



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1723219 B

(45) 授权公告日 2010.05.26

(21) 申请号 200480001770.2

(22) 申请日 2004.11.13

(30) 优先权数据

10-2003-0080299 2003.11.13 KR

(85) PCT申请进入国家阶段日

2005.06.30

(86) PCT申请的申请数据

PCT/KR2004/002944 2004.11.13

(87) PCT申请的公布数据

W02005/047336 EN 2005.05.26

(73) 专利权人 韩美药品工业株式会社

地址 韩国京畿道

(72) 发明人 金荣民 金大振 裴城敏 林昌基

权世昌 李宽淳

(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 刘晓东

(51) Int. Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C07K 1/14(2006.01)

A61K 38/00(2006.01)

(56) 对比文件

US 6475983 B1, 2002.11.05, 全文.

WO 0103737 A1, 2001.01.18, 全文.

CN 1361793 A, 2002.07.31, 全文.

审查员 汪波莉

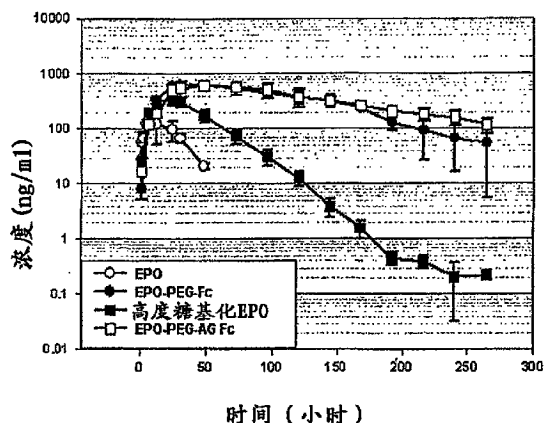
权利要求书 3 页 说明书 34 页 附图 10 页

(54) 发明名称

利用免疫球蛋白片段的蛋白质复合物及其制备方法

(57) 摘要

本文公布了在体内持续时间和稳定性上有所改进的蛋白质缀合物以及它们的用途。所说蛋白质缀合物包含生理学活性多肽、非肽聚合物和免疫球蛋白 Fc 片段。由于这三种组分是共价连接的,就该生理学活性多肽而言,所述蛋白质缀合物的体内持续时间延长且稳定性增强。对于该生理学活性多肽而言,所述蛋白质缀合物能使体内活性维持在相对高的水平,并且显著延长了血清半寿期,而引起不需要的免疫应答的风险较低。因此,所述蛋白质缀合物可用于开发各种多肽药物的长效制剂。



1. 由生理学活性多肽和免疫球蛋白 Fc 片段组成的蛋白质缀合物,其中所述多肽和所述免疫球蛋白 Fc 片段通过聚乙二醇 (PEG) 共价地连接,

其中所述 PEG 通过其自身两端的反应性基团与生理学活性多肽和免疫球蛋白 Fc 片段共价连接,

其中所述 PEG 的反应性基团选自醛基、琥珀酰亚胺基丙酸酯、和羟基琥珀酰亚胺,和

其中所述蛋白质缀合物中的生理活性多肽、PEG、免疫球蛋白 Fc 片段的摩尔比为 1 : 1 : 1。

2. 依照权利要求 1 的蛋白质缀合物,其中所述醛基是丙醛基或丁醛基。

3. 依照权利要求 1 的蛋白质缀合物,其中所述免疫球蛋白 Fc 片段是非糖基化的。

4. 依照权利要求 1 的蛋白质缀合物,其中所述免疫球蛋白 Fc 片段由选自 C<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2、C<sub>H</sub>3 和 C<sub>H</sub>4 结构域中的一个至四个结构域组成。

5. 依照权利要求 4 的蛋白质缀合物,其中所述免疫球蛋白 Fc 片段中另外还包括铰链区。

6. 依照权利要求 1 的蛋白质缀合物,其中所述免疫球蛋白 Fc 片段选自来自 IgG、IgA、IgD、IgE、IgM 的 Fc 片段以及它们的组合和杂合体。

7. 依照权利要求 6 的蛋白质缀合物,其中所述免疫球蛋白 Fc 片段选自来自 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 的 Fc 片段以及它们的组合和杂合体。

8. 依照权利要求 7 的蛋白质缀合物,其中所述免疫球蛋白 Fc 片段是 IgG4 Fc 片段。

9. 依照权利要求 8 的蛋白质缀合物,其中所述免疫球蛋白 Fc 片段是人的非糖基化 IgG4 Fc 片段。

10. 依照权利要求 1 的蛋白质缀合物,其中所述 PEG 在其两末端具有活性醛基作为反应性基团。

11. 依照权利要求 1 的蛋白质缀合物,其中所述 PEG 在各末端都与免疫球蛋白 Fc 片段和生理学活性多肽的氨基末端、赖氨酸残基、组氨酸残基或半胱氨酸残基处的游离反应性基团连接。

12. 依照权利要求 1 的蛋白质缀合物,其中所述生理学活性多肽选自激素、细胞因子、酶、抗体、生长因子、转录调控因子、凝血因子、疫苗、结构蛋白质、配体蛋白质和受体。

13. 依照权利要求 12 的蛋白质缀合物,其中所述生理学活性多肽选自人生长因子、生长激素释放肽、干扰素、干扰素受体、集落刺激因子、胰高血糖素样肽、G 蛋白偶联受体、白介素、白介素受体、酶、白介素结合蛋白、细胞因子结合蛋白、巨噬细胞活化因子、B 细胞因子、T 细胞因子、蛋白 A、变态反应抑制物、细胞坏死糖蛋白、免疫毒素、淋巴毒素、肿瘤坏死因子、肿瘤抑制物、转移生长因子、 $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶、白蛋白、 $\alpha$ -乳清蛋白、载脂蛋白 -E、促红细胞生成素、高度糖基化的促红细胞生成素、angiopoietins、血红蛋白、凝血酶、凝血酶受体激活肽、凝血调节蛋白、因子 VII、因子 VIIa、因子 VIII、因子 IX、因子 XIII、纤溶酶原活化因子、纤维蛋白结合肽、尿激酶、链激酶、水蛭素、蛋白 C、C 反应蛋白、肾素抑制物、胶原酶抑制物、超氧化物歧化酶、leptin、血小板衍生生长因子、上皮生长因子、表皮生长因子、制管张素、血管紧张素、骨生长因子、骨刺激蛋白质、降钙素、胰岛素、心房肽激素、软骨诱发因子、依降钙素、结缔组织活化因子、组织因子途径抑制物、促卵泡激素、黄体生成素、黄体生成素释放激素、神经生长因子、甲状旁腺激素、松弛素、促胰液素、生长调节素、胰岛素样生长因

子、肾上腺皮质激素、胰高血糖素、缩胆囊素、胰多肽、胃泌素释放肽、促肾上腺皮质激素释放因子、促甲状腺素、自分泌运动因子、乳铁蛋白、筒箭毒碱、受体、受体拮抗剂、细胞表面抗原、病毒来源的疫苗抗原、单克隆抗体、多克隆抗体和抗体片段。

14. 依照权利要求 13 的蛋白质缀合物,其中所述生理学活性多肽是人生长激素、 $\alpha$  干扰素、粒细胞集落刺激因子、促红细胞生成素或 Fab' 抗体片段。

15. 制备依照权利要求 1 的蛋白质缀合物的方法,包括:

(a) (a1) 将免疫球蛋白 Fc 片段或生理学活性多肽与活化的 PEG 的一端共价连接;

(a2) 从所得反应混合物中分离含有与所述 PEG 共价连接的免疫球蛋白 Fc 片段或生理学活性多肽的复合物;并

(a3) 将免疫球蛋白 Fc 片段或生理学活性多肽与所述分离复合物中 PEG 的另一端共价连接,以得到含有与 PEG 各端连接的免疫球蛋白 Fc 片段和生理学活性多肽的蛋白质缀合物;和

(b) 分离依照权利要求 1 的所述蛋白质缀合物;

其中,在步骤 (a1) 中,生理学活性多肽和 PEG 以反应摩尔比例 1 : 1.25 至 1 : 5 使用;

或

免疫球蛋白 Fc 片段和 PEG 以反应摩尔比例 1 : 5 至 1 : 10 使用;且

其中,在步骤 (a3) 中,获自步骤 (a2) 的复合物与免疫球蛋白 Fc 片段或所述生理学活性多肽以反应摩尔比例 1 : 0.5 至 1 : 20 使用;

其中所述 PEG 通过其自身两端的反应性基团与生理学活性多肽和免疫球蛋白 Fc 片段共价连接,

其中所述 PEG 的反应性基团选自醛基、琥珀酰亚胺基丙酸酯、和羟基琥珀酰亚胺,和

其中所述蛋白质缀合物中的生理活性多肽、PEG、免疫球蛋白 Fc 片段的摩尔比为 1 : 1 : 1。

16. 依照权利要求 15 的方法,其中所述醛基是丙醛基或丁醛基。

17. 依照权利要求 15 的方法,其中步骤 (a1) 和 (a3) 是在还原剂的存在下进行的。

18. 依照权利要求 17 的方法,其中所述还原剂选自  $\text{NaCNBH}_3$ 、硼氢化钠、硼酸二甲胺和硼酸吡啶。

19. 增强生理学活性多肽的体内持续时间和稳定性的药物组合物,其中包含权利要求 1 的蛋白质缀合物及其药用可接受载体。

20. 依照权利要求 19 的药物组合物,其中免疫球蛋白 Fc 片段是非糖基化的。

21. 依照权利要求 20 的药物组合物,其中免疫球蛋白 Fc 片段由选自  $C_H1$ 、 $C_H2$ 、 $C_H3$  和  $C_H4$  结构域中的一个至四个结构域组成。

22. 依照权利要求 21 的药物组合物,其中免疫球蛋白 Fc 片段中还包括铰链区。

23. 依照权利要求 19 的药物组合物,其中免疫球蛋白 Fc 片段选自来自 IgG、IgA、IgD、IgE、IgM 的 Fc 片段以及它们的组合和杂合体。

24. 依照权利要求 23 的药物组合物,其中免疫球蛋白 Fc 片段选自来自 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 的 Fc 片段以及它们的组合和杂合体。

25. 依照权利要求 24 的药物组合物,其中免疫球蛋白 Fc 片段是 IgG4Fc 片段。

26. 依照权利要求 25 的药物组合物,其中免疫球蛋白 Fc 片段是人非糖基化 IgG4Fc 片

段。

27. 依照权利要求 26 的药物组合物,其中 PEG 在其两末端具有活性醛基作为反应性基团。

28. 依照权利要求 19 的药物组合物,其中 PEG 在各末端都与免疫球蛋白 Fc 片段和生理学活性多肽的氨基末端、赖氨酸残基、组氨酸残基或半胱氨酸残基处的游离反应性基团连接。

29. 依照权利要求 19 的药物组合物,其中生理学活性多肽选自激素、细胞因子、酶、抗体、生长因子、转录调控因子、凝血因子、疫苗、结构蛋白质、配体蛋白质和受体。

30. 依照权利要求 29 的药物组合物,其中生理学活性多肽选自人生长因子、生长激素释放肽、干扰素、干扰素受体、集落刺激因子、胰高血糖素样肽、G 蛋白偶联受体、白介素、白介素受体、酶、白介素结合蛋白、细胞因子结合蛋白、巨噬细胞活化因子、B 细胞因子、T 细胞因子、蛋白 A、变态反应抑制物、细胞坏死糖蛋白、免疫毒素、淋巴毒素、肿瘤坏死因子、肿瘤抑制物、转移生长因子、 $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶、白蛋白、 $\alpha$ -乳清蛋白、载脂蛋白 E、促红细胞生成素、高度糖基化的促红细胞生成素、angiopoietins、血红蛋白、凝血酶、凝血酶受体激活肽、凝血调节蛋白、因子 VII、因子 VIIa、因子 VIII、因子 IX、因子 XIII、纤溶酶原活化因子、纤维蛋白结合肽、尿激酶、链激酶、水蛭素、蛋白 C、C 反应蛋白、肾素抑制物、胶原酶抑制物、超氧化物歧化酶、leptin、血小板衍生生长因子、上皮生长因子、表皮生长因子、制管张素、血管紧张素、骨生长因子、骨刺激蛋白质、降钙素、胰岛素、心房肽激素、软骨诱发因子、依降钙素、结缔组织活化因子、组织因子途径抑制物、促卵泡激素、黄体生成素、黄体生成素释放激素、神经生长因子、甲状旁腺激素、松弛素、促胰液素、生长调节素、胰岛素样生长因子、肾上腺皮质激素、胰高血糖素、缩胆囊素、胰多肽、胃泌素释放肽、促肾上腺皮质激素释放因子、促甲状腺素、自分泌运动因子、乳铁蛋白、筒箭毒碱、受体、受体拮抗剂、细胞表面抗原、病毒来源的疫苗抗原、单克隆抗体、多克隆抗体和抗体片段。

31. 依照权利要求 30 的药物组合物,其中生理学活性多肽是人生长激素、 $\alpha$  干扰素、粒细胞集落刺激因子、促红细胞生成素或 Fab' 抗体片段。

## 利用免疫球蛋白片段的蛋白质复合物及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及含生理学活性多肽、非肽聚合物和免疫球蛋白 Fc 片段的蛋白质缀合物,其中各组分共价连接,并且与天然形式相比其生理学作用持续时间延长。

### [0002] 背景领域

[0003] 因为多肽由于其低稳定性而倾向于容易变性、在血液中被蛋白水解酶降解并容易通过肾脏或肝脏排除,所以蛋白质药物,包括以多肽作为药物有效成分的药物需要频繁的施用于患者以维持所需要的血液水平浓度和效价。不过,这样频繁施用蛋白质药物,尤其是通过注射施用,会引起患者的痛苦。为了解决这些问题,已进行了许多努力来提高蛋白质药物的血清稳定性以及长时期保持药物在血液中的高水平,从而使药物的药效最大化。因此,具有持续活性的药物组合物需要提高蛋白质药物的稳定性并保持足够高水平的效价而不会引起患者的免疫应答。

[0004] 为了稳定蛋白质、预防酶促降解和被肾脏清除,传统上使用了诸如聚乙二醇(下文中简称为“PEG”)等具有高溶解性的聚合物来化学修饰蛋白质药物的表面。通过与靶蛋白质的特定区域或各种区域结合,PEG 稳定了蛋白质并防止其水解,且不会造成严重的副作用(Sada 等, J. Fermentation Bioengineering 71:137-139, 1991)。不过,尽管它能增强蛋白质的稳定性,PEG 偶联也存在一些问题,诸如大大降低了生理学“活性”蛋白质的效价。此外,随着 PEG 分子量的提高,其产率会有所降低,这是由于该蛋白质的反应性有所降低。

[0005] 最近已设计了聚合物-蛋白质药物缀合物。例如,如美国专利 5,738,846 中所述,可通过在 PEG 两端连接同样的蛋白质药物来制备缀合物从而提高该蛋白质药物的活性。此外,如国际专利 WO 92/16221 中所述,也可以将两种不同的蛋白质药物连接于 PEG 的两端,得到具有两种不同活性的缀合物。不过,以上方法在维持蛋白质药物的活性方面不是非常成功。

[0006] 另一方面, Kinstler 等报道了一种通过偶联粒细胞集落刺激因子(G-CSF)与人白蛋白而制备的融合蛋白显示出改良的稳定性(Kinstler 等, Pharmaceutical Research 12(12):1883-1888, 1995)。不过,在这篇文章中,由于与单独施用天然 G-CSF 相比,具有 G-CSF-PEG-白蛋白结构的经修饰药物只显示出体内停留时间提高了大约 4 倍和血清半衰期的稍微延长,所以它尚未作为蛋白质药物的有效的长效制剂而被工业化生产。

[0007] 改进生理学活性蛋白质体内稳定性的一种备选方法是通过用遗传重组技术将生理学活性蛋白质的基因与编码具高血清稳定性的蛋白质的基因连接起来并培养用所述重组基因转染的细胞以产生融合蛋白。例如,可通过用遗传重组将白蛋白或其片段与感兴趣的生理学活性蛋白质缀合来制备融合蛋白,所述白蛋白是已知在增强蛋白质稳定性方面最有效的一种蛋白质(国际专利申请 WO 93/15199 和 WO 93/15200, 欧洲专利申请 413,622)。由人类基因组科技公司(HumanGenome Science Company)研发并以商品名‘Albuferon™’,被销售的  $\alpha$  干扰素和白蛋白的融合蛋白在猴子中的半衰期从 5 小时延长到了 93 小时,但已知成问题的是它的体内活性降低到未修饰的  $\alpha$  干扰素的 5% 以下(Osborn 等, J. Phar. Exp. Ther. 303(2):540-548, 2002)。

[0008] 另一方面,免疫球蛋白(Ig)主要由两个区域组成:具有抗体结合位点的Fab和具有补体结合位点的Fc。进行了其他尝试以通过遗传重组将蛋白质药物与免疫球蛋白Fc片段融合。例如,干扰素(韩国专利公开申请文件2003-9464)和白介素-4受体、白介素-7受体或促红细胞生成素(EPO)受体(韩国专利注册文件249572)先前已在哺乳动物中以与免疫球蛋白Fc片段融合的形式得到表达。国际专利申请W001/03737描述了一种包含通过寡肽接头与免疫球蛋白Fc片段连接的细胞因子或生长因子的融合蛋白。

[0009] 此外,美国专利5,116,964公布了通过遗传重组与免疫球蛋白Fc片段的氨基或羧基末端融合的LHR(淋巴细胞表面糖蛋白)或CD4蛋白质,美国专利5,349,053则描述了IL-2与免疫球蛋白Fc片段的融合蛋白。通过遗传重组制备的Fc融合蛋白的其它例子包括 $\beta$ 干扰素或其衍生物与免疫球蛋白Fc片段的融合蛋白(国际专利申请W000/23472),IL-5受体与免疫球蛋白Fc片段的融合蛋白(美国专利5,712,121)、 $\alpha$ 干扰素和免疫球蛋白G4的Fc片段的融合蛋白(美国专利5,723,125),以及CD4蛋白质和免疫球蛋白G2的Fc片段的融合蛋白(美国专利6,451,313)。此外,如美国专利No.5,605,690中所述,具有氨基酸变化的Fc变体,尤其是在补体结合位点或受体结合位点具有氨基酸变化的Fc变体,可通过重组DNA技术与TNF受体融合,以得到TNFR-IgG1Fc融合蛋白。用遗传重组修饰的免疫球蛋白Fc片段制备Fc融合蛋白的方法可参阅美国专利6,277,375、6,410,008和6,444,792。

[0010] 美国专利No.6,660,843公布了通过遗传重组在大肠杆菌中生产包含借助接头而与免疫球蛋白Fc片段融合之靶蛋白的缀合物的方法。此方法生产缀合物的成本比利用哺乳动物表达体系低,产生未糖基化(aglycosylated)形式的缀合物。不过,由于靶蛋白和免疫球蛋白Fc片段一起于大肠杆菌中产生,如果靶蛋白在天然状态下是糖基化的,就难以用此方法生产这样的靶蛋白。此方法还有另一个问题,即缀合物以包涵体表达,导致错误折叠率很高。

[0011] 然而,通过遗传重组产生的Fc融合蛋白具有以下优点:蛋白质融合只发生在免疫球蛋白Fc片段的特定区域,即在氨基或羧基末端;只以均二聚体形式而不以单体形式产生;融合只可能发生在糖基化蛋白质之间或未糖基化(aglycosylated)蛋白质之间,而不可能形成由糖基化蛋白质和未糖基化蛋白质组成的融合蛋白。此外,由这种融合所建立的新氨基酸序列可能引发免疫应答,而接头区可能变得对蛋白水解降解作用敏感。

[0012] 另一方面,就利用免疫球蛋白Fc片段研发融合蛋白而言,没有关于含有利用交联剂与人源天然Fc相连接的靶蛋白的缀合物方面的报导。用接头制备缀合物的优势在于方便了选择和调控连接在一起的两个蛋白质的连接位点和方向,使得表达可以是单体、二聚体或多聚体,并可以制备同源或异源构建体。免疫球蛋白Fc片段可通过重组DNA技术利用哺乳动物细胞或大肠杆菌产生。不过,迄今为止,还没有关于在大肠杆菌中单独以高产量产生并用作长效制剂的天然免疫球蛋白Fc片段方面的报导。此外,迄今为止,还未尝试通过重组DNA技术生产含有借助交联剂而与这种大肠杆菌来源的免疫球蛋白Fc片段连接的靶蛋白的缀合物。

[0013] 另一方面,免疫球蛋白具有抗体功能,诸如抗体依赖型细胞介导的细胞毒性(ADCC)或补体依赖型细胞毒性(CDC),且免疫球蛋白Fc片段中存在的糖基部分在ADCC和CDC效应中起着重要作用(Burton D., Molec. Immun. 22,161-206,1985)。缺乏糖基部分的免疫球蛋白具有与糖基化免疫球蛋白类似的血清半寿期,但补体和受体结合亲和

力下降了 10-1000 倍 (Waldmann H., Eur. J. Immunol. 23,403-411,1993 ;Morrison S., J. Immunol. 143,2595-2601,1989)。

[0014] 如上所述,已尝试了各种方法用于将聚合物与生理学活性蛋白质连接。传统方法增强了多肽的稳定性但显著降低了其活性,或者提高了多肽的活性而忽略了稳定性。因此,需要有能达到使蛋白质药物的活性降低最少且稳定性增强的目的的方法。

