



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111164128 A

(43)申请公布日 2020.05.15

(21)申请号 201880063020.X

(22)申请日 2018.10.01

(30)优先权数据

10-2017-0127790 2017.09.29 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2018/011626 2018.10.01

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/066609 KO 2019.04.04

(71)申请人 韩美药品株式会社

地址 韩国京畿道

(72)发明人 朴悺嫻 宋芝英 金垠廷 李钟旻

李钟锡 金大振

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

代理人 曹雯 黄歆

(51)Int.Cl.

C08G 65/325(2006.01)

C07K 14/62(2006.01)

A61K 47/54(2006.01)

A61K 47/56(2006.01)

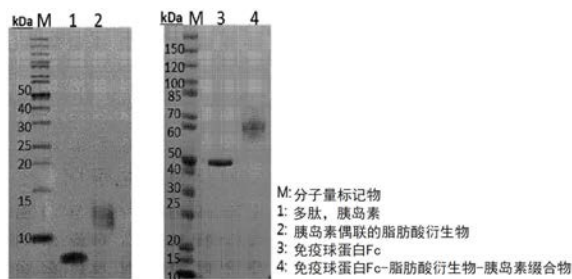
权利要求书5页 说明书20页 附图2页

(54)发明名称

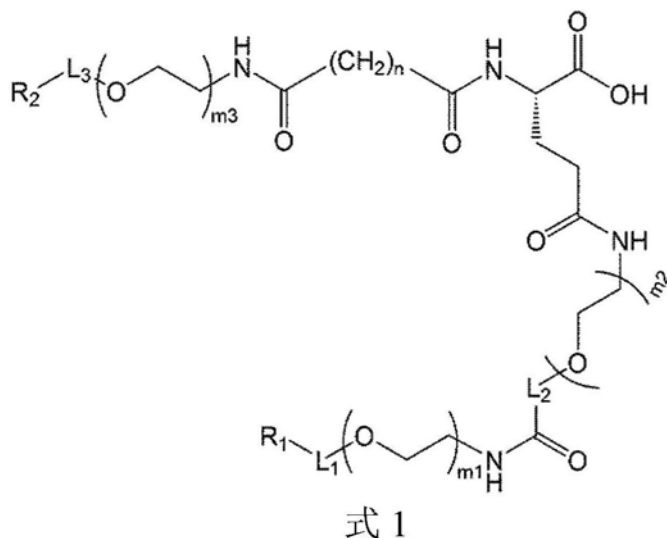
包含作为接头的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的蛋白复合物及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种蛋白缀合物及其制备方法,在所述蛋白质缀合物中,生理活性多肽通过作为接头的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物与生物相容性材料相连,相比天然形式,所述蛋白缀合物表现出延长的生理活性持续时间。据证实,生物相容性材料、非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物以及生理活性多肽相连接,蛋白缀合物中的生理活性多肽的血清半衰期延长,因此所述蛋白缀合物可广泛地用于蛋白药物领域。



1. 下式1表示的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物、其立体异构体或其药学上可接受的盐：



其中,在上述式1中,

L_1 - L_3 各自独立地为直链或支化 C_{1-6} 亚烷基,

R_1 和 R_2 各自独立地选自2,5-二氧化吡咯烷基、2,5-二氧化吡咯基、醛、马来酰亚胺、 C_{6-20} 芳基二硫化物、 C_{5-20} 杂芳基二硫化物、乙烯基砜、硫醇、卤代乙酰胺、琥珀酰亚胺、对硝基苯基碳酸酯、 C_{7-10} 炔基、邻二硫吡啶(OPSS)、卤素,及其衍生物,

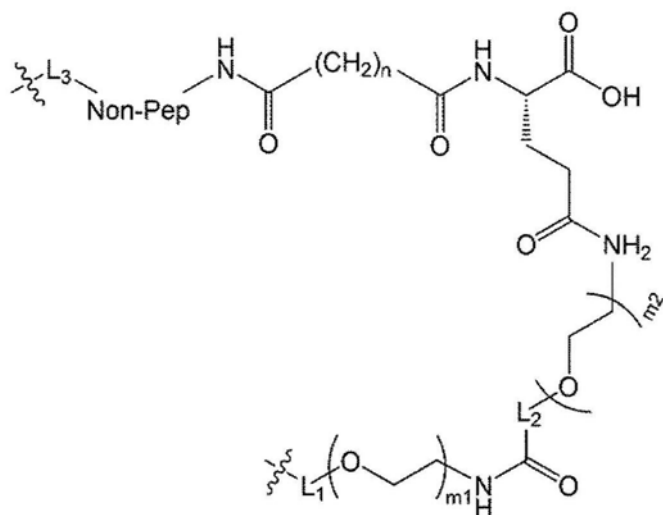
m_1 - m_3 各自独立地为1-2400的自然数,并且

n 为1-40的自然数。

2. 根据权利要求1所述的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物、其立体异构体或其药学上可接受的盐,其中

R_1 和 R_2 各自独立地为马来酰亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺、琥珀酰亚胺、甲醛、乙醛、丙醛、丁醛、邻二硫吡啶(OPSS)、碘乙酰胺、包含溴、氟、氯、砷或tennessine代替碘的卤代乙酰胺、二氟环辛炔(DIFO)、二苯并环辛炔(DIBO)、二苯并-氮杂-环辛炔(DIBAC或DBCO)、双芳基氮杂环辛炔酮(BARAC)、四甲基硫杂环庚炔(TMTH)、双环壬炔(BCN)、Sondheimer二炔、环辛炔(OCT)、单氟代环辛炔(MOFO)、二甲氧基氮杂环辛炔(DIMAC)、2,3,6,7-四甲氧基-二苯并环辛炔(TMDIBO)、磺酰化二苯并环辛炔(S-DIBO)、羧甲基单苯并环辛炔(COMBO)、吡咯并环辛炔(PYRROC)或 C_{7-10} 炔基。

3. 一种蛋白复合物,其中生理活性多肽和生物相容性材料通过共价键与下式2表示的作为接头的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物相连:



式 2

其中在上述式2中，

L₁-L₃各自独立地为直链或支化C₁₋₆亚烷基，

Non-Pep为非肽基聚合物，

m₁和m₂各自独立地为1-2400的自然数，并且

n为1-40的自然数。

4. 根据权利要求3所述的蛋白复合物，其中

所述非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物具有两个或更多个反应基团，反应基团各自直接或通过接头与脂肪酸骨架连接，其中所述非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物通过所述反应基团分别与所述生理活性多肽和所述生物相容性材料相连。

5. 根据权利要求4所述的蛋白复合物，其中

所述接头包含C₁₋₃烷氨基链或(C₁₋₃烷氧基)_n(C₁₋₃烷氨基)链，其中n为1-3的整数。

6. 根据权利要求3-5中任一项所述的蛋白复合物，其中

所述非肽基聚合物包含选自如下的至少一个：聚乙二醇均聚物、聚丙二醇均聚物、乙二醇-丙二醇共聚物、聚氧乙烯化多元醇、聚乙烯醇、多糖、葡聚糖、聚乙基醚、生物可降解聚合物、脂质聚合物、脂肪酸、甲壳质、透明质酸及其任意组合。

7. 根据权利要求3-6中任一项所述的蛋白复合物，其中

所述非肽基聚合物为包含1-2400个重复单元的聚乙二醇。

8. 根据权利要求3-7中任一项所述的蛋白复合物，其中

所述生理活性多肽和所述非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的至少一个缀合物与所述生物相容性材料的单元相连。

9. 根据权利要求3-8中任一项所述的蛋白复合物，其中

所述生理活性多肽为激素、细胞因子、白细胞介素、白细胞介素结合蛋白、酶、抗体、生长因子、转录因子、血液因子、疫苗、结构蛋白、配体蛋白、受体、细胞表面抗原或受体拮抗剂。

10. 根据权利要求3-9中任一项所述的蛋白复合物，其中所述生理活性多肽选自

调节体重和肠胃中血糖水平的肠降血糖素，所述肠降血糖素包括胰高血糖素样肽-1 (GLP-1)、胰高血糖素样肽-2 (GLP-2)、胰高血糖素、抑胃肽 (GIP)、胃泌酸调节素、类爪蟾肽、

胰岛素、胆囊收缩素 (CCK)、胰淀素、胃泌素、胃生长激素释放素和肽YY (PYY)；

脂肪分泌的脂肪素，所述脂肪素包括瘦蛋白、脂连蛋白、adipolin、apelin和cartonectin；

大脑分泌的神经肽，所述神经肽包括吻素和nesfatin-1；

肌肉分泌的肽或蛋白，所述肌肉分泌的肽或蛋白包括鸢尾素、肌联素、饰胶蛋白、促滤泡素抑制素和肌肉素；

血管活性肠肽、利尿钠肽、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、人生长激素 (hGH)、促红细胞生成素 (EPO)、生长激素释放激素、生长激素释放肽、干扰素、干扰素受体、G蛋白偶联受体、白细胞介素、白细胞介素受体、酶、白细胞介素结合蛋白、细胞因子结合蛋白、巨噬细胞活化因子、巨噬细胞肽、B细胞因子、T细胞因子、A蛋白、变态反应抑制因子、细胞坏死糖蛋白、免疫毒素、淋巴毒素、肿瘤坏死因子、肿瘤抑制因子、转移生长因子、 α -1抗胰蛋白酶、白蛋白、 α -乳清蛋白、载脂蛋白-E、高度糖基化的促红细胞生成素、血管生成素、血红蛋白、凝血酶、凝血酶受体激活肽、凝血调节蛋白、血液因子VII、血液因子VIIa、血液因子VIII、血液因子IX和血液因子XIII、纤溶酶原激活因子、纤维蛋白结合肽、尿激酶、链激酶、水蛭素、C蛋白、C-反应蛋白、肾素抑制剂、胶原酶抑制剂、超氧化物歧化酶、血小板衍生生长因子、上皮生长因子、表皮生长因子、血管抑制素、血管紧张素、骨生长因子、骨刺激蛋白、降钙素、心房肽激素、软骨诱导因子、依降钙素、结缔组织激活因子、组织因子途径抑制物、促卵泡激素、黄体生成素、促黄体素释放激素、神经生长因子、甲状旁腺激素、松弛素、促胰液素、生长调节素、胰岛素样生长因子、肾上腺皮质激素、胆囊收缩素、胰多肽、胃泌素释放肽、促肾上腺皮质激素释放因子、促甲状腺激素、自分泌运动因子、乳铁蛋白、肌生成抑制蛋白、细胞表面抗原、病毒衍生的疫苗抗原、单克隆抗体、多克隆抗体和抗体片段。

11. 根据权利要求3-10中任一项所述的蛋白复合物，其中所述生理活性多肽同时激活两个或更多个受体。

12. 根据权利要求3-11中任一项所述的蛋白复合物，其中

所述生物相容性材料选自聚乙二醇 (PEG)、胆固醇、白蛋白及其片段、白蛋白结合材料、以特定氨基酸序列作为重复单元的聚合物、抗体、抗体片段、FcRn结合材料、体内结缔组织或其衍生物、核苷酸、纤连蛋白、转铁蛋白、糖类、聚合物，及其任意组合。

