

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2016 年 7 月 7 日 (07.07.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/106941 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 38/50 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) C12N 9/82 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/072167
- (22) 国际申请日: 2015 年 2 月 3 日 (03.02.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201410837456.3 2014 年 12 月 29 日 (29.12.2014) CN
- (71) 申请人: 江苏众红生物工程创研院有限公司 (ZONHON BIOPHARMA INSTITUTE INC.) [CN/CN]; 中国江苏省常州市新北区黄河中路 132 号, Jiangsu 213022 (CN)。常州京森生物医药研究所有限公司 (GENSUN INSTITUTE OF BIOMEDICINE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省常州市武进区常武中路 801 号天润大厦 A 座 4 层, Jiangsu 213164 (CN)。
- (72) 发明人: 马永 (MA, Bruce Yong); 中国江苏省常州市新北区黄河中路 132 号, Jiangsu 213022 (CN)。王俊 (WANG, Jun); 中国江苏省常州市新北区黄河中路 132 号, Jiangsu 213022 (CN)。吴鼎龙 (WU, Dinglong); 中国江苏省常州市新北区黄河中路 132 号, Jiangsu 213022 (CN)。闻兴元 (WEN, Xingyuan); 中

国江苏省常州市新北区黄河中路 132 号, Jiangsu 213022 (CN)。王和 (WANG, He); 中国江苏省常州市新北区黄河中路 132 号, Jiangsu 213022 (CN)。徐春林 (XU, Chunlin); 中国江苏省常州市新北区黄河中路 132 号, Jiangsu 213022 (CN)。陈一飞 (CHEN, Yifei); 中国江苏省常州市新北区黄河中路 132 号, Jiangsu 213022 (CN)。王耀方 (WANG, Yaofang); 中国江苏省常州市新北区黄河中路 132 号, Jiangsu 213022 (CN)。

- (74) 代理人: 南京天华专利代理有限责任公司等 (NANJING TIANHUA PATENT AGENT CO., LTD. et al.) 等; 中国江苏省南京市鼓楼区山西路 67 号世贸中心大厦 A1 座 23 层, Jiangsu 210009 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA,

[见续页]

(54) Title: SITE-SPECIFIC POLYETHYLENE GLYCOL MODIFIED ASPARAGINASE, PREPARATION METHOD THEREFOR AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 聚乙二醇定点修饰的门冬酰胺酶及其制备方法与应用

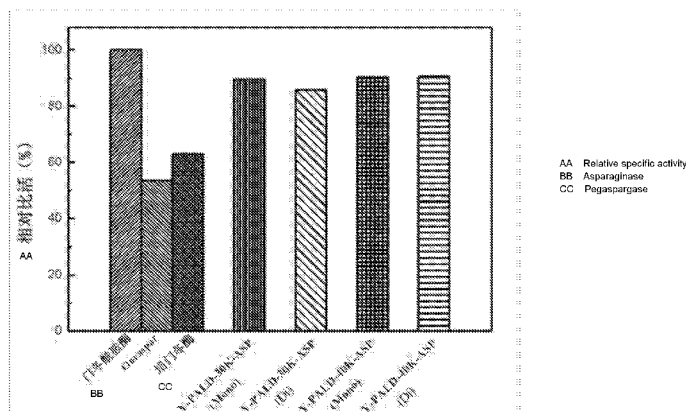


Fig. 8

(57) Abstract: The present application discloses polyethylene glycol-based asparaginase and application thereof. Polyethylene glycol is coupled to the N-end amino of 1 or 2 subunits of L-asparaginase, and the molecular weight of the polyethylene glycol is 30-40 KDa. The polyethylene glycol is preferably branched and has an aldehyde group serving as an active group. The polyethylene glycol-based asparaginase is suitable for preparing anti-tumor medicaments.

(57) 摘要: 本申请公开了一种聚乙二醇化的门冬酰胺酶及其应用。本申请的聚乙二醇在 L-门冬酰胺酶的 1 或 2 个亚基的 N 端氨基上偶联, 所述聚乙二醇的分子量为 30-40KDa。聚乙二醇优先采用分支型、活化基团为醛基的聚乙二醇。所述聚乙二醇化的门冬酰胺酶适用于抗肿瘤药物的制备。

WO 2016/106941 A1



RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

聚乙二醇定点修饰的门冬酰胺酶及其制备方法与应用

技术领域

本发明涉及聚乙二醇修饰的蛋白类药物，特别是聚乙二醇修饰的门冬酰胺酶及其制备方法和其在药物制备中的应用，以及其在临床治疗中的应用。

背景技术

门冬酰胺酶(Asparaginase, ASP)是具有L-天冬酰胺氨基水解酶活性的蛋白(通常被称为L-天冬酰胺酶, L-门冬酰胺酶, 或天门冬酰胺酶), 活性形式为4个亚基组成的同源四聚体结构, 每一亚基由326个氨基酸组成。L-门冬酰胺酶可以有效的治疗儿童或成人中的急性淋巴细胞白血病(ALL)。最近几年, 含有L-门冬酰胺酶的药物已经用于联合化疗方案来治疗NK/T细胞淋巴瘤, 并取得了较好的治疗效果。NK/T细胞淋巴瘤是种特殊类型的非霍奇金淋巴瘤, 多见于亚洲和拉丁美洲, 我国发病率相对较高。根据肿瘤发生部位, NK/T细胞淋巴瘤可分为鼻型NK/T细胞淋巴瘤和非鼻型NK/T细胞淋巴瘤。另外L-门冬酰胺酶还被用于治疗何杰金氏病, 急性骨髓白血病, 急性骨髓单核细胞白血病, 慢性淋巴细胞白血病, 淋巴肉瘤, 网状细胞肉瘤和黑素肉瘤(Kotzia and labrou, J. Biotechnol. 127(2007)657-669)。

L-门冬酰胺酶最初从若干生物体中纯化, 包括大肠杆菌(*E.coli*)和软腐欧文氏菌(*Erwinia carotovora*)。在哺乳动物中, 仅在豚鼠(*Cavioidea* 超科)和某些阔鼻猴(New World monkey)中发现略高于痕量的L-门冬酰胺酶。由于它来源于外源生物, 对人而言是一种外源蛋白, 有较强的免疫原性, 临床上常见进行性免疫反应和全身性过敏反应, 而限制了其临床应用。(张丽娜, 宫道华. 江苏医药. 左旋门冬酰胺酶治疗小儿急性淋巴细胞性白血病的毒副反应. 2005, 31(5): 392; 王宁玲, 刘芝璋等. 左旋门冬酰胺酶治疗儿童白血病的毒副作用及防治. 中国小儿血液, 2005, 10(3): 133)。另一方面, 由于天然结构的L-asparaginase分子在人体内半衰期短, 用药间隔短。这些特点使患者对该药的依从性下降。

针对这些弊端, 现有技术从多方面对该药物进行了改进, 例如: ①对于大肠杆菌L-asparaginase敏感患者, 以欧文氏菌来源的酶代替大肠杆菌L-asparaginase; ②L-asparaginase的剂型改造, 如制备其脂质体等形式; ③通过蛋白质工程进行结构改造, 对大肠杆菌L-asparaginase抗原部位进行突变以减弱免疫原性; ④根据L-asparaginase结构进行的化学修饰。而以聚乙二醇(PEG)修饰则是化学修饰的一种。

聚乙二醇(PEG)是一种线性、在溶液中可自由卷曲的不带电荷的聚合物, 具有无毒、微弱的抗原性和良好的生物相容性。用它来共价修饰蛋白质, 可以增加蛋白质的体内循环半衰期

和减小其抗原性，增加蛋白质的溶解性并会改变蛋白质在人体内的生物学分布。自 1977 年 Abuchowski, Davis(J. Biol. Chem. 1977, 252: 3578-3581.)等人首次报道用 PEG 修饰蛋白质以来，PEG 修饰技术在生物医学和生物技术领域得到了广泛的应用，PEG 已经被广泛地应用于蛋白质、多肽类药物的修饰研究。目前蛋白质 PEG 化技术已经成为降低蛋白质生物药物的免疫原性，以及改善其药代动力学/药效学性质最有效的方法之一，且已通过 FDA 认证可用于药物、食品和化妆品。

聚乙二醇修饰技术经历了几十年的发展，目前虽然已经比较成熟。但并不能找出一种通用的聚乙二醇修饰剂以及修饰方法来对所有的蛋白药物进行修饰。蛋白本身的结构以及所用 PEG 的分子量、形状以及修饰的位点等对聚乙二醇化的蛋白质的生物活性以及药效有很大的影响。对于特定药物的修饰，聚乙二醇修饰剂是影响修饰产物理化性质、体内外生物活性、药代动力学、药效学以及修饰产物临床表现最重要的因素。因此，修饰剂的选择(修饰剂种类、分子量大小)以及修饰反应的控制对聚乙二醇修饰技术中占有重要地位。蛋白质结构的解析并不能准确预测天然蛋白质的药代动力学行为，而在蛋白偶联上 PEG 以后由于引入了许多新的变量如分子量、修饰剂种类等，对于 PEG 偶联物的药代动力学行为预测变得更加不可能。为此，针对不同的蛋白质药物，需要通过选择不同种类以及不同分子量的修饰剂，并通过理化性质检测、动物实验评价等确定最佳方案。

例如，在大多数情况下，与未修饰的原蛋白相比，聚乙二醇化的蛋白药物的活性会降低，一般修饰后的蛋白活性仅有原蛋白的 30%-40%，甚至更低。例如 Schering-Plough 公司的 PEG-Intron，是用分子量为 5000 的 PEG 修饰干扰素，修饰后其活性只有原蛋白的 8%。又如 Yoshihiro 等分别用分子质量为 750，1900，5000 U 的分支状活化 PEG(2-0-methoxypolyethylene glycol-4, 6-dichloro-s-triazine)对大肠杆菌门冬酰胺酶进行修饰。其中 5000u-PEG 修饰了门冬酰胺酶所有 92 个游离氨基(88 个 δ -氨基与 4 个 α -氨基)中的 73 个，保留原酶活性的 7%，修饰后产物完全失去与门冬酰胺酶抗性血清结合能力。此外，一般随着 PEG 分子量的增大，修饰后的蛋白质活性降低更明显。例如用分子量为 20KDa、30 KDa、40 KDa 的 PEG 修饰促红细胞生成素(EPO)后，活性随着 PEG 分子量的增大而显著减小(Yin-jue Wang, journal of controlled release, 2010(145):306-313)。Bailon 等采用分支型 40 kDa PEG 修饰 Interferon- α -2a，所得单修饰物获得较长的循环半衰期，但是仅仅保留了 7% 的体外活性(Bailon P, Bioconjugate Chem., 2001, 12: 195-202.)。

