



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102724980 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 15

(21) 申请号 201080056068. 1

(22) 申请日 2010. 12. 09

(30) 优先权数据

61/285, 411 2009. 12. 10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 06. 08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/059714 2010. 12. 09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/072138 EN 2011. 06. 16

(73) 专利权人 药华医药股份有限公司

地址 中国台湾台北市南港区园区街 3 号 13 层

(72) 发明人 K-C · 林 R · 威德曼

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

(51) Int. Cl.

A61K 31/40 (2006. 01)

A61K 38/21 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

A61P 31/12 (2006. 01)

A61P 31/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1630530 A, 2005. 06. 22,

John E. Mickle et al. GENOTYPE-PHENOTYPE RELATIONSHIPS IN CYSTIC FIBROSIS. 《MEDICAL CLINICS OF NORTH AMERICA》. 2000, 第 84 卷 (第 3 期), 第 597-607 页.

Jean-Jacques Kiladjian et al. pegylated interferon-alpha-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. 《BLOOD》. 2008, 第 112 卷 (第 8 期), 第 3065-3072 页.

审查员 耿胜燕

权利要求书1页 说明书9页

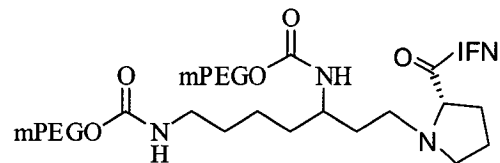
(54) 发明名称

蛋白-聚合物偶联物的治疗用途

(57) 摘要

本发明涉及采用说明书描述的蛋白-聚合物偶联物来治疗多种疾病, 包括的疾病是原发性骨髓纤维化、真性红细胞增多症和原发性血小板增多症。

1. 有效量的下式偶联物在制备治疗疾病的药物中的用途：



其中：

IFN 代表干扰素 α -2b 部分，其中 IFN 的 N 末端氨基结合至羰基；

mPEG 的分子量为 20kD；

所述疾病为原发性骨髓纤维化、真性红细胞增多症或原发性血小板增多症。

2. 如权利要求 1 所述的用途，其中所述疾病是原发性骨髓纤维化。
3. 如权利要求 1 所述的用途，其中所述疾病是真性红细胞增多症。
4. 如权利要求 1 所述的用途，其中所述疾病是原发性血小板增多症。

蛋白 - 聚合物偶联物的治疗用途

[0001] 相关申请段落的交叉引用

[0002] 本申请要求 2009 年 12 月 10 日提交的美国临时申请 No. 61/285, 411 的优先权, 其内容以引用方式全部合并于此。

背景技术

[0003] 细胞生物学和重组蛋白技术的发展导致蛋白疗法的发展。

[0004] 然而, 主要障碍仍然存在。大多数蛋白质易于发生蛋白水解的降解, 因此在循环系统中具有短的半衰期。其他不利性包括低的水溶性和诱导中和抗体。

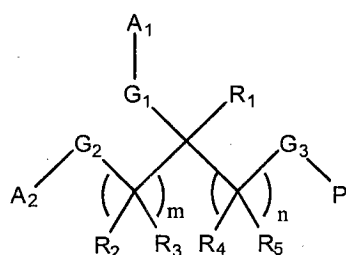
[0005] 将聚合物例如聚乙二醇 (PEG) 连接至蛋白质阻止了蛋白水解酶接近蛋白质骨架, 从而导致蛋白质稳定性提高。另外, 它也改善水溶性并使免疫原性最小化。因此需要将聚合物连接至蛋白质的有效方法。

[0006] 发明简述

[0007] 本发明的一方面涉及采用蛋白 - 聚合物偶联物来治疗多种疾病。所述偶联物包含至少一个聚合物部分、干扰素 α 部分和连接体。在所述偶联物中, 总分子量是 2-200kD (优选 40kD), 且所述偶联物中的聚合物部分的数目不大于 10。所述一个或多个聚合物部分连接至连接体; 干扰素 α 部分的 N 末端氮原子结合至连接体; 以及所述连接体是共价键、 C_{1-10} 亚烷基、 C_{2-10} 亚烯基或 C_{2-10} 亚炔基。优选地, 所述偶联物是基本上纯的, 例如, 纯度大于 70%、80% 或 90%。可由所述偶联物治疗的疾病包括多发性硬化、慢性病毒感染 (例如乙肝病毒感染、丙肝病毒感染和人乳头状瘤病毒感染)、癌症、原发性骨髓纤维化、真性红细胞增多症和原发性血小板增多症。