13. 根据权利要求12所述的蛋白复合物，其中

所述FcRn结合材料为包含免疫球蛋白Fc区的多肽。

14. 根据权利要求13所述的蛋白复合物，其中

所述免疫球蛋白Fc区是非糖基化的。

15. 根据权利要求13或14所述的蛋白复合物，其中

所述免疫球蛋白Fc区还包含铰链区。

16. 根据权利要求13-15中任一项所述的蛋白复合物，其中

所述免疫球蛋白Fc区选自IgG、IgA、IgD、IgE、IgM、其任意组合，及其任意杂合体。

17. 根据权利要求13-16中任一项所述的蛋白复合物，其中

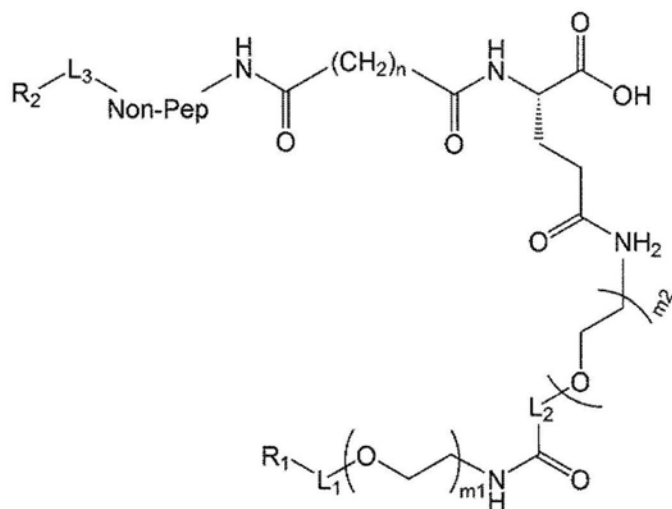
所述免疫球蛋白Fc区是IgG4 Fc片段。

18. 一种制备蛋白复合物的方法，所述方法包括：

(a) 通过包含两个或更多个反应基团的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物使生

理活性多肽与生物相容性材料相连,所述非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物如下式3表示;以及

(b) 分离蛋白复合物,所述蛋白复合物是步骤(a)中获得的反应产物:



式 3

其中在上述式3中,

L₁-L₃各自独立地为直链或支化C₁₋₆亚烷基,

R₁和R₂各自独立地选自2,5-二氧化吡咯烷基、2,5-二氧化吡咯基、醛、马来酰亚胺、C₆₋₂₀芳基二硫化物、C₅₋₂₀杂芳基二硫化物、乙烯基砜、硫醇、卤代乙酰胺、琥珀酰亚胺、对硝基苯基碳酸酯、C₇₋₁₀炔基、邻二硫吡啶(OPSS)、卤素,及其衍生物,

Non-Pep为非肽基聚合物,

m₁-m₃各自独立地为1-2400的自然数,并且

n为1-40的自然数。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中步骤(a)包括:

(a1) 使所述生物相容性材料和所述生理活性多肽中的一个与所述非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的一个反应基团相连;

(a2) 从步骤(a1)的反应混合物中分离缀合物,其中,所述生物相容性材料或所述生理活性多肽与所述非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物相连;以及

(a3) 使所述生物相容性材料和所述生理活性多肽中的另一个与步骤(a2)中分离的缀合物的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的其他反应基团相连,以制备蛋白复合物,其中,所述非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的两个或更多个反应基团分别与所述生理活性多肽和所述生物相容性材料相连。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中

在还原剂的存在下进行步骤(a1)和(a3)。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中

所述还原剂为氰基硼氢化钠(NaCNBH₃)、硼氢化钠、二甲氨基硼酸盐、甲基吡啶硼烷络合物或硼烷吡啶。

22. 根据权利要求19-21中任一项所述的方法,其中在步骤(a1)中,

所述生理活性多肽与所述非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的摩尔比为1:1-

1:20,并且

所述生物相容性材料与所述非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的摩尔比为1:1-1:20。

23.根据权利要求19-22中任一项所述的方法,其中在步骤(a3)中,步骤(a2)中分离的缀合物与所述生物相容性材料或所述生理活性多肽的摩尔比为1:0.5-1:20。

包含作为接头的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的蛋白复合物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种蛋白复合物及其制备方法,在所述蛋白复合物中,生理活性多肽通过非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物与生物相容性材料相连,相比天然形式,所述蛋白复合物表现出延长的生理活性持续时间。

背景技术

[0002] 一般来说,由于低稳定性,生理活性多肽容易变性,被血液中的蛋白酶降解,并且容易被肾脏或肝脏清除。因此,为了维持包含生理活性多肽作为药理组分的蛋白药物的血药浓度和滴度,需要频繁地向患者给药蛋白药物。但是,由于大多数蛋白药物通过注射的形式向患者给药,为了维持生理活性多肽的血药浓度而通过注射频繁地给药给患者带来了剧烈的疼痛。为了解决这些问题,已做出许多努力,通过提高蛋白药物的血液稳定性,并长时间保持其血药浓度处于高水平,以最大化蛋白药物的功效。但是,蛋白药物的这些长效制剂不应当在提高蛋白药物稳定性的同时诱导患者的免疫应答。

[0003] 蛋白聚乙二醇化法是一种常用的稳定蛋白、抑制其与蛋白酶接触以及减少肾脏清除的方法,其中将高度可溶的聚合物例如聚乙二醇(下文称为“PEG”)化学地添加至蛋白药物的表面。由于PEG非特异性结合至靶蛋白的特定位点或各种位点并增加其溶解性,因此已知其能有效地稳定蛋白并防止蛋白水解,且不引起任何特定的副作用(Sada等, J.Fermentation Bioengineering,71:pp 137-139,1991)。

[0004] 已知游离脂肪酸与人血清白蛋白(HAS)具有结合亲和力(Curry S.等.,Biochim, Biophys.Acta,1441:131-140,1999)。由于这一特征,当通过治疗药物(例如蛋白、肽和 siRNA)组合的形式向人体给药时,脂肪酸通过非共价键与对脂肪酸具有结合亲和力的血清白蛋白结合。已知上述方式形成的白蛋白药物复合物通过减少蛋白的水解或降低细胞膜的吸收速率来延长血清半衰期。已知Levemir®(地特胰岛素,Novo Nordisk)和Victoza®(利拉鲁肽[rDNA源]注射剂,Novo Nordisk)是与脂肪酸衍生物结合的治疗剂,并已获得了美国食品药品监督管理局(FDA)和欧洲医学机构(EMA)的批准。

发明内容

[0005] 技术问题

[0006] 本发明的一个目的在于提供一种非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物、其立体异构体或其药学上可接受的盐。

[0007] 本发明的另一目的在于提供一种蛋白复合物,其中,生理活性多肽和生物相容性材料通过共价键与作为接头的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物相连。

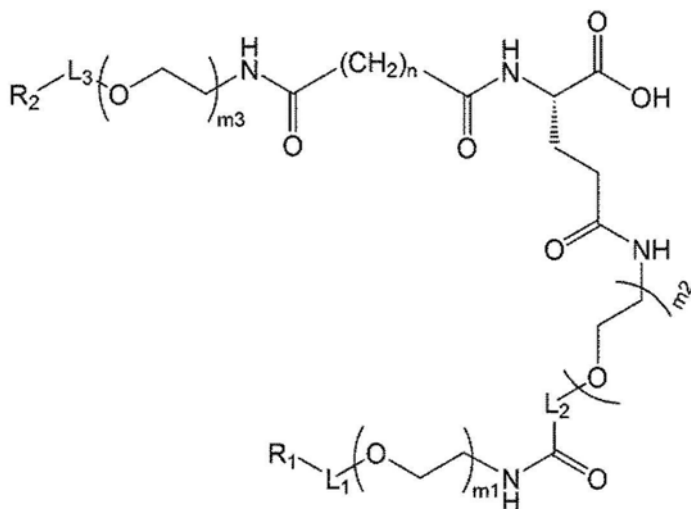
[0008] 本发明的又一目的在于提供一种制备所述蛋白复合物的方法。

[0009] 技术方案

[0010] 本发明一方面提供下式1表示的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物、其立

体异构体或其药学上可接受的盐：

[0011]

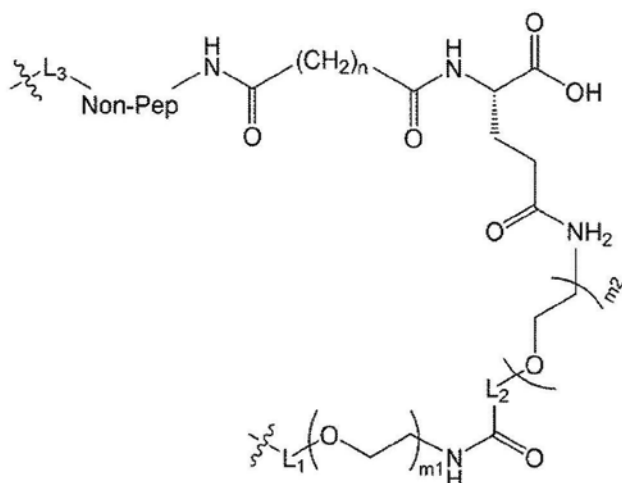


式 1

[0012] 在上述式1中, L_1 - L_3 各自独立地为直链或支化 C_{1-6} 亚烷基, R_1 和 R_2 可以各自独立地选自2,5-二氧代吡咯烷基、2,5-二氧代吡咯基、醛、马来酰亚胺、 C_{6-20} 芳基二硫化物、 C_{5-20} 杂芳基二硫化物、乙烯基砜、硫醇、卤代乙酰胺、琥珀酰亚胺、对硝基苯基碳酸酯、 C_{7-10} 炔基、邻二硫吡啶(OPSS)、卤素,及其衍生物, m_1 - m_3 各自独立地为1-2400的自然数,并且 n 为1-40的自然数。

[0013] 根据一个实施方案, R_1 和 R_2 与本发明的蛋白复合物中的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的反应基团相对应,所述 R_1 和 R_2 可以各自独立地为马来酰亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺、琥珀酰亚胺、 C_{1-4} 亚烷基醛、邻二硫吡啶(OPSS)、碘乙酰胺(IA)、包含溴、氟、氯、或碲代替碘的卤代乙酰胺、二氟环辛炔(DIFO)、二苯并环辛炔(DIBO)、二苯并-氮杂-环辛炔(DIBAC或DBCO)、双芳基氮杂环辛炔酮(BARAC)、四甲基硫杂环庚炔(TMTH)、双环壬炔(BCN)、Sondheimer二炔、环辛炔(OCT)、单氟代环辛炔(MOFO)、二甲氧基氮杂环辛炔(DIMAC)、2,3,6,7-四甲氧基-DIBO(TMDIBO)、磺酰化DIBO(S-DIBO)、羧甲基单苯并环辛炔(COMBO)、吡咯并环辛炔(PYRROC)或炔。

[0014] 本发明另一方面提供一种蛋白复合物,其中生理活性多肽和生物相容性材料通过共价键与作为接头并以下式2表示的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物相连。



式 2

[0016] 在上述式2中, L_1 - L_3 各自独立地为直链或支化 C_{1-6} 亚烷基, Non-Pep为非肽基聚合物, m_1 和 m_2 各自独立地为1-2400的自然数, 并且 n 为1-40的自然数。

[0017] 根据一个实施方案, 在本发明的蛋白复合物中, 非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物可以具有两个反应基团, 反应基团各自直接或通过接头与非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的脂肪酸骨架相连, 并且非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物可以通过反应基团分别与生理活性多肽和生物相容性材料相连。具体地, 所述非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物可以作为接头使生理活性多肽与生物相容性材料相连。

[0018] 根据另一个实施方案, 本发明的蛋白复合物中包含的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物可以具有两个或更多个反应基团, 反应基团各自直接或通过接头与非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的脂肪酸骨架相连, 并且非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物可以通过反应接头分别与生理活性多肽和生物相容性材料相连。

[0019] 根据上述任一个实施方案, 作为接头, 本发明的蛋白复合物中包含的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物可以包含 C_{1-3} 烷氨基和 $(C_{1-3}$ 烷氧基) $_n$ (C_{1-3} 烷氨基)链。

[0020] 根据上述任一个实施方案, 本发明的蛋白复合物中包含的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的非肽基聚合物可以是聚乙二醇均聚物、聚丙二醇均聚物、乙二醇-丙二醇共聚物、聚氧乙烯化多元醇、聚乙烯醇、多糖、葡聚糖、聚乙烯基乙基醚、生物可降解聚合物、脂质聚合物、脂肪酸、甲壳质、透明质酸及其任意组合。

[0021] 根据上述任一个实施方案, 本发明的蛋白复合物中包含的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的非肽基聚合物可以是包含1-2400个重复单元的聚乙二醇。