目前针对 L-门冬酰胺酶的聚乙二醇修饰研究也有很多。国外利用聚乙二醇修饰的 L-门冬酰胺酶的产品 Oncaspar(Enzon Inc.)早在 1994 年就已上市，并在 2006 年起被批准作为儿童和成人的 ALL 的一线疗法。Oncaspar 使用琥珀酰亚胺琥珀酸酯(SS-PEG)进行修饰，具有修

修饰产物不均一，修饰产物活性损失较大，且含有对酶的水解敏感的、或者在微碱性 PH 值时不稳定的酯键（美国专利号 4670417）等缺陷。这些性质显著降低了体外和体内的稳定性并且副作用也较大。而国内目前上市的 PEG 修饰的 L-门冬酰胺酶只有恒瑞公司的“培门冬酶”，它是 Oncaspar 的仿制药，也存在着上述问题。

这两种产品都是随机修饰的产物，因此修饰产物不均一，其产品的组成是由偶联了不同数目的 PEG 分子而组成的。另外随机修饰后，由于修饰位点较多，对门冬酰胺酶的活性部分具有较大的位阻作用，因此活性有较大损失，只保留了原蛋白 60% 的活性。已有文献进行了门冬酰胺酶 N 端定点修饰的相关研究，得到的修饰产物的活性只有原蛋白的 36% 左右。（迟少萍，王伯初，药物生物技术 聚乙二醇醛对 L-门冬酰胺酶化学修饰的初步研究）。而国内另一个对门冬酰胺酶进行 N 端定点修饰的专利（申请号 200810112025.5）中，使用的也是直链 PEG，分子量为 20KDa，最终纯化得到的修饰产物中，PEG 除了偶联在门冬酰胺酶其中一个亚基上的 N 端外，另一个是和亚基的氨基酸侧链上的氨基偶联。修饰产物最终只保留了原蛋白 40% 左右的生物活性，活性损失较大。上述两个例子都是用的直链 PEG 对门冬酰胺酶进行定点修饰。

发明内容

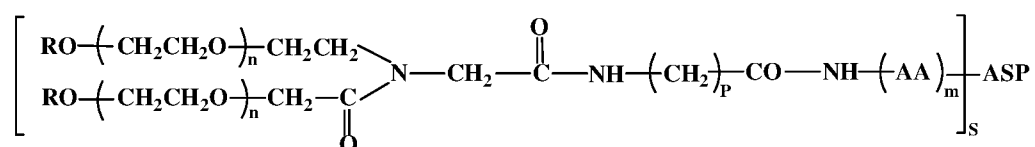
解决的技术问题：为了克服现有技术中的上述技术问题，本发明旨在提供稳定性提高、免疫原性降低的同时，也具有高活性，组分均一的聚乙二醇定点修饰的门冬酰胺酶（ASP），及其制备方法和在制备治疗儿童或成人急性淋巴细胞白血病以及非霍奇金淋巴瘤等疾病的药物中的应用。

更进一步的说：

本发明的第一目的是提供聚乙二醇定点修饰的 L-门冬酰胺酶，所述聚乙二醇在 L-门冬酰胺酶的 1 或 2 个亚基的 N 端氨基上偶联，所述聚乙二醇分子量为 30-40kDa，聚乙二醇为分支型，活化基团为醛基。

优选的，所述聚乙二醇在 L-门冬酰胺酶的 2 个亚基的 N 端伯氨基上偶联，所述聚乙二醇分子量为 30 kDa 或 40kDa，聚乙二醇为分支型，活化基团为乙醛、丙醛、丁醛或戊醛。

所述聚乙二醇定点修饰的 L-门冬酰胺酶的结构通式如下所示：



其中 R 为 H

或C1-C4的烷基；n为100到500的整数值，p为1-4的整数；AA为N端的L-氨基酸残基，m为0-5的整数，s为1或者2。

优选地，所述烷基为甲基，n为320-455之间的整数值，p为2，m为0。

本发明的第二目的是提供一种上述的聚乙二醇定点修饰的ASP的制备方法，包括如下步骤：步骤1，用40mM pH4-6的乙酸-乙酸钠缓冲液配制15-20mg/mL的L-门冬酰胺酶溶液；步骤2，按摩尔比L-门冬酰胺酶:聚乙二醇:还原剂=1:(4-5):(100-200)在4℃的条件下反应12-24h；步骤3，反应结束后以离子交换色谱法纯化处理，最终得到单修饰及二修饰的聚乙二醇化的L-门冬酰胺酶。

所述聚乙二醇优选分子量40KDa。

所述聚乙二醇化的L-门冬酰胺酶纯化产物优选二修饰产物。

所述还原剂优选为氰基硼氢化钠。

本发明的第三目的是提供一种上述聚乙二醇定点修饰的ASP在制备治疗儿童或成人急性淋巴细胞白血病以及非霍奇金淋巴瘤等疾病的药物中的应用。目前已有文献报道用PEG修饰的门冬酰胺酶用来联合化疗治疗NK/T细胞淋巴瘤或急性淋巴细胞白血病，并取得较好疗效。因此本发明中提供的定点修饰技术制备的PEG修饰的门冬酰胺酶也可用于联合治疗NK/T细胞淋巴瘤或急性淋巴细胞白血病。

本发明的第四目的是提供一种聚乙二醇定点修饰的ASP或其药学上可接受的盐或复合物。所述复合物是指两种或两种以上不同物质所形成的结合体。

本发明的第五目的是提供一种药物组合物，所述药物组合物含有上述聚乙二醇定点修饰的ASP或其药学上可接受的盐或复合物和药学上可接受的辅料。

所述药物组合物为液态针剂或冻干粉针剂。

所述的辅料包括药学上可接受的载体和/或赋形剂等。

所述定点修饰的L-门冬酰胺酶及其药物组合物通过肌肉、静脉或皮下途径给药。

有益效果：本发明提供的聚乙二醇定点修饰的ASP，在具有半衰期明显延长、结构稳定均一等优点的基础上，更大程度的提高了其生物活性。

附图说明

图1：不同PEG-ASP偶联物高效液相分析。

使用SEC法分别对培门冬酶、Y-PALD-40K-ASP (Mono) 及 Y-PALD-40K-ASP (Di)、Y-PALD-30K-ASP (Mono) 及 Y-PALD-30K-ASP (Di) 进行分析。从结果中可以看出，经过纯化后，Y-PALD-40K-ASP (Mono) 及 Y-PALD-40K-ASP (Di)，Y-PALD-30K-ASP (Mono)

及 Y-PALD-30K-ASP (Di) 纯度均能达到 98%以上, 略高于培门冬酶的纯度 97%。且与培门冬酶相比, Y-PALD-40K-ASP (Di)、Y-PALD-30K-ASP (Di) 具有更高的分子量。

图 2: 不同 PEG-ASP 偶联物 SDS-PAGE 分析。

使用还原性 SDS-PAGE 对培门冬酶、Y-PALD-40K-ASP(Mono)及 Y-PALD-40K-ASP(Di)、Y-PALD-30K-ASP (Mono) 及 Y-PALD-30K-ASP (Di) 进行分析。图 2a 泳道 1-4 分别为高分子量 Marker、培门冬酶、Y-PALD-40K-ASP (Mono) 及 Y-PALD-40K-ASP (Di)。图 2b 泳道 1-3 别为高分子量 Marker、Y-PALD-30K-ASP (Di) 及 Y-PALD-30K-ASP (Mono)。由于 ASP 为四亚基组成的同源四聚体, 在还原环境中, 四个亚基会发生解聚。由于修饰度不同各亚基在 SDS-PAGE 中将显示出不同的条带。如图所示, 培门冬酶呈现出弥散条带, 说明其蛋白均一度较差, 与之相比, Y-PALD-40K-ASP (Mono) 及 Y-PALD-40K-ASP (Di) 显示出被修饰亚基与未被修饰亚基两条清晰的谱带, 均一度较高, 图 2a 中泳道 3、4 图 2b 中泳道 2、3 中显示的分子量较大的条带表示经修饰后的 ASP 单亚基, 分子量较小的条带表示未经修饰的 ASP 单亚基。

图 3: PEG-ASP 偶联物的修饰位点鉴定。

从 PEG-ASP 偶联物和原蛋白的酶解肽图可以看出, Y-PALD-40K-ASP (Mono) 及 Y-PALD-40K-ASP (Di) 的 PEG 是修饰在蛋白的 N 端的。其中 Y-PALD-40K-ASP (Mono) 是门冬酰胺酶分子的 4 个亚基中, 只有一个亚基的 N 端偶联上了一个 PEG 分子。其中 Y-PALD-40K-ASP (Di) 是门冬酰胺酶分子的 4 个亚基中, 有两个亚基的 N 端各偶联上了一个 PEG 分子。

图 4: 不同 PEG-ASP 偶联物圆二色光谱分析

使用圆二色光谱分别对门冬酰胺酶、Y-PALD-40K-ASP (Mono) 及 Y-PALD-40K-ASP (Di) 进行结构鉴定。从结果看, 远紫外扫描结果显示, 与门冬酰胺酶相比, Y-PALD-40K-ASP (Mono) 及 Y-PALD-40K-ASP (Di) 圆二色特征谱图未发生明显变化, 近紫外结果显示相同结果。由此认为, 经过 Y-PALD-40K-PEG 修饰后, 蛋白主体结构未发生变化。

图 5: 不同 PEG-ASP 偶联物荧光光谱分析

使用荧光分光光度计对门冬酰胺酶、Y-PALD-40K-ASP (Mono) 及 Y-PALD-40K-ASP (Di) 进行内源荧光光谱扫描, 结果表明 PEG 修饰后没有改变门冬酰胺酶的三级结构。

图 6: 门冬酰胺酶及其 PEG 偶联物药代动力学性质检测。

图 6a 表示静脉注射的药代动力学结果, 图 6b 表示肌肉注射的药代动力学结果。

使用 ^{125}I 同位素标记示踪法对 PEG 修饰后的门冬酰胺酶的体内血药浓度进行了研究。从结果看, 与门冬酰胺酶相比, Y-PALD-40K-ASP (Mono) 及 Y-PALD-40K-ASP (Di) 均具有

更好的药代动力学性质，其中 Y-PALD-40K-ASP (Di) 药代动力学性质提升更为显著。

图 7: 不同 PEG-ASP 偶联物热处理后的活性测定

图 8: 不同 PEG-ASP 偶联物体外酶活测定。

使用《中国药典》所附方法分别对门冬酰胺酶、Oncaspar、培门冬酶、Y-PALD-40K-ASP (Mono)、Y-PALD-40K-ASP (Di)、Y-PALD-30K-ASP (Mono) 及 Y-PALD-30K-ASP (Di) 的体外酶活进行检测。从结果可以看出，门冬酰胺酶相比，经过修饰后，各修饰产物均有不同程度活性损失。其中 Oncaspar 和培门冬酶损失较大，本发明的修饰产物的活性损失相对较小。

具体实施方式

定义:

本发明使用的缩写含义如下:

