC膜中再透析24小时。在冷冻干燥后, 得到一种白色粉末19 (75mg)。

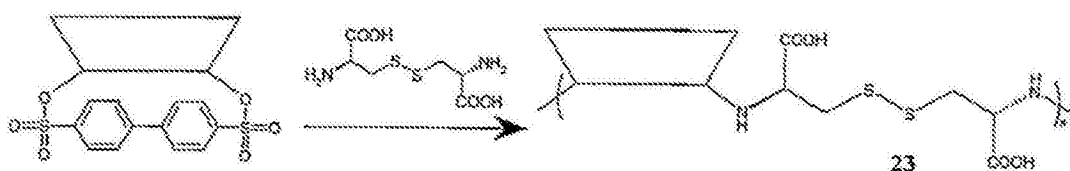
[0487] 向该聚合物 (19) /DMSO溶液中存在EDC (2当量)、NHS (1当量) 和DIEA (1.0当量) 的情况下加入11。将该溶液搅拌16小时, 然后将其倾倒入乙醚中。将该沉淀用CH₂Cl₂充分洗涤直至在洗涤溶液中观察不到游离药物。在将其在高真空下干燥后得到化合物20。

[0488] B: 将二亚乙基三胺五乙酸二酐 (8.5mg, 0.024mmol) 和CDDC, 3 (30mg, 0.024mmol) 溶解于1-甲基-2-吡啶酮 (2mL) 中。将该混合物在64℃下搅拌4天, 然后将其在10,000MWC膜中透析2天。在冷冻干燥后, 得到一种白色粉末21 (3mg)。

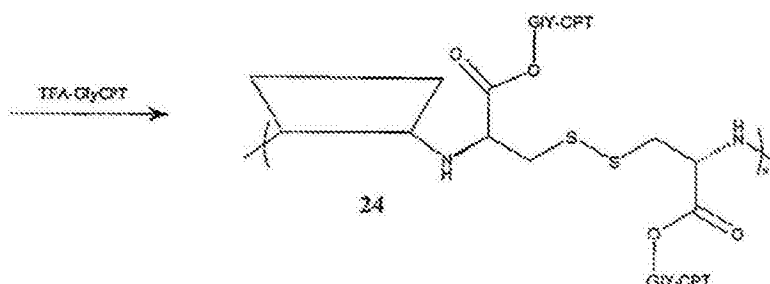
[0489] 向该聚合物 (21) /DMSO溶液中存在EDC (2当量)、NHS (1当量) 和DIEA (1.0当量) 的情况下加入11。将该溶液搅拌16小时, 然后使其在乙醚中沉淀。将该沉淀用CH₂Cl₂充分洗涤直至在洗涤液中观察不到游离药物。在将其在高真空下干燥后, 得到化合物22。

[0490] 实施例20: CCD-Cys共聚物23以及其CPT轭合物24的合成

[0491] 流程XXX



[0492]

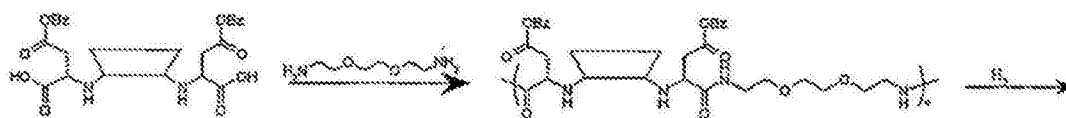


[0493] 将CCD 1 (141.3mg, 0.1mmol) 和胱氨酸 (24mg, 0.1mmol) 溶解于无水DMSO (0.3mL) 和吡啶 (0.1mL) 中。将该混合物在氩气下在72℃下搅拌过夜。向其中加入水 (10mL)。将沉淀滤出并将滤液在10,000MWC0膜 (Spectra/Por 7) 中透析48小时。得到一种白色粉末23 (8mg)。

[0494] 将11与23在DMSO中混合。向该溶液中加入EDC (2当量)、NHS (1当量) 和DIEA (1.0当量)。将该溶液搅拌16小时, 然后用乙醚使其沉淀。将该沉淀用CH₂Cl₂充分洗涤直至在洗涤溶液中观察不到游离药物。在将其在高真空下干燥后得到化合物24。

[0495] 实施例21: CD-BisGlu-二胺共聚物25以及其CPT轭合物26的合成

[0496] 流程XXXI



[0497]

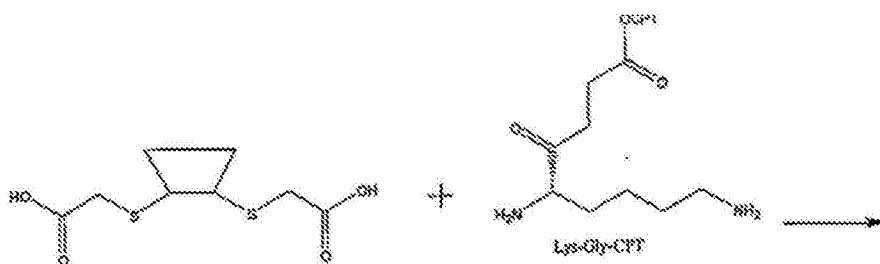


[0498] 将CD-二(谷氨酸-γ-苄酯)6和乙二醇二乙胺溶解于无水DMSO中。向该混合物中加入EDC (3当量) 和磺基-NHS (2当量)。将该溶液在室温下在氩气下搅拌2天。然后, 将该溶液转移到10,000MWC0透析膜中并将其透析48小时。在冷冻干燥后, 得到一种白色粉末。然后, 将该固体溶解于DMSO和甲醇溶剂混合物中并将其用H₂在存在10% Pd/C催化剂的情况下处理24小时。将该溶液倾倒入乙醚中以析出产物。在将其在高真空下干燥后, 得到25。

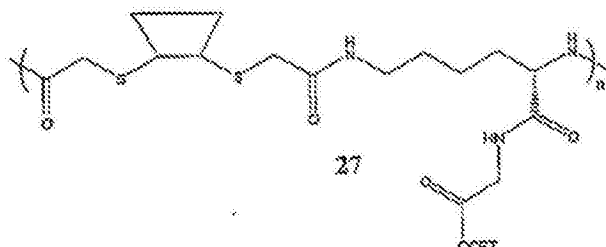
[0499] 将11与25在DMSO溶液中混合。向该溶液中加入EDC (2当量)、NHS (1当量) 和DIEA (1.0当量)。将该溶液搅拌16小时, 然后用乙醚使其沉淀。将该沉淀用CH₂Cl₂充分洗涤, 直至在洗涤溶液中观察不到游离药物。在将其在高真空下干燥后, 得到化合物26。

[0500] 实施例22: CDDM-Lys (GlyCPT) 聚合物27的合成

[0501] 流程XXXH



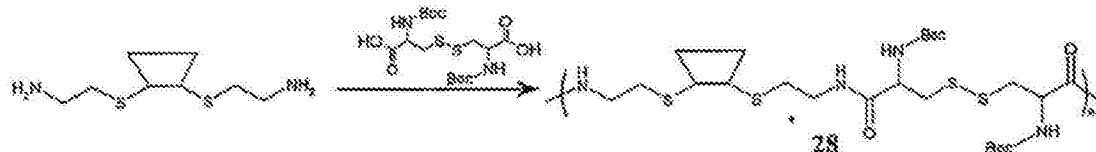
[0502]



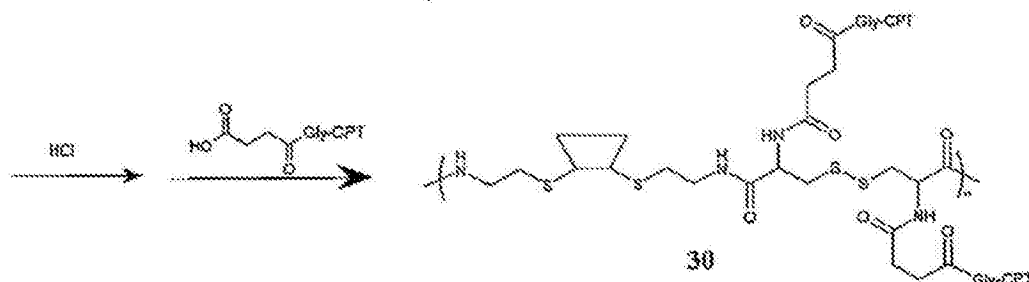
[0503] 将CDDM,5和Lys-Gly-CPT,14溶解于无水DMSO中。向该混合物中加入EDC (3当量) 和磺基-NHS (2当量)。将该溶液在氩气下在室温下搅拌2天。然后,将该溶液倾倒入乙醚中。将沉淀27在高真空下干燥。

[0504] 实施例23:CDDC-Cys (Boc) 共聚物28、CDDC-Cys共聚物29以及其CPT轭合物30的合成

[0505] 流程XXXIII



[0506]

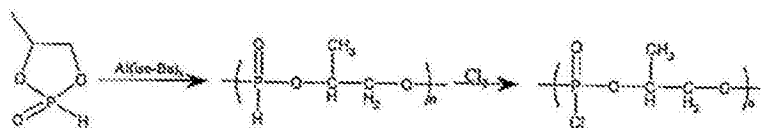


[0507] 将CDDC (3) 和N,N-BiBoc-胱氨酸溶解于无水DMSO中。将EDC (3当量) 和磺基-NHS (2当量) 加入到该混合物中。将该溶液室温下在氩气下搅拌2天。然后,将该溶液转移到10,000MWC0透析膜中并将其透析48小时。在冷冻干燥后,得到一种白色粉末CDDC-Cys (Boc) 聚合物28。向该白色粉末28中加入HCl和DMSO溶液的混合物。将该溶液在室温下搅拌1小时,然后再用水用10,000MWC0膜透析24小时。得到白色固体形式的29。

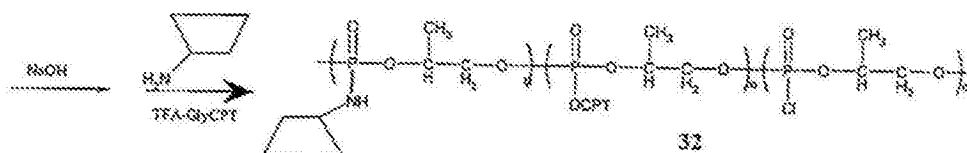
[0508] 将Suc-Gly-CPT 15与29在DMSO溶液中混合。向该溶液中加入EDC (2当量)、NHS (1当量) 和DIEA (1.0当量)。将该溶液在氩气下搅拌16小时,然后用乙醚使之沉淀。将该沉淀用乙醚洗涤,直至在洗涤溶液中观察不到游离药物。在将其在高真空下干燥后,得到化合物30。

[0509] 实施例24:可生物降解的CD-聚磷酸酯聚合物31以及其CPT轭合物32的合成

[0510] 流程XXXIV



[0511]

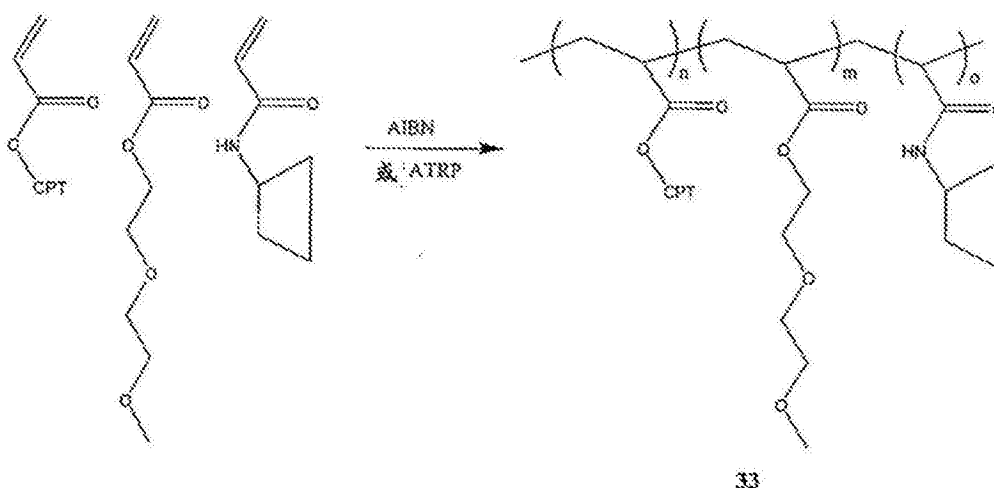


[0512] 该可生物降解的聚磷酸酯的合成可以参见Wang J等人, JACS, 2001, 123, 9480-9481。

[0513] 将聚磷酸酯与10 (0.5当量重复单元) 在DMSO中混合。向该溶液中加入EDC (2当量)、NHS (1当量) 和DIEA (1.0当量)。将该溶液搅拌16小时, 然后用乙醚使之沉淀。将所得的CD-聚磷酸酯31溶解于DMSO中。向该溶液中加入11 (0.5当量重复单元)、EDC (2当量)、NHS (1当量) 和DIEA (1.0当量)。将该溶液搅拌16小时, 然后用乙醚使之沉淀。将该沉淀用乙醚充分洗涤, 直至在洗涤溶液中观察不到游离药物。在将其在高真空下干燥后, 得到化合物32。

[0514] 实施例25: 通过自由基反应进行的具有聚乙烯主链的CD共聚物-CPT轭合物33的合成

[0515] 流程XXXV



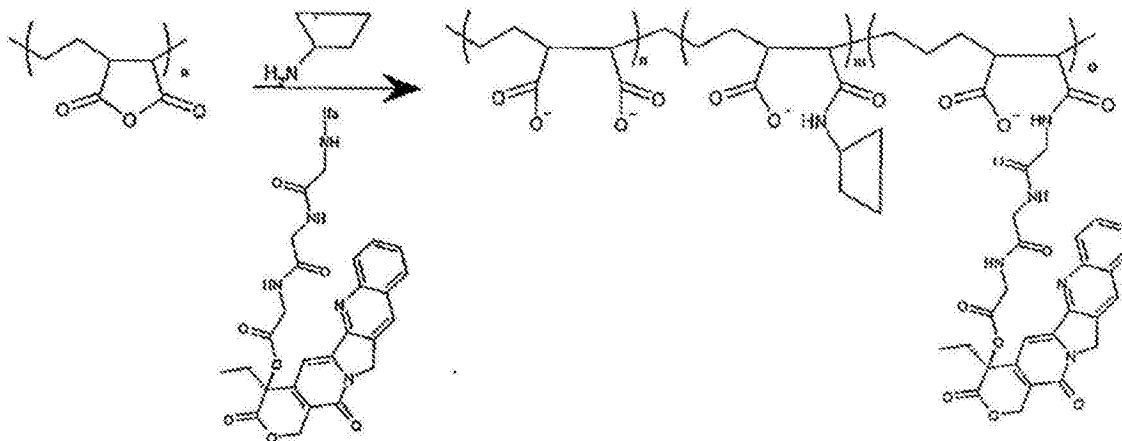
[0516]

