(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108524919 A
(43)申请公布日 2018.09.14

(21)申请号 201810286061.7

(22)申请日 2013.03.14

(30)优先权数据
61/648,516 2012.05.17 US
61/673,874 2012.07.20 US
61/780,346 2013.03.13 US

(62)分案原申请数据
201380024922.X 2013.03.14

(71)申请人 延伸生物科学股份有限公司
地址 美国马萨诸塞

(72)发明人 T·M·索利曼 L·M·黑尔斯 H·P·萨德 M·阿梅利

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 唐伟杰

(51)Int.Cl.
A61K 38/22(2006.01)
A61K 38/18(2006.01)
A61K 47/60(2017.01)
A61K 47/55(2017.01)
A61P 3/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

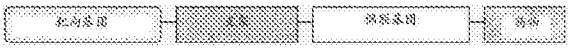
权利要求书2页 说明书45页
序列表8页 附图6页

(54)发明名称

用于改进的药物递送的载体

(57)摘要

本发明提供了增强治疗化合物的吸收、半衰期或生物利用度的载体。这些载体包括结合维生素D结合蛋白(DBP)的靶向基团、用于将这些靶向基团偶联至这些治疗化合物的轭合基团、以及可任选的支架部分。



CN 108524919 A

1.一种药物载体,包括

(a)一个靶向基团,该靶向基团结合维生素D结合蛋白(DBP),以及

(b)一个偶联基团,用于将所述靶向基团轭合至一种治疗化合物,

其中所述药物载体增加所述治疗化合物在循环中的吸收、半衰期、效力或生物利用度。

2.如权利要求1所述的药物载体,其中所述靶向基团选自下组,该组由以下各项组成:维生素D、维生素D类似物、维生素D相关代谢物、维生素D相关代谢物的类似物、肽、抗DBP抗体、抗DBP抗体衍生物、核苷酸适体、以及结合DBP的基于碳的小分子。

3.如权利要求1所述的药物载体,其中所述偶联基团选自下组,该组由以下各项组成:胺反应基团、硫醇反应基团、马来酰亚胺基团、硫醇基、醛基、NHS-酯基、卤代乙酰基、碘代乙酰基、溴代乙酰基、SMCC基团、磺基SMCC基团、碳二亚胺基团、双官能团交联剂、NHS-马来酰亚胺基、及其组合。

4.一种药物组合物,包括与一种载体轭合或配制的一种治疗化合物,其中所述载体包括一个靶向基团,该靶向基团结合维生素D结合蛋白(DBP),并且其中所述载体增加所述治疗化合物在循环中的吸收、生物利用度、或半衰期。

5.一种药物组合物,包括

(a)一种具有FGF21活性的蛋白质,该蛋白质包括与SEQ ID NO:2具有至少90%序列一致性的氨基酸序列,

(b)一个支架部分,该支架部分是聚(乙二醇),以及

(c)一个靶向基团,该靶向基团是维生素D,

其中所述靶向基团增加所述治疗化合物在循环中的吸收、生物利用度、或半衰期。

6.一种药物组合物,包括

(a)一种具有胃饥饿素活性的蛋白质,该蛋白质包括与SEQ ID NO:5具有至少90%序列一致性的氨基酸序列,

(b)一个支架部分,该支架部分是聚(乙二醇),以及

(c)一个靶向基团,该靶向基团是维生素D,

其中所述靶向基团增加所述治疗化合物在循环中的吸收、生物利用度、或半衰期。

7.如权利要求4至6中任一项所述的药物组合物用于生产一种药剂的用途,所述药剂用于治疗一位需要其的患者。

8.一种生产如权利要求4至6中任一项所述的药物组合物的方法,该方法包括将一个靶向基团和一种药物轭合至一种载体-药物化合物中,其中所述轭合步骤采用一个偶联基团。

9.从如权利要求8所述的方法获得的药物组合物,其中所述组合物包括一种含有连键的载体-药物化合物,该连键选自下组,该组由以下各项组成:硫醇键、酰胺键、肟键、腙键、以及噻唑啉酮键。

10.一种包括式I的药物载体:

$$B—L^1—S—L^2—L^3—C$$

I

其中:

B是一个选自以下的靶向基团:维生素D、维生素D类似物、维生素D相关代谢物、维生素D相关代谢物的类似物、结合DBP的肽、抗DBP抗体、抗DBP抗体衍生物、结合DBP的核苷酸适体、

或结合DBP的基于碳的小分子；

S是一个包括以下的支架部分：聚(乙二醇)、聚赖氨酸、聚乙烯亚胺、聚(丙二醇)、肽、血清白蛋白、硫氧还蛋白、免疫球蛋白、氨基酸、核酸、聚糖、包含反应接头的修饰基团、聚乳酸、水溶性聚合物、小碳链接头、或另外的治疗部分；

C是胺反应基团、硫醇反应基团、马来酰亚胺基团、硫醇基团、二硫化物基团、醛基、NHS-酯基、4-硝基苯基酯、酰基咪唑、卤代乙酰基、碘代乙酰基、溴代乙酰基、SMCC基团、磺基SMCC基团、碳二亚胺基团以及诸如NHS-马来酰亚胺基的双官能团交联剂，或其组合；

L^1和L^2是独立选自以下的接头：$-(CH_2)_n-$、-C(O)NH-、-HNC(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-O-、-S-S-、-S-、-S(O)-、$-S(O)_2-$以及-NH-；

L^3是$-(CH_2)_o-$；

n是一个0-3的整数；并且

o是一个0-3的整数。

用于改进的药物递送的载体

[0001] 本申请是申请日为2013年03月14日、申请号为201380024922.X、发明名称为“用于改进的药物递送的载体”的中国专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明的领域提供了组合物，以及治疗化合物的载体、轭合物、融合物或配制品用于通过改进体内药物代谢动力学特性而用于增加这些化合物的效力、吸收、生物利用度或循环半衰期的意图的通用用途。

[0003] 发明背景

[0004] 本发明涉及改进治疗化合物的效力、吸收或药物代谢动力学特性。聚(乙二醇)或(PEG)的添加是已知的通过降低肾脏清除率、减少聚集、并且减少潜在不想要的免疫识别而增加某些化合物半衰期的方法(简(Jain)，治疗药物载体系统锐评(Crit.Rev.Ther.Drug Carrier Syst.)25:403-447(2008))。PEG典型地以显著大的大小(20-40kDa)使用，以使循环中的半衰期最大化。这可以通过使用附接至该化合物的单个大的PEG或多个更小PEG完成。(克拉克(Clark)等人，生物化学杂志(J.Biol.Chem.)271:21969-21977(1996)；菲什伯恩(Fishburn)，药物科学杂志(J.Pharm.Sci.)97:4167-4183(2008))。

[0005] 吸收是药物开发和医疗化学中的主要焦点，这是因为药物必须在可发生任何医疗效果之前被吸收。药物的药物代谢动力学曲线可以受到许多因素的影响。另外，治疗化合物的吸收特性在化合物与化合物之间是显著不同的。一些治疗化合物在口服或皮肤给予后很难被吸收。其他治疗化合物，例如大多数基于肽和蛋白质的治疗剂不能口服给予。给药的替代途径例如静脉内、皮下、或肌肉内注射常规地用于一些化合物；然而，这些途径常常导致慢吸收和治疗化合物暴露于可以降解它们的酶，由此需要很高的剂量来实现效力。

[0006] 多种肽已经被鉴别为治疗上有希望的。肽和蛋白质的化学与生物特性使得它们成为引人注目的用作治疗化合物的候选者。肽和蛋白质是由氨基酸组成的天然存在的分子，并且涉及多种生理过程。肽和蛋白质展现高度的选择性和效力，并且可以不遭受潜在的药物不良相互作用或其他不良副作用。因此，肽和蛋白质具有很大的作为高度多样的、高效力的以及高度选择性及低毒性的一类治疗化合物的希望。然而，肽和蛋白质可能具有短的体内半衰期。对于此类肽，这可以是几分钟。这可以使得它们在处于其天然形式用于治疗给予时大体上是不切实际的。另外，肽可以具有短的作用持续时间或不良的生物利用度。

[0007] 成纤维细胞生长因子21(SEQ ID:2)是一种在血清中循环的蛋白质。它由FGF21基因编码，是成纤维细胞生长因子(FGF)家族(包括FGF19和FGF23)的一员。它缺乏常规的FGF肝素结合结构域。FGF家族成员具有广泛的促有丝分裂和细胞存活的活性，并且涉及多种生物过程，包括胚胎发育、细胞生长、形态发生、组织修复、肿瘤生长以及侵染。FGF21是由HMGCS2活性特异性地诱导的。FGF21刺激葡萄糖被脂肪细胞而非其他细胞类型摄取。该作用对于胰岛素的活性是附加的。

[0008] 体外研究指示FGF21优选结合至FGFR1c/b-Klotho受体复合物而非含有其他FGFR亚型的那些(克利韦尔(Kliewer)和曼格尔斯多夫(Mangelsdorf)，美国临床营养学杂志

(Am.J.Clin.Nutr.)91:254S-257S(2010))。FGF21促进葡萄糖由脂肪细胞的体外摄取。FGF21给予至糖尿病动物降低了循环葡萄糖水平,同时过多的FGF21不会诱导如给予过多的胰岛素所看到的低血糖症(卡瑞托尼可(Kharitonenkov)和申费尔特(Shanafelt),试验药物的当前观点(Curr.Opin.Investig.Drugs)10:359-364(2009))。因此,FGF21是有希望的用于治疗糖尿病的治疗蛋白质。然而,在动物模型中,频繁地给予FGF21以看到治疗益处(卡瑞托尼可(Kharitonenkov)等人,临床研究杂志(J.Clin.Invest.)115:1627-1635(2005))。FGF21在其天然形态时在血清中具有极其短的半衰期(1.1小时),使得外源添加处于天然形态的FGF21不能在临床上实践为治疗(参见WO 03/011213)。另外,当皮下注射时,FGF21展现不良的生物利用度。在药物代谢动力学的比较研究中,静脉内(IV)或皮下(SC)注射1mg/kg的FGF21,并且对FGF21的随着时间推移的浓度进行分析。结果显示与静脉途径(Cmax 1890nM)相比,使用皮下给予途径(Cmax 73nM)显著地降低了生物利用度(参见徐(Xu)J等人,2009,美国生理学杂志.内分泌与新陈代谢(Am J Physiol Endocrinol Metab)297:E1105-E1114,表1)。前述参考文件通过引用以其全文结合在此。

[0009] 胃饥饿素肽(SEQ ID NO:5)是天然地分泌自哺乳动物的胃,然后进入循环以刺激食欲和生长激素的释放。胃饥饿素刺激生长激素(GH)通过细胞受体GHS-R从脑垂体释放,并且在能量稳态中发挥着重要的作用。此外,胃饥饿素直接作用于中枢神经系统,以降低交感神经活性。胃饥饿素受体(GHS-R)集中于下丘脑脑垂体单元。GHS-R分布于外周组织中,包括心脏、肺、肝、肾、胰腺、胃、小肠及大肠、脂肪、以及免疫细胞。

[0010] 胃饥饿素已经在治疗上用于在遭受慢性病(例如癌症)引起的恶病质或非自愿体重丧失的患者中增加体重和无脂体重(Hiura等人,癌症(Cancer)1月26日,2012,http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.27430/abstract)。然而,胃饥饿素在人类中具有天然短的11分钟的半衰期(阿卡米祖(Akamizu)等人,欧洲内分泌学杂志(Eur J Endocrinol)150:447-55(2004)),并且因此必须经常给药以看到治疗效果。

[0011] 英利昔单抗(类克(Remicade)®,詹森生物技术公司(Janssen Biotech Inc.),美国专利号US 5,919,452和US 2002/0141996,通过引用以其全文结合于此)是结合用于治疗自身免疫性疾病的肿瘤坏死因子α(TNF-α,SEQ ID:10)的单克隆抗体。英利昔单抗由美国食品与药品管理局(FDA)批准用于银屑病、克罗恩病、强直性脊柱炎、银屑病关节炎、类风湿关节炎、以及溃疡性结肠炎的治疗。TNF-α是一种化学信使(细胞因子),并且是自身免疫反应的关键角色。英利昔单抗由保健专家经静脉内给予,并且未被批准用于皮下给予。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明提供了增强治疗化合物的吸收、稳定性、半衰期、作用持续时间、效力、或生物利用度的载体。这些载体包括结合维生素D结合蛋白(DBP)的靶向基团、用于将这些靶向基团偶联至这些治疗化合物的轭合基团、以及可任选的支架部分。

[0014] 在本发明的一个实施例中,靶向基团是维生素D、维生素D类似物、维生素D相关代谢物、维生素D相关代谢物的类似物、结合DBP的肽、抗DBP抗体、抗DBP抗体衍生物、结合DBP的核苷酸适体、或结合DBP的基于碳的小分子。

[0015] 在另一个实施例中,偶联基团是胺反应基团、硫醇反应基团、马来酰亚胺基团、硫醇基团、醛基、NHS-酯基、4-硝基苯基酯、酰基咪唑、卤代乙酰基、碘代乙酰基、溴代乙酰基、SMCC基团、磺基SMCC基团、碳二亚胺基团以及诸如NHS-马来酰亚胺基的双官能团交联剂,或

其组合。本发明的偶联基团可以促成硫醇键、酰胺键、肟键、腙键、噻唑啉酮键，或采用环加成反应(例如，点击化学)以将载体或靶向基团偶联至治疗化合物。

[0016] 在另一个实施例中，该药物载体进一步包括一个支架部分，该支架部分包括：聚(乙二醇)、聚赖氨酸、聚乙烯亚胺、聚(丙二醇)、肽、血清白蛋白、硫氧还蛋白、免疫球蛋白、氨基酸、核酸、聚糖、包含反应接头的修饰基团、水溶性聚合物、小碳链接头、或另外的治疗部分。

[0017] 在另一个实施例中，支架部分是在大约100Da.与200,000Da.之间。在优选实施例中，该支架部分是在大约100Da.与20,000Da.、200Da.与15,000Da.、300Da.与10,000Da.、400Da.与9,000Da.、500Da.与5,000Da.、600Da.与2,000Da.、1000Da.与200,000Da.、5000Da.与100,000Da.、10,000Da.与80,000Da.、20,000Da.与60,000Da.、或20,000Da.与40,000Da.之间。

[0018] 本发明提供了药物组合物，该药物组合物包括与一种载体轭合、融合、或配制的治疗化合物。该载体包括结合DBP的靶向基团，并且增加循环中治疗化合物的吸收、生物利用度、或半衰期。本发明的药物组合物可以包括与单一载体轭合的两种或更多种治疗化合物。本发明的药物组合物可以包括与治疗化合物轭合的两种或更多种载体。

[0019] 在一个实施例中，在该药物组合物中的靶向基团是维生素D、维生素D类似物、维生素D相关代谢物、维生素D相关代谢物的类似物、结合DBP的肽、抗DBP抗体、抗DBP抗体衍生物、结合DBP的核苷酸适体、或结合DBP的基于碳的小分子。

[0020] 在另一个实施例中，该药物组合物进一步包括一个支架部分。在一个优选实施例中，支架部分是聚(乙二醇)、聚赖氨酸、聚乙烯亚胺、聚(丙二醇)、肽、血清白蛋白、硫氧还蛋白、免疫球蛋白、氨基酸、核酸、聚糖、包含反应接头的修饰基团、水溶性聚合物、小碳链接头、或另外的治疗化合物。

[0021] 本发明的药物组合物可以包括：小分子、化学实体、核酸、核酸衍生物、肽、肽衍生物、天然存在的蛋白质、非天然存在的蛋白质、肽-核酸(PNA)、钉肽、吗啉基化合物(morpholinos)、磷二酰胺吗啉基化合物(phosphorodiamidate morpholinos)、反义药、基于RNA的沉默药物、适体、糖蛋白、酶、激素、细胞因子、干扰素、生长因子、凝血因子、抗体、抗体片段、抗体衍生物、毒素轭合的抗体、代谢效应子、镇痛药、解热药、抗炎剂、抗生素、抗微生物剂、抗病毒剂、抗真菌药、肌肉骨骼药、心血管药、肾部药物、肺部药物、消化系统病药物、血液药物、泌尿道药物、代谢药物、肝部药物、神经系统药物、抗糖尿病药物、抗癌药物、治疗胃部病症的药物、治疗结肠病症的药物、治疗皮肤病症的药物、或治疗淋巴病症的药物。

[0022] 在一个优选实施例中，该药物组合物包括一种具有FGF21活性的蛋白质，该蛋白质包括与SEQ ID NO:2具有至少90％序列一致性的氨基酸序列。在另一个优选实施例中，该靶向基团是维生素D。在另一个优选实施例中，该支架部分是聚(乙二醇)。

[0023] 在一个最优选的实施例中，本发明考虑了一种药物组合物，该药物组合物包括具有FGF21活性的蛋白质、支架部分、以及靶向基团，该蛋白质包括与SEQ ID NO:2具有至少90％序列一致性的氨基酸序列，该支架部分是聚(乙二醇)，该靶向基团是维生素D。在此实施例中，该靶向基团增加该治疗化合物在循环中的吸收、生物利用度、或半衰期。在另一个最优选的实施例中，本发明考虑了一种药物组合物，该药物组合物包括具有FGF21活性以及

SEQ ID NO:2氨基酸序列的蛋白质。

[0024] 在一个优选实施例中，该药物组合物包括一种具有胃饥饿素活性的蛋白质，该蛋白质包括与SEQ ID NO:5具有至少90％序列一致性的氨基酸序列。在另一个优选实施例中，该靶向基团是维生素D。在另一个优选实施例中，该支架部分是聚(乙二醇)。

[0025] 在一个最优选的实施例中，本发明考虑了一种药物组合物，该药物组合物包括具有胃饥饿素活性的蛋白质、支架部分、以及靶向基团，该蛋白质包括与SEQ ID NO:5具有至少90％序列一致性的氨基酸序列，该支架部分是聚(乙二醇)，该靶向基团是维生素D。在此实施例中，该靶向基团增加该治疗化合物在循环中的吸收、生物利用度、或半衰期。在另一个最优选的实施例中，本发明考虑了一种药物组合物，该药物组合物包括具有胃饥饿素活性以及SEQ ID NO:5氨基酸序列的蛋白质。

[0026] 在一个实施例中，该药物组合物包括一种抗体。在一个优选实施例中，该抗体是一种抗TNF-α抗体，该抗体特异性地结合一种具有与SEQ ID NO:10有至少90％序列一致性的氨基酸序列的蛋白质。在一个更优选实施例中，该抗TNF-α抗体特异性地结合一种具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的蛋白质。在另一个优选实施例中，该靶向基团是维生素D。在另一个优选实施例中，该支架部分是聚(乙二醇)。

[0027] 在一个最优选的实施例中，本发明包括一种抗TNF-α抗体、支架部分以及靶向基团，该抗体特异性地结合具有与SEQ ID NO:10有至少90％序列一致性的氨基酸序列的蛋白质，该支架部分是聚(乙二醇)，该靶向基团是维生素D。在此实施例中，该靶向基团增加该治疗化合物在循环中的吸收、生物利用度、或半衰期。

[0028] 在某些实施例中，本发明提供了包括具有式I的那些的载体：

[0029] $B-L^1-S-L^2-L^3-C$

[0030] I

[0031] 其中：

[0032] B是一个选自以下的靶向基团：维生素D、维生素D类似物、维生素D相关代谢物、维生素D相关代谢物的类似物、结合DBP的肽、抗DBP抗体、抗DBP抗体衍生物、结合DBP的核苷酸适体、或结合DBP的基于碳的小分子；

[0033] S是一个包括以下的支架部分：聚(乙二醇)、聚赖氨酸、聚乙烯亚胺、聚(丙二醇)、肽、血清白蛋白、硫氧还蛋白、免疫球蛋白、氨基酸、核酸、聚糖、包含反应接头的修饰基团、聚乳酸、水溶性聚合物、小碳链接头、或另外的治疗部分；

[0034] C是胺反应基团、硫醇反应基团、马来酰亚胺基团、硫醇基团、二硫化物基团、醛基、NHS-酯基、4-硝基苯基酯、酰基咪唑、卤代乙酰基、碘代乙酰基、溴代乙酰基、SMCC基团、磺基SMCC基团、碳二亚胺基团以及诸如NHS-马来酰亚胺基的双官能团交联剂，或其组合；

[0035] L^1和L^2是独立选自以下的接头：$-(CH_2)_n-$、-C(O)NH-、-HNC(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-O-、-S-S-、-S-、-S(O)-、$-S(O)_2-$以及-NH-。

[0036] L^3是$-(CH_2)_o-$；

[0037] n是一个0-3的整数；并且

[0038] o是一个0-3的整数。

[0039] 在某些实施例中，本发明提供了产生具有式I的载体的方法：

[0040] $B-L^1-S-L^2-L^3-C$

[0041] I

[0042] 包括使具有式Ia的化合物：

[0043] B-COOH

[0044] Ia

[0045] 与具有式Ib的化合物进行反应的步骤：

[0046] H_2N-S-L^2-L^3-C

[0047] Ib

[0048] 该反应是在酰胺偶联剂的存在下进行，

[0049] 其中B、S、C、L^2和L^3是如上所限定的，并且L^1是-C(O)NH-。

[0050] 在某些其他实施例中，本发明提供了产生具有式I的载体的方法：

[0051] B-L^1-S-L^2-L^3-C

[0052] I

[0053] 包括使具有式Ia的化合物：

[0054] B-COOH

[0055] Ia

[0056] 与具有式Ic的化合物进行反应的步骤：

[0057] H_2N-S-L^2-L^3-$COOR^1$

[0058] Ic

[0059] 该反应是在酰胺偶联剂的存在下进行，

[0060] 将一种酯水解为羧酸并且，

[0061] 将一种羧酸转化为一种活性酯，

[0062] 其中B、S、L^2、L^3以及n和o是如上所定义的，

[0063] L^1是-C(O)NH-并且，

[0064] R^1是C_1-C_6烷基。

[0065] 本发明提供了一种治疗一位需要治疗化合物的患者的方法，包括给予有效量的在此所述的一种或多种药物组合物。示例性的治疗化合物包括：小分子、化学实体、核酸、核酸衍生物、肽、肽衍生物、天然存在的蛋白质、非天然存在的蛋白质、肽-核酸(PNA)、钉肽、吗啉基化合物、磷二酰胺吗啉基化合物、反义药、基于RNA的沉默药物、适体、糖蛋白、酶、激素、细胞因子、干扰素、生长因子、凝血因子、抗体、抗体片段、抗体衍生物、毒素轭合的抗体、代谢效应子、镇痛药、解热药、抗炎剂、抗生素、抗微生物剂、抗病毒剂、抗真菌药、肌肉骨骼药、心血管药、肾部药物、肺部药物、消化系统病药物、血液药物、泌尿道药物、代谢药物、肝部药物、神经系统药物、抗糖尿病药物、抗癌药物、治疗胃部病症的药物、治疗结肠病症的药物、治疗皮肤病症的药物、以及治疗淋巴病症的药物。

[0066] 在优选方法中，该治疗化合物是一种具有FGF21活性的蛋白质，该蛋白质包括与SEQ ID NO:2具有至少90％序列一致性的氨基酸序列。在其他优选方法中，该治疗化合物是一种具有胃饥饿素活性的蛋白质，该蛋白质包括与SEQ ID NO:5具有至少90％序列一致性的氨基酸序列。在其他优选方法中，该治疗化合物是一种抗TNF-α抗体，该抗体特异性地结合一种具有与SEQ ID NO:10有至少90％序列一致性的蛋白质。在其他优选方法中，该靶向基团是维生素D或该支架是聚(乙二醇)。

[0067] 在其他实施例和方法中，本发明的药物组合物是在药学上可接受的配制品中。药物组合物可以通过以下方式递送至患者：透皮、口服、肠胃外、皮下、皮内、静脉内、肌肉内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、病灶内、颅内注射、输注、吸入、经眼睛、局部、经直肠、经鼻、经颊、舌下、经阴道、或植入式储药器。

[0068] 本发明提供了披露的药物组合物用于生产可治疗需要药剂的患者的药剂的用途。

[0069] 本发明提供了生产在此披露的药物组合物的方法，包括采用偶联基团将靶向基团和药物轭合入载体-药物化合物中。这些偶联基团可以是胺反应偶联基团、马来酰亚胺偶联基团、半胱氨酸偶联基团、醛偶联基团、或硫醇反应偶联基团。马来酰亚胺是用于偶联至例如在一个游离半胱氨酸残基上的巯基的有用的偶联基团，这种半胱氨酸残基可以位点特异性地在一个希望的位置处工程化入肽或蛋白质中。可以用于位点特异性地附接至治疗化合物N端的其他偶联基团例如靶向胺基团的NHS-或醛对于本领域技术人员而言是熟知的。其他更特化的偶联基团被考虑到，并且可以由本领域技术人员取代。

[0070] 在一些方法中，该靶向基团是维生素D、维生素D类似物、维生素D相关代谢物、维生素D相关代谢物的类似物、结合DBP的肽、抗DBP抗体、抗DBP抗体衍生物、结合DBP的核苷酸适体、或结合DBP的基于碳的小分子。

[0071] 在其他实施例中，生产药物组合物的方法进一步包括将一个支架部分轭合至该靶向基团或药物。该支架部分可以是聚(乙二醇)、聚赖氨酸、聚乙烯亚胺、聚(丙二醇)、肽、血清白蛋白、硫氧还蛋白、免疫球蛋白、氨基酸、核酸、聚糖、包含反应接头的修饰基团、水溶性聚合物、小碳链接头、或另外的治疗化合物。

附图说明

[0072] 图1：显示与药物偶联的载体的大体结构的示意图。该载体包括靶向基团、支架、以及可任选的偶联基团。

[0073] 图2：显示用于形成载体维生素D_3-PEG-马来酰亚胺加合物的化学结构和合成法的反应方案。该载体是通过轭合1)维生素D类似物(靶向基团)、2)PEG支架、以及3)马来酰亚胺偶联基团来形成。

