

Даний винахід відноситься до областей хімії білків та фармацевтичних і медичних наук. Зокрема, даний винахід забезпечує способи отримання кон'югатів водорозчинних полімерів (наприклад, полі(етиленгліколю) та його похідних) і біологічно активних компонентів, причому ці кон'югати мають меншу антигенність та імуногенність порівняно із стандартними кон'югатами полімерів та біологічно активних компонентів. Даний винахід також забезпечує кон'югати, отримані в такі способи, композиції, які містять зазначені кон'югати, набори, які включають такі кон'югати і композиції, та способи використання кон'югатів і композицій у запобіганні, діагностиці та лікуванні різних медичних та ветеринарних станів.

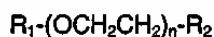
Двома основними факторами, що ускладнюють розробку і застосування рекомбінантних білків як терапевтичних засобів, є їх, як правило, короткий час напівжиття у кровообігу та їх потенційна антигенність та імуногенність. У галузі техніки взагалі і тут зокрема термін "антигенність" означає здатність молекули зв'язуватись з вже існуючими антитілами, а термін "імуногенність" - спроможність викликати імунну реакцію *in vivo*, незалежно від того, чи включає ця реакція утворення антитіл ("гуморальну реакцію"), чи стимулює клітинні імунні реакції. Для введення рекомбінантних терапевтичних білків часто бажаним є внутрішньовенне (i.v.) введення, оскільки воно забезпечує найвищу циркуляційну активність і мінімізує проблеми із біодоступністю та розкладанням. Проте, після i.v. введення час напівжиття дрібних білків, як правило, дуже нетривалий [див. приклади у Mordenti, J., та ін., (1991) *Pharm Res* 8:1351-1359; Kuwabara, T., та ін. (1995) *Pharm Res* 12:1466-1469]. Здорові нирки зазвичай залишають у кровообігу білки, гідродинамічні радіуси яких перевищують радіус сироваткового альбуміну, для якого радіус Стокса становить с 36 Å, а молекулярна маса - с 66000 Дальтон (66kDa). Проте, дрібніші білки, такі як гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор ("G-CSF") та рибонуклеаза, швидко виводяться з кровотоку в процесі клубочкової фільтрації [Brenner, B.M., та ін. (1978) *Am J Physiol* 254:F455-F460; Venkatachalam, M.A., та ін. (1978) *Circ Res* 43:337-347; Wilson, G., (1979) *J Gen Physiol* 74:495-509]. Внаслідок цього, підтримання терапевтично корисних концентрацій дрібних рекомбінантних білків у кровотоку після i.v. введення являє собою проблему. Отже, доводиться підвищувати концентрації таких білків та робити ін'єкції частіше. Високі дози збільшують вартість лікування, зменшують ймовірність виконання пацієнтом вимог та підвищують ризик негативних явищ, наприклад, імунних реакцій. Клітинні та гуморальні імунні реакції здатні зменшувати циркулюючі концентрації рекомбінантних білків, введених ін'єкцією, до рівня, що може унеможливити введення ефективної дози чи призвести до явищ, що обмежуватимуть лікування, таких як анафілаксія [Pui, C.-H., та ін. (2001) *J Clin Oncol* 19:697-704].

Інші шляхи введення, такі як підшкірні (s.c.) чи внутрішньом'язові (i.m.) ін'єкції, можуть подолати деякі з зазначених проблем, забезпечуючи більш поступове потрапляння рекомбінантних білків до кровообігу. Проте, біодоступність може виявитись досить низькою, що ускладнює забезпечення ефективних циркулюючих концентрацій таких ліків. Ще одна можлива проблема, пов'язана з низькою біодоступністю ліків, що вводяться s.c. або i.m., - це підвищення ймовірності розпадання терапевтичного білка у місці ін'єкції.

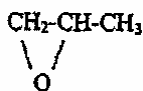
Модифікація рекомбінантних білків шляхом ковалентного приєднання похідних полі(етиленгліколю) ("PEG") активно вивчалась із метою усунення зазначених вище недоліків [огляд у Sherman, M.R., та ін. (1997) в: *Poly(ethylene glycol): Chemistry and Biological Applications* [Полі(етиленгліколь): Хімія та біологічне застосування], Harris, J.M., та ін., eds., American Chemical Society, Washington, D.C., стор. 155-169; Roberts, M.J., та ін. (2002) *Adv Drug Deliv Res* 54:459-476]. Було показано, що приєднання похідних PEG до білків стабілізує їх, покращує біодоступність і/або зменшує їх імуногенність *in vivo*. (Ковалентне приєднання похідних PEG до білка чи іншого субстрату називається тут, як і в галузі техніки, "PEGілуванням"). Крім того, PEGілування може привести до значного збільшення гідродинамічних радіусів білків. Якщо дрібний білок, такий як цитокін або поліпептидний гормон, приєднати до однієї довгої нитки PEG (яка, наприклад, має молекулярну масу, принаймні, 18kDa), то отриманий кон'югат матиме більший гідродинамічний радіус, ніж у сироваткового альбуміну, і його кліренс через ниркові клубочки значно затримуватиметься. Такі комплексні результати PEGілування - зменшення протеолізу, зниження імунного розпізнавання та зменшення швидкості ниркового кліренсу - надають значні переваги щодо застосування PEGілованих білків як лікувальних засобів.

З 1970-х років робилися спроби використання ковалентного приєднання полімерів з метою підвищення безпечності та ефективності різних білків для їх фармацевтичного застосування [див., наприклад, патент США №4,179,337]. Деякі приклади включають приєднання PEG або полі(етиленоксиду) (PEO) до аденозиндезамінази (EC 3.5.4.4) для використання у лікуванні важкого комбінованого імунодефіциту [Davis, S., та ін. (1981) *Clin Exp Immunol* 46:649-652; Hershfield, M.S., та ін. (1987) *N Engl J Med* 3/6589-596]. Інші приклади включають приєднання PEG до супероксиддисмутази (EC 1.15.1.1) для лікування запальних станів [Saifer, M., та ін., патенти США №№5,006,333 і 5,080,891] та до уратоксидази (EC 1.7.3.3) для усунення надлишку сечової кислоти з крові та сечі [Inada, Y., заявка на патент Японії 55-099189; Kelly, S.J., та ін., (2001) *J Am Soc Nephrol* 72:1001-1009; Williams, L.D., та ін. PCT публікація WO 00/07629 A3, що відповідає патенту США №6,576,235; Sherman, M.R., та ін., PCT публікація WO 01/59078 A2].

PEO і PEG - це полімери, що складаються з ковалентно зв'язаних етиленоксидних ланок. Ці полімери мають таку загальну структуру:



де R_2 може бути гідроксильною групою (або її реакційноздатною похідною), а R_1 може являти собою водень, як у "PEG діолі", метильну групу, як у монометоксиПЕС ("mPEG"), або іншу групу нижчого алкілу, як, наприклад, у ізо-пропоксиПЕС або трет-бутоксиПЕС. Параметр n у загальній структурі PEG означає кількість етиленоксидних ланок в полімері та в галузі техніки і тут називається "ступінь полімеризації". PEG і PEO можуть бути лінійними, розгалуженими [Fuке, I., та ін., (1994) *J Control Release* 30:27-34] або у формі зірки [Merrill, E.W. (1993) *J Biomater Sci Polym Ed* 5:1-11]. PEG та PEO амфіпатичні, тобто вони розчинні у воді та деяких органічних розчинниках і можуть прилипати до ліпід-вмісних матеріалів, у тому числі вірусів, що містять оболонку, та мембран тваринних та бактеріальних клітин. Певні випадкові співполімери, блок-співполімери або переміжні співполімери етиленоксиду (OCH_2CH_2) і пропіленоксиду структури:



мають властивості, достатньо подібні до властивостей PEG, так що ці співполімери розглядають як придатні замітники PEG у деяких галузях застосування [див., наприклад, патенти США №№4,609,546 та 5,283,317]. Термін "поліалкіленоксиди" та скорочення "PAO" вживаються тут для позначення таких полімерів, так само як і для PEG чи PEO та співполімерів полі(оксіетилен-оксиметилен) [патент США №5,476,653]. Термін "поліалкіленгліколи" та скорочення "PAG" вживаються тут для загального позначення полімерів, придатних для використання у кон'югатах відповідно до винаходу, зокрема, PEG, а більш конкретно - PEG, що містять одну реакційноздатну групу ("монофункціонально активовані PEG").

Зазвичай, кілька (наприклад, від 5 до 10) ниток одного чи кількох PAG, наприклад, одного чи кількох mPEG із молекулярною масою від приблизно 5кДа до приблизно 10кДа, приєднуються до цільового білка через первинні аміногрупи (епілон-аміногрупи лізинових залишків та альфа-аміногрупу N-кінцевої амінокислоти). Недавно вдалося синтезувати кон'югати, що містять одну нитку mPEG із більшою молекулярною масою, наприклад, 12кДа, 20кДа або 30кДа. Було продемонстровано пряму залежність між часом напівжиття кон'югатів в плазмі та збільшенням молекулярної маси і/або збільшенням кількості приєднаних ниток PEG [Clark, R., та ін. (1996) J Biol Chem 277:21969-21977]. З іншого боку, із збільшенням кількості ниток PEG зростає і ймовірність того, що аміногрупа на суттєвій ділянці біологічно активного компонента (особливо, якщо біологічно активний компонент є білком) буде модифікована, що послабить його біологічну функцію (наприклад, каталіз для ферменту або рецепторне зв'язування для цитокіну). Для більших білків, що містять багато аміногруп, та для ферментів із субстратами з малою молекулярною масою цей компроміс між подовженою тривалістю дії та зменшеною питомою активністю може бути прийнятним, оскільки він забезпечує чисте збільшення біологічної активності in vivo кон'югатів, що містять PEG. Проте, для дрібніших білків, таких як поліпептидні гормони і цитокіни, відносно високий ступінь заміщення ймовірно призведе до такого зменшення функціональної активності, коли нанівець буде зведена перевага подовженого часу напівжиття в кровотоку [Clark, R., та ін., див. вище].

Деякі з винахідників, названих у цій заявці, свого часу відкрили різні стратегії PEGілування та застосували їх до деяких білків з метою отримання бажаного поєднання доброї фармакокінетики та більшої активності in vivo. Серед цих білків був гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор ("GM-CSF") [Saifer, M.G.P., та ін. (1997) Polym Preprints 38:576-577; Sherman, M.R., та ін. (1997) див. вище] та рекомбінантний уратоксидаза ссавців [див. PCT публікації WO 00/07629 і WO 01/59078; Kelly, S.J., та ін., див. вище; патент США №6,576,235]. Використовуючи GM-CSF як цитокін-модель, деякі з названих тут винахідників показали, що приєднання одної чи кількох ниток mPEG із високою молекулярною масою (близько 36кДа) є достатнім для істотного збільшення активності рекомбінантного мишачого GM-CSF in vivo [Saifer, M.G.P., та ін. (1997) див. вище; Sherman, M.R., та ін. (1997) див. вище].

Також були проведенні дослідження, в яких рекомбінантну уратоксидазу (уриказу) ссавця модифікували та вивчали як потенційні ліки проти важковиліковної подагри [див. PCT публікації WO 00/07629, що відповідає патенту США №6,576,235, та WO 01/59078, повне викладення яких включено сюди шляхом посилання]. При використанні PEG-урикази для лікування миші з дефіцитом урикази (uox-/-), у якій спостерігали сильну викликану сечовою кислотою нефропатію, було виявлено, що ліки добре переносились, були ефективними і, по суті, неімуногенними. У миші, яку лікували, спостерігали покращення функції нирок протягом часу лікування (10 тижнів) та значно менше ураження нирок, пов'язане із сечовою кислотою, ніж у миші uox-/-, яку не лікували. Це підтвердили результати мікроскопічної магнітно-резонансної візуалізації [Kelly, S.J., та ін. (2001) див. вище].

Ковалентне зв'язування ниток PEG із молекулою поліпептиду розкрито у патенті США №4,179,337, виданому Davis, F.F., та ін., а також у Abuchowski, A., та ін. (1981) в: Enzymes as Drugs [Ферменти - ліки], Holcenberg, J.S., та ін., eds., John Wiley and Sons, New York, стор.367-383. В цих джерелах показано, що ферменти та інші білки, модифіковані mPEG, мають зменшену імуногенність та антигенність та характеризуються більш тривалим часом життя у кровотоку порівняно із відповідними немодифікованими білками. Ці покращенні властивості хімічно модифікованих кон'югатів дуже корисні у різних видах терапевтичного застосування.

Для здійснення ковалентного приєднання PEG або поліалкіленоксидів до білка принаймні одну з гідроксильних кінцевих груп полімеру необхідно спочатку перетворити на реакційноздатну функціональну групу. Цей процес часто називають "активацією", а продукт - "активованим PEG" або активованим поліалкіленоксидом. Як правило, використовують монометоксиPEG, керований на одному кінці nereакційноздатним, хімічно стабільним метиловим ефіром ("метоксильна група") а на другому кінці - функціональною групою, що може реагувати з аміногрупами на молекулі білка. Менш часто застосовують так звані "розгалужені" mPEG, що містять дві чи більше метоксильні групи, розташовані по периферії від активованої функціональної групи. Прикладом може служити ди-mPEG-лізин, в якому карбоксильна група лізину частіше за все активується шляхом естерифікації N-гідроксисукцинімідом [Harris, J.M., та ін., патент США №5,932,462].

Активовані полімери реагують із терапевтичним засобом, що має нуклеофільні функціональні групи, які служать сайтами приєднання. Однією з нуклеофільних функціональних груп, що зазвичай використовуються як сайти приєднання, є епілон-аміногрупа лізинових залишків. Також в якості сайтів приєднання використовують вільні карбоксильні групи, прийнятним чином активовані карбонільні групи, окислені вуглеводні частини та групи тіолу.

Гідроксильну групу mPEG активували ціанурхлоридом, а потім отриману сполуку зв'язували з білками [Abuchowski, A., та ін. (1977) J Biol Chem 252:3582-3586; Abuchowski, A., та ін. (1981) див. вище]. Проте, використання цього метода має недоліки, такі як токсичність ціанурхлориду та його неспецифічна реакційна здатність із білками, що мають відмінні від амінів функціональні групи, такі як доступні із розчинником

цистеїнові чи тирозинові залишки, котрі можуть бути незамінними для функціонування.

Для подолання цих та інших недоліків були запропоновані інші активовані PEG, такі як сукцинімідилсукцинатні похідні mPEG ("SS-PEG") [Abuchowski, A., та ін. (1984) *Cancer Biochem Biophys* 7:175-186]. У м'яких умовах SS-PEG швидко реагує із білками (протягом 30 хвилин) із одержанням активних і сильно модифікованих кон'югатів.

M. Saifer, та ін. у патенті США №5,468,478 розкриває поліалкіленгліколь-моно-N-сукцинімідилкарбонати та отримані з них кон'югати. S. Zalipsky в патенті США №5,612,460 розкриває способи приготування полі(етиленгліколь)-N-сукцинімідилкарбонатів. Ця форма полімеру ("SC-PEG") швидко реагує з аміногрупами білків, а також пептидами із низькою молекулярною масою та іншими матеріалами, що містять вільні аміногрупи, з якими він утворює уретанові зв'язки.

З рівня техніки також відомо, що уретанові (або карбаматні) зв'язки між аміногрупами білка та PEG отримують, виходячи з інших PEG-карбонатних похідних [Beauchamp, C, та ін. (1983) *Anal Biochem* 131:25-33; Veronese, F.M., та ін. (1985) *Appl Biochem Biotechnol* 77:141-152]. З рівня техніки також відомі реакційноздатні проміжні продукти mPEG та способи їх використання у синтезі PEG-кон'югатів біологічно активних компонентів із приєднанням амідними зв'язками, складноефірними зв'язками, вторинними амініними та туюефірними зв'язками та ін.

T. Suzuki та ін. [(1984) *Biochim Biophys Acta* 788:248-255] ковалентно приєднали імуноглобулін G ("IgG") до mPEG, активованого ціанурхлоридом. Вони вивчали біологічні та фізико-хімічні властивості, такі як антигензв'язувальна активність та молекулярна структура, хроматографічна поведінка із виключенням за розміром, поверхнева активність, міжповерхнева здатність до агрегації та здатність до агрегації при нагріванні, що спричиняє неспецифічну активацію комплементу кон'югатами PEG-IgG. Приєднання PEG до IgG збільшило радіус Стокса, що спостерігається, та поверхневу активність IgG, а також стабілізувало IgG до дії нагрівання і/або відкривання поверхні поділу. При цьому структурної денатурації IgG не спостерігали. Причину пригнічення неспецифічної здатності до агрегації, в основному, вбачають у стеричному інгібуванні асоціації PEGілованих молекул IgG. Ці результати демонструють корисність з'єднаного з mPEG IgG в якості внутрішньовенного препарату, а також показали можливу корисність PEG як допоміжної речовини для стабілізації немодифікованого IgG при внутрішньовенному застосуванні.

K.A. Sharp та ін. [(1986) *Anal Biochem* 754:110-117] досліджували можливість отримання лігандів із біоспецифічною спорідненістю для поділу клітин у водних двофазних полімерних системах на основі антигенів клітинної поверхні. Кролячий IgG проти еритроцитів людини реагував із активованими ціанурхлоридом mPEG з молекулярними масами приблизно 0,2, 1,9 та 5кДа при різних молярних відношеннях PEG до лізинових груп на білку. Коефіцієнт розподілу білка у двофазній системі, що містить декстран та PEG, збільшувався із зростанням ступеню модифікації та збільшенням молекулярної маси mPEG. Спостерігається супутня втрата здатності до аглютинації еритроцитів людини.

R.H. Tullis у патенті США №4,904,582 розкриває олігонуклеотидні кон'югати, в яких олігонуклеотиди з'єднуються через з'єднувальну ділянку із гідрофобною частиною, що може являти собою поліоксисалкіленову групу. Повідомляється, що отримані кон'югати є більш ефективними у мембранному транспорті, оскільки здатні перетинати мембрану та ефективно модулювати транскрипційну систему. Таким чином, композиції можуть використовуватись *in vitro* та *in vivo* для вивчення клітинних процесів, захисту хазяїнів-ссавців від патогенних організмів, розвитку генної терапії тощо.

Проте, надмірна кон'югація полімерів та/або кон'югація, що зачіпляє активну ділянку лікувальної частини, де розташовані групи, пов'язані із біологічною активністю, часто може призводити до втрати активності, а отже і терапевтичної дії. Так часто і відбувається з пептидами із низькою молекулярною масою, що мають кілька сайтів взаємодії, які не пов'язані із біологічною активністю. Наприклад, I. Benhar та ін. [(1994) *Bioconjug Chem* 5:321-326] спостерігали, що PEGілування рекомбінантного одноланцюжкового імунотоксину призвело до втрати специфічної цільової імунореактивності імунотоксину. Втрата активності імунотоксину стала результатом приєднання PEG до двох лізинових залишків на ділянці взаємодії з антигеном імунотоксину.

Хоча ковалентне приєднання PAG і PAO (наприклад, PEG, PEO тощо) до терапевтичних білків має на меті усунути їх імунореактивність, PEGіловані білки залишаються слабо імуногенними. Вважається, що ця імуногенність спричинена, принаймні частково, тим фактом, що полімери PEG та PAO самі по собі дещо антигенні та імуногенні. Наприклад, кролів імунізували до різних PEG шляхом введення тваринам кон'югатів, в яких PEG було приєднано до імуногенного білка-носія [Richter, A.W., та ін. (1983) *Int Arch Allergy Appl Immunol* 70:124-131]. Крім того, було продуковане моноклональне антитіло, що реагує з поліефірним основним ланцюгом PEG, шляхом ін'єкування миші mPEG кон'югата β -глюкуронідази та вибору клону гібридами, що виділяє анти-PEG антитіло [Cheng, T.-L, та ін. (1999) *Bioconjug Chem* 10:520-528; Cheng, T.-L, та ін. (2000) *Bioconjug Chem* 11:258-266; Tsai, N.-M., та ін. (2001) *Biotechniques* 30:396-402; Roffler, S., та ін., патенти США №№6,596,849 і 6,617,118; розкриття усіх їх включено сюди шляхом посилання у всій повноті]. Інше моноклональне антитіло, що реагує із поліефірним основним ланцюгом PEG, було нещодавно розкрито Roberts, M.J., та ін. у патентній заявці США № 2003/001704 A1.

Кілька дослідників розкрили отримання лінійних або розгалужених "неантигенних" PEG полімерів та їх похідних чи кон'югатів [див., наприклад, патенти США №№5,428,128; 5,621,039; 5,622,986; 5,643,575; 5,728,560; 5,730,990; 5,738,846; 5,811,076; 5,824,701; 5,840,900; 5,880,131; 5,900,402; 5,902,588; 5,919,455; 5,951,974; 5,965,119; 5,965,566; 5,969,040; 5,981,709; 6,011,042; 6,042,822; 6,113,906; 6,127,355; 6,132,713; 6,177,087 та 6,180,095; див. також PCT публікацію WO 95/13090 та опубліковані патентні заявки США №№2002/0052443, 2002/0061307 та 2002/0098192]. У більшості прикладів з зазначених вище патентів та патентних заявок використовуються полімери, що містять одну чи кілька ниток mPEG, наприклад, ди-mPEG-лізин. Проте, досі не було розкрито механізму позбавлення PEG антигенних властивостей у таких полімерах чи кон'югатах.

