

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380109611.X

[51] Int. Cl.

A61K 47/00 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

A61B 10/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 11 月 8 日

[11] 公开号 CN 1859925A

[22] 申请日 2003.12.23

[21] 申请号 200380109611.X

[30] 优先权

[32] 2002.12.26 [33] US [31] 60/436,020

[32] 2003.6.20 [33] US [31] 60/479,914

[86] 国际申请 PCT/US2003/041162 2003.12.23

[87] 国际公布 WO2004/060300 英 2004.7.22

[85] 进入国家阶段日期 2005.8.9

[71] 申请人 山景医药公司

地址 美国加利福尼亚

[72] 发明人 谢姆·S·巴斯卡伦

梅瑞·R·歇尔曼

马克·G·P·塞佛

艾尔·D·威廉斯

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 程 泳

权利要求书 16 页 说明书 64 页 序列表 6 页
附图 16 页

[54] 发明名称

具有保留的受体结合活性的细胞因子、趋化因子、生长因子、多肽激素及其拮抗剂的聚合物缀合物

[57] 摘要

提供用于合成细胞因子、趋化因子、生长因子、多肽激素及其受体结合拮抗剂的聚合物缀合物的方法，此缀合物通常保留高受体结合活性。根据本发明的方法来制备聚合物缀合物可减少或避免因聚合物附着在细胞因子、趋化因子、生长因子、多肽激素及其激动和拮抗类似物的受体结合区域而通常引起的对受体-配体相互作用的空间抑制作用。本发明也提供由这类方法所生产的缀合物和组合物。相对于那些通过传统聚合物偶联方法(其目标不在于避开细胞因子、趋化因子、生长因子和多肽激素的受体-结合结构域)所生产的缀合物，本发明的缀合物保持了更高的受体-结合活性。相对于未缀合的细胞因子、趋化因子、生长因子和多肽激

素，本发明的缀合物也在体内和体外显示出延长的半衰期。本发明也提供含有这类缀合物和/或组合物的试剂盒，以及在不同的诊断、预防、治疗和生物加工应用中使用这类缀合物和组合物的方法。

1. 用于合成缀合物的方法，该缀合物为一种或多种合成的水溶性聚合物与细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂的缀合物，此缀合物所保留的所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素或其拮抗剂的受体结合效力超过了当这类聚合物被随机偶联时所保留的受体结合效力，此方法包含：

(a) 选择细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，它们的氨基-端氨基酸位于远离所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素、或其拮抗剂的一个或多个受体-结合结构域的位置；及

(b) 将所述一种或多种聚合物选择性地偶联至所述氨基-端氨基酸。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述一种或多种聚合物选自：一种或多种聚亚烷基二醇、一种或多种聚环氧烷、一种或多种聚乙烯醇、一种或多种聚羧酸（酯）、一种或多种聚（乙烯基吡咯烷酮）、一种或多种聚（氧亚乙基-氧亚甲基）、一种或多种聚（氨基酸）、一种或多种聚丙烯酰吗啉、一种或多种酰胺和一种或多种烯化氧的一种或多种共聚物、一种或多种葡聚糖及一种或多种透明质酸。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂具有四螺旋束结构。

4. 权利要求 3 的方法，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂选自：巨噬细胞集落刺激因子（M-CSF）、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）、白血病抑制因子（LIF）、血小板生成素（Tpo）、红细胞生成素（EPO）、干细胞因子（SCF）、Flt3 配体、制瘤素 M（OSM）、白介素-2（IL-2）、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12（p35 亚基）、IL-13、IL-15、IL-17、干扰素 α （IFN- α ）、干扰素 β （IFN- β ）、共有干扰素、催乳素和生长激素，及其突变蛋白、拮抗剂、变异体、类似物和衍生物。

5. 权利要求 1 的方法，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子

或多肽激素，或其拮抗剂具有 β -折叠或 β -圆筒结构。

6. 权利要求 5 的方法，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂选自：肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-12 (p40 亚基)、IL-16、表皮生长因子 (EGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、酸性 FGF、FGF-4 和角质细胞生长因子 (KGF; FGF-7)，及其突变蛋白、拮抗剂、变异体、类似物和衍生物。

7. 权利要求 1 的方法，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂，具有混合的 α/β 结构。

8. 权利要求 7 的方法，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂选自：嗜中性白细胞活化肽-2 (NAP-2)、基质细胞衍生因子-1 α (SDF-1 α)、IL-8、单核细胞化学引诱蛋白-1 (MCP-1)、MCP-2、MCP-3、嗜伊红趋化素-1、嗜伊红趋化素-2、嗜伊红趋化素-3、RANTES、髓细胞祖代抑制因子-1 (MIP-1)、神经趋化素、巨噬细胞移动抑制因子 (MIP-1) 和生长相关性致癌基因/黑色素瘤生长刺激活性 (GRO- α /M-CSF)，及其突变蛋白、拮抗剂、变异体、类似物和衍生物。

9. 权利要求 1 的方法，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂选自：干扰素 α 、干扰素 β 、IL-2、IL-4、IL-10、TNF- α 、IGF-1、EGF、bFGF、胰岛素、TNF- α 拮抗剂、hGH拮抗剂及催乳素拮抗剂。

10. 权利要求 9 的方法，其中所述细胞因子为 IL-2。

11. 权利要求 9 的方法，其中所述细胞因子为干扰素- α 。

12. 权利要求 9 的方法，其中所述细胞因子为 TNF- α 。

13. 权利要求 9 的方法，其中所述细胞因子拮抗剂为 TNF- α 拮抗剂。

14. 权利要求 9 的方法，其中所述生长因子为 EGF。

15. 权利要求 9 的方法，其中所述生长因子为 IGF-1。

16. 权利要求 1 的方法，其中所述聚合物共价偶联至所述氨基末端氨基酸的 α 氨基基团。

17. 权利要求 16 的方法，其中所述聚合物与所述 α 氨基基团的所述共价偶联是通过仲胺键进行。

18. 权利要求 1 的方法，其中所述聚合物偶联至所述氨基末端氨基酸的化学反应性侧链基团。

19. 权利要求 18 的方法，其中所述反应性侧链选自：羟基、巯基、胍基、咪唑基、氨基、羧基和醛基。

20. 权利要求 1 的方法，其中所述水溶性聚合物为聚亚烷基二醇。

21. 权利要求 20 的方法，其中所述聚亚烷基二醇选自：聚（乙二醇）、单甲氧基聚（乙二醇）和单羟基聚（乙二醇）。

22. 权利要求 21 的方法，其中所述聚亚烷基二醇为单甲氧基聚（乙二醇）。

23. 权利要求 21 的方法，其中所述聚亚烷基二醇为单羟基聚（乙二醇）。

24. 权利要求 20 的方法，其中所述聚亚烷基二醇具有约 1kDa-100kDa 的分子量。

25. 权利要求 24 的方法，其中所述聚亚烷基二醇具有约 1kDa-5kDa 的分子量。

26. 权利要求 24 的方法，其中所述聚亚烷基二醇具有约 10kDa-20kDa 的分子量。

27. 权利要求 24 的方法，其中所述聚亚烷基二醇具有约 18kDa-60kDa 的分子量。

28. 权利要求 24 的方法，其中所述聚亚烷基二醇具有约 12kDa-30kDa 的分子量。

29. 权利要求 28 的方法，其中所述聚亚烷基二醇具有约 20kDa 的分子量。

30. 权利要求 24 的方法，其中所述聚亚烷基二醇具有约 30kDa 的分子量。

31. 权利要求 4 的方法，其中所述多肽激素，或其拮抗剂选自：催乳素和可模拟或拮抗由催乳素受体所介导的催乳素生物效应的催乳素

类似物。

32. 权利要求 4 的方法，其中所述多肽激素，或其拮抗剂选自：生长激素和可模拟或拮抗由生长激素受体所介导的生长激素生物效应的生长激素类似物。

33. 权利要求 4 的方法，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂选自：非糖基化红细胞生成素和可模拟或拮抗由红细胞生成素受体所介导的红细胞生成素生物效应的红细胞生成素类似物。

34. 权利要求 1 的方法，其中所述聚合物偶联至所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂的所述氨基末端氨基酸处，模拟了所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂的糖基化或过糖基化的有益效应。

35. 权利要求 1 的方法，其中所述受体-结合效力是通过选自下述的一种或多种方法来测量：超离心、以细胞为基础的分析、竞争性结合分析、放射受体分析、表面等离子共振及动态光散射。

36. 一种由权利要求 1 的方法所生产的缀合物。

37. 包含一种或多种权利要求 36 的缀合物及一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体的药物组合物。

38. 包含偶联至一种或多种合成的水溶性聚合物的细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素、或其拮抗剂的缀合物，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂被选出是因为它是一类受体-结合蛋白和多肽的成员，在这类受体-结合蛋白和多肽中，氨基端氨基酸位于远离一个或多个受体结合结构域处，而其中所述一种或多种聚合物是偶联至所述氨基端氨基酸。

39. 权利要求 38 的缀合物，其中所述一种或多种聚合物选自：一种或多种聚亚烷基二醇、一种或多种聚环氧烷、一种或多种聚乙烯醇、一种或多种聚羧酸（酯）、一种或多种聚（乙烯基吡咯烷酮）、一种或多种聚（氧亚乙基-氧亚甲基）、一种或多种聚（氨基酸）、一种或多种聚丙烯酰吗啉、一种或多种酰胺和一种或多种烯化氧的一种或多种共

聚物、一种或多种葡聚糖及一种或多种透明质酸。

40. 权利要求 38 的缀合物，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂具有四螺旋束结构。

41. 权利要求 40 的缀合物，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂选自：巨噬细胞集落刺激因子（M-CSF）、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）、白血病抑制因子（LIF）、血小板生成素（Tpo）、红细胞生成素（EPO）、干细胞因子（SCF）、Flt3 配体、制瘤素 M（OSM）、白介素-2（IL-2）、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12（p35 亚基）、IL-13、IL-15、IL-17、干扰素 α （IFN- α ）、干扰素 β （IFN- β ）、共有干扰素、催乳素和生长激素，及其突变蛋白、拮抗剂、变异体、类似物和衍生物。

42. 权利要求 38 的缀合物，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂具有 β -折叠或 β -圆筒结构。

43. 权利要求 42 的缀合物，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂选自：肿瘤坏死因子- α （TNF- α ）、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-12（p40 亚基）、IL-16、表皮生长因子（EGF）、碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）、酸性 FGF、FGF-4 和角质细胞生长因子（KGF；FGF-7），及其突变蛋白、拮抗剂、变异体、类似物和衍生物。

44. 权利要求 38 的缀合物，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂具有混合的 α/β 结构。

45. 权利要求 44 的缀合物，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂选自：嗜中性白细胞活化肽-2（NAP-2）、基质细胞衍生因子-1 α （SDF-1 α ）、IL-8、单核细胞化学引诱蛋白-1（MCP-1）、MCP-2、MCP-3、嗜伊红趋化素-1、嗜伊红趋化素-2、嗜伊红趋化素-3、RANTES、髓细胞祖代抑制因子-1（MPL-1）、神经趋化素、巨噬细胞移动抑制因子（MIF）和 GRO/黑色素瘤生长刺激活性（GRO- α /MCSA），及其突变蛋白、变异体、类似物和衍生物。

46. 权利要求 38 的缀合物，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂选自：干扰素 α 、干扰素 β 、IL-2、IL-4、

IL-10、TNF- α 、IGF-1、EGF、bFGF、hGH、胰岛素和催乳素，及其拮抗剂。

47. 权利要求 46 的缀合物，其中所述细胞因子为 IL-2。

48. 权利要求 46 的缀合物，其中所述细胞因子为干扰素- α 。

49. 权利要求 46 的缀合物，其中所述细胞因子为 TNF- α 。

50. 权利要求 46 的缀合物，其中所述细胞因子拮抗剂为 TNF- α 拮抗剂。

51. 权利要求 46 的缀合物，其中所述生长因子为 EGF。

52. 权利要求 46 的缀合物，其中所述生长因子为 IGF-1。

53. 权利要求 38 的缀合物，其中所述聚合物共价偶联至所述氨基末端氨基酸的 α 氨基基团。

54. 权利要求 53 的缀合物，其中所述聚合物与所述 α 氨基基团的所述共价偶联是通过仲胺键进行。

55. 权利要求 38 的缀合物，其中所述聚合物偶联至所述氨基末端氨基酸的化学反应性侧链基团。

56. 权利要求 55 的缀合物，其中所述反应性侧链选自：羟基、巯基、胍基、咪唑基、氨基、羧基和醛基。

57. 权利要求 38 的缀合物，其中所述水溶性聚合物为聚亚烷基二醇。

58. 权利要求 57 的缀合物，其中所述聚亚烷基二醇选自：聚（乙二醇）、单甲氧基聚（乙二醇）和单羟基聚（乙二醇）。

59. 权利要求 58 的缀合物，其中所述聚亚烷基二醇为单甲氧基聚（乙二醇）。

60. 权利要求 58 的缀合物，其中所述聚亚烷基二醇为单羟基聚（乙二醇）。

61. 权利要求 57 的缀合物，其中所述聚亚烷基二醇具有约 1kDa-100kDa 的分子量。

62. 权利要求 61 的缀合物，其中所述聚亚烷基二醇具有约 1kDa-5kDa 的分子量。

63. 权利要求 61 的缀合物, 其中所述聚亚烷基二醇具有约 10kDa-20kDa 的分子量。

64. 权利要求 61 的缀合物, 其中所述聚亚烷基二醇具有约 18kDa-60kDa 的分子量。

65. 权利要求 61 的缀合物, 其中所述聚亚烷基二醇具有约 12kDa-30kDa 的分子量。

66. 权利要求 65 的缀合物, 其中所述聚亚烷基二醇具有约 20kDa 的分子量。

67. 权利要求 61 的缀合物, 其中所述聚亚烷基二醇具有约 30kDa 的分子量。

68. 权利要求 40 的缀合物, 其中所述多肽激素, 或其拮抗剂选自: 催乳素和可模拟或拮抗由催乳素受体所介导的催乳素生物效应的催乳素类似物。

69. 权利要求 40 的缀合物, 其中所述多肽激素, 或其拮抗剂选自: 生长激素和可模拟或拮抗由生长激素受体所介导的生长激素生物效应的生长激素类似物。

70. 权利要求 41 的缀合物, 其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素, 或其拮抗剂选自: 非糖基化红细胞生成素和可模拟或拮抗由红细胞生成素受体所介导的红细胞生成素生物效应的红细胞生成素类似物。

71. 权利要求 38 的缀合物, 其中所述聚合物偶联至所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素, 或其拮抗剂的所述氨基末端氨基酸处, 模拟了所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素, 或其拮抗剂的糖基化或过糖基化的有益效应。

72. 包含权利要求 38 的缀合物和药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。

73. 包含权利要求 37 的药物组合物的试剂盒。

74. 包含权利要求 38 的缀合物的试剂盒。

75. 包含权利要求 40 的缀合物的试剂盒。

76. 包含权利要求 72 的药物组合物的试剂盒。

77. 用于合成缀合物的方法，该缀合物为一种或多种合成的水溶性聚合物与细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂的缀合物，此缀合物所保留的所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂的受体结合效力超过了当这类聚合物被随机偶联时所保留的受体结合效力，此方法包含：

(a) 选择细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素或其拮抗剂，在它们中自然出现或基因工程化的糖基化位置位于远离所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素、或其拮抗剂的一个或多个受体-结合结构域处；及

(b) 将所述一种或多种聚合物选择性地偶联至所述糖基化位置或附着于其上的碳水化合物部分。

78. 权利要求 77 的方法，其中所述一种或多种聚合物选自：一种或多种聚亚烷基二醇、一种或多种聚环氧烷、一种或多种聚乙烯醇、一种或多种聚羧酸（酯）、一种或多种聚（乙烯基吡咯烷酮）、一种或多种聚（氧亚乙基-氧亚甲基）、一种或多种聚（氨基酸）、一种或多种聚丙烯酰吗啉、一种或多种酰胺和一种或多种烯化氧的一种或多种共聚物、一种或多种葡聚糖及一种或多种透明质酸。

79. 权利要求 77 的方法，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂具有四螺旋束结构。

80. 权利要求 79 的方法，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂选自：巨噬细胞集落刺激因子（M-CSF）、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）、白血病抑制因子（LIF）、血小板生成素（Tpo）、红细胞生成素（EPO）、干细胞因子（SCF）、Flt3 配体、制瘤素 M（OSM）、白介素-2（IL-2）、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12（p35 亚基）、IL-13、IL-15、IL-17、干扰素 α （IFN- α ）、干扰素 β （IFN- β ）、共有干扰素、催乳素和生长激素，及其突变蛋白、拮抗剂、变异体、类似物和衍生物。

81. 权利要求 77 的方法，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因

子或多肽激素，或其拮抗剂具有 β -折叠或 β -圆筒结构。

82. 权利要求 81 的方法，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂选自：肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-12 (p40 亚基)、IL-16、表皮生长因子 (EGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、酸性 FGF、FGF-4 和角质细胞生长因子 (KGF; FGF-7)，及其突变蛋白、拮抗剂、变异体、类似物和衍生物。

83. 权利要求 77 的方法，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂具有混合的 α/β 结构。

84. 权利要求 83 的方法，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂选自：嗜中性白细胞活化肽-2 (NAP-2)、基质细胞衍生因子-1 α (SDF-1 α)、IL-8、单核细胞化学引诱蛋白-1 (MCP-1)、MCP-2、MCP-3、嗜伊红趋化素-1、嗜伊红趋化素-2、嗜伊红趋化素-3、RANTES、髓细胞祖代抑制因子-1 (MPL-1)、神经趋化素、巨噬细胞移动抑制因子 (MIF) 和 GRO/黑色素瘤生长刺激活性 (GRO- α /MCSA)，及其突变蛋白、变异体、类似物和衍生物。

85. 如权利要求 77 的方法，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂选自：干扰素 α 、干扰素 β 、IL-2、IL-4、IL-10、TNF- α 、IGF-1、EGF、bFGF、hGH、催乳素、胰岛素，及其拮抗剂。

86. 权利要求 85 的方法，其中所述细胞因子为 IL-2。

87. 权利要求 85 的方法，其中所述细胞因子为干扰素- α 。

88. 权利要求 85 的方法，其中所述细胞因子为 TNF- α 。

89. 权利要求 85 的方法，其中所述细胞因子拮抗剂为 TNF- α 拮抗剂。

90. 权利要求 85 的方法，其中所述生长因子为 EGF。

91. 权利要求 85 的方法，其中所述生长因子为 IGF-1。

92. 权利要求 77 的方法，其中所述水溶性聚合物为聚亚烷基二醇。

93. 权利要求 92 的方法，其中所述聚亚烷基二醇选自：聚(乙二醇)、单甲氧基聚(乙二醇)和单羟基聚(乙二醇)。

94. 权利要求 93 的方法,其中所述聚亚烷基二醇为单甲氧基聚(乙二醇)。

95. 权利要求 93 的方法,其中所述聚亚烷基二醇为单羟基聚(乙二醇)。

96. 权利要求 92 的方法,其中所述聚亚烷基二醇具有约 1kDa-100kDa 的分子量。

97. 权利要求 96 的方法,其中所述聚亚烷基二醇具有约 1kDa-5kDa 的分子量。

98. 权利要求 96 的方法,其中所述聚亚烷基二醇具有约 10kDa-20kDa 的分子量。

99. 权利要求 96 的方法,其中所述聚亚烷基二醇具有约 18kDa-60kDa 的分子量。

100. 权利要求 96 的方法,其中所述聚亚烷基二醇具有约 12kDa-30kDa 的分子量。

101. 权利要求 100 的方法,其中所述聚亚烷基二醇具有约 20kDa 的分子量。

102. 权利要求 96 的方法,其中所述聚亚烷基二醇具有约 30kDa 的分子量。

103. 权利要求 77 的方法,其中所述多肽激素,或其拮抗剂选自:催乳素和可模拟或拮抗由催乳素受体所介导的催乳素生物效应的催乳素类似物。

104. 权利要求 77 的方法,其中所述多肽激素,或其拮抗剂选自:生长激素和可模拟或拮抗由生长激素受体所介导的生长激素生物效应的生长激素类似物。

105. 权利要求 77 的方法,其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素,或其拮抗剂选自:非糖基化红细胞生成素和可模拟或拮抗由红细胞生成素受体所介导的红细胞生成素生物效应的红细胞生成素类似物。

106. 权利要求 77 的方法,其中所述聚合物偶联至所述细胞因子、

趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂的所述糖基化位置或其附近，模拟了所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素的糖基化或过糖基化的有益效应。

107. 一种由权利要求 77 的方法所生产的缀合物。

108. 包含一种或多种权利要求 107 的缀合物及一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体的药物组合物。

109. 包含偶联至一种或多种合成的水溶性聚合物的细胞因子、生长因子、趋化因子或多肽激素、或其拮抗剂的缀合物，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂被选出是因为它是一类受体-结合蛋白和多肽的成员，在这类受体-结合蛋白和多肽中，糖基化位置位于远离一个或多个受体结合结构域处，而其中所述一种或多种聚合物是偶联至一个或多个糖基化位置处或其附近，或偶联至附着于其上的碳水化合物部分。

110. 权利要求 109 的缀合物，其中所述一种或多种聚合物选自：一种或多种聚亚烷基二醇、一种或多种聚环氧烷、一种或多种聚乙烯醇、一种或多种聚羧酸（酯）、一种或多种聚（乙烯基吡咯烷酮）、一种或多种聚（氧亚乙基-氧亚甲基）、一种或多种聚（氨基酸）、一种或多种聚丙烯酰吗啉、一种或多种酰胺和一种或多种烯化氧的一种或多种共聚物、一种或多种葡聚糖及一种或多种透明质酸。

111. 权利要求 109 的缀合物，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂具有四螺旋束结构。

112. 权利要求 111 的缀合物，其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂选自：巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白血病抑制因子(LIF)、血小板生成素(Tpo)、红细胞生成素(EPO)、干细胞因子(SCF)、Flt3 配体、制瘤素 M(OSM)、白介素-2(IL-2)、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12(p35 亚基)、IL-13、IL-15、IL-17、干扰素 α (IFN- α)、干扰素 β (IFN- β)、共有干扰素、催乳素和生长激素，及其突变蛋白、拮抗剂、变异体、类似物和衍生物。

113. 权利要求 109 的缀合物, 其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素, 或其拮抗剂具有 β -折叠或 β -圆筒结构。

114. 权利要求 113 的缀合物, 其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素, 或其拮抗剂选自: 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-12 (p40 亚基)、IL-16、表皮生长因子 (EGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、酸性 FGF、FGF-4 和角质细胞生长因子 (KGF; FGF-7), 及其突变蛋白、拮抗剂、变异体、类似物和衍生物。

115. 权利要求 109 的缀合物, 其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素, 或其拮抗剂具有混合的 α/β 结构。

116. 权利要求 115 的缀合物, 其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素, 或其拮抗剂选自: 嗜中性白细胞活化肽-2 (NAP-2)、基质细胞衍生因子-1 α (SDF-1 α)、IL-8、单核细胞化学引诱蛋白-1 (MCP-1)、MCP-2、MCP-3、嗜伊红趋化素-1、嗜伊红趋化素-2、嗜伊红趋化素-3、RANTES、髓细胞祖代抑制因子-1 (MIP-1)、神经趋化素、巨噬细胞移动抑制因子 (MIF) 和生长相关性致癌基因/黑色素瘤生长刺激活性 (GRO- α /MCSA), 及其突变蛋白、拮抗剂、变异体、类似物和衍生物。

117. 权利要求 109 的缀合物, 其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素, 或其拮抗剂选自: 干扰素 α 、干扰素 β 、IL-2、IL-4、IL-10、TNF- α 、IGF-1、EGF、bFGF、hGH、催乳素、胰岛素, 及其拮抗剂。

118. 权利要求 117 的缀合物, 其中所述细胞因子为 IL-2。

119. 权利要求 117 的缀合物, 其中所述细胞因子为干扰素- α 。

120. 权利要求 117 的缀合物, 其中所述细胞因子为 TNF- α 。

121. 权利要求 117 的缀合物, 其中所述细胞因子拮抗剂为 TNF- α 拮抗剂。

122. 权利要求 117 的缀合物, 其中所述生长因子为 EGF。

123. 权利要求 117 的缀合物, 其中所述生长因子为 IGF-1。

124. 权利要求 109 的缀合物, 其中所述水溶性聚合物为聚亚烷基

二醇。

125. 权利要求 124 的缀合物, 其中所述聚亚烷基二醇选自: 聚(乙二醇)、单甲氧基聚(乙二醇)和单羟基聚(乙二醇)。

126. 权利要求 125 的缀合物, 其中所述聚亚烷基二醇为单甲氧基聚(乙二醇)。

127. 权利要求 125 的缀合物, 其中所述聚亚烷基二醇为单羟基聚(乙二醇)。

128. 权利要求 124 的缀合物, 其中所述聚亚烷基二醇具有约 1kDa-100kDa 的分子量。

129. 权利要求 128 的缀合物, 其中所述聚亚烷基二醇具有约 1kDa-5kDa 的分子量。

130. 权利要求 128 的缀合物, 其中所述聚亚烷基二醇具有约 10kDa-20kDa 的分子量。

131. 权利要求 128 的缀合物, 其中所述聚亚烷基二醇具有约 18kDa-60kDa 的分子量。

132. 权利要求 128 的缀合物, 其中所述聚亚烷基二醇具有约 12kDa-30kDa 的分子量。

133. 权利要求 132 的缀合物, 其中所述聚亚烷基二醇具有约 20kDa 的分子量。

134. 权利要求 128 的缀合物, 其中所述聚亚烷基二醇具有约 30kDa 的分子量。

135. 权利要求 109 的缀合物, 其中所述多肽激素, 或其拮抗剂选自: 催乳素和可模拟或拮抗由催乳素受体所介导的催乳素生物效应的催乳素类似物。

136. 权利要求 109 的缀合物, 其中所述多肽激素, 或其拮抗剂选自: 生长激素和可模拟或拮抗由生长激素受体所介导的生长激素生物效应的生长激素类似物。

137. 如权利要求 109 的缀合物, 其中所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素, 或其拮抗剂选自: 非糖基化红细胞生成素和可模

拟或拮抗由红细胞生成素受体所介导的红细胞生成素生物效应的红细胞生成素类似物。

138. 权利要求 109 的缀合物, 其中所述聚合物偶联至所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素, 或其拮抗剂的所述糖基化位置或其附近, 模拟了所述细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素的糖基化或过糖基化的有益效应。

139. 包含权利要求 109 的缀合物和药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。

140. 包含权利要求 107 的缀合物的试剂盒。

141. 包含权利要求 108 的药物组合物的试剂盒。

142. 包含权利要求 109 的缀合物的试剂盒。

143. 包含权利要求 139 的药物组合物的试剂盒。

144. 在患有或易患上身体疾病的动物中预防、诊断或治疗所述身体疾病的方法, 包含对所述动物施用有效量的权利要求 36、38、107 和 109 中任何一项的缀合物。

145. 在患有或易患上身体疾病的动物中预防、诊断或治疗所述身体疾病的方法, 包含对所述动物施用有效量的权利要求 37、72、108 和 139 中任何一项的药物组合物。

146. 权利要求 144 的方法, 其中所述动物为哺乳动物。

147. 权利要求 145 的方法, 其中所述动物为哺乳动物。

148. 权利要求 146 或 147 的方法, 其中所述哺乳动物为人类。

149. 权利要求 144 的方法, 其中所述身体疾病选自: 癌症、感染性疾病、神经变性疾病、自体免疫疾病和遗传病。

150. 权利要求 149 的方法, 其中所述癌症选自: 乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、肺癌、白血病、淋巴瘤、结肠癌、胃肠道癌、胰癌、膀胱癌、肾癌、骨癌、神经癌、头颈癌、皮肤癌、肉瘤、恶性肿瘤、腺癌及骨髓瘤。

151. 权利要求 149 的方法, 其中所述感染性疾病选自: 细菌病、真菌病、病毒病和寄生虫病。

152. 权利要求 151 的方法, 其中所述病毒病选自: 乙型肝炎、丙型肝炎、由亲心性病毒引起的疾病及 HIV/AIDS。

153. 权利要求 149 的方法, 其中所述自体免疫疾病选自: 系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎和牛皮癣。

154. 权利要求 149 的方法, 其中所述遗传病选自: 贫血、嗜中性白细胞减少症、血小板减少症、血友病、侏儒病和严重的联合免疫缺陷症 ("SCID")。

155. 权利要求 149 的方法, 其中所述神经变性疾病是多发性硬化症。

156. 权利要求 149 的方法, 其中所述神经变性疾病是克-雅病或阿尔兹海默氏症。

157. 权利要求 145 的方法, 其中所述身体疾病选自: 癌症、感染性疾病、神经变性疾病、自体免疫疾病和遗传病。

158. 权利要求 157 的方法, 其中所述癌症选自: 乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、肺癌、白血病、淋巴瘤、结肠癌、胃肠道癌、胰癌、膀胱癌、肾癌、骨癌、神经癌、头颈癌、皮肤癌、肉瘤、恶性肿瘤、腺癌及骨髓瘤。

159. 权利要求 157 的方法, 其中所述感染性疾病选自: 细菌病、真菌病、病毒病和寄生虫病。

160. 权利要求 159 的方法, 其中所述病毒病选自: 乙型肝炎、丙型肝炎、由亲心性病毒引起的疾病及 HIV/AIDS。

161. 权利要求 157 的方法, 其中所述自体免疫疾病选自: 系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎和牛皮癣。

