

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00811540.0

A61K 31/075
A61K 31/13 A61K 31/16
A61K 31/21 A61K 31/325
A61K 38/02 A61K 38/28

[43] 公开日 2002 年 9 月 11 日

[11] 公开号 CN 1368877A

[22] 申请日 2000.6.19 [21] 申请号 00811540.0

[30] 优先权

[32] 1999.6.19 [33] US [31] 09/336,548

[86] 国际申请 PCT/US00/16879 2000.6.19

[87] 国际公布 WO00/78302 英 2000.12.28

[85] 进入国家阶段日期 2002.2.8

[71] 申请人 诺贝克斯公司

地址 美国北卡罗莱纳州

[72] 发明人 N·埃乌里贝 M·拉马斯瓦默

J·拉杰戈帕兰

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

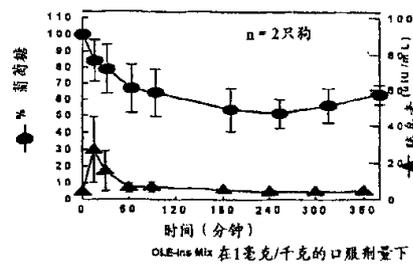
代理人 温宏艳 杨九昌

权利要求书 9 页 说明书 36 页 附图页数 3 页

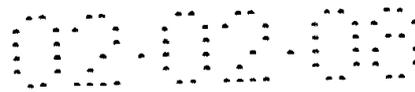
[54] 发明名称 含有可水解的亲脂成分的两亲药物 - 低聚物结合物及其制备和使用方法

[57] 摘要

本发明广泛涉及可水解类药物 - 低聚物结合物、含这类结合物的药物组合物以及制备和使用这类结合物和药物组合物的方法。例如，胰岛素、PEG 和油酸的结合物可以口服。

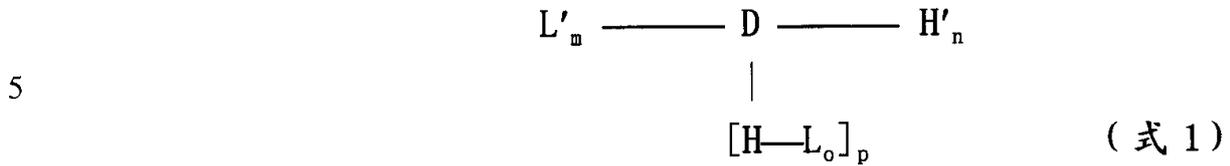


ISSN 1008-4274



权 利 要 求 书

1. 具有以下通式的药物-低聚物结合物:



其中

D 是治疗药物部分;

10 H 和 H'各自是亲水部分, 独立选自含有 2~130 个 PEG 亚单位的直链或支链 PEG 聚合物和糖;

L 是亲脂部分, 选自含有 2~24 个碳原子的烷基基团、胆固醇和脂肪酸; 以及

15 $m+n+p$ 合计具有至少为 1 和不超过 D 上的 -H'、-L 和 -H-L 取代基的共价键合位点总数的数值;

H-L 键是可水解的, 而 D-L'键如果存在的话也是可水解的。

2. 权利要求 1 的药物-低聚物结合物, 其中 m 为 0, 而 p 至少为 1。

20 3. 权利要求 1 的药物-低聚物结合物, 其中 n 为 0, 而 p 至少为 1。

4. 权利要求 1 的药物-低聚物结合物, 其中 m 和 n 各为 0, 而 p 至少为 1。

5. 权利要求 1 的药物-低聚物结合物, 其中 p 为 0, 而 m 和 n 各自至少为 1。

25 6. 权利要求 1 的药物-低聚物结合物, 其中 D-H 键和 D-H'键(如果存在的话)是非水解型。

7. 权利要求 1 的药物-低聚物结合物, 其中 D-L'键, 如果存在的话, 是非水解型的。

30 8. 权利要求 1 的药物-低聚物结合物, 其中 D-H 键和 D-H'键, 如果存在的话, 独立选自氨基甲酸酯、酰胺和仲胺。

9. 权利要求 1 的药物-低聚物结合物, 其中 H-L 键选自酯和碳酸酯。

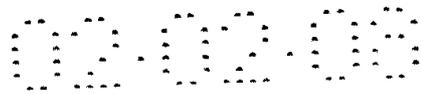


10. 权利要求 1 的药物-低聚物结合物, 其中有 D-L'键存在, 并且选自酯和碳酸酯。

11. 权利要求 1 的药物-低聚物结合物, 其中 D 是生物活性多肽。

12. 权利要求 11 的药物-低聚物结合物, 其中生物活性多肽至少有一个供结合用的可利用部分, 其选自 XNH_2 ; $-OH$ 和 XSH ; 以及其中至少有一个可利用部分结合在 H-L 部分上。

13. 权利要求 11 的药物-低聚物结合物, 其中生物活性多肽选自: 促肾上腺皮质激素、促肾上腺皮质激素衍生物类、依比拉肽、血管紧张肽、血管紧张肽 II、天冬酰胺酶、心房利钠肽类、心房钠利尿肽类、杆菌肽、 β -内啡肽类、凝血因子 VII、凝血因子 VIII、凝血因子 IX、血液胸腺因子、血液胸腺因子衍生物、骨形态形成因子、骨形成蛋白、缓激肽、蛙皮素、降钙素基因相关多肽、降钙素类、CCK-8、细胞生长因子、EGF、TGF- α 、TGF- β 、PDGF、酸性 FGF、碱性 FGF、蛙皮缩胆囊肽、趋化因子类、缩胆囊肽、缩胆囊肽-8、缩胆囊肽-肠促胰酶素、粘菌素、集落刺激因子、CSF、GCSF、GMCSF、MCSF、促肾上腺皮质激素释放因子、细胞因子类、去氨加压素、二啡肽、二肽、岐化酶、强啡肽、章鱼素、内啡肽类、内皮素、内皮素拮抗肽类、endothelins、脑啡肽衍生物类、脑啡肽类、表皮生长因子、红细胞生成素、促滤泡激素、gallanin、肠抑胃肽、释胃泌素肽、胃泌素类、G-CSF、高血糖素、谷胱甘肽过氧化物酶、glutathio 过氧化物酶、促性腺素、短杆菌肽、短杆菌肽类、生长因子、生长激素释放因子、生长激素类、生长激素类、h-ANP、激素释放激素、人绒毛膜促性腺素、人绒毛膜促性腺素- β -链、人胎盘促乳素、抑制剂、胰岛素、胰岛素样生长因子、IGF-I、IGF-II、干扰素类、白细胞介素类、肠肽、血管舒缓素、kyotorphin、促黄体素释放素、促黄体化激素、促黄体化激素释放激素、氯化溶菌酶、促黑激素、促黑激素、促黑激素、mellitin、促胃动素、促黑激素、胞壁酰、胞壁酰二肽、神经生长因子、神经营养因子类、NT-3、NT-4、CNTF、GDNF、BDNF、神经肽 Y、神经降压肽、催产素、胰抑制素、胰多肽、促胰酶素、甲状旁腺素、五肽胃泌素、多肽 YY、垂体腺苷酸环化酶活化多肽类、血小板衍生生长因子、多粘菌素 B、促乳素、促蛋白质合成多肽、PTH 相关蛋白、松弛素、肾素、胰泌素、血清胸腺因子、生长调节素类、生长激素抑制素类衍生物类、



生长激素抑制素类、P 物质、超氧化物、超氧化物歧化酶、taftsin、四肽胃泌素、血小板生成素、胸腺体液因子、胸腺生成素、胸腺素、胸腺刺激素、甲状腺激素释放激素、促甲状腺素、促甲状腺素释放激素 TRH、胰蛋白酶、促吞噬素、肿瘤生长因子、肿瘤坏死因子、肿瘤坏死因子、短杆菌酪肽、尿抑胃素、尿激酶、vasactive 肠肽、血管活性肠肽、加压素以及这些多肽类的功能等同物。

14. 权利要求 1 的药物-低聚物结合, 其中 D 是来自微生物的抗原或与疾病状态有关的抗原, 选自: 腺病毒类、炭疽、百日咳杆菌、肉毒中毒、牛鼻气管炎、卡他布兰汉球菌、犬病毒性肝炎、犬温热、衣原体、霍乱、球孢子菌病、牛痘、巨细胞病毒、巨细胞病毒、登革热、登革弓形体病、白喉、脑炎、大肠杆菌产毒素、非洲淋巴细胞瘤病毒、马脑炎、马感染性贫血、马流感、马肺炎、马鼻病毒、大肠杆菌、猫白血病、黄病病毒、球蛋白、流感嗜血杆菌 b 型、流感嗜血杆菌、百日咳嗜血杆菌、幽门螺杆菌、嗜血杆菌、肝炎、甲肝、乙肝、丙肝、疱疹病毒、HIV、HIV-1 病毒、HIV-2 病毒、HTLV、流感、日本脑炎、克雷白杆菌种、侵肺军团菌、利什曼原虫、麻风、莱姆病、疟疾免疫原、麻疹、脑膜炎、脑膜炎球菌、脑膜炎球菌多糖 A 型、脑膜炎球菌多糖 C 型、流行性腮腺炎、流行性腮腺炎病毒、分枝杆菌及结核分枝杆菌、奈瑟氏菌、淋球菌、脑膜炎双球菌、非甲非乙肝炎、羊蓝舌病、羊脑炎、乳头状瘤、副流感、副粘病毒、粘液病毒类、百日咳、鼠疫、肺炎球菌属、卡氏肺囊虫、肺炎、脊髓灰质炎病毒、变形杆菌种、绿脓杆菌、狂犬病、呼吸道合胞体病毒、轮状病毒、风疹、沙门氏菌、血吸虫病、志贺氏菌、猿猴免疫缺陷病毒、天花、金黄色葡萄球菌、葡萄球菌种、肺炎链球菌、酿脓链球菌、链球菌种、猪流感、破伤风、苍白密螺旋体、伤寒、牛痘、水痘带状疱疹病毒和霍乱弧菌。

15. 权利要求 1 的药物-低聚物结合物, 其中 D 是胰岛素或其功能等同物。

16. 权利要求 1 的药物-低聚物结合物, 其中 H 和 H' 独立选自直链或支链 PEG₁₋₁₃₀ 和糖。

17. 权利要求 1 的药物-低聚物结合物, 其中 H 和/或 H' 是糖, 独立选自氨基糖、甘油和天然单糖。

18. 权利要求 1 的药物-低聚物结合物, 其中 L 选自含有 2~24 个碳原子的烷基基团; 含有 4~26 个碳原子的脂肪酸; 胆固醇和金刚烷。

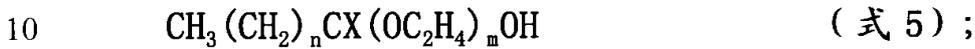
5 19. 权利要求 1 的药物-低聚物结合物, 其中 H-L 包含选自下列的亚单位:



其中 $n = 3 \sim 25$ 及 $m = 1 \sim 7$;



其中 $n = 3 \sim 25$ 及 $m = 1 \sim 6$;



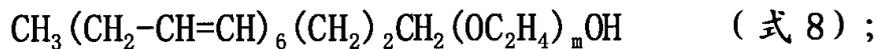
其中 $n = 3 \sim 25$, $m = 1 \sim 7$ 及 $X = \text{O}$;



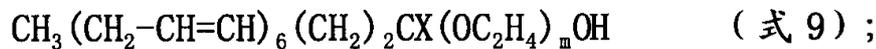
其中 $m = 0 \sim 5$ 及 $\text{R} = \text{胆固醇或金刚烷}$; 或者



15 其中 $m = 0 \sim 14$;



其中 $m = 0 \sim 7$;



其中 $m = 1 \sim 7$ 及 $X = \text{N}$ 或 O 。

20 20. 一种药物组合物, 它包含权利要求 1 的药物-低聚物结合物与药物载体。

21. 一种药物组合物, 它包含权利要求 1 的药物-低聚物结合物与乳液。

25 22. 一种药物组合物, 它包含权利要求 1 的药物-低聚物结合物与微乳液。

23. 具有以下通式的药物-低聚物结合物:



其中

D 是治疗药物部分;

