



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101511380 B

(45) 授权公告日 2012. 12. 12

(21) 申请号 200780028859. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2007. 07. 11

A61K 38/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

审查员 李煦颖

60/830, 011 2006. 07. 11 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 02. 02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/015770 2007. 07. 11

(87) PCT申请的公布数据

W02008/008363 EN 2008. 01. 17

(73) 专利权人 昌达生物科技公司

地址 美国特拉华州

(72) 发明人 李雨华 简铭达

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 程金山

权利要求书 4 页 说明书 13 页 附图 2 页

(54) 发明名称

用于持续释放递送肽的药物组合物

(57) 摘要

本发明提供通过施用液体药物组合物在体内原位形成固体的、可生物降解的移植物的方法,所述液体药物组合物包括有效量的生物相容的、水不溶的、可生物降解的聚合物和有效量的被一个或多个亲脂性或两亲性部分共价修饰的治疗性肽,所述聚合物和治疗性肽是溶解或分散在生物相容的、水溶性的有机溶剂中的。本发明还提供相关的组合物和方法。

1. 用于受控释放治疗性多肽的液体聚合药物组合物,所述液体聚合药物组合物包括:
(a) 药用、水不溶性、可生物降解的聚合物;(b) 溶解所述可生物降解聚合物的药用有机溶剂;和(c) 与一个或多个亲脂性部分缀合的治疗性多肽,其中所述组合物处于可注射的粘性液体的形式,且能够通过受试者体内消散或分散所述有机溶剂而形成受控的释放移植物;且其中与作为未与所述亲脂性部分缀合的治疗性多肽的组合物相比,所述组合物具有更高的体外稳定性和更低的初始爆发释放,其中所述亲脂性部分是选自由下列各项组成的组:C3-39-烷基、C3-39-链烯基、C3-39-链二烯基、生育酚和类固醇化合物,其中所述有机溶剂是选自由下列各项组成的组:N-甲基-2-吡咯烷酮;N,N-二甲基甲酰胺;二甲基亚砜;碳酸异丙酯;己内酰胺;三醋精;苯酸苄酯;苄醇;乳酸乙酯;甘油三乙酸酯;柠檬酸的酯;聚乙二醇;烷氧基聚乙二醇;聚乙二醇乙酸酯;或它们的任意组合,其中所述可生物降解聚合物是选自由下列各项组成的组:聚丙交酯、聚乙交酯、聚己酸内酯、聚二噁烷酮、聚碳酸酯、聚羟基丁酸酯、聚亚烃草酸酯、聚酐、聚酰胺、聚酯酰胺、聚氨基甲酸酯、聚缩醛、聚原碳酸酯、聚磷腈、聚羟基戊酸酯、聚亚烷基琥珀酸酯、和聚原酸酯、以及它们的共聚物、嵌段共聚物、支化共聚物、三元共聚物以及混合物。

2. 权利要求1的组合物,其中所述多肽和所述一个或多个亲脂性部分是共价缀合的。

3. 权利要求2的组合物,其中所述多肽和所述一个或多个亲脂性部分是通过间隔区、桥接或连接体基团共价缀合的。

4. 权利要求1的组合物,其中所述多肽是选自由下列各项组成的组中之一:催产素、血管升压素、促肾上腺皮质激素(ACTH)、表皮生长因子(EGF)、促乳素、黄体生成素、促性腺素释放素(LHRH)、LHRH激动剂、LHRH拮抗剂、生长素、生长素释放因子、胰岛素、促红细胞生成素、促生长素抑制素、胰高血糖素、白细胞介素、干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- γ 、促胃液素、四肽胃泌素、五肽胃泌素、尿抑胃素、胰泌素、降钙素、脑啡肽、内啡肽、血管紧张素、促甲状腺素释放素(TRH)、肿瘤坏死因子(TNF)、甲状旁腺激素(PTH)、神经生长因子(NGF)、粒细胞集落形成刺激因子(G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、巨噬细胞集落形成刺激因子(M-CSF)、肝素酶、血管内皮生长因子(VEGF)、骨形态发生蛋白(BMP)、hANP、胰高血糖素样肽(GLP-1)、exenatide、肽YY(PYY)、生长素释放肽、肾素、缓激肽、杆菌肽、多黏菌素、黏菌素、短杆菌酪肽、短杆菌肽、环孢素、促卵泡激素、高托尔芬、taftsin、胸腺生成素、胸腺素、胸腺刺激素、胸腺体液因子、血清胸腺因子、促胃动素、铃蟾肽、dinorphan、神经降压肽、蛙皮素(cerulein)、尿激酶、激肽释放酶、物质P拮抗剂、血管紧张素II、血液凝固因子VII和IX、溶菌酶、短杆菌肽(gramicidine)、促黑激素、甲状腺激素释放激素、促甲状腺激素、促胰酶素、缩胆囊素、人胎盘催乳激素、人绒毛膜促性腺激素、胃抑制肽、血管活性肠肽、和血小板来源的生长因子。

5. 权利要求1的组合物,其中所述多肽是选自由下列各项组成的组中之一:酶、细胞因子、抗体、疫苗、抗生素和糖蛋白。

6. 权利要求1的组合物,其中所述多肽是集落刺激因子。

7. 权利要求1的组合物,其中所述多肽是选自由下列各项组成的组中之一:ACTH、胰高血糖素、促生长素、胸腺素、色素激素、生长调节素、绒毛膜促性腺激素、下丘脑(hypothalamic)释放因子、血管升压素、促甲状腺激素、biphalin和促乳素。

8. 权利要求1的组合物,其中所述多肽是选自由下列各项组成的组中之一:多柔比星、

雷帕霉素、纳曲酮、表皮生长因子 (EGF)、LHRH 激动剂、LHRH 拮抗剂、生长素、生长素释放因子、抑生长肽、干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- γ 、降钙素、甲状旁腺激素 (PTH)、胰高血糖素样肽 (GLP-1)、和肽 YY (PYY)。

9. 权利要求 1 的组合物,其中所述多肽是胰高血糖素样肽 (GLP-1)。

10. 权利要求 1 的组合物,其中所述多肽是胰高血糖素样肽的抑制剂。

11. 权利要求 1 的组合物,其中所述多肽是抑生长肽。

12. 权利要求 1 的组合物,其中所述多肽是胰岛素。

13. 权利要求 1 的组合物,其中所述 C3-39- 烷基, C3-39- 链烯基和 C3-39- 链二烯基中的每一种是 (i) 直链或支链的;和 (ii) 饱和的、单不饱和的或双-不饱和的。

14. 权利要求 1 的组合物,其中所述亲脂性部分是脂质。

15. 权利要求 1 的组合物,其中所述可生物降解聚合物是选自由下列各项组成的组中之一:聚乳酸和聚乙醇酸、和它们的共聚物。

16. 用于形成权利要求 1 的液体聚合药物组合物的方法,所述方法包括下列步骤:(a) 将药用、水不溶性、可生物降解聚合物溶解于药用有机溶剂中,以形成聚合物溶液;和 (b) 使所述聚合物溶液与有效量的与一个或多个亲脂性部分缀合的治疗性多肽相混合,以形成药物组合物。

17. 权利要求 1 的液体聚合药物组合物在制备用于原位形成固体的、可生物降解移植物从而持续递送治疗性多肽的药剂中的应用,其中权利要求 1 的液体聚合药物组合物被施用到受试者体内的移植部位。

18. 权利要求 17 的应用,其中所述药物组合物为适于注射的形式。

19. 权利要求 18 的应用,其中所述注射是皮下或肌肉内的。

20. 按照权利要求 16 的方法形成的液体聚合药物组合物在制备用于原位形成固体的、可生物降解移植物从而持续递送治疗性多肽的药剂中的应用,其中所述组合物被施用到受试者体内的移植部位。