162. 权利要求 157 的方法, 其中所述遗传病选自: 贫血、嗜中性白细胞减少症、血小板减少症、血友病、侏儒病和严重的联合免疫缺陷症 ("SCID")。

163. 权利要求 157 的方法, 其中所述神经变性疾病是多发性硬化症。

164. 权利要求 157 的方法, 其中所述神经变性疾病是克-雅病或阿

尔兹海默氏症。

具有保留的受体结合活性的细胞因子、趋化因子、
生长因子、多肽激素及其拮抗剂的聚合物缀合物

发明背景

本发明是在蛋白质生物化学及药学和医学领域中。尤其是，本发明提供用于生产由水溶性聚合物（如：聚（乙二醇）及其衍生物）和某些生物活性成分缀合的缀合物的方法，这种缀合物与标准的聚合物-生物活性成分缀合物相比较，具有增加的受体-结合活性。更具体地说，本发明提供用于生产具有非常高受体-结合活性的某些受体-结合蛋白质的聚合物缀合物的方法。本发明也提供由这类方法所生产的缀合物、含这类缀合物的组合物、含这类缀合物和组合物的试剂盒，以及利用该缀合物和组合物来预防、诊断和治疗多种医学和兽医疾病的方法。

相关技术

下列相关技术的描述包括不在现有技术中的本发明者自身的解释。细胞因子为以内分泌、旁分泌或自分泌方式来控制细胞的生存、生长、分化和/或效应物功能（effector function）的被分泌出的调节性蛋白质（回顾：Nicola, N.A. (1994): *Guidebook to Cytokines and Their Receptors*, Nicola, N.A., ed., pp. 1-7, Oxford University Press, New York）。趋化因子为一族结构上相关，具有有效的白细胞活化和/或趋化活性的糖蛋白（回顾：Oppenheim, J.J. 等, (1997) *Clin Cancer Res* 3: 2682-2686）。就像其密切相关的物质，多肽激素和生长因子、细胞因子及趋化因子通过结合至其靶细胞表面上的特殊受体蛋白来启动其调节功能（回顾：Koskiakoff, A.A. 等, (1998) *Adv Protein Chem* 52: 67-108; Onuffer, J.J. 等, (2002)

Trends Pharmacol Sci 23: 459-467)。由于其效力、特异性、尺寸较小,和相对容易在重组有机体中生产,因此,细胞因子、趋化因子、生长因子和多肽激素在作为治疗剂上有多种可能的用途。

一般而言,两种关键因素阻碍细胞因子,尤其是,重组蛋白在一般作为治疗剂上的发展-----其在循环中普遍较短的半衰期,及其潜在的抗原性和免疫原性。此处及本领域中一般所使用的术语"抗原性"是指分子结合到预先存在的抗体的能力,而术语"免疫原性"是指分子在体内激发免疫反应的能力,不论该反应是涉及形成抗体("体液反应")或是刺激细胞免疫反应。

在重组的治疗性蛋白质的给药方面,静脉内(i.v.)给药通常较适宜用来取得最高的循环活性,并可将生物可利用性及降解问题降至最低。然而,在静脉内给药后小分子蛋白质的半衰期通常非常短(参看下列文献中的实施例: Mordenti, J.等, (1991) *Pharm Res* 8: 1351-1359; Kuwabara, T.等, (1995) *Pharm Res* 12: 1466-1469)。流体动力学半径超过血清白蛋白(其具有约 36Å 的史托克(Stokes)半径和约 66,000 道尔顿(66kDa)的分子量)的蛋白质通常可由健康肾脏保留在血流中。然而,较小的蛋白质,包括: 细胞因子,如: 粒细胞集落刺激因子("G-CSF")、白介素-2("IL-2")、干扰素- α ("IFN- α ") 和干扰素- γ ("IFN- γ ") 将通过肾小球过滤作用快速地从血流中清除(Brenner, B.M.等, (1978) *Am J Physiol* 234: F455-F460; Venkatachalam. M.A.等, (1978) *Circ Res* 43: 337-347; Wilson, G., (1979) *J Gen Physiol* 74: 495-509; Knauf, M.J.等, (1988) *J Biol Chem* 263: 15064-15070; Kita, Y.等, (1990) *Drug Des Deliv* 6: 157-167; Rostaing, L.等, (1998) *J Am Soc Nephrol* 9: 2344-2348)。结果是,注射后,在循环中维持小分子重组蛋白的治疗上有用浓度是有疑问的。因此,一般必须施予更高浓度的这类蛋白质和更频繁的注射。所产生的剂量方案会增加治疗成本,降低患者适应的可能性,并增加不良后果如免疫反应的风险。细胞和体液免疫反应均会降低注入的重组蛋白的循环浓度,以至可能妨碍有效剂量的施予,或可能导致

治疗-限制性的后果, 包括加速清除, 药力失效和过敏性反应 (Ragnhammar, P. 等, (1994) *Blood* 84: 4078-4087; Wadhwa, M. 等, (1999) *Clin Cancer Res* 5: 1353-1361; Hjelm Skog, A.-L. 等, (2001) *Clin Cancer Res* 7: 1163-1170; Li, J. 等, (2001) *Blood* 98: 3241-3248; Basser, R. L. 等, (2002) *Blood* 99: 2599-2602; Schellekens, H. (2002) *Clin Ther* 24: 1720-1740)。

通过共价连接聚(乙二醇) ("PEG") 的重组蛋白的修饰已被广泛研究, 以用作对付上述缺点的方法(回顾见: Sherman, M. R. 等, (1997): *Poly (ethylene glycol): Chemistry and Biological Applications*, Harris, J. M. 等, eds., pp. 155-169, American Chemical Society, Washington, D. C.; Roberts, M. J. 等, (2002) *Adv Drug Deliv Rev* 54: 459-476)。将 PEG 附着至蛋白质显示出可稳定蛋白质, 改善其体内的生物可利用性和/或降低其免疫原性。(将 PEG 共价连接至蛋白质或其它底物在本文中以及本领域中熟知为"聚乙二醇化")。另外, 聚乙二醇化可显著增加蛋白质的流体动力半径。当小分子蛋白质, 如细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素偶联至 PEG (如: 所具有的分子量至少约 18kDa) 的单一长链时, 所产生的缀合物的流体动力学半径超过血清白蛋白, 且其通过肾小球从循环中清除的速率显著减缓。聚乙二醇化的联合效果(降低蛋白质水解、降低免疫识别及降低肾脏清除速率)赋予作为治疗剂的聚乙二醇化的蛋白质多种优点。

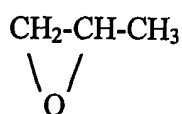
自 1970 年代起, 已有许多努力去采用共价连接聚合物来改善用于药学用途的不同蛋白质的安全性和有效性(见, 如, Davis, F. F., 等, U. S. Patent No. 4,179,337)。一些实施例包括将 PEG 或聚(氧乙烯) ("PEO") 偶联至腺苷脱氨酶 (EC3.5.4.4), 以用来治疗严重的联合免疫缺陷症(Davis, S. 等, (1981) *Clin Exp Immunol* 46: 649-652; Hershfield, M. S. 等, (1987) *N Engl J Med* 316: 589-596), 偶联至超氧化物歧化酶 (EC1.15.1.1), 以治疗发炎状态 (Saifer, M. 等, U. S. Patent Nos. 5,006,333 和 5,080,891), 及偶联至尿酸氧化酶 (EC1.7.3.3), 以从血液和尿液中排除过量的尿酸 (Kelly, S. J. 等,

(2001) *J Am Soc Nephrol* 12: 1001-1009; Williams, L. D. 等, PCT Publication No. WO 00/007629 A2 和 A3 及 U. S. Patent No. 6, 576, 235; Sherman, M. R. 等, PCT Publication No. WO 01/59078 A2)。

PEOs 和 PEGs 是由共价连接的氧乙烯单位所组成的聚合物。这些聚合物具有下列的一般结构:



其中 R_2 可为羟基基团 (或其反应性衍生物), 而 R_1 可为氢 (如在二羟基 PEG ("PEG 二醇") 中)、甲基基团 (如在单甲氧基 PEG ("mPEG") 中)、或另一低级烷基 (如在异丙氧基 PEG 或叔丁氧基 PEG 中)。在 PEG 的一般结构中的变量 n 表示在聚合物中的氧乙烯单位的数量, 而此处和本领域中是指"聚合化程度"。具相同的一般结构的聚合物 (其中 R_1 为 C_{1-7} 烷基团) 也曾表示为环氧乙烷衍生物 (Yasukohchi, T. 等, U. S. Patent No. 6, 455, 639)。PEG 和 PEO 可是线性、分支 (Fuke, I. 等, (1994) *J Control Release* 30: 27-34) 或星形 (Merrill, E. W. (1993) *J. Biomater Sci Polym Ed* 5: 1-11)。PEG 和 PEO 为两亲性分子, 也就是其可溶于水和某些有机溶剂中, 且其可黏附至含脂的物质上, 包括有包膜病毒, 及动物和细菌细胞的细胞膜。某些具有下列结构:



的氧乙烯 (OCH_2CH_2) 和氧丙烯的随机、或嵌段或交替性的共聚物具有充分类似于 PEG 所具的性质, 在某些应用中, 这些共聚物被认为是 PEG 的合适的替代物 (见, 如: Hiratani, H., U. S. Patent No. 4, 609, 546 和 Saifer, M. 等, U. S. Patent No. 5, 283, 317)。此处所使用的术语"聚环氧烷"和缩写"PAOs"一词是指这类共聚物, 以及 PEGs 或 PEOs, 和聚(氧亚乙基-氧亚甲基)共聚物 (Pitt, C. G. 等, U. S. Patent No. 5, 476, 653)。此处所使用的"聚亚烷基二醇"和缩写"PAGs"

一般是指适合用于本发明缀合物中的聚合物，尤其是 PEGs，更特别是含单一反应基团的 PEGs ("单功能性活化的 PEGs")。

将 PEG 或其它聚环氧烷共价连接至蛋白质需要将至少一个聚合物的末端基团转化成反应性功能基团。此过程常称为"活化"，产物被称为"活化的 PEG"或活化的聚环氧烷。这类方法最常使用单甲氧基 PEGs (其中在一端的氧被一个未反应的、化学上稳定的甲基团加帽(以产生"甲氧基")，而另一端具有一个与蛋白质分子氨基基团反应的官能基团)。称为"分支性"的 mPEGs (其含有远离单一活化的官能团的二或多个甲氧基)较不常被使用。二-mPEG-赖氨酸是分支 PEG 的一个实例，其中 PEG 偶联至两个氨基，而赖氨酸的羧基最常通过 N-羟基琥珀酰亚胺的酯化反应来活化 (Martinez, A. 等, U.S. Patent No. 5,643,575; Greenwald, R.B. 等, U.S. Patent No. 5,919,455; Harris, J.M. 等, U.S. Patent No. 5,932,462)。

通常，活化的聚合物与具有亲核性官能基(作为附着部位)的生物活性化合物反应。一种常作为附着部位的亲核性官能基为赖氨酸残基的 ϵ 氨基。溶剂易接近的 α -氨基、羧酸基团、胍基团、咪唑基团、经适当活化的羰基团、氧化的糖部分和硫醇基团也用作附着部位。

PEG 的羟基在连接蛋白质前已通过氰尿酸活化 (Abuchowski, A., 等, (1977) *J Biol Chem* 252: 3582-3586; Abuchowski, A., 等, (1981) *Cancer Treat Rep* 65: 1077-1081)。然而，该方法在使用上有缺点，如：氰尿酸有毒性，且其对具有除了氨基类之外的官能基(如：对功能而言为必要的溶剂易接近的半胱氨酸或酪氨酸残基)的蛋白质具有非特异的反应性。为了克服这些及其它缺点，此方法已引入替换的活化的 PEGs，如：PEG 的琥珀酰亚氨基琥珀酸酯衍生物 ("SS-PEG") (Abuchowski, A., 等, (1984) *Cancer Biochem Biophys* 7: 175-186), PAG 的琥珀酰亚氨基碳酸酯衍生物 ("SC-PAG") (Saifer, M., 等, U.S. Patent No. 5,006,333) 和 PEG 的醛衍生物 (Royer, G.P., U.S. Patent No. 4,002,531)。

通常，一个或多个 PAGs 的几条(如：5-10)链(如：分子量为约

5kDa 至约 10kDa 的一个或多个 PEGs) 通过伯氨基基团(赖氨酸残基的 ϵ 氨基酸, 以及可能的氨基酸氨基端("N-端")的 α 氨基团) 偶联至靶蛋白质。最近, 已合成含有更高分子量(如: 12kDa、20kDa 或 30kDa) 的单链 mPEG 的缀合物。缀合物的血浆半衰期与增加的分子量和/或增加的偶联的 PEG 链数间的直接相关性已被证实(Knauf, M. J., 等, 同上; Katre, N. V. (1990) *J Immunol* 144: 209-213; Clark, R., 等, (1996) *J Biol Chem* 271: 21969-21977; Leong, S. R., 等, (2001) *Cytokine* 16: 106-119)。另一方面, 偶联至蛋白质各分子的 PEG 链数增加时, 在蛋白质的必要区中的氨基团被修饰的机率也增加, 这暗示该蛋白质的生物功能将减弱, 尤其是当它是一种受体-结合蛋白质时。对含有许多氨基团的较大蛋白质, 及具有低分子量底物的酶而言, 由于在体内的含 PEG 的缀合物的生物活性净增加, 因此在增加的作用期与降低的特异活性间的平衡是可接受的。然而, 在那些通过与细胞-表面受体的相互作用来发生作用的较小蛋白质(如: 细胞因子、趋化因子、生长因子和多肽激素) 方面, 已有报告表示相当高度的取代反应会将功能活性降低到甚至抹灭其在血流中的半衰期延长的优点的程度(Clark, R., 等, 同上)。

因此, 聚合物缀合作用是一种建立完善的用于延长治疗性蛋白质(如: 酶) 的生物活性和降低其免疫活性的技术(见, 如: 2002 年 12 月 26 日提出的 U.S. 临时申请案 60/436, 020 号和 2003 年 6 月 20 日提出的 U.S. 临时申请案 60/479, 913 号和 60/479, 914 号, 其公开内容全文引入作为本文的参考文献)。然而, 聚合物缀合至通过特异结合到细胞-表面受体而作用的受体-结合蛋白质上, 通常会: 1) 干扰这类结合; 2) 明显削减细胞因子、趋化因子、生长因子及多肽激素激动剂的信号转导效力; 及 3) 明显削减细胞因子、趋化因子、生长因子及多肽激素拮抗剂的竞争效力。已发表的这类具有削减的受体-结合活性的缀合物的实例包括: 人生长激素("hGH") (Clark, R., 等, 同上), 尤其是 hGH 拮抗剂(Ross, R. J. M., 等, (2001) *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1716-1723; IFN- α (Bailon, P., 等, (2001) *Bioconjug*

Chem 12: 195-202; Wylie, D.C., 等, (2001) *Pharm Res* 18: 1354-1360; Wang, Y.-S., 等, (2002) *Adv Drug Deliv Rev* 54: 547-570) 和 G-CSF (Kinstler, O., 等, PCT 申请案 WO 96/11953 号; Bowen, S., 等, (1999) *Exp Hematol* 27: 425-432) 的聚合物缀合物。在一特殊案例中, 将聚合物偶联至白介素-15 ("IL-15") 可将此类似 IL-2 的生长因子转化成一种细胞增殖抑制剂 (Pettit, D.K., 等, (1997) *J Biol Chem* 272: 2312-2318)。不欲受限于理论, 这类不利的聚乙二醇化效果的机制可能涉及庞大的 PEG 基团、电荷中和, 或此二者对受体相互作用所造成的空间阻碍。

因此, 需要有方法生产保留大致的生物活性 (如: 至少约 40%)、接近完整的生物活性 (如: 至少约 80%) 或实质上完整的生物活性 (如: 至少约 90%) 的含 PAG (如: 含 PEG 和/或含 PEO) 的缀合物 (尤其是这类水溶性聚合物和受体-结合蛋白质之间的缀合物)。这类缀合物可取得由聚合物成分所提供的增加溶解度、稳定性、体内半衰期及生物可利用性的益处, 且与传统的聚合物缀合物相比较下, 以预防、治疗或诊断为目的而引入动物体内的该缀合物将显现出实质增加的效力或用途。

发明简述

本发明解决了上述需要, 并提供用于制备水溶性聚合物 (如: 聚 (乙二醇), 及其衍生物) 与生物活性成分, 尤其是受体-结合蛋白质, 特别是治疗性或诊断用的生物活性成分 (如: 细胞因子、趋化因子、多肽激素及多肽生长因子) 的缀合物的方法。本发明也提供由这类方法制备的缀合物。与相对应的未缀合的生物活性成分相比, 本发明的缀合物具有增加的稳定性 (也就是在活体内保存较久, 半衰期较长)。另外, 与那些由相同的生物活性成分和任意附着在沿多肽链的溶剂-易接近位置上的聚合物链制备出的缀合物相比较, 本发明的缀合物具有增加的受体-结合活性 (其可在体外测量或使用), 及增加的体内效力。本发明也提供这类改善的缀合物来用于工业细胞培养中。再者,

本发明提供含有这类缀合物的组合物、含有这类缀合物和组合物的试剂盒，及该缀合物和组合物在多种预防、诊断及治疗方案中应用的方法。

在一种实施方案中，本发明提供用于保存细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素的受体-结合效力的方法，其包含将一种或多种合成的水溶性聚合物选择性地偶联至细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂的氨基端氨基酸，其中所述氨基端氨基酸位于远离细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂的一个或多个受体-结合结构域的位置处。在一种相关的实施方案中，本发明提供用于保存细胞因子、趋化因子、生长因子及多肽激素或其拮抗剂的受体-结合效力的方法，其包含将一种或多种合成的水溶性聚合物选择性地偶联至或接近于细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素或其拮抗剂的一个或多个糖基化位置处，其中所述一个或多个糖基化位置位于细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素的一个或多个受体-结合结构域的远端。

适合用于本发明这些方法中的聚合物包括但不限于，一种或多种聚亚烷基二醇（包括但不限于，一种或多种聚（乙二醇）、一种或多种单甲氧基聚（乙二醇）及一种或多种单羟基聚（乙二醇））、一种或多种聚环氧烷、一种或多种聚环氧乙烷、一种或多种聚乙烯醇类（如：聚乙烯醇）、一种或多种聚羧酸酯、一种或多种聚（乙烯基吡咯烷酮）、一种或多种聚（氧亚乙基-氧亚甲基）、一种或多种聚（氨基酸）、一种或多种聚丙烯酰吗啉、一种或多种酰胺类和一种或多种烯化氧的一种或多种共聚物、一种或多种葡聚糖及一种或多种透明质酸类。适合用于本发明方法中的聚合物的分子量通常介于约 1kDa 和约 100kDa 之间（包含端值），或更特别的为介于约 1kDa 和约 5kDa 之间（包含端值）；介于约 10kDa 和约 20kDa 之间（包含端值）；介于约 18kDa 和约 60kDa 之间（包含端值）；介于约 12kDa 和约 30kDa 之间（包含端值）；或约 10kDa、约 20kDa 或约 30kDa。

多种细胞因子、趋化因子、生长因子和多肽激素（和模拟（也就

是激动)或拮抗相对应的细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素的生物效应(这是通过其特异性细胞-表面受体介导)的类似物)均适合用来制备本发明的缀合物。这些包括具有四个螺旋束结构的细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素(包括但不限于,粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白血病抑制因子(LIF)、红细胞生成素(EPO)、血小板生成素(Tpo)、干细胞因子(SCF)、Flt3配体、制瘤素M(OSM)、白介素-2(IL-2)、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12(p35亚基)、IL-13、IL-15、IL-17、干扰素 α (IFN- α)、干扰素 β (IFN- β)(包括IFN- β -1b)、共有(consensus)干扰素、催乳素和生长激素、及其突变蛋白、变异体、类似物和衍生物);具有 β -折叠或 β -圆筒结构的细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素(包括但不限于,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-12(p40亚基)、IL-16、表皮生长因子(EGF)、胰岛素样生长因子1(IGF-1)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、酸性FGF、FGF-4及角质细胞生长因子(KGF;FGF-7),及其突变蛋白、变异体、类似物和衍生物);具有混合的 α/β 结构的细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素(包括但不限于,嗜中性白细胞活化肽-2(NAP-2)、基质细胞-衍生因子-1 α (SDF-1 α)、IL-8、单核细胞化学引诱蛋白-1(MCP-1)、MCP-2、MCP-3、嗜伊红趋化素(eotaxin)-1、嗜伊红趋化素-2、嗜伊红趋化素-3、RANTES、髓细胞祖代抑制因子-1(myeloid progenitor inhibitory factor-1)(MPIF-1)、神经趋化素、巨噬细胞移动抑制因子(MIF)和GRO/黑色素瘤生长刺激活性(GRO- α /MGSA),及其突变蛋白、变异体、类似物和衍生物)。适合用于本发明中的多肽激素包括但不限于,胰岛素和可模拟或拮抗由胰岛素受体介导的胰岛素生物效应的胰岛素类似物;催乳素和可模拟或拮抗由催乳素受体介导的催乳素的生物效应的催乳素类似物;及生长激素(尤其是人生长激素)和可模拟或拮抗由生长激素受体介导的生长激素的生物效应的生长激素类似物。

特别优选的适合根据本发明而应用的细胞因子、趋化因子、生长因子及多肽激素包括：IL-2；IL-10；IFN- α ；IFN- β （包括IFN- β -1b）；TNF- α ；IGF-1；EGF；bFGF；hGH；催乳素和胰岛素。特别合适者还有前述细胞因子、趋化因子、生长因子及多肽激素的竞争性拮抗剂，如：TNF- α 、hGH或催乳素，及这些细胞因子、趋化因子、生长因子和多肽激素的突变蛋白、变异体和衍生物的拮抗剂。

在某些实施方案中，一种或多种聚合物共价偶联（尤其是通过仲胺的连接）至细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素的氨基端的氨基酸的 α 氨基团。在其它实施方案中，一种或多种聚合物共价偶联至细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素的氨基端氨基酸的化学活性侧链基团（如：羟基、巯基、胍基、咪唑基、氨基、羧基或醛衍生物）。在额外的实施方案中，聚合物在氨基端氨基酸或者是在或接近一个或多个糖基化位置处，偶联至细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，可模拟细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素糖基化的有利效果。在相关实施方案中，聚合物在或接近细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素上的一个或多个糖基化位置偶联至细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，可模拟细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素过糖基化的有利效果，其中"过糖基化"表示除了存在于天然结构中的那些外，共价连接简单或复杂的碳水化合物部分。

本发明也提供由本发明方法所制备的缀合物。本发明的缀合物含有偶联至一种或多种合成的水溶性聚合物（如上述者）的选出的细胞因子、选出的趋化因子、选出的生长因子、选出的多肽激素或选出的其拮抗剂（如上述者），其中所述一种或多种聚合物是偶联至细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素的氨基端氨基酸上，其中所述氨基端氨基酸是位于远离该选出的细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素的一个或多个受体-结合结构域的位置处。另外，本发明的缀合物含有偶联至一种或多种合成的水溶性聚合物（如上述者）的选出的细胞因子、选出的趋化因子、选出的生长因子、选出的多肽激素或选出的其拮抗剂（如上述者），其中所述一种或多种聚合物是偶联至细

胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂的一个或多个糖基化位置处，其中所述一个或多个糖基化位置是位于远离该细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素，或其拮抗剂的一个或多个受体-结合结构域的位置处。在本发明的激动剂的聚合物缀合物方面，优选聚合物附着的位置远离所有受体-结合结构域。在本发明的某些拮抗剂的聚合物缀合物方面，也许优选聚合物结合位置远离某些为发生结合所必需的受体-结合结构域，但不必远离所有为由激动剂信号转导所必需的受体-结合结构域。本发明也提供含有一种或多种本发明的缀合物，及一种或多种其它成分（如一种或多种药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载体）的组合物，尤其是药物组合物。本发明也提供含有一种或多种本发明的缀合物、组合物和/或药物组合物的试剂盒。

本发明也提供对患有身体疾病或易患身体疾病的动物（例如哺乳动物，如人类）进行预防、诊断，或治疗其身体疾病的方法。这类方法可包含，例如，施予该动物有效量的一种或多种本发明的缀合物、组合物和/或药物组合物。适合根据本发明这类方法治疗或预防的身体疾病，包括但不限于，癌症（如乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、肺癌、白血病、淋巴瘤、结肠癌、胃肠癌、胰癌、膀胱癌、肾癌、骨癌、神经癌、头颈部癌、皮肤癌、肉瘤、腺癌、恶性瘤及骨髓瘤）；感染性疾病（如细菌病、真菌病、寄生虫病和病毒病如病毒性肝炎，由亲心性病毒（cardiotropic Virus）引起的疾病；HIV/AIDS与类似疾病）；及遗传病（如：贫血、嗜中性白细胞减少症、血小板减少症、血友病、侏儒病及严重的联合免疫缺陷症（"SCID"）；自体免疫症（如：牛皮癣、系统性红斑性狼疮和类风湿性关节炎）和神经变性疾病（如：不同形式和阶段的多发性硬化症、克-雅病、阿尔兹海默氏症和类似病症）。

一般技术人员在参考本发明下列的图形和说明以及权利要求后，将可清楚本发明的其它优选实施方案。

插图简述

图 1 至图 8 显示以 RasMol 软件 (Sayle, R. A. 等, (1995) *Trends Biochem Sci* 20: 374-376), 根据结晶学资料所创造出的不同细胞因子和生长因子的分子模型。除了某些特别有意义的残基外 (以"球-和-棒"版式表示), 每一模型是以"丝带"或"动画 (cartoon format)"版式来表达。这些版式是利用 RasMol 软件选出的选项。带状物的暗色部分代表细胞因子和生长因子中被描述为参与结合其受体的结构域。图中指出各结构在蛋白质数据库 ("PDB") 中的登录号 (见 Laskowski, R. A., (2001) *Nucleic Acids Res* 29: 221-222; Peitsch, M. C., (2002) *Bioinformatics* 18: 934-938; Schein, C. H., (2002) *Curr Pharm Des* 8: 2113-2129)。

图 1a 显示干扰素- α -2a (SEQ ID NO: 1) 的模型, 其中四个被描述为是罗氏 (Roche's) PEG-干扰素产物 PEGASYS® 中的主要聚乙二醇化位置处的赖氨酸残基 (Lys31、Lys121、Lys131 和 Lys134) 是以"球-和-棒"版式显示 (根据上述 Bailon, P., 等的资料)。参与结合其受体的区域 ("结合位置 1 和 2") 已被鉴定出。四个被描述为在 PEGASYS 中被聚乙二醇化的赖氨酸残基全都在结合位置 1 的区域中 (PDB 代码 1ITF)。

图 1b 显示干扰素- α -2b (SEQ ID NO: 2) 的模型, 其中被描述为是先灵-普洛 (Schering-Plough) 的 PEG-INTRON® 中的主要聚乙二醇化位置的残基 (His34、Lys31、Lys121、Tyr129 和 Lys131) 是以"球-和-棒"版式显示 (根据上述 Wylie, D. C., 等的资料)。这些氨基酸残基均在结合位置 1 的区域中。

图 1c 显示干扰素- α -2b 的模型, 其中氨基端的半胱氨酸残基 ("Cys1") (其为根据本发明的聚乙二醇化作用的靶) 是以"球-和-棒"版式显示。Cys1 远离结合位置 1 和 2。

图 1d 显示与图 1c 图示相同的干扰素- α -2b 的模型, 在 N-端半胱氨酸残基 ("Cys1") 上已连接一条 20-kDa PEG 的单链。PEG 的结构应用 Lee, L. S., 等 (1999) *Bioconjug Chem* 10: 973-981) 所描述的程序产生, 并使其与蛋白质具相同大小。

图 2 显示人干扰素- β -1a (SEQ ID NO: 3) 的分子模型, 其中指出数个位于受体结合结构域内或与其相邻的赖氨酸残基 (Lys19、Lys33、Lys99 和 Lys134)。另外, 糖基化位置 (Asn80) 和 N-端甲硫氨酸残基 ("Met 1") 是以 "球-和-棒" 版式显示 (根据 Karpusas, M., 等, (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11813-11818; Karpusas, M., 等, (1998) *Cell Mol Life Sci* 54: 1203-1216; Runkel, L., 等, (2000) *Biochemistry* 39: 2538-2551 的资料)。Met 1 远离结合位置 1 和 2, 但数个赖氨酸残基均位于受体结合结构域内。(PDB 代码 1AUI)。干扰素- β -1b 与干扰素- β -1a 的结构不同处在于其缺少 N-端甲硫氨酸残基及碳水化合物部分, 以及具有一个取代未成对的半胱氨酸残基 (Cys17) 的丝氨酸残基。

图 3 显示人类粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 ("GM-CSF", SEQ ID NO: 5) 的分子模型, 其中三个在受体结合结构域的赖氨酸残基 (Lys72、Lys107 和 Lys111) 以及可在结晶结构中看到的接近氨基端的第一个氨基酸残基 ("Arg 4") 是以 "球-和-棒" 版式显示 (根据 Rozwarski, D. A., 等 (1996) *Proteins* 26: 304-313 的资料)。GM-CSF 的氨基端区域远离结合位置 1 和 2。(PDB 代码 2GMF)。

图 4 显示人白介素-2 ("IL-2", SEQ ID NO: 6) 的分子模型, 其中被描述为牵涉到所有三种受体 (α 、 β 和 γ) 的氨基酸残基是以 "球-和-棒" 版式显示, 如在受体结合结构域或接近此结构域的数个赖氨酸残基。可在结晶结构中看到的最接近氨基端的氨基酸残基为远离受体结合结构域的丝氨酸 6 ("Ser6"), (根据 Bamborough, P., 等, (1994) *Structure* 2: 839-851; Pettit, D. K., 等, 如上述的资料)。(PDB 代码 3INK)。

图 5 显示以 "动画" 版式表示的人表皮生长因子 ("EGF", SEQ ID NO: 7) 的分子模型, 但涉及受体结合的残基, 及邻近受体结合区的两个赖氨酸 (Lys28 和 Lys48) 除外。链内二硫键以虚线显示。根据此模型, 可在此结晶结构中看到的最接近氨基端的氨基酸残基为半胱氨酸 6 ("Cys 6") (根据 Carpenter, G., 等, (1990) *J Biol Chem* 265:

7709-7712; Lu, H.-S., 等, (2001) *J Biol Chem* 276: 34913-34917 的资料)。结晶结构中看不到的 EGF 氨基端的弹性部分(残基 1-5)并未显示出是在受体结合区内(PDB 代码 1JL9)。

图 6 显示以"动画"版式来表示的碱性成纤维细胞生长因子("bFGF"; SEQ ID NO: 8)的分子模型,其中涉及结合到受体及结合到肝素的残基是通过"球-和-棒"版式来确认(根据 Schlessinger, J., 等, (2000) *Mol Cell* 6: 743-750 的资料)。从氨基端开始的前 12 个氨基酸残基并未牵涉到受体结合(PDB 代码 1FQ9)。

图 7 显示以"动画"版式来表示的胰岛素样生长因子-1("IGF-1"; SEQ ID NO: 9)的分子模型,但涉及受体结合的残基(23-25 和 28-37),及谷氨酸残基 3("Glu3")(其是结晶结构中可看到的最接近氨基端的氨基酸残基)除外。鉴别了两个赖氨酸残基,其中之一(Lys27)是邻近受体-结合结构域,另一个则远离受体-结合结构域(根据 Brzozowski, A.M., 等, (2002) *Biochemistry* 41: 9389-9397 的资料)。IGF-1 的氨基端是远离受体-结合结构域。(PDB 代码 1GZR)。

图 8 显示干扰素 γ ("IFN- γ "; SEQ ID NO: 4)的分子模型,其为同型二聚体。为了澄清两种多肽链间的相互作用,单体之一("链 A")是以"丝带"版式显示,另一("链 B")则以"骨架"版式显示。赖氨酸残基(以亮的"球和棒"版式显示)是沿着多肽链(包括牵涉到单体间的界面的区域,或邻近涉及受体结合的氨基酸残基的区)产生。IFN- γ 的氨基端区域远离二聚体界面,但谷氨酰胺 1 (Gln 1)已涉及受体结合(Thiel D.J., 等, (2000) *Structure* 8: 927-936; PDB 代码 1FG9)。

图 9 显示未聚乙二醇化的干扰素- α -2b ("IFN")、单聚乙二醇化的干扰素- α -2b ("PEG₁-IFN")和二聚乙二醇化的干扰素- α -2b ("PEG₂-IFN")通过将含 IFN, 20kDa mPEG-醛和还原剂的反应混合物进行阳离子-交换层析而分离的结果。

图 10 显示对如图 9 所示而分离的反应混合物,及从离子交换柱收集的选出的分离物(其结果显示于图 9 中)进行的大小-排阻层析分析。

图 11 显示将含人 IL-2, 20-kDa mPEG-醛和还原剂的反应混合物进行阳离子-交换层析的分离结果。在指示的洗脱条件下, 不像图 9 所示的干扰素- α -2b 的结果, 残余的未聚乙二醇化的 IL-2 并未从柱上洗脱出。

图 12 显示对如图 11 所示分离的反应混合物, 及从那根柱上洗脱出的选出的分离物进行的大小-排阻层析分析。

图 13 显示聚乙二醇化的干扰素-2 ("PEG-IL-2") 和从阳离子交换柱收集的分离物(其层析图显示于图 11 中)的反应混合物的电泳分析。

发明详述

除非另外定义, 否则此处使用的所有技术和科学名词与本发明的技术领域中的一般技术人员所普遍理解的意思相同。虽然类似或等价于此处所描述的那些类型的任何方法和物质均可用来执行或测试本发明, 但优选的方法和物质描述于下。

定义

约: 当本文中用来指任何数值时, "约"一词是指所陈述的数值 $\pm$ 10% 的值(如: "约 50°C" 是包含从 45°C 至 50°C (包括端值) 的温度范围; 类似地, "约 100mM" 是包含从 90mM 至 110mM (包括端值) 的浓度范围)。

氨基酸残基: 此处所使用的"氨基酸残基"一词是指一种特定氨基酸, 其通常因参与到两个肽键、参与到多肽骨架或侧链而脱水, 但也指氨基酸参与到一个肽键如发生在线性多肽链的每一端。氨基酸残基通过本领域中常用的三字代码或单字代码来表示。

拮抗剂: 此处所使用的"拮抗剂"一词是指一种化合物、分子、部分或复合物, 其对于指定的细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素通过指定的细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素的受体介导

的生物学和/或生理学效应,可实质性地降低或完全抑制。拮抗剂可以多种方式行使此类效果,包括但不限于,与激动剂竞争在细胞表面上的结合位置或受体;以降低、充分降低或抑制激动剂结合到细胞表面受体的能力的方式来与激动剂相互作用;结合到细胞表面受体并诱发其构象变化,以使受体呈现一种激动剂不再结合(或仅能以减低或充分减低的亲和力和/或效力结合)的结构;在细胞、组织或有机体中诱发生理学变化(如:增加胞内信号传递复合物,增加转录抑制剂,降低细胞表面配体受体的表达等)以使激动剂的结合或激动剂结合至细胞所诱导的生理信号降低、充分降低或完全抑制;及本领域中一般技术人员所熟知的拮抗剂实现其活性的其它机制。如本领域中一般技术人员所知,拮抗剂可能与其所拮抗的配体具有类似结构(例如,拮抗剂可能为激动剂的突变蛋白、变形体、片段和衍生物),或可能具有完全无关的结构。

生物活性成分: 此处所使用的"生物活性成分"一词是指在体内、体外或离体对细胞、组织、或有机体具有特殊生物活性,且可结合到一种或多种聚亚烷基二醇以形成本发明的缀合物的化合物、分子、部分或复合物。优选的生物活性成分,包括但不限于,蛋白质和多肽类,例如本文中所描述的类型。

结合: 此处所使用的"结合"一词是指可以是共价(如以化学方式偶联),或非共价(如离子性相互作用、疏水性相互作用、氢键等)的结合或连接。共价键可以是,例如:酯、醚、磷酸酯、硫酯、硫醚、氨基甲酸乙酯、酰胺、胺、肽、二酰亚胺、脲、酰肼、碳-硫键、碳-磷键和类似物。"结合"一词包含"偶联"、"缀合"和"连接"的意义且更广义。

缀合物/缀合作用: 此处所使用的"缀合物"一词是指聚合物(如:PEG或PEO)共价连接到生物活性成分(如:蛋白质或糖蛋白)的产物。"缀合作用"是指形成如前句所定义的缀合物的反应。任何本领域中的技术人员所常用于将聚合物缀合至生物活性物质的方法均可用于本发明中。

偶联的：此处所使用的"偶联的"一词是指通过共价键或强的非共价相互作用的连接，典型且优选的情况为通过共价键连接。任何本领域技术人员所常用于偶联生物活性物质的方法均可用于本发明中。

细胞因子/趋化因子：此处所使用的"细胞因子"一词定义为可控制细胞的存活、生长、分化和/或效应子功能，而以内分泌、旁分泌或自分泌方式分泌出的调节性蛋白质（回顾：Nicola, N.A., 如上述；Koskiakoff, A.A. 等, 如上述）。类似地，此处所使用的"趋化因子"一词定义为结构上相关、具有白细胞活化功效和/或趋化活性的糖蛋白家族中的一员（回顾：Oppenheim, J.J., 等, 如上述）。根据这些定义，细胞因子和趋化因子包括白介素、集落刺激因子、生长因子及其它由不同细胞所生产的肽因子，包括但不限于此处所具体公开或示范的那些类型。如同其相近的类似物，多肽激素和生长因子，细胞因子和趋化因子通过结合至在其靶细胞表面上的特殊受体蛋白质来起动其调节功能。

疾病、障碍、病症：此处所使用的"疾病"或"障碍"一词是指上述任何人类或动物的不良状态，包括：肿瘤、癌症、过敏、成瘾、自体免疫、感染、中毒或对理想的精神或生理功能的损伤。此处所使用的"病症"一词包括疾病和障碍，但也指生理状态。例如，生育力为一种生理状态而非疾病或障碍。因此，适合通过降低生育力来预防怀孕的本发明组合物可被描述成处理一种病症（生育力），而非治疗障碍或疾病。其它病症为本领域中一般技术人员所了解。

有效量：此处所使用的"有效量"一词是指为了实现所期望的生物效应所需或足够的给定缀合物或组合物的量。本发明的给定缀合物或组合物的有效量是可达到此选择结果的量，且这类量可由本领域中技术人员利用本领域中已知和/或此处所描述的分析进行常规性的测定，而不需过多的实验。例如：用于治疗免疫系统缺陷的有效量可为在暴露至抗原时能引起免疫系统活化，以发展出抗原-特异性免疫反应所需要的量。此名词也与"足够量"同义。用于任何特殊应用的有效量可根据下列因素而有不同：处理的疾病或病症、施予的特定组合物、给药途径、

个体的尺寸,和/或疾病或病症的严重程度。本领域中一般技术人员可根据经验来测定本发明的特定缀合物或组合物的有效量,而不需过多的实验。

一 (one、a 或 an): 除非另外指出,本公开内容中所使用的"一"词是指"至少一"或"一或多"。

PEG: 此处所使用的"PEG"包括所有氧乙烯的聚合物,不论其为直链型、或支链型、或多臂型,也不论其为末端加帽型或羟基终结型。本领域使用于氧乙烯聚合物的其它名字中,"PEG"包括那些本领域中已知为聚(乙二醇)、甲氧基聚(乙二醇)、或 mPEG、或聚(乙二醇)单甲醚、烷氧基聚(乙二醇)、聚(环氧乙烷)、或 PEO、 α -甲基- ω -羟基-聚(氧-1,2-乙二基)和聚环氧乙烷的聚合物。

聚乙二醇化作用、聚乙二醇化的及莫克(Mock)聚乙二醇化的: 此处所使用的"聚乙二醇化作用"一词是指任何用来将 PEG 共价偶联至生物活性靶分子,尤其是受体-结合蛋白质的过程。由此产生的缀合物称为"经聚乙二醇化的"。此处所使用的"经莫克聚乙二醇化的"一词是指在聚乙二醇化反应混合物中,没有共价连接 PEG 的蛋白质部分或其它生物活性成分。然而,经莫克聚乙二醇化的产物可能在反应或接下去的纯化步骤中被改变,如:在通过还原性烷基化作用进行聚乙二醇化的期间,因暴露在还原剂中所造成的结果,和/或在处理和/或纯化步骤时去除一种或多种抑制剂、化合物,等所造成的结果。

多肽: 此处所使用的"多肽"一词是指通过酰胺键(也称为肽键)以线性方式连接的单体(氨基酸)所组成的分子。它是指一种氨基酸的分子链,而非指特定长度的产物。因此,肽类、二肽类、三肽类、寡肽类和蛋白质均包括在多肽的定义内。此名词也指多肽的表达后修饰的产物,如:糖基化、过糖基化、乙酰基化、磷酸化作用和类似物。多肽可从天然来源衍生,或通过重组技术产生,但不一定是从指定的核酸序列翻译而来。它也许以任何方式产生,包括通过化学合成产生。

蛋白质和糖蛋白: 此处所使用的蛋白质一词通常是指其大小大于约 10 或更多氨基酸, 20 或更多氨基酸, 25 或更多氨基酸, 50 或更多

氨基酸, 75 或更多氨基酸, 100 或更多氨基酸, 200 或更多氨基酸, 500 或更多氨基酸, 1000 或更多氨基酸, 或 2000 或更多氨基酸的多肽。蛋白质一般具有限定的三维结构, 虽然并不必然具有这种结构, 且与肽类和多肽类相反 (其通常不会拥有限定的三维结构, 而是采取大量不同构象, 并称为未折叠的结构), 蛋白质的结构通常称为折叠结构。然而, 肽类也可有限定的三维结构。此处所使用的"糖蛋白"一词是指与至少一个碳水化合物部分偶联的蛋白质, 该碳水化合物部分通过氨基酸残基 (如: 丝氨酸残基或天门冬酰胺残基) 的含氧或含氮侧链附着至蛋白质。

远离: 此处所使用的"远离" (如在"远离 N-端氨基酸"或"远离糖基化位置"中) 一词是指一种结构, 其中通过分子建模评估, 在蛋白质上的一种或多种聚合物的一个或多个附着位置是位于该蛋白质的一个或多个受体-结合区或结构域的远端, 或与其有空间上的相隔。聚合物在这类远端附着部位 (对于受体-结合蛋白质, 通常为 N-端氨基酸, 其因此被称为"远离 N-端"或"RN"受体-结合蛋白质), 或在糖蛋白上的一个或多个碳水化合物部分或糖基化位置 (对于受体-结合蛋白质, 其因此被称为"远端糖基化"或"RG"受体-结合蛋白质) 的缀合作用不会对其受体造成蛋白质结合的实质空间遮蔽。因此, 当一水溶性聚合物分别缀合 (如: 共价连接) 至氨基端氨基酸或糖基化位置而不会实质上干扰细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素结合到其受体, 尤其是细胞表面受体的能力时, 在细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素上的氨基端氨基酸或糖基化位置可说成是"定位于远离细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素的一个或多个受体-结合结构域"。当然, 指定的细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素可含有超过一个受体-结合结构域。在这种情况下, 细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素的氨基端氨基酸或糖基化位置可位于远离一个或多个这类结构域的位置上, 而仍被视为"位于远离一个或多个受体-结合结构域的位置上", 只要该氨基端氨基酸或糖基化位置的缀合作用不会实质上干扰细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素通过一个或多个受体-

结合结构域与其受体的结合。缀合作用是否会实质上干扰蛋白质结合其受体的能力可利用一般技术人员所熟知的本领域内已知的配体-受体结合分析而很容易地来测定。

评估配体-受体结合的方法包括但不限于，竞争性结合分析、放射性受体-结合分析、以细胞为基础的分析、表面等离子共振测量、动态光散射及超离心。

如本说明书的图 1d 所示，相对于类似分子量的蛋白质，PEG 是一种在溶液中占据大体积，且具有高度延展性及弹性的聚合物。虽然 PEG 所附着的氨基酸残基可能远离一个或多个受体-结合位置，但聚合物的部分可某种程度地干扰受体-结合。这类干扰的可能性随着分子量增加和因此造成的聚合物在溶液中所占体积的增加而增加。最后，远离受体-结合区的聚乙二醇化作用较随机的聚乙二醇化作用对受体-结合的干扰较少。

实质上地、实质的：如此处所使用，如果缀合的蛋白质结合至受体的速度和/或量相对于未缀合的对应的细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素的结合速度和/或量，不低于约 40%、约 50%、约 60%、约 65%、约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或约 100%或更多时，则可说蛋白质的缀合作用不会"实质上"干扰蛋白质结合至其受体的能力。

治疗：此处所用的术语"治疗" (treatment、treat、treated 或 treating) 是指预防和/或治疗。例如：当用在感染疾病方面时，此名词可指增加个体对病原感染的抵抗力的预防性治疗（或者，换言之，降低个体受病原感染，或因感染而显示病症的可能性），以及在个体受病原感染后用来对抗感染的治疗，如降低或排除感染，或预防其变得更严重。

综述

本发明提供用于合成受体-结合蛋白质的聚合物缀合物的方法，相

对于其中有一个或多个聚合物是随机连接的同一受体-结合蛋白质的聚合物缀合物,本发明方法所合成的产物可保留出乎意料的高受体-结合活性。利用 X-光结晶学和基于核磁共振的结构分析、突变分析和分子建模软件,本发明者已鉴定出细胞因子、趋化因子、生长因子和多肽激素的聚乙二醇化的靶位置(包括涉及或不涉及与受体的结合的类型)。包括这些细胞因子、趋化因子、生长因子及多肽激素的激动剂和拮抗剂的这类蛋白质在本文中称为受体-结合蛋白质。通过对合成策略的选择,该策略将聚合物的连接靶向于那些受体-结合蛋白的不涉及受体相互作用的区域,可避免某些不利的空间遮蔽,而所产生的聚合物缀合物可保留非常高的效力。那些具有远离一个或多个受体-结合区或结构域的氨基端残基的受体-结合蛋白质在本文中被定义为"远离 N-端"或"RN"受体-结合蛋白质;它们包括所有那些氨基端氨基酸是位于远离蛋白质的受体-结合位置处的细胞因子、趋化因子、生长因子和多肽激素,或其拮抗剂。

本发明另一实施方案中,生产出含有一种或多种经共价偶联至如下述的细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素的合成性聚合物(如:一种或多种聚(乙二醇))的缀合物,这些细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素具有远离一个或多个受体-结合区或结构域的天然糖基化位置。根据本发明的这一方面,当合成性聚合物在糖基化位置的区域中偶联时,缀合物的生物活性成分(如:蛋白质)将显示出保存良好的受体-结合活性。受体-结合蛋白质的此亚型在本文中称为"RG"受体-结合蛋白质。当亲水性或两亲性聚合物选择性地在"远端糖基化"位置处或其近处偶联时,尤其是当靶蛋白是一种天然糖基化蛋白质的非-糖基化形式时,该聚合物可模拟天然的碳水化合物的有利效果,例如,对聚集、稳定性和/或溶解度的作用,因此,其附着作用在此称为"假糖基化作用"。因此,本发明提供用来合成缀合物的方法,且在此缀合物中,合成性聚合物的位置选择性偶联作用可使天然的碳水化合物部分被有效取代。与蛋白质的其它非糖基化形式相比,所产生的假糖基化可改善溶解度、减少聚集,并从血液中延迟清除。

因此, 本方法特别适合用来制备在原核宿主细胞(例如细菌如大肠杆菌)中以重组 DNA 技术产生的蛋白质的缀合物和组合物, 因为原核有机体通常不会将其表达的蛋白质糖基化。类似地, 将糖蛋白的碳水化合物部分进行选择性的聚乙二醇化可造成糖蛋白的"假性过糖基化"。本方法已被描述, 例如 C. Bona 等, PCT 公开号第 WO 96/40731, 其公开内容全部合并为本文的参考文献。因此, 本方法特别适合用来制备在真核宿主细胞(例如酵母、植物细胞和动物细胞包括哺乳动物和昆虫细胞)中, 通过重组 DNA 技术产生的蛋白质的缀合物和组合物, 因为如果那些蛋白质包含天然产生的糖基化信号或通过重组 DNA 技术引入的糖基化信号时, 真核有机体通常会将其表达的蛋白质糖基化。这类假性糖基化及假性过糖基化的 RG 受体-结合蛋白质是在本发明的范围内。

因此, 本发明也包含充分、几乎完全或实质上完全保留受体-结合活性的"RN"受体-结合蛋白质的聚合物缀合物, 和充分、几乎完全或实质上完全保留受体-结合活性的假性糖基化或假性过糖基化的"RG"受体-结合蛋白质。当细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素与根据本发明的一种或多种水溶性聚合物缀合时, 如果该细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素的缀合作用不会实质性地干扰蛋白质结合其受体的能力, 也就是如果缀合的蛋白质与其相对应的受体结合的速度和/或量不低于未缀合形式的对应蛋白质的结合速度和/或量的约 40%、约 50%、约 60%、约 65%、约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或约 100%或更多时, 则可说细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素"保留充分的、几乎全部的、实质上全部的受体-结合活性"。那些被同时归类为"RN"和"RG"受体-结合蛋白质的受体-结合蛋白质的聚合物缀合物也包含在本发明的范围内。后者蛋白的两个实例是干扰素 B(尤其是干扰素-B-1b)及 IL-2。

在另外的实施方案中, 本发明提供用于合成受体-结合蛋白质的聚合物缀合物的方法, 这些聚合物缀合物与其中有一个或多个聚合物是

随机附着的同一受体-结合蛋白质的聚合物缀合物相比,可保留出乎意料的高受体-结合活性。本发明也提供由这类方法生产的缀合物,含有一种或多种本发明的这些缀合物的组合物,这些组合物还可另外包含一种或多种其它成分或试剂,如一种或多种缓冲盐类、一种或多种碳水化合物赋形剂、一种或多种载体蛋白质、一种或多种酶、一种或多种清洁剂、一种或多种核酸分子、一种或多种聚合物(如未缀合的 PEG 或聚亚烷基二醇和类似物)。本发明也提供含本发明的缀合物和组合物的试剂盒。

本发明也提供包含本发明的缀合物及至少一种药学或兽医学用途上可接受的赋形剂或载体的药学或兽医学组合物。本发明也提供利用这类组合物来治疗或预防多种身体疾病的方法,其包含对患有或容易出现身体疾病或病症的动物施予一种或多种有效量的本发明的缀合物或组合物。

再者,本发明提供稳定的受体-结合蛋白质及用于工业细胞培养的生产它们的方法,通过在工业用途中充分保留生物活性和增加作用期的合并效应,而导致取得了出乎意料的高效力。本发明缀合物的不寻常的高效力可反映在不寻常的高生物量产量、不寻常的高重组蛋白质表达水平及生物过程的效率中的其它改善。

方法

本发明者已发现将聚合物靶向于"RN"受体-结合蛋白质的氨基端氨基酸,或靶向于"RG"受体-结合蛋白质的糖基化位置的近处可确保聚合物附着在远离该蛋白质的一个或多个受体-结合区或结构域的位置上,从而通过该附着的聚合物分子将受体相互作用的立体遮蔽情况降至最少。因此,与那些聚合物是附着在分子中涉及受体-结合的区段内或近端处的情况相比较,根据本发明方法可通过缀合蛋白质来保留较高百分比的受体-结合活性。此原则(可保留出乎意料的高受体-结合活性)可用从如下群体选出的受体-结合蛋白质来证明:碱性成纤维细胞生长因子("bFCF"或"FGF-2")、表皮生长因子(EGF)、胰岛素样

生长因子-1 ("IGF-1")、干扰素- α ("IFN- α ")、干扰素- β ("IFN- β " (包括 IFN- β -1b))、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 ("GM-CSF")、单核细胞集落刺激因子 ("M-CSF")、Flt3 配体、干细胞因子 ("SCF")、白介素 2、3、4、6、10、12、13 和 15, 肿瘤坏死因子- α ("TNF- α ")、肿瘤坏死因子- β ("TNF- β ")、转化生长因子- α ("TGF- α ")、转化生长因子- β ("TGF- β ")、角质细胞生长因子 ("KGF"), 人生长激素 ("hGH")、催乳素、胎盘催乳激素、睫状神经营养因子 ("CNTF")、瘦素 (leptin) 及模拟这些蛋白质的作用的这些受体-结合蛋白质的结构类似物, 或其受体-结合拮抗剂。相反的, 大聚合物对 IFN- γ 氨基端的选择性地附着并不被预期成可保留此细胞因子的大部分活性, 因为这类偶联被认为会干扰活性二聚体结合到其受体上 (根据 Walter, M. R., 等, (1995) *Nature* 376: 230-235 和 Thiel, D. J., 等同上, 的资料)。

在本发明的相关的这类实施方案中, 聚合物偶联至受体-结合蛋白质的突变蛋白的氨基端残基上, 该突变蛋白通过结合到一种或多种相同受体但不启动信号转导而作为该天然蛋白质的竞争性拮抗剂。可作为实例的有: 含有单点突变 G120R 的 hGH 拮抗剂的聚合物缀合物 (Sundström, M., 等, (1996) *J Biol Chem* 271: 32197-32203) 和含有单点突变 G129R 的催乳素的拮抗剂 (Goffin, V., 等, (1997) *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2: 7-17; Chen, W. Y., 等, (1999) *Clin Cancer Res* 5: 3583-3593; Chen, W. Y., PCT 公开号 W0 99/58142 A1)。其它受体-结合蛋白质的拮抗剂可通过选择性单点突变、截断或缺失而产生 (见如: Tchelet, A., 等, (1997) *Mol Cell Endocrinol* 130: 141-152; Peterson, F. C., (1998) *Identification of Motifs Associated with the Lactogenic and Somatotrophic Actions of Human Growth Hormone*, Ph. D. Dissertation, Ohio State University, UMI# 9822357)。

在本发明的另一实施方案中, 在 "RG" 受体 - 结合蛋白质方面, 本发明的方法使一种或多种合成性聚合物附着在那些 (是糖蛋白的) 受

体-结合蛋白质的碳水化合物部分的天然附着位置邻近处。这将造成这些受体-结合蛋白质的"假糖基化作用"(例如: 当其通过重组 DNA 技术表达在大肠杆菌或其它不会执行翻译后糖基化作用的原核细胞中时), 或造成其糖蛋白形式的"假过糖基化作用"(例如: 对天然产生的糖蛋白或由可执行翻译后糖基化作用的真核宿主细胞(如: 酵母菌、植物细胞和动物细胞包括哺乳动物和昆虫细胞)所产生的糖蛋白而言)。实施例有: 干扰素 α 和 β , 以及红细胞生成素("EPO")和白介素-2 的聚合物缀合物。将合成性聚合物附着在天然糖基化位置或其附近的反应可通过任何本领域中的已知方法来完成, 包括 R. J. Goodson 等((1990) *Biotechnology* 8: 343-346) 的突变方法和涉及碳水化合物的先行氧化的 R. S. Larson 等((2001) *Bioconjug Chem* 12: 861-869) 的方法, 这些文献公开的内容全部合并为此处的参考文献。

一些蛋白质的氨基端修饰方法已在以前公开过(见如: Dixon, H. B. F., (1984) *J Protein Chem* 3: 99-108)。例如, 已有报告对蛋白质的 N-端修饰可稳定某些蛋白质以对抗氨肽酶的作用(Guerra, P. I., 等, (1998) *Pharm Res* 15: 1822-1827), 改善蛋白质的溶解度(Hinds, K., 等, (2000) *Bioconjug Chem* 11: 195-201), 降低 N-端氨基基团上的电荷, 或者, 尤其是改善所产生的缀合物的同质性(Kinstler, O., 等, 欧洲专利公开号 EP 0 822 199 A2 号; Kinstler, O., 等, (2002) *Adv Drug Deliv Rev* 54: 477-485)。另一种通过本领域中已知的"天然化学连接"程序将聚合物偶联至 N-端半胱氨酸或组氨酸残基的 α 氨基的替代方法已被公开(Roberts, M. J., 等, PCT 公开号 WO 03/031581 A2 和 U.S. 专利申请公开号 2003/0105224)。然而, 受体-结合蛋白质的"RN"和"RG"亚类的存在, 用于选择这些类型的成员的一般应用方法, 及作为保留"RN"受体-结合蛋白质的令人意外的高功能活性的方法的这类受体-结合蛋白质的聚合物缀合物的制备和使用, 均未在以前被认识或描述。

因此, 测定指定的细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素是否具有远离配体的受体-结合位置的 N-端和/或糖基化位置是有益的。

将配体与聚合物缀合前，预测指定的细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽是否为"RN"或"RG"配体的能力可充分减少生产聚合物-配体缀合物（例如与聚合物如 PEG 缀合的细胞因子、趋化因子、生长因子、多肽激素或其拮抗剂）时所需的实验，其中所述缀合物的抗原性和免疫原性相对于未缀合的配体的抗原性和免疫原性而言已降低，而该缀合配体的受体-结合和生理活性并未减低。

因此，在其它实施方案中，本发明提供用于鉴定和选择具有远离蛋白质配体受体-结合位置的 N-端和/或糖基化位置的受体-结合蛋白质配体（如：细胞因子、趋化因子、生长因子、多肽激素及其拮抗剂）的方法（也就是用于鉴定和选择"RN"或"RG"蛋白质的方法）。在某些本发明的这类实施方案中，用于一种或多种聚合物（如一种或多种 PEGs）缀合的理想位置可利用分子建模来测定，例如，利用分子建模软件来观察蛋白质（细胞因子、趋化因子、生长因子、多肽激素或其拮抗剂）的三维结构，以预测可让一种或多种聚合物附着至蛋白质而不会实质性地损失蛋白质的生物或受体连接活性的位置（也见 Schein, C. H., 如上述）。类似方法已被证明，例如，将 PEG 缀合至 G-CSF，以改善其对蛋白质水解性的分解作用的抗性（见已出版的 T. D. Osslund 的 U. S. 申请案第 2001/0016191 A1 号，其全部公开内容合并为此处的参考）。适合用于本发明中的分子建模软件，如：RASMOL (Sayle, R. A., 等, 如上述)及其它用来产生存放于蛋白质数据库(Protein Data Bank) (PDB; 见 Laskowski, R. A., 如上述)的大分子结构的数据库的程序为本领域中所熟知，并将为本领域中的一般技术人员所熟悉。利用这类分子建模软件，可根据配体及其受体的结晶学分析可靠地预测或测定多肽，如：细胞因子、趋化因子、生长因子、多肽激素或其拮抗剂的三维结构。以此方式，一般技术人员可以很容易地测定哪一个配体为适合用于本发明的"RN"或"RG"配体。

为了实践本发明，一种用来将水溶性聚合物共价偶联至蛋白质 N-端氨基酸残基的 α -氨基的较方便的途径是通过希夫氏 (Schiff's) 碱与带有单一醛基的聚合物的还原性烷基化反应而完成，如 G. P. Royer

所申请的专利 (U.S. 专利案第 4,002,531 号), 但非 J.M.Harris 等人所申请的专利 (U.S. 专利案第 5,252,714 号), 因后面这位发明者仅申请在两端带有醛基的衍生的聚合物的专利, 而此物质为交联剂, 因此不适合用来合成可保留实质的受体-结合活性的长效受体-结合蛋白质。

将 PEG-单醛的希夫氏碱导向到受体-结合蛋白 N-端氨基酸的 α 氨基, 而远离其赖氨酸残基的 ϵ 氨基, 所进行的还原性烷基化反应可根据下列公开内容, 通过多种方法完成: J.T. Edsall *Proteins, Amino Acids and Peptides as Ions and Dipolar Ions* ((1943) 的第 4 章和第 5 章, pp. 75-115 和 pp. 116-139, Reinhold Publishing Corporation, New York), 其公开内容全部合并为此处的参考。多肽 N-端氨基酸的 α 氨基的酸性解离常数 (" pK_a ") 被预期为低于 7.6, 然而多肽中的赖氨酸残基的 ϵ 氨基团的酸性解离常数 (" pK_a ") 被预期为约 9.5。Edsall (1943, 如上述) 清楚地陈述了醛类与氨基酸的氨基"仅在其等电点的碱性一侧"化合。