30 H 是亲水部分, 选自含有 2~130 PEG 亚单位的直链或支链 PEG 聚合物和糖;

L 是亲脂部分, 选自含有 2~24 个碳原子的烷基基团、胆固醇和脂



肪酸；以及

S 是间隔基团，选自糖、碳水化合物和甘油；

n 是从 1 到最大共价键合位点数的数值，S 可在这种共价键合位点上连于 H' 上；

5 o 是从 1 到最大共价键合位点数的数值，L 可在这种共价键合位点上连于 S 上；

p 是从 1 到最大共价键合位点数的数值， $-(H-S_n)-L_o$ 可在这种共价键合位点上连于 D 上；以及

S-L 键和/或 S-H 键是可水解的。

10 24. 权利要求 23 的药物-低聚物结合物，其中 D 是胰岛素或其功能等同物。

25. 有以下通式的药物-低聚物结合物：



D 是治疗药物部分；

15 H 和 H' 是亲水部分，独立选自含有 2-130 个 PEG 亚单位的直链或支链 PEG 聚合物和糖；

L 是亲脂部分，选自含有 2-24 个碳原子的烷基基团、胆固醇和脂肪酸；以及

S 是间隔基团，选自糖、碳水化合物和甘油；

20 n 是从 1 到最大共价键合位点数的数值，S 可在这种共价键合位点上连于 H 上；

q 是从 1 到最大共价键合位点数的数值，H' 可在这种共价键合位点上连于 S 上；

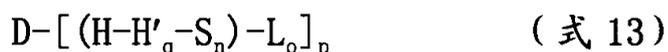
25 o 是从 1 到最大共价键合位点数的数值，L 可在这种共价键合位点上连于 S 上；

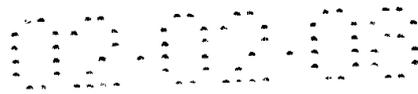
p 是从 1 到最大共价键合位点数的数值， $-(H-S_n-H'_q)-L_o$ 可在这种共价键合位点上连于 D 上；以及

S-H 键和/或 S-H' 键是可水解的。

30 26. 权利要求 25 的药物-低聚物结合物，其中 D 是胰岛素或其功能等同物。

27. 具有以下通式的药物-低聚物结合物：





D 是治疗药物部分;

H 和 H' 是亲水部分, 独立选自含有 2-130 个 PEG 亚单位的直链或支链 PEG 聚合物和糖;

L 是亲脂部分, 选自含有 2-24 个碳原子的烷基基团、胆固醇和脂肪
5 肪酸; 以及

S 是间隔基团, 选自糖、碳水化合物和甘油;

q 是从 1 到最大共价键合位点数的数值, H' 可在这种位点上连于 H
上;

n 是从 1 到最大共价键合位点数的数值, S 可在这种位点上连于 H'
10 上;

o 是从 1 到最大共价键合位点数的数值, L 可在这种位点上连于 S
上; 以及

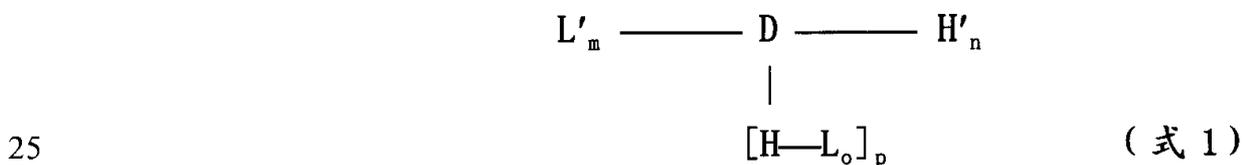
H-H' 键是可水解的。

28. 权利要求 27 的药物-低聚物结合物, 其中 D 是胰岛素或其功
15 能等同物。

29. 权利要求 27 的药物-低聚物结合物, 其中 D 是胰岛素或其功
能等同物以及 H 是 PEG₂₋₇。

30. 权利要求 27 的药物-低聚物结合物, 其中 D 是胰岛素或其功
能等同物及 H 是 PEG₃。

20 31. 一种将药物增溶于微乳剂的方法, 包括
a) 提供具有式 1 的药物-低聚物结合物:



其中

D 是治疗药物部分;

H 和 H' 各自是亲水部分, 独立选自含有 2~130 个 PEG 亚单位的直
30 链或支链 PEG 聚合物和糖;

L 和 L' 各自是亲脂部分, 独立选自含有 2~24 个碳原子的烷基基团、
胆固醇和脂肪酸;



$m+n+p$ 之和至少为 1 和不超过这些取代基的共价键合位点数;
o 是从 1 到最大共价键合位点数的数值, L 可在这种位点上连于 H 上;

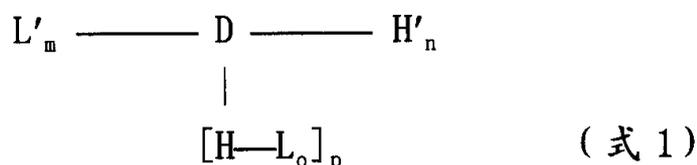
H-L 键和 D-H 键, 如果存在的话, 是可水解的;

5 b) 将 a) 的药物-低聚物结合物与微乳剂结合起来。

32. 权利要求 32 的药物-低聚物结合物, 其中 D 是胰岛素或其功能等同物。

33. 一种使活性药物-亲水物结合物达到受试者的某一部位的方法, 该方法包括给受试者施用具有式 1 的非活性药物-低聚物结合物:

10



15

其中

H 和 H'各自是亲水部分, 独立选自含有 2~130 个 PEG 亚单位的直链或支链 PEG 聚合物和糖;

L 和 L'各自是亲脂部分, 独立选自含有 2~24 个碳原子的烷基基团、胆固醇和脂肪酸;

20

$m+n+p$ 至少为 1 并且不超过这些取代基的共价键合位点数;

o 是从 1 到最大共价键合位点数的数值, L 可在这种位点上连于 H 上;

H-L 键和 D-H 键, 如果存在的话, 在受试者体内是可水解的, 用来提供活性的药物-两亲物结合物。

25

34. 权利要求 33 的方法, 其中 D 是胰岛素或其功能等同物。

35. 权利要求 33 的方法, 其中 H 是含有 2~7 个 PEG 亚单位的直链或支链 PEG 聚合物。

36. 权利要求 33 的方法, 其中 H 是含有 3~6 个 PEG 亚单位的直链或支链 PEG 聚合物。

30

37. 权利要求 34 的方法, 其中 H 是含有 2~7 个 PEG 亚单位的直链或支链 PEG 聚合物。

38. 权利要求 34 的方法, 其中 H 是含有 3~6 个 PEG 亚单位的直



链或支链 PEG 聚合物。

39. 一种使活性药物 - PEG 结合物达到受试者的某一部位的方法，其中药物 - PEG 结合物的药物组分选自胰岛素和胰岛素的功能等同物，并且其中与相应的未结合胰岛素分子相比，这种药物 - PEG 结合物增强了活性，这种方法包括给受试者施用具有式 10 的无活性药物 - PEG - 亲脂物结合物：



其中

D 是治疗部分；

10 H 是含有 2 - 7 个 PEG 亚单位的直链或支链 PEG 聚合物；

H' 是含有 0 - 130 个 PEG 亚单位的直链或支链 PEG 聚合物；

L 是亲脂部分，选自含有 2 - 24 个碳原子的烷基基团、胆固醇和脂肪酸；

15 q 是从 1 到最大共价键合位点数的数值，H' 可在这种位点上连于 H 上；

o 是从 1 到最大共价键合位点数的数值，L 可在这种位点上连于 H' 上；

p 是从 1 到最大共价键合位点数的数值， $[(H-H'_q)-L_o]_p$ 可在这种位点上连于 D 上；

20 H - H' 键和/或 H - L 键在受试者体内是可水解的以提供活性的药物一两亲物结合物。

40. 权利要求 39 的方法，其中 H 是含有 2、3、4、5 或 6 个 PEG 亚单位的直链或支链 PEG 聚合物。

25 41. 权利要求 39 的方法，其中药物 - PEG₂₋₁₀ - 亲脂物与可药用载体作为药物组合物施用。

42. 权利要求 39 的方法，其中药物 - PEG₂₋₁₀ - 亲脂物与乳液一起作为药物组合物施用。

43. 权利要求 39 的方法，其中药物 - PEG₂₋₁₀ - 亲脂物与微乳液一起作为药物组合物施用。

30 44. 具有以下通式的药物 - 低聚物结合物：



其中



D 是治疗药物部分;

H 和 H' 是亲水部分, 独立选自含有 2 - 130 个 PEG 亚单位的直链或支链 PEG 聚合物和糖;

L 是亲脂部分, 选自含有 2 - 24 个碳原子的烷基基团、胆固醇和脂肪酸; 以及

H - H' 键是可水解的, 而 H' - L 键是不可水解的;

q 是从 1 到 H 上最大共价键合位点数的数值, H' 可在这种位点上连于 H 上;

o 是从 1 到最大共价键合位点数的数值, L 取代基可在这种位点上连于 H' 上; 以及

p 是从 1 到最大共价键合位点数的数值, $[(H-H'_q)-L_o]_p$ 可在此位点上连于 D 上。

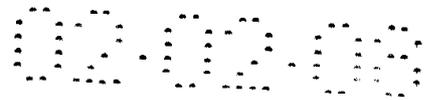
45. 权利要求 44 的药物 - 低聚物结合物, 其中对 D、H、H' 和 L 进行选择 and 排列, 以便药物 - 低聚物结合物是两亲性的。

15 46. 权利要求 44 的药物 - 低聚物结合物, 其中 D 是胰岛素或其功能等同物以及 H 是 PEG₂₋₇。

47. 权利要求 44 的药物 - 低聚物结合物, 其中 D 是胰岛素或其功能等同物以及 H 是 PEG₃。

20 48. 权利要求 45 的药物 - 低聚物结合物, 其中 D 是胰岛素或其功能等同物以及 H 是 PEG₂₋₇。

49. 权利要求 45 的药物 - 低聚物结合物, 其中 D 是胰岛素或其功能等同物以及 H 是 PEG₃。



说明书

含有可水解的亲脂成分的两亲药物 - 低聚物 结合物及其制备和使用方法

5 1. 引言

本专利广泛涉及可水解的药物 - 低聚物结合物、含这类结合物的药物组合物以及制备和使用这类结合物和药物组合物的方法。

2. 发明背景

10 许多肽和蛋白质（这里共同指“多肽”）作为治疗剂可能是有用的，但是缺乏合适的给药方法。

多肽作为治疗剂的用途受到生物屏障的限制，必须穿过这些屏障多肽才能到达其特定的体内靶。胃肠外施用的多肽易被血浆蛋白酶代谢。口服或许是最具有吸引力的给药途径，但是口服更成问题。经口服施用的多肽在胃中有遭受酶促蛋白水解和酸化降解的危险。由于过
15 度的蛋白水解多肽在肠内残存甚至更不可能。在该腔中多肽继续遭到各种酶，包括胃酶和胰酶、外肽酶和内肽酶以及刷状缘肽酶（brush border peptidases）的阻截。结果多肽由肠腔到血流的通路严重受阻。

因此，本领域需要能使治疗用多肽胃肠外和口服施用的手段。

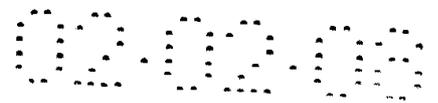
20

2.1 多肽药物的给药途径

对于与多肽口服和胃肠外给药有关的问题制药业已很清楚。已使用各种对策来尝试改进多肽的口服和胃肠外给药。

25 已研究了穿透增强剂（例如水杨酸盐、脂质 - 胆汁盐混合胶束、甘油酯和酰基肉碱）改善多肽口服的效果。但是，穿透增强剂往往造成严重的局部毒性问题，例如局部刺激和毒性、上皮层局部或完全磨损以及组织发炎等。此外，穿透增强剂通常与这种多肽药同时服用，常出现这种剂型的渗漏。

30 增强口服效果的另一常见对策是多肽药物与蛋白酶抑制剂（例如抑肽酶、大豆胰蛋白酶抑制剂和抑氨肽酶素）同时服用。遗憾的是，蛋白酶抑制剂也抑制所期望的蛋白酶的作用。因此需要在无蛋白酶抑制剂的情况下有效递送多肽药物的方法和组合物。



还做了一些尝试来改变多肽药物的物理化学特性以增强这类药物透过粘膜的穿透力。一种这样的方法是将多肽药物结合到亲脂分子上；不过结果提示单纯提高亲脂性还不足以增加穿过细胞的转运。

5 对于稳定多肽的其它方法也有报道。例如，Abuchowski 和 Davis 公开了产生水溶性、非免疫原性、体内稳定产物的各种衍生酶方法（“可溶性聚合物-酶加合物”，Enzyme as Drugs, eds. Holcenberg and Robert, J. Wiley and Sons, New York, NY, (1981)）。Abuchowski 和 Davis 公开了将酶结合到葡聚糖、聚乙烯基吡咯烷酮、糖肽、聚乙二醇和聚氨基酸等聚合物材料上的各种方法。据报道这种结合产生的
10 缀合多肽对胃肠外施用仍保持其生物活性和水溶性。此外，美国专利 4, 179, 337 号公开了聚乙二醇使蛋白质变为可溶和非免疫原性。不过，这些高分子材料不含改善肠粘膜结合或促进/增强膜穿透的组分。因此，这些结合物不适于口服给药。

