

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 03824856.5

[51] Int. Cl.

C07K 14/00 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)
C07K 14/575 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 7 月 11 日

[11] 公开号 CN 1997661A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

A61K 38/38 (2006.01)

[22] 申请日 2003.9.25 [21] 申请号 03824856.5

[30] 优先权

[32] 2002.9.30 [33] US [31] 60/414,424

[32] 2002.12.12 [33] US [31] 10/317,092

[86] 国际申请 PCT/US2003/029989 2003.9.25

[87] 国际公布 WO2004/030617 英 2004.4.15

[85] 进入国家阶段日期 2005.4.29

[71] 申请人 山景医药公司

地址 美国加利福尼亚

[72] 发明人 A·L·马丁内斯 M·R·舍曼

M·G·P·塞弗

L·D·威廉姆斯

[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

代理人 陈轶兰

权利要求书 10 页 说明书 55 页 附图 9 页

[54] 发明名称

抗原性减弱的聚合物缀合物,其制备方法和应用

[57] 摘要

本发明提供了用于制备多种生物活性成分,特别是蛋白与水溶性聚合物(例如,聚(乙二醇)及其衍生物)的缀合物的方法,所述缀合物与用含有甲氧基或另一种烷氧基的聚(乙二醇)制备的类似缀合物相比,具有减弱了的抗原性和免疫原性。本发明还提供了通过所述方法制备的缀合物,包括所述缀合物的组合物,包括所述缀合物或组合物的试剂盒,以及将所述缀合物和组合物用于诊断和治疗方案的方法。

1. 一种缀合物，包括与至少一个线性或分支的聚烷撑二醇共价结合的一种或多种生物活性成分，其中，所述聚烷撑二醇在任何末端都不包括烷氧基，并且所述聚烷撑二醇在所述聚烷撑二醇上的单一位点与单一的生物活性成分相连。

2. 如权利要求 1 的缀合物，其中，与包括相同生物活性成分的，在所述生物活性成分上的相同位点与相同数目的包括一个或多个末端烷氧基的具有相同大小和线性或分支的结构聚烷撑二醇连接的缀合物相比，所述缀合物的抗原性是减弱了的或明显减弱了的。

3. 如权利要求 1 的缀合物，其中，所述线性或分支的聚烷撑二醇选自：聚（乙二醇）和环氧乙烷与环氧丙烷的共聚物。

4. 如权利要求 3 的缀合物，其中，所述线性或分支的聚烷撑二醇是聚（乙二醇）（"PEG"）。

5. 如权利要求 1 的缀合物，其中，所述聚烷撑二醇与所述生物活性成分的结合是用选自以下的至少一种聚烷撑二醇的反应性衍生物实现的：线性二羟基 PEG（"PEG 二醇"），羟基 PEG-一缩醛和羟基 PEG-一酸。

6. 如权利要求 1 的缀合物，其中，所述聚烷撑二醇与所述生物活性成分的结合是用选自以下的羟基 PEG 的反应性衍生物实现的：一醛，一酸的单酯，一胺，一硫醇，单二硫化物，单溴苯基碳酸酯，单氯苯基碳酸酯，单氟苯基碳酸酯，单硝基苯基碳酸酯，一羰基咪唑，一酰肼，一胍基甲酸酯，一碘乙酰胺，一马来酰亚胺，一邻吡啶基二硫化物，一肟，一苯甲酰甲醛，一噻唑烷-2-硫酮，一硫酯，单三嗪和单乙烯基砷。

7. 如权利要求 1 的缀合物，其中，所述聚烷撑二醇的分子量为大约 1,000 道尔顿（1 kDa）-大约 100,000 道尔顿（100 kDa）。

8. 如权利要求 7 的缀合物，其中，所述聚烷撑二醇的分子量为大约 2 kDa -大约 60 kDa。

9. 如权利要求 8 的缀合物，其中，所述聚烷撑二醇具有两个分支，

各自的分子量为大约 2 kDa -大约 30 kDa。

10. 如权利要求 9 的缀合物,其中,所述聚烷撑二醇具有两个分支,各自的分子量为大约 5 kDa -大约 20 kDa。

11. 如权利要求 8 的缀合物,其中,所述聚烷撑二醇的分子量为大约 10 kDa -大约 20 kDa。

12. 如权利要求 11 的缀合物,其中,所述聚烷撑二醇的分子量为大约 12 kDa。

13. 如权利要求 8 的缀合物,其中,所述聚烷撑二醇的分子量为大约 18 kDa -大约 60 kDa。

14. 如权利要求 13 的缀合物,其中,所述聚烷撑二醇的分子量为大约 18 kDa -大约 22 kDa。

15. 如权利要求 14 的缀合物,其中,所述聚烷撑二醇的分子量为大约 20 kDa。

16. 如权利要求 13 的缀合物,其中,所述聚烷撑二醇的分子量为大约 27 kDa -大约 33 kDa。

17. 如权利要求 1 的缀合物,其中,所述缀合物包括大约 1 -大约 100 股所述聚烷撑二醇。

18. 如权利要求 17 的缀合物,其中,所述缀合物包括大约 1 -大约 5 股所述聚烷撑二醇。

19. 如权利要求 18 的缀合物,其中,所述缀合物包括大约 1 或大约 2 股所述聚烷撑二醇。

20. 如权利要求 17 的缀合物,其中,所述缀合物包括大约 5 -大约 100 股所述聚烷撑二醇。

21. 如权利要求 1 的缀合物,其中,所述聚烷撑二醇选自:一羟基 PEG-酸和二羟基 PEG-酸,如二羟基 PEG-赖氨酸。

22. 如权利要求 1 的缀合物,其中,所述聚烷撑二醇如果是线性的话,具有位于不与所述生物活性成分结合的末端("远端末端")的羟基;或者如果是分支的话,在每个远端末端具有羟基。

23. 如权利要求 5 的缀合物,其中,所述聚烷撑二醇是所述线性二

羟基 PEG 的反应性衍生物。

24. 如权利要求 5 的缀合物, 其中, 所述聚烷撑二醇是所述羟基 PEG—羧酸的反应性衍生物。

25. 如权利要求 1 的缀合物, 其中, 所述生物活性成分选自下列一组: 肽, 蛋白, 糖蛋白, 有机化合物, 含胺的化合物, 含羧基的化合物, 含羟基的化合物和含硫醇的化合物。

26. 如权利要求 25 的缀合物, 其中, 所述生物活性成分选自下列一组: 肽, 蛋白和糖蛋白。

27. 如权利要求 26 的缀合物, 其中, 所述肽或蛋白或糖蛋白选自下列一组: 酶, 血清蛋白, 血清糖蛋白, 血细胞蛋白, 色素蛋白, 血红蛋白, 病毒蛋白, 肽激素, 蛋白激素, 糖蛋白激素, 下丘脑释放因子, 细胞因子, 生长因子和模拟上述组中任意一种或功能为它们的拮抗剂的肽和蛋白和糖蛋白。

28. 如权利要求 27 的缀合物, 其中, 所述血清蛋白选自下列一组: 白蛋白, 免疫球蛋白, 凝血因子和模拟上述血清蛋白中任意一种或功能为它们的拮抗剂的肽和蛋白和糖蛋白。

29. 如权利要求 27 的缀合物, 其中, 所述肽激素或蛋白激素或糖蛋白激素选自下列一组: 抗利尿激素, 绒毛膜促性腺激素, 促黄体生成激素, 促卵泡激素, 胰岛素, 催乳素, 促生长因子, 生长激素, 甲状腺刺激激素, 胎盘催乳素和模拟上述激素中的任意一种或功能为它们的拮抗剂的肽和蛋白和糖蛋白。

30. 如权利要求 27 的缀合物, 其中, 所述生长因子选自下列一组: 集落刺激因子, 表皮生长因子, 成纤维细胞生长因子, 胰岛素样生长因子, 转化生长因子, 血小板衍生的生长因子, 神经生长因子, 肝细胞生长因子, 神经营养因子, 睫状神经营养因子, 脑衍生的神经营养因子, 神经胶质衍生的神经营养因子或骨形态发生肽和模拟上述生长因子中的任意一种或功能为它们的拮抗剂的肽和蛋白和糖蛋白。

31. 如权利要求 27 的缀合物, 其中, 所述细胞因子选自下列一组: 促红细胞生成素, 淋巴因子, 白介素, 干扰素, 肿瘤坏死因子, 白血病

抑制因子和血小板生成素和模拟上述细胞因子中的任意一种或功能为它们的拮抗剂的肽和蛋白和糖蛋白。

32. 如权利要求 27 的缀合物, 其中, 所述酶选自下列一组: 碳水化合物特异性酶, 蛋白水解酶, 氧化还原酶, 转移酶, 水解酶, 裂解酶, 异构酶和连接酶。

33. 如权利要求 32 的缀合物, 其中, 所述氧化还原酶是尿酸酶。

34. 如权利要求 32 的缀合物, 其中, 所述蛋白水解酶是纤维蛋白溶酶原激活物。

35. 如权利要求 26 的缀合物, 其中, 所述肽, 蛋白或糖蛋白是过敏原。

36. 如权利要求 1 的缀合物, 其中, 所述生物活性化合物是紫杉烷或其衍生物。

37. 如权利要求 1 的缀合物, 其中, 所述生物活性化合物是抗生素或其衍生物。

38. 一种药用组合物, 包括权利要求 1 的缀合物和可以药用的赋形剂或载体。

39. 一种预防, 诊断, 或治疗动物的身体疾病的方法, 包括给所述动物施用有效量的权利要求 1 的缀合物或权利要求 38 的组合物。

40. 如权利要求 39 的方法, 其中, 所述动物是哺乳动物。

41. 如权利要求 40 的方法, 其中, 所述哺乳动物是人。

42. 如权利要求 39 的方法, 其中, 所述身体疾病选自下列一组: 癌, 关节炎, 感染性疾病, 遗传障碍, 神经系统疾病, 代谢障碍, 酶障碍, 心血管疾病和高血压。

43. 如权利要求 42 的方法, 其中, 所述癌选自下列一组: 乳腺癌, 子宫癌, 卵巢癌, 前列腺癌, 睾丸癌, 肺癌, 白血病, 淋巴瘤, 结肠癌, 胃肠癌, 胰腺癌, 膀胱癌, 肾癌, 骨癌, 神经系统癌, 头颈部癌, 皮肤癌和其他癌, 肉瘤, 腺瘤和骨髓瘤。

44. 如权利要求 42 的方法, 其中, 所述感染性疾病选自下列一组: 细菌性疾病, 真菌性疾病, 病毒性疾病和寄生虫病。

45. 如权利要求 44 的方法, 其中, 所述病毒性疾病选自 HIV/AIDS 和肝炎。

46. 如权利要求 42 的方法, 其中, 所述遗传障碍选自下列一组: 肌萎缩性脊髓侧索硬化, 囊性纤维化, 高歇病, 血友病和其他遗传性血液病, 庞普病和严重联合免疫缺陷病 ("SCID")。

47. 如权利要求 42 的方法, 其中, 所述神经系统疾病选自阿尔茨海默氏病和多发性硬化。

48. 如权利要求 39 的方法, 其中, 所述施用是肠胃外施用。

49. 如权利要求 48 的方法, 其中, 所述肠胃外施用是静脉内施用。

50. 如权利要求 39 的方法, 其中, 所述施用是口服。

51. 如权利要求 39 的方法, 其中, 所述施用是局部使用。

52. 如权利要求 39 的方法, 其中, 所述施用是通过吸入。

53. 如权利要求 39 的方法, 其中, 所述施用是直肠使用。

54. 一种生产生物活性化合物和仅在一个末端活化的聚烷撑二醇 ("单活化的聚烷撑二醇") 的缀合物的方法, 包括:

(a) 获得不包括任何端基的聚烷撑二醇, 所述端基是稳定连接的烷氧基;

(b) 任选地, 在将步骤 (a) 的聚烷撑二醇转化成单官能活化的聚烷撑二醇之前, 通过添加一个或多个可除去的封闭基团, 如叔丁氧基, 芳氧基或三苯基甲基 ("三苯甲基") 保护除了一个端基之外的所有端基;

(c) 通过让所述聚烷撑二醇与衍生化化合物起反应, 生产所述聚烷撑二醇的单官能活化的衍生物, 反应条件使得所述聚烷撑二醇在不包括所述可除去的封闭基团的末端衍生单一衍生化基团;

(d) 如果添加了封闭基团来保护端基, 如上面步骤 (b) 所述, 则以一个或多个步骤除去所述封闭基团, 而不除去按上述步骤 (c) 所述结合的活化基团, 以产生单官能活化的聚烷撑二醇, 其中远端末端是羟基; 和

(e) 在有利于所述单官能活化的聚烷撑二醇与所述生物活性成分共价结合的条件下让所述单官能活化的聚烷撑二醇与至少一种生物活

性成分接触，或

(f) 或者在实施步骤(d)之前实施步骤(e)。

55. 如权利要求54的方法，其中，所述衍生化基团选自下列一组：醛和羧基。

56. 如权利要求54的方法，其中，所述封闭基团选自下列一组：三苯甲基，芳氧基和叔丁氧基。

57. 一种从相应的PEG-二醛中分离线性单羟基PEG-一醛的方法，包括：

(a) 将PEG-醛上的所有羟基转化成三苯甲基衍生物；

(b) 通过反相层析将单三苯甲基PEG-一醛与PEG-二醛和任何双-三苯甲基PEG分离，和

(c) 通过在酸性介质中水解除去所述三苯甲基，将单三苯甲基PEG-一醛转化成单羟基PEG-一醛。

58. 如权利要求57的方法，其中，所述醛或者所述二醛为缩醛衍生物形式。

59. 用权利要求54的方法生产的缀合物。

60. 如权利要求59的缀合物，其中，所述缀合物的抗原性与包括相同生物活性成分、在生物活性成分上的相同位点与相同数目的具有相同大小和线性或分支结构的聚烷撑二醇分子连接的缀合物相比是减弱了的或明显减弱了的，其中如果所述聚烷撑二醇是线性的话，其包括位于远端末端的烷氧基，或者如果所述聚烷撑二醇是分支的话，包括位于远端末端的两个或多个烷氧基。

61. 如权利要求59的缀合物，其中，所述聚烷撑二醇选自下列一组：聚(乙二醇)和环氧乙烷与环氧丙烷的共聚物。

62. 如权利要求59的缀合物，其中，所述聚烷撑二醇成分选自下列一组：线性聚(乙二醇)和分支的聚(乙二醇)。

63. 如权利要求59的缀合物，其中，各所述聚烷撑二醇的分子量为大约1 kDa - 大约100 kDa。

64. 如权利要求63的缀合物，其中，所述聚烷撑二醇的分子量为

大约 2 kDa -大约 60 kDa。

65. 如权利要求 64 的缀合物, 其中, 所述聚烷撑二醇具有两个分支, 各自的分子量为大约 2 kDa -大约 30kDa。

66. 如权利要求 65 的缀合物, 其中, 所述聚烷撑二醇具有两个分支, 各自的分子量为大约 5 kDa -大约 20 kDa。

67. 如权利要求 64 的缀合物, 其中, 所述聚烷撑二醇的分子量为大约 10 kDa -大约 20 kDa。

68. 如权利要求 67 的缀合物, 其中, 所述聚烷撑二醇的分子量为大约 12 kDa。

69. 如权利要求 64 的缀合物, 其中, 所述聚烷撑二醇的分子量为大约 18 kDa -大约 60 kDa。

70. 如权利要求 69 的缀合物, 其中, 所述聚烷撑二醇的分子量为大约 18 kDa -大约 22 kDa。

71. 如权利要求 70 的缀合物, 其中, 所述聚烷撑二醇的分子量为大约 20 kDa。

72. 如权利要求 69 的缀合物, 其中, 所述聚烷撑二醇的分子量为大约 27 kDa -大约 33 kDa。

73. 如权利要求 59 的缀合物, 其中, 所述缀合物包括 1-大约 100 股所述聚烷撑二醇。

74. 如权利要求 73 的缀合物, 其中, 所述缀合物包括大约 1 -大约 5 股所述聚烷撑二醇。

75. 如权利要求 74 的缀合物, 其中, 所述缀合物包括大约 1 或大约 2 股所述聚烷撑二醇。

76. 如权利要求 73 的缀合物, 其中, 所述缀合物包括大约 5-大约 100 股所述聚烷撑二醇。

77. 如权利要求 59 的缀合物, 其中, 用于合成所述缀合物的所述单官能活化的聚烷撑二醇选自下列一组: 羟基 PEG-一醛和羟基 PEG-一酸的活性酯。

78. 如权利要求 59 的缀合物, 其中, 如果是线性的话, 用于合成

所述缀合物的所述单官能活化的聚烷撑二醇在它的远端末端具有羟基，或者如果它是分支的话，在每一个远端末端具有羟基。

79. 如权利要求 59 的缀合物，其中，用于其合成的所述单官能活化的聚烷撑二醇来源于线性二羟基 PEG。

80. 如权利要求 59 的缀合物，其中，所述生物活性成分选自下列一组：肽，蛋白，糖蛋白，有机化合物，含胺的化合物，含羧基的化合物，含羟基的化合物和含硫醇的化合物。

81. 如权利要求 80 的缀合物，其中，所述生物活性成分选自下列一组：肽，蛋白和糖蛋白。

82. 如权利要求 81 的缀合物，其中，所述肽或蛋白或糖蛋白选自下列一组：酶，血清蛋白，血清糖蛋白，血细胞蛋白，色素蛋白，血红蛋白，病毒蛋白，肽激素，蛋白激素，糖蛋白激素，下丘脑释放因子，细胞因子，生长因子和模拟上述组中的任意一种或功能为它们的拮抗剂的肽和蛋白和糖蛋白。

83. 如权利要求 82 的缀合物，其中，所述血清蛋白选自下列一组：白蛋白，免疫球蛋白，凝血因子和模拟上述血清蛋白中的任意一种或功能为它们的拮抗剂的肽和蛋白和糖蛋白。

84. 如权利要求 82 的缀合物，其中，所述肽激素或蛋白激素或糖蛋白激素选自下列一组：抗利尿激素，绒毛膜促性腺激素，促黄体生成激素，促卵泡激素，胰岛素，催乳素，促生长因子，生长激素，甲状腺刺激激素，胎盘催乳素和模拟上述激素中的任意一种或功能为它们的拮抗剂的肽和蛋白和糖蛋白。

85. 如权利要求 82 的缀合物，其中，所述生长因子选自下列一组：集落刺激因子，表皮生长因子，成纤维细胞生长因子，胰岛素样生长因子，转化生长因子，血小板衍生的生长因子，神经生长因子，肝细胞生长因子，神经营养因子，睫状神经营养因子，脑衍生的神经营养因子，神经胶质衍生的神经营养因子或骨形态发生肽和模拟上述生长因子中的任意一种或功能为它们的拮抗剂的肽和蛋白和糖蛋白。

86. 如权利要求 82 的缀合物，其中，所述细胞因子选自下列一组：

促红细胞生成素，淋巴因子，白介素，干扰素，肿瘤坏死因子，白血病抑制因子和血小板生成素和模拟上述细胞因子中的任意一种或功能为它们的拮抗剂的肽和蛋白和糖蛋白。

87. 如权利要求 82 的缀合物，其中，所述酶选自下列一组：碳水化合物特异性酶，蛋白水解酶，氧化还原酶，转移酶，水解酶，裂解酶，异构酶和连接酶。

88. 如权利要求 87 的缀合物，其中，所述氧化还原酶是尿酸酶。

89. 如权利要求 87 的缀合物，其中，所述蛋白水解酶是纤维蛋白溶酶原激活物。

90. 如权利要求 81 的缀合物，其中，所述肽，蛋白或糖蛋白是过敏原。

91. 如权利要求 59 的缀合物，其中，所述生物活性化合物是紫杉烷或其衍生物。

92. 如权利要求 59 的缀合物，其中，所述生物活性化合物是抗生素或其衍生物。

93. 一种药用组合物，包括权利要求 59 的缀合物和可以药用的赋形剂或载体。

94. 包括权利要求 1 的缀合物的试剂盒。

95. 包括权利要求 38 的药用组合物的试剂盒。

96. 包括权利要求 59 的缀合物的试剂盒。

97. 一种 PEG-脂质体组合物，其中，所述 PEG 成分在任何末端都不包括烷氧基，并且每一个 PEG 分子与单一个脂质分子在所述脂质分子和所述 PEG 分子上的单一个位点结合。

98. 如权利要求 97 的组合物，其中，所述结合位点是磷脂酰乙醇胺的氨基。

99. 如权利要求 97 的组合物，其中，所述结合位点是二酰基甘油的羟基。

100. 如权利要求 97 的组合物，其中，与包括至少一种烷氧基 PEG 或在一个以上位点与脂质结合或一个以上脂质分子结合的 PEG 的

PEG-脂质体组合物相比，所述组合物的免疫反应性是减弱了的或明显减弱了的。

抗原性减弱的聚合物缀合物， 其制备方法和应用

发明背景

发明领域

本发明属于蛋白质生物化学以及药物和医学科学领域。具体地讲，本发明提供了用于生产水溶性聚合物（例如，聚（乙二醇）及其衍生物）和生物活性成分的缀合物的方法，与标准聚合物-生物活性成分缀合物相比，所述缀合物具有减弱了的抗原性和免疫原性。本发明还提供了通过所述方法生产的缀合物，包括所述缀合物的组合物，包括所述缀合物和组合物的试剂盒，以及将所述缀合物和组合物用于预防，诊断和治疗多种医学和兽医学状况的方法。

相关技术

有两种关键因素妨碍了重组蛋白作为治疗剂的发展——在循环中它们通常具有短的半衰期以及它们的潜在的抗原性和免疫原性。在本文中并且在本领域中一般来说，术语"抗原性"表示分子与预先存在的抗体结合的能力，而术语"免疫原性"表示在体内引起免疫应答的能力，无论所述反应是否涉及抗体形成（"体液应答"）或细胞免疫应答的刺激。为了施用重组治疗蛋白，静脉内（i.v.）给药通常是理想的，以便获得最高的循环活性，并且减少生物利用度和降解的问题。不过，在静脉内给药之后小蛋白的半衰期通常极短（参见以下文献中的例子：Mordenti, J. 等，（1991）Pharm Res 8: 1351-1359; Kuwabara, T. 等，（1995）Pharm Res 12: 1466-1469）。健康的肾脏通常将流体动力学半径超过血清白蛋白的蛋白保留在血流中，所述血清白蛋白的 Stokes 半径为 c. 36 Å，并且分子量为 c. 66,000 道尔顿（66kDa）。不过，较小的蛋白，如粒细胞集落刺激因子（"G-CSF"）和核糖核酸酶通过肾小球过滤

从血流中迅速清除 (Brenner, B. M., 等 (1978) *Am J Physiol* 234: F455-F460; Venkatachalam, M. A., 等 (1978) *Circ Res* 43: 337-347; Wilson, G., (1979) *J Gen Physiol* 74: 495-509)。结果, 在静脉内给药之后, 在循环中保持小的重组蛋白的治疗有效浓度是成问题的。因此, 必须施用较高浓度的所述蛋白, 并且更频繁地注射。高的剂量速率加大了治疗成本, 降低了患者依从的可能性, 并且加大了不良事件的风险, 例如, 免疫反应。细胞和体液免疫应答, 都能将注射的重组蛋白的循环浓度降低到可阻止施用有效剂量, 或者可能导致诸如过敏反应的治疗限制事件的程度 (Pui, C. -H., 等 (2001) *J Clin Oncol* 19: 697-704)。

