

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480039650.1

[51] Int. Cl.

C12N 9/96 (2006.01)

C07K 1/00 (2006.01)

C07K 14/505 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 1 月 24 日

[11] 公开号 CN 1902311A

[22] 申请日 2004.12.23

[21] 申请号 200480039650.1

[30] 优先权

[32] 2003.12.31 [33] US [31] 60/533,617

[86] 国际申请 PCT/US2004/043081 2004.12.23

[87] 国际公布 WO2005/065239 英 2005.7.21

[85] 进入国家阶段日期 2006.6.30

[71] 申请人 森托科尔公司

地址 美国宾夕法尼亚州

[72] 发明人 C·普尔 J·米尔斯

M·昆宁哈姆

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 李波 梁谋

权利要求书 4 页 说明书 28 页 序列表 10 页
附图 7 页

[54] 发明名称

具有 N-末端游离硫羟基的新的重组蛋白

[57] 摘要

本发明涉及具有 N 末端游离硫羟基的新的修饰的蛋白,其可以通过重组方法生产,并且可以用于进一步化学衍生化。具体地,本发明涉及具有改变的生物化学、生理化学和药代动力学特性的促红细胞生成素缀合物化合物。更具体地,本发明的一个实施方案涉及式 $(M)_n - X - A - cys - EPO$ (I) 的促红细胞生成素缀合物化合物,其中 EPO 是促红细胞生成素部分,选自促红细胞生成素或具有至少一个与野生型人 EPO 不同的氨基酸的促红细胞生成素变体,或任何具有导致骨髓细胞对红细胞的生产增加的生物学性质的其药学可接受的衍生物;cys 代表半胱氨酸,并且存在于相对于促红细胞生成素部分的氨基酸序列的 -1 位;A 表示用于将 X 化学连接于 -1Cys 的硫羟基的残基部分的结构;X 是水溶性聚合物,如聚亚烷基二醇或其它聚合物;M 是增加构

建体的循环半衰期的有机分子(包括肽和蛋白);并且 n 是 0 到 15 的整数。

1. 制备治疗性蛋白缀合物的方法，该缀合物具有缀合到治疗性蛋白的 N 末端半胱氨酸的聚合物，其中所述半胱氨酸残基的巯羟基参与所述缀合物的共价键的形成，该方法包括：

a)获得所述治疗性蛋白的核酸序列，

b)选择用于在细胞中表达所述蛋白的信号序列，并且获得所述信号序列的核酸序列，

c)通过将(b)的信号序列工程化到(a)的蛋白序列，并且将密码子 TGT 插入这两者之间使得信号序列在 TGT 上游，定向形成构建体，

d)使所述构建体在细胞中表达，

e)回收由所述构建体编码的多肽，和

f)在 N 末端半胱氨酸将所述多肽缀合于聚合物。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述定向步骤是定向于寡核苷酸的诱变。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述选择步骤包括使用公众可获得的计算机方法。

4. 权利要求 3 的方法，其中可能的信号序列选自人生长激素前导序列(SEQ ID NO: 2)、抗体重链前导序列(SEQ ID NO: 3)、抗体轻链前导序列(SEQ ID NO: 4)、人干扰素 $\delta 1$ 前导序列(SEQ ID NO:12)和人干扰素 $\omega 1$ 序列(SEQ ID NO: 13)。

5. 一种促红细胞生成素缀合物，具有导致骨髓细胞对红细胞的生产增加的生物学性质，包含式(M)_n-X-A-cys-EPO(I)所示的部分，其中 EPO 是促红细胞生成素部分，选自促红细胞生成素或具有至少一个与野生型人 EPO 不同的氨基酸的促红细胞生成素变体，或任何具有导致骨髓细胞对红细胞的生产增加的生物学性质的其药学可接受的衍生物，cys 代表半胱氨酸，并且存在于相对于促红细胞生成素部分的氨基酸序列的-1 位；A 是巯羟基反应部分的残基；X 是亲水聚合物，并且是任选的；M 是能够增加所述部分的循环半衰期的有机分子；并且 n 是 0 到 15 的整数。

6. 权利要求 3 的导致骨髓细胞对红细胞的生产增加的促红细胞生成素缀合物，所述增加在给予所述促红细胞生成素缀合物之后维持的时间比给予未缀合的促红细胞生成素后维持的时间长。

7. 权利要求 4 的促红细胞生成素缀合物, 其中维持的效果是由于相对未修饰的哺乳动物促红细胞生成素的增加的血清半衰期。

8. 权利要求 3 的促红细胞生成素缀合物, 其中 M 部分包含 1 - 大约 6 个有机部分, 其各自独立地选择脂肪酸基团、脂肪酸酯基团、脂质或磷脂。

9. 权利要求 4 的促红细胞生成素缀合物, 其中所述亲水聚合物是聚环氧烷。

10. 权利要求 3 的促红细胞生成素缀合物, 其中所述促红细胞生成素或促红细胞生成素部分选自重组和非重组哺乳动物促红细胞生成素。

11. 权利要求 7 的促红细胞生成素缀合物, 其中所述聚环氧烷是取代的聚环氧乙烷。

12. 权利要求 7 的促红细胞生成素缀合物, 其中所述聚环氧烷选自聚乙二醇均聚物、聚丙二醇均聚物、烷基-聚环氧乙烷、二聚环氧乙烷和聚环氧烷的共聚物或嵌段共聚物。

13. 权利要求 7 的促红细胞生成素缀合物, 其中所述聚环氧烷是分子量为大约 200 - 大约 100,000 的聚乙二醇均聚物。

14. 权利要求 3 的促红细胞生成素缀合物, 其中所述亲水聚合物是线性或含支链的聚亚烷基二醇链、碳水化合物链、氨基酸链或聚乙烯吡咯烷酮链, 并且其中所述亲水聚合物的分子量是大约 800 - 大约 120,000 道尔顿。

15. 权利要求 12 的促红细胞生成素缀合物, 其中所述亲水聚合物是线性或含支链的聚亚烷基二醇链, 其分子量大于 2,000 道尔顿。

16. 权利要求 12 的促红细胞生成素缀合物, 其中所述亲水聚合物是线性或含支链的聚乙二醇链或线性或含支链的取代的聚乙二醇链, 并且有机部分 M 选自烷基、C₆-C₄₀ 脂肪酸基团、C₆-C₄₀ 脂肪酸酯基团、脂质基团和磷脂基团。

17. 权利要求 14 的促红细胞生成素缀合物, 其中所述亲水聚合物是线性或含支链的聚乙二醇链, 其由选自烷基、C₆-C₄₀ 脂肪酸基团、C₆-C₄₀ 脂肪酸酯基团、脂质基团或磷脂基团的有机部分末端取代。

18. 权利要求 15 的促红细胞生成素缀合物, 其中所述有机部分是棕榈酰基。

19. 权利要求 15 的促红细胞生成素缀合物, 其中所述有机部分是二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)。

20. 权利要求 3 的缀合物, 其中 A 是乙基, X 是 PEG 或其它聚合物, 并且是任选的, 并且 M 是生物素、丹酰或者其它给 EPO 赋予能用于研究、诊断或治疗目的的生物物理特性的部分。

21. 权利要求 3 的缀合物, 其中 A 是乙基。

22. 权利要求 3 的促红细胞生成素缀合物, 其中 EPO 是红细胞生成素部分, 选自 a) SEQ ID NO:1 的从第 28 位到至少 165 位, b) 具有至少一个与 SEQ ID NO:1 不同的氨基酸的促红细胞生成素变体, 或 c) (a) 或 (b) 的任何药学可接受的衍生物; 并且 cys 代表半胱氨酸, 并且存在于相对 SEQ ID NO:1 或变体的第 28 位氨基酸的 N 末端位置; A 表示硫羟基反应部分的残基; X 是亲水聚合物; M 是烷基、C₆-C₄₀ 脂肪酸基团、C₆-C₄₀ 脂肪酸酯基团、脂质基团或磷脂基团; 并且 n 是 0 到 15 的整数。

23. 制备权利要求 3 的促红细胞生成素缀合物的方法, 包括使在 N 末端具有半胱氨酸残基的 cys-EPO 部分接触预先构建的式 Y-X-(M)_n 的亲水聚合物-有机部分复合物, 其中 Y 是硫羟基反应部分, 所述硫羟基反应部分在形成 EPO-cys-聚合物-缀合物的条件下含有或成为残基 A。

24. 权利要求 21 的方法, 其中所述聚合物是聚环氧烷。

25. 权利要求 22 的方法, 其中所述聚环氧烷是 α -取代的聚环氧烷。

26. 权利要求 23 的方法, 其中所述聚环氧烷是聚乙二醇。

27. 权利要求 21 的方法, 其中所述硫羟基反应部分是砷。

28. 权利要求 25 的方法, 其中所述硫羟基反应部分是乙砷。

29. 权利要求 21 的方法, 其中所述硫羟基反应部分是二硫化物。

30. 权利要求 21 的方法, 其中所述硫羟基反应部分是马来酰亚胺。

31. 权利要求 21 的方法, 其中 X 是肽或蛋白, 并且 A 是 Cys₁ 和硫酯或酯部分的反应产物。

32. 权利要求 21 的方法, 其中所述硫羟基反应部分是碘乙酰胺。

33. 权利要求 21 的方法, 其中 A 是乙基, X 是 PEG 或其它水溶性聚合物, 并且是任选的, 并且 M 是生物素、丹酰或者其它给 EPO

赋予能用于研究、诊断或治疗目的的生物物理特性的部分。

34. 治疗贫血的方法，包括给予治疗有效量的权利要求 3 的缀合物。

35. 权利要求 32 的方法，其中所述缀合物的特征在于与缀合的促红细胞生成素相比增加的血清半衰期。

36. 一种促红细胞生成素蛋白或蛋白缀合物，含有重组或非重组的哺乳动物促红细胞生成素，其中通过重组、酶促或化学方法添加了具有游离 α 胺的半胱氨酸残基，以提供反应性游离硫羟基，并且所述反应性游离硫羟基不干扰蛋白折叠、分泌或生物活性，并且所述硫羟基可以衍生化，从而增加所述促红细胞生成素蛋白的循环半衰期或改进所述促红细胞生成素蛋白的生物活性。

37. 式 Z-cys-EPO 所式的部分，其中 EPO 是促红细胞生成素部分，选自促红细胞生成素或具有至少一个与野生型人 EPO 氨基酸不同的氨基酸的促红细胞生成素变体，或任何具有导致骨髓细胞对红细胞的产生增加的生物学性质的其药学可接受的衍生物，cys 代表半胱氨酸，并且存在于相对于促红细胞生成素部分的氨基酸序列的-1 位；并且 Z 是异源信号序列。

38. 权利要求 35 的部分，其中异源信号序列是人生长激素前导序列 (SEQ ID NO.2)。

具有 N-末端游离巯羟基的新的重组蛋白

发明领域

本发明涉及可以通过重组方法生产并且可以进一步进行化学衍生的新的修饰蛋白。具体地，本发明涉及具有改变的生物化学、生理化学和药代动力学性质的促红细胞生成素缀合物化合物。

发明背景

促红细胞生成素（EPO）是一种天然形成的糖蛋白，其功能是作为集落刺激因子并作为主要因子参与红细胞合成的调节。促红细胞生成素通过刺激骨髓中的前体细胞、促使它们分裂并分化成为成熟红细胞而起作用。这个过程在体内是严格控制的，这样红细胞在循环中的破坏或清除才能与新细胞的形成速度匹配。天然存在的 EPO 是在肾脏中产生的一种糖蛋白（Jacobs 等人，Nature 313（6005），806-810（1985））。这样，除了骨髓中的前体产生红细胞低或不足的状况，任何肾功能损害或破坏的状况，如末期肾脏疾病，代表了红细胞生成素反应状况。

已经证明了多种细胞类型产生 EPO，除了红细胞祖细胞外，很多细胞表达 EPO 受体，包括毛细血管内皮细胞和脑内细胞。星形细胞反应于缺氧而产生 EPO（Masuda, S. et al. 1994 J Biol Chem 269:19488-19493），并且外源 EPO 能够保护附近的神经细胞免受动物模型中的缺血损伤（Sakanaka M., et al. 1998, Proc Natl Acad Sci USA 95 :4635-4640），因此，EPO 可能在预防神经破坏或疾病和从神经破坏或疾病恢复中起作用。最近，发现红细胞生成素保护视网膜神经元免受急性缺血再灌注损伤（Junk, et al. 2002, Proc. Nat. Acad. Sci. 99: 10659-10664）并且增强从实验性脊髓损伤的神经恢复（Gorio et al., 2002, Proc. Nat. Acad. Sci. 99: 9450-9455）。影响神经系统中的神经元或胶质细胞的致病神经状况，可能是由于缺血、凋亡、坏死、氧化或自由基损伤和兴奋毒性（excitotoxicity）。神经病理包括，例如，脑和脊髓缺血、急性脑损伤、脊髓损伤、视网膜病和神经退化疾病，如阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病和 ALS。因此，目前认为外源 EPO 对这些疾病的某些或全部具有保护或预防作用。