21. 权利要求 20 的应用,其中所述药物组合物为适于注射的形式。

22. 权利要求 21 的应用,其中所述注射是皮下或肌肉内的。

23. 用于受控释放治疗性多肽的液体聚合药物组合物,所述液体聚合药物组合物包括:(a) 药用、水不溶性、可生物降解聚合物;(b) 溶解所述可生物降解聚合物的药物有机溶剂;和 (c) 与一个或多个两亲部分缀合的治疗性多肽,其中所述组合物处于可注射粘性液体的形式,且能够通过受试者体内消散或分散所述有机溶剂而形成受控的释放移植物;且其中与作为未与所述两亲部分缀合的治疗性多肽的组合物相比,所述组合物具有更高的体外稳定性和更低的初始爆发释放,其中所述两亲部分的亲脂性部分是选自由下列各项组成的组中之一:C3-39- 烷基、C3-39- 链烯基、C3-39- 链二烯基、生育酚和类固醇化合物,其中所述有机溶剂是选自由下列各项组成的组中之一:N- 甲基-2- 吡咯烷酮;N, N- 二甲基甲酰胺;二甲基亚砜;碳酸异丙酯;己内酰胺;三醋精;苯酸苄酯;苄醇;乳酸乙酯;甘油三乙酸酯;柠檬酸的酯;聚乙二醇;烷氧基聚乙二醇;聚乙二醇乙酸酯;或它们的任意组合,其中所述可生物降解聚合物是选自由下列各项组成的组中之一:聚丙交酯、聚乙交酯、聚己酸内酯、聚二噁烷酮、聚碳酸酯、聚羟基丁酸酯、聚亚烃草酸酯、聚酐、聚酰胺、聚酯酰胺、聚氨基甲酸酯、聚缩醛、聚原碳酸酯、聚磷腈、聚羟基戊酸酯、聚亚烷基琥珀酸酯、和聚原酸酯、以及

它们的共聚物、嵌段共聚物、支化共聚物、三元共聚物以及混合物。

24. 权利要求 23 的组合物,其中所述多肽和所述一个或多个两亲部分是共价缀合的。

25. 权利要求 24 的组合物,其中所述多肽和所述一个或多个两亲部分是通过间隔区、桥接或连接体基团共价缀合的。

26. 权利要求 23 的组合物,其中所述多肽是选自由下列各项组成的组中之一:催产素、血管升压素、促肾上腺皮质激素 (ACTH)、表皮生长因子 (EGF)、促乳素、黄体生成素、促性腺素释放素 (LHRH)、LHRH 激动剂、LHRH 拮抗剂、生长素、生长素释放因子、胰岛素、促红细胞生成素、促生长素抑制素、胰高血糖素、白细胞介素、干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- γ 、促胃液素、四肽胃泌素、五肽胃泌素、尿抑胃素、胰泌素、降钙素、脑啡肽、内啡肽、血管紧张素、促甲状腺素释放素 (TRH)、肿瘤坏死因子 (TNF)、甲状旁腺激素 (PTH)、神经生长因子 (NGF)、粒细胞集落形成刺激因子 (G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、巨噬细胞集落形成刺激因子 (M-CSF)、肝素酶、血管内皮生长因子 (VEGF)、骨形态发生蛋白 (BMP)、hANP、胰高血糖素-样肽 (GLP-1)、exenatide、肽 YY (PYY)、生长素释放肽、肾素、缓激肽、杆菌肽、多黏菌素、黏菌素、短杆菌酪肽、短杆菌肽、环孢素、促卵泡激素、高托尔芬、taftsin、促胸腺生成素、胸腺素、胸腺刺激素、胸腺体液因子、血清胸液因子、促胃动素、铃蟾肽、dinorphan、神经降压肽、蛙皮素、尿激酶、激肽释放酶、物质 P 拮抗剂、血管紧张素 II、血液凝固因子 s VII 和 IX、溶菌酶、短杆菌肽、促黑激素、甲状腺激素释放激素、促甲状腺激素、促胰酶素、缩胆囊素、人胎盘催乳激素、人绒毛膜促性腺激素、胃抑制肽、血管活性肠肽、和血小板来源的生长因子。

27. 权利要求 23 的组合物,其中所述多肽是选自由下列各项组成的组中之一:酶、细胞因子、抗体、疫苗、抗生素和糖蛋白。

28. 权利要求 23 的组合物,其中所述多肽是集落刺激因子。

29. 权利要求 23 的组合物,其中所述多肽是选自由下列各项组成的组中之一:ACTH、胰高血糖素、促生长素、胸腺素、色素激素、生长调节素、绒毛膜促性腺激素、下丘脑 (hypothalamic) 释放因子、血管升压素、促甲状腺激素、biphalin 和促乳素。

30. 权利要求 23 的组合物,其中所述多肽是选自由下列各项组成的组中之一:多柔比星、雷帕霉素、纳曲酮、表皮生长因子 (EGF)、LHRH 激动剂、LHRH 拮抗剂、生长素、生长素释放因子、抑生长肽、干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- γ 、降钙素、甲状旁腺激素 (PTH)、胰高血糖素样肽 (GLP-1)、和肽 YY (PYY)。

31. 权利要求 23 的组合物,其中所述多肽是胰高血糖素样肽 (GLP-1)。

32. 权利要求 23 的组合物,其中所述多肽是胰高血糖素样肽的抑制剂。

33. 权利要求 23 的组合物,其中所述多肽是抑生长肽。

34. 权利要求 23 的组合物,其中所述多肽是胰岛素。

35. 权利要求 23 的组合物,其中所述 C3-39-烷基, C3-39-链烯基和 C3-39-链二烯基中的每一种是 (i) 直链或支链的;和 (ii) 饱和的、单不饱和的或双-不饱和的。

36. 权利要求 23 的组合物,其中所述两亲部分的亲水性部分是选自由聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、和糖组成的组中之一。

37. 权利要求 23 的组合物,其中所述可生物降解聚合物是选自由下列各项组成的组中之一:聚乳酸和聚乙醇酸、和它们的共聚物。

38. 用于形成权利要求 23 的液体聚合药物组合物的方法,所述方法包括下列步骤:(a) 将药用、水不溶性、可生物降解聚合物溶解于药用有机溶剂中,以形成聚合物溶液;和 (b) 使所述聚合物溶液与有效量的与一个或多个两亲部分缀合的治疗性多肽相混合,以形成药物组合物。

39. 权利要求 23 的液体聚合药物组合物在制备用于原位形成固体的、可生物降解移植物从而持续递送治疗性多肽的药剂中的应用,其中权利要求 26 的液体聚合药物组合物被施用到受试者体内的移植部位。

40. 权利要求 39 的应用,其中所述药物组合物为适于注射的形式。

41. 权利要求 40 的应用,其中所述注射是皮下或肌肉内的。

42. 按照权利要求 38 的方法形成的液体聚合药物组合物在制备用于原位形成固体的、可生物降解移植物从而持续递送治疗性多肽的药剂中的应用,其中所述组合物被施用到受试者体内的移植部位。

43. 权利要求 42 的应用,其中所述药物组合物为适于注射的形式。

44. 权利要求 43 的应用,其中所述注射是皮下或肌肉内的。

用于持续释放递送肽的药物组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于 2006 年 7 月 11 日提交的美国临时申请号 60/830,011 的优先权,将其内容引入本文作为参考。

[0003] 贯穿本申请,引用了不同的出版物。将这些出版物的公开内容作为参考引入本申请,以更完整地描述本发明所属的技术领域的状况。

[0004] 发明背景

[0005] 1. 发明领域

[0006] 本发明涉及受控释放递送治疗性肽的领域,和用于受控释放递送被一种或多种亲脂性或两亲分子共价修饰的治疗性肽的组合物和方法。

[0007] 2. 相关技术的描述

[0008] 肽,也称为寡肽、多肽和蛋白质,已被广泛用作治疗剂。肽可以方便地通过重组 DNA 技术产生,或可以通过充分确定的肽合成技术合成。然而,许多肽易受酶降解的影响,且具有非常短的体内循环半衰期。因此,大多数肽药物是通过注射,典型地每日多次注射来施用的。如果能够在延长的时期内以一种受控的方式递送所述肽,以提高其安全性、功效和患者的依从性,则将是非常有益的。

[0009] 可生物降解的聚合物已经用于持续递送治疗性肽。通常将肽引入到聚合组合物中,并在体外形成理想的形状,诸如杆状、圆片和微颗粒。然后,能够通过切口或注射将这些固体组合物插入到体内。备选地和优选地,能够将一些聚合组合物作为液体聚合组合物注射到体内,从而形成原位移植物。专利文献中记述了可注射的液体可生物降解聚合组合物,其用于原位形成移植物,从而以受控的方式递送药物。认为下列参考文献是该领域中的代表,并将其作为参考引入本文:美国专利号 6,565,874 ;6,528,080 ;RE37,950 ;6,461,631 ;6,395,293 ;6,355,657 ;6,261,583 ;6,143,314 ;5,990,194 ;5,945,115 ;5,792,469 ;5,780,044 ;5,759,563 ;5,744,153 ;5,739,176 ;5,736,152 ;5,733,950 ;5,702,716 ;5,681,873 ;5,599,552 ;5,487,897 ;5,340,849 ;5,324,519 ;5,278,202 ;5,278,201 ; 和 4,938,763。如其中所述地,将生物活性试剂溶于或分散到在生物相容的有机溶剂中的生物可降解聚合物溶液中,从而提供液体组合物。当将该液体组合物注射到体内时,溶剂消散到周围的水性环境中,并且所述聚合物沉淀形成固体或凝胶库 (depot),在随着所述聚合物降解的长时期内,生物活性试剂从所述固体或凝胶库中释放出来。在递送醋酸亮丙立德治疗晚期前列腺癌中例证了所述递送系统的用途 (Eligard™)。虽然有一些成功,但是,对于大量可以通过该方法有效递送的肽而言,那些方法尚不是完全满意的。

