

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780048279.9

[51] Int. Cl.

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009年11月25日

[11] 公开号 CN 101588819A

[22] 申请日 2007.12.27

[21] 申请号 200780048279.9

[30] 优先权

[32] 2006.12.27 [33] US [31] 60/877,589

[86] 国际申请 PCT/US2007/026425 2007.12.27

[87] 国际公布 WO2008/082613 英 2008.7.10

[85] 进入国家阶段日期 2009.6.26

[71] 申请人 尼克塔治疗亚拉巴马公司

地址 美国亚拉巴马

[72] 发明人 M·J·博萨德 G·史蒂芬森

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 袁志明

权利要求书6页 说明书37页 附图2页

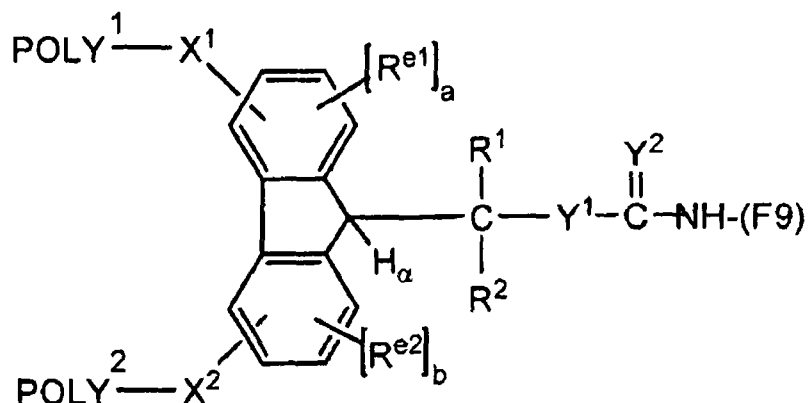
[54] 发明名称

具有可释放的键合的 IX 因子部分 - 聚合物
轭合物

[57] 摘要

本发明提供了具有可释放的键合的 IX 因子部分
- 聚合物轭合物。 还提供了制备轭合物的方法、用
于施用轭合物的方法。

1. 一种化合物，其具有以下结构：



其中：

POLY¹ 为第一水溶性聚合物；

POLY² 为第二水溶性聚合物；

X¹ 为第一间隔基部分；

X² 为第二间隔基部分；

H_α 为可电离的氢原子；

R¹ 为 H 或有机基；

R² 为 H 或有机基；

(a) 为 0 或 1；

(b) 为 0 或 1；

R^{e1} 当存在时，为第一电子改变基团；

R^{e2} 当存在时，为第二电子改变基团；

Y¹ 为 O 或 S；

Y² 为 O 或 S；且

(F9) 为含胺的 IX 因子部分的残基。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物，其中所述含胺的 IX 因子部分为重组 IX 因子。

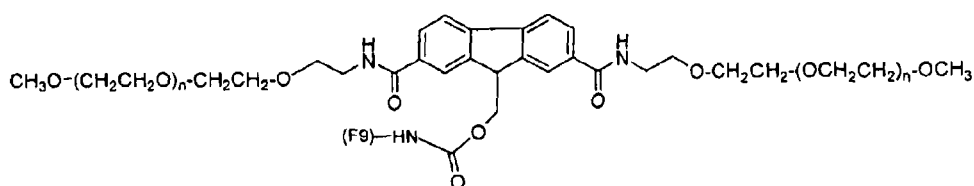
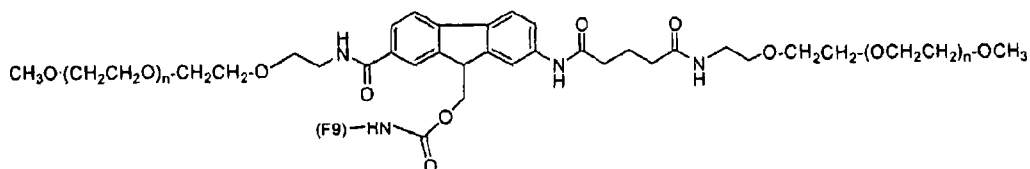
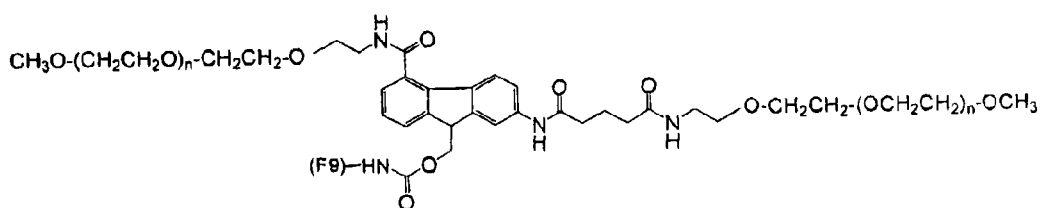
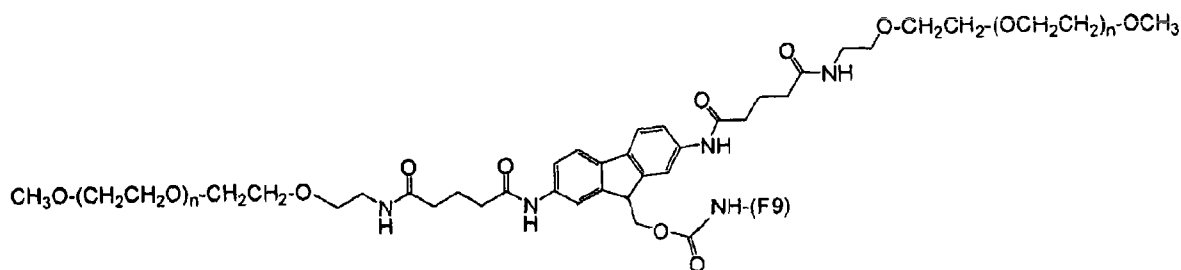
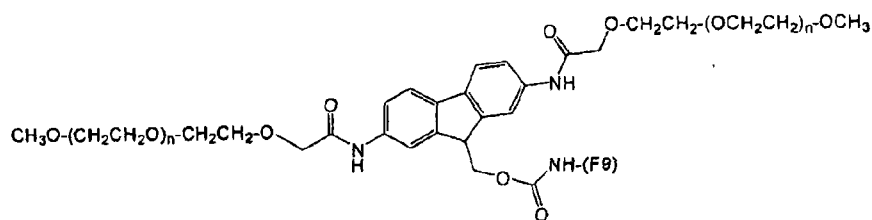
3. 根据权利要求 2 所述的化合物，其中所述重组 IX 因子为人重组 IX 因子。

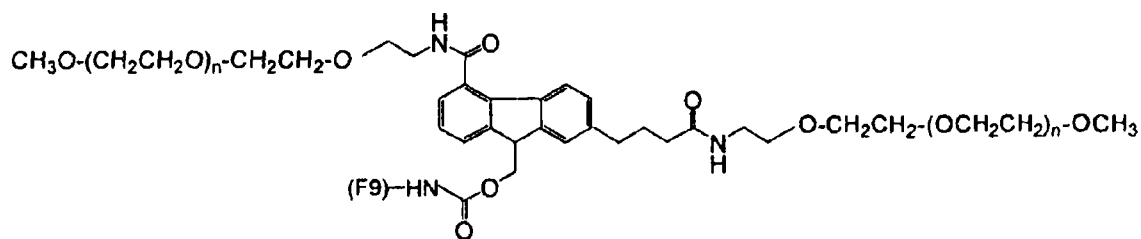
4. 根据权利要求 1 所述的化合物，其中所述第一水溶性聚合物为

聚氧化烯烃且所述第二水溶性聚合物为聚氧化烯烃。

5. 根据权利要求1所述的化合物，其中所述第一水溶性聚合物具有10,000道尔顿至85,000道尔顿之间的重均分子量且所述第二水溶性聚合物具有10,000道尔顿至85,000道尔顿之间的重均分子量。

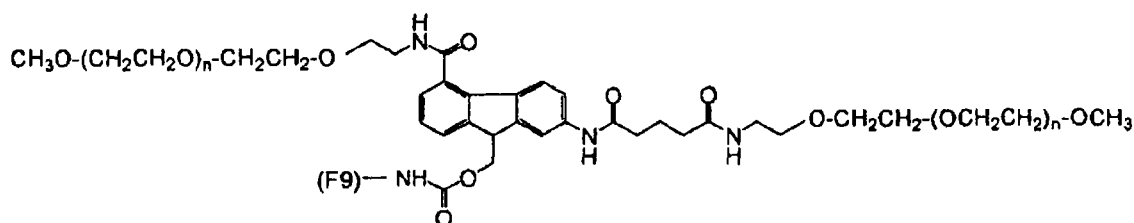
6. 根据权利要求1所述的化合物，其具有选自由以下组成的组的结构：





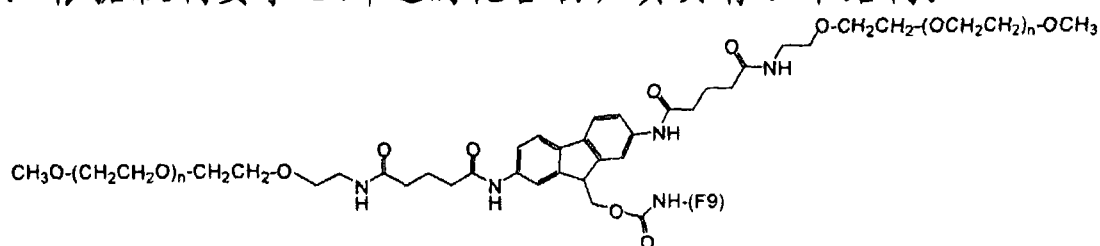
其中，对于每个结构和在每个实例中，(n)独立地为 4 至 1500 的整数，且 (F9) 为含胺的 IX 因子部分的残基。

