



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104530182 A

(43) 申请公布日 2015.04.22

(21) 申请号 201410737723.X

代理人 江侧燕

(22) 申请日 2010.07.26

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

61/228,828 2009.07.27 US

61/347,136 2010.05.21 US

C07K 1/107(2006.01)

C12N 9/96(2006.01)

A61K 47/48(2006.01)

(62) 分案原申请数据

201080042343.4 2010.07.26

(71) 申请人 利普森技术有限公司

地址 英国伦敦

申请人 巴克斯特国际公司

巴克斯特医疗保健股份有限公司

(72) 发明人 S·杰因 G·格利戈里亚迪斯

A·德维伟迪 S·纳什 J·思科曼

S·海德 H·罗顿斯坦纳

P·图利克

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有

限公司 44205

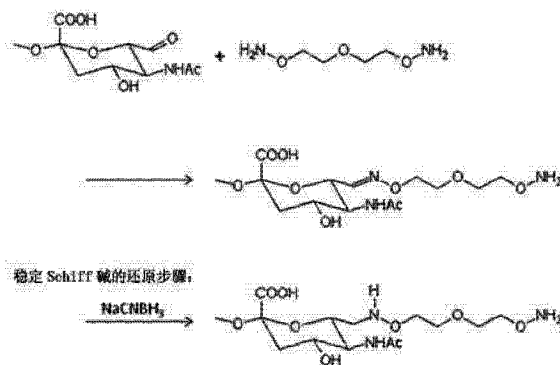
权利要求书1页 说明书21页 附图2页

(54) 发明名称

非凝血蛋白的糖基多唾液酸化

(57) 摘要

本发明公开了水溶性聚合物特别是多唾液酸(PSA)或改性PSA(mPSA),通过使氧化的碳水化合物部分与水溶性聚合物接触,缀合到非凝血蛋白的糖蛋白的氧化的碳水化合物部分,或缀合至神经节苷脂,或缀合至药物传递系统,其中所述水溶性聚合物包含氨氧基以及在氧化的碳水化合物部分和水溶性聚合物上的氨氧基之间形成脞键,或其中所述水溶性聚合物包含酰肼基以及在氧化的碳水化合物部分和水溶性聚合物的酰肼基之间形成脞键。由此得到氨氧-水溶性聚合物或酰肼-水溶性聚合物例如 PSA 和 mPSA 的缀合物,其中 PSA 和 mPSA 通过碳水化合物部分连接。



1. 一种将多唾液酸 (PSA) 或改性 PSA (mPSA) 与包含碳水化合物基团的非凝血蛋白的糖蛋白的氧化的碳水化合物部分缀合的方法, 所述方法包括在能够缀合的条件下使所述氧化的碳水化合物部分与 PSA 或 mPSA 接触, 其中所述 PSA 或 mPSA 包含酰肼基, 以及在所述氧化的碳水化合物部分与所述 PSA 或 mPSA 的酰肼基之间形成腙键。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述 PSA 或 mPSA 为多聚乙酰神经氨糖酸或改性多聚乙酰神经氨糖酸。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中所述 PSA 或 mPSA 包含 2-500 个唾液酸单元。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中所述糖蛋白选自细胞因子、集落刺激因子、植物蛋白、肿瘤坏死因子、白细胞介素受体、生长因子、激素、免疫球蛋白、半乳糖苷酶、DNA 酶、它们的片段, 以及包含任何上述蛋白或其片段的融合蛋白。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中所述糖蛋白选自白细胞间介素、 $\alpha$ -干扰素、 $\beta$ -干扰素以及  $\gamma$ -干扰素、粒细胞集落刺激因子、成纤维细胞生长因子、血小板源性生长因子、磷脂酶激活蛋白 (PUP)、胰岛素、凝集素和蓖麻毒素、肿瘤坏死因子、可溶型肿瘤坏死因子受体、可溶型白细胞介素受体、组织生长因子、转化生长因子、表皮生长因子、生长调节素、色素激素、下丘脑释放因子、抗利尿激素、催乳素、绒膜促性腺激素、促卵泡激素、促甲状腺素、组织型纤溶酶原激活剂、IgG、IgE、IgM、IgA、IgD、单克隆抗体、促红细胞生成素 (EPO)、 $\alpha$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、胎球蛋白、它们的片段, 以及包含任何上述蛋白或其片段的融合蛋白。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中在所述糖蛋白选自 TGF  $\alpha$ 、TGF  $\beta$  或它们的片段, 以及包含任何上述蛋白或其片段的融合蛋白。

7. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其包括通过用高碘酸钠 ( $\text{NaIO}_4$ ) 与糖蛋白温育来氧化所述碳水化合物部分。

8. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其包括氧化 PSA 或 mPSA 以在 PSA 或 mPSA 的末端单元上形成醛基, 并使所述氧化的 PSA 或 mPSA 与酰肼连接剂反应。

9. 根据权利要求 8 所述的方法, 其包括用  $\text{NaIO}_4$  氧化 PSA 或 mPSA。

10. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其包括使所述氧化的碳水化合物部分在含有选自苯胺和苯胺衍生物的亲核催化剂的缓冲液中与 PSA 或 mPSA 接触。

11. 根据权利要求 10 所述的方法, 所述酰肼基通过氧化的 PSA 或 mPSA 与酰肼连接剂反应形成。

12. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 进一步包括在还原性化合物存在下, 通过进行温育来还原缀合的糖蛋白中的腙键。

13. 根据权利要求 12 所述的方法, 其中所述还原性化合物为氰基硼氢化钠 ( $\text{NaCNBH}_3$ ) 或抗坏血酸 (维生素 C)。

14. 可通过权利要求 1-13 中任一项所述的方法得到的缀合糖蛋白。

15. 一种非凝血蛋白的缀合糖蛋白, 其包括:

(a) 所述糖蛋白; 以及

(b) 与 (a) 中的糖蛋白结合的至少一种酰肼-PSA 或酰肼-mPSA, 其中所述酰肼-PSA 或酰肼-mPSA 通过一个或多个碳水化合物部分连接到所述糖蛋白上。

## 非凝血蛋白的糖基多唾液酸化

[0001] 相关申请

[0002] 本申请的原申请是发明专利申请日为2010年7月26日,申请号为201080042343.4,发明名称为《非凝血蛋白的糖基多唾液酸化》的分案申请,原申请要求申请日为2009年7月27日的美国申请61/228,828,以及申请日为2010年5月21日的美国申请61/347,136的优先权。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及用于将水溶性聚合物特别是多唾液酸,与含碳水化合物的化合物特别是非凝血蛋白的糖蛋白缀合的材料和方法,以及得到的缀合物。

### 背景技术

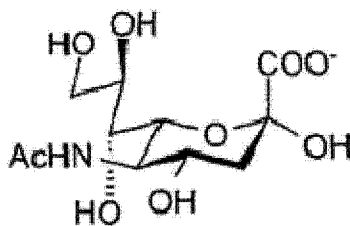
[0004] 例如通过聚乙二醇化或多唾液酸化 (polysialylation) 缀合的多肽药物防止该药物在血液循环中降解,并由此提高其药效学和药代动力学性质 (Harris 和 Chess, Nat Rev Drug Discov. 2003 ;2:214-21 ;S. Jain, D. Hreczuk-Hirst, P. Laing 和 G. Gregoriadis, Drug Delivery Systems and Sciences (药物传递系统和科学), 4 (No 1):3-9, 2004.)。聚乙二醇化方法把乙二醇重复单元 (聚乙二醇 (PEG)) 连接到多肽药物上。PEG 分子具有大的流体力学体积 (为球状蛋白质尺寸的5-10倍), 其水溶性高、高度水合、无毒、无免疫原性并且能够快速从体内清除。分子的聚乙二醇化可导致药物对酶降解的抵抗性提高、体内半衰期延长、给药频率减少、免疫原性降低、物理和热稳定性增加、溶解性增加、液体稳定性增加及聚集性减少。FDA 在二十世纪九十年代初批准了第一批聚乙二醇化药物。从那时起, FDA 已经批准了几批用于口服、可注射和局部给予的聚乙二醇化药物。

[0005] 已发现唾液酸 (也称 N-乙酰基神经氨酸) 和多唾液酸广泛分布于动物组织内, 较少数地分布于从植物和真菌至酵母和细菌的其它物种内, 大部分分布在糖蛋白和神经节苷脂内。

[0006] 本文所使用的缩写“PSA”指术语“多唾液酸”。同样地, 本文所使用的缩写“mPSA”指术语“改性多唾液酸”。

[0007] PSA 由 N-乙酰基神经氨酸的聚合物 (通常为均聚物) 构成。仲氨基一般具有乙酰基, 但它可具有乙醇酰基来代替乙酰基。羟基上可能的取代基包括乙酰基、乳酰基、乙基、硫酸基和磷酸基。

[0008]



[0009] N-乙酰基神经氨酸

[0010] Neu5Ac

[0011] 唾液酸 (N-乙酰基神经氨酸) 的结构

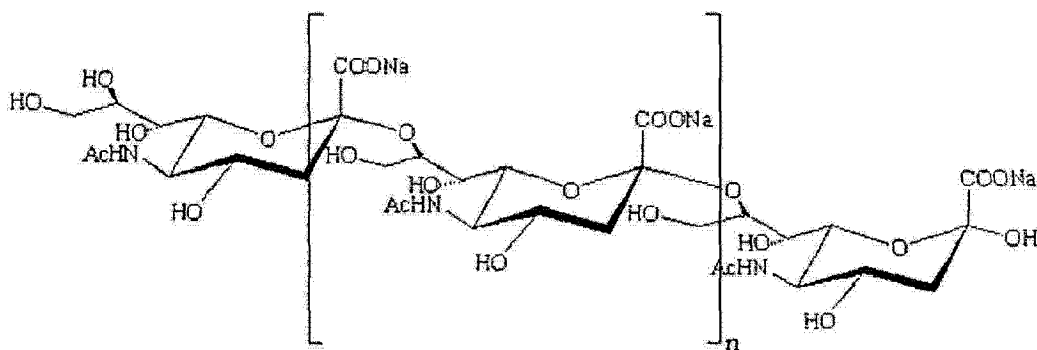
[0012] PSA 和 mPSA 通常包括主要由连接有 2, 8- 或 2, 9- 糖苷键或这些键的组合 (例如, 交替的 2, 8- 和 2, 9- 糖苷键) 的 N-乙酰基神经氨酸部分 (moiety) 构成的线性聚合物。在特别优选的 PSA 和 mPSA 中, 糖苷键为  $\alpha$ -2, 8 糖苷键。这类 PSA 和 mPSA 方便地衍生于多聚乙酰神经氨酸 (colominic acid), 并在本文中被称作“CA”和“mCA”。一般的 PSA 和 mPSA 包含至少 2 个, 优选至少 5 个, 更优选至少 10 个以及最优选至少 20 个 N-乙酰基神经氨酸部分。因此, 它们可包含 5-500 个 N-乙酰基神经氨酸部分, 优选 10-300 个 N-乙酰基神经氨酸部分。PSA 和 CA 可以是包含不同糖部分的聚合物。它们可以是共聚物。PSA 和 CA 优选基本上无除 N-乙酰基神经氨酸外的糖部分。PSA 和 CA 优选包含至少 90%, 更优选至少 95% 以及最优选至少 98% 的 N-乙酰基神经氨酸部分。

