

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.⁷
A61K 47/48



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99805496.8

[45] 授权公告日 2005 年 2 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 1187094C

[22] 申请日 1999.4.28 [21] 申请号 99805496.8

[30] 优先权

[32] 1998.4.28 [33] US [31] 60/083,339

[86] 国际申请 PCT/US1999/009161 1999.4.28

[87] 国际公布 WO1999/055377 英 1999.11.4

[85] 进入国家阶段日期 2000.10.26

[71] 专利权人 应用研究系统 ARS 股份公司

地址 荷属安的列斯群岛库拉索市

[72] 发明人 N·埃尔塔亚 M·J·罗伯茨

M·哈里斯 W·索利维切

审查员 赵超

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

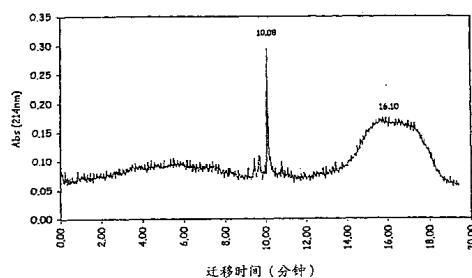
代理人 徐迅

权利要求书 1 页 说明书 15 页 附图 6 页

[54] 发明名称 多元醇干扰素 β 偶联物

[57] 摘要

用硫醇反应 PEG 化剂通过位点特异性 PEG 化过程产生了 PEG-IFN- β 偶联物(其中一个 PEG 分子和人 IFN- β 的 Cys¹⁷ 共价结合)。还提供了用于治疗感染、肿瘤和自身免疫及炎症疾病的药物组合物和方法。本发明还涉及 PEG 分子连续分步结合到多肽,更具体为 IFN- β 上的方法。



1. 一种多元醇-干扰素- β 偶联物，其特征在于，该偶联物具有与人干扰素- β 的 Cys¹⁷ 共价结合的聚亚烷基二醇分子。
- 5 2. 如权利要求 1 所述的多元醇-干扰素- β 偶联物，其特征在于，所述聚亚烷基二醇分子是聚乙二醇分子。
3. 一种产生权利要求 1 所述的多元醇-干扰素- β 偶联物的方法，其特征在于，该过程包括以下步骤：
- 用硫醇反应性多元醇剂和干扰素- β 反应，来使聚亚烷基二醇分子和人干扰
- 10 素- β 位点特异性共价结合，从而产生多元醇-干扰素- β 偶联物；以及
- 回收产生的多元醇-干扰素- β 偶联物；
- 所述硫醇反应性多元醇剂是具有选自二硫对吡啶、乙烯砜、马来酰亚胺和碘乙酰胺的官能团的多元醇衍生物。
4. 如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述硫醇反应性多元醇是硫醇
- 15 反应性 PEG 化剂。
5. 如权利要求 3 或权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述硫醇反应性多元醇剂是单甲氧基化的。
6. 如权利要求 3 或权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述硫醇反应性多元醇剂是双功能性的。
- 20 7. 如权利要求 3 或权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述硫醇反应性多元醇剂是单甲氧基化多元醇的二硫对吡啶衍生物。
8. 如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，该反应步骤在干扰素- β 稳定的酸性 pH 下进行。
9. 一种药物组合物，其特征在于，该组合物包括作为活性成分的、根据
- 25 权利要求 1 所述的多元醇-干扰素- β 偶联物，和药学可接受的载体、赋形剂或辅助剂。

多元醇干扰素 β 偶联物5 相关申请的交叉引用

本申请根据 35 U. S. C. § 119(e) 要求美国临时申请号 60/083, 339 的优先权, 其全部内容在此纳入以供参考。

技术领域

- 10 本发明涉及多元醇-IFN- β 偶联物, 其中多元醇单元和 Cys¹⁷ 共价结合。本发明的另一个目的是其位点特异性产生的过程以及其在细菌感染、病毒感染、自身免疫疾病和炎症疾病中治疗、预后或诊断中的用途。本发明还涉及两个或多个 PEG 分子分步结合到多肽上的方法。

15 背景技术

人成纤维细胞干扰素 (IFN- β) 具有抗病毒活性而且也能刺激针对致瘤性细胞的自然杀伤细胞。它是由病毒和双链 RNA 诱导的约 20, 000Da 的多肽。Derynk 等(自然, 285: 542-547, 1980) 用重组 DNA 技术克隆的成纤维细胞基因的核苷酸序列推出了该蛋白质的完整氨基酸序列。它长 166 个氨基酸。

- 20 Shepard 等(自然, 294:536-565, 1981)描述了 842 位的碱基突变能消除其抗病毒活性(位点 141Cys $\rightarrow$ Tyr), 以及具有 1119-1121 核苷酸缺失的变异克隆。

- Mark 等(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81(18):5662-5666, 1984)通过用(A)置换 469(T)碱基, 导致在位点 17 从 Cys $\rightarrow$ Ser 的氨基酸转变, 插入了一个人工突变。报道了得到的 IFN- β 与“天然”IFN- β 活性相同, 并且在长期储藏(-70 $^{\circ}$ C)中保持稳定。

将亲水性多聚物聚乙二醇(PEG)(也称作聚环氧乙烷)与分子共价结合是生物技术和医学上的重要应用。PEG 在其最常见形式下是在各末端具有羟基基团的线性多聚物:

- 30 HO-CH₂-CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂-OH

该分子式能简单的代表为 HO-PEG-OH, 其中指-PEG-代表没有末端基团的

多聚物主链：

“-PEG-”指 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$

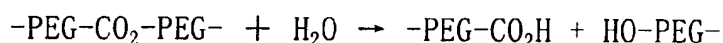
PEG 通常用作甲氧基-PEG-OH，其中一个末端是相对惰性的甲氧基基团，而另一个末端是要化学修饰的羟基基团。

5 $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$

也常用支链 PEG。支链 PEG 可以表示成 $\text{R}(-\text{PEG}-\text{OH})_m$ ，其中 R 代表例如季戊二醇或丙三醇的中央核心分子，而 m 代表支化臂的数目。支化臂的数目(m)能从三变化到 100 或更多。羟基基团要进行化学修饰。

其它如 PCT 专利申请 WO 96/21469 所述的支链形式具有要进行化学修饰的单个末端。这种 PEG 类型能表示成 $(\text{CH}_3\text{O}-\text{PEG}-)_p\text{R}-\text{X}$ ，其中 p 等于 2 或 3，R 代表例如赖氨酸或丙三醇的中央核心，而 X 代表如能进行化学活化的羧基的功能性基团。而另一个支链形式，“侧基 PEG”具有如羧基（其主要在 PEG 主链上而不是在 PEG 链末端）的反应性基团。

除了 PEG 的这些形式，也能用在主链中的弱键或可降解键来制备多聚物。例如，Harris 已在美国专利申请 06/026,716 中显示能用多聚物主链中可进行水解的酯键来制备 PEG。该水解（反应）导致多聚物被切成较小分子量的片段，根据反应流程：



根据本发明，术语聚乙二醇或 PEG 指包括所有上述衍生物。

20 环氧乙烷和环氧丙烷的共多聚物在其化学上和 PEG 密切相关，而且它们能用来代替 PEG 的许多应用。它们具有以下通式：



其中 R 是 H 或 CH_3 。

PEG 是具有高水溶性以及许多有机溶剂中具有高溶解性的性质的有用的多聚物。PEG 无毒性也无免疫原性。当 PEG 和水不溶性化合物化学结合（PEG 化）时，得到的偶联物通常是水溶性的，以及许多有机溶剂中是可溶的。

现在，PEG-蛋白质偶联物被用于蛋白质替代治疗和其它治疗性用途中。例如，PEG 化腺苷脱氨酶 (ADAGEN®) 正将用于治疗重度联合免疫缺陷病 (SCIDS)，PEG 化 L- 天冬酰胺酶 (ONCAPSPAR®) 正将用于治疗急性淋巴母细胞白血病 (ALL)，而 PEG 化干扰素- α (INTRON(R)A) 正在进行治疗丙型肝炎的三期试

