



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109589415 A

(43)申请公布日 2019.04.09

(21)申请号 201811043884.3

A61P 35/00(2006.01)

(22)申请日 2018.09.07

A61P 37/02(2006.01)

(66)本国优先权数据

A61P 31/12(2006.01)

201710919466.5 2017.09.30 CN

A61P 31/04(2006.01)

(71)申请人 天津键凯科技有限公司

地址 300457 天津市滨海新区经济技术开  
发区西区康诚街9号

(72)发明人 王庆彬 宋艳萍 冯泽旺 汪进良  
熊艳丽 赵宣

(74)专利代理机构 北京布瑞知识产权代理有限  
公司 11505

代理人 孟潭

(51)Int.Cl.

A61K 47/60(2017.01)

A61K 38/20(2006.01)

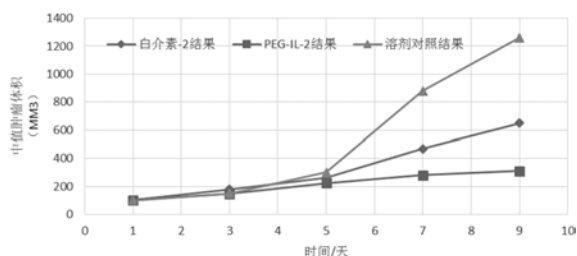
权利要求书8页 说明书30页 附图3页

(54)发明名称

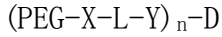
一种聚乙二醇-多肽和蛋白类药物的结合物

(57)摘要

本发明公开了一种聚乙二醇-多肽和蛋白类药物的结合物,特别是一种聚乙二醇-白细胞介素(如白介素2)的结合物,所述结合物中,药物如白介素2可以从结合物结构中降解分离,可实现缓释和控释,降低给药频率,大大提高药物的生物利用度和病人的依从性。特别地,本发明的发明人对结合物的偶合度进行了更深入的研究,得到偶联度明确的结合物或其混合物,有利于后续药效的优化和药理的研究。



1. 一种聚乙二醇-连接子-药物结合物,其具有如下结构:



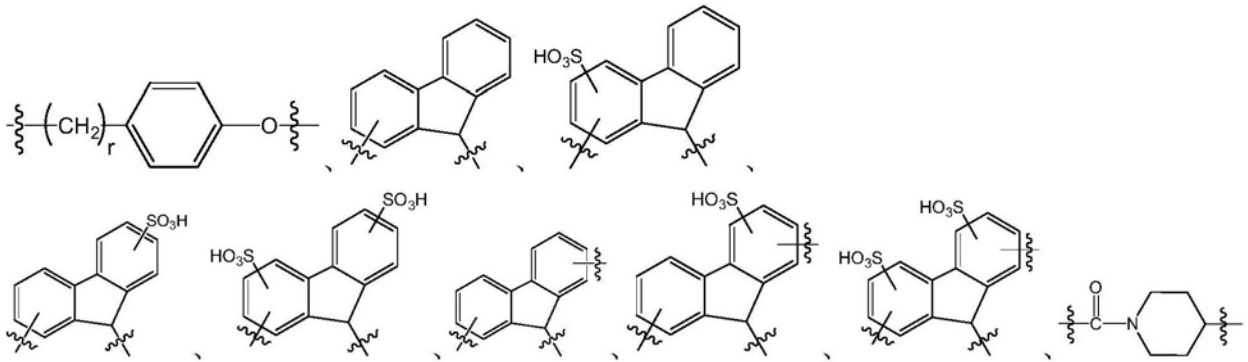
(IX)

其中,PEG为聚乙二醇残基,

X为PEG与L的连接基团,选自: $-(CH_2)_a-$ 、 $-(CH_2)_aCO-$ 、 $-(CH_2)_aOCO-$ 、 $-(CH_2)_aNHCO-$ 、 $-NH(CH_2)_aCO-$ 、 $-(CH_2)_aSO_2-$ 、 $-O(CH_2)_a-$ 、 $-O(CH_2)_aCO-$ 、 $-O(CH_2)_aOCO-$ 、 $-O(CH_2)_aNHCO-$ 和 $-O(CH_2)_aSO_2-$ 中的一种或多种的组合,a为0-10的整数,

Y为L与D的连接基团,选自: $-(CH_2)_r-$ 、 $\begin{matrix} R_{17} \\ | \\ \text{---} (CH_2)_r \text{---} C \text{---} \\ | \\ R_{18} \end{matrix}$ 、 $-(CH_2)_rO-$ 、 $-(CH_2)_rCO-$ 、 $-(CH_2)_rNH-$ 、

$-(CH_2)_rCONH-$ 、 $-(CH_2)_rNHCO-$ 、 $-(CH_2)_rSH-$ 、



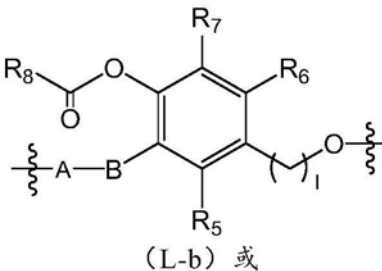
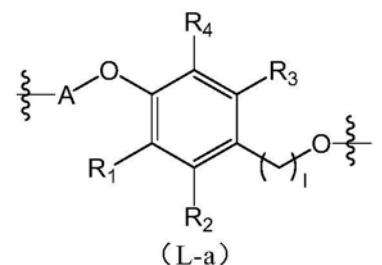
和 中的一种或多种的组合,r为0-10的整数,

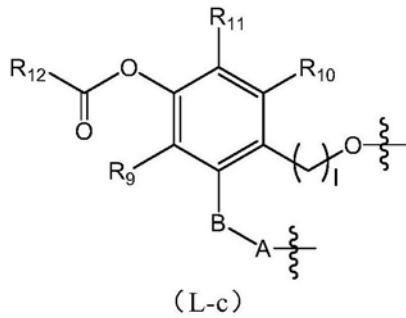
R<sub>17</sub>和R<sub>18</sub>独立地选自: $-H$ 、C<sub>1</sub>-6的烷基、C<sub>1</sub>-6的烷氧基、C<sub>3</sub>-6环烷基和C<sub>4</sub>-10亚烷基环烷基,

D为多肽和蛋白质类药物,

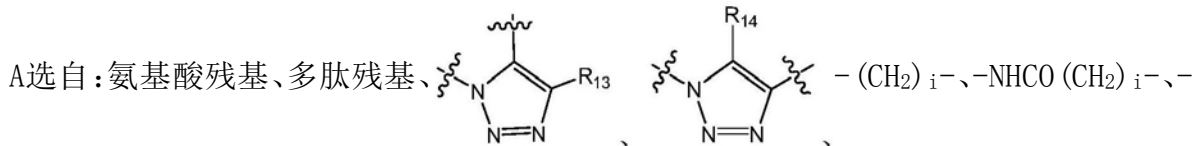
n为整数,且 $1 \leq n \leq 500$ ,

L为连接子,其具有如下结构:





其中,1为1-5的整数,



$R_{1-7}$ 、 $R_{9-11}$ 独立地选自: $-H$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、C1-6的烷基、C1-6的烷氧基、C3-6的环烷基、C1-6的烯基、C6-12的芳基、C6-12芳烷基、C3-12芳族或非芳族的杂环基、C3-12的杂环烷基和 $-(CH_2)_{1-6}-Z$ ,

$R_8$ 和 $R_{12}$ 独立地选自C1-6的烷基,

$R_{13-16}$ 独立地选自: $-H$ 、C1-6的烷基,

B为连接基团 $-B_1-B_2-$ ,

其中, $B_1$ 选自: $-(CH_2)_j-$ 、 $-NHCO(CH_2)_j-$ 和 $-CONH(CH_2)_j-$ ,  $j$ 为0-6的整数,

$B_2$ 选自: $-C=O$ 、 $-C=S$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-C(S)O-$ 和 $-S-S-$ 。

2. 如权利要求1所述的结合物,其特征在于,所述的多肽和蛋白类药物为细胞因子、人血红蛋白、凝血因子、血管内皮生长因子抗体拮抗剂、蛋白类激素、抗体或酶及辅酶类药物;优选地,所述D为细胞因子,更优选为白介素;进一步优选地,所述D为IL-2,优选为rhIL-2。

3. 如权利要求2所述的结合物,其特征在于, $n$ 为1-12的整数,优选为1-7的整数。

4. 如权利要求1所述的结合物,其特征在于,连接子中,所述 $R_{5-7}$ 均为 $-H$ ;

所述的 $R_{9-11}$ 均为 $-H$ ;

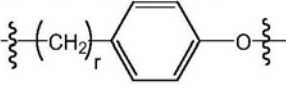
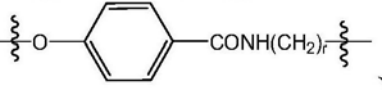
所述 $R_8$ 和/或 $R_{12}$ 为甲基;

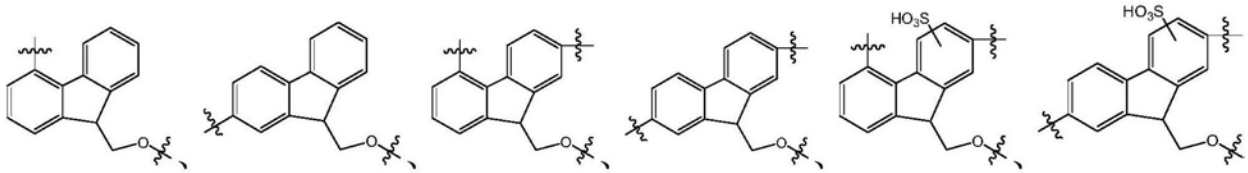
所述1为1;

连接子L-a中,所述A为 $-COCH_2NH-$ 、 $-COCH(CH_3)NH-$ 或 $-COCH(CH(CH_3)_2)NH-$ ;

连接子L-b或L-c中,所述 $-B-A-$ 为 $-OCH_2CH_2NH-$ 。

5. 如权利要求1所述的结合物,其特征在于,所述X选自: $-(CH_2)_a-$ 、 $-(CH_2)_aCO-$ 、 $-(CH_2)_aNHCO-$ 、 $-NH(CH_2)_aCO-$ 、 $-O(CH_2)_a-$ 、 $-O(CH_2)_aCO-$ 、 $-O(CH_2)_aNHCO-$ 中的一种或多种的组合;和/或,

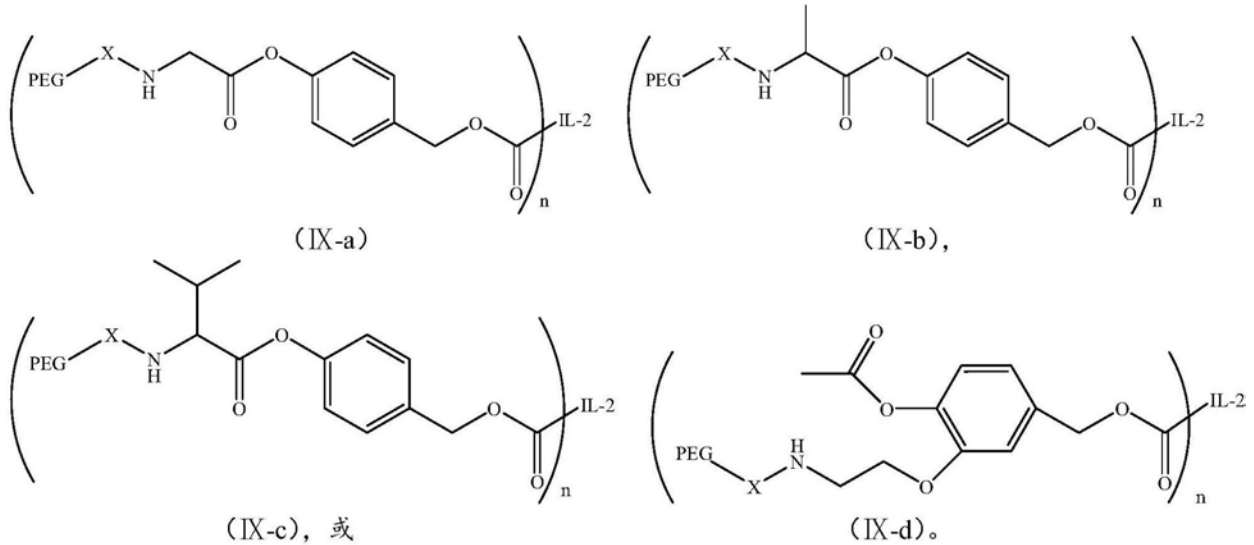
所述Y为 $-(CH_2)_rCO-$ 与单键、 $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2CH_2CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH(CH_3)-$ 、 $-(CH_2)_rO-$ 、 $-(CH_2)_rCONH-$ 、 $-(CH_2)_rNHCO-$ 、 $-(CH_2)_rNH-$ 、 $-(CH_2)_rSH-$ 、、



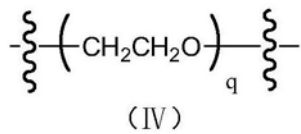
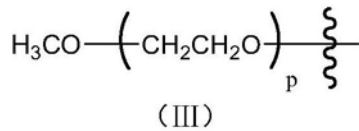
中的一种或多种的组合。

6. 如权利要求1所述的结合物,其特征在于,所述X为单键、-CH<sub>2</sub>-、-CO-、-CH<sub>2</sub>CO-或-NHCO-;和/或,所述的Y为-CO-。

7. 如权利要求2所述的结合物,其特征在于,所述聚乙二醇-连接子-IL-2结合物具有如下结构:



8. 如权利要求1-7任一项所述的结合物,其特征在于,所述PEG为直链聚乙二醇残基,其具有通式III或IV所示的结构:

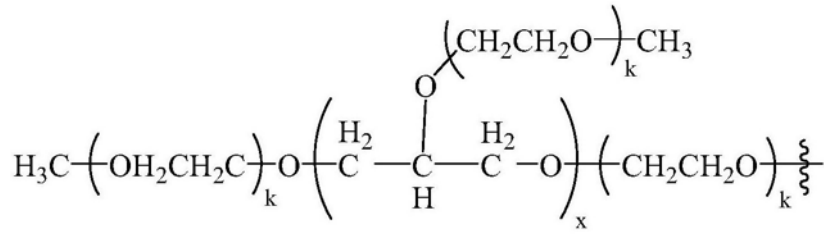


其中,p和q独立地选自1-960的整数;

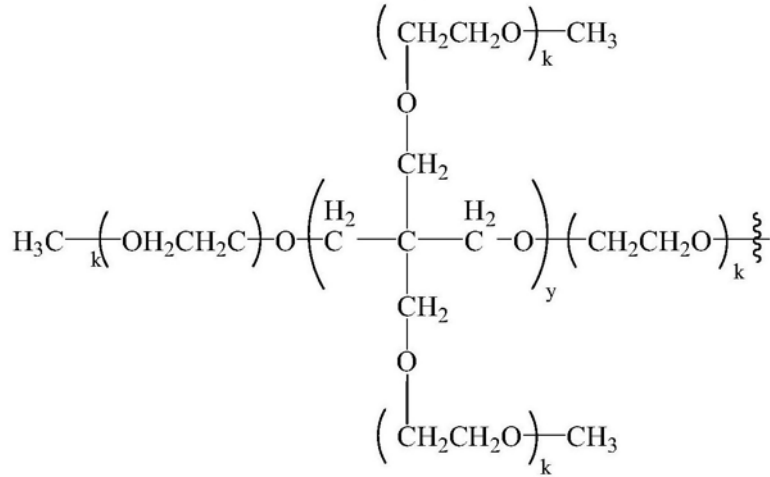
或,

所述PEG为Y型聚乙二醇残基,其具有通式V或VI所示的结构:





(VII-2), 或

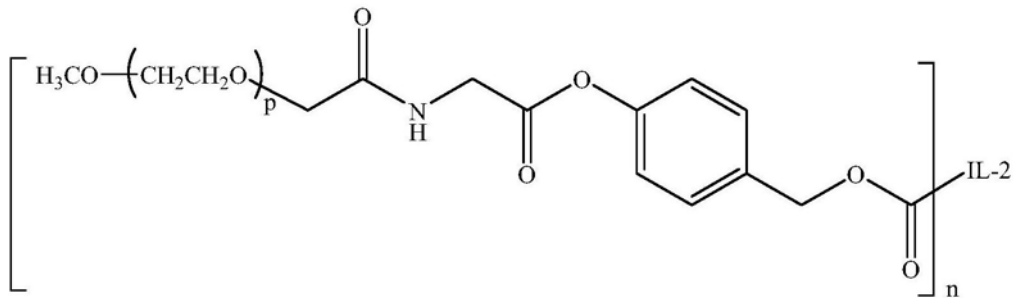


(VII-5)

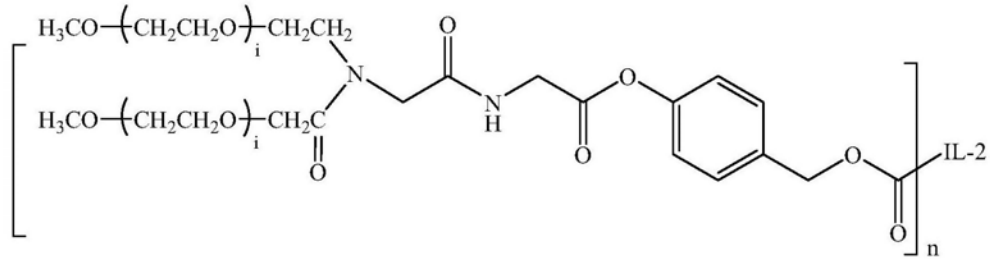
其中, x和y独立地选自1-10的整数。

10. 如权利要求8所述的结合物, 其特征在于, 所述的PEG的分子量为1-100KDa, 优选为10-50KDa。

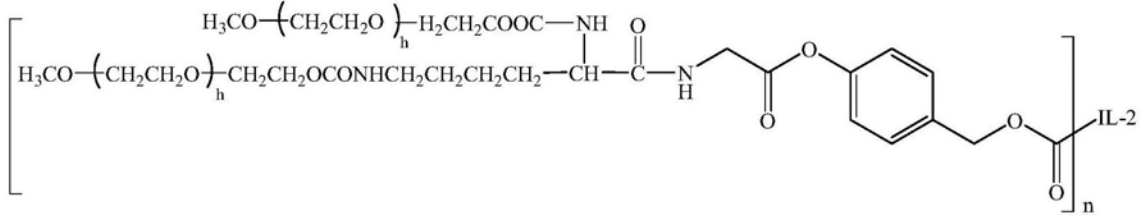
11. 如权利要求2所述的结合物, 其特征在于, 所述聚乙二醇-连接子-IL-2结合物具有如下结构:



