



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104363926 B

(45)授权公告日 2017.06.23

(21)申请号 201380031844.6

(22)申请日 2013.06.17

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104363926 A

(43)申请公布日 2015.02.18

(30)优先权数据

1210770.2 2012.06.18 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.12.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2013/051567 2013.06.17

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/190272 EN 2013.12.27

(73)专利权人 宝力泰锐克斯有限公司

地址 英国剑桥

(72)发明人 A·戈德温

(74)专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

代理人 钟守期 侯婧

(51)Int.Cl.

A61K 47/58(2017.01)

A61K 47/59(2017.01)

C08G 65/329(2006.01)

(56)对比文件

CN 101820920 A, 2010.09.01,

US 7985838 B2, 2011.07.26,

Yuehua Cong等.Site-Specific

PEGylation at Histidine Tags.

《Bioconjugate Chemistry》.2012,第23卷第248-263页.

王良友等.多肽和蛋白质的聚乙二醇化修饰方法.《有机化学》.2003,第23卷(第11期),第1320-1323页.

审查员 刘应梅

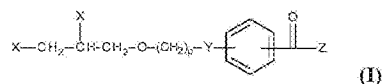
权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称

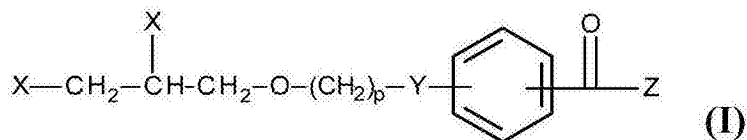
缀合试剂

(57)摘要

本发明提供一种通式化合物,其中每个X独立地代表聚合物链;p代表1-6的整数;Y代表酰胺基;且Z代表-CH₂·(CH₂L)₂或-C(CH₂L)(=CH₂),其中每个L独立地代表离去基团。所述化合物是可用于将聚合物缀合至蛋白质上的试剂,所得缀合物是新的并且也构成本发明的一部分。



1. 以下通式的化合物



其中每个X独立地代表聚(乙二醇); p代表1-6的整数; Y代表酰胺基; Z代表 $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{L})_2$ 或 $-\text{C}(\text{CH}_2\text{L})(=\text{CH}_2)$, 其中每个L独立地代表离去基团。

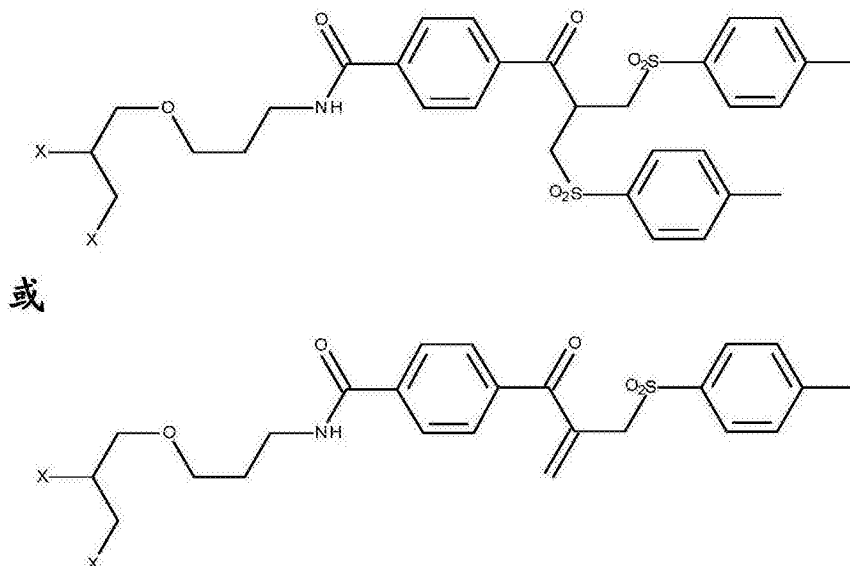
2. 权利要求1的化合物, 其中Y代表 $-\text{NH}-\text{CO}-$ 。

3. 权利要求1或2的化合物, 其中p是3。

4. 权利要求1或2的化合物, 其中每个L独立地代表 $-\text{SR}$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}$ 、 $-\text{OSO}_2\text{R}$ 、 $-\text{N}^+\text{R}_3$ 、 $-\text{N}^+\text{HR}_2$ 、 $-\text{N}^+\text{H}_2\text{R}$ 、卤素、或 $-\text{O}\text{O}$, 其中R代表氢原子或烷基、芳基或烷芳基, 且 OO 代表含有至少一个吸电子取代基的取代芳基。

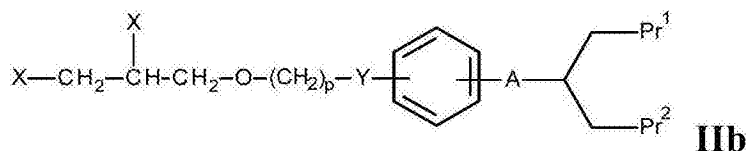
5. 权利要求4的化合物, 其中每个L独立地代表苯磺酰基或甲苯磺酰基。

6. 权利要求1的化合物, 其具有式:



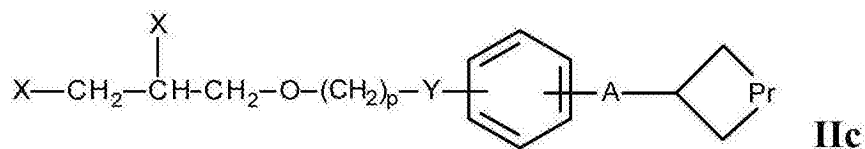
7. 权利要求6的化合物, 其中每个X独立地代表式 $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-$ 的聚乙二醇, 其中m是X中环氧乙烷单元的数量。

8. 以下通式的化合物



其中X、p和Y具有上述权利要求任一项中给定的含义, A代表基团 CO 、 CHOH 、 CHNH_2 、 CHNHR 、 CHNR_2 、 CHOR 、 $\text{CHOC}(\text{O})\text{R}$ 、 $\text{CHNHC}(\text{O})\text{R}$ 或 $\text{CHN}(\text{C}(\text{O})\text{R})_2$, 其中每个R代表氢原子或烷基、芳基或烷芳基, 且每个 Pr^1 和 Pr^2 代表独立的蛋白质或肽分子或 Pr^1 和 Pr^2 二者一起代表在两个独立的点处结合的单个蛋白质或肽。

9. 权利要求8的化合物, 其具有通式:



其中X、p、Y和A具有权利要求8中给定的含义，且Pr代表在两个不同点上结合的单个蛋白质或肽。

10. 权利要求9的化合物，其中Pr代表单个蛋白质或肽，其结合至来自所述蛋白质或肽中的二硫键的两个硫原子、或结合至与所述蛋白质或肽连接的聚组氨酸标签中存在的两个组氨酸残基。

