

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 47/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580008210.4

[43] 公开日 2008 年 2 月 27 日

[11] 公开号 CN 101132812A

[22] 申请日 2005.3.15

[21] 申请号 200580008210.4

[30] 优先权

[32] 2004.3.15 [33] US [31] 60/553,146

[86] 国际申请 PCT/US2005/008632 2005.3.15

[87] 国际公布 WO2005/089805 英 2005.9.29

[85] 进入国家阶段日期 2006.9.14

[71] 申请人 阿拉巴马耐科塔医药公司

地址 美国阿拉巴马州

[72] 发明人 迈克尔·D·本特利 赵 宣

哈罗德·察佩

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任
公司

代理人 刘 慧 杨 青

权利要求书 7 页 说明书 84 页 附图 3 页

[54] 发明名称

HIV 进入抑制剂的聚合物基组合物和结合物

[57] 摘要

本文提供了 HIV 进入抑制剂的水溶性聚合物结合物和聚合物基组合物。本发明还提供了所述结合物和组合物的合成和给药方法。

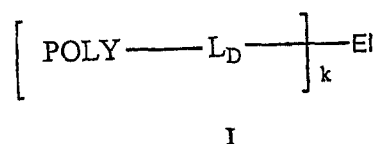
1. 结合物，其包括通过可降解的键合与水溶性聚合物共价连接的进入抑制剂。

2. 权利要求 1 的结合物，其中所述可降解的键合是可水解的键合。

3. 权利要求 1 的结合物，其中所述可水解的键合包括选自以下的部分：羧酸酯、磷酸酯、氨基甲酸酯、酐、缩醛、缩酮、酰氧基烷基醚、亚胺、原酸酯、硫代酸酯、硫羟酸酯和碳酸酯。

4. 权利要求 3 的结合物，其中所述部分选自可水解的氨基甲酸酯、酯和碳酸酯。

5. 权利要求 1 的结合物，其具有以下结构



其中 POLY 为水溶性聚合物， L_D 为可降解的键合，EI 为进入抑制剂，k 相当于 EI 上与聚合物片段 (POLY- L_D) 共价连接的活性部位数。

6. 权利要求 5 的结合物，其中 k 的值为 1 到 8。

7. 权利要求 6 的结合物，其中 k 的值选自 1、2、3、4、5 和 6。

8. 权利要求 7 的结合物，其中 k 选自 1、2、3 和 4。

9. 权利要求 5 的结合物，其中 L_D 包括选自以下的部分：羧酸酯、磷酸酯、氨基甲酸酯、酐、缩醛、缩酮、酰氧基烷基醚、亚胺、原酸酯、硫代酸酯、硫羟酸酯和碳酸酯。

10. 权利要求 5 的结合物，其中 POLY 选自聚氧化烯烃、聚乙烯基吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚噁唑啉和聚丙烯酰基吗啉。

11. 权利要求 10 的结合物，其中 POLY 为聚氧化烯烃。

12. 权利要求 11 的结合物，其中聚氧化烯烃为聚乙二醇。

13. 权利要求 12 的结合物，其中聚乙二醇由选自以下的封端部分进行封端：羟基、烷氧基、取代的烷氧基、烯氧基、取代的烯氧基、炔氧基、取代的炔氧基、芳氧基和取代的芳氧基。

14. 权利要求 13 的结合物，其中聚乙二醇由甲氧基进行封端。

15. 权利要求 12 的结合物，其中聚乙二醇的分子量选自以下范围：约 500 道尔顿到约 100,000 道尔顿、约 2,000 道尔顿到约 85,000 道尔顿、约 5,000 道尔顿到约 60,000 道尔顿、约 10,000 道尔顿到约 50,000 道尔顿、和约 15,000 道尔顿到约 40,000 道尔顿。

16. 权利要求 5 的结合物，其中 POLY 具有选自以下的结构：线型、支化和叉形。

17. 权利要求 5 的结合物，其中所述 EI 选自：T-20、T-1249、PRO 542 (又名 CD4-IgG2)、PRO-140、PRO-367、SCH-417690、TXN-355、UK-427、UK-857、GSK-873、GSK-140、PA9、PA10、PA11 和 PA12。

18. 权利要求 17 的结合物，其中 EI 选自：T-20、T-1249、PRO 542 和 PRO-140。

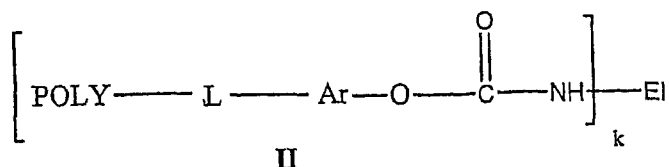
19. 权利要求 5 的结合物，其中与聚合物片段连接的 EI 活性部位

独立地选自：N末端、C末端、氨基、羟基和硫羟基。

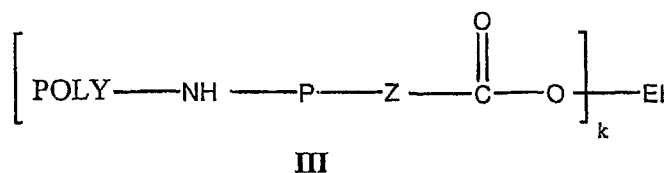
20. 权利要求 19 的结合物，其中与聚合物片段连接的 EI 活性部位为氨基或者羟基。

21. 权利要求 5 的结合物，其中 L_D 具有选自约 1 到约 20 个原子、约 2 到约 15 个原子、和约 3 到约 10 个原子的长度。

22. 权利要求 5 的结合物，其包括选自以下的结构：



和



其中：

结构 II 中的 L 为 -O- 或 -NH-C(O)-，

Ar 为芳基，

-NH- 为得自 EI 的氨基残基，

结构 III 中的 P 为间隔基，

Z 为 -O-、-NH-、或 -CH₂-，和

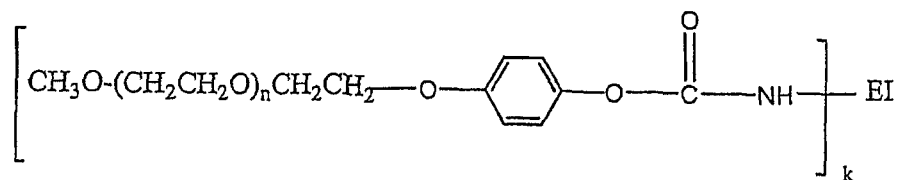
O 为得自 EI 的羟基残基。

23. 权利要求 22 的结合物，其中在结构 III 中，当合起来考虑 -NH-P-Z-C(O)- 时，P 为天然或非天然存在的氨基酸的残基。

24. 权利要求 22 的结合物，其中 Ar 为邻位、间位或对位取代的苯基。

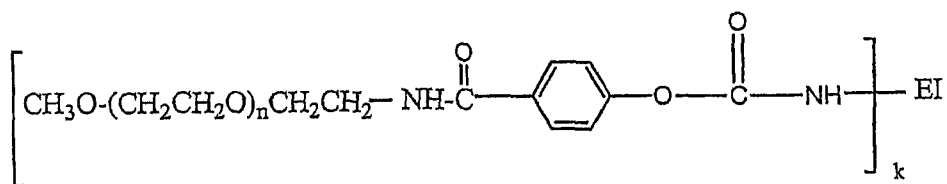
25. 结构 III 所示的结构, 其中“POLY-NH-”选自不存在 EI 部分的表 1 中的聚合物 1-1 到 1-40。

26. 权利要求 22 的结合物, 其对应于以下结构:



IV

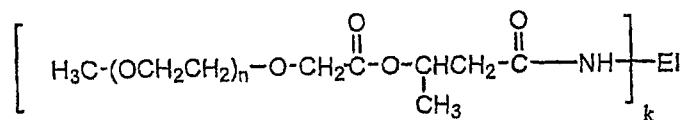
或



V

其中 n 为 2 到约 3400。

27. 权利要求 5 的结合物, 其包括以下结构:



VI

其中 n 为 2 到约 3400。

28. 权利要求 5 的结合物, 其中 k 等于 1。

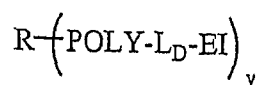
29. 权利要求 1 的结合物, 其中所述水溶性聚合物为多臂型聚合物。

30. 权利要求 29 的结合物, 其中所述多臂型聚合物包括中心核心, 从所述中心核心伸出至少三个聚合物臂。

31. 权利要求 30 的结合物, 其中所述聚合物臂为均聚的或共聚的。

32. 权利要求 31 的结合物, 其中每个聚合物臂包括这样的共聚物, 该共聚物包括与所述中心核心共价连接的内部多肽片段和与所述多肽片段共价连接的外部亲水性聚合物片段。

33. 权利要求 31 的结合物, 其包括以下结构:



VII

其中:

R 为核心分子,

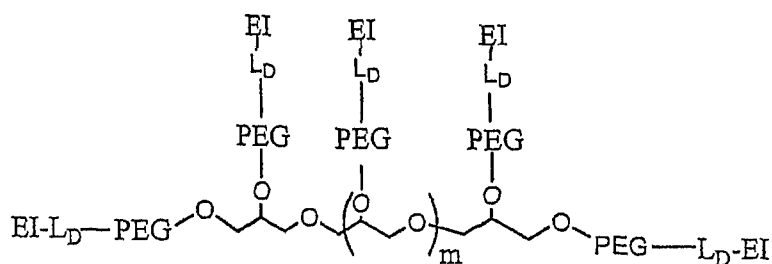
POLY 为水溶性聚合物,

L_D 为可降解的键合,

EI 为进入抑制剂, 和

y 为 3 到 15。

34. 权利要求 33 的结合物, 其包括以下结构:



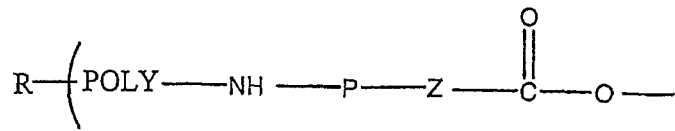
VIII

其中 m 选自 3、4、5、6、7 和 8。

35. 权利要求 32 的结合物, 其中所述 EI 通过可降解的键合共价连

接于内部多肽片段。

36. 权利要求 33 的结合物，其包括以下结构：



IX

其中：

P 为间隔基，

Z 为 -O-、-NH-、或 -CH₂-，和

O 为得自 EI 的羟基残基。

37. 权利要求 36 的结合物，其中当合起来考虑 -NH-P-Z-C(O)- 时，P 为天然或非天然存在的氨基酸的残基。

38. 包括多种单一聚物 EI 结合物的组合物。

39. 包括权利要求 1 所述的结合物的药物组合物。

40. 权利要求 39 的药物组合物，进一步包括可药用的赋形剂。

41. 非可逆胶凝水凝胶，其包括进入抑制剂和作为凝胶组分之一的聚氧化烯烃。

42. 权利要求 41 的水凝胶，其中所述水凝胶为交联的。

43. 权利要求 41 的水凝胶，其中所述水凝胶为未交联的。

44. 权利要求 41 的水凝胶，其中所述进入抑制剂为权利要求 1 所

述的水溶性聚合物结合物形式。

45. 权利要求 41 的水凝胶，其在生理条件下可降解。

46. 权利要求 41 的水凝胶，其中所述进入抑制剂任选共价连接于一种或多种凝胶组分。

47. 生产权利要求 1 所述的聚合物结合物的方法，包括在结合条件下使进入抑制剂与水溶性聚合物试剂接触形成包括可降解键合的聚合物进入抑制剂结合物。

48. 制备包括进入抑制剂的不可逆水凝胶的方法，所述方法包括：

在有效促进适当的水凝胶前体试剂胶凝的条件下使所述适当的水凝胶前体试剂彼此接触并与所述进入抑制剂接触，从而形成其中包埋有所述进入抑制剂的不可逆水凝胶，

其中所述进入抑制剂为结合形式或非结合形式，并且所述水凝胶前体试剂不表现出可逆胶凝性质。

49. 抑制 HIV 感染的方法，包括给药包括治疗有效量的权利要求 1 所述的结合物和可药用赋形剂的组合物。

50. 权利要求 49 的方法，其中所述结合物与一种或多种其它抗病毒药组合给药。

HIV 进入抑制剂的聚合物基组合物和结合物

相关申请的交叉引用

本申请要求 2004 年 3 月 15 日提交的美国临时申请 60/553,146 的优先权，其被全文并入本文作为参考。

技术领域

本发明总地涉及 HIV 进入抑制剂(EI)的缓释给药。更具体地，本发明涉及 HIV 进入抑制剂的水溶性聚合物结合物(conjugate)和聚合物基组合物。另外，本发明包括合成这种结合物和组合物的方法，以及通过给药本文中所述组合物抑制 HIV 感染的方法。

背景技术

在 1981 年在美国首次报告的 AIDS(获得性免疫缺乏综合症)是世界性的流行病。AIDS 由人类免疫缺陷性病毒(HIV)引起，HIV 通过杀死或破坏身体免疫系统的细胞而进行性地破坏身体对抗感染和某些类型的癌症的能力。据估计，在美国目前有接近一百万人感染 HIV。

当 AIDS 首次在美国被发现时，没有对抗 HIV 的药物；然而，在过去的 11 年中，已经开发了药物用于对抗 HIV 感染及其相关的感染和癌症。这些药物可以根据它们的作用方式分为不同类别。有三类抗 HIV 药物，尽管在病毒生命周期的不同时期起作用，但在病毒已感染 T 细胞之后中断病毒复制。这些抗 HIV 药物类别包括核苷类逆转录酶抑制剂(NRTI)、蛋白酶抑制剂(PI)、和非核苷类逆转录酶抑制剂(NNRTI)。这些不同类别的药物包括 AZT、扎西他滨(双去氧胞苷)、双去氧肌苷(dideoxyinosine)、司他夫定(stavudine)和拉米夫定(核苷类逆转录酶抑制剂)；delvaridine、奈维拉平(nevirapine)、和依非韦伦(efravirenz)(非核苷类逆转录酶抑制剂)；和利托那韦(ritonavir)、saquinavir、和茚地那韦

(indinavir)(蛋白酶抑制剂)。然而，还有另一类抗逆转录病毒药，即，进入抑制剂，其以与前述常规类别的抗 HIV 药物不同的方式起作用。与对抗 T 细胞感染后的 HIV 不同，进入抑制剂实际上首先防止 HIV 感染 T 细胞。更具体地，进入抑制剂通过使其本身依附于 T 细胞表面上的蛋白质或 HIV 表面上的蛋白质而起作用。为了使 HIV 结合于 T 细胞，HIV 外被上的蛋白质必须结合于 T 细胞表面上的蛋白质。进入抑制剂防止这种结合的发生。一些进入抑制剂靶向 HIV 表面上的 gp120 或 gp41 蛋白质，而其它进入抑制剂靶向 T 细胞表面上的 CD4 蛋白质或 CCR5 或 CXCR4 受体。进入抑制剂包括 T-20 (也称为恩夫韦地(enfuvirtide))、PRO-542、SCH-C、SCH-D、和 T-1249。至今，只有一种进入抑制剂 T-20 得到 FDA 的批准。T-20 抑制 HIV-1 与 CD4+细胞的融合。

进入抑制剂(包括融合抑制剂)是有前途的新型抗 HIV 药物。进入抑制剂如 T-20 对于在单独或联合治疗中使用常规抗 HIV 药物如，PI、NRTI 和 NNRTI 没有响应的 HIV 阳性个体特别有吸引力。T-20 为 36 个氨基酸的合成肽，其具有乙酰化 N-末端和改性为羧酰胺的 C-末端。T-20(FUZEON™)在 2003 年 3 月收到 FDA 的上市批准。令人遗憾的是，尽管期望很高，该药物的销售受到其不合理的价格的阻碍，并且更重要的是，其难以给药。T-20 皮下注射，每天两次。这种对患者的频繁给药非常不受患者的欢迎—由于高频率的剂量给药、给药方式、和与制备和给药该药物相关的全面疲惫感，其中许多患者最终没能维持必要的剂量给药方案。实际上，98%的 FUZEON™患者报告了疼痛的或麻烦的局部注射部位反应(ISR)的至少一种情况。ISR 症状包括疼痛/不适、硬化、红斑、和小结/囊肿。报告的过敏性反应包括皮疹、发烧、恶心和呕吐、寒战、强直、和低血压。越来越显而易见，药物如 T-20 不是可为患者所容易接受的药物。与 ISR 有关的疼痛被认为是轻微的到中度的，并且各种 ISR 的平均持续时间为约 7 天。此外，如果没有连贯地接受全部的剂量，T-20 可相当迅速地形成抗药性。(GMHC Treatment Issues, Vol. 17, No. 1/2, Jan/Feb 2003)。因此，本领域中需要改善的抗 HIV 药物，并且特别是，需要改善的进入抑制剂，其在血流中有更长

久的循环半衰期、同时维持可测量的，并且更优选是显著的活性程度，从而可以较低频率对患者剂量给药并从而减少局部注射部位反应的发生。本发明满足这些需要。

发明内容

因此，在一个方面，本发明提供抗逆转录病毒 HIV 药物的缓释给药组合物，抗逆转录病毒 HIV 药物具体地为肽酰基进入抑制剂如 T-20 和 T-1249。本发明的结合物和组合物具有缓释释放性质，如，比它们的未改进的 EI 对应物相比具有更长久的血流半衰期，从而解决了与未改进的 EI 如 T-20 有关的一些给药相关性问题的。

本文中所述的结合物和组合物有利地降低免疫原性。同样重要的是，本发明的结合物和组合物与不含水溶性聚合物的常规 EI 组合物相比(结合形式或非结合形式)需要降低的剂量给药频率。因此，本文提供的结合物和组合物通过它们的用于提供延长和治疗水平的血流 EI(优选多肽基 EI)的缓释释放性质而有利地减少接受相应的不含与其共价连接或与其结合的水溶性聚合物的进入抑制剂药物的 HIV-1 感染主体通常所承受的令人痛苦的注射次数和相关的局部注射部位反应。

在一个方面，本发明涉及水溶性聚合物和进入抑制剂化合物的结合物。本发明这个方面的示例性结合物在本文中的表格中提供。

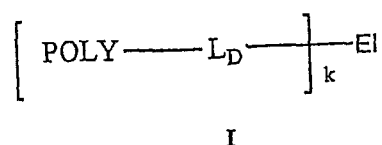
在优选的实施方案中，本发明的结合物和组合物为可降解，也就是说，其包括至少一个可降解的键合，优选可水解的键合。

例如，本发明的结合物或组合物中包含的可水解键合可包含可水解部分，如羧酸酯、磷酸酯、氨基甲酸酯、酐、缩醛、缩酮、酰氧基烷基醚、亚胺、原酸酯、硫代酸酯、硫羟酸酯、或碳酸酯。

在一个优选的实施方案中，可水解部分为可水解的氨基甲酸酯、

酯或碳酸酯。

在另一个实施方案中，本发明的结合物具有以下结构：



其中 POLY 为水溶性聚合物，L_D 为可降解的键合，EI 为进入抑制剂，k 相当于 EI 上与独立聚合物片段(POLY-L_D)共价连接的活性部位数。每个聚合物片段(即，聚合物片段的单独组分)进行独立地选择，虽然优选共价连接于 EI 的每个聚合物片段都相同。通常，k 为约 1 到约 8，也就是说，k 选自 1、2、3、4、5、6、7 和 8。优选地，k 为 1、2、3 或 4，更优选 k 为 1。

在本发明的这方面和其它方面的优选实施方案中，水溶性聚合物为聚乙二醇。

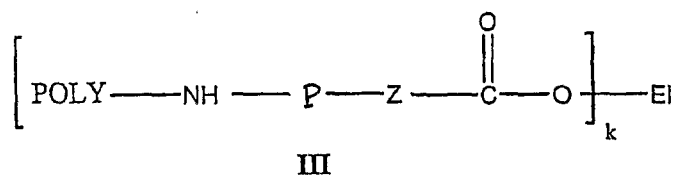
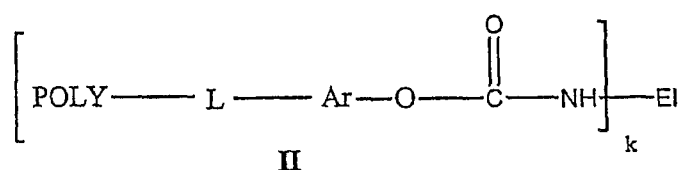
水溶性聚合物如聚乙二醇通常具有处于以下范围内的分子量：约 500 道尔顿到约 100,000 道尔顿、约 2,000 道尔顿到约 85,000 道尔顿、约 5,000 道尔顿到约 60,000 道尔顿、约 10,000 道尔顿到约 50,000 道尔顿、或约 15,000 道尔顿到约 40,000 道尔顿，并且可具有多种结构中的任一种(如，线型、支化、叉形、等等)。

本发明的结合物和组合物中使用的进入抑制剂包括例如 T-20、T-1249、PRO 542 (又名 CD4-IgG2)、PRO-140、PRO-367、SCH-417690、TXN-355、UK-427、UK-857、GSK-873、GSK-140、PA9、PA10、PA11、和 PA12。在具体的实施方案中，进入抑制剂为 T-20、T-1249、PRO 542、或 PRO-140。

在另外的实施方案中，如上述结构 I 中所示的聚合物片段所连接的 EI 活性部位独立地选自 N 末端、C 末端、氨基、羟基和巯羟基。

通常, L_D 具有例如约 1 到约 20 个原子、约 2 到约 15 个原子、或约 3 到约 10 个原子的长度。也就是说, L_D 通常具有选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、和 20 个原子的总原子长度。

本发明的又一个具体实施方案包括具有以下通用结构之一的结合物:

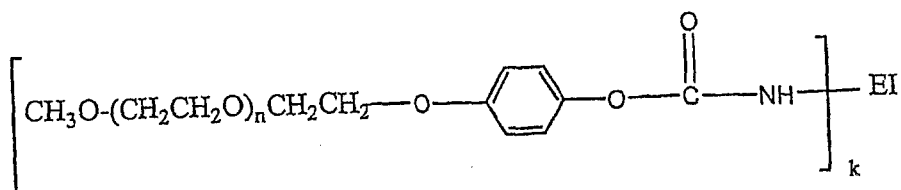


其中结构 II 中的 L 为 -O- 或 -NH-C(O)-, Ar 为芳基如邻位、间位、或对位取代的苯基、-NH- 为得自 EI 的氨基残基, 结构 III 中的 P 为间隔基, Z 为 -O-、-NH-、或 -CH₂-, 和 O 为 EI 的羟基残基。

在更具体的实施方案中, 在结构 III 中, 当合起来考虑 -NH-P-Z-C(O)- 时, P 为天然或非天然存在的氨基酸的残基。

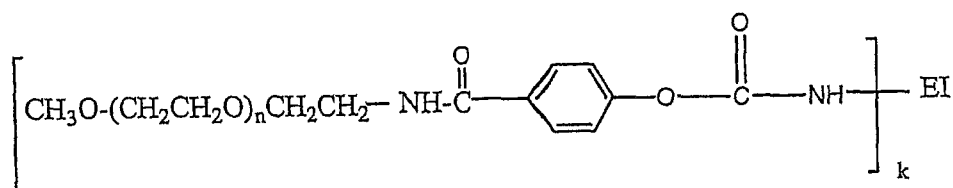
还构成本发明这个方面的一部分的是对应于结构 III 的结合物, 其中 “POLY-NH-” 相当于不存在 EI 部分的表 1 中的聚合物 1-1 到 1-40。

仍在又一个的实施方案中, 本发明的结合物的特征在于以下的结构:



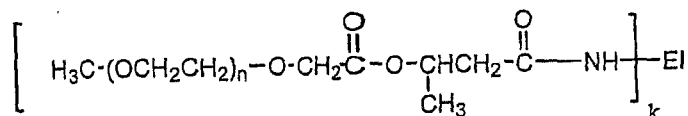
IV

或



V

或



VI

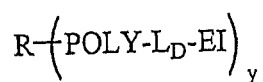
其中 n 为 2 到约 3400。

还构成本发明的一部分的是多臂型(multi-armed)水溶性聚合物的结合物。

在本发明这个方面的一个具体实施方案中，多臂型聚合物包括中心核心，从中心核心伸出至少三个通常为均聚或共聚形式的聚合物臂。

在本发明的多臂型聚合物的结合物的又一个实施方案中，各个聚合物臂包括这样的共聚物，该共聚物包括与中心核心共价连接的内部多肽片段和与所述多肽片段共价连接的外部亲水性聚合物片段。

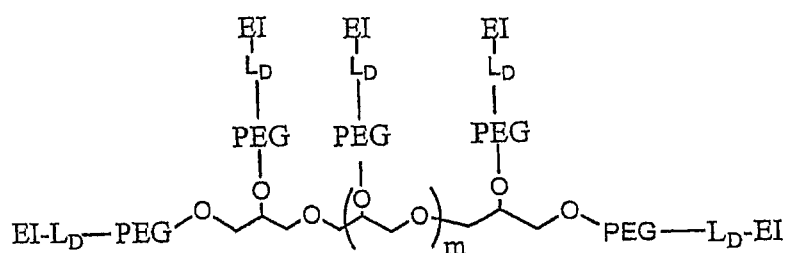
本发明这个方面的示例性结合物通常包括以下结构：



VII

其中 R 为核心分子, POLY 为水溶性聚合物, L_D 为可降解的键合, EI 为进入抑制剂, 和 y 为约 3 到 15。

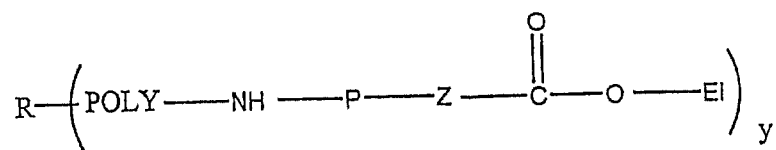
或者, 结合物可包括以下结构:



VIII

其中 m 选自 3、4、5、6、7 和 8。

仍在又一个和更具体的实施方案中, 这种类型的结合物可相当于以下结构:



IX

其中 P 为间隔基, Z 为 -O-、-NH-、或 -CH₂-, O 为得自 EI 的羟基残基。在优选实施方案中, 当合起来考虑 -NH-P-Z-C(O)- 时, P 为天然或非天然存在的氨基酸的残基。

在又一个方面, 本发明包括含多种单一聚物 EI 结合物的组合物, 这是指 EI 结合物各自具有一个聚合物试剂共价连接于 EI, 但是连接在 EI 上的不同活性部位或位置。

在本发明的另一个方面，将 EI 与水凝胶混合，水凝胶更优选为可水解降解的水凝胶，即，在生理条件下降解的那种。这种水凝胶可为交联的或非交联的。在优选实施方案中，水凝胶是包括进入抑制剂并且包括聚氧化烯烃作为凝胶组合之一的非可逆胶凝(non-reverse gelation)水凝胶。在具体的实施方案中，进入抑制剂为水溶性聚合物结合物形式。或者，进入抑制剂任选地共价连接于一种或多种凝胶组分。

还构成本发明的一部分的是生产聚合物结合物的方法。该方法包括在结合条件下使进入抑制剂与水溶性聚合物试剂接触以形成聚合物进入抑制剂结合物的步骤。优选这种结合物包括可降解的键合。

在又一个方面，提供了制备包括进入抑制剂的非可逆胶凝水凝胶的方法。这种方法包括在有效促进适当的水凝胶前体试剂胶凝的条件下使所述适当的水凝胶前体试剂彼此接触和与所述进入抑制剂接触，从而形成其中包埋有进入抑制剂的非可逆胶凝水凝胶的步骤。进入抑制剂为结合形式或非结合形式，并且水凝胶前体试剂不表现出可逆胶凝性质。

在本发明的又一个实施方案中，提供了包括与可药用赋形剂组合的本发明的结合物的组合物。所述组合物包括所有类型的制剂，特别是适合于注射的那些制剂，如可以重新构建的粉末、以及液体(如，悬浮液和溶液)。

在本发明另外的实施方案中，提供了抑制 HIV 感染的方法。在该方法中，将 EI-结合物或包括治疗有效量的这种结合物的药物组合物对感染 HIV-1 的主体或细胞给药。通常，给药 EI 结合物或组合物的步骤通过注射(如，肌肉内注射、静脉内注射、皮下注射等途径)进行。

本发明另外的目的、优点和新的特征在以下描述中阐述，并且其

在某种程度上对于阅读了以下描述的本领域技术人员来说是显而易见的，或者可通过实践本发明获悉。

附图说明

图 1 为得自实施例 1(第 4 泳道)和实施例 2(4:1 摩尔比)(第 3 泳道)的示例性结合物样品的 SDS-PAGE 电泳凝胶。第 2 泳道相当于游离的肽 T-1249，用作参考。第 1 泳道相当于 MARK 12 标准品。

图 2 为得自实施例 2(DMSO 溶剂系统)和实施例 3(混合的含水 DMSO 溶剂系统)的示例性结合物样品的 SDS-PAGE 电泳凝胶。第 1 泳道相当于 MARK 12 标准品。第 2 泳道相当于游离的肽 T1249；第 3 泳道相当于 1:1 摩尔比的 DMSO 反应物(实施例 2)；第 4 泳道相当于 1:2 摩尔比的 DMSO 反应物(实施例 2)；第 5 泳道相当于使用 4:1 摩尔比的水/DMSO 混合反应物(1:1)(实施例 3)。

图 3 说明实施例 3 的 1:1 摩尔比的结合物混合物的 HPLC 色谱。注射的样品为 1:1 摩尔比的水/DMSO 反应物，并且表现出类似于图 2 的第 3 泳道中所见的肽和产物分布。

图 4 相当于实施例 5A 中所述的纯化的单-PEG T1249 的 SDS-PAGE 电泳凝胶。第 1 泳道为标准品，第 2 泳道为单独的 T1249，第 3 和 4 泳道表示最终纯化的制剂的不同的载荷量；和

图 5 为表示使用共价连接于示例性的可降解 mPEG 试剂(mPEG-琥珀酰亚胺基苯基-碳酸酯，20 kDa)的模型肽制备的单 PEG 化结合物(实施例 5.D)的体外水解图。

发明的详细说明

定义

在详细地描述本发明之前，应该理解，本发明不限于具体的聚合物、水凝胶、合成技术、进入抑制剂等，因而可有变化，如从随后的描述和附图显而易见的。

需要指出的是，如本说明书和权利要求中所用的，单数形式“一”、

“一个”、和“该”包括复数对象，除非上下文清楚地表示不是这样。因此，例如，“聚合物”包括单个的聚合物以及两种或多种相同和不同的聚合物，“任选的赋形剂”是指单一的任选赋形剂以及两种或多种相同或不同的任选赋形剂，等等。

在描述和主张本发明时，以下术语以如下所述定义使用。

如本文中使用的，“PEG”、“聚乙二醇”和“聚(乙二醇)”可互换使用，是指包括任何水溶性聚(环氧乙烷)。通常，用于本发明的 PEG 包括以下结构 “ $-(OCH_2CH_2)_n-$ ”，其中 n 为 2 到约 4000。如本文中使用的，术语“PEG”也可指具体结构 “ $-CH_2CH_2-O(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-$ ” 或 “ $-(OCH_2CH_2)_nO-$ ”，取决于末端氧是否已经被替代。贯穿说明书和权利要求，应该记住，术语“PEG”包括具有多种末端或“封端”基团等的结构。术语“PEG”是指包含大多数(大于 50%)的 $-OCH_2CH_2-$ 重复亚单元的聚合物。对于具体的形式，PEG 可呈现多种不同的分子量、以及结构或几何学，如“支化”、“线型”、“叉形”、“多官能的”等，其在以下更具体地描述。

术语“封端的”和“末端封端的”在本文中可交换地使用，是指具有封端部分的聚合物末端或终端。通常，虽然不是必须地，封端部分包括羟基或 C_{1-20} 烷氧基或苄氧基，更优选 C_{1-10} 烷氧基，更优选 C_{1-5} 烷氧基。因此，封端部分的例子包括烷氧基(如，甲氧基、乙氧基和苄氧基)，以及芳基、杂芳基、环基、杂环基、等等。必须记住的是，封端部分可包括聚合物中末端单体的一个或多个原子[如， $CH_3(OCH_2CH_2)_n-$ 中的封端部分“甲氧基”]。另外，考虑了前述每一种的饱和的、不饱和的、被取代的和未被取代的形式。此外，封端基团也可作为硅烷。封端基团也可有利地包括可检测标记。当聚合物具有包括可检测标记的封端基团时，可通过使用适当的检测器测定聚合物和/或聚合物所结合的部分(如，活化剂)的量或位置。这种标记包括但不限于荧光剂、化学发光剂、用于酶标记的部分、比色(如，染料)标记、金

属离子、放射性部分、等等。适当的检测器包括光度计、薄膜、分光计等。封端基团也可有利地包括磷脂。当聚合物具有包括磷脂的封端基团时，其赋予聚合物和得到的结合物以独特的性质。示例性的磷脂包括但不限于选自被称作磷脂酰胆碱的磷脂类别的那些。具体的磷脂包括但不限于选自二月桂酰基磷脂酰胆碱、二油酰基磷脂酰胆碱、二棕榈酰基磷脂酰胆碱、二硬脂酰基磷脂酰胆碱、山俞酰基磷脂酰胆碱、花生四烯酰基磷脂酰胆碱、和卵磷脂的那些。

本文中关于聚合物所述的“非天然存在的”是指聚合物作为整体在自然界中完全没有发现过。然而，本发明的非天然存在的聚合物可包含一种或多种天然存在的单体或单体的片段，只要总的聚合物结构在自然界中没有发现过即可。

“水溶性聚合物”中的术语“水溶性”是指聚合物是在室温下可溶于水的任何聚合物。通常，水溶性聚合物将透射由经过滤之后的相同溶液所透射的光的至少约 75%、更优选至少约 95%。以重量计，优选水溶性聚合物以最少约 35%(重量)可溶于水，更优选以最少约 50%(重量)可溶于水，更优选以最少约 70%(重量)可溶于水，更优选以最少约 85%(重量)可溶于水。然而，更优选地，水溶性聚合物以约 95% (重量)可溶于水或完全可溶于水。

在本发明的水溶性聚合物的上下文中，分子量(如 PEG 的分子量)可表示为数均分子量或重均分子量。除非另有陈述，本文中关于分子量的所有描述都是指重均分子量。数均分子量和重均分子量的测定都使用凝胶渗透色谱法或其它液相色谱技术测量。也可使用其它的分子量值测定方法，如使用端基分析或测量依数性质(如，凝固点降低、沸点升高、或渗透压)测定数均分子量，或使用光散射技术、超速离心或粘度测定法测定重均分子量。本发明的聚合物通常为多分散性的(即，聚合物的数均分子量和重均分子量不相等)，具有较低的多分散性值，优选小于约 1.2，更优选小于约 1.15，更优选小于约 1.10，更优选小于

约 1.05，最优选小于约 1.03。

在本发明的连接基的描述中，总原子长度是指单个链的原子数，不算取代基。例如， $-\text{CH}_2-$ 算作是一个原子的总连接基长度， $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 算作是 3 个原子长度，非直链基团如苯基环算作是 4 个原子长度。

术语“活性的”或“活化的”在用于具体的官能团时，是指容易与另一个分子上的亲电体或亲核体反应的活性官能团。这与需要强催化剂或非常不实用的反应条件起反应的那些基团(即，“非活性的”或“惰性的”基团)相反。

如本文中使用的，术语“官能团”或其任何同义词是指包括其被保护的形式和未被保护的形式。

本文中使用的术语“键合”或“连接基”是指任选用于连接互相连接的部分如聚合物片段的末端与进入抑制剂(如，T-20 或 T-1249)的一个原子或多个原子的集合。连接基可具有水解稳定性，或者可以包括生理学可水解的或酶促可降解的键合。

“烷基”是指烃链，通常具有约 1 到 15 个原子的长度。这种烃链优选但非必须为饱和的，并且可为支链或直链，虽然通常优选为直链的。示例性的烷基包括甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、1-甲基丁基、1-乙基丙基、3-甲基戊基等。如本文中使用的，“烷基”包括环烷基以及含亚环烷基的烷基。

“低级烷基”是指包含 1 到 6 个碳原子的烷基，并且其可为直链或支链的，示例如甲基、乙基、正丁基、异丁基和叔丁基。

“环烷基”是指饱和或不饱和的环烃链，包括优选由 3 到约 12 个碳原子、更优选 3 到约 8 个碳原子构成的桥接、稠合、或螺环的环状

化合物。“亚环烷基”是指通过在环状系统中任二个碳结合于链而插入在烷基链中的环烷基。

“烷氧基”是指-O-R基团，其中R为烷基或被取代的烷基，优选为C₁₋₆烷基(如，甲氧基、乙氧基、丙氧基等)。

如“被取代的烷基”中的术语“被取代的”是指被一个或多个互不干扰的取代基取代的部分(如，烷基)，取代基例如但不限于：烷基；C₃₋₈环烷基，如环丙基、环丁基等；卤代，如氟代、氯代、溴代、和碘代；氰基；烷氧基、低级苯基；被取代的苯基；等等。“被取代的芳基”为具有一个或多个互不干扰的基团作为取代基的芳基。对于苯基环上的取代，取代基可为任何定位(即，邻位、间位、或对位)。

“互不干扰的取代基”是当存在于一个分子中时通常不与分子内包含的其它官能团反应的那些基团。

“芳基”是指各自具有5或6个核碳原子的一个或多个芳环。芳基包括多个芳基环，它们可为稠合形式如萘基，或未稠合形式如联苯基。芳基环也可与一个或多个环烃、杂芳基、或杂环稠合的或未稠合的形式。如本文中使用的，“芳基”包括杂芳基。

“杂芳基”是指包含一到四个杂原子的芳基，优选杂原子为硫、氧、或氮、或其组合。杂芳基环也可与一个或多个环烃、杂环基、芳基、或杂芳基稠合的或未稠合的形式。

“杂环”或“杂环基”是指有或者没有不饱和性或芳香性并且具有至少一个非碳环原子的含5-12个原子、优选5-7个原子的一个或多个环。优选的杂原子包括硫、氧和氮。

“被取代的杂芳基”为具有一个或多个互不干扰的基团作为取代

基的杂芳基。

“被取代的杂环”是指具有一个或多个由互不干扰的取代基形成的侧链的杂环。

“亲电体”和“亲电基团”是指离子或原子或多个原子的集合，其可为离子性的，并且具有亲电中心，即，能够与亲核试剂反应的追求电子的中心。

“亲核体”和“亲核基团”是指离子或原子或多个原子的集合，其可为离子性的，并且具有亲电中心，即，能够追求亲电中心或与亲电试剂反应的中心。

“生理学可裂解的”或“可水解的”或“可降解的”键为在生理条件下与水反应(即，被水解)的键。键在水中水解的趋势不仅取决于连接两个中心原子的键合的一般类型，而且取决于连接于这些中心原子的取代基。适当的水解不稳定键的或者弱键包括但不限于羧酸酯、磷酸酯、酐、缩醛、缩酮、酰氧基烷基醚、亚胺、原酸酯、肽和低聚核苷酸。在本发明的某些实施方案中，优选在 pH 8、25℃ 条件下的水解半衰期小于约 30 分钟的键，虽然这种优选不在任何情况下中具有限制性。

“可酶促降解的键合”是指容易被一种或多种酶降解的键合。

“水解稳定的”键合或键是指在水中基本上稳定的化学键，通常指共价键，其在延长的时段内在生理条件下不经历达到任何可觉察程度的水解。水解稳定的键合的例子包括但不限于以下：碳-碳键(如，在脂肪族链中)、醚、酰胺、氨基甲酸酯、等等。通常，水解稳定的键合是在生理条件下表现出每天低于约 1-2% 的水解速率的那些键合。典型的化学键的水解速率可以在大多数标准的化学教科书中找到。

“可药用的赋形剂或载体”是指可以任选包括在本发明的组合物中并且不对患者造成显著不利的毒理学作用的赋形剂。“药理学有效量”、“生理学有效量”和“治疗有效量”在本文中可交换地使用，是指提供理想的在血流或靶组织中的结合物(或相应的非结合的进入抑制剂)水平所需的进入抑制剂结合物或组合物(如，水凝胶)的量。精确的量取决于许多因素，如，具体的进入抑制剂、治疗组合物的组分和物理性质、目标患者群、单个患者的考虑、等等，并且可由本领域技术人员根据本文中提供的信息容易地决定。

关于聚合物的几何结构或整体结构所提及的“支化”是指具有从分支点伸出的至少两个聚合物“臂”的聚合物。支化聚合物可具有 2 个聚合物臂、3 个聚合物臂、4 个聚合物臂、6 个聚合物臂、8 个聚合物臂、或更多个聚合物臂。支化聚合物的子集为多臂型聚合物，也就是说，具有从中心核心伸出的至少 3 个臂的聚合物。

“分支点”是指包括一个或多个原子的分叉点，聚合物或连接基团在此从直链结构分开或分叉为一个或多个另外的聚合物臂。

术语“活性的”或“活化的”是指在常规的有机合成条件下容易地或以实用速率起反应的官能团。这与不反应或需要强催化剂或不实用的反应条件起反应的那些基团(即，“非活性的”或“惰性的”基团)相反。

“被保护的形式”中所提及的官能团是指代带有保护基的官能团。如本文中使用的，术语“官能团”或其任何同义词是指包括其被保护的形式。典型的保护基在 Greene, T.、Wuts, P. G., "Protective Groups in Organic Synthesis", 第三版, John Wiley & Sons, Inc., 1999 中描述。

“多官能的”是指具有至少三个官能团的聚合物，其中官能团可

相同或不同。本发明的多官能的聚合试剂通常在聚合物主链内包含约 3-100 个官能团，或 3-50 个官能团，或 3-25 个官能团，或 3-15 个官能团，或 3 到 10 个官能团，或包含 3、4、5、6、7、8、9 或 10 个官能团。

“进入抑制剂”为特定类别的抗逆转录病毒药物，它们靶向病毒感染靶细胞之前发生的 HIV 生命周期中的一个或多个步骤。具体地，它们是设计用于破坏 HIV-1 复制功能的化合物，最显著地，它们破坏 HIV-1 的细胞融合和进入。进入抑制剂包括融合抑制剂、连接抑制剂、和共受体抑制剂。所有的进入抑制剂通过阻断 HIV 成功进入并从而感染靶细胞的能力而起作用。通常，虽然不是必须地，本发明的进入抑制剂为肽或被修饰的肽，如杂交融合蛋白，或其它嵌合肽，其具有至少一个适合于与聚合物试剂反应的亲电基团或亲核基团。术语“进入抑制剂”或“EI”包括结合之前以及结合之后的进入抑制剂。

“水凝胶”为吸收溶剂(如，水)、经历迅速的膨胀而没有可觉察的溶解、并且维持能够可逆变形的三维网络的材料。水凝胶可为未交联的或交联的。亲水性聚合物如 PEG 的共价(化学)交联的网络可以形成水合状态的水凝胶。未交联的水凝胶通常为具有亲水区域和疏水区域的嵌段共聚物。由于由离子吸引、氢键合、范德华力等形成的物理交联力，这些未交联的物质可以在被置于水相环境中时形成水凝胶。由于疏水区域和亲水区域的存在，它们能够吸水而不溶解。

“基本上”或“本质上”是指接近全部或完全，例如某一给定量的至少 95%。

术语“患者”是指患有或倾向于患有可以通过给用本发明的活性剂(如，结合物)预防或治疗的状况的活生物体，包括人和动物。

“任选的”或“任选地”意思是随后描述的情况可能发生或可能

不发生，使得该描述包括其中该情况发生和不发生的情况。

肽中的氨基酸残基缩写为单个字母缩写形式或相应的氨基酸缩写如下：

F	Phe	苯丙氨酸
L	Leu	亮氨酸
I	Ile	异亮氨酸
M	Met	甲硫氨酸
V	Val	缬氨酸
S	Ser	丝氨酸
P	Pro	脯氨酸
T	Thr	苏氨酸
A	Ala	丙氨酸
Y	Tyr	酪氨酸
H	His	组氨酸
Q	Gln	谷氨酰胺
N	Asn	天冬酰胺
K	Lys	赖氨酸
D	Asp	天冬氨酸
E	Glu	谷氨酸
C	Cys	半胱氨酸
W	Trp	色氨酸
R	Arg	精氨酸
G	Gly	甘氨酸

综述：进入抑制剂的缓释释放聚合物组合物

如前所述，本发明提供用于 HIV 进入抑制剂化合物如 T-20、T-1249 及其它的缓释给药的组合物和方法。本文中描述的是用于在给药时延长短效进入抑制剂化合物(特别是那些肽基化合物)的半衰期同时还维持至少可测量的、更优选显著程度的它们的逆转录病毒活性的示例性

的聚合物、结合物和组合物。在某些情况中，优选具有一个或多个设计用于在体内释放结合物的聚合物部分的可水解键合的聚合物结合物，或可降解的水凝胶基组合物，如本文中更具体地描述的。特别是对于药物如进入抑制剂，由于聚合物连接的可降解性质，具有一个或多个可降解键合的结合物具有延长的循环半衰期和在体内表现出生物活性的优点，因为聚合物在水解时释放进入抑制剂。因此，在这种实施方案中，聚合物连接的大小和位置对 EI 防止 HIV 进入 T 细胞的能力的影响不具有特别的利害关系，因为所述分子的聚合物部分在身体内脱离(fall off)以释放进入抑制剂。

进入抑制剂

进入抑制剂

本发明的结合物和组合物包括至少一种抗 HIV 药物，优选为进入抑制剂。进入抑制剂在本文中在结构上统称为“EI”。优选用于本发明的进入抑制剂为肽基化合物，也就是说，包括至少三个邻接的氨基酸残基。这种 EI 包括 T-20、T-1249、PRO 542(又名 CD4-IgG2)、PRO-140、PRO-367、SCH-417690、TXN-355、UK-427、UK-857、GSK-873、和 GSK-140。

对于上述讨论到的第一个进入抑制剂 T-20，其是具有乙酰化 N-末端并且在其 C-末端具有羧酰胺基团的线型 36 个氨基酸的合成肽。T-20 的分子量为 4492。T-20 由天然存在的 L-氨基酸残基组成，并且具有以下表示为 SEQ ID NO:1 的主要的氨基酸序列：

SEQ ID NO:1. 乙酰基-Tyr-Thr-Ser-Leu-Ile-His-Ser-Leu-Ile-Glu-Glu-Ser-Gln-Asn-Gln-Gln-Glu-Lys-Asn-Glu-Gln-Glu-Leu-Leu-Glu-Leu-Asp-Lys-Trp-Ala-Ser-Leu-Trp-Asn-Trp-Phe-NH₂

使用氨基酸缩写，SEQ ID NO:1 可以替代地表示为：

SEQ ID NO:1. YTSLIHSLEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF。

T-20 通过抑制病毒与细胞膜的融合而干扰 HIV-1 进入细胞中。T-20 结合于病毒包膜糖蛋白的 gp41 亚单元中的第一个七肽重复区域 (HR1)，从而防止膜融合所需的构象变化。HR1 只有在 gp120 结合 CD4 之后才变为 T-20 可接近的。共受体结合被认为是诱导引起膜融合的最终构象变化。T-20 似乎在融合过程中结合于结构中间体，并且似乎具有极窄的其中将其自身插入到合并细胞中的动力学窗。由于其作用机理，本发明的一个实施方案中优选用于共价连接于融合抑制剂如 T-20 的低分子量聚合物，或者在替代性实施方案中，优选具有一个或多个可水解键合的聚合物，使得 T-20 对 gp41 的第一个螺旋区域(HR1) 的结合不被阻止，因为聚合物在体内水解时离开。

为了用于本发明，可将 T-20 多肽序列在其氨基或羧基末端的一端或两端进行封闭和/或衍生化，如美国专利 5,464,933 中所述的，或者可在一个或多个赖氨酸位置具有封闭基团，如，用于帮助位置选择性的聚合物连接，根据将聚合物连接于 EI 所采用的化学作用而定。T-20 的序列在 Lys18 和 Lys28 处包含赖氨酸，在本发明的某些实施方案中，优选其每个或两者用于水溶性聚合物的共价连接。

具体地，可将酪氨酸氨基末端用芳基封闭或衍生化，并且将苯丙氨酸的羧基末端用氨基封闭或衍生化。

考虑用于本发明的另外的类似 T-20 的序列包括 HIV-1_{LAI} gp41 蛋白质的氨基酸 638 到 673、及其片段、类似物、和同系物，如美国专利 5,464,933 中所述的，该文献被特别地并入本文作为参考。特别优选的

肽序列对应于如美国专利 5,464,933 中所述的 SEQ ID NO: 1、3、4、5、6 和 7，其分别相对于本文中的 SEQ ID No: 1 到 6。优选的水溶性聚合物连接位点包括赖氨酸的氨基、存在于酪氨酸、苏氨酸、或丝氨酸上的 N 末端、C 末端、羟基。

如上所述，用于本发明组合物中的另外的类似 T-20 的多肽包括：

SEQ ID NO:2 YTNTIYTLLEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF

SEQ ID NO:3 YTGITYNLLEESQNQQEKNEQELLELDKWANLWNWF

SEQ ID NO:4 YTSLIYSLLEKSQIQQEKNEQELLELDKWASLWNWF

SEQ ID NO:5 LEANISKSLEQAQIQQEKKNMYELQKLNSWDIFGNWF

SEQ ID NO:6 LEANISQSLEQAQIQQEKKNMYELQKLNSWDVFTNWL,

其中各个氨基酸残基以其单字母代码存在。

T-1249 表示用于本发明的结合物中的另一种进入抑制剂。与 T-20 相似，T-1249 也衍生自不同的逆转录病毒包膜(gp41)蛋白质序列，但是比 T-20 具有某些改善的药代动力学性质。T-1249 为杂交多肽，其包含连接于增强器肽序列的核心多肽序列。T-1249 具有 39 个氨基酸，并且结合于与 T-20 不同的 HIV gp41 区域。T-1249 的氨基酸序列在美国专利 6,656,906 的图 13B 中表示。T1249 表现出体内抗 HIV-1、HIV-2、和 SIV 隔离活性。

T1249 的多肽序列为：

SEQ ID NO. 7 WQEWEQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF。

从上述序列可以看出，N-末端氨基酸为色氨酸，C 末端氨基酸为苯丙氨酸。如美国专利 6,348,568 的表 1 中所述，(SEQ. ID NO. 1071)，可将 T-1249 序列在其氨基和羧基末端进行封闭和/或衍生化。例如，可用酰基将色氨酸末端封闭或衍生化，并用氨基将苯丙氨酸羧基末端封闭，从而形成酰胺官能度。T-1249 的序列在以下四个位置包含赖氨酸，根据所采用的聚合物试剂的类型而定，它们可适合于水溶性聚合物的共价连接(Lys7、Lys21、Lys28 和 Lys31)。