PEG, 聚乙二醇; PEG 修饰剂, 聚乙二醇修饰剂。

聚乙二醇(PEG, $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$)是一种两端带羟基的线型聚合物, 聚乙二醇是经环氧乙烷聚合而成的, 由重复的氧乙烯基组成, 有分支型, 直链型和多臂型。PEG 也被称为 poly(ethyleneoxide) (PEO), poly(oxy-ethylene) (POE), 或者 polyoxirane。一般情况下, 分子量低于 20,000 的被称为 PEG, 分子量更大的被称为 PEO。普通的聚乙二醇两端各有一个羟基, 若一端以甲基封闭则得到甲氧基聚乙二醇 (mPEG), 这种衍生物是蛋白质聚乙二醇化技术中最常用到。

聚乙二醇修饰剂, 则是指带有官能团的聚乙二醇衍生物, 是指经过活化的聚乙二醇, 目前主要用于蛋白质以及多肽药物修饰, 又叫修饰性聚乙二醇, 修饰性 PEG。

Y-PALD-40K, 分子量为 40KDa 的分支聚乙二醇丙醛, 结构通式为

$$\begin{array}{c} \text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2- \\ \text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{C} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{N}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_p-\text{C}(=\text{O})-\text{H} \\ \text{C}(=\text{O}) \end{array}$$

, 其中 R 为甲基, n 为 455, p 为 2;

Y-PALD-30K, 分子量为 30KDa 的分支聚乙二醇丙醛, 结构通式为

$$\begin{array}{c} \text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2- \\ \text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{C} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{N}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_p-\text{C}(=\text{O})-\text{H} \\ \text{C}(=\text{O}) \end{array}$$

, 其中 R 为甲基, n 为 320, p 为 2。

ASP, 门冬酰胺酶。

本申请中所用, 术语“偶联物”, 是指聚乙二醇修饰门冬酰胺酶后得到的修饰产物;

几种聚乙二醇修饰门冬酰胺酶的修饰产物可在本申请中称为“Y-PALD-40K-ASP (Mono)”

(用分子量为 40K 的 PEG 丙醛修饰门冬酰胺酶后纯化得到的单修饰产物, 只有一个亚基的 N 端偶联了 PEG)及 Y-PALD-40K-ASP (Di) (用分子量为 40K 的 PEG 丙醛修饰门冬酰胺酶后纯化得到的二修饰产物, 有两个亚基的 N 端偶联了 PEG), Y-PALD-30K-ASP (Mono) (用分子量为 30K 的 PEG 丙醛修饰门冬酰胺酶后纯化得到的单修饰产物, 只有一个亚基的 N 端偶联了 PEG)及 Y-PALD-30K-ASP (Di) (用分子量为 30K 的 PEG 丙醛修饰门冬酰胺酶后纯化得到的二修饰产物, 有两个亚基的 N 端偶联了 PEG)”统称为 PEG-ASP 或 PEG 修饰 ASP 的偶联物。Oncaspar, 是原研药的产品名称。

本发明使用的聚乙二醇修饰剂优选下面几种: 醛基活化的聚乙二醇, 更具体地, 聚乙二醇修饰剂为丙醛活化的聚乙二醇。

在本发明中, 所修饰的门冬酰胺酶蛋白, 可以是任何来源的, 门冬酰胺酶可从大肠杆菌中提取, 包括但不限于大肠杆菌。也可以是重组表达的。在本发明的偶联物的特定实施方式中, 门冬酰胺酶与包含 SEQ ID NO:1 的序列的蛋白具有至少约 60% 的序列一致性。更特别地与包含 SEQ ID NO:1 的蛋白具有至少约 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 或 100% 的序列一致性。

在特定的实施方式中, 所述蛋白为大肠杆菌来源的门冬酰胺酶, 其具有 SEQ ID NO:1 的序列。

实施例 1: ASP 的 PEG 偶联物的制备及分析

制备例一, 本发明聚乙二醇定点修饰的 ASP 通过如下方法制备、纯化、鉴定:

1. PEG 偶联物样品制备

用 40mM pH5.0 的乙酸-乙酸钠缓冲液溶解将 L-门冬酰胺酶 (来源于常州千红生化制药股份有限公司) 配制成为 20mg/mL 的溶液, PEG 采用 Y-PALD-40K (购自北京键凯科技有限公司), 按门冬酰胺酶:PEG:氰基硼氢化钠为 1:4:200 的摩尔比进行反应, 在 4°C 下反应 12h 后, 加入 1M 甘氨酸终止反应。制备得到单修饰产物 Y-PALD-40K-ASP (Mono) 及二修饰产物 Y-PALD-40K-ASP (Di)。

2. PEG 偶联物样品纯化

色谱法条件: Q 离子交换柱 (购自 GE 公司, HiTrap Q HP 5mL), A 液: 20mM 的 Tris-HCl (pH9.0), B 液: 含 1M NaCl 的 20mM 的 Tris-HCl (pH9.0), 流速 2.5mL/min, 检测波长为 280nm。

上样: 上述修饰反应产物用 0.5M 的 NaOH 溶液调节至 pH 9.0, 结合至 Q 离子交换柱。

平衡: A 液冲洗 5 个柱体积。

洗脱： 0-50%B 液，洗脱体积为 10 个柱体积，时间 20 分钟，分步进行收样。

2. PEG 偶联物样品检测

2.1 色谱方法检测：

色谱法条件：HPLC（Waters，e2695 HPLC），Superdex 200 10/300GL（购自 GE 公司），流动相为含 0.1M Na₂SO₄ 的 PBS（pH7.4），流速为 0.4mL/min，检测波长为 280nm，进样量 50μL，检测时间为 60min。

分析结果见图 1a 所示。如图可以看出，制备的两种产物 Y-PALD-40K-ASP（Mono）及 Y-PALD-40K-ASP（Di）的纯度均高于 98%。同时，Y-PALD-40K-ASP（Di）修饰产物的分子量也高于培门冬酶（购自江苏恒瑞医药股份有限公司）的分子量。

2.2 电泳方法鉴定：

蛋白浓缩胶为8%，分离胶为7%。浓缩胶缓冲液为0.5 M Tris-HCl 缓冲液(pH 6.8)；分离胶缓冲液为1.5 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH8.8)。取10ug蛋白样品，与样品缓冲液等体积混合，在 100 °C下煮沸5 min后上样运行，电泳结束后用使用考马斯亮蓝染液进行染色。鉴定结果如图 2a所示。

制备例二 PEG 为 Y-PALD-30K，具体参数与得率如下表 1 所示，表 1 未列出的方法步骤和参数与制备例一相同：

表 1

实验条件	对应实验参数
pH 值	5.0
修饰剂	Y-PALD-30K
摩尔比（蛋白:PEG:还原剂）	1:5:100
反应温度	4℃
反应时间（小时）	24
蛋白浓度（mg/mL）	15

同时也对制备例二所得修饰产物进行色谱法与电泳法进行鉴定，所得结果分别如图 1b、2b 所示。

制备例二所制备的单修饰及二修饰产物的活性及纯度与制备例一中的所得的单修饰及二修饰产物无显著性差异，Y-PALD-30K-ASP（Mono）及Y-PALD-30K-ASP（Di）的纯度均高于98%。

由图2a、2b可以看出，修饰产物Y-PALD-40K-ASP（Mono）及Y-PALD-40K-ASP（Di），Y-PALD-30K-ASP（Mono）及Y-PALD-30K-ASP（Di）的电泳条带非常均一。比较国内市场上的同类产品——培门冬酶(购自江苏恒瑞医药股份有限公司)，均一性得到很大提高。

图2a中第3、4泳道都显示出两条均一的条带，第3、4泳道中的第一个条带所对应的分子

量大概是200KDa左右，由于PEG分子在溶液中会结合大量水分子，使得其表观分子量是其理论分子量的4倍左右。因此可以初步判断这个条带是偶联了一个PEG分子的门冬酰胺酶的亚基，而第二个条带所对应的分子量是34KDa左右，和门冬酰胺酶的单个亚基的分子量一致，因此可以初步判断第二个条带是没有偶联上PEG的门冬酰胺酶的单个亚基。通过软件分析结果可以得出，第3泳道的第一个条带和第二个条带的含量的比例为1: 1，说明该修饰产物中，有两个亚基偶联上了PEG，而另两个亚基没有偶联上PEG分子，可以确定是二修饰产物。同样，在第4泳道上我们通过软件分析得出，第一个条带和第二个条带的含量的比例为1: 3，说明该修饰产物中，只有一个亚基偶联上了PEG，而另三个亚基没有偶联上PEG分子，可以确定是单修饰产物。结果和我们的预期相一致。而第2泳道已上市的产品培门冬酶确显示出弥散的条带，这是由于培门冬酶采用的是随机修饰方式，在最终的修饰产物中，每个门冬酰胺酶上的亚基所偶联的PEG个数并不相同，因此在电泳中显示出来的是弥散的条带。从产品的均一性来看，本发明中制备的定点修饰产物均一性较好，具有较大的优势。和图2a比较，在图2b中也得到了类似的结果，有所区别的是，由于所使用的PEG是分子量为30KDa的，因此图2b中第2, 3泳道的第一个条带的大小对应的分子量是150KDa左右，略小于用分子量为40KDa的PEG修饰得到的修饰产物。

实施例2：PEG-ASP偶联物修饰位点的鉴定

为了确定 PEG-ASP 偶联物的 PEG 修饰位点，我们对 PEG-ASP 偶联物进行了胰蛋白酶的酶解实验，并和原蛋白的酶解图谱做比较。通过比较原蛋白和修饰产物肽段的差异，可以确定 PEG 的修饰位点。具体实验步骤如下，取浓度为 0.5 mg/mL 样品 100 μ L 加入 0.9 μ L 浓度为 1mg/mL 的胰蛋白酶溶液，37 $^{\circ}$ C 反应 5h。反应结束后加入 10%wt 的 TFA 对反应进行终止。酶解产物使用 C18 反相色谱柱（购自 Waters 公司）进行分析，流动相分别为：A 液 $H_2O+0.1\%wtTFA$ ，B 液乙腈+0.1%wtTFA，上样量为 80 μ L，流速为 0.5 mL/min，运行时间为 120 min。梯度洗脱条件：0-100min 5%wt-60%wtB。

肽图的比较结果如图 3 所示，由图可以看出，PEG-ASP 偶联物的 N 末端肽段和原蛋白比较，Y-PALD-40K-ASP (Mono) 及 Y-PALD-40K-ASP (Di) N 末端肽段峰面积已经分别降低了 25%和 50%，说明 PEG 确实是偶联到了 ASP 的 N 末端氨基酸上，与预期结果一致。其中 Y-PALD-40K-ASP (Mono) 是单修饰产物，只有一个 PEG 偶联在门冬酰胺酶的一个亚基上，而另外 3 个亚基并没有偶联上 PEG，因此在对其进行胰蛋白酶酶解后，和原蛋白比较，只有一个亚基的 N 端肽段的峰会发生位移，而另外三个亚基由于并没有偶联上 PEG，因此 N 端肽段的出峰不会发生变化。因此最终 N 端肽段的峰面积只降低了 25%。而对于二修饰产物

