



(45) 授权公告日 2014.06.25

权利要求书3页 说明书50页 附图3页

药物产品制造工艺流程图

定温下将 10% DMISO (pH 3.5)

加入少量的混合

10% 的 DMISO 溶液

加入 1.5% NaOH

加入含有 20% 浓度的 Sodium 溶液 (pH 值在 50 ± 2) 将产物

加入剩余的 NaCl 并搅拌 (1 小时 / 1℃ 以下 (pH 值在 50 ± 2)) 将产物

加入 10% 的 NaOH 溶液, 并使其完全分

离, 溶液每层不得超过 15 分钟

将溶液转移到新的容器

在不超过 20 分钟内将溶液以恒定速度冷却至 25 ± 2

“过温之前”的步骤:

通过 0.2 微米过滤器

“过温之后”的步骤

进行密封和充氧 (如产品测试)

将瓶小

除去溶剂和杂质

加入水或水基

填充氮气、N₂ E.P. 并加上盖子

密封表面

1. 一种组合物, 包含 :
 - (a) ANG1005 ;
 - (b) 可选的张度剂 ;
 - (c) 缓冲剂, 所述缓冲剂维持溶液 pH 为 4-6 ;
 - (d) 膨胀剂 ;
 - (e) Solutol HS15 ; 以及
 - (f) 0.2% 至小于 8%DMSO。
2. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中, 所述张度剂是氯化钠。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的组合物, 其中, 所述缓冲剂是甘氨酸。
4. 根据权利要求 1 或 2 所述的组合物, 其中, 所述缓冲剂是柠檬酸或乳酸。
5. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中, 所述膨胀剂是甘露醇或山梨醇。
6. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中, DMSO 的量为 0.2-5%。
7. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中, DMSO 的量为 0.2-2%。
8. 根据权利要求 7 所述的组合物, 其中, 所述 DMSO 的量在 0.2% 和 1.0% 之间。
9. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中, 所述组合物中 Cremophor 的量小于 5%。
10. 根据权利要求 9 所述的组合物, 其中, 所述组合物不含 Cremophor。
11. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中, 所述组合物溶解在水中。
12. 一种组合物, 包含 :

化合物	按非水重量计的百分比
ANG1005	0.1-5%
张度剂	1-15%
维持 pH 为 4-6 的缓冲剂	1-10%
膨胀剂	0-15%
Solutol HS15	40-75%
DMSO	0.2% 至小于 8%

13. 根据权利要求 12 所述的组合物, 其中, 所述张度剂是氯化钠, 所述缓冲剂是甘氨酸, 以及所述膨胀剂是甘露醇。

14. 根据权利要求 12 所述的组合物, 包含 :

化合物	按非水重量计的百分比
ANG1005	1.8-2.3%
张度剂	9-11%
缓冲剂	4.5-6%

膨胀剂	8-10%
Solutol HS15	69-75%
DMSO	0.2-2%

15. 根据权利要求 14 所述的组合物,其中,所述张度剂是氯化钠,所述缓冲剂是甘氨酸,以及所述膨胀剂是甘露醇。

16. 一种组合物,包含:

化合物	按非水重量计的百分比
ANG1005	1.8-4.0%
维持 pH 为 4-6 的缓冲剂	0.1-6%
膨胀剂	2-10%
Solutol HS15	80-95%
DMSO	0.2-1%

17. 根据权利要求 16 所述的组合物,其中,所述缓冲剂是乳酸或柠檬酸,以及所述膨胀剂是甘露醇。

18. 权利要求 1-17 中任一项所述的组合物在制备用于治疗罹患癌症患者的药物中的应用。

19. 根据权利要求 18 所述的应用,其中,所述癌症是脑癌、卵巢癌、肺癌、肝癌、脾癌或肾癌。

20. 根据权利要求 19 所述的应用,其中,所述脑癌选自由胶质瘤、室管膜瘤和脑膜瘤组成的组。

21. 根据权利要求 20 所述的应用,其中,所述胶质瘤是胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤和少突神经胶质瘤。

22. 一种含有权利要求 15 所述的组合物的密封容器。

23. 一种试剂盒,包含:

(a) 根据权利要求 22 所述的密封容器;和

(b) 使用说明。

24. 一种用于制备药物组合物的方法,所述方法包括:

(a) 将 ANG1005 溶解在 DMSO 中从而形成混合物;

(b) 将 Solutol HS15 加入到步骤(a)的所述混合物中;

(c) 可选地将水和缓冲剂加入到所述混合物中,所述缓冲剂维持溶液 pH 为 4-6;

(d) 冻干步骤(c)的混合物;其中,所述冻干致使所述 DMSO 的量减少至少 20%,但没有显著减少 Solutol HS15 的量;

其中 DMSO 的终浓度为 0.2% 至小于 8%。

25. 根据权利要求 24 所述的方法, 其中, 水和缓冲剂在步骤(c) 中加入, 并且所述步骤(d) 冻干包括:

- (i) 冷冻所述混合物;
- (ii) 在足够除去至少一部分所述水的第一温度和压力下干燥所述冷冻产品; 以及
- (iii) 在足够除去至少一部分所述 DMSO 的第二温度和压力下干燥所述产品。

26. 根据权利要求 24 或 25 所述的方法, 其中, 在步骤(d) 冻干之前过滤步骤(b) 的所述混合物。

27. 根据权利要求 24 所述的方法, 其中, 在步骤(d) 冻干之前将所述混合物放置在小瓶中。

28. 根据权利要求 24 所述的方法, 进一步包括以下步骤:

(e) 再悬浮所述冻干产品。

29. 一种通过权利要求 24-28 中任一项所述的方法而生产的药物组合物。

30. 一种用于生产药物组合物的方法, 包括以下步骤:

(a) 将 ANG1005 溶解在 DMSO 中, 从而形成混合物;

(b) 将 Solutol HS15 加入到所述混合物中;

(c) 将水、缓冲剂, 和可选的张度剂或膨胀剂, 加入到所述混合物中, 所述缓冲剂维持溶液 pH 为 4-6; 以及

(d) 在从所述混合物中除去所述水和所述 DMSO 的条件下冻干所述混合物, 其中 DMSO 的终浓度为 0.2% 至小于 8%。

31. 根据权利要求 30 所述的方法, 其中, 在加入到所述混合物中之前, 将所述 Solutol HS15 与水、缓冲剂, 和可选的张度剂或膨胀剂, 混合, 其中, 所述水、缓冲剂和可选的张度剂或膨胀剂的添加量维持所述结合物在所述混合物中的溶解性。

32. 根据权利要求 30 或 31 所述的方法, 其中, 在所述步骤(a) 溶解之前将所述 DMSO 酸化为 pH3.5 至 4.5 之间。

33. 根据权利要求 30 所述的方法, 其中, 所述冻干不减少所述混合物中 Solutol HS15 的量。

34. 一种通过权利要求 30-33 中任一项所述的方法而生产的药物组合物。

紫杉醇、紫杉醇类似物或紫杉醇结合物的药物组合物及相关制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及紫杉醇和紫杉醇类似物或其结合物,以及其它疏水性药剂的制剂。

背景技术

[0002] 由于不溶于水溶液,所以诸如紫杉醇和紫杉醇类似物之类的疏水性药剂,在给予患者之前,典型地,要么在非水或表面活性剂缓冲液中溶解(溶液化, solubilized),要么附接在亲水部分上以增加在水溶液中的溶解性。在商业供应的紫杉醇剂型中,每毫升含有 6mg 紫杉醇、527mg 纯化的 Cremophor(克列莫佛)[®] EL(聚氧乙烯蓖麻油)以及 49.7% (v/v) 的脱水醇、USP 和乙醇。在给予之前,将调配的紫杉醇稀释在氯化钠/葡萄糖或葡萄糖的林格氏液(Ringer's solution)中。由于 Cremophor 可引起超敏(例如,过敏)反应,接受紫杉醇的患者需要在术前给予地塞米松(dexamethasone)从而降低这些反应的发生率。由于这些反应,因而在 4 小时后给予紫杉醇,从而将超敏作用减至最低。

[0003] 由于在标准紫杉醇制剂中包括 Cremophor 可引起高比率的副作用,因而产生供替换的制剂。这些制剂依赖于紫杉醇与可溶性化合物的结合(联合、关联, association)。Abraxane(商标名)是紫杉醇结合在白蛋白上的紫杉醇制剂。还提出了微脂体(liposomal)紫杉醇制剂。

[0004] 由于诸如紫杉醇之类的疏水性药剂的现有制剂要么含有不期望的赋形剂,要么很难制造,因此需要此种药剂的新制剂。

发明内容

[0005] 在一方面,本发明的特征在于一种组合物,其包含(a)疏水性药剂,紫杉醇、紫杉醇类似物、或结合物(例如, ANG1005),或本文描述的任何疏水性药剂,该结合物包括(i)多肽载体和(ii)选自由紫杉醇和紫杉醇类似物组成的组中的治疗剂,其中该治疗剂结合在多肽上;该组合物还包含(b)可选的张度剂(例如,氯化钠或本文描述的任何张度剂);(c)缓冲剂(例如,甘氨酸、乳酸或柠檬酸,或本文描述的任何缓冲剂);(d)膨胀剂(或增量剂, bulking agent)(例如,甘露醇、山梨醇或本文描述的任何膨胀剂);以及(e)增溶剂(例如,脂肪酸聚氧乙烯酯,如 Solutol HS 15(聚乙二醇-12-羟基硬脂酸酯-15),或本文描述的任何增溶剂),例如,其中该增溶剂不是 Cremophor。该多肽载体可以包括这种氨基酸序列,其与选自由 SEQ ID NO:1-105 及 107-116 组成的组的氨基酸序列(例如,血管肽(AngioPep)-1(SEQ ID NO:67)、血管肽-2(SEQ ID NO:97),或血管肽-7(SEQ ID NO:112))基本相同(例如,至少 70%、80%、90%、95%,或 100%相同)。在某些实施方式中,该缓冲剂将溶液 pH 维持为小于 6(例如, pH 4~6)。在某些实施方式中,该组合物进一步包括 0.01-10%(例如,少于 8%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.75%、0.5%、0.2%,或 0.1%)的 DMSO。在某些实施方式中,该组合物基本不含 Cremophor(例如,不含 Cremophor)。该组合物可溶解在水中。

[0006] 在某些实施方式中,该组合物包含表 1-4 中任一个所给出的量的药剂。

[0007] 表 1

[0008]

化合物	百分比 (按非水重量计)
ANG1005	0.1-5%
张度剂	0-15%
缓冲剂	1-10%
膨胀剂	0-15%
Solutol HS 15	40-75%
DMSO	0.01-10%

[0009] 表 2

[0010]

化合物	百分比 (按非水重量计)
ANG1005	1.8-2.3%
张度剂	9-11%
缓冲液	4.5-6%
膨胀剂	8-10%
Solutol HS 15	69-75%
DMSO	0.2-1%

[0011] 表 3

[0012]

化合物	百分比 (按非水重量计)
ANG1005	1.8-4.0%
缓冲液	0.1-6%
膨胀剂	2-10%
Solutol HS 15	80-95%
DMSO	0.2-1%

[0013] 表 4

[0014]

化合物	百分比（按非水重量计）
ANG1005	2.0-3.0%
缓冲液	0.5-6%
膨胀剂	4-7%
Solutol HS 15	85-95%
DMSO	0.2-0.6%

[0015] 在这些组合物中,如果存在张度剂,则它可以是氯化钠,缓冲剂可以是甘氨酸、乳酸,或柠檬酸,和/或膨胀剂可以是甘露醇。该组合物可以由约 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2.0%、2.1%、2.2%、2.3%、2.4%、2.5%、2.6%、2.7%、2.8%、3.0%、3.2%、3.5%、4.0%,或 5.0% 的 ANG1005 构成,或者由这些值中任何值之间的任何范围的 ANG1005 构成。该 ANG1005 可以溶解在足够量的 Solutol HS 15,和/或 DMSO 中,其可以进一步稀释在水溶液中。

[0016] 上面组合物可以存在于可被密封的容器中。该容器可以是试剂盒的一部分,该试剂盒进一步包括使用说明(例如,给予该组合物而治疗例如本文描述的任何疾病)。

[0017] 在另一个方面,本发明的特征在于一种向罹患疾病,例如本文描述的任何疾病,如癌症(例如,卵巢癌、脑癌、肺癌、肝癌、脾癌,或肾癌)的患者给予以上几个方面的组合物的方法。该方法包括向该患者给予可治疗或预防性治疗该疾病的足够量的组合物。在某些实施方式中,该癌症是脑癌,其选自胶质母细胞瘤(glioblastoma)、星形细胞瘤、胶质瘤、髓母细胞瘤(meduloblastoma),以及少突神经瘤、神经胶质瘤、室管膜瘤和脑膜瘤组成的组。

[0018] 在另一方面,本发明的特征在于一种用于制备药物组合物的方法。该方法包括(a)将疏水性药剂溶解在第一增溶剂(例如,DMSO或本文描述的任何此类试剂)中从而形成混合物;(b)将第二增溶剂(例如,脂肪酸聚氧乙烯酯,如 Solutol HS 15,或本文描述的任何此类试剂)加入到步骤(a)的混合物中;(c)可选地将水和缓冲剂加入到该混合物中;(d)冻干步骤(c)的混合物;其中该冻干致使第一增溶剂的量减小至少 5%(例如,10%、20%、30%、50%、75%、90%、95%,或 99%)(例如,减少至最终比例小于冻干产品总重量的 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%、1.5%、2%、3%、4%、5%、8%)。在某些实施方式中,该冻干不显著减少第二增溶剂的量。在某些实施方式中,该疏水性药剂包括紫杉醇或紫杉醇类似物。该疏水性药剂可以包括以下物质或可以是包括以下物质的结合物:(a)多肽载体和(b)本文描述的药剂(例如,紫杉醇及其类似物),其中该药剂结合到该载体上。该多肽载体可以与选自 SEQ IDNO:1-105 及 107-116 组成的组的氨基酸序列(例如,血管肽-1(SEQ ID NO:67)、血管肽-2(SEQ ID NO:97),或血管肽-7(SEQ IDNO:112))基本相同。在特别的实施方式中,该结合物是 ANG1005。在某些实施方式中,水和缓冲剂在步骤(c)中

加入,并且步骤(d)的冻干包括(i)冷冻该混合物,(ii)在足够除去至少一部分(例如,至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.5%、99.9%,或99.99%)水的第一温度和压力下干燥该冷冻产品,和(iii)在足够除去至少一部分(例如,至少5%,例如,10%、20%、30%、50%、75%、90%、95%,或99%)第一溶剂的第二温度和压力下干燥该产品。可以在步骤(d)冻干之前过滤步骤(b)的混合物,或者可以在步骤(d)冻干之前将步骤(b)的混合物放置在小瓶或容器中。该方法可以进一步包括(e)再悬浮该冻干产品。

[0019] 在另一方面,本发明的特征在于一种用于生产药物组合物的方法,其包括步骤(a)将包括结合到多肽载体的紫杉醇或紫杉醇类似物的结合物溶解在DMSO中,从而形成混合物;(b)将Solutol HS15加入到该混合物中;(c)将水、缓冲剂和可选的盐或膨胀剂加入到该混合物中;和(d)在可从该混合物中除去水和DMSO的条件下冻干该混合物。在加入到混合物中之前,可将Solutol HS 15与水、缓冲剂和可选的张度剂或膨胀剂混合,其中水、缓冲剂和可选的张度剂的添加量应维持该结合物在该混合物中的溶解性。该缓冲剂可以将该溶液pH维持在4和6之间。在步骤(a)溶解之前,可将DMSO酸化至pH为3.5和4.5之间。在某些实施方式中,该冻干不显著降低混合物中的Solutol HS 15的量。该结合物可以包括本文描述的多肽中的任一种(例如,血管肽-2)。在特别的实施方式中,该紫杉醇-多肽结合物是ANG1005。

[0020] 在另一方面,本发明的特征在于由上述方法中的任一种生产的药物组合物。

[0021] “缓冲剂”是指在加入可以以其他方式改变pH的药剂之后,能够将该溶液pH维持在特定范围内(例如,在pH 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0和13.5中的任何值之间)的任何化合物或化合物组。本文描述了示例缓冲剂。

[0022] “张度剂”是指可以改变水溶液渗量(摩尔渗透压浓度 osmolarity)(例如,10、20、50、75、100、150、200、250、300、400、500、750、1000、1500或2000mM中的任一个或它们之间的任何范围)的任何药剂。离子盐,例如氯化钠,可用来调节张度。本文描述了另外的张度剂。

[0023] “膨胀剂(增量剂, bulking agent)”是指可在脱水或冻干步骤之后改变化学组合物物理形态(physical form)的化合物。本文描述了示例性膨胀剂(增量剂)。

[0024] “增溶剂”是指能够溶解特定化合物(例如,疏水性化合物,如含有紫杉醇或紫杉醇类似物的化合物或结合物)的任何溶剂。本文描述了适用于疏水性化合物的示例性增溶剂。

[0025] “载体(vector)”是指可被运送到特定细胞类型(例如,肝、肺、肾、脾或肌肉)中或穿过BBB的化合物或分子,例如多肽。载体可附接(共价或非共价)或结合至药剂并从而可以将该药剂运送到特定细胞类型中或穿过BBB。在某些实施方式中,该载体可以结合到位于癌症细胞或脑内皮细胞上的受体并从而通过转胞吞作用(transcytosis)被运送到癌症细胞中或穿过BBB。该载体可以是可为此获得高水平的经内皮运送而不影响该细胞或BBB完整性的分子。该载体可以是多肽或模拟肽(peptidomimetic),并可以是天然存在的,或者通过化学合成或重组基因技术生产的。

[0026] “结合物”是连接到药剂的载体。结合可以是化学性质的,例如经由连接物(连接器, linker),或基因性质的,例如通过重组基因技术,如与例如报道分子(例如,绿色荧光

蛋白、 β -半乳糖苷酶、组氨酸标签等)的融合蛋白形式。

[0027] “被有效运送到特定细胞类型”的载体或结合物是指能够在该细胞类型中蓄积(积累, accumulate)(例如, 由于进入该细胞运送量的增加、从该细胞流出量的减少, 或其结合)的载体或结合物, 其蓄积程度至少比对照物质, 或如果是结合物, 则至少比未结合的药剂, 大 10% (例如, 25%、50%、100%、200%、500%、1,000%、5,000% 或 10,000%)。

[0028] “基本纯的”或“分离的”是指与其它化学组分分开的化合物(例如, 多肽或结合物)。典型地, 当该化合物的以重量计至少 30% 中不含其它组分时, 该化合物基本是纯的。在某些实施方式中, 该制剂的以重量计至少 50%、60%、75%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 中不含其它组分。纯化的多肽可通过, 例如编码此种多肽的重组多核苷酸的表达获得或通过化学合成该多肽而获得。纯度可用任何合适的方法测得, 例如柱色谱、聚丙烯酰胺凝胶电泳, 或通过 HPLC 分析测得。

[0029] “基本不含”某物质的药物组合物是指该组合物中某物质的量少于该组合物干重的 5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.3%、0.2%、0.1%、0.05% 或 0.01%。

[0030] “基本相同的”是指表现出与参考氨基酸或核酸序列至少 35%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%, 或甚至 99% 同一性的多肽或核酸。对于多肽, 比较序列(对比序列)的长度一般为至少 4 个(例如, 至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、50, 或 100 个)氨基酸。对于核酸, 比较序列的长度一般为至少 60 个核苷酸, 优选至少 90 个核苷酸, 更优选至少 120 个核苷酸, 或全长。本文中应当理解, 在与原始多肽氨基酸相同或相似的类似物的氨基酸之间可以存在间隙(gap)。该间隙可以不包括氨基酸、包括一个或更多与原始多肽不相同或不相似的氨基酸。由此可以包括本发明载体(多肽)的生物活性类似物。同一性百分比可以使用默认间隙重量(gapweight)确定, 例如利用 Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0 中的 n 算法 GAP、BESTFIT 或 FASTA 确定。

[0031] “片段”是指源自原始或亲本序列的一部分或源自所述亲本序列类似物的多肽。片段包括具有一个或多个氨基酸截断(truncation)的多肽, 其中该截断可源自氨基末端(N-末端)、羧基末端(C-末端), 或源自蛋白质内部。片段可以包括与原始序列相应部分相同的序列。本发明包括本文描述的载体(多肽)的功能片段。片段至少可以为 5(例如, 至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、25、28、30、35、40、45、50、60、75、100, 或 150)个氨基酸。本发明的片段可包括, 例如, 7、8、9 或 10 个氨基酸至 18 个氨基酸的多肽。片段可含有本文描述的修饰中的任一种(例如, 乙酰化、酰胺化、氨基酸置换)。

[0032] “非天然存在的氨基酸”是指不是在哺乳动物中自然产生或发现的氨基酸。

[0033] “药剂”是指任何化合物, 例如, 抗体, 或治疗剂、标记物、示踪物, 或显像化合物(成像化合物, imaging compound)。

[0034] “治疗剂”是指具有生物活性的药剂。在一些情况下, 该治疗剂用来治疗疾病、生理或心理病况、创伤或感染的症状, 并且其包括抗癌剂、抗生素、抗血管生成剂(anti-angiogenic agents)和中枢神经系统水平上活性的分子。

[0035] “小分子药物”是指分子量为 1000g/mol 或更小(例如, 小于 800、600、500、400 或 200g/mol)的药物。

[0036] “受验者（对象）”是指人或非人动物（例如，哺乳动物）。

[0037] “治疗”受验者的疾病、障碍或病况是指通过向该受验者给予治疗剂来减轻该疾病、障碍或病况的至少一种症状。

[0038] “预防性治疗”受验者的疾病、障碍或病况是指通过向该受验者给予治疗剂来降低疾病、障碍或病况发生的频率（例如，阻止）。

[0039] “癌症”是指任何细胞的增殖，其独有的特征在于失去正常控制，导致不受控的生长、缺乏分化，或侵入组织和转移的能力。癌症可以在任何组织或任何器官中发生。癌症旨在包括，但不局限于，脑癌、肝癌、肺癌、肾癌或脾癌。本文描述了另外的癌症。

