



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I388570B1

(45)公告日：中華民國 102 (2013) 年 03 月 11 日

(21)申請案號：098124944

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 07 月 23 日

(51)Int. Cl. : C07K19/00 (2006.01)

A61K47/48 (2006.01)

(30)優先權：2008/07/23 南韓

10-2008-0071766

(71)申請人：韓美科學有限公司(南韓) HANMI SCIENCE CO., LTD. (KR)

南韓

(72)發明人：宋大海 SONG, DAE HAE (KR)；申載熙 SHIN, JAE HEE (KR)；李美枝 LEE, MI JI (KR)；洪性熙 HONG, SUNG HEE (KR)；權世昌 KWON, SE CHANG (KR)；李寬淳 LEE, GWAN SUN (KR)

(74)代理人：閻啟泰；林景郁

(56)參考文獻：

WO 94/11399A1

WO 2008/082274A1

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：25 項 圖式數：3 共 0 頁

(54)名稱

包含具有三個官能端的非肽醯聚合物的多肽複合物

A POLYPEPTIDE COMPLEX COMPRISING NON-PEPTIDYL POLYMER HAVING THREE FUNCTIONAL ENDS

(57)摘要

本發明揭示一種蛋白複合物，其包含生理活性多肽、二聚蛋白及具有三個官能端(3 臂)之非肽醯聚合物，其中該生理活性多肽及該二聚蛋白皆藉由各別之共價鍵鍵聯至該 3 臂非肽醯聚合物上。該蛋白複合物保證生理活性多肽之長效活性及生物穩定性。該蛋白複合物具有高度維持生理活性多肽或肽之生物活性及顯著改善該等多肽或肽之血清半生期之能力，因此可應用於開發各種生理活性多肽藥物之持續釋放調配物。其亦在無顯著損失之情況下利用包括該等生理活性多肽之原料，從而增加產率。此外，其可容易地純化。

Disclosed is a protein complex, comprising a physiologically active polypeptide, a dimeric protein and a non-peptidyl polymer having three functional ends (3-arm), with the linkage of both the physiologically active polypeptide and the dimeric protein to the 3-arm non-peptidyl polymer via respective covalent bonds. The protein complex guarantees the long acting activity and biostability of a physiologically active polypeptide. Having the ability to maintain the bioactivity of physiologically active polypeptides or peptides highly and to significantly improve the serum half life of the polypeptides or peptides, the protein complex can be applied to the development of sustained release formulations of various physiologically active polypeptide drugs. Also, it utilizes raw materials including the physiologically active polypeptides without significant loss, thereby increasing the production yield. Further, it can be easily purified.

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫) 107K19/00 (2006.01)

※申請案號：9814944

A61K47/48 (2006.01)

※申請日：98.7.23 ※IPC 分類：

一、發明名稱：(中文/英文)

包含具有三個官能端的非肽醯聚合物的多肽複合物

A POLYPEPTIDE COMPLEX COMPRISING NON-PEPTIDYL
POLYMER HAVING THREE FUNCTIONAL ENDS

二、中文發明摘要：

本發明揭示一種蛋白複合物，其包含生理活性多肽、二聚蛋白及具有三個官能端（3臂）之非肽醯聚合物，其中該生理活性多肽及該二聚蛋白皆藉由各別之共價鍵鍵聯至該3臂非肽醯聚合物上。該蛋白複合物保證生理活性多肽之長效活性及生物穩定性。該蛋白複合物具有高度維持生理活性多肽或肽之生物活性及顯著改善該等多肽或肽之血清半生期之能力，因此可應用於開發各種生理活性多肽藥物之持續釋放調配物。其亦在無顯著損失之情況下利用包括該等生理活性多肽之原料，從而增加產率。此外，其可容易地純化。

三、英文發明摘要：

Disclosed is a protein complex, comprising a physiologically active polypeptide, a dimeric protein and a non-peptidyl polymer

having three functional ends (3-arm), with the linkage of both the physiologically active polypeptide and the dimeric protein to the 3-arm non-peptidyl polymer via respective covalent bonds. The protein complex guarantees the long acting activity and biostability of a physiologically active polypeptide. Having the ability to maintain the bioactivity of physiologically active polypeptides or peptides highly and to significantly improve the serum half life of the polypeptides or peptides, the protein complex can be applied to the development of sustained release formulations of various physiologically active polypeptide drugs. Also, it utilizes raw materials including the physiologically active polypeptides without significant loss, thereby increasing the production yield. Further, it can be easily purified.

101年9月10日修(正)換頁

101年9月10日替換頁

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：圖（ 1 ）。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

101年9月10日修(改)正替換頁

101年9月10日替換頁

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於提供具有二聚蛋白之生理活性多肽之長效活性的蛋白複合物。更特定言之，本發明係關於一種蛋白複合物，其中生理活性多肽及二聚蛋白經由各別共價鍵連接於具有三個官能端（3臂）之非肽醯聚合物，以及製備其之方法。

【先前技術】

由於多肽之低穩定性，其一般易於變性且由蛋白酶降解並喪失其活性。另一方面，肽尺寸相對較小因此其容易經由腎臟排泄。

因此為維持理想血液濃度水準及其效價，需要頻繁投予包含多肽或肽作為活性成份之蛋白質類藥物。然而，因為大部分蛋白質類藥物為適於注射之形式，所以將生理活性多肽或肽維持在適當血液水準需要頻繁注射，造成患者顯著疼痛。為克服此等問題，人們已嘗試藉由增加血液中蛋白質類藥物之穩定性且維持血液藥物含量長時間較高來提供最大醫學效果。需要此等持久之蛋白質類藥劑不僅增加蛋白質類藥物之穩定性且維持藥物本身之足夠效價，而且不引起患者之免疫反應。

慣常情況下，將諸如聚乙二醇（PEG）之高度可溶聚合物化學接枝於蛋白質表面上，其旨在使該等蛋白質穩定、防止蛋白酶與蛋白質接觸及抑止小尺寸肽之腎損失。接枝

至蛋白質上之特異或各種不同部位之 PEG 適用於使蛋白質穩定化且防止蛋白質水解而不產生顯著之副作用。此外，接枝之 PEG 增加蛋白質之分子量，從而阻止蛋白質之腎損失且維持蛋白質之生理活性。

舉例而言，WO 2006/076471 描述 B 型利尿鈉肽 (BNP) 在治療鬱血性心臟衰竭中之用途。BNP 與利尿鈉肽受體 A (NPR-A) 結合以觸發 cGMP 之合成，從而降低動脈血壓。當 BNP 經聚乙二醇化時，將其描述為使其生理活性延長較長時間。美國專利第 6,924,264 號亦揭示藉由將 PEG 接枝於離胺酸殘基上而增加腸促胰島素類似物-4 (exendin-4) 之活性時間。

為增加其生理活性，將藥用多肽與 PEG 之兩端連接以形成雙結合物 (美國專利第 5,738,846 號)。另一方面，將兩種不同藥用蛋白質與 PEG 之各別末端連接以形成具有兩種不同生理活性之蛋白複合物 (WO 92/16221)。然而，未發現此等蛋白質類藥物顯著維持活性。

亦據報導 G-CSF 及人類白蛋白與一個 PEG 連接之融合蛋白穩定性增加 (Kinstler 等人, Pharmaceutical Research 12(12): 1883-1888, 1995)。然而，發現與單獨之天然藥物相比，具有 G-CSF-PEG-白蛋白結構之修飾藥物將滯留時間僅增加至約四倍，且僅稍微增加血清半生期。因此，修飾藥物實際上不用作持久藥劑。

當與 PEG 偶合時，肽變得如此穩定以致於延長其活體內之持久性。然而，當指定較高分子量時，PEG 使生理活

性肽之效價顯著較低且降低與肽之反應性，造成低產率。

增加活體內生理活性蛋白之穩定性之替代方案借助於基因重組。使編碼在血液中高度穩定之蛋白質的基因與編碼所關注之生理活性蛋白之基因連接，接著轉型至動物細胞中，隨後培養細胞而生成融合蛋白。