[0013] 在 PSA 和 CA 包含除 N-乙酰基神经氨酸外的部分 (例如在 mPSA 和 mCA 中) 的情况下, 它们优选位于聚合物链的一端或两端。这类“其它”部分可为例如末端 N-乙酰基神经氨酸部分经氧化或还原获得的部分。

[0014] 例如, WO-A-0187922 描述了这样的 mPSA 和 mCA, 其中通过与高碘酸钠反应, 非还原末端 N-乙酰基神经氨酸单元转化为醛基。另外, WO 2005/016974 描述了这样的 mPSA 和 mCA, 其中还原末端 N-乙酰基神经氨酸单元经还原而还原性地打开了还原末端 N-乙酰基神经氨酸单元上的环, 由此形成了邻二醇基, 随后经氧化将邻二醇基转化为醛基。

[0015] 在人体和其它有机体内, 富含唾液酸的糖蛋白与选择蛋白结合。它们在人类流感感染中起着重要作用。例如, 唾液酸可隐藏宿主细胞或细菌表面的甘露糖抗原而躲避甘露糖结合凝集素 (mannose-binding lectin)。这防止了补体的激活。唾液酸还隐藏倒数第二个半乳糖残基, 由此防止糖蛋白被肝实质细胞上的半乳糖受体快速清除。

[0016]



[0017] 多聚乙酰神经氨酸 (N-乙酰基神经氨酸的均聚物) 的结构

[0018] 特别地, CA 由具有 K1 抗原的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的特定菌株产生。CA 具有许多生理功能。它们是重要的药物和化妆品原料。

[0019] 使用多唾液酸化的天门冬酰胺酶和未改性的天门冬酰胺酶在体内进行的对比研究表明, 多唾液酸化延长了酶的半衰期 (Fernandes 和 Gregoriadis, *Biochimica Biophysica Acta* (生物化学与生物物理学报) 1341:26-34, 1997)。

[0020] 通过在水溶性聚合物和治疗性蛋白之间形成共价键制备缀合物可采用多种化学方法进行。一种用于将 PSA 偶联 (couple) 到治疗性蛋白的方法是聚合物经蛋白的碳水化

合物部分缀合。蛋白质中的碳水化合物的邻羟基 (OH) 易被高碘酸钠 (NaIO<sub>4</sub>) 氧化形成活性醛基 (Rothfus 和 Smith, J Biol Chem(生物化学杂志)1963 ;238:1402-10 ;van Lenten 和 Ashwell, J Biol Chem(生物化学杂志)1971 ;246:1889-94)。随后,可使用含有例如活性酰肼基的试剂将聚合物偶联至碳水化合物的醛基上 (Wilchek M 和 Bayer EA, Methods Enzymol(酶学方法)1987 ;138:429-42)。较新的技术是使用含有与醛反应形成肟键的氨基的试剂 (WO 96/40662, WO2008/025856)。

[0021] 美国公布 2009/0076237 中描述了其它的将 PSA 缀合到治疗性蛋白上的实施例,其教导氧化 rFVIII, 以及随后使用酰肼化学法偶联至 PSA 和其它水溶性聚合物 (例如 PEG、HES、右旋糖酐) 上 ;WO 2008/025856 教导氧化不同的凝血因子,例如 rFIX、FVIII 和 FVIIa, 以及随后偶联至例如 PEG 的聚合物上。

[0022] 最近,公开了一种改进的方法,该方法包括:用高碘酸盐温和地氧化唾液酸以生成醛,随后在催化量的苯胺存在下,与含氨基的试剂反应 (Dirksen A 和 Dawson PE, Bioconjugate Chem(生物缀合化学). 2008 ;19, 2543-8 ;以及 Zeng Y 等, Nature Methods(自然方法)2009 ;6:207-9)。苯胺催化可显著地加速肟连接,能够使用很低浓度的试剂。

[0023] 尽管已有能够将水溶性聚合物缀合至治疗性蛋白的方法,但仍需要开发用于将水溶性聚合缀合至非凝血蛋白的含碳水化合物的化合物上的材料和方法,其可提高化合物的药效和 / 或药代动力学性质,同时最小化各种相关试剂的成本。

## 发明内容

[0024] 本发明提供用于将水溶性聚合物缀合至非凝血蛋白的含碳水化合物的化合物的材料和方法,其可提高化合物的药效和 / 或药代动力学性质,同时最小化各种相关试剂的成本。

[0025] 在本发明的一个实施方案中,提供了将水溶性聚合物缀合至非凝血蛋白的含碳水化合物的化合物经氧化的碳水化合物部分的方法,其包括在能够缀合的条件下使经氧化的碳水化合物部分与水溶性聚合物接触,其中所述水溶性聚合物包含氨基以及在氧化的碳水化合物部分和水溶性聚合物的氨基之间形成肟键,或其中所述水溶性聚合物包含酰肼基以及在氧化的碳水化合物部分和水溶性聚合物的酰肼基之间形成脎键。化合物可为 (1) 非凝血蛋白的糖蛋白, (2) 神经节苷脂,或 (3) 包含碳水化合物基团的药物传递系统。

[0026] 可使用糖特异性氧化酶 (例如半乳糖或葡萄糖氧化酶), 或通过与包含氧化剂的缓冲液温育来氧化碳水化合物部分,所述氧化剂选自:高碘酸钠 (NaIO<sub>4</sub>)、四乙酸铅 (Pb(OAc)<sub>4</sub>) 和高钨酸钾 (KRuO<sub>4</sub>)。

[0027] 碳水化合物部分可在唾液酸、甘露糖、半乳糖或葡萄糖残基处被氧化。

[0028] 本发明使用的水溶性聚合物可为,包括但不限于:聚乙二醇 (PEG)、支化 PEG、PEG 衍生物、PSA、mPSA、CA、mCA、羟乙基纤维素 (HEC)、糊精、聚噁唑啉、碳水化合物 (carbohydrate)、多糖 (polysaccharides)、普鲁兰多糖 (pullulane)、壳聚糖、透明质酸、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、淀粉、右旋糖酐、羧甲基右旋糖酐、聚亚烷基氧化物 (polyalkylene oxide) (PAO)、聚亚烷基二醇 (polyalkylene glycol) (PAG)、聚丙二醇 (PPG) 聚噁唑啉、聚丙烯酰吗啉、聚乙烯醇 (PVA)、聚羧酸盐 (polycarboxylate)、聚乙烯吡咯烷酮、聚磷腈、

聚噁唑啉、聚乙烯共马来酸酐 (polyethylene-co-maleic acid anhydride)、聚苯乙烯共马来酸酐 (polystyrene-co-maleic acid anhydride)、聚(1-羟甲基乙烯基-羟甲基甲醛) (poly(1-hydroxymethylethylene hydroxymethylformal)) (PHF)、2-甲基丙烯酰氧-2'-乙基三甲基磷酸铵盐 (2-methacryloyloxy-2'-ethyltrimethylammoniumphosphate) (MPC)。

[0029] 在以下实施例说明的本发明的特定实施方案中,水溶性聚合物为 PEG 或支化 PEG。

[0030] 在以下实施例说明的本发明更特定的实施方案中,水溶性聚合物为多唾液酸 (PSA) 或改性 PSA (mPSA)。PSA 或 mPSA 的分子量可为 350Da-120,000Da、500Da-100,000Da、1000Da-80,000Da、1500Da-60,000Da、2,000Da-45,000Da 或 3,000Da-35,000Da。

[0031] PSA 或 mPSA 可为多聚乙酰神经氨酸或改性多聚乙酰神经氨酸。

[0032] 在本发明的另一个实施方案中,PSA 或 mPSA 由约 2-500 或约 10-300 个唾液酸单元组成。在又一个实施方案中,提供了前述方法,其中氧化剂为高碘酸钠 (NaIO<sub>4</sub>)。

[0033] 本发明的方法可包括氧化水溶性聚合物以在水溶性聚合物的末端唾液酸单元上形成醛基,以及使经氧化的水溶性聚合物与氨氧连接剂反应。

[0034] 在本发明的再一个实施方案中,提供了前述方法,其中水溶性聚合物通过使激活的氨氧连接剂与经氧化的水溶性聚合物反应来制备,其中连接剂为同型双功能连接剂或异型双功能连接剂。同型双功能连接剂可具有 NH<sub>2</sub>[OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>n</sub>NH<sub>2</sub> 的通式,其中 n = 1-50,优选 1-11,更优选 1-6。连接剂具体可选自:

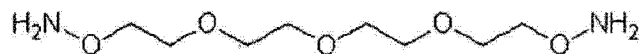
[0035] 3-氧-戊烷-1,5-二氧胺 (3-oxa-pentane-1,5-dioxyamine) 连接剂,其结构式为:

[0036]



[0037] 以及 3,6,9-三氧-十一烷-1,11-二氧胺连接剂,其结构式为:

[0038]



[0039] PSA 或 mPSA 可通过与氧化剂温育被氧化,以在 PSA 的非还原端形成末端醛基。

[0040] 该方法可包括:氧化水溶性聚合物以在水溶性聚合物的末端单元例如 PSA 或 mPSA 的末端唾液酸单元上形成醛基,以及使经氧化的水溶性聚合物与氨氧连接剂反应。在另一个实施方案中,提供了前述方法,其中氨氧连接剂为 3-氧-戊烷-1,5-二氧胺。在相关实施方案中,氧化剂为 NaIO<sub>4</sub>。

[0041] 在本发明的又一个实施方案中,提供了前述方法,其中经氧化的碳水化合物部分与激活的水溶性聚合物在包含亲核催化剂的缓冲剂中接触,所述亲核催化剂选自由苯胺和苯胺衍生物构成的组。

