[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 97196829.2

[45] 授权公告日 2009 年 3 月 25 日

[11] 授权公告号 CN 100471521C

[22] 申请日 1997.8.1 [21] 申请号 97196829.2

[30] 优先权

[32] 1996. 8. 2 [33] US [31] 60/023,050

[86] 国际申请 PCT/US1997/013756 1997.8.1

[87] 国际公布 WO1998/005363 英 1998.2.12

[85] 进入国家阶段日期 1999.1.27

[73] 专利权人 奥索·麦克尼尔药品公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 Z·P·韦 S·梅农-鲁多尔夫

P·戈斯·达斯蒂达

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 齐曾度

[56] 参考文献

EP0605963A 1994.7.13

审查员 刘启明

权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 10 页

[54] 发明名称

含有与 N-末端共价结合的单个水溶性聚合物的多肽类

[57] 摘要

本发明提供基本上由多肽和水溶性聚合物组成的组合物，其中的水溶性聚合物通过脲键或还原脲键，或者肟键或还原肟键共价结合到多肽 N-末端的 α-碳原子上。本发明还提供制备该组合物的方法，含有该组合物的药物组合物和用于制备该组合物的试剂盒。

1、一种共价结合物，它基本上由肽或蛋白质和水溶性聚合物组成，其中的水溶性聚合物共价结合到多肽 N-末端的α-碳原子上，其条件是：(a)多肽与聚合物通过腙键或还原腙键相互结合，(b)聚合物是分子量为200-200,000道尔顿的PEG或mPEG，(c)除去N-末端的α-氨基后，多肽的天然功能并不消失，和(d)蛋白质N-末端的氨基酸残基不是丝氨酸或苏氨酸。

2、根据权利要求1所述的结合物，其中的蛋白质是EPO。

3、根据权利要求1所述的结合物，其中的PEG或mPEG的分子量为700-20,000道尔顿。

4、根据权利要求1所述的结合物，其中的PEG或mPEG的分子量为5,000道尔顿。

5、根据权利要求1所述的结合物，其中的蛋白质是EPO，聚合物是分子量为5,000道尔顿的mPEG。

6、一种把水溶性聚合物共价结合到多肽N-末端α-碳原子上的方法，包括的步骤是：

(a) 使多肽与(i)浓度为0.1-2.0M的乙醛酸离子，(ii)浓度为10μM-1M的过渡金属离子，和(iii)浓度为10mM-10M的路易斯碱，在pH3.0-8.0、温度0-100℃的条件下接触，产生一个具有N-末端α-羰基的转氨基多肽；和

(b) 在pH为1.0-7.5的条件下，使上述转氨基多肽和水溶性聚合物接触，所述聚合物上带有一个与其共价结合的部分，该部分可与转氨基多肽的N-末端α-羰基反应产生腙键，通过该腙键使聚合物结合到多肽的N-末端α-碳原子上，其条件是：聚合物是分子量为200-200,000道尔顿的PEG或mPEG；在除去N-末端的α-氨基后，多肽的天然功能并不消失。

7、根据权利要求6所述的方法，其中步骤(a)的pH值为5.0-7.0。

8、根据权利要求6所述的方法，其中步骤(b)的pH值为3.0-5.0。

9、根据权利要求6所述的方法，其中的蛋白质是EPO。

10、根据权利要求6所述的方法，其中的PEG或mPEG的分子量为700-20,000道尔顿。

11、根据权利要求10所述的方法，其中的PEG或mPEG的分子量为5,000道尔顿。

12、根据权利要求 6 所述的方法，其中共价结合到聚合物上的部分是肼羧酸酯。

13、根据权利要求 6 所述的方法，其中的蛋白质是 EPO，聚合物是分子量 5,000 道尔顿的 mPEG，共价结合到聚合物上的部分是肼羧酸酯。

14、根据权利要求 6 所述的方法，该方法还包括的步骤是还原步骤(b)产生的腙键以形成还原腙键。

15、一种药物组合物，包括有效量的权利要求 1 所述的结合物和药学上可接受的载体。

16、一种用来制备权利要求 1 所述结合物的试剂盒，它包括：

(a)乙醛酸离子；

(b)过渡金属离子；

(c)路易斯碱；和

(d)分子量为 200-200,000 道尔顿的有一个与其共价结合的部分的 PEG 或 mPEG，所述部分可与转氨基多肽的 N-末端 α -羰基反应产生腙键，通过此腙键使 PEG 或 mPEG 共价结合到多肽的 N-末端 α -碳原子上。

含有与N-末端共价结合的单个水溶性聚合物的多肽类

发明领域

本发明涉及 N-末端与单个水溶性聚合物结合的多肽类。这些多肽类具有的性质使它们有利于用作药物或诊断试剂。本发明还涉及制备这些多肽类的方法，以及相关的药物组合物和试剂盒。

发明背景

本申请引用了许多出版物。这些出版物所公开的内容在此引入本文作为参考，以便更完整地描述与本发明相关的技术领域。

近年来，非抗原的水溶性聚合物，例如聚乙二醇(“PEG”)，已经用来共价修饰有治疗或诊断作用的多肽类。例如，据报道，治疗性多肽类如白介素(Knauf, M. J. 等，生物化学杂志(J. Biol. Chem.) 1988, 263, 15, 064；Tsutsumi, Y 等，控释杂志(J. Controlled Release) 1995, 33, 447)、干扰素(Kita, Y 等, Drug Des. Delivery 1990, 6, 157)、过氧化氢酶(Abuchowski, A.等,生物化学杂志 1977, 252, 3, 582)、超氧化物歧化酶(Beauchamp, C. O.等, 分析生物化学(Anal. Biochem), 1983, 131, 25)和腺苷脱氨酶(Chen, R.等, 生物化学生物物理学报(Biochim. Biophy. Acta) 1981, 660, 293)，当它们与 PEG 共价结合时，能增加它们的体内半衰期，和/或降低它们的免疫原性和抗原性。

然而，这些方法有许多严重的缺点。具体地讲，在许多情况下，应用具有不同反应部分的甲氧基化 PEG("mPEG")通过多肽的氨基结合 PEG 分子。这些聚合物包括mPEG-琥珀酰亚氨基琥珀酸酯、mPEG-琥珀酰亚氨基碳酸酯、mPEG-亚氨酸酯和 mPEG-氰尿酸酰氯。应用这些聚合物的结合通常是非特异性的，也就是说，以任意的方式与多肽的不同氨基结合，而不是专一性地与特定氨基结合。这些非特异性的结合可改变活性部位的氨基酸残基以致降低多肽的生理活性。同时，得到的结合物可能含有修饰后多肽的非均匀混合物，这样的混合物在药物应用中是不希望得到的。

为了解决这些问题，希望聚合物部位特异性地结合到多肽上。对于多肽来说，这样做可保持生物学活性、延长血液循环时间、降低免疫原性、增加水溶

性和增强对蛋白酶消化的抵抗力。通过固相合成已经对强效的生长激素释放因子类似物的N-末端、侧链和C-末端进行了部位特异性聚乙醇化(pegylation)(Felix, A. M.等，Int. J. Peptide Protain Res. 1995，46，253)。由于特异性聚乙醇化是在将肽装配到树脂上的过程中完成的，因此该方法不能应用于现成的多肽。

还有另外一种方法：用过氧化钠氧化 N-末端的苏氨酸，从而在 N-末端产生一个活泼醛基，通过此基团，以部位特异性的方式，将多肽结合到脂质体表面的PEG链终端(Zalipsky, S.等，生物结合化学(Bioconj. Chem.) 1995, 6, 705)。然而，该方法仅仅限于N-末端为苏氨酸或丝氨酸的多肽类。

还公开了一种在多肽 C-末端特异性地引入活化基团的酶辅助方法，(Schwarz, A.等，酶学方法(Methods Enzymol), 1990, 184, 160；Rose,K.等，生物结合化学 1991, 2, 154；Gaertner，H.F.等，生物化学杂志 1994, 269, 7224)。典型的是，这些活性基团可以是：酰肼、醛基和芳香氨基，这些基团可将功能探针结合到多肽上。然而，这些方法以特异性蛋白酶为基础，需要极度小心，因此它们的应用范围受到限制。

用来制备部位特异性结合聚合物的多肽类的另外一个方法是位点特异性的突变。WO 90/12874 公开的方法是：插入半胱氨酸残基或用半胱氨酸残基取代其它残基对蛋白质进行修饰，再对该蛋白质进行部位导向的聚乙醇化。该出版物还公开了甲氧基化聚乙二醇-红细胞生成素(“mPEG-EPO”)的制备方法：即将半胱氨酸特异性的 mPEG 衍生物与 EPO 上重组引入的半胱氨酸残基反应。类似地，白介素-2 经部位导向的突变后在它的糖基化部位进行聚乙二醇化，(Goodson，R. J.等，Bio/Technology 1990, 8, 343)。

糖蛋白中有碳水化合物可用作修饰的额外靶部位。用 PEG-二胺通过过氧化酶的碳水化合物部分对该过氧化酶进行了修饰(Urrutiogoity, M 等，生物催化(Biocatalysis) 1989, 2, 145)。WO94/28024 描述了通过高碘酸盐氧化的糖制备 mPEG-EPO。化学反应包括 mPEG-酰肼和 EPO 碳水化合物部分的醛基反应生成腙。这种类型的修饰通过氧化反应产生活泼醛基，其中的氧化反应能强有效地氧化碳水化合物部分不同类型的糖残基和多肽的氨基酸如蛋氨酸残基。这些方法的缺点源于 EPO 中碳水化合物部分的不均匀性。由中国仓鼠卵巢细胞表达的 EPO 有四个碳水化合物链，包括三个 N-连接链分别在 24、38 和 83 精氨酸部位，和一个 O-连接链在 126 丝氨酸部位。已经识别了共 52 个不同 N-连

接的和至少6个O-连接的低聚糖(Rush，R. S. 等，分析化学(Anal. Chem.) 1995，67，1442；Linsley，K.B 等，分析化学 1994, 219, 207)。因此，通过碳水化物链修饰EPO或其它蛋白质，聚合物的连接位置和数目是很难控制的。

