



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107405384 A

(43)申请公布日 2017. 11. 28

(21)申请号 201680014816.7

(22)申请日 2016.03.11

(30)优先权数据

62/131,634 2015.03.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.09.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/022146 2016.03.11

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/145388 EN 2016.09.15

(71)申请人 尼克塔治疗公司

地址 美国加利福尼亚

(72)发明人 D·H·查里奇 张平 P·B·柯克

(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 11038

代理人 袁志明

(51)Int.Cl.

A61K 38/20(2006.01)

A61K 47/60(2017.01)

A61K 47/58(2017.01)

A61K 47/59(2017.01)

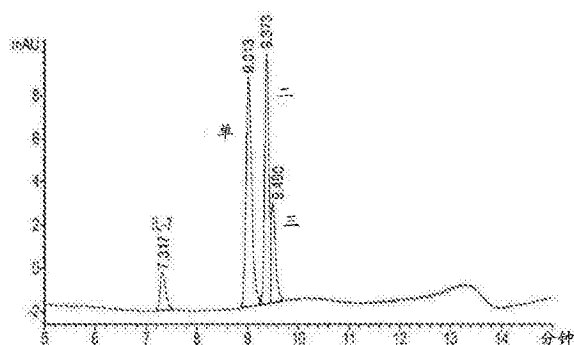
权利要求书1页 说明书44页 附图3页

(54)发明名称

IL-7部分与聚合物的缀合物

(57)摘要

提供IL-7部分与一种或多种非肽水溶性聚合物的缀合物。典型地,该非肽水溶性聚合物是聚(乙二醇)或其衍生物。尤其,还提供了包含缀合物的组合物、用于制造缀合物的方法、以及向个体施用组合物的方法。



1. 一种缀合物, 包含与水溶性聚合物共价连接的IL-7部分的残基。
2. 如权利要求1所述的缀合物, 其中与该水溶性聚合物共价连接的该IL-7部分经可释放键共价连接。
3. 如权利要求1所述的缀合物, 其中与该水溶性聚合物共价连接的该IL-7部分经稳定键共价连接。
4. 如权利要求1、2以及3中任一项所述的缀合物, 其中该水溶性聚合物是分枝的水溶性聚合物。
5. 如权利要求1、2、3以及4中任一项所述的缀合物, 其中该水溶性聚合物是选自下组的聚合物, 该组由以下各项组成: 聚(环氧烷)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(乙烯醇)、聚噁唑啉以及聚(丙烯酰基吗啉)。
6. 如权利要求5所述的缀合物, 其中该水溶性聚合物是聚(环氧烷)。
7. 如权利要求6所述的缀合物, 其中该聚(环氧烷)是聚(乙二醇)。
8. 如权利要求7所述的缀合物, 其中该聚(乙二醇)用选自下组的封端部分进行封端, 该组由以下各项组成: 羟基、烷氧基、取代的烷氧基、烯氧基、取代的烯氧基、炔氧基、取代的炔氧基、芳氧基以及取代的芳氧基。
9. 如权利要求1、2、3、4、5、6以及7中任一项所述的缀合物, 其中该水溶性聚合物具有在从约500道尔顿到约100,000道尔顿范围内的重均分子量。
10. 如权利要求1、2、3、4、5、6、7、8、9以及10中任一项所述的缀合物, 其中该缀合物在该IL-7部分的该残基的胺基处共价连接。
11. 如权利要求1、2、3、4、5、6、7、8、9以及10中任一项所述的缀合物, 其中一种、两种、三种或四种水溶性聚合物与该IL-7部分的该残基连接。
12. 如权利要求1、2、3、4、5、6、7、8、9以及10中任一项所述的缀合物, 其中一种、两种或三种水溶性聚合物与该IL-7部分的该残基连接。
13. 如权利要求1、2、3、4、5、6、7、8、9以及10中任一项所述的缀合物, 其中一种或两种水溶性聚合物与该IL-7部分的该残基连接。
14. 如权利要求1、2、3、4、5、6、7、8、9以及10中任一项所述的缀合物, 其中一种水溶性聚合物与该IL-7部分的该残基连接。
15. 如前述权利要求中任一项所述的缀合物, 其中该IL-7部分具有选自下组的氨基酸序列, 该组由以下各项组成: SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:7; 以及SEQ ID NO:8。
16. 一种缀合物, 包含与水溶性聚合物共价连接的IL-7部分的残基, 其中该水溶性聚合物在被共价连接之前是携带N-羟基琥珀酰亚胺基的聚合物试剂。
17. 一种药物组合物, 包含如权利要求1到16中任一项所述的缀合物以及药学上可接受的赋形剂。
18. 一种方法, 包括向个体施用如权利要求17所述的药物组合物。
19. 一种用于制造缀合物的方法, 包括在缀合条件下使IL-7部分与聚合物试剂接触。

IL-7部分与聚合物的缀合物

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请根据35 U.S.C. §119 (e) 要求2015年3月11日提交的美国临时专利申请号62/131,634的优先权的权益,该临时申请的披露内容以其全文通过引用结合在此。

技术领域

[0002] 尤其,本发明的一个或多个实施例总体上涉及包含IL-7部分(即具有与人IL-7类似的至少某种活性的部分)及水溶性、非肽聚合物的缀合物。另外,本发明涉及(尤其)包含缀合物的组合物、用于合成缀合物的方法以及施用组合物的方法。

背景技术

[0003] 细胞因子是免疫系统的刺激物并且因此可用作药物。例如,干扰素- α (IFN- α)、干扰素- β (IFN- β)、白介素-2 (IL-2) 和粒细胞/巨噬细胞-集落刺激因子 (GM-CSF) 全部都是已批准的药物。该类药物用于治疗患有病毒感染、癌症和免疫系统失调如自身免疫疾病的个体,并促进癌症化疗后免疫系统的恢复。不幸的是,这些蛋白质可以刺激对自身的免疫应答,导致患者发展针对治疗性蛋白质的抗体。这些抗体还可以抑制在患者体内内源性产生的相同蛋白质的功能,产生对患者健康的潜在的长期后果。

[0004] 白介素-7 (“IL-7”) 是促进T细胞、长期记忆T细胞、B细胞和其他免疫细胞的存活和/或增殖的细胞因子。该细胞因子与IL-7受体结合,IL-7受体是细胞表面蛋白质并且由两个不同的较小的蛋白质链(即IL-7受体- α 和常见的 γ)组成。Kroemer等人(1996) Protein Eng. [蛋白质工程] 9 (12):1135-1142。IL-7似乎扩大T细胞谱系以允许肿瘤抗原的更多样化靶向。IL-7的这些和其他活性已经使细胞因子成为治疗性蛋白质的潜在候选物以用于治疗免疫系统已被癌症化学疗法、HIV感染或其他疾病、障碍或化学暴露损伤的患者。然而,基于其免疫刺激特性,治疗性施用的IL-7预期诱导针对自身的抗体应答。因此,在本领域中需要产生较少免疫原性但是保持刺激免疫系统的特性的IL-7的改进版本。

[0005] 此外,在外源性施用IL-7后可发生的相对高水平的IL-7可导致IL-7受体的表达中的极大且持续的降低。参见,例如,Ghazawi等人(2013) Immunology and Cell Biology [免疫学与细胞生物学] 91:149-158。因此,本领域的另一种需要是以避免与相对高水平激动剂相关的IL-7受体的表达降低的方式导致持续水平的IL-7激动剂的基于IL-7的治疗。

[0006] 尤其,本发明的一个或多个实施例因此是针对与IL-7相比具有以下特征中的一个或多个的IL-7形式:降低的免疫原性;减少的或减缓的消除;免疫应答的激活更定位到肿瘤环境;以及通过JAK/STAT途径的持续且持久的信号传导,以及包含这些缀合物的组合物以及如在此所描述的相关方法,它们据信是新的并且完全未由现有技术提出。

发明内容

[0007] 因此,在本发明的一个或多个实施例中,提供一种缀合物,该缀合物包含与水溶性聚合物共价连接的IL-7部分的残基。

[0008] 在本发明的一个或多个实施例中,提供一种缀合物,该缀合物包含与水溶性聚合物共价连接的IL-7部分的残基,其中该IL-7部分的残基通过可释放键与水溶性聚合物共价连接。

[0009] 在本发明的一个或多个实施例中,提供一种缀合物,该缀合物包含与水溶性聚合物共价连接的IL-7部分的残基,其中该IL-7部分的残基通过不可释放键与水溶性聚合物共价连接,优选地其中该水溶性聚合物具有大于5,000道尔顿的重均分子量。

[0010] 在本发明的一个或多个实施例中,提供一种缀合物,该缀合物包含与水溶性聚合物共价连接的IL-7部分的残基,其中该IL-7部分不含不涉及二硫键合的半胱氨酸残基。

[0011] 在本发明的一个或多个实施例中,提供一种缀合物,该缀合物包含与水溶性聚合物共价连接的IL-7部分的残基,其中该IL-7部分具有与人IL-7相比额外的半胱氨酸残基,并且该水溶性聚合物与该额外的半胱氨酸残基共价连接。

[0012] 在本发明的一个或多个实施例中,提供一种缀合物,该缀合物包含与分枝的水溶性聚合物共价连接的IL-7部分的残基。

[0013] 在本发明的一个或多个实施例中,提供一种缀合物,该缀合物包含与水溶性聚合物共价连接的IL-7部分的残基,其中该IL-7部分的胺通过除酰胺键外的键与该水溶性聚合物共价连接。

[0014] 在本发明的一个或多个实施例中,提供一种缀合物,该缀合物包含与水溶性聚合物共价连接的IL-7部分的残基,其中该IL-7部分的胺通过胺键与该水溶性聚合物共价连接。

[0015] 在本发明的一个或多个实施例中,提供一种组合物,该组合物包含如在此所述的缀合物连同药学上可接受的赋形剂。

[0016] 在本发明的一个或多个实施例中,提供一种用于递送缀合物的方法,该方法包括以下步骤:向患者皮下施用由IL-7的残基与水溶性聚合物的缀合物组成的组合物。

附图说明

[0017] 图1是如实例1中所述制备的mPEG2-NHS、20kDa-IL-7缀合物溶液的RP-HPLC分析图。

[0018] 图2是如实例1中所述的IL-7与不同量的mPEG2-NHS,20kDa的缀合反应混合物的SDS-PAGE凝胶的图像。

[0019] 图3是如实例2中所述制备的mPEG2-NHS、40kDa-IL-7缀合物溶液的RP-HPLC分析图。

[0020] 图4是如实例2中所述的IL-7与不同量的mPEG2-NHS,40kDa的缀合反应混合物的SDS-PAGE凝胶的图像。

[0021] 图5是如实例3中所述的IL-7与不同量的C2-PEG2-FMOC-NHS,20kDa的缀合反应混合物的SDS-PAGE凝胶的图像。

详细说明

[0022] 在详细描述本发明的一个或多个实施例之前,应当了解本发明不限于这些特定聚合物、合成技术、IL-7部分等,因此它们可以改变。

[0023] 必须指出的是,除非上下文另外明确规定,否则如本说明书和预期权利要求书中

所使用,单数形式“一个/一种(a/an)”和“该”包括复数个指示物。因此,例如,提及“一种聚合物”包括单一聚合物以及两种或更多种相同或不同的聚合物,提及“一种任选赋形剂”是指单一任选赋形剂以及两种或更多种相同或不同的任选赋形剂等。

[0024] 在描述和要求本发明的一个或多个实施例时,将根据下文所描述的定义使用以下术语。

[0025] 如在此所使用的“PEG”、“聚乙二醇”以及“聚(乙二醇)”是可互换的并且涵盖任何非肽水溶性聚(环氧乙烷)。典型地,根据本发明使用的PEG包含以下结构“ $-(OCH_2CH_2)_n-$ ”,其中(n)是2到4000。如在此所使用,取决于例如在合成转化期间末端氧是否已被替换,PEG还包括“ $-CH_2CH_2-O(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-$ ”和“ $-(OCH_2CH_2)_nO-$ ”。贯穿本说明书和权利要求书,应当记住的是,术语“PEG”包括具有不同末基或“封端(end capping)”基等等的结构。术语“PEG”还意指一种聚合物,这种聚合物包含大部分(也就是说大于50%)的 $-OCH_2CH_2-$ 重复亚单元。就特定形式来说,PEG可以采取任何数目的多种分子量以及下文予以更详细描述的多重结构或几何结构,如“分枝”、“线性”、“叉状”、“多官能性”等。

[0026] 术语“封端”和“末端封盖”在此可互换地用来指一种具有封端部分的聚合物的末端或端点。典型地,不过并非未必,封端部分包含羟基或 C_{1-20} 烷氧基,更优选地 C_{1-10} 烷氧基,并且再更优选地 C_{1-5} 烷氧基。因此,封端部分的实例包括烷氧基(例如甲氧基、乙氧基以及苯甲氧基)以及芳基、杂芳基、环基、杂环基等。必须记住的是,封端部分可以包括聚合物中末端单体的一个或多个原子[例如 $CH_3O(CH_2CH_2O)_n-$ 和 $CH_3(OCH_2CH_2)_n-$ 中的封端部分“甲氧基”]。另外,设想前述每种基团的饱和、不饱和、取代以及未取代的形式。此外,封端基团还可以是硅烷。封端基团还可以有利地包含一种可检测标记。当聚合物具有包含可检测标记的封端基团时,可以通过使用适合的检测器来确定该聚合物和/或与该聚合物偶联的部分(例如活性剂)的量或位置。此类标记包括(但不限于)荧光剂、化学发光剂、用于酶标记中的部分、比色部分(例如染料)、金属离子、放射性部分等。适合的检测器包括光度计、胶片、分光仪等。封端基团还可以有利地包含磷脂。当聚合物具有包含磷脂的封端基团时,赋予聚合物和所得缀合物独特特性。示例性磷脂包括(但不限于)选自称为磷脂酰胆碱的磷脂类别中的那些磷脂。特定磷脂包括(但不限于)选自下组的那些磷脂,该组由以下各项组成:二月桂酰基磷脂酰胆碱、二油烯基磷脂酰胆碱(dioleoylphosphatidylcholine)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱、二硬脂酰基磷脂酰胆碱、山嵛酰基磷脂酰胆碱(behenoylphosphatidylcholine)、花生酰基磷脂酰胆碱(arachidoylphosphatidylcholine)以及卵磷脂。封端基团还可以包括靶向部分,从而该聚合物(以及与其连接的任何物质,例如IL-7部分)可以优先定位于目的区域内。

[0027] 相对于在此所描述的一种聚合物来说,“非天然存在”意指整体上不存在于自然界中的一种聚合物。然而,一种非天然存在聚合物可以包含天然存在的一个或多个单体或单体链段,只要整体聚合物结构不存在于自然界中即可。

[0028] 如在“水溶性聚合物”中的术语“水溶性”聚合物是在室温可溶于水的任何聚合物。典型地,水溶性聚合物将透射由过滤后的相同溶液所透射的光(例如,具有600nm的波长)的至少约75%、更优选地至少约95%。以重量计,一种水溶性聚合物将优选地至少约35%(以重量计)可溶于水中,更优选地至少约50%(以重量计)可溶于水中,再更优选地约70%(以重量计)可溶于水中并且再更优选地约85%(以重量计)可溶于水中。然而,最优选的是水溶性聚合物为约95%(以重量计)可溶于水中或完全可溶于水中。

[0029] 在一种水溶性聚合物(如PEG)的情形下,分子量可以表示为数均分子量或重均分子量。除非另外规定,否则所有对分子量的提及在此均指重均分子量。两种分子量测定(数均与重均分子量)均可以使用凝胶渗透色谱法或其他液相色谱技术来测量。也可以使用用于测量分子量值的其他方法,如使用端基分析或测量依数性(colligative property)(例如凝固点降低、沸点升高或渗透压)来确定数均分子量或使用光散射技术、超速离心法(ultracentrifugation)或粘度测定法来确定重均分子量。本发明的聚合物典型地是多分散的(即这些聚合物的数均分子量与重均分子量不相等),具有优选地小于约1.2、更优选地小于约1.15、再更优选地小于约1.10、再又更优选地小于约1.05并且最优选地小于约1.03的低的分散性值。

[0030] 与一种特定官能团结合使用时,术语“活性”、“反应性”或“活化”指一种反应性官能团,该反应性官能团易于与另一个分子上的亲电子体或亲核体反应。这与需要强催化剂或高度不切实际的反应条件以便反应的那些基团(即“非反应性”或“惰性”基团)相反。

[0031] 如在此所使用,术语“官能团”或其任何同义词意指涵盖其受保护的形式以及未受保护的形式。

[0032] 术语“间隔基部分”、“键”以及“连接物”在此用于指任选地用来连接互连部分(如聚合物试剂的末端以及IL-7部分或IL-7部分的亲电子试剂或亲核试剂)的键或原子或原子集合。间隔基部分可以是水解稳定的或可以包括生理上可水解或可酶降解的键。除非上下文另外明确规定,否则间隔基部分任选地存在于化合物的任何两种元素之间(例如所提供的包含IL-7部分的残基和水溶性聚合物的缀合物可以直接或通过间隔基部分间接连接)。

[0033] “烷基”是指一种烃链,长度范围典型地从约1到15个原子。此类烃链优选地但未必是饱和的并且可以是支链或直链,不过典型地直链是优选的。示例性烷基包括甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、3-甲基戊基等。

[0034] “低级烷基”是指包含从1到6个碳原子并且可以是直链或支链的一种烷基,如通过甲基、乙基、正丁基、异丁基以及叔丁基所例示。

[0035] “环烷基”是指一种饱和或不饱和环烃链,包括桥联、稠合或螺环化合物,优选地由3到约12个碳原子、更优选地3到约8个碳原子构成。“亚环烷基”是指一种环烷基,这种环烷基通过在环状环系统中的任何两个碳处键合烷基链而插入该链中。

[0036] “烷氧基”是指-OR基团,其中R是烷基或取代的烷基,优选地是C₁₋₆烷基(例如甲氧基、乙氧基、丙氧基等等)。

[0037] 如在例如“取代的烷基”中的术语“取代”是指一个部分(例如烷基)由一个或多个非干扰性取代基取代,如(但不限于):烷基、C₃₋₈环烷基,例如环丙基、环丁基等;卤基,例如氟、氯、溴以及碘;氰基;烷氧基、低级苯基;取代的苯基;等。“取代的芳基”是具有一个或多个非干扰性基团作为取代基的芳基。对于苯基环上的取代,取代基可以处于任何取向(即邻位、间位或对位)。