[0040] “给予”是指递送模式，包括但不限于，口服（orally）、动脉内、鼻内、腹膜内、静脉内、肌内、皮下、透皮或经口（per os）。每日剂量可以分成合适形式的一剂、两剂或更多剂，从而在整个时间段给予一次、二次或更多次。

[0041] “治疗有效的”或“有效量”是指足够改善、减少、预防、延缓、抑制或阻止被治疗的疾病或病况的任何症状的治疗剂的量。治疗有效量的药剂不需要治愈疾病或病况，但将对疾病或病况提供治疗，以便延缓、阻断或预防疾病或病况的发作，或缓解疾病或病况症状，或改变疾病或病况的期限或例如使其不太严重，或加速个体的恢复。

[0042] 如果对于特定特征（例如，温度、浓度、时间等）提及了“范围”或“物质的组”，则本发明涉及并在此明确地并入各个及每个具体成员和其中子范围或子组的结合。因而，例如，对于 9～18 个氨基酸长度，应当理解为本文具体并入各个及每个单个长度，例如，18、17、15、10、9 的长度和在其间的任何数目的长度。因此，除非特别指出，本文提及的每个范围应当理解为包括端值。例如，5～19 个氨基酸长度的表达应理解为包括 5 和 19。类似地，这也适用于其它参数，例如序列、长度、浓度、元素等。

[0043] 本文定义的序列、区域和部分各自包括其中描述的各个及每个单独序列、区域和部分以及各个及每个可能的亚序列、亚区域和亚部分，不论这种亚序列、亚区域和亚部分是被定义为肯定性包括特定可能性、还是排除特定可能性、抑或是二者的结合。例如，对于区域的排除性定义如下：“只要所述多肽不短于 4、5、6、7、8 或 9 个氨基酸。否定性限制的进一步实例如下：包括 SEQ ID. :X 的序列，其中排除 SEQ ID. :Y 的多肽；等。否定性限制的另外实例如下：只要所述多肽不是（不包含或不由其构成）SEQ ID NO. :Z。

[0044] 通过下面的详细描述、附图以及权利要求，本发明的其它特征和优点将是明显的。

附图说明

[0045] 图 1 是用于制备包括 ANG1005 的药物组合物的示例方法的示意图。

[0046] 图 2 是示出重配的注射用 ANG1005 随时间的 HPLC 谱图，该 ANG1005 在临床使用条件下用 D5W 稀释至浓度为 1.0mg/ml。

[0047] 图 3 是示出离心分离的沉积物（沉淀物）的 HPLC 谱图，该沉积物是从储存～6h 并在 DMSO 中溶解的 2.0mg/mL 样品中收集的。

具体实施方式

[0048] 我们开发了对疏水性治疗剂有用的药物制剂，该疏水性治疗剂包括紫杉醇和紫杉醇类似物，或其结合物（例如，ANG1005），我们还开发了用于制备和给予含有此种制剂的

药物组合物的方法。疏水性治疗剂（例如，紫杉醇）通常在疏水溶剂中溶解（并且，事实上，通常需要这样）。紫杉醇的常用溶剂包括 Cremophor 和 DMSO，患者对它们的耐受性欠佳。特别是 Cremophor 可以引起过敏反应，因而需要用诸如皮质类固醇之类的药剂预先处理。为了避免使用此种耐受性差的溶剂，我们开发了示例性多肽-紫杉醇结合物的新制剂，ANG1005。本文描述的该制剂是非常有利的，其原因在于它们无需使用 Cremophor 就可制造，可被配制从而含有极低的 DMSO 浓度，使得活性剂的降解低而活性高，并且可以采用传统方法制造。不含耐受性差的赋形剂的组合物可向患者给予更多的剂量，可以更迅速地给予（例如，静脉给予的情况），可以更频繁地给予，或者可以避免为提高对此种赋形剂的耐受性而用药剂（例如，皮质类固醇）预先处理的必要性。

[0049] ANG1005 制剂的开发

[0050] 在开发示例性疏水性药剂新制剂，ANG1005 的过程中，我们首先测试了它在各种溶剂以及溶剂组合中的溶解性。如实施例 1 中所陈述的，和紫杉醇一样，ANG1005 在水溶液中的溶解性低，但在 DMSO 中却是高度可溶的 (high soluble) (120mg/ml)。在 75℃ 下，ANG1005 在含有乙醇的 Solutol HS 15 (BASF, Parsippany, N. J.) 中也是可溶的 (6mg/ml)。由于其低毒性和与药物的相容性，因而选择 Solutol HS 15 作为增溶剂。但是单独地用 Solutol HS 15 溶解，将导致 ANG1005 显著降解。为了溶解 ANG1005，将 Solutol HS 15 加热到至少 65℃。另外，我们注意到，将未缓冲的 (unbuffered) Solutol 从 25℃ 加热到 50℃ 时，它的 pH 从 6.0 增大到 9.0。因而，高温及高 pH 的结合很可能导致在这些条件下观察到 ANG1005 的不稳定性。

[0051] 为了避免过度降解，在加入 50℃ 的 Solutol 之前，首先将 ANG1005 溶解在酸化 DMSO (pH 3.5-4.0) 中（参见实施例 2）。为了进一步稳定 ANG1005，我们通过将 Solutol HS 15 与 H 5.0 的甘氨酸缓冲液预先混合来酸化 Solutol HS，这可以维持 ANG1005 的溶解性。这样做就可以使 ANG1005 的降解减到最少。在加入 ANG1005 之前，可以向该 Solutol 中添加多达 20%（例如，1%、5%、10%，或 15%）的缓冲液，而不影响 ANG1005 的溶解性，但将更多量的缓冲液与 Solutol 混合将引起不完全溶解。

[0052] 由于我们观察到在 pH 为 6 以上时 ANG1005 逐渐变得不稳定，所以，为了确保 ANG1005 的稳定性，我们将该制剂稀释在 pH 5 的甘氨酸缓冲水溶液中。也评价了这个 pH 范围内的其它缓冲液，包括醋酸盐缓冲液和磷酸盐缓冲液，但这些缓冲液与该制剂的相容性较小。我们也试图通过将最终 pH 降到 4 来稳定 ANG1005，但所得冻干饼不能重配成澄清溶液。

[0053] 示例性 ANG1005 组合物在下表 5 中给出。

[0054] 表 5：注射用 ANG1005 中的组分功能

[0055]

组分	用途	目标量 / 批次	目标量 / 小瓶
ANG1005	API	60g	120mg
氯化钠、USP	渗量	290g	580mg

甘氨酸	缓冲液	150g	300mg
甘露醇	膨胀剂	260g	520mg
Solutol HS 15	API 增溶	2000ml	4ml
DMSO	冻干前 API 增溶	500ml ¹	1ml ¹
HCl	pH 调节	调节 pH	
注射用水, USP	溶剂	QS 至 10L ¹	至 20ml ¹

[0056] ¹ 通过冻干除去

[0057] 还加入了膨胀剂,从而使冻干产品更容易重配。评价了含有甘露醇和山梨醇的制剂。甘露醇产生的饼较好。

[0058] 冻干

[0059] 由于 DMSO/Solutol/ 缓冲液制剂含有不期望的高水平 DMSO, 并且不够稳定, 所以开发了设计用于减少 DMSO 和提高 ANG1005 稳定性的冻干方案。评价了许多可替换 (alternative) 的冻干循环从而将 DMSO 含量减到最少 (即, 提高温度和增加二次干燥的时长 (length); 见实施例 3)。下面将详细描述冻干条件。我们尝试了第一冻干方案, 而这个方案致使 DMSO 浓度大于 1%。这个方案的详细信息在表 6 中示出。

[0060] 表 6

[0061]

注射用 ANG1005 的冻干循环			
步骤	温度	真空度	持续时间
加样 (loading)	≤-40°C	大气	N/A
冷冻	≤-40°C	大气	3 ± 1 小时
一次干燥	≥-25°C	50 mT	90 ± 1 小时
二次干燥	≥22°C	50 mT	9 ± 1 小时
加塞 (Stoppering)	≥22°C	5-10 mmHg	N/A

[0062] 通过采用优化的二步干燥程序, 我们已可以将 DMSO 浓度进一步降低到小于 1%。简言之, 产品冷冻之后, 在搁板温度 (储存温度, shelf temperature) 下冻干, 持续足够除去该产品中大部分水的时间。升高搁板温度, 并在适合除去 DMSO 的温度下干燥该产品。具体条件 (precise condition) 可随着被干燥的样品体积、使用的压力和温度, 以及使用的制剂和缓冲液变化。基于本文描述的程序, 本领域技术人员能够确定适当的干燥条件从而制得本文描述的组合物。

[0063] 在一个示例程序中, 在 -70 和 +25 °C 之间 (例如, -40 °C) 加样配方 (组分, formula)。然后将温度坡度升高 (爬升, ramp) 至足够冷冻该溶液的设定温度 (0°C 和 -70°C

之间的任何温度,例如 -40°C),并保持该温度足够冷冻该产品的时间,优选足够确保冻干饼不塌陷的时间。我们确定,在 -40°C 下,至少需要 12 小时(例如,至少 15、18、20、24、36,或 48 小时)的冻干时间来确保该饼不塌陷。冷冻之后,将真空度设置到足够除去用于一次干燥循环的产品中的水的压力(例如,10-500mT,如 20、50、100、200,或 500mT)和温度(例如, $-15 \sim -35^{\circ}\text{C}$,如 -25°C)。为此目的,测试了 10-100mT 之间的压力,其结果变化极小。干燥时间可以是足够除去产品中存在的大部分(例如,至少 50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.9%)水的时间(例如,至少 6 小时、12 小时、1 天、2 天、4 天、6 天、8 天、10 天,或 14 天)。一次干燥循环之后,执行二次干燥循环从而除去 DMSO。将该产品坡度升温至 10-30 $^{\circ}\text{C}$ 之间较高的温度(例如,18、19、20、21、22、23、24、25、26,或 27°C),从而除去 DMSO。在优选的实施方式中,在 2 小时内将搁板温度坡度升温至 27°C ,然后将该温度在 27°C 保持 1 小时。然后在 30 分钟内,坡度升高(或维持)搁板温度到 23 和 27°C 之间,然后在该温度下再维持至少 10 小时(例如,至少 15、20、25、30、40、48、60,或 72 小时)。为了防止残留的 DMSO 融化,可将产品保存在低于 25°C 。该方法的示例方案在表 7 中示出。使用 Hull Freezer Dryer, Model 72FS 100-SS20C 进行冻干。

[0064] 表 7

[0065]

区段 (Segment)	操作	温度	时间
1	加样设定点 (Load Set Point)	-40°C	N/A
冷冻			
2	将搁板坡度升温至	-40°C	0 分钟
3	保持搁板在	-40°C	420-1440 分钟
一次干燥			
在步骤 4-7 中, 将真空度控制器设定在 50mT & 将冷凝控制器设定在 -50°C			
4	将搁板坡度升温至	-25°C	120 分钟
5	保持搁板在	-25°C	5760 分钟
二次干燥			
6	将搁板坡度升温至	27°C	120 分钟
7	保持搁板在	27°C	60 分钟
8	将搁板坡度升温至	23- 27°C	30 分钟

[0066]

9	保持搁板在	23- 27°C	900-1200 分钟
---	-------	--------------------------	-------------

[0067] 产品的重配

[0068] 在注射到患者或进行产品的实验分析之前,可对冻干产品进行重配。可使用适于重配 (reconstitution) 的任何缓冲液、溶剂,或(一种或多种)缓冲液和溶剂(一种或多种)的组合,具体的缓冲液并不是关键的。然而,通常期望的是,活性剂在该溶液中足够稳定,并且患者对给予他的溶液中所用(一种或多种)缓冲液或(一种或多种)溶剂的耐受

性足够好。在 ANG1005 的情况下,因为该产品在 pH 高于 6.0 时较不稳定,所以一般期望使用可保持 pH 低于 6.0 的重配溶剂 / 缓冲体系。对于 ANG1005,一个优选的溶剂体系是乙醇与乳酸林格氏液 / 5% 葡糖糖的组合。在这个体系中,将乙醇加入到含有该产品的小瓶中,轻轻混合,然后加入乳酸林格氏液 / 5% 葡糖糖从而溶解该产品。使用常规注射用水 (WFI) 或盐水作为稀释剂可产生高的 pH 水平,导致 ANG1005 降解。溶解之后,可进一步将该混合物稀释在水或其它缓冲体系中。冻干产品重配的示例性条件将在以下实施例 4 中进一步描述。

[0069] 制剂组合物 (formulation compositions)

[0070] 如上所述,我们已开发出适于给予患者的示例性疏水性药剂的制剂, ANG1005。冻干之前,在某些实施方式中,该制剂可以含有相当大比例的 DMSO。此种组合物可具有表 8A 和 8B 中给出的下列组分 (例如,干重)。表 8C 示出在冻干之前水溶液中各组分的示例浓度。

[0071] 表 8A :按不包括水的重量计的百分比

[0072]

化合物	百分比 (按重量计)	优选的百分比	示例性百分比
ANG1005	0.1-5%	1-3%	1.8%
张度剂 (如氯化钠)	1-15%	5-12%	8.6%
缓冲液 (如甘氨酸)	1-10%	3-7%	4.5%
膨胀剂 (如甘露醇)	0-15%	5-12%	7.7%
Solutol HS 15	40-75%	50-70%	61.1%
DMSO	3-20%	10-20%	16.3%

[0073] 表 8B :水溶液中的百分比 (冻干前)

[0074]

化合物	百分比 (按重量计)	优选 百分比	更优选 百分比	示例性 百分比
ANG1005	0.05-1.5%	0.1-1.0%	0.2-0.8%	0.55%
张度剂 (如氯化钠)	0.1-10%	0.5-6%	1-3%	2.7%
缓冲液 (如甘氨酸)	0.05-5%	0.1-4%	0.5-1.5%	1.4%
膨胀剂 (如甘露醇)	0-5%	0.2-4%	1.0-3.0%	2.4%
Solutol HS 15	1-40%	3-30%	10-25%	19.0%
DMSO	0.5-15%	1-10%	2-8%	5.0%
水	25-85%	50-80%	65-75%	69.0%

[0075] 表 8C :冻干前水溶液中的浓度 (mg/ml)

[0076]

化合物	浓度 (mg/ml)	优选浓度	更优选浓度	示例性浓度
ANG1005	0.1-10.0	2-7	4-6.5	6.0
张度剂 (如氯化钠)	5-200	10-100	10-50	29
缓冲液 (如甘氨酸)	1-200	3-100	5-25	15
膨胀剂 (如甘露醇)	0-100	2-50	5-35	26
Solutol HS 15	10-400	20-300	50-250	206
DMSO	1-200	15-200	30-100	55

[0077] 在冻干之前,该组合物典型地被稀释在水中(见下文中有冻干条件)。对于大部分临床应用,该溶液被分成适于 ANG1005 单剂量给予的量(例如,约 10、20、30、60、90、120、150、200、240、300、400,或 500mg)。冻干之后(例如,在本文描述的条件),DMSO 浓度可显著降低。冻干之后,本发明 ANG1005 组合物可具有表 9 示出的下列特性(例如,干重)。

[0078] 表 9

[0079]

化合物	百分比 (按重量计)	优选百分比	更优选百分比	示例性百分比 (0.5% DMSO)
ANG1005	0.1-5%	1.5-3%	1.8-2.3%	2.11
张度剂 (如氯化钠)	0-15%	0-12%	9-11%	10.18

[0080]

缓冲液 (如甘氨酸)	1-10%	3-7%	4.5-6%	5.27
膨胀剂 (如甘露醇)	0-15%	5-12%	8-10%	9.13
Solutol HS 15	40-75%	50-70%	69-75%	72.32
DMSO	0.01-10%	0.1-5%	0.2-0.5	0.50

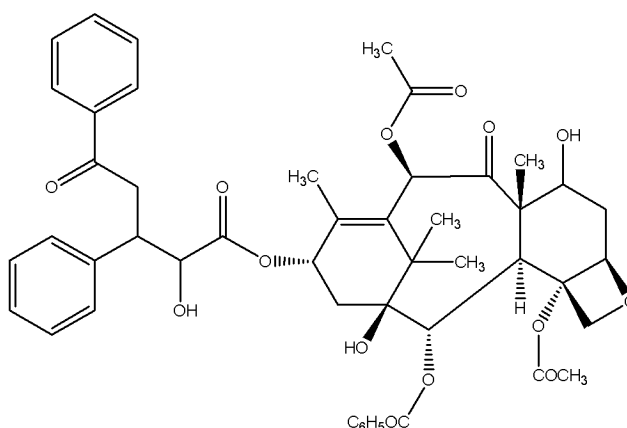
[0081] 疏水性药剂

[0082] 在本发明组合物和方法中可使用任何疏水性药剂。下面描述了示例化合物。

[0083] 紫杉醇和相关化合物

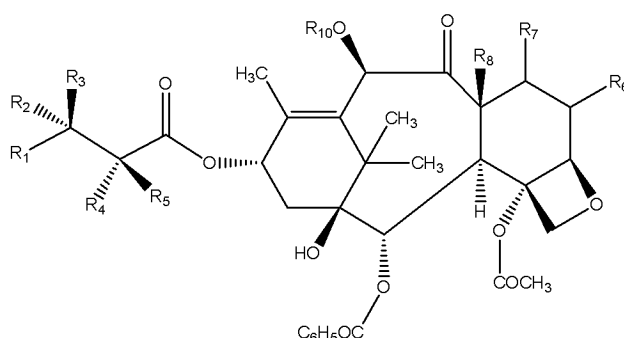
[0084] 尽管本发明用 ANG1005、血管肽 2- 紫杉醇结合物进行例示,但本文描述的制剂也可与紫杉醇、紫杉醇类似物,或其结合物一起使用。紫杉醇具有式:

[0085]



[0086] 紫杉醇的结构类似物描述在美国专利 6,911,549 中,并可由下式表示:

[0087]



[0088] 其中 R_1 选自由以下基团组成的组,即, $-\text{CH}_3$; $-\text{C}_6\text{H}_5$, 或被 1 个、2 个或 3 个 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_3 烷氧基、卤素、 C_1 - C_3 烷硫基、三氟甲基、 C_2 - C_6 、二烷基氨基、羟基,或硝基取代的苯基;以及 2-呋喃基、2-噻吩基、1-萘基、2-萘基或 3,4-亚甲基二氧基苯基; R_2 选自由以下基团组成的组,即, $-\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{C}_1$ - C_{10} 烷基(优选 $-\text{NHC}(\text{O})\text{C}_4$ - C_6 烷基)、 $-\text{NHC}(\text{O})$ 苯基、被 1、2 或 3 个 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_3 烷氧基、卤素、 C_1 - C_3 烷硫基、三氟甲基、 C_2 - C_6 二烷基氨基、羟基或硝基取代的 $-\text{NHC}(\text{O})$ 苯基、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OCH}_2$ 苯基、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2$ -4-甲苯基、 $-\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})$ -4-(SO_3H) 苯基、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})$ -1-金刚烷基、 $-\text{NHC}(\text{O})$ 0-3-四氢呋喃基、 $-\text{NHC}(\text{O})$ 0-4-四氢吡喃基、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OC}_1$ - C_{10} 烷基、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHC}_1$ - C_{10} 烷基、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHPh}$ 、被 1、2 或 3 个 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_3 烷氧基、卤素、 C_1 - C_3 烷硫基、三氟甲基、 C_2 - C_6 二烷基氨基,或硝基取代的 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHPh}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{C}_3$ - C_8 环烷基、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、苯二甲酰亚氨基、 $-\text{NHC}(\text{O})$ -1-苯基-1-环戊基、 $-\text{NHC}(\text{O})$ -1-甲基-1-环己基、 $-\text{NHC}(\text{S})\text{NHC}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHCC}(\text{CH}_3)_3$ 或 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NHPh}$; R_3 选自由以下物质组成的组,即, $-\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})$ 苯基或 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$,总的条件是 R_2 和 R_3 之一是 $-\text{H}$,但 R_2 和 R_3 不都是 $-\text{H}$; R_4 是 $-\text{H}$,或选自由以下基团组成的组,即, $-\text{OH}$ 、 $-\text{OAc}$ ($-\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$)、 $-\text{OC}(\text{O})\text{OCH}_2\text{C}(\text{Cl})_3$ 、 $-\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+\text{HCOO}^-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})$ 苯基、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 及其药物可接受的盐、 $-\text{OCO}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ 及其药物可接受的盐,以及 $-\text{OC}(\text{O})-\text{Z}-\text{C}(\text{O})-\text{R}'$ [其中 Z 是亚乙基 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$)、亚丙基 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$)、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、1,2-环己基或 1,2-亚苯基, R' 是 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OH}$ 碱、 $-\text{NR}'_2\text{R}'_3$ 、 $-\text{OR}'_3$ 、 $-\text{SR}'_3$ 、 $-\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})\text{NR}'_4\text{R}'_5$,其中 R'_2 是 $-\text{H}$ 或 $-\text{CH}_3$, R'_3 是 $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_6\text{R}'_7$ 或 $(\text{CH}_2)_n\text{N}^+\text{R}'_6\text{R}'_7\text{R}'_8\text{X}^-$,其中 n 是 1-3, R'_4 是 $-\text{H}$ 或 $-\text{C}_1$ - C_4 烷基, R'_5 是 $-\text{H}$ 、 $-\text{C}_1$ - C_4 烷基、苄基、羟乙基、 $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ 或二甲基氨基乙基,