7. 根据权利要求 1 所述的化合物，其具有以下结构：



其中，(F9) 为含胺的 IX 因子部分的残基并且在每个实例中，(n) 独立地为 4 至 1500。

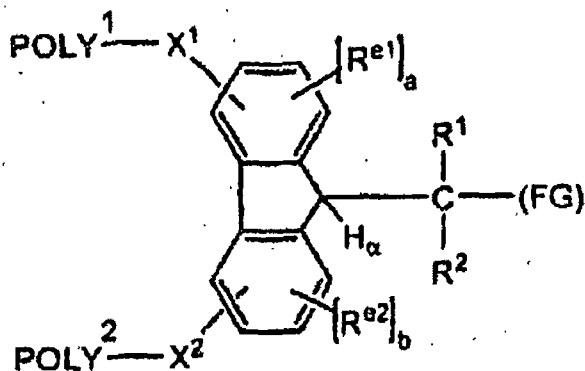
8. 根据权利要求 1 所述的化合物，其具有以下结构：



其中，(F9) 为含胺的 IX 因子部分的残基并且在每个实例中，(n) 独立地为 4 至 1500。

9. 根据权利要求 7 和权利要求 8 之一所述的化合物，其中所述 IX 因子部分为人重组 IX 因子。

10. 一种方法，其包括在适于形成聚合物试剂与生物活性剂之间的共价连接的条件使所述聚合物试剂与含胺的 IX 因子部分接触，其中所述聚合物试剂具有以下结构：



其中：

POLY¹ 为第一水溶性聚合物；

POLY² 为第二水溶性聚合物；

X¹ 为第一间隔基部分；

X² 为第二间隔基部分；

H_α 为可电离的氢原子；

R¹ 为 H 或有机基；

R² 为 H 或有机基；

(a) 为 0 或 1；

(b) 为 0 或 1；

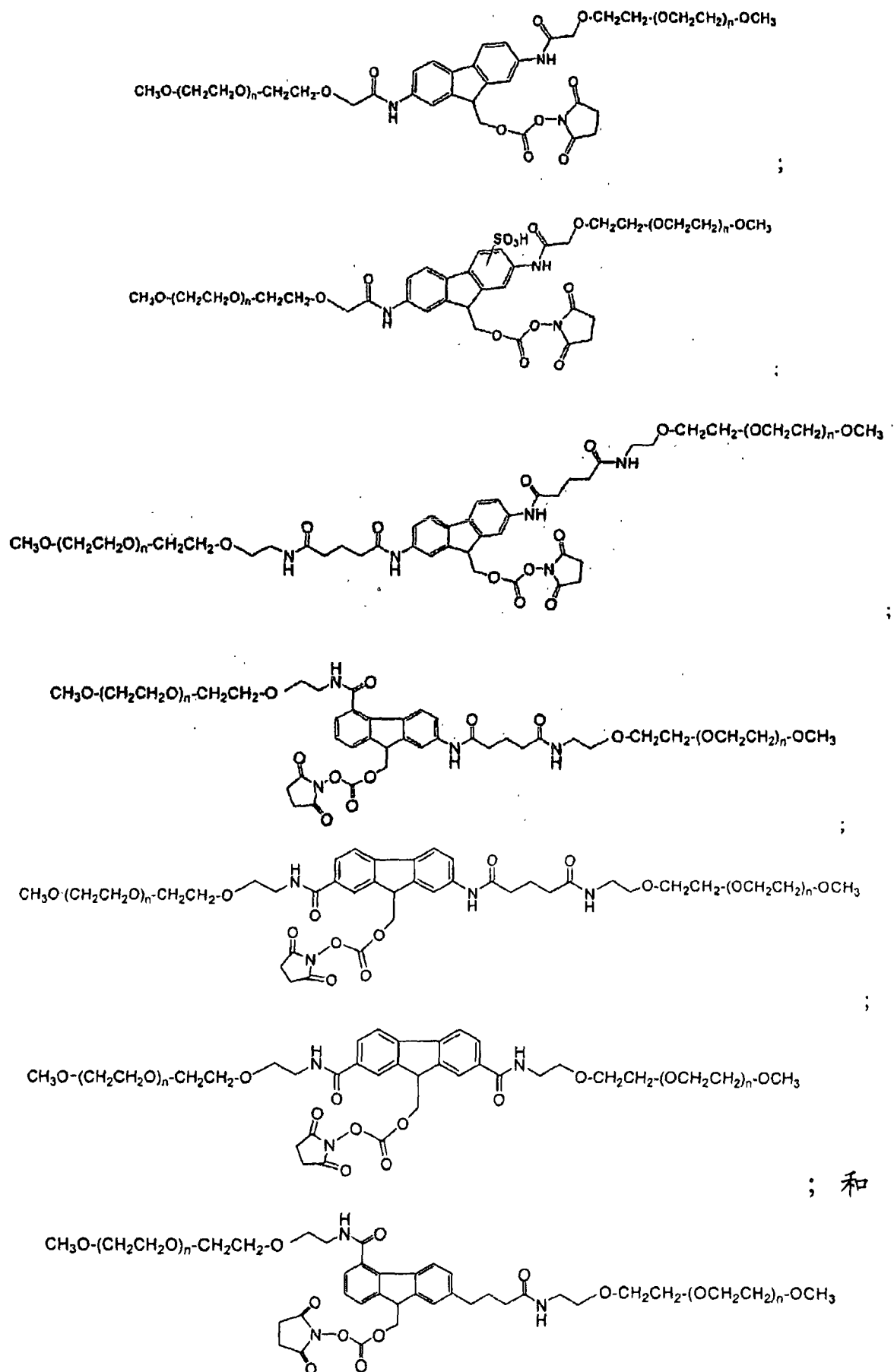
R^{e1} 当存在时，为第一电子改变基团；

R^{e2} 当存在时，为第二电子改变基团；且

(FG) 为能与活性剂的氨基反应以形成可释放的键合的官能团。

11. 根据权利要求 10 所述的方法，其中所述可释放的键合为氨基甲酸酯键合。

12. 根据权利要求 10 所述的方法，其中所述聚合物试剂具有选自以下组成的组的结构：



其中，对于每个结构和在每个实例中，(n)独立地为4至1500的整

数。

13. 根据权利要求 12 所述的方法，其中 IX 因子部分为人重组 IX 因子。

14. 一种组合物，其包括权利要求 1 至 9 中任一项所述的化合物和药学上可接受的赋形剂。

15. 一种方法，其包括施用权利要求14所述的组合物至患者。

具有可释放的键合的 IX 因子部分-聚合物轭合物

相关申请的交叉引用

本申请要求于 2006 年 12 月 27 日提交的序列号为 60/877,589 的美国临时专利申请的优先权的权益，所述临时专利申请其全部内容通过引用并入本文。

发明领域

本发明一般涉及具有可释放的键合(releasable linkage)以由此在体内释放活性剂的聚合物-活性剂轭合物。此外，除了其他事项之外，本发明涉及用于合成所述轭合物的方法、用于纯化所述轭合物的方法等。

发明背景

科学家和临床医师在尝试将活性剂开发成适于递送至患者的形式中面临着许多挑战。例如，为多肽的活性剂通常是经由注射、而不是口服递送的。这样，多肽在不暴露于胃的蛋白水解环境(proteolytic environment)的情况下被引入到体循环中。然而，多肽的注射具有若干缺点。例如，很多多肽具有相对短的半衰期，因此需要重复注射，这通常是不便的且痛苦的。而且，某些多肽可诱导一种或多种免疫应答，其结果为患者的免疫系统试图破坏或以其他方式中和免疫原性多肽。当然，一旦多肽被破坏或以其他方式被中和，则该多肽不能发挥其预期的药效活性。因此，诸如多肽的活性剂的递送通常是有问题的，即使是在这些剂通过注射施用。

在解决经由注射递送活性剂的问题中已经获得一些成功。例如，将活性剂与水溶性聚合物轭合已得到具有减少的免疫原性和抗原性的聚合物-活性剂轭合物。此外，由于通过肾的清除减少和/或体循环中

的酶促降解减少,这些聚合物-活性剂轭合物与它们未轭合的对应物相比,通常具有显著增加的半衰期。由于具有更长的半衰期,所以聚合物-活性剂轭合物需要更少频率的给药,这进而减少了疼痛注射和不便探访健康护理专业人员的总次数。而且,仅仅勉强可溶的活性剂证明了当与水溶性聚合物轭合时,水溶性显著增加。

由于其安全性已有文件证明以及其被 FDA 批准用于局部应用和内服应用,聚乙二醇已经与活性剂轭合。当活性剂与聚乙二醇或“PEG”的聚合物轭合时,轭合的活性剂照惯例称为“PEG 化的”。PEG 化的活性剂如 PEGASYS[®] PEG 化干扰素 α -2a (Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ)、PEG-INTRON[®] PEG 化干扰素 α -2b (Schering Corp., Kenilworth, NJ) 和 NEULASTA PEG-非格司亭 (Amgen Inc., Thousand Oaks, CA) 的商业成功证明了施用轭合形式的活性剂相比于未轭合的对应物,可具有显著的优势。小分子如二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (Zalipsky (1993) *Bioconjug. Chem.* 4(4): 296-299) 和 氟尿嘧啶 (Ouchi 等人 (1992) *Drug Des. Discov.* 9(1): 93-105) 也已被 PEG 化。Harris 等人已提供了 PEG 化对药物的作用的综述。Harris 等人 (2003) *Nat. Rev. Drug Discov.* 2(3): 214-221。

尽管有了这些成功,但是聚合物与活性剂轭合以得到商业上相关的药物通常具有挑战性。例如,轭合可使得聚合物在对于药理活性所必需的活性剂上的位点或此位点附近(例如在结合位点或在结合位点附近)被连接。由于,例如,聚合物所引入的立体效应,因此这些轭合物可能具有不能接受的低活性。当活性剂几乎没有或没有其他适于与聚合物连接的位点时,尝试补救具有不能接受的低活性的轭合物可能会失败。因此,已期望其他 PEG 化替代物。

一种用于解决这种问题或其他问题的所提议的方法为“可逆的 PEG 化”,其中天然活性剂(或与 PEG 化的活性剂相比具有增加的活性的部分)被释放。例如,可逆的 PEG 化已在癌症化学疗法的领域中公开了。参见 Greenwald (1997) *Exp. Opin. Ther. Patents* 7(6): 601-609。美国专利申请公布第 2005/0079155 号描述了使用可逆的键合的轭合

物。如在此公布中所描述的，可逆的键合可通过使用酶底物部分来实现。然而，已经指出，依赖于酶促活性的方法取决于酶的有效性。参见 Peleg-Schulman(2004) *J. Med. Chem.* 47: 4897-4904。以这些酶的量 and 活性为基础的患者差异性可在不同的群体中引入不一致的轭合物的性能。因此，已经将不依赖于降解的酶法的其他方法描述成是期望的。

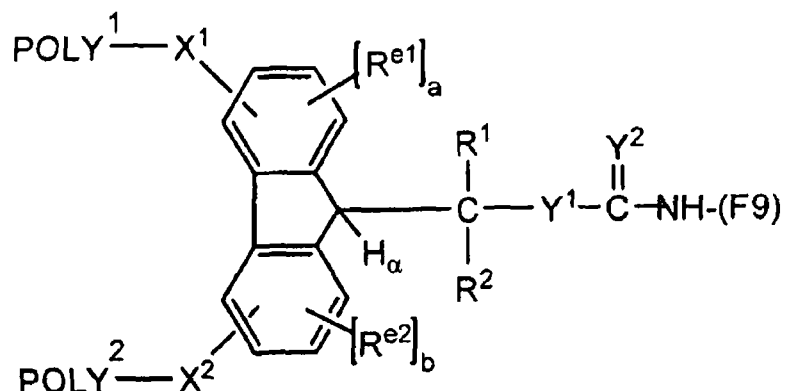
另一种用于可逆的 PEG 化的方法在美国专利第 7,060,259 号中描述，其描述了(除了其他事项之外)水溶性前药，在水溶性前药中生物活性剂通过可水解的氨基甲酸酯键连接到水溶性非免疫原性聚合物。如在其中所述，可通过不需添加酶或催化材料的氨基甲酸酯键的体内水解，容易地释放生物活性剂。

另一种用于可逆的 PEG 化的方法在 Peleg-Schulman(2004) *J. Med. Chem.* 47: 4897-4904、WO 2004/089280 和美国专利申请公布第 2006/0171920 号中描述。尽管这种方法已应用于有限数量的活性剂，但是这些参考文献忽视了可逆的 PEG 化将特别适用的其他活性剂。还有另一种可释放的方法在美国专利申请公布第 2006/0293499 号中描述。

在出血性病证的领域中，蛋白质(诸如，例如 IX 因子)有时可被施用至患者以解决(address)或者以其他方式改善出血性病证。由于 IX 因子和相关蛋白质的半衰期相对短，所以通过例如可逆的 PEG 化来增加这些蛋白质的体内半衰期将是有利的。因此，本发明试图解决本领域中的此需要及其他需要。

发明概述

在本发明的一个或多个实施方案中，提供了下式的轭合物：



其中：

POLY¹ 为第一水溶性聚合物；

POLY² 为第二水溶性聚合物；

X¹ 为第一间隔基部分；

X² 为第二间隔基部分；

H_α 为可电离的氢原子；

R¹ 为 H 或有机基；

R² 为 H 或有机基；

(a) 为 0 或 1；

(b) 为 0 或 1；

R^{e1} 当存在时，为第一电子改变基团 (electron altering group)；

R^{e2} 当存在时，为第二电子改变基团；且

Y¹ 为 0 或 S；

Y² 为 0 或 S；且

F9 为含胺的 IX 因子部分的残基。

在本发明的一个或多个实施方案中，提供了用于制备轭合物的方法。

在本发明的一个或多个实施方案中，提供了包括轭合物的药物制品。

在本发明的一个或多个实施方案中，提供了用于施用轭合物的方法。

附图简述

图 1 为本发明轭合物的时间-浓度曲线。关于此图的其他信息在实施例 3 中提供。

图 2 提供了本发明轭合物的凝血活性。关于此图的其他信息在实施例 4 中提供。

发明详述

在详细描述本发明之前，应理解的是，本发明不限于具体的聚合物、合成技术、活性剂及类似事项，因为这些可以变化。

必须注意的是，如在本说明书和权利要求书中所使用的，单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数对象，除非上下文中另有明确规定。因此，例如，对“聚合物”的提及包括单个聚合物以及两种或多种相同或不同的聚合物，对“轭合物”的提及是指单个轭合物以及两种或多种相同或不同的轭合物，对“赋形剂”的提及包括单个赋形剂以及两种或更多种相同或不同的赋形剂，以及类似情况。

在描述本发明和要求本发明的权利时，将根据下述的定义使用下列术语。

如本文所用的“PEG”、“聚乙二醇”和“聚(乙二醇)”意指涵盖任何水溶性聚氧化乙烯。通常地，根据本发明使用的 PEG 包括下列结构“ $-O(CH_2CH_2O)_m-$ ”，其中(m)为 2 至 4000。如本文所用的，PEG 还包括“ $-CH_2CH_2-O(CH_2CH_2O)_m-CH_2CH_2-$ ”和“ $-(CH_2CH_2O)_m-$ ”，取决于末端氧是否已被取代。当 PEG 进一步包括间隔基部分(将在下文更详细地描述)时，包括间隔基部分的原子在共价连接到水溶性聚合物片段时，不会导致氧-氧键的生成(即“ $-O-O-$ ”或过氧化物键合)。在整个说明书和权利要求书中，应记住的是，术语“PEG”包括含有各种端基或“封端”基团等的结构。术语“PEG”还表示包含大多数、也就是说超过 50%的 $-CH_2CH_2O-$ 单体亚单元的聚合物。对于特定形式，PEG 可采用许多分子量中的任何数量，以及采用各结构或几何形状如“支链的”、“直链的”、“叉状的”、“多官能的”及类似结构或几何形状，这将在下文更详细地描述。

术语“封端的”或“封末端的(terminally capped)”在本文可互换地用于意指具有封端部分的聚合物的末端或端点。尽管不是必需地,通常封端部分包括羟基或 C_{1-20} 烷氧基。因此,封端部分的实例包括烷氧基(例如,甲氧基、乙氧基和苄氧基)以及芳基、杂芳基、环(cyclo)、杂环及类似基团。此外,设想前述每一个的饱和的、不饱和的、取代的和未取代的形式。而且,封端基团还可以是硅烷。封端基团还可有利地包括可检测的标记。当聚合物具有包括可检测标记的封端基团时,聚合物和/或与所述聚合物偶联的感兴趣部分(例如活性剂)的量或位置可通过使用适当的检测器来确定。这些标记包括但不限于荧光剂、化学发光剂(chemiluminescer)、用于酶标记的部分、比色剂(colorimetric)(例如染料)、金属离子、放射性部分及类似标记。适合的检测器包括光度计、膜、分光计及类似检测器。

关于聚合物或水溶性聚合物的“非天然存在的”表示其整体未在自然界中发现的聚合物。然而,非天然存在的聚合物或水溶性聚合物可包含天然存在的一个或多个亚单元或亚单元的部分,只要总体聚合物结构未在自然界中发现。

术语“水溶性聚合物”为在室温可溶于水的任何聚合物。通常地,水溶性聚合物将透射过滤后由相同溶液透射的光的至少约 75%,更优选至少约 95%。在重量基础上,水溶性聚合物将优选为至少约 35%(按重量计)溶于水,更优选至少约 50%(按重量计)溶于水,还更优选约 70%(按重量计)溶于水,以及还更优选约 85%(按重量计)溶于水。然而,还更优选水溶性聚合物为约 95%(按重量计)溶于水,且最优选水溶性聚合物完全溶于水。