[0038] “非干扰性取代基”是当存在于分子中时典型地不与该分子内部所含的其他官能团反应的那些基团。

[0039] “芳基”意指一个或多个芳族环,各自具有5或6个核心碳原子。芳基包括多个芳基环,这些芳基环可以是稠合的(如萘基中那样)或如是未稠合的(如联苯基中那样)。芳基环还可以与一个或多个环烃、杂芳基环或杂环状环稠合或未稠合。如在此所使用,“芳基”包括

杂芳基。

[0040] “杂芳基”是一种芳基,该芳基包含从一到四个杂原子,优选地是硫、氧或氮或其组合。杂芳基环还可以与一个或多个环烃、杂环、芳基、或者杂芳基的环进行稠合。

[0041] “杂环”或“杂环状的”意指一种或多种环,所述环具有5-12个原子、优选地5-7个原子、具有或不具有不饱和度或芳香族特征并且具有至少一个不是碳的环原子。优选的杂原子包括硫、氧以及氮。

[0042] “取代的杂芳基”是具有一个或多个非干扰性基团作为取代基的杂芳基。

[0043] “取代的杂环”是一种具有一个或多个由非干扰性取代基形成的侧链的杂环。

[0044] 如在此所使用的“有机基团”应当包括烷基、取代的烷基、芳基以及取代的芳基。

[0045] “亲电子试剂”和“亲电子基团”是指一种离子或原子或原子集合,它们可以是离子性的,具有亲电子中心(即寻求电子的中心),能够与亲核试剂反应。

[0046] “亲核试剂”和“亲核基团”是指离子或原子或原子集合,它们可以是离子性的,具有亲核中心(即寻求亲电子中心或具有亲电子试剂的中心)。

[0047] “可酶降解的键”意指一种经受一种或多种酶降解的键。

[0048] “可水解的”键是在生理学条件下与水进行反应(即,被水解)的键。一种键在水中水解的倾向将不仅取决于连接两个中心原子的键的总体类型而且取决于与这些中心原子连接的取代基。适当的水解不稳定或弱的键包括(但不限于)羧酸酯、磷酸酯、酸酐、缩醛、缩酮、酰氧基烷基醚、亚胺、原酸酯、肽以及寡核苷酸。“可释放的键”是在生理条件下以临床上有用的速率裂解的共价连接并且包括,例如但不限于可水解的键和可酶降解的键。

[0049] “水解稳定”的键或键(bond)是指一种化学键、典型地共价键,这种键在水中是基本上稳定的,也就是说,在生理条件下在一段较长的时间内不发生水解至任何明显的程度。水解稳定的键的实例包括(但不限于)以下键:碳-碳键(例如在脂族链中)、醚、酰胺、氨基甲酸酯等。总体上,水解稳定的键是在生理条件下展现每天小于约1%-2%的水解速率的键。代表性化学键的水解速率可以在大多数标准化学教科书中找到。

[0050] “药学上可接受的赋形剂或载体”是指可以任选地在本发明的组合物中包括并且不对患者造成明显有害毒理学作用的赋形剂。

[0051] “药理学有效量”、“生理学有效量”以及“治疗有效量”在此可互换使用,意指在血流中或在靶组织中为提供所希望水平的缀合物(或相应的未结合的IL-7部分)所需要的聚合物-(IL-7)部分缀合物的量。精确量将取决于许多因素,例如治疗性组合物的特定IL-7部分、组分以及物理特征、预期患者群体、个体患者考虑因素等,并且可以容易地由本领域普通技术人员基于在此所提供信息来确定。

[0052] “多官能性”意指一种具有三个或更多个包含在其中的官能团的聚合物,其中这些官能团可以相同或不同。本发明的多官能性聚合物试剂将典型地包含从约3-100个官能团,并且可以包含,例如,满足以下范围中的一个或多个的数目:从3-50个官能团;从3-25个官能团;从3-15个官能团;从3-10个官能团。例如,在聚合物骨架内的官能团的数目可以选自下组,该组由以下各项组成:3、4、5、6、7、8、9和10个官能团。

[0053] 如在此所使用的术语“IL-7部分”是指具有人IL-7活性的肽或蛋白质部分。IL-7部分还将具有至少一个适合于与聚合物试剂反应的亲电子基团或亲核基团。另外,术语“IL-7部分”涵盖缀合之前的IL-7部分以及缀合之后的IL-7部分残基。如下文中将进一步详细解

释,本领域的普通技术人员可以确定任何给定部分是否具有IL-7活性。包含与SEQ ID NO:1到8中任一项对应的氨基酸序列的蛋白质以及基本上与其同源的任何蛋白质或多肽都是IL-7部分。如在此所使用,术语“IL-7部分”包括例如通过位点定向诱变而有意修饰或通过突变而偶然修饰的此类肽和蛋白质。这些术语还包括具有从1至6个额外糖基化位点的类似物、在肽或蛋白质的羧基末端处具有至少一个额外氨基酸(其中所述额外氨基酸包括至少一个糖基化位点)的类似物以及具有包括至少一个糖基化位点的氨基酸序列的类似物。该术语包括天然地、重组地和合成地产生的部分。

[0054] 术语“基本上同源”意指一种特定主题序列(例如突变序列)因一个或多个取代、缺失或添加而不同于参考序列,其净效应不导致在该参考序列与主题序列之间不利的官能差异。为了本发明的目的,具有大于95百分比的同源性、等效的生物活性(不过不必是等效强度的生物活性)、以及等效的表达特征的序列被认为是基本上同源的。出于确定同源性的目的,应当忽略成熟序列的截短。在此所用的示例性IL-7部分包括与SEQ ID NO:1基本上同源的那些序列。

[0055] 术语“片段”意指任何蛋白质或多肽,其具有IL-7部分的一个部分或片段的氨基酸序列并且具有IL-7的生物活性。片段包括由IL-7部分的蛋白水解降解所产生的蛋白质或多肽以及通过本领域中常规的方法以化学合成产生的蛋白质或多肽。

[0056] 术语“患者”是指罹患或倾向于可以通过施用活性剂(例如缀合物)来预防或治疗的病症的活有机体,并且包括人类和动物。

[0057] “任选的”或“任选地”意指随后所描述的情形可能发生或可能不发生,从而描述内容包括这种情形发生的情况以及它不发生的情况。

[0058] “基本上”意指几乎全部或完全,例如满足以下中的一项或多项:大于50%、51%或更大、75%或更大、80%或更大、90%或更大以及95%或更大的情况。

[0059] 将肽中的氨基酸残基缩写如下:苯丙氨酸是Phe或F;亮氨酸是Leu或L;异亮氨酸是Ile或I;甲硫氨酸是Met或M;缬氨酸是Val或V;丝氨酸是Ser或S;脯氨酸是Pro或P;苏氨酸是Thr或T;丙氨酸是Ala或A;酪氨酸是Tyr或Y;组氨酸是His或H;谷氨酰胺是Gln或Q;天冬酰胺是Asn或N;赖氨酸是Lys或K;天冬氨酸是Asp或D;谷氨酸是Glu或E;半胱氨酸是Cys或C;色氨酸是Trp或W;精氨酸是Arg或R;并且甘氨酸是Gly或G。

[0060] 转向本发明的一个或多个实施例,提供一种缀合物,该缀合物包含与水溶性聚合物共价连接(直接或通过间隔基部分)的IL-7部分的残基。本发明的这些缀合物将具有一种或多种以下特征。

[0061] IL-7部分

[0062] 如先前所陈述,缀合物包含与水溶性聚合物共价连接(直接或通过间隔基部分)的IL-7部分的残基。如在此所使用,术语“IL-7部分”应当指缀合之前的IL-7部分以及与非肽水溶性聚合物连接之后的IL-7部分。然而,应了解的是,当原始IL-7部分与非肽水溶性聚合物连接时,由于存在与这种或这些聚合物键合有关的一个或多个共价键而使IL-7部分轻微改变。经常,将这种与另一个分子连接的IL-7部分的轻微改变形式称为IL-7部分的“残基”。

[0063] IL-7部分可以源自非重组方法和重组方法,并且在此方面本发明不受限制。另外,IL-7部分可以源自人类来源、动物来源(包括昆虫)、真菌来源(包括酵母)、以及植物来源。

[0064] IL-7部分可以根据Namen等人(1998) J. Exp. Med. [实验医学学报] 167:988-1002等

描述的程序获得。

[0065] IL-7部分可以源自重组方法。参见,例如,Ouellette等人(2003) *Protein Expression and Purification* [蛋白表达与纯化] 30:156-166。

[0066] IL-7部分可以商购自,例如加利福尼亚州圣地亚哥eBioscience公司(eBioscience, Inc., San Diego, CA)。

[0067] IL-7部分可以在细菌[例如大肠杆菌(*E. coli*)],参见例如费歇尔(Fischer)等人(1995) *生物技术与应用生物化学* (*Biotechnol. Appl. Biotechnol.*) 21 (3):295-311]、哺乳动物[参见例如克朗曼(Kronman)等人(1992) *基因* (*Gene*) 121:295-304]、酵母[例如毕赤酵母(*Pichia pastoris*),参见例如莫雷尔(Morel)等人(1997) *生物化学杂志* (*Biochem. J.*) 328 (1):121-129]以及植物[参见例如莫而(Mor)等人(2001) *生物技术与生物工程* (*Biotechnol. Bioeng.*) 75 (3):259-266]表达系统中表达。表达可以通过外源性表达(当宿主细胞天然地包含所希望的遗传编码时)或通过内源性表达来进行。

[0068] 虽然用于制备蛋白质的基于重组的方法可以不同,但重组方法典型地涉及构建编码所希望的多肽或片段的核酸,将该核酸克隆到表达载体中,转化宿主细胞(例如植物、细菌、酵母、转基因动物细胞或哺乳动物细胞,如中国仓鼠卵巢细胞或幼仓鼠肾细胞),并且表达该核酸以产生所希望的多肽或片段。用于体外并且在原核和真核宿主细胞中产生并表达重组多肽的方法为本领域普通技术人员已知。

[0069] 为促进重组多肽的鉴定和纯化,可以将编码一种表位标签的核酸序列或其他亲和结合序列与所编码的序列符合可读框地插入或添加,由此产生一种包含所希望的多肽与适合于结合的多肽的融合蛋白。可以通过以下方式鉴定并纯化融合蛋白:首先使一种包含融合蛋白的混合物经过携带针对融合蛋白中表位标签或其他结合序列的结合部分(例如抗体)的亲和柱,由此在柱内结合融合蛋白。此后,融合蛋白可以通过用适当溶液(例如酸)洗涤该柱以释放结合的融合蛋白来回收。还可以通过以下方式纯化重组多肽:裂解宿主细胞,例如通过离子交换层析、亲和结合方法、疏水性相互作用方法分离多肽,并且此后通过MALDI或蛋白印迹法(western blot)鉴定,并且收集所述多肽。这些和其他用于鉴定和纯化重组多肽的方法为本领域普通技术人员已知。然而,在本发明的一个或多个实施例中,IL-7部分不处于融合蛋白形式。

[0070] 取决于用于表达具有IL-7活性的蛋白质的系统,IL-7部分可以是非糖基化或糖基化的并且任一种可以使用。也就是说,IL-7部分可以是非糖基化的或IL-7部分可以是糖基化的。在本发明的一个或多个实施例中,IL-7部分是非糖基化的。在其中IL-7部分被糖基化的那些实施例中,缀合可任选地发生在碳水化合物上(以在例如美国专利号7,956,032中所述的方式)。

[0071] 可以有利地修饰IL-7部分以包含和/或置换一个或多个氨基酸残基,如赖氨酸、半胱氨酸和/或精氨酸,以便使聚合物与氨基酸侧链内部的原子容易连接。美国专利号6,177,079中描述IL-7部分的置换的一个实例。另外,可以修饰IL-7部分以包括非天然存在的氨基酸残基。用于添加氨基酸残基和非天然存在的氨基酸残基的技术为本领域普通技术人员众所周知。参考J. 马奇(J. March), *高等有机化学:反应机理和结构* (*Advanced Organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure*), 第4版(纽约:威利跨学科出版社(New York: Wiley-Interscience), 1992)。

[0072] 另外,可以有利地修饰IL-7部分以包括对官能团的连接(除通过添加包含官能团的氨基酸残基以外)。例如,可以修饰IL-7部分以包括硫醇基。另外,可以修饰IL-7部分以包括N端 α 碳。另外,可以修饰IL-7部分以包括一个或多个碳水化合物部分。另外,可以修饰IL-7部分以包括醛基。另外,可以修饰IL-7部分以包括酮基。在本发明的一些实施例中,优选的是IL-7部分不修饰成包括以下中的一种或多种:硫醇基、N端 α 碳、碳水化合物、醛基以及酮基。

[0073] 在此处,在文献中,以及在例如美国专利号7,589,179,Wong等人(2013) *OncoImmunology* [肿瘤免疫学] 2 (11), e26442:1-3, Romano等人(1998) *Protein Engineering* [蛋白质工程] 11 (1):31-40和Vudattu等人(2009) *Genes and Immunity* [基因与免疫] 10:132-140中描述了示例性IL-7部分。优选的IL-7部分包括具有一种氨基酸序列的那些IL-7部分,所述氨基酸序列包含选自下组的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:1到8,以及基本上与其同源的序列。一个优选的IL-7部分具有与SEQ ID NO:1对应的氨基酸序列。

[0074] 在一些情况下,IL-7部分将处于“单体”形式,其中将相应的肽的单一表达组织成离散单元中。在其他情况下,IL-7部分将处于“二聚体”形式(例如重组IL-7的二聚体),其中蛋白质的两个单体形式彼此缔合。

[0075] 前述序列中任一项的截短形式、杂交变体以及肽模拟物也可以充当IL-7部分。前述序列中任一项的维持至少一些程度的IL-7活性的生物活性片段、缺失变体、置换变体或添加变体也可以充当IL-7部分。

[0076] 对于任何给定肽或蛋白质部分,均有可能确定该部分是否具有IL-7活性。本领域中描述了用于确定体外IL-7活性的不同方法。例如,任何提出的IL-7部分和由其形成的缀合物的生物活性可以使用IL-7依赖性的小鼠原B细胞系2E8进行评估,其中来自该系的细胞以一定浓度范围暴露于感兴趣的测试物品持续限定的时间段,并且信号传导蛋白质STAT5的磷酸化程度被用作生物活性的定量量度。在这样的测试中,表现出以下品质中的至少一个的测试物品被理解为具有IL-7活性:(a) STAT5磷酸化水平为饱和剂量的人类天然IL-7引起的STAT5磷酸化水平的至少10%;和(b) EC50比人类天然IL-7的EC50高出小于1000倍。当该测试物品是本发明的聚合物缀合物时,优选的是,该缀合物将具有由饱和剂量的人类天然IL-7引起的STAT5磷酸化水平的至少50%的STAT5磷酸化水平和/或比人类天然IL-7的EC50高出小于10倍的EC50。应当理解,聚合物缀合物可以表现出最小量的IL-7生物活性,但仍被理解为本发明范围内的缀合物,由于释放一种或多种水溶性聚合物(其中该缀合物的“下游”版本,例如,相对于施用于患者的版本,缺少一种或多种水溶性聚合物的版本确实表现出以下品质中的至少一种:(a) 由饱和剂量的人类天然IL-7引起的STAT5磷酸化水平的至少10%的STAT5磷酸化水平;和(b) 比人类天然IL-7的EC50高出小于1000倍的EC50)。

[0077] 本领域中已知的其他方法也可以用于评估IL-7功能,包括量电法、分光光度法、色谱法以及辐射测量方法。

[0078] 与测量IL-7部分的活性相联系使用的测定也可以被用来测量在此所述的缀合物的活性。由于给定的缀合物特性(例如,结合可释放键、承受代谢的能力、增加的半衰期、选择性结合特性等等),然而,该缀合物不一定需要表现出与在此定义的IL-7部分相同的活性。

[0079] 水溶性聚合物

[0080] 如先前所论述,每种缀合物包含与水溶性聚合物连接的IL-7部分。就水溶性聚合物来说,该水溶性聚合物是非肽、无毒、非天然存在并且生物相容的。就生物相容性来说,如果与关于活组织的单独或与另一种物质(例如活性剂,如IL-7部分)一起使用一种物质(例如向一位患者给药)有关的有利作用超过任何有害作用(如由一名临床医师(例如一名医生)所评估),那么认为该物质是生物相容的。就非免疫原性来说,如果一种物质的预期使用在体内不产生不希望的免疫反应(例如形成抗体)或如果产生免疫反应而这种反应不被认为是临床上显著或重要的(如由一名临床医师所评估),那么认为该物质是非免疫原性的。特别优选的是非肽水溶性聚合物是生物相容的和非免疫原性的。

[0081] 此外,这种聚合物典型地表征为具有从2至约300个末端。此类聚合物的实例包括(但不限于)聚(烷二醇)(如聚乙二醇(“PEG”)、聚(丙二醇)(“PPG”)、乙二醇和丙二醇的共聚物等)、聚(乙氧基化多元醇)、聚(烯醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(羟烷基甲基丙烯酰胺)、聚(羟烷基甲基丙烯酸酯)、聚(糖)、聚(α -羟基酸)、聚(乙醇醇)、聚膦腈、聚噁唑啉(“POZ”)(其在WO 2008/106186中描述)、聚(N-丙烯酰基吗啉)以及任何前述物质的组合。

[0082] 水溶性聚合物不限于特定结构并且可以是线型的(例如封端的,例如烷氧基PEG或双官能PEG)、分枝的或多臂的(例如叉状PEG或与多元醇核心连接的PEG)、树枝状(或星形)架构,各自具有或不具有一个或多个可降解键。此外,水溶性聚合物的内部结构可以按任何数目的不同重复模式组织起来,并且可以选自下组,该组由以下各项组成:均聚物、交替共聚物、无规共聚物、嵌段共聚物、交替三聚物、无规三聚物以及嵌段三聚物。