[0008] 本发明的另一方面涉及采用如下所示的式 I 的蛋白 - 聚合物偶联物来治疗上述疾病:

[0009]



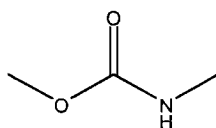
式 I

[0010] 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 各自独立为 H、 C_{1-5} 烷基、 C_{2-5} 烯基、 C_{2-5} 炔基、芳基、杂芳基、 C_{3-8} 环烷基或 C_{3-8} 杂环烷基; A_1 和 A_2 各自独立为聚合物部分; G_1 、 G_2 和 G_3 各自独立为键或连接官能团; P 是干扰素 α 部分; m 是 0 或 1-10 的整数; 且 n 是 1-10 的整数。

[0011] 关于上式, 所述蛋白 - 聚合物偶联物可以具有一个或多个以下特征: G_3 是键且 P 是干扰素 α 部分, 其中 N 末端的氨基连接至 G_3 ; A_1 和 A_2 是分子量为 2-100kD (优选 10-30kD)

的聚环氧烷 (polyalkylene oxide) 部分, G_1 和 G_2 各自为

[0012]



[0013] (其中 O 连接至 A_1 或 A_2 , 且 NH 连接至如式 I 所示的碳原子), 或 G_1 和 G_2 各自为尿素、磺酰胺或酰胺, (其中 N 连接至如式 I 所示的碳原子); m 是 4, N 是 2, 且 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 各自为 H; 且 P 是含有 1-4 个额外的氨基酸残基的修饰的干扰素 α 部分。

[0014] 术语“烷基”是指一价直链或支链烃基。烷基的实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、叔丁基和正戊基。类似地, 术语“烯基”或“炔基”是指包含一个或多个 $C=C$ 双键或一个或多个 $C\equiv C$ 三键的一价直链或支链烃基。

[0015] 术语“亚烷基”是指二价直链或支链烃基。类似地, 术语“亚烯基”或“亚炔基”是指包含一个或多个 $C=C$ 双键或一个或多个 $C\equiv C$ 三键的二价直链或支链烃基。

[0016] 术语“芳基”是指具有至少一个芳环的烃环系统 (单环或二环)。芳基部分的实例包括但不限于苯基、萘基和茚基。

[0017] 术语“杂芳基”是指具有至少一个芳环的烃环系统 (单环或二环), 所述芳环包含至少一个杂原子如 O、N 或 S 作为环系统的一部分, 其余为碳。杂芳基部分的实例包括但不限于呋喃基、吡咯基、噻吩基、噁唑基、咪唑基、噻唑基、吡啶基、嘧啶基、喹啉基和吲哚基。

[0018] 术语“环烷基”是指仅具有碳环原子的部分或完全饱和的单环或二环的环状系统。实例包括但不限于环丙烷基、环戊烷基和环己烷基。

[0019] 术语“杂环烷基”是指除碳之外还具有一个或多个杂原子 (例如 O、N 或 S) 作为环原子的部分或完全饱和的单环或二环的环状系统。实例包括但不限于哌啶、哌嗪、吗啉、硫代吗啉和 1,4-氧杂氮杂环庚烷。

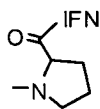
[0020] 此处提及的烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、环烷基和杂环烷基包括取代和未取代部分两者。取代基的实例包括 C_1 - C_{10} 烷基、 C_2 - C_{10} 烯基、 C_2 - C_{10} 炔基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_5 - C_8 环烯基、 C_1 - C_{10} 烷氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳氧基、氨基、 C_1 - C_{10} 烷基氨基、 C_1 - C_{20} 二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基、羟基氨基、烷氧基氨基、 C_1 - C_{10} 烷基磺酰胺、芳基磺酰胺、羟基、卤素、硫代、 C_1 - C_{10} 烷硫基、芳硫基、氰基、硝基、酰基、酰氧基、羧基和羧酸酯。

[0021] 术语“聚环氧烷部分”是指衍生自直链、支链或星型聚环氧烷的单价基团。聚环氧烷部分的分子量可以是 2-100kD。聚环氧烷部分是饱和或不饱和的。聚环氧烷部分的实例包括但不限于聚环氧乙烷、聚乙二醇、聚环氧异丙烷、聚环氧丁烷, 及其共聚物。其他聚合物例如右旋糖酐、聚乙烯醇、聚丙烯酰胺或基于碳水化合物的聚合物也可用于代替聚环氧烷部分, 只要它们不是抗原性、毒性的或不引起免疫反应。聚环氧烷部分是取代或未取代的。例如, 它可以是甲氧基-封端的聚乙二醇 (mPEG)。