[0022] 根据上述任一个实施方案, 生理活性多肽和非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的至少一个缀合物与本发明的蛋白复合物中包含的生物相容性材料的单元相连。

[0023] 根据上述任一个实施方案, 本发明的蛋白复合物中包含的生理活性多肽可以是激素、细胞因子、白细胞介素、白细胞介素结合蛋白、酶、抗体、生长因子、转录因子、血液因子、疫苗、结构蛋白、配体蛋白、受体、细胞表面抗原或受体拮抗剂。

[0024] 根据上述任一个实施方案, 本发明的蛋白复合物中包含的生理活性多肽可以选自调节体重和肠胃中血糖水平的肠降血糖素, 例如胰高血糖素样肽-1 (GLP-1)、胰高血糖素样肽-2 (GLP-2)、胰高血糖素、抑胃肽 (GIP)、胃酸调节素、类爪蟾肽 (xenin)、胰岛素、胆囊收

缩素 (CCK)、胰淀素、胃泌素、胃生长激素释放素和肽YY (PYY) ;脂肪分泌的脂肪素,例如瘦蛋白、脂连蛋白、adipolin、apelin和cartonectin;大脑分泌的神经肽,例如吻素 (Kisspeptin) 和nesfatin-1;肌肉分泌的肽或蛋白,例如鸢尾素、肌联素 (myonectin)、饰胶蛋白、促滤泡素抑制素和肌肉素;血管活性肠肽、利尿钠肽、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、人生长激素 (hGH)、促红细胞生成素 (EPO)、生长激素释放激素、生长激素释放肽、干扰素、干扰素受体、G蛋白偶联受体、白细胞介素、白细胞介素受体、酶、白细胞介素结合蛋白、细胞因子结合蛋白、巨噬细胞活化因子、巨噬细胞肽、B细胞因子、T细胞因子、A蛋白、变态反应抑制因子、细胞坏死糖蛋白、免疫毒素、淋巴毒素、肿瘤坏死因子、肿瘤抑制因子、转移生长因子、 α -1抗胰蛋白酶、白蛋白、 α -乳清蛋白、载脂蛋白-E、高度糖基化的促红细胞生成素、血管生成素、血红蛋白、凝血酶、凝血酶受体激活肽、凝血调节蛋白、血液因子VII、血液因子VIIa、血液因子VIII、血液因子IX和血液因子XIII、纤溶酶原激活因子、纤维蛋白结合肽、尿激酶、链激酶、水蛭素、C蛋白、C-反应蛋白、肾素抑制剂、胶原酶抑制剂、超氧化物歧化酶、血小板衍生长因子、上皮生长因子、表皮生长因子、血管抑制素、血管紧张素、骨生长因子、骨刺激蛋白、降钙素、心房肽激素、软骨诱导因子、依降钙素、结缔组织激活因子、组织因子途径抑制物、促卵泡激素、黄体生成素、促黄体素释放激素、神经生长因子、甲状旁腺激素、松弛素、促胰液素、生长调节素、胰岛素样生长因子、肾上腺皮质激素、胆囊收缩素、胰多肽、胃泌素释放肽、促肾上腺皮质激素释放因子、促甲状腺激素、自分泌运动因子 (autotaxin)、乳铁蛋白、肌生成抑制蛋白 (myostatin)、细胞表面抗原、病毒衍生的疫苗抗原、单克隆抗体、多克隆抗体和抗体片段。

[0025] 根据上述任一个实施方案,本发明的生理活性多肽可以同时激活两个或更多个受体。

[0026] 根据上述任一个实施方案,本发明的生理活性多肽不是天然存在的多肽,但选自天然存在的生理活性多肽的衍生物。生理活性多肽的衍生物指那些对受体的结合亲和力或生理化学性质得到改变的多肽,即通过化学修饰,例如氨基酸的取代、插入和缺失、糖基化、去糖基化、非天然氨基酸的插入、环插入和甲基残基的插入,以增加水溶性或改变免疫原性,并且也可以包括经过修饰后对两种或更多种不同受体具有结合亲和力的合成肽。

[0027] 根据上述任一个实施方案,本发明的蛋白复合物中包含的生物相容性材料可以选自聚乙二醇 (PEG)、胆固醇、白蛋白及其片段、白蛋白结合材料、以特定氨基酸序列作为重复单元的聚合物、抗体、抗体片段、FcRn结合材料、体内结缔组织或其衍生物、核苷酸、纤连蛋白、转铁蛋白、糖类、聚合物,及其任意组合。

[0028] 根据上述任一个实施方案,本发明的蛋白复合物中包含的FcRn结合材料可以是包含免疫球蛋白Fc区的多肽。

[0029] 根据上述任一个实施方案,本发明的蛋白复合物中包含的免疫球蛋白Fc区可以是非糖基化的。

[0030] 根据上述任一个实施方案,本发明的蛋白复合物中包含的免疫球蛋白Fc区可以包含铰链区。

[0031] 根据上述任一个实施方案,本发明的蛋白复合物中包含的免疫球蛋白Fc区可以选自IgG、IgA、IgD、IgE、IgM,其任意组合,及其任意杂合体。

[0032] 根据上述任一个实施方案,本发明的蛋白复合物中包含的免疫球蛋白Fc区的可以

附图说明

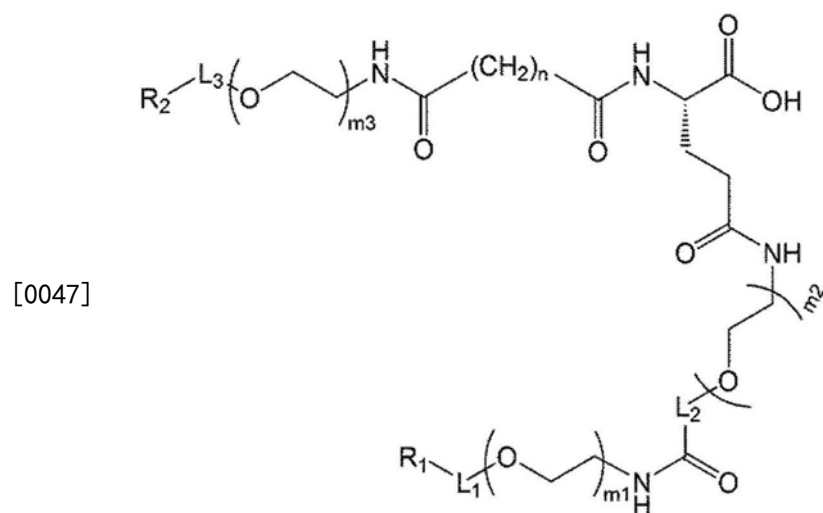
[0043] 图1示出SDS-PAGE分析结果以鉴定本发明的免疫球蛋白Fc-脂肪酸衍生物-胰岛素复合物的合成。

[0044] 图2为本发明一个实施方案制备的免疫球蛋白Fc-脂肪酸衍生物-胰岛素复合物的结构式。

[0045] 图3为本发明的免疫球蛋白Fc-脂肪酸衍生物-胰岛素复合物的药代动力学分析结果图。为了进行比较,同时示出免疫球蛋白Fc-脂肪酸衍生物-胰岛素复合物给药组、人胰岛素给药组和免疫球蛋白Fc-PEG-胰岛素复合物给药组随时间的血药浓度的结果。

具体实施方式

[0046] 本发明一方面提供下式1表示的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物、其立体异构体或其药学上可接受的盐



式 1

[0048] 在上述式1中, L_1 - L_3 各自独立地为直链或支化 C_{1-6} 亚烷基、 R_1 和 R_2 各自独立地选自2,5-二氧代吡咯烷基、2,5-二氧代吡咯基、醛、马来酰亚胺、 C_{6-20} 芳基二硫化物、 C_{5-20} 杂芳基二硫化物、乙烯基砜、硫醇、卤代乙酰胺、琥珀酰亚胺、对硝基苯基碳酸酯、 C_{7-10} 炔基、邻二硫吡啶(OPSS)、卤素,及其衍生物, m_1 - m_3 各自独立地为1-2400的自然数,并且 n 为1-40的自然数。

[0049] 例如, R_1 和 R_2 可以各自独立地包括2,5-二氧代吡咯烷基、2,5-二氧代吡咯基、醛、马来酰亚胺、芳基二硫化物、杂芳基二硫化物、卤代乙酰胺或 C_{7-10} 炔基。具体地,反应基团可以是马来酰亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺、琥珀酰亚胺、甲醛、乙醛、丙醛、丁醛、邻二硫吡啶(OPSS)、碘乙酰胺、包含溴、氟、氯、或碲代替碘的卤代乙酰胺、二氟环辛炔(DIFO)、二苯并环辛炔(DIBO)、二苯并-氮杂-环辛炔(DIBAC或DBCO)、双芳基氮杂环辛炔酮(BARAC)、四甲基硫杂环庚炔(TMTH)、双环壬炔(BCN)、Sondheimer二炔、环辛炔(OCT)、单氟代环辛炔(MOFO)、二甲氧基氮杂环辛炔(DIMAC)、2,3,6,7-四甲氧基-二苯并环辛炔(TMDIBO)、磺酰化二苯并环辛炔(S-DIBO)、羧甲基单苯并环辛炔(COMBO)、吡咯并环辛炔(PYRROC)或炔,但不限于此。

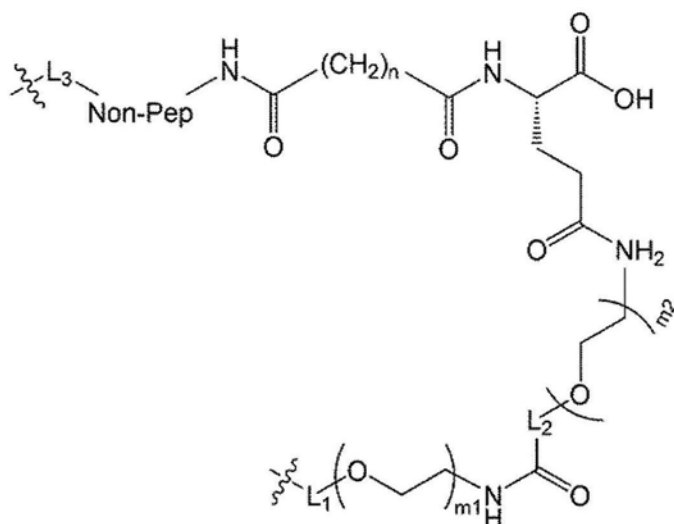
[0050] 例如, m_1 - m_3 可以各自独立地为1-2400的自然数,具体地, m_1 和 m_2 可以各自独立地为1-20的自然数、1-10的自然数或1-5的自然数,但不限于此。 m_3 可以是20-500的自然数、

10-500的自然数、10-100的自然数或100-500的自然数,但不限于此。

[0051] 例如,n可以是1-40的自然数,具体地为4-30的自然数,更具体的为10-25的自然数,但不限于此。

[0052] 本发明另一方面提供一种蛋白复合物,其中,生理活性多肽位于一端,作为接头并以下式2表示的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物以及生物相容性材料,通过共价键依次连接

[0053]



式 2

[0054] 在上述式2中,L₁-L₃各自独立地为直链或支化C₁₋₆亚烷基,Non-Pep为非肽基聚合物,m₁和m₂各自独立地为1-2400的自然数,并且n为1-40的自然数。

[0055] 特别地,在本发明的蛋白复合物中,生理活性多肽可以经由共价键,通过位于作为接头的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的两端的两个或更多个反应基团与生物相容性材料相连。

[0056] 在本文中,术语“生理活性多肽”,作为构成复合物部分的组分,指在体内具有一定生理作用的多肽的一般概念,其具有常见的多肽结构,并显示出各种生物活性。生理活性多肽可以包括这样的生理活性多肽,其通过调节基因表达或生理功能,能够纠正因缺乏或过度分泌与调节生物体某种功能相关的物质而引起的异常,并且也包括典型的蛋白药物。此外,生理活性多肽不仅包括天然多肽,还包括其衍生物。