舉例而言，已報導一種融合蛋白，其中使迄今已知最有效穩定化蛋白質之白蛋白或其片段與所關注之生理活性蛋白融合（WO 93/15199 及 93/15200, EP 公開案第 413,622 號）。同樣，由 Human Genome Sciences（商標名：Albuferon™）之酵母產生的干擾素 α 及白蛋白之融合蛋白，血清半生期自 5 小時增加至 93 小時，但主要缺點為將生物活性減少至小於未處理干擾素之生物活性的 5%（Osborn 等人，J. Phar. Exp. Ther. 303(2): 540-548, 2002）。

至於肽，在 WO 02/46227 及美國專利第 6,756,480 號中提及其修飾，前一專利案揭示利用基因重組技術使 GLP-1、腸促胰島素類似物-4 及其類似物與人血清白蛋白或免疫球蛋白片段（Fc）融合，後一專利案揭示副甲狀腺激素（PTH）或其類似物與免疫球蛋白片段（Fc）之融合蛋白。此等方法可克服低聚乙二醇化反應產率及非特異性，但缺點在於血清半生期無顯著增加且在一些情況下，效價結果較低。人們使用各種肽連接子來最大限度地增加血清半生期，但顯示有造成免疫反應之高可能性。當指定具有二硫鍵之肽（諸如 BNP）時，其很可能誘發錯誤摺疊（misfolding）且因此難以應用。

亦已知經由基因重組將免疫球蛋白之 Fc 域連接至干擾素（韓國專利公開案第 2003-9464 號）、介白素-4 受體、介白素-7 受體或紅血球生成素受體（韓國專利第 249572 號）而製備其他各種融合蛋白。PCT 專利公開案第 WO 01/03737 號揭示一種融合蛋白，其中細胞介素或生長因子經由寡肽連接子連接至免疫球蛋白之 Fc 片段。美國專利第 5,116,964 號描述 LHR（淋巴球細胞表面糖蛋白）或 CD4 蛋白，利用基因重組技術使其融合至免疫球蛋白 Fc 域之胺基或羧基端。美國專利第 5,349,053 號亦揭示一種 IL-2 與免疫球蛋白 Fc 域連接之融合蛋白。利用基因重組技術構建之許多其他 Fc 融合蛋白皆得以揭示，其之實例包括免疫球蛋白 Fc 域與干擾素 β 之融合蛋白或其衍生物（PCT 專利公開案第 WO 00/23472 號）；免疫球蛋白 Fc 域與 IL-5 受體之融合蛋白（美國專利第 5,712,121 號）；免疫球蛋白 G4 Fc 域與干擾素 α 之融合蛋白（美國專利第 5,723,125 號）；及免疫球蛋白 G2 Fc 域與 CD4 蛋白之融合蛋白（美國專利第 6,451,313 號）。另一方面，美國專利第 5,605,690 號教示經修飾之免疫球蛋白 Fc 域於製備融合蛋白中之用途。舉例而言，利用基因重組方法，使用具有尤其對補體結合位點或受體結合位點修飾之胺基酸殘基的免疫球蛋白 Fc 來製備 TNFR-IgG1 Fc 融合蛋白。在美國專利第 6,277,375 號、第 6,410,008 號及第 6,444,792 號中揭示了利用基因重組技術所製備之經修飾免疫球蛋白 Fc 域之其他融合蛋白。

免疫球蛋白起抗體的作用，顯示抗體相關細胞之細胞

毒性 (ADCC) 或補體相關之細胞毒性 (CDC)，且據報導存在於免疫球蛋白 Fc 域中之糖鏈在 ADCC 及 CDC 中起重要作用 (Burton D., Molec. Immun. 22, 161-206, 1985)。已知當不含糖鏈時，免疫球蛋白本身之血清半生期類似於具有糖鏈之免疫球蛋白之血清半生期，但在補體結合力及受體結合力方面減少至 10 至 1000 分之一 (Waldmann H., Eur. J. Immunol. 23, 403-411, 1993; Morrison S., J. Immunol. 143, 2595-2601, 1989)。

美國專利第 6,660,843 號揭示利用基因重組技術經由連接子融合 Fc 域與所關注之肽且在大腸桿菌 (*E. coli*) 中產生融合蛋白。為用於製備複合物，連接子允許選擇介於所關注之兩種蛋白之間的結合部位及其取向 (orientation)，且使複合物能夠產生為均質或異質單體、二聚體或多聚體之形式。此外，當利用此方法時，可以比利用哺乳動物細胞低之成本產生該等複合物。此外，該等複合物可能產生為不含糖鏈之形式。然而，由於在大腸桿菌中相伴產生所關注之蛋白與免疫球蛋白 Fc 域，因此當天然形式之目標蛋白具有糖鏈時此方法難以適用於該目標蛋白。利用包涵體，此方法極易誘發錯誤摺疊。在利用基因重組技術產生之 Fc 融合蛋白中，僅在特異性部位可能發生融合，亦即在免疫球蛋白 Fc 域之胺基端或羧基端。Fc 融合蛋白僅表現為均質二聚形式，而非單體形式。另外，融合可能僅在糖基化蛋白之間或在無糖基化蛋白之間進行，而不可能在糖基化蛋白與無糖基化蛋白之間進行。若存在由於融合而新形

成之胺基酸序列，則其可能誘發免疫反應。此外，連接子可能對酶促降解敏感。

在利用免疫球蛋白 Fc 域之融合蛋白開發中，先前報導中並未進行目標蛋白與人類天然 Fc 經由交聯子提供複合物之嘗試。可利用基因重組技術在哺乳動物細胞或大腸桿菌中產生免疫球蛋白 Fc 域，但先前報導中並未進行以高產率產生單獨的不含目標蛋白之天然免疫球蛋白 Fc 域且將其應用於持久形式中之嘗試。此外，不曾進行重組免疫球蛋白 Fc 與目標蛋白經由交聯子產生複合物之嘗試。

因而，為將生理活性多肽與聚合物結合起來已實行各種不同方法。在習知方法中，可改善多肽之穩定性，但同時活性顯著降低，或可不顧及穩定性而改善活性。因此，仍需要可在使修飾誘發之活性減少最少之情況下增加蛋白質類藥物穩定性的方法。

在此情況下，本發明之發明者藉由將免疫球蛋白及生理活性多肽分別連接至如韓國專利第 10-0725315 號及第 10-0775343 號（其之全文以引用的方式併入本文）中所揭示之非肽醯連接子之相反末端而開發出一種具有高活性且血清半生期得以改善之蛋白複合物。

習知藉由將非肽醯聚合物優先與生理活性多肽連接且隨後與免疫球蛋白 Fc 域連接來製備免疫球蛋白及生理活性多肽分別與非肽醯聚合物之相反末端連接之蛋白複合物。然而，此習知製備方法產生許多不希望有的雜質，亦造成損失大量生理活性多肽。亦即，習知方法之工業應用在經

98-9月28日換發

濟上不利，且所得複合物必須以稍微複雜之方式加以純化。在生理活性多肽呈二聚體形式之情況下，其與非肽醯聚合物之兩端產生橋接形式，因此其不能與免疫球蛋白 Fc 複合或可複合但產率極低。另一方面，當免疫球蛋白 Fc 域首先與非肽醯聚合物連接時，亦出現類似問題。因為免疫球蛋白 Fc 為兩個 N 末端彼此鄰近之同質二聚體 (homo-dimer)，在免疫球蛋白 Fc 之兩個 N 末端與非肽醯聚合物之相反末端之間形成各別連接以產生橋接形式，因此未留下待與生理活性多肽反應之官能端。因此，產率顯著降低。

【發明內容】

目的在於克服先前技術中遇到之問題且由本發明之發明者進行的對蛋白複合物的導致本發明且廣泛與徹底的研究，導致發現在製備由二聚蛋白及生理活性多肽構成之蛋白複合物中使用 3 臂非肽醯聚合物作為連接子可防止生理活性多肽損失從而顯著增加產率、允許用簡單方法純化複合物、及使蛋白複合物之結構穩定從而延長血清半生期且同時維持其生物活性。