[0022] 术语“干扰素 α 部分”是指衍生自干扰素 α 的单价基团。“干扰素 α ”是指抑制病毒复制和细胞增殖并调节免疫应答的高度同源种类-特异性蛋白质家族。参见 Bonnem 等人, J. Biol. Response Mod., 1984, 3(6):580-598; 和 Finter, J. Hepatol., 1986, 3Suppl 2:S 157-160。它可以是天然存在形式或修饰形式。修饰的干扰素 α 例如可以是包含干扰素 α 和在所述干扰素的 N 末端具有 1-4 个额外的氨基酸残基的蛋白质。这种修饰的干扰

素 α 的一个实例是

[0023]



[0024] IFN 代表干扰素 α -2b 部分,其 N 末端氨基结合至羰基。

[0025] 许多类型的干扰素 α 蛋白质是可商购的,包括 Schering Corporation, Kenilworth, N.J. 提供的 Intron-A 干扰素、Hoffmann-La Roche, Nutley, N.J. 提供的 Roferon 干扰素、Boehringer Ingelheim Pharmaceutical, Inc., Ridgefield, Conn. 提供的 Berofer α 2 干扰素、Sumitomo, Japan 提供的 Sumiferon 和 Glaxo-Wellcome Ltd., London, Great Britain 提供的 Wellferon 干扰素 α -n1 (INS)。

[0026] 以下所列是前体形式或成熟形式的五种典型的人干扰素 α 蛋白质的氨基酸序列:

[0027] maltfallva llvlsckssc svgcdlpqth slgsrrtlml laqmrrislf
sclkdrrhdfgfpqeefgnqf qkaetipvlh emiqqifnlf stkdssaawd etlldkfyte
lyqqldleacviqgvgtetp tlmkedsil avrkfqrilt lylkekkysp cawevvraei mrsfslstnl
geslrskeSEQ ID NO. :1

[0028] (参见 Krasagakis 等人, Cancer Invest. 26(6), 562-568, 2008)cdlpqthslg
srtrlml laq mrkislfscl kdrhdfgfpq eefgnqfqka etipvlhemiqqifnlfstk dssaawdetl
ldkfyte lyq qlndleacvi qgvgtetp lmkedsilavr kyfqriltlylkekkyspcaw evvraeimrs
fslstnlqes lrske SEQ ID NO. :2

[0029] (参见 Klaus 等人, J. Mol. Biol. 274(4), 661-675, 1997)

[0030] mcdlpqthsl gsrrtlml la qmrrislfsc lkdrhdfgfp qeefgnqfqk
aetipvlhemiqqifnlfstk dssaawdet lldkfyte lyq qlndleacvi iqgvgtetp lmkedsilav
rkyfqriltlylkekkyspca wevvraeimr sfsfslstnlqe slrske SEQ ID NO. :3

[0031] (参见 GenBank 登录号 AAP20099, 2003 年 4 月 30 日版)

[0032] mallfp llaa lvmtsyspvg slgcdlpqnh gllsrntllvl lhqmrrisfp
lclkdrrdfrfpqemvkgsq lqkahvmsvl hemlqqifsl fhterssaaw nmtlldqlht
elhqqqlqhletcllqvvg eg esagaisspa ltlrryf qgi rvy lkekkys dcawevvrme
imkslflstnmqerlrskdr dlgs SEQ ID NO. :4

[0033] (参见 Capon 等人, J. Mol. Cell. Biol. 5(4) :768-779, 1985)

[0034] lsyksic slg cdlpqthslg nrralillaq mgrispsfsc lkdrhdfglpq
eefdgngfqktqaisvlhem iqqtfnlfstk edssaaweqs llekfstely qqlnnleacv
iqevgmeetplmned silav rkyfqriltly ltekkyspca wevvraeimr slsfstnlqk rlrkd SEQ ID
NO. :5

[0035] (参见 Lund 等人, J. Interferon Res. 5(2), 229-238, 1985)

[0036] 在一个实施方式中,用于制备本发明偶联物的干扰素 α 蛋白质的氨基酸序列与上列氨基酸序列之一、或与对应于成熟干扰素 α 的其片断具有至少 80% (例如, 85%、90%、95% 或 99%) 的一致性。