[0015] 这样,由有关研发能实现活性降低最小化且稳定性增强的长效蛋白质药物制剂(这通常被认为难以完成)的深入彻底的研究得到了本发明,从而发现了通过共价键合免疫球蛋白 Fc 片段、非肽聚合物和生理学活性多肽制备的蛋白质缀合物显著延长了该生理学活性多肽的血清半寿期并保持了高于已知蛋白质药物的效价。

## 发明内容

[0016] 因此本发明的一个目的是提供使生理学活性多肽的活性降低最小同时延长该多肽的血清半寿期、并降低诱发免疫应答的风险的蛋白质缀合物,以及制备所述蛋白质缀合物的方法。

[0017] 本发明的另一目的是提供长效蛋白质药物制剂,其中含有血清半寿期延长的蛋白质缀合物作为有效组分。

[0018] 本发明的另一目的是提供通过使生理学活性多肽的活性降低最小化且同时增加该多肽的血清半寿期而改进了稳定性和生理学作用持续时间的方法。

[0019] 附图简述

[0020] 本发明的以上及其它目的、特性和其它优势可通过以下详述并结合附图来更清楚的理解,其中:

[0021] 图 1 显示了用木瓜蛋白酶切割免疫球蛋白获得的免疫球蛋白 Fc 片段的层析结果;

[0022] 图 2 显示了纯化的免疫球蛋白 Fc 片段的 SDS-PAGE 结果 (M:分子量标准,泳道 1: IgG,泳道 2 :Fc);

[0023] 图 3 显示了 IFN $\alpha$ -PEG-Fc (A), <sup>17</sup>Ser-G-CSF-PEG-Fc (B) 与 EPO-PEG-Fc (C) 缀合物的 SDS-PAGE 结果,它们是通过偶联反应产生的 (M:分子量标准,泳道 1 :Fc,泳道 2 :生理学活性蛋白质,泳道 3 :生理学活性蛋白质-PEG-Fc 缀合物);

[0024] 图 4 显示了偶联反应后纯化的 IFN $\alpha$ -PEG-Fc 缀合物的大小排阻层析的结果;

[0025] 图 5 显示了 EPO-PEG-Fc 缀合物的 MALDI-TOF 质谱的结果;

[0026] 图 6a 和 6b 分别显示了天然免疫球蛋白 Fc 和去糖基化免疫球蛋白 Fc (DG Fc) 的 MALDI-TOF 质谱和 SDS-PAGE 分析结果;

[0027] 图 7 显示了 IFN $\alpha$ -PEG-Fc 缀合物和 IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc 缀合物的 MALDI-TOF 质谱结果;

[0028] 图 8a 至 8c 显示了 IFN $\alpha$ -PEG-Fc、IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc 和 IFN $\alpha$ -PEG-重组 AG Fc 衍生物缀合物的反相 HPLC 结果;

[0029] 图 9 是显示天然 IFN $\alpha$ 、IFN $\alpha$ -40K PEG 复合物、IFN $\alpha$ -PEG-白蛋白缀合物和 IFN $\alpha$ -PEG-Fc 缀合物药物代谢动力学分析结果的曲线图;

[0030] 图 10 是显示天然 EPO、高度糖基化的 EPO、EPO-PEG-Fc 缀合物和 EPO-PEG-AG Fc 缀

合物的药物代谢动力学分析结果的曲线图；

[0031] 图 11 是显示 IFN $\alpha$ -PEG-Fc、IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc 和 IFN $\alpha$ -PEG-重组 AG Fc 衍生物缀合物的药物代谢动力学分析结果的曲线图；

[0032] 图 12 是显示 Fab'、Fab'-S-40K PEG 复合物、Fab'-N-PEG-N-Fc 缀合物和 Fab'-S-PEG-N-Fc 缀合物的药物代谢动力学曲线图；

[0033] 图 13 是显示 Fab'、Fab'-S-40K PEG 复合物和 Fab'-N-PEG-N-Fc 缀合物和 Fab'-S-PEG-N-Fc 缀合物体内活性的曲线图；

[0034] 图 14 是显示人 IgG 各亚型与 C1q 补体结合亲和力的比较结果的曲线图；以及

[0035] 图 15 是显示糖基化 Fc、酶促去糖基化 DG Fc 和其中载体为大肠杆菌所产生的 AG Fc 的干扰素-PEG-载体缀合物与 C1q 补体结合亲和力的比较结果的示意图。

[0036] 实施本发明的最佳方式

[0037] 一方面，为了达到上述目的，本发明提供了含有共价连接的生理学活性多肽、两端都有反应性基团的非肽聚合物以及免疫球蛋白 Fc 片段的蛋白质缀合物。

[0038] 术语“蛋白质缀合物”或“缀合物”用于此处时指含有一个或多个生理学活性多肽、一个或多个两端都有反应性基团的非肽聚合物和一个或多个免疫球蛋白 Fc 片段，其中这三种组分共价连接。此外，为了与“缀合物”相区分，只包含选自生理学活性多肽、非肽聚合物和免疫球蛋白 Fc 片段中的两种不同分子的构建体（其中这两种分子共价连接在一起）则被称为“复合物”。

[0039] 本发明的蛋白质缀合物是被制成减少蛋白质药物的生理学活性的降低并延长其体内持续时间的蛋白质药物变体，其特征在于将免疫球蛋白 Fc 片段与蛋白质药物相连接。

[0040] 免疫球蛋白 Fc 片段就用作药物载体而言是安全的，因为它是可生物降解的多肽，能够在体内被新陈代谢掉。此外，免疫球蛋白 Fc 片段与整个免疫球蛋白分子相比具有相对较低的分子量，因此有利于目的缀合物的制备、纯化和生产。另外，由于免疫球蛋白 Fc 片段不包含 Fab 片段（它的氨基酸序列在抗体亚型中有所不同，因此具有高度的非均一性），它能极大的提高物质的均一性并且具有较低的抗原性。

[0041] 术语“免疫球蛋白 Fc 片段”用于此处时是指含有免疫球蛋白重链恒定区 2(C<sub>H</sub>2) 和重链恒定区 3(C<sub>H</sub>3) 且不含免疫球蛋白重链和轻链可变区、重链恒定区 1(C<sub>H</sub>1) 和轻链恒定区 1(C<sub>L</sub>1) 的蛋白质。它可能进一步包含位于重链恒定区的铰链区域。此外，除了重链和轻链可变区之外，本发明的免疫球蛋白 Fc 片段可能包含重链恒定区 1(C<sub>H</sub>1) 和 / 或轻链恒定区 1(C<sub>L</sub>1) 的一部分或全部。同样，只要它具有与天然蛋白质基本上相似或优于天然蛋白质的生理学作用，则 IgG Fc 片段可以是在 C<sub>H</sub>2 和 / 或 C<sub>H</sub>3 氨基酸序列的相对较长部分中有缺失的片段。即，本发明的免疫球蛋白 Fc 片段可包含 1) C<sub>H</sub>1 结构域、C<sub>H</sub>2 结构域、C<sub>H</sub>3 结构域和 C<sub>H</sub>4 结构域，2) C<sub>H</sub>1 结构域和 C<sub>H</sub>2 结构域，3) C<sub>H</sub>1 结构域和 C<sub>H</sub>3 结构域，4) C<sub>H</sub>2 结构域和 C<sub>H</sub>3 结构域，5) 一个或多个结构域和免疫球蛋白铰链区（或铰链区的一部分）的组合，和 6) 重链恒定区和轻链恒定区各个结构域的二聚体。

[0042] 本发明的 Fc 片段包括天然氨基酸序列和其序列衍生物（突变体）。氨基酸序列衍生物是由于一个或多个氨基酸残基的缺失、插入、非保守性或保守性取代或它们的组合而不同于天然氨基酸序列的序列。例如，在 IgG Fc 中，已知对于结合重要且位于位点 214 至 238、297 至 299、318 至 322 或 327 至 331 处的氨基酸残基可用作修饰的适当靶目标。此外，



其它各种衍生物也是有可能的,包括其中能形成二硫键的区域被缺失,或者天然 Fc 形式 N 末端的某些氨基酸残基被除去或在此添加了甲硫氨酸残基的衍生物。此外,为了去除效应器功能,缺失可以发生在补体结合位点,诸如 C1q 结合位点和 ADCC 位点。制备所述的免疫球蛋白 Fc 片段序列衍生物的技术参阅国际专利申请 WO 97/34631 和 WO 96/32478。

[0043] 蛋白质和肽中通常不改变其活性的氨基酸变换是本领域所已知的 (H. Neurath, R. L. Hill, 蛋白质 The Proteins, Academic Press, New York, 1979)。最通常发生的变换是 Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Thy/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu 和 Asp/Gly,可以是其中任何一种替换另一种。

[0044] 此外,如果需要,Fc 片段可以通过磷酸化、硫酸化、丙烯酸化、糖基化、甲基化、法呢基化 (farnesylation)、乙酰化、酰胺化等等作用而被修饰。

[0045] 上述 Fc 衍生物是具有与本发明 Fc 片段同样的生物学活性或提高了结构稳定性 (例如,抗热、pH 等等) 的衍生物。

[0046] 此外,这些 Fc 片段可获自从人或包括牛、山羊、猪、小鼠、兔、仓鼠、大鼠和豚鼠在内的其它动物中分离的天然形式,或可以是重组体或它们的衍生物,获自被转化的动物细胞或微生物。在此,它们可通过从人或动物体中分离完整的免疫球蛋白并用蛋白水解酶加以处理而从天然的免疫球蛋白获得。木瓜蛋白酶将天然的免疫球蛋白消化成 Fab 和 Fc 片段,而胃蛋白酶处理则导致了 pF' c 和 F(ab' )<sub>2</sub> 片段的产生。可对这些片段进行例如大小排阻层析以分离 Fc 或 pF' c。

[0047] 优选的,人源 Fc 片段是获自微生物的重组免疫球蛋白 Fc 片段。

[0048] 此外,本发明的免疫球蛋白 Fc 片段可以是具有天然糖链、与天然形式相比糖链增加或与天然形式相比糖链减少的形式,或者可以是去糖基化的形式。免疫球蛋白 Fc 糖链的增加、减少或去除可以通过本领域的通用方法完成,诸如化学法、酶促法和利用微生物的遗传工程方法。将糖链从 Fc 片段中去除导致了它与第一补体成分 C1 的 C1q 部分的结合亲和力明显降低和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的降低或丧失,从而不会在体内引起不必要的免疫应答。在这点上,去糖基化或未糖基化形式的免疫球蛋白 Fc 片段可能更适于本发明作为药物载体的目的。

[0049] 用于此处时,术语“去糖基化”指从 Fc 片段中酶促除去了糖基部分,而术语“未糖基化”指 Fc 片段是以非糖基化的形式由原核生物,优选大肠杆菌产生。

[0050] 另一方面,免疫球蛋白 Fc 片段可来自人类或其它动物,包括牛、山羊、猪、小鼠、兔子、仓鼠、大鼠和豚鼠,优选人类。此外,免疫球蛋白 Fc 片段可以是来自 IgG、IgA、IgD、IgE 和 IgM 的 Fc 片段,或者通过它们的组合或杂合制备而来的 Fc 片段。优选 Fc 片段来自 IgG 或 IgM (它们是人类血液中最丰富的蛋白质之一),最优选来自 IgG (已知它能延长配体结合蛋白质的半寿期)。

[0051] 另一方面,术语“组合”用于此处时是指编码同一起来源的单链免疫球蛋白 Fc 区的多肽与不同来源的单链多肽连接形成二聚体或多聚体。即,二聚体或多聚体可以由选自 IgG1Fc、IgG2Fc、IgG3Fc 和 IgG4Fc 片段中的两种或多种片段所形成。

[0052] 术语“杂合体”用于此处时指编码两种或多种不同来源的免疫球蛋白 Fc 片段的序列存在于单链免疫球蛋白 Fc 片段中。在本发明中,各种类型的杂合体都是有可能的。即,

结构域杂合体可以由选自 IgG1Fc、IgG2Fc、IgG3Fc 和 IgG4Fc 的 CH1、CH2、CH3 和 CH4 中的一种至四种结构域组成,且可能包含铰链区。

[0053] 另一方面,IgG 被划分为 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 亚型,本发明包括它们的组合和杂合体。优选 IgG2 和 IgG4 亚型,最优选 IgG4 的 Fc 片段,它几乎不具有诸如 CDC(补体依赖型细胞毒性)等效应器功能(参阅图 14 和 15)。

[0054] 也就是说,作为本发明的药物载体,最优选的免疫球蛋白 Fc 片段是人 IgG4 来源的未糖基化 Fc 片段。人源 Fc 片段比非人源 Fc 片段更优越,因为后者可能在人体内作为抗原并引起不期望有的免疫应答,诸如产生抗该抗原的新抗体。

[0055] 本发明的特征在于免疫球蛋白 Fc 片段和蛋白质缀合物是通过非肽聚合物连接在一起的。

[0056] 术语“非肽聚合物”用于此处指生物相容性聚合物,其中包括两个或多个通过除肽键之外的共价键彼此相连的重复单元。

[0057] 能用于本发明的非肽聚合物可选自聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇和丙二醇的共聚物、聚氧乙基化多元醇、聚乙烯醇、多糖、葡聚糖、聚乙烯醚、诸如 PLA(聚乳酸)和 PLGA(poly lactic-glycolic acid)等可生物降解聚合物、脂类聚合物、几丁质、透明质酸及它们的组合物。最优选的是聚乙二醇(PEG)。此外,本领域众所周知且在本领域技术范围内易于制备的它们的衍生物也包含在本发明的范围内。非肽聚合物优选分子量为 1-100kDa,更优选 1-20kDa。此外,本发明中与免疫球蛋白 Fc 片段连接的非肽聚合物可以是一种聚合物或不同类型聚合物的组合。

[0058] 可用于本发明的非肽聚合物具有能与免疫球蛋白 Fc 片段和蛋白质药物结合的反应性基团。

[0059] 非肽聚合物在两端都具有反应性基团,优选所述基团选自反应性醛基、丙醛基、丁醛基、马来酰亚胺基和琥珀酰亚胺衍生物。所述琥珀酰亚胺衍生物可以是丙酸琥珀酰亚胺酯、羟基琥珀酰亚胺基、琥珀酰亚胺基羧甲基或碳酸琥珀酰亚胺酯。尤其是,当非肽聚合物在其两端都具有反应性醛基时,在其两端与生理学活性多肽和具有最小非特异反应的免疫球蛋白 Fc 片段相连接是有效的。通过醛键由还原性烷基化产生的终产物比通过酰胺键连接的要稳定得多。

[0060] 在非肽聚合物两端的反应性基团可以是相同的或不同的。例如,非肽聚合物可以在一端具有马来酰亚胺基团,而在另一端具有醛基、丙醛基或丁醛基。当用两端具有反应性羟基的聚乙二醇(PEG)作为非肽聚合物时,所述羟基可通过已知的化学反应被激活成多种反应性基团,或者可利用具有商品化修饰反应性基团的 PEG 以制备本发明的蛋白质缀合物。

[0061] 另一方面,在本发明中,免疫球蛋白 Fc 片段和非肽聚合物的复合物与生理学活性多肽连接以产生蛋白质缀合物。

[0062] 术语“生理学活性多肽”、“生理学活性蛋白质”、“活性多肽”、“多肽药物”和“蛋白质药物”用于此处时其意义是可互换的,其特征是它们都处于呈现各种体内生理学功能的生理学活性形式。

[0063] 蛋白质药物的劣势是由于其易被体内存在的蛋白水解酶变性或降解的特性造成了它不能长期保持生理学作用。不过,当多肽药物与本发明的免疫球蛋白 Fc 片段相缀合而

形成缀合物时,该药物的结构稳定性得以提高,降解半寿期也延长了。同样,与Fc片段缀合的多肽与其它已知的多肽药物制剂相比,其生理学活性的降低要小得多。因此,与常规多肽药物的体内生物利用率相比,依照本发明的多肽和免疫球蛋白Fc片段的缀合物的特征是具有显著提高的体内生物利用率。这一点也通过本发明的实施方案进行了清楚的阐述。即,与它们单独缀合PEG或缀合PEG和白蛋白二者的常规形式相比,当与本发明的免疫球蛋白Fc片段连接时,IFN $\alpha$ 、G-CSF、hGH和其它蛋白质药物呈现出体内生物利用率提高了大约2至6倍(表8、9和10)。

[0064] 另一方面,蛋白质和本发明免疫球蛋白Fc片段之间的连接的特征在于,它不是通过常规的重组方法融合的。通过重组方法获得的并用作药物的免疫球蛋白Fc片段与活性多肽的融合形式是以如下方式得到的,即将多肽与Fc片段的N末端或C末端连接,并从编码融合形式的核苷酸序列表达和折叠成单一多肽。

[0065] 这导致了所产生的融合蛋白的活性显著降低,因为蛋白质作为生理学功能性物质的活性是由蛋白质的构象决定的。因此,当多肽药物通过重组方法与Fc融合时,即使融合蛋白的结构稳定性提高了,它对其体内生物利用率也没有影响。同样,由于这样的融合蛋白常常错误折叠并因此以包涵体形式表达,这样的融合方法在蛋白质产生和分离纯化中是不经济的。此外,当多肽的活性形式是糖基化形式时,多肽应于真核细胞中表达。这种情况下,Fc也被糖基化,而此糖基化可能引起体内不适当的免疫应答。

[0066] 也就是说,只有本发明有可能产生糖基化活性多肽和非糖基化免疫球蛋白Fc片段的缀合物,并克服所有上述问题,包括提高蛋白质产量,因为复合物的两种组分是通过最佳体系单独制备和分离的。

[0067] 另一方面,可应用于本发明蛋白质缀合物的生理学活性多肽举例说来有激素、细胞因子、白介素、白介素结合蛋白、酶、抗体、生长因子、转录调控因子、凝血因子、疫苗、结构蛋白质、配体蛋白质或受体、细胞表面抗原、受体拮抗剂及它们的衍生物。

[0068] 具体而言,生理学活性多肽的非局限性例子包括人生长激素、生长激素释放激素、生长激素释放肽、干扰素和干扰素受体(例如干扰素 $-\alpha$ 、 $-\beta$ 和 $-\gamma$ ,水溶性I型干扰素受体,等)、集落刺激因子、白介素(例如白介素-1、-2、-3、-4、-5、-6、-7、-8、-9、-10、-11、-12、-13、-14、-15、-16、-17、-18、-19、-20、-21、-22、-23、-24、-25、-26、-27、-28、-29、-30等)和白介素受体(例如IL-1受体、IL-4受体等)、酶(例如葡糖脑苷脂酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、 $\alpha$ -半乳糖苷酶-A、 $\alpha$ -L-iduronidase、丁酰胆碱酯酶、几丁质酶、谷氨酸脱羧酶、imidoglucerase、脂酶、尿酸酶、血小板活化因子乙酰水解酶、中性内肽酶、髓过氧化物酶、等)、白介素和细胞因子结合蛋白(例如IL-18bp、TNF结合蛋白,等)、巨噬细胞活化因子、巨噬细胞肽、B细胞因子、T细胞因子、蛋白A、变态反应抑制物、细胞坏死糖蛋白、免疫毒素、淋巴毒素、肿瘤坏死因子、肿瘤抑制物、转移生长因子、 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶、白蛋白、 $\alpha$ -乳清蛋白、载脂蛋白-E、促红细胞生成素、高度糖基化的促红细胞生成素、angiopoietins、血红蛋白、凝血酶、凝血酶受体激活肽、凝血调节蛋白、因子VII、因子VIIa、因子VIII、因子IX、因子XIII、纤溶酶原活化因子、纤维蛋白结合肽、尿激酶、链激酶、水蛭素、蛋白C、C反应蛋白、肾素抑制物、胶原酶抑制物、超氧化物歧化酶、leptin、血小板衍生生长因子、上皮生长因子、表皮生长因子、制管张素、血管紧张素、骨生长因子、骨刺激蛋白质、降钙素、胰岛素、心房肽激素(atriopeptin)、软骨诱发因子、依降钙素(elcatonin)、结缔组织活化因子、组

织因子途径抑制物、促卵泡激素、黄体生成素、黄体生成素释放激素、神经生长因子（如神经生长因子、睫状神经营养因子、axogenesis factor-1、胰高血糖素样肽（如 GLP-1）、脑促尿钠排泄肽、神经胶质来源的神经营养因子、netrin、neurophil 抑制因子、神经营养因子、neuturin 等）、甲状旁腺激素、松弛素、促胰液素（secretin）、生长调节素、胰岛素样生长因子、肾上腺皮质激素、胰高血糖素、缩胆囊素、胰多肽、胃泌素释放肽、促肾上腺皮质激素释放因子、促甲状腺素、自分泌运动因子（autotaxin）、乳铁蛋白、筒箭毒碱（myostatin）、受体（如 TNFR(P75)、TNFR(P55)、IL-1 受体、VEGF 受体、B 细胞活化因子受体，等）、受体拮抗剂（如 IL1-Ra 等）、细胞表面抗原（如 CD 2、3、4、5、7、11a、11b、18、19、20、23、25、33、38、40、45、69 等）、单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片段（如 scFv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 和 Fd）和病毒来源的疫苗抗原。