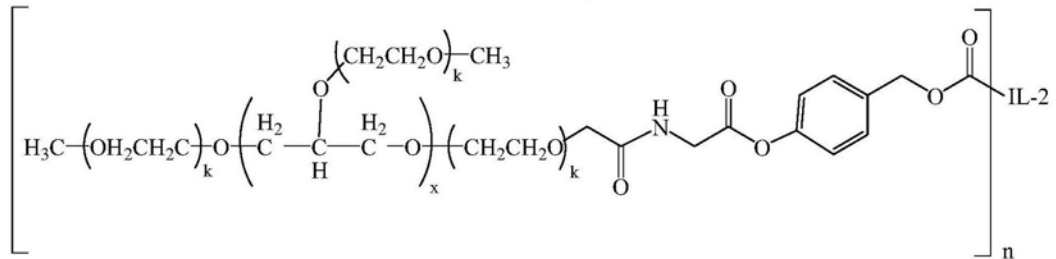
(IX-a-1),



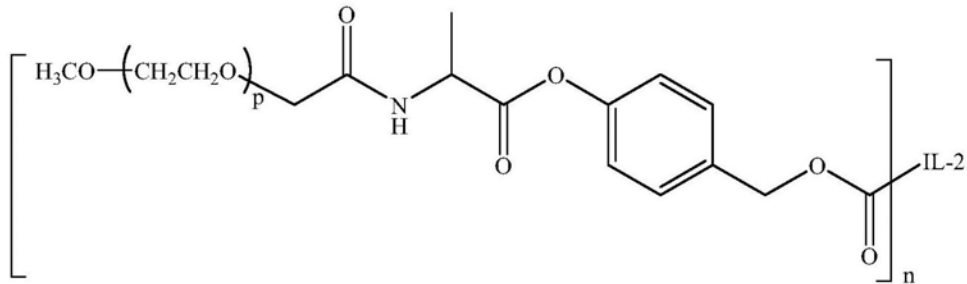
(IX-a-2) ,



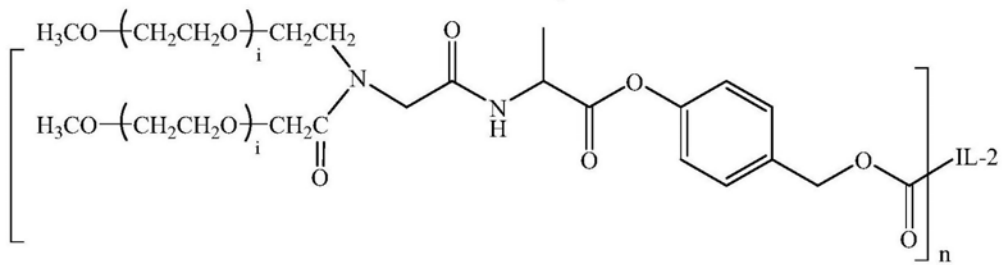
(IX-a-3) ,



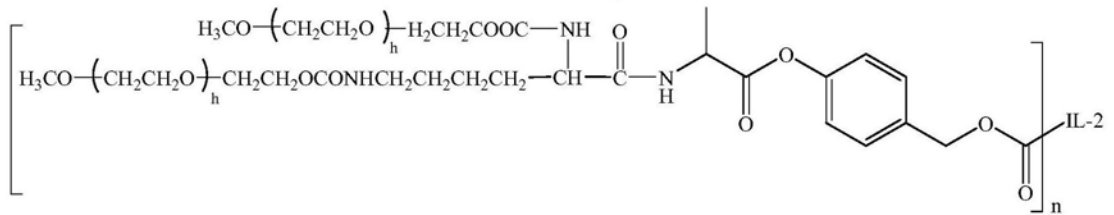
(IX-a-4) ,



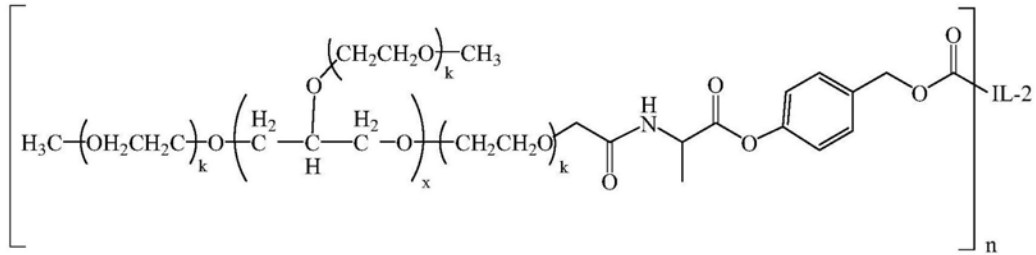
(IX-b-1) ,



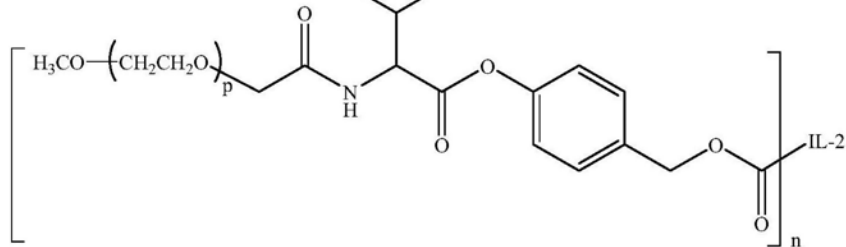
(IX-b-2) ,



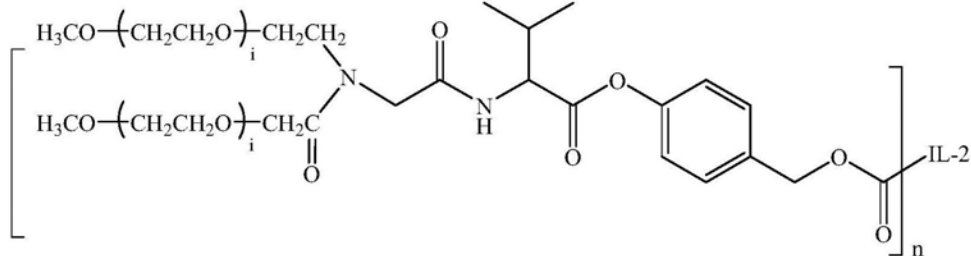
(IX-b-3) ,



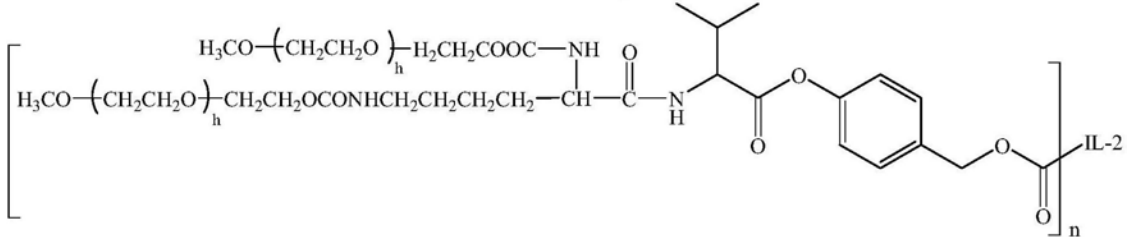
(IX-b-4),



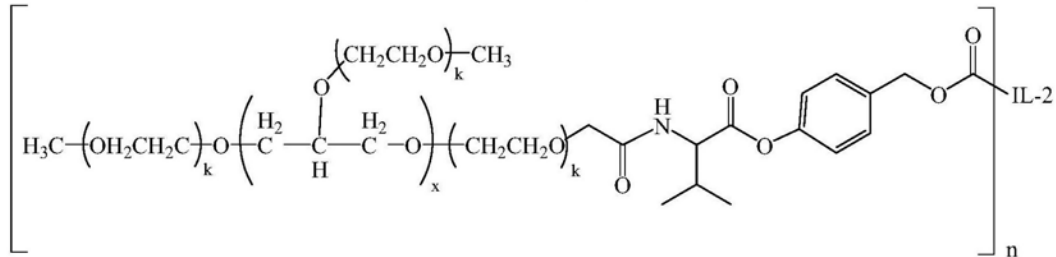
(IX-c-1),



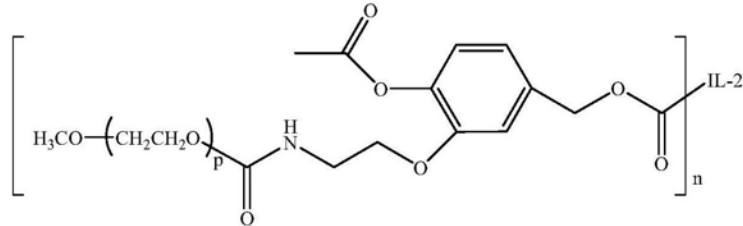
(IX-c-2),



(IX-c-3),

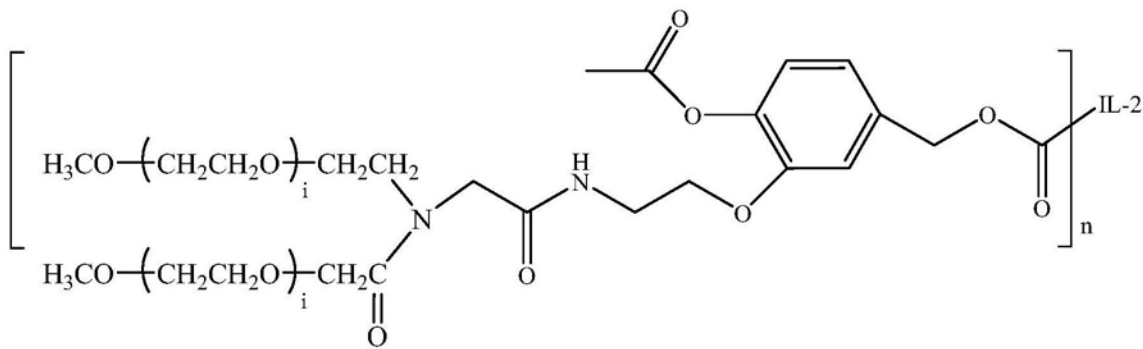


(IX-c-4),

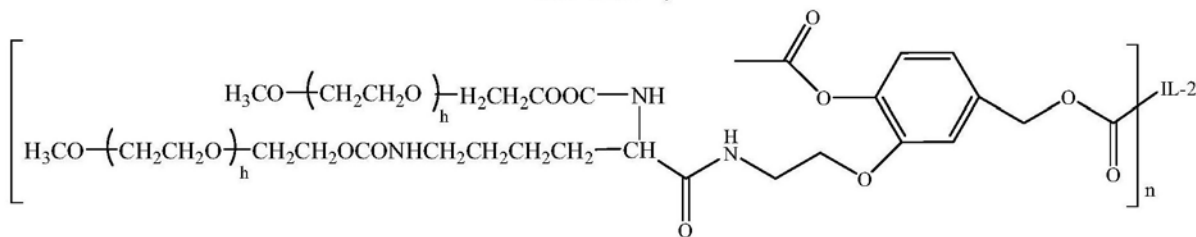


(IX-d-1),

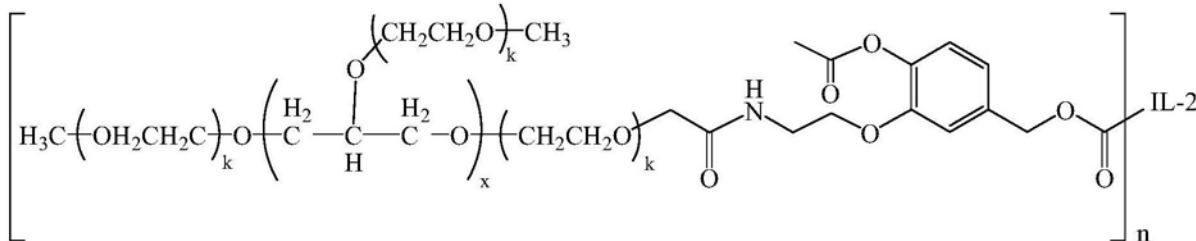




(IX- d-2) ,



(IX- d-3), 或,



(IX- d-4)

其中,p和q独立地选自1-960的整数,

i和h独立地选自1-480的整数,

k是1-320的整数,

x为1-10的整数,

n为1-12的整数。

12. 一种包括权利要求1-11任一项所述的聚乙二醇-连接子-药物结合物的组合物,所述组合物中包括至少两种或至少三种具有不同n值的聚乙二醇-连接子-药物结合物。

13. 如权利要求12所述的组合物,其特征在于,所述D为IL-2,优选为rhIL-2;所述n为1-7的整数;

优选地,所述组合物为n=1、2和3的聚乙二醇-连接子-药物结合物的组合物;或,

所述组合物为n=3、4和5的聚乙二醇-连接子-药物结合物的组合物;或,

所述组合物为n=4、5、6和7的聚乙二醇-连接子-药物结合物的组合物。

14. 一种药物组合物,其包含权利要求1-11任一项所述的聚乙二醇-连接子-药物结合物或权利要求12或13所述的组合物。

15. 一种权利要求1-11任一项所述的聚乙二醇-连接子-药物结合物、权利要求12或13所述的组合物或权利要求14所述的药物组合物在制备预防和/或治疗疾病的药物中的应用;

优选地,所述的疾病为肿瘤、自身免疫疾病、病毒性疾病或细菌性疾病。

## 一种聚乙二醇-多肽和蛋白类药物的结合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医药技术领域,具体涉及一种聚乙二醇-多肽和蛋白类药物的结合物,特别是一种聚乙二醇-白细胞介素(如白介素2)的结合物。

### 背景技术

[0002] 目前,在临床上,多肽和蛋白类药物口服给药时,由于进入消化道后容易受各种蛋白酶、肽酶等水解环境破坏,药效降低甚至丧失,如某些药物对胃部有刺激性或不耐酸,易被胃酸破坏,因此不适宜口服,其主要给药途径为注射给药,直接注入人体组织或血管,不经过消化系统和肝脏,不会受到消化液的破坏和食物的影响,药物吸收快,血药浓度升高迅速,给药剂量精确,但在临床应用中,由于注射给药后药物常常会迅速分布全身,对病灶部位如肿瘤组织的靶向性较差,生物利用度不高,药效相对不高,且不良反应出现迅速,应对处理相对困难,另外,常常需要多次给药,且给药时需严格遵守无菌操作原则,需专业人士如医生和护士来操作,不利于病人的依从性,因此药物的临床应用常常遭遇瓶颈。

[0003] 现有技术中科研人员常利用水溶性聚合物如聚乙二醇修饰连接药物,来延长药物的生理半衰期,降低药物的免疫原性和毒性,但药物在体内的释放和药效有时并不理想。实验中发现通过连接子(linker)将水溶性聚合物和药物连接形成聚合物-药物结合物,药物从结合物链上的降解,可以达到缓释和控释的目的,药物在病灶(例如患癌)部位停留更长时间,可降低给药频率,减少患者用药不便。如专利文献CN200680029849.5公开了一种轭合物,其中包括含有可电离氢原子的芳香族部分如苄、间隔部分和水溶性聚合物。

[0004] 本发明的发明人经过大量的试验和研究,得到一种多肽和蛋白类药物通过非肽连接子与聚乙二醇的结合物,特别是一种白介素(如白介素2)通过非肽连接子与聚乙二醇的结合物,所述结合物中,药物可以从结合物结构中降解分离,可实现缓释和控释,降低给药频率,大大提高药物的生物利用度和病人的依从性。特别是,发明人对结合物的偶合度进行了更深入的研究,得到偶合度明确的结合物或其混合物,有利于后续药效的优化和药理的研究。

### 发明内容

[0005] 本发明的一个目的是提供一种连接子化合物。

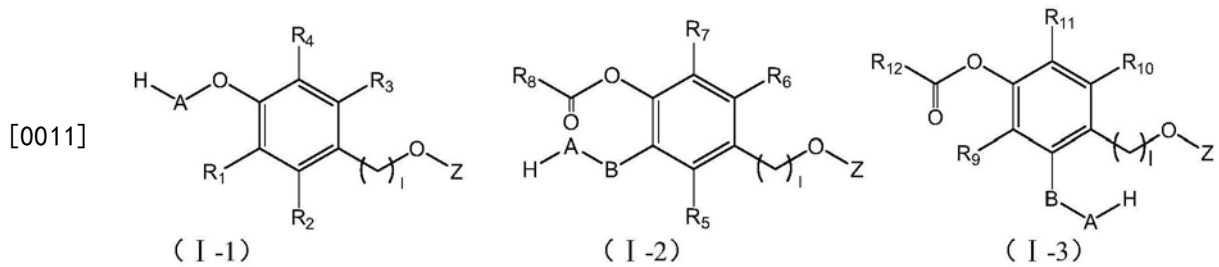
[0006] 本发明的另一个目的是提供一种聚乙二醇与上述连接子的结合物及其衍生物。

[0007] 本发明的另一个目的是提供一种聚乙二醇-连接子-药物的结合物。

[0008] 本发明的另一个目的是提供包含上述结合物及其与药学上可接受的载体或添加剂的药物组合物。

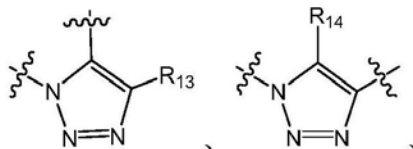
[0009] 本发明的还一个目的是提供一种上述结合物、药物组合物在制备用于预防和/或治疗疾病的药物中的应用。

[0010] 具体地,本发明第一方面提供一种化合物,其具有如下结构:



[0012] 其中,1为1-5的整数,

[0013] Z选自:-H和羟基保护基团,

[0014] A选自:氨基酸残基、多肽残基、、 $-(CH_2)_i-$ 、 $-NHCO$

$(CH_2)_i-$ 、 $-CONH(CH_2)_i-$ 、 $-(CH_2)_iNH-$ 和 $-CO(CR_{15}R_{16})_iNH-$ 中的一种或多种的组合,i为0-6的整数,

[0015] 所述氨基酸选自:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、脯氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸、组氨酸、色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸,

[0016]  $R_{1-7}$ 、 $R_{9-11}$ 独立地选自:-H、-F、-Cl、-Br、-I、C1-6的烷基、C1-6的烷氧基、C3-6的环烷基、C1-6的烯基、C6-12的芳基、C6-12芳烷基、C3-12芳族或非芳族的杂环基、C3-12的杂环烷基和 $-(CH_2)_i-O-Z$ ,

[0017]  $R_8$ 和 $R_{12}$ 独立地选自C1-6的烷基,

[0018]  $R_{13-16}$ 独立地选自:-H和C1-6的烷基,

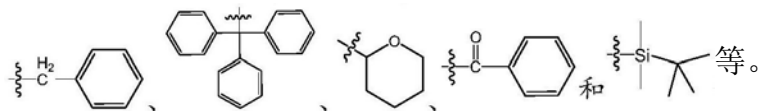
[0019] B为连接基团 $-B_1-B_2-$ ,

[0020] 其中, $B_1$ 选自: $-(CH_2)_j-$ 、 $-NHCO(CH_2)_j-$ 和 $-CONH(CH_2)_j-$ ,j为0-6的整数,

[0021]  $B_2$ 选自: $-C=O$ 、 $-C=S$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-C(S)O-$ 和 $-S-S-$ 。

[0022] 所述的连接子化合物中,所述的1为1-5的整数,如1、2、3、4、5,优选为1、2或3;更优选为1。

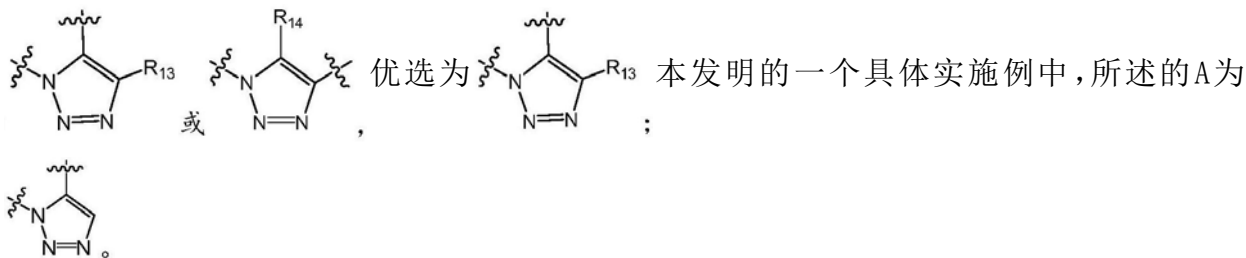
[0023] 所述的连接子化合物中,本领域技术人员可以根据实际需要选择合适的羟基保护基团,如: $-CH_3$ 、 $-C(CH_3)_3$ 、 $-CH_2OCH_3$ 、 $-COCH_3$ 、 $-COC(CH_3)_3$ 、 $-CH_2CH=CH_2$ 、 $-Si(CH_3)_3$ 、



[0024] 在本发明的一个实施例中,所述的Z为-H。

[0025] 本发明的一个实施例中,所述的连接子化合物中,所述A为氨基酸残基,所述氨基酸选自:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、脯氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸、组氨酸、色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸,优选自:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰胺和赖氨酸,更优选自:甘氨酸、丙氨酸和缬氨酸。

[0026] 本发明的另一个实施例中,所述的连接子化合物中,所述A为



[0027] 在本发明的另一个实施例中,所述的连接子化合物中,所述的A为 $-(CH_2)_i-$ 、 $-(CH_2)_iNH-$ 和 $-CO(CR_{15}R_{16})_iNH-$ 中的一种或多种的组合。

[0028] 优选地,所述的连接子化合物中,所述的 $R_{1-7}$ 、 $R_{9-11}$ 独立地选自: $-H$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $C_{1-6}$ 的烷基、 $C_{1-6}$ 的烷氧基和 $-(CH_2)_1-O-Z$ ;更优选自: $-H$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CH_2CH_2CH_3$ 、 $-CH(CH_3)_2$ 、 $-C(CH_3)_3$ 、 $-OCH_3$ 和 $-(CH_2)_1-O-Z$ ;进一步优选自: $-H$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-CH_3$ 、 $-OCH_3$ 和 $-(CH_2)_1-O-Z$ 。

[0029] 在本发明的一个实施例中,所述的 $R_{1-4}$ 均为 $-H$ 。

[0030] 在本发明的一个实施例中,所述的 $R_{5-7}$ 均为 $-H$ 。

[0031] 在本发明的一个实施例中,所述的 $R_{9-11}$ 均为 $-H$ 。

[0032] 优选地,所述的连接子化合物中,所述 $R_8$ 和 $R_{12}$ 独立地选自 $C_{1-4}$ 的烷基,如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基或叔丁基;更优选地,所述 $R_8$ 和/或 $R_{12}$ 为甲基。