[0517] CPT的丙烯酸酯单体、三甘醇单甲醚和CD-单肼胺可以由N-丙烯氧基琥珀酰亚胺 (Polysciences, Inc.) 来合成。将这些单体以1:1:1的比例在无水DMSO中进行混合。在氩气下向该混合物中加入AIBN。将该溶液在室温下搅拌24-48小时直至该溶液变粘。用乙醚使聚合物-CPT轭合物33沉淀并将其在真空下干燥。

[0518] 实施例26: CD-接枝-聚(乙烯-交替-马来酸酐)-GlyGlyGlyCPT 34的合成

[0519] 流程XXXVI

[0520]

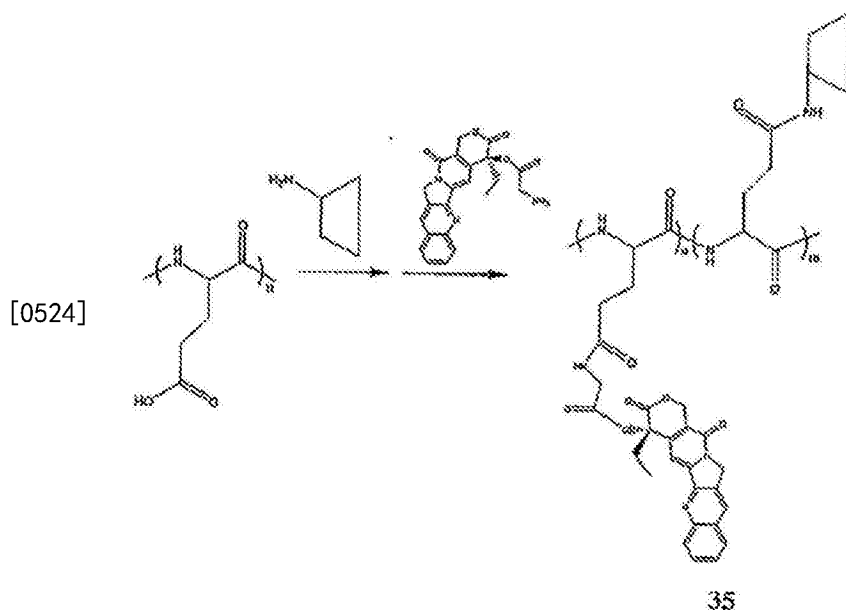


34

[0521] 将聚(乙烯-交替-马来酸酐) (Aldrich) 溶解于DMSO中。向其中加入10 (0.4当量重复单元) 和12 (0.4当量重复单元)。将该溶液在70℃下加热16小时,然后用乙醚使之沉淀。将得到的CD-接枝-聚(乙烯-交替-马来酸酐)-GlyGlyGlyCPT 34在高真空下干燥。

[0522] 实施例27:聚谷氨酸酯-CD-CPT轆合物35的合成

[0523] 流程XXXVII



33

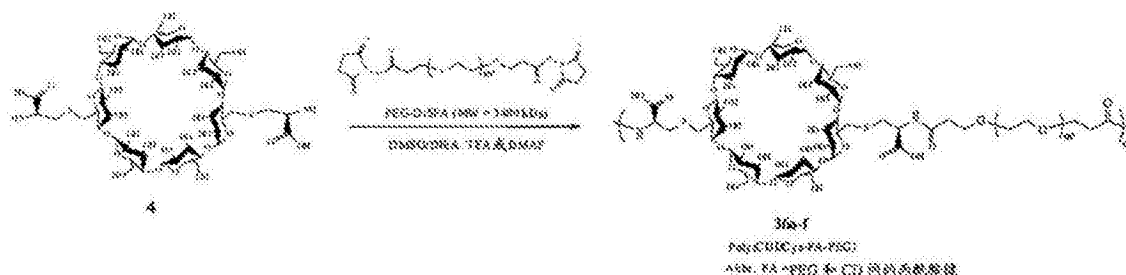
[0525] 将聚谷氨酸酯(得自Sigma-Aldrich)与10 (0.5当量重复单元)和11 (0.5当量重复单元)在DMSO中混合。向该溶液中加入EDC (3当量)、NHS (2当量)和DIEA (1.0当量)。将该溶液搅拌16小时,然后用乙醚使之沉淀。在将其在高真空下干燥后,得到聚谷氨酸酯-CD-CPT 轭合物35。

[0526] 实施例28:CD-BisCys-Peg3400共聚物36以及其CPT轭合物37的合成和特性描述

[0527] A.CD-BisCys-Peg3400共聚物36的合成和特性描述

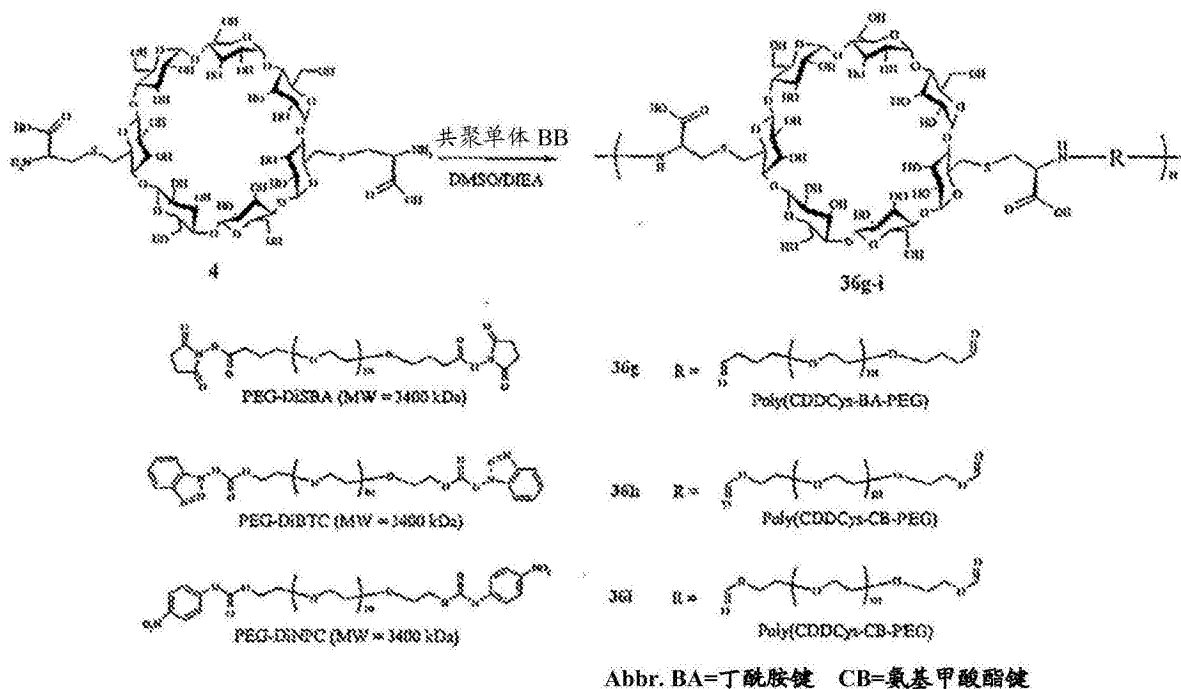
[0528] 流程XXXVIIIa

[0529]



[0530] 流程XXXVIIIb

[0531]



[0532] 聚(CDDCys-PA-PEG), 36a的合成

[0533] 将4(在用丙酮沉淀后, 63mg, 0.047mmol)和PEG-DiSPA (MW 3400, 160mg, 0.047mmol)在真空下干燥8小时。在氩气下向该混合物中加入无水DMSO (1.26mL)。在搅拌10分钟后,在氩气下向其中加入无水二异丙基乙胺(DIEA, 19μL, 2.3当量)。将该反应混合物在氩气下搅拌120小时。将包含聚合物的溶液用10,000MWC0膜(Spectra/Por 7)用水透析48小时,将其冷冻干燥,得到196mg 36a (90%, 表1)。M_w=57.4kDa, M_n=41.7kDa, M_w/M_n=1.38。¹HNMR (D₂O) δ5.08 (m, CD-2-H), 4.27 (m, Cys-CH), 2.72-3.76 (m, CD-3, 4, 5, 6-CH, CD-CH₂, PEG-CH₂), 2.44 (m, Cys-CH₂)。

[0534] 其它聚(CDDCys-PA-PEG) (36b-f)、聚(CDDCys-BA-PEG) (36g)、聚(CDDCys-CB-PEG) (36h-i)的合成在与36a相似的聚合反应条件下完成。聚合条件、单体选择、聚合物分子量、多分散性和收率的详细说明如表1所列。36g: ¹HNMR (D₂O) δ5.10 (m, CD-2-H), 4.25-4.37 (m, Cys-CH), 2.72-3.86 (m, CD-3, 4, 5, 6-CH, CD-CH₂, PEG-CH₂), 2.21 (m, Cys-CH₂)。36h-i: ¹H NMR (D₂O) δ5.05 (m, CD-2-H), 4.56 (m, Cys-CH), 2.70-3.93 (m, CD-3, 4, 5, 6-CH, CD-CH₂, PEG-CH₂), 2.38 (m, -OCH₂CH₂CH₂C(O)-NH-), 2.34 (m, Cys-CH₂), 1.90 (m, -OCH₂CH₂CH₂C(O)-NH-)。

[0535] 对于该聚合反应而言,必需加入一种非亲核性的有机碱(如DIEA),这是因为如果

不加入该碱的话,在48小时后观察不到该聚合反应溶液的粘度变化。当加入2.3当量DIEA时,在反应4-6小时后,该聚合反应溶液的粘度显著增加。DIEA将4的氨基去质子化,从而使其对与PEG-DiSPA的偶联而言亲核性更强。如果使用其它碱,如TEA或DMAP,在该聚合反应中基本没有差异(36b-c,表1)。使用通过两种不同的沉淀方法(丙酮和甲醇)回收的4的聚合反应产生了具有不同MW的聚合物。与由丙酮沉淀法(36a)获得的纯度较低的4相比,用甲醇沉淀法进行纯化的4(不包含游离胱氨酸)给出了更高MW的聚合物(36d-e)。4与PEG-DiSPA的聚合反应一般制备的聚合物收率高于90%。

[0536] 将4与其它活性单体如PEG-DiSBA、PEG-DiBTC和PEG-DiNPC聚合。4与PEG-DiSBA的反应给出了与36a-f具有相似键合(酰胺键,但是在该连接基上比36a-f多一个-CH₂)的M_w高于100kDa的聚合物36g,而4与PEG-DiBTC和PEG-DiNPC的反应分别产生了具有连接的氨基甲酸酯部分并且M_w' 高于50kDa的聚合物36h和36i(表1)。

[0537] 表1.4与双官能化的PEG的聚合反应

[0538]

CDP	PEG 共聚 单体	碱	聚合时间 (小时)	M _w (kDa)	M _n (kDa)	M _w /M _n	收率 (%)
36a ^a	PEG-DiSPA	DIEA	120	57.4	41.7	1.38	90
36b ^a	PEG-DiSPA	DMAP	120	54.2	38.1	1.42	91
36c ^a	PEG-DiSPA	TEA	120	57.4	42.6	1.35	91
36d ^b	PEG-DiSPA	DIEA	120	93.6	58.0	1.48	96
36e ^b	PEG-DiSPA	DIEA	144	97.3	58.0	1.67	94
36f ^b	PEG-DiSPA	DIEA	2	35.3	25.6	1.38	95
36g	PEG-DiSBA	DIEA	120	114.7	77.9	1.47	96
36h	PEG-DiBTC	DIEA	120	67.6	39.4	1.47	95
36i	PEG-DiNPC	DIEA	120	86.5	57.2	1.51	96

[0539] ^a在聚合反应前,将4用丙酮洗涤。

[0540] ^b在聚合反应前,将4用甲醇洗涤。

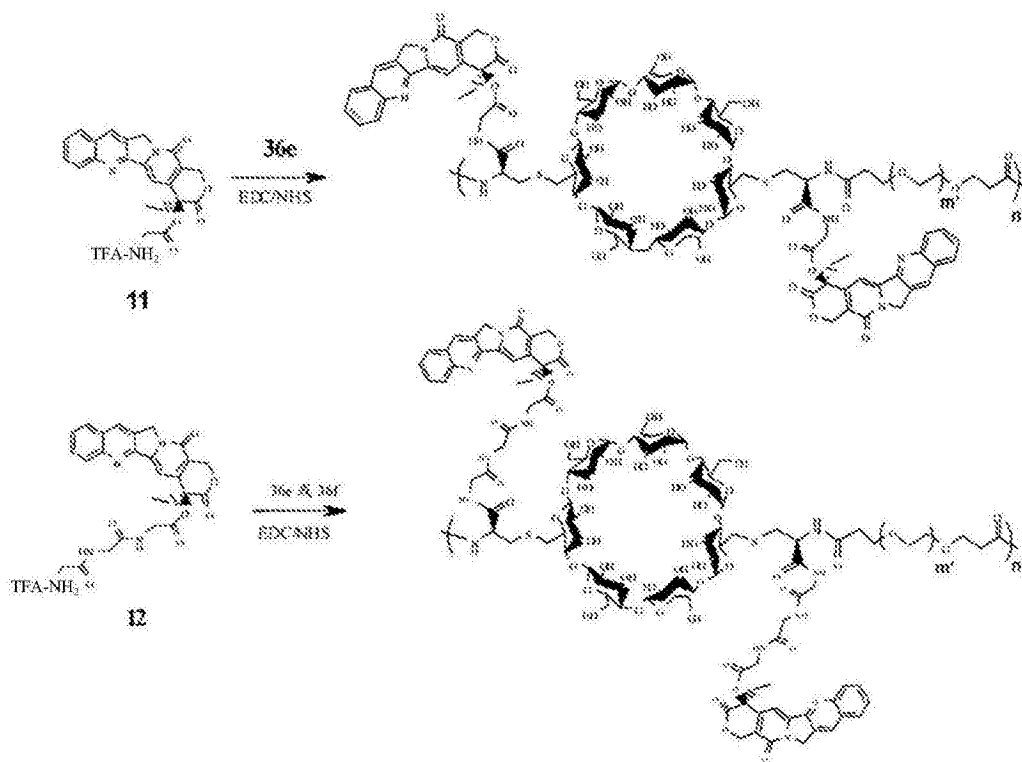
[0541] 聚合物36a-i在水溶液中高度溶解。其可容易地以至少200mg/mL的浓度溶解于水或磷酸盐缓冲的盐水(PBS)溶液中。由于其粘度高,所以不尝试这些聚合物在水溶液中浓度高于200mg/mL的溶解度。这些聚合物还可溶解于DMF、DMSO和甲醇中,微溶于CH₃CN和CHCl₃,但是不溶于THF和乙醚。

[0542] CD聚合物的分子量控制将4(在用甲醇沉淀后)(56.2mg,0.0419mmol)和PEG-SPA(147mg,0.0419mmol)在真空下干燥4-8小时。在氩气下向该混合物中加入无水DMSO(1.1mL)。在搅拌10分钟后,在氩气下向其中加入DIEA(16mL,2.2当量)。在所选择的时间(2小时、18小时、43小时、70小时、168小时和288小时)取出一部分聚合反应溶液(150μL)并用乙醚使其沉淀。如上所述那样测定沉淀出来的聚合物的MW。