Y-PALD-40K-ASP (Di)，每个门冬酰胺酶分子有两个亚基偶联上了 PEG，因此和原蛋白比较，最终 N 端肽段的峰面积降低了 50%。

结合实施例 1 中的实验结果，进一步验证了我们纯化得到的两个修饰产物是修饰在蛋白 N 端的单修饰和二修饰产物。用分子量为 30KDa 的 PEG 修饰产物进行酶解肽图的分析也得到了相同的结果，说明我们用分子量为 30KDa 的 PEG 修饰后得到的两个修饰产物是修饰在蛋白 N 端的单修饰和二修饰产物。

实施例 3：PEG-ASP 偶联物和原蛋白的圆二色谱图分析

用圆二色光谱仪可以表征修饰蛋白以及未修饰蛋白的二级结构及三级结构。蛋白浓度范围是 0.1~0.2 mg/mL。样品加入 1 mm 光径的圆二色比色杯，检测其远紫外区（190 nm-250 nm）和近紫外区（253nm-480nm）的圆二色光谱，扫描带宽为 1 nm，扫描速度为 500 nm/min。每次检测以相应缓冲液为背景，测三次取平均值。由图 4 可以看出，PEG-ASP 偶联物的远紫外区圆二色谱图和原蛋白相比，偶联物的光谱几乎没有发生峰的位移，峰值没有明显变化，说明用分枝状 PEG 修饰后的二级结构没有差别，这个结果符合 PEG 的特性，由于 PEG 在溶液中是一种柔性的两亲性大分子，因此偶联到蛋白表面后，不会对其结构有显著影响。说明 PEG 修饰没有影响 ASP 的二级结构。同样的，PEG-ASP 偶联物的近紫外区圆二色谱图和原蛋白相比，偶联物的光谱也几乎没有发生峰的位移，虽然峰值有一定变化，这说明 PEG 修饰没有影响 ASP 的三级结构。总体看来，通过定点修饰制备的偶联物，ASP 的高级结构基本没有发生改变。由于偶联物经过 PEG 修饰后，其结构未变化，因此其活性和原蛋白比较，损失较少。

实施例 4：PEG-ASP 偶联物和原蛋白的荧光谱图分析

修饰蛋白以及未修饰蛋白的内源荧光检测的激发波长为 280 nm，发射波长范围为 300~400 nm。扫描速度为 1200 nm/min。激发和发射的缝隙宽度（slit widths）均为 5 nm，使用 0.1 cm 的样品池，在室温下进行检测。待测蛋白质的浓度范围是 0.1~0.2 mg/ml。

通过内源荧光（Intrinsic Fluorescence）来检测 PEG 修饰对门冬酰胺酶三级结构的影响。如图 5 所示，当激发波长为 280 nm 时，门冬酰胺酶及其修饰产物的发射荧光峰值在 315 nm 处。单修饰、二修饰和门冬酰胺酶，其荧光发射光谱基本一致。这表明 PEG 对门冬酰胺酶的修饰不影响其三级结构。PEG 修饰蛋白的发射光谱强度比未修饰蛋白略有降低，这可能跟 PEG 链对蛋白光谱发射产生的屏蔽作用有关。

实施例 5: PEG-ASP 偶联物的药代动力学研究

用分子量为 30KDa 和 40KDa 的分支 PEG 修饰门冬酰胺酶得到的修饰产物的活性差别不大。但从药代动力学的角度考虑,一般分子量越大的修饰产物,其药代动力学的表现越好。因此本实施例中选择用分子量为 40KDa 的分支 PEG 修饰得到的二修饰和单修饰产物进行药代动力学研究,并和未修饰的原蛋白以及已上市的产品培门冬酶进行比较。

我们分别考察了静脉注射和肌肉注射给药的药代动力学。对样品采用 IODOGEN 标记方法进行 ^{125}I 标记。并对标记后的供试品进行纯化,经 SHPLC 验证纯度。标记后的系列样品采用 BCA 蛋白测定试剂盒进行蛋白浓度测定,然后分别与各自一定量的未标记的样品混合,用 1× 的溶媒 (10× 的溶媒用注射用水稀释到 1×) 将样品稀释 1.175mg/mL 的注射液,并取配制后的药物 (5μL 左右),测定放射性。比活性 = 放射性/蛋白浓度。大鼠给药后按照一定的时间点进行取样,如果各静脉给药组最后一个取血时间点血药浓度未低于 2min 时间点血药浓度的 1/20,那么接下来继续取血每天一次,直至其血药浓度低于 2min 时间点的 1/20。如果各肌肉给药组最后一个取血时间点血药浓度未低于达峰血药浓度的 1/10,那么接下来继续取血每天一次,直至其血药浓度低于达峰血药浓度的 1/10。取血后将血样立即置于加有肝素钠 (1000 IU/mL, 10 μL) 抗凝的 EP 管中,颠倒 5~10 次,4000 rpm 离心 5 分钟分离出血浆。取 50μL 血浆,加入等体积的 20% 三氯乙酸 (TCA),涡旋混匀后,测定总放射性。之后 4500rpm,常温离心 10min,弃上清,测定沉淀部分放射性。

代谢动力学参数计算:采用 WinNonlin6.2 进行非房室模型方法 (NCA) 拟合计算 AUC 等主要代谢动力学参数;

2) 浓度计算:

样本放射性

药物含量 = ————— / 样本体积 (重量);

蛋白比活

3) 数据处理:采用 Excel 2007 对均值、标准差等数据进行统计描述。

药代动力学各参数的计算结果见表 2、表 3,图 6a、6b 所示。

表 2 PEG-ASP 偶联物和门冬酰胺酶的药代动力学参数比较 (静脉注射)

Sample	T1/2(h)	AUC(mg/L*h)	CL(L/h/kg)
门冬酰胺酶	2.84	123896.00	18.50
培门冬酶	53.41	3738733.50	0.60
Y-PALD-40K-ASP (Mono)	34.38	1701512.23	1.35
Y-PALD-40K-ASP (Di)	58.70	3827982.37	0.59

表 3 PEG-ASP 偶联物和门冬酰胺酶的药代动力学参数比较（肌肉注射）

Sample	T1/2(h)	AUC(mg/L*h)	CL(L/h/kg)
门冬酰胺酶	6.97	55241.11	32.06
培门冬酶	42.62	3046417.50	0.75
Y-PALD-40K-ASP (Mono)	37.22	1008025.72	2.25
Y-PALD-40K-ASP (Di)	56.00	3367604.25	0.69

Y-PALD-40K-ASP (Mono) 及 Y-PALD-40K-ASP (Di) 的药代参数与门冬酰胺酶的参数相比，无论是静脉注射还是肌肉注射，其半衰期明显延长，并且药时曲线下面积 (AUC) 有了显著提高。其次，Y-PALD-40K-ASP (Mono) 及 Y-PALD-40K-ASP (Di) 在血液中的清除速率也远低于门冬酰胺酶。由此可见，与门冬酰胺酶相比，Y-PALD-40K-ASP (Mono) 及 Y-PALD-40K-ASP (Di) 在体内的稳定性均有一定程度的增强，而 Y-PALD-40K-ASP (Di) 增强幅度更为明显，因此其半衰期显著提高，血液中代谢速度明显降低，有效的延长了药物的药效时间，如图 6 所示。另外从软件计算的药代参数可以看出，和已上市的培门冬酶比较，不管是肌肉注射还是静脉注射，Y-PALD-40K-ASP (Di) 的半衰期都高于培门冬酶。

实施例 6: PEG-ASP 偶联物的稳定性研究

将培门冬酶、Oncaspar (购自 Sigma Tau 制药公司) 以及 Y-PALD-40K-ASP (Di) 分别用 Tris-HCl (9.0) 的缓冲液稀释到 1mg/ml。放入 55℃ 水浴锅中，分别于 0h、1h、2h、3h、4h、5h 之后各取出 100ul，用于酶活性检测。活性测定结果如图 7 所示。

由图可以看出，经过水浴处理 1 小时，培门冬酶的活性基本完全损失，活性基本为零，Oncaspar 样品的酶活略好于培门冬酶，在处理 1 小时后保留了 30% 左右的活性，而 Y-PALD-40K-ASP (Di) 样品在处理 1 小时后保留了 80% 左右的活性，在处理 5 小时后依然保持了 60% 左右的生物活性，稳定性显著优于培门冬酶和 Oncaspar。分析培门冬酶和 Oncaspar 活性显著降低的原因，应该和其 PEG 容易脱落有关，由于 PEG 分子的不断脱落，使得 PEG 对门冬酰胺酶的保护作用显著降低，造成活性损失较大。而 Y-PALD-40K-ASP (Di) 样品在处理过程中没有发生 PEG 脱落，PEG 分子可以很好的增加门冬酰胺酶的热稳定性，因此活性损失相对较慢。

实施例 7: PEG-ASP 偶联物的体外活性检测

L-门冬酰胺酶可以水解门冬酰胺的酰胺基，根据这一原理，可以对门冬酰胺酶的活性进行测定。具体测定方法参照 2005 版药典第二部第 31 页所述方法进行。测活所需的试剂都购自国药集团化学试剂有限公司。检测的样品分别是 Y-PALD-40K-ASP (Mono) 及 Y-PALD-40K-ASP (Di)，Y-PALD-30K-ASP (Mono) 及 Y-PALD-30K-ASP (Di) 以及未修饰

的原蛋白和市场上的同类产品培门冬酶(购自江苏恒瑞医药股份有限公司), Oncaspar (购自 Sigma Tau 制药公司)。它们的相对活性比较结果如图 8 所示。

由图 8 活性测定的结果可以看出, 本发明的 PEG 修饰门冬酰胺酶后的活性和市场上的同类产品培门冬酶, Oncaspar 都有一定程度的降低, 但 Y-PALD-40K-ASP (Mono) 及 Y-PALD-40K-ASP (Di), Y-PALD-30K-ASP (Mono) 及 Y-PALD-30K-ASP (Di) 分别保留了原蛋白 90.25%、90.5%、89.5%、85.8% 的活性, 而培门冬酶和 Oncaspar 的活性仅保留了原蛋白 62.9%、53.5% 的活性。