实际上, EPO 证明了在多种细胞和组织类型中的内分泌(激素)、自分泌和旁分泌功能(对自身和邻近细胞类型的激活或刺激作用)(参见, Lappin, T. R. et al., 2002, Stem Cells 20: 485-492 的综述), 所述细胞和组织类型包括心肌组织(Parsa, C. J. et al, 2003, J Clin Invest. 112(7): 999-1007)和胃肠组织(Fatouros, M.S., 2003, Eur J Surgery 165 (10):986-992)。因此, 给予 EPO 的潜在治疗适应症已经大大超过了肾功能不全和贫血。

已经利用重组 DNA 技术来生产促红细胞生成素, 其通过克隆 EPO 基因并在中国仓鼠卵巢细胞中表达 (Lin, US 5618698)。重组生产的 EPO 已经作为一种治疗各种形式贫血的有效治疗剂供应, 所述贫血包括与慢性肾衰竭、叠氮胸苷治疗的 HIV 感染患者以及骨髓抑制性化疗的癌症患者相关的贫血。EPO 糖蛋白经肠胃外给药, 其在含有人血清白蛋白 (HSA) 为载体的常规缓冲水溶液中作为静脉 (IV) 或者皮下 (SC) 注射剂。这种制剂以 EPOGEN® 和 PROCRIT® 为商品名在美国市场上销售。这些产品含 1ml 单剂无防腐剂或 2ml 多剂防腐管形瓶中的红细胞生成素。

尽管这些制剂被证明非常成功, 某些缺陷也与该产品相关。目前, 诸如促红细胞生成素的蛋白质治疗剂的生物活性周期受到短的血浆半衰期和对蛋白酶降解易感性的限制。诸如 EPO 这样的治疗性蛋白质的短半衰期, 使得频繁给予成为必要。这对慢性状况的治疗是不利的, 并可能导致病人依从性差, 因此达不到最佳效果。因而进行了很大努力来增加 EPO 的血浆半衰期。

近年来, 诸如聚乙二醇 (PEG) 的非抗原性水溶性聚合物被运用于对治疗和诊断有重大意义的多肽的共价修饰上。例如, PEG 共价连接到诸如白介素 (Knauf, M. J.等人, J.Biol. Chem. 1988, 263, 15, 064; Tsutsumi, Y.等人, J. Controlled Release 1995, 33, 447)、干扰素 (Kita, Y. 等人, Drug Des Delivery 1990, 6, 157)、过氧化氢酶 (Abuchowski, A.等人, J. Biol Chem. 1977, 252, 3, 582)、超氧化物歧化酶 (Beauchamp, C. O.等人, Anal Biochem. 1983, 131, 25) 以及腺苷脱氨酶 (Chen, R. 等人, Biochim, Biophys. Acta. 1981, 660, 293) 的治疗性多肽上, 已经报道了延长它们的体内半衰期、和/或降低它们的免疫原性和抗原性。

衍生的聚乙二醇化合物以前就已公开 (US5438040)。这种翻译后衍生的方法同样适用于 EPO。例如, WO94/28024 公开了一种具有促红细胞生成素活性的碳水化合物修饰的聚合物缀合物, 其中 PEG 通过被氧化的碳水化合物连接。US 4904584 公开了缺失了赖氨酸的多肽变体的聚环氧烷缀合物, 包括 EPO。WO 90/12874 描述了单甲氧基-PEG-EPO (mPEG-EPO) 的制备, 其中 EPO 包含了一个由基因工程导入的半胱氨酸残基, 特定 PEG 试剂被共价连接到它上面。其它 PEG-EPO 组合物在 EP 605693、US 6,077,939、WO01/02017 和 EP 539167 中公开。

申请人的共同未决的申请 USSN 09/431,861 公开了用 PEG 修饰抗体和抗体片段, 并且证明了 PEG 能够增加小鼠和灵长类动物中的循环半衰期。衍生化的 PEG 被用于修饰抗体 c7E3 的 Fab 片段。循环半衰期的增加与 PEG 的分子量成正比。随着 PEG 的分子量增加, 化合物在体外抑制 ADP 诱导的血小板聚集的能力降低, 而通过 BIAcore 测量的与纯化 GPIIb/IIIa 的结合不受影响。向 PEG (PEG_{3.4K}-DSPE[二硬脂酰磷脂酰乙醇胺])加入脂肪酸或脂质, 产生了比 PEG_{5K} 更长的循环半衰期。尽管 c7E3 Fab' (PEG_{5K})相对于 c7E3 Fab 的体外活性降低, 但 c7E3 Fab' (PEG_{3.4K}-DSPE)₂ 的活性与 c7E3 Fab 相同。

申请人的另外一个共同未决的申请美国系列号 60/377,946 公开了修饰 EPO 的方法, 其中 EPO 与非抗原性亲水聚合物共价缀合, 所述聚合物与有机分子连接, 该有机分子使组合物的循环血清半衰期的增加比添加单独的亲水聚合物增加得多。所述方法包括使具有促红细胞生成活性的蛋白或糖蛋白与具有用于将聚合物连接于糖蛋白的连接基团的基本非抗原性的官能化的亲水聚合物反应的步骤。制备方法包括使 EPO 与激活形式的聚环氧烷反应, 激活形式的聚环氧烷将与 EPO 上的官能团反应。这包括激活的聚环氧烷, 如活性酯、酰肼、肼、氨基脒、氨基硫脒马来酰亚胺或卤代乙酰基聚环氧烷。

许多用纯化学方法通过缀合到 PEG 上 (“聚乙二醇化”) 修饰蛋白质的方法都经常有一个受限制的方面, 那就是与存在于可接近的赖氨酸残基上和/或蛋白质的 N 端胺上的氨基无差别和不完全的反应。其它的化学方法要求碳水化合物基团的氧化作为修饰策略的一部分, 这同样会导致不完全或不连续反应以及不明确的产物组成。这样, 考虑

目前所拥有的选择，一种在温和的、位点特异性方式下修饰诸如 EPO 的治疗性蛋白的方法是更有利的。

修饰或添加基序到天然存在的分子上将带来多种风险，这对那些正在进行目的是为治疗性蛋白质提供生产方法的基因工程技术实践的人员来说是公知的。这些效果中最明显的就是丧失或部分丧失生物活性。在其它情况下，构建的表达载体的表达水平对于生产细胞系低的无法接受。偶联或融合一种来自天然存在的蛋白质的异源序列的另一种方法的可能缺点是产生抗原表位并在患者体内引起不必要的免疫反应，这最终限制了治疗性蛋白质的长期功效。此外，利用攻击最具反应性的官能团赖氨酸的化学方法来修饰蛋白质也改变了蛋白质的等电点和 pKa，这可能影响蛋白质的结构和活性。因此，当目的是提供安全并经济生产的产品时，明白这些限制是非常重要的。

已经证明了导入赖氨酸残基是在蛋白上导入用于定点修饰的独特位点的有效方法(Kuan, Chien Tsun et al. *Journal of Biological Chemistry* 269,7610-7616 (1994)). N 末端半胱氨酸具有特别独特的生化特性。由于 α -胺和侧链硫羟基紧密相邻，N 末端半胱氨酸残基与酯部分反应，形成稳定的酰胺键(Tam, James P. et al. *Biopolymers* 51,311-332 (2000))。这使得肽、蛋白和其它分子以高度选择和稳定的方式与蛋白的 N 末端缀合。半胱氨酸上的游离 α -胺的存在使得局部 pH 更碱性，导致 N 末端硫羟基相对于内部胱氨酸上的硫羟基反应性更高。因此，另一个优点是在更低的 pH 下进行缀合反应，导致蛋白更加非特异性的衍生。将半胱氨酸的硫羟基转化为硫酯的进一步的优点是它不导致半胱氨酸等电点或电荷的改变。

但是，在分泌的蛋白中，半胱氨酸残基通常作为二硫化胱氨酸存在，并且导致蛋白三级结构的稳定化。添加额外的半胱氨酸残基导致了破坏蛋白的危险。例如，EPO 含有 4 个参与二硫桥的半胱氨酸残基。因此，存在这样的可能性，即，在 N 末端导入第五个半胱氨酸残基可能会干扰正确的折叠并因此干扰受体识别。

当修饰分泌的蛋白时，在成熟 N 末端导入氨基酸提供了有趣的挑战，即，破坏信号序列切割位点。翻译了大量分泌的蛋白，其在 N 末端具有额外的区域，生物合成从此处开始（称作信号或前导序列），该区将蛋白导向于内质网(ER)。信号序列共有某些特征：他们通常具

有大约 20-25 个氨基酸，在 N 末端是碱性的，在中部是高度疏水的，并且在信号肽酶对其进行切割的位点之前具有小的不带电残基。疏水区对于与 ER 受体复合物的相互作用是关键的，并且促进氧化环境中的翻译和折叠。在从膜分泌时，在蛋白的功能成熟 N 末端氨基酸酶促切割信号序列，所述氨基酸成为蛋白中仅有的游离 α 胺。保留了信号部分，在细胞中降解。这样，向将成为新的 N 末端氨基酸的前体蛋白序列添加氨基酸，需要在信号序列和正常的成熟 N 末端之间插入额外的残基，因此改变对切割和分泌效率具有未知影响的天然切割位点。人 EPO 前体多肽具有 27 个氨基酸的信号序列。一旦位于细胞的 ER 腔室中，在信号肽的甘氨酸 27 和成熟 EPO 链的丙氨酸 28 之间切割信号肽。

可以通过添加或改变核酸编码序列，用基因工程方法向蛋白加入氨基酸或改变氨基酸。因此，本领域技术人员将意识到采用标准技术，通过操作编码序列或 cDNA 制备新的治疗蛋白序列的可能性，所述治疗蛋白序列具有位于天然存在的 N 末端氨基酸残基 N 末端的半胱氨酸残基。为了增加工程化的蛋白的 N 末端是半胱氨酸的可能性，通常，内源信号序列必须被已知能有效将蛋白靶定于 ER，并且产生合适的切割位点的序列代替。

例如，采用用于在酵母 (US4775622 和 Elliott, S. et al.(1989) Gene 79, 167-180) 和哺乳动物细胞 (Kim, Chang H. et al. (1997) Gene 199, 293-301) 中表达 EPO 的替代信号序列，已经将异源信号序列成功用于对蛋白的成熟 N 末端工程化。但是，还没有关于将异源信号序列用于分泌 N 末端工程化形式的治疗蛋白的报道。

发明概述

本发明提供了一种具有生物活性的多肽缀合物 (conjugate) 的组合，其中修饰了编码多肽的多核苷酸序列，以产生具有 N 末端半胱氨酸的缀合配偶体肽，并且所述配偶体共价和位点特异性地缀合到非抗原性亲水性聚合物上，所述聚合物也可以共价地连接到一个有机分子上，两种修饰都增加组合物的循环血清半衰期。

更具体地，本发明的一个实施方案涉及如下式所描述的 EPO 衍生物



其中 EPO 是促红细胞生成素部分，选自促红细胞生成素或具有至少一

个与野生型人 EPO 氨基酸不同的氨基酸的促红细胞生成素变体, 或任何具有导致骨髓细胞对红细胞的生产增加的生物学性质的其药学可接受的衍生物; cys 代表半胱氨酸, 并且存在于相对于促红细胞生成素部分的氨基酸序列的-1 位; A 表示用于将 X 化学连接于-1Cys 的硫羟基的残基部分的结构; X 是水溶性聚合物, 如聚亚烷基二醇或其它聚合物; M 是增加构建体的循环半衰期的有机分子 (包括肽和蛋白); 并且 n 是 0 到 15 的整数。A 和 X 之间或 X 和 M 之间可以包括其它分子, 以提供用于偶联或价的合适官能度。有机分子 M 是任选的。X 优选是聚环氧烷, 如聚乙二醇, 并且也是任选的。

本发明也提供了治疗贫血或与内源促红细胞生成素或红细胞生成减少相关的其他状况或者期望增加红细胞的状况的方法。本发明的方法也包括使用本发明的组合物治疗不直接与红细胞生成缺陷相关, 但可能与 EPO 的抗凋亡作用相关的状况, 所述 EPO 的抗凋亡作用与维持或增强肌肉、粘膜组织、生殖腺功能和认知功能相关。本发明的方法进一步包括使用本发明的组合物预防、维持或治疗神经组织或其它组织的缺血、化学或机械损伤。在本发明的这一方面, 治疗包括给予需要所述治疗的哺乳动物有效量的此处描述的缀合物。作为本发明的结果, 提供了在体内具有充分延长的促红细胞生成素活性的缀合物和制备所述缀合物的方法。

这里所公开的技术的优点是通过含有 N 末端半胱氨酸残基并且 EPO 的半衰期增加的 EPO 变体的表达, 获得了基本上确定的终产物组成。

附图简述

图 1 显示了基于 166 个氨基酸的人形式和有方框中的-1cys 残基和粗体表示的信号序列的重新工程化的前体促红细胞生成素分子的氨基酸序列。

图 2 显示通过化学方法确定的纯化的 cys-EPO 和纯化的 cys-EPO 的 N 末端序列的染色的 SDS PAGE 分析, (N)表示占位符。

图 3 是显示比较 cys-EPO 与 EPO 的 UT-7 细胞增殖测定结果的照片。

图 4 显示各泳道中表示的样品的 4-12% SDS-PAGE 凝胶: (1)分子量标记; (2) EPO +0 mM MEA; (3) EPO +0 mM MEA + 马来酰亚胺-