用于本发明的另外的示例性进入抑制剂序列(与 T-1249 的序列相似)在美国专利 6,656,906 中描述,其内容被特别地并入本文作为参考。特别优选的序列在美国专利 6,656,906 的图 13A-C 中表示。用于测定任一种上述杂交 gp-41 衍生化多肽序列的抗病毒活性、及其相应的聚合物结合物或组合物的活性的方法也在美国专利 6,656,906 中描述。

另一种优选的肽基进入抑制剂为 PRO-542,为将 CD4 受体的 HIV-结合区域与人抗体分子组合的杂交融合蛋白。PRO-542 通过结合于 gp 120 从而预防病毒对宿主细胞的连接而抵消 HIV。更具体地,PRO-542 为具有如美国专利 6,187,748 所述的氨基酸序列的 CD4-IgG2 嵌合杂四聚体,所述专利的内容被特别地并入本文作为参考。更具体地,PRO-542 由耦合于 IgG2 的轻链和重链恒定区的人 CD4 的 N 末端区域组成。PRO-542 被认为是连接抑制剂,并且在病毒进入过程的极早期起作用。试验如合胞体抑制试验和用于测定这种杂交融合蛋白的抗病毒性质的方法在美国专利 6,187,748 中描述,并且可由本领域技术人员采用,以类似地测定相应的聚合物结合物或组合物的抗病毒活性。发明的优选实施方案为其中水溶性聚合物如 PEG 通过以下更具体描述的可降解共价键合而共价连接于 PRO-542 或本文所述的其它抑制剂中的任一种的那些。

用于本发明的肽基进入抑制剂的另外的非限制性例子包括 CCR5 肽,包括其磺酸酯和非磺酸酯形式,如 PRO 140、和 PRO 367。磺酸化 CCR5 肽在美国专利申请公开 2003/0139571 中描述。

PRO 140 (以前称为 PA14)为小鼠免疫球蛋白 G1 人源化单克隆抗体,其分类为 CCR5 共受体抑制剂。PRO 140、和抗-CCR5 单克隆抗体结合于跨越 CCR5 上的多个胞外域的复合表位。其在不阻止 CC-趋化因子信号的浓度下有力地抑制 CCR5-介导的 HIV-1 进入到靶细胞即 CD4+ T 细胞和巨噬细胞上(Trkola, A.等人, Journal of Virology, January 2001,

Vol. 75, No. 2, 579-588)。PRO 140 的制备、分离、和纯化通常如 Olson, W. C.等人的 1999, J. Virol., 73:4145-4155 中所述进行。单克隆抗体, PRO 140, 也对应于 Olsen 等人在美国专利申请公开 2004/0228869 中所述的 ATCC 保藏号 HB-12610。

适合用于本发明的另外的单克隆抗体包括如 Olsen 等人在美国专利申请公开 2004/0228869 中所述的命名为 PA8 (ATCC 保藏号 HB-12605)、PA9 (ATCC 保藏号 HB-12606)、PA10 (ATCC 保藏号 HB-12607)、PA11(ATCC 保藏号 HB-12608)、和 PA12 (ATCC 保藏号 HB-12609)的抗体。这些抗体包括结合于趋化因子受体 5 (CCR5)表位的互补性决定区域(CDR)。CCR5 为趋化因子受体,其结合趋化因子的 C-C 组成员, 并且其氨基酸序列包括在 Genbank 保藏号 1705896 中提供的氨基酸序列。本发明的表位包括存在于 i) CCR5 的 N-末端、ii) CCR5 的三个细胞外环状区域之一、或 iii) (i)和(ii)的组合中的连续的氨基酸残基。

也可将至少保持一定程度的抗逆转录病毒活性的上述任一种的生物学活性片段、缺失变体、替代变体或加合变体用作本发明的 EI。本发明的 EI 可重组生产或使用本领域公知的合成方法生产。

如有必要,可有利地将本发明的 EI 进行修饰,以包括一个或多个氨基酸残基,诸如例如,赖氨酸、半胱氨酸和/或精氨酸,以提供聚合物对氨基酸侧链内原子的容易的连接。用于加合氨基酸残基的技术为本领域技术人员公知的。参见 J. March 的 *Advanced Organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure*, 第四版。

肽基 EI 上的用于共价连接水溶性聚合物的优选位置包括 N-末端或 C-末端; 赖氨酸的氨基; 存在于酪氨酸、苏氨酸、或丝氨酸上的羟基; 和半胱氨酸的巯基。

EI 的制备

上述进入抑制剂的任一种都可以使用一种或多种本领域中公知的通常用于合成和制备多肽的以下合成方法制备。例如，EI 可使用常规的逐步溶液或固相合成、片段缩合、F-MOC 或 T-BOC 化学合成，如 *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, William 等人编著，1997, CRC Press, Boca Raton Fla, 及其中引用的参考文献；和 *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, Atherson & Sheppard, Eds., 1989, IRL Press, Oxford, England；和 Sheppard, R. C. 等人, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, pp. 165-166 (1985)), 使用例如得自 Advanced Chemtech., Louisville, Ky. 的 Advanced Chemtech model 200、得自 Millipore, Bedford Mass. 的 Millipore 9050+、或其它可用的仪器。

或者，本发明的 EI 化合物可通过将 cDNA 编码序列结合在功能性病毒或循环质粒 DNA 载体中重组生产。然后使用载体或质粒用于转染或转化选择的微生物。将经转化或转染的微生物在有益于表达携带载体的 DNA 序列的条件下培养，然后从生长培养基分离所需的肽。参见例如美国专利 5,955,422。可使用的载体包括得自重组噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 的包那些。例如，可使用质粒载体如 pcDNA3、pBR322、pUC 19/18、pUC 118、119 和 M13 mp 系列的载体。噬菌体载体包括 λ gt10、 λ gt11、 λ gt18-23、 λ ZAP/R 和 EMBL 系列的噬菌体载体。可利用的粘粒载体包括但不限于 pJB8、pCV 103、pCV 107、pCV 108、pTM、pMCS、和 pNNI。

也可使用的重组病毒载体包括得自疱疹病毒、逆转录病毒、牛痘病毒、腺病毒、或杆状病毒的那些。

本发明的 EI 化合物也可使用本领域中公知的标准重组 DNA 技术制备，如在 Sambrook 等人的 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版, ((Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y.)或在 Ausubel 等人的 *Current Protocols in Molecular Biology* 中所述的那些，

其两者都被并入本文作为参考。制备 T-1249 和 T-20 的说明性方法在美国专利 6,767,993、美国专利 6,015,881(T-20)、美国专利 6,258,782(T-1249) 和美国专利 6,348,568(T-1249) 中描述。

在裂解和脱保护之后，多肽 EI 可通过例如离子交换色谱法、凝胶电泳、亲和色谱法、尺寸排阻色谱法、沉淀等纯化。或者，可采用正相或反相 HPLC 用于从较小片段纯化/分离出全长多肽。

进入抑制剂的氨基酸序列可以使用标准氨基酸分析、以及使用例如自动氨基酸序列分析仪(例如由 Applied Biosystems 制造的那些)进行手动或自动的 Edman 降解和各个氨基酸的测定进行证实和鉴定。适当的自动化序列分析仪包括 Applied Biosystems 476A Protein Sequencer 或 the Procise 494 Protein Sequencer。两种分析仪都使用标准气相或脉冲液体 Edman 降解化学作用。也可使用 HPLC 分析或质谱法证实给出的 EI 的同一性。

如 Olsen, W. C.等人的 J. of Virol., May 1999, p. 4145-4155, Vol. 73, No. 5 和美国专利申请公开 2004/0228869 中所述制备人源化单克隆抗体如 PRO 140、PA 8、PA 9、PA 10、PA 11 或 PA 12。简而言之，例如这些单克隆抗体可使用与人源化抗体生产用技术组合的标准杂交瘤技术从鼠科 L1.2-CCR5⁺细胞制备(Wu, L.等人, Nature, 384:179-183, 1996)。描述如何生产人源化抗体的说明性的出版物包括美国专利 4,816,567、美国专利 5,225,539、美国专利 5,585,089、美国专利 5,693,761、和 WO 90/07861。

PRO-542, CD4-IgG2 嵌合杂四聚体，可使用在美国专利 6,451,313 中所述的技术和表达载体制备。

另外的进入抑制剂如硫酸化 CCR4 肽如美国专利申请公开 2003/0139571 中所述制备。

聚合物

如前所述,本发明的一个方面涉及 EI 如 T-20 或 T-1249 等(如上所述)与水溶性聚合物(在本文中通常简称为 POLY)连接的结合物。对于水溶性聚合物,水溶性聚合物为非肽类的、无毒的、非天然存在的和生物相容的。如果在生命组织方面结合使用单独物质或该物质与另一种物质(如,活化剂如进入抑制剂)(如,对患者给药)产生的有益效果胜过由临床医师如医生评价的任何有害影响,则认为该物质为生物相容的。对于非免疫原性,如果某物质在体内的预定使用没有产生不期望的免疫反应(如,抗体形成),或者如果产生了免疫反应但是这种反应不被临床医师评价为具有临床显著性或重要性,则认为该物质为非免疫原性的。特别优选的是本发明的水溶性聚合物既是生物相容的又是非免疫原性的。

这种聚合物的例子包括但不限于聚(烷撑二醇)如聚乙二醇(PEG)、聚(丙二醇) (“PPG”)、乙二醇和丙二醇的共聚物等;聚(乙氧基化的多元醇)、聚(烯醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(羟烷基甲基丙烯酰胺)、聚(羟烷基丙烯酸酯)、聚(糖)、聚(α -羟酸)、聚(乙烯醇)、聚磷腈、聚噁唑啉、聚(N-丙烯酰基吗啉)、和上述任意的组合。本发明的聚合物可为由前述聚合物的任何单体形成的均聚物、交替共聚物、无规共聚物、嵌段共聚物、交替三聚体、无规三聚体、或嵌段三聚体。优选地,聚合物为如聚乙二醇的共聚物,或者,更优选地,为其均聚物。虽然本文中的大部分讨论集中在将 PEG 作为说明性的水溶性聚合物,但是本文提供的讨论和结构意在包括任何上述的水溶性聚合物。更具体地,对于表示作为水溶性聚合物的“PEG”的示例性结构和图,术语“PEG”还指被本文中所述的任何替代性水溶性聚合物代替,使得本文中提供的结构和图明确地延伸到这种替代性的水溶性聚合物。

在结合于 EI 之前,聚合物本身通常表征为具有 2 到约 300 个末端,更优选地,具有约 2 到约 25 个末端,更优选地,具有 2、3、4、5、6、

7、8、9、或 10 个末端。

聚合物不限于具体的结构，并且可为线型(如，封端 PEG 或线型双官能 PEG)、支化或多臂型。通常，在与 EI 结合之前，用适合于偶联到 EI 上所需位置的适当的活化基团将 PEG 和其它水溶性聚合物活化。代表性的聚合物试剂和用于将这些聚合物结合于活性部分的方法为本领域中已知的，并且进一步在 Zalipsky, S.等人的"Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides" in Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J. M. Harris, Plenus Press, New York (1992)中；在 Zalipsky (1995) Advanced Drug Reviews 16:157-182 中；在 Roberts, M.等人的"Chemistry for Peptide and Protein PEGylation", Advanced Drug Delivery Reviews 54 (2002):459-476 中；和在 "Nektar Advanced PEGylation: Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation", Catalog 2004 中描述。

通常，结合物中的非肽水溶性聚合物的重均分子量为约 100 道尔顿到约 150,000 道尔顿。然而，示例性的范围包括约 500 道尔顿到约 100,000 道尔顿、约 2,000 道尔顿到约 90,000 道尔顿、约 5,000 道尔顿到约 85,000 道尔顿、约 10,000 道尔顿到约 50,000 道尔顿、或约 15,000 道尔顿到约 40,000 道尔顿的重均分子量。

当通过可水解键合共价连接于 EI 时，优选更高分子量的聚合物，如，分子量大于约 20,000 道尔顿或更高、或 30,000 道尔顿或更高、或 40,000 道尔顿或更高、或 50,000 道尔顿或更高。在一个实施方案中，优选使用高分子量和/或支化的可降解聚合物，因为由于对多肽基 EI 的空间限制，有可能只将一个或两个高分子聚合物分子连接于 EI。这样，有利于形成可水解的单聚合物结合物(即，只有一个聚合物分子共价连接于 EI)或二聚合物结合物。这可有利地得到较高的收率，以及更洁净的结合物合成和随后的分离、纯化、和表征，由于没有形成多种结合物物质，虽然不同的 PEG-基体(其中活化剂共价结合有 1-、2-、3-或更

多个聚合物链的结合物)可如以下更具体描述是可分离的。此外,当考虑结合物在体内的作用时,单聚合物结合物的水解特别有利,因为只涉及单一的水解反应,即,有效水解以释放 EI 和聚合物,其与其中聚合物或药物的释放伴随有多个水解步骤所涉及的动力学和中间体物质的聚合物对 EI 上的多个活性部位或者多个 EI 药物共价连接于多臂型聚合物的可降解的共价连接相反。虽然使用可降解的更大分子量的聚合物可以在某些情况中提供优于替代性的结合物结构或结构的某些优点,但并不是说替代性的实施方案如使用单个或多个结合于 EI 的较小聚合物,或如本文中描述的其它另外的实施方案,没有各自的有关优点,如本文以下更详细描述。

水溶性聚合物片段的示例性重均分子量包括约 100 道尔顿、约 200 道尔顿、约 300 道尔顿、约 400 道尔顿、约 500 道尔顿、约 600 道尔顿、约 700 道尔顿、约 750 道尔顿、约 800 道尔顿、约 900 道尔顿、约 1,000 道尔顿、约 2,000 道尔顿、约 2,200 道尔顿、约 2,500 道尔顿、约 3,000 道尔顿、约 4,000 道尔顿、约 4,400 道尔顿、约 5,000 道尔顿、约 6,000 道尔顿、约 7,000 道尔顿、约 7,500 道尔顿、约 8,000 道尔顿、约 9,000 道尔顿、约 10,000 道尔顿、约 11,000 道尔顿、约 12,000 道尔顿、约 13,000 道尔顿、约 14,000 道尔顿、约 15,000 道尔顿、约 20,000 道尔顿、约 22,500 道尔顿、约 25,000 道尔顿、约 30,000 道尔顿、约 35,000 道尔顿、约 40,000 道尔顿、约 45,000 道尔顿、约 50,000 道尔顿、约 55,000 道尔顿、约 60,000 道尔顿、约 65,000 道尔顿、约 70,000 道尔顿、和约 75,000 道尔顿。也可使用具有上述任何的总分子量的水溶性聚合物的支链或其它多臂型形式(如,具有两个 20,000 道尔顿聚合物“臂”的支化的 40,000 道尔顿的水溶性聚合物)。

在其中聚合物为 PEG 的情况中,PEG 通常包括许多(OCH_2CH_2)单体。如贯穿说明书中所用的,重复单元数目由“ $(\text{OCH}_2\text{C}_2)_n$ ”中的下标“n”确定。因此,n 的值通常落入一个或多个以下范围:2 到约 3400、约 100 到约 2,300、约 100 到约 2,270、约 136 到约 2,050、约 225 到约

1,930、约 450 到约 1,930、约 1,200 到约 1,930、约 568 到约 2727、约 660 到约 2730、约 795 到约 2730、约 909 到约 2730、和约 1,200 到约 1,900。对于其中分子量已知的任何给定聚合物，有可能通过用聚合物的总分子量除以重复单元的分子量测定重复单元的数目(即，“n”)。

用于本发明的特别优选的聚合物为封端聚合物，即，具有至少一个末端被相对惰性的基团如 C_{1-6} 烷氧基或苄氧基封端的聚合物，虽然也可使用羟基。当聚合物为例如 PEG 时，在许多情况中优选使用甲氧基-PEG (通常称为 mPEG)，其为 PEG 的一种形式，通常为线型，其中聚合物的一个末端为甲氧基($-OCH_3$)，而另一个末端为可以任选进行化学修饰的羟基或其它官能团，

mPEG 的结构如下。

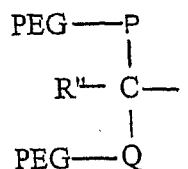
$CH_3O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-$ ，其中 n 的值如上所述。

或者，不是被封端，聚合物反应物(和相应的产物)可具有哑铃样或双官能的线型结构，使得得到的结合物为其中 EI 通过中心的线型 POLY 如 PEG 互相连接的那种。更具体地，在一个实施方案，这种结合物表示为结构 EI-PEG-EI，其中 EI 可相同或不同。也就是，各个独立的 EI 选自：T-20、T-1249、PRO 542、PRO-140、PA 8、PA 9、PA 10、PA 11、PA 12、PRO-367、SCH-417690、TXN-355、UK-427、UK-857、GSK-873、和 GSK-140。优选地，本发明的结合物为其中聚合物 POLY 共价连接于选自 T-20、T-1249、PRO-542 和 PRO-140 的 EI 的那种。在其中联合治疗是有利的情况中，例如，当联合治疗用于预防 HIV-抗药性时，或当存在协同效应时，包括共价连接于聚合物的两种不同的 EI 药物的结合物为优选实施方案。例如，T-20 与 PRO 542 和 PRO 140 组合，其协同起作用以阻断健康细胞的感染(4th Annual Fortis Bank Biotechnology Conference, London, May 4, 2004)。因此，本发明这一方面的示例性实施方案包括具有 T-20 和 PRO-542 连接于相对的末端、或 T-20 和

PRO-140 连接于相对的末端、或 PRO-542 和 PRO 140 连接于相对的末端的哑铃聚合物结构，而第三种 EI 简单地与其共同给药。在又一个实施方案中，采用三臂型聚合物结构，三个 EI 药物各自共价连接于每个聚合物臂。在又一个实施方案中，本发明的结合物具有哑铃结构，T-20 在一个聚合物末端，T-1249 在在另一末端。在又一个实施方案中，线型双官能结合物具有结构 EI-POLY-A，其中 A 在广义上表示适合连接于另一个部分的官能团。优选地，A 为逆转录病毒药物，最优选地，为与 EI 协同起作用的抗 HIV 药物。

用于本发明的聚合物可具有 2 个臂、3 个臂、4 个臂、5 个臂、6 个臂、7 个臂、8 个臂、或更多个臂。多臂型聚合物可用于形成结合物，或者可用于形成水凝胶，并且可具有大约 2 到 300 个活性末端。

在本发明的一个实施方案中，优选具有 2 或 3 个聚合物臂的支化聚合物片段。如美国专利 5,932,462 中所述的说明性的支化 POLY 相当于以下结构：

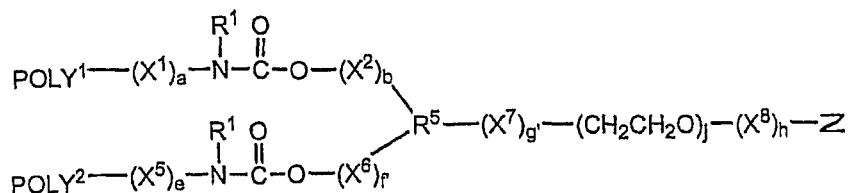


在这种表现形式中，R'' 为非活性部分，如 H、甲基或 PEG，P 和 Q 为非活性键合。在上述具体的支化结构中，支化聚合物片段具有从“C”分支点伸出的单个活性部位用于 EI 的定位，任选地通过可任选包括可降解键合的连接基。

在说明性的实施方案中，支化 PEG 聚合物片段为具有单个用于共价连接 EI 的连接位点的甲氧基聚(乙二醇)二取代的赖氨酸。取决于 EI 上的连接位点，可将二取代赖氨酸的活性酯基进一步修饰或活化，以形成适合于与 EI 药物上的目标基团反应的官能团。

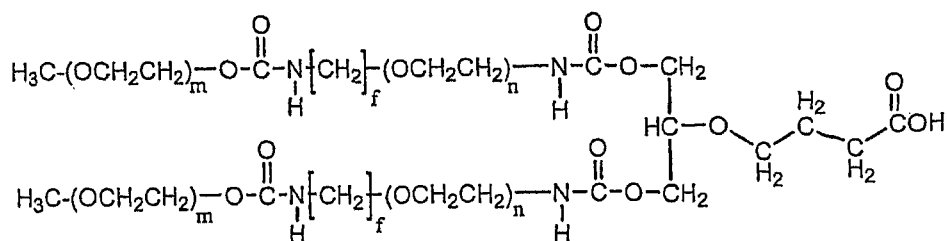
用于本发明的具有上述通用结构的支化 PEG 通常具有少于 4 个 PEG 臂, 更优选地, 具有 2 或 3 个 PEG 臂。这种支化 PEG 提供具有单个活性部位、以比它们的线型 PEG 对应物具有更大更密集的聚合物密度(cloud)偶联的优点。支化 PEG-EI 结合物的一个具体类型相当于以下结构: (MeO-PEG)-iG-, 其中 i 等于 2 或 3, G 为具有适合连接 EI 的位点的赖氨酸或其它适当的氨基酸残基。

用于本发明的另外的支化 PEG 包括在国际专利申请公开 WO 2005/000360 中描述的那些。例如，用于制备 EI 结合物的另外的支化聚合物具有以下结构：



其中 POLY¹ 为水溶性聚合物；POLY² 为水溶性聚合物；(a) 为 0、1、2 或 3；(b) 为 0、1、2 或 3；(c) 为 0、1、2 或 3；(d) 为 0、1、2 或 3；(e) 为 0、1、2 或 3；(f) 为 0、1、2 或 3；(g) 为 0、1、2 或 3；(h) 为 0、1、2 或 3；(i) 为 0、1、2 或 3；(j) 为 0 到 20；每个 R¹ 独立地为 H 或选自烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、取代炔基、芳基和取代芳基的有机基；X¹，在存在时，为第一间隔基部分；X²，在存在时，为第二间隔基部分；X³，在存在时，为第三间隔基部分；X⁴，在存在时，为第四间隔基部分；X⁵，在存在时，为第五间隔基部分；X⁶，在存在时，为第六间隔基部分；X⁷，在存在时，为第七间隔基部分；X⁸，在存在时，为第八间隔基部分；R⁵ 为支化不过软基；和 Z 为用于连接 EI 的活性基团，任选地通过插入间隔基进行连接。优选地，前述支化聚合物结构中的 POLY¹ 和 POLY² 为相同的，即，具有相同的聚合物类型(结构)和分子量。

属于上述分类、适用于本发明的代表性的支化聚合物为：



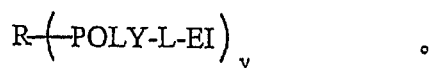
其中(m)为 2 到 4000, (f)为 0 到 6, 和(n)为 0 到 20。

用于制备本发明的结合物或水凝胶的支化聚合物另外包括一般地由式 $R(\text{POLY})_y$ 表示的那些, 其中 R 为伸出至少两个 POLY 臂如 PEG 的中心或核心分子。变量 y 表示 POLY 臂的数目, 其中每个聚合物臂可以独立地被封端或在其末端具有活性官能团。本发明这一实施方案的更清楚的结构为结构 $R(\text{POLY-Z})_y$, 其中各个 Z 独立地为封端基团, 或活性基团, 如适合与交联剂或与 EI 反应的活性基团。在其中当 Z 为活性基团的又一个实施方案中, 在与例如交联剂或 EI 反应时, 产生的键合可为水解稳定的, 或者可为可降解, 即, 可水解的。通常, 至少一个聚合物臂具有适合与 EI 反应的末端官能团。上述的支化 PEG, 如式 $R(\text{PEG})_y$ 表示的那些, 具有 2 个聚合物臂到约 300 个聚合物臂(即, y 为 2 到约 300)。优选地, 这种支化 PEG 具有 2 到约 25 个聚合物臂, 更优选 2 到约 20 个聚合物臂, 更优选 2 到约 15 个聚合物臂, 或 3 到约 15 个聚合物臂, 或更少。最优选的是具有 3、4、5、6、7 或 8 个臂的多臂型聚合物。

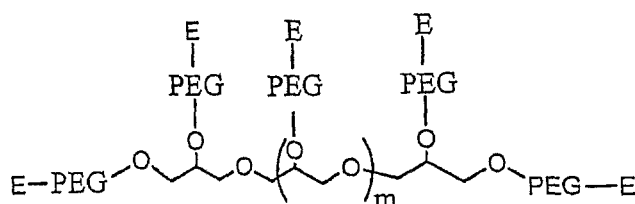
上述支化 PEG 中优选的核心分子为多元醇, 然后将其进一步官能化。这种多元醇包括具有 1 到 10 个碳原子和 1 到 10 个羟基的脂肪族多元醇, 包括乙二醇、链烷二醇、烷基二醇、烷叉烷基二醇、烷基环烷烃二醇、1,5-十氢化萘二醇、4,8-双(羟甲基)三环癸烷、亚环烷基(cycloalkylidene)二醇、二羟基烷、三羟基烷、等等。也可采用环脂族多元醇, 包括直链或闭环的糖和糖醇, 如甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇、木糖醇、白雀木醇、苏糖醇、阿糖醇、赤藓糖醇、福寿糖醇、半乳糖醇、岩藻糖(fucose)、核糖、阿拉伯糖、木糖、来苏糖、鼠李糖、半乳