通过酶活测定结果可以看出, 本发明实施例 1 中制备的门冬酰胺酶定点修饰产物, 其活性显著高于市场上已有的产品培门冬酶和 Oncaspar。市售的培门冬酶和 Oncaspar 是采用分子量 5000Da 的 PEG 通过随机修饰得到的产品, 修饰后的门冬酰胺酶的活性只保留了原蛋白 62.9% 和 53.5% 的活性; 而本发明采用分子量 30kDa~40kDa 的 PEG 丙醛对门冬酰胺酶进行 N 端定点修饰, 修饰后的门冬酰胺酶的活性保留了原蛋白 90% 左右的生物活性。另外, 按照 PEG 修饰的一般规律, 使用同类型的 PEG 对蛋白进行修饰, PEG 的分子量越大, 修饰后蛋白的活性损失越大。但在本发明中制备的修饰产物却很意外的没有完全遵循这样的规律, 不仅修饰物活性高于培门冬酶的活性, 而且本发明中使用分子量为 30KDa 和 40KDa 的 PEG 修饰剂修饰后得到的修饰产物的活性基本都保留了原蛋白 90% 左右的活性, 其中用 40KDa 的 PEG 修饰后得到的修饰产物的活性略大于用 30KDa 的 PEG 修饰后得到的修饰产物。另外, 对于使用同一分子量的 PEG 修饰剂修饰后得到的修饰产物来说, 和单修饰产物比较, 二修饰产物中每个门冬酰胺酶的分子上多偶联了一个 PEG 分子, 因此二修饰的分子量显著高于单修饰产物。从实施例 1 中的凝胶过滤分析的图谱上也可以看出这点。因此按照 PEG 修饰的一般规律, 二修饰产物的活性应该显著低于单修饰产物。但本发明中制备的单修饰产物和二修饰产物的活性基本没有差别。我们进一步分析, 这可能和门冬酰胺酶的结构特点有密切的关系, 门冬酰胺酶是由 4 个亚基组成的多亚基蛋白, 这 4 个亚基的氨基酸序列完全一致, 活性中心处在由 4 个亚基包裹的空间区域中。我们制备的二修饰产物, PEG 分子是分别偶联在 2 个不相邻亚基的 N 端, 因此这两个 PEG 分子相对独立, 相互之间不会有较大的空间位阻, 因此使得单修饰产物和二修饰产物的活性差别不大。

另外, 由于已有的文献或专利报道中, 也有使用定点修饰技术对门冬酰胺酶进行 N 端定点修饰的例子。这些例子中使用的都是直链 PEG, 并且制备出的修饰产物是 N 端定点的单修饰产物, 活性都只有原蛋白 40% 左右, 远低于本发明中制备的修饰产物。由于都属于 N 端定点修饰, 且都是直链、小分子量的 PEG, 因此修饰后的修饰产物其活性理论上应该更优于本发明, 但结果出人意料的是本发明中制备出的修饰产物活性较高。因此可以看出, 在用 PEG

对蛋白进行修饰，开发长效蛋白药物的过程中，虽然有一些普遍的规律可以遵循，但最为重要的是要结合所修饰的蛋白药物的结构特点，进行大量的优化筛选，这样才能筛选制备出最佳的修饰产物。这是一个具体情况具体分析的过程。

实施例 8：PEG-ASP 偶联物对肿瘤细胞的抑制率评价

为了评价 PEG-ASP 偶联物对肿瘤细胞的抑制率，并和培门冬酶以及 Oncaspar 进行比较，我们选择了 THP-1（来源于人的单核细胞白血病细胞系）、Raji（来源于人的淋巴瘤细胞系）、L1210（来源于小鼠的白血病细胞）这 3 种细胞进行评价。通过 MTT 法检测细胞的抑制率，考察了不同给药浓度的抑制率，并最终计算出 IC_{50} 值，计算结果如下表 4 所示。

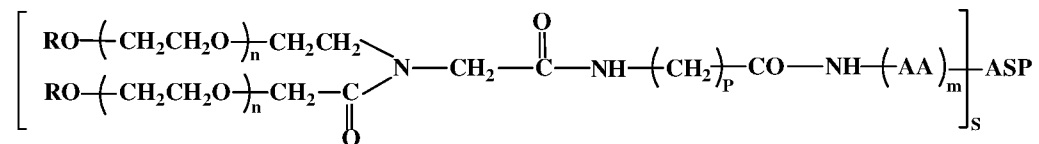
表 4 不同 PEG-ASP 偶联物及培门冬酶对肿瘤细胞的 IC_{50} 值

肿瘤细胞	ASP	培门冬酶	Oncaspar	Y-PALD-40K-A SP(Mono)	Y-PALD-40K-A SP(Di)
THP-1	3.8 μ mol/L	7.9 μ mol/L	7.5 μ mol/L	2.05 μ mol/L	1.93 μ mol/L
Raji	8.9 μ mol/L	8.8 μ mol/L	8.1 μ mol/L	2.7 μ mol/L	2.6 μ mol/L
L1210	7.9 μ mol/L	10.28 μ mol/L	10.69 μ mol/L	3.75 μ mol/L	3.05 μ mol/L

根据实验结果，PEG 定点修饰后的门冬酰胺酶对上述 3 种肿瘤细胞的杀伤性普遍高于未修饰的门冬酰胺酶，并且它们的抗肿瘤活性明显高于培门冬酶和 Oncaspar，对多种细胞株均表现出良好的抗肿瘤作用。由于本发明中制备的门冬酰胺酶的定点修饰产物，其比活都高于培门冬酶和 Oncaspar，因此对肿瘤细胞的抑制作用更好。

15
权 利 要 求 书

- 1、聚乙二醇定点修饰的 L-门冬酰胺酶，其特征在于，聚乙二醇在 L-门冬酰胺酶的 1 或 2 个亚基的 N 端氨基上偶联，所述聚乙二醇分子量为 30-40KDa，聚乙二醇为分支型。
- 2、聚乙二醇定点修饰的 L-门冬酰胺酶，其特征在于，聚乙二醇在 L-门冬酰胺酶的 1 或 2 个亚基的 N 端氨基上偶联，所述聚乙二醇分子量为 30-40KDa，聚乙二醇为分支型，活化基团为醛基。
- 3、根据权利要求 1 所述的聚乙二醇定点修饰的 L-门冬酰胺酶，其特征在于，聚乙二醇在 L-门冬酰胺酶的 2 个亚基的 N 端伯氨基上偶联，所述聚乙二醇分子量为 30 KDa 或 40KDa，聚乙二醇活化基团为乙醛、丙醛、丁醛或戊醛。
- 4、根据权利要求 1 所述的聚乙二醇定点修饰的 L-门冬酰胺酶，其特征在于所述聚乙二醇化的 L-门冬酰胺酶的结构通式如下所示：



其中R为H或C1-C4的烷基；n为320-455的整数，P为1-4的整数；AA为N端的L-氨基酸残基，m为0-5的整数，S为1或2。

- 5、根据权利要求 4 所述的聚乙二醇定点修饰的 L-门冬酰胺酶，其特征在于所述烷基为甲基，n 为 320-455 之间的整数，P 为 2，m 为 0。
- 6、聚乙二醇定点修饰的 L-门冬酰胺酶的制备方法，其特征在于包括如下步骤：步骤 1，用 40mM pH5.0 的乙酸-乙酸钠缓冲液配制 15-20mg/mL 的 L-门冬酰胺酶溶液；步骤 2，按摩尔比 L-门冬酰胺酶:PEG:还原剂=1:(4-5):(100-200)在 4℃的条件下反应 12-24h；步骤 3，反应结束后以离子交换色谱法纯化处理，最终得到聚乙二醇单修饰或者二修饰的 L-门冬酰胺酶；其中，所述还原剂为氰基硼氢化钠。
- 7、权利要求 1-5 任一项所述聚乙二醇定点修饰的 L-门冬酰胺酶药学上可接受的盐或复合物。
- 8、一种药物组合物，其特征在于所述药物组合物含有权利要求1-5任一项聚乙二醇定点修饰的门冬酰胺酶、或其药学上可接受的盐或其复合物和药学上可接受的辅料。
- 9、根据权利要求8所述的药物组合物，其特征在于所述的药物组合物的剂型为冻干粉针制剂。
- 10、权利要求1-5任一项聚乙二醇定点修饰的门冬酰胺酶或权利要求8或9所述的药物组合物在制备治疗肿瘤的药物中的应用。
- 11、权利要求 1-5 任一项聚乙二醇定点修饰的门冬酰胺酶或权利要求 8 或 9 所述的药物组合物在制备治疗急性淋巴细胞白血病、NK/T 细胞淋巴瘤、何杰金氏病、急性骨髓白血病、急性骨髓单核细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、淋巴肉瘤、网状细胞肉瘤或黑素肉瘤