[0543] 如图5a和5b所示,可以通过调节聚合反应时间来对分子量进行控制。

[0544] B. 聚(CDDCys-PA-PEG)-CPT轭合物(HGGG6-LGGG10-HG6-HGGG10)的合成。

[0545] 流程XXXIX



[0547] 聚(CDDCys-PA-PEG)-GlyGlyGly-CPT (HGGG6) 的合成

[0548] 将36e (1.37g, 0.30mmol的重复单元) 溶解于无水DMSO (136mL) 中。将该混合物搅拌10分钟。向该聚合物溶液中加入12 (419mg, 0.712mmol, 2.36当量)、DIEA (0.092mL, 0.712mmol, 2.36当量)、EDC (172mg, 0.903mmol, 3当量) 和NHS (76mg, 0.662mmol, 2.2当量) 并将其搅拌约15小时。将该聚合物用乙醚(1L) 沉淀。将乙醚倾倒出来并将沉淀用CH₃CN (3x 100mL) 洗涤。将该沉淀溶解于600mL水中。用0.2μm滤器将一些不溶性固体滤出。将该溶液用25,000MWC0膜 (Spectra/Por 7) 在10-15℃下在DI水中透析10小时。每60分换一次透析水。通过使其通过0.2μm滤器将该聚合物-药物轭合物溶液灭菌。将该溶液冷冻干燥, 得到一种黄色固体HGGG6 (1.42g, 收率为85%)。

[0549] 聚(CDDCys-PA-PEG)-GlyGlyGly-CPT (LGGG10) 的合成

[0550] 12与36f的轭合是以与用于制备HGGG6的方式相似的方式进行的, 只是该轭合物的透析是用10,000MWC0膜 (Spectra/Por 7) 而不是25,000MWC0膜进行的。LGGG10的收率为83%。

[0551] 聚(CDDCys-PA-PEG)-Gly-CPT (HG6) 的合成

[0552] 11与36e的轭合是用与制备HGGG6的方式相似的方式进行的。HG6的收率为83%。

[0553] 聚(CDDCys-PA-PEG)-GlyGlyGly-CPT (HGGG10) 的合成

[0554] 将36e (1.5g, 0.33mmol的重复单元) 溶解于无水DMSO (150mL) 中。将该混合物搅拌10分钟。向该聚合物溶液中加入12 (941mg, 1.49mmol, 4.5当量)、DIEA (0.258mL, 1.49mmol, 4.5当量)、EDC (283mg, 1.49mmol, 4.5当量) 和NHS (113mg, 0.99mmol, 3当量) 并将其搅拌约24小时。向该轭合物溶液中加入另一份EDC (142mg, 0.75mmol, 2.3当量) 和NHS (56mg, 0.5mmol, 1.5当量)。将该聚合物再搅拌22小时。该后处理过程是用与HGGG6的合成方法相同的方法进行的。HGGG10的收率为77%。

[0555] 该轭合物上CPT重量%的测定

[0556] 以10mg/mL的浓度制备HGGG6、LGGG10、HG6和HGGG10在DMSO中的储备液。用1N NaOH将相应储备液的等分试样稀释至100 μ g/mL。CPT在该碱性溶液中在室温下在2小时内完全水解并转化成其羧酸盐形式。用8.5% H₃PO₄将该溶液的等分试样稀释至10 μ g/mL,并将CPT羧酸盐形式转化成其内酯形式。将30 μ L该溶液注射到HPLC中。将CPT内酯形式的峰面积积分并将其与标准曲线进行比较。

[0557] 用常规的偶联方法将11和12轭合到36e或36f上(表2)。由于11和12的酯连接基在水溶液中不稳定,所以该轭合是在氩气下在无水DMSO中进行的。需要有机碱来将11和12的TFA盐去质子化以促进偶联。对于与12的聚合物轭合物而言,药物负载量的重量百分比(重量%)为约6-10%。使用MW为3400Da的PEG时理论上的最大药物负载量为约13%;通过降低PEG部分的MW可以增加这些最大值。所有轭合物在水或PBS中的溶解度都高于200mg/mL(对于6-10%的药物负载量而言,分别等于12-20mg CPT/mL)。对于HGGG6、LGGG10、HG6和HGGG10的详细情况被概括地列于表2中。

[0558] 表2. 聚合物-CPT轭合物的性质

[0559]

轭合物 ^a	母体聚合物的 M _w ($\times 10^{-3}$)	M _w /M _n ^b	连接基	CPT(重量%)
HGGG6	97	1.7	三甘氨酸	6.1
LGGG10	35	1.6	三甘氨酸	10.2
HG6	97	1.7	三甘氨酸	6.8
HGGG10	97	1.7	三甘氨酸	9.6

[0560] ^a缩写:H=高M_w聚合物(97kDa),L=低M_w聚合物(35kDa),GGG=三甘氨酸连接基,G=甘氨酸连接基,6=约6重量%的药物负载量,10=约10%重量的药物负载量。

[0561] ^b用光散射技术(26)测得的聚合物多分散性

[0562] C.CPT从HGGG6和HG6的释放

[0563] CPT在PBS中的释放

[0564] 以1mg/mL的浓度制备在PBS(1x,pH 7.4)中的HGGG6和HG6。将该溶液100 μ L的等分试样转移到1.5mL Eppendorf管中并将其在37 $^{\circ}$ C下培养。以所选择的时间间隔将所培养的样品停止培养并将其储存在-80 $^{\circ}$ C下直至进行分析。用8.5% H₃PO₄在容量瓶中将各溶液稀释至5mL的总体积。将30 μ L该溶液注射到HPLC中。将CPT内酯形式的峰面积积分并将其与标准曲线进行比较。

[0565] 在包含乙酰胆碱酯酶(一种酯酶,100个单位/mL)的PBS中、在KH₂PO₄缓冲液(pH 6.1,0.1M)中和在包含组织蛋白酶B(一种半胱氨酸蛋白酶,200 μ M,在冰浴上在包含2mM DTT和1mM EDTA的该缓冲液中预活化30分钟)的KH₂PO₄缓冲液(pH 6.1,0.1M)中对CPT从HGGG6和HG6的释放进行分析,该分析是用与上面所描述的仅使用PBS时的方式相似的方式进行的。

[0566] CPT在人血浆中的释放

[0567] 用PBS(1x,pH 7.4)将HGGG6和HG6储备液的等分试样稀释至0.5mg/mL的终浓度。用

推荐量将该溶液加入到人血浆的冷冻干燥粉末以重构100%人血浆。将该溶液分成等体积(250 μ L)放到1.5mL的Eppendorf管中,在37℃下进行培养,并在所选择的时间点停止培养。将样品储存在-80℃下直至进行分析。用固相萃取柱将这些样品从血浆中分离出来。在加样前,将该固相萃取柱(Oasis HLB 1cc柱,得自Waters)先用1mL乙腈,然后用1mL 8.5% H_3PO_4 预处理。在加样前,将这些样品用等体积的8.5%的 H_3PO_4 酸化。在将被酸化的溶液装载到所说的柱上后,用3x 1mL水对柱床进行洗涤。用3x 1mL乙腈和磷酸钾缓冲液(pH 4.1)的溶液混合物(60/40v/v)对被释放的CPT和聚合物轭合物进行洗脱。在5mL容量瓶中将该洗脱液稀释至5mL的总体积。将30 μ L该溶液注射到HPLC中。将CPT内酯形式的峰面积积分并将其与标准曲线进行比较。

[0568] 在包含4%人血浆的PBS (PBS/重构的人血浆溶液=96/4 (v/v)) 中、在小鼠血浆中和在重构的人白蛋白 (PBS溶液) 中用与使用纯人血浆时的上述方式相似的方式来进行CPT从HGGG6和HG6的释放。

[0569] 在PBS (1x, pH 7.4) 中, CPT从HG6和HGGG6释放的半衰期($t_{1/2}$) 分别为59小时和32小时。在存在4%人血浆的情况下, 该半衰期分别降至25小时和22小时, 在100%人血浆 (“HP”) 中分别降至1.7小时和1.6小时, 并且在100%小鼠血浆 (“MP”) 中分别降至2.6小时和2.2小时。在存在白蛋白 (“Alb”) 或乙酰胆碱酯酶 (“Ac Cho”) 的情况下CPT从HG6和HGGG6的释放速率都与在PBS中的数量级相同。在含或不含有酶——组织蛋白酶B (在6.1的pH下有活性) 的pH低于PBS的缓冲溶液 (pH 6.1) 中, 在长达144小时的时间内从HG6和HGGG6释放了小于总轭合的CPT的50%的CPT (表3)。

[0570] 表3. CPT从HG6和HGGG6^a释放的半衰期 ($t_{1/2}$, 小时)

[0571]

轭合物	PBS ^b	4% HP ^c	HP ^d	MP ^e	Alb ^f	Ac Cho ^g	pH6.1 的 缓冲液 ^h	组织蛋白 B (pH 6.1) ⁱ
HG6	59	25	1.7	2.6	62	33	>144	>144
HGGG6	32	22	1.6	2.2	73	43	>144	>144

[0572] ^a $t_{1/2}$ 被定义为轭合的总CPT释放一半时的时间 (小时)。

[0573] 缩写: HP指的是人血浆, MP指的是小鼠血浆。

[0574] ^bpH 7.4 PBS 1x缓冲液。

[0575] ^c与PBS混合的重构的人血浆 (v/v=4/96)。

[0576] ^d重构的人血浆。

[0577] ^e新鲜的小鼠血浆

[0578] ^f在重构的人白蛋白PBS缓冲液中

[0579] ^g在存在乙酰胆碱酯酶的PBS溶液 (100个单位/mL) 中。

[0580] ^h pH 6.1的磷酸盐缓冲液 (0.1M)

[0581] ⁱ存在组织蛋白酶B的pH 6.1的磷酸盐缓冲液

[0582] CPT在不同pH溶液中的释放。

[0583] 将HGGG6和HG6在pH范围为酸性 (pH=1.2) 至碱性 (pH=13.1) 的缓冲液中制备为

1mg/mL的浓度并将其在37℃下培养24小时。用8.5% H_3PO_4 将各溶液的等分试样稀释至约100 μ g/mL。将30 μ L该溶液注射到HPLC中。将CPT内酯形式的峰面积积分并将其与标准曲线进行比较。

[0584] 水溶液的pH对CPT从HG6和HGGG6的释放速率有显著影响。图6说明了在pH范围为1.1至13.1的缓冲液中24小时后,在37℃下从HG6和HGGG6释放的CPT的量。因为在24小时内释放的CPT少于7%,所以HG6和HGGG6的甘氨酸基-CPT酯键在酸性pH(1.1至6.4)下十分稳定。

[0585] 通过MTT测定获得的 IC_{50}

[0586] 人卵巢癌A2780细胞系得自European Collection of Cell Cultures (Salisbury, Wiltshire, UK)。人结肠直肠癌HT29、人前列腺癌PC-3和人结肠腺癌LS174T细胞系得自American Type Culture Collection (Rockville, MD)。将这些细胞以5000个细胞/孔的浓度接种到96-孔板中并使之在5% CO_2 的潮湿气氛下,在包含10%胎牛血清的培养基中在37℃下生长24小时。将该培养基用以1nM至10 μ M CPT和36e(对于HGGG6和HG6而言为CPT当量)的浓度包含CPT、36e、HGGG6或HG6的新鲜培养基替代。在各浓度下,对每个板的三个孔进行处理。在72小时后,通过MTT测定来测量这些化合物对细胞生长的作用。除去培养基,将这些细胞用PBS清洗,以0.5mg/mL的浓度加入MTT溶液,并且将这些板在37℃下培养4小时。除去培养基并且将甲臯结晶溶解于DMSO中。用SPECTARFluor Plus板式读数器(Tecan, Durham, NC)在560nm下来测量吸收度。相对于未进行处理的细胞来计算细胞存活百分比,并且 IC_{50} 是由用剂量对细胞存活作的图来测得的。CPT、36e、HGGG6或HG6的 IC_{50} 数据如表4所列。

[0587] 表4. CPT、未轭合的聚合物36e和CPT轭合物HG6和HGGG6在各种细胞系中的 IC_{50}

[0588]

细胞系	36e (μ M)	CPT (μ M)	HG6 (μ M)	HGGG6 (μ M)
LS174T	>300	0.005	0.050	0.010
HT29	300	0.020	0.050	0.030
A2780	100	0.007	0.025	0.020
PC3	>300	0.075	0.25	0.15

[0589] 实施例29: 聚-CD-BisCys-Peg3400-Ala-CPT 37

[0590] 将36e (54mg, 0.012mmol重复单元) 溶解于无水DMSO (226mL) 中并将其搅拌10分钟。向该聚合物溶液中加入与11相似地制备的TFA-Ala-CPT (15mg, 0.028mmol, 2.36当量)、DIEA (4.88mL, 0.028mmol, 2.36当量)、DCC (24.52mg, 0.12mmol, 10当量) 和NHS (13.6mg, 0.12mmol, 10当量)。将该混合物搅拌约16小时。用乙醚 (40mL) 使该聚合物沉淀并用乙醚 (2x 30mL) 和 CH_3CN (2x 10mL) 对其进行洗涤。然后, 将其重新溶解于pH4的水溶液 (10mL) 中并在室温下将其用25,000MWC0膜透析48小时。然后, 使该溶液通过无菌的0.2 μ m滤器, 然后将其冷冻干燥, 得到37 (46mg, 85%)。在用碱使CPT从37释放后, 用配有荧光检测器的HPLC计算得到的药物负载重量百分比为5.5%。37中的游离CPT<1%。

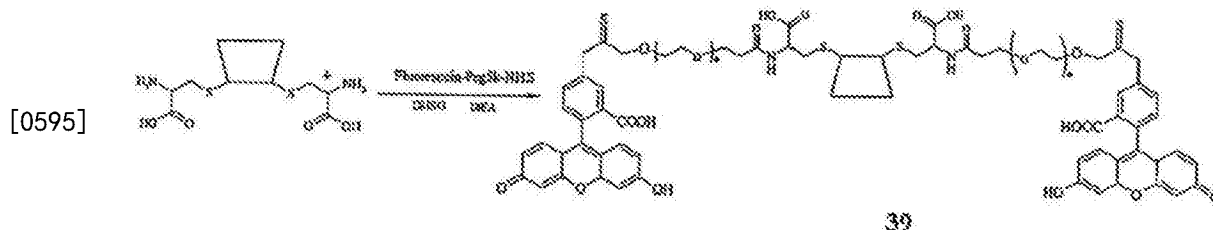
[0591] 实施例30: 聚-CD-BisCys-Peg3400-Leu-CPT 38