Отже, існує потреба в ідентифікації методів отримання PAO-вмісних (наприклад, PEG- і/або PEO-вмісних) кон'югатів, зокрема, кон'югатів між такими водорозчинними полімерами та терапевтичними білками, що мають

зменшену, істотно зменшену антигенність або антигенність, що не піддається виявленню. Ці кон'югати матимуть переваги, що їх забезпечує полімерний компонент і які полягають у підвищеній стійкості та біодоступності *in vivo*, але не викликають істотної імунної реакції в організмі тварини, якій ці кон'югати ввели к лікувальною чи діагностичною метою.

Даний винахід спрямовано на вирішення поставлених вище питань. Винахід забезпечує способи отримання кон'югатів водорозчинних полімерів (наприклад, полі(етиленгліколю) та його похідних) і біологічно активних компонентів, зокрема, терапевтичних біологічно активних компонентів, таких як білки. Винахід також забезпечує полімери та їх кон'югати, отримані у такі способи, причому зазначені полімери та їх кон'югати характеризуються меншою антигенністю та імуногенністю порівняно з алкоксил-вмісними полімерами і кон'югатами такого самого біологічно активного компонента, отриманими із використанням алкоксиPEG, наприклад, mPEG. Винахід також забезпечує композиції, які містять зазначені кон'югати, набори, які містять такі кон'югати і композиції, та способи використання кон'югатів і композицій у різноманітних терапевтичних і діагностичних режимах.

В одному аспекті винахід забезпечує кон'югат, що містить один чи кілька біологічно активних компонентів, ковалентно зв'язаних, принаймні, з одним лінійним або розгалуженим монофункціонально активованим поліалкіленгліколем, причому цей монофункціонально активований поліалкіленгліколь не має метоксильної групи, іншої алкоксильної чи арилоксильної групи на жодному з своїх кінців. У певних таких варіантах втілення кон'югат має зменшену або істотно зменшену антигенність порівняно з кон'югатом, отриманим із використанням алкоксиполі(етиленгліколю), наприклад, mPEG, або розгалуженого полімеру, що містить mPEG, такого як ди-mPEG-лізин.

Поліалкіленгліколі, що особливо підходять для використання в синтезі кон'югатів відповідно до цього винаходу, включають (не обмежуючись названим) полі(етиленгліколі) та співполімери етиленоксиду та пропіленоксиду; особливо прийнятними є PEG, а ще більш прийнятними - монофункціонально активовані PEG (наприклад, PEG, активовані на одному кінці, включаючи гідроксиPEG-моноальдегіди, гідроксиPEG-моновінілсульфони, реакційноздатні складні ефіри гідроксиPEG-монокарбонових кислот та гідроксиPEG-монофенілкарбонатні похідні). Інші проміжні сполуки, які можуть використовуватись у синтезі реакційноздатних полімерних похідних, включають інші гідроксиPEG-монокислоти та гідроксиPEG-моноацетаті.

У деяких таких варіантах втілення поліалкіленгліколь має молекулярну масу від приблизно 1000 Дальтон до приблизно 100кДа, більш прийнятно - від приблизно 2кДа до приблизно 60кДа; від приблизно 2кДа до приблизно 30кДа, від приблизно 5кДа до приблизно 20кДа; від приблизно 10кДа до приблизно 30кДа; від приблизно 10кДа до приблизно 20кДа; дві гілки, кожна із молекулярною масою від приблизно 2кДа до приблизно 30кДа; а більш прийнятно - дві гілки, кожна з яких має молекулярну масу від приблизно 18кДа до приблизно 22кДа. Кон'югати відповідно до цього аспекту винаходу можуть містити одну чи кілька ниток поліалкіленгліколю, у деяких варіантах втілення, більш прийнятно, від приблизно однієї до приблизно 10 ниток, від приблизно однієї до приблизно п'яти ниток, ще більш прийнятно, від приблизно однієї до приблизно трьох ниток і, найбільш прийнятно, від приблизно однієї до приблизно двох ниток; в інших варіантах втілення, більш прийнятно, від приблизно п'яти до приблизно 100 ниток, від приблизно 10 до приблизно 50 ниток і, ще більш прийнятно, від приблизно шести до приблизно 20 ниток на субланку білка-ферменту із високою молекулярною масою. У особливо прийнятному такому варіанті втілення поліалкіленгліколь, що використовується в кон'югаті, включає одну чи дві нитки монофункціонально активованого полі(етиленгліколю) (наприклад, реакційноздатний складний ефір гідроксиPEG-монокислоти, гідроксиPEG-моноальдегід, гідроксиPEG-моновінілсульфон або гідроксиPEG-монофенілкарбонатна похідна) із молекулярною масою від приблизно 18кДа до приблизно 22кДа або від приблизно 27кДа до приблизно 33кДа.

Біологічно активні компоненти, підходять для використання у кон'югатах або композиціях відповідно до винаходу, включають (не обмежуючись названим) різні пептиди, білки, глікопротеїни, органічні сполуки, амін-вмісні сполуки, карбоксил-вмісні сполуки, гідроксил-вмісні сполуки та тіол-вмісні сполуки.

Винахід також надає способи отримання кон'югатів між біологічно активною сполукою та монофункціонально активованим поліалкіленгліколем, які, наприклад, включають: (a) отримання або приготування лінійного чи розгалуженого поліалкіленгліколю, що містить принаймні одну нереагуючу блокуючу групу, яку можна потім вилучити, таку як одна чи кілька трифенілметильних груп ("трифенільних груп"); (b) отримання похідної поліалкіленгліколю шляхом проведення його реакції із принаймні одною дериватизуючою сполукою за таких умов, що поліалкіленгліколь дериватизується однією дериватизуючою групою (такою, як карбоксильна група) на кінці, де немає блокуючої (блокуючих) групи (груп); (c) вилучення блокуючої (блокуючих) групи (груп) без вилучення дериватизуючої групи з отриманням, за один чи кілька етапів, монофункціонально активованого поліалкіленгліколю; та (d) введення в контакт монофункціонально активованого поліалкіленгліколю з принаймні одним біологічно активним компонентом в умовах, що сприяють ковалентному зв'язуванню біологічно активного компонента із монофункціонально активованим поліалкіленгліколем. Більш прийнятно, кон'югати, отримані в такі способи, мають зменшені, істотно зменшені антигенність та імуногенність або антигенність та імуногенність, що не піддаються виявленню, порівняно із кон'югатами, дериватизованими такою самою мірою, із mPEG подібного розміру, структури та зв'язку із біологічно активним агентом. Винахід також забезпечує кон'югати, отримані в такі способи.

Винахід також забезпечує фармацевтичні або ветеринарні композиції, які містять кон'югати відповідно до винаходу та принаймні один наповнювач або носій, що є прийнятним для фармацевтичного або ветеринарного застосування.

У додаткових варіантах втілення винахід також забезпечує способи запобігання, діагностики або лікування фізичних розладів у тварин (таких як ссавці, в тому числі і люди) із використанням кон'югатів чи композицій відповідно до цього винаходу. Один такий спосіб включає, наприклад, введення тварині, яка страждає на або має схильність до фізичного розладу (такого, як анемія, артрит, рак, хвороба Альцгеймера, ферментна недостатність, серцево-судинне захворювання, підвищений кров'яний тиск, інфекційні хвороби, порушення

обміну речовин, неврологічні розлади, нейтропенія, гіперурикемія та її прояви (наприклад, подагра), захворювання чи розлади, спричинені генетично зумовленою недостатністю, тощо), ефективної кількості одного чи кількох кон'югатів або композицій відповідно до винаходу, що можуть вводитись тварині, зокрема, ссавцю і, головним чином, людині перорально, локально або парентерально, наприклад, внутрішньовенно, внутрішньом'язово або підшкірно.

У додаткових варіантах втілення даний винахід забезпечує композиції, які включають один чи кілька кон'югатів із зменшеною антигенністю відповідно до винаходу, та можуть ще включати один чи кілька додаткових компонентів або реагентів, таких як одна чи кілька буферних солей, один чи кілька вуглеводних наповнювачів, один чи кілька білків-носіїв, один чи кілька ферментів, один чи кілька детергентів, одна чи кілька молекул нуклеїнових кислот, один чи кілька полімерів, таких як PEG, тощо. Винахід також забезпечує набори, що містять кон'югати із зменшеною антигенністю і/або композиції відповідно до винаходу.

У додаткових варіантах втілення винахід забезпечує PEG-ліпосоми із зменшеною імунореактивністю, отримані із використанням монофункціонально активованих поліалкіленгліколів, що не мають метоксильних або інших алкоксильних груп, а не монофункціонально активованого mPEG. Інші більш прийнятні варіанти втілення даного винаходу будуть очевидними для спеціалістів із звичайним рівнем знань у цій галузі техніки у світлі наведених далі креслень, опису винаходу та формули винаходу.

На Фіг.1 подані результати конкурентного ферментного імуносорбентного аналізу ("ELISA"). У цьому дослідженні mPEG кон'югат одного білка зв'язували із 96-лунковим аналітичним планшетом та визначали інгібування зв'язування кролячих антитіл з mPEG кон'югатом іншого білка розчинами mPEG або t-бутоксипег.

На Фіг.2a подані результати конкурентного ELISA, проведеного як пояснено для Фіг.1 із використанням PEG різного розміру та структури, що містять одну або дві метоксильні групи. Результати зв'язування антитіл наведено у вигляді графіка - функції молярної концентрації метоксильних груп у кожному зразку.

На Фіг.2b подані ті самі дані, що і на Фіг.2a, але у вигляді функції не молярної концентрації метоксильних груп, а масової концентрації PEG (мкг/мл).

На Фіг.3 подані деякі з даних на Фіг.1, 2a та 2b у форматі, що демонструє пряму залежність антигенності від числа метоксильних груп на молекулу PEG. Ці зразки включають 10-кДа PEG, один з яких не має метоксильної групи (t-бутоксипег), один містить одну метоксильну групу (mPEG) і один містить дві метоксильні групи [Ди-(5-кДа) mPEG-лізин].

На Фіг.4 проілюстровано конкурентний ELISA, такий як описано для Фіг.1, в якому 4,8-кДа mPEG порівнюють із трьома PEG відповідно до винаходу, які не мають метоксильних груп на кінцях лінійного полімеру (позначені як "PharmaPEG"). Відстань між кривими по горизонтальній осі показує, що антигенності усіх трьох PEG відповідно до винаходу приблизно у 100 разів менші, ніж у mPEG при проведенні аналізу із анти-mPEG антитілами.

На Фіг.5a показані результати дослідження, в якому зразки ізомеру карбоангідрази ("CA II") і такої самої карбоангідрази, з'єднаної із, в середньому, 3-4 нитками 5-кДа mPEG, аналізували методом електрофорезу в поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію ("SDS-PAGE"). Смужки 1 та 2 у гелі показують результати, отримані із забарвленням білка Рубіновим марки SYPRO® та фотографуванням у темній шафі із освітленням 302нм. Смужки 3 та 4 показують результати вестерн-блоттингу кон'югатів mPEG та неPEGілованого ферменту, відповідно, в якому в якості первинних антитіл використовували полікліональні кролячі анти-mPEG антитіла. Смужка 5 показує положення попередньо забарвлених білкових стандартів.

На Фіг.5b подано кількісний аналіз інтенсивностей смуг у гелі та вестерн-блоттингу, показаних на Фіг.5a. Аналіз проведено із використанням фотоапарата Kodak та програмного забезпечення для цифрової обробки зображень. Горизонтальна вісь представляє відстань переміщення відносно фронту барви, а вертикальна вісь - відносні інтенсивності забарвлення білка або забарвлення анти-mPEG. Нижня крива являє собою смуги попередньо забарвлених стандартних білків із середньою молекулярною масою (зліва направо) 203,8, 110,9, 68,8, 51,5, 40,2, 28,9, 20,7 і 14,9кДа. Друга крива знизу відповідає забарвленню антитілами анти-mPEG PEGілованої карбоангідрази. Третя крива знизу відповідає забарвленню білком смуги карбоангідрази, а верхня крива - забарвленим білком смугам mPEG кон'югатів карбоангідрази.

На Фіг.6a та 6b подані результати ELISA-аналізів сироватки з груп з трьох кроликів, яких імунізували кон'югатами свинячої урикази, що містить, в середньому, приблизно дві нитки mPEG або гідроксиPEG ("PharmaPEG") на субланку урикази. Антитіла проти урикази визначали за допомогою аналітичних планшетів, покритих свинячою уриказою. Антитіла проти PEG визначали за допомогою чашок, покритих кон'югатами неспорідненого білка, приєднаного до mPEG. На Фіг.6a подані дані другого взяття крові кроликів, яким було зроблено чотири ін'єкції PEG-урикази в неповному ад'юванті Фрейнда. На Фіг.6b подані дані третього взяття крові тих самих кроликів після того, як їм було зроблено п'ять ін'єкцій PEG-урикази в неповному ад'юванті Фрейнда.

Якщо не визначено інакше, усі технічні та наукові терміни, які вживаються тут, мають значення, що відповідають звичайному розумінню їх спеціалістом із звичайним рівнем знань у галузі техніки, до якої належить цей винахід. Хоча у практиці даного винаходу або для його тестування можуть використовуватись будь-які способи і матеріали, аналогічні або еквівалентні описаним тут, нижче будуть описані більш прийнятні методи та матеріали.

Приблизно: Термін "приблизно", що вживається стосовно будь-якої числової величини, означає діапазон $\pm 10\%$ від зазначеної величини (наприклад, "приблизно 50°C" охоплює діапазон температур від 45°C до 55°C, включно; аналогічно, "приблизно 100мМ" охоплює діапазон концентрацій від 90мМ до 110мМ, включно).

Біологічно активний компонент: Термін "біологічно активний компонент", що вживається тут, означає сполуку, молекулу, частину або комплекс, який має певну біологічну активність in vivo, in vitro чи ex vivo на клітину, тканину, орган або організм і який може з'єднуватись із одним чи кількома поліалкіленгліколями із утворенням кон'югатів відповідно до винаходу. Більш прийнятні біологічно активні компоненти докладно описані нижче.

Зв'язок: Термін "зв'язок", що вживається тут, означає приєднання чи зв'язок, що може бути ковалентним,

наприклад, хімічний зв'язок, або нековалентним, наприклад, міжіонні взаємодії, гідрофобні взаємодії, водневі зв'язки тощо. Ковалентні зв'язки можуть бути, наприклад, складноєфірними, ефірними, фосфоскладноєфірними, тіоскладноєфірними, тіоефірними, уретановими, амідними, пептидними, імідними, вуглець-сірковими зв'язками, вуглець-фосфорними зв'язками тощо. Термін "зв'язок" є ширшим від понять "приєднаний", "з'єднаний" і "прикріплений" та включає їх.

(2) З'єднаний: Термін "з'єднаний", що вживається тут, означає приєднання ковалентними зв'язками або сильними нековалентними взаємодіями, але, як правило і більш прийнятно, - приєднання ковалентними зв'язками. Будь-який спосіб, що зазвичай використовується спеціалістами у цій галузі техніки для приєднання біологічно активних матеріалів, може застосовуватись у даному винаході.

Захворювання, розлад, стан: Терміни "захворювання" або "розлад", що вживаються тут, означають будь-який несприятливий стан людини або тварини, що включає пухлини, рак, алергії, залежність, аутоімунність, отруєння або погіршення розумових чи фізичних функцій порівняно з оптимальним рівнем. "Стани" включають тут хвороби та розлади, а також стосуються фізіологічних станів. Наприклад, фертильність є фізіологічним станом, але не захворюванням і не розладом. Композиції відповідно до винаходу, що придатні для запобігання вагітності шляхом зменшення фертильності, будуть описані як такі, що призначені для лікування стану (фертильності), але не для лікування захворювання чи розладу. Спеціалісти із звичайним рівнем знань у цій галузі техніки розуміють інші стани.

Ефективна кількість: Термін "ефективна кількість", що вживається тут, означає кількість того чи іншого кон'югата або композиції, яка є необхідною чи достатньою для одержання бажаної біологічної дії. Ефективною кількістю названого кон'югата або композиції відповідно до цього винаходу буде кількість, яка забезпечує досягнення вибраного результату. Спеціаліст у цій галузі техніки у звичайний спосіб може визначити цю кількість. Наприклад, ефективною кількістю для лікування недостатності імунної системи буде кількість, необхідна для активації імунної системи, що призведе до появи антиген-специфічної імунної реакції у відповідь на появу антигену. Цей термін є синонімом поняття "достатня кількість". Для того чи іншого застосування ефективна кількість може бути різною, залежно від таких чинників, як захворювання чи стан, які лікують, конкретна композиція, що вводиться, розмір пацієнта і/або важкість захворювання чи стану. Спеціаліст із звичайним рівнем знань у цій галузі техніки може емпіричним шляхом визначити ефективну кількість конкретного кон'югата або композиції відповідно до даного винаходу без необхідності в зайвому експериментуванні.

Імунна реакція: Термін "імунна реакція", що вживається тут, означає гуморальну імунну реакцію (тобто, утворення антитіл) і/або клітинну імунну реакцію, що веде до активації або проліферації В- і/або Т-лімфоцитів і/або антиген-презентуючих клітин. Однак, у деяких випадках імунні реакції можуть бути слабкими і виявлятися лише при використанні принаймні однієї речовини, що відповідає цьому винаходу. "Імуногенний" є характеристикою агента, що означає його здатність стимулювати імунну систему живого організму таким чином, що одна чи кілька функцій імунної системи посилюються і спрямовуються проти імуногенного агента.

"Один", відсутність чіткої вказівки "цей, даний" чи вказівки щодо кількості: Термін "один" та відсутність чіткої вказівки "цей, даний" чи вказівки щодо кількості у даному описі означають "принаймні один" або "один чи кілька", якщо не зазначено іншого.

Поліпептид: Термін "поліпептид", що вживається тут, означає молекулу, яка складається з мономерів (амінокислот), лінійно з'єднаних амідними зв'язками (які також називаються пептидними зв'язками). Термін позначає молекулярний ланцюжок амінокислот, але не зазначає конкретної його довжини. Таким чином, визначення поліпептиду охоплює дипептиди, трипептиди, олігопептиди, пептиди невизначеної довжини та білки. Цей термін також вживається щодо продуктів пост-експресійних модифікацій поліпептиду, наприклад, глікозилювання, ацетилювання, фосфорилування тощо. Поліпептид може бути рекомбінантним або отриманим з природного біологічного джерела, але не обов'язково трансльованим з названої амінокислотної послідовності. Він може бути створеним у будь-який спосіб, включаючи й хімічний синтез.

Білок та глікопротеїн: Термін "білок", що вживається тут, означає поліпептид, який, як правило, має розмір завбільшки від приблизно 5 чи більше, 10 чи більше, 20 чи більше, 25 чи більше, 50 чи більше, 75 чи більше, 100 чи більше, 200 чи більше, 500 чи більше, 1000 чи більше або 2000 чи більше амінокислот. Взагалі, білки мають визначену тривимірну структуру, хоча це і не обов'язково, і їх часто називають упорядкованими, на відміну від пептидів та поліпептидів, які часто не мають визначеної тривимірної структури, а можуть набувати великої кількості різних конформацій і називаються неупорядкованими. Проте, пептиди можуть мати визначену тривимірну структуру. Термін "глікопротеїн", що вживається тут, означає білок, що містить принаймні одну цукрову частину, приєднану до білка через кисень-вмісний або азот-вмісний боковий ланцюжок амінокислоти, наприклад, серин або аспарагін.

Очищений: Термін "очищений", що вживається тут стосовно молекули, означає, що концентрацію очищених молекул було збільшено порівняно із молекулами, пов'язаними з їх природним середовищем або середовищем, в якому їх було отримано, виявлено чи синтезовано. Пов'язані з природним середовищем молекули включають білки, нуклеїнові кислоти, ліпіди та цукри, але, в загальному випадку, не включають воду, буфери і реагенти, які додаються для підтримання цілісності або сприяння очищенню молекул, що піддаються очищенню. Наприклад, навіть якщо потрібний білок у неочищеному екстракті розбавляється водним розчинником при проведенні колонкової хроматографії, молекули білка вважаються очищеними зазначеною хроматографією, якщо природно пов'язані нуклеїнові кислоти, небажані білки та інші біологічні молекули відділяються від молекул потрібного білка. Згідно з цим визначенням, речовина може бути чистою на 5% чи більше, 10% чи більше, 20% чи більше, 30% чи більше, 40% чи більше, 50% чи більше, 60% чи більше, 70% чи більше, 80% чи більше, 90% чи більше, 95% чи більше, 98% чи більше, 99% чи більше або чистою на 100% при розгляданні відносно забруднювачів.

Залишок: Термін "залишок", що вживається тут, означає конкретну амінокислоту, як правило, дегідратовану внаслідок її участі в утворенні одного чи кількох пептидних зв'язків, у поліпептидному остові або боковому ланцюжку.

Лікування: Терміни "лікування", "лікувати", "якого лікують" або "процес лікування", що вживаються тут, стосуються профілактики і/або терапії. При використанні терміну стосовно, наприклад, інфекційної хвороби, він може означати профілактичне лікування, яке підвищує стійкість пацієнта до інфекції, викликаної патогенними організмами, або, іншими словами, зменшує ймовірність того, що пацієнта буде інфіковано патогенами, або в нього виявляться ознаки хвороби, спричиненої такою інфекцією, а також лікування вже інфікованого пацієнта з метою боротьби з інфекцією, наприклад, зменшення, усунення інфекції або запобігання її погіршенню.