总之，在现有技术中，把水溶性聚合物连接到多肽的方法有许多严重的缺点。这些缺点包括：(a)化学计量准确性和连接位置准确性差；(b)需要完成有难度并且劳动强度大的技术如位置特异性突变；(c)需要在连接聚合物的同时应用固相肽合成，而不是在预先存在的多肽上连接聚合物；和(d)识别 N-末端氨基酸残基要求严格，必须是苏氨酸或丝氨酸。

一段时间以来，需要有一种通用的方法，该方法能把水溶性聚合物部位特异性地连接到多肽N-末端的氨基酸残基上，并且该方法没有上面所述的缺点。然而，这样的方法并不存在。

发明概述

本发明提供两种组合物物质。第一种组合物物质基本上由多肽和水溶性聚合物组成，其中水溶性聚合物通过腙键或还原腙键共价结合到多肽 N-末端的α-碳原子上，其条件是：(a)聚合物的分子量约为 200-200,000 道尔顿，(b)在除去 N-末端的α-氨基后，多肽的天然功能并不消失，和(c)多肽 N-末端的氨基酸残基不是丝氨酸或苏氨酸。

第二种组合物物质基本上由多肽和水溶性聚合物组成，其中水溶性聚合物通过肟键或还原肟键共价结合到多肽 N-末端的α-碳原子上，其条件是：(a)聚合物的分子量约为 200-200,000 道尔顿，和(b)在除去 N-末端的α-氨基后，多肽的天然功能并不消失。

本发明同时提供把水溶性聚合物共价结合到多肽 N-末端α-碳原子上的四种方法。第一种方法，通过腙键把聚合物结合到碳原子上，它包括的步骤是：

(a) 使多肽与(i)浓度约为 0.1-2.0M 的乙醛酸离子或其衍生物，(ii)浓度约为10μM-1M 的过渡金属离子，和(iii)浓度约为 10mM-10M 的路易斯碱，在 pH 约3.0-8.0、温度约 0-100℃的条件下接触，产生一个具有 N-末端α-羰基的转氨基多肽；和

(b) 在pH 约为 1.0-7.5 的条件下，使上述转氨基多肽和水溶性聚合物接触，所述聚合物上带有一个与其共价结合的部分，该部分可与转氨基多肽的N-末端α-羰基反应产生腙键，通过该腙键使聚合物结合到多肽的 N-末端α-碳原子

上，其条件是：聚合物的分子量约为 200-200,000 道尔顿；在除去 N-末端的α-氨基后，多肽的天然功能并不消失。

第二种方法，通过肟键把聚合物结合到碳原子上，它包括的步骤是：

(a) 使多肽与(i)浓度约为 0.1-2.0M 的乙醛酸离子或其衍生物，(ii)浓度约为 10μM-1M 的过渡金属离子，和(iii)浓度约为 10mM-10M 的路易斯碱，在 pH 约 3.0-8.0、温度约 0-100℃的条件下接触，产生一个具有 N-末端α-羰基的转氨基多肽；和

(b)在 pH 约为 1.0-7.5 的条件下，使上述转氨基多肽和水溶性聚合物接触，所述聚合物上带有一个与其共价结合的部分，该部分可与转氨基多肽的 N-末端α-羰基反应产生肟键，通过该肟键使聚合物结合到多肽的 N-末端α-碳原子上，其条件是：聚合物的分子量约为 200-200,000 道尔顿；在除去 N-末端的α-氨基后，多肽的天然功能并不消失。

第三种方法包括第一种方法的步骤，还有一个更进一步的步骤是还原(b)步骤中所产生的腙键。第四种方法包括第二种方法的步骤，还有一个更进一步的步骤是还原(b)步骤中所产生的肟键。

本发明还提供一种药物组合物，它包括：有效量的所述第一种或第二种组合物和一种药学上可接受的载体。

最后，本发明还提供用于制备所述组合物的试剂盒。第一种试剂盒，用来制备所述的第一种组合物，包括：

(a) 乙醛酸离子或其衍生物；

(b) 过渡金属离子；

(c) 路易斯碱；和

(d)分子量约为 200-200,000 道尔顿的有一个与其共价结合部分的水溶性聚合物，所述部分可与转氨基多肽的 N-末端α-羰基反应产生腙键，通过此肟键使该聚合物共价结合到多肽的N-末端α-碳原子上。

第二种试剂盒，用来制备所述的第二种组合物，包括：

(a)乙醛酸离子或其衍生物；

(b)过渡金属离子；

(c)路易斯碱；和

(d)分子量约为 200-200,000 道尔顿的有一个与其共价结合部分的水溶性聚

合物，所述部分可与转氨基多肽的 N-末端α-羰基反应产生肟键，通过此肟键使该聚合物共价结合到多肽的N-末端α-碳原子上。

附图概述

图1表示N-末端修饰的EPO的制备方案，这是一个包括两个步骤的反应：转氨基化和聚乙醇化。所用的四种mPEG5000(即分子量为5000道尔顿的mPEG)衍生物分别带有肼羧酸酯(hydrazine carboxylate, HZC)，酰肼(HZ)，氨基脲(SCZ)和羟胺(oxylamine)官能团。

图2表示带有用肼羧酸酯(HZC)部分产生的腙键的mPEG-EPO、天然EPO和肼羧酸酯mPEG5000的凝胶过滤色谱，色谱柱为TSKG 3000SWxL 柱(7.5×30mm)。流动相为含有100mM NaCl的20mM柠檬酸钠(pH7.0)。

图3表示mPEG-5000肼羧酸酯、天然EPO和含有由肼羧酸酯产生的腙键的mPEG-EPO的基质辅助激光解吸飞行时间质谱。

图4表示通过电泳法对mPEG-EPO特性的鉴定：(1)4-15%的SDS-PAGE，Coomassie 着色；(2)Western 印迹；(3)4-15%的 SDS-PAGE，碘着色；和(4)等电点聚焦(IEF，PH3-7)。第1道，MW或PI标记物；第2道，天然EPO；第3道，转氨基EPO；第4道和第5道分别是用肼羧酸酯(HZC)和酰肼(HZ)部分形成腙键的mPEG-EPO。

图5表示含有用肼羧酸酯(HZC)和酰肼(HZ)部分形成的腙键的mPEG-EPO的ELISA分析结果图。

图6表示天然 EPO、转氨基 EPO 和含有用肼羧酸酯(HZC)和酰肼(HZ)部分形成腙键的 mPEG-EPO的细胞增殖分析结果图。

图 7 表示用肼羧酸酯(HZC)、酰肼(HZ)和氨基脲(SCZ)部分形成腙键的mPEG-EPO的exhypoxic小鼠生物分析结果图。

发明详述

本发明提供两种组合物物质。第一种组合物物质基本上由多肽和水溶性聚合物组成，其中水溶性聚合物通过腙键或还原腙键共价结合到多肽 N-末端的α-碳原子上，其条件是：(a)聚合物的分子量约为200-200,000道尔顿，(b)除去N-末端的α-氨基后，多肽的天然功能并不消失，和(c)多肽 N-末端的氨基酸残基不是丝氨酸或苏氨酸。

第二种组合物物质基本上由多肽和水溶性聚合物组成，其中水溶性聚合物

通过肟键或还原肟键共价结合到多肽 N-末端的α-碳原子上，其条件是：(a)聚合物的分子量约为 200-200,000 道尔顿，和(b)除去 N-末端的α-氨基后，多肽的天然功能并不消失。

在本申请所用的术语中，“多肽”包括肽和蛋白质。“肽”意思是长度小于 10 个氨基酸残基的多肽。“蛋白质”意思是长度等于或大于 10 个氨基酸残基的多肽。在本发明中，多肽是天然的也可为重组的(即通过重组 DNA 技术产生的)，多肽可包括突变(如点突变、插入突变和缺失突变)以及其它共价修饰(如葡萄糖基化和用生物素、抗生蛋白链菌素、fluoracine 和放射性同位素如 I131 标记)。并且，每一个所述组合物可包括一条以上多肽，也就是说，每个组合物可为单体(一条多肽与一个聚合物结合)或多体(两条或更多多肽与一个聚合物结合或彼此结合)。

多肽的例子可包括单克隆和多克隆抗体，细胞因子如 M-CSF 和 GM-CSF，淋巴因子，IL-2，IL-3，生长因子如 PDGF 和 EGF，肽激素如 hGH、EPO 及其衍生物，血凝集因子如 VIII 因子，免疫原，酶，酶抑制剂和其它配体。在所述组合物的优选实施方案中，多肽是 EPO 或其衍生物。EPO 可为天然的也可为重组的。EPO 衍生物包括但不限于多肽类

GGLYLCRFGPVTWDCGYKGG，

GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG，

GGDYHCRMGPLTWVCKPLGG，

VGNYMCHFGPITWVCRPGGG，

GGVYACRMGPITWVCSPLGG，

VGNYMAHMGPITWVCRPGG，

GGTYSCHFGPLTWVCKPQ，

GGLYACHMGPMTWVCQPLRG，

TIAQYICYMGPETWECRPSPKA，

YSCHFGPLTWVCK，和

YCHFGPLTWVC，

以及下列表 1 中所示的突变物。

表 1

突变	相对于 wt*的活性	参考文献
L5S	+/-	9
L5S/W51S/M54S/V82S/W88S/ L112A/A124S/A125S	+/-	9
S9A	++++	3
R10A	++++	3
E13A	++++	3
R14L	++++	3
R14A	++	3
L17A	++++	3
E18A	++++	3
K20A	++++	3
E21A	++++	3
N24Q	++	1
N24Q/N83Q	+	1
N24Q/N38Q/ N83Q	+++	1
C29Y/C33Y	++++	3
A30S/L35S	+++	9
A30S/A124S/A125S	++	9
C33P/R139C	++++	7
L35S/A124S/A125S	++	9
N38Q	++	1
N38Q/N83Q	++++	1
V41S	+/-	9
K45A	++++	3
F48S	++++	3
Y49S	++++	3
A50S	++++	3
W51S	++++	3
W51S/V144S	+	9
W51S/V82S/W88S	++	9
W51S/V82S/W88S/V144N	++	9
W51S/V82S/W88S/L112A/I119A A124S/A125S	+++	9
W51S/M54S/V82S/W88S/A124S A125S	++	9
W51S/M54S/V82S/W88S/L112A A124S/A125S	+	9
W51S/M54S/V82S/W88S/L112A A124S/A125S/L130A	+++	9