[0033] 优选地,所述的连接子化合物中, $R_{13-16}$ 独立地选自: $-H$ 和 $C_{1-3}$ 的烷基(如甲基、乙基、正丙基或异丙基)。

[0034] 优选地,所述的连接子化合物中, $R_{15}$ 为 $-H$ , $R_{16}$ 选自: $-H$ 、甲基、乙基、正丙基和异丙基。

[0035] 在本发明的一个实施例中,所述的 $R_{13}$ 和/或 $R_{14}$ 为 $-H$ 。

[0036] 优选地,所述的连接子化合物中, $i$ 为0-3的整数,如0、1、2或3。

[0037] 优选地,所述的连接子化合物中, $j$ 为0-3的整数,如0、1、2或3。

[0038] 优选地,在本发明的一个实施例中,式I-1中,所述A为 $-COCH_2NH-$ 、 $-COCH(CH_3)NH-$ 、 $-COCH(CH(CH_3)_2)NH-$ 。

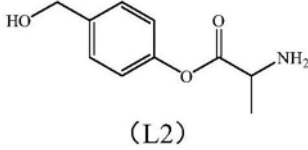
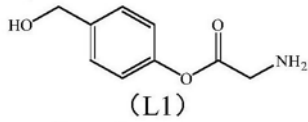
[0039] 优选地,所述 $B_2$ 选自: $-C=O$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-C(O)S-$ 和 $-S-S-$ 。

[0040] 在本发明的一个实施例中,所述的 $B_2$ 为 $-C(O)O-$ 或 $-O-$ 。

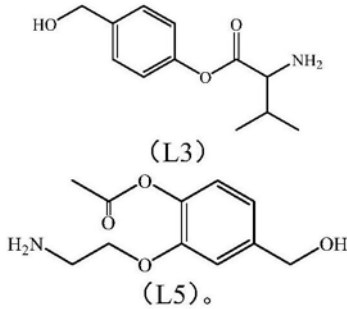
[0041] 在本发明另一个实施例中,所述的B为 $-(CH_2)_jO-$ , $j$ 为0-3的整数,如0、1、2或3。

[0042] 在本发明的一个实施例中,式I-2、I-3中,所述 $-B-A-$ 为 $-OCH_2CH_2NH-$ 。

[0043] 在本发明的一个实施例中,所述连接子化合物选自如下结构:



[0044]



[0045] 本发明另一方面还提供一种聚乙二醇-连接子结合物,其具有如下结构:

[0046] PEG-X-L

[0047] (II)

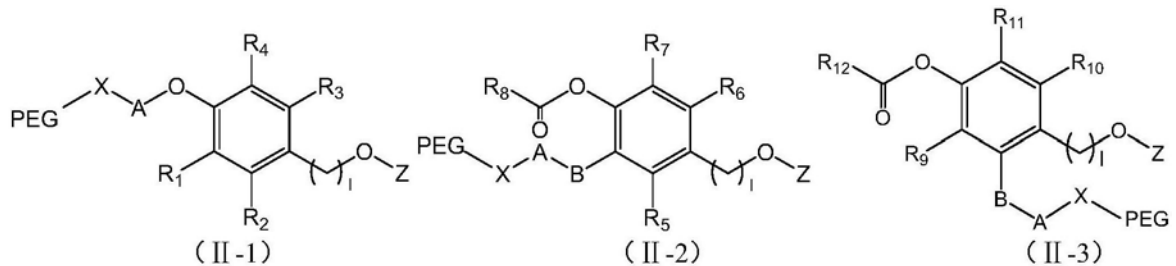
[0048] 其中,L为本发明上述连接子,

[0049] PEG为聚乙二醇残基,

[0050] X为连接基团,选自: $-(\text{CH}_2)_a-$ 、 $-(\text{CH}_2)_a\text{CO}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_a\text{OCO}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_a\text{NHC}-$ 、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_a\text{CO}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_a\text{SO}_2-$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_a-$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_a\text{CO}-$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_a\text{OCO}-$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_a\text{NHC}-$ 和 $-\text{O}(\text{CH}_2)_a\text{SO}_2-$ 中的一种或多种的组合,a为0-10的整数。

[0051] 在本发明一个实施例中,所述聚乙二醇-连接子结合物具有如下结构:

[0052]



[0053] 上式II-1~II-3中,所述 $R_{1-12}$ 、1、A、B、Z等具有本发明上述定义。

[0054] 在本发明的一个实施方式中,所述聚乙二醇-连接子结合物中,所述X选自: $-(\text{CH}_2)_a-$ 、 $-(\text{CH}_2)_a\text{CO}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_a\text{NHC}-$ 、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_a\text{CO}-$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_a-$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_a\text{CO}-$ 和 $-\text{O}(\text{CH}_2)_a\text{NHC}-$ 中的一种或多种的组合,优选为 $-(\text{CH}_2)_a-$ 、 $-(\text{CH}_2)_a\text{CO}-$ 或 $-(\text{CH}_2)_a\text{NHC}-$ 。

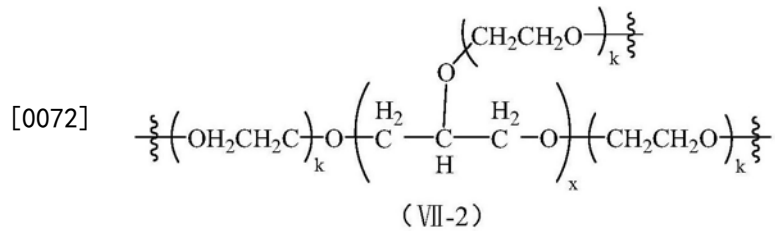
[0055] 优选地,所述聚乙二醇-连接子结合物中,a为0-5的整数,如0、1、2、3、4或5。

[0056] 在本发明的一个实施例中,所述聚乙二醇-连接子结合物中,所述X为单键、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CO}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CO}-$ 或 $-\text{NHC}-$ 。

[0057] 优选地,所述聚乙二醇-连接子结合物中,所述PEG为直链、Y型、多分支的聚乙二醇残基,例如包括单甲氧基聚乙二醇(mPEG)、直链双端PEG、Y型PEG、4臂支链PEG、6臂支链PEG或8臂支链PEG等。

[0058] 在本发明一具体实施方式中,所述聚乙二醇-连接子结合物中,所述PEG为直链聚

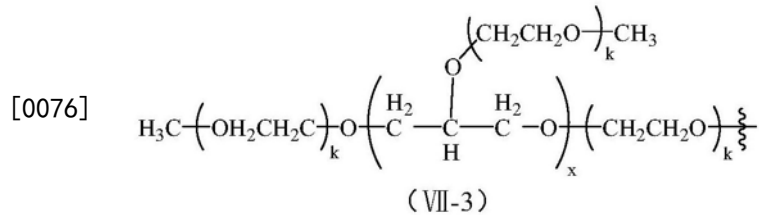




[0073] 其中, k是1-320的整数, 优选为1-240的整数,

[0074] x为1-10的整数(具体如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10), 优选为1-6的整数。

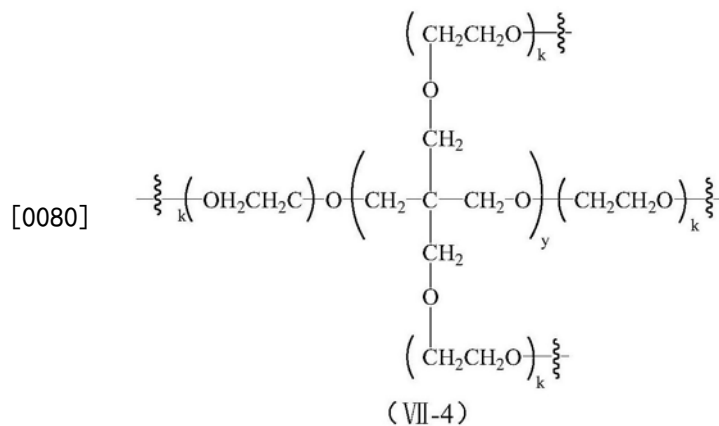
[0075] 在本发明的另一个实施例中, 所述多分支聚乙二醇残基具有如下结构:



[0077] 其中, k是1-320的整数, 优选为1-240的整数,

[0078] x为1-10的整数(具体如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10), 优选为1-6的整数。

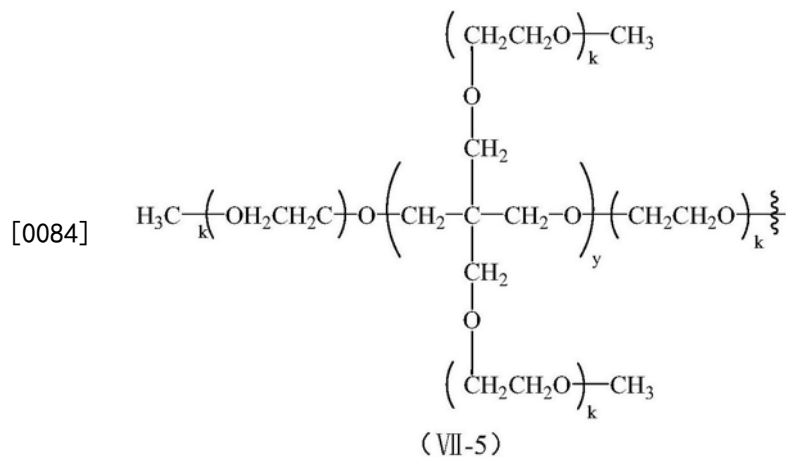
[0079] 在本发明另一个实施例中, 所述多分支聚乙二醇残基具有如下结构:



[0081] 其中, k是1-320的整数, 优选为1-240的整数, 更优选为1-120的整数,

[0082] y为1-10的整数(具体如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10), 优选为1-5的整数, 更优选为1-3的整数。

[0083] 在本发明的另一个实施例中, 所述多分支聚乙二醇残基具有如下结构:

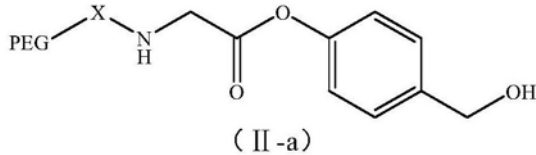


[0085] 其中,k是1-320的整数,优选为1-240的整数,更优选为1-120的整数,

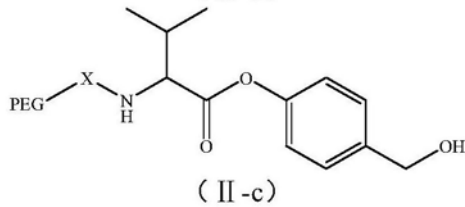
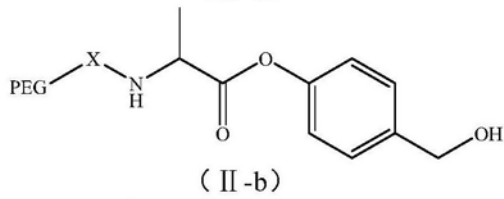
[0086] y为1-10的整数(具体如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10),优选为1-5的整数,更优选为1-3的整数。

[0087] 本发明中,所述的PEG的分子量可为1-100KDa,例如1-10KDa(具体可为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10KDa)、10-50KDa(具体可为10、15、20、25、30、35、40、45、50KDa)、50-100KDa(具体可为50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100KDa)等;进一步优选为10-50KDa。

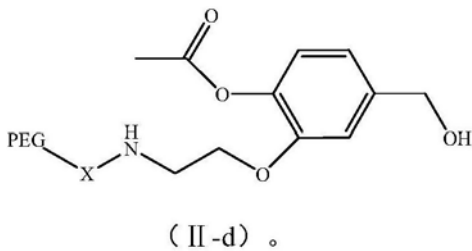
[0088] 在本发明的一个实施方式中,所述聚乙二醇-连接子结合物选自如下结构:



[0089]



[0090]



[0091] 上式 II-a、II-b、II-c和 II-d中,PEG和X具有本发明上述相应定义。

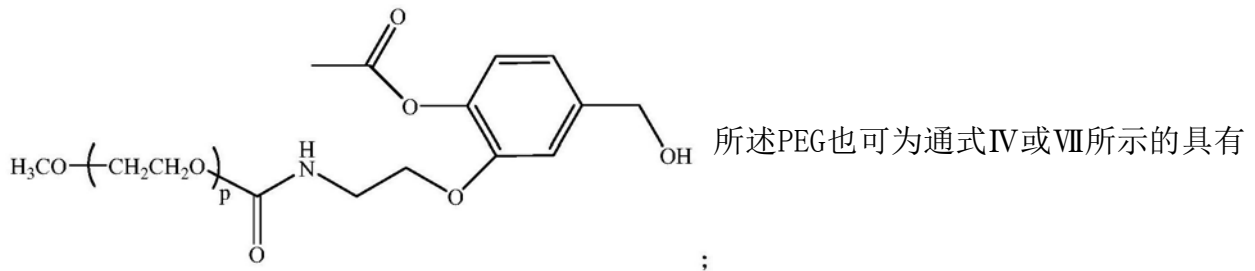
[0092] 在本发明的一个实施例中,上式 II-a、II-b、II-c和 II-d中,所述PEG具有本发明上述通式 III、V、VI、VII-3或 VII-5的结构;

[0093] 在本发明的一个实施例中,上式 II-a、II-b、II-c和 II-d中,所述PEG的分子量为10-50KDa(具体可为10、15、20、25、30、35、40、45或50KDa)。

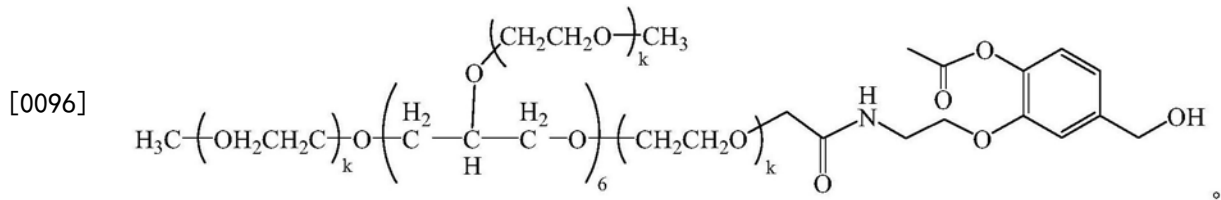
[0094] 在本发明的一个实施例中,上式 II-a、II-b、II-c和 II-d中,所述X为-CH<sub>2</sub>CO-或-CO-。

[0095] 此处所述PEG可以为通式 III、V或 VI所示的具有一个可连接位点的PEG结构,其连接一个连接子,如PEG具有通式 III所示结构,X为-CO-时,II-d的结构为





两个以上可连接位点的PEG,其可通过一个或多个连接位点实现连接子的连接。在本发明的一个实施方式中,所述PEG为通式IV或VII所示的具有两个以上可连接位点的PEG时,其通过一个连接位点与连接子连接,其他可连接位点可连接封端基(如甲氧基),如通式VII-1所示结构,具体如PEG为八臂聚乙二醇,X为-CH<sub>2</sub>CO-时,II-d的结构可为:



[0097] 优选地,上式II-a、II-b、II-c和II-d中,所述PEG具有本发明上述III、V、VI、VII-3或VII-5的结构,其中,x优选为1-6的整数,y优选为1-3的整数。

[0098] 本发明另一方面还提供一种聚乙二醇-连接子结合物衍生物,其具有如下结构:

[0099] PEG-X-L-P-Q

[0100] (VIII)

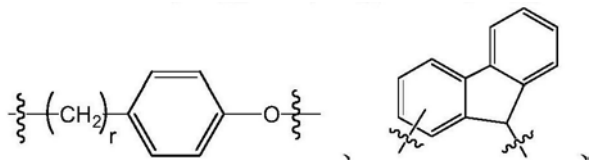
[0101] 其中,L为本发明上述连接子,

[0102] PEG为聚乙二醇残基,

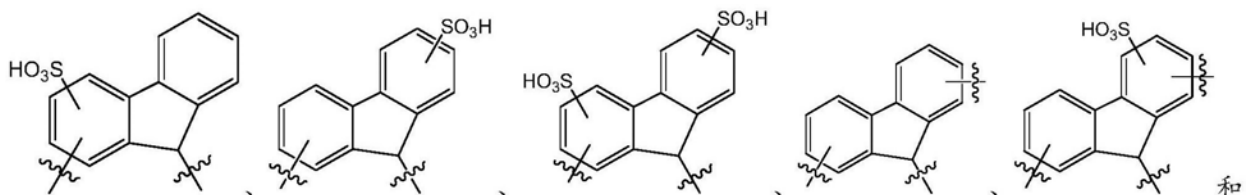
[0103] X为PEG与L的连接基团,选自:-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>CO-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>OCO-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>NHCO-、-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>CO-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>SO<sub>2</sub>-、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>CO-、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>OCO-、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>NHCO-和-O(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>SO<sub>2</sub>-中的一种或多种的组合,a为0-10的整数,

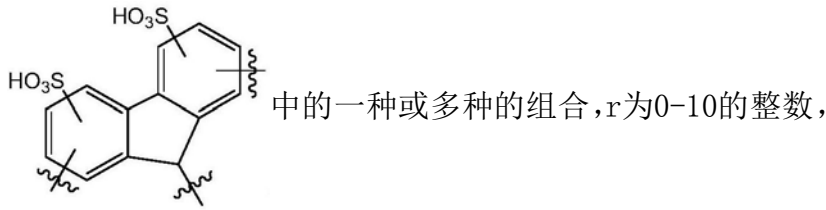
[0104] P为L与封端基Q的连接基团,选自:-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-、 $\begin{matrix} \text{R}_{17} \\ | \\ \text{---}(\text{CH}_2)_r\text{---C---} \\ | \\ \text{R}_{18} \end{matrix}$ 、-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>O-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>CO-、-

(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>NH-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>CONH-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>NHCO-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>SH-、



[0105]



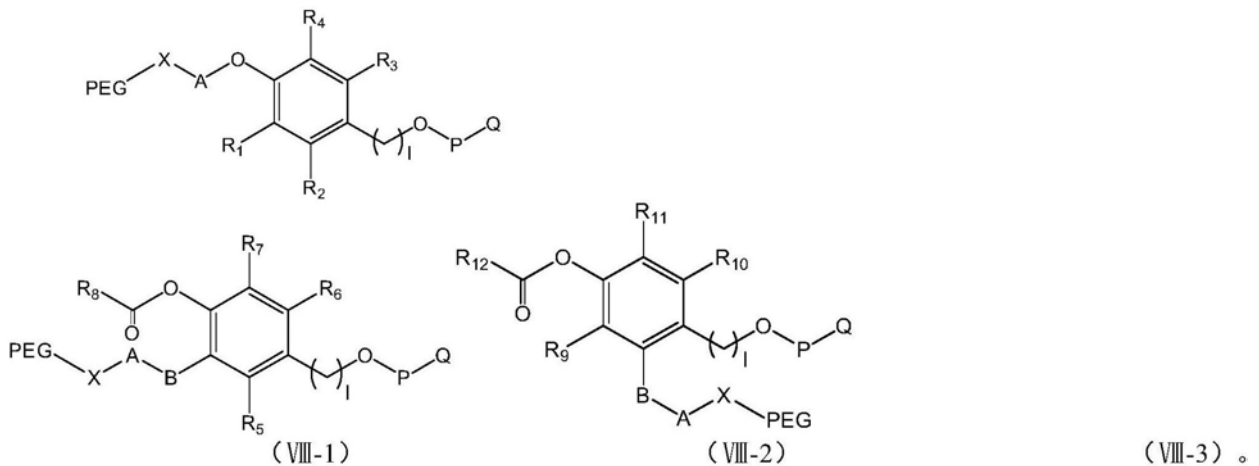


[0106] Q为封端基,选自:C1-C6的烷氧基、羟基、氨基、羧基、巯基、酯基、酮基、醛基、邻二硫吡啶基、叠氮基、酰肼基、炔基、硅烷基、马来酰亚胺基和琥珀酰亚胺基,

[0107] R<sub>17</sub>和R<sub>18</sub>独立地选自:-H、C1-6的烷基、C1-6的烷氧基、C3-6环烷基和C4-10亚烷基环烷基。

[0108] 在本发明一个实施方式中,所述衍生物具有如下结构:

[0109]