[0057] 在本发明的复合物中,生理活性多肽的类型和大小没有特别的限制,只要生理活性多肽能够通过本发明复合物的结构而延长血清半衰期。

[0058] 本发明的生理活性多肽可以是激素、细胞因子、白细胞介素、白细胞介素结合蛋白、酶、抗体、生长因子、转录因子、血液因子、疫苗、结构蛋白、配体蛋白、受体、细胞表面抗原或受体拮抗剂。

[0059] 根据另一实施方案,本发明的蛋白复合物中包含的生理活性多肽可以选自调节体重和肠胃中血糖水平的肠降血糖素,例如胰高血糖素样肽-1 (GLP-1)、胰高血糖素样肽-2 (GLP-2)、胰高血糖素、抑胃肽 (GIP)、胃酸调节素、类爪蟾肽 (Xenin)、胰岛素、胆囊收缩素 (CCK)、胰淀素、胃泌素、胃生长激素释放素和肽YY (PYY);脂肪分泌的脂肪素,例如瘦蛋白、脂连蛋白、adipolin、apelin和cartonectin;大脑分泌的神经肽,例如吻素 (Kisspeptin) 和

nesfatin-1;肌肉分泌的肽或蛋白,例如鸢尾素、肌联素、饰胶蛋白、促滤泡素抑制素和肌肉素;血管活性肠肽、利尿钠肽、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、人生长激素(hGH)、促红细胞生成素(EPO)、生长激素释放激素、生长激素释放肽、干扰素、干扰素受体、G蛋白偶联受体、白细胞介素、白细胞介素受体、酶、白细胞介素结合蛋白、细胞因子结合蛋白、巨噬细胞活化因子、巨噬细胞肽、B细胞因子、T细胞因子、A蛋白、变态反应抑制因子、细胞坏死糖蛋白、免疫毒素、淋巴毒素、肿瘤坏死因子、肿瘤抑制因子、转移生长因子、 α -1抗胰蛋白酶、白蛋白、 α -乳清蛋白、载脂蛋白-E、高度糖基化的促红细胞生成素、血管生成素、血红蛋白、凝血酶、凝血酶受体激活肽、凝血调节蛋白、血液因子VII、血液因子VIIa、血液因子VIII、血液因子IX和血液因子XIII、纤溶酶原激活因子、纤维蛋白结合肽、尿激酶、链激酶、水蛭素、C蛋白、C-反应蛋白、肾素抑制剂、胶原酶抑制剂、超氧化物歧化酶、血小板衍生生长因子、上皮生长因子、表皮生长因子、血管抑制素、血管紧张素、骨生长因子、骨刺激蛋白、降钙素、心房肽激素、软骨诱导因子、依降钙素、结缔组织激活因子、组织因子途径抑制物、促卵泡激素、黄体生成素、促黄体素释放激素、神经生长因子、甲状旁腺激素、松弛素、促胰液素、生长调节素、胰岛素样生长因子、肾上腺皮质激素、胆囊收缩素、胰多肽、胃泌素释放肽、促肾上腺皮质激素释放因子、促甲状腺激素、自分泌运动因子、乳铁蛋白、肌生成抑制蛋白、细胞表面抗原、病毒衍生的疫苗抗原、单克隆抗体、多克隆抗体和抗体片段。

[0060] 根据另一实施方案,本发明的生理活性多肽不是天然存在的多肽,但选自天然存在的生理活性多肽的衍生物。生理活性多肽的衍生物指那些对受体的结合亲和力或生理化学性质得到改变的多肽,即通过化学修饰,例如氨基酸的取代、插入和缺失、糖基化、去糖基化、非天然氨基酸的插入、环插入和甲基残基的插入,以增加水溶性或改变免疫原性,并且也可以包括经过修饰后对两种或更多种不同受体具有结合亲和力的合成肽。

[0061] 在本文中,术语“生理活性多肽”、“生理活性蛋白”、“活性蛋白”或“蛋白药物”指在生物体内具有拮抗(길항)的生理作用的多肽或蛋白,并且这些术语可以互换使用。

[0062] 在本文中,作为构成复合物部分的组分,术语“生物相容性材料”指与生理活性多肽相连时能够延长体内半衰期的物质。在本文中,术语“生物相容性材料”指能够延长体内半衰期的物质,并且可以与“载体”互换使用。生物相容性材料或载体可以包括与生理活性多肽相连时,能够延长所述生理活性多肽的半衰期的任何材料,生物相容性材料或载体的实例可以包括选自如下的任何材料:聚乙二醇(PEG)、胆固醇、白蛋白及其片段、白蛋白结合材料、以特定氨基酸序列作为重复单元的聚合物、抗体、抗体片段、FcRn结合材料、体内结缔组织或其衍生物、核苷酸、纤连蛋白、转铁蛋白、糖类、聚合物,及其任意组合,但不限于此。FcRn结合材料可以是包括免疫球蛋白Fc区的多肽,其实例可以包括IgG Fc。生物相容性材料或载体可以通过脂肪酸衍生物与生理活性多肽相连。

[0063] 当聚乙二醇用作载体时,Ambrex的ReCODE™技术可以用于聚乙二醇的位点特异性偶联,并且Neose的GlycoPEGylation™技术可以用于对聚糖位点的特异性偶联。此外,也可以使用,但不限于,使聚乙二醇在体内缓慢清除的可释放PEG技术,以及任何能够增加PEG在体内的利用度的技术。此外,聚合物例如聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇-丙二醇共聚物、聚氧乙烯化多元醇、聚乙烯醇、多糖、葡聚糖、聚乙烯基乙基醚、生物可降解聚合物、脂质聚合物、甲壳质或透明质酸也可以与本发明的复合物相连。

[0064] 在本发明中,当白蛋白用作载体时,本发明的蛋白复合物可以是这样的复合物,其

中白蛋白或白蛋白片段通过共价键直接连接至非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物。尽管白蛋白没有直接与非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物相连,但是白蛋白结合材料,例如白蛋白特异性结合抗体或抗体片段,可以与蛋白复合物中的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物相连。此外,也可以使用如下的蛋白复合物,其中,对白蛋白具有结合亲和力的某些肽、蛋白、化合物等与非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物相连,或者包含对白蛋白具有结合亲和力的脂肪酸的蛋白复合物,但不限于此。

[0065] 在本发明中,抗体或抗体片段可用作载体,所述载体可以是具有FcRn结合位点的抗体或抗体片段,或者不具有FcRn结合位点的抗体片段,例如Fab,但不限于此。具体地,在本发明中,免疫球蛋白Fc区可用作载体。

[0066] 由于免疫球蛋白Fc区为生物体内代谢的生物可降解多肽,因此,其用作药物载体是安全的。而且,相对于整个免疫球蛋白分子,免疫球蛋白Fc区具有较低的分子量,因此这有利于复合物的制备、纯化和产率。此外,由于去除了因为抗体间氨基酸序列差异而表现出高异质性的Fab区,Fc区具有显著提高的同质性以及诱导血清抗原性的低可能性。

[0067] 在本发明中,“免疫球蛋白Fc区”指不包括免疫球蛋白重链可变区和轻链可变区的重链恒定区、第一重链恒定区(CH1)和第一轻链恒定区(CL1)。Fc片段也可以包括重链恒定区中的铰链区。

[0068] 此外,本发明的免疫球蛋白Fc区可以是扩展的Fc片段,其全部或部分地包括第一重链恒定区(CH1)和/或第一轻链恒定区(CL1),仅不包括免疫球蛋白的重链可变区和轻链可变区。

[0069] 由于免疫球蛋白Fc为生物体内代谢的生物可降解多肽,因此,其用作药物载体是安全的。此外,相对于整个免疫球蛋白分子,免疫球蛋白Fc区具有较低的分子量,这有利于复合物的制备、纯化和产率。此外,由于去除了因为抗体中氨基酸序列差异而表现出高异质性的Fab部分,Fc区具有显著提高的同质性以及诱导血清抗原性的低可能性。

[0070] 在本发明中,免疫球蛋白Fc区不仅包括天然存在的氨基酸序列,还包括其序列突变体。氨基酸序列突变体指这样的序列,其不同于天然存在的氨基酸序列,并由以下原因产生:天然存在的氨基酸序列的一个或多个氨基酸的缺失、插入、非保守取代或保守取代,或其任意组合。例如,在IgG Fc中,已知位于214-238、297-299、318-322或327-331位点处的氨基酸残基在结合中是重要的,其可用作修饰合适的靶点。

[0071] 此外,通过缺失能够形成二硫键的区域、天然Fc中N末端的一些氨基酸或向天然Fc中的N末端添加甲硫氨酸残基可得到各种类型的变体。另外,为了消除效应子功能,可以去除补体结合位点,例如C1q-结合位点,或去除抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)区域。制备免疫球蛋白Fc片段序列衍生生物的技术在公布号为W097/34631和W096/32478的国际专利申请中公开。

[0072] 一般不改变分子活性的蛋白和肽中的氨基酸交换是本领域已知的(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979)。Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Thy/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu和Asp/Gly的氨基酸残基交换是最常发生的交换。

[0073] 在某些情况下,可以通过磷酸化、硫酸化、丙烯酸化、糖基化、甲基化、法尼基化、乙酰化、酰胺化等修饰免疫球蛋白Fc区。

[0074] 上述Fc突变体是具有与本发明Fc片段相同的生物活性的变体,但具有改进的抗热、pH等的结构稳定性。

[0075] 此外,Fc区可获自从人和包括牛、山羊、猪、小鼠、兔、仓鼠、大鼠和豚鼠在内的动物中分离的天然形式,或者可以是获自转化的动物细胞或微生物的重组形式或其衍生物。根据从天然形式获得Fc区的方法,从人或动物的生物体分离整个免疫球蛋白,并用蛋白酶处理。用木瓜蛋白酶处理时,免疫球蛋白被切断为Fab和Fc,而用胃蛋白酶处理时,免疫球蛋白被切断为pF'c和F(ab)₂。可采用尺寸排阻色谱处理这些片段分离出Fc或pF'c。

[0076] 优选地,Fc区可以是利用衍生自人的Fc区从微生物中获得的重组免疫球蛋白Fc区。

[0077] 此外,免疫球蛋白Fc区可以是天然存在的聚糖(糖链)形式、与天然存在的聚糖形式相比增加或减少的聚糖形式或去糖基化的形式。免疫球蛋白Fc聚糖的增加、减少或去除可以通过常规方法进行,例如化学方法、酶促方法和利用微生物的遗传工程方法。从Fc区去除聚糖,获得的免疫球蛋白Fc区表现出与补体(C1q)的结合亲和力的显著减弱,以及抗体依赖性细胞毒性或补体依赖性细胞毒性的降低或丢失,从而不诱导不必要的体内免疫应答。就这一点而言,去糖基化或非糖基化的免疫球蛋白Fc区可以更适合作为药物载体。

[0078] 在本文中,术语“去糖基化”Fc区指通过酶去除糖部分的Fc区,并且术语“非糖基化的”Fc区指在原核生物中,优选在大肠杆菌中产生的未糖基化Fc区。

[0079] 同时,免疫球蛋白Fc区可以源自人或动物,例如牛、山羊、猪、小鼠、兔、仓鼠、大鼠或豚鼠。优选地源自人。此外,免疫球蛋白Fc区可以是源自IgG、IgA、IgD、IgE和IgM的Fc片段,及其任意组合,或其任意杂合体。优选地,免疫球蛋白Fc区可以源自IgG或IgM,人血液中最丰富的蛋白,并且更优选地源自IgG,已知IgG增强配体结合蛋白的半衰期。

[0080] 同时,在本文中,术语“组合”指编码同一起来源的单链免疫球蛋白Fc片段的多肽与不同来源的单链多肽之间形成连接以形成二聚体或多聚体。换言之,二聚体或多聚体可以由选自IgG Fc、IgA Fc、IgM Fc、IgD Fc和IgE Fc中的两种或更多种片段形成。