[0042] 通过使经氧化的水溶性聚合物与酰肼连接剂反应,可在水溶性聚合物上形成酰肼基。适合的酰肼连接剂可为己二酸二酰肼或肼。

[0043] 在本发明的再一个实施方案中,提供了前述方法,其还包括还原缀合蛋白中的脔键或脞键的步骤,例如通过在包含还原性化合物的缓冲剂中温育缀合蛋白,所述还原性化合物选自由氰基硼氢化钠 (NaCNBH<sub>3</sub>) 和抗坏血酸 (维生素 C) 构成的组。在相关的实施方

案中,还原性化合物为氰基硼氢化钠 ( $\text{NaCNBH}_3$ )。

[0044] 在本发明的另一个实施方案中,提供了由前述方法产生的缀合糖蛋白。在本发明的又一个实施方案中,缀合的非凝血蛋白的糖蛋白、神经节苷脂或药物传递系统包含 (a) 所述糖蛋白、神经节苷脂或药物传递系统;以及 (b) 与 (a) 的糖蛋白结合的至少一种氨氧水溶性聚合物,其中所述氨氧水溶性聚合物通过一个或多个碳水化合物部分连接到糖蛋白、神经节苷脂或药物传递系统上。在本发明的再一个实施方案中,缀合的非凝血蛋白的糖蛋白、神经节苷脂或药物传递系统包含 (a) 所述糖蛋白、神经节苷脂或药物传递系统;以及 (b) 与 (a) 的糖蛋白连接的至少一种酰肼水溶性聚合物,其中所述酰肼水溶性聚合物通过一个或多个碳水化合物部分连接到糖蛋白、神经节苷脂或药物传递系统上。

#### 附图说明

[0045] 图 1 显示了水溶性二氨氧连接剂 3-氧-戊烷-1,5-二氧胺和 3,6,9-三氧-十一烷-1,11-二氧胺的合成;

[0046] 图 2 显示了氨氧-PSA (aminooxy-PSA) 的制备。

#### 具体实施方式

[0047] 含碳水化合物的化合物例如非凝血蛋白的糖蛋白的药理学和免疫学性质可通过用水溶性聚合物特别是 PEG 或 PSA 或 mPSA 进行化学改性和缀合来改善。所得缀合物的性质通常强烈依赖于聚合物的结构和尺寸。因此,通常优选具有界定的和窄的尺寸分布的聚合物。特定实施例中使用的 PSA 和 mPSA 可采用最终制备出具有窄的尺寸分布的 PSA 的方式来纯化。

#### [0048] 糖蛋白

[0049] 如本文所描述,本发明考虑使用的非凝血蛋白的糖蛋白包括但不限于:细胞因子(例如白细胞介素、 $\alpha$ -干扰素、 $\beta$ -干扰素以及  $\gamma$ -干扰素)、集落刺激因子(包括粒细胞集落刺激因子)、成纤维细胞生长因子、血小板源性生长因子、磷脂酶激活蛋白(PUP)、胰岛素、植物蛋白(例如凝集素和蓖麻毒素)、肿瘤坏死因子及相关等位基因(alleles)、可溶型肿瘤坏死因子受体、白细胞介素受体和可溶型白细胞介素受体、生长因子、组织生长因子、转化生长因子(例如 TGF  $\alpha$  或 TGF  $\beta$  以及表皮生长因子)、激素、生长调节素、色素激素(pigmentary hormone)、下丘脑释放因子、抗利尿激素、催乳素、绒膜促性腺激素、促卵泡激素、促甲状腺激素、组织型纤溶酶原激活剂,以及免疫球蛋白(例如 IgG、IgE、IgM、IgA 和 IgD)、单克隆抗体、促红细胞生成素(EPO)、非凝血蛋白的血液因子、半乳糖苷酶、 $\alpha$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、DNA 酶、胎球蛋白、它们的片段,以及任何融合蛋白,所述融合蛋白一般包含任何上述蛋白或其片段以及治疗性糖蛋白。在一个实施方案中,糖蛋白为 EPO。在另一个实施方案中,糖蛋白为半乳糖苷酶。在又一个实施方案中,糖蛋白为 DNA 酶。在再一个实施方案中,糖蛋白为胎球蛋白。最后,在本发明另一个实施方案中,糖蛋白为粒细胞集落刺激因子。

[0050] 本文使用的“生物活性衍生物”或“生物活性变体”包括任何分子衍生物或变体,所述分子衍生物或变体具有与所述分子基本相同的功能性质和/或生物学性质例如结合性质,和/或相同的结构基础例如肽骨架或基本聚合单元。

[0051] “类似物”、“变体”或“衍生物”是结构上基本相似的化合物，具有相同的生物学活性，虽然在某些情况下与天然存在的分子不同。例如，多肽变体是指具有基本相似的结构并具有与对照多肽相同的生物学活性的多肽。与衍生该类似物的天然存在的多肽相比较，基于一个或多个突变，变体或类似物在氨基酸序列的组成上不同，所述突变包括：(i) 在多肽的一个或多个末端处和 / 或天然存在的多肽序列的一个或多个内部区域（例如，片段）处删除一个或多个氨基酸残基，(ii) 在多肽的一个或多个末端处（通常为“添加”或“融合”）和 / 或天然存在的多肽序列的一个或多个内部区域处（通常为“插入”）插入或添加一个或多个氨基酸，或 (iii) 天然存在的多肽序列中的其它氨基酸取代一个或多个氨基酸。例如，“衍生物”是指具有与对照多肽相同或基本相似的结构的多肽，其已经过例如化学法的改性。

[0052] 多肽变体或多肽类似物包括插入变体，其中一个或多个氨基酸残基被加到本发明的蛋白质氨基酸序列上。插入可位于蛋白的一个末端或两个末端，和 / 或可置于蛋白质氨基酸序列的内部区域内。一个末端或两个末端上具有其它残基的插入变体包括例如融合蛋白和含有氨基酸标记或其它氨基酸标签的蛋白。在一个方面，特别是在细菌例如大肠杆菌内重组地表达分子的情况下，蛋白质分子任选地包含 N 末端甲硫氨酸。

[0053] 在删除型变体内，本文所描述的蛋白质或多肽中的一个或多个氨基酸残基被移除。删除可在蛋白质或多肽的一个或两个末端上进行，和 / 或在蛋白质氨基酸序列内移除一个或多个残基。因此，删除型变体包括蛋白质或多肽序列的片段。

[0054] 在取代型变体中，蛋白质或多肽的一个或多个氨基酸残基被移除并用其它残基代替。在一个方面，取代物在自然界中是保守的并且这种类型的保守取代物为本领域所熟知。或者，本发明还包括非保守的取代物。示范性的保守取代物描述于 Lehninger, [Biochemistry, 第二版;Worth Publishers, Inc., New York (1975), pp. 71-77] 中，并立即在下面列出：

[0055] 保守取代物

[0056]



侧链特征	氨基酸
非极性（疏水性）：	
A.脂肪族	A L I V P
B.芳香族	F W
C.含硫	M
D.临界（Borderline）	G
不带电荷的极性：	
A.羟基	S T Y
B.酰胺	N Q
C.巯基	C
D.临界	G
[0057]	
带正电（碱性）	K R H
带负电（酸性）	D E

[0058] 或者，下面立即列出示范性的保守取代物：

[0059] 保守取代物 II

[0060]

原残基	示范性取代物
Ala (A)	Val, Leu, Ile
Arg (R)	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys (K)	Arg, Gln, Asn
Met (M)	Leu, Phe, Ile
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala
Pro (P)	Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

[0061] 神经节苷脂

[0062] 在本发明的实施方案中,神经节苷脂与水溶性聚合物例如 PEG 或 PSA 或 mPSA 缀合。已知神经节苷脂为细胞提供可在细胞识别和细胞间通讯中发挥作用的识别表面标记物 (distinguishing surface marker)。它们用作治疗剂。

[0063] 本发明的缀合物可包含神经节苷脂和水溶性聚合物,其中神经节苷脂包含糖链上连接有一个或多个唾液酸的鞘糖脂(神经酰胺和寡糖)。根据分子上存在多少个唾液酸单元,对神经节苷脂进行分类。神经节苷脂的实施例为 GM1、GM2 和 GM3(单唾液酸神经节苷酯)、GD1a、GD1b、GD2 和 GD3(双唾液酸神经节苷酯)、GT1b(三唾液酸神经节苷酯)和 GQ1(四唾液酸神经节苷酯)。

[0064] 优选用于本发明的神经节苷脂包括连接葡萄糖的神经酰胺、连接第一半乳糖的神经酰胺、连接 N-乙酰半乳糖胺的神经酰胺、连接第二半乳糖的神经酰胺。该第二半乳糖可

连接一个唾液酸。第一半乳糖可连接一个、二个、三个或四个唾液酸。唾液酸既可作为单体（每个半乳糖分子上一个），也可作为寡唾液酸（2-4个唾液酸）连接至第一半乳糖。

[0065] 在给予的地方，治疗性神经节苷脂需要在血液中长期循环。这样，它们对目标组织的作用更有效，神经节苷脂可通过例如本发明的方法进行多唾液酸化。

#### [0066] 药物传递系统

[0067] 在本发明另外的实施方案中，药物传递系统与水溶性聚合物例如 PEG 或 PSA 或 mPSA 缀合。通常，药物传递系统 (DDS) 是任何的分子或微粒实体，其控制与实体相联的药物的去向和效果。可将 DDS 分为两种普通的类型。第一种类型包括大分子 (MDDS) 例如抗体、拟糖蛋白以及合成聚合物例如聚（羟丙基甲基丙烯酸酯）、聚赖氨酸和聚合的氰基丙烯酸烷基酯。药物与包括将该药物定位到想要的位置上的各种类型的大分子载体（包括单克隆抗体）的关联由例如 Gregoriadis 在 Nature (自然) 265, 407-411 (1977) 中进行了描述。第二种类型为微粒 DDS (PDDS)，其包括例如纳米球或微球，这些纳米球或微球含有可生物降解的材料例如白蛋白，或含有半生物可降解的材料例如右旋糖酐和氰基丙烯酸烷基酯聚合物，或含有由非离子型表面活性剂形成的小囊 (vesicle) 或脂质体，详见例如 Gregoriadis 在 NIPS, 4, 146-151 (1989) 中的描述。