[0010] 对于许多治疗性肽,在释放过程中观察到包封在聚 (DL-丙交酯-共-乙交酯) 微球体中的肽的乙酰化和 / 或降解。[例如,Na DH,Youn YS, Lee SD, Son MO, Kim WA, DeLuca PP, Lee KC. 控制释放杂志 (J Control Release). 2003 ;92(3) :291-9]。肽上的亲核官能团不仅能够与可生物降解的聚合物反应,还能够催化可生物降解聚合物的降解。还发现乙酰化和 / 或降解在聚合物溶液中比在固态中可以发生地快得多。例如,当在 NMP 中,使抑生长肽乙酸酯与 50/50 具有羧基末端基团的聚 (DL-丙交酯-共-乙交酯) 溶液相混合时,24

小时内有多于 80% 的抑生长肽被乙酰化和 / 或被降解。所述肽和聚合物或其降解产物之间的相互作用 / 反应能够发生在配制、保存和施药的过程中。因此, 为了维持制剂的稳定性, 典型地, 在单独的注射器中提供肽, 而将其余的成分包装在另一个注射器中。在即将使用前混合注射器中的内容物。然而, 因为该聚合物制剂的粘性特征, 所以最终使用者通常很难混合两个单独注射器中的内容物。由最终使用者制备的制剂的均一性可能显著不同, 还可能发生污染, 因此能够显著危害治疗质量。此外, 由可注射的液体聚合物制剂原位形成固体移植是缓慢的过程。典型地, 根据所使用的溶剂, 溶剂消散 / 扩散过程能够发生几小时 - 若干天或更长。在该过程中, 有机溶剂的存在能够促进肽和聚合物或其降解产物之间的相互作用 / 反应。

[0011] 另外, 在形成移植物的过程中, 肽从凝结的聚合组合物扩散的速度可以比从随后形成的固体移植物发生释放的速度快得多。在移植物形成过程中肽的这种初始“爆发”释放可以导致大量治疗性肽的损失或释放。如果所述肽是特别有毒的或具有有限的治疗窗口, 则该初始释放或爆发可能引起毒性副作用, 并可以损伤邻近的组织。因此, 固体移植物的缓慢形成过程和生物活性试剂和 / 或赋形剂的不稳定性代表了对于使用该类制剂持续释放递送治疗性肽的非常显著的挑战。

[0012] 描述了利用亲脂性分子, 诸如脂肪酸对肽进行共价修饰通过经与白蛋白结合而提高体内循环半衰期来改善治疗功效。[EP0708179-A2, EP0699686-A2, US 6268343, Knudsen LB, Nielsen PF, Huusfeldt PO, Johansen NL, Madsen K, Pedersen FZ, Thogersen H, Wilken M, Agerso H. 具有适合于每日一次施药的药动力学特征的胰高血糖素样肽-1 的有效衍生物 (Potent derivatives of glucagon-like peptide-1 with pharmacokinetic properties suitable for once daily administration). 医学和化学杂志 (J MedChem). 2000, 43(9):1664-9; Kurtzhals P, Havelund S, Jonassen I, Kiehr B, Larsen UD, Ribel U, Markussen J. 由脂肪酸乙酰化的胰岛素的白蛋白结合: 配体 - 蛋白质相互作用和结合亲和性和体内胰岛素功效之间相关性的表征 (Albumin binding of insulins acylated with fatty acids: characterization of the ligand-protein interaction and correlation between binding affinity and timing of the insulin effect in vivo). 生物化学杂志 (Biochem J). 1995; 312(3):725-31, 以及其中引用的参考文献]。尽管亲脂性修饰的肽与天然肽相比, 显示出延长的体内作用, 但是该修饰肽的血浆滞留期受到其与白蛋白结合亲和性的限制。一个成功的实例是乙酰化的胰岛素 (Detemir), 其具有 10.2 ± 1.2 小时的循环半衰期。[Havelund S, Plum A, Ribel U, Jonassen I, Vølund A, Markussen J 和 Kurtzhals P, 制药学研究 (Pharmaceutical Research), 2004; 21(8), 1498-1504]。该产物被批准用于注射治疗患有 I 型糖尿病的患者。然而, 仍需要每日对患者施药。因此, 非常需要一种稳定的组合物, 其中能够更容易的控制特定肽的递送速度, 尤其是对于需要长期持续释放的肽。

[0013] 发明概述

[0014] 意外地发现, 利用可生物降解的聚合物能够配制被一种或多种亲脂性和 / 或两亲分子共价修饰的肽, 从而相对于非 - 缀合的肽, 导致显著改善的稳定性和持续释放特征。亲脂性和 / 或两亲修饰的肽不仅能够在配制、保存和随后的体内释放过程中防止肽不受控的随机乙酰化和降解, 而且还能减少不希望的肽初始爆发释放。该递送系统容许将较高浓度

的治疗性肽安全地引入到可生物降解的聚合物递送系统中。也改进了所述产物的功效,因为在用于持续释放的递送系统中保持了高得多百分比的完整无损的活性肽,且该百分比在配制、保存、施药和随后体内释放过程中不通过降解而损失。

[0015] 因此,本发明提供用于受控持续释放治疗性肽的新型药物制剂。本发明的组合物包括 (a) 与一种或多种亲脂性分子共价缀合的肽;(b) 可生物降解聚合物;和 (c) 药用有机溶剂。所述肽以这样的方式与一种或多种亲脂性分子共价缀合,所述方式使缀合的肽保持未缀合肽的大部分或全部生物活性,同时相对于未缀合的肽,它具有针对与可生物降解聚合物体外和体内反应的增强的化学抗性。然后,通过利用药用有机溶剂溶解或分散到可生物降解聚合物溶液中,而配制亲脂性修饰的肽。本发明的制剂不仅在配制、保存、施药和随后的释放过程中增强肽的稳定性,而且改进其释放特征,使其具有较低的初始爆发水平和维持的持续时间。

[0016] 在另一方面,本发明提供这样的组合物,其包括 (a) 与一种或多种两亲部分共价缀合的肽;(b) 可生物降解聚合物;和 (c) 药用有机溶剂。所述肽以这样的方式与一种或多种两亲部分共价缀合,所述方式使缀合的肽保持未缀合肽的大部分或全部生物活性,同时相对于未缀合的肽,具有针对与可生物降解聚合物体外和体内反应的增强的化学抗性。然后,通过利用药用有机溶剂溶解或分散到可生物降解聚合物溶液中,而配制两亲性修饰的肽。本发明的制剂不仅在配制、保存、施药和随后的释放过程中增强肽的稳定性,而且改进其释放特征,使其具有较低的初始爆发水平和维持的持续时间。缀合的肽还通过肽的亲核基团,减少聚合物受催化的降解。

[0017] 各种本发明的组合物可以是粘性的或非粘性的液体,凝胶或半固体,其如流体般运动,这样可以利用注射器进行注射。各种组合物可以在体外形成可移植的聚合物基质,或备选地,可以原位形成凝胶或固体移植物的形式。可以通过注射和/或皮下、肌肉内、腹膜内、或皮内移植而施用所述组合物。当施用于受试者时,根据移植的组合物,可将肽的受控释放维持理想的时期。由于选择可生物降解聚合物和其他赋形剂,肽持续释放期可以被控制在数周-一年的时期内。

[0018] 利用具体在附加的并形成本公开内容一部分的权利要求中指出了表征本发明新颖性的不同特征。为了更好地理解本发明,其操作优势、通过它的应用而获得的特定目标,应该参考附图和说明内容主题,在所述附图和说明内容主题中举例说明并描述了本发明的优选实施方案。

[0019] 附图简述

[0020] 图 1. 溶菌酶和棕榈酸乙酰化的溶菌酶从处于 mPEG350 中的 RG503H 溶液中的制剂的体外释放。

[0021] 图 2. 生长素释放肽和去乙酰化的生长素释放肽从处于 mPEG350 中的 RG503H 溶液中的制剂的体外释放。

[0022] 图 3. 抑生长肽从处于 NMP 中的 DLPLG85/15 (IV 0.28) 溶液中的制剂的体外释放。

[0023] 图 4. 被修饰的抑生长肽 (Pal-PEG-BA-OCT) 从处于 NMP 中的 DLPLG85/15 (IV 0.28) 溶液中的制剂的体外释放。