糖、葡萄糖、果糖、山梨糖、甘露糖、吡喃糖、阿卓糖、塔罗糖、万寿菊糖 (tagitose)、吡喃糖苷、蔗糖、乳糖、麦芽糖、等等。另外的脂肪族多元醇包括甘油醛、葡萄糖、核糖、甘露糖、半乳糖的衍生物, 和相关的立体异构体。可使用的其它核心多元醇包括冠醚、环糊精、糊精、和其它碳水化合物如淀粉和直链淀粉。优选的多元醇包括甘油、季戊四醇、山梨糖醇、和三羟甲基丙烷。

相当于本发明的多臂型聚合物结合物的代表性的多臂型结构显示如下, 其中优选 y 为约 3 到约 8, R 的定义同上, L 为将各个聚合物臂共价连接于 EI 的连接基, 任选通过可水解键合连接。如以下在连接基部分中更详细描述, 虽然多种键合中的任一种都可以用于将聚合物或聚合物臂共价连接于 EI , 但是在某些情况中, 优选键合为可降解的, 在本文中称为 L_D , 即包含至少一个可在生理条件下水解的键或部分, 如酯、可水解的氨基甲酸酯、碳酸酯、或其它这种基团。



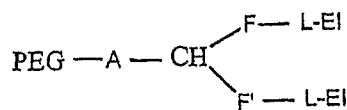
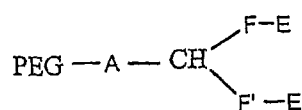
用于形成本发明的多臂型 EI -结合物或水凝胶的另外的多臂型聚合物包括得自 Nektar (Huntsville, Alabama) 的多臂型 PEG。用于本发明方法的优选的多臂型活化聚合物相当于以下结构, 其中 E 表示适用于连接 EI 的活性基团。在一个实施方案中, 优选 E 为 $-OH$ (用于与羧基或等价物反应)、羧酸或等价物、或碳酸(用于与 $EI-OH$ 基团反应)、或氨基(用于与 C 末端反应)。



PEG 为 $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2-$, m 选自 3、4、5、6、7 和 8。当然, 相应的 EI 聚合物结合物产物具有不同之处在于活性基团 E 被 “ $-L-EI$ ” 代替的以上所示的结构, 其中 L 表示由 E 与 EI 上的活性基团反应形成

的键合。如前所述,在某些实施方案中,优选的键合为酯、羧基和可水解的氨基甲酸酯,使得结合物的聚合物部分在体内水解以释放 EI 和聚合物。在这种情况下,连接基 L 命名为 L_D 。

或者,聚合物结合物可具有总的叉形结构。叉形 PEG 的例子相当于以下通用结构,其中第一个结构表示活化的叉形 PEG,第二个结构表示叉形 EI 聚合物结合物:



其中 PEG 为本文中所述的任何 PEG 形式, E 为适用于与 EI 共价结合的活性基团, A 为连接基团,优选为水解稳定的键合如氧、硫、或 $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$, F 和 F' 为任选存在的水解稳定的间隔基, L 定义同上。在优选实施方案中,连接基 L 包含至少一个可水解的官能团。在右面的结合物结构中, EI 可相同或不同。如前述实施方案中,虽然没有明确地表示,但是也考虑了其中一个 EI 被另一种逆转录病毒药物或抗 HIV 药物代替的叉形结构。对应于 A、F 和 F' 的示例性的连接基和间隔基在美国专利 6,362,254 中描述,并且可用于形成本发明的聚合物结合物。F 和 F' 为可相同或不同的间隔基。在上述的一个具体的实施方案中, PEG 为 mPEG, A 相当于 $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$, F 和 F' 都是亚甲基或 $-\text{CH}_2-$ 。这类聚合物片段可用于与两个活化剂反应,其中两个活化剂以精确的或预定的距离间隔定位,根据 F 和 F' 的选择而定。

在本文中提供的任何代表性结构中,可另外地在聚合物片段 POLY 中包含一个或多个可降解键合,以允许在体内产生具有比在最初给药的结合物中产生的更小的 PEG 链的结合物。适当的生理学可裂解的键合包括但不限于酯、碳酸酯、氨基甲酸酯、硫酸酯、磷酸盐、酰氧基烷基醚、缩醛和缩酮。当包含在给定的聚合物片段中时,优选这种键合在储存和当最初给药时为稳定的。

更具体地，如上所述，由可水解键合连接的两个或多个聚合物片段可由以下结构表示：PEG1-W-PEG2 (其中 PEG1 和 PEG2 可相同或不同)，W 表示弱的可水解键合。这些聚合物结构包含可在体内去掉(即，可裂解的)的 PEG 片段，如美国专利申请公开 US 2002/0082345 中具体公开的。

用于制备本发明的结合物的 PEG 聚合物可以包括沿着 PEG 的长度而不是在 PEG 链的端部共价连接的具有活性基团如羧基的侧基 PEG 分子。侧基活性基团可直接或通过间隔基部分如亚烷基连接于 PEG。

用于制备本发明的结合物的具有线型或支化结构的另外的代表性 PEG 可购自 Nektar Therapeutics (原来的 Shearwater Corporation, Huntsville, Alabama)。说明性的结构在 Nektar 的 2004 目录中描述，其内容被特别地并入本文作为参考。

不仅可用作聚合物主链内的可降解键合，而且在本发明的情况中优选用于将聚合物共价连接于 EI 的水解可降解键合包括：碳酸酯；由例如胺和醛的反应产生的亚胺(参见例如，Ouchi 等人(1997) Polymer Preprints, 38 (1):582-3)；通过例如醇与磷酸基反应形成的磷酸酯；通过例如酰肼和醛的反应形成的腙；通过例如醛和醇反应形成的缩醛；通过例如甲酸酯和醇之间的反应形成的原酸酯；和某些尿烷键合。

用于本发明的另外的 PEG 试剂包括可水解的 PEG 和连接基，如在国际专利申请公开 WO 04/089280 中描述的那些。在利用这种方法时，将本文中所述的 EI 内的一个或多个游离的官能团如氨基、羟基、巯基、磷酸酯和/或羧基用对温和的碱性条件敏感的基团如 9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或 2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)衍生化，即共价连接于聚合物片段如 PEG 部分。在得到的结合物中，EI 和聚合物各自共价连接于 Fmoc 或 FMS 支架(scaffold)结构的不同位置，并且能够在生理条件下释放。

聚合物结合物的这种任选的特征，即，将一个或多个可降解键合引入到聚合体链中，可提供对当结合物给药时最终的理想药理学性质的另外的控制。例如，可以给药大的和相对非活性的结合物(即，具有一个或多个高分子量 PEG 链连接于其上，例如分子量大于约 10,000 的一个或多个 PEG 链，其中结合物基本上没有活性或具有微不足道的生物活性)，其水解以产生具有一部分初始 PEG 链的生物活性 EI 结合物。或者，如果使用可降解键合将 EI 共价连接于聚合物，水解引起最初的 EI 离开聚合物片段，或者聚合物片段的水解留下具有短标签部分的被修饰的 EI 药物，其中被修饰的 EI 仍保留其 HIV-进入抑制剂的性质。这样，可以更有效地调节结合物的性质，以平衡给药时的结合物的药理学性质。

本领域技术人员应该认识到，主要涉及基本上为水溶性聚合物片段的以上所述在任何意义上都不是详尽的，而只是说明性的，本发明考虑了具有上述性质的所有的聚合物材料。如本文中使用的，术语“聚合物试剂”泛指完整的分子，其可以包括水溶性聚合物片段和官能团。

键合和示例性的 EI 结合物

如上所述，本发明的结合物包括共价连接于 EI 的水溶性聚合物 POLY。通常，对于任何已知的结合物，由一到约四个水溶性聚合物共价连接于 EI，其中聚合物可具有本文中所述的任何形式。在优选实施方案中，EI 具有共价连接于其上的 1 或 2 个聚合物。

将 EI 共价连接于聚合物的具体的键合取决于许多因素。这些因素包括例如缩采用的具体的键合化学、具体的 EI、EI 内用于共价连接的可用的官能团、EI 内可能任选需要保护基的其它活性官能团的潜在存在、等等。

虽然不是必要地，但是本发明的结合物可为前药，其意思指聚合物和 EI 之间的键合为水解可降解的，以允许释放 EI 部分。这种键合可

以通过用本领域中通常采用的偶联方法结合本申请的教导适当修饰肽基 EI(如,蛋白质的羧基 C 末端或蛋白质内包含的氨基酸如丝氨酸或苏氨酸的侧链羟基)和/或聚合物试剂容易地制备。然而,最优选的是通过适当活化的聚合物与 EI 内包含的未被修饰的官能团的反应形成的可水解键合,任选通过插入连接基。

或者,也可采用水解稳定的键合,如酰胺、尿烷(又名氨基甲酸酯)、胺、硫醚(又名硫化物)、或脲(又名碳酰二胺)键合作为用于连接 EI 的键合。优选的水解稳定的键合为酰胺。

结合物(与未结合的 EI 相反)可能具有或可能不具有可测量程度的逆转录病毒活性,取决于聚合物是否通过可降解的或水解稳定的连接基共价连接。也就是说,本发明的聚合物结合物无论何时将具有未被修饰的母体 EI 的从约 0.1%到约 100%或更高的抗 HIV 活性。优选地,具有很少活性或没有活性的结合物包含将聚合物连接于 EI 的可水解键合,使得尽管结合物没有活性,但是在水诱导可水解键合裂解时释放活性 EI (或其衍生物)。

对于具有将 EI 与聚合物连接的水解稳定性键合的结合物,结合物通常具有可测量程度的抗病毒活性。例如,当在例如本领域中公知的适当的模型中测量时,这种聚合物结合物通常的特征为具有相对于未被修饰的母体 EI 为至少约 2%、5%、10%、15%、25%、30%、40%、50%、60%、80%、85%、90%、95%、97%、100%或更高的活性。优选地,具有水解稳定性键合(如,酰胺键)的结合物具有至少某种程度的未被修饰的母体 EI 的生物活性。

现在描述本发明的示例性的聚合物结合物。

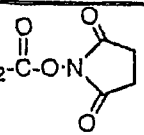
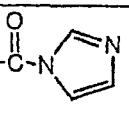
有许多可用于与包含在 EI 内的活性氨基形成共价键合的适当的水溶性聚合物试剂的例子。具体的例子以及相应的结合物在以下表 1 中

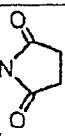
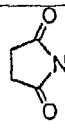
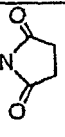
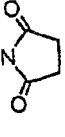
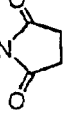
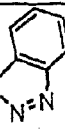
提供。在表中，变量(n)表示重复的单体单元的数目，“-NH-EI”表示结合于水溶性聚合物之后的EI，其中“NH-”表示EI上的氨基。虽然表1中的各个聚合物部分以“CH₃”基团结束，但是可以将其替换为其它基团(如H、乙基和苄基)。此外，虽然本文中的表格一般表示连接于EI药物的单个聚合物试剂，但是这只是用于说明性的目的。应该理解，给出的聚合物试剂可共价连接于EI上的多个位点，根据所采用的活性基团、合成策略、聚合物的大小、等等而定。为了简化起见，以下表中的说明性结构表示共价连接于EI上一个位点的一个聚合物试剂，虽然这种结构意在另外地包括所述聚合物试剂共价连接于超过一个的位点。

另外，如果如所示的为不可降解的，可将表1中的任何聚合物结合物进行修饰以形成包括以下可降解键合的结合物。例如，双官能间隔基，优选可脱离地(releasably)连接于EI的那种如氨基酸，共价连接于EI上的活性部位。优选地，双官能间隔基在一端为氨基，使得与表1中的示例性聚合物试剂的反应容易地得到促进。在双官能间隔基的另一端为例如在与存在于EI化合物上的一个或多个羟基反应时有效形成可水解酯的羧基，使得聚合物和间隔基在水解时裂解，引起母体EI药物的释放。

表1

胺选择性聚合物试剂及其各自的EI结合物

$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  mPEG-琥珀酰亚胺基衍生物	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{EI}$ 酰胺键合 结构1-1
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{N}$  mPEG-氧基羰基咪唑衍生物	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{EI}$ 氨基甲酸酯键合 结构1-2

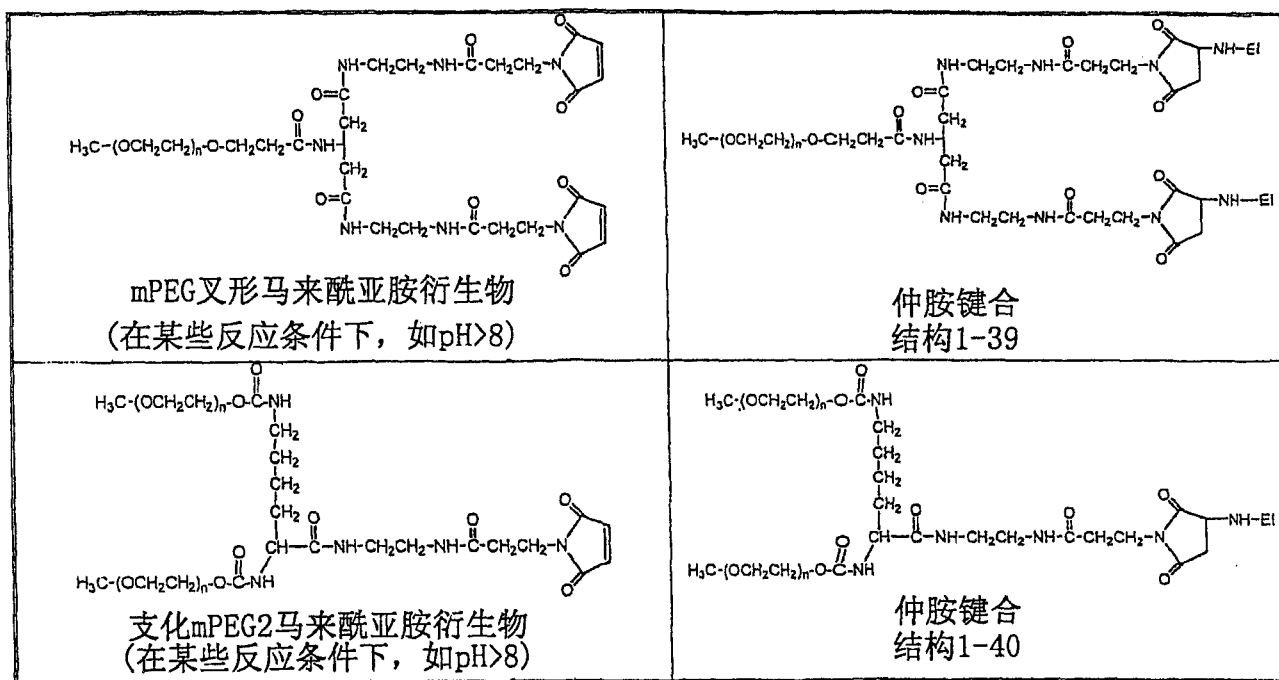
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ mPEG硝基苯基衍生物	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{EI}$ 氨基甲酸酯键合 结构1-3
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_2(\text{Cl})_3$ mPEG-三氯苯基碳酸酯	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{EI}$ 氨基甲酸酯键合 结构1-4
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  mPEG-琥珀酰亚胺基衍生物	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{EI}$ 酰胺键合 结构1-5
 $\text{N}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  均双官能PEG-琥珀酰亚胺基衍生物	$\text{EI}-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{EI}$ 酰胺键合 结构1-6
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  mPEG-琥珀酰亚胺基衍生物	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{EI}$ 酰胺键合 结构1-7
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  mPEG琥珀酰亚胺基衍生物	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{EI}$ 酰胺键合 结构1-8
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  mPEG-琥珀酰亚胺基衍生物	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{EI}$ 酰胺键合 结构1-9
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  mPEG-苯并三唑碳酸酯衍生物	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{EI}$ 氨基甲酸酯键合 结构1-10

$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array}$ mPEG-琥珀酰亚胺基衍生物	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{EI}$ 氨基甲酸酯键合 结构1-11
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array}$ mPEG-琥珀酰亚胺基衍生物	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{EI}$ 酰胺键合 结构1-12
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array}$ mPEG琥珀酰亚胺基衍生物	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{NH}-\text{EI}$ 酰胺键合 结构1-13
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2- \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array}$ 支化mPEG2-N-羟基琥珀酰亚胺衍生物	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2- \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array}$ 酰胺键合 结构1-14
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array}$ mPEG-琥珀酰亚胺基衍生物	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{EI}$ 酰胺键合 结构1-15
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array}$ mPEG-琥珀酰亚胺基衍生物	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{EI}$ 酰胺键合 结构1-16
$\begin{array}{c} \text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array} -\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array} \\ \text{CH}_3 \qquad \qquad \qquad \text{CH}_3 \end{array}$ 均双官能PEG-琥珀酰亚胺基衍生物	$\begin{array}{c} \text{EI}-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{EI} \\ \text{CH}_3 \qquad \qquad \qquad \text{CH}_3 \end{array}$ 酰胺键合 结构1-17

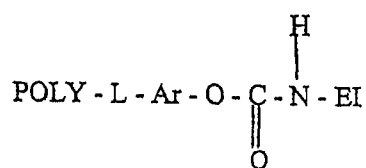
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{O} \end{array}$ mPEG-琥珀酰亚胺基衍生物	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{EI}$ 酰胺键合 结构1-18
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{O} \end{array} \text{N}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{O} \end{array}$ 均双官能PEG-琥珀酰亚胺基丙酸酯衍生物	$\text{EI}-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{EI}$ 酰胺键合 结构1-19
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{O} \end{array}$ mPEG-琥珀酰亚胺基衍生物	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{EI}$ 酰胺键合 结构1-20
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{HC}-\text{OCH}_2\text{CH}_2-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{O} \end{array} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2 \end{array}$ 支化mPEG2-N-羟基琥珀酰亚胺衍生物	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{HC}-\text{OCH}_2\text{CH}_2-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{EI} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2 \end{array}$ 酰胺键合 结构1-21
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{HC}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{O} \end{array} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2 \end{array}$ 支化mPEG2-N-羟基琥珀酰亚胺衍生物	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{HC}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{EI} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2 \end{array}$ 酰胺键合 结构1-22
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{S}-\text{C}_5\text{H}_4\text{N}$ mPEG-硫代酸酯衍生物	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{EI}$ 酰胺键合(通常连接于具有N末端 半胱氨酸或组氨酸的EI部分) 结构1-23
$\text{O}=\text{HC}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CHO}$ 均双官能PEG丙醛衍生物	$\text{EI}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{EI}$ 仲胺键合 结构1-24

$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$ mPEG丙醛衍生物	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{EI}$ 仲胺键合 结构1-25
$\overset{\text{O}}{\parallel}\text{HCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$ 均双官能PEG丁醛衍生物	$\text{EI}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{EI}$ 仲胺键合 结构1-26
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$ mPEG丁醛衍生物	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{EI}$ 仲胺键合 结构1-27
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$ mPEG丁醛衍生物	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{EI}$ 仲胺键合 结构1-28
$\begin{array}{c} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH} \\ \text{HN}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH} \end{array}$ 均双官能PEG丁醛衍生物	$\begin{array}{c} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{EI} \\ \text{HN}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{EI} \end{array}$ 仲胺键合 结构1-29
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH} \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{CH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH} \end{array}$ 支化mPEG2丁醛衍生物	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH} \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{CH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{EI} \end{array}$ 仲胺键合 结构1-30
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2 \\ \text{HC}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH} \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2 \end{array}$ 支化mPEG2丁醛衍生物	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2 \\ \text{HC}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{EI} \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2 \end{array}$ 仲胺键合 结构1-31
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{OCH}_2\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ mPEG乙醛衍生物	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{EI}$ 仲胺键合 结构1-32

$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \diagdown \diagup \end{array} \text{C}(=\text{O})$ mPEG哌啶酮衍生物	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \diagdown \diagup \end{array} \text{NH}-\text{EI}$ 仲胺键合(连接于仲碳) 结构1-33
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_{2.5}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3$ mPEG甲基酮衍生物	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_{2.5}-\text{CH}(\text{NH}-\text{EI})-\text{CH}_3$ 仲胺键合(连接于仲碳) 结构1-34
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{S}(=\text{O})_2-\text{CH}_2-\text{CF}_3$ mPEG三氟乙磺酸酯	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{EI}$ 仲胺键合 结构1-35
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \diagdown \diagup \end{array} \text{C}(=\text{O}) \text{C}(\text{O}) \text{C}=\text{C} \text{C}(=\text{O}) \text{N}$ mPEG马来酰亚胺衍生物 (在某些反应条件下, 如pH>8)	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \diagdown \diagup \end{array} \text{C}(=\text{O}) \text{C}(\text{O}) \text{C}=\text{C} \text{C}(=\text{O}) \text{NH}-\text{EI}$ 仲胺键合 结构1-36
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \diagdown \diagup \end{array} \text{C}(=\text{O}) \text{C}(\text{O}) \text{C}=\text{C} \text{C}(=\text{O}) \text{N}$ mPEG马来酰亚胺衍生物 (在某些反应条件下, 如pH>8)	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \diagdown \diagup \end{array} \text{C}(=\text{O}) \text{C}(\text{O}) \text{C}=\text{C} \text{C}(=\text{O}) \text{NH}-\text{EI}$ 仲胺键合 结构1-37
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \diagdown \diagup \end{array} \text{C}(=\text{O}) \text{C}(\text{O}) \text{C}=\text{C} \text{C}(=\text{O}) \text{N}$ mPEG马来酰亚胺衍生物 (在某些反应条件下, 如pH>8)	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \diagdown \diagup \end{array} \text{C}(=\text{O}) \text{C}(\text{O}) \text{C}=\text{C} \text{C}(=\text{O}) \text{NH}-\text{EI}$ 仲胺键合 结构1-38



在本发明的一个优选实施方案中, 提供具有以下结构的结合物, 其中结合物为 EI 的前药:

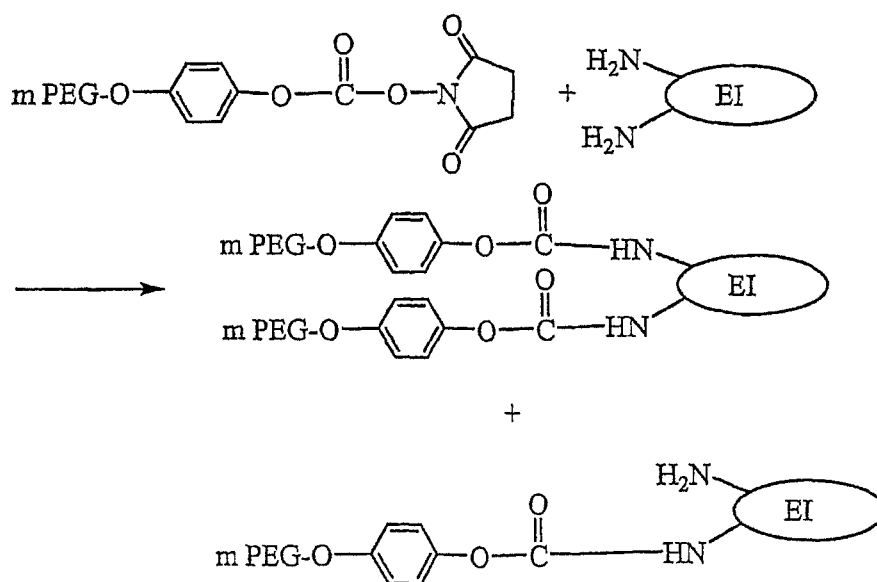


其中 POLY 为本文中所述的水溶性聚合物, L 为连接基团, Ar 为芳基, NH-EI 一起表示具有氨基的 EI。这个具体结构具有可水解的氨基甲酸酯键, 使得在水解时释放 EI。优选地, 在水解时释放母体 EI、以及 CO₂ 和相应的芳香醇。优选的芳族基团为邻、间、或对位取代的苯基。对于本发明的这一具体实施方案, 优选的 L 基团为 -O- 和 -NH-C(O)-。这种结合物的具体实施方案存在于上表 1 中。上述还包括具有通过同一键合连接于 POLY 末端的 EI 或其它抗 HIV 药物的哑铃型结构。属于上述通用结构的具体聚合物和结合物在美国专利 6,413,507 中描述, 其内容被特别地并入本文作为参考。优选的聚合物试剂包括在美国专利 6,413,507 的实施例中描述的和在上述表 1 中表示的那些。

对于采用如上所述的那些氨基选择性试剂且其中可水解的结合物是理想的本发明的实施方案，采用具有可水解的间隔基可脱离地连接于其上的进入抑制剂化合物，例如由实施例 11-15 举例说明的。通常，这种策略包括以下合成步骤：1)采用常规的保护基化学，如 Boc，最初保护任何 EI 伯胺，即赖氨酸，2)通过可降解键合如羧基为 EI 的酪氨酸、丝氨酸、或苏氨酸的羟基官能度附加适当的间隔基(如，甘氨酸、丙氨酸等)，3)将间隔基脱保护，和 4)随后与胺选择性 PEG 试剂结合，和 5)伯胺的最终脱保护。通常，根据本发明的优选实施方案，这种间隔基方法适合于修饰本文中所述的任何聚合物试剂，特别是表 1 中的那些，从而赋予其可释放的性质。