在本发明水溶性聚合物如 PEG 的情况下,分子量可表示为数均分子量或重均分子量。除非另有说明,本文中对分子量的所有提及是指重均分子量。两种分子量(数均和重均分子量)测定可使用凝胶渗透色谱法或其他液相色谱技术来测量。还可使用其他用于测量分子量值的方法,诸如使用端基分析或测量依数性(例如,冰点降低、沸点上升或渗透压)以测定数均分子量或使用光散射技术、超速离心或粘度测量法

以测定重均分子量。本发明聚合物通常为多分散的(即聚合物的数均分子量和重均分子量不相等),具有优选小于约 1.2、更优选小于约 1.15、还更优选小于约 1.10、甚至还更优选小于约 1.05、且最优选小于约 1.03 的低的多分散性值。

如本文所用,术语“羧酸”为具有 $\text{-}\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}\text{-OH}$ 官能团[也表示为“-COOH”或 -C(O)OH]的部分以及为羧酸衍生物的部分,这些衍生物包括例如被保护的羧酸。因此,除非上下文中另有明确规定,术语羧酸不仅包括酸式,而且还包括相应的酯和被保护的形式。关于适于羧酸和本文所述的任何其他官能团的保护基,请参考 Greene 等人,“PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (有机合成中的保护基)”第 3 版, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1999。

术语“反应性的”和“活化的”当与具体官能团结合使用时,是指容易与另一个分子上的亲电体或亲核体反应的反应性官能团。这与为了反应需要强催化剂或高度不切实际的反应条件的那些基团(即“非反应性的”或“惰性的”基团)形成对比。

术语“受保护的”、“保护基(protecting group)”和“保护基(protective group)”是指存在预防或阻断在某些反应条件下的分子中特定的化学反应性官能团的反应的部分(即保护基)。保护基将根据受保护的化学反应性官能团的类型以及将使用的反应条件和分子中另外的反应基或保护基(如果有的话)的存在而变化。本领域已知的保护基可在 Greene 等人(同上)中发现。

如本文所用,术语“官能团”或其任何同义词意指涵盖其受保护的形式。

术语“间隔基”或“间隔基部分”在本文用于意指在一个部分与另一个部分之间任选出现的原子或原子的集合。间隔基部分可以是水解稳定的或可包括一个或多个生理上可水解的或酶促可释放的键合(enzymatically releasable linkage)。

如本文所用的“有机基”包括,例如,烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基和取代的芳基。

“烷基”是指烃链，通常长度范围为约 1 至 20 个原子。这些烃链优选但并不必需为饱和的且可为支链或直链，尽管通常优选直链。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-甲基戊基及类似烷基。如本文所用，“烷基”包括“环烷基”（当涉及三个或更多个碳原子时）和低级烷基。

“低级烷基”是指含有 1 至 6 个碳原子的烷基，并且可为直链或支链，如甲基、乙基、正丁基、异丁基和叔丁基所例示的。

“环烷基”是指饱和的或不饱和的环状烃链，包括桥环、稠环或螺环化合物，优选由 3 至约 12 个碳原子、更优选 3 至约 8 个碳原子组成。

“无干扰取代基 (non-interfering substituent)”为当其存在于分子中时，通常与包含于分子中的其他官能团是非反应性的那些基团。

在例如“取代的烷基”中的术语“取代的”是指用一个或多个无干扰取代基取代一个或多个氢原子的部分(例如烷基)，所述无干扰取代基诸如但不限于： C_3-C_8 环烷基，例如环丙基、环丁基及类似环烷基；卤素，例如氟、氯、溴和碘；氰基；烷氧基，低级苯基；取代的苯基；及类似基团。“取代的芳基”为具有作为取代基的一个或多个无干扰基团的芳基。对于苯环上的取代，取代基可处于任何方向(即邻位、间位或对位)。“取代的铵”为具有作为取代基的一个或多个无干扰基团(例如有机基)的铵。

“烷氧基”是指-O-R 基团，其中 R 为烷基或取代的烷基，优选 C_1-C_{20} 烷基(例如甲氧基、乙氧基、丙氧基、苄基等)，更优选 C_1-C_7 烷基。

如本文所用，“烯基”是指长度为 2 至 15 个原子、含有至少一个双键的支链或无支链的烃基。示例性的烯基包括(不限于)乙烯基、正丙烯基、异丙烯基、正丁烯基、异丁烯基、辛烯基、癸烯基、十四烯基及类似烯基。

如本文所用的术语“炔基”是指长度为 2 至 15 个原子、含有至少一个三键的支链或无支链的烃基。示例性的炔基包括(不限于)乙炔基、

正丁炔基、异戊炔基、辛炔基、癸炔基等等。

“芳基”表示一个或多个芳族环，每个芳族环为5个或6个核碳原子。芳基包括多个芳环，其可为稠合的例如在萘基中，或可为非稠合的例如在联苯基中。芳环还可与一个或多个环状烃、杂芳基或杂环稠合或非稠合。如本文所用，“芳基”包括杂芳基。含芳族的部分(例如 Ar^1 、 Ar^2 等等)表示含芳基的结构。

“杂芳基”为含有1至4个杂原子(优选N、O或S或其组合)的芳基。杂芳环还可与一个或多个环状烃、杂环、芳基或杂芳环稠合。

“杂环”或“杂环的”表示5-12个原子、优选5-7个原子的一个或多个环，其具有或不具有不饱和性质或芳香性并且具有至少一个不是碳的环原子。优选的杂原子包括硫、氧和氮。

“取代的杂芳基”为具有作为取代基的一个或多个无干扰基团的杂芳基。

“取代的杂环”为具有由无干扰取代基形成的一个或多个侧链的杂环。

“亲电体”是指离子或原子或原子的集合，其可以为离子型的(ionic)，具有亲电子中心，即寻找电子的、能与亲核体反应的中心。

“亲核体”是指离子或原子或原子的集合，其可以为离子型的，具有亲核中心，即寻找亲电子中心或与亲电体反应的中心。

“生理上可裂解的”以及“可水解的”键为相对弱的键，其在生理条件下与水反应(即水解)。键在水中水解的趋势将不仅取决于连接两个中心原子的键合的一般类型，而且取决于与这些中心原子连接的取代基。示例性的可水解的键包括但不限于羧酸酯、磷酸酯、酸酐、缩醛、缩酮、酰氧基烷基醚、亚胺和原酸酯。

“可释放的键合”包括但不限于生理上可裂解的键、可水解的键和酶促可降解的键合。因此，“可释放的键合”为可在生理条件下经水解或经由某些其他机理(例如酶催化机理、酸催化机理、碱催化机理等等)裂解的键合。例如，“可释放的键合”可涉及具有碱性移去(base abstraction)质子(例如可电离的氢原子 H_a)作为驱动力的消除反应。

为了本文的目的，“可释放的键合”与“可降解的键合”同义。

“酶促可释放的键合”表示经受一种或多种酶的降解的键合。

“水解稳定的”键合或键是指化学键，通常为共价键，其在水中基本上是稳定的，也就是说，在延长的时段内在生理条件下没有经受水解至任何可察觉的程度。水解稳定的键合的实例包括但不限于下述：碳-碳键(例如于脂肪链中)、醚、酰胺及类似键合。一般地，水解稳定的键合是在生理条件下显示少于约 1-2%/天的水解速率的键合。代表性的化学键的水解速率可在大多数标准化学教科书中找到。必须指出的是，某些键合可以是水解稳定的或可水解的，这取决于(例如)接近的和邻近的原子和环境条件。本领域普通技术人员可通过例如将感兴趣的含键合分子置于感兴趣的条件下并测试水解的证据(例如由单个分子的裂解导致的两个分子的存在和量)，来确定在给定情况下给定的键合或键是否为水解稳定的或可水解的。还可使用本领域普通技术人员已知的用于确定给定的键合或键是否为水解稳定的或可水解的其他方法。

术语“活性剂”、“生物活性剂”和“药理活性剂”在本文可互换使用并且定义为包括提供某些通常有益的药理作用(可在体内或体外得以证实)的任何剂、药物、化合物、物质的组合或混合物。这包括食品增补剂、营养素、营养药、药物、蛋白质、疫苗、抗体、维生素和其他有益的剂。如本文所用，这些术语进一步包括在患者中产生局部或全身效应的任何生理上或药理上活性的物质。

“药学上可接受的赋形剂”或“药学上可接受的载体”是指可包含于本发明组合物中并且不会对患者产生明显不利的毒理作用的赋形剂。

“药理有效量”、“生理有效量”和“治疗有效量”在本文可互换地用于表示在血流中或靶组织中提供期望水平的活性剂和/或轭合物所需的、通常存在于药物制品中的聚合物-活性剂轭合物的量。精确量将取决于很多因素，例如具体活性剂、药物制品的组分和物理特性、预期的患者种群、患者顾虑及类似因素，并且可根据本文提供的且在

有关文献中可获得的信息由本领域普通技术人员容易地确定。

在聚合物的情况下，“多官能的”表示具有包含在其中的3个或更多个官能团的聚合物，其中所述官能团可以是相同的或不同的。多官能的聚合物将通常包含约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至10个官能团、或者在聚合物中将包含3、4、5、6、7、8、9或10个官能团。“双官能的”聚合物表示具有包含在其中的两个官能团的聚合物，所述官能团为相同的(即同基双功能的)或不同的(即异基双功能的)。

关于聚合物的几何形状或总体结构的“支链”是指含有2个或更多个聚合物“臂”的聚合物。支链聚合物可具有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。多支链聚合物的一种具体类型为树枝状聚合物或树枝状大分子，为了本发明的目的，其被认为具有不同于支链聚合物结构的结构。

“树枝状大分子”或树枝状聚合物为球状、尺寸单分散的聚合物，其中所有键以规则的支链模式且以重复单元(每个重复单元贡献分支点)放射状地从中心焦点或核引出。树枝状大分子显示了某些树枝状状态性质如核包封，使它们较之于其他类型的聚合物是独特的。

本文所述的碱性或酸性反应物包括其中性的、荷电的及任何相应的盐形式。

术语“患者”是指遭受或易受可通过施用本文所提供的轭合物而预防或治疗的病状的活生物体，且包括人和动物两者。

如本文所用，“药物释放速率”表示其中系统中聚合物-活性剂轭合物的总量的一半将裂解成活性剂和聚合物残基的速率(表述为半衰期)。

“任选的”和“任选地”表示随后所描述的情况可以发生或可以不发生，以使描述包括了情况发生的实例和情况不发生的实例。

如本文所用，当卤素与分子连接时，一般使用“halo(卤素)”指示符(例如氟、氯、碘、溴等等)，而当卤素以其独立的离子形式存在时(例如，诸如当离去基团离开分子时)，使用后缀“ide(化物)”

(例如氟化物、氯化物、碘化物、溴化物等等)。

如本文所用，术语“IX 因子部分”是指具有 IX 因子活性的部分。IX 因子部分还将至少具有适于与聚合物试剂反应的胺基。尽管不是必需的，通常所述 IX 因子部分为蛋白质。此外，术语“IX 因子部分”涵盖结合前的 IX 因子部分以及结合后的 IX 因子部分残基。如将在下文进一步详细解释的，本领域普通技术人员可确定任何给定的部分是否具有 IX 因子活性。如本文所用，术语“IX 因子部分”包括有意修饰的（例如通过定向诱变）或通过突变意外修饰的蛋白质。术语“IX 因子部分”还包括具有 1 至 6 个额外的糖基化位点的衍生物、在蛋白质的羧基末端具有至少一个额外的氨基酸的衍生物（其中额外的氨基酸包括至少一个糖基化位点）和具有包括至少一个糖基化位点的氨基酸序列的衍生物。

在本讨论的情况下，应认识到，对于一种结构或结构式所提供的变量的定义可适用于在不同结构中重复的相同变量，除非上下文中另有规定。

如前文所述，本发明包括（除了其他事项之外）具有可释放的键合的羧合物。

在描述本发明的示例性羧合物之前，将讨论水溶性聚合物和能与活性剂的氨基反应以形成可释放的键合如氨基甲酸酯键合的官能团的实施方案。

关于给定的水溶性聚合物，每种水溶性聚合物（例如 POLY、POLY¹ 和 POLY²）可包括任何聚合物，只要聚合物为水溶性的且为非肽的。尽管优选聚（乙二醇），本文所用的水溶性聚合物可以是例如其他水溶性聚合物，诸如其他聚亚烷基二醇[也称为“聚氧化烯烃”]、诸如聚丙二醇（“PPG”）、乙二醇和丙二醇的共聚物及类似物、聚烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚羟烷基甲基丙烯酰胺、聚羟烷基甲基丙烯酸酯、多糖、聚（ α -羟基酸）、聚乙烯醇、聚磷嗪、聚噁唑啉、聚（N-丙烯酰吗啉），诸如在美国专利第 5,629,384 号中描述的。水溶性聚合物可以是前述中任一种的均聚物、共聚物、三元共聚物、非无规嵌段聚合物和无规

嵌段聚合物。此外，水溶性聚合物可为直链的，但还可为如将在下文进一步详细描述的其他形式(例如支链的、叉状的及类似形式)。在存在于总体结构内的情况下，水溶性聚合物具有1至约300个末端。

在聚合物试剂包括两个或更多个水溶性聚合物的实例中，总体结构中的每个水溶性聚合物可以是相同的或不同的。然而，优选的是，总体结构中的所有水溶性聚合物具有相同的类型。例如，优选的是，在给定结构内的所有水溶性聚合物为聚(乙二醇)聚合物。