[0024] 目前优选实施方案详述

[0025] 本发明提供用于形成关于肽的受控释放递送系统的可注射液体可生物降解聚合

组合物。本发明还提供其制备方法及其使用方法。

[0026] 本发明的组合物包括 (a) 与一种或多种亲脂性分子缀合的, 优选地共价缀合的肽; (b) 药用、水不溶性、可生物降解的聚合物; 和 (c) 药用有机溶剂。所述肽以这样的方式与一种或多种亲脂性分子共价缀合, 所述方式使缀合的肽保持未缀合肽的大部分或全部生物活性, 同时相对于未缀合的肽, 具有针对与可生物降解聚合物体外和体内反应的增强的化学抗性。然后, 通过利用药用有机溶剂溶解或分散到可生物降解聚合物溶液中, 而配制所述亲脂性修饰的肽。本发明的制剂不仅在配制、保存、施药和随后的释放过程中增强肽的稳定性, 而且改进其释放特征, 使其具有较低的初始爆发水平和维持的持续时间。

[0027] 在另一方面, 本发明提供这样的组合物, 其包括与一种或多种两亲分子缀合的, 优选地共价缀合的肽; (b) 药用、水不溶性、可生物降解的聚合物; 和 (c) 药用有机溶剂。所述肽以这样的方式与一种或多种两亲分子共价缀合, 所述方式使缀合的肽保持未缀合肽的大部分或全部生物活性, 同时相对于未缀合的肽, 具有针对与可生物降解聚合物体外和体内反应的增强的化学抗性。然后, 通过利用药用有机溶剂溶解或分散到可生物降解聚合物溶液中, 而配制两亲性修饰的肽。本发明的制剂不仅在配制、保存、施药和随后的释放过程中增强肽的稳定性, 而且改进其释放特征, 使其具有较低的初始爆发水平和维持的持续时间。缀合的肽还通过肽的亲核基团, 减少聚合物的受催化降解。

[0028] 用于本文时, 术语“一种” (“a”、“an” 和 “one”) 意欲解释为“一种或多种”和“至少一种”。

[0029] 术语“肽”与“多肽”和“蛋白质”同义使用。肽能够具有的治疗特性的非限制性实例包括抗 - 新陈代谢、抗 - 真菌、抗 - 炎性、抗 - 肿瘤、抗 - 感染、抗生素的、营养的、激动剂、和拮抗剂特性。

[0030] 更具体地, 本发明的肽能够被亲脂性或两亲分子共价修饰。所述肽优选地包含一种或多种可修饰的官能团。在制备本发明制剂中有效的肽包括, 但不限于, 催产素、血管升压素、促肾上腺皮质激素 (ACTH)、表皮生长因子 (EGF)、血小板 - 来源的生长因子 (PDGF)、促乳素、激素诸如黄体生成素、促性腺素释放激素 (LHRH)、LHRH 激动剂、LHRH 拮抗剂、生长素、生长素释放因子、胰岛素、促红细胞生成素、促生长素抑制素、胰高血糖素、白细胞介素、干扰素 - α 、干扰素 - β 、干扰素 - γ 、促胃液素、四肽胃泌素、五肽胃泌素、尿抑胃素、分泌素、降钙素、脑啡肽、内啡肽、血管紧张素、促甲状腺素释放素 (TRH)、肿瘤坏死因子 (TNF)、甲状旁腺激素 (PTH)、神经生长因子 (NGF)、粒细胞集落形成刺激因子 (G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、巨噬细胞集落形成刺激因子 (M-CSF)、肝素酶、血管内皮生长因子 (VEGF)、骨形态发生蛋白 (BMP)、hANP、胰高血糖素 - 样肽 (GLP-1)、exenatide、肽 YY (PYY)、生长素释放肽、肾素、缓激肽、杆菌肽、多黏菌素、黏菌素、短杆菌酪肽、短杆菌肽、环孢素、酶、细胞因子、抗体、疫苗、抗生素、抗体、糖蛋白、促卵泡激素、高托尔芬、taftsin、胸腺生成素、胸腺素、胸腺刺激素、胸腺体液因子、血清胸腺因子、集落刺激因子、促胃动素、铃蟾肽、dionorphin、神经降压肽、蛙皮素 (cerulein)、尿激酶、激肽释放酶、物质 P 类似物和拮抗剂、血管紧张素 II、血液凝固因子 VII 和 IX、溶菌酶、短杆菌肽 (gramicidine)、促黑激素、甲状腺激素释放激素、促甲状腺激素、促胰酶素、缩胆囊素、人胎盘催乳激素、人绒毛膜促性腺激素、蛋白质合成刺激肽、胃抑制肽、血管活性肠肽、血小板来源的生长因子、色素激素、生长调节素、绒毛膜促性腺激素、下丘脑 (hypothalamic) 释放因子、血管升压素、促甲状腺激素、

biphalin 和促乳素。

[0031] 用于本文时,术语“亲脂性部分”意指任何具有亲脂性特征并在 20℃水中具有小于 5mg/ml,优选地小于 0.5mg/ml 的溶解性的部分。所述亲脂性部分典型地选自 C₃₋₃₉-烷基、C₃₋₃₉-链烯基、C₃₋₃₉-链二烯基、生育酚和类固醇残基。术语“C₃₋₃₉-烷基”、“C₃₋₃₉-链烯基”和“C₃₋₃₉-链二烯基”意欲包括 3-39 个碳原子的直链和支链的,优选地直链,饱和的、单不饱和的和双-不饱和的烃。

[0032] 亲脂性部分与肽的共价缀合导致亲脂性修饰的肽,其与天然肽相比,具有改善的治疗功效。这能够典型地通过使肽中的官能团诸如胺基与亲脂性分子中的酸或其他反应基团反应而实现。备选地,肽和亲脂性分子之间的缀合是通过另外的部分诸如桥、间隔区、或连接部分完成的,所述另外的部分可以是可生物降解的或非-可生物降解的。现有技术中公开了一些实例[例如,日本专利申请 1,254,699 中描述了脂肪酸-乙酰化的胰岛素。还参见,Hashimoto, M.,等,制药学研究 (Pharmaceutical Research), 6:171-176(1989),和 Lindsay, D. G.,等,生物化学杂志 (Biochemical J.), 121:737-745(1971)]。更多关于脂肪酸乙酰化的胰岛素和脂肪乙酰化的胰岛素类似物,以及它们合成方法的公开内容见于美国专利号 5,693,609、W095/07931、美国专利号 5,750,497、和 W096/29342 中。W098/08871、W098/08872、和 W099/43708 中存在乙酰化肽的其他实例。这些公开内容描述了亲脂性修饰的肽,并能够进行它的制备。

[0033] 用于本文时,术语“两亲部分”意指具有亲脂性和亲水性特征并既溶于水也溶于亲脂性溶剂的任何部分。本发明中使用的两亲分子由亲脂性和亲水性部分组成。亲脂性部分优选地是天然脂肪酸或烷基链和上述那些。亲水性部分选自聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、糖,等。亲水性部分优选地是具有少于 1000 个乙二醇单元的聚乙二醇 (PEG)。可以调节亲脂性部分和亲水性部分的尺寸和组成,以获得理想的两亲性。

[0034] 用于本文时,对于肽和本发明修饰肽的其他成分,术语“缀合的”,“连接的”,“结合的”,等,意指特定部分彼此,优选地共价地,通过连接体、桥、间隔区等结合。

[0035] 用于本文时,术语“连接体”、“桥”、“间隔区”等指优选地,共价地连接例如亲脂性部分和治疗性肽的一个原子或一组原子。

[0036] 为了实现共价缀合,治疗性肽可以具有一个或多个合适的官能团,或可以被修饰为包括一个或多个用于共价偶联亲脂性或两亲部分的合适官能团。合适的官能团包括,例如,下列基团:羟基、氨基(伯氨基或仲氨基)、硫羟基、和羧基。本发明的亲脂性或两亲部分可以具有一个或多个合适的官能团,或可以被修饰为包括一种或多种用于共价偶联肽的合适官能团。合适的官能团包括,例如,羟基、氨基(伯氨基或仲氨基)、硫羟基、羧基、醛基,异氰酸(isocyanato)基、磺酸基、硫酸基、磷酸基、膦酸基、烯丙基卤基团、苄基卤基团、取代的苄基卤基团、和环氧乙烷基。

[0037] 治疗性肽可以通过酯基团、酰胺基、仲或叔胺基、氨基甲酸酯基团、磺酸酯基团、硫酸酯基团、磷酸酯基团、膦酸酯基团、或醚基团,直接或间接地与一种或多种亲脂性部分偶联。