[0074] 图3：FGF21-载体轭合物的生物利用度和药物代谢动力学。将单独的或轭合至维生素D_3-PEG-马来酰亚胺载体的FGF21(SEQ ID NO:3)以0.1mg/kg皮下注入斯普拉-道来(Sprague Dawley)大鼠中。通过ELISA一式两份地针对FGF21浓度对血浆样品进行分析，并且将来自每个时间点的3-5个动物的平均值绘制在半对数点图上。

[0075] 图4：胃饥饿素-载体轭合物的药物代谢动力学。将单独的或轭合至维生素D_3-PEG-马来酰亚胺载体的胃饥饿素(SEQ ID NO:6)以0.1mg/kg静脉内注入斯普拉-道来大鼠中。通过ELISA一式两份地针对胃饥饿素浓度对血浆样品进行分析，并且将来自每个时间点的3-5个动物的平均值绘制在半对数点图上。

[0076] 图5：显示用于形成另一种载体维生素D_3-PEG-NHS加合物的化学结构和合成法的反应方案。该载体是通过轭合1)维生素D类似物(靶向基团)、2)PEG支架、以及3)NHS偶联基团来形成。

[0077] 图6：英利昔单抗-载体轭合物的生物利用度和药物代谢动力学。将单独的或轭合至维生素D_3-PEG-NHS载体的英利昔单抗以1mg/kg皮下注入斯普拉-道来大鼠中。通过英利

昔单抗特异性的ELISA针对英利昔单抗浓度对血浆样品进行分析，并且将来自每个时间点的3个动物的平均值绘制在线性点图上。

[0078] 发明详细说明

[0079] 本发明提供了与治疗蛋白质、肽、核酸或小分子共价附接、融合或配制的载体分子，以用于改进治疗化合物的效力、吸收、生物利用度、循环半衰期或药物代谢动力学特性的目的。在某些实施例中，这些载体包括靶向基团、支架、以及偶联基团。在其他实施例中，这些载体缺乏支架，该支架除了其他功能充当靶向基团与治疗化合物之间的“间隔”。

[0080] 这些载体被设计在适用于人类和动物。这些载体用于改进与该载体偶联、轭合、融合、或配制的生物或化学实体的药物代谢动力学特性的目的。这通过靶向基团与维生素D结合蛋白(DBP)的相互作用发生，这可以活性地快速和有效地将分子从给药部位传输到循环血浆，由此减少药物于降解性酶中的暴露。通过结合至DBP，这些载体还改进了药物的循环半衰期，由此通过预防肾脏过滤增加了药物的效力和治疗功效。用于将载体轭合至在此所述的治疗化合物的方法在本领域中是已知的。通过举例方式，使用本发明的偶联基团的轭合可以使用WO 93/012145(阿塔西(Atassi)等人)和7,803,777(德弗里斯(Defrees)等人)中描述的组合物和方法来进行，这些文献各自通过引用以其全文结合于此。

[0081] 在描述和要求本发明的一个或多个实施例中，将依据以下所述的定义使用以下术语。

[0082] 术语“吸收”是药物移动进入血流。药物需要经由某些给药途径引入(例如，口服、局部或皮肤)或以特定剂型(例如，片剂、胶囊或液体)引入。静脉内疗法、肌肉内注射、以及肠道营养提供了吸收方面的较少的可变性，并且生物利用度常常接近100％。吸收的最快途径是吸入。

[0083] “拮抗剂”是指一种分子，能够中和、阻断、抑制、去除、降低、或干扰具体或特定蛋白质的活性，包括在配体情况下其与一种或多种受体结合、或在受体情况下其与一种或多种配体结合。拮抗剂包括抗体和其抗原结合片段、蛋白质、肽、糖蛋白、糖肽、糖脂类、多糖类、低聚糖、核酸、生物有机分子、模拟肽、药理学药剂、以及它们的代谢物、转录和翻译控制序列、等等。拮抗剂还包括蛋白质、激素或其他生物活性分子的小分子抑制剂。拮抗剂可以是融合蛋白、受体分子、反义分子、适体、核酶，或特异性结合至蛋白质、激素、或其他生物活性分子并且由此隔绝其与其靶标结合的衍生物。

[0084] “抗体”(Ab)和“免疫球蛋白”(Ig)是指具有类似结构特性的糖蛋白。尽管抗体展现与特异性抗原的结合特异性，免疫球蛋白包括抗体和其他通常缺乏抗原特异性的抗体样分子两者。后一种类型的多肽是例如通过淋巴系统以低水平以及通过骨髓瘤以增加的水平产生的。

[0085] “适体”是已经被选择为结合特异性靶标的基于核酸的化合物。基于适体的治疗化合物的实例可以发现于WO 07/035922中，通过引用以其全文结合于此。

[0086] 术语“生物利用度”是指达到全身循环的未改变的药物的给药剂量的分数，是药物的主要药物代谢动力学特性之一。当静脉内给予药剂时，它的生物利用度是100％。当药剂是经由其他途径(例如，口服)给予时，它的生物利用度通常降低(由于不完全吸收和第一轮代谢)或可以在患者与患者之间不同。当针对给药的非静脉内途径计算时，生物利用度被认为是药物代谢动力学中的一种重要参数。

[0087] “载体”是可以与治疗化合物轭合、融合、偶联或配制的化合物，用以改进药物的吸收、半衰期、生物利用度、药物代谢动力学、或药效动力学特性。它们包括靶向基团、偶联基团、以及可任选地支架部分。

[0088] “有效量”是指治疗化合物以剂量计并且持续所需的时段以实现所希望的治疗或预防结果的有效的量。治疗化合物的“治疗有效量”可以根据多种因素而变化，例如个体疾病状态、年龄、性别、以及体重，以及抗体在个体中引发希望的应答的能力。治疗有效量可以例如通过改进的存活率、更快速的恢复、或症状的改善、改进或消除或其他可接受的生物标志物或替代标志物来测量。治疗有效量还是其中治疗化合物的任何毒性或不利影响被治疗有益的效果胜过的一个量。“预防有效量”是指治疗化合物以剂量计并且持续所需的时段以实现所希望的预防结果的有效的量。典型地，但非必需的，因为预防的剂量是在疾病之前或早期在受试者体内使用的，所以这种预防有效量将小于治疗有效量。

[0089] “半衰期”是本领域中已知的科学术语，是指当一半量的测试分子不再被检测到时流逝的时间的量。体内半衰期是指在人类或动物的循环血浆或组织中当一半的测试分子不再可检测到时流逝的时间。

[0090] “激素”是具有信号传导能力的从一个细胞(或细胞群)到另一个细胞的生物或化学信使。如在此所述，用于本发明的激素可以是肽、类固醇、信息素、白细胞介素、淋巴因子、细胞因子、或其他本领域中已知的激素类成员。

[0091] “同系物”是在核苷酸序列、肽序列、功能或结构水平方面类似于参照分子的生物活性分子。同系物可以包括与参照序列共享某个百分比的一致性的序列衍生物。因此，在一个实施例中，同源或衍生的序列共享至少70％的序列一致性。在一个优选实施例中，同源或衍生的序列共享至少80％或85％的序列一致性。在一个更优选的实施例中，同源或衍生的序列共享至少86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、或99％的序列一致性。同源的或衍生的核酸序列还可以由它们在高严谨度杂交条件下保持结合至参照核酸序列上的能力来限定。与参照分子具有结构或功能相似度的同系物可以是参照分子的化学衍生物。针对结构和功能同系物连同衍生物进行检测、产生并且筛选的方法在本领域中是已知的。

[0092] “杂交”通常取决于当互补链存在于在它们解链温度以下的环境中时变性DNA重退火的能力。探针与可杂交序列之间的希望的同源性程度越高，可以使用的相对温度越高。作为结果，它遵循更高的相对温度将倾向于使得反应条件更加严谨，而更低的温度使得反应条件不太严谨。对于杂交反应的严谨度的另外细节和解释，参见奥苏伯尔(Ausubel)等人，当前分子生物学工具(Current Protocols in Molecular Biology)，威利世界科学出版社(Wiley Interscience Publishers)，(1995)。

[0093] “个体”、“受试者”、或“患者”是脊椎动物。在某些实施例中，该脊椎动物是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于灵长类(包括人类和非人类灵长类)以及啮齿类(例如，小鼠、仓鼠、豚鼠、以及大鼠)。在某些实施例中，哺乳动物是人。“对照受试者”是指没有被诊断为患有已经在一位个体、受试者或患者中鉴定的疾病、功能障碍、或病症的健康受试者。对照受试者不遭受任何与该疾病、功能障碍或病症相关联的病征或症状。

[0094] “药剂”是已经被生产用于治疗疾病、失调或病症的活性药物。

[0095] “吗啉基化合物(Morpholinos)”是天然核酸的非天然变体的合成分子，采用磷二

酰胺键，描述于美国专利号8,076,476中，将其通过引用以其全文结合于此。

[0096] “核酸”是一组大分子的任一个，DNA、RNA或其变体，携带可以指导细胞功能的基因信息。核酸可以具有酶样活性（例如核酶）或可以用于抑制受试者中的基因表达（例如，RNAi）。在此处描述的本发明中使用的核酸可以是单链、双链、线性或环状的。本发明进一步结合了核酸变体的使用，包括但不限于适体、PNA、吗啉基化合物、或核酸的其他非天然变体。通过举例的方式，有用于本发明的核酸描述于美国专利号8,076,476中，将其通过引用以其全文结合于此。

[0097] “患者反应”或“反应”可以使用指示对患者有益的任何端点来评估，包括但不限于，(1)将疾病进展抑制到一定程度，包括减慢和完全的抑制；(2)在疾病发作和/或症状的次数方面的减少；(3)疾病细胞浸润入邻近外围器官和/或组织的抑制（即降低、减慢或完全终止）；(4)疾病扩散的抑制（即.降低、减慢或完全终止）；(5)自身免疫病症的减少；(6)在与失调相关联的生物标志物的表达方面的有利改变；(7)将与一种失调相关联的一种或多种症状减轻到一定程度；(8)在治疗之后无病呈现的长度上的增加；或(9)在治疗之后在给定时间点降低的死亡率。

[0098] 如在此使用的，术语“肽”是包括两个或更多个氨基酸的任何肽。术语肽包括短肽（例如，包括2-14个氨基酸之间的肽）、中等长度肽（15-50）或长链肽（例如，蛋白质）。术语肽、中等长度肽和蛋白质可以在此互换使用。如在此使用的，并入术语“肽”用以意指由氨基酸残基构成的聚合物、相关的天然存在的结构变体、及其合成的非天然存在的经由肽键连接的类似物、相关天然存在的结构变体、及其合成的非天然存在的类似物。合成肽可以是例如使用自动肽合成仪合成的。肽还可以通过其他手段例如通过细胞、细菌、酵母、或其他生物来合成。肽可以包含20个基因编码氨基酸以外的氨基酸。肽包括通过天然过程（例如通过加工和其他翻译后修饰）修饰的那些，还包括通过化学修饰技术修饰的那些。此类修饰详细描述于基础文本和更详细的专题论文中，并且对于本领域技术人员而言是熟知的。修饰发生于肽的任何地方，包括肽骨架、氨基酸侧链以及氨基或羧基端。

[0099] 如在此使用的，“药学上可接受的载体”或“治疗有效的载体”是水性或非水性（固体）的，例如含酒精的或油质的，或其混合物，并且可以包含表面活性剂、软化剂、润滑剂、稳定剂、染料、香料、防腐剂、用于调节pH的酸或碱、溶剂、乳化剂、胶凝剂、保湿剂、稳定剂、润湿剂、时间释放剂、湿润剂、或其他通常被包括在药物组合物的具体形式中的组分。药学上可接受的载体在本领域中是熟知的，并且包括例如水性溶液，例如水或生理缓冲盐水或其他溶剂或运载体，例如乙二醇、甘油、以及例如橄榄油的油类或可注射的有机酯。药学上可接受的载体可以包含生理学上可接受的化合物，例如其作用以稳定或增加特异性抑制剂的吸收的化合物，例如碳水化合物（例如葡萄糖、蔗糖或右旋糖酐），抗氧化剂（例如，抗坏血酸或谷胱甘肽），螯合剂，低分子量蛋白质或其他稳定剂或赋形剂。

[0100] 术语“药物代谢动力学”当前定义为治疗化合物的吸收、分布、代谢和排泄的时间历程。改进的“药物代谢动力学”被定义为：针对具体治疗化合物改进如所希望的药物代谢动力学特性中的一个或多个。实例包括但不限于：通过代谢或分泌来降低消除，增加药物吸收，增加半衰期，和/或增加生物利用度。

[0101] “PNA”是指具有类似于DNA或RNA的化学结构的肽核酸。肽键用于将核苷酸或核苷连接在一起。

[0102] “支架”是与其他分子可以共价或非共价地附接或配制的分子。本发明的支架可以充当靶向基团与药物之间的“间隔”或“接头”。支架还可以包含反应接头或可以具有药物以外的有益治疗特性。因此，本发明的支架可以是例如PEG、血清白蛋白、硫氧还蛋白、免疫球蛋白、包含反应接头的修饰基团、水溶性聚合物、或治疗化合物。

[0103] 杂交反应的“严谨度”是可易于由本领域技术人员确定的，并且通常是取决于探针长度、洗涤温度、以及盐浓度的经验计算。通常，更长的探针需要更高的用于合适退火的温度，同时更短的探针需要更低的温度。

[0104] 如在此定义的“严谨条件”或“高严谨度条件”可以通过以下的那些来鉴别：(1)采用低离子强度和高温度用于洗涤，例如0.015M氯化钠/0.0015M柠檬酸钠/0.1％十二烷基硫酸钠，50℃；(2)在杂交期间采用变性剂，例如，甲酰胺，如50％(v/v)甲酰胺与0.1％牛血清白蛋白/0.1％聚蔗糖(Ficoll)/0.1％聚乙烯吡咯烷酮/50mM磷酸钠缓冲液，pH 6.5连同750mM氯化钠，75mM柠檬酸钠，42℃；或(3)在采用以下的溶液中过夜杂交：50％甲酰胺，5x SSC(0.75M NaCl，0.075M柠檬酸钠)，50mM磷酸钠(pH 6.8)，0.1％焦磷酸钠，5x登哈特溶液(Denhardt’s solution)，经声处理的鲑鱼精DNA(50μl/ml)，0.1％SDS，以及10％硫酸葡聚糖，42℃，其中在0.2x SSC(氯化钠/柠檬酸钠)中在42℃洗涤10分钟，之后在55℃在包含EDTA的0.1x SSC中进行10分钟的高严谨度洗涤。

[0105] 在此披露的“治疗化合物”是指向受试者给予的小分子、化学实体、核酸、核酸衍生物、肽、肽衍生物、天然存在的蛋白质、非天然存在的蛋白质、糖蛋白、以及类固醇，以治疗疾病或功能障碍或以其他方式影响个体健康。治疗化合物的非限制实例包括多肽(例如酶)、激素、细胞因子、抗体或抗体片段、抗体衍生物、影响代谢功能的药物、以及有机化合物，例如镇痛药、解热药、抗炎剂、抗生素、抗病毒化合物、抗真菌化合物、心血管药、影响肾功能、电解质代谢的药物、作用于中枢神经系统的药物、化疗化合物、受体激动剂和受体拮抗剂。治疗化合物包括例如细胞外分子，例如血清因子，包括但不限于血浆蛋白质，例如血清白蛋白、免疫球蛋白、载脂蛋白或转铁蛋白、或发现于红细胞或淋巴细胞表面上的蛋白质。因此，示例性的治疗化合物包括：小分子、化学实体、核酸、核酸衍生物、肽、肽衍生物、天然存在的蛋白质、非天然存在的蛋白质、肽-核酸(PNA)、钉肽、磷二酰胺吗啉基化合物、反义药、基于RNA的沉默药物、适体、糖蛋白、酶、激素、细胞因子、干扰素、生长因子、凝血因子、抗体、抗体片段、抗体衍生物、毒素轭合的抗体、代谢效应子、镇痛药、解热药、抗炎剂、抗生素、抗微生物剂、抗病毒剂、抗真菌药、肌肉骨骼药、心血管药、肾部药物、肺部药物、消化系统病药物、血液药物、泌尿道药物、代谢药物、肝部药物、神经系统药物、抗糖尿病药物、抗癌药物、治疗胃部病症的药物、治疗结肠病症的药物、治疗皮肤病症的药物、以及治疗淋巴病症的药物。如在此使用的术语“治疗化合物”具有与术语“药物”或“治疗剂”基本上相同的含义。

[0106] 如在此使用的，“治疗”是指临床干预，试图改变个体或正被处理的细胞的天然历程，并且可以在临床病理学历程之前或期间进行。治疗的令人希望的效果包括预防疾病或其病症或症状的发生或复发，缓解疾病的病症或症状，减少疾病的任何直接或间接病理学结果，降低疾病进展的速度，改善或减轻疾病状态，以及实现缓解或改进的预后。在一些实施例中，本发明的方法和组合物在试图延迟疾病或失调的发展中是有用的。

[0107] “维生素”是本领域中认可的术语，并且被定义为脂溶性或水溶性有机物质，其以微小的量在正常生长和身体活动中是至关重要的，并且天然地获得自植物和动物性食品或

补充物。

[0108] “维生素D”是脂溶性开环甾类化合物的一个组。存在若干形式(类维生素)的维生素D。两种主要形式是维生素D_2或钙化醇、以及维生素D_3或胆钙化醇。不带下标的维生素D是指D_2或D_3或两者。在人类中,维生素D可以作为胆钙化醇(维生素D_3)或钙化醇(维生素D_2)摄入。另外,当阳光暴露充足时,人类可以从胆固醇合成它。

[0109] “维生素D结合蛋白”或“DBP”是在所有哺乳动物中发现的天然循环的血清蛋白质,该蛋白质除了其他活性还可以结合至维生素D及其类似物并且运输它们到肝脏和肾脏部位,在那里维生素被修饰为其活性形式,并且在循环中它将维生素D维持为其不同形式,在人体中平均持续30天。DBP蛋白序列披露于SEQ ID NO:7中,并且对DBP蛋白序列编码的示例性核酸序列披露于SEQ ID NO:8中。DBP具有多重天然存在的亚型。示例性亚型可获得于公开序列数据库中(例如,登录号NM_001204306.1、NM_001204307.1、NM_000583.3、BC036003.1、M12654.1、X03178.1、AK223458、P_001191235.1、NP_000574.2、AAA61704.1、AAD13872.1、NP_001191236.1、AAA19662.2、I54269、P02774.1、EAX05645.1、AAH57228.1、AAA52173.1、AAB29423.1、AAD14249.1、AAD14250.1、和BAD97178.1)。

[0110] 本发明考虑了DBP变体以及同系物的使用,它们包含基本上维持DBP活性的保守或非保守氨基酸取代。DBP结合分子或功能性DBP变体可以使用已知的技术鉴别,并且使用已知的方法表征(布伊隆(Bouillon)等人,骨骼和矿物质研究杂志6(10):1051-7(1991),蒂加登(Teegarden)等人,分析生物化学(Anal.Biochemistry)199(2):293-299(1991),麦克劳德(McLeod)等人,生物化学杂志(J Biol Chem.)264(2):1260-7(1989),雷维尔(Revelle)等人,类固醇生物化学杂志(J.Steroid Biochem.)22:469-474(1985))前述参考文献通过引用以其全文结合于此。

[0111] 术语“水溶性”是指具有在水中一定的可检测程度的溶解性。用以检测和/或定量水溶解性的方法在本领域中是熟知的。示例性水溶性聚合物包括肽、聚(醚)、聚(胺)、聚(羧酸)等等。

[0112] 本发明提供了用于给予蛋白质、肽、其他生物剂、核酸和小分子药物的有效途径。本发明进一步提供了用于经由以下方式给药的有效途径:透皮、口服、肠胃外、皮下、皮内、静脉内、肌肉内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、病灶内、颅内注射、输注、吸入、经眼睛、局部、经直肠、经鼻、经颊、舌下、经阴道、或植入式储药器。

[0113] 此外,在此描述的本发明提供了用于维持靶标结合活性,即治疗化合物的药效动力学(PD)的组合物和方法。它进一步提供了用于改进如在此描述的治疗化合物的药物代谢动力学(PK)曲线的组合物和方法。本发明进一步提供了用于与使用相同给药途径的药物或使用不同给药途径但不含在此所述的本发明的药物的药物吸收谱相比而言改进的药物吸收谱的组合物和方法。本发明进一步提供了用于与使用相同给药途径的药物或使用不同给药途径但不含在此所述的本发明的药物的药物生物利用度谱相比而言改进的药物生物利用度谱的组合物和方法。本发明进一步提供了用于与使用相同给药途径的药物或使用不同给药途径但不含在此所述的本发明的药物的药物半衰期谱相比而言改进的药物半衰期谱的组合物和方法。

[0114] 本发明还提供了当与不含在此描述的本发明的药物相比时,更加成本有效的并且有利于患者的替代给药途径。

[0115] 本发明提供了用于使用充当载体的分子的组合物和方法，这些载体可以与活性治疗化合物轭合、融合、或配制，以用于改进药物的吸收、半衰期、生物利用度、或药物代谢动力学特性的目的。这些载体具有结合至体内天然DBP的特性。本发明的一方面提供了使用天然DBP以将载体-药物复合物从给药部位运输至循环血清。本发明的另一方面是天然DBP用于维持药物于循环中持续延长的时期。这可以防止它从体内排出，并且增加治疗化合物于体内的暴露，以实现更长的持续疗效。在本发明的另一方面中，在与未轭合的、未融合的或未配制的药物相比时，当与该载体轭合、融合或配制时需要更小剂量的药物。本发明的另一方面是当载体偶联至治疗化合物时使用载体以取代更大PEG化合物的功能。这可以改进轭合的、融合的或配制的化合物的药物代谢动力学曲线和功效。

[0116] 本发明提供了一种载体分子，它优选由一个或多个部分或组分组成。在一个实施例中，该载体包括靶向基团以及用于将靶向基团附接至治疗化合物的偶联基团。在另一个实施例中，该载体包括与靶向基团和治疗化合物连接的支架部分。该靶向基团是维生素D、维生素D类似物、维生素D相关代谢物、维生素D相关代谢物类似物、或另一种可以与维生素D结合蛋白(DBP)结合或相互作用的分子。在一个实施例中，该靶向基团是抗体或抗体衍生物、被设计为接合DBP的肽或其片段、衍生自噬菌体展示或其他针对DBP选择的肽文库的肽或其片段、结合DBP的核苷酸适体、被设计为结合DBP或衍生自针对DBP选择的化学文库的小分子或其片段。

[0117] 本发明的治疗化合物载体轭合物典型地具有单独附接至治疗化合物的大约1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10个靶向基团。在一个实施例中，本发明的载体轭合物将包括单独附接至治疗化合物的大约4个靶向基团，或单独附接至治疗化合物的大约3个靶向基团，或单独附接至治疗化合物的大约2个靶向基团，或附接至治疗化合物的大约1个靶向基团。附接至治疗化合物的各个靶向基团的结构可以是相同或不同的。在一个优选实施例中，一个或多个靶向基团稳定地在治疗蛋白质的N端处附接至治疗化合物。在另一个优选实施例中，一个或多个靶向基团稳定地在治疗蛋白质的C端处附接至治疗蛋白质。在其他优选实施例中，一个或多个靶向基团可以稳定地附接至治疗蛋白质上的其他位点。例如，治疗化合物载体轭合物可以包括附接至N端的靶向基团以及另外地附接至赖氨酸残基的靶向基团。在另一个实施例中，治疗化合物载体轭合物具有这样的靶向基团，该靶向基团经由一个修饰(例如，作为糖基化位点的部分的糖残基)或在肽的酰化位点上附接至治疗蛋白质或附接至磷酸化位点或者其他对于本领域技术人员而言熟悉的天然或非天然修饰。还考虑了使用以上所述位点的组合的附接位点。本发明的一个优选实施例包括这样的靶向基团，该靶向基团在治疗化合物上的一个特异性位点附接至治疗化合物。在另一个优选实施例中，在蛋白质上的附接位点可以是半胱氨酸、赖氨酸、N端或C端。

[0118] 在另一个实施例中，该支架是药学上可接受的载体。在优选实施例中，该支架是聚(乙二醇)、聚赖氨酸、聚乙烯亚胺、聚(丙二醇)、肽、血清白蛋白、硫氧还蛋白、免疫球蛋白、氨基酸、核酸、聚糖、包含反应接头的修饰基团、水溶性聚合物、小碳链接头、或另外的治疗部分。

[0119] 在一个实施例中，水溶性支架部分具有在水中一定的可检测程度的溶解性。用以检测和/或定量水溶解性的方法在本领域中是熟知的。示例性水溶性聚合物包括肽、聚(醚)、聚(胺)、聚(羧酸)等等。

[0120] 肽可以具有混合的序列或由单一氨基酸组成，例如聚(赖氨酸)。示例性多糖是聚(唾液酸)。示例性聚(醚)是聚(乙二醇)，例如m-PEG。聚(乙烯亚胺)是示例性的聚胺，并且聚(丙烯)酸是代表性聚(羧酸)。水溶性聚合物的聚合物骨架可以是聚(乙二醇)(即PEG)。然而，应理解其他相关聚合物也适用于在本发明的实践中使用，并且术语PEG或聚(乙二醇)的使用在此方面旨在是包含性的并非排外性的。术语PEG包括处于其任何形式中的聚(乙二醇)，包括烷氧基PEG、双官能团PEG、多臂PEG、叉状PEG、分支PEG、悬垂式PEG(即具有悬垂于聚合物骨架的一个或多个官能团的PEG或相关聚合物)、或其中具有可降解连键的PEG。聚合物骨架可以是线性或分支的。

[0121] 分支聚合物骨架在本领域中是众所周知的。典型地，分支聚合物具有中枢支核心部分以及多个连接至该中枢支核心的线性聚合物链。PEG通常以分支形式使用，这些分支形式可以通过将环氧乙烷添加至不同的多元醇例如甘油、季戊四醇和山梨醇中来制备。中枢支部分还可以衍生自若干氨基酸，例如赖氨酸。分支的聚(乙二醇)可以呈现在如R(-PEG-OH)$_m$的通常形式中，其中R表示核心部分，例如甘油或季戊四醇，并且m表示臂的数目。多臂PEG分子例如在美国专利号5,932,462中描述的那些(将其通过引用以其全文结合于此)还可以用作聚合物骨架。