R'_6 和 R'_7 为 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、苄基,或者 R'_6 和 R'_7 与 $NR'_6R'_7$ 中的氮一起形成吡咯烷基、哌啶基、吗啉基(吗啉代,morpholino),或 N-甲基哌嗪基(piperizino); R'_8 是 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 或苄基, X^- 是卤离子(halide),并且碱为 NH_3 、 $(HOC_2H_4)_3N$ 、 $N(CH_3)_3$ 、 $CH_3N(C_2H_4)_2NH$ 、 $NH_2(CH_2)_6NH_2$ 、N-甲基葡萄糖胺、NaOH 或 KOH]、 $-OC(O)(CH_2)_nNR^2R^3$ [其中 n 是 1-3, R^2 是 $-H$ 或 $-C_1-C_3$ 烷基并且 R^3 是 $-H$ 或 $-C_1-C_3$ 烷基]、 $-OC(O)CH(R'')NH_2$ [其中 R'' 选自由 $-H$ 、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ 、 $-CH(CH_3)_2$ 、 $-CH_2$ 苯基、 $-(CH_2)_4NH_2$ 、 $-CH_2CH_2COOH$ 、 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ 组成的组]、氨基酸脯氨酸的残基、 $-OC(O)CH=CH_2$ 、 $-C(O)CH_2CH_2C(O)NHCH_2CH_2SO_3^-Y^+$ 、 $-OC(O)CH_2CH_2C(O)NHCH_2CH_2CH_2SO_3^-Y^+$, 其中 Y^+ 为 Na^+ 或 $N^+(Bu)_4$ 、 $-OC(O)CH_2CH_2C(O)OCH_2CH_2OH$; R_5 是 $-H$ 或 $-OH$, 总的条件是当 R_5 为 $-OH$ 时, R_4 是 $-H$, 进一步的条件是当 R_5 为 $-H$ 时, R_4 不是 $-H$; 当 R_7 为 $\alpha-R_{71}$: $\beta-R_{72}$ 并且 R_8 是 $-CH_3$ 时, R_6 为 $-H$: $-H$, 其中 R_{71} 和 R_{72} 中的一个为 $-H$, R_{71} 和 R_{72} 中的另一个为 $-X$, 其中 X 是卤素; 当 R_7 为 $\alpha-H$: $\beta-R_{74}$ 时, R_6 为 $-H$: $-H$, 其中 R_{74} 和 R_8 一起形成环丙基环; R_{10} 为 $-H$ 或 $-C(O)CH_3$; 以及当该化合物含有酸性或碱性官能团时则包含其药物可接受的盐。

[0089] 特别的紫杉醇类似物包括(叠氮苯基)脲基)紫杉烷(taxoid)、(2 α , 5 α , 7 β , 9 α , 10 β , 13 α)-5, 10, 13, 20-四乙酰氧基紫杉-11-烯-2, 7, 9-三醇、(2 α , 5 α , 9 α , 10 β)-2, 9, 10-三乙酰氧基-5-((β -D-吡喃葡萄糖基)氧)-3, 11-环紫杉-11-烯-13-酮、1 β -羟基巴卡丁(baccatin) I、1, 7-二羟基紫杉宁(紫松素, 紫杉素, taxinine)、1-乙酰基-5, 7, 10-去乙酰基-巴卡丁 I、1-去羟基巴卡丁 VI、1-羟基-2-去乙酰氧基-5-去桂皮酰基-紫杉宁 j、1-羟基-7, 9-双去乙酰基巴卡丁 I、1-羟基巴卡丁 I、10-乙酰基-4-去乙酰基泰索帝(taxotere)、10-去乙酰氧基紫杉醇、10-去乙酰基巴卡丁 III 二甲亚砜二溶剂化物(disolvate)、10-去乙酰基-10-(3-氨基苯甲酰基)紫杉醇、10-去乙酰基-10-(7-(二乙氨基)香豆素-3-羰基)紫杉醇、10-去乙酰基-9-二氢泰素(紫杉酚, taxol)、10-去乙酰基巴卡丁 III、10-去乙酰基紫杉醇、10-去乙酰基紫杉宁、10-去乙酰基泰素、10-去氧-10-C-吗啉乙基紫杉萜(多西他赛, docetaxel)、10-0-乙酰基-2-0-(环己基羰基)-2-脱苯甲酰基泰索帝、10-0-仲-氨乙基紫杉萜、11-desmethyllaulimalide、13-去氧-13-乙酰氧基-7, 9-二乙酰基-1, 2-双脱氧紫杉碱(taxine)、13-去氧巴卡丁 III、14-羟基-10-去乙酰基-2-0-脱苯甲酰基巴卡丁 III、14-羟基-10-去乙酰基巴卡丁 III、14 β -苯甲酰氧基-13-去乙酰基巴卡丁 IV、14 β -苯甲酰氧基-2-去乙酰基巴卡丁 VI、14 β -苯甲酰氧基巴卡丁 IV、19-羟基巴卡丁 III、2', 2''-亚甲基紫杉萜、2', 2''-亚甲基紫杉醇、2'-(缬氨酰-亮氨酰-赖氨酰-PABC)紫杉醇、2'-乙酰基泰素、2'-0-乙酰基-7-0-(N-(4'-荧光素羰基)丙氨酰)泰素、2, 10, 13-三乙酰氧基-紫杉-4(20), 11-二烯-5, 7, 9-三醇、2, 20-0-二乙酰基二萜紫杉烷(taxumairol)N、2-(4-叠氮苯甲酰基)泰素、2-去乙酰氧基紫杉宁 J、2-脱苯甲酰基-2-间甲氧基苯甲酰基-7-三甲基硅烷基-13-氧代-14-羟基巴卡丁 III 1, 14-碳酸酯、2-0-(环己基羰基)-2-脱苯甲酰基巴卡丁 III 13-0-(N-(环己基羰基)-3-环己基异丝氨酸酯)、2 α , 7 β , 9 α , 10 β , 13 α -五乙酰氧基紫杉-4(20), 11-二烯-5-醇、2 α , 5 α , 7 β , 9 α , 13 α -五羟基-10 β -乙酰氧基紫杉-4(20), 11-二烯、2 α , 7 β , 9 α , 10 β , 13-五乙酰氧基-11 β -羟基-5 α -(3'-N, N-二甲氨基-3'-苯基)-丙酰氧基紫杉-4(20), 12-二烯、2 α , 7 β -二乙酰氧基-5 α , 10 β , 13 β -三羟基-2(3-20)松香(abeo)-紫杉-4(20), 11-二烯-9-酮、2 α , 9 α -二羟

基-10 β ,13 α -二乙酰氧基-5 α -(3'-甲氨基-3'-苯基)-丙酰氧基紫杉-4(20),11-二烯、2 α -羟基-7 β ,9 α ,10 β ,13 α -四乙酰氧基-5 α -(2'-羟基-3'-N,N-二甲氨基-3'-苯基)-丙酰氧基紫杉-4(20),11-二烯、3'-(4-叠氮苯甲酰氨基)泰素、3'-N-(4-苯甲酰基二氢桂皮酰基)-3'-N-脱苯甲酰基紫杉醇、3'-N-间氨基苯甲酰氨基-3'-去苯甲酰氨基紫杉醇、3'-对羟基紫杉醇、3,11-环紫杉宁 NN-2,4-去乙酰基泰素、5,13-二乙酰氧基-紫杉-4(20),11-二烯-9,10-二醇、5-0-苯甲酰化紫杉宁 K、5-0-苯基丙酰氧基紫杉宁 A、5 α ,13 α -二乙酰氧基-10 β -桂皮酰氧基-4(20),11-紫杉二烯-9 α -醇、6,3'-对二羟基紫杉醇、6- α -羟基-7-去氧-10-去乙酰基巴卡丁-III、6-氟-10-乙酰基紫杉萜、6-羟基泰素、7,13-二乙酰氧基-5-桂皮酰氧基-2(3-20)-松香-紫杉-4(20),11-二烯-2,10-二醇、7,9-双去乙酰基巴卡丁 VI、7-(5'-生物素基酰氨基丙酰基)紫杉醇(7-(5'-Biotinylamidopropanoyl)paclitaxel)、7-乙酰基泰素、7-去氧-10-去乙酰基巴卡丁-III、7-去氧-9-二氢紫杉醇、7-表紫杉醇、7-甲硫基甲基紫杉醇、7-0-(4-苯甲酰基二氢桂皮酰基)紫杉醇、7-0-(N-(4'-荧光素羰基)丙氨酰)泰素、7-木糖甙-10-去乙酰基泰素、8,9-单-环氧短叶苏木酚(8,9-single-epoxy brevifolin)、9-二氢巴卡丁 III、9-二氢泰素、9 α -羟基-2 α ,10 β ,13 α -三乙酰氧基-5 α -(3'-N,N-二甲氨基-3'-苯基)-丙酰氧基紫杉-4(20),11-二烯、巴卡丁 III、巴卡丁 III13-0-(N-苯甲酰基-3-环己基异丝氨酸酯)、BAY59、苯甲酰基泰素、BMS 181339、BMS 185660、BMS 188797、短叶老鹳草素(brevifoliol)、butitaxel、三尖杉宁碱(cephalomannine)、紫杉烷二萜(dantaxusin)A、紫杉烷二萜 B、紫杉烷二萜 C、紫杉烷二萜 D、二溴-10-去乙酰基三尖杉宁碱(cephalomannine)、DJ927、紫杉萜、Flutax 2、戊二酰基紫杉醇 6-氨基己醇葡糖苷酸、IDN 5109、IDN5111、IDN 5127、IDN 5390、isolaulimalide、laulimalide、MST 997、N-(紫杉醇-2'-0-(2-氨基)苯基丙酸酯)-0-(β -葡糖苷酸基)氨基甲酸酯、N-(紫杉醇-2'-0-3,3-二甲基丁酸酯)-0-(β -葡糖苷酸基)氨基甲酸酯、N-脱苯甲酰基-N-(3-(二甲氨基)苯甲酰基)紫杉醇、九泰素(nonataxel)、奥曲肽(octreotide)-结合的紫杉醇、紫杉醇、紫杉醇-转铁蛋白、PNU 166945、聚(乙二醇)-结合的紫杉醇-2'-甘氨酸酯、聚谷氨酸-紫杉醇、protax、紫杉醇前体(protaxel)、RPR 109881A、SBT-101187、SBT-1102、SBT-1213、SBT-1214、SBT-1250、SBT-12843、tasumatrol E(紫杉烷类)、tasumatrol F、tasumatrol G、紫杉-4(20),11(12)-二烯-5-基乙酸酯、紫杉-4(20),11(12)-二烯-5-醇、紫杉烷(taxane)、taxchinin N、紫杉醇 D(taxcultine)、紫杉佐匹定(taxezopidine)M、紫杉佐匹定 N、紫杉碱、紫杉宁、紫杉宁 A、紫杉宁 M、紫杉宁 NN-1、紫杉宁 NN-7、泰素 C-7-木糖、泰素-唾液酰(taxol-sialyl)结合物、二萜紫杉烷(taxumairol)A、二萜紫杉烷 B、二萜紫杉烷 G、二萜紫杉烷 H、二萜紫杉烷 I、二萜紫杉烷 K、二萜紫杉烷 M、二萜紫杉烷 N、二萜紫杉烷 O、二萜紫杉烷 U、二萜紫杉烷 V、二萜紫杉烷 W、二萜紫杉烷-X、二萜紫杉烷-Y、二萜紫杉烷-Z、紫杉素(taxusin)、taxuspinanane A、taxuspinanane B、紫杉平(taxuspine)C、紫杉平 D、紫杉平 F、云南紫杉宁(taxuyunnanine)C、云南紫杉宁 S、云南紫杉宁 T、云南紫杉宁 U、云南紫杉宁 V、tRA-96023,和 wallifoliol。其它紫杉醇类似物包括 1-去氧基紫杉醇、10-去乙酰氧基-7-去氧基紫杉醇、10-0-去乙酰基紫杉醇 10-琥珀酰单酯、10-琥珀酰紫杉醇、12b-乙酰氧基-2a,3,4,4a,5,6,9,10,11,12,12a,12b-十二氢-4,11-二羟基-12-(2,5-二甲氧基苄氧基)-4a,8,13,13-四甲基-5-氧代-7,11-桥亚甲基(methano)-1H-环癸并(3,4)苯并

(1,2-b)oxet-9-基 3-(叔丁氧羰基)氨基-2-羟基-5-甲基-4-己烯酸酯、130-nm 白蛋白结合型紫杉醇、2'-紫杉醇甲基 2-吡喃葡萄糖基琥珀酸酯、3'-(4-叠氮苯基)-3'-脱苯基紫杉醇、4-氟紫杉醇、6,6,8-三甲基-4,4a,5,6,7,7a,8,9-八氢环戊并(4,5)环庚并(1,2-c)-呋喃-4,8-二醇 4-(N-乙酰基-3-苯基异丝氨酸酯)、6,6,8-三甲基-4,4a,5,6,7,7a,8,9-八氢环戊并(4,5)环庚并(1,2-c)-呋喃-4,8-二醇 4-(N-叔丁氧基羰基-3-苯基异丝氨酸酯)、7-(3-甲基-3-亚硝基丁硫酰(thiobutryl))紫杉醇、7-去氧紫杉醇、7-琥珀酰基紫杉醇、A-Z-CINN310、AI-850、白蛋白结合型紫杉醇、AZ 10992、isotaxel、MAC321、MBT-0206、NK105、Pacliex、聚谷氨酸紫杉醇(paclitaxelpoliglumex)、紫杉醇-EC-1 结合物、polilactofate 和 TXD 258。其它紫杉醇类似物描述在美国专利 4,814,470、4,857,653、4,942,184、4,924,011、4,924,012、4,960,790 ;5,015,744 ;5,157,049 ;5,059,699 ;5,136,060 ;4,876,399 ;和 5,227,400 中。

[0090] 其它疏水性药剂

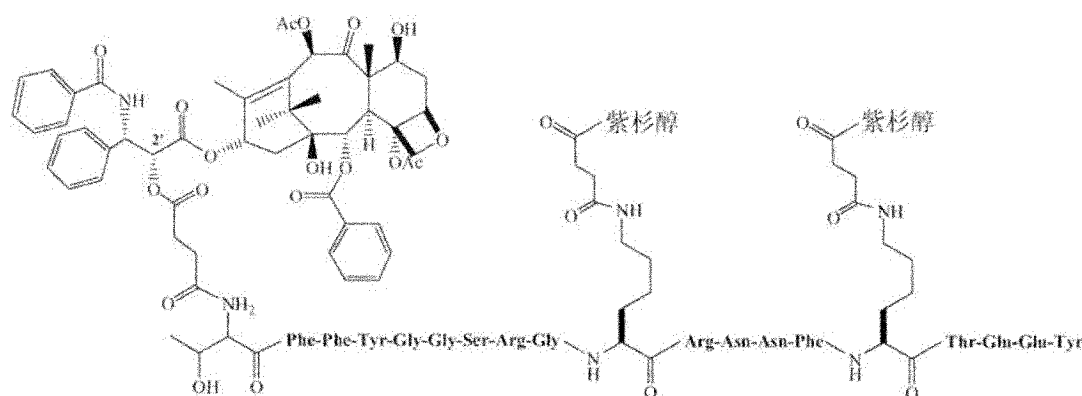
[0091] 其它疏水性药剂包括镇痛剂和抗炎剂(例如,阿洛泼林、金诺芬(auranofin)、阿扎丙宗、贝诺酯、二氟尼柳、依托度酸、芬布芬、非诺洛芬钙、氟比洛芬、布洛芬、吲哚美辛、酮洛芬、甲氯灭酸、甲灭酸、萘丁美酮、萘普生、羟基保泰松、保泰松、吡罗昔康、舒林酸)、驱蠕虫药(例如,阿苯达唑、羟基萘酸苄酚宁、坎苯达唑、双氯酚、伊维菌素、甲苯达唑、奥沙尼喹、奥芬达唑、双羟基萘酸间酚嘧啶、吡喹酮、双羟基萘酸噻嘧啶(oxantel embonate)、吡喹酮、噻嘧啶、噻苯咪唑)、抗心律失常药(例如,盐酸乙胺碘呋酮、双异丙吡胺、醋酸氟卡尼、奎尼丁硫酸盐)、抗菌剂(例如,苯明青霉素、西诺沙星、盐酸环丙沙星、克拉霉素、氯法齐明、氯唑西林、地美环素、多西环素、红霉素、乙硫异烟胺、亚胺培南、萘啶酸、硝基呋喃妥因、利福平、螺旋霉素、磺胺苯甲酰胺(sulphabenzamide)、磺胺多辛、磺胺甲基嘧啶、磺胺醋酰、磺胺嘧啶、磺胺异噁唑、磺胺甲基异噁唑、磺胺吡啶、四环素、甲氧苄氨嘧啶)、抗凝血剂(例如,双香豆素、双嘧达莫、醋硝香豆素(nicoumalone)、苯茛二酮)、抗抑郁药(例如,阿莫沙平、盐酸马普替林、盐酸米塞林、盐酸去甲替林、盐酸曲唑酮、马来酸三甲丙咪嗪)、抗糖尿病药(例如,醋酸己脲、氯磺丙脲、格列本脲(glibenclamide)、格列齐特(gliclazide)、格列吡嗪(glipizide)、妥拉磺脲(tolazamide)、甲苯磺丁脲)、抗癫痫药(例如,贝克拉胺、卡马西平、氯硝西洋、乙苯妥英、美芬妥英、甲琥胺、甲苯比妥、奥卡西平、甲乙双酮、苯乙酰脲、苯巴比妥、苯妥英、苯琥胺、扑米酮、舒噻美、丙戊酸)、抗真菌剂(例如,两性霉素、硝酸布康唑、克霉唑、硝酸益康唑、氟康唑、氟胞嘧啶、灰黄霉素、伊曲康唑、酮康唑、咪康唑、那他霉素、制霉菌素、硝酸硫康唑、盐酸特比萘芬、特康唑、噻康唑、十一碳烯酸)、抗痛风剂(例如,别嘌醇、丙磺舒、苯磺唑酮(sulphin-pyrazone))、抗高血压剂(例如,氨氯地平、贝尼地平、达罗地平、盐酸地尔硫卓(diltazem HCl)、二氮嗪、非洛地平、醋酸胍那苄、伊拉地平、米诺地尔、盐酸尼卡地平、硝苯地平、尼莫地平、盐酸苯氧苄胺、盐酸哌唑嗪、利舍平、盐酸特拉唑嗪)、抗疟疾药(例如,阿莫地喹、氯奎、盐酸氯丙胍、盐酸卤泛群(halofantrine HCl)、盐酸甲氟喹、盐酸氯胍、乙胺嘧啶、硫酸奎宁)、抗偏头痛药(例如,甲磺酸双氢麦角胺、酒石酸麦角胺、马来酸二甲麦角新碱、马来酸苯噻啶、琥珀酸舒马曲坦)、抗毒蕈碱剂(例如,阿托品(atropine)、盐酸苯海索(benzhexol HCl)、比哌立登、盐酸普罗吩胺(ethopropazine HCl)、莨菪碱、溴美喷酯、氧苯环亚胺盐酸盐(oxyphencylcimine HCl)、托吡卡胺)、抗肿瘤剂和免疫抑制剂(例如,氨鲁米特、氨吡啶、硫唑嘌呤、白消安、苯丁酸氮芥、环孢菌素、氮烯

唑胺、雌莫司汀、依托泊苷、洛莫司汀、美法仑 (melphalan)、巯基嘌呤、氨甲蝶呤、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌 (mitozantrone)、盐酸丙卡巴肼、柠檬酸他莫昔芬、睾内酯)、抗原虫药 (例如, 苄硝唑、氯碘羟喹、癸氧喹酯、二碘羟基喹啉、糠酸二氯散、二硝托胺、呋喃唑酮、甲硝基羟乙唑、尼莫唑、呋喃西林、奥硝唑、磺甲硝咪唑)、抗甲状腺素药 (例如, 甲亢平、丙基硫氧嘧啶)、抗焦虑药、镇静剂、安眠药和安定药 (例如, 阿普唑仑、异戊巴比妥、巴比妥、苯他西泮、溴吡二氮卓、溴哌利多、溴替唑仑、正丁巴比妥、卡溴脲、甲氨二氮卓、氯美噻唑、氯丙嗪、氯巴占、氯噻西泮、氯氮平、安定、达哌啶醇、炔己蚁胺、氟阿尼酮 (flunaniSone)、氟硝安定、三氟丙嗪、癸酸三氟噻醇、癸酸氟奋乃静、氟胺安定、氟哌啶醇、氯羟去甲安定、氯甲西泮、去氧安定、氨甲丙二酯、安眠酮、咪达唑仑、硝基安定、去甲羟安定、戊巴比妥、羟哌氯丙嗪、迷清、甲哌氯丙嗪、舒必利、羟基安定、甲硫哒嗪、三唑苯二氮、吡嗪哌酯)、 β -阻断剂 (例如, 醋丁洛尔、阿普洛尔、阿替洛尔、拉贝洛尔、美托洛尔、蔡羟心安、心得平、品多洛尔、普萘洛尔)、强心药 (例如, 氨利酮、洋地黄毒苷、地高辛、依诺昔酮、毛花苷C、甲基地高辛)、皮质类固醇 (例如, 倍氯米松、倍他米松、丁地去炎松、醋酸可的松、去氧米松、地塞米松、醋酸氟氢可的松、氟尼缩松、氟可龙 (flucortolone)、氟替卡松丙酸酯、氢化可的松、甲泼尼松龙、泼尼松龙、泼尼松、曲安西龙)、利尿剂: 乙酰唑胺、氨氯吡脒、苄氟噻嗪、丁苯氧酸、氯噻嗪、氯噻酮、利尿酸、呋塞米、美托拉宗、螺内酯、氨苯喋啶、抗帕金森病药 (例如, 甲磺酸溴麦角隐亭、马来酸麦角乙脲)、肠胃病药 (例如, 双乙酰氧苯基甲基吡啶、甲腈咪胍、西沙必利、盐酸氟苯哌酯、哌双咪酮、法莫替丁、氯哌丁胺、美沙拉嗪、尼扎替丁、奥美拉唑、盐酸奥坦西隆、盐酸雷尼替丁、柳氮磺胺吡啶)、组胺 H- 受体拮抗剂 (例如, 阿伐斯汀、阿司咪唑、肉桂苯哌嗪、赛克利嗪、盐酸二苯环庚啶、茶苯海明、盐酸氟苯利嗪、氯雷他定、盐酸敏克静、奥沙米特、特非那定)、血脂调节剂 (例如, 苯扎贝特、安妥明、非诺贝特、二甲苯氧庚酸、丙丁酚)、硝酸酯和其它抗心绞痛药物 (例如, 硝酸戊酯、三硝酸甘油酯、二硝酸异山梨醇酯、单硝酸异山梨醇酯、四硝酸季戊四醇酯)、鸦片类止痛药 (例如, 可待因、右丙氧芬、二乙酰吗啡、二氢可待因、美普他酚、美沙酮、吗啡、环丁甲羟氢吗啡、镇痛新)、性激素 (例如, 枸橼酸氯芪酚胺、炔羟雄烯异噁唑、炔雌醇、安宫黄体酮、炔雌醇甲醚、甲基睾酮、炔诺酮、炔诺孕酮、雌二醇、共轭雌激素、黄体酮、康力龙、己烯雌酚、睾丸激素、替勃龙) 以及兴奋剂 (例如, 苯丙胺、右旋苯丙胺、右旋氟苯丙胺、右旋氟苯丙胺、氯苯咪唑啉)。