[0592] 将36e (54mg, 0.012mmol重复单元) 溶解于无水DMSO (226mL) 中并将其搅拌10分钟。

向该聚合物溶液中加入与11相似地制备的TFA-Leu-CPT (16mg, 0.028mmol, 2.36当量)、DIEA (4.88mL, 0.028mmol, 2.36当量)、DCC (24.52mg, 0.12mmol, 10当量) 和NHS (13.6mg, 0.12mmol, 10当量)。将该混合物搅拌约16小时。用乙醚(40mL)使该聚合物沉淀并用乙醚(2x 30mL)和CH₃CN(2x 10mL)对其进行洗涤。然后, 将其重新溶解于pH 4的水溶液(10mL)中并将其用25,000MWC0膜在室温下透析48小时。然后, 使该溶液通过一种无菌的0.2μm滤器, 然后将其冷冻干燥, 得到38 (42mg, 78%)。在用碱使CPT从38释放后, 用配有荧光检测器的HPLC计算得到的药物负载重量百分比为5.0%。38中的游离CPT<1%。

[0593] 实施例31: CD-BisCys-BisPeg-FITC 39的合成

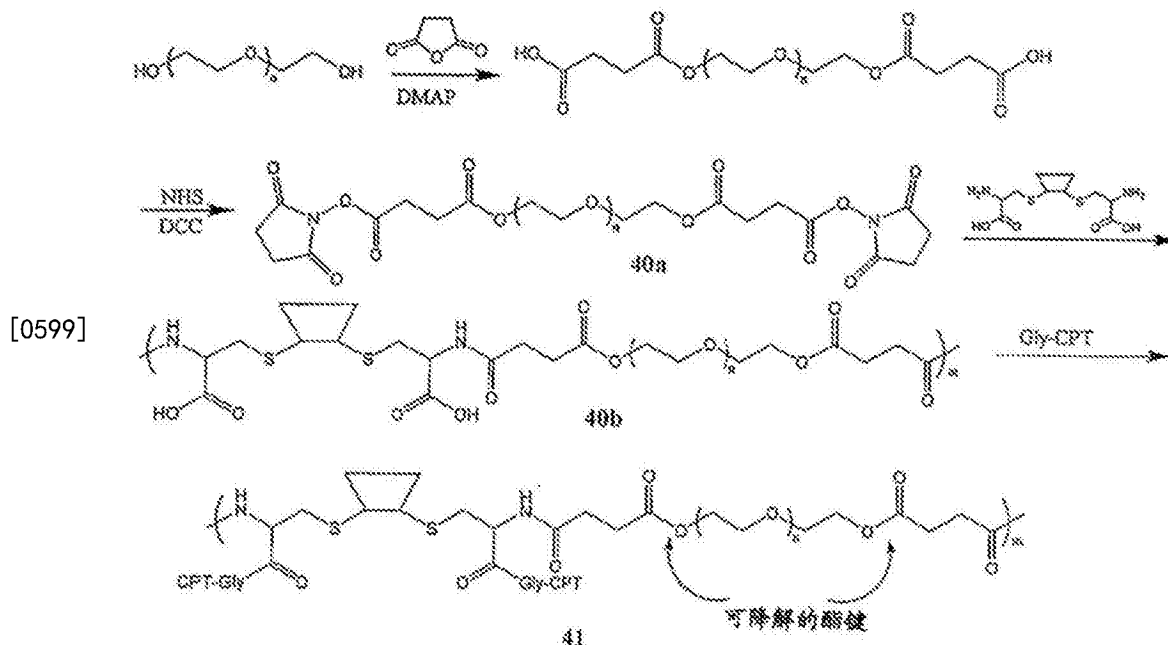
[0594] 流程XXXX



[0596] 将4 (25mg, 0.0186mmol) 和FITC-Peg5000-NHS (Shearwater, 186mg, 0.0373mmol) 溶解于无水DMSO (2mL) 中。向该混合物中加入DIEA (0.0094mL, 0.056mmol, 3当量)。将该混合物放置在黑暗中并搅拌24小时。然后向其中加入水 (10mL) 并将该溶液在黑暗中使用10,000MWC0透析约48小时。在冷冻干燥后, 得到一种黄色聚合物39。用MS和¹HNMR对该聚合物定性。

[0597] 实施例32: 二-琥珀酰亚胺基琥珀酸酯Peg3400 (二-SS-PEG) (40a) 和可生物降解的CD-BisCys-SS-Peg3400 (40b) 以及其CPT轭合物41的合成

[0598] 流程XXXXI



[0600] 向配有磁力搅拌棒和隔膜的100mL圆底烧瓶中加入10g (2.99mmol) 聚乙二醇 (Mw 3350)、2.0g (20mmol) 琥珀酸酐和50mL无水吡啶。将该溶液在50℃下搅拌16小时, 然后用旋转蒸发器除去溶剂。将残余物重新溶解于30mL水中并用10mL氯仿萃取三次。将有机层用MgSO₄干燥并过滤。然后, 将溶剂浓缩并使其在乙醚中沉淀。以90.6%的收率得到9.6g二-琥

琥珀酰亚胺基Peg3400。用反相高效液相色谱对产物进行分析。

[0601] 向配有磁力搅拌棒和隔膜的100mL圆底烧瓶中加入2g (0.56mmol) 二-琥珀酰亚胺基Peg3400和10mL无水二氯甲烷。向该溶液中加入0.324g (2.82mmol) N-羟基琥珀酰亚胺。然后,将该溶液混合物在冰浴上冷却并向其中加入0.58g (2.82mmol) 1,3-二环己基碳二亚胺。将其在室温下放置24小时后,将该溶液过滤并使之在150mL乙醚中沉淀。将用10mL二氯甲烷溶解和用乙醚沉淀的过程重复进行两次。得到1.74g (82.9%) Bis-SS-PEG 40a。用反相高效液相色谱对其进行分析。

[0602] CD-BisCys-SS-Peg3400聚合物40b

[0603] 向50-mL珍珠形烧瓶中加入100mg (0.0746mmol) 4和254mg (0.0746mmol) 40a。将合并的固体在真空下干燥24小时,然后加入1mL无水DMSO和2.2当量 (0.164mmol) DIEA。将该溶液混合物在室温下搅拌3天,然后使之在乙醚中沉淀。得到100% 40b。用配有AnsSpec RI检测器、Precision Detectors DLS检测器和Progel-TSK G3000PWL柱的Hitachi HPLC系统对分子量进行分析,用0.1M PBS作为洗脱剂以0.7mL · min⁻¹的流速洗脱。 $M_w=93,000$, $M_n=61,000$, $M_w/M_n=1.5$ 。

[0604] CD-BisCys-SS-Peg3400-GlyGlyGly-CPT轭合物41

[0605] 将40b (201.8mg, 0.044mmol重复单元)、TFA-GlyGlyGly-CPT 12 (66mg, 0.105mmol, 2.36当量)、EDC (25.5mg, 0.133mmol, 3当量) 和NHS (11mg, 0.0977mmol, 2.2当量) 溶解于无水DMSO (6mL) 中并搅拌30分钟。向该聚合物溶液中加入DIEA (19μL, 0.105mmol, 2.36当量)。将该混合物搅拌约41小时。用乙醚 (250mL) 使该聚合物沉淀并用乙腈 (3x 25mL) 对其进行洗涤。然后,将其重新溶解于pH 4的水 (10mg/mL) 中并用10,000MWCO膜在室温下透析24小时。然后,使该溶液通过无菌的0.2μm滤器,然后冷冻干燥,得到41 (128mg, 52%)。在用碱使CPT从41释放后,用配有荧光检测器的HPLC计算得到的药物负载量百分比为6.95%。

[0606] 在1mg/mL下在人血浆 (100%溶液) 中进行41的水解。将这些溶液的等分试样 (100μL) 放置在1.5mL的eppendorf管中并将其在37℃的水浴中进行培养。然后,将这些样品用100μL 8.5% H₃PO₄酸化并将其施加到进行了预处理的固相萃取柱上。用60:40 (v/v) 的乙腈:KH₂PO₄缓冲液进行洗脱。用乙腈/KH₂PO₄缓冲液在HPLC/荧光检测器上对游离CPT (内酯型) 进行分析。测得半衰期为3小时。

[0607] CD-BisCys-SS-Peg3400聚合物40b的降解

[0608] 用在PBS (pH 7.4) 溶液中重构的人血浆制备50mg/mL的40b溶液。将100μL等分试样在37℃下进行培养。在特定的时间点将各样品取出并使之在900μL冷甲醇中沉淀。将该溶液离心并用HPLC/ELS检测器对上清液进行分析。所得图谱如图7所示。

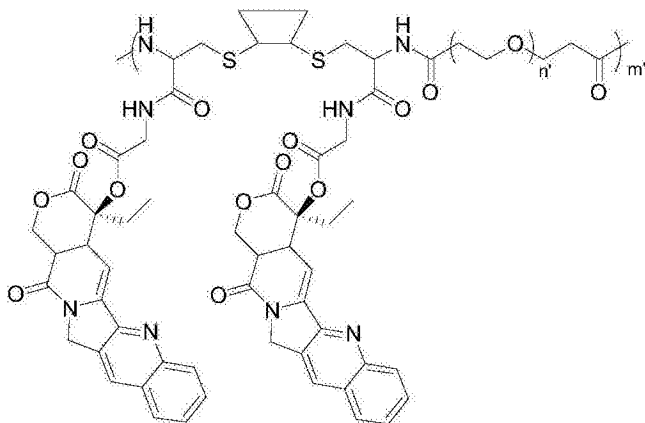
[0609] 用于增加药物负载量重量百分比的方法

[0610] 方法I. 具有短Peg键的CD-BisCys-Peg共聚物以及其GlyCPT轭合物的合成

[0611] 实施例33: CD-BisCys-Peg (短PEG, 例如, Peg200-Peg2000) 以及其CPT轭合物42的合成

[0612] 流程XXXXII

[0613]



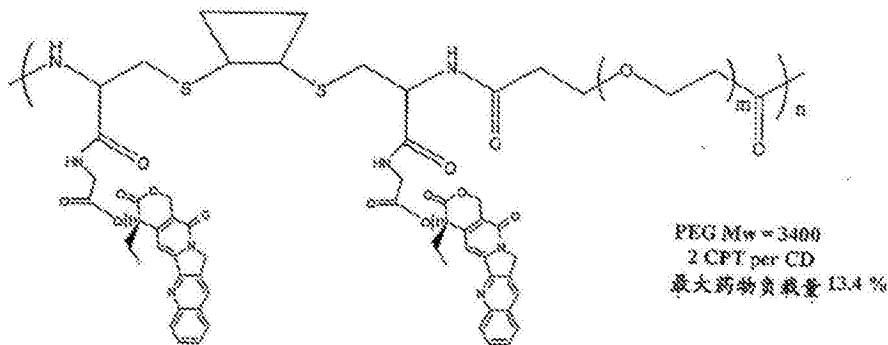
[0614] 其中 m' 是使聚合物的总分子量为10,000至500,000的整数, n' 是使形成的PEG部分是200-2000的整数

[0615] 聚合物和药物轭合物42的合成与实施例28中的36、37和38相同。

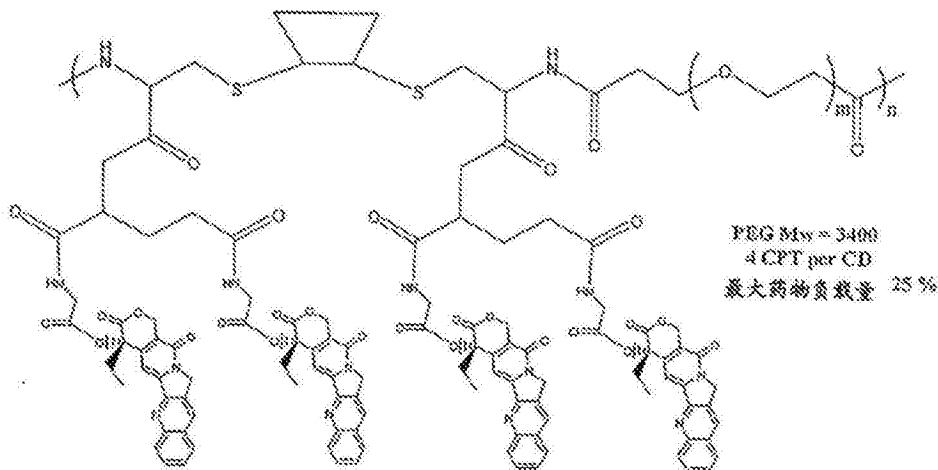
[0616] 方法II.在各负载部位上有多个药物分子的CD-BisCys-Peg共聚物的合成。

[0617] 实施例34:CD-BisCys-Peg以及其Glu二(GlyCPT)轭合物43的合成。

[0618] 流程XXXXIII



[0619]

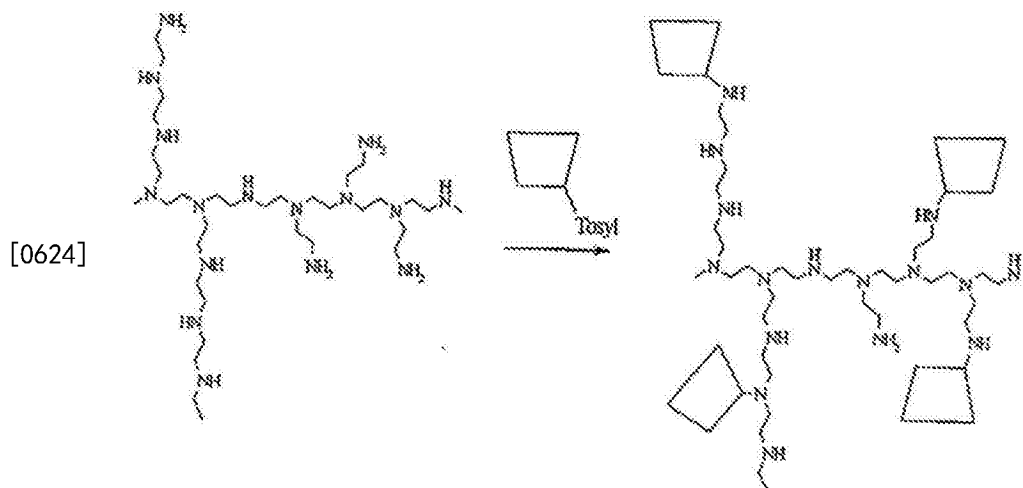


[0620] 将36和Glu-Bis(Gly-CPT) 17溶解于DMSO中。向该溶液中加入EDC (3当量)、NHS (2.2当量) 和DIEA (2.2当量)。用CH₃CN使CD-BisCys-Peg-Glu二(GlyCPT) 43沉淀并用相同的溶剂对其进行洗涤直至用UV或TLC检测不到游离药物。将43在高真空下干燥。