[0083] 典型地,活化的PEG以及其他活化的水溶性聚合物(即聚合物试剂)用适合与IL-7部分上的所希望位点偶联的适合活化基团活化。因此,聚合物试剂将具有用于与IL-7部分反应的反应性基团。用于将这些聚合物与活性部分缀合的代表性聚合物试剂以及方法是本领域中已知的并且进一步在以下文献中描述:塞里普斯基S. (Zalipsky, S.) 等人,“官能化聚(乙二醇)来修饰多肽的用途”(“Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides”;聚乙二醇化学:生物技术和生物医学应用(Polyethylene Glycol Chemistry:Biotechnical and Biomedical Biomedical Applications),J.M. 哈里斯(J.M. Harris),纽约普伦纽斯出版社(Plenus Press, New York) (1992);以及塞里普斯基(1995)高级药物评论(Advanced Drug Reviews) 16:157-182。适合与IL-7部分偶联的示例性活化基团尤其包括羟基、马来酰亚胺、酯、缩醛、缩酮、胺、羧基、醛、水合醛、酮、乙烯基酮、硫酮(thione)、硫醇、乙烯基砷、胂。

[0084] 典型地,缀合物中水溶性聚合物的重均分子量是从约100道尔顿到约150,000道尔顿。然而,示例性范围包括在大于5,000道尔顿到约100,000道尔顿范围内、在从约6,000道尔顿到约90,000道尔顿范围内、在从约10,000道尔顿到约85,000道尔顿范围内、在大于10,000道尔顿到约85,000道尔顿范围内、在从约20,000道尔顿到约85,000道尔顿范围内、在从约53,000道尔顿到约85,000道尔顿范围内、在从约25,000道尔顿到约120,000道尔顿范围内、在从约29,000道尔顿到约120,000道尔顿范围内、在从约35,000道尔顿到约120,000道尔顿范围内以及在从约40,000道尔顿到约120,000道尔顿范围内的重均分子量。对于任何给定水溶性聚合物,优选具有在这些范围中一种或多种范围内的分子量的PEG。

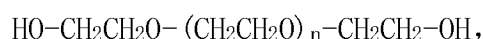
[0085] 水溶性聚合物的示例性重均分子量包括约100道尔顿、约200道尔顿、约300道尔

顿、约400道尔顿、约500道尔顿、约600道尔顿、约700道尔顿、约750道尔顿、约800道尔顿、约900道尔顿、约1,000道尔顿、约1,500道尔顿、约2,000道尔顿、约2,200道尔顿、约2,500道尔顿、约3,000道尔顿、约4,000道尔顿、约4,400道尔顿、约4,500道尔顿、约5,000道尔顿、约5,500道尔顿、约6,000道尔顿、约7,000道尔顿、约7,500道尔顿、约8,000道尔顿、约9,000道尔顿、约10,000道尔顿、约11,000道尔顿、约12,000道尔顿、约13,000道尔顿、约14,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约22,500道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿、约50,000道尔顿、约55,000道尔顿、约60,000道尔顿、约65,000道尔顿、约70,000道尔顿以及约75,000道尔顿。也可以使用具有前述分子量中任一种总分子量的水溶性聚合物的分枝形式(例如包含两种20,000道尔顿聚合物的分枝40,000道尔顿水溶性聚合物)。在一个或多个实施例中,缀合物将不具有任何与具有小于约6,000道尔顿重均分子量的PEG直接或间接连接的PEG部分。

[0086] 当用作聚合物时,PEG将典型地包含多个(OCH_2CH_2)单体[或($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$)单体,这取决于如何定义PEG]。如本说明自始至终使用的,重复单元的数量是通过在“ $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ ”中的下标“n”识别的。因此,值(n)典型地落在以下范围中的一种或多种内:从2到约3400、从约100到约2300、从约100到约2270、从约136到约2050、从约225到约1930、从约450到约1930、从约1200到约1930、从约568到约2727、从约660到约2730、从约795到约2730、从约795到约2730、从约909到约2730以及从约1,200到约1,900。对于已知分子量的任何给定聚合物,通过将聚合物的总重均分子量除以重复单体的分子量有可能确定重复单元的数目(即“n”)。

[0087] 用于本发明中的一种特别优选的聚合物是一种封端的聚合物,即具有至少一个用相对惰性的基团封端的末端的一种聚合物,例如低级 C_{1-6} 烷氧基,虽然也可以使用羟基基团。例如,当聚合物是PEG时,优选的是使用甲氧基-PEG(通常称为mPEG),甲氧基-PEG是线型形式的PEG,其中该聚合物的一个末端是甲氧基($-\text{OCH}_3$),而另一个末端是羟基或可以任选地被化学修饰的其他官能团。

[0088] 在适用于本发明的一个或多个实施例的一种形式中,游离或未结合的PEG是在每一末端处以羟基封端的线型聚合物:



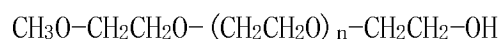
其中(n)典型地范围从零到约4,000。

[0089] 上述聚合物 α -, ω -二羟基聚(乙二醇)可以按简洁形式表示为 $\text{HO}-\text{PEG}-\text{OH}$,其中应当理解, $-\text{PEG}-$ 符号可以表示以下结构单元:



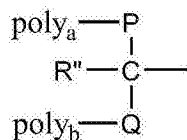
其中(n)如上文所定义。

[0090] 适用于本发明的一个或多个实施例的另一种类型的PEG是甲氧基-PEG-OH或简言之mPEG,其中一个末端是相对惰性的甲氧基,而另一个末端是羟基。以下给出mPEG的结构。



其中(n)如上文所描述。

[0091] 多臂或分枝的PEG分子,如美国专利号5,932,462中所描述的那些PEG分子,也可以用作PEG聚合物。例如,PEG可以具有以下结构:



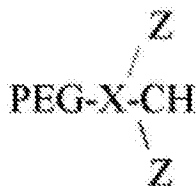
其中:

poly_a和poly_b是PEG主链(相同或不同),如甲氧基聚(乙二醇);

R''是非反应性部分,如H、甲基或PEG主链;并且

P和Q是非反应性键。在一个优选实施例中,分枝的PEG聚合物是甲氧基聚(乙二醇)双取代的赖氨酸。取决于所使用的特定IL-7部分,可以进一步修饰双取代的赖氨酸的反应性酯官能团以形成适合与IL-7部分内部的靶基团反应的官能团。

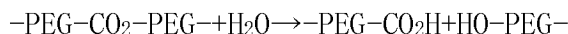
[0092] 另外,PEG可以包括叉状PEG。叉状PEG的一个实例由以下结构表示:



其中:X是具有一个或多个原子的间隔基部分并且每个Z是通过具有限定长度的原子的链与CH连接的活化端基。国际专利申请公开W0 99/45964披露了能够用于本发明的一个或多个实施例中的不同叉状PEG结构。将Z官能团与分枝碳原子连接的原子的链充当系栓基团(tethering group),并且可以包括例如烷基链、醚链、酯链、酰胺链以及其组合。

[0093] PEG聚合物可以包括具有沿PEG的长度而非在PEG链的末端处共价连接的反应性基团(如羧基)的侧挂PEG分子。侧挂反应性基团可以直接或通过间隔基部分(如亚烷基)与PEG连接。

[0094] 除上述形式的PEG以外,还可以制备在聚合物(包括上文描述的聚合物中的任一种)中具有一个或多个弱键或可降解键的聚合物。例如,可以制备在聚合物中具有遭受水解的酯键的PEG。如以下所示,这种水解导致该聚合物裂解成较低分子量的片段:



[0095] 适用作聚合物主链内部可降解键和/或IL-7部分的可降解键的其他可水解降解键包括:碳酸酯键;亚胺键,例如由胺与醛的反应产生(参见例如大内(Ouchi)等人(1997)聚合物预印本(Polymer Preprints) 38(1):582-3);磷酸酯键,例如通过使醇与磷酸酯基团反应所形成;脎键,典型地通过酰肼与醛的反应形成;缩醛键,典型地通过醛与醇之间的反应形成;原酸酯键,例如通过甲酸酯与醇之间的反应形成;酰胺键,由例如位于如PEG的聚合物的末端处的胺基和另一个PEG链的羧基形成;氨基甲酸酯键,由例如具有末端异氰酸酯的PEG与PEG醇的反应形成;肽键,由例如位于如PEG的聚合物末端处的胺基与肽的羧基形成;以及寡核苷酸键,由例如位于聚合物末端的例如亚磷酰胺基与寡核苷酸的5'羟基形成。

[0096] 缀合物的此类任选特征,即将一个或多个可降解键引入聚合物链或引至IL-7部分,可以提供在施用时对缀合物的最终所希望药理学特性的额外控制。例如,可以给予一种大的并且相对惰性的共轭物(即具有附接到其上的一个或多个高分子量PEG链,例如具有一个或多个大于约10,000分子量的PEG链,其中该共轭物实质上不具有生物活性),它被水解以产生一种生物活性共轭物(具有最初PEG链的一部分)。以这种方式,可以更有效地定制缀合物的特性以随时间推移平衡缀合物的生物活性。

[0097] 与缀合物连接的水溶性聚合物还可以是“可释放的”。也就是说，水溶性聚合物释放(通过水解、酶促过程、催化过程或以另外的方式)，由此产生未结合的IL-7部分。在一些情况下，可释放的聚合物与IL-7部分在体内脱离，而不留下水溶性聚合物的任何片段。在其他情况下，可释放的聚合物与IL-7部分在体内脱离，留下相对小的来自水溶性聚合物的片段(例如丁二酸酯标签)。示例性可裂解聚合物包括通过一个碳酸酯键与IL-7部分连接的聚合物。

[0098] 本领域普通技术人员将认识到，与非肽和水溶性聚合物有关的前述论述决不是穷尽性的而是仅为说明性的，并且涵盖具有上述品质的所有聚合材料。如在此所使用，术语“聚合物试剂”总体上是指可以包含水溶性聚合物链段和官能团的整个分子。

[0099] 如上文所描述，本发明的缀合物包含一种与IL-7部分共价连接的水溶性聚合物。典型地，对于任何给定缀合物，将存在一种到三种与具有IL-7活性的一个或多个部分共价连接的水溶性聚合物。然而，在一些情况下，缀合物可以具有1、2、3、4、5、6、7、8或更多种单独地与IL-7部分连接的水溶性聚合物。任何给定水溶性聚合物可以与IL-7部分的氨基酸共价连接或当IL-7部分是(例如)糖蛋白时与IL-7部分的碳水化合物连接。与碳水化合物连接可以如下进行，例如采用唾液酸-叠氮化物化学使用代谢功能化[卢坎斯基(Luchansky)等人(2004)生物化学(Biochemistry) 43(38):12358-12366]或其他适合的方法，例如使用缩水甘油以促进醛基的引入[海尔特(Heldt)等人(2007)欧洲有机化学杂志(European Journal of Organic Chemistry) 32:5429-5433]。

[0100] 在具有IL-7活性的部分和聚合物内部的具体键取决于多种因素。此类因素包括例如所使用的具体键合化学、特定IL-7部分、IL-7部分内部的可使用官能团(用于与聚合物连接或转化为适合的连接位点)、IL-7部分内部额外反应性官能团的存在等。

[0101] 本发明的缀合物可以(不过未必)是前药，这意指聚合物与IL-7部分之间的键是可水解释放的，以允许释放母体部分。示例性可释放键包括羧酸酯、磷酸酯、硫醇酯、酸酐、缩醛、缩酮、酰氧基烷基醚、亚胺、原酸酯、肽以及寡核苷酸。此类键可以容易地通过使用在本领域中常用的偶联方法适当修饰IL-7部分(例如蛋白质的羧基C端，或蛋白质内部所含氨基酸(如丝氨酸或苏氨酸)的侧链羟基，或碳水化合物内部的类似官能团)和/或聚合物试剂来制备。然而，最优选的是这些可水解键，它们易于通过适当活化的聚合物与具有IL-7活性的部分内部所包含的未修饰官能团反应而形成。

[0102] 或者，还可以采用水解稳定键作为用于偶联IL-7部分的键，如酰胺、氨基甲酸酯(urethane)(也称为氨基甲酸酯(carbamate))、胺、硫醚(thioether)(也称为硫醚(sulfide))或脲(urea)(也称为脲(carbamide))键。再次，一种优选的水解稳定键是酰胺。在一种方法中，携带活化酯的水溶性聚合物可以与IL-7部分上的胺基反应，以便由此产生酰胺键，以便由此产生酰胺键。

[0103] 缀合物(相较于未结合的IL-7部分)可能具有或可能不具有可测量程度的IL-7活性。也就是说，根据本发明的聚合物-IL-7部分缀合物将具有未修饰母体IL-7部分的从约0.1%到约100%中任一百分数的生物活性。在一些情况下，聚合物-IL-7部分缀合物可能具有未修饰母体IL-7部分的大于100%的生物活性。优选地，具有极少或不具有IL-7活性的缀合物包含一个使该聚合物与该部分连接的可水解键，从而无论缀合物中是否缺乏(或相对缺乏)活性，在可水解键的水性诱导裂解时活性母体分子(或其衍生物)均释放。此类活性可

以根据所使用的具有IL-7活性的特定部分的已知活性,使用适合的体内或体外模型来确定。

[0104] 对于拥有使具有IL-7活性的部分与聚合物偶联的水解稳定键的缀合物,缀合物将典型地具有可测量程度的生物活性。例如,此类缀合物典型地表征为相对于未结合的IL-7部分的生物活性,具有满足以下百分比中的一种或多种的生物活性:至少约2%、至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约97%、至少约100%以及多于105%(当在一种适合的模型(如在本领域中众所周知的那些模型)中测量时)。优选地,具有水解稳定键(例如酰胺键)的缀合物将具有至少一些程度的未修饰的具有IL-7活性的母体部分的生物活性。

[0105] 现将描述本发明的示例性缀合物。典型地,此类IL-7部分预期共有(至少部分地)与SEQ ID NO:1到7中至少一项所提供的序列类似的氨基酸序列。因此,当将提及SEQ ID NO:1到7内的特定位置或原子时,此类提及是仅为方便起见,并且本领域普通技术人员将能够容易地确定具有IL-7活性的其他部分中的相应位置或原子。具体来说,在此所提供的关于天然人IL-7的说明经常可适用于前述中任一项的片段、缺失变体、置换变体或添加变体。

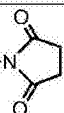
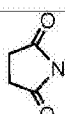
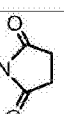
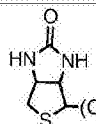
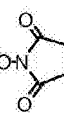
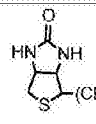
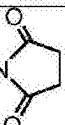
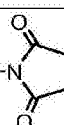
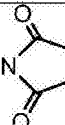
[0106] IL-7部分上的氨基提供IL-7部分与水溶性聚合物之间的连接点。使用SEQ ID NO:1到7中所提供的氨基酸序列,显而易见的是在具有可以用于缀合的ε氨基酸的每个氨基酸序列中存在几个赖氨酸残基。此外,任何蛋白质的N端胺也可以充当连接点。

[0107] 存在可用于与IL-7部分的可用胺形成共价键的适合聚合物试剂的多个实例。下表1中提供特定实例以及相应的缀合物。在该表中,变量(n)表示重复单体单元的数目,并且“-NH-(IL-7)”表示与聚合物试剂缀合之后IL-7部分的残基。虽然表1中所呈现的每个聚合部分[例如 $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ 或 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$]都以“CH₃”基团封端,但“CH₃”基团可以用其他基团(例如H和苯甲基)替代。

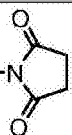
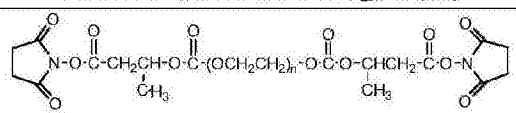
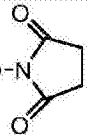
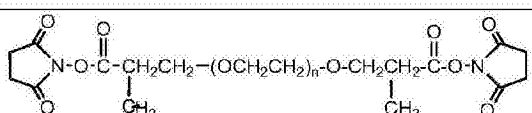
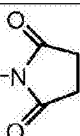
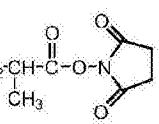
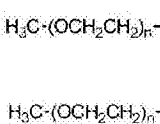
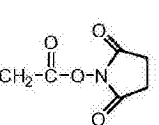
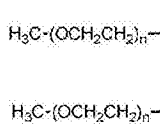
表1

胺选择性聚合物试剂以及自其形成的IL-7部分缀合物

聚合物试剂	相应的缀合物
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \diagdown \diagup \end{array} \text{N} \\ \text{mPEG-氧羰基咪唑试剂}$	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{IL-7}) \\ \text{氨基甲酸酯键}$