Кілька дослідників, які раніше вивчали це питання, розкрили отримання лінійних або розгалужених неантигенних PEG полімерів або їх кон'югатів [див., наприклад, патенти США №№5,428,128; 5,621,039; 5,622,986; 5,643,575; 5,728,560; 5,730,990; 5,738,846; 5,811,076; 5,824,701; 5,840,900; 5,880,131; 5,900,402; 5,902,588; 5,919,455; 5,951,974; 5,965,119; 5,965,566; 5,969,040; 5,981,709; 6,011,042; 6,042,822; 6,113,906; 6,127,355; 6,132,713; 6,177,087 та 6,180,095; див. також РСТ публікацію WO 95/13090 та опубліковані патентні заявки США №№2002/0052443, 2002/0061307 та 2002/0098192; розкриття усіх їх включено сюди шляхом посилання у всій їх повноті]. Проте, PEG і кон'югати, відповідно до зазначених попередніх відомостей, залишаються, принаймні, слабо імуногенними, а це може мати небажані наслідки у вигляді появи антитіл до PEG компонента кон'югатів при введенні цих кон'югатів тварині з профілактичною, діагностичною або терапевтичною метою. Ці антитіла можуть призводити до швидкого виведення PEG-вмісних біологічно активних кон'югатів, що зменшує біодоступність лікувальних композицій [Cheng, T.-L, та ін. (1999), див. вище], а також може спричинити опосередкований імунним комплексом розлад. Крім того, досі ще не було розкрито механізму того, як зробити заявлені PEG або їх кон'югати, по суті, неантигенними або неімуногенними.

Даний винахід покликаний подолати наявні в рівні техніки обмеження. Загалом, цей винахід забезпечує стабільні композиції та способи, що можуть використовуватись у профілактиці, діагностиці та лікуванні різних фізичних розладів. Більш конкретно, цей винахід забезпечує способи отримання реакційноздатних полімерів із зменшеною антигенністю та стабілізованих полімерних кон'югатів білків, зокрема, терапевтичних білків, що мають зменшену, істотно зменшену антигенність або антигенність, що не піддається виявленню. В інших варіантах втілення даний винахід забезпечує кон'югати, отримані у названі способи відповідно до винаходу, і композиції, зокрема, фармацевтичні композиції, що містять ці кон'югати. У додаткових варіантах втілення цей винахід забезпечує способи використання зазначених кон'югатів і композицій для запобігання, діагностики і лікування різних фізичних розладів. Винахід також забезпечує набори, що включають один чи кілька кон'югатів і/або композицій відповідно до винаходу.

В одному аспекті даний винахід забезпечує способи отримання кон'югатів із зменшеною, істотно зменшеною антигенністю або антигенністю, що не піддається виявленню, шляхом ковалентного приєднання водорозчинних полімерів до однієї чи кількох біологічно активних або компонентів, таких як один чи кілька білків і, зокрема, один чи кілька терапевтичних білків. У таких кон'югатах вибрані полімери самі по собі мають зменшену, істотно зменшену антигенність або антигенність, що не піддається виявленню, порівняно із стандартними полімерами, які зазвичай використовуються для отримання білок-полімерних кон'югатів. Термін "зменшена антигенність", що вживається тут, стосується полімеру (наприклад, PAO чи PAG, зокрема, PEG, а ще більш конкретно - монофункціонально активованого PEG), кон'югата або композиції, що містить такий полімер або його/її було синтезовано із використанням такого полімеру, причому здатність званого полімеру реагувати із антитілами, виробленими проти більш антигенних полімерів (наприклад, mPEG), зменшена на будь-яку величину. У більш прийнятному випадку антигенність зменшена, принаймні, приблизно на 90%, ще більш прийнятно - принаймні, приблизно на 50%, а найбільш прийнятно - більше ніж на приблизно 75% порівняно із більш антигенним полімером. Аналогічно, полімер (або кон'югат чи композиція, що містять такий полімер або синтезовані з його використанням) має "істотно зменшену антигенність", якщо цей полімер (кон'югат або композиція) має антигенність на рівні приблизно 20% чи менше, більш прийнятно - приблизно 15% чи менше, ще більш прийнятно - приблизно 10% чи менше і найбільш прийнятно - приблизно 1% чи менше від антигенності відповідного антигенного полімеру (наприклад, mPEG). І, нарешті, полімер (або кон'югат чи композиція, що містять такий полімер або синтезовані з його використанням) має "антигенність, що не піддається виявленню", якщо дослідження цього полімеру, кон'югата або композиції відомими в рівні техніки методами (наприклад, ELISA чи інші способи виявлення антигенності, такі як відомі з рівня техніки і описані тут у Прикладах) не виявляє антигенності.

Поліалкіленгліколі, що особливо підходять для використання у приготуванні кон'югатів відповідно до цього винаходу, включають (не обмежуючись названням) полі(етиленгліколі) та співполімери етиленоксиду та пропіленоксиду; особливо прийнятними є PEG, а ще більш прийнятними - монофункціонально активовані гідроксиPEG (наприклад, гідроксиPEG, активовані на одному кінці, включаючи реакційноздатні складні ефіри гідроксиPEG-монокарбонових кислот, гідроксиPEG-моноальдегіди, гідроксиPEG-моноаміни, гідроксиPEG-моногідразиди, гідроксиPEG-монокарбазати, гідроксиPEG-моноіодацетаміди, гідроксиPEG-мономалеїміди, гідроксиPEG-моноортопіридилдисульфід, гідроксиPEG-монооксими, гідроксиPEG-монофенілкарбонати, гідрокси PEG-монофенілглюксали, гідроксиPEG-монотіазолідин-2-тіони, гідроксиPEG-монотіоефіри, гідроксиPEG-монотіолі, гідроксиPEG-монотріазини і гідроксиPEG-моновінілсульфони).

Особливо прийнятними для використання при отриманні кон'югатів відповідно до цього винаходу полімерами із зменшеною, істотно зменшеною антигенністю або антигенністю, що не піддається виявленню, є монофункціонально активовані PEG, що не містять метоксильних груп, інших алкоксильних груп або арилоксильних груп. Застосування таких монофункціонально активованих PEG замість монофункціонально активованих mPEG у синтезі кон'югатів відповідно до цього винаходу надає отримуваним кон'югатам несподівано зменшеної антигенності, тобто зменшеної здатності взаємодіяти із антитілами, виробленими проти mPEG кон'югатів того самого біологічно активного компонента. Отримані кон'югати також характеризуються зменшеною імуногенністю, тобто зменшеною здатністю викликати імунну реакцію.

В одному аспекті винаходу монофункціонально активовані PEG можуть бути синтезовані із використанням підходящих оборотно блокованих похідних активуючої групи в якості ініціатора полімеризації етиленоксиду

[Akiyama, Y.; та ін. (2000) *Bioconjug Chem*, 17:947-950]. Akiyama та ін. запропонували умови синтезу моногідроксильної, моноацетальної похідної PEG із використанням 3,3-діетоксипропанолату калію в якості ініціатора полімеризації етиленоксиду. Оскільки Akiyama та ін. не визначили найбільш бажану зменшену антигенність чи імуногенність цього проміжного продукту, вони перетворили кінцеву гідроксильну групу на тіол шляхом припинення полімеризації додаванням метансульфонілхлориду і, таким чином, отримали гетеробіфункціональний PEG замість PEG похідної відповідно до цього винаходу. Додатковим свідченням того, що ця група дослідників не побачила корисності монофункціонально активованого PEG із гідроксильною групою на кінці, є те, що вони опублікували й запатентували способи синтезу інших гетеробіфункціональних PEG з моногідроксильних, монофункціонально активованих PEG, а в деяких випадках навіть "кепували з кінця" гідроксиPEE метоксильними групами. Аналогічно, Bentley, M.D., та ін. в опублікованій патентній заявці США № 2002/0072573 A1 розкривають полімерні композиції та способи, які не відбивають розуміння імунологічної переваги монофункціонально активованих полімерів із гідроксильною групою на кінці, а говорять про бажаність перетворення кінцевих гідроксильних груп таких полімерів на метоксильні групи.

В іншому аспекті даного винаходу монофункціонально активовані PEG можна синтезувати шляхом контролювання міри активації лінійних PEG, що містять гідроксильні групи на обох кінцях ("PEG діоли"), щоб обмежити кількість б/с-активованих PEG прийнятно низьким рівнем, наприклад, <5%, більш прийнятно - <2% або ще більш прийнятно - <1%. Це - альтернатива способу, показаному у Прикладі 5. В особливо прийнятному аспекті монофункціонально активовані PEG можуть бути синтетизовані з монофункціональних PEG, з яких не реакційноздатну блокуючу групу можна вилучити після дериватизації PEG, не вилучаючи дериватизаційну групу. Прикладом дериватизованого PEG є PEG-карбонова кислота, а прикладами не реакційноздатних блокуючих груп, які можна усунути після дериватизації, є арилосильні групи [Bentley, M.D., та ін., РСТ публікація WO 01/26692 A1], тритильні групи [Kocienski, P.J., (1994) *Protecting Groups* [Захисні групи], Georg Thieme Verlag, Stuttgart, стор.54-58] і t-бутоксильні групи. t-бутоксипег-карбонова кислота може бути активованою, наприклад, N-гідроксисукцинімідом. Нарешті, t-бутоксильна група може бути вилучена шляхом безводного ацидолізу із отриманням активованої PEG карбоновокислотної похідної, що має гідроксильну групу замість метоксильної на дистальному кінці полімеру. У більш прийнятному варіанті втілення t-бутоксипег-карбонова кислота може бути перетворена на гідроксиPEE-карбонову кислоту шляхом ацидолізу перед тим, як карбоксильна група буде активована N-гідроксисукцинімідом. В іншому варіанті втілення даного винаходу t-бутоксипег-ацетат синтезують шляхом введення t-бутоксипег у контакт з галоацеталем і перетворення отриманого продукту на гідроксиPEE-ацетат або гідроксиPEE-альдегід здійсненням вибіркового безводного ацидолізу для усунення t-бутоксильної групи. Цей ацетат можна перетворити на альдегід (або альдегідгідрат) для приготування до його приєднання до амін-вмісної сполуки шляхом відновлювального алкілювання [Bentley, M.D., та ін., патент США №5,990,237]. В іншому варіанті втілення арилосильна захисна група, дистально розташована від реакційноздатного кінця полімеру, може бути усунута шляхом каталітичного гідрогенолізу. Таким чином отримують моноактивований гідроксиPAG відповідно до цього винаходу. Альтернативно, оборотне блокування усіх, крім однієї, кінцевих гідроксильних груп, як описано в Прикладі 6, може використовуватись у синтезі монофункціонально активованих гідроксиPAG.

PAG полімери, що використовуються у приготуванні кон'югатів відповідно до цього винаходу, можуть бути лінійними полімерами або можуть розгалужуватись в одній чи кількох точках у молекулі полімеру. Крім того, полімери, що використовуються для утворення кон'югатів відповідно до даного винаходу, можуть бути гомополімерами, в яких численні ланки одного мономерного типу з'єднані разом із утворенням полімеру, такого як полі(етиленгліколь), або вони можуть бути гетерополімерами або співполімерами (в яких мономерні ланки двох чи більше структур з'єднані разом із утворенням полімеру, такого як співполімер етиленоксиду і пропіленоксиду). Такі співполімери можуть бути випадковими співполімерами, блок-співполімерами або переміжними співполімерами.

Полімери, що використовуються відповідно до цього винаходу, можуть бути не реакційноздатними або реакційноздатними полімерами. Термін "не реакційноздатні полімери", що вживається тут, означає полімери, що не зв'язуються ковалентно із білком. Приклади таких "не реакційноздатних полімерів" включають (не обмежуючись названим) mPEG, який є лінійним полімером з етиленоксидних ланок з гідроксильною групою на одному кінці і метоксильною - на іншому, і PEG діол, який є лінійним полімером з етиленоксидних ланок з гідроксильними групами на обох кінцях. Термін "реакційноздатні полімери", що вживається тут, означає полімери, які можуть вступати в реакцію із доступними для розчинника нуклеофільними групами, наприклад, тіольними групами або аміно групами у біологічно активному компоненті (такому, як білок), включаючи (але не обмежуючись названим) альфа аміно групу або епсилон аміно групи лізину залишків. Приклади "реакційноздатних полімерів" включають (не обмежуючись названим) PEG, в яких гідроксильну кінцеву групу заміщено або перетворено на електрофільну групу, таку як сукцинімідилпропіонова кислота (як у "SPA-PEG"), або p-нітрофенілкарбонат (як у "NPC-PEG") або альдегід, як у PEG-альдегіді. На додаток до поліалкіленоксидів підходять полімери можуть включати полівінілові спирти, полі(оксиетилен-оксиметиленові) співполімери, поліаміди [наприклад, Rose, K., РСТ публікація WO 00/12587], полікарбоксилати, полі(вінілпіролідони) [von Specht, B.-U., та ін. (1973) *Norpe-Zwivv Z Physiol Chem* 354:1659-1660], полі D-амінокислоти і/або полі L-амінокислоти, поліакрилоїл-морфолін [Rocca, M., та ін. (1996) *Int J Artif Organs* 19:730-734] та декстрини [Iakunitskaya, L.M., та ін. (1980) *Prikl Biokhim Mikrobiol* 76:232-237]. Похідні PEG, PEO та інших PAO, що реагують більш чи менш селективно із різними сайтами на цільових біологічно активних компонентах, добре відомі з рівня техніки і їх можна придбати у таких постачальників, як Fluka (Мілуокі, Вісконсин); NOF Corporation (Токіо, Японія); Shearwater Corporation (Хантсвілл, Алабама), фірми Nektar Therapeutics (Сан-Карлос, Каліфорнія); Sigma Chemical Company (Сент-Луїс, Міссурі) або SunBio, Inc. (Анянг, Південна Корея).

Активовані форми полімерів, що придатні для використання у способах та композиціях даного винаходу, можуть включати будь-які монофункціонально активовані форми полімерів із гідроксильними групами на кінцях, що відомі з рівня техніки. Наприклад, підходять є лінійні та розгалужені PAO різних розмірів,

включаючи ті, що мають молекулярну масу (виключаючи масу активуючої групи) в діапазоні від приблизно 1кДа до приблизно 100кДа. Підхожі діапазони молекулярних мас включають (не обмежуючись названим): від приблизно 2кДа до приблизно 60кДа; від приблизно 2кДа до приблизно 30кДа; від приблизно 5кДа до приблизно 20кДа; від приблизно 10кДа до приблизно 20кДа; та від приблизно 18кДа до приблизно 60кДа, від приблизно 20кДа до приблизно 30кДа. У випадку лінійних PEG діапазон молекулярних мас від приблизно 20кДа до приблизно 30кДа відповідає ступеню полімеризації (n) в діапазоні від приблизно 450 до приблизно 680 мономерних ланок етиленоксиду. Слід зазначити, що переваги приєднання терапевтичного білка до полімерів із останнім, досить високим діапазоном молекулярних мас (тобто, >20-30кДа) вперше спостерігали задовго до того, як було виявлено імуногенність mPEG [Saifer, M., та ін., PCT публікація WO 89/01033, опублікована 9 лютого 1989р., яку включено сюди у всій її повноті шляхом посилання].

Лінійний полімер необов'язково може мати реакційноздатну групу на одному кінці або на обох кінцях, а отже бути "реакційноздатним полімером". У деяких варіантах втілення даного винаходу може бути бажаним використовувати сукцинімідоловий складний ефір монопропіоновокислотної похідної PEG, як розкрито у Harris, J.M., та ін., патенті США №5,672,662, який включено сюди повністю шляхом посилання, або інші активовані сукцинімідом PEG-карбонові кислоти. У деяких інших варіантах втілення може бути бажаним використовувати сукцинімідилкарбонатні похідні PEG ("SC-PEG"), як описано у Saifer, M., та ін., патентах США №№5,006,333; 5,080,891; 5,283,317 і 5,468,478, або р-нітрофенілкарбонатну похідну PEG, як розкрито у Kelly, S.J., та ін. (2001) див. вище; PCT публікації WO 00/07629 A2, див. вище і аналогічному патенті США №6,576,235 та в PCT публікації WO 01/59078 A2 див. вище. Більше того, інші типи реакційноздатних груп можуть використовуватись для синтезу полімерних кон'югатів білків. Ці похідні включають (не обмежуючись названим) альдегідні похідні PEG [Royer, G.P., патент США №4,002,531; Harris, J.M., та ін., патент США №5,252,714], амінові, бромфенілкарбонатні, карбонілімідазольні, хлорфенілкарбонатні, фторфенілкарбонатні, гідразидні, карбазатні, йодацетамідні, малеїмідні, ортопіридилдисульфідні, оксимні, фенілглюкмальні, тiazолідин-2-тіонові, тіоефірні, тіольні, триазинові та вінілсульфонові похідні PEG.

У деяких варіантах втілення даного винаходу бажано мінімізувати утворення внутрішньомолекулярних та міжмолекулярних поперечних зшивок у полімерах, таких як PEG, під час реакції, в якій полімер приєднується до біологічно активного компонента з утворенням кон'югатів відповідно до винаходу. Цього можна досягти шляхом використання полімерів, що активовані лише на одному кінці (які тут називаються "монофункціонально активованими PEG" або "монофункціонально активованими PAG"), або полімерних препаратів, в яких процентна частка біфункціонально активованих полімерів (які у випадку лінійних PEG називаються "біс-активованими PEG діолами") становить менше 30% або, більш прийнятно - менше 10% або, найбільш прийнятно - менше 2% (мас/мас). Використання активованих полімерів, що в основному є монофункціональними, може звести до мінімуму утворення усього з названого далі: внутрішньомолекулярних поперечних зшивок в молекулі білка, "гантелеподібних" структур, в яких одна нитка полімеру з'єднує дві молекули білка, та крупніших агрегатів чи гелів. У разі використання активованих полімерів, що реагують із аміногрупами, теоретична максимальна кількість ниток полімеру, які можуть приєднуватися до однієї молекули білка, відповідає загальному числу аміногруп. Реальна кількість доступних аміногруп на поверхні білка за тих чи інших умов приєднання полімеру може бути меншою від теоретичного максимуму.

Кон'югати відповідно до винаходу можуть містити одну чи кілька ниток поліалкіленгліколю, більш прийнятно, від приблизно однієї до приблизно 100 ниток, від приблизно однієї до приблизно 20 ниток на субланку лікувальних ферментів, і від приблизно однієї до приблизно трьох ниток та, більш прийнятно, від приблизно однієї до приблизно двох ниток на субланку рецепторзв'язувальних цитокінів, факторів росту, білкових гормонів та колонієстимулюючих факторів. У особливо прийнятних з таких варіантів втілення поліалкіленгліколю, що використовується для одержання кон'югата, містить одну чи дві нитки полі(алкіленгліколю) (зокрема, карбоксиПЕЗ, гідроксиПЕС дигідроксиПЕС або PEG-ацеталю). У деяких таких варіантах втілення лінійний або розгалужений поліалкіленгліколь має молекулярну масу від приблизно 1кДа до приблизно 100кДа, більш прийнятно - від приблизно 2кДа до приблизно 60кДа; від приблизно 5кДа до приблизно 20кДа; від приблизно 10кДа до приблизно 20кДа; від приблизно 18кДа до приблизно 60кДа; і більш прийнятно - від приблизно 18кДа до приблизно 22кДа або від приблизно 27кДа до приблизно 33кДа, якщо він лінійний, і разом від приблизно 36кДа до приблизно 44кДа, якщо полімер має дві гілки однакової маси.

Як зазначалось вище, кон'югати відповідно до винаходу містять один чи кілька PAG або PAO і, зокрема, одну чи кілька ниток PEG, ковалентно зв'язаних з одним чи кількома біологічно активними компонентами. Біологічно активні компоненти, до яких ковалентно приєднані один чи кілька полімерів (або їх ниток), називаються тут по-різному і еквівалентно "кон'югованими біологічно активними компонентами" або "модифікованими біологічно активними компонентами". Ці терміни слід відрізнити у даному описі від "некон'югованих біологічно активних компонентів", "початкових біологічно активних компонентів" або "немодифікованих біологічно активних компонентів". Усі названі терміни означають біологічно активні компоненти, до яких ковалентно не приєднані один чи кілька полімерів. В іншому аспекті даний винахід забезпечує способи та композиції для стабілізації розчинів біологічно активних компонентів шляхом примішування до них полімерів. Проте, слід розуміти, що "некон'югований", "немодифікований" або "початковий" біологічно активний компонент може включати інші не полімерні кон'югації або модифікації порівняно із диким типом або нативною молекулою, але він все ж буде розглядатись як "некон'югований", "немодифікований" або "початковий" відповідно до даного винаходу, оскільки цей біологічно активний компонент є "некон'югованим", "немодифікованим" або "початковим" у сенсі приєднання полімерів.