11. 权利要求9或10的化合物，其中Pr代表IgG Fab片段、INF- α 、INF- β 或复合INF。

12. 制备权利要求8-11中任一项的化合物的方法，其包括将权利要求1-7中任一项的化合物与蛋白质或肽反应；以及任选地将所得缀合物中的酮基还原。

13. 药物组合物，其包括权利要求1-7中任一项的化合物与可药用载体，并任选地还包括其他活性成分。

14. 权利要求1-7中任一项的化合物或权利要求13的药物组合物在制备用于治疗患者的药物中的用途。

缀合试剂

[0001] 本发明涉及用于将聚合物缀合到蛋白质和肽的新型缀合试剂,还涉及生产新型缀合物的新方法。

[0002] 许多治疗活性分子,例如蛋白质,不具有在临床医学用途中达到效果所需要的性质。例如,许多天然蛋白质不能作为良好的药物,因为在将其给予患者时有几个固有缺点,包括:(1)蛋白质被多种存在于血液或组织中的肽链内切酶和肽链端解酶消化;(2)在一定程度上,几乎所有的蛋白质都是免疫原性的;和(3)蛋白质能被肾脏超滤作用和细胞内吞作用快速地排泄。一些被发现可在医学上作为活性治疗剂的分子具有全身毒性或缺乏最佳生物利用度和药物动力学。如果蛋白质很快地从血液循环清除,则它们通常不得不被频繁地给予患者。频繁的给药进一步提高毒性风险,尤其是免疫学衍生的毒性。通常很难达到治疗有效剂量,因此效力受损。因此,快速清除既是效力问题也是安全性问题。

[0003] 水溶性合成聚合物,特别是聚亚烷基二醇,被广泛用于缀合治疗活性分子如蛋白质。通过延长循环时间和降低清除率,这些治疗缀合物已显示可有利地改变药物动力学,降低全身毒性,并且在一些情况下,显示出提高的临床效力。将聚乙二醇PEG共价缀合到蛋白质的方法通常称为“PEG化”。

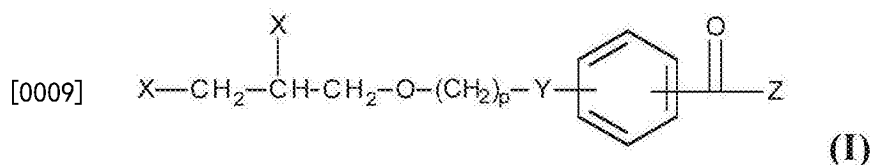
[0004] 对于使效力最优化和确保剂量之间的一致性非常重要,对于每个分子,缀合到每个蛋白质的缀合聚合物分子的数量是相同的,并且各聚合物分子特异性地共价缀合到每个蛋白质分子的相同的氨基酸残基上。在沿着蛋白质分子的位点上非特异性缀合会导致缀合产物分布,且通常未缀合的蛋白质形成难以纯化且纯化成本高的复杂混合物。

[0005] WO 2005/007197公开了一系列新型缀合试剂,所述缀合试剂可用于与蛋白质的亲核基团反应从而产生蛋白质-聚合物缀合物。这些试剂发现特别有用,因为其能够与来自蛋白质中的二硫键的两个硫原子缀合从而形成硫醚缀合物,并且也能用于缀合其它亲核试剂,例如与两个组氨酸残基,例如在与蛋白质连接的聚组氨酸标签中的两个组氨酸残基缀合,如WO 2009/047500中记载的。

[0006] 对于一些用途,需要将两个聚合物链缀合到蛋白质上,因为含有给定分子量的单链的缀合物的空间性质可明显不同于含例如各具有一半分子量的两条链的缀合物的性质。可用于这种缀合作用的试剂是已知的。因此,例如,US 5,932,462 (Harris) 公开了能将两条PEG链缀合到蛋白质的试剂。Cong et al, Bioconjugate Chemistry 23 (2012), pp.248-263 也公开了能将两条PEG链缀合到蛋白质的试剂,具体地,如第249页图1的试剂3所示的PEG-双砜试剂。在Cong的试剂中,两个PEG链连接到作为苯基基团上的不同位置,所述苯基基团为该试剂与蛋白质反应官能团之间的连接基团。Cong的试剂能够将两个PEG链缀合到,例如,来自蛋白质中的二硫键的两个硫原子,或者缀合到与蛋白质连接的聚组氨酸标签中存在的两个组氨酸残基,其与Harris的试剂相比提供了改良的缀合作用。

[0007] 现已发现能够将两条聚合物链缀合到蛋白质的新试剂,其显示超越Cong已知试剂的改良性质。

[0008] 因此,本发明提供通式化合物:



[0010] 其中每个X独立地代表聚合物链；p代表1-6的整数；Y代表酰胺基；且Z表示-CH₃、(CH₂L)₂或-C(CH₂L)(=CH₂)，其中每个L独立地代表离去基团。

[0011] 式I试剂含有两条聚合物链X。每个聚合物X可为，例如聚(亚烷基二醇)、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酸酯如聚(丙烯酰吗啉)、聚甲基丙烯酸酯、聚噁唑啉、聚乙烯醇、聚丙烯酰胺或聚甲基丙烯酰胺如聚羧甲基丙烯酰胺、或HPMA共聚物。另外，该聚合物可以是一种易受酶降解或水解降解的聚合物。这样的聚合物，例如包括聚酯、聚缩醛、聚(原酸酯)、聚碳酸酯、聚(亚氨基碳酸酯)、以及聚酰胺如聚(氨基酸)。聚合物可以是均聚物、无规共聚物或结构限定的共聚物如嵌段共聚物。例如，它可以是来自两个或更多个环氧烷、或者来自聚(环氧烷)与聚酯、聚缩醛、聚(原酸酯)、或聚(氨基酸)的共聚物，例如嵌段共聚物。所谓的Pluronics是PEG嵌段共聚物中重要的类别。这些都来自环氧乙烷和氧化丙烯嵌段。可使用的多官能聚合物包括二乙烯基醚-马来酸酐与苯乙烯-马来酸酐的共聚物。

[0012] 也可以使用天然存在的聚合物，例如，多糖如壳多糖、葡聚糖、糊精、脱乙酰壳多糖、淀粉、纤维素、糖原、聚唾液酸及其衍生物。可使用蛋白质作为聚合物。这样允许将一个蛋白质如抗体或抗体片段与另一个蛋白质如酶或其他活性蛋白质缀合。并且，如果使用含催化剂序列的肽，例如糖基转移酶的O-聚糖受体位点，则允许为随后的酶反应引入底物或目标物。也可使用聚(氨基酸)如聚谷氨酸或聚甘氨酸，也可使用来自天然单体如糖或氨基酸与合成单体如环氧乙烷或甲基丙烯酸的混合聚合物。

[0013] 优选地，用于本发明的每个聚合物是亲水的或水溶性的合成聚合物。如果聚合物是聚(亚烷基二醇)，则优选为一种含C₂和/或C₃单元的聚合物，特别是聚(乙二醇)(PEG)。除了上下文另有要求，本说明书中任何之处提及聚合物，都应理解为包括对PEG的具体提及。