PEG; (4) EPO + 15 mM MEA ; (5) EPO+ 15 mM MEA +马来酰亚胺-PEG ;(6) EPO + 20 mM MEA; (7) EPO + 20 mM MEA + 马来酰亚胺-PEG ;(8) EPO + 25 mM MEA; (9) EPO+25 mM MEA + 马来酰亚胺-PEG;(10) EPO 标准。

图 5 显示各泳道中表示的样品的 4-12% SDS-PAGE 凝胶: (1)分子量标记; (2) Cys-EPO + 0 mM MEA; (3) Cys-EPO +0 mM MEA + 马来酰亚胺-PEG ; (4) Cys-EPO +15 mM MEA; (5) Cys-EPO + 15 mM MEA + 马来酰亚胺-PEG; (6) Cys-EPO + 20 mM MEA ;(7) Cys-EPO + 20 mM MEA + 马来酰亚胺-PEG ; (8) Cys-EPO + 25 mM MEA; (9) Cys-EPO + 25 mM MEA + 马来酰亚胺-PEG ; (10) Cys-EPO 标准。注意相应于与 PEG 缀合的 Cys-EPO 的条带由白色箭头示出。

图 6 是 EPO、EPO+ 0 mM MEA+马来酰亚胺-PEG 和 EPO+ 25 mM MEA + 马来酰亚胺-PEG 的 SELDI 质谱。28,000 附近的峰相应于未修饰的 EPO。

图 7 是 Cys-EPO、Cys-EPO+ 0 mM MEA + 马来酰亚胺-PEG 和 Cys-EPO + 25mM MEA + 马来酰亚胺-PEG 的 SELDI 质谱。8,000 附近的峰相应于未修饰的 EPO, 存在相应于加入 5,960 MW PEG 的峰。

发明详述

本发明的蛋白是治疗性蛋白的 N-cys 变体,并且具有使得能够实现特异和稳定的化学修饰的 N 末端游离硫羟基或“NTFI”。非常少的天然存在或重组制备的蛋白是以使得半胱氨酸残基是分子的成熟 N 末端的方式加工。本发明的方法采用异源信号序列“强制”在成熟的、天然存在的人蛋白或具有治疗价值的工程化蛋白的 N 末端出现添加的半胱氨酸。采用异源信号序列避免了需要的 N 末端半胱氨酸残基的不准确或错误加工的可能,这种情况在内源前导序列不能与所述改变相容时会发生。不良加工或不准确加工导致 a)信号序列的不良切割效率,从而导致不良的表达速度,或 b)N 末端的不准确切割,这样或者根本不保留半胱氨酸,或者使其保留在+2、+3 或+n 位。在后一种情况下,蛋白的特异性和化学修饰的容易性将不如半胱氨酸位于成熟蛋白的+1 位时理想。

早在 1972 年就针对免疫球蛋白注意到了包含靶定用于细胞外分泌的特定蛋白的加工或“信号”肽的前体蛋白,近年来,更详细研究了

这些序列的亚结构和相关的加工步骤以及酶(概述可参见 Dalbey, et al. (1997) Protein Sci. 6:1129-1138)。

一种特别优选的信号序列是人生长激素前导序列 (SEQ ID NO:2), 但是, 理论上, 存在许多可以有效和准确产生需要的 N 末端的哺乳动物异源前导序列。产生成熟 N 末端半胱氨酸蛋白的包含信号肽的其它哺乳动物前体多肽是与干扰素 α 基因家族相关的那些。已经开发了 in silico 预测算法, 如 SigCleave, 它是加权的矩阵法(EMBOSS), 和 SigPfam, 它是基于隐藏的 Markov 模型(HMM), 以便预测蛋白包含信号肽和最可能包含切割位点的概率。表 1 示出了来自人前体蛋白的多种信号序列和用 SignalP 第 3 版 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/; Bendtsen et al. J. Mol. Biol., 340: 783-795, 2004) 预测的与作为需要的成熟蛋白的 N-Cys-EPO 偶联时的切割位点。SignalP 第 3 版从实验验证的切割位点的 Swiss-Prot 数据库提供了在真核蛋白上培养的神经网络(NN) 并且提供了 HMM。基于这些预测(表 1), 表明预测天然的 EPO 前导序列不适于作为 N-Cys-EPO 的前导序列, 而预测 hGH 前导序列和一些, 但不是所有干扰素(IFN)蛋白信号肽产生具有 N 末端 Cys 的蛋白。

表 1

信号序列	长度	蛋白名称	NCBI 获取号	SignalP 3.0 (NN) 最可能	SignalP 3.0 (HM) MD 概率
MGVHECPAWL WLLSLLSLP LGLPVLG (SEQ ID NO: 1, 1-27)	27	EPO	P01588	28 和 29: LGC-AP	0.476 27和28 之间
MATGSRTSLL LAFGLLCLPW LQEGSA (SEQ ID NO: 2)	26	生长激素, 异构体	NP_00050 6	26 和 27: GSA-CA	0.490 27和28 之间
MAVWVTLFL MAAAQSIQA (SEQ ID NO: 3)	19	抗体 HC		19 和 20: IQA-CA	0.777 19和20 之间
MGIKMETHSQ VFVYMLLWLS GSVEG (SEQ ID NO: 4)	25	抗体 LC		25 和 26: VEG-CA	0.878 25和26 之间
MASPFALLMV LVVLSCKSSC SLG (SEQ ID NO: 5)	23	IFN α 1	NP_07691 8	23 和 24: SLG-CA	0.324 23和24 之间
MALTFALLVA LLVLSCKSSC SVG (SEQ ID NO: 6)	23	IFN α 2	NP_00059 6	SVG-CA	0.333 20和21 之间
MALSFSLLMA VLVLSYKSIC SLG (SEQ ID NO: 7)	23	IFN α 4, 10 & 17	NP_06654 6	23 和 24: SLG-CA	0.222 23和24 之间
MALPFVLLMA LVVLNCKSIC SLG (SEQ ID NO: 8)	23	IFN α 5	NP_00216 0.	16 和 17: LNC-KS	0.205 22和23 之间
MALPFALLMA LVVLSCKSSC SLD (SEQ ID NO: 9)	23	IFN α 6	NP_06628 2	24 和 25: LDC-AP	0.375 21和22 之间
MALSFSLLMA VLVLSYKSIC SLG (SEQ ID NO: 7)	23	IFN α 10	NP_00216 2	与 IFN α 4 相同	

信号序列	长度	蛋白名称	NCBI 获取号	SignalP 3.0 (NN) 最可能	SignalP 3.0 (HM) MD 概率
MASPFALLMA LVVLSCKSSC SLG (SEQ ID NO: 10)	23	IFN α 13	NP_00883 1	23 和 24: SLG-CA	0.324 23位和 24之间
MALPFALLMA LVVLSCKSSC SLG (SEQ ID NO: 11)	23	IFN α 14	NP_00216 3	23 和 24: SLG-CA	0.320 23位和 24之间
MALSFSLLMA VLVLSYKSIC SLG (SEQ ID NO: 7)	23	IFN α 17	NP_06709 1	与 IFN α 4 相同	
MAFVLSLLMA LVLVSYGPGG SLG (SEQ ID NO: 12)	23	IFN δ 1	P37290	23 和 24: SLG-CA	0.815 23位和 24之间
MALLFPLLAA LVMTSYSPVG SLG (SEQ ID NO: 13)	23	IFN Ω 1	NP_00216 8	23 和 24: SLG-CA	0.649 23位和 24之间

多种哺乳动物表达载体已经成功地用于表达重组蛋白。通过本发明的方法生成的示例的组合物包含利用强病毒启动子、共有 Kozak 序列、编码感兴趣的蛋白的前体 (hHG 信号肽: EPO) 的 DNA、六 His 标记、终止密码子和聚腺苷酸化信号的单一表达载体, 所述聚腺苷酸化信号来源于例如 SV40 (猿猴病毒) 聚腺苷酸化信号或牛生长激素聚腺苷酸化信号。

一旦构建了含有本发明的组合物的表达载体, 就采用转染宿主细胞的常规方法表达新的蛋白。可以采用瞬时转染或稳定转染方法, 并且可以采用能够加工哺乳动物信号序列的任何宿主细胞 (优选哺乳动物细胞)。有用的宿主细胞系的例子是 VERO 和 HeLa 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系、W138、293、BHK、COS-7 和 MDCK 细胞系。从细胞培养物回收和纯化蛋白的方法是本领域技术人员公知的, 包括添加用于所谓的纯化“标记”的氨基酸基序的编码区, 所述“标记”如六组氨酸或 FLAG。

当由原核生物表达时, 通常含有 N 末端甲硫氨酸或甲酰基甲硫氨酸并且不糖基化的多肽就不是优选的。但是, 本领域技术人员将意识到, 本发明不限于使用前面所述的含有哺乳动物信号肽的载体和哺乳动物宿主细胞, 特别是当目的不在于产生糖基化蛋白时。已经了解并且使用了用于表达和分泌蛋白的细菌系统。例如, 已经将金黄色葡萄

球菌核酸酶信号肽编码序列用于产生胰岛素原和芽孢杆菌的构建体，例如，参见 EP0176320A1。多种分泌信号肽序列可以用于芽孢杆菌，并且进行操作，能够产生本发明的 N 末端半胱氨酸多肽。所述分泌编码序列包括，但不限于，解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶信号肽序列、蜡状芽孢杆菌的 O-内酰胺酶 I 型信号肽序列、枯草芽孢杆菌果聚糖蔗糖酶信号肽序列和解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶信号肽序列。上述分泌编码序列可以适当连接在载体的转录和翻译激活序列与编码功能性 N 末端半胱氨酸多肽的序列之间。

EPO

EPO 主要在肾脏中产生，其作用是通过结合到前体细胞上的受体二聚体而导致红细胞的分化以及随后的增殖 (Livnah, O.等人. Science 1999, 283, 987-990)。EPO 通过两个结合面结合到受体上，其中一个结合受体的亲和力比另外一个强。EPO 的晶体结构已经被分辨 (Syed, 等人. Nature 395 (6701), 511-516 (1998); Cheetham, J. C.等人. Human Erythropoietin, NMR minimized average structure, 1998 年 9 月 8 日。蛋白质数据库 ID 1BUY)。结合到其受体上的 EPO 的晶体结构也已经被描述 (见 Stroud, R. M.和 Reid, S. W., Erythropoietin complexed with extracellular domains of erythropoietin receptor. 蛋白质数据库 ID1CN4)。

促红细胞生成素基因具有编码 193 个氨基酸的多肽原的 5 个外显子 (SEQ ID NO: 1)。从多肽原的氨基末端切除 27 个氨基酸的前导序列，产生 166 个氨基酸的功能性多肽。但是，在中国仓鼠卵巢细胞中表达的重组人促红细胞生成素仅仅含有 165 个氨基酸，缺失了 arg166。其机理是未确定的，并且不知道在血浆中循环的促红细胞生成素是否也缺乏 arg166 或进一步的 C 末端截短。促红细胞生成素的核苷酸和氨基酸序列在哺乳动物中都是高度保守的。

修饰成本发明的生物活性形式的 EPO 的原料优选是人促红细胞生成素 (SEQ ID NO. 1) 或 des-166Arg SEQ ID NO: 1，或已知具有生物活性的其它变体，或具有导致骨髓细胞对网织红细胞和红细胞的生产增加的生物学性质的其它衍生物。可从天然来源获得 EPO 糖蛋白或用于此引入作为参考的 U.S. 4,703,008; 5,441,868; 5,547,933; 5,618,698 和 5,621,080 中描述的程序重组产生。在野生型人 EPO 中，第 24、38 和

83 位的 Asn 残基代表三种天然存在的 N-连接的糖基化位点。这三个位置的糖基化和一个 O-连接的位点(Ser123) 占天然和哺乳动物细胞培养物中产生的重组 EPO 的大约 40 重量%。已经制备了基因修饰的变体, 其具有更多、更少或不同的糖基化位点。也可以将具有需要的生物学活性的非糖基化形式、低糖基化形式或高糖基化形式的促红细胞生成素用于本发明的组合物中。可以由原核生物产生非糖基化的蛋白, 因此将对哺乳动物蛋白进行了密码子适应的核酸序列用于采用原核细胞, 如大肠杆菌的表达系统中, 导致了产生非糖基化蛋白产物的能力。所述方法教导于 W000/32772 中。也描述了具有生物学活性的其它变体, 它们具有通过将第 24、38 或 83 位的 Asn 中的任何一个进行氨基酸交换而产生的改变的糖基化模式(Yamaguchi, K., et al., 1991, J. Biol. Chem. 266 : 20434-20439)。