揭示

技術問題

因此本發明之一目標為提供一種蛋白複合物及製備其之方法，該蛋白複合物中生理活性多肽、3 臂非肽醯聚合物、及二聚蛋白係經由共價鍵連接。

本發明之另一目標為提供一種包含蛋白複合物之持續

蛋白質類藥劑，其延長生理活性多肽之血清半生期同時維持其生物活性。

技術解決方案

根據本發明之一個方面，本發明係關於蛋白複合物，其中生理活性多肽及二聚蛋白與 3 臂非肽醯聚合物共價連接。

如本文中所使用，術語「蛋白複合物」或「複合物」意欲指由至少一種生理活性多肽、至少一種 3 臂非肽醯聚合物及至少一種二聚蛋白構成之結構，其之間經由共價鍵互連。為將術語「結合物」與「複合物」區別開來，本文中使用的術語「結合物」係指僅成對之生理活性多肽、非肽醯聚合物及二聚蛋白經由共價鍵互連之結構。

本發明之蛋白複合物為蛋白質類藥物，其經修飾以增加其活體內持久性且最低限度減少其生物活性。本發明提供使用 3 臂非肽醯聚合物來連接生理活性多肽及二聚蛋白，由此形成蛋白複合物，從而使製備方法得以應用，藉由該方法可防止生理活性多肽之損失且蛋白複合物可如此結構穩定以使純化簡單。

如本文中所使用，術語「二聚蛋白」意謂具有兩個 N 末端之蛋白質。較佳可使用免疫球蛋白 Fc 域作為載體。生理活性同質二聚體或異質二聚體亦包括在二聚蛋白之範疇內。

免疫球蛋白 Fc 域對用作藥物載體而言足夠穩定，因為其為活體內代謝之生物可降解多肽。此外，由於相對較小

之分子量，就複合物之製備、純化及產率而言，免疫球蛋白 Fc 域與總免疫球蛋白分子相比具有優點。另外，因為 Fc 不含在一種抗體與另一種抗體之間胺基酸序列存在極大不同之 Fab，所以 Fc 大大促進複合物之均質性 (homogeneity) 且預期減少抗原性之誘發。

如本文中所使用之術語「免疫球蛋白 Fc 域」意欲表示不含重鏈及輕鏈可變域之重鏈恆定域 2 (C_{H2}) 及重鏈恆定域 3 (C_{H3})、重鏈恆定域 1 (C_{H1}) 及輕鏈恆定域 1 (C_{L1}) 且可包含鉸鏈區。當保證效果實質上與天然形式相同或比天然形式高時，本發明之免疫球蛋白 Fc 域可為擴展 Fc 域，其另外包含一部分或全部重鏈恆定域 1 (C_{H1}) 及/或輕鏈恆定域 1 (C_{L1}) 且不含重鏈及輕鏈可變域。或者，Fc 域可為 C_{H2} 及/或 C_{H3} 之截斷形式，其缺少相應胺基酸序列之重要部分。總之，本發明之免疫球蛋白 Fc 域可為 1) C_{H1} 域、 C_{H2} 域、 C_{H3} 域及 C_{H4} 域；2) C_{H1} 域及 C_{H2} 域；3) C_{H1} 域及 C_{H3} 域；4) C_{H2} 域及 C_{H3} 域；5) 一或多個域與免疫球蛋白鉸鏈區 (或一部分鉸鏈) 之組合；或 6) 由各輕鏈恆定域與輕鏈恆定域構成之二聚體。

此外，如本文中所使用之術語「免疫球蛋白 Fc 域」意欲不僅涵蓋天然胺基酸序列而且涵蓋其突變體。胺基酸序列突變體意謂由於一或多種胺基酸殘基或其組合之缺失、插入、非保守或保守性取代而與天然序列不同之胺基酸序列。舉例而言，可將已知在抗體結合中起重要作用的 IgG Fc 之位置 214 至 238、297 至 299、318 至 322 或 327 至 331

之胺基酸殘基加以修飾以便用作適當結合位點。此外，例如缺少形成天然 Fc 之二硫鍵或若干 N 末端胺基酸之殘基，或在天然 Fc 之 N 末端具有額外甲硫胺酸殘基的各種突變體亦為可能。另外，可藉由移除補體結合基元，例如 C1q 結合基元或 ADCC（抗體相關之細胞介導之細胞毒性）基元，來消除效應子功能。關於免疫球蛋白 Fc 域之胺基酸序列突變體之製備可參考 WO 97/34631 及 WO 96/32478。

在此項技術中已知總體上不改變天然蛋白質或肽之活性的胺基酸取代（H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979）。最典型之取代發生於 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 及 Asp/Gly 之間。必要時，可對該等胺基酸進行修飾，諸如磷酸化、硫酸化、丙烯酸化、糖基化、甲基化、法呢基化（farnesylation）、乙醯化、醯胺化等。

上述 Fc 突變體較佳為其天然形式之功能等效物，因此生物活性類似，而對熱及 pH 之結構穩定性得到改善。

Fc 域可為自人類及其他動物（包括牛、山羊、豬、小鼠、兔、倉鼠、大鼠及天竺鼠）分離之天然形式，或可為自經轉型之動物細胞或微生物中所獲得之其重組體或衍生物。在前者情況下，自人類或動物中分離總免疫球蛋白，隨後經蛋白酶處理。當用木瓜蛋白酶處理時，總免疫球蛋白分成 Fab 及 Fc。胃蛋白酶將總免疫球蛋白分解成 pF'c 及

F(ab)2。可利用尺寸排阻層析法將 Fc 或 pF'c 自此等片段中分離。較佳為在微生物中自人類 Fc 域衍生之重組免疫球蛋白 Fc 域。

適用於本發明之免疫球蛋白 Fc 域可具有小於、等於、或大於天然 Fc 域之長度的糖鏈，或可不具有糖鏈。利用典型技術（諸如化學技術、酶促技術或利用微生物之基因重組技術）可達成添加、減少或移除免疫球蛋白 Fc 糖鏈。去糖基化免疫球蛋白 Fc 域之補體（C1q）結合力顯著減小且幾乎不具有抗體相關之細胞介導之細胞毒性或補體相關之細胞毒性，且因此不誘發不必要之免疫反應。在此情況下，去糖基化或無糖基化免疫球蛋白 Fc 域優先符合用作藥物載體之預期功能。

如本文中所使用，術語「去糖基化」係指自天然 Fc 上酶促移除糖鏈。術語「無糖基化」係指因為在真核生物中且較佳在大腸桿菌中產生而在 Fc 域中缺少糖鏈。

免疫球蛋白 Fc 域可來源於包括人類、牛、山羊、豬、小鼠、兔、倉鼠、大鼠及天竺鼠之動物，較佳為人類來源。此外，適用於本發明之免疫球蛋白 Fc 域可源自於 IgG、IgA、IgD、IgE、IgM 及其組合或其雜種。較佳地，其源自於比其他類型免疫球蛋白充足之 IgG 或 IgM，且最佳源自於已知延長配體結合蛋白之血清半生期的 IgG。

免疫球蛋白 Fc 域亦可為二聚體或多聚體之形式（免疫球蛋白 Fc 之組合），各包含由相同來源之域構成之糖基化免疫球蛋白。

如本文中所使用之術語「組合」意謂編碼相同來源之單鏈免疫球蛋白 Fc 片段的多肽與不同來源之單鏈多肽連接形成二聚體或多聚體。亦即，可藉由組合選自 IgG Fc、IgA Fc、IgM Fc、IgD Fc 及 IgE Fc 之 Fc 片段中之兩種或多於兩種片段來製備二聚體或多聚體。

如本文中所使用之術語「雜種」意謂編碼不同來源之兩種或多於兩種免疫球蛋白 Fc 片段的序列存在於單鏈免疫球蛋白 Fc 片段中。在本發明中，可能存在各種雜種形式。舉例而言，Fc 域係由選自 IgG Fc、IgM Fc、IgA Fc、IgE Fc 及 IgD Fc 之 C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} 及 C_{H4} 之一至四個不同域構成且可包含鉸鏈區。

IgG 亦更分為子類：IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4，且本發明中允許其之組合或雜種。較佳為 IgG2 或 IgG4 之 Fc 域，最佳為不含效應子功能（諸如補體相關細胞毒性（CDC））之 IgG4 之 Fc 域。