W51S/M54S/V82S/W88S/I119A A124S/A125S	+	9
W51S/M54S/V82S/W88S/L112A I119A/A124S/A125S	+++	9
W51S/M54S/V82S/W88S/A124S A125S/L130A	+++	9
W51S/V82S/W88S/A125S/A125S L130A	+++	9
K52S	++++	3
M54L	++++	10
M54S/V56S	++++	9
W57S/V82S/W88S/L112A/I119A A124S/A125S	+++	9
E62A	++++	3
W64A	++++	3
Q65A	++++	3
G66A	++++	3
L69A	++++	3
L69N	++++	4
S71A	+++	3
A73G	++++	3
R76A	++++	3
V82S	+/-	9
V82S/W88S/V144N	++	9
V82S/W88S/A124S/A125S	++++	9
N83Q	++	9
Q92A	++++	3
L93A	++++	3
K97A	++++	3
S100A	++++	3
G101A	++++	3
L102A	++++	8
R103A	++	2
S104A	++	3
S104N	+/-	6
L105A	++	8
L105F	+/-	6
T106A	++++	3
T107A	+++	8
L108A	++	3
L109A	+++	8
L112A	+/-	9
L112A/I119S/L130A/I133A	++++	9
P122Q	+/-	6
A124P/A125T	++++	4
A125T	++++	4

A125N/A127S	++++	4
L130A	+/-	9
D136A	++++	3
R139A	++++	3
K140A	++++	3
R143A	++++	3
S146A	++++	3
N147A	++++	3
R150A	+++	3
K152A	++	3
L153A	+++	3
K154A	++++	3
L155A	++++	3
Y156A	++	3
T157A	++++	3
G158A	++++	3
E159A	++++	3
R162K/T163D/G164E/D165L	++	3
R162H/T163H/G164H/D165H/ R166H/(167)H	++++	3
Æ2-5	++	3
Æ13-17	++++	2
Æ32-36	++	3
Æ43-47	++	3
Æ53-57	++	3
Æ78-82	+	3
Æ111-119	+++	3
Æ115-121	+++	2
Æ120-122	++++	5
Æ123-125	++++	5
Æ126-129	+++	5
Æ163-166	++++	3
K116 (insertion of LISEEDL)	++++	3

* 相对于野生型定义如下：

++++ = 野生型 或更高活性

+++ = 大约75%的野生型活性

++ = 大约50%的野生型活性

+ = 大约25%的野生型活性

+/- = 被报道为有活性的诱变 EPO，然而对于评价相对于野生型的活性来说，数据不完整。

参考文献

1) Akai, K., Yamaguchi, K.和 Ueda, M，修饰形式的人红细胞生成素和能表达它们的 DNA 序列编码基因，EP 0427189 A1。

2) Bittorf, T, Jaster, R. 和 Brock, J.(1993) FEBS Letters, 336：133-136。

3) Bunn, H. F.等的结果。

4) Byrne, T. E.和 Elliott, S. G., 红细胞生成素异构体，EP0 668 351 A1。

5) Chern, Y., Chung, T.,和 Sytkowski, A. J.(1991) 欧洲生物化学杂志(Eur. J. Biochem.) 202：225-229。

6) Funakoshi, A., Muta, H., Baba, T.,和 Shimizu, S. (1993) 生物化学和生物物理学研究通讯(Biochem. Biophys. Res. Commun.)195：717-722。

7) Okasinski, G, Devries, P. J., Mellovitz, B. S., Meuth, J. L.和 Schaefer, V.G., 红细胞生成素类似物的组合物和方法, WO 94/25055。

8) Grodberg, J., Davis, K. L.和 Sytkowski, A. J.(1993) 欧洲生物化学杂志 218：597-601。

9) Pulito, V.等的结果。

10) Shoemaker, C. B., 红细胞生成素组合物 U.S. 4, 835, 260。

在本申请中，聚合物的“天然功能”是指该分子在共价修饰其 N-末端(-氨基之前的功能。天然功能包括例如酶活性、受体结合(如抗体)、配体结合和免疫原性。

本发明的方法在下面得到更为完整的描述，该方法可引起所共价修饰的多肽失去 N-末端α-氨基。因此，多肽必须有这样的一级结构即当共价修饰之后，其天然功能仍然保持而不会消失。如果多肽消除 N-末端α-氨基后，该多肽完成其天然功能的能力降低了 99%，那么，这种消除则能引起多肽天然功能的消失。在一个实施方案中，这种消除使多肽完成其天然功能的能力降低不大于 90%。在优选的实施方案中，这种消除使多肽完成其天然功能的能力降低不大于 50%。

在本申请中，“腙键”是指包括共价结构 NH-N=C 的键，“肟键”是指包括共价结构 O-N=C 的键，“还原腙键”是指包括共价结构 NH-NH-C 的键，“还原肟键”是指包括共价结构 O-NH-C 的键。此处提供含有还原腙键或肟键的化合物，因为这些键具有较高的化学稳定性。

如上所述，在本领域中已知的方法是：只要多肽的 N-末端氨基酸残基是苏氨酸或丝氨酸时，就通过脲键把水溶性聚合物连接到多肽的 N-末端α-碳原子上。这些已知的方法对于其它 N-末端残基的多肽是无效的。尽管这些已知的方法与本发明所述方法有根本上的不同，但这些方法确实是通过脲键得到在 N-末端α-碳原子上结合聚合物的 N-末端丝氨酸或苏氨酸多肽类。由于这个原因，本发明的第一种组合物不包括其中多肽的 N-末端氨基酸是苏氨酸或丝氨酸的通过脲键结合聚合物的多肽。

本发明所用的水溶性聚合物包括但不限于(a)葡聚糖和葡聚糖衍生物，包括葡聚糖硫酸酯、交联糊精和羧甲基糊精；(b)纤维素和纤维素衍生物，包括甲基纤维素和羧甲基纤维素；(c)淀粉和糊精，及其衍生物；(d)聚亚烷基二醇及其衍生物，包括 PEG、mPEG、PEG 均聚物、聚丙二醇均聚物、乙二醇和丙二醇的共聚物，其中所述的均聚物或共聚物是非取代的或一端有烷基取代；(e)肝素和肝素片断；(f)聚乙烯醇和聚乙烯醚类；(g)聚乙烯吡咯烷酮；(h)a,b-聚(2-羟基乙基)-DL-天冬酰胺；和(i)聚氧乙基化多元醇类。这些聚合物可以是具有宽分子量范围的直链、支链或星形聚合物。在优选的实施方案中，聚合物是 mPEG。

当这些组合物用作药物时，该聚合物应是无毒的。并且，当所述聚合物被给定分子量时，这个分子量仅仅是近似值，该值反映的是聚合物分子总体的平均分子量，其中的各个分子由于具有不同数目的亚单位而不同。

在一个实施方案中，PEG 或其衍生物的分子量约为 700-20,000 道尔顿。在优选的实施方案中，PEG 或其衍生物的分子量约为 5,000 道尔顿。并且，在优选的本发明组合物实施方案中，多肽为 EPO，聚合物是分子量约为 5,000 道尔顿的 mPEG。

本发明同时提供把水溶性聚合物共价结合到多肽 N-末端α-碳原子上的四种方法。第一种方法，通过脲键把聚合物结合到碳原子上，它包括的步骤是：

(a) 使多肽与(i)浓度约为 0.1-2.0M 的乙醛酸离子或其衍生物，(ii)浓度约为 10μM-1M 的过渡金属离子，和(iii)浓度约为 10mM-10M 的路易斯碱，在 pH 约 3.0-8.0、温度约 0-100℃的条件下接触，产生一个具有 N-末端α-羰基的转氨基多肽；和

(b) 在 pH 约为 1.0-7.5 的条件下，使上述转氨基多肽和水溶性聚合物接触，所述聚合物上带有一个与其共价结合的部分，该部分可与转氨基多肽的 N-末端

α-羰基反应产生腙键，通过该腙键使聚合物结合到多肽的 N-末端α-碳原子上，其条件是：聚合物的分子量约为 200-200,000 道尔顿；在除去 N-末端的α-氨基后，多肽的天然功能并不消失。

第二种方法，通过肟键把聚合物结合到碳原子上，它包括的步骤是：

(a) 使多肽与(i)浓度约为 0.1-2.0M 的乙醛酸离子或其衍生物，(ii)浓度约为 10μM-1M 的过渡金属离子，和(iii)浓度约为 10mM-10M 的路易斯碱，在 pH 约 3.0-8.0、温度约 0-100℃的条件下接触，产生一个具有 N-末端α-羰基的转氨基多肽；和

(b)在 pH 约为 1.0-7.5 的条件下，使上述转氨基多肽和水溶性聚合物接触，所述聚合物上带有一个与其共价结合的部分，该部分可与转氨基多肽的 N-末端α-羰基反应产生肟键，通过该肟键使聚合物结合到多肽的 N-末端α-碳原子上，其条件是：聚合物的分子量约为 200-200,000 道尔顿；在除去 N-末端的α-氨基后，多肽的天然功能并不消失。

第三种方法包括第一种方法的步骤，还有一个更进一步的步骤是还原(b)步骤中所产生的腙键。第四种方法包括第二种方法的步骤，还有一个更进一步的步骤是还原(b)步骤中所产生的肟键。 还原步骤可以通过例如，硼氢化钠($NaBH_4$)和氰基硼氢化钠($NaBH_3CN$)，根据已知的方法进行。

乙醛酸离子衍生物包括但不限于乙醛酰胺和苯乙醛酰离子。过渡金属离子包括但不限于二价铜离子、镍离子、二价钴离子或锌离子。路易斯碱包括但不限于乙酸盐和吡啶。

与转氨基多肽 N-末端α-羰基反应形成腙键的部分包括但不限于肼羧酸酯、肼、氨基脲、酰肼、硫氨基脲、碳酸二酰肼、卡巴肼、硫卡巴肼和芳基酰肼。与这些部分共价结合的水溶性聚合物可在商业上得到。另外，与转氨基多肽 N-末端α-羰基反应产生肟键的部分包括但不限于羟胺(oxylamine)。带有共价结合的羟胺(以及其它肟形成部分)的水溶性聚合物可在商业上得到。