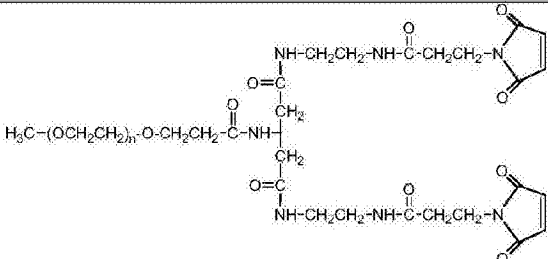
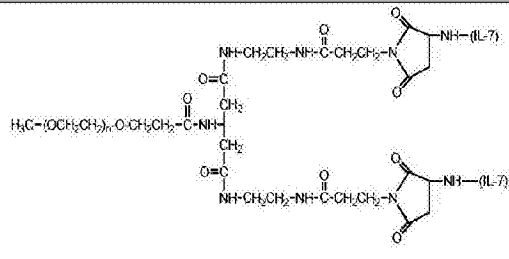
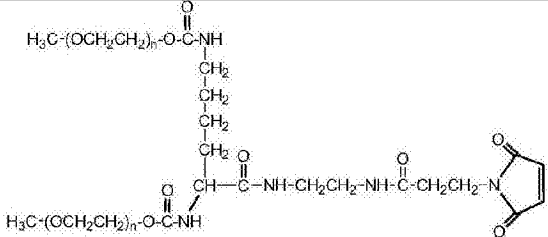
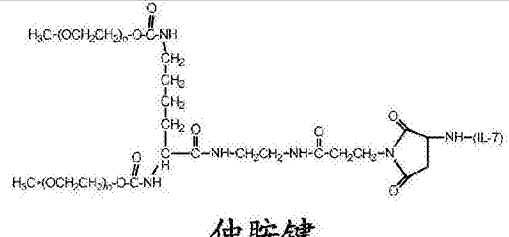
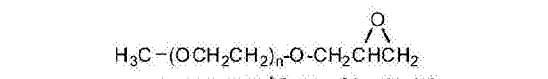
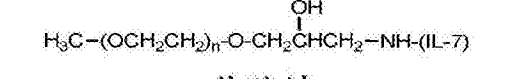
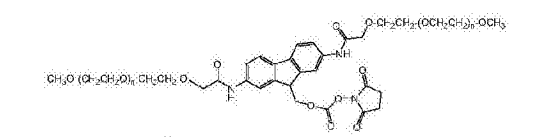
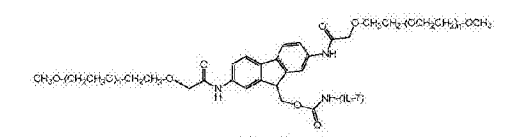
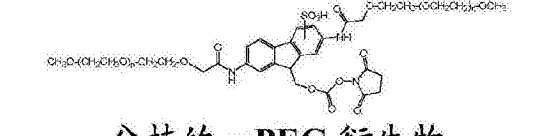
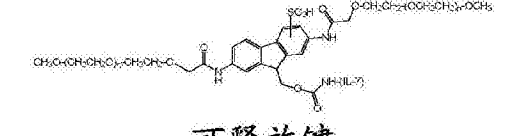
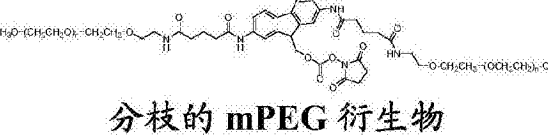
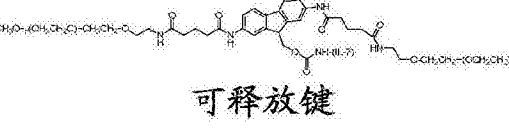
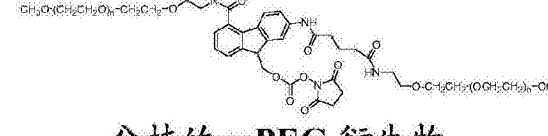
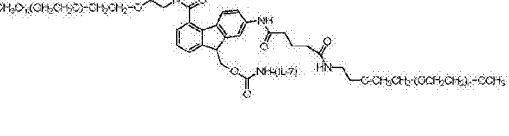
聚合物试剂	相应的缀合物
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ mPEG 硝基苯基试剂	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 氨基甲酸酯键
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_2(\text{Cl})_3$ mPEG-碳酸三氯苯酯试剂	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 氨基甲酸酯键
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  mPEG-琥珀酰亚胺基试剂	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{N}-(\text{IL-7})$ 酰胺键
 $\text{N}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  同型双官能 PEG-琥珀酰亚胺基试剂	$(\text{IL-7})-\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 酰胺键
 $-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  异型双官能 PEG-琥珀酰亚胺基试剂	 $-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 酰胺键
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  mPEG-琥珀酰亚胺基试剂	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 酰胺键
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  mPEG-琥珀酰亚胺基试剂	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 酰胺键
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  mPEG 琥珀酰亚胺基试剂	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 酰胺键
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  mPEG-琥珀酰亚胺基试剂	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 酰胺键

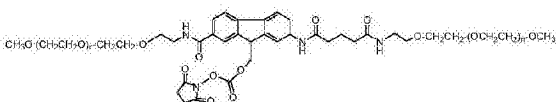
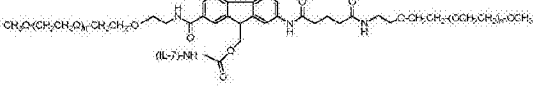
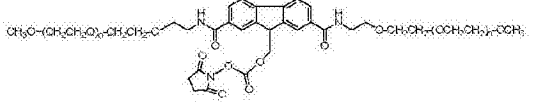
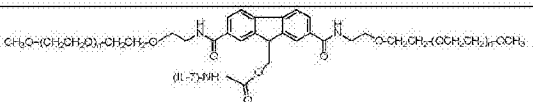
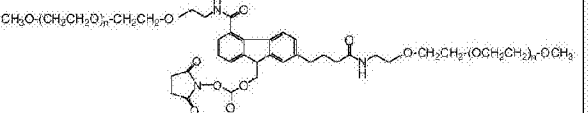
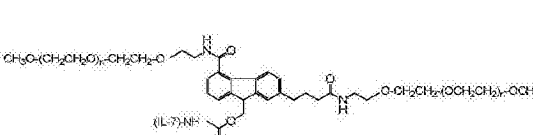
聚合物试剂	相应的缀合物
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{C}_6\text{H}_4 \diagdown \\ \text{N}=\text{N} \end{array}$ mPEG-苯并三唑碳酸酯试剂	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 氨基甲酸酯键
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{C}_6\text{H}_4 \diagdown \\ \text{N}=\text{N} \end{array}$ mPEG-琥珀酰亚胺基试剂	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 氨基甲酸酯键
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{C}_6\text{H}_4 \diagdown \\ \text{N}=\text{N} \end{array}$ mPEG-琥珀酰亚胺基试剂	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 氨基甲酸酯键
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{C}_6\text{H}_4 \diagdown \\ \text{N}=\text{N} \end{array}$ mPEG 琥珀酰亚胺基试剂	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 氨基甲酸酯键
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{C}_6\text{H}_4 \diagdown \\ \text{N}=\text{N} \end{array}$ 分枝的 mPEG2-N-羟基琥珀酰亚胺试剂	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 酰胺键
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{C}_6\text{H}_4 \diagdown \\ \text{N}=\text{N} \end{array}$ 分枝的 mPEG2-醛试剂	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 仲胺键
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{C}_6\text{H}_4 \diagdown \\ \text{N}=\text{N} \end{array}$ mPEG-琥珀酰亚胺基试剂	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 酰胺键

聚合物试剂	相应的缀合物
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  mPEG-琥珀酰亚胺基试剂	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 酰胺键
 同型双官能 PEG-琥珀酰亚胺基试剂	$(\text{IL-7})-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 酰胺键
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  mPEG-琥珀酰亚胺基试剂	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 酰胺键
 同型双官能 PEG-丙酸琥珀酰亚胺酯试剂	$(\text{IL-7})-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 酰胺键
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}$  mPEG-琥珀酰亚胺基试剂	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 酰胺键
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2$  分枝的 mPEG2-N-羟基琥珀酰亚胺试剂	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2$  酰胺键
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2$  分枝的 mPEG2-N-羟基琥珀酰亚胺试剂	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2$  酰胺键

聚合物试剂	相应的缀合物
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{S}-\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ mPEG-硫酯试剂	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 酰胺键 (典型地到具有 N 端半胱氨酸或组氨酸的 IL-7 部分上)
$\overset{\text{O}}{\parallel}\text{HC}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$ 同型双官能 PEG 丙醛试剂	$\text{NH}-(\text{IL-7})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 仲胺键
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$ mPEG 丙醛试剂	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 仲胺键
$\overset{\text{O}}{\parallel}\text{HCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$ 同型双官能 PEG 丁醛试剂	$\text{HN}-(\text{IL-7})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 仲胺键
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$ mPEG 丁醛试剂	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 仲胺键
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$ mPEG 丁醛试剂	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 仲胺键
$\begin{array}{c} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH} \\ \text{HN}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH} \end{array}$ 同型双官能 PEG 丁醛试剂	$\begin{array}{c} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{IL-7}) \\ \text{HN}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{IL-7}) \end{array}$ 仲胺键
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH} \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH} \end{array}$ 分枝的 mPEG2 丁醛试剂	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{IL-7}) \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{IL-7}) \end{array}$ 仲胺键
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{HC}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH} \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{HC}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH} \end{array}$ 分枝的 mPEG2 丁醛试剂	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{HC}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{IL-7}) \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{HC}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{IL-7}) \end{array}$ 仲胺键

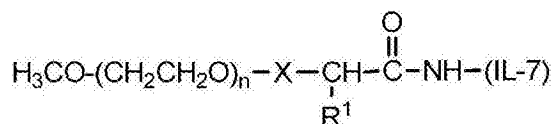
聚合物试剂	相应的缀合物
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{OCH}_2\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ mPEG 缩醛试剂	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 仲胺键
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \diagdown \diagup \end{array} \text{O}$ mPEG 哌啶酮试剂	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \diagdown \diagup \end{array} \text{NH}-(\text{IL-7})$ 仲胺键 (到仲碳上)
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_{2-5}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_3$ mPEG 甲基酮试剂	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_{2-5}-\overset{\text{NH}-(\text{IL-7})}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{CH}_3$ 仲胺键 (到仲碳上)
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{S}-\text{CH}_2-\text{CF}_3$ mPEG 三氟乙基磺酸酯 (Tresylate) 试剂	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{IL-7})$ 仲胺键
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \diagdown \diagup \end{array} \text{O}$ mPEG 马来酰亚胺试剂 (在某些反应条件下, 例如 pH > 8)	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \diagdown \diagup \end{array} \text{NH}-(\text{IL-7})$ 仲胺键
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \diagdown \diagup \end{array} \text{O}$ mPEG 马来酰亚胺试剂 (在某些反应条件下, 例如 pH > 8)	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \diagdown \diagup \end{array} \text{NH}-(\text{IL-7})$ 仲胺键
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \diagdown \diagup \end{array} \text{O}$ mPEG 马来酰亚胺试剂 (在某些反应条件下, 例如 pH > 8)	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \diagdown \diagup \end{array} \text{NH}-(\text{IL-7})$ 仲胺键

聚合物试剂	相应的缀合物
 mPEG 叉状马来酰亚胺试剂 (在某些反应条件下, 例如 pH > 8)	 仲胺键
 分枝的 mPEG2 马来酰亚胺试剂 (在某些反应条件下, 例如 pH > 8)	 仲胺键
 mPEG 环氧化物试剂 (在某些反应条件下, 例如 pH > 8)	 仲胺键
 分枝的 mPEG 衍生物	 可释放键
 分枝的 mPEG 衍生物	 可释放键
 分枝的 mPEG 衍生物	 可释放键
 分枝的 mPEG 衍生物	 可释放键

聚合物试剂	相应的缀合物
 分枝的 mPEG 衍生物	 可释放键
 分枝的 mPEG 衍生物	 可释放键
 分枝的 mPEG 衍生物	 可释放键

[0108] 一种聚合物试剂与IL-7部分的氨基的缀合可以通过多种技术来实现。在一种方法中,IL-7部分可以与用琥珀酰亚胺基衍生物(或其他活化酯基,其中可以使用与对这些替代性包含活化酯基的聚合物试剂所述的方法类似的方法)官能化的聚合物试剂缀合。在这种方法中,携带琥珀酰亚胺基衍生物的聚合物可以在水介质中在7到9.0的pH值与IL-7部分连接,不过使用不同的反应条件(例如如6到7的更低pH值,或不同温度和/或小于15℃)可以导致聚合物与IL-7部分上的不同位置连接。另外,可以通过使胺封端的非肽水溶性聚合物与携带活化羧酸基团的IL-7部分反应来形成酰胺键。

[0109] 示例性缀合物涵盖于以下结构范围内:



其中:

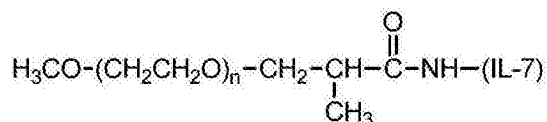
(n)是具有从2到4000的值的整数;

X是间隔基部分;

R¹是有机基团;并且

IL-7是IL-7部分的残基。

[0110] 示例性缀合物由以下结构涵盖:

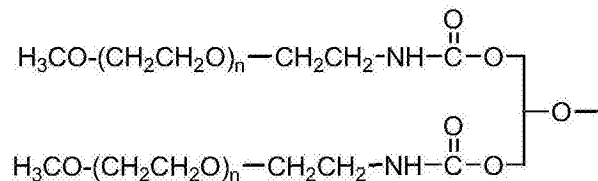


其中(n)是具有从2到4000的值的整数,并且IL-7是IL-7部分的残基。

[0111] 可用于将IL-7部分与聚合物试剂缀合的另一种典型方法是使用还原性胺化来将IL-7部分的伯胺与用酮、醛或其水合形式(例如水合酮、水合醛)官能化的聚合物试剂结合。在这种方法中,来自IL-7部分的伯胺与醛或酮的羰基(或水合醛或酮的相应的包含羟基的基团)反应,由此形成希夫碱(Schiff base)。通过使用还原剂(如硼氢化钠),希夫碱随后可以转而还原地转化成稳定缀合物。选择性反应(例如在N端处)是可能的,特别是在用酮或α-

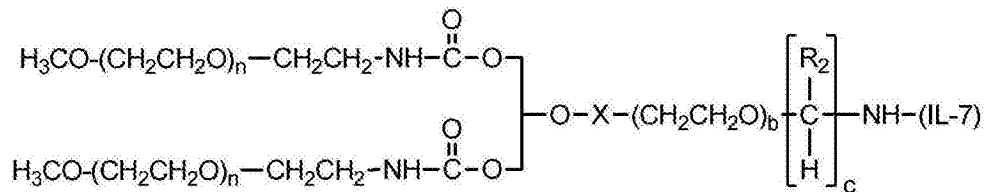
甲基支链醛官能化的聚合物情况下和/或在特定反应条件(例如降低的pH值)下。

[0112] 水溶性聚合物处于分枝形式的本发明示例性缀合物包括其中水溶性聚合物涵盖于以下结构范围内的那些缀合物:



其中每一(n)独立地是具有从2到4000的值的整数。

[0113] 本发明的示例性缀合物涵盖于以下结构范围内:



其中:

每一(n)独立地是具有从2到4000的值的整数;

X是间隔基部分;

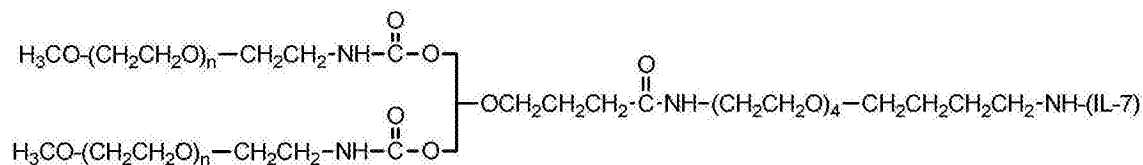
(b)是具有从2到6的值的整数;

(c)是具有从2到6的值的整数;

R²在每次出现时独立地是H或低级烷基;并且

IL-7是IL-7部分的残基。

[0114] 本发明的示例性缀合物涵盖于以下结构范围内:

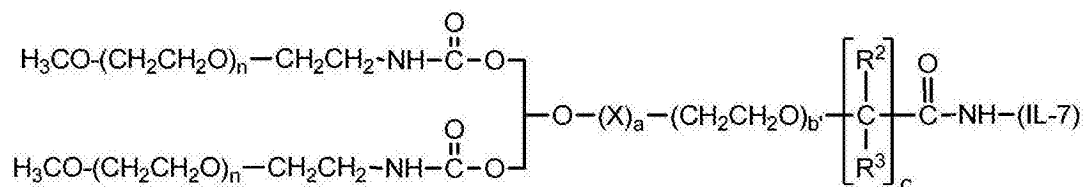


其中:

每一(n)独立地是具有从2到4000的值的整数;并且

IL-7是IL-7部分的残基。

[0115] 本发明的其他示例性缀合物涵盖于以下结构范围内:



其中:

每一(n)独立地是具有从2到4000的值的整数;

(a)是零或一;

当存在时,X是包含一个或多个原子的间隔基部分;

(b')是零或具有1到10的值的整数;