验。

对于具有临床功效的 PEG 蛋白质偶联物的综述, 可见 N. L. Burnham, Am. J. Hosp. Pharm., 15:210-218, 1994。

已经开发了得到 PEG 化蛋白质的不同方法。将 PEG 与蛋白质上发现的反
5 应性基团结合通常是利用亲电活化 PEG 衍生物完成的。将 PEG 与赖氨酸残基和
N 末端上找到的 α -和 ϵ -氨基基团结合, 得到组成产物混合物的偶联物。

通常, 这些偶联物包括每个蛋白质分子结合的 PEG 分子数从 0 到蛋白质
中氨基基团数变化的偶联物。对于已经单独修饰的蛋白质分子, PEG 单元可以
结合在许多不同的胺位点上。

10 非特异性 PE 固化的这种类型已经产生了许多变得几乎无活性的偶联物。
活性减弱通常是由于如同在许多细胞因子和抗体中一样, 屏蔽了蛋白质的活性
结合功能域所致。例如, Katre 等在美国专利 4, 766, 106 和美国专利 4, 917,
888 中描述了用超量许多的甲氧基-聚乙二醇基 N-琥珀酰亚胺基戊二酸和甲氧
基-聚乙二醇基 N-琥珀酰亚胺基琥珀酸 PEG 化 IFN- β 和 IL-2。两种蛋白质都
15 是在微生物宿主细胞中产生的, 其允许自由半胱氨酸位点特异性突变为丝氨
酸。突变在 IFN- β 的微生物表达中是必需的, 以促进蛋白折叠。具体的, 这
些实验中所用的 IFN- β 是商业产品 Betaseron[®], 其中 Cys¹⁷ 被丝氨酸替换。另
外, 无糖基化减弱了它在水溶液中的可溶性。非特异性 PEG 化导致可溶性提高,
但主要问题是活性和产量的水平降低。

20 欧洲专利申请 EP 593 868 (题为 PEG-干扰素结合物), 描述了 PEG-IFN- α
的制备。然而, PEG 化反应不是位点特异性的, 并因此获得了 PEG-IFN α 偶
联物位置异构体的混合物 (也见 Monkarsh 等, ACS. Symp. Ser., 680: 207-216,
1997)。

Kinstler 等在欧洲专利申请 EP 675 201 中演示了用 mPEG-丙醛对巨核细
25 胞生长和发育因子 (MGDF) 的 N-末端残基的选择性修饰。这考虑到批间可重复
性 PEG 化和药物代谢动力学。Gilbert 等在美国专利 5, 711, 944 中证明能产
生具有最适水平活性的 IFN- α 的 PEG 化。在该例中需要费力的纯化步骤来获
得最适偶联物。

大部分细胞因子, 以及其它蛋白质没有特异性 PEG 结合位点, 而且除上
30 文提到的例子以外, 很可能一些通过 PEG 化反应产生的异构体部分或完全无活
性, 从而导致最终混合物的活性丧失。

因此位点特异性单-PEG 化是这些蛋白质偶联物制备中的理想目标。

Woghiren 等在 Bioconjugate Chem., 4(5):314-318, 1993 中为这样的位点特异性 PEG 化合成了硫醇选择性 PEG 衍生物。显示了稳定的硫醇保护的 PEG 衍生物以二硫对吡啶反应基团的形式与蛋白质木瓜蛋白酶的自由半胱氨酸特异性偶联。木瓜蛋白酶和 PEG 酯键新形成的二硫键能在温和降解条件下被切开，以再生天然蛋白。

本文任何文件的引用并不承认这些文件是有关现有技术，或是本申请任何权利要求专利性的材料。任何对任一文件的内容和时间的陈述是基于在提交时对申请人可得的信息，不是对该陈述正确性的承认。

10

发明内容

在本发明中提供了多元醇-IFN- β 偶联物，具体是 PEG-IFN- β 偶联物，其中多元醇单元与 Cys¹⁷ 共价结合。通过使硫醇反应性多元醇剂和 IFN- β 中的 Cys¹⁷ 残基反应获得特异性偶联物。希望这种偶联物在体内显示提高的作用。目标是获得在中等 pH 可溶性提高，稳定性提高（减少聚集），免疫原性减弱，以及与“天然”IFN- β 比较不损失活性。这种聚合反应的结果将减少达到所需效果的剂量，简化和稳定药物组合物的配制，以及可能提高长期功效。

本发明还提供了 PEG 分子连续分步结合到多肽上的方法。

20

附图说明

图 1 显示 PEG-IFN- β 纯化前毛细管电泳(CE)图。

图 2A-2C 显示通过分子排阻层析 (Superose 12) 进行的 PEG-IFN- β 偶联物纯化：图 2A-首次通过；图 2B-二次通过；图 2C-第三次通过。

图 3 显示来自第三次通过层析的纯化 PEG-IFN- β 偶联物的 SDS-PAGE 层析。泳道 1 和 4 是蛋白质分子量标准，泳道 2 是“天然”IFN- β ，而泳道 3 是 PEG-IFN- β 偶联物。

图 4 报道了纯化的 PEG-IFN- β 偶联物（其中 IFN 用 mPEG-OPSS_{5k}PEG 化）的毛细管电泳(CE)图。

图 5 报道了纯化 PEG-IFN- β 偶联物的 MALDI MS 色谱。

图 6 显示了“天然：IFN- β 和 PEG-IFN- β 偶联物的抗病毒活性酯键的比较。用指定浓度的 IFN- β 样品与 WISH 细胞在用水泡性口炎病毒的致细胞病变

的剂量攻击前一起培养 24 小时。在另外 48 小时后用 MTT 法测定细胞病变作用。

图 7 显示了 Daudi 细胞中 IFN- β 和 PEG-IFN 的结合。

图 8 显示了静脉施药后小鼠中 IFN- β 和 PEG-IFN 的药物代谢动力学。虚线表明各标准曲线的 LOQ 测定。

5 图 9 显示了皮下施药后小鼠中 IFN- β 和 PEG-IFN 的药物代谢动力学。虚线表明各标准曲线的 LOQ 测定。

具体实施方式

本发明基于多元醇分子，具体是 PEG 分子，与人 IFN- β 的 Cys¹⁷ 残基的结合出乎意料的比天然人干扰素- β 提高了（或至少保持了并不导致减弱了）IFN- β 生物学活性的发现。因此，具有多元醇分子与 Cys¹⁷ 残基结合的 IFN- β 不仅展示了相同或提高的 IFN- β 活性，而且该多元醇-IFN- β 偶联物也提供了多元醇分子授予的理想性质，例如提高的可溶性。

“IFN- β ”，如本文所用，指如从生物液分离获得的，或用 DNA 重组技术从原核或真核宿主细胞获得的人成纤维细胞干扰素，以及其盐、功能性衍生物、前体和活性片段，规定其含有在天然存在形式的位点 17 出现的半胱氨酸残基。

根据本发明，多元醇-IFN- β 偶联物中的多元醇分子可能是任何具有线性或支链的水溶性单-或双功能性聚（环氧烷基）。通常，多元醇是聚（乙二醇）（PEG）。然而，本领域技术人员将认识到也能合适的使用其它多元醇，例如聚（丙三醇）和聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物。

如本文所用的术语“PEG 分子”指包括但不限于，线性或分支 PEG，甲氧基 PEG，可水解或酶解 PEG，侧基（pendant）PEG，树枝聚物（dendrimer）PEG，PEG 和一或多个多元醇的共聚物，以及 PEG 和 PLGA（聚（乳酸/乙醇酸））共聚物。

25 本文使用的定义“盐”同时指羧基基团的盐和可用已知方法获得的化合物氨基官能团的盐。羧基的盐包含无机盐，如钠、钾、钙盐和例如用胺如三羟乙基胺、精氨酸或赖氨酸形成的有机碱的盐。氨基的盐包含与无机酸，如盐酸的盐，和与有机酸，例如乙酸的盐。