施用的其他途径, 如皮下 (s. c.) 或肌肉内 (i. m.) 注射通过提供重组蛋白向循环中的更逐步释放可以克服某些上述问题。不过, 生物利用度可能相当低, 使它难以获得所述药物的有效的循环浓度。与通过皮下或肌肉内施用的药物的较差的生物利用度相关的其他问题是, 治疗蛋白在注射部位降解的可能性增大。

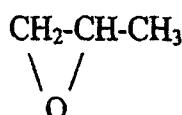
作为解决上述缺点的手段, 业已广泛研究了通过聚 (乙二醇) ("PEG") 的衍生物的共价结合修饰重组蛋白 (在以下文献中进行了综述: Sherman, M. R., 等 (1997): *poly(ethylene glycol): Chemistry and Biological Applications*, Harris, J. M. 等, eds., American Chemical Society, Washington, D. C., pp. 155-169; Roberts, M. J., 等 (2002) *Adv Drug Deliv Res* 54: 459-476)。业已证实 PEG 衍生物与蛋白的结合能稳定所述蛋白, 改善它们的生物利用度和/或降低它们在体内的免疫原性 (PEG 衍生物与蛋白或其他底物的共价结合在这里被称为, 并且在本领域中被称为 "PEG 化")。另外, PEG 化能够显著增加蛋白的流体动力学半径。当诸如细胞因子或多肽激素的小蛋白与单一的长链 PEG (例如, 分子量为至少大约 18 kDa) 偶联时, 所得到的缀合物具有比血清白蛋白大的流体动力学半径, 并且通过肾小球对它的清除被显著延缓。PEG 化的联合作用—减弱了的蛋白水解, 减弱了的免疫识别和降低了的肾清除速率—使 PEG 化的蛋白作为治疗剂具有显著优点。

从 1970 年代开始, 业已进行了尝试, 利用聚合物的共价结合改善各种蛋白作为药物用途的安全性和效力 (例如, 参见, 美国专利号 4, 179, 337)。某些例子包括 PEG 或聚 (环氧乙烷) (PEO) 与腺苷脱氨酶 (EC 3.5. 4.4) 偶联, 用于治疗严重联合免疫缺陷疾病 (Davis, S., 等 (1981) Clin Exp Immunol 46: 649- 652; Hershfield, M. S., 等 (1987) N Engl J Med 316: 589-596)。其他例子包括 PEG 与超氧化物歧化酶 (EC 1.15. 1.1) 偶联, 用于治疗炎症病症 (Saifer, M. 等, 美国专利号 5, 006, 333 和 5, 080, 891) 以及与尿酸氧化酶 (EC 1.7. 3.3) 偶联, 用于消除血液和尿液中的过多的尿酸 (Inada, Y., 日本专利申请 55-099189; Kelly, S. J., 等 (2001) J Am Soc Nephrol 12: 1001-1009; Williams, L. D. 等, PCT 公开号 WO 00/07629 A3, 相应于美国专利号 6, 576, 235; Sherman, M. R. 等, PCT 公开号 W001/59078 A2)。

PEO 和 PEG 是由共价连接的环氧乙烷单位组成的聚合物。这些聚合物具有以下通用结构:



其中, R_2 可以是羟基 (或它的活性衍生物), 而 R_1 可以是氢, 如在 "PEG 二醇" 中, 是甲基, 如在一甲氧基 PEG ("mPEG") 中, 或是其他低级烷基, 例如在异丙氧基 PEG 或叔丁氧基 PEG 中。在 PEG 的通用结构中的参数 n 表示该聚合物中环氧乙烷单位的数量, 并且在这里以及在本领域中被称作 "聚合度"。PEG 和 PEO 可以是线性的, 分支的 (Fuke, L, 等 (1994) J Control Release 30: 27-34) 或星形的 (Merrill, E. W. (1993) J Biomater Sci Polym Ed 5: 1-11)。PEG 和 PEO 是两亲性的, 即它们可溶于水并且可溶于某些有机溶剂, 并且它们能够附着在含脂的材料上, 包括有包膜的病毒, 以及动物和细菌细胞的细胞膜。环氧乙烷 (OCH_2CH_2) 和环氧丙烷的某些随机或嵌段或交替共聚物具有以下结构:



它们具有与 PEG 足够相似的特性, 因此, 这些共聚物被认为在某些应用中是 PEG 的合适的替代物 (例如, 参见, 美国专利号 4, 609, 546 和 5, 283, 317)。在本文中, 术语"聚环氧烷"和缩略语"PAO"表示这样的共聚物, 并且表示 PEG 或 PEO 和聚(氧乙烯-甲醛)共聚物(美国专利号 5, 476, 653)。在本文中, 术语"聚烷撑二醇"和缩略语"PAG"被用于一般表示适用于本发明的缀合物的聚合物, 特别是 PEG, 尤其是含有单一活性基团的 PEG ("单官能活化的 PEG")。

一般, 将一个或多个 PAG 的若干 (例如, 5 - 10) 股, 例如, 分子量为大约 5 kDa - 大约 10 kDa 的一个或多个 mPEG 通过伯氨基 (赖氨酸残基的 ϵ 氨基和 N-末端氨基酸的 α 氨基) 偶联到靶蛋白上。最近, 业已合成了包括具有较大分子量的单链 mPEG 的缀合物, 例如, 12 kDa, 20 kDa 或 30 kDa。业已证实了所述缀合物的血浆半衰期和偶联的 PEG 的分子量增大和/或链数目增加直接相关 (Clark, R., 等 (1996) J Biol Chem 271: 21969- 21977)。另一方面, 随着 PEG 链数目的增加, 生物活性成分 (特别是如果所述生物活性成分是蛋白的话) 重要区域中的氨基被修饰的可能性也加大, 削弱了它的生物学功能 (例如, 酶的催化作用或细胞因子对受体的结合)。对于包括很多氨基的较大的蛋白来说, 以及对于具有低分子量底物的酶来说, 作用持续时间延长和特异性活性降低之间的这种折中可能是可以接受的, 因为它产生了含 PEG 的缀合物在体内的生物学活性的净增加。不过, 对于诸如多肽激素和细胞因子的较小的蛋白来说, 较高的取代度可能将其功能性活性降低到抵消在血流中半衰期延长的优点的程度 (Clark, R. 等, 同上)。

本发明人中的某一些业已倡导了多种 PEG 化策略, 并且业已将这些策略应用在若干种蛋白上, 以便在体内获得有利的药代动力学和增强效力的理想的组合。所述蛋白包括粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 ("GM-CSF") (Saifer, M. G. P., 等 (1997) Polym Preprints 38: 576- 577; Sherman, M. R., 等 (1997) 同上) 和重组哺乳动物尿酸酶 (参见 PCT 公开号 WO 00/07629 和 WO 01/59078; Kelly, S. J. 等, 同上; 美国专利号 6, 576, 235)。用 GM-CSF 作为模型细胞因子, 本发

明人中的某一些业已证实了一股或两股具有高分子量（大约 36 kDa）的 mPEG 的结合足以显著增强重组鼠 GM-CSF 在体内的效力（Saifer, M. G. P. 等（1997）同上；Sherman, M. R. 等（1997）同上）。

同样业已进行了研究，其中，对重组哺乳动物尿酸氧化酶（尿酸酶）进行修饰，并且探究了对难治性痛风的潜在治疗作用（参见 PCT 公开号 WO 00/07629，相应于美国专利号 6, 576, 235，和 WO 01/59078，以上文献的内容被完整地收作本文参考）。在将 PEG-尿酸酶用于治疗表现出显著的尿酸诱导的肾病的尿酸酶-缺陷型小鼠（uox-/-）时，发现了其很好的耐受性，有效并且实质上无免疫原性。处理过的小鼠在治疗期间（10 周）表现出改善了的肾功能，并且与未处理过的 uox-/- 小鼠相比，具有显著较少的尿酸相关的肾损伤，正如通过显微磁共振成像所证实的（Kelly, S. J., 等（2001）同上）。

在以下文献中披露了 PAG 链与多肽分子的共价结合：授予 Davis, F. F., 等的美国专利号 4, 179, 337，以及 Abuchowski, A., 等（1981）：Enzymes as Drugs, Holcenberg, J. S. 等, eds., John Wiley and Sons, New York, pp. 367-383。以上文献披露了与相应的未修饰的蛋白相比，用 mPEG 修饰过的酶和其他蛋白具有减弱了的免疫原性和抗原性，并且在血流中具有更长的寿命。化学修饰的缀合物所产生的有利的特性在很多治疗应用中是非常有用的。

为了实现 PEG 或聚环氧烷与蛋白的共价结合，首先必须将所述聚合物的至少一个羟基端基转化成活性官能团。这一过程通常被称作“活化”，并且其产物被称为“活化的 PEG”或活化的聚环氧烷。一甲氧基 PEG 的一个末端用无反应性的，化学上稳定的甲基醚（“甲氧基”）封端，而另一个末端用对蛋白分子上的氨基有反应性的官能团封端，这种 PEG 最常用于这种方法。包括两个或多个远离单一活化官能团的甲氧基的所谓“分支的” mPEG 较少使用。一种例子是二-mPEG-赖氨酸，其中赖氨酸的羧基最常见的是通过用 N-羟基琥珀酰亚胺酯化而活化的（Harris, J. M. 等，美国专利号 5, 932, 462）。

活化的聚合物与具有起着结合位点作用的亲核官能团的治疗剂起

反应。通常被用作结合位点的一种亲核的官能团是赖氨酸残基的 ϵ 氨基。游离羧酸基团, 适当活化的羰基, 氧化的碳水化合物部分和硫醇基团也被用作结合位点。

业已用氰尿酸氯对 mPEG 的羟基进行了活化, 并且随后将所得到的化合物与蛋白偶联 (Abuchowski, A. 等 (1977) J Biol Chem 252: 3582-3586; Abuchowski, A. 等 (1981) 同上)。不过, 使用这种方法是具有缺陷的, 如氰尿酸氯的毒性, 以及它对具有除了胺以外的官能团的蛋白的非特异性反应性, 如对功能可能是必需的溶剂可及的半胱氨酸或酪氨酸残基。

为了克服以上和其他缺陷, 业已引入了其他活化的 PEG, 如 mPEG 的琥珀酰亚胺琥珀酸酯衍生物 ("SS-PEG") (Abuchowski, A. 等 (1984) Cancer Biochem Biophys 7: 175-186)。在温和条件下, SS-PEG 能与蛋白迅速反应 (在 30 分钟以内), 得到有活性的并且广泛修饰的缀合物。

M. Saifer 等在美国专利号 5, 468, 478 中披露了聚烷撑二醇——N-琥珀酰亚胺碳酸酯, 以及由它生产的缀合物。S. Zalipsky, 在美国专利号 5, 612, 460 中披露了用于制备聚 (乙二醇) -N-琥珀酰亚胺碳酸酯的方法。这种形式的聚合物 ("SC-PEG") 能容易地与蛋白和低分子量的肽的氨基以及含有游离氨基的其他材料起反应, 它与所述物质形成尿烷键。

在本领域中, 同样已知的是, 蛋白的氨基和 PEG 之间的尿烷 (或氨基甲酸酯) 键可由其他 PEG -碳酸酯衍生物产生 (Beauchamp, C., 等 (1983) Anal Biochem 131: 25-33; Veronese, F. M. 等 (1985) Appl Biochem Biotechnol 11: 141-152)。反应性 mPEG 中间产物以及它们的使用方法在本领域中同样已知可用于合成通过酰胺键, 酯键, 仲胺和硫酯键等连接的生物活性成分的 PEG 缀合物。

T. Suzuki 等 ((1984) Biochim Biophys Acta 788: 248-255) 将免疫球蛋白 G ("IgG") 共价偶联到业已用氰尿酸氯活化的 mPEG 上。他们研究了生物学和物理化学特性, 如抗原结合活性和分子结构, 大小

排阻层析表现, 表面活性, 界面聚集能力和热聚集能力, 其通过 PEG-IgG 缀合物诱导补体的非特异性活化。PEG 与 IgG 的偶联加大了 IgG 的表观 Stokes 半径以及表面活性, 并使 IgG 对加热和/或接触界面稳定, 同时没有观察到 IgG 的结构变性。对非特异性聚集能力的抑制作用主要归因于 PEG 化的 IgG 分子之间结合的空间抑制作用。以上结果表明了 mPEG-偶联的 IgG 作为静脉内制剂的用途, 并且还暗示了 PEG 作为添加剂来稳定用于静脉内使用的未修饰的 IgG 的用途。

K. A. Sharp 等 ((1986) Anal Biochem 154: 110-117) 研究了生产用于根据细胞表面抗原在含水的两相聚合物系统中分离细胞的生物特异性亲和配体的可能性。兔抗-人红细胞 IgG 与分子量大约为 0.2, 1.9 和 5 kDa 的氰尿酸氯活化的 mPEG 起反应, PEG 与所述蛋白上的赖氨酸基团具有各种摩尔比。所述蛋白在含有葡聚糖和 PEG 的两相系统中的分配系数随着修饰程度的增加和 mPEG 的分子量的增加而增加。同时伴随着使人红细胞凝集的能力的丧失。

R. H. Tullis, 在美国专利号 4, 904, 582 中披露了寡核苷酸缀合物, 其中所述寡核苷酸通过连接臂与疏水性部分结合, 后者可以是聚氧化烯基团。所得到的缀合物据称在膜转运方面更有效, 从而能够穿过所述膜, 并且有效调控转录系统。这样, 所述组合物可用于在体外和体内研究细胞过程, 保护哺乳动物宿主免受病原体侵害, 以及易化基因治疗等。

不过, 聚合物的过度缀合和/或涉及到治疗部分的活性位点的缀合 (其中发现与生物活性相关的基团) 可常常导致活性的丧失, 因此导致治疗效力的丧失。对于具有较少的与生物活性无关的结合位点的较低分子量肽来说这种情况是常见的。例如, I. Benhar 等 ((1994) Bioconjug Chem 5: 321-326) 观察到重组单链免疫毒素的 PEG 化导致了免疫毒素的特异性目标免疫反应性的丧失。所述免疫毒素的活性的丧失是 PEG 与免疫毒素的抗原结合区中两个赖氨酸残基结合的结果。

尽管 PAG 和 PAO (例如, PEG, PEO 等) 与治疗蛋白的共价结合旨在消除它们的免疫反应性, PEG 化的蛋白仍保持弱的免疫原性。这种免疫

原性似乎至少部分是由于 PEG 和 PAO 聚合物本身具有某种程度的抗原性和免疫原性这一事实。例如，业已通过用其中 PEG 与免疫原性载体蛋白偶联的缀合物注射动物而使兔子对各种 PEG 免疫 (Richter, A. W., 等 (1983) *Int Arch Allergy Appl Immunol* 70: 124-131)。另外，业已通过用 β -葡糖醛酸酶的 mPEG 缀合物注射小鼠并且筛选能分泌抗-PEG 抗体的杂交瘤克隆，产生了能与 PEG 的聚醚主链起反应的单克隆抗体，(Cheng, T. -L., 等 (1999) *Bioconjug Chem* 10: 520-528; Cheng, T. -L., 等 (2000) *Bioconjug Chem* 11: 258-266; Tsai, N.-M., 等 (2001) *Biotechniques* 30: 396-402; Roffler, S., 等，美国专利号 6, 596, 849 和 6, 617, 118; 所有文献的内容以它们的全文形式收作本文参考)。最近，Roberts, M. J., 等，在美国专利申请号 2003/001704A1 中业已披露了能与 PEG 的聚醚主链起反应的另一种单克隆抗体。

多个研究者业已披露了线性或分支的"非抗原性"PEG 聚合物及其衍生物或缀合物的制备(例如，参见美国专利号 5, 428, 128; 5, 621, 039; 5, 622, 986; 5, 643, 575; 5, 728, 560; 5, 730, 990; 5, 738, 846; 5, 811, 076; 5, 824, 701; 5, 840, 900; 5, 880, 131; 5, 900, 402; 5, 902, 588; 5, 919, 455; 5, 951, 974; 5, 965, 119; 5, 965, 566; 5, 969, 040; 5, 981, 709; 6, 011, 042; 6, 042, 822; 6, 113, 906; 6, 127, 355; 6, 132, 713; 6, 177, 087, 和 6, 180, 095; 还可参见 PCT 公开号 WO 95/13090 和公开的美国专利申请号 2002/0052443, 2002/0061307 和 2002/0098192)。在上述专利和专利申请中的大部分实施例采用了包括一股或多股 mPEG 的聚合物，例如，二-mPEG-赖氨酸。不过，迄今为止，尚未披露使所述聚合物或缀合物中的 PEG 成为非抗原性的机制。

因此，需要鉴定生产含有 PAO (例如，含有 PEG 和/或 PEO) 的缀合物，特别是这类水溶性聚合物和治疗蛋白的缀合物的方法，所述缀合物具有减弱了的或明显减弱了的抗原性或没有可检测的抗原性。所述缀合物将具有聚合物成分提供的在体内稳定性和生物利用度增大的优点，但

在出于治疗或诊断目的导入了所述缀合物的动物体内不会引发显著的免疫应答。

发明概述

本发明满足了上述需要，并且提供了用于制备水溶性聚合物（例如，聚（乙二醇）及其衍生物）和生物活性成分，特别是诸如蛋白的治疗性生物活性成分的缀合物的方法。本发明还提供了通过上述方法生产的聚合物和缀合物，与含烷氧基的聚合物和用烷氧基 PEG 例如 mPEG 制备的相同生物活性成分的缀合物相比，所述聚合物和缀合物具有减弱了的抗原性和免疫原性。本发明还提供了包括所述缀合物的组合物，包括所述缀合物和组合物的试剂盒，以及将所述缀合物和组合物用于多种治疗和诊断方案中的方法。

一方面，本发明提供了包括与至少一种线性或分支的单官能活化的聚烷撑二醇共价连接的一种或多种生物活性成分的缀合物，其中，所述单官能活化的聚烷撑二醇不包括位于任何末端的甲氧基，另一烷氧基或芳氧基。在某些这样的实施方案中，与用烷氧基聚（乙二醇），例如，mPEG 或包括 mPEG 的分支的聚合物，如二- mPEG-赖氨酸制备的缀合物相比，所述缀合物具有减弱了的或明显减弱了的抗原性。

特别适用于合成本发明的缀合物的聚烷撑二醇包括但不限于，聚（乙二醇）和环氧乙烷与环氧丙烷的共聚物；特别优选的是 PEG，更特别优选的是单官能活化的 PEG（例如，在单一末端活化的 PEG，包括羟基 PEG-一醛，羟基 PEG-一乙烯基砜，羟基 PEG-一羧酸的活性酯和羟基 PEG-一苯基碳酸酯衍生物）。可用于合成所述活性聚合物衍生物的其他中间物包括其他羟基 PEG-一酸和羟基 PEG-一缩醛。

在某些这样的实施方案中，所述聚烷撑二醇的分子量为大约 1,000 道尔顿 - 大约 100 kDa，优选大约 2 kDa - 大约 60 kDa；大约 2 kDa - 大约 30 kDa，大约 5 kDa - 大约 20 kDa；大约 10 kDa - 大约 30 kDa；大约 10 kDa - 大约 20 kDa；两个分支，各自分子量为大约 2 kDa - 大约 30 kDa；更优选两个分支，各自为大约 18 kDa - 大约 22 kDa。根

据本发明这一方面的缀合物可以包括一股或多股聚烷撑二醇，在某些实施方案中，优选大约 1 - 大约 10 股，大约 1 - 大约 5 股，更优选大约 1 - 大约 3 股，最优选大约 1 - 大约 2 股；在其他实施方案中，优选大约 5 - 大约 100 股，大约 10 - 大约 50 股，更优选大约 6 - 大约 20 股/高分子量酶蛋白亚基。在特别优选的这样的实施方案中，用于所述缀合物中的聚烷撑二醇包括一股或两股单官能活化的聚（乙二醇）（例如，羟基 PEG-一酸的活性酯，羟基 PEG-一醛，羟基 PEG-一乙烯基砜或羟基 PEG-一苯基碳酸酯衍生物）分子量为大约 18 kDa - 大约 22 kDa 或大约 27 kDa - 大约 33 kDa。

适用于本发明的缀合物或组合物的生物活性成分包括但不限于，多种肽，蛋白，糖蛋白，有机化合物，含胺的化合物，含羧基的化合物，含羟基的化合物和含硫醇的化合物。

本发明还提供了生产生物活性化合物和单官能活化的聚烷撑二醇的缀合物的方法，例如，包括：（a）获得或制备线性或分支的聚烷撑二醇，它包括至少一个随后可以除掉的无反应性的封闭基团，如一个或多个三苯基甲基（"三苯甲基"）；（b）通过让它与至少一种衍生化合物起反应生产聚烷撑二醇的衍生物，反应条件使得在缺乏所述封闭基团的末端用一个衍生化基团（如一个羧基）衍生所述聚烷撑二醇；（c）除去所述封闭基团，而不除去衍生化基团，以便通过一个或多个步骤产生单官能活化的聚烷撑二醇；和（d）让所述单官能活化的聚烷撑二醇与至少一种生物活性成分在有利于所述生物活性成分与所述单官能活化的聚烷撑二醇共价结合的条件下接触。优选地，与用具有类似的大小，结构和与生物活性剂的连接的 mPEG 衍生到相同程度的缀合物相比，通过所述方法生产的缀合物具有减弱了的，明显减弱了的或不可检测的抗原性和免疫原性。本发明还提供了通过所述方法生产的缀合物。

本发明还提供了药用或兽用组合物，它包括本发明的缀合物和至少一种可用于药用或兽用的赋形剂或载体。

在其他实施方案中，本发明还提供了利用本发明的缀合物或组合物预防，诊断或治疗动物（如哺乳动物，包括人）的身体疾病的方法。例

如,一种这样的方法包括给患有或倾向于患有身体疾病(例如贫血,关节炎,癌,阿尔茨海默氏病,酶缺陷,心血管疾病,高血压,感染性疾病,代谢疾病,神经疾病,中性白细胞减少,高尿酸血症及其表现(例如,痛风),遗传缺陷疾病或障碍等)的动物施用有效量的一种或多种本发明的缀合物或组合物,给所述动物,特别是哺乳动物,最特别是人类施用的方法可以是口服,局部或肠胃外施用,例如静脉内,肌肉或皮下施用。

在其他实施方案中,本发明提供了包括一种或多种本发明的抗原性减弱的缀合物的组合物,它还可以包括一种或多种其他成分或试剂,如一种或多种缓冲盐,一种或多种碳水化合物赋形剂,一种或多种载体蛋白,一种或多种酶,一种或多种去污剂,一种或多种核酸分子,一种或多种聚合物如 PEG 等。本发明还提供了包括本发明的抗原性减弱的缀合物和/或组合物的试剂盒。

在其他实施方案中,本发明提供了具有减弱了的免疫反应性的 PEG-脂质体,它是用缺乏甲氧基或其他烷氧基的单官能活化的聚烷撑二醇而不是单官能活化的 mPEG 制备的。通过阅读以下附图和本发明的说明,以及权利要求书,本领域普通技术人员能够理解本发明的其他优选实施方案。