在所述方法的优选实施方案中，步骤(a)的 pH 值约为 5.0-7.0，步骤(b)的 pH 值约为 3.0-5.0，蛋白质是 EPO 或其衍生物。

在所述方法的实施方案中，聚合物是 PEG 及其衍生物。在另一个的实施方案中，PEG 或其衍生物的分子量约为 700-20,000 道尔顿。在优选的实施方案中，PEG 或其衍生物的分子量约为 5000 道尔顿。

在第一种方法的实施方案中，结合在聚合物上的与转氨基多肽反应的部分是肼羧酸酯。在优选的实施方案中，多肽是 EPO，聚合物是分子量约 5000 道尔顿的 mPEG，共价结合到聚合物的部分是肼羧酸酯。

在第二种方法的实施方案中，结合在聚合物上的与转氨基多肽反应的部分是羟胺。

在每一种所述的方法中，步骤(a)优选的接触时间是 20 分钟-2 小时，对于步骤(b)，优选的接触时间和温度分别是 10-50 小时和 4℃至室温。

对于某些多肽，其 N-末端被"掩埋"，也就是说，当多肽以天然构象存在时，其末端不与周围的溶剂或试剂接触。为了能使多肽的 N-末端残基进行所述方法中必须的反应，有些试剂如四甲基脲或尿素可用来打开这些多肽。

本发明还提供一种药物组合物，它包括：有效量的所述第一种或第二种组合物和一种药学上可接受的载体。例如，该药物组合物可以包括治疗贫血症患者有效量的 mPEG-EPO。

药学上可接受的载体是本领域技术人员所熟知的，这些载体包括但不限于，0.01-0.1M 并且优选 0.05M 的磷酸盐缓冲液或 0.8%的生理盐水。并且，这些药学上可接受的载体可为含水的或不含水的溶液、悬浮液或乳液。非水溶剂的例子为丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油，和能用于注射的有机酯如油酸乙酯。含水载体包括水，醇/水溶液、乳液或悬浮液，包括生理盐水和缓冲介质。肠胃外载体包括氯化钠溶液、Ringer's 葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸盐 Ringer's 或固定油。静脉内载体包括流体和营养补充剂，电解质补充剂例如基于 Ringer's 葡萄糖等物质的补充剂。还可有防腐剂和其它添加剂例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

最后，本发明还提供用于制备所述组合物的试剂盒。第一种试剂盒，用来制备所述的第一种组合物，包括：

(a)乙醛酸离子或其衍生物；

(b)过渡金属离子；

(c)路易斯碱；和

(d)分子量约为 200-200,000 道尔顿的有一个与其共价结合部分的水溶性聚合物，所述部分可与转氨基多肽的 N-末端 α -羰基反应产生腙键，通过此肼键使该聚合物共价结合到多肽的 N-末端 α -碳原子上。

第二种试剂盒，用来制备所述的第二种组合物，包括：

(a)乙醛酸离子或其衍生物；

(b)过渡金属离子；

(c)路易斯碱；和

(d)分子量约为 200-200,000 道尔顿的有一个与其共价结合部分的水溶性聚合物，所述部分可与转氨基多肽的 N-末端α-羰基反应产生肟键，通过此肟键使该聚合物共价结合到多肽的N-末端α-碳原子上。

这些试剂可通过预先确定的量装入所述试剂盒中，也可装入独立的隔室中。或者，当该方法允许时，可将某些试剂包含在同一个隔室中。最后，根据本发明的方法，本试剂盒还可包括用来产生还原胺或肟键的还原剂，以及合适的缓冲液和反应容器。

通过下面的实施例可更好地理解本发明，然而，本领域技术人员很容易明白：这些特别的实施例仅仅用来说明本发明，本发明在权利要求书中得到更完整的描述。

实施例

1、转氨基 EPO 的制备

将含有 5mg EPO 的 20mM 柠檬酸钠(pH6.9)和 100mM 氯化钠溶液用 Centrion-10(Amicon, Beverly, MA)转换成 100mM 乙酸钠(pH7.0)缓冲液。最终浓度调整至 1mg/ml EPO、2M 柠檬酸钠、0.4M 乙酸、0.1M 乙醛酸和 10mM 硫酸铜(pH5.5)(图 1)。该反应在室温下进行两小时，加入 100ml 的 0.5M EDTA 终止反应。应用 100mM 乙酸钠(pH4.5)缓冲液通过 Sephadex G-25 色谱柱(Pharmacia, Piscataway, NJ)纯化转氨基 EPO。

按文献所述方法(参见 Fields, R.等,生物化学杂志 1971，121，587)，用 2,4-二硝基苯肼估计转氨基化的程度。在开始几分钟和 1 个小时之后测定 370nm 处的消光值。吸光度的差别与 EPO 分子中存在的羰基量成比例。在 ABI 420H 系统(Applied Biosystems, Foster City, CA)上应用预柱 PITC 化学法对该转氨基 EPO 进行氨基酸分析。结果表明：赖氨酸残基，即非 N-末端残基，未被转氨基化。

2、用 mPEG-肼羧酸酯制备 mPEG-EPO

将含有转氨基 EPO(1mg)的 100mM 乙酸钠溶液(PH4.5)调至 0.5M 氯化钠，最终体积为 1ml，向其中加入 10mg mPEG5000 肼羧酸酯(Shearwater Polymers,

Hunstville, AL)。室温下搅拌反应混合物40小时，应用含100mM氯化钠的20mM柠檬酸钠缓冲液(7.0)通过 Sephacryl S-200 柱(Pharmacia, Piscataway, NJ)进行纯化。为了提高结合的产率，还可在反应混合物中加入0.1% SDS。

在凝胶渗透色谱中，与EPO和mPEG5000胂羧酸酯相比，该mPEG-EPO结合物显示出明显增加的分子量(图2)。

应用基质辅助激光解吸质谱(Finnigan-MAT LaserMAT 2000，线性飞行时间)测定分子量表示 mPEG-EPO 的特性(图 3)。mPEG5000 胂羧酸酯在 m/z 5157.4 处示有离子。EPO 显示一个双电荷单体(m/z 14604)、一个单电荷单体(m/z 28569)、一个二聚体(m/z 57208)和一个三聚体(85284)。类似地，mPEG-EPO 显示一个双电荷单体(m/z 17092)、一个单电荷单体(m/z 34279)、一个二聚体(m/z 69071)和一个三聚体(102955)。

mPEG-EPO 的园二色谱(CD 谱)(Jobin-YVON CD6, Dichrograph Spectrometer Instruments, SA, Edison, NJ)显示蛋白质保留了存在于天然EPO中的α-螺旋结构(未显示数据)。此结果表明EPO N-末端的PEG分子不破坏其二级结构。

3、用mPEG-酰胂、mPEG-氨基脲和羟胺制备mPEG-EPO

将含有转氨基EPO(1mg)的100mM 乙酸钠溶液(pH 4.5)调整至0.5M氯化钠、0.1% SDS，最终体积为1ml，加入10-20mg的mPEG5000酰胂、mPEG-氨基脲或羟胺。室温下搅拌反应混合物40小时，应用含100mM氯化钠的20mM柠檬酸钠缓冲液(7.0)通过Sephacryl S-200色谱柱(Pharmacia, Piscataway, NJ)进行纯化。

用4-15%的SDS-PAGE(Bio-Rad, Hercules, CA)对mPEG-EPO进行了分析，所用的方法是：Coomassie 着色(专用于蛋白质)、Western 印迹(专用于 EPO)和碘着色(专用于 PEG)。在 SDS-PAGE 上，聚合物量的 mPEG-EPO 结合物比天然EPO的迁移距离小。等电点聚焦模式表明：经修饰后，EPO 的等电点(PI)没有显著变化。然而，转氨基EPO比天然EPO或mPEG-EPO稍微更酸性一些。

由于通过 SDS-PAGE 可很好地分开 EPO 带和 mPEG-EPO 带，因此，该技术可用来监视结合反应的效果。结果发现：应用mPEG5000-胂羧酸酯时，结合反应完成程度大于95%；应用mPEG5000-酰胂、mPEG5000-氨基脲或mPEG-羟胺时，反应只完成20%左右。因此，与酰胂、氨基脲或羟胺部分相比，胂羧

酸酯对羰基的反应性显得更强些。

4、mPEG-EPO 和抗 EPO 抗体的反应性

应用 Quantikine™ IVD™ EPO ELISA 试剂盒(R&D System, Minneapolis, MN)对 mPEG-EPO 的抗原性进行了研究。测定包括用 EPO 单克隆抗体涂覆的微滴定板。将 EPO 或 mPEG-EPO 与该涂覆的板相接触进行反应。清洗板后，加入抗 EPO 多克隆抗体和辣根过氧化酶的结合物。除去多余的结合物后，向孔中加入生色团，通过酶反应氧化生色团形成蓝色络合物。检测该络合物在 450nm 处的吸收。

对于含有由肼羧酸酯(HZC)或酰肼(HZ)形成腙键的 mPEG-EPO，其 ELISA 分析结果如图 5 所示。该数据表明：可能由于空间位阻的原因，即使是一个 PEG 分子结合到 EPO 的 N-末端也显著地降低 EPO 结合单克隆抗体的亲和力。

5、mPEG-EPO 的体外活性

应用 FDC-P1/HER 细胞(鼠造血细胞系)，通过细胞增殖分析测定 mPEG-EPO 的体外生物活性。该细胞系表达 EPO 受体并依赖 EPO 生长。在 EPO 不存在的条件下使该细胞系生长 24 小时，然后再往该细胞中加入 EPO 或 mPEG-EPO。培养该细胞 42 小时后，再往该细胞中加入氚代胸腺嘧啶核苷。6 小时之后，通过掺入的胸腺嘧啶核苷确定细胞的生长。