Термін "стабілізація" біологічно активного компонента (або "способи стабілізації" чи "стабілізований біологічно активний компонент") означає, що біологічно активний компонент було стабілізовано у способи даного винаходу (тобто, до біологічно активного компонента було ковалентно приєднано чи примішано полімер у способи, що відповідають даному винаходу). Такі стабілізовані біологічно активні компоненти демонструють певні змінені біохімічні та біофізичні властивості порівняно з біологічно активним компонентом, який не було стабілізовано (тобто, біологічно активним компонентом, до якого не було ковалентно приєднано

чи примішано полімер). До таких змінених біохімічних та біофізичних властивостей можуть належати (зокрема, для таких білків, як ферменти) зменшений аутоліз і, особливо, підтримання ферментативної активності білка під час інкубації за певних суворих експериментальних умов чи умов навколишнього середовища. У деяких варіантах втілення даного винаходу змінені біохімічні та біофізичні параметри можуть включати, наприклад, збільшений час напівжиття у кровообігу *in vivo*, покращену біодоступність і таке інше.

Будь-який компонент (як правило, молекула або макромолекулярний комплекс), що має біологічну (тобто, фізіологічну, біохімічну або фармацевтичну) активність, може бути придатним для використання в якості початкового компонента у даному винаході. Такі біологічно активні компоненти включають (але не обмежуються названим) білки, поліпептиди, пептиди, терапевтичні віруси, органічні сполуки тощо. Біологічно активні компоненти також включають фрагменти, варіанти та похідні таких білків, поліпептидів, пептидів, терапевтичних вірусів, органічних сполук тощо, зокрема, такі фрагменти, варіанти та похідні, що мають біологічну (тобто, фізіологічну, біохімічну або фармацевтичну) активність.

Органічні сполуки, підходять для використання в якості біологічно активних компонентів у даному винаході, включають (не обмежуючись названим) частини, такі як таксани, антрациклін, сполуки, у тому числі даунорубіцин, доксорубіцин, р-аміноанілінова гірчиця, мелфалан, цитозин арабінозид ("Ara-C") та інші антиметаболічні сполуки, наприклад, гемцитабін тощо. Альтернативно, біологічно активний компонент може являти собою серцево-судинний агент, антинеопластичний, антиінфекційний, протигрибковий агент, такий як ністатин та амфотерин В, седативний засіб, шлунково-кишковий засіб, агент, що виявляє активність у центральній нервовій системі, анальгетик, фертильний засіб, контрацептивний агент, протизапальний засіб, стероїдний засіб, протиурицемічний засіб, вазоділататор, вазоконстриктор і таке інше.

Підходять пептиди, поліпептиди, ферменти та інші білки, глікопротеїни тощо, що можуть використовуватись в якості біологічно активних компонентів у даному винаході, включають будь-який пептид, поліпептид, фермент чи інший білок і т.і., що має, принаймні, одну доступну аміногрупу, тіольну групу чи іншу групу, до якої можна приєднати полімер. Такі компоненти включають матеріали, що мають фізіологічні або фармакологічні активності, а також ті, що можуть каталізувати реакції в органічних розчинниках. Пептиди, поліпептиди і білки, що являють собою інтерес, включають (не обмежуючись названим) гемоглобін, сироваткові білки, такі як фактори згортання крові, наприклад, Фактори VII, VIII та IX, імуноглобуліни, інсулін, цитокіни, такі як інтерлейкіни, наприклад, IL-1 - IL-18, інтерферони (наприклад, IFN-альфа, IFN-бета, IFN-гамма та консенсусні IFN), колонієстимулюючі фактори, включаючи (але не обмежуючись названим) GM-CSF, G-CSF, макрофагальний колонієстимулюючий фактор, тромбopoетин, фактор росту і розвитку мегакаріоцитів, еритропоетин, похідний фактор росту тромбоцитів, білок, що активує фосфоліпазу ("PLAP"), фактор інгібування лейкої ("LIF", також відомий з рівня техніки як "Фактор Стіла"), нейротрофічні фактори та фактор стовбурових клітин і їх пептидні міметики. Рецепторзв'язувальні антагоністи біологічно активних агентів самі по собі є придатними для використання в якості біологічно активних компонентів відповідно до цього винаходу. Інші білки, що є предметом загального біологічного або терапевтичного інтересу, включають інсулін, рослинні білки, такі як лектини і рицини, фактори некрозу пухлин і споріднені білки, фактори росту, такі як трансформуючі фактори росту, наприклад, TGF-альфа або TGF-бета, фактори росту фібробластів, фактори росту епідермісу, фактори росту гепатоцитів, гормони, соматомедина, еритропоетин, пігментні гормони, гіпоталамічні вивільнюючі гормони, антидіуретичні гормони, пролактин, хоріонічний гонадотропін, фолікулостимулюючий гормон, тиреостимулюючий гормон, пролактин, активатор тканинного плазмінотина, їх рецепторзв'язувальні білкові антагоністи і таке інше. Багато з таких білків існують як у глікозильованій, так і в неглікозильованій формах. Неглікозильовані форми можуть бути отримані при їх продукуванні із використанням рекомбінантних способів в прокаріотах. Ці неглікозильовані продукти належать до пептидів і білків, що є придатними біологічно активними компонентами відповідно до даного винаходу.

Ферменти, що є предметом інтересу, включають вуглевод-специфічні ферменти, протеолітичні ферменти, оксидоредуктази, трансферази, гідролази, ліази, ізомерази та лігази. Не обмежуючись конкретними ферментами, приклади ферментів, що є предметом інтересу, включають аспарагіназу, аргіназу, аргініндезаміназу, аденозіндезаміназу, супероксид-дисмутази, ендотоксинази, каталазу, хімотрипсин, ліпази, урикази, аденозіндіфосфатазу, тирозинази і білірубіноксидазу. Вуглевод-специфічні ферменти, що є предметом інтересу, включають глюкозооксидазу, глюкозидази, галактозидази, глюкоцереброзидази, глюкуронідази тощо.

Також підходять для використання в якості біологічного активного компонента у кон'югатах відповідно до цього винаходу будь-які сполуки, що виявляють біологічну активність *in vivo*. Такі сполуки включають (не обмежуючись названим) амінокислотні послідовності, нуклеїнові кислоти (ДНК, РНК), пептидні нуклеїнові кислоти ("PNA"), фрагменти антитіл, одноланцюжкові зв'язувальні білки [див., наприклад, Ladner, R.C., та ін., патент США №4,946,778, розкриття якого включено сюди шляхом посилання], зв'язувальні молекули, включаючи розчинні рецептори, поліклональні антитіла, моноклональні антитіла, каталітичні антитіла та продукти злиття антитіл або їх фрагментів.

Білки або їх частини можна отримати або виділити, використовуючи способи, відомі спеціалістам із звичайним рівнем знань у цій галузі техніки, такі як хімічний синтез, культура клітин, тканини чи органу, виділення з тваринних джерел або методи рекомбінантних ДНК. Також передбачаються трансгенні джерела амінокислотних послідовностей, поліпептидів, білків тощо. Такі матеріали можна отримати з трансгенних тварин, наприклад, мишей, кроликів, свиней, кіз та корів, у яких білки експресуються у молоці, крові чи тканинах або у яйцях трансгенних птахів. Трансгенні комахи та грибні або бакуловірусні експресуючі системи також можуть бути джерелами. Крім того, до обсягу винаходу також включені мутантні варіанти білків.

Інші білки, що є предметом інтересу, - це алергенні білки, такі як амброзія, Антиген Е, бджолина отрута, кліщовий алерген тощо. Назване вище є ілюстративним переліком білків, придатних для даного винаходу. Слід розуміти, що інші пептиди, поліпептиди або білки або їх фрагменти, які конкретно тут не названі, але мають одну чи більше доступних аміногруп або тіольних груп, що підходять для з'єднання з одним чи кількома полімерами відповідно до цього винаходу, також мають на увазі і включені до обсягу даного винаходу.

У більш прийнятному аспекті винаходу сполука, що здатна з'єднуватись із полімером, є біологічно активною сполукою, придатною для лікарського або діагностичного застосування при лікуванні тварин, наприклад, ссавців, у тому числі і людей, у станах, в яких таке лікування є бажаним. Наведений вище список є ілюстративним і не обмежує перелік сполук, що їх можна модифікувати. Спеціалістам із звичайним рівнем знань у цій галузі техніки буде зрозуміло, що інші такі сполуки можна аналогічно модифікувати без зайвого експериментування. Слід розуміти, що біологічно активні матеріали, які конкретно тут не названі, але мають одну чи більше доступних нуклеофільних груп, таких як аміногрупи або тіоли, що можуть приєднуватись до одного чи кількох полімерів відповідно до цього винаходу, також мають на увазі і включені до обсягу даного винаходу.

Слід зазначити, що біологічно активні компоненти, які підходять для включення в кон'югати відповідно до винаходу, можуть бути речовинами або сполуками, які самі по собі не є активними у кон'югаті або одразу після гідролітичного вивільнення з кон'югата, але можуть стати активними після подальшої хімічної обробки чи реакції. Наприклад, ліки проти раку, які вводяться до кровотоку у формі кон'югата відповідно до даного винаходу, можуть залишатись неактивними, доки не потраплять в ракову клітину або клітину пухлини, де будуть активовані хімічним процесом, що проходить в такій раковій клітині або клітині пухлини, наприклад, ферментною реакцією, що є унікальною для такої клітини або особливо ефективно в ній проходить.

Інші сполуки, придатні для використання в якості біологічно активних сполук у кон'югатах та композиціях даного винаходу, включають гідроксил-вмісні сполуки, такі як камптотексин і споріднені інгібітори топоізомераз I. Камптотексин - це нерозчинний у воді цитотоксичний алкалоїд, що продукується деревами *Camptotheca acuminata*, які ростуть у Китаї, і деревами, *Nothapodytes foetida* які ростуть в Індії. Камптотексин і споріднені сполуки та аналоги добре відомі, як потенційні протиракові та протипухлинні засоби. Вже було показано, що вони виявляють цю активність *in vitro* та *in vivo* (див. наприклад, патенти США №4,943,579, 5,004,758 і Re 32,518; вміст яких включено сюди шляхом посилання). Такі сполуки і їх похідні можна отримати у відомі методи синтезу без зайвого експериментування. Більш прийнятні для використання у цьому винаході похідні камптотексину включають ті, що містять 20-ОН або іншу гідроксильну групу, здатну безпосередньо реагувати із активними формами полімерів даного винаходу, такими як монофункціонально активовані PEG.

Додаткові гідроксил-вмісні частини, що підходять для використання в якості біологічно активних компонентів в описаних тут кон'югатах, включають таксани і похідні паклітакселю. Для цілей даного винаходу термін "таксан" включає усі сполуки таксанового сімейства терпенів. Так, Таксол (паклітаксель), 3'-заміщені t-бутоксикарбоніл-амінові похідні (таксотери) тощо, а також інші аналоги, які без зайвих зусиль синтезуються із використанням стандартних для органічної хімії методів або можуть бути отримані з комерційних джерел, таких як Sigma (Сент-Луїс, Міссурі), входять до обсягу даного винаходу. Було виявлено, що ці сполуки та їх похідні є ефективними протираковими засобами. Численні дослідження показують, що ці агенти виявляють активність проти різноманітних злоякісних утворень та інших видів раку.

Спеціалісту із звичайним рівнем знань у галузі техніки буде зрозуміло, що будь-який біологічно активний компонент, відомий і доступний у галузі техніки, підходить для кон'югації із монофункціональними полімерами, що мають зменшену антигенність, істотно зменшену антигенність або антигенність, що не піддається виявленню, відповідно до даного винаходу. Згідно з певними аспектами даного винаходу ці початкові біологічно активні компоненти використовуються для одержання кон'югатів, в яких один чи кілька PAG або PАО ковалентно зв'язані із біологічно активною молекулою. Сайти на початкових біологічно активних молекулах, до яких можуть приєднуватись полімери, переважно включають лізинові залишки на пептидних молекулах, причому кожен з цих залишків має по дві аміногрупи. Одна з цих аміногруп (альфа-аміногрупа) бере участь в утворенні пептидного зв'язку (окрім випадків, коли лізин є аміно-кінцевим залишком білка), а інша аміногрупа (епілон-аміногрупа) залишається доступною для приєднання полімеру. Іншими сайтами на молекулах білка або пептиду, до яких можуть переважно приєднуватись полімери, включають, серед інших, альфа-аміногрупу на аміно-кінцевому залишку поліпептиду; сульфгідрильні групи цистеїнових залишків на білку або пептиді [Braxton, S.M., патент США №5,766,897], до яких можуть приєднуватись полімери, активовані вінілсульфоном, maleїмідом, йодацетамідом, бромацетамідом або ортопіридилдисульфідом, серед інших реагуючих із тіолом груп, що відомі з рівня техніки; гуанідино групи аргінінових залишків на білку або пептиді [Sano, A., та ін., патент США №5,093,531], до яких можуть приєднуватись полімери, активовані фенілглюксалем; альфа-карбоксильну групу C-кінцевого залишку, бета-карбоксильні групи аспартатних залишків на білку або пептиді та гама-карбоксильні групи глутаматних залишків на білку або пептиді [Sakane, T., та ін. (1997) Pharm Res 14:1085-1091], до яких можуть приєднуватись аміно або гідрозид похідні полімеру. Певно, що інші місця на молекулі білка або пептиду, підходять для приєднання одного або кількох поліалкіленоксидів, будуть очевидними для спеціаліста із звичайним рівнем знань у цій галузі, особливо при розгляді первинних і третинних структур пептиду та розкритих тут відомостей.

Перед приєднанням полімеру до цільового біологічно активного компонента (наприклад, білка) може бути вигідним спочатку очистити компонент від забруднювачів; в протилежному випадку, аналіз ступеню модифікації інтактного компонента може бути ускладнений утворенням полімерних кон'югатів фрагментів компонента та інших забруднювачів. Очищення біологічно активного компонента може бути вигідним незалежно від того, чи отриманий білок, який буде піддаватись кон'югації, з природних джерел або продукований рекомбінантними методами, оскільки забруднення можна очікувати в препаратах, одержаних з обох джерел. Очищення такого біологічно активного компонента може здійснюватись у будь-який відомий спосіб, знайомий спеціалісту із звичайним рівнем знань у галузі техніки, включаючи (але не обмежуючись названням) електрофорез, діаліз, сольову екстракцію (таку, як осадження сульфатом амонію), хроматографію (таку, як афінна хроматографія, іонообмінна хроматографія, хроматографія із виключенням за розміром, високоефективна рідинна хроматографія ("HPLC"), швидка білкова рідинна хроматографія ("FPLC") тощо) або їх поєднання. Слід розуміти, однак, що очищення біологічно активного компонента не є істотним для одержання кон'югатів полімеру і біологічно активного компонента, що відповідають даному винаходу, оскільки біологічно активні компоненти (особливо білки) у неочищених препаратах можуть бути вигідно кон'юговані із полімерами у

способи згідно з даним винаходом.

PAG, що застосовуються у практиці даного винаходу, які, як зазначено вище, більш прийнятно активовані реакцію із групою приєднання, можуть приєднуватись до будь-якої з кількох груп, які можуть бути наявні на молекулі біологічно активного компонента, наприклад, карбоксильних груп або аміногруп, що не беруть участь в утворенні пептидних зв'язків, тільних груп та фенольногідроксильних груп. Для деяких пептидів або білків більш прийнятним є те, щоб активовані PAG приєднувались до N-кінцевої альфа-аміногрупи і/або аміногруп лізинових залишків та/або сульфгідрильних груп цистеїнових залишків.

Неочищений або очищений біологічно активний компонент (наприклад, білок) може бути інкубований із активованим полімером в буфері із рН в діапазоні від приблизно 11 або найвищого рН, при якому будь-яка інактивація білка лужністю може бути оборотною, до приблизно рН 5 або найнижчого рН, при якому будь-яка інактивація білка кислотністю може бути оборотною [див Arakawa, T., та ін. (1990) Biopolymers 29:1065-1068]. Як відомо з рівня техніки і очевидно для спеціаліста із звичайним рівнем знань у цій галузі техніки, використання низького рН для приєднання полімерів до білків може бути бажаним у випадку використання деяких білків або застосування певних хімічних процесів приєднання. Проте, використання більш високих рН може бути вигідним для деяких інших білків та хімічних процесів приєднання, залежно від того, який вплив рН справляє на розчинність та стабільність білка та від співвідношення швидкості інактивації активованого полімеру (тобто, це відбувається спонтанно чи каталізується самим полімером) і швидкості приєднання полімеру до цільового білка у способи, відомі в галузі техніки.

Реакція між PAG та біологічно активним компонентом як правило проводиться у розчині, більш прийнятно - у водному буферному розчині, що забезпечує рН у діапазоні від приблизно 5 до приблизно 11. Зокрема, більш прийнятними для приєднання PAG до білкового біологічно активного компонента (наприклад, поліпептиду, пептиду, білка чи їх фрагментів) будуть значення рН від приблизно 7 до приблизно 9, а найбільш прийнятно - від приблизно 7 до приблизно 8. В інших варіантах втілення більш прийнятними будуть значення рН від приблизно 4,5 до приблизно 6,5. Приклади буферних розчинів, які забезпечують значення рН у зазначених діапазонах при 25°C, включають, але не обмежуються названим:

50мл 0,1 молярн. дигідрофосфату калію + від 5,6 до 46,1мл 0,1 молярн. NaOH, розбавлений до 100мл

50мл 0,025 молярн. борату + від 2,0 до 20,5мл 0,1 молярн. HCl, розбавлений до 100мл

50мл 0,025 молярн. борату + від 0,9 до 18,3мл 0,1 молярн. NaOH, розбавлений до 100мл

50мл 0,05 молярн. бікарбонату натрію + від 5,0 до 10,7мл 0,1 молярн. NaOH, розбавлений до 100мл

50мл 0,05 молярн. оцтової кислоти + від 5,0 до 30мл 0,1 молярн. NaOH, розбавлений до 100мл

50мл 0,05 молярн. Tris HCl + від 10 до 50мл 0,1 молярн. Tris основи, розбавлений до 100мл

Точно визначити кількість кислоти або основи, які потрібні для досягнення бажаного рівня рН, без зайвих зусиль зможе спеціаліст у цій галузі техніки.

Якщо у конкретному випадку буде необхідним використання біологічного буфера, можна застосувати один з названих далі:

Гідроксипіперазин-етансульфонова кислота ("HEPES")

3-(N-Морфоліно)пропансульфонова кислота ("MOPS")

3-(N-Морфоліно)-2-гідроксипропансульфонова кислота ("MOPSO")

Піперазин-N, N'-біс(2-гідроксипропансульфонова кислота) ("POPSO")

Реакція між PAG і біологічно активним компонентом, як правило, проводиться за умов, що не спричиняють інактивацію або денатурацію, наприклад, при температурах, при яких біологічно активний компонент зберігає, по суті, свою біологічну активність, та при перемішуванні, що не перевищує необхідного для адекватного змішування реагентів. Реакція між PAG та біологічно активними білками, більш прийнятно, проводиться при температурі в діапазоні від приблизно 4°C до приблизно 40°C. Більш прийнятно, реакцію проводять між PAG та білками при кімнатній температурі, тобто від приблизно 20°C до приблизно 25°C. Реакції між PAG та небілковими біологічно активними агентами, наприклад, пептидами і біологічно активними органічними сполуками, можуть проводитись при більш високих чи більш низьких температурах, що забезпечують стабільність тієї чи іншої біологічно активної органічної хімічної речовини, яку з'єднують із PAG.

Спеціалістам в галузі техніки буде зрозуміло, що кількість використовуваного PAG у співвідношенні до кількості біологічно активного компонента залежатиме від бажаного ступеню приєднання полімеру до біологічно активного компонента. Наприклад, якщо треба провести реакцію PAG з конкретною фракцією доступних для розчинника лізинових залишків (у випадках, коли біологічно активний компонент є поліпептидом), молярна концентрація PAG має принаймні дорівнювати молярній концентрації лізину, що будуть брати участь у приєднанні. Очевидно, якщо дериватизації підлягають не всі з доступних для розчинника реакційноздатних сайтів на молекулі біологічно активного компонента, відповідно, менше потрібно буде PAG. Проте, у загальному випадку використання надлишкових кількостей PAG, як визначили винахідники, більш прийнятними будуть молярні надлишки порядку 2-10.

Час, необхідний для реакції, залежить від низки факторів, таких як температура реакції, концентрації реагентів та бажаний ступінь дериватизації. За перебігом реакції можна слідували за допомогою звичайних засобів, таких як періодичний аналіз зразків за допомогою хроматографії із виключенням за розміром або гел-електрофореза. Реакцію у зручний спосіб і в потрібний момент можна припинити шляхом додавання низькомолекулярної сполуки, що має реакційноздатну групу, наприклад, гліцин, для зв'язування надлишку амін-реакційноздатного PAG або шляхом хроматографічного поділу. При кімнатній температурі звичайний час реакції PAG з зв'язувальними групами більшості біологічно активних компонентів (наприклад, лізиновими групами поліпептидних ланцюжків) становить від приблизно 15 хвилин до приблизно 24 годин. При більш низьких температурах час реакції може бути довшим. Спеціалісту-практику буде зрозуміло, що час кон'югації і кількість та тип PAG не повинні призводити до інактивації використовуваного біологічно активного компонента, тобто ці параметри не повинні призводити до значної втрати біологічної активності біологічно активного компонента. Вираз "не призводити до значної втрати біологічної активності біологічно активного компонента" означає, що кон'югований із PAG біологічно активний компонент демонструє, принаймні, приблизно 10%,

більш прийнятно - принаймні, приблизно 20%, 35%, 50%, 75%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% чи більше від рівня біологічної активності (наприклад, ферментативної активності; рецепторзв'язувальної активності; анти-неопластичної активності тощо), яку демонстрував *in vitro* або *in vivo* той самий біологічно активний компонент, не кон'югований із PAG.