[0621] 实施例35:PEI-CD-CPT轭合物44(具有CPT轭合物的分支CD-聚合物)的合成

[0622] A:分支PEI-环糊精聚合物的合成

[0623] 流程XXXXIV

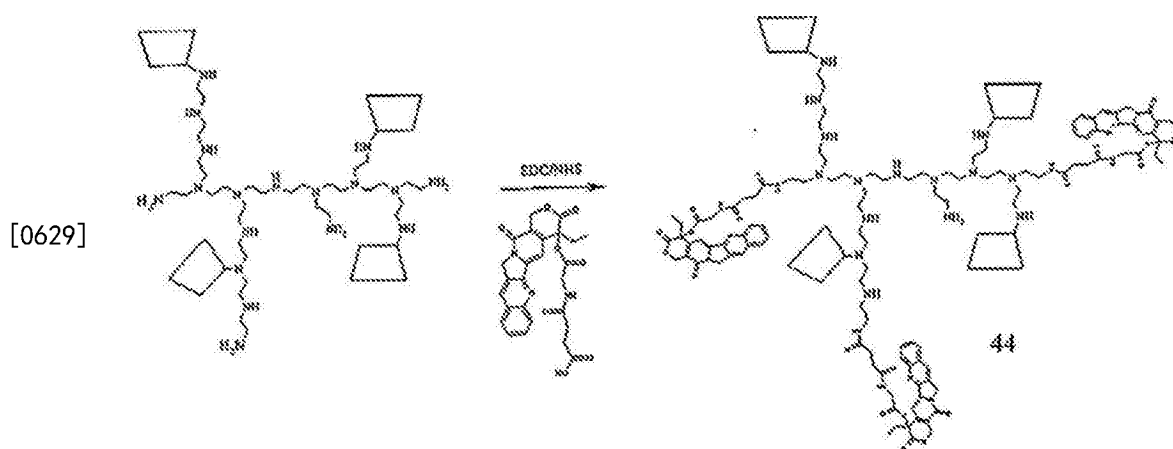


[0625] 将PEI (29mg, Aldrich Mw 25,000) 溶解于无水DMSO (2mL) 中。在N₂下向该溶液中加入环糊精单甲苯磺酸酯 (448mg, Cyclodextrin Technologies Development, Inc.)。将其在70℃下搅拌约1小时后, 该浑浊的溶液变澄清。在N₂下, 在该温度下48小时后, 该溶液略微变黄。

[0626] 将该溶液转移到Spectra/Por MWC0 10,000膜上并将其用水透析4天。然后, 通过冷冻干燥除去水。将该溶液冷冻干燥后, 得到一种白色粉末 (120-140mg)。根据¹HNMR的质子积分来计算环糊精/PEI比例。

[0627] B: 分支PEI-CD-CPT 轭合物的合成

[0628] 流程XXXXV

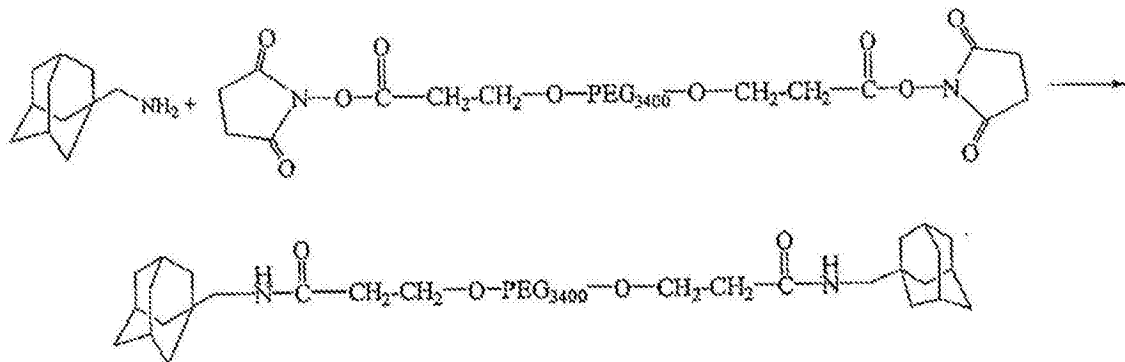


[0630] 将PEI-CD和Suc-Gly-CPT 15 (1.0当量) 溶解于DMSO中。向该溶液中加入EDC (3当量)、NHS (2.2当量) 和DIEA (1当量)。用乙醚使PEI-CD-Gly-CPT 44沉淀, 用该溶剂充分进行洗涤, 并将其在高真空下干燥。

[0631] 实施例36: Ad-PEG₃₄₀₀-Ad 45的合成

[0632] 流程XXXXVI

[0633]



45

[0634] 将240mg 1-氨基金刚烷 (1.60mmol, Aldrich) 和272mg PEG₃₄₀₀ (SPA)₂ (0.080mmol, Shearwater Polymers) 加入到配有搅拌棒的玻璃小瓶中。向其中加入5mL二氯甲烷, 将该溶液搅拌一整夜。第二天, 将该溶液过滤以除去该N-羟基琥珀酰亚胺副产物并在真空下除去二氯甲烷。将该残余物溶解于水中并离心以除去过量的1-氨基金刚烷。然后, 在Pierce's Slide-A-Lyzer中用MWC0=3500将该上清液透析一整夜。然后, 将该溶液冷冻干燥, 得到248mg白色绒毛状固体形式的Ad-PEG₃₄₀₀-Ad 45。

[0635] 实施例37: 二环糊精PEG 46的合成

[0636] 将362mg CD-NH₂ (0.32mmol, Cyclodextrin Technology, Inc.) 和436mg PEG₃₄₀₀ (SPA)₂ (0.128mmol, Shearwater Polymers) 加入到配有搅拌棒的玻璃小瓶中。向该小瓶中加入4.36mL DMSO, 并将该溶液搅拌72小时。将该溶液用2000MWC0膜在水中透析4天。在冷冻干燥后, 得到白色粉末形式的46 (603mg, 86%)。

[0637] 实施例38: 使用DiAD-Peg 45和DiCD-PEG 46进行的包合聚合物47的合成

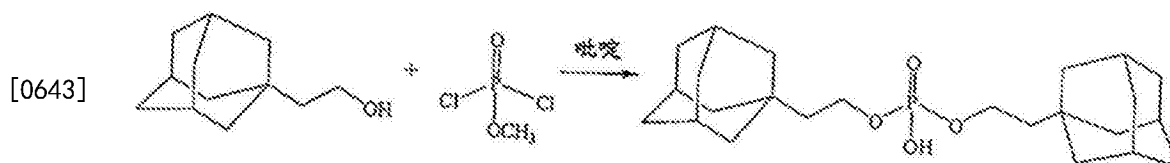
[0638] 将46 (54.6mg, 0.01mmol) 和45 (34mg, 0.01mmol) 在水 (0.27mL) 中混合并将其搅拌一整夜。该溶液十分粘。用醚使聚合物47沉淀出来并将其真空干燥。

[0639] 实施例39: DiCD-PEG 46和CPT-Di-AD化合物之间包合聚合物CPT-轭合物48的合成

[0640] 二金刚烷交联剂: 二-(2-(1-金刚烷基) 乙基) 磷酸酯的合成

[0641] (Zhang等人, J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 1676-1681)

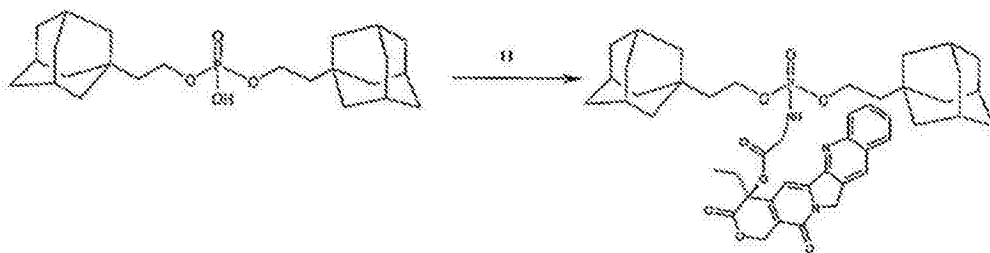
[0642] 流程XXXXVII



[0644] 将无水吡啶 (10mL, Aldrich, Milwaukee, WI) 在冰浴上冷却并向其中滴加二氯磷酸甲酯 (1.488g, 10mmol, Aldrich, Milwaukee, WI)。将该混合物保持冷却15分钟。在此期间, 形成N-甲基吡啶二氯磷酸盐沉淀。向其中加入1-金刚烷乙醇 (4.758g, 26.4mmol, Aldrich, Milwaukee, WI), 将密封的混合物在室温下搅拌一整夜。然后, 将其倾倒入10% NaHCO₃溶液 (50mL) 中并在真空下蒸发掉吡啶。将该略微发黄的固体溶解于1L水中并用乙醚对其进行萃取 (3x 150mL)。将水相用2N HCl酸化至pH 1, 然后用三份CHCl₃:n-BuOH (7:3) (每份150mL) 萃取。将所合并的有机层 (乙醚和CHCl₃:n-BuOH) 用水进行洗涤, 在该混合溶剂中形成一种

略带黄色的沉淀,此时在真空下蒸发掉溶剂。形成一种略带黄色的固体,用丙酮/己烷将其重结晶。将该固体真空干燥,收率为60%。

[0645] 流程XXXXVIII



[0646]

[0647] 将二-(2-(1-金刚烷基)乙基)磷酸酯和11在DMSO中混合。向该溶液中加入EDC(3当量)、NHS(2.2当量)和DIEA(1当量)。将该溶液在氩气下搅拌16小时。用乙醚使二-(2-(1-金刚烷基)乙基)磷酸酯-Gly-CPT沉淀,将其用该溶剂充分洗涤,将其在高真空下干燥。将该化合物和Di-CD-PEG 46在DMSO中混合从而形成包合聚合物-CPT轭合物48。

[0648] 实施例40:AD-Peg-叶酸酯49的合成

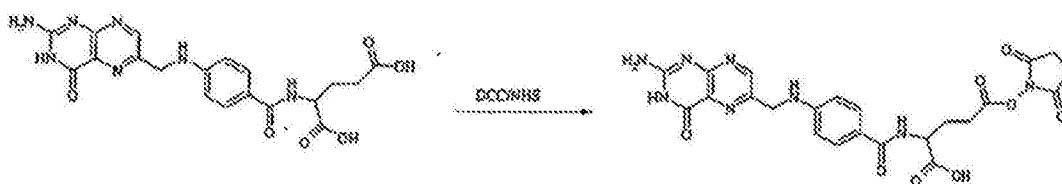
[0649] 下面是合成AD-Peg₅₀₀₀-叶酸酯的步骤。该方法适于合成任何客体分子-连接基-配体三组分分子。

[0650] 1.AD-Peg-NH₂的合成

[0651] 将266mg FMOC-PEG₅₀₀₀-NHS(78.2μmol, Shearwater Polymers, Huntsville AL)加入到配有磁力搅拌棒的玻璃小瓶中。然后,向其中加入10当量溶解于3mL二氯甲烷中的1-金刚烷-甲胺(1.5mmol, Aldrich)并将该溶液在室温下搅拌一整夜。在真空下除去溶剂并向剩余的溶液中加入水以使该PEG产物溶解。将该溶液在20K ref下离心10分钟,从而以更浓稠的液体形式将金刚烷-甲胺相分离出来。收集水性部分并在真空下除去水。将剩余的粘性液体重新溶解于20%哌啶的DMF溶液以将FMOC去保护并将其在室温下搅拌30分钟。在真空下除去溶剂,用DMF洗涤几次,将其重新溶解于水中,在阴离子交换柱上展开以除去未反应的PEG。收集第一级分并将其冷冻干燥,得到222mg白色绒毛状粉末形式的所需产物(收率为76%),通过MALDI-TOF分析确定了其是所需的产物。

[0652] 2.N-羟基琥珀酰亚胺-叶酸酯(NHS-叶酸酯)的合成

[0653] 流程XXXXIX



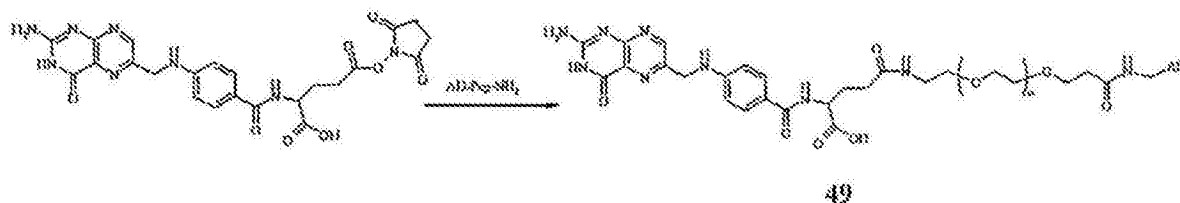
[0654]

[0655] NHS-叶酸酯是根据Lee和Low(Lee, R. J.; Low, P. S. J. Biol. Chem. 1994, 269, 3198-3204)的方法来合成的。将叶酸(5g, 11.3mmol; Sigma)溶解于DMSO(100mL)和三乙胺(2.5mL)中并使其与N-羟基琥珀酰亚胺(2.6g, 22.6mmol)和二环己基碳二亚胺(4.7g, 22.7mmol)在室温下反应一整夜。将该溶液过滤并使其在减压下浓缩。用乙醚使NHS-叶酸酯沉淀(黄色-橙色沉淀),并用无水乙醚将其洗涤2-3次,真空干燥并储存在-20℃下。

[0656] 3.AD-Peg₅₀₀₀-叶酸酯

[0657] 流程L

[0658]



[0659] 将AD-Peg₅₀₀₀-NH₂和NHS-叶酸酯以1:1当量在DMSO溶液中混合。向其中加入DIEA (2当量)。将该混合物在室温下搅拌一整夜。然后,将DMSO溶液用3500MWC0 (Spectra/Por 7) 膜透析48小时。在冷冻干燥后,得到AD-Peg₅₀₀₀-叶酸酯49。

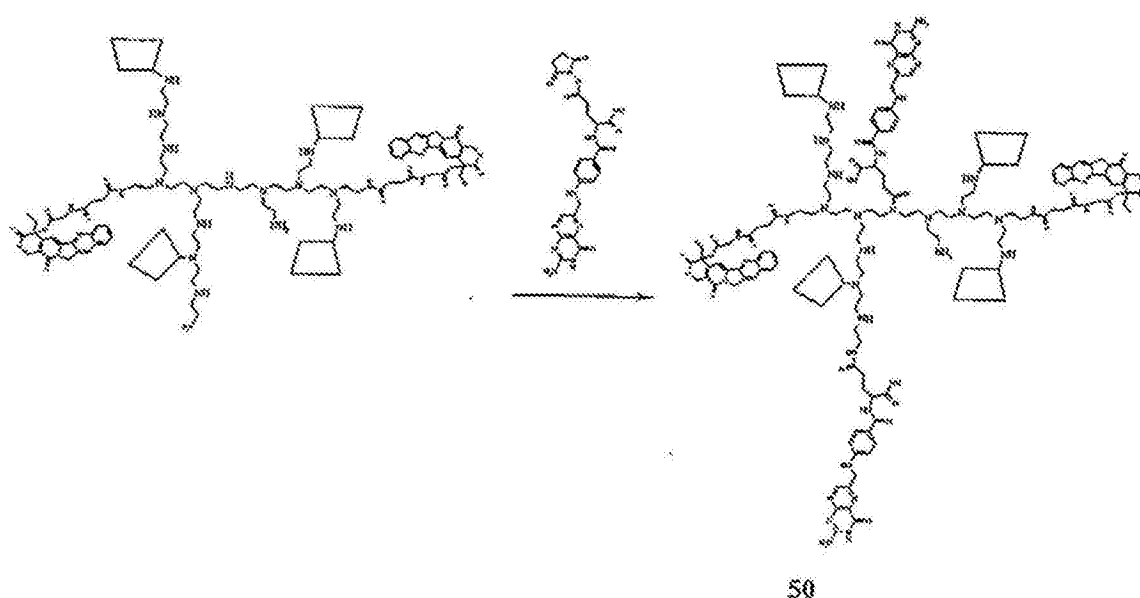
[0660] 实施例41:AD-Peg-叶酸酯和CD-聚合物-CPT轭合物的形成