[0014] 聚合物可任选地通过任何希望的方式衍生或官能化。反应性基团可连接到聚合物终点或末端基团，或沿着聚合物链通过侧链连接基团连接；在这种情况下，聚合物可以是，例如聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯或马来酸酐共聚物。这种官能化的聚合物提供了制备多聚缀合物(即聚合物缀合到多于一个分子上的缀合物)的又一个机会。例如，聚合物可以在沿着它长度的任何点上(例如在它的终点上)携带一个或多个药物分子。如果需要，可使用常规方法将该聚合物偶联到固体载体上。

[0015] 所述两条聚合物链X可以相同或者不同。特别是，每个X可以代表相同的化学聚合物，或不同的化学聚合物。例如，每个X均可代表PEG链，或一个X可代表PEG链且另一个X可代表不同的聚合物，例如PVP或蛋白质链。


[0016] 每个聚合物X可含有单个的直链，或其可具有包含许多或大或小的链的支化形态。通常，聚合物链通过合适的末端基团引发或终止，并且在该链的另一末端连接到式I分子的剩余部分。例如，PEG链可以具有选自烷氧基(如甲氧基)、芳氧基、羧基或羟基的末端基团。在该链是支化的情况下，每个自由支链终点都会携带末端基团。

[0017] 每个聚合物链X可具有任何合适的分子量，且每个聚合物链X可具有与另一个相同或不同的分子量。例如每个链可有至少5、10、15、20、30或40kDa的分子量。通常，每个链的优

选最大分子量是60kDa。当缀合物意在离开循环并渗入组织时,例如用于治疗由恶性肿瘤、感染或自身免疫疾病或者创伤引起的炎症时,可有利地使用聚合物(X+X)的总分子量在2000-30,000g/mol范围内的缀合物。对于缀合物意在保留在循环中的应用,使用总分子量较高的聚合物是有利的,例如在20,000-75,000g/mol范围内。

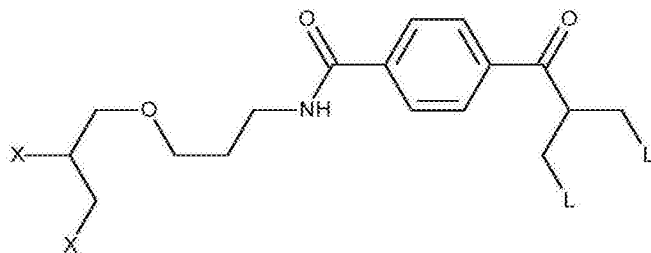
[0018] p代表1-6的整数,例如1、2,或特别是3。

[0019] 本发明的试剂包含酰胺基Y,如绘在式I中的Y可为-CO-NR'-或优选为-NR'-CO-,其中R'代表C₁₋₄烷基基团,例如甲基基团,或特别是氢原子。该基团可连接到式I中苯基的任何位置,但是优选-CO.Z基团的对位。如果需要,式I的苯基基团可携带另外的取代基,但是优选不被取代。

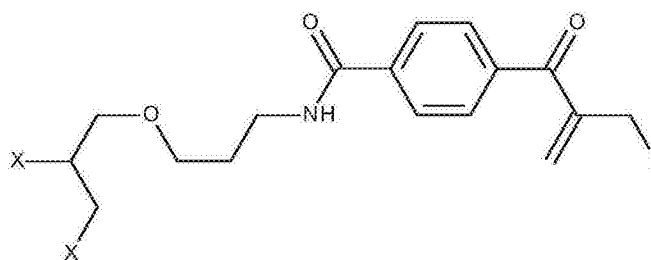
[0020] 离去基团L可代表例如-SR、-SO₂R、-OSO₂R、-N⁺R₃、-N⁺HR₂、-N⁺H₂R、卤素或-,其中R具有上述给出的含义,且代表取代的芳基,特别是苯基,包含至少一个吸电子取代基,例如-CN、-NO₂、-CO₂R、-COH、-CH₂OH、-COR、-OR、-OCOR、-OCO₂R、-SR、-SOR、-SO₂R、-NHCOR、-NRCOR、-NHCO₂R、-NRCO₂R、-NO、-NHOH、-NROH、-C=N-NHCOR、-C=N-NRCOR、-N⁺R₃、-N⁺HR₂、-N⁺H₂R、卤素如氯或特别是溴或碘、-C≡CR、-C=CR₂及-C=CHR,其中每个R独立地具有上述给出的含义之一。烷基或芳基磺酰基基团是特别优选的离去基团,苯磺酰基或特别是甲苯磺酰基是特别优选的。当存在两个L时,这些可以是不同的基团,但是优选它们是相同的基团。

[0021] 除非另有说明,可存在于式(I)化合物中任选取代的芳基(例如苯基)或杂芳基上的取代基包括,例如,一个或多个选自烷基(优选C₁₋₄烷基,特别是甲基,任选地被OH或CO₂H取代)、-CN、-NO₂、-CO₂R、-COH、-CH₂OH、-COR、-OR、-OCOR、-OCO₂R、-SR、-SOR、-SO₂R、-NHCOR、-NRCOR、NHCO₂R、-NR.CO₂R、-NO、-NHOH、-NR.OH、-C=N-NHCOR、-C=N-NR.CO₂R、-N⁺R₃、-N⁺H₃、-N⁺HR₂、-N⁺H₂R、卤素如氟和氯、-C≡CR、-C=CR₂和-C=CHR的相同或不同的取代基,其中每个R独立地具有上文给出的含义之一。优选的取代基,如果存在的话,包括例如CN、NO₂、-OR、-OCOR、-SR、-NHCOR、-NR.CO₂R、-NHOH和-NR.CO₂R。

[0022] 本发明特别优选的试剂具有下式:

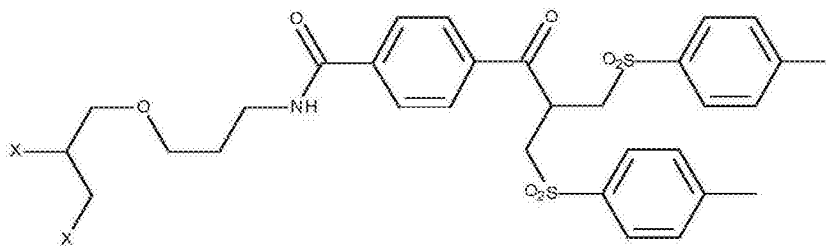


[0023] 或

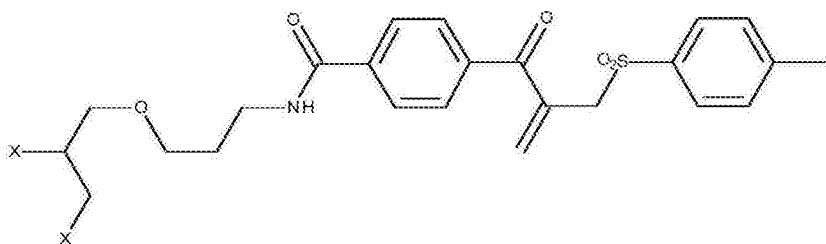


[0024] 在这些试剂中,优选X是聚乙二醇,特别是以甲氧基为终点的聚乙二醇,即CH₃O-(CH₂CH₂O)_m-,其中m是PEG中环氧乙烷单元的数量。另外,在这些试剂中,优选每个L是甲苯磺