[0038] 在本发明的一个实施方案中,棕榈酸受到 N-羟基琥珀酰亚胺的活化,并随后与抑生长肽,即八肽上的胺基反应,从而通过酰胺连接体在棕榈基亲脂性部分和所述肽之间形成缀合。抑生长肽上存在两个伯胺基。两个胺基能够同时缀合,或者,能够通过调节反应条

件和随后通过分离,只选择性缀合一个胺基。

[0039] 在另一个实施方案中,癸醛,即具有醛末端基团的亲脂性化合物,与抑生长肽上的胺基反应,从而通过伯胺键形成缀合。两个胺基能够同时缀合,或者,能够通过调节反应条件和随后通过分离,只选择性缀合一个胺基。

[0040] 在进一步的实施方案中,棕榈酸以若干比例,通过其六个胺基,与溶菌酶缀合。当棕榈酸:溶菌酶的比例小于6时,根据每个胺基的反应性,溶菌酶上的缀合位点可以是随机的。

[0041] 在再一个实施方案中,生长素释放肽是通过其羟基与正-辛酰基部分乙酰化的肽。生长素释放肽是胃肽,其刺激生长素分泌并增高肥胖倾向。它是对先前克隆的生长素促分泌素受体所确定的第一个天然配体,所述前克隆生长素促分泌素受体存在于脑的垂体和下丘脑区域。

[0042] 亲脂性部分可以首先与亲水性部分共价偶联,以形成两亲分子。本发明的两亲分子可以具有一种或多种合适的官能团,或可以被修饰为包括一个或多个用于共价偶联肽的合适官能团。合适的官能团选自羟基、氨基(伯氨基或仲氨基)、硫羟基、羧基、醛基、异氰酸基、磺酸基、硫酸基、磷酸基、膦酸基、烯丙基卤基团、苄基卤基团、取代的苄基卤基团、和环氧乙烷基。

[0043] 治疗性肽可以通过酯基团、酰胺基、仲或叔胺基、氨基甲酸酯基团、磺酸酯基团、硫酸酯基团、磷酸酯基团、膦酸酯基团、或醚基团,直接或间接地与一种或多种两亲部分偶联。

[0044] 优选地,治疗性肽共价地缀合于一种或多种包括(a)亲水性部分和(b)亲脂性部分的两亲分子,其中所述两亲分子平衡的亲水性和亲脂性特征赋予该缀合物在生物体液或水溶液中合适的溶解性。

[0045] 更优选地,治疗性肽共价地缀合于一种或多种包括(a)线性聚乙二醇部分和(b)亲脂性部分的两亲分子,其中将所述治疗性肽、聚乙二醇和亲脂性部分在构象上安排为在表面上具有亲脂性部分,从而易于与亲脂性环境或细胞膜相互作用。所述两亲修饰的肽,相对于未缀合的肽,具有针对与可生物降解聚合物体外和体内反应的增强的化学抗性。

[0046] 优选地,所述两亲分子具有下列通用结构: $L-S-(OC_2H_4)_mOH$ (式1),其中L是亲脂性部分,优选地,选自 C_{3-39} -烷基、 C_{3-39} -链烯基、 C_{3-39} -链二烯基、生育酚和类固醇残基,且其中S是连接体,其选自酯基团、酰胺基、仲或叔胺基、氨基甲酸酯基团、磺酸酯基团、硫酸酯基团、磷酸酯基团、膦酸酯基团、或醚基团的基团。

[0047] 在一个实施方案中,16个碳的烷基通过醚键共价偶联于聚乙二醇分子。由此生成的两亲分子具有一个羟基,能够对其进行活化或衍生化,以与肽的合适官能团反应。在本发明的一个实施方案中,对所述两亲分子进行衍生化,以使其具有醛末端基团。然后,两亲分子通过与抑生长肽上的胺基反应及随后通过与 $NaCNBH_3$ 进行还原反应,而共价地缀合于抑生长肽。抑生长肽上两个胺基能够同时缀合,或者,能够通过调节反应条件和随后通过分离,只选择性缀合一个胺基。所述缀合物是通过仲胺基形成的,其没有改变未缀合抑生长肽的电荷特征。该特征可以用于保持所述肽的活性。

[0048] 在另一个实施方案中,用4-硝苯基氯甲酸酯活化两亲分子单棕榈基聚(乙二醇)($M_n \sim 1124$)。然后,两亲分子通过与抑生长肽上胺基的反应共价地缀合于抑生长肽。抑生长肽上两个胺基能够同时缀合,或者,能够通过调节反应条件和随后通过分离,只选择性缀

合一个胺基。

[0049] 被一种或多种亲脂性或两亲部分共价修饰的肽包括,例如,药用盐以及所述修饰肽的复合物。修饰可以在肽上的一个或多个位点处。这样的肽还包括,例如位点-特异性修饰的肽和单-位点和多-位点修饰的肽的混合物。

[0050] “药用盐”意指在肽中任意一个或多个带电基团,或任何一个或多个药用、非-毒性阳离子或阴离子之间形成的盐。有机和无机盐包括,例如,由酸诸如盐酸、硫酸、磺酸、酒石酸、富马酸、氢溴酸、乙醇酸、柠檬酸、马来酸、磷酸、琥珀酸、醋酸、硝酸、苯甲酸、抗坏血酸、对-甲苯磺酸、苯磺酸、萘磺酸、丙酸、碳酸、等,或例如铵、钠、钾、钙、或镁制备的那些。

[0051] 术语“可生物降解水不溶性聚合物”包括能够在体内使用的任何生物相容的(即,药用)和可生物降解的合成的或天然的聚合物。该术语还包括不溶的或在 37°C 变为不溶于水或生物体液的聚合物。可以纯化所述聚合物,任选地,从而利用本领域中已知的技术去除单体和低聚物(例如,美国专利号 4,728,721;美国专利申请号 2004/0228833)。所述聚合物的一些非限制性实例是聚丙交酯、聚乙交酯、聚己酸内酯、聚二噁烷酮、聚碳酸酯、聚羟基丁酸酯、聚亚烃草酸酯、聚酐、聚酰胺、聚酯酰胺、聚氨基甲酸酯、聚缩醛、聚原碳酸酯、聚磷腈、聚羟基戊酸酯、聚亚烷基琥珀酸酯和聚原酸酯,和它们的共聚物、嵌段共聚物、支化共聚物、三元共聚物以及组合和混合物。

[0052] 本领域中普通技术人员可以确定聚合物的合适分子量。当确定分子量时,可能考虑的因素包括聚合物在溶剂中的理想降解率、机械强度、和溶解速率。典型地,在其它因素中特别根据选择使用哪种聚合物,聚合物合适的分子量范围是约 2,000 道尔顿-约 150,000 道尔顿,具有 1.0-2.8 的多分散性。

[0053] 按照本发明,将治疗性肽的药物制剂制备为存在于药用溶剂中的聚合物可注射溶液或混悬液形式,所述药用溶剂包含分散的或溶解的亲脂性或两亲性修饰的肽。通过使肽和亲脂性或两亲分子共价偶联,肽中的一些反应基受到保护,并且不能用于与溶液中的聚合物反应。因此,通过共价修饰所述肽,改善了本发明组合物中肽和聚合物的稳定性。

[0054] 因此,本发明提供在受试者体内原位形成固体的、可生物降解移植物的方法,其包括:(a) 将生物相容的、水不溶性、可生物降解聚合物和被一种或多种亲脂性或两亲部分共价修饰的治疗性肽溶解或分散到生物相容的、水溶性有机溶剂中,从而形成组合物;所述有机溶剂根据在身体组织中的分布,能够消散或扩散到体液中;和(b) 将所述组合物施用到体内的移植部位中,从而容许有机溶剂消散或扩散到所述体液中,并且使所述聚合物凝结或凝固,从而产生可生物降解的固体移植物。

[0055] 另外,本发明提供用于在体内原位形成可生物降解移植物的液体药物组合物,其包括有效量的生物相容的、水不溶性、可生物降解聚合物和有效量的被一种或多种亲脂性或两亲部分共价修饰的治疗性肽,将所述治疗性肽溶解或分散到有效量的生物相容的、水溶性有机溶剂中;其中所述溶剂能够消散或扩散到体液中,且所述聚合物能够随着与体液接触而凝结或凝固。

[0056] 合适的肽和亲脂性或两亲分子是以上定义的那些。缀合物中肽与亲脂性或两亲分子的摩尔比会按照肽的天性而改变,例如从 1:1 到 1:10。

[0057] 能够使用任何合适的可生物降解聚合物,条件是该聚合物在水溶液或体液中是不可溶的,或在 37°C 变为不可溶的。合适的可生物降解聚合物是以上定义的那些。