[0661] 一种典型方法:将CD-聚合物CPT轭合物溶解于D5W缓冲液中。向该聚合物溶液中加入包含0.1-1当量(重复单元的摩尔数)AD-Peg-叶酸酯溶液的D5W溶液。在加入AD-Peg-叶酸酯前和加入后用光散射测定聚合物的粒度。将该溶液用于对叶酸酯靶向作用进行分析的体外或体内试验。

[0662] 实施例42:靶向配体(例如,叶酸酯)与CD-CPT聚合物轭合物(例如PEI-CD-GlyCPT)的共价连接50

[0663] 流程LI

[0664]



[0665] 将PEI-CD-GlyCPT 44和叶酸酯-NHS (0.1-0.5当量) 在DMSO中混合并将其搅拌24小时。用乙醚使该聚合物沉淀并用该溶剂将其充分洗涤直至检测不到游离叶酸酯分子。将所得的CD-聚合物-CPT-叶酸酯轭合物50真空干燥。

[0666] 实施例43:用Ad-Peg-Ad进行的CD-CPT聚合物的交联51

[0667] 一种典型方法:将AD-Peg-AD 45 (0.01-0.1当量的CD-聚合物重复单元) 和CD-聚合物CPT轭合物在最少量的DMSO中混合。用乙醚使所得的粘性溶液沉淀并将其在真空下干燥,得到轻微交联的聚合物51。51在溶液中仍然维持小粒度、具有良好的水溶性、并且具有高于母体CD-聚合物CPT轭合物的分子量。

[0668] 实施例44:喜树碱聚合物轭合物HGGG6、LGCG10、HG6和HGGG10 (根据实施例28进行

合成)的体内试验。

[0669] A.用母体聚合物36e给药进行的体内毒性和血液化学分析

[0670] 用雌性Charles River裸鼠(13-14周大)对36e的毒性以及其对血液化学的影响进行评估。将每组6只小鼠的4个治疗组在第1、5和9天分别通过尾静脉注射剂量为240mg/kg、160mg/kg、80mg/kg 36e的D5W溶液或仅注射D5W来进行处理。根据20g小鼠注射200 μ l的比例来确定给药体积,并且根据小鼠的实际体重适当地增加或减少。在前五天每天都记录小鼠的体重,然后每周测定两次。在第12天,在异氟烷麻醉下通过眼眶后取血由各小鼠采集血样(150-200 μ l)。在各组中用得自三只小鼠的血样来进行全血液计数(CBC)分析,同时对各组中得自剩余三只小鼠的血样进行处理以进行血液化学分析。在第23天终止该研究。通过在CO₂下心脏穿刺使所有的小鼠安乐死,收集得自各小鼠的血,按照与第12天相同的方式进行CBC和血液化学分析。

[0671] 在研究期间,在36e处理组和D5W对照组之间,在体重降低、CBC或血液化学数据方面都没有显著差异,并且对于所有治疗组而言,在23天内都没有观察到时间依赖性的作用。在最大处理剂量(240mg/kg)下,36e可以被小鼠良好耐受。

[0672] B.CDP-CPT轭合物最大耐受剂量(MTD)的测定。

[0673] 用雌性Charles River裸鼠(15-16周大)来测定HG6、LGGG10、HGGG10的MTD。在每次注射前,新制备该聚合物-CPT轭合物的5% (w/v) 葡萄糖溶液(D5W)。治疗组的剂量为2.25mg CPT/kg至54mg CPT/kg。给药是在第1、5和9天通过尾静脉注射来静脉内(i.v.)给药的。根据20g小鼠注射200 μ l的比例来确定给药体积,并且根据小鼠的实际体重(BW)来适当增加或减少。各治疗组使用三至五只小鼠。在前五天每天都记录小鼠的体重,然后每周测定两次。将MTD定义为使得平均组BW降低小于20%的最高给药剂量或不会使该组任何动物死亡的最高给药剂量。在表5中列出了所有治疗组的最大平均体重降低和与治疗有关的死亡。

[0674] 表5.MTD研究的剂量响应。通过尾静脉注射对裸鼠(n=3-6)进行静脉内处理。

	物质	mg/kg ^a	最大体重降低%; 天 ^b	N _{TR} /N ^c
	D5W	-	-2.5%; 第 3 天	0/6
	36e	240	-2.0%; 第 3 天	0/6
	36e	160	-3.5%; 第 13 天	0/6
	36e	80	-2.3%; 第 3 天	0/6
	LGGG10	54	-20.6%; 第 3 天	3/3
	LGGG10	36	-9.3%; 第 13 天	0/3
	LGGG10	18	0	0/3
	LGGG10	9	0	0/5
	LGGG10	4.5	-0.8%; 第 13 天	0/5
[0675]	HG6	54	-28.5%; 第 3 天	3/3
	HG6	36	-23.9%; 第 3 天	3/3
	HG6	18	-22.1%; 第 3 天	3/3
	HG6	9	-6.1%; 第 9 天	0/5
	HG6	4.5	-4.4%; 第 5 天	0/5
	HG6	2.25	-2.9%; 第 9 天	0/5
	HGGG10	54	---	3/3
	HGGG10	36	-34%; 第 5 天	3/3
	HGGG10	18	-16%; 第 3 天	1/3
	HGGG10	9	-3.3%; 第 9 天	0/5
	HGGG10	4.5	-2.5%; 第 9 天	0/5

[0676] ^a对于CDP聚合物而言为mg CDP/kg,对于三种受试轭合物而言为mg CPT/kg。

[0677] ^b注射后观察到的最大体重 (BW) 降低

[0678] ^c与治疗有关的死亡数 (N_{TR}) / 被治疗的小鼠数 (N)

[0679] 测得LGGG10、HG6和HGGG10的MTD分别为36mg CPT/kg、9mg CPT/kg和9mg CPT/kg。由于HGGG6和HGGG10之间的结构相似性,预期这两组的MTD相似。因此,推测HGGG6的MTD(没有进行试验)为9mg CPT/kg。

[0680] C. 抗肿瘤功效研究。

[0681] 用雌性Charles River裸鼠(15-16周大)来进行抗肿瘤功效研究。在给药前约14-18天,将人LS174T结肠癌组织片断(1mm³)皮下(s.c.)植入到各试验小鼠的右侧腹。通过用卡钳在两维上对肿瘤进行测量并用下面的公式进行计算来对肿瘤体积进行测定:肿瘤体积=(长×宽²)/2。假定1mm³等于1mg重的肿瘤,将肿瘤体积转化成肿瘤重量。当平均肿瘤大小达到约60-100mg时开始进行治疗(第1天)。将动物分成12组。各组包括肿瘤大小为62.5-144.0mg的7只小鼠,各组的平均肿瘤大小为88.6-90.7mg。根据表6所列的方案对各组中的小鼠进行处理。所有的轭合物治疗都是通过尾静脉注射来静脉内给药的。在实验期间,每周测量两次肿瘤大小。在研究结束时,从被安乐死的各小鼠采集肿瘤并将其冷冻在-80℃下。

[0682] 表6. 功效研究的给药方案^a

[0683]

组	物质	剂量(mg CPT/kg) ^b	途径 ^c	时间表 ^d
1	D5W	-	i.v.	Q4D x 3
2	CPT	9	i.p.	Q4D x 2 ^e
3	依替立康	100 ^f	i.p.	Qwk x 3
4	HGGG6	9	i.v.	Q4D x 3
5	HGGG6	4.5	i.v.	Q4D x 3
6	LGGG10	36	i.v.	Q4D x 3

[0684]

7	LGGG10	18	i.v.	Q4D x 3
8	LGGG10	9	i.v.	Q4D x 3
9	HG6	9	i.v.	Q4D x 3
10	HG6	4.5	i.v.	Q4D x 3
11	HGGG10	9	i.v.	Q4D x 3
12	HGGG10	4.5	i.v.	Q4D x 3

[0685] ^a各组使用7只小鼠[0686] ^b除第3组外,剂量是CPT的当量[0687] ^c i.p. = 腹膜内, i.v. = 静脉内[0688] ^d给药时间表被缩写为:Q4D x 3 = 四天注射三次, Qwk x 3 = 一周注射三次, 对于所有组而言, 在第1天开始给予第一个剂量[0689] ^e由于出现毒性, 没有按计划给予第三个剂量[0690] ^f 100mg伊立替康/kg

[0691] 当肿瘤重量达到预定的终点大小(1,500mg)时将各动物安乐死。由下面的方程计算各小鼠的时间-至-终点(TTE): $TTE = (\log(\text{终点} - b)) / m$, 其中b和m分别是通过将转化成log形式的肿瘤生长数据组(包含超过该研究终点体积的第一次观察和即将达到终点体积之前的三次连续观察)线性回归获得的直线的截距和斜率。没有达到终点的动物被指定为TTE值等于该研究的最后一天(114天)。被归类为与治疗有关的死亡(TR)的动物被指定为TTE值等于死亡的那一天。不计算被归类为与治疗无关的死亡(NTR)的动物的TTE。被定义为与对照组相比, 治疗组中至终点的时间中值(TTE)增加的肿瘤生长延迟(TGD)是一种用来评估治疗功效的研究参数。通过治疗组TTE中值和对照组TTE中值之间的差异来计算TGD ($TGD = T - C$)并用天数来进行表示, 并且将其表示为对照组TTE中值的百分比; $\%TGD = (T - C) / C$, 其中T等于治疗组的TTE中值, C等于对照组, 即第1组的TTE中值。

[0692] 毒性. 在第1-5天每天都对动物进行称重, 其后每周称重两次。经常对小鼠任何明显的与药物有关的不良作用进行检查。NCI将癌症药物在小鼠中可接受的毒性定义为研究期间一组的平均体重降低小于20%, 并且在7只被治疗动物中由于毒性而死亡的动物不多

于一只。

[0693] 在表7中概括地列出了包括TTE值中值、在第114天时肿瘤负荷的中值、治疗响应和死亡在内的该功效研究的结果。

[0694] 表7.

组	TTE 中值 ^a	T-C ^b	%TGD ^c	肿瘤负 荷中值 (mg) (N _s ^d)	N _{TR} ^e / N _{NTR} ^f / N _{EU} ^g	P vs D5W ^h	P vs CPT ⁱ
1	34.9	-	-	-(0)	0/1/6	-	-
2	51.4	16.5	47%	-(0)	2/0/5	0.2128	-
3	68.7	33.8	97%	1152 (3)	0/0/4	0.0002	0.0253
4	114.0	79.1	227%	256 (3)	1/0/1	0.0040	0.0115
[0695] 5	65.6	30.7	88%	566 (2)	0/1/4	0.0046	0.1369
6	100.0	65.1	187%	666 (3)	4/0/0	0.0272	0.0289
7	75.6	40.7	117%	221 (3)	0/0/4	0.0018	0.0601
8	63.2	28.3	81%	700 (1)	1/0/5	0.0006	0.1064
9	114.0	79.1	227%	394 (4)	0/0/3	0.0002	0.0028
10	74.2	39.3	113%	668(2)	1/1/3	0.0016	0.0673
11	114.0	79.1	227%	500 (5)	1/0/1	0.0040	0.0050
12	78.0	43.1	123%	1010 (2)	0/0/6	0.0006	0.0392

[0696] ^a TTE=至终点(1500mg)的时间(天数)

[0697] ^b T-C=治疗组与对照组TTE(天数)之间的差异

[0698] ^c TGD%=[(T-C)/C]

[0699] ^d小鼠存活

[0700] ^e N_{TR}=与治疗有关的死亡数

[0701] ^f N_{NTR}=与治疗无关的死亡数

[0702] ^g N_{EU}=在达到终点后安乐死的小鼠数

[0703] ^h对D5W治疗组(组1)的P值

[0704] ⁱ对CPT治疗组(组2)的P值

[0705] 在第72天时在用D5W进行处理的对照动物中观察到一个NTR死亡。在其它六个对照小鼠中的肿瘤生长至1500mg的终点大小,产生34.9天的TTE中值(表7)。

[0706] 对于9mg/kg的CPT而言,在第9天报道了两例与治疗有关的死亡。因此,必需考虑CPT在该实验中在这一剂量下是有毒的。相对于未进行处理的小鼠而言,这一组的TTE中值为51.4天,相当于16.5天的T-C和47%的TGD(不显著)。在第2组中,没有动物可以活到114天。

[0707] 第三组以100mg/kg(Qwk x 3)的剂量i.p.使用伊立替康。相对于对照小鼠而言,第

3组的TTE中值为68.7天,相当于有显著意义的33.8天的T-C和97%的TGD ($P<0.01$)。有三只动物存活到了第114天,肿瘤负荷中值为1,152mg。没有记录到肿瘤消退。

[0708] 第4组和第5组分别以9和4.5mg CPT/kg的剂量i.v.使用HGGG6 (Q4D x 3)。在第4组,在第16天观察到一例与治疗有关的死亡,在第5组中在第37天记录了一例NTR死亡。第4组的TTE中值为114天,其是该研究中可以获得的最大可能值。相对于对照而言,该值相当于具有显著意义的79.1天的T-C和227%的TGD ($P<0.01$)。第4组中有五只小鼠的肿瘤没有达到1,500mg的终点。这五只小鼠在第114天具有256mg的肿瘤负荷中值。第5组的TTE中值为65.6天,相对于对照而言,相当于有显著意义的30.7天的T-C和88%的TGD相一致 ($P<0.01$)。

[0709] 第6-8组分别用LGGG10以36、18和9mg CPT/kg的剂量i.v.处理 (Q4D x 3)。虽然在MTD研究中用该轭合物在36mg CPT/kg下在不荷瘤小鼠中没有观察到死亡 (表5),但是当以该剂量给予荷瘤小鼠时在第6组中记录了四例与治疗有关的死亡,在第16天两例,在第75和100天各一例。这些结果表明36mg CPT/kg可能超过了LGGG10的MTD。如表5所示,当以18mg CPT/kg的剂量对小鼠进行给药时在MTD研究中没有记录到显著的体重降低,表明该剂量低于该MTD。因此,LGGG10的MTD位于18至36mg CPT/kg之间的某处。第7组 (18mg CPT/kg)的TTE中值为75.6天。相对于对照小鼠而言,该TTE值相当于具有显著意义的40.7天的T-C和117%的TGD ($P<0.01$)。在第114天,该组中的三只小鼠具有221mg的肿瘤负荷中值。在第8组 (9mg CPT/kg)中在第103天记录了一例晚期的TR死亡。第8组的TTE中值为63.2天。相对于对照而言,该TTE值相当于具有显著意义的28.3天的T-C和81%的TGD ($P<0.01$)。在第114天,该小组剩余的小鼠的肿瘤负荷为700mg。