[0069] 具体而言，优选作为生理学活性多肽的是那些在施用于个体以治疗或预防疾病时需频繁给药的多肽，包括人生长激素、干扰素（干扰素- $\alpha$ 、- $\beta$ 、- $\gamma$  等）、粒细胞集落刺激因子、促红细胞生成素（EPO）和抗体片段。最优选的多肽药物是干扰素- $\alpha$ 。此外，某些衍生物也包括在本发明的生理学活性多肽的范围内，只要与天然形式的生理学活性多肽相比，它们具有基本上相同的或更优越的功能、结构、活性或稳定性。

[0070] 在本发明中，抗体片段可以是 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd 或 scFv，它能结合特异的抗原，优选 Fab'。Fab 片段包含轻链的可变区（V<sub>L</sub>）和恒定区（C<sub>L</sub>）以及重链的可变区（V<sub>H</sub>）和第一恒定区（C<sub>H1</sub>）。Fab' 片段不同于 Fab 片段在于它在 C<sub>H1</sub> 结构域的羧基末端添加了数个氨基酸残基，包括来自铰链区的一个或多个半胱氨酸残基。Fd 片段只包含 V<sub>H</sub> 和 C<sub>H1</sub> 结构域，而 F(ab')<sub>2</sub> 片段则作为一对 Fab' 片段通过二硫键或化学反应产生。scFv（单链 Fv）片段包含通过肽键相互连接并因此以单一多肽链存在的 V<sub>L</sub> 和 V<sub>H</sub> 结构域。

[0071] 另一方面，当免疫球蛋白 Fc 片段和蛋白质药物通过非肽聚合物被连接在一起时，免疫球蛋白 Fc 片段的连接位点包括存在于铰链区或恒定区的氨基酸残基的一个或多个游离反应性基团。优选的，免疫球蛋白 Fc 恒定区和蛋白质药物在氨基末端、赖氨酸残基的氨基、组氨酸残基的氨基或游离的半胱氨酸残基处与非肽聚合物相应末端的反应性基团共价连接。

[0072] 本发明的蛋白质缀合物可包含一个或多个“生理学活性多肽-非肽聚合物-免疫球蛋白 Fc 片段”单元结构，其中所有的组分都通过共价键线性连接。由于非肽聚合物在自身的两端都具有反应性基团，它可以与生理学活性多肽和免疫球蛋白 Fc 片段通过共价键连接。也就是说，非肽聚合物与生理学活性多肽的一个或多个复合物可通过共价键与单个免疫球蛋白 Fc 片段连接，以产生以免疫球蛋白 Fc 片段为载体的生理学活性多肽单体、二聚体或多聚体，从而更有效的提高体内活性和稳定性。

[0073] 在本发明的蛋白质缀合物中，生理学活性多肽可与免疫球蛋白 Fc 片段以各种摩尔比例连接。

[0074] 此外，正如通常所已知的，两种不同的蛋白质通过寡肽连接在一起，在接头位点处形成的氨基酸序列有引起免疫反应的风险，而蛋白质的连接位点局限于 N 末端和 C 末端。相反，由于本发明的蛋白质缀合物通过生物相容性非肽聚合物介导，它的有利之处在于没有诸如毒性或免疫应答产生等副作用，并且由于其连接位点的多样性而可以制备多种蛋白质缀合物。

[0075] 此外,通过遗传重组将免疫球蛋白 Fc 片段直接与活性蛋白质相融合的常规方法是有问题的,因为这使融合只发生在用作融合配偶体的免疫球蛋白 Fc 片段末端序列中,而且由于其依赖于动物细胞培养的生产模式而限制了融合蛋白的产量。传统方法具有另外的问题,即其中活性蛋白质的活性可能由于非天然的糖基化作用而降低,蛋白质折叠必须准确发生,且融合蛋白可能会以均二聚体的形式产生。尤其是,当缀合物于大肠杆菌中产生时,不溶性的错误折叠的缀合物非常难以除去。相反,本发明的蛋白质缀合物可能具有长得多的作用持续时间和高得多的稳定性,同时还不会引起这些问题,它在保持多肽的活性方面而尤其优选,使得可能制备含有与非糖基化 Fc 连接的糖基化治疗蛋白质的缀合物。

[0076] 另一方面,低分子量化学结合剂,诸如碳二亚胺或戊二醛,存在以下问题:它们可以同时结合蛋白质上的几个位点,导致蛋白质的变性,且结合是非特异性的,从而使得难以控制连接位点或纯化所连接的蛋白质。相反,由于本发明的蛋白质缀合物利用了非肽聚合物,所以它便于控制连接位点,使非特异性反应最小化,并且便于蛋白质的纯化。

[0077] 本发明的用处在于以下实施方案中有更详细的描述。含有与 PEG 各端连接的生理学活性多肽和免疫球蛋白 Fc 片段的本发明蛋白质缀合物(多肽-PEG-Fc),比多肽-PEG 复合物或多肽-PEG-白蛋白缀合物具有高得多的稳定性。药物代谢动力学分析显示,与天然 IFN $\alpha$  相比,当与 40-kDa PEG 连接时(IFN $\alpha$ -40K PEG 复合物),IFN $\alpha$  的血清半寿期提高了大约 20 倍,而在 IFN $\alpha$ -PEG-白蛋白缀合物中则提高了大约 10 倍。相反,依照本发明的 IFN $\alpha$ -PEG-Fc 缀合物显示出半寿期显著增加大约 50 倍(见表 3)。此外,在其它靶蛋白、人生长激素(hGH)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)和其衍生物( $^{17}\text{S}$ -G-CSF)以及促红细胞生成素(EPO)中观察到了同样的结果。与蛋白质的天然形式以及缀合 PEG 或 PEG-白蛋白的形式相比,依照本发明的蛋白质缀合物(其中各包含与 PEG-Fc 连接的靶蛋白)显示出平均停留时间(mean residence time, MRT)和血清半寿期延长了大约 10 倍(见表 4 至 7)。

[0078] 此外,当 PEG-Fc 复合物与接近 Fab' C 末端或 Fab' N 末端的-SH 基团连接时,产生的 Fab'-PEG-Fc 缀合物呈现出比 40K PEG-Fab' 复合物长 2 到 3 倍的血清半寿期(见图 12)。

[0079] 此外,当蛋白质缀合物是用去糖基化免疫球蛋白 Fc(DG Fc)(其中糖基部分被去除)和重组的非糖基化免疫球蛋白 Fc(AG Fc)衍生物制备的时候,它们的血浆半寿期和体外活性维持在与利用天然 Fc 制备的蛋白质缀合物相似的水平上(见表 3,图 8 和 11)。

[0080] 因此,由于本发明的蛋白质缀合物具有延长的血清半寿期和平均停留时间(MRT),当它们被应用于包括人生长激素、干扰素、促红细胞生成素、集落刺激因子或其衍生物和抗体衍生物在内的多种生理学活性多肽时,它们可用于开发不同生理学活性多肽的长效制剂。

[0081] 在另一方面,本发明提供了制备体内持续时间和稳定性有所改进的蛋白质缀合物的方法,包括:(a)促进两端都具有反应性基团的非肽聚合物、生理学活性多肽和免疫球蛋白 Fc 片段之间共价连接的反应;并(b)分离所产生的含有与非肽聚合物各端共价连接的生理学活性多肽和免疫球蛋白 Fc 片段的缀合物。

[0082] 在步骤(a)中,所述三种组分之间的共价连接依次或同时发生。例如,当生理学活性多肽和免疫球蛋白 Fc 片段与非肽聚合物的各端连接时,生理学活性多肽和免疫球蛋白 Fc 片段中的任一个与非肽聚合物的一端连接,然后另一组分与非肽聚合物的另一端连接。

为了使除了预期蛋白质缀合物之外的副产物的生成最小化,优选这样的顺序连接方法。

[0083] 因此,步骤(a)可能包括(a1)将免疫球蛋白Fc片段或生理学活性多肽与非肽聚合物的一端共价连接;(a2)从反应混合物中分离含有与非肽聚合物连接的免疫球蛋白Fc片段或生理学活性多肽的复合物;并(a3)将生理学活性多肽或免疫球蛋白Fc片段与所分离的复合物中非肽聚合物的另一端共价连接,得到含有与非肽聚合物各端连接的免疫球蛋白Fc片段和生理学活性多肽的蛋白质缀合物。

[0084] 在步骤(a1)中,生理学活性多肽和非肽聚合物的最佳反应摩尔比例是1:2.5至1:5之间,而免疫球蛋白Fc片段和非肽聚合物的最佳反应摩尔比例是1:5至1:10之间。

[0085] 另一方面,在步骤(a3)中,步骤(a2)中获得的复合物与免疫球蛋白Fc片段或生理学活性多肽之间的反应摩尔比例可以在1:0.5至1:20之间,而优选1:1至1:3之间。

[0086] 如果需要,可在还原剂存在的条件下进行步骤(a1)和(a3),这取决于参与步骤(a1)和(a3)反应的非肽聚合物两端的反应性基团类型。优选的还原剂可包括氰基硼氢化钠(NaCNBH<sub>3</sub>)、硼氢化钠、硼酸二甲胺和硼酸吡啶。

[0087] 考虑到步骤(a2)和(b)所需的纯度以及产物的分子量和电荷,可从本领域通常所用的蛋白质分离方法中选择适当的蛋白质分离方法。例如,可应用多种已知方法,包括大小排阻层析和离子交换层析。如果需要,还可以使用数种不同方法的组合来达到高度纯化。

[0088] 在另一方面,本发明提供了药物组合物以使生理学活性多肽在体内持续时间和稳定性上有所改进,其中包含本发明蛋白质缀合物作为有效组分以及药用可接受载体。

[0089] 术语“施用”用于此处时指通过某一合适方法将预定量的物质引入患者中。本发明的缀合物可通过任何常规路径施用,只要它能到达预期组织即可。各种施用方式都在考虑范围内,包括腹膜内、静脉内、肌肉内、皮下、皮内、口服、局部、鼻内、肺内和直肠内施用,但本发明并不局限于这些例证性的施用方式。不过,由于在口服时肽会被消化,故口服组合物的活性成分应被包裹或配制成保护其在胃中免于降解的形式。优选的,本发明组合物可以可注射的形式施用。此外,本发明的药物组合物可用能将活性成分转运入靶细胞的某种设备施用。

[0090] 含有依照本发明的缀合物的药物组合物可包含药物可接受载体。对口服而言,药物可接受载体可包括粘合剂、润滑剂、崩解剂、赋形剂、增溶剂、分散剂、稳定剂、悬浮剂、着色剂和芳香剂。对可注射制剂而言,药物可接受载体可包括缓冲剂、保存剂(preserving agent)、止痛剂、增溶剂、等渗剂和稳定剂。对于局部施用的制剂而言,药物可接受载体可包括碱、赋形剂、润滑剂和保存剂。本发明的药物组合物可与前述药物可接受载体组合配制成各种剂型。例如,就口服给药而言,药物组合物可以被配制成片剂、锭剂、胶囊、酞剂、悬浮液、糖浆或干胶片(wafer)。就可注射制剂而言,药物组合物可被配制成单位剂型,诸如多剂量容器或单剂量形式的安瓿。药物组合物也可被配制成溶液、悬浮液、片剂、胶囊和长效制剂。

[0091] 另一方面,适于药物制剂的载体、赋形剂和稀释液的例子包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、木糖醇、赤藻糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯树胶、藻酸盐(酯)、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、甲基羟基苯甲酸盐

(酯)、丙基羟基苯甲酸盐(酯)、滑石、硬脂酸镁和矿物油。此外,药物组合物可进一步包含填充剂、抗凝剂、润滑剂、保湿剂、芳香剂、乳化剂和防腐剂。

[0092] 与作为载体的本发明免疫球蛋白 Fc 片段组合的药物的实质剂量可能由数种相关因素决定,包括待治疗疾病的类型、施用途径、患者年龄、性别、体重和病情的严重程度以及作为活性组分的药物的类型。由于本发明的药物组合物在体内具有很长的作用持续时间,所以它具有极大地降低治疗药物施用频率的优势。

[0093] 从以下实施例中可以更好的理解本发明,这些实施例的提出只是为了举例说明,而不应被认为是对本发明的限制。

[0094] 实施例 1:IFN $\alpha$ -PEG-免疫球蛋白 Fc 片段缀合物的制备 I

[0095] <步骤 1>用免疫球蛋白制备免疫球蛋白 Fc 片段

[0096] 免疫球蛋白 Fc 片段制备如下。将溶于 10mM 磷酸盐缓冲液中的 200mg 150-kDa 免疫球蛋白 G(IgG) (Green Cross, Korea) 用 2mg 蛋白水解酶-木瓜蛋白酶(Sigma) 在 37°C 温和搅拌处理 2 小时。酶反应后,对由此再生的免疫球蛋白 Fc 片段依次用 Superdex 柱、蛋白 A 柱和阳离子交换柱进行层析纯化。具体的说,就是将反应液加到用 10mM 磷酸钠缓冲液(PBS, pH 7.3) 平衡过的 Superdex 200 柱(Pharmacia) 上,将柱子用同一缓冲液以流速 1ml/分钟洗脱。与免疫球蛋白 Fc 片段相比具有相对较高分子量的未反应免疫球蛋白分子(IgG) 和 F(ab')<sub>2</sub> 由于其洗脱早于 Ig Fc 片段的特性而被除去。分子量近似于 Ig Fc 片段的 Fab 片段通过蛋白 A 柱层析除去(图 1)。将洗脱自 Superdex 200 柱的含 Ig Fc 片段的所得组分以 5ml/分钟的流速加到用 20mM 磷酸盐缓冲液(pH 7.0) 平衡的蛋白 A 柱(Pharmacia) 上,用同一缓冲液洗涤柱,以去除未结合在柱上的蛋白质。然后,用 100mM 柠檬酸钠缓冲液(pH 3.0) 洗脱蛋白 A 柱,以获得高纯度的免疫球蛋白 Fc 片段。最后用阳离子交换柱(polyCAT, PolyLC Company) 纯化从蛋白 A 柱收集的 Fc 组分,其中上样了 Fc 组分的该柱子用 10mM 乙酸盐缓冲液(pH 4.5) 中的 0.15-0.4M NaCl 线性梯度洗脱,从而提供了高纯度的 Fc 组分。用 12% SDS-PAGE 分析高纯度的 Fc 组分(图 2 中的泳道 2)。

[0097] <步骤 2>IFN $\alpha$ -PEG 复合物的制备

[0098] 将两端具有醛反应性基团的 3.4-kDa 聚乙二醇 ALD-PEG-ALD(Shearwater) 与以 5mg/ml 的量溶于 100mM 磷酸盐缓冲液中的人干扰素  $\alpha$ -2b(hIFN $\alpha$ -2b, MW:20kDa) 以 IFN $\alpha$ :PEG 摩尔比率 1:1、1:2.5、1:5、1:10 和 1:20 混合。向此混合物中加入终浓度 20mM 的还原剂氰基硼氢化钠(NaCNBH<sub>3</sub>, Sigma),并在温和搅拌下在 4°C 反应 3 小时,使 PEG 与干扰素  $\alpha$  的氨基末端连接。为了得到 PEG 和干扰素  $\alpha$  的 1:1 复合物,将反应混合物用 Superdex<sup>R</sup> 柱(Pharmacia) 进行大小排阻层析。用 10mM 磷酸钾缓冲液(pH 6.0) 作为洗脱液将 IFN $\alpha$ -PEG 复合物从柱上洗脱下来,而未与 PEG 连接的干扰素  $\alpha$ 、未反应的 PEG 以及 PEG 与两个干扰素  $\alpha$  分子连接的二聚体副产物则被去除。将纯化的 IFN $\alpha$ -PEG 复合物浓缩至 5mg/ml。通过此实验,发现具有最高反应性且产生最小量诸如二聚体等副产物的 IFN $\alpha$ :PEG 最佳反应摩尔比率是 1:2.5 至 1:5。

[0099] <步骤 3>IFN $\alpha$ -PEG-Fc 缀合物的制备

[0100] 为了将上述步骤 2 中纯化的 IFN $\alpha$ -PEG 复合物与免疫球蛋白 Fc 片段的 N 末端连接,将以上步骤 1 中制备的免疫球蛋白 Fc 片段(约 53kDa) 溶于 10mM 磷酸盐缓冲液中,并以 IFN $\alpha$ -PEG 复合物:Fc 的摩尔比率 1:1、1:2、1:4 和 1:8 与 IFN $\alpha$ -PEG 复合物

混合。在将反应溶液的磷酸盐缓冲液浓度调节到 100mM 之后,将还原剂 NaCNBH<sub>3</sub> 加入反应液中,终浓度 20mM,在温和搅拌下于 4°C 反应 20 小时。通过此实验,发现具有最高反应性且产生最少量的诸如二聚体等副产物的 IFN $\alpha$ -PEG 复合物:Fc 的最佳反应摩尔比率是 1:2。

[0101] <步骤 4>IFN $\alpha$ -PEG-Fc 缀合物的分离和纯化

[0102] 在以上步骤 3 的反应之后,对反应混合物进行 Superdex 大小排阻层析以去除未反应的物质和副产物,并纯化所产生的 IFN $\alpha$ -PEG-Fc 蛋白缀合物。将反应混合物浓缩并加到 Superdex 柱上之后,使 10mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.3) 以 2.5ml/分钟的流速通过柱子,以去除未结合的 Fc 和未反应的物质,随后进行柱子洗脱,收集 IFN $\alpha$ -PEG-Fc 蛋白质缀合物部分。由于所收集到的 IFN $\alpha$ -PEG-Fc 蛋白质缀合物级分包含小量的杂质、未反应的 Fc 和干扰素  $\alpha$  二聚体,进行阳离子交换层析以去除杂质。将 IFN $\alpha$ -PEG-Fc 蛋白质缀合物级分加到用 10mM 乙酸钠 (pH 4.5) 平衡的 PolyCAT LP 柱 (PolyLC) 上,并用 1M NaCl 在 10mM 乙酸钠缓冲液 (pH 4.5) 中的 0-0.5M NaCl 线性梯度洗脱柱子。最后,用阴离子交换柱纯化 IFN $\alpha$ -PEG-Fc 蛋白质缀合物。将 IFN $\alpha$ -PEG-Fc 蛋白质缀合物部分加到用 10mM Tris-HCl (pH 7.5) 平衡的 PolyWAX LP 柱 (PolyLC) 上,然后用 1M NaCl 在 10mM Tris-HCl (pH 7.5) 中的 0-0.3M NaCl 线性梯度洗脱柱子,从而分离高纯度形式的 IFN $\alpha$ -PEG-Fc 蛋白质缀合物。

[0103] 实施例 2:IFN $\alpha$ -PEG-Fc 蛋白质缀合物的制备 II

[0104] <步骤 1>Fc-PEG 复合物的制备

[0105] 将两端具有醛反应性基团的 3.4-kDa 聚乙二醇 ALD-PEG-ALD (Shearwater) 与以 15mg/ml 的量溶于 100mM 磷酸盐缓冲液中的实施例 1 步骤 1 中所制备的免疫球蛋白 Fc 片段按 Fc:PEG 摩尔比率 1:1、1:2.5、1:5、1:10 和 1:20 混合。在此混合物中加入终浓度 20mM 的还原剂氰基硼氢化钠 (NaCNBH<sub>3</sub>, Sigma),并在温和搅拌下使之于 4°C 反应 3 小时。为了得到 PEG 和 Fc 的 1:1 复合物,将反应混合物用 Superdex<sup>R</sup> 柱 (Pharmacia) 进行大小排阻层析。用 10mM 磷酸钾缓冲液 (pH 6.0) 作为洗脱液将 Fc-PEG 复合物从柱上洗脱下来,而未与 PEG 连接的免疫球蛋白 Fc 片段、未反应的 PEG 以及 PEG 与两个免疫球蛋白 Fc 片段分子连接的二聚体副产物则被去除。将纯化的 Fc-PEG 复合物浓缩至大约 15mg/ml。通过此实验,发现具有最高反应性且产生最小量诸如二聚体等副产物的 Fc:PEG 最佳反应摩尔比率是 1:3 至 1:10。

[0106] <步骤 2>Fc-PEG 复合体和干扰素  $\alpha$  的缀合物的形成和纯化

[0107] 为了将上述步骤 1 中纯化的 Fc-PEG 复合物与 IFN $\alpha$  的 N 末端连接,将 Fc-PEG 复合物与溶于 10mM 磷酸盐缓冲液的 IFN $\alpha$  以 Fc-PEG 复合物:IFN $\alpha$  的摩尔比率 1:1、1:1.5、1:3 和 1:6 混合。在将反应溶液中的磷酸盐缓冲液浓度调节到 100mM 之后,将还原剂 NaCNBH<sub>3</sub> 加入反应液中,终浓度 20mM,使之在温和搅拌下于 4°C 反应 20 小时。反应完成后,依照实施例 1 步骤 4 中同样的纯化方法将未反应的物质和副产物去除,从而分离高纯度形式的 Fc-PEG-IFN $\alpha$  蛋白质缀合物。

[0108] 实施例 3:hGH-PEG-Fc 缀合物的制备

[0109] 依照与实施例 1 相同的方法制备和纯化 hGH-PEG-Fc 缀合物,不同之处在于使用除干扰素  $\alpha$  之外的药物-人生长激素 (hGH, MW:22kDa),并且 hGH:PEG 的摩尔比率是 1:5。