[0092] 多肽结合物

[0093] 本文描述的制剂中可以使用包括活性剂和多肽的结合物。如美国专利申请公开 2006/0182684, 和 2006/0189515, 以及 2007 年 12 月 20 日提交的美国临时申请 61/008, 880 中描述的, 我们已开发了多肽-药剂结合物。此种结合物可以包括本文描述的任何多肽、疏水性药剂, 例如紫杉醇或紫杉醇类似物 (例如, 本文描述的那些), 和连接物 (例如, 本文描述的那些)。紫杉醇结合物可以 ANG1005 例示, 其包括血管肽-2 肽 (SEQ ID NO:97), 该血管肽-2 肽通过 N- 末端的酯键, 和通过位置 10 和 15 处的赖氨酸结合到三个紫杉醇分子上。ANG1005 的结构为:

[0094]



[0095] 该结合物,在某些实施方式中,可穿过血脑屏障(BBB)或可优选地靶向某些细胞类型,例如肝细胞、肺细胞、肾细胞、肌细胞,或者可以靶向(本文描述的任何细胞类型的)肿瘤细胞。结合到这些肽的这些药剂可以表现出被靶细胞吸收的量的增大,例如,通过受体介导的胞吞作用(例如,通过LRP受体)。该结合药剂可以,替换地或附加地,表现出提高的稳定性或被细胞逐出减少(例如,由于P-糖蛋白介导的流出)。

[0096] 多肽

[0097] 本发明的组合物和方法可包括本文描述的任何多肽,例如表10中描述的多肽中的任一种(例如,SEQ ID NO:1-105和107-112中任何一个,如SEQ ID NO:1-97、99、100、101,或107-112限定的多肽)、或其任何片段、类似物、衍生物,或变体。在某些实施方式中,该多肽可具有与本文描述的多肽至少35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%,或甚至100%的同一性。相对此处描述的序列之一,该多肽可具有一个或多个(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15)置换(替换,取代,substitutions)。其它修饰将在下面进行更详细的描述。

[0098] 本发明的特征还在于这些多肽的片段(例如,功能片段)。在某些实施方式中,该片段能够进入或蓄积在特定细胞类型(例如,肝、肺、肾、脾或肌)中或能够穿过BBB。该多肽的截断(截断体,truncations)可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多的氨基酸,其源自多肽的N-末端、多肽的C-末端,或其组合。其它片段包括多肽内部缺失的序列。

[0099] 其它多肽可利用美国专利申请公开2006/0189515(其并入本文以供参考)中描述的一种试验或方法,或利用本领域中已知的任何方法鉴定(识别)。例如,候选载体可用常规多肽合成法生产,可与泰素(taxol)结合,并可给予实验动物。生物活性载体可基于,例如它的这种效能识别,这种效能为与未用结合物治疗的(例如,用未结合的药剂治疗的)对照相比,它可增大注射有肿瘤细胞并用结合物治疗的动物的成活率的效能。

[0100] 在另一个实施例中,生物活性多肽可以基于原位脑灌注试验中其在实质(parenchyma)中的位置进行鉴定。在体外BBB试验中,例如由CELLIAL™技术开发的模型,可用来鉴定此种载体。

[0101] 也可进行试验从而确定它在其它组织中的蓄积。可将多肽的标记结合物给予动物,然后可测量它在不同器官中的蓄积。例如,结合到可检测标签(标记,label)(例如,近IR荧光光谱标签,例如Cy5.5)的多肽允许在体内实时可视化(live in vivo visualization)。将此种多肽给予动物,并检测器官中该多肽的存在,从而使该多肽在期望器官中的蓄积率和量得以确定。在其它实施方式中,可用放射性同位素(例如,¹²⁵I)标记多肽。然后将该多肽给予动物。一段时间之后,处死该动物,取出该动物的器官。每个器官中

放射性同位素的量可随后利用本领域中已知的任何方式测量。通过比较特定器官中标记候选多肽的量与标记对照的量,可确定候选多肽在特定组织中的蓄积能力以及蓄积率和量。合适的阴性对照包括已知不能被有效地运送到特定细胞类型中的任何多肽。

[0102] 表 10

[0103] SEQ ID

[0104] NO :

[0105] 1 T F V Y G G C R A K R N N F K S A E D

[0106] 2 T F Q Y G G C M G N G N N F V T E K E

[0107] 3 P F F Y G G C G G N R N N F D T E E Y

[0108] 4 S F Y Y G G C L G N K N N Y L R E E E

[0109] 5 T F F Y G G C R A K R N N F K R A K Y

[0110] 6 T F F Y G G C R G K R N N F K R A K Y

[0111] 7 T F F Y G G C R A K K N N Y K R A K Y

[0112] 8 T F F Y G G C R G K K N N F K R A K Y

[0113] 9 T F Q Y G G C R A K R N N F K R A K Y

[0114] 10 T F Q Y G G C R G K K N N F K R A K Y

[0115] 11 T F F Y G G C L G K R N N F K R A K Y

[0116] 12 T F F Y G G S L G K R N N F K R A K Y

[0117] 13 P F F Y G G C G G K K N N F K R A K Y

[0118] 14 T F F Y G G C R G K G N N Y K R A K Y

[0119] 15 P F F Y G G C R G K R N N F L R A K Y

[0120] 16 T F F Y G G C R G K R N N F K R E K Y

[0121] 17 P F F Y G G C R A K K N N F K R A K E

[0122] 18 T F F Y G G C R G K R N N F K R A K D

[0123] 19 T F F Y G G C R A K R N N F D R A K Y

[0124] 20 T F F Y G G C R G K K N N F K R A E Y

[0125] 21 P F F Y G G C G A N R N N F K R A K Y

[0126] 22 T F F Y G G C G G K K N N F K T A K Y

[0127] 23 T F F Y G G C R G N R N N F L R A K Y

[0128] 24 T F F Y G G C R G N R N N F K T A K Y

[0129] 表 10

[0130] 25 T F F Y G G S R G N R N N F K T A K Y

[0131] 26 T F F Y G G C L G N G N N F K R A K Y

[0132] 27 T F F Y G G C L G N R N N F L R A K Y

[0133] 28 T F F Y G G C L G N R N N F K T A K Y

[0134] 29 T F F Y G G C R G N G N N F K S A K Y

[0135] 30 T F F Y G G C R G K K N N F D R E K Y

[0136] 31 T F F Y G G C R G K R N N F L R E K E

[0137] 32 T F F Y G G C R G K G N N F D R A K Y

[0138]	33	T F F Y G G S R G K G N N F D R A K Y
[0139]	34	T F F Y G G C R G N G N N F V T A K Y
[0140]	35	P F F Y G G C G G K G N N Y V T A K Y
[0141]	36	T F F Y G G C L G K G N N F L T A K Y
[0142]	37	S F F Y G G C L G N K N N F L T A K Y
[0143]	38	T F F Y G G C G G N K N N F V R E K Y
[0144]	39	T F F Y G G C M G N K N N F V R E K Y
[0145]	40	T F F Y G G S M G N K N N F V R E K Y
[0146]	41	P F F Y G G C L G N R N N Y V R E K Y
[0147]	42	T F F Y G G C L G N R N N F V R E K Y
[0148]	43	T F F Y G G C L G N K N N Y V R E K Y
[0149]	44	T F F Y G G C G G N G N N F L T A K Y
[0150]	45	T F F Y G G C R G N R N N F L T A E Y
[0151]	46	T F F Y G G C R G N G N N F K S A E Y
[0152]	47	P F F Y G G C L G N K N N F K T A E Y
[0153]	48	T F F Y G G C R G N R N N F K T E E Y
[0154]	49	T F F Y G G C R G K R N N F K T E E D
[0155]	50	P F F Y G G C G G N G N N F V R E K Y
[0156]	51	S F F Y G G C M G N G N N F V R E K Y
[0157]	表 10	
[0158]	52	P F F Y G G C G G N G N N F L R E K Y
[0159]	53	T F F Y G G C L G N G N N F V R E K Y
[0160]	54	S F F Y G G C L G N G N N Y L R E K Y
[0161]	55	T F F Y G G S L G N G N N F V R E K Y
[0162]	56	T F F Y G G C R G N G N N F V T A E Y
[0163]	57	T F F Y G G C L G K G N N F V S A E Y
[0164]	58	T F F Y G G C L G N R N N F D R A E Y
[0165]	59	T F F Y G G C L G N R N N F L R E E Y
[0166]	60	T F F Y G G C L G N K N N Y L R E E Y
[0167]	61	P F F Y G G C G G N R N N Y L R E E Y
[0168]	62	P F F Y G G S G G N R N N Y L R E E Y
[0169]	63	M R P D F C L E P P Y T G P C V A R I
[0170]	64	A R I I R Y F Y N A K A G L C Q T F V Y G
[0171]	65	Y G G C R A K R N N Y K S A E D C M R T C G
[0172]	66	P D F C L E P P Y T G P C V A R I I R Y F Y
[0173]	67	T F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y
[0174]	68	K F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y
[0175]	69	T F Y Y G G C R G K R N N Y K T E E Y
[0176]	70	T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y

[0177]	71	C T F F Y G C C R G K R N N F K T E E Y
[0178]	72	T F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y C
[0179]	73	C T F F Y G S C R G K R N N F K T E E Y
[0180]	74	T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y C
[0181]	75	P F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y
[0182]	76	T F F Y G G C R G K R N N F K T K E Y
[0183]	77	T F F Y G G K R G K R N N F K T E E Y
[0184]	78	T F F Y G G C R G K R N N F K T K R Y
[0185]	表 10	
[0186]	79	T F F Y G G K R G K R N N F K T A E Y
[0187]	80	T F F Y G G K R G K R N N F K T A G Y
[0188]	81	T F F Y G G K R G K R N N F K R E K Y
[0189]	82	T F F Y G G K R G K R N N F K R A K Y
[0190]	83	T F F Y G G C L G N R N N F K T E E Y
[0191]	84	T F F Y G C G R G K R N N F K T E E Y
[0192]	85	T F F Y G G R C G K R N N F K T E E Y
[0193]	86	T F F Y G G C L G N G N N F D T E E E
[0194]	87	T F Q Y G G C R G K R N N F K T E E Y
[0195]	88	Y N K E F G T F N T K G C E R G Y R F
[0196]	89	R F K Y G G C L G N M N N F E T L E E
[0197]	90	R F K Y G G C L G N K N N F L R L K Y
[0198]	91	R F K Y G G C L G N K N N Y L R L K Y
[0199]	92	K T K R K R K K Q R V K I A Y E E I F K N Y
[0200]	93	K T K R K R K K Q R V K I A Y
[0201]	94	R G G R L S Y S R R F S T S T G R
[0202]	95	R R L S Y S R R R F
[0203]	96	R Q I K I W F Q N R R M K W K K
[0204]	97	T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y
[0205]	98	M R P D F C L E P P Y T G P C V A R I
[0206]		I R Y F Y N A K A G L C Q T F V Y G G
[0207]		C R A K R N N F K S A E D C M R T C G G A
[0208]	99	T F F Y G G C R G K R N N F K T K E Y
[0209]	100	R F K Y G G C L G N K N N Y L R L K Y
[0210]	101	T F F Y G G C R A K R N N F K R A K Y
[0211]	102	N A K A G L C Q T F V Y G G C L A K R N N F
[0212]	表 10	
[0213]		E S A E D C M R T C G G A
[0214]	103	Y G G C R A K R N N F K S A E D C M R T C G
[0215]		G A

[0216] 104 G L C Q T F V Y G G C R A K R N N F K S A E
 [0217] 105 L C Q T F V Y G G C E A K R N N F K S A
 [0218] 107 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y
 [0219] 108 R F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y
 [0220] 109 R F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y
 [0221] 110 R F F Y G G S R G K R N N F R T E E Y
 [0222] 111 T F F Y G G S R G K R N N F R T E E Y
 [0223] 112 T F F Y G G S R G R R N N F R T E E Y
 [0224] 113 C T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y
 [0225] 114 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y C
 [0226] 115 C T F F Y G G S R G R R N N F R T E E Y
 [0227] 116 T F F Y G G S R G R R N N F R T E E Y C

[0228] 肽序号 5 包括 SED ID NO :5 序列并在其 C- 末端酰胺化

[0229] 肽序号 67 包括 SED ID NO :67 序列并在其 C- 末端酰胺化

[0230] 肽序号 76 包括 SED ID NO :76 序列并在其 C- 末端酰胺化

[0231] 肽序号 91 包括 SED ID NO :91 序列并在其 C- 末端酰胺化

[0232] 肽序号 107 包括 SED ID NO :97 序列并在其 N- 末端乙酰化

[0233] 肽序号 109 包括 SED ID NO :109 序列并在其 N- 末端乙酰化

[0234] 肽序号 110 包括 SED ID NO :110 序列并在其 N- 末端乙酰化

[0235] 血管肽-1 (SED ID NO :67) 和血管肽-2 (SED ID NO :97) 的氨基已用作药剂结合的位点。为了研究氨基在结合中的作用以及它们对这些载体总运送能力的影响,设计了基于血管肽-1 和血管肽-2 序列的新载体,其具有可变的反应性氨基和可变的总电荷。这些多肽在表 11 中示出。

[0236] 表 11 :具有可变氨基靶的载体

[0237]

多肽名称	多肽序列	反应性氨 (位置)	电荷	SEQ ID No.
血管肽-3*	Ac ¹ -TFFYGGSRGKRNNFKTEEY	2 (10,15)	+1	107
血管肽-4b	RFFYGGSRGKRNNFKTEEY	3 (1,10,15)	+3	108
血管肽-4a	Ac ¹ -RFFYGGSRGKRNNFKTEEY	2 (10,15)	+2	109
血管肽-5	Ac ¹ -RFFYGGSRGKRNNFRTEEY	1 (10)	+2	110
血管肽-6	TFFYGGSRGKRNNFRTEEY	2 (1,10)	+2	111
血管肽-7	TFFYGGSRGRRNNFRTEEY	1 (1)	+2	112

[0238] * 血管肽-3 是血管肽-2 的乙酰化形式。

[0239] ¹Ac 表示乙酰化。

[0240] 修饰的多肽

[0241] 本发明的组合物和方法也可包括具有本文描述的氨基酸序列修饰的多肽（例如，具有 SEQ ID NO:1-105 和 107-116 中任何一个中描述的序列的多肽，例如，血管肽-3、-4a、-4b、-5、-6，或 -7）。在某些实施方式中，该修饰不显著破坏期望的生物活性。在一些实施方式中，该修饰可降低生物活性（例如，降低了至少 5%、10%、20%、25%、35%、50%、60%、70%、75%、80%、90%，或 95%）。在其它实施方式中，该修饰对生物活性没有影响，或可提高（例如，提高至少 5%、10%、25%、50%、100%、200%、500%，或 1000%）原始多肽的生物活性。经修饰的多肽可具有或可优化本发明多肽特性中的一种或多种，在一些情况下这些特性是需要或理想的。此种特性包括体内稳定性、生物利用率、毒性、免疫活性和免疫学特性 (immunological identity)。

[0242] 用在本发明中的多肽可包括经天然过程，例如翻译后加工或通过本领域中已知的化学修饰技术修饰的氨基酸或序列。修饰可以发生在多肽的任何位置，包括多肽骨架、氨基酸侧链和氨基-或羧基-末端。在给定多肽中的几个位点上可以存在相同或不同程度的相同类型的修饰，且多肽可含有多于一种类型的修饰。多肽可以因泛素化 (ubiquitination) 而支化，并且可以是环状，带有或不带有分支。环状、支化和支化环状多肽可由翻译后自然过程产生或可合成制得。其它修饰包括聚乙二醇化、乙酰化、酰化、乙酰氨基甲基 (acetamidomethyl, AcM) 基团的添加、ADP-核糖基化、烷基化、酰胺化、生物素化、甲氨酰化、羧乙基化、酯化、共价连接黄素、共价连接血红素部分、共价连接核苷酸或核苷酸衍生物、共价连接药物、共价连接标记物（例如，荧光性的或放射性的）、共价连接脂质或脂质衍生物、共价连接磷脂酰肌醇、交联、环化、二硫键形成、脱甲基、共价交联的形成、胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、 γ -羧基化、糖基化、GPI 锚形成 (anchor formation)、羟基化、碘化、甲基化、肉豆蔻酰化 (myristoylation)、氧化、蛋白质水解加工、磷酸化、异戊二烯化 (prenylation)、外消旋化、硒酰化 (selenoylation)、硫酸盐化、转移-RNA 介导的氨基酸添加至蛋白质如精氨酰化 (arginylation) 和泛素化。

[0243] 经修饰的多肽可进一步包括多肽序列中的氨基酸插入、缺失 (deletion)，或者保守性或非保守性置换（例如，D-氨基酸、脱氨基酸）（例如，其中此类变化基本不改变该多肽的生物活性）。

[0244] 置换可以是保守性的（即，其中残基被属于统一通用类型 (general type) 或者同一组的另一个残基替换）或非保守性的（即，其中残基被另一种类型的氨基酸替换）。另外，非天然存在的氨基酸可置换天然存在的氨基酸（即，非天然存在的保守性氨基酸置换或非天然存在的非保守性氨基酸置换）。

[0245] 合成制得的多肽可包括不是由 DNA 天然编码的氨基酸（例如，非天然存在或非天然氨基酸）的置换。非天然存在的氨基酸实例包括 D-氨基酸、具有连接到半胱氨酸硫原子上的乙酰氨基甲基的氨基酸、聚乙二醇化 (pegylated) 氨基酸、具有式 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ 的 ω 氨基酸（其中 n 为 2 ~ 6）、中性非极性氨基酸，例如肌氨酸、叔丁基丙氨酸、叔丁基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸和正亮氨酸。苯基甘氨酸可置换 Trp、Tyr 或 Phe；瓜氨酸和蛋氨酸亚砷是中性非极性的，磺丙氨酸是酸性的，并且鸟氨酸是碱性的。脯氨酸可以用羟脯氨酸置换并保持赋予性能的构象。

[0246] 类似物可通过置换诱变产生并可保持原始多肽的生物活性。被确认为“保守性置

换”的置换实例在表 12 中给出。如果此种置换导致不期望的变化,则引入表 12 中称为“示例性置换”或如本文进一步描述的关于氨基酸类别的其它类型的置换,并筛选产物。

[0247] 通过选择置换可实现功能或免疫学特性的实质性修饰,这些置换对维持 (a) 置换区域内多肽骨架的结构,例如,作为片层或螺旋构象, (b) 靶位点上分子的电荷或疏水性,或 (c) 侧链大小的效果显著不同。基于常见的侧链特性可将天然存在的残基分成几组:

[0248] (1) 疏水性的:正亮氨酸、蛋氨酸 (Met)、丙氨酸 (Ala)、缬氨酸 (Val)、亮氨酸 (Leu)、异亮氨酸 (Ile)、组氨酸 (His)、色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr)、苯丙氨酸 (Phe),

[0249] (2) 中性亲水性的:半胱氨酸 (Cys)、丝氨酸 (Ser)、苏氨酸 (Thr)

[0250] (3) 酸性 / 带负电荷的:天冬氨酸 (Asp)、谷氨酸 (Glu)

[0251] (4) 碱性的:天冬酰胺 (Asn)、谷氨酰胺 (Gln)、组氨酸 (His)、赖氨酸 (Lys)、精氨酸 (Arg)

[0252] (5) 影响链取向的残基:甘氨酸 (Gly)、脯氨酸 (Pro);

[0253] (6) 芳香族的:色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr)、苯丙氨酸 (Phe)、组氨酸 (His),

[0254] (7) 极性的:Ser、Thr、Asn、Gln

[0255] (8) 碱性带正电荷的:Arg、Lys、His, 和;

[0256] (9) 带电荷的:Asp、Glu、Arg、Lys、His

[0257] 其它保守性氨基酸置换在表 12 中列出。

[0258] 表 12:其它氨基酸置换

[0259]

原始残基	示例性置换	保守性置换
Ala (A)	Val、Leu、Ile	Val
Arg (R)	Lys、Gln、Asn	Lys
Asn (N)	Gln、His、Lys、Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Asn、Gln、Lys、Arg	Arg
Ile (I)	Leu、Val、Met、Ala、Phe、正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe	Ile

Lys (K)	Arg、Gln、Asn	Arg
Met (M)	Leu、Phe、Ile	Leu
Phe (F)	Leu、Val、Ile、Ala	Leu
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Trp、Phe、Thr、Ser	Phe
Val (V)	Ile、Leu、Met、Phe、Ala、正亮氨酸	Leu