[0081] 在本文中,术语“杂合体”指对应于不同来源的免疫球蛋白Fc片段的两种或更多种序列存在于单链免疫球蛋白Fc片段中。在本发明中,各种类型的杂合体都是可能的。换言之,结构域杂合体可以由IgM Fc、IgA Fc、IgE Fc、IgD Fc和IgG Fc的CH1、CH2、CH3和CH4中的1-4种结构域构成,并且可以包含铰链区。

[0082] 同时,IgG可以划分为IgG1、IgG2、IgG3和IgG4亚型,并且其任意组合或其任意杂合体可用于本发明。优选地,可以使用IgG2和IgG4亚型,并且更优选地,可以使用IgG4的Fc区,上述亚型或Fc区几乎不具有例如补体依赖性细胞毒性(CDC)的效应子功能。特别地,作为本发明的药物载体,免疫球蛋白Fc区可以是人IgG4来源的非糖基化的Fc片段。人源Fc片段相比非人源Fc片段表现出更好的效果,非人源Fc片段可以在人体内充当抗原,并引起不希望的免疫应答,例如产生所述抗原的新抗体。

[0083] 根据本发明,肽或蛋白片段可以用作载体以延长体内半衰期。使用的肽或蛋白片段的实例可以是弹性蛋白样多肽(ELP),其包含某些作为重复单元的氨基酸组合,已知具有高体内稳定性的转铁蛋白、作为结缔组织的组分的纤连蛋白,或其衍生物,但不限于此,并且任何能够延长体内半衰期的肽或蛋白可以包括在本发明的范围内。

[0084] 在本文中,在术语“非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物”中,作为构成复合

物部分的组分,脂肪酸通常指包含一个羧基($-\text{COOH}$)的烃链,但具有两个羧基的脂肪二酸也是本发明的脂肪酸。本发明的脂肪酸可以是饱和脂肪酸,其仅包含构成烃链的碳骨架上的单键。

[0085] 此外,本发明的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物中的脂肪酸可以是具有正常链结构的脂肪酸或由具有侧链的烷基形成的脂肪酸。根据构成烃链的碳原子的数目,脂肪酸可以分为短链、中链和长链脂肪酸。通常,短链脂肪酸包含1-6个碳原子,中链脂肪酸包含6-12个碳原子,而长链脂肪酸包含14个或更多个碳原子。

[0086] 另外,本发明的“非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物”可以指其中两个或更多个反应基团直接或通过接头分别与脂肪酸骨架相连的物质。例如,反应基团可以通过包含 C_{1-3} 烷氨基链或 $(\text{C}_{1-3}\text{烷氧基})_n$ (C_{1-3} 烷氨基)链(其中 n 是1-3的自然数)的接头与脂肪酸骨架相连,但接头的类型并不限于此。

[0087] 本发明的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物中的脂肪酸可以是具有化学式 $\text{R}-\text{COOH}$ 或 $\text{R}-(\text{COOH})_2$ 的羧酸,其中 R 是直链或支化的饱和烃基,具体地具有1-40个碳原子,更具体地具有4-30个碳原子,甚至更加具体地具有10-25个碳原子,但不限于此。例如,本发明的脂肪酸可以是选自如下的脂肪二酸:丙二酸($\text{CH}_2(\text{COOH})_2$)、琥珀酸($\text{C}_2\text{H}_4(\text{COOH})_2$)、戊二酸($\text{C}_3\text{H}_6(\text{COOH})_2$)、己二酸($\text{C}_4\text{H}_8(\text{COOH})_2$)、庚二酸($\text{C}_5\text{H}_{10}(\text{COOH})_2$)、辛二酸($\text{C}_6\text{H}_{12}(\text{COOH})_2$)、壬二酸($\text{C}_7\text{H}_{14}(\text{COOH})_2$)、癸二酸($\text{C}_8\text{H}_{16}(\text{COOH})_2$)、十一烷二酸($\text{C}_9\text{H}_{18}(\text{COOH})_2$)、十二烷二酸($\text{C}_{10}\text{H}_{20}(\text{COOH})_2$)、十三烷二酸($\text{C}_{11}\text{H}_{22}(\text{COOH})_2$)、十四烷二酸($\text{C}_{12}\text{H}_{24}(\text{COOH})_2$)、十五烷二酸($\text{C}_{13}\text{H}_{26}(\text{COOH})_2$)、十六烷二酸($\text{C}_{14}\text{H}_{28}(\text{COOH})_2$)、十七烷二酸($\text{C}_{15}\text{H}_{30}(\text{COOH})_2$)、十八烷二酸($\text{C}_{16}\text{H}_{32}(\text{COOH})_2$)、十九烷二酸($\text{C}_{17}\text{H}_{34}(\text{COOH})_2$)、二十烷二酸($\text{C}_{18}\text{H}_{36}(\text{COOH})_2$)、二十一烷二酸($\text{C}_{19}\text{H}_{38}(\text{COOH})_2$)和二十二烷二酸($\text{C}_{20}\text{H}_{40}(\text{COOH})_2$),更具体地,十四烷二酸、十五烷二酸、十六烷二酸、十七烷二酸、十八烷二酸、十九烷二酸、二十烷二酸、二十一烷二酸或二十二烷二酸,但不限于此。

[0088] 此外,本发明的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物中的脂肪酸可以是上述脂肪酸的衍生物或类似物。特别地,构成脂肪酸的烃可以是变体,其包括除了直链或支化基团之外的环状基团。烃中可以包含的环状基团可以是饱和的同素环、杂环、芳香缩合或非缩合的同素环或杂环,并且环状基团可以具有醚键、不饱和键或取代基。

[0089] 此外,专利号为8,129,343的美国专利和公开号为W02015/067715、W02015/055801、W02013/041678、W02014/133324、W02014/009316和W02015/052088的国际专利申请中公开的脂肪酸可以用作本发明的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物中的脂肪酸,但不限于此。例如,本发明的脂肪酸可以包括,但不限于,包含两个或更多个羧基的多脂肪酸、包括以羧酸(生物)等排体、磷酸或硫酸代替脂肪酸中羧基的材料、脂肪酸酯等。

[0090] 此外,关于本发明的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物中的脂肪酸,本领域已知的上述脂肪酸的衍生物和类似物,以及现有技术中容易制备的衍生物和类似物也在本发明的范围内。本发明的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物中,脂肪酸的分子量可以为0.1kDa-100kDa,具体地为0.1kDa-30kDa。作为本发明的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物中的脂肪酸,不仅可以使使用单一类型的聚合物,还可以使使用不同类型聚合物的组合,但并不限于此。

[0091] 在本发明的蛋白复合物中包含的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物中的

两个或更多个反应基团可以是相同的或不同的。例如,脂肪酸可以具有马来酰亚胺作为一个反应基团,并且醛基作为另一反应基团,例如烷基醛基(例如丙醛基或丁醛基)。当使用包含羟基反应基团的脂肪酸或非肽基聚合物作为两个或更多个反应基团时,本发明的复合物可以通过如下方式制备,通过已知的化学反应激活羟基使之变为各种反应基团,或通过使用可商购的具有修饰的反应基团的脂肪酸。

[0092] 在本发明的蛋白复合物中的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物中,“非肽基聚合物”可用作生物相容性聚合物的通用名称,所述生物相容性聚合物包含两个或更多个除肽以外彼此结合的重复单元。重复单元通过共价键而不是肽键彼此连接。在本发明中,非肽基聚合物可以与非肽基接头互换使用。

[0093] 可用于本发明的非肽基聚合物可以选自聚乙二醇均聚物、聚丙二醇均聚物、乙二醇-丙二醇共聚物、聚氧乙烯化多元醇、聚乙烯醇、多糖、葡聚糖、聚乙烯基乙基醚、生物可降解聚合物、脂质聚合物、脂肪酸、甲壳质、透明质酸及其任意组合。具体地,非肽基聚合物可以是聚乙二醇均聚物,更具体,包含1-2400个重复单元的聚合物,但不限于此。此外,本领域已知的和本领域技术人员可以容易地制得的非肽基聚合物的衍生物也在本发明的范围内。

[0094] 根据常规的读码框融合方法制备融合蛋白时通常使用的肽基接头具有如下缺点:在生物体内容易被蛋白酶切割,因此不能像使用载体时那样充分延长活性药物的血清半衰期。然而,在本发明中,通过使用具有蛋白酶抗性的聚合物,肽的血清半衰期可以维持在与使用载体时相似的水平。因此,只要在体内对蛋白酶具有抗性,本发明可用的非肽基聚合物没有限制。非肽基聚合物的分子量可以大于0kDa并等于或小于100kDa,在1kDa至100kDa的范围内,具体地,大于0kDa,例如等于或大于1kDa并等于或小于20kDa,或者在0.5kDa至20kDa、0.5kDa至5kDa或5kDa至20kDa的范围内,但不限于此。另外,本发明的非肽基聚合物不仅可以是一种类型聚合物,还可以是不同类型聚合物的组合。

[0095] 此外,非肽基聚合物可以具有两个或更多个末端,其实例可以包括,但不限于,含有两个末端的非肽基聚合物和含有三个末端的非肽基聚合物。

[0096] 一种非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物可以包含一种或更多种类型的非肽基聚合物。

[0097] 本发明的蛋白复合物可以是这样的,其中非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的脂肪酸或非肽基聚合物部分连接至位于生理活性多肽的N-末端或C-末端或者中间的氨基酸残基,而不是N-末端或C-末端,并且生物相容性材料连接至非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的脂肪酸或非肽基聚合物中的另一个,所述非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物与所述生理活性多肽相连。

[0098] 在本文中,术语“N-末端区”指肽或蛋白的氨基末端区。例如,“N-末端区”不仅可以包括位于N-末端的氨基酸残基,还可以包括N-末端氨基酸临近的氨基酸残基,具体地,从最末端起第20位的氨基酸残基。然而,本发明的N-末端区不限于此。

[0099] 在本文中,术语“C-末端区”指肽或蛋白的羧基末端区。例如,“C-末端区”不仅可以包括位于C-末端的氨基酸残基,还可以包括C-末端氨基酸临近的氨基酸残基,具体地,从最末端其第20位的氨基酸残基,但不限于此。

[0100] 本发明的蛋白复合物可以包括以下至少一种结构:[生理活性多肽-脂肪酸衍生物-非肽基聚合物-生物相容性材料]和[生理活性多肽-非肽基聚合物-脂肪酸衍生物-生物

相容性材料]。构成结构的组分可以通过共价键以直链或支化的形式彼此连接,并且本发明的蛋白复合物可以包含各成分中的至少一个。由于本发明的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物可以包含两个或更多个反应基团,其可以通过共价键分别与生理活性多肽和生物相容性材料相连。此外,至少一个缀合物通过共价键与生物相容性材料相连,在所述缀合物中,生理活性多肽与非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物相连,从而可以使用生物相容性材料作为介质,形成生理活性多肽的单体、二聚体或多聚体。因此,可以有效地增强生理活性多肽在体内的活性和稳定性。

[0101] 在本发明的蛋白复合物中,生理活性多肽可以各种摩尔比与生物相容性材料相连。

[0102] 本发明另一方面提供一种制备蛋白复合物的方法,所述方法包括(a)通过非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物使生理活性多肽与生物相容性材料相连;以及(b)分离蛋白复合物,所述蛋白复合物是步骤(a)的反应产物。

[0103] 所述生理活性多肽、生物相容性材料和非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物如上文所定义。

[0104] 在步骤(a)中,三个组分可以通过共价键连接,并且共价键可以依次或同时存在。例如,当生理活性多肽和生物相容性材料与具有两个或更多个反应基团的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物相连时,依次进行如下反应是有利的:首先使生理活性多肽和生物相容性材料中的任一个与非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的一个反应基团相连,然后使生理活性多肽和生物相容性材料中的另一个与非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的其他反应基团相连,以最小化除目标蛋白复合物以外的副产物的产生。

[0105] 因此,步骤(a)可以包括:

[0106] (a1)使生物相容性材料和生理活性多肽中的一个与非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的一个反应基团相连;

[0107] (a2)从步骤(a1)的反应混合物中分离缀合物,其中,生物相容性材料或生理活性多肽与非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物相连;以及

[0108] (a3)使生物相容性材料和生理活性多肽中的另一个与步骤(a2)中分离的缀合物的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的其他反应基团相连,以制备蛋白复合物,其中,非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的两个或更多个反应基团分别与生理活性多肽和生物相容性材料相连,但不限于此。

[0109] 考虑到参与反应的肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的反应基团的类型,步骤(a1)和(a3)的反应可以在还原剂的存在下进行。具体地,还原剂可以是氰基硼氢化钠(NaCNBH_3)、硼氢化钠、二甲氨基硼酸盐、甲基吡啶硼烷络合物或硼烷吡啶。

[0110] 在上述方法中,考虑到产品的特性,例如产品所需的纯度、产品的分子量以及产品的电荷,根据需要,可以合适地选择常规的蛋白分离方法进行步骤(a2)和(b)。例如,可以应用各种已知的方法,包括尺寸排阻色谱和离子交换色谱,并且在需要时,可以组合使用多种不同的方法以获得更高的纯度。

[0111] 在步骤(a1)中,生理活性多肽与非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的反应摩尔比以及生物相容性材料与非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的反应摩尔比可以各自是1:1-1:20。具体地,生理活性多肽与非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的

反应摩尔比可以是1:2-1:10,并且生物相容性材料与非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物的反应摩尔比可以是1:4-1:20。同时,在步骤(a3)中,步骤(a2)中分离的缀合物与生物相容性材料或生理活性多肽的反应摩尔比可以是1:0.5-1:20,但不限于此。

[0112] 本发明另一方面提供了一种通过所述方法制备的蛋白复合物以及包含所述制备的蛋白复合物的药物组合物。相比天然存在的生理活性多肽,本发明的药物组合物可以是一种长效制剂,具有延长的体内持续时间和增强的体内稳定性。

[0113] 包含本发明的复合物的药物组合物可以包含药学上可接受的载体。对于口服给药,药学上可接受的载体可以包含粘合剂、润滑剂、崩解剂、赋形剂、增溶剂、分散剂、稳定剂、助悬剂、着色剂、调味剂等。对于注射制剂,药学上可接受的载体可以包含缓冲剂、防腐剂、镇痛剂、增溶剂、等渗剂、稳定剂等。对于局部给药制剂,药学上可接受的载体可以包含基底、赋形剂、润滑剂、防腐剂等。本发明的药物组合物可以与上述药学上可接受的载体组合配制为各种剂型。例如,对于口服给药,药物组合物可以配制为片剂、锭剂、胶囊剂、酏剂、混悬剂、糖浆剂、薄片等。对于注射制剂,药物组合物可以配制为单剂量安瓿或多剂量形式。药物组合物也可以配制为溶液剂、混悬剂、片剂、丸剂、胶囊剂、缓释制剂等。

[0114] 同时,适用于制剂的载体、赋形剂和稀释剂的实例包括乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯胶、藻酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁、矿物油等。

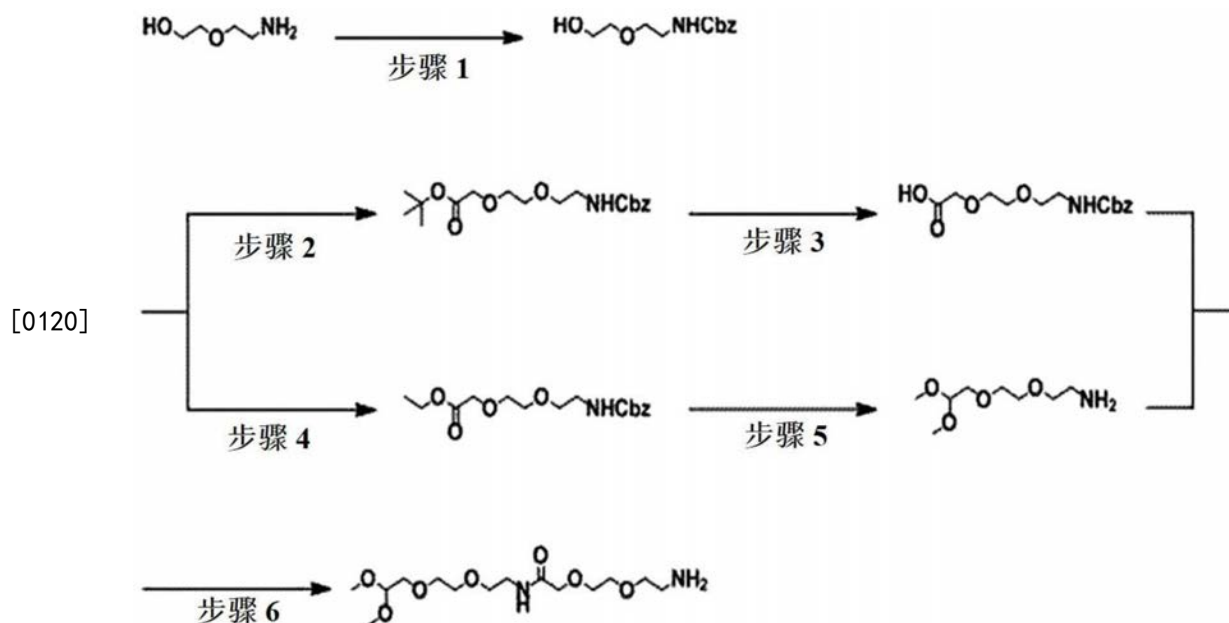
[0115] 此外,本发明的药物组合物还可以包含填料、抗凝剂、润滑剂、湿润剂、调味剂和防腐剂等。

[0116] 实施例

[0117] 在下文中,参考以下实施例更详细地描述本发明。但是,这些实施例仅用于说明目的,而不意图限制本发明的范围。

[0118] 制备例1: 2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)-N-(2-(2-(2,2-二甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)乙酰胺(中间体1)的合成

[0119] 反应路线1



[0121] 步骤1. 2-(2-羟基乙氧基)乙基氨基甲酸苄酯的制备

[0122] 将2-(2-氨基乙氧基)乙醇(150mL, 1.459mol)溶于四氢呋喃(THF, 5L)后, 向其中加入三乙胺(229mL, 1.645mol)和氯甲酸苄酯(211mL, 1.495mol), 将混合物搅拌12小时。将固体滤出, 用乙酸乙酯洗涤, 并将滤液浓缩。将浓缩液通过柱层析纯化以获得标题化合物(202g)。

[0123] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 7.37-7.29 (m, 5H), 5.25 (br, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.13-4.11 (m, 2H), 3.57-3.54 (m, 4H), 3.43-3.38 (m, 2H), 2.24 (br, 1H)。

[0124] 步骤2. 3-氧代-1-苯基-2,7,10-三氧杂-4-氮杂十二烷-12-酸叔丁酯的制备

[0125] 将步骤1获得的2-(2-羟基乙氧基)乙基氨基甲酸苄酯(129g, 0.539mol)溶于THF(2L)后, 在0℃下向其中滴加叔丁醇钾(60.5g, 0.593mol)。30分钟之后, 向其中加入溴乙酸叔丁酯, 并在0℃下搅拌3小时并在室温下进一步搅拌15小时。通过向反应溶液中加入水以终止反应, 将所得物浓缩并用乙酸乙酯萃取。将有机层用无水硫酸镁干燥并过滤。将滤液浓缩并通过柱层析纯化以获得标题化合物(87.5g)。

[0126] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 7.36-7.30 (m, 5H), 5.38 (br, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.00 (s, 2H), 3.70-3.64 (m, 4H), 3.60-3.56 (m, 2H), 3.43-3.40 (m, 2H), 1.46 (s, 9H)。

[0127] 步骤3. 3-氧代-1-苯基-2,7,10-三氧杂-4-氮杂十二烷-12-酸的制备

[0128] 将步骤2中获得的3-氧代-1-苯基-2,7,10-三氧杂-4-氮杂十二烷-12-酸叔丁酯(9.5g, 26.880mmol)溶于二氯甲烷(32mL)后, 其中加入三氟乙酸(32mL), 将混合物在室温下搅拌5小时。将反应溶液过滤并浓缩后获得标题化合物(7.1g)。

[0129] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 7.36-7.31 (m, 5H), 5.24 (s, 1H), 5.11 (s, 2H), 4.15 (s, 2H), 3.75-3.59 (m, 6H), 3.43-3.41 (m, 2H)。

[0130] 步骤4. 3-氧代-1-苯基-2,7,10-三氧杂-4-氮杂十二烷-12-酸乙酯的制备

[0131] 将步骤1中获得的2-(2-羟基乙氧基)乙基氨基甲酸苄酯(20.0g, 83.588mmol)溶于THF(320mL)后, 在0℃下向其中滴加叔丁醇钾(9.4g, 83.588mmol)。30分钟后, 向其中加入溴乙酸乙酯(11.5mL, 100.305mmol), 将混合物在0℃下搅拌3小时并在室温下进一步搅拌15小

时。通过向反应溶液中加入水以终止反应,将所得物浓缩并用乙酸乙酯萃取。将有机层用无水硫酸镁干燥并过滤,将滤液浓缩并通过柱层析纯化以获得标题化合物(9.5g)。

[0132] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 7.36-7.30 (m, 5H), 5.32 (br, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.19 (q, 2H), 4.12 (s, 2H), 3.72-3.65 (m, 4H), 3.59-3.56 (m, 2H), 3.41-3.38 (m, 2H), 1.26 (t, 3H)。

[0133] 步骤5. 2-(2-(2,2-二甲氧基乙氧基)乙氧基)乙烷-1-胺的制备

[0134] 将步骤4中获得的3-氧代-1-苯基-2,7,10-三氧杂-4-氮杂十二烷-12-酸乙酯(9.5g, 29.198mmol)溶于无水THF(60mL)后,在-78℃下及氩气的气氛下向其中缓慢地滴加二异丁基氢化铝(DIBAL-H, 43.8mL, 23.051mmol),将混合物在0℃下搅拌1小时。向反应溶液中缓慢地加入10%的盐酸,将混合物在0℃下搅拌30分钟,随后用乙酸乙酯萃取。将有机层用无水硫酸镁干燥并过滤,并将滤液浓缩。在氩气气氛下将产物溶于甲醇(36mL)后,向其中加入原甲酸三甲酯(25.6mL, 233.587mmol)和对甲苯磺酸(278mg, 1.460mmol),并将混合物在室温下搅拌2小时。将混合物用乙酸乙酯萃取,将有机层在用水硫酸镁干燥并过滤,将滤液浓缩并通过柱层析纯化。将产物溶于甲醇(40mL)后,向其中加入10%的Pd/C(780mg, 0.4wt%),将混合物于室温下在氢气气氛中搅拌3小时。将反应溶液过滤,干燥滤液以得到标题化合物(1.2g)。

[0135] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 4.66 (br, 2H), 4.54 (t, 1H), 3.74-3.64 (m, 6H), 3.65 (d, 2H), 3.41 (s, 6H), 3.01 (t, 2H)。

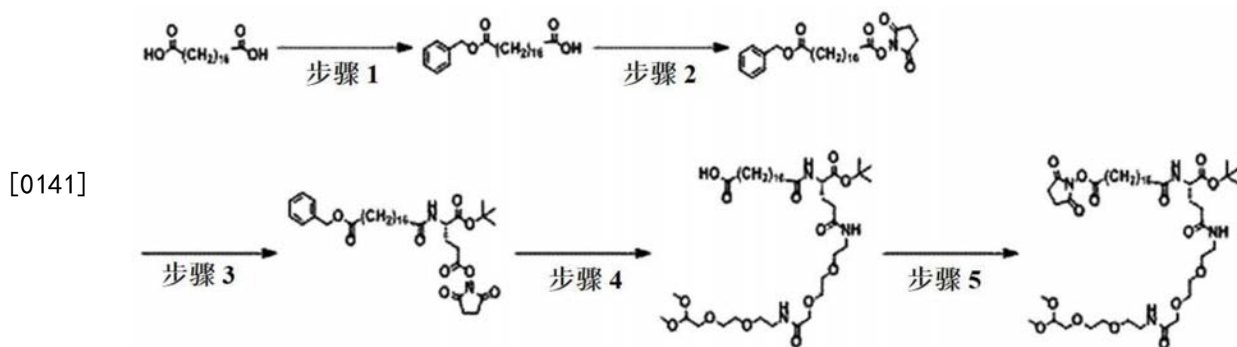
[0136] 步骤6. 2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)-N-(2-(2,2,2-二甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)乙酰胺的制备