的药物中的应用。

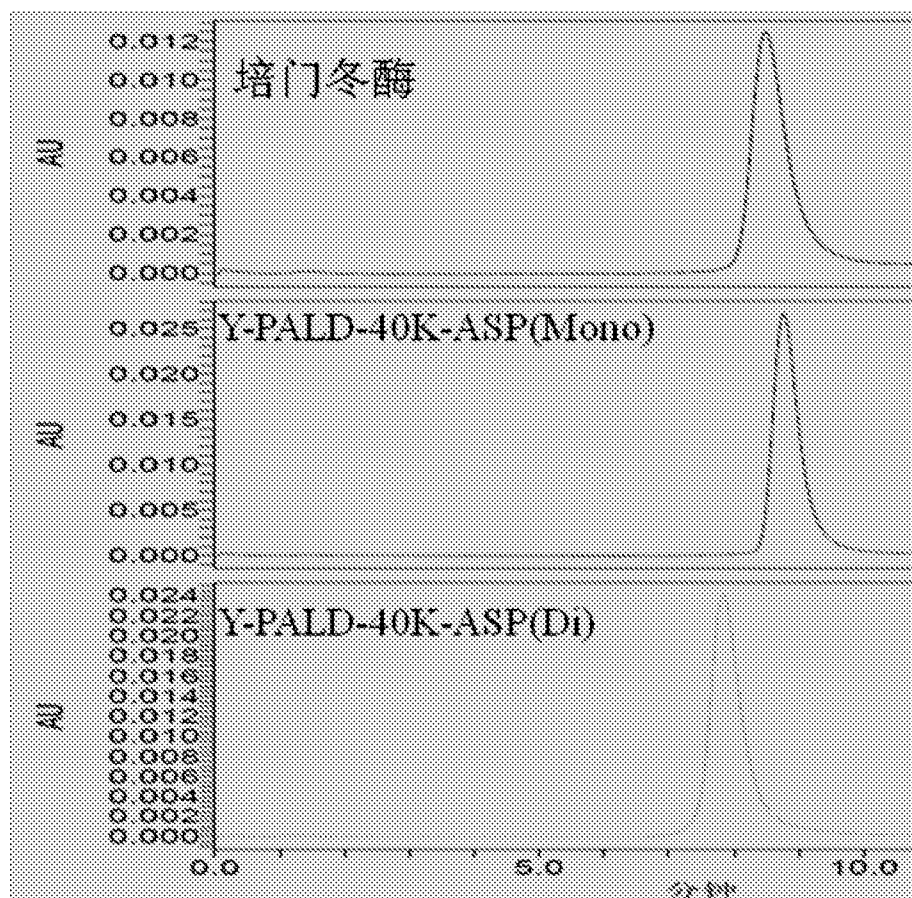


图 1a

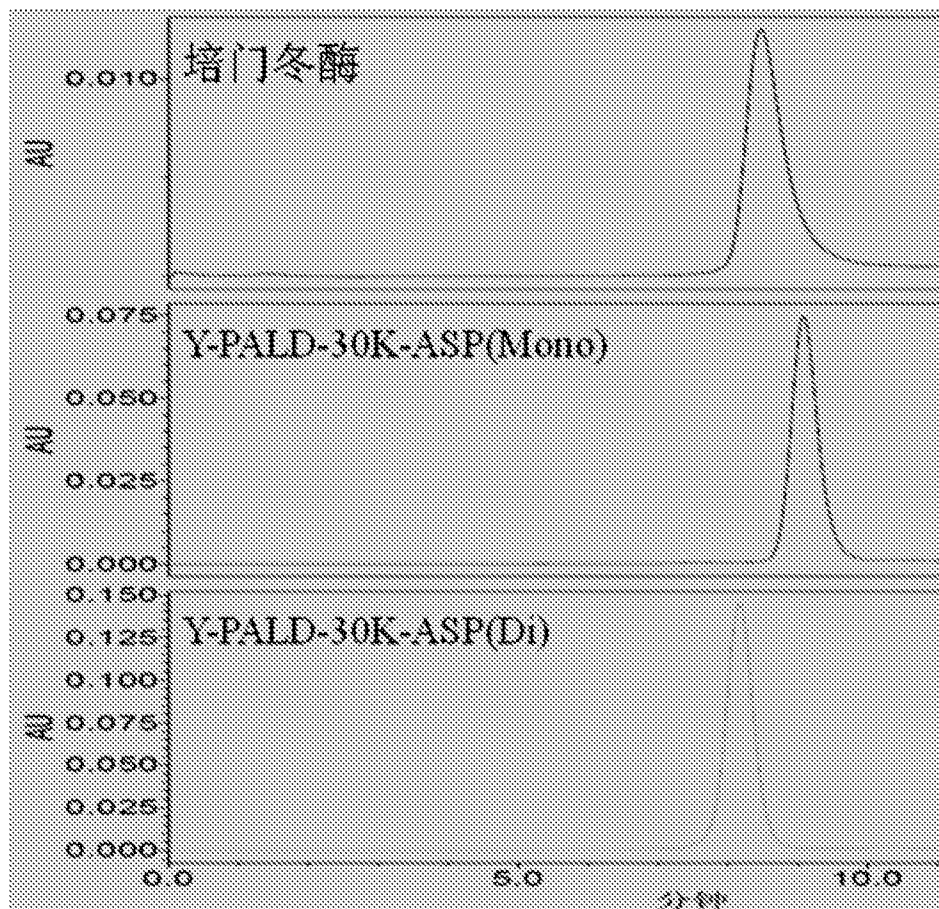


图 1b

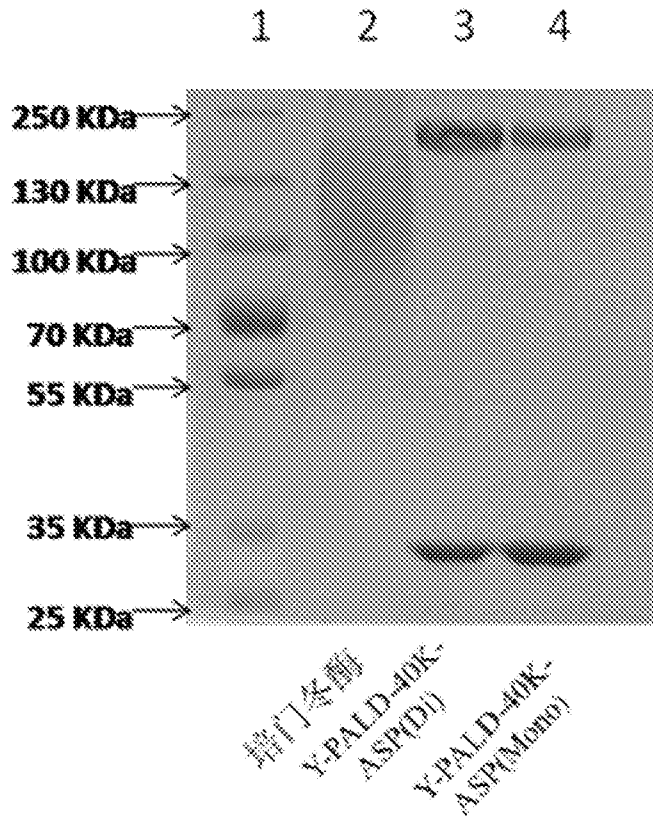


图 2a

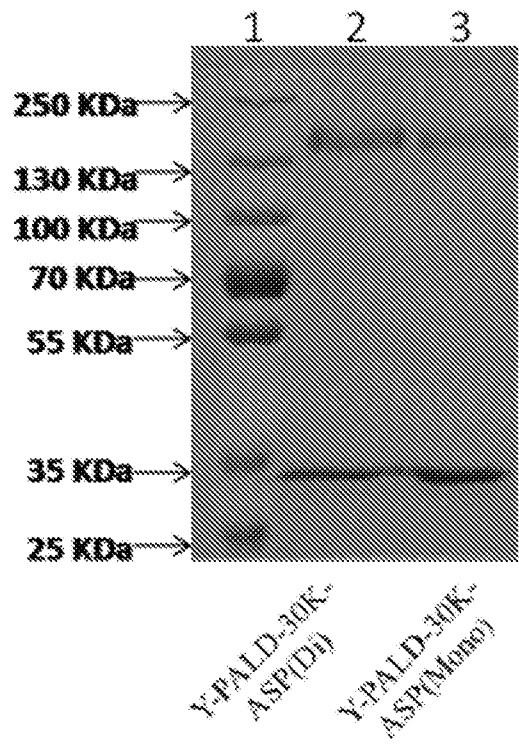


图 2b

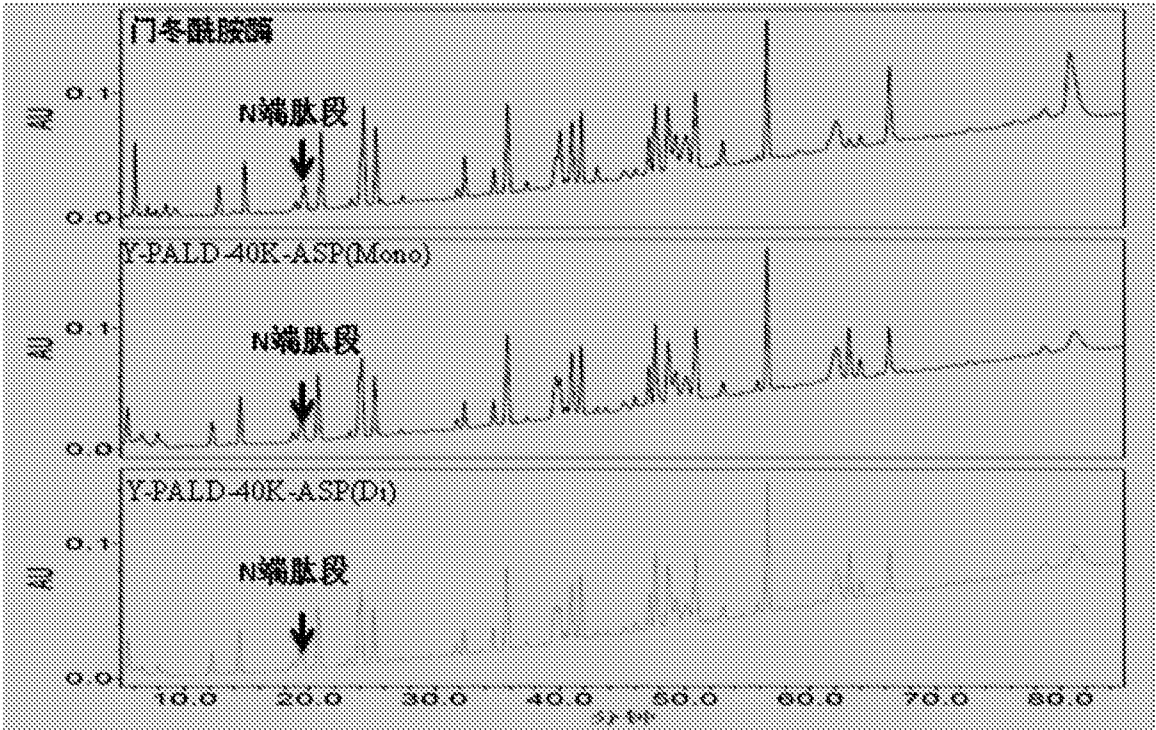


图 3

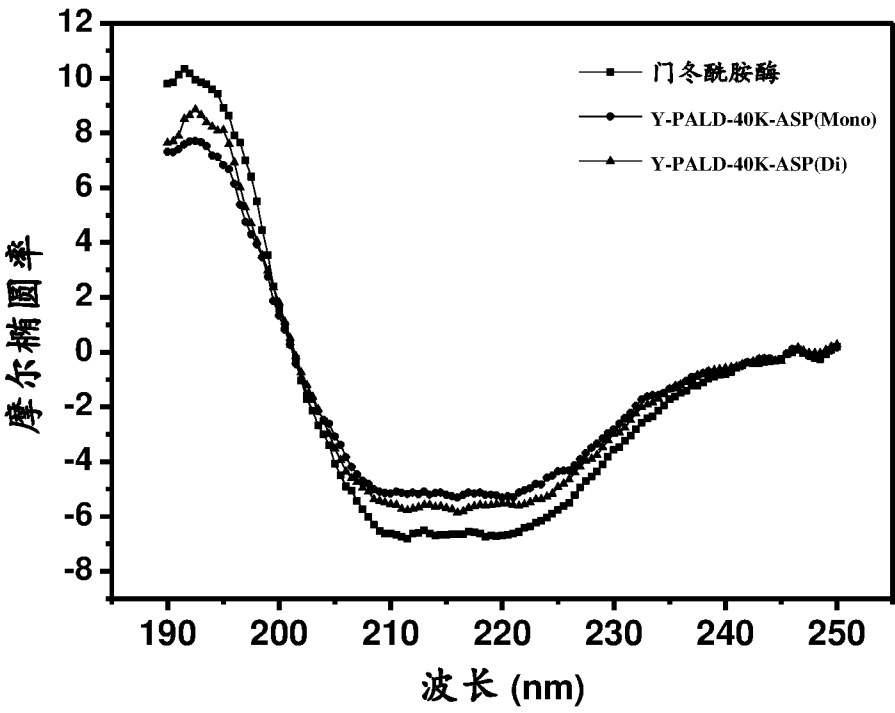


图 4

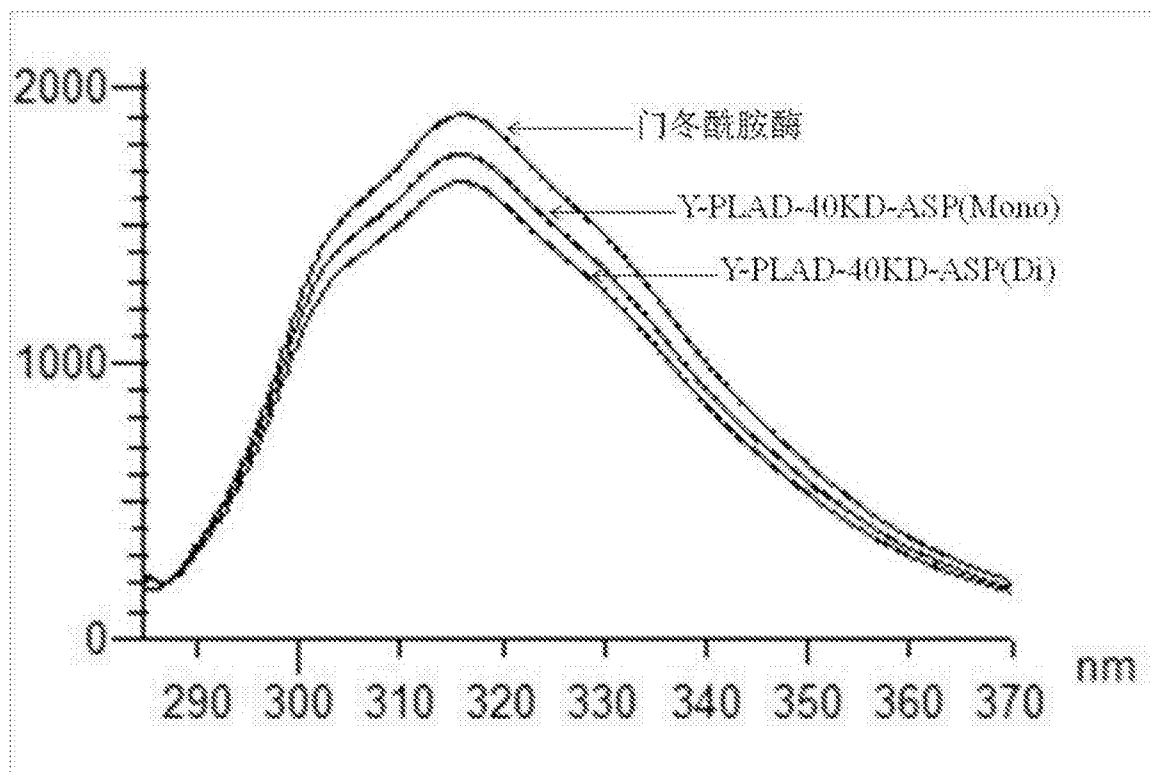


图 5

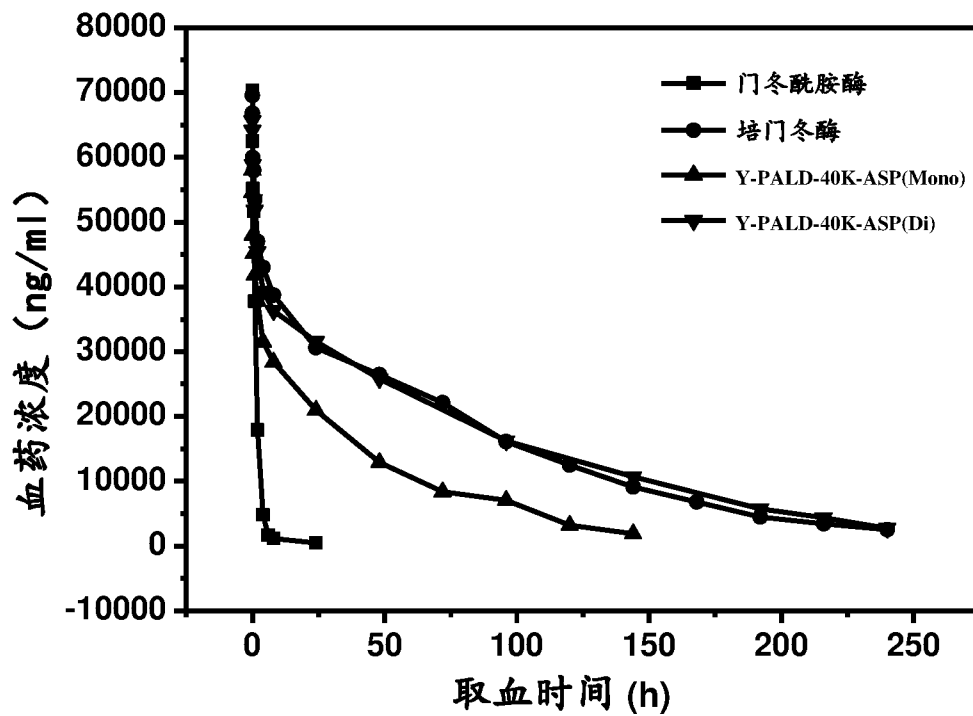


图 6a

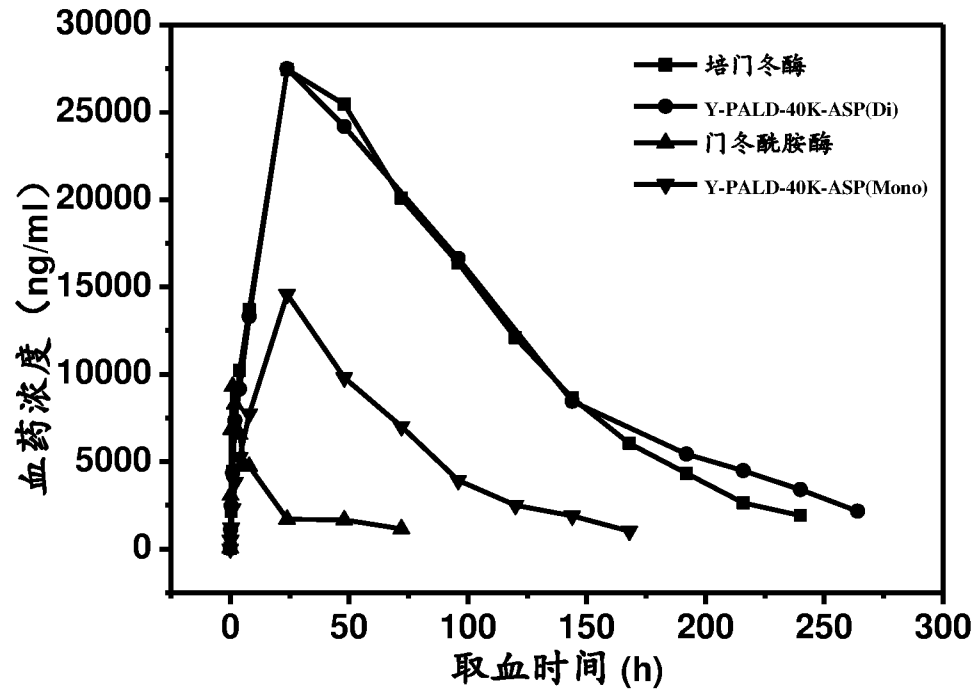


图 6b

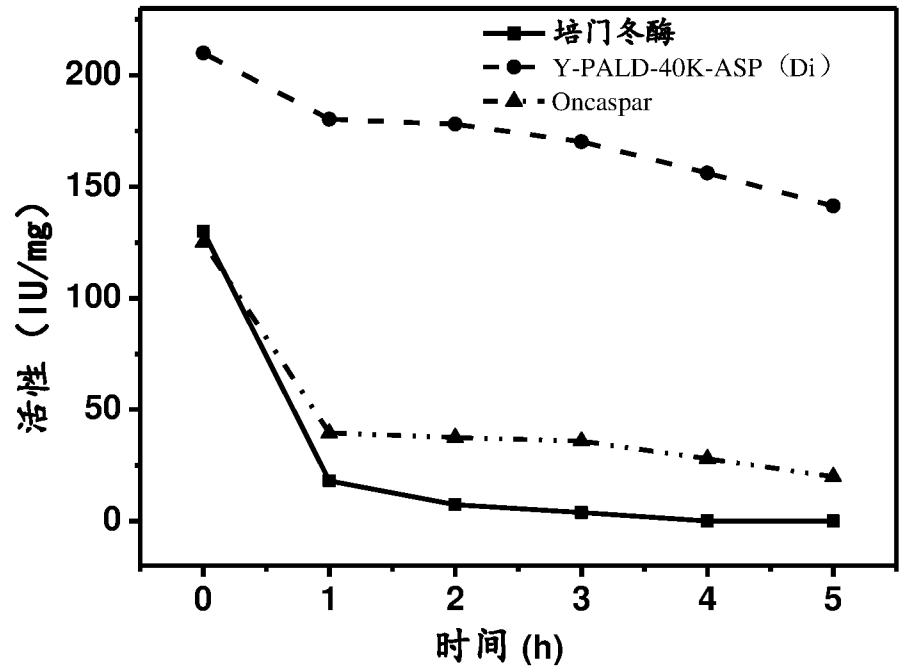


图 7

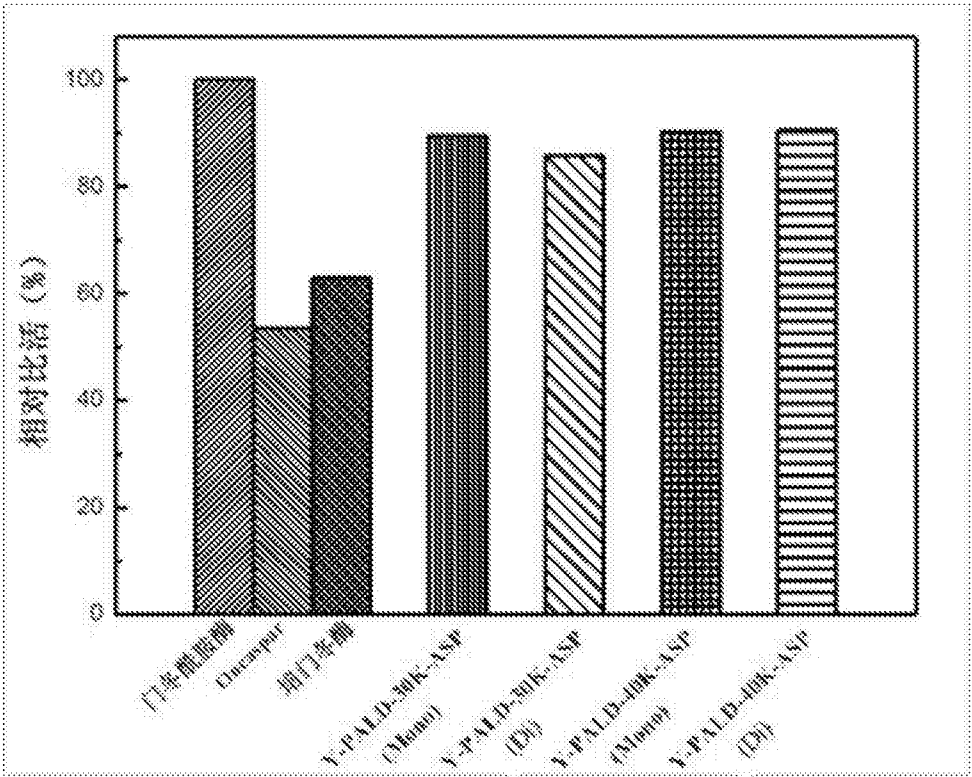


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/072167

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/50 (2006.01) i; A61K 47/48 (2006.01) i; A61P 35/02 (2006.01) i; C12N 9/82 (2006.01) i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 38/-; A61K 47/-; A61P 35/-; C12N 9/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, WPI, EPODOC, CNKI, WANFANG, PubMed, ISI web of knowledge, googlescholar: Asparaginase, poly ethylene, glycol, carbowax, PEG, branched, pegaspargase, L-Asparaginasum, branching, furcal poly glycol