[0260] 另外的类似物

[0261] 本发明中使用的多肽和结合物可以包括本领域中已知的抑肽酶多肽类似物。例如,美国专利 5,807,980 描述了牛胰蛋白酶抑制剂(抑肽酶)-衍生的抑制剂及其制备方法和治疗用途,其包括 SEQ ID NO:102 的多肽。这些多肽已用于治疗以组织因子和/或因子 VIIIa 的异常表现或量为特征的病况,例如异常血栓形成。美国专利 5,780,265 描述了能够抑制血浆激肽释放酶的丝氨酸蛋白酶抑制剂,其包括 SEQ ID NO:103。美国专利 5,118,668 描述了牛胰蛋白酶抑制剂变体,其包括 SEQ ID NO:105。抑肽酶氨基酸序列 (SEQ ID NO:98)、血管肽-1 氨基酸序列 (SEQ ID NO:67),和 SEQ ID NO:64,以及一些生物活性类似物的序列可在国际申请公开 W02004/060403 中查到。

[0262] 编码抑肽酶类似物的示例性核苷酸序列列于 SEQ ID NO:106 (atgagaccag atttctgcct cgagccgccg tacactgggc cctgcaaagc tcgtatcatccgttacttct acaatgcaaa ggcaggcctg tgcagacct tcgtatacgg cggctgcagagctaagcgta acaacttcaa atccgcggaa gactgcatgc gtacttgcgg tgggtgcttag;Genbank 登录号 X04666)。这个序列在位置 16 处编码了赖氨酸,而不是缬氨酸,如 SEQ ID NO:98 中发现的。SEQ ID NO:106 核苷酸序列中的突变可通过本领域中的已知方法引入,从而改变位置 16 处具有缬氨酸的 SEQ ID NO:98 的多肽产生。其它突变或片段可利用本领域中已知的任何技术获得。

[0263] 利用国际申请 PCT/CA2004/000011 中公开的合成抑肽酶序列(或其部分),通过蛋白质 BLAST (Genbank :www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/),可发现抑肽酶类似物的其它实例。根据登录号 CAA37967 (GI:58005) 和 1405218C (GI:3604747),可查到示例性抑肽酶类似物。

[0264] 多肽衍生物和模拟肽的制备

[0265] 除了仅由天然存在的氨基酸组成的多肽之外,本发明还可使用模拟肽或多肽类似物。多肽类似物通常作为性能类似于模板多肽 (template polypeptide) 的非多肽药物而用于制药业。非多肽化合物称为“多肽模拟物”或“模拟肽”(Fauchere 等人, Infect. Immun. 54:283-287, 1986; Evans 等人, J. Med. Chem. 30:1229-1239, 1987)。结构上与治疗

有用多肽相关的多肽模拟物可以用来产生等效或增强的治疗或预防作用。一般地,模拟肽在结构上类似于范例多肽(paradigm polypeptide)(即,具有生物或药物活性的多肽),例如天然存在的受体结合多肽,但具有一个或多个肽键(peptidelinkage),通过本领域已熟知的方法(Spatola, Peptide Backbone Modifications, Vega Data, 1(3):267, 1983); Spatola 等人, (Life Sci. 38:1243-1249, 1986); Hudson 等人, (Int. J. Pept. Res. 14:177-185, 1979); 和 Weinstein. B., 1983, Chemistry and Biochemistry, of AminoAcids, Peptides and Proteins, Weinstein eds, Marcel Dekker, New-York), 该肽键可选地被诸如 $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ (顺式和反式)、 $-\text{CH}_2\text{SO}-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 、 $-\text{COCH}_2-$ 等连键替换。此种多肽模拟物相对于天然存在的多肽可以具有显著优势,包括生产较经济、化学稳定性强、药理特性(例如,半衰期、吸收、效力、有效性)增强、抗原性降低及其它方面。

[0266] 虽然本发明使用的多肽可有效进入特定细胞类型(例如,本文描述的这些),但其效用可能由于蛋白酶的存在而降低。血清蛋白酶具有特殊的底物要求。底物必须具有用于剪切的 L-氨基酸和肽键。此外,代表血清中蛋白酶活性的最突出组分的外肽酶,通常作用于多肽的第一个肽键且需要游离的 N-末端(Powell 等人, Pharm. Res. 10:1268-1273, 1993)。鉴于此,使用多肽的修饰形式经常是有利的。修饰的多肽保持了赋予关于 IGF-1 的生物活性的原始 L-氨基酸多肽的结构特性,但有利地不易于被蛋白酶和/或外肽酶剪切。

[0267] 用相同类型的 D-氨基酸对共有序列中一个或多个氨基酸进行的系统性置换(Systematic substitution)(例如, D-赖氨酸代替 L-赖氨酸)可用来产生更加稳定的多肽。因此,本发明中使用的多肽衍生物或模拟肽可以都是 L-型,都是 D-型,或混合的 D、L 型多肽。N-末端或 C-末端 D-氨基酸的存在可增加多肽的体内稳定性,这是因为肽酶不能利用 D-氨基酸作为底物(Powell 等人, Pharm. Res. 10:1268-1273, 1993)。反向-D多肽是含有 D-氨基酸的多肽,以相对于含有 L-氨基酸的多肽的反向序列排列。因而, L-氨基酸多肽的 C-末端残基变成 D-氨基酸多肽的 N-末端,等等。反向 D-多肽保持了与 L-氨基酸多肽相同的三级构象,且因此保持了与它相同的活性,但对于体内和体外的酶促降解更稳定,因而具有比原始多肽更强的治疗效力(Brady and Dodson, Nature 368:692-693, 1994; Jameson 等人, Nature 368:744-746, 1994)。除了反向-D多肽之外,包含共有序列或基本相同的共有序列变化的限制多肽(constrained polypeptide)可通过本领域中熟知的方法生成(Rizo and Gierasch, Ann. Rev. Biochem. 61:387-418, 1992)。例如,限制多肽可以通过添加能够形成二硫桥键并由此得到环状多肽的半胱氨酸残基产生。环状多肽没有游离的 N-或 C-端(termini)。因此,它们不易于被外肽酶蛋白水解,尽管其的确易感于内肽酶,但内肽酶不在多肽末端进行剪切。带有 N-末端或 C-末端 D-氨基酸的多肽和环状多肽的氨基酸序列通常分别与它们对应的多肽序列相同,除了存在 N-末端或 C-末端的 D-氨基酸残基,或它们的环状结构。

[0268] 含有分子内二硫键的环状衍生物可以通过常规固相合成制备,同时在选择用于环化的位置,例如氨基和羧基端并入合适的 S-保护的半胱氨酸或高半胱氨酸残基(Sah 等人, J. Pharm. Pharmacol. 48:197, 1996)。完成链组装后,如下进行环化:(1)通过选择性除去 S-保护基团,随之发生相应的两个游离 SH-官能团的担载氧化(on-support oxidation),从而形成 S-S 键,接着按常规从载体中去除产物并进行合适的纯化程序;或者(2)通过从载体中去除多肽并完成侧链脱保护,接着在高度稀释的水溶液中氧化游离 SH-官能团。

[0269] 含有分子内酰胺键的环状衍生物可以通过常规固相合成制备,同时在选择用于环化的位置并入合适的氨基和羧基侧链被保护的氨基酸衍生物。含有分子内-S-烷基键的环状衍生物可以通过常规固相化学制备,同时在选择用于环化的位置并入具有合适的氨基-被保护的侧链的氨基酸残基和合适的 S-被保护的半胱氨酸或高半胱氨酸残基。

[0270] 另一种赋予对作用于多肽 N-末端或 C-末端残基的肽酶的抗性(resistance)的有效方法是在多肽端添加化学基团,以便修饰的多肽不再是肽酶的底物。一种这样的化学修饰是在任一端或两端对多肽进行糖基化。某些化学修饰,特别是 N-末端糖基化,已被证实可提高多肽在血清中的稳定性(Powell 等人, Pharm. Res. 10:1268-1273, 1993)。其它增强血清稳定性的化学修饰包括,但不局限于,添加由 1~20 个碳原子的低级烷基组成的 N-末端烷基基团,例如乙酰基,和/或添加 C-末端酰胺或取代的酰胺基。特别地,本发明的组合物和方法可以包括由带有 N-末端乙酰基和/或 C-末端酰胺基的多肽组成的修饰多肽。

[0271] 本发明也包括其它类型的多肽衍生物,其含有并非多肽常见部分的另外的化学部分,条件是该衍生物可保持多肽的期望功能活性(functional activity)。此种衍生物的实例包括(1)氨基末端或另一个游离氨基的 N-酰基衍生物,其中该酰基可以是烷酰基(例如,乙酰基、己酰基、辛酰基),芳酰基(例如,苯甲酰基)或封端基团(保护基团,blocking group),例如 F-moc(苄甲基-O-CO-);(2)羧基末端或另一个游离羧基或羟基的酯;(3)羧基末端或另一个通过与氨或与合适的胺反应制得的游离羧基的酰胺;(4)磷酸化衍生物;(5)结合到抗体或其它生物配体上的衍生物以及其它类型的衍生物。

[0272] 还包括本发明中使用的通过多肽中加入另外的氨基酸残基形成的较长多肽序列。预期此种较长多肽序列具有与上述多肽相同的生物活性(例如,进入特定细胞类型)。虽然不排除具有大量另外氨基酸的多肽,但已认识到一些大的多肽可呈现遮盖有效序列的构象,从而阻止结合到靶上(例如,LRP 受体家族的成员,如 LRP 或 LRP2)。这些衍生物可充当竞争性拮抗剂。因而,虽然本发明包括具有延伸部分(extension)的本文描述的多肽或多肽衍生物,但期望该延伸部分不会破坏多肽或其衍生物的细胞靶向活性。

[0273] 可用在本发明中的其它衍生物是由本文描述的两个相同,或两个不同的多肽组成的双重多肽(dual polypeptides),其中这两个多肽彼此直接或通过间隔物(间隔子,spacer)共价连接,例如通过丙氨酸残基的短链(short stretch)或通过蛋白质水解的推定位点(例如,通过组织蛋白酶,见美国专利 5,126,249 和欧洲专利 495049)。用在本发明中的多肽多聚体由相同或不同多肽或其衍生物形成的分子聚合物组成。

[0274] 本发明也包括多肽衍生物,其为含有本文描述的多肽的嵌合或融合蛋白或其片段,在其氨基或羧基末端,或两末端处均连接到不同蛋白的氨基酸序列。此种嵌合或融合蛋白可以通过编码该蛋白的核酸重组表达而生成。例如,嵌合或融合蛋白可以含有用在本发明中的多肽的至少 6 个氨基酸,并期望地具有与用在本发明中的多肽相当或较高的功能活性。

[0275] 用在本发明中的多肽衍生物可以通过借助置换、添加或缺失改变氨基酸序列或通过改变氨基酸残基制得,从而根据需要提供功能等价的分子,或功能增强或减弱的分子。用在本发明中的衍生物包括,但不局限于,含有本文描述的多肽的全部或部分氨基酸序列(SEQ ID NO:1-105 和 107-116)作为一级氨基酸序列的那些多肽衍生物,包括含有功能等

价的氨基酸残基置换的改变序列。例如,该序列中的一个或多个氨基酸残基可用另一种充当功能等价物的极性相似的氨基酸置换,引起沉默改变。该序列中的氨基酸置换可选自该氨基酸所属类别中的其它成员。例如,带正电荷的(碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。非极性(疏水性)氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、脯氨酸、色氨酸和蛋氨酸。不带电荷的极性氨基酸包括丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。带负电荷的(酸性)氨基酸包括谷氨酸和天冬氨酸。氨基酸甘氨酸可包括在非极性氨基酸家族或不带电荷的(中性)极性氨基酸家族中。在氨基酸家族中作出的置换通常应理解为保守性置换。

[0276] 用于鉴定模拟肽的试验

[0277] 如上所述,产生从而复制该方法所鉴定多肽的骨架结构和药效团表现的非肽基化合物(模拟肽),可以具有更高代谢稳定性、更高效力、更长作用持久性和更佳生物利用率的性质。

[0278] 用在本发明中的模拟肽化合物可以利用本领域中已知组合文库方法中大量途径中的任一种获得,包括:生物学文库、可空间寻址并行的(spatially addressable parallel)固相或液相文库、需要解卷积(deconvolution)的合成文库、“一珠一化合物”(one-bead-one-compound)文库方法,以及利用亲和层析选择的合成文库方法。生物学文库途径局限于多肽文库,而其它四个途径可适用于多肽、非肽低聚体或化合物的小分子文库(Lam, Anticancer Drug Des. 12:145,1997)。合成分子文库的方法实例可在本领域中查到,例如,在:DeWitt 等人,(Proc. Natl Acad. Sci. USA 90:6909,1993);Erb 等人,(Proc. Natl Acad. Sci. USA 91:11422,1994);Zuckermann 等人,(J. Med. Chem. 37:2678,1994);Cho 等人,(Science 261:1303,1993);Carell 等人,(Angew. Chem, Int. Ed. Engl. 33:2059,1994 and ibid 2061);以及在 Gallop 等人,(Med. Chem. 37:1233,1994)中。化合物文库可存在于溶液中(例如,Houghten, Biotechniques 13:412-421,1992)或珠体(Lam, Nature 354:82-84,1991)、芯片(Fodor, Nature 364:555-556,1993)、细菌或孢子(美国专利 No. 5,223,409)、质粒上(Cull 等人,Proc. Natl Acad. Sci. USA 89:1865-1869,1992)或在噬菌体(Scott and Smith, Science 249:386-390,1990),或萤光素酶,以及通过确定底物向产物的适当转化而检测的酶标签上。

[0279] 一旦可用在本发明中的多肽被鉴定,它可通过许多标准方法分离和纯化,这些方法包括,但不局限于,差别溶解度法(例如,沉淀)、离心法、色谱法(例如,亲和、离子交换、尺寸排阻等),或可通过用于纯化多肽、模拟肽或蛋白质的任何其它标准技术。已鉴定的感兴趣多肽的功能特性可以利用本领域中已知的任何功能性试验进行评估。期望地,使用用于评估胞内信号中下游受体功能(例如,细胞增殖)的试验。

[0280] 例如,用在本发明中的模拟肽化合物可使用下面三阶段工艺获得:(1)扫描用在本发明中的多肽,从而鉴定靶向本文所述特定细胞类型所需要的二级结构区域;(2)使用构象受限二肽替代物(surrogate)精修(refine)骨架结构并提供对应于这些替代物的有机平台(organic platform);和(3)利用最佳有机平台显示设计用于模拟天然多肽期望活性的候选物文库中的有机药效团。这三阶段更详细说明如下。在第1阶段中,扫描主导(主要,lead)候选多肽并简化其结构从而鉴定针对其活性的要求。合成一系列原始多肽的多肽类似物。在第2阶段中,利用构象受限双肽替代物考察最佳的多肽类似物。吡啶里西

啉-2-酮(indolizidin-2-one)、喹啉里西啉-9-酮和喹诺里西啉酮(quinolizidinone)氨基酸(分别为 I²aa、I⁹aa 和 Qaa)可作用于研究最佳多肽候选物骨架结构的平台。这些平台和相关平台(综述在 Halab 等人 Biopolymers 55:101-122, 2000, 和 Hanessian 等人 Tetrahedron 53:12789-12854, 1997 中)可以在多肽的特定区域引入,从而使药效团在不同方向取向。这些类似物的生物学评价可以鉴定改进的主导多肽(lead polypeptides),其模拟针对活性的结构要求。在第 3 阶段,来自最有活性的主导多肽的平台可用来显示负责天然多肽活性的药效团的有机替代物。药效团和支架可以合并为并行的合成模式。多肽和以上阶段的衍化也可以利用本领域中已知方法通过其它方式完成。

[0281] 从用在本发明中的多肽、多肽衍生物、模拟肽或其它小分子确定的结构功能关系可以用来精修和制备具有相似或更佳活性的类似分子结构。因此,用在本发明中的化合物还包括与本文所述多肽具有共同结构、极性、电荷特性和侧链特性的分子。

[0282] 总之,基于本文的公开内容,本领域技术人员可以开发对于鉴定将药剂靶向特定细胞类型(例如,本文描述的那些)的化合物有用的多肽或模拟肽筛选试验。该试验可开发用于低通量、高通量或超高通量的筛选模式。本发明试验包括适于自动化的试验。

[0283] 结合物

[0284] 本文描述的多肽或其衍生物可以连接到药剂上。例如,多肽(例如本文描述的任何一种)可以附接到治疗剂、诊断剂或标签。在某些实施方式中,该多肽连接到可检测标签或用可检测标签进行标记,如放射成像剂,以便诊断疾病或病况。这些药剂的实例包括放射成像剂-抗体-载体结合物,其中抗体结合到疾病或病况-特异性抗原(例如,用于诊断或治疗)。本发明也考虑了其它结合分子。在其它情况下,多肽或衍生物连接到治疗剂,从而治疗疾病或病况,或者可以连接到其混合物或者用其混合物标记。可以在允许药剂运送穿过 BBB 或运送到特定细胞类型中的条件下,通过向个体给予载体-药剂结合物治疗该疾病或病况。每种多肽可以包括至少 1、2、3、4、5、6 或 7 种药剂。在其它实施方式中,每种药剂具有至少 1、2、3、4、5、6、7、10、15、20 或更多种附接到其上的多肽。本发明的结合物可以促进该药剂在受试者的特定细胞类型或组织如肝、肺、肾、脾或肌肉中的蓄积(例如,由于吸收增加或外排减少引起的)。

[0285] 在运送到特定细胞类型中或穿过 BBB 之后,药剂可以从载体释放。药剂例如可以通过载体和药剂之间化学键的酶促裂解或其它破坏而释放。然后,在不存在载体的情况下释放的药剂可以其预期能力起作用。

[0286] 治疗剂。治疗剂可以是任何生物活性剂。例如,治疗剂可以是治疗疾病(例如用于杀死癌细胞)的药物、药品、发射辐射的药剂、细胞毒素(例如化疗剂)、其生物学活性片段或其混合物,或者它可以是用于治疗个体疾病或病况的药剂。治疗剂可以是合成产物或真菌、细菌或其它微生物(例如支原体或病毒)、动物如爬行动物或者植物来源的产物。治疗剂和/或其生物活性片段可以是酶促活性药剂和/或其片段,或者可以通过抑制或阻断重要和/或必要的细胞途径或者通过与重要和/或必要的天然细胞组分竞争而起作用。其它治疗剂包括抗体和抗体片段。

[0287] 抗癌剂。本领域中已知的任何抗癌剂都可以是本发明使用的结合物的一部分。在某些实施方式中,该药剂是紫杉醇或紫杉醇类似物(例如,本文描述的那些)。脑癌可以利用含有可被有效运送穿过 BBB 的载体(血管肽-1、血管肽-2、血管肽-3、血

管肽-4a、血管肽-4b、血管肽-5或血管肽-6)的结合物进行治疗。肝癌、肺癌、肾癌或脾癌可以利用结合到可被有效运送到适当细胞类型中的载体(例如血管肽-7)上的抗癌剂治疗。示例性药剂包括阿巴瑞克(abarelix)、阿地白介素(aldesleukin)、阿仑单抗(alemtuzumab)、阿利维A酸(alitretinoin)、别嘌呤醇(allopurinol)、六甲密胺(altretamine)、氨磷汀(amifostine)、阿那白滞素(anakinra)、阿那曲唑(anastrozole)、三氧化二砷、天冬酰胺酶、阿扎胞苷(azacitidine)、BCG活疫苗(BCG Live)、北伐单抗(bevacuzimab)、贝沙罗汀(bexarotene)、博来霉素(bleomycin)、博来霉素、硼替佐米(bortezomibi)、硼替佐米(bortezomib)、白消安(busulfan)、白消安、卡普睾酮(calusterone)、卡培他滨(capecitabine)、卡铂、卡莫司汀(carmustine)、塞来考昔(celecoxib)、西妥昔单抗(cetuximab)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、顺铂、克拉屈滨(cladribine)、氯法拉滨(clofarabine)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、阿糖胞苷(cytarabine)、达卡巴嗪(dacarbazine)、更生霉素(dactinomycin)、放线菌素D(actinomycinD)、达肝素(dalteparin)(例如钠)、达依泊汀 α (darbepoetin alfa)、达沙替尼(dasatinib)、柔红霉素(daunorubicin)、道诺霉素(daunomycin)、地西他滨(decitabine)、地尼白介素(denileukin)、地尼白介素2(denileukin diftitox)、右雷佐生(dexrazoxane)、紫杉萜(docetaxel)、多柔比星(doxorubicin)、丙酸甲雄烷酮(dromostanolone propionate)、艾库组单抗(eculizumab)、表柔比星(epirubicin)(例如, HCl)、阿法依伯汀(Epoetin alfa)、埃罗替尼(erlotinib)、雌氮芥(estramustine)、依托泊苷(etoposide)(例如磷酸盐)、依西美坦(exemestane)、芬太尼(fentanyl)(例如柠檬酸盐)、非格司亭(filgrastim)、氟尿苷(floxuridine)、氟达拉滨(fludarabine)、氟尿嘧啶(flurouracil)、5-FU、氟维司群(fulvestrant)、吉非替尼(gefitinib)、吉西他滨(gemcitabine)(例如, HCl)、吉姆单抗(gemtuzumab)奥佐米星(ozogamicin)、戈舍瑞林(goserelin)(例如乙酸盐)、组氨瑞林(histrelin)(例如乙酸盐)、羟基脲(hydroxyurea)、替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan)、伊比达星(idarubicin)、异环磷酰胺(ifosfamide)、伊马替尼(imatinib)(例如去铁胺(mesylate))、干扰素 α -2b(Interferon alfa-2b)、伊立替康(irinotecan)、二甲苯磺酸拉帕替尼(lapatinib ditosylate)、来那度胺(lenalidomide)、来曲唑(letrozole)、甲酰四氢叶酸(leucovorin)、亮丙瑞林(leuprolide)(例如乙酸盐)、左旋咪唑(levamisole)、洛莫司汀(lomustine)、CCNU、meclorothamine(氮芥)、甲地孕酮(megestrol)、美法仑(melphalan)(L-PAM)、巯嘌呤(mercaptopurine)(6-MP)、美司钠(mesna)、甲氨喋呤(methotrexate)、甲氧沙林(methoxsalen)、丝裂霉素C(mitomycinC)、米托坦(mitotane)、米托蒽醌(mitoxantrone)、苯丙酸诺龙(nandrolone phenpropionate)、奈拉滨(nelarabine)、诺非单抗(nofetumomab)、奥普瑞白介素(oprelvekin)、奥沙利铂(oxaliplatin)、紫杉醇(paclitaxel)、帕利夫明(palifermin)、帕玛二磷酸(pamidronate)、帕尼单抗、培加酶(pegademase)、培门冬酶(pegaspargase)、聚乙二醇化非格司亭(pegfilgrastim)、培干扰素 α -2b(peginterferon alfa-2b)、培美曲塞(pemetrexed)(例如二钠)、喷司他丁(pentostatin)、哌泊溴烷(pipobroman)、普卡霉素(plicamycin)(光辉霉素(mithramycin))、卜菲尔钠(porfimer)(例如钠)、丙卡巴肼(procarbazine)、奎纳克林(quinacrine)、拉布立酶(rasburicase)、利妥昔单抗(rituximab)、沙格