因此，人類 IgG4 之無糖基化 Fc 域為最佳藥物載體。人類來源之 Fc 域比非人類來源之 Fc 域有利，因為後者在體內可能起抗原作用，誘發其抗體產生。

本發明提供蛋白質類藥物與二聚蛋白經由非肽醴聚合物之鍵聯。

在本發明中，非肽醴聚合物意謂由兩個或多於兩個經由除肽鍵以外之共價鍵彼此連接之重複單元所構成的生物可相容聚合物。

在經由符合讀框融合製備之融合蛋白中所使用之習知

肽醯連接子具有以下缺點：易於在活體內被蛋白酶分解，從而不能保證活性藥物之血清半生期與載體保持完整時之預期值一樣長。相反，本發明之聚合物對酶促降解具有抗性，維持藥物之血清半生期與載體保持完整時所保證之血清半生期一樣長。只要作用如上所述，亦即對蛋白酶具有活體內抗性，則任何聚合物皆可在對其無限制之情況下用於本發明中。適用於本發明之非肽醯聚合物之分子量範圍為 1 至 100 kDa 且較佳為 1 至 20 kDa。與免疫球蛋白 Fc 域結合之本發明之非肽醯聚合物可為一種聚合物或不同聚合物之組合。

適用於本發明之非肽醯聚合物之實例包括生物可降解聚合物，諸如聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇與丙二醇之共聚物、聚氧乙基化多元醇、聚乙烯醇、多醣、聚右旋糖、聚乙烯乙醚，諸如 PLA（聚乳酸）及 PLGA（聚乳酸-乙醇酸）之生物可降解聚合物、脂質聚合物、甲殼素、玻尿酸及其組合，較佳為聚乙二醇。此項技術中已知或可利用典型技術容易地製備之其衍生物亦屬於本發明範圍中。

本發明中所使用之非肽醯聚合物具有免疫球蛋白 Fc 域及蛋白質類藥物可結合之官能基。

與利用具有兩個官能端（2 臂）之非肽醯聚合物製備蛋白複合物之先前方法（韓國專利第 10-0725315 號）不同，本發明使用 3 臂非肽醯聚合物。適用於本發明之非肽醯聚合物不同於具有一個官能端及自核心分子伸出之分枝的習知非肽醯聚合物，其具有三個官能端，其中兩個負責與二

101年9月10日修(更)正替換頁

101年9月10日替換頁

聚蛋白形成共價鍵，而另一個與生理活性多肽共價連接。

更詳細而言，因為免疫球蛋白 Fc 為具有兩個彼此鄰近之 N 末端的同質二聚體，所以在免疫球蛋白 Fc 之兩個 N 末端與非肽醯聚合物之相反末端之間形成各別連接。因此，當 2 臂非肽醯聚合物首先與免疫球蛋白 Fc 域形成共價鍵時，未留下可與生理活性多肽反應之官能端，導致產率顯著減小。因此，使生理活性多肽在 2 臂非肽醯聚合物之前與免疫球蛋白 Fc 域反應。然而，當生理活性多肽先期反應時，產生許多不希望有之雜質，因此導致生理活性多肽之損失。相反，有可能使 3 臂非肽醯聚合物在與生理活性多肽反應之前與免疫球蛋白 Fc 域反應，因為其三個官能端中之兩個負責與免疫球蛋白 Fc 之兩個 N 末端反應，而其另一官能端可用於 (cover) 生理活性多肽。因此，可以高產率製得蛋白複合物。在實踐中，發現產率比使用 2 臂非肽醯聚合物時增加至多 2 至 9 倍。

非肽醯聚合物之三個末端官能基可與免疫球蛋白 Fc 域及生理活性多肽之 N 末端、自由離胺酸、組胺酸或半胱胺酸殘基結合。

非肽醯聚合物之三個末端官能基較佳選自醛基、丙醛基、丁醛基、順丁烯二醯亞胺基及丁二醯亞胺衍生物。適用於本發明之丁二醯亞胺衍生物之實例包括丁二醯亞胺基丙酸酯、羥基丁二醯亞胺基、丁二醯亞胺基羧甲基及丁二醯亞胺基碳酸酯。較佳為醛基。當反應性醛基存在於非肽醯聚合物之三個末端上時，其可使非特異性反應最小化且

101年9月10日修(異)正替換頁

101年9月10日替換頁

與生理活性多肽及二聚蛋白有效形成鍵結。另外，藉由與醛進行之還原性烷基化而形成之最終產物比用醯胺鍵結所形成之產物穩定得多。一般而言，在低 pH 值下醛官能基選擇性地與胺基端反應，而在例如 pH 9.0 之高 pH 值下時與離胺酸殘基形成共價鍵。非肽醯聚合物之三個末端官能基彼此可相同或不同。

根據本發明，二聚蛋白與非肽醯聚合物之結合物與生理活性多肽連接以形成蛋白複合物。

本文中，術語「生理活性多肽」、「生理活性蛋白」、「活性蛋白」、「活性多肽」或「蛋白質類藥物」意謂對於活體內生理事件具有某種拮抗活性的多肽、肽或蛋白質，且該等術語可互換使用。

可適用於本發明之蛋白複合物的生理活性多肽可由以下例示：激素、細胞介素、介白素、介白素結合蛋白、酶、抗體、生長因子、轉錄因子、血液因子、疫苗、結構蛋白、配體蛋白、受體、細胞表面抗原、受體拮抗劑及其衍生物或類似物。

適用於本發明之生理活性多肽之具體實例包括人類生長激素、生長激素釋放激素、生長激素釋放肽、干擾素及干擾素受體（例如干擾素 α 、 β 及 γ 、可溶 I 型干擾素受體）、群落刺激因子、類升糖素肽（GLP-1 等）、腸促胰島素類似物-4（exendin-4）肽、ANP、BNP、CNP、DNP、G 蛋白偶合受體、介白素（例如介白素 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) 及介白素受體 (例如 IL-1 受體、IL-4 受體等)、酶 (例如葡萄糖腦苷脂酶 (glucocerebrosidase)、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶 (iduronate-2-sulfatase)、 α -半乳糖苷酶-A、 α -L-艾杜糖醛酸酶、丁醯基膽鹼酯酶、甲殼素酶、麩胺酸脫羧酶、伊米苷酶 (imiglucerase)、脂肪酶、尿酸酶、血小板活化因子乙醯水解酶、中性內肽酶、髓過氧化酶等)、介白素結合蛋白及細胞介素結合蛋白 (例如 IL-18bp、TNF 結合蛋白等)、巨噬細胞活化因子、巨噬細胞肽、B 細胞因子、T 細胞因子、蛋白 A、過敏抑制物、細胞壞死糖蛋白、免疫毒素、淋巴毒素、腫瘤壞死因子、腫瘤抑制子、轉型生長因子、 α -1 抗胰蛋白酶、白蛋白、 α -乳白蛋白、脂蛋白元-E、紅血球生成素 (erythropoietin)、糖基化紅血球生成素、血管生成素 (angiopoietin)、血紅素、凝血酶、凝血酶受體活化肽、血栓調節蛋白 (thrombomodulin)、血液因子 VII、VIIa、VIII、IX 及 XIII、纖維蛋白溶酶原活化子、纖維蛋白結合肽、尿酸酶、鏈球菌激酶 (streptokinase)、水蛭素 (hirudin)、蛋白 C、C-反應蛋白、腎素抑制物、膠原酶抑制物、超氧化物歧化酶、瘦素、血小板衍生性生長因子、上皮生長因子、表皮生長因子、血管抑制素 (angiostatin)、血管緊縮素 (angiotensin)、骨生長因子、骨刺激蛋白、抑鈣素 (calcitonin)、胰島素、體抑素 (somatostatin)、奧曲肽 (octreotide) (體抑素激動劑)、心房肽 (atriopeptin)、軟骨誘導因子、依降鈣素 (elcatonin)、結締組織活化因子、