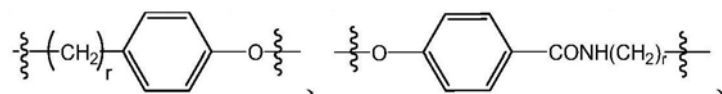


[0110] 上式VIII-1~VIII-3中,所述R<sub>1-12</sub>、1、A、B、X、PEG等具有本发明上述相应定义。

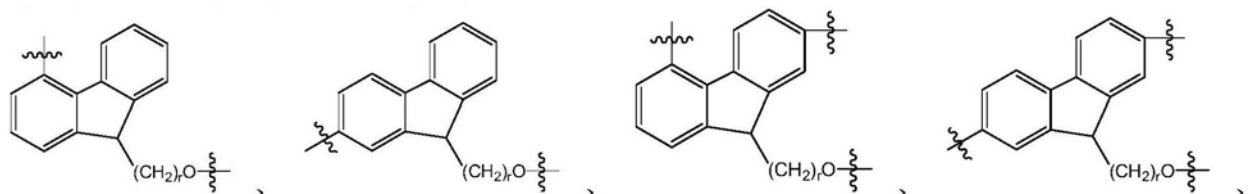
[0111] 在本发明的一个实施例中,所述X为单键、-CH<sub>2</sub>-、-CO-、-CH<sub>2</sub>CO-或-NHCO-。

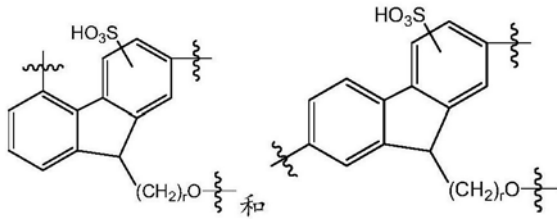
[0112] 优选地,R<sub>17</sub>和R<sub>18</sub>独立地选自:-H、-CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-OCH<sub>3</sub>、-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>和-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,更优选自:-H、-CH<sub>3</sub>、-OCH<sub>3</sub>和-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,在本发明一个实施例中,R<sub>17</sub>为H,R<sub>18</sub>为-CH<sub>3</sub>、-OCH<sub>3</sub>或-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,在本发明一个优选实施例中,R<sub>17</sub>为H,R<sub>18</sub>为-CH<sub>3</sub>。

[0113] 在本发明的一个实施例中,所述P选自:- (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-、- (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>CH (CH<sub>3</sub>) -、- (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>O-、- (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>CO-、- (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>NH-、- (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>CONH-、- (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>NHCO-、- (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>SH-、



[0114]

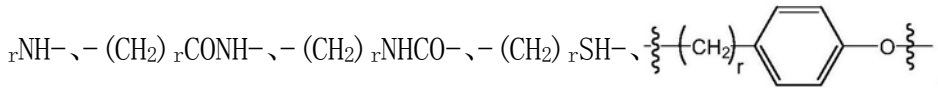




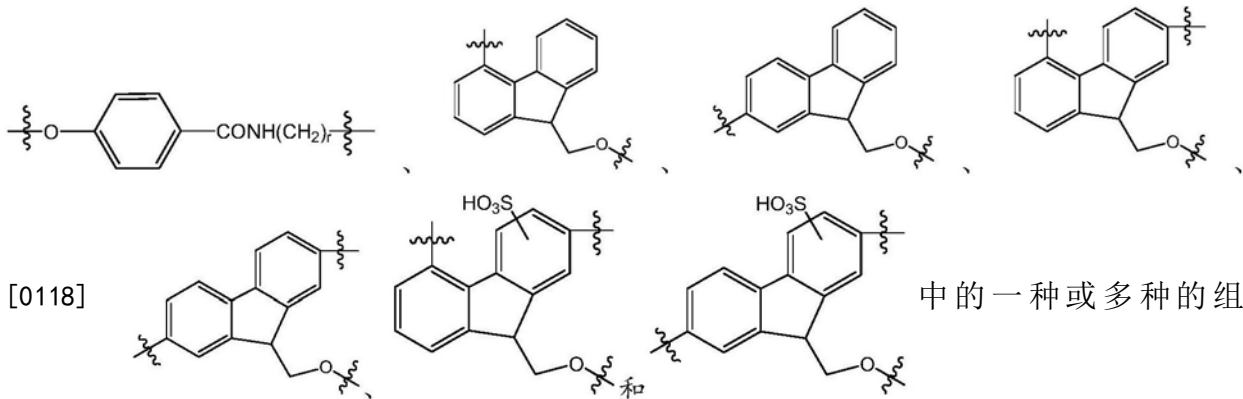
中的一种或多种的组合。

[0115] 优选地, r为0-5的整数, 如0、1、2、3、4或5。

[0116] 在本发明的一个具体实施例中, 所述P选自: 单键、-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-CH(CH<sub>3</sub>)-、-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>O-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>CO-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>NH-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>CONH-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>NHCO-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>SH-、



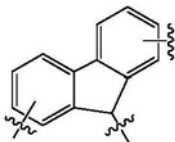
[0117]

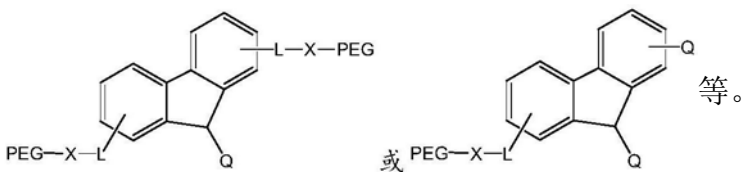


[0118] 中的一种或多种的组合。

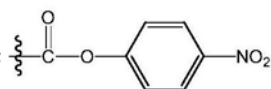
合。

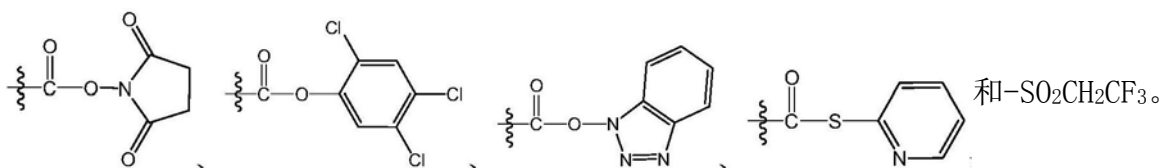
[0119] 在本发明中, 所述P具有两个以上连接位点时, 可连接一个以上PEG-X-L-和一个以

上Q, 如所述P为  时, 上述衍生物可为

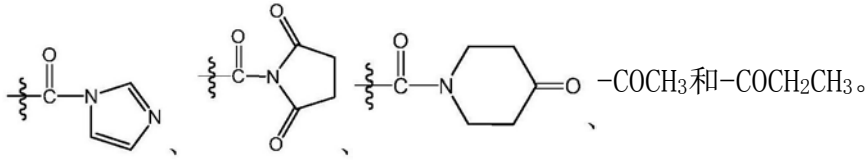


[0120] 在本发明的一个实施例中, 所述Q为酯基或酮基。

[0121] 在本发明的一个具体实施例中, 所述的Q中, 所述酯基选自: 

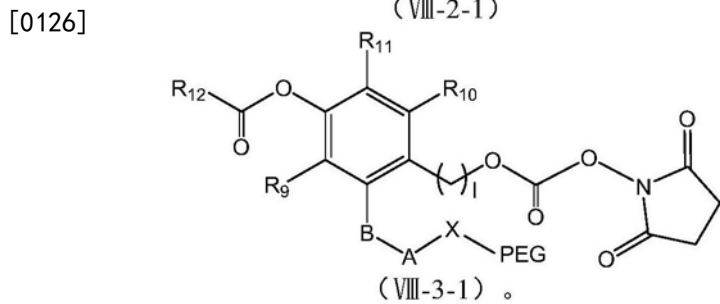
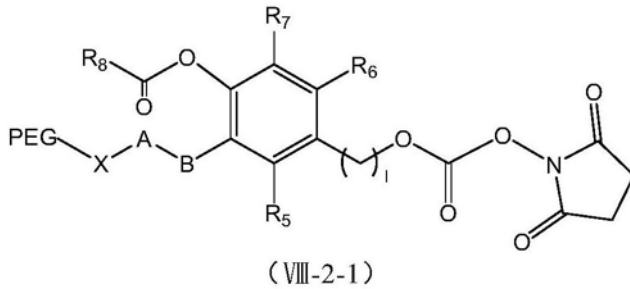
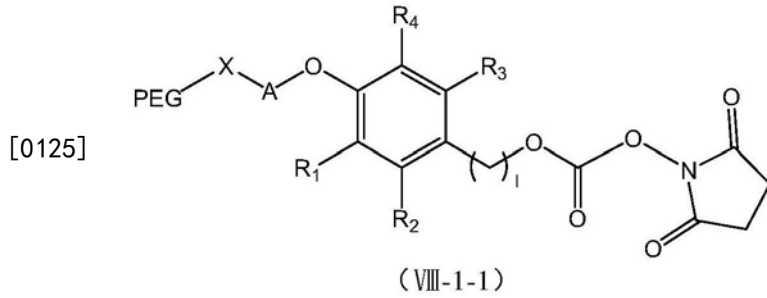


[0122] 在本发明的另一个具体实施例中, 所述的Q中, 所述酮基选自:



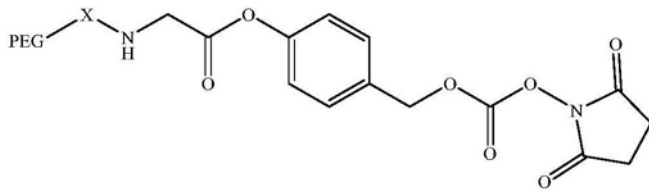
[0123] 在本发明的一个优选实施例中,所述Q为 或 。

[0124] 在本发明一个实施方式中,所述衍生物具有如下结构:

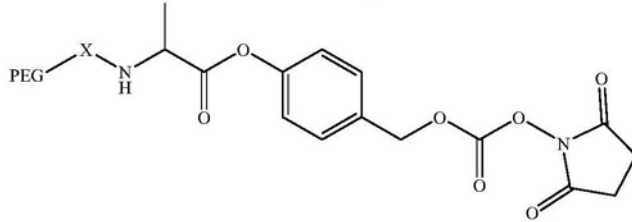


[0127] 上式VIII-1~VIII-3中,所述R<sub>1-12</sub>、1、A、B、X、PEG等具有本发明上述相应定义。

[0128] 在本发明的一个实施方式中,所述衍生物选自如下结构:

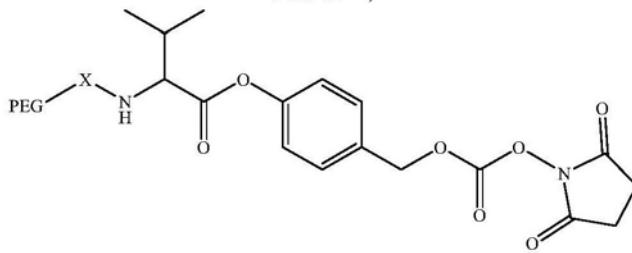


(VIII-a) ,

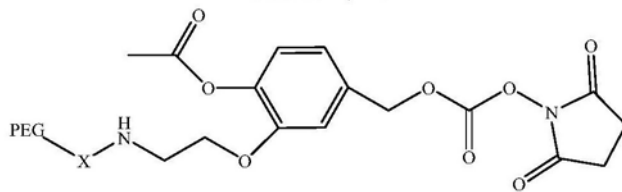


(VIII-b) ,

[0129]



(VIII-c) , 和



(VIII-d) 。

[0130] 上式VIII-a、VIII-b、VIII-c和VIII-d中,所述PEG和X具有本发明上述相应定义。

[0131] 在本发明的一个实施例中,上式VIII-a、VIII-b、VIII-c和VIII-d中,所述PEG具有本发明上述通式III、V、VI、VII-3或VII-5的结构。

[0132] 在本发明的一个实施例中,上式VIII-a、VIII-b、VIII-c和VIII-d中,所述PEG的分子量为10-50KDa(具体可为10、15、20、25、30、35、40、45或50KDa)。

[0133] 在本发明的一个实施例中,上式VIII-a、VIII-b、VIII-c和VIII-d中,所述X为-CH<sub>2</sub>CO-或-CO-。

[0134] 优选地,上式VIII-a、VIII-b、VIII-c和VIII-d中,所述PEG具有本发明上述III、V、VI、VII-3或VII-5的结构,其中,x为1-6的整数,y为1-3的整数。

[0135] 本发明另一方面还提供一种聚乙二醇-连接子-药物结合物,其具有如下结构:

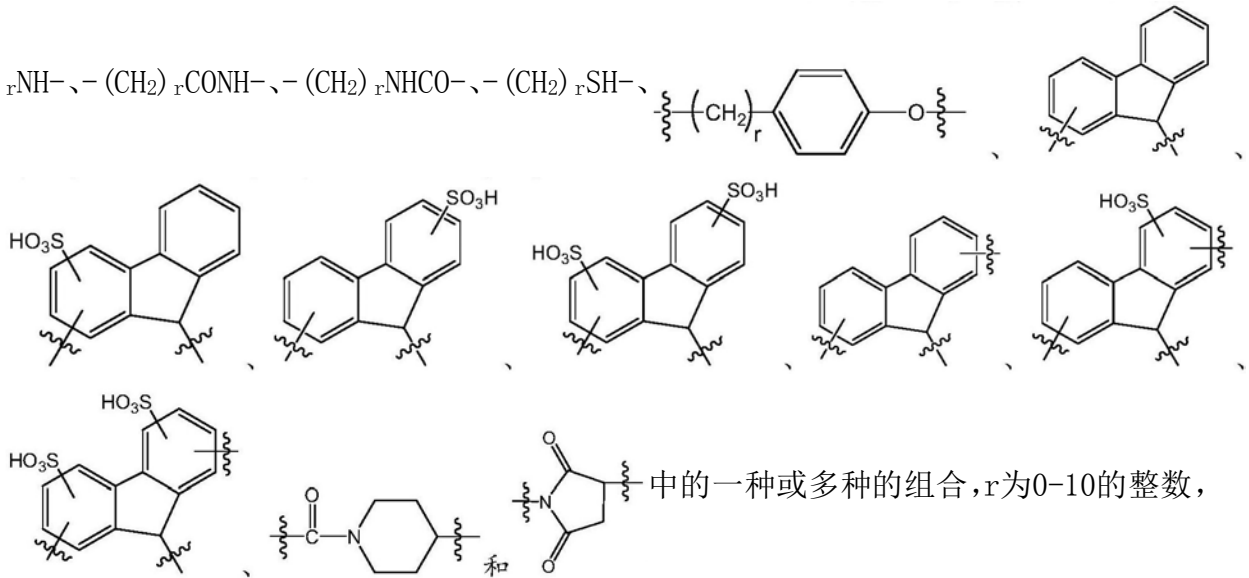
[0136] (PEG-X-L-Y)<sub>n</sub>-D

[0137] (IX)

[0138] 其中,PEG为聚乙二醇残基,

[0139] X为PEG与L的连接基团,选自:-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>CO-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>OCO-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>NHCO-、-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>CO-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>SO<sub>2</sub>-、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>CO-、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>OCO-、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>NHCO-和-O(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>SO<sub>2</sub>-中的一种或多种的组合,a为0-10的整数,

[0140] Y为L与D的连接基团,选自: $-(CH_2)_r-$ 、 $-\left[ (CH_2)_r - \overset{R_{17}}{\underset{R_{18}}{C}} \right]_n-$ 、 $-(CH_2)_rO-$ 、 $-(CH_2)_rCO-$ 、 $-(CH_2)_rNH-$ 、 $-(CH_2)_rCONH-$ 、 $-(CH_2)_rNHCO-$ 、 $-(CH_2)_rSH-$ 、



[0141]  $R_{17}$ 和 $R_{18}$ 独立地选自: $-H$ 、C1-6的烷基、C1-6的烷氧基、C3-6环烷基和C4-10亚烷基环烷基,

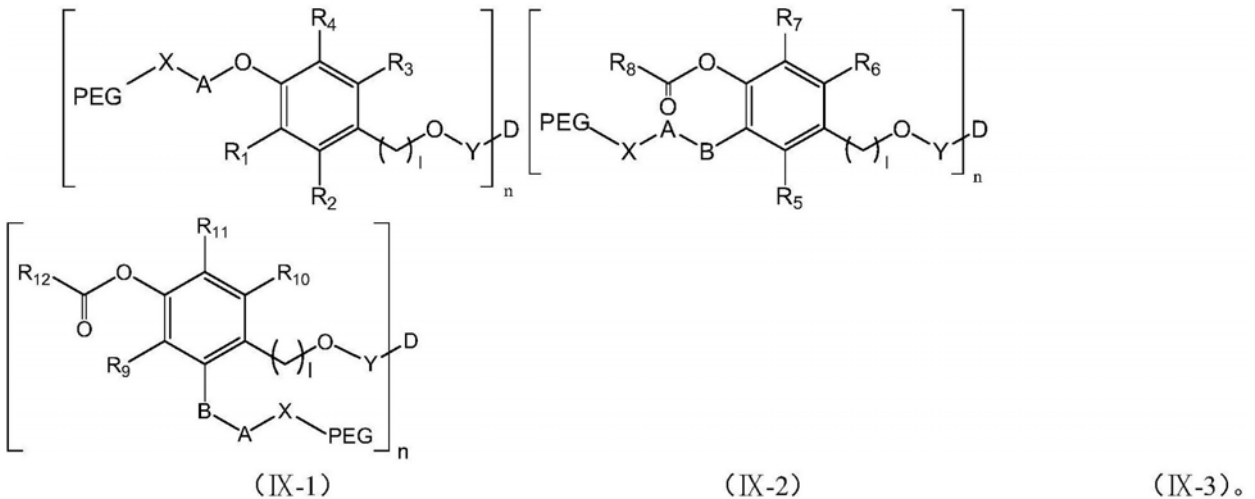
[0142] L为本发明上述连接子,

[0143] D为多肽和蛋白质类药物,

[0144] n为整数,且 $1 \leq n \leq 500$ 。

[0145] 在本发明一个实施方式中,所述聚乙二醇-连接子-药物结合物具有如下结构:

[0146]



[0147] 上式IX-1~IX-3中,所述 $R_{1-12}$ 、1、A、B、X、PEG等具有本发明上述相应定义。

[0148] 在本发明的一个实施例中,上式IX-1中,所述的 $R_{1-4}$ 均为-H。

[0149] 在本发明的一个实施例中,上式IX-2中,所述的 $R_{5-7}$ 均为-H。

[0150] 在本发明的一个实施例中,上式IX-3中,所述的 $R_{9-11}$ 均为-H。

[0151] 在本发明的一个实施例中,上式IX-2、IX-3中,所述 $R_8$ 和/或 $R_{12}$ 为甲基。

[0152] 在本发明的一个实施例中,上式IX-1~IX-3中,所述1为1。

[0153] 在本发明的一个实施例中,上式IX-1中,所述A为 $-\text{COCH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{COCH}(\text{CH}_3)\text{NH}-$ 或 $-\text{COCH}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)\text{NH}-$ 。

[0154] 在本发明的一个实施例中,上式IX-2、IX-3中,所述B-A-为 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ 。

[0155] 在本发明的一个实施例中,上式IX-1~IX-3中,所述X为单键、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CO}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CO}-$ 或 $-\text{NHCO}-$ 。

[0156] 在本发明的一个实施例中,上式IX-1~IX-3中,所述PEG具有本发明上述III、V、VI、VII-3或VII-5的结构,其中,x为1-6的整数,y为1-3的整数。

[0157] 在本发明的一个实施例中,上式IX-1~IX-3中,所述的PEG的分子量为10-50KDa(具体可为10、15、20、25、30、35、40、45或50KDa)。

[0158] 在本发明中所述的多肽和蛋白类药物如细胞因子(如白细胞介素、集落刺激因子、干扰素、生长因子、肿瘤坏死因子、转化生长因子- $\beta$ 家族或趋化因子家族等)、人血红蛋白、凝血因子、血管内皮生长因子拮抗剂、蛋白类激素(如胰岛素、胰高血糖素、降钙素、下丘脑激素、垂体激素或胃肠激素等)、抗体(如单克隆抗体、多克隆抗体、二聚体、多聚体、多特异性抗体或抗体片断)、酶及辅酶类药物(苯丙氨酸裂解酶、精氨酸酶、精氨酸脱酰酶、胰核糖核酸酶、超氧化物歧化酶、天冬酰胺酶、葡糖脑苷脂酶或透明质酸酶)。在所述药物结合物中,药物分子通过胺基与聚乙二醇-连接子连接,所述胺基可为肽链N-末端氨基和/或肽链内氨基酸(如赖氨酸等)残基的侧链氨基;更优选地,在所述药物结合物中,聚乙二醇-连