司亭 (sargramostim)、索拉菲尼 (sorafenib)、链脲菌素 (streptozocin)、舒尼替尼 (sunitinib) (例如, 马来酸盐)、滑石、他莫西芬 (tamoxifen)、替莫唑胺 (temozolomide)、替尼泊苷 (teniposide) (VM-26)、睾内酯 (testolactone)、沙立度胺 (thalidomide)、硫鸟嘌呤 (thioguanine) (6-TG)、噻替派 (thiotepa)、塞替派、塞替派、托泊替康 (topotecan) (例如, HCl)、托瑞米芬 (toremifene)、托西莫单抗 /I-131 (Tositumomab)、曲妥珠单抗 (trastuzumab)、曲妥珠单抗、维 A 酸 (ATRA)、尿嘧啶氮芥 (uracil mustard)、戊柔比星 (valrubicin)、长春碱 (vinblastine)、长春新碱 (vincristine)、长春瑞滨 (vinorelbine)、伏林司他 (vorinostat)、唑来膦酸盐 (zoledronate) 和唑来膦酸 (zoledronic acid)。

[0288] 可检测标签。为了检测或诊断的目的, 可以对用在本发明中的结合物进行标记。可检测标签或标记物可以是放射性标签、荧光标签、核磁共振活性标签、发光标签、生色团标签 (chromophore label)、用于 PET 扫描仪的正电子发射同位素 (positron emitting isotope)、化学发光标签、或酶标签。发射辐射的示例性放射成像剂 (可检测放射标签) 包括钼 -111、锝 -99 或低剂量碘 -131。γ 和 β 发射放射性核素包括 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{90}Y 、 ^{111}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 和 ^{201}Tl 。正电子发射放射性核素包括 ^{18}F 、 ^{55}Co 、 ^{60}Cu 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{66}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{82}Rb 和 ^{86}Y 。荧光标签包括 Cy5.5、Alexa 488、绿色荧光蛋白 (GFP)、荧光素和罗丹明。化学发光标签包括萤光素酶和 β-半乳糖苷酶。酶标签包括过氧化氢酶和磷酸酶。组氨酸标签也可以是可检测标签。例如, 结合物可以包括载体部分和抗体部分 (抗体或抗体片段), 其可以进一步包括标签。在这种情况下, 标签可以附接到载体或抗体。

[0289] 抗体。抗体也可以是用在本发明中的结合物中的一部分。该结合也可以通过本领域中已知的任何方式实现 (例如, 使用本文描述的结合策略)。任何诊断或治疗性抗体都可以结合到本发明载体中的一个或多个 (例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多)。另外, 抗体片段 (例如, 能够结合到抗原) 也可以结合到本发明载体。抗体片段包括抗体 (例如, 本文中描述的任何抗体) 的 Fab 和 Fc 区、重链和轻链。用于诊断和治疗癌症的示例性抗体包括 ABX-EGF (Panitumumab)、OvaRex (Ore govemab)、Theragyn (PEM 单抗 钇 (pemtumomabytrrium)-90)、Therex、比伐单抗 (Bivatuzumab)、Panorex (依决洛单抗 (Edrecolomab))、ReoPro (阿昔单抗 (Abciximab))、Bexxar (托西莫单抗 (Tositumomab))、Mab、独特型 105AD7、抗 -EpCAM (卡妥索单抗 (Catumaxomab))、Mab 肺癌 (来自 Cytoclonal)、赫赛汀 (Hereptin) (曲妥珠单抗 (Trastuzumab))、Rituxan (利妥昔单抗 (Rituximab))、阿瓦斯丁 (Avastin) (贝伐珠单抗 (Bevacizumab))、AMD Fab (兰尼单抗 (Ranibizumab))、E-26 (2nd gen. IgE) (奥马珠单抗 (Omalizumab))、泽娃灵 (Zevalin) (Rituxan+ 钇 -90) (替依莫单抗 (Ibritumomabtiuxetan))、西妥昔单抗 (Cetuximab)、BEC2 (米妥莫单抗 (Mitumomab))、IMC-1C11、nuC242-DM1、Lymphocide (依帕珠单抗 (Epratuzumab))、Lymphocide Y-90、CEA-Cide (拉贝珠单抗 (Labetuzumab))、CEA-CideY-90、CEA-Scan (Tc-99m- 标记的阿西莫单抗 (arcitumomab))、LeukoScan (Tc-99m- 标记的硫索单抗 (sulesomab))、LymphoScan (Tc-99m- 标记的贝妥莫单抗 (bectumomab))、AFP-Scan (Tc-99m- 标记的)、HumaRAD-HN (+ 钇 -90)、HumaSPECT (伏妥莫单抗 (Votumumab))、MDX-101 (CTLA-4)、MDX-210 (her-2 过表达)、MDX-210/MAK、Vitaxin、Mab425、IS-IL-2、Campath (阿伦珠单抗 (alemtuzumab))、CD20 抗生蛋白链菌素、Avidicin、

(白蛋白 +NRLU13)、Oncolym(+ 碘 -131)Cotara(+ 碘 -131)、C215(+ 金黄色葡萄球菌肠毒素, Mab 肺 / 肾癌 (来自 Pharmacia 公司)、他那可单抗他那托 (nacolomabtafenatox) (C242 金黄色葡萄球菌肠毒素)、Nuvion(维西珠单抗 (Visilizumab))、SMART M195、SMART 1D10、CEAVac、TriGem、TriAb、放射标记的 NovoMAb-G2、Monopharm C、GliomaB-H(+ 白树因毒素 (gelonin toxin))、Rituxan(利妥昔单抗 (Rituximab)), 和 ING-1。另外的治疗性抗体包括 5G1.1(艾库组单抗 (Ecluzumab))、5G1.1-SC(培克珠单抗 (Pexelizumab))、ABX-CBL(戈利木单抗 (Gavilimomab))、ABX-IL8、Antegren(那他珠单抗 (Natalizumab))、抗 -CD11a(依法珠单抗 (Efalizumab))、抗 -CD18(来自 Genetech)、抗 -LFA1、Antova、BTI-322、CDP571、CDP850、Corsevin M、D2E7(阿达木单抗 (Adalimumab))、Humira(阿达木单抗)、Hu23F2G(罗维珠单抗 (Rovelizumab))、IC14、IDEC-114、IDEC-131、IDEC-151、IDEC-152、英利昔单抗 (Infliximab) (Remicade)、LDP-01、LDP-02、MAK-195F(阿非莫单抗 (Afelimomab))、MDX-33、MDX-CD4、MEDI-507(西利珠单抗 (Siplizumab))、OKT4A、OKT3(莫罗莫那 (Muromonab)-CD3) 和 ReoPro(阿昔单抗 (Abciximab))。

[0290] 结合连接物

[0291] 结合物 (例如, 多肽 - 药剂结合物) 可以利用本领域中已知的任何交联 (结合) 试剂或方案获得, 其中许多是市售的。此种方案和试剂包括与氨基、羧基、巯基、羰基、碳水化合物和 / 或酚基发生反应的交联剂。此种方案的量、次数和条件可以变化从而优化结合。交联剂含有至少两个反应性基团并且通常分成同型官能交联剂 (含有相同的反应性基团) 和异型官能交联剂 (含有不相同的反应性基团)。本发明交联剂可以是同型二官能和 / 或异型二官能的。此外, 交联剂可以在反应部分之间并入 “间隔物 (spacer)”, 或交联剂中的两个反应部分可以直接连接。键可以包括酯键。

[0292] 示例性连接物包括 BS³[二 (硫代琥珀酰亚胺基) 辛二酸酯)、NHS/EDC(N- 羟基琥珀酰亚胺和 N- 乙基 - (二甲基氨基丙基) 碳二亚胺)、硫代 -EMCS([N-e- 马来酰亚胺基己酸] 酰肼)、SATA(N- 琥珀酰亚胺基 -S- 乙酰基硫代乙酸酯) 以及酰肼。BS³ 是同型二官能 N- 羟基琥珀酰亚胺酯, 其靶向可接近的伯胺。NHS/EDC 允许伯胺基团与羧基基团结合。硫代 -EMCS 是异型二官能反应性基团 (马来酰亚胺和 NHS- 酯), 其对于巯基和氨基是反应性的。利用硫代 -NHS/EDC 活化的胺连接 (偶接, coupling) 可以用来交联治疗性抗体与本发明多肽。这是快速、简单且可重复的连接技术。所得结合物稳定且保持抗体的生物学活性。而且, 它在连接程序中具有可靠控制的高结合能力以及低非特异性相互作用。SATA 对胺有反应性, 并加入受保护的巯基基团。NHS- 酯与伯胺反应从而形成稳定的酰胺键。巯基基团可以利用羟基胺去保护。酰肼可以用来将羧基连接到伯胺, 因此可以用于连接糖蛋白。

[0293] 小分子如治疗剂可以结合到多肽 (如, 本文描述的那些)。示例性小分子, 紫杉醇, 具有对于结合有用的两个重要位置 (位置 C2' 和 C7)。载体或本发明载体与紫杉醇的结合可以如下进行。简而言之, 紫杉醇与酸酐琥珀酸吡啶在室温下反应 3 小时从而在位置 2' 附接琥珀酰基。2' - 琥珀酰基紫杉醇在位置 2' 具有可剪切的酯键, 可以简单地释放琥珀酸。如果需要, 这种可剪切的酯键可以利用连接物进一步用于各种修饰。所得的 2' -O- 琥珀酰基 - 紫杉醇然后与 DMSO 中的 EDC/NHS 在室温下反应 9 小时, 接着在室温下加入该载体或林格氏液 /DMSO 中的载体, 再反应 4 小时。结合反应可通过 HPLC 监控。每个中间体如紫杉醇、2' -O- 琥珀酰基 - 紫杉醇和 2' -O-NHS- 琥珀酰基 - 紫杉醇可利用不同方法进行纯化

和证实,例如 HPLC、薄层液相色谱、NMR (^{13}C 或 ^1H 交换)、熔点、质谱。最终结合物可通过质谱和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。这使在每个载体上结合的紫杉醇分子的数量得以确定。

[0294] 药物组合物

[0295] 由于疏水性药剂在水溶液中经常表现出有限的溶解性,所以本发明药物组合物可以包括增溶剂。ANG1005 的示例制剂包括 DMSO 和 Solutol HS 15,但替代这些药剂或除这些药剂之外的其它增溶剂可用于本发明组合物。该组合物可进一步包括缓冲剂、张度剂,和冻干剂(例如,膨胀剂或冷冻保护剂)。

[0296] 增溶剂

[0297] 本发明组合物和方法可包括本领域中已知的任何增溶剂。此种药剂可构成该组合物质量的至少 1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%,或 70%。示例性增溶剂包括水溶性有机溶剂(例如,聚乙二醇 300、聚乙二醇 400、乙醇、丙二醇、甘油、N-甲基-2-吡咯烷酮、二甲基乙酰胺,和二甲基亚砷)、非离子表面活性剂(例如,Cremophor EL、Cremophor RH 40、Cremophor RH 60、D- α -生育酚聚乙二醇 1000 琥珀酸酯、聚山梨酯 20、聚山梨酯 80、Solutol HS 15(聚乙二醇 15-羟基硬脂酸酯)、山梨醇酐单油酸酯、泊洛沙姆(poloxamer) 407、Labrafil M-1944CS、Labrafil M-2125CS、Labrasol、Gellucire 44/14、Softigen 767,以及 PEG 300、400 或 1750 的单和双脂肪酸酯)、水溶性脂质(例如,蓖麻油、玉米油、棉籽油、橄榄油、花生油、薄荷油、红花油、芝麻油、大豆油、氢化植物油、氢化大豆油,以及椰子油和棕榈仁油的中链甘油三酯)、有机液体/半固体(蜂蜡、d- α -生育酚、油酸、中链甘油单酯和甘油二酯)、环糊精(例如, α -环糊精、 β -环糊精、羟丙基- β -环糊精,和磺丁基醚- β -环糊精),以及磷脂(例如,氢化大豆磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰甘油、1- α -二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、1- α -二肉豆蔻酰磷脂酰甘油)。

[0298] 缓冲剂

[0299] 本发明的组合物和方法也可包括一种或多种缓冲剂。根据疏水性药剂,维持药物组合物的 pH 或张度(例如,从而将活性剂的降解减到最低,或从而使该药剂在用于治疗时安全性或效力达到最高)是理想的。缓冲到任何特定 pH 或 pH 范围(例如,到 pH 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0,这些值之间的任何范围)可利用适当的缓冲液实现。该缓冲液可以为实现期望缓冲效果所需的任何浓度(例如,1mM、10mM、20mM、50mM、100mM、200mM、500mM、1.0M、1.5M,或这些值中的任何范围)。示例性缓冲剂包括柠檬酸/g 酸盐、乙酸盐、巴比妥(barbital)、硼酸盐、勃-罗二氏缓冲液(Britton-Robinson)、二甲胂酸盐、柠檬酸盐、可力丁(collidine)、甲酸盐、马来酸盐(maleat)、McIlvaine、磷酸盐、Prideaux-Ward、琥珀酸盐、柠檬酸盐-磷酸盐-硼酸盐(Teorell-Stanhagen)、佛罗那(veronal)乙酸盐、MES(2-(N-吗啉基)乙磺酸)、BIS-TRIS(双(2-羟乙基)亚氨基三(羟甲基)甲烷)、ADA(N-(2-乙酰氨基)-2-亚氨基二乙酸)、ACES(N-(氨基甲酰甲基)-2-氨基乙磺酸)、PIPES(哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸))、MOPSO(3-(N-吗啉基)-2-羟基丙磺酸)、BIS-TRIS PROPANE(1,3-双(三(羟基-甲基)甲氨基)丙烷)、BES(N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基-乙磺酸)、MOPS(3-(N-吗啉基)丙磺酸)、TES(N-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙磺酸)、HEPES(N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)、DIPSO(3-(N,N-双(2-羟乙基)氨基)-2-羟基丙磺酸)、MOBS(4-(N-吗啉基)丁磺酸)、TAPSO(3-(N-三(羟甲基)甲基-氨基)-2-羟

基丙磺酸)、TRIZMA(三(羟甲基-氨基甲烷)、HEPPSO(N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-羟基-丙磺酸)、POPSO(哌嗪-N,N'-双(2-羟基丙烷磺酸))、TEA(三乙醇胺)、EPPS(N-(2-羟乙基)-哌嗪-N'-(3-丙磺酸)、TRICINE(N-三(羟基-甲基)甲基甘氨酸)、GLY-GLY(双甘氨酸)、BICINE(N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸)、HEPBS(N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(4-丁磺酸))、TAPS(N-三(羟甲基)甲基-3-氨基-丙磺酸)、AMPD(2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇),和/或本领域中已知的任何其它缓冲液。

[0300] 除了缓冲剂之外,或代替缓冲剂,可使用本领域中已知的任何药物可接受的盐来维持张度。示例性盐包括乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾,以及氯化钙。此种盐,要么单独的(along)要么结合缓冲剂,其存在的量应足够维持期望的张度(例如,1mM、10mM、20mM、50mM、100mM、200mM、500mM、1.0M、1.5M,或这些值之间的任何范围)。

[0301] 其它赋形剂

[0302] 在某些实施方式中,本发明组合物和方法包括其它赋形剂(例如膨胀剂或冷冻保护剂)。膨胀剂是特别理想的,其中该药物组合物是以脱水(例如,冻干)形式提供的。冻干组合物可含有按重量计少于10%(例如,少于8%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%)的水或其它溶剂。因为通过肠胃外途径给予的脱水组合物在向患者给予之前典型地溶解在水溶液中,所以脱水工艺以允许再溶解(resolubilization)的方式进行是很重要的。添加膨胀剂从而确保可以更容易地再溶解该冻干产品。此种药剂在本领域中是已知的,并包括聚乙二醇、聚乙烯醇、聚乙烯基吡咯烷酮、葡聚糖(dextran);糖,如葡萄糖、甘露醇、蔗糖、乳糖、海藻糖,和山梨醇;氨基酸,例如甘氨酸、精氨酸、天冬氨酸;和可溶性蛋白,例如胶原蛋白、明胶或血清白蛋白。

[0303] 该组合物可进一步包含防腐剂(例如,硫柳汞(thimerosal)、苯甲醇、对羟基苯甲酸酯(parabens)),聚合物如聚乙二醇共价连接到蛋白质,与金属离子络合,或该材料掺入到诸如聚乳酸、聚乙醇酸、水凝胶等聚合化合物的颗粒制剂之中或之上,或掺入到脂质体、微乳状液、胶团、单层或多层囊泡、红细胞影,或球形体(spheroplast)之上。此种组合物将影响物理状态、溶解性、稳定性、体内释放速率,和体内清除速率。受控释放或持续释放的组合物包括亲脂性贮库(lipophilic depots)(例如,脂肪酸、蜡、油)形式的制剂。本发明也考虑了用聚合物(例如,泊洛沙姆(poloxamer)或泊洛沙胺(poloxamines))涂层的颗粒组合物。本发明组合物的其它实施方式并入了用于各种给予途径的颗粒形式的保护性涂层、蛋白酶抑制剂或渗透增强剂,该各种给予途径包括肠胃外、经肺、经鼻、经口、经阴道、经直肠途径。在一个实施方式中,该药物组合物经下列途径给予:肠胃外、癌周围(paracancerally)、透粘膜、透皮、肌内、静脉内、皮内、皮下、腹膜内、心室内、颅内,和肿瘤内。

[0304] 用于口服使用的固体剂型

[0305] 用于口服使用的制剂包括片剂,其含有在与非毒性的药物可接受赋形剂的混合物中的(一种或多种)活性成分,并且此种制剂已为本领域熟练技术人员所知(例如美国专利5,817,307、5,824,300、5,830,456、5,846,526、5,882,640、5,910,304、6,036,949、6,036,949、6,372,218,其通过引用并入本文)。这些赋形剂可以,例如是惰性稀释剂或填料(例如蔗糖、山梨醇、糖、甘露醇、微晶纤维素、包括马铃薯淀粉的淀粉、碳酸钙、氯化钠、乳糖、磷酸钙、硫酸钙或磷酸钠);造粒剂或崩解剂(例如,纤维素衍生物,包括微晶纤维素、包

括马铃薯淀粉的淀粉、交联羧甲基纤维素钠、藻酸钠或海藻酸)；结合剂(例如，蔗糖、葡萄糖、山梨醇、阿拉伯胶(acacia)、海藻酸、藻酸钠、明胶、淀粉、预凝胶化淀粉、微晶纤维素、硅酸铝镁、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乙基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、或聚乙二醇)；以及润滑剂、助流剂和抗粘附剂(例如，硬脂酸镁、硬脂酸锌、硬脂酸、硅酸盐、氢化植物油或滑石)。其它药物可接受赋形剂可以是着色剂、调味剂、增塑剂、保湿剂、缓冲剂等。

[0306] 该片剂可以是未涂层的或者其可以通过已知技术进行涂层，从而可选地延缓胃肠道中的崩解和吸收，由此在较长期间内提供持续作用。涂层可以适合于以预定模式释放药剂(例如为了获得受控释放的制剂)或可以适合于在通过胃之后才释放(一种或多种)药剂(肠溶衣)。该涂层可以是糖涂层(糖衣)、薄膜涂层(例如，基于羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、甲基羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羧甲基纤维、丙烯酸酯共聚物、聚乙二醇、和/或聚乙烯吡咯烷酮)，或肠溶衣(例如，基于甲基丙烯酸共聚物、醋酸纤维素酞酸酯、羟丙基甲基纤维素酞酸酯、醋酸羟丙基甲基纤维素琥珀酸酯、聚醋酸乙烯酯酞酸酯、虫胶和/或乙基纤维素)。此外，可以采用延时材料，例如甘油单硬脂酸或甘油二硬脂酸。

[0307] 该固体片剂组合物可以包括适于防止该组合物发生不希望的化学变化(例如，在活性物质释放之前发生的化学降解)的涂层。该涂层可以以与 Encyclopedia of Pharmaceutical Technology(上文)中描述的类似方式施加在固体剂型上。

[0308] 用于口服使用的制剂也可以作为可咀嚼片剂提供，或作为硬胶囊提供，其中活性成分与惰性固体稀释剂(例如，马铃薯淀粉、乳糖、微晶纤维素、碳酸钙、磷酸钙，或高岭土)混合，或者作为软胶囊提供，其中活性成分与水或油介质，例如，花生油、液体石蜡或橄榄油混合。粉末和颗粒可以使用，例如混合仪、流化床装置，或喷雾干燥装备，以传统方式，利用上述在片剂和胶囊中的成分制备。