对于转氨基 EPO 和含有由肼羧酸酯(HZC)或酰肼(HZ)形成腙键的 mPEG-EPO，其细胞增殖分析结果如图 6 所示。通过 ED_{50} 测定，与天然 EPO 相比，转氨基 EPO 显示出全部生物活性。通过 ED_{50} 测定，含有由肼羧酸酯(HZC)和酰肼(HZ)形成腙键的 mPEG-EPO 分别只保留了 38.5%和 25%的活性。该数据表明：可能由于空间位阻的原因，一个 PEG 分子结合到 EPO 的 N-末端时可显著地降低 EPO 结合单克隆抗体的亲和力。

6、mPEG-EPO 的体内活性

通过 exhypoxic 小鼠生物测定方法对 mPEG-PEO 的体内活性进行评估(Coates, P. M.等，自然(Nature), 1961, 191, 1065)。通过暴露在低压下产生的红细胞增多症抑制鼠内源性红细胞的产生。以 1 单位/鼠的剂量注射 EPO 或 mPEG-EPO 结合物。注射 EPO 或 mPEG-EPO 结合物 48 小时之后，施用铁-59。在注射 EPO 或 mPEG-EPO 结合物 48、72 和 96 小时之后，测定铁-59 掺入量，该值显示血中新的红细胞的产生。

对于含有由肼羧酸酯(HZC)、酰肼(HZ)和氨基脲(SCZ)产生的腙键的mPEG-EPO，其exhypoxic鼠的生物测定结果如图7所示。相对于天然EPO，该 mPEG-EPO 样品在体内显示高活性以及较长的活性持续时间。该体内结果表明：mPEG-EPO 样品在体内有较长的循环时间，并在循环过程中持续释放EPO。

7、mPEG-纤维蛋白17-29二聚体的制备

纤维蛋白17-29二聚体有如下结构：

Gly-Pro-Arg-Val-Val-Glu-Arg-His-Gln-Ser-Ala-Cys-Lys

S

S

Gly-Pro-Arg-Val-Val-Glu-Arg-His-Gln-Ser-Ala-Cys-Lys

取2mg 纤维蛋白17-29二聚体溶于0.5ml 的2M乙酸钠、0.4M乙酸、0.1M乙醛酸和10mM硫酸铜中(pH5.5)。该反应在室温下进行2小时，加入20ml 的0.5M EDTA 终止反应。应用100mM 乙酸钠(pH4.5)缓冲液通过SephadexG-10柱(Pharmacia, Piscataway, NJ)对转氨基纤维蛋白二聚体进行纯化。在氨基酸分析中，转氨基纤维蛋白二聚体显示明显减少了甘氨酸，这表明N-末端甘氨酸的转氨基化。

将含有 1mg 转氨基纤维蛋白二聚体的 0.5ml 的 100mM 乙酸钠(pH4.5)加入到 10mg 的 mPEG5000 肼羧酸酯中，室温下搅拌反应混合物 24 小时。用阴离子交换色谱纯化mPEG-纤维蛋白二聚体，色谱柱为HEMA IEC BIO CM色谱柱(Alltech)。流动相A为20mM的乙酸钠(pH5.5)。流动相B为0.2M MOPS，0.05M磷酸二氢钾和0.25M的磷酸氢二钾(pH7.5)。梯度是100%的A洗脱5分钟，然后0-100%的B洗脱25分钟。收集14.5分钟时新出现的峰用于进一步分析，上述峰在未修饰纤维蛋白二聚体(18 分钟)之前出现。激光解吸质谱表明离子在m/z 8070.9处，这证明一个PEG分子已连接到纤维蛋白二聚体(m/z 2986.8)上。

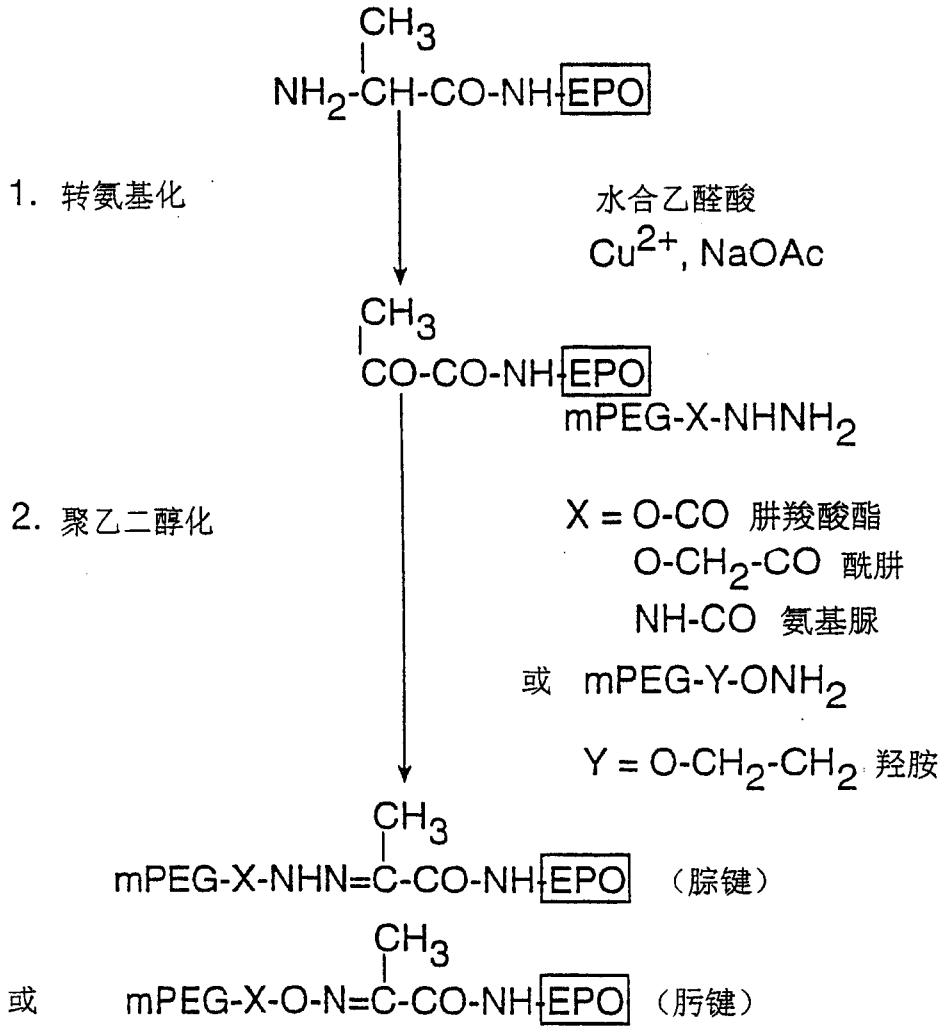
CH3
NH2-CH-CO-NH-EPO
1. 转氨基化
水合乙醛酸
Cu2+, NaOAc
CH3
CO-CO-NH-EPO
mPEG-X-NHNH2
2. 聚乙二醇化
X = O-CO 肼羧酸酯
O-CH2-CO 酰肼
NH-CO 氨基脲
或 mPEG-Y-ONH2
Y = O-CH2-CH2 羟胺
CH3
mPEG-X-NHN=C-CO-NH-EPO （腙键）
CH3
或 mPEG-X-O-N=C-CO-NH-EPO （肟键）

图 1

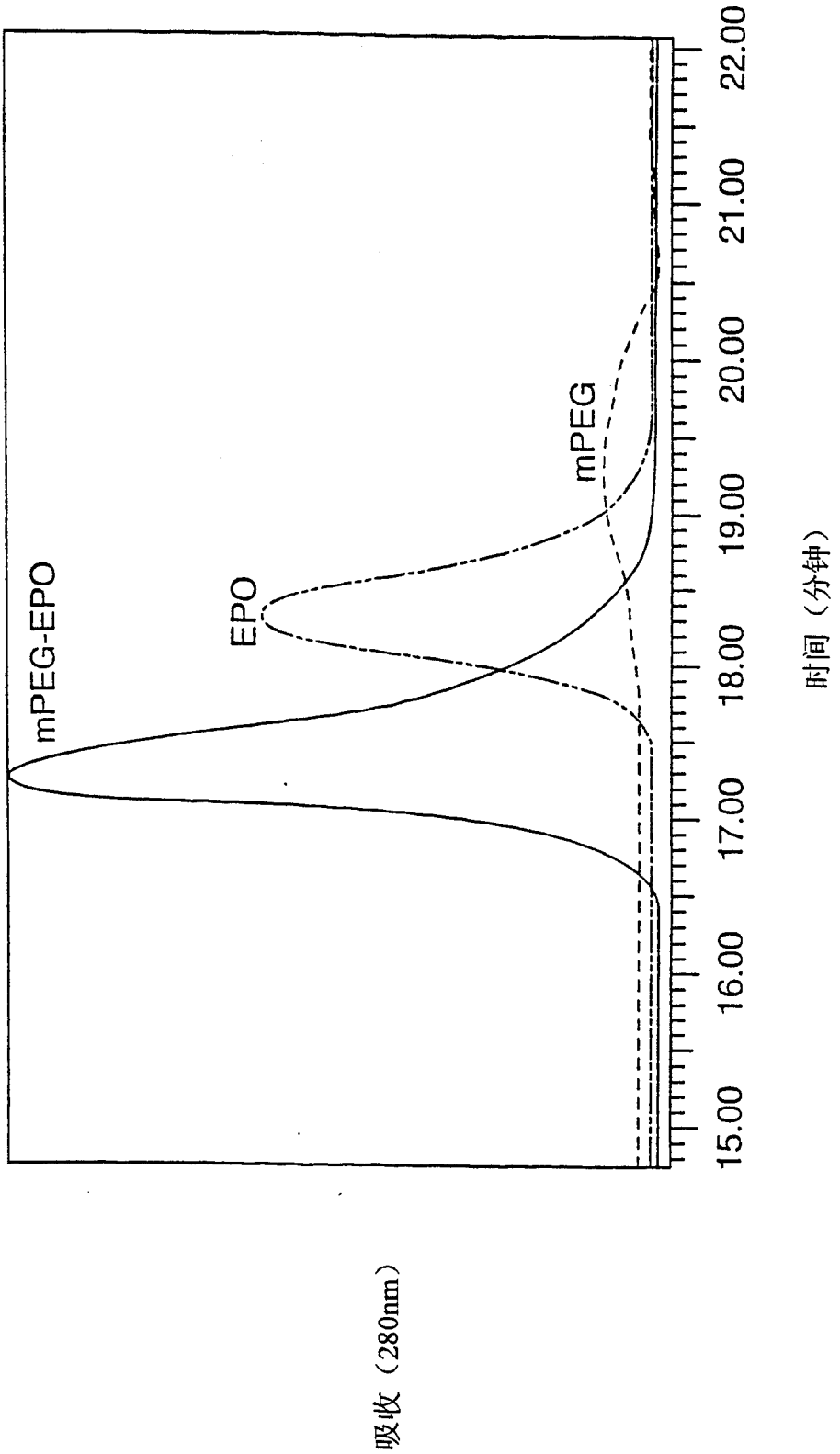
mPEG-EPO
EPO
mPEG
15.00
16.00
17.00
18.00
19.00
20.00
21.00
22.00
时间（分钟）
吸收（280nm）