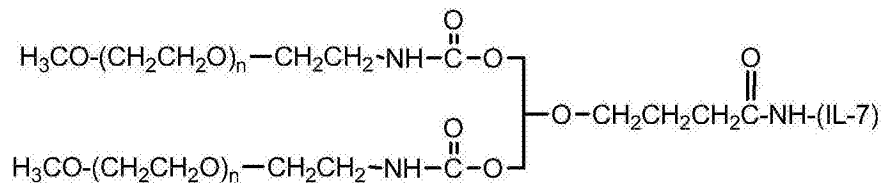
(c) 是有1到10的值的整数；

在每次出现时， R^2 独立地是H或有机基团；

在每次出现时， R^3 独立地是H或有机基团；并且

IL-7是IL-7部分的残基。

[0116] 本发明的再其他示例性缀合物涵盖于以下结构范围内：

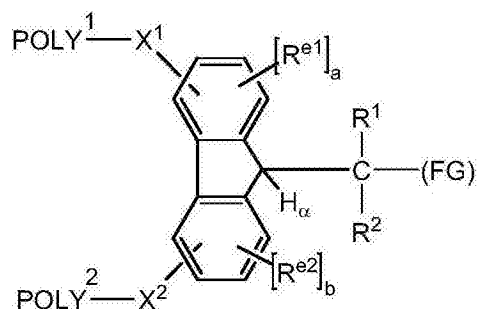


其中：

每一 (n) 独立地是具有从2到4000的值的整数；并且

IL-7是IL-7部分的残基。

[0117] 包括可释放键的示例性缀合物包括IL-7部分与涵盖在下式内的聚合物试剂缀合的那些缀合物：



其中：

POLY¹是第一水溶性聚合物；

POLY²是第二水溶性聚合物；

X¹是第一间隔基部分；

X²是第二间隔基部分；

H_a是可电离氢原子；

R¹是H或有机基团；

R²是H或有机基团；

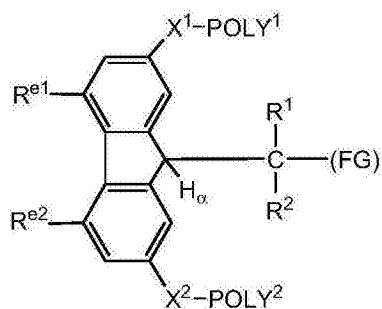
(a) 是零或一；

(b) 是零或一；

当存在时，R^{e1}是第一电子改变基团；

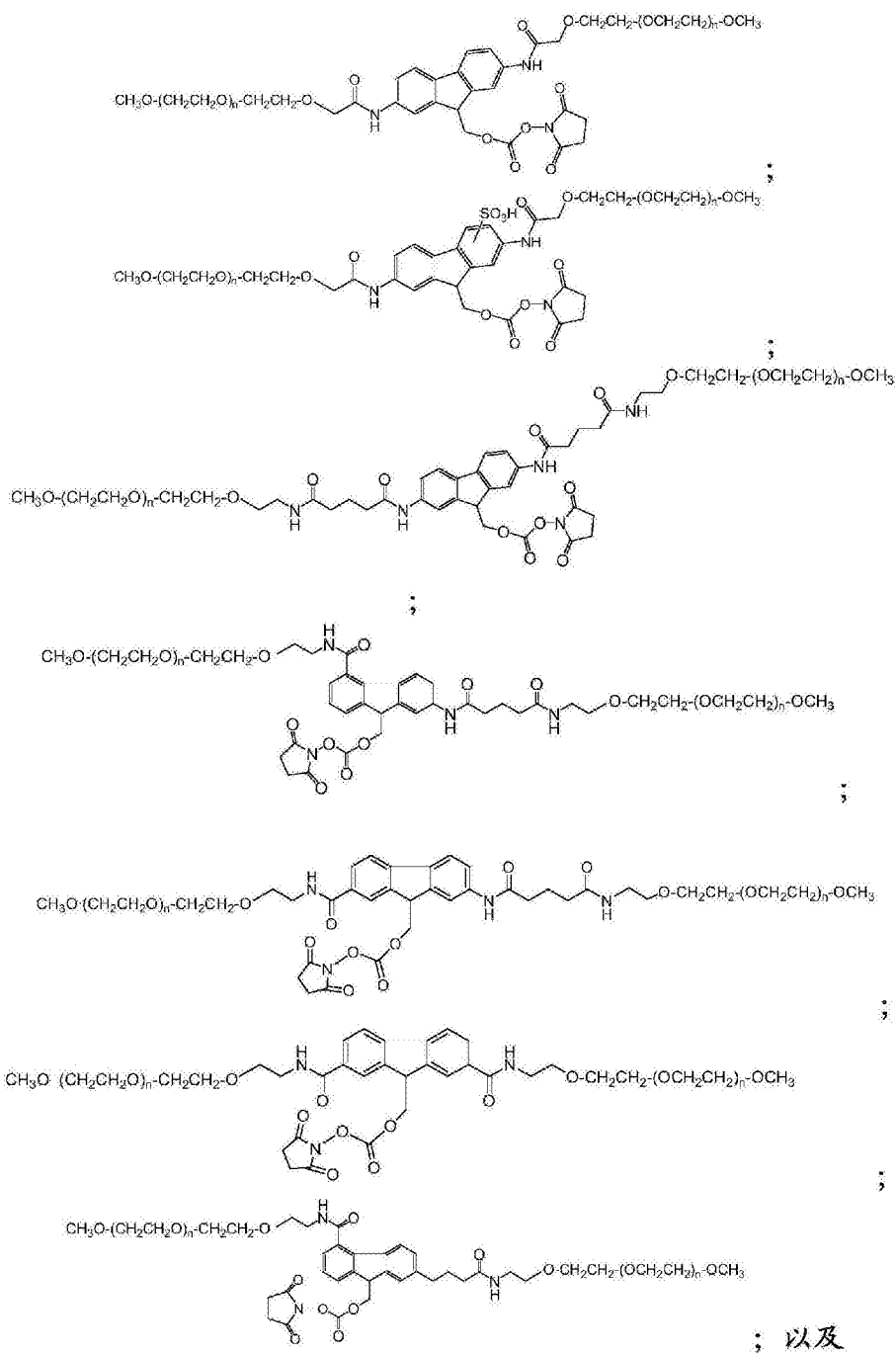
当存在时，R^{e2}是第二电子改变基团；并且

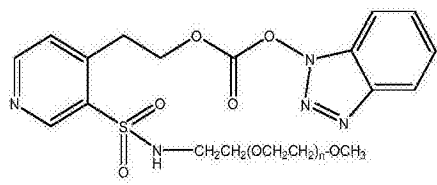
(FG) 是能够与活性剂的氨基反应以形成可释放键(如氨基甲酸酯键)的官能团。在这个式中，涵盖了具有更确定结构的聚合物试剂：



其中POLY¹、POLY²、X¹、X²、R¹、R²、H_a以及(FG)各自如先前所定义,并且R^{e1}是第一电子改变基团;并且R^{e2}是第二电子改变基团。

[0118] 再其他示例性聚合物试剂落入下式范围内:

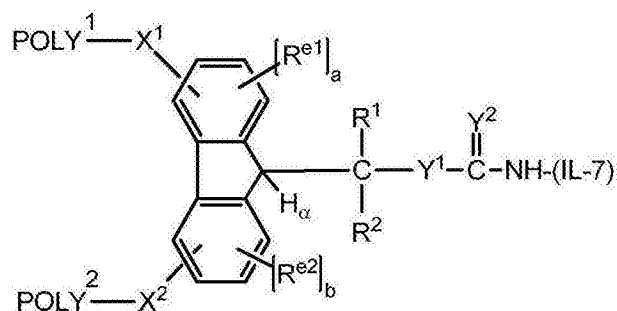




其中,对于每种结构并且在每种情况下,(n)独立地是从4到1500的整数。

[0119] 这些提供可释放键的聚合物试剂可以根据美国专利申请公开号2006/0293499中所阐述的程序来制备。

[0120] 使用提供可释放键的聚合物试剂所形成的示例性缀合物包括具有下式的那些缀合物:



其中:

POLY¹是第一水溶性聚合物;

POLY²是第二水溶性聚合物;

X¹是第一间隔基部分;

X²是第二间隔基部分;

H_α是可电离氢原子;

R¹是H或有机基团;

R²是H或有机基团;

(a) 是零或一;

(b) 是零或一;

当存在时,R^{ex1}是第一电子改变基团;

当存在时,R^{ex2}是第二电子改变基团;

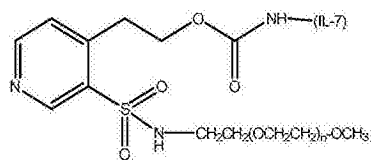
Y¹是O或S;

Y²是O或S;并且

IL-7是IL-7部分的残基。

[0121] 示例性缀合物具有以下结构:





其中,对于每种结构并且在每种情况下,(n)独立地是从4到1500的整数,并且IL-7是IL-7部分的残基。

[0122] 羧基表示可以充当IL-7部分上的连接点的另一种官能团。在结构上,缀合物将包含以下结构:



其中IL-7和相邻羰基与包含羧基的IL-7部分相对应,X是键,优选地是选自O、N(H)以及S的杂原子,并且POLY是水溶性聚合物,例如PEG,任选地以封端部分终止。

[0123] C(O)-X键从携带末端官能团的聚合衍生物与包含羧基的IL-7部分之间的反应产生。如上文所论述,特定键将取决于所利用的官能团的类型。如果聚合物是用羟基末端官能化或“活化”的,那么所得键将是羧酸酯并且X将是O。如果聚合物主链用硫醇基官能化,那么所得键将是硫酯并且X将是S。当使用某些多臂、分枝或叉状聚合物时,C(O)X部分以及具体来说X部分可以是相对更复杂的并且可以包括更长的键结构。

[0124] 包含酰肼部分的水溶性衍生物也适用于在羰基和羧酸处缀合。就IL-7部分不包含羰基部分或羧酸来说,可以使用本领域的普通技术人员已知的技术来添加羰基部分或羧酸。例如,可以通过还原羧酸(例如C端羧酸)和/或通过提供糖基化或糖化(其中所添加的糖具有羰基部分)形式的IL-7部分来引入羰基部分。就包含羧酸的IL-7部分来说,PEG-肼试剂可以在偶联剂(例如DCC)存在下与IL-7部分共价连接[例如mPEG-OCH₂C(O)NHNH₂+HOC(O)-(IL-7)产生mPEG-OCH₂C(O)NHNHC(O)-(IL-7)]。下表2中提供包含酰肼部分的水溶性衍生物的特定实例以及相应的缀合物。另外,包含活化酯(例如琥珀酰亚胺基)的任何水溶性衍生物可以通过使包含活化酯的水溶性聚合物衍生物与肼(NH₂-NH₂)或肼基甲酸叔丁酯[NH₂NHCO₂C(CH₃)₃]反应来转化成包含酰肼部分。在该表中,变量(n)表示重复单体单元的数目,并且“-C(O)-(IL-7)”表示与聚合物试剂缀合之后IL-7部分的残基。任选地,可以使用适合的还原剂还原腙键。虽然表2中所呈现的每个聚合部分[例如(OCH₂CH₂)_n或(CH₂CH₂O)_n]都以“CH₃”基团封端,但“CH₃”基团可以用其他基团(例如H和苯甲基)替代。

表2

羧基特异性聚合物试剂以及自其形成的IL-7部分缀合物

聚合物试剂	相应的缀合物
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ mPEG-胍试剂	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{IL-7})$ 胍键
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ mPEG-胍试剂	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{IL-7})$ 胍键
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ mPEG-胍试剂	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{IL-7})$ 胍键
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\cdot\text{NH}-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ mPEG-胍试剂	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{H}}{\text{N}}-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{IL-7})$ 胍键
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{S}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ mPEG-胍试剂	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{S}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{IL-7})$ 胍键
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\cdot\text{NH}-\text{NH}-\overset{\text{S}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ mPEG-胍试剂	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{H}}{\text{N}}-\text{NH}-\overset{\text{S}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{IL-7})$ 胍键

聚合物试剂	相应的缀合物
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ mPEG-胍试剂	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{IL}-7)$ 胍键
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ mPEG-胍试剂	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{IL}-7)$ 胍键
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2$ mPEG-胍试剂	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-(\text{IL}-7)$ C(O)NHNHC(O)键

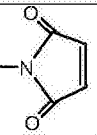
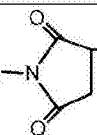
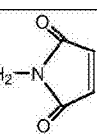
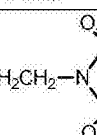
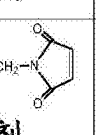
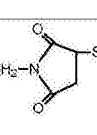
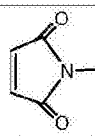
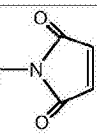
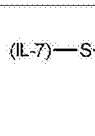
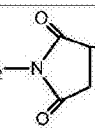
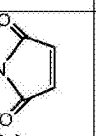
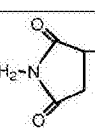
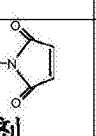
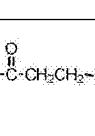
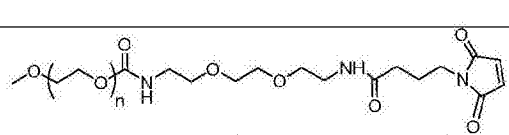
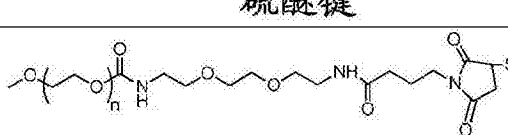
[0125] 在IL-7部分内部所包含的硫醇基可以充当水溶性聚合物的有效连接位点。具体来说,当IL-7部分是蛋白质时,半胱氨酸残基提供硫醇基。此类半胱氨酸残基中的硫醇基可以随后与对与硫醇基反应具有特异性的活化PEG反应,例如如美国专利号5,739,208和WO 01/62827中所描述的N-马来酰亚胺基聚合物或其他衍生物。另外,受保护的硫醇可以并入活化糖蛋白的寡糖侧链中,随后用硫醇反应性水溶性聚合物脱保护。

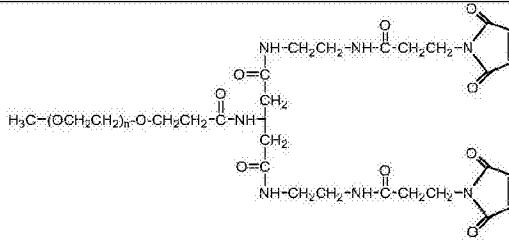
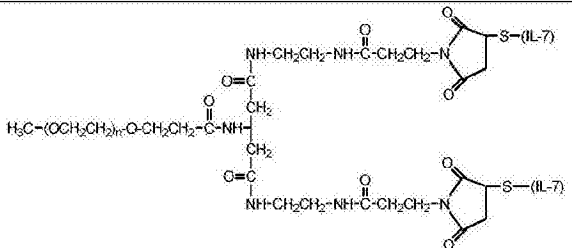
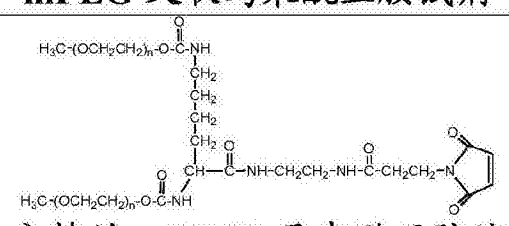
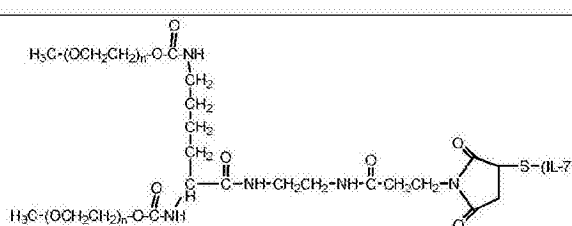
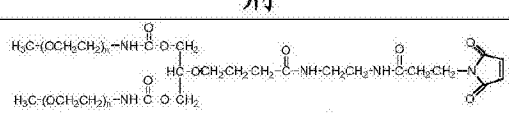
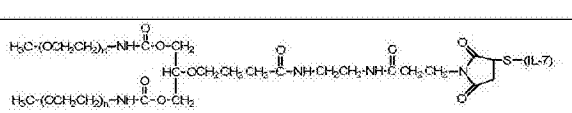
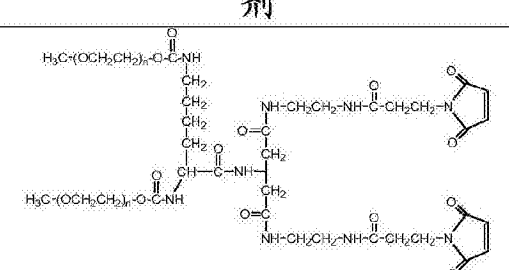
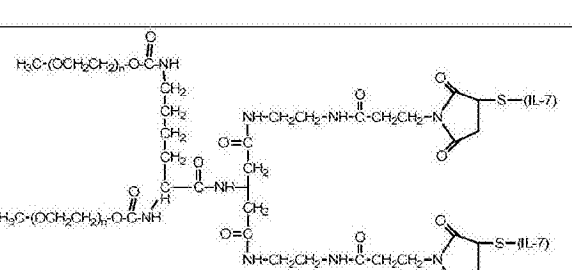
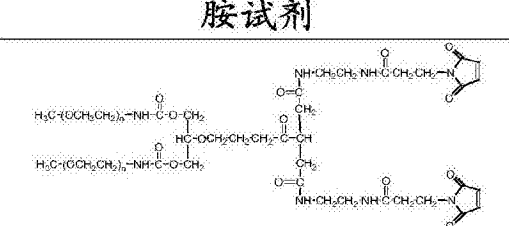
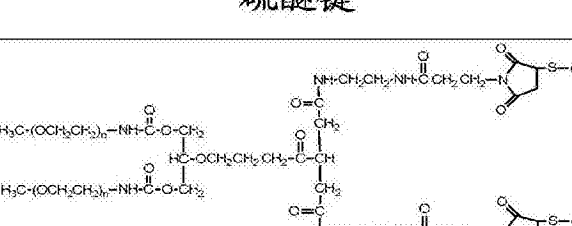
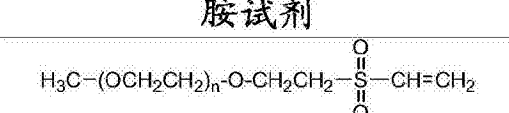
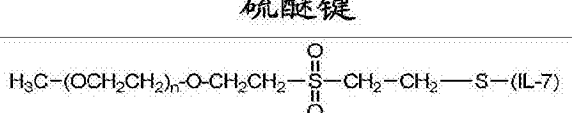
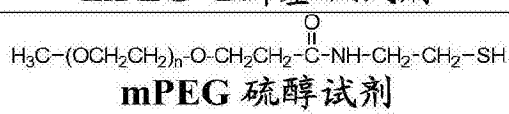
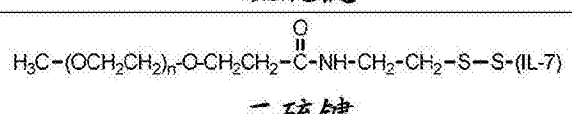
[0126] 下表3中提供试剂的特定实例以及相应的缀合物。在该表中,变量(n)表示重复单体单元的数目并且“-S-(IL-7)”表示与水溶性聚合物缀合之后的IL-7部分残基。虽然表3中所呈现的每个聚合部分[例如 $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ 或 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$]都以“CH₃”基团封端,但“CH₃”基团可以用其他基团(例如H和苯甲基)替代。

[0127] 就与示例性IL-7部分相应的SEQ ID NO:1来说,可以看到,在位置3、35、48、93、130和142处存在半胱氨酸残基。因此,示例性硫醇连接位点包括位置3、35、48、93、130和142。另外,有可能使用常规合成技术将半胱氨酸残基添加至IL-7部分。参见例如WO 90/12874中关于添加半胱氨酸残基所描述的程序,其中此类程序可以改造用于IL-7部分。另外,常规基因工程化方法也可以用来将半胱氨酸残基引入到IL-7部分中。然而,在一些实施例中,优选的是不引入额外的半胱氨酸残基和/或硫醇基。