尽管任何单个水溶性聚合物的重均分子量可变化，但是任何给定的水溶性聚合物的重均分子量通常在下述范围内：100道尔顿至约150,000道尔顿。然而，示例性的范围包括下述范围内的重均分子量：约880道尔顿至约5,000道尔顿的范围内；大于5,000道尔顿至约100,000道尔顿的范围内；约6,000道尔顿至约90,000道尔顿的范围内；约10,000道尔顿至约85,000道尔顿的范围内；大于10,000道尔顿至约85,000道尔顿的范围内；约20,000道尔顿至约85,000道尔顿的范围内；约53,000道尔顿至约85,000道尔顿的范围内；约25,000道尔顿至约120,000道尔顿的范围内；约29,000道尔顿至约120,000道尔顿的范围内；约35,000道尔顿至约120,000道尔顿的范围内；约880道尔顿至约60,000道尔顿的范围内；约440道尔顿至约40,000道尔顿的范围内；约440道尔顿至约30,000道尔顿的范围内；和约40,000道尔顿至约120,000道尔顿的范围内。对于任何给定的水溶性聚合物，优选具有在这些范围的一个或多个中的分子量的PEG。

水溶性聚合物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440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1,500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4,500道尔顿、约5,000道尔顿、约5,500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 16,000 道尔顿、约 17,000 道尔顿、约 18,000 道尔顿、约 19,000 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。还可使用具有前述中任一个的总重均分子量的水溶性聚合物的支链形式(例如由两个 20,000 道尔顿的聚合物组成的支链的 40,000 道尔顿的水溶性聚合物)。

用于制备轭合物的聚合物试剂将包括至少一种水溶性聚合物,所述水溶性聚合物具有在适于由其所形成的轭合物的期望释放速率的范围内的总尺寸。例如,具有相对长释放速率(long release rate)的轭合物可由具有下述尺寸的聚合物试剂制备:适于(a)在从轭合物中释放活性剂之前,延长循环,和(b)一旦从轭合物中释放,就适度快速地体内清除从轭合物释出的物类(species)的尺寸。同样地,当轭合物具有相对快的释放速率时,那么聚合物试剂通常将具有较低的分子量。

当 PEG 用作聚合物试剂中的水溶性聚合物时,PEG 通常包括许多 $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ 单体[或 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 单体,取决于如何定义 PEG]。如在整个说明书中使用,重复单元的数量通过“ $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ ”中的下标“n”来识别。因此,(n)值通常落入下述范围中的一个或多个之内:2 至约 3400、约 4 至约 1500、约 100 至约 2300、约 100 至约 2270、约 136 至约 2050、约 225 至约 1930、约 450 至约 1930、约 1200 至约 1930、约 568 至约 2727、约 660 至约 2730、约 795 至约 2730、约 795 至约 2730、约 909 至约 2730 和约 1,200 至约 1,900。对于其中分子量已知的任何给定的聚合物,通过用聚合物的总重均分子量除以重复单体的分子量确定重复单元的数量(即“n”)是可能的。

每个水溶性聚合物通常是生物相容的且非免疫原性的。关于生物相容性,如果单独使用物质或与另一种物质(例如活性剂)一起使用此物质在活组织方面(例如施用至患者)相关的有益效果优于临床医师例

如医生所评价的任何有害作用，则此物质被认为是生物相容的。关于非免疫原性，如果单独使用物质或与另一种物质一起使用此物质在活组织方面不会产生免疫应答(例如生成抗体)或者如果产生免疫应答，认为这种应答不具有临床医师所评价的临床显著性或重要性，则此物质被认为是非免疫原性的。特别优选的是，本文所述的水溶性聚合物以及活性剂与聚合物的轭合物是生物相容的且非免疫原性的。

在有用的一种形式中，游离的或非结合的 PEG 为每个端部用羟基封端的直链聚合物：



其中 (m') 的范围通常为 0 至约 4,000，优选为约 20 至约 1,000。

上述聚合物， α -、 ω -二羟基聚(乙二醇)可用简略形式如 HO-PEG-OH 来表示，其中应理解的是，-PEG-符号可表示下述结构单元：



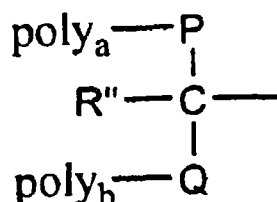
其中 (m') 如上所定义。

用于本发明的游离的或非结合的 PEG 的另一种类型为甲氧基-PEG-OH，或简称 mPEG，其中一个末端为相对惰性的甲氧基，而另一个末端为羟基。下面给出 mPEG 的结构。



其中 (m') 如上所述。

多臂或支链 PEG 分子，如在美国专利第 5,932,462 号中描述的那些分子，也可用作 PEG 聚合物。例如，PEG 可具有以下结构：



其中：

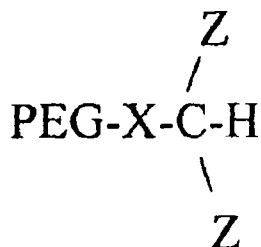
poly_a 和 poly_b 为 PEG 主链(相同的或不同的)，如甲氧基聚(乙二醇)；

R'' 为非反应性部分，如 H、甲基或 PEG 主链；且

P 和 Q 为非反应性键合。在一个优选的实施方案中，支链 PEG 聚

合物为甲氧基聚(乙二醇)二取代的赖氨酸。

此外, PEG 可包括叉状 PEG。游离的或非结合的叉状 PEG 的实例由下式表示:



其中: X 为间隔基部分, 并且每个 Z 为经由已定义长度的原子链与 CH 连接的活化端基。连接 Z 官能团与分支碳原子的原子链用作系链基团 (tethering group) 并且可包括, 例如, 烷基链、醚链、酯链、酰胺链及其组合。美国专利第 6,362,254 号公开了能在本发明中使用的各种叉状 PEG 结构。

PEG 聚合物可包括具有沿着 PEG 的长度而不是在 PEG 链的端部共价连接的反应基 (如羧基) 的侧链 (pendant) PEG 分子。侧链反应基可直接或通过间隔基部分如亚烷基与 PEG 连接。

除了上述形式的 PEG 之外, 聚合物试剂中的每个水溶性聚合物还可用聚合物 (包括上述聚合物中的任一个) 中的一个或多个弱键合或可释放的键合制备。例如, PEG 可用易遭受水解的聚合物中的酯键合制备。如下所示, 这种水解使得聚合物裂解成较低分子量的片段:



在聚合物主链内用作可降解的键合的其他可水解降解的键合包括碳酸酯键合; 例如由胺与醛的反应得到的亚胺键合 (参见, 例如 Ouchi 等人 (1997) *Polymer Preprints* 38 (1): 582-3); 例如由醇与磷酸基团 (phosphate group) 反应形成的磷酸酯键合; 通常由酰肼与醛的反应形成的腙键合; 通常由醛与醇之间的反应形成的缩醛键合; 例如由甲酸酯 (formate) 与醇之间反应形成的原酸酯键合; 由例如在聚合物如 PEG 的端部的胺基与另一个 PEG 链的羧基形成的酰胺键合; 由例如含有末端异氰酸酯基 (isocyanate group) 的 PEG 与 PEG 醇的反应形成的聚氨酯 (urethane) 键合; 由例如在聚合物如 PEG 的端部的胺基

与肽的羧基形成的肽键合；以及由例如在聚合物端部的亚磷酰胺基与寡核苷酸的 5' 羟基形成的寡核苷酸键合。

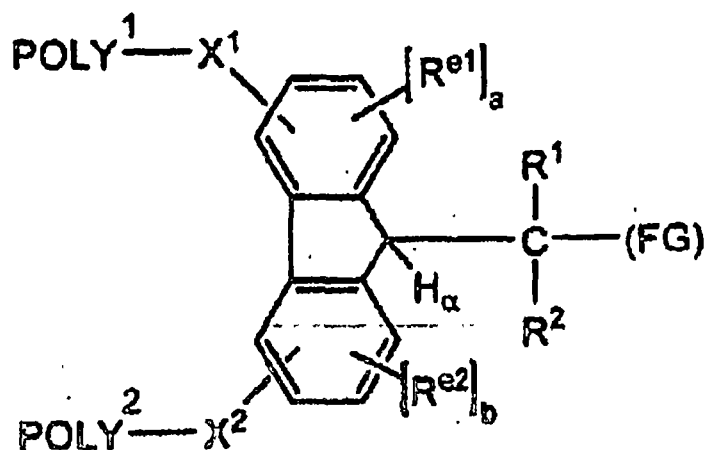
本领域普通技术人员应理解，术语聚(乙二醇)或 PEG 表示或包括所有上述形式的 PEG。

本领域普通技术人员将认识到，涉及基本上水溶性的聚合物的前述讨论决不是穷举的而仅仅是例证性的，并且涵盖具有上述性质的所有聚合物材料。如本文所用，术语“水溶性聚合物”既指分子也指已经与另一部分连接的水溶性聚合物的残基。水溶性聚合物的下列描述不仅可应用于聚合物试剂，而且可应用于使用所述聚合物试剂形成的相应的轭合物。

用于形成本文所述轭合物的聚合物试剂的官能团为能与活性剂的氨基反应以形成可释放的键合如氨基甲酸酯键合的官能团。本发明并不限于特定官能团，只要官能团能与活性剂的氨基反应以形成可释放的键合如氨基甲酸酯键合。能与活性剂的氨基反应的示例性官能团包括选自以下组成的组的那些官能团：活性碳酸酯如 N-琥珀酰亚胺基、1-苯并三唑基、咪唑、碳酸酯卤化物(如碳酸酯氯化物和碳酸酯溴化物)、苯酚盐(如对硝基苯酚盐)等。并且，作为特别的例子，如果具有转化成异氰酸酯或异硫氰酸酯基团的活性胺基的活性剂是可用的，那么聚合物试剂的官能团可以是羟基，因为这些组分的反应提供了可释放的氨基甲酸酯键合。

现将进一步详细地讨论示例性的聚合物试剂。必须记住的是，尽管在任何结构式或结构(不论对于聚合物试剂、轭合物或任何其他结构式或结构)中没有明确显示立体化学，但是所提供的结构式和结构涵盖两种对映体以及含有等量(即外消旋混合物)和不等量的每个对映体的混合物的组合物。

示例性的聚合物试剂具有以下结构：



其中：

POLY¹ 为第一水溶性聚合物；

POLY² 为第二水溶性聚合物；

X¹ 为第一间隔基部分；

X² 为第二间隔基部分；

H_α 为可电离的氢原子；

R¹ 为 H 或有机基；

R² 为 H 或有机基；

(a) 为 0 或 1；

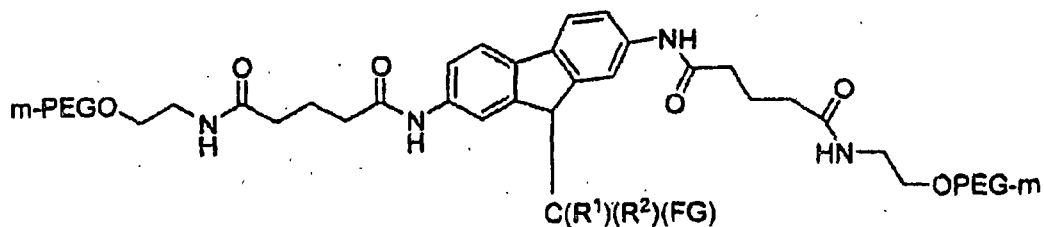
(b) 为 0 或 1；

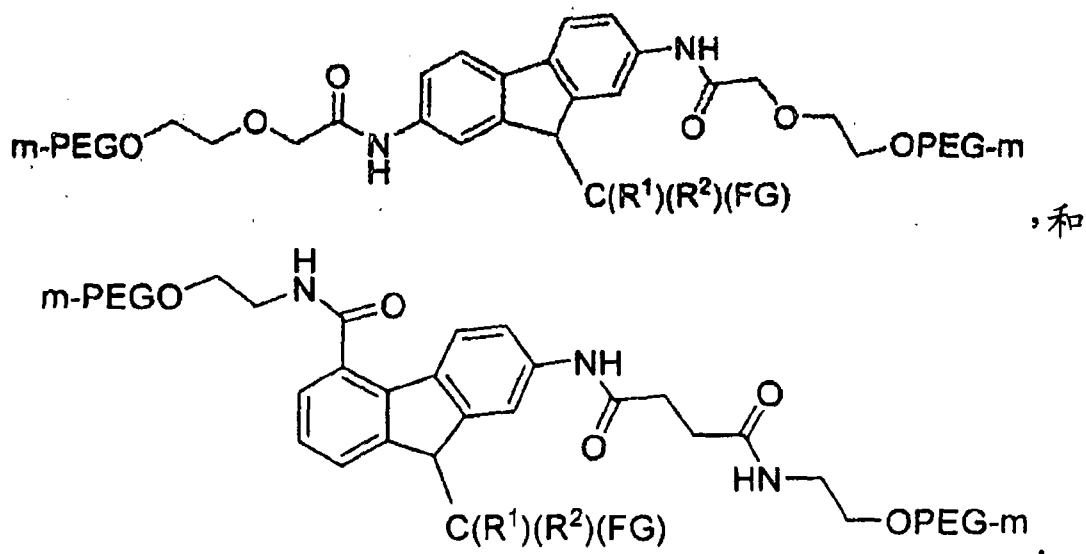
R^{e1} 当存在时，为第一电子改变基团；

R^{e2} 当存在时，为第二电子改变基团；且

(FG) 为能与活性剂的氨基反应以形成可释放的键合如氨基甲酸酯键合的官能团。

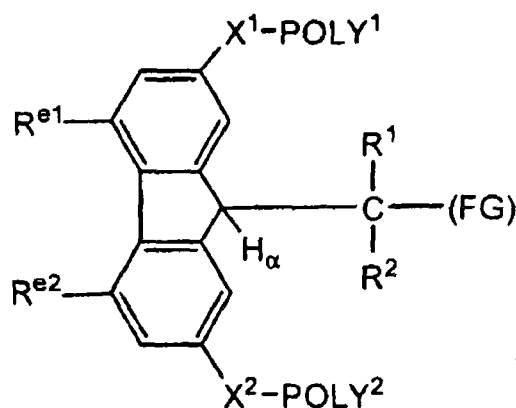
示例性的聚合物试剂包括在下式之内：





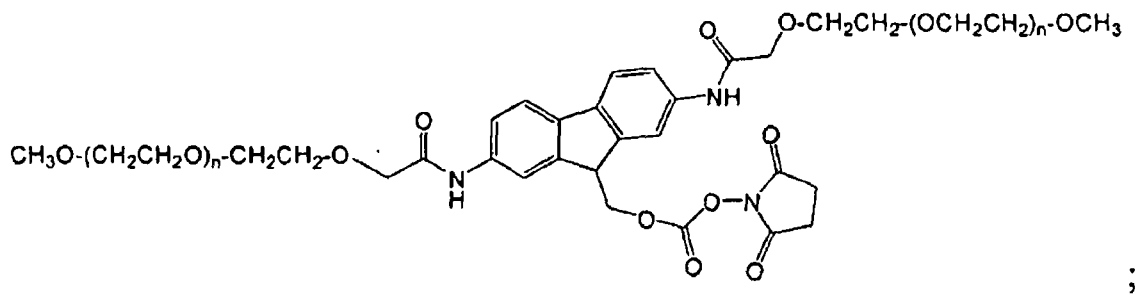
其中, 在每个实例中: (FG) 为能与活性剂的氨基反应以形成可释放的键合如氨基甲酸酯键合的官能团; R^1 为 H 或有机基; 且 R^2 为 H 或有机基。