[0110] 实施例 4:(G-CSF)-PEG-Fc 缀合物的制备



[0111] 依照与实施例 1 相同的方法制备和纯化 G-CSF-PEG-Fc 缀合物,不同之处在于使用干扰素  $\alpha$  之外的药物 - 人粒细胞集落刺激因子 (hG-CSF), 并且 hG-CSF : PEG 的摩尔比率是 1 : 5。

[0112] 另一方面,利用在天然 hG-CSF 的第 17 位氨基酸残基处具有丝氨酸取代的 G-CSF 衍生物  $^{17}\text{S-G-CSF}$ ,依照上述相同的方法制备和纯化  $^{17}\text{S-G-CSF-PEG-Fc}$  蛋白质缀合物。

[0113] 实施例 5 :EPO-PEG-Fc 缀合物的制备

[0114] 依照与实施例 1 相同的方法制备和纯化 EPO-PEG-Fc 缀合物,不同之处在于使用了干扰素  $\alpha$  之外的药物 - 人促红细胞生成素 (EPO), 并且 EPO : PEG 的摩尔比率是 1 : 5。

[0115] 实施例 6 :用具有不同反应性基团的 PEG 制备蛋白质缀合物

[0116] 用两端具有丙酸琥珀酰亚胺酯 (SPA) 反应性基团的 PEG 制备 IFN  $\alpha$  -PEG-Fc 蛋白质缀合物,步骤如下。将 3.4-kDa 聚乙二醇 SPA-PEG-SPA (Shearwater) 与溶于 100mM 磷酸盐缓冲液中的 10mg 干扰素  $\alpha$  以 IFN  $\alpha$  : PEG 摩尔比率 1 : 1、1 : 2.5、1 : 5、1 : 10 和 1 : 20 混合。然后使混合物在温和搅拌下于室温反应 2 小时。为了获得 PEG 和干扰素  $\alpha$  的 1 : 1 复合物 (IFN  $\alpha$  -PEG 复合物) (其中 PEG 选择性的与干扰素  $\alpha$  的赖氨酸残基的氨基连接),对反应混合物进行 Superdex 大小排阻层析。用 10mM 磷酸钾缓冲液 (pH 6.0) 作为洗脱缓冲液从柱上洗脱 IFN  $\alpha$  -PEG 复合物,未连接 PEG 的干扰素  $\alpha$ 、未反应的 PEG 以及其中两个干扰素  $\alpha$  分子与 PEG 两端连接的二聚体副产物被去除。为了将 IFN  $\alpha$  -PEG 复合物与免疫球蛋白 Fc 的赖氨酸残基的氨基连接,将纯化的 IFN  $\alpha$  -PEG 复合物浓缩至约 5mg/ml,并依照实施例 1 步骤 3 和 4 中相同的方法制备和纯化 IFN  $\alpha$  -PEG-Fc 缀合物。通过此实验,发现具有最高反应性且产生最少量诸如二聚体等副产物的最佳 IFN  $\alpha$  : PEG 反应摩尔比例是 1 : 2.5 至 1 : 5。

[0117] 另一方面,依照上述相同方法,利用在两端都具有 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 反应性基团的 PEG 即 NHS-PEG-NHS (Shearwater) 或两端都具有丁醛反应性基团的 PEG 即 BUA-PEG-BUA (Shearwater) 制备另一种 IFN  $\alpha$  -PEG-Fc 缀合物。

[0118] 实施例 7 :用具有不同分子量的 PEG 制备蛋白质缀合物

[0119] 用两端具有醛反应性基团的 10-kDa 聚乙二醇即 ALD-PEG-ALD (Shearwater) 制备 IFN  $\alpha$  -10K PEG 复合物。依照实施例 1 步骤 2 中相同的方法制备和纯化此复合物。通过此实验,发现具有最高反应性且产生最少量诸如二聚体等副产物的最佳 IFN  $\alpha$  : 10-kDa PEG 反应摩尔比率是 1 : 2.5 至 1 : 5。将纯化的 IFN  $\alpha$  -10K PEG 复合物浓缩至大约 5mg/ml,并用此浓度依照实施例 1 步骤 3 和 4 中相同的方法制备和纯化 IFN  $\alpha$  -10K PEG-Fc 缀合物。

[0120] 实施例 8 :Fab' -S-PEG-N-Fc 缀合物 (-SH 基团) 的制备

[0121] <步骤 1>Fab' 的表达和纯化

[0122] 将表达抗肿瘤坏死因子  $\alpha$  Fab' 的大肠杆菌转化株 BL21/poDLHF (保藏号 : KCCM-10511) 在 100ml LB 培养基中振荡培养过夜,接种于 5-L 的发酵罐 (Marubishi) 中,并在 30°C 以 500rpm 转数和 20vvm 空气流速进行培养。为了补充发酵期间细菌生长所需的不足营养物,根据细菌的发酵状态在培养物中补充葡萄糖和酵母提取物。当培养物达到  $\text{OD}_{600}$  值为 80-100 时,在培养物中加入诱导剂 IPTG 以诱导蛋白质的表达。将培养物进一步培养 40 到 45 小时,直至 600nm 的 OD 值提高到 120 至 140。将由此获得的发酵液以 20,000×g 离心 30 分钟。收集上清,弃沉淀。

[0123] 对上清液进行以下三步柱层析以纯化抗肿瘤坏死因子  $\alpha$  Fab'。将上清液加到用 20mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 平衡的 HiTrap 蛋白 G 柱 (5ml, Pharmacia) 上, 并用 100mM 甘氨酸 (pH 3.0) 洗脱柱子。然后将收集到的 Fab' 级分加到用 10mM 磷酸钠缓冲液 (PBS, pH 7.3) 平衡的 Superdex 200 柱 (Pharmacia) 上, 并用相同的缓冲液洗脱此柱子。最后, 将第二步的 Fab' 级分加到 polyCAT 21 $\times$ 250 柱 (PolyLC) 上, 并用 10mM 乙酸盐缓冲液 (pH 4.5) 中的 0.15-0.4M NaCl 线性梯度洗脱柱子, 从而提供高纯度的抗肿瘤坏死因子  $\alpha$  Fab' 级分。

[0124] <步骤 2>Fc-PEG 复合物的制备和纯化

[0125] 为了将 PEG 接头连接到免疫球蛋白 Fc 的 N-末端, 将依照实施例 1 步骤 1 中同一种方法制备的免疫球蛋白 Fc 溶于 100mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中, 终浓度 5mg/ml, 并以 Fc : PEG 摩尔比率 1 : 10 与 NHS-PEG-MAL (3.4kDa, Sheatwater) 混合, 随后在温和搅拌下于 4 $^{\circ}$ C 保温 12 小时。

[0126] 反应完成后, 用 20mM 磷酸钠缓冲液 (pH 6.0) 置换反应缓冲液, 以去除未结合的 NHS-PEG-MAL。然后, 将反应混合物加到 polyCAT 柱 (PolyLC) 上。用 20mM 磷酸钠缓冲液 (pH 6.0) 中的 0.15-0.5M 线性 NaCl 梯度洗脱柱子。在洗脱过程中, 免疫球蛋白 Fc-PEG 复合物早于未反应的免疫球蛋白 Fc 而洗脱下来, 而未反应的 Ig Fc 稍后被洗脱, 从而除去了未反应的 Ig Fc 分子。

[0127] <步骤 3>Fab' -S-PEG-N-Fc 缀合物 (-SH 基团) 的制备和纯化

[0128] 为了将免疫球蛋白 Fc-PEG 复合物连接至 Fab' 的半胱氨酸基团处, 将上述步骤 1 中纯化的 Fab' 以 2mg/ml 的浓度溶于 100mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.3) 中, 并与上述步骤 2 中制备的免疫球蛋白 Fc-PEG 复合物以 Fab' : 复合物摩尔比例 1 : 5 混合。将反应混合物浓缩至终浓度 50mg/ml, 并在温和搅拌下于 4 $^{\circ}$ C 保温 24 小时。

[0129] 反应完成后, 将反应混合物加到用 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.3) 平衡的 Superdex 200 柱 (Pharmacia) 上, 并用同样的缓冲液以 1ml/ 分钟的流速洗脱柱子。被偶联的 Fab' -S-PEG-N-Fc 缀合物由于其高分子量而相对较早地洗脱下来, 而未反应的免疫球蛋白 Fc-PEG 复合物和 Fab' 则在稍后被洗脱下来, 从而除去了未反应的分子。为了完全除去未反应的免疫球蛋白 Fc-PEG, 将收集的 Fab' -S-PEG-N-Fc 缀合物级分再加到 polyCAT 21 $\times$ 250 柱 (PolyLC) 上, 并用 20mM 磷酸钠缓冲液 (pH 6.0) 中的 0.15-0.5M 线性 NaCl 梯度洗脱柱子, 由此得到含有与接近 Fab' C 末端的 -SH 基团连接的 Fc-PEG 复合物的纯 Fab' -S-PEG-N-Fc 缀合物。

[0130] 实施例 9 : Fab' -N-PEG-N-Fc 缀合物 (N-末端) 的制备

[0131] <步骤 1>Fab' -PEG 复合物 (N-末端) 的制备和纯化

[0132] 将实施例 8 步骤 1 中纯化的 40mg Fab' 以 5mg/ml 的浓度溶于 100mM 磷酸钠缓冲液 (pH 6.0) 中, 以 Fab' : PEG 摩尔比率 1 : 5 与丁基 ALD-PEG-丁基 ALD (3.4kDa, Nektar) 混合。将还原剂 NaCNBH<sub>3</sub> 加到反应混合物中, 终浓度 20mM, 然后在温和搅拌下使反应混合物在 4 $^{\circ}$ C 反应 2 小时。

[0133] 在反应完成后, 用 20mM 磷酸钠缓冲液 (pH 6.0) 置换反应缓冲液。然后, 将反应混合物加到 polyCAT 柱 (PolyLC) 上。用 20mM 乙酸盐缓冲液 (pH 4.5) 中的 0.15-0.4M 线性 NaCl 梯度洗脱柱子。在柱洗脱过程中, 含有与 Fab' N 末端连接的 PEG 的 Fab' -PEG 复合物早于未反应的 Fab' 被洗脱下来, 而未反应的 Fab' 稍后被洗脱下来, 从而除去了未反应的

Fab' 分子。

[0134] <步骤 2>Fab'-N-PEG-N-Fc 缀合物的制备和纯化

[0135] 为了将以上步骤 1 中纯化的 Fab'-PEG 复合物与免疫球蛋白 Fc 的 N 末端连接,将 Fab'-PEG 复合物以 10mg/ml 的浓度溶于 100mM 磷酸钠缓冲液 (pH 6.0) 中,并与溶于相同缓冲液中的免疫球蛋白 Fc 以 Fab'-PEG 复合物:Fc 摩尔比率 1:5 混合。在反应混合物浓缩至蛋白质终浓度 50mg/ml 后,将还原剂 NaCNBH<sub>3</sub> 加入反应混合物中,终浓度为 20mM,然后在温和搅拌下使反应混合物在 4°C 反应 24 小时。

[0136] 反应完成后,将反应混合物加到用 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.3) 平衡的 Superdex 200 柱 (Pharmacia) 上,并用相同缓冲液以 1ml/分钟的流速洗脱柱子。被偶联的 Fab'-N-PEG-N-Fc 缀合物由于其高分子量而被相对较早地洗脱下来,而未反应的免疫球蛋白 Fc 和 Fab'-PEG 复合物则在稍后被洗脱下来,从而除去了未反应的分子。为了完全除去未反应的免疫球蛋白 Fc 分子,将收集的 Fab'-N-PEG-N-Fc 缀合物级分再加入到 polyCAT 21×250 柱 (PolyLC) 上,并用 20mM 磷酸钠缓冲液 (pH 6.0) 中的 0.15-0.5M 线性 NaCl 梯度洗脱柱子,由此得到含有与 Fab' N 末端连接的免疫球蛋白 Fc-PEG 复合物的纯 Fab'-N-PEG-N-Fc 缀合物。

[0137] 实施例 10:去糖基化免疫球蛋白 Fc 的制备和纯化

[0138] 将根据实施例 1 中的相同方法制备的 200mg 免疫球蛋白 Fc 以浓度 2mg/ml 溶于 100mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) 中,并与 300U/mg 去糖基化酶 PNGa8e F (NEB) 混合。使反应混合物在温和搅拌下于 37°C 反应 24 小时。然后,为了纯化去糖基化的免疫球蛋白 Fc,将反应混合物加到 SP Sepharose FF 柱 (Pharmacia) 上,然后用 1M NaCl 在 10mM 乙酸盐缓冲液 (pH 4.5) 中的 0.1-0.6M 线性 NaCl 梯度洗脱柱子。天然免疫球蛋白 Fc 较早地洗脱下来,而去糖基化免疫球蛋白 Fc (DG Fc) 则稍后被洗脱下来。

[0139] 实施例 11:IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc 缀合物的制备

[0140] 为了将实施例 10 中制备的去糖基化免疫球蛋白 Fc 与实施例 1 步骤 2 中纯化的 IFN $\alpha$ -PEG 复合物连接,将 IFN $\alpha$ -PEG 复合物与溶于 10mM 磷酸盐缓冲液中的 DG Fc 以 IFN $\alpha$ -PEG 复合物:DG Fc 摩尔比例 1:1、1:2、1:4 和 1:8 混合。在将反应溶液的磷酸盐缓冲液浓度调节到 100mM 后,将还原剂 NaCNBH<sub>3</sub> 以 20mM 的终浓度加到反应溶液中,并在温和搅拌下使其在 4°C 反应 20 小时。通过此实验,发现具有最高反应性且产生最少量诸如二聚体等副产物的最佳反应摩尔比例 IFN $\alpha$ -PEG 复合物:DG Fc 是 1:2。

[0141] 在偶联反应后,将反应混合物用 Superdex<sup>R</sup> 柱 (Pharmacia) 进行大小排阻层析,以去除未反应的物质和副产物,并纯化 IFN $\alpha$ -PEG-DGFc 蛋白质缀合物。在将反应混合物加到柱子上后,使磷酸盐缓冲液 (pH 7.3) 以 2.5ml/分钟的流速通过柱子,以去除未结合的 DG Fc 和未反应的物质,随后柱洗脱,以收集 IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc 蛋白质缀合物级分。由于所收集到的 IFN $\alpha$ -PEG-Fc 蛋白质缀合物级分包含小量的杂质、未反应的 DG Fc 和 IFN $\alpha$ -PEG 复合物,进行阳离子交换层析以去除杂质。将 IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc 蛋白质缀合物级分加到用 10mM 乙酸钠 (pH 4.5) 平衡的 PolyCAT LP 柱 (PolyLC) 上,并用 1M NaCl 在 10mM 乙酸钠缓冲液 (pH 4.5) 中的 0-0.6M NaCl 线性梯度洗脱柱子。最后,用阴离子交换柱纯化 IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc 蛋白质缀合物。将 IFN $\alpha$ -PEG-Fc 蛋白质缀合物级分加到用 10mM Tris-HCl (pH 7.5) 平衡的 PolyWAX LP 柱 (PolyLC) 上,然后用 1M NaCl 在 10mM Tris-HCl (pH 7.5) 中的 0-0.3M

NaCl 线性梯度洗脱柱子,从而分离高纯度形式的 IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc 蛋白质缀合物。

[0142] 实施例 12:重组非糖基化免疫球蛋白 Fc 衍生物的制备和纯化

[0143] <IgG4Fc 衍生物 1 表达载体的制备>

[0144] 为了制备人免疫球蛋白 IgG4 重链恒定区,先制备了在天然铰链区氨基末端具有 9 个氨基酸缺失的第一种衍生物 (IgG4 delta-Cys) 和由于铰链区所有 12 个氨基酸都被缺失而缺少铰链区的第二种衍生物 (IgG4 单体)。利用了本发明的发明者在本发明前研发的含大肠杆菌分泌序列的表达载体 pT14S1SH-4T20V22Q (Korean Pat. No. 38061)。

[0145] 为了得到人免疫球蛋白 IgG4 重链恒定区,用分离自人血液细胞的 RNA 作为模板进行 RT-PCR,步骤如下。首先,用 Qiamp RNA 血液试剂盒 (Qiagen) 从大约 6ml 血液中分离总 RNA,以此总 RNA 为模板用 One-Step RT-PCR 试剂盒 (Qiagen) 进行基因扩增。在此 PCR 中,使用了 SEQ ID Nos. 1 和 2 代表的一对合成引物以及 SEQ ID Nos. 2 和 3 代表的另一对合成引物。SEQ ID NO. 1 是起始自 IgG4 铰链区如下 12 个氨基酸残基中的第 10 个残基丝氨酸的核苷酸序列。SEQ ID NO. 3 被设计成编码以丙氨酸作为第一个氨基酸残基的 C<sub>H</sub>2 结构域的核苷酸序列。SEQ ID NO. 2 被设计成具有含终止密码的 BamHI 识别位点。

[0146] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

[0147] gag tcc aaa tat ggt ccc cca tgc cca tca tgc cca

[0148] ctc agg ttt ata cca ggg ggt acg ggt agt acg ggt

[0149] Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro

[0150] 为了将各个已扩增的 IgG4 恒定区片段克隆入含大肠杆菌分泌序列衍生物的表达载体中,利用了本发明的发明者在本发明之前研发的 pT14S1SH-4T20V22Q (Korean Pat. No. 38061)。此表达载体包含具有 SEQ ID NO. 4 所示核苷酸序列的热稳定性肠毒素分泌序列衍生物。为了便于克隆,用 SEQ ID Nos. 5 和 6 表示的一对引物,通过定性位诱变将 StuI 识别位点插入 pT14S1SH-4T20V22Q 质粒的大肠杆菌热稳定性肠毒素分泌序列衍生物的一端,以引发诱变,从而在编码分泌序列最后一个氨基酸残基的核苷酸序列处引入 StuI 位点。通过 DNA 测序发现成功插入了 StuI 位点。所产生的含 StuI 位点的 pT14S1SH-4T20V22Q 质粒被称为 pmSTIII。用 StuI 和 BamHI 处理 pmSTIII 质粒并进行琼脂糖凝胶电泳,纯化含大肠杆菌热稳定性肠毒素分泌序列衍生物的大片段 (4.7kb)。然后,用 BamHI 消化已扩增的基因片段,并与线性化的表达载体连接,由此产生了 pSTIIIdCG4Fc 和 pSTIIIG4Mo。

[0151] 将最终的表达载体单独转化入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,所产生的转化体被称为“BL21/pSTIIIdCG4Fc (HM10932)”和“BL21/pSTIIIdCG4Mo (HM10933)”,它们在 2004 年 9 月 15 日保藏于韩国微生物培养中心 (KCCM),指定的保藏号分别是 KCCM-10597 和 KCCM-10598。其后,当培养物达到 OD<sub>600</sub> 值为 80 时,将诱导剂 IPTG 加到培养物中以诱导蛋白质表达。将培养物进一步培养 40 到 45 小时,直至 600nm 的 OD 值增加到 100 至 120。破碎自发酵液收集的大肠杆菌细胞,对产生的细胞裂解物进行两步柱层析,以纯化存在于大肠杆菌胞质中的重组免疫球蛋白恒定区衍生物。

[0152] 用 PBS 平衡 5ml 蛋白-A 亲和柱 (Pharmacia),将细胞裂解物以 5ml/ 分钟的流速加到柱子上。未被结合的蛋白质用 PBS 洗出,而已结合的蛋白质则用 100mM 柠檬酸盐 (pH 3.0) 洗脱。对收集到的级分通过 HiPrep 26/10 脱盐柱 (Pharmacia) 用 10mM Tris 缓冲液 (pH8.0) 脱盐。然后,用 50ml Q HP 26/10 柱 (Pharmacia) 进行二次阴离子交换柱层析。

将初步纯化的重组非糖基化免疫球蛋白 Fc 级分加到 Q-Sepharose HP 26/10 柱上,用 10mM Tris 缓冲液 (pH 8.0) 中的 0-0.2M NaCl 线性梯度洗脱柱子,从而得到高纯度的重组非糖基化免疫球蛋白 Fc (AG Fc) 衍生物、IgG4 delta-Cys 和高纯度的 IgG4 单体级分。

[0153] 实施例 13 :IFN $\alpha$ -PEG 复合物和重组 AG Fc 衍生物的缀合物的制备

[0154] 依照与实施例 1 和 11 中相同的方法,将 IFN $\alpha$ -PEG 复合物与实施例 12 中作为 AG Fc 衍生物制备的 IgG4 delta-Cys 的 N 末端连接。偶联反应后,将未反应的物质和副产物从反应混合物中去除,由此产生的 IFN $\alpha$ -PEG-AG Fc 蛋白质缀合物 (I) 首先用 50ml Q HP 26/10 柱 (Pharmacia) 纯化,然后进一步用 polyCAT 21.5 $\times$ 250 柱 (polyLC) 通过高压液相层析试验进行纯化,由此高度纯化所述缀合物。用 10mM Tris 缓冲液 (pH 8.0) 通过 HiPrep 26/10 脱盐柱 (Pharmacia) 对偶联反应溶液进行脱盐。然后,将反应溶液以流速 8ml/分钟加到 50ml QHP 26/10 柱 (Pharmacia) 上,并用 0-0.2M 的线性 NaCl 梯度洗脱此柱子,以获得预期的级分。将收集到的级分以流速 15ml/分钟再加到用 10mM 乙酸盐缓冲液 (pH 5.2) 平衡的 polyCAT 21.5 $\times$ 250 柱上,用 0.1-0.3M 的线性 NaCl 梯度洗脱此柱子,由此提供高度纯化的级分。依照与上述相同的方法,用实施例 12 中制备的另一种 AG Fc 衍生物 IgG4 单体制备另一种 IFN $\alpha$ -PEG-AG Fc 蛋白质缀合物 (II)。