本文所用的定义“功能性衍生物”指能从存在于氨基酸分子侧链或末端 N-C-基团的官能团根据已知方法制备的，并当其是药物学可接受时，亦即，当其不毁坏蛋白质活性或不授予含有它们的药物组合物毒性时包括在本发明中

的衍生物。这种衍生物包含羧基的酯或脂肪酸，和自由氨基的 N-酰基衍生物，或自由羟基的 O-酰基衍生物，并通过酰基如链酰基-或芳酰基-基团形成。

“前体”是在人或动物体内转化为 IFN- β 的化合物。

对于蛋白质的“活性片段”，本发明指当这种片段或前体显示和药物相
5 同的 IFN- β 活性时，单独或和与其结合的相关分子或残基，例如蔗糖或磷酸残基，或多肽分子的聚合物联合的化合物本身多肽链的任何片段或前体。

本发明的偶联物能用任何本领域已知的方法制备。根据本发明的一个实施例，将 IFN- β 和 PEG 化剂在合适溶剂中反应，分离并纯化所要的偶联物，例如，通过进行一或多次层析方法。

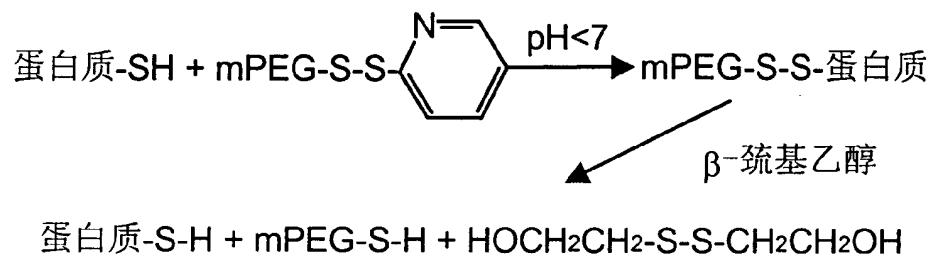
10 “层析方法”指任何用它们与溶剂（流动相）流过的载体（固定相）连接来分离混合物组分的方法。层析的分离原理是根据固定相和流动相的不同物理性质。

一些层析方法文献中熟知的具体类型包含：液相，高效液相，离子交换，吸收，亲和，分离，疏水，反相，凝胶过滤，超滤或薄层层析。

15 如本申请所用的“硫醇反应性 PEG 化剂”指任何能与半胱氨酸残基的硫醇基团反应的 PEG 衍生物。它可能是，含有例如二硫对吡啶、乙烯砜、马来酰亚胺、碘乙酰胺及其它官能团的 PEG。根据本发明的优选例，硫醇反应性 PEG 化剂是 PEG 的二硫吡啶（OPSS）衍生物。

以其单-甲氧基化形式使用 PEG 化剂，其中仅一个末端能被偶联，或以双
20 功能形式使用，其中两个末端都能偶联，例如以两个 IFN- β 与一个 PEG 分子共价连接形成偶联物。分子量优选在 500 和 100,000 之间。

本发明偶联物制备的典型反应流程如下：



上述流程的第二行报道了一种切开 PEG-蛋白键的方法。mPEG-OPSS 衍生物对于自由巯基高选择性，并且在 IFN- β 稳定的酸性 pH 条件下迅速反应。能
25 从与 IFN- β 和 PEG 的天然形式偶联的减少证明高选择性。

已显示蛋白质和 PEG 分子之间产生的二硫键在循环中是稳定的，但它在进入细胞环境后会被还原。因此希望该偶联物不进入细胞，在循环中都保持稳定，直到被清除。

需要注意的是，上述反应是位点特异性的，因为在人 IFN- β 天然存在形式中的位点 31 和 141 处的其它两个 Cys 残基由于形成二硫桥，不和硫醇反应性 PEG 化剂反应。

本发明还指出了两个或多个 PEG 分子连续分步结合到多肽的方法。该方法是根据低分子量的活化 PEG 比高分子量的活化 PEG 能更完整的和蛋白质上的空间位阻反应位点反应的认识。昂贵的治疗用蛋白质的 PEG 修饰为了使 PEG 偶联物能实践生产，必须是花费有效的。另外，为了减少肾小球滤过和优化 PEG-蛋白质偶联物的药理学性质，偶联物必须具有和分子量为 70kDa 的蛋白质相当的有效尺寸。这意味着对于将结合一个 PEG 的位点特异性修饰，优选结合一个具有 20kDa 以上分子量的 PEG 衍生物。如果修饰位点是空间拥挤的，大 PEG 分子上的反应基团可能难于达到修饰位点从而因此将导致低产量。根据本发明 PEG 化多肽的优选方法通过首先结合由于其相对较小的尺寸能和空间拥挤的位点反应的小异双功能或同双功能性 PEG 分子来提高位点特异性 PEG 化的产量。大分子量 PEG 衍生物随后和该小 PEG 的结合得到高产量的所要的 PEG 化蛋白质。

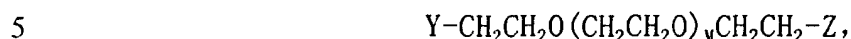
根据本发明，两个或多个 PEG 分子连续分步与多肽结合的方法包含：首先将低分子量异双功能性或同双功能性 PEG 分子与多肽结合，然后将单功能性或双功能性 PEG 分子和结合于多肽的低分子量 PEG 分子末端结合。在两个或多个 PEG 分子连续分步与多肽结合（其中多肽优选是 IFN- β ，而且其中位于空间拥挤位点的 Cys¹⁷ 是 PEG 结合的优选位点）后，能用一或多种纯化技术例如离子交换层析、分子排阻层析、疏水反应层析、亲和层析和反相层析来纯化 PEG-多肽偶联物。

低分子量 PEG 分子具有分子式：



其中 W 和 X 是分别和胺、巯基、羧基或羟基官能团反应，来将低分子量 PEG 分子和多肽结合的基团。W 和 X 优选分别选自二硫对吡啶、马来酰亚胺、乙烯砜、碘乙酰胺、胺、硫醇、羧基、活性酯、苯并三唑碳酸、p-硝基苯碳酸、异氰酸盐和生物素。低分子量 PEG 分子优选具有范围在大约 100 到 5,000 道尔顿的分子量。

用来与结合于多肽的低分子量 PEG 自由末端结合的单功能性或双功能性 PEG 分子优选具有范围大约 100 道尔顿到 200kDa 的分子量，而且优选是甲氧基 PEG，分支 PEG，可水解或酶解 PEG，侧基 PEG，或树枝聚物 PEG。但功能性或双功能性 PEG 还具有分子式：



其中 Y 和结合于多肽上的低分子量 PEG 分子的自由末端基团反应，而 Z 是 $-OCH_3$ 或一个与其反应来形成双功能性偶联物的基团。

为了两个或多个 PEG 分子连续分步与多肽结合的方法产生的 PEG-多肽偶联物能用来产生用于治疗疾病或失常的医学或药物组合物，其中多肽作为活性成分是有
10 有效的。

本发明的另一个目的是提供充分纯化形式的偶联物，来使它们适合用作药物组合物，细菌和病毒感染以及自身免疫、炎症疾病和肿瘤的治疗、诊断或预后的活性成分。这种药物组合物代表了本发明的另一个目的。

上述疾病的非限制性例子包含：感染性休克、AIDS、类风湿性关节炎、红斑
15 狼疮和多发性硬化症。

本发明的其它实施例和优点将在下列描述中被证明。

本发明的一个实施例是将本发明偶联物的药理活性量施用给受到上面报道的疾病之一发生的威胁的人或已经显示这种病理状态的人。

能使用任何与活性要素兼容的施药途径。肠道外施药，例如皮下、肌肉内或
20 静脉注射都是优选的。要施用的活性成分剂量由参照病人年龄、体重和个人反应的医学处方的基础而定。