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FU, Qizhong, "PREPARATION, PURIFICATION, IDENTIFICATION AND RESEARCH OF N-TERMINAL OF PEG-L-ASP, " CDMD (master) Medicine/Hygiene and Science, no. 6, 15 May 2007 (15.05.2007) page 18, the first paragraph, page 37, the first and second paragraphs	1-11
Y	VERONESE, FM et al., "Branched and linear poly (ethylene glycol): Influence of the polymer structure on enzymological, pharmacokinetic, and immunological properties of protein conjugates" JOURNAL OF BIOACTIVE AND COMPATIBLE POLYMERS, vol. 12, no. 7, 31 July 1997 (31.07.1997) the abstract, and page 197, the third paragraph	1-11
Y	CN 101484181 A (ENZON PHARMACEUTICALS INC.) 15 July 2009 (15.07.2009) description, page 24, the first to the fourth paragraphs	1-11
Y	CN 104046600 A (ZONHON BOPHARMA INSTITUTE, INC. et al.) 17 September 2014 (17.09.2014) description, paragraphs [0006], [0017], [0027], [0030] and [0031]	3, 6-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 10 August 2015	Date of mailing of the international search report 31 August 2015
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer CAO, Kou Telephone No. (86-10) 62413565

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/072167

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009009716 A1 (ENZON PHARMACEUTICALS, INC. et al.) 15 January 2009 (15.01.2009) the whole document	1-11
A	CN 101082043 A (SHANGHAI INSTITUTE OF PHARMACEUTICAL INDUSTRY) 05 December 2007 (05.12.2007) the whole document	1-11
A	CN 102573917 A (ALIZE PHARMA II) 11 July 2012 (11.07.2012) the whole document	1-11
A	CN 101586099 A (BEIJING SHUANGLU PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 25 November 2009 (25.11.2009) the whole document	1-11
A	GUO, Qiao et al. "Studies on the Recombinant Human Asparaginase Modified with Polyethylene Glycol" Biotechnology, vol. 15, no. 12, 30 April 2005 (30.04.2005) pages 32-35	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/072167

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101484181 A	15 July 2009	US 2008063632 A1	13 March 2008
		TW 1427148 B	21 February 2014
		EP 2046369 A2	15 April 2009
		MX 2009000284 A	26 January 2009
		KR 101408062 B1	20 June 2014
		EP 2046369 A4	21 April 2010
		JP 5308333 B2	09 October 2013
		IL 195168 D0	01 August 2011
		US 7807436 B2	05 October 2010
		AU 2007275535 A1	24 January 2008
		NZ 572519 A	30 June 2011
		US 2010273236 A1	28 October 2010
		CA 2652718 A1	24 January 2008
		CN 101484181 B	26 December 2012
		AU 2007275535 B2	16 August 2012
		TW 200817518 A	16 April 2008
		KR 20090033175 A	01 April 2009
		IL 195168 A	31 December 2014
		JP 2009542219 A	03 December 2009
		WO 2008011234 A3	16 October 2008
		WO 2008011234 A2	24 January 2008
CN 104046600 A	17 September 2014	None	
WO 2009009716 A1	15 January 2009	US 2009017004 A1	15 January 2009
		CA 2693645 A1	15 January 2009
		EP 2176404 A1	21 April 2010
		TW 200922623 A	01 June 2009
		JP 2010533233 A	21 October 2010
		EP 2176404 A4	19 November 2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/072167

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101082043 A	05 December 2007	CN 101082043 B	10 October 2012
CN 102573917 A	11 July 2012	AU 2010270294 B2	25 June 2015
		CO 6612174 A2	01 February 2013
		NZ 597912 A	31 January 2014
		SG 176984 A1	30 January 2012
		WO 2011003633 A1	13 January 2011
		US 2012100121 A1	26 April 2012
		CN 102573917 B	17 June 2015
		MX 2012000424 A	23 July 2012
		EA 021168 B1	30 April 2015
		EA 201270134 A1	30 July 2012
		PE 05012012 A1	31 May 2012
		JP 2012532185 A	13 December 2012
		UA 104634 C2	25 February 2014
		KR 20120104154 A	20 September 2012
		AU 2010270294 A1	23 February 2012
		MA 33503 B1	01 August 2012
		CA 2767149 A1	13 January 2011
		IL 217392 D0	29 February 2012
		WO 2011003886 A1	13 January 2011
CN 101586099 A	25 November 2009	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/072167

A. 主题的分类

A61K 38/50(2006.01)i; A61K 47/48(2006.01)i; A61P 35/02(2006.01)i; C12N 9/82(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K38/-; A61K47/-; A61P35/-; C12N9/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNPAT, WPI, EPODOC, CNKI, 万方, PubMed, ISI web of knowledge, googlescholar: 门冬酰胺酶, 天冬酰胺酶, 天门冬酰胺酶, 聚乙二醇, 分支, 分枝, 支链, 支化, 叉状聚乙二醇, Asparaginase, poly ethylene glycol, carbowax, PEG, branched, pegaspargase

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	府旗中. "N-端聚乙二醇化L-门冬酰胺酶的制备、纯化及鉴定研究" 中国优秀硕士学位论文全文数据库(硕士)医药卫生科技辑, 第6期, 2007年 5月 15日 (2007 - 05 - 15), 第18页第1段, 第37页第1-2段	1-11
Y	VERONESE, FM等. "Branched and linear poly(ethylene glycol): Influence of the polymer structure on enzymological, pharmacokinetic, and immunological properties of protein conjugates" JOURNAL OF BIOACTIVE AND COMPATIBLE POLYMERS, 第12卷, 第7期, 1997年 7月 31日 (1997 - 07 - 31), 摘要, 第197页第3段	1-11
Y	CN 101484181 A (安佐制药股份有限公司) 2009年 7月 15日 (2009 - 07 - 15) 说明书第24页第1-4段	1-11
Y	CN 104046600 A (江苏众红生物工程创药研究院有限公司等) 2014年 9月 17日 (2014 - 09 - 17) 说明书第[0006], [0017], [0027], [0030]-[0031]段, 实施例1	3, 6-11

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的
公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体
说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解
发明之理论或原理的在后文件“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是
新颖的或不具有创造性“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并
且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发
明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2015年 8月 10日

国际检索报告邮寄日期

2015年 8月 31日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
北京市海淀区蓟门桥西土城路6号
100088 中国

传真号 (86-10)62019451

受权官员

曹扣

电话号码 (86-10)62413565

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2009009716 A1 (ENZON PHARMACEUTICALS, INC. 等) 2009年 1月 15日 (2009 - 01 - 15) 全文	1-11
A	CN 101082043 A (上海医药工业研究院) 2007年 12月 5日 (2007 - 12 - 05) 全文	1-11
A	CN 102573917 A (阿利兹第二药物公司) 2012年 7月 11日 (2012 - 07 - 11) 全文	1-11
A	CN 101586099 A (北京双鹭药业股份有限公司) 2009年 11月 25日 (2009 - 11 - 25) 全文	1-11
A	郭桥等. "聚乙二醇修饰重组人天冬酰胺酶的研究" 生物技术, 第15卷, 第2期, 2005年 4月 30日 (2005 - 04 - 30), 第32-35页	1-11

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/072167

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	101484181	A	2009年 7月 15日	US	2008063632	A1	2008年 3月 13日
				TW	I427148	B	2014年 2月 21日
				EP	2046369	A2	2009年 4月 15日
				MX	2009000284	A	2009年 1月 26日
				KR	101408062	B1	2014年 6月 20日
				EP	2046369	A4	2010年 4月 21日
				JP	5308333	B2	2013年 10月 9日
				IL	195168	D0	2011年 8月 1日
				US	7807436	B2	2010年 10月 5日
				AU	2007275535	A1	2008年 1月 24日
				NZ	572519	A	2011年 6月 30日
				US	2010273236	A1	2010年 10月 28日
				CA	2652718	A1	2008年 1月 24日
				CN	101484181	B	2012年 12月 26日
				AU	2007275535	B2	2012年 8月 16日
				TW	200817518	A	2008年 4月 16日
				KR	20090033175	A	2009年 4月 1日
				IL	195168	A	2014年 12月 31日
				JP	2009542219	A	2009年 12月 3日
				WO	2008011234	A3	2008年 10月 16日
				WO	2008011234	A2	2008年 1月 24日
CN	104046600	A	2014年 9月 17日	无			
WO	2009009716	A1	2009年 1月 15日	US	2009017004	A1	2009年 1月 15日
				CA	2693645	A1	2009年 1月 15日
				EP	2176404	A1	2010年 4月 21日
				TW	200922623	A	2009年 6月 1日
				JP	2010533233	A	2010年 10月 21日
				EP	2176404	A4	2014年 11月 19日
CN	101082043	A	2007年 12月 5日	CN	101082043	B	2012年 10月 10日
CN	102573917	A	2012年 7月 11日	AU	2010270294	B2	2015年 6月 25日
				CO	6612174	A2	2013年 2月 1日
				NZ	597912	A	2014年 1月 31日
				SG	176984	A1	2012年 1月 30日
				WO	2011003633	A1	2011年 1月 13日
				US	2012100121	A1	2012年 4月 26日
				CN	102573917	B	2015年 6月 17日
				MX	2012000424	A	2012年 7月 23日
				EA	021168	B1	2015年 4月 30日
				EA	201270134	A1	2012年 7月 30日
				PE	05012012	A1	2012年 5月 31日
				JP	2012532185	A	2012年 12月 13日
				UA	104634	C2	2014年 2月 25日
				KR	20120104154	A	2012年 9月 20日
				AU	2010270294	A1	2012年 2月 23日
				MA	33503	B1	2012年 8月 1日
				CA	2767149	A1	2011年 1月 13日
				IL	217392	D0	2012年 2月 29日
				WO	2011003886	A1	2011年 1月 13日
CN	101586099	A	2009年 11月 25日	无			

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)