表3

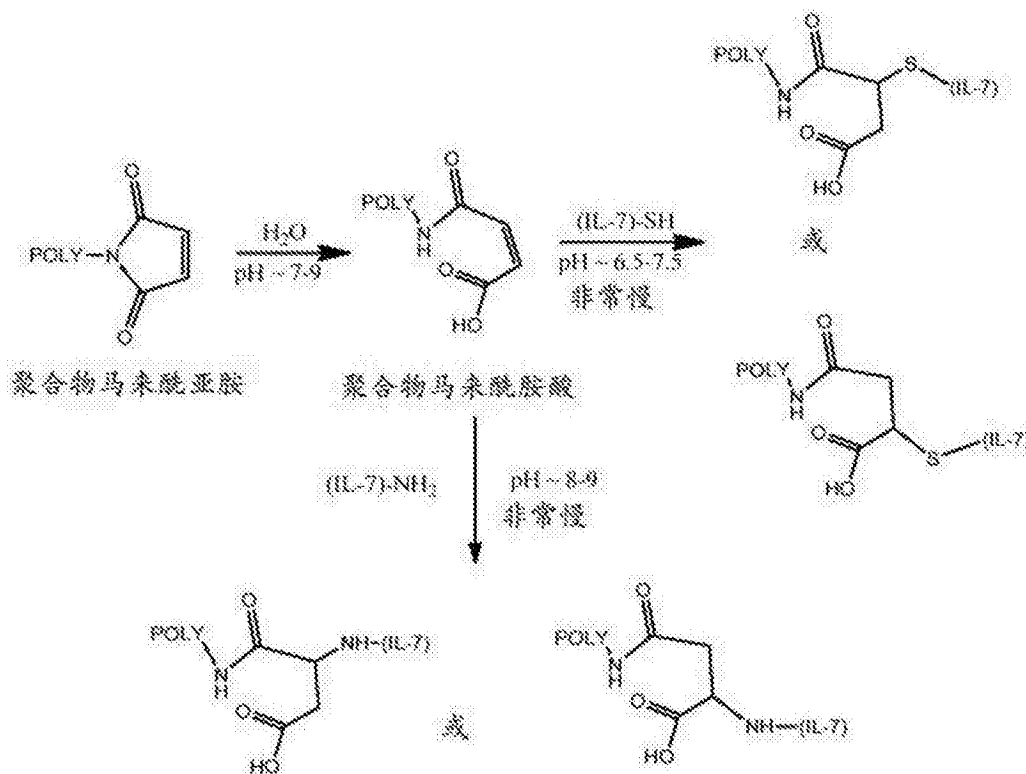
硫醇选择性聚合物试剂以及自其形成的IL-7部分缀合物

聚合物试剂	相应的缀合物
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  mPEG 马来酰亚胺试剂	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  硫醚键
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  mPEG 马来酰亚胺试剂	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  硫醚键
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  mPEG 马来酰亚胺试剂	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  硫醚键
 $\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  同型双官能 mPEG 马来酰亚胺试剂	 $\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  硫醚键
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  mPEG 马来酰亚胺试剂	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  硫醚键
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  mPEG 马来酰亚胺试剂	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$  硫醚键
 mPEG 马来酰亚胺试剂	 硫醚键

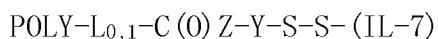
聚合物试剂	相应的缀合物
 mPEG 叉状马来酰亚胺试剂	 硫醚键
 分枝的 mPEG2 马来酰亚胺试剂	 硫醚键
 分枝的 mPEG2 马来酰亚胺试剂	 硫醚键
 分枝的 mPEG2 叉状马来酰亚胺试剂	 硫醚键
 分枝的 mPEG2 叉状马来酰亚胺试剂	 硫醚键
 mPEG 乙烯基砷试剂	 硫醚键
 mPEG 硫醇试剂	 二硫键

聚合物试剂	相应的缀合物
$\text{HS}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{SH}$ 同型双官能 PEG 硫醇试剂	$(\text{IL}-7)-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-(\text{IL}-7)$ 二硫键
$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{C}_6\text{H}_4\text{N}$ mPEG 二硫化物试剂	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-(\text{IL}-7)$ 二硫键
$\text{C}_6\text{H}_4\text{N}-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{C}_6\text{H}_4\text{N}$ 同型双官能二硫化物试剂	$(\text{IL}-7)-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-(\text{IL}-7)$ 二硫键

[0128] 就由携带一个或多个马来酰亚胺官能团(无论马来酰亚胺是否与IL-7部分上的胺或硫醇基反应)的水溶性聚合物形成的缀合物来说,水溶性聚合物的相应马来酰胺酸形式也可以与IL-7部分反应。在某些条件下(例如pH值是约7-9并且在水存在下),马来酰亚胺环将“打开”以形成相应的马来酰胺酸。马来酰胺酸转而可以与IL-7部分的胺或硫醇基反应。下文示意性地示出基于示例性马来酰胺酸的反应。POLY表示水溶性聚合物,并且IL-7表示IL-7部分。



[0129] 根据本发明的代表性缀合物可以具有以下结构:



其中POLY是水溶性聚合物,L是任选的连接物,Z是选自下组的杂原子,该组由以下各项组成:O、NH以及S,并且Y选自下组,该组由以下各项组成:C₂₋₁₀烷基、C₂₋₁₀取代的烷基、芳基以及取代的芳基,并且IL-7是IL-7部分。可以与IL-7部分反应并且产生这种类型的缀合物的聚合物试剂在美国专利申请公开号2005/0014903中描述。

[0134] 就聚合物试剂来说,在此以及其他地方所描述的那些聚合物试剂可以购自商业来源或由可商购的起始材料制备。另外,文献中描述了用于制备聚合物试剂的方法。

[0135] IL-7部分与非肽水溶性聚合物之间的连接可以是直接的,其中没有居间原子位于IL-7部分与聚合物之间,或是间接的,其中一个或多个原子位于IL-7部分与聚合物之间。就间接连接来说,“间隔基部分”充当IL-7部分的残基与水溶性聚合物之间的连接物。构成间隔基部分的一个或多个原子可以包括碳原子、氮原子、硫原子、氧原子以及其组合中的一项或多项。间隔基部分可以包括酰胺、仲胺、氨基甲酸酯、硫醚和/或二硫基团。特定间隔基部分的非限制性实例包括选自下组的那些,该组由以下各项组成: -O-、-S-、-S-S-、-C(O)-、-C(O)-NH-、-NH-C(O)-NH-、-O-C(O)-NH-、-C(S)-、-CH₂-、-CH₂-CH₂-、-CH₂-CH₂-CH₂-、-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-、-O-CH₂-、-CH₂-O-、-O-CH₂-CH₂-、-CH₂-O-CH₂-、-CH₂-CH₂-O-、-O-CH₂-CH₂-CH₂-、-CH₂-O-CH₂-CH₂-、-CH₂-CH₂-O-CH₂-、-CH₂-CH₂-CH₂-O-、-O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-、-CH₂-O-CH₂-CH₂-CH₂-、-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-、-CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-、-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-、-C(O)-NH-CH₂-、-C(O)-NH-CH₂-CH₂-、-CH₂-C(O)-NH-CH₂-、-CH₂-CH₂-C(O)-NH-、-C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-、-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-、-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-、-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-、-C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-、-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-、-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-、-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-、-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-、-C(O)-O-CH₂-、-CH₂-C(O)-O-CH₂-、-CH₂-CH₂-C(O)-O-CH₂-、-C(O)-O-CH₂-CH₂-、-NH-C(O)-CH₂-、-CH₂-NH-C(O)-CH₂-、-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-、-NH-C(O)-CH₂-CH₂-、-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-、-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-、-C(O)-NH-CH₂-、-C(O)-NH-CH₂-CH₂-、-O-C(O)-NH-CH₂-、-O-C(O)-NH-CH₂-CH₂-、-NH-CH₂-、-NH-CH₂-CH₂-、-CH₂-NH-CH₂-、-CH₂-CH₂-NH-CH₂-、-C(O)-CH₂-、-C(O)-CH₂-CH₂-、-CH₂-C(O)-CH₂-、-CH₂-CH₂-C(O)-CH₂-、-CH₂-CH₂-C(O)-CH₂-CH₂-、-CH₂-CH₂-C(O)-、-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-、-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-、-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-、-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-、-O-C(O)-NH-[CH₂]_h-(OCH₂CH₂)_j-、二价环烷基、-O-、-S-、氨基酸、-N(R⁶)-、以及任何前述间隔基部分中的两项或更多项的组合,其中R⁶是H或选自下组的有机基团,该组由以下各项组成:烷基、被取代的烷基、烯基、被取代的烯基、炔基、被取代的炔基、芳基以及被取代的芳基,(h)是零到六,并且(j)是零到20。其他的特定间隔基部分具有以下结构:-C(O)-NH-(CH₂)₁₋₆-NH-C(O)-、-NH-C(O)-NH-(CH₂)₁₋₆-NH-C(O)-以及-O-C(O)-NH-(CH₂)₁₋₆-NH-C(O)-,其中每个亚甲基后的下标值表示结构中所包含的亚甲基的数目,例如(CH₂)₁₋₆意指该结构可以包括1、2、3、4、5或6个亚甲基。另外,上述间隔基部分中的任一项都可以进一步包括环氧乙烷低聚物链,所述环氧乙烷低聚物链包含1到20个环氧乙烷单体单元[即,-(CH₂CH₂O)₁₋₂₀]。也就是说,环氧乙烷低聚物链可以出现在间隔基部分之前或之后,并且任选地在包含两个或更多个原子的间隔基部分中的任何两个原子之间。另外,如果低聚物与聚合物链段相邻并且只表示该聚合物链段的延伸,那么该低聚物链将不被视为间隔基部分的一部分。

[0136] 组合物

[0137] 缀合物典型地是组合物的一部分。总体上,该组合物包含多种缀合物,优选地不过未必每一缀合物都是由相同的IL-7部分组成(即在整个组合物内,只找到一种类型的IL-7部分)。另外,组合物可以包含多种缀合物,其中任何给定缀合物都是由一个选自下组的部

分组成,该组由两种或更多种不同的IL-7部分组成(即在整个组合物内,找到两种或更多种不同的IL-7部分)。然而,最佳地,组合物中基本上所有缀合物(例如组合物中的多种缀合物的85%或更多)各自包含相同的IL-7部分。

[0138] 组合物可以包含单一缀合物种类(例如单聚乙二醇化缀合物,其中对于组合物中的基本上所有缀合物来说单一聚合物在相同位置处连接)或多种缀合物种类的混合物(例如多种单聚乙二醇化缀合物的混合物,其中聚合物的连接在不同位点处发生,和/或单聚乙二醇化、二聚乙二醇化以及三聚乙二醇化缀合物的混合物)。组合物还可以包含具有四种、五种、六种、七种、八种或更多种与具有IL-7活性的任何给定部分连接的聚合物的其他缀合物。另外,本发明包括以下情况:其中组合物包含多种缀合物,每种缀合物包含一种与一个IL-7部分共价连接的水溶性聚合物;以及包含两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种或更多种与一个IL-7部分共价连接的水溶性聚合物的多种组合物。

[0139] 关于组合物中的缀合物,组合物将满足以下特征中的一项或多项:组合物中至少约85%的缀合物将具有从一到八种与IL-7部分连接的聚合物;组合物中至少约85%的缀合物将具有从一到七种与IL-7部分连接的聚合物;组合物中至少约85%的缀合物将具有从一到五种与IL-7部分连接的聚合物;组合物中至少约85%的缀合物将具有一到三种与IL-7部分连接的聚合物;组合物中至少约95%的缀合物将具有从一到两种与IL-7部分连接的聚合物;组合物中至少约95%的缀合物将具有从三到八种与IL-7部分连接的聚合物;组合物中至少约95%的缀合物将具有从二到五七种与IL-7部分连接的聚合物;组合物中至少约95%的缀合物将具有从三到六种与IL-7部分连接的聚合物;组合物中至少约95%的缀合物将具有一种与IL-7部分连接的聚合物;组合物中至少约99%的缀合物将具有从一到六种与IL-7部分连接的聚合物;组合物中至少约99%的缀合物将具有从一到四种与IL-7部分连接的聚合物;组合物中至少约99%的缀合物将具有从一到三种与IL-7部分连接的聚合物;组合物中至少约99%的缀合物将具有从一到两种与IL-7部分连接的聚合物;并且组合物中至少约99%的缀合物将具有一种与IL-7部分连接的聚合物。应了解,提及一系列聚合物,例如“从x到y种聚合物”,涵盖x到y的多种聚合物(包括x种聚合物和y种聚合物)(也就是说,例如“从一到三种聚合物”涵盖一种聚合物、两种聚合物以及三种聚合物,“从一到两种聚合物”涵盖一种聚合物和两种聚合物等等)。此外,还设想的是,具有两种或更多种与IL-7部分连接的聚合物的给定缀合物可具有稳定的并且可释放地连接的聚合物的混合物(其中至少一种聚合物与IL-7部分稳定地连接并且至少一种聚合物与IL-7部分可释放地连接)。

[0140] 在一个或多个实施例中,优选的是包含缀合物的组合物不含或基本上不含白蛋白。还优选的是组合物不含或基本上不含不具有IL-7活性的蛋白质。因此,优选的是组合物是85%、更优选地95%并且最优选地99%不含白蛋白。另外,优选的是组合物是85%、更优选地95%并且最优选地99%不含不具有IL-7活性的任何蛋白质。就白蛋白存在于组合物中来说,本发明的示例性组合物基本上不含包含聚(乙二醇)聚合物的缀合物,所述聚(乙二醇)聚合物使IL-7部分的残基与白蛋白连接。

[0141] 可以通过选择适当的聚合物试剂、聚合物试剂对IL-7部分的比率、温度、pH条件以及缀合反应的其他方面来实现控制相对于任何给定部分的聚合物的所希望数目。另外,可以通过纯化手段来实现减少或消除不希望的共轭物(例如那些具有四个或更多个附接聚合物的共轭物)。

[0142] 例如,可以纯化聚合物-IL-7部分缀合物以获得/分离不同的缀合种类。具体来说,可以纯化产物混合物以获得任何地方每个L-7部分平均一个、两个、三个、四个、五个或更多个PEG,典型地每个IL-7部分一个、两个或三个PEG。用于纯化最终缀合反应混合物的策略将取决于多个因素,包括例如所使用的聚合物试剂的分子量、特定IL-7部分、所希望的给药方案以及这种或这些单独缀合物的残余活性和体内特性。

[0143] 如果希望的话,那么可以使用凝胶过滤色谱法和/或离子交换层析来分离具有不同分子量的缀合物。也就是说,使用凝胶过滤色谱法以基于差异性分子量(其中这种差异基本上与水溶性聚合物部分的平均分子量相对应)来分级差异性编号的聚合物对IL-7部分的比率(例如1聚物、2聚物、3聚物等等,其中“1聚物”表示1份聚合物对IL-7部分,“2聚物”表示两份聚合物对IL-7部分等)。例如,在其中35,000道尔顿的蛋白质随机与分子量约20,000道尔顿的聚合物试剂缀合的示例性反应中,所得的反应混合物可以包含未修饰的蛋白质(具有约35,000道尔顿的分子量)、单聚乙二醇化蛋白质(具有约55,000道尔顿的分子量)、二聚乙二醇化蛋白质(具有约75,000道尔顿的分子量)等等。

[0144] 虽然这种方法可以用于分离PEG以及具有不同分子量的其他聚合物-IL-7部分缀合物,但这种方法对于分离在IL-7部分内部具有不同聚合物连接位点的位置性同种型物总体上无效。例如,凝胶过滤色谱法可以用来将PEG 1聚物、2聚物、3聚物等等的混合物彼此分离,不过每种所回收的缀合物组合物可能包含一个或多个与IL-7部分内部不同反应性基团(例如赖氨酸残基)连接的PEG。

[0145] 适合于执行这种类型分离的凝胶过滤柱包括可以从通用电气医疗集团(GE Healthcare)(英国白金汉郡(Buckinghamshire,UK))获得的Superdex™和Sephadex™柱。特定柱的选择将取决于所希望的分级范围。总体上使用适合的缓冲液(如磷酸盐、乙酸盐等)进行洗脱。可以通过多种不同方法分析所收集的级分,例如(i)针对蛋白质含量的在280nm的吸光度,(ii)使用牛血清白蛋白(BSA)作为标准物的基于染料的蛋白质分析法,(iii)针对PEG含量的碘测试(西姆斯(Sims)等人(1980)分析生物化学(Anal.Biochem),107:60-63),(iv)十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS PAGE),随后用碘化钡染色,以及(v)高效液相色谱法(HPLC)。

[0146] 通过以下方式进行位置性同种型物的分离:通过反相色谱法,其使用反相高效液相色谱法(RP-HPLC),使用适合的柱(例如可从如安玛西亚生物科学公司或维达克(Vydac)的公司商购的C18柱或C3柱);或通过离子交换层析,使用离子交换柱,例如可从通用电气医疗集团获得的Sephacrose™离子交换柱。可以使用任一方法来分离具有相同分子量的聚合物-活性剂异构体(即位置性同种型物)。

[0147] 组合物优选地基本上不含不具有IL-7活性的蛋白质。另外,组合物优选地基本上不含所有其他非共价连接的水溶性聚合物。然而,在一些情形中,组合物可以包含聚合物-IL-7部分缀合物和未结合的IL-7部分的混合物。

[0148] 任选地,本发明的组合物进一步包含一种药学上可接受的赋形剂。如果希望的话,可以添加药学上可接受的赋形剂到缀合物中以形成组合物。

[0149] 示例性赋形剂包括(但不限于)选自下组的那些赋形剂,该组由以下各项组成:碳水化合物、无机盐、抗微生物剂、抗氧化剂、表面活性剂、缓冲剂、酸、碱、氨基酸以及其组合。

[0150] 碳水化合物,如糖、衍生化糖(如糖醇(alditol)、醛糖酸、酯化糖和/或糖聚合物),

可以作为赋形剂存在。特定碳水化合物赋形剂包括例如：单糖，如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等；二糖，如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等；多糖，如棉子糖(raffinose)、松三糖(melezitose)、麦芽糊精(maltodextrin)、葡聚糖、淀粉等；以及糖醇，如甘露醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇、山梨糖醇(葡萄糖醇)、哌喃糖基山梨糖醇、肌醇、环糊精等。

[0151] 赋形剂还可以包括无机盐或缓冲剂，如柠檬酸、乙酸、氯化钠、氯化钾、硫酸钠、硝酸钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠以及其组合。

[0152] 组合物还可以包括用于防止或遏制微生物生长的抗微生物剂。适合于本发明的一个或多个实施例的抗微生物剂的非限制性实例包括苯扎氯铵(benzalkonium chloride)、苄索氯铵(benzethonium chloride)、苯甲醇、十六烷基吡啶氯化物、氯丁醇、苯酚、苯乙醇、硝酸苯汞(phenylmercuric nitrate)、硫柳汞(thimersol)以及其组合。