[0122] 许多其他聚合物也适用于本发明。呈非肽的和水溶性的、具有从2至大约300个端点的聚合物骨架在本发明中是特别有用的。适合的聚合物的实例包括但不限于其他聚(亚烷基醇)，例如聚(丙二醇)(“PPG”)、乙二醇和丙二醇的共聚物等等，聚(氧乙基化多元醇)，聚(烯醇)，聚乙烯吡咯烷酮)，聚赖氨酸，聚乙烯亚胺，聚(羟丙基甲基丙烯酰胺)，聚(α-羟基酸)，聚(乙烯醇)，聚磷腈，聚噁唑啉，聚(N-丙烯酰吗啉)(例如描述于美国专利号5,629,384中的，将该专利通过引用以其全文结合于此)，以及其共聚物、三元共聚物和混合物。虽然聚合物骨架的每个链的分子量可以变化，典型地是处于大约100Da至大约100,000Da的范围内。

[0123] 在其他实施例中，支架部分可以是肽、血清白蛋白、硫氧还蛋白、免疫球蛋白、氨基酸、核酸、聚糖、包含反应接头的修饰基团、水溶性聚合物、小碳链接头、或另外的治疗化合物。在一个实施例中，支架部分对于人类和动物是非毒性的。在另一个实施例中，支架是内源性血清蛋白。在另一个实施例中，支架部分是水溶性聚合物。在另一个实施例中，支架是非天然存在的聚合物。在另一个实施例中，支架是通过共价附接至另外部分(例如，PEG、聚(丙二醇)、聚(天冬氨酸)、生物分子、治疗部分、或诊断部分)而被修饰的天然存在的部分。

[0124] 亲水聚合物如PEG的轭合在本领域中是已知的。在其最常见形式中，PEG是在具有羟基的各末端处终止的线性聚合物。HO—CH_2CH_2O--(CH_2CH_2O)$_n$--CH_2CH_2—OH，其中n典型地范围为从大约3至大约4000。在一个优选实施例中，PEG具有基本上均匀分散的分子量分布。在另一个优选实施例中，PEG是一种线性聚合物。在另一个优选实施例中，PEG是一种分支聚合物。

[0125] 许多末端功能化的或分支的衍生物以及不同大小在本领域中是已知的，并且是可商购的。通过举例方式，PEG或PEO的轭合可以使用在此描述的组合物和方法以及美国专利号7,803,777(德弗里斯(Defrees)等人)和4,179,337(戴维斯(Davis)等人)中描述的来进行，这些文献各自通过引用以其全文结合于此。

[0126] 在一些实施例中，更小的治疗化合物与更小的支架部分配对，并且更大的治疗化

合物与更大的支架部分配对。但是，应考虑到更小的治疗化合物可以与更大的支架部分配对，并且反之亦然。更小的治疗化合物被定义为具有1Da至10kDa的分子量。更大的治疗化合物被定义为具有10kDa至1000kDa的分子量。

[0127] 本发明的支架例如可以具有100道尔顿(Da.)、500Da.、1000Da.、2000Da.、5000Da.、10,000Da.、15,000Da.、20,000Da.、30,000Da.、40,000Da.或60,000Da.的分子量。在本发明的一个实施例中，“小”支架部分可以是在大约100Da.与20,000Da.之间在另一个实施例中，“大”支架部分可以是大于大约20,000Da.至大约200,000Da.。在优选实施例中，支架部分是在大约100Da.与200,000Da.之间。在更优选的实施例中，该支架部分是在大约100Da.与20,000Da.、200Da.与15,000Da.、300Da.与10,000Da.、400Da.与9,000Da.、500Da.与5,000Da.、600Da.与2,000Da.、1000Da.与200,000Da.、20,00Da.与200,000Da.、100,000与200,000Da.、5000Da.与100,000Da.、10,000Da.与80,000Da.、20,000Da.与60,000Da.、或20,000Da.与40,000Da之间。

[0128] 该载体分子的另一个组分优选包括偶联基团，该偶联基团用于共价将药物附接至支架或载体。本发明的偶联基团包括胺反应基团、硫醇反应基团、马来酰亚胺基团、硫醇基、醛基、NHS-酯基、卤代乙酰基、碘代乙酰基、溴代乙酰基、SMCC基团、磺基SMCC基团、碳二亚胺基团、以及双官能团交联剂(例如，NHS-马来酰亚胺基)、及其组合，或者其他本领域技术人员熟悉的偶联基团。本发明的偶联基团可以促成硫醇键、酰胺键、肟键、腙键、噻唑啉酮键，或采用环加成反应(还称为点击化学)以将载体偶联至治疗化合物。在另一个实施例中，该组合物优选包括附接至支架分子的偶联基团上的一种或多种治疗化合物的组合。

[0129] NHS基团为本领域技术人员所知是因为其在偶联至天然肽和蛋白质而不必在附接位点进行改造中是有用的。NHS基团允许附接至包含具有胺基的氨基酸(例如，赖氨酸残基)的大多数蛋白质和肽。NHS基团的采用允许在载体轭合位点的灵活性，因为蛋白质结构和反应时间可以影响轭合至治疗化合物的载体分子的附接位点和数目。通过举例方式，控制NHS-载体与治疗化合物的摩尔比，本领域技术人员可以在附接至治疗化合物的载体分子的数目上进行一些控制，由此如果希望的话允许多于一种载体轭合至给定治疗化合物上。

[0130] 将载体轭合至治疗化合物是通过使用相容溶液、缓冲液或溶剂将分子的溶液以特定摩尔比混合来实现的。例如，可以使用摩尔比为1:1、2:1、4:1、5:1、10:1、20:1、25:1、50:1、100:1、1000:1、或1:2、1:4、1:5、1:10、1:20、1:25、1:50、1:100或1:1000的载体与治疗化合物。在某些实施例中，可以使用摩尔比为1:1、2:1、4:1、5:1、10:1、20:1、25:1或1:2、1:4、1:5、1:10、1:20、1:25、1:50的载体与治疗化合物。在优选实施例中，可以使用摩尔比为1:1、2:1、4:1、5:1、10:1或1:2、1:4、1:5、1:10的载体与治疗化合物。通过改变比例，这可以导致不同数目的单独载体附接至治疗化合物，或可以有助于选择附接的特定位点。载体的附接还取决于pH、缓冲液、盐和温度，并且除了其他参数之外改变这些参数可以影响所附接载体的附接和数目以及反应的速度。例如，通过针对反应将pH选择为pH 6或该pH之下可以有助于选择性地将醛形式的载体轭合至治疗蛋白质或肽的N端。

[0131] 在某些实施例中，本发明提供了包括具有式I的那些的载体：

[0132] $B-L^1-S-L^2-L^3-C$

[0133] I

[0134] 其中：

[0135] B是一个选自以下的靶向基团：维生素D、维生素D类似物、维生素D相关代谢物、维生素D相关代谢物的类似物、结合DBP的肽、抗DBP抗体、抗DBP抗体衍生物、结合DBP的核苷酸适体、或结合DBP的基于碳的小分子；

[0136] S是一个包括以下的支架部分：聚(乙二醇)、聚赖氨酸、聚乙烯亚胺、聚(丙二醇)、肽、血清白蛋白、硫氧还蛋白、免疫球蛋白、氨基酸、核酸、聚糖、包含反应接头的修饰基团、聚乳酸、水溶性聚合物、小碳链接头、或另外的治疗化合物；

[0137] C是胺反应基团、硫醇反应基团、马来酰亚胺基团、硫醇基团、二硫化物基团、醛基、NHS-酯基、4-硝基苯基酯、酰基咪唑、卤代乙酰基、碘代乙酰基、溴代乙酰基、SMCC基团、磺基SMCC基团、碳二亚胺基团以及诸如NHS-马来酰亚胺基的双官能团交联剂，或其组合；

[0138] L^1和L^2是独立选自以下的接头：$-(CH_2)_n-$、-C(O)NH-、-HNC(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-O-、-S-S-、-S-、-S(O)-、$-S(O)_2-$以及-NH-；

[0139] L^3是$-(CH_2)_o-$；

[0140] n是一个0-3的整数；并且

[0141] o是一个0-3的整数。

[0142] 在优选实施例中，本发明提供了包括具有式I的那些的载体：

[0143] $B-L^1-S-L^2-L^3-C$

[0144] I

[0145] 其中：

[0146] B是靶向基团，选自维生素D、维生素D类似物、维生素D-相关代谢物、维生素D相关代谢物的类似物、或结合DBP的基于碳的小分子；

[0147] S是一个包括以下的支架部分：聚(乙二醇)、聚赖氨酸、聚(丙二醇)、肽、血清白蛋白、氨基酸、核酸、聚糖、聚乳酸、水溶性聚合物、或小碳链接头；

[0148] C是马来酰亚胺基团、硫醇基、二硫化物基团、醛基、NHS-酯基、碘代乙酰基、或溴代乙酰基；

[0149] L^1和L^2是独立选自以下的接头：$-(CH_2)_n-$、-C(O)NH-、-HNC(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-O-、-S-、和-NH-；

[0150] L^3是$-(CH_2)_o-$；

[0151] n是一个0-3的整数；并且

[0152] o是一个0-3的整数。

[0153] 在更优选的实施例中，本发明提供了包括具有式I的那些的载体：

[0154] $B-L^1-S-L^2-L^3-C$

[0155] I

[0156] 其中：

[0157] B是选自以下的靶向基团：维生素D、维生素D类似物、或维生素D相关代谢物；

[0158] S是一个包括以下的支架部分：聚(乙二醇)、聚赖氨酸或聚(丙二醇)；

[0159] C是马来酰亚胺基团、二硫化物基团、醛基、NHS-酯基或碘代乙酰基；

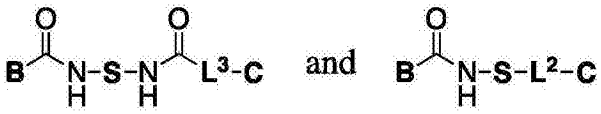
[0160] L^1和L^2是独立选自以下的接头：$-(CH_2)_n-$、-C(O)NH-、-HNC(O)-、-C(O)O-和-OC(O)-；

[0161] L^3是$-(CH_2)_o-$；

[0162] n是一个0-3的整数;并且

[0163] o是一个0-3的整数。

[0164] 在最优选的实施例中,本发明提供了包括具有式IIa和IIb的那些的载体:

[0165] 

IIa and IIb

[0166] 其中:

[0167] B是选自以下的靶向基团:维生素D、维生素D类似物、或维生素D相关代谢物;

[0168] S是一个包括以下的支架部分:聚(乙二醇)、或聚(丙二醇);并且

[0169] C是马来酰亚胺基团、二硫化物基团、醛基、NHS-酯基或碘代乙酰基;

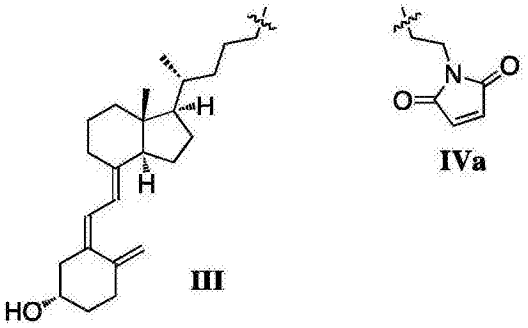
[0170] L^2是-$(CH_2)_n$-;

[0171] L^3是-$(CH_2)_o$-;

[0172] n是1;并且

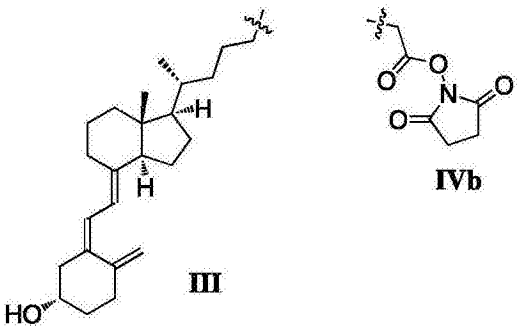
[0173] o是2。

[0174] 在某些最优选的具有式IIa的实施例中,B是由式III表示,S是聚(乙二醇)并且L^3-C是由式IVa表示。

[0175] 

III IVa

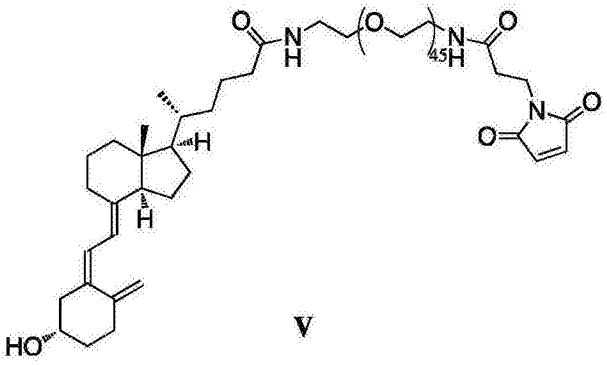
[0176] 在某些最优选的具有式IIb的实施例中,B是由式III表示,S是聚(乙二醇)并且L^2-C是由式IVb表示。

[0177] 

III IVb

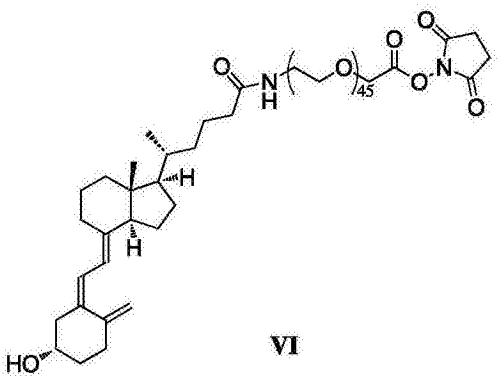
[0178] 在某些最优选的实施例中,S是在大约100Da.与200,000Da.之间。在其他最优选的实施例中,支架部分是在大约100Da.与20,000Da.、200Da.与15,000Da.、300Da.与10,000Da.、400Da.与9,000Da.、500Da.与5,000Da.、600Da.与2,000Da.、1000Da.与200,000Da.、5000Da.与100,000Da.、10,000Da.与80,000Da.、20,000Da.与60,000Da.、或20,000Da.与40,000Da.之间。

[0179] 在一个具体实施例中,本发明提供了由式V表示的载体。

[0180] 

V

[0181] 在另一个具体实施例中，本发明提供了由式VI表示的载体。

[0182] 

VI

[0183] 在某些实施例中，本发明提供了产生具有式I的载体的方法：

[0184] $B—L^1—S—L^2—L^3—C$

I

[0185] 包括使具有式Ia的化合物：

[0186] B-COOH

[0187] Ia

[0188] 与具有式Ib的化合物进行反应的步骤：

[0189] H_2N-S-L^2-L^3-C

[0190] Ib

[0191] 该反应是在酰胺偶联剂的存在下进行，

[0192] 其中B、S、C和L^2是如上所限定的，并且L^1是-C(O)NH-。

[0193] 本领域技术人员将认识到具有式Ib的化合物可以作为游离碱或适合的盐形式来使用。适合的盐形式包括但不限于TFA、HCl、HBr、MsOH、TfOH和AcOH。

[0194] 任何适合的酰胺偶联剂可以用于形成具有式I的化合物。适合的酰胺偶联剂包括但不限于2-氯甲基吡啶鎓碘化物、BOP、PyBOP、HBTU、HATU、DCC、EDCI、TBTU和T3P。在某些实施例中，单独使用酰胺偶联剂。在某些实施例中，酰胺偶联剂与共试剂例如HOBT或DMAP一起使用。在某些实施例中，酰胺偶联剂与碱例如三乙胺或二异丙基乙胺一起使用。在某些实施例中，酰胺偶联剂与共试剂(例如HOBT或DMAP)以及碱(例如三乙胺或二异丙基乙胺)两者一起使用。本领域技术人员将认识到可以使用HOBT或DMAP以外的共试剂。并且，本领域技术人员将认识到可以使用三乙胺或二异丙基乙胺以外的碱。

[0195] 在某些实施例中，具有式Ia的羧酸组分是通过用水解剂处理具有式Id的酯来产生：

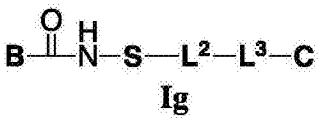
[0196] B-COOR

[0197] Id

[0198] 其中,B如上定义,并且R是C_1-C_6分支的或未分支的烷基。

[0199] 任何适合水解剂可以用于从具有式Id的化合物制备具有式Ia的化合物。

[0200] 在某些其他实施例中,本发明提供了产生具有式Ig的载体的方法:

[0201] 

Ig

[0202] 包括使具有式Ia的化合物:

[0203] B-COOH

[0204] Ia

[0205] 与具有式Ic的化合物进行反应的步骤:

[0206] H_2N-S-L^2-L^3-$COOR^1$

[0207] Ic

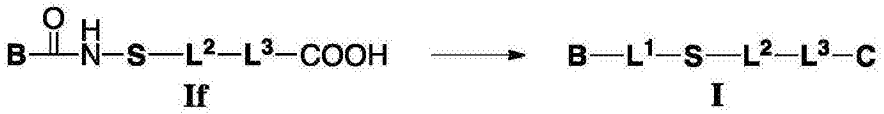
[0208] 该反应是在酰胺偶联剂的存在下进行,形成具有式Ie的化合物;

[0209] 将具有式Ie的酯水解为具有式If的羧酸;并且

[0210] 

Ie If

[0211] 将具有式If的羧酸转化为具有式I的活性酯;

[0212] 

If I

[0213] 其中B、S、C、R^1、L^2、L^3、n和o是如上所限定的,并且L^1是-C(O)NH-。

[0214] 本领域技术人员将认识到具有式Ic的化合物可以作为游离碱或适合的盐形式来使用。适合的盐形式包括但不限于TFA、HCl、HBr、MsOH、TfOH和AcOH。

[0215] 任何适合的酰胺偶联剂可以用于形成具有式Ie的化合物。适合的酰胺偶联剂包括但不限于2-氯甲基吡啶鎓碘化物、BOP、PyBOP、HBTU、HATU、DCC、EDCI、TBTU和T3P。在某些实施例中,单独使用酰胺偶联剂。在某些实施例中,酰胺偶联剂与共试剂例如HOBT或DMAP一起使用。在某些实施例中,酰胺偶联剂与碱例如三乙胺或二异丙基乙胺一起使用。在某些实施例中,酰胺偶联剂与共试剂(例如HOBT或DMAP)以及碱(例如三乙胺或二异丙基乙胺)两者一起使用。本领域技术人员将认识到可以使用HOBT或DMAP以外的共试剂。并且,本领域技术人员将认识到可以使用三乙胺或二异丙基乙胺以外的碱。

[0216] 在某些实施例中,具有式Ia的羧酸组分是通过用水解剂处理具有式Id的酯来产生:

[0217] B-COOR

[0218] Id

[0219] 其中,B如上定义,并且R是C_1-C_6分支的或未分支的烷基。

[0220] 任何适合水解剂可以用于从具有式Id的化合物制备具有式Ia的化合物。适合的水解剂包括但不限于氢氧化锂、氢氧化钠以及氢氧化钾。

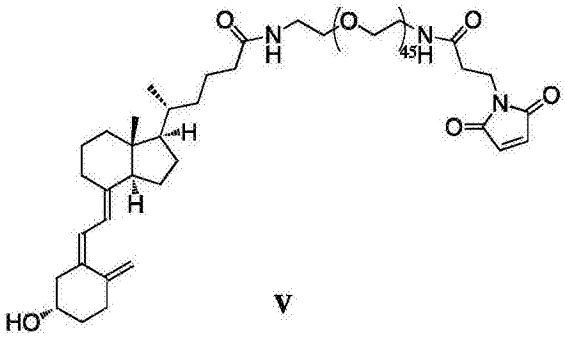
[0221] 任何适合的水解剂可以用于从具有式Ie的化合物制备具有式If的化合物。适合的水解剂包括但不限于氢氧化锂、氢氧化钠以及氢氧化钾。

[0222] 任何适合的离去基团可以在适合的偶联剂的存在下与具有式If的羧酸偶联，以形成具有式I的活性酯。适合的离去基团包括但不限于咪唑、HOBT、NHS和4-硝基酚。适合的偶联剂包括但不限于2-氯甲基吡啶鎓碘化物、BOP、PyBOP、HBTU、HATU、DCC、EDCI、TBTU和T3P。

[0223] 在一些实施例中，具有式I的活性酯是使用适合的离去基团和偶联剂的组合从具有式If的羧酸形成。

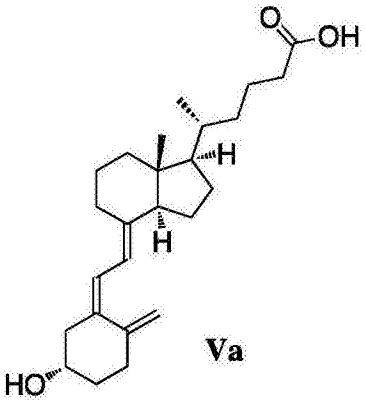
[0224] 在一些实施例中，具有式I的活性酯是使用产生离去基团并且还影响偶联反应的单一试剂从具有式If的羧酸形成。此类试剂包括但不限于1,1'-羰二咪唑、N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯、4-硝基苯基三氟醋酸盐以及HBTU。在一些实施例中，单独使用单一试剂。在某些实施例中，该单一试剂与酰基转移催化剂一起使用。此类酰基转移催化剂包括但不限于DMAP和吡啶。本领域技术人员将认识到可以使用另外的酰基转移催化剂。

[0225] 在一个具体实施例中，本发明提供了产生由式V表示的载体的方法：

[0226] 

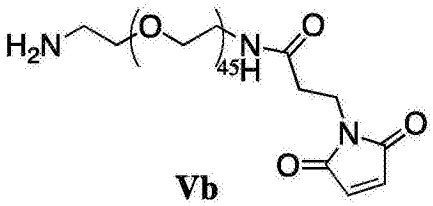
V

[0227] 包括使具有式Va的化合物：

[0228] 

Va

[0229] 与具有式Vb的化合物进行反应的步骤：

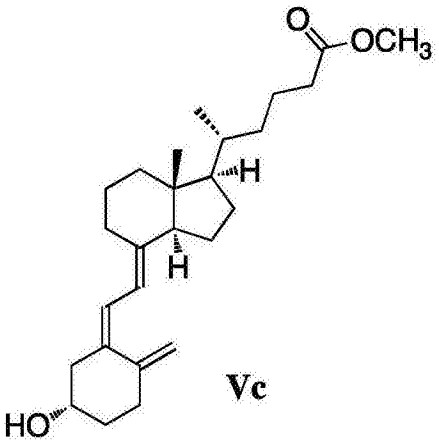
[0230] 

Vb

[0231] 该反应是在酰胺偶联剂的存在下进行。本领域技术人员将认识到具有式Vb的化合物可以作为游离碱或适合的盐形式来使用。适合的盐形式包括但不限于TFA、HCl、HBr、MsOH、TfOH和AcOH。

[0232] 任何适合的酰胺偶联剂可以用于形成具有式V的化合物。适合的酰胺偶联剂包括但不限于2-氯甲基吡啶鎓碘化物、BOP、PyBOP、HBTU、HATU、DCC、EDCI、TBTU和T3P。在某些实施例中，单独使用酰胺偶联剂。在某些实施例中，酰胺偶联剂与共试剂例如HOBT或DMAP一起使用。在某些实施例中，酰胺偶联剂与碱例如三乙胺或二异丙基乙胺一起使用。在某些实施例中，酰胺偶联剂与共试剂(例如HOBT或DMAP)以及碱(例如三乙胺或二异丙基乙胺)两者一起使用。本领域技术人员将认识到可以使用HOBT或DMAP以外的共试剂。并且，本领域技术人员将认识到可以使用三乙胺或二异丙基乙胺以外的碱。

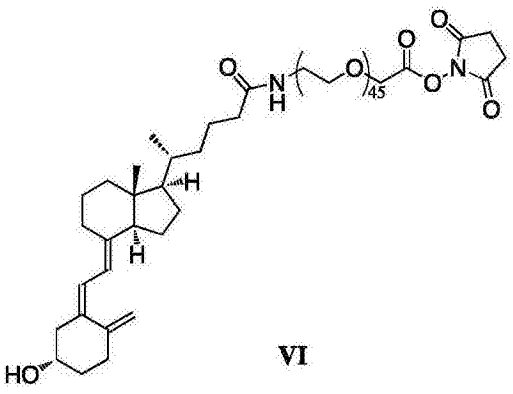
[0233] 在具体实施例中，具有式Va的羧酸组分是通过用水解剂处理具有式Vc的甲基酯来产生：

[0234] 

Vc

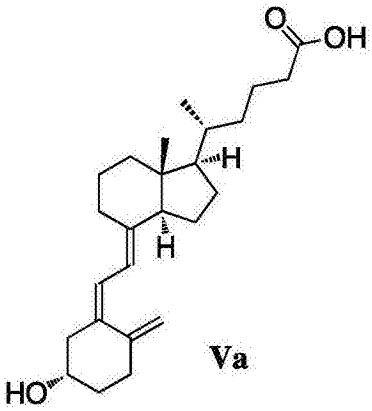
[0235] 任何适合的水解剂可以用于从具有式Vc的化合物制备具有式Va的化合物。适合的水解剂包括但不限于氢氧化锂、氢氧化钠以及氢氧化钾。

[0236] 在另一个具体实施例中，本发明提供了产生由式VI表示的载体的方法：

[0237] 

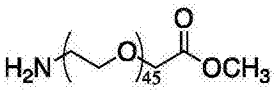
VI

[0238] 包括使具有式Va的化合物：

[0239] 