采用上面刚刚描述的地类型的聚合物的凝胶制剂在以下章节中更具体地描述。

以下提供 EI 与同具体的可降解的氨基甲酸酯连接的 PEG 结合的另外的图示表示，其中 PEG 试剂包含对位取代的苯基环。例如，当 EI 为 T-20 时，说明性的 PEG 试剂可能连接于肽的一个或两个赖氨酸氨基。



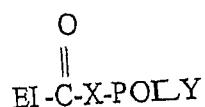
虽然将 mPEG 表示为 POLY 部分，但是可利用本文中所述的任何 POLY 结构。在其中期望将水溶性聚合物连接于 EI 内所含的仅一个氨基的情况下，或者当在 EI 上存在超过一个活性氨基时，可以如本领域

通常已知的那样采用保护/脱保护策略,或者采用分离/纯化技术以分离由随机 PEG 化方法产生的所需的结合物或结合物类型(如,单-PEG 基体、二-PEG 基体、三-PEG 基体等)。

在本发明的结合物的一个优选实施方案中,当 EI 为 T-20 或 T-1249、以及水溶性聚合物通过与醛封端的水溶性聚合物反应连接于 N 末端时,这种水溶性聚合物缺少内部酰胺基,更具体地,具有不同于以下结构类型的结构: $\text{PEG-O-(CH}_2\text{)}_m\text{-C(O)-NH-(CH}_2\text{)}_p\text{-CHO}$, 其中 m 为约 1-17, n 为约 10 到 1,000, p 为约 1 到 3。在其中优选使用醛封端的聚合物的情况中,示例性的聚合物为在标题为 "Water-Soluble Polymer Alkanals" 的共有的国际专利申请 PCT/US03/28221 中描述的那些,其内容被特别地并入本文作为参考。

用于将 PEG 与 EI 连接的反应条件随 EI、所需的 PEG 化程度、和所采用的具体试剂而定。通常,聚合物试剂对 EI 的氨基的结合在室温下在 pH 约 5 到约 9.5、优选 pH 约 8 到约 9.5 进行,反应时间为约 30 分钟到几小时。PEG 试剂与蛋白质的优选的摩尔比为约 1:1 到 5:1,或者 10:1,和甚至最高为 100:1。提高 pH 增加反应速率,而降低 pH 降低反应速率。选择性反应(如,在 N-末端)可特别地通过与用酮或 α -甲基支化醛官能化的聚合物反应和/或在具体的反应条件下(如,降低 pH)进行。参见例如实施例 1-3 和 6-15,其表示随机的和位置选择性的聚合物连接,以形成说明性的本发明的 EI 聚合物结合物和组合物。

羧基表示可充当 EI 上的连接点的另一种官能团。在结构上,该结合物包括以下结构:

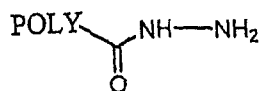


其中 EI 和相邻的羧基相当于包含羧基的 EI, X 为键合,优选为选自 O、N (H)、和 S 的杂原子, POLY 为水溶性聚合物如 PEG, 其任选

以封端部分结束。

C(O)-X 键合由带有末端官能团的聚合物试剂和包含羧基的 EI 之间的反应产生。如上所述，具体的键合根据所采用的官能团类型而定。如果聚合物由羟基进行末端官能化或“活化”，则产生的键合为羧酸酯，并且 X 将是 O。如果聚合物由硫羟基进行官能化，则产生的键合为硫代酸酯，并且 X 将是 S。当采用某些多臂型、支化或叉形聚合物时，C(O)X 部分，特别是 X 部分，可相对更加复杂，并且可包括更长的连接结构。

包含酰肼部分的水溶性聚合物也可用于在羧基处的结合。可通过连接包含羧基官能度的小型间隔基如氨基酸或通过羟基的氧化将这种基团引入到 EI 中。这种衍生物的例子包括具有以下结构的聚合物：

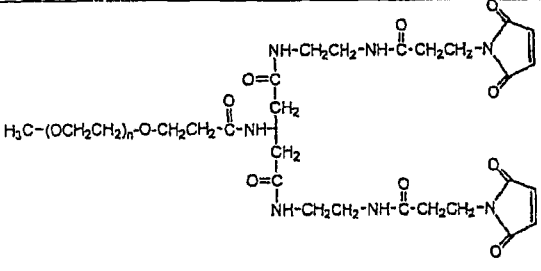
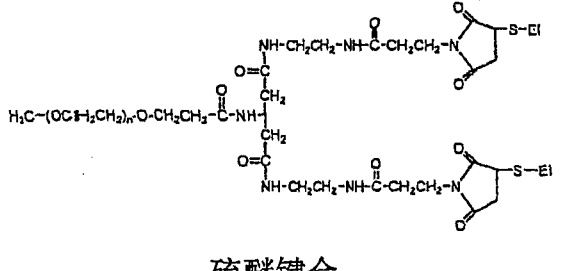
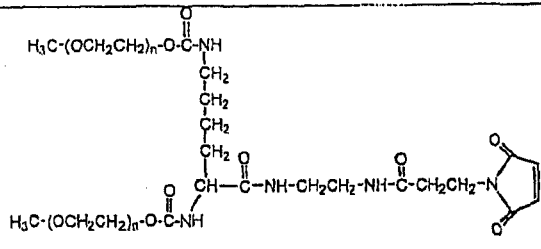
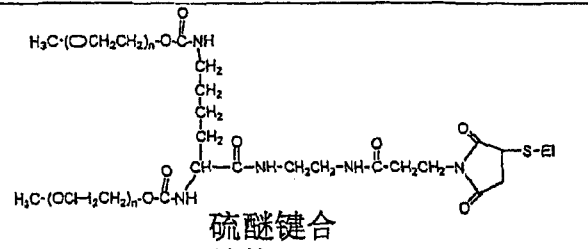
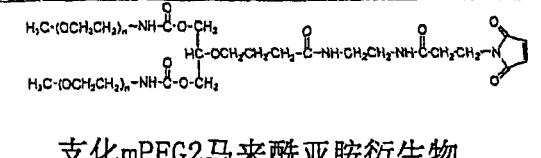
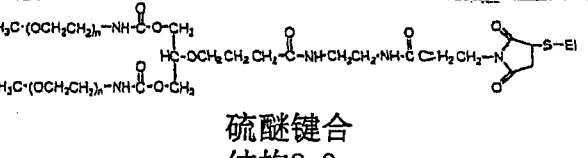
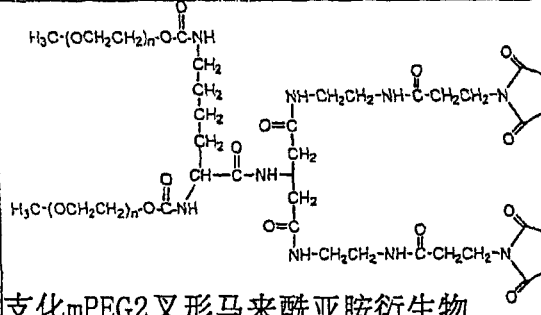
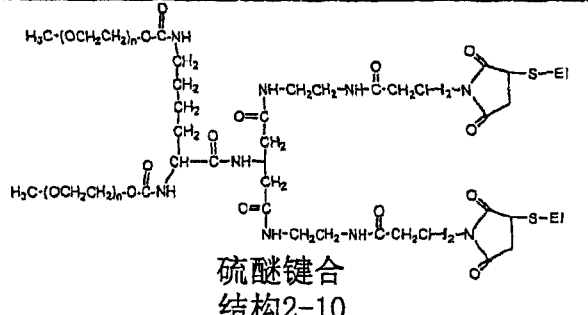


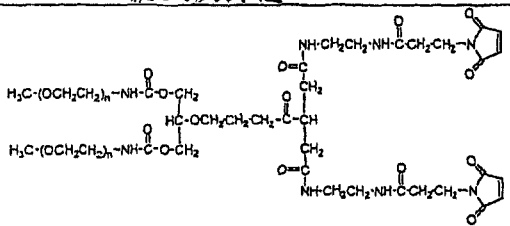
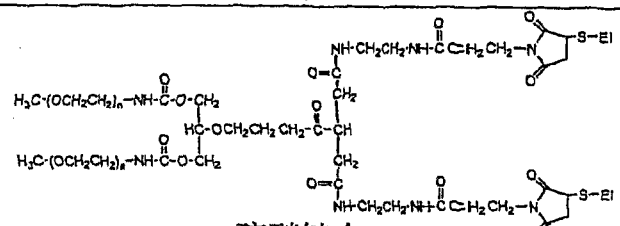
EI 内包含的或引入的硫羟基可以充当连接水溶性聚合物的有效位置。特别是，在 EI 为肽或包括肽部分时，半胱氨酸残基提供硫羟基。然后这种半胱氨酸残基中的硫羟基可与对于与硫羟基的反应为特异性的活化 PEG 反应，如，N-马来酰亚胺基聚合物或其它衍生物，如美国专利 5,739,208 和 6,602,498、和国际专利申请公开 WO 01/62827 中所述的。

具体的例子以及相应的结合物在以下表 2 中提供。在表中，变量 (n) 表示重复单体单元的数目，“-S-EI”表示结合于水溶性聚合物之后的 EI。虽然表 2 中的各个聚合物部分以“CH₃”基团结束，但是可以将其替换为其它基团(如 H、乙基和苄基)。

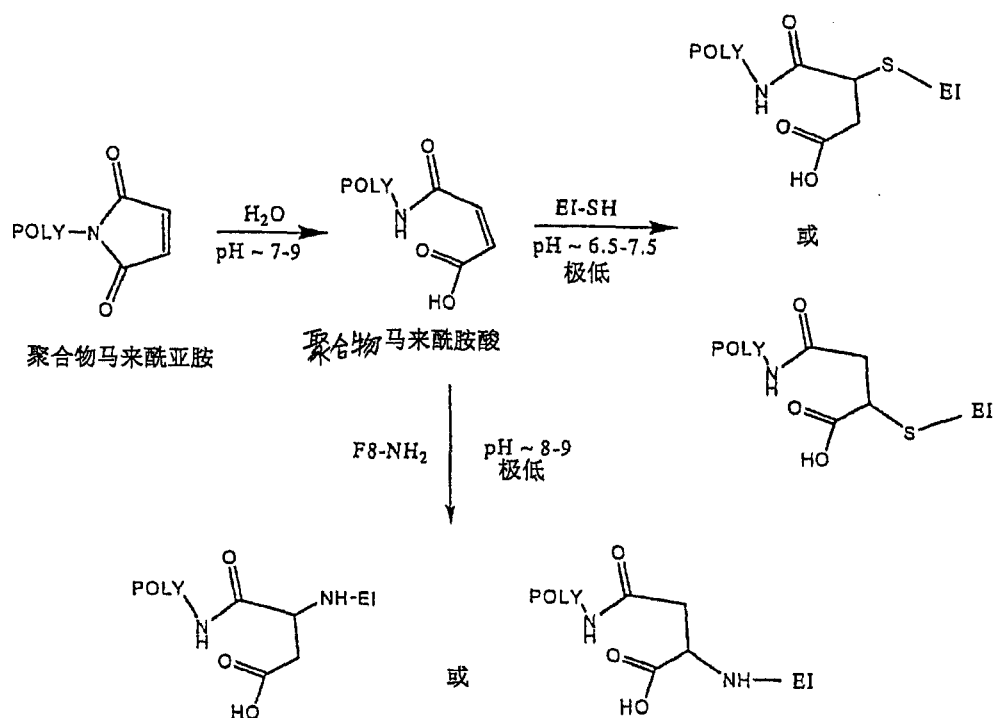
表 2
硫羟基特异性的聚合物试剂及其各自的 EI 结合物

聚合物试剂	EI结合物
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array}$ mPEG马来酰亚胺衍生物	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \text{S}-\text{EI}$ 硫醚键合 结构2-1
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array}$ mPEG马来酰亚胺衍生物	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \text{S}-\text{EI}$ 硫醚键合 结构2-2
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array}$ mPEG马来酰亚胺衍生物	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \text{S}-\text{EI}$ 硫醚键合 结构2-3
$\begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array}$ 均双官能mPEG马来酰亚胺衍生物	$\text{EI}-\text{S} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \text{S}-\text{EI}$ 硫醚键合 结构2-4
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array}$ mPEG马来酰亚胺衍生物	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \text{S}-\text{EI}$ 硫醚键合 结构2-5
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array}$ mPEG马来酰亚胺衍生物	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \text{S}-\text{EI}$ 硫醚键合 结构2-6

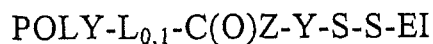
聚合物试剂	EI 结合物
 mPEG叉形马来酰亚胺衍生物	 硫醚键合 结构2-7
 支化mPEG2马来酰亚胺衍生物	 硫醚键合 结构2-8
 支化mPEG2马来酰亚胺衍生物	 硫醚键合 结构2-9
 支化mPEG2叉形马来酰亚胺衍生物	 硫醚键合 结构2-10

聚合物试剂	EI 结合物
 支化mPEG2叉形马来酰亚胺衍生物	 硫醚键合 结构2-11
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}(=\text{O})_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ mPEG乙烯基砜衍生物	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}(=\text{O})_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{EI}$ 硫醚键合 结构2-12
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$ mPEG硫醇衍生物	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{EI}$ 二硫键合 结构2-13
$\text{HS}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{SH}$ 均双官能 PEG硫醇衍生物	$\text{EI}-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{EI}$ 二硫键合 结构2-14
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{C}_6\text{H}_4\text{N}$ mPEG二硫化物衍生物如2004年12月21日提交的标题为“Stabilized Polymeric Thiol Reagents”的待决美国专利临时申请60/639,823中所述的。	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{EI}$ 二硫键合 结构2-15
$\text{C}_6\text{H}_4\text{N}-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{C}_6\text{H}_4\text{N}$ 均双官能二硫化物衍生物如2004年12月21日提交的标题为“Stabilized Polymeric Thiol Reagents”的待决美国专利临时申请60/639,823中所述的。	$\text{EI}-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{EI}$ 二硫键合 结构2-16

对于由带有一个或多个马来酰亚胺官能团的水溶性聚合物形成的结合物(无论马来酰亚胺是否与 EI 上的胺或巯基反应),相应的水溶性聚合物的马来酰胺酸形式也可与 EI 反应。在某些条件下(如, pH 约 7-9 和在水的存在下),马来酰亚胺环“打开”形成相应的马来酰胺酸。马来酰胺酸又可与例如 EI 上的胺或巯基反应,如国际专利申请公开 WO 04/060966 中所述的。示例性的马来酰胺酸基反应如以下图解表示。POLY 表示水溶性聚合物, EI 表示进入抑制剂。



在又一个实施方案中,本发明的代表性的结合物具有以下结构:



其中 POLY 为水溶性聚合物, L 为任选的连接基, Z 为选自 O、NH、和 S 的杂原子, Y 选自 C_{2-10} 烷基、 C_{2-10} 取代烷基、芳基、和取代芳基。可与 EI 反应并且形成这种类型的结合物的聚合物试剂在 2004 年 1 月 6 日提交的标题为“Thiol-Selective Water Soluble Polymer derivatives”的待决申请和相当于国际专利申请 WO 04/063250 的转让的美国专利申请 10/753,047 中描述。

对于聚合物试剂，本文和别处描述的那些可购自商业来源(如，Nektar Therapeutics, Huntsville AL)。另外，制备聚合物试剂的方法在文献中有所描述。

通常，虽然不是一定地，EI 和聚合物试剂之间的键合包括一个或多个原子，如一个或多个碳、氮、硫、及其联合。例如，优选的水解稳定性键合包括酰胺、仲胺、氨基甲酸酯、硫醚、或二硫基。任选地，可由另外的原子将所述键合连接于聚合物试剂内的重复单体链。这也适用于其中键合为可降解的，即包括水解可降解部分的实施方案。通常，当被全面地考虑时，可降解键合包含将可降解部分本身连接于聚合物和/或 EI 的另外的原子或原子的组合。将 EI 连接于本文中指定为 POLY 的重复单体链的原子的具体系列包括选自以下的那些：-O-，-S-，-S-S-，-C(O)-，-O-C(O)-，-C(O)-O-，-C(O)-NH-，-NH-C(O)-NH-，-O-C(O)-NH-，-C(S)-，-CH₂-，-CH₂-CH₂-，-CH₂-CH₂-CH₂-，-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-，-O-CH₂-，-CH₂-O-，-O-CH₂-CH₂-，-CH₂-O-CH₂-，-CH₂-CH₂-O-，-O-CH₂-CH₂-CH₂-，-CH₂-O-CH₂-CH₂-，-CH₂-CH₂-O-CH₂-，-CH₂-CH₂-CH₂-O-，-O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-，-CH₂-O-CH₂-CH₂-CH₂-，-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-，-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-，-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-，-C(O)-NH-CH₂-，-C(O)-NH-CH₂-CH₂-，-CH₂-C(O)-NH-CH₂-，-CH₂-CH₂-C(O)-NH-，-C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-，-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-，-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-，-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-，-C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-，-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-，-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-，-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-，-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-，-C(O)-O-CH₂-，-CH₂-C(O)-O-CH₂-，-CH₂-CH₂-C(O)-O-CH₂-，-C(O)-O-CH₂-CH₂-，-NH-C(O)-CH₂-，-CH₂-NH-C(O)-CH₂-，-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-，-NH-C(O)-CH₂-CH₂-，-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-，-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-，-C(O)-NH-CH₂-，-C(O)-NH-CH₂-CH₂-，-O-C(O)-NH-CH₂-，-O-C(O)-NH-CH₂-CH₂-，-O-C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-，-NH-CH₂-，-NH-CH₂-CH₂-，-CH₂-NH-CH₂-，-CH₂-CH₂-NH-CH₂-，-C(O)-CH₂-，-C(O)-CH₂-CH₂-，-CH₂-C(O)-CH₂-，-CH₂-CH₂-C(O)-CH₂-，-CH₂-CH₂-C(O)-CH₂-CH₂-，-CH₂-CH₂-C(O)-，-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-，-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-，-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-，-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-，

-O-C(O)-NH-[CH₂]₀₋₆-(OCH₂CH₂)₀₋₂-, -C(O)-NH-(CH₂)₁₋₆-NH-C(O)-, -NH-C(O)-NH-(CH₂)₁₋₆-NH-C(O)-, -O-C(O)-CH₂-, -O-C(O)-CH₂-CH₂-, 和 -O-C(O)-CH₂-CH₂-CH₂-. 另外, 双官能连接基如氨基酸或双官能 PEG 低聚物可用于将 EI 连接于聚合物试剂。

结合物通常为组合物的一部分。组合物可包含单一类型的聚合物结合物, 如单 PEG-EI 单体(即, 只有一个 PEG 链共价连接于 EI, 虽然 PEG 可共价连接于 EI 内的不同位置, 如, 在序列内的不同氨基酸处连接), 或者组合物可包含多个结合物, 优选地但不是一定地, 各个结合物具有共价连接于一个 EI 的约 1 到约 3 个水溶性聚合物。

如上简述的, 对于任何给出的 EI, 可以通过选择适当的聚合物试剂、聚合物试剂与 EI 的比、温度、pH 条件、和结合反应的其它方面实现对所需聚合物数目的控制。另外, 可以通过纯化实现不希望有的结合物(如, 具有至少四个连接聚合物的那些结合物)的减少或消除。

另外的多臂型聚合物结合物

用于形成具有多个 EI 或其它抗 HIV 药物共价连接于其上的结合物的多臂型聚合物已经在本文中前面描述了。如果需要高剂量的 EI 以递送治疗有效量的如 T-20 或 T-1249, 则多臂型聚合物是特别有吸引力的。这样, 将药物“加载”(优选可脱离地加载)到具有几个适于共价连接的活性部位的单个聚合物分子上。

用于实现最大 EI 加载的一个优选的多臂型聚合物类型为具有由中心核心分子(中心核心分子上共价连接有多肽片段)限定的内核区域和由亲水性聚合物片段(亲水性聚合物片段共价连接于各个多肽聚合物片段)限定的外部亲水区域的多臂型嵌段共聚物。因此, 多臂型结构的各个臂是包括内部(即离中心核心分子更近或邻近)的多肽聚合物片段和外部(即离中心核心分子更远或远侧)的亲水性聚合物片段的嵌段共聚物。这种多臂型嵌段共聚物非常适于在内核区域内包封或包埋生物学

活性分子。如本发明中使用的，“包封”或“包埋”意思是提将 EI 物理限制在共聚物的内核区域内，无论通过共价连接、电荷相互作用、金属-酸复合物、范德华力、或其它吸引力或键合力。这种单分子的多臂型嵌段共聚物通常具有约 5,000 Da 到约 120,000 Da、优选约 10,000 Da 到约 100,000 Da、更优选约 20,000 Da 到约 80,000 Da 的总的数均分子量。

优选外部亲水性聚合物片段为聚(乙二醇)，虽然也可使用其它亲水性聚合物片段。使用多肽聚合物片段作为单分子的多臂型结构的内核区域的一部分为设计和调整多臂型结构的药物递送性质提供了极大的灵活性。EI 与单分子的多臂型结构的核心区域之间的相互作用可以大大地影响药物加载和药物释放特征。在本发明中，取决于多肽聚合物片段的结构，内核区域可为疏水性的、带电的、适合与药物分子共价连接、或其任何组合。

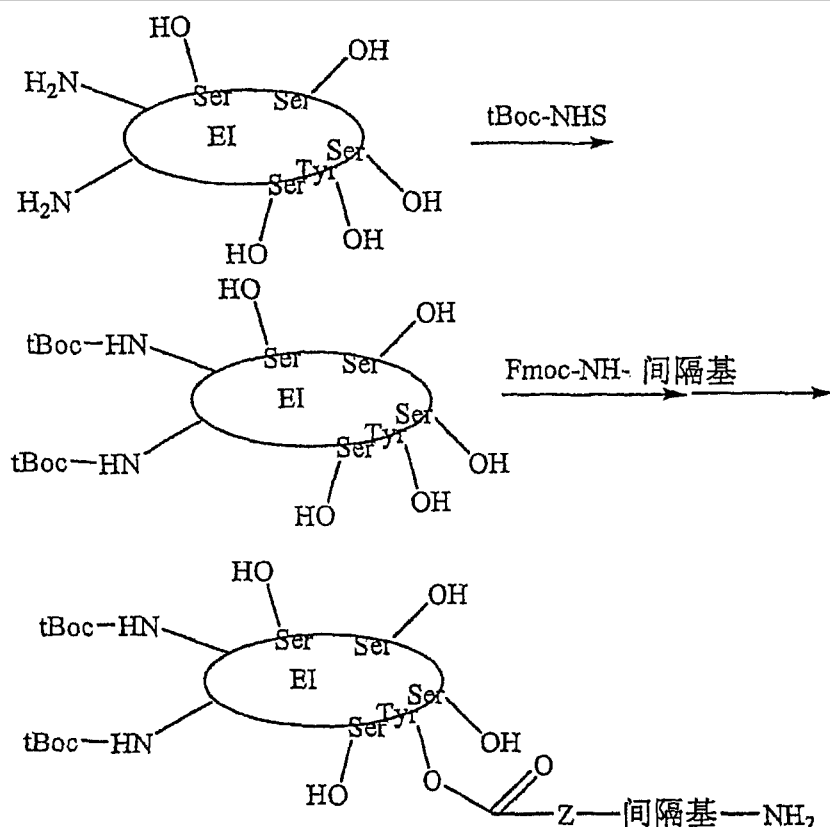
优选地，中心核心分子是具有至少三个带有胺基团的末端的聚胺的残基。优选使用聚胺核心是因为核心的胺基团容易地与氨基酸的羧酸基团反应以形成酰胺键合。然而，也可使用具有可用于与共聚物臂连接的其它官能团的核心分子。在采用聚胺核心的实施方案中，胺基团的数目将决定多臂型结构中共聚物臂的数目。优选地，聚胺包括 3 到约 25 个胺基团。在不同的实施方案中，聚胺包括至少约 5 个胺基团、至少约 8 个胺基团、或至少约 10 个胺基团。具有这类结构的多臂型聚合物在 2003 年 12 月 24 日提交的标题为“Multi-arm Polypeptide Poly(ethylene Glycol) Block Copolymers as Drug Delivery Vehicles”的共有专利申请中详细描述，其对应于国际专利申请公开 WO/04060977，其内容被特别地并入本文作为参考。本发明这一方面的代表性的实施方案在实施例 14.c 中提供。

说明性的聚合物结构包括多臂型(3、4、5、6、7、8、9、10 或 12-臂)聚(苄基天冬氨酸)-PEG、聚(天冬氨酸)-PEG(其具有多个优选地但不

是一定地通过可降解键合如酯和可水解的氨基甲酸酯共价连接于结构的多肽核心的 EI)。或者,不是共价连接,而是 EI 可能被包埋在内核区域内。

以下提供表示 EI 的具体羟基对多臂型聚合物的共价连接的说明性图解。聚合物在 EI 内的一个羟基位置处的选择性连接通过在其末端具有活性基团如胺的间隔基分子实现。参见例如,实施例 11-15。