[0137] 将步骤3中获得的3-氧代-1-苯基-2,7,10-三氧杂-4-氮杂十二烷-12-酸(1.2g, 5.951mmol)溶于乙腈(70mL)后,向其中加入(苯并三唑-1-基氧基)三(二甲基氨基)磷鎓六氟磷酸盐(BOP, 2.8g, 6.235mmol)和N,N-二异丙基乙胺(DIPEA, 3.0mL, 17.003mmol),并将混合物在室温下搅拌30分钟。向反应溶液中加入步骤5中获得的2-(2-(2,2-二甲氧基乙氧基)乙氧基)乙烷-1-胺(1.7g, 5.668mmol),并将混合物在室温下搅拌3小时。反应完成时,向其中加入乙酸乙酯,并用碳酸氢钠洗涤混合物。然后,用无水硫酸镁干燥所得物并过滤,滤液浓缩并通过柱层析纯化。将产物溶于甲醇(30mL),向其中加入10%的Pd/C(640mg, 0.4wt%),将混合物于室温下在氢气气氛中搅拌3小时。将反应液过滤,将滤液浓缩并干燥,得到标题化合物(中间体1, 1.0g)。

[0138] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 4.51 (t, 1H), 4.02 (s, 2H), 3.71-3.49 (m, 16H), 3.41 (s, 6H), 2.94 (t, 2H)。

[0139] 制备例2: 2,5-二氧代吡咯烷-1-基(S)-24-(叔丁氧基羰基)-3-甲氧基-12,21,26-三氧代-2,5,8,14,17-五氧杂-11,20,25-三氮杂四十三烷-43-酸酯的合成(中间体2)

[0140] 反应路线2



[0142] 步骤1. 18-(苄氧基)-18-氧代十八烷酸的制备

[0143] 将十八烷二酸(100g, 318mmol)、对甲苯磺酸(756mg, 3.975mmol)和苄醇(26.4mL, 254.4mmol)加入甲苯(3.7L), 并将混合物蒸馏。将硅藻土加入反应溶液, 将混合物冷却至40℃, 搅拌1小时并通过硅胶过滤。在减压下将滤液浓缩, 并在50℃下加入庚烷。过滤得固体, 用庚烷洗涤并干燥获得标题化合物(67.9g)。

[0144] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 7.36–7.34 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 2.35 (t, 4H), 1.64 (t, 4H), 1.25 (s, 24H)。

[0145] 步骤2. 18-(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)十八烷二酸-1-苄酯的制备

[0146] 将步骤1中获得的18-(苄氧基)-18-氧代十八烷酸(20.0g, 49.433mmol)溶于N-羟基琥珀酰亚胺(6.8g, 59.319mmol), 并将N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC, 12.24g, 59.312mmol)溶于N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP, 200mL)后, 将混合物在60℃下搅拌2.5小时。反应完成时, 将反应液冷却至室温并过滤以得到固体。向滤液中加水, 滤出产生的固体并用水洗涤。所得的固体用异丙醇重结晶以获得标题化合物(21.6g)。

[0147] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 7.37–7.31 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 2.83 (s, 2H), 2.60 (t, 2H), 2.35 (t, 2H), 1.77–1.53 (m, 6H), 1.25 (s, 24H)。

[0148] 步骤3. (S)-5-(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)2-(18-(苄氧基)-18-氧代十八烷酰胺基)戊二酸-1-叔丁酯的制备

[0149] 将步骤2中获得的18-(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)十八烷二酸-1-苄酯(9.0g, 17.940mmol)和L-谷氨酸5-叔丁酯(3.8g, 18.837mmol)加入NMP(80mL)后, 将混合物在50℃下搅拌4小时。反应完成时, 将反应溶液冷却至室温, 向其中加入水(230mL)、0.5M硫酸氢钾(34mL)和乙酸乙酯并对混合物进行萃取。将有机层用无水硫酸镁干燥并过滤, 并将滤液浓缩。将产物溶于NMP(68mL)后, 向其中加入N-羟基琥珀酰亚胺(3.3g, 28.705mmol)和N,N'-二异丙基碳二亚胺(DCC, 4.8g, 23.323mmol), 将混合物在室温下搅拌16小时。过滤固体并用水洗涤滤液。将有机层用无水硫酸镁干燥并过滤, 并将滤液浓缩。浓缩物通过柱层析纯化获得标题化合物(4.9g)。

[0150] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 7.36–7.32 (m, 5H), 6.24 (d, 1H), 5.12 (s, 2H), 4.62–4.60 (m, 1H), 3.39 (t, 2H), 2.85 (s, 4H), 2.80–2.73 (m, 2H), 2.33 (t, 2H), 2.25–2.00 (m, 2H), 1.67–1.63 (m, 4H), 1.48 (s, 9H), 1.25 (s, 24H)。

[0151] 步骤4. (S)-24-(叔丁氧基羰基)-3-甲氧基-12,21,26-三氧代-2,5,8,14,17-五氧杂-11,20,25-三氮杂四十三烷-43-酸的制备

[0152] 将步骤3中获得的(S)-5-(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)2-(18-(苄氧基)-18-氧代十

八烷酰胺基)戊二酸-1-叔丁酯(1.9g, 2.814mmol)、根据制备例1制备的中间体1(1.0g, 2.955mmol)和三乙胺(1.2mL, 8.443mmol)加入乙腈(40mL),将混合物在室温下搅拌16小时。反应完成时,将反应液浓缩并通过柱层析纯化。将产物溶于甲醇(80mL)后,向其中加入10%的Pd/C(600mg, 0.4wt%),并且混合物于室温下在氢气气氛中搅拌3小时。将反应溶液过滤后,将滤液浓缩并在减压下干燥以获得标题化合物(1.1g)。

[0153] ^1H NMR(300MHz, CDCl_3) δ 7.21 (br, 1H), 6.87 (br, 1H), 6.66 (d, 1H), 4.52 (t, 1H), 4.41-4.37 (m, 1H), 4.03 (s, 2H), 3.70-3.47 (m, 18H), 3.40 (s, 6H), 2.36-2.20 (m, 7H), 1.93-1.86 (m, 1H), 1.63-1.61 (m, 4H), 1.46 (s, 9H), 1.25 (s, 24H)。

[0154] 步骤5. (S)-2,5-二氧化吡咯烷-1-基24-(叔丁氧基羰基)-3-甲氧基-12,21,26-三氧代-2,5,8,14,17-五氧杂-11,20,25-三氮杂四十三烷-43-酸酯的制备

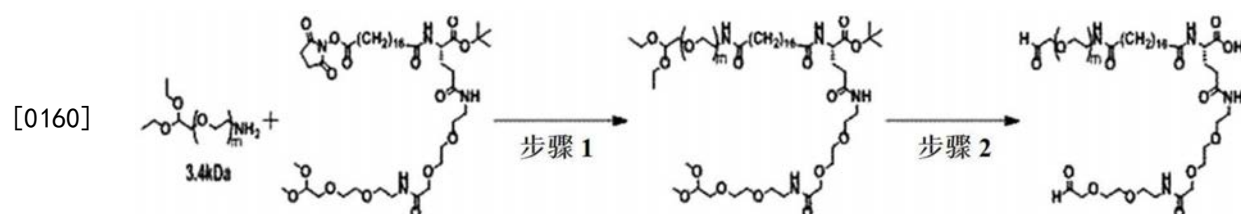
[0155] 将步骤4中获得的(S)-24-(叔丁氧基羰基)-3-甲氧基-12,21,26-三氧代-2,5,8,14,17-五氧杂-11,20,25-三氮杂四十三烷-43-酸(1.1g, 1.293mmol)溶于二氯甲烷(35mL)后,向其中加入N-羟基琥珀酰亚胺(164mg, 1.422mmol)和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC, 297mg, 1.551mmol),然后将混合物在室温下搅拌16小时。反应完成时,将所得物用碳酸氢钠洗涤并用无水硫酸镁干燥。过滤所得物,将滤液浓缩并通过柱层析纯化以获得标题化合物(中间体2, 778mg)。

[0156] ^1H NMR(300MHz, CDCl_3) δ 7.20 (br, 1H), 6.75 (br, 1H), 6.54 (d, 1H), 4.51 (t, 1H), 4.43-4.40 (m, 1H), 4.01 (s, 2H), 3.70-3.47 (m, 18H), 3.39 (s, 6H), 2.84 (s, 4H), 2.60 (t, 2H), 2.29-2.19 (m, 5H), 1.99-1.98 (m, 1H), 1.75 (t, 2H), 1.63-1.59 (m, 2H), 1.25 (s, 24H);

[0157] MS (ESI⁺): $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 917.6。

[0158] 实施例1:两端具有醛基的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物(A1d-PEG-FA)的制备

[0159] 反应路线3



[0161] 步骤1.两端引入缩醛基的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物(Acetal-PEG-FA)的制备

[0162] 将Acetal-PEG-胺(3.4kDa, 平均 $n=77$, 370mg, 0.11mmol)溶于二氯甲烷(22mL)中,并向其中加入三乙胺(23 μL , 0.164mmol)和根据制备例2制备的中间体2(50mg, 0.055mmol),随后将混合物在室温下反应16小时。反应完成时,浓缩反应溶液并通过MPLC纯化以获得标题化合物(60mg)。

[0163] MS: MW 4100-4400。

[0164] 步骤2.两端引入缩醛基的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物(A1d-PEG-FA)的制备

[0165] 将步骤4中获得的Acetal-PEG-FA(30mg, 0.007mmol)溶于二氯甲烷(1mL),并向其中加入三氟乙酸(53 μL , 0.714mmol),随后将混合物在室温下反应24小时。反应完成时,浓缩

反应溶液并用乙醚重结晶以获得标题化合物 (18mg)。

[0166] MS:MW 3900-4300。

[0167] 实施例2:使生理活性多肽与非肽基聚合物-偶联的脂肪酸衍生物相连

[0168] 为了使作为接头的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物(具有作为反应基团的醛基,通过实施例1在两端引入而制备)与胰岛素B链(一种生理活性多肽)的N-末端相连,将胰岛素粉(Biocon,India)溶于10mM盐酸。将胰岛素溶液与接头以1:2的摩尔比混合,并且将胰岛素的浓度调节至5mg/mL,随后在室温下反应2小时。在这种情况下,通过向其中加入以50mM柠檬酸钠缓冲液(pH 5.0)和异丙醇为混合溶剂的氰基硼氢化钠(SCB;NaCNBH₃)还原剂溶液以进行反应。使用包含柠檬酸钠(pH 3.0)和乙醇的缓冲液并采用钾浓度梯度的SP-HP色谱柱(GE,USA)纯化反应液。

[0169] 实施例3:蛋白复合物(其中免疫球蛋白Fc与非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物相连)的制备