图2

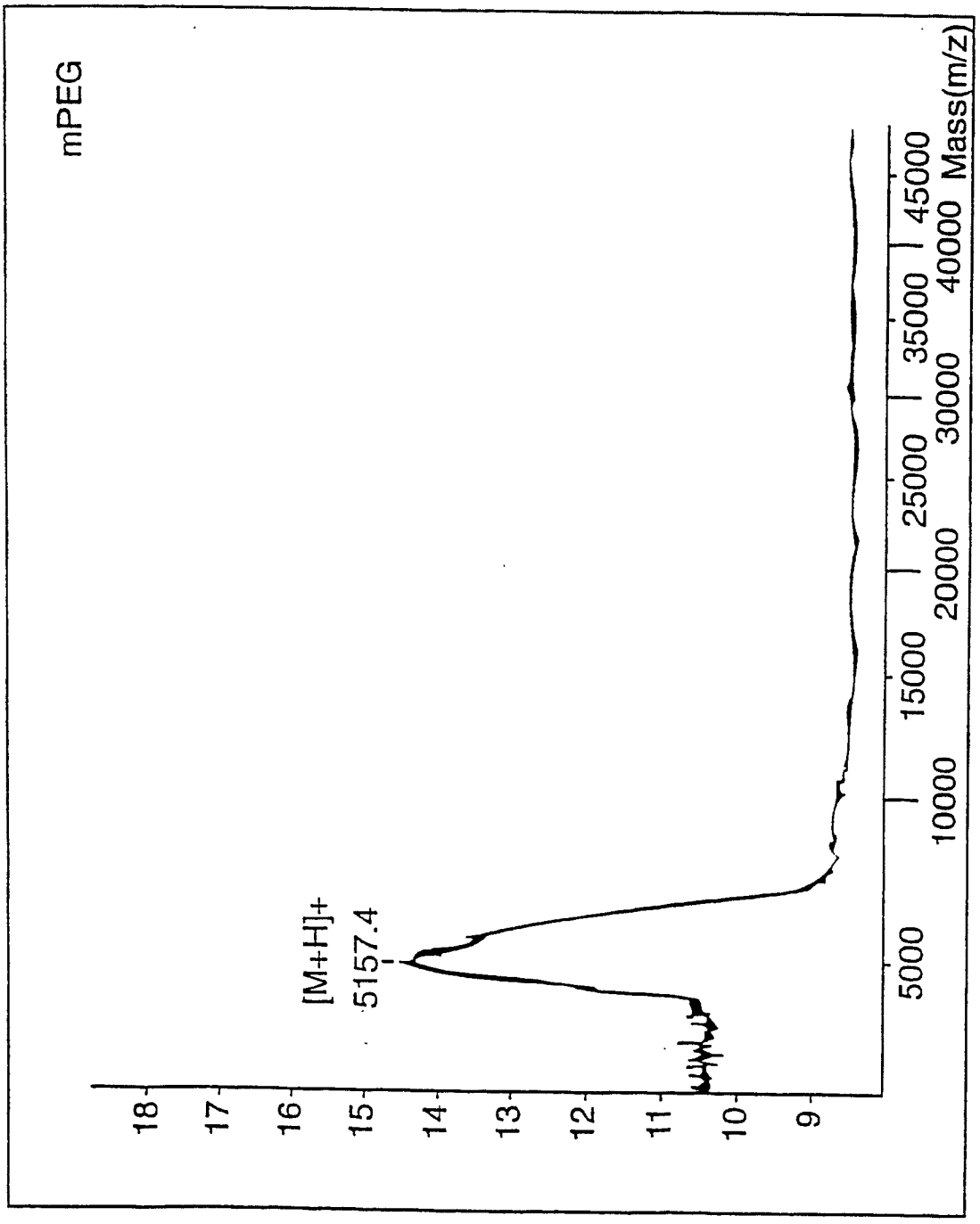
mPEG
[M+H]+
5157.4
18
17
16
15
14
13
12
11
10
9
5000
10000
15000
20000
25000
30000
35000
40000
45000
Mass(m/z)

图3 A

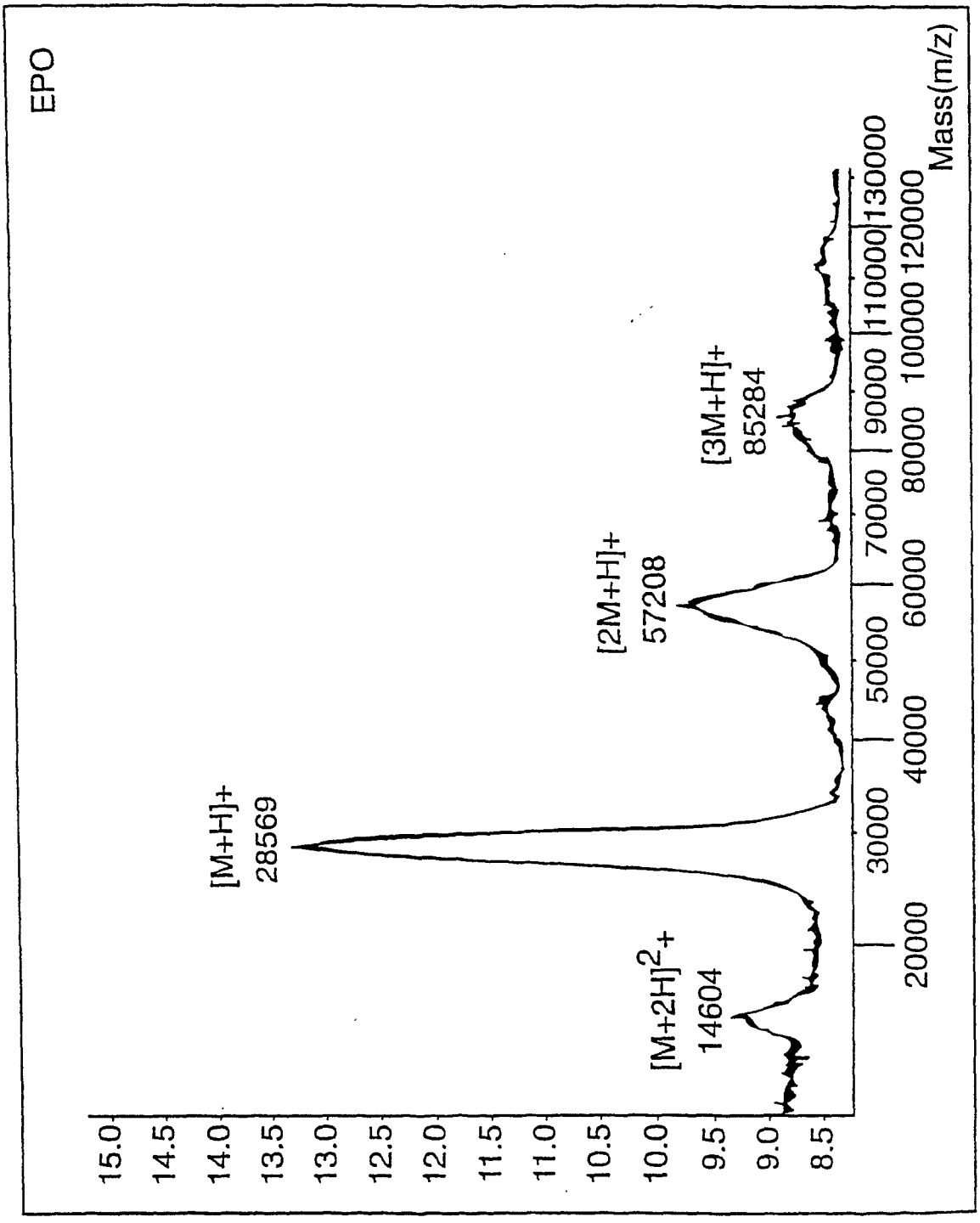
EPO
[M+H]+
28569
[2M+H]+
57208
[3M+H]+
85284
[M+2H]2+
14604
15.0
14.5
14.0
13.5
13.0
12.5
12.0
11.5
11.0
10.5
10.0
9.5
9.0
8.5
20000
30000
40000
50000
60000
70000
80000
90000
100000
110000
120000
130000
Mass(m/z)