还有其他的示例性聚合物试剂具有以下结构:

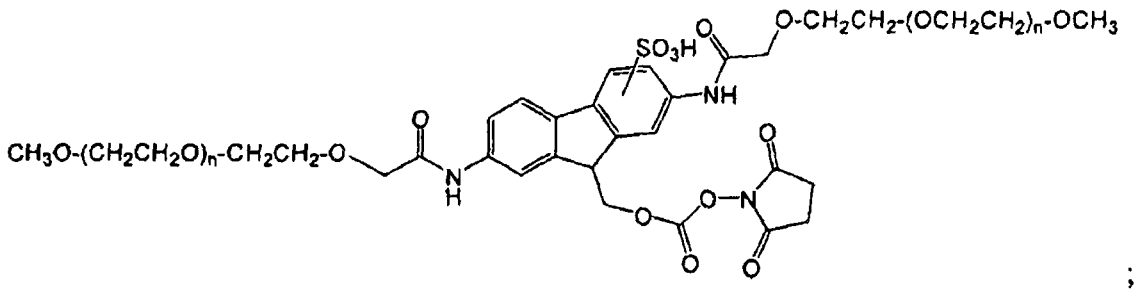


其中 $POLY^1$ 、 $POLY^2$ 、 X^1 、 X^2 、 R^1 、 R^2 、 H_α 和 (FG) 中的每一个如前述定义, 且 R^{e1} 为第一电子改变基团; 且 R^{e2} 为第二电子改变基团。

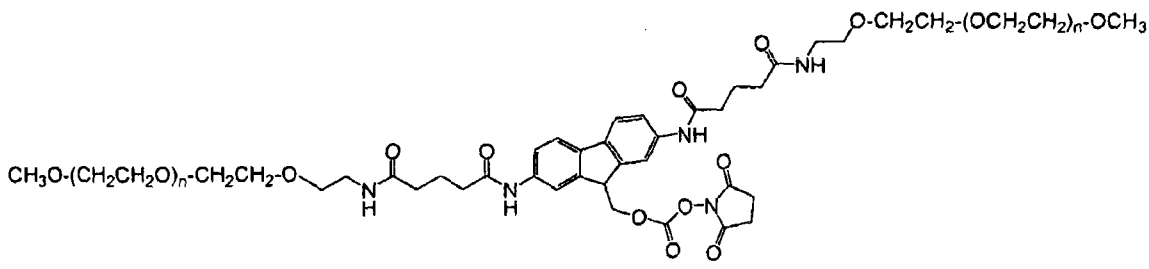
还有其他示例性的聚合物试剂包括在下述结构之内:



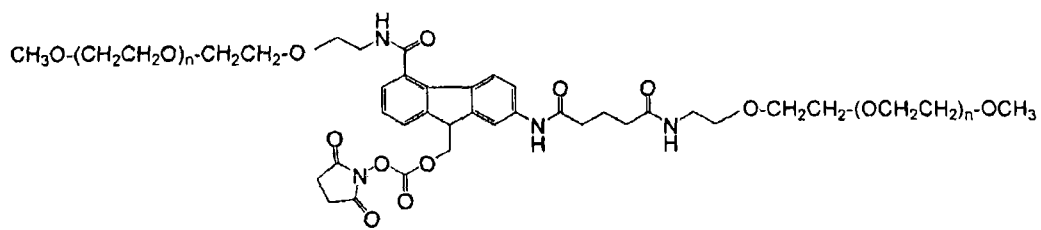
;



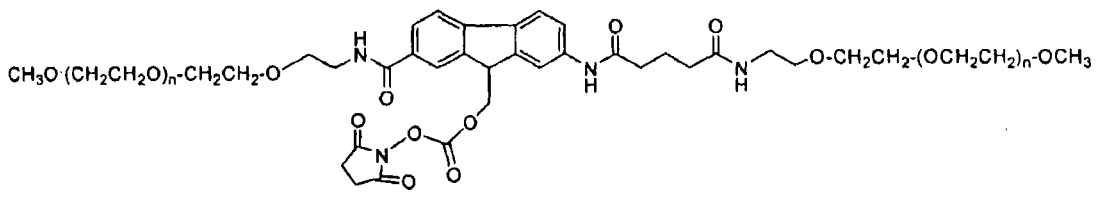
;



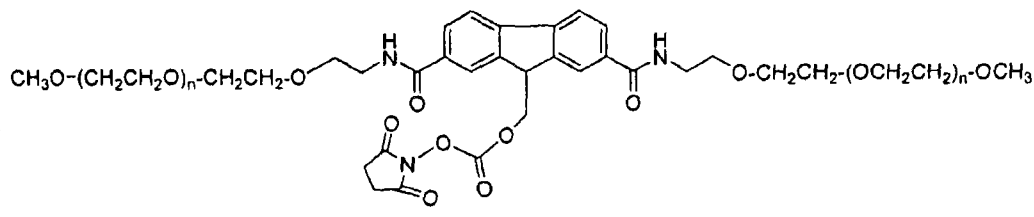
;



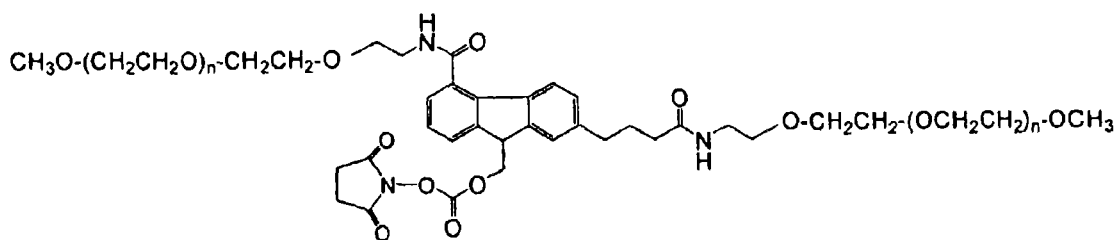
;



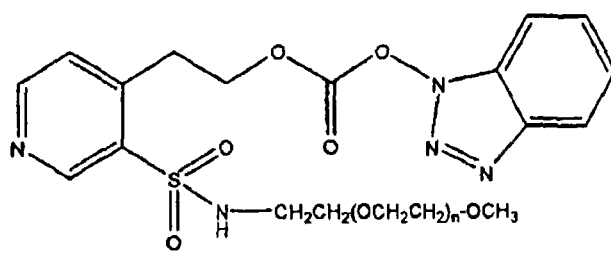
;



;



和

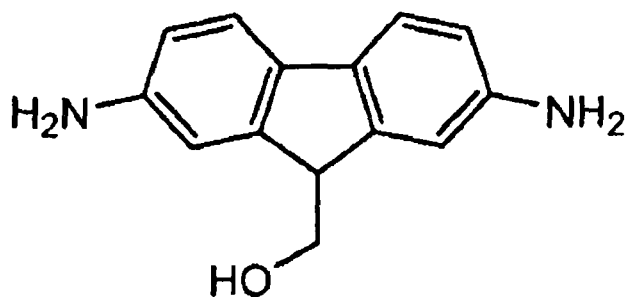


其中，对于每个结构和在每个实例中，(n)独立地为4至1500的整数。

聚合物试剂可以以许多方法来制备。因此，聚合物试剂的合成并不限于用于制备它们的特定技术或方法。

在用于制备在制备本文所述轭合物中有用的聚合物试剂的方法中，所述方法包括：(a) 提供了带有第一连接位点(attachment site)、第二连接位点和任选的第三连接位点的含芳族部分；(b) 使官能团试剂与第一连接位点反应以得到带有官能团的第一连接位点，所述官能团能与活性剂的氨基反应并得到可释放的键合，如氨基甲酸酯；和(c) 使带有反应基的水溶性聚合物与第二连接位点和任选的第三连接位点(当存在时)反应以得到：(i) 通过间隔基部分带有水溶性聚合物的第二连接位点，和(ii) 通过间隔基部分带有第二水溶性聚合物的任选的第三连接位点(当存在时)。在某些实例中，在步骤(c)之前进行(b)，而在其他的实例中，在步骤(b)之前进行(c)。

因此，在用于制备聚合物试剂的此方法中，所需步骤为(a) 提供带有第一连接位点、第二连接位点和任选的第三连接位点的含芳族部分。在合成制备的情况下，应理解的是，“提供”材料表示获得材料(通过例如合成它或商业上获得它)。为了说明的目的，示例性的含芳族部分为9-羟甲基-2,7-二氨基芴，如下所示。



此含芳族部分 9-羟甲基-2,7-二氨基茛为具有三个连接位点的含芳族部分的实例,所述三个连接位点为:在9位的羟基及在2位和7位中每一个的氨基。含芳族部分可以以碱或盐形式提供。对于9-羟甲基-2,7-二氨基茛,使用二盐酸化物形式是可能的。其他含芳族部分可通过合成制备和/或从商品供应商购买而提供。

已经提供了含芳族部分,此方法中的另一个步骤广泛地包括使带有反应基的水溶性聚合物与含芳族部分上的连接位点反应的步骤。在这里,可使用用于将水溶性聚合物连接至含芳族部分上的一个或多个连接位点的任何本领域已知的方案,并且此方法并不限于特定方案。例如,胺反应性的 PEG (诸如,例如在二环己基碳二亚胺 (DCC) 或二异丙基碳二亚胺 (DIC) 作为缩合剂和任选地在碱的存在下,由 N-羟基琥珀酰亚胺和 $\text{CH}_3\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{OCH}_2\text{CH}_2-\text{OCH}_2\text{COOH}$ 反应而形成的 N-琥珀酰亚胺酯封端的 mPEG) 可与带有含芳族部分如 9-羟甲基-2,7-二氨基茛的胺反应。

在某些实例中,带有反应基的水溶性聚合物与含芳族部分的反应将使得所有可能的连接位点具有与其连接的水溶性聚合物。在如此情况下,除去至少一个水溶性聚合物是必要的,以使连接位点可用于与官能团试剂反应。因此,例如,在前段中所论述的 N-琥珀酰亚胺酯封端的 mPEG 与 9-羟甲基-2,7-二氨基茛的反应得到混合物,所述混合物包括 (a) 带有两个水溶性聚合物的物类,其中在两个胺位点的每一个处有一个水溶性聚合物,和 (b) 带有三个水溶性聚合物的物类,其中在两个胺位点的每一个处有一个水溶性聚合物并且在羟基位点处有一个水溶性聚合物。在这里,通过使用尺寸排阻色谱法除去并收集较高分子量的物类是可能的。此外,将混合物处理至高 pH [例如用氢氧化

锂(LiOH)、氢氧化钠(NaOH)、氢氧化钾(KOH)处理混合物]、然后进行离子交换色谱法(IEC)是可能的。在任一种情况下,结果为主要包括带有两个水溶性聚合物(在两个胺位点的每一个处有一个水溶性聚合物)的9-羟甲基-2,7-二氨基芴的组合物。因而第三个羟基位点可用于与官能团试剂反应。

终步骤是使含芳族部分的反应活性部位与官能团试剂反应。优选的方法是将带有两个水溶性聚合物(在两个胺位点的每一个处有一个水溶性聚合物)的含羟基的9-羟甲基-2,7-二氨基芴与三光气反应,然后用N-羟基琥珀酰亚胺处理。以这种方式,在含羟基的反应活性部位上形成能与活性剂的氨基反应以形成可释放的键合如氨基甲酸酯键合(在此实例中,“活性碳酸酯”)的官能团。