[0170] 随后,为了使根据实施例2制备的缀合物(其中非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物与胰岛素相连)与免疫球蛋白Fc片段的N-末端(一种生物相容性材料)相连,将实施例2的缀合物与免疫球蛋白Fc片段以1:10的摩尔比混合,并且将蛋白的总浓度调整至20mg/mL,随后在25℃下反应12-18小时。在这种情况下,以包含氯化钠的100mM的HEPES缓冲液(pH 8.2)为反应溶液,并向其中加入20mM硼氢化钠作为还原剂。反应完成时,使用Tris缓冲液(pH 7.5)和Q-HP色谱柱(GE,USA)并采用氯化钙浓度梯度纯化反应溶液,随后使用尺寸排阻色谱柱(Superdex 200,GE,USA)分离未反应的蛋白。另外,只有这样的复合物使用Source 15Q色谱柱(GE,USA)(其中采用氯化钠和Tris(PH 6.0)浓度梯度)进行纯化,在所述复合物中,胰岛素通过非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物化合物接头以共价键与免疫球蛋白Fc片段相连。蛋白复合物通过SDS-PAGE(图1)确认。

[0171] 实施例4:蛋白复合物体内药代动力学的验证

[0172] 根据实施例3制备的蛋白复合物的体内药代动力学得到证实,并将其体内持续时间与现有的胰岛素进行对比。具体地,将广泛用于常规动物模型的SD大鼠用于证实药代动力学。将非禁食的8周龄正常大鼠分为以下组:人胰岛素的给药组(172nmol/kg)、免疫球蛋白Fc-PEG-胰岛素复合物的给药组(3.88nmol/kg)以及实施例3的蛋白复合物的给药组,即免疫球蛋白Fc-非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物-胰岛素复合物(以下为了便于描述,在后续实施例和附图中称为“免疫球蛋白Fc-脂肪酸衍生物-胰岛素”)(3.88nmol/kg)。单次皮下注射测试物质至每组三只正常大鼠中。通过尾静脉采血,在0.25、0.75、1、1.5、2、3和5小时,从人胰岛素的给药组采集全血,在1、4、8、24、48、72、96、120和144小时,从免疫球蛋白Fc-PEG-胰岛素复合物的给药组和免疫球蛋白Fc-脂肪酸衍生物-胰岛素复合物的给药组,即实施例3的蛋白复合物,采集全血。室温下,在1.5mL的微量离心管中,以5,000rpm离心10分钟,从采集的全血中分离出血清,并在-20℃下保存。对血清进行酶联免疫吸附测定(ELISA),以定量每组的血清中所包含的胰岛素复合物的浓度。同时将每次收集的血清和抗人IgG4-HPR(Alpha Diagonosis,#10124)添加至涂敷有胰岛素单克隆抗体(ALPC0,#80-INSHU-E10.1)的板上,以进行ELISA,在室温下反应1小时,并用TMB试剂进行显色反应,然后在450nm波长下测量吸光度。基于每小时的血液浓度,使用Phoenix™ WinNonin 7.0计算药代动力学参数,并在图3中示出。

[0173] 如图3所示,相比人胰岛素,所有免疫球蛋白Fc-PEG-胰岛素复合物和免疫球蛋白Fc-脂肪酸衍生物-胰岛素的持续时间显著地延长。特别地,当给药相同剂量时,测得的免疫球蛋白Fc-脂肪酸衍生物-胰岛素复合物和免疫球蛋白Fc-PEG-胰岛素复合物的半衰期分别为35.8小时和14.8小时。这表明,本发明的免疫球蛋白Fc-脂肪酸衍生物-胰岛素复合物的体内持续时间延长。特别地,结果也表明,作为新型接头,非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物取得了优异的效果。

[0174] 这些结果表明,本发明的非肽基聚合物偶联的脂肪酸衍生物接头(其将生理活性多肽与生物相容性材料相连)可以显著地延长与其连接的生理活性多肽的持续时间,从而提供一种能够减少给药剂量和频率的新药物平台的状态。

[0175] 本发明的以上描述是为了说明的目的,并且本领域的技术人员应当理解,在不改变本发明的技术构思和基本特征的情况下可以进行各种改变和修改。因此,显然上述实施方案在所有方面都是示例性的,并不限制本发明。本发明的范围由所附的权利要求而不是由前述的说明书来定义,因此,落入权利要求的界限之内的所有改变和修改、或与此界限等同的范围旨在由所述权利要求涵盖。

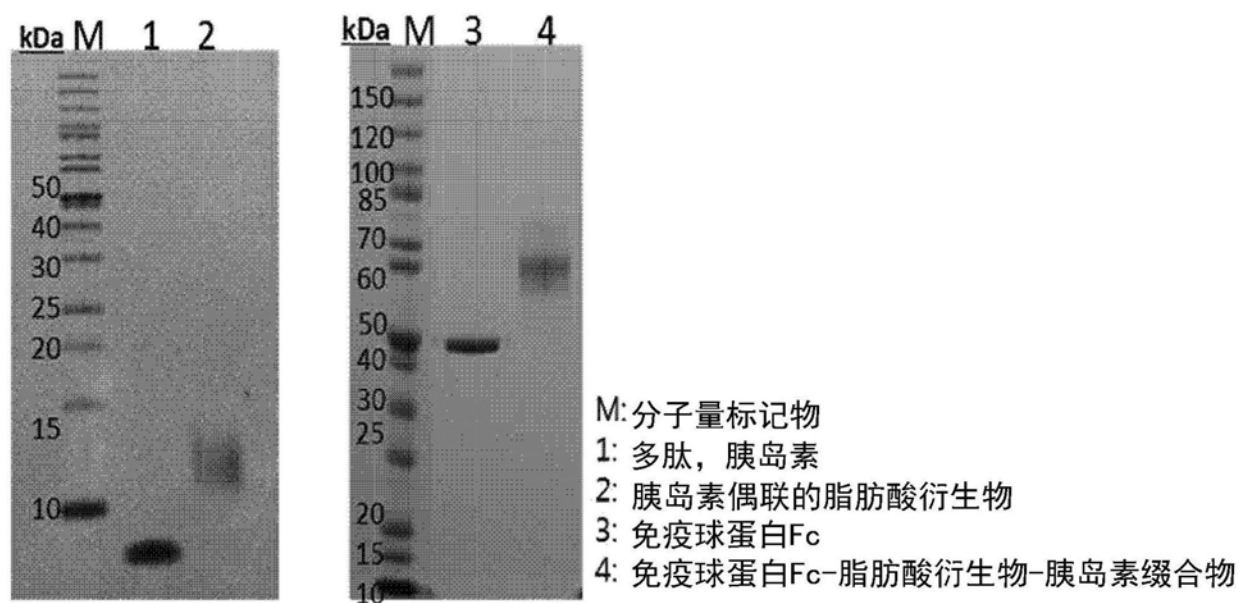


图1

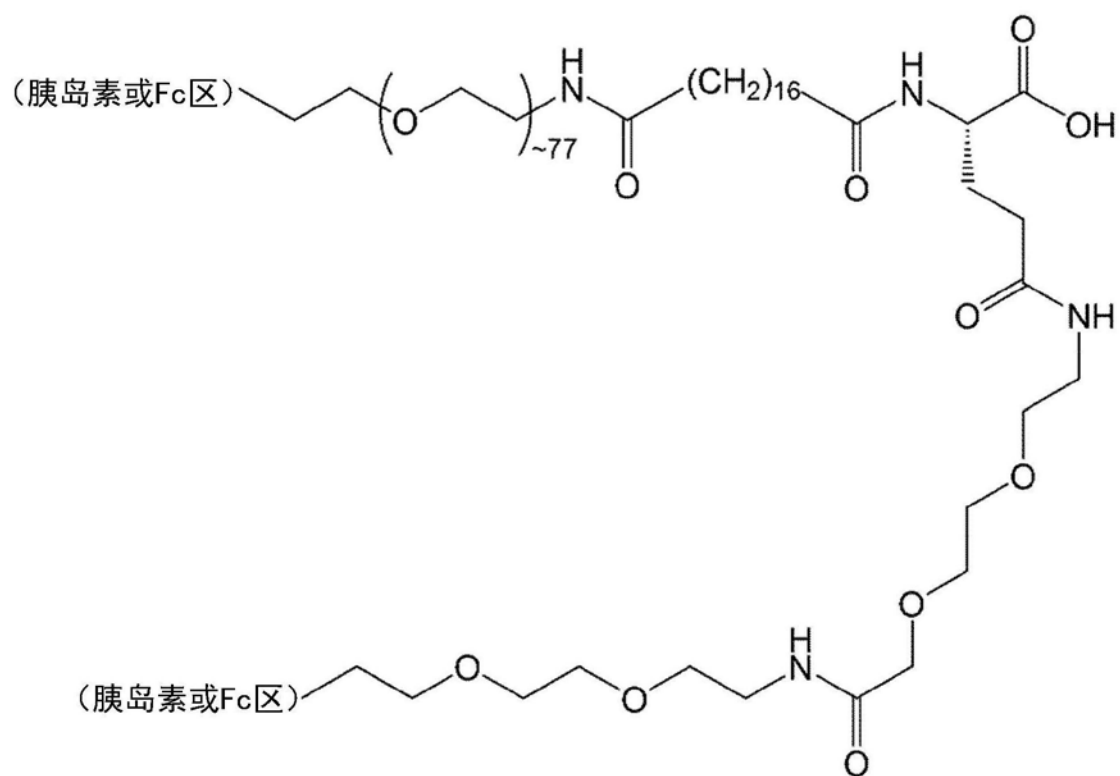


图2

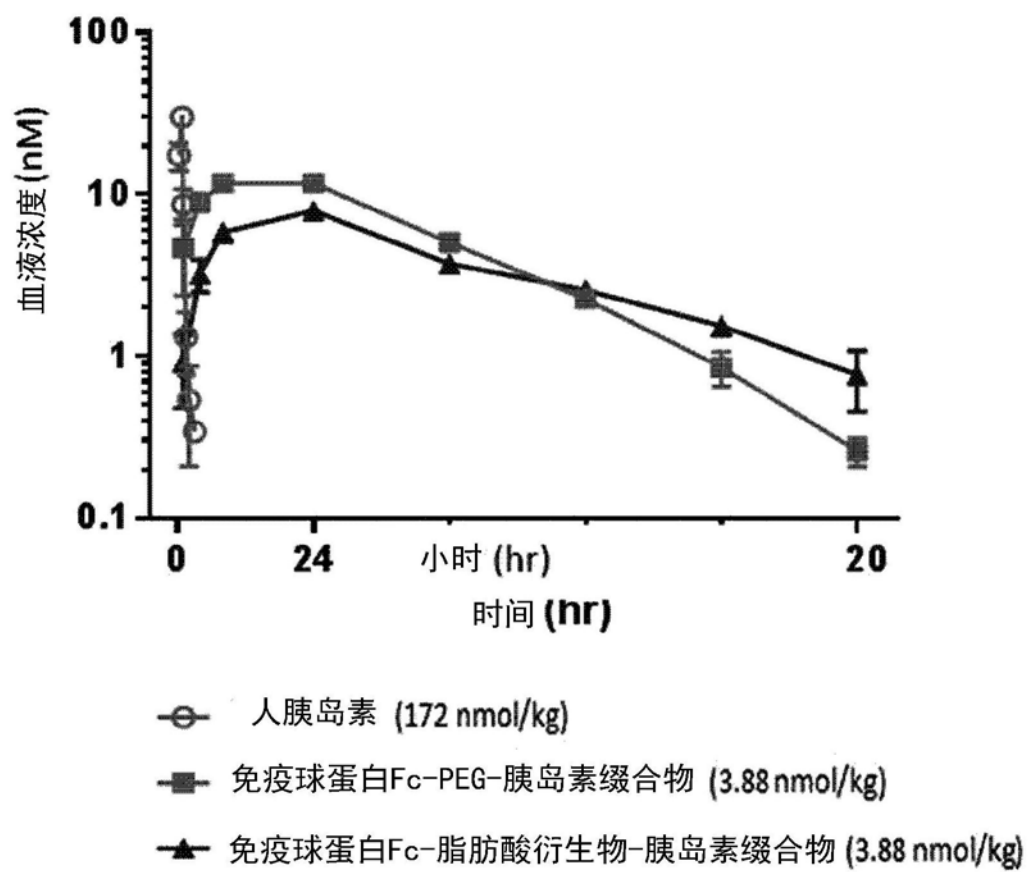


图3