Va

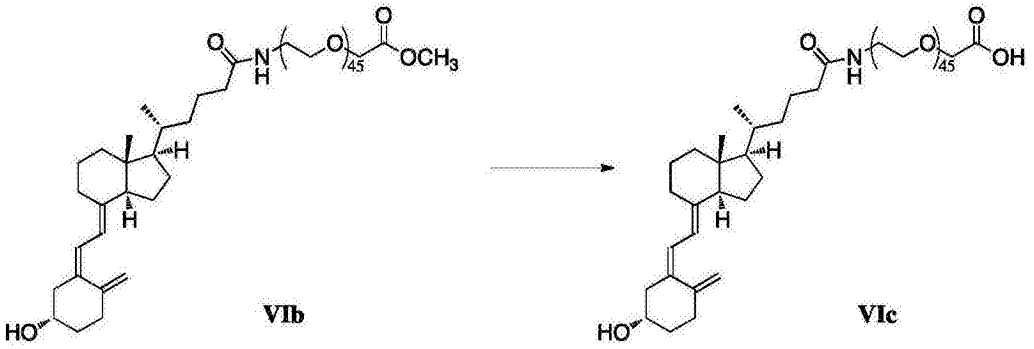
[0240] 与具有式VIa的化合物进行反应的步骤：

[0241] 

VIa

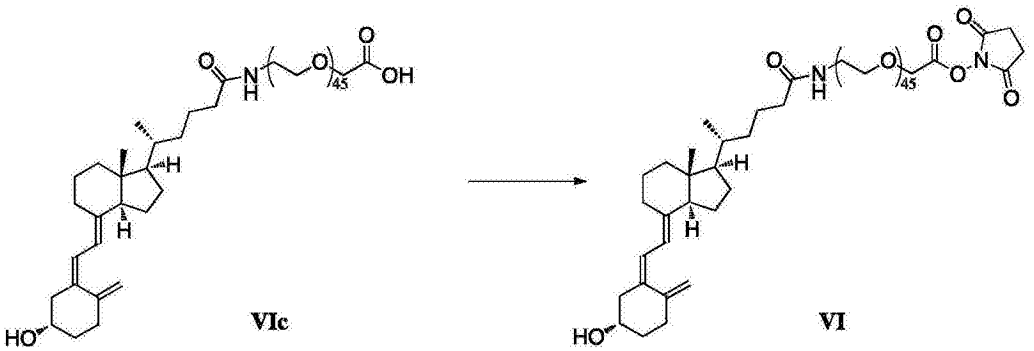
[0242] 该反应是在酰胺偶联剂的存在下进行，形成具有式VIb的化合物；

[0243] 将具有式VIb的酯水解为具有式VIc的羧酸；并且

[0244] 

VIb VIc

[0245] 将具有式VIc的羧酸转化为具有式VI的活性酯；

[0246] 

VIc VI

[0247] 本领域技术人员将认识到具有式VIa的化合物可以作为游离碱或适合的盐形式来使用。适合的盐形式包括但不限于TFA、HCl、HBr、MsOH、TfOH和AcOH。

[0248] 任何适合的酰胺偶联剂可以用于形成具有式VIb的化合物。适合的酰胺偶联剂包括但不限于2-氯甲基吡啶鎓碘化物、BOP、PyBOP、HBTU、HATU、DCC、EDCI、TBTU和T3P。在某些实施例中，单独使用酰胺偶联剂。在某些实施例中，酰胺偶联剂与共试剂例如HOBT或DMAP一起使用。在某些实施例中，酰胺偶联剂与碱例如三乙胺或二异丙基乙胺一起使用。在某些实施例中，酰胺偶联剂与共试剂(例如HOBT或DMAP)以及碱(例如三乙胺或二异丙基乙胺)两者一起使用。本领域技术人员将认识到可以使用HOBT或DMAP以外的共试剂。并且，本领域技术

人员将认识到可以使用三乙胺或二异丙基乙胺以外的碱。

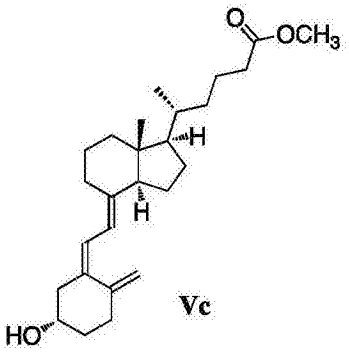
[0249] 任何适合的水解剂可以用于从具有式VIb的化合物制备具有式VIc的化合物。适合的水解剂包括但不限于氢氧化锂、氢氧化钠以及氢氧化钾。

[0250] NHS在适合的偶联剂的存在下与具有式VIc的羧酸偶联，以形成具有式VI的活性酯。适合的偶联剂包括但不限于2-氯甲基吡啶鎓碘化物、BOP、PyBOP、HBTU、HATU、DCC、EDCI、TBTU和T3P。

[0251] 在一些实施例中，具有式VI的活性酯是使用NHS和偶联剂的组合从具有式VIc的羧酸形成。

[0252] 在一些实施例中，具有式VI的活性酯是使用产生离去基团并且还影响偶联反应的单一试剂从具有式VIc的羧酸形成。此类试剂包括但不限于N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯。在一些实施例中，单独使用单一试剂。在某些实施例中，该单一试剂与酰基转移催化剂一起使用。此类酰基转移催化剂包括但不限于DMAP和吡啶。本领域技术人员将认识到可以使用另外的酰基转移催化剂。

[0253] 在具体实施例中，具有式Va的羧酸组分是通过用水解剂处理具有式Vc的甲基酯来产生：

[0254] 

Vc

[0255] 任何适合的水解剂可以用于从具有式Vc的化合物制备具有式Va的化合物。适合的水解剂包括但不限于氢氧化锂、氢氧化钠以及氢氧化钾。

[0256] 如果希望的话，具有不同分子量的治疗化合物载体轭合物可以使用凝胶过滤色谱和/或离子交换色谱来分离。凝胶过滤色谱可以用于基于它们不同的分子量(其中该区别基本上对应于靶向基团的平均分子量)分离不同的治疗化合物载体轭合物(例如，1-mer、2-mer、3-mer，等等，其中"1-mer"指示一个靶向基团分子/治疗化合物，"2-mer"指示附接至治疗化合物的两个靶向基团，等等)。

[0257] 适用于执行这种类型的分离的凝胶过滤柱包括可获得自安玛西亚公司(Amersham Biosciences)(皮斯卡塔韦(Piscataway)，新泽西州(N.J.))的Superdex和Sephadex柱。具体柱的选择将取决于所希望的分离范围。洗脱通常使用适合的缓冲液进行，例如磷酸盐、乙酸盐、或类似物。收集的部分可以通过多种不同方法分析，例如(i)针对蛋白质含量，在280nm的光密度(OD)，(ii)牛血清白蛋白(BSA)蛋白质分析，以及(iii)十二烷基硫酸钠聚丙酰胺凝胶电泳(SDS PAGE)。

[0258] 治疗化合物载体轭合物的分离还可以通过使用反相-高效液相色谱(RP-HPLC)C18柱(安玛西亚公司或Vydac)的反相色谱进行，或通过使用离子交换柱(例如可获得自安玛西亚公司的DEAE-或CM-琼脂糖离子交换柱)的离子交换色谱进行。所得到的纯化的组合物优

选基本上不含非靶向基团轭合的治疗化合物。此外，这些组合物优选基本上不含所有其他非共价附接的靶向基团。

[0259] 本发明提供了用于通过使用维生素D或其他DBP结合分子改进药物代谢动力学特性而使得药物更有效力的组合物和方法。在暴露于紫外线的皮肤上形成维生素D的天然途径依赖于与DBP的相互作用以将UV活化的维生素D带入循环中，在循环中它可以用于细胞过程(利普斯(Lips)，生物物理学与分子生物学进展(Prog.Biophys.Molec.Biol.)92:4-8(2006)；德卢卡(DeLuca)，营养评论(Nutr.Rev.)66(增刊2):S73-S78(2008))。DBP迅速并有效地将维生素D带入循环。DBP还将活性维生素D保持在循环中持续平均30天(库克(Cooke)，N.E.，和J.G.哈达德(Haddad)，1989.内分泌学评论(Endocr.Rev.)10:294-307；哈达德(Haddad)，J.G.等人1993.临床研究杂志(J.Clin.Invest.)91:2552-2555；哈达德，J.G.1995.类固醇生物化学与分子生物学杂志(J.Steroid Biochem.Molec.Biol.)53:579-582)。本发明首次提供了使用DBP来更有效地将治疗化合物递送至体内。在一个实施例中，治疗化合物与载体共价地连接或融合。在另一个实施例中，治疗化合物与载体配制在一起而不是共价连接。在一个实施例中，载体与DBP相互作用，以用于将药物更有效地从给药部位携带入体内的目的。在另一个实施例中，载体将药物保持在循环中持续延长的时期。

[0260] 在一个实施例中，该载体包括靶向基团以及用于将靶向基团附接至治疗化合物的偶联基团。在另一个实施例中，该载体包括与靶向基团和治疗化合物连接的支架部分。该靶向基团是维生素D、维生素D类似物、维生素D相关代谢物、维生素D相关代谢物类似物、或另一种可以与维生素D结合蛋白(DBP)结合或相互作用的分子。在一个实施例中，该靶向基团是抗体或抗体衍生物、被设计为接合DBP的肽或其片段、衍生自噬菌体展示或其他针对DBP选择的肽文库的肽或其片段、结合DBP的核苷酸适体、被设计为结合DBP或衍生自针对DBP选择的化学文库的小分子或其片段、或者可以结合如在此披露的DBP的部分。在另一个实施例中，载体包括DBP本身或DBP的衍生物。

[0261] 维生素D是脂溶性开环甾类化合物的一个组。存在若干形式(类维生素)的维生素D。两个主要形式是维生素D_2或钙化醇、以及维生素D_3或胆钙化醇，不带下标的维生素D是指D_2或D_3或两者。在人类中，维生素D可以作为胆钙化醇(维生素D_3)或钙化醇(维生素D_2)摄入。另外，当阳光暴露充足时，人类可以从胆固醇合成它。

[0262] 维生素D由在不同器官中发现的酶进一步修饰为还能够结合DBP的“维生素D代谢物”的一个家族。例如，在肝脏中维生素D转化为骨化二醇(25OH羟基-维生素D)。骨化二醇的部分被肾脏转化为骨化三醇(1,25(OH)$_2$二羟基-维生素D)。在肾脏的外部骨化二醇被转化为骨化三醇，用于其他目的。在体内还发现24,25(OH)$_2$二羟基-维生素D。因此，在一个实施例中，靶向基团是维生素D代谢物。

[0263] 在另一个实施例中，靶向基团是“维生素D类似物”。这些这些化合物是基于维生素D结构，并且保留维生素D的部分功能。和维生素D一样，它们与相同的蛋白质中的一些(例如，DBP和维生素D受体)相互作用，虽然是在不同的亲和力下。示例性类似物包括：OCT，一种化学合成的1,25(OH)$_2$D3类似物，其中一个氧原子在侧链中的22位置处(亚伯(Abe)等人，FEBS快报226:58-62(1987))；双性(Gemini)维生素D类似物，1α,25-二羟基-20R-21(3-羟基-3-氚甲基-4,4,4-三氚丁基)-23-炔-26,27-六氟-胆钙化醇(BXL0124)(索(So)等人，分子药理学(Mol Pharmacol.)79(3):360-7(2011))；帕立骨化醇，一种维生素D_2衍生的甾醇，

缺少在所有天然维生素D代谢物中发现的碳-19亚甲基基团(斯拉托普斯凯(Slatopolsky)等人,美国肾病杂志(Am J.Kidney Dis.)26:852(1995));度骨化醇(1α-羟基维生素D_2),像阿法骨化醇(1α-羟基维生素D_3),是一种药物前体,它在肝脏中被羟基化为1α,25(OH)$_2$D2。不像阿法骨化醇,度骨化醇还被24-羟基化而产生1α,24(S)-(OH)$_2$D2(克努森(Knutson)等人,生物化学药理学(Biochem Pharmacol)53:829(1997));二氢速甾醇$_2$(DHT_2),在体内被羟基化为25(OH)DHT_2和1,25(OH)$_2DHT_2$(麦金太(McIntyre)等人,国际肾脏(Kidney Int),55:500(1999))。还参见厄尔本(Erben)和木索罗卡尔(Musculoskel),神经元相互作用(Neuron Interact),2(1):59-69(2001)以及斯塔登(Steddon)等人肾脏病与透析肾移植(Nephrol.Dial.Transplant),16(10):1965-1967(2001)。前述参考文件通过引用以其全文结合。

[0264] 在另一个实施例中,该载体进一步包括与靶向基团和治疗化合物共价附接的药学上可接受的支架部分。本发明的载体的支架部分不是必需参与而是可以贡献于治疗化合物的功能或改进治疗化合物的药物代谢动力学特性。本发明的支架基本上不会干扰靶向基团与DBP的结合。同样,本发明的支架基本上不会干扰治疗化合物的结构或功能。支架部分的长度取决于靶向基团和治疗化合物的性质。本领域的技术人员将认识到原子的不同组合基于不同键之间的已知距离提供分子的可变长度(莫里森(Morrison)和博伊德(Boyd),有机化学(Organic Chemistry),第3版,阿林(Allyn)和培根(Bacon)公司,波士顿(Boston),马萨诸塞州(Mass.)(1977),通过引用结合于此)。本发明考虑的其他支架包括肽接头、蛋白质接头(例如人血清白蛋白)、抗体或其片段、核酸接头、小碳链接头、氧或氮散布的碳接头,还考虑到这些实例的组合。

[0265] 在其他实施例中,肽已经被选择作为结合DBP的靶向基团。针对DBP结合肽筛选肽或蛋白质文库的方法在本领域中是已知的。在一个优选实施例中,使用了鉴定DBP结合肽的双杂交方法。在另一个优选实施例中,使用了针对DBP结合的体外筛选。该靶向肽可以进而与一种药物共价附接或可替代地配制。在一个优选实施例中,使用了支架部分。在另一个实施例中,该靶向基团是因为其结合DBP而被选择的一种适体。所述适体可以进而通过支架与一种药物共价附接或配制,或直接与该药物融合。

[0266] 在一个实施例中,该药物是DNA分子、RNA分子、适体(单链或双链)、DNA或RNA寡核苷酸、呈线性或环状的更大的DNA分子、用于RNA干扰的寡核苷酸(RNAi)、DNA的变体(例如DNA/RNA杂交分子的取代)、合成的DNA样分子(例如PNA或其他核酸衍生物分子)(参见WO 07/035922,通过引用以其全文结合于此)。在另一个实施例中,治疗化合物是由抗核酸酶的DNA或RNA寡核苷酸组成。在一个优选实施例中,抗核酸酶DNA寡核苷酸是吗啉基化合物(Morpholinos)(即,核酸的磷二酰胺类似物,以一种序列特异性方式结合至核酸,AVI生物制药公司,巴索(Bothell),华盛顿州(WA))。

[0267] 在另一个实施例中,该药物是小分子或化学实体。在另一个实施例中,该药物是肽或肽的衍生物(例如,PNA)。在另一个实施例中,该药物是包括多肽的全部或部分的蛋白质,不论是全长还是片段或截短形式,无论PEG化、糖基化还是以其他方式共价或非共价修饰或留置未修饰。

[0268] 治疗化合物包括蛋白质、肽、糖蛋白、糖肽、糖脂类、多糖类、低聚糖、核酸等等。示例性的多肽包括生长因子,例如肝细胞生长因子(HGF)、神经生长因子(NGF)、表皮生长因子

(EGF)、成纤维细胞生长因子(包括FGF21)、凝血因子，激素，例如生长激素、促卵泡激素(FSH)，细胞因子，干扰素，肿瘤坏死因子，酶，骨形态发生蛋白，神经营养素，以及生长分化因子。本发明的组合物和方法还包括靶合的上述蛋白质、糖蛋白、小分子、激素、生长因子、以及其他在患者或受试者中发现的分子的激动剂、拮抗剂或其他效应子。

[0269] 治疗肽也在本发明的范围之内。术语肽意为包括一系列氨基酸。在本发明的肽中的氨基酸可以是天然存在的或非天然存在的。本发明的肽可以经化学或生物合成，并且可以包括富含半胱氨酸的肽、环状肽、钉肽、包括D-或L-氨基酸的肽及其混合物、模拟肽、肽-核酸(PNA)、及其组合。示例性实施例包括AIDS疫苗，过敏症疫苗，抗炎肽，抗整合素肽，抗TCR疫苗，抗过敏肽，抗癌肽，抗真菌肽，抗细菌肽，抗风湿肽，抗凝血酶肽，抗病毒肽，G蛋白偶联受体(GPCR)配体以及相关肽(例如分泌素家族)，CGRP类似物，GPCR拮抗剂，CMV肽，钙蛋白酶抑制剂，胶原酶抑制剂，DAP抑制剂，防御素，透析寡肽，增强蛋白，内啡肽，内啡肽拮抗剂，纤连蛋白抑制剂，胃泌素拮抗剂，胃饥饿素，胰高血糖素拮抗剂，戈那瑞林类似物，生长因子肽，下丘脑激素，垂体激素，控制肠道功能和食欲的肽，促炎脂肪组织产物(proinflammatory adipose tissue product)，刺激干细胞扩增的肽，促炎肽，天然产物，单纯性疱疹疫苗，肝素结合肽，乙型肝炎疫苗，免疫调节肽，流感疫苗，LHRH拮抗剂，阿片样肽衍生物，MMP抑制剂，MUC-1疫苗，疟疾疫苗，黑色素瘤疫苗，脑膜炎疫苗，神经肽，阿片样肽，成骨生长肽，骨质疏松症肽，乳头瘤病毒疫苗，前列腺癌疫苗，RGD肽，RSV疫苗，T细胞受体肽等等。本发明考虑了它的可以通过由在此所述的方法进行的进一步修饰被改进为临床产品的合成类似物。本领域的技术人员将认识到许多其他商业上重要的可经受在此所述的修饰的肽来提供增加的半衰期、作用持续时间、吸收和/或生物利用度。

[0270] 还考虑在此处描述的实施例范围之内的是分支的、或具有或不具有分支的环状的肽。环状的、分支的以及分支的环状肽来自于翻译后天然过程，并且也可以通过适合的合成方法制得。在一些实施例中，在此描述的任何肽产物包括上述肽类似物，上述肽类似物进而共价附接至烷基-糖苷表面活性剂部分。

[0271] 还考虑在此处呈现的实施例范围之内的是在一个适合的位置处被此处要求的类似物的修饰取代的肽链。例如，酰化是在接头氨基酸上，例如，在赖氨酸的ε-位置，用脂肪酸进行，这些脂肪酸例如辛酸、癸酸、十二酸、十四酸、十六酸、十八酸、3-苯基丙酸等等，或用饱和或不饱和的烷基链进行(张(Zhang)，L.和布拉吉(Bulaj)，G.(2012)当前医药化学(Curr Med Chem)19:1602-1618，通过引用以其全文结合于此)。

[0272] 还考虑在此处呈现的实施例范围之内的是包括天然和非天然氨基酸或天然氨基酸类似物的肽链。如在此使用的，肽和/或蛋白质“类似物”包括基于天然氨基酸的非天然氨基酸，例如酪氨酸类似物，包括对位取代的酪氨酸、邻位取代的酪氨酸、以及间位取代的酪氨酸，其中在酪氨酸上的取代基包括乙酰基、苯甲酰基、氨基、肼、羟基胺、硫醇基、羧基、甲基、异丙基、C2-C20直链或分支烃、饱和或非饱和的烃、O-甲基、聚醚基团、卤素、硝基等等。Tyr类似物的实例包括2,4-二甲基-酪氨酸(Dmt)、2,4-二乙基-酪氨酸、O-4-烯丙基-酪氨酸、4-丙基-酪氨酸、Ca-甲基-酪氨酸等等。赖氨酸类似物的实例包括鸟氨酸(Orn)、同型赖氨酸(homo-lysine)、Ca-甲基-赖氨酸(CMeLys)等等。苯丙氨酸类似物的实例包括但不限于对位取代的苯丙氨酸，其中取代基包括甲氧基，C1-C20烷基，例如甲基、烯丙基、乙酰基等等。具体实例包括但不限于2,4,6-三甲基-L-苯丙氨酸(Tmp)、O-甲基-酪氨酸、3-(2-萘基)

丙氨酸(Nal(2))、3-(1-萘基)丙氨酸(Nal(1))、3-甲基-苯丙氨酸、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸(Tic)、氟化苯丙氨酸、异丙基-苯丙氨酸、对-叠氮基-苯丙氨酸、对-酰基-苯丙氨酸、对-苯甲酰基-苯丙氨酸、对-碘代-苯丙氨酸、对-溴代苯丙氨酸、对-氨基-苯丙氨酸、以及异丙基-苯丙氨酸、等等。

[0273] 还考虑在此处呈现的实施例范围之内的是包含本领域已知的非标准或非天然氨基酸的肽链,这些氨基酸例如C-α-二取代的氨基酸,如Aib、Ca-二乙基甘氨酸(Deg)、氨基环戊烷-1-羧酸(Ac4c)、氨基环戊烷-1-羧酸(Ac5c)等等。此类氨基酸频繁地导致限制的结构,常常偏置为朝着α螺旋结构(考尔(Kaul),R.和巴拉拉姆(Balaram),P.(1999)生物有机医学化学(Bioorg Med Chem)7:105-117,通过引用以其全文结合于此)。此类在类似物设计中有用的非天然氨基酸的另外实例是同型精氨酸(Har)等等。在某些情况下还原型酰胺键的取代导致改进的保护而免于酶破坏或改变受体结合。通过举例的方式,将残基之间的还原型酰胺键(指定为Tic-F[CH2-NH]ˆ-Phe)并入Tic-Phe二肽单元会降低酶降解。

[0274] 还考虑在此处呈现的实施例范围之内的是在氨基或羧基末端处的修饰可以可任选地引入在此的肽或蛋白质中(内斯特(Nestor),J.J.,Jr.(2009)当前医药化学(Current Medicinal Chemistry)16:4399-4418)。例如,在此的肽或蛋白质可以在N末端上截短或酰化(古尔莱(Gourlet),P.,等人(1998)欧洲药理学杂志(Eur J Pharmacol)354:105-1 1 1,戈兹(Gozes),I.和弗曼(Furman),S.(2003)当前药物设计(Curr Pharm Des)9:483-494),通过引用将其内容结合于此)。当被此处描述的修饰(例如,长链烷基糖苷)取代时,对肽或蛋白质的N末端的其他修饰(例如D-氨基酸(如D-Phe)的缺失、或掺入)还可以给出有力的且长效的激动剂或拮抗剂。此类激动剂和拮抗剂还具有商业效用,并且是在此处描述的考虑实施例的范围之内。前述参考文件以其全文结合在此。

[0275] 还考虑在此处描述的实施例范围之内的是与治疗化合物类似物共价附接、融合或配制的载体,其中天然治疗化合物是通过以下作用修饰的:乙酰化、酰化、PEG化、ADP-核糖基化、酰胺化、脂质或脂质衍生物的共价附接、磷脂酰肌醇的共价附接、交联、环化、二硫键形成、脱甲基、半胱氨酸共价交联形成的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、γ-羧基化、糖基化、GPI锚形成、羟基化、碘化、甲基化、十四酰化、氧化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊烯化、外消旋化、糖基化、脂质附接、硫酸化、谷氨酸残基的γ-羧基化、羟基化和ADP-核糖基化、硒化(selenoylation)、硫酸化、转运RNA介导的将氨基酸添加至蛋白质(例如精氨酰化(arginylation))、以及泛素化。参见,例如(内斯特,J.J.,Jr.(2007)综合医药化学(Comprehensive Medicinal Chemistry)II 2:573-601,内斯特,J.J.,Jr.(2009)当前医药化学(Current Medicinal Chemistry)16:4399-4418,克赖顿(Creighton),T.E.(1993,沃尔德(Wold),F.(1983)蛋白质的翻译后共价修饰(Posttranslational Covalent Modification of Proteins)1-12,塞夫特(Seifter),S.和昂格拉尔(Englard),S.(1990)酶学方法(Methods Enzymol)182:626-646,拉坦(Rattan),S.I.,等人(1992)纽约科学学术年报(Ann N Y Acad Sci)663:48-62)。前述参考文件通过引用以其全文结合。

[0276] 糖基化的治疗肽可以使用常规的Fmoc化学和固相肽合成技术(例如,在树脂上)来制备,其中所希望的受保护的糖基氨基酸是在肽合成之前制备,并且进而在肽合成期间在希望的位置处被引入肽链中。因此,治疗肽聚合物轭合物可以在体外轭合。糖基化可以在去保护之前进行。氨基酸糖苷的制备描述于美国专利号5,767,254、WO 2005/097158、以及多

瑞斯(Doores),K.,等人,化学通讯(Chem.Commun.),1401-1403,2006中,将这些文献通过引用以其全文结合于此。例如,丝氨酸和苏氨酸残基的α和β选择性糖基化是使用柯尼希斯-克诺尔反应(Koenigs-Knorr reaction)和勒米厄(Lemieux)原位正位异构化方法采用希夫碱中间体进行的。希夫碱糖苷的去保护进而是使用温和的酸性条件或氢解作用进行的。包含糖基化治疗肽轭合物的组合物是通过逐步固相肽合成制得的,该逐步固相肽合成涉及:使生长肽链与受保护的氨基酸以逐步方式进行接触(其中受保护的氨基酸中的至少一个被糖基化)、之后为水溶性聚合物轭合。此类组合物可以具有纯度为至少95%、至少97%、或至少98%的单一种类的糖基化和轭合的治疗肽。

[0277] 可以用于在此处定义和/或披露的治疗肽的一个或多个氨基酸残基处被引入的单糖包括葡萄糖(右旋糖)、果糖、半乳糖、以及核糖。适合使用的另外的单糖包括甘油醛、二羟丙酮、赤藓糖、苏糖、赤藓酮糖、阿拉伯糖、来苏糖、木糖、核酮糖、木酮糖、阿洛糖、阿卓糖、甘露糖、N-乙酰神经氨酸、海藻糖、N-乙酰半乳糖胺、和N-乙酰葡糖胺、以及其他。用于修饰治疗肽、此处定义和/或披露的治疗肽的一个或多个氨基酸残基的糖苷,例如单-、二-、和三糖,包括蔗糖、乳糖、麦芽糖、海藻糖、蜜二糖、以及纤维二糖等等。三糖包括阿卡波糖、棉子糖、以及松三糖。