对于 75 公斤平均体重，剂量可能是每日 10 微克和 1 毫克之间，而优选的每日剂量是 20 微克和 200 微克之间。

能够用含有活性要素和合适载体的可注射形式制备胃肠外施药的药物组
25 合物。用于胃肠外施药的载体是本领域熟知的，并且包含例如水、盐溶液、Ringer 溶液和/或葡萄糖。载体能含有小量赋形剂来保持药物学制备物的稳定性和等渗性。溶液制备能参经常规形式进行。

本发明已经根据具体实施例描述，但描述内容包括所有本领域技术人员可提出的变体和替换物，不超过权利要求的意图和目的。

30 现在本发明将通过下列实施例来详述，它们不意图以任何方式限制本发

明。

实施例 1: PEG-IFN- β 偶联物的制备

IFN- β 用 mPEG_{5k}-OPSS 的修饰

5 将在 50mM 醋酸钠缓冲液浓度为 0.37mg/ml, pH3.6 中是稳定的重组人 IFN- β 用于 PEG-IFN- β 的制备。将大约 1.0ml 的 6M 尿素以浓度为 0.37mg/ml (0.74mg, 3.7×10^{-8} 摩尔) 加到 2 毫升 IFN- β 中。以 50M 对 1M IFN- β 摩尔剩余量加入 mPEG_{5k}-OPSS, 两者在聚丙烯瓶中 37°C 反应 2 小时或 50°C 反应 1 小时。在任何纯化步骤之前, 用毛细管电泳 (CE) 图分析反应混合物来测定通过 PEG 化反应

10 PEG-IFN- β 偶联物形成的程度 (图 1)。该反应的通常产量为 50% PEG-IFN- β 。将反应产物从反应混合物中用 0.22mm 针筒式过滤器过滤出来, 然后将滤出液加到分子排阻层析柱 (Superose 12 或 Suoerdex 75, Pharmacia) 上, 用 50mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH7.5 缓冲液洗脱。图 2A 显示了 PEG-IFN- β 偶联物在 Superose 12 分子排阻层析柱上纯化的洗脱图谱。收集峰并用 SDS-PAGE 分析

15 (图 3)。由于“天然” IFN- β 峰靠得很近 (图 2B), 将含有 PEG-IFN- β 偶联物的组分合并在一起, 然后将浓缩液重新加到同一分子排阻层析柱上, 来再次纯化 PEG-IFN- β 偶联物。再次重复该程序 (第三次通过) 来确保纯度 (图 2C)。图 4 和图 5 分别显示了纯化 PEG-IFN- β 偶联物的毛细管电泳图和 MALDI MS 色谱。

20 IFN- β 用 mPEG_{30k}-OPSS 的修饰

提供了以 0.36mg/ml 溶于 50mM 醋酸钠缓冲液, pH3.6 中是稳定的重组人 IFN- β 。将溶于 3ml 去离子 H₂O 的约 36 毫克 mPEG_{30k}-OPSS 加到浓度为 0.36mg/ml (1.08mg, 4.9×10^{-8} 摩尔) 的 3 毫升 IFN- β 中。使两者在聚丙烯试管中 50°C 反应 2 小时。用毛细管电泳分析反应混合物的修饰程度。该反应的通常产量低

25 于 30%。然后将溶液加到分子排阻层析柱 (Superose12, Pharmacia) 上, 用 50mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH7.0 缓冲液洗脱。收集峰并用 SDS-PAGE 分析其内容。

实施例 2: PEG-IFN- β 偶联物的生物学活性

30 为了评价 PEG 化对人重组 IFN- β 抗病毒活性的作用, 将人 WISH 羊膜细胞和新制备 IFN- β (用于 PEG 化的同一批) 或 PEG-IFN- β 偶联物一起预培养。

根据基于 Novick 等, 免疫学杂志, 129: 2244-2247 (1982) 的方案开发的抗病毒 WISH 生物试验, 如同用 WISH-VSV 细胞病变试验测试的那样来测定 IFN- β 介导的抗病毒活性。该 WISH 试验中使用的材料如下:

WISH 细胞 (ATCC CCL 25)

- 5 水泡性口角炎病毒原种 (ATCC V-520-001-522), 贮藏在 -70°C
IFN- β , 人重组, InterPharm Laboratories LTD(32,075-种, Batch# 205035), $82 \times 10^6 \text{IU/ml}$, 比活性: $222 \times 10^6 \text{IU/mg}$

如实施例 1 制备的 PEG-IFN- β 偶联物, 保存在 PBS, pH7.4

- WISH 生长培养基 (MEM 高葡萄糖和 Earls 盐 + 10% FBS + 1.0% L-谷氨酰胺 + 青霉素/链霉素 (100U/ml, 100 微克/ml))
- 10

WISH 试验培养基 (MEM 高葡萄糖和 Earls 盐 + 5% FBS + 1.0% L-谷氨酰胺 + 青霉素/链霉素 (100U/ml, 100 微克/ml))

PBS 中的 5mg/ml MTT, 储藏在 -70°C 。

WISH 试验的方案如下:

- 15 将 IFN- β 样品稀释到 2X WISH 试验培养基中的起始浓度。

将 3 倍稀释度的 WISH 测定培养基中的 IFN- β 样品置于平底 96 孔板中, 从而使各孔含有 50 微升稀释的 IFN- β 样品 (一些对照孔只加入了 50 微升 WISH 试验培养基)

- 用胰蛋白酶/EDTA 溶液收集对数生长期的 WISH 细胞, 用 WISH 试验培养液
- 20 洗涤, 并得到最终浓度为 0.8×10^6 细胞/ml。

将 50 微升 WISH 细胞悬液 (4×10^4 细胞/孔) 加到各孔中。接触细胞的 IFN- β 最终浓度是 1X。

- 在 5% CO_2 加湿培养箱中培养 24 小时后, 将 50 微升 1: 10 稀释 (于 WISH 试验培养液) 的 VSV 原种 (预定在 48 小时中裂解 100% WISH 细胞的剂量) 加
- 25 到除了无病毒对照孔 (这些只加入等体积的试验培养液) 之外的所有孔中。

经过另外 48 小时后, 将 25 微升 MTT 溶液加到所有的孔中, 然后将板在培养箱中再培养 2 小时。

通过倒置板除去孔的内容物, 将 200 微升 100% 乙醇加到孔中。

- 1 小时后, 用 Soft max Pro 软件包和 Spectramax 分光光度计系统
- 30 (Molecular Devices) 在 595nm 处对板读数。

表 1. PEG 化和模拟-PEG 化 IFN- β 样品的抗病毒活性

IFN- β 样品 *	EC ₅₀ **
PEG-IFN- β 偶联物	3.9+/-0.7pg/ml
IFN- β	16.4+/-1.0pg/ml

*用氨基酸分析测定的样品中 IFN- β 的原种浓度

**用软件程序 Microcal Origin 4.1 测定的 EC₅₀(+/-S.D.)

如上文图 6 和表 1 所示, PEG-IFN- β 偶联物维持了高于新制备的 IFN- β 母本批的抗病毒活性水平。

- 5 观察到 PEG-IFN- β 偶联物具有比新制备 IFN- β 大约高 4 倍的生物活性, 这也可能是与“天然”IFN- β 比较, 在加入 WISH 细胞试验培养基后 PEG-IFN- β 偶联物稳定性较高的结果。

实施例 3: PEG-IFN 样品相对活性的体外试验

- 10 用实施例 2(表 2)中所述的标准方案通过 WISH 试验测定了 PEG[30kD]-IFN- β 和 PEG[2X20kD]-IFN- β 的相对生物活性。通过三个不同的人在不同时间进行了三次独立试验。

表 2. PEG-IFN- β 的相对抗病毒活性

样品	相对干扰素活性*(来自三次研究)			
	试验 1	试验 2	试验 3	平均(S.D.)
PEG[30kD]-IFN- β	3.2X 更高	3.1X 更高	1.8X 更高	3.0X(0.78)更高
PEG[2x20kD]-IFN- β	4.2X 更高	1.3X 更高	0.85X 更高	2.1X(1.8)更高