酰基,因此为:

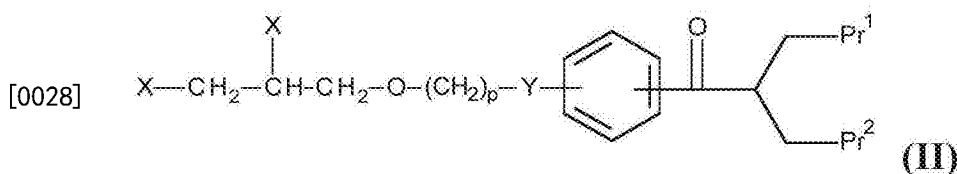


[0025] 或

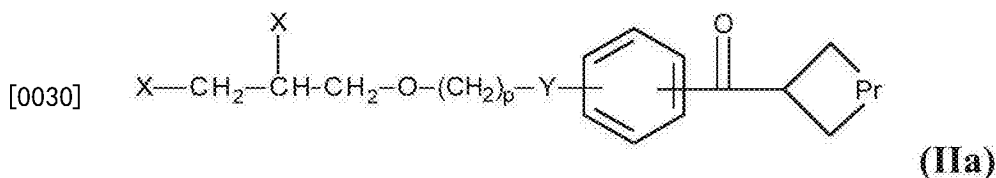


[0026] 式I化合物可用于缀合至蛋白质或肽。为了方便,本说明书中使用术语“蛋白质”,并且除非上下文另有要求,术语“蛋白质”的使用应理解为包括指肽。

[0027] 相应地,本发明还提供制备聚合物缀合物的方法,其包含将通式I化合物与蛋白质或肽反应。得到的缀合物具有以下通式:

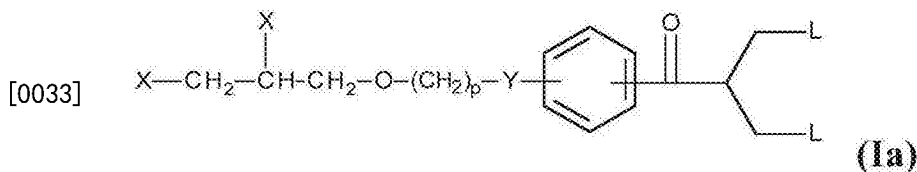


[0029] 其中X、p和Y具有上文给出的含义,且每个Pr¹和Pr²代表独立的蛋白质或肽分子,或Pr¹和Pr²在一起代表在两个独立的点处结合的单蛋白质或肽Pr,因此:



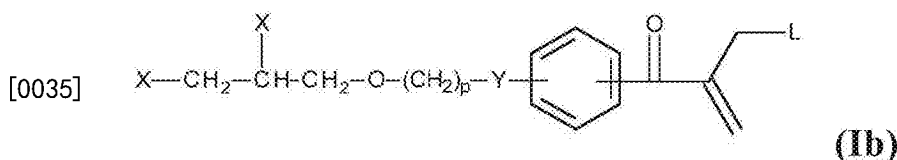
[0031] 优选Pr¹和Pr²一起代表单个蛋白质,该蛋白质结合至来自蛋白质中的二硫键的两个硫原子,或结合至与蛋白质连接的聚组氨酸标签中存在的两个组氨酸残基(即所得缀合物具有通式IV(a))。

[0032] 在式I试剂中,Z代表-CH₂-(CH₂L)₂或-C(CH₂L)(=CH₂)。这两个基团彼此化学等价。如果在式I试剂中Z代表-CH₂-(CH₂L)₂,即式Ia试剂:



[0034] 被用于在根据本发明的方法与蛋白质反应,则反应通过失去一个离去基团L并形成式I试剂的生成物而进行,其中在式I试剂的生成物中,Z表示-C(CH₂L)(=CH₂),即式Ib

的试剂:



[0036] 该试剂与蛋白质中的一个亲核体,如半胱氨酸、组氨酸或赖氨酸残基反应。随后,失去残留的离去基团L,并发生与第二亲核体(在第二个蛋白质分子中或与第一亲核体在同一个蛋白质分子中)的反应,从而形成所需的缀合物。因此,本发明的方法可以通过使用式Ia化合物作为起始材料进行,在这种情况下原位形成式Ib化合物,或使用预先形成的式Ib化合物作为起始材料。

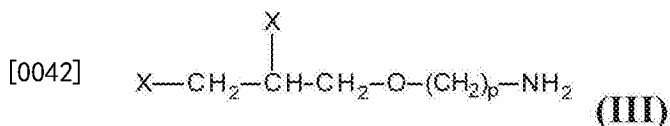
[0037] 可在WO 2005/007197和WO 2009/047500记载的反应条件下实现本发明的缀合反应。例如,所述方法可在所有反应物均可溶的溶剂或溶剂混合物中进行。例如,可允许蛋白质与聚合物缀合试剂在含水反应介质中直接反应。该反应介质还也可以是缓冲的,取决于亲核体的pH要求。反应的最佳pH通常为至少4.5,典型地为约5.0-约8.5,优选约6.0-7.5。当然,最佳的反应条件取决于使用的具体反应物。

[0038] 当使用含水反应介质时,反应温度在3-37℃通常是适合的。在有机介质(例如THF、乙酸乙酯、丙酮)中进行的反应通常在最高达环境温度的条件下进行。

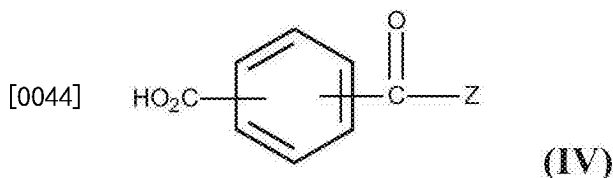
[0039] 在通过来自蛋白质中的二硫键的两个硫原子结合到蛋白质的情况下,本方法可通过原位还原二硫键随后将该还原产物与式I试剂反应而进行。优选地,在引入缀合试剂前还原二硫键并除去任何过量的还原剂,例如,通过缓冲液交换。可以使用常规方法用例如二硫苏糖醇、巯基乙醇或三羧乙基膦还原二硫化物。

[0040] 使用化学计算等量的或轻微过量的缀合试剂I能有效缀合蛋白质。然而,也有可能使用化学计算过量的缀合试剂进行缀合反应,并且这可能对一些蛋白质是理想的。在随后的缀合物提纯过程中,能容易地除去过量的试剂,例如通过离子交换色谱。