[0037] 两种氨基酸序列的“一致性百分比”采用 Karlin 和 Altschul Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 87 :2264-68, 1990、在 Karlin 和 Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :5873-77, 1993 中修改的算法测定。这种算法合并入 Altschul 等人, J. Mol. Biol. 215 :403-10, 1990 的 NBLAST 和 XBLAST 程序 (2.0 版) 中。BLAST 蛋白搜索可采用 XBLAST 程序、分数 = 50、字长 = 3 来进行, 从而获得与本发明蛋白质分子同源的氨基酸序列。当两种序列之间存在间隙, 可如 Altschul 等人, Nucleic Acids Res. 25 (17) :3389-3402, 1997 所描写使用间隙 BLAST。当采用 BLAST 和间隙 BLAST 程序时, 可使用各个程序 (例如, XBLAST 和 NBLAST) 的缺省参数。

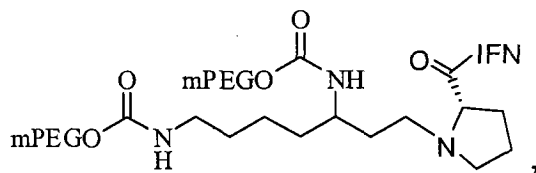
[0038] 术语“连接官能团”是指二价官能团, 一端连接到聚合物部分且另一端连接到蛋白部分。实例包括但不限于, -O-、-S-、羧酸酯、羰基、碳酸酯、酰胺、氨基甲酸酯、尿素、磺酰基、亚磺酰基、氨基、亚氨基、羟基氨基、膦酸酯或磷酸基。

[0039] 上述蛋白-聚合物偶联物可以是游离形式或盐形式 (如果需要的话)。例如, 盐可以通过本发明蛋白-聚合物偶联物上的阴离子和带正电荷的基团 (例如氨基) 之间形成。适当的阴离子包括氯化物、溴化物、碘化物、硫酸盐、硝酸盐、磷酸盐、柠檬酸盐、甲磺酸盐、三氟醋酸盐和醋酸盐。类似地, 盐也可以通过本发明蛋白-聚合物偶联物上的阳离子和带负电荷的基团 (例如羧酸盐) 之间形成。适当的阳离子包括钠离子、钾离子、镁离子、钙离子、和铵阳离子, 例如四甲铵离子。

[0040] 此外, 所述蛋白-聚合物偶联物可具有一个或多个双键或一个或多个不对称中心。这种偶联物可作为外消旋物、外消旋混合物、单一对映体、单一非对映体、非对映混合物和正-或反-或 E-或 Z-双键异构形式存在。

[0041] 本发明蛋白-聚合物偶联物的一个实例显示如下:

[0042]