图 3B

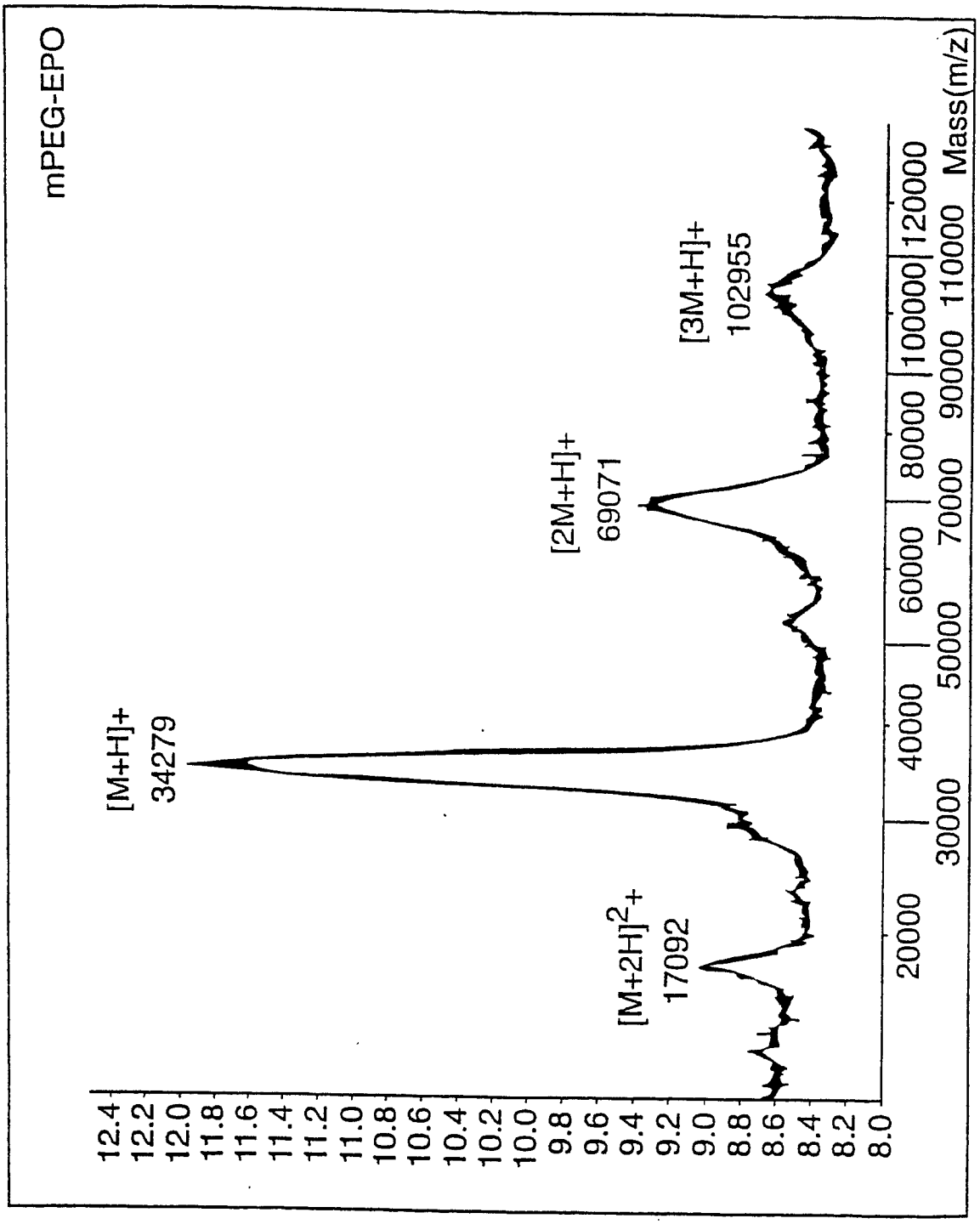
mPEG-EPO
[M+H]+
34279
[M+2H]2+
17092
[2M+H]+
69071
[3M+H]+
102955
12.4
12.2
12.0
11.8
11.6
11.4
11.2
11.0
10.8
10.6
10.4
10.2
10.0
9.8
9.6
9.4
9.2
9.0
8.8
8.6
8.4
8.2
8.0
20000
30000
40000
50000
60000
70000
80000
90000
100000
110000
120000
Mass(m/z)

图3C

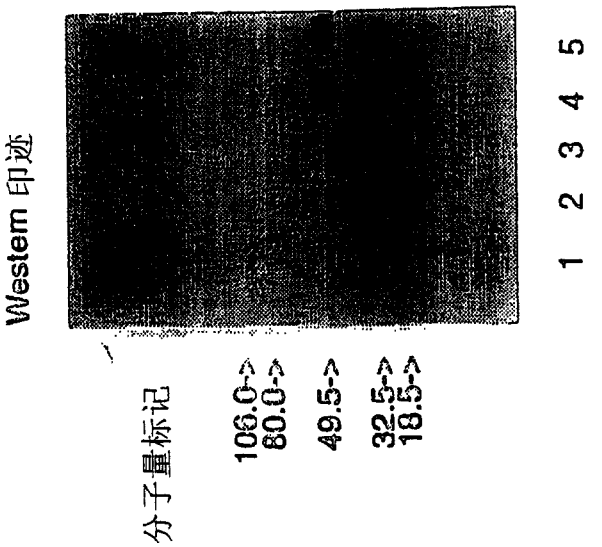
Western 印迹
分子量标记
106.0->
80.0->
49.5->
32.5->
18.5->
1 2 3 4 5

图 4B

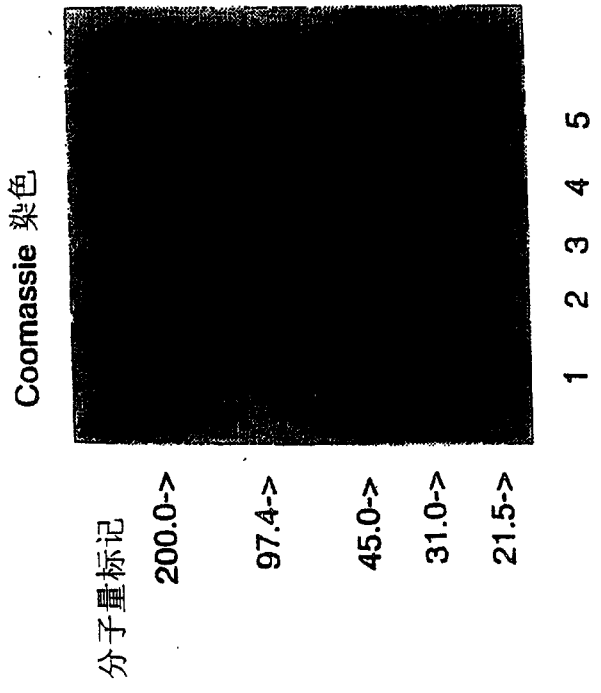
Coomassie 染色
分子量标记
200.0->
97.4->
45.0->
31.0->
21.5->
1 2 3 4 5

图 4A

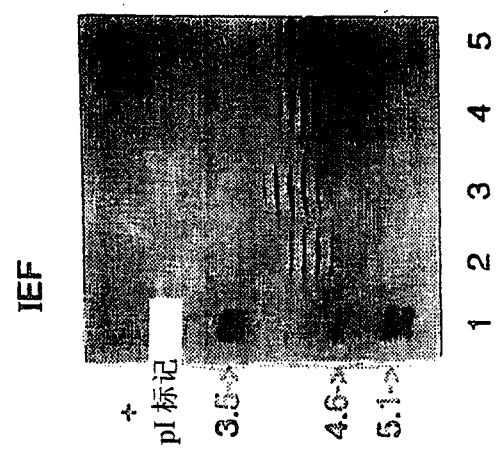
IEF
+
pI 标记
3.6-3.
4.6-4.
5.1-5.
1 2 3 4 5

图 4D

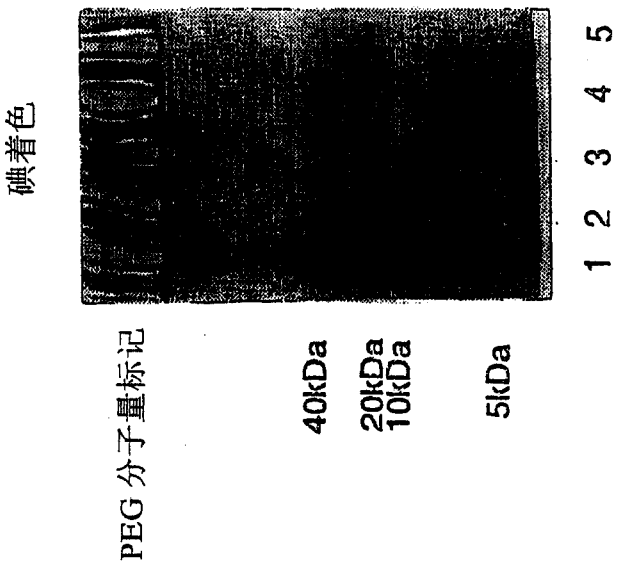
碘着色
PEG 分子量标记
40kDa
20kDa
10kDa
5kDa
1 2 3 4 5

图 4C

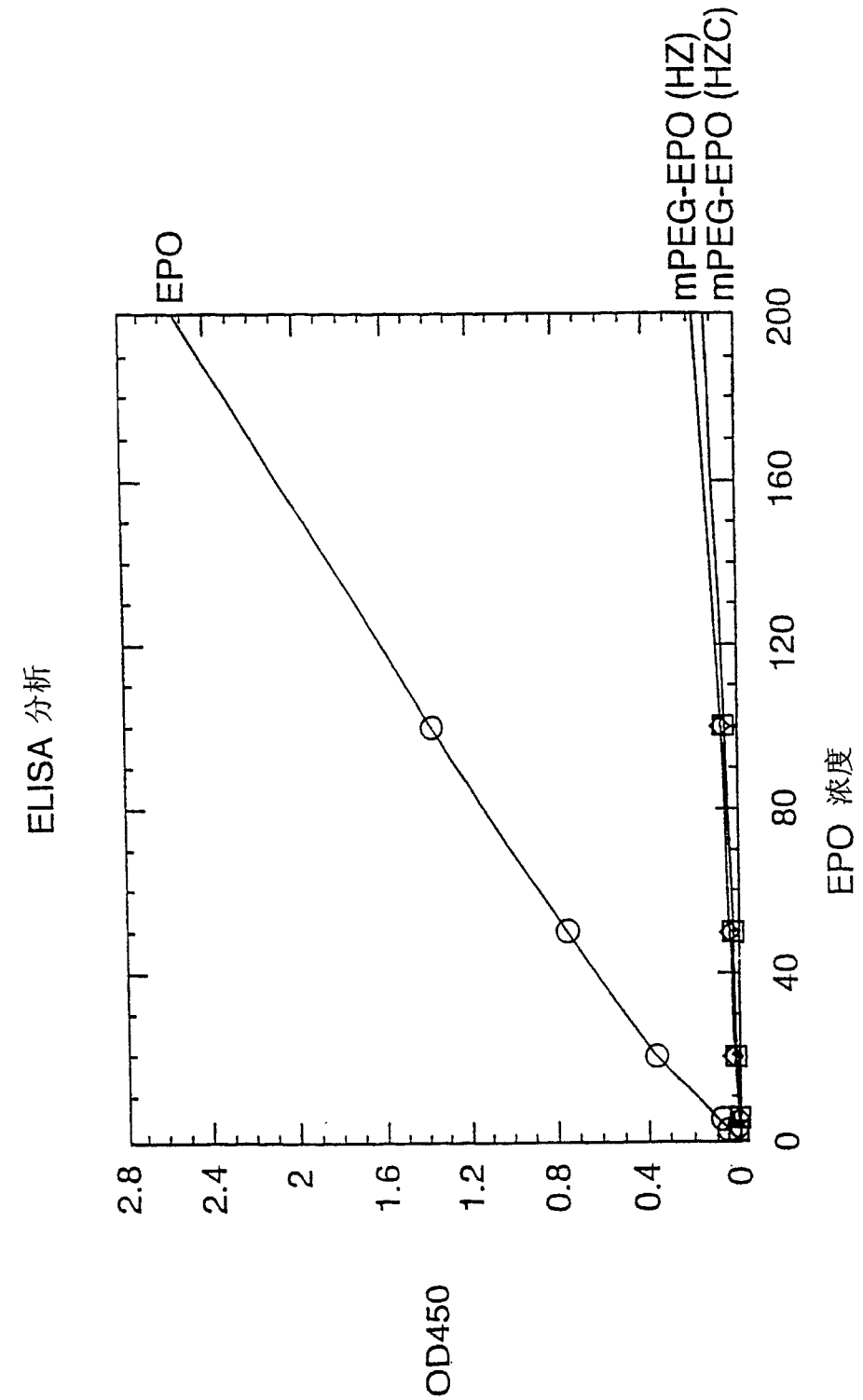
ELISA 分析
EPO
mPEG-EPO (HZ)
mPEG-EPO (HZC)
OD450
2.8
2.4
2
1.6
1.2
0.8
0.4
0
0
40
80
120
160
200
EPO 浓度