因此, 根据本公开内容及本领域中很容易取得的资料, 本领域中的一般技术人员可认识到: (1) 醛与蛋白质的 α 氨基的选择性反应较倾向于在 pH 低于 9.5 的范围内进行(大约蛋白质中的 ϵ 氨基团的 pK_a); (2) 当反应的 pH 向 7.6 降低(约为蛋白质中的 α 氨基的 pK_a) 时, 醛与 ϵ 氨基团的反应速率将减慢; (3) 当反应的 pH 向 7.6 降低时, 醛与 α 氨基的反应速率降低的程度小于醛与 ϵ 氨基的反应速率降低的程度; (4) 醛与 α 氨基的反应的选择性可通过将 pH 向 6.6 降低而稍微改善。由于后者的数值约低于 α 氨基的 pK_a 一个 pH 单位, 低于 ϵ 氨基的 pK_a 三个 pH 单位, 因此, 约有 10% 的 α 氨基和约 0.1% 的 ϵ 氨基将处于其具有反应性的、未质子化的状态。因而在 pH6.6 时, 未质子化的 α 氨基的部分, 较未质子化的 ϵ 氨基团的部分多出 100 倍。因此, 通过将反应的 pH 值进一步降低至, 例如 5.6 (其中, 理论上, 1% 的 α 氨基和约 0.01% 的 ϵ 氨基将处于其反应性的、未质子化的状态) 只能使选择性再增加一点。因此, 在本发明的某些实施方案中, 蛋白质配体 (尤其是

"RN"或"RG"配体,包括细胞因子、趋化因子、生长因子、多肽激素和其拮抗剂)与一种或多种聚合物的缀合是通过在约 5.6 至约 7.6 的 pH 值下;在约 5.6 至约 7.0 的 pH 值下;在约 6.0 至约 7.0 的 pH 值下;在约 6.5 至约 7.0 的 pH 值下;在约 6.6 至约 7.6 的 pH 值下;在约 6.6 至约 7.0 的 pH 值下;或在约 6.6 的 pH 值下,形成配体和该一种或多种聚合物间的混合物来进行。因此,本方法与本领域中已知的方法显著不同,本领域已知的方法中将聚合物偶联至配体的 N-端氨基酸残基上的 α 氨基的反应是在 pH 值约为 5 下进行(Kinstler, O., 等, (2002) *Adv Drug Deliv Rev* 54: 477-485; 欧洲专利公开号 EP 0 822 199 A2; U.S. 专利第 5,824,784 号和 5,985,265 号; Roberts, M.J., 等, (2002) 如上述; Delgado, C., 等, U.S. 申请公开号 2002/0127244 A1), 而将聚合物偶联至配体多肽骨架中赖氨酸残基的 ϵ 氨基的反应是在 pH 值约为 8.0 下进行(Kinstler, O., 等, EP 0 822 199 A2; U.S. 专利案第 5,824,784 和 5,985,265 号)。以相同方式,本发明方法也与利用转谷氨酰胺酶,将聚(乙二醇)的烷基胺衍生物偶联至某些蛋白质上的酶方法(此反应是在 pH 值为 7.5 下进行)显著不同(Sato, H., (2002), *Adv Drug Deliv Rev* 54: 487-504)。

以温和的还原剂,如氰基硼氢化钠或吡啶硼烷(Cabacungan, J.C., 等, (1982) *Anal Biochem* 124: 272-278) 将所产生的希夫氏碱还原,可形成在生理 pH 值下保留蛋白质的 N-端 α 氨基的正电荷的仲胺键。这类保留与天然蛋白质相同电荷的键,比中和电荷的替代性化学连接(例如,通过形成酰胺键(Burg, J., 等, PCT 公开号 WO 02/49673 A2; Kinstler, O., 等, 欧洲专利申请号 EP 0 822 199 A2; Kinstler, O.B., 等, (1996) *Pharm Res*, 13: 996-1002; Kita, Y., 等, 如上述), 或氨基甲酸乙酯键(Gilbert, C.W., 等, U.S. 专利第 6,042,822 号; Grace, M., 等, (2001) *J Interferon Cytokine Res* 21: 1103-1115; Youngster, S., 等, (2002) *Curr Pharm Des* 8: 2139-2157)) 更可能保留其生物活性。

用来将聚合物选择性偶联至 N-端氨基酸残基的替代方法为本领

域技术人员所已知。这些方法包括将酰肼、肼、氨基脒或其它含胺的聚合物偶联至已被高碘酸盐氧化分裂成醛类的 N-端丝氨酸或苏氨酸残基上 (Dixon, H.B.F., 如上述; Geoghegan, K.F., U.S. 专利 5,362,852 号; Gaertner, H.F., 等, (1996) *Bioconj Chem* 7: 38-44; Drummond, R.J., 等, U.S. 专利 6,423,685)。

合适的聚合物

在某些本发明的实施方案中, 期望在反应 (其中聚合物偶联至生物活性成分上, 以产生本发明缀合物) 中将聚合物 (如 PEG) 分子内和分子间交联的形成降至最少。这可通过使用下列的聚合物来实现: 仅在一端被活化的聚合物 (此处称为 "单功能性活化的 PEGs" 或 "单功能性活化的 PAGs"), 或其中经双功能性活化 (在直链型 PEG 中称为 "双活化的 PEG 二醇") 或经多功能性活化的聚合物的比例少于约 30% (以少于约 10% 更佳, 而以少于约 2% (重量/重量) 最佳) 的聚合物制品。使用全部或几乎全部单功能性活化的聚合物可将下列各项的形成都减至最少: 在单独蛋白质分子中的分子内交联, "哑铃" 结构 (其中 PEGs 的一条链连接两个蛋白质分子) 及更大的集合体或胶化体。

适合用于本发明的方法和组合物中的活化形式的聚合物可包括任何本领域中已知的直链型或支链型的聚合物的单功能活化形式。包含在内的例如有分子量在约 1kDa 至约 100kDa 范围内的类型 (不包括活化基团的质量)。合适的分子量范围包括, 但不限于, 约 5kDa 至约 30kDa; 约 10kDa 至约 20kDa; 约 18kDa 至约 60kDa; 约 12kDa 至约 30kDa; 约 5kDa、约 10kDa、约 20kDa 或约 30kDa。在直链型 PEGs 的情况中, 约 10kDa、约 20kDa 或约 30kDa 的分子量分别相当于约 230、约 450 或约 680 个氧乙烯单体单位的聚合度。在体外的用途方面, 合适的活化聚合物的分子量范围包括约 1kDa 至约 5kDa。需要注明的是: 早在认识到 "RN" 和 "RG" 类的受体-结合蛋白质的存在之前很久, 首先观察到将治疗性蛋白质偶联至具有相当高分子量 (也就是超过约 20-30kDa) 的聚合物的益处 (Saifer, M., 等, PCT 公开号 WO 89/01033

A1 号, 1989 年 2 月 9 日出版, 其内容全部合并为此处的参考)。

在本发明的其它实施方案中, 可用于体外 (例如在细胞培养中) 的受体-结合蛋白质的缀合物 (具有异常高比例的被保留的生物活性) 可根据本发明的方法, 通过偶联单功能性活化的约 1kDa、约 2kDa 或约 5kDa 的聚合物而制备。在这类体外的应用方面, 优选更低范围的分子量。

随意地, 直链型聚合物可在一端或两端具有一反应基团, 从而创造 "反应性聚合物"。在本发明某些实施方案中, 使用 PEG 的单丙酸衍生物的 N-羟基琥珀酰亚胺酯 (如 J.M.Harris 等, U.S. 专利第 5,672,662 号中所公开的, 其内容全部合并为此处的参考) 或其它 N-羟基琥珀酰亚胺活化的 PEG-单羧酸可令人满意。在其它的某些实施方案中, 使用 PEG 的单琥珀酰亚胺碳酸酯衍生物 ("SC-PEG") (如 M.Saifer 等, U.S. 专利号 5,006,333; 5,080,891; 5,283,317 和 5,468,478 号中所公开者), 或 PEG 的单-对-硝苯基碳酸酯衍生物 (如下列文献所公开的: S.J. Kelly 等, 如上述; L.D. Williams 等, PCT 公开号 WO 00/07629 A2 和 A3; L.D. Williams 等, U.S. 专利第 6,576,235 号和 M.R. Sherman 等, PCT 公开号 WO 01/59078 A2) 可令人满意。此外, 可使用其它类型的反应性基团来合成蛋白质的聚合物缀合物。这些衍生物包括, 但不限于, PEGs 的单醛衍生物 (Royer, G.P., U.S. 专利第 4,002,531 号; Harris, J.M. 等, U.S. 专利第 5,252,714 号), PEGs 的单胺、单-三溴苯基碳酸酯、单羧基-咪唑、单-三氯苯基碳酸酯、单-三氟苯基碳酸酯、单酰肼、单氨基脲、单胍基甲酸酯、单硫代氨基脲、单碘基乙酰胺、单马来酰亚胺、单-邻吡啶基二硫化物、单-肟、单-苯基乙二醛、单-噻唑烷-2-硫酮、单硫酯、单硫醇、单三嗪和单乙烯砷的衍生物。在另外的实施方案中, 细胞因子、趋化因子、生长因子、多肽激素及其拮抗剂可依照共同拥有的审查中的 U.S. 专利申请案第 10/669,597 号 (其公开内容全部合并为此处的参考) 中的描述, 偶联至一种或多种聚合物。

生物活性成分

如上述指出的，本发明的缀合物含有共价附着至一种或多种生物活性成分的 PAG 或 PAO，尤其是 PEG 的一条链。本文中，共价连接着一种或多种聚合物（或其链）的生物活性成分是"缀合的生物活性成分"或"修饰的生物活性成分"的多样化但等价的表述。这些术语需与那些指尚未有聚合物共价附着于其上的生物活性成分的名称："未缀合的生物活性成分"、"初始的生物活性成分"或"未修饰的生物活性成分"相区分。然而，当与野生型或天然分子相比较时，"未缀合的"、"未修饰的"或"初始的"生物活性成分可含有其它非聚合物的缀合或修饰，且根据本发明，其仍将被视为"未缀合的"、"未修饰的"或"初始的"生物活性成分，因为就聚合物的附着而言，该生物活性成分仍为"未缀合的"、"未修饰的"或"初始的"，就如在此处称为"经莫克聚乙二醇化的"生物活性成分的情况。

术语"稳定"生物活性成分（或"稳定的方法"，或"稳定的生物活性成分"）是指已根据本发明的方法稳定化的生物活性成分（也就是根据本发明的方法已共价连接聚合物的生物活性成分）。当与未稳定化的生物活性成分（也就是未共价连接聚合物的生物活性成分）比较时，这类稳定化的生物活性成分将展现出某些改变的生物化学和生物物理的特征。尤其对于受体-结合蛋白质，这类被改变的生物化学和生物物理参数包括对蛋白水解性降解作用的易感性降低，尤其是，在某些恶劣的环境或实验条件下培养的期间，受体-结合蛋白质活性的维持。在本发明的某些实施方案中，改变的生物化学和生物物理变量可包括，例如，体内的循环中的半衰期增加、生物可利用性增加、体外的作用期增加和类似情形。

任何受体-结合蛋白质（通常为细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素）具有与（远离其氨基端、或远离天然产生的或经突变引入的糖基化位置的）分子的部分相关的生物（也就是生理的、生化的或药学的）活性时，其可适合作为本发明的起始成分。这类生物活性成分包括但不限于，肽类、多肽类、蛋白质和类似物。生物活性成分也

包括这类肽、多肽、蛋白质和类似物的片段、突变蛋白和衍生物，尤其是具有生物（也就是生理的、生化的或药学的）活性的这类片段、突变蛋白和衍生物。

可用来作为本发明中生物活性成分的合适的肽类、多肽类和蛋白质、糖蛋白及类似物包括任何的肽类、多肽类或蛋白质等，其具有远离该生物活性成分的受体-结合区的、聚合物可选择性地连接至其上的一个或超过一个的可用的氨基、巯基或其它基团。这类肽类、多肽类、蛋白质、糖蛋白和类似物包括细胞因子、趋化因子、生长因子和多肽激素，其可具有多种结构中的任一种（Nicola, N.A., 如上述; Schein, C.H., 如上述）。

例如，有意义的合适的肽类、多肽类和蛋白质包括但不限于，具有包含四个 α -螺旋束（长链和短链两种亚类）的结构细胞因子类（回顾，见：Schein, C.H., 如上述）。多种适合用于本发明的这类包含四个 α -螺旋束的蛋白质，包括但不限于，白介素，如：IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12（p35亚基）、IL-13、IL-15和IL-17；集落刺激因子，如：巨噬细胞集落刺激因子（M-CSF）和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF; Rozwarski, D.A., 等, (1996) *Proteins* 26: 304-313）；干扰素，如：IFN- α 、IFN- β （包括IFN- β -1b）和共有IFN；白血病抑制因子（LIF）、红细胞生成素（EPO）、血小板生成素（Tpo）、巨核细胞生长和发育因子（MGDF）；干细胞因子（SCF），其在本领域中也称为史提尔（Steel）因子（Morrissey, P.J., 等, (1994) *Cell Immunol* 157: 118-131; McNiece, I.K., 等, (1995) *J Leukoc Biol* 58: 14-22）；制瘤素M（OSM）；磷脂酶-活化蛋白质（PLAP）；神经营养因子；及其肽模拟物。虽然催乳素和生长激素是在体内大范围循环的传统激素，不像细胞因子通常是在接近其靶细胞处产生，但催乳素和生长激素因具有四个 α -螺旋束，而与细胞因子属于相同的结构类（Nicola, N.A., 如上述; Goffin, V., 等, 如上述），且它们是类似的适合聚合物偶联和适合根据本发明制备缀合物的靶。这些肽类、多肽类和蛋白质的类似物、

突变蛋白、拮抗剂、变异体和衍生物也适合用于本发明中，且因此是包含在本发明中。

长链 β -折叠或 β -圆筒结构类的受体-结合蛋白质（回顾，见 Schein, C. H., 如上述）也适合用来制备本发明的缀合物和组合物。这包括但不限于，细胞因子的肿瘤坏死因子家族，如 TNF- α 、TNF- β 和 Fas 配体，其显示 β -胶状滚筒结构；IL-1（包括 IL-1 α 和 IL-1 β ）和 FGF（包括碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）、酸性 FGF、FGF-4 及角质细胞生长因子（KGF；FGF-7）族类，其显示 β -三叶形折叠（Schein, C. H., 等，如上述）；IL-12、IL-16；表皮生长因子（EGF；Lu, H.-S., 等，如上述）；和血小板衍生生长因子（PDGFs）、转化生长因子（包括转化生长因子- α 和转化生长因子- β （TGF- β ））和神经生长因子，其采用胱氨酸-结结构。这些肽类、多肽类和蛋白质的类似物、突变蛋白、拮抗剂、变异体和衍生物也适合用于本发明，因此是包含在本发明中。

可方便地用在本发明的缀合物和组合物中的另一结构类的蛋白质是富含二硫化物的混合的 α/β 细胞因子、趋化因子和生长因子（回顾见 Schein, C. H., 如上述），包括但不限于，EGF 一族，其具有 β -弯曲结构；IL-8；RANTES；嗜中性白细胞活化肽-2（NAP-2）；基质细胞衍生因子-1 α （SDF-1 α ）；单核细胞化学引诱蛋白（MCP-1、MCP-2 和 MCP-3）；嗜伊红趋化素（如：嗜伊红趋化素-1、嗜伊红趋化素-2 和嗜伊红趋化素-3）；髓细胞祖代抑制因子-1（MPLF-1）；神经趋化素、巨噬细胞移动抑制因子（MIF）；生长相关性致癌基因/黑色素瘤生长刺激活性（GRO- α /MCSA）；生长调节素；和胰岛素及胰岛素样生长因子（如：IGF-1 和 IGF-2）。用于本发明的缀合物和组合物中的相关的蛋白质结构类为具马赛克结构的细胞因子，其包括生长因子如 IL-12 和肝细胞生长因子（Nicola, N. A., 如上述）。这些肽类、多肽类和蛋白质的类似物、突变蛋白、拮抗剂、变异体和衍生物也适合用于本发明，因此是包含在本发明中。

其它有意义的蛋白质，包括但不限于，生长激素（尤其是人生长激素（hGH；见 Tchelet, A., 等，如上述））及其拮抗剂（见，如：

Sundström, M., 等, 如上述)、催乳素及其拮抗剂、绒毛膜促性腺素、滤泡刺激激素、促甲状腺激素、色素激素、角质细胞生长因子、丘脑下释放因子、抗利尿激素和所有上述结构类的细胞因子、趋化因子、生长因子和多肽激素的受体-结合拮抗剂。许多这类蛋白质是以糖基化及非-糖基化两种形式存在。非-糖基化形式可利用在原核细胞中进行的重组 DNA 技术生产而产生, 或利用化学合成。这类非-糖基化产品是包括在作为本发明的合适生物活性成分的肽类和蛋白质中。最后, 虽然某些抗体可作为受体-结合激动剂或拮抗剂(见, 如: Morris, J.C., 等, (2000) *Ann Rheum Dis* 59 (Suppl I): i109-i114), 但这类免疫球蛋白并非本发明范围内用于 N-端聚合物偶联作用的合适候选者, 也就是它们并非 RN 受体-结合蛋白质, 因为轻链和重链的氨基端区域都参与了抗原识别。

可特别用来制备本发明的聚合物缀合物的生物活性成分有: 干扰素- α 、干扰素 β (包括 IFN- β -1b)、IL-2、IL-4、IL-10、TNF- α 、hGH、催乳素、胰岛素、IGF-1、EGF、bFGF 和红细胞生成素 (EPO)。这类生物活性成分的突变蛋白和片段也具有特别用途, 尤其是能结合至相应的野生型或完整多肽的受体的那些类型, 不论这种结合是否能诱导出生物或生理效果。在某些这类实施方案中, 生物活性成分的突变蛋白和片段可作为相应配体的拮抗剂, 其可减少、充分减少或完全抑制配体连接到其受体, 和/或配体在其靶细胞、组织和/或有机体上的活性。有意义的配体的其它拮抗剂(其可能是也可能不是结构类似物、突变蛋白、变异体或衍生物)也适合根据本发明制备缀合物。实际上, 指定的突变蛋白、片段、变异体、衍生物或拮抗剂对指定配体的生物和/或生理作用是否拮抗, 均可应用对配体本身的生物和/或生理作用的分析来测定, 其中多项为本领域中所熟知和/或在此所描述, 而不需做过多的实验。

可根据本发明方便使用的这些和其它有意义的多肽类的结构(一级、二级、三级及当合适时, 四级)为本领域所熟知, 且也为一般技术人员所熟悉, 尤其是在参考过本文及本文所列举的参考文献(其内

容全部合并为此处的参考)中所提出的结构后。

缀合物

本发明提供用于多种应用的生物活性成分(尤其是细胞因子、趋化因子、生长因子和多肽激素)的稳定缀合物。如下列所示,与本领域中已知的缀合物的非限制性及示范性比较显示,本发明的这类缀合物较本领域中先前已知的类型具有许多优点。

H. Hiratani(欧洲专利第 EP 0 098 110 号和 U.S. 专利第 4,609,546 号)公开了氧乙烯和氧丙烯的共聚物("PEG-PPG", PAGs 的一般类型中的一员)与蛋白质(包括干扰素和白介素)的缀合物,其中没有优选避开涉及受体-结合的蛋白质区的内容被公开。在这些参考资料中,干扰素 α 、 β 和 γ 被认为是 PAG 偶联的等价的靶,不像在本发明中,干扰素- γ 并不被认为是用于 N-端偶联的合适靶,因为氨基端是在此细胞因子的受体-结合区内。另外,Hiratani 公开仅以 1kDa 至 10kDa 的 PAG 进行合成的缀合物,然而,本发明的方法优选偶联水溶性、分子量超过 10kDa 的合成性聚合物,以用于治疗性应用。类似地,N.V. Katre((1990) *J Immunol* 144: 209-213)公开了将大量的 5-kDa mPEG 链偶联至人的重组白介素-2 可增加所产生的缀合物在小鼠和兔子血流中的寿命。然而,此参考文献并未公开或认识到本发明所提供的将更少量的 PEG 的较长链,或高分子量 PEG 的单链偶联至 IL-2 的氨基端的优点。

G. Shaw(U.S. 专利第 4,904,584 号和 PCT 公开号 WO 89/05824 A2 号)公开了通过在靶蛋白(尤其是 EPO、G-CSF 和 IL-2)中引入、取代或删除赖氨酸残基来诱发胺-反应性聚合物的位置选择性连接的方法。然而,不像本发明中所公开的内容,这些参考文献并未公开胺-反应性聚合物可与靶蛋白中除了赖氨酸残基的 ϵ 氨基团外的任何胺反应,这清楚地有别于本发明公开的内容。

D.E. Nitecki 等人(U.S. 专利第 4,902,502 号)公开了从倾向于与赖氨酸残基的 ϵ 氨基反应的 PEG 的多种氯甲酸酯衍生物所制得的经

多重聚乙二醇化的 IL-2 缀合物。然而，与本发明的方法相反，此参考文献未公开避免将 IL-2 蛋白质区域中的赖氨酸残基（涉及受体-结合者）聚乙二醇化的方法，也对避开这类位置的优点没有任何认识。

N. Katre 等人（U.S. 专利第 5,206,344 号）公开了 PEG-IL-2 缀合物，其中 PEG 是偶联至赖氨酸残基的 ϵ 氨基、偶联至在位置 125（从氨基端开始数）的天然半胱氨酸残基的未配对巯基，或偶联至已通过突变方式引入的从 IL-2 氨基端开始的第 1 和第 20 个残基间位置处的半胱氨酸残基的巯基上。在 '344 专利中所公开的突变蛋白包括 "des-ala-1" IL-2，也就是，氨基端丙氨酸已被删除，且未聚乙二醇化的突变蛋白。然而，与本发明公开的内容相反，'344 专利中并未公开任何可避免将 PEG 偶联至（涉及与受体结合的）氨基酸残基的方法，也不知道这种方法的优点。与此观念一致，但与本发明相反，'344 专利中所提出的大范围的连接点并未建议将 PEG 偶联至 IL-2 的氨基端特别有利。

在 S. P. Monkarsh 等，(1997) *Anal Biochem* 247: 434-440 和 S. P. Monkarsh 等，(1997) in Harris, J.M., 等，eds., *Poly(ethylene glycol): Chemistry and Biological Applications*, pp. 207-216, American Chemical Society, Washington, D.C., 中，公开了将干扰素- α -2a 与过量三倍摩尔的分子量为 5300 道尔顿的活化 PEG 反应可产生 11 种单 PEG-干扰素的位置异构体，对应于干扰素- α -2a 中的 11 个赖氨酸残基。没有报道描述 PEG 偶联至干扰素氨基端的 α 氨基的 PEG-干扰素。这些参考文献中所报道的 11 种位置异构体在细胞培养中所显示出的抗病毒活性为未修饰干扰素活性的 6% 至 40%，而在细胞培养中所显示出的抗增殖活性为未修饰的干扰素的 9% 至 29%。这类结果清楚地证明：与本发明方法所制备的缀合物相反，由这些研究人员所实践的赖氨酸残基的随机聚乙二醇化作用会干扰由干扰素- α -2a 受体所介导的干扰素- α -2a 的功能。另外，不像本发明的缀合物，在这些参考文献中所报道的缀合物中并没有 N-端聚乙二醇化的干扰素。

O. Nishimura 等人（美国专利法发明登记第 H1662 号）公开了通

过在 pH7.0 (对干扰素缀合物而言) 或 pH7.15 (对 IL-2 缀合物而言) 下, 以氰基硼氢化钠将活化的"聚乙二醇甲醚醛类"进行还原性烷基化而制备的干扰素- α 、干扰素- γ 和 IL-2 的缀合物。然而, 通过这类方法所制备的缀合物被报道为损失多至 95% 的未修饰蛋白质的生物活性, 这显然是因为有多处聚合物附着位置存在, 这些位置均被描述为在赖氨酸残基的 ϵ 氨基团上 (参考本发明的图 1 和图 4)。

D.K. Pettit 等人 (如上述) 公开了白介素-15 ("IL-15") 的聚合物缀合物。然而, 本参考文献中所报道的缀合的 IL-15 不只因为聚合物是偶联至涉及受体-结合的蛋白质区域中的赖氨酸残基而损失其类 IL-2 生长-促进能力, 且也显示出其拮抗性超过激动性。这些作者总结出: 选择性地抑制 IL-15 与数种细胞表面受体之一结合, 可能是聚合物缀合作用的结果, 而这类抑制作用不仅可减少受体结合, 也可逆转蛋白质的生物学效应。通过避免将聚合物偶联至 (涉及与受体-结合蛋白质的受体相互作用的) 受体-结合蛋白质部分, 本发明可避免这种聚合物偶联作用的不利结果。

J. Hakimi 等人 (U.S. 专利第 5,792,834 号和 5,834,594 号) 公开了蛋白质的氨基甲酸乙酯-连接的 PEG 缀合物, 包括干扰素- α , IL-2, 白介素-1 ("IL-1"), 和 IL-1-受体的拮抗剂, 其制备目的是为了降低蛋白质各自的免疫原性、增加溶解度并延长生物半衰期。在这些参考文献中, PEG 是偶联至"不同的游离氨基", 而没有涉及 N-端聚乙二醇化, 也未公开 N-端 α 氨基可或应被聚乙二醇化。这些专利也陈述其中所公开的缀合物"具有至少一部分"起始蛋白质的原始生物活性, 这表示可能损失相当的生物活性。此结果与其中所公开的使用不定向聚乙二醇化方法一致。与本发明相反, 这些专利未公开任何 (欲通过改变其中所公开的聚乙二醇化方法的选择性来改善其缀合物的生物活性保持力的) 尝试。

O.B. Kinstler 等人 (欧洲专利公开号 EP 0 822 199 A2 号) 公开了用于将聚(乙二醇)与多肽 (尤其是共有干扰素和 G-CSF, 由 Amgen 公司 (本专利申请案的受让人) 生产的两种蛋白质) 氨基端氨基酸的

α 氨基进行反应的方法。此公开内容指出"足以酸化至可选择性地活化 α 氨基的 pH"为所公开的方法的必要特性。相反的, 本发明已发现通过降低 pH 值可降低氨基与 PEG 醛类的反应性, 且 α 氨基团未被质子化 (也就是在高于其 pK_a 的 pH 值下) 时更具反应性。因此, 本发明者发现没有任何 pH 值是"足以酸化至可选择性地活化任何本发明的 RN 细胞因子的 α 氨基团"。由 J. T. Edsall (如上述) 和由 R. S. Larsen 等人 ((2001) *Bioconjug Chem* 12: 861-869) 所提出的 N-端 α 氨基团与醛类的反应性对 pH 值的依赖性的解释与本发明者的经验较相符。再者, Kinstler 等人报道利用多肽的 N-端聚乙二醇化反应来增加所产生的缀合物的同一性, 并保护氨基端不被蛋白酶降解, 但并未公开 N-端聚乙二醇化作用可使某些受体-结合蛋白质保留更大比例的受体-结合活性 (见, 如: PCT 刊物第 WO 96/11953 号; 欧洲专利第 EP 0 733 067 号, 和 U.S. 专利第 5, 770, 577 号、5, 824, 784 号和 5, 985, 265 号, 全部为 Kinstler, O. B., 等所有)。

Kinstler 等人的欧洲申请案 (EP 0 822 199 A2) 也归纳出 N-端聚乙二醇化作用对所有多肽的益处, 而这并非本发明者的经验。具体而言, 如 R. S. Larsen 等人 (如上述) 所公开的, 与赖氨酸残基的随机聚乙二醇化相比, 由于抗体分子的氨基端是在抗体蛋白质的抗原-结合区近端 (Chapman, A. P. (2002) *Adv Drug Deliv Rev* 54: 531-545), 因此, 抗体的 N-端聚乙二醇化作用对生物活性具有出乎意料的伤害。类似地, 非"RN"受体-结合蛋白 (如: 干扰素- γ , 见图 8) 的受体-结合蛋白进行的 N-端聚乙二醇化作用, 被预期为与这类受体-结合蛋白的赖氨酸残基的随机聚乙二醇化相比, 更加抑制与受体的相互作用。

因此, 如上述, 本发明的方法与此处所引用的 Kinstler 等人在公开内容中所公开的方法的区别在于, 本发明的缀合物是通过将一种或多种选出的作为 RN 受体-结合蛋白质的细胞因子、趋化因子、生长因子、多肽激素或其拮抗剂与一种或多种聚合物在下列 pH 值下缀合而制备, 而该缀合是通过形成配体和一种或多种聚合物的混合物来进行:

在约 5.6 至约 7.6 的 pH 值下；在约 5.6 至约 7.0 的 pH 值下；在约 6.0 至约 7.0 的 pH 值下；在约 6.5 至约 7.0 的 pH 值下；在约 6.6 至约 7.6 的 pH 值下；在约 6.6 至约 7.0 的 pH 值下；或在约 6.6 的 pH 值下。相反的，Kinstler 等人的方法依赖配体在 pH 值低于 5.5 以下的缀合作用，而本发明者发现该 pH 范围对于制备配体在远离 N-端氨基酸处和/或在远离糖基化位置处选择性地与聚合物缀合而成的制品而言，较不理想或较差。