[0278] 在本发明的另外实施例中,在此定义和/或披露的治疗化合物可以经化学偶联至生物素。该生物素/治疗化合物可以进而结合至抗生物素蛋白。

[0279] 还在本发明的范围之内的是呈抗体的多肽。术语抗体意为包括单克隆抗体、多克隆抗体、毒素轭合的抗体、人源化抗体、抗体片段(例如,Fc结构域)、Fab片段、单链抗体、双-或多-特异性抗体、美洲驼抗体(Llama antibody)、纳米抗体、双体、Fv、Fab、F(ab')2、Fab'、scFv、scFv-Fc等等。还包括在该术语中的是抗体-融合蛋白,例如Ig嵌合体。优选的抗体包括人源化或全人单克隆抗体或其片段。

[0280] 术语"抗体"和"免疫球蛋白"在最广泛意义上可以互换使用,并且包括单克隆抗体(例如,全长或完整的单克隆抗体)、多克隆抗体、单价抗体、、多价抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体,只要它们展现希望的生物学活性),并且还可以包括某些抗体片段(如在此更详细描述的)。抗体可以是嵌合的、人的、人源化的和/或亲和性成熟的。

[0281] 在此可互换使用术语"全长抗体"、"完整抗体"和"整个抗体"以指代处于其基本上完整形式的抗体,而不是如下定义的抗体片段。这些术语特别指代具有包含Fc区的重链的抗体。"抗体片段"包括完整抗体的一部分,优选包括其抗原结合区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')2、和Fv片段;双体;线性抗体;单链抗体分子;以及从抗体片段形成的多特异性抗体。如在此使用的术语"单克隆抗体"是指获得自基本上均一的抗体的群体的抗体,即包括该群体的单独抗体是相同的,除了可能的突变,例如天然存在的突变,可能以较小的量存在。因此,修饰语"单克隆"指示抗体的特征,而并不是离散抗体的混合物。

[0282] 在某些实施例中,这样的单克隆抗体典型地包括含有结合靶标的多肽序列的抗体,其中该结合靶标的多肽序列是通过以下过程获得:该过程包括从多个多肽序列中选择单一靶标结合多肽序列。例如,选择过程可以是从多个克隆(例如,杂交瘤克隆,噬菌体克隆,或重组DNA克隆的库)中选择独特的克隆。应理解,所选择的靶标结合序列可以进一步改变为例如改进对于靶标的亲和力、使得靶标结合序列人源化、改进它在细胞培养物中的生产、降低它在体内的免疫原性、产生多特异性抗体等,并且应理解包含所改变的靶标结合序

列的抗体也是本发明的单克隆抗体。与典型地包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制品相比，单克隆抗体制品的每个单克隆抗体是针对抗原上单个决定簇。除了它们的特异性之外，单克隆抗体制品还在它们典型地不被其他免疫球蛋白污染方面是有优势的。

[0283] 特异性地结合至抗原的抗体具有针对该抗原的高亲和力。抗体亲和力可以通过解离常数(Kd)来测量。在某些实施例中，在此提供的抗体具有以下解离常数(Kd)：≦100nM、≦10nM、≦1nM、≦0.1nM、≦0.01nM、或≦0.001nM(例如，10-8M或更小，例如从10-8M至10-13M，例如从10-9M至10-13M)。

[0284] 在一个实施例中，Kd是通过放射标记的抗原结合测定(RIA)来测量，该测定是用感兴趣抗体的Fab形式以及它的抗原来进行，如以下测定所述。Fab针对抗原的溶液结合亲和力是通过在滴定序列的未标记抗原的存在下，用最小浓度的(125I)-标记抗原平衡Fab，然后将结合的抗原用抗-Fab抗体包被的板进行捕获来测量的(参见，例如，Chen等人，分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)293:865-881(1999))。为了确立用于测定的条件，在50mM碳酸钠(pH 9.6)中，将MICROTITER®多孔板(赛默飞世尔(Thermo Scientific))用5μg/ml的捕获型抗-Fab抗体(卡佩尔实验室(Cappel Labs))包被过夜，并且随后在室温(大约23℃)用PBS中的2%(w/v)牛血清白蛋白封闭持续两至五个小时。在一个非吸附性板(Nunc#269620)中，将100μM或26μM[125I]-抗原与感兴趣Fab的连续稀释物混合(例如，与Presta等人，癌症研究(Cancer Res.)57:4593-4599(1997)中，抗-VEGF抗体，Fab-12的评估一致)。然后将感兴趣Fab孵育过夜；然而，该孵育可以持续更长的时期(例如，大约65小时)，以确保达到平衡。此后，将化合物转移至捕获板，以用于在室温下孵育(例如，持续一个小时)。然后将该溶液移除，并且将板用PBS中的0.1%聚山梨醇酯20(吐温-20®)洗涤八次。当板已经干燥时，添加150μl/孔的闪烁材料(MICROSCINT-20™；惠普公司(Packard))，并且将板在TOPCOUNT™伽马计数仪(惠普公司(Packard))上计数十分钟。将给出小于或低于20%的最大结合率的每个Fab的浓度选择用于竞争性结合测定。

[0285] 根据另一个实施例，Kd是在25℃使用表面等离子体共振测定来测量，采用了BIACORE®-2000或BIACORE®-3000(BIAcore公司，皮斯卡塔韦(Piscataway)，新泽西州(N.J.))，采用例如为大约10个响应单位(RU)的固定化抗原CM5芯片。简而言之，根据供应商说明书，将羧甲基化葡聚糖生物传感器芯片(CM5，BIACORE公司)用N-乙基-N′-(3-二甲基氨丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)进行活化。将抗原用pH 4.8的10mM乙酸钠稀释至5μg/ml(大约0.2μM)，之后以5μl/分钟的流速注入，以实现偶联蛋白质的大约10个响应单位(RU)。在注入抗原之后，将1M乙醇胺注入以封闭未反应的基团。对于动力学测量，在25℃，将在具有0.05%聚山梨醇酯20(吐温-20™)表面活性剂(PBST)的PBS中的Fab的双倍的连续稀释物(0.78nM至500nM)以大约25μl/min的流速注入。缔合速率(kon)和解离速率(koff)是使用简单的一对一朗缪尔结合模型(BIACORE®评估软件版本3.2)通过同时拟合缔合与解离传感图来计算。平衡解离常数(Kd)计算为比率koff/kon，参见例如陈(Chen)等人，分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)293:865-881(1999)。如果通过以上表面等离子体共振测定的缔合速率(on-rate)超过106M-1s-1，则缔合速率可以通过使用荧光淬灭技术来确定，该技术在增加的抗原浓度(如光谱仪例如截流配置的分光光度计(阿维夫仪器)或具有搅拌吸收池的8000系列SLM-AMINCO™分光光度计测量的)的存在下，在25℃测量

PBS(pH 7.2)中的20nM抗-抗原抗体(Fab形式)的荧光发射强度(激发＝295nm;发射＝340nm,16nm带通)的增加或减少。其他用于将靶标抗原偶联至芯片表面的化学方法(例如,链霉亲和素/生物素,疏水作用、或二硫化物化学法)也易于获得,而代替上述胺偶联方法(CM5芯片),如将由本领域技术人员理解的。

[0286] 修饰语"单克隆"指示当获得自基本上均一的抗体群体的抗体的特征,并且不应理解为要求通过任何具体方法产生抗体。例如,依据本发明待使用的单克隆抗体可以是通过多种技术制得,包括例如杂交瘤方法(例如,科勒(Kohler)等人,自然(Nature),256:495(1975);哈洛(Harlow)等人,抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual),(冷泉港实验室出版社,第二版1988);哈默林(Hammerling)等人,在:单克隆抗体和T细胞杂交瘤(Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas)563-681(爱思唯尔出版公司(Elsevier),纽约州(N.Y.),1981)),重组DNA方法(参见,例如美国专利号4,816,567),噬菌体展示技术(参见,例如格拉克森(Clackson)等人,自然(Nature),352:624-628(1991);马克思(Marks)等人,分子生物学杂志(J.Mol.Biol),222:581-597(1992);西度(Sidhu)等人,分子生物学杂志(J.Mol.Biol),338(2):299-310(2004);李(Lee)等人,分子生物学杂志(J.Mol.Biol),340(5):1073-1093(2004);费卢斯(Fellouse),美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)101(34):12467-12472(2004);以及李(Lee)等人,免疫学方法杂志(J.Immunol.Methods)284(1-2):119-132(2004),以及用于在具有人类免疫球蛋白基因座或对人类免疫球蛋白序列进行编码的基因的部分或全部的动物中产生人类或人类样抗体的技术(参见,例如WO 98/24893;WO 96/34096;WO 96/33735;WO 91/10741;雅克博维茨(Jakobovits)等人,美国国家科学院院刊90:2551(1993);雅克博维茨等人,自然(Nature)362:255-258(1993);布吕格曼(Bruggemann)等人,免疫学之年(Year in Immunol),7:33(1993);美国专利号5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,661,016;马克思(Marks)等人,生物技术(Bio.Technology)10:779-783(1992);伦贝格(Lonberg)等人,自然(Nature)368:856-859(1994);莫里森(Morrison),自然(Nature)368:812-813(1994);费舍维尔德(Fishwild)等人,自然生物技术(Nature Biotechnol),14:845-851(1996);纽伯格(Neuberger),自然生物技术,14:826(1996)以及伦贝格(Lonberg)和胡萨尔(Huszar),免疫学国际评论(Intern.Rev.Immunol),13:65-93(1995)。以上专利、公开物、以及参考文件通过引用以其全文结合。

[0287] "人源化"形式的非人类的(例如,鼠类)抗体是嵌合抗体,包含从非人类免疫球蛋白衍生的最小序列。在一个实施例中,人源化抗体是人类免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体高变区的残基被来自非人类物种(例如小鼠,大鼠,兔,或非人类灵长类)(供体抗体)的具有希望的特异性、亲和力和/或能力的高变区的残基替换。在一些情况下,人类免疫球蛋白的框架区(FR)残基被相应的非人类残基替换。另外,人源化抗体可以包括未在受体抗体或供体抗体中发现的残基。这些修饰可以制成为进一步改善抗体性能。通常,人源化抗体将包括基本上至少一个、并且典型地两个可变结构域的全部,其高变环的全部或基本上全部对应于非人类免疫球蛋白的那些,并且FR的全部或基本上全部是人类免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体可任选地还将包括(典型地人类免疫球蛋白的)免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分。关于进一步的细节,参见琼斯(Jones)等人,自然(Nature)321:522-525(1986);里希曼(Riechmann)等人,自然332:323-329(1988);以及普雷斯塔(Presta),当前结构生物

学观点(Curr.Op.Struct.Biol.)2:593-596(1992)。还参见以下综述文章和其中引用的参考文件:瓦西尼(Vaswani)和哈密尔顿(Hamilton),过敏学年报(Ann.Allergy),气喘与免疫学(Asthma&Immunol),1:105-115(1998);哈里斯(Harris),生物化学学会学报(Biochem.Soc.Transactions)23:1035-1038(1995);赫尔利(Hurle)和格罗斯(Gross),当前生物技术观点(Curr.Op.Biotech),5:428-433(1994)。前述参考文件通过引用以其全文结合。

[0288] “人类抗体”是这样的一种抗体:它包含对应于由人类产生的抗体的氨基酸序列的氨基酸序列和/或它已经使用如在此披露的用于制造人类抗体的技术的任一种制得。此类技术包括筛选人类衍生的重组文库,例如噬菌体展示文库(参见例如马克思(Marks)等人,分子生物学杂志(J.Mol.Biol),222:581-597(1991)以及哈根布(Hoogenboom)等人,核酸研究(Nucl.Acids Res),19:4133-4137(1991));使用人类骨髓瘤和小鼠-人类异质骨髓瘤细胞系用于生产人类单克隆抗体(参见,例如库斯贝尔(Kozbor),免疫学杂志(J.Immunol),133:3001(1984);布罗德(Brodeur)等人,单克隆抗体生产技术和应用(Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications),55-93页(马塞尔德克尔(Marcel Dekke)公司,纽约,1987);以及博尔纳(Boerner)等人,免疫学杂志(J.Immunol),147:86(1991));以及在能够在内源性免疫球蛋白产生的不存在下产生人类抗体全谱的转基因动物(例如小鼠)中产生单克隆抗体(参见,例如雅克博维茨等人,美国国家科学院院刊,90:2551(1993);雅克博维茨等人,自然,362:255(1993);比格尔曼(Bruggermann)等人,免疫学之年(Year in Immunol.),7:33(1993))。人类抗体的这个定义确切地排除包含来自非人类动物的抗原结合残基的人源化抗体。

[0289] 所有已知类型的此类抗体是在本发明的范围之内。示例性抗体包括结合至生长因子、细胞因子、淋巴因子、细胞表面受体、酶、血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子的那些以及它们对应的受体的抗体。其他示例性抗体包括针对受体-IgG Fc融合蛋白以及糖蛋白的单克隆抗体。任何修饰形式(例如突变的)的以上所列多肽的任一个也在本发明的范围之内。有待用于本发明中的治疗化合物在本领域中是已知的,并且通过举例方式披露于美国专利号7,608,681中,将其通过引用以其全文结合于此。另外,本发明考虑了受试者中天然存在或非天然存在的抗体的抑制剂或拮抗剂的轭合物,这些抗体导致自身免疫病或不希望的炎性病症。

[0290] 载体的组装的一些方面采用了本领域中熟知的化学方法。例如,维生素E-PEG是由伊士曼化工(Eastman Chemical)生产,生物素-PEG是由许多PEG生产商生产,例如恩综(Enzon)、内克达(Nektar)和NOF公司。产生有某些维生素和其他治疗化合物连接至其上的PEG分子的方法遵循这些和其他本领域中已知的化学方法。PEG附接至寡核苷酸或相关分子发生,例如,像PEG2-N-羟基琥珀酰亚胺酯通过5’胺部分偶联至寡核苷酸。一些偶联方法被考虑并且包括例如,NHS偶联至胺基(如肽上的赖氨酸残基),马来酰亚胺偶联至巯基(如在半胱氨酸残基上的),碘代乙酰基偶联至巯基,吡啶基二硫醇偶联至巯基,酰肼用于偶联至碳水化合物基团,醛用于偶联至N-末端,或已知与伯胺或仲胺反应的四氟苯基酯偶联。其他可能的化学偶联方法对于本领域技术人员来说是已知的,并且可以被取代。通过举例方式,使用本发明的偶联基团的轭合可以使用WO 93/012145(阿塔西(Atassi)等人)中描述的组合物和方法来进行,并且还参见7,803,777(德弗里斯(Defrees)等人),这些文献通过引用

以其全文结合于此。

[0291] 在一个实施例中，载体化合物可以共价或非共价地附接至药物。在另一个实施例中，载体化合物与药物分离，但以离散浓度混合在一起从而变得配制入功能单元中。本发明的示例性药物配制品包括水性溶液、有机溶液、粉末配制品、固体配制品以及混合相配制品。

[0292] 本发明的药物组合物包括本发明的化合物中的任一种，以及其药学上可接受的盐，以及任何药学上可接受的载体、佐剂或运载体。可以在本发明的药物组合物中使用的药学上可接受的载体、佐剂和运载体包括但不局限于：离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白(如人血清白蛋白)、缓冲物质(如磷酸盐)、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或电解质(如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐)、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、基于纤维素的物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物、聚乙二醇以及羊毛脂。

[0293] 药学上可接受的盐保留治疗组合物的希望的生物学活性而无毒性副作用。此类盐的实例是(a)与无机酸形成的酸加成盐，这些无机酸例如盐酸、溴酸、硫酸、磷酸、硝酸等等/和与有机酸形成的盐，这些有机酸例如像乙酸、三氟乙酸、酒石酸、琥珀酸、马来酸、延胡索酸、葡糖糖酸、柠檬酸、苹果酸、抗坏血酸、苯甲酸、单宁酸、帕莫酸、海藻酸、聚谷氨酸、萘磺酸、萘二磺酸、聚半乳糖醛酸等等；(b)与多价金属阳离子形成的碱加成盐或复合物，这些金属阳离子例如锌、钙、铋、钡、镁、铝、铜、钴、镍、镉等等；或与来自N,N'-二苄基乙二胺或乙二胺的有机阳离子形成的；或(c)(a)和(b)的组合，例如鞣酸锌盐等等。

[0294] 本发明的药物组合物可以通过以下方式来给予：透皮、口服、肠胃外、吸入、经眼睛、局部、直肠、经鼻、经颊(包括舌下)、经阴道、或植入式储药器。本发明的药物组合物可以包含任何常规的非毒性的药学上可接受的载体、佐剂或运载体。如在此使用的术语肠胃外包括皮下、皮内、静脉内、肌肉内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、病灶内、以及颅内注射或输注技术。

[0295] 在一些实施例中还考虑的是包含以下的药物组合物：作为活性成分的在此所述的治疗化合物，或其药学上可接受的盐，与药学上可接受的非毒性组分的混合物。如上所述，此类组合物可以被制备为用于肠胃外给予，具体地是处于液体溶液或悬浮液的形式；用于口服或经颊给予，具体地是处于片剂或胶囊的形式；用于鼻内给予，具体地是出于粉末形式、滴鼻剂、蒸发溶液或气雾剂；用于吸入，具体地是与广义定义的赋形剂处于液体溶液或干粉形式；用于透皮给予，具体地是处于皮肤贴剂或微针贴剂；并且用于直肠或阴道给予，具体地是处于栓剂的形式。

[0296] 这些组合物可以便利地以单位剂型给予，并且可以通过任何制药领域中熟知的方法来制备，例如如描述于雷明登氏药学全书(Remington's Pharmaceutical Sciences)，第17版，马克出版公司(Mack Publishing Co.)，伊斯顿(Easton)，宾夕法尼亚州(PA)(1985)中的，将其通过引用以其全文结合于此。肠胃外给予的配制品可以包含作为赋形剂的无菌水或盐水亚烷基醇例如丙二醇，聚亚烷基醇例如聚乙二醇，糖类，植物来源的油类，氢化萘，血清白蛋白或其他纳米颗粒(如在紫杉醇(Abraxane)™，美国制药合作伙伴(American Pharmaceutical Partners)公司，绍姆堡(Schaumburg)，伊利诺伊州(IL)中使用的)等等。对于口服给予，配制品可以通过添加胆盐或酰基肉毒碱来增强。用于经鼻给予的配制品可

以是处于蒸发溶剂(例如,氢氟烃)中的固体或溶液,并且可以包含用于稳定的赋形剂,例如糖类、表面活性剂、亚微米无水α-乳糖或葡聚糖,或可以是水性或油性溶液以用于滴鼻剂形式或计量喷雾。对于经颊给予,典型的赋形剂包括糖、硬脂酸钙、硬脂酸镁、预胶凝化淀粉等等。

[0297] 经延长的时期例如,持续一周至一年的时期,将在此所述的修饰的治疗化合物递送至受试者可以通过单一给予包含了用于希望的释放时期的足够活性成分的控制释放系统来完成。不同的控制释放系统,例如单片或储器类型的微胶囊、储槽式植入物、高分子水凝胶、渗透泵、运载体、胶束、脂质体、透皮贴剂、离子电渗装置以及可替代的注射剂型可以用于此目的。定位在活性成分希望递送的部位是一些控制释放装置的另外的特征,这可以证明在某些失调的治疗中是有益的。

[0298] 在透皮给予的某些实施例中,经过皮肤屏障的递送会使用电极(例如离子电渗法)、电穿孔、或对皮肤的短的高压电脉冲的施加、射频、超声(例如超声促渗)、显微注射(例如微针)、喷射注射器、热消融、磁导入、激光、速度、或光学机械波来增强。药物可以被包含在单层的粘合剂包药物、多层粘合剂包药物、储药器、基质、或蒸汽型贴剂中,或可以采用无贴剂(patchless)技术。经过皮肤屏障的递送还可以使用封装、皮肤脂质流化剂、或中空或固体微结构透皮系统(MTS,例如由3M生产的)、喷射注射器来增强。配制品的添加剂用以辅助治疗化合物通过皮肤,包括药物前体、化学品、表面活性剂、细胞穿透肽、渗透促进剂、封装技术、酶、酶抑制剂、凝胶、纳米颗粒和肽或蛋白质伴侣分子。

[0299] 一种形式的控制释放配制品包含分散或被封装在缓慢降解的无毒的非抗原性聚合物(例如,共聚(乳酸/乙醇酸))中的治疗化合物或其盐,如在肯特(Kent)等人,美国专利号4,675,189的首创工作中描述的,将其通过引用结合于此。这些化合物或其盐还可以配制在胆固醇或其他脂质基质球丸或硅塑料(silastomer)基质植入物中。另外的缓慢释放、储槽式植入物或注射配制品将对于技术人员而言是清楚的。参见,例如,持续和控制释放药物递送系统(Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems),JR罗宾逊(Robinson)编,马塞尔德克尔(Marcel Dekke)公司,纽约,1978;以及生物活性剂的控制释放(Controlled Release of Biologically Active Agents),RW贝克(Baker),约翰威利父子出版社(John Wiley&Sons),纽约,1987。前述文件通过引用以其全文结合。

[0300] 另外形式的控制释放配制品包括生物可降解聚合物的溶液,例如共聚(乳酸/乙醇酸)或乳酸和PEG的嵌段聚合物,是生物可接受的溶剂,将其皮下或肌肉内注射以实现储槽式配制品。将在此所述的治疗化合物与这种聚合物配制品进行混合适用于实现非常长的作用时期配制品。

[0301] 当被配制为经鼻给予时,经鼻粘膜的吸收可以通过以下进一步增强:处于大约0.1与15wt%之间、大约0.5与4wt%之间范围内、或大约2wt%的量的表面活性剂,例如像,甘氨胆酸、胆酸、牛磺胆酸、乙基胆酸(ethocholic acid)、脱氧胆酸、鹅去氧胆酸、脱氢胆酸、甘氨脱氧胆酸、环糊精等等。报道为展现更大功效并且具有降低的刺激的另一类吸收增强剂是烷基麦芽糖苷类,例如如十四烷基麦芽糖苷(阿诺德(Arnold),J.J.等人,(2004)药物科学杂志(J Pharm Sci)93:2205-13;阿尔森(Ahsan),F.等人,(2001)药学研究(Pharm Res)18:1742046)和其中的参考文献,所有文献通过引用特此结合。

[0302] 药物组合物可以处于无菌可注射的制品的形式,例如作为无菌可注射的水性或油

性悬浮液。该悬浮液可以根据本领域已知技术，使用合适的分散剂或湿润剂(例如，吐温80)和助悬剂配制。无菌可注射的制品也可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂(例如1,3-丁二醇溶液)中的无菌可注射的溶液或悬浮液。在可接受的运载体和溶剂中，可以采用的是甘露醇、水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。此外，常规采用无菌的非挥发油类作为溶剂或悬浮介质。为此目的，可以采用任意温和的非挥发油，包括合成的甘油单酯或甘油二酯。脂肪酸，如油酸和它的甘油酯衍生物在注射剂的制备中是有用的，因为它们是天然的药学上可接受的油，如橄榄油或蓖麻油，尤其是处于它们的聚氧乙烯化的形式。这些油溶液或悬浮液也可以包含长链的醇稀释剂或分散剂，如Ph.Helv或类似的醇。

[0303] 本发明的药物组合物可以是按任何口服可接受的剂型来口服给予，该剂型包括但不限于胶囊、片剂、以及水性悬浮液和溶液。在用于口服使用的片剂的情况下，通常使用的载体包括乳糖和玉米淀粉。还典型地添加润滑剂，如硬脂酸镁。对于胶囊形式的口服给予，有用的稀释剂包括乳糖和干玉米淀粉。当口服给药水性悬浮液时，活性成分与乳化剂和助悬剂组合。如果希望，可以添加某些甜味剂和/或调味剂和/或着色剂。

[0304] 本发明的药物组合物还可以按照栓剂的形式给予以用于直肠给予。这些组合物可以通过将本发明的化合物与适合的非刺激性赋形剂进行混合来制备，该赋形剂在室温下是固体而在直肠温度下为液体，并且因此在直肠中将融化以释放活性组分。此类材料包括但不限于可可脂、蜂蜡、以及聚乙二醇。

[0305] 当希望的治疗涉及通过局部施用容易地可接近的区域或器官时，本发明的药物组合物的局部给予尤其有用。对于局部应用到皮肤，药物组合物应当用含有悬浮或溶解在载体中的活性组分的合适软膏配制。用于本发明的化合物的局部给予的载体包括但不限于矿物油、液体石油、白凡士林、丙二醇、聚氧乙烯聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。可替代地，药物组合物可以用含有悬浮或溶解在载体中的活性化合物的合适洗剂或乳膏配制。合适的载体包括但不限于，矿物油、脱水山梨醇单硬脂酸酯、聚山梨醇酯60、十六烷基酯蜡、鲸蜡硬脂醇、2-辛基十二烷醇、苯甲醇和水。本发明的药物组合物也可以通过直肠栓剂配制品或以合适的灌肠配制品局部地施用于低位肠道。局部透皮贴剂也被包括在本发明中。

[0306] 本发明的药物组合物可以通过鼻腔气雾剂或吸入给予。此类组合物是根据药物配制品领域熟知的技术制备，并且可以采用苯甲醇或其他合适的防腐剂、用来提高生物利用度的吸收促进剂、碳氟化合物和/或本领域已知的其他增溶剂或分散剂制备为盐水中的溶液。

[0307] 当配制为用于通过吸入递送时，多种配制品提供优势。将治疗化合物吸收至易于分散的固体例如二酮哌嗪(例如，技术圈颗粒(Technosphere particles)[普富茨纳(Pfutzner)，A和福斯特(Forst)，T，2005，药物递送专家观点(Expert Opin Drug Deliv)2:1097-1106]或类似的结构给出一种配制品，该配制品导致治疗化合物的快速初始摄取。包含治疗化合物和赋形剂的冻干粉，尤其是玻璃状颗粒，可用于以良好的生物利用度递送至肺部，例如参见Exubera®(吸入性胰岛素，由辉瑞(Pfizer)和安万特(Aventis)医药公司提供)。