Meisner 等（美国专利 4, 585, 754 号）指出，将蛋白质结合到硫酸
15 软骨素上可使蛋白质得到稳定。这种结合产物通常是多阴离子的、极亲水的并且缺乏细胞穿透力；它们通常不适于口服给药。

Mill 等（美国专利 4, 003, 792 号）指出，有些酸性多糖、诸如果
20 胶、海藻酸、透明质酸和角叉菜胶，可偶联到蛋白质上产生可溶和不溶产物。这类多糖没有改善细胞穿透特性的能力，并且不适于口服给药。

其他研究者证明连接到蛋白质上的聚乙二醇提高了对变性和酶促
消化的稳定性(Boccu 等 Pharmacological Research Communication 14, 11-120 (1982))。不过，这些聚合物不含增强膜相互作用的组分。因此，这样产生的结合物也遇到与上述相同的问题，并且不适合口服
25 给药。

多肽与低分子量化合物（例如，aminoethicin, 脂肪酸，维生素 B12 和糖苷）结合已有报道（R. Igarishi 等, Proceed. P3 18-19 行）。所得聚合物不含有对口服生物利用度所需要的改进可溶性和膜亲合性所需要的一些成份。

30 将蛋白质药物包在偶氮类聚合物薄膜之中也是用来使多肽药物能够口服的一种手段（M. Saffan 等, Science 223, 1081, (1986)）。据报道，这种薄膜不被胃中消化所破坏，而在大肠中被肠道微生物降



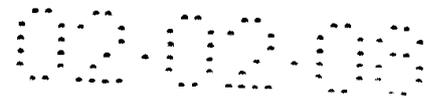
解从而释放出所包的蛋白质。另外已知这种方法延长了多肽药物在体内的作用时间。不过，这种方法使用一种物理混合物，并不促进所释放的蛋白质跨膜吸收。

同样，脂质体也已用来稳定口服和胃肠外施用多肽药物。在 Y. W. Chien 的 “New Drug Delivery Systems”，Marcel Dekker, New York, 1992 中有一篇有关脂质体使用情况的文献综述。脂质体-蛋白质复合物是物理混合物。基于脂质体的给药结果往往不稳定和无法预料。此外，使用脂质体可能造成多肽药物在某些器官中的不希望蓄积。基于脂质体的制剂的其他缺点包括高成本、需要复杂的冻干循环的复杂生产工艺和溶剂不相容性。

有利多肽药物口服的另一方法是使用“类蛋白质”（Santiago, N. 等“用流感病毒 M 蛋白（M1）微球体对大鼠进行经口免疫”，Abstract #A 221, Proc. Int. Symp. Control. Ret. Bioac. Mater., 19, 116 (1992)）。类蛋白质将多肽药物包封于由多支链氨基酸组成的高分子膜中。正如脂质体的情况一样，这种多肽药物也不是化学地结合到类蛋白质球体上的；药物组分可能从这种剂型中渗漏。

曾有人尝试用乳剂作为不稳定药物（例如对酶促降解、化学降解或物理降解敏感的胰岛素等药物）给药的母体。不过，尽管已有有关乳剂制剂促进胰岛素在大鼠和家兔肠内吸收的功效的初步报告（见 Engel, S. 等，“胰岛素：以 water-in-oil-in-water 乳剂方式的肠吸收”，Nature, 219: 856-857 (1968)）；Shichiri, Y. 等，“油包水水包油胰岛素乳剂的肠吸收与家兔”，Diabetologia, 10: 317-321 (1974)，但因这种胰岛素的不稳定性并且需要过量剂量才能保持血糖内稳态，后续研究工作被放弃（Shichiri, Y. 等，“胰岛素肠吸收增加：胰岛素栓剂”，J. Pharm. Pharmacol., 30: 806-808 (1978)；Block, L. 等，“药物乳剂与微乳剂”，Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Vol. 2, p. 71 (1996)）。因此，在此领域仍然缺乏能够使用乳剂和微乳剂提供不稳定药物如胰岛素的方法和组合物。

显然在此领域仍需要以下方法：（1）能使多肽药物在肠道中保持完好和穿过肠上皮进入血液；（2）能使多肽药物在血流中保持活性形式，以及（3）提供具有缓发作用和/或作用时间较长的多肽药物。本



发明提供解决这三个重要问题中每一个的方法。

2.2 糖尿病与胰岛素

5 糖尿病是一种糖代谢疾病，自古有之。糖尿病是胰岛素分泌不足或对胰岛素的敏感性下降引起的。胰岛素合成于胰腺胰岛 β -细胞，并且是机体大多数细胞正常利用葡萄糖所必需的。糖尿病患者利用葡萄糖的正常能力受到抑制，从而使血糖水平升高（高血糖症）。由于葡萄糖在血液中蓄积，大量的糖排入尿中（糖尿）。糖尿病的其他症状包括尿量增加和尿频、干渴、瘙痒、饥饿、体重减轻和虚弱。

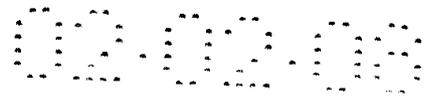
10 有两种类型的糖尿病。I型是胰岛素依赖型糖尿病或IDDM。IDDM以前指青少年发作的糖尿病。患IDDM时，胰腺不分泌胰岛素，必须向患者提供外源性胰岛素。II型成人发作糖尿病一般可通过膳食加以控制，不过有些晚期病例也需要胰岛素。

15 在20世纪20年代没有分离出胰岛素之前，大多数糖尿病病人发病后不久即死亡。未加治疗的糖尿病会导致酮症，这是脂肪分解产物酮在血液中蓄积的结果。继之是酸中毒（血液中酸蓄积）并伴有恶心呕吐。由于紊乱的糖和脂肪代谢的有毒产物不断增加，患者会进入糖尿病性昏迷状态。

20 糖尿病的治疗通常需要定期注射胰岛素。使用胰岛素作为治疗糖尿病的一种治疗方法始于1922年，当时Banting等（“胰腺提取物在糖尿病治疗上的应用”，*Can. Med. Assoc. J.*, 12, 141-146 (1922)）证明胰腺活性提取物对糖尿病狗具有治疗作用。同年用胰腺提取物对糖尿病患者进行的治疗取得明显的、挽救生命的临床进展。由于还不便于胰岛素注射，胰岛素成了改善胰岛素给药方式和生物吸收的大量研究工作的焦点。

25 胰岛素由两条通过二硫键连接起来的氨基酸链（mw. 6,000）构成。胰岛 β -细胞分泌一条单链胰岛素前体，称为胰岛素原。胰岛素原蛋白酶解除去4个基本氨基酸（胰岛素原链上的第31、32、64和65位氨基酸，分别是Arg、Arg、Lys、Arg），产生结合（“C”）多肽。在所得两条链胰岛素分子中，A链的氨基末端为甘氨酸，而B链的氨基末端为苯丙氨酸。

胰岛素可能以单体、二聚体或三个二聚体形成的六聚体的形式存



在。这种六聚体与两个 Zn^{++} 原子配位。生物活性存在于单体之中。尽管直到最近几乎只用牛胰岛素和猪胰岛素治疗人类的糖尿病，但已知胰岛素存在许多种属差异。猪胰岛素与人胰岛素最接近，与人胰岛素所不同的仅仅是猪胰岛素的 B 链 C-末端是一个丙氨酸残基而不是苏氨酸残基。尽管有这些差异，但是大多数哺乳动物的胰岛素都有类似的特异活性。直到最近动物提取物提供了治疗糖尿病用的所有胰岛素。重组技术的出现使人胰岛素商品化生产成为可能（如 Humulin™ 胰岛素，Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN 的商品化产品）。

与口服胰岛素使糖尿病患者达到血糖正常有关的问题已在医药文献中得到充分描述。胰岛素在胃肠消化酶的作用下降解迅速并从而失去生物活性。由于没有充分的亲脂性（1），膜通透性也很差。有效解决这两大难题的经口给药系统应提高肠吸收。

在我们以前的专利（U. S. Pat. Nos. 5, 359, 030; 5, 438, 040; 及 5, 681, 811）中，我们已证明胰岛素的两亲性修饰提高了胰岛素的亲脂性和对酶促降解的稳定性。然而，本发明者惊奇地发现可口服的胰岛素结合物提供了缓释作用和/或作用时间延长，同时明显增强了胰岛素的活性。

3. 发明摘要

本发明者惊奇地发现了新的一组低聚物，它们包含通过可水解键（例如酯键）连在一起的亲水组分和亲脂组分。当这类低聚物结合到药物（如在本文中限定的药物）上并且经过适当配制，这类低聚物则有利于口服，药物在血流中的延迟释放/或作用时间延长。为了便于参考，在这里将这类结合物描述为药物-低聚物结合物；不过，正如本领域技术人员都会清楚的，这种药物组分可能结合在若干亲水-亲脂组分上和/或结合到单独的亲水和亲脂组分上。

本发明的低聚物包括亲水组分和亲脂组分。适合的亲脂组分包括例如直链或支链脂肪酸或者烷基链，优选的亲脂物是天然脂肪酸或烷基链。脂肪酸组分可具有（饱和或不饱和）碳原子的并且碳原子的适当范围为 2~28 个碳原子的直链或支链分子。最优选具有 12~22 个碳原子的脂肪酸。

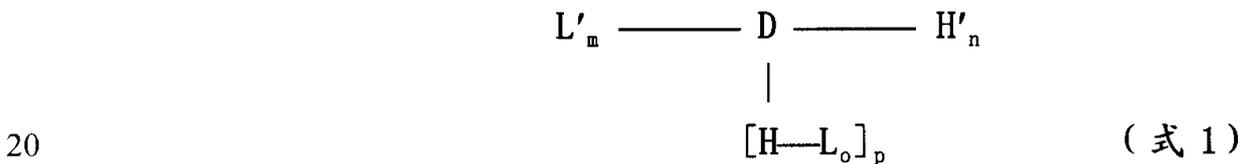
亲水组分优选直链或支链聚乙二醇（PEG）聚合物，优选具有 2-130

个 PEG 单位的聚合物，更优选具有 1~100 个 PEG 单位的聚合物。在一具体实施方案中，药物组分是胰岛素，而亲水物是具有 2~7 个 PEG 单位的 PEG 链，优选具有 2~6 个 PEG 单位的 PEG 链，更优选具有 3、4 或 5 个 PEG 单位的 PEG 链。

5 亲水组分与亲脂组分优选通过可水解键如酯键或碳酸酯键连接在一起。使用可水解键可保证当结合物穿过肠上皮进入血流的亲水环境时，亲脂组分通过可水解键水解而从结合物上断开，从而释放出结合物的药物-亲水组分。这对于药物组分是胰岛素和亲水组分是增强胰岛素活性的 PEG 链来说特别重要。

10 在一个结合物是用来口服给药的优选模式中，应将亲脂组分和亲水组分的长度和组成调至保证 (1) 结合物具有穿过肠上皮的充足两亲性，以及 (2) 一旦亲脂组分因连接亲水组分与亲脂组分的可水解键水解而遭受破坏，不消除治疗药物部分的活性。此外，必要的话，药物-低聚物结合物的两亲性 (amphiphilicity) 应调至能使药物配制进入亲脂
15 或亲水载体，或进入乳剂或微乳剂。

优选地，本发明的多肽-低聚物结合物具有以下通式



其中

D 是治疗药物部分；

H 是亲水部分，此部分选自具有 2~130 个 PEG 亚单位的直链或支
25 链 PEG 聚合物和糖；

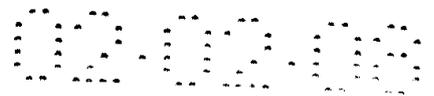
L 和 L'各自都是亲脂部分，分别独立选自具有 2~24 个碳原子的烷基基团、胆固醇和脂肪酸；

o 是一个从 1 至 H 上最大共价键合位点数的数值；

p 是至少为 1 的数值，而 m+n+p 合计是至少为 1 的数值，但不超
30 过 D 上取代基的共价键合位点的总数；

H-L 键是可水解的，而如果有 D-L'键的话，也是可水解的。

在一个较窄的方面，本发明的药物-低聚物结合物具有下式：



其中

D 是治疗药物部分;