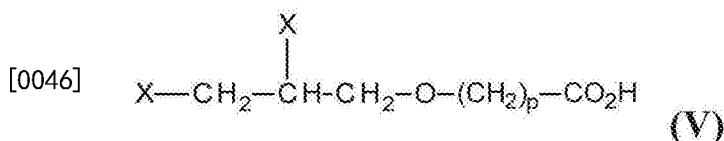
[0041] 通式I化合物,其中Z代表-CH₂·(CH₂L)₂,可通过将通式I化合物



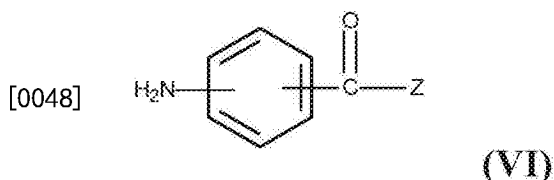
[0043] 与通式化合物



[0045] 反应,或通过将通式化合物



[0047] 与通式化合物



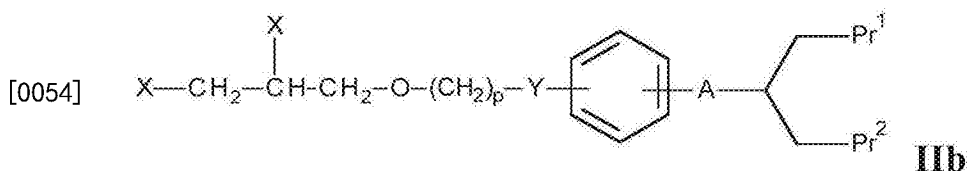
[0049] 反应而制备。

[0050] 在这两种情况下都形成酰胺基。如同在本领域中公知的,将反应形成酰胺基的CO₂H基团适当地激活以促进反应,例如通过形成活性酯、酰基氯、或酸酐,或通过使用激活剂如碳二亚胺直接与胺反应。

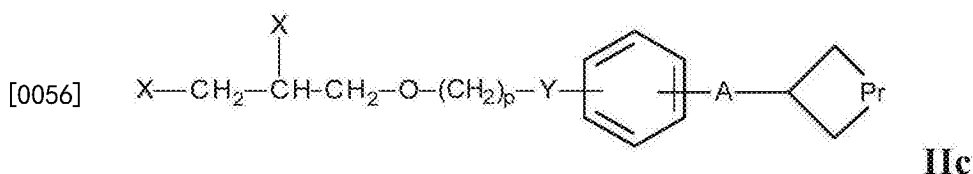
[0051] 如上文解释的,可通过从Z代表-CH₂-(CH₂L)₂基团的通式I的相应化合物中除去离去基团L而制备Z代表-C(CH₂L)(=CH₂)的通式I化合物。

[0052] 根据本发明方法的直接产物是仍包含与式I中苯环连接的酮基CO的缀合物,即上述式II缀合物,特别是IIa。然而,在合适的条件下,本发明的方法是可逆的。这样对于一些应用是理想的,例如要求快速释放蛋白质的情况,但是对于其它应用,快速释放蛋白质可能是不理想的。因此,需要通过还原酮基以产生阻止蛋白质释放的部分,通常是羟基OH,从而使缀合物稳定,但也可进行还原胺化,生成氨基CH₂NH₂、CH₂NHR或CH₂NR₂,其中每个R独立地具有上述含义。如果需要,这些基团可进一步反应,例如,羟基可通过与醚化剂反应而转化为醚基CH₂OR;通过羟基与酰化试剂反应,可以得到酯基CH₂OC(O)R;或者通过胺的酰化作用,可以形成酰胺CH₂NHC(O)R或CH₂NC(O)R₂。因此,本发明的方法可包括另外的还原缀合物中酮基的步骤。特别优选使用硼氢化物(例如硼氢化钠、硼氰化钠、硼氢化钾或三乙酰氧基硼氢化钠)作为还原剂。可使用的其它还原剂包括,例如,氯化锡(II)、醇盐如烷醇铝、和氢化铝锂。

[0053] 可由本发明方法制备的缀合物是新的,因此构成本发明本身的一部分。根据本发明的新型缀合物具有通式:



[0055] 其中X、p和Y具有上述给定的含义,A代表基团CO、CHOH、CH₂NH₂、CH₂NHR、CH₂NR₂、CH₂OR、CH₂OC(O)R、CH₂NHC(O)R或CH₂NC(O)R₂,其中每个R具有上述给定的含义,且每个pr¹和pr²代表独立的蛋白质或肽分子或pr¹和pr²二者一起代表在两个独立的点处结合的单个蛋白质或肽。优选的缀合物具有通式:



[0057] 其中X、p、Y和A具有上述给定的含义,且Pr代表在两个独立的点处结合的单个蛋白质或肽。

[0058] 当然,有可能多于一个的式I缀合试剂缀合到蛋白质,其中所述蛋白质含有足够的合适的结合点。例如,在含有两个不同二硫键的蛋白质中,或在含有一个二硫键并携带聚组

氨酸标签的蛋白质中,每分子蛋白质可能缀合两分子式I试剂。

[0059] 可使用本发明方法缀合的适合的蛋白质包括,例如,肽、多肽、抗体、抗体片段、酶、细胞因子、趋化因子、受体、血液因子、肽激素、毒素、转录蛋白质或多聚蛋白质。

[0060] 以下给出一些可利用本发明缀合的具体蛋白质。酶包括碳水化合物-特异性酶、蛋白水解酶等,如US 4179337公开的氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂合酶、异构酶和连接酶。感兴趣的酶包括天冬酰胺酶、精氨酸酶、腺苷脱氨酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、胰凝乳蛋白酶、脂肪酶、尿酸氧化酶、胆红素氧化酶、葡萄糖氧化酶、葡糖醛酸糖苷酶、半乳糖苷酶、葡糖脑苷脂酶 (glucocerebrosidase)、葡糖醛酸糖苷酶和谷氨酰胺酶。

[0061] 血液蛋白质包括白蛋白、运铁蛋白、凝血因子VII、凝血因子VIII或凝血因子IX、von Willebrand因子、胰岛素、ACTH、胰高血糖素、生长激素抑制剂、生长激素、胸腺素、甲状旁腺激素、色素激素、生长调节素类、红细胞生成素、促黄体激素、下丘脑释放因子、抗利尿激素、催乳素、白介素、干扰素如IFN- α 或IFN- β 、集落刺激因子、血红蛋白、细胞因子、抗体、抗体片段、绒毛膜促性腺激素、促卵泡激素、促甲状腺激素和组织血纤维蛋白溶酶原激活剂。

[0062] 其它感兴趣的蛋白质是由Dreborg et al Crit.Rev.Therap.Drug Carrier Syst. (1990) 6315-365公开过敏原蛋白质,其与聚合物如聚环氧烷缀合时具有降低的过敏性,因此适合用作耐药量诱导物。在公开的过敏原中有豚草属抗原E、蜂毒、螨过敏原等。

[0063] 感兴趣的有糖多肽如免疫球蛋白、卵白蛋白、脂肪酶、葡糖脑苷脂酶、凝集素、组织纤溶酶原激活剂和糖基化的白介素、干扰素和集落刺激因子,及免疫球蛋白IgG、IgE、IgM、IgA、IgD及其片段。