图 5

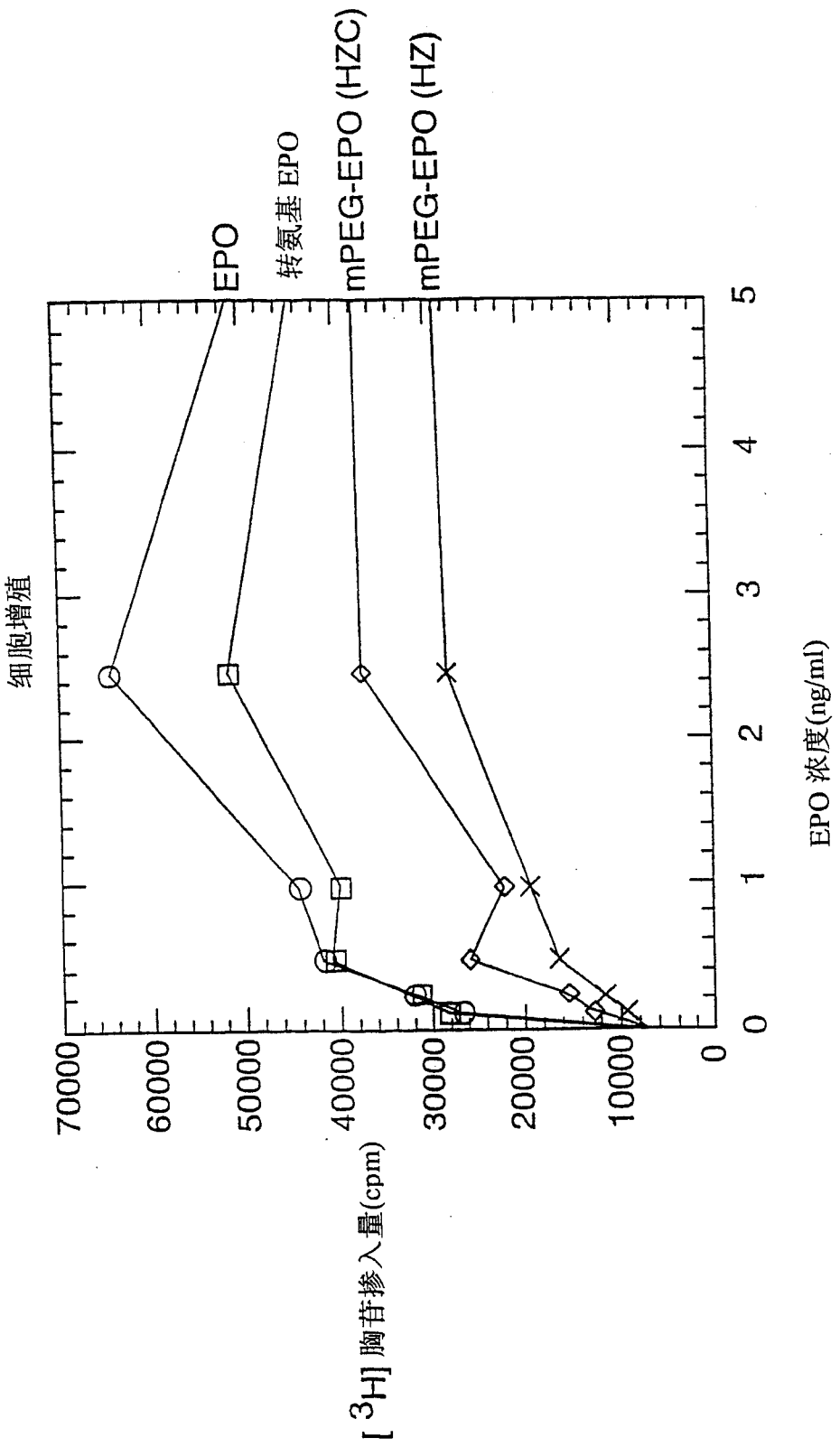
细胞增殖
[3H] 胸苷掺入量(cpm)
EPO 浓度(ng/ml)
EPO
转氨基 EPO
mPEG-EPO (HZC)
mPEG-EPO (HZ)
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
1
2
3
4
5

图 6

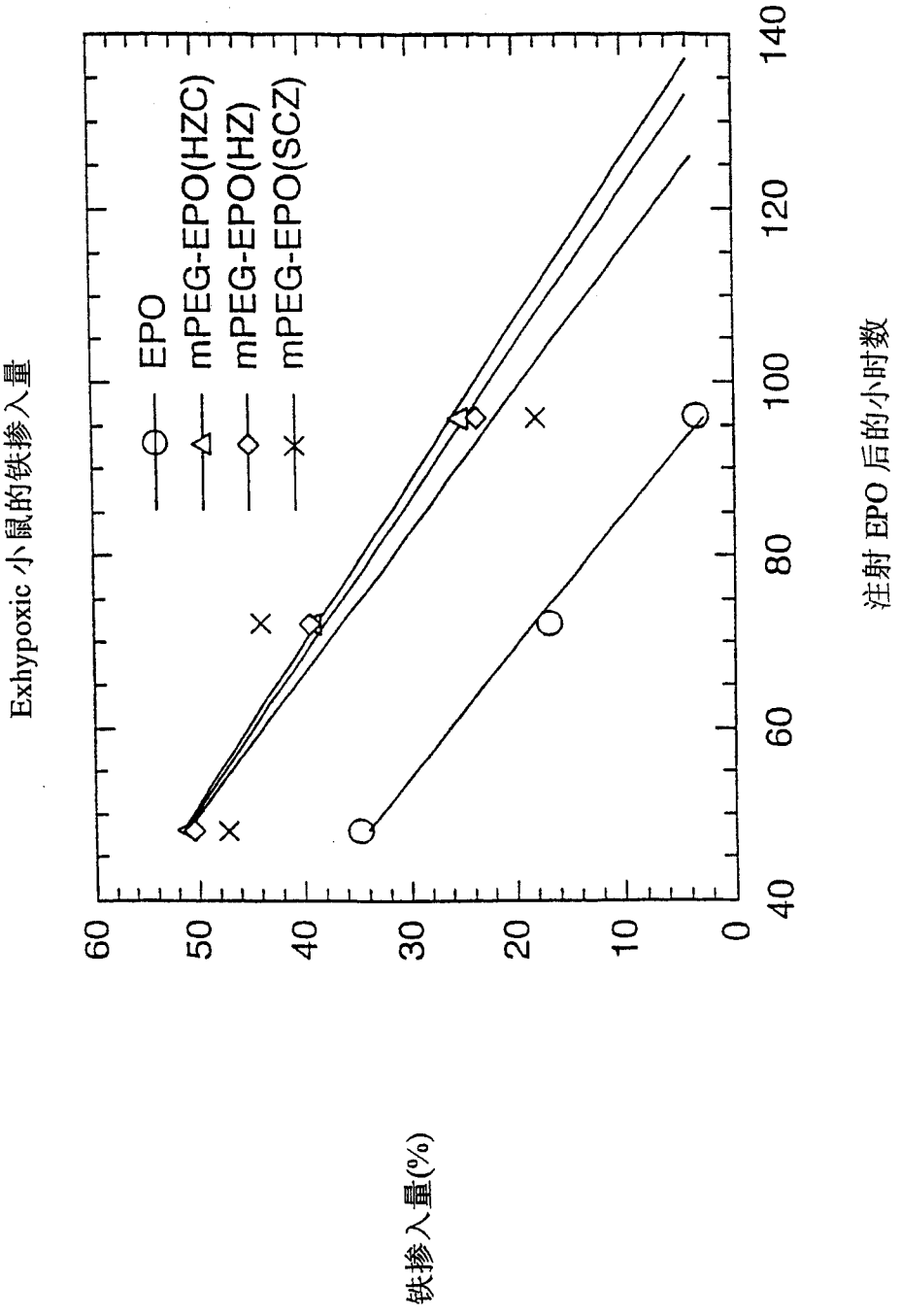
Exhypoxic 小鼠的铁掺入量
EPO
mPEG-EPO(HZC)
mPEG-EPO(HZ)
mPEG-EPO(SCZ)
铁掺入量(%)
注射 EPO 后的小时数
60
50
40
30
20
10
0
40
60
80
100
120
140

图 7