H 是亲水部分, 选自具有 2 - 130 个 PEG 亚单位的直链或支链 PEG

5 聚合物和糖;

L 是亲脂部分, 选自具有 2 - 24 个碳原子的烷基基团、胆固醇和脂肪酸; 以及

o 是从 1 至 H 上最大共价键合位点数的一个数值;

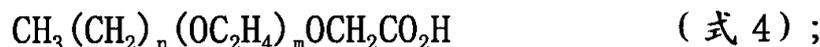
p 是从 1 至 D 上最大共价键合位点数的一个数值;

10 H-L 键是可水解的。

一方面, 本发明的低聚物包含选自以下的亚单位:



其中 $n = 3 \sim 25$ 和 $m = 1 \sim 7$;



15 其中 $n = 3 \sim 25$ 和 $m = 1 \sim 6$;



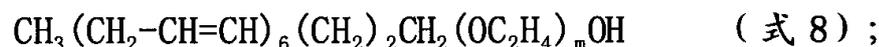
其中 $n = 3 \sim 25$, $m = 1 \sim 7$ 和 $X = O$;



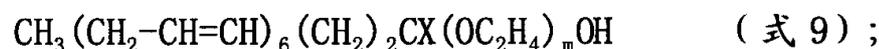
其中 $m = 0 \sim 5$ 和 $R =$ 胆固醇或金钢烷; 或者



其中 $m = 0 \sim 14$;



其中 $m = 0 \sim 7$;



25 其中 $m = 1 \sim 7$ 和 $X = N$ 或 O 。

根据本发明其他可使用的不饱和脂肪酸包括油酸、亚油酸和亚麻酸。

本发明者还发现用 PEG_{2-7} , 优选用 PEG_3 对胰岛素 PEG 化 (pegylation) 会显著增加胰岛素的活性。本发明利用这一意外发现提供一种其中 PEG 亲脂键是可水解键的胰岛素 - PEG_{2-7} - 亲脂物结合物。在血流中这种可水解 PEG - 亲脂键被水解, 在血液循环中释出高活性胰岛素 - PEG 化合物。

30 在其他实施方案中, 本发明的结合物具有下式:

类结合物的药物制剂的方法。

3.1 定义

在本发明中术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”等交替使用，并且是用来指任一长度的氨基酸序列。

本文中所用的“PEG”一词指直链或支链聚乙二醇聚合物和单体。术语“PEG亚单位”指单个聚乙二醇单位，即：



本文中所用术语“亲脂的”指在脂质中的溶解能力和/或穿过生物膜、与生物膜相互作用和/或跨生物膜的能力，而术语“亲脂部分”或“亲脂物”则指的是本身是亲脂的部分和/或连接在其他化学实体上提高该化学实体亲脂性的部分，例如脂肪酸、胆固醇。亲脂物在本文的式中以“L”表示。

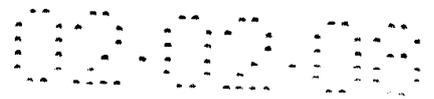
本文所用术语“亲水的”指的是能溶于水中，而术语“亲水部分”或“亲水物”则指的是本身是亲水的部分和/或连接在其他化学实体上提高该化学实体亲水性的部分，例如糖、PEG。亲水物在本文的式中以“H”或“H'”表示。

本文所用的术语“两亲的”指的是能溶于水和脂质中，而术语“两亲部分”或“两亲物”则指的是本身是两亲的部分和/或连接在多肽药物或非多肽药物上提高所得结合物的两亲性的部分，例如 PEG-脂肪酸低聚物、糖-脂肪酸低聚物。

本文所用术语“共价偶联”、“连接”、“结合”、“接合”等词，就本发明药物-低聚物结合物的药物、亲水物和亲脂物组分而论，指的是这些特定的组分直接共价结合到另一组分或通过一插入部分或组分如桥、间隔物、连接物等（如糖部分或甘油部分）间接共价结合到另一组分，这种插入部分或组分在 PEG 聚合物与脂肪酸部分之间起着间隔作用（即 PEG-糖-脂肪酸或 PEG-甘油-脂肪酸）。

本文所用的术语如“非水解的”和如“不能水解的”，是用来指在任何条件下都不能被水解的键，以及在正常生理条件下不能很快被水解的氨基甲酸酯、酰胺或其他键。

本文所用的术语“药物”指的是用来诊断、表征、治疗、缓解治疗、预防或减轻疾病发病、疾病状态或其他生理疾病的物质，或者增



强人体和/或动物的正常生理功能的物质。该术语包括前体药物、盐类、酯类和其他各种可给药的药物形式。在本文的式中药物以“D”表示。

“治疗有效量”是预防、延缓或减轻疾病发病严重程度所需的量，或者阻止或减轻正在发展的疾病的严重程度所需的量，而且还包括增强正常生理功能所需的量。

本文所用术语“功能等同物”指天然多肽的活性类似物、衍生物、片段、截短同工型等多肽。在保留了相应天然多肽的某些或全部生物活性时多肽是具有活性的。

本文所用术语“免疫效应”是指给予具有二级应答（对同种免疫原或类似免疫原）是通过下列一种或多种表征的这种免疫应答的受试者免疫细胞记忆：与未经免疫而相应暴露所引起的迟滞期相比迟滞期较短；产生抗体的持续时间比未经这样免疫而相应暴露所引起的抗体产生时间要长；与未经免疫而相应暴露而产生的抗体的类型和质量相比，所产抗体的类型和质量有所改变；典型免疫反应发生变化，IgG 抗体的浓度比 IgM 的高，IgG 抗体的持续时期要比 IgM 抗体的长；与未经免疫而暴露于抗原的抗体对抗原的平均亲合力（结合常数）相比，抗体对抗原的平均亲合力增高；和/或本领域已知的描述二级免疫应答的其他特征。

根据本发明，这里所用制剂的“可药用”组分（例如盐、载体、赋形剂或稀释剂）是这样的组分：（1）可与制剂的其他组分配伍的组分，其中这些组分可与本发明的药物-低聚物结合物联用而不消除这种药物-低聚物结合物的生物活性；以及（2）适合用于动物（包括人类）而无过分的有害副作用（如毒性、刺激和变应性反应）的组分。如果这些组分的危害超过药剂组合物所产生的益处即为副作用“过分”。可药用组分的实例包括，但不限于，任何标准药物载体如磷酸缓冲盐水溶液、水、油/水乳剂等乳液、微乳液和各种湿润剂。

本文中所用的关于多肽如胰岛素的术语“天然”，是指所述多肽具有在自然界发现的相应多肽的氨基酸序列。

本文所用的术语“抗原”和“抗原性的”指的是存在于生物的免疫细胞时引起免疫应答的物质。抗原可包含一种或多种 B 细胞受体（即 B 细胞膜上的抗体）或 T 细胞受体识别的免疫原性表位。因此，这里所用的这些术语指的是能激发免疫应答的任何物质，例如人类免疫缺陷

L 和 L' 是亲脂部分, 分别独立选自具有 2~24 个碳原子的烷基基团、胆固醇和脂肪酸; 以及

p 是至少为 1 的数值, 而 m+n+p 合计是至少为 1 的数值, 但不超过 D 上取代基的共价键合位点数;

5 其中 H-L 键是可水解键, 而 D-L' 键如果存在的话也是可水解键。

m+n+p 的数值不得超过这些部分能连接在 D 上的位点数。例如, 天然人胰岛素有 3 个共价键合位点; 因此, 若 D 是天然人胰岛素, 那么 m+n+p 不得超过 3。不过, 应意识到胰岛素和其他药物可从化学上进行改进以提供另外的共价键合位点。m+n+p 的范围优选 1~10, 更优选 1~8; 还更优选 1~5, 最优选 1、2、3 或 4。若 H-L 基团的 H 是 PEG 聚合物 (直链或支链), o 则优选是 1~3, 更优选 1 或 2, 最优选 2。

15 在一优选模型中 m+n=0 和 p 至少为 1。或者, p=0, 而 m 与 n 各自至少为 1。在这种情况下, H-D 键是非水解型的, 而 L-D 键则是水解型的。

在较窄的方面, 本发明提供具有下式的药物-低聚物结合物:



其中

D 是治疗药物部分;

20 H 是亲水部分, 选自具有 2~130 个 PEG 亚单位的直链或支链 PEG 聚合物和糖;

L 是亲脂部分, 选自具有 2~24 个碳原子的烷基基团、胆固醇和脂肪酸; 以及

o 是从 1 到 H 上最大共价键合位点数的一个数值;

25 p 是从 1 至 D 上最大共价键合位点数的一个数值;

其中 H-L_o 键是可水解的。

式 2 中的 o 优选 1~3, 更优选 1 或 2, 而 p 则优选 1~5, 更优选 1、2 或 3。

可水解键优选选自酯和碳酸酯。

30 本发明人还发现胰岛素经 PEG₂₋₇ (优选 PEG₃) PEG 化明显增加了胰岛素的活性。本发明利用这一意外发现提供了胰岛素-PEG-亲脂物结合物, 其中 PEG-亲脂物键是可水解的。这种可水解 PEG-亲脂物键在

血流中水解，释出在血液中循环的极高活性的胰岛素-PEG 化合物。

5 优选对胰岛素-PEG-亲脂物结合物的亲脂物进行选择，以便使胰岛素在 PEG-亲脂物可水解键发生水解之前不具活性。这样一来活性形式（胰岛素-PEG）随着 PEG-亲脂物键水解缓慢在血液中释放，从而使活性胰岛素-PEG 逐步释放，并且使胰岛素的作用时间延长。还可将本发明的这种胰岛素-PEG-亲脂物结合物制成具有充分两亲性的，以便能使这类结合物穿过肠上皮，这样就能使这种结合物能够口服。可用本领域已知的手段缩短、延长和/或其他改变 PEG 和/或亲脂物的构象和/或结构来调整两亲性。

10 本发明还提供了制备和使用这种多肽-低聚物结合物的方法。

4.1.1 药物-低聚物结合物的药物组分

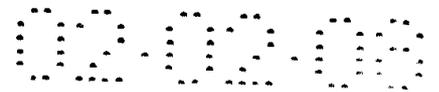
15 本发明的药物-低聚物结合物包含药物组分。该药物组分可以是小分子治疗药物部分或生物活性多肽。适合的药物有：（1）能结合到本发明的低聚物上的药物；以及（2）水解除去药物-低聚物结合物的亲脂组分后保留一些或全部活性的药物（即以药物-亲水物形式存在的药物）。

20 在优选对在血液循环中药物组分保持连接于亲水体的情况下（例如亲脂药物得益于亲水物使之亲水性增强，和/或亲水物使这种药物的活性增加），亲水物应通过非水解键连于低聚物的药物组分上。优选非水解键包括氨基甲酸酯、酰胺和仲胺。然而，本领域的技术人员应意识到，在某些条件下通过可水解键将一个或多个亲水物连于药物上可能是可取的。例如保留大部分亲水组分在循环中以使亲水性达到最佳水平来改善循环或者使循环药物的活性达到最佳水平可能是有利的。

25 此外，可利用将多个可水解亲水物连于药物上来改善循环和延缓药物作用的发挥。例如服用药物-低聚物结合物的混合物可保证某些结合物几乎立即发挥作用（即只有少数键水解），而其他结合物待到一定的时间多个可水解键（将亲脂物连于亲水物上和/或将亲水物连于

30 药物上）水解时才变得具有活性。

这种药物可（1）通过共价结合直接连于低聚物的亲水组分上，或者（2）通过间隔基团（例如下述的糖基）间接地连接。这种结合复合



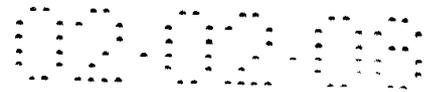
物的优选结构排列是亲水部分直接连于药物上，而亲脂部分连于亲水部分上。此外，在没有低聚物或与低聚物合用条件下，可将药物连于一个或多个附加的亲水部分和/或亲脂部分上。

5 由于这里所举的实例是用来具体说明以胰岛素作为药物-低聚物结合物的药物组分，本领域的技术人员应意识到，本发明的应用不限于此。许许多多的药物品种都可用于本发明的广泛的应用实践之中。适合的药物组分是那些可结合到这里述及的低聚物的亲水组分上的药物。优选的药物组分是当可水解键水解而亲脂组分从药物-低聚物结
10 合物上断下来而释放出完整的药物-亲水物组分时变得具有活性。而在另一种实施方案中亲水物可通过可水解键连在药物组分上，这样一来当水解时就会释出游离的、未结合的活性药物。