不论使用何种方法,合成方法的步骤在适合的溶剂中发生。本领域普通技术人员可确定任何特定溶剂是否适于任何给定的反应。然而,通常地,所述溶剂优选为非极性溶剂或极性非质子溶剂。非极性溶剂的非限制性实例包括苯、二甲苯、二噁烷、四氢呋喃(THF)、叔丁醇和甲苯。特别优选的非极性溶剂包括甲苯、二甲苯、二噁烷、四氢呋喃和叔丁醇。示例性的极性非质子溶剂包括但不限于DMSO(二甲基亚砷)、HMPA(六甲基磷酰胺)、DMF(二甲基甲酰胺)、DMA(二甲基乙酰胺)、NMP(N-甲基吡咯烷酮(N-methylpyrrolidinone))。

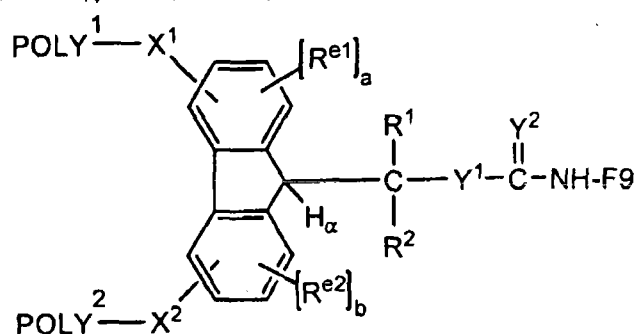
一旦制备好,就可分离聚合物试剂。可使用已知的方法来分离聚合物试剂,但是特别优选使用色谱法,例如尺寸排阻色谱法。可选择地或另外地,所述方法包括一旦形成聚合物试剂就将其纯化的步骤。此外,可使用标准的本领域已知的纯化方法来纯化聚合物试剂。

聚合物试剂对水分和氧是敏感的并且最好在惰性气氛下诸如在氩气下或在氮气下和在低温下贮存。以这种方式,减少或完全避免与例如大气氧相关的潜在降解过程。在某些情况下,为了避免氧化降解,在贮存前可将抗氧化剂如丁羟甲苯(BHT)加入到聚合物试剂。此外,优选将与贮存条件相关的水分量降至最低以减少与水相关的潜在的损害反应,例如活性酯的水解。而且,优选将贮存条件保持黑暗以便避免

涉及光的某些降解过程。因此，优选的贮存条件包括以下的一种或多种：在干燥氩气或另一种干燥惰性气体下贮存；在低于约 -15°C 的温度下贮存；在没有光下贮存；以及与适合量(例如约 50 至约 500 ppm)的抗氧化剂如 BHT 一起贮存。

上述聚合物试剂用于与生物活性剂轭合。例如，活性剂上的氨基(例如伯胺)将与官能团反应，所述官能团能与活性剂的氨基反应以形成可释放的如氨基甲酸酯键合。

示例性的轭合物具有以下结构：



其中：

POLY¹ 为第一水溶性聚合物；

POLY² 为第二水溶性聚合物；

X¹ 为第一间隔基部分；

X² 为第二间隔基部分；

H_α 为可电离的氢原子；

R¹ 为 H 或有机基；

R² 为 H 或有机基；

(a) 为 0 或 1；

(b) 为 0 或 1；

R^{e1} 当存在时，为第一电子改变基团；

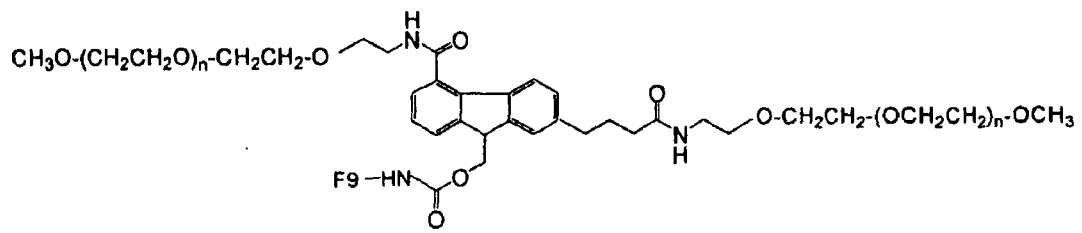
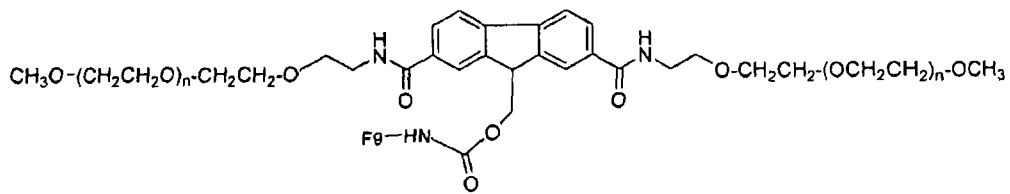
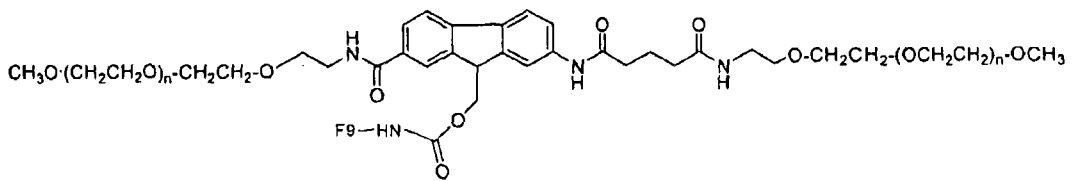
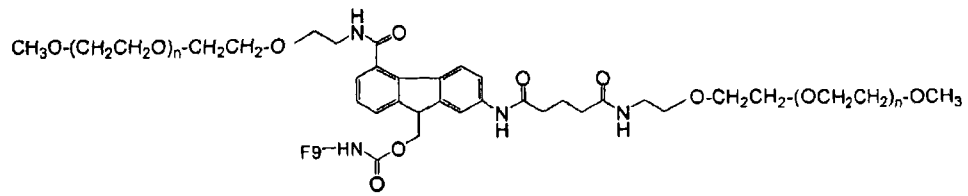
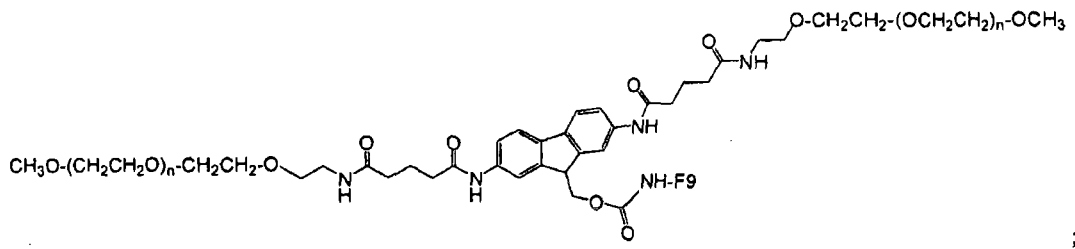
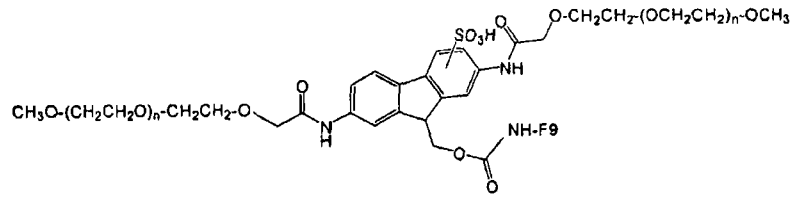
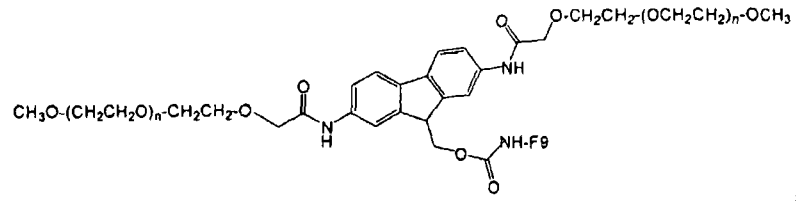
R^{e2} 当存在时，为第二电子改变基团；

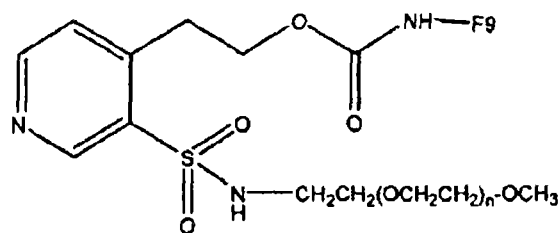
Y¹ 为 0 或 S；

Y² 为 0 或 S；且

F9 为含胺的 IX 因子部分的残基。

示例性的轭合物包括下式的那些：





其中，对于每个结构并且在每个实例中，(n)独立地为 4 至 1500 的整数，且 F9 为含胺的 IX 因子部分的残基。

可与本文所述聚合物试剂耦联的生物活性剂为含胺的生物活性剂。通常地，所述生物活性剂将为分子量大于约 3,500 道尔顿的大分子，如多肽。药理上活性的多肽表示优选的生物活性剂类型。应理解的是，为了本讨论的目的，术语“多肽”对于寡肽和蛋白质为通用的。对于多肽，与聚合物试剂偶联的胺可在多肽中氨基酸(如赖氨酸)的 N-末端或含胺侧链上。

本发明还提供了制备耦合物的方法，其包括在适于形成聚合物与生物活性剂之间的共价连接的条件下，使聚合物试剂与生物活性剂接触的步骤。通常地，以等摩尔量(就期望的适于与反应基反应的基因数而言)或以摩尔过量将聚合物加入到活性剂或表面。例如，可以约 1:1(聚合物试剂:活性剂)、1.5:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、8:1 或 10:1 的摩尔比将聚合物试剂加入到靶活性剂(target active agent)。允许耦合反应进行直到基本上没有进一步的耦合发生，这通常可通过监测随时间变化的反应进程来确定。可通过在不同的时间点从反应混合物中取出等分试样并用 SDS-PAGE 或 MALDI-TOF 质谱法或任何其他适合的分析方法分析反应混合物来监测反应进程。一旦关于所形成的耦合物的量或剩余的未耦合聚合物的量达到稳定水平，则假定反应完全。通常地，耦合反应花费大约数分钟至数小时(例如 5 分钟至 24 小时或更长)。优选但不是必需的，将所得的产物混合物纯化以分离出过量试剂、未耦合反应物(例如活性剂)、不希望的多耦合物类、和游离的或未反应的聚合物。然后可使用分析方法如 MALDI、毛细管电泳、凝胶电泳和/或色谱法进一步表征所得的耦合物。

关于聚合物-活性剂耦合物，可将耦合物纯化以获得/分离不同的

羧合物类。可选择地，且更优选地，对于较低分子量(例如小于约 20 千道尔顿，更优选小于约 10 千道尔顿)的聚合物来说，可将产物混合物纯化以获得每活性剂水溶性聚合物片段的分布。例如，可将产物混合物纯化以获得每活性剂(例如多肽)大约一个至五个 PEG 的平均值。最终羧合反应混合物的纯化策略将取决于许多因素，包括例如所用聚合物的分子量、具体活性剂、期望的给药方案和个别羧合物的剩余活度以及体内性质。

如果需要，可使用凝胶过滤色谱法分离具有不同分子量的羧合物。也就是说，使用凝胶过滤色谱法来以它们不同的分子量(其中该差异基本上对应于水溶性聚合物片段的平均分子量)为基础将不同数目的聚合物:活性剂的比率(例如，1-mer、2-mer、3-mer 等等，其中“1-mer”表示 1 个聚合物:活性剂，“2-mer”表示 2 个聚合物:活性剂等等)进行分级。例如，在一个示例性反应中，该反应中 100 kDa 蛋白质与具有约 20 kDa 分子量的聚合物试剂随机羧合，所得的反应混合物将可能包含未改性的蛋白质(分子量 100 kDa)、单-PEG 化的蛋白质(分子量 120 kDa)、双-PEG 化的蛋白质(分子量 140 kDa)等等。尽管这种方法可用来分离 PEG 和具有不同分子量的其他聚合物羧合物，但是这种方法通常对于分离在蛋白质中具有不同聚合物连接位点的位置异构体是无效的。例如，可使用凝胶过滤色谱法来从 PEG 1-mer、2-mer、3-mer 等的彼此混合物中进行分离，尽管每个已回收的 PEG-mer 组合物可包含与活性剂中的不同反应性氨基(例如赖氨酸残基)连接的 PEG。

适于进行此类分离的凝胶过滤柱包括可从 Amersham Biosciences (Piscataway, NJ)获得的 Superdex 和 Sephadex 柱。具体柱的选择将取决于所期望的分级范围。通常使用适合的缓冲液如磷酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液或类似缓冲液进行洗脱。所收集的部分可通过许多不同的方法来分析，所述方法例如(i)用于蛋白质含量的在 280 nm 下的光密度(OD)、(ii)牛血清白蛋白(BSA)蛋白质分析、(iii)用于 PEG 含量的碘试验[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)，然后用碘化钡染色。

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) 的反相色谱法或通过使用离子交换柱例如可从 Amersham Biosciences 获得的 Sepharose 离子交换柱的离子交换色谱法来进行。任一种方法可用于分离具有相同分子量的聚合物-活性剂异构体 (位置异构体)。

关于 IX 因子部分, 用于本发明的 IX 因子部分包括具有与天然的人 IX 因子相同的活性 (尽管并不必需具有相同的活度) 的任何蛋白质。

如前文所述, 术语 “IX 因子部分” 应包括在轭合前的 IX 因子部分和与水溶性聚合物连接后的 IX 因子部分。然而, 应理解的是, 当 IX 因子部分与非肽的水溶性聚合物连接时, 由于与聚合物的键合 (或与聚合物连接的间隔基部分) 相关联的一个或多个共价键的存在, IX 因子部分被略微改变。经常地, 与另一个分子连接的 IX 因子部分的此略微改变的形式称为 IX 因子部分的 “残基”。