R. B. Pepinsky 等人 (PCT 刊物第 WO 00/23114 号和 U.S. 专利申请刊物第 2003/0021765 A1 号) 公开了在抗病毒分析中相对于未糖基化的干扰素- β -1b 更具活性的糖基化的干扰素- β -1a 的聚合物缀合物。此参考文献也公开了聚亚烷基二醇可通过在不同位置处 (包括糖基化蛋白质的氨基端、羧基端和碳水化合物部分) 的不同偶联基团偶联至干扰素- β -1a。然而，本公开内容中并未公开所述方法可推广至其它蛋白质："这些研究指出，不论干扰素- β -1a 和干扰素- β -1b 间的序列中的保守度如何，其生化本质不同，因此，关于干扰素- β -1b 的已知部分大多无法适用于干扰素- β -1a，反之亦然"。相反地，本发明公开了包括在 (如此处所定义的) "RN" 和 "RG" 受体-结合蛋白质中的普遍特性。根据本发明，干扰素- β -1a 和干扰素- β -1b 皆为 "RN" 受体-结合蛋白质。另外，干扰素- β -1b 为一种 "RG" 受体-结合蛋白质。因此，与 WO 00/23114 的方法相反，本发明的方法可用来制备干扰素- β -1b 和干扰素- β -1a 二者的稳定、具有生物活性的缀合物。

Z. Wei 等人 (U.S. 专利第 6,077,939 号) 公开了用于将水溶性聚合物 (尤其是 PEG) 偶联至多肽 (尤其是红细胞生成素) 的 N-端 α 碳原子的方法，其中在 N-端氨基酸的 α 碳处的胺是先转氨到 α 羰基团，然后再与 PEG 衍生物反应，以形成肟或腙键。由于此参考文献的公开目的为发展一种可应用于一般蛋白质的方法，因此，并未考虑可通过选择氨基端作为某些受体-结合蛋白质的聚乙二醇化位置来保留受体-结合活性。因此，与 Wei 等人所公开的内容相反，本发明不需要移除 N-端 α 氨基，但相反的，可在中性 pH 下，通过形成蛋白质和聚

合物间的仲胺键而保存 N-端 α 氨基的电荷。

C.W. Gilbert 等人 (U.S. 专利第 6,042,822 号; 欧洲专利第 EP 1 039 922 号) 公开了 PEG-干扰素- α -2b 位置异构体的混合物, 其中特别有利的异构体具有偶联至干扰素- α -2b 的组氨酸残基 (尤其是组氨酸-34) 的 PEG, 并证明 PEG 连接到组氨酸-34 并不稳定。由于组氨酸-34 位于干扰素- α -2b 表面上的一个必须与干扰素受体密切接触才能引起信号转导 (见本专利说明书的图 1b) 的区域内, 因此, 在这些参考文献中所公开的 PEG 和组氨酸-34 间的连接的不稳定性显示出其对这些参考文献中所公开的 PEG-干扰素缀合物的功能具有关键作用。S. Lee 等人的 U.S. 专利第 5,985,263 号中公开了充分纯化的经组氨酸连接的蛋白质的聚合物缀合物。相反的, 本发明证明优选的缀合物为 PEG-干扰素缀合物, 其中 PEG 稳定连接在一个远离干扰素成分的受体-结合结构域的位置处。

P. Bailon 等人 ((2001) *Bioconjug Chem* 12: 195-202) 公开了以每分子干扰素对一分子 40-kDa 双-mPEG-赖氨酸的量所聚乙二醇化的干扰素- α -2a, 包含四种主要的位置异构体。此参考文献公开了几乎所有 PEG 均通过酰胺键附着至赖氨酸 31、121、131 或 134, 而它们中每一个都在干扰素- α -2a 的受体-结合结构域内或邻近此区域 (根据 Bailon, 等, 残基 29-35 和 123-140; 见本专利申请的图 1a)。Bailon 等人并未报道 N-端聚乙二醇化作用。分离出的 PEG-干扰素的位置异构体混合物对抗马汀-达比 (Madin-Darby) 牛肾细胞的疱疹性口炎病毒感染的体外抗病毒活性为被测试的未缀合的干扰素- α -2a 活性的 7%。这些不包含 N-端聚乙二醇化的干扰素的干扰素缀合物中观察到的生物活性的实质性损失可由此而清楚地区分 Bailon 等人的缀合物和本发明的缀合物。

R.B. Pepinsky 等人 ((2001) *J Pharmacol Exp Ther* 297: 1059-1066) 公开了从 (1) 含有 N-端甲硫氨酸残基的糖基化的干扰素- α -1a 和 (2) 20-kDa PEG-醛, 而合成缀合物的方法。此缀合物 (该参考文献中作为 N-端甲硫氨酸处的单聚乙二醇化而被提及) 在抗病毒

分析中被认为可保留全部生物活性，然而，与具有较高分子量的 PEG 偶联时会降低或排除抗病毒活性。虽然这些作者公开了其选择在 N-端位置将糖基化的干扰素- β -1b 聚乙二醇化是由于受制于位置-选择性聚乙二醇化试剂的可利用性和分子建模，但他们承认"某些效果为产品特异的"。再者，与本发明相反，其中所报道的观察内容并不能推广到包括此处定义为"RN"受体-结合蛋白质的受体-结合蛋白质一类。

J. Burg 等人 (PCT 刊物第 WO 01/02017 A2 号) 公开了生产红细胞生成素糖蛋白的烷氧基 PEG 缀合物的方法，其中一至三条链的甲氧基 PEG 与巯基 (通过修饰糖蛋白表面上的赖氨酸残基的 ϵ 基团，以化学方式引入) 进行反应。然而，与本发明相反的，此参考文献并未公开将 PEG 偶联至红细胞生成素的 N-端氨基酸的游离 α 氨基的任何尝试，或避免修饰在红细胞生成素糖蛋白的对于与红细胞生成素受体的相互作用而言所必要的区域中的赖氨酸残基的任何尝试。

J. Burg 等人 (PCT 刊物第 WO 02/49673 A2 号) 公开了天然红细胞生成素糖蛋白和其突变蛋白的 N-端酰胺-连接 PEG 的缀合物的合成方法，其中含有采用可选择性裂解的 N-端肽延长物的过程，而该 N-端肽延长物在聚乙二醇化前经过糖蛋白的赖氨酸残基的所有 ϵ 氨基团的可逆柠檬基化 (citraconylation) 后被裂解。此参考文献中所公开的用于多步骤过程的基本原理为选择 N-端氨基酸的游离 α 氨基团进行聚乙二醇化，以产生同型的单聚乙二醇化缀合物，从而避免需要从经多重聚乙二醇化的衍生物中分离出单聚乙二醇化的缀合物。此方法在多个重要方面与本发明不同，包括但不限于：(1) Burg 等人的方法限于那些烷氧基 PEG 是通过酰胺键连接的红细胞生成素糖蛋白，而本发明可应用在利用多种合成性聚合物缀合的多种生物活性成分上；(2) 本发明可应用在糖基化和非糖基化的"RN"和"RG"两种受体-结合蛋白质上，而 Burg 等人仅公开糖蛋白的缀合作用；(3) 本发明同时包含烷氧基 PEGs (如：mPEG)，和经单功能活化的羟基 PEGs，然而 Burg 等人仅公开烷氧基 PEGs 的用途；(4) 本发明中，位于聚合物和蛋白质间的仲胺键较 Burg 等人所使用的酰胺键为佳，因为前者较稳

定,且保留氨基上的正电荷。在同一小组的类似工作中,Burg 等人(U. S. 专利第 6,340,724 号)公开了生产红细胞生成素糖蛋白的酰胺-连接缀合物的方法,在这种缀合物中烷氧基 PEG 的一至三条链是连接到蛋白质的一至三个氨基团上。然而,与本发明相反,此参考文献报道在 N-端氨基酸的 α 氨基,和不在涉及与受体相互作用的区域中的氨基之间,没有优选。

C. Delgado 等人(U. S. 专利第 6,384,195 号)公开了利用反应性聚合物(以崔氏基(tresyl)单甲氧基 PEG 作为代表,在该参考资料表示为"TMPEG")制备的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的缀合物。此参考资料指出当将 TMPEG 与重组的人 GM-CSF 接触时,"该修饰的物质含有不具活性的种类,及活性较未修饰的物质更高的种类"。本领域中的一般技术人员可很容易地认识到:在聚合物-生物活性成分缀合物的混合物中,不具活性的种类较不利,尤其是在含有这类缀合物的用于治疗的组合中,因为它会造成将该缀合物施予需要这类施用的患者时的风险,而不提供有利的效用。如此处所指出,本发明通过避免在涉及蛋白质受体-结合活性的蛋白质位置上修饰 GM-CSF 和其它受体-结合蛋白质,从而减少或排除合成不具活性的种类,来至少克服部分这类限制。本发明也提供用于分离和纯化具有不同大小、不同电荷和/或蛋白质上的电荷被聚合物遮蔽的程度不同的缀合物的方法。(见图 9-12)。

值得注意的是:U. S. 专利第 6,384,195 号并未提到 GM-CSF 的 N-端聚乙二醇化作用,因此并未识别出本发明方法的优点。最后,U. S. 专利第 6,384,195 号指出优选在 GM-CSF 的每一分子上有超过一个 PEG 偶联的缀合物,而完全没有考虑那些 PEG 分子是附着在 GM-CSF 分子上的何处(除了偶联赖氨酸残基者外)。通过陈述优选每一 GM-CSF 上有至多六个 PEG 的缀合物,该参考文献因此而陈述了优选 PEG 可连接至所有可能的赖氨酸残基的缀合物,以确保 PEG 将连接在可空间阻隔蛋白紧密接近其细胞-表面受体的位置上(见本专利说明书图 3)。相反的,本发明指出将 PEG 偶联至赖氨酸残基的不利处,除非那些赖氨酸

残基远离为与受体的相互作用所必需，并因此转导信号（在激动剂的情况中）或竞争性地抑制信号转导（在拮抗剂的情况中）的受体-结合蛋白质的结构域。

T. Nakamura 等人（PCT 刊物第 WO 02/32957 A1 号）公开了增加（偶联至红细胞生成素糖蛋白 52 位点的赖氨酸残基的 ϵ 氨基上的）PEG 分子量时，可增加缀合物在活体内的红细胞生成效应，并降低缀合物对红细胞生成素受体的亲和力。然而，与本发明相反的，本参考文献并未公开 PEG 在氨基端或接近糖基化位置处的偶联反应，也未识别出如此做的任何优点。

因此，本发明提供较先前公开者明显具有结构和功能上的优点的缀合物，及生物活性成分与合成性聚合物偶联的缀合物的合成方法。

组合物

本发明提供含有一种或多种偶联至一种或多种稳定的聚合物（如一种或多种 PEGs）的生物活性成分（适合的是一种或多种细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素）的缀合物或复合物。典型地，这类缀合物是通过此处所描述的本发明方法来生产；然而，具有除了此处所描述类型之外的结构和活性的缀合物若是通过本发明方法生产，则也被视为等价物，因此，也包含在本发明内。在相关方面中，本发明也提供含有一种或多种这类缀合物或复合物的组合物。根据本发明这一方面的组合物将含有一种或多种（如：一、二、三、四、五、十，等）本发明上述的缀合物或复合物。在一定的这些方面中，组合物可含有一种或多种附加成分，如：一种或多种缓冲盐类、一种或多种离液（chaotropic）试剂、一种或多种清洁剂、一种或多种蛋白质（如：白蛋白或者一种或多种酶）、一种或多种未结合的聚合物、一种或多种渗透活性剂，和类似物。本发明这一方面的组合物可为任何形式，包括固体（如：干燥粉末）或溶液（尤其是含有一种或多种本发明的缀合物的生理上兼容的缓冲盐溶液形式）。

A. 药物组合物

本发明的某些组合物特别制成用作在预防、诊断或治疗性应用中使用的药物组合物的配方。这类组合物通常含有一种或多种本发明的缀合物、复合物或组合物，及一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂。此处所使用的"药学上可接受的载体或赋形剂"一词是指引入该药物组合物的受体动物（包括人类或其它哺乳动物）所可以耐受的任何形式的非毒性固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、胶囊装填物质或配方佐剂，其加入后不会对组合物产生不良作用。

本发明的药物组合物可通过任何合适的施药模式施予受试者，如：通过口服、直肠、胃肠道外、系统内、阴道、腹膜内、局部（如：通过粉末、软膏、滴剂或穿皮贴片）、口颊途径，以口服或鼻喷雾或吸入形式来施予。此处所使用的"胃肠道外"一词是指施予模式，包括：静脉内、动脉内、肌肉内、腹膜内、脑池内、皮下和关节内注射和输注。

本发明所提供的用于胃肠道外注射的药物组合物可含有药学上可接受的无菌的水性的或非水性的溶液、分散液、悬浮液或乳剂，以及在使用前才加入以重组成无菌的注射溶液或分散液的无菌粉末。合适的水性和非水性载体、稀释剂、溶剂或媒介物的实例包括：水、乙醇、多元醇（如：甘油和类似物，丙二醇、聚（乙二醇））、羧甲基纤维素及其合适的混合物、植物油（如：橄榄油）和可注射的有机酯类（如：油酸乙酯）。维持合适的流动性的方法有，如：使用涂覆物质（如：卵磷脂），在分散液的情况中维持所需的颗粒大小，及使用表面活性剂。

这类本发明的药物组合物也可含有佐剂，如：防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。预防微生物的作用可通过包含不同抗菌和抗真菌剂，如：对羟基苯甲酸酯、苄基醇、氯丁醇、苯酚、山梨酸，和类似物来确保。在其中加入渗透剂，如：糖类、氯化钠，和类似物也可令人满意。可注射的药物形式可通过包含延迟吸收剂，如：单硬脂酸铝、水凝胶和明胶来延长吸收。

在某些情况中，为了延长药效，最好减慢从皮下或肌肉内注射中吸收的速度。这可通过使用在水性体液中溶解度较差的结晶型或无定型物质的液态悬浮液来完成。此时，药物的吸收速率是依赖其溶解速率，而这，接下来，也许就依赖于其物理形式。或者，经胃肠道外途径施予的药物形式可通过将药物溶解或悬浮在油性媒介物中来达到延迟吸收。

可注射的贮库形式是通过药物在可生物分解的聚合物如聚乳酸-聚甘油酸中形成微包囊基质而制备。根据药物对载体聚合物的比例和所使用的特殊载体聚合物的性质可控制药物释出的速度。其它可生物分解的聚合物的实例包括生物相容性的聚（原酸酯）和聚（酐）。可注射的贮库配方也可通过将药物截留在可与生理组织相容的脂质体或微乳剂内来制备。

可注射的配方可通过在使用前先将其通过细菌-保留滤器，或加入可溶解或分散在无菌水或其它无菌的可注射介质中的无菌固体组合物形式的杀菌剂来消毒。

用于口服给药的固体剂型包括胶囊、片剂、药丸、粉末及颗粒。在这类固体剂型中，活性化合物与至少一种药学上可接受的赋形剂或载体（如：柠檬酸钠或磷酸二钙），和/或如下物质混合：a）填充剂或延展剂，如：淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇及硅酸，b）黏合剂，如：羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯酮、蔗糖和阿拉伯树胶，c）保湿剂，如甘油，d）崩解剂，如：琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐，及碳酸钠，e）溶液阻滞剂，如：石蜡，f）吸收加速剂，如：季铵化合物，g）润湿剂，如：鲸蜡醇和甘油单硬脂酸酯，h）吸附剂，如：高岭土和皂土，及i）润滑剂，如：滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体 PEG、月桂基硫酸钠，及其混合物。在胶囊、片剂和药丸的情况中，剂型中也可含有缓冲剂。

类似类型的固体组合物也可用作使用赋形剂（如乳糖（奶糖）及高分子量 PEGs 和类似物）的软和硬-填充明胶胶囊的填充剂。

片剂、糖衣片、胶囊、药丸和颗粒的固体剂型可使用包衣和外壳，

如肠溶衣或择时调节包衣及其它药制剂领域中所熟知的包衣，来制备。其可随意地含有不透明剂，而也可是仅释放出活性成分的这类组合物，或者，优选的为：随意地以延迟的方式，在胃肠道中的某一部分释放。可使用的包埋组合物的实例包括聚合的物质及蜡。如果合适，也能以一种或多种上述赋形剂将活性化合物制成微包囊的形式。

用于口服给药的液体剂型可包括药学上可接受的乳剂、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂。除了活性化合物外，该液体剂型可含有本领域中常用的惰性稀释剂，如：水或其它溶剂、助溶剂和乳化剂，如：乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、醋酸乙酯、苺基醇、苺甲酸苺酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油类（尤其是棉籽、花生、玉米、胚芽、橄榄、蓖麻和芝麻的油）、甘油、四氢糠醇、聚（乙二醇）和山梨糖醇的脂肪酸酯，及其混合物。

除了惰性稀释剂外，口服组合物也可包含佐剂，如：润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂和香味剂。

除了活性化合物外，悬浮液可含有悬浮剂，如：乙氧基化的异硬脂醇、聚环氧乙烷山梨糖醇和山梨糖醇酐酯、微晶型纤维素、偏氢氧化铝、皂土、琼脂、西黄蓍胶，及其混合物。

局部给药包括施予皮肤或黏膜，包括肺和眼的表面。用于局部给药的组合物（包括那些用于吸入者）可制备成干粉形式，这些干粉可为经加压化，或非-加压化的。在非-加压化的粉末组合物中，精细分散形式的活性成分可与较大尺寸的药学上可接受的惰性载体（包含颗粒的大小为，例如，直径最大至 100 微米）一起混合使用。合适的惰性载体包括糖类，如：乳糖和蔗糖。令人满意的情况为，至少有 95%（重量%）的活性成分的颗粒具有在 0.01 至 10 微米范围内的有效颗粒尺寸。

或者，药物组合物可经过加压并含有压缩的气体，如：氮或液态气体推进剂。液态推进剂介质及组合物整体优选使得活性成分不会实质上溶解于其中。经过加压的组合物也可包含表面活性剂。表面活性剂可为液态或固态非-离子型表面活性剂，或可为固态阴离子型表面活性剂。

性剂。优选使用钠盐形式的固态阴离子型表面活性剂。

另一种局部给药的形式为眼部给药。在这种给药模式中，本发明的缀合物或聚合物是以药学上可接受的眼科媒介物递送，如此，活性化合物可维持与眼球表面接触一段足够的时间，以使化合物渗透入眼睛的结膜或角膜，以及内部区域，如：前室、后室、玻璃体、水液、玻璃液、角膜、瞳孔/睫毛、晶状体、脉络膜/网膜和巩膜。药学上可接受的眼科媒介物可以是，如：软膏、植物油或包封物质。

用于直肠或阴道给药的组合物宜为栓剂，其可通过将本发明的缀合物或组合物与合适的非-刺激性赋形剂或载体混合来制备，这些赋形剂或载体有，如：可可油、PEG 或栓剂蜡，其在室温时为固体，但在体温时为液体，因此，可在直肠或阴道腔中融化并释出药物。

本治疗方法中所使用的药物组合物也可以用脂质体形式施予。如本领域中所已知，脂质体通常是从磷脂或其它脂类物质衍生。脂质体是由分散在水性介质中的水化的单-或多-层液态结晶所形成。任何能形成脂质体的非毒性、生理上可接受并可代谢的脂类均可使用。除了本发明的一种或多种缀合物或组合物外，本脂质体形式的药物组合物也可含有一种或多种稳定剂、防腐剂、赋形剂和类似物。优选的脂类是天然与合成的磷脂和磷脂酰胆碱（卵磷脂）。形成脂质体的方法为本领域所已知（见，如：Zalipsky, S., 等, U.S. 专利第 5,395,619 号）。含有缀合至 PEG 的磷脂的脂质体（最普遍的为偶联至单甲氧基-PEG 的磷酸乙醇胺）具有有益的性质，包括在哺乳动物的血液循环中有延长的寿命（Fisher, D., U.S. 专利第 6,132,763 号）。

B. 用途

如本文中他处所述，本发明的方法、缀合物和组合物适合用于维持生物活性成分的生物可利用性，而不干扰生物成分结合到其受体的能力的方法中。本发明的某些这类方法可能需要将一种或多种缀合物和组合物递送至细胞、组织、器官或有机体。尤其是，本发明提供控制性地将一种或多种复合物或组合物的成分递送至细胞、组织、器官

或有机体的方法，从而提供使用者暂时性及空间性地调节特定成分的数量能力，该特定成分可释放出来对细胞、组织、器官或有机体具有活性。

一般而言，本发明这类方法涉及一种或多种活性。例如：一种本发明的这类方法包含：(a) 制备一种或多种如本文中所详述的本发明的缀合物或组合物；和 (b) 将一种或多种细胞、组织、器官或有机体与一种或多种缀合物或组合物在倾向于让一种或多种本发明的缀合物或组合物与细胞、组织、器官或有机体结合的条件下接触。一旦本发明的缀合物和/或组合物的生物活性成分已被细胞、组织、器官或有机体结合（或者，在某些情况中为内化）时，这些成分继续完成其所欲完成的生物功能。例如：肽成分可结合至在细胞、组织、器官或有机体上或其内的受体或其它成分；参与细胞、组织、器官或有机体内的代谢反应；在细胞、组织、器官或有机体实现正调节或活化，或逆向调节或抑制一种或多种酶的活性；提供细胞、组织、器官或有机体一种失去的结构成分；提供细胞、组织、器官或有机体一种或多种营养需要；抑制、治疗、逆转或减轻一种疾病或身体障碍的一种或多种过程或症状；以及类似情况。

在其它实施方案中，由于本发明的缀合物的生物活性成分具有出人意料的高效力，因此可将该缀合物和组合物用于工业细胞培养中，而该缀合物的高效力是由于其生物活性被充分保留及作用期增加（即使是在工业用途的苛刻条件下）的合并效果造成的。这些本发明缀合物的出人意料的高效力可导致不寻常的高生物量产量，不寻常的高重组蛋白表达水平，并改善其它生物过程的效率。

C. 剂量方案

本发明的缀合物、复合物或组合物可经体外、离体、或体内途径施予细胞、组织、器官或有机体，以将一种或多种生物活性成分（也就是一种或多种细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素或其拮抗剂）递送至该处。本领域中的一般技术人员认同，指定的活性化合物、

缀合物、复合物或组合物的有效量，可实验性地测定，和，可以以纯化形式使用，或当此形式存在时以药学上可接受的配剂或前体药物形式使用。本发明的化合物、缀合物、复合物或组合物也许以兽医或药物组合物加上一种或多种药学上可接受的赋形剂的形式施予有此需要的动物（包括哺乳动物，如：人类）患者。用于任何特殊患者的治疗上的有效剂量水平可根据多种因素决定，包括：欲实现的细胞反应的类型和程度；所使用的特殊化合物、缀合物、复合物或组合物的特性和/或活性；患者的年龄、体重或表面积、一般健康情况、性别和饮食；给药时间、给药途径、及活性化合物的排泄速度；治疗期；与该特殊化合物、缀合物、复合物或组合物组合或同时使用的其它药物；药学和医学领域中的一般技术人员所熟知的其它类似因子。例如：指定的本发明的化合物、缀合物、复合物或组合物的开始剂量比实现期望疗效所需的剂量低，再逐渐增加剂量直到取得期望疗效，这点为本领域的技术人员所熟知。

剂量方案可能也以患者-特异性的方式安排，以提供血液中指定活性化合物的预定浓度，该预定浓度可通过本领域中可接受和例行的技术测定，如：大小-排阻法、离子交换法或反相高效液相层析法（"HPLC"）、生物分析或免疫分析。因此，患者的剂量方案可经过调整，以取得相当固定的血中浓度（根据医学、制药和/或药学技术中的一般技术人员所熟知的方法，如：通过 HPLC 或免疫分析测量得知）。

D. 诊断和治疗用途

本发明的缀合物的诊断用途可用来找出动物（尤其是人类）体内对细胞因子、趋化因子、生长因子或肽激素具有不寻常的高结合能力的细胞或组织（如：癌症）的位置，这是通过将本发明的缀合物或组合物施予动物来进行，其中所述缀合物（或一种或多种成分，也就是生物活性成分和/或合成性聚合物）被标记上或含有一种或多种可探测到的标记，以使缀合物可被探测到，如：根据本领域中的已知方法的光学、放射线测定、荧光或共振探测。例如：大部分的非-小细胞肺癌

会表达出异常高浓度的表皮生长因子的受体 (Bunn, P. A., 等, (2002) *Semin Oncol* 29 (Suppl 14): 38-44)。因此, 在本发明的另一方面中, 本发明的缀合物和组合物可用在诊断或治疗方法中, 例如: 对易患上或患有多种身体疾病的动物尤其是哺乳动物如人体内的这类疾病的诊断、治疗或预防。在这类方法中, 治疗目标是延迟或预防疾病的发展, 和/或治愈疾病、诱导或维持疾病减缓, 和/或减少其它治疗方案的副作用, 或使其减至最少。

因此, 本发明的缀合物、复合物和组合物可用来保护、抑制或治疗身体病症如感染或疾病。此处所使用的"保护"不受身体病症影响一词包含"预防"、"抑制"和"治疗"。"保护"涉及在诱出疾病或身体病症之前施予本发明的复合物或组合物, 而"抑制"涉及在疾病的临床表现出来之前施予本发明的复合物或组合物; 因此, 身体病症的"预防"和"抑制"通常是在易患疾病或对其具有易感性, 但仍未受苦于此的动物体内进行。然而, "治疗"身体病症涉及在疾病的临床表现出来后施予本发明的治疗性复合物或组合物。需要被理解的是, 在人类和兽医学中, 并非总能区分"预防"和"抑制"身体疾病。在许多情况中, 最终的诱导事件可能是未知或潜伏的, 且患者和医疗人员可能需要直到诱导事件完全发生后才知道。因此, 常使用"预防性的"一词来区别"治疗", 以包含此处所定义的"预防"和"抑制"。因此, 根据本发明的方法所使用的"保护"一词是包括"预防疾病的"。根据本发明这一方面的方法可含有一种或多种步骤, 以使临床医生能达成上述治疗目标。本发明的这类方法之一包含, 例如: (a) 鉴别患有或易患某种身体疾病的动物(优选哺乳动物, 如: 人类); 及 (b) 施予该动物一种或多种有效量的如此处所描述的本发明缀合物、复合物或组合物, 这样, 该施予的缀合物、复合物或组合物就可预防、延迟或诊断动物体内的身体病症的发展, 或治愈疾病, 诱使身体疾病减缓或维持减缓。

本文中, "易患"某种身体病症的动物是定义为一种动物并未显示出多种明显的疾病的生理症状, 但遗传上、生理上或其它方面却具有发展出该疾病的风险。在本方法中, 对动物(如: 哺乳动物, 包括人

类)是否易患,处于患病风险中或患有有一种指定的身体疾病的鉴别可根据一般临床医生所熟悉的本领域中已知的标准方法完成,包括,如:放射分析、生化分析(如:分析从动物取得的样本中的特殊肽、蛋白质、电解质,等的相关水平)、外科方法、遗传筛选、家族史、生理触诊法、病理或组织学试验(如:组织或体液样本或涂片的显微镜评估、免疫分析,等)、体液的测试(如:血液、血清、血浆、脑脊液、尿液、唾液、精液和类似物),影像(如:放射学、荧光、光学、共振(如:利用核磁共振("NMR")或电磁共振("ESR")),等。一旦动物已通过一种或多种这类方法得到鉴别,可将动物积极和/或准备性进行治疗,以预防、抑制、延迟或治愈该身体疾病。

可用本发明的缀合物、复合物、组合物和方法来预防、诊断或治疗的身体病症包括任何可在预防、诊断或治疗中使用缀合物或组合物的生物活性成分(代表性的是,细胞因子、趋化因子、生长因子或多肽激素或其拮抗剂)的身体疾病。这类疾病包括,但不限于:多种癌症(如:乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、白血病、淋巴瘤、肺癌、神经癌、皮肤癌、头颈癌、骨癌、大肠癌和其它胃肠道癌、胰癌、膀胱癌、肾癌和其它恶性肿瘤、肉瘤、腺癌及骨髓瘤);医源性疾病;感染性疾病(如:细菌病、真菌病、病毒病(包括:肝炎,由亲心性病毒(cardiotropic virus)引起的疾病;HIV/AIDS和类似的类型)、寄生虫病,等);遗传病(如:纤维囊肿、肌萎缩性侧索硬化、肌营养不良症、高歇氏病、蓬珀病、严重的联合免疫缺陷症("SCID")、侏儒病和类似的类型)、贫血、嗜中性白细胞减少症、血小板减少症、血友病及其它血液病;神经变性疾病(如:多发性硬化症、克-雅病、阿尔兹海默氏症,和类似类型);酶性疾病(如:痛风、尿毒症、血高胆固醇症,等);不确定或多病灶病原的异常(如:心血管病、高血压、炎症性肠病和类似类型);自体免疫疾病(如:系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、牛皮癣和类似类型)和一般技术人员所易熟悉的医学上重要的其他疾病。本发明的缀合物、复合物、组合物和方法也可用于预防疾病的进展,如:用于预防恶化前病灶进展为恶化病灶的化

学预防法。

因此,本发明的治疗方法是使用本发明的一种或多种缀合物、复合物或组合物,或本发明的一种或多种药物组合物,这些物质能以口服或鼻喷雾或吸入形式通过多种途径施予有此需要的动物,这些途径包括:通过口服、直肠、胃肠道外(包括静脉内、动脉内、肌肉内、腹膜内、脑池内、皮下和关节内注射和输注)、系统内、阴道、腹膜内、局部(如:通过粉末、软膏、滴剂或穿皮贴片)、口颊途径,以口服或鼻喷雾形式,或通过吸入来给药。通过本发明,可将有效量的缀合物、复合物或组合物在体外、离体或体内施予细胞、或患有或易患某种特定疾病的动物,以此而预防、延迟、诊断或治疗动物体内的疾病。此处所使用的"有效量的缀合物(或复合物或组合物)"是指能让缀合物(或复合物或组合物)实现该缀合物、复合物或组合物的生物活性成分(也就是细胞因子、趋化因子、生长因子、多肽激素或其拮抗剂)的生物活性,以此而预防、延迟、诊断、治疗或治愈被施用了本发明的缀合物、复合物或组合物的动物的身体疾病。一般技术人员认同本发明的缀合物、复合物或组合物的有效量可根据药学和医学领域中一般技术人员所熟知的标准方法,以实验方式测定;见,如:Beers, M. H., 等, eds. (1999) *Merck Manual of Diagnosis & Therapy*, 17th edition, Merck and Co., Rahway, NJ; Hardman, J. G., 等, eds. (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th edition, McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York; Speight, T. M., 等, eds. (1997) *Avery's Drug Treatment*, 4th edition, Adis International, Auckland, New Zealand; Katzung, B. G., editor (2000) *Basic and Clinical Pharmacology*, 8th edition, Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York; 这些参考文献及其中所列举的参考文献内容全部合并为本文的参考。