- 15 *EC₅₀ 剂量和各试验中包含的标准 IFN- β 进行比较

**比较基于 330 微克/ml IFN- β 浓度。用 AAA 测定 PEG[30kD]-IFN- β (5.41 微克/ml) 和 PEG[2x20kD]-IFN- β (6.86 微克/ml) 的原种浓度。

- 20 在固定量 ¹²⁵I-IFN- α 2a 的存在下评估了 PEG-IFN- β 和细胞上其受体的结合。用氯胺 T 方法使用 ¹²⁵I 放射性标记 IFN- α 2a。使反应物通过 Sephadex G25 柱并合并含有组分的蛋白(Pharmacia)来从 ¹²⁵I 结合的 IFN α 2a 中除去自由碘。用 IFN- α 2a ELISA 试验(Biosource, USA)定量 ¹²⁵I-IFN- α 2a 并测定比活性。收集对数期的 Daudi 细胞, 在不同浓度的稀释于含有 2% 胎牛血清和 0.1% 叠氮化钠的 RPMI 1640 测定缓冲液中的 PEG-IFN- β 或 IFN- α 2a 存在下, 将 2x10⁶

细胞和 0.5nM ¹²⁵I-IFN- α 2a 在室温下培养 3 小时。在培养终点，将细胞离心通过一层邻苯二甲酸盐油，并用 γ 计数器来对细胞结合放射性进行计数。另外，PEG[30kD]-IFN- β 和 PEG[2x20kD]-IFN- β 和受体的结合与如图 7 所示的结合活性非常相似或接近。

- 5
- 另外，在 Daudi 细胞（人 B 细胞淋巴瘤）抗增殖试验中测定了相对活性（表 3）。以 200ng/ml 的 2X 浓度制备了所有 IFN。将样品延着板长度 3 倍稀释到最终体积为 100 微升。将 1x10⁵ 细胞/孔(100 微升)加到各孔中，并在 CO₂ 加湿培养箱中 37℃ 共培养 72 小时。48 小时后，以 20 微升中 1 μ Ci/孔加入含氚（³H）胸苷。在 72 小时培养的终点，用 Tomtek Plate Harvester 收集板。
- 10
- 显示于表 3 的结果表明从 PEG 化未观察到可检测的 IFN 损失。实际上，发现活性比自由 IFN- β 稍微高一些。这可能是由于自由 IFN 中无活性聚集物的形成或由于定量方法之间的差异（对于 PEG-IFN 样品的氨基酸分析和对于 IFN- β 的 RP-HPLC）。

15

表 3. Daudi 抗增殖试验

	IC ₅₀ 剂量*	对于 IFN 增加的倍数
IFN- β （板 1）	1153. 1	-
PEG[30kD]-IFN(71A)	695. 6	1. 6X
IFN- β （板 2）	1005. 8	-
PEG[40kD]-IFN(71B)	629. 4	1. 7X

* pg/ml

实施例 4：小鼠静脉施药的药动力学研究

- 20
- 用 100 纳克 IFN- β ， PEG[30kD]-IFN- β 或 PEG[2X20kD]-IFN- β 注射小鼠，之后在指定时间采血。用 IFN- β 特异性 ELIAS（Toray Industries）测定 IFN- β 的血清浓度，结果显示于图 8。将 28 只雌性 B6D2F1 株小鼠（6-8 周）（大约各重 20 克）分成如下 4 组：组 1 含有 9 只用 200 微升 500ng/ml 人 IFN- β （最终剂量为 100ng/鼠）弹丸注射的小鼠；组 2（9 鼠）接受了 200 微升等量的 PEG30kD-IFN- β ；而组 3 接受了 200 微升等量的 PEG（2 x 20kD）-IFN- β ；
- 25
- 而组 4 是 3 只作为阴性对照的未注射小鼠组。于 9 个指定时间通过用毛细管眼眶静脉丛来收集血样（大约 200 微升/样品）。使血样在室温下凝结 1 小时，

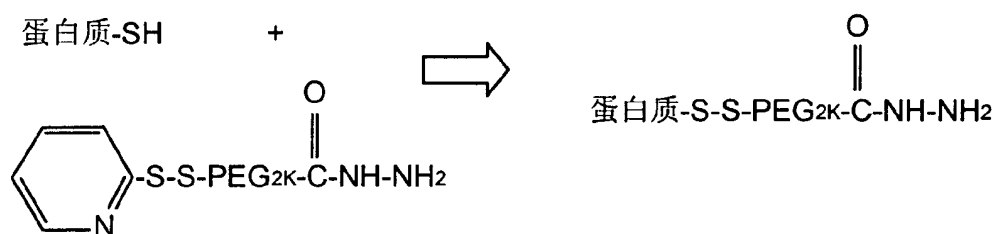
并微量离心。将血清储藏在 -70°C 直到收集所有血清。用 Toray 试验测定血清中生物活性的人 IFN- β 的存在。结果表明曲线下区域 (AUC) 在 PEG-IFN 样品中比自由 IFN- β 显著增加, 而 PEG[2X20kD]-IFN- β 比 PEG[30 kD]-IFN- β 更高。

皮下施药

- 5 用 IFN- β 和 PEG-IFN (100ng/鼠) 皮下注射小鼠。图 9 显示与自由 IFN- β 比较, PEG-IFN 样品总曲线下面积 (AUC) 显著增加。药物代谢动力学研究与具有较长半衰期及增加曲线下面积的 PEG-IFN 样品一致。

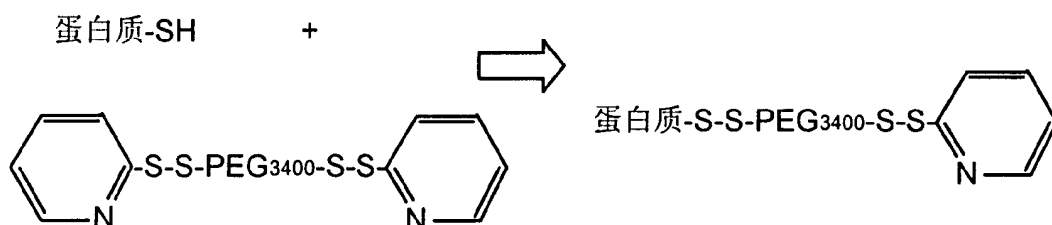
实施例 5: 低分子量 PEG 分子和多肽的结合

- 10 IFN- β 和 OPSS-PEG_{2K}-酰肼连接



- 15 重组人 IFN- β 以 0.33mg/ml 溶于 50mM 醋酸钠缓冲液, $\text{pH}3.8$ 的溶液。将大约 3.6mg (比蛋白质摩尔多 40 摩尔) 异双功能 PEG 试剂, OPSS-PEG_{2K}-酰肼 (溶于 2ml 去离子水) 加到 3 毫升 0.33mg/ml (0.99mg) 的 IFN- β 中, 使二者在聚丙烯试管中 45°C 反应 1 小时。然后用毛细管电泳分析反应混合物, 来测定修饰程度。通常产量由 IFN- β 和 PEG 试剂的纯度而定, 从 $90\text{--}97\%$ 变化。然后将溶液加到分子排阻层析柱 (Superdex 75, Pharmacia) 上, 用 5mM 磷酸钠, 150mM NaCl, $\text{pH}7.0$ 缓冲液洗脱。收集峰, 用 SDS-PAGE 分析。将单 PEG 化 IFN- β 组分合并在一起, 然后在用高分子量 PEG 进一步修饰步骤中使用。