[0064] 有特别兴趣的是为诊断和治疗目的用于临床医学的受体和配体结合蛋白质与抗体和抗体片段。所述抗体可被单独使用或可与其他原子或分子如放射性同位素或细胞毒素的/抗感染的药品共价缀合(“负荷”)。表位可被用于疫苗接种以产生免疫原性聚合物-蛋白质缀合物。

[0065] 特别优选的蛋白质包括抗体片段如IgG Fab片段和干扰素如IFN- α 、IFN- β 和复合IFN。

[0066] 如果需要,所述蛋白质可以衍生化或官能化。特别是,在缀合之前,可使蛋白质如天然蛋白质与多种保护基团反应,以保护其上的敏感基团;或可使用本发明的方法或使用可替换的方法,使其与一个或多个聚合物或其它分子预先缀合。在本发明的一个优选实施方案中,蛋白质含有聚组氨酸标签,所述聚组氨酸标签是根据本发明的缀合试剂的标靶。

[0067] 本发明还提供一种药物组合物,所述药物组合物包括根据本发明的缀合物和可药用载体,且任选地还含有除了根据本发明的缀合物以外的活性成分;根据本发明的用于治疗缀合物;根据本发明的缀合物在生产药物方法中的用途;以及治疗患者的方法,其中包括向患者给予药用有效量的根据本发明的缀合物或药物组合物。

[0068] 现已发现,本发明的缀合试剂极其有用,可以对蛋白质进行高效地、位点特异性缀合,得到的新缀合物显示出高水平的稳定性。如以下实施例举例说明的,与Cong et al, Bioconjugate Chemistry 23 (2012), pp.248-263中类似的已知试剂相比,得到了显著改良效果。

[0069] 附图说明了在以下实施例中得到的结果:

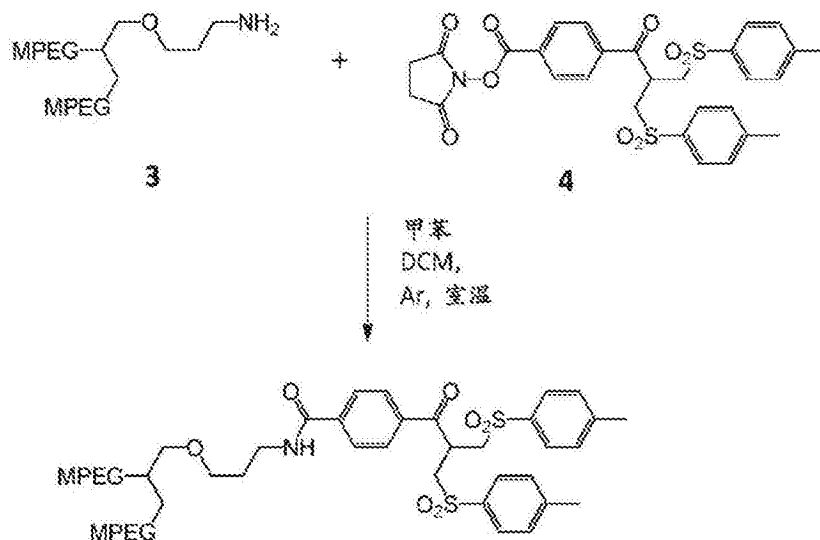
[0070] 图1说明在实施例2中得到的SDS-PAGE凝胶。

[0071] 图2、3和4说明实施例3中得到的SDS-PAGE凝胶。

[0072] 图5说明实施例4中得到的SDS-PAGE凝胶。

[0073] 以下实施例说明本发明。

[0074] 实施例1:PEG试剂1的制备

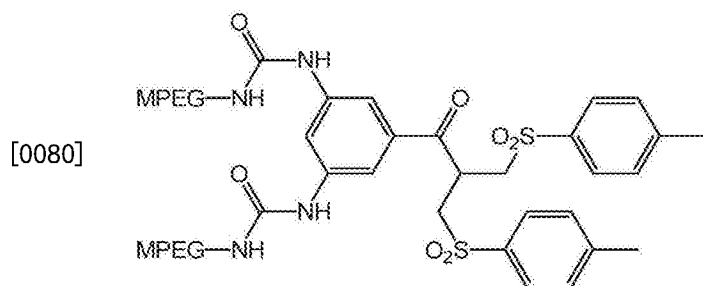


[0076] 40 (2x20) kDa分支的PEG胺3 (MPEG是 $\text{CH}_3\text{O} \cdot (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m$) 购自NOF CORPORATION (SUNBRIGHT GL2-400PA, 批次:M7D902)。根据Brocchini et al. Nat. Protoc. 2006, 1 (4), 2241-2252制备4-[2,2-二[(对甲苯磺酰基)甲基]乙酰基]苯甲酸-NHS酯4。

[0077] 向装有磁性搅拌棒的单颈圆底烧瓶中加入分支的PEG胺3 (300mg) 和甲苯 (8mL)。将形成的均一溶液用旋转蒸发仪减压蒸发2小时剩余固体残余物。将残余物在二氯甲烷 (15mL) 中溶解, 用隔膜密封所述烧瓶, 在氩气环境下搅拌混合物。向该溶液中加入活化的连接物4 (27mg), 用隔膜密封所述烧瓶, 在室温下搅拌该反应过夜。移去隔膜, 用旋转蒸发仪减压除去挥发性部分。向残余物中加入丙酮 (20mL), 温和加热 (30℃) 溶解固体。将所得溶液通过非吸收性的脱脂棉过滤到50mL离心管 (Falcon tube) 中。将所述溶液在干冰浴中冷却得到厚的浓沉淀物。离心 (-9℃, 4000rpm) 30分钟沉降所述沉淀物。倾倒出上清液, 将团球 (pellet) 在30℃再次溶于丙酮 (20mL)。如之前说明的进行沉淀、沉降和倾倒。进行第三轮的丙酮沉淀和沉降, 缓慢倒出上清液后, 将沉淀在-80℃冷冻, 然后在高真空下干燥至恒重, 得到为近于纯白的固体PEG试剂1 (227mg)。¹H NMR (CDCl_3): δ (ppm) 2.49 (s, 6H), 3.38 (s, 6H), 3.45-3.86 (m), 4.33 (m, 1H), 7.36 (AA'BB', 4H), 7.64 (AA'BB', 2H), 7.68 (AA'BB', 4H), 7.83 (AA'BB', 2H)。

[0078] 实施例2:PEG试剂1和2与人IgG Fab片段的反应性的比较

[0079] 在本实施例中, 将实施例的PEG试剂1与下列试剂即Cong et al. (同前) 的PEG试剂2比较, 其中MPEG是 $\text{CH}_3\text{O} \cdot (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{m-1}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$:



[0081] 将人IgG Fab片段溶液(4.0mg, 0.909mL) Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. Cat. No. 009-000-007) 用50mM磷酸钠, pH 7.4 (含150mM NaCl和20mM EDTA) 稀释到4.95mL。为了还原链间二硫键从而发生PEG化, 向Fab片段溶液加入1.0M DTT (50μL), 得到的最终DTT浓度为10mM。轻轻地混合所得溶液, 然后在4℃静置1小时。使用PD-10脱盐柱将还原Fab的溶液进行缓冲液交换成为50mM磷酸钠, pH 7.4 (含150mM NaCl和20mM EDTA)。将还原的Fab溶液等量地分为两份(3.5mL, ~2mg)。将两种PEG试剂: PEG试剂1和PEG试剂2以20mg/mL的浓度溶于50mM磷酸钠, pH 7.4 (含150mM NaCl和20mM EDTA)。向第一份Fab溶液中加入PEG试剂1 (75μL, 1.5mg), 并向第二份Fab溶液中加入PEG试剂2 (75μL, 1.5mg)。轻轻混合两个反应, 然后在4℃静置20小时。20小时后, 将粗反应混合物用SDS-PAGE分析。将所述凝胶用InstantBlue™染色, 用IMAGEQUANT™ LAS 4010设备成像。结果如图1所示。图1中, 泳道M指Novex蛋白质标准; 泳道1指人IgG Fab片段; 泳道2指来自20小时PEG试剂2的PEG化产品; 泳道3指来自20小时PEG试剂1的PEG化产品。从SDS-PAGE分析可以看出, 尽管PEG试剂1和2都成功地缀合到Fab片段, PEG试剂1的缀合效率是26%, 是PEG试剂2 (10%) 的两倍以上。

[0082] 实施例3: 用PEG试剂1和2制备的IFN α-2a缀合物的稳定性比较

[0083] 缀合物的制备: 在50mM磷酸钠缓冲液, pH 7.4 (含150mM NaCl和20mM EDTA) 中制备IFN α-2a (6.5mg, 0.845mg/mL) 溶液。用缓冲液 (313μL) 稀释蛋白质溶液, 然后加入1.0mM DTT水溶液 (水为187.5mL), 得到的最终DTT浓度为25mM, 反应体积为7.5mL。轻轻混合后, 将所述反应在室温静置30分钟。用PD-10柱将还原的蛋白质进行缓冲液交换成为50mM磷酸钠, pH 7.4 (含150mM NaCl和20mM EDTA)。将洗脱的蛋白质溶液离心 (3000g, 4℃, 5min), 然后将上层清液用UV吸光度测量法在280nm定量 (0.532mg/mL)。将蛋白质溶液用缓冲液稀释至0.10mg/mL。将PEG 1和2以20mg/mL的浓度溶于50mM磷酸钠, pH 7.4 (含150mM NaCl和20mM EDTA)。将还原的IFN α-2a (2.5mg, 24.8mL) 分别装入两个小瓶; 向第一小瓶加入PEG试剂1 (4.9mg, 0.245mL), 向第二小瓶加入PEG试剂2 (4.9mg, 0.245mL)。将反应轻轻混合并在4℃静置18小时。将最终反应混合物中所有还原的蛋白质通过顺序加入5mg/mL硫酸铜 (12.18μL) 然后加入50:50 (mM) GSH/GSSG (0.25mL) 而氧化。所述再氧化反应在4℃进行过夜。将述反应混合物用100mM pH4的乙酸钠稀释4倍, 然后用阳离子交换色谱 (Macrocap™ SP) 纯化, 纯化通过使用100mM pH4的乙酸钠 (1.0M NaCl) 梯度洗脱进行, 所需缀合物在0.60-0.65M NaCl处洗脱。

[0084] 稳定性比较1。用PEG试剂1和2制备的IFN α-2a缀合物的应力测试: 对于每个用1和2PEG化的IFN α-2a样品 (过滤除菌的PBS中), 准备四个小瓶。每个小瓶分别装有20μL浓度为200μg/mL的缀合物。每个待测样品的两个小瓶中含10mM DTT。将一个含DTT的小瓶和一个不含DTT的小瓶在50℃加热1小时。将其余小瓶在90℃加热10分钟。用SDS-PAGE分析样品 (与未缀合的蛋白质和未受应力的缀合物一起) 一将该凝胶用InstantBlue™染色, 并用

IMAGEQUANT™ LAS 4010设备成像,所得结果对于PEG 1-IFN α -2a和PEG 2-IFN α -2a分别示于图2和图3中。在图2和图3中,泳道M表示Novex蛋白质标准;泳道1表示IFN α -2a;泳道2表示PEG-IFN α -2a;泳道3表示PEG-IFN α -2a-50℃,1h;泳道4表示PEG-IFN α -2a-50℃,DTT,1h;泳道5表示PEG-IFN α -2a-90℃,DTT,10分钟;泳道6表示PEG-IFN α -2a-90℃,DTT,10分钟。

[0085] 图2和3显示,测试的两种缀合物都可在50℃稳定1个小时。然而,在10mM DTT存在时,在50℃加热1小时后,在用PEG试剂2制备的缀合物中观察到明显更多的游离蛋白质和聚集物。90℃、10分钟的热应力引起由2PEG化的缀合物释放游离蛋白质,但是没有引起由1PEG化的缀合物释放游离蛋白质。

[0086] 稳定性比较2。用PEG试剂1和2PEG化的IFN α -2a缀合物的加速稳定性研究,28天,40℃。在过滤除菌的PBS(含0.01% (w/v) NaN_3)中制备两种实验样品溶液,蛋白质浓度200 μ g/mL。对于每个PEG 1-IFN α -2a和PEG 2-IFN α -2a,在四个小瓶中加入100 μ L待测样品。将每个样品的小瓶立即冷冻于-80℃(t=0天)。将剩下的三个小瓶用parafilm®密封并储存在40℃。在第7、14和28天,从储存中取出一个样品在-80℃冷冻,直到实验完成。将实验样品在恒温37℃的水浴中迅速溶解并用SDS-PAGE分析(用InstantBlue™染色并用IMAGEQUANT™ LAS 4010设备成像),结果如图4所示,,其中泳道M代表Novex蛋白质标准;泳道1代表IFN α -2a(1 μ g);泳道2代表PEG 2-IFN α -2a,0天;泳道3代表PEG 2-IFN α -2a,7天;泳道4代表PEG 2-IFN α -2a,14天;泳道5代表PEG 2-IFN α -2a,28天;泳道6代表PEG 1-IFN α -2a,0天;泳道7代表PEG 1-IFN α -2a,7天;泳道8代表PEG 1-IFN α -2a,14天;泳道6代表PEG 1-IFN α -2a,28天。图4中,可以清楚看出PEG 2-IFN α -2a比PEG 1-IFN α -2a更不稳定,在每个时间点残余更多的游离蛋白质和更少的缀合物。