組織因子路徑抑制物、濾泡刺激激素、促黃體激素、促黃體激素釋放激素、神經生長因子（例如神經生長因子、睫狀神經營養因子（ciliary neurotrophic factor）、軸突生長因子-1（axogenesis factor-1）、類升糖素肽（GLP-1）、腸促胰島素類似物-4 肽、腦利尿鈉肽、膠細胞衍生之神經營養因子、神經突起誘向因子（netrin）、嗜中性球抑制因子、神經營養因子（neurturin）等）、副甲狀腺激素、鬆弛素（relaxin）、胰泌素、體介素、類胰島素生長因子、腎上腺皮質激素、升糖素、膽囊收縮素、胰多肽、胃泌素釋放肽、促皮質素釋放因子、甲狀腺刺激激素、自趨化素（autotaxin）、乳鐵素、肌肉抑制素（myostatin）、受體（例如 TNFR(P75)、TNFR(P55)、IL-1 受體、VEGF 受體、B 細胞活化子受體等）、受體拮抗劑（例如 IL1-Ra 等）、細胞表面抗原（例如 CD 2、3、4、5、7、11a、11b、18、19、20、23、25、33、38、40、45、69 等）、單株抗體、多株抗體、抗體片段（例如 scFv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 及 Fd）及病毒來源之疫苗抗原。生理活性多肽較佳選自人類生長激素、干擾素- α 、干擾素- β 、粒細胞群落刺激因子、紅血球生成素、腸促胰島素類似物-4、咪唑乙醯基腸促胰島素類似物-4 肽（腸促胰島素類似物-4 激動劑）、抑鈣素、奧曲肽（體抑素激動劑）、BNP 及 Fab'。

不利地，此等蛋白質類藥物不能長時間維持其活體內生物活性，因為其極易變性或容易地被蛋白酶降解。然而，二聚蛋白及多肽經由非肽醯聚合物結合之本發明複合物增加藥物之結構穩定性及半清除時間。與習知複合物中所得

相比，由於與二聚蛋白結合所造成之多肽生物活性減少極微小。因此，與習知多肽藥劑相比，本發明之多肽與免疫球蛋白 Fc 域之複合物之特徵在於具有顯著改善之生物可用性。

根據本發明之另一方面，本發明係關於一種製備蛋白複合物之方法，該蛋白複合物中二聚蛋白經由 3 臂非肽醯聚合物與生理活性多肽結合，該方法包含：(1) 使 3 臂非肽醯聚合物之兩臂共價連接於二聚蛋白之相反 N 末端胺基以形成結合物；(2) 自步驟 (1) 之反應混合物中分離結合物，該結合物中二聚蛋白在其 N 末端處與非肽醯聚合物共價連接；及 (3) 使生理活性多肽共價連接於經分離之結合物之非肽醯聚合物的一個自由臂。

在一較佳具體實例中，步驟 (1) 之二聚蛋白為免疫球蛋白 Fc 域。在另一較佳具體實例中，步驟 (1) 之非肽醯聚合物之三個臂在其末端處具有各別醛官能基。更佳地，非肽醯聚合物在 pH 6.0 下與生理活性多肽之 N 末端胺基連接。

在步驟 (1) 中，二聚蛋白與非肽醯聚合物以 1:2 至 1:5 之莫耳比反應。在步驟 (3) 中，由步驟 (2) 分離之結合物與生理活性多肽之莫耳比較佳在 1:0.5 至 1:0.05 範圍內。

步驟 (1) 及 (3) 中之反應視非肽醯聚合物之三個端基而定。必要時，反應可在還原劑存在下進行。還原劑之較佳實例包括氰基硼氫化鈉 (NaCNBH_3)、硼氫化鈉、硼酸二甲基胺及硼酸吡啶。

免疫球蛋白 Fc 域與生理活性多肽之間的鍵聯並非由基於基因重組之融合達成，而是經由共價鍵達成。

根據本發明之另一方面，本發明係關於一種包含本發明之蛋白複合物及醫藥學上可接受之媒劑的醫藥組成物，其顯示生理活性多肽之活體內可持續性 (sustainability) 得到改善。

本發明之醫藥組成物必須經由合適途徑引入所關注之組織或器官中。可使用任何途徑投予本發明之醫藥組成物，只要能將其傳遞至目標組織。舉例而言，可經由腹膜內、靜脈內、肌肉內、皮下、皮內、經口、局部、鼻內、肺內及直腸內之途徑（但不限於此等途徑）進行投藥。較佳以可注射形式投予本發明之醫藥組成物。亦可藉助於將活性物質傳遞至目標細胞之裝置投予醫藥組成物。

以本發明複合物為主之醫藥組成物可另外包含醫藥學上可接受之媒劑。為用作經口劑型之醫藥學上可接受之媒劑，選擇黏合劑、潤滑劑、崩解劑、賦形劑、增溶劑、分散劑、穩定劑、懸浮劑、著色劑及/或片段 (fragment)。當將本發明之醫藥組成物調配成注射劑時，可單獨使用或組合使用緩衝劑、防腐劑、疼痛減輕劑 (pain relieving agent)、增溶劑、等張劑及穩定劑。就局部應用而言，可使用基質 (base)、賦形劑、潤滑劑及防腐劑。對於實際使用，可將本發明之醫藥組成物與醫藥學上可接受之媒劑組合調配成各種劑型。就劑型而言，其可調配成錠劑、片劑、膠囊、酏劑、懸浮液、糖漿、糯米紙囊劑 (wafer) 等。至於注射

劑，其可為單次劑量安瓿瓶或多次劑量之形式。其他可用之形式包括溶液、懸浮液、丸劑、散劑、膠囊及持續釋放藥劑。適用於調配中之媒劑、賦形劑及稀釋劑之實例包括乳糖、D-乳糖 (dlactose)、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、赤藻糖醇、麥芽糖醇、澱粉、阿拉伯樹膠、海藻酸鹽、明膠、磷酸鈣、矽酸鈣、纖維素、甲基纖維素、非晶形纖維素、聚乙烯吡咯啉酮、水、羥基苯甲酸甲酯 (methylhydroxybenzoate)、羥基苯甲酸丙酯 (propylhydroxybenzoate)、滑石、硬脂酸鎂及礦物油。亦可使用填充劑、抗聚集劑、潤滑劑、芳香劑、乳化劑及防腐劑。

本發明之蛋白複合物之醫藥學上有效量視欲治療之疾病之種類、投藥途徑及頻率、患者之年齡、性別及體重及疾病嚴重程度以及生理活性多肽之種類而變化。蛋白複合物在活體內持久性及效價方面之優勢使減少本發明醫藥組成物之投藥劑量及頻率成為可能。

如韓國專利第 10-0725315 號及第 10-0775343 號中所揭示，提供一種蛋白複合物，其中免疫球蛋白恆定域及生理活性多肽分別與非肽醯聚合物之相反末端連接。藉由使非肽醯聚合物與生理活性多肽連接形成結合物且隨後與免疫球蛋白 Fc 連接而製備此蛋白複合物。該製備方法之缺點在於製備過程中損失大量生理活性多肽。相比之下，使用 3 臂非肽醯聚合物製備蛋白複合物可格外減少生理活性多肽之損失。另外，可利用簡單純化方法分離蛋白複合物。

98年9月18日修(※)正替換頁

有利效果

本發明之蛋白複合物具有生理活性多肽及二聚蛋白經由共價鍵與 3 臂非肽醯聚合物連接之結構，使得本發明之蛋白複合物可在長時間內維持活性多肽之高血液濃度，從而產生穩定的醫學效果。

此外，製備本發明之蛋白複合物之方法可大大減少利用 2 臂非肽醯聚合物之習知方法所需之生理活性多肽之量，且與習知方法相比具有引入更為簡單之純化方法及顯著增加產率之優點。尤其，較佳利用本發明之方法製備具有二聚、生理活性多肽之持久的蛋白複合物。