制备高糖基化 EPO 的方法教导于 W00249673 和 EP640619。可以将其它 N-连接的碳水化合物链加入 rHuEPO 分子。在哺乳动物细胞中, 在用于添加碳水化合物的共有序列 (Asn-X-Ser/Thr) 将 N-连接的碳水化合物连接于多肽主链, 其中 X 是除 Pro 或 Asp 之外的氨基酸。该过程发生在细胞内质网中, 并且是由膜结合的寡糖转移酶催化的。识别共有序列的知识是由基因工程师发现的, 从而通过在要克隆的 DNA 的序列中制造需要的改变而将新的碳水化合物连接位点导入多肽主链中。当然, 必须将共有序列加在与碳水化合物添加相容的位置, 例如, 不干扰受体结合或不损害分子的折叠、构象或稳定性的位置。促红细胞生成素类似物 NSEP 是通过将 2 个成功糖基化的 4 条链的类似物的碳水化合物添加位点合并到一个分子中而产生的。NESP 的氨基酸序列与人促红细胞生成素的序列在 5 个位置上不同 (Ala30Asn、His32Thr、Pro87Val、Trp88Asn 和 Pro90Thr), 使得其它寡核苷酸连接在第 30 和 80 位的天冬酰胺残基(Elliott et al, Blood 96: 82a(2000))。专利申请公开 WO0181405 中公开的高糖基化变体添加了三个额外的 N-连接的糖基化位点: 30、53 和 88; 30、55 和 114 ; 或 30、88 和 114。

US6583272 和 US6340742 中也描述了糖基化改变的聚乙二醇化的 EPO 变体, 其中添加的糖基化共有序列主要位于 30、57、59、67、88、89、136 和 138 位。

对蛋白重新工程化的方法

采用本领域公知的一些方法中的任何一种，可以制备本发明的多肽变体或其功能性片段。定向于寡核苷酸的诱变是公知的用于系统性导入突变的有效过程，不依赖于它们的表型，因此适于蛋白工程化的定向进化方法。该方法是灵活的，允许导入精确的突变，不需要使用限制酶，并且是相对便宜的。重组和酶促合成，包括聚合酶链反应和其它扩增方法可以参见，例如 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001) 和 Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD(1999)。

可以实施采用定向于寡核苷酸的诱变合成的突变多肽的有效合成和表达方法，并且该方法是本领域公知的，描述于 Adelman et al., (1983) *DNA*, 2: 183 和 Kunkel *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 82:488-492 (1985)，在此引入作为参考。

同样，例如，可以用编码突变氨基酸的寡核苷酸，例如基于 PCR 的定点诱变（例如 QuikChange™, Stratagene）中使用的那些，产生单个或多个氨基酸突变。也可以用在此引入作为参考的 Higuchi et al., *Nucleic Acids Res.* 16: 7351-7367(1988)中描述的技术实现编码野生型或母体蛋白的 cDNA 的定点诱变。概言之，该过程要求使用两组引物：第一对引物位于要突变的蛋白的完整 cDNA 的侧翼，并且因此在 PCR 扩增时将产生 cDNA 的全长拷贝，第二对引物彼此互补，并且含有需要的突变。这些引物最初产生两组产物，一组具有在 3' 末端附近导入的突变，另一组具有在 5' 末端附近导入的突变。但是由于这两种产物彼此互补，并且与 PCR 引物互补，两组产物可以形成在两个方向延伸的重叠的双链体。这样，cDNA 在两组引物存在下的 PCR 扩增，可以用于产生编码图 1 所示需要的构建体的全长 cDNA (SEQ ID NO:14)。

基因或基因片段的合成，或至少是无细胞制备方法也是本领域公知的。通过顺序退火寡核苷酸而和合成大核酸聚合物的方法可以参见，例如，Evans 的 PCT 申请 No. WO99/14318 和美国专利 No.6,521,427。用体外方法合成改变的基因或完整编码序列的方法以前已经用于人 EPO：例如，参见 US159687 和 US6537746。体内引起突变以产生具有改变的性质的 EPO 的方法教导于 EP0843725 和 US6444441。

可以用具有需要的生物学活性的蛋白的任意变异或突变形式实施本发明的将半胱氨酸添加在活性蛋白，如 EPO 或 EPO 变体多肽的 N 末端的方法。该方法可以在用真核细胞系统表达的糖蛋白，特别是 EPO 上实施，或者可以在未唾液酸化或未糖基化的蛋白或 EPO 上实施。

水溶性聚合物

一种特别优选的水溶性聚合物是 PEG 几个种类中的一种。PEG 包含一个基本的碳单元， $\text{HO}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$ ，并通过以下名称以各种形式出售：聚乙二醇（各种分子量）；PEG200；PEG（各种分子量）；聚环氧乙烷；Carbowax； α -氢- ω -羟基聚（氧-1,2-乙二醇）；乙氧基化的 1,2-乙二醇；聚氧乙烯醚（Polyoxyethylene ether）；Emkapol 200；Gafanole 200；Pluriol e 200；Polydiol 200；Polyox WSR-301；Macrogol 以及 PolyoxyethyleneIn。在本发明的使用了基于 PEG 的聚合物的方面，它们优选具有从大约 200 到大约 100,000 道尔顿的平均分子量，并优选从大约 2,000 到大约 20,000 道尔顿。2,000 到 12,000 道尔顿的分子量是最优选的。

其它的水溶性聚物质包括了诸如葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、多糖、淀粉、聚乙烯醇、聚丙烯酰胺或其它类似的非免疫原性聚合物的材料。本领域普通技术人员能够理解，前面所述的只不过是例证性的，并不打算限制在这里适用的非抗原聚合物的类型。

赋予延长的药代动力学体内半衰期的有机分子

有机部分可以连接到亲水性聚合物上，以增加包括脂肪酸、二羧酸、二羧酸的单酯或单酰胺、含有饱和脂肪酸的脂质、含有不饱和脂肪酸的脂质、含有饱和与不饱和脂肪酸混合物的脂质、简单的碳水化合物、复杂的碳水化合物、碳环化合物（如类固醇）、杂环化合物（如生物碱）、氨基酸链、蛋白质、酶、酶辅因子或者维生素的半衰期。

在一个实施方案中，亲水性聚合物基团被 1 到大约 6 个烷基、脂肪酸、脂肪酸酯、脂质或磷脂基团取代（正如此处所述，例如式 I）。优选地，被取代的亲水性聚合物基团是直链的或含支链的 PEG。优选地，被取代的亲水性聚合物基团是被脂肪酸、脂肪酸酯、脂质或磷脂基团或者烃末端取代的直链 PEG（如 PEG 二胺）。被烷基、脂肪酸、脂肪酸酯、脂质或磷脂基团取代的亲水性聚合物可以使用合适的方法来制备。例如，修饰剂可以用单保护的 PEG 二胺与活化的脂肪酸（例

如棕榈酰氯)反应来制备。所得产物可以用来生产包含被脂肪酸基团取代的 PEG 的修饰 EPO。许多其它合适的合成方案都可以使用。例如,含有胺的聚合物可以被偶联到此处所述的脂肪酸或脂肪酸酯,在脂肪酸或脂肪酸酯上的活化的羧酸酯(如用 N, N'-羰基二咪唑活化的)可被偶联到聚合物的羟基上。这样,就可构建许多合适的具有期望的性质的直链或含支链的多聚结构,并最终连接或修饰为含有可以作为转谷氨酰胺酶胺供体的伯胺。

适用于本发明的脂肪酸和脂肪酸酯可以是饱和的或者可以包含一个或多个不饱和单元。在一个优选的实施方案中,脂肪酸和脂肪酸酯包括大约 6 个到大约 40 个碳原子,或大约 8 个到大约 40 个碳原子。适合用来在本发明的方法中修饰 EPO 的脂肪酸包括,例如 n-十二烷酸酯(C12,月桂酸酯)、n-十四烷酸酯(C14,豆蔻酸酯)、n-十六烷酸酯(C16,软脂酸酯)、n-十八烷酸酯(C18,硬脂酸酯)、n-二十烷酸酯(C20,花生酸酯)、n-二十二烷酸酯(C22,山萮酸酯)、n-三十烷酸酯(C30)、n-四十烷酸酯(C40)、顺- Δ^9 -十八碳烯酸酯(C18,油酸酯)、全顺式 $\Delta^{5,8,11,14}$ -二十烷酸酯(C20,花生四烯酸酯)、辛二酸、十四碳二烯酸、十八碳二烯酸,二十二碳二烯酸以及类似物。合适的脂肪酸酯包括含有直链或含支链低级烷基的二羧酸的单酯。低级烷基可以包括 1 到大约 12 个碳原子,优选 1 个到大约 6 个碳原子。用于修饰本发明蛋白质的合适的脂肪酸酯包括,例如十八烷酸甲酯、十八烷酸乙酯、十八烷酸丙酯、十二烷酸丁酯、十二烷酸仲丁酯、十二烷酸叔丁酯、十二烷酸新戊酯、十四烷酸己酯、顺- Δ^9 -十八碳烯酸甲酯以及类似物。

制备用于转移到 N 末端 Cys 多肽的底物

包含连接于亲电试剂的两种或三种或更多成分的组合物可以作为本发明方法中合适的缀合底物。

底物的制备优选是逐步进行的,在最终的步骤中形成单个硫羟基反应化合物。由还原剂如 DTT 切割的二硫键和硫酯键,以及在还原条件下不可切割的硫酯键可以用于本发明的组合物中。

二硫桥的形成是采用含硫羟基的底物或活化的二硫化物,即,PEG-邻吡啶基-二硫化物实现的(C. Woghiren, B. Sharma, S. Stein, Protected thiol-polyethylene glycol: a new activated polymer for reversible protein

modification, Bioconjugate Chem 4 (1993) 314)。硫酯键通常是采用马来酰亚胺活化的底物或 PEG-碘乙酰胺形成的。也已经证明了基于向 PEG-乙烯砜双键添加硫羟基的相对新的试剂(M. Morpurgo, O. Schiavon, P.Caliceti, F.M. Veronese, Covalent modification of mushroom tyrosinase with different amphiphic polymers for pharmaceutical and biocatalysis applications, Appl Biochem Biotechnol 56(1996) 59-72)。将有机分子缀合于聚合物的其它方法是公知的, 包括使用与硫羟基反应的试剂, 例如, 丙烯酰、吡啶基二硫化物、5-硫羟基-2-硝基苯甲酸硫羟基 (TNB-硫羟基)等。

反应基团可以直接键合到亲水性聚合物、缀合物复合物或者通过接头部分如 C1-C12 烷基。如这里所使用的, “烷基”是指烷基链, 其中一个或多个碳原子任选被诸如氧、氮或硫的杂原子取代。合适的接头部分包括, 例如四甘醇、 $-(CH_2)_3-$ 、 $-NH-(CH_2)_6-NH-$ 、 $-(CH_2)_2-NH-$ 以及 $-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH-NH-$ 。

可以在将最终底物缀合到蛋白的 N 末端半胱氨酸之前, 并且采用本领域公知的任何化学或酶促方法连接水溶性聚合物 X 和亲脂试剂 M。这样, 例如, 如果用诸如包括甲苯磺酸酯、甲磺酰酯、卤素(氯、溴、碘)、N-羟基琥珀酰亚胺酯(NHS)、取代的苯基酯、酰卤等亲电基团的胺反应基团用于偶联水溶性聚合物和有机分子, 伯胺在大多数情况下必须被保护。其它缀合有机分子到聚合物上的方法是公知的, 包括使用能与硫羟基反应的试剂诸如马来酰亚胺、碘乙酰基、丙烯酰基、吡啶基二硫化物、5-硫羟基-2-硝基苯甲酸硫羟基(TNB-硫羟基)以及类似物。醛或酮基官能团可以偶联到含有胺或肟的分子上, 叠氮基可以与三价磷基团反应生成氨基磷酸酯或磷酸亚胺键。将这种硫羟基反应基团引入分子的合适方法在现有技术中是公知的(比如参见 Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, CA (1996))。反应基团可以直接键合到亲水性聚合物、缀合物复合物或者通过连接部分如 C1-C12 烷基。如这里所使用的, “烷基”是指烷基链, 其中一个或多个碳原子被诸如氧、氮或硫的杂原子任选地取代。合适的接头部分包括, 例如四甘醇、 $-(CH_2)_3-$ 、 $-NH-(CH_2)_6-NH-$ 、 $-(CH_2)_2-NH-$ 以及 $-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH-NH-$ 。

包括接头部分的修饰试剂可以这样产生, 比如通过将单-叔丁氧羰

基-烷基二胺（如单-Boc-乙二胺、单-Boc-二氨基己烷）与脂肪酸在存在1-乙基-3-（3-二甲基氨基丙基）碳二亚胺（EDC）时进行反应以在游离胺和脂肪酸羧酸酯之间形成酰胺键。用三氟乙酸（TFA）处理可以使Boc 保护基团从产物上除去以暴露可被偶联到另一个羧酸酯上的伯胺，或者可与马来酸酐反应、环化所得到的产物以生成脂肪酸的活化马来酰亚胺衍生物（参见，例如 Thompson 等人的 WO 92/16221，其全部教导引入这里作为参考）。

将底物缀合于多肽的 N 末端 Cys

一旦选择聚合物部分用于缀合到多肽的 N 末端 cys 并且是合成制备的，如果没有活化，必须在需要与多肽的 N 末端连接的位置用硫羟基反应基团活化。

砜

用于制备聚乙二醇和相关聚合物的活性砜的合成途径教导于 US5446090 (Shearwater)，在此全文引入作为参考。根据该专利中的教导，该方法包括至少 4 个步骤，其中硫与聚合物分子结合，然后通过一系列反应转化为活性砜官能团。进一步的反应(5) 是在碱性条件下将卤代烷砜转化为乙烯砜。下面示出了用于每个步骤中的特别优选的试剂，但也可以使用其它试剂：