Очищення з'єднаного із полімером біологічно активного компонента може здійснюватись у способи, що зазвичай застосовуються спеціалістами у галузі техніки, такі як, наприклад, хроматографія із виключенням за розміром, іонообмінна хроматографія, ультрафільтрація, діаліз тощо. Якщо потрібно, розчини продукту реакції можуть концентруватись на роторному випарнику, і продукт можна одержати в сухому стані шляхом ліофілізації.

Залежно від конкретного біологічно активного компонента, що використовується, та міри його реагування із PAG, отриманий продукт приєднання, як очікується, буде корисним для діагностики або лікування, маючи порівняно із біологічно активним компонентом, що не прореагував, зменшену антигенність і імуногенність, подовжений час життя в кровообігу та підвищену стабільність, зберігаючи при цьому корисний рівень біологічної активності.

Біологічно активний компонент може реагувати із монофункціонально активованими розгалуженими полі(етиленгліколевыми) полімерами, які було описано вище (зокрема, одним чи кількома монофункціонально активованими розгалуженими дигідроксиPEG, наприклад, дигідроксиPEG-лізин), у водному реакційному середовищі, що може бути буферним, залежно від вимог до рН нуклеофільного і активованого полімеру. Оптимальним рН для реакції, як правило, є значення між приблизно 6,5 та приблизно 8,5 і, більш прийнятно, приблизно 7,4 для підтримання розчинності і стабільності більшості поліпептидів. Оптимальне рН для приєднання активованого PAG, наприклад, NPC-PEG, до урикаси ссавця становить приблизно рН 10, а оптимальне рН для селективного приєднання певних активованих PAG до N-кінцевої альфа аміногрупи білка або пептиду знаходиться в діапазоні від приблизно 4 до приблизно 7. Оптимальні умови реакції, необхідні для підтримання стабільності біологічно активного компонента, ефективності реакції тощо, будуть відомі спеціалісту із звичайним рівнем знань у цій галузі техніки. Більш прийнятний діапазон температур: від приблизно 4°C до приблизно 40°C. Температура реакції не повинна перевищувати температуру, при якій нуклеофіл може піддатись денатурації чи розпаданню. Більш прийнятним є проведення реакції нуклеофілу із надлишком активованого розгалуженого полімеру. По закінченні реакції кон'югат збирають та очищають, наприклад, шляхом діалізації, колонкової хроматографії, їх комбінацій тощо.

Використання молекулярного моделювання може допомогти скласти стратегію оптимізації приєднання полімеру до білка. Наприклад, дані рентгенівської кристалографії можна використовувати для створення комп'ютерних зображень доступних для розчинника поверхонь білків [Sayle, R.A., та ін. (1995) *Trends Biochem Sci* 20:374-376]. Корисним може виявитись і структурний аналіз, оснований на вимірюваннях ядерного магнітного резонансу. Частина доступних сайтів на поверхні, які можуть брати участь в реакції того чи іншого активованого полімеру, та розподіл ниток полімеру серед різних сайтів може модулюватись шляхом вибору відповідної активуючої групи, молярного відношення полімеру до білка та відповідних умов реакції приєднання (наприклад, рН, температура, концентрації реагентів, тривалість інкубації). В деяких умовах може бути вигідним приєднувати полімер до залишків, що розташовані достатньо далеко від активного сайту ферменту для того, щоб мінімізувати будь-який негативний вплив на біологічну активність. Наприклад, поверхня Протеїнази К містить багато потенційних сайтів для приєднання полімерів, що активуються різними хімічними засобами. Проте, попереднє відкриття, зроблене деякими з названих тут винахідників, показало що більшість доступних для розчинника залишків лізину Протеїнази К розташовані виключно на ділянці ферменту, яка знаходиться відносно далеко від каталітичних сайтів. Це робить використання реагуючих з аміном полімерів особливо бажаним у випадку цього конкретного ферменту [див. спільну заявку на патент США №10/183,607, подану 28 червня 2002р., яку включено сюди у всій її повноті шляхом посилання].

У деяких варіантах втілення (наприклад, у випадку ферментів, в яких каталітична ділянка містить аміногрупи (такі, як описано вище), з якими може вступати в реакцію активований полімер), може бути бажаним закрити активний сайт від контакту з активованим полімером. У таких випадках фермент може бути міцно, проте оборотно, зв'язаний із субстратним аналогом або конкурентним інгібітором, достатньо великим, щоб стерично ускладнювати доступ активованого полімеру до реакційноздатних залишків в активному сайті чи поряд з ним [див., наприклад, Nahri, L.O., та ін. (1991) *J Protein Chem* 70:385-389]. Альтернативно, ці аналоги або інгібітори можуть бути зв'язані із твердою матрицею, до якої потім може адсорбуватись білок. Зв'язаний із отриманою "афінною матрицею" білок може реагувати із активованим полімером. Ця стратегія може звести до мінімуму приєднання реакційноздатного полімеру до сайтів, в яких таке приєднання може інгібувати каталіз. Вибірково модифікований білок може потім бути вивільнений з афінної матриці у способи, відомі спеціалістам у цій галузі техніки [див. Wilchek, M., та ін. (1984) *Methods Enzymol* 704:3-55]. Отримані кон'югати можуть включати молекули білка, до яких полімер в більш прийнятний спосіб приєднаний у сайтах, де він не заважає біологічній активності білка.

Після реакції приєднання кон'югати, дериватизовані різною мірою, можуть бути відділені один від одного за допомогою хроматографії із виключенням за розміром і/або іонообмінної хроматографії, як описано Sherman, M.R., та ін. (1997) див. вище. Наприклад, хроматографія на колонці Superdex®75 HR 10/30 або Superdex® 200 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech, Піскатавей, Нью-Джерсі) дає змогу відділити молекули білка, РЕвіловані різною мірою, а також відділити їх від залишкового вільного PEG та від більшості побічних продуктів реакції приєднання [див. спільну заявка на патент США №10/183,607 вище].

Винахід забезпечує стабілізовані кон'югати PEGілованих біологічно активних компонентів із зменшеною антигенністю, отримані у способи відповідно до даного винаходу. У відповідних аспектах винахід також забезпечує композиції, що містять один чи більше таких кон'югатів. Композиції даного аспекту винаходу включають один чи кілька (наприклад, один, два, три, чотири, п'ять, десять тощо) описаних вище кон'югатів, що відповідають даному винаходу. У деяких таких аспектах композиція може включати один чи кілька додаткових компонентів, таких як одна чи кілька буферних солей, один чи кілька роз'єднувальних агентів, один

чи кілька детергентів, один чи кілька білків (наприклад, один чи кілька ферментів), один чи кілька полімерів тощо. Композиції даного аспекту винаходу можуть бути у будь-якій формі, включаючи тверду форму (наприклад, сухий порошок) або розчин (зокрема, у формі фізіологічно сумісного буферизованого сольового розчину, що містить один чи кілька кон'югатів відповідно до цього винаходу).

Деякі композиції відповідно до цього винаходу складені для використання в якості фармацевтичних композицій для профілактичних, діагностичних або терапевтичних цілей. Такі композиції, як правило, включають один чи кілька кон'югатів відповідно до цього винаходу і один чи кілька фармацевтично прийнятних носіїв або наповнювачів. Термін "фармацевтично прийнятний носій або наповнювач", що вживається тут, означає нетоксичний твердий, напівтвердий або рідкий наповнювач, розріджувач, інкапсулюючий матеріал або допоміжні речовини будь-якого типу, що можуть переноситись твариною, включаючи людину та інших ссавців, які вводять цю фармацевтичну композицію, без негативних наслідків від їх додавання.

Фармацевтичні композиції цього винаходу можуть вводитись реципієнту у будь-який придатний спосіб: перорально, ректально, парентерально, внутрішньосистемно, вагінально, внутрішньочеревно, місцево (у вигляді порошків, мазей, крапель або трансдермального пластиру), трансбукально, у вигляді ротового чи назального спрею або шляхом інгаляції. Термін "парентеральні", що вживається тут, означає способи введення, що включають внутрішньовенні, внутрішньом'язові, внутрішньочеревні, інтрацистернальні, підшкірні та внутрішньосуглобні ін'єкції та вливання.

Фармацевтичні композиції для парентеральних ін'єкцій відповідно до цього винаходу можуть включати фармацевтично прийнятні стерильні водні або неводні розчини, дисперсії, суспензії або емульсії, а також стерильні порошки, призначені для перетворення на стерильні ін'єкційні розчини або дисперсії безпосередньо перед використанням. Приклади підхожих водних і неводних носіїв, розріджувачів, розчинників або основ включають воду, етанол, поліолі (такі як гліцерин, пропіленгліколь, полі(етиленгліколь) тощо), карбоксиметилцелюлозу та їх підхожі суміші, рослинні олії (такі як оливкова олія) та придатні для ін'єкцій органічні складні ефіри, такі як етилолеат. Потрібну плинність можна підтримувати, наприклад, використовуючи покриваючі матеріали, такі як лецитин, підтримуючи потрібний розмір частинок у випадку дисперсії і застосовуючи поверхнево-активні речовини.

Фармацевтичні композиції даного винаходу можуть також містити ад'юванти, такі як консерванти, змочувальні засоби, емульгатори та диспергатори. Запобігти впливу мікроорганізмів можна шляхом включення різних протибактеріальних і протигрибкових засобів, наприклад, парабену, бензилового спирту, хлорбутанолу, фенолу, сорбінової кислоти тощо. Бажаним може бути включення осмотичних агентів, таких як цукри, хлорид натрію і т.і. Подовжене абсорбування ін'єкційної фармацевтичної форми може забезпечуватись включенням агентів, що затримують абсорбцію, таких як моностеарат алюмінію, гідрогелі та желатин.

У деяких випадках для того, що подовжити дію ліків, бажано уповільнити абсорбцію після підшкірної або внутрішньом'язової ін'єкції. Цього можна досягнути шляхом використання рідкої суспензії кристалічного або аморфного матеріалу із слабкою розчинністю в водних рідинах тіла. Тоді швидкість абсорбування ліків залежатиме від швидкості їх розчинення, яка, в свою чергу, може залежати від фізичної форми. Альтернативно, затриману абсорбцію введених парентерально ліків забезпечують шляхом їх розчинення або суспендування у масляній основі.

Депо-форми для ін'єкцій отримують шляхом формування мікроінкапсульованих матриць ліків у полімерах, що розсмоктуються, таких як полілактид-полігліколід. Швидкістю вивільнення ліків можна управляти через співвідношення між ліками та полімером-носієм, а також природу полімеру-носія, що використовується у конкретному випадку. Приклади інших полімерів, що розсмоктуються, включають біосумісні полі(ортоєфіри) та полі(ангідриди). Депо-форми для ін'єкцій готують також шляхом включення ліків до ліпосом або мікреомульсій, сумісних із тканинами тіла.

Склади для ін'єкцій можуть бути стерилізовані, наприклад, шляхом фільтрування крізь фільтр, що уловлює бактерії, або шляхом введення стерилізуючих засобів у форму стерильних твердих композицій, які розчиняють чи диспергують у стерильній воді або іншому стерильному середовищі для ін'єкцій безпосередньо перед використанням.

Тверді дозувальні форми для перорального введення включають капсули, таблетки, пілюлі, порошки та гранули. У таких твердих дозувальних формах активні сполуки змішані з, принаймні, одним фармацевтично прийнятним наповнювачем або носієм, таким як цитрат натрію або двокальцієвий фосфат і/або а) заповнювачами або сухими розбавителями, такими як крохмалі, лактоза, сахароза, глюкоза, маніт та кремнієва кислота, б) зв'язувальними засобами, такими як, наприклад, карбоксиметилцелюлоза, альгінати, желатин, полівінілпіролідон, сахароза та гуміарабік, с) гігроскопічними речовинами, такими як гліцерин, d) засобами для розпадання, такими як агар-агар, карбонат кальцію, картопляний або тапіоковий крохмаль, альгінова кислота, деякі силікати та карбонат натрію, е) уповільнювачами розчинення, такими як парафін, f) прискорювачами абсорбції, такими як четвертинні амонієві сполуки, g) змочувальними агентами, такими як, наприклад, цетиловий спирт і гліцеролмоностеарат, h) адсорбентами, такими як каолін і бентонітова глина, та і) ковзальними речовинами, такими як тальк, стеарат кальцію, стеарат магнію, тверді полі(етиленгліколі), лаурилсульфат натрію та їх сумішами. У випадку капсул, таблеток і пігулок дозувальна форма може містити також буферні агенти.

Тверді композиції подібного типу також можуть використовуватись для заповнення м'яких та твердих желатинових капсулах, використовуючи такі наповнювачі як лактоза (молочний цукор), а також високомолекулярні PEG і т.і.

Тверді дозувальні форми - таблетки, драже, капсули, пілюлі та гранули - можуть готуватись із покриттями або оболонками, такими як ентеральні або хрономодулюючі покриття та інші покриття, добре відомі у техніці складання фармацевтичних композицій. Вони можуть необов'язково містити глушники та можуть мати такий склад, що забезпечує вивільнення активного (активних) інгредієнта (інгредієнтів) лише або більш прийнятно у певній частині шлунково-кишкового тракту, необов'язково, в уповільнений спосіб. Приклади композицій для заливання, що можуть використовуватись, включають полімерні речовини та віски. Активні сполуки можуть

також бути в мікроінкапсульованій формі, якщо необхідно - з одним чи кількома зазначених вище наповнювачів.

Рідкі дозувальні форми для перорального введення включають фармацевтично прийнятні емульсії, розчини, суспензії, сиропи та еліксири. На додаток до активних сполук рідкі дозувальні форми можуть містити інертні розріджувачі, які зазвичай використовуються у галузі техніки, такі як, наприклад, вода чи інші розчинники, розчиняючі агенти та емульгатори, такі як етиловий спирт, ізопропіловий спирт, етилкарбонат, етилацетат, бензиловий спирт, бензилбензоат, пропіленгліколь, 1,3-бутиленгліколь, диметилформамід, олії (зокрема, бавовняна, арахісова, кукурудзяна, зародкова, оливкова, касторова та кунжутна олія), гліцерин, тетрагідрофурфуріловий спирт, PEG, складні ефіри сорбіту і жирних кислот та їх суміші.

На додаток до інертних розріджувачів пероральні композиції можуть також містити ад'юванти, такі як змочувальні засоби, емульгатори та суспендувальні агенти, підсолоджувачі, смакові домішки та засоби покращення запаху.

Суспензії можуть містити, окрім активних сполук, суспендувальні засоби, як, наприклад, етоксировані ізостеарилові спирти, поліоксетиленсорбіт та складні ефіри сорбіту, мікрокристалічна целюлоза, метагідрат алюмінію, бентоніт, агар-агар, трагакант та їх суміші.

Місцеве введення включає нанесення на шкіру або слизову оболонку, включаючи поверхні легень та очей. Композиції для місцевого застосування, включаючи ті, що призначені для інгаляції, можуть бути приготовані у вигляді сухого порошку, що може перебувати під тиском або не перебувати під тиском. У порошкових композиціях, що не перебувають під тиском, активні інгредієнти у тонко диспергованій формі можуть використовуватись у суміші із крупнішим фармацевтично прийнятним інертним носієм із розміром часток, наприклад, до 100 мікрметрів в діаметрі. Підхожі інертні носії включають цукри, такі як лактоза і сахароза. Бажаним є те, щоб принаймні 95мас.% часток активного інгредієнта мали дійсний розмір частинок у діапазоні від 0,01 до 10 мікрметрів.

Альтернативно, фармацевтична композиція може перебувати під тиском та містити стиснений газ, такий як азот, або пропелент у вигляді зрідженого газу. Зріджене середовище пропеленту і, загалом, уся композиція можуть бути, більш прийнятно, такими, що активні інгредієнти не розчиняються в них значною мірою. Композиції, що перебувають під тиском, можуть також містити поверхнево-активний агент. Поверхнево-активний агент може бути рідким або твердим неіонним поверхнево-активним агентом або може являти собою твердий аніонний поверхнево-активний агент. Більш прийнятним є використання твердого аніонного поверхнево-активного агента у формі натрієвої солі.

Ще однією формою місцевого введення є введення в око. У цьому виді введення кон'югати або композиції даного винаходу вводяться у фармацевтично прийнятній офтальмологічній основі, такий, що активні сполуки перебувають у контакт з поверхнею ока протягом достатнього часу, щоб сполуки могли проникнути в кон'юнктиву або рогівку і внутрішні частини ока, наприклад, передню камеру, задню камеру, склисте тіло, водянисту вологу, склисту вологу, рогівку, райдужну оболонку/ціліарне тіло, кришталик, судинну оболонку/сітківку та склеру. Фармацевтично прийнятною офтальмологічною основою може бути, наприклад, мазь, рослинна олія або інкапсулюючий матеріал.

Композиції для ректального або вагінального введення - більш прийнятно, супозиторії - можуть готуватись шляхом змішування кон'югатів або композицій відповідно до винаходу із підходящими не подразнюючими наповнювачами або носіями, такими як масло какао, PEG або віск для супозиторіїв, як є твердими при кімнатній температурі, але рідкі при температурі тіла і, отже, плавляться у прямій кишці або піхві із вивільненням ліків.

Фармацевтичні композиції, що застосовуються у описаних тут методах лікування, можуть вводитись у формі ліпосом. Як відомо з рівня техніки, ліпосоми, як правило, одержують з фосфоліпідів або інших ліпідних речовин. Ліпосоми утворюють моно- або багаточастинові гідровані рідкі кристали, дисперговані у водному середовищі. Може використовуватись будь-який нетоксичний, фізіологічно прийнятний ліпід, що перетворюється у процесі обміну речовин і здатний утворювати ліпосоми. Окрім одного чи кількох кон'югатів або композицій відповідно до цього винаходу ці фармацевтичні композиції у формі ліпосом можуть також містити один чи кілька стабілізаторів, консервантів, наповнювачів тощо. Більш прийнятними ліпідами є фосфоліпіди та фосфатидилхоліни (лецитини), як природні, так і синтетичні. Методи отримання ліпосом відомі з рівня техніки [див., наприклад, Zalipsky, S., та ін., патент США №5,395,619]. Ліпосоми, що містять фосфоліпіди, кон'юговані із PEG, частіше за все - приєднаний до mPEG фосфатидилетаноламін, мають покращені властивості, у тому числі, подовжений час життя у кровообігу ссавців [Fisher, D., патент США №6,132,763]. Ще кращим буде заміна mPEG при утворенні названих PEG-ліпосом на гідроксиPEG відповідно до цього винаходу. Найбільш вигідною буде заміна активованих mPEG у синтезі PEG-діацилгліцерину, що може входити до PEG-ліпосом, на монофункціонально активовані гідроксиPEG відповідно до цього винаходу.

Кон'югати або композиції даного винаходу можуть вводитись *in vitro*, *ex vivo* або *in vivo* у клітини з метою покращення реакції клітини на активну (активні) сполуку (сполуки). Спеціаліст із звичайним рівнем знань зрозуміє, що ефективні кількості тієї чи іншої активної сполуки, кон'югата або композиції можуть бути визначені емпіричним шляхом і можуть використовуватись у чистій формі або у таких формах (якщо вони існують), як фармацевтично прийнятний склад або проліки. Сполуки, кон'югати або композиції даного винаходу можуть вводитись тварині або людині, яка потребує цього, у вигляді ветеринарних або фармацевтичних композицій у поєднанні із одним чи кількома фармацевтично прийнятними наповнювачами. Слід розуміти, що у разі введення пацієнту-людині, загальна денна, тижнева або місячна доза сполук і композицій даного винаходу буде визначатись лікуючим лікарем, виходячи з обґрунтованої медичної оцінки. Рівень терапевтично ефективної дози для того чи іншого пацієнта залежить від цілої низки факторів, включаючи тип у ступінь клітинної реакції, якої треба досягти; вид і/або активність конкретної (конкретних) речовини (речовин), кон'югата (кон'югатів) або композиції (композицій), що застосовується; вік, масу тіла або площу поверхні, загальний стан здоров'я, стать, дієту та рівень активності пацієнта; час введення, шлях введення, швидкість виведення активної (активних) сполуки (сполук); тривалість лікування; інші ліки, які пацієнт приймає в

поєднанні або паралельно із сполукою (сполуками), кон'югатом (кон'югатами) або композицією (композиціями); та подібні фактори, добре відомі спеціалістам із звичайним рівнем знань в фармацевтичній і медичній царині. Наприклад, з рівня техніки добре відомий спосіб, коли спочатку сполуку, кон'югат або композицію відповідно до винаходу вводять у дозах, менших від необхідних для досягнення бажаного терапевтичного ефекту, а потім поступово збільшують дози аж до отримання потрібного результату.

Режими дозування можуть бути організовані в індивідуальний для кожного пацієнта спосіб, щоб забезпечити попередньо визначену концентрацію активної сполуки у крові, яку визначають із застосуванням звичайних для галузі техніки методів, наприклад, хроматографія із виключенням за розміром, іонообмінна хроматографія або HPLC із оберненою фазою. Отже, режими дозування для пацієнта можуть регулюватись так, щоб досягти відносно постійних рівнів у крові (відповідно до результатів вимірювання за допомогою HPLC), і це здійснюється у способи, добре відомі і звичні для спеціалістів із звичайним рівнем знань у медичній, фармацевтичній і/або фармакологічній галузі.