[0308] 在大约0.01与大约100mg/kg体重/天之间的剂量水平，优选0.5与大约50mg/kg体重/天的活性成分化合物在疾病的预防和治疗中是有用的。典型地，本发明的药物组合物将以从大约1至大约5次/天或可替代地作为连续输注来给予。这种给药可以用作慢性或急性

疗法。可与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量将取决于所治疗的宿主以及具体给药模式而变化。典型的制品将包含从大约5％至大约95％的活性化合物(w/w)。优选地，此类制品包含从大约20％至大约80％的活性化合物。

[0309] 在患者病症改善时，如果需要的话，可以给予维持剂量的本发明的化合物、组合物或组合。之后，随着症状变化，给予的剂量或频率或两者可以减少至维持改善的病症的水平，当症状已经减轻至希望水平，应该停止治疗。但是患者可以在疾病症状的任何复发时要求在长期基础上的间歇治疗。

[0310] 如本领域技术人员将理解的，可以要求比以上引用的那些的更低或更高的剂量。对于任何特定患者的特定剂量和治疗方案将取决于多种因素，包括所采用的特定化合物的活性、年龄、体重、总体健康状况、性别、饮食、给予时间、排泄速率、药物组合、感染的严重性和进程、患者对感染的处置以及治疗医师的判断。

[0311] 与未轭合的、未融合的或未配制的药物相比，载体-药物轭合物、融合物、或配制品为药物生产商和患者提供了优势。确切地，与未轭合的、未融合的或未配制的药物相比，载体-药物轭合物或配制品将是更有力的且药效更长的药物，需要更少和更小频率地给药。这为患者转化为降低的医疗保健成本和更便利的给药计划。载体-药物轭合物或配制品还可以影响通常是通过静脉内注射而输注的药物的注射途径，现在变为经由皮下注射或透皮递送系统中给药。经由皮下注射或透皮递送的给药途径是最有利的，因为它们可以由患者在家中自行给予。这可以改进患者顺应性。

[0312] 在本发明的又另一方面中，DBP的水平可以作为载体-药物疗法的部分而得以增加。已经报道雌激素可以增加DBP水平(Speeckaert等人，临床化学学报(Clinica Chimica Acta)371:33)。在此考虑了DBP的水平可以通过给予雌激素来增加，以更有效地递送载体-药物轭合物。

[0313] 在本发明的又另一方面中，考虑了该载体可以用于透皮地递送药物。由于正常情况下在接近于皮肤表面的位置处DBP运输UV活化的维生素D，所以具有载体的透皮递送系统的使用变得可行。

[0314] 为了使在此所述的本发明可以得到更完全的理解，列出了以下实例。应理解的是这些实例仅出于说明性目的而不应理解为以任何方式限制本发明。实例

[0315] 实例1:示例性的由维生素D_3-PEG与马来酰亚胺反应基团构成的硫醇-反应载体的制备

[0316] 在此实例中的载体上的马来酰亚胺用于轭合至实例2和3中的蛋白质或肽上的游离半胱氨酸。考虑到本发明的支架中PEG的大小是从0.1kDa至100kDa。因此，2kDa PEG被选择作为此实例的支架。在此实例中使用的起始材料，对于维生素D类似物，购买自多伦多的化学品研究公司(Toronto Research Chemicals)(化合物1)，以及对于2kDa mPEG-马来酰亚胺，购买自Creative Pegworks(化合物4)。

[0317] 根据图2，(R)-甲基5-((1R,3aS,7aR,E)-4-((Z)-2-((S)-5-((叔-丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-2-亚甲基环亚己基)亚乙基)-7a-甲基八氢-1H-茚-1-基)己酸盐(化合物1，7.5mg，0.0145mmol，1个当量，购买自多伦多化学研究公司(Toronto Research Chemicals))溶解于无水四氢呋喃(0.4mL)并且用氮气吹扫。添加四丁基氟化铵(22.7mg，0.087mmol，6个当量)，并且将反应在室温下搅拌3小时，同时通过薄层色谱(TLC，硅胶，30％

乙酸乙酯于己烷中，UV检测，磷钼酸染色)进行监测。向所得的包含化合物2的混合物中添加一水氢氧化锂(4.2mg，0.1015mmol，7个当量)、四氢呋喃(0.3mL)和水(0.15mL)。将该反应用氮气吹扫并且在室温下搅拌18小时。通过TLC和质谱(MS)的评估指示反应完全以及期望的化合物3的存在。将反应混合物用乙醚稀释(2x 15mL)并且用10％水性柠檬酸(30mL)、水(30mL)和盐水(30mL)进行洗涤。将有机层用无水硫酸钠进行干燥，并且浓缩，同时保持20℃以下的温度。将样品在氮气流下进一步干燥，给出呈无色胶状物的((R)-5-((1R,3aS,7aR,E)-4-((Z)-2-((S)-5-羟基-2-亚甲基环亚乙基)亚乙基)-7a-甲基八氢-1H-茚-1-基)己酸)(化合物3，5.3mg，95％产率)。Rf 0.2(硅胶，40％EtOAc于己烷中)。NMR分析揭示大约1.14％的THF和大约0.14％的乙醚的存在。

[0318] 化合物3(5.3mg，0.0137mmol，1个当量)、化合物4(MAL-PEG-胺TFA盐，21.9mg，0.0109mmol，0.8个当量，购买自Creative Pegworks)以及2-氯-1-甲基吡啶鎓碘化物(8.7mg，0.0342mmol，2.5个当量)溶解于无水二氯甲烷中(0.5mL)。添加三乙胺(7.6μL，0.0548mmol，4个当量)，并且在室温下在氮气下将反应混合物搅拌3小时。然后将反应用二氯甲烷(30mL)稀释并且用10％水性柠檬酸(40mL)、饱和水性碳酸氢钠(30mL)和盐水(30mL)进行洗涤。将有机层用无水硫酸钠进行干燥、过滤、浓缩，同时将温度保持在20℃以下。在氮气流下将该样品进行进一步干燥以给出呈棕色胶状物的目标化合物。Rf 0.6(硅胶，20％甲醇于二氯甲烷中)。分离产物的TLC分析(茚三酮染色)指示化合物4的不存在。分离材料的1H NMR分析确证了它的同一性和纯度。NMR分析未显示可检测量的二氯甲烷或其他溶剂。

[0319] 实例2：修饰的FGF21蛋白质-载体轭合物的制备和表征：

[0320] 修饰的FGF21轭合至在实例1中描述的维生素D_3-PEG-马来酰亚胺载体。如下所示，当与天然存在的FGF21相比较时，FGF21-载体组合物提供了显著改进的药物代谢动力学特性，由此使得载体轭合的分子成为用于治疗糖尿病的重要治疗化合物。

[0321] FGF21表达于大肠杆菌中，如下被纯化并轭合至载体。修饰的FGF21被设计为在FGF21的氨基末端附近掺入一个游离的半胱氨酸残基以允许将蛋白质定点特异性地偶联至载体，并且添加His_6标签以便纯化。修饰的FGF21编码序列(SEQ ID NO:4)经计算机优化为用于在大肠杆菌中表达，并且该基因是通过受托研究机构(DNA2.0门洛帕克，加利福尼亚州(CA))经化学合成并且克隆进表达载体pJexpress401中，该载体包含T5启动子以及卡那霉素抗性基因。将该质粒转化进大肠杆菌Origami2细胞(EMD生物科学公司)中。在Origami菌株中FGF21从pJexpress401载体的表达是如下完成的。将卢里亚肉汤培养基加1％葡萄糖用过夜培养物以1:100的稀释度接种，并且生长至对数期，此时OD600是0.6。然后，将培养温度从37℃降低至18℃，并且使用0.2mM IPTG诱导该培养物，并且使之在18℃在伴随180rpm的振摇下生长过夜。将细胞收获、裂解，并且收集上清液。将蛋白质使用固相金属亲和色谱(IMAC)树脂进行亲和纯化，并且通过离子交换色谱进行精炼。

[0322] 然后将纯化的FGF21蛋白缓冲交换到10mM Tris pH 8.0、50mM NaCl、1mM EDTA中。与维生素D_3-PEG-马来酰亚胺载体分子(实例1)的轭合是通过将溶解于DMSO中的10mg/mL硫醇反应载体与包含游离半胱氨酸的0.5mg/mL FGF21蛋白(SEQ ID NO:3)以2:1的载体对蛋白质的摩尔比进行混合来完成的。将轭合的蛋白质通过离子交换色谱从未反应的组分分离。轭合和纯度是通过SDS-PAGE确证。然后将单独的FGF21和FGF21-载体轭合物缓冲交换至PBS，并且使用0.22微米滤器进行除菌以用于动物研究。

[0323] 在斯普拉-道来大鼠中，研究了FGF21(SEQ ID NO:3)或FGF21-载体轭合物的药物代谢动力学。简而言之，0.1mg/kg的各分子被通过SC注射分开注射入大鼠中。在30分钟、60分钟、120分钟、240分钟、360分钟、24小时和48小时处收集血浆样品。使用针对FGF21经验证的商业ELISA试剂盒(密理博公司，货号EZHFGF21-19K)对样品进行分析。结果显示在SC给药之后在以下时间点处FGF21和FGF21-载体轭合物之间的在吸收方面的显著差别(30、60、120和240分钟)，超过此时间后FGF21水平开始下降(图3)。这些数据显示在SC注射之后，载体与FGF21的轭合显著地增加了FGF21的生物利用度(380倍增加，通过将FGF21-载体轭合物的平均Cmax 143526pg/mL除以FGF21的平均Cmax 376pg/mL计算出)。曲线下面积(AUC)还被计算为：FGF21-载体轭合物为1047980h*pg/mL，而FGF21单独为1551h*pg/mL。因此，当将FGF21-载体轭合物的平均AUC除以FGF21的平均AUC时，在药物暴露方面有675倍的增加。综上，数据证实载体分子在增加生物利用度方面是有用的，并且指示轭合的FGF21具有优于天然FGF21的显著的药物代谢动力学优势。

[0324] 实例3：胃饥饿素肽-载体轭合物的制备和表征：

[0325] 在此实例中，在实例1中的维生素D_3-PEG-马来酰亚胺载体与胃饥饿素的轭合赋予胃饥饿素显著更长的半衰期，由此使得轭合的分子成为用于治疗恶病质、厌食症和/或老年人的虚弱的潜在有用的治疗剂。

[0326] 具有添加的C末端半胱氨酸的合成大鼠胃饥饿素肽是购买自Innovagen(隆德，瑞典，SEQ ID NO:6)。如实例1中描述的维生素D_3-PEG-马来酰亚胺载体被选择为在大小上与2-3kDa肽成比例，以使得轭合可以不显著地影响生物活性。与载体的轭合是通过将溶解于DMSO中的10mg/mL硫醇反应载体(来自实例1)与包含游离半胱氨酸的在15mM MES pH 6.0、1mM EDTA中的1mg/mL胃饥饿素肽以2:1载体对肽的摩尔比进行混合来完成的。将轭合的肽通过离子交换色谱从未反应的组分分离。轭合和纯度是通过SDS-PAGE确证。然后将大鼠胃饥饿素(r胃饥饿素)肽和r胃饥饿素-载体轭合物缓冲交换至PBS，并且使用0.22微米滤器进行过滤除菌以用于动物研究。

[0327] 在斯普拉-道来大鼠中，研究了r胃饥饿素(SEQ ID NO:6)或r胃饥饿素-载体轭合物的药物代谢动力学。简而言之，0.1mg/kg的各分子被通过静脉内(IV)注射分开注射入大鼠中。在30分钟、60分钟、120分钟、240分钟、360分钟、24小时和48小时处收集血浆样品。使用商业ELISA试剂盒(密理博公司，货号EZRGRT-91K)对样品进行分析，该试剂盒经验证用于分析来自大鼠血浆的r胃饥饿素。结果显示r胃饥饿素和r胃饥饿素-载体轭合物在药物代谢动力学曲线方面的显著差别(图4)。使用WinNonLin对半衰期进行的计算揭示了r胃饥饿素的半衰期为0.37小时，而r胃饥饿素-载体轭合物的半衰期为8小时，这被计算为22倍的改进。数据证实这是载体分子在增加半衰期方面的有用性的第二实例。因此，处于轭合形式的胃饥饿素是用于治疗胃饥饿素反应疾病如恶病质、厌食症以及老年人的虚弱的有用治疗剂。

[0328] 实例4.胃饥饿素肽-载体的受体结合活性的评估。

[0329] 当轭合至载体时，胃饥饿素肽的活性不受支架和靶向基团的存在的不利影响。为了显示这个，使用如下所述的基于细胞的受体激动剂测定，将胃饥饿素(SEQ ID:5)和来自实例3的维生素D_3-PEG-马来酰亚胺载体轭合的胃饥饿素针对受体结合和胃饥饿素受体活化(激动剂活性)进行了比较。

[0330] 将测试化合物添加至表达GHS-R的CHO-K1细胞培养物中。胃饥饿素结合并活化GHS-R受体，并且对细胞内钙反应进行评估以作为激动剂活性的指示。通过基于钙通量的测定来测量活性，这种测定是由美国GenScript公司对于FLIPR™(荧光成像板读取器(Fluorescence Imaging Plate Reader))高通量细胞筛选仪器开发的。

[0331] 将表达GHS-R的CHO-K1细胞培养于增补有10％胎牛血清、500mg/mL G418的汉姆氏(Ham's)F12中，并且进行传代以维持最佳的细胞健康。在测定之前18小时，将细胞以每孔20,000个细胞的密度于20μL生长培养基中接种在384孔黑壁透明底的板中，并且维持在37℃/5％CO_2。在测定开始时，将20μL钙-4(Calcium-4)加样缓冲液添加至孔中。将板在37℃孵育在暗处持续60分钟，然后在室温下持续15分钟。胃饥饿素和胃饥饿素轭合物测试物品是处于DMSO中1mM的起始浓度。在添加至测试板之前，用pH7.4的20mM HEPES缓冲液将测试物品10倍连续稀释于汉克氏缓冲盐水溶液(HBSS)中。每个测试物品的最终浓度是添加至细胞前的浓度的5倍。使用FLIPR™仪器对细胞中的细胞内钙水平测量20秒，之后添加至测试物品中。将10μL的各个稀释测试物品添加至板，以使得最终体积为50μL。对细胞内钙水平的变化进行测量，持续另外的100秒(21至120秒)。

[0332] 将20秒读取的平均值计算为基线读数(1至20秒)，并且将相对荧光单位(ΔRFU)强度值用最大荧光单位(21至120秒)减去基线读取的平均值来计算。使用ScreenWorks®(版本3.1)进行数据采集和分析，并且导出到Excel。

[0333] 使用以下方程式计算化合物的活化％：

[0334] ％活化＝(ΔRFU$_{化合物}$－ΔRFU$_{背景}$)/(ΔRFU$_{激动剂对照}$－ΔRFU$_{背景}$)}*100％，然后将活化绘制为化合物的累积剂量的对数的函数图。数据代表双份测定的平均值。EC50是使用GenScript编写的数据分析向导(wizard)来确定。

[0335] 没有载体的胃饥饿素的EC50值是88.5nM。相比之下，载体轭合的胃饥饿素具有85nM的EC50值，这几乎与对照肽相同。因此，在载体轭合至胃饥饿素肽之后，肽的激动剂活性得以保留。注意这些测定是在包含DBP的10％血清的存在下进行的。针对载体轭合的肽，没有观察到对受体结合和活化方面的干扰。

[0336] 实例5.示例性的由维生素D_3-PEG与NHS-反应基团构组成的胺-反应载体的制备

[0337] 产生在载体上的NHS-反应基团以用于轭合至蛋白质上的胺基上。2kDa PEG被选择作为此实例的支架。在此实例中使用的起始材料，对于维生素D类似物，购买自多伦多的化学品研究公司(Toronto Research Chemicals)(化合物1)，以及对于2kDa mPEG-氨基酸，购买自Creative Pegworks(化合物5)。

[0338] 根据图5(步骤1和2)：(R)-甲基-5-((1R,3aS,7aR,E)-4-((Z)-2-((S)-5-((叔-丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-2-亚甲基环亚己基)亚乙基)-7a-甲基八氢-1H-茚-1-基)己酸盐(化合物1,8.2mg,0.0159mmol,1个当量)溶解于无水四氢呋喃(THF,0.4mL)，并且将混合物用氮气吹扫。添加四丁基氟化铵溶液(25mg,0.096mmol,6个当量)，并且将反应在室温下搅拌3小时，同时通过薄层色谱(TLC,硅胶,30％乙酸乙酯于己烷中,UV检测,磷钼酸染色)进行监测。向所得的包含化合物2的混合物中添加一水氢氧化锂(4.6mg,0.109mmol,7个当量)、THF(0.3mL)和水(0.16mL)。将该反应混合物用氮气吹扫并且在室温下搅拌18小时。通过TLC和质谱(MS)的评估指示反应完全以及期望的化合物3的存在。将反应混合物用乙醚(10mL)稀释并且用10％水性柠檬酸(10mL)、水(10mL)和盐水(10mL)进行洗涤。将有机层用无水硫

酸钠进行干燥，并且浓缩，同时保持20℃以下的温度。将样品在氮气流下进一步干燥，给出呈无色胶状物的((R)-5-((1R,3aS,7aR,E)-4-((Z)-2-((S)-5-羟基-2-亚甲基环亚乙基)乙基-茚)-7a-甲基八氢-1H-茚-1-基)己酸(化合物3，6.1mg，99％产率)。Rf 0.2(硅胶，40％乙酸乙酯(EtOAc)于己烷中)。核磁共振光谱法(NMR)分析揭示大约7％的乙醚的存在。

[0339] 根据图5(步骤3)：向PEG-氨基酸4(18.5mg，0.0092mmol，购买自Creative Pegworks)于无水甲醇中的溶液添加二噁烷中的HCl(4M，1.5mL)，并且将反应混合物在70℃在密封试管中加热20小时。将反应通过TLC(茚三酮染色)来监测，并且在反应完成时，将其在旋转蒸发仪上进行浓缩。将残余物与二氯甲烷(3x 5mL)和乙醚(3x 5mL)共蒸发至一种淡黄色泡沫，将其悬浮于乙醚(5mL)中。将液体进行轻轻倒出，并且将获得的固体进行干燥以分离呈淡黄色固体的希望的产物5(14mg，75％)。Rf 0.2(硅胶，20％甲醇(MeOH)/DCM/0.2％NH4OH)。NMR分析未显示可检测量的二氯甲烷或乙醚。

[0340] 根据图5(步骤4)：化合物3(3.4mg，0.009mmol，1个当量)、化合物6(甲基酯PEG-胺HCl盐，14mg，0.007mmol，0.8个当量)以及2-氯-1-甲基吡啶鎓碘化物(5.6mg，0.022mmol，2.5个当量)溶解于无水二氯甲烷(0.6mL)中。添加三乙胺(5μL，0.0356mmol，4个当量)，并且在室温下在氮气下将反应混合物搅拌3小时。在此时反应是不完全的，因此，添加额外量的化合物3(1.7mg，0.0045mmol)，并且使反应继续另外的3个小时，然后用二氯甲烷(10mL)进行稀释，并且用10％水性柠檬酸(10mL)、饱和水性碳酸氢钠(10mL)和盐水(10mL)进行洗涤。将有机层用无水硫酸钠进行干燥、过滤、浓缩，同时将温度保持在20℃以下。将样品通过硅胶(2g)快速色谱进行纯化。将柱首先用乙酸乙酯进行洗脱以去除未反应的化合物3，并且进而用1％-10％MeOH/二氯甲烷(各自20mL)洗脱。将包含纯产物的部分合并在一起，并且在旋转蒸发仪上进行蒸发，同时将温度保持在20℃以下。在氮气流下将该样品进行干燥以给出呈棕色胶状物的化合物7(10mg，60％)。Rf 0.3(硅胶，5％MeOH于二氯甲烷中)。分离产物的TLC分析(茚三酮染色)指示化合物6的不存在。分离材料的1H NMR分析确证了它的同一性和纯度。NMR分析揭示了1.1％的二氯甲烷的存在。

[0341] 根据图5(步骤5)：化合物7(10mg，0.0042mmol)溶解于THF(0.2mL)和一滴甲醇的混合物中。向此溶液中添加一水氢氧化锂溶液(0.9mg，0.021mmol，5个当量于0.1mL水中)。将该反应混合物用氮气吹扫并且在室温下搅拌18小时。通过TLC的评估指示反应完全以及化合物8的存在。将反应混合物用二氯甲烷(10mL)稀释并且用10％水性柠檬酸(10mL)和盐水(10mL)进行洗涤。将有机层用无水硫酸钠进行干燥，并且浓缩，同时保持20℃以下的温度。将该样品在氮气流下进行进一步干燥，给出呈棕色胶状物的希望的维生素-D_3-PEG-酸(化合物8，7mg，71％)。Rf 0.2(硅胶，10％MeOH/二氯甲烷)。NMR分析揭示了大约2％的二氯甲烷的存在。

[0342] 制备储备溶液：1mL无水二甲基甲酰胺(DMF)中的34g的N-羟基琥珀酰亚胺，以及在1mL无水二氯甲烷中的61mg二环己基碳二亚胺(DCC)。

[0343] 根据图5(步骤6)：向化合物8(7mg，0.003mmol，1个当量)于二氯甲烷(0.3mL)中的溶液添加在DMF中的N-羟基琥珀酰亚胺(10μL，0.34mg，0.003mmol)的溶液，随后添加在二氯甲烷中的DCC(10μL，0.61mg，0.003mmol)的溶液，并且将该反应混合物用氮气吹扫并且搅拌20小时。由于如TLC指示的，反应是不完全的，添加额外量的在DMF中的N-羟基琥珀酰亚胺(25μL，0.85mg，0.0075mmol)以及在二氯甲烷中的DCC(25μL，1.53mg，0.0075mmol)，并且使

反应继续另外的20小时。将氯仿(10mL)添加至反应混合物中，并且将其用水(10mL)进行洗涤。将有机相用硫酸钠进行干燥，并且溶剂的去除提供了希望的目标化合物维生素D_3-PEG-NHS(7.0mg，粗品)。此材料的^1H NMR和TLC(R_f:0.3，10％MeOH/氯仿)指示希望的材料的存在。维生素D_3-PEG-NHS载体进而用于实例6中。

[0344] 实例6.抗体-载体轭合物的制备和表征

[0345] 当与英利昔单抗单独相比时，英利昔单抗-载体轭合物显示在大鼠中具有增加的血清浓度和生物利用度。

[0346] 用水将作为具有适当的盐的冻干粉销售(汉娜制药(Hannah Pharmaceuticals))的英利昔单抗重悬浮至10mg/mL的浓度。维生素D_3-PEG-NHS载体以10mg/mL的浓度重悬浮于DMSO中。然后将维生素D_3-PEG-NHS载体和英利昔单抗以5:1和10:1的载体对英利昔单抗的摩尔比进行混合。本发明的治疗化合物载体轭合物典型地具有单独附接至治疗化合物的至少1个并且可以是在1-10之间个载体分子。通过使用NHS形式的载体，多于一种载体可以附接至治疗蛋白质，并且这可以通过改变载体与目标治疗剂的摩尔比来实验控制。在此实例中，设置2-4个载体的目标分布作为希望的参数。通过测试两个不同的摩尔比，以及通过质谱检验得到的轭合物，确定真实比例。

[0347] 通过使用具有40kDa截取值的脱盐柱(Zeba Spin，赛默飞世尔(Thermo Scientific))，将英利昔单抗和英利昔单抗NHS-载体轭合物与未轭合的载体分离。使用质谱来计算在反应中英利昔单抗的完整质量。结果显示未经修饰的英利昔单抗具有149kDa为主的质量。载体轭合的英利昔单抗的质量具有随着2-4个载体/抗体的3kDa载体的平均附接处于渐增比例的质量。

[0348] 然后将纯化的5:1反应产物用于大鼠药物代谢动力学研究中，比较皮下(SC)给予的英利昔单抗与英利昔单抗-载体轭合物。在所有测试组中剂量是1mg/kg，每组三个大鼠。在给药前、并且在注射后从5分钟48小时不同的时间处收集血清样品。然后使用特别用于确定英利昔单抗在血清中的水平的ELISA试剂盒(Promonitor™，Progenika™)，通过ELISA对血清样品进行分析。使用WinNonLin对药物代谢动力学参数进行确定。显示于图6中的结果证实当与未轭合的抗体相比较时，抗体轭合至维生素D_3-PEG-NHS载体时血清浓度和曲线下面积(AUC)方面改进了1.5倍。更确切地，在24小时和48小时的时间点处，对于英利昔单抗观察到了2100ng/mL和4800ng/mL的浓度。相比之下，在24小时和48小时的时间点处，对于载体轭合的英利昔单抗观察到了3200ng/mL和7000ng/mL的浓度。这就是说在生物利用度方面有50％的改进。AUC计算显示50％的改进(图6)。因此，该实例显示了当与未轭合的抗体相比较时，载体在改进英利昔单抗的血清浓度和生物利用度方面的效用。

[0349] 示例性序列

[0350] SEQ ID NO:1

[0351] 人类FGF21蛋白序列

[0352] MDSDETGFEHSGLWVSVLAGLLLGACQAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTV
GGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHL
PGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS

[0353] SEQ ID NO:2

[0354] 成熟人类FGF21蛋白序列

[0355] HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVK TSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAL PEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS

[0356] SEQ ID NO:3

[0357] 修饰的成熟人类FGF21蛋白序列(N端6-his标签,tev裂解位点,在C端另外的182P,以及对于以下残基的修饰使用成熟人类FGF21序列的编号:I3C以及G170E)

[0358]

MGSHHHHHHSSGENLYFQGHPCPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKAL KPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAR FLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYASPSEQ ID NO:4

[0359] 针对大肠杆菌中FGF21表达的优化编码序列(参见氨基酸SEQ ID NO:3)