[0155] 实施例 14 :EPO-PEG-重组 AG Fc 衍生物缀合物的制备

[0156] 依照与实施例 13 中相同的方法,通过将 AG Fc 衍生物 IgG4delta-Cys 与 EPO-PEG 复合物连接而制备 EPO-PEG-重组 AG Fc 衍生物缀合物。

[0157] 比较实施例 1 :IFN $\alpha$ -40K PEG 复合物的制备

[0158] 将 5mg 干扰素  $\alpha$  溶于 100mM 磷酸盐缓冲液中,达到终体积 5ml,并与 40-kDa 活化的甲氧基-PEG-醛 (Shearwater) 混合,IFN $\alpha$  : 40-kDa PEG 的摩尔比例是 1 : 4。向此混合物中,加入终浓度 20mM 的还原剂 NaCNBH<sub>3</sub>,并在温和搅拌下使其在 4 $^{\circ}$ C 反应 18 小时。为了灭活不与 IFN $\alpha$  反应的 PEG,将乙醇胺以 50mM 的终浓度加到反应混合物中。

[0159] 用 Sephadex G-25 柱 (Pharmacia) 除去未反应的 PEG,并用另一种缓冲液置换厚缓冲液。首先,用两倍柱体积 (CV) 的 10mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5) 平衡此柱子,然后加反应混合物上样。通过用 UV 分光光度计测定 260nm 处的吸收值来检测流过液。当柱子用同一种缓冲液洗脱时,因在 N 末端加入 PEG 而被修饰具有较高分子量的干扰素  $\alpha$  较早被洗脱下来,而未反应的 PEG 则较晚被洗脱下来,从而可以只分离 IFN $\alpha$ -40K PEG。

[0160] 进行以下层析以进一步从收集的级分中纯化 IFN $\alpha$ -40K PEG 复合物。用 10mM Tris-HCl (pH 7.5) 平衡 3ml PolyWAX LP 柱 (PolyLC)。将收集到的含有 IFN $\alpha$ -40K PEG 复合物的级分以流速 1ml/分钟加样到柱子上,用 15ml 平衡缓冲液洗脱柱子。然后,用 30ml 1M NaCl 以 0-100% 的线性 NaCl 梯度洗脱柱子,由此顺序洗脱与三-、二-和单-PEG 缀合的干扰素  $\alpha$ 。为了进一步纯化单-PEG-缀合的干扰素  $\alpha$ ,对收集到的含有单-PEG-缀合干扰素  $\alpha$  的级分进行大小排阻层析。将级分浓缩并加样到用 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 平衡的 Superdex 200 柱 (Pharmacia) 上,用相同缓冲液以流速 1ml/分钟洗脱柱子。三和二-PEG-缀合的干扰素  $\alpha$  分子由于其早于单-PEG-缀合的干扰素  $\alpha$  被洗脱下来的特性而被去除,从而以高纯度形式分离出单-PEG-缀合的干扰素  $\alpha$ 。

[0161] 依照上述同一种方法,将 40-kDa PEG 与人生长激素、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 和 G-CSF 衍生物的 N 末端缀合,从而得到 hGH-40K PEG、G-CSF-40K PEG 和 40K

PEG-<sup>17</sup>S-G-CSF 衍生物复合物。

[0162] 比较实施例 2 :IFN $\alpha$ -PEG- 白蛋白缀合物的制备

[0163] 为了将实施例 1 步骤 2 中纯化的 IFN $\alpha$ -PEG 复合物与白蛋白的 N 末端连接, 将 IFN $\alpha$ -PEG 复合物与溶于 10mM 磷酸盐缓冲液中的人血清白蛋白 (HSA, 约 67kDa, Green Cross) 以 IFN $\alpha$ -PEG 复合物 : 白蛋白摩尔比例 1 : 1、1 : 2、1 : 4 和 1 : 8 混合。将反应溶液中的磷酸盐缓冲液浓度调节到 100mM 后, 将还原剂 NaCNBH<sub>3</sub> 以终浓度 20mM 加到反应液中, 并在温和搅拌下使其在 4℃ 反应 20 小时。通过此实验, 发现具有最高反应性且产生最少量诸如二聚体等副产物的最佳反应摩尔比例 IFN $\alpha$ -PEG 复合物 : 白蛋白是 1 : 2。

[0164] 在偶联反应后, 将反应混合物用 Superdex<sup>R</sup> 柱 (Pharmacia) 进行大小排阻层析, 以去除未反应的物质和副产物, 并纯化所产生的 IFN $\alpha$ -PEG- 白蛋白蛋白质缀合物。在将反应混合物浓缩并加样到柱子上后, 使 10mM 乙酸钠缓冲液以 2.5ml/ 分钟的流速通过柱子, 以去除未结合的白蛋白和未反应的物质, 随后进行柱洗脱, 以仅仅纯化 IFN $\alpha$ -PEG- 白蛋白蛋白质缀合物。由于所收集到的 IFN $\alpha$ -PEG- 白蛋白蛋白质缀合物级分包含小量的杂质、未反应的白蛋白和干扰素  $\alpha$  二聚体, 故进行阳离子交换层析以去除杂质。将 IFN $\alpha$ -PEG- 白蛋白蛋白质缀合物级分加样到用 10mM 乙酸钠 (pH 4.5) 平衡的 SP5PW 柱 (Waters) 上, 并用 1M NaCl 在 10mM 乙酸钠缓冲液 (pH 4.5) 中的 0-0.5M NaCl 线性梯度洗脱, 从而分离高纯度形式的 IFN $\alpha$ -PEG- 白蛋白蛋白质缀合物。

[0165] 依照上述同一种方法, 将白蛋白与人生长激素、G-CSF 和 G-CSF 衍生物缀合, 从而提供 hGH-PEG- 白蛋白、G-CSF-PEG- 白蛋白和 17S-G-CSF-PEG- 白蛋白缀合物。

[0166] 比较实施例 3 :Fab'-S-40K PEG 复合物的制备

[0167] 通过在活化缓冲液 (20mM 乙酸钠 (pH 4.0), 0.2mM DTT) 中保温 1 小时激活实施例 8 步骤 1 中纯化的 Fab' 的游离半胱氨酸残基。用 PEG 修饰缓冲液置换所述缓冲液后, 将 50mM 磷酸钾 (pH 6.5)、马来酰亚胺-PEG (MW :40kDa, Shearwater) 以 Fab' : 40-kDa PEG 摩尔比例 1 : 10 加到其中, 并在温和搅拌下在 4℃ 反应 24 小时。

[0168] 反应完成后, 将反应液加到用 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.3) 平衡的 Superdex 200 柱 (Pharmacia) 上, 用相同缓冲液以流速 1ml/ 分钟洗脱柱子。被 Fab' 缀合的 40-kDa PEG (Fab'-40K PEG) 由于其高分子量而相对较早地洗脱下来, 而未反应的 Fab' 则稍后洗脱下来, 从而去除了未反应的 Fab'。为了完全去除未反应的 Fab', 再次将收集到的 Fab'-40K PEG 复合物级分加样到 polyCAT 21 $\times$ 250 柱 (PolyLC) 上, 用 20mM 磷酸钠缓冲液 (pH 4.5) 中的 0.15-0.5M 线性 NaCl 梯度洗脱此柱, 从而提供了含有与 Fab' 的 -SH 基团连接的 40-kDa PEG 的纯 Fab'-S-40K PEG 复合物。

[0169] 实验实施例 1 :蛋白质缀合物的鉴定和定量分析

[0170] <1-1> 蛋白质缀合物的鉴定

[0171] 用 4-20% 梯度凝胶和 12% 凝胶以及 ELISA (R&D System) 通过非还原性 SDS-PAGE 分析上述实施例中制备的蛋白质缀合物。

[0172] SDS-PAGE 分析的结果如图 3 中所示, 其中生理学多肽、非肽聚合物、PEG 和免疫球蛋白 Fc 片段的偶联反应导致成功形成了 IFN $\alpha$ -PEG-Fc 缀合物 (A)、<sup>17</sup>Ser-G-CSF-PEG-Fc 缀合物 (B) 和 EPO-PEG-Fc 缀合物 (C)。

[0173] 此外, 用非还原性 12% SDS-PAGE 分析实施例 10 中制备的 DG Fc。如图 6b 中所示,

在与缺乏糖基部分的天然 Fc 的分子量相应的位置处检测到了 DG Fc 条带。

[0174] <1-2> 蛋白质缀合物的定量分析

[0175] 用 HiLoad 26/60Superdex 75 柱 (Pharmacia) 通过大小排阻层析对以上实施例中制备的蛋白质缀合物进行定量,其中以 10mM 磷酸钾缓冲液 (pH 6.0) 作为洗脱缓冲液,并将其中各蛋白质缀合物的峰面积与对照组的峰面积相比较。将先前已定量分析的标准品、IFN $\alpha$ 、hGH、G-CSF、<sup>17</sup>S-G-CSF、EPO 和 Fc 单独进行大小排阻层析,测定浓度和峰之间的转换因子。对预定量的各蛋白质缀合物进行相同大小排阻层析。通过从由此获得的峰面积中减去相应于免疫球蛋白 Fc 片段的峰面积,测定存在于各蛋白质缀合物中的生理学活性蛋白质的数量值。图 4 显示了已纯化的 IFN $\alpha$ -PEG-Fc 缀合物的大小排阻层析结果,其中观察到了单一的峰。此结果表明,已纯化的蛋白质缀合物不包含诸如二聚体、三聚体和更高数量单体等多聚体杂质。

[0176] 当用特异于生理学活性多肽的抗体对与 Fc 缀合的生理学活性多肽进行定量分析时,抗体与多肽的结合被阻止,导致了数值低于由层析计算的真实值。以 IFN $\alpha$ -PEG-Fc 缀合物为例,ELISA 中得到的 ELISA 数值相当于真实值的大约 30%。

[0177] <1-3> 蛋白质缀合物的纯度和质量分析

[0178] 对以上实施例中制备的蛋白质缀合物进行大小排阻层析,并检测 280nm 处的吸收值。结果显示,IFN $\alpha$ -PEG-Fc、hGH-PEG-Fc、G-CSF-PEG-Fc 和 <sup>17</sup>Ser-G-CSF-PEG-Fc 缀合物在 70 至 80-kDa 大小的物质保持时间处显示出单一峰。

[0179] 另一方面,进行反相 HPLC,以确定实施例 1、11 和 13 中制备的蛋白质缀合物 IFN $\alpha$ -PEG-Fc、IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc 和 IFN $\alpha$ -PEG-重组 AG Fc 衍生物的纯度。利用了反相柱 (259VHP54 柱, Vydac)。利用配制于 0.5% TFA 中的 40-100% 乙腈梯度洗脱柱子,通过检测 280nm 处的吸收值分析纯度。结果如图 8 所示,样品中不含有未结合的干扰素或免疫球蛋白 Fc,且发现所有蛋白质缀合物 IFN $\alpha$ -PEG-Fc (A)、IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc (B) 和 IFN $\alpha$ -PEG-重组 AG Fc 衍生物 (C) 的纯度都高于 96%。

[0180] 为了确定已纯化蛋白质缀合物的准确分子量,用高通量 MALDI-TOF 质谱仪 (Voyager DE-STR, Applied Biosystems) 分析各个缀合物的质量。用芥子酸作为基质。将 0.5  $\mu$ l 各待测样品包被在样品载玻片上并空气干燥,再与等体积的基质溶液混合并空气干燥,放入离子源中。用线性模式 TOF 分析仪以阳性方式进行检测。离子用通过延迟提取 (delayed extraction, DE) 操作的分裂提取源加速,在总加速电压约 2.5kV 处采用 750 纳秒至 1500 纳秒的延迟提取时间。

[0181] 由 MALDI-TOF 质谱仪观察到的各实施例中制备的 Fc 蛋白质缀合物的分子量如下表 1 中所示。图 5 显示了 EPO-PEG-Fc 缀合物的 MALDI-TOF 质谱分析结果,而图 7 显示了 IFN $\alpha$ -PEG-Fc 和 IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc 缀合物的 MALDI-TOF 质谱分析结果。结果发现, EPO-PEG-Fc 蛋白质缀合物纯度高于 95%,且分子量非常接近理论分子量。此外,发现 EPO 与免疫球蛋白 Fc 片段以 1 : 1 的比例偶联。

[0182] 表 1

[0183]

	理论 MW (kDa)	测定 MW (kDa)
IFN $\alpha$ -PEG-Fc (E. 1)	75.4	75.9
hGH-PEG-Fc (E. 3)	78.4	78.6
G-CSF-PEG-Fc (E. 4)	75.3	75.9
<sup>17</sup> S-G-CSF 衍生物 -PEG-Fc (E. 4)	75.0	75.9
EPO-PEG-Fc (E. 5)	91.4	91.0

[0184] 此外,当用 MALDI-TOF 质谱仪测定实施例 10 中制备的 Fc 和 DG Fc 的分子量时,发现 DG Fc 是 50kDa,这比天然 Fc 小大约 3-kDa(图 6a)。由于这 3-kDa 分子量相应于糖基部分的理论大小,该结果证实了糖基部分完全被去除了。

[0185] 下表 2 显示了实施例 11 中制备的 IFN  $\alpha$  -PEG-DG Fc 缀合物和实施例 13 中所制备的 IFN  $\alpha$  -PEG- 重组 AG Fc 衍生物缀合物 (I 和 II) 的 MALDI-TOF 质谱分析结果。发现 IFN  $\alpha$  -PEG-DG Fc 缀合物比 IFN  $\alpha$  -PEG-Fc 缀合物的 75.9kDa 小 3kDa,而 IFN  $\alpha$  -PEG- 重组 AG Fc 衍生物缀合物 (I) 比 IFN  $\alpha$  -PEG-Fc 缀合物的 75.9kDa 小大约 3-4kDa。与 Fc 单体偶联的 IFN  $\alpha$  -PEG- 重组 AG Fc 衍生物缀合物 (II) 显示出分子量降低了 24.5kDa,这相应于 Fc 单体的分子量。

[0186] 表 2

[0187]

	理论 MW (kDa)	测定 MW (kDa)
IFN $\alpha$ -PEG-DGFc (E. 11)	72.8	73.0
IFN $\alpha$ -PEG- 重组 AGFc 衍生物 (I) (E. 13)	72.3	72.2
IFN $\alpha$ -PEG- 重组 AGFc 衍生物 (II) (E. 13)	46.8	46.6

[0188] 实验实施例 2 :药物代谢动力学分析 I

[0189] 评估天然形式的生理学活性蛋白质 (对照) 以及实施例和比较实施例中制备的蛋白质缀合物 -40K PEG 复合物、-PEG- 白蛋白缀合物、-PEG-Fc 缀合物、-PEG-DG Fc 缀合物和 -PEG- 重组 AG Fc 衍生物缀合物在 SD 大鼠 (每组 5 只大鼠) 中的血清稳定性和药物代谢动力学参数。以 100  $\mu$ g/kg 的剂量单独皮下注射对照以及 -40K PEG 复合物、-PEG- 白蛋白缀合物、-PEG-Fc 缀合物、-PEG-DG Fc 缀合物和 -PEG- 重组 AG Fc 衍生物缀合物 (试验组)。皮下注射后,在 0.5、1、2、4、6、12、24、30、48、72 和 96 小时收集对照组的血样,在 1、6、12、24、30、48、72、96、120、240 和 288 小时收集试验组的血样。血样收集在装有抗凝剂肝素



的试管中,用 Eppendorf 高速小型离心机离心 5 分钟以去除血细胞。用特异于所述生理学活性蛋白质的抗体通过 ELISA 检测血清蛋白质水平。

[0190] 天然形式的 IFN $\alpha$ 、hGH、G-CSF 和 EPO 以及它们的 -40K PEG 复合物、它们的 -PEG- 白蛋白缀合物、它们的 -PEG-Fc 缀合物以及它们的 -PEG-DG Fc 缀合物的药物代谢动力学分析结果如下表 3 至 7 中所示。在以下的表中,  $T_{\max}$  表示达到最大药物血清浓度所需的时间,  $T_{1/2}$  指药物的血清半寿期, 而 MRT (平均停留时间) 指药物分子在身体中停留的平均时间。

[0191] 表 3

[0192] 干扰素  $\alpha$  的药物代谢动力学

[0193]

	天然 IFN $\alpha$	IFN $\alpha$ -40 KPEG (C. E. 1)	IFN $\alpha$ -PE G- 白蛋 白 (C. E. 2)	IFN $\alpha$ -PE G-Fc (E. 1)	IFN $\alpha$ -PEG - DGFc (E. 11)	IFN $\alpha$ -PEG- 重组 AGFc 衍生物 (I) (E. 13)	IFN $\alpha$ -PEG- 重 组 AGFc 衍生 物 (II) (E. 13)
$T_{\max}$ (小时)	1.0	30	12	30	48	24	24
$T_{1/2}$ (小时)	1.7	35.8	17.1	90.4	71.0	61.2	31.2
MRT (小时)	2.1	71.5	32.5	150.1	120.6	111.0	58.8

[0194] 表 4

[0195] 人生长因子的药物代谢动力学

[0196]

	天然 hGH	hGH-40K PEG (C. E. 1)	hGH-PEG- 白蛋白 (C. E. 2)	hGH-PEG-Fc (E. 3)
$T_{\max}$ (小时)	1.0	12	12	12
$T_{1/2}$ (小时)	1.1	7.7	5.9	11.8
MRT (小时)	2.1	18.2	13.0	18.8

[0197] 表 5

[0198] G-CSF 的药物代谢动力学

[0199]

	天然 G-CSF	G-CSF-40K PEG (C. E. 1)	G-CSF-PEG- 白蛋白 (C. E. 2)	G-CSF-PEG-Fc (E. 4)
T <sub>max</sub> (小时)	2.0	12	12	12
T <sub>1/2</sub> (小时)	2.8	4.8	5.2	6.9
MRT (小时)	5.2	24.5	25.0	32.6

[0200] 表 6

[0201] <sup>17</sup>S-G-CSF 衍生物的药物代谢动力学

[0202]

	天然 <sup>17</sup> S-G-CSF 衍生物	<sup>17</sup> S-G-CSF-40K PEG (C. E. 1)	<sup>17</sup> S-G-CSF-PEG- 白蛋白 (C. E. 2)	<sup>17</sup> S-G-CSF -PEG-Fc (E. 4)
T <sub>max</sub> (小时)	2.0	24	24	24
T <sub>1/2</sub> (小时)	2.9	4.3	6.4	7.0
MRT (小时)	5.8	24.4	25.1	33.2

[0203] 表 7

[0204] EPO 的药物代谢动力学

[0205]

	天然 EPO	高度糖基化的 EPO	EPO-PEG-Fc (E. 5)	EPO-PEG- 重组 AG Fc 衍生物 (E. 13)
T <sub>max</sub> (小时)	6.0	12	30	48
T <sub>1/2</sub> (小时)	9.4	18.4	61.5	87.9
MRT (小时)	21.7	26.8	117.6	141.6

[0206] 如表 3 的数据和图 9 的药物代谢动力学曲线所示, IFN $\alpha$ -PEG-Fc 蛋白质缀合物的血清半寿期是 90.4 小时, 这比天然 IFN $\alpha$  高大约 50 倍, 而比较实施例 1 中制备的 IFN $\alpha$ -40K PEG 的 35.8 小时半寿期高大约 2.5 倍。此外, 发现本发明的 IFN $\alpha$ -PEG-Fc 蛋白质缀合物在血清半寿期上优于 IFN $\alpha$ -PEG- 白蛋白, 后者的半寿期为 17.1 小时。

[0207] 另一方面, 如表 3 和图 11 中所示, IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc 缀合物的血清半寿期为 71.0 小时, 这几乎与 IFN $\alpha$ -PEG-Fc 缀合物相同, 表明 Fc 的去糖基化确实极大影响了 IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc 缀合物的体内稳定性。此外, 发现用通过重组方法产生的重组 AG Fc 衍生物制备的缀合物具有与天然形式衍生的 DG Fc 相同的效应。不过, 与 Fc 单体偶联的复合物的血清半寿期大约是与正常 Fc 二聚体偶联的复合物的血清半寿期的一半。

[0208] 如表 4 中所示, 人生长激素在依照本发明与 IgG Fc 片段缀合时也显示出了血清半寿期延长。也就是说, 与天然形式 (1.1 小时) 相比, hGH-40K PEG 复合物和 hGH-PEG- 白蛋白缀合物的半寿期稍微延长, 分别为 7.7 小时和 5.9 小时, 而本发明的 hGH-PEG-Fc 蛋白质缀合物则显示出半寿期明显延长至 11.8 小时。

[0209] 正如从表 5 和 6 中有关 G-CSF 和其衍生物的药物代谢动力学数据中显而易见的, G-CSF-PEG-Fc 和 <sup>17</sup>S-G-CSF-PEG-Fc 缀合物呈现出比 -40K PEG 复合物和 -PEG- 白蛋白缀合物长得多的血清半寿期。发现免疫球蛋白 Fc 片段在血清中延长了天然形式的生理学活性蛋白质的作用持续时间, 而它们的具有某些氨基酸残基改变的衍生物也呈现出与天然形式相似水平的这种特性。从这些结果中可很容易的预计本发明的方法会对其它蛋白质及其它们的衍生物具有类似的影响。