[0043] 其中 mPEG 的分子量为 20kD 且 IFN 是干扰素 α -2b 部分。

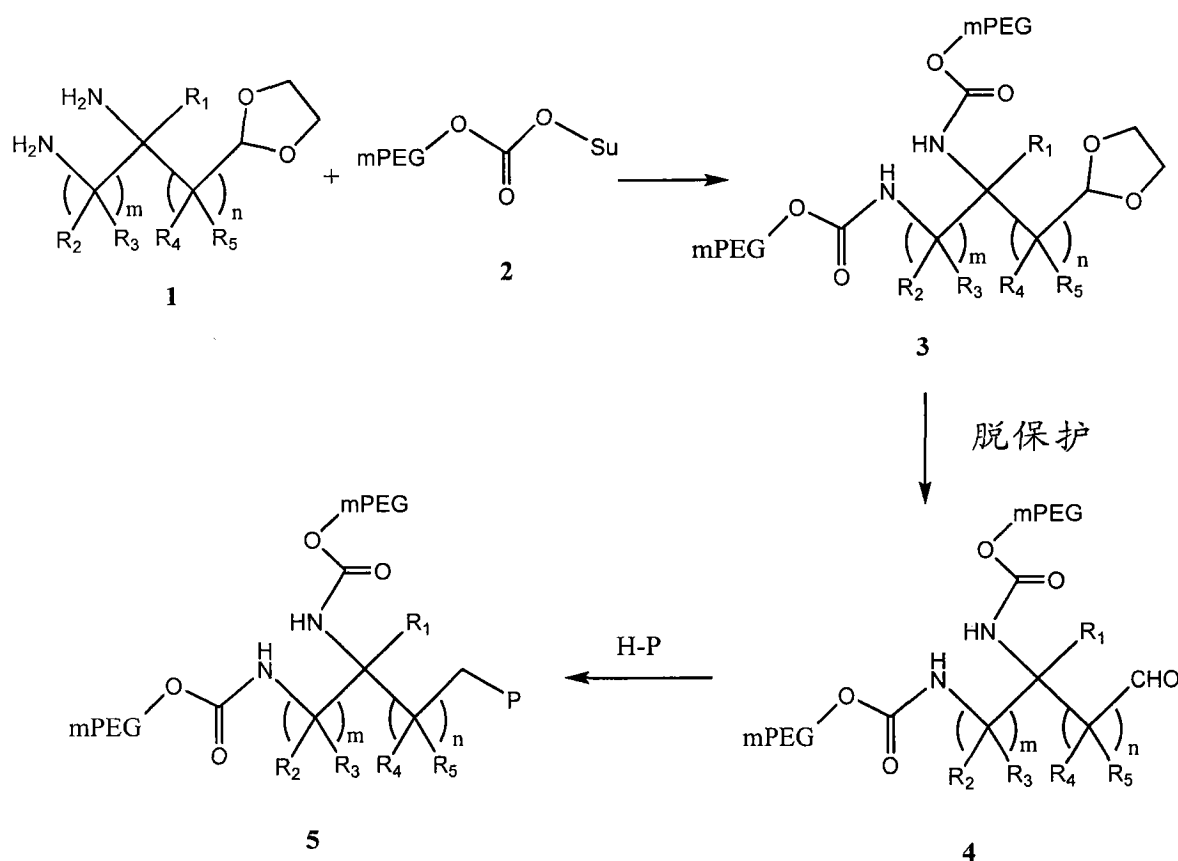
[0044] 所述偶联物在制备治疗上述疾病之一的药剂中的用途也在本发明范围内。

[0045] 本发明一个或多个实施方式的细节将在以下说明书中阐明。本发明的其他特征、目的和优点将从说明书和权利要求书中变得明显。

[0046] 发明详述

[0047] 用于实施本发明的蛋白-聚合物偶联物可以通过化学领域熟知的合成方法, 例如美国序列号 12/192, 485 中描述的方法来制备。方案 1 显示制备本发明蛋白-聚合物偶联物的实例。含有乙缩醛基的二胺化合物 1 与 N-羟基琥珀酰亚胺基碳酸酯 mPEG (即化合物 2) 反应形成二-PEG 化合物 3, 其随后转化为醛 4。所述醛化合物与具有游离氨基的蛋白质经由还原性烷基化反应生成本发明蛋白-聚合物偶联物。

[0048]



[0049] 方案 1

[0050] 由此合成的蛋白-聚合物偶联物可通过例如离子交换色谱法、凝胶过滤色谱法、电泳、透析、超滤或超离心法进一步纯化。

[0051] 上述的化学反应包括使用溶剂、试剂、催化剂、保护基和脱保护基试剂，以及某种反应条件。它们还可以在此处具体描述的步骤之前或之后包括添加或去除适当的保护基的步骤，从而最终合成蛋白-聚合物偶联物。此外，多个合成步骤可以交替的顺序或次序进行，从而形成所需蛋白-聚合物偶联物。用于合成适当的蛋白-聚合物偶联物的合成化学转化和保护基方法（保护和脱保护）是本领域已知的，例如包括在 R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989) ; T. W. Greene 和 P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第二版, John Wiley 和 Sons (1991) ; L. Fieser 和 M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley 和 Sons (1994) ; 以及 L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley 和 Sons (1995) 及其后续版本中描述的那些。

[0052] 本发明偶联物可具有非常高的纯度。即，60%或以上（例如，70%、80%或90%）的偶联物分子在所有方面是相同的，包括蛋白部分的序列及其与聚合物部分的结合位置。

[0053] 本发明偶联物的偶联形式可以是药学活性的。或者，它可以通过酶性裂解蛋白部分和聚合物部分之间的键合而在体内释放药学活性的干扰素 α （例如，通过水解）。涉及体内裂解键合的酶的实例包括氧化酶（例如，过氧化酶、胺氧化酶或脱氢酶）、还原酶（例如，酮还原酶）和水解酶（例如，蛋白酶、酯酶、硫酸酯酶或磷酸酶）。

[0054] 本发明偶联物可用于治疗多发性硬化、慢性病毒感染（例如乙肝病毒感染、丙肝病毒感染和人乳头状瘤病毒感染）、癌症、原发性骨髓纤维化、真性红细胞增多症和原发性