一方面，药物-低聚物结合物的药物组分是多肽。适合的多肽是那些具有生物活性的多肽，例如：促肾上腺皮质激素（ACTH）、促肾上腺皮质激素衍生物类（例如依比拉肽）、血管紧张肽、血管紧张肽 II、
15 天冬酰胺酶、心房利钠肽类、心房钠利尿肽类、杆菌肽、 β -内啡肽类、凝血因子 VII、凝血因子 VIII、凝血因子 IX、血液胸腺因子（FTS）、血液胸腺因子衍生物（见 U. S. Pat. No. 4, 229, 438）、韩蛙皮素、骨形态形成因子（BMP）、骨形成蛋白、缓激肽、蛙皮素、降钙素基因相关多肽（CGRP）、降钙素、CCK-8、细胞生长因子（如 EGF、TGF- α 、TGF- β 、PDGF、酸性 FGF、碱性 FGF）、蛙皮缩胆囊肽、趋化因子
20 类、缩胆囊肽、缩胆囊肽-8、缩胆囊肽-肠促胰酶素（CCK-PZ）、粘菌素、集落刺激因子（如 CSF、GCSF、GMCSF、MCSF）、促肾上腺皮质激素释放因子（CRF）、细胞因子、去氨加压素、二啡肽（dinorphan）、二肽、岐化酶、强啡肽、章鱼素、内啡肽类、内皮素、内皮素拮抗肽
25 类（见 European Patent Publication Nos. 436189、457195 和 496452 和 Japanese Patent Unexamined Publication Nos. 94692/1991 和 130299/1991）、endothelins、脑啡肽类、脑啡肽衍生物（见 U. S. Pat. No. 4, 277, 394 和 European Patent Publication No. 31567）、表皮生长因子（EGF）、红细胞生成素（EPO）、促滤泡激素（FSH）、
30 gellanin、肠抑胃肽、释胃泌素肽（GRP）、胃泌素类、G-CSF、高血糖素、谷胱甘肽过氧化物酶、glutathione 过氧化物酶、促性腺素（如人绒毛膜促性腺素及其 α -和 β -亚单位）、短杆菌肽、短杆菌肽类、生

长因子 (EGF)、生长激素释放因子 (GRF)、生长激素类、激素释放激素 (HRH)、人心房利钠肽 (h-ANP)、人胎盘促乳素、胰岛素、胰岛素样生长因子 (IGF-I、IGF-II)、干扰素、干扰素类 (如 α 、 β -和 γ -干扰素)、白细胞介素类 (如白细胞介素 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12)、肠肽 (VIP)、血管舒缓素、kyotorphin、促黄体素释放素、促黄体化激素 (LH)、促黄体化激素释放激素 (LH-RH)、氯化溶菌酶、促黑激素 (MSH)、促黑激素、mellitin、促胃动素、胞壁酰、胞壁酰二肽、神经生长因子 (NGF)、神经营养因子类 (如 NT-3、NT-4、CNTF、GDNF、BDNF)、神经肽 Y、神经降压肽、催产素、胰抑制素、胰多肽、促胰酶素、甲状旁腺素 (PTH)、五肽胃泌素、多肽 YY、垂体腺苷酸环化酶活化多肽类 (PACAPs)、血小板衍生生长因子、多粘菌素 B (polymixin)、促乳素、促蛋白质合成多肽、PTH 相关蛋白、松弛素、肾素、胰泌素、血清胸腺因子、生长调节素类、生长激素抑制素类衍生物 (Sandostatin; 见 U. S. Pat. Nos. 4, 087, 390、4, 093, 574、4, 100, 117 和 4, 253, 998)、P 物质、超氧化物歧化酶、taftsin、四肽胃泌素、血小板生成素 (TPO)、胸腺体液因子 (THF)、胸腺生成素、胸腺素、胸腺刺激素、甲状腺激素释放激素、促甲状腺素 (TSH)、促甲状腺素释放激素 (TRH)、胰蛋白酶、促吞噬素、肿瘤生长因子 (TGF- α)、肿瘤坏死因子 (TNF)、短杆菌酪肽、尿抑胃素、尿激酶、血管活性肠收缩肽、加压素以及这些多肽类的功能等同物。

另一方面, 这种多肽为抗原。本领域已熟悉的很多合适的抗原例如有可引起增强的免疫应答、增强免疫应答和/或可引起对下述疾病和病原体产生免疫有效应答的抗原: 腺病毒类、炭疽、百日咳杆菌、肉毒中毒、牛鼻气管炎、卡他布兰汉球菌、犬病毒性肝炎、犬瘟热、衣原体、霍乱、球孢子菌病、牛痘、巨细胞病毒、登革热、登革弓形体病、白喉、脑炎、大肠杆菌肠毒素、非洲淋巴细胞瘤病毒、马脑炎、马感染性贫血、马流感、马肺炎、马鼻病毒、大肠杆菌、猫白血病、黄病病毒、球蛋白、流感嗜血杆菌 b 型、流感嗜血杆菌、百日咳嗜血杆菌、幽门螺杆菌、嗜血杆菌、肝炎、甲肝、乙肝、丙肝、疱疹病毒、HIV、HIV-1 病毒、HIV-2 病毒、HTLV、流感、日本脑炎、克雷白杆菌种、侵肺军团菌、利什曼原虫、麻风、莱姆病 (lyme disease)、

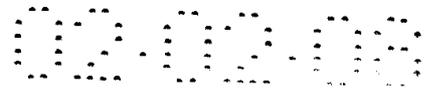


疟疾免疫原、麻疹、脑膜炎、脑膜炎球菌、脑膜炎球菌多糖 A 型、脑膜炎球菌多糖 C 型、流行性腮腺炎、流行性腮腺炎病毒、分枝杆菌及结核分枝杆菌、奈瑟氏菌、淋球菌、脑膜炎双球菌、羊蓝舌病、羊脑炎、乳头状瘤、副流感、副粘病毒、粘液病毒类、百日咳、鼠疫、肺炎球菌属、卡氏 (Carinii) 肺囊虫、肺炎、脊髓灰质炎病毒、变形杆菌种、绿脓杆菌、狂犬病、呼吸道合胞体病毒、轮状病毒、风疹、沙门氏菌、血吸虫病、志贺氏菌、猿猴免疫缺陷病毒、天花、金黄色葡萄球菌、葡萄球菌种、肺炎链球菌、酿脓链球菌、链球菌种、猪流感、破伤风、苍白密螺旋体、伤寒、牛痘、水痘带状疱疹病毒和霍乱弧菌。

10 优选的抗原是那些本领域已知可作为疫苗组分的抗原。例如，这种抗原可能包括各种类毒素类、病毒性抗原和/或细菌性抗原。例如这种抗原可能包括常用于以下疫苗的抗原：水痘疫苗、白喉、破伤风和百日咳菌苗、b 型嗜血流感疫苗 (Hib)，甲肝疫苗，乙肝疫苗，流感疫苗，麻疹、流行性腮腺炎和风疹疫苗 (MMR)，肺炎球菌菌苗、脊髓灰质炎疫苗，轮状病毒疫苗，炭疽菌苗，以及破伤风和白喉疫苗 (Td)。

15 优选地，这种药物 - 低聚物结合物的药物组分是胰岛素或其功能等同物，优选哺乳动物胰岛素或其功能等同物，最优选人胰岛素或其功能等同物。

20 适合用于本发明的药物 - 低聚物结合物的另一种胰岛素是胰岛素 lispro，这是一种新研制的人胰岛素类似物，在这种人胰岛素类似物中胰岛素分子 β -链末端上的氨基酸赖氨酸和脯氨酸的位置被转换 (Koivisto, V. A. “人胰岛素类似物胰岛素 lispro”，Ann Med 1996, Jun 30: 3 260-6)。在 B28 位点上有赖氨酸和 B29 位点上有脯氨酸的胰岛素 lispro 比人胰岛素的自缔合倾向弱。这导致它与人胰岛素在药代动力学方面有三大不同：作用开始快，峰值较高和作用时间短。因此胰岛素 lispro 对进餐时间的作用比人正常胰岛素的更为准确。建议在进餐前 15 分钟之内注射胰岛素 lispro，而注射人胰岛素则在进餐前 30~40 分钟内。胰岛素 lispro 是用来作为一种进餐时间胰岛素使用的。另一方面，可能 (先后或同时) 将含有速效胰岛素 (如 lispro) 25 的药物 - 低聚物结合物和含慢效胰岛素 (如常规胰岛素) 的药物 - 低聚物结合物施用于患者。这样一来，患者的血糖水平会 (1) 很快得到控制 30 和控制和 (2) 保持较长的一段时间，后者是单独施用速效胰岛素不可能



取得的效果。

4.1.2 低聚物组分

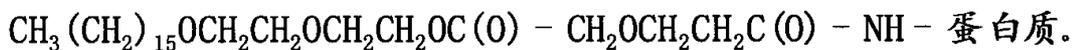
5 本发明的药物 - 低聚物包含低聚物组分。本发明的低聚物包括亲水组分（亲水物）和亲脂组分（亲脂物）。

适合的亲脂组分包括例如天然脂肪酸或烷基链。优选脂肪酸组分是含（饱和或不饱和）碳原子的直链分子，其碳原子的适宜范围为 2~28 个。最优选碳原子为 12~22 个的脂肪酸。可用作这种低聚物的亲脂性组分的不饱和脂肪酸包括例如油酸、亚油酸和亚麻酸。

10 典型的亲水组分是直链或支链 PEG 聚合物和/或糖。当亲水组分是 PEG 聚合物时，优选有 1~130 个 PEG 单位的 PEG 聚合物，更优选有 1~100 个 PEG 单位的 PEG 聚合物。亲水组分优选为小的聚乙二醇（PEG）片段，优选有 1~10 个 PEG 单位的 PEG 聚合物，更优选有 2~8 个 PEG 单位的 PEG 聚合物。非常优选地，这种药物是胰岛素或一种胰岛素功能等同物，并且 PEG 多肽有 3、4、5、6 或 7 个 PEG 单位。

15 可对亲脂组分和亲水组分的长度和组成进行选择，以便使其达到所需要的亲脂性、亲水性或两亲程度。可将脂肪酸或烷基组分的碳链延长以增加亲脂性，同时可将 PEG 组分延长以增加亲水性。凡是口服的药物 - 低聚物结合物，应将这种药物 - 低聚物结合物的两亲性程度调至能使这种药物 - 低聚物结合物穿过肠上皮进入血流。

20 此外，亲脂组分可通过非水解键或通过不能立即水解的键连接在亲水组分上。然后可通过可水解键将这种亲脂物的亲水组分连接到低聚物的亲水组分上。例如：



25 这样一来，低聚物的亲水特性即可通过增加可水解键亲脂一侧的亲水部分而得到平衡。这样即可按照以下通式用另一种方法来描述本发明：



30 其中 D、H 和 L 如上所述，H' 是如上述 H 的描述；而其中 H-H 键是可水解的，H'-L 键是不可水解的；q 是从 1 至 H 上最大共价键合位点数的一个数值，在这种共价键合位点上 H' 可连于 H 上；而 L 是从 1 至最大共价键合位点数的一个数值，在这些共价键合位点上 L 取代基可

连于 H' 上。这种排列可对 H 部分和 H' 部分进行选择，以便使结合物的 H 的亲水性与 L 的亲脂性相平衡，并且（根据 D 的亲水性或亲脂性）能产生两亲结合物，与此同时，能利用小的 H 部分（例如 H 可以是具有 2~10 个 PEG 单位的短 PEG 链），其使或保留了水解的 D-H 部分的活性。

5 换言之，这种可水解键可位于亲水部分的任一点上，其提供具有最大活性的水解的 D-H 部分。

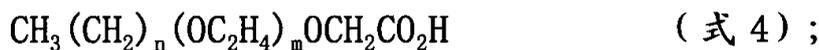
因此，当 D 是胰岛素时，H 部分是优选具有 2~7 个 PEG 单位的 PEG 聚合物，更优选具有 3、4、5 或 6 个 PEG 单位的 PEG 聚合物，最优选具有 3 个 PEG 单位的 PEG 聚合物；而 H' 可以是平衡结合物其余组分的亲脂性所需要的任一长度，结果产生具有穿过肠壁（例如通过与肠细胞的生物膜相互作用）进入血流的两亲结合物。在血流中，H-H' 键将被水解，从而产生胰岛素-PEG 结合物，与未结合的胰岛素多肽相比，这种胰岛素-PEG 结合物的活性得到改进。

15 胆固醇或金刚烷部分可取代作为这种低聚物亲脂组分的直链脂肪酸。

本发明优选低聚物包括选自下述的组分：



其中 $n = 3 \sim 25$ 及 $m = 1 \sim 7$;