步骤 1 是亲水聚合物上可利用的羟基的“活化”。通常可以通过两种途径，即羟基酯化或取代中的一种途径活化羟基部分，本领域技术人员也可以使用其它方法。羟基酯化是通过将酸或酸衍生物，如酸卤化物与 PEG 反应形成反应性酯而完成的。典型的酯是磺酸酯、羧酸酯和磷酸酯。适用于实施本发明的磺酸卤化物包括甲磺酰氯和对-甲苯磺酰氯。

在取代反应中，亲水聚合物的羟基被反应性更高的部分，一般是卤化物取代。例如，结构上表示为 SOCl_2 的亚硫酰二氯可以与 PEG 反应以形成更反应性更高的氯代 PEG。

步骤 2 是将硫直接连接于聚合物中的碳原子，并且形成乙硫或具有相似反应特性的乙硫衍生物。2 碳“乙基”部分是需要，以便链中远离硫基团的第二个碳原子提供用于将硫羟基部分与硫连接的反应位点。

步骤 3 涉及将碳连接于硫基团 $-\text{SO}_2$ 的硫的有限氧化。存在许多这样的氧化剂，包括过氧化氢和过硼酸钠。可以使用催化剂，如钨酸。

在步骤 4，通过羟基的活化或通过用反应性更高的基团取代羟基，将第 2 步中添加的羟基部分转化为反应性更高的形式，与反应顺序中的第 1 步类似。

得到的聚合物活化的乙硫是稳定的，可分离的，并且适于硫羟基选择性偶联反应。例如，PEG 氯乙硫在大约 7 或更低的 pH 下是稳定的，但在碱性 pH 直到高达至少约 pH9 的条件下可以用于使硫羟基选择性偶联反应有利。PEG 乙烯硫也是稳定的并且可分离的，可以形成硫羟基选择性、水解稳定的键。

可以在合成中添加步骤 5，以便将活化的乙硫转化为乙烯硫或其活性衍生物之一，用于硫羟基选择性偶联反应中。聚合物乙烯硫比其乙硫对应物更迅速与硫羟基反应，并且在低于约 11 的 pH 下，在至少数天内对水解是稳定的。

预计反应产生这样的产物，其中乙基或乙烯基的碳保留为最终缀合物的一部分。US5446090 和其中的教导提供了任何分子量并且可以是线性或含支链的活性 PEG 硫，其可以是取代或未取代的。硫部分对水解的稳定性使其特别适用于双官能或杂双官能应用。

聚合物乙烯硫及其前体和衍生物可以用于直接连接于表面和具有硫羟基的分子。但是，更典型地，杂双官能团亲水聚合物，如 PEG，在通常位于聚合物末端的一个位置具有乙烯硫部分，同时在相反末端具有不同的官能团。在一个末端具有硫部分，在另一个末端具有胺特异性部分的杂双官能 PEG 可以连接在例如相同或不同蛋白的半胱氨酸和赖氨酸部分。或者，可以用杂双官能化分子掺入此处描述的第二有机部分，以至于在未反应的硫部分的反应之前，可以形成稳定的胺键。

可以从多种化合物中选择用于杂双官能活化的 PEG 的其它活性基团。对于生物和生物技术应用,通常可以从反应部分选择取代基,所述反应部分通常用于 PEG 化学以活化 PEG,如醛、三氟乙磺酸酯(有时也称作 tresylate)、n-羟基琥珀酰亚胺酯、氰尿酸氯、氰尿酸氯、酰叠氮、琥珀酸酯、对-重氮苄基、3-(对-重氮苄氧基)-羟基丙氧基、马来酰亚胺等。

也可以通过酯化学将肽、蛋白、PEG 和其它聚合物连接于含有 N 末端半胱氨酸的 EPO。对于肽和蛋白,可以合成或表达这两者,以使其在 C 末端含有酯部分(优选硫酯)。在温和水性条件下,硫酯化合物可以与含有 N 末端半胱氨酸的 EPO 反应,终产物是通过在半胱氨酸残基的 α 氨基和所述硫酯的羧基碳之间形成的酰胺键与所述硫酯化合物缀合的 EPO(Tam, J. P., Proc. Natl. Acad. Sci. 92,12485-12489(1995))。

衍生化的促红细胞生成素化合物的实例是:

M-PEG-A-Cys-EPO, 其中 Cys 代表相对于生物活性促红细胞生成素氨基酸序列的 Cys₁, M 是脂质、碳水化合物、多糖、脂肪酸、脂肪酸衍生物、脂肪醇或蛋白; A 代表亲电硫羟基反应基团,优选马来酰亚胺的载体或反应产物。

(M-PEG)₂-A-Cys-EPO, 其中 Cys 代表相对于生物活性促红细胞生成素氨基酸序列的 Cys₁; 其中 M-PEG 在 A 上酯化为两个不同的羧基,并且 A 进一步包含代表亲电硫羟基反应基团,优选马来酰亚胺的载体或反应产物的部分; 并且其中 M 是脂质、碳水化合物、多糖、脂肪酸、脂肪酸衍生物、脂肪醇或蛋白。也包括更高级的多聚物。

(M-PEG)₂-R-A-Cys-EPO, 其中 Cys 代表相对于生物活性促红细胞生成素氨基酸序列的 Cys₁; 其中 A 代表亲电硫羟基反应基团,优选马来酰亚胺的载体或反应产物; 其中(M-PEG)₂-R 连接于 A 上的两个不同的羧基; 其中 M 是脂质、碳水化合物、多糖、脂肪酸、脂肪酸衍生物、脂肪醇或蛋白,并且 R 是增强价的构建体。也包括更高级的多聚物。

M-A-Cys-EPO, 其中 Cys 代表相对于生物活性促红细胞生成素氨基酸序列的 Cys₁; 其中 M 是蛋白或肽,并且 A 是所述蛋白或肽上的游离半胱氨酸侧链。

M-A-Cys-EPO, 其中 Cys 代表相对于生物活性促红细胞生成素氨

基酸序列的 Cys₁；其中 M 是脂质，并且 A 代表亲电硫羟基反应基团，优选马来酰亚胺的载体或反应产物。

M-A-Cys-EPO，其中 Cys 代表相对于生物活性促红细胞生成素氨基酸序列的 Cys₁；其中 M 是生物素、丹酰或者其它给 EPO 赋予能用于研究、诊断或治疗目的的生物物理特性的部分；并且其中 A 代表亲电硫羟基反应基团，优选马来酰亚胺的载体或反应产物。在生物素或另一个具有已知结合配偶体的部分被引入到这个缀合物时，预期所述缀合物能以复合物的形式与其已知的结合配偶体如生物素-抗生物素蛋白复合物用于研究、诊断或治疗。

M-A-Cys-EPO，其中 Cys 代表相对于生物活性促红细胞生成素氨基酸序列的 Cys₁；其中 M 是生物素、丹酰或者其它给 EPO 赋予能用于研究、诊断或治疗目的的生物物理特性的部分；并且其中 A 代表酯或硫酯基团与 Cys₁ 之间的反应产物。

治疗给药

本发明的 NTFT 促红细胞生成素缀合物适合用作治疗血液病的肠胃外制剂，所述血液病的特征为低的或有缺陷的红细胞产生，如各种形式的贫血，包括与慢性肾衰竭、叠氮胸苷治疗的 HIV 感染患者以及化疗的癌症病人相关联的贫血。它也可以应用于治疗各种疾病状态、失调以及血液学方面不规律的状态，例如镰刀细胞病、 β -地中海贫血病、囊性纤维化、妊娠和月经不调、早期早发贫血、脊髓损伤、宇航病、急性失血、衰老以及类似病症。它也可应用于期望增加红细胞的情形，例如外科手术前的患者。优选地，本发明的 NTFT 促红细胞生成素缀合物经肠胃外给予（例如 IV、IM、SC 和 IP）。

有效剂量可望根据治疗的状况和给药途径进行相当程度的改变，不过预期在 0.1 到 100 μ g/kg（约 7 到 7000U）体重的活性物质。治疗贫血状况的优选剂量是大约 50 到大约 300 单位/kg 每周三次。

本发明的 NTFT 促红细胞生成素缀合物制剂可以用于治疗神经病理，特别是中枢神经系统的那些，包括，但不限于：脑和脊髓缺血、急性脑损伤、脊髓损伤、视网膜病和神经退化性疾病，如阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病和 ALS。除神经病理外，本发明的 EPO 制剂可用于治疗由于缺血或缺氧应激如心肌梗塞导致的其它组织损伤、手术介入导致的软组织损伤，包括结缔组织和器官损伤、以及由于创伤

和免疫介导的炎症导致的组织损伤，或促进这些损伤的愈合。

药物组合物

根据本发明制备的治疗性 NTFT 蛋白可通过现有技术中公知的方法用药学可接受的载体或赋形剂制剂化为适于注射的药物组合物。例如，WO97/09996、WO97/40850、WO98/58660 以及 WO99/07401 中描述了合适的组合物。用于配制本发明产品的优选的药学可接受的载体包括人血清白蛋白、人血浆蛋白质等。本发明的化合物可以在 pH 值为 7 的 10 mM 磷酸钠/钾缓冲液中，其中含有渗透压调节剂如 132 mM 氯化钠中制剂化。任选地，药物组合物可含有防腐剂。药物组合物可含有不同量的促红细胞生成素产品，如 10-2000 $\mu\text{g/ml}$ ，如 50 μg 或 400 μg 。

添加诸如生育酚、丁基化羟甲苯、丁基化羟基苯甲醚、棕榈酸抗坏血酸酯的抗氧化剂或者诸如乙二胺四乙酸二钠的乙二胺四乙酸盐，该组合物的稳定性可以被进一步增强，其中乙二胺四乙酸盐额外结合可能存在的重金属。此外，该组合物还可以通过添加防腐剂来增强稳定性，例如苯甲酸以及对羟基苯甲酸甲酯和/或对羟基苯甲酸丙酯这样的对羟基苯甲酸酯。

对特征为低的或者有缺陷的红细胞产生的血液病的治疗

一方面，本发明的 NTFT 促红细胞生成素缀合物的给药导致人体内红细胞的形成。因此，NTFT 促红细胞生成素缀合物的给药补充或代替了对红细胞的产生很重要的天然 EPO 蛋白质的功能。含有 NTFT 促红细胞生成素缀合物的药物组合物可配制成有效强度，足以通过各种方法给药于正经受特征为低的或有缺陷的红细胞产生的血液病的人患者，这种低的或有缺陷的红细胞产生是单独的或作为一种状况或疾病的部分。可以通过诸如皮下注射、静脉注射或者肌肉注射等注射方法来给予药物组合物。NTFT 促红细胞生成素缀合物的平均量可能会变化，特别地应当基于有执照的医师的建议和处方。缀合物的精确量要优先考虑诸如被治疗状况的确切类型、被治疗病人的状况以及组合物的其它成分等因素。比如，0.01 到 10 μg 每千克体重，优选 0.1 到 10 μg 每千克体重，可以一个星期给药一次。

另一方面，本发明的 NTFT 促红细胞生成素缀合物制剂的用途是针对需要介入的人类患者，以保护、恢复或加强神经组织，特别是中

中枢神经系统的神经组织，以及由于以下疾病导致的减少、破坏或损失的功能：脑和脊髓缺血、急性脑损伤、脊髓损伤、视网膜病和神经退化性疾病，如阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病和 ALS。本发明的 NTFT 促红细胞生成素缀合物制剂的用途也可以是治疗需要介入的人类患者，以保护、恢复由于缺血或缺氧应激如心肌梗塞导致的其它组织损伤、手术介入导致的软组织损伤，包括结缔组织和器官损伤、以及由于创伤或免疫介导的炎症导致的组织损伤，或促进其愈合。

本申请中参考了各种出版物。这些出版物的公开内容引入这里是为了更充分地描述现有技术状态。

本发明通过下面的实施例进一步进行阐述，这些实施例的存在是以例证本发明化合物和组合物的制备为目的的，而不是限制性的。

实施例 1

克隆 cys-EPO

EPO 的 N 末端不参与受体结合，并且其位置离开 EPO - 受体复合物。因此，EPO 的 N 末端提供了用于掺入化学修饰的理想位置，该修饰至少应该对受体结合具有立体影响，因此对生物活性也有影响。因此，在 N 末端导入半胱氨酸残基使得能够对 EPO 进行定点修饰，而不破坏受体结合。

因此，通过操作 EPO 基因序列或 cDNA，制备了具有在丙氨酸残基的 N 末端的半胱氨酸残基的 hEPO。但是，in silico 分析提示仅仅在 EPO 前体编码序列中加入半胱氨酸残基，会使信号肽中推测的切割位点向上游移动到 24 位的脯氨酸和 25 位的缬氨酸之间，使 val25 成为新的 N 末端残基，或导致 cys(-1)和 ala1 之间的切割，以有效地完全除去添加的半胱氨酸(SignalP 3.0; www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)。为了增加工程化的 EPO 的 N 末端是半胱氨酸的可能性，提出了用已知能够有效将蛋白靶定于内质网的肽，如人生长激素的前 26 个氨基酸替代内源 hEPO 信号肽(Morris, A. E. et al. (1999) *Journal of Biological Chemistry* 274,418-423)。当通过计算机模型分析时，预测该异源蛋白(图 1, SEQ. ID. NO:3)产生具有 N 末端半胱氨酸的成熟蛋白。