【實施方式】

經由以下實施例可獲得對本發明之更佳瞭解，該等實施例係為說明提出，而不應理解為限制本發明。

實施例 1：製備免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-奧曲肽(N)複合物

為使免疫球蛋白 Fc 之 N 末端聚乙二醇化，在 4℃ 下使莫耳比為 1:2 之 10 mg/ml 免疫球蛋白 Fc 與 5K PropionALD (3) PEG (具有三個丙醛基之 PEG, NOF, Japan) 反應 4.5 小時。在 20 mM SCB(NaCNBH_3) 還原劑存在下，在 100 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 6.0) 中進行反應。利用 SOURCE Q (XK 16 ml, GE Healthcare) 自反應混合物純化單-聚乙二醇化免疫球蛋白 Fc。接著，在 4℃ 下使莫耳比為 1:2 之奧曲肽與免疫球蛋白 Fc-5K PEG 結合物反應，總蛋白濃度設為 25

mg/ml。在 20 mM SCB 還原劑存在下，在 100 mM 磷酸鉀 (pH 6.0) 中進行此偶合反應。經由 SP HP 純化管柱純化偶合反應混合物。利用 10 mM 磷酸鈉緩衝液 (pH 5.4) 作為結合緩衝液，未進行偶合反應之免疫球蛋白 Fc-5K PEG 結合物並未附著於 SP HP 管柱 (XK 16 ml, GE Healthcare)，而是藉由載入通過管柱而分離，而免疫球蛋白-PEG-奧曲肽 (HM11760B) 輕微附著至管柱且隨後用 1 M NaCl 之鹽梯度溶離。

管柱：SP HP (XK 16 ml, GE Healthcare)

流速：2.0 ml/min

梯度：A 0→20% 60 min B (A: 10 mM Na-P pH 5.4, B: A + 1 M NaCl)

實施例 2：製備免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-抑鈣素(N)複合物

免疫球蛋白-Fc 與 5K PropionALD(3) PEG 以與實施例 1 中相同之方式在免疫球蛋白-Fc 之 N 末端上反應，隨後僅純化單-聚乙二醇化免疫球蛋白 Fc 且與抑鈣素偶合。在此方面，在 4°C 下使莫耳比為 1:2 之抑鈣素與免疫球蛋白 Fc-5K PEG 結合物反應 20 小時，總蛋白濃度設為 25 mg/mL。100 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 6.0)，補充以還原劑 20 mM SCB (NaCNBH_3) 用作此偶合反應中之介質。經由 SP HP 純化管柱純化偶合反應混合物。首先，使用 SP HP 管柱 (XK 16 ml, GE Healthcare) 來移除仍未與抑鈣素偶合之免疫球蛋白 Fc-5K PEG 結合物。利用 10 mM 磷酸鈉緩衝液 (pH 5.4)

作為結合緩衝液，未進行偶合反應之免疫球蛋白 Fc-5K PEG 結合物並未附著於 SP HP 管柱 (XK 16 ml, GE Healthcare)，而是藉由載入通過管柱而分離，而免疫球蛋白-PEG-抑鈣素輕微附著至管柱且隨後用 1 M NaCl 之鹽梯度溶離。

管柱：SP HP (XK16 ml, GE Healthcare)

流速：2.0 ml/min

梯度：A 0→20% 60 min B (A: 10 mM Na-P pH 5.4, B: A + 1 M NaCl)

實施例 3：比較 3 臂 PEG 複合物 (實施例 1 及 2) 與 2 臂 PEG 複合物之間的產率及純化方法簡單性

利用分別由實施例 1 及 2 製備之免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-奧曲肽(N)複合物及免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-抑鈣素(N)複合物比較 3 臂 PEG 複合物與 2 臂 PEG 複合物之產率 (表 1)。

作為對照組之 2 臂 PEG 複合物係藉由將作為生理活性多肽之奧曲肽或抑鈣素經由作為連接子之 2 臂 PEG (具有兩個丙醛基之 PEG, IDB, South Korea) 連接至免疫球蛋白 Fc 區域而製備。詳言之，2-臂 PEG 與奧曲肽或抑鈣素偶合且隨後經由共價鍵與免疫球蛋白 Fc 域偶合 (KR10-0725315)。

表 1

活性醫藥成份 (API)	PEG 形式	產率(以 API 計)
奧曲肽	2 臂	9%
	3 臂	33%
抑鈣素	2 臂	18%
	3 臂	30%

分析純化來自偶合反應混合物之複合物之方法的簡單性，且初級（primary）管柱尺寸及結果於下表 2 中概述。

表 2

API	PEG 形式	純化方法	初級管柱尺寸
奧曲肽	2 臂	Source Q -> Source ISO	5
	3 臂	SP HP	1
抑鈣素	2 臂	Souce Q -> Source ISO	4
	3 臂	SP HP	1

當利用 2 臂 PEG 複合物時，仍未偶合之所有免疫球蛋白 Fc 附著至管柱以便本身自免疫球蛋白 Fc-2 臂 PEG-奧曲肽或免疫球蛋白 Fc-2 臂 PEG-抑鈣素中分離。相比之下，當利用 3 臂 PEG 複合物時，在仍未與生理活性多肽偶合之免疫球蛋白 Fc-5K PEG 結合物與免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-奧曲肽或免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-抑鈣素之間的分離使用以下方式達成：藉由載入通過管柱移除免疫球蛋白 Fc-5K PEG 結合物，而免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-奧曲肽或免疫球蛋白 Fc-3

臂 PEG-抑鈣素附著至管柱。因此，不僅純化方法自兩個步驟減少至一個步驟，而且管柱尺寸減少為 1/5。

實施例 4：製備免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-FSH(N)複合物

免疫球蛋白-Fc 與 5K PropionALD(3) PEG 以與實施例 1 中相同之方式在免疫球蛋白-Fc 之 N 末端上反應，隨後僅純化單-聚乙二醇化免疫球蛋白 Fc 且與 FSH 偶合。在此方面，在 4°C 下使莫耳比為 1:15 之 FSH 與免疫球蛋白 Fc-5K PEG 結合物反應 20 小時，總蛋白濃度設為 40 mg/mL。100 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 6.0)，補充以還原劑 20 mM SCB 用作此偶合反應中之介質。經由兩個純化管柱純化偶合反應混合物。首先，使用 Blue HP 管柱 (Hitrap 5 ml, GE Healthcare) 來移除仍未與 FSH 偶合之免疫球蛋白 Fc-5K PEG 結合物。隨後，經由 Resource Iso (1 ml, GE Healthcare) 基於疏水性移除兩個或多於兩個免疫球蛋白 Fc-5K PEG 結合物與 FSH 偶合之多聚物。

管柱：Blue HP (Hitrap 5 ml, GE Healthcare)

流速：3.0 ml/min

梯度：A 0→100% 20 min B

A：50 mM Gly-NaOH + 0.2 M KCl

B：50 mM Gly-NaOH + 2.5 M KCl

管柱：Resource ISO (1 ml, GE Healthcare)

A 0→100% 90min B (A：20 mM Tris pH 7.5, B：A + 1.3 M A.S)

實施例 5：製備免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-胰島素(N)複合物

為使免疫球蛋白 Fc 之 N 末端聚乙二醇化，在 4°C 下使莫耳比為 1:2 之 10 mg/ml 免疫球蛋白 Fc 與 5K PEG PropionALD(3) PEG (具有三個丙醛基之 PEG, NOF, Japan) 反應 4.5 小時。在 20 mM SCB (NaCNBH_3) 還原劑存在下，在 100 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 6.0) 中進行反應。利用 SOURCE Q (LRC25 85 ml, GE Healthcare) 自反應混合物純化單-聚乙二醇化免疫球蛋白 Fc。接著，在 4°C 下使莫耳比為 1:4 之胰島素與免疫球蛋白 Fc-5K PEG 結合物反應 19.5 小時。100 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 6.0)，補充以還原劑 20 mM SCB 用作此偶合反應中之介質。經由兩個純化管柱純化偶合反應混合物。首先，使用 SOURCE Q 管柱 (LRC25 85 ml, GE Healthcare) 來移除仍未與胰島素偶合之免疫球蛋白 Fc-5K PEG 結合物。在 20 mM Tris (pH 7.5) 中 1 M NaCl 之鹽梯度下先使免疫球蛋白 Fc-5K PEG 結合物由於相對弱結合力而溶離，緊接著溶離免疫球蛋白 Fc-PEG-胰島素。經由此初級純化，免疫球蛋白 Fc-5K PEG 結合物得以移除，但 Fc-5K PEG 與胰島素之多聚物並未完全分離。因此利用 Sephacryl S-300 (GE Healthcare) 管柱基於複合物與多聚物之間分子量之差異進行二級純化。同時，調配免疫球蛋白 Fc-PEG-胰島素複合物。先溶離免疫球蛋白 Fc-5K PEG 與胰島素之高分子量多聚物，接著溶離免疫球蛋白 Fc-PEG-胰島素複合物。