血小板增多症。其具有意想不到地长的体内半衰期、降低的药物剂量和 / 或延长的给药间隔。

[0055] 如本发明所使用,术语“治疗 (treating)”或“治疗 (treatment)”定义为将包含蛋白-聚合物偶联物的组合物施用或给药于受试者(人或动物),所述受试者具有疾病、疾病症状、所述疾病继发的疾病或疾患、或患病倾向,目的是治愈、缓解、减轻、补救或改善所述疾病、疾病症状、所述疾病继发的疾病或疾患、或患病倾向。“有效量”是指赋予被治疗受试者治疗效果的蛋白-聚合物偶联物的量。所述治疗效果可以是客观的(即,通过一些试验或标志物测定)或主观的(即,受试者出现效果指征或感觉到效果)。

[0056] 包含有效量的至少一种上述的蛋白-聚合物偶联物和药学可接受的载体的药物组合物也在本发明范围内。此外,本发明包括将有效量的一种或多种的蛋白-聚合物偶联物给予患有的一种或多种疾病的患者的方法。如本领域技术人员所了解,有效剂量将例如取决于蛋白-聚合物偶联物的水解速度、待治疗疾病类型、给药途径、赋形剂使用和与其他治疗法的共同使用的可能性而改变。

[0057] 为实施本发明方法,含有一种或多种上述化合物的组合物可以胃肠外、口服、经鼻、直肠、局部、或经颊给予。此处使用的术语“胃肠外”是指经皮下、皮内、静脉内、肌内、关节内、动脉内、滑膜内、胸骨内、鞘内、损害内、腹内、气管内或颅内注射,以及任何适当的滴注技术。

[0058] 无菌可注射组合物可以是非毒性的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂(例如 1,3-丁二醇溶液)中的溶液或悬浮液。可使用的可接受的介质和溶剂是甘露醇、水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。此外,不挥发油通常用作溶剂或悬浮介质(例如,合成的单甘油酯或甘油二酯)。脂肪酸(例如油酸)及其甘油酯衍生物可用于制备注射制剂,如天然药学上可接受的油,例如橄榄油或蓖麻油,特别是其聚氧乙烯化形式。这些油溶液或悬浮液也可包含长链醇稀释剂或分散剂,或羧甲基纤维素或类似分散剂。通常用于制备药学可接受的固体、液体或其他剂型的其他的常用表面活性剂例如吐温和司盘或其他类似的乳化剂或生物利用率增强剂也可用于制剂目的。

[0059] 用于口服给药的组合物可以是任何口服可接受的剂型,包括胶囊、片剂、乳剂和水悬浮液、分散体和溶液。在片剂情况下,常用的载体包括乳糖和玉米淀粉。通常也添加润滑剂,例如硬脂酸镁。对于以胶囊形式口服给药,有用的稀释剂包括乳糖和干玉米淀粉。当口服给予水悬浮液或乳剂时,活性成分可以悬浮或溶解在添加有乳化剂或悬浮剂的油相中。如果需要,可添加某些甜味剂、矫味剂或着色剂。

[0060] 鼻气雾剂或吸入组合物可根据药物制剂领域熟知的技术来制备。例如,这种组合物可制成盐溶液,采用苯甲醇或其他适当的防腐剂、提高生物利用率的吸收促进剂、碳氟化合物和 / 或本领域已知的其他增溶剂或分散剂。含有一种或多种上述的化合物的组合物也可以以栓剂形式给予,用于直肠给药。

[0061] 药学可接受的载体通常和一种或多种上述活性化合物一起使用。药物组合物中的载体必须是“可接受的”,意思是它与所述组合物的活性成分相容(且优选地,能够稳定所述活性成分)且对待治疗受试者无害。其他载体的实例包括胶体二氧化硅、硬脂酸镁、纤维素、十二烷基硫酸钠和 D&C Yellow#10。

[0062] 适当的试验可用于初步评价上述偶联物在治疗多种疾病中的功效。例如,可以

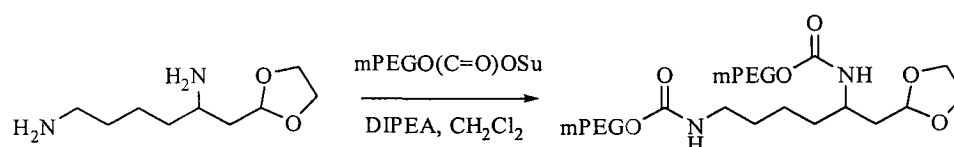
分别根据 Kiladjian 等人, Blood 2008 ;112(8) :3065-72 和 Langer 等人, Haematologica 2005 ;90 :1333-1338 描述的方法评价所述偶联物在治疗真性红细胞增多症和原发性血小板增多症中的效果。