Діагностичне застосування кон'югата відповідно до даного винаходу може полягати у визначенні місця розташування антигенної частини, наприклад, раку, у тілі тварини, зокрема, людини, шляхом введення кон'югованого із полімером антитіла згідно з даним винаходом. Цей кон'югат мітять у його білковій або полімерній частині у способи, що забезпечують його подальше детектування, наприклад, оптичне, радіометричне, флуоресцентне або резонансне детектування, які будуть описані далі.

Очікують, що кон'югати PAG та біологічно активної речовини (які, більш прийнятно, вводяться у вигляді композицій, що містять такі кон'югати) відповідно до цього винаходу матимуть більш тривалий час напівжиття у кровообігу та зменшену антигенність й імуногенність *in vivo*. Ці властивості послаблюють або покращують ситуацію із швидким кліренсом з кровообігу, що спостерігається для багатьох терапевтичних сполук (зокрема, біологічно активних сполук, таких як використовуються в якості компонентів кон'югатів у даному винаході), коли їх вводять тварині, особливо людині або іншому ссавцю, із лікувальною метою. Використання кон'югатів або композицій даного винаходу також зменшує або усуває проблеми, пов'язані із кількаретовим введенням певної біологічно активної сполуки або компонента, що може призвести до виникнення імунної реакції у пацієнта. Особливо непокоїть ті імунні реакції, які нейтралізують біологічну активність і/або підвищують швидкість виведення біологічно активної сполуки з кровообігу (таким чином, зменшуючи ефективність діагностичної або лікувальної процедури), і ті, що справляють несприятливу дію на пацієнта.

Отже, в іншому аспекті даного винаходу кон'югати і композиції відповідно до винаходу можуть використовуватись у діагностичних або терапевтичних способах, наприклад, у діагностиці, лікуванні або профілактиці численних фізичних розладів у тварин, зокрема, ссавців, таких як людина, які страждають на такий розлад чи мають схильність до нього. При таких підходах мета лікування полягає у тому, щоб затримати або запобігти розвитку розладу і/або вилікувати чи викликати ремісію розладу і/або зменшити чи звести до мінімуму побічні ефекти інших терапевтичних режимів. Отже кон'югати PAG та біологічно активного компонента і композиції даного винаходу можуть застосовуватись для захисту, пригнічення або лікування фізичних розладів, таких як інфекції або захворювання. Термін "захист" від фізичного розладу, що вживається тут, включає "запобігання", "пригнічення" та "лікування". "Запобігання" передбачає введення кон'югата або композиції відповідно до цього винаходу до виникнення захворювання або фізичного розладу, "пригнічення" означає введення такого кон'югата або композиції до появи клінічних проявів захворювання; отже, "запобігання" і "пригнічення" фізичного розладу, як правило, проводять для тварини, яка схильна або сприйнятлива до розладу, хоча поки і не страждає на нього. "Лікування" фізичного розладу передбачає введення терапевтичного кон'югата або композиції після виявлення проявів захворювання.

Зрозуміло, що у медицині і ветеринарії не завжди можна чітко розрізнити "запобігання" фізичному розладу та його "пригнічення". У багатьох випадках справжня подія чи події, що дають початок розладу, можуть бути невідомими або латентними, і ані пацієнту, ані лікарю може не бути відомо про таку подію, доки не мине певний час після неї. Отже, більш звичайною практикою є застосування терміну "профілактика", на відміну від "лікування", що включає і "запобігання", і "пригнічення", визначені тут. Таким чином, термін "захист", що вживається стосовно способів відповідно до цього винаходу, включає і "профілактику".

Способи даного аспекту винаходу можуть включати один чи кілька етапів, які дозволять клініцисту досягнути описаних вище лікувальних цілей. Один з таких способів відповідно до винаходу може, наприклад, включати:

(a) виявлення тварини (більш прийнятно - ссавця, такого як людина), яка страждає на фізичний розлад або схильна до нього; і

(b) введення тварині ефективної кількості однієї чи кількох сполук або композицій відповідно до цього винаходу, як описано тут, зокрема, одного чи кількох PAG кон'югатів біологічно активного компонента (або однієї чи кількох фармацевтичних композицій, що містять такі кон'югати), таким чином, щоб введення зазначених сполук або композицій запобігало, затримувало або діагностувало розвиток фізичного розладу у тварини або виліковувало його чи забезпечувало ремісію.

Тварина, яка "схильна" до фізичного розладу, означає тут тварину, яка не демонструє ряд очевидних фізичних симптомів такого розладу, але для неї існує генетичний, фізіологічний чи інший ризик розвитку цього розладу. В описаних тут способах виявлення тварини (такої, як ссавець, у тому числі і людина), яка схильна, сприйнятлива до певного фізичного розладу або страждає на нього, може здійснюватись із використанням стандартних, добре відомих у галузі техніки способів, знайомих клініцисту із звичайним рівнем підготовки, включаючи, наприклад, радіологічні аналізи, біохімічні аналізи (наприклад, аналізи відносного рівня тих чи інших пептидів, білків, електролітів тощо у зразку, отриманому у тварини), хірургічні методи, генетичні перевірки, вивчення історії родини, фізичну пальпацію, патологічні або гістологічні тести (наприклад, мікроскопічне дослідження тканини, зразків рідини тіла або мазків, імунологічні аналізи тощо), тестування рідин тіла (наприклад, крові, сироватки, плазми, цереброспінальної рідини, сечі, слини, сперми тощо), візуалізацію (наприклад, радіологічна, флуоресцентна, оптична, резонансна (наприклад, із використанням ядерного магнітного резонансу (ЯМР) або електронного спінового резонансу (ЕСР)) тощо. Після того, як

тварину виявлено у один чи кілька з названих способів, її можна піддати інтенсивному і/або випереджувальному лікуванню для запобігання, пригнічення, затримки або виліковування фізичного розладу.

Фізичні розлади, яким можна запобігти, які можна діагностувати чи лікувати кон'югатами, композиціями та способами даного винаходу, включають будь-які фізичні розлади, для запобігання, діагностики або лікування яких може застосовуватись біологічно активний компонент кон'югата. Такі розлади включають (але їх перелік не обмежується названим) різні види раку (наприклад, різні види раку молочної залози, раку матки, раку яєчників, раку простати, раку яєчок, лейкемії, лімфоми, раку легень, нейрологічного раку, раку шкіри, раку голови та шиї, раку кісток, раку товстої кишки та інших видів шлунково-кишкового раку, раку підшлункової залози, раку міхура, раку нирок та інші карциноми, саркоми, аденоми та мієломи); інфекційні захворювання (наприклад, бактеріальні, грибкові, вірусні захворювання (включаючи гепатит та ВІЛ/СНІД), паразитарні захворювання тощо); генетичні розлади (наприклад, кістозний фіброз, боковий аміотрофічний склероз, м'язову дистрофію, хворобу Гоше, хворобу Помпе, важкий комбінований імунodefіцит тощо), анемію, нейтропенію, гемофілію та інші хвороби крові; неврологічні розлади (наприклад, розсіяний склероз та хворобу Альцгеймера); ферментні розлади (наприклад, подагру, уремію, гіперхолестеринемію тощо); розлади неясної етіології (наприклад, серцево-судинні захворювання, підвищений кров'яний тиск тощо); та інші важливі у медицині розлади, знайомі спеціалісту із звичайним рівнем підготовки. Композиції і способи відповідно до цього винаходу можуть використовуватись для запобігання прогресуванню захворювання, такого як хіміопрофілактика передракового ураження у злаякісне ураження.

Таким чином, у терапевтичних методах даного винаходу використовуються один чи кілька кон'югатів відповідно до винаходу або одна чи кілька фармацевтичних композицій відповідно до винаходу, які можуть вводитись тварині, яка потребує цього, у різні способи, включаючи пероральний, ректальний, парентеральний (включаючи внутрішньовенні, внутрішньом'язові, внутрішньочеревні, інтрацистернальні, підшкірні та внутрішньосуглобні ін'єкції та вливання), внутрішньосистемний, вагінальний, внутрішньочеревний, місцевий (у вигляді порошків, мазей, крапель або трансдермального пластиру), трансбукальний, у вигляді ротового чи назального спрею або шляхом інгаляції. Відповідно до винаходу, ефективна кількість кон'югатів або композицій можуть вводитись *in vitro*, *ex vivo* або *in vivo* у клітини або тваринам, які страждають на певний розлад або схильні до нього, таким чином, запобігаючи, затримуючи, діагностуючи або лікуючи цей розлад в організмі тварини. Термін "ефективна кількість кон'югата (або композиції)", що вживається тут, означає таку кількість, при якій кон'югат виявляє біологічну активність біологічно активного компонента кон'югата, таким чином, запобігаючи, затримуючи, діагностуючи, лікуючи або виліковуючи фізичний розлад в організмі тварини, якій ввели цей кон'югат, що відповідає винаходу. Спеціаліст із звичайним рівнем знань зрозуміє, що ефективні кількості кон'югатів або композицій даного винаходу можуть бути визначені емпіричним шляхом відповідно до стандартних методик, добре відомих спеціалістам із звичайним рівнем підготовки у фармацевтичній і медичній галузі; див., наприклад, Beers, M.H., та ін., під ред. (1999) *Merck Manual of Diagnosis & Therapy*, 17-е видання, Merck and Co., Rahway, NJ; Hardman, J.G., та ін., під ред. (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10-е видання, McGraw-Hill Professional Publishing, Elmsford, NY; Speight, T.M., та ін., під ред. (1997) *Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 4-е видання, Blackwell Science, Inc., Boston; Katzung, B.G. (2000) *Basic and Clinical Pharmacology*, 8-е видання, Appleton and Lange, Norwalk, CT; ці джерела та джерела, процитовані в них, включені сюди у всій повноті шляхом посилання.

Слід розуміти, що у разі введення пацієнту-людині, загальна денна, тижнева або місячна доза кон'югатів і композицій даного винаходу буде визначатись лікуючим лікарем, виходячи з обґрунтованої медичної оцінки. Наприклад, задовільні результати отримують при введенні певних кон'югатів або композицій даного винаходу у відповідних дозах, що залежать від конкретної біологічно активної сполуки, яка використовується. Ці дози будуть досить знайомі спеціалісту із звичайним рівнем підготовки та можуть бути без зайвих зусиль визначені емпірично, проводячи лише звичайні експерименти. Відповідно до цього аспекту винаходу кон'югати або композиції можуть вводитись одноразово або поділятись на окремі дози, наприклад, два рази на день або на тиждень чи на місяць. Відповідні дозувальні режими для різних шляхів введення (наприклад, парентерально, підшкірно, внутрішньом'язово, внутрішньоочно, інтраназально тощо) можуть бути без зайвих зусиль визначені емпірично, проводячи лише звичайні експерименти, або вони будуть очевидні для спеціаліста із звичайним рівнем підготовки. Це залежить від виду біологічно активного компонента.

У додаткових видах застосування кон'югати і композиції даного винаходу можуть використовуватись для спеціального націлювання діагностичного або терапевтичного агента на клітину, тканину, орган або організм, що експресує рецептор, зв'язується, включає або в інший спосіб може прийняти біологічно активний компонент кон'югата. Способи відповідно до цього аспекту винаходу можуть включати, наприклад, контактування клітини, тканини, органу або організму з одним чи кількома кон'югатами даного винаходу, причому кон'югати додатково включають один чи кілька діагностичних або терапевтичних агентів (більш прийнятно, ковалентно зв'язаних із РАО або PEG компонентом кон'югата), так що кон'югат приймається клітиною, тканиною, органом або організмом через будь-який механізм (наприклад, опосередкований рецепторами ендцитоз, піноцитоз, фагоцитоз, дифузія тощо). Таким чином, діагностичний або терапевтичний засіб доставляється у клітину, тканину, орган або організм. Діагностичний або терапевтичний засіб, що використовується відповідно до даного аспекту винаходу, може бути (але не обмежується названим) принаймні одним агентом, вибраним з нуклеїнової кислоти, органічної сполуки, білка, антитіла, ферменту, глікопротеїну, ліпопротеїну, елемента, ліпиду, сахариду, ізотопу, вуглеводу, радіофармацевтичного засобу, зонду, що може виявлятись, або будь-якого їх поєднання, причому все назване може бути мічене з метою подальшого виявлення, як описано тут. Терапевтичний засіб, що використовується у цьому аспекті даного винаходу, може справляти терапевтичний ефект на клітину-мішень (або тканину-мішень, орган-мішень або організм-мішень), вибраний з наведеного далі переліку (але не обмежений ним): корегування дефективного гена або білка, дія ліків, токсичний ефект, ефект стимулювання росту, ефект пригнічення росту, метаболічний ефект, катаболічний ефект, анаболічний ефект, протівірусна дія, протигрибкова дія, протибактеріальна дія,

гормональний ефект, нейрогуморальний ефект, ефект стимуляції клітинного диференціювання, ефект інгібування клітинного диференціювання, нейромодуляторний ефект, антинеопластичний ефект, протипухлинна дія, ефект стимуляції або інгібування продукування інсуліну, ефект стимуляції кісткового мозку, п्लीорипотентний ефект стимуляції стовбурових клітин, ефект стимуляції імунної системи та будь-яка інша відома лікувальна дія, що може забезпечуватись терапевтичним засобом, що доставляється у клітину (тканину, орган або організм) через систему доставки відповідно до цього аспекту даного винаходу.

Ці додаткові терапевтичні засоби, що також можуть включати біологічно активний кон'югат або композицію відповідно до цього винаходу, можна вибрати (без обмеження названим) з відомих та нових сполук і композицій, у тому числі антибіотиків, стероїдів, цитотоксичних засобів, вазоактивних ліків, антитіл та інших лікувальних засобів. Необмежуючі приклади таких агентів включають антибіотики та інші ліки, що використовуються у лікуванні бактеріального шоку, такі як гентаміцин, тобраміцин (небцин), нафцилін, парентеральні цефалоспориноли тощо; адреностероїди та їх аналоги, такі як дексаметазон, що зменшує ураження клітин ендотоксинами; вазоактивні ліки, такі як альфа-адренорецептор-блокуючий агент (наприклад, феноксibenзамін), агоніст бета-адренорецептора (наприклад, ізопротеренол) та допамін.

Кон'югати та композиції даного винаходу можуть також використовуватись для діагностики захворювання або моніторингу терапевтичної реакції. У деяких таких способах кон'югати відповідно до цього винаходу можуть містити одну чи кілька міток, що можуть детектуватись (такі, як описано тут у різних розділах). У зазначених конкретних способах ці мічені кон'югати даного винаходу можуть використовуватись для виявлення клітин, тканин, органів або організмів, що експресують рецептори або в інший спосіб можуть прийняти біологічно активний компонент кон'югатів. В одному прикладі такого способу клітина, тканина, орган або організм контактує з одним чи кількома міченими кон'югатами з цього винаходу, що можуть детектуватись, в умовах, які сприяють прийняттю кон'югата клітиною, тканиною або організмом (наприклад, шляхом зв'язування кон'югата із рецептором на поверхні клітини, пінолізу або дифузії кон'югата всередину клітини), а потім детектують кон'югат, зв'язаний з клітиною або включений у неї, використовуючи способи виявлення, що відповідають мітці (наприклад, флуоресцентне детектування флуоресцентно мічених кон'югатів; магнітно-резонансна візуалізація магнітно мічених кон'югатів; радіовізуалізація радіоактивно мічених кон'югатів тощо). Інші способи використання таких мічених із можливістю детектування кон'югатів можуть включати, наприклад, візуалізацію клітини, тканини, органа чи організму або внутрішньої структури тварини (включаючи людину) шляхом введення ефективної кількості міченої форми одного чи кількох кон'югатів даного винаходу та вимірювання випромінювання, що може детектуватись, пов'язаного із клітиною, тканиною, органом або організмом (чи твариною). Методи виявлення різних типів міток та їх використання у діагностичній та терапевтичній візуалізації добре відомі спеціалістам із звичайним рівнем підготовки. Вони описані тут у різних розділах.

В іншому аспекті кон'югати і композиції даного винаходу можуть використовуватись у методах модуляції концентрації або активності конкретного рецептора, який реагує на біологічно активний компонент кон'югата, на поверхні клітини, яка експресує такий рецептор. Під "модуляцією" активності певного рецептора розуміють, що кон'югат після зв'язування із рецептором активує або інгібує фізіологічну активність (наприклад, внутрішньоклітинний каскад сигналізації), опосередковану цим рецептором. Не бажаючи обмежуватись певним механістичним поясненням регуляторної дії кон'югатів даного винаходу, слід зазначити, що ці кон'югати можуть антагонізувати фізіологічну активність клітинного рецептора шляхом зв'язування рецептора біологічно активним компонентом кон'югата, таким чином, блокуючи зв'язування природного агоніста (наприклад, некон'югованого біологічно активного компонента) та запобігаючи активації рецептора природним агоністом, у той самий час не спричиняючи значної активації фізіологічної активності самого рецептора. Способи відповідно до цього аспекту винаходу можуть включати один чи кілька етапів, наприклад, контактування клітини (*in vitro* або *in vivo*) з одним чи кількома кон'югатами даного винаходу в таких умовах, в яких кон'югат (тобто, частина кон'югата, що є біологічно активним компонентом) зв'язується із рецептором, який реагує на такий біологічно активний компонент, на поверхні клітини, але, по суті, не активує цей рецептор. Ці методи будуть корисними для різних діагностичних та терапевтичних цілей, і це очевидно для спеціаліста із звичайним рівнем підготовки у цій галузі техніки.

Даний винахід також забезпечує набори, що містять кон'югати і/або композиції відповідно до винаходу. Ці набори, як правило, включають упаковку, таку як ящик, картонна коробка, пробірка чи подібне, що містить один чи кілька щільно упакованих всередині посудин, таких як флакони, пробірки, ампули, пляшечки і т.і., причому перша посудина містить один чи кілька кон'югатів і/або композицій відповідно до даного винаходу. Набори відповідно до цього аспекту винаходу можуть ще включати один чи кілька додаткових компонентів (наприклад, реагентів і сполук), необхідних для здійснення одного чи кількох застосувань кон'югатів та композицій даного винаходу, такі як один чи кілька компонентів, що використовуються для діагностики, лікування або запобігання певному захворюванню або фізичному розладу (наприклад, один чи кілька додаткових, терапевтичних сполук або композицій, один чи кілька діагностичних реагентів, один чи кілька носіїв або наповнювачів тощо), один чи кілька додаткових кон'югатів або композицій даного винаходу тощо.

Спеціалісту із звичайним рівнем підготовки у відповідних галузях будуть очевидні інші можливі модифікації і адаптації способів та застосувань, описаних тут, що не виходять за межі обсягу винаходу або будь-якого з його варіантів втілення. Після докладного опису даного винаходу воно стане більш зрозумілим із посиланням на наведені далі приклади, які включені сюди лише з метою ілюстрації і які не мають обмежувати обсяг винаходу.

Приклад 1: Отримання та тестування антитіл до монометоксиPEG

Раніше повідомлялось, що кролів можна імунізувати до різних PEG шляхом введення тваринам кон'югатів, в яких PEG приєднано до імуногенного білка-носія [Richter, A.W., та ін. (1983) *Int Arch Allergy Appl Immunol* 70:124-131]. Моноклональне антитіло, що реагує з поліефірним основним ланцюгом PEG, виробляли шляхом ін'єкування миші mPEG кон'югата β -глюкуронідази та вибору клонів гібридами, що продукують антитіла до

PEG [Cheng, T.-L., та ін. (1999), див. вище; Cheng, T L, та ін. (2000) див. вище; Tsai, N.-M., та ін. (2001), див. вище; Roffler, S., та ін., опублікована патентна заявка США №2001/0028881 A1 та патенти США №№6,596,849 і 6,617,118; розкриття усіх їх включено сюди шляхом посилання у всій повноті]. Інше моноклональне антитіло, що реагує із поліефірним основним ланцюгом PEG, було нещодавно розкрито Roberts, M.J., та ін. у патентній заявці США №2003/001704 A1.

Для того, щоб розробити чутливі способи виявлення PEG у кон'югатах PEG-білок, готували поліклональні антитіла проти PEG як описано нижче. Оскільки майже всі PEG кон'югати терапевтичних білків, описані в рівні техніки, були синтезовані із використанням mPEG, названі тут винахідники дослідили роль метоксильної групи в імунореактивності кон'югатів, що містять mPEG. p-нітрофенілкарбонатні похідні 10-кДа mPEG спеціально синтезувала Shearwater Corporation (Хантсвілл, Алабама) - філіал Nektar Therapeutics (Сан-Карлос, Каліфорнія). Отримали уретан-зв'язаний mPEG кон'югат рекомбінантної урикази ссавця, що містив мінімальну кількість ниток цього 10-кДа mPEG, необхідну для сольобілізації білка в фізіологічному pH (приблизно дві нитки PEG або mPEG на 35кДа субланку урикаси). Ця кількість PEG не була достатньою для пригнічення незвичайно високої імуногенності щодо урикаси [див. Sherman, M.R., та ін., PCT публікація WO 01/59078 A2, та Kelly, S.J., та ін. (2001) див. вище, розкриття яких включено сюди шляхом посилання у всій їх повноті]. Цей препарат PEG-урикаси кількаразово вводили ін'єкцією трьом кроликам у ад'юванті Фрейнда. У кроликів брали кров для приготування антисироватки, що містила поліклональні антитіла проти урикаси, кон'югатів PEG-урикаси та PEG.