为了实现可以用于表达在 N 末端具有添加的半胱氨酸的构建体的生产，将人生长激素前导序列与半胱氨酸密码子一起工程化到用于表达新蛋白的载体中。

从pEG15扩增EPO的核酸序列。从源自XGH5 (Nichols Diagnostic) 的载体扩增hGH信号序列的核酸序列。将hGH-EPO构建体连接到称作pSUE质粒的质粒中。下文描述了用于制备编码SEQID NO: 3(图3)的多肽的多核苷酸的方法。

引物设计

用第一 PCR 引物对(SEQ ID NOS: 15 和 16)制备含有 HindIII-Kozac-hGH-CYS-ApaLI 的 107bp 片段。

5'.HindIII.Kozac.hGH 5'-ATG CAA GCT TGC CAC CAT GGC TAC
AG-3'
3'.hGH.cys.ApaLIB 5'-GTG GTG GTG CAC AGG CAC TGC CCT
C-3'

用第二 PCR 引物对(SEQ ID NOS: 17 和 18)制备含有 CYS-ApaLI-EPO-BamHI 的 518 bp 片段。

5'.cys.ApaLLEPO 5'-ATG CGC ATG TGC ACC ACC ACG CCT
C-3'
3'EPO.BamHI 5'-GCA TGG ATC CTC TGT CCC CTG-3'

克隆

用第一引物对制备用于最终构建体的hGH信号序列片段(SEQ ID NO: 2)。PCR梯度条件是95℃ x 2分钟, 然后是30个循环的95℃x 2分钟, 50-60℃ 30秒, 72℃ 30秒, 然后是72℃下最终延伸3分钟, 然后4℃下维持。用第二引物对制备最终构建体的EPO片段。PCR条件是94℃ 2分钟, 然后是30个循环的94℃x 30秒, 60℃x30秒, 72℃ x 3分钟, 然后是72℃下最终延伸7分钟, 然后4℃下维持。扩增后, 将10 μL每一种PCR反应物与1 μL 10×加样染料混合, 并且用1Kb序列梯(Invitrogen, Carlsbad, CA)在1% SeaKem 凝胶(Bio-Rad, Hercules, CA)上电泳。hGH PCR反应在每个温度下产生了在大约100bp位置迁移的条带; 切下该条带并且合并在一起, 根据QIAQuick Gel 萃取柱(Qiagen, Valencia, CA)进行萃取, 并且在30 μL dH₂O中洗

脱。类似地，切下并萃取在大约 500bp 位置迁移的 EPO 条带。

用 BamHI 和 ApaLI 消化 EPO 片段，用 HindIII 和 ApaLI 消化 hGH 片段，用 HindIII 和 BamHI 消化载体 pSUE。按上文所述，10 μ L pSUE 消化物在 1% SeaKem 凝胶上电泳。切下约 10Kb 处的载体条带，按照上文所述萃取。用小牛肠碱性磷酸酶(New England BioLabs, Beverly, MA)处理全部 30 μ L 洗脱物，然后根据 QIAQuick PCR 纯化柱(Qiagen)的说明书纯化，并且在 30 μ L dH₂O 中洗脱。用 QIAQuick PCR 纯化柱纯化片段消化物，在 30 μ L dH₂O 中洗脱。

用 Roche 快速连接试剂盒(Roche Applied Science, Indianapolis, IN)连接各个片段和载体。将连接反应转化到 TOP10 OneShot 化学感受态细胞(Invitrogen)，并且铺板在含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素(Teknova, Half Moon Bay, CA)的 Luria-Bertani (LB)平板上。将各个集落挑选到选择性液体 LB 培养基中，在 37 度下 225rpm 振荡生长过夜。用 Qiagen Spin Miniprep 试剂盒(Qiagen)提取质粒 DNA，并且洗脱到 75 μ L dH₂O 中。用限制酶消化所有克隆，以筛选用于插入。用荧光染料 - 终止子和具有载体的内部引物的 ABI3 100 基因分析仪(Applied Biosystems, Foster City, CA)对阳性克隆测序。通过测序鉴定了两种阳性克隆；但是，这两种都含有 hHG 信号序列中的突变(Q22R)。该突变不影响预测的 C 末端半胱氨酸处的切割。最终的质粒称作 pSUEcysEPO。

在本研究中，我们采用了简单的表达载体，该载体利用强病毒启动子、共有 Kozak 序列、感兴趣的基因 (EPO)、六 His 标记、终止密码子和来源于牛生长激素基因的聚腺苷酸化信号。或者，可以制备表达 cys-EPO 的稳定哺乳动物细胞系，以表达基因产物。采用了 HEK 293E 细胞，但是，也可以使用能够加工哺乳动物信号序列的任何宿主细胞（优选哺乳动物细胞，但不是必须的）。

实施例 2

cys - EPO 的表达

用瞬时转染表达新的 EPO 蛋白，其中 DNA 由哺乳动物细胞摄取，运输到细胞核并且转录。采用该技术，以快速方式实现蛋白表达的脉冲。转染后 5 天，从条件培养基收集产物，即，cys - EPO，并且用位于蛋白 C 末端的六 His 标记纯化。

用阳离子脂质试剂(LF2K)将编码 cys-EPO 的 DNA(pSUEcysEPO)

转染到 HEK 293E 细胞中。然后, 在 10 层的细胞培养箱中的无血清培养基(2934-SFMII)中培养细胞, 4 天后回收条件培养基, 用 TALON IMAC 纯化 cys-EPO。透析和浓缩后, 通过 SDS PAGE 分析纯化产物的纯度(图 2), 进行 N 末端测序和 UT-7 生物测定(图 3)。

分析前, 在生物测定中, 在具有 L-谷氨酸和 5% PBS 而不具有 Epo 的 IMDM 中使 UT-7 细胞饥饿 24.5 小时。洗涤细胞, 以每孔 30,000 个细胞铺板。以双份加入 EPO(2.5-0.0024ng/mL)和 cys-EPO (20-0.01952ng/mL)。47.2 小时后, 37℃ 下用 Promega's MTS 溶液测量每孔的细胞数, 以 1、2 和 3 小时的间隔进行 OD 读数。所得值是用 SoftMax Pro 校正的背景, 平均背景是 0.327 OD 单位(图 3)。

从上清液回收 cys-EPO 的事实证明了由转染到细胞中的核酸成功表达了蛋白, 并且表明通过人生长激素信号序列将该蛋白靶定于内质网, 正确折叠, 并且分泌。

材料的考马斯亮蓝染色的 SDS PAGE(图 2)在大约 31KDa 处显示明显的条带, 其与由人和哺乳动物细胞产生的天然糖基化产物导致的 34KDa 匹配很好。相反, 非糖基化的 EPO 是大约 18 kDa。

N 末端测序证明正常成熟丙氨酸残基上游的单个氨基酸的存在。示出了从该条带除去的材料的 N 末端序列, *的解释如下: 由于半胱氨酸残基不容易被 N 末端测序方法识别, 除非该蛋白以某些方式衍生化, 否则只能将 N 末端氨基酸(N 在括号中)设计为存在, 即, 由测序仪“呼叫”, 并因此表明蛋白不具有封闭的 N 末端。此外, 可以确定该(N)不是衍生自 hGH 信号序列的 C 末端, 因为这是可以由测序方法鉴定的丙氨酸(A)。此外, 第一次呼叫后的氨基酸系列(N)相当于成熟的人 EPO 基因(APP 等)。

编码该构建体的核酸序列示于 SEQ ID NO:19。

实施例 3

Cys-EPO 的化学修饰

实验 1

在 pH7.0 (PBS), 用 1 mM 乙二胺四乙酸(EDTA), 用磷酸缓冲液对 Cys-EPO 进行缓冲液交换。在 37℃ 下将 Cys-EPO (0.7mg/ml, 溶于 PBS +100 mM 磷酸盐, pH 6.8)和 EPO (0.7mg/ml, 溶于 PBS + 100 mM 磷酸盐, pH6.8)与 0mM、15mM、20mM 和 25mM b-巯基乙胺(MEA)

(Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL)一起温育 2 小时。然后按照制造商的说明用磷酸缓冲液(50mM, pH 6.8)平衡的 Biospin-6 脱盐柱(Biorad Laboratories, Hercules, CA)从样品中除去 MEA。然后在室温下将样品与 0.75 mM 马来酰亚胺-PEG (平均分子量: 5960) (Nektar, Huntsville, AL)一起温育 1 小时。1 小时后, 将半胱氨酸加至 0.75mM 的浓度, 并且在室温下温育 20 分钟。然后加样并且在 4-12% SDS-PAGE 凝胶上电泳。也通过 SELDI 质谱(Ciphergen, Fulton, CA), 在采用 sinnapic acid 的基质并且按照制造商的推荐制备的 H-4 反相芯片上分析样品。以相同的方式处理野生型 EPO。

EPO 样品的凝胶(图 4)显示, 在研究的任一条件下, 没有发生明显 EPO 的聚乙二醇化。这是由缺乏代表相对于未修饰的 EPO 标准的分子量偏移的条带而表明的。样品的 SELDI-MS(图 6)也显示没有分子量差异, 再次表明在这些条件下没有发生聚乙二醇化。

cys-EPO 样品的凝胶(图 5)显示在研究的每一条件下都发生了明显的 cys-EPO 的聚乙二醇化。这是通过代表相对于未修饰的 EPO 标准的分子量偏移的条带(用白色箭头表示)而显示的(注意为了更好地显示杂质的存在, cys-EPO 标准是以更高的浓度加样的, 并且描述的分子量偏移是与相对于用标准物观察到的主要条带)。

在样品的 SELDI 质谱分析中(图 6 和 7), 28,000 附近的峰相当于未修饰的 EPO 或 cys-EPO。注意图 7 中相当于添加 5,960MW PEG 的峰的存在, 其是与预期的聚乙二醇化产物的分子量成比例的分子量差异。由于 PEG 的异质性和 EPO 上的糖基化, 该峰很宽, 并且分子量必须视为是大约的。但是, 相对分子量表明 PEG 与还原和未还原的 Cys-EPO 的连接, 再次表明在这些条件下确实发生 cys-EPO 的聚乙二醇化。同样, 聚乙二醇化的程度似乎相对于用于还原的 MEA 浓度有所增加。这表明, cys-EPO 上的 N 末端半胱氨酸的至少一些是与另一硫羟基, 如半胱氨酸或谷胱甘肽通过二硫桥连接的, 并且可以采用此处描述的条件选择性还原这些二硫化物。综上所述, 这些数据表明, cys-EPO 上的 N 末端硫羟基是可接近的, 并且可以用硫羟基特异性试剂, 如马来酰亚胺-PEG 进行修饰。

实验 2

在 pH7.0 (PBS), 用 1 mM 乙二胺四乙酸(EDTA), 用磷酸缓冲液

对 Cys-EPO 进行缓冲液交换。在此溶液中加入 3 倍摩尔过量的马来酰亚胺活化的二硬脂酰 (steroyl) 磷脂酰乙醇胺, 其中含有马来酰亚胺和脂质之间 (mal-PEG-DSPE) 的分子量为 14 - 20,000 的聚合物接头 (如 PEG)。在 20 - 25 摄氏度温育反应混合物 1 小时。然后将反应混合物加样到 zorbax GF-250 XL 大小排阻 HPLC 柱上, 用 PBS 以 2ml/分钟的流速洗脱。然后合并含有得到的修饰蛋白峰的级份, 检测生物活性。

实验 3

在溶于二甲基甲酰胺(DMF)的 28.7ml 0.5 M 的 HOBt/HBTU (1-羟基苯并三唑/2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基 uronium 六氟磷酸酯) 中加入 14.35ml 2M 二异丙基乙胺(DIEA), 然后加入 5g (14.35mmol) 3-(S,三苯甲基)-巯基丙酸(Bachem, King of Prussia, PA)。将该溶液加入 5g MBHA 树脂(0.8mmol/g) (Bachem), 搅拌 30 分钟。用几体积的 DMF、DCM 和甲醇连续洗涤树脂, 在真空中干燥。得到的树脂用于采用标准 Boc 化学进行肽合成。用标准 Boc 化学合成长度为 2 - 50 个残基的肽, 在 90% HF、10%对-甲酚、-5℃、1.5 h 的条件下完成切割。将肽沉淀在乙醚中, 冻干, 并且通过制备反相 HPLC(RP-HPLC)纯化。然后将肽与溶于 PBS (pH 7.0)中的 Cys-EPO + 1 mM EDTA 一起温育 12 - 48 小时。用分析大小排阻层析 HPLC(SEC-HPLC)监测反应, 进行 SDS 凝胶电泳和/或 SELDI 质谱。最后的缀合物加样到 Zorbax GF-250 XL 大小排阻 HPLC 柱上, 用 PBS 以 2ml/分钟的流速洗脱。然后合并含有得到的修饰的蛋白峰的级份, 并且检测生物活性。