[0153] 抗氧化剂同样可以存在于组合物中。抗氧化剂用来防止氧化，由此防止缀合物或制剂的其他组分的变质。适用于本发明的一个或多个实施例的抗氧化剂包括例如棕榈酸抗坏血酸酯、丁基化羟基苯甲醚、丁基化羟基甲苯、次磷酸、单硫代甘油、没食子酸丙酯、亚硫酸氢钠、甲醛次硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠以及其组合。

[0154] 表面活性剂可以作为赋形剂存在。示例性表面活性剂包括：聚山梨醇酯，如“吐温20”和“吐温80”，以及普朗尼克(pluronic)，如F68和F88(这两种物质均可从新泽西州弗洛勒姆帕克的巴斯夫(BASF, Florham Park, NJ)获得)；脱水山梨糖醇酯；脂质，如磷脂(如卵磷脂和其他磷脂酰胆碱)、磷脂酰乙醇胺(不过优选地不处于脂质体形式)、脂肪酸以及脂肪酯；类固醇，如胆甾醇；以及IL-7化剂，如EDTA、锌以及其他此类适合的阳离子。

[0155] 酸或碱可以作为赋形剂存在于组合物中。可以使用的酸的非限制性实例包括选自下组的那些酸，该组由以下各项组成：盐酸、乙酸、磷酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、甲酸、三氯乙酸、硝酸、高氯酸、磷酸、硫酸、富马酸以及其组合。适合碱的实例包括(但不限于)选自下组的碱，该组由以下各项组成：氢氧化钠、乙酸钠、氢氧化铵、氢氧化钾、乙酸铵、乙酸钾、磷酸钠、磷酸钾、柠檬酸钠、甲酸钠、硫酸钠、硫酸钾、富马酸钾以及其组合。

[0156] 在此描述了一种或多种可以在组合物中作为赋形剂存在的氨基酸。在此方面，示例性氨基酸包括精氨酸、赖氨酸以及甘氨酸。

[0157] 组合物中的缀合物(即活性剂与聚合物试剂之间形成的缀合物)的量将视多个因素而变化，但将组合物储存于单位剂量容器(例如小瓶)中时最佳将是治疗有效剂量。另外，可以将药物制剂收纳在注射器中。治疗有效剂量可以通过反复施用渐增量的缀合物以便确定哪一个量产生临床上所希望的终点来实验地确定。

[0158] 组合物中任何单独赋形剂的量将根据赋形剂的活性和组合物的特定需要而变化。典型地，任何单独赋形剂的最佳量通过常规实验确定，即通过制备包含不同量的赋形剂(范围从低到高)的组合物，检查稳定性和其他参数，并且接着确定在没有显著不利作用的情况下获得最佳性能的范围。

[0159] 然而，总体上，赋形剂将在组合物中以赋形剂的约1重量%到约99重量%、优选地从约5重量%到约98重量%、更优选地从约15到约95重量%的量存在，并且最优选的是浓度小于30重量%。

[0160] 这些前述药物赋形剂以及其他赋形剂描述于“雷明顿：制药科学与实践

(Remington: The Science & Practice of Pharmacy)”, 第19版, 威廉姆斯出版社 (Williams & Williams), (1995); “医师案头参考 (Physician’s Desk Reference)”, 第52版, 新泽西州蒙特威尔的医学经济出版社 (Medical Economics, Montvale, NJ) (1998); 以及基贝A.H. (Kibbe, A.H.), 药物赋形剂手册 (Handbook of Pharmaceutical Excipients), 第3版, 华盛顿的美国药物协会 (American Pharmaceutical Association, Washington, D.C.), 2000。

[0161] 这些组合物涵盖所有类型的制剂以及尤其适合于注射的那些制剂, 例如可以被重构的散剂或冻干剂以及液体剂。适合用于在注射之前重构固体组合物的稀释剂的实例包括注射用抑菌水、水中的5%右旋糖、磷酸盐缓冲生理盐水、林格氏溶液 (Ringer’s solution)、生理盐水、无菌水、去离子水以及其组合。就液体药物组合物来说, 设想溶液剂和混悬剂。

[0162] 在一个或多个实施例中, 该组合物还可以是水凝胶。示例性水凝胶包括包含聚(乙二醇) (呈非共轭形式) 的那些, 例如在Zustiak等人 (2010) *Biomacromolecules* [生物大分子] 11 (5): 1348–1357中描述的那些。

[0163] 一个或多个实施例的组合物典型地 (不过未必) 通过注射施用, 并且因此在即将施用之前总体上是水凝胶、液态溶液或混悬剂。药物制剂还可以采取其他形式, 如糖浆剂、乳膏剂、软膏剂、片剂、散剂等。还包括其他施用模式, 如经肺、经直肠、经皮、经粘膜、经口、鞘内、瘤内、瘤周、腹膜内、皮下、动脉内等等。

[0164] 本发明还提供一种用于向罹患对用缀合物治疗有响应的病症的一位患者施用如在此所提供的缀合物的方法。该方法包括总体上通过注射向一位患者施用治疗有效量的缀合物 (优选地以药物组合物的一部分的形式提供)。如先前所描述, 可以注射缀合物 (例如肌肉内、皮下以及胃肠外)。适合用于胃肠外施用的制剂类型尤其包括注射即用型溶液剂、在使用之前与溶剂组合的干散剂、注射即用型混悬剂、在使用之前与媒介物组合的干燥不溶性组合物以及在施用之前稀释的乳剂和液体浓缩剂。

[0165] 施用缀合物 (优选地以药物组合物的一部分的形式提供) 的方法可以任选地进行以便使缀合物定位到特定区域中。例如, 可以将包含缀合物的液体剂、凝胶剂以及固体制剂以手术方式植入患病区域内 (如在肿瘤中、在肿瘤附近、在发炎区域中以及在发炎区域附近)。方便地, 还可以对器官和组织成像以确保所希望的位置更佳地曝露于缀合物。

[0166] 施用方法可以用来治疗可以通过施用该缀合物来治疗或预防的任何病症。本领域普通技术人员了解一种特定缀合物可以有效治疗哪些病症。例如, 缀合物可以单独使用或与其他药物疗法组合使用, 以治疗患有免疫缺陷的患者并加速例如在本质上免疫抑制的疾病或治疗之后发生的免疫系统的自然重建。例如, 缀合物可用于治疗病毒感染、免疫障碍并增强特定细胞类型的生长 (包括增殖)。此外, 缀合物可用于治疗患有癌症的患者, 例如膀胱癌、肺癌、脑癌、乳腺癌、皮肤癌和前列腺癌。有利地, 可以在施用另一种活性剂之前、同时或之后向患者施用缀合物。例如, 该缀合物可用作治疗患有癌症的患者的涉及免疫治疗的方法的一部分, 其中该缀合物在施用另一种用于治疗患有癌症的个人中的免疫治疗药物之前、同时或之后施用给患者。

[0167] 待施用的实际剂量可以取决于受试者的年龄、重量以及整体状况, 连同有待治疗的病症的严重程度, 健康专家的判断、以及有待施用的缀合物而改变。治疗有效量是本领域的普通技术人员已知的和/或在相关参考文本和文献中描述。总体上, 治疗有效量将范围从

约0.001mg到100mg,优选地处于从每天0.01mg到每天75mg的剂量内并且更优选地处于从每天0.1mg到每天50mg的剂量内。可以定期施用给定剂量直到例如临床医生确定达到适当的终点(例如、治愈、消退、部分消退、等等)。

[0168] 视临床医师的判断、患者的需要等等而定,可以按多种给药方案施用单位剂量的任何给定缀合物(再次,优选地以药物制剂的一部分的形式提供)。特定给药方案将是本领域普通技术人员已知的或可以使用常规方法以实验方式测定。示例性给药方案包括(但不限于)每天一次、每周三次、每周两次、每周一次、每月两次、每月一次施用以及其任何组合。一旦已实现临床终点,就暂停组合物的给药。

[0169] 应了解,虽然已结合本发明的优选特定实施例描述本发明,但前述说明以及随后的实例意在说明而不是限制本发明的范围。对于本发明所属领域的普通技术人员来说,本发明范围内的其他方面、优点以及修改将是显而易见的。

[0170] 在此所参考的所有文章、书籍、专利以及其他出版物通过引用以其全文结合在此。

实验

[0171] 除非另外规定,否则本发明的操作将使用本领域技术范围内的有机合成、生物化学、蛋白质纯化等的常规技术。此类技术在文献中有充分解释。参见例如J. 马奇,高等有机化学:反应机理和结构,第4版(纽约威利跨学科出版社,1992),同前文献。

[0172] 在以下实例中,已努力确保所使用数字(例如量、温度等)的准确性,但应将一些实验误差和偏差考虑在内。除非另外规定,否则温度是℃并且压力是在海平面处的大气压力或接近在海平面处的大气压力。以下每个实例视为对本领域普通技术人员关于执行在此所描述的一个或多个实施例有启发性。

[0173] 制备包含与氨基酸序列SEQ ID NO:1对应的重组IL-7(“rhIL-7”)的水溶液(“储备溶液”)用于在实例中使用。

[0174] SDS-PAGE分析

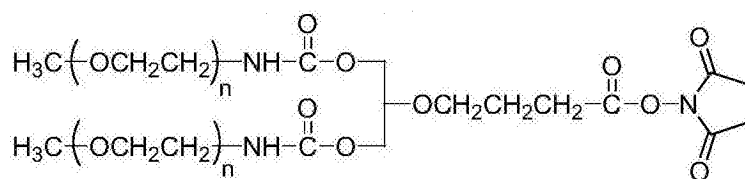
[0175] 样品是使用Invitrogen凝胶电泳系统(XCell SureLock Mini-Cell)通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析的。将样品与样品缓冲液混合。然后,将制备的样品装载到NuPAGE Novex 4-12%聚丙烯酰胺预制凝胶中并且运行持续大约30分钟。

[0176] RP-HPLC分析

[0177] 在Agilent 1200HPLC系统(Agilent)上进行反相色谱(RP-HPLC)分析。使用Poroshell 300SB-C3柱(2.1×75mm,Agilent)在60℃下分析样品。流动相为0.1%TFA/H₂O(A)和0.1%TFA/CH₃CN(B)。柱的流速是0.5ml/分钟。洗脱的蛋白质和PEG-蛋白质缀合物使用UV在280nm处检测。

实例1

使用分枝的mPEG-N-羟基琥珀酰亚胺衍生物(20kDa)对IL-7进行聚乙二醇化



分枝的mPEG-N-羟基琥珀酰亚胺衍生物(20kDa) (“mPEG2-NHS”)

[0178] 将在-20℃下在氩气下储存的mPEG2-NHS(20kDa)升温到环境温度。将10至50倍过

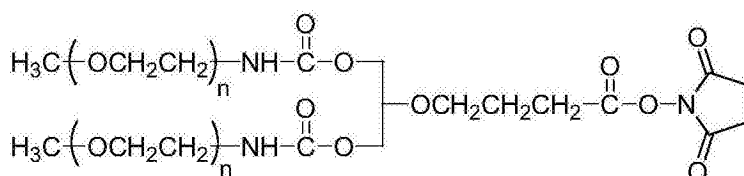
量(相对于所测量的储备IL-7溶液的等分试样中的IL-7的量)的升温的mPEG2-NHS溶解在2mM HCl中以形成10%试剂溶液。将该10%试剂溶液快速加入到储备IL-7溶液的等分试样中(在20mM Tris, 50mM NaCl, pH 7.8中0.5mg/ml)并充分混合。为了允许经酰胺键将mPEG2-NHS偶联到IL-7上,将反应溶液在室温下放置在慢速实验室旋转器上持续2小时并且然后在4℃下过夜。用25mM甘氨酸溶液淬灭反应。通过SDS-PAGE和RP-HPLC二者表征缀合物。

[0179] 图1示出了使用十倍过量的PEG的缀合物溶液的RP-HPLC分析后的色谱图。聚乙二醇化反应产生44%的单缀合物(一个与IL-7连接的PEG)、35%的二缀合物(两个与IL-7连接的PEG)和14%的三缀合物(三个与IL-7连接的PEG)种类。溶液中只剩下7%未反应的IL-7。

[0180] 图2示出了在不同的mPEG2-NHS, 20kDa浓度(即10x、20x和50x过量)下聚乙二醇化的SDS凝胶结果。

实例2

使用分枝的mPEG-N-羟基琥珀酰亚胺衍生物(40kDa)对IL-7进行聚乙二醇化



分枝的mPEG-N-羟基琥珀酰亚胺衍生物(40kDa) (“mPEG2-NHS”)

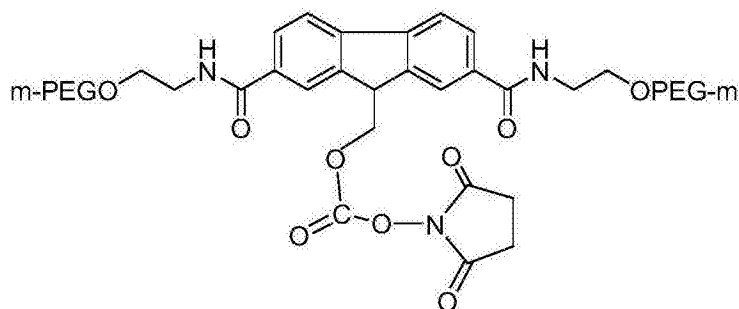
[0181] 将在-20℃下在氩气下储存的mPEG2-NHS(40kDa)升温到环境温度。将10至50倍过量(相对于所测量的储备IL-7溶液的等分试样中的IL-7的量)的升温的mPEG2-NHS溶解在2mM HCl中以形成10%试剂溶液。将该10%试剂溶液快速加入到储备IL-7溶液的等分试样中(在20mM Tris, 50mM NaCl, pH 7.8中0.5mg/ml)并充分混合。为了允许经酰胺键将mPEG2-NHS偶联到IL-7上,将反应溶液在室温下放置在慢速实验室旋转器上持续2小时并且然后在4℃下过夜。用25mM甘氨酸溶液淬灭反应。通过SDS-PAGE和RP-HPLC二者表征缀合物。

[0182] 图3示出了使用十倍过量的PEG的缀合物溶液的RP-HPLC分析后的色谱图。聚乙二醇化反应产生36%的单缀合物、44%的二缀合物和17%的三缀合物种类。溶液中只剩下3%未反应的IL-7。

[0183] 图4示出了在不同的mPEG2-NHS, 40kDa浓度(即10x、20x和50x过量)下聚乙二醇化的SDS凝胶结果。

实例3

使用9-羟基甲基-2,7-二[mPEG(10,000)-羧酰胺基]芴-N-羟基琥珀酰亚胺衍生物(20kDa)对IL-7进行聚乙二醇化



分枝的mPEG-FMOC-N-羟基琥珀酰亚胺衍生物(20kDa) (“C2-PEG2-FMOC-NHS”)

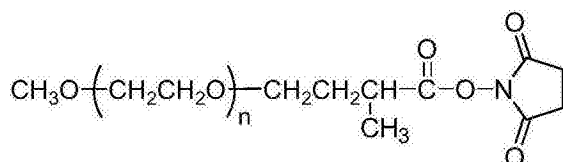
[0184] 将在-20℃下在氩气下储存的C2-PEG2-FMOC-NHS (20kDa) 升温到环境温度。将10至50倍过量(相对于所测量的储备IL-7溶液的等分试样中的IL-7的量)的升温的C2-PEG2-FMOC-NHS溶解在2mM HCl中以形成10%试剂溶液。将该10%试剂溶液快速加入到储备IL-7溶液的等分试样中(在20mM Tris, 50mM NaCl, pH 7.8中0.5mg/ml)并充分混合。为了允许经氨基甲酸酯键将C2-PEG2-FMOC-NHS偶联到IL-7上,将反应溶液在室温下放置在慢速实验室旋转器上持续2小时并且然后在4℃下过夜。用25mM甘氨酸溶液淬灭反应。通过SDS-PAGE和RP-HPLC二者表征缀合物。

[0185] 图5示出了聚乙二醇化溶液的SDS凝胶结果。如以下在凝胶中所示,使用十倍过量试剂的优势种类是单缀合物(43%),而使用二十倍过量试剂的优势种类是二缀合物(40%),并且使用五十倍过量试剂的优势种类是三缀合物(47%)。

[0186] 使用这种相同方法,可以使用具有其他重均分子量的C2-PEG2-FMOC-NHS制备其他缀合物。

实例4

使用α-甲基丁酸线性mPEG-琥珀酰亚胺酯衍生物 (30kDa) 对IL-7进行聚乙二醇化



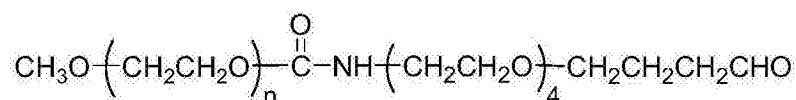
α-甲基丁酸线性mPEG-琥珀酰亚胺酯衍生物 (30kDa)
("mPEG-SMB")

[0187] 将在-20℃下在氩气下储存的mPEG-SMB (30kDa) 升温到环境温度。将20倍过量(相对于所测量的储备IL-7溶液的等分试样中的IL-7的量)的升温的mPEG-SMB溶解在2mM HCl中以形成10%试剂溶液。将该10%试剂溶液快速加入到储备IL-7溶液的等分试样中(在磷酸钠缓冲液, pH 7.5中0.5mg/ml)并充分混合。在加入mPEG-SMB后,使用常规技术测定反应混合物的pH并调节至7.5。为了允许经酰胺键将mPEG-SMB偶联到IL-7上,将反应溶液在室温下放置在慢速实验室旋转器上过夜以促进缀合。用甘氨酸溶液淬灭反应。通过HPLC和SDS-PAGE表征缀合物溶液。

[0188] 使用这种相同方法,可以使用具有其他重均分子量的mPEG-SMB制备其他缀合物。

实例5

使用线性mPEG-丁醛衍生物 (20kDa) 对IL-7进行聚乙二醇化



线性mPEG-丁醛衍生物 (20kDa) ("mPEG-丁醛")