Кожному кролику вводили ін'єкцією препарат PEG-урикаси: один раз у повному ад'юванті Фрейнда і п'ять разів (із інтервалом від одного до чотирьох тижнів) - у неповному ад'юванті Фрейнда. Аналіз крові проводили приблизно через два тижні після кожної з трьох останніх ін'єкцій. Сироватку готували з кожного з дев'яти зразків крові, і малі кількості сироватки тестували на наявність антитіл проти PEG за допомогою ферментного імуносорбентного аналізу ("ELISA"), використовуючи 96-лункові планшети, покриті mPEG кон'югатами білка, який структурно не є спорідненим до урикаси.

В кожному взятій крові отримували антисироватку, яка реагувала з PEG в процесі аналізів ELISA. Кожен з трьох кроликів реагував на імунізацію PEG із якісно подібною кінетикою та подібною специфічністю до метоксильної кінцевої групи mPEG. Це вимірювали за допомогою конкурентного ELISA. Спочатку провели дот-блот аналіз для визначення чутливості анти-PEG антитіл у сироватці кроликів. Розчини PEG різного розміру та структури і розчин PEG-урикаси, який використовували для імунізації кроликів, наносили плямами ("спотами") на полівінілідендифторидну блот-мембрану (Invitrogen, Карлсбад, Каліфорнія; каталожний №LS2002). Після блокування мембрани розчином 2% (мас/об.) нежирного сухого молочного порошку мембрану інкубували із розчином кролячої антисироватки до PEG-урикаси, яку отримали в описаний вище спосіб. Потім в якості вторинного антитіла наносили розведення антитіл проти IgG кролика, продуктованих в організмі кози та з'єднаних із лужною фосфатазою (Calbiochem, Сан-Дієго, Каліфорнія; каталожний №401371). Активність лужної фосфатази на блоті визначали із використанням комбінації 5-бром-4-хлор-3-індолілфосфату та нітросинього тетразолію (Sigma, каталожний №B-1911), як було описано раніше (Blake, M.S., та ін. (1984) Anal Biochem 736:175-190, розкриття яких включено сюди шляхом посилання у всій їх повноті). Із високою чутливістю та специфічністю кролячі антитіла проти PEG виявляли розчини PEG та кон'югат mPEG-білок, які тестували.

Приклад 2: Демонстрація ролі метоксильної групи у антигенності mPEG

Названі тут винахідники несподівано виявили, що анти-PEG антитіла, отримані як описано у Прикладі 1, були спрямовані, в основному, проти метоксильної кінцевої групи mPEG компонента антигену. На Фіг.1 показані результати конкурентного аналізу ELISA, в якому 96-лункові планшети були покриті mPEG кон'югатом білка, який структурно не є спорідненим до урикаси. Після блокування планшета 2% сироваткою кози додавали розчини із зростаючою концентрацією 4,8-кДа mPEG (Polymer Laboratories, каталожний №6570-5010), 10-кДа mPEG (Union Carbide, каталожний №MPEG-10,000) або 10-кДа t-бутоксипег (Polymer Laboratories, каталожний №29999997) та інкубували 1:1000 розведенням кролячої антисироватки, утвореної проти кон'югата mPEG-урикаси. Після вилучення розчину міру зв'язування анти-PEG антитіл із кон'югатом mPEG-білка на планшеті визначали спектрофотометрично, використовуючи кон'юговане з пероксидазою вторинне антитіло (козячий IgG проти кролика, Calbiochem®, Сан-Дієго, Каліфорнія; каталожний №401393), а потім додавали пероксидазний субстрат, о-фенілендіаміндігдрохлорид (Sigma, Сент-Луїс, Міссурі; каталожний №P-9781). Для кожного зразка спостерігали початкову швидкість реакції (у міліюдиницях абсорбції за хвилину) у відсутності конкурента. Її приймали за 100%. Криві двох розчинів mPEG, що перекриваються, показують, що довжина основного ланцюга PEG не є основним визначальним фактором його антигенності. Крива t-бутоксипег зсунута вправо приблизно на 2 log одиниці. Це показує, що у t-бутоксипег приблизно в 100 разів менша афінність, ніж у mPEG, до антитіл, вироблених проти кон'югата mPEG-білок. У попередніх неопублікованих експериментах, які провели деякі з названих тут винахідників, було виявлено, що t-бутоксипег виявляє значну імуногенність у разі кон'югації із імуногенним білком. Отже, хоча на Фіг.1 можна бачити дуже малу переверну реактивність t-бутоксипег з антитілами, виробленими проти mPEG, використання t-бутоксипег замість mPEG в отриманні PEGілованих терапевтичних білків не вирішує проблеми імуногенності PEG компонента.

Результати, подані на Фіг.1, показують, що метоксильна група на mPEG є домінуючою антигенною групою на молекулі полімеру. Для підтвердження цього висновку антитіла, отримані в описаний у Прикладі 1 спосіб, піддавали конкурентному ELISA аналізу, проведеному як пояснено для Фіг.1 із використанням PEG різного розміру та структури, що містять одну або дві метоксильні групи. Результати зв'язування антитіл подано на Фіг.2а у вигляді графіка - функції молярної концентрації метоксильних груп у кожному зразку. Концентрацію конкурента, що забезпечувала 50% інгібування зв'язування ("IC50"), розраховували із використанням рівняння для 5-параметричної сигмоїдної кривої та програми SigmaPlot®, (SPSS Science, Чикаго, Іллінойс).

Як показано на Фіг.2а, подібно антигенними на молярній основі виявились такі PEG: лінійні PEG із одною метоксильною групою ("10-кДа mPEG"), отримані шляхом гідролізу mPEG-NPC (PEG-Shop), та "моно-20-кДа

mPEG-лізин", синтезований шляхом приєднання лізину до 20-кДа NPC-PEG (Shearwater, каталожний №M-NPC-20,000); лінійний PEG з двома метоксильними групами ("Біс-(2-кДа) mPEG" (Sigma-Aldrich, каталожний №81314)) та великий "розгалужений" PEG, що містить дві метоксильні групи ("Ди-(20-кДа) mPEG-лізин" (Shearwater, каталожний №PEG2-NHS-40K)). І, навпаки, крива меншого "розгалуженого" PEG з двома метоксильними групами ("Ди-(5-кДа) mPEG-лізин" (Shearwater, каталожний №2Z3X0L01)) була зсунута вліво від середнього для результатів інших зразків на 0,5-0,6 log одиниць. Це показує, що ця форма "розгалуженого" mPEG у три-чотири рази більш антигенна, ніж інші зразки, випробувані у даному експерименті. На Фіг.2b подані ті самі дані, що і на Фіг.2a, але у вигляді функції не молярної концентрації метоксильних груп, а масової концентрації PEG (мкг/мл). Вона підтримує висновок про те, що метоксильна група відіграє основну роль у взаємодії mPEG із анти-mPEG антитілами.

На Фіг.3 подані деякі з даних на Фіг.1, 2a та 2b у форматі, що демонструє пряму залежність антигенності від числа метоксильних груп на молекулу PEG. Ці зразки представляють 10-кДа PEG: без метоксильної групи ("10-кДа t-бутоксипес"), з однією метоксильною групою ("10-кДа mPEG") або з двома метоксильними групами ("Ди-(5-кДа) mPEG-лізин"). Результати показують, що антигенність даного полімеру і, отже, кон'югата відповідно до даного винаходу, отриманого із використанням даного полімеру, прямо залежить від кількості метоксильних груп у молекулі PEG полімеру. Чим більша кількість метоксильних груп, тим вища афінність полімеру до антитіл, вироблених проти кон'югата mPEG-білок.

Разом ці результати показують, що повне інгібування зв'язування кролячих антитіл із mPEG кон'югатом можна досягнути шляхом конкурування із розчинами PEG і, особливо, mPEG. Більше того, здатність розчинів mPEG блокувати зв'язування кролячих анти-PEG антитіл із mPEG кон'югатами неспорідненого білка пов'язана із наявністю метоксильних груп. На основі концентрації за масою mPEG із нижчою молекулярною масою виявились більш сильними конкурентами, ніж mPEG із більшою молекулярною масою. Це проілюстровано на Фіг.2b. Цей висновок відповідає тому факту, що відношення маси гідроксильних груп до загальної маси полімеру зменшується із зростанням молекулярної маси полімеру. Серед протестованих PEG найбільш сильними антигенами (на молярній основі) були "розгалужені" PEG із двома метоксильними групами, які іноді називають парасольковими або "U-PEG" [Martinez, A., та ін., патент США №5,643,575] або "Y-PEG" [Greenwald, R.B., та ін. опублікована заявка на патент США №2002/0052443 A1].

Приклад 3: Тестування анти-PEG антитіл із PEG без метоксильних груп

Термін "PharmaPEG" вживається тут для позначення лінійних або розгалужених PEG без антигенної групи на кінці або кінцях, дистальному (дистальних) відносно кінця, який активовано або який може бути активовано. З попередніх прикладів можна дійти висновку, що антигенність полімеру і, отже, полімерного кон'югата біологічно активного агента є функцією наявності метоксильних груп у полімері. Для подальшого тестування цього висновку провели конкурентні аналізи ELISA, як описано для Фіг.1, в яких порівнювали здатність mPEG ("4,8-кДа mPEG") та 12-кДа, 20-кДа і 35-кДа PharmaPEG, які не мають метоксильних груп або інших алкоксильних груп на кінцях лінійних полімерів, зв'язуватись із анти-mPEG антитілами. Результати подані на Фіг.4. Зсув трьох кривих PharmaPEG відносно кривої mPEG, показаний на Фіг.4, свідчить про те, що при проведенні аналізу із анти-mPEG антитілами антигенність PharmaPEG приблизно у 100 разів менша, ніж у mPEG. Отже, полімери без метоксильних груп (наприклад, PharmaPEG) мають зменшену або істотно зменшену антигенність порівняно із полімерами, які традиційно використовуються для біокон'югації фармацевтичних засобів, наприклад, mPEG.

Як зазначалось вище, на основі маси конкурентні можливості mPEG зворотно пропорційні їх молекулярній масі. Проте, PEG без метоксильних груп мали лише приблизно 1% конкурентну здатність порівняно з mPEG, незалежно від їх молекулярних мас. Ці результати підтримують висновок про те, що монофункціонально реакційноздатні полімери без метоксильних груп особливо підходять для використання в одержанні полімерних кон'югатів біологічно активних агентів, що мають зменшену, істотно зменшену або відсутню антигенність порівняно з кон'югатами, отриманими із використанням mPEG, особливо "розгалужених" mPEG, таких як ди-mPEG-лізин.

Приклад 4: Виявлення РЕСілованих кон'югатів білка за допомогою вестерн-блотингу із анти-mPEG антитілами

МонометоксиPEG кон'югати карбоангідрази (ЕС 4.2.1.1; "CAH") використовували як моделі для тестування здатності анти-mPEG антитіл детектувати РЕСіловані кон'югати білка після електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію ("SDS-PAGE"). Гелі електроблотували на полівінілідендіфторинду мембрану, і блоти інкубували із кролячими анти-mPEG антитілами (розведення 1:200), а потім інкубували із вторинним антитілом (козячий проти-кролячий IgG), кон'югованим із лужною фосфатазою, та піддавали дії субстрату, що приводило до утворення забарвленого осаду. Цей спосіб імунологічного виявлення білків або кон'югатів полімеру та білка, перенесених з електрофоретичного геля на мембрану, часто називають "вестерн-блотингом" [Tsang, V.C.W., та ін., (1984) Anal Biochem 143:304-307]. Процес виявлення та реактиви були такими самими, як було описано для дот-блот аналізу в Прикладі 1. Результати подані на Фіг.5a. Смужки 1 та 2 показують гель, забарвлений для виявлення білка із використанням Рубінового марки SYPRO® (Molecular Probes, Юджин, Орегон, каталожний №S-12000) та фотографуванням цифровим фотоапаратом Kodak із оранжевим/червоним фільтром видимого світла (Molecular Probes, каталожний №S-6655) у темній шафі із освітленням 302нм. Смужки 3 і 4 показують результати вестерн-блотингу для тих самих зразків. Анти-mPEG антитіла можна бачити в положеннях усіх РЕВілованих варіантах (смужка 3), але не у випадку немодифікованої карбоангідрази (смужка 4).

На Фіг.5b подано кількісний аналіз інтенсивностей смуг у гелі та вестерн-блотингу, показаних на Фіг.5a. Аналіз проведено із використанням програмного забезпечення Kodak 1D Imaging Analysis для цифрової обробки зображень (Kodak, Рочестер, Нью-Йорк). Горизонтальна вісь представляє відстань переміщення відносно фронту барви, а вертикальна вісь - відносні інтенсивності забарвлення білка або забарвлення анти-mPEG. Нижня крива являє собою смуги попередньо забарвлених SeeBlue Plus2™ стандартних білків [Invitrogen Corporation, Карлсбад, Каліфорнія; каталожний №LC5625], де піки, пронумеровані від 1 до 8,

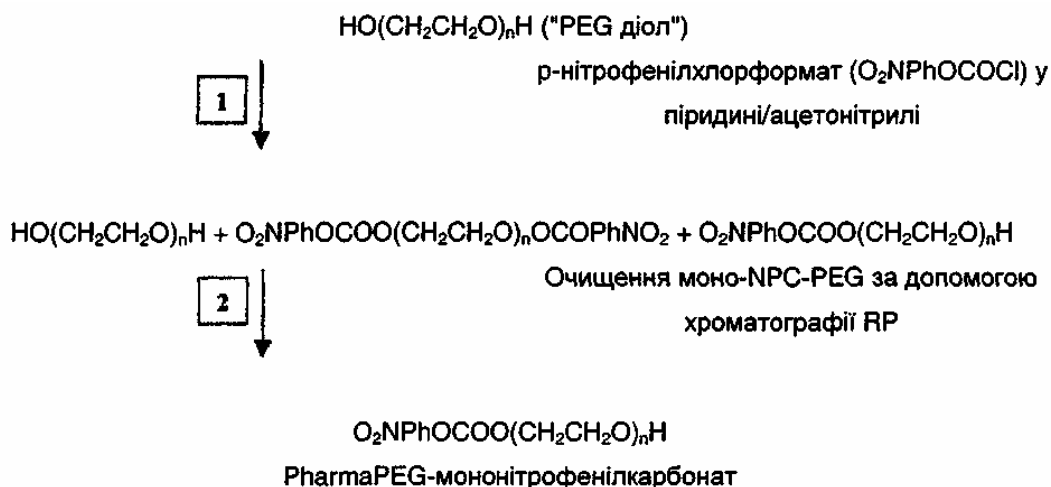
відповідають білкам із середньою молекулярною масою (в кДа): 204, 111, 68,8, 51,5, 40,2, 28,9, 20,7 і 14,9, відповідно. Друга крива знизу відповідає забарвленню білком смузі карбоангідази, а верхня крива - забарвленням білком mPEG кон'югатам карбоангідази. Цифри над піками на Фіг.5b показують кількість ниток mPEG, приєднаних до карбоангідази в кон'югаті (кон'югатах) цього піка. PEG₀ показує положення карбоангідази, в якому не приєднаний PEG.

Разом ці результати показують, що анти-mPEG антитіла здатні легко утворювати комплекси із PEGілованими білками, отриманими із використанням реакційноздатної форми mPEG, що уможливило їх чутливе й селективне виявлення. Якщо ці кон'югати ввести тварині з діагностичною, профілактичною або терапевтичною метою, індукування анти-mPEG антитіл сприятиме прискореному кліренсу агента з кровотоку, а це обмежить ефективність цих кон'югатів і може призвести до негативних наслідків через утворення імунних комплексів.

Приклад 5: Синтез PharmaPEG-мононітрофенілкарбонату

Необхідність в отриманні монофункціонально активованого PharmaPEG з PEG діолу викликана тим, що на деякому етапі синтезу одна з кінцевих груп PEG повинна мати такі властивості, які зроблять можливим відділення PEG, що містять різні кількості таких кінцевих груп. Ця група повинна бути більш гідрофобною, ніж PEG або активований PEG, що дозволить здійснити поділ за допомогою хроматографії із оберненою фазою ("хроматографії RP"). Альтернативно, така група може бути зарядженою, і тоді можна буде здійснити поділ за допомогою іонообмінної хроматографії. Ця група може бути частиною твердої фази, що дозволить здійснити поділ фаз з рідин, в яких незв'язаний PEG розчиняється. Якщо активуюча група може використовуватись як основа для поділу, як у випадку NPC-PEG, описаному у цьому Прикладі 5, тоді єдиною потрібною реакцією синтезу буде приєднання активуючої групи. Якщо основою для поділу буде блокуюча група, що може усуватись, наприклад, t-бутильна або трифенілметильна ("тримильна") група, то блокуючу групу можна додати перед або після приєднання активованої групи або групи, що може активуватись, як описано в Прикладі 6. Теоретично, етап очищення для виділення PEG, що містить бажану кількість блокуючих груп, може проводитись у будь-який час після приєднання блокуючої групи. На практиці відносні лабільності зв'язків між основним ланцюгом полімеру та блокуючою групою і між основним ланцюгом полімеру та активуючою групою (або групою, що може активуватись) можуть зумовлювати оптимальну послідовність етапів.

Синтез монофункціонально активованого NPC-PEG з дигідроксиPEG у загальному вигляді поданий на наведеній нижче схемі, де Ph позначає фенільну групу, а n - кількість етиленоксидних ланок у полімері, що становить приблизно 227 для 10-кДа PEG.



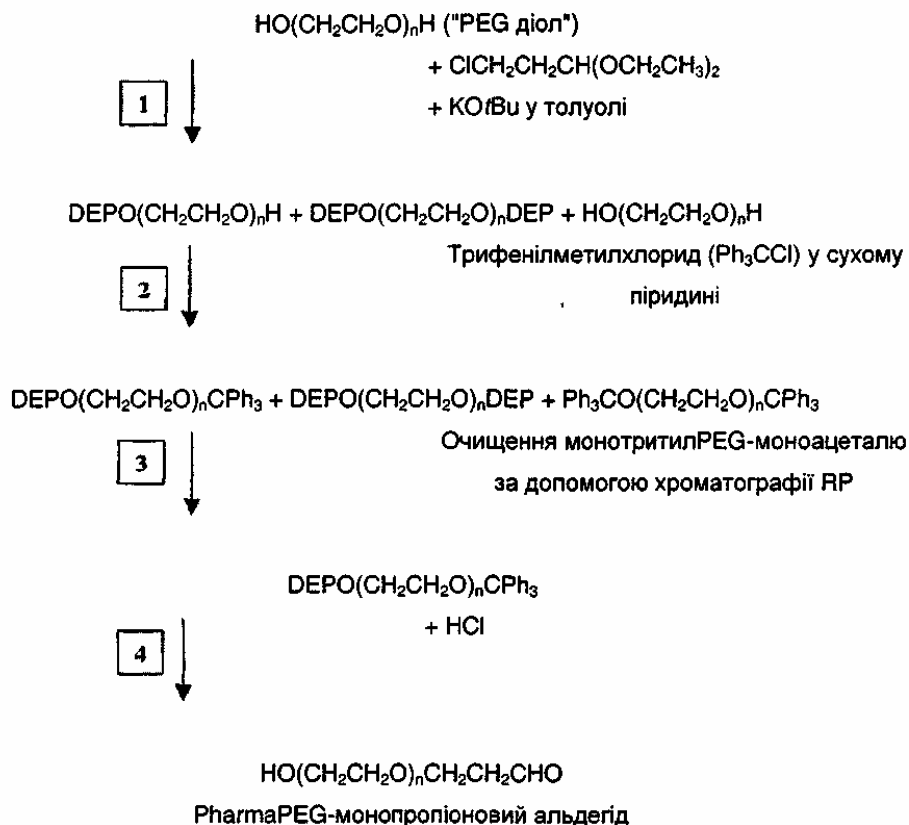
PEG діоли від кількох постачальників (на етикетках усіх була зазначена молекулярна маса 10кДа) тестували на чистоту та гомогенність. Жоден з них не містив більше 90% PEG з молекулярною масою приблизно 10кДа. Отже, 10-кДа PEG діол (Fluka Chemical Corp., Мілуокі, Вісконсин, каталожний №81280) фракціонували від забруднювачів із меншою молекулярною масою шляхом хроматографії з оберненою фазою на колонці Amberchrom MD-P CG-300SD (7,5мм×15см, TosoHaas, Монтгомерівілл, Пенсільванія). PEG завантажували у колонку у вигляді розчину у 5% (об./об.) ацетонітрилу у воді та елюювали із лінійним градієнтом 5%-35% ацетонітрилу у воді. Фракції аналізували за допомогою хроматографії із виключенням за розміром на колонці Superdex® 200 HR10/30 (Amersham Pharmacia Biotech, Піскатавей, Нью-Джерсі) у 20мМ ацетаті натрію, що містить 150мМ NaCl, pH 4,6. Фракції з колонки Amberchrom, для яких понад 98% сигналу показника заломлення ("RI"), спричиненого PEG, знаходилось у піку, що відповідає приблизно 10-кДа PEG, збирали й ліофілізували.