- 20 IFN- β 和 (OPSS)₂-PEG₃₄₀₀ 连接

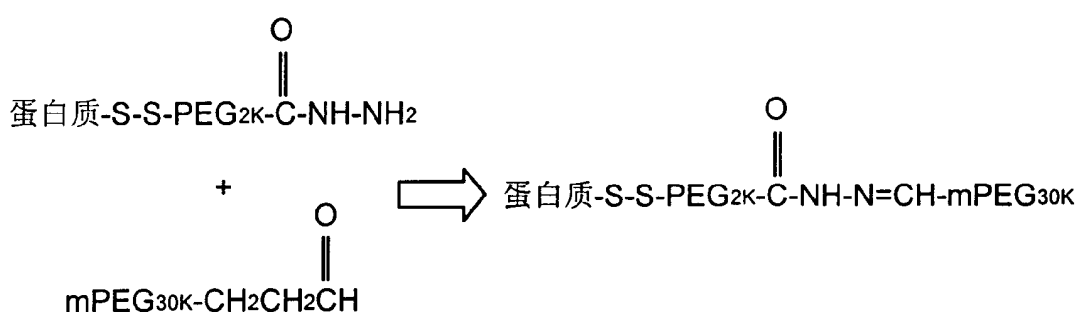


重组人 IFN- β 以 0.33mg/ml 溶于 50mM 醋酸钠缓冲液, $\text{pH}3.8$ 的溶液。将大约 6.1mg (比蛋白质摩尔多 40 摩尔) 同双功能 PEG 试剂, (OPSS)₂-PEG₃₄₀₀ (溶

于 2ml 去离子水) 加到 3 毫升 0.33mg/ml (0.99mg) 的 IFN- β 中, 使二者在聚丙烯试管中 50°C 反应 2 小时。用无降解 SDS-PAGE 监测反应, 用毛细管电泳分析最终反应混合物, 来测定修饰程度。和 IFN- β 的该反应典型修饰量大于 95%。然后将溶液加到分子排阻层析柱 (Superdex 75, Pharmacia) 上, 用 5mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH7.0 缓冲液洗脱。收集峰, 用 SDS-PAGE 分析其内容物。单 PEG 化 IFN- β 组分被合并在一起。

实施例 6: 第二个 PEG 分子和低分子量 PEG 化多肽的结合

用 mPEG_{30k}-乙醛 (ALD) 对 IFN-S-S-PEG_{2k}-酰肼的修饰



将比蛋白质多 20 摩尔的 mPEG_{30k}-ALD 加到实施例 5 中的 IFN-S-S-PEG_{2k}-酰肼合并组分中。使反应在室温（25℃）下进行 4 小时，将样品加到分子排阻层析柱（Superose 6, Pharmacia）上来测定修饰量。本反应的修饰量由 PEG 试剂和反应条件而定，通常大于 80%。

15 现在已完整描述了本发明，可以理解本领域技术人员在相当的参数、浓度和条件的广阔范围内，不违背本发明的精神和范围，不进行不适当的实验，能进行同样的（实践）。

20 由于本发明已经与其特定实施例一起被描述，可以理解的是还能进行其它修饰。本申请将要覆盖任何本发明的变体、用途、或改变，它们是根据本发明的一般原理，并包含对本公开的违背（例如将其作为本发明涉及领域的已知或通常实践，和例如应用本文上文列出的如在所附权利要求范围内的基本特征）。

本文所引用的全部参考文献，包含杂志文章或摘要、出版或未出版的美国或外国专利申请、授权的美国或外国专利、或任何其它参考文献，都通过在本文中参考被全部引入，包含全部引用文献中的数据、表格、图、和文字、另外，本文引用的参考文献也被全部引入以供参考。

已知方法步骤、常规方法步骤、已知方法或常规方法的参考在任何方面都不是承认本发明的任何方面、描述或实施例在相关领域中被公开、传授或提出。

前面对特定实施例的描述将完全揭示本发明的一般特点，因此其它人能通过使用本领域技术人员知识（包含本文引用的参考文献的内容）不进行不合适的实验，不违背本发明的一般观点，容易的修改和/或改变这些特定实施例的不同应用。因此，这些改变和修改应在公开实施例的等效例的意义和范围内，基于本文的传授和指导。也可理解，本文的措词和术语是为了描述而不是限制，因此本说明书的术语或措词可以被技术人员根据本文的传授和指导，结合本领域一般技术人员知识被解释。