[0068] 药物既可共价连接 DDS，也可被动地包埋到 DDS 中。例如，包含表面活性剂小囊或脂质体的 PDDS 可通过形成表面活性剂或脂质分子的层的适当组合来包埋亲水性或疏水性的药用活性化合物。药用活性化合物常通过在体内裂解或不裂解的键共价连接 MDDS，例如在活性化合物发挥其功能前或后。

[0069] 许多 MDDS 具有能够被目标细胞或组织表面上的受体识别的固有能力和获得性能力（例如拟糖蛋白）。通常，这类 DDS 经注射被目标特异性地摄取。然而，特异性摄取因大部分 DDS 被其它（对治疗）无关的组织摄取而受限。其原因在于抗体和其它 DDS 蛋白（不管其对目标的特异性如何）必须（与其它蛋白类似）在其生物学生命结束时被分解代谢。

[0070] 大分子型 MDDS 中使用的合成聚合物例如聚（羟丙基甲基丙烯酸酯）、聚赖氨酸和聚合的氰基丙烯酸烷基酯。这些合成聚合物在网状内皮系统 (RES) 或其它组织内被合适的溶酶体酶分解代谢。需要通过一些方法，例如减少 RES 或其它组织对 DDS 的摄取，或一旦被 RES 摄取则减少由溶酶体酶产生的降解，以降低这类可生物降解的大分子型 DDS 的分解代谢速率。

[0071] 作为一项规则，RES 将微粒 DDS (PDDS) 由循环中移除。因为 PDDS 对 RES 具有倾向性，故常将其用于将药物传递到这些组织。然而，常需要将 PDDS 导向非 RES 组织的组织。为实现该目标，必须阻断或延迟 RES 截取 PDDS。

[0072] 用于本发明的 DDS 开始时可不包含糖基。一个选择是将糖基添加或纳入 DDS 结构中。这类情况的实施例为纳入甘露糖化或半乳糖化的脂质的脂质体。这些糖基脂质体分别将活性物定位到表达甘露糖受体或半乳糖受体的组织。

[0073] 在 DDS 需要在血液中长期循环以便例如被目标组织更有效地摄取（如肝实质细胞）的情况下，其可有利地通过本发明方法进行多唾液酸化。

#### [0074] 给予

[0075] 在一个实施方案中，本发明经缀合的化合物可通过注射例如静脉注射、肌肉注射

或腹腔内注射进行给予。组合物可用作治疗剂、诊断剂和 / 或类似的试剂。

[0076] 为将包含本发明经缀合的化合物的组合物给予人或试验动物,一方面,组合物包含一种或多种药用可接受载体。术语“药用”或“药理学上可接受”指如下描述的分子实体和组合物,其是稳定的,抑制蛋白质降解例如聚集和裂解产物,并且在利用本技术领域众所周知的途径进行给予时不会产生过敏或其它不良反应。“药用可接受载体”包括任何及所有临床有用的溶剂、分散介质、包衣、抗菌和抗真菌试剂、等渗和吸收延迟剂等,包括上面公开的那些试剂。

[0077] 本文所用的“有效量”包括适用于治疗患有临床上界定的障碍的哺乳动物的剂量。

[0078] 组合物可经口、局部、透皮、肠胃外、吸入喷雾、经阴道、直肠或颅内注射进行给予。本文所用术语“肠胃外”包括皮下注射、静脉注射、肌肉注射、脑池内注射或输注技术。还可通过静脉内、皮内、肌肉内、乳房内、腹腔内、鞘内、眼球后、肺内注射和或特定位置上的外科植入进行给予。通常,组合物基本上无热源及其它可能对接受者有害的杂质。

[0079] 可通过治疗医生选择的剂量水平和方式单次或多次给予组合物。为预防或治疗疾病,合适的剂量将取决于上述待治疾病的类型、疾病的严重程度和病程、药物的给予是用于预防目的还是治疗目的、先前的治疗、患者的临床病史和对药物的反应,以及主治医师的酌情决定。

[0080] 本发明还涉及包含本文所定义的有效量的缀合化合物或蛋白的药用组合物。药用组合物可进一步包含药用可接受载体、稀释剂、盐、缓冲液或赋形剂。药用组合物可用于治疗临床上界定的障碍。本发明的药用组合物可以是溶液或冻干品。可对药用组合物溶液进行任何合适的冻干加工。

[0081] 另一方面,本发明包括含有采用便于给予患者的方式包装的本发明组合物的试剂盒。在一个实施方案中,这种试剂盒包含本文描述的化合物或组合物(例如包含缀合蛋白的组合物),其包装于例如密封瓶或管的容器内,配有附于容器上或含在包装内的标签,该标签描述了在实施该方法中如何使用化合物或组合物。在一个实施方案中,试剂盒包含第一容器和第二容器,所述第一容器装有含缀合蛋白的组合物,所述第二容器装有用于第一容器内的组合物的生理学上可接受的重建溶液。一方面,化合物或组合物以单位剂量形式包装。试剂盒可进一步包含适用于根据特定的给予途径给予组合物的仪器。优选地,试剂盒包含描述治疗性蛋白或肽组合物的使用的标签。

[0082] 在一个实施方案中,衍生物保留了天然治疗化合物的全部功能活性,并且与天然治疗化合物相比,提供了延长的体内半衰期。在另一个实施方案中,相对于天然化合物,衍生物保留了至少 20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140 或 150 百分比(%)的生物活性。

[0083] 唾液酸和 PSA

[0084] 本文所使用的“唾液酸部分”包括唾液酸单体或聚合物(“多糖”),其可溶于水溶液或悬浮液中,并且以药用有效量给予 PSA-蛋白质缀合物时对哺乳动物有很少或无负面影响例如副作用。一方面,PSA 和 mPSA 的特征在于具有 1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400 或 500 个唾液酸单元。在某些方面,不同的唾液酸单元结合在

一链中。

[0085] 在本发明的一个实施方案中, PSA 或 mPSA 化合物的唾液酸部分高度亲水,而在另一个实施方案中,整个化合物高度亲水。亲水性主要由唾液酸单元的侧基羧基,以及羟基赋予。糖类单元可包含其它官能团例如胺基、羟基、硫酸基或它们的组合。这些基团可存在于天然存在的糖类化合物上,或被引入衍生的多糖化合物中。本发明的方法和缀合物中使用的 PSA 和 mPSA 的进一步特征可如上面发明背景中所描述。

[0086] 天然存在的聚合物 PSA 可用作多分散制备物,其尺寸分布(例如 Sigma C-5762)广以及多分散性(PD)高。因为在细菌内产生的多糖常伴随共纯化内毒素的固有风险,所以纯化长唾液酸聚合物链可提高内毒素含量增加的可能性。也可合成制备具有 1-4 个唾液酸单元的短 PSA 分子(Kang SH 等人, Chem Commun(化学通讯). 2000 ;227-8 ;Ress DK 和 Linhardt RJ, Current Organic Synthesis(现代有机合成). 2004 ;1:31-46),从而最小化内毒素水平高的风险。然而,现在可生产尺寸分布窄和多分散性低的 PSA 制备物,其也无内毒素。用于本发明的特定用途的多糖化合物在一方面是由细菌产生的那些化合物。这些天然存在的多糖的某些多糖被称为糖脂。在一个实施方案中,多糖化合物基本没有末端半乳糖单元。

[0087] 在各种实施方案中,化合物按化学计量量与 PSA 或 mPSA 化合物连接或联接(例如, 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4, 1 : 5, 1 : 6, 1 : 7, 1 : 7, 1 : 8, 1 : 9 或 1 : 10 等)。在各种实施方案中, 1-6, 7-12 或 13-20 个 PSA 和 / 或 mPSA 单元连接到化合物上。仍然在其它的实施方案中, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 或更多的 PSA 和 / 或 mPSA 单元连接到化合物上。

[0088] 任选地,化合物经改性以引入糖基化位点(即非天然糖基化位点的位点)。可使用本技术领域已知的标准分子生物学技术来完成这种改性。此外,在通过一个或多个碳水化合物部分进行缀合前,化合物可在体内或体外糖基化。

[0089] 氨氧键

[0090] 在本发明的一个实施方案中,应用羟胺或羟胺衍生物与醛(例如,在被高碘酸钠氧化后的碳水化合物部分上)反应以形成肟基来制备化合物的缀合物。例如,首先使用例如高碘酸钠( $\text{NaIO}_4$ )的氧化剂氧化糖蛋白(Rothfus JA et Smith EL., J Biol Chem(生物化学杂志)1963, 238, 1402-10;以及 Van Lenten L 和 Ashwell G., J Biol Chem(生物化学杂志)1971, 246, 1889-94)。例如糖蛋白的高碘酸氧化基于经典的 Malaprade 反应,该反应描述于 1928 年,高碘酸盐氧化邻二醇以形成活性醛基(Malaprade L., Analytical application, Bull Soc Chim France(法国化学学会通报), 1928, 43, 683-96)。这类氧化剂的其它实施例为四乙酸铅( $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ )、醋酸锰( $\text{MnO}(\text{Ac})_3$ )、醋酸钴( $\text{Co}(\text{OAc})_2$ )、醋酸亚铊( $\text{TlOAc}$ )、硫酸铈( $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ ) (US4, 367, 309) 或高钌酸钾( $\text{KRuO}_4$ ) (Marko 等人, J Am Chem Soc(美国化学学会杂志)1997, 119, 12661-2)。“氧化剂”是指温和的氧化化合物,其能够在生理反应条件下氧化碳水化合物中的邻二醇,从而产生活性醛基。

[0091] 第二步是将含有氨氧基的聚合物偶联至氧化的碳水化合物部分以形成肟键。在本发明的一个实施方案中,该步骤可在催化量的亲核催化剂苯胺或苯胺衍生物的存在下进行(Dirksen A et Dawson PE, Bioconjugate Chem(生物缀合物化学). 2008 ;Zeng Y 等人, Nature Methods(自然方法)2009 ;6:207-9)。苯胺催化显著地加速肟连接,使得能够使用

很低浓度的试剂。在本发明的另一个实施方案中,通过用  $\text{NaCNBH}_3$  还原来稳定肟键以形成烷氧胺 (alkoxyamine) 键。

[0092] 在本发明的一个实施方案中,分别按顺序进行将 PSA 或 mPSA 缀合至蛋白质的各反应步骤(即,起始材料(例如,蛋白质、聚合物等)、试剂(例如,氧化剂、苯胺等)和反应产物(例如,蛋白质上经氧化的碳水化合物、经激活的氨氧聚合物等)在各反应步骤之间被分开)。