[0210] 如表 7 和图 10 中所示, 天然糖基化 EPO 与 Fc 片段的缀合也导致了血清半寿期的延长。也就是说, EPO 在天然形式时, 血清半寿期为 9.4 小时, 当为了提高血清稳定性而将其高度糖基化时, 其血清半寿期延长至 18.4 小时。EPO-PEG-Fc 缀合物 (包含依照本发明与免疫球蛋白 Fc 片段偶联的 EPO) 显示出血清半寿期显著延长至 61.5 小时。此外, 当与大肠杆菌来源的重组非糖基化 (AG)Fc 衍生物缀合时, EPO 的血清半寿期则延长至 87.9 小时, 表明 Fc 片段的非糖基化使得蛋白质缀合物的制备不影响无抗体功能的蛋白质的血清稳定性。

[0211] 正如从以上结果中显而易见的, 依照本发明通过非肽聚合物与免疫球蛋白 Fc 片段共价键合的蛋白质缀合物呈现出血清半寿期比其天然形式的血清半寿期延长了数倍至数十倍。此外, 当免疫球蛋白 Fc 由于在大肠杆菌中产生而非糖基化形式或由于通过酶处理而去糖基化时, 它的延长其蛋白质缀合物的血清半寿期的效果保持在相似水平。

[0212] 特别是, 与为了延长蛋白质在血清中的持续作用时间而用 PEG 分子中具有最长持续作用时间的 40-kDa PEG 修饰的蛋白质相比, 免疫球蛋白 Fc 蛋白质缀合物具有更为优越

的血清稳定性。此外,与偶联了白蛋白而非免疫球蛋白 Fc 的蛋白质缀合物相比,本发明的蛋白质缀合物呈现出极高的血清稳定性,表明本发明的蛋白质缀合物在研发长效形式的蛋白质药物中是有效的。这些结果,即与常规 PEG- 或白蛋白- 缀合蛋白质相比,本发明的蛋白质缀合物对包括点突变的集落刺激因子衍生物在内的多种蛋白质的血清稳定性以及 MRT 具有极好的影响,表明本发明缀合物的稳定性提高和持续时间延长的效果可适用于其它的生理学活性多肽。

[0213] 另一方面,当用如上所述的相同方法评估利用非肽聚合物 10-kDa PEG 制备的 IFN $\alpha$ -10K PEG-Fc 蛋白质缀合物(实施例 7)的血清半寿期时,显示出其血清半寿期为 48.8 小时,这稍微短于用 3.4-kDa PEG 制备的蛋白质缀合物的血清半寿期(79.7 小时)。

[0214] 此外,蛋白质缀合物的血清半寿期随着非肽聚合物 PEG 的分子量的增加而降低。这些结果表明,提高蛋白质缀合物的血清稳定性并延长其持续时间的主要因素是被缀合的免疫球蛋白 Fc 片段,而不是非肽聚合物。

[0215] 即使当 PEG 的反应性基团被除醛基外的反应性基团置换时,含 PEG 的蛋白质缀合物仍然显示了与偶联了具有醛反应性基团的 PEG 的那些缀合物相似模式的表观分子量和血清半寿期。

[0216] 实验实施例 3:药物代谢动力学分析 II

[0217] 为了测定实施例 8 和 9 中制备的 Fab' -S-PEG-N-Fc 和 Fab' -N-PEG-N-Fc 缀合物以及比较实施例 3 中制备的 Fab' -S-40KPEG 复合物的血清半寿期,依照实验实施例 2 中相同的方法以 Fab' 作为对照进行了缀合物和复合物的药物代谢动力学分析。结果如图 12 中所示。

[0218] 如图 12 中所示, Fab' -S-PEG-N-Fc 和 Fab' -N-PEG-N-Fc 缀合物呈现出血清半寿期与 Fab' 或 Fab' -S-40K PEG 复合物相比延长了两或三倍。

[0219] 实验实施例 4:蛋白质缀合物细胞内活性的评估

[0220] <4-1>IFN $\alpha$  蛋白质缀合物细胞内活性的比较

[0221] 为了比较 IFN $\alpha$  蛋白质缀合物的细胞内活性,用感染了疱疹性口腔炎病毒的 Madin Darby 牛肾 (MDBK) 细胞 (ATCC CCL-22) 通过细胞培养物生物测定法评估 IFN $\alpha$ -PEG-Fc(实施例 1)、IFN $\alpha$ -PEG-DG Fc(实施例 11)、IFN $\alpha$ -PEG-重组 AG Fc 衍生物(实施例 13)、IFN $\alpha$ -40K PEG(比较实施例 1)和 IFN $\alpha$ -PEG-白蛋白(比较实施例 2)的抗病毒活性。以可获自生物学标准品和对照国家研究院 (NIBSC) 的未 PEG 化干扰素  $\alpha$ -2b 作为标准物质。

[0222] 在补充了 10% FBS 和 1% 青霉素 / 链霉素的 MEM(最低基本培养基, JBI) 中于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$  的条件下培养 MDBK 细胞。用培养基将待分析样品和标准物质稀释至预定浓度,将 100- $\mu$ l 等分试样加入 96 孔板的各孔中。分离所培养的细胞,将其加入以 100  $\mu$ l 的体积含有样品的平板中,在 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO $_2$  的条件下培养约 1 小时。然后,将 5-7 $\times$ 10 $^3$ PFU 的疱疹性口腔炎病毒 (VSV) 50  $\mu$ l 加入平板的各孔中,细胞在 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$  的条件下进一步培养大约 16-20 小时。将不含样品或标准物质而只包含病毒的孔用作阴性对照,而只含有细胞的孔则用作阳性对照。

[0223] 去除培养基后,将 100  $\mu$ l 中性红溶液加入平板中对存活的细胞染色,随后在 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$  的条件下保温 2 小时。去除上清液后,将 100  $\mu$ l 100% 乙醇和 1% 乙酸的 1 : 1

混合物加入平板的每个孔中。充分混合以溶解自被染色细胞洗脱的所有中性红结晶后,检测 540nm 的吸收值。将阴性对照用作空白,计算  $ED_{50}$  值(造成 50% 细胞生长抑制的剂量),其中阳性对照的细胞生长被设定为 100%。

[0224] 表 8

[0225]

	浓度 (ng/ml)	比活 (IU/mg)	相对于天然 IFN $\alpha$ 的相对活 性 (%)
天然 IFN $\alpha$	100	4.24E+08	100
IFN $\alpha$ -40KPEG	100	2.04E+07	4.8
IFN $\alpha$ -PEG-白蛋白	100	2.21E+07	5.2
IFN $\alpha$ -PEG-Fc	100	1.19E+08	28.1
IFN $\alpha$ -PEG-DGFc	100	1.09E+08	25.7
IFN $\alpha$ -PEG-重组 AGFc 衍生物	100	9.58E+07	22.6

[0226] 如表 8 中所示, IFN  $\alpha$ -40K PEG 活性降低至天然 IFN  $\alpha$  的 4.8%。尤其是,当 PEG 部分的大小增加时,蛋白质缀合物具有提高的血清稳定性,但活性逐渐降低。据报道,干扰素  $\alpha$  在用 12-kDa PEG 修饰时具有 25% 的体外活性,而当用 40-kDa PEG 修饰时则具有大约 7% 的活性 (P. Bailon 等, Bioconjugate Chem. 12:195-202, 2001)。也就是说,由于随着 PEG 部分分子量的增加,蛋白质缀合物的半寿期变长,但生物学活性急速降低,所以需要研发具有较长半寿期和较强活性的蛋白质缀合物。此外, IFN  $\alpha$ -PEG-白蛋白缀合物展示了弱的活性,与天然 IFN  $\alpha$  相比大约为 5.2%。相反,本发明的 IFN  $\alpha$ -PEG-Fc 和 IFN  $\alpha$ -PEG-DGFc 缀合物呈现了显著提高的相对活性,与天然 IFN  $\alpha$  相比大约为 28.1% 和 25.7%。此外, IFN  $\alpha$  与重组 AGFc 衍生物的缀合导致了活性的相似提高。从这些结果预计,与免疫球蛋白 Fc 片段缀合的干扰素  $\alpha$  具有显著延长的血清半寿期和极大提高的体内药效。

[0227] <4-2> 人生长激素蛋白质缀合物细胞内活性的比较

[0228] 为了比较人生长激素蛋白质缀合物的细胞内活性,比较了 hGH-PEG-Fc、hGH-40K PEG 和 hGH-PEG-白蛋白的细胞内活性。

[0229] 用大鼠结节淋巴瘤细胞系 Nb2(欧洲细胞培养物保藏中心 (ECACC) #97041101) 通过体外试验检测 hGH 缀合物的细胞内活性,所说细胞系显示了人生长激素依赖型有丝分裂。

[0230] 将 Nb2 细胞培养于补充了 10% FBS(胎牛血清)、0.075%  $NaCO_3$ 、0.05mM 2-巯基乙醇和 2mM 谷氨酰胺的 Fisher's 培养基中,并进一步在不含 10% FBS 的相似培养基中培养 24 小时。然后,对所培养的细胞进行计数,将大约  $2 \times 10^4$  个细胞的等分试样加至 96 孔板的各孔中。将 hGH-PEG-Fc、hGH-40K PEG、hGH-PEG-白蛋白、可获自生物学标准品和对照国家

研究院 (NIBSC) 作为对照的标准品和天然人生长激素 (HM-hGH) 稀释, 并以多种浓度加入各孔中, 随后在 37°C 5% CO<sub>2</sub> 的条件下保温 48 小时。之后, 为了通过测定各孔中的细胞数目来检测细胞增殖活性, 将 25 μl Cell Titer 96Aqueous One Solution Reagent (Promega) 加入各孔中, 将细胞进一步培养 4 小时。检测 490nm 处的吸收值, 计算各样品的效价。结果如下表 9 中所示。

[0231] 表 9

[0232]

	浓度 (ng/ml)	比活* (U/mg)	对天然 HM-hGH 的相对活性 (%)
天然 hGH	100	2.71E+06	100
hGH (可获自 NIBSC 的标准)	100	2.58E+06	95.2
hGH-40K PEG	100	0.206E+06	7.6
hGH-PEG-白蛋白	100	0.141E+06	5.2
hGH-PEG-Fc	100	0.76E+06	28.1
<b>比活* = 1/ED<sub>50</sub> × 10<sup>6</sup> (ED<sub>50</sub>: 达到最大细胞生长的 50% 所需的蛋白质量)</b>			

[0233] 如表 9 中所示, 同样以人生长激素为例, 与 40-kDa PEG 的缀合 (hGH-40K PEG) 导致了活性降低至大约为天然形式的 7.6%, 而 hGH-PEG-白蛋白缀合物显示出大约为天然 hGH 的 5.2% 的低体外活性。不过, 本发明的 hGH-PEG-Fc 缀合物显著提高了相对活性, 达到天然 hGH 的 28% 以上。从这些结果预计, 与免疫球蛋白 Fc 片段连接的人生长激素具有显著延长的血清半寿期和极大提高的体内药效。此外, 我们认为本发明免疫球蛋白 Fc 蛋白质缀合物活性的提高是由于血清稳定性的提高, 而与受体的结合亲和力的保留则归因于免疫球蛋白 Fc 或非肽聚合物形成的空间。这些效果预计可适用于与其它生理学活性蛋白质偶联的免疫球蛋白 Fc 蛋白质缀合物。

[0234] <4-3>G-CSF 蛋白质缀合物的细胞内活性比较

[0235] 为了比较具有 G-CSF 衍生物的蛋白质缀合物的细胞内活性, 比较了天然 G-CSF (Filgrastim, Jeil Pharm. Co., Ltd.)、<sup>17</sup>Ser-G-CSF 衍生物、20K PEG-G-CSF (Neulasta)、40K PEG-17S-G-CSF、<sup>17</sup>Ser-G-CSF-PEG-白蛋白和 <sup>17</sup>S-G-CSF-PEG-Fc 的细胞内活性。

[0236] 首先, 将人骨髓细胞系 HL-60 (ATCC CCL-240, 前髓细胞性白血病患者 / 36 岁白种女性) 培养于补充了 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中。将培养的细胞以大约 2.2 × 10<sup>5</sup> 个细胞 / ml 的密度悬浮, 并在其中加入 DMSO (二甲亚砜, 培养级, Sigma) 至终浓度 1.25% (v/v)。然后, 将 90 μl 细胞悬浮液接种于 96 孔板 (Corning/ 低蒸发 96 孔板) 的各孔中, 从而密度大约为每孔 2 × 10<sup>4</sup> 个细胞, 在 37°C 含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养大约 72 小时。

[0237] 将蛋白质浓度用 G-CSF ELISA 试剂盒 (R&D systems) 测定过的各样品用 RPMI 1640 稀释至同一浓度 10 μg/ml, 再进一步用 RPMI 1640 稀释 19 次, 每次稀释 2 倍。将连续的两倍稀释液 10 μl 独立加到含 HL-60 细胞的各孔中, 从而各样品浓度起始为 1 μg/ml。然

后,将细胞在 37℃培养箱培养 72 小时。

[0238] 用 Cell Titer 96™(Cat.NO.G4100, Promega) 检测 HL-60 细胞的增殖,通过测量 670nm 的吸收值确定增加的细胞数。

[0239] 表 10

[0240]

	ED <sub>50</sub> (IU/mg)	对天然 G-CSF 的相对活性(%)
天然 G-CSF	0.30	100
<sup>17</sup> Ser-G-CSF	0.26	115
G-CSF-20KPEG (Neulasta)	1.20	25
<sup>17</sup> Ser-G-CSF-40KPEG	10.0	< 10.0
<sup>17</sup> Ser-G-CSF-PEG-白蛋白	1.30	23.0
<sup>17</sup> Ser-G-CSF-PEG-Fc	0.58	51.7

[0241] 如表 10 中所示,与具有氨基酸取代的 G-CSF 衍生物 <sup>17</sup>Ser-G-CSF 的免疫球蛋白 Fc 蛋白质缀合物同样呈现出了与天然 G-CSF-偶联蛋白质缀合物相似的效果。先前报道了 <sup>17</sup>Ser-G-CSF-PEG 与未 PEG 化的 <sup>17</sup>Ser-G-CSF(韩国专利公开文件 2004-83268) 相比具有相对较长的血清半寿期,但活性有所降低。尤其是,当 PEG 部分的大小增大时,蛋白质缀合物的血清稳定性增加,但活性逐渐降低。<sup>17</sup>Ser-G-CSF-40KPEG 显示出非常低的活性,与天然形式相比低于大约 10%。也就是说,由于蛋白质缀合物随着 PEG 部分的分子量增加而具有较长的血清半寿期但活性急速降低,所以需要研发一种具有长血清半寿期和强活性的蛋白质缀合物。<sup>17</sup>Ser-G-CSF-PEG-白蛋白也显示出与天然 G-CSF 相比大约为其 23% 的低活性。相反,<sup>17</sup>Ser-G-CSF-PEG-Fc 则大大提高了相对活性,其相对活性大于天然 G-CSF 的 51%。从这些结果中,预计与免疫球蛋白 Fc 片段连接的 <sup>17</sup>Ser-G-CSF 具有显著增加的血清半寿期,且极大提高了其体内药效。

[0242] <4-4>Fab' 缀合物的细胞毒性中和测定

[0243] 用实施例 8 和实施例 9 中制备的 Fab' -S-PEG-N-Fc 和 Fab' -N-PEG-N-Fc 缀合物以及比较实施例 3 中制备的 Fab' -S-40KPEG 复合物进行体外活性测定。通过基于测量 TNF α - 介导的细胞毒性的细胞毒性测定,评估 Fab' 缀合物以确定其是否在小鼠成纤维细胞系 L929(ATCC CRL-2148) 中中和了 TNF α - 诱导的凋亡。

[0244] 按两倍系列稀释 Fab' -S-PEG-N-Fc 和 Fab' -N-PEG-N-Fc 缀合物以及 Fab' -S-40KPEG 复合物,将 100-μl 等分溶液加到 96 孔板的孔中。将 rhTNF-α (R&D systems) 和放线菌素 D(Sigma) 作为 RNA 合成抑制剂分别以终浓度 10ng/ml 和 1 μg/ml 加入各孔中,在 37℃含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中保温 30 分钟,再转移到微量滴定板上供检测。将

L929 细胞以  $5 \times 10^4$  个细胞 /  $50 \mu\text{l}$  培养基的密度加入各孔中并在  $37^\circ\text{C}$  含  $5\% \text{CO}_2$  的培养箱中培养 24 小时。去除培养基后,将以  $5\text{mg/ml}$  浓度溶于 PBS 中的  $50 \mu\text{l}$  MTT(Sigma) 加入各孔中,细胞进一步在  $37^\circ\text{C}$  含  $5\% \text{CO}_2$  的培养箱中培养大约 4 小时。将  $150 \mu\text{l}$  DMSO 加入各孔中,通过测定  $540\text{nm}$  的吸收值确定细胞毒性中和的程度。作为对照,使用了实施例 8 步骤 1 中纯化的 Fab'。

[0245] 如图 13 中所示,所有用于此试验的蛋白质缀合物都具有与 Fab' 相似的效价。这些结果表明,当将免疫球蛋白 Fc 通过 PEG 连接至 Fab' 的 N 末端或 C 末端附近的游离半胱氨酸来制备蛋白质缀合物时, Fab' 呈现出显著增高的血清半寿期和高体内活性。

[0246] <4-5> 补体依赖型细胞毒性 (CDC) 测定

[0247] 为了确定在大肠杆菌转化体表达并纯化的实施例中制备的衍生物和相应于免疫球蛋白恒定区的蛋白质是否结合人 C1q,进行了如下的酶联免疫吸附测定 (ELISA)。在试验组中,使用了 HM10932 和 HM10927 转化体产生的免疫球蛋白恒定区以及以上实施例中制备的衍生物,所说的两个转化体于 2004 年 9 月 15 日保藏于韩国微生物保存中心 (KCCM),保藏号为 KCCM-10597、KCCM-10588。作为标准参照,使用了糖基化的免疫球蛋白 (IVIG- 球蛋白 S, Green Cross PBM) 和数种作为治疗抗体的商品化抗体。试验和标准样品以浓度  $1 \mu\text{g/ml}$  配制于  $10\text{mM}$  碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 中。样品以每孔  $200\text{ng}$  的量等分至 96 孔板 (Nunc) 中,并将平板在  $4^\circ\text{C}$  包被过夜。然后,将各孔用 PBS-T ( $137\text{mM}$  NaCl,  $2\text{mM}$  KCl,  $10\text{mM}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $2\text{mM}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0.05\%$  Tween 20) 漂洗三次,用  $250 \mu\text{l}$  封闭缓冲液 (溶于 PBS-T 中的  $1\%$  牛血清白蛋白) 室温封闭 1 小时,再用同样的 PBS-T 漂洗三次。将标准和试验样品在 PBS-T 中稀释至预定浓度,并添加到抗体包被的孔中,将平板在室温保温 1 小时,并用 PBS-T 洗三次。之后,将  $2 \mu\text{g/ml}$  C1q (R&D Systems) 加入平板中,并于室温反应 2 小时,然后将平板用 PBS-T 洗 6 次。将  $200 \mu\text{l}$   $1:1000$  稀释于封闭缓冲液中的人抗人 C1q 抗体-过氧化物酶缀合物 (Biogenesis, USA) 加入各孔中,并于室温反应 1 小时。用 PBS-T 将各孔漂洗三次后,混合等体积的显色试剂 A 和 B (显色剂 A:稳定的过氧化物和显色剂 B:稳定的色素原; DY 999, R&D Systems), 将  $200 \mu\text{l}$  混合物加到各孔中,随后保温 30 分钟。然后,在各孔中加入  $50 \mu\text{l}$  反应终止液,  $2\text{M}$  硫酸。用微量滴定板读数仪 (Molecular Device) 对平板读数。在波长  $450\text{nm}$  处测量标准和试验样品的吸收值,结果分别参见图 14 和 15。

[0248] 在相互比较免疫球蛋白亚型之间其免疫球蛋白 Fc 片段中的补体活性时,发现人免疫球蛋白 IgG1 (Fitzgerald) 具有最高的 C1q 结合亲和力,其次是 IgG2 (Fitzgerald), 然后是 IgG4 (Fitzgerald), 表明在亚型之间补体活性存在差异。此试验中所用的 IVIG 是 IgG 亚型的合并物,由于 IgG1 占了 IVIG 的大部分,所以 IVIG 呈现出与纯化的 IgG1 近乎相同的 C1q 结合亲和力。与这些标准相比,在由于去糖基化而造成的 C1q 结合亲和力的改变方面,具有最强的补体活性的 IgG1 Fc 在非糖基化时此活性显著降低。IgG4 Fc, 已知不会诱发补体的活化,它对 C1q 几乎没有结合亲和力,表明 IgG4 Fc 可被用作无补体活性的极好重组载体 (图 14)。