[0360] ATGGGCTCACATCATCACCACCATCATAGCAGCGGAGAGAACTTGTATTTTCAGGGACATCCGTGCCCT GACAGCAGCCCGCTGCTGCAGTTCGGTGGTCAAGTCCGTCAGCGTTACCTGTACACTGACGACGCGCAACAGACCGA GGCGCACCTGGAAATTCGCGAAGATGGTACGGTGGGTGGCGCAGCGGACCAAAGCCCGGAGTCCCTGTTGCAGCTGA AGGCCCTGAAGCCGGGTGTCATCCAAATCCTGGGCGTTAAAACCAGCCGTTTTCTGTGCCAACGTCCGGATGGTGCG CTGTACGGTTCCCTGCACTTCGACCCAGAGGCATGTAGCTTTCGTGAACTGCTGCTGGAAGATGGCTATAATGTGTA CCAGTCTGAGGCGCACGGTCTGCCGTTGCACTTGCCGGGTAACAAAAGCCCGCACCGCGACCCAGCACCGCGTGGTC CGGCTCGCTTCCTGCCGCTGCCGGGTCTGCCTCCGGCGCTGCCGGAGCCGCCAGGCATTCTGGCTCCGCAACCGCCG GATGTTGGCAGCAGCGATCCGCTGAGCATGGTTGAACCGTCGCAGGGCCGCAGCCCGTCTTATGCCAGCCCGTAA

[0361] SEQ ID NO:5

[0362] 人类胃饥饿素蛋白序列

[0363] GS(正辛酰基-S)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR

[0364] SEQ ID NO:6

[0365] 具有添加的C端cys的大鼠胃饥饿素

[0366] GS(正辛酰基-S)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPRC

[0367] SEQ ID NO:7

[0368] DBP蛋白质序列

[0369] MKRVLVLLLAVAFGHALERGRDYEKNKVCKEFSHLGKEDFTSLSLVLYSRKFPSGTFEQVSQLVKEVVS LTEACCAEGADPDCYDTRTSALSAKSCESNSPFPVHPGTAECCTKEGLERKLCMAALKHQPQEFPTYVEPTNDEICE AFRKDPKEYANQFMWEYSTNYGQAPLSLLVSYTKSYLSMVGSCCTSASPTVCFLKERLQLKHLSLLTTLSNRVCSQY AAYGEKKSRLSNLIKLAQKVPTADLEDVLPLAEDITNILSKCCESASEDCMAKELPEHTVKLCDNLSTKNSKFEDCC QEKTAMDVFVCTYFMPAAQLPELPDVELPTNKDVCDPGNTKVMDKYTFELSRRTHLPEVFLSKVLEPTLKSLGECCD VEDSTTCFNAKGPLLKKELSSFIDKGQELCADYSENTFTEYKKKLAERLKAKLPDATPTELAKLVNKHSDFASNCCS INSPPLYCDSEIDAELKNIL

[0370] SEQ ID NO:8

[0371] DBP核苷酸序列

[0372] TTTAATAATAATTCTGTGTTGCTTCTGAGATTAATAATTGATTAATTCATAGTCAGGAATCTTTGTAAA AAGGAAACCAATTACTTTTGGCTACCACTTTTACATGGTCACCTACAGGAGAGAGGAGGTGCTGCAAGACTCTCTGG TAGAAAAATGAAGAGGGTCCTGGTACTACTGCTTGCTGTGGCATTTGGACATGCTTTAGAGAGAGGCCGGGATTATG

AAAAGAATAAAGTCTGCAAGGAATTCTCCCATCTGGGAAAGGAGGACTTCACATCTCTGTCACTAGTCCTGTACAGT
AGAAAATTTCCCAGTGGCACGTTTGAACAGGTCAGCCAACTTGTGAAGGAAGTTGTCTCCTTGACCGAAGCCTGCTG
TGCGGAAGGGGCTGACCCTGACTGCTATGACACCAGGACCTCAGCACTGTCTGCCAAGTCCTGTGAAAGTAATTCTC
CATTCCCCGTTCACCCAGGCACTGCTGAGTGCTGCACCAAAGAGGGCCTGGAACGAAAGCTCTGCATGGCTGCTCTG
AAACACCAGCCACAGGAATTCCCTACCTACGTGGAACCCACAAATGATGAAATCTGTGAGGCGTTCAGGAAAGATCC
AAAGGAATATGCTAATCAATTTATGTGGGAATATTCCACTAATTACGGACAAGCTCCTCTGTCACTTTTAGTCAGTT
ACACCAAGAGTTATCTTTCTATGGTAGGGTCCTGCTGTACCTCTGCAAGCCCAACTGTATGCTTTTTGAAAGAGAGA
CTCCAGCTTAAACATTTATCACTTCTCACCACTCTGTCAAATAGAGTCTGCTCACAATATGCTGCTTATGGGGAGAA
GAAATCAAGGCTCAGCAATCTCATAAAGTTAGCCCAAAAAGTGCCTACTGCTGATCTGGAGGATGTTTTGCCACTAG
CTGAAGATATTACTAACATCCTCTCCAAATGCTGTGAGTCTGCCTCTGAAGATTGCATGGCCAAAGAGCTGCCTGAA
CACACAGTAAAACTCTGTGACAATTTATCCACAAAGAATTCTAAGTTTGAAGACTGTTGTCAAGAAAAAACAGCCAT
GGACGTTTTTGTGTGCACTTACTTCATGCCAGCTGCCCAACTCCCCGAGCTTCCAGATGTAGAGTTGCCCACAAACA
AAGATGTGTGTGATCCAGGAAACACCAAAGTCATGGATAAGTATACATTTGAACTAAGCAGAAGGACTCATCTTCCG
GAAGTATTCCTCAGTAAGGTACTTGAGCCAACCCTAAAAAGCCTTGGTGAATGCTGTGATGTTGAAGACTCAACTAC
CTGTTTTAATGCTAAGGGCCCTCTACTAAAGAAGGAACTATCTTCTTTCATTGACAAGGGACAAGAACTATGTGCAG
ATTATTCAGAAAATACATTTACTGAGTACAAGAAAAAACTGGCAGAGCGACTAAAAGCAAAATTGCCTGATGCCACA
CCCACGGAACTGGCAAAGCTGGTTAACAAGCACTCAGACTTTGCCTCCAACTGCTGTTCCATAAACTCACCTCCTCT
TTACTGTGATTCAGAGATTGATGCTGAATTGAAGAATATCCTGTAGTCCTGAAGCATGTTTATTAACTTTGACCAGA
GTTGGAGCCACCCAGGGGAATGATCTCTGATGACCTAACCTAAGCAAAACCACTGAGCTTCTGGGAAGACAACTAGG
ATACTTTCTACTTTTTCTAGCTACAATATCTTCATACAATGACAAGTATGATGATTTGCTATCAAAATAAATTGAAA
TATAATGCAAACCATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

[0373] SEQ ID NO:9

[0374] 肿瘤坏死因子-α(TNF-α)

[0375] ATGAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGCTGGCCGAGGAGGCGCTCCCCAAGAAGACAGGGGGG
CCCCAGGGCTCCAGGCGGTGCTTGTTCCTCAGCCTCTTCTCCTTCCTGATCGTGGCAGGCGCCACCACGCTCTTCTG
CCTGCTGCACTTTGGGGTGATCGGCCCCCAGAGGGAAGAGTTCCCCAGGGACCTCTCTCTAATCAGCCCTCTGGCCC
AGGCAGTCAGATCATCTTCTCGAACCCCGAGTGACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTAGCAAACCCTCAAGCTGAGGGG
CAGCTCCAGTGGCTGAACCGCCGGGCCAATGCCCTCCTGGCCAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAACCAGTTGGTGGT
GCCATCAGAGGGCCTGTACCTCATCTACTCCCAGGTCCTCTTCAAGGGCCAAGGCTGCCCCTCCACCCATGTGCTCC
TCACCCACACCATCAGCCGCATCGCCGTCTCCTACCAGACCAAGGTCAACCTCCTCTCTGCCATCAAGAGCCCCTGC
CAGAGGGAGACCCCAGAGGGGGCTGAGGCCAAGCCCTGGTATGAGCCCATCTATCTGGGAGGGGTCTTCCAGCTGGA
GAAGGGTGACCGACTCAGCGCTGAGATCAATCGGCCCGACTATCTCGACTTT

[0376] GCCGAGTCTGGGCAGGTCTACTTTGGGATCATTGCCCTGTGA

[0377] SEQ ID NO:10

[0378] 肿瘤坏死因子-α(TNF-α)

[0379] MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRDLSL
ISPLAQAVRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCP
STHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAES
GQVYFGIIAL

[0380] 在此披露或提及的所有公开物和专利文件通过引用以其全文结合在此。前述说明书已经仅出于说明和描述的目的得以呈现。本说明书不旨在限制本发明为所披露的精确形式。本发明的范围应旨在由所附权利要求书来限定。

[0381] 更具体地，本发明涉及以下各项所保护的技术方案：

[0382] 1.一种药物载体，包括

[0383] (a)一个靶向基团，该靶向基团结合维生素D结合蛋白(DBP)，以及

[0384] (b)一个偶联基团，用于将所述靶向基团轭合至一种治疗化合物，

[0385] 其中所述药物载体增加所述治疗化合物在循环中的吸收、半衰期、效力或生物利用度。

[0386] 2.如第1项所述的药物载体，其中所述靶向基团选自下组，该组由以下各项组成：维生素D、维生素D类似物、维生素D相关代谢物、维生素D相关代谢物的类似物、肽、抗DBP抗体、抗DBP抗体衍生物、核苷酸适体、以及结合DBP的基于碳的小分子。

[0387] 3.如第1项所述的药物载体，进一步包括一个支架部分，其中所述支架部分选自下组，该组由以下各项组成：聚(乙二醇)、聚赖氨酸、聚乙烯亚胺、聚(丙二醇)、肽、血清白蛋白、硫氧还蛋白、免疫球蛋白、氨基酸、核酸、聚糖、包含反应接头的修饰基团、水溶性聚合物、小碳链接头、以及另外的治疗部分。

[0388] 4.如第1项所述的药物载体，其中所述偶联基团选自下组，该组由以下各项组成：胺反应基团、硫醇反应基团、马来酰亚胺基团、硫醇基、醛基、NHS-酯基、卤代乙酰基、碘代乙酰基、溴代乙酰基、SMCC基团、磺基SMCC基团、碳二亚胺基团、双官能团交联剂、NHS-马来酰亚胺基、及其组合。

[0389] 5.如第3项所述的药物载体，其中所述支架部分是在大约100Da.与200,000Da.之间。

[0390] 6.如第5项所述的药物载体，其中所述支架部分是在大约100Da.与20,000Da.、200Da.与15,000Da.、300Da.与10,000Da.、400Da.与9,000Da.、500Da.与5,000Da.、600Da.与2,000Da.、1000Da.与200,000Da.、5000Da.与100,000Da.、10,000Da.与80,000Da.、20,000Da.与60,000Da.、或20,000Da.与40,000Da.之间。

[0391] 7.一种药物组合物，包括与一种载体轭合或配制的一种治疗化合物，其中所述载体包括一个靶向基团，该靶向基团结合维生素D结合蛋白(DBP)，并且其中所述载体增加所述治疗化合物在循环中的吸收、生物利用度、或半衰期。

[0392] 8.如第7项所述的药物组合物，其中所述靶向基团选自下组，该组由以下各项组成：维生素D、维生素D类似物、维生素D相关代谢物、维生素D相关代谢物的类似物、肽、抗DBP抗体、抗DBP抗体衍生物、核苷酸适体、以及结合DBP的基于碳的小分子。

[0393] 9.如第7项所述的药物组合物，进一步包括一个支架部分，其中所述支架部分选自下组，该组由以下各项组成：聚(乙二醇)、聚赖氨酸、聚乙烯亚胺、聚(丙二醇)、肽、血清白蛋白、硫氧还蛋白、免疫球蛋白、氨基酸、核酸、聚糖、包含反应接头的修饰基团、水溶性聚合物、小碳链接头、以及另外的治疗化合物。

[0394] 10.如第7至9项中任一项所述的药物组合物，其中所述治疗化合物选自下组，该组由以下各项组成：小分子、化学实体、核酸、核酸衍生物、肽、肽衍生物、天然存在的蛋白质、非天然存在的蛋白质、肽-核酸(PNA)、钉肽、吗啉基化合物、磷二酰胺吗啉基化合物、反义

药、基于RNA的沉默药物、适体、糖蛋白、酶、激素、细胞因子、干扰素、生长因子、凝血因子、抗体、抗体片段、抗体衍生物、毒素轭合的抗体、代谢效应子、镇痛药、解热药、抗炎剂、抗生素、抗微生物剂、抗病毒剂、抗真菌药、肌肉骨骼药、心血管药、肾部药物、肺部药物、消化系统病药物、血液药物、泌尿道药物、代谢药物、肝部药物、神经系统药物、抗糖尿病药物、抗癌药物、治疗胃部病症的药物、治疗结肠病症的药物、治疗皮肤病症的药物、以及治疗淋巴病症的药物。

[0395] 11.如第10项所述的药物组合物，其中所述治疗化合物是一种具有FGF21活性的蛋白质，该蛋白质包括与SEQ ID NO:2具有至少90％序列一致性的氨基酸序列。

[0396] 12.如第11项所述的药物组合物，其中所述靶向基团是维生素D。

[0397] 13.如第11项所述的药物组合物，其中所述支架部分是聚(乙二醇)。

[0398] 14.一种药物组合物，包括

[0399] (a)一种具有FGF21活性的蛋白质，该蛋白质包括与SEQ ID NO:2具有至少90％序列一致性的氨基酸序列，

[0400] (b)一个支架部分，该支架部分是聚(乙二醇)，以及

[0401] (c)一个靶向基团，该靶向基团是维生素D，

[0402] 其中所述靶向基团增加所述治疗化合物在循环中的吸收、生物利用度、或半衰期。

[0403] 15.如第10项所述的药物组合物，其中所述治疗化合物是一种具有胃饥饿素活性的蛋白质，该蛋白质包括与SEQ ID NO:5具有至少90％序列一致性的氨基酸序列。

[0404] 16.如第15项所述的药物组合物，其中所述靶向基团是维生素D。

[0405] 17.如第15项所述的药物组合物，其中所述支架部分是聚(乙二醇)。

[0406] 18.一种药物组合物，包括

[0407] (a)一种具有胃饥饿素活性的蛋白质，该蛋白质包括与SEQ ID NO:5具有至少90％序列一致性的氨基酸序列，

[0408] (b)一个支架部分，该支架部分是聚(乙二醇)，以及

[0409] (c)一个靶向基团，该靶向基团是维生素D，

[0410] 其中所述靶向基团增加所述治疗化合物在循环中的吸收、生物利用度、或半衰期。

[0411] 19.一种治疗一位需要治疗化合物的患者的方法，该方法包括给予有效量的如第7至9项中任一项所述的药物组合物。

[0412] 20.如第19项所述的方法，其中所述治疗化合物选自下组，该组由以下各项组成：小分子、化学实体、核酸、核酸衍生物、肽、肽衍生物、天然存在的蛋白质、非天然存在的蛋白质、肽-核酸(PNA)、钉肽、吗啉基化合物、磷二酰胺吗啉基化合物、反义药、基于RNA的沉默药物、适体、糖蛋白、酶、激素、细胞因子、干扰素、生长因子、凝血因子、抗体、抗体片段、抗体衍生物、毒素轭合的抗体、代谢效应子、镇痛药、解热药、抗炎剂、抗生素、抗微生物剂、抗病毒剂、抗真菌药、肌肉骨骼药、心血管药、肾部药物、肺部药物、消化系统病药物、血液药物、泌尿道药物、代谢药物、肝部药物、神经系统药物、抗糖尿病药物、抗癌药物、治疗胃部病症的药物、治疗结肠病症的药物、治疗皮肤病症的药物、以及治疗淋巴病症的药物。

[0413] 21.如第20项所述的方法，其中所述治疗化合物是一种具有FGF21活性的蛋白质，该蛋白质包括与SEQ ID NO:2具有至少90％序列一致性的氨基酸序列。

[0414] 22.如第20项所述的方法，其中所述治疗化合物是一种具有胃饥饿素活性的蛋白

质，该蛋白质包括与SEQ ID NO:5具有至少90％序列一致性的氨基酸序列。

[0415] 23.如第19项所述的方法，其中所述靶向基团是维生素D。

[0416] 24.如第19项所述的方法，其中所述支架是聚(乙二醇)。

[0417] 25.如第19项所述的方法，其中所述药物组合物是一种药学上可接受的配制品。

[0418] 26.如第19项所述的方法，其中所述药物组合物是通过以下方式递送至所述患者：透皮、口服、肠胃外、皮下、皮内、静脉内、肌肉内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、病灶内、颅内注射、输注、吸入、经眼睛、局部、经直肠、经鼻、经颊、舌下、经阴道、或植入式储药器。

[0419] 27.如第7至9、14或18项中任一项所述的药物组合物用于生产一种药剂的用途，所述药剂用于治疗一位需要其的患者。

[0420] 28.一种生产如第7至9、14或18项中任一项所述的药物组合物的方法，该方法包括将一个靶向基团和一种药物轭合至一种载体-药物化合物中，其中所述轭合步骤采用一个偶联基团。

[0421] 29.根据第28项所述的方法，进一步包括将一个支架部分轭合至所述靶向基团或所述药物。

[0422] 30.根据第28项所述的方法，其中所述偶联基团选自下组，该组由以下各项组成：胺反应基团、硫醇反应基团、马来酰亚胺基团、硫醇基、醛基、NHS-酯基、卤代乙酰基、碘代乙酰基、溴代乙酰基、SMCC基团、磺基SMCC基团、碳二亚胺基团、双官能团交联剂、NHS-马来酰亚胺基、及其组合。

[0423] 31.从如第28项所述的方法获得的药物组合物，其中所述组合物包括一种含有连键的载体-药物化合物，该连键选自下组，该组由以下各项组成：硫醇键、酰胺键、肼键、腙键、以及噻唑啉酮键。

[0424] 32.根据第28项所述的方法，其中所述轭合步骤是通过环加成反应完成的。

[0425] 33.根据第28项所述的方法，其中所述靶向基团选自下组，该组由以下各项组成：维生素D、维生素D类似物、维生素D相关代谢物、维生素D相关代谢物的类似物、肽、抗DBP抗体、抗DBP抗体衍生物、核苷酸适体、以及结合DBP的基于碳的小分子。

[0426] 34.如第28项所述的方法，其中所述支架部分选自下组，该组由以下各项组成：聚(乙二醇)、聚赖氨酸、聚乙烯亚胺、聚(丙二醇)、肽、血清白蛋白、硫氧还蛋白、免疫球蛋白、氨基酸、核酸、聚糖、包含反应接头的修饰基团、水溶性聚合物、小碳链接头、以及另外的治疗部分。

[0427] 35.如第10项所述的药物组合物，其中所述治疗化合物是一种抗体。

[0428] 36.如第35项所述的药物组合物，其中所述抗体是一种抗TNFα抗体，该抗体特异性地结合一种具有与SEQ ID NO:10有至少90％序列一致性的氨基酸序列的蛋白质。

[0429] 37.如第36项所述的药物组合物，其中所述抗TNFα抗体特异性地结合一种具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的蛋白质。

[0430] 38.如第37项所述的药物组合物，其中所述靶向基团是维生素D，并且所述支架部分是聚(乙二醇)。

[0431] 39.一种包括式I的药物载体：

[0432] $B-L^1-S-L^2-L^3-C$

[0433] I

[0434] 其中：

[0435] B是一个选自以下的靶向基团：维生素D、维生素D类似物、维生素D相关代谢物、维生素D相关代谢物的类似物、结合DBP的肽、抗DBP抗体、抗DBP抗体衍生物、结合DBP的核苷酸适体、或结合DBP的基于碳的小分子；

[0436] S是一个包括以下的支架部分：聚(乙二醇)、聚赖氨酸、聚乙烯亚胺、聚(丙二醇)、肽、血清白蛋白、硫氧还蛋白、免疫球蛋白、氨基酸、核酸、聚糖、包含反应接头的修饰基团、聚乳酸、水溶性聚合物、小碳链接头、或另外的治疗部分；

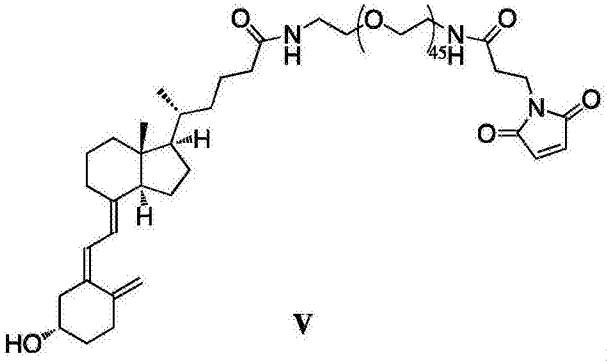
[0437] C是胺反应基团、硫醇反应基团、马来酰亚胺基团、硫醇基团、二硫化物基团、醛基、NHS-酯基、4-硝基苯基酯、酰基咪唑、卤代乙酰基、碘代乙酰基、溴代乙酰基、SMCC基团、磺基SMCC基团、碳二亚胺基团以及诸如NHS-马来酰亚胺基的双官能团交联剂，或其组合；

[0438] L^1和L^2是独立选自以下的接头：$-(CH_2)_n-$、-C(O)NH-、-HNC(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-O-、-S-S-、-S-、-S(O)-、$-S(O)_2-$以及-NH-；L^3是$-(CH_2)_o-$；

[0439] n是一个0-3的整数；并且

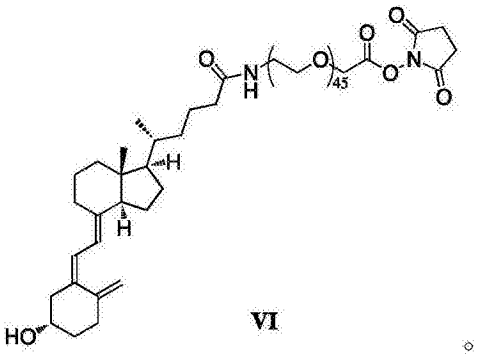
[0440] o是一个0-3的整数。

[0441] 40.如第39项所述的药物载体，包括式V：

[0442] 

V

[0443] 41.如第39项所述的药物载体，包括式VI：

[0444] 

VI

序列表

<110> 塔里克(Tarik), 苏莱曼(SOLIMAN) M.

劳拉(Laura), 黑尔斯(HALES) M.

霍华德(Howard), 萨尔德(SARD) P.