20 其中 $n = 3 \sim 25$ 及 $m = 1 \sim 6$;



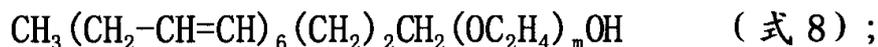
其中 $n = 3 \sim 25$ 及 $m = 1 \sim 7$;



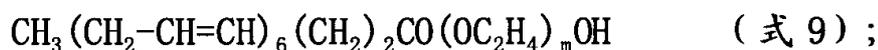
其中 $m = 0 \sim 5$ 及 R = 胆固醇或金刚烷；或者



其中 $m = 0 \sim 5$;

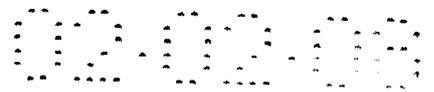


其中 $m = 1 \sim 7$;

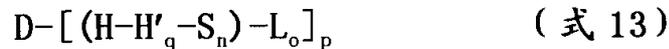
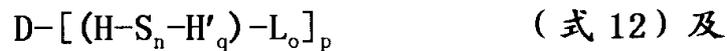


30 其中 $m = 1 \sim 7$ 。

式 5 是代表性低聚物，它具有 H-L 构型，其中的 H-L 键是可水解的。式 3、4、6、7、8 和 9 是具有 H-H'-L 构型低聚物的 H'-L 的



发明也提供具有以下通式的结合物:



5 其中 D、H、H'和 L 如上所述, 而 S 是间隔基团, 选自糖、碳水化合物和甘油; q 是从 1 到 H 上最大共价键合位点数的一个数值; n 是 0 到 H'上最大共价键合位点数的一个数值; o 是从 1 到 S 上 (若有 S 存在的话) 或 H'上 (若无 S 存在的话) 最大共价键合位点数的一个数值; 以及 p 是从 1 到 D 上最大共价键合位点数的一个数值; 若无 S 存在, L
10 则如式 1 和式 2 连于 H 或 H'上。式 11、12 和 13 各自至少有 1 个可水解键。在式 11 中, 可水解键可以是 S-L 或 S-H; 在式 12 中可水解键可以是 S-H 或 S-H'; 在式 13 中可水解键是 H-H'。

4.2 药物-低聚物结合物的制备

15 4.2.1 药物-低聚物结合物的多肽组分的制备

当本发明的药物组分是多肽时, 这种多肽可按本领域已知的任一方法制备。除了重组方法外, 制备这种多肽组分可用本领域已知的合成技术例如使用多肽合成仪或本领域已知的其他标准化学方法 (例如见 Hunkapiller, M. et al., 1984, Nature 310: 105-111; Clark-Lewis et al., 1991, Biochem. 30: 3128-3135 和 Merrifield, 1963, J. Amer. Chem. Soc. 85: 2149-2156)。例如, 可用固相技术合成
20 多肽, 从树脂上裂解以及用制备高效液相色谱法纯化 (例如见 Creighton, 1983, Proteins, Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman and Co., N. Y. pp. 50-60)。多肽的组成可用氨基酸分析或测序来确证 (例如, Edman 降解法; 见 Creighton, 1983, Proteins, Structures and Molecular Prcinciples, W. H. Freeman and Co., N. Y., pp. 34-49) 或者用蛋白质作图法来确证。本发明的多肽可用氨基酸残基顺序加成法整体合成, 或者用本领域已知的方法如片段缩合法合成可以组合的片段亚组分 (Shin et al., 1992, Biosci. Biotech.
25 Biochem. 56: 404-408; Nyfeler et al., 1992, Peptides, Proc. 12th Amer. Pep. Soc., Smith and Rivier (eds.), Leiden, pp. 661-663; 以及 Nokihara et al., 1990, Protein Research Foundation,

Yanaihara (ed.) Osaka, pp. 315 - 320)。在另外的实施例中，可用标准方法（例如免疫亲和纯化法）从天然资源中纯化出天然多肽。

可用任一现有方法，例如用反相高效液相色谱法（RP-HPLC）或者其他根据多肽大小或电荷的分离方法可对一种新合成的多肽进行纯化。此外，纯化的多肽可用这些方法或其他已知方法如氨基酸分析和质谱法进行鉴定。

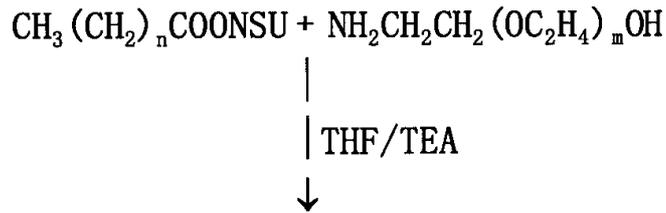
可对本发明的药物-低聚物结合物的药物组分进行修饰，以便使其偶联到低聚物组分上。当药物组分是多肽时，可将功能基团加到多肽 C-末端或 N-末端，或者加到多肽的侧链上，以便为低聚物提供一个连接点。例如，可将一个脯氨酸残基或丙氨酸残基加到治疗用多肽的 N-末端以便有利于低聚物组分的连接。适当的修饰是那些不消除药物活性的修饰。

同样可将特定氨基酸插入多肽的氨基酸链中或用特定氨基酸置换这种治疗用多肽的氨基酸，以便有利于低聚物的连接，条件是这种修饰不消除多肽的活性。

因此，例如可修饰或置换多肽药物中的一个或多个氨基酸，如通过一个或多个氨基酸的保守氨基酸置换法。保守氨基酸置换变化可包括例如一种酸性氨基酸置换另一种酸性氨基酸、一种亲水氨基酸置换另一亲水氨基酸或者本领域已知的其他保守置换，包括使用非天然存在的氨基酸，如 Nle 置换 Leu 或鸟氨酸（Orn）或同源精氨酸（homoArg）置换精氨酸。

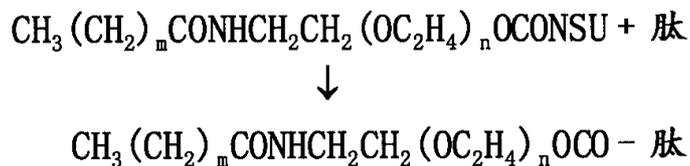
除上述的各种修饰或置换外，还可使用一种或多种氨基酸的模拟物、也称为多肽模拟物或肽模拟物。这里所用的术语“模拟物”指的是氨基酸或具有氨基酸的相同或类似功能特性的氨基酸类似物。因此例如（D）精氨酸类似物，如果它含有在生理 pH 具有正电荷的侧链，并是具有精氨酸的胍（guanidinium）侧链反应性基团的特征，那么它就可以是（D）精氨酸的模拟物。多肽模拟物或肽模拟物是保留如相应多肽中存在的类似多肽链药效团的有机分子。

如上所述，用非天然形成的氨基酸和肽模拟物置换氨基酸可基于侧链的官能度修饰，增强特定多肽的总活性或特性。例如，这些类型的改变可用于本发明的低聚物组分以进一步增强多肽对酶促降解的抗性和/或提高生物活性。



其中 $n = 0 \sim 24$, 以及 $m = 2 \sim 130$.

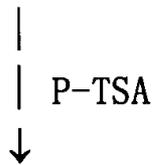
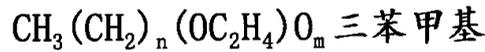
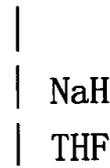
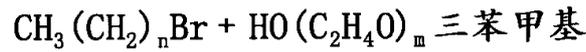
10 这种低聚物可通过将低聚物的游离羟基部分转化为 N-羟基琥珀酰亚胺酯 (NSU) 偶联到肽药物上。N-羟基琥珀酰亚胺基团易于与肽的亲核氨基残基反应。



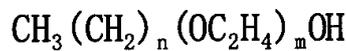
15 其中 $n = 0 \sim 24$, 以及 $m = 2 \sim 130$

20 在低聚物的亲脂部分通过醚键键合连于亲水部分的低聚物合成之中, 将所期望的聚乙二醇 (亲水物) 首先进行保护。于吡啶中用 1 摩尔三苯甲基氯将一个三苯甲基加于末端两个游离羟基的一个羟基上而使之得到保护。将得到保护的聚乙二醇溶解于适当的惰性溶剂之中, 并且加氢氧化钠处理。将亲脂部分的溴或甲苯磺酰酯衍生物溶于惰性溶剂并加到得到保护的聚乙二醇溶液中。在室温下用对甲苯磺酸在无水惰性溶剂中的溶液处理这种产物。用惰性溶剂萃取这种所期望的产物, 并用柱色谱加以纯化。下面描述这种转化的结构:

5



10

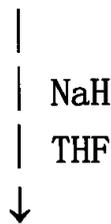
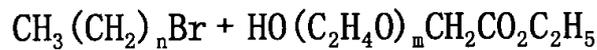


其中 $n = 0 \sim 24$, 及 $m = 2 \sim 130$.

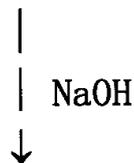
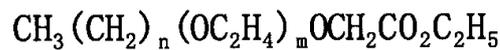
亲脂部分优选选自烷基、胆固醇和金刚烷基。

15 在低聚物亲脂部分通过醚键连于亲水部分和末端是羧酸部分的低聚物的合成中, 最好保护羧基。选择一端有一游离羟基和另一端有一羧基的聚乙二醇。羧基通过酯化加以保护。将得到保护的聚乙二醇溶于适当的惰性溶剂(如 THF)中并且用氢化钠处理。将亲脂部分的溴或甲苯磺酸酯衍生物溶于惰性溶剂中, 并将其加到得到保护的聚乙二醇溶液中。产物用氢氧化钠处理以释放出游离酸。用惰性溶剂萃取所期望的产物, 然后用柱色谱纯化。这种转化的结构描述如下:

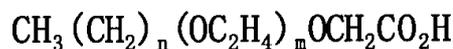
20



25



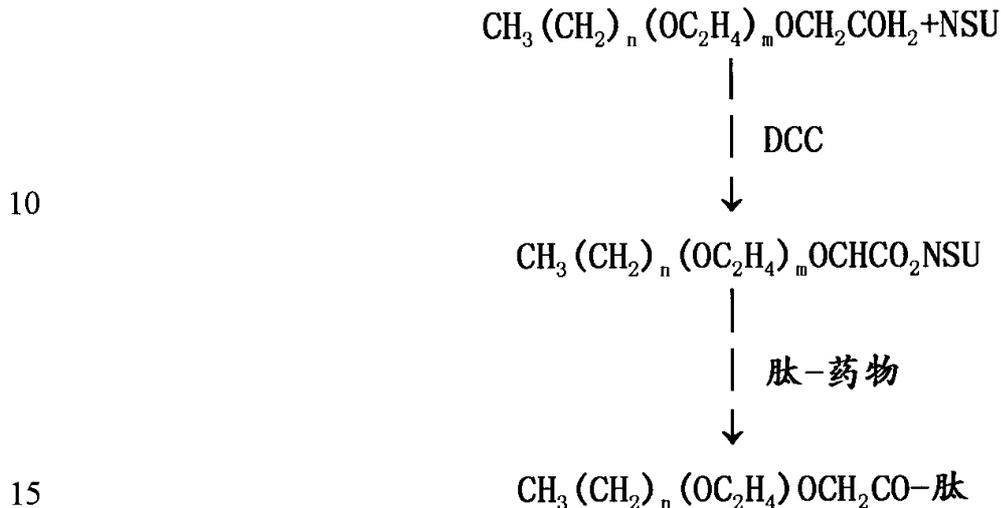
30



其中 $n = 0 \sim 24$, 及 $m = 2 \sim 130$.