[0249] 为了确定载体是否在即使与生理学活性肽缀合后仍保持了对 C1q 没有结合亲和力的特性,用糖基化的 Fc、酶促去糖基化的 Fc 和非糖基化重组 Fc 作为  $\text{IFN}\alpha$  的载体制备  $\text{IFN}\alpha$ -Fc 缀合物,并评估其对 C1q 的结合亲和力。发现偶联了糖基化 Fc 的  $\text{IFN}\alpha$  缀合物 ( $\text{IFN}\alpha$ -PEG-Fc:糖基化 IgG1Fc) 保持了对 C1q 的高结合亲和力。相反,当将干扰



素  $\alpha$  与用 PNGase F 和其他酶去糖基化的 Fc 偶联时,所产生的缀合物 (IFN  $\alpha$ -PEG-DGFc : 去糖基化 IgG1Fc) 展示了明显降低的 C1q 结合亲和力,这与大肠杆菌来源的非糖基化 Fc 缀合物类似。此外,当以 IgG4 部分替换偶联了非糖基化 IgG1 Fc 的干扰素  $\alpha$  缀合物 (IFN  $\alpha$ -PEG-AGFcG1 : 非糖基化 IgG1Fc) 的 IgG1 部分时,发现所产生的干扰素缀合物 (IFN  $\alpha$ -PEG-FcG4 衍生物 1 : 非糖基化 IgG4Fc) 完全丧失了其与 C1q 的结合亲和力。当 IgG1Fc 部分被 IgG4Fc 单体替换时,所产生的缀合物 (IFN  $\alpha$ -PEG-FcG4 衍生物 2 : 非糖基化 IgG4Fc)。这些结果显示这样的 IgG4Fc 片段形式可用作不具有抗体片段效应器功能的极好载体 (图 15)。

#### [0250] 工业适用性

[0251] 如上文所描述的,本发明的药物缀合物极大的延长了多肽药物的血浆半寿期,其水平高于任何常规修饰的蛋白质。另一方面,所述蛋白质缀合物克服了常规长效制剂最显著的缺陷,即药物效价降低,从而使血液循环时间和体内活性超过了原先已知最有效的白蛋白。此外,所述蛋白质缀合物没有诱发免疫应答的风险。由于这些优势,该蛋白质缀合物可用于开发蛋白质药物的长效制剂。依照本发明的蛋白质药物长效制剂能减少患者频繁注射的痛苦,在较长时间内保持活性多肽的血清浓度,从而使药效稳定。

[0252] 此外,本发明制备蛋白质缀合物的方法克服了遗传操作生产融合蛋白质的缺点,包括表达体系难以建立、糖基化作用不同于天然形式、诱发免疫应答和蛋白质融合的方位有限、由于非特异性反应造成的低产率以及用作粘合剂的化合物的毒性等化学偶联的问题,从而可以方便且经济的提供血清半寿期延长并具有高活性的蛋白质药物。

[0253] 国际承认用于专利程序目的的微生物保藏布达佩斯条约

[0254] INTERNATIONAL FORM

[0255]

To. Kyung-yoon Min  
 Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd.  
 893-3, Hajeo-ri, Paltan-myeon, Hwaseong-si,  
 Gyeonggi-do, Korea

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
 issued pursuant to Rule 7.1 by the  
 INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
 identified at the bottom of this page

<b>I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</b>	
Identification reference given by the DEPOSITOR : HM10927	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM-10588
<b>II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION</b>	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
<b>III. RECEIPT AND ACCEPTANCE</b>	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on Sep. 15. 2004. (date of the original deposit) <sup>1</sup>	
<b>IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY</b>	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms  Address : 361-221, Yurim B/D Hongje-1-dong, Seodaemun-gu SEOUL 120-091 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s)  Date: Sep. 21. 2004.

<sup>1</sup> Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired; where a deposit made outside the Budapest Treaty after the acquisition of the status of international depository authority is converted into a deposit under the Budapest Treaty, such date is the date on which the microorganism was received by the international depository authority.

Form HP/4

Sole page


[0256] 国际承认用于专利程序目的的微生物保藏布达佩斯条约

[0257] INTERNATIONAL FORM

[0258]

To. Kyung-yoon Min  
 Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd.  
 893-3, Hajeo-ri, Paltan-myeon, Hwaseong-si,  
 Gyeonggi-do, Korea

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
 issued pursuant to Rule 7.1 by the  
 INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
 identified at the bottom of this page

<b>I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</b>	
Identification reference given by the DEPOSITOR : HM10932	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM-10597
<b>II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION</b>	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
<b>III. RECEIPT AND ACCEPTANCE</b>	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on Sep. 15. 2004. (date of the original deposit) <sup>1</sup>	
<b>IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY</b>	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms  Address : 361-221, Yurim B/D Hongje-1-dong, Seodaemun-gu SEOUL 120-091 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):  Date: Sep. 21. 2004 

<sup>1</sup> Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of International Depository authority was acquired; where a deposit made outside the Budapest Treaty after the acquisition of the status of international depository authority is converted into a deposit under the Budapest Treaty, such date is the date on which the microorganism was received by the international depository authority.

Form BP/4

Sole page


[0259] 国际承认用于专利程序目的的微生物保藏布达佩斯条约

[0260] INTERNATIONAL FORM

[0261]

To: Kyung-yoon Min  
 Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd.  
 883-3, Hajeo-ri, Paltan-myeon, Hwaseong-si,  
 Gyeonggi-do, Korea

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
 issued pursuant to Rule 7.1 by the  
 INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
 identified at the bottom of this page

<b>I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</b>	
Identification reference given by the DEPOSITOR : HM10933	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM-10598
<b>II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION</b>	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
<b>III. RECEIPT AND ACCEPTANCE</b>	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on Sep. 15. 2004. (date of the original deposit) <sup>1</sup>	
<b>IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY</b>	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms  Address : 361-221, Yurim B/D Hongje-1-dong, Seodaemun-gu SEOUL 120-091 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s)  Date: Sep. 21. 2004 

<sup>1</sup> Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired; where a deposit made outside the Budapest Treaty after the acquisition of the status of international depository authority is converted into a deposit under the Budapest Treaty, such date is the date on which the microorganism was received by the international depository authority.

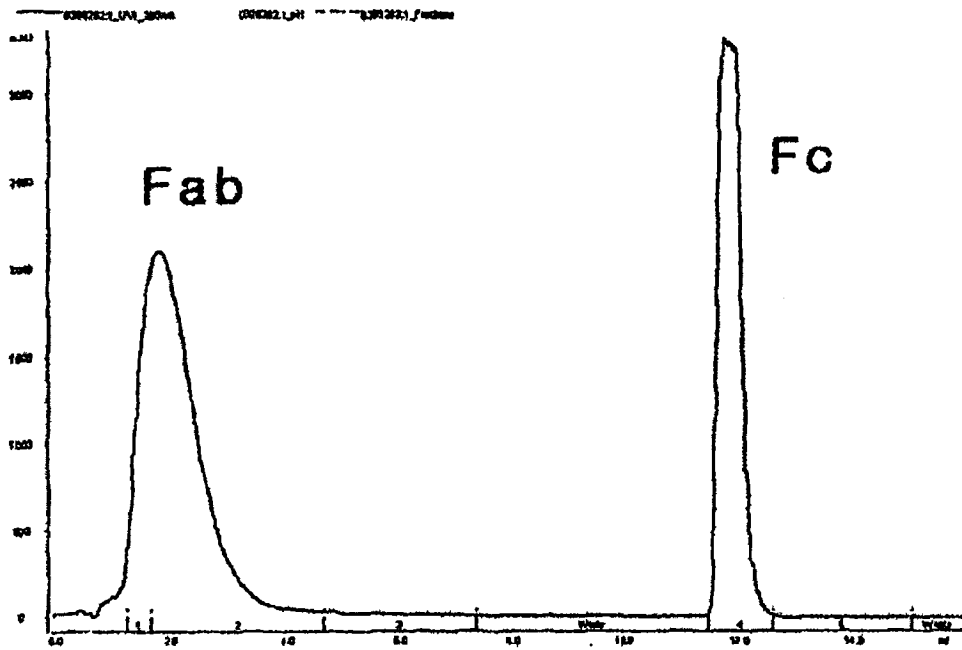
Form BP/4

Sole page

- [0262] 序列表  
 [0263] <110>Hanmi Pharm. Co., Ltd.  
 [0264] <120> 利用免疫球蛋白片段的蛋白质复合物及其制备方法  
 [0265] <150>KR10-2003-0080299  
 [0266] <151>2003-11-13  
 [0267] <160>6  
 [0268] <170>Kopatentln 1.71  
 [0269] <210>1  
 [0270] <211>35

[0271]	<212>DNA	
[0272]	<213> 人工序列	
[0273]	<220>	
[0274]	<223> 引物	
[0275]	<400>1	
[0276]	cgtcatgccc agcacctgag ttcctggggg gacca	35
[0277]	<210>2	
[0278]	<211>42	
[0279]	<212>DNA	
[0280]	<213> 人工序列	
[0281]	<220>	
[0282]	<223> 引物	
[0283]	<400>2	
[0284]	gggggatcct cattacca gagacagga gaggctcttc tg	42
[0285]	<210>3	
[0286]	<211>29	
[0287]	<212>DNA	
[0288]	<213> 人工序列	
[0289]	<220>	
[0290]	<223> 引物	
[0291]	<400>3	
[0292]	cggcacctga gttcctgggg ggaccatca	29
[0293]	<210>4	
[0294]	<211>69	
[0295]	<212>DNA	
[0296]	<213> 人 (Homo sapiens)	
[0297]	<400>4	
[0298]	atgaaaaga caatgcatt tcttcttgca tctatgtteg tttttctat tgctacaaat	60
[0299]	gcccaggcg	69
[0300]	<210>5	
[0301]	<211>45	
[0302]	<212>DNA	
[0303]	<213> 人工序列	
[0304]	<220>	
[0305]	<223> 引物	
[0306]	<400>5	
[0307]	tctattgcta caaatgceca ggcettceca accattecct tatec	45
[0308]	<210>6	
[0309]	<211>45	

- 
- [0310] <212>DNA
- [0311] <213> 人工序列
- [0312] <220>
- [0313] <223> 引物
- [0314] <400>6
- [0315] agataacgat gtttacgggt ccggaagggt tggttaaggga atagg 45

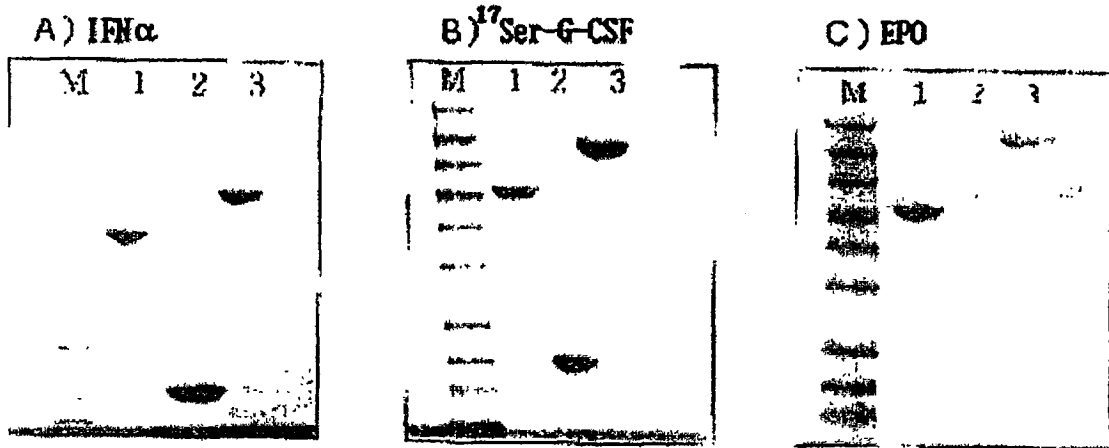


蛋白A (分步pH洗脱)