需要理解的是,当施予人类患者时,本发明的缀合物、复合物和组合物的每日、每周或每月的总剂量将由主治医生在合理的医疗判断范围内决定。例如:通过以取决于所使用的特殊生物活性化合物的合

适剂量，施予本发明的某些缀合物、复合物或组合物，而取得令人满意的结果，这些剂量对本领域中的一般技术人员而言很熟悉，或可很容易地仅利用常规实验，实验性地测定。根据本发明的这一方面，该缀合物、复合物或组合物可一次给完，或以分开的剂量施予，如：每天一次或二次，或每周一次或二次，或每月一次或二次，等。用于不同给药模式（如：胃肠道外、皮下、肌肉内、眼内、鼻内，等）的合适的剂量方案也可根据缀合物、复合物或组合物的生物活性成分（也就是，细胞因子、趋化因子、生长因子、多肽激素或其拮抗剂）仅利用常规实验而实验性地测定，或对本领域中的一般技术人员很容易明白。

在其它应用中，本发明的缀合物、复合物或组合物可用于将诊断或治疗剂特异地靶向于那些表达出缀合物、复合物或组合物的（可结合、整合或摄入生物活性成分即细胞因子、趋化因子、生长因子、多肽激素或其拮抗剂的）受体的细胞、组织、器官或有机体。根据本发明这一方面的方法可包含，如：将一种或多种本发明的缀合物、复合物或组合物（其另外含有一种或多种诊断或治疗剂）与细胞、组织、器官或有机体接触，以使缀合物、复合物或组合物可被细胞、组织、器官或有机体结合或摄入，从而将诊断或治疗剂递送至细胞、组织、器官或有机体。根据本发明这一方面所使用的诊断或治疗剂，可以是但不限于，至少一种选自下列的试剂：核酸、有机化合物、蛋白质或肽、抗体、酶、糖蛋白、脂蛋白、某种元件、脂类、糖类、同位素、碳水化合物、成像剂、可探测的探针，或其任何组合，它们可按本文的描述加上标记来探测。本发明这一方面中所使用的治疗剂可对靶细胞（或组织、器官或有机体）具有治疗效应，这些效应选自但不限于：修正有缺陷的基因或蛋白质、药物作用、毒性作用、生长刺激作用、生长抑制作用、代谢作用、催化作用、合成代谢作用、抗病毒作用、抗真菌作用、抗细菌作用、激素作用、神经液作用、细胞分化刺激作用、细胞分化抑制作用、神经调节作用、抗瘤形成状态作用、抗肿瘤作用、胰岛素刺激或抑制作用、骨髓刺激作用、多能干细胞刺激作用、

免疫系统刺激作用及任何其它已知的以本发明这一方面的递送系统将治疗剂递送至细胞（或组织、器官或有机体）而提供的治疗性效应。

这类另外的治疗剂可选自，但不限于：已知和新颖的化合物及组合物，包括：抗生素、胆固醇、细胞毒性剂、血管作用药物、抗体和其它治疗剂。这类试剂的非限制性实例包括：抗生素及其它用于治疗细菌性休克的药物，如：庆大霉素、妥布霉素、萘夫西林、非经胃肠道的头孢菌素，等；肾上腺皮质类固醇及其类似物，如：地塞米松（dexamethasone），可减缓由内毒素所引起的细胞损伤；血管作用药物，如： α 肾上腺素受体阻断剂（如：苯氧基苄胺）、 β 肾上腺素受体激动剂（如：异丙基肾上腺素），及多巴胺。

本发明的缀合物、复合物和组合物也可用于诊断疾病和监测治疗反应。在某些这类方法中，本发明的缀合物、复合物或组合物可含有一种或多种可探测性标记（如本文其它部分所描述的）。在这类特殊方法中，这些可探测的经标记的本发明缀合物、复合物或组合物可用于对那些表达出缀合物、复合物或组合物的（可结合、整合或摄入生物活性成分即细胞因子、趋化因子、生长因子、多肽激素或其拮抗剂的）受体的细胞、组织、器官或有机体进行探测。在这类方法的某一实施例中，将细胞、组织、器官或有机体与一种或多种本发明的缀合物、复合物或组合物在倾向于让细胞、组织、器官或有机体结合或摄入缀合物的条件下接触（如：通过将缀合物结合至细胞表面受体，或让缀合物通过胞饮作用或扩散作用进入细胞），然后利用对所使标记专一的探测方法（如：用于荧光标记的缀合物的荧光探测法；用于磁性标记的缀合物的磁共振成像法；用于放射标记的缀合物的放射成像法等）来探测结合到或整合进细胞的缀合物。这类可探测的经标记的缀合物的其它用途包括，如：通过施予有效量的一种或多种本发明缀合物的标记形式，并测量与细胞、组织、器官或有机体（或动物）结合的可探测的辐射来将细胞、组织、器官或有机体或动物（包括人类）的内部结构成像。探测不同类型标记的方法，及其于诊断和治疗成像中的用途，为本领域中的一般技术人员所熟知，并描述于本文其它部

分。

在另一方面中，本发明的缀合物和组合物可用来调节位于细胞表面上的（缀合物的生物活性成分的）特殊受体的浓度或活性。“调节”给定受体的活性一词，是指当缀合物结合至受体时，可通过受体的介导来活化或抑制生理活性（如：胞内信号级联反应）。不倾向于被任何对本发明缀合物调节活性的特殊机制的解释所限制，这类缀合物可通过缀合物的生物活性成分结合至受体来拮抗细胞受体的生理活性，从而阻断天然激动剂（如：未缀合的生物活性成分）的结合，并防止受体被天然激动剂活化，而不会诱发受体本身生理活性的充分活化。根据本发明这一方面的方法可含有一种或多种步骤（其可在体外、离体或体内进行），如：将细胞与一种或多种本发明的缀合物在能让缀合物（也就是缀合物的生物活性成分）连接到细胞表面的生物活性成分受体，但不会充分活化受体的条件下接触。这类方法将在多种诊断及治疗性应用中有用，如本领域一般技术人员所容易认同的一样。

试剂盒

本发明也提供含有本发明的缀合物和/或组合物的试剂盒。这类试剂盒代表性地含有载体，如：盒子、纸盒、管子和类似物，其中有一个或多个密闭限制性的容器，如：玻璃瓶、试管、小玻璃瓶、瓶子、针筒和类似物，其中第一个容器内含有一种或多种本发明的缀合物和/或组合物。本发明这一方面所包含的试剂盒还进一步包含一种或多种完成本发明的缀合物和组合物的一种或多种特殊应用时所需要的其它成分（如：试剂和化合物），例如，一种或多种用于诊断、治疗或预防特殊疾病或身体疾病的成分（如：一种或多种另外的治疗性化合物或组合物，一种或多种诊断试剂，一种或多种载体或赋形剂和类似物），一种或多种本发明的其它缀合物或组合物，和类似物。

相关领域的一般技术人员可很容易明白，其它可用来修饰和适应本文中所描述的方法和应用的合适的方法可被设计出，而不背离本发明的范围或其任何实施方案。现在已对本发明进行详细描述，本发明

的内容在参考下列实施例后将更容易了解，这些实施例仅用来说明，而非用来限制本发明。

实施例

实施例 1: PEG-干扰素- α 缀合物

干扰素- α 是一种商业化的重要的医用蛋白质，2001 年时全球市场超过 20 亿美元，其主要用于治疗感染丙型肝炎病毒 ("HCV") 的患者。在美国，有 3 至 4 百万人感染慢性丙型肝炎病毒，且每年约有 10000 人的死因与 HCV 有关 (Chander, G., 等, (2002) *Hepatology* 36: 5135-5144)。在改善干扰素- α 的用处的努力中，负责干扰素- α 的发展和销售的两个主要公司 (先灵-普洛 (Schering-Plough) 公司和罗氏 (F. Hoffmann-La Roche AG) 公司) 已发展出带有单甲氧基聚 (乙二醇) 或 "mPEG" 的干扰素- α 的缀合物，并已商业性发布该产品。在每一情形中，mPEG 仅在一个附着点上与干扰素- α 的每个分子连接。在每一情形中，产品包含了与未修饰的干扰素相比，受体-结合活性显著降低的位置异构体的混合物。在每一情形中，正如通过每周注射一次缀合物 (与每周注射三次未修饰的蛋白质，以治疗 HCV 的慢性感染相比) 所得到的改善的临床效力所测出的，因 PEG 缀合作用导致的缀合物在体内的生物可利用性和作用期的增加补偿了体外生物活性的降低，而且增加的效力大于降低的效力。(Manns, M. P., 等, (2001) *Lancet* 358: 958-965)。

在罗氏公司的 PEG-干扰素- α -2a 缀合物，PEGASYS® 中，20-kDa mPEG 的二条链偶联至单一赖氨酸联结子上 (因此称为 "支链型 PEG")，该联结子主要连接至 Lys31、Lys121、Lys131 或 Lys134 中的一个 (这四个都在干扰素- α -2a 的受体-结合结构域 (见图 1a 中的结合位置 1 和 SEQ ID NO: 1) 内或邻近于此区) (Bailon, P., 等, 如上述)。

在先灵-普洛公司的 PEG-干扰素- α -2b 缀合物中，一条 12-kDa mPEG 的单链主要偶联至位置 34 的组氨酸残基 (His 34; Wylie, D. C., 等, 如上述; Gilbert, C. W., 等, U.S. 专利第 6,042,822 号; Wang,

Y.-S., 等, 如上述), 它是位于对结合受体而言重要的区域内(见图 1b)。其它在先灵-普洛公司的 PEG-INTRON 产物中的 PEG 连接位置(Lys121、Tyr129 和 Lys131)也可在结合位置 1 中或其附近见到(见图 1b 和 SEQ ID NO: 2)。

相对于此两种商品, 本发明的缀合物具有连接到 N-端氨基酸残基的水溶性、合成性聚合物(优选 PEG 或 mPEG)的单链, 该 N-端氨基酸残基远离蛋白质的受体-结合区(见图 1c 和 1d 中 Cys-1 和结合位置间的空间关系), 这证明干扰素- α 是一种"RN"细胞因子。图 9 和 10 分别显示本发明的示范性 PEG-干扰素- α 缀合物的阳离子-交换和大小-排阻层析图。反应混合物中含有干扰素- α -2b, 其中附加的一个甲硫氨酸残基存在于氨基端, 位于 Cys-1 之前, 而 Cys-1 为天然序列的第一个残基。反应性 PEG 为 20-kDa 的 PEG-醛, 其以浓度 0.2mM 出现。还原剂为氰基硼氢化钠, 最终浓度为 14mM。反应进展是在 4°C 培育期间内, 定期通过大小-排阻层析法进行监测。如: C. W. Gilbert 等人关于 IFN- α 的描述(U. S. 专利第 5,711,944 号)和 R. B. Greenwald 等人关于 IFN- β 的描述(U. S. 专利第 5,738,846 号), 虽然 IFN- α 可充分溶解, 而在所述条件下被聚乙二醇化, 但其它细胞因子如 IFN- β 则相对不溶, 也许需要有表面活性剂存在才能被聚乙二醇化。

用于图 9 中所显示的分离反应的阳离子-交换柱为 ToyoPearl MD-G SP (1x6.8cm; Tosoh Biosep, 宾州蒙哥马利市), 它是在 20mM 醋酸钠缓冲液中, 用 0-0.4M NaCl 线性梯度(pH4.6)以流速 0.5 毫升/分来制备。用来取得图 10 中的数据的大小-排阻性柱为 Superdex®200 (HR10/30; 艾默森生物科学公司(Amersham Biosciences), 纽泽西州匹兹凯特威), 它是在含 150mM NaCl (pH4.6)的 20mM 醋酸钠缓冲液中, 以 0.5 毫升/分的速度进行洗脱。其它合适的离子-交换和大小-排阻层析介质及分离条件为本领域技术人员所已知。通过自动化艾德曼(Edman)降解对本发明的纯化的单 PEG- IFN- α -2b 进行的氨基端氨基酸分析, 证明超过 90%的 PEG 是附着在 N-端残基上。此分析是由合富生物技术(Commonwealth Biotechnologies)公司(维吉尼亚州

理奇蒙市)完成。

实施例 2: PEG-白介素-2 缀合物

白介素-2 ("IL-2") 是一种对某些癌症 (包括肾细胞癌和恶性黑色素瘤) 显示出免疫调节活性的细胞因子。然而, 临床效力不良, 结果是仅有小部分患者经历部分或完全的反应 (Weinreich, D.M., 等, (2002) *J Immunother* 25: 185-187)。IL-2 在血流中的半衰期短, 这使得其诱导癌症患者病症缓解的速度慢。通过将赖氨酸残基随机聚乙二醇化来使 IL-2 变得更有用的尝试仍不理想 (Chen, S.A., 等, (2000) *J Pharmacol Exp Ther* 293: 248-259)。将 PEG 选择性地附着至 IL-2 的糖基化位置的尝试 (Goodson, R.J., 等, 如上述), 或附着至含有半胱氨酸 (在残基 1 和 20 间) 的 IL-2 的非-必需半胱氨酸 (Cys125) 或其突变体的尝试 (Katre, N., 等, U.S. 专利第 5, 206, 344 号) 仍未得到临床上有用的产品。

图 4 显示涉及 IL-2 的受体-结合区的赖氨酸残基的分布, 其显示出许多的表面-易接近的赖氨酸残基是在涉及受体-结合的区域。事实上, Lys-35 和 Lys-43 已被鉴定为 IL-2 与 α -受体相互作用所必需, 这使人联想到通过将赖氨酸残基聚乙二醇化而将 IL-2 去活化的机制 (见 SEQ ID NO: 6)。图 4 也显示出 IL-2 的 N-端区远离蛋白质的受体-结合区, 这证明 IL-2 具有 "RN" 细胞因子的结构。我们的结论是 IL-2 是一种 "RN" 细胞因子, 这与 H. Sato, 等人 ((2000) *Bioconjug Chem* 11: 502-509) 的观察相符合, H. Sato, 等人是使用酶催化的转谷氨酰胺作用来将 10-kDa mPEG 的一或两条链偶联至序列 AQQIVM (作者们将其引入一个 IL-2 突变蛋白作为 N-端的延伸) 中的一或两个谷氨酰胺残基 ("Q")。Sato 等人报道: 通过突变蛋白的转谷氨酰胺作用而在接近 N-端处被聚乙二醇化的缀合物, 相对于通过将 IL-2 突变蛋白中的赖氨酸随机聚乙二醇化所制备的缀合物, 保留更多的生物活性。回顾用来将其它蛋白质聚乙二醇化的类似方法, 可参考 Sato, H., (2002), 如上述。如图 4 中所示, 基于 IL-2 的氨基端与蛋白质的受体-结合区间

的空间相隔,可理解到残基 Thr-3 (未显示)的糖基化位置使 IL-2 成为如本文中所定义的"RG"受体-结合蛋白质。因此,IL-2 同时为"RN"细胞因子和"RG"细胞因子。

图 11 和 12 分别显示本发明的示范性 PEG-IL-2 缀合物的阳离子-交换和大小-排阻层析图,该 PEG-IL-2 是通过如实施例 1 中的 N-端选择性、还原性烷基化反应而被聚乙二醇化。分离所使用的条件与图 9 和 10 图中所分别描述的相同。图 13 显示相同缀合物在通过离子-交换层析法进行纯化之前和之后(如图 11 中所示),进行的十二烷基硫酸钠存在下的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析("SDS-PAGE")。该凝胶含有在 Bis-Tris 缓冲液中的 4-12%总丙烯酰胺梯度(目录#NP0335,因维特金公司(Invitrogen),加州卡斯班市)。分析前,将样本(各含约 1-2 微克蛋白质)在 90℃加热 10 分钟。在 117-120 伏特的稳定电压下跑胶约 135 分钟,并同时冷却。以 Sypro®Ruby 蛋白质凝胶染料(分子探针公司,奥勒冈州尤金市)将一部分凝胶染色,其它部分则采用 C. E. Childs ((1975) *Microchem J* 20: 190-192) 和 B. Skoog ((1979) *Vox Sang* 37: 345-349) 的方法将 PEG 染色。将图 11 中的两个波峰处的纯化的单 PEG- IL-2 通过自动化的艾德曼降解进行氨基端氨基酸分析,结果证明超过 90%的 PEG 是附着在 N-端残基上。此分析是由合富生物技术公司(维吉尼亚州理奇蒙市)完成。

实施例 3: N-端聚乙二醇化的 EGF 和 IGF-1 的合成方法和分析

分别根据图 5 和 7 中的分子模型(其显示 EGF 和 IGF-1 为 RN 生长因子),选择表皮生长因子("EGF"; SEQ ID NO: 7)和胰岛素样生长因子-1("IGF-1"; SEQ ID NO: 9)来进行 N-端聚乙二醇化。将 5-kDa PEG-丙醛(NOF 公司,东京)溶解于 1mM HCl 中,使最终浓度成为 15 毫克/毫升,以制备 5-kDa PEG-醛的 3mM 溶液。将 35 微升(μL)的 8M 硼烷-吡啶(欧德里奇(Aldrich))在 0.3 毫升乙腈加 0.15 毫升水中稀释,使最终浓度成为 0.58M,而制备硼烷-吡啶。制备含有各为 0.2M 的磷酸钠和醋酸钠的缓冲液(pH6.3),将其通过 0.1 微米孔的无菌滤

器过滤。将来自因维特金公司（加州卡斯班市）的重组的人 EGF 溶解在水中，浓度为 1 毫克/毫升。在 0.6 毫升此溶液中加入 70 微升 3mM PEG-醛溶液、35 微升磷酸盐-醋酸盐缓冲液和 30 微升的 0.58M 甲硼烷-吡啶溶液，并将混合物冷藏。4-8℃培育四天后，在含有 100mM NaCl 的碳酸钠缓冲液（pH10.1）中，以 Superdex 75 HR 10/30 柱通过大小-排阻 HPLC 来分析样本等份，并通过 280nm 处的吸收和折射指数来监测洗脱液。在注入 0.65 毫升已培育 5 天的反应混合物后，从 280nm 的吸收主峰的中心收集组分。通过加入醋酸来将此混合物的 pH 值降至约 5.5。通过大小-排阻 HPLC 对此产物的混合物进行的再次分析指出：100%的蛋白质在对应于 PEG1-EGF（"单-PEG-EGF"）的位置处，而此混合物的蛋白质浓度为约 0.32 毫克/毫升。通过 SDS-PAGE 分析确定所有蛋白质是由 EGF 的单-PEG 缀合物所组成。在进行以细胞为基础的生物分析的测试（如实施例 4 的描述）前，先将产物混合物通过 0.2 微米孔的 Corning 针筒过滤器进行无菌过滤。以类似方法合成、纯化和分析 EGF 的 10-kDa PEG 缀合物，但用来自 NOF 公司的 10-kDa PEG-丙醛取代 5-kDa PEG-醛。10-kDa PEG 缀合物的最终蛋白质产物浓度为约 0.36 毫克/毫升。

通过所描述的用于对应的 EGF 缀合物的方法，将来自因维特金公司的重组的人类-胰岛素生长因子-1（"IGF-1"）的样本偶联至 5-kDa 或 10-kDa PEG-醛上。将 5-kDa PEG-醛与 IGF-1 偶联后，再按照关于 PEG-EGF 的描述来将缀合物纯化，所产生的产物是约 99%纯的单-PEG-IGF-1 缀合物，最终的蛋白质浓度为约 0.20 毫克/毫升。SDS-PAGE 分析可确定该蛋白质主要为单-PEG 缀合物。电泳分析也显示当装载在凝胶上的量很多时，有双-PEG 缀合物的印迹存在。将 10-kDa PEG-醛偶联至 IGF-1 的产物的大小-排阻 HPLC 分析指出：此产物是由 95%的单-PEG 缀合物和约 5%的二-PEG 缀合物所组成，而总蛋白质浓度为约 0.23 毫克/毫升。

实施例 4：N-端聚乙二醇化的 EGF 和 IGF-1 的生物分析

评估 EGF 和 IGF-1 的 N-端聚乙二醇化作用是否会降低个别生长因子的受体-结合能力是通过细胞培养分析来进行。在 PEG-EGF 的分析方面,按先前关于 EGF 的描述,使用 3T3 成纤维细胞(Crouch, M.F., 等, (2001) *J Cell Biol* 152: 263-273)。在 PEG-IGF-1 的分析方面,按先前关于 IGF-1 的描述,使用中国仓鼠卵巢("CHO")细胞(Amoui, M., 等, (2001) *J Endocrinol* 171: 153-162; Morris, A.E., 等, (2000) *Biotechnol Prog* 16: 693-697)。将按实施例 3 的描述所制备的 PEG-EGF 和 PEG-IGF-1 的产品混合物透过 0.2 微米孔 Corning 针筒滤器进行无菌过滤,然后在以细胞为基础的生物分析中进行测试。将经无菌过滤的 EGF 和与 5-kDa 和 10-kDa PEG 合成的单-PEG 缀合物的系列稀释物加入到培养基(其含有比理想生长所需更低的百分比的血清)中的 3T3 细胞培养物中。将细胞在标准条件(37℃, 5%CO₂/空气)下培养,并在一周中的数个间隔时间点以库特(Coulter)细胞计数器(Z1 型,佛罗里达州,迈阿密市)计算细胞。相对于未加入生长因子时所观察到的细胞数,本发明的单-PEG 缀合物所增加的细胞数百分比至少与未修饰的 EGF 所增加者相同。类似地,将无菌过滤后的 IGF-1 的单-PEG 缀合物和未修饰的 IGF-1 的系列稀释液加入到培养基(其含有比理想生长所需更低的百分比的血清)中的 CHO 细胞培养物中,并按上述关于 EGF 测试培养的描述来培养和计算细胞。如在 EGF 及其 N-端单-PEG 缀合物的试验中所观察到的,数天后观察细胞数目时,由 IGF-1 的单-PEG 缀合物所增加的细胞数百分比至少与未修饰的生长因子所增加者相同。因此,EGF 和 IGF-1 二者均被证明为 N-端聚乙二醇化后仍具有完全的功能,如同对于在远离受体-结合区的氨基酸残基上具有 PEG 附着的蛋白质的预期。

实施例 5: "RN"受体-结合蛋白质类群的成员和非成员

图 2、3 和 5-8 显示受体-结合蛋白质干扰素- β 、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子("GM-CSF")、表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子("bFGF", 本领域中也称为"FGF-2")、胰岛素样生长因子

-1 ("IGF-1") 和干扰素- γ ("IFN- γ ") 的赖氨酸残基相对于这些蛋白的受体-结合区的表面分布,并显示出这些蛋白质中哪些是"RN"细胞因子和生长因子。另外,图 2 显示干扰素- β 是"RG"细胞因子。

图 2 显示赖氨酸残基分布遍布于干扰素- β 的结合位置 1 和结合位置 2 的区中,而多肽链的氨基端则远离蛋白质的受体-结合区,这证明 IFN- β 为一种"RN"细胞因子(见 SEQ ID NO: 3)。

图 3 显示赖氨酸残基分布遍布于结合位置 1(与 GM-CSF 的 α 受体结合)和结合位置 2(与 GM-CSF 的 β 受体结合)的区域内,然而,多肽链的氨基端则远离蛋白质的受体-结合区,这证明 GM-CSF 为一种"RN"细胞因子(见 SEQ ID NO: 5)。

图 5 显示赖氨酸残基沿着表皮生长因子("EGF")的多肽链分布,包括那些在蛋白质的受体-结合区内或其附近的赖氨酸残基,然而多肽链的氨基端则更远离蛋白质的受体-结合区(见 SEQ ID NO: 7)。

图 6 显示碱性成纤维细胞生长因子("bFCF")的数个赖氨酸残基涉及结合到受体或肝素,这二者都是经由 bFCF 的信号转导所必需(Schlessinger, J., 等,如上述)。bFCF 的氨基端远离 bFCF 的肝素-结合区,也许充分远离受体-结合位置,而使 bFCF 成为一种 RN 生长因子(见 SEQ ID NO: 8)。

图 7 显示数个胰岛素样生长因子-1("IGF-1")的赖氨酸残基是在多肽的受体-结合区内或邻近此区,而 IGF-1 的氨基端则远离受体-结合结构域,证明 IGF-1 为一种"RN"生长因子(见 SEQ ID NO: 9)。

图 8 显示干扰素- γ ("IFN- γ ") 是以同型二聚体的形式存在,其中这两条多肽链有大量的相互作用。每一多肽的数个赖氨酸残基邻近于涉及与受体结合的 IFN- γ 的氨基酸残基,或在二聚体化作用的界面中的氨基酸残基。氨基酸残基 Gln-1 的"球-和-棒"版式涉及反映了关于此 N-端残基的功能重要性的证据。此图所依据的晶体结构包括一个不存在于天然蛋白质中的附加的甲硫氨酸残基(标记为"Met0") (见 SEQ ID NO: 4)。由于 IFN- γ 的 N-端残基远离二聚体化作用的界面,因此, N-端的聚乙二醇化可避免赖氨酸聚乙二醇化对 IFN- γ 的同型二

聚体化反应的抑制作用。另一方面,二聚体与其受体的相互作用很可能通过将聚合物偶联至氨基端而受到抑制,尤其是当附着于聚合物的长链时。

IFN- γ 、IL-10 和干细胞因子是以同型二聚体形式作用的细胞因子的实例(Walter, M.R., 等,如上述; Josephson, K., 等, (2000) *J Biol Chem* 275: 13552-13557; Thiel, D.J., 等,如上述; McNiece, I.K., 等,如上述)。受体-结合蛋白质的二聚体化作用为确定这些蛋白的 N-端单-聚乙二醇化的缀合物的特征提出了特别的争议,因为不同的可能的分子结构均可出现在具有类似或相等大小及形状的缀合物的制品中。例如:由一个双-聚乙二醇化单体及一个未聚乙二醇化的单体所组成的二聚体($\text{PEG}_2\text{-蛋白质}_1 + \text{蛋白质}_1$)可能很难或不可能通过大部分的以大小为基础的二聚体性缀合物的分析(如:大小-排阻层析法或沉淀系数、光散射或扩散系数的评估)来与由两个 N-端聚乙二醇化的单体所组成的二聚体($\text{PEG}_1\text{-蛋白质}_1$)₂ 区分,而这两种缀合物(各缀合物包含每一蛋白质单体一个 PEG 的平均值)的受体-结合效力可能相当不同。

在形成同型三聚体的长链 β -折叠受体-结合蛋白质如肿瘤坏死因子 α ("TNF- α ") 方面, $\text{PEG}_3\text{-蛋白质}_3$ 三聚体的异构体的数目甚至比在溶液中产生的同型二聚体形式的受体-结合蛋白质还多。由于在 TNF 近氨基端的化学修饰显示出可将此细胞因子去活化(Utsumi, T., 等, (1992) *Mol Immunol* 29: 77-81), 因此,当在某些选择 N-端残基的条件下,以试剂将 TNF- α 聚乙二醇化时, TNF- α 可能无法充分保留活性。然而, TNF- α 的拮抗剂(如: Apo2L/TRAIL) (Hymowitz, S.G. 等 (2000), *Biochemistry* 39: 633-640) 适合利用本发明进行聚乙二醇化。

确定那些以寡聚物形式作用的细胞因子的缀合物的特征时,需要数种分析方法的组合。氨基端序列分析可探测是否有带游离 N-端 α 氨基的单体存在,而解离的单体的电泳分析(如: SDS-PAGE 或毛细管电泳)可显示是否有受体-结合蛋白质的未聚乙二醇化和多重-聚乙二醇

化的单体存在。没有这类证据时，无法清楚证明这类同型二聚体-形成性和同型三聚体-形成性蛋白质的单-聚乙二醇化缀合物的合成。

这些实施例，尤其是通过图 1 至 8 图解说明者，对理解（受体-结合蛋白在这些生物活性成分的受体-结合结构域内或相邻位置的）聚乙二醇化作用对蛋白质-受体相互作用的立体遮蔽的可能功能，提供了容易形象化的基础。如果 PEG 是在单体间相互作用所需的区域中偶联，则可高度延展及有弹性的 PEG 链（见图 1d）所占据的大体积也会在空间上阻隔某些受体-结合蛋白质的单体联结成功能性的同型二聚体或同型三聚体。因此，将聚乙二醇化作用靶向于远离受体-结合蛋白质的受体-结合区的位置，可减少聚乙二醇化作用干扰分子间的相互作用（为其功能所必需）的可能性。根据本发明的方法进行受体-结合蛋白质的聚乙二醇化反应时可获得较预期更多的益处。所产生的缀合物将所预期的改善溶解度、增加生物可利用性、更强的稳定性和降低的免疫原性这些益处与出乎意料的高的生物活性的保留组合了起来。

本发明参考某些实施方案及其某些实施例来做说明。本发明的方法可类似地应用于除了细胞因子、趋化因子、生长因子和多肽激素或其拮抗剂外的受体-结合肽和蛋白质，及其它缀合试剂上。因此，本发明的范围不限于所描述的实施方案，而仅限于权利要求书的范围。本领域一般技术人员很容易认同其它实施方案可不背离本发明的范围而实行。所有这类变化均被视为本发明的部分。