[0093] 在以下的参考文献中可发现关于氨氧基技术的其它信息,其中每份参考文献以其整体结合到本文中:EP 1681303A1(HASylated erythropoietin(羟烷基淀粉化促红细胞生成素));WO 2005/014024(conjugates of a polymer and a protein linked by an oxime linking group(通过肟连接基连接的聚合物与蛋白质的缀合物));WO96/40662(aminooxy-containing linker compounds and their application in conjugates(含氨氧连接剂化合物及其在缀合物中的应用));WO 2008/025856(Modified proteins(改性蛋白质));Peri F 等人, Tetrahedron(四面体快报)1998, 54, 12269-78;Kubler-Kielb J 和 Pozsgay V., J Org Chem(有机化学杂志)2005, 70, 6987-90;Lees A 等人, Vaccine(疫苗)2006, 24(6), 716-29;以及 Heredia KL 等人, Macromolecules(大分子)2007, 40(14), 4772-9。

[0094] 本发明的优点包括缀合回收率高;与未经缀合的蛋白质相比,经缀合的糖蛋白的活性保持能力高,以及缀合效率高。

[0095] 现在参考以下实施例说明本发明。实施例 1-3、9 和 11-27 说明了本发明的特定实施方案。实施例 4-8 和 10 因其与本发明相应缀合物的制备相关而作为参考实施例纳入。

[0096] 实施例

[0097] 实施例 1

[0098] 同型双功能连接剂  $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_2\text{ONH}_2$  的制备

[0099] 根据 Boturyn 等人 (Tetrahedron(四面体快报)1997;53:5485-92) 的两步有机反应,采用改进的伯胺的 Gabriel 合成法,合成含有两个活性氨氧基的同型双功能连接剂  $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_2\text{ONH}_2$  (3-氧-戊烷-1,5-二氧胺):

[0100]



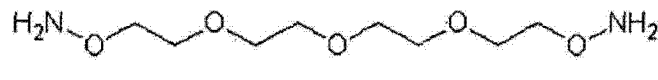
[0101] 在第一步中,一个分子的 2,2-氯二乙基乙醚与两分子的内-N-羟基-5-降冰片烯-2,3-二甲酰亚胺 (Endo-N-hydroxy-5-norbornene-2,3-dicarboximide) 在二甲基甲酰胺 (DMF) 中反应。在乙醇中通过肼解作用从所得中间体制备所需要的同型双功能产物。除非另有说明,否则这在下面的实施例中被称为双氨氧连接剂。

[0102] 实施例 2

[0103] 同型双功能连接剂  $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_4\text{ONH}_2$  的制备

[0104] 根据 Boturyn 等人 (Tetrahedron(四面体快报)1997;53:5485-92) 的两步有机反应,采用改进的伯胺的 Gabriel 合成法,合成含有两个活性氨氧基的同型双功能连接剂  $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_4\text{ONH}_2$  (3,6,9-三氧-十一烷-1,11-二氧胺):

[0105]



[0106] 在第一步中,一个分子的二(2-(2-氯乙氧基)-乙基)醚(Bis-(2(2-chlorethoxy)-ethyl)-ether)与两分子的内-N-羟基-5-降冰片烯-2,3-二甲酰亚胺在DMF中反应。在乙醇中通过肼解作用从所得中间体制备所需要的同型双功能产物。

[0107] 实施例3

[0108] 氨氧-PSA的制备

[0109] 将500mg获自Serum Institute of India(印度血清研究所)(Pune, India)的氧化PSA(MW = 18.8kD)溶解于8ml 50mM的醋酸钠缓冲液(pH5.5)中。然后,加入100mg 3-氧-戊烷-1,5-二氧胺。在室温下摇晃2小时后,加入44mg 氰基硼氢化钠。在4°C下再摇晃4小时后,将反应混合物加入Slide-A-Lyzer(Pierce, Rockford, IL)透析卡(3.5kD的膜,再生纤维素)中,对PBS(pH7.2)透析4天。在-80°C下冷冻产物。图2中说明了根据此程序制备氨氧基-PSA的过程。

[0110] 实施例4

[0111] 将氨氧-PSA偶联到rFIX上及缀合物的纯化

[0112] 将289 μl高碘酸钠水溶液(10mM)加入溶于6.3ml 50mM醋酸钠缓冲液(pH, 6.0)的12.6mg rFIX中。于黑暗中4°C下摇晃混合物1小时,加入6.5 μl的1M甘油在室温下淬灭(quench)15分钟。通过采用Vivaspin(Sartorius, Goettingen, Germany)浓缩器(30kD的膜,再生纤维素)进行超滤/渗滤(UF/DF),除去低分子量污染物。然后,将43mg的氨氧-PSA加入UF/DF渗余物中,并在4°C下摇晃混合物18个小时。通过疏水相互作用色谱法(HIC)除去过量的PSA试剂。将冷却的反应混合物的电导率升高至180mS/cm,并加到5ml HiTrap Butyl FF(GE Healthcare, Fairfield, CT)HIC柱(1.6×2.5cm)上,该柱经50mM HEPES、3M氯化钠、6.7mM氯化钙、0.01%的Tween 80(pH 6.9)预平衡。用50mM HEPES、6.7mM氯化钙、0.005%的Tween 80(pH7.4)以5ml/min的流率在2.4柱容积(CV)内洗脱缀合物。通过测量总蛋白(BCA)和FIX生色活性分析表征该制备物。对于PSA-rFIX缀合物,确定80.2IU/mg蛋白质的比活(与天然的rFIX相比为56.4%)。结果汇总于表1中。

[0113] 表1

[0114]

项目	BCA [mg/ml]	FIX:生色活性 [IU/ml]	比活 [IU FIX:生色活性/mg BCA]	比活 [%]
rFIX	8.58	1221	142.3	100
PSA-rFIX	1.15	92.2	80.2	56.4

[0115] 实施例5

[0116] 在亲核催化剂苯胺存在下将氨氧-PSA偶联到rFIX上

[0117] 将14.1 μl高碘酸钠水溶液(10mM)加入溶于1.4ml 50mM醋酸钠缓冲液(pH6.0)的3.0mg的rFIX中。于黑暗中4°C下摇晃混合物1小时,然后加入1.5 μl的1M甘油在室

温下淬灭 15 分钟。通过采用 PD-10 脱盐柱 (GE Healthcare, Fairfield, CT) 的尺寸排阻色谱法 (SEC) 除去低分子量污染物。将溶于 1.33ml 的 50mM 醋酸钠缓冲液 (pH6.0) 中的 1.2mg 氧化的 rFIX 与 70  $\mu$ l 苯胺 (200mM 的储备水溶液) 混合,并在室温下摇晃 45 分钟上。然后,加入 4.0mg 氨氧-PSA,并在室温下摇晃该混合物 2 小时,在 4 $^{\circ}$ C 下再摇晃 16 小时。1 小时后、2 小时后以及在 18 小时后反应结束时取样。接下来,通过 HIC 除去过量的 PSA 试剂和游离的 rFIX。将冷却的反应混合物的电导率升高至 180mS/cm,并加到 5ml HiTrap Butyl FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) HIC 柱 (1.6 $\times$ 2.5cm) 上,该柱经 50mM HEPES、3M 氯化钠、6.7mM 氯化钙、0.01% 的 Tween 80 (pH6.9) 预平衡。缀合物用线性梯度洗脱到 20CV 内、流率为 5ml/min 的 50mM HEPES、6.7mM 氯化钙、0.005% 的 Tween 80 (pH7.4) 中。

[0118] 实施例 6

[0119] 将氨氧-PSA 偶联到 rFIX 上并用 NaCNBH<sub>3</sub> 还原

[0120] 将 53  $\mu$ l 高碘酸钠水溶液 (10mM) 加入溶于 5.25ml 50mM 醋酸钠缓冲液 (pH6.0) 的 10.5mg 的 rFIX 中。于黑暗中 4 $^{\circ}$ C 下摇晃该混合物 1 小时,然后加入 5.3  $\mu$ l 的 1M 甘油在室温下淬灭 15 分钟。通过采用 Vivaspin (Sartorius, Goettingen, Germany) 浓缩器 (30kD 的膜,再生纤维素) 进行 UF/DF,除去低分子量污染物。然后,将 35.9mg 氨氧-PSA 加到 UF/DF 渗余物中,并在室温下摇晃该混合物 2 个小时。随后加入 53  $\mu$ l 氰基硼氢化钠水溶液 (5M),并使反应再进行 16 个小时。然后通过 HIC 除去过量的 PSA 试剂。将冷却的反应混合物的电导率升高至 180mS/cm,并加到 5ml HiTrap Butyl FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) HIC 柱 (1.6 $\times$ 2.5cm) 上,该柱经 50mM HEPES、3M 氯化钠、6.7mM 氯化钙、0.01% 的 Tween 80 (pH6.9) 预平衡。用 50mM HEPES、6.7mM 氯化钙、0.005% 的 Tween 80 (pH7.4) 以 5ml/min 的流率在 2.4CV 内洗脱缀合物。

[0121] 实施例 7

[0122] 将氨氧-PSA (连接剂: NH<sub>2</sub>[OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>4</sub>ONH<sub>2</sub>) 偶联到 rFIX 上及缀合物的纯化

[0123] 将 102  $\mu$ l 高碘酸钠水溶液 (10mM) 加到溶于 2.8ml 50mM 醋酸钠缓冲液 (pH6.0) 的 5.6mg rFIX 中。于黑暗中 4 $^{\circ}$ C 下摇晃该混合物 1 小时,然后加入 2.9  $\mu$ l 的 1M 甘油在室温下淬灭 15 分钟。通过采用 Vivaspin (Sartorius, Goettingen, 德国) 浓缩器 (30kD 的膜,再生纤维素) 进行 UF/DF,除去低分子量污染物。随后将 19mg 氨氧-PSA 加到 UF/DF 渗余物中,并在 4 $^{\circ}$ C 下摇晃该混合物 18 个小时。通过 HIC 除去过量的 PSA 试剂。将冷却的反应混合物的电导率升高至 180mS/cm,并加到 5ml HiTrap Butyl FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) HIC 柱 (1.6 $\times$ 2.5cm) 上,该柱经 50mM HEPES、3M 氯化钠、6.7mM 氯化钙、0.01% 的 Tween 80 (pH6.9) 预平衡。用 50mM HEPES、6.7mM 氯化钙、0.005% 的 Tween 80 (pH7.4) 以 5ml/min 的流率在 2.4CV 内洗脱缀合物。