图 1



图 2



M: 分子量标志  
泳道1: Fc  
泳道2: 生理学活性蛋白  
泳道3: 生理学活性蛋白-PEG-Fc缀合物

图 3

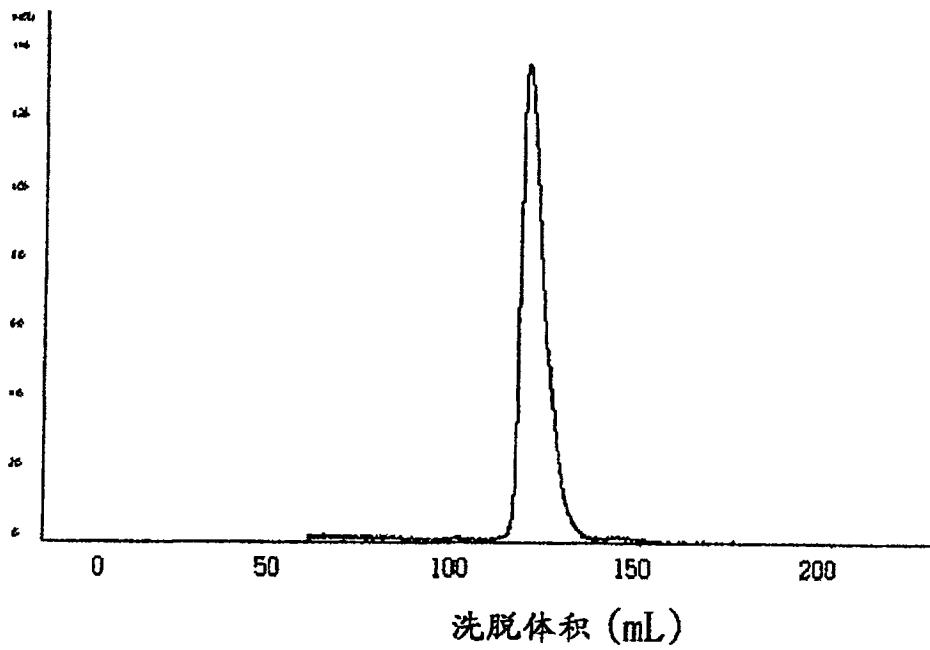


图 4



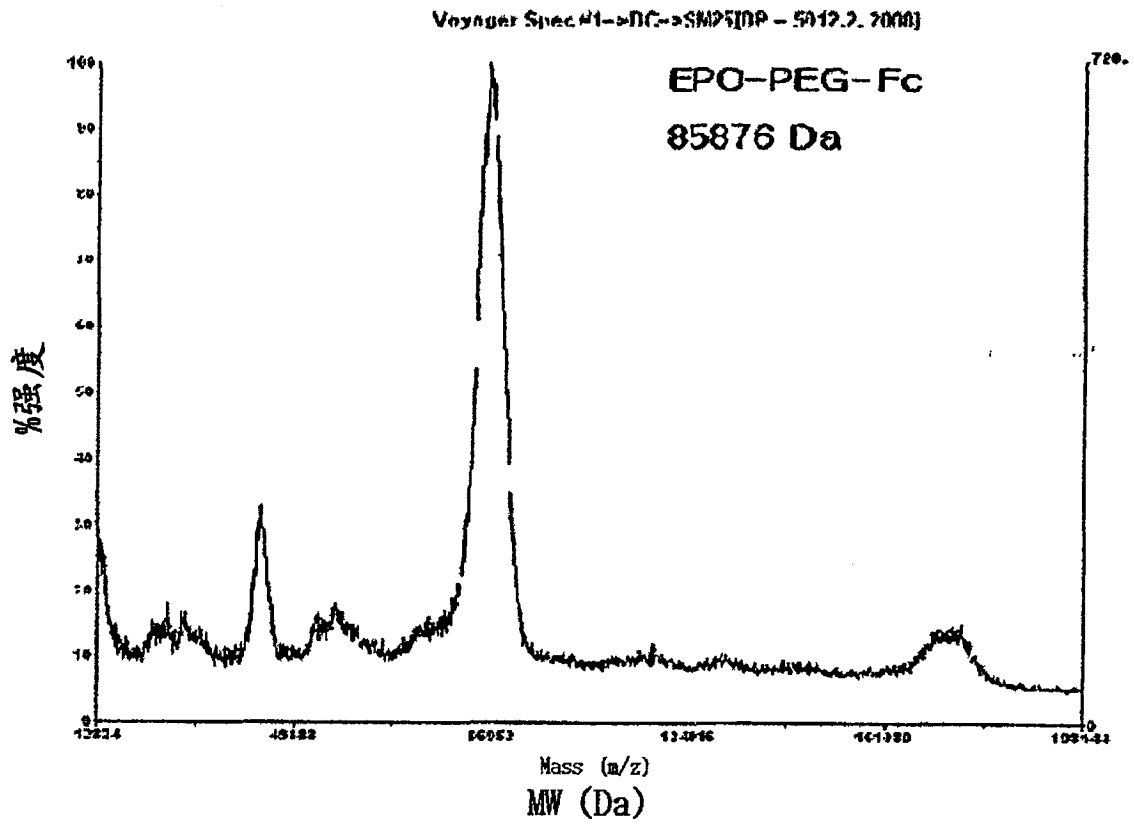


图 5

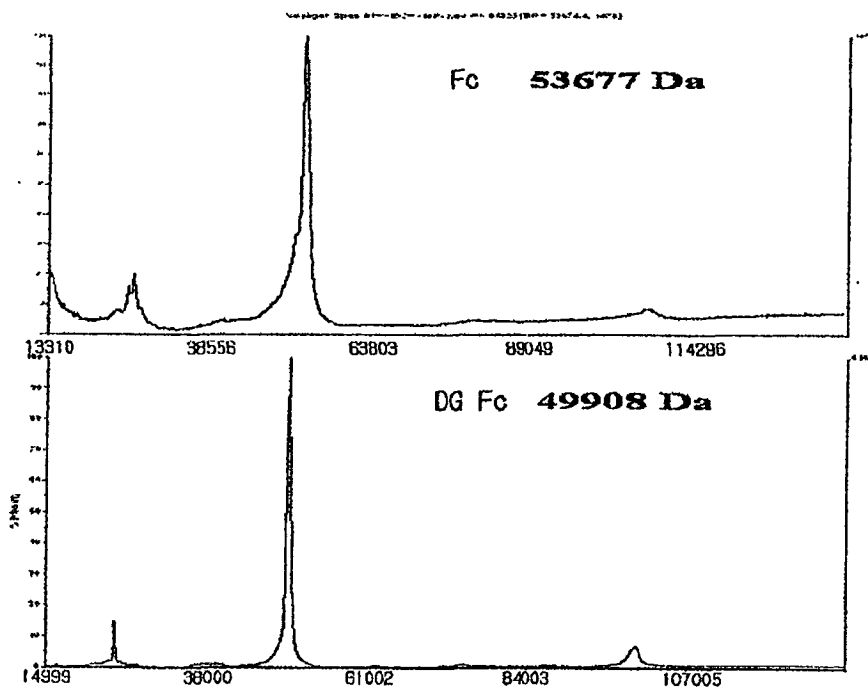


图 6a

**M Fc DG Fc**

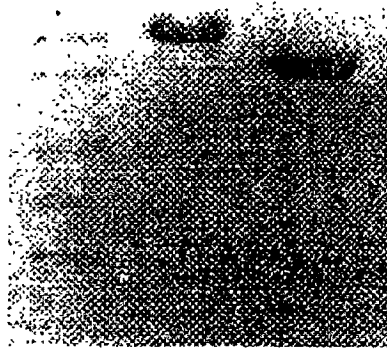


图 6b

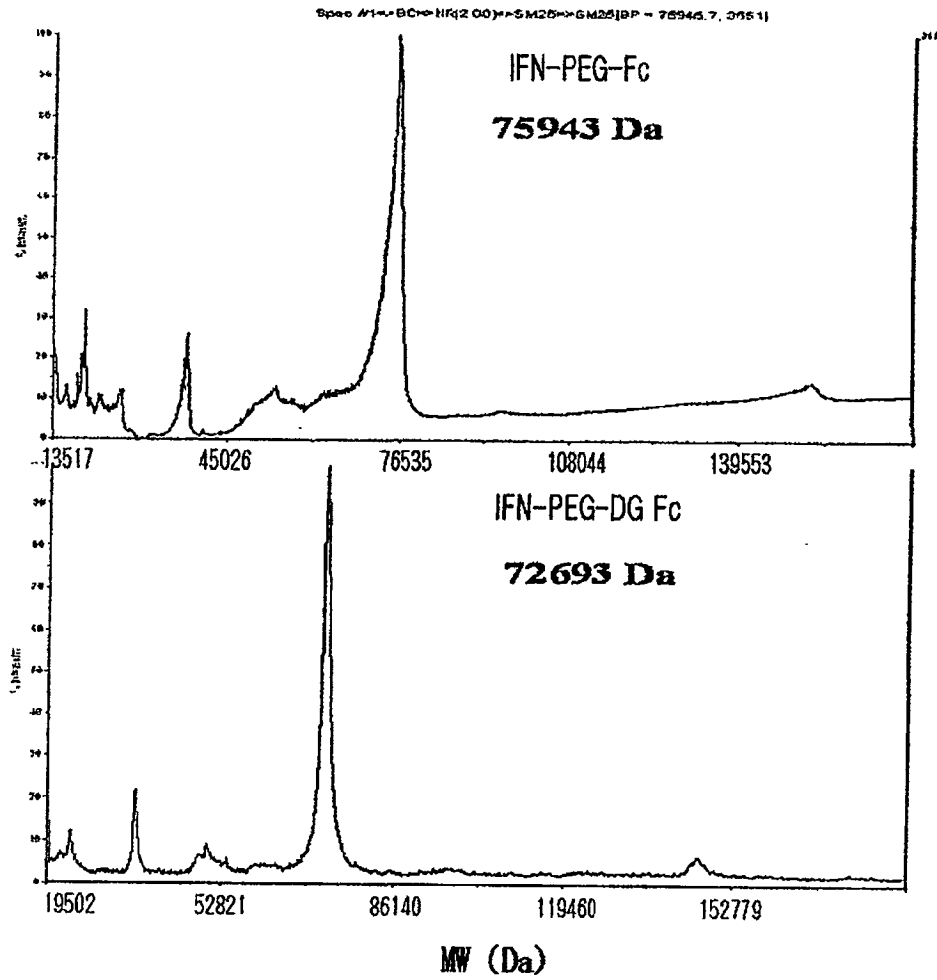
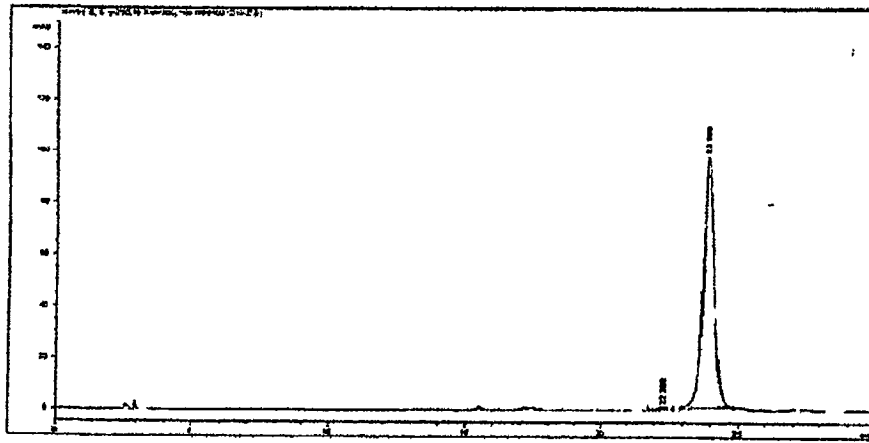
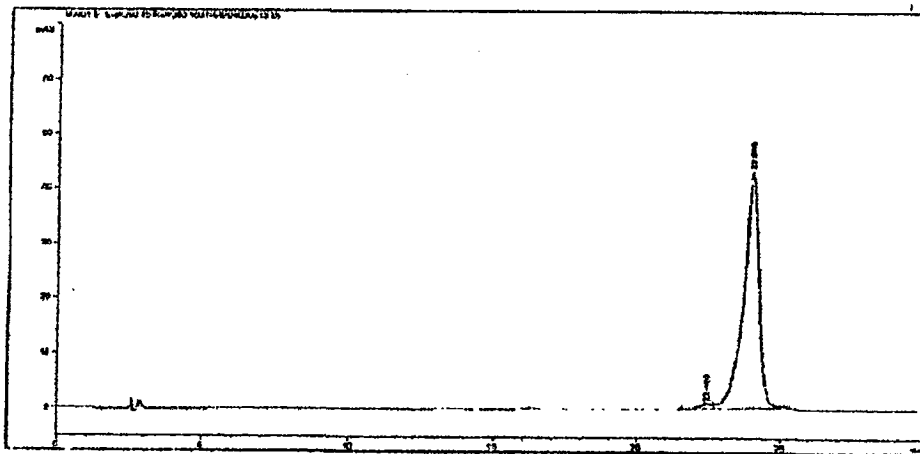


图 7



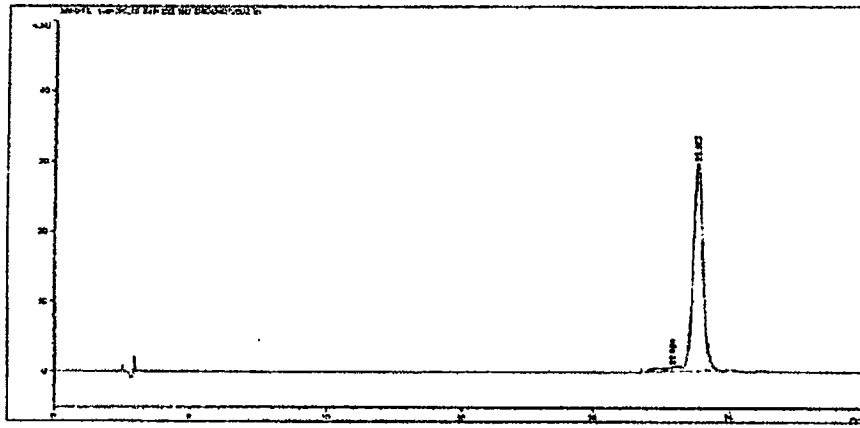
时间 (分钟)

图 8a



时间 (分钟)

图 8b



时间 (分钟)

图 8c

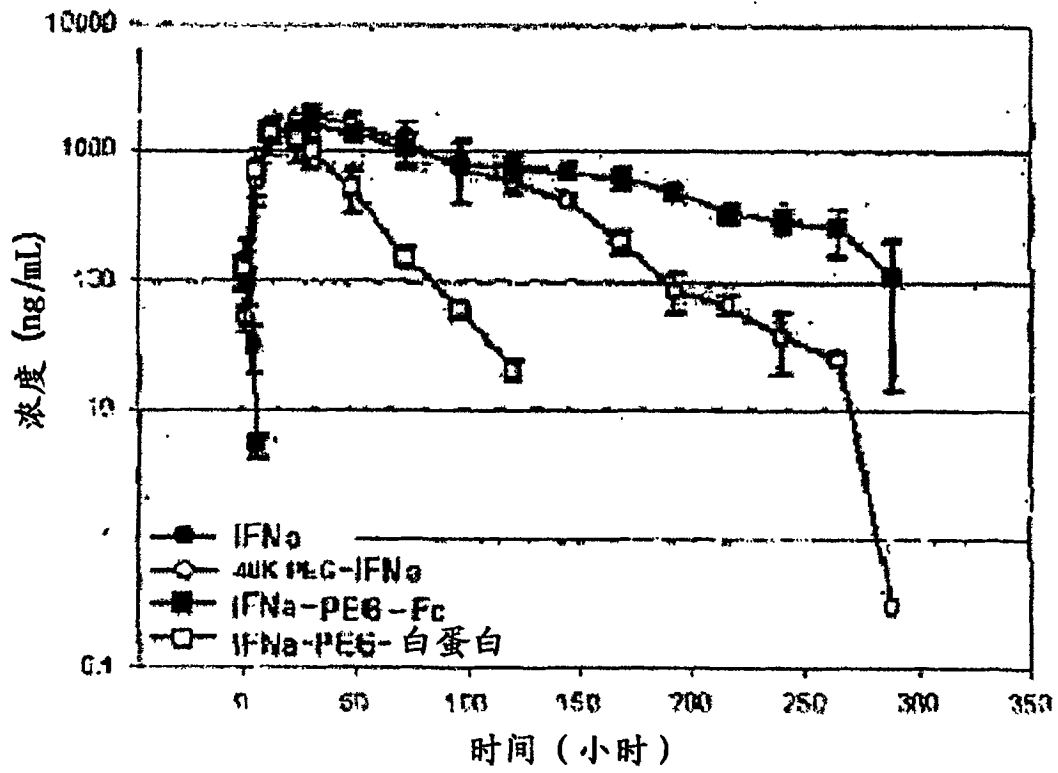


图 9

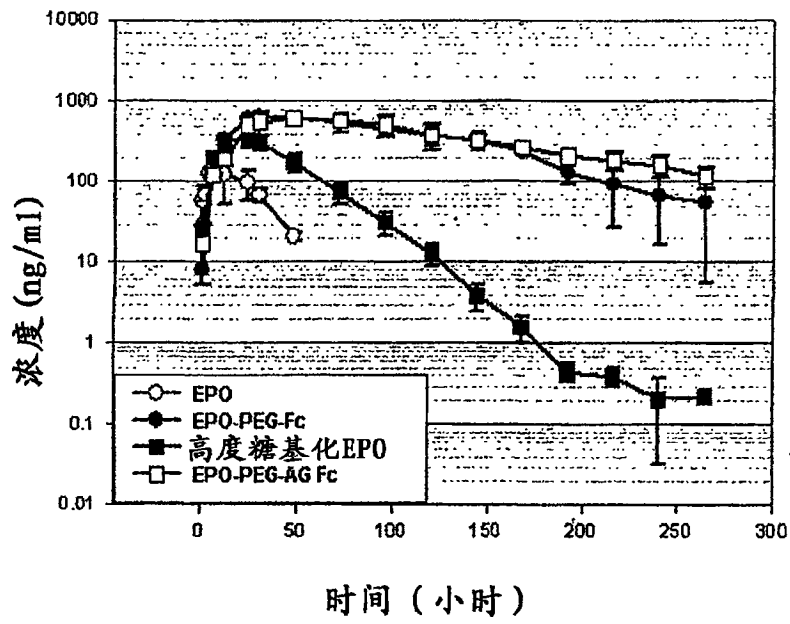


图 10

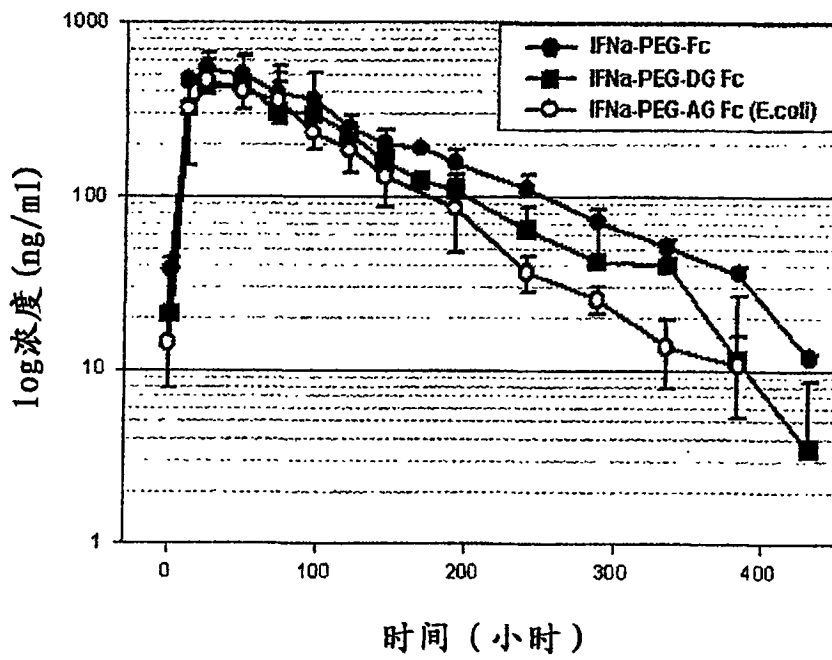


图 11

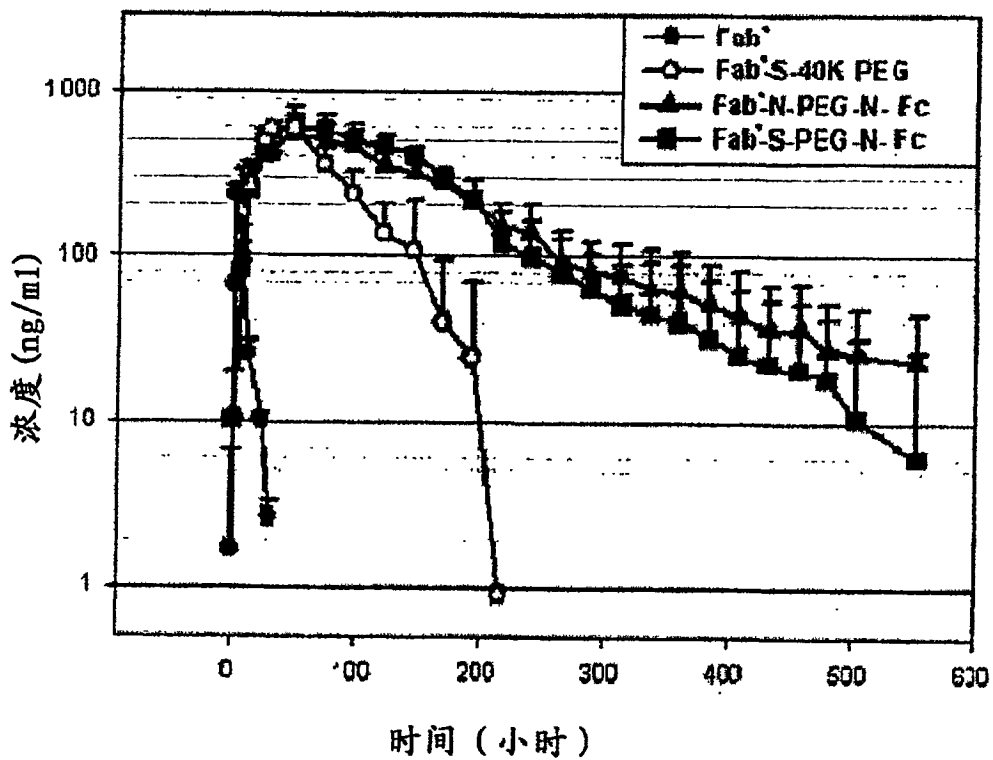


图 12

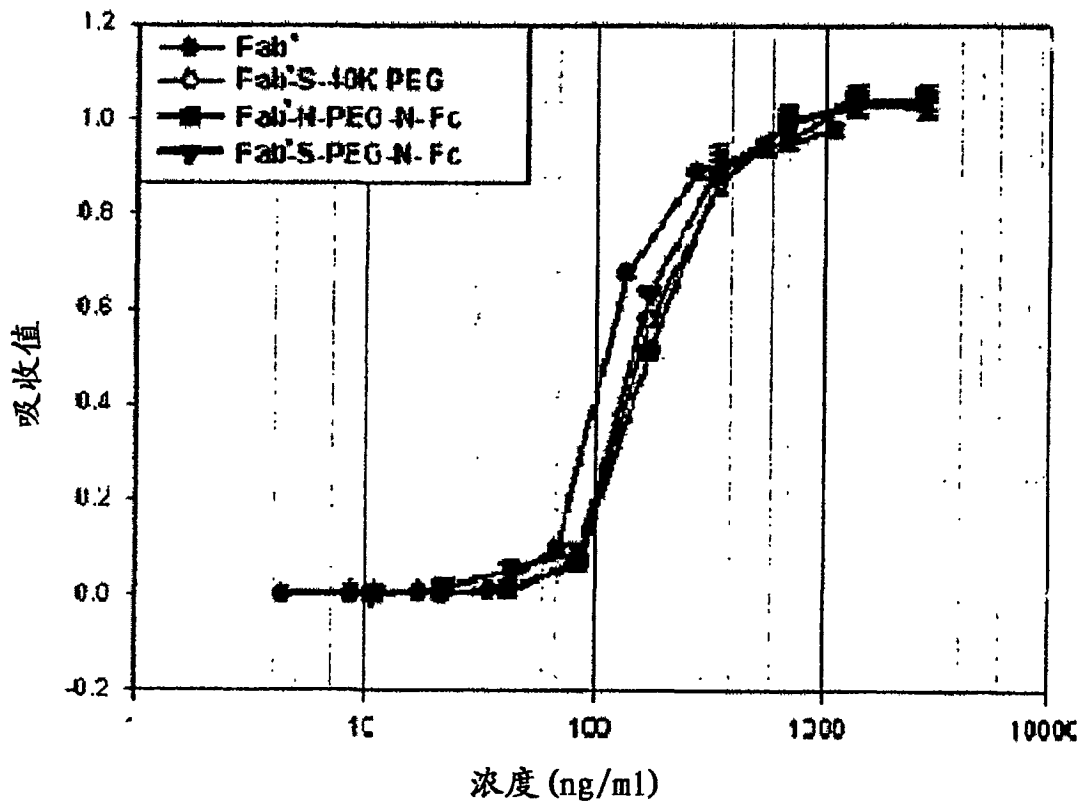


图 13

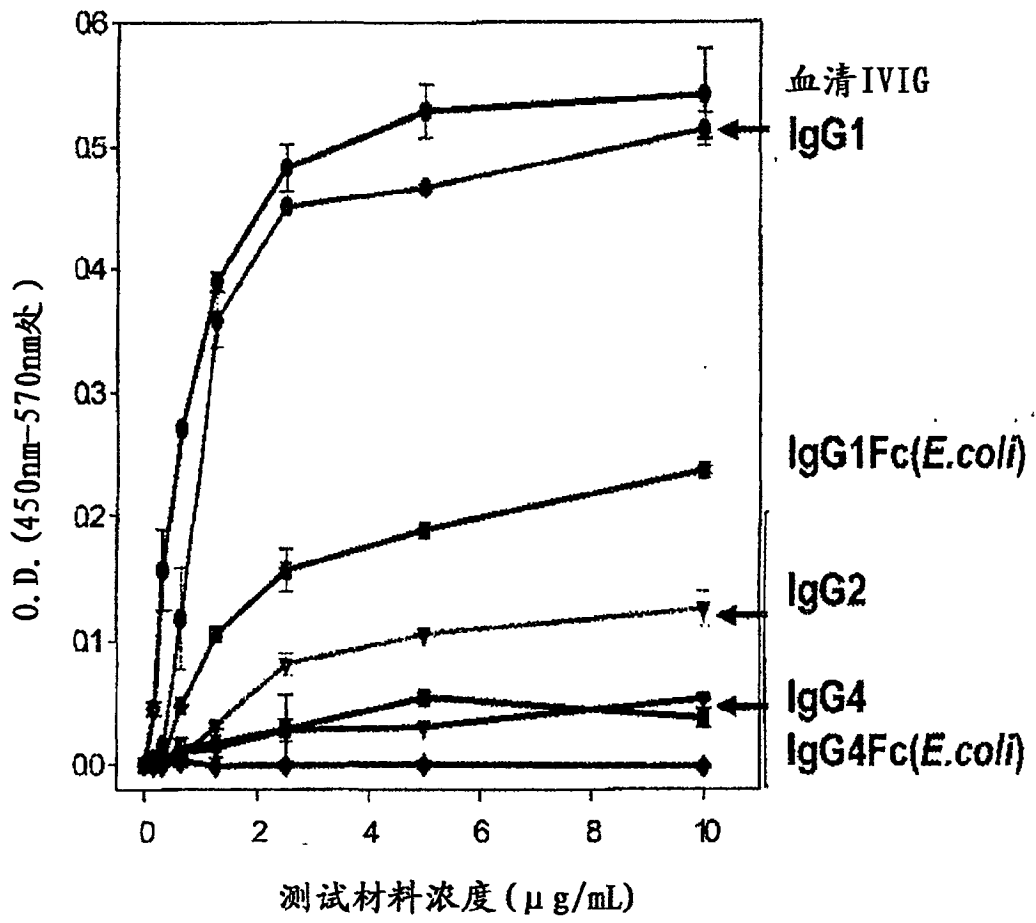


图 14

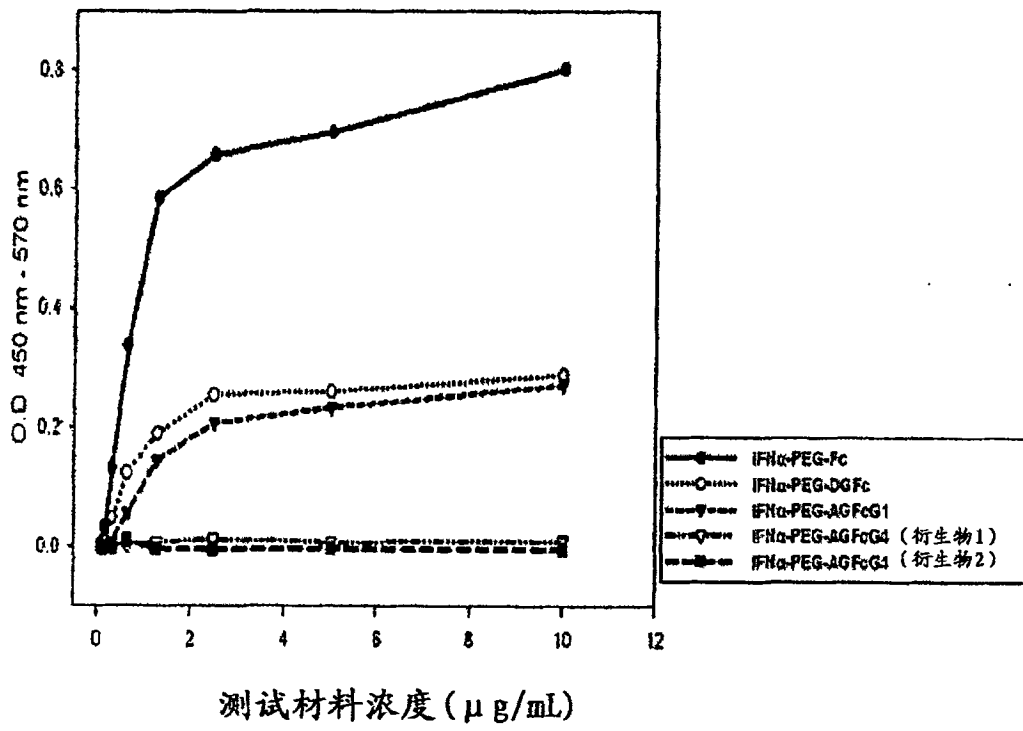


图 15