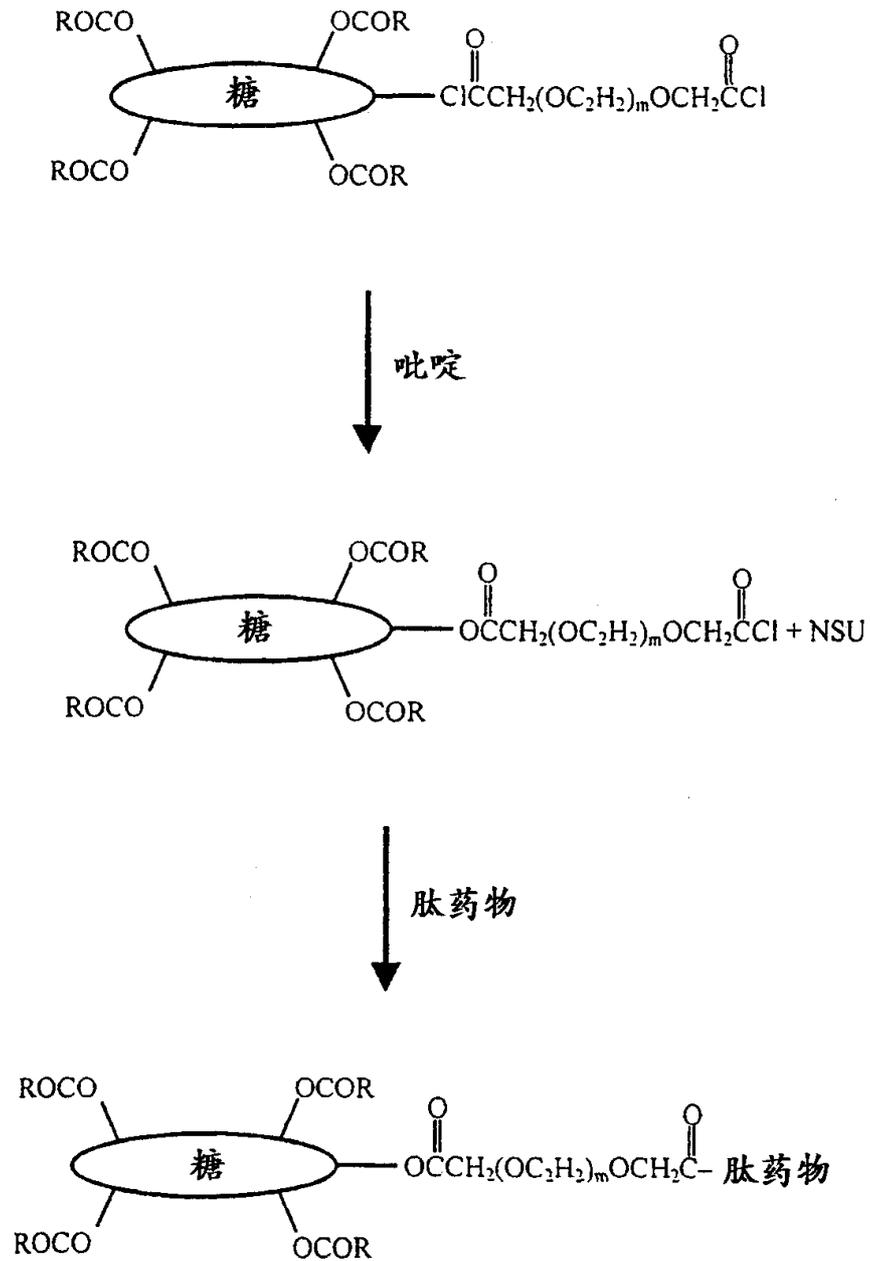
亲脂部分优选选自烷基、胆固醇和金刚烷基。

5 这组酸性低聚物可首先通过羧基与 N-羟基琥珀酰亚胺 (NSU) 的反应形成一个容易离去的基团而偶联于肽药物上。然后用溶于适当惰性溶剂的期望肽处理这种活化的低聚物的溶液。可选择反加入。



有时最好用亲脂糖取代亲脂部分。这种糖部分首先用脂肪酸酰氯酯化以获得选择性或部分酰化。产物用聚乙二醇的期望二羧酸衍生物的二元酰氯于惰性溶剂中处理。

20 1 摩尔当量各反应部分进行反应。这种反应得到的亲水物的一端携酰基氯, 将该端进一步转化为 N-羟基琥珀酰亚胺酯。该活化酯在适当的惰性溶剂中与肽药物反应。



其中 R 选自脂肪酸、烷基₁₋₂₆、胆固醇和金刚烷，并且其中 m 是一个从 1~130 的数值。

5

4.3 治疗方法

本发明提供了施于受试者有效剂量的本发明药物-低聚物结合物的治疗和预防方法。

10 本发明的一个实施方案提供了施用本发明的药物组合物的方法，这种药物组合物包括治疗有效剂量的本发明药物-低聚物结合物。

给药的方法包括但不限于经口、胃肠外、直肠、局部、舌下、粘膜、经鼻、经眼、皮下、肌内、静脉内、经皮、脊柱、鞘内、关节内、动脉内、蛛网膜下、支气管、淋巴管和子宫内给药。这种结合物的给药途径可以是任何合适的途径，例如输注或快速浓注，经上皮或粘膜（例如口腔粘膜、直肠粘膜和肠粘膜等）吸收，也可以与其他生物活性物质一起给药。优选给药途径是经口和胃肠外，最优选经口。也可全身或局部给药。

在某些情况下，最好通过适当的给药途径，包括心室内和鞘内注射，将本发明的药物组合物直接引入中枢神经系统。可用心室内导管，例如连于贮器如奥马耶贮器上的心室内导管进行心室内注射。

也可用肺或鼻给药，例如使用吸入器或雾化器，和有雾化剂的药物制剂。

在另一实施方案中，可在一控释系统施用这种结合物。在一实施方案中，可使用一种泵（见 Langer, supra; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88: 507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321: 574 (1989)）。在又一另外实施方案中，将控释系统安装在贴近治疗靶即大脑处，因此只需要全身剂量的一部分（见例如 Goodson, “控释系统在医疗方面的应用”一文, supra, Vol. 2, pp. 115 - 138 (1984)）。在 Langer 的文献综述 (Science 249: 1527 - 1533 (1990)) 中还讨论了其他控释系统。

受试对象优选动物，包括但不限于牛、猪、马、鸡、猫、狗等动物，而且受试对象优选哺乳动物，最优选人类。

4.4 药物组合物

本发明打算将药物组合物用于兽医和医用。这种药物组合物一般包含作为治疗成分的一种或多种本发明的药物-低聚物组合物。这种药物组合物可能包括药学有效载体，任选可包括其他治疗成分。载体必须是可药用的，也就是说它们是与治疗成分可以配伍的，并且对其接受者没有过分的害处。可配伍的载体是那些不消除治疗成分的活性的载体。优选的载体是那些不明显削弱治疗成分的活性的载体。治疗成分都是以治疗有效量提供的。



优选地，该药物组合物的治疗成分包括胰岛素-PEG₁₋₁₀-亲脂物结合物。

本发明的药物组合物含有治疗有效量的药物-低聚物结合物，优选纯化形式，同时还含有适量的载体，以便提供适合患者服用的剂型。

5 这种制剂应适合给药方式。

已知有各种给药系统，它们都可用来施用本发明的结合物，例如包封微胶囊。本发明的优选药物制剂包括乳剂和微乳剂，最优选的是微乳剂。

10 术语“载体”指的是稀释剂、佐剂、赋形剂，或者与结合物一起施用的其他载体。这些药物载体可以是无菌液体，例如水和油，包括石油以及动物、植物或合成来源的油，例如花生油、豆油、矿物油和芝麻油等。适合的药物载体的其他例子在 E. W. Martin 的“Renington's Pharmaceutical Sciences”中有描述。适合的药剂赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、凝胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、甘油单硬脂酸酯、滑石粉、氯化钠、干脱脂乳、甘油、丙二醇、水、乙醇等。

20 在一优选实施方案中，这种组合物是按常规方法作为适合人类静脉使用的一种药物组合物配制的。如果这种药物组合物是静脉给药，那么水则是一种优选载体。盐水溶液及含水葡萄糖溶液和含水甘油溶液也可用作液体载体，尤其是用作注射溶液。静脉使用的组合物一般都是无菌等渗水缓冲液。必要的话，这种组合物可能还包括增溶剂和缓解注射部位疼痛的局部麻醉剂如利多卡因。一般这些组分单独提供或共同混合于单位剂量形式之中，例如装在密封容器如安瓿或小袋中的干燥的冻干粉剂或无水浓缩物，容器上标明活性物质的量。

25 输注用的组合物可配装于含药品级无菌水或盐水的输注瓶中。注射用的组合物，则可提供一安瓿注射用无菌水或盐水，以便在用前将这些组分混合在一起。口服制剂可包括标准载体，例如药品级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。

必要的话，这种组合物还可含有湿润剂或乳化剂，或 pH 缓冲剂。

30 这种组合物可采用溶液、混悬液、糖浆、乳剂、微乳剂、酞剂、片剂、丸剂、胶囊、锭剂、散剂、持续释放制剂等剂型。还可将这种组合物制成带有传统粘结剂和载体如甘油三酯的栓剂。栓剂一般含有

0.5% ~ 10% (以重量计) 的活性组分; 口服制剂优选含 10% ~ 95% 的活性组分。

优选地, 可将本发明的药物组合物制成乳剂或微乳剂, 尤其优选微乳剂。

5 乳剂是由不互溶液体(例如油与水)构成的胶体分散体, 其中的一种液体以液滴形式分散于另一种液体之中(Block, L. et al., “药物乳剂与微乳剂”, Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Vol. 2, pp. 47-109 (1999))。乳剂一般是通过对乳剂组分进行碾磨加工处理而制成。乳剂包括那些是两相乳剂延伸的体系, 其中不连续相或内相本身含有乳化体系。每个内相本身又可能是多分散性的, 10 产生三元、四元或更高级的乳剂。因此对本发明有用的乳剂包括例如 W/O、O/W、W/O/W、O/W/O 等。本发明的乳剂组合物还可包含第 3 非液体相, 例如包着固体颗粒物或亲液晶体的相。

微乳剂一般定义为水、油和两亲物体系, 这种体系是一种光学各向同性和热动力学稳定性液体。微乳剂的制备一般是通过先分散和油 15 进入水表面活性剂溶液, 然后加足量的中链醇形成一种透明体系。

有许多极性和非极性化学组分都可用作乳剂的不互溶相。极性组分包括例如多元醇(例如丁二醇、甘油、聚乙二醇、丙二醇)和水。非极性组分包括例如酯类(如脂肪、羊毛脂、肉豆蔻酸异丙酯、棕榈 20 酸异丙酯、单硬脂酸甘油酯和植物油)、醚类(如全氟聚醚、聚氧丙烯)、脂肪酸、脂肪醇类、烃类(如丁烷、丙烷、微晶蜡、矿物油、矿脂和角鲨烯)、卤代烃(如全氟烃和含氟氟烃)、植物蜡和动物蜡以及聚硅氧烷流体。

这种乳剂还可包含各种乳剂稳定剂、防腐剂、抗氧化剂和其他功能 25 性组分。

在本发明的乳剂和微乳剂中使用表面活性剂对降低打破相持续性所需的能量以及通过降低表面张力而获得完全的相分散有益。适合用于本发明乳剂和微乳剂的表面活性剂可包括阴离子、阳离子、两性离子和非离子表面活性剂。优选的表面活性剂是那些亲水亲脂平衡(HLB) 30 值为 6~20 的表面活性剂, 更优选 HLB 值为 8~20 的表面活性剂, 还更优选 HLB 值为 10~20 的表面活性剂, 最优选 HLB 值为 13~20 的表面活性剂。另外, 优选的表面活性剂是那些可产生稳定半透明乃至透

明溶液的表面活性剂，最优选的是那些可产生透明溶液的表面活性剂。

5 适合的乳剂稳定剂包括例如：亲液胶体、多糖、阿拉伯胶、琼脂、海藻胶、角叉菜胶、瓜尔胶、刺梧桐胶、黄芪胶、黄原胶、粘土、微晶纤维素、氧化物和氢氧化物、热解法二氧化硅或气相法二氧化硅、明胶、卡波姆树脂、纤维素醚类等。

防腐剂（例如抗微生物剂）和抗氧化剂（例如柠檬酸、EDTA、苯丙氨酸、磷酸、酒石酸、色氨酸、抗坏血酸、硫酸氢钠和亚硫酸钠）也可用于本发明的乳剂和微乳剂。

10 当然给药方式和剂型会影响组合物的治疗量，后者是特定治疗应用所需要的并且是有效的。治疗有效量会因接受者的体重和健康状况、给药方式和所治疾病的类型等因素不同而有所不同，这对于本领域的技术人员来说是显而易见的。

15 例如，胰岛素结合物的适宜剂量一般为 0.1 mg/kg 至 5 mg/kg，优选 0.1 mg/kg 至 2 mg/kg，更优选 0.2 mg/kg 至 0.3 mg/kg。有效剂量可从体外体系或动物模型体系所得剂量-反应曲线外推获得。

对辅料无限制，可包括稀释剂、缓冲剂、矫味剂、崩解剂、表面活性剂、增稠剂、润滑剂、防腐剂和/或抗氧化剂。

20 可将本发明的药物-低聚物结合物制成中性形式或盐形式。可药用盐包括那些游离氨基与盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等生成的盐，以及游离羧基与钠、钾、氨、钙、铁的氢氧化物、异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等生成的盐。