[0124] 实施例 8

[0125] 将氨氧-PSA 偶联到 rFVIII 上

[0126] 将 57  $\mu$ l 的 10mM 高碘酸钠加入溶于 11ml Hepes 缓冲液 (pH6) (50mM Hepes、5mM CaCl<sub>2</sub>、150mM NaCl、0.01% Tween) 的 11mg rFVIII 中。于黑暗在 4 $^{\circ}$ C 下摇晃该混合物 30 分钟,加入 107  $\mu$ l 的 1M 甘油水溶液在 4 $^{\circ}$ C 下淬灭 30 分钟。然后加入 19.8mg 氨氧-PSA (18.8kD),在 4 $^{\circ}$ C 下摇晃该混合物过夜。通过加入含 8M 醋酸铵的缓冲液 (8M 醋酸铵、50mM Hepes、5mM CaCl<sub>2</sub>、350mM NaCl、0.01% 的 Tween 80, pH6.9) 增加离子强度以得到 2.5M





随后,用 60%洗脱缓冲液(50mM Hepes、6.7mM 氧化钙,pH7.4)的线性梯度在 40CV 内洗脱缀合物。最后,收集含 PSA-rFIX 的片段,并使用再生纤维素(Millipore)制成的 30kD 膜对其进行 UF/DF。通过测量总蛋白(BCA)和 FIX 生色活性分析表征该制备物。对于用两种变体制备的 PSA-rFIX 缀合物,与天然的 rFIX 相比,比活经确定 >50%。

[0140] 实施例 11

[0141] 氨氧-PSA 试剂的制备

[0142] 根据实施例 3 制备氨氧-PSA 试剂。终产物用 5kD 膜(再生纤维素,Millipore)对 pH7.2 的缓冲液(50mM Hepes)渗滤,在 -80℃ 下进行冷冻并冻干。冻干后,将试剂溶解于适当体积的水中用于通过碳水化合物改性制备 PSA-蛋白缀合物。

[0143] 实施例 12

[0144] 氨氧-PSA 试剂的详细合成

[0145] 根据如实施例 1 概述的 Botyryn 等人(Tetrahedron(四面体快报)1997; 53:5485-92)的两步有机合成法合成 3-氧-戊烷-1,5-二氧胺。

[0146] 步骤 1:

[0147] 将无水  $K_2CO_3$ (45.51g;1.00eq)和 2,2-二氯二乙醚(15.84ml;0.41eq)加入溶于 700ml 无水 N,N-二甲基甲酰胺的内-N-羟基-5-降冰片烯-2,3-二甲酰亚胺(59.0g;1.00eq)溶液中。在 50℃ 下搅拌反应混合物 22 小时。将混合物减压蒸发至干。将残留物悬浮于 2L 二氯甲烷中,并用饱和 NaCl 水溶液提取两次(每次 1L)。用  $Na_2SO_4$  干燥二氯甲烷层,并随后将二氯甲烷层进行减压蒸发至干,并于高真空下干燥得到 64.5g 3-氧戊烷-1,5-二氧-内-2',3'-二羧基二酰亚胺降冰片烯(3-oxapentane-1,5-dioxy-endo-2',3'-dicarboxydiimidenorborene)的白黄色固体(中间体 1)。

[0148] 步骤 2:

[0149] 将 31.0ml 水合肼(4.26eq)加入溶于 800ml 无水乙醇的中间体 1(64.25g;1.00eq)溶液中。随后将反应混合物回流 2 小时。通过减压蒸发溶剂将混合物浓缩至初始体积的一半。滤除出现的沉淀物。将留下的乙醇层减压蒸发至干。真空干燥含有粗产物 3-氧-戊烷-1,5-二氧胺的残留物,得到 46.3g。通过柱色谱(Silicagel 60;用二氯甲烷/甲醇混合物进行无梯度洗脱,9+1)进一步纯化粗产物以得到 11.7g 纯的终产物 3-氧-戊烷-1,5-二氧胺。

[0150] 实施例 13

[0151] 氨氧-PSA 聚合物的制备

[0152] 将 1.3g 氧化的多聚乙酰神经氨糖酸(23kDa)溶解于 18ml 的 50mM 醋酸钠(pH5.5±0.02)中。将 20 倍摩尔过量的 1,11-二氨基-3,6,9-三氧十一烷(1,11-diamino-3,6,9-trioxaundecane)(也称作 3,6,9-三氧-十一烷-1,11-二氧胺)溶解于最少量的 50mM 醋酸钠(pH5.5±0.02)中,并加入到 PSA 溶液中。最终的多聚乙酰神经氨糖酸的浓度为 62.5mg/ml。在 22±1.0℃ 下在温和的混合器(22 次振动/分钟)上温育反应混合物 2±0.1 小时。这之后,将 0.65ml 的 160mg/ml  $NaCNBH_3$  溶液加到上述反应混合物中以使终浓度达到 5.00mg/ml。将其放于无内毒素气密容器内置于振动器上(22 次振动/分钟)在 4.0±1.0℃ 下温育 3.0±0.2 小时,所述容器具有足够的顶空用于混合。对于纯化,用 2mM 三乙醇胺(pH8.0±0.02)稀释样品以使多聚乙酰神经氨糖酸的终浓度为 20mg/ml。对反应混

合物进行脱盐以除去过量的 1, 11- 二氨基 -3, 6, 9- 三氧十一烷、NaCNBH<sub>3</sub>及反应的副产物。随后使用 20mM 的三乙醇胺缓冲液 (pH8.0±0.02) 在 Sephadex G25 柱上进行脱盐。将脱盐样品的 pH 调节至 7.8-8.0, 并用 20mM TEA (pH8.0) 超滤 / 渗滤一次, 用 pH8.0 的 2mM 三乙醇胺 (TEA) 超滤 / 渗滤两次。将样品冷冻干燥并储存于 -80℃ 下。

[0153] 或者, 在脱盐和超滤 / 渗滤 (UF/DF) 步骤中在高盐存在下进行纯化。高盐的阴离子交换色谱法还用以制备高纯度的氨氧 -PSA。以此类推, 合成不同分子量的氨氧 -PSA。

[0154] 实施例 14

[0155] 将二氨氧 (3, 6, 9- 三氧 - 十一烷 -1, 11- 二氧胺) -PSA 偶联到 β - 半乳糖苷酶上

[0156] 用不同浓度的 NaIO<sub>4</sub> (范围从 0.157mM 到 2mM) 氧化 β - 半乳糖苷酶 (β -Gal)。于黑暗中 4℃ 酸性 pH5.75 下氧化 0.5mg β -Gal。加入 NaHSO<sub>3</sub> 至终浓度 5mM 来终止氧化。使用二氨氧 PSA 聚合物 (22kDa) 与氧化的 β -Gal 进行缀合反应。反应混合物中聚合物的终浓度为 1.25mM, 而 β -Gal 的浓度为 0.125mg/ml-0.76mg/ml。所有反应均在 pH5.75 下完成。将氰基硼氢化钠加到反应混合物中至浓度为 50mM 或 3.17mg/ml。在 4℃ 下进行反应, 并在 1 小时、2 小时和 24 小时的时间间隔处收集样品。使用 SDS PAGE 和蛋白质印迹法 (western blotting) 鉴定缀合物。在 SDS PAGE 中见到对应于缀合物的条带转移 (shift) 并且这也被蛋白质印迹法证实。

[0157] 基于最佳的反应条件, 在 4℃ 下用 1.5mM 的 NaIO<sub>4</sub> 氧化 1.9mg 的 β -Gal 30 分钟, 随后通过加入 NaHSO<sub>3</sub> 至终浓度 5mM 来终止氧化。用氧化的 β -Gal 和二氨氧 PSA 聚合物进行缀合反应。反应混合物中的聚合物和蛋白质的终浓度分别为 1.25mM 和 0.76mg/ml。反应混合物的最终 pH 值为 5.75。将氰基硼氢化钠加到反应混合物中至浓度为 50mM 或 3.17mg/ml。反应在 4℃ 下进行 2 小时。用 SDS PAGE 和蛋白质印迹法鉴定纯化和未纯化的缀合物。在 SDS PAGE 中见到对应于缀合物的条带转移, 并且这被使用抗 -PSA 抗体的蛋白质印迹法证实。使用 All in one (一体) β Gal 试剂盒 (Pierce) 进行测试, PSA-β Gal 缀合物的体外活性与天然蛋白质相当。观察到使用醛基连接剂化学法制得的相当的缀合物的活性小于 50%。此外, 整个过程放大至 3 倍。

[0158] 实施例 15

[0159] 将二氨氧 -PSA 偶联到胎球蛋白上

[0160] 用 10mM NaIO<sub>4</sub> 于黑暗中以 4℃ 下氧化胎球蛋白 60 分钟, 并通过加入 NaHSO<sub>3</sub> 至终浓度 10mM 来终止氧化。使用经氧化的胎球蛋白和二氨氧 -PSA 聚合物 (23kDa) 进行缀合反应。反应混合物中聚合物的终浓度在 pH5.75 下为 2.5mM。将氰基硼氢化钠加到反应混合物中至浓度为 50mM 或 3.17mg/ml。反应中蛋白质的终浓度为 0.714mg/ml, 并且反应在 4℃ 下进行 2 小时。使用 SDS PAGE 和蛋白质印迹法鉴定这些缀合物。在 SDS PAGE 中见到对应于缀合物的条带转移, 并且这也被蛋白质印迹法所证实。

[0161] 对于放大反应, 用 10mM NaIO<sub>4</sub> 于黑暗中以 4℃ 下氧化 5mg 胎球蛋白 60 分钟, 然后加入 NaHSO<sub>3</sub> 至终浓度 10mM 来终止氧化。用经氧化的胎球蛋白与二氨氧 -PSA 聚合物 (23kDa) 进行缀合反应。反应混合物中聚合物的终浓度在 pH5.75 下为 2.5mM。将氰基硼氢化钠加到反应混合物中至浓度为 50mM 或 3.17mg/ml。反应在 4℃ 下进行, 并在 2 小时后收集样品。用 SDS PAGE 和蛋白质印迹法鉴定纯化和未纯化的缀合物。在 SDS PAGE 中见到对应于缀合物的条带转移, 并且这也被蛋白质印迹法证实。