实施例 4

UT7 细胞增殖测定

UT7 细胞是一种已经适应于成为 EPO 依赖的人白血病细胞系 (Komatsu, N., 等人. 血液 (Blood) 82 (2), 456-464, 1993)。UT7 细胞在 PBS 中漂洗 3 次, 并在分析前进行 EPO 饥饿 24 小时。UT7 细胞在含有添加的 L-谷氨酰胺和 5% FBS (I5Q) 的 IMDM 培养基中饥饿。细胞在 50ml DPBS 中漂洗一次, 在 DPBS 中悬浮时计数, 并以最终浓度为 6×10^5 个细胞/mL 悬浮于适当培养基中 (产生的最终浓度为每孔 30000 个细胞)。EPO 标准样是通过将 EPO 的贮存液 (1.7 mg/mL) 稀释到 0.85 μ g/mL (2 μ L 加入 4 mL 培养基中) 而制备的。贮存液稀释 2:340 到 5 ng/mL, 紧接着 1:2 连续稀释, 使其浓度降到 I5Q 培养基

中的 0.0098 ng/mL。所得稀释液提供了浓度为 2.5 ng/mL 到 0.0024ng/mL 的标准。测试样品用类似的方法稀释。将 50 μ L 的 UT-7 细胞悬浮液等份试样转移到相应的孔中,并且将平板在 37℃ 温育 48 小时。细胞增殖是使用 Promega's MTS 溶液(Promega, Madison, WI)来评估的,每孔加 20 μ L。在加入 MTS 1 小时后开始读数。

图 3 显示在未修饰和 N 末端 cys 修饰的 EPO 上进行的 UT7 细胞测定中 EPO 材料的浓度依赖性图。由未修饰的 EPO 计算的 EC₅₀ 是 1.795×10^{-11} M, 修饰的 EPO 是 2.948×10^{-11} M。这些数据表明分泌的材料是有活性的。

实施例 5

在小鼠中刺激造血

在过滤顶塑料笼中饲养条件下对从 Charles Rivers Laboratories(Raleigh, NC)获得的体重大约 18 - 20 克的 BDF1 雌性小鼠分组(每笼 10 只)。

在研究的第 5 天,将动物分成 1 - 3 个治疗组(PBS 对照、EPO 和 M-PEG-A-Cys-EPO),每组 15 只动物。用 CO₂ 麻醉动物,通过眶后窦将血样采集在 EDTA 包被的试管中,靶血体积是 0.05mL/样品,从而建立基线水平。将血液放置在可商购的 EDTA 制备的微量离心管中。将等分样品置于血细胞比容管中,用粘土密封管,离心 5 分钟。在可商购的血细胞比容测定卡上对血细胞比容管读数,获得细胞压积(PCV/血细胞比容)。采用 10 μ l 血液,用 Coulter™ 计数器确定血红蛋白水平。在第 0 天和第 2 天,动物接受 0.94 mL (112.8mL/kg) PBS (pH 7.4)、EPO (0.333/mL 溶于 PBS)或溶于 PBS 中的本发明的 M-PEG-A-Cys-EPO 组合物(其量等同于由实施例 4 的 UT-7 测定校准的生物活性)的腹膜内注射。在第 4、7、10、14、17 和 21 天,采集血样,等分到用粘土密封的血细胞比容管中,离心 5 分钟。在可商购的血细胞比容测定卡上对血细胞比容管读数,获得细胞压积(PCV/血细胞比容)。采用 10 μ l 样品,用 Coulter™ 计数器确定血红蛋白水平。

-
- <110> Centocor, Inc.
Cunningham, Mark
Mills, Julianne
Pool, Chadler
- <120> 具有N-末端游离巯基的新的重组蛋白
- <130> CEN 5046

<110> Centocor, Inc.
Cunningham, Mark
Mills, Julianne
Pool, Chadler

<120> 具有N-末端游离巯基的新的重组蛋白

<130> CEN 5046

<150> 60/533617

<151> 2003-12-31

<160> 20

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 193

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 信号

<222> (1)..(27)

<220>

<221> 成熟肽

<222> (28)..(193)

<220>

<221> 变体

<222> (193)..(193)

<223> 截短, desArg

<400> 1

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
-25 -20 -15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
-10 -5 -1 1 5

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
10 15 20

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
25 30 35

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
40 45 50

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
55 60 65

CEN5026 Cys-EP0 listing.ST25.txt

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
70 75 80 85

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
90 95 100

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
105 110 115

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
120 125 130

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
135 140 145

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
150 155 160 165

Arg

<210> 2
<211> 26
<212> PRT
<213> 人

<400> 2

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala
20 25

<210> 3
<211> 19
<212> PRT
<213> 鼠

<400> 3

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15

Ile Gln Ala

<210> 4
<211> 25
<212> PRT
<213> 鼠

<400> 4

Met Gly Ile Lys Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu
 1 5 10 15

Leu Trp Leu Ser Gly Ser Val Glu Gly
 20 25

<210> 5
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 5

Met Ala Ser Pro Phe Ala Leu Leu Met Val Leu Val Val Leu Ser Cys
 1 5 10 15

Lys Ser Ser Cys Ser Leu Gly
 20

<210> 6
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 6

Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
 1 5 10 15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly
 20

<210> 7
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 7

Met Ala Leu Ser Phe Ser Leu Leu Met Ala Val Leu Val Leu Ser Tyr
 1 5 10 15

Lys Ser Ile Cys Ser Leu Gly
 20

<210> 8
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 8

Met Ala Leu Pro Phe Val Leu Leu Met Ala Leu Val Val Leu Asn Cys

1	5	10	15
---	---	----	----

Lys Ser Ile Cys Ser Leu Gly
20

<210> 9
<211> 23
<212> PRT
<213> 人

<400> 9

Met Ala Leu Pro Phe Ala Leu Leu Met Ala Leu Val Val Leu Ser Cys
1 5 10 15

Lys Ser Ser Cys Ser Leu Asp
20

<210> 10
<211> 23
<212> PRT
<213> 人

<400> 10

Met Ala Ser Pro Phe Ala Leu Leu Met Ala Leu Val Val Leu Ser Cys
1 5 10 15

Lys Ser Ser Cys Ser Leu Gly
20

<210> 11
<211> 23
<212> PRT
<213> 人

<400> 11

Met Ala Leu Pro Phe Ala Leu Met Met Ala Leu Val Val Leu Ser Cys
1 5 10 15

Lys Ser Ser Cys Ser Leu Gly
20

<210> 12
<211> 23
<212> PRT
<213> 人

<400> 12

Met Ala Phe Val Leu Ser Leu Leu Met Ala Leu Val Leu Val Ser Tyr
1 5 10 15

Gly Pro Gly Gly Ser Leu Gly
20

<210> 13
<211> 23
<212> PRT
<213> 人

<400> 13

Met Ala Leu Leu Phe Pro Leu Leu Ala Ala Leu Val Met Thr Ser Tyr
1 5 10 15

Ser Pro Val Gly Ser Leu Gly
20

<210> 14
<211> 193
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> 变体
<222> (22)..(22)
<223> Q22R

<400> 14

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Arg Glu Gly Ser Ala Cys Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 15
<211> 26
<212> DNA
<213> 人

<400> 15
atgcaagctt gccaccatgg ctacag 26

<210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> 人

<400> 16
gtggtggtgc acaggcactg ccctc 25

<210> 17
<211> 25
<212> DNA
<213> 人

<400> 17
atgcgcatgt gcaccaccac gcctc 25

<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> 人

<400> 18
gcatggatcc tctgtcccct g 21

<210> 19
<211> 606
<212> DNA
<213> 人


```

gcc atc tcc cct cca gat gcg gcc tca gct gct cca ctc cga aca atc      480
Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
    120                125                130

act gct gac act ttc cgc aaa ctc ttc cga gtc tac tcc aat ttc ctc      528
Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
    135                140                145                150

cgg gga aag ctg aag ctg tac aca ggg gag gca tgc agg aca ggg gac      576
Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
                155                160                165

aga gga tcc cat cat cac cat cac cat tga      606
Arg Gly Ser His His His His His His
                170                175

```

```

<210> 20
<211> 201
<212> PRT
<213> 人

```

```

<400> 20

```

```

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
   -25                -20                -15

```

```

Cys Leu Pro Trp Leu Arg Glu Gly Ser Ala Cys Ala Pro Pro Arg Leu
  -10                -5                -1    1    5

```

```

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
    10                15                20

```

```

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
   25                30                35

```

```

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
   40                45                50

```

```

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
   55                60                65                70

```

```

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
    75                80                85

```

```

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
   90                95                100

```

```

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
  105                110                115

```

```

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
  120                125                130