25 本发明还提供一个药包或试剂盒，其中含有一个或多个装有本发明药物组合物一种或多种组分的容器。管理药品或生物制品生产、使用和销售的政府机构规定的注意事项可任选与这种容器有关。这些注意事项可说明政府机构批准生产、使用或销售以用于人类施用。

本发明不限于这里描述的具体实施方案的范围。的确，除了这里描述的以外，对本发明的前面叙述和所附图的各种修改对本领域技术人员是显而易见的。这些修改将纳入附属的权利要求范围内。

30 本发明说明书中提及了各种专利和非专利文献。本文引入的每篇文献的全部公开内容及下述每篇文献的全部公开内容引入本文作为参考：U. S. Pat. No. 5, 681, 811，题为“结合稳定的治疗剂”，1997年10月28日发布；U. S. Pat. No. 5, 438, 040，题为“结合稳定

的多肽组合物、含此组合物的治疗和诊断制剂以及制备和使用这种组合物的方法”，1995年8月1日发布；U. S. Pat. No. 5, 359, 030，题为“结合稳定化的多肽组合物、含此组合物的治疗和诊断制剂以及制备和使用这种组合物的方法”，1994年10月25日发布；U. S. Pat. Appl. No. 08/958, 383，题为“游离型和/或结合稳定化的治疗剂如胰岛素的亲水物与亲脂物平衡微乳剂制剂”，1997年10月27日提出申请；U. S. Pat. Appl. No. 09/134, 803，题为“血脑屏障治疗药”，1998年8月14日提出申请；Chien, Y. W. et al., Drug Dev Ind Pharm. 15: 1601 - 1634(1989)；Radhakrishnan, B. et al., Proc. Int'l Symp. Control Rel. Bioactive Mater. 25: 124 - 125(1998)；以及 Ekwuribe, N. AAPS Ann. Meeting Abst. S - 102 ~ S - 103 (1998)。

5. 实施例

本发明的结合物经用小鼠血糖测定检验其效力进行了评价。对制成微乳剂的结合物还用胰切除糖尿病狗进行了口服活性评价。

5.1 可水解和非水解低聚物胰岛素的合成与特性

可水解低聚物是通过脂肪酰氯与等摩尔聚乙二醇偶联合成的。非水解低聚物是通过烷基溴化物与适宜聚乙二醇的单钠盐偶联合成的。这种低聚物经用 N-羧基琥珀酰亚胺活化，并且偶联于胰岛素，经纯化并且经用 MALDI (TOF) - MS 表征以确定一摩尔胰岛素上的低聚物数量。图 1 描述了这种基本合成路线。

5.2 三甘醇与 PEG₉

三甘醇 (100 g, 0.67 摩尔) 于 Erlenmeyer 瓶中称重，溶于二氯甲烷并用 MgSO₄ 处理。用装有硅皂土的烧结玻璃漏斗滤去 MgSO₄。除去二氯甲烷，组合物于高真空条件下用 P₂O₅ 干燥过夜。

在一配备有搅拌棒、硫酸钙管和附加漏斗的清洁、干燥的两颈圆底瓶中，干燥的三甘醇 (49.72 g, 0.33 摩尔) 于瓶中称重，加入无水 THF (200 ml)。将一摩尔当量三乙胺 (15.8 ml, 0.11 摩尔) 加于此容器中。将反应瓶冷却至 5℃。从一附加漏斗于 10 分钟滴加存在于两倍体积的 THF 中的油酰氯 (33.10 g, 0.11 摩尔)。滴加后搅拌反应 3 h,

准备一 C18 反相柱，柱上装有 Perstaltic 泵 (2.5 × 26.5 cm)，用含 30% 去离子水的异丙醇溶液作洗脱剂。

在装有搅拌棒的圆底瓶中称重胰岛素 (1.52 g, 0.262 毫摩尔)。搅拌下小心加 DMSO (5 ml)。加三乙胺 (2.1 毫摩尔)，搅拌 10 分钟。

5 将活化的月桂酸酯 PEG₅ (0.152 g, 0.262 毫摩尔) 溶于最小量的 DMSO (2 ml)，然后将此溶液小心地一次加入，于室温下搅拌 3 h。每 30 分钟用 HPLC 监测反应一次。结合物经用制备 HPLC Vydac C18 HPLC 22 idmm × 250 mm 纯化。

10 5.3 用于可水解 TEG 胰岛素的制剂的制备

首先制备有以下组分的空白微乳剂：

表 1. 微乳剂的组分

组分	量, gm/100 ml
维生素 E TPGS	2.01 g
Labrasol	38.24
B 型明胶, 2% 的溶液	0.6 g
红花油	0.81 g
Capmul MCM	0.80 g
大豆卵磷脂	1.10 g
对羟基苯甲酸甲酯	0.004 g
对羟基苯甲酸丙酯	0.020 g
L-抗坏血酸棕榈酸酯	0.010 g
薄荷油	0.004 g
注射用水	54.769 g + 1.19 g
无水磷酸二氢钠	0.03 g
无水磷酸一氢钠	0.14 g
氮	配制过程中使用并且存在于产品瓶的顶部空间

5.3.1 空白微乳剂的制备

15 空白微乳剂的制备以重量计算的重量为基础，使用 5 步法。

第 1 步 油混合物的制备：豆油、Capmul MCM、红花油、对羟基苯



甲酸甲酯 NF、对羟基苯甲酸丙酯 NF 和 L-抗坏血酸棕榈酸酯 NF 混合物在氮下于 50℃ 声波处理 10 分钟获得一种透明黄色溶液。

第 2 步 乳化剂混合物的制备：一装有 Labrasol 和维生素 E-TPGS 混合物的玻璃容器中于 50℃ 声波处理 10 分钟获一种透明溶液。

5 第 3 步 100 mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 的制备：将无水磷酸二氢钠和无水磷酸一氢钠溶于去离子水中，并且用 0.2 μm 过滤器过滤这种溶液。溶液的最终 pH 约为 7.4。

第 4 步 终制剂的制备：将己基胰岛素 M2 溶于含有磷酸钠缓冲剂、无菌水、明胶溶液和乳化剂混合物的 150 ml 无菌瓶中。将从第 1 步获得的油混合物滴加于上述混合物中。将氮气吹扫瓶子的顶部空间，将瓶子用特氟隆包着的平底塞封上。于室温下对这种溶液进行声波处理 2 分钟。终组合物是一种透明溶液。

第 5 步 药物产品溶液的填充和密封：10 ml 本体药物产品溶液等分于 10 ml 小瓶中，加特氟隆包平底塞密封。顶部空间用氮 NF 吹扫。

15

5.3.2 胰岛素 TEG 低聚物的制备

本系列所用的全部化合物都具有有限的水溶性。

配方制胰岛素 TEG 油酸酯混合物的制备：将 58.6 mg (纯度 85%) 的 TEG 油酸酯混合物溶于 5 ml ME365 空白微乳剂中。

20 于微乳剂中制备胰岛素 PEG₃ 油酸酯单结合物 (M1 + M2) 的混合物：将 65.8 mg (纯度 85%) 溶于 12.5 g (12 ml) 浓度为 4.23 mg/ml 的制剂中。

于微乳剂中制备胰岛素 TEG 辛酸酯的混合物：将 57.3 mg (纯度 85%) 溶于 5 ml 制剂中。

25 于微乳剂中制备胰岛素 TEG 棕榈酸酯的混合物：将 58.9 mg (纯度 85%) 溶于 5 ml 制剂中。

于微乳剂中制备胰岛素 PEG₉ 油酸酯单结合物 (M1 + M2) 的混合物：将 2 mg (纯度 85%) 溶于 0.2 ml 浓度为 9.17 mg/ml 的制剂中。

30 于微乳剂中制备胰岛素 PEG₉ 油酸酯的双结合物：将 2 mg (纯度 85%) 溶于 0.2 ml 浓度为 5.78 mg/ml 的制剂中。

胰岛素 TEG DHA 结合物混合物的制备：将 70 mg 单结合物和双结合物混合物溶于 50 ml 空白乳剂中。

说明书附图



图 1 药物-低聚物结合物合成路线

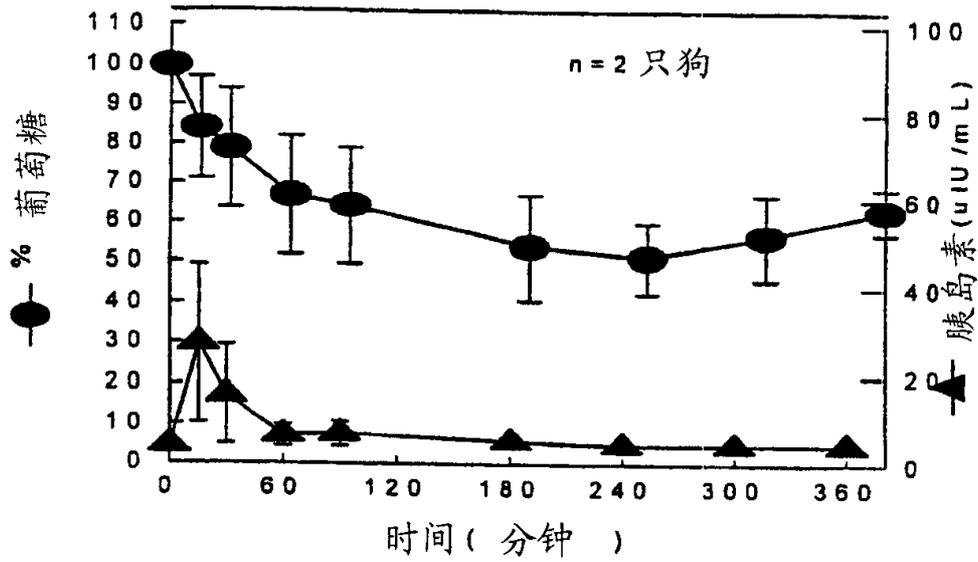


图 2 OLE-Ins Mix 在 1mg/kg 口服剂量下

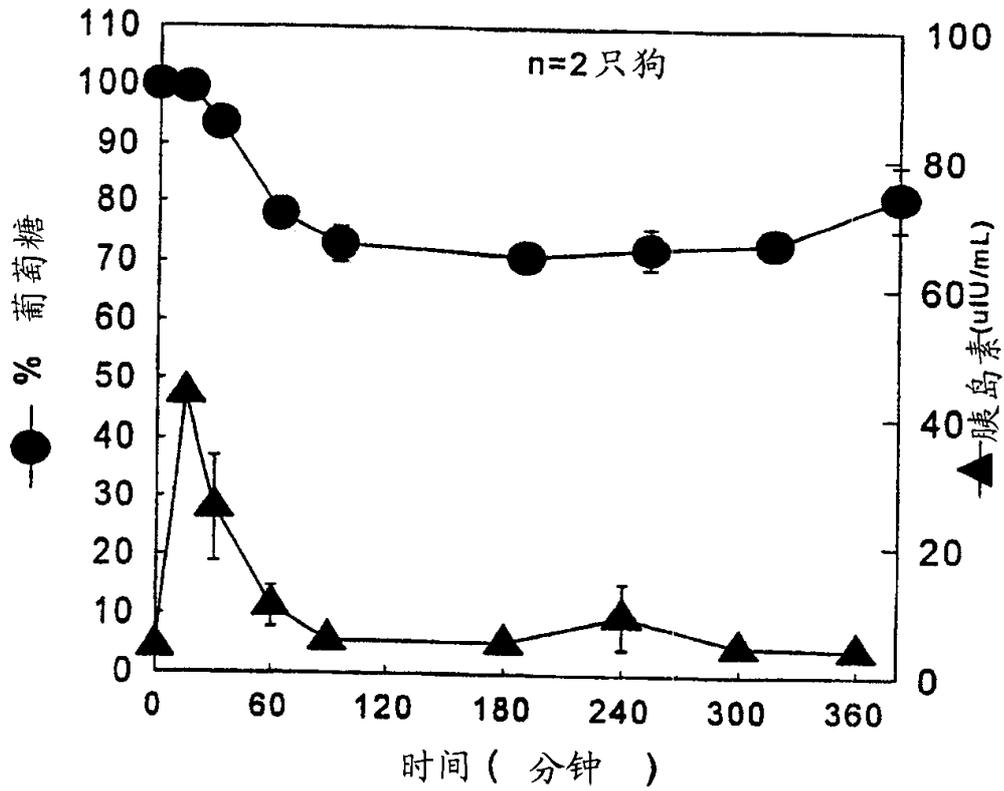


图 3 OCT-Ins Mix 在 1 mg/kg 口服剂量下