附图的简要说明

图 1 表示竞争性酶联免疫吸附测定 ("ELISA") 分析的结果。在该测定中,将一种蛋白的 mPEG 缀合物结合在 96-孔测定平板上,并且测定了 mPEG 或叔丁氧基 PEG 的溶液对兔抗体与另一种蛋白的 mPEG 缀合物结合的抑制作用。

图 2a 表示竞争性 ELISA 的结果,该测定是按图 1 所述方法进行的,采用具有各种大小和结构的,包括一个或两个甲氧基的 PEG。以每一个样品中甲氧基的摩尔浓度的函数形式对抗体结合的结果进行作图。

图 2b 与图 2a 相同的数据,它是以 PEG 的重量浓度(微克/mL)而不是甲氧基的摩尔浓度的函数作图的。

图 3 以表格形式表示来自图 1, 2a 和 2b 的某些数据, 证实了抗原性对每个 PEG 分子的甲氧基数目的直接依赖性。这些样品包括 10-kDa PEG, 其中之一缺乏甲氧基(叔丁氧基 PEG), 其中一个包括一个甲氧基(mPEG), 一个包括两个甲氧基[二-(5-kDa) mPEG-赖氨酸]。

图 4 表示如图 1 所述的竞争性 ELISA, 其中, 4.8-kDa mPEG 与在线性聚合物的末端没有甲氧基的本发明的三种 PEG (标记的 "PharmaPEG") 进行了比较。在水平轴线上曲线之间的偏移表明, 在用抗-mPEG 抗体测定时, 本发明的所有三种 PEG 的抗原性比 mPEG 低大约 100 倍。

图 5a 表示研究结果, 其中, 通过在存在十二烷基硫酸钠的条件下进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 ("SDS-PAGE") 对碳酸酐酶的异构体 ("CA II") 和与平均 3-4 股 5-kDa mPEG 偶联的相同的碳酸酐酶的样品进行分析。所述凝胶的泳道 1 和 2 表示通过用 SYPRO® 牌 Ruby 染料对蛋白进行染色并且在暗室中用 302 nm 的光源照相获得的结果。泳道 3 和 4 分别表示 mPEG 缀合物和未 PEG 化的酶的 Western 印迹的结果, 其中, 将多克隆兔抗-mPEG 抗体用作一抗。泳道 5 表示预先染色的蛋白标准物的位置。

图 5b 表示图 5a 所示凝胶和 Western 印迹的条带强度的定量, 是使用柯达相机和数码成像软件获得的。水平轴线表示相对染料前沿的迁移距离, 而垂直轴线表示蛋白染色或抗-mPEG 染色的相对强度。底部的描绘表示预先染色的标准蛋白的条带, 从左到右它们的表观分子量为 203.8, 110.9, 68.8, 51.5, 40.2, 28.9, 20.7 和 14.9 kDa。从底部起的第二幅描绘是 PEG 化的碳酸酐酶的抗-mPEG 抗体染色。从底部起的第三幅描绘表示碳酸酐酶的蛋白染色条带, 而顶部描绘表示碳酸酐酶的 mPEG 缀合物的蛋白染色条带。

图 6a 和 6b 表示来自三只一组的兔子的血清的 ELISA 分析结果, 所述兔子是用猪尿酸酶的缀合物免疫的, 每个尿酸酶亚基包括平均大约两股 mPEG 或羟基 PEG ("PharmaPEG")。采用用猪尿酸酶包被的测定平板测定抗尿酸酶的抗体。采用用与 mPEG 偶联的不相关蛋白的缀合物包被的平板测定抗 PEG 的抗体。图 6a 表示来自业已接受了处在不完全弗氏

佐剂中的 PEG-尿酸酶四次注射的兔子第二次放血的数据。图 6b 表示来自在接受了处在不完全弗氏佐剂中的 PEG-尿酸酶五次注射后相同兔子第三次放血的数据。

发明的详细说明

除非另有说明，本文所使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域普通技术人员所普遍了解的含义。尽管可以将与本文所披露的类似或等同的任何方法和材料用于实施或检测本发明，下面将披露优选的方法和材料。

定义

大约：在本文中，在用于表示任何数值时，术语“大约”表示所指明的值 $\pm 10\%$ 的值（例如，“大约 50°C ”包括 45°C - 55°C 的温度范围，包括端值；类似的，“大约 100 mM ”包括从 90 mM - 110 mM 的浓度范围，包括端值）。

生物活性成分：在本文中，术语“生物活性成分”表示在体内，体外或离体对细胞，组织，器官或生物具有特定生物学活性的化合物，分子，部分或复合物，并且其能够与一种或多种聚烷撑二醇结合，形成本发明的缀合物，优选的生物活性成分在下面详细披露。

结合：在本文中，术语“结合”表示结合或连接，它可以是共价的，例如，通过化学偶联，或是非共价的，例如，离子相互作用，疏水相互作用，氢键等。例如，共价键可以是酯，醚，磷酸酯，硫酯，硫醚，尿烷，酰胺，肽，酰亚胺，碳-硫键，碳-磷键等。术语“结合”比诸如“偶联”，“连接”和“附着”的术语的含义更广，并且包括这些术语。

偶联：在本文中，术语“偶联”表示通过共价键或通过强的非共价相互作用的连接，通常并且优选表示通过共价键连接。本领域技术人员常用于偶联生物活性材料的任何方法都可用于本发明中。

疾病，障碍，状况：在本文中，术语“疾病”或“障碍”表示人或动物的任何不良状况，包括肿瘤，癌，过敏，成瘾，自身免疫，中毒或最佳

精神或身体功能的损伤。在本文中，"状况"包括疾病和障碍，不过，还表示生理学状态。例如，生育力是生理学状态，但不是疾病或障碍。因此，适用于通过减弱生育力防止怀孕的本发明的组合物会被描述为对状况（生育力）的治疗，而不是对障碍或疾病的治疗。其他状况为本领域普通技术人员所了解。

有效量：在本文中，术语"有效量"表示实现理想生物学作用所必需的或足以实现理想生物学作用的给定缀合物或组合物的量。本发明给定缀合物或组合物的有效量是获得该选定结果的量，并且所述量可以由本领域技术人员按常规确定。例如，用于治疗免疫系统缺陷的有效量可以是导致激活免疫系统，导致在接触抗原时产生抗原特异性免疫应答所需要的量。该术语还是“足够量”的同义词。对任何特定应用的有效量可以根据以下因素改变，如要治疗的疾病或状况，施用的特定组合物，对象的体形，和/或疾病或状况的严重性。本领域普通技术人员可以凭经验确定本发明的特定缀合物或组合物的有效量，而没有必要进行过多实验。

免疫应答：在本文中，术语"免疫应答"表示能导致 B-和/或 T 淋巴细胞和/或抗原呈递细胞活化或增殖的体液免疫应答（即，形成抗体）和/或细胞免疫应答。不过，在某些场合下，免疫应答可以是低强度的，并且只有在使用至少一种本发明的物质时才能够检测到。“免疫原性”表示一种物质能够刺激活的有机体的免疫系统，从而使得免疫系统的一种或多种功能增强并针对所述免疫原性物质。

一或一个：在本说明书中使用术语"一"或"一个"时，它们表示“至少一（个）”或“一（个）或多（个）”，除非另有说明。

多肽：在本文中，术语"多肽"表示由通过酰胺键（又被称作肽键）线性连接的单体（氨基酸）组成的分子。它表示氨基酸的分子链，而不表示有关产物的特定长度。因此，在多肽的定义内包括二肽，三肽，寡肽，具有未指明长度的肽和蛋白。该术语还用于表示多肽的表达后修饰的产物，例如，糖基化，乙酰化和磷酸化等。多肽可以是重组的或源于天然生物学来源的，不过不一定是由指定的核酸序列翻译的。它可以是

用任何方式生成的，包括化学合成。

蛋白和糖蛋白：在本文中，术语蛋白表示其大小一般超过大约 5 或更多，10 或更多，20 或更多，25 或更多，50 或更多，75 或更多，100 或更多，200 或更多，500 或更多，1,000 或更多或 2,000 或更多氨基酸的多肽。蛋白通常具有确定的三维结构，不过并不一定如此，并且通常被称作折叠的，相对于通常不具有确定的三维结构，而可能采取大量不同构象，并且被称作未折叠的肽和多肽。不过，肽也可以具有确定的三维结构。在本文中，术语糖蛋白表示包括至少一个通过氨基酸例如丝氨酸或天冬酰胺的含氧或含氮侧链与蛋白连接的糖部分的蛋白。

纯化的：在本文中，当术语"纯化的"用于表示分子时，它表示被纯化的分子的浓度相对于在其天然环境中或在它被生产，发现或合成的环境中与它相关的分子得以提高。天然相关的分子包括蛋白，核酸，脂类和糖类，不过通常不包括水，缓冲液和添加进去用于保持被纯化的分子的完整性或有利于所述分子纯化的试剂。例如，即使粗制提取物中的给定蛋白在柱层析期间用含水溶剂稀释，通过该层析的蛋白分子也被认为是纯化的，如果天然相关的核酸，不需要的蛋白和其他生物分子与所述主题蛋白分子分离的话。根据该定义，在相对于它的污染物考虑时，一种物质的纯度可以为 5%或以上，10%或以上，20%或以上，30%或以上，40%或以上，50%或以上，60%或以上，70%或以上，80%或以上，90%或以上，95%或以上，98%或以上，99%或以上，或 100%。

残基：在本文中，术语"残基"表示特定氨基酸，由于在多肽主链或侧链中参与一个或多个肽键，因此其通常是脱水的。

治疗：在本文中，术语"治疗"表示预防或/或治疗。例如，在用于感染性疾病时，该术语可以表示预防性治疗，它能增强对象对病原体感染的抗性，换句话说，减小所述对象受所述病原体感染或表现出可归于所述感染的疾病征象的可能性，以及在所述对象业已受到感染之后的治疗，以战胜所述感染，例如，减轻或消除所述感染，或防止感染恶化。

总述

有多位以前的研究者业已披露了线性或分支的非抗原性 PEG 聚合物或其缀合物的制备（例如，参见美国专利号 5, 428, 128; 5, 621, 039; 5, 622, 986; 5, 643, 575; 5, 728, 560; 5, 730, 990; 5, 738, 846; 5, 811, 076; 5, 824, 701; 5, 840, 900; 5, 880, 131; 5, 900, 402; 5, 902, 588; 5, 919, 455; 5, 951, 974; 5, 965, 119; 5, 965, 566; 5, 969, 040; 5, 981, 709; 6, 011, 042; 6, 042, 822; 6, 113, 906; 6, 127, 355; 6, 132, 713; 6, 177, 087, 和 6, 180, 095; 还可参见 PCT 公开号 WO 95/13090 和公开的美国专利申请号 2002/0052443, 2002/0061307 2002/0098192; 所有文献的内容都以它们的全文形式收作本文参考）。不过，在上述以前报导中的 PEG 和缀合物至少保留了弱的免疫原性，在将所述缀合物导入动物用于预防，诊断或治疗目的时，这有可能导致产生针对缀合物的 PEG 成分的抗体的不利后果。所述抗体可能导致含 PEG 的生物活性缀合物被迅速清除，从而降低了所述治疗性组合物的生物利用度（Cheng, T.-L., 等（1999），同上），以及有可能诱导免疫复合物介导的疾病。另外，尚未披露使所述 PEG 或其缀合物实质上无抗原性或无免疫原性的机制。

本发明业已克服了现有技术的上述局限。总的来说，本发明提供了用于预防，诊断和治疗多种身体疾病的稳定的组合物和方法。更具体地讲，本发明提供了用于生产具有减弱了的抗原性的活性聚合物和具有减弱了的或明显减弱了的抗原性或具有不可检测的抗原性的蛋白特别是治疗蛋白的稳定化的聚合物缀合物。在其他实施方案中，本发明提供了通过本发明的上述方法生产的缀合物，以及包括所述缀合物的组合物，特别是药用组合物。在其他实施方案中，本发明提供了将所述缀合物和组合物用于预防，诊断和治疗多种身体疾病的方法。本发明还提供了包括本发明的一种或多种缀合物和/或组合物的试剂盒。

制备抗原性减弱的缀合物

一方面，本发明提供了用于制备具有减弱了的抗原性，明显减弱了的抗原性，或不可检测的抗原性的缀合物的方法，通过将水溶性聚合物

共价结合到一种或多种生物活性化合物或成分上，如一种或多种蛋白，特别是一种或多种治疗蛋白。在所述缀合物中，所选择的聚合物本身与常用于制备蛋白-聚合物缀合物的标准聚合物相比，具有减弱了的抗原性，明显减弱了的抗原性或不可检测的抗原性。在本文中，术语"减弱了的抗原性"表示聚合物（例如，PAO 或 PAG，特别是 PEG，最特别是单官能活化的 PEG）或包括所述聚合物或用所述聚合物合成的缀合物或组合物，其中所述聚合物与针对具有更高抗原性聚合物（例如，mPEG）产生的抗体起反应的能力业已减弱了任意程度。优选地与抗原性更高的聚合物相比，抗原性减弱了至少大约 30%，更优选减弱了至少大约 50%，最优选减弱了大约 75%以上。延伸开来，如果一种聚合物（或含有所述聚合物或用所述聚合物合成的缀合物或组合物）具有相应的抗原性聚合物（例如，mPEG）的大约或低于 20%，更优选大约或低于 15%，更优选大约或低于 10%，最优选大约或低于 1%的抗原性的话，这种聚合物（或缀合物或组合物）被称为具有"明显减弱了的抗原性"。最后，如果一种聚合物或缀合物或组合物在用本领域已知方法（例如，ELISA 或其他检测抗原性的方法，如本领域所公知的并且披露于本文的实施例中的方法）检测时不具有可检测的抗原性的话，所述聚合物（或含有所述聚合物或用所述聚合物合成的缀合物或组合物）被称为具有"不可检测的抗原性"。

聚合物

特别适用于制备本发明的缀合物的聚烷撑二醇包括但不限于，聚（乙二醇），和环氧乙烷与环氧丙烷的共聚物；特别优选的是 PEG，更特别优选的是单官能活化的羟基 PEG（例如，在单一末端活化的羟基 PEG，包括羟基 PEG-羧酸的活性酯，羟基 PEG-一醛，羟基 PEG-一胺，羟基 PEG-一酰肼，羟基 PEG-一胍基甲酸酯，羟基 PEG-一碘乙酰胺，羟基 PEG-一马来酰亚胺，羟基 PEG-一邻吡啶基二硫化物，羟基 PEG-一肟，羟基 PEG-一苯基碳酸酯，羟基 PEG-一苯甲酰甲醛，羟基 PEG-一噻唑烷-2-硫酮，羟基 PEG-一硫酯，羟基 PEG-一硫醇，羟基 PEG-单三嗪和

羟基 PEG—乙烯基醚)。

用于制备本发明的具有减弱了的抗原性,明显减弱了的抗原性,或不可检测的抗原性的缀合物的特别优选的聚合物是单官能活化的 PEG,它不包括甲氧基,其他烷氧基或芳氧基。在合成本发明的缀合物时用这种单官能活化的 PEG 取代单官能活化的 mPEG 赋予了所得到的缀合物出乎预料地减弱了的抗原性,即与针对相同生物活性成分的 mPEG 缀合物而产生的抗体相互作用的能力降低。所得到的缀合物还具有减弱了的免疫原性,即,引起免疫应答的能力降低。

在本发明的一个方面,单官能活化的 PEG 可以通过用所述活化基团的合适的可逆封闭的衍生物作为环氧乙烷聚合的引发剂来合成(Akiyama, Y., 等(2000) Bioconj Chem, 11: 947-950)。Akiyama 等提供了用 3, 3-二乙氧基丙醇钾作为环氧乙烷聚合的引发剂合成 PEG 的单羟基—缩醛衍生物的条件。由于 Akiyama 等没有认识到这种中间产物最理想地减弱了的抗原性或免疫原性,他们通过添加甲磺酰氯终止所述聚合反应将末端羟基转化成硫醇,从而生产了杂双官能 PEG,而不是本发明的 PEG 衍生物。该研究小组没有认识到具有羟基末端的单官能活化的 PEG 的有用性的另一个证据是,他们公开了从单羟基、单官能活化的 PEG 合成其他杂双官能 PEG 的方法并且申请了专利,并且,在某些场合下甚至用甲氧基对羟基 PEG 进行“封端”。类似的, Bentley, M. D. 等在公开的美国专利申请号 2002/0072573A1 中披露了反映他们没有认识到具有羟基末端的单官能活化的聚合物的免疫学优点的聚合物组合物和方法,并且教导了将所述聚合物的末端羟基转化成甲氧基的愿望。

在本发明的另一方面,可以通过控制在两端包括羟基的线性 PEG (“PEG 二醇”)的活化程度合成单官能活化的 PEG,以便将双-活化的 PEG 的量限制在可接受的低水平上,例如<5%,优选<2%,或更优选<1%,作为例 5 中所披露方法的替代。在特别优选的方面,单官能活化的 PEG 可以从单官能 PEG 合成,在对所述 PEG 进行衍生化之后,可以将无反应性的封闭基团除去,而不除去所述衍生化基团。衍生化 PEG 的一个例

子是 PEG-羧酸,而在衍生化之后可以除去的无反应性的封闭基团的例子是芳氧基 (Bentley, M. D. 等, PCT 公开号 WO 01/26692 A1), 三苯甲基 (Kocienski, P. J. , (1994) Protecting Groups, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp. 54-58), 和叔丁氧基。所述叔丁氧基 PEG-羧酸可以活化,例如,用 N-羟基琥珀酰亚胺活化。最后,可以通过无水酸解除去叔丁氧基,以便产生活化的 PEG 羧酸衍生物,它具有位于聚合物远端的羟基,而不是甲氧基。在更优选的实施方案中,可以通过在用 N-羟基琥珀酰亚胺活化所述羧基之前酸解而将叔丁氧基 PEG-羧酸转化成羟基 PEG-羧酸。在本发明的另一种实施方案中,叔丁氧基 PEG-缩醛的合成是通过让叔丁氧基 PEG 与卤代缩醛接触,并且通过选择性无水酸解除去叔丁氧基将产物转化成羟基 PEG-缩醛或羟基 PEG-醛。通过还原性烷基化作用,可以在制备中将缩醛转化成醛(或水合醛)以与含胺的化合物偶联 (Bentley, M. D. 等, 美国专利号 5,990,237)。在另一种实施方案中,可以通过催化性氢解作用除去远离所述聚合物的活性末端的芳氧基保护基团,从而产生本发明的单活化的羟基 PAG。另外,正如在例 6 中所披露的,可逆封闭除了一个末端羟基以外的所有羟基,可用于合成单官能活化的羟基 PAG。

用于制备本发明缀合物的 PAG 聚合物可以是线性聚合物,或者可以在所述聚合物分子内的一个或多个点上分支。另外,用于生产本发明的缀合物的聚合物可以是均聚物,其中,单一单体类型的多个单位连接在一起以形成所述聚合物,如聚(乙二醇),或者它们可以是杂聚物或共聚物(其中,将两种或多种结构的单体单位连接在一起,以形成所述聚合物,如环氧乙烷和环氧丙烷的共聚物)。所述共聚物可以是随机共聚物,嵌段共聚物或交替共聚物。

用于本发明的聚合物可以是无活性聚合物或活性聚合物。在本文中,"无活性聚合物"是这样的聚合物,它们不会与蛋白共价连接。所述"无活性聚合物"的例子包括但不限于,mPEG,它是环氧乙烷单位的线性聚合物,具有位于一个末端的羟基和位于另一末端的甲氧基,以及 PEG 二醇,它是环氧乙烷单位的线性聚合物,具有位于两端的羟基。在本文

中, "活性聚合物"是这样的聚合物, 它能与溶剂可及的亲核的基团起反应, 例如生物活性成分(如蛋白)上的硫醇基或氨基, 包括但不局限于赖氨酸残基的 α 氨基或 ϵ 氨基。"活性聚合物"的例子包括但不局限于PEG, 其中, 羟基端基已转化成亲电子基团或被亲电子基团替代, 如琥珀酰亚胺丙酸(如在"SPA-PEG"中)或对硝基苯基碳酸酯(如在"NPC-PEG"中), 或醛, 如在PEG-醛中。除了聚环氧烷之外, 合适的聚合物可以包括聚乙烯醇, 聚(氧乙烯-甲醛)共聚物, 聚酰胺(例如, Rose, K., PCT公开号WO 00/12587), 聚羧酸酯, 聚(乙烯吡咯烷酮)(von Specht, B.-U., 等(1973) Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 354: 1659-1660), 聚D-氨基酸和/或聚L-氨基酸, 聚丙烯酰吗啉(Rocca, M., 等(1996) Int J Artif Organs 19: 730-734)和葡聚糖(Iakunitskaya, L. M., 等(1980) Prikl Biokhim Mikrobiol 16: 232-237)。与目标生物活性成分上的各个位点选择性或高或低反应的PEG, PEO和其他PAO的衍生物为本领域所熟知, 并且可以从供应商那里购买, 如Fluka(Milwaukee, WI); NOF Corporation(Tokyo, Japan); Shearwater Corporation(Huntsville, AL), Nektar Therapeutics(San Carlos, CA)的子公司; Sigma Chemical Company(St. Louis, MO)或SunBio, Inc.(Anyang City, South Korea)。

适用于本发明方法和组合物的聚合物的活化形式可包括本领域所公知的聚合物的任何羟基末端的, 单功能活性形式。例如, 具有各种大小的线性和分支的PAO是合适的, 包括分子量(排除了活化基团的质量)在大约1 kDa -大约100 kDa范围内的聚合物。分子量的合适范围包括但不局限于大约2 kDa -大约60 kDa; 大约2 kDa -大约30 kDa; 大约5 kDa -大约20 kDa; 大约10 kDa -大约20 kDa; 和大约18 kDa -大约60 kDa, 大约20 kDa或大约30 kDa。对于线性PEG来说, 所述分子量范围为大约20 kDa -大约30 kDa, 相当于在大约450 -大约680个环氧乙烷单体单位范围内的聚合度(n)。应当指出的是, 治疗蛋白与具有上述后面的较高分子量范围(即, $>20-30\text{kDa}$)的聚合物偶联的优点最初是在认识到mPEG的免疫原性以前很久就发现的(Saifer, M.