[0710] 第9组和第10组分别以9和4.5mg CPT/kg的剂量i.v.给予HG6 (Q4D x 3)。在第47和84天,在第10组中分别记录了一例TR和一例NTR死亡。第9组的TTE中值为最大值114天。相对于未进行处理的对照小鼠而言,该TTE值相当于具有显著意义的79.1天的T-C和227%的TGD ($P<0.01$)。在第114天,在第9组中,四只小鼠具有394mg的肿瘤负荷中值。第10组的TTE中值为74.2天。相对于对照小鼠而言,该TTE值相当于具有显著意义的39.3天的T-C和113%的TGD ($P<0.01$)。在第114天,第10组中剩余的两只小鼠具有668mg的肿瘤负荷中值。

[0711] 第11组和第12组分别以9和4.5mg CPT/kg的剂量i.v.给予HGGG10。在第11组中,在第16天记录了一例与治疗有关的死亡。第11组和第12组的TTE中值分别为114天和78天。相对于对照小鼠而言,第11组的TTE值相当于具有显著意义的79.1天的T-C和227%的TGD ($P<0.01$)。第11组中有五只小鼠的肿瘤没有达到终点;在第114天,这五只小鼠具有500mg的肿瘤负荷中值。相对于对照小鼠而言,第12组的TTE值相当于具有显著意义的43.1天的T-C和123%的TGD ($P<0.01$)。在第114天,该组中剩余的两只小鼠具有1,010mg的肿瘤负荷中值。

[0712] 对于DSW、CPT、伊立替康、其最高无毒试验剂量下 (18mg CPT/kg)的LGGG10以及在其MTD下的其它三种与高MW聚合物的轭合物 (HGGG6、HG6、HGGG10)而言,肿瘤生长与时间的关系曲线如图8所示。与D5W、CPT和伊立替康相比,以其MTD给药的三种高MW轭合物表现出更长时间的肿瘤生长抑制。图9所示的HGGG6、HG6和HGGG10的肿瘤生长中值曲线表明当以其MTD和其MTD的一半的剂量进行给药时,这三种聚合物有不同的剂量响应。如图10所述,各自以9mg CPT/kg的剂量给药的LGGG10和HGGG10的肿瘤生长中值曲线证明,当与低MW轭合物相比时,高MW聚合物-药物轭合物具有更高的抗肿瘤作用,推测其可能是由于累积增强 (EPR作用)和肾清除率降低导致的。

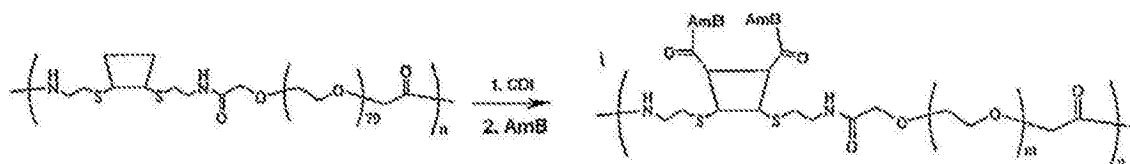
[0713] 小鼠的平均体重降低。用D5W、CPT、伊立替康和以其MTD给药的三种包含高MW聚合物的轭合物的平均体重(MBW)降低对时间作图(图11)。在第2组(CPT)中观察到的和在其MTD下给药的含有三甘氨酸连接基的两种轭合物(第4组和第11组)中观察到的最大MBW降低分别为13.1%、18.3%和12.6%。HG6(唯一带有一个甘氨酸连接基的轭合物)的最大MBW降低(3.4%)与所记录的伊立替康的最大MBW降低(5.0%)相似。所有其它治疗组和D5W组中记录的最大组平均体重降低可忽略不计(<5%)。在停止治疗后,所有治疗组的平均体重恢复到基准水平。

[0714] D. 安乐死小鼠的肿瘤大小和相应肿瘤中CPT浓度的相关性

[0715] 将在LS174t异种移植小鼠研究结束时由小鼠获得的各肿瘤解冻并将其放置到2mL溶胞管(Lysing Matrix D, Qbiogen)中。向各管中加入300μL溶胞试剂(Cellytic-MT Mommalian组织溶解/提取试剂)。将该组织在FastPrep FP12匀浆器(Qbiogen)中在5m/s下匀浆40秒。以10分钟的间隔将该匀浆重复连续匀浆六次。将该被匀浆的溶液在10℃下在14000g下离心15分钟。将90μL该溶液用注射器吸取出来并向其中加入10μL 1N NaOH。使该匀浆的溶液在室温下放置2小时后,向该溶液中加入400μL MeOH。将该溶液在14000g下离心15分钟。将上清液(270μL)与30μL 1N HCl混合并将其注射到HPLC中以进行分析。CPT浓度(ng/mg组织)与肿瘤大小(mg)的相关性如图12所示。CPT浓度与肿瘤大小反相相关。

[0716] 实施例45:通过酰胺连接基进行的聚(CDDC-PEG)-两性霉素B 52的合成流程LII

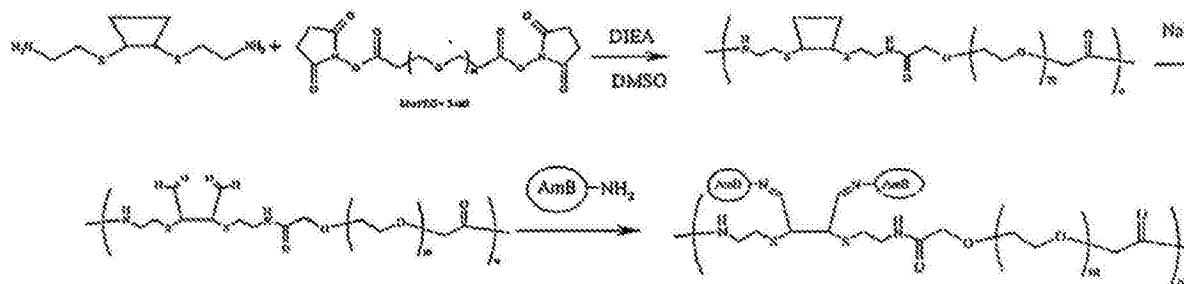
[0717]



[0718] 将聚(CDDC-PEG) (788mg) 和1,1'-羰基二咪唑(CDI, 1.45g, 50当量) 在无水DMSO (10mL) 中在存在DMAP (429mg, 20当量) 的情况下搅拌16小时。向该混合物中加入乙醚(200mL) 从而使得聚(CDDC-PEG)-羰基-咪唑沉淀。将所得的黄色固体用乙醚2 x 200mL洗涤并将其在真空下干燥。将该固体溶解于无水DMSO (15mL) 中, 然后加入AmB (332mg, 2当量) 和DMAP (43.0mg, 2当量)。将该溶液在黑暗中搅拌48小时并用25000MWC膜在水中透析3天。然后, 将该溶液用0.2μm滤器过滤并将其冷冻干燥。得到一种黄色固体 (920mg) 52。AmB的重量%为大约13%。

[0719] 实施例46:通过亚胺连接基进行的聚(CDDC-PEG)-两性霉素B 53的合成

[0720]



[0721] 将3和PEG-DiSPA (比例为1:1) 在室温下真空干燥。向该固体中加入DMSO (10mg 3/mL DMSO), 然后向该混合物中加入DIEA (2当量)。5天后用过量的乙醚使聚合物沉淀出来并

用25000MWCO膜将其透析48小时。聚(CDDC-PEG)的收率为80-95%。用GPC测得聚合物的M_w为70-100kDa。

[0722] 将聚(CDDC-PEG) (1.124g, 0.25mmol) 溶解于水 (55mL) 中。向其中加入NaIO₄ (0.264g, 5当量)。将该溶液在黑暗中在室温下搅拌20分钟并将其在4℃下在黑暗中储存24小时。向该溶液中加入BaCl₂溶液 (5.05当量), 立即产生Ba (IO₄)₂沉淀。滤掉沉淀。加入饱和Na₂CO₃溶液以将pH调至11。向该溶液中加入两性霉素B (343mg, 1.5当量) 并将其在室温下在黑暗中搅拌48小时。在反应期间, 通过加入NaOH (0.1N) 将该溶液的pH维持为11。用25000MWCO将该溶液在4℃下透析48小时并将其冷冻干燥, 得到1.03g黄色粉末形式的聚合物-AmB轭合物53。用UV分光计在405nm下测得AmB的重量%为18。

[0723] D. 参考资料

[0724] 在US申请09/203,556、09/339,818、09/453,707、10/021,294和10/021,312中公开了可以根据本发明的教导进行改变的另外的包含环糊精的聚合物以及制备该类聚合物的方法, 所有这些申请在这里都被全部引入作为参考。

[0725] 在这里所列举的所有参考资料、专利和公开物都在这里被引入作为参考。

[0726] 等价形式

[0727] 本领域技术人员将意识到或能在最多使用常规实验的情况下确定大量本文所述化合物以及其使用方法的等价形式。认为该类等价形式也在本发明的范围内并且被下面的权利要求所覆盖。