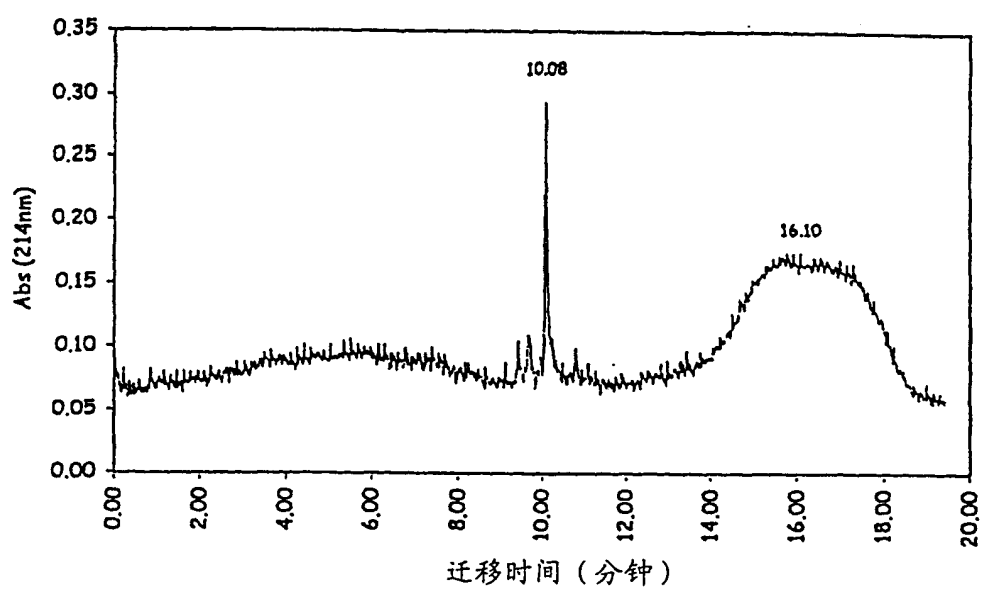


图 1

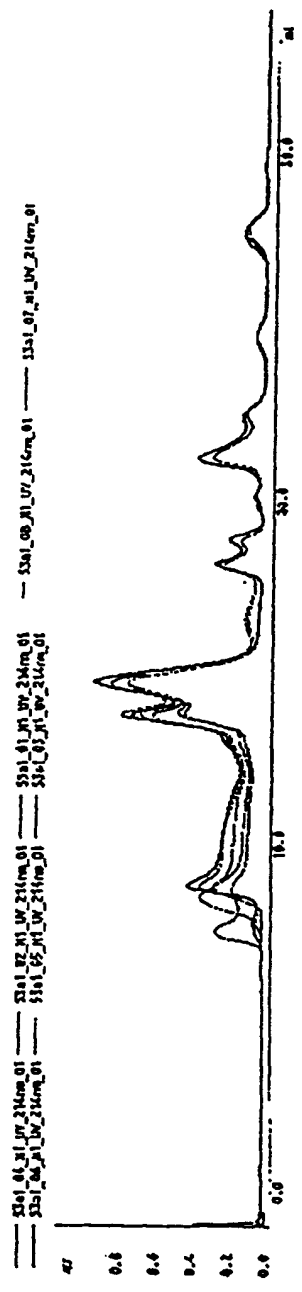


图 2A

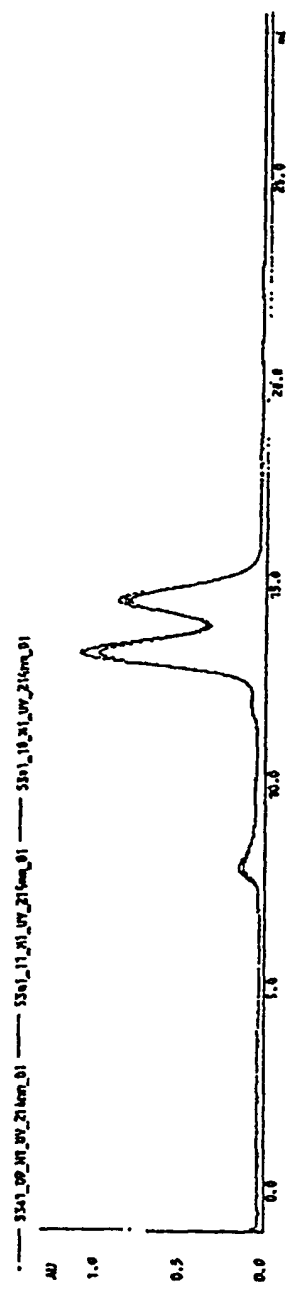


图 2B

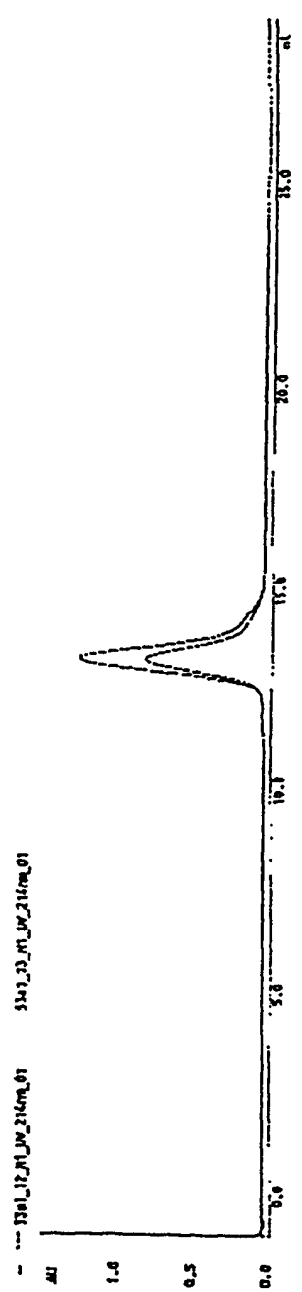


图 2C

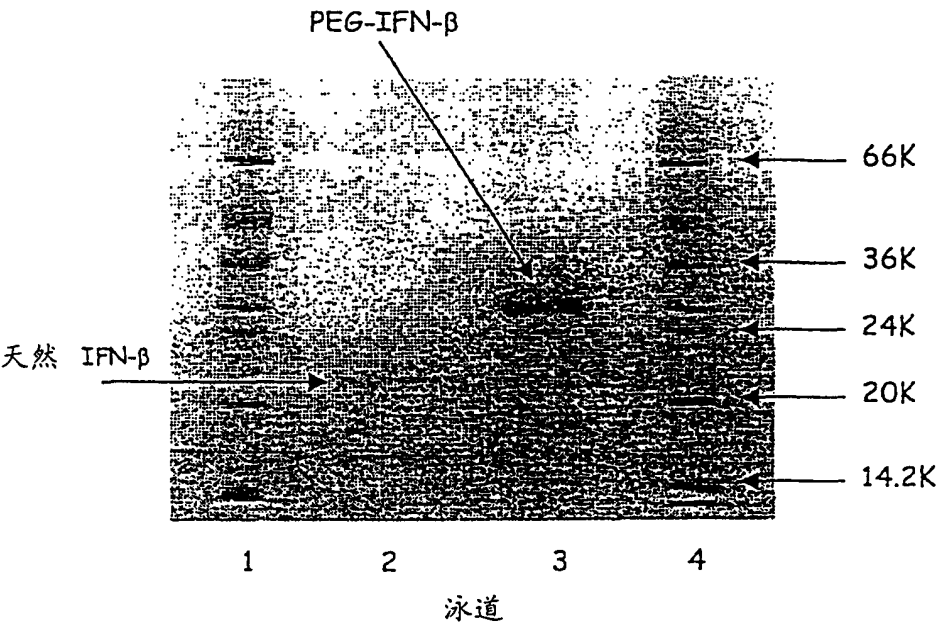


图 3

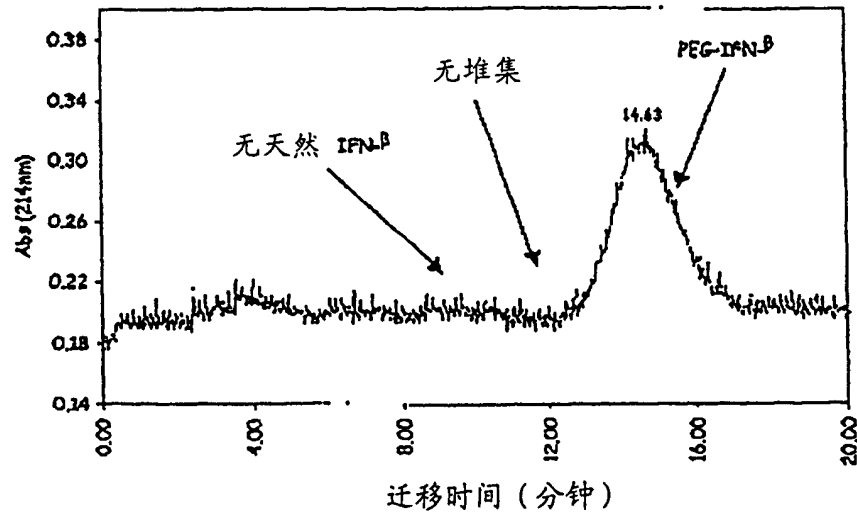
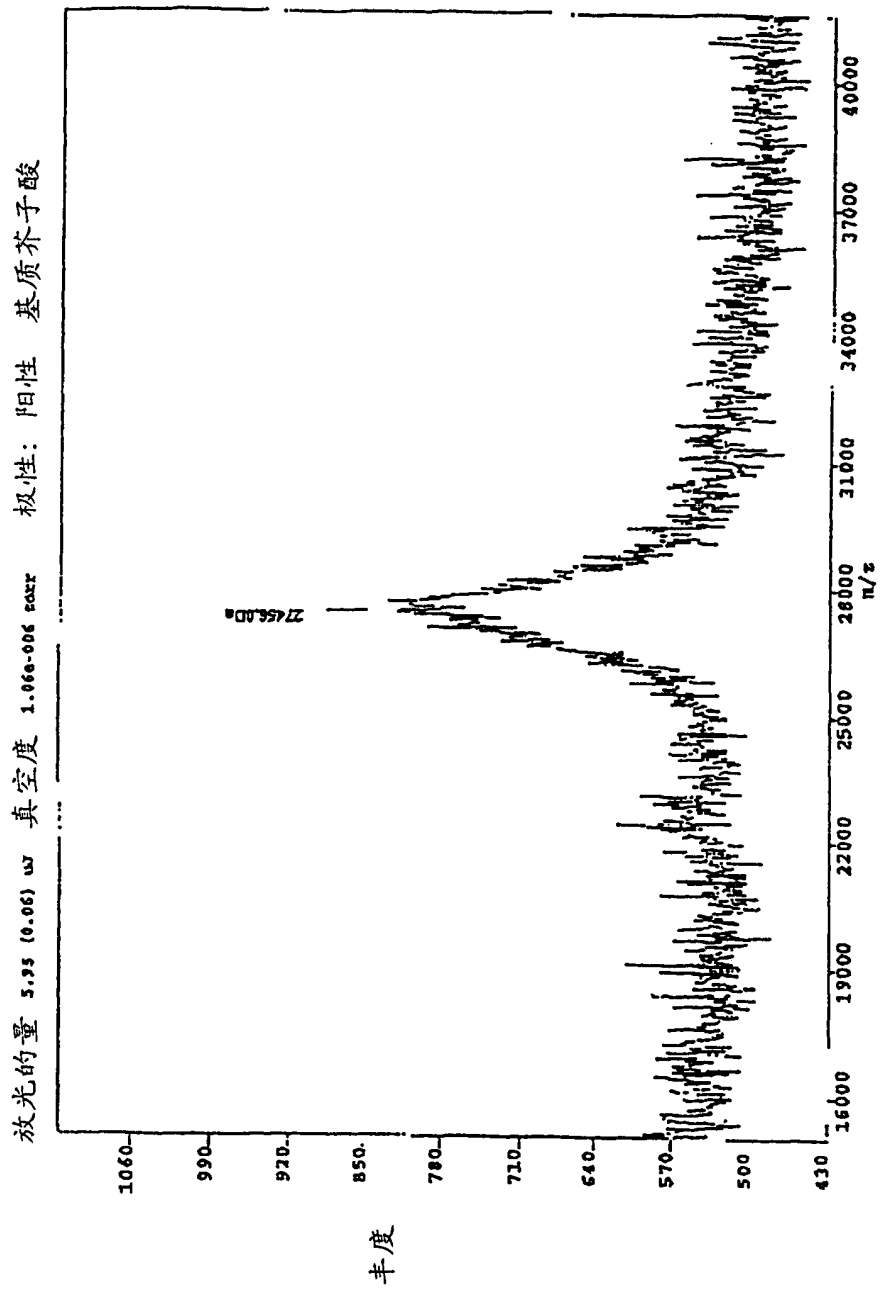