[0063] 以下实施例仅作为说明性解释,而不以任何方式限定本发明的其余部分。无需进一步细节,据信本领域技术人员可以基于本说明书而充分利用本发明。本发明引用的所有出版物以引用方式全部合并于此。

具体实施方式

[0064] 二-PEG 醛的制备

[0065]



[0066] 20kD PEGO(C = O)OSu 由从 (SunBio Inc., CA, USA) 购买的 20kDmPEGOH 根据 Bioconjugate Chem. 1993,4,568-569 描述的方法制备。

[0067] 将 6-(1,3-二氧戊环-2-基)己烷-1,5-二胺的二氯甲烷(含有 9.03mg 二胺的 11.97g 溶液,47.8 μ mol)溶液添加到含有 20kD PEGO(C = O)OSu (1.72g,86.0 μ mol) 的烧瓶中。PEGO(C = O)OSu 完全溶解后,添加 N,N'-二异丙基乙胺(79 μ L,478 μ mol)。反应混合物在室温下搅拌 24 小时,然后在搅拌下滴加甲基叔丁基醚(200mL)。收集所得沉淀并在真空下干燥,生成白色固体状二-PEG 缩醛(1.69g,98%)。

[0068] ^1H NMR(400MHz, d_6 -DMSO) δ 7.16(t, J = 5.2Hz,1H),7.06(d, J = 8.8Hz,1H),4.76(t, J = 4.8Hz,1H),4.10-3.95(m,4H),1.80-1.65(m,1H),1.65-1.50(m,1H),1.48-1.10(m,6H)。

[0069]

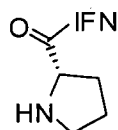


[0070] 将二-PEG 缩醛(4.0g,0.2mmol)悬浮在 pH 2.0 的缓冲液(柠檬酸,40mL)中。反应混合物在 35°C 下搅拌 24 小时,然后以二氯甲烷(3x50mL)萃取。合并的有机层以硫酸镁干燥、浓缩、然后再溶解在二氯甲烷(20mL)中。搅拌下将该溶液滴加至甲基叔丁基醚(400mL)中。收集所得沉淀并减压干燥,生成白色固体状二-PEG 醛(3.8g,95%)。

[0071] ^1H NMR(400MHz, d_6 -DMSO) δ 9.60(s,1H),7.24(d, J = 8.4Hz,1H),7.16(t, J = 5.2Hz,1H),4.10-3.95(m,4H),3.95-3.80(m,1H),3.00-2.85(m,2H),2.58-2.36(m,2H),1.46-1.15(m,6H)。

[0072] 修饰干扰素的制备

[0073]



[0074] 修饰的重组人干扰素 α -2b 通过 PCR 法采用人基因组 DNA 作为模板克隆。寡核苷酸基于人干扰素 α -2b 的侧翼序列 (GenBank 登录 #J00207, 2008 年 1 月 8 日) 合成。衍生的 PCR 产物亚克隆入 pGEM-T 载体 (Promega) 中。IFN 变种通过 pGEM-T 克隆再次 PCR 扩增, 随后采用 NdeI/BamHI 作为克隆位点亚克隆入蛋白表达载体 pET-24a (Novagen) (一种 T7RNA 聚合酶启动子驱动载体) 中。然后将载体 pET-24a 转化到大肠杆菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene) 菌株。在卡那霉素 ($50 \mu\text{g/mL}$) 和氯霉素 ($50 \mu\text{g/mL}$) 存在下通过维持转化的大肠杆菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL 来选择高表达克隆。