接子通过活性碳酸酯基与药物分子的伯胺基反应形成  $\text{---O---C(=O)---NH---}$  实现连接。

[0159] 本申请中,术语“抗体”以其最广泛的含义使用并且特别覆盖单克隆抗体、多克隆抗体、二聚体、多聚体、多特异性抗体(例如:双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出所需的生物活性(Miller等(2003) Jour. of Immunology, 170:4854-4861)。抗体可以为鼠、人、人源化、嵌合抗体或来源于其它物种。抗体可具有任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD及IgA)及类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2),其中IgM含游离氨基约450个。

[0160] 在本发明的一个实施方式中,所述的D为细胞因子;在本发明的一个实施例中,所述的细胞因子为白介素,优选为白介素2(IL-2),更优选为重组人白介素2(rhIL-2)。

[0161] 在本发明另一个实施方式中,所述的细胞因子为集落刺激因子,优选为粒细胞集落刺激因子,更优选为重组人粒细胞集落刺激因子。

[0162] 在本发明的另一个实施方式中,所述的D为抗体。

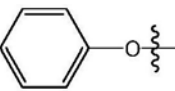
[0163] 在本发明的一个实施方式中,所述的抗体为单克隆抗体,如抗HER2单克隆抗体,优选为重组抗HER2人源化单克隆抗体。

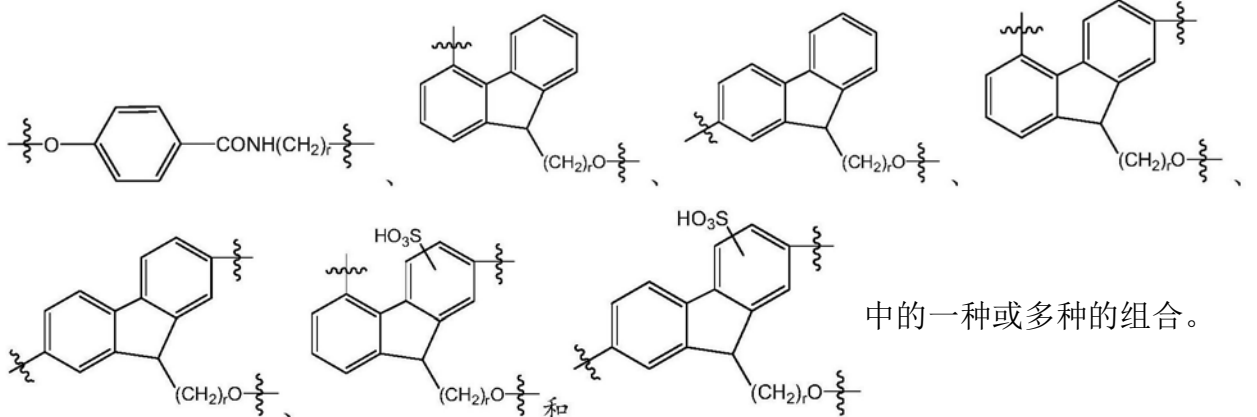
[0164] 在本发明的另一个实施方式中,所述D为人血红蛋白。

[0165] 在本发明的另一个实施方式中,所述D为酶及辅酶类药物,优选自:胰核糖核酸酶、超氧化物歧化酶和天冬酰胺酶。

[0166] 在本发明的另一个实施方式中,所述D为蛋白类激素,优选为胰岛素。

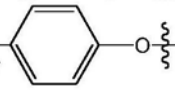
[0167] 所述聚乙二醇-连接子-药物结合物中,n为1-500的整数(如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450或500),如所述药物为白介素2时,n可为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12;所述药物为重组抗HER2人源化单克隆抗体时,n可为1-90的整数;所述药物为IgM时,n可为1-450的整数。

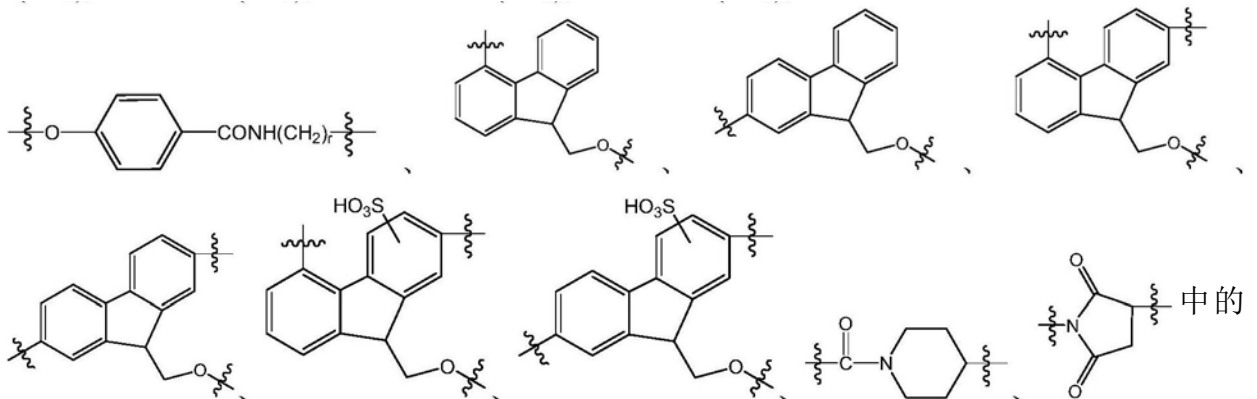
[0168] 在本发明的一个实施方式中,所述Y选自: $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2)_rCH(CH_3)-$ 、 $-(CH_2)_rO-$ 、 $-(CH_2)_rCO-$ 、 $-(CH_2)_rNH-$ 、 $-(CH_2)_rCONH-$ 、 $-(CH_2)_rNHCO-$ 、 $-(CH_2)_rSH-$ 、 $\begin{matrix} \text{---} \\ | \\ (CH_2)_r \\ | \\ \text{---} \end{matrix}$    $\text{---}$



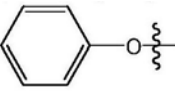
中的一种或多种的组合。

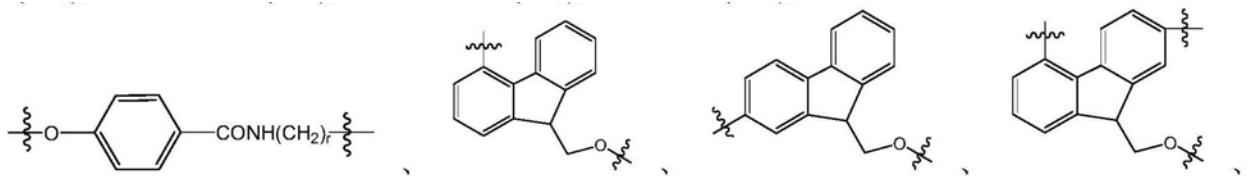
[0169] 优选的,  $r$  为 0-5 的整数, 如 0、1、2、3、4 或 5。

[0170] 在本发明的一个具体实施例中,所述Y选自:单键、 $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2CH_2CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH(CH_3)-$ 、 $-(CH_2)_rO-$ 、 $-(CH_2)_rCO-$ 、 $-(CH_2)_rCONH-$ 、 $-(CH_2)_rNH-$ 、 $-(CH_2)_rSH-$ 、 $\begin{matrix} \text{---} \\ | \\ (CH_2)_r \\ | \\ \text{---} \end{matrix}$    $\text{---}$

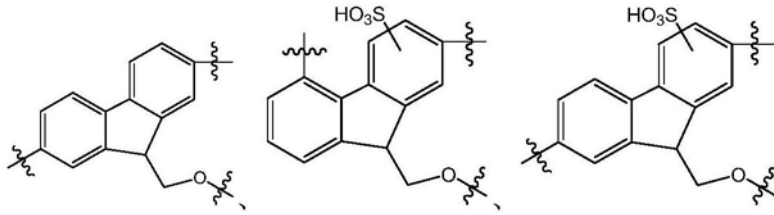


一种或多种的组合。

[0171] 在本发明的另一个具体的实施例中,所述Y为 $-(CH_2)_rCO-$ 与单键、 $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2CH_2CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH(CH_3)-$ 、 $-(CH_2)_rO-$ 、 $-(CH_2)_rCONH-$ 、 $-(CH_2)_rNHCO-$ 、 $-(CH_2)_rNH-$ 、 $-(CH_2)_rSH-$ 、 $\begin{matrix} \text{---} \\ | \\ (CH_2)_r \\ | \\ \text{---} \end{matrix}$    $\text{---}$





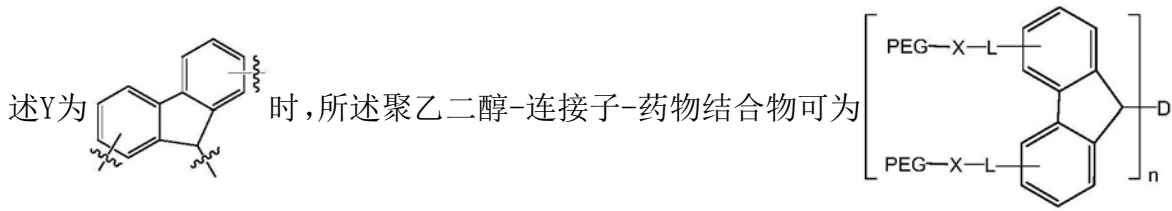


中的一种或多种的组合。

[0172] 在本发明的一个实施例中,所述聚乙二醇-连接子-药物结合物中,所述Y为 $-(CH_2)_rCO-$ 。

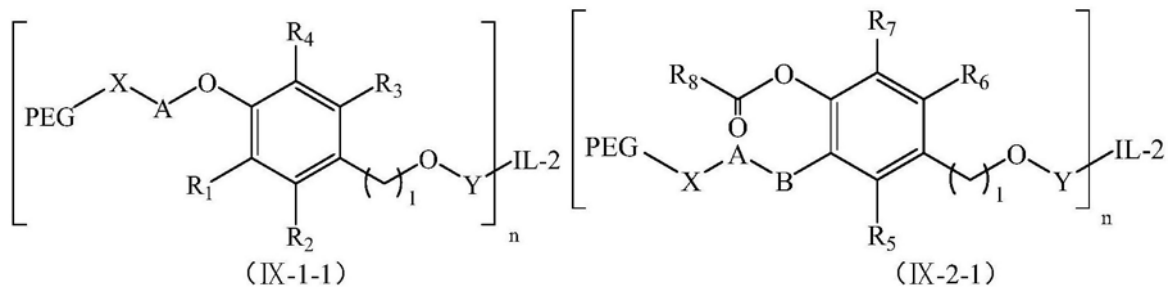
[0173] 在本发明的一个另一个实施例中,所述聚乙二醇-连接子-药物结合物中,所述Y为 $-CO-$ 。

[0174] 在本发明中,所述Y具有两个以上连接位点时,可连接一个以上PEG-X-L和D,如所

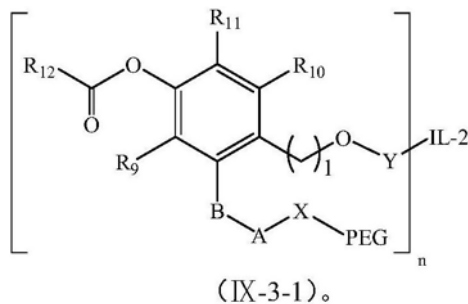


[0175] 在本发明的一个实施方式中,所述聚乙二醇-连接子-药物结合物中,所述D为IL-2,n为1-12的整数,所述聚乙二醇-连接子-IL-2结合物具有如下结构:

[0176]



[0177]



[0178] 上式IX-1-1、IX-2-1、IX-3-1中,所述 $R_{1-12}$ 、1、A、B、X、PEG、Y等具有本发明上述相应定义。

[0179] 在本发明的一个实施例中,上式IX-1-1中,所述的 $R_{1-4}$ 均为-H。

[0180] 在本发明的一个实施例中,上式IX-2-1中,所述的 $R_{5-7}$ 均为-H。

[0181] 在本发明的一个实施例中,上式IX-3-1中,所述的 $R_{9-11}$ 均为-H。

[0182] 在本发明的一个实施例中,上式IX-1-1、IX-2-1、IX-3-1中,所述 $R_8$ 和/或 $R_{12}$ 为甲基。

[0183] 在本发明的一个实施例中,上式IX-1-1、IX-2-1、IX-3-1中,所述1为1。

[0184] 在本发明的一个实施例中,上式IX-1-1中,所述A为 $-COCH_2NH-$ 、 $-COCH(CH_3)NH-$ 或-

COCH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH-

[0185] 在本发明的一个实施例中,上式IX-2-1、IX-3-1中,所述-B-A-为-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-

[0186] 在本发明的一个实施例中,上式IX-1-1、IX-2-1、IX-3-1中,所述X为单键、-CH<sub>2</sub>-、-CO-、-CH<sub>2</sub>CO-或-NHCO-

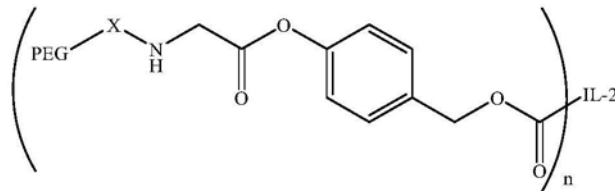
[0187] 在本发明的一个实施例中,上式IX-1-1、IX-2-1、IX-3-1中,所述PEG具有本发明上述III、V、VI、VII-3或VII-5的结构,其中,x为1-6的整数,y为1-3的整数。

[0188] 在本发明的一个实施例中,上式IX-1~IX-3中,所述的PEG的分子量为10-50KDa(具体可为10、15、20、25、30、35、40、45或50KDa)。

[0189] 在本发明的一个实施例中,上式IX-1~IX-3中,所述Y为-CO-

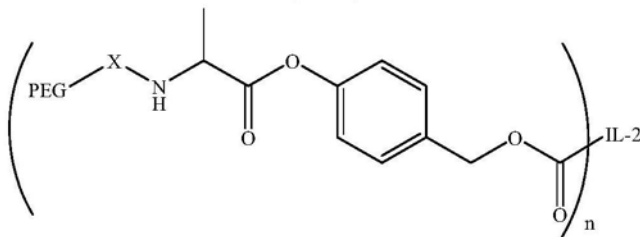
[0190] 在本发明的一个实施例中,上式IX-1~IX-3中,n为1-12的整数,优选为1-7的整数,具体如1、2、3、4、5、6或7。

[0191] 在本发明的一个具体实施方式中,所述聚乙二醇-连接子-IL-2结合物具有如下结构:

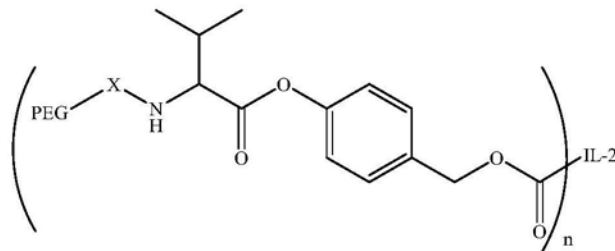


(IX-a)

[0192]

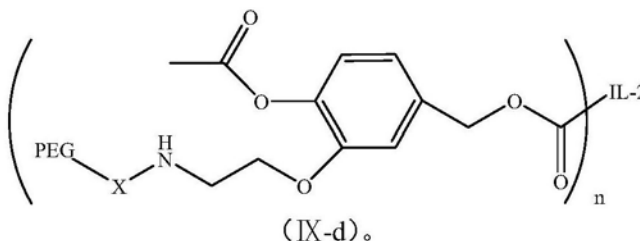


(IX-b)



(IX-c)

[0193]



(IX-d)

[0194] 上式IX-a、IX-b、IX-c和IX-d中,所述PEG、X和n具有本发明上述定义。

[0195] 在本发明的一个实施例中,上式IX-1-1、IX-2-1、IX-3-1中,所述PEG具有本发明上述III、V、VI、VII-3或VII-5的结构,其中,x为1-6的整数,y为1-3的整数。当PEG为通式V、VI或

VII-1的结构时,可增加空间位阻效应,调控药物释放速度。

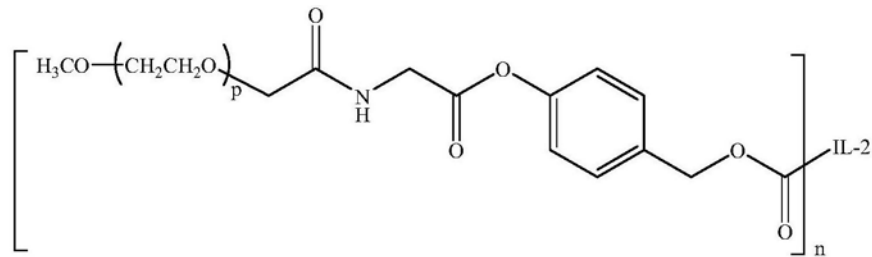
[0196] 在本发明的一个实施例中,上式IX-a、IX-b、IX-c和IX-d中,所述PEG的分子量为10-50KDa(具体可为10、15、20、25、30、35、40、45或50KDa)。

[0197] 在本发明的一个实施例中,上式IX-a、IX-b、IX-c和IX-d中,所述X为-CH<sub>2</sub>CO-或-CO-。

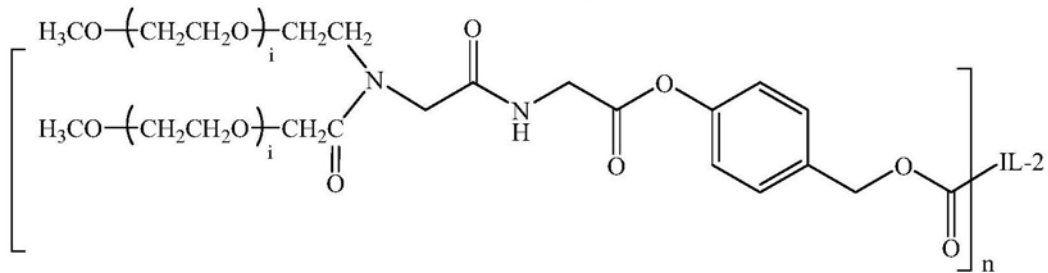
[0198] 在本发明的一个实施例中,上式IX-a、IX-b、IX-c和IX-d中,所述n为1-12的整数,优选为1-7的整数,具体如1、2、3、4、5、6或7。

[0199] 在本发明的一个实施例中,上式IX-a、IX-b、IX-c和IX-d中,所述IL-2为rhIL-2。

[0200] 在本发明的一个更具体的实施方式中,所述聚乙二醇-连接子-IL-2结合物具有如下结构:

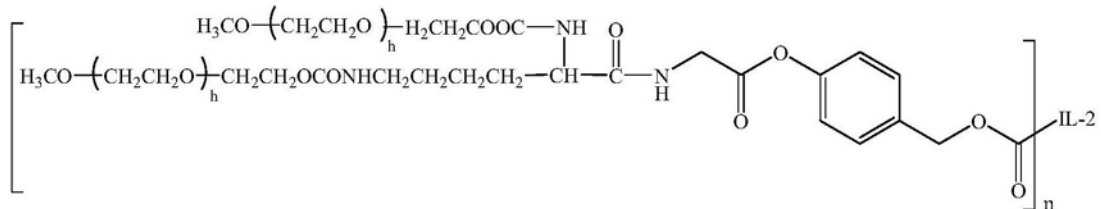


(IX-a-1),

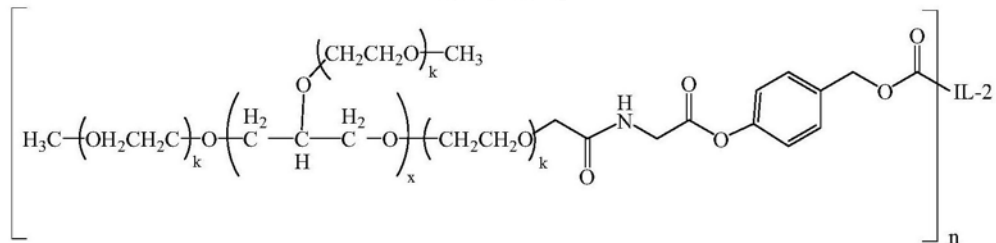


[0201]