等, PCT 公开号 WO 89/01033, 公开日为 1989 年 2 月 9 日, 该文献被以它的全文形式收作本文参考)。

线性聚合物可选择性地在一端或两端具有活性基团, 以便产生“活性聚合物”。在某些实施方案中, 可能需要使用 PEG 的单丙酸衍生物的琥珀酰亚胺酯, 参见 Harris, J. M. 等, 美国专利号 5, 672, 662, 它被完整地收作本文参考, 或其他琥珀酰亚胺活化的 PEG-羧酸。在某些其他实施方案中, 可能需要使用 PEG 的琥珀酰亚胺碳酸酯衍生物 ("SC-PEG"), 参见 Saifer, M. 等, 美国专利号 5, 006, 333; 5, 080, 891; 5, 283, 317 和 5, 468, 478, 或 PEG 的对硝基苯基碳酸酯衍生物, 参见 Kelly, S. J., 等 (2001) 同上; PCT 公开号 WO 00/07629 A2, 同上, 和相应的美国专利号 6, 576, 235, 并且参见 PCT 公开号 W001/59078 A2 同上。另外, 可以将其他类型的活性基团用于合成蛋白的聚合物缀合物。这些衍生物包括但不限于 PEG 的醛衍生物 (Royer, G. P., 美国专利号 4, 002, 531; Harris, J.M. 等, 美国专利号 5, 252, 714), PEG 的胺, 溴苯基碳酸酯, 羰基咪唑, 氯苯基碳酸酯, 氟苯基碳酸酯, 酰肼, 胍基甲酸酯, 碘乙酰胺, 马来酰亚胺, 邻吡啶基二硫化物, 肟, 苯甲酰甲醛, 噻唑烷-2-硫酮, 硫酯, 硫醇, 三嗪和乙烯基砷衍生物。

在本发明的某些实施方案中, 在反应期间, 希望将诸如 PEG 的聚合物在分子内和分子间形成交联降到最低限度, 其中, 在所述反应中, 所述聚合物与生物活性成分偶联, 以形成本发明的缀合物。这一目的可以通过使用仅在一个末端活化的聚合物 (本文称之为“单官能活化的 PEG”或“单官能活化的 PAG”) 或其中的双官能活化的聚合物 (对于线性 PEG 来说被称作“双-活化的 PEG 二醇”) 的百分比低于 30%, 或更优选低于 10% 或最优选低于 2% (w/w) 的聚合物制剂实现。使用主要为单官能的活化的聚合物可以将所有以下结构的形成降到最低限度: 在单个蛋白分子内的分子内交联, “哑铃”结构, 其中, 一股聚合物连接两个蛋白分子, 以及更大的聚集体或凝胶。在使用能与氨基起反应的活化的聚合物时, 可以与一个蛋白分子连接的聚合物链的理论最大数相当于氨基的总数。在聚合物偶联的任何特定条件下蛋白表面上可及的氨基基团的实际数

目可能小于理论最大值。

本发明的缀合物可以包括一股或多股聚烷撑二醇，优选大约 1 - 大约 100 股，大约 1 - 大约 20 股，每个治疗性酶的亚基；以及大约 1 - 大约 3 股，更优选大约 1 - 大约 2 股，每个受体结合细胞因子、生长因子、蛋白激素和集落刺激因子的亚基。在特别优选的这样的实施方案中，用于制备缀合物的聚烷撑二醇包括一股或两股聚（乙二醇）（特别是羧基 PEG，羟基 PEG，二羟基 PEG 或 PEG-缩醛）。在某些这样的实施方案中，线性或分支的聚烷撑二醇的分子量为大约 1 kDa - 大约 100 kDa，优选大约 2 kDa - 大约 60 kDa；大约 5 kDa - 大约 20 kDa；大约 10 kDa - 大约 20 kDa；大约 18 kDa - 大约 60 kDa；最优选大约 18 kDa - 大约 22 kDa 或大约 27 kDa - 大约 33 kDa，如果是线性的话；和总共为大约 36 kDa - 大约 44 kDa，如果所述聚合物具有质量相等的两个分支的话。

生物活性成分

正如上文所指出的，本发明的缀合物包括一个或多个 PAG 或 PAO，特别是与一种或多种生物活性成分共价结合的一股或多股 PEG。与一种或多种聚合物（或聚合物链）共价结合的生物活性成分在本文中名称不一，并与“缀合的生物活性成分”或“修饰的生物活性成分”等同。在本文中，上述术语要与“未缀合的生物活性成分”，“原始的生物活性成分”或“未修饰的生物活性成分”区分开来，所有这些术语表示在它上面没有共价结合一个或多个聚合物的生物活性成分。在另一方面，本发明提供了通过向其中混合聚合物而稳定生物活性成分溶液的方法和组合物。不过，应当理解的是，与野生型或天然分子相比，“未缀合的”，“未修饰的”或“原始的”生物活性成分可以包括其它非聚合物缀合或修饰，并且按照本发明仍然被视为“未缀合的”，“未修饰的”或“原始的”，因为所述生物活性成分相对所述聚合物的结合而言是“未缀合的”，“未修饰的”或“原始的”。

术语“稳定”生物活性成分（或“稳定方法”或“稳定化的生物活性成分”）表示业已按照本发明方法稳定化的生物活性成分（即，业已按

照本发明的方法共价连接了聚合物或混合了聚合物的生物活性成分)。与没有稳定化的生物活性成分(即未共价结合或混合聚合物的生物活性成分)相比,所述稳定化的生物活性成分将表现出某些改变了的生物化学和生物物理学特性。特别是对于诸如酶的蛋白而言,所述改变了的生物化学和生物物理学参数可以包括在某些严酷环境或实验条件下培养期间蛋白的减弱的自溶,特别是酶促活性的保持。例如,在本发明的某些实施方案中,所述改变了的生物化学或生物物理参数可以包括在体内循环中的半衰期延长,和增加了的生物利用度等。

具有生物学(即,生理学,生物化学或药理学)活性的任何成分(通常是分子或大分子复合物)都可适合用作本发明的原始成分。所述生物活性成分包括但不局限于蛋白,多肽,肽,治疗病毒,和有机化合物等。生物活性成分还包括所述蛋白,多肽,肽,治疗病毒,和有机化合物等的片段,变体和衍生物,特别是具有生物学(即生理学,生物化学或药理学)活性的这类片段,变体和衍生物。

适合用作本发明的生物活性成分的有机化合物包括但不限于以下成分,如紫杉烷类,蒽环类抗生素,化合物包括道诺霉素,阿霉素,对氨基苯胺氮芥,美法仑,阿糖胞苷("Ara-C")和其他抗代谢化合物,例如,吉西他滨等。另外,所述生物活性成分可以是心血管药,抗肿瘤剂,抗感染剂,抗真菌剂,如制霉菌素和两性霉素B,抗焦虑药,胃肠药,在中枢神经系统中有活性的药剂,止痛剂,生育药,避孕药,抗炎剂,甾体类药,抗尿酸血症药,血管舒张剂,和血管收缩剂等。

可用作本发明生物活性成分的合适的肽,多肽,酶和其他蛋白,糖蛋白等包括具有至少一个可用于结合聚合物的氨基,硫醇基或其他基团的任何肽,多肽,酶或其他蛋白等。所述成分包括具有生理学或药理学活性的物质,以及能够催化在有机溶剂中反应的物质。感兴趣的肽,多肽和蛋白包括但不限于血红蛋白,血清蛋白,如凝血因子,例如,因子VII, VIII, 和IX,免疫球蛋白,胰岛素,细胞因子,如白介素,例如, IL-1 - IL-18, 干扰素(例如, IFN- α , IFN- β , IFN- γ 和共有IFN), 集落刺激因子,包括但不限于GM-CSF, G-CSF, 巨噬细胞集

落刺激因子，促血小板生成素，巨核细胞生长和成长因子，红细胞生成素，血小板衍生的生长因子，磷脂酶-活化蛋白 ("PLAP")，白血病抑制因子 ("LIF"，在本领域中又被称作"Steel 因子")，神经营养因子以及干细胞因子及其肽模拟物。生物活性剂的受体结合拮抗剂本身适合用作本发明的生物活性成分。具有一般生物学或治疗价值的其他蛋白包括胰岛素，植物蛋白，如凝集素和蓖麻毒素，肿瘤坏死因子及相关蛋白，生长因子，如转化生长因子，例如，TGF- α 或 TGF- β ，成纤维细胞生长因子，表皮生长因子，肝细胞生长因子，激素，促生长因子，红细胞生成素，色素激素，下丘脑释放因子，抗利尿激素，催乳素，绒毛膜促性腺激素，促卵泡激素，甲状腺刺激激素，催乳素，组织纤维蛋白溶酶原激活物，及其受体结合蛋白拮抗剂等。很多这样的蛋白以糖基化和非糖基化形式存在。所述非糖基化形式可来自采用重组技术在原核生物中对它们的生产。这类非糖基化产物也包括在适合本发明生物活性成分的肽和蛋白中。

感兴趣的酶包括碳水化合物特异性酶，蛋白水解酶，氧化还原酶，转移酶，水解酶，裂解酶，异构酶和连接酶。在不局限于特定酶的前提下，感兴趣的酶的例子包括天冬酰胺酶，精氨酸酶，精氨酸脱亚氨酶，腺苷脱氨酶，超氧化物歧化酶，内毒素酶，过氧化氢酶，胰凝乳蛋白酶，脂肪酶，尿酸酶，二磷酸腺苷酶，酪氨酸酶和胆红素氧化酶。感兴趣的碳水化合物特异性酶包括葡萄糖氧化酶，葡糖苷酶，半乳糖苷酶，葡糖脑苷脂酶，和葡糖苷酸酶等。

同样适合用作本发明缀合物中的生物活性成分的是在体内具有生物活性的任何化合物。这些化合物包括但不限于氨基酸序列，核酸 (DNA, RNA)，肽核酸 ("PNA")，抗体片段，单链结合蛋白 (例如，参见，Ladner, R. C. 等，美国专利号 4, 946, 778，该专利的内容被收作本文参考)，包括可溶性受体的结合分子，多克隆抗体，单克隆抗体，催化抗体以及抗体或其片段的融合产物。

可以通过本领域普通技术人员所公知的技术制备或分离所述蛋白或其部分，如化学合成，细胞、组织或者器官培养，从动物来源中提取，

或通过重组 DNA 方法生产。还涉及所述氨基酸序列，多肽和蛋白等的转基因来源。所述材料可以从转基因动物中获得，例如，小鼠，兔，猪，山羊和牛，其中，所述蛋白是在乳汁，血液或组织中，或在转基因禽类的蛋中表达。还可将转基因昆虫和真菌或杆状病毒表达系统用作来源。另外，蛋白的突变形式也属于本发明的范围。

感兴趣的其他蛋白是引起过敏的蛋白，如豚草，抗原 E，蜜蜂毒素和螨虫过敏原等。以上是适合本发明的蛋白的例子。应当理解的是，在本文中没有专门提到但具有一个或多个可适用于按照本发明与一种或多种聚合物偶联的氨基或硫醇基的其他肽，多肽或蛋白或其片段也可以使用，并且属于本发明的范围。

在本发明的优选方面，能够偶联聚合物的化合物是生物学活性的化合物，它适合医药或诊断用途，用于治疗动物，例如包括人的哺乳动物的需要这种治疗的状况。上面的列举是说明性的，而不是要限定可以修饰的化合物。普通技术人员能够了解的是，无须进行过多实验就可以对其他这样的化合物进行类似的修饰。应当理解的是，没有专门提到的，但是具有一个或多个可用于按照本发明与一种或多种聚合物偶联的亲核基团，如氨基或硫醇的生物学活性材料也可以使用，并且属于本发明的范围。

应当指出的是，适合引入本发明的缀合物中的生物活性成分可以是本身没有活性的物质或化合物，但是在所述缀合物中或者在通过水解从缀合物中释放之后即刻，在经过进一步化学加工或反应之后可以变得有活性。例如，以本发明的缀合物形式输送到血流中的抗癌药可以保持无活性，直到进入癌或肿瘤细胞中，在这里，通过癌或肿瘤细胞中发生的化学过程使它活化，例如，通过所述细胞所特有的或特别有效的酶促反应活化。

适合用作本发明的缀合物和组合物中的生物活性化合物的其他化合物包括含羟基的化合物，如喜树碱和拓扑异构酶 I 的相关抑制剂。喜树碱是由中国土生的喜树和印度土生的臭味假柴龙树生产的水不溶性细胞毒性生物碱。喜树碱和相关的化合物和类似物还已知是潜在的抗癌

或抗肿瘤剂，并业已在体外和体内表现出这些活性（例如，参见，美国专利号 4, 943, 579.5, 004, 758 和 Re 32, 518, 所述专利的内容被收作本文参考）。所述化合物及其衍生物可以用已知合成技术制备，而不用进行过多实验。用于本发明的优选的喜树碱衍生物包括这样的衍生物，它包括能够与活化形式的聚合物，如本发明的单官能活化的 PEG 直接起反应的 20-OH 或其他羟基。

适合用作本发明缀合物中的生物活性成分的其他含羟基的部分包括紫杉烷类和紫杉醇衍生物。对于本发明来说，术语"紫杉烷"包括萜烯的紫杉烷家族内的所有化合物。因此，泰素（紫杉醇），3'-取代的叔丁氧基羰基-胺衍生物（泰索帝）等，以及可以用标准有机技术方便地合成的或可以从诸如 Sigma (St. Louis, MO) 的商业渠道获得的其他类似物属于本发明的范围。业已发现所述化合物及其衍生物是有效的抗癌剂。多项研究证实了所述药剂具有抗多种恶性肿瘤和其他癌的活性。

正如本领域普通技术人员所了解的，本领域已知的并且可方便地获得的任何生物活性成分都适合与本发明的具有减弱了的抗原性，明显减弱了的抗原性或不可检测的抗原性的单官能聚合物缀合。根据本发明的某些方面，将这些原始的生物活性成分用于生产缀合物，其中，一个或多个 PAG 或 PAO 与所述生物活性分子共价连接。所述原始的生物活性成分分子上可以与聚合物有利连接的位点包括存在于肽分子上的赖氨酸残基，这些残基各自具有两个氨基。其中的一个氨基（ α 氨基）参与了肽键形成（当所述赖氨酸是蛋白的氨基-末端残基时除外），留下另一个氨基（ ϵ 氨基）用于聚合物偶联。蛋白或肽分子上聚合物可有利连接的其他位点包括位于多肽的氨基-末端残基上的 α 氨基；位于蛋白或肽上的半胱氨酸残基的巯基 (Braxton, S. M. , 美国专利号 5, 766, 897), 用乙烯基砜，马来酰亚胺，碘乙酰胺，溴乙酰胺或邻吡啶基二硫化物，以及其他本领域已知的硫醇反应性基团活化的聚合物可以与其偶联；蛋白或肽上的精氨酸残基的胍基 (Sano, A. 等, 美国专利号 5, 093, 531), 用苯甲酰甲醛活化的聚合物可以与它偶联；C-末端残基的 α 羧基，蛋白或肽上的天冬氨酸残基的 β 羧基以及蛋白或肽上的谷氨酸残基的 γ

羧基 (Sakane, T., 等 (1997) Pharm Res 14: 1085-1091), 所述聚合物的氨基或酰胺衍生物可以与这些基团偶联。当然, 所述蛋白或肽分子上一个或多个聚环氧烷可以有利连接的其他合适位点对本领域普通技术人员来说是很好理解的, 特别是在考虑到所述肽的一级和三级结构以及本文的说明之后更是如此。

在将聚合物偶联到目标生物活性成分 (例如, 蛋白) 上之前, 有利的是纯化所述成分, 以便除去污染杂质; 否则, 会由于所述成分的片段与其他污染杂质形成聚合物缀合物而使得对所述完整成分的修饰程度的分析复杂化。无论要缀合的蛋白是从天然来源获得的或是通过重组方法生产的, 对所述生物活性成分进行纯化都是有利的, 因为制剂中的污染杂质可能来自任何来源。给定生物活性成分的纯化可以通过本领域普通技术人员所熟悉的任何已知方法完成, 包括但不限于电泳, 透析, 盐提取 (如硫酸铵沉淀), 层析 (如亲和层析, 离子交换层析, 大小排阻层析, 高效液相层析 ("HPLC"), 和快速蛋白液相层析 ("FPLC") 等) 或其组合。不过, 应当理解的是, 给定生物活性成分的纯化对于本发明的聚合物-生物活性成分缀合物的制备来说不是必须的, 因为粗制制剂中的生物活性成分 (特别是蛋白) 同样能按照本发明的方法与聚合物有利地缀合。

聚合物与生物活性成分的偶联

用于实施本发明的 PAG 如上所述优选通过与偶联基团反应活化, 其能够与可能存在于所述生物活性成分分子上的若干基团中的任意基团连接, 例如, 未参与肽键的羧基或氨基, 硫醇基和酚羟基。对于某些肽或蛋白来说, 优选将活化的 PAG 与 N-末端 α 氨基和/或赖氨酸残基的氨基和/或半胱氨酸残基的巯基偶联。

所述粗制或纯化的生物活性成分 (例如, 蛋白) 可以与活化的聚合物一起在缓冲液中温育, 所述缓冲液的 pH 范围为大约 11 或者碱度导致的任何蛋白失活可得到逆转的最高 pH, 直至大约 pH 5 或酸度导致的任何蛋白失活可得到逆转的最低 pH (参见 Arakawa, T., 等 (1990))

Biopolymers 29: 1065-1068)。正如本领域所公知的以及本领域普通技术人员能方便地理解的, 将低的 pH 用于将聚合物与蛋白偶联对于某些蛋白或连键化学来说是理想的。不过, 对于某些其他蛋白和某些偶联化学来说, 使用较高的 pH 是有利的, 这取决于 pH 对蛋白的溶解度和稳定性的影响以及对活化的聚合物的失活速度(无论是自发的或者是通过蛋白本身催化的)相对根据本领域已知方法所述聚合物与靶蛋白结合的速度影响。

PAG 和所述生物活性成分之间的反应通常是在溶液, 优选 pH 在大约 5 - 大约 11 的范围内的含水缓冲溶液中进行。为了使 PAG 与蛋白类生物活性成分(例如, 多肽, 肽, 蛋白或其片段)偶联, 特别优选的 pH 值为大约 7 - 大约 9, 最优选大约 7 - 大约 8。在其他实施方案中, 优选大约 4.5 - 大约 6.5 的 pH 值。能在 25℃ 下提供上述范围的 pH 值的缓冲溶液的例子包括但不限于:

50 mL 的 0.1M 磷酸二氢钾 + 5.6 - 46.1 mL 0.1 M NaOH, 稀释到 100 mL

50 mL 的 0.025 M 硼酸盐 + 2.0 - 20.5 mL 0.1 M HCl, 稀释到 100 mL

50 mL 的 0.025 M 硼酸盐 + 0.9 - 18.3 mL 0.1 M NaOH, 稀释到 100 mL

50 mL 的 0.05 M 碳酸氢钠 + 5.0 - 10.7 mL 0.1 M NaOH, 稀释到 100 mL

50 mL 的 0.05 M 乙酸 + 5.0 - 30 mL 0.1 M NaOH, 稀释到 100 mL

50 mL 的 0.05 M Tris-HCl + 10 - 50 mL 0.1 M Tris 碱, 稀释到 100 mL

本领域技术人员可以方便地确定为了提供特定理想 pH 对酸和碱的用量的精确调整。

在特定场合下, 如果需要使用生物学缓冲液, 可以采用下列物质之一:

羟基乙基哌嗪-乙磺酸 (“HEPES”)

3-(N-吗啉代)丙磺酸 (“MOPS”)

3-(N-吗啉代)-2-羟基丙磺酸 (“MOPSO”)

哌嗪-N, N' -双(2-羟基丙磺酸) (“POPSO”)

PAG 和生物活性成分之间的反应通常是在不会产生失活或变性的条件下进行的,例如,在所述生物活性成分保持大体生物活性的温度和不进行确保反应物充分混合所需之外的搅拌的条件。PAG 和生物活性蛋白之间的反应优选是在大约 4℃-大约 40℃ 的温度范围内进行的。更优选的是,所述反应是在大约 4℃-8℃ 或在室温下进行的,即在大约 20℃-大约 25℃ 下进行, PAG 和非蛋白生物活性剂,例如,肽和生物活性有机化学物质之间的反应,可以在适合与 PAG 偶联的特定生物活性有机化学物质的稳定性的较高或较低温度下进行。

本领域技术人员很好理解的是,相对生物活性成分用量所使用的 PAG 的量取决于聚合物与所述生物活性成分偶联的期望程度,例如,当需要 PAG 与特定分数的溶剂可及的赖氨酸残基(此时所述生物活性成分是多肽)反应时,要求 PAG 的摩尔浓度至少等于有待偶联的赖氨酸的浓度。显然,如果是要将所述生物活性成分分子上少于所有溶剂可及的反应位点衍生化,将需要相应较少的 PAG。不过,一般,在使用摩尔过量的 PAG 时,本发明人已确定 2-10 数量级的摩尔过量可能是优选的。

所述反应所需要的时间取决于多种因素,如反应温度,反应物浓度,以及需要的衍生程度。可以通过常规方法监测反应过程,如通过大小排阻层析或凝胶电泳对样品进行定期分析。必要时可以通过添加具有活性基团的低分子量化合物例如甘氨酸以便清除多余的胺-反应性 PAG 或通过层析分级分离而方便地终止所述反应。在室温下,通常需要大约 15 分钟-大约 24 小时的反应时间,以便使 PAG 与大部分生物活性成分的结合基团反应(例如,多肽链的赖氨酸基团)。在较低温度下,可能需要较长的反应时间。技术人员可以理解的是,用于缀合的时间,以及 PAG 的用量和类型必须是不会使所用的所述生物活性成分失活的,即,必须不会导致所述生物活性成分的生物学活性的明显丧失。“不会导致所述生物活性成分的生物学活性的明显丧失”表示 PAG-缀合的生物活性成分

所表现出的活性为没有与 PAG 缀合的相同生物活性成分在体外或体内表现出来的生物活性（例如，酶促活性；受体结合能力；抗肿瘤活性等）水平的至少大约 10%，优选至少大约 20%，35%，50%，75%，90%，92%，94%，95%，96%，97%，98%，99%或以上。

聚合物偶联的生物活性成分的纯化可以通过本领域技术人员常用的方法实现，例如，大小排阻层析，离子交换层析，超滤和透析等。如果需要的话，所述反应产物的溶液可以用旋转蒸发器浓缩，并且所述产物可以通过冷冻干燥以干燥状态获得。

根据所使用的特定生物活性成分，以及它与 PAG 反应的程度，预计所得到的加合物可用于诊断或治疗目的，与未反应的生物活性成分相比，具有减弱了的抗原性和免疫原性，延长了的循环寿命，以及增强了的稳定性，同时保持有用水平的生物学活性。

所述生物活性成分可以与上文所述的单官能活化的分支的聚（乙二醇）聚合物（特别是一个或多个单官能活化的，分支的二羟基 PEG，例如，二羟基 PEG-赖氨酸）在含水反应介质中反应，所述介质可以根据亲核试剂和活化的聚合物的 pH 要求进行缓冲。所述反应的最佳 pH 通常在大约 6.5-大约 8.5 之间，优选大约 7.4，以便保持大部分多肽的溶解度和稳定性。活化的 PAG，例如 NPC-PEG 与哺乳动物尿酸酶偶联的最佳 pH 为大约 pH 10，而某些活化的 PAG 与蛋白或肽的 N-末端 α 氨基选择性地偶联的最佳 pH 在大约 4-大约 7 的范围内。保持所述生物活性成分的稳定性，反应效率等所需的最佳反应条件属于本领域普通技术人员的公知常识。优选的温度范围在大约 4℃-大约 40℃之间。所述反应温度不能超过所述亲核试剂可能变性或分解的温度。优选所述亲核试剂与过量的活化的分支聚合物起反应。在所述反应之后，回收并且纯化所述缀合物，例如，通过渗滤，柱层析或它们的组合等。