[0058] 所述组合物中存在的可生物降解聚合物的类型、分子量、和量能够影响肽从受控释放移植物中释放的时间长度。通过常规实验,本领域中的普通技术人员能够进行对所述组合物中存在的可生物降解聚合物类型、分子量、和量的选择,从而获得受控释放移植物的理想特性。

[0059] 药用有机溶剂包括,但不仅限于,N-甲基-2-吡咯烷酮;N,N-二甲基甲酰胺;二甲亚砜;碳酸异丙酯;己内酰胺;三醋精;苯酸苄酯;苄醇;乳酸乙酯;甘油三乙酸酯;柠檬酸的酯;聚乙二醇;烷氧基聚乙二醇和聚乙二醇乙酸酯;或它们的任意组合。

[0060] 可生物降解聚合物的有机溶剂的标准是它们是药用的且在水性介质中或体液中可混溶-可分散。合适的有机溶剂应该能够扩散到体液中,以使得所述液体组合物凝结或凝固,从而原位形成移植物。可以使用单一的和/或混合的溶剂,并且可以通过常规实验确定所述溶剂的适宜性。

[0061] 本发明的药物组合物典型地包含处于 0.1-40% w/v 范围内的肽。通常,最佳药物负荷依赖于所需的释放周期和肽的潜能。显然地,对于具有低潜能和较长释放周期的肽,可能需要较高水平的引入。

[0062] 本发明可注射液体组合物的粘性由聚合物的分子量和所使用的有机溶剂确定。例如,当使用聚(丙交酯-共-乙交酯)时,聚酯溶液在 NMP 中比在 mPEG350 中具有更低的粘性。典型地,当使用相同溶剂时,聚合物分子量和浓度越高,则粘性越高。优选地,溶液中聚合物的浓度是低于 70 重量%。更优选地,溶液中聚合物的浓度是 20-60 重量%。

[0063] 亲脂性或两亲修饰的肽从这些原位形成的移植物中的释放将遵从与药物从整段(monolithic)聚合装置中的释放相似的一般规则。亲脂性或两亲性修饰的肽的释放能够受到移植物尺寸和形状,移植物内亲脂性或两亲性修饰的肽的负荷,涉及亲脂性或两亲性修饰的肽和具体聚合物的渗透性因素,和聚合物降解的影响。药物递送领域中的技术人员根据选择用于递送的修饰肽的量,能够调节以上参数,从而提供理想的释放速度和持续时间。

[0064] 施用的可注射组合物的量典型地应该依赖于受控释放移植物的理想特性。例如,可注射溶液组合物的量能够影响肽从受控释放移植物中释放的时间长度。

[0065] 按照本发明,当需要持续受控释放递送肽时,可以向受试者施用包含亲脂性或两亲性修饰的肽的组合物。用于本文时,术语“受试者”意欲包括温血动物,优选地,哺乳动物,最优选地,人。

[0066] 用于本文时,术语“施用于”意指通过将组合物递送到受试者身上理想位置的任何合适途径,包括通过皮下、肌肉内、腹膜内、或皮内注射和/或移植,和通过对粘膜施药,对受试者分配、递送或应用组合物(例如,药物制剂),从而基于用所述治疗性肽治疗多种医学病症的已知参数,提供理想剂量的肽。

[0067] 术语“受控的、持续释放递送”,用于本文时,包括,例如在施药后的一段时间内体内连续递送治疗性肽,优选地,至少数天-数周或数月。例如,通过一段时间内试剂的连续治疗效果,能够证明肽的受控持续释放递送(例如,对于抑生长肽,通过一段时间内连续的 GH 减少能够证明该肽的持续递送)。备选地,可以通过检测一段时间内所述试剂在体内的存在,来证明试剂的持续递送。

[0068] 在该申请中,还预期了权利要求中提出的关于本液体药物组合物的不同实施方案,已作必要的修正,从而获得用于形成所述组合物的方法,和用于形成固体移植物的方

法。

[0069] 实施例

[0070] 下列实施例说明了本发明的组合物和方法。不应该将下列实施例认为是限制,而仅应该认为是教导如何制备有效的药物递送系统。

[0071] 实施例 1. 制备棕榈酰 - 抑生长肽 (PAL-OCT)

[0072] 将 50mg 抑生长肽乙酸酯溶于 1mL 含有 100 μ L 三乙胺 (TEA) 的无水 DMSO 中。将 40.2mg 棕榈酸 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 (Mw 353.50) 溶于 3mL 无水 DMSO 中,并将其加入到肽溶液中。容许反应在室温下进行 3 小时。将混合物倒入二乙醚中,以沉淀棕榈酰化的抑生长肽。用二乙醚清洗该沉淀 2 次,并然后在真空下干燥。由此产生的乙酰化肽处于白色粉末的形式。

[0073] 实施例 2. 制备棕榈酰 - 抑生长肽 (PAL-OCT)

[0074] 将 50mg 抑生长肽乙酸酯溶于 1000 μ L 含有 100 μ L TEA 的无水 DMSO 中。将 17.1mg 棕榈酸 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 (Mw 353.50) 溶于 3mL 无水 DMSO 中,并将其直接注射添加到肽溶液中。容许在室温下反应过夜。将混合物倒入二乙醚中,以沉淀棕榈酰化的抑生长肽。用二乙醚清洗该沉淀 2 次,并然后在真空下干燥。由此产生的乙酰化肽处于白色粉末的形式。

[0075] 实施例 3. 制备癸醛 - 抑生长肽 (DCL-OCT)

[0076] 将 50mg 抑生长肽溶于 2mL 处于 0.1 M 乙酸缓冲液, pH 5 中的 20mM 氰基硼氢化钠 (Mw 62.84, NaCNBH₃) (2.51mg) 溶液中。通过直接注射将 13.7mg 癸醛 (Mw 156.27) (OCT : DCL = 1 : 2) 加入到肽溶液中。容许在 4°C 反应过夜。通过离心分离混合物。对沉淀的 PAL-OCT 进行冷冻干燥。

[0077] 实施例 4. 制备棕榈酰 - 溶菌酶 (PAL-Lyz, 3 : 1)

[0078] 将 302mg 溶菌酶 (Mw 14,500) 溶于 1000 μ L 含有 200 μ L TEA 的无水 DMSO 中。将 18.25mg 棕榈酸 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 (Mw 353.50) 溶于 3mL 无水 DMSO 中,并通过直接注射将其添加到肽溶液中。容许在室温下反应过夜。将 PAL-Lyz 沉淀到二乙醚中,并在除去有机溶剂后对最终产物进行冷冻干燥。

[0079] 实施例 5. 由可注射聚合物制剂制备棕榈酰 - 溶菌酶

[0080] 通过将聚合物适当地溶解于 mPEG350 中而制备 40% PLGA RG503H。然后,将棕榈酰 - 溶菌酶和溶菌酶,分别以约 7% 与该聚合物溶液相混合。充分混合该制剂,从而获得均匀的制剂。

[0081] 溶菌酶和棕榈酰化的溶菌酶从可注射聚合物溶液的体外释放:在 37°C,将制剂混悬液 (约 100mg) 注射到 3mL 具有 0.1% 叠氮化钠的磷酸盐缓冲液, pH 7.4 中。在选择的时间点时,用新鲜的缓冲溶液替换接受液,并利用处于 pH 7.4 的 PB 适当地稀释所除去的缓冲溶液,并通过 UV 分光光度计,在 280nm,针对标准曲线分析其药物浓度。图 1 显示乙酰化的和天然溶菌酶二者的累积释放分布。天然溶菌酶与乙酰化的溶菌酶相比,显示出显著的初始释放。

[0082] 实施例 6. 制备棕榈酰 - 溶菌酶 (PAL-Lyz, 5 : 1)

[0083] 将 50mg 溶菌酶 (Mw 14,500) 溶于水中,并将 pH 调节为 9.58。冷冻干燥该溶液。再将干燥的粉末溶于 3mL DMSO 中。然后通过直接注射,将 322 μ L 处于无水 DMSO 中的 20mg/

mL 棕榈酸 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 (Mw353.50) 溶液加入到蛋白质溶液中。容许在 4℃ 反应过夜。将 PAL-Lyz 沉淀到二乙醚中,并在除去有机溶剂后对最终产物进行冷冻干燥。

[0084] 实施例 7. 制备棕榈酰 - 溶菌酶 (PAL-Lyz, 13 : 1)