更具体地,在本发明的这一实施方案中,将 EI 中的羟基如酪氨酸羟基用作选择性的点,用于通过在其游离的未偶联的终端具有例如活性氨基的间隔基连接和引入可水解键合(如碳酸酯或酯)。这种方法利用酪氨酸和丝氨酸羟基之间反应性的差异,从而实现在酪氨酸羟基处的位置选择性反应。在酪氨酸羟基处反应之前,将 EI 内的氨基使用本领域已知的任何适当的氨基保护基进行保护或封闭以避免偶联。以下图解中使用 t-Boc 仅是说明性的。在以下实施方案中,间隔基在距离 EI 较远处具有活性基团如胺,其适于结合于例如多臂型 PEG 或如上所述的具有内部疏水性区域和外部亲水性区域的共聚物 PEG-基系统。EI 中另一个活性胺的保护允许选择性地引入从 EI 伸出的一个特别的氨基位置,并且此外,该方法提供用于将可降解共价键合引入到分子中的机制。然后其上共价连接有延长的连接基或间隔基的被修饰的 EI 共价连接于本文中所述的水溶性聚合物。该方法不同于本文中前述的那些,在于首先将“连接基”或“连接基前体”引入到 EI 中,优选以选择性的方式引入,以形成示例性的 EI 中间体(EI-O-C(O)-Z-间隔基-NH₂),然后其适合连接于可为线型、支化、或多臂型聚合物。在这种结构中, EI-O-表示存在于 EI 内的羟基的残基。



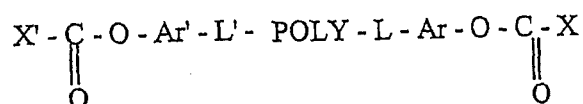
在这一点上，可以常规方式将 EI 的单-氨基衍生物连接于例如多臂型聚合物中。在完成结合之后，使用已知的技术除去 t-Boc 基团。在上述图中，优选 Z 为 O、NH、或 CH_2 ，并且间隔基可为例如氨基酸或氨基酸的片段、或者为低聚 PEG 如双官能 PEG 或具有 1 到约 20 个单体亚单元(优选 1-10 个单体亚单元，更优选具有 1、2、3、4、5、6、7、和 9 个亚单元)的聚合物连接基。

在稍有不同的方法中，当希望利用例如包含在谷氨酸或天冬氨酸氨基酸中的那些羧基时，优选将所有的活性氨基和羟基保护起来。在 $-\text{COOH}$ 基团与羟基封端的间隔基进行单结合以形成可水解的羧酸酯之后，以类似方式完成对多臂型 PEG 等的共价连接。诸如这些方法的合成方法可由本领域技术人员通过考虑本说明书的教导和本领域中通常可获得的知识来确定。该方法可以延伸到制备具有其它(如，可降解或不可降解的)键合的类似的多臂型结合物。

水凝胶

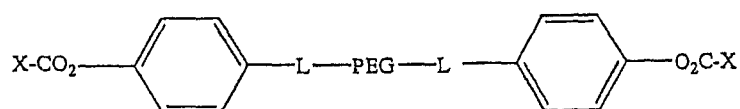
与前面所述的结合物或共价连接的 EI 组合物相对, 本文中另外提供了其中 EI 不必要地共价连接于一种或多种聚合物组分的以凝胶形式存在的水凝胶-EI 组合物。这种水凝胶可为交联的或未交联的, 并且优选包含 PEG-组分。在一个具体的实施方案中, 水凝胶组分为未交联的, 或者为略微交联的, 以促进 EI 的释放。EI 可以结合形式和/或未结合形式存在。

说明性的水凝胶具有如上所述的芳香族的可水解氨基甲酸酯片段。具体地, 水凝胶由通过可水解的氨基甲酸酯键合与交联剂结合的聚合物组成。优选实施方案中的交联剂为具有下式的上述双官能聚合物:

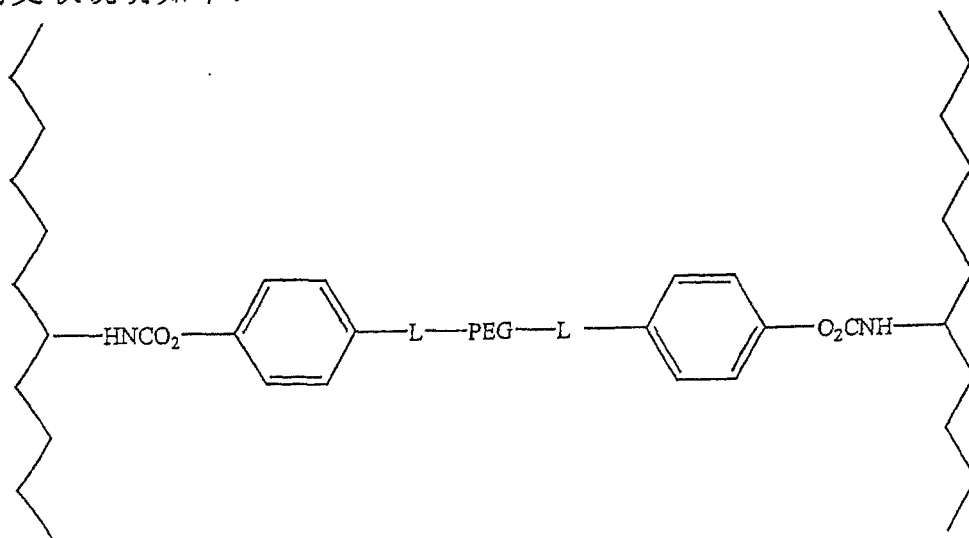


其中 POLY、POLY'、L、L'、X、X'、Ar 和 Ar' 如前述定义。

在优选实施方案中, 交联剂为下式:



其中 X 和 L 如上所述。因此, 具有多个氨基的聚合物与上述交联剂的交联说明如下:



其中锯齿形符号表示具有胺基团的聚合物，其中 L 如上所述。

显而易见，聚合物部分和交联剂之间的氨基甲酸酯键合为可水解的。因此，由于氨基甲酸酯键合的水解，该水凝胶在体内逐渐地分解或降解。

用于制备缓释递送 EI 组合物的另一种有利的水凝胶具有碳酸酯键合。更具体地，提供了由两个或多个低聚物组成的水溶性的非肽类聚合物，两个或多个低聚物由水解可降解的碳酸酯键合连接在一起，如共有的美国专利 6,348,558 中所述的，其内容被特别地并入本文作为参考。该聚合物可在水相环境如在体内水解降解为小的低聚物，并且可用于制备可降解的水凝胶。

代表性的这类聚合物由下式表示：

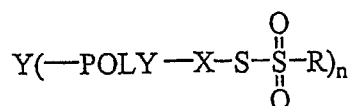
$X-O-[-(CH_2CH_2-O)_n-CO_2-]_m-(CH_2CH_2O)_n-Y$ ，其中 n 为约 2 到约 2,000 的整数， m 为约 2 到约 200 的整数，并且其中 X 和 Y 各自独立地为 H、烷基、烯基、芳基、或活性部分，并且可为相同的或不同的。在其中 X 或 Y (或两者)与 EI 的官能团有反应性的情况中，则在本发明的又一个实施方案中，EI 可任选地共价连接于其上。

在又一个实施方案中，用于制备 EI 组合物的水凝胶为 2003 年 12 月 31 日提交的标题为“Methods for the Formation of Hydrogels Using Thiosulfonate Compositions and Uses Thereof”的共有实用新型专利申请中所述的硫代磺酸酯(thiosulfonate)凝胶，该文献的内容作为参考被并入本文。

更具体地，根据本发明的这一实施方案，优选形成水凝胶的组分为多臂型硫代磺酸酯聚合物衍生物，其在暴露于碱下时形成交联的聚合物组合物而无需第二种交联剂、氧化还原催化剂、或辐射的存在。这种硫代磺酸酯聚合物衍生物也可通过与具有至少两个硫羟基的水溶

性聚合物反应形成水凝胶。

通常，这种组合物包括下式所示的水凝胶形成组分：



其中 POLY 为水溶性聚合物，n 为 3 到约 100，X 为连接基团，Y 为衍生自具有至少三个亲核基团的部分，R 为烷基或芳基。示例性的连接基团在文章中别处描述。聚合物可任选地包含至少一个可降解的键合，如酯、碳酸酯、缩醛、原酸酯、磷酸酯、或硫羧酸酯。一个或多个可降解键合的存在允许聚合物链伴随水凝胶的破坏和溶解而降解(如，通过水解或者酶促降解)。在优选实施方案中，特别是当 EI 为 T-20 或 T-1249 时，水凝胶或含有效形成水凝胶的组合物的聚合物为不表现出可逆胶凝性质的那种，即，在低于生理学温度下为液体，但是在生理学温度形成水凝胶。例如，这种水凝胶或水凝胶形成组合物通常由不同于 Poloxomer 407™ 的聚合物组成。

本发明的水凝胶组合物可在使用之前被制备。形成的水凝胶组合物可任选经过脱水或冷冻干燥，以除去结合的水并且用作完整的水凝胶或缩小为粉末或微粒形式。本发明的水凝胶组合物也可不经脱水或冷冻干燥作为形成的物体使用，并且可被引入到包括但不限于以下的给药系统中：眼嵌入物、栓剂、阴道栓、透皮贴片、或填充了水凝胶组合物的胶囊。

无论水凝胶形成组合物或水凝胶组合物的形式如何，都有可能将所述组合物包装在单次应用、多次应用、或散装容器中。可以任选地通过本领域公知的方法将制剂灭菌。在一个优选实施方案中，将所述物质包装在无菌的单次应用容器中。在其它实施方案中，将所述物质包装在单次或多次应用的容器中，以便于通过加入水、水溶液或悬浮液进行重新构建。在另一个实施方案中，所述物质作为与用于引起凝

胶形成的碱的试剂盒形式被销售。

结合物的纯化

可将本发明的聚合物-EI 结合物进行纯化，以得到/分离不同的结合物质。具体地，可以将产物混合物纯化以得到每 EI 平均具有一个、两个、或三个或过多个 PEG。优选具有一个聚合物分子连接于其上的 EI 结合物。用于纯化最终的结合物反应混合物的策略根据许多因素而定，包括例如所采用的聚合物试剂的分子量、具体的 EI、所需的剂量给药方案、和单独的结合物的残余活性和体内性质。

如果期望，可使用凝胶过滤色谱法和/或离子交换色谱法分离具有不同分子量的结合物。即，根据它们的不同分子量(其中差异基本上对应于水溶性聚合物部分的平均分子量)，将数目不同的聚合物对 EI 的比(如，1-基体、2-基体、3-基体等，其中“1-基体”表示一个聚合物连接于 EI，“2-基团”表示两个聚合物连接于 EI，等等)使用凝胶过滤色谱法分级。例如，在其中将 100,000 道尔顿的多肽随机地结合于分子量为约 20,000 道尔顿的聚合物试剂的示例性反应中，得到的反应混合物可以包含未被修饰的蛋白质(分子量约 100,000 道尔顿)、单 PEG 化的蛋白质(分子量约 120,000 道尔顿)、二 PEG 化的蛋白质(分子量约 140,000 道尔顿)、等等。

虽然这种方法可用于分离 PEG-EI 结合物和具有不同分子量的其它聚合物-EI 结合物，但是该方法对于分离在 EI 内具有不同聚合物连接位点的位置异构体通常是无效的。例如，凝胶过滤色谱法可用于将 PEG 的 1-基体、2-基体、3-基体等的混合物彼此分离，虽然每种回收的 PEG-基体组合物可包含连接于不同活性氨基(如，赖氨酸残基)或 EI 的其它官能团的 PEG。

适于进行这类分离的凝胶过滤柱包括 Superdex™和 Sephadex™柱，其得自 Amersham Biosciences (Piscataway, NJ)。具体的柱的选择根

据所需的理想分级范围而定。洗脱通常使用适当的缓冲液进行,如磷酸盐、乙酸盐等。收集的级分可通过许多不同的方法进行分析,例如(i)在 280 nm 的光密度(OD)用于分析蛋白质含量,(ii)牛血清白蛋白(BSA)蛋白质分析,(iii)碘试验用于分析 PEG 含量(Sims 等人(1980) *Anal. Biochem.* 107:60-63),和(iv) 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS PAGE),随后用碘化钡染色。

位置异构体的分离通过使用反相高效液相色谱(RP-HPLC)C18柱(Amersham Biosciences 或 Vydac)的反相色谱法进行,和通过使用得自 Amersham Biosciences 的离子交换柱如 Sepharose™离子交换柱的离子交换色谱法进行。任一种方法都可用于分离具有相同分子量的聚合物-活化剂异构体(位置异构体)。

优选得到的纯的组合物基本上不含无抗逆转录病毒活性的蛋白质。另外,优选该组合物基本上不含所有其它的非共价连接的水溶性聚合物。

活性的评价

本发明的结合物和组合物的抗病毒活性可使用适当的体内和体外模型进行测定,根据所采用的具体 EI 的已知活性而定。用于测定本发明的 EI 结合物或组合物的抗病毒活性的方法包括细胞融合试验、无细胞的病毒感染试验、逆转录酶试验、等等,都是抗逆转录病毒活性的适当的指标。用于测定本文中所述的任一种 T-20 或 T-20 相关序列、或相应的聚合物结合物或组合物的活性的方法在美国专利 5,464,933 中描述。另外,适合于测定抗病毒活性的体内试验在实施例 16 中描述。作为比较用标准,T-1249 本身的 IC₅₀ 为 0.003 μ g/ml;其 IC₉₀ 为 0.023 μ g/ml。另外,当作为 90 mg 的单次皮下剂量给药时(N=12),T-20 表现出 3.8 ± 0.6 h 的平均消除半衰期,和 24.8 ± 4.1 mL/h/kg 的平均 $\pm$ SD 表观清除率(Fuzeon™的包装说明书)。抗-CCR5 鼠源单克隆抗体 PA8、PA9、PA10、PA11、PA12、和 PA 14 (PRO 140)的结合物或组合物的

抗病毒活性使用例如在 Olson, W.等人的 J. of Virology, May 1999,73 (5), 4145-4155 中描述的 gp120-sCD4 结合试验和 RET 试验(用于检测包膜介导的膜融合和 HIV-1 进入)进行评价, 或通过如 Trkola, A.等人的 J. of Virology, 2001,75 (2), 579-588 中所述方法通过评价在 PBMC 培养物或在巨噬细胞培养物中的 HIV-1 复制的抑制进行评价。使用如美国专利申请公开 2003/0139571 中所述的用于检测复合肽结合的固相 ELISA 评价硫酸化 CCR5 肽的聚合物结合物和组合物的抗病毒活性。使用例如 ELISA 方法评价单体 gp120 的结合亲和力、和/或使用无病毒的合胞体试验检查 HIV-1 包膜介导的合胞体形成的抑制、和/或使用适应实验室的菌株和 HIV-1 的初次分离物的中和试验(如美国专利 6,451,313 中提供的)检查 CD4-IgG2 嵌合体的聚合物结合物和组合物的抗病毒活性。

药物组合物

任选地, 本发明的组合物可另外包括一种或多种可药用的赋形剂, 以提供药物组合物。示例性的赋形剂包括但不限于碳水化合物、无机盐、抗微生物剂、抗氧化剂、表面活性剂、缓冲剂、酸、碱、及其组合。适合于可注射组合物的赋形剂包括水、醇、多元醇、甘油、植物油、磷脂、和表面活性剂。

可存在碳水化合物如糖、衍生化的糖如醛醇、醛糖糖酸、酯化的糖、和/或糖聚合物作为赋形剂。具体的碳水化合物赋形剂包括例如: 单糖, 如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等; 二糖, 如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等; 多糖, 如棉子糖、松三糖、麦芽糖糊精、右旋糖酐、淀粉、等; 和醛醇, 如甘露糖醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇、山梨糖醇(葡糖醇)、吡喃糖基山梨糖醇、肌醇等。

赋形剂也可包括无机盐或缓冲剂, 如柠檬酸、氯化钠、氯化钾、硫酸钠、硝酸钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、及其组合。

组合物也可包括抗微生物剂用于预防或阻止微生物生长。适合本发明的抗微生物剂的非限制性例子包括苯扎氯铵、苄索氯铵、苯甲醇、十六烷基氯化吡啶鎓、氯丁醇、酚、苯乙醇、硝酸苯汞、硫柳汞、及其组合。

也可在组合物中存在抗氧化剂。抗氧化剂用于防止氧化，从而防止结合物或制剂的其它组分变质。用于本发明的适当的抗氧化剂包括例如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基苯甲醚、丁基化羟基甲苯、次磷酸、单硫代甘油、没食子酸丙酯、亚硫酸氢钠、甲醛合次硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、及其组合。

也可存在表面活性剂作为赋形剂。示例性的表面活性剂包括：聚山梨醇酯，如“Tween 20”和“Tween 80”、和 pluronics 如 F68 和 F88 (其两者都来自 BASF, Mount Olive, New Jersey)；山梨糖醇酐酯；脂质，如磷脂如卵磷脂和其它磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺(虽然优选不是脂质体体(liposomal)形式)、脂肪酸和脂肪酸酯；甾族化合物，如胆固醇；和螯合剂，如 EDTA、锌和其它这种适当的阳离子。

可存在酸或碱作为组合物中的赋形剂。可使用的酸的非限制性例子包括选自盐酸、乙酸、磷酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、甲酸、三氯乙酸、硝酸、高氯酸、磷酸、硫酸、富马酸、及其组合的酸。适当的碱的例子包括但不限于选自氢氧化钠、乙酸钠、氢氧化铵、氢氧化钾、乙酸铵、乙酸钾、磷酸钠、磷酸钾、柠檬酸钠、甲酸钠、硫酸钠、硫酸钾、富马酸钾、及其组合的碱。

组合物中结合物(即，在 EI 和聚合物试剂之间形成的结合物)的量根据多种作用剂而定，但是当将组合物储存在单位剂量容器(如，小瓶)中时，其最好处在治疗有效剂量。另外，可以将药物制剂容纳在注射器中。治疗有效剂量可通过增加结合物或组合物的量的重复给药以测定产生临床所需目标的量的实验方法测定。

组合物中任何单独的赋形剂的量根据赋形剂的活性和对组合物的具体需要而定。通常，任何单独的赋形剂的最佳量通过常规试验测定，即，通过制备包含不同量(从低到高)的赋形剂的组合物、检查稳定性和其它参数、然后确定获得最佳性能而没有显著副作用的范围。

然而，通常，赋形剂以约 1 重量%到约 99 重量%、优选约 5 重量%到约 98 重量%、更优选约 15 到约 95 重量%的量存在于组合物中，最优选低于 30 重量%的浓度。

这些前述的药用赋形剂以及其它赋形剂在“Remington: The Science & Practice of Pharmacy”，第 19 版，Williams & Williams, (1995); the "Physician's Desk Reference", 第 52 版，Medical Economics, Montvale, NJ (1998); 和 Kibbe, A. H. , Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第三版，American Pharmaceutical Association, Washington, D. C. , 2000 中描述。

组合物包括所有类型的制剂，特别是适合于注射的那些制剂，如可以构新构建的粉末或冻干物、以及液体。用于在注射之前重新构建固体组合物的适当的稀释剂的例子包括抑菌的注射用水、含 5%右旋糖的水、磷酸盐缓冲水、林格溶液、盐水、无菌水、去离子水、及其组合。对于液体药物组合物，考虑了溶液和悬浮液。

优选地，本发明中所述的 EI 组合物为单位剂型，意思指为预定的或预包装的形式的适合于单次剂量给药的量的本发明的结合物或组合物。

给药

本发明的组合物通常但并非必要地通过注射给药，因此在即将给药前通常为液体溶液或悬浮液。药物制剂也可其它形式，如糖浆、

乳剂、膏剂、片剂、粉末、等等。其它给药方式还包括例如肺、直肠、透皮、经粘膜、经口、鞘内、皮下、动脉内、等等。

本发明还提供将本文提供的结合物对患有对使用结合物的治疗有反应的状况的患者给药的方法。该方法包括给药(通常通过注射)治疗有效量的结合物(优选作为药物组合物的一部分提供)。如前所述,结合物可以通过静脉注射以非肠道方式注射给药,或者次之优选通过肌肉内或皮下注射。用于非肠道给药的适当的制剂类型包括即用型(ready-for-)注射溶液、用于在使用之前与溶剂组合的干粉、备用于注射的悬浮液、用于在使用之前与介质组合的干燥不溶性组合物、和用于在给药之前稀释的乳剂和液体浓缩物、和其它。

该给药方法可用于治疗可通过给药 EI 结合物进行治疗或预防的任何状况。本领域技术人员应该知道具体的结合物可以有效进行治疗的状况。例如,结合物可用于治疗感染 HIV 的个体。给药的剂量将根据主体的年龄、体重、和一般状况、以及待治状况的严重程度、保健专业人员的判断和给药的结合物而定。治疗有效量可由本领域技术人员确定并可根据各个具体情况的具体需要进行调节。通常,治疗有效量为约 0.001 mg 到 300 mg 的 EI, 优选为 0.01 mg/每天两次到 200 mg/每天两次的剂量, 优选约 0.01 mg/天到 200 mg/天的剂量, 更优选 0.10 mg/天到 100 mg/天的剂量。

任何给出的结合物的单元剂量(同样, 优选作为药物制剂的一部分提供)可根据临床医师的判断、患者的需要等按照不同的剂量给药时间表给药。具体的剂量给药时间表为本领域技术人员已知的, 或者可以使用常规方法用实验方法测定。示例性的剂量给药时间表包括但不限于每天给药五次、每天给药四次、每天给药三次、每天给药两次、每天给药一次、每周给药三次、每周给药两次、每周给药一次、每月给药一次、或其任何组合。优选的结合物和组合物是需要比每天一次给药的频率更低的频率给药的那些。即, 优选地, 本发明的组合物每天

给药两次、每天给药一次、每隔一天给药一次、每周给药两次、每周给药一次、每两周给药一次、或每月给药一次。更优选的是不比每周一次更频繁给药的结合物和组合物，更优选不比每月两次(每两周一次)更频繁给药的那些。

给药本发明的某些结合物的一个优点在于包括完整的聚合物的单独的水溶性聚合物部分可以裂开。这种结果当由于聚合物的大小而使从身体的清除是潜在问题时是有利的。最佳地，每个水溶性聚合物部分的裂解通过使用生理学可裂解的和/或酶促可降解的键合如安氨基甲酸酯、碳酸酯或者含酯的键合而变得受到促进。这样，可以通过选择聚合物分子的大小和类型、提供所需的清除性质的官能团而调整结合物的清除(经由单独的水溶性聚合物部分的裂解)。本领域技术人员可以确定聚合物的最佳分子大小以及可裂解的官能团。例如可以通过制备具有不同聚合物重量和可裂解官能团的多种聚合物衍生物然后进行如本文中所述的体外或体内试验以评价效力，从而确定优选的聚合物分子大小、结构、和/或可裂解的官能团。或者，可使用适当的体内模型得到清除图形(如，通过周期性地采血样或采尿样)。

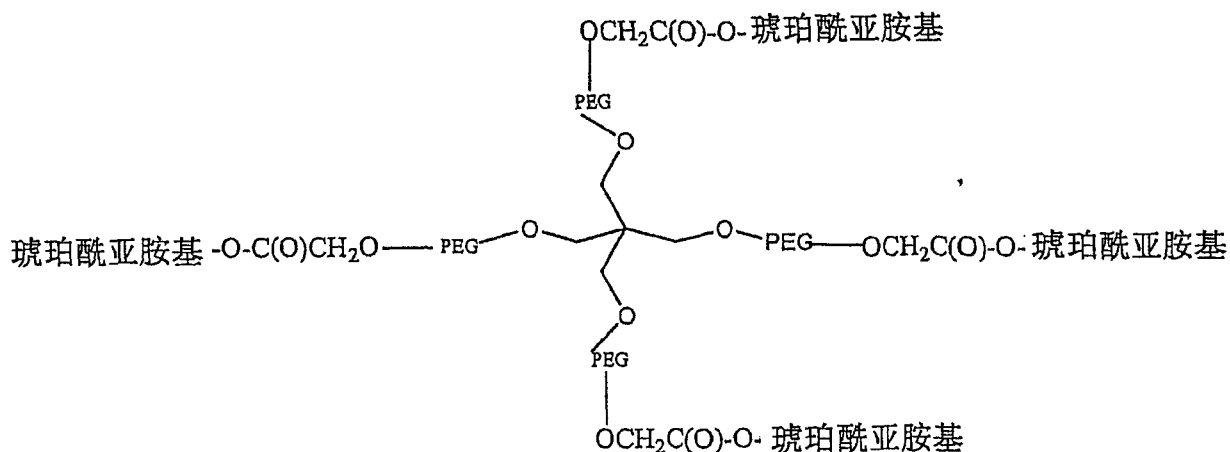
本发明的EI结合物和组合物可在通常被称为联合治疗的方法中与一种或多种其它抗病毒药物或抗逆转录病毒药物共同给药。可存在于本发明的组合物中的或可以共同给药的其它抗病毒药包括 DP107、 $rIFN\alpha$ 、 $rIFN\beta$ 、 $rIFN\gamma$ 、AZT、3TC、d4T、ddI、阿德福韦、阿巴卡韦、甲磺酸 delaviridine、奈维拉平、依发韦仑、病毒唑、利托那韦、甲磺酸奈非那韦、安普那韦、沙奎那韦、茚地那韦、ABT538、两性霉素 B、和栗精胺、或任何的本文中所述的 EI。

应该理解，虽然已经结合优选的具体实施方案描述了本发明，但是上述说明及以下实施例意在用于说明目的，而不是用于限制本发明的范围。本发明范围内的其它方面、优点和变体对于本发明所属领域的技术人员来说是显而易见的。