分子模拟的应用可有助于优化聚合物与蛋白偶联的策略。例如，X 射线结晶数据可用于生成蛋白的溶剂可及表面的计算机化的图像（Sayle, R. A., 等（1995）Trends Biochem Sci 20: 374-376）。基于核磁共振测定的结构分析也可用于这一方面。通过选择合适的活化基

团，聚合物与蛋白的摩尔比，以及偶联反应的合适条件（例如，pH，温度，反应剂的浓度，培养时间），可以调节特定活化聚合物可与之反应的表面上的可及位点的分数以及聚合物链在各个位点间的分布。在某些场合下，可以有利地将所述聚合物连接在距离酶的活性位点足够远的残基上，以便将对生物活性产生的任何负面影响降到最低限度。例如，蛋白酶 K 的表面包括很多用于结合聚合物的潜在位点，这些位点是用各种不同化学方法活化的。不过，本发明人中的某一些以前发现了蛋白酶 K 的大部分溶剂可及的赖氨酸残基仅位于所述酶的距离催化位点较远的区域，这使得采用胺-反应性聚合物对于这种特定酶特别理想（参见申请日为 2002 年 6 月 28 日的共同拥有的待批美国专利申请号 10/183,607，该文献被以它的整体形式收作本文参考）。

在某些实施方案中（例如，在酶的催化结构域包括所述活化的聚合物可以与之反应的氨基（如上文所述）的情况下），可能需要防止活性位点与所述活化的聚合物接触。在这种情况下，所述酶可紧密地，但是可逆地与足够大的底物类似物或竞争性抑制剂结合，以在空间上妨碍所述活化的聚合物接触所述活性位点内或靠近所述活性位点的反应性残基（例如，参见，Nahri, L. O., 等（1991）*Protein Chem* 10: 385-389）。另外，可以将所述类似物或抑制剂结合在固体基质上，所述蛋白可随后吸附在该基质上。在与所得到的“亲和基质”结合的同时，所述蛋白可以与所述活化的聚合物起反应。这种策略可以将所述反应性聚合物与所述偶联可能抑制催化的位点的偶联降到最低限度。然后，可以通过本领域技术人员所公知的方法将选择性地修饰的蛋白从所述亲和基质上释放出来（参见 Wilchek, M., 等（1984）*Methods Enzymol* 104: 3-55）。所得到的缀合物可以包括蛋白分子，所述聚合物优先结合在不干扰该蛋白的生物活性的位点上。

在所述偶联反应之后，被衍生到不同程度的缀合物可以使用大小排阻和/或离子交换层析彼此分离，参见 Sherman, M. R., 等（1997）同上。例如，在 Superdex® 75 brand HR 10/30 柱或 Superdex® 200 brand HR 10/30 柱（Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ）上进

行层析，可以分离被 PEG 化到不同程度的蛋白分子，并且使它们与残余的游离 PEG 分离，以及与所述偶联反应的大部分副产品分离（参见共同拥有的待批美国专利申请号 10/183, 607，同上）。

组合物

本发明提供了通过本发明方法生产的抗原性减弱的 PEG 化生物活性成分的稳定化的缀合物。在相关方面，本发明还提供了包括一种或多种所述缀合物的组合物。根据本发明这一方面的组合物可以包括一种或多种（例如，一，二，三，四，五，十等）本发明的上述缀合物。在某些上述方面，所述组合物可以包括一种或多种其他成分，如一种或多种缓冲盐，一种或多种离液剂，一种或多种去污剂，一种或多种蛋白（例如，一种或多种酶），一种或多种聚合物等。本发明这一方面的组合物可以是任何形式的，包括固体（例如，干粉）或溶液（特别是生理学上相容的缓冲盐溶液形式，包括一种或多种本发明的缀合物）。

药用组合物

本发明的某些组合物是特别配制用作用于预防，诊断或治疗性应用的药用组合物。所述组合物通常包括一种或多种本发明的缀合物，以及一种或多种可以药用的载体或赋形剂。在本文中，术语"可以药用的载体或赋形剂"，表示无毒的固体，半固体或液体的填充材料，稀释剂，胶囊化材料或包括人或其他哺乳动物在内的要导入所述药用组合物的受体动物能够耐受的任何类型的制剂辅助材料，而不会因为它的添加产生不良作用。

本发明药用组合物可以通过任何合适的施用模式给受体施用，如口服，直肠，肠胃外，系统内，阴道，腹膜内，局部（如通过粉末，软膏，滴液或经皮贴片），口腔，如口腔或鼻腔喷雾或通过吸入施用。在本文中，术语"肠胃外"表示包括静脉内，肌内，腹膜内，脑池内，皮下和关节内注射和输液的给药方式。

本发明提供的用于肠胃外注射的药用组合物可以包括可以药用的

无菌含水或非水溶液，分散液，悬浮液或乳液，以及无菌粉末，用于在使用之前重构成无菌注射溶液或分散液。合适的含水和非水载体，稀释液，溶剂，或载体的例子包括水，乙醇，多元醇（如甘油，丙二醇，和聚（乙二醇）等），羧甲基纤维素及其合适的混合物，植物油（如橄榄油）和可注射的有机酯，如油酸乙酯。可以保持适当的流动性，例如，通过使用诸如卵磷脂的包衣材料，对于分散液来说通过保持需要的粒径，以及通过使用表面活性剂。

本发明的药用组合物还可以包括助剂，如防腐剂，湿润剂，乳化剂和分散剂。防止微生物作用可以通过包含各种抗细菌和抗真菌剂来保证，例如，对羟基苯甲酸酯，苜醇，氯丁醇，苯酚，和山梨酸等。可能还需要包含渗透剂，如糖和氯化钠等。可以通过添加能延缓吸收的物质来延长可注射药用形式的吸收，如单硬脂酸铝，水凝胶和明胶。

在某些场合下，为了延长药物的作用，需要延缓来自皮下和肌肉注射的吸收。这一目的可以通过使用在含水液体中具有较差溶解度的晶体或非晶体材料的液体悬浮液实现。这样，所述药物的吸收速度取决于它的溶解速度，反过来溶解速度又取决于它的物理形态。或者，肠胃外施用的药物形式的延缓的吸收是通过将所述药物溶解或悬浮在油性媒介物中实现的。

可注射的储存形式是通过在诸如聚交酯-聚乙交酯的可生物降解的聚合物中形成药物的微囊化基质而制备的。根据药物与载体聚合物的比例，以及所采用的特定载体聚合物的性质，可以控制药物释放速度。其他生物可降解的聚合物的例子包括生物相容性聚（原酸酯）和聚（酐）。储存式可注射制剂还可以通过将药物包封在与身体组织相容的脂质体或微型乳液中制备。

所述可注射的制剂可以灭菌，例如，通过截留细菌的过滤器过滤，或通过引入杀菌剂，采取无菌固体组合物形式，它可以在使用之前溶解或分散在无菌水或其他无菌可注射介质中。

用于口服的固体剂型包括胶囊，片剂，丸剂，粉末和颗粒。在所述固体剂型中，所述活性化合物与至少一种可以药用的赋形剂或载体混

合，如柠檬酸钠或磷酸二钙和/或 a) 填充剂或混合剂，如淀粉，乳糖，蔗糖，葡萄糖，甘露糖，和硅酸，b) 粘合剂，例如羧甲基纤维素，藻酸盐，明胶，聚乙烯吡咯烷酮，蔗糖，和阿拉伯胶，c) 保湿剂，如甘油，d) 崩解剂，如琼脂，碳酸钙，马铃薯或木薯淀粉，藻酸，某些硅酸盐，和碳酸钠，e) 溶解延缓剂，如石蜡，f) 吸收加速剂，如季铵化合物，g) 湿润剂，例如，鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯，h) 吸附剂，如高岭土和膨润土黏土，和 i) 润滑剂，如滑石，硬脂酸钙，硬脂酸镁，固体聚（乙二醇），十二烷基硫酸钠，及其混合物。对于胶囊，片剂和丸剂来说，所述剂型还可以包括缓冲剂。

还可将类似类型的固体组合物用作软和硬填充的明胶胶囊填充剂，所述明胶胶囊使用乳糖以及高分子量 PEG 等的赋形剂。

所述固体剂型的片剂，糖锭，胶囊，丸剂和颗粒可以制备有包衣和外壳，如肠衣或缓式调节包衣，以及药物制备领域所熟知的其他包衣。它们可选择性地含有遮光剂，并且还可以是只能够或优选在胃肠道的某些部分释放活性成分的组合物，选择性地以延缓方式释放。可以使用的包埋组合物的例子包括聚合物物质和蜡。所述活性化合物还可以是微胶囊化形式的，如果合适的话，使用一种或多种上述赋形剂。

用于口服的液体剂型包括可以药用的乳液，溶液，悬浮液，糖浆和酏剂。除了所述活性化合物之外，所述液体剂型还可以包括本领域常用的惰性稀释剂，例如水或其他溶剂，增溶剂和乳化剂，如乙醇，异丙醇，碳酸乙酯，乙酸乙酯，苿醇，苯甲酸苿酯，丙二醇，1，3-丁二醇，二甲基甲酰胺，油（特别是棉籽油，落花生油，玉米油，胚芽油，橄榄油，蓖麻油和芝麻油），甘油，四氢糠醇，PEG 和失水山梨糖醇的脂肪酸酯，及其混合物。

除了惰性稀释剂之外，所述口服组合物还可以包括助剂，如湿润剂，乳化剂和悬浮剂，增甜剂，调味剂和芳香剂。

除了所述活性化合物之外，悬浮液还可以包括悬浮剂，例如，乙氧基化异硬脂醇，聚氧乙烯山梨糖醇和失水山梨糖醇酯，微晶纤维素，aluminum metahydroxide，膨润土，琼脂，和黄芪胶，及其混合物。

局部使用包括用在皮肤或粘膜上，包括肺和眼睛表面。用于局部使用的组合物包括用于吸入的组合物，可作为干粉形式制备，它可以是加压的或不加压的。在不加压的粉末组合物中，细碎形式的活性成分可以与较大尺寸的可药用的惰性载体混合使用，例如，它包括直径高达100微米的颗粒。合适的惰性载体包括糖类，如乳糖和蔗糖。理想的是，占所述活性成分颗粒的至少95重量%具有在0.01-10微米范围内的有效粒径。

另外，所述药用组合物可以是加压的，并且包括压缩气体，如氮气或液化气体推进剂。所述液化推进介质以及实际上整个组合物可以优选使得所述活性成分不会以任何显著程度溶解在它里面。所述加压的组合物还可以包括表面活性剂。所述表面活性剂可以是液体或固体非离子表面活性剂，或者可以是固体阴离子表面活性剂。优选使用钠盐形式的固体阴离子表面活性剂。

另一种形式的局部使用是用于眼睛。在这种使用模式中，本发明的缀合物或组合物是在可以药用的眼用媒介物中输送的，以便所述活性化合物保持与眼表面接触足够的时间，以使所述化合物穿透结膜或角膜以及眼睛的内部区域，例如，前房，后房，玻璃体，房水，玻璃体液，角膜，虹膜/睫状体，晶状体，脉络膜/视网膜和巩膜。例如，所述可以药用的眼用媒介物可以是油膏，植物油或胶囊化材料。

用于直肠或阴道使用的组合物优选是栓剂，可以通过将本发明的缀合物或组合物与合适的非刺激性赋形剂或载体混合而制备，如可可脂，PEG或栓剂蜡，这些材料在室温下是固体，而在体温下是液体，因此能在直肠或阴道腔内融化并且释放所述药物。

用于本发明治疗方法的药用组合物还可以以脂质体形式施用。正如本领域所公知，脂质体通常来自磷脂或其他脂类物质。脂质体是由分散在含水介质中的单层或多层水合液晶形成的。能够形成脂质体的任何无毒的，生理学上可以接受的并且能够代谢的脂类都可以使用。除了本发明的一种或多种缀合物或组合物之外，本发明的脂质体形式的药用组合物还可以包括一种或多种稳定剂，防腐剂，和赋形剂等。优选的脂类是

磷脂和磷脂酰胆碱（卵磷脂）（天然的和合成的）。用于形成脂质体的方法为本领域所公知（例如，参见，Zalipsky, S. 等，美国专利号 5, 395, 619）。包括与 PEG 缀合的磷脂，最常见的是与 mPEG 偶联的磷脂酰乙醇胺的脂质体具有有利的特性，包括在哺乳动物的血液循环中具有延长的寿命（Fisher, D. , 美国专利号 6, 132, 763）。更有利的是，本发明的羟基 PEG 可以代替 mPEG 以形成所述 PEG-脂质体。最有利的是，本发明的单官能活化的羟基 PEG 可以代替活化的 mPEG 用于合成要掺入到 PEG-脂质体中的 PEG-二酰基甘油。

剂量方案

本发明的缀合物或组合物可以在体外，离体或体内施用于细胞，以便增强对活性化合物的细胞反应。普通技术人员可以理解的是，给定活性化合物，缀合物或组合物的有效量可以凭经验确定，并且能够以纯形式使用，或者如果存在的话以可以药用的制剂或前药形式使用。本发明的化合物，缀合物或组合物可以作为兽用或药用组合物与一种或多种可以药用的赋形剂组合给需要它的动物或人类患者使用。可以理解的是，在给人类患者使用时，本发明的化合物和组合物的总的每日，每周或每月的用量将由主治医师根据正常的医学判断确定。任何特定患者的治疗有效剂量水平取决于多种因素，包括要实现的细胞反应的类型和程度；所采用的特定化合物，缀合物或组合物的性质和/或活性；患者的年龄，体重或表面积，一般健康状况，性别，饮食，和活动程度；施用时间，施用途径，活性化合物的排泄速度；治疗持续时间；与特定化合物，缀合物或组合物联合或同时使用的其他药物；以及药物学和医学领域普通技术人员所公知的类似因素。例如，本领域众所周知的是，本发明的给定化合物，缀合物或组合物的开始的剂量水平低于获得理想的治疗效果所需要的剂量水平，并且逐渐加大剂量，直到获得需要的效果。

还能够以患者特异性方式安排剂量方案，以便在血液中提供给定活性化合物的预定浓度，这种浓度是通过本领域认可和常用的技术确定的，例如，大小排阻，离子交换或反相 HPLC。因此，按照医学，药理学

和/或药理学领域普通技术人员常用并且熟悉的方法，可以对患者剂量方案进行调整，以便获得相对稳定的血液水平，如通过 HPLC 测定的。

诊断和治疗用途

本发明缀合物的诊断用途可以是在动物，特别是人体内定位抗原性部分，例如，癌，通过施用本发明的聚合物-缀合的抗体，其中，所述缀合物在蛋白或聚合物成分上进行标记，以便能够检测，例如，通过下文所讨论的光学，辐射测量，荧光或共振检测。

预计，本发明的 PAG-生物活性化合物缀合物（优选以包括所述缀合物的组合物形式施用）在体内具有长得多的循环半衰期和减弱了的抗原性和免疫原性。以上特性能减轻或缓解从循环系统中迅速清除，这种现象是在出于治疗目的将很多治疗化合物（特别是生物活性化合物，如用作本发明缀合物中成分的化合物）导入动物，特别是人或其他哺乳动物体内时观察到的。本发明的缀合物和化合物的使用，还减轻或消除了重复施用特定生物活性化合物或成分的问题，否则，其会在所述患者体内引起免疫反应。关注的免疫反应包括中和生物活性和/或加快所述生物活性化合物从循环系统中清除的速度（因此减弱了诊断和治疗操作的效果）以及导致对患者的不良作用的那些免疫反应。

因此，在本发明的另一方面，本发明的缀合物和组合物可用于诊断或治疗方法，例如，用于诊断，治疗或预防动物的多种身体疾病，特别是倾向于患或患有所述疾病的诸如人的哺乳动物。在所述方法中，所述治疗目的是延缓或预防疾病的发生，和/或治愈或诱导疾病的消退，和/或减少或最小化其他治疗方案的副作用。因此，本发明的 PAG-生物活性成分缀合物和组合物可用于保护，抑制或治疗身体疾病，如感染或疾病。在本文中，术语“保护”身体疾病，包括“预防”，“抑制”和“治疗”。“预防”涉及在诱发所述疾病或身体疾病之前施用本发明的缀合物或组合物，而“抑制”涉及在所述疾病的临床表现之前施用所述缀合物或组合物；因此，身体疾病的“预防”和“抑制”通常是在倾向于或容易患所述疾病的，但是尚未患所述疾病的动物上采取的措施。而身体疾病的“治疗”

则涉及在所述疾病出现之后施用所述治疗性缀合物或组合物。可以理解的是，在人类和兽医医学上，并非总是可以区分“预防”和“抑制”身体疾病。在很多场合下，最终的诱发事件可能是未知的或潜伏的，并且患者或者医生可能都不意识到所述诱发事件直至其发生后很久。因此，区别于“治疗”，通常使用术语“预防”包括本文所定义的“预防”和“抑制”。因此，根据本发明方法所使用的术语“保护”的含义包括“预防”。

根据本发明这一方面的方法可以包括一个或多个步骤，这些步骤使得临床医生能够实现上述治疗目的。例如，本发明的一种这样的方法可以包括：

(a) 确定患有或倾向于患身体疾病的动物（优选哺乳动物，如人）；
和

(b) 给所述动物施用有效量的一种或多种本文所披露的本发明的化合物或组合物，特别是一种或多种生物活性成分的 PAG 缀合物（或一种或多种含有所述缀合物的药用组合物），从而所述化合物或组合物的施用能够预防，延缓或诊断所述动物的身体疾病的发生或者治愈所述疾病或诱导其消退。

在本文中，“倾向于患”身体疾病的动物被定义为没有表现出所述疾病的多种明显的身体症状，不过，所述动物在遗传学上，生理学上或其他方面处在发生所述疾病的危险之中。在本发明的方法中，倾向于，处在危险之中，或患有给定身体疾病的动物（如包括人在内的哺乳动物）的确定，可以按照具有普通技能的临床医生所熟悉的标准的本领域公知的方法完成，包括例如放射学测定，生物化学测定（例如，分析从动物体内获得的样品中特定肽，蛋白，电解质等的相对含量），外科手术方法，遗传筛选，家族病史，身体触诊，病理学或组织学检测（例如，对组织或体液标本或涂片的显微镜评估，免疫学测定等），体液（例如，血液，血清，血浆，脑脊液，尿液，唾液，和精液等）的检测，成像（例如，放射学，荧光，光学，共振（例如，使用核磁共振（NMR）或电子自旋共振（ESR））等。一旦通过一种或多种所述方法确定了动物，就

可以对所述动物进行强力的和/或积极的治疗，以预防，抑制，延缓或治愈所述身体疾病。

可以用本发明的缀合物，组合物和方法预防，诊断或治疗的身体疾病包括可以用所述缀合物的生物活性成分预防，诊断或治疗的任何身体疾病。所述疾病包括但不限于多种癌（例如，乳腺癌，子宫癌，卵巢癌，前列腺癌，睾丸癌，白血病，淋巴瘤，肺癌，神经系统癌，皮肤癌，头颈部癌，骨癌，结肠和其他胃肠癌，胰腺癌，膀胱癌，肾癌和其他癌，肉瘤，腺瘤和骨髓瘤）；感染性疾病（例如，细菌病，真菌病，病毒病（包括肝炎和 HIV/AIDS），和寄生虫病等）；遗传障碍（例如，囊性纤维化，肌萎缩性脊髓侧索硬化，肌肉萎缩症，高歇病，庞普病和严重联合免疫缺陷障碍等），贫血，中性白细胞减少，血友病和其他血液疾病；神经系统疾病（例如，多发性硬化和阿尔茨海默氏病）；酶疾病（例如，痛风，尿毒症，和高胆固醇血症等）；不确定病因的疾病（例如，心血管疾病，和高血压等）；以及本领域普通技术人员所熟悉的其他医学上重要的疾病。还可将本发明的组合物和方法用于预防疾病进展，如化学预防恶化前病损向恶性病损的发展。

因此，本发明的治疗方法使用本发明的一种或多种缀合物，或本发明的一种或多种药用组合物，可以通过多种施用途径给需要它的动物施用，包括口服，直肠，肠胃外（包括静脉内，肌内，腹膜内，脑池内，皮下和关节内注射以及输液），系统内，阴道，腹膜内，局部（如通过粉末，软膏，滴液或经皮贴片），口腔，作为口腔或鼻腔喷雾或通过吸入。通过本发明，有效量的缀合物或组合物可以在体外，离体或在体内施用于细胞或患有或倾向于患特定疾病的动物，从而预防，延缓，诊断或治疗所述动物的疾病。在本文中，“有效量的缀合物（或组合物）”表示所述缀合物实施该缀合物的生物活性成分的生物学活性的量，从而在施用本发明缀合物的动物中预防，延缓，诊断、治疗或治愈所述身体疾病。普通技术人员能够理解的是，本发明的缀合物或组合物的有效量可以按照药理学或医学领域普通技术人员所熟知的标准方法凭经验确定。例如，参见 Beers, M. H. 等, eds. (1999) Merck Manual of Diagnosis

& Therapy, 17th 版, Merck and Co. , Rahway, NJ; Hardman, J. G. 等, eds. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th 版, McGraw-Hill Professional Publishing, Elmsford, NY; Speight, T. M. 等, eds. (1997) Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 4th 版, Blackwell Science, Inc., Boston; Katzung, B. G. (2000) Basic and Clinical Pharmacology, 8th 版, Appleton and Lange, Norwalk, CT; 所述文献及其中所引用的文献被以它们的全文形式收作本文参考。

可以理解的是,在给人类患者施用,本发明缀合物和组合物的总的每日,每周或每月的剂量将由主治医师根据正常的医学判断确定。例如,通过根据所使用的特定生物活性化合物施用合适剂量的某些本发明的缀合物或组合物可获得令人满意的结果,所述剂量是普通技术人员所熟知的或者仅仅使用常规实验凭经验就可容易地确定。根据本发明的这一方面,所述缀合物或组合物可以一次施用,或以分开的剂量施用,例如,每日或每周或每月两次。仅仅使用常规实验,还可以凭经验容易地确定对各种施用方式(例如,肠胃外,皮下,肌内,眼内,鼻腔内等)的合适的剂量方案,或者根据所述生物活性成分的性质,所述剂量方案是本领域普通技术人员显而易见的。

在其他应用中,本发明的缀合物和组合物可用于将诊断或治疗剂特异性靶向表达其受体、结合、掺入或以其他方式可摄取所述缀合物的生物活性成分的细胞,组织,器官或有机体。例如,根据本发明这一方面的方法可以包括,让所述细胞,组织,器官或有机体与本发明的一种或多种缀合物接触,所述缀合物还包括一种或多种诊断或治疗剂(优选与所述缀合物的 PAO 或 PEG 成分共价连接),以便所述缀合物通过任何机制被所述细胞,组织,器官或有机体摄取(例如,由受体介导的胞吞,胞饮作用,吞噬作用,扩散等),从而将所述诊断或治疗剂输送到所述细胞,组织,器官或有机体。用于本发明这一方面的诊断或治疗剂可以是,但不局限于,选自下列一组的至少一种物质:核酸,有机化合物,