[0162] 实施例 16

[0163] 用苯胺作为亲核催化剂将二氨氧-PSA 偶联到胎球蛋白上

[0164] 用 10mM  $\text{NaIO}_4$  于黑暗中 4°C 下氧化 0.2mg 胎球蛋白 30 分钟, 随后通过加入  $\text{NaHSO}_3$  至终浓度 5mM 来终止氧化。用氧化的胎球蛋白与二氨氧 PSA 聚合物 (23kDa) 进行缀合反应。反应混合物中聚合物的终浓度为 1.25mM。反应混合物的最终 pH 值为 5.75。将氰基硼氢化钠加到反应混合物中至浓度为 50mM 或 3.17mg/ml。反应中的最终蛋白浓度为 0.125mg/ml。将 84.21  $\mu\text{l}$  的 200mM 苯胺溶液加到 1.6ml 反应混合物中。反应在 4°C 下进行过夜。

[0165] 实施例 17

[0166] 将二氨氧-PSA 偶联到促红细胞生成素 (EPO) 上

[0167] 用 10mM  $\text{NaIO}_4$  于黑暗中 4°C 下氧化 0.2mg EPO 30 分钟。通过加入  $\text{NaHSO}_3$  至终浓度 5mM 来终止氧化。使用氧化的 EPO 和 23kDa 的二氨氧聚合物进行缀合反应。反应混合物中聚合物的终浓度为 1.25mM。反应混合物中 EPO 的终浓度为 1.25mg/ml。反应混合物的最终 pH 值为 5.75 左右。将氰基硼氢化钠加入反应混合物中至浓度为 50mM 或 3.17mg/ml。反应在 4°C 下进行 24 小时。用 SDS PAGE 鉴定未纯化的缀合物。在 SDS PAGE 中见到对应于缀合物的条带转移。

[0168] 实施例 18

[0169] 用苯胺作为亲核催化剂将二氨氧-PSA 偶联到 EPO 上

[0170] 用 10mM  $\text{NaIO}_4$  在 4°C 下氧化 0.2mg EPO 30 分钟。通过加入  $\text{NaHSO}_3$  至终浓度 5mM 来终止氧化。用氧化的 EPO 和二氨氧 PSA 聚合物 (22kDa) 进行缀合反应。反应混合物中聚合物的终浓度为 1.25mM。反应混合物的最终 pH 值为 5.75 左右。将氰基硼氢化钠加入反应混合物中至浓度为 50mM 或 3.17mg/ml。反应中最终蛋白浓度为 0.125mg/ml。将 84.21  $\mu\text{l}$  的 200mM 苯胺溶液加到 1.6ml 的反应混合物中。反应在 4°C 下进行过夜。用 SDS PAGE 来鉴定缀合物。见到缀合物的条带转移。未观察到苯胺对缀合物活性的不良影响。

[0171] 实施例 19

[0172] 将二氨氧-PSA 偶联到 DNA 酶上

[0173] 对于 DNA 酶的糖基多唾液酸化 (glycopolysialation), 使用牛胰 DNA 酶进行缀合反应。这种来源的 DNA 酶作为冻干粉提供, 储存于 -20°C。反应前, 将该冻干粉溶解于醋酸钠缓冲液 (pH5.75) 中。用于糖基多唾液酸化的聚合物具有 10kDa-22kDa 范围的分子量。对于 DNA 酶的糖部分的氧化, 用  $\text{NaIO}_4$  作为氧化剂, 加至终浓度 1mM。在 4°C 酸性 pH5.75 下氧化 DNA 酶 30 分钟。加入  $\text{NaHSO}_3$  至终浓度 2mM 来终止氧化。氧化完成后, 通过加入二氨氧 PSA 聚合物至终浓度 1.25mM 进行缀合反应。将  $\text{NaCNBH}_3$  加入反应混合物中至终浓度 50mM 或 3.17mg/ml, 并在  $4.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$  下进行 DNA 酶的多唾液酸化至少 2 小时。用比聚合物多 25 摩尔的 Tris (三羟甲基氨基甲烷) 终止反应。用 SDS PAGE 和蛋白质印迹法鉴定缀合物。在 SDS PAGE 中见到对应于缀合物的条带转移, 并且从蛋白质印迹法中得到了阳性结果。经测定, 活性为 95% (相比于在用醛基连接剂化学法制得的相当的缀合物中观察到的小于 50% 的活性)。

[0174] 实施例 20

[0175] 将二氨氧 (3-氧-戊烷-1,5-二氧胺连接剂)-PSA 偶联到  $\beta$ -半乳糖苷酶上

[0176] 用浓度为 2mM 的  $\text{NaIO}_4$  氧化  $\beta$ -半乳糖苷酶。在酸性 pH5.75、4°C 下氧化 3mg  $\beta$ -半

乳糖苷酶 30 分钟,随后通过加入  $\text{NaHSO}_3$  至终浓度 2mM 来终止氧化。用氧化的  $\beta$ -半乳糖苷酶和二氨氧 PSA 聚合物 (23kDa) 进行缀合反应。反应混合物中聚合物的终浓度为 1.5mM。反应混合物中  $\beta$ -半乳糖苷酶的终浓度为 0.867mg/ml。反应混合物的最终 pH 为 5.75 左右。将氰基硼氢化钠加入反应混合物中至浓度为 50mM 或 3.17mg/ml。反应在 4°C 下进行 2 小时。用 SDS PAGE 和蛋白质印迹法鉴定缀合物。在 SDS PAGE 中见到了对应于缀合物的条带转移,并且从蛋白质印迹法中得到了阳性结果。

[0177] 实施例 21

[0178] 酰肼-多聚乙酰神经氨糖酸的制备

[0179] 我们使用以下方案利用己二酸二酰肼来制备 PSA-酰肼(多聚乙酰神经氨糖酸-酰肼)。使用类似的方法来制备其它 PSA-酰肼。

[0180] 1 将 1g 经激活的多聚乙酰神经氨糖酸溶解于 ~10ml 的 20mM 醋酸钠 (pH5.5±0.02) 中。多聚乙酰神经氨糖酸的终浓度应为 62.5mg/ml。

[0181] 2 将 25 倍摩尔过量(过量于氧化的多聚乙酰神经氨糖酸“CAO”)的己二酸二酰肼 (MW = 174.2gms) 溶解于最少量的 20mM 醋酸钠 (pH5.5±0.02) 中,并加入来自 1 的溶液中。

[0182] 3 待加入的己二酸二酰肼的量

[0183] =  $\frac{\text{CAO 的重量 (g)} \times 25 \times \text{己二酸二酰肼的 MW (g)}}{\text{CAO 的 MW (道尔顿)}}$

[0184] CAO 的 MW (道尔顿)

[0185] =  $\frac{1 \times 25 \times 174.2}{15 \times 10^3}$

[0186]  $15 \times 10^3$

[0187] = 0.290g

[0188] 4 加入己二酸二酰肼溶液后,用醋酸钠将多聚乙酰神经氨糖酸的体积补充至终浓度 62.5mg/ml。因此总反应体积为 16ml。

[0189] 5 在振动器 (22 次振动 / 分钟) 上于 22.0±1.0°C 下温育反应混合物 2±0.1 小时。

[0190] 6 制备  $\text{NaCNBH}_3$  浓缩液 (165mg/ml), 并将 0.5ml 的浓缩液加入来自 1 的溶液中, 使其在最终反应混合物中的终浓度变为 5.0mg/ml。在振动器 (22 次振动 / 分钟) 上于 4.0±1.0°C 下温育反应混合物 3.0±0.20 小时。

[0191] 7 将反应混合物置于无内毒素的气密容器内, 该容器具有 50ml 过量的顶空用于适当混合(应当有足够的空间, 以使反应混合物不接触容器帽)。

[0192] 8 在 4°C 下反应 3 小时后, 用 2mM 的三乙醇胺(使体积达到 50ml) 在 pH8.0±0.02 下稀释样品以使多聚乙酰神经氨糖酸的终浓度达到 20mg/ml。

[0193] 9 将反应混合物脱盐以从聚合物中除去过量未处理的己二酸二酰肼和  $\text{NaCNBH}_3$  等。这可使用 GPC(使用 XK 50 Sephadex G-25 中等基质(matrix); ≤ 1.8mg CA/ml 基质; 35cm 床高; 柱体积 = 687ml) 通过观察 UV 224nm 和电导率来完成。用 20mM 的三乙醇胺 (pH 8.0±0.02) 缓冲液进行脱盐。

[0194] 10 脱盐后, 使多聚乙酰神经氨糖酸-酰肼经历一个循环的超滤、用 20mM TEA (pH8.0±0.02) 进行的一个循环的渗滤、用 2mM TEA (pH 8.0±0.02) 进行的至少三个循环的渗滤。这可使用 3kDa 的回旋流 / 切向流超滤器 (vivaflow cassette) 来完成。

[0195] 11 将经脱盐的样品的 pH 调节至 pH7.8-8.0。任选地, 冷冻干燥样品并接着将其保存用于二次干燥以除去多余水分。

[0196] 实施例 22

[0197] 将酰肼-PSA 偶联到促红细胞生成素上

[0198] 使用浓度为 10mM 的  $\text{NaIO}_4$  氧化促红细胞生成素 (EPO)。在 pH5.75、4℃ 下氧化 EPO(1mg) 30 分钟, 随后加入  $\text{NaHSO}_3$  至终浓度为 5mM 来终止氧化。使用经氧化的 EPO 和酰肼-PSA(hydrazide-PSA) 聚合物进行缀合反应。用于缀合的酰肼-PSA 的分子量为 24.34kDa。反应混合物中酰肼-PSA 的终浓度为 1.25mM。反应混合物中 EPO 的终浓度为 0.125mg/ml。反应混合物的最终 pH 值为 5.75 左右。向反应混合物中加入氰基硼氢化钠至浓度为 50mM 或 3.17mg/ml。反应在 4℃ 下进行 24 小时。使用 SDS PAGE 和蛋白质印迹法鉴定缀合物。在 SDS PAGE 中见到对应于缀合物的条带转移, 并从蛋白质印迹法中得到阳性结果。

[0199] 实施例 23

[0200] 将酰肼-PSA 偶联到  $\beta$ -半乳糖苷酶上

[0201] 用 0.625mM-2mM 的  $\text{NaIO}_4$  在 4℃ 下氧化  $\beta$ -半乳糖苷酶 (0.5-4.5mg) 30 分钟。加入  $\text{NaHSO}_3$  至终浓度 5mM 来终止氧化。使用经氧化的  $\beta$ -半乳糖苷酶和 24.34kDa-27.9kDa 的酰肼-PSA 进行缀合反应。反应混合物中酰肼-PSA 的终浓度为 1.25mM。反应混合物中  $\beta$ -半乳糖苷酶的终浓度为 0.125mg/ml-0.76mg/ml。反应混合物的最终 pH 值为 5.75 左右。向反应混合物中加入氰基硼氢化钠至浓度为 50mM 或 3.17mg/ml。反应在 4℃ 下进行, 并在 1 小时、2 小时和 24 小时收集样品。使用 SDS PAGE 和蛋白质印迹法鉴定纯化和未纯化的缀合物。在 SDS PAGE 中见到对应于缀合物的条带转移, 并且从蛋白质印迹法得到了阳性结果。活性经测定为 84%。观察到用醛基连接剂化学法制得的相当的缀合物的活性小于 50%。