Очищений висушений PEG діол (530мг) поєднували із 61,4мг p-нітрофенілхлорформату (Aldrich, Мілуокі, Вісконсин, каталожний №16,021-0) та розчиняли у 4мл ацетонітрилу у скляній пробірці 13×100мм із кришкою, що нагвинчується. Отримували кінцеві концентрації приблизно 12,5мМ PEG діолу і приблизно 75мМ p-нітрофенілхлорформату. Додавали піридин (0,25г) та інкубували реакційну суміш протягом ночі при 36°C. Реакцію гасили шляхом збовтування суміші із 33мл крижаної 0,1М соляної кислоти. Розчин фільтрували для усунення легкого осаду p-нітрофенолу та діалізували протягом одного дня у холоді із чотирма 1л замінами води. До діалізованого розчину додавали ацетонітрил для доведення концентрації до 5% (об./об.). Половину суміші, отриманої на етапі 1 (24мл), що містила приблизно 265мг очищеного 10-кДа PEG діолу, завантажували

на колонку Amberchrom і зв'язані види PEG елюювали градієнтом 5%-65% ацетонітрилу у воді. Фракції аналізували за допомогою хроматографії із виключенням за розміром, як і раніше, спостерігаючи як за показником заломлення, так і поглинанням при 280 нм. ДигідроксиПЕв без поглинання при 280нм елюювали першим, потім - PEG, дериватизований однією р-нітрофенільною групою ("моно-NPC PEG"), потім - ди-NPC PEG, для якого відношення поглинання при 280нм до показника заломлення було у двічі більшим, ніж у моно-NPC-PEG. Дві фракції у центрі діапазону елювання моно-NPC PEG об'єднували з отриманням приблизно 110мг моно-NPC PEG, що відповідає приблизно 42% виходу. Продукт етапу 2 можна висушити для зберігання в екзикаторі і/або холодильнику або прямо використовувати для приєднання до амін-вмісної біологічно активної сполуки або лінкера, що містить дві чи більше аміногруп, для отримання розгалужених PEG, наприклад, диРЕБ-лізин, що не містять алкоксильних груп.

Приклад 6: Синтез PharmaPEG-моноальдегіду з PEG діолу

Синтез монопропіональдегідної похідної PharmaPEG показаний у загальному вигляді на поданій нижче схемі, де KOtBu позначає t-бутоксид калію, а DEP - 3,3-діетоксипропільну групу.



Більш прийнятним є те, щоб дигідроксиPEG, який використовується в якості вихідного матеріалу для етапу 1, мав молекулярну масу в межах 10% від його номінальної молекулярної маси і полідисперсність <1,05. Полідисперсність визначають як відношення середньомасової молекулярної маси ("M_w") до середньочислової молекулярної маси ("M_n"). Обидва ці параметри - M_w і M_n - можна виміряти за допомогою хроматографії із виключенням за розміром, використовуючи PEG із точно відомими молекулярними масами в якості стандартів та програмне забезпечення для гель-проникної хроматографії, таке як EZChrom Elite Client/Server Software, версія 2.8.3 (Scientific Software, Inc., Плезантон, Каліфорнія). Альтернативно, полідисперсність PEG можна виміряти час-пролітним мас-спектрометром ("MALDI-TOF") із іонізацією лазерною десорбцією в матриці (Marie, A., та ін., (2000) Anal Chem 72:5106-5114), використовуючи таке програмне забезпечення, як Voyager Software (Applied Biosystems, Фостер-Сіті, Каліфорнія). Для отримання фармацевтичних продуктів, що містять ковалентно зв'язаний PEG, бажано, щоб вихідний матеріал PEG мав полідисперсність <1,02, більш прийнятно - <1,01, виміряну мас-спектроскопом MALDI-TOF. Вихідний матеріал можна отримати у Aldrich Chemical Co., Fluka Chemicals (Buchs, Швейцарія), Shearwater Corporation або в Sigma Chemical Co., а також у інших постачальників, відомих спеціалістам у цій галузі техніки. Якщо вихідний матеріал недостатньо гомогенний, його можна фракціонувати у спосіб, описаний в Прикладі 5.

Суміш монопропіональдегідної та дипропіональдегіддіетилацетальної похідних PEG діолу можна синтезувати, використовуючи 3-хлор-пропіоновий альдегід діетилацеталь (Aldrich, каталожний №C6,900-4), як описано для оцтового альдегіду діетилацеталу у Harris, J.M., та ін., [(1984) JPolym Sci 22:341-352] (див. етап 1). Аналогічні способи описані також Bentley, M.D., та ін., [(1998) J Pharm Sci 87:1446-1449] і потім запатентовані Bentley, M.D., та ін. [патент США №5,990,237].

Достатню кількість трифенілметилхлориду (хлортрифенілметану або тритилхлориду, Ph₃CCl, наприклад, Aldrich каталожний №T8,380-1), розчиненого у піридині, додавали до суміші, отриманої на етапі 1, так, щоб при реакційних умовах Ph₃CCl реагував з усіма гідроксильними групами вихідного матеріалу PEG, які не з'єднані із пропіоновим альдегідом діетилацеталем (Kocienski, P.J., див. вище). Для завершення етапу 2 суміш

збирали після осадження шляхом додавання слабого розчинника PEG (наприклад, простого ефіру) або випарювання розчинника або в інші способи, відомі з рівня техніки.

Суміш, отриману на етапі 2, розчиняли у воді перед або після додавання 5% (об./об.) ацетонітрилу і розчин завантажували на колонку з оберненою фазою, яка, згідно з відомими з рівня техніки принципами, має зв'язувати тритил похідні PEG. Колонка може містити алкільні або арильні похідні кремнезему чи полімерний субстрат або може бути полімером на основі стиrolу (наприклад, Amberchrom MD-P CG-300), як у Прикладі 5. PEG діол та тритильні похідні можна елюювати у режимі зворотної фази із зростаючим градієнтом органічного розчинника, як у Прикладі 5, або у режимі заміщення зразків, продовжуючи завантажувати колонку, аж доки не буде елюйовано принаймні частину бажаних видів [Agner, E., та ін., РСТ публікація WO 00/23798 A1], або в режимі заміщення (Cramer, S.M., патент США №6,239,262), або використовуючи поєднання цих режимів. Загалом, похідні PEG без тритильної групи елююватимуть першими, другою буде монотритильна похідна, а третім - дитритил PEG. Оптимальний вихід бажаного продукту отримують при співвідношенні цих трьох видів 1:2:1. Для покращення виходу і/або чистоти бажаного монотритил PEG продукту може виявитись бажаним піддати частину ефлюенту рециркуляційній хроматографії, як це добре відомо у галузі техніки хроматографії. Для завершення етапу 3 частину елюату, що містить принаймні частину монотритильної похідної, відділяли, концентрували та висушували у способи, відомі з рівня техніки.

За помірно кислотних умов та при низькій температурі ацеталь можна перетворити на альдегід, зберігаючи при цьому більшість зв'язків тритилу на дистальному кінці PEG. У деяких застосуваннях цього прикладу може бути бажаним провести реакцію монотритил PEG моноальдегіду із цільовою частиною, а лише потім вилучити тритильну групу. Ці варіанти втілення передбачені даним винаходом та включені до нього.

Приклад 7: Демонстрація зменшеної імуногенності кон'югатів, отриманих із використанням гідроксиPEG порівняно з метоксиPEG

Виконуючи описану процедуру імунізації mPEG кон'югатами урикази (див. Приклад 1), групу з трьох кроликів імунізували кон'югатами mPEG або кон'югатами гідроксиPEG одного й того самого препарату свинячої урикази. Кожен кон'югат містив, в середньому, приблизно дві нитки 10-кДа PEG на субланку урикази. Середню кількість приєднаних ниток полімеру у кожному препараті кон'югатів перевіряли за допомогою HPLC із виключенням за розміром та SDS-PAGE, де гелі забарвлювали як на білок (як у Прикладі 4), так і на PEG, використовуючи спосіб, описаний у спільній заявці на патент США 10/183,607, поданій 28 червня 2002р., яку включено сюди у всій її повноті шляхом посилання. Кожному кролику вводили ін'єкцією один з препаратів PEG-урикази: один раз у повному ад'юванті Фрейнда і п'ять разів (із інтервалом від одного до чотирьох тижнів) - у неповному ад'юванті Фрейнда. Кров брали через два тижні після четвертої і п'ятої ін'єкції у неповному ад'юванті Фрейнда та отримували сироватку. Коли послідовні 4-кратні розведення сироватки цих кроликів аналізували методом ELISA (як у Прикладі 2), концентрація анти-PEG антитіл, індукованих кон'югатами, отриманими із гідроксиPEG, виявилась меншою, ніж 5% від концентрації, що відповідає кон'югатам, отриманим із mPEG (див. Фіг.6a та 6b). І навпаки, індукування анти-уриказних антитіл кон'югатами, отриманими з зазначеними двома типами PEG, виявились подібними у двох групах кроликів. Сироватка цих кроликів перед імунізацією не містила анти-PEG антитіл, які можна було б виявити.

Повідомлялось, що PEG із кінцевою метоксильною групою (mPEG) та PEG із кінцевою гідроксильною групою (біс-гідроксиPEG або PEG діол) еквівалентні для використання в біокон'югації або, частіше, що mPEG та інші PEG нижчих алкоксилів кращі від PEG діолів. Більше того, біс-активовані діоли можуть діяти як перехреснозшиваючі агенти, що може бути небажаним для отримання розчинних, діючих тривалий час біокон'югатів із низькою імуногенністю та антигенністю. Несподівані результати цих досліджень показують, що mPEG є значно більш антигенними, а антитіла, індуковані проти метоксильної групи mPEG, зв'язуються із PEGілованими білковими кон'югатами, отриманими із використанням mPEG. Отже, несподівано і всупереч попереднім повідомленням виявилось, що mPEG не є еквівалентом гідроксиPEG і mPEG не є більш прийнятним для отримання полімерних кон'югатів біологічно активним компонентів (таких як білки), які повинні мати підвищену біодоступність, стабільність у кровообігу та мінімальну імуногенність.

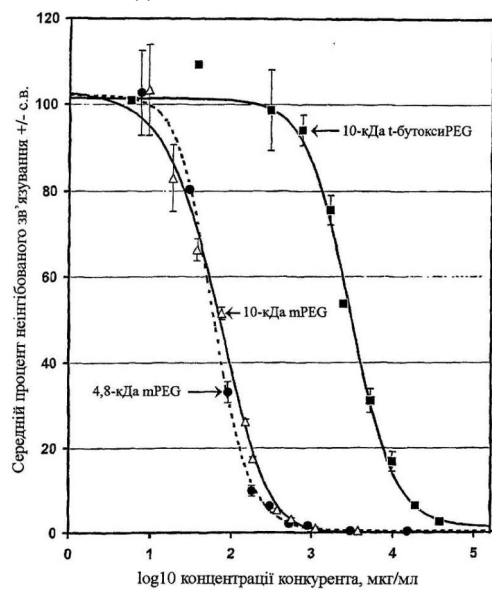
На основі поданих результатів стає ясно, що використання монофункціонально активованого PEG, що не містить метоксильну групу або іншу алкоксильну групу, для синтезу білкових кон'югатів забезпечує отримання кон'югатів із зменшеною імунореактивністю. Отримані кон'югати продемонстрували зменшену антигенність, тобто зменшену здатність взаємодіяти із антитілами, виробленими проти mPEG кон'югатів того самого білка, та зменшену імуногенність, тобто зменшену здатність викликати імунну реакцію проти PEG компонента. Отже, висновок такий: слід очікувати, що кон'югати, отримані із розгалуженими PEG, що містять дві чи більше метоксильних груп, будуть більш імуногенними, ніж кон'югати, отримані з розгалужених PEG без алкоксильних груп.

Нарешті, на основі поданих тут результатів робимо висновок, що використання монофункціонально активованого PEG, що не містить метоксильної групи або іншої алкоксильної групи (замість монофункціонально активованого mPEG), для синтезу PEG-ліпосом має забезпечити отримання PEG-ліпосом із зменшеною імунореактивністю, що включає і меншу тенденцію до запуску процесу активації комплементу у крові та меншу тенденцію до індукування гострого розладу зовнішнього дихання або псевдоанафілактичних і псевдоалергічних реакцій.

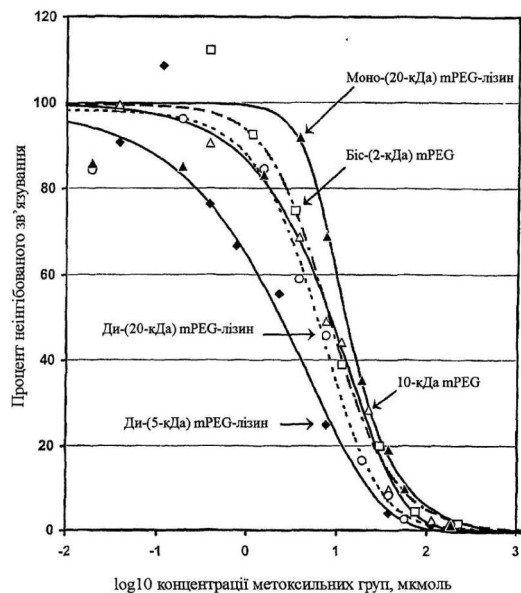
Даний винахід описано із посиланням на деякі варіанти його втілення. Способи даного винаходу в аналогічний спосіб можуть застосовуватись до інших типів білків, інших біологічно активних агентів та інших реагентів кон'югації. Отже, обсяг даного винаходу не обмежується описаними варіантами втілення, а обмежується лише обсягами формули винаходу і/або її еквівалентів. Для спеціалістів із звичайним рівнем підготовки у цій галузі техніки будуть очевидними інші варіанти втілення, які не будуть виходити за межі даного винаходу. Усі ці варіації вважаються частиною винаходу.

Усі публікації, патенти і патентні заявки, зазначені у цьому описі, вказують на рівень підготовки спеціалістів у галузі техніки, до якої належить цей винахід, і включено сюди шляхом посилання тією самою мірою, якою, як зазначалось, кожна окрема публікація, патент або патентна заявка була окремо і конкретно

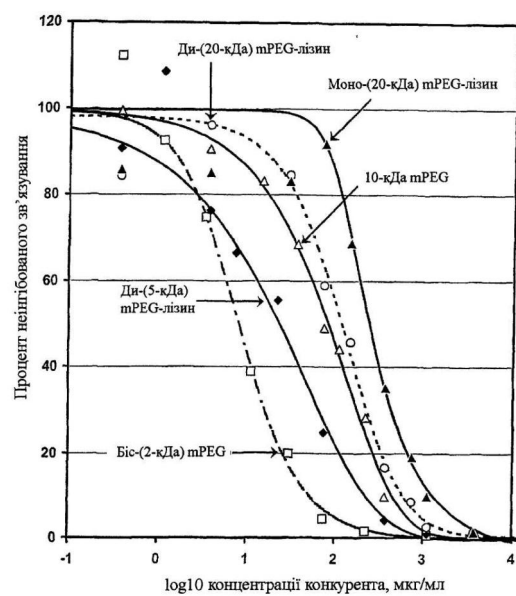
включена сюди шляхом посилання.



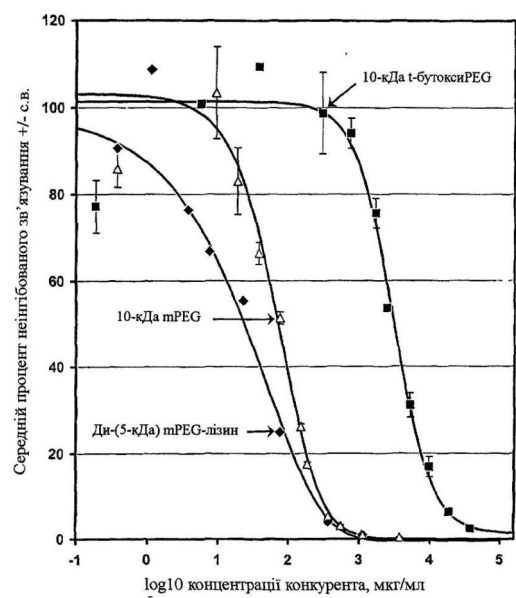
Фиг. 1



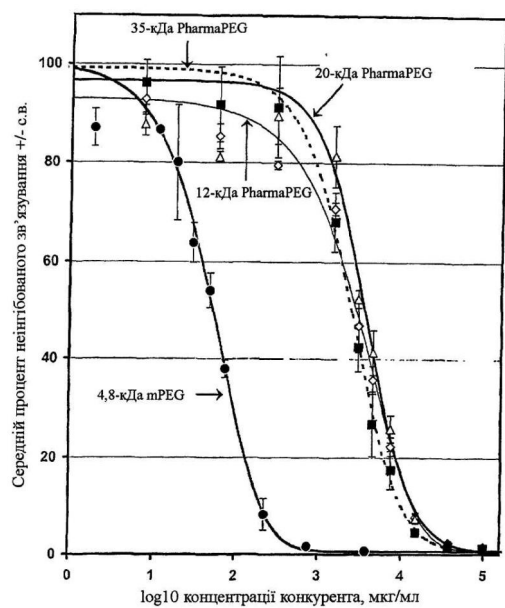
Фиг. 2а



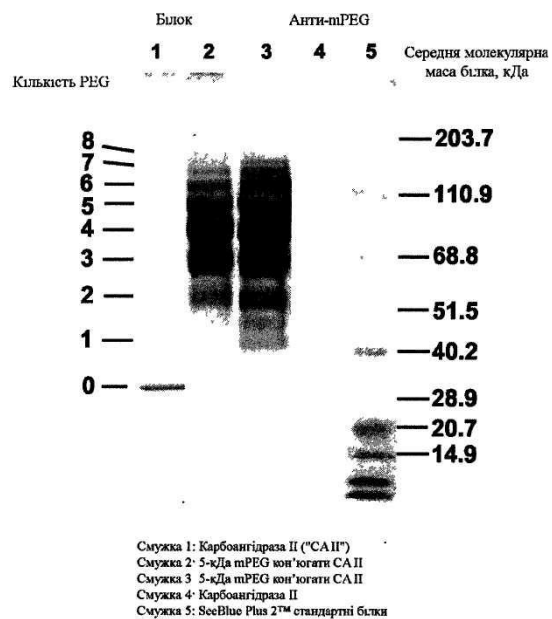
Фіг. 2b



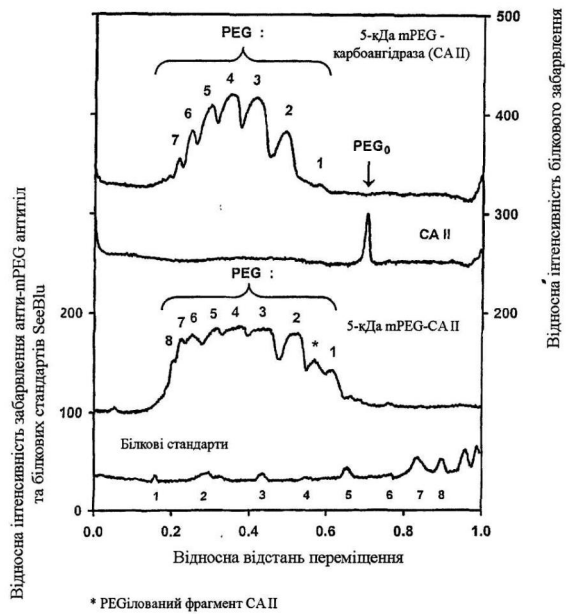
Фіг. 3



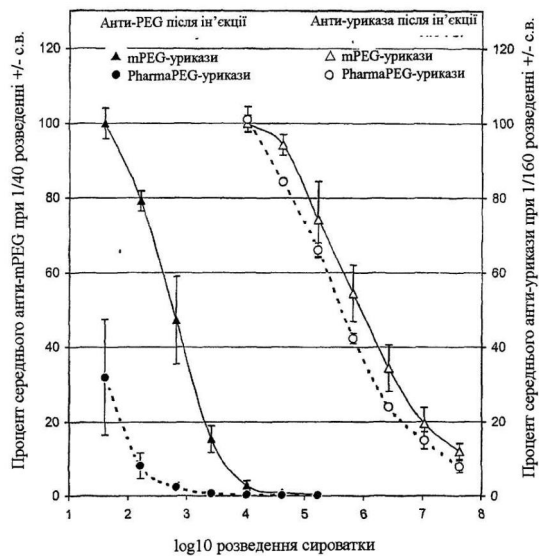
Фиг. 4



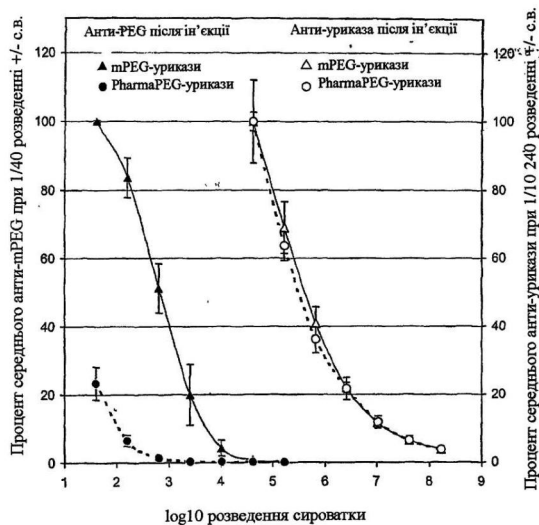
Фиг. 5a



Фиг. 5b



Фиг. 6a



Фиг. 6b