```

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
135 140 145 150

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
155 160 165

Arg Gly Ser His His His His His His
170 175

MATGSRTSLL LAFGLLCLPW LREGSACAPP RLICDSRVLE RYLLEAKEAE NITTGCAEHC
60

SLNENITVPD TKVNFYAWKR MEVGQQAVEV WQGLALLSEA VLRGQALLVN SSQPWEPLQL
120

HVDKAVSGLR SLTTLLRALG AQKEAISPPD AASAAPLRTI TADTFRKLFR VYSNFLRGKL
180

KLYTGEACRT GDR
193

图 1

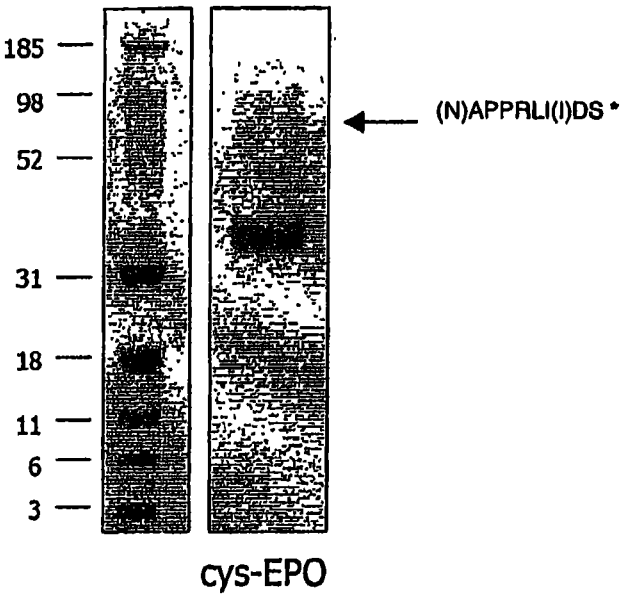


图 2

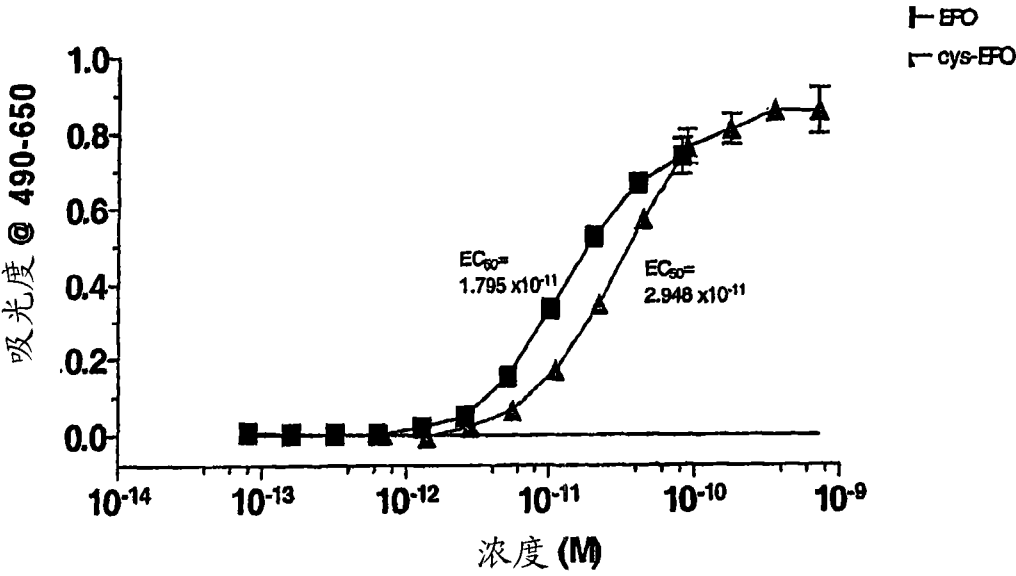


图 3

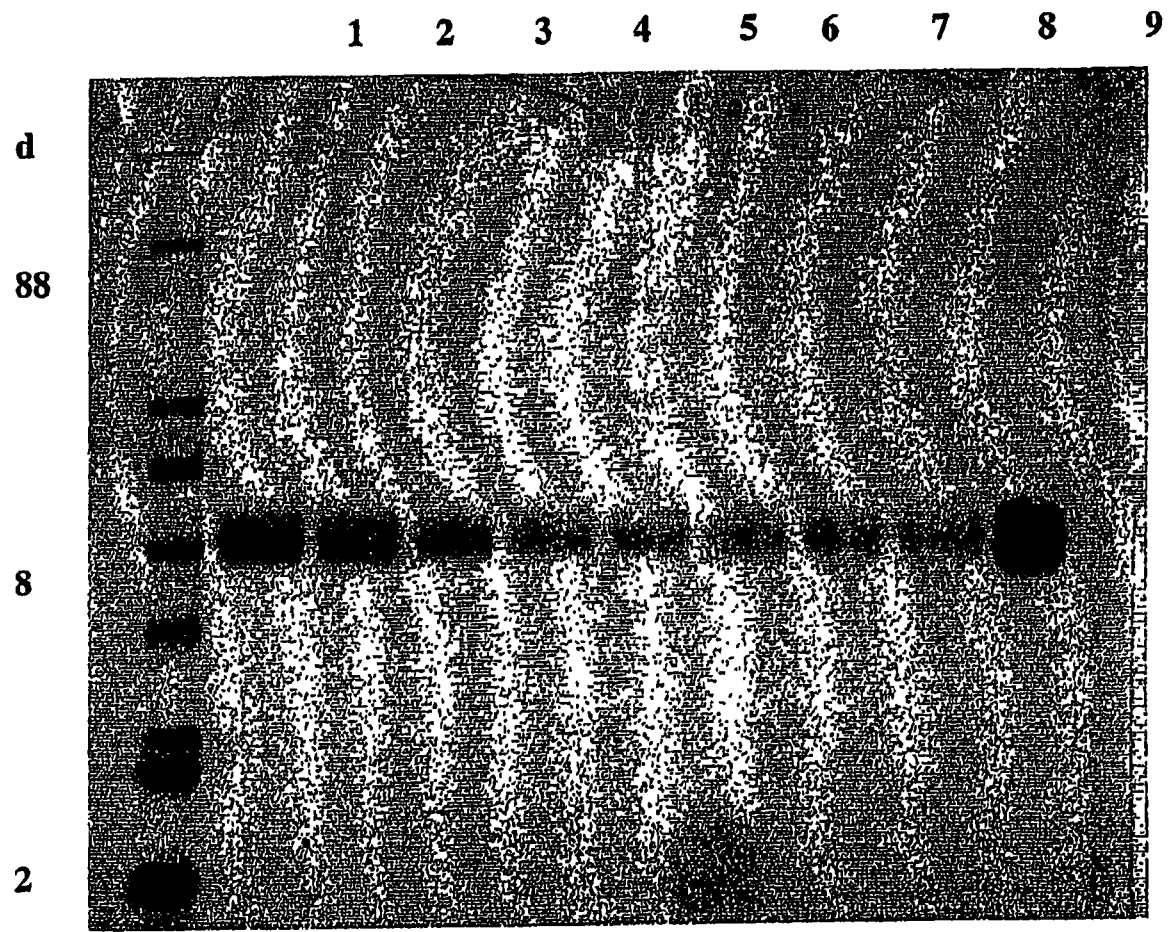


图 4

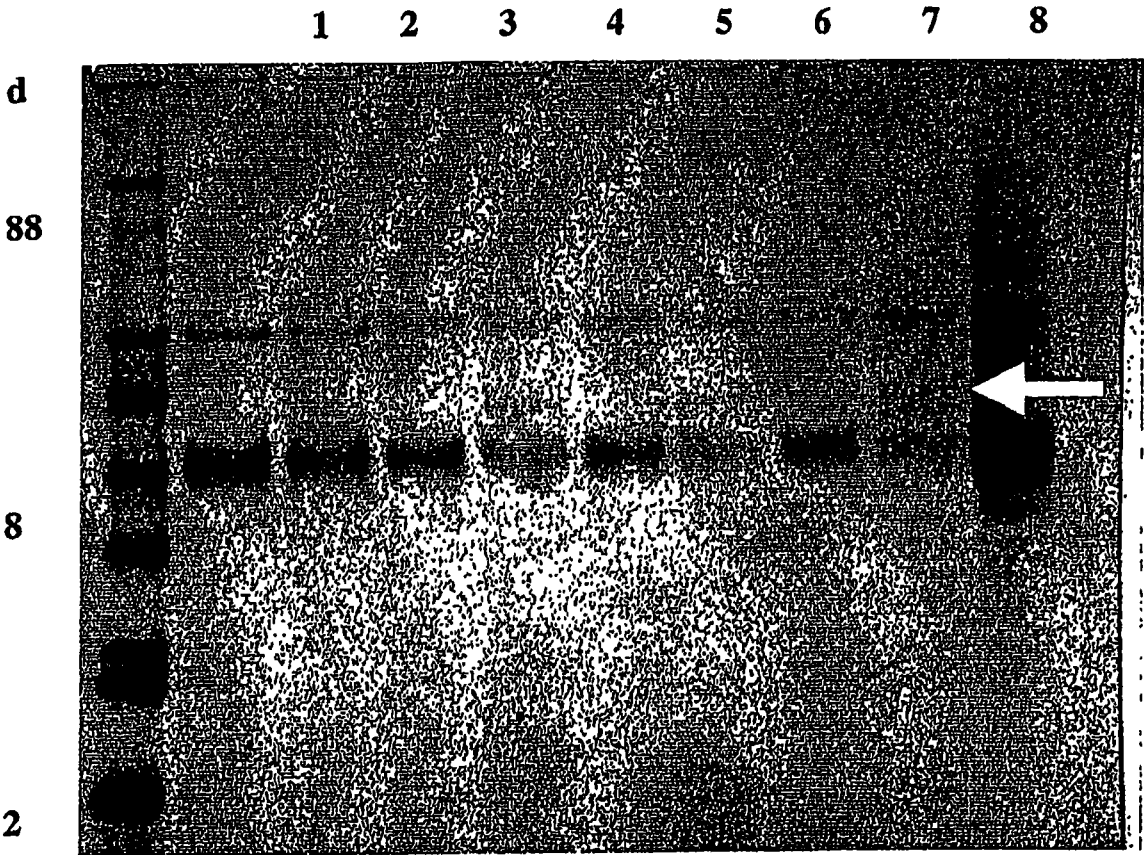


图 5

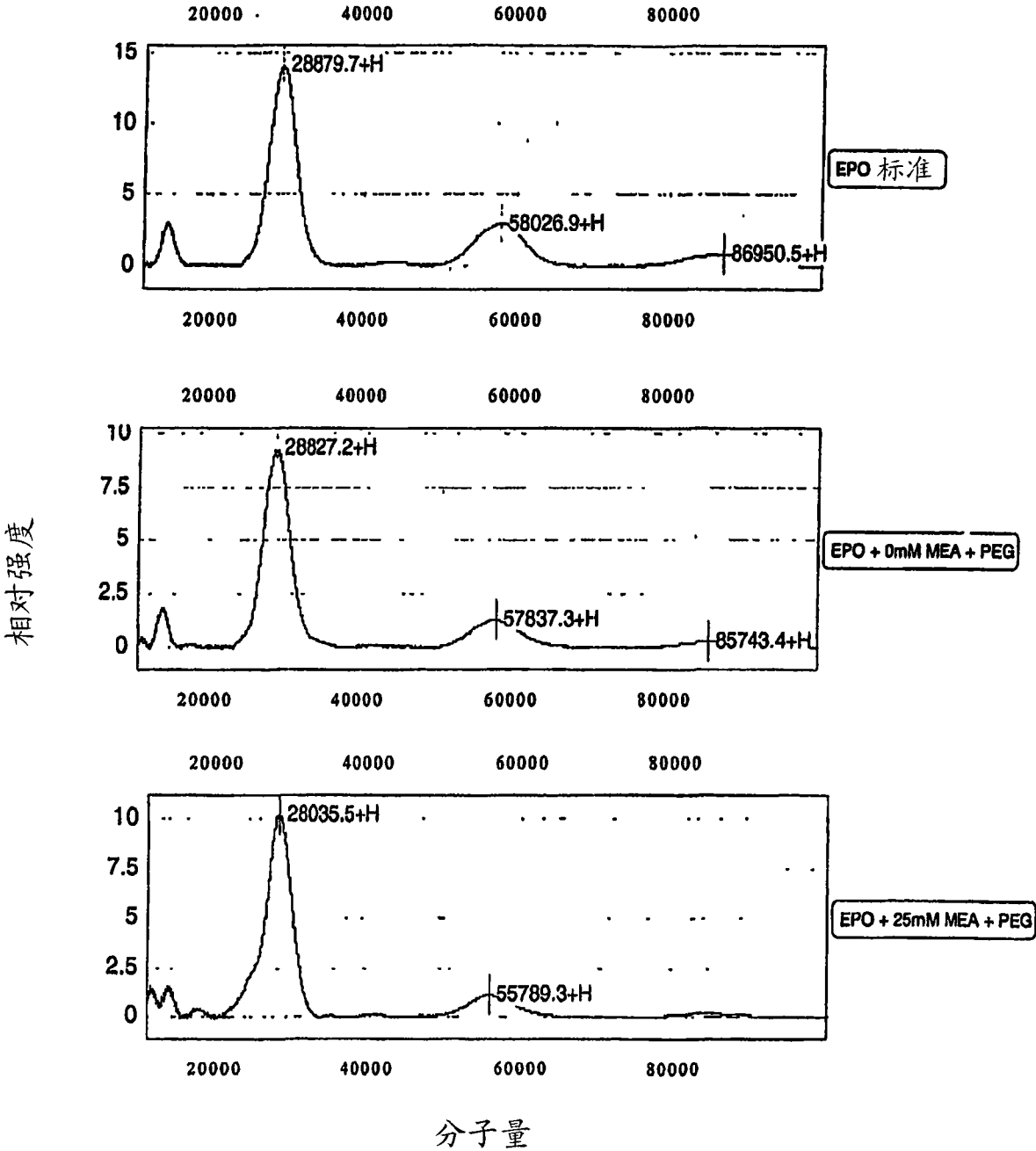


图 6

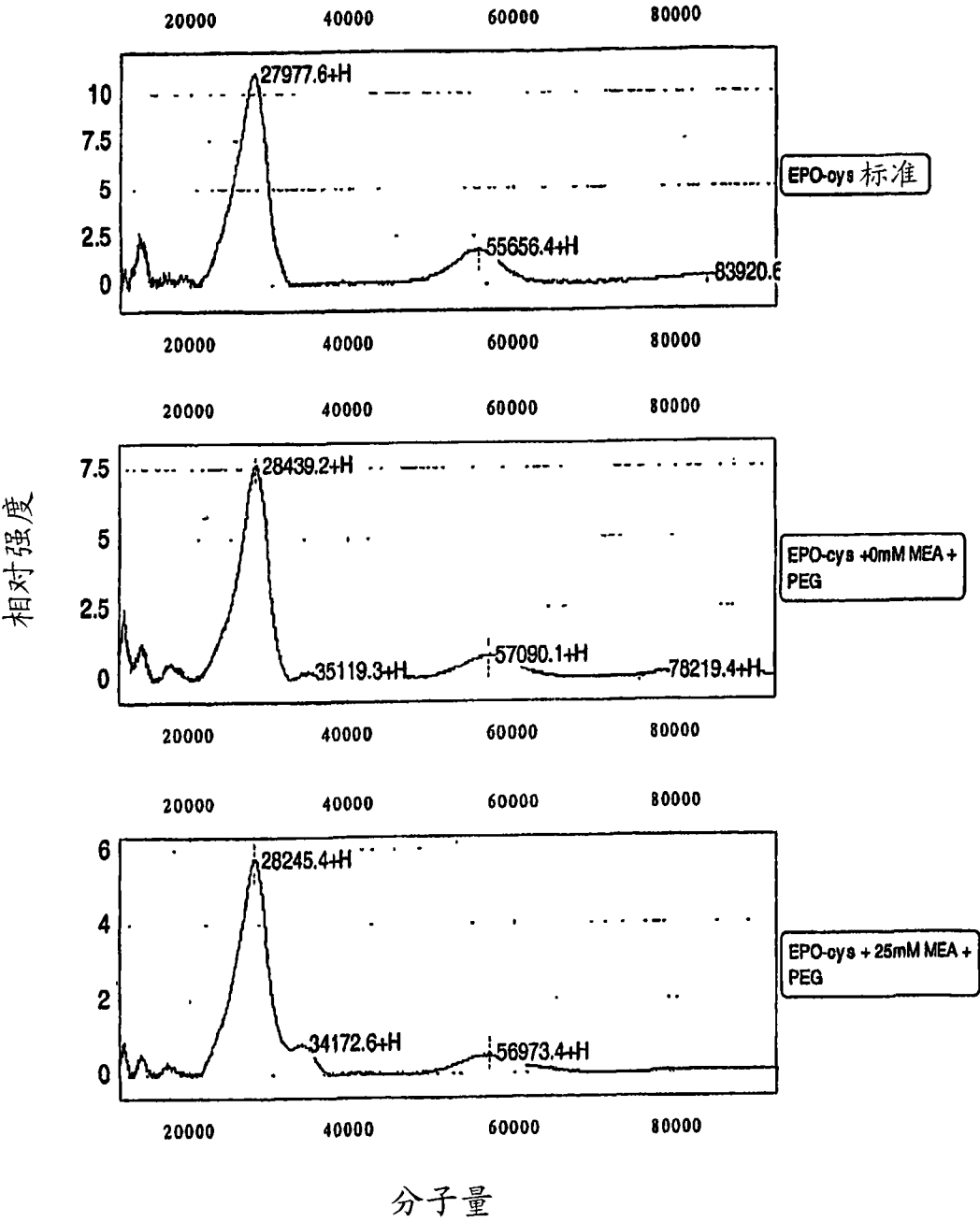


图 7