(IX-a-2),

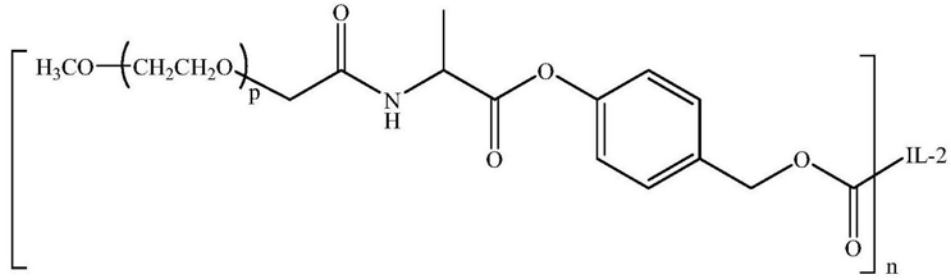


(IX-a-3),

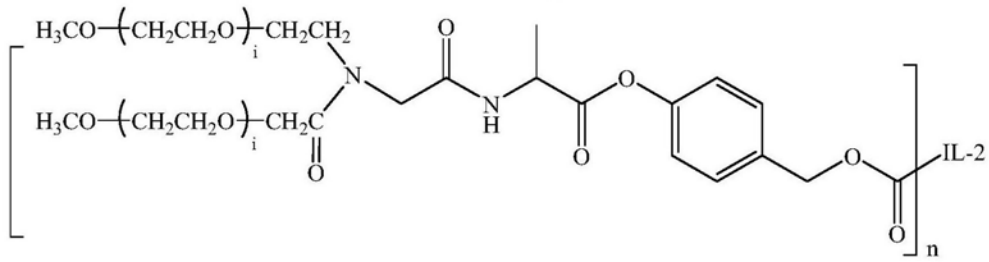


(IX-a-4)

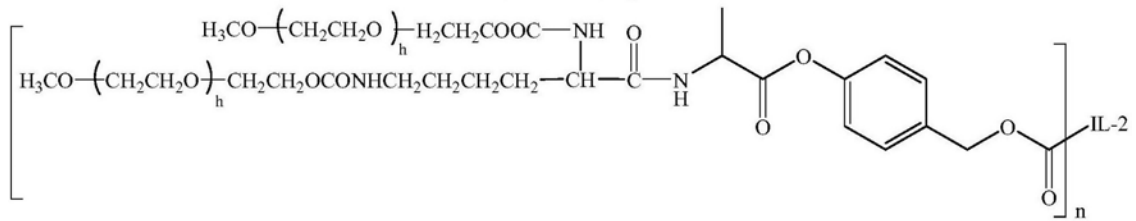
[0202]



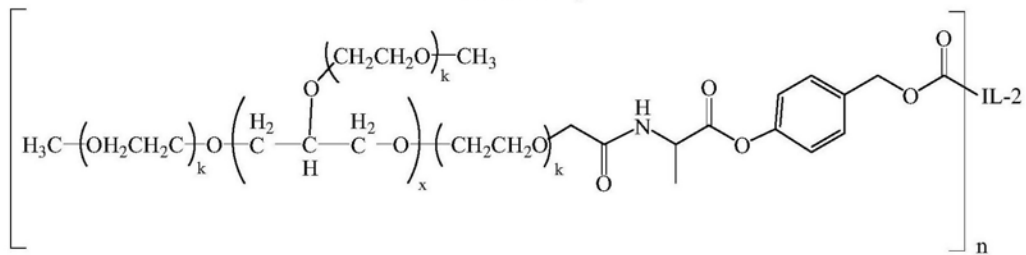
(IX-b-1) ,



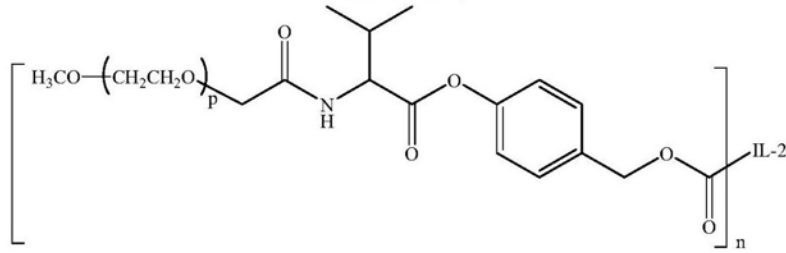
(IX-b-2) ,



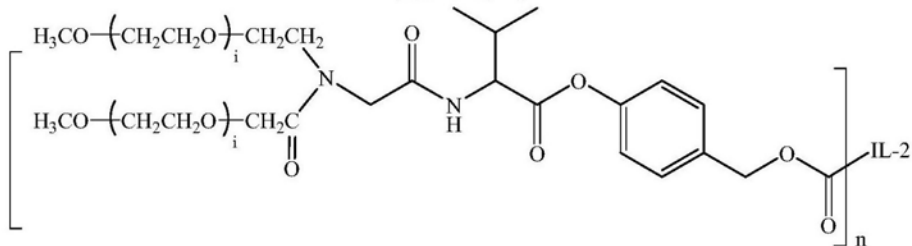
(IX-b-3) ,



(IX-b-4) ,

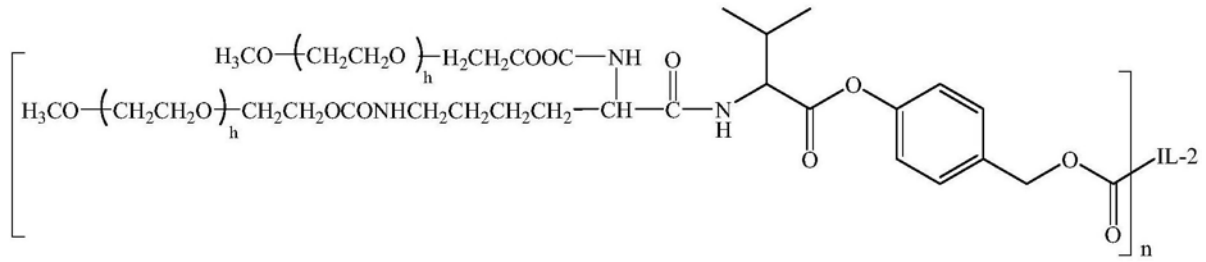


(IX-c-1) ,

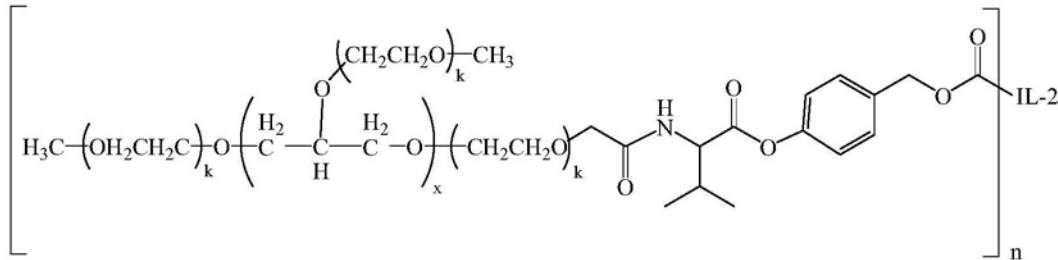


(IX-c-2) ,

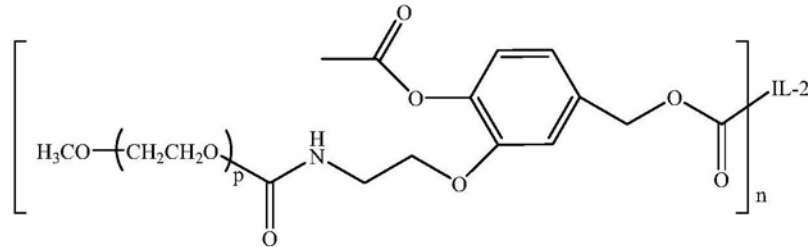
[0203]



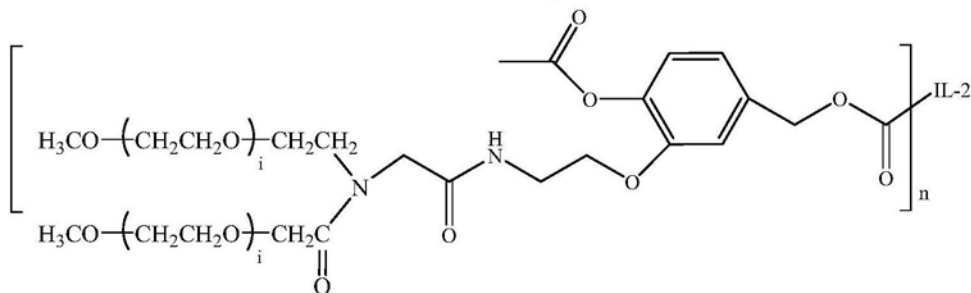
(IX-c-3),



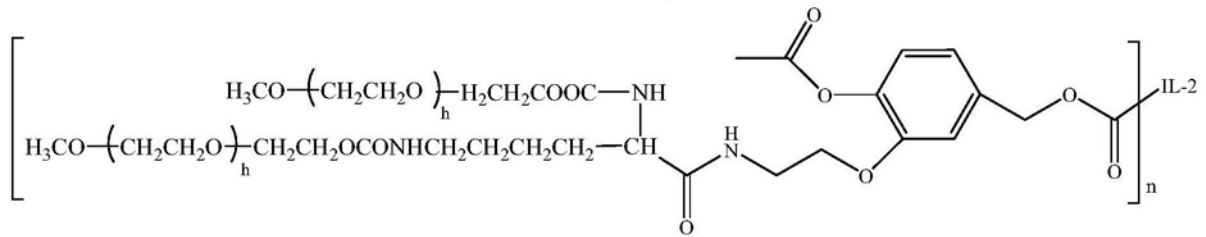
(IX-c-4),



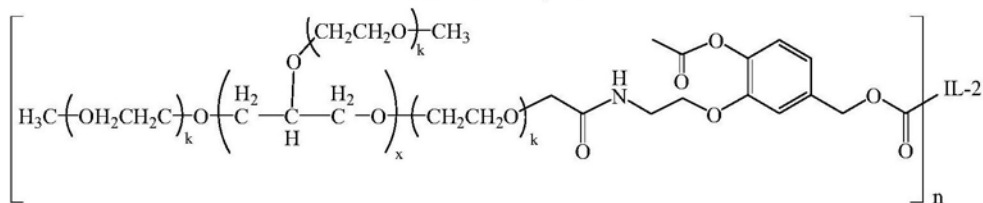
(IX-d-1),



(IX-d-2),



(IX-d-3), 和



(IX-d-4)。

[0204] 上式中,p、q、i、h、k和x分别具有本发明通式III、V、VI、VII-3中的定义。

- [0205] 在本发明的一个实施例中,  $x$ 为1-6的整数, 优选地,  $x$ 为6。
- [0206] 在本发明的一个实施例中, 上式中, 所述 $n$ 为1-12的整数, 优选为1-7的整数, 具体如1、2、3、4、5、6或7。
- [0207] 在本发明的一个实施例中, 上式中, 所述IL-2为rhIL-2。
- [0208] 本发明另一方面还提供一种上述聚乙二醇-连接子-药物结合物的制备方法, 包括本发明上述聚乙二醇-连接子结合物衍生物与多肽和蛋白类药物反应连接的步骤。
- [0209] 优选地, 所述制备方法中, 所述的衍生物为活性酯, 更优选地, 所述衍生物的反应基团为活性碳酸酯基。
- [0210] 在本发明的一个实施例中, 所述衍生物具有上述式VIII-a、VIII-b、VIII-c或VIII-d的结构。
- [0211] 优选地, 所述制备方法中, 所述多肽和蛋白类药物的反应基团为胺基, 更优选为伯胺基。
- [0212] 在本发明的一个实施例中, 所述多肽和蛋白类药物为IL-2, 更优选为rhIL-2。
- [0213] 在本发明的一个优选实施例中, 所述的聚乙二醇-连接子-药物结合物为聚乙二醇-连接子-IL-2结合物, 其制备方法包括本发明上述聚乙二醇-连接子结合物衍生物与IL-2反应连接的步骤。
- [0214] 优选地, 所述聚乙二醇-连接子-IL-2结合物的制备方法中, 所述聚乙二醇-连接子结合物衍生物与IL-2的摩尔比为1-50:1 (具体如1:1、5:1、10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1或50:1), 更优选为10-30:1。
- [0215] 优选地, 所述聚乙二醇-连接子-IL-2结合物的制备方法中, 所述反应pH值为6.0-10.0 (具体如6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5或10.0)。
- [0216] 优选地, 所述聚乙二醇-连接子-IL-2结合物的制备方法中, 所述反应温度为20-30℃, 更优选为室温。
- [0217] 优选地, 所述聚乙二醇-连接子-IL-2结合物的制备方法中, 所述反应在缓冲液中进行, 本领域技术人员可以根据所采用的反应pH值选择合适的缓冲液种类, 如磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液或碳酸氢钠缓冲液等, 本发明对此不作具体限定。
- [0218] 优选地, 所述聚乙二醇-连接子-IL-2结合物的制备方法还包括终止反应的步骤, 更优选地, 所述终止反应步骤包括加入甘氨酸溶液, 所述甘氨酸溶液浓度为0.5-2M (具体如0.5、1.0、1.5或2.0M)。
- [0219] 优选地, 所述聚乙二醇-连接子-IL-2结合物的制备方法还包括分离纯化反应产物的步骤。所述分离纯化的方法可采用本领域中常用的方法, 如离子交换柱层析、反相高效液相色谱分离和凝胶渗透色谱分离等中的一种或多种的组合, 本发明对此不作具体限定。
- [0220] 本发明另一方面还提供一种上述聚乙二醇-连接子-药物结合物的组合物, 所述组合物中包括至少两种本发明上述具有不同 $n$ 值的聚乙二醇-连接子-药物结合物。
- [0221] 在本发明的一个实施方式中, 上述组合物中包括至少三种本发明上述具有不同 $n$ 值的聚乙二醇-连接子-药物结合物。
- [0222] 优选地, 所述聚乙二醇-连接子-药物结合物聚乙二醇-连接子-IL-2结合物。
- [0223] 在本发明的一个实施例中, 所述组合物包括 $n$ 值为1-7的聚乙二醇-连接子-IL-2结合物。

[0224] 在本发明的一个实施例中,所述组合物包括n值为1-3的聚乙二醇-连接子-IL-2结合物。

[0225] 在本发明的一个实施例中,所述组合物包括n值为3-5的聚乙二醇-连接子-IL-2结合物。

[0226] 在本发明的一个实施例中,所述组合物包括n值为4-7的聚乙二醇-连接子-IL-2结合物。

[0227] 本发明另一方面还提供一种上述聚乙二醇-连接子-药物结合物的药学上可接受的盐、异构体、前药或溶剂化物。

[0228] 本发明另一方面还提供一种包含上述聚乙二醇-连接子-药物结合物及其药学上可接受的盐、异构体、前药或溶剂化物和药学上可接受的载体或添加剂的药物组合物。

[0229] 如本文所用,“药学上可接受”一词是指在对人施用后具有生理相容性并且不会引起肠胃失调、诸如头晕的过敏反应或类似反应。添加剂可为赋形剂、崩解剂、粘结剂、润滑剂、悬浮剂、稳定剂等等中的任一种。赋形剂的例子包括乳糖、甘露醇、益寿糖、微晶纤维素、硅化微晶纤维素、粉状纤维素等等。崩解剂的例子包括低取代羟丙基纤维素、交聚维酮、羧基乙酸淀粉钠、交联羧甲基纤维素钠、淀粉等等。粘结剂的例子包括羟丙基纤维素、羟丙甲纤维素、聚维酮、共聚维酮、预胶凝淀粉等等。润滑剂的例子包括硬脂酸、硬脂酸镁、富马酰硬脂酸钠等等;润湿剂的例子包括聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯、泊洛沙姆、聚氧乙烯蓖麻油衍生物等等。悬浮剂的例子包括羟丙甲纤维素、羟丙基纤维素、聚维酮、共聚维酮、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素等等。稳定剂的例子包括柠檬酸、富马酸、琥珀酸等等。另外,本发明的药物组合物还可包括阻凝剂、增味剂、乳化剂、防腐剂等等中的任一种。

[0230] 本发明所述的药物组合物可以为片剂(包括糖衣片剂、膜包衣片剂、舌下片剂、口腔崩解片、口腔片剂等等)、丸剂、粉剂、颗粒剂、胶囊剂(包括软胶囊、微胶囊)、锭剂、糖浆剂、液体、乳剂、混悬剂、控制释放制剂(例如,瞬时释放制剂、缓释制剂、缓释微囊)、气雾剂、膜剂(例如,口服崩解膜剂、口腔粘膜-粘附膜剂)、注射剂(例如,皮下注射、静脉注射、肌肉注射、腹膜内注射)、静脉滴注剂、透皮吸收制剂、软膏剂、洗剂、粘附制剂、栓剂(例如,直肠栓剂、阴道栓剂)、小药丸、鼻制剂、肺制剂(吸入剂)、眼睛滴剂等等、口服或胃肠外制剂(例如,静脉内、肌肉、皮下、器官内、鼻内、皮内、滴注、脑内、直肠内等给药形式、给药至肿瘤的附近和直接给药至病变处)。优选地,所述的药物组合物为注射剂。

[0231] 本发明所述的药学上可接受的辅料优选为药学上可接受的注射剂辅料,例如等渗的无菌盐溶液(磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁等,或上述盐的混合物),或所述药物组合物是干燥的例如是冷冻干燥的组合物,其适当地通过加入无菌水或生理盐水形成可注射溶质。

[0232] 本发明另一方面还提供一种上述连接子化合物、聚乙二醇-连接子结合物在制备聚乙二醇-连接子结合物衍生物中的应用。

[0233] 优选地,所述的衍生物为活性酯,更优选为活性碳酸酯。

[0234] 本发明另一方面还提供一种上述连接子化合物、聚乙二醇-连接子结合物及其衍生物在修饰药物中的应用。

[0235] 优选的,所述的应用为制备聚乙二醇-连接子-药物结合物;所述药物为多肽和蛋白质类药物,其具有本发明上述定义。

[0236] 在本发明的另一个具体实施例中,所述的药物为细胞因子,所述细胞因子优选为白介素,更优选为IL-2,最优选为rhIL-2;所述抗体优选为单克隆抗体,更优选为重组抗HER2人源化单克隆抗体。

[0237] 本发明另一方面还提供一种上述连接子化合物、聚乙二醇-连接子结合物及其衍生物、聚乙二醇-连接子-药物结合物及其药学上可接受的盐、异构体、前药或溶剂化物、药物组合物在制备预防和/或治疗疾病的药物中的应用。

[0238] 优选地,所述聚乙二醇-连接子-药物结合物为本发明所述的聚乙二醇-连接子-IL-2结合物。

[0239] 优选地,所述的疾病为肿瘤、自身免疫疾病、病毒性疾病或细菌性疾病。

[0240] 优选地,所述肿瘤疾病包括肾细胞癌、黑色素瘤、恶性血管内皮细胞瘤、皮肤T细胞瘤、卵巢癌、乳腺癌、膀胱癌、肺癌、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、肝癌、毛细胞白血病、髓样母细胞白血病、结肠癌、癌性胸腹腔积液或非霍奇金淋巴瘤等。

[0241] 优选地,所述自身免疫疾病包括类风湿关节炎、系统性红斑狼疮和干燥综合征。

[0242] 优选地,所述病毒包括肝炎病毒、乳头状病毒、HSV、HIV、EBV、冠状病毒和流感病毒等,更优选为肝炎病毒,如HBV或HCV。

[0243] 优选地,所述细菌性疾病如麻风病、肺结核等。

[0244] 优选地,所述应用为本发明所述的聚乙二醇-连接子-IL-2结合物在制备增强手术、放疗或化疗后的肿瘤患者的机体免疫功能的药物中的应用。

[0245] 本发明另一方面还提供一种向一名个体施用上述药物组合物的方法。

[0246] 本发明提供的连接子化合物及其与聚乙二醇的结合物及其衍生物,可用于修饰药物,且修饰反应简单,容易进行,反应产率较高,修饰药物的适用范围较宽。本发明的提供的多肽和蛋白类药物通过非肽连接子与聚乙二醇的结合物,特别是一种白介素(如白介素2)通过非肽连接子与聚乙二醇的结合物,药物可以从结合物结构中降解分离,可实现缓释和控释,降低给药频率,大大提高药物的生物利用度和病人的依从性。特别是,本发明的发明人对结合物的偶合度进行了更深入的研究,得到偶联度明确的结合物或其混合物,有利于后续药效的优化和药理的研究。

## 附图说明

[0247] 图1所示为实施例8中各反应组制备的mPEG-L5-rhIL-2 (20K)的RP-HPLC色谱图,检测波长:214nm。从上到下分别为:1-反应1组,2-反应2组,3-反应3组,4-反应4组,5-反应5组,6-反应6组。