管柱：Source Q (LRC25 85 ml，GE Healthcare)

流速：8.0 ml/min

梯度：A 0→25% 100 min B (A：20mM Tris pH 7.5，B：
A + 1 M NaCl)

管柱：Sephacryl S-300(HiPrep 120 ml，GE Healthcare)

流速：0.6 ml/min

**實施例 6：比較 3 臂 PEG 複合物（實施例 4 及 5）與 2
臂 PEG 複合物之間的產率**

利用分別由實施例 4 及 5 製備之免疫球蛋白 Fc-3 臂
PEG-FSH(N)複合物及免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-胰島素(N)複
合物比較 3 臂 PEG 複合物與 2 臂 PEG 複合物之產率(表 3)。

當利用 2 臂 PEG 使用習知製備方法時，二聚生理活性
多肽（諸如 FSH（分子量約為 40,000 Da）及胰島素（分子
量 5,807）佔據非肽醯聚合物之兩個末端，因此聚合物不能
與提供活體內持久性之免疫球蛋白 Fc 域形成共價鍵。在諸
如胰島素之小分子量的二聚生理活性多肽中此現象更為顯
著。

因此，較佳利用 3 臂 PEG 製備具有二聚生理活性多肽
之持久的蛋白複合物。

根據利用 2 臂 PEG 及 3 臂 PEG 之製備方法，FSH 及胰
島素之產率差異於下表 3 中概述。

表 3

活性醫藥成份 (API)	PEG 形式	產率 (以 API 計)
FSH	2 臂 PEG	10%
	3 臂 PEG	32%
胰島素	2 臂 PEG	3%
	3 臂 PEG	27%

實施例 7：製備免疫球蛋白 Fc-PEG-FacVIIa(N)複合物

為使免疫球蛋白 Fc 之 N 末端聚乙二醇化，在 4°C 下使莫耳比為 1:2 之 6 mg/ml 免疫球蛋白 Fc 與 5K PropionALD(3) PEG (具有三個丙醛基之 PEG, NOF, Japan) 反應 4.5 小時。在 20 mM SCB (NaCNBH₃) 還原劑存在下，在 100 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 6.0) 中進行反應。利用 SOURCE Q (LRC25 85 ml, GE Healthcare) 自反應混合物純化單-聚乙二醇化免疫球蛋白 Fc。接著，在 4°C 下使莫耳比為 1:9 之 FVIIa 與免疫球蛋白 Fc-5K PEG 結合物反應 18 小時，總蛋白濃度設為 20 mg/mL。100 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 6.0)，補充以還原劑 20 mM SCB 用作此偶合反應中之介質。經由兩個純化管柱純化偶合反應混合物。首先，使用 SOURCE Q 管柱 (LRC25 85 ml, GE Healthcare) 來移除仍未與 FVIIa 偶合之免疫球蛋白 Fc-5K PEG 結合物。在 20 mM Tris (pH 7.5) 中 1 M NaCl 之鹽梯度下先使免疫球蛋白 Fc-5K PEG 結合物由於相對弱結合力而溶離，緊接著溶離免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-FVIIa。其後，利用 RESOURCE ISO (GE Healthcare) 管柱進行二

級純化以分離免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-FVIIa 與 FVIIa 多聚體雜質。先溶離免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-FVIIa，接著溶離 FVIIa 多聚體雜質。

管柱：Source Q (LRC25 85 ml, GE Healthcare)

流速：4 ml/min

梯度：A 0→7% 1 min B, 7%→37% 80 min B (A: 20mM Tris pH 7.5, B: A + 1 M NaCl)

管柱：RESOURCE ISO (預裝 1 ml, GE Healthcare)

流速：2 ml/min

梯度：B 100→0% 60 min A (A: 20mM Tris pH 7.5, B: A + 1.6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

表 4

活性醫藥成份 (API)	PEG 形式	產率 (以 API 計)
FacVIIa	2 臂 PEG	未製備
	3 臂 PEG	高於約 3%

實施例 8：活體內檢定免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-奧曲肽 (N) 複合物

檢定免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-奧曲肽 (N) 以確定在 SD 大鼠中將其皮下投藥時對體重及 IGF-1 水準之影響。奧曲肽為生長激素之有效抑制物，且主要應用於治療肢端肥大症 (acromegaly)。其可以兩種形式自 Novartis 購得：善得定 (Sandostatin)，一種短效型式；及善得定-LAR，一種長效型式。目前，肢端肥大症為當人類生長激素 (hGH) 超量產

98年9月18日修(次)正替換頁

生 (overproduction) 時所造成之症候群。在奧曲肽之活體內測試中，監控經皮下投予該藥之大鼠的體重及 IGF-1 水準以檢驗其對抑制 GH 分泌之作用。同樣，活體內檢定免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-奧曲肽(N)對大鼠體重及 IGF-1 水準之改變。將免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-奧曲肽(N)以 0.5、1.0 及 2.0 mg/kg 之單次劑量投予而將作為對照組之善得定-LAR 以 1.0 及 2.0 mg/kg 之單次劑量投予，隨後在兩週內監控大鼠體重及 IGF-1 水準。兩種測試物質皆經皮下投予。

與投予媒劑之組相比，觀察到當投予 1.0 mg/kg 之劑量時，善得定-LAR 組體重減少約 3.7%，且當投予 2.0 mg/kg 之劑量時，善得定-LAR 組體重減少約 8.9%。另一方面，當投予 0.5 mg/kg 時，免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-奧曲肽(N)組之體重減少約 44.3%；當投予 1.0 mg/kg 時，該組之體重減少約 40.1%；且當投予 2.0 mg/kg 時，該組之體重減少約 55.1%。

使用大鼠 IGF-1 ELISA 套組定量分析大鼠中 IGF-1 之變化。與媒劑相比，基於血液 IGF-1 水準之 AUC，觀察到善得定 1.0 mg/kg 之情況下血液 IGF-1 水準減少約 15%，且善得定 2.0 mg/kg 之情況下血液 IGF-1 水準減少約 11%。另一方面，在 0.5 mg/kg 之劑量下，免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-奧曲肽(N)組之血液 IGF-1 水準減少約 23%，在 1.0 mg/kg 之劑量下，減少約 18%，且在 2.0 mg/kg 之劑量下，減少約 25%[圖 2]。

活體內測試資料說明免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-奧曲肽(N)在活性方面比善得定-LAR (一種奧曲肽之持續調配物) 有

效。

98 9.28

實施例 9: 活體內檢定免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-FSH(N) 複合物

根據 Steelman-Pohley 方法 (Endocrinology 53, 504-616) 進行免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-FSH(N) 之活體內檢定。使用未成年雌性 SD 大鼠 (21 天大) 進行免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-FSH(N) 之活體內檢定。以 0.018、0.075 及 0.3 微克 / 大鼠之單次劑量投予免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-FSH(N)，而將用作對照組之福裏托普 (Follitrope) (一種市售天然形式之 FSH) 以 4、2 及 1 IU / 大鼠之劑量每天一次投予三天。以 13.3 U / 大鼠與 hCG (人類絨毛膜促性腺素) 組合投予媒劑及測試物質。以 0.25 ml/kg 之量經皮下投予各測試物質。在首次投予測試物質 72 小時之後，使動物經受安樂死且進行卵巢切除術。將如此切除之卵巢稱重。

如圖 3 中所描繪，免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-FSH(N) 顯示劑量相關之活體內活性，與免疫球蛋白 Fc-2 臂 PEG-FSH(N) 相等。

【圖式簡單說明】

圖 1 顯示利用具有三個官能端 (3 臂) 之非肽醯聚合物之蛋白複合物的代表圖。

圖 2 顯示免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-奧曲肽(N)複合物之活體內功效的曲線圖 (HM11760B: 免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-奧曲肽(N)複合物，善得定-LAR: 奧曲肽之持續釋放調配

101 年 9 月 10 日替換頁

101 年 9 月 10 日修(大)正替換頁

物)。

圖 3 顯示免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-FSH(N)複合物之活體內功效 (HM12160A: 免疫球蛋白 Fc-2 臂 PEG-FSH(N)複合物, HM12160B: 免疫球蛋白 Fc-3 臂 PEG-FSH(N)複合物)。