[0085] 将 50mg 溶菌酶 (Mw 14,500) 溶于水中,并将 pH 调节为 9.58。冷冻干燥该溶液。再将干燥的粉末溶于 3mL DMSO 中。然后通过直接注射,将 799 μ L 处于无水 DMSO 中的 20mg/mL 棕榈酸 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 (Mw353.50) 溶液加入到蛋白质溶液中。容许在 4℃ 反应过夜。将 PAL-Lyz 沉淀到二乙醚中,并在除去有机溶剂后对最终产物进行冷冻干燥。

[0086] 实施例 8. 制备棕榈酰 - 溶菌酶 (PAL-Lyz)

[0087] 将溶菌酶加入到处于含有 2% 脱氧胆酸酯的 PBS (pH 8.0) 中的 PAL-NHS 中。将该混合物在 37℃ 温育 6 小时。离心该混合物,以除去未反应的 PAL-NHS。针对含有 0.15% DOC 的 PBS 透析产物 48 小时 (PAL-NHS : Lyso = 15 : 1)。

[0088] 实施例 9. 生长素释放肽从可注射聚合物制剂中的释放

[0089] 通过将聚合物适当地溶解于 mPEG350 中而制备 40% PLGA RG503H。然后,将生长素释放肽 (人,大鼠 1-5) 和去乙酰化生长素释放肽 (Des- 正 - 辛酰基 -[Ser]³- 生长素释放肽 (人,大鼠 1-5)), 分别以约 6%, 与该聚合物溶液相混合。充分混合该制剂,从而获得均匀的制剂。

[0090] 在 37℃, 将制剂混悬液 (约 100mg) 注射到 3mL 具有 0.1% 叠氮化钠的磷酸盐缓冲液, pH 7.4 中。在选择的时间点时,用新鲜的缓冲溶液替换接受液,并利用处于 pH 7.4 的 PB 适当地稀释所除去的缓冲溶液,并利用相对应的标准曲线,通过 HPLC, 分析其药物浓度。图 2 显示 PBS 中生长素释放肽和去乙酰化生长素释放肽的累积释放分布。去乙酰化生长素释放肽在测试的两周内显示出快得多的释放。具有亲脂性部分的生长素释放肽显示出慢得多的释放速度。

[0091] 实施例 10. 制备单棕榈基聚 (乙二醇) - 丁醛, 即二乙基乙缩醛

[0092] 通过在降压条件下蒸馏出甲苯,共沸点干燥单棕榈基聚 (乙二醇) (平均 Mn ~ 1124) (5.0g, 4.45 毫摩尔) 和甲苯 (75mL) 的混合物。将干燥的单棕榈基聚 (乙二醇) 溶解于无水甲苯 (50mL) 中,向无水甲苯中添加了处于 THF (4.0mL, 6.6 毫摩尔) 中的 20% (w/w) 叔丁氧化钾溶液和 4- 氯丁醛二乙基乙缩醛 (0.96g, 5.3 毫摩尔, MW 180.67)。在氩氛, 100-105℃ 下, 搅拌该混合物过夜。冷却到室温后, 过滤该混合物, 并将其加入到 150mL 处于 0-5℃ 的乙醚中。过滤出沉淀的产物, 并在减压下进行干燥。

[0093] 实施例 11. 抑生长肽在 N- 末端胺基处与单棕榈基聚 (乙二醇) 的缀合 (PAL-PEG-BA-OCT)

[0094] 在典型的制备中, 将 201.6mg 单棕榈基聚 (乙二醇) - 丁醛, 即二乙基乙缩醛 (PAL-PEG-BADA) 溶解于 10mL 0.1 M 磷酸 (pH 2.1) 中, 并将由此生成的溶液在 50℃ 加热 1 小时, 然后冷却至室温。用 1 N NaOH 将该溶液的 pH 调节为 5.5, 并将由此生成的溶液加入到处于 3.5mL 0.1 M 磷酸钠缓冲液 (pH 5.5 中的 195.3mg 抑生长肽溶液中)。1 小时后, 加入 18.9mg NaCNBH₃, 以具有 20mM 的浓度。在室温下继续反应过夜。然后利用具有 2000 道尔顿的 MW 截断值的膜透析该反应混合物, 或将其上样到具有 C-18 柱的制备 HPLC 上。纯化的缀合抑生长肽主要是具有一个伯胺 (赖氨酸) 和一个仲胺 (N- 末端) 的单一化合物。

[0095] 实施例 12. 液体聚合组合物中肽和可生物降解多肽的体外释放和稳定性

[0096] 将聚(DL-丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)(DLPLG85/15, IV :0.28), 其具有 85/15 的丙交酯与乙交酯比例并具有 1.5 的多分散性, 溶解于 N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP) 中, 以获得 50%重量的溶液。将肽与 NMP 中的 PLGA 溶液混合, 从而提供处于表 1 中所示比例的均匀可注射组合物。

[0097] 表 1 :测试的可注射聚合制剂

[0098]

样品	肽 (mg)	DLPLG 8515/NMP (mg)	药物负荷 (%, w/w)
空白	0	1000	0
OCT	60	940	6
Pal-PEG-BA-OCT	120	880	6

[0099] 从每种制剂中取等分试样, 以用于在 37℃, 在含有 0.1%叠氮化钠的磷酸盐缓冲液, pH 7.4 中进行体外释放, 并且使用剩余的制剂监测在室温下, 肽和聚合物随时间的稳定性。时间点为 0.125、1、2、5、7、14、21、和 28 天。通过 HPLC 确定样品中的肽纯度。利用具有已知分子量的聚苯乙烯标准, 通过凝胶渗透层析(GPC), 确定聚合物的分子量。

[0100] 按照现有技术, 肽上存在亲核基团能够导致组合物的肽和可生物降解聚合物之间的相互作用。肽上的亲核基团能够与可生物降解的聚合物反应, 从而形成乙酰化的产物, 并能够催化可生物降解聚合物的降解。众所周知地, 当抑生长肽和聚(DL-丙交酯-共-乙交酯)组合时, 特别是在有机溶液诸如 NMP 中, 抑生长肽将会迅速被乙酰化, 并且聚合物将迅速降解。本发明中抑生长肽的 N-末端缀合物包含一个伯胺, 一个仲胺和一个 C-末端羧酸基团, 并认为其与抑生长肽本身相类似地与聚合物相互作用和 / 或反应。然而, 意外地发现本发明共价缀合的抑生长肽与未修饰的抑生长肽相比, 阻止乙酰化反应, 并显著减小聚合物的降解速度。如现有技术中所述和表 2 中所示地, 当将抑生长肽与在 NMP 中的聚(DL-丙交酯-共-乙交酯)混合时, 室温下, 在 24 小时内, 多于 80%的抑生长肽被乙酰化, 并且 7 天后基本完全反应。然而, 相同条件下, 该共价缀合抑生长肽在甚至 56 天后仍很稳定。如表 3 中所示, 室温下, 含有抑生长肽的制剂中的聚合物分子量迅速减小。21 天后, 聚合物的分子量减小 50%。然而, 对于含有共价缀合抑生长肽的制剂中的聚合物, 保持了多于 90%的初始分子量。

[0101] 表 2 :液体聚合制剂中肽的稳定性

时间(天)	抑生长肽	PAL-PEG-BA-OCT
7	2.3	99.6
14	0.6	100.0
21	0.3	100.0
56	0.0	100.0

[0102]

[0103] 表 3 :液体聚合制剂中聚合物的稳定性

	时间 (天)	NMP 中的 8515PLG	抑生长肽	PAL-PEG-BA-OCT
	0	100	100	100
	0.1	100.0	95.8	100.6
	1	99.2	75.3	99.8
[0104]	2	99.0	66.1	98.8
	3	102.0	65.3	100.4
	7	98.9	59.0	98.6
	14	100.8	57.1	98.1
	21	98.2	51.3	92.2

[0105] 如现有技术中所公开地,为了维持制剂中生物活性试剂和赋形剂的稳定性,通常,将生物活性试剂与制剂的其他成分分开包装,诸如在商业醋酸亮丙立德制剂 Eligard 中。然后,在使用前立即混合全部成分。尽管,这样的制剂可以防止肽和可生物降解聚合物在储存期间内的相互作用,但是不防止它们在混合后的任何相互作用。肽和聚合物的相互作用可以发生在施药和随后的体外或体内释放过程中。