蛋白，抗体，酶，糖蛋白，脂蛋白，元素，脂类，糖类，同位素，碳水化合物，显像剂，可检测探针，或它们的任意组合，它们还可以按本文所披露的方法进行可检测地标记。用于本发明这一方面的治疗剂可以对靶细胞（或组织，器官或有机体）具有治疗作用，所述作用选自但不限于纠正缺陷型基因或蛋白，药物作用，毒性作用，生长刺激作用，生长抑制作用，代谢作用，分解代谢作用，合成代谢作用，抗病毒作用，抗真菌作用，抗细菌作用，激素作用，神经体液作用，细胞分化刺激作用，细胞分化抑制作用，神经调节作用，抗肿瘤作用，抗癌作用，胰岛素刺激或抑制作用，骨髓刺激作用，多能干细胞刺激作用，免疫系统刺激作用，以及可以由按照本发明这一方面经由输送系统输送到细胞（或组织，器官或有机体）的治疗剂提供的任何其他已知的治疗作用。

其他治疗剂可进一步构成本发明的生物活性缀合物或组合物，它们可选自但不限于已知的和新的化合物和组合物，包括抗生素，类固醇，细胞毒性剂，血管活性药物，抗体和其他治疗剂。所述治疗剂的非限定性例子包括用于治疗细菌性休克的抗生素和其他药物，如庆大霉素，妥布霉素，萘夫西林，肠胃外头孢菌素等；肾上腺皮质激素及其类似物，如地塞米松，它能缓解由内毒素导致的细胞损伤；血管活性药物，如 α 肾上腺素能受体阻断剂（例如，酚苳明）， β 肾上腺素能受体激动剂（例如，异丙肾上腺素），和多巴胺。

本发明的缀合物和组合物还可用于诊断疾病和用于监测治疗反应。在某些这样的方法中，本发明的缀合物可以包括一种或多种可检测的标记（如在本文的其他部分所披露的）。在具体的所述方法中，本发明的这些可检测地标记的缀合物可用于检测能表达所述缀合物的生物活性成分的受体或以其他方式摄取所述成分的细胞，组织，器官或有机体。在所述方法的一种实施例中，让所述细胞，组织，器官或有机体与本发明的一种或多种可检测地标记过的缀合物接触，接触条件为有利于所述细胞，组织或有机体对所述缀合物的摄取（例如，通过所述缀合物与细胞表面受体结合，或通过胞饮作用或扩散使所述缀合物进入细胞），然后使用对所使用的标记特异的检测方法检测与所述细胞结合或掺入所

述细胞的缀合物（例如，对荧光标记的缀合物的荧光检测；对磁标记的缀合物的磁共振成像；对放射性标记的缀合物的放射成像等）。所述可检测地标记的缀合物的其他用途可以包括，例如，使细胞，组织，器官或有机体，或使动物（包括人）的内部结构显像，通过施用有效量的标记形式的一种或多种本发明的缀合物，并且测定与所述细胞，组织，器官或有机体（或动物）相关的可检测的辐射。检测各种类型的标记的方法及其在诊断或治疗成像中的用途为本领域普通技术人员所熟知，并且在本文的其他地方披露。

另一方面，本发明的缀合物和组合物可用于调节表达对缀合物的生物活性成分的特异性受体的细胞表面上所述受体的浓度或活性的方法中。“调节”给定受体的活性表示所述缀合物在与所述受体结合之后，能激活或抑制通过所述受体介导的生理学活性（例如，细胞内信号传导级联反应）。尽管不希望受到对本发明缀合物的调控活性的任何特定机制性解释的约束，所述缀合物能够通过所述缀合物的生物活性成分与所述受体的结合而拮抗细胞受体的生理学活性，从而阻断天然激动剂（例如，未缀合的生物活性成分）的结合，并且阻止所述天然激动剂对所述受体的激活，同时又不会诱导所述受体本身的生理学活性的明显激活。根据本发明这一方面的方法可以包括一个或多个步骤，例如，让所述细胞与一种或多种本发明的缀合物接触（可以在体外或体内进行）。接触是在这样的条件下进行的，使得所述缀合物（即，所述缀合物的生物活性成分部分）能结合所述细胞表面上对所述生物活性成分的受体，但不会明显激活所述受体。所述方法可用于本领域普通技术人员能方便地理解的多种诊断和治疗应用。

试剂盒

本发明还提供了包括本发明的缀合物和/或组合物的试剂盒。所述试剂盒通常包括载体，如盒子，纸板箱，或试管等，在它里面紧密封装了一个或多个容器，如小瓶，试管，安瓿和瓶子等，其中，第一个容器装有一种或多种本发明的缀合物和/或组合物。本发明这一方面所涉及

的试剂盒还可以包括一种或多种实现本发明的缀合物和组合物的一种或多种特定应用所必需的其他成分（例如，试剂和化合物），如用于诊断，治疗或预防特定疾病或身体疾病的一种或多种成分（例如，一种或多种其他治疗化合物或组合物，一种或多种诊断试剂，和一种或多种载体或赋形剂等），和一种或多种另外的本发明的缀合物或组合物等。

相关领域的普通技术人员很好理解的是，在不超出本发明的范围或它的任何实施方案的前提下，可以对本文所披露的方法和用途进行其他合适的改良和改进。在已经对本发明进行了详细说明之后，通过结合下面的实施例可以更清楚地理解本发明，这些实施例包括在本文中只是用于说明目的，而不是要限定本发明。

实施例

实施例 1：一甲氧基 PEG 的抗体的制备和测试

以前业已报导了通过用其中的 PEG 与免疫原性载体蛋白偶联的缀合物接种兔子而使动物对各种 PEG 免疫（Richter, A. W. , 等（1983）*Int Arch Allergy Appl Immunol* 70: 124-131）。通过用 β -葡糖醛酸酶的 mPEG 缀合物注射小鼠，并且筛选能产生抗 PEG 的抗体的杂交瘤克隆，业已产生了能与 PEG 的聚醚主链起反应的单克隆抗体（Cheng, T-L. , 等（1999），同上.; Cheng, T L. , 等（2000）同上; Tsai, N. -M. , 等（2001），同上.; Roffler, S. 等，公开的美国专利申请号 2001/0028881 A1 和美国专利号 6, 596, 849 和 6, 617, 118; 以上所有文献的内容以它们的全文形式收作本文参考）。最近业已披露了能与 PEG 的聚醚主链起反应的另一种单克隆抗体，参见 Roberts, M. J. , 等，美国专利申请号 2003/001704A1。

为了开发用于检测 PEG-蛋白缀合物中的 PEG 的灵敏的方法，按下文所述制备了抗 PEG 的多克隆抗体。由于在本领域中所披露的治疗蛋白的几乎所有的 PEG 缀合物都是用 mPEG 合成的，本发明人研究了甲氧基在含有 mPEG 的缀合物的免疫反应性方面的作用。10-kDa mPEG 的对硝基苯基碳酸酯衍生物是由 Shearwater Corporation (Huntsville, AL)

定制合成的，该公司是 Nektar Therapeutics (San Carlos, CA) 的一个子公司。制备了重组哺乳动物尿酸酶的尿烷-连接的 mPEG 缀合物，它包括使所述蛋白在生理学 pH 下溶解所需要的这种 10-kDa mPEG 的最低数量的链（每个 35-kDa 的尿酸酶亚基大约两股 PEG 或 mPEG）。这种数量的 PEG 不足以抑制尿酸酶的异常高的免疫原性（参见 Sherman, M. R. 等, PCT 公开号 W001/59078 A2, 和 Kelly, S. J., 等 (2001) 同上, 以上文献被以它们的全文形式收作本文参考）。在弗氏佐剂中将这种 PEG-尿酸酶制剂重复注射到三只兔子体内, 并且对所述兔子放血, 以便制备含有抗尿酸酶, PEG-尿酸酶缀合物和 PEG 的多克隆抗体的抗血清。

对每只兔子用在完全弗氏佐剂中的 PEG-尿酸酶制剂注射一次, 并且用在不完全弗氏佐剂中的制剂注射五次, 间隔一至四周。在最后三次注射的每一次注射之后大约两周采集血样。从九个血液样品中的每一个制备血清, 并且取小体积血清检测抗 PEG 的抗体, 通过酶联免疫吸附测定 ("ELISA") 检测, 使用用在结构上与尿酸酶无关的蛋白的 mPEG 缀合物包被的 96-孔平板。

每一次测试放血得到了在 ELISA 分析中与 PEG 起反应的抗血清。这三只兔子各自对用 PEG 进行的免疫起反应, 通过竞争性 ELISA 测定发现, 它们具有在性质上类似的动力学, 并且对 mPEG 的甲氧基端基具有类似的特异性。首先, 进行斑点印迹分析, 以便测定所述兔子血清中抗-PEG 抗体的灵敏度。将用于对兔子进行免疫的具有各种大小和结构的 PEG 的溶液和 PEG-尿酸酶溶液点在聚偏二氟乙烯印迹膜 (Invitrogen, Carlsbad, CA; catalog # LS2002) 上。在用 2% (w/v) 脱脂干奶粉的溶液封闭所述膜之后, 将所述膜与按上述方法制备的抗 PEG-尿酸酶的兔抗血清稀释液一起培养。然后作为二抗施加在山羊体内生产的并且与碱性磷酸酶偶联的抗兔 IgG 抗体的稀释液 (Calbiochem, San Diego, CA; catalog # 401371)。使用 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸和氮蓝四唑 (Sigma, catalog # B-1911) 的组合检测所述印迹上的碱性磷酸酶活性, 正如以前所披露的 (Blake, M. S., 等 (1984) Anal Biochem 136: 175-190, 所述文献的内容以它们的全文形式收作本文参考)。所述兔抗-PEG 抗体

能以高的灵敏度和特异性检测所测试的 PEG 溶液和 mPEG-蛋白缀合物。

实施例 2: 证实甲氧基在 mPEG 的抗原性方面的作用

出乎预料的是, 本发明人业已发现按例 1 所述方法制备的抗-PEG 抗体主要是针对所述抗原的 mPEG 成分的甲氧基端基的。图 1 表示来自竞争性 ELISA 测定的结果, 其中, 用在结构上与尿酸酶无关的蛋白的 mPEG 缀合物对 96-孔平板进行包被。在用 2%山羊血清封闭所述平板之后, 添加增加浓度的 4.8-kDa mPEG (Polymer Laboratories, catalog # 6570-5010), 10-kDa mPEG (Union Carbide, catalog # MPEG-10, 000) 或 10-kDa 叔丁氧基 PEG (Polymer Laboratories, catalog # 29999997) 的溶液, 并且与针对 mPEG-尿酸酶缀合物而形成的兔抗血清的 1: 1, 000 稀释液一起培养。在除去所述溶液之后, 通过分光光度测定, 使用过氧化物酶-缀合的二抗 (山羊抗-兔 IgG, Calbiochem®, San Diego, CA; catalog # 401393), 然后添加过氧化物酶底物, 邻苯二胺二氢氯化物 (Sigma, St. Louis, MO; catalog # P-9781), 测定抗-PEG 抗体与平板上 mPEG-蛋白缀合物的结合程度。对每一个样品来说, 将在缺乏竞争剂的条件下观察到的原始的反应速度 (表示为每分钟的毫吸收单位) 确定为 100%。两种 mPEG 溶液的重叠的曲线表明 PEG 主链长度不是其抗原性的主要决定因素。叔丁氧基 PEG 的曲线向右侧偏移了大约 2 个对数单位, 表明叔丁氧基 PEG 对所制备的抗 mPEG-蛋白缀合物的抗体的亲和力比 mPEG 低大约 100 倍。不过, 在本发明人中的某些人以前没有公开的实验中, 发现了当与免疫原性蛋白缀合时, 叔丁氧基 PEG 表现出显著的免疫原性。因此, 尽管图 1 表现出叔丁氧基 PEG 与抗 mPEG 的抗体具有非常小的交叉反应性, 在生产 PEG 化的治疗蛋白时, 用叔丁氧基 PEG 取代 mPEG, 不能解决 PEG 成分的免疫原性的问题。

图 1 所示结果表明, mPEG 上的甲氧基是所述聚合物分子上的主要抗原性基团。为了证实这一推论, 对按例 1 所述方法制备的抗体进行了竞争性 ELISA 分析, 按对图 1 所述方式进行, 使用具有各种大小和结构的, 包括一个或两个甲氧基的 PEG。图 2a 表示抗体结合的结果, 是以在

每一个样品中甲氧基的摩尔浓度的函数形式作图的。使用 5-参数 s 形曲线的方程和程序 SigmaPlot® (SPSS Science, Chicago, IL) 计算了导致对结合产生 50%抑制作用的竞争剂的浓度 ("IC₅₀")。

如图 2a 所示, 下面的 PEG 在摩尔基础上都具有类似的抗原性: 具有一个甲氧基的线性 PEG ("10-kDa mPEG"), 通过水解 mPEG-NPC 制备 (PEG-Shop), 以及"单-20-kDa mPEG-赖氨酸", 通过将赖氨酸偶联到 20-kDa NPC-PEG 上而合成 (Shearwater, catalog # M-NPC-20, 000); 具有两个甲氧基的线性 PEG ("双-(2-kDa) mPEG" (Sigma-Aldrich, catalog # 81314)), 以及包括两个甲氧基的大的"分支的"PEG ("二-(20-kDa) mPEG-赖氨酸" (Shearwater, catalog # PEG2-NHS-40K))。相比之下, 具有两个甲氧基的较小的"分支的"PEG ("二-(5-kDa) mPEG-赖氨酸" (Shearwater, catalog # 2Z3X0L01)) 的曲线相对其他样品的结果的平均值向左偏移了 0.5-0.6 个对数单位, 表明这种形式的“分支的”mPEG 的抗原性是在本实验中测试的其他样品的抗原性的 3-4 倍。图 2b 表示来自图 2a 的数据, 作为 mPEG 的重量浓度 ($\mu\text{g/ml}$) 的函数而不是甲氧基的摩尔浓度的函数, 支持了这样的结论: 对于 mPEG 与抗-mPEG 抗体的相互作用来说, 重要的是甲氧基。

图 3 以表格形式表示来自图 1, 2a 和 2b 的数据的子集, 它证实了抗原性直接取决于每个 PEG 分子的甲氧基数目。这些样品表示没有甲氧基的 ("10-kDa 叔丁氧基 PEG"), 具有一个甲氧基 ("10-kDa mPEG") 或具有两个甲氧基的 ("二-(5-kDa) mPEG-赖氨酸") 的 10-kDa 的 PEG。结果表明, 特定聚合物的抗原性, 以及用该聚合物生产的本发明的缀合物的抗原性直接取决于所述 PEG 聚合物分子上所包含的甲氧基的数目, 甲氧基的数目越大, 所述聚合物对抗 mPEG-蛋白缀合物的抗体的亲和力越高。

总之, 以上结果表明对于所述兔抗体与 mPEG 缀合物结合的完全抑制, 可以通过用 PEG, 特别是 mPEG 的溶液竞争实现。另外, mPEG 的溶液阻断兔抗-PEG 抗体与不相关蛋白的 mPEG 缀合物结合的能力与它们的甲氧基含量相关。根据重量浓度, 具有较低分子量的 mPEG 是比具有较

大分子量的 mPEG 更有效的竞争剂,如图 2b 所示。这一结论与以下事实吻合:随着聚合物分子量的增加,甲氧基的质量与聚合物总质量的比例降低。在测试过的 PEG 中,最有效的抗原(以摩尔为基础)是包括两个甲氧基的“分支的”PEG,它有时候被称作伞-样或"U-PEG"(Martinez, A. 等,美国专利号 5,643,575)或称作"Y-PEG"(Greenwald, R. B. 等,公开的美国专利申请号 2002/0052443A1)。

实施例 3: 用缺乏甲氧基的 PEG 检测抗-mPEG 抗体

在本文中,术语"PharmaPEG"表示在远离被活化的或可被活化的末端的末端缺乏抗原性基团的线性或分支的 PEG。通过以上实施例可以推测聚合物的抗原性,以及生物活性剂的聚合物缀合物的抗原性受所述聚合物中甲氧基含量的影响。为了进一步检验这种推测,进行如图 1 所示出的竞争性 ELISA 分析,比较了 mPEG ("4.8-kDa mPEG")和在线性聚合物的末端没有甲氧基或其他烷氧基的 12-kDa, 20-kDa 和 35-kDa PharmaPEG 被抗-mPEG 抗体结合的能力。结果如图 4 所示。在图 4 中,三条 PharmaPEG 曲线相对 mPEG 曲线的偏移,表明了在用抗-mPEG 抗体检测分析时,PharmaPEG 的抗原性比 mPEG 的抗原性低大约 100 倍。因此,与传统上用于药物的生物缀合的聚合物,例如 mPEG 相比,缺乏甲氧基的聚合物(例如,PharmaPEG)的抗原性是减弱了的或明显减弱了的。

正如上文所指出的,在重量基础上,mPEG 的竞争效力与它们的分子量成反比。不过,缺乏甲氧基的 PEG 只具有 mPEG 的竞争效力的大约 1%,与它们的分子量无关。以上结果支持了以下结论:缺乏甲氧基的单官能反应性聚合物特别适用于制备与使用 mPEG,特别是"分支的" mPEG,如二-mPEG-赖氨酸生产的缀合物相比具有减弱了的,明显减弱了的,或无抗原性的生物活性剂的聚合物缀合物。

实施例 4: 用抗-mPEG 抗体通过 Western 印迹检测 PEG 化的蛋白缀合物

将碳酸酐酶 (EC 4.2. 1.1; "CA II") 的一甲氧基 PEG 缀合物用作模型, 测试在存在十二烷基硫酸钠的条件下进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 ("SDS-PAGE") 之后抗-mPEG 抗体检测 PEG 化的蛋白缀合物的能力。将凝胶电印迹到聚偏二氟乙烯膜上, 并且将所述印迹与兔抗-mPEG 抗体(稀释倍数 1: 200) 一起培养, 然后与和碱性磷酸酶缀合的二抗(山羊抗-兔 IgG) 一起培养, 并且接触形成有色沉淀物的底物。这种对从电泳凝胶转移到膜上的蛋白或聚合物-蛋白缀合物进行免疫学检测的方法, 通常被称作"Western 印迹" (Tsang, V. C. W. 等, (1984) Anal Biochem 143: 304-307)。检测方法和试剂与在例 1 中披露的用于斑点印迹的方法和试剂相同。结果如图 5a 所示。泳道 1 和 2 表示使用 SYPRO®brand Ruby Stain (Molecular Probes, Eugene, OR, catalog # S-12000) 对蛋白进行染色的凝胶, 以及用 Kodak 柯达数码相机使用橙/红可见光滤光器 (Molecular Probes, catalog # S-6655) 在暗室中以 302nm 照明进行照相。泳道 3 和 4 表示相同样品的 Western 印迹的结果。抗-mPEG 抗体出现在所有 PEG 化种类的位置上 (泳道 3), 但是不存在于未修饰的碳酸酐酶位置上 (泳道 4)。

图 5b 表示用柯达 1D 成像分析软件 (Kodak, Rochester, NY) 获得的如图 5a 所示的凝胶和 Western 印迹中条带强度的定量。水平轴线表示相对染料前沿的迁移距离, 而垂直轴线表示蛋白染色或抗-mPEG 染色的相对强度。底部的描绘表示 SeeBlue Plus2™ brand 预染色的标准蛋白 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA; catalog # LC5625) 的条带, 其中, 编号 1-8 的峰表示具有以下表观分子量的蛋白 (以 kDa 为单位): 分别为 204, 111, 68.8, 51.5, 40.2, 28.9, 20.7 和 14.9。从底部倒数第二的描绘是 PEG 化的碳酸酐酶的抗-mPEG 抗体染色。从底部倒数第三的描绘表示碳酸酐酶的蛋白染色的条带, 而顶部描绘表示蛋白染色的碳酸酐酶的 mPEG 缀合物。图 5b 中峰上面的数字表示与该峰的缀合物中的碳酸酐酶偶联的 mPEG 链的数目。PEG₀ 表示没有 PEG 与它偶联的碳酸酐酶的位置。

总之, 以上结果表明, 抗-mPEG 抗体能够与用反应性形式的 mPEG

制备的 PEG 化的蛋白容易地形成复合物，并因此能够对它们进行灵敏的和选择性的检测。在将所述缀合物导入动物用于诊断，预防或治疗目的时，抗-mPEG 抗体的诱导会导致所述制剂从血流中清除的速度加快，从而限制了所述缀合物的效力，并有可能导致通过形成免疫复合物介导的不良作用。

实施例 5: PharmaPEG-单硝基苯基碳酸酯的合成

从 PEG 二醇制备单官能活化的 PharmaPEG 的要求是，在合成中的某些步骤，所述 PEG 的末端基团之一必须具有能够分离包括不同数量的所述末端基团的 PEG 的特性。所述基团可能比 PEG 或活化的 PEG 的疏水性更强，从而能够通过反相层析 ("RP 层析") 分离。另外，所述基团可以是带电荷的，可以通过离子交换层析分离。所述基团可以是固相的一部分，能够从未结合的 PEG 可溶于其中的液体中进行相分离。如果活化基团可以用作分离的基础的话，正如在本例 5 中所披露的 NPC-PEG 的情形，则所述活化基团的结合是唯一需要的合成反应。如果可除去的封闭基团，例如，叔丁基或三苯基甲基 ("三苯甲基") 基团提供了所述分离的基础，则所述封闭基团可以在所述活化的或可以活化的基团结合之前或之后添加，正如在例 6 中所披露的。理论上讲，用于分离包括所需数量的封闭基团的 PEG 的纯化步骤可以在所述封闭基团连接之后的任何时间进行。实际上，聚合物主链和封闭基团之间以及聚合物主链和活化(或可活化的)基团之间的结合的相对不稳定性，可以决定最佳的步骤顺序。

在下面的示意图中归纳了从二羟基 PEG 合成单官能活化的 NPC-PEG，其中，Ph 表示苯基，而 n 表示聚合物中环氧乙烷单位的数量，对于 10-kDa PEG 来说，该数量大约为 227。

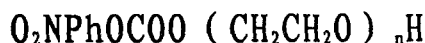
$\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ ("PEG 二醇")

1 ↓ 存在于吡啶/乙腈中的对硝基苯基氯甲酸酯 ($\text{O}_2\text{NPhOCOCl}$)

$\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H} + \text{O}_2\text{NPhOCOO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{OCOPhNO}_2 +$