所有本专利申请书中所提及的公开内容、专利和专利申请书是本发明所属领域的技术人员的技术水平的指示，且被合并为本文的参考文献，如同每一独立的公开内容、专利或专利申请书被具体而独立地指出而合并成本文的参考资料一样。

<110> Mountain View Pharmaceuticals, Inc.
3475-S Edison Way
Menlo Park, California 94025
United States of America

<120> 具有保留的受体结合活性的细胞因子、趋化因子、生长因子、多肽激素及其拮抗剂的
聚合物缀合物

<130> 2057.006PC02/JAG/BJD

<140> (To be assigned)

<141> 2003-12-23

<150> US 60/479,914

<151> 2003-06-20

<150> US 60/436,020

<151> 2002-12-26

<160> 9

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 165

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met

1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp

20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln

35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe

50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu

65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
 85 90 95
 Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
 100 105 110
 Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
 115 120 125
 Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
 130 135 140
 Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160
 Leu Arg Ser Lys Glu
 165

<210> 2
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 2
 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
 1 5 10 15
 Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30
 Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
 35 40 45
 Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
 50 55 60
 Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
 65 70 75 80
 Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
 85 90 95
 Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
 100 105 110
 Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
 115 120 125
 Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
 130 135 140
 Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160
 Leu Arg Ser Lys Glu
 165

<210> 3
 <211> 166

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

```

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
1           5           10           15
Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
           20           25           30
Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
           35           40           45
Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
           50           55           60
Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
65           70           75           80
Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
           85           90           95
His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
           100          105          110
Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
           115          120          125
Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
           130          135          140
Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
145          150          155          160
Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
           165

```

<210> 4

<211> 143

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

```

Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
1           5           10           15
Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
           20           25           30
Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
           35           40           45
Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
           50           55           60

```

Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
 65 70 75 80
 Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
 85 90 95
 Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
 100 105 110

Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
 115 120 125
 Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala Ser Gln
 130 135 140

<210> 5
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 5
 Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val
 1 5 10 15
 Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr
 20 25 30
 Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe Asp
 35 40 45
 Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln
 50 55 60
 Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met
 65 70 75 80
 Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys
 85 90 95
 Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp
 100 105 110
 Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
 115 120 125

<210> 6
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 6
 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1	5	10	15
Leu Leu Leu Asp	Leu Gln Met Ile	Leu Asn Gly Ile	Asn Asn Tyr Lys
20	25	30	
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met	Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met	Pro Lys	
35	40	45	
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys			
50	55	60	
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu			
65	70	75	80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu			
85	90	95	
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala			
100	105	110	
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile			
115	120	125	
Ile Ser Thr Leu Thr			
130			

<210> 7
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 7
 Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His
 1 5 10 15
 Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn
 20 25 30
 Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys
 35 40 45
 Trp Trp Glu Leu Arg
 50

<210> 8
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 8
 Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly Gly Ser Gly Ala Phe Pro Pro Gly His

```

1           5           10           15
Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu
           20           25           30
Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp
           35           40           45
Pro His Ile Lys Leu Gln Leu Gln Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser
           50           55           60
Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly
65           70           75           80
Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu
           85           90           95
Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr
           100          105          110
Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser
           115          120          125
Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala
           130          135          140
Lys Ser
145

```

```

<210> 9
<211> 70
<212> PRT
<213> 智人

```

```

<400> 9
Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe
1           5           10           15
Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly
           20           25           30
Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys
           35           40           45
Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu
           50           55           60
Lys Pro Ala Lys Ser Ala
65           70

```

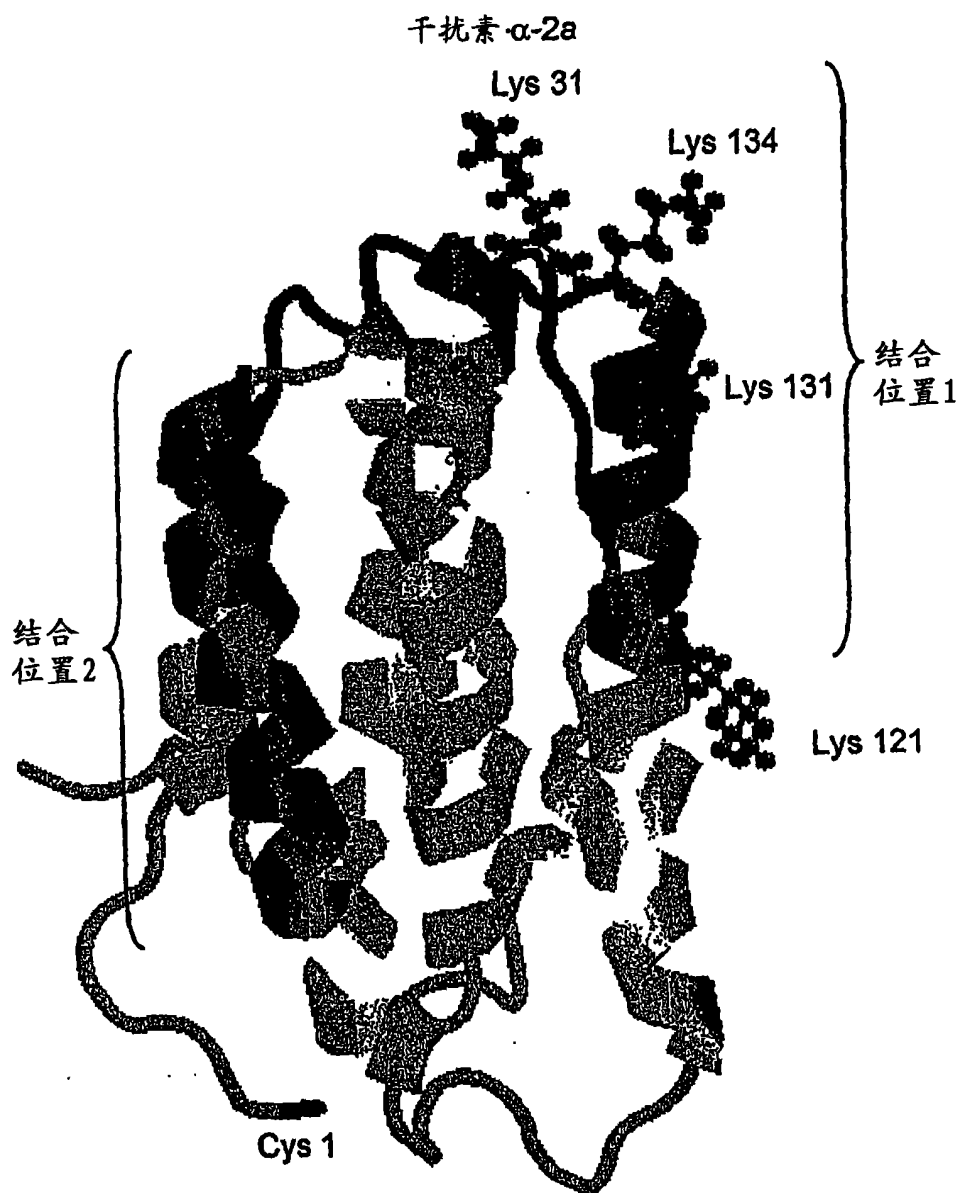


图 1a

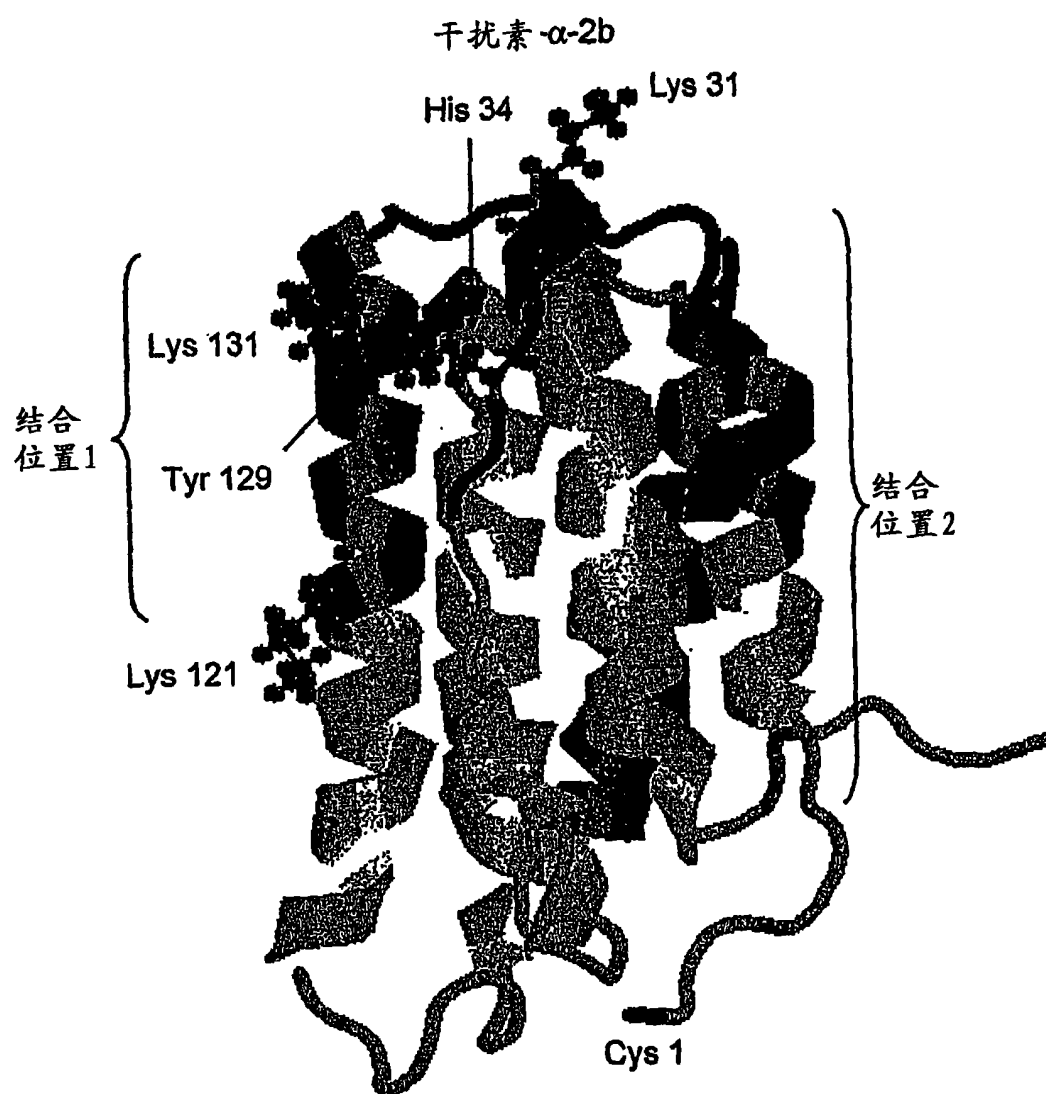


图1b

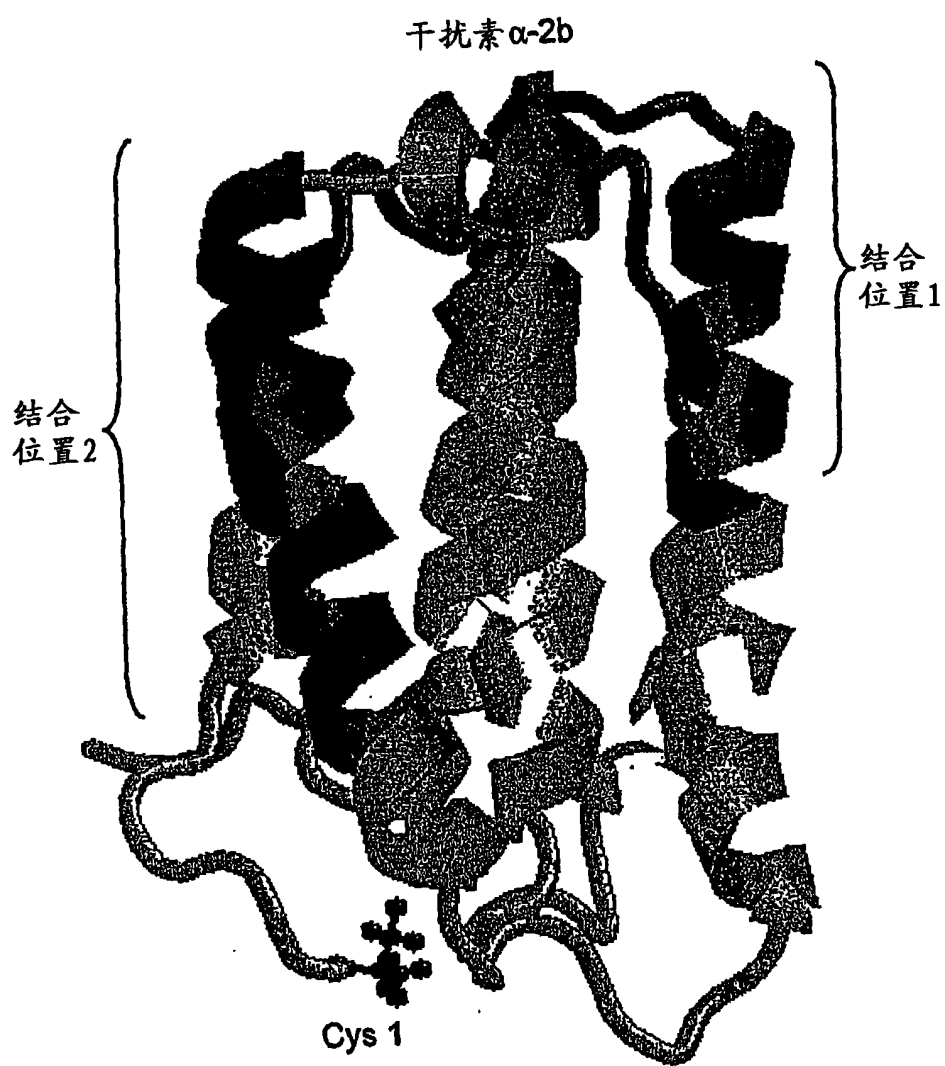


图1c

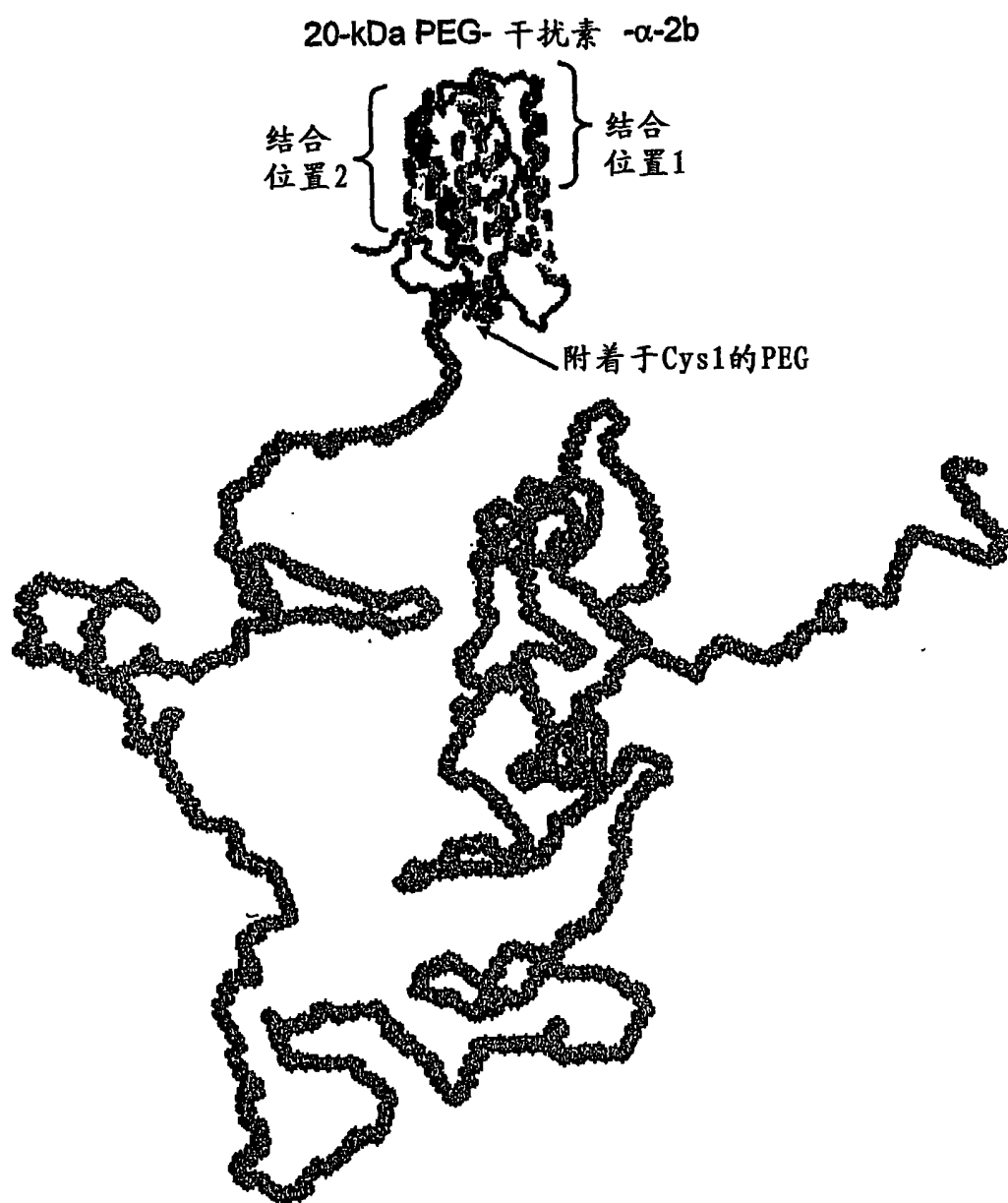
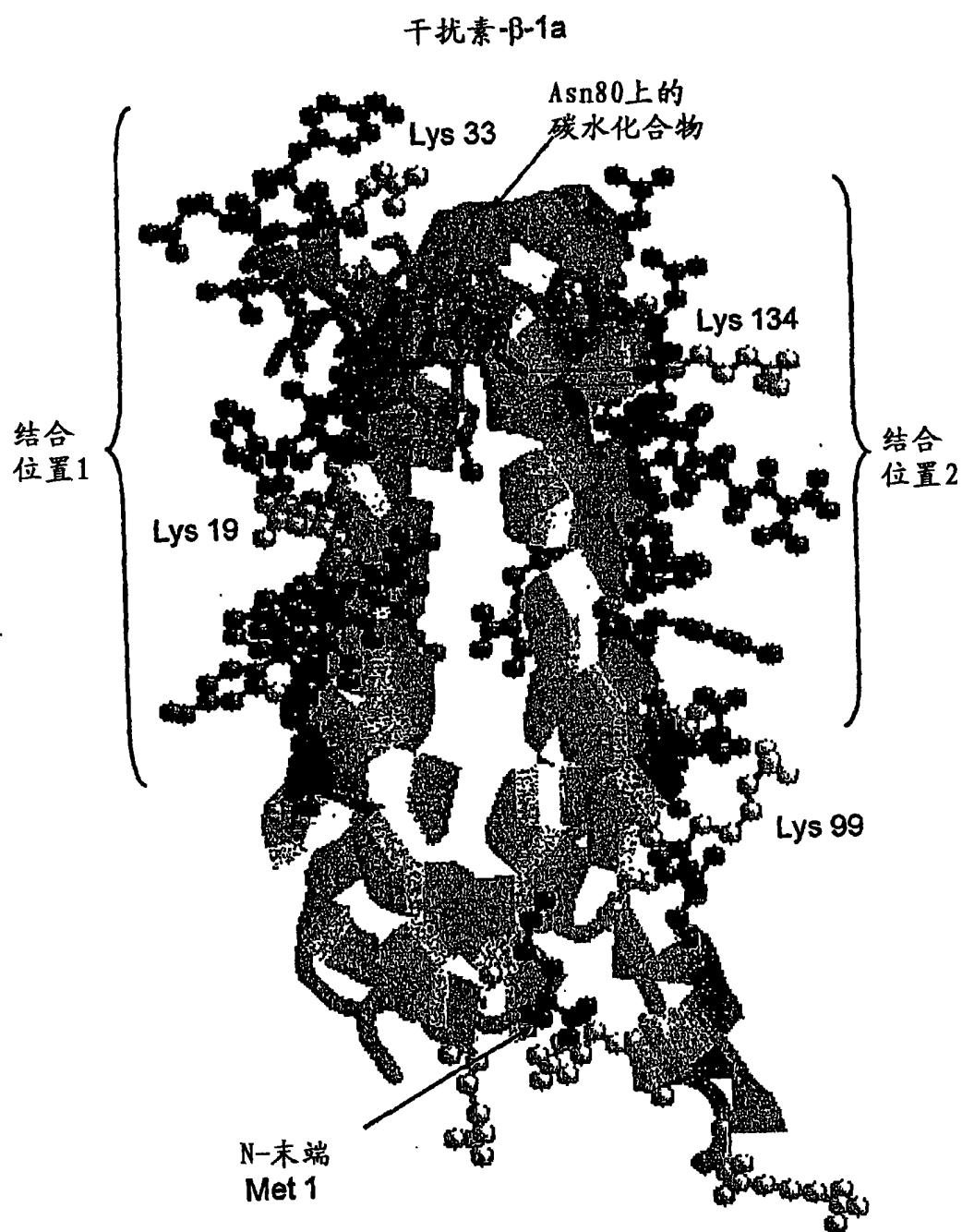