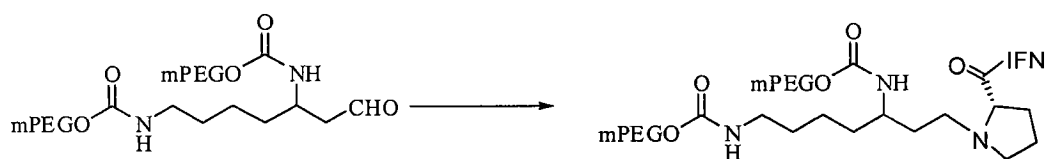
[0075] 在 1000mL 烧瓶中采用 Terrific 培养基 (BD, 200mL) 来繁殖带有 Pro-IFN 基因的 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL。烧瓶在 37°C 下以 230rpm 振摇 16 小时。在 5 升发酵罐 (Bioflo 3000; New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ) 中进行分批发酵和分批补料发酵。分批发酵使用 150mL 预培养过夜的接种物和含有卡那霉素 ($50 \mu\text{g/mL}$)、氯霉素 ($50\mu\text{g/mL}$)、0.4% 甘油和 0.5% (v/v) 痕量元素 ($10\text{g/L FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $2.25\text{g/L ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $1\text{g/L CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.5\text{g/L MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $0.3\text{g/L H}_3\text{BO}_3$ 、 $2\text{g/L CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.1\text{g/L (NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 、 0.84g/L EDTA 、 50mL/L HCl) 的 3L Terrific 培养基。将溶解氧浓度控制在 35% 并通过添加 5N NaOH 水溶液将 pH 维持在 7.2。制备包含 600g/L 葡萄糖和 20g/L 的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的补料溶液。当 pH 升至大于凝结点的值时, 添加适当体积的补料溶液以提高培养基中的葡萄糖浓度。Pro-IFN 基因的表达通过添加 IPTG 至最终浓度为 1mM 来诱导, 且在培养 3 小时后收获培养基。

[0076] 收集的细胞沉淀用 TEN 缓冲液 (50mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA , 100mM NaCl) 以约 1 : 10 (湿重 g/mL) 的比率重悬, 并通过微射流机破裂, 然后以 10,000rpm 离心 20 分钟。含有包涵体 (IB) 的沉淀用 TEN 缓冲液洗涤两次, 并如上所述进行离心。然后将含有 IB 的沉淀悬于 150mL 4M 的盐酸胍 (GuHCl) 水溶液中, 并以 20,000rpm 离心 15 分钟。然后将 IB 溶解在 50mL 6M GuHCl 溶液中。GuHCl 溶液化材料以 20,000rpm 离心 20 分钟。通过以 1.5L 新鲜制备的复性 (Refolding) 缓冲液 (100mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5M L-精氨酸 , 2mM EDTA) 稀释变性 IB 开始复性, 仅在添加期间搅拌。无搅拌下使复性反应混合物培养 48 小时。以 20mM Tris 缓冲液 (含有 2mM EDTA 和 0.1M 尿素, pH 7.0) 透析复性重组人干扰素 α -2b (即 Pro-IFN), 用于通过 Q-Sepharose 柱色谱法进一步纯化。

[0077] 将复性重组人蛋白 Pro-IFN 装载在 Q-Sepharose 柱 (GE Amersham Pharmacia, Pittsburgh, PA) 上。所述柱用 20mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0) 预平衡并洗涤。用 20mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0) 和 200mM NaCl 的混合物洗脱产物。含有 Pro-IFN 的馏分基于其在 280nm 处的吸光率来收集。Pro-IFN 的浓度通过蛋白分析试剂盒采用 Bradford 法 (Pierce, Rockford, IL) 来测定。

[0078] 制备蛋白-聚合物偶联物

[0079]



[0080] 向上述制备的二-PEG 醛 (1.2g , 0.03mmol) 的水 (72mL) 溶液中添加 2M 磷酸钠缓冲液 (pH 4.0, 5mL) 和 Pro-IFN (200mg 于 22.2mL pH 7.0 的含有 20mM Tris-HCl 和 0.2M NaCl 的缓冲液中, 0.01mmol)。反应混合物在室温下搅拌 10 分钟; 然后添加氰基硼氢钠水溶液

(400mM, 1.25mL, 0.5mmol)。反应混合物在暗处搅拌 16 小时,并通过 SP XL Sepharose 层析纯化。含有所需聚合物-蛋白偶联物的馏分基于其保留时间和在 280nm 处的吸光率来收集。偶联物的浓度通过蛋白分析试剂盒采用 Bradford 法 (Pierce, Rockford, IL) 来测定。偶联物的分离产率大致为 40%或更高。

[0081] 其他实施方式

[0082] 本说明书中公开的所有特征可以以任何组合结合。本说明书中公开的各特征可以被提供相同、相当或相似目的的选择性特征替代。因此,除非另有说明,所公开的各特征仅是通用系列的相同或相似特征的实例。

[0083] 从以上描述,本领域技术人员可以容易地确定本发明的必要特征,并且可以在不脱离其精神和范围的前提下进行本发明的各种变化和修改以使其适应多种用法和条件。因此,其他实施方式也在以下权利要求范围内。