$\text{O}_2\text{NPhOCOO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$

2 ↓ 单-NPC-PEG 的 RP 层析纯化



PharmaPEG-单硝基苯基碳酸酯

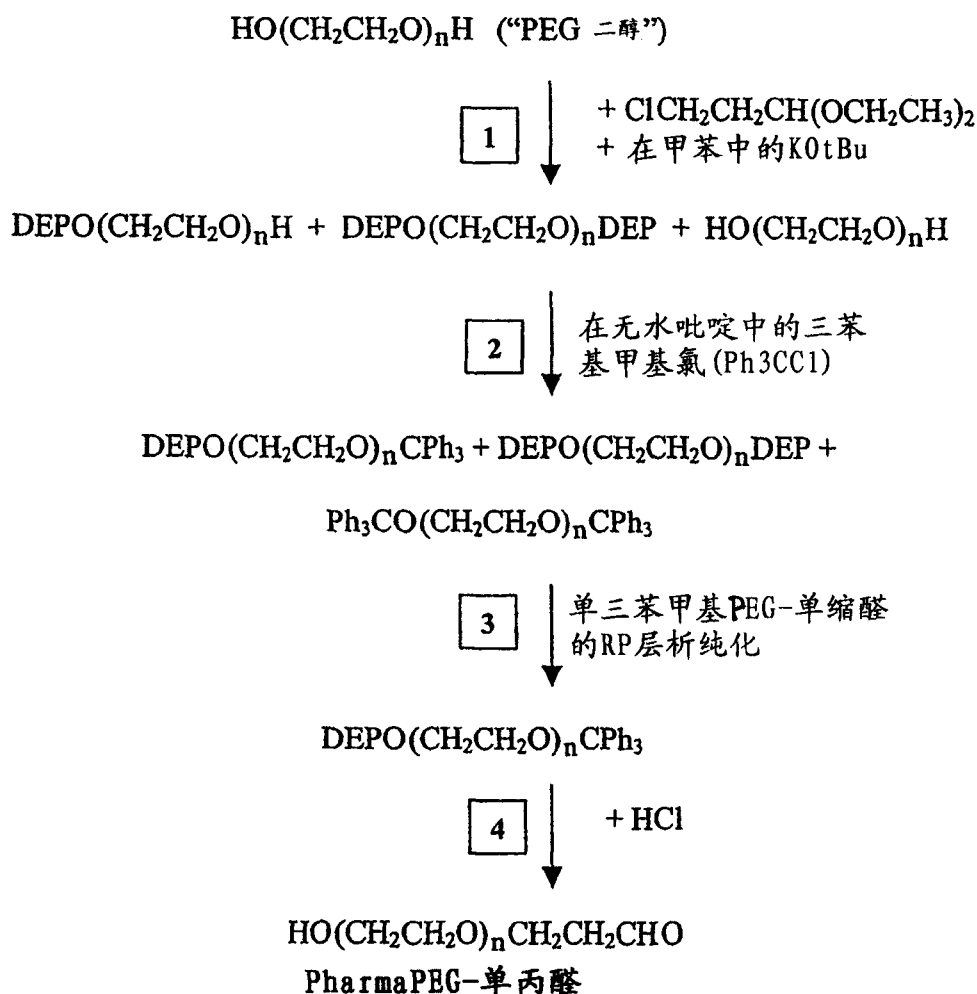
检测了来自若干供应商的 PEG 二醇的纯度和均匀性，所有产品都标称具有 10 kDa 的分子量，其中都不包括超过 90%的分子量大约为 10 kDa 的 PEG。因此，通过反相层析在 Amberchrom MD-P CG-300SD 柱 (7.5 mm x 15 cm, TosoHaas, Montgomeryville, PA) 上使 10-kDa PEG 二醇 (Fluka Chemical Corp., Milwaukee, WI, catalog # 81280) 与低分子量的污染杂质分离。PEG 以溶解在 5% (v/v) 乙腈水溶液中的溶液形式加样到所述柱上，并且用线性梯度的 5%-35% 乙腈水溶液洗脱。在 pH 4.6 的含有 150 mM NaCl 的 20 mM 乙酸钠中，在 Superdex®200 brand HR10/30 柱 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 上通过大小排阻层析分析级分。合并来自 Amberchrom 柱的其中超过 98%的由 PEG 所致的折射率 ("RI") 信号是在相应于大约 10-kDa PEG 的峰中的级分，并且冷冻干燥。

将纯化的，干燥的 PEG 二醇 (530 mg) 与 61.4 mg 对硝基苯基氯甲酸酯 (Aldrich, Milwaukee, WI, catalog # 16, 021-0) 混合，并且溶解在装在带螺纹盖的 13 x 100 mm 玻璃试管中的 4 mL 乙腈中，得到最终浓度为大约 12.5 mM 的 PEG 二醇和大约 75 mM 的对硝基苯基氯甲酸酯。添加吡啶 (0.25 g)，并且在 36°C 下温育反应混合物过夜。通过搅拌混合物到 33 mL 冰冷的 0.1 M 盐酸中，结束该反应。对该溶液进行过滤，以便除去轻微的对硝基苯酚沉淀，并且在冷却条件下用 1-L 的水透析一天，更换四次水。将乙腈添加到经透析溶液中，使浓度为 5% (v/v)。将含有大约 265 mg 的纯化的 10-kDa PEG 二醇的在步骤 1 中获得的混合物的一半 (24 mL) 加样到 Amberchrom 柱上，并且用溶解在水中的 5%-65% 乙腈的梯度洗脱结合的 PEG 种类。如前所述通过大小排阻层析分析级分，监测在 280 nm 波长下的折射率和吸光度。在 280 nm 波长下缺乏吸光度

的二羟基 PEG 首先被洗脱, 随后是衍生有单一的对硝基苯基的 PEG ("单-NPC PEG"), 接着是二-NPC PEG, 它在 280 nm 波长下的吸光度与折射率的比值是单-NPC-PEG 的二倍。将位于单-NPC PEG 洗脱范围中间的两级分合并在一起, 得到大约 110 mg 的单-NPC PEG, 相当于大约 42% 的产率。可以对步骤 2 的产物进行干燥, 以便在干燥器和/或冷冻器中保存, 或直接用于与含胺的生物活性化合物偶联, 或与含有两个或两个以上氨基的接头偶联, 以便制备分支的 PEG, 例如, 二 PEG-赖氨酸, 它不含有烷氧基。

例 6: 从 PEG 二醇合成 PharmaPEG-一醛

在下面的示意图中归纳了 PharmaPEG 的单丙醛衍生物的合成, 其中, KOtBu 表示叔丁醇钾, 而 DEP 表示 3, 3-二乙氧基丙基。



优选地,被用作步骤 1 的原材料的二羟基 PEG 的分子量在它的标称分子量的 10%以内,并且具有 <1.05 的多分散性。多分散性被定义为重均分子量 (" M_w ")与数均分子量 (" M_n ")之比。这两种参数 M_w 和 M_n 都可以通过大小排阻层析测定,使用具有准确已知分子量的 PEG 作为标准物,和凝胶渗透层析软件,如 EZ Chrom Elite Client/Server 软件, 2.8.3 版 (Scientific Software, Inc., Pleasanton, CA)。另外,PEG 的多分散性可以通过矩阵协助的激光解吸/离子化飞行时间 (" $MALDI-TOF$ ")质谱分析 (Marie, A. 等, (2000) Anal Chem 72: 5106-5114), 使用诸如 Voyager 的软件 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 来测定。为了制备含有共价连接的 PEG 的药用制品, PEG 原材料优选具有 <1.02 的多分散性,更优选 <1.01 , 是通过 MALDI-TOF 质谱分析测定的。所述原材料可以从以下公司获得: Aldrich Chemical Co., Fluka Chemicals (Buchs, Switzerland), Shearwater Corporation 或 Sigma Chemical Co., 以及本领域技术人员已知的其他供应商。如果所述原材料的均匀度不够,可以通过采用例 5 所披露的方法进行分级分离。

可以使用 3-氯-丙醛二乙基缩醛 (Aldrich catalog # C6, 900-4) 合成 PEG 二醇的单丙醛和二丙醛二乙基缩醛衍生物的混合物, 如 Harris, J. M., 等对于乙醛二乙基缩醛所述 ((1984) J Polym Sci 22: 341-352) (参见步骤 1)。Bentley, M. D., 等披露了类似方法 ((1998) J Pharm Sci 87: 1446-1449), 并且由 Bentley, M. D., 等申请了专利 (美国专利号 5, 990, 237)。

将足量的溶解在吡啶中的三苯基甲基氯 (氯代三苯基-甲烷或三苯基甲基氯, Ph_3CCl , 例如, Aldrich catalog # T8, 380-1) 添加到在步骤 1 中生产的混合物中, 以便在所述反应条件下, Ph_3CCl 将与 PEG 原材料上没有与丙醛二乙基缩醛偶联的所有羟基反应 (Kocienski, P. J., 同上)。为了完成步骤 2, 在沉淀之后回收所述混合物, 通过添加 PEG 的不良溶剂 (例如, 乙醚) 或通过蒸发溶剂或通过本领域已知的其他方法。

在添加 5% (v/v) 乙腈之前或之后将从步骤 2 中回收的混合物溶解在水中, 并且将该溶液加样到反相柱上, 根据本领域公知的原理, 预计它能够结合 PEG 的三苯甲基衍生物。所述柱可以包括硅的烷基或芳基衍生物或聚合底物, 或者它可以是苯乙烯型聚合物 (例如, Amberchrom MD-P CG-300), 正如在例 5 中所披露的。所述 PEG 二醇和三苯甲基衍生物可以用增加梯度的有机溶剂以反相模式洗脱, 正如在例 5 中所披露的, 或者以样品置换模式, 通过连续对所述柱加样, 直到业已将至少一部分需要的物质洗脱 (Agner, E. 等, PCT 公开号 WO 00/23798 A1), 或以替代模式 (Cramer, S. M., 美国专利号 6, 239, 262), 或以所述模式的组合进行。一般, 缺乏任何三苯甲基的 PEG 衍生物首先洗脱, 单三苯甲基衍生物其次洗脱, 而双-三苯甲基 PEG 第三个洗脱。当以上三种物质的比例为 1: 2: 1 时, 获得需要产物的最佳产率。为了提高需要的单三苯甲基 PEG 产物的产率和/或纯度, 可能需要对一部分柱流出液进行再循环层析, 正如层析技术领域所熟知的。为了完成步骤 3, 分离包括至少一部分单三苯甲基衍生物的洗脱物部分, 并且通过本领域所公知的方法浓缩和干燥。

在弱酸性条件下, 并且在低温下, 可以将缩醛转化成醛, 并且保留位于 PEG 远端的大部分三苯甲基连键。在本实施例的某些应用中, 在除去三苯甲基之前, 让所述单三苯甲基 PEG 一醛与目标部分起反应可能是有利的。本发明涉及并且包括这样的实施方案。

例 7: 证实用羟基 PEG 制备的缀合物与甲氧基 PEG 相比具有减弱了的免疫原性

按照例 1 中所披露的用尿酸酶的 mPEG 缀合物免疫接种方法进行, 每组三只兔子用相同猪尿酸酶制剂的 mPEG 缀合物或羟基 PEG 缀合物免疫, 所述缀合物各自包括平均大约两股 10-kDa PEG /尿酸酶亚基。通过大小排阻 HPLC 分析和通过 SDS-PAGE 证实与每一种缀合物制剂结合的聚合物链的平均数目, 其中, 按例 4 方法对所述凝胶进行蛋白染色, 并且使用在申请日为 2002 年 6 月 28 日的共同拥有的待批美国专利申请

10/183, 607 中披露的方法进行 PEG 染色, 该文献被以它的完整形式收作本文参考。对每只兔子用在完全弗氏佐剂中的 PEG-尿酸酶制剂之一注射一次, 并且用在不完全弗氏佐剂中的制剂注射五次, 间隔一至四周。在用不完全弗氏佐剂进行第四次和第五次注射之后两周抽取血液, 并且制备血清。在按照例 2 方法通过 ELISA 分析对来自所述兔子的血清的系列四倍稀释液进行检测时, 发现通过用羟基 PEG 制备的缀合物诱导的抗-PEG 抗体的浓度低于通过用 mPEG 制备的缀合物诱导的抗体浓度的 5% (参见图 6a 和 6b)。相比之下, 用两种类型的 PEG 制备的缀合物对抗-尿酸酶抗体的诱导在两组兔子中是类似的。来自所述兔子的免疫前的血清都不含可检测的抗-PEG 抗体。

讨论和结论

本领域业已报导了末端为甲氧基的 PEG(mPEG)和末端为羟基的 PEG(双-羟基 PEG 或 PEG 二醇)可等同地用于生物缀合, 或者, 更常见的是, mPEG 和其他低级烷氧基 PEG 优于 PEG 二醇。另外, 双-活化的二醇可以起着交联剂的作用, 对于生产具有低免疫原性和抗原性的可溶性长效生物缀合物来说它们可能是不理想的。令人吃惊的是, 本研究的结果表明 mPEG 具有显著的抗原性, 并且诱导的抗 mPEG 的甲氧基的抗体能结合用 mPEG 制备的 PEG 化的蛋白缀合物。因此, 出乎预料的并且与以前的报导相反的是, mPEG 不与羟基 PEG 等同, 并且 mPEG 对于制备希望在血液循环中具有增高的生物利用度, 稳定性, 并且具有最低的免疫原性的生物活性成分(如蛋白)的聚合物缀合物而言不是优选的。

根据本发明的结果, 可以看出使用不包括甲氧基或其他烷氧基的单官能活化的 PEG 合成蛋白缀合物, 得到了具有减弱了的免疫反应性的缀合物。业已证实所得到的缀合物具有减弱了的抗原性, 即减弱了的与针对相同蛋白的 mPEG 缀合物产生的抗体相互作用的能力, 以及减弱了的免疫原性, 即引发抗 PEG 成分的免疫反应的能力减弱。作为必然结果, 用包括两个或两个以上甲氧基的分支的 PEG 制备的缀合物的免疫原性预计高于从缺乏烷氧基的分支的 PEG 制备的缀合物。

最后,根据本发明的发现,将不包括甲氧基或其他烷氧基的单官能活化的 PEG 而不是单官能活化的 mPEG 用于合成 PEG-脂质体,预计能赋予所得到的 PEG-脂质体减弱了的免疫反应性,包括触发血液中补体活化的倾向降低,以及诱导急性呼吸窘迫或类过敏反应和假过敏反应的倾向降低。

结合本发明的某些实施方案对本发明进行了说明。本发明的方法同样可应用于其他类型的蛋白,其他生物活性剂,以及其他缀合试剂。因此,本发明的范围并不局限于所披露的实施方案,而仅受限于权利要求书和/或它的等同形式的范围。本领域普通技术人员可以方便地理解的是,在不超出本发明范围的前提下,可以实施其他实施方案。所有这样的变化都被视为本发明的一部分。

在本说明书中所提到的出版物,专利和专利申请指示本发明所属领域技术人员的技术水平,并且这些文献以相同的程度收作本文参考,就如同每一份单独的出版物,专利,专利申请被专门和分别指明收作本文参考一般。