[0202] 实施例 24

[0203] 将酰肼-PSA 偶联到胎球蛋白上

[0204] 用  $\text{NaIO}_4$  (5 或 10mM) 在 4℃ 下氧化胎球蛋白 (0.25mg) 30 分钟或 60 分钟。酌情加入  $\text{NaHSO}_3$  至终浓度 5mM 或 10mM 以匹配用于氧化的  $\text{NaIO}_4$  浓度来终止氧化。使用经氧化的胎球蛋白和己二酸二酰肼-PSA 聚合物进行缀合反应。反应混合物中聚合物的终浓度为 1.25mM-2.5mM。反应混合物的最终 pH 为 5.75 左右。向反应混合物中加入氰基硼氢化钠至浓度为 50mM 或 3.17mg/ml。反应在 4℃ 下进行 1 小时至 4 小时。使用 SDS PAGE 和蛋白质印迹法鉴定缀合物。在 SDS PAGE 中见到对应于每组反应条件的缀合物的条带转移, 并且从蛋白质印迹法得到阳性结果。

[0205] 进行 5mg 胎球蛋白的放大反应, 随后纯化所得的缀合物。用 10mM  $\text{NaIO}_4$  在 4℃ 下氧化 5mg 胎球蛋白 60 分钟, 随后加入  $\text{NaHSO}_3$  至终浓度为 10mM 来终止氧化。使用经氧化的胎球蛋白和己二酸二酰肼-PSA 聚合物进行缀合反应。反应混合物中聚合物的终浓度为 2.5mM。反应混合物的最终 pH 为 5.75 左右。向反应混合物中加入氰基硼氢化钠至浓度 50mM 或 3.17mg/ml。反应在 4℃ 下进行, 并在 2 小时收集样品。使用 SDS PAGE 和蛋白质印迹法鉴定纯化和未纯化的缀合物。在 SDS PAGE 中见到对应于缀合物的条带转移, 并且从蛋白质印迹法得到了阳性结果。

[0206] 实施例 25

[0207] 将酰肼-PSA 偶联到 DNA 酶上

[0208] 用  $\text{NaIO}_4$  在 4℃ 下氧化 DNA 酶 30 分钟至终浓度 0.2mM-2mM。加入  $\text{NaHSO}_3$  至终浓度

2-5mM(取决于氧化使用的 $\text{NaIO}_4$ 浓度)来终止氧化反应。通过向经氧化的DNA酶中加入酰肼-PSA聚合物至终浓度1.25mM进行经氧化DNA酶的糖基多唾液酸化。向反应混合物中加入氰基硼氢化钠至终浓度50mM或3.17mg/ml,并在4°C下进行DNA酶的糖基多唾液酸化1小时至2小时。用25倍摩尔过量于聚合物的Tris终止反应。使用SDS PAGE和蛋白质印迹法鉴定缀合物。在SDS PAGE中见到对应于缀合物的条带转移,并且从蛋白质印迹法得到了阳性结果。活性经测定为49%。

[0209] 实施例 26

[0210] 用氨氧连接剂(3-氧-戊烷-1,5-二氧胺)使 $\beta$ -半乳糖苷酶聚乙二醇化

[0211] 用1.5mM  $\text{NaIO}_4$ 在4°C下氧化 $\beta$ -半乳糖苷酶(1mg)30分钟。加入 $\text{NaHSO}_3$ 至终浓度1.5mM来终止氧化。

[0212] 使用经氧化的 $\beta$ -半乳糖苷酶和二氨氧-PEG聚合物(20kDa)进行缀合反应。反应混合物中聚合物的终浓度为1.25mM。反应混合物中 $\beta$ -半乳糖苷酶的终浓度为1mg/ml。反应混合物的最终pH应为5.75左右。向反应混合物中加入氰基硼氢化钠至50mM或3.17mg/ml的浓度。反应在4°C下进行2小时。用SDS PAGE来鉴定未纯化的缀合物,并在SDS PAGE中见到对应于缀合物的条带转移。活性经测定为59%。

[0213] 实施例 27

[0214] 使用氨氧连接剂使促红细胞生成素聚乙二醇化

[0215] 用5mM或10mM的 $\text{NaIO}_4$ 在50mM醋酸钠(pH5.75)中于4°C下氧化促红细胞生成素(EPO;0.2mg)45分钟,然后加入 $\text{NaHSO}_3$ 至终浓度5或10mM(以匹配用于氧化的 $\text{NaIO}_4$ 的浓度)来终止氧化。使用经氧化的EPO和二氨氧PEG聚合物(20kDa)进行缀合反应。反应混合物中聚合物的终浓度为1.5mM。反应混合物的最终pH应为5.75左右。向反应混合物中加入氰基硼氢化钠至50mM或3.17mg/ml的浓度。反应中蛋白的最终浓度为0.4mg/ml。缀合反应在4°C下进行过夜。

[0216] 由此,本发明提供了非凝血蛋白的化合物与水溶性聚合物特别是PSA和mPSA的缀合物。

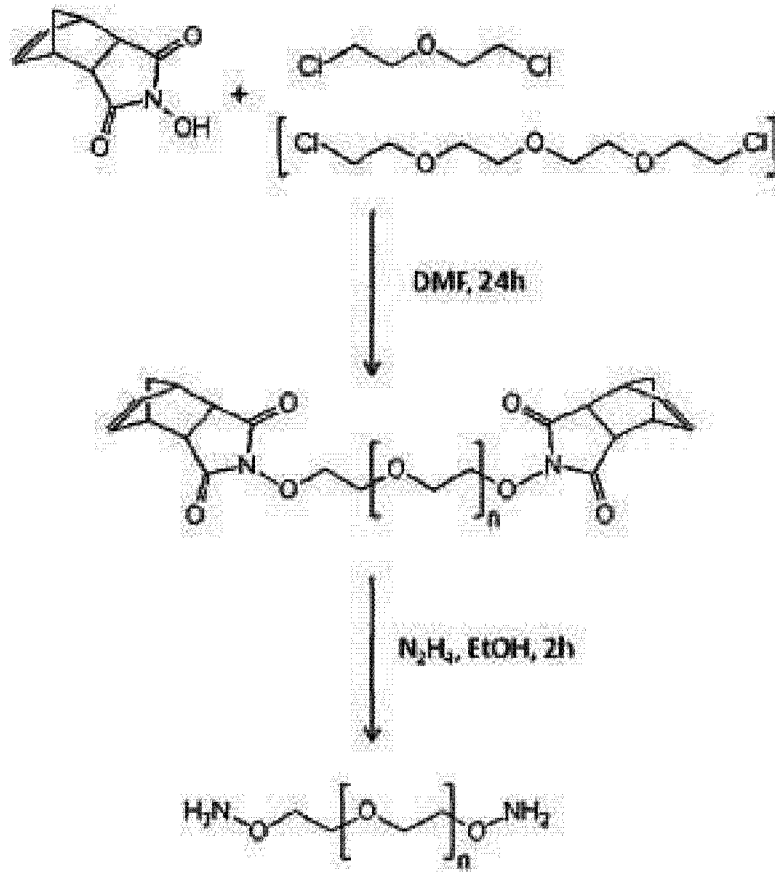


图 1



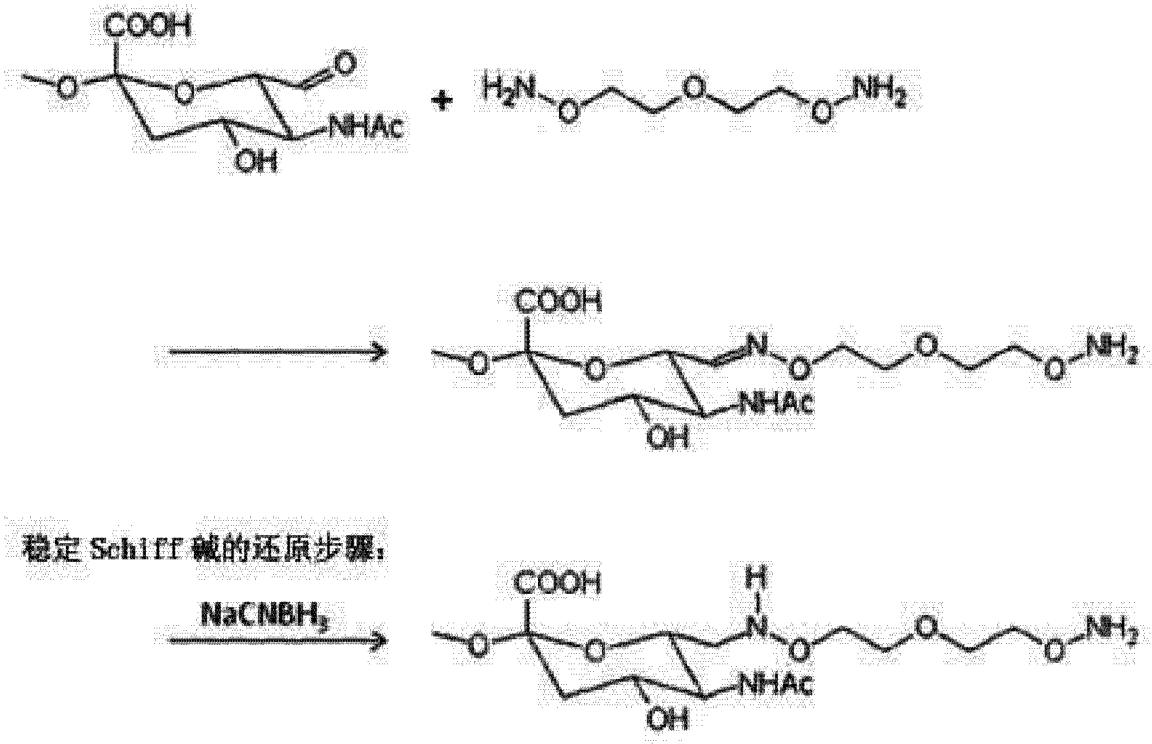


图 2