图 4



图

5

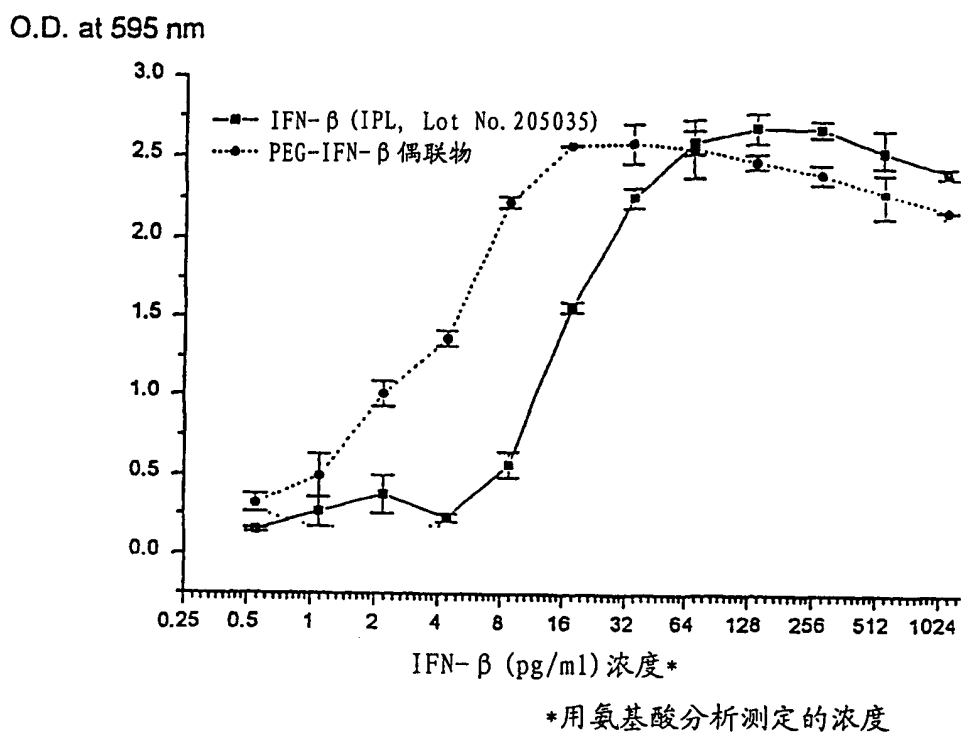


图 6

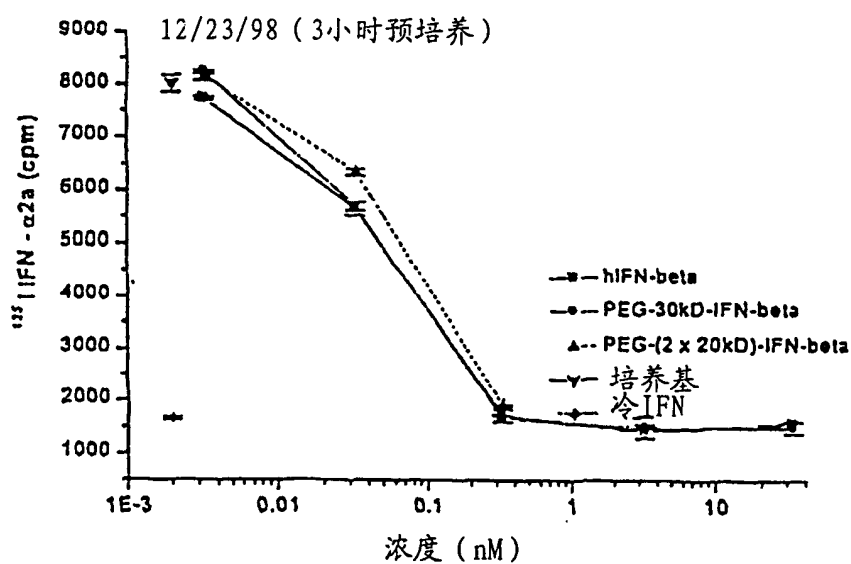


图 7

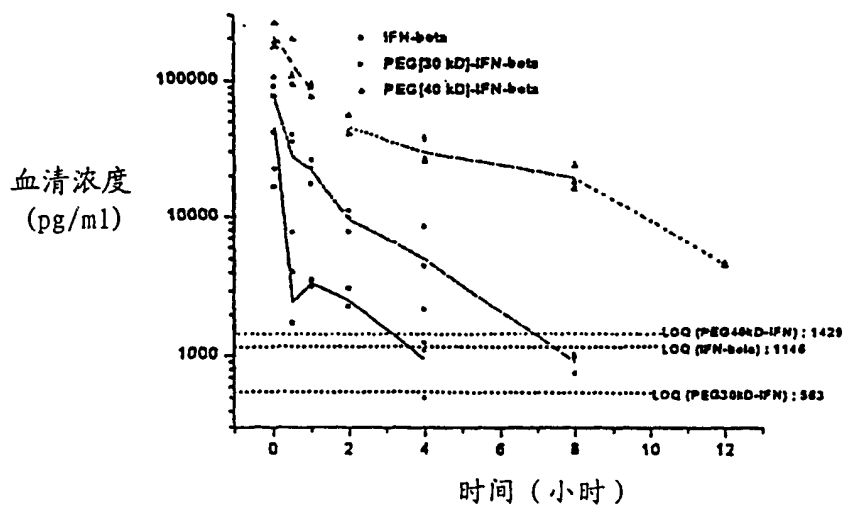


图 8

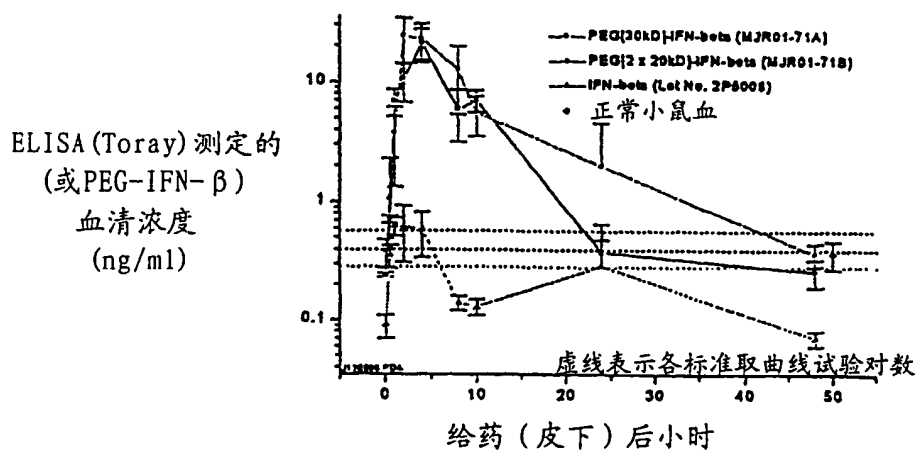


图 9