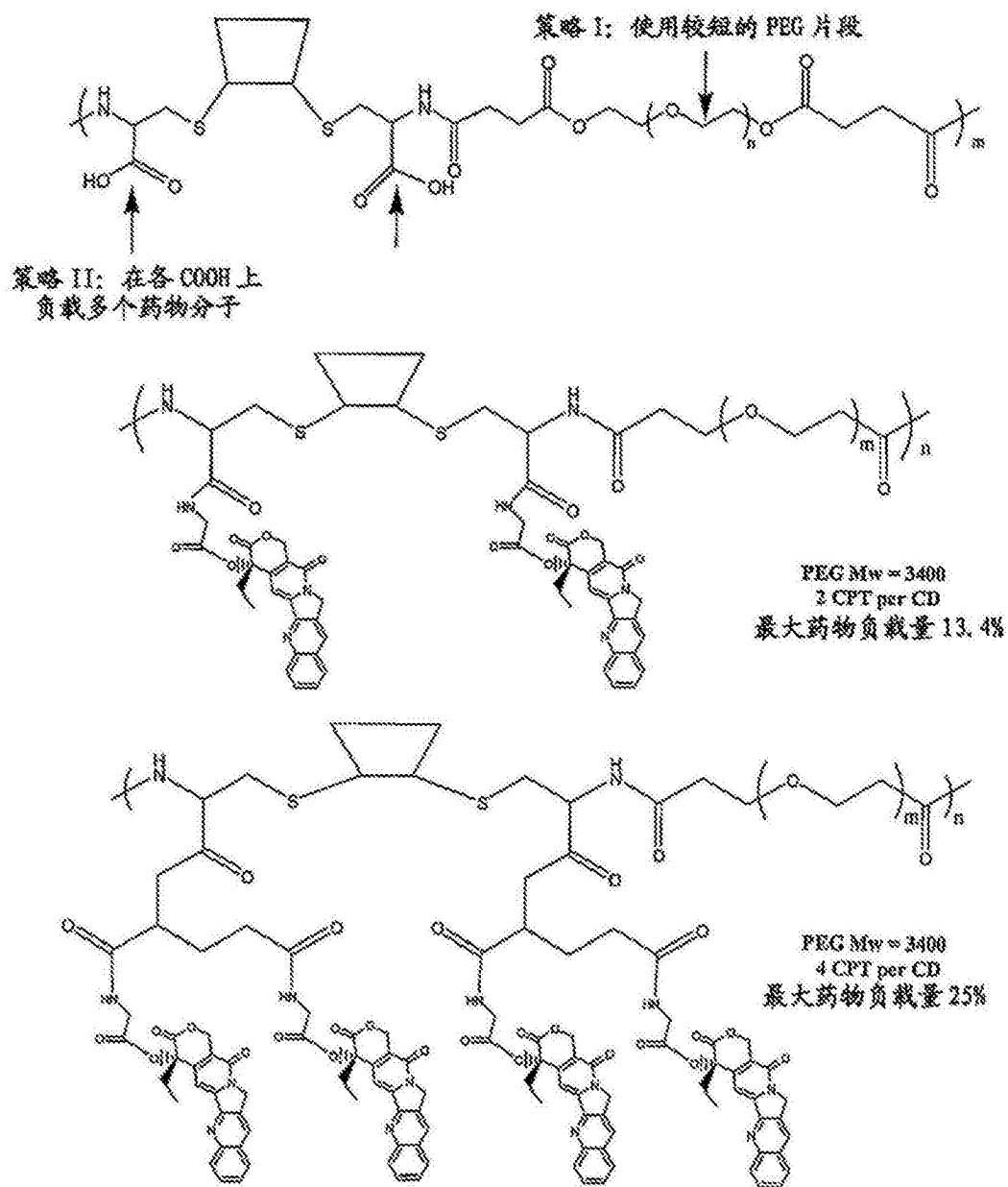


图1

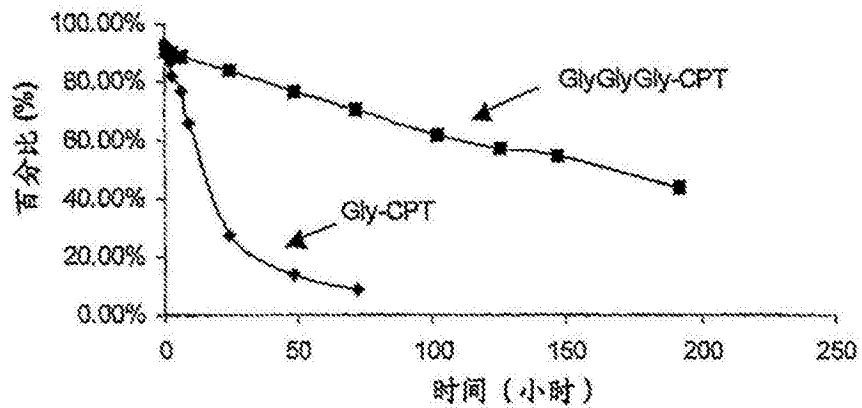


图2

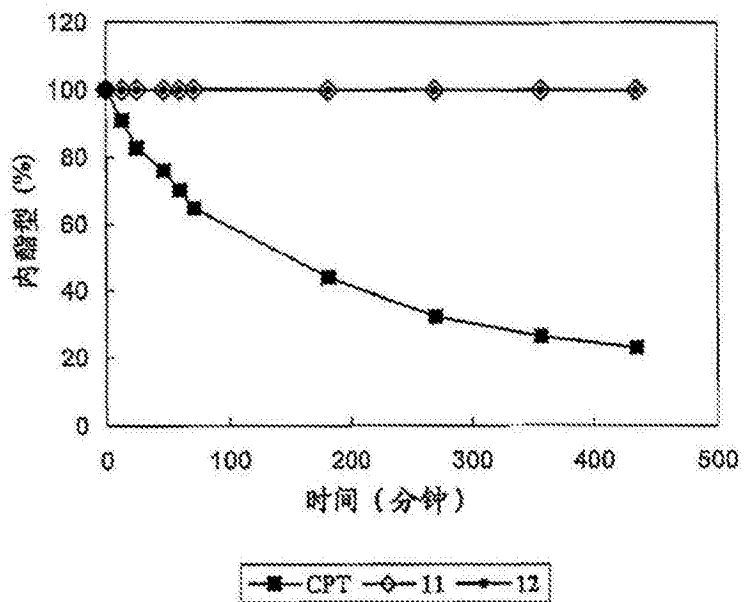


图3

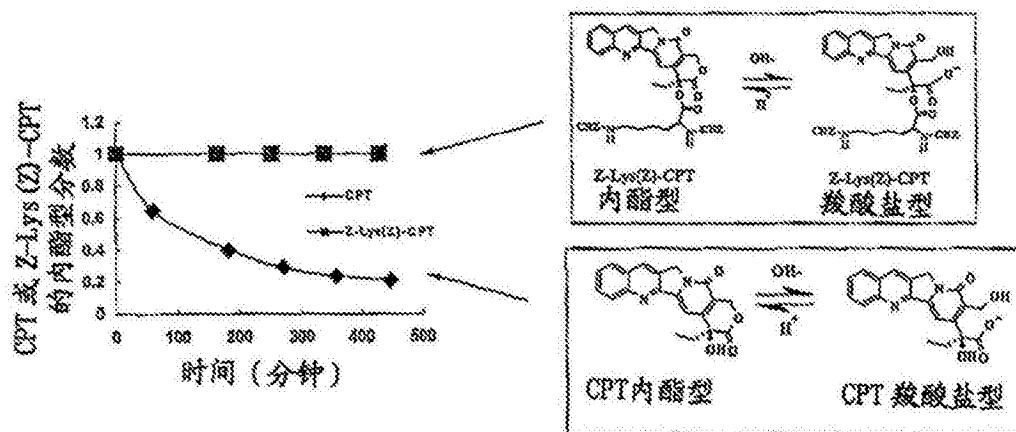


图4

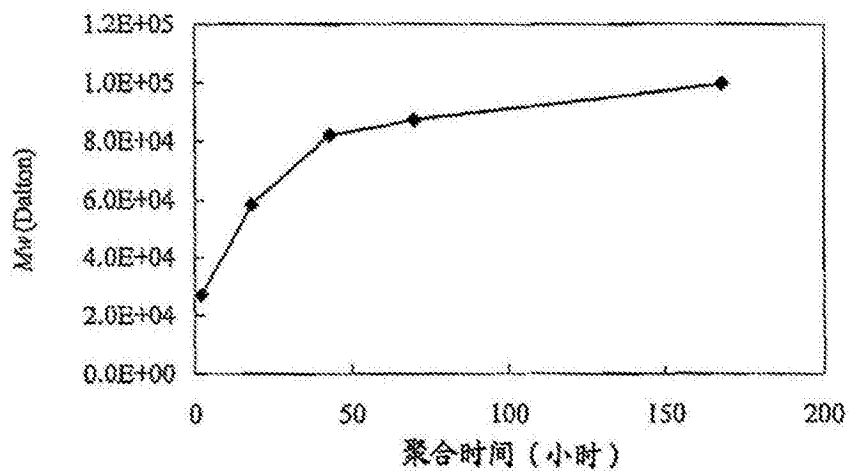


图5a

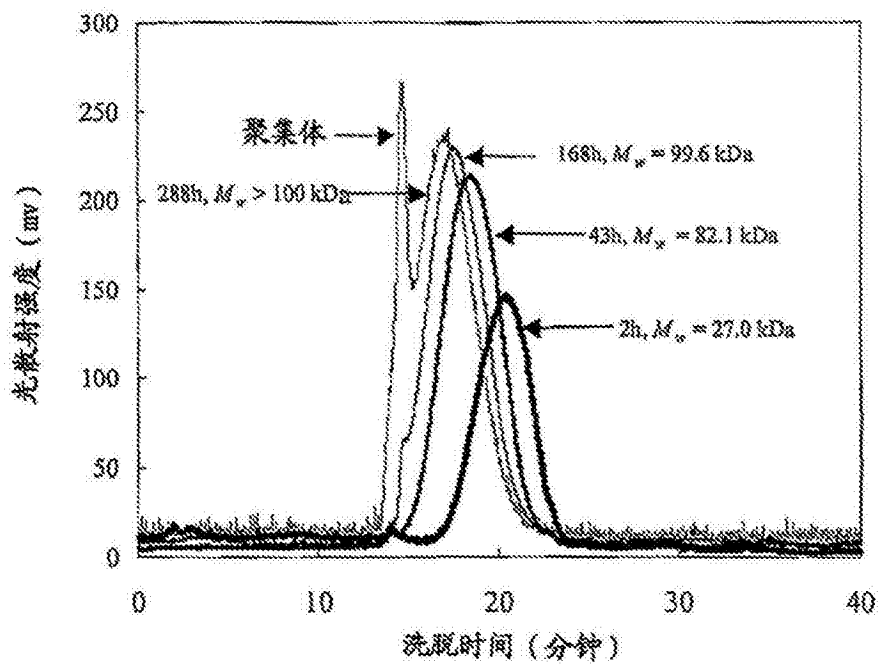


图5b

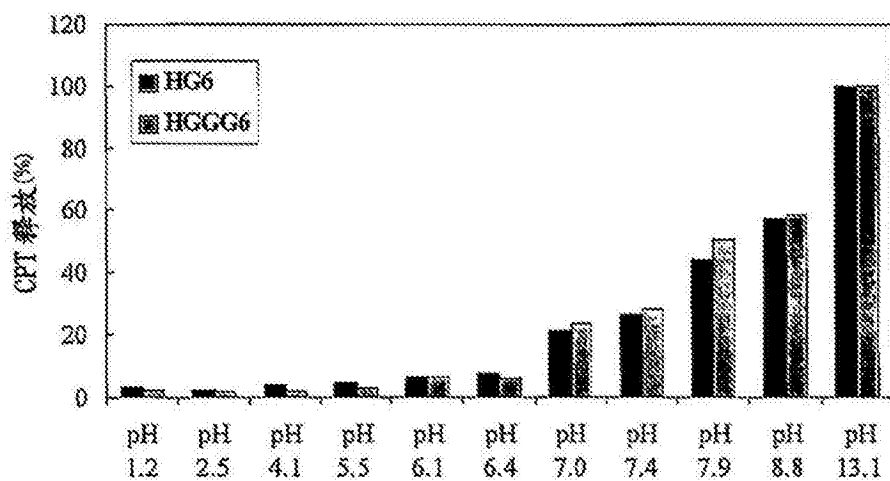


图6

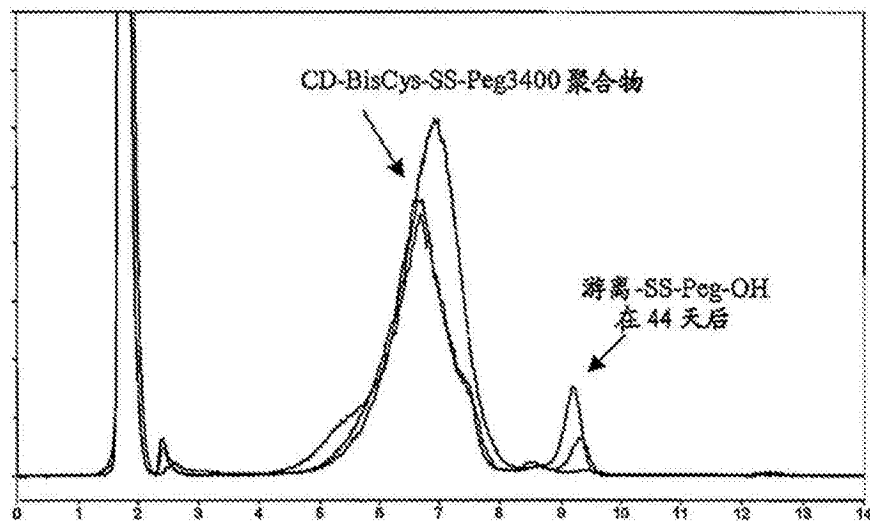


图7

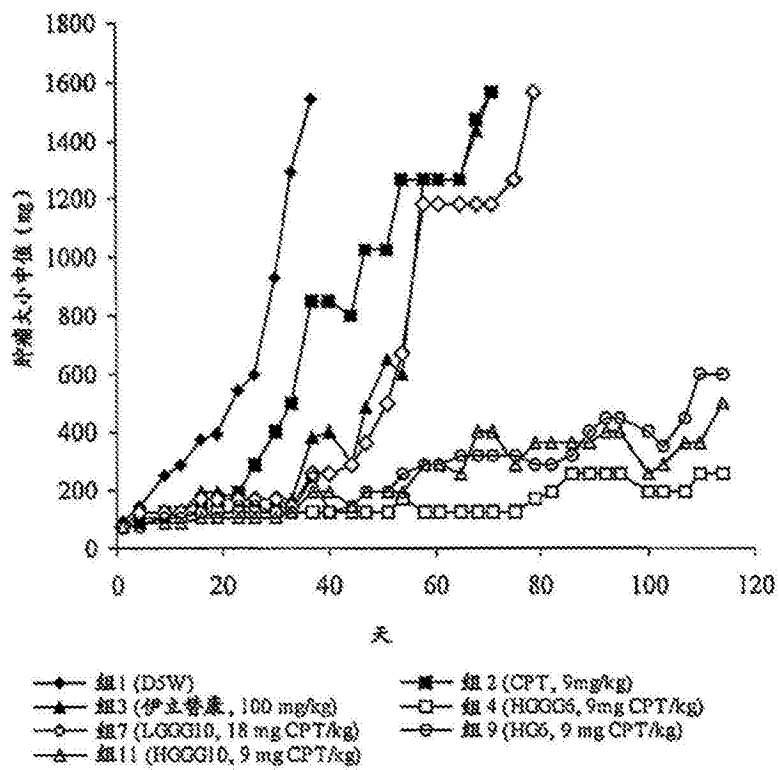


图8

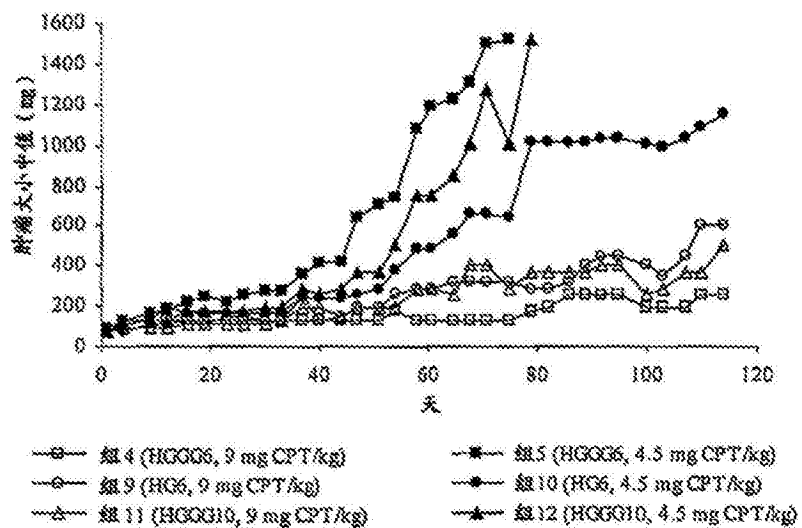


图9

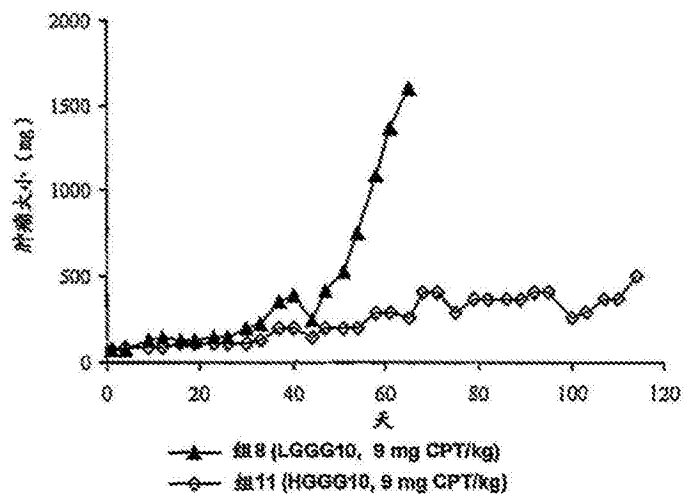


图10

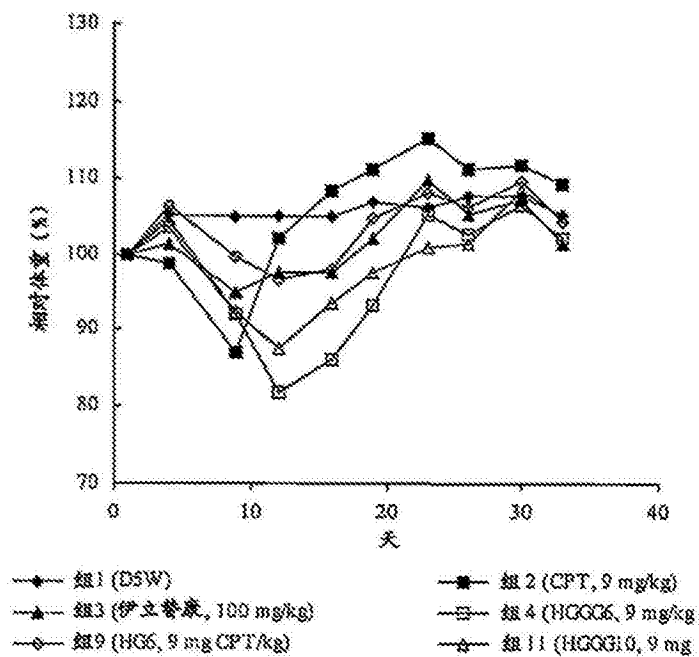


图11

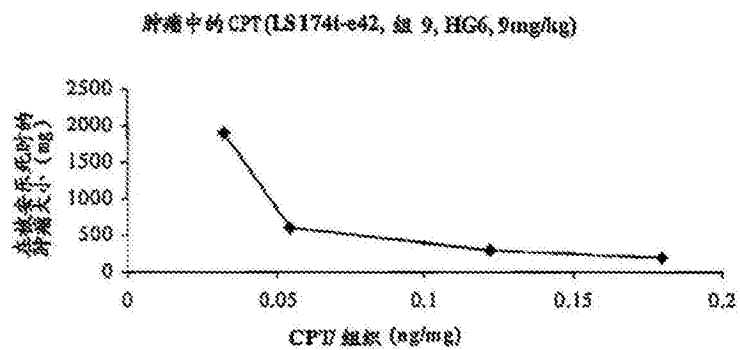


图12