[0248] 图2所示为实施例8中反应3组制备的mPEG-L5-rhIL-2 (20K)的SEC-MALS谱图。

[0249] 图3所示为实施例8中反应3组制备的mPEG-L5-rhIL-2 (20K)经阳离子交换层析后的色谱图。

[0250] 图4所示为实施例8中反应3组制备的mPEG-L5-rhIL-2 (20K)纯化后穿透峰及各分段收集偶联物的RP-HPLC色谱图。从上到下分别为:1-穿透,2-A8,3-A7,4-A6,5-A5,6-A4,7-A3。

[0251] 图5所示为实施例14得到的药效学研究实验结果。



## 具体实施方式

[0252] 除非另有定义,本发明中所使用的所有的技术和科学术语具有与本发明涉及领域的技术人员通常理解的相同的含义,如,“多肽和蛋白类药物”是指用于预防、治疗和诊断的多肽和蛋白质类物质,其中,多肽是 $\alpha$ -氨基酸以肽键连接在一起形成的化合物,也可以是蛋白质水解的中间产物;N条多肽链按一定的空间结构缠绕纠缠构成蛋白质。多肽和蛋白类药物按药物结构分类可分为:氨基酸及其衍生物类药物、多肽和蛋白质类药物、酶和辅酶类药物、核酸及其降解物和衍生物类药物、糖类药物、脂类药物、细胞生长因子和其他生物制品类药物。

[0253] 本发明中所述的IL-2可以是天然的、重组蛋白(如重组人白介素2)或同样具有天然IL-2功能的突变体(如“重组人白介素-2(IL-2)突变体克隆及在巴斯德毕赤酵母系统中的表达与纯化”,刘堰,博士学位论文,中所述的“IL-2-C125A/L18M/L19S”),也包括通过组织培养、蛋白质合成、细胞培养(天然、重组细胞或突变体)方法得到的产品。天然、重组IL-2或突变体的提取和分离方法是本领域技术人员所熟知的。

[0254] 本发明中所述的英文缩写及其代表含义如下:

[0255] IL-2:白介素2;rhIL-2:重组人白介素2;HSV:单纯疱疹病毒;HIV:人类免疫缺陷病毒;HBV:乙型肝炎病毒;HCV:丙型肝炎病毒;EBv:人类疱疹病毒4型。

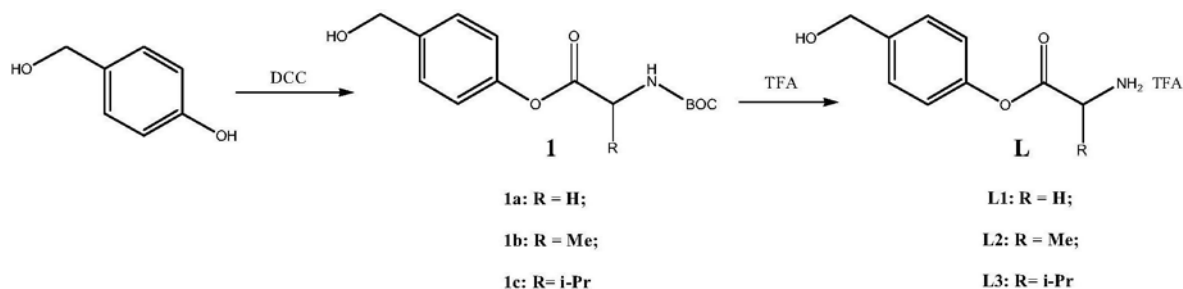
[0256] 下面将结合本发明实施例,对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0257] 本发明所用的化合物原料可以商购,也可以根据公开的制备方法进行制备,其并不限制本发明的范围。

[0258] 实施例中所用的聚乙二醇及其衍生物由北京键凯科技股份有限公司提供,除非指明,分子量均为20K。其他为市售试剂。

[0259] 实施例1:连接链(L)的合成

[0260]



[0261] 将BOC-氨基酸(92.2mmol)和N,N-二环己基碳二亚胺(DCC,23.8g,115.3mmol)加到二氯甲烷(500mL)中,冰水浴冷却,再加入对羟基苯甲醇(11.4g,92.2mmol),加完后撤去冰浴,室温反应过夜。过滤,滤饼用乙酸乙酯洗涤,滤液蒸干得粗品,柱层析纯化后得到产物1。

[0262] 1a:19.7g,收率76.0%。<sup>1</sup>H NMR:(CDCl<sub>3</sub>):8.75(s,1H),7.22(d,2H),7.05(d,2H),4.87(s,2H),3.74(s,2H),1.52(s,9H)。

[0263] 1b:20.3g,收率74.8%。<sup>1</sup>H NMR:(CDCl<sub>3</sub>):8.74(s,1H),7.21(d,2H),7.05(d,2H),4.88(s,2H),3.77(m,1H),1.51(s,9H),1.27(d,3H)。

[0264] 1c:21.6g, 收率72.5%。<sup>1</sup>H NMR: (CDCl<sub>3</sub>): 8.75 (s, 1H), 7.22 (d, 2H), 7.05 (d, 2H), 4.87 (s, 2H), 3.61 (d, 1H), 2.82 (m, 1H), 1.52 (s, 9H), 1.06 (d, 6H)。

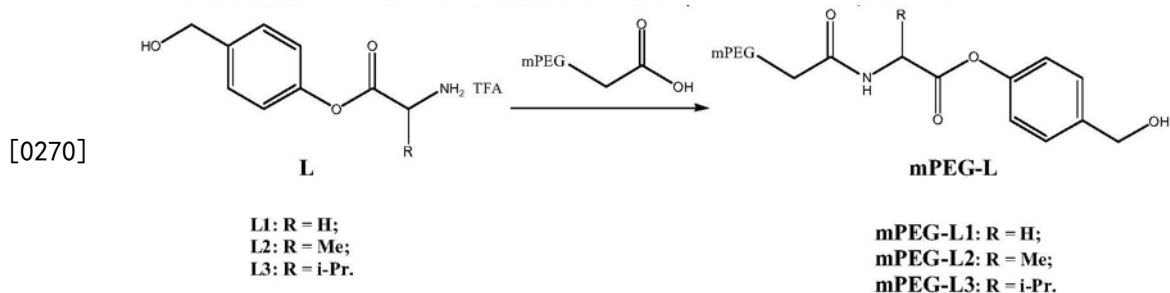
[0265] 将化合物1 (39.1mmol) 溶于二氯甲烷 (250mL) 中, 加入三氟乙酸 (50mL), 加完后室温搅拌过夜, 浓缩, 残分中加入二氯甲烷, 再蒸干, 反复三次, 最后加乙醚沉淀, 过滤, 得产物L。

[0266] L1:11.1g, 收率96.7%。

[0267] L2:11.6g, 收率97.1%。

[0268] L3:12.7g, 收率96.3%。

[0269] 实施例2: 单甲氧基聚乙二醇乙酸与连接链的结合物 (mPEG-L-40K) 的合成



[0271] 将单甲氧基聚乙二醇-乙酸 (mPEG-CM, 40K, 5g, 0.125mmol)、化合物L (0.25mmol, 实施例1制备) 和1-羟基苯并三氮唑 (HOBt, 16.9mg, 0.125mmol) 加到反应瓶中, 用二氯甲烷溶解, 再加入二异丙基乙基胺 (45.2mg, 0.35mmol), 搅拌均匀, 冰浴冷却后分批加入 (EDCI, 47.9mg, 0.25mmol), 加完后体系自然升到室温, 反应过夜。次日浓缩后残分用异丙醇结晶, 抽滤, 干燥后得产品mPEG-L。

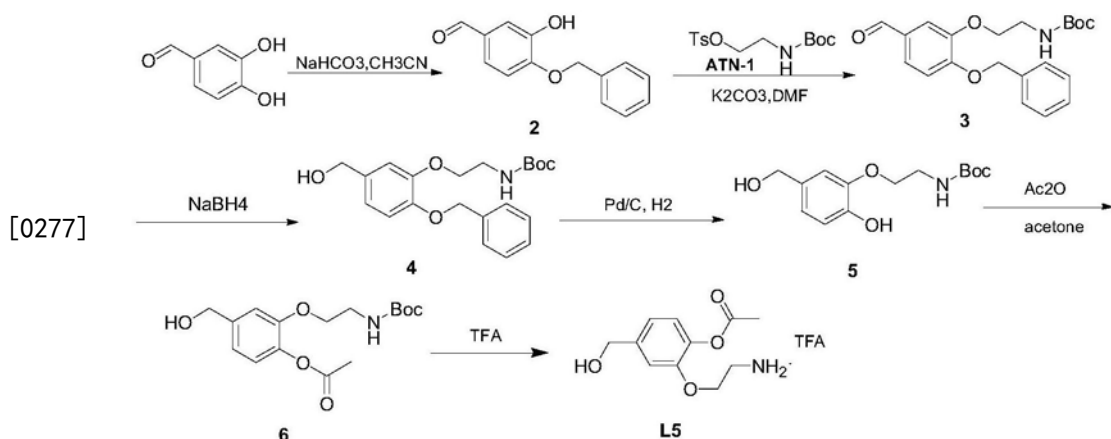
[0272] mPEG-L1 (40K): 4.6g, 收率92.4%。

[0273] mPEG-L2 (40K): 4.5g, 收率90.8%。

[0274] mPEG-L3 (40K): 4.7g, 收率93.7%。

[0275] 实施例3: 连接链L5的制备

[0276] 连接链L5的合成路线如下所示:



[0278] 化合物 (2) 的合成:

[0279] 3,4-二羟基苯甲醛 (10g, 72.5mmol) 溶于乙腈 (150mL) 中, 加入碳酸氢钠 (8g, 94.3mmol), 升温至60℃, 加入溴苄 (12.4g, 72.5mmol), 然后升温至80℃搅拌过夜。浓缩除去乙腈, 残分中加入10%盐酸水溶液 (200mL), 用乙酸乙酯萃取 (150mL\*3), 合并后干燥, 过滤,

浓缩,残分用柱层析纯化得灰白色固体10g(收率60%)。<sup>1</sup>H NMR:(CDCl<sub>3</sub>): $\delta$ 9.82(s,1H), 7.48-7.40(m,7H), 7.05(m,1H), 6.02(s,1H), 5.21(s,2H)。

[0280] 化合物(3)的合成:

[0281] 化合物(2)(5g,21.9mmol)溶于DMF(80mL)中,加入碳酸钾(7.6g,54.75mmol),碘化钾(0.73g,4.38mmol),搅拌10分钟,加入ATN-1(9g,28.47mmol),升至70℃搅拌过夜。后处理,往反应液中加入氯化铵饱和溶液(400mL),用乙酸乙酯萃取(150mL\*3),合并后干燥,过滤,浓缩,残分用柱层析纯化得白色固体5g(收率61%)。<sup>1</sup>H NMR:(CDCl<sub>3</sub>): $\delta$ 9.85(s,1H), 7.47-7.36(m,7H), 7.03(m,1H), 5.24(s,2H), 5.07(s,1H), 4.17(m,2H), 3.59(m,2H), 1.46(s,9H)。

[0282] 化合物(4)的合成:

[0283] 将化合物(3)(5g,13.5mmol)溶于四氢呋喃(100mL)中,室温加入硼氢化钠(0.77g,20.25mmol),室温搅拌2小时后冷却到0℃,加入醋酸(2mL)淬灭反应,减压浓缩除去溶剂,残分用柱层析纯化,得无色油状物4g(收率80%)。<sup>1</sup>H NMR:(DMSO-d<sub>6</sub>): $\delta$ 7.38-7.05(m,8H), 6.80(m,1H), 5.09(s,2H), 5.06(m,1H), 4.40(m,2H), 3.98(m,2H), 3.31(m,2H), 1.38(s,9H)。

[0284] 化合物(5)的合成:

[0285] 化合物(4)(1g,2.7mmol)溶于甲醇(8mL)中,加入Pd/C(10%,0.3g),再通入氢气反应过夜。过滤,滤液浓缩,残分用柱层析纯化,得产品0.6g(收率78%)。<sup>1</sup>H NMR:(DMSO-d<sub>6</sub>): $\delta$ 8.37(s,1H), 7.09(s,1H), 6.71(s,1H), 6.65(d,1H), 6.56(d,1H), 4.45(s,2H), 3.89(m,2H), 3.31(m,2H), 1.38(s,9H)。

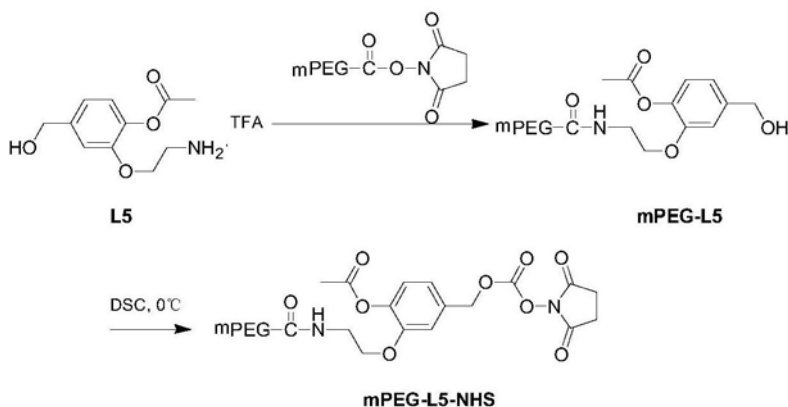
[0286] 化合物(6)的合成:

[0287] 将化合物(5)(0.6g,2.1mmol)溶于丙酮(7mL),加入碳酸钾(0.58g,4.2mmol),体系冷却到0℃,加入醋酸酐(235mg,2.3mmol),缓慢升至室温反应3小时。后处理,加入氯化铵水溶液(30mL),乙酸乙酯萃取,合并干燥浓缩,过柱得产物0.5g(收率73%)。<sup>1</sup>H NMR:(DMSO-d<sub>6</sub>): $\delta$ 7.12(s,1H), 6.89(s,1H), 6.65(d,1H), 6.56(d,1H), 4.45(s,2H), 3.89(m,2H), 3.31(m,2H), 2.14(s,3H), 1.38(s,9H)。

[0288] 化合物(L5)的合成:

[0289] 将化合物(6)(0.5g,1.5mmol)溶于二氯甲烷(7mL)中,加入三氟乙酸(4mL),室温搅拌1小时。浓缩除去溶剂,残分中加入乙醚,有固体析出,过滤,干燥得固体产物0.3g,收率86%。<sup>1</sup>H NMR:(DMSO-d<sub>6</sub>): $\delta$ 8.30(s,1H), 6.89(s,1H), 6.65(d,1H), 6.56(d,1H), 4.45(s,2H), 3.85(m,2H), 3.29(m,2H), 2.12(s,3H)。

[0290] 实施例4:单甲氧基聚乙二醇乙酸与连接链的结合物(mPEG-L5-NHS-20K)的合成



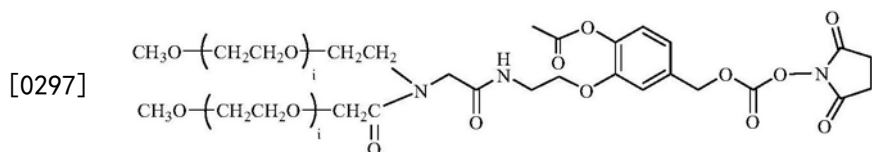
[0292] mPEG-L5的合成:

[0293] 将mPEG (20K)-CM-NHS (2g, 0.1mmol) 溶于无水二氯甲烷中, 低温冷却至0°C, 加入DIPEA (78mg, 0.6mmol), 然后加入化合物L5, 缓慢升至室温搅拌过夜。反应液浓缩后残分用异丙醇结晶, 抽滤, 干燥后得产品mPEG-L5 (1.8g, 90%)。<sup>1</sup>H NMR: (DMSO-d<sub>6</sub>): δ8.10 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.72 (d, 1H), 6.65 (d, 1H), 5.34 (s, 2H), 4.20 (m, 2H), 3.65 (m, 1800H), 3.51 (m, 2H), 3.24 (s, 3H), 2.78 (m, 4H), 2.12 (s, 3H)。

[0294] mPEG-L5-NHS的合成:

[0295] 将化合物mPEG-L5 (1g, 0.05mmol) 加到反应瓶中, 用二氯甲烷 (6mL) 溶解, N<sub>2</sub>保护下冷却, 加入琥珀酰亚胺碳酸酯 (19.0mg, 0.075mmol), 搅拌溶解后再加入DIPEA (12.9mg, 0.1mmol), 加完后撤去冷浴, 室温反应过夜。反应液浓缩, 残分用异丙醇结晶, 得产品mPEG-L5-NHS。<sup>1</sup>H NMR: (DMSO-d<sub>6</sub>): δ8.10 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.72 (d, 1H), 6.65 (d, 1H), 4.65 (s, 2H), 4.15 (m, 2H), 3.65 (m, 1800H), 3.29 (m, 2H), 3.24 (s, 3H), 2.12 (s, 3H)。

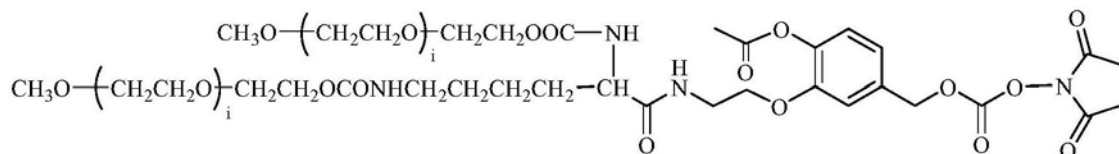
[0296] 实施例5: Y-PEG-L5-NHS-20K的合成



[0298] 其制备方法参考实施例4。

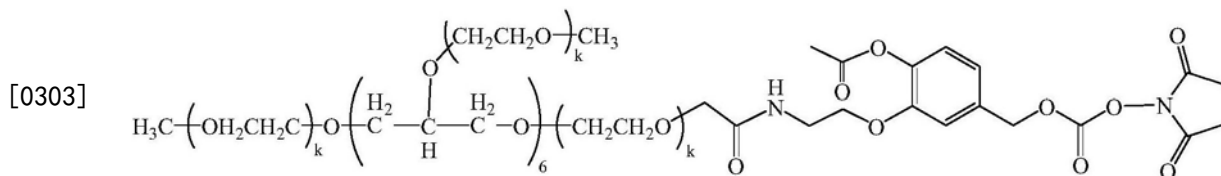
[0299] 实施例6: U-PEG-L5-NHS-20K的合成

[0300]



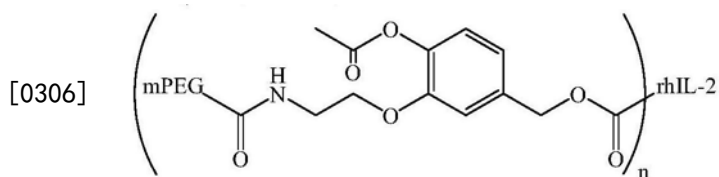
[0301] 其制备方法参考实施例4。

[0302] 实施例7: 8arm-PEG-L5-NHS-20K的合成



[0304] 其制备方法参考实施例4。

[0305] 实施例8:mPEG-L5-rhIL-2 (20K) 的合成



[0307] 在氮气吹扫下,将在-20℃下储存的mPEG-L5-NHS (20K, 实施例4制备) 升温至室温。在DMSO中制备mPEG-L5-NHS (20K) 储备溶液 (200mg/mL), 加入rhIL-2溶液中 (反应分组、反应条件如反应物mPEG-L5-NHS:rhIL-2摩尔比 (以下简称为PEG:rhIL-2摩尔比) 及具体反应pH如表1所示)。混合物中rhIL-2的终浓度是0.5mg/mL。将碳酸氢钠缓冲液 (1M, pH9.0) 分别添加至混合物以达到20mM的终浓度, 室温下反应2h以提供缀合物。2h后, 分别添加1M甘氨酸 (pH6.0) 至终浓度100mM来终止反应。

[0308] 对终止后的反应体系开展RP-HPLC测定不同反应组的偶联情况, 根据偶联物的迁移情况 (左移代表偶联度高) 分析评价偶联效率和偶联度, RP-HPLC谱图如图1所示, 由图1可知, 偶联度及偶联效率均为反应3组>反应4组>反应5组>反应2组>反应6组>反应1组。进一步开展SEC+MALS分析反应3组, 评价偶联度, 结果如图2所示。

[0309] 本实施例制备的偶联物mPEG-L5-rhIL-2 (20K) 的偶联度结果如表1所示。

[0310] 表1: 实施例8制备的偶联物的SEC-MALS偶联度结果表

[0311]