IX 因子部分可由非重组方法或由重组方法得到并且本发明在这点上不受限制。此外, IX 因子部分可从人源或从动物源中得到。

IX 因子部分可非重组地得到。例如, IX 因子部分可从血源性来源 (blood-derived sources) 获得。特别地, IX 因子可使用本领域普通技术人员已知的沉淀和离心技术从人血浆中分离。参见, 例如 Wickerhauser (1976) *Transfusion* 16(4): 345-350 和 Slichter 等人 (1976) *Transfusion* 16(6): 616-626。IX 因子还可从人粒细胞中分离。参见 Szmitkoski 等人 (1977) *Haematologia (Budap.)* 11(1-2): 177-187。

IX 因子部分可由重组方法得到。例如, 已经将编码天然 IX 因子的 cDNA (其为 IX 因子部分) 分离、表征并克隆到表达载体中。参见, 例如 Choo 等人 (1982) “Molecular Cloning of the Gene for Human Anti-hemophilic Factor IX (人抗血友病 IX 因子的基因的分子克隆)”, *Nature*, Vol. 299: 178-180 和 Kurachi 等人 (1982) “Isolation and Characterization of a cDNA Coding for Human Factor IX (编码人 IX 因子的 cDNA 的分离和表征)” *Proc. Natl. Acad. Sci.*

U. S. A. , Vol. 79: 6461-65.

一旦被表达,天然 IX 因子就为约 55,000 道尔顿的单链糖蛋白。它在结构上可被认为具有四个结构域:富含 Glu 或 γ 羧基谷氨酸的结构域; EGF 样区; 激活肽; 和活性部位。

关于 IX 因子部分的部分,还可使用保持至少一些所期望的 IX 因子活度的前述中任一种的生物活性片段、缺失变体、置换变体或添加变体。

可有利地修饰活性剂来包括一种或多种氨基酸残基诸如,例如赖氨酸、半胱氨酸和/或精氨酸,以便提供聚合物与氨基酸侧链内原子的容易的连接。用于添加氨基酸残基的技术为本领域普通技术人员所公知。请参考 J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure* (高等有机化学: 反应机理和结构), 第 4 版 (New York: Wiley-Interscience, 1992)。

活性剂可从血源性来源获得。例如, VIII 因子可使用本领域普通技术人员已知的沉淀和离心技术从人血浆中分离。参见,例如 Wickerhauser (1976) *Transfusion* 16(4): 345-350 和 Slichter 等人 (1976) *Transfusion* 16(6): 616-626。VIII 因子还可从人粒细胞中分离。参见 Szmitkoski 等人 (1977) *Haematologia (Budap.)* 11(1-2): 177-187。

此外,活性剂还可由重组方法获得。简要地,重组方法涉及构建编码所期望的多肽或片段的核酸,将所述核酸克隆至表达载体,转化宿主细胞(例如细菌、酵母或哺乳动物细胞如中国仓鼠卵巢细胞或 BHK 细胞)和表达所述核酸以生成所期望的多肽或片段。用于在体外和在原核宿主细胞和真核宿主细胞中生成和表达重组多肽的方法为本领域普通技术人员已知的。参见,例如美国专利第 4,868,122 号。

只要适用,上文示例性的生物活性剂意指涵盖其类似物、激动剂、拮抗剂、抑制剂、异构体和药学上可接受的盐形式。关于肽和蛋白质,本发明旨在涵盖其合成的、重组的、天然的、糖基化的和非糖基化的形式以及生物活性片段。此外,术语“活性剂”旨在涵盖融合前的活

性剂和轭合后的活性剂“残基”。

对于任何给定的部分,确定所述部分是否具有 IX 因子活性是可能的。例如,已经有意地用血友病的基因突变繁殖某些动物系(animal line),以使由该系产生的动物具有非常低且不足的 IX 因子水平。这些系可从多种来源获得,所述来源诸如但不限于 the Division of Laboratories and Research, New York Department of Public Health (纽约公共卫生局实验室和研究部门), Albany, NY 和 the Department of Pathology, University of North Carolina (北卡罗来纳大学病理学系), Chapel Hill, NC。例如,这两个来源都提供了遭受犬血友病 B 的犬。为了测试正在讨论的任何给定部分的 IX 因子活性,将所述部分注射到患病动物中,制造小切口并与作为对照的受治疗的患病动物比较出血时间。用于确定 IX 因子活性的另一个方法是测定辅因子和促凝剂活性。参见,例如 Mertens 等人(1993) *Brit. J. Haematol.* 85:133-42。还可使用本领域普通技术人员已知的其他方法来确定给定部分是否具有 IX 因子活性。这些方法用于确定所提议的 IX 因子部分以及相应的聚合物-IX 因子部分轭合物两者的 IX 因子活性。

本发明还包括药物制品,其包括与药用赋形剂结合的本文所提供的轭合物。一般地,轭合物本身将为可与适合的药用赋形剂结合的固体形式(例如沉淀物),所述药用赋形剂可以是固体或液体形式。

示例性的赋形剂包括但不限于选自由以下组成的组的那些: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。

碳水化合物如糖、衍生糖(derivatized sugar)如糖醇、糖醛酸、酯化糖(esterified sugar)和/或糖聚合物可以作为赋形剂存在。特定的碳水化合物赋形剂包括,例如:单糖,诸如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖及类似单糖;二糖,诸如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖及类似二糖;多糖,诸如棉子糖、松三糖、麦芽糖糊精、葡聚糖、淀粉及类似多糖;和糖醇,诸如甘露醇、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、

肌醇及类似糖醇。

所述赋形剂还可包括无机盐或缓冲剂，诸如柠檬酸、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。

所述制品还可包括用于预防或阻止微生物生长的抗微生物剂。适于本发明的抗微生物剂的非限制性实例包括苯扎氯铵、苜蓿氯铵、苯甲醇、西吡氯铵、氯丁醇、苯酚、苯乙醇、硝酸苯汞、thimersol 及其组合。

抗氧化剂也可存在于制品中。抗氧化剂用于预防氧化，因而预防本制品的羧合物或其他组分的变质。用于本发明的适合的抗氧化剂包括，例如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基羟基茴香醚、丁羟甲苯、次磷酸、硫代甘油、没食子酸丙酯、亚硫酸氢钠、甲醛次硫酸氢钠、焦亚硫酸钠及其组合。

表面活性剂可作为赋形剂存在。示例性的表面活性剂包括：聚山梨醇酯如“吐温 20”和“吐温 80”，和普朗尼克(pluronic)如 F68 和 F88(这两种均可得自 BASF, Mount Olive, New Jersey); 脱水山梨糖醇酯；脂质，诸如磷脂如卵磷脂和其他磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺(尽管优选不以脂质体形式存在)、脂肪酸和脂肪酸酯；类固醇，诸如胆固醇；和螯合剂，诸如 EDTA、锌和其他像这样的适合的阳离子。

酸或碱可作为赋形剂存在于制品中。可用的酸的非限制性实例包括选自由以下组成的组的那些酸：盐酸、醋酸、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。适合的碱的实例包括但不限于选自由以下组成的组的碱：氢氧化钠、醋酸钠、氢氧化铵、氢氧化钾、醋酸铵、醋酸钾、磷酸钠、磷酸钾、柠檬酸钠、甲酸钠、硫酸钠、硫酸钾、富马酸钾(potassium fumarate)及其组合。

所述药物制品包括所有制剂类型，特别是适于注射的那些制剂，例如，可重建的粉剂以及悬浮液和溶液。组合物中羧合物(即本文所述的活性剂和聚合物之间形成的羧合物)的量将根据许多因素而变化，但是最佳地将为在组合物贮存于单位剂量容器(例如小瓶)中时的治疗有

效剂量。此外，所述药物制品可保存于注射器中。可通过重复施用递增量的轭合物以便确定哪一种量产生临床上期望的终点，从而实验性地确定治疗有效剂量。

任何单个赋形剂在组合物中的量将根据赋形剂的活性和组合物的具体需要而变化。通常地，任何单个赋形剂的最佳量通过常规实验来确定，即通过制备含有变化量的赋形剂(范围从低到高)的组合物，检测稳定性和其他参数，然后确定获得最佳性能而没有显著副作用的范围来确定。

然而，一般地，赋形剂将以按赋形剂重量计约1%至约99%、优选按赋形剂重量计约5%-98%、更优选按赋形剂重量计约15-95%的量、最优选以按重量计少于30%的浓度存在于组合物中。

这些前述的药用赋形剂连同其他赋形剂在“Remington: The Science & Practice of Pharmacy (雷明顿: 药学的理论与实践)”，第19版, Williams & Williams (1995)、 “Physician's Desk Reference (医生案头参考)”，第52版, Medical Economics, Montvale, NJ (1998) 和 Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients (药用赋形剂手册)，第3版, American Pharmaceutical Association, Washington, D. C, 2000 中描述。

尽管不是必需的，本发明的药物制品通常经由注射施用，且因此在即将施用前一般为液体溶液或悬浮液。所述药物制品还可采用其他形式，诸如糖浆、乳膏、软膏、片剂、粉剂及类似形式。还包括其他施用方式，诸如肺、直肠、透皮、透粘膜、口服、鞘内、皮下、动脉内施用方式等。

如前所述，轭合物可通过静脉内注射、或次优选通过肌内注射或通过皮下注射而胃肠外施用。用于胃肠外施用的适合的制剂类型包括即用型注射溶液、用于在使用前与溶剂结合的干粉、即用型注射悬浮液、用于在使用前与媒介物结合的干不溶性组合物以及乳剂和用于在施用前稀释的液体浓缩物、及其他类型。

本发明还提供了向遭受病状的患者施用本文所提供的轭合物的方

法，所述病状对用辄合物治疗是有响应的。所述方法包括施用（一般经由注射）治疗有效量的辄合物（优选作为药物制品的一部分提供）。施用的方法可用于治疗任何病状，所述病状可通过施用具体辄合物来治疗或预防。本领域普通技术人员理解特定的辄合物可有效治疗哪种病状。待施用的实际剂量将根据受治疗者的年龄、体重和一般状况、以及所治疗病状的严重程度、健康护理专业人员的判断和所施用的辄合物而变化。治疗有效量为本领域技术人员所已知的，和/或在有关的参考文本或文献中描述。一般地，治疗有效量将为约 0.001 mg 至 100 mg 的范围，优选为 0.01 mg/天至 75 mg/天的剂量，且更优选为 0.10 mg/天至 50 mg/天的剂量。

任何给定的辄合物（再一次，优选作为药物制品的一部分提供）的单位剂量可以以多种给药方案来施用，所述给药方案取决于临床医师的判断、患者的需要等等。特定的给药方案将为本领域普通技术人员已知的或可使用常规方法实验性地确定。示例性的给药方案包括但不限于施用一天五次、一天四次、一天三次、每天两次、每天一次、每周三次、每周两次、每周一次、每月两次、每月一次及其任何组合。一旦已经达到临床终点，就停止组合物给药。

应理解的是，尽管已经结合本发明优选的特定实施方案描述了本发明，但是前文描述以及下文的实验旨在说明而不限制本发明的范围。在本发明范围内的其他方面、优势和变更对本发明所属领域的技术人员来说是明显的。

因此，本文所参考的所有文章、书籍、专利、专利公布和其他出版物的全部内容通过引用并入。

实验

除非另有说明，本发明的实施将使用本领域普通技术人员所理解的且在文献中被阐明的有机合成及类似方法的常规技术。在下述实施例中，已经努力确保关于所用的数（例如数量、温度等等）的准确性，但是应考虑到某些实验误差和偏差。除非另有说明，温度以摄氏度计，

压力为海平面大气压或接近海平面大气压。除非另有说明，所有试剂从商业上获得。所有产生的 NMR 得自 Bruker (Billerica, MA) 所制造的 300 或 400 MHz NMR 波谱仪。所有处理在玻璃或搪玻璃容器中进行并且避免与含金属容器或装置接触。

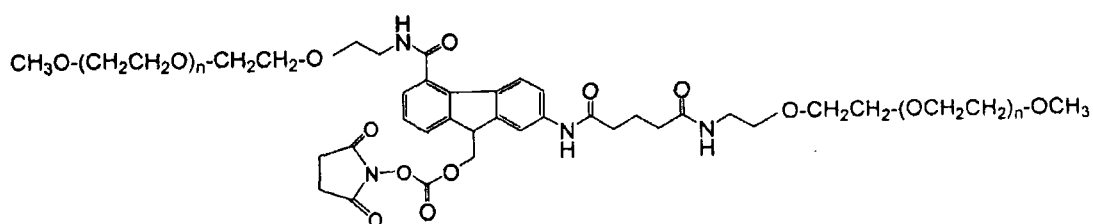
将使用下述缩写。

HPLC 高压液相色谱法

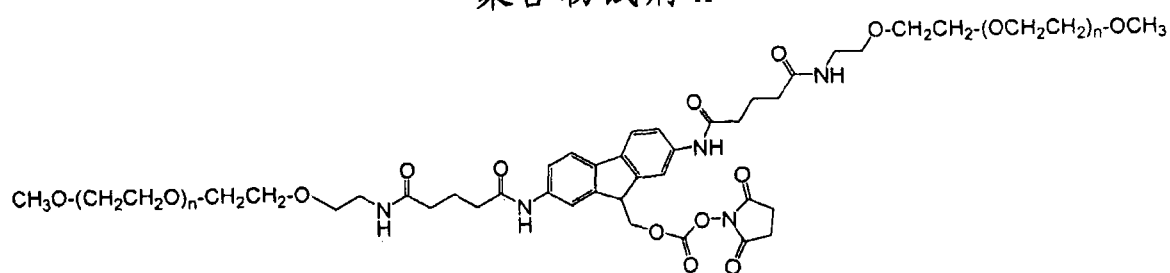
SDS-PAGE 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳

用于下述实施例的 IX 因子从以重组 IX 因子的 BENEFIX[®] 商标市售的商业上可得到的制品 (Wyeth, Madison NJ) 中分离。在降低的温度下贮存所分离的蛋白质溶液。

聚合物试剂根据在美国专利申请公布第 2006/0293499 号中描述的基本方法来制备，并具有以下结构：



“聚合物试剂 A”



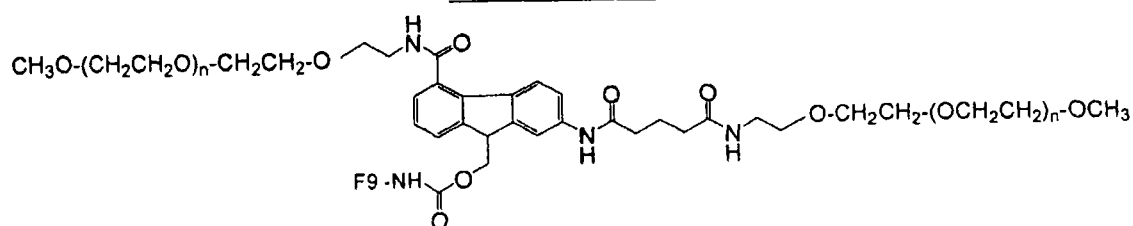
“聚合物试剂 B”

实施例 1

IX 因子轭合物的制备

(20,000 道尔顿的总聚合物重均分子量)

(“短释放”)



(其中 F9 为 IX 因子的残基)

从 4°C 贮存室取出一小瓶的 Benefix® IX 因子 (5.5 mg IX 因子, Wyeth) 并允许加热至室温。如包装插入物中所述, 将冻干的粉剂再悬浮 (每小瓶 10 mL 无菌水)。当在摇板上将 IX 因子溶液再溶解时, 从 -20 °C 贮存室取出聚合物试剂 A 并加热至室温。使用 GE 的 16/10 HiPrep DeSalt 柱将 Benefix® 再悬浮液体经缓冲液更换为 1 × PBS+1% 蔗糖+0.005% 吐温 20 pH 7.3 以除去制剂中的甘氨酸。收集蛋白质部分并汇合到用于聚合物试剂 A 反应的 50 mL 锥形管 (conical tube) 中。将新鲜溶解于 2 mM HCl 中的 9.34 过量摩尔比 (相对于 IX 因子) 的聚合物试剂 A 缓慢地用移液管移到 IX 因子溶液中, 聚合物试剂 A 具有约 40,000 道尔顿的总聚合物重均分子量 (即每个聚合物“臂”的重均分子量的总和)。将搅拌棒加入到反应体系, 且对于耦联过程低速搅拌溶液 3 小时。然后通过 1:100 地添加溶于水中的 1 M 甘氨酸来淬灭反应, 其允许于室温在振荡器上轻轻振荡另外 30 分钟。应认为, 添加甘氨酸应发生在 24 小时之内。通过 3:1 (体积) 地添加 20 mM Bis-Tris pH 7.5+1% 蔗糖+10 mM 组氨酸+0.005% 吐温 20 来稀释溶液。通过轻轻涡旋将溶液充分混合, 然后通过离子交换色谱法除去溶液中未结合的聚合物试剂 A。通过 NaCl 梯度洗脱耦联的 IX 因子。因而制得“短释放” IX 因子耦合物。

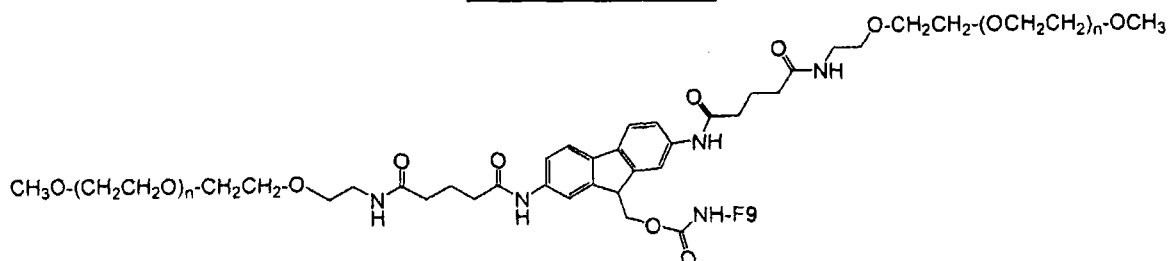
除了使用具有约 40,000 道尔顿的总聚合物重均分子量的聚合物试剂 A 和 640.64 mg 聚合物试剂, 重复基本操作。

实施例 2

IX 因子耦合物的制备

(20,000 道尔顿的总聚合物重均分子量)

(“长释放”)



(其中 F9 为 IX 因子的残基)

从 4℃ 贮存室取出一小瓶的 Benefix® IX 因子 (5.5 mg IX 因子, Wyeth) 并允许加热至室温。如包装插入物中所述, 将冻干的粉剂再悬浮 (每小瓶 10 mL 无菌水)。当在摇板上将 IX 因子溶液再溶解时, 从 -20℃ 贮存室取出聚合物试剂 B 并加热至室温。使用 GE 的 16/10 HiPrep DeSalt 柱将 Benefix® 再悬浮液体经缓冲液更换为 1 × PBS+1% 蔗糖 +0.005% 吐温 20 pH 7.3 以除去制剂中的甘氨酸。收集蛋白质部分并汇合到用于聚合物试剂 B 反应的 50 mL 锥形管中。将新鲜溶解于 2 mM HCl 中的 9.34 过量摩尔比 (相对于 IX 因子) 的聚合物试剂 B 缓慢地用移液管移到 IX 因子溶液中, 聚合物试剂 B 具有约 40,000 道尔顿的总聚合物重均分子量 (即每个聚合物 “臂” 的重均分子量的总和)。将搅拌棒加入到反应体系, 且对于耦联过程低速搅拌溶液 3 小时。然后通过 1:100 地添加溶于水中的 1 M 甘氨酸来淬灭反应, 其允许于室温在振荡器上轻轻振荡另外 30 分钟。应认为, 添加甘氨酸应发生在 24 小时之内。通过 3:1 (体积) 地添加 20 mM Bis-Tris pH 7.5+1% 蔗糖 +10 mM 组氨酸+0.005% 吐温 20 来稀释溶液。通过轻轻涡旋将溶液充分混合, 然后通过离子交换色谱法除去溶液中未结合的聚合物试剂 B。通过 NaCl 梯度洗脱耦联的 IX 因子。因而制得 “长释放” IX 因子耦合物。

除了使用具有约 40,000 道尔顿的总聚合物重均分子量的聚合物试剂 B 和 400.4 mg 聚合物试剂, 重复基本操作。

实施例 3

药动学

根据实施例 1 和 2 制备的耦合物 (每个具有 20,000 道尔顿的总聚合物重均分子量) 的药动学 (与作为对照的 IX 因子一起) 使用常规技术来确定。简要地, 使用雄性 SD 大鼠 (180-220 克; 6-7 周龄) 并给予一次 100 μL iv 注射。使用每组四只动物, 并在注射后不同时间点 (例如 0、1、2、3、6、12、24、36、48、72 小时) 收集血浆。

结果在下表 1 中提供, 其中 V 为分布容积, CL 为总血浆清除率,

AUC 为血浆浓度-时间曲线下面积，且 $T_{1/2\beta}$ 为末期消除相的半衰期。还做出了浓度-时间曲线，如图 1 所提供。

表 1
轭合物药动学数值

剂量 (ug/kg)	处理	V (mL/kg)	CL (mL/小时/kg)	AUC (ng/mL*小时/kg)	$T_{1/2\beta}$ (小时)
500	IX因子	183.9	59.3	8431.5	2.4
500	IX因子-"短释放"	76.7	11.8	42489.8	8.9
500	IX因子-"长释放"	44.2	2.9	170391.3	21.2
	比率				
	IX因子-"短释放"/IX因子	0.42	0.20	5.04	3.77
	IX因子-"长释放"/IX因子	0.24	0.05	20.21	8.98

实施例 4

凝血活性

根据实施例1和2制备的轭合物(每个具有20,000道尔顿的总聚合物重均分子量)的体外凝血活性(与作为对照的IX因子一起)使用常规技术来确定。结果在图2中提供。

IX因子复合物的药动学

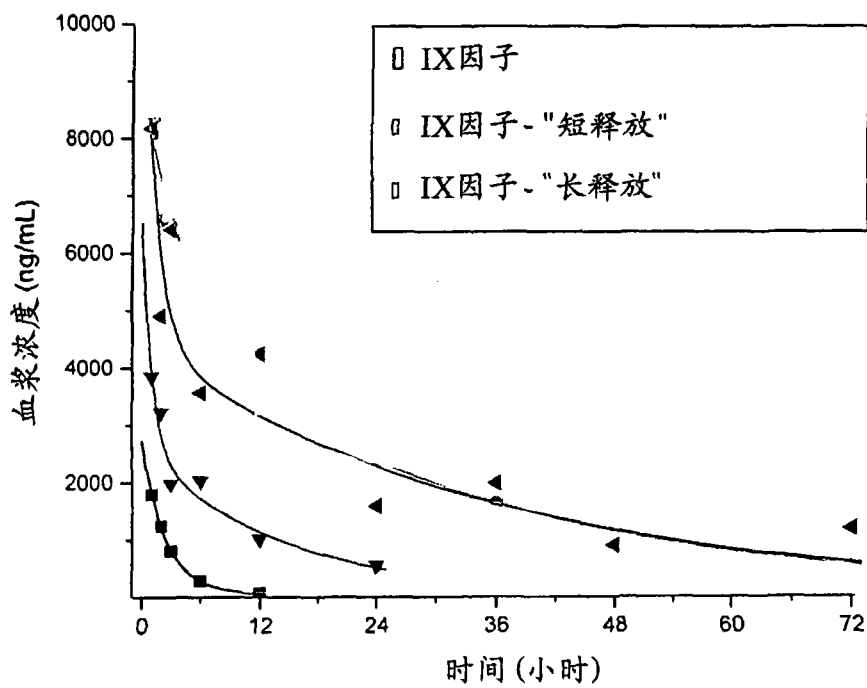


图1

体外凝血活性

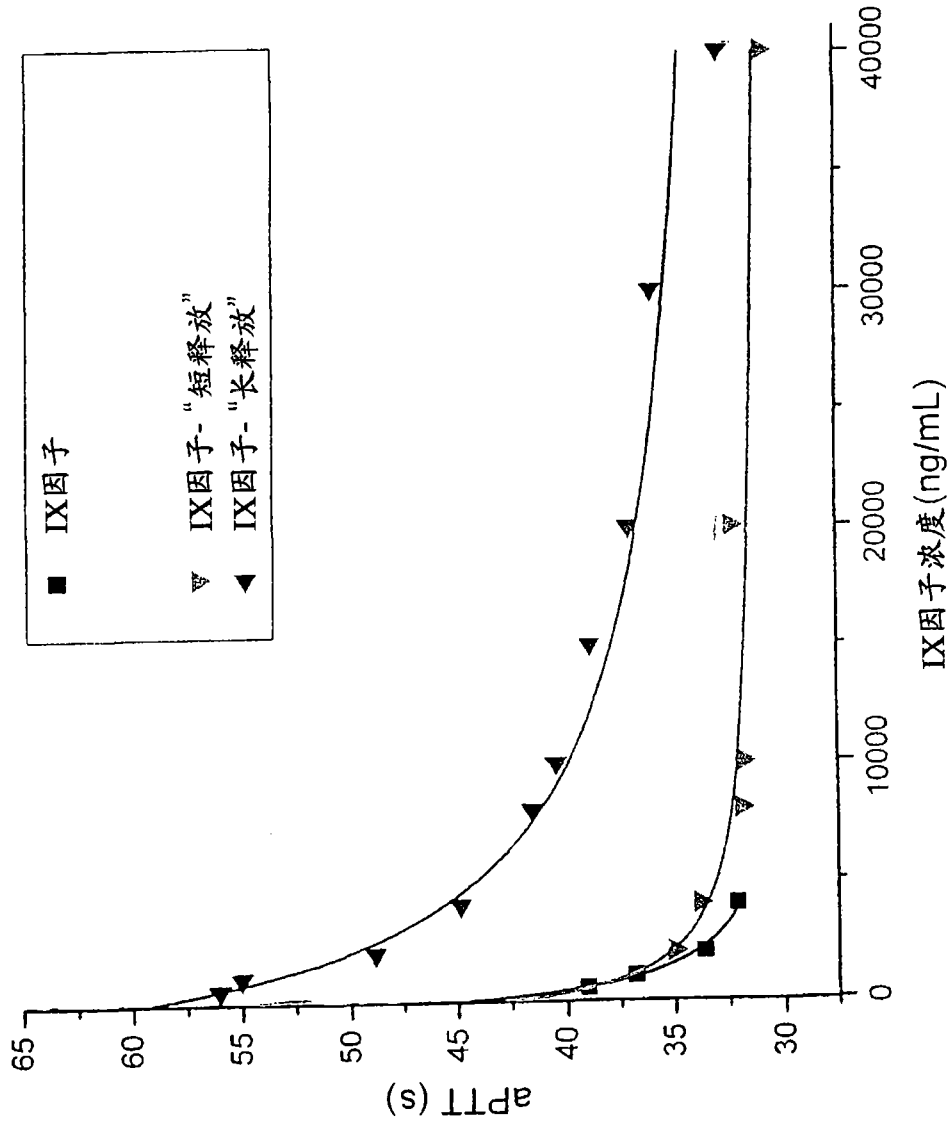


图2