本文中引用的所有的文章、书记、专利和其它出版物都被全文并入本文作为参考。

缩写

EI	进入抑制剂
AIDS	获得性免疫缺乏综合症
HIV	人类免疫缺陷性病毒
NRTT	核苷类逆转录酶抑制剂
PI	蛋白酶抑制剂
NNRTI	非核苷类逆转录酶抑制剂
AZT	叠氮胸苷(也称为齐多夫定或 3'-叠氮基-3'-脱氧胸苷)
PEG	聚乙二醇
trt	三苯甲基
Boc	叔丁氧羰基
PBS	磷酸盐缓冲盐水
Troc	氨基甲酸-2,2,2-三氯乙基酯
Teoc	氨基甲酸-2-三甲基甲硅烷基乙基酯
TEA	三乙胺
DMAP	4-二甲氨基吡啶
DIC	1,3-二异丙基碳二亚胺
DCC	二环己基碳二亚胺
DCM	二氯甲烷
TFA	三氟乙酸
PTSA	对甲苯磺酸
4-臂 PEG-SCM	



PG 聚谷氨酸

IPA 异丙醇

实施例

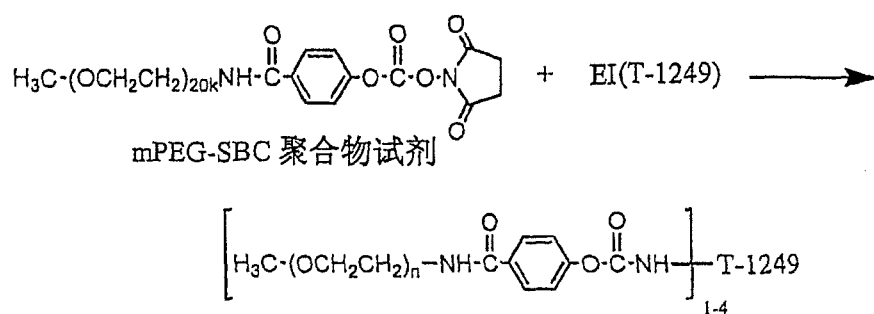
材料

除非另有陈述，在随后的实施例中涉及的所有化学试剂都是市售的，或者可根据本领域中可获得的信息制备。

除非另有陈述，在随后的实施例中涉及的所有的 PEG 试剂都得自 Nektar, Huntsville, AL。所有的 ¹H NMR 数据都由 Bruker 生产的 300 或 400 MHz 的核磁共振波谱仪生成。

实施例 1

T1249 与 mPEG-琥珀酰亚胺基苯甲酰胺-碳酸酯 20 kDa(MPEG-SBC 20kDa)在水相反应中的 PEG 化



将得自 Nektar Therapeutics (Huntsville, Alabama)的在氩气下在-20℃下储存的 mPEG-SBC 20 kDa 回温到环境温度。反应在室温下进行。将计算量的经回温的 mPEG-SBC 20 kDa (414 mg, 以得到基于绝对肽含量为 8 倍摩尔过量的 mPEG-SBC 20kDa)称重到含磁力搅拌棒的 5 mL 玻璃小瓶中。加入 4.5 mg/mL 的 T1249 肽溶液(N-末端被乙酰化; C-末端用酰胺基修饰, 在磷酸盐缓冲盐水 PBS pH 7.4 中制备)的 2.0 mL 小份并补充另外的 PBS 使体积达到 4.5 mL。使用磁力搅拌器以最大速度搅拌混合物, 直到 PEG 完全溶解。将搅拌速度降低到 50%, 并将反应进行 2.5 小时, 得到结合物溶液。反应结束时结合物溶液的 pH 为 6.1, 用 0.1 M HCl 使其 pH 进一步降低到 5.5。

将该结合物溶液通过 SDS-PAGE (图 1, 第 4 泳道)和 RP-HPLC (C18)进行分析。如图 1 所示, 水相反应没有进行完全, 因为还可见游离的肽、单-、二-、和三-PEG 化的物质。

实施例 2

T1249 与 mPEG-琥珀酰亚胺基苯甲酰胺-碳酸酯 20 kDa 在 DMSO 反应混合物中的 PEG 化

将在-20℃储存的 mPEG-琥珀酰亚胺基苯甲酰胺-碳酸酯(20 kDa)回温到环境温度。反应在室温下进行。使用三个不同摩尔比(1:1、1:2、和 1:4 的肽:mPEG-SBC 20kDa)。将计算量的经回温的 mPEG-SBC 20 kDa (对于 1:1、1:2 和 1:4 的比例分别为 29 mg、58 mg、和 116 mg)称重到上述实施例 1 中的玻璃小瓶中。在各个小瓶中将 PEG-SBC 20kDa 溶解(通过搅拌)在 1 mL 的 DMSO 中, 然后加入也溶于 DMSO 中的 5 mg/mL T1249 肽溶液的 1 mL 小份。使反应继续进行 3 小时, 产生结合物溶液。

将该结合物溶液通过 SDS-PAGE (图 1, 第 3 泳道, 4:1 摩尔比)和 RP-HPLC 进行分析。从图 1 第 3 泳道可以看出, 结合反应完全, 因为

没有游离的肽剩余,并且可看见大部分是三-和更高的 PEG 基体(在 66.3 kDa 标记物以上)。

实施例 3

T1249 与 mPEG-琥珀酰亚胺基苯甲酰胺-碳酸酯 20 kDa 在 1:1 的水/DMSO 反应混合物中的 PEG 化

将在氩气下在 -20℃ 储存的 mPEG-琥珀酰亚胺基苯甲酰胺-碳酸酯 (20 kDa) 回温到环境温度。反应如上述实施例 2 中所述在室温下进行,不同之处在于将肽溶解于 1 X PBS 中。

为了总结在以上实施例 1-3 中所述的实验,使用 1:1、2:1 和 4:1 的摩尔比进行反应,使用水相/DMSO 混合反应条件(实施例 3)和纯的 DMSO 反应条件(实施例 2);两种方法的结果相似。典型的结果如图 2 中所示。以 1:1 比(第 3 泳道)得到收率最高的单 PEG 化的肽,其中 >50% 的产物为单 PEG 化的。在图 2 中,在所示的三-PEG 化的物质上方可见四-PEG 化的结合物的痕迹。

图 3 说明得自实施例 3 的摩尔比为 1:1 的结合物混合物的 HPLC 色谱图。曲线下面积的计算显示在任何的另外纯化之前为 51 % 收率的单-PEG 化的 T1249、17 % 收率的二-和三-PEG 化的 T1249 和 32% 收率的游离肽。注射的样品为 1:1 摩尔比的水/DMSO 反应混合物,并且表现出类似于图 2 中第 3 泳道中所见的肽和产物分布。

实施例 4

结合物混合物的分析

通过 SDS PAGE 分析在实施例 1、2 和 3 中制备的结合物溶液。

SDS-PAGE

使用 MES 缓冲液在 4-12% Novex 双-Tris 凝胶(Invitrogen)上拆分肽和结合物。电泳运行时间为 35 分钟。使用 Simply Blue 凝胶染色(Invitrogen)根据生产商的说明书将凝胶染色。在所有的凝胶上使用蛋白质标准品 MARK 12(Invitrogen)。

实施例 5

示例性的 PEG-EI 结合物混合物的纯化

对得自实施例 3 (混合的水相/DMSO 反应液, 1:1 摩尔比)的结合物组合物进行另外的纯化。

A. 阴离子交换色谱法

使用 5ml 的 Q-HP 柱(Pharmacia)纯化得自实施例 3 的 T1249 的 PEG 化形式。使用两种缓冲液用于纯化: 缓冲液 A 为 20 mM MES(pH 6.0), 缓冲液 B 为 20 mM MES(pH 6.0)和 0.5 M NaCl。使用 Akta Purifier (Pharmacia)进行纯化。将 5 ml 的 Q-HP 柱(Pharmacia)在 14% B (在所有情况中, 缓冲液 A 等于 100-%B)中平衡。样品被注射并通过泵送 5 个柱体积的 14% B 通过柱而将未结合的级分洗脱。通过增加缓冲液 B 含量到 17% (5 个柱体积)从柱洗脱包含至少两个 PEG 部分的 PEG 化的 T1249 (“高-基体(himer)”)。通过提高缓冲液 B 含量到 45% (5 个柱体积)洗脱单 PEG 化的形式。最后将缓冲液 B 含量提高到 70% (5 个柱体积)以洗脱未 PEG 化的 T1249。收集级分并通过 SDS PAGE 进行分析。

单 PEG 化的收集物的 SDS PAGE 如图 4 中所示。在收集的物质中有极低量(<10%)的二-和三-PEG 化的物质。

进行其它的纯化以除去其余的二-和三-PEG 化的物质。

B. AMICON 浓缩

收集包含单-PEG 化的 T1249 的色谱级分并使其通过 Amicon 过滤浓缩(YM 10 膜, 10,000 MWCO) (Millipore)。

C. HPLC 方法

将 Zorbax 80A Extend-C18 柱(Agilent) 4.6 X 250 mm 与 Agilent 1100 HPLC 一起使用流动相 A 为含 0.1 % TFA 的 Milli-Q 水, 流动相 B 为含 0.1% TFA 的乙腈。柱维持在 58℃ 的温度。时间表如下:

时间, 分钟	% A	% B
0	55	45
4	55	45
24	45	55
25	0	100
26	0	100
27	55	45

该方法包括 4 分钟的柱后时间。

在所述条件下, 游离的 T1249 肽具有 4.5 ± 0.1 分钟的保留时间。游离的 PEG 具有 18.0 ± 0.1 分钟的保留时间。纯化的单-PEG 化的制剂表现出在 19.8 和 20.6 分钟处的两个主峰。这两个峰大概相应于单-PEG 化的物质的两种位置异构体。二-和三-PEG 化的物质分别在 21.6 和 22.6 分钟的保留时间作为两个峰洗脱。

D. 单 PEG 化的 T1249 的降解

将单 PEG 化的 T1249 样品($450 \mu\text{l}$)与 1/10 体积($50 \mu\text{l}$)的 10 X PBS 合并。将 pH 提高到 7.4 并将样品在 37℃ 培养过夜。样品通过 HPLC 进行分析。

HPLC 分析证实结合物样品的体外水解。图 5 中提供说明模型肽 -SPC 单-PEG 结合物在体外(即, 在 pH 7.4 的 PBS 中和 37℃ 下)的水解图形。从该图中可以看出, 随着单-PEG 结合物水解, 通过 HPLC 分析测定到游离肽的出现。在 384 小时(即, 16 天), 约 50% 的结合物水解

释放游离的肽，显示本文中提供的代表性的结合物的缓释释放图。

在上述说明性例子中，看来好像 4 个赖氨酸中只有 3 个可容易地用于 PEG 化，在单独的 DMSO 中或混合反应物(水相/DMSO)中 4:1 比的反应当反应完成时都主要得到三-PEG 化的物质，虽然观察到痕量的四-PEG 化的物质。T-1249 上的两个赖氨酸(Lys 28 和 31)是仅有的两个相隔的氨基酸，并且在任一个上的 PEG 化都可能潜在地影响在另一个位置上的 PEG 化，例如由于位阻。

在采用的离子交换纯化方法中，至少 3 个单 PEG 化的峰有意地合并为一个峰。这些单独的峰代表着位置异构体，如果期望，可以通过制造肽图对其进行进一步的纯化和表征。

实施例 6

T1249 与 mPEG-琥珀酰亚胺基苯甲酰胺-碳酸酯 30 kDa (mPEG-SBC 30 kDa)的 PEG 化

如上述实施例 1-3 所述使用不同的溶剂系统(水相、DMSO、含水的 DMSO)将 T-1249 进行 PEG 化，不同之处在于采用的 PEG 试剂具有 30 kDa 的分子量。将得到的结合物混合物如上述实施例 4 和 5 中所述进行分析和进一步纯化。

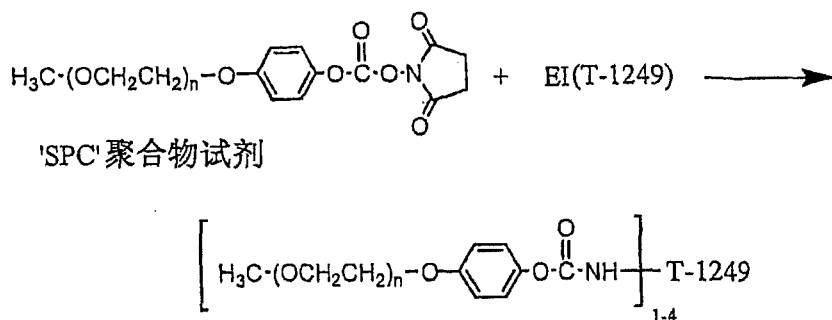
实施例 7

T1249 与 mPEG-琥珀酰亚胺基苯甲酰胺-碳酸酯 40 kDa (mPEG-SBC 40 kDa)的 PEG 化

如上述实施例 1-3 所述使用不同的溶剂系统(水相、DMSO、含水的 DMSO)将 T-1249 进行 PEG 化，不同之处在于采用的 PEG 试剂具有 40 kDa 的分子量。将得到的结合物混合物如上述实施例 4 和 5 中所述进行分析和进一步纯化。

实施例 8

T1249 与 mPEG-琥珀酰亚胺基苯基-碳酸酯 20 kDa(mPEG SPC 20 kDa)在水相反应中的 PEG 化



将得自 Nektar Therapeutics (Huntsville, Alabama)的在氩气下在-20℃储存的 mPEG-SPC 20 kDa 回温到环境温度。反应在室温下进行。使用(基于绝对的肽含量的)绝对 8 倍摩尔过量的 mPEG-SPC 试剂。将 PEG 试剂称重到含磁力搅拌棒的 5 mL 玻璃小瓶中。加入 4.5 mg/mL 的 T1249 肽溶液(N-末端被乙酰化;C-末端用酰胺基修饰,在磷酸盐缓冲盐水 PBS pH 7.4 中制备)的 2.0 mL 小份并补充另外的 PBS 使体积达到 4.5 mL。使用磁力搅拌器以最大速度搅拌混合物,直到 PEG 完全溶解。将搅拌速度降低到 50%并使反应进行约 2.5 到 3 小时,以形成结合物产物。测量反应结束时结合物溶液的 pH,并且根据需要通过加入 0.1M 的 HCl 进一步酸化,以使最终溶液的 pH 为约 5.5。

然后通过 SDS-PAGE 和 RP-HPLC (C18)对结合物溶液进行分析以测定反应程度(即,反应是否完成)。

使用得自 Nektar Therapeutics, Huntsville, Alabama 的 (i) mPEG-SPC 30 kDa、和(ii) mPEG-SPC 40 kDa 如上所述进行另外的反应。

实施例 9

T1249 与 mPEG-琥珀酰亚胺基苯基-碳酸酯 20 kDa(mPEG SPC 20

kDa)在 DMSO 反应混合物中的 PEG 化

将在氩气下在-20℃储存的 mPEG-琥珀酰亚胺基苯基-碳酸酯(20 kDa)回温到环境温度。反应在室温下进行。使用三个不同的摩尔比(1:1、1:2、和 1:4 的肽:mPEG-SPC 20kDa)。如上述实施例 8 中所述将相应的计算量的经回温的 mPEG-SPC 20 kDa (分别用于 1:1、1:2 和 1:4 的比)称重到玻璃小瓶中。在各个小瓶中将 PEG-SPC 20kDa 溶解(通过搅拌)在 1 mL 的 DMSO 中, 然后加入也溶于 DMSO 中的 5 mg/mL T1249 肽溶液的 1 mL 小份。使反应继续进行约 3-5 小时, 产生结合物溶液。

然后通过 SDS-PAGE 和 RP-HPLC 分析每个反应得到的结合物溶液, 以测定反应程度。

实施例 10

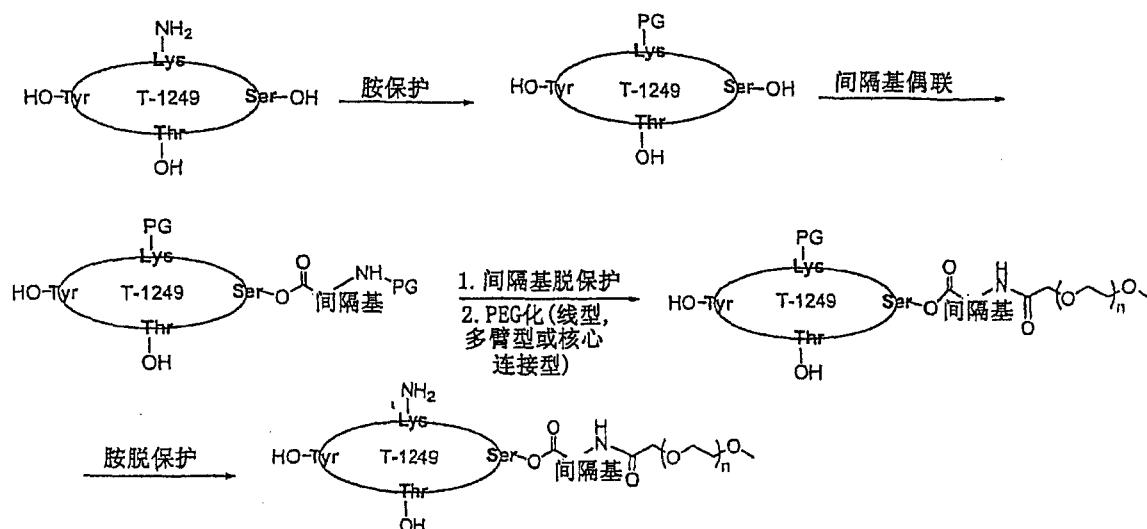
T1249 与 mPEG-琥珀酰亚胺基苯基-碳酸酯 20 kDa 在 1:1 的水/DMSO 反应混合物中的 PEG 化

将在氩气下在-20℃储存的 mPEG-琥珀酰亚胺基苯基-碳酸酯回温到环境温度。反应如上述实施例 9 中所述在室温下进行, 不同之处在于将肽溶解于 1 X PBS 中。

如上述实施例 4 和 5 中所述对得自实施例 8-10 的产物组合物进行另外的分析、纯化、和水解。

实施例 11-15 涉及以下提供的通用图解。在该方法中, 经由连接基的连接将可降解的键合引入到最终的聚合物结构中, 在这种情况下, 经由可降解的酯键将示例性的氨基酸(甘氨酸)连接于肽药物。以下实施例描述用于产生本发明这一方面的进入抑制剂结合物的合成步骤。

说明性的反应图解:



关于 T-1249 而具体描述的上述反应图解适用于本文所述的其它进入抑制剂, 使得上述图解中的名称“T-1249”可被通用术语“EI”(进入抑制剂)代替。

实施例 11

T-1249 伯胺基的最初保护

N^{ϵ} -Troc-T-1249: 向搅拌的肽 T-1249 的水(30 mL/g 肽药物)和(THF, 12 mL/g 肽)溶液中加入三乙胺(TEA, 20 eq)和 2,2,2-三氯乙基琥珀酰亚胺基碳酸酯(Troc-OSu, 20 eq)。将混合物在室温下搅拌 16 小时。在将溶液用浓盐酸(HCl)酸化到 pH 4-6 之后, 减压除去有机溶剂, 并将水层冻干至干燥。然后将残余物在乙醚中沉淀(300 mL/g 肽)。在将肽以 12,000 rpm 离心 5 分钟之后将乙醚倾析掉并将沉淀物用冷乙醚洗涤(2 x 100 mL/g 肽)。或者, 通过抽滤收集产物并用冷乙醚洗涤(2 x 100 mL/g 肽)。基于最初的分析, 根据需要进行另外的纯化, 如, 通过制备性 HPLC 进行。将药物产物 N^{ϵ} -Troc-T-1249 在真空中干燥过夜。通过质谱法(MS)表征并通过 HPLC 测定纯度。

N^{ϵ} -Teoc-T-1249: 如以上关于 N^{ϵ} -Troc-T-1249 所述进行胺基团的保护, 不同之处在于使用不同的保护基 1-[(2-三甲基甲硅烷基)乙氧羰基氧基]吡咯烷-2,5-二酮(Teoc-OSu)。

实施例 12

对胺保护的 T-1249 附加保护的氨基酸间隔基

在存在于 T-1249 主链中的三种不同的羟基(丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸)中, 预计丝氨酸的伯醇羟基表现出最高的反应性, 虽然可以调节反应条件以有利于在其它的前述位置进行取代。

N^{α} -Boc-Gly- N^{ϵ} -Troc-T-1249: 将 N^{ϵ} -Troc-T-1249 溶解于二氯甲烷(DCM, 35 mL/g 肽)中并加入少量的二甲亚砜(DMSO, <3 mL/g 肽)以增加肽的溶解性。加入 N^{α} -叔丁氧羰基甘氨酸(N^{α} -Boc-甘氨酸-OH, 1.2 eq)和 4-二甲氨基吡啶(DMAP, 1.2 eq)并将反应在室温下搅拌约 10 分钟。加入 1,3-二异丙基碳二亚胺(DIC, 2 eq)并使反应在室温下继续进行约 16 小时。将 DCM 溶液减压浓缩并将残余物用在冰浴中冷却的乙醚沉淀(300 mL/g 肽)。在将肽以 12,000 rpm 离心 5 分钟之后将有机相倾析掉并将沉淀物用冷乙醚洗涤(2 x 80 mL/g 肽)。作为离心的替代法, 可通过抽滤收集产物并用冷乙醚洗涤(2 x 100 mL/g 药物), 随后任选另外通过制备性 HPLC 纯化, 如基于对产物的分析而正当进行的。将肽产物 N^{α} -Boc-Gly- N^{ϵ} -Troc-T-1249 在真空中干燥过夜。通过质谱法(MS)进行表征, 同时通过 HPLC 测定产品纯度。

实施例 13

N^{α} -BOC-GLY- N^{ϵ} -TROC-T-1249 中的间隔基的脱保护

A. Gly- N^{ϵ} -Troc-T-1249: 将 N^{α} -Boc-Gly- N^{ϵ} -Troc-T-1249 溶解于 DCM (30 mL/g 肽)并加入少量的 DMSO (<3 mL/g 肽)以增加肽的溶解性。加入无水的三氟乙酸(TFA, 4 mL/g 肽)并将反应在室温下搅拌 2 小时。减压除去 TFA/DCM 溶剂并将残余物用乙醚洗涤(2 x 80 mL/g 肽)并在其每次在乙醚(300 mL/g 肽)中沉淀之前将其蒸发到干燥。在将肽以 12,000 rpm 离心 5 分钟之后将有机相倾析掉并将沉淀物用冷乙醚洗涤(2 x 100 mL/g 肽)。作为离心的替代办法, 通过抽滤收集产物并用冷乙醚洗涤(2 x 100 mL/g 肽)。如有必要, 可通过例如制备性 HPLC 进行另外

的纯化。将产物 Gly-N^e-Troc-T-1249 的 TFA 盐在真空中干燥过夜。通过质谱法(MS)进行表征并通过 HPLC 测定纯度。

B. Gly-N^e-Troc-T-1249: 将 N^α-Boc-Gly-N^e-Troc-T-1249 溶解于 THF (40 mL/g)和 DMSO (5 mL/g 肽)的混合物中。加入对甲苯磺酸(PTSA, 1.0 eq)的乙醇溶液(6 mL/g 药物)。将溶液置于旋转蒸发器上并除去溶剂混合物。将浴温升高到 60-65°C并在该温度保持另外的 20 分钟。在冷却到室温后,将残余物在乙醚中沉淀(300 mL/g 药物)。在将药物以 12,000 rpm 离心 5 分钟之后将有机相倾析掉并将沉淀物用冷乙醚洗涤(2 x 100 mL/g 药物)。作为离心的替代办法,通过抽滤收集产物并用冷乙醚洗涤(2 x 100 mL/g 药物)。任选进行另外的纯化,如,通过制备性 HPLC 进行。将产物 Gly-N^e-Troc-T-1249de PTSA 盐在真空中干燥过夜。通过质谱法(MS)进行表征并通过 HPLC 测定纯度。

实施例 14

Gly-N^e-Troc-T-1249 对示例性的 PEG 试剂的共价连接,以提供可降解的 PEG-T-1249 结合物

a.1) 线型 PEG 结合物
(CH₃O-(CH₂CH₂O)_{20kD}-CH₂C(O)-NH-Gly-N^e-Troc-T-1249, 其中“NH-Gly-”表示对甘氨酸氨基的共价连接): 将得自上述实施例 13 的 Gly-N^e-Troc-T-1249 盐溶解于 DCM (30 mL/g 药物)并加入少量的 DMSO (<3 mL/g 药物)以增加药物的溶解性。加入三乙胺(TEA, 10 eq)并将反应溶液在室温下搅拌 5 分钟。加入含 PEG_{20kD}-SCM (1 eq), CH₃O-(CH₂CH₂O)_{20kD}-CH₂C(O)-琥珀酰亚胺)的 DCM(10 mL/g 药物)并使反应在室温下进行约 16 小时。减压除去溶剂并将残余物通过加入乙醚进行沉淀(300 mL/g 药物)。在抽滤和真空干燥过夜后,收集简称为 PEG_{20kD}-Gly-N^e-Troc-T-1249 (其中确切的结构如上所述)的所需产物。

a.2) 线型 PEG 结合物

(CH₃O-(CH₂CH₂O)_{30kD}-CH₂C(O)-NH-Gly-N^e-Troc-T-1249): 将得自上述实施例 13 的 Gly-N^e-Troc-T-1249 盐溶解于 DCM (30 mL/g 药物)中并加入少量的 DMSO (<3 mL/g 药物)以增加药物溶解性。加入三乙胺(TEA, 10 eq)并将反应溶液在室温下搅拌 5 分钟。加入含 PEG_{30kD}-SCM (1 eq), CH₃O-(CH₂CH₂O)_{30kD}-CH₂C(O)-O-琥珀酰亚胺)的 DCM(10 mL/g 药物)并使反应在室温下进行约 16 小时。减压除去溶剂并将残余物通过加入乙醚(300 mL/g 药物)沉淀。在抽滤和真空干燥过夜之后收集简称为 PEG_{30kD}-Gly-N^e-Troc-T-1249 (其中确切的结构如上所示)的所需产物。