[0087] 实施例4:PEG试剂1与IFN- β -1b的缀合作用。

[0088] 为使还原的IFN- β -1b(9.5mg,0.3mg/mL),pH 7.3形成二硫键,加入PEG试剂1(1.7mL,20mg/mL)的溶液,pH 7.3。将所得溶液在22℃培养4小时,用SDS-PAGE分析粗反应混合物。将所述凝胶用InstantBlue™染色,用IMAGEQUANT™ LAS 4010设备成像。结果如图5所示。在图5中泳道M是Novex蛋白质标准;泳道1是初始的IFN- β -1b;泳道2是还原的IFN- β -1b;泳道3是PEG试剂1与IFN- β -1b的反应混合物。从SDS-PAGE分析可以看出,IFN- β -1b的PEG化成功地发生,具有110kDa蛋白质标准可见水平的产品谱带。

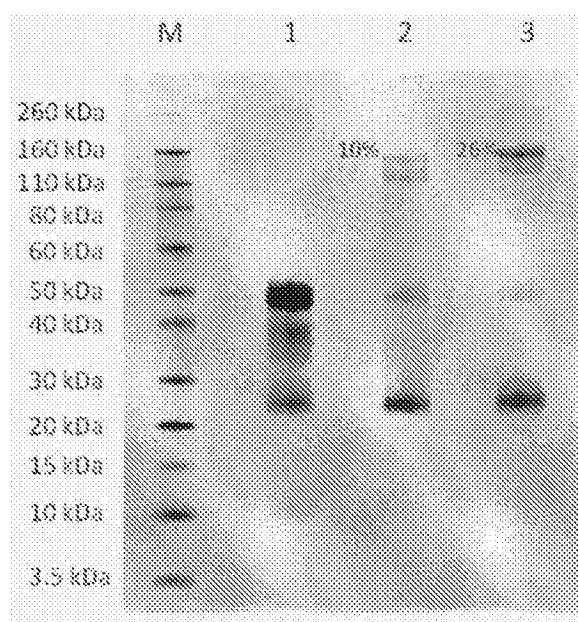


图1

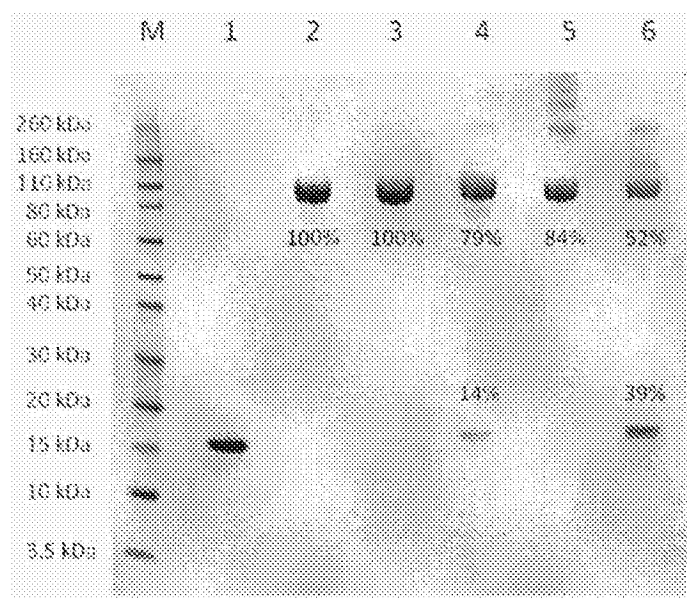


图2

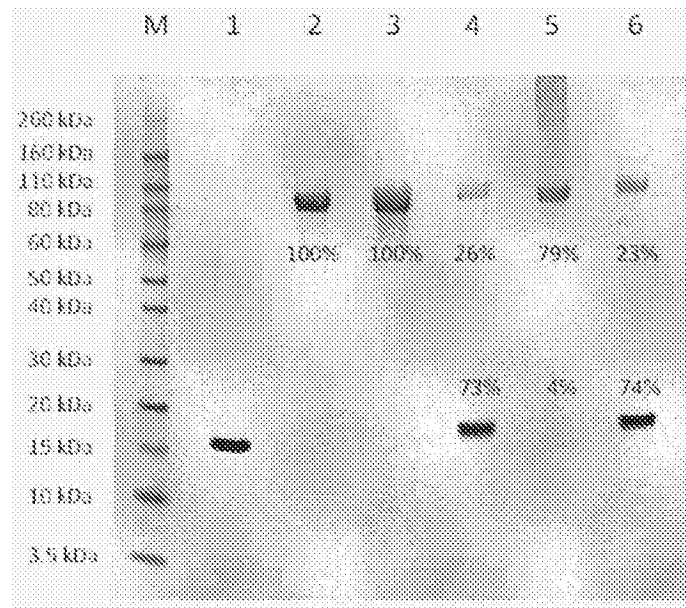


图3

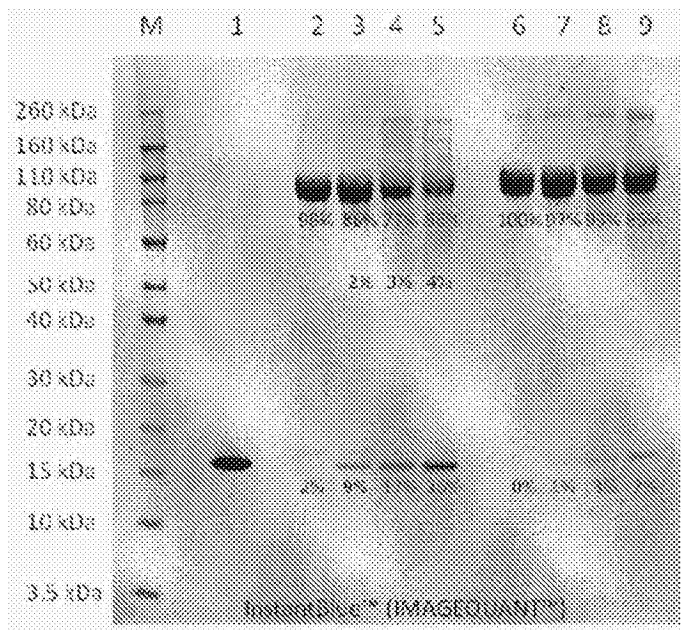


图4

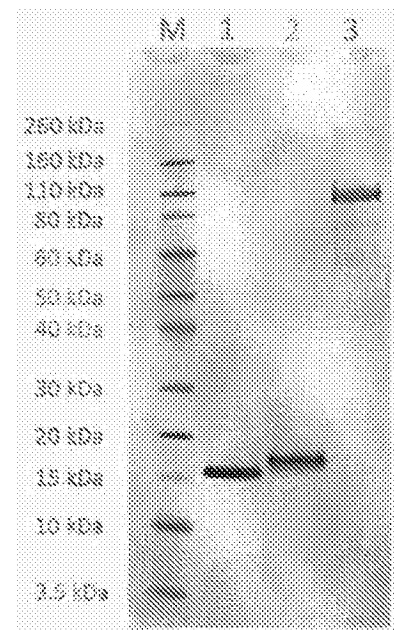


图5