[0106] 当制备后,从每种制剂中取等分试样,从而在 37°C,在含有 0.1%叠氮化钠的磷酸盐缓冲液,pH 7.4 中进行体外释放时,令人惊讶地发现,在混合和随后的体外释放过程中发生抑生长肽和聚合物的相互作用。如图 3 中所示,3 小时内,在释放介质中检测到约 30%的抑生长肽被降解,或与聚合物反应。28 天后,在释放介质中检测到多于 50%的抑生长肽被降解或被乙酰化。28 天后,将聚合物基质溶于乙腈中,并且利用水沉淀该聚合物。利用 HPLC 分析抑生长肽。发现多于 50%的保持在聚合物基质中的抑生长肽也被乙酰化了。所述抑生长肽的降解和 / 或乙酰化显著降低天然抑生长肽的适用性,并可以产生不希望的毒性副产物。防止肽和聚合物的这种相互作用将是非常有利的。

[0107] 图 4 显示共价缀合抑生长肽 Pal-PEG-BA-OCT 的体外释放。尽管修饰的抑生长肽与未修饰的抑生长肽含有相似的亲核试剂,但是令人惊讶地发现在 28 天内,在释放介质和聚合物基质中没有检测到该修饰的抑生长肽的降解。该结果说明了肽与两亲部分诸如单棕榈基聚(乙二醇)的共价缀合能够防止或显著减少肽和可生物降解聚合物之间的相互作用和 / 或反应。

[0108] 实施例 13. 制备由 4- 硝苯基氯甲酸酯 (NPC) 活化的单棕榈基聚(乙二醇)

[0109] 通过在降压条件下蒸馏出 50mL 苯,共沸点干燥单棕榈基聚(乙二醇)(平均 Mn ~ 1124)(10.0g,8.9 毫摩尔)和苯(100mL)的混合物。将反应混合物冷却到 30°C,随后在氩条件下添加无水吡啶(0.809mL,10mmol),并添加 4- 硝苯基氯甲酸酯(2.015g,10.0mmoles)。一旦完成添加,在 45°C 搅拌该反应 2 小时,随后在室温下搅拌过夜。

[0110] 然后过滤反应混合物,随后通过在真空中蒸馏,从过滤物中除去溶剂。从异丙醇中对残余物进行再结晶,从而产生 8.2g 产物(PAL-PEG-NPC)。

[0111] 实施例 14. 抑生长肽与单棕榈基聚(乙二醇)的缀合(PAL-PEG-OCT)

[0112] 将 236.5mg PAL-PEG-NPC 加入到处于 10mL 50mM 硼酸钠缓冲液 (pH9) 中的 239mg 抑生长肽溶液中。连续磁力搅拌该溶液过夜。利用 MW 截取值为 2000 的膜,对最终溶液进行透析。冷冻干燥透析的溶液,并利用 HPLC 进行分析。结果显示修饰的肽是单位点和多位点缀合的抑生长肽的混合物。

[0113] 本发明不受上述实施方案的局限,上述实施方案仅作为实例存在,并且能够在由所附的专利权利要求所定义的保护范围内,以不同方式对其进行改进。

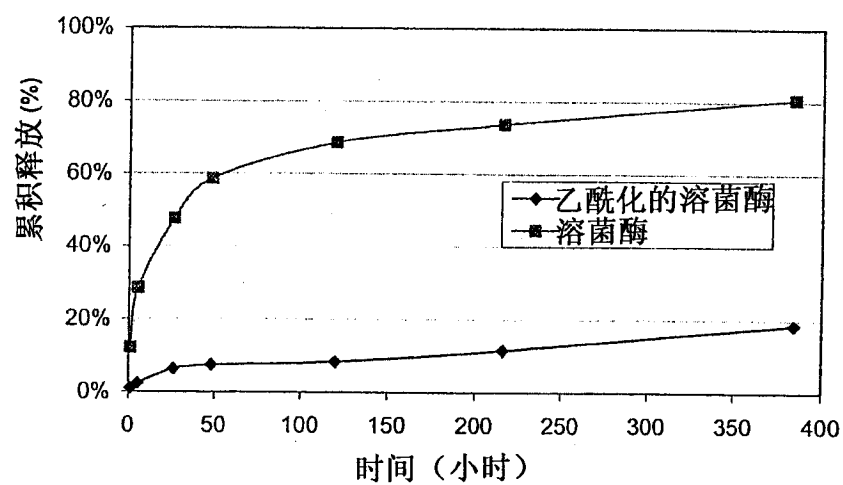


图 1

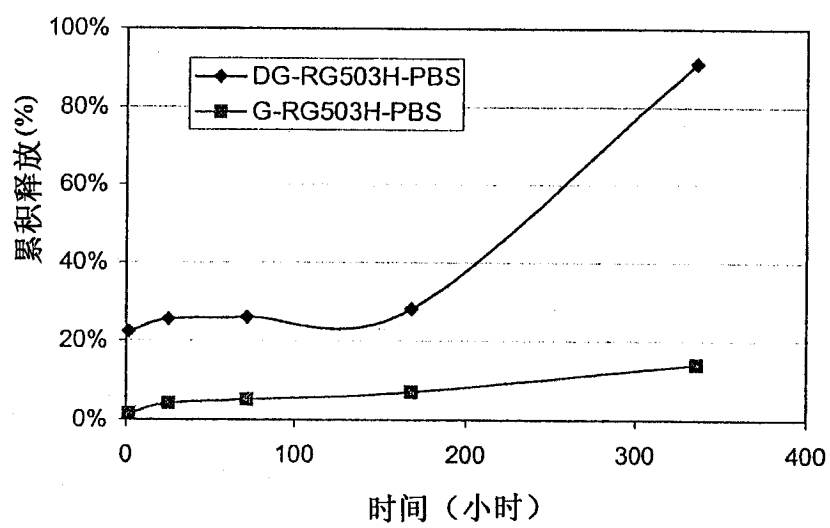


图 2

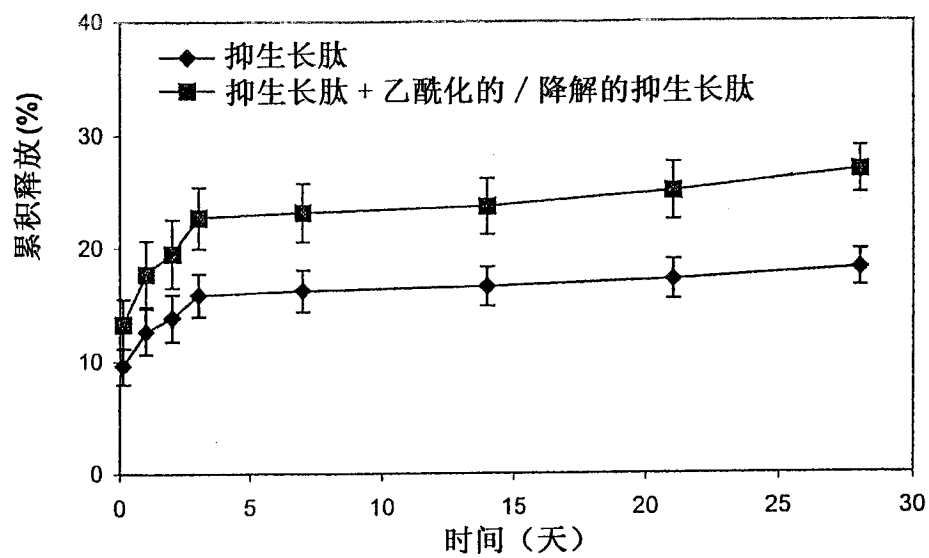


图 3

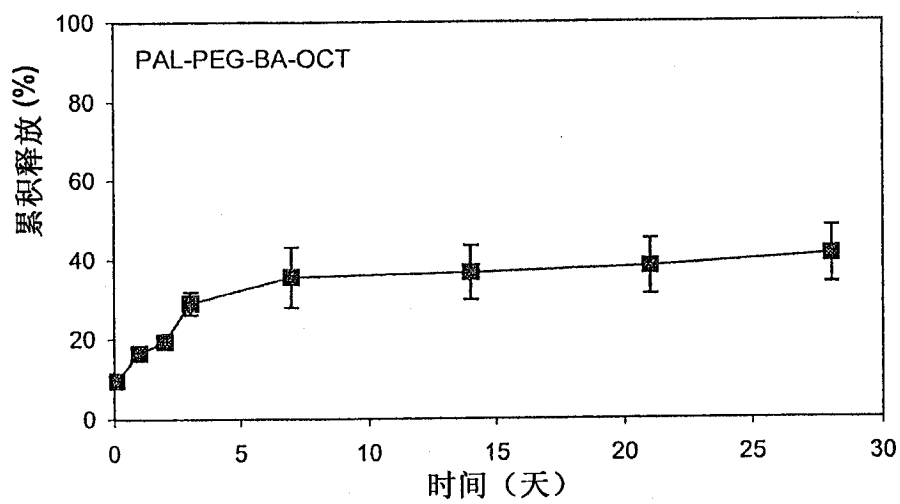


图 4