图 1d



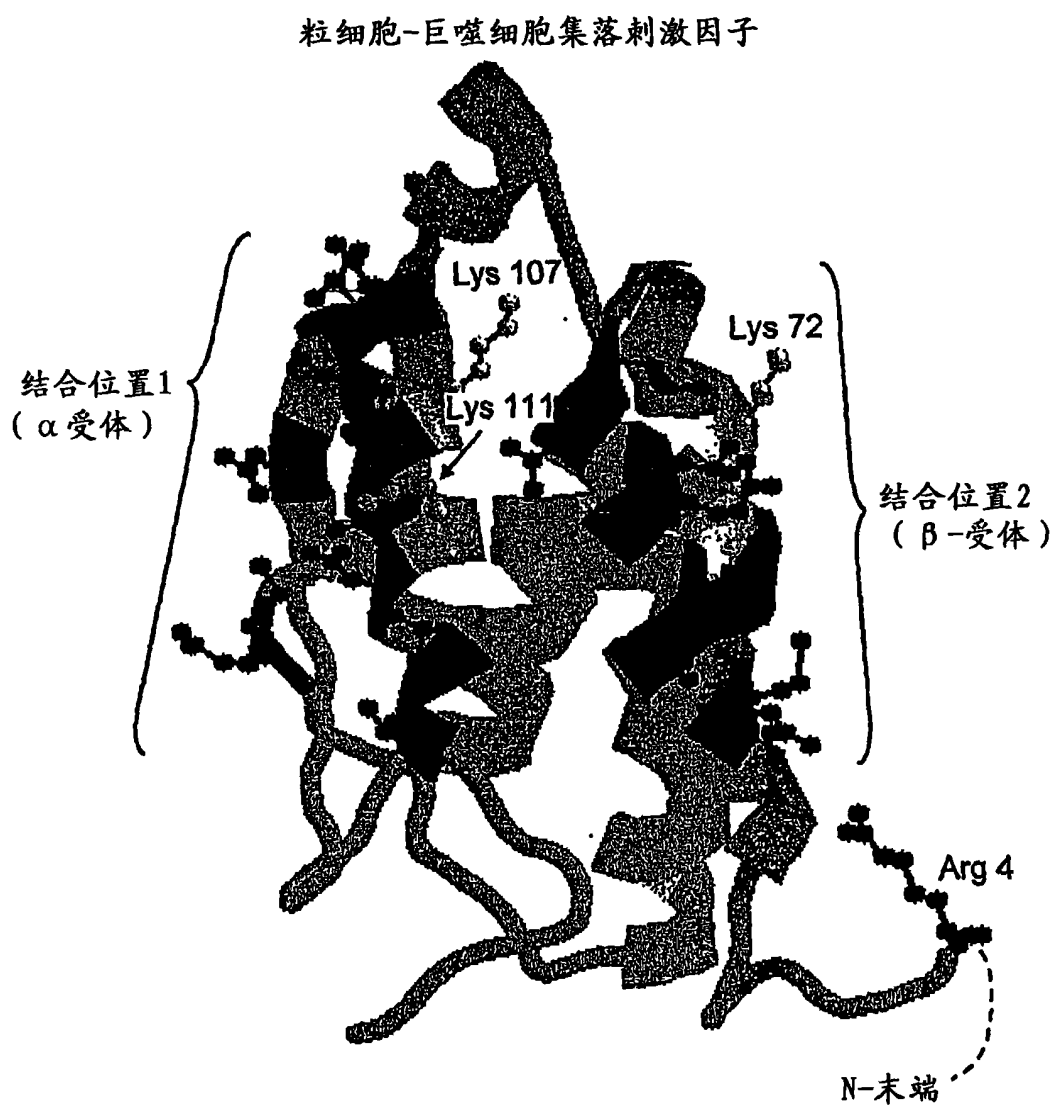


图 3

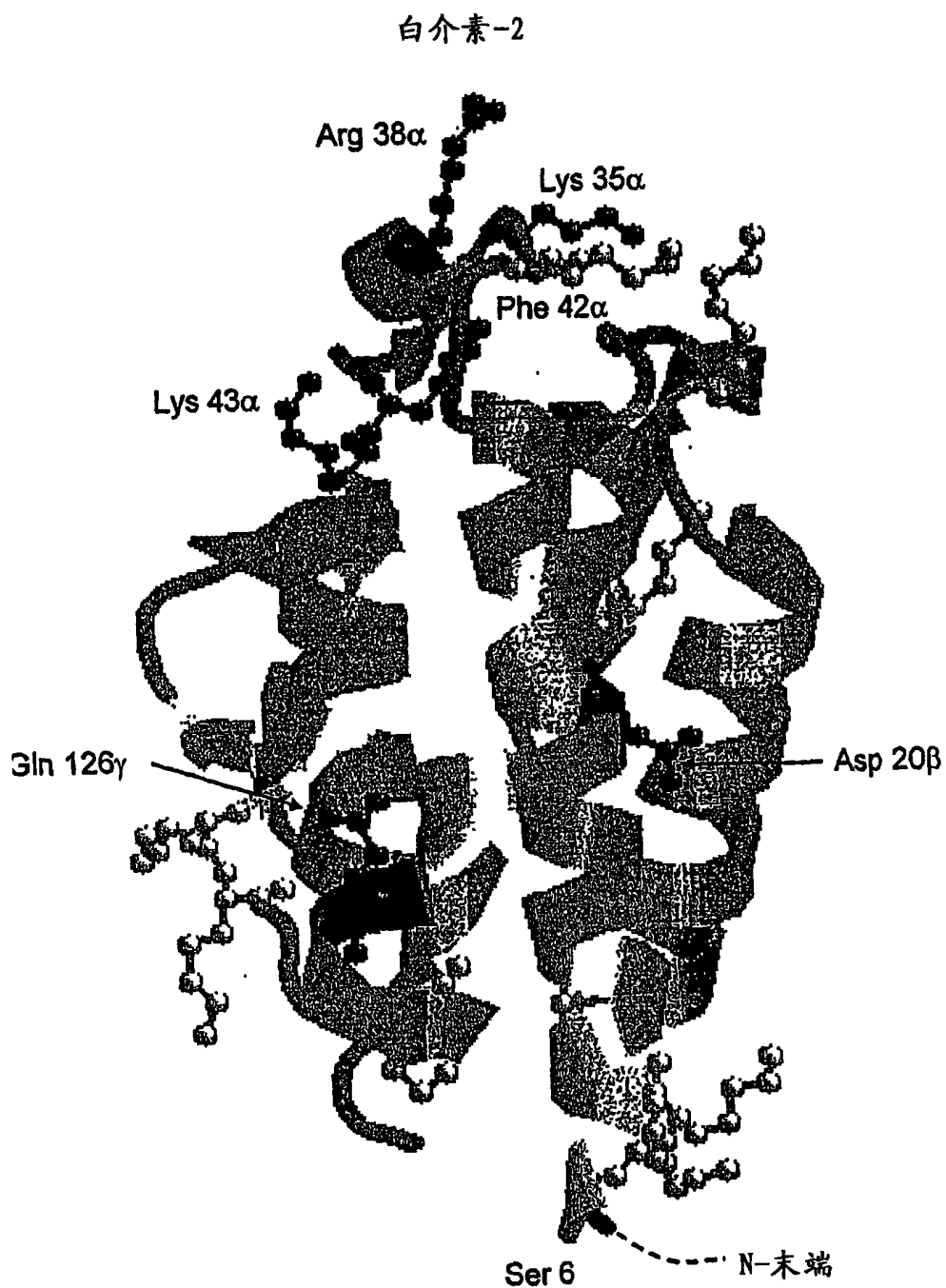


图 4

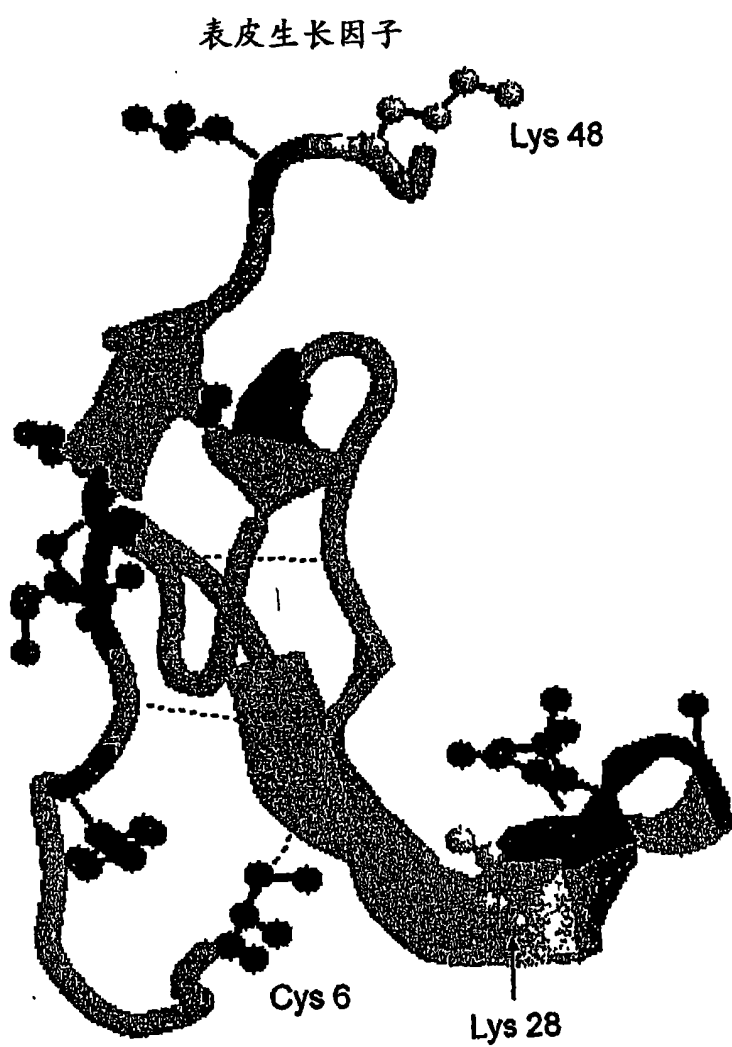
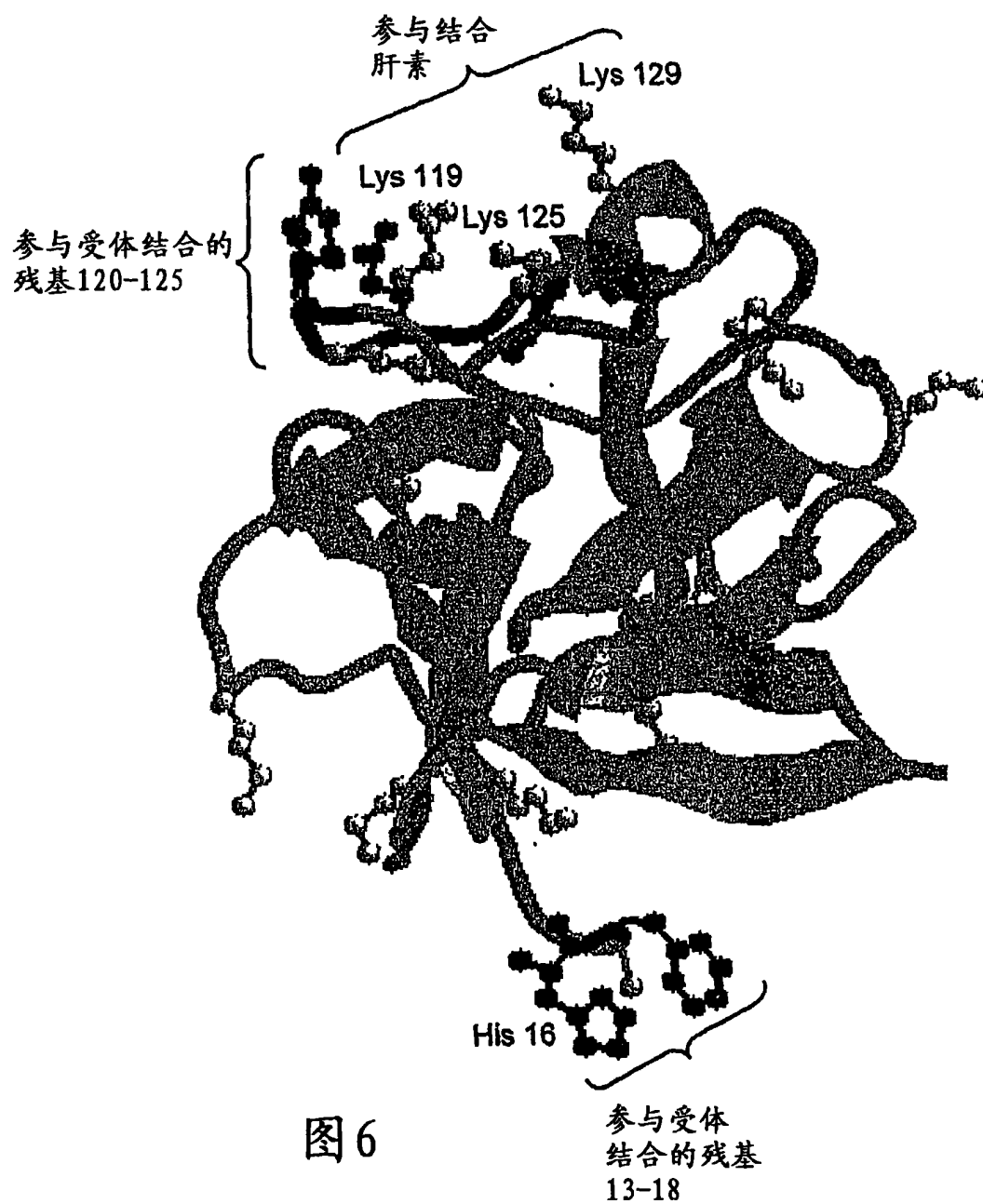


图 5

碱性成纤维细胞生长因子



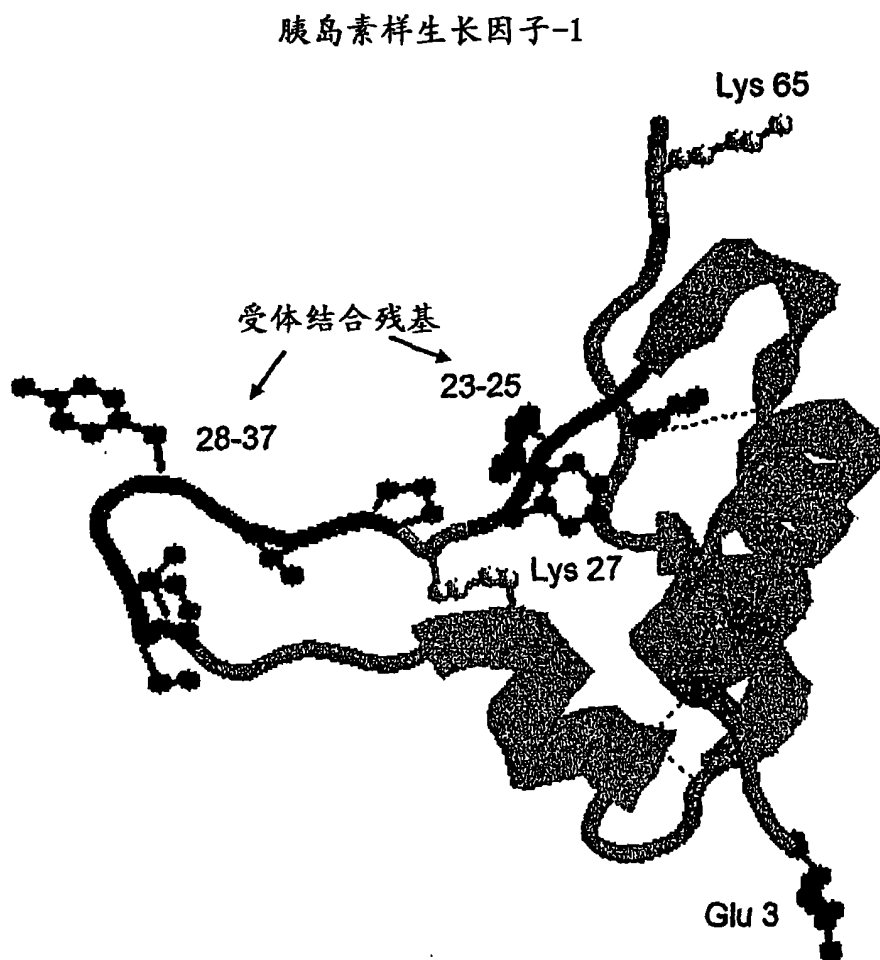


图7

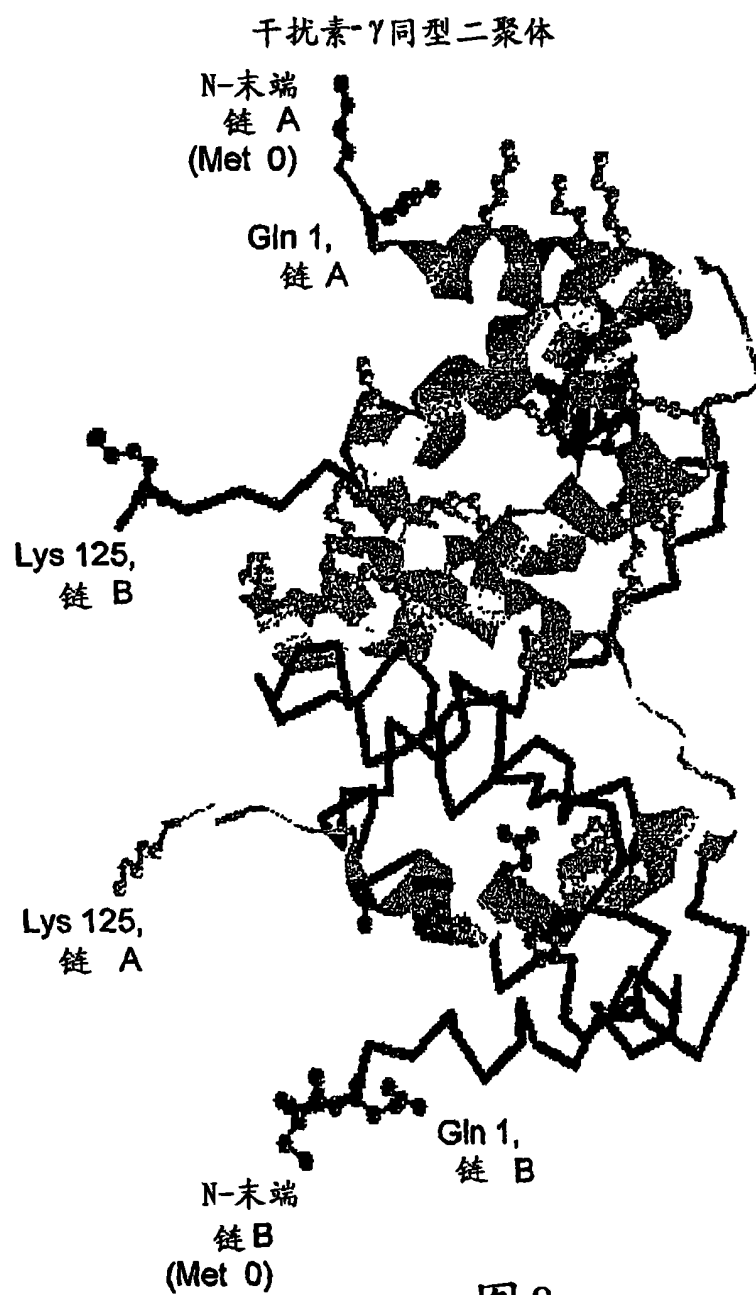


图 8

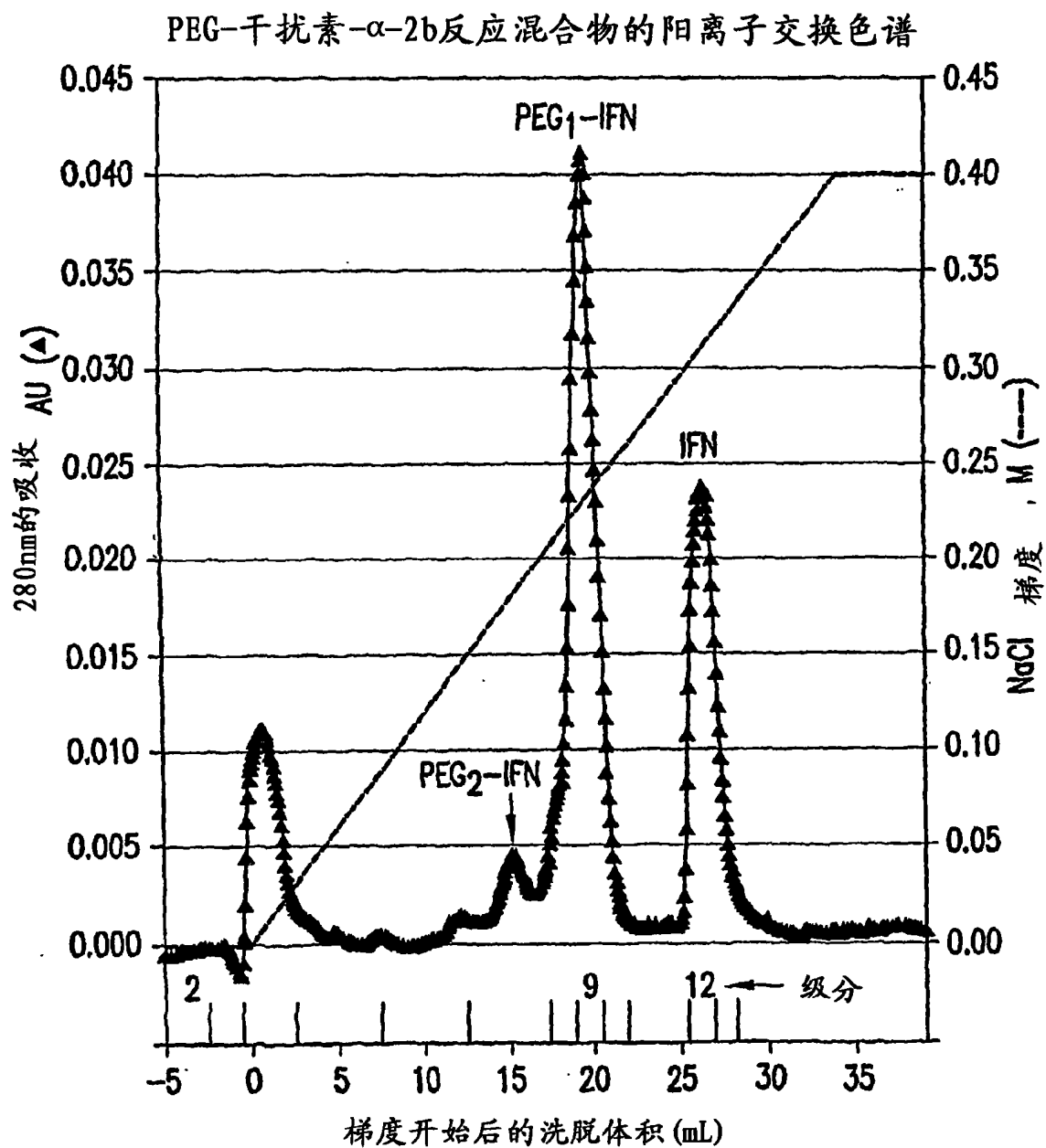


图9

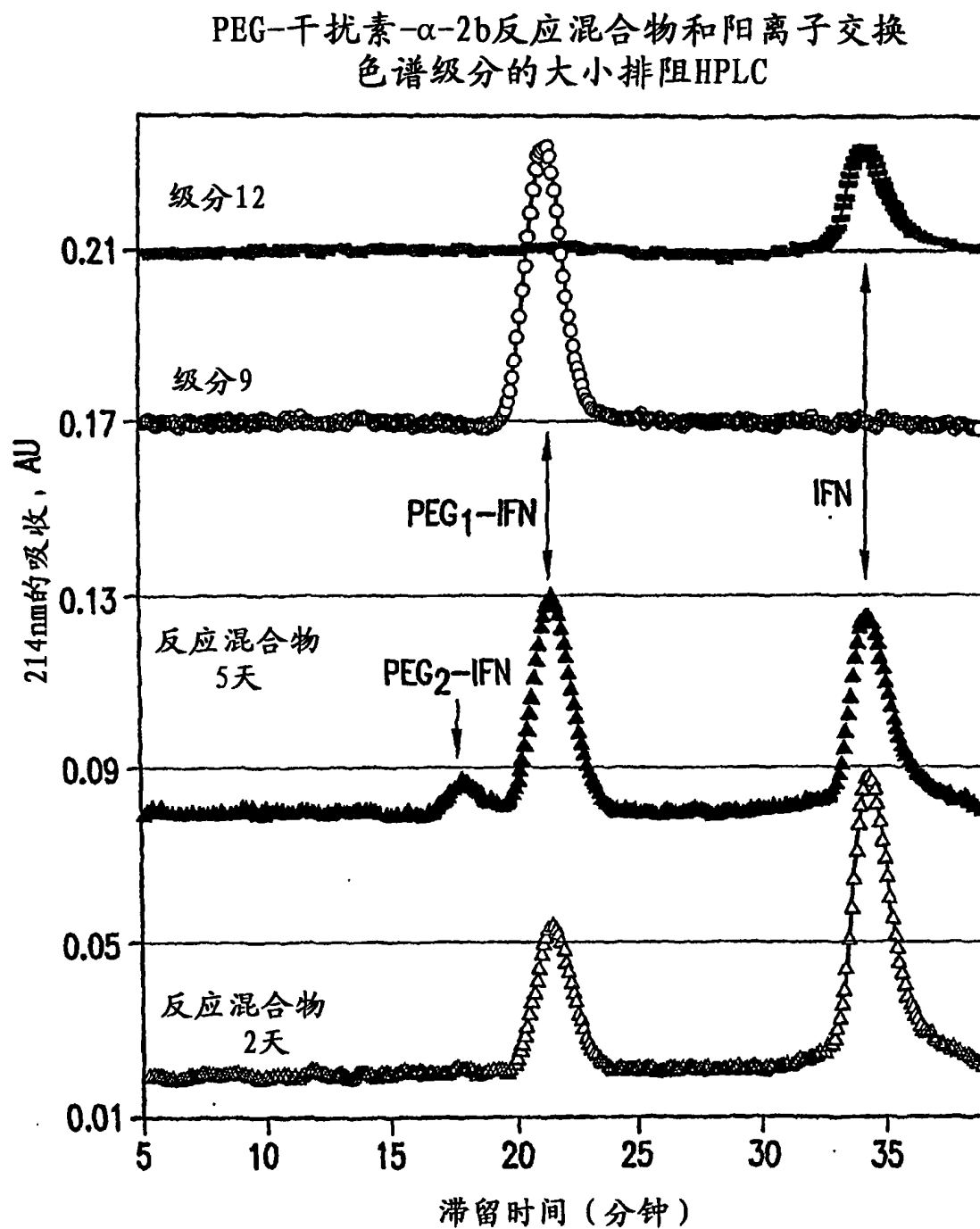


图10

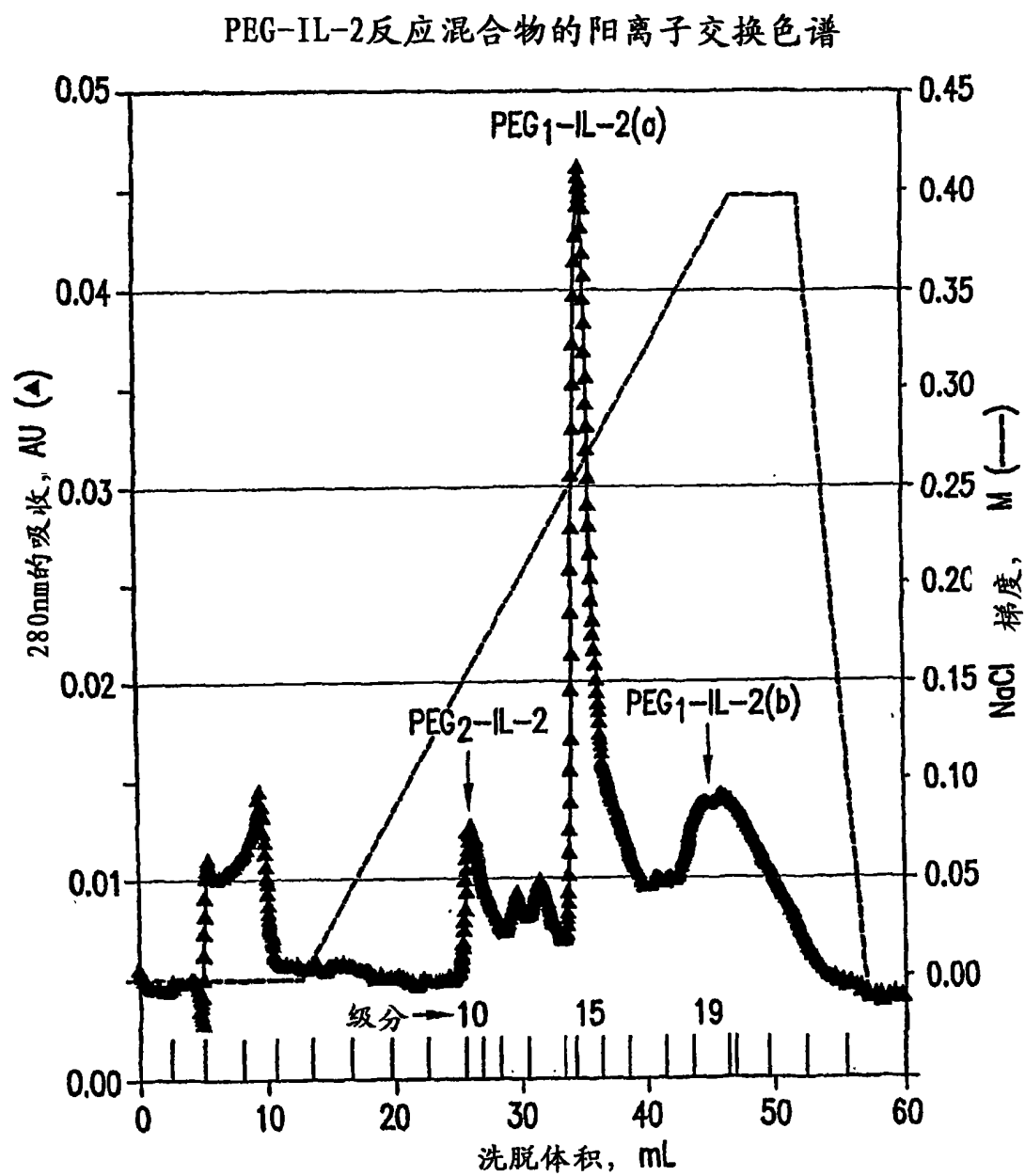


图 11

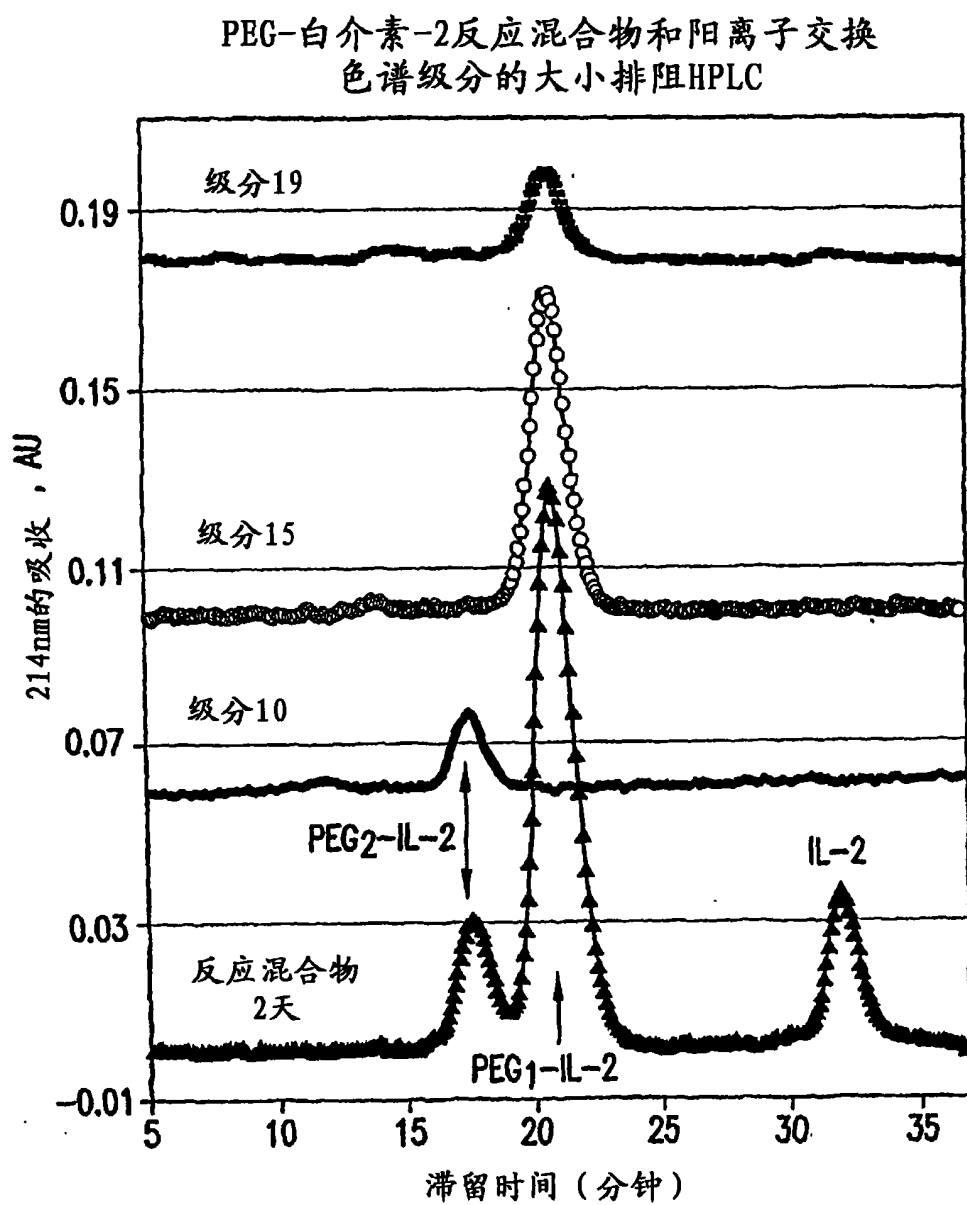


图 12

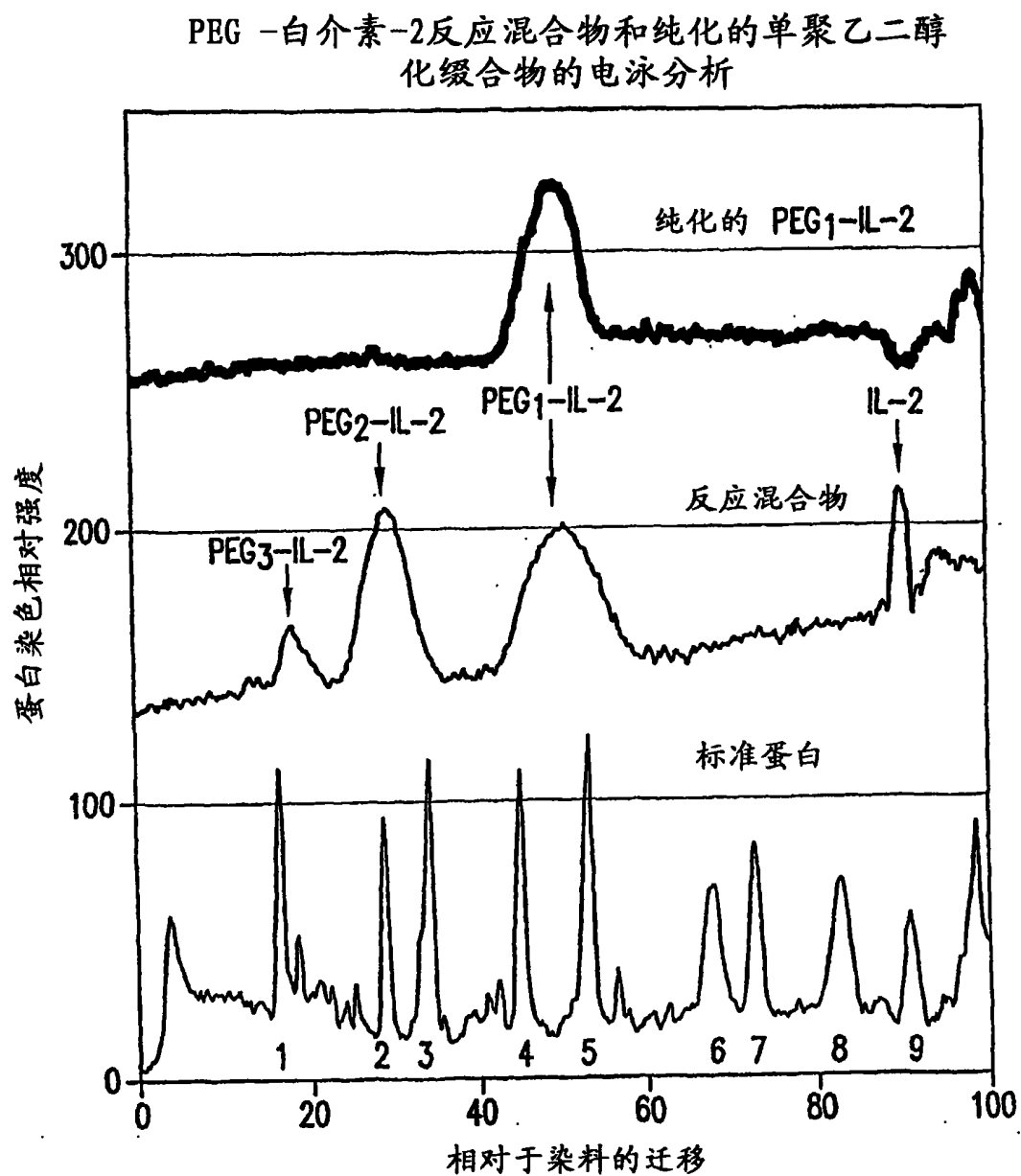


图 13