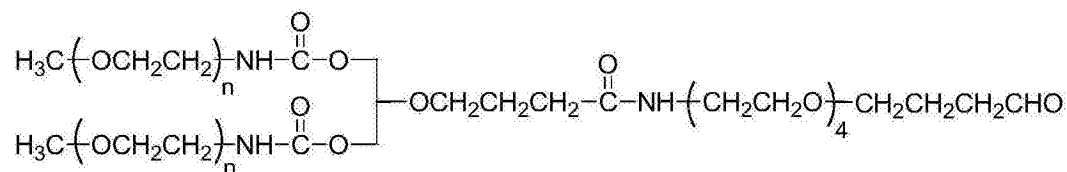
[0189] 将在-20℃在氩气下储存的mPEG-丁醛 (20kDa) 升温到环境温度。将30倍过量(相对于所测量的储备IL-7的等分试样中的IL-7的量)的升温的mPEG-丁醛溶解在Milli-Q H₂O中以形成10%试剂溶液。将该10%试剂溶液快速加入到储备IL-7溶液的等分试样中(在乙酸钠缓冲液, pH 5.5中0.5mg/ml)并充分混合。在加入mPEG-丁醛30分钟后,然后加入还原剂氰基硼氢化钠以制成10mM NaCNBH₃。将反应溶液置于慢速实验室旋转器上过夜以促进在室温下的缀合。将反应用乙酸淬灭至pH 4。通过HPLC和SDS-PAGE表征缀合物溶液。

[0190] mPEG-丁醛的醛基可以在由还原试剂(如氰基硼氢化钠)还原时与同IL-7连接的伯胺反应并且通过仲胺与它们共价键合。因为聚乙二醇化反应在pH 5.5下进行,所以将PEG衍生物连接到IL-7对于N-末端更有选择性。

[0191] 使用这种相同方法,可以使用具有其他重均分子量的线性mPEG-丁醛制备其他缀合物。

实例6

使用分枝的mPEG-丁醛衍生物(40kDa)对IL-7进行聚乙二醇化



分枝的mPEG-丁醛衍生物(40kDa) (“mPEG2-丁醛”)

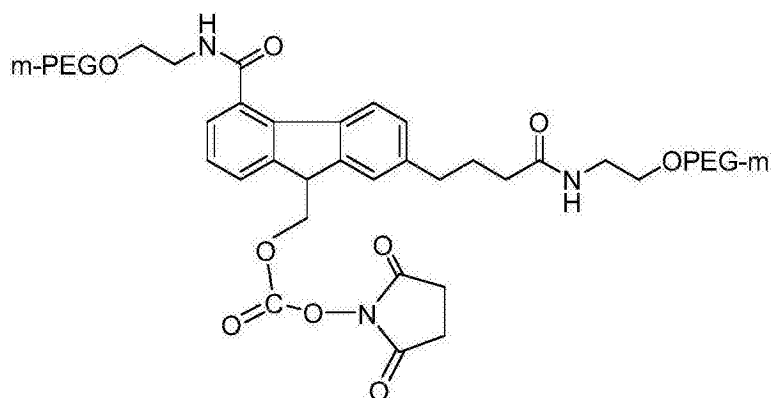
[0192] 将在-20℃下在氩气下储存的mPEG2-丁醛(40kDa)升温到环境温度。将30倍过量(相对于所测量的储备IL-7的等分试样中的IL-7的量)的升温的mPEG2-丁醛溶解在Milli-Q H₂O中以形成10%试剂溶液。将该10%试剂溶液快速加入到储备IL-7溶液的等分试样中(在磷酸钠缓冲液,pH 6.0中0.5mg/ml)并充分混合。在加入mPEG2-丁醛30分钟后,然后加入还原剂氰基硼氢化钠以制成10mM NaCNBH₃。将反应溶液置于慢速实验室旋转器上过夜以促进在室温下的缀合。将反应用乙酸淬灭至pH 4。通过HPLC和SDS-PAGE分析表征缀合物溶液。

[0193] mPEG2-丁醛的醛基可以在由还原试剂(如氰基硼氢化钠)还原时与同IL-7连接的伯胺反应并且通过仲胺与它们共价键合。因为聚乙二醇化反应在pH 6.0下进行,所以将PEG衍生物连接到IL-7对于N-末端更有选择性。

[0194] 使用这种相同方法,可以使用具有其他重均分子量的分枝的mPEG2-丁醛制备其他缀合物。

实例7

使用9-羟甲基-4-(mPEG(20,000)-羧酰胺基)-7-(3-(mPEG(20,000))氨基甲酰基-丙基)-苄-N-羟基琥珀酰亚胺基碳酸酯(40kDa)对IL-7进行聚乙二醇化



分枝的mPEG-FMOC-N-羟基琥珀酰亚胺衍生物(40kDa)

(“CAC-PEG2-FMOC-NHS”)

[0195] 将在-20℃下在氩气下储存的CAC-PEG2-FMOC-NHS(40kDa)升温到环境温度。将10至50倍过量(相对于所测量的储备IL-7溶液的等分试样中的IL-7的量)的升温的CAC-PEG2-

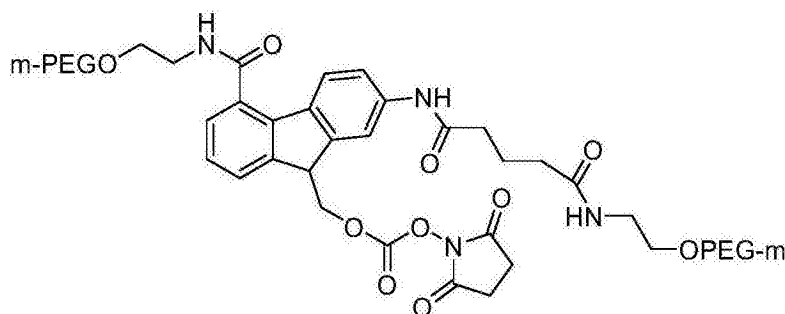
FMOC-NHS溶解在2mM HCl中以形成10%试剂溶液。将该10%试剂溶液快速加入到储备IL-7溶液的等分试样中(在磷酸钠缓冲液,pH 7.5中0.5mg/ml)并充分混合。最初将反应溶液在室温下放置于慢速实验室旋转器(RotoMix)上持续2小时并且然后在4℃下过夜。通过加入1M乙酸以将pH降低至5来淬灭反应。通过SDS-PAGE和HPLC表征缀合物溶液。

[0196] 由于PEG结构中的可释放键,PEG在生理条件下可从PEG-IL-7缀合物中释放。

[0197] 使用这种相同方法,可以使用具有其他重均分子量的CAC-PEG2-FMOC-NHS制备其他缀合物。

实例8

使用9-羟甲基-[4-羧酰胺基M-PEG (20,000)-7-氨基戊二酸酰胺M-PEG (20,000)]苄-N-羟基琥珀酰亚胺衍生物(40kDa)对IL-7进行聚乙二醇化



分枝的mPEG-FMOC-N-羟基琥珀酰亚胺衍生物(40kDa)
 (“CG-PEG2-FMOC-NHS”)

[0198] 将在-20℃下在氩气下储存的CG-PEG2-FMOC-NHS(40kDa)升温到环境温度。将10至50倍过量(相对于所测量的储备IL-7溶液的等分试样中的IL-7的量)的升温的CG-PEG2-FMOC-NHS溶解在2mM HCl中以形成10%试剂溶液。将该10%试剂溶液快速加入到储备IL-7溶液的等分试样中(在磷酸钠缓冲液,pH 7.5中0.5mg/ml)并充分混合。最初将反应溶液在室温下放置于慢速实验室旋转器(RotoMix)上持续2小时并且然后在4℃下过夜。通过加入1M乙酸以将pH降低至5来淬灭反应。通过SDS-PAGE和HPLC表征缀合物溶液。

[0199] 由于PEG结构中的可降解键,PEG在生理条件下可从PEG-IL-7缀合物中释放。

[0200] 使用这种相同方法,可以使用具有其他重均分子量的CG-PEG2-FMOC-NHS制备其他缀合物。

SEQ ID NO:1

```

      10      20      30      40      50      60
MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLD SMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA
      70      80      90     100     110     120
ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGT TIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL
      130     140     150
KEQKKLNDLC FLKRL LQEI K TCWNKILMGT KEH

```

SEQ ID NO:2

```

      10      20      30      40      50      60
DCDIEGKDGK QYESVLMVSI DQLLD SMKEI GSNCLNNEFN FFKRHICDAN KEGMFLFRAA
      70      80      90     100     110     120
RKL RQFLKMN STGDFDLHL KVSEGT TILL NCTGQVKGR PAALGEAQP KSLEENKSLK
      130     140     150
EQKKLNDLCF LKRL LQEI K CWNKILMGT K EH

```

SEQ ID NO:3

```

      10      20      30      40      50      60
DCDIEGKDGK QYESVLMVSI DQLLD SMKEI GSNCLNNEFN FFKRHICDAN KEGMFLFRAA
      70      80      90     100     110     120
RKL RQFLKMN STGDFDLHL KVSEGT TILL NCTGQENKS LKEQKKLNDL CFLKRL LQEI
      130
KTCWNKILMG TKEH

```

SEQ ID NO:4

```

      10      20      30      40      50      60
DCDIEGKDGK QYESVLMVSI DQLLD SMKEI GSNCLNNEFN FFKRHICDAN KEGMFLFRAA
      70      80      90     100     110     120
RKL RQFLKMN STGDFDLHL KVSEGT TILL KEQKKLNDLC FLKRL LQEI K TCWNKILMGT
      130
KEH

```

SEQ ID NO:5

```
      10      20      30      40      50      60
DCDIEGKD GK QYESVLMVSI DQLLDSMKEI GSNCLNNEFN FFKRHICDAN KVEGRKPAAL
      70      80      90     100
GEOPTKSL ENESLKEQKK LNDLCFLKRL LQEI KTCWNK ILMGTKEH
```

SEQ ID NO:6

```
      10      20      30      40      50      60
DCDIEGKD GK QYESVLMVSI DQLLDSMKEI GSNCLNNEFN FFKRHICDAN KEENESLKEQ
      70      80      90
KKLNDLCFLK RLLQEI KTCW NKILMGTKEH
```

SEQ ID NO:7

```
      10      20      30      40      50      60
DCDIEGKD GK QYESVLMVSI DQLLVXGRKP AALGEOPTK SLEENESLKE QKKLNDLCFL
      70      80      90     100     110     120
KRLLEI KTC WNKILMGTKE H
```

SEQ ID NO:8

```
      10      20      30      40      50      60
DCDIEGKD GK QYESVLMVSI DQLLEENKSL KEQKKLNDLC FLKRLLEIK TCWNKILMGT
KEH
```

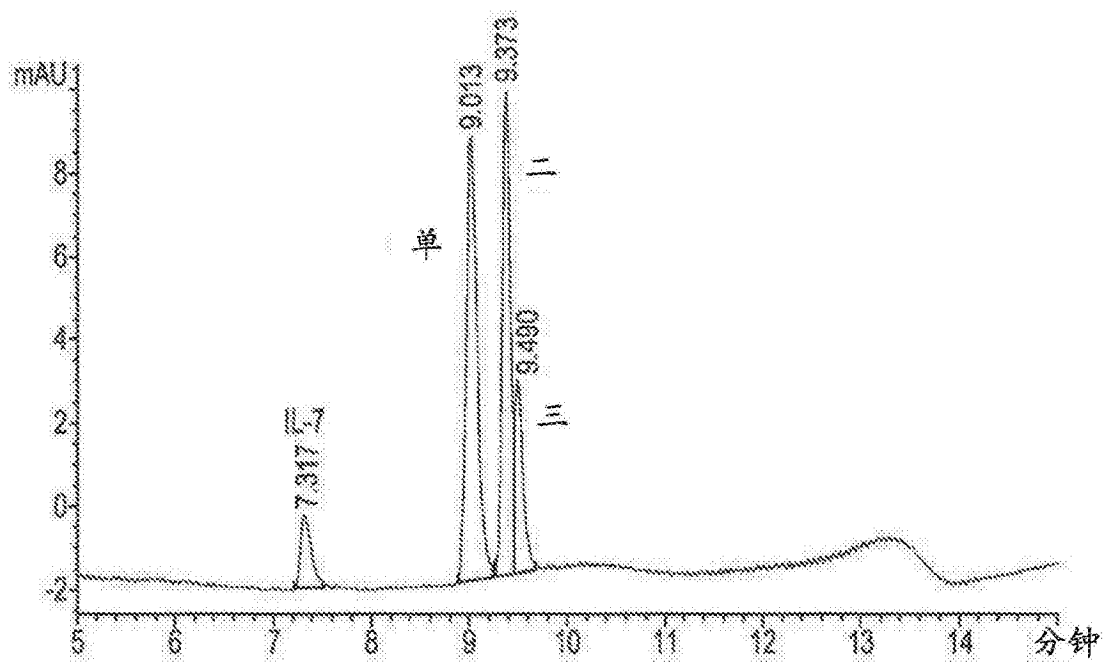


图1

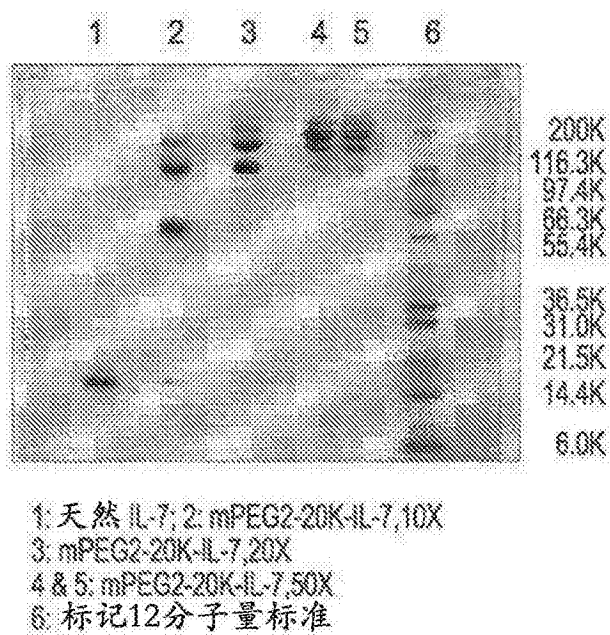


图2

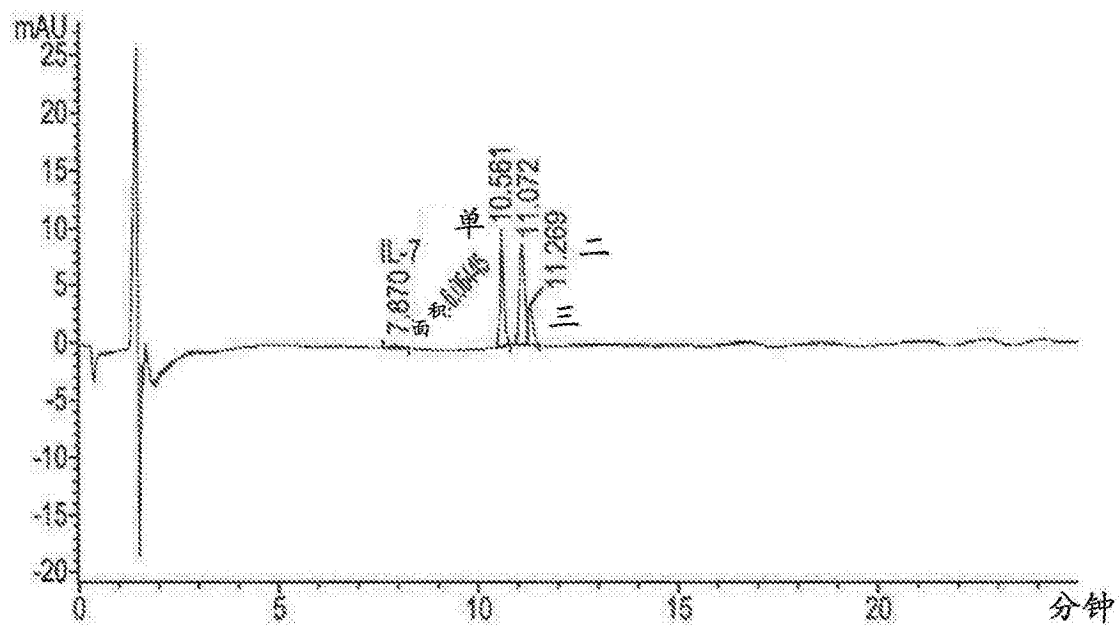
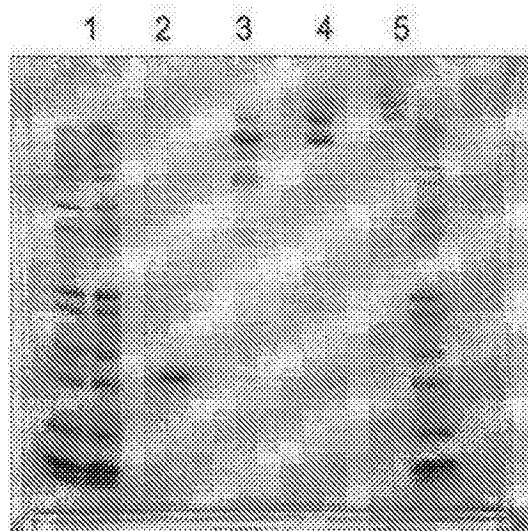


图3



1: 标记12分子量标准
 2: 天然 IL-7; 3: mPEG2-40K-IL-7, 10X
 4: mPEG2-40K-IL-7, 20X
 5: mPEG2-40K-IL-7, 50X

图4

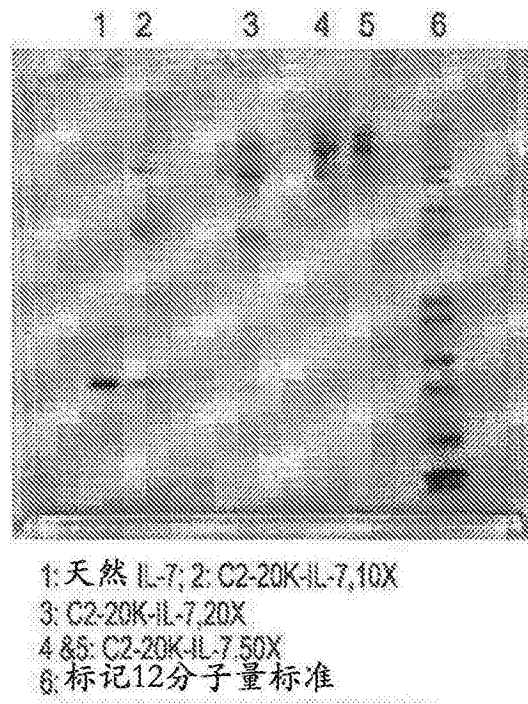


图5