穆肯蒂(MUKKANTI), 埃默尔(AMERE)

<120> 用于改进的药物递送的载体

<130> XTND002W

<140> 待指定

<141> 同此

<150> 61/673,874

<151> 2010-07-20

<160> 10

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 209

<212> PRT

<213> 人类FGF21蛋白序列

<400> 1

Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser
1 5 10 15
Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro
20 25 30
Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr
35 40 45
Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg
50 55 60
Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu
65 70 75 80
Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val
85 90 95
Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly
100 105 110
Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
115 120 125
Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu
130 135 140
His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly
145 150 155 160

Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu
165 170 175
Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
180 185 190
Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala
195 200 205
Ser

<210> 2
<211> 181
<212> PRT
<213> 成熟人类FGF21蛋白序列
<400> 2

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1 5 10 15
Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
20 25 30
Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
35 40 45
Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
50 55 60
Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
65 70 75 80
Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
85 90 95
Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
100 105 110
Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
115 120 125
Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
130 135 140
Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
145 150 155 160
Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
165 170 175
Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 3
<211> 201
<212> PRT

<213> 修饰的成熟人类FGF21蛋白序列

<400> 3

Met Gly Ser His His His His His His Ser Ser Gly Glu Asn Leu Tyr
1 5 10 15
Phe Gln Gly His Pro Cys Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
20 25 30
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
35 40 45
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
50 55 60
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
65 70 75 80
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
85 90 95
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
100 105 110
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
115 120 125
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
130 135 140
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
145 150 155 160
Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
165 170 175
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln
180 185 190
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser Pro
195 200

<210> 4

<211> 606

<212> DNA

<213> 针对FGF21的优化编码序列

<400> 4

atgggctcac atcatcacca ccatcatagc agcggagaga acttgtattt tcagggacat 60
ccgtgccctg acagcagccc gctgctgcag ttcggtggtc aagtccgtca gcgttacctg 120
tacactgacg acgcgcaaca gaccgaggcg cacctggaaa ttcgcgaaga tggtacggtg 180
ggtggcgcag cggaccaaag cccggagtcc ctgttgcagc tgaaggccct gaagccgggt 240
gtcatccaaa tcctgggcgt taaaaccagc cgttttctgt gccaacgtcc ggatggtgcg 300
ctgtacggtt ccctgcactt cgacccagag gcatgtagct ttcgtgaact gctgctggaa 360

gatggctata atgtgtacca gtctgaggcg cacggtctgc cgttgcactt gccgggtaac 420
aaaagcccgc accgcgaccc agcaccgcgt ggtccggctc gcttcctgcc gctgccgggt 480
ctgcctccgg cgctgccgga gccgccaggc attctggctc cgcaaccgcc ggatgttggc 540
agcagcgatc cgctgagcat ggttgaaccg tcgcagggcc gcagcccgtc ttatgccagc 600
ccgtaa 606

<210> 5
<211> 28
<212> PRT
<213> 人类胃饥饿素蛋白序列
<400> 5

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys
1 5 10 15
Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
20 25

<210> 6
<211> 29
<212> PRT
<213> 具有添加的C端cys的大鼠胃饥饿素
<400> 6

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys
1 5 10 15
Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Cys
20 25

<210> 7
<211> 474
<212> PRT
<213> DBP蛋白质序列
<400> 7

Met Lys Arg Val Leu Val Leu Leu Leu Ala Val Ala Phe Gly His Ala
1 5 10 15
Leu Glu Arg Gly Arg Asp Tyr Glu Lys Asn Lys Val Cys Lys Glu Phe
20 25 30
Ser His Leu Gly Lys Glu Asp Phe Thr Ser Leu Ser Leu Val Leu Tyr
35 40 45
Ser Arg Lys Phe Pro Ser Gly Thr Phe Glu Gln Val Ser Gln Leu Val
50 55 60
Lys Glu Val Val Ser Leu Thr Glu Ala Cys Cys Ala Glu Gly Ala Asp
65 70 75 80
Pro Asp Cys Tyr Asp Thr Arg Thr Ser Ala Leu Ser Ala Lys Ser Cys

85 90 95

Glu Ser Asn Ser Pro Phe Pro Val His Pro Gly Thr Ala Glu Cys Cys
100 105 110

Thr Lys Glu Gly Leu Glu Arg Lys Leu Cys Met Ala Ala Leu Lys His
115 120 125

Gln Pro Gln Glu Phe Pro Thr Tyr Val Glu Pro Thr Asn Asp Glu Ile
130 135 140

Cys Glu Ala Phe Arg Lys Asp Pro Lys Glu Tyr Ala Asn Gln Phe Met
145 150 155 160

Trp Glu Tyr Ser Thr Asn Tyr Gly Gln Ala Pro Leu Ser Leu Leu Val
165 170 175

Ser Tyr Thr Lys Ser Tyr Leu Ser Met Val Gly Ser Cys Cys Thr Ser
180 185 190

Ala Ser Pro Thr Val Cys Phe Leu Lys Glu Arg Leu Gln Leu Lys His
195 200 205

Leu Ser Leu Leu Thr Thr Leu Ser Asn Arg Val Cys Ser Gln Tyr Ala
210 215 220

Ala Tyr Gly Glu Lys Lys Ser Arg Leu Ser Asn Leu Ile Lys Leu Ala
225 230 235 240

Gln Lys Val Pro Thr Ala Asp Leu Glu Asp Val Leu Pro Leu Ala Glu
245 250 255

Asp Ile Thr Asn Ile Leu Ser Lys Cys Cys Glu Ser Ala Ser Glu Asp
260 265 270

Cys Met Ala Lys Glu Leu Pro Glu His Thr Val Lys Leu Cys Asp Asn
275 280 285

Leu Ser Thr Lys Asn Ser Lys Phe Glu Asp Cys Cys Gln Glu Lys Thr
290 295 300

Ala Met Asp Val Phe Val Cys Thr Tyr Phe Met Pro Ala Ala Gln Leu
305 310 315 320

Pro Glu Leu Pro Asp Val Glu Leu Pro Thr Asn Lys Asp Val Cys Asp
325 330 335

Pro Gly Asn Thr Lys Val Met Asp Lys Tyr Thr Phe Glu Leu Ser Arg
340 345 350

Arg Thr His Leu Pro Glu Val Phe Leu Ser Lys Val Leu Glu Pro Thr
355 360 365

Leu Lys Ser Leu Gly Glu Cys Cys Asp Val Glu Asp Ser Thr Thr Cys
370 375 380

Phe Asn Ala Lys Gly Pro Leu Leu Lys Lys Glu Leu Ser Ser Phe Ile
385 390 395 400

Asp Lys Gly Gln Glu Leu Cys Ala Asp Tyr Ser Glu Asn Thr Phe Thr
405 410 415
Glu Tyr Lys Lys Lys Leu Ala Glu Arg Leu Lys Ala Lys Leu Pro Asp
420 425 430
Ala Thr Pro Thr Glu Leu Ala Lys Leu Val Asn Lys His Ser Asp Phe
435 440 445
Ala Ser Asn Cys Cys Ser Ile Asn Ser Pro Pro Leu Tyr Cys Asp Ser
450 455 460
Glu Ile Asp Ala Glu Leu Lys Asn Ile Leu
465 470

<210> 8
<211> 1800
<212> DNA
<213> DBP核苷酸序列
<400> 8

tttaataata attctgtgtt gcttctgaga ttaataattg attaattcat agtcaggaat 60
ctttgtaaaa aggaaaccaa ttacttttgg ctaccacttt tacatggtca cctacaggag 120
agaggaggtg ctgcaagact ctctggtaga aaaatgaaga gggtcctggt actactgctt 180
gctgtggcat ttggacatgc tttagagaga ggccgggatt atgaaaagaa taaagtctgc 240
aaggaattct cccatctggg aaaggaggac ttcacatctc tgtcactagt cctgtacagt 300
agaaaatttc ccagtggcac gtttgaacag gtcagccaac ttgtgaagga agttgtctcc 360
ttgaccgaag cctgctgtgc ggaaggggct gaccctgact gctatgacac caggacctca 420
gcactgtctg ccaagtcctg tgaaagtaat tctccattcc ccgttcaccc aggcactgct 480
gagtgctgca ccaaagaggg cctggaacga aagctctgca tggctgctct gaaacaccag 540
ccacaggaat tccctaccta cgtggaaccc acaaatgatg aaatctgtga ggcgttcagg 600
aaagatccaa aggaatatgc taatcaattt atgtgggaat attccactaa ttacggacaa 660
gctcctctgt cacttttagt cagttacacc aagagttatc tttctatggt agggtcctgc 720
tgtacctctg caagcccaac tgtatgcttt ttgaaagaga gactccagct taaacattta 780
tcacttctca ccactctgtc aaatagagtc tgctcacaat atgctgctta tggggagaag 840
aaatcaaggc tcagcaatct cataaagtta gcccaaaaag tgcctactgc tgatctggag 900
gatgttttgc cactagctga agatattact aacatcctct ccaaatgctg tgagtctgcc 960
tctgaagatt gcatggccaa agagctgcct gaacacacag taaaactctg tgacaattta 1020
tccacaaaga attctaagtt tgaagactgt tgtcaagaaa aaacagccat ggacgttttt 1080
gtgtgcactt acttcatgcc agctgcccaa ctccccgagc ttccagatgt agagttgccc 1140
acaaacaaag atgtgtgtga tccaggaaac accaaagtca tggataagta tacatttgaa 1200
ctaagcagaa ggactcatct tccggaagta ttcctcagta ggtacttgag ccaaccctaa 1260
aaagccttgg tgaatgctgt gatgttgaag actcaactac ctgttttaat gctaagggcc 1320
ctctactaaa gaaggaacta tcttctttca ttgacaaggg acaagaacta tgtgcagatt 1380
attcagaaaa tacatttact gagtacaaga aaaaactggc agagcgacta aaagcaaaat 1440

tgcctgatgc cacacccacg gaactggcaa agctggttaa caagcactca gactttgcct 1500
ccaactgctg ttccataaac tcacctcctc tttactgtga ttcagagatt gatgctgaat 1560
tgaagaatat cctgtagtcc tgaagcatgt ttattaactt tgaccagagt tggagccacc 1620
caggggaatg atctctgatg acctaaccta agcaaaacca ctgagcttct gggaagacaa 1680
ctaggatact ttctactttt tctagctaca atatcttcat acaatgacaa gtatgatgat 1740
ttgctatcaa aataaattga aatataatgc aaaccataaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1800

<210> 9
<211> 702
<212> DNA
<213> 肿瘤坏死因子-α
<400> 9

atgagcactg aaagcatgat ccgggacgtg gagctggccg aggaggcgct ccccaagaag 60
acaggggggc cccagggctc caggcggtgc ttgttcctca gcctcttctc cttcctgatc 120
gtggcaggcg ccaccacgct cttctgcctg ctgcactttg gggtgatcgg cccccagagg 180
gaagagttcc ccagggacct ctctctaatc agccctctgg cccaggcagt cagatcatct 240
tctcgaaccc cgagtgacaa gcctgtagcc catgttgtag caaaccctca agctgagggg 300
cagctccagt ggctgaaccg ccgggccaat gccctcctgg ccaatggcgt ggagctgaga 360
gataaccagt tggtggtgcc atcagagggc ctgtacctca tctactccca ggtcctcttc 420
aagggccaag gctgcccctc cacccatgtg ctcctcaccc acaccatcag ccgcatcgcc 480
gtctcctacc agaccaaggt caacctcctc tctgccatca agagcccctg ccagagggag 540
accccagagg gggctgaggc caagccctgg tatgagccca tctatctggg aggggtcttc 600
cagctggaga agggtgaccg actcagcgct gagatcaatc ggcccgacta tctcgacttt 660
gccgagtctg ggcaggtcta ctttgggatc attgccctgt ga 702

<210> 10
<211> 233
<212> PRT
<213> 肿瘤坏死因子-α
<400> 10

Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
1 5 10 15
Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe
20 25 30
Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe
35 40 45
Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro
50 55 60
Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser
65 70 75 80
Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro

85 90 95

Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu
100 105 110

Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser
115 120 125

Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly
130 135 140

Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala
145 150 155 160

Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro
165 170 175

Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu
180 185 190

Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu
195 200 205

Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly
210 215 220

Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
225 230

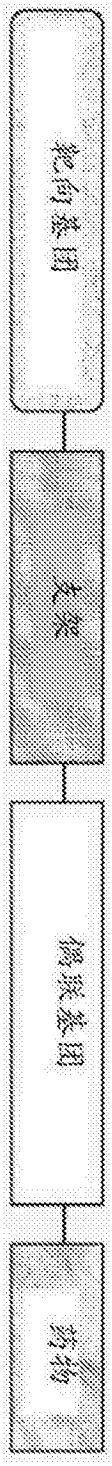


图1

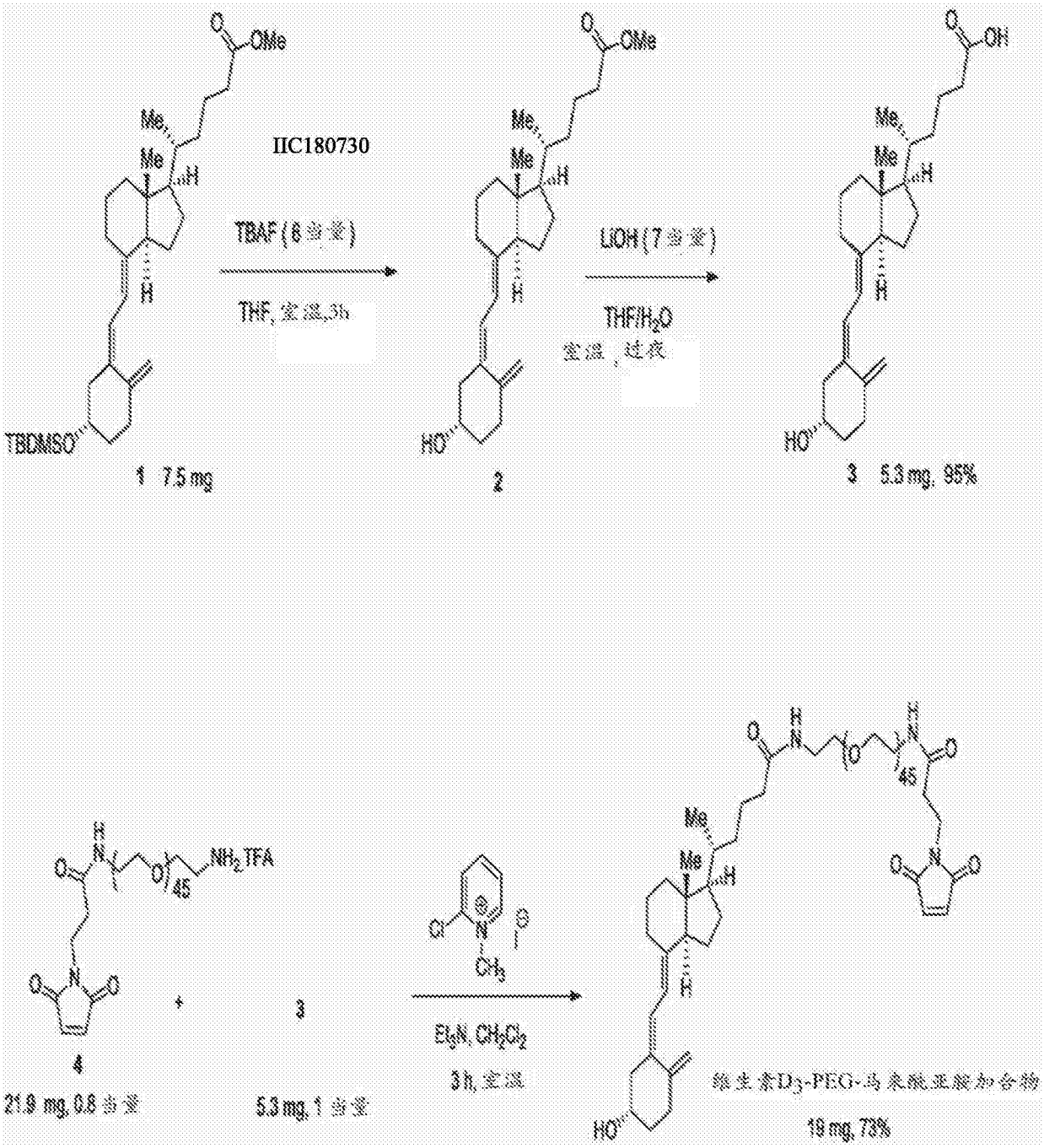

IIC180730
TBAF (6 当量)
THF, 室温, 3h
1 7.5 mg
LiOH (7 当量)
THF/H2O
室温，过夜
2
3 5.3 mg, 95%
4
21.9 mg, 0.8 当量
+
3
5.3 mg, 1 当量
Et3N, CH2Cl2
3 h, 室温
维生素D3-PEG-马来酰亚胺加合物
19 mg, 73%

图2

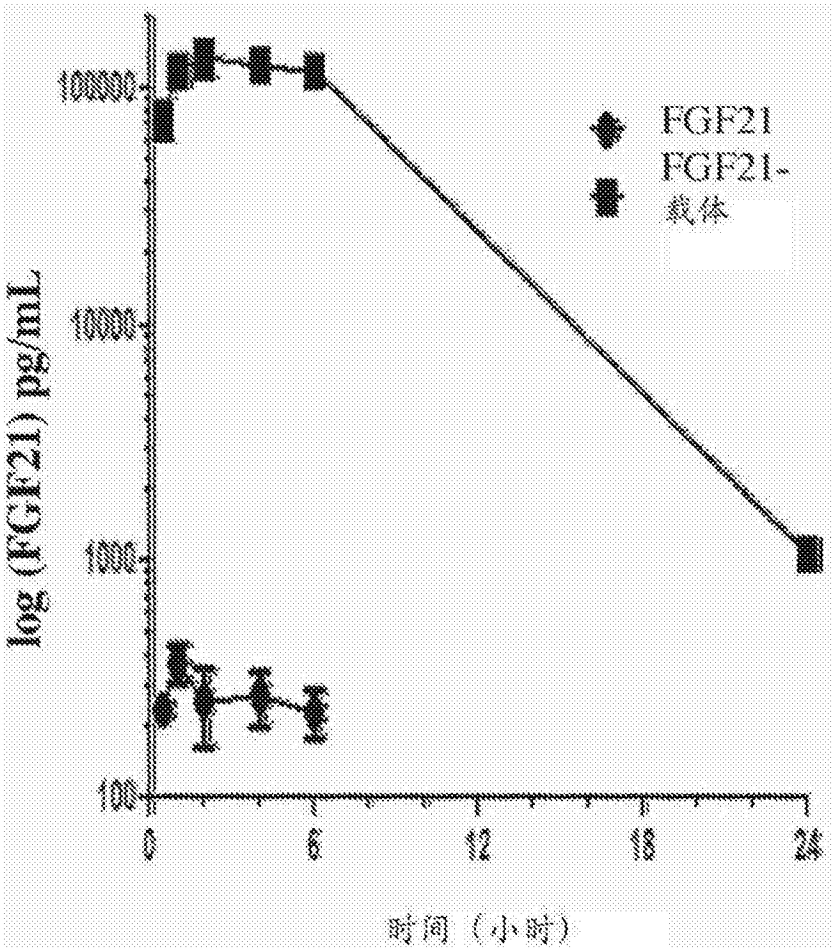


图3

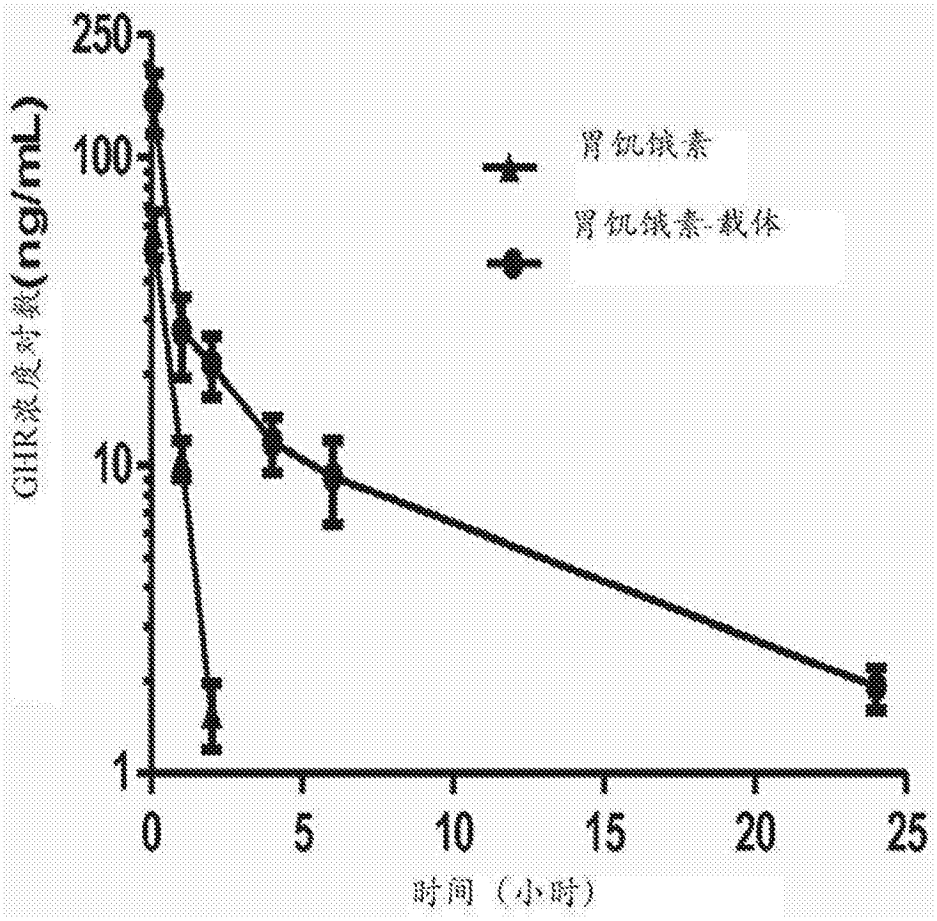


图4

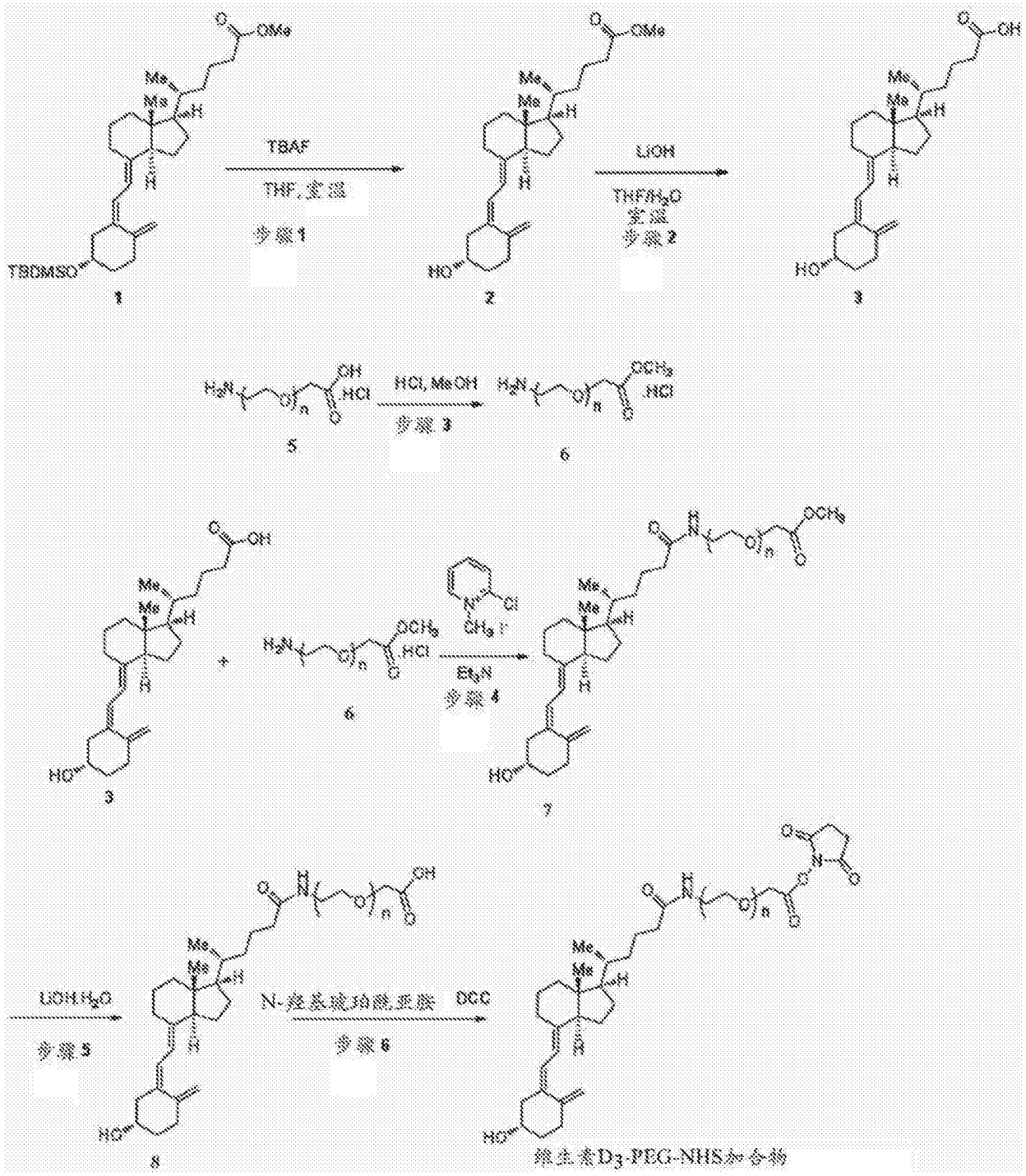
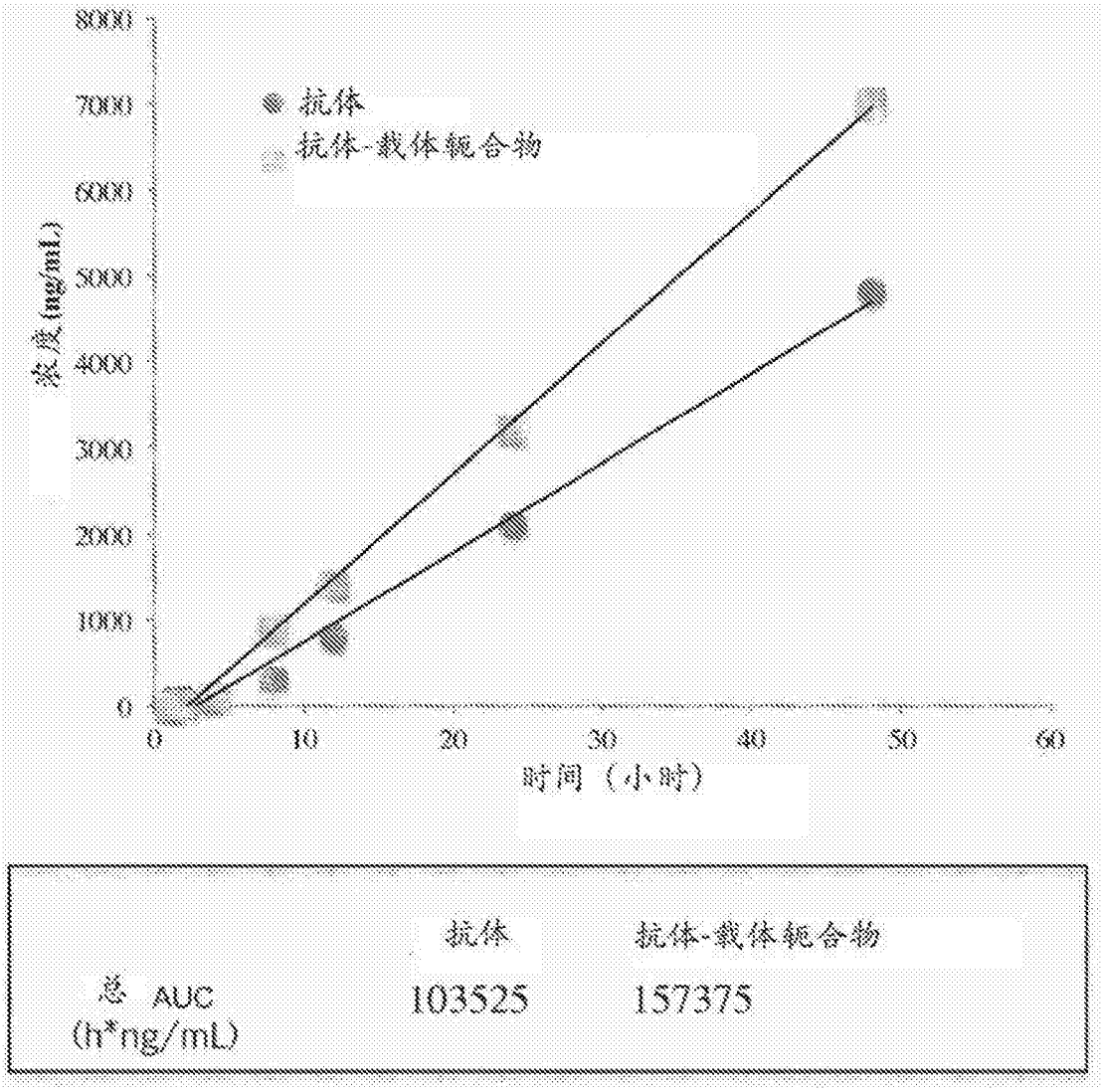

TBAF
THF, 室温
步骤1
LiOH
THF/H2O
室温
步骤2
HCl, MeOH
步骤3
Et3N
步骤4
LiOH·H2O
步骤5
N-羟基琥珀酰亚胺
DCC
步骤6
维生素D3-PEG-NHS衍生物

图5



	抗体	抗体-载体耗合物
总 AUC (h*ng/mL)	103525	157375

图6