[0309] 治疗方法

[0310] 本发明的特征还在于利用本文描述的药剂进行治疗的方法。本文描述的抗癌剂和结合物(ANG1005)可用来治疗本领域中已知的任何癌症。本发明结合物，包括本文描述的肽，能够穿过 BBB(例如，血管肽-1 至血管肽-6)，因而可用来治疗任何脑或中枢神经系统疾病(例如，脑癌如胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、胶质瘤、髓母细胞瘤，和少突神经瘤、神经胶质瘤、室管膜瘤，和脑膜瘤)。这些结合物也可以被有效地运送到肝、肺、肾、脾或肌肉(例如，血管肽-1 至血管肽-7)，因此也可以联合适当的治疗剂使用从而治疗与这些组织关联的疾病(例如，癌症，如肝细胞癌、肝癌、小细胞癌(例如，燕麦细胞癌)、混合的小细胞/大细胞癌、合并小细胞癌，以及转移性肿瘤。转移性肿瘤可以起源于任何组织的癌症，包括乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、肉瘤、膀胱癌、成神经细胞瘤、Wilm 肿瘤、淋巴瘤、非霍奇金(non-Hodgkin)淋巴瘤，和某些 T-细胞淋巴瘤)。可利用本发明组合物治疗的另外示例性癌症，包括肝细胞癌、乳腺癌、包括各种淋巴瘤，如套细胞淋巴瘤在内的头部和颈部的癌症、非霍奇金淋巴瘤、腺瘤、鳞状细胞癌、喉癌、视网膜癌、食管癌、多发性骨髓瘤、卵巢癌、子宫癌、黑素瘤、结肠直肠癌、膀胱癌、前列腺癌、肺癌(包括非小细胞肺癌)、胰腺癌、宫颈癌、头颈癌、皮肤癌、鼻咽癌、脂肪肉瘤，上皮癌、肾细胞癌、胆囊腺癌、腮腺腺癌、子宫内膜肉瘤、多药耐药性癌，以及增殖性疾病和病况，例如与肿瘤血管发生关联的新血管形成、黄斑变性(例如，湿/干 AMD)、角膜新血管形成、糖尿病性视网膜病变，新生血管性青光眼，近视变性

以及其它增殖性疾病和病况,如再狭窄和多囊性肾病。可以利用有效运送穿过 BBB 的载体治疗的脑癌包括星形细胞瘤、纤维性星形细胞瘤、胚胎发育不良性神经上皮瘤、少突神经胶质瘤、室管膜瘤、多形性胶质母细胞瘤、混合胶质瘤、寡星形细胞瘤、髓母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、成神经细胞瘤、生殖细胞瘤和畸胎瘤。

[0311] 本发明的结合物或组合物可以通过本领域中已知的任何方式给予受验者,例如,口服、动脉内、鼻内、腹膜内、静脉内、肌内、皮下、透皮或经口。该药剂可以,例如是抗血管生成的化合物。

[0312] 剂量

[0313] 本文描述的或利用本文描述的方法鉴定的任何结合物或组合物的剂量取决于多个因素,包括:给予方法、待治疗的疾病(例如癌症)、疾病严重性、癌症是要治疗还是预防,以及待治疗受验者的年龄、体重和健康状况。

[0314] 关于本发明的治疗方法,并不是要将载体、结合物或组合物给予受验者局限于特定的给药模式、剂量或给药频率,本发明考虑了所有给药模式。该结合物或组合物可以以单剂量或多剂量形式给予受验者。例如,本文描述的或利用本发明筛选方法鉴定的化合物可以一周给予一次,持续例如 2、3、4、5、6、7、8、10、15、20 或更多周。应当理解,对于任何特定受验者,具体的给药方案应根据个体需要以及给药或监督组合物给药人员的专业判断而随时间进行调整。例如,如果较低剂量在治疗本文描述的疾病或病况(例如,癌症)中未提供足够的活性,则组合物的剂量可以增加。相反,如果疾病(例如癌症)减轻或消除,则该组合物的剂量可以降低。

[0315] 虽然主治医师最终将决定适当的量和剂量方案,但本文描述的载体、结合物或组合物的治疗有效量可以,例如在 $0.0035 \mu\text{g} \sim 20 \mu\text{g/kg}$ 体重/天或 $0.010 \mu\text{g} \sim 140 \mu\text{g/kg}$ 体重/周的范围内。期望地,治疗有效量在 $0.025 \mu\text{g} \sim 10 \mu\text{g/kg}$ 的范围内,例如每天、每隔一天或一周两次给予至少 0.025、0.035、0.05、0.075、0.1、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 或 $9.0 \mu\text{g/kg}$ 体重。另外,治疗有效量可以在 $0.05 \mu\text{g} \sim 20 \mu\text{g/kg}$ 的范围内,例如每周、每隔一周、每三周、每月一次地给予至少 0.05、0.7、0.15、0.2、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、10.0、12.0、14.0、16.0 或 $18.0 \mu\text{g/kg}$ 体重。此外,化合物的治疗有效量可以在,例如每隔一天、每周一次、每隔一周或每三周给予的 $0.1\text{mg/m}^2 \sim 2,000\text{mg/m}^2$ 的范围内。例如,ANG1005 可每一、二、三、四周,或每月或每隔一月地给予 50、100、200、300、400、420、500、600、700、800 或 $1,000\text{mg/m}^2$ 。在一个特别的实施例中,ANG1005 每三周给予 300mg/m^2 或 420mg/m^2 。在另一个实施方式中,治疗有效量在 $1000 \mu\text{g/m}^2 \sim 20,000 \mu\text{g/m}^2$ 的范围内,例如每日、每隔一天、每周两次、每周,或每隔一周给予至少 1000、1500、4000 或 $14,000 \mu\text{g/m}^2$ 化合物。

[0316] 下面实施例是用于说明,而不是限制本发明。

[0317] 实施例 1

[0318] ANG1005 的溶解性

[0319] 测试了 ANG1005 在一些溶剂和表面活性剂中的溶解性。单一药剂的结果在下表 13 中给出。

**表 13: 溶剂/表面活性剂作为单个药剂测试的
ANG1005 溶解列表**

[0320]

溶剂/表面活性剂	溶解性	浓度
乙腈 (100%)	不溶	
脱水 EtOH	不溶	
甲基叔丁基醚	不溶	
丙酮	不溶	
乙酸乙酯	不溶	
叔丁醇	不溶	
N,N-二甲基乙酰胺	溶解	25 mg/ml
DMSO	溶解	120 mg/ml
聚山梨酯 80 (吐温 80)	不溶	
Cremophor EL	不溶	
Cremophor ELP (BASF)	不溶	
PEG 300	不溶	
PEG	不溶	
PEG	不溶	
聚乙烯吡咯烷酮 (Kollidon 17)	不溶	
聚乙烯吡咯烷酮 (Kollidon 19)	不溶	
环糊精	不溶	
Labrafil	不溶	

[0321] 还测试了 ANG1005 在溶剂 / 表面活性剂组合 (combination) 中的溶解性。这些结果在表 14 中给出。

[0322]

**表 14: 溶剂/表面活性剂作为组合测试的
ANG1005 溶解列表**

溶剂/表面活性剂	溶解性	浓度
EtOH/吐温 80	不溶	
EtOH/Cremophor EL	不溶	
EtOH/Cremophor ELP	不溶	
EtOH/PEG	不溶	
EtOH/聚乙烯吡咯烷酮	不溶	
Solutol HS15/缓冲液 (用微波加热)	溶解	6 mg/ml
EtOH/Solutol HS15/缓冲液(75°C)	溶解	6 mg/ml
DMSO/Solutol HS15/缓冲液(50°C)	溶解	6 mg/ml
DMSO/吐温 80/缓冲液(65°C)	溶解	6 mg/ml
DMSO/Cremophor/缓冲液(65°C)	溶解	6 mg/ml

[0323] 实施例 2

[0324] ANG1005 溶解条件

[0325] 在用于冻干的制剂中, ANG1005 经历数个溶解条件。这些结果概括在下面。如上所述, 首先将 ANG1005 溶解在 DMSO 中。向这个混合物中加入热 Solutol 或 Solutol 缓冲液组合中。最后, 将甘氨酸缓冲液加入到 ANG1005/DMSO/Solutol 混合物中。因此测试了表 15 中的溶解条件。

[0326] 表 15 :ANG1005 的溶解

[0327]

试验 (Pilot)	目标最终 pH	DMSO pH (5%)	Solutol (20%)	缓冲液 pH (75%)	加热温度
1	4.50	4.0 (± 0.5)	无调整	4.0 (± 0.2)	42°C
2	4.75	4.0 (± 0.5)	无调整	4.3 (± 0.2)	42°C
3	5.00	4.0 (± 0.5)	无调整	4.5 (± 0.2)	42°C
4	5.25	4.0 (± 0.5)	无调整	4.8 (± 0.2)	42°C
5	4.50	4.0 (± 0.5)	无调整	4.0 ±	46°C

[0328]

6	4.75	4.0 (± 0.5)	无调整	4.3 (± 0.2)	46°C
7	5.00	4.0 (± 0.5)	无调整	4.5 (± 0.2)	46°C
8	5.25	4.0 (± 0.5)	无调整	4.8 (± 0.2)	46°C
9	4.50	4.0 (± 0.5)	无调整	4.0 (± 0.2)	50°C
10	4.75	4.0 (± 0.5)	无调整	4.3 (± 0.2)	50°C
11	5.00	4.0 (± 0.5)	无调整	4.5 (± 0.2)	50°C
12	5.25	4.0 (± 0.5)	无调整	4.8 (± 0.2)	50°C
试验	目标最终 pH	DMSO pH (5%)	Solutol/缓冲液: 80/20 (25%)	缓冲液 pH (70%)	加热温度
13	4.50	4.0 (± 0.5)	pH=5.0 (± 0.5)	5.0 (± 0.2)	50°C
14	4.75	4.0 (± 0.5)	pH=5.5 (± 0.5)	5.5 (± 0.2)	50°C
15	5.00	4.0 (± 0.5)	pH=6.0 (± 0.5)	5.5 (± 0.2)	50°C
16	5.25	4.0 (± 0.5)	pH=6.5 (± 0.5)	6.0 (± 0.2)	50°C
试验	目标最终 pH	DMSO pH (5%)	Solutol/水-HCl 80/20 (25%)	缓冲液 pH (70%)	加热温度
17	5.00	4.0 (± 0.5)	pH=6.0 (± 0.5)	5.5 (± 0.2)	50°C

[0329] 这些试验的结果在表 16 中给出。

[0330] 表 16

[0331]

试验	目标 pH	纯度 (%)	DMSO (ppm) *	备注
1	4.50	95.9	5855	快速, 澄清的重配液, 然后浑浊
2	4.75	94.0	6488	快速, 澄清的重配液, 良好
3	5.00	95.0	6256	快速, 澄清的重配液, 良好
4	5.25	95.4	6382	快速, 澄清的重配液, 良好
5	4.50	96.0	6818	快速, 澄清的重配液, 然后浑浊
6	4.75	94.4	6330	快速, 澄清的重配液, 良好
7	5.00	94.6	6806	快速, 澄清的重配液, 良好
8	5.25	94.0	6930	快速, 澄清的重配液, 良好
9	4.50	95.2	6235	快速, 澄清的重配液, 良好
10	4.75	93.8	6932	快速, 澄清的重配液, 良好
11	5.00	95.1	6302	快速, 澄清的重配液, 良好
12 (参照)	5.25	93.9	7846	快速, 澄清的重配液, 良好

13	4.50	97.6	7035	浑浊的重配液 (++)
----	------	------	------	-------------

[0332]

14	4.75	97.4	7071	快速,澄清的重配液,然后浑浊并有沉淀
15	5.00	95.4-94.3	6818	快速,澄清的重配液,良好
16	5.25	95.9-96.2	7155	快速,澄清的重配液,良好
17	5.00	96.5	6163	浑浊的重配液 (++)

[0333] 在这些结果的基础上,我们确定,该制剂可以在 40 和 50℃之间的温度下加工。该溶液的pH应当高于 4.5 从而使得Solutol HS 15的胶团 (micelles) 能够形成,因为 pH 4.5

重配可形成浑浊的溶液。在加入 ANG1005 之前酸化 Solutol HS 15,使其降解减至最低。

[0334] 实施例 3

[0335] 冻干条件

[0336] 溶解之后,将 ANG1005 混合物稀释在含水缓冲液(例如,甘氨酸缓冲液,用 HCl、甘露醇和氯化钠调节 pH 至 5)中,冷冻和冻干该混合物。示例性条件在上表 4 中给出。

[0337] 在 $-70^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ 之间测试了区段(segment)1 的加样温度。区段 2 的坡度升温时间(ramp time)可根据区段 1 和 3 中温度之间的差异变化,并可以长达 6 小时。我们确定,区段 3 必须进行至少 12 小时,因为较短的时限(time frame)导致冻干饼塌陷。区段 8 和 9 可在上面示出的温度范围内调整,从而确保在二次干燥期间产品温度在 18°C 至 21°C 之间。该产品应当保持低于 25°C ,从而避免融化。利用本文描述的增溶/冻干方案,在一些情况下,我们能够制得纯度大于 96%,残留 DMSO 小于 1%的产品,如表 17 中所给出的。

[0338] 表 17

表 17: 注射用 ANG1005 的 GMP 批次的主要结果			
	C0807121	C0907124	C1007135
纯度	93.3%	90.9%	96.5%
2:1 结合物	4.6%	6.4%	2.2%
测定	93.8%	94.2%	100.4%
水	0.2%	0.1%	0.05%

[0340]

DMSO	8.2%	2.4%	0.6%
------	------	------	------

[0341] 1007135 批次以及其它批次的进一步特性在下表 18 中给出。

[0342] 表 18

[0343]

批号	C1007135	C0108002	C0308011	C0608030	C1108062
纯度	96.5%	96.9%	95.5%	95.6%	96.9%
2 : 1 结合物	2.2%	1.4%	2.0%	2.7%	2.3%
测定	100.4%	97.2%	100.7%	102.6%	105.7%
总相关物质	3.5%	3.1%	5.0%	4.4%	3.1%
未结合的血管肽 -2	ND	ND	ND	ND	ND
未结合的紫杉醇	0.9%	0.6%	1.0%	0.7%	0.5%
1 : 1 结合物	ND	ND	ND	ND	ND

未知	0.5%	1.0%	1.0%	1.0%	0.4%
含水量	0.05%	0.04%	0.05%	0.12%	0.03%
DMSO	0.65%	0.54%	0.37%	0.54%	0.64%

[0344] ND = 未检出

[0345] 实施例 4

[0346] 冻干 ANG1005 的重悬浮

[0347] 开发了用于将 ANG1005 冻干制剂溶解和悬浮在水溶液中的以下程序。陈述的程序适于含有 120mg ANG1005 的单只小瓶。

[0348] 在室温下使 ANG1005 小瓶平衡。然后给小瓶开孔。利用装有 18G 11/2”注射针的 20cc 注射器,沿着该小瓶侧面向下缓慢注入(例如,超过 30 秒)4ml 无水乙醇。然后,将该小瓶放置在盘旋混合仪(nutating mixer)上 10 分钟,使得乙醇缓慢地润湿该饼,从而提供乳状悬浮液。

[0349] 然后从该混合仪中移出小瓶,利用装到 18G 1.5”注射针上的 20cc 塑料注射器,沿着该小瓶侧面向下注入含有 5%葡萄糖的 12ml 乳酸林格氏液。然后将该小瓶放置在盘旋混合仪上 5 分钟。然后旋转该小瓶 180 度,然后继续在盘旋混合仪上再混合 5 分钟。此时,该悬浮液澄清,含有极少的泡沫。然后,在进行下一步骤(例如,稀释用于注射、分析)之前,将小瓶静置在工作台上 5 分钟。

[0350] 也测试了供替换的稀释剂(表 19)。虽然使用这些稀释剂形成了彻底溶解的澄清溶液,但室温下它们相对于含有 5%葡萄糖的乳酸林格氏液与乙醇的混合物使 ANG1005 发生更大的降解。

[0351] 表 19:用于重悬浮的供替换的稀释剂:

[0352]

	量	条件
注射用水	16ml	升温至 40-50℃
注射用水 / 乙醇	12ml+4ml	RT
D5W	16ml	升温至 40-50℃
D5W/ 乙醇	12ml+4ml	RT
乳酸林格氏液 -D5W	16ml	升温至 40-50℃

[0353] 实施例 5

[0354] 另外的缓冲液和膨胀剂的测试

[0355] 我们作出进一步努力,以减少残留 DMSO(0.5%)和缩短冻干循环(5 天)。

[0356] 我们认为制剂的各种赋形剂(尤其是甘氨酸和氯化钠)致使该循环的二次干燥期间 DMSO 除去效率降低。在无 NaCl、甘氨酸、甘露醇或水的情况下制取的制剂使得 DMSO 含量

低得多（量级 0.01%）。但在无甘露醇的情况下，该饼是蜡样的（主要由 Solutol 组成）。这些低 DMSO 制剂都未能利用乙醇和 D5W/ 乳酸林格氏液进行重配。另外，当不存在甘氨酸时，pH 不受控制。这引起 ANG1005 的降解。

[0357] 因而，在进一步的测试中，保留了作为膨胀剂的甘露醇，用包括柠檬酸和乳酸的缓冲液代替甘氨酸，并除去 NaCl。这些制剂，使用了更短的冻干循环，但仍然导致该饼含有 0.05% 的 DMSO 残留。在这个水平的 DMSO 下，该饼是不可溶的。在另外的制剂中，用大豆卵磷脂代替了甘露醇。这导致 0.2% 的 DMSO 残留。在 0.2% 的残留 DMSO 下，该饼在乙醇和 D5W/LR 中是可溶的。因此，我们认为对于该小瓶的重配和进一步稀释成输液袋，0.2-0.4% DMSO 是必需的。可以相应调节冻干时间，从而使 DMSO 浓度在这个范围内。

[0358] 在这些测试中使用的组合物的详细信息如下（表 20-22）。

[0359] 表 20 :冻干前组合物

[0360]

% w/w	供应商	F-37	F-38	F-39	F-40
ANG1005		0.72	0.72	0.72	0.72
Solutol HS15		24.92	24.88	24.83	24.88
DMSO, USP	Gaylord	13.39	13.36	13.32	13.36
1N HCl		0.311	0.311	0.306	0.311
柠檬酸		0.04			
乳酸 **			0.21	0.42	0.21
甘露醇		1.54	1.53	1.53	
大豆卵磷脂	PL90G				1.53
注射用水		59.08	59.00	58.86	59.00
总计		100.00	100.00	100.00	100.00

[0361] ** 在水中 85%

[0362] Solutol/API 比例与 ANG 批次记录的相同

[0363] DMSO/HCl 比例与 ANG 批次记录的相同

[0364] 选择柠檬酸浓度从而提供 pH 5（基于 F-34）

[0365] 计算乳酸浓度从而提供 pH 5 (F38) 及更低 (F39)

[0366] 甘露醇在水中的浓度与 ANG 批次记录的相同

[0367] 大豆卵磷脂是“增溶性”膨胀剂从而代替甘露醇

[0368] 表 21 :配料表 (compounding table)

[0369]

Mg/ 管	等级 & 批号	F-37	F-38	F-39	F-40
ANG1005		184	184	184	184
Solutol HS15		6328	6328	6328	6328
DMSO, USP		3399	3399	3395	3399
1N HCl		79	79	78	79
柠檬酸		10			
乳酸 **			54	108	54
甘露醇		390	390	390	
大豆卵磷脂					390
注射用水		15000	15000	15000	15000
总计		25390	25434	25483	25434
总计干重		6991	7035	7088	7035

[0370] ** 在水中 85 %

[0371] 表 22 :冻干后的组成表

[0372]

% w/w	供应商	F-37	F-38	F-39	F-40
ANG1005		2.64	2.62	2.60	2.62
Solutol HS15		90.65	89.95	89.28	89.95
DMSO, USP	Gaylord				
1N HCl		1.13	1.12	1.10	1.12
柠檬酸		0.14			
乳酸 **			0.77	1.52	0.77
甘露醇		5.59	5.54	5.50	
大豆卵磷脂					5.54
注射用水					

总计		100.0	100.0	100.0	100.0
----	--	-------	-------	-------	-------

[0373] ** 在水中 85%

[0374] 该组合物制备如下：通过称取 0.5g 1N HCl 标准溶液到 50ml Falcon 管中，制备 DMSO/HCl 原液。加入 21.5g DMSO，并充分混合从而获得 DMSO+1N HCl 原液。

[0375] 对于每种组成，都称取甘露醇、Solutol、柠檬酸或乳酸和 WFI，并将它们放入 50ml Falcon 管中。充分混合这些成分从而溶解。给该管子加盖，并加热至 51℃（“缓冲混合物”）。使用另一个 50ml (Falcon 管) 称取 ANG1005。然后添加 DMSO/HCl 原液并通过涡流（旋涡，vortex）充分混合直至该溶液变得澄清。将该热缓冲混合物缓慢地加入到 DMSO/ANG1005 混合物中，同时进行涡流。然后将该混合物冷却至 RT。将 1700–1730mg 溶液放到每只小瓶中。按照本文所述冻干该溶液。将该混合物 (compound) 储存在 -20℃。

[0376] 然后对该溶液的重配能力进行测试。为了重配该溶液，加入乙醇并混合。然后加入乳酸林格氏液。量在表 23 中给出。

[0377] 表 23：重配体积

[0378]

每只小瓶中的重量 (wt)	参照 (ref) 产品	F-37 ~ F-40
API (mg)	125	12.5
乙醇 (mg)	3234	323.4
含有 D5W 的乳酸林格氏液 (mg)	12186	1218.6

[0379] 如果重配成功，则记录该样品外观（颜色、显微镜下的结晶或固体 PPT，等等）。然后通过 HPLC 对等分试样进行分析（例如，测定和纯度）。也将测量 pH。