	反应 1 组	反应 2 组	反应 3 组	反应 4 组	反应 5 组	反应 6 组
投料摩尔比 (PEG: rhIL-2)	10: 1	20: 1	30: 1	30: 1	30: 1	30: 1
反应 pH	9.8	9.8	9.8	8.0	7.2	6.0
偶联度	1,2,3	1,2,3	4~7	3~5	1,2,3	1,2,3
比例	> 90%	> 90%	> 90%	> 90%	> 70%	> 80%

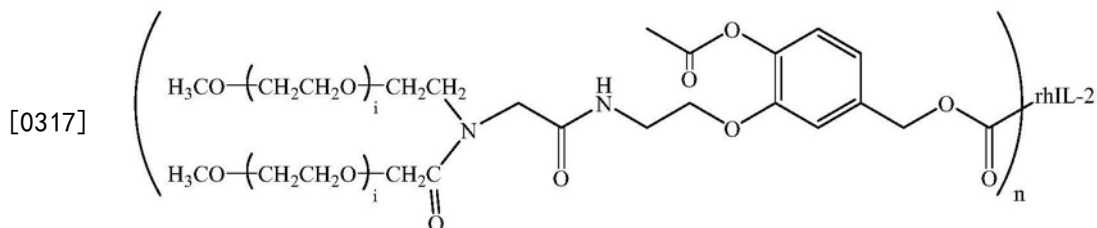
[0312] 上表所获产品可以分为三类: 偶联度为4-7的mPEG-L5-rhIL-2、偶联度为3-5的mPEG-L5-rhIL-2和偶联度为1-3的mPEG-L5-rhIL-2, 最优含量可控制在大于90%。

[0313] 接着分别将终止反应的混合物用纯化水稀释以提供低于0.5mS/cm (25℃) 的电导率。使用冰醋酸将pH值调节至4.0, 然后进行柱层析纯化, 如图3所示。结合RP-HPLC分析 (图4), PEG在穿透峰中富集, mPEG-L5-rhIL-2在0~50%B (0~0.5M NaCl梯度) 中洗脱, 分段收集各洗脱峰 (A3~A8), 观察到偶联度由高到低分布。

[0314] 实施例9:mPEG-L5-rhIL-2 (40K) 的合成

[0315] 其制备方法参照实施例8。

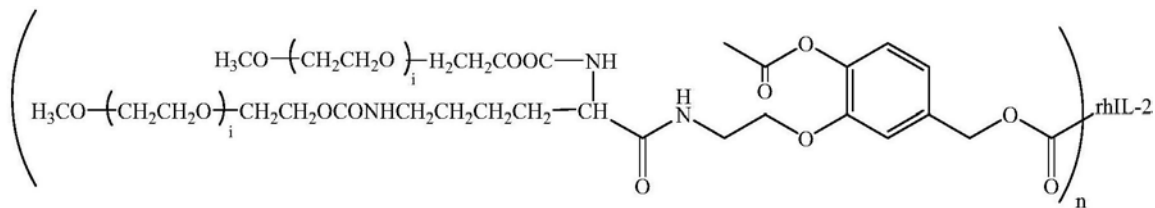
[0316] 实施例10:Y-PEG-L5-rhIL-2 (20k) 的合成



[0318] 其制备方法参照实施例8。

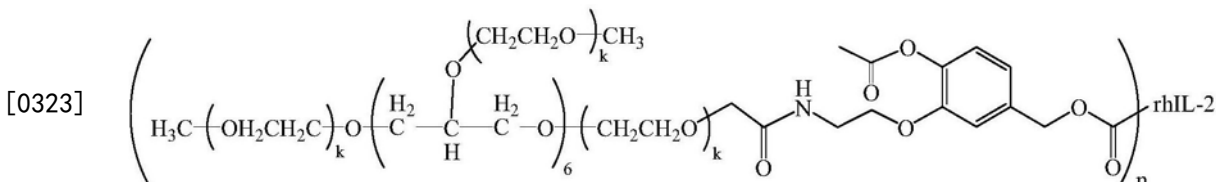
[0319] 实施例11:U-PEG-L5-rhIL-2 (20k) 的合成

[0320]



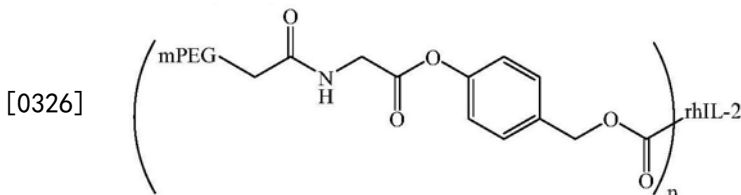
[0321] 其制备方法参照实施例8。

[0322] 实施例12:8arm-PEG-L5-rhIL-2 (20K) 的合成



[0324] 其制备方法参照实施例8。

[0325] 实施例13:mPEG-L1-rhIL-2 (20K) 的合成



[0327] 在氮气吹扫下,将在-20℃下储存的mPEG-L1-NHS (20K,其制备方法参考实施例2)升温至室温。在DMSO中制备mPEG-L1-NHS (20K) 储备溶液 (200mg/mL),加入rhIL-2溶液中 (PEG:rhIL-2摩尔比分别为1:1、3:1、10:1、30:1)。混合物中rhIL-2的终浓度是0.5mg/mL。将碳酸氢钠缓冲液 (1M,pH9.0) 分别添加至混合物以达到20mM的终浓度,室温下反应2h以提供缀合物。2h后,分别添加1M甘氨酸 (pH6.0) 至终浓度100mM来终止反应。接着分别将终止反应的混合物用纯化水稀释以提供低于0.5mS/cm (25℃) 的电导率。使用冰醋酸将pH值调节至4.0,然后进行柱层析纯化。

[0328] 实施例14:经本发明修饰的IL-2的药效学研究

[0329] 采用实施例8的反应3组条件进行PEG与rhIL-2偶联,偶联混合物经离子交换色谱纯化,分离得到PEG与rhIL-2偶联物进行药效学实验。采用C57BL/6小鼠的皮下黑色素瘤B16模型评估mPEG-L5-rhIL-2偶联物 (以下简称为PEG-rhIL-2) 的抑制肿瘤效果。实验过程如下:每只5-6周龄的C57BL/6小鼠在背部中部植入10<sup>6</sup>个B16细胞。肿瘤生长至可测量尺寸后,实验动物随机分组,每组6只,以不同剂量浓度和剂量方案对小鼠施用测试化合物:rhIL-2、PEG-rhIL-2及溶剂对照。每隔一天测量体重和肿瘤体积。药效实验分组如表2所示,实验结果如表3和图5所示。

[0330] 表2:药效实验分组

[0331]

分组	剂量浓度	施用途径	频次
溶剂对照组	N/A	IV	注射一次
rhIL-2组	1mg/Kg	IV	每天一次,注射5天
PEG-rhIL-2组	1mg/Kg	IV	注射一次

[0332] 表3:药效实验结果

时间/天 \ 肿瘤体积/mm <sup>3</sup>	溶剂对照组	rhIL-2 组	PEG-rhIL-2 组
1	100	102	104
3	150	180	147
5	300	260	225
7	880	470	280
9	1260	650	310

[0334] 由数据可知,给药第9天时,与溶剂对照组肿瘤体积(1260mm<sup>3</sup>)相比,经本发明修饰的rhIL-2组肿瘤体积(310mm<sup>3</sup>)大大减小,与未修饰的rhIL-2组肿瘤体积(650mm<sup>3</sup>)相比,经本发明修饰后的mPEG-L5-rhIL-2组的抑瘤效果提高了27%,且其给药频次大大降低,作为抗肿瘤药物具有降低给药频率、大大提高药物的生物利用度和病人的依从性的优势。

[0335] 本发明实施例中所述的“偶联度”是指每个IL-2分子上偶联的PEG分子数目(即本发明中通式IX中所述的n值),如,偶联度为4的mPEG-L5-rhIL-2,是指每个rhIL-2分子上偶联4个mPEG-L5链段;偶联度为4-7的mPEG-L5-rhIL-2,是指含有偶联度为4的mPEG-L5-rhIL-2、偶联度为5的mPEG-L5-rhIL-2、偶联度为6的mPEG-L5-rhIL-2和偶联度为7的mPEG-L5-rhIL-2的混合物。

[0336] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换等,均应包含在本发明的保护范围之内。

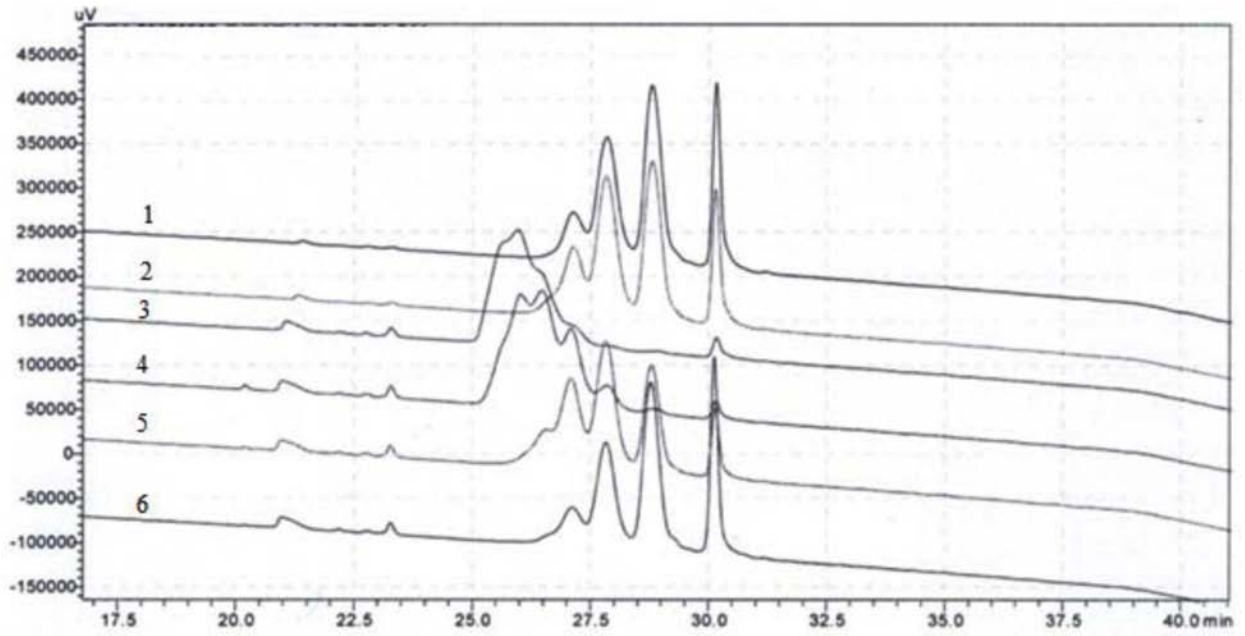


图1

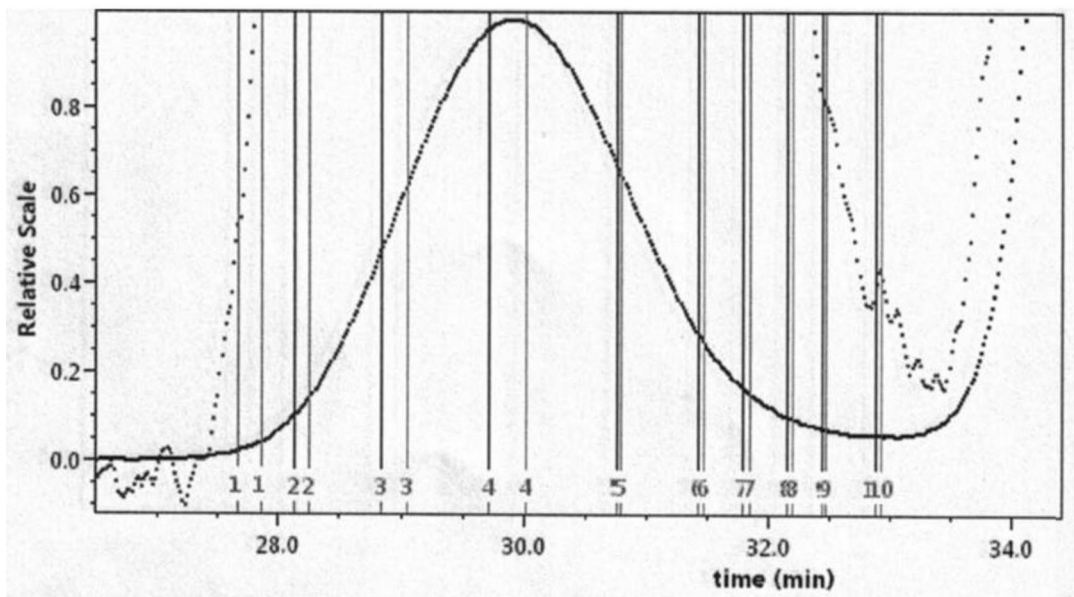


图2



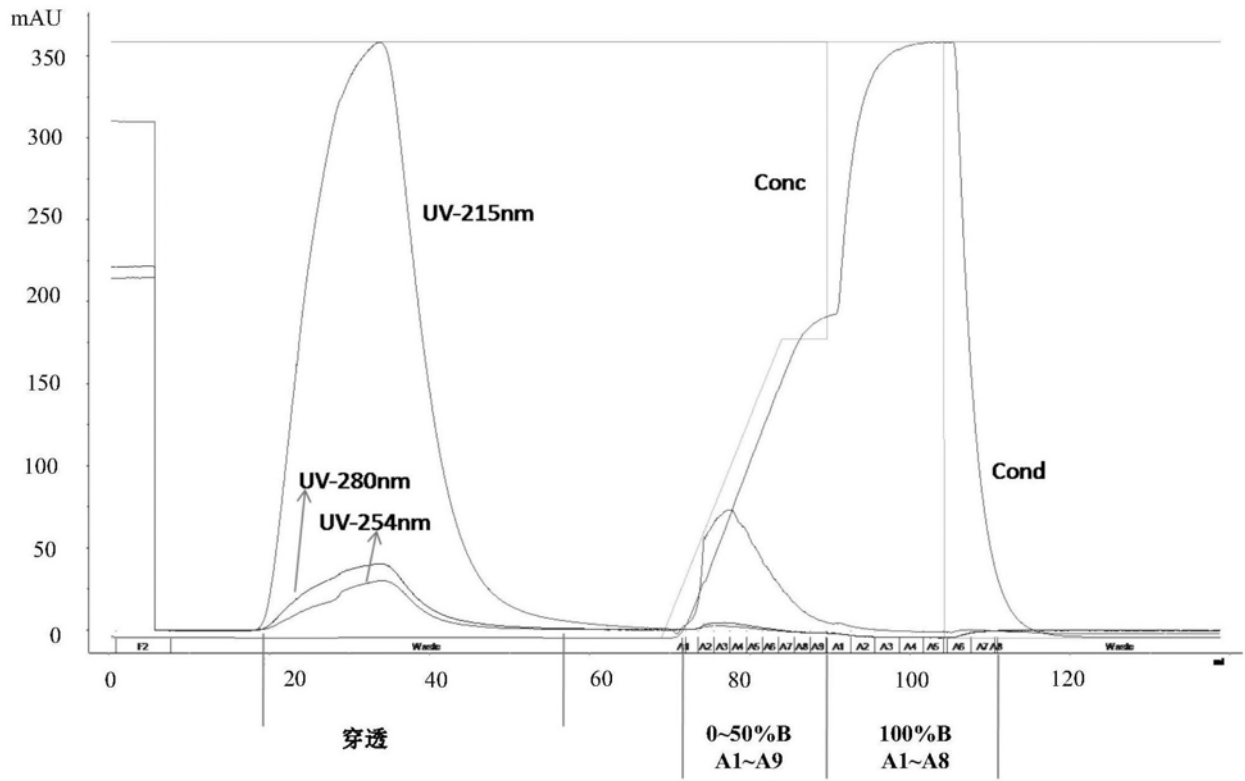


图3

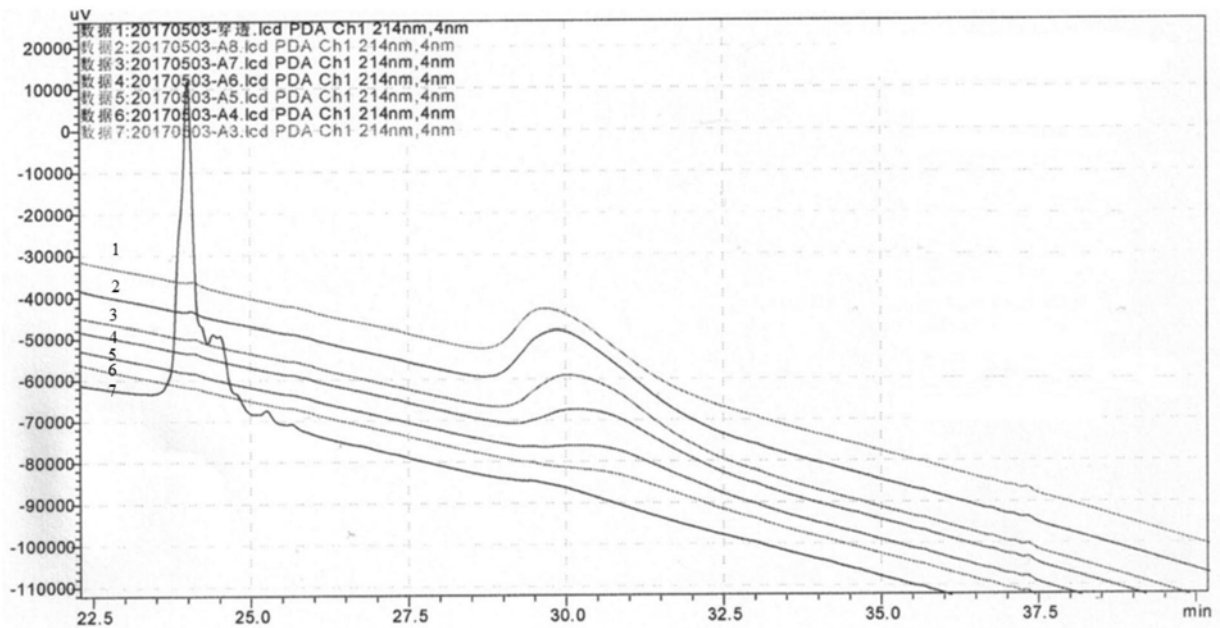


图4

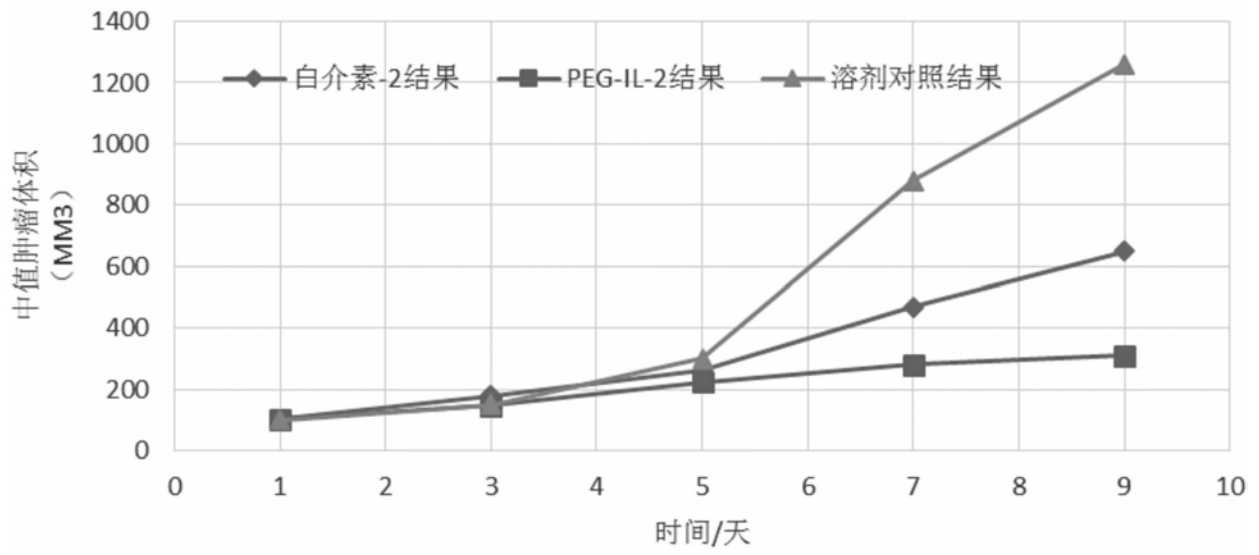


图5