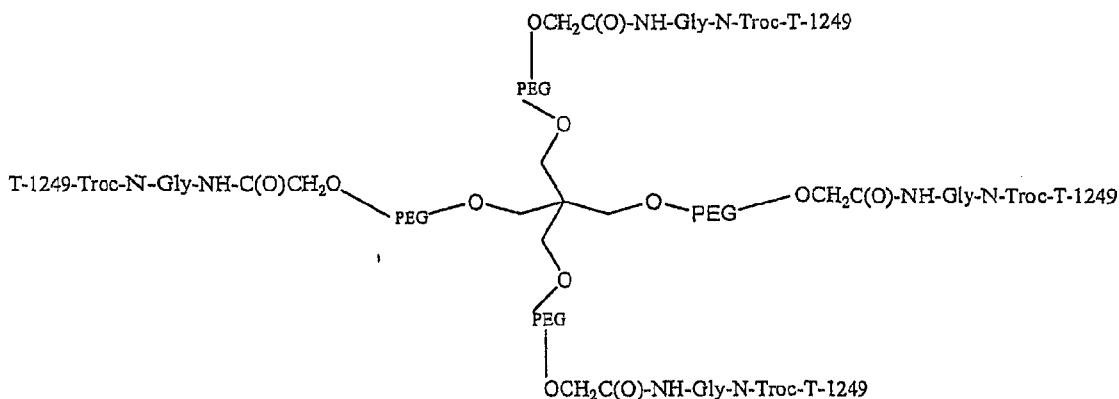
a.3). 线型 PEG 结 合 物 ,
CH₃O-(CH₂CH₂O)_{30kD}-CH₂CH₂-C(O)-NH-Gly-N^e-Troc-T-1249): 将得到上述实施例 13 的 Gly-N^e-Troc-T-1249 盐溶解于 DCM (30 mL/g 药物)并加入少量的 DMSO (<3 mL/g 药物)以增加药物溶解性。加入三乙胺(TEA, 10 eq)并将反应溶液在室温下搅拌 5 分钟。加入含 PEG_{30kD}-SPA (1 eq)、PEG-琥珀酰亚胺基丙酸酯, CH₃O-(CH₂CH₂O)_{30kD}-CH₂CH₂C(O)-O-琥珀酰亚胺)的 DCM (10 mL/g 药物)并使反应在室温下继续约 16 小时。减压除去溶剂并将残余物通过加入乙醚沉淀(300 mL/g 药物)。在抽滤和真空干燥过夜之后, 收集产物 CH₃O-(CH₂CH₂O)_{30kD}-CH₂CH₂-C(O)-NH-Gly-N^e-Troc-T-1249)。

a.4). 线型 PEG 结 合 物 ,
CH₃O-(CH₂CH₂O)_{20kD}-CH₂CH₂-C(O)-NH-Gly-N^e-Troc-T-1249): 将得自上述实施例 13 的 Gly-N^e-Troc-T-1249 盐溶解于 DCM (30 mL/g 药物)中并加入少量的 DMSO (<3 mL/g 药物), 以增加药物溶解性。加入三乙胺(TEA, 10 eq)并将反应溶液在室温下搅拌 5 分钟。加入含 PEG_{20kD}-SPA (1 eq)、PEG-琥珀酰亚胺基丙酸酯、CH₃O-(CH₂CH₂O)_{20kD}-CH₂CH₂C(O)-O-琥珀酰亚胺)的 DCM (10 mL/g 药物)并使反应在室温下继续进行约 16 h。减压除去溶剂并将残余物通过加入乙醚(300 mL/g 药物)沉淀。在抽滤和真空干燥过夜之后收集产物 CH₃O-(CH₂CH₂O)_{20kD}-CH₂CH₂-C(O)-NH-Gly-N^e-Troc-T-1249)。

a.5). 线型 PEG 结 合 物 ,
 $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{30\text{kD}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{Gly}-\text{N}^\text{e}-\text{Troc}-\text{T}-1249$): 将
 得自上述实施例 13 的 $\text{Gly}-\text{N}^\text{e}-\text{Troc}-\text{T}-1249$ 盐溶解于 DCM (30 mL/g 药
 物) 并加入少量的 DMSO (<3 mL/g 药物)以增加药物的溶解性。加入三
 乙胺 (TEA, 10 eq) 并将反应溶液在室温下搅拌 5 分钟。加入含
 $\text{PEG}_{30\text{kD}}-\text{SBA}$ (1 eq)、PEG-琥珀酰亚胺基丁酸酯、
 $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{30\text{kD}}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{琥珀酰亚胺}$ 的 DCM (10 mL/g 药
 物)并使反应在室温下继续进行约 16 小时。减压除去溶剂并将残余物通
 过加入乙醚 (300 mL/g 药物)沉淀。在抽滤和真空干燥过夜之后收集产物
 $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{30\text{kD}}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{Gly}-\text{N}^\text{e}-\text{Troc}-\text{T}-1249$ 。

a.6). 线型 PEG 结 合 物 , $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{30\text{kD}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}$
 $(\text{CH}_3)-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{Gly}-\text{N}^\text{e}-\text{Troc}-\text{T}-1249$): 将得自上述实施例 13 的
 $\text{Gly}-\text{N}^\text{e}-\text{Troc}-\text{T}-1249$ 盐溶解于 DCM (30 mL/g 药物)并加入少量的 DMSO
 (<3 mL/g 药物)以增加药物的溶解性。加入三乙胺 (TEA, 10 eq) 并将反应
 溶液在室温下搅拌 5 分钟。加入含 $\text{mPEG}_{30\text{kD}}-\text{SMB}$ (1 eq)、mPEG-琥珀
 酰 亚 胺 基 α - 甲 基 丁 酸 酯 、
 $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{30\text{kD}}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{琥珀酰亚胺}$ 的 DCM (10
 mL/g 药物)并使反应在室温下继续进行约 16 小时。减压除去溶剂并将
 残余物通过加入乙醚 (300 mL/g 药物)沉淀。在抽滤和真空干燥过夜之后
 收 集 产 物
 $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{30\text{kD}}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{Gly}-\text{N}^\text{e}-\text{Troc}-\text{T}-1249$ 。

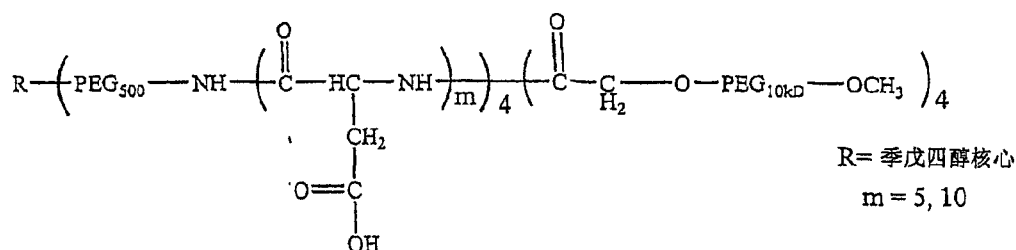
b) 多臂型 PEG (4-臂- $\text{PEG}_{20\text{k}}-\text{Gly}-\text{N}^\text{e}-\text{Troc}-\text{T}-1249$):



将 4-臂-PEG_{20k}-SCM (参见上述缩写一节中的结构)溶解于无水二氯甲烷中。在单独的圆底烧瓶中, 将 Gly-N^e-Troc-T-1249 盐(1.0 当量)溶解于 DCM 中并用 TEA 处理, 在室温下搅拌 5 分钟。然后向 4-臂-PEG_{20k}-SCM 的二氯甲烷溶液中加入 T-1249 溶液并将反应在室温下搅拌约 15 小时。将产物 4-臂-PEG_{20k}-Gly-N^e-Troc-T-1249 在乙醚中沉淀并通过抽滤收集。肽药物加载的纯度和程度通过 HPLC 分析测定。

c) “核心连接” (核心连接-Gly-N^e-Troc-T-1249):

术语“核心连接”对应于以下结构, 为国际专利公开 WO 04/060967 中所述的 4-臂 PEG-PGA-PEG 聚合物系统, 在本文中也称为 4-臂-PEG2K-PG-PEG10k (MW~47k)。



1. 4-臂 PEG-NH₂ 的合成: 将 4-臂-PEG (20 g, MW=2,000 Da) (Nektar Therapeutics, Huntsville Alabama)在甲苯(100 ml)中共沸脱水直到得到油状稠度。将粗油状物溶解于甲苯(100 ml)以及三乙胺(12.9ml)中并搅拌五分钟。然后向溶液中加入甲磺酰氯(6.5 ml)并将得到的溶液在室温下搅拌 16 小时。在加入乙醇之后, 通过旋转蒸发除去溶剂并将 PEG-甲磺酸盐干燥过夜。将氯化铵(每克 PEG 为 6 克)溶解于氢氧化铵(每克 PEG 为 40 ml)中, 向其中加入 PEG 甲磺酸盐并将得到的溶液在室温下搅拌 48 小时。向溶液中加入氯化钠(10%溶液)然后用二氯甲烷

提取。除去溶剂并将 4-臂-PEG-NH₂ 在真空下干燥。产物收率为约 85-90%。

2. Glu-NCA (BLG-NCA)的合成：将苄基-L-谷氨酸酯(BLG, 1.0 当量)溶解于四氢呋喃(10 ml/克)以及三光气(1.2 当量)中。将溶液在 60℃下搅拌三小时。然后向溶液中加入己烷以使固体沉淀，然后将其过滤。将回收的沉淀物溶解于氯仿并再次用己烷沉淀。然后将沉淀物过滤并在真空下干燥。收率：90%。

3. PEG-PBLG 的合成：将 4-臂-PEG_{2K}-NH₂(700 mg)在甲苯(50ml)中共沸脱水两次，然后在真空下干燥过夜。将 4-臂-PEG_{2K}-NH₂(700 mg)溶解于二甲基甲酰胺 (7 ml)中。然后将得自上述的 BLG-NCA(3.68g)加入到溶液中。将溶液在氮气下搅拌三小时。然后从溶液除去样品并使其沉淀。产物通过混合-D 和 NMR 方法表征，以确保核心的形成，随后用活化的 PEG 试剂 PEG-SCM(CH₃O-(CH₂CH₂O)_{10kD}-CH₂C(O)-O-琥珀酰亚胺)进行聚合物的 PEG 化。将 m-PEG10K-SCM (14 g)溶解于另外包含二环己基碳二亚胺(335 mg)和 4-(二甲氨基)吡啶(20 mg)的二氯甲烷中，向其中加入得自上述的 BLG-NCA。将得到的溶液在室温下搅拌过夜。4. PEG-PBLG 的脱苄基化以形成“核心连接”，4-臂-PEG_{2K}-PG-PEG_{10k} (MW~47k)

将 PEG-PBLG (16 g)溶解于乙酸(16 ml)、去离子水(16 ml)、和二甲基甲酰胺(80 ml)。向该溶液中加入甲酸铵(16 g)和钯/炭(1.6 g)。将溶液在室温下搅拌 48 小时，随后过滤通过硅藻土垫以除去大部分的炭粒子。然后将溶液在水中透析，从溶液除去溶剂。在使用 30,000 MW 过滤器进行超滤之后，从溶液除去未结合的 PEG。然后将溶液以 20,000 RPM 离心 3 小时，以除去其余的炭粒子。产物收率为 45%到 55%。

5. 核心连接-Gly-N^ε-Troc-T-1249)：将 4-臂-PEG_{2K}-PG-PEG_{10k} (MW~47k)溶解于 DMF，在室温下向其中加入 N-羟基琥珀酰亚胺和 DCC。将反应搅拌过夜。将 Gly-N^ε-Troc-T-1249 盐溶解于 DMF 并用 TEA

处理, 然后将其加入到多-臂 PEG 试剂("核心连接")溶液。将反应在室温下搅拌约 36 小时, 然后在乙醚中沉淀。通过抽滤收集产生的固体产物。药物加载的纯度和程度通过 HPLC 分析测定。

实施例 15

可降解的 Gly-N^e-Troc-T-1249 PEG 结合物的最终的脱保护

对于实施例 14 中的各个结合物(上述 a.1 到 a.6 到 c): 在室温下将相应的 PEGn-Gly-N^e-Troc-T-1249 溶解于乙酸-水-四氢呋喃(3:1:1)的混合物中并搅拌 24 小时。减压除去有机溶剂并通过冷冻干燥除去水。首先将得到的残余物在乙醚中沉淀并进一步在甲醇(10 mL/g 药物)和 IPA (30 mL/g 药物)中纯化。通过 HPLC 分析测定纯度和水解速率。

对于实施例 14 中的每个结合物(上述 a.1 到 a.6 到 c): 将 PEGn-Gly-N^e-Troc-T-1249 溶解于 THF (30 mL/g 药物)和磷酸二氢钾(1.0 M, 30 mL)的混合物中。加入新鲜的锌粉(60 eq)并将混合物在室温下搅拌 24 小时, 然后将其用水(100 mL/g 药物)稀释。过滤 Zn 固体并用 THF 洗涤。减压除去有机溶剂并将水相用 DCM 提取(3 x 25 mL/g)。将合并的有机相用冰冷的 5% NaOH (20 mL)和盐水(20 mL)洗涤, 用 MgSO₄ 干燥, 并在减压下除去溶剂。首先将得到的残余物在乙醚中沉淀并在甲醇(10 mL/g 药物)和 IPA (30 mL/g 药物)中进一步纯化。通过 HPLC 分析测定纯度和水解速率。

实施例 16

体外试验评价抗病毒活性

使用评分试验提供本发明的结合物/组合物的抗病毒活性指标, 所述试验采用指示细胞系(MAGI(半乳糖苷酶指示剂的多核活化)、或表达 CCR5 的衍生物(cMAGI)对病毒感染滴度的降低进行评分。

MAGI 细胞系通过引入 CD4 和 HIV-1 LTR-驱动的具有双嗜性逆转

录病毒载体的 β -gal 报道基因的基因而衍生自亲代海拉细胞(如 Kimpton J, Emerman M, *J Virol*, 66:2232-9,1992 中所述)。CMAGI 细胞系通过使用双嗜性逆转录病毒载体 PA317 引入 CCR5 而衍生自 MAGI 细胞系(如 Chackerian B 等人, *J Virol* 71:3932-9,1997 中所述)。cMAGI 细胞支持原代 NSI (R5)隔离物和实验室改造的 X4 病毒的复制,而 MAGI 细胞只支持 X4 病毒的复制。两个细胞系都利用 HIV-1 tat 反式激活由 HIV-LTR 驱动的 β -半乳糖苷酶报道基因表达的能力。将 β -gal 报道基因进行修饰以定位在原子核中,并且可以随着在感染的几天内的强烈的核染色而用 X-gal 底物检测到。如果在染色之前只有一轮感染,则被染色原子核的数目解释为等于攻击接种物中传染性病毒粒子的数目。

在感染 24 小时之后,加入感染和细胞-细胞融合的抑制剂如 T-1249 或 T-20(Wild C 等人, *AIDS Res Hum Retroviruses*, 9:1051-3,1993)或者本文中所述的另一种 EI,以允许读取单独一轮感染的读数。使用 CCD-成像器计算被感染的细胞。在 MAGI 和 cMAGI 试验中,感染滴度的 50%降低($V_n/N_o = 0.5$)具有显著性,并且提供用于评价抗病毒活性的最初的截止值。将感染滴度的 90%降低(V_n/N_o)用作评价抗病毒活性的另外的截止值。

将每个试验化合物的稀释物一式两份进行对抗病毒接种物的试验,调节病毒接种物以得到 48 孔微量滴定板的每个孔为约 1500-2000 个被感染细胞。向 cMAGI 或 MAGI 细胞加入试验化合物,随后加入病毒接种物,24 小时后,加入感染和细胞-细胞融合的已知抑制剂(Wild C, 等人, *AIDS Res Hum Retroviruses* 9:1051-3,1993)以预防第二轮的感染和细胞-细胞病毒传播。通常将细胞再培养 2 天,固定并用 X-gal 底物染色以检测被感染的细胞。然后用 CCD-成像器测定每个对照和试验化合物稀释物的被感染细胞的数目,然后测定相应的 IC₅₀ 和 IC₉₀ 值,并与例如没有聚合物的进入抑制剂本身相比较。数值通常报告为 μ g/ml。IC₅₀ 定义为引起病毒感染滴度 50%降低的试验化合物的稀释物,IC₉₀ 定义为引病毒滴度 90%降低的试验化合物的稀释物。

实施例 17

药代动力学

9 只雄性 Wistar 大鼠(Charles River Laboratories, Wilmington, Del.)(n = 3/时间点)接受 T1249 或 T-20 的聚合物结合物/组合物(如本文中诸如实施例 1、2、3、6、7、8、9、10 和 11-15 中所述的)的单次皮下剂量给药。

将试验用 mPEG 结合物与生理盐水或 5%葡萄糖注射液混合。用 NaOH 或 HCl 的稀溶液调节 pH, 以制备 pH 为约 6.2-7.4 和重量克分子渗透压浓度为约 290 mOsm/kg 的药物溶液。采用的结合物的量为足够在最终制剂中提供每毫升为约 50-250 mg 结合物的浓度。对大鼠剂量给药 8 mg 活性成分/kg 体重。

在剂量给药之后, 在每个时间点从后眼窝采血约 0.2 到 0.5 ml。时间点为剂量给药后的 0.5、1、3、6、8、16、24、32、48、72、96 和 120 小时。将每个样品立即处理以收集血浆或血清并且在分析之前储存在-70℃下。通过使用允许通过吸光度检测(280nm)进行主要分析物和代谢物检测的反相方法的液相色谱或通过质谱法(单-或三-四极)分析每个样品。从使用加入结合物和 EI 本身的血清提取物作为校准用标准的图外推得到浓度。然后使用收集的结合物、释放的 EI、可检测的代谢物、及其组合的血清浓度从浓度-时间图导出药代动力学参数。使用市售的药代动力学分析软件包如得自 Pharsight Corporation, Mountain View, Calif.的 WIN-NONLIN 从非房室分析报告 PK 分析参数。

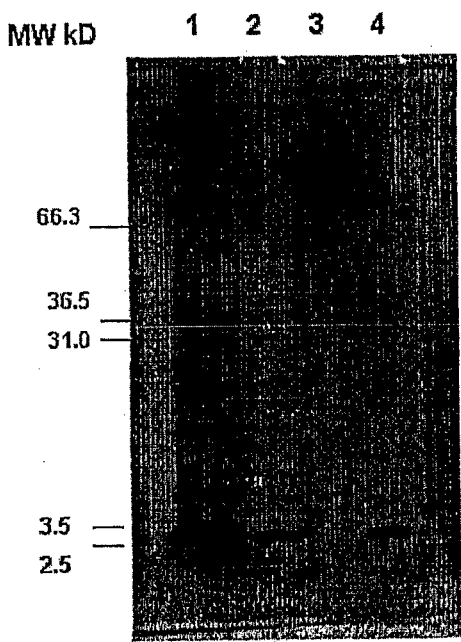


图1

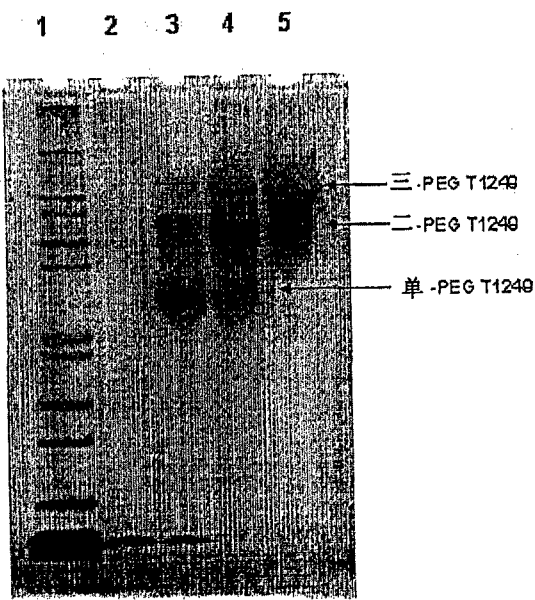


图2

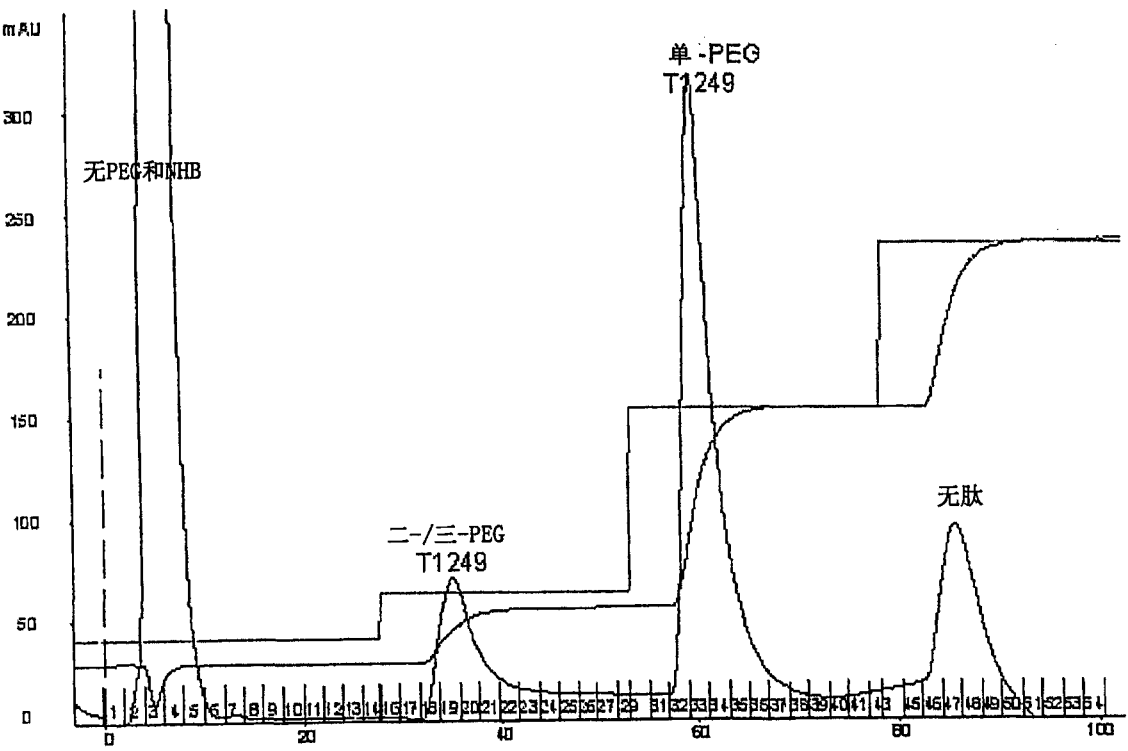


图3

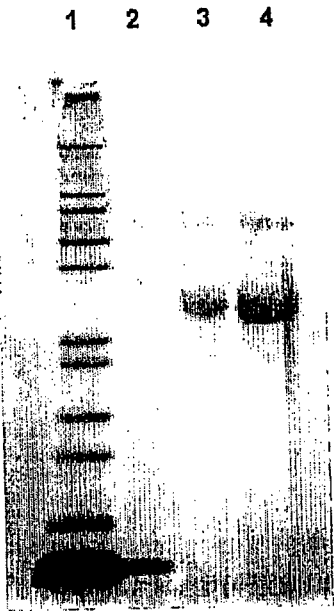


图4

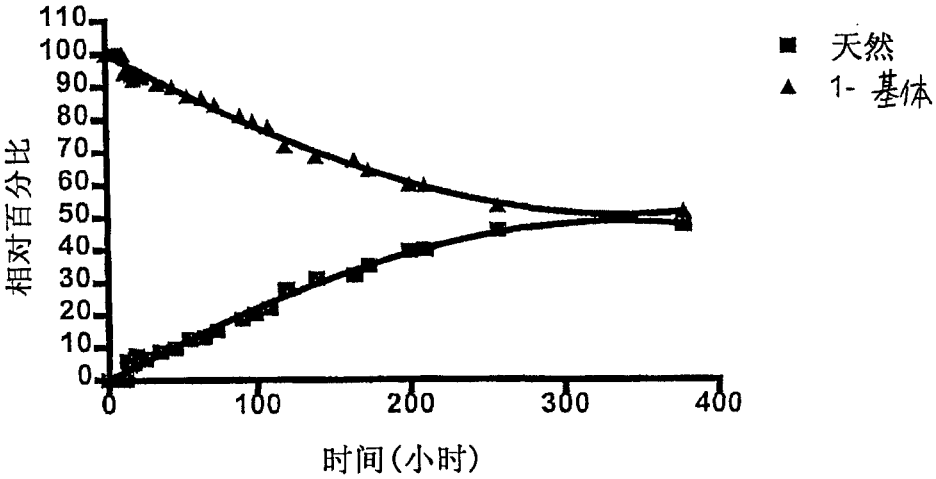


图5