[0380] 实施例 6

[0381] 冻干 ANG1005 产品的稳定性测试

[0382] 测试了 ANG1005 产品随时间的稳定性。对储存在约 -15℃ 下的冻干产品的活性、纯度、外观、pH 和降解进行监测。这些测试的结果在下表 24 中给出。

[0383]

**表 24: 注射用 ANG1005 的稳定性结果,
储存在 $-15 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 的批号 C1007135**

注射用 ANG1005,
批号 C1007135
制造日期: 2007 年 10 月
包装: 60 ml 小瓶, 带有 15 mm
Daikyo 塞子和 15 mm 铝塑组合帽
(flip-off seal)

强度: 120 mg/小瓶的 ANG1005
稳定性研究开始日期: 2007 年 11 月
研究持续时间: 24 个月

测试	初始	1 个月	2 个月	3 个月	6 个月	9 个月	12 个月	16 个月
外观	符合	符合	符合	符合	符合	符合	符合	符合
溶液的澄清和完全性	符合	符合	符合	符合	符合	符合	符合	符合
pH	5.2	5.9	5.5	5.5	5.5	5.8	5.8	5.7
含水量	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	ND	ND	0.1%
测定 (wt/wt)	100.4 %	97.6%	98.4 %	97.5 %	93.7 %	103.3 %	103.5 %	101.3 %
纯度	96.5%	97.4%	97.2 %	96.7 %	96.2 %	97.3 %	97.4 %	97.2%
2:1 结合物	2.2%	1.4%	1.5%	1.5%	1.4%	1.3%	1.2%	1.4%
紫杉醇	0.9%	0.6%	0.7%	0.6%	1.1%	0.5%	0.5%	0.6%
未知 Rel 物质	0.5%	0.4%	0.4%	1.2%	1.3%	0.8%	0.8%	0.8%
Imp RRT 0.60	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Imp RRT 0.61	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Imp RRT 0.62	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Imp RRT 0.64	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Imp RRT 0.66	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Imp RRT 0.79	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Imp RRT 0.83	0.1%	ND	ND	ND	0.1%	ND	ND	ND
Imp RRT 0.91	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Imp RRT 0.93	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%
Imp RRT 0.95	ND	ND	ND	0.1%	ND	ND	0.1%	0.1%
Imp RRT 0.98	ND	ND	ND	0.3%	0.2%	ND	ND	0.2%

[0384]

Imp RRT 1.03	ND	0.2%	0.2%	0.2%	0.1%	ND	ND	ND
Imp RRT 1.04	0.2%	ND	ND	ND	0.2%	ND	0.2%	0.1%
Imp RRT 1.06	0.1%	0.1%	0.1%	0.2%	0.2%	0.5%	0.2%	0.1%
Imp RRT 1.07	0.1%	0.1%	ND	0.2%	ND	ND	ND	ND
无菌性	无菌	N/Ap	N/Ap	N/Ap	N/Ap	N/Ap	无菌	N/Ap
颗粒物	符合	N/Ap	N/Ap	N/Ap	N/Ap	N/Ap	符合	N/Ap

[0385] 实施例 7

[0386] ANG1005 产品在重配之后的稳定性

[0387] 进行了数个实验从而评价 ANG1005 在重配成溶液之后的稳定性。这些实验描述如下。

[0388] 实验 1

[0389] 按本文描述的,将注射用 ANG1005 的批号 C0108002 产品重配到 1.0 ~ 2.0mg/ml 浓度范围内。先前确定了浓度为 2.0mg/ml 的 ANG1005 是用于临床使用的最适宜剂量,如先前在 IND 中存在的。这些初步实验以小体积形式在玻璃小瓶中进行。样品保存在室温下,并在不同的时间点目测检查。在 HPLC 分析之前,过滤所选样品。

[0390] 表 25 示出随时间测试的浓度与目测的溶液澄清度。外观混浊 (cloudiness) 似乎与浓度和时间的增大都有关。所选样品的 HPLC 分析展现单 ANG1005 峰,在不同时间点其纯度没有显著改变。在相关物质谱图 (profile) 中未观察到任何改变 (表 26)。注意到两个相关物质峰,鉴定其为 2 : 1 结合物 (RRT 0.88) 和未结合的紫杉醇 (RRT 0.95)。观察到 RRT 为 1.15 的峰 (8.1 分钟),这个峰是来自 HPLC 柱中的杂质,因为它也存在于空白色谱图中。

[0391] 表 25 :稀释在 D5W 中的重配 ANG1005 的目测外观

[0392]

	0h	1h	2h	3h	4h	6h
1.0mg/ml	澄清	澄清	澄清	澄清	澄清	X
1.5mg/ml	澄清	澄清	X	X	XX	XXX
2.0mg/ml	澄清	X	XX	XX	XXX	XXX

[0393] X :轻微混浊

[0394] XX :混浊

[0395] XXX :非常混浊

[0396] 表 26 :稀释在 D5W 中的重配注射用 ANG1005 的纯度

[0397]

	0h	1.5h	3.5h	6h
1.0 mg/ml	97.3% 相关物质: 1.3% (0.88) 1.4% (0.95)	NT	97.1% 相关物质: 1.4% (0.88) 1.5% (0.95)	NT
1.5 mg/ml	97.3% 相关物质: 1.3% (0.88) 1.4% (0.95)	97.1% 相关物质: 1.4% (0.88) 1.5% (0.95)	NT	96.8% 相关物质: 1.5% (0.88) 1.7% (0.95)
2.0 mg/ml	97.2% 相关物质: 1.3% (0.88) 1.5% (0.95)	97.1% 相关物质: 1.4% (0.88) 1.5% (0.95)	NT	NT

[0398] NT = 未检出

[0399] 相关物质 : 报告单峰大于 0.5%, 括号中为相对保留时间

[0400] RRT 0.88 处的相关物质表示 2 : 1 结合物

[0401] RRT 0.95 处的相关物质表示未结合的紫杉醇

[0402] 注意 : 观察到相对保留时间为 1.15(8.1min) 的峰, 这个峰是 HPLC 柱中的杂质, 因为它也存在于空白色谱图中。

[0403] 实验 2

[0404] 为了证实实验 1 中获得的 1.0mg/ml 时的稳定性结果, 在临床使用条件下进行了另外的研究。按描述的重配注射用 ANG1005, 批号 C0108002, 从而在 500ml D5W 输液袋中将最终浓度配制成 1.0mg/ml。室温下在 6 小时的观察期内, 该溶液仍然是目测澄清的, 纯度或相关物质谱图未显著改变 (见表 27 和图 2)。

[0405] 表 27 : 在临床使用条件下用 D5W 稀释至 1.0mg/ml 的重配注射用 ANG1005 的纯度

[0406]

时间	0h	2h	4h	6h
纯度	97.4% 相关物质: 1.2% (0.88) 1.4% (0.95)	97.3% 相关物质: 1.3% (0.88) 1.4% (0.95)	97.0% 相关物质: 1.5% (0.88) 1.5% (0.95)	97.2% 相关物质: 1.4% (0.88) 1.4% (0.95)

[0407] 相关物质 : 报告单峰大于 0.5%, 括号中为相对保留时间

[0408] RRT 0.88 处的相关物质表示 2 : 1 结合物

[0409] RRT 0.95 处的相关物质表示未结合的紫杉醇

[0410] 注意 : 观察到相对保留时间为 1.15(8.1min) 的峰, 这个峰是 HPLC 柱中的杂质, 因为它也存在于空白色谱图中。

[0411] 实验 3

[0412] 重配注射用 ANG1005, 批号 C0108002, 并在玻璃小瓶中用 D5W 稀释至最终浓度为 2.0mg/ml。将该样品保存在室温下 ~ 6h。该溶液变得混浊并被离心。通过慢慢倒出上清液收集所得沉积物, 使其在 DMSO 中溶解, 并通过 HPLC 分析。再溶解的沉积物主峰鉴定为纯

度为 97.2% 的 ANG1005。在相关物质谱图中未观察到变化,仅存在两个预期的另外峰 (RRT 0.88 处的 1.3% 和 RRT 0.95 处的 1.5%)。这个样品的 HPLC 色谱图在图 3 中示出。观察到 RRT 为 1.15 的峰 (8.1 分钟),这个峰来自 HPLC 柱中的杂质,因为它也存在于空白色谱图中。

[0413] 综合数据表明观察到的浑浊 / 混浊是由完整的 ANG1005 没有任何降解地析出 (going out) 溶液的结果,这可能是由于药物产品组分与 D5W 之间的相互作用引起的。这个现象似乎是与浓度和时间相关的。

[0414] 为了减少浑浊,建议为接受 ANG1005 剂量 $> 300\text{mg}/\text{m}^2$ 的所有患者,将最终浓度减少到 $\leq 1\text{mg}/\text{ml}$ 。

[0415] 有一些数据可以表明这个结果大部分是由药物产品中残留 DMSO 量的减少引起的。药物产品的第一批,批号 C0807121,具有 8.2% 的残留 DMSO 含量,而更近的一批,批号 C0108002,具有 0.54% 的残留 DMSO 含量。似乎这个改变已影响该物质的溶解性。

[0416] 正在进行另外的实验从而修改稀释程序以提高该重配药物的稳定性。对在重配工艺最后一步中用乳酸林格氏液代替 5% 葡萄糖注射液作为稀释剂制备的溶液进行测试:首先如前面那样用 4ml 无水乙醇和 12ml 乳酸林格氏液 / 5% 葡萄糖注射液对每小瓶注射用 ANG1005 进行重配从而达到 $6\text{mg}/\text{ml}$ 的浓度,然后用乳酸林格氏注射液进一步稀释。表 28 中给出的初步数据揭示,同样浓度范围 (高达 $2.0\text{mg}/\text{ml}$) 的乳酸林格氏液代替 D5W 可以阻止观察到的输液混浊。整个观察期所有溶液保持澄清,而没有影响 ANG1005 的纯度。

[0417] 表 28 :用乳酸林格氏注射液稀释的重配注射用 ANG1005 的纯度

[0418]

	0h	1h	2h	4h
0.5 mg/ml	97.2% 相关物质: 1.4% (0.88) 1.4% (0.95)	96.9% 相关物质: 1.5% (0.88) 1.6% (0.95)	96.7% 相关物质: 1.7% (0.88) 1.6% (0.95)	96.3% 相关物质: 2.0% (0.88) 1.7% (0.95)
1.0 mg/ml	96.8% 相关物质: 1.6% (0.88) 1.6% (0.95)	96.7% 相关物质: 1.7% (0.88) 1.6% (0.95)	96.6% 相关物质: 1.8% (0.88) 1.6% (0.95)	96.6% 相关物质: 1.8% (0.88) 1.6% (0.95)
1.5 mg/ml	97.0% 相关物质: 1.5% (0.88) 1.5% (0.95)	96.9% 相关物质: 1.6% (0.88) 1.5% (0.95)	96.6% 相关物质: 1.8% (0.88) 1.6% (0.95)	96.6% 相关物质: 1.8% (0.88) 1.6% (0.95)
2.0 mg/ml	97.1% 相关物质: 1.4% (0.88) 1.5% (0.95)	96.8% 相关物质: 1.6% (0.88) 1.6% (0.95)	96.6% 相关物质: 1.8% (0.88) 1.6% (0.95)	96.6% 相关物质: 1.8% (0.88) 1.6% (0.95)

[0419] 相关物质 :报告单峰大于 0.5%,括号中为相对保留时间

[0420] RRT 0.88 处的相关物质表示 2 : 1 结合物

[0421] RRT 0.95 处的相关物质表示未结合的紫杉醇

[0422] 其它实施方式

[0423] 本说明书中提及的所有专利、专利申请及出版物以引用的方式并入在此，该引用程度就如同具体地及单独地将各个专利、专利申请或出版物以引用的方式并入一般。

药物产品制造工艺流程图

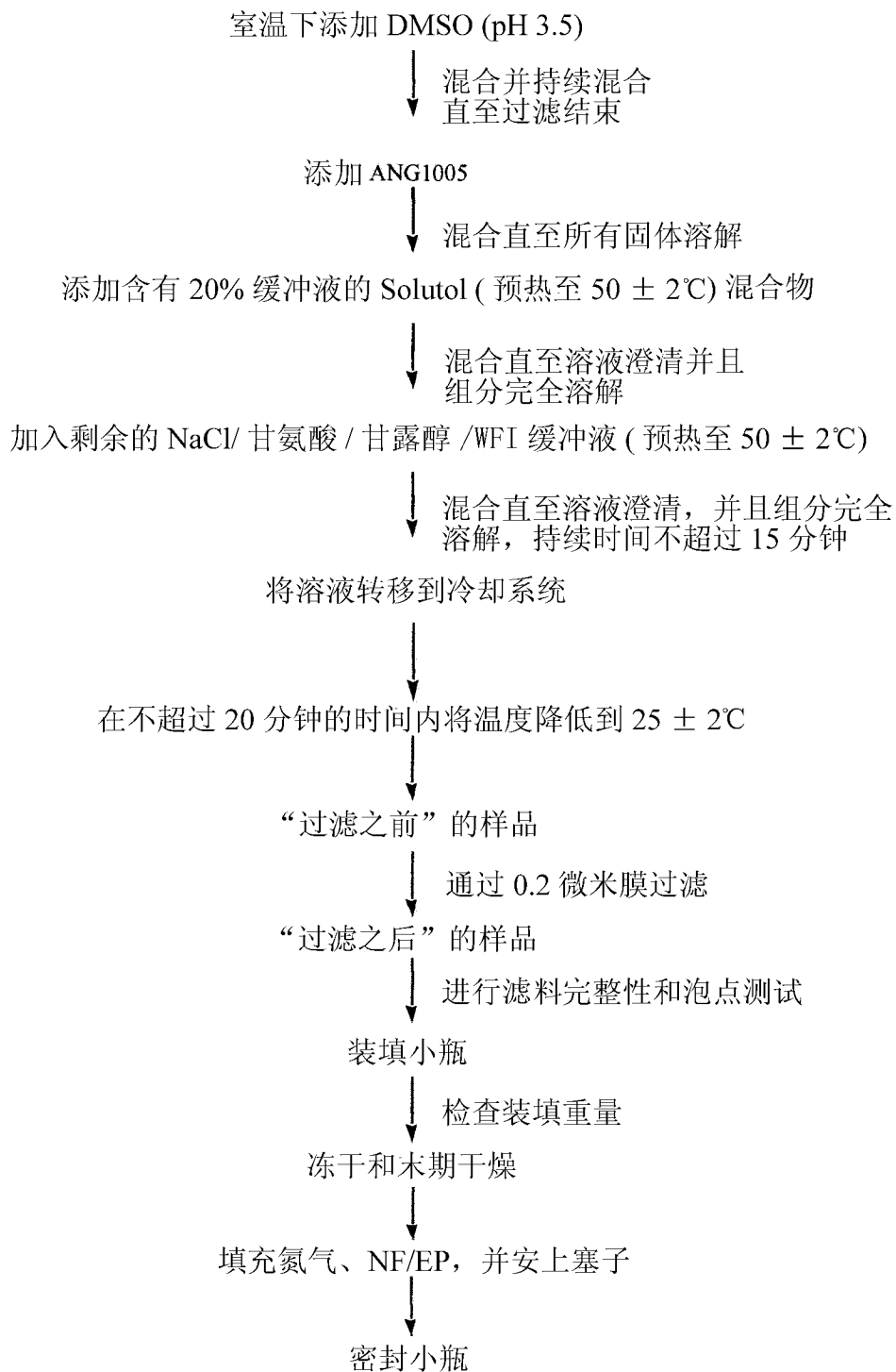


图 1

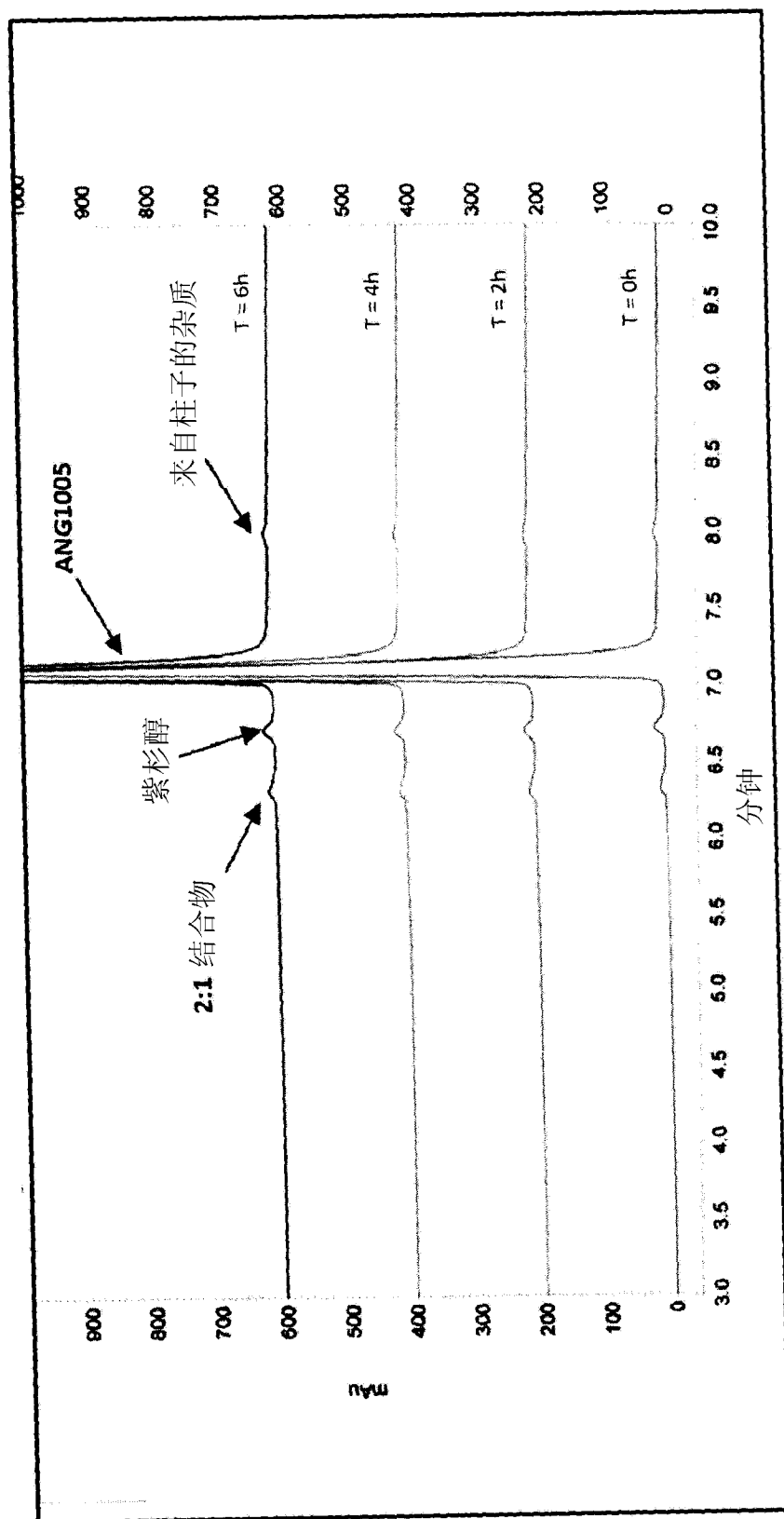


图 2

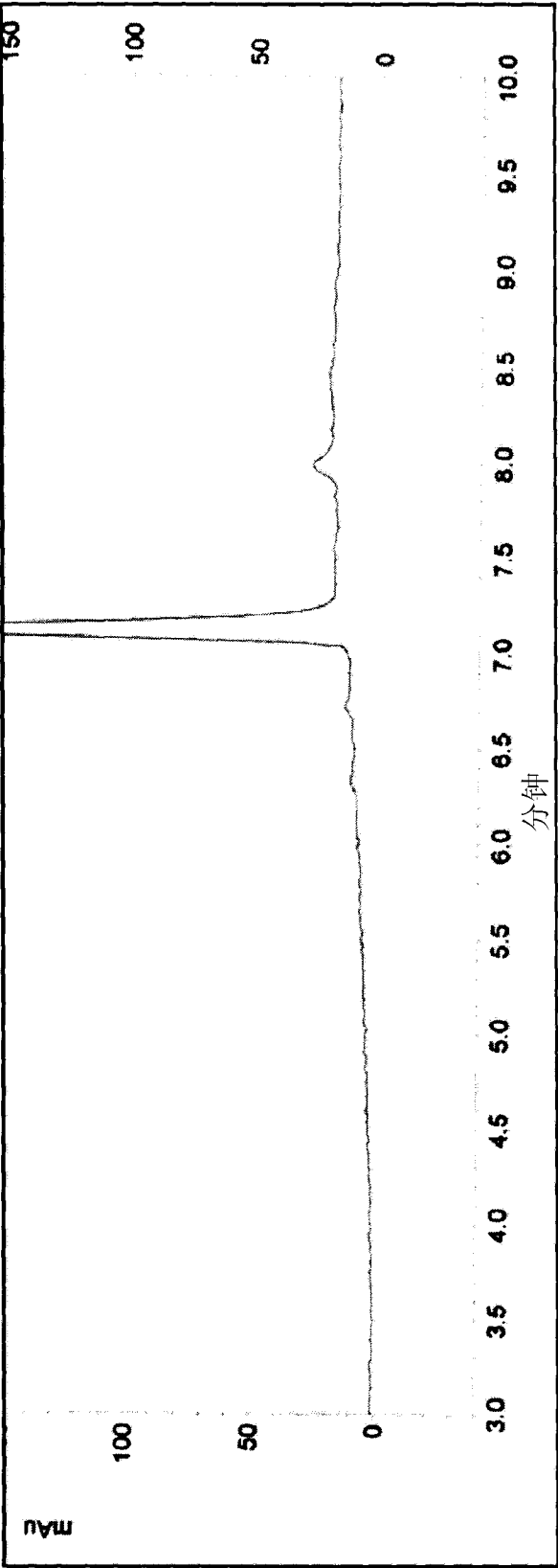


图 3