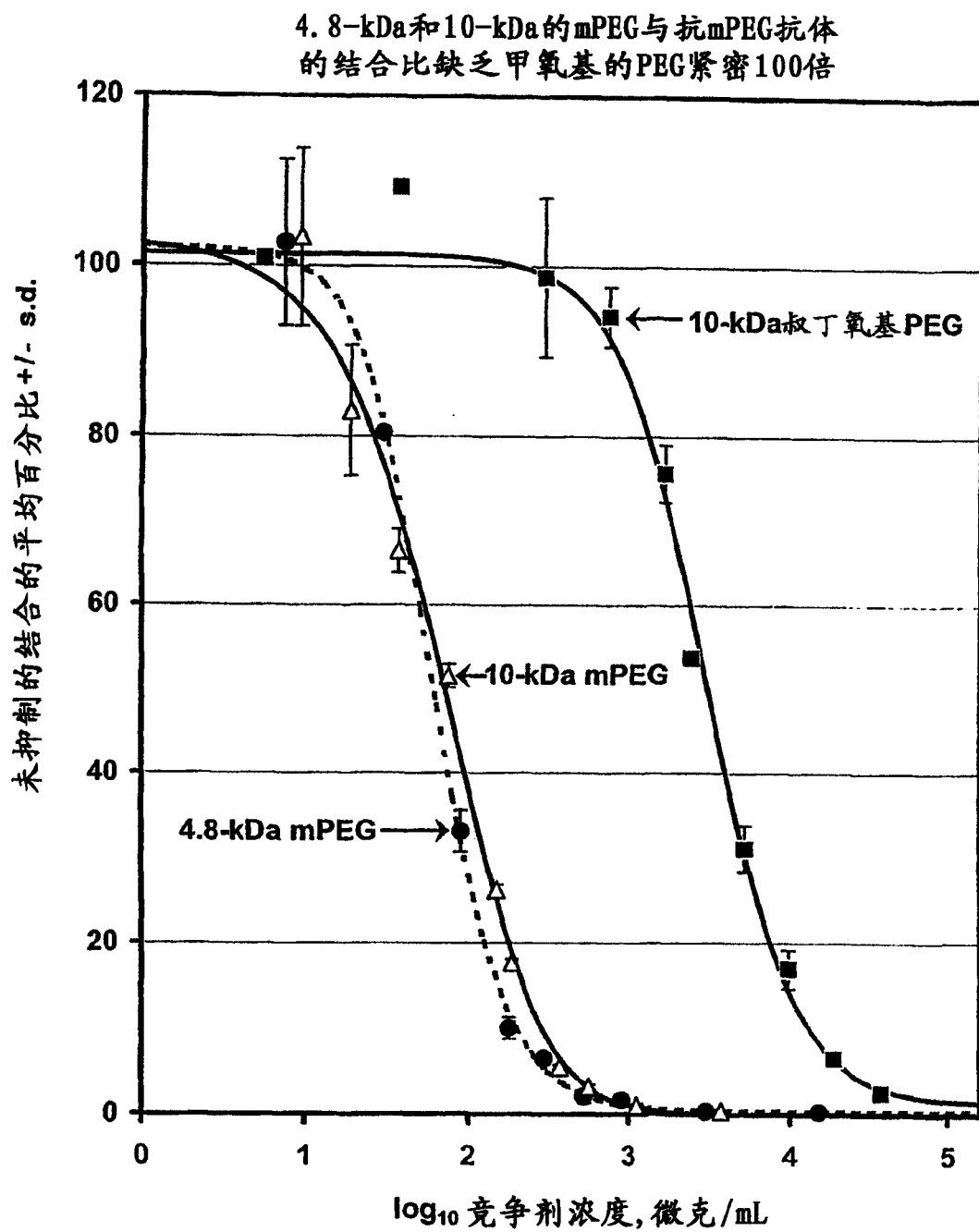


图1

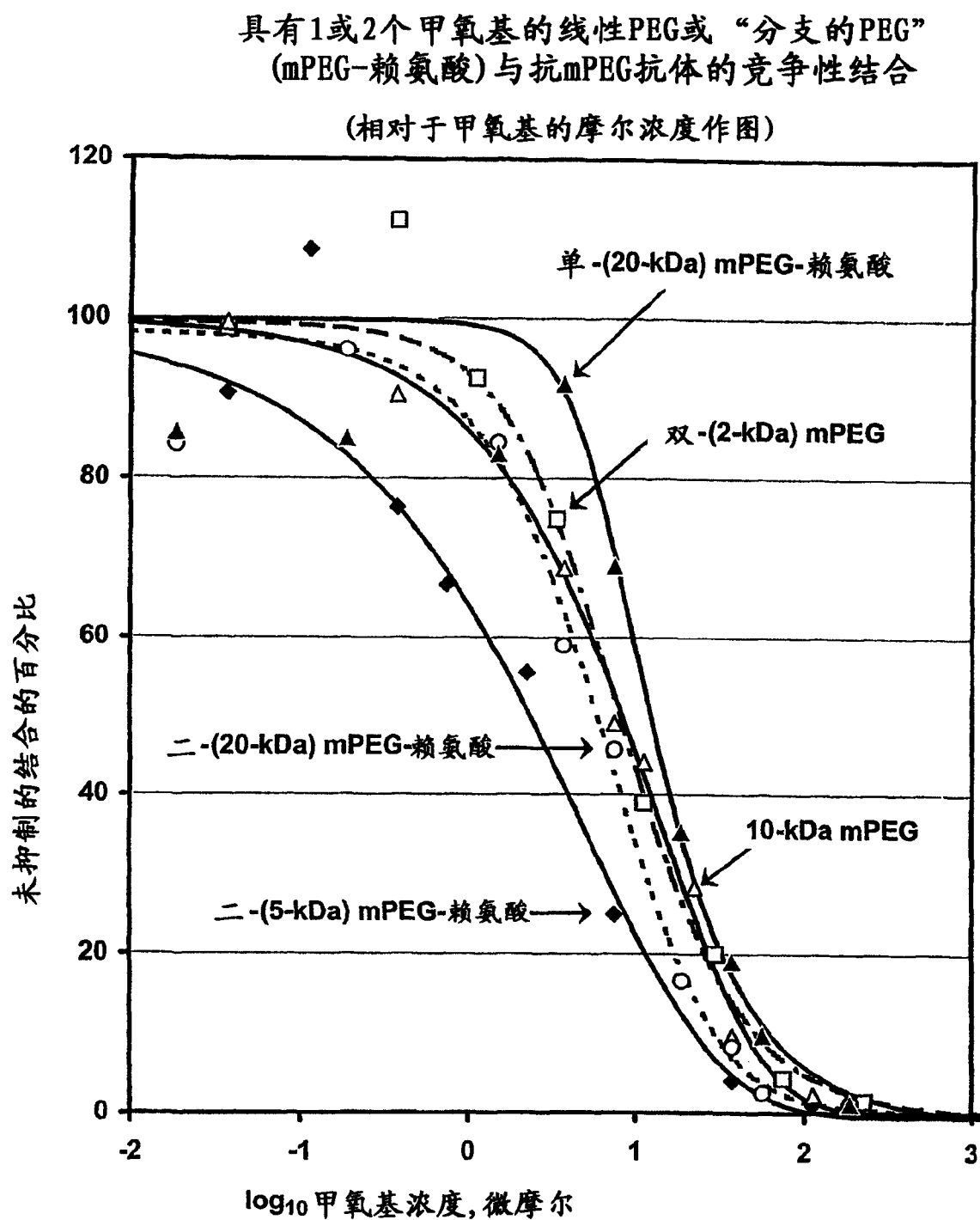


图 2a

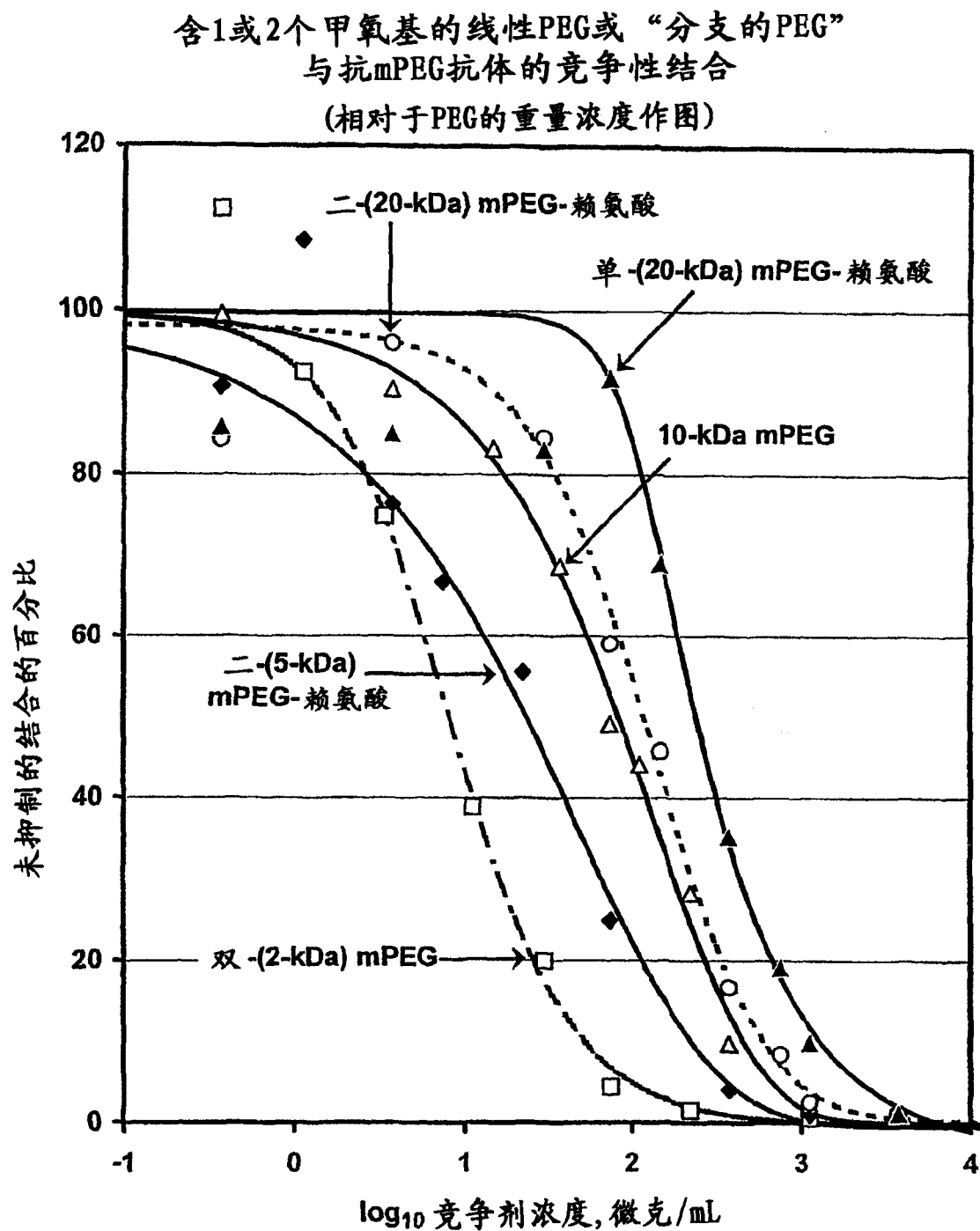


图 2b

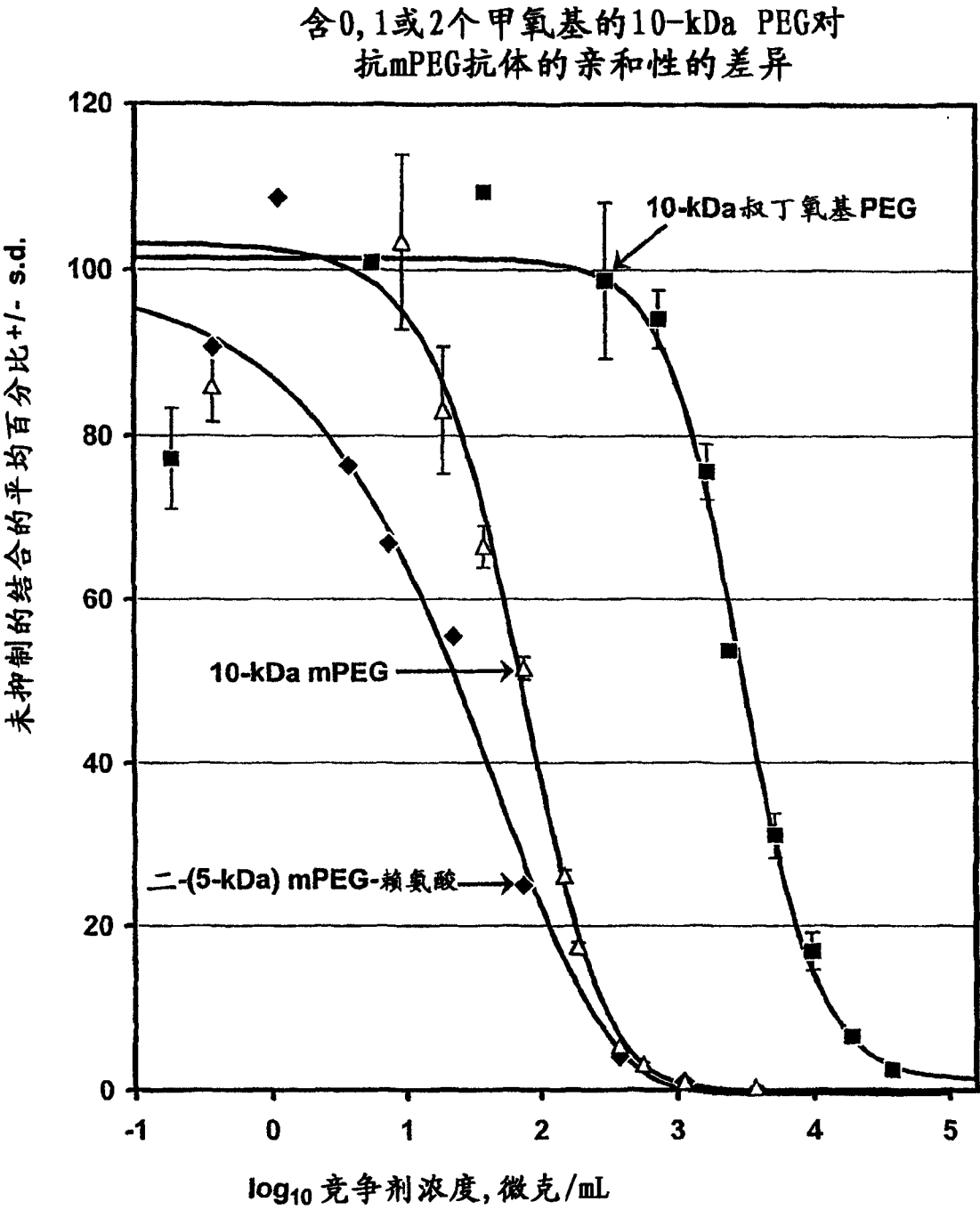


图 3

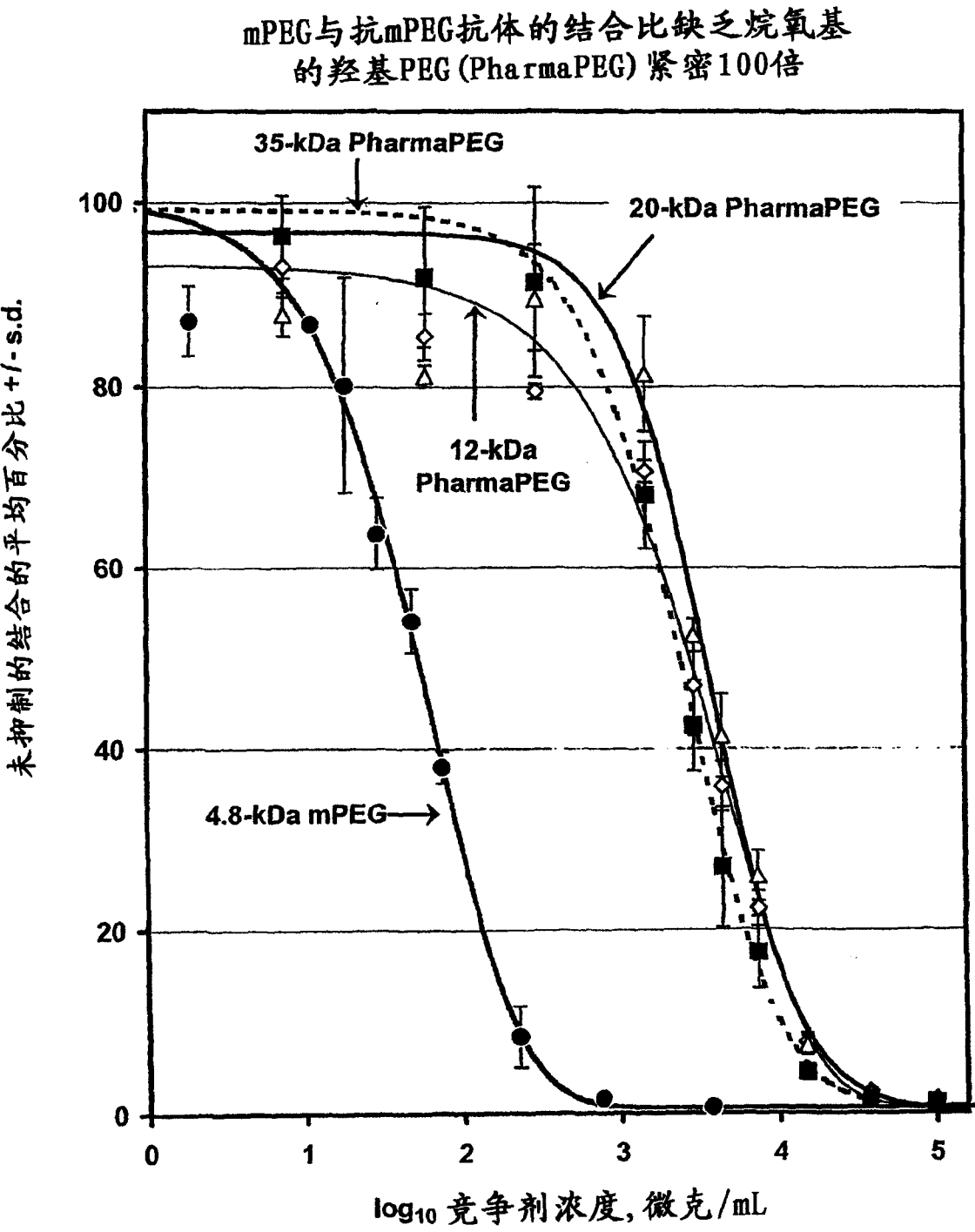
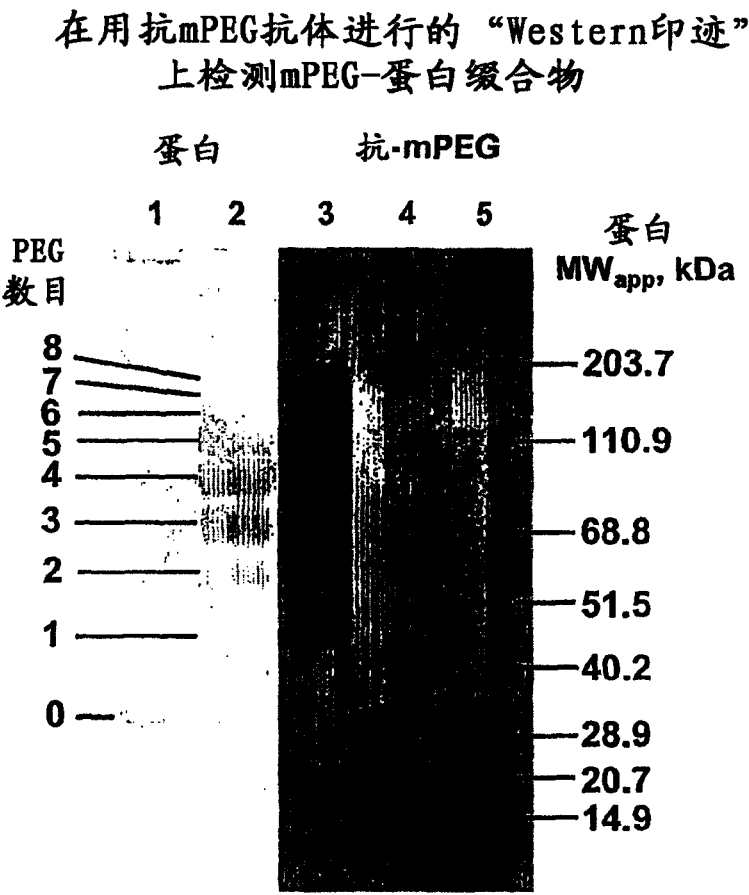


图 4



泳道1: 碳酸酐酶 II ("CA II")
泳道2: CA II 的 5-kDa mPEG缀合物
泳道3: CA II 的 5-kDa mPEG缀合物
泳道4: 碳酸酐酶 II
泳道5: SeeBlue Plus 2™ 标准蛋白

图 5a

在电泳凝胶中和用抗mPEG抗体进行的“Western印迹”上的染色条带的相对强度

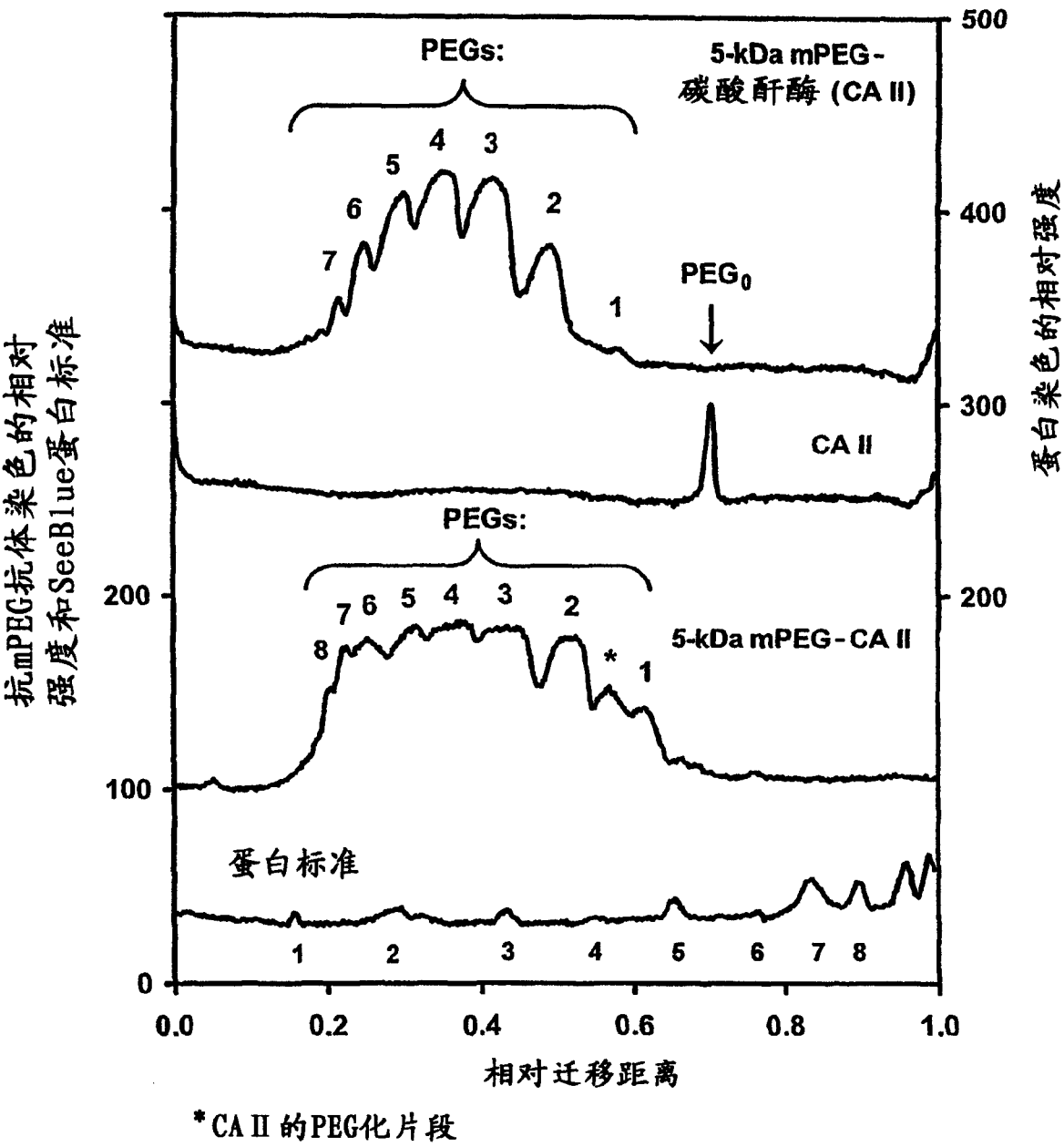


图 5b

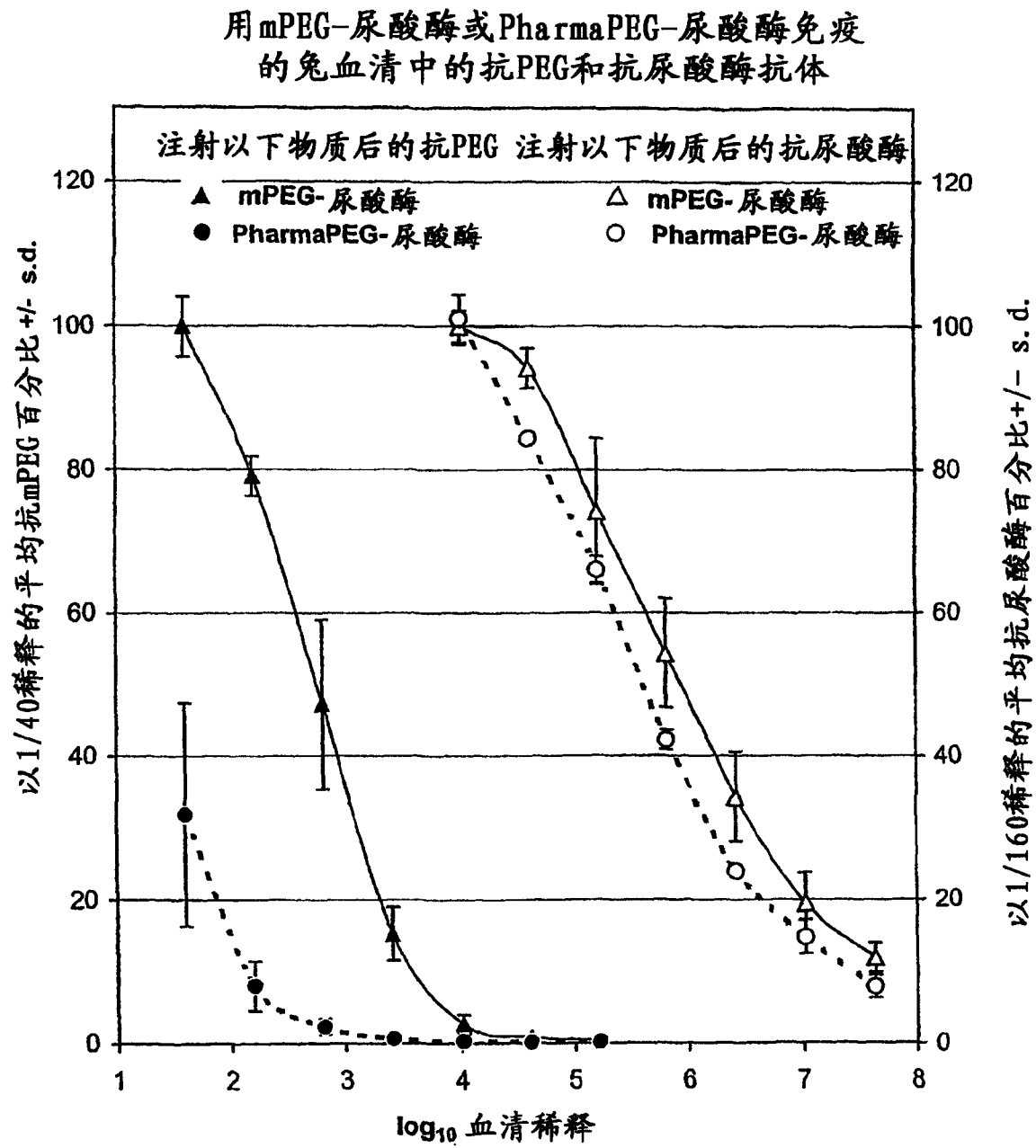


图 6a

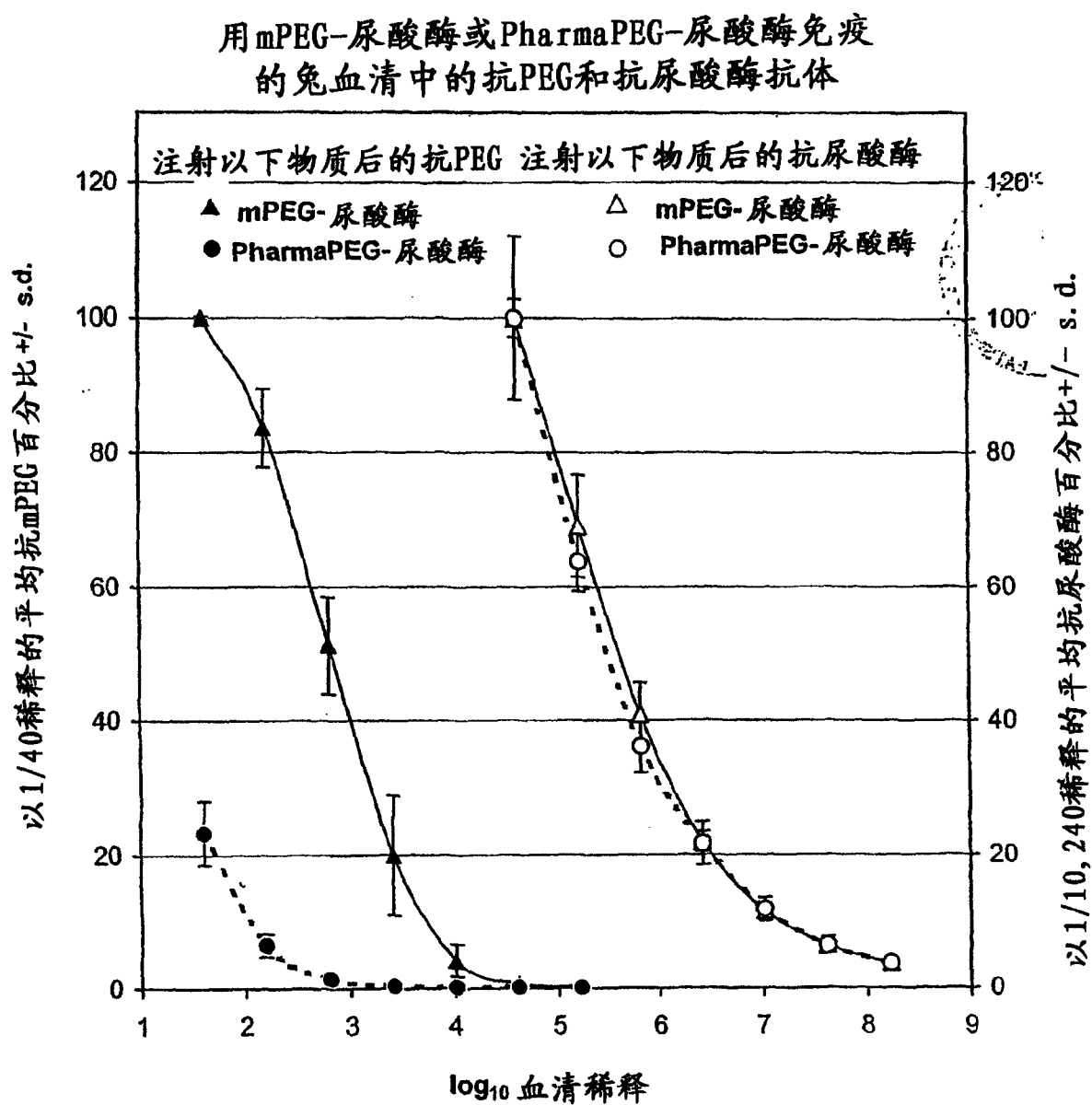


图6b