【主要元件符號說明】

無

公告本

101年9月10日修(威)正本

101年9月10日替換頁

七、申請專利範圍：

1.一種蛋白複合物，其包含生理活性多肽、免疫球蛋白 Fc 域及具有三個官能端之非肽醯聚合物，其中該三個官能端藉由分別的共價鍵分別連接至該免疫球蛋白 Fc 域之一個次單元、該免疫球蛋白 Fc 域之另一次單元、及該生理活性多肽。

2.如申請專利範圍第 1 項之蛋白複合物，其中該免疫球蛋白 Fc 域係經無乙醇酸化 (aglycolated)。

3.如申請專利範圍第 1 項之蛋白複合物，其中該免疫球蛋白 Fc 域係由選自 C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} 及 C_{H4} 之一至四個不同域構成。

4.如申請專利範圍第 3 項之蛋白複合物，其中該免疫球蛋白 Fc 域另外包含鉸鏈區。

5.如申請專利範圍第 1 項之蛋白複合物，其中該免疫球蛋白 Fc 域係選自由以下者所組成之群組：IgG、IgA、IgD、IgE、IgM、及其組合及雜種之 Fc 域。

6.如申請專利範圍第 5 項之蛋白複合物，其中該免疫球蛋白 Fc 域係選自由以下者所組成之群組：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、及其組合及雜種之 Fc 域。

7.如申請專利範圍第 5 項之蛋白複合物，其中該免疫球蛋白 Fc 域係呈二聚體或多聚體之形式 (免疫球蛋白 Fc 之組合)，各包含由相同來源之域構成的糖基化免疫球蛋白。

8.如申請專利範圍第 5 項之蛋白複合物，其中該免疫球蛋白 Fc 域係 IgG4 Fc 域。

9.如申請專利範圍第 8 項之蛋白複合物，其中該免疫球蛋白 Fc 域係人類無糖基化 IgG4 Fc 域。

10.如申請專利範圍第 1 項之蛋白複合物，其中該非肽醯聚合物係選自由以下者所組成之群組：聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇與丙二醇之共聚物、聚氧乙基化多元醇、聚乙烯醇、多醣、聚右旋糖、聚乙烯乙醚、生物可降解聚合物、脂質聚合物、甲殼素、玻尿酸及其組合。

11.如申請專利範圍第 10 項之蛋白複合物，其中該非肽醯聚合物係聚乙二醇。

12.如申請專利範圍第 1 項之蛋白複合物，其中該非肽醯聚合物具有選自醛基、丙醛基、丁醛基、順丁烯二醯亞胺基及丁二醯亞胺衍生物之末端官能基。

13.如申請專利範圍第 12 項之蛋白複合物，其中該非肽醯聚合物在其各別末端具有三個官能醛基。

14.如申請專利範圍第 1 項之蛋白複合物，其中該非肽醯聚合物之該三個官能端與該免疫球蛋白 Fc 域及該生理活性多肽之 N 末端官能基結合，該等 N 末端官能基係選自由離胺酸、組胺酸、半胱胺酸殘基及其組合所組成之群組。

15.如申請專利範圍第 1 項之蛋白複合物，其中該生理活性多肽係選自由以下者所組成之群組：激素、細胞介素、介白素、介白素結合蛋白、酶、抗體、生長因子、轉錄因子、血液因子、疫苗、結構蛋白、配體蛋白、受體、細胞表面抗原、受體拮抗劑、及其衍生物或類似物。

16.如申請專利範圍第 15 項之蛋白複合物，其中該生理

活性多肽選自以下者所組成之群組：人類生長激素、生長激素釋放激素、生長激素釋放肽、干擾素及干擾素受體、群落刺激因子、類升糖素肽、腸促胰島素類似物-4 (exendin-4) 肽、ANP、BNP、CNP、DNP、G 蛋白偶合受體、介白素及介白素受體、酶、介白素結合蛋白、細胞介素結合蛋白、巨噬細胞活化因子、巨噬細胞肽、B 細胞因子、T 細胞因子、蛋白 A、過敏抑制物、細胞壞死糖蛋白、免疫毒素、淋巴毒素、腫瘤壞死因子、腫瘤抑制子、轉型生長因子、 α -1 抗胰蛋白酶、白蛋白、 α -乳白蛋白、脂蛋白元-E、紅血球生成素、高度糖基化紅血球生成素(erythropoietin)、血管生成素(angiotensin)、血紅素、凝血酶、凝血酶受體活化肽、血栓調節蛋白(thrombomodulin)、血液因子 VII、VIIa、VIII、IX 及 XIII、纖維蛋白溶酶原活化子、纖維蛋白結合肽、尿激酶、鏈球菌激酶(streptokinase)、水蛭素(hirudin)、蛋白 C、C-反應蛋白、腎素抑制物、膠原酶抑制物、超氧化物歧化酶、瘦素、血小板衍生性生長因子、上皮生長因子、表皮生長因子、血管抑制素(angiostatin)、血管緊縮素(angiotensin)、骨生長因子、骨刺激蛋白、抑鈣素(calcitonin)、胰島素、體抑素(somatostatin)、奧曲肽(octreotide, 體抑素激動劑)、心房肽(atriopeptin)、軟骨誘導因子、依降鈣素(elcatonin)、結締組織活化因子、組織因子路徑抑制物、濾泡刺激激素、促黃體激素、促黃體激素釋放激素、神經生長因子、副甲狀腺激素、鬆弛素(relaxin)、胰泌素、體介素、類胰島素生長因子、腎上腺

皮質激素、升糖素、膽囊收縮素、胰多肽、胃泌素釋放肽、促皮質素釋放因子、甲狀腺刺激激素、自趨化素 (autotaxin)、乳鐵素、肌肉抑制素 (myostatin)、受體、受體拮抗劑、細胞表面抗原、病毒來源之疫苗抗原、單株抗體、多株抗體、抗體片段。

17.如申請專利範圍第 16 項之蛋白複合物，其中該生理活性多肽係選自由以下者所組成之群組：人類生長激素、干擾素- α 、干擾素- β 、粒細胞群落刺激因子、紅血球生成素、腸促胰島素類似物-4、咪唑乙醯基腸促胰島素類似物-4 肽 (腸促胰島素類似物-4 激動劑)、抑鈣素、奧曲肽 (體抑素激動劑)、BNP 及 Fab' 片段。

18.一種製備由生理活性多肽、免疫球蛋白 Fc 域及具有三個官能端之非肽醯聚合物構成之蛋白複合物的方法，其中該三個官能端藉由分別的共價鍵分別連接至該免疫球蛋白 Fc 域之一個次單元、該免疫球蛋白 Fc 域之另一次單元、及該生理活性多肽，該方法包含：

(1) 使該非肽醯聚合物之兩個官能端共價連接於該免疫球蛋白 Fc 域之相反 N 末端胺基以形成結合物；

(2) 自步驟 (1) 之反應混合物中分離該結合物，該結合物中該免疫球蛋白 Fc 域在其 N 末端處與該非肽醯聚合物共價連接；及

(3) 使該生理活性多肽共價連接於該經分離之結合物之該非肽醯聚合物的一個自由官能端。

19.如申請專利範圍第 18 項之方法，其中該非肽醯聚合

物在其各別末端具有三個官能醛基。

20.如申請專利範圍第 18 項之方法，其中在步驟（1）中該免疫球蛋白 Fc 域係以 1:2 至 1:5 之莫耳比率與該非肽醯聚合物反應。

21.如申請專利範圍第 18 項之方法，其中在步驟（3）中該結合體係以 1:0.5 至 1:0.05 之莫耳比率與該生理活性多肽反應。

22.如申請專利範圍第 18 項之方法，其中步驟（1）及（3）中之該等反應係在還原劑存在下進行。

23.如申請專利範圍第 22 項之方法，其中該還原劑係選自由氰基硼氫化鈉（ NaCNBH_3 ）、硼氫化鈉、硼酸二甲基胺及硼酸吡啶所組成之群組。

24.一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第 1 項之蛋白複合物及視情況選用之醫藥學上可接受之媒劑。

25.一種蛋白複合物，其使用如申請專利範圍第 18 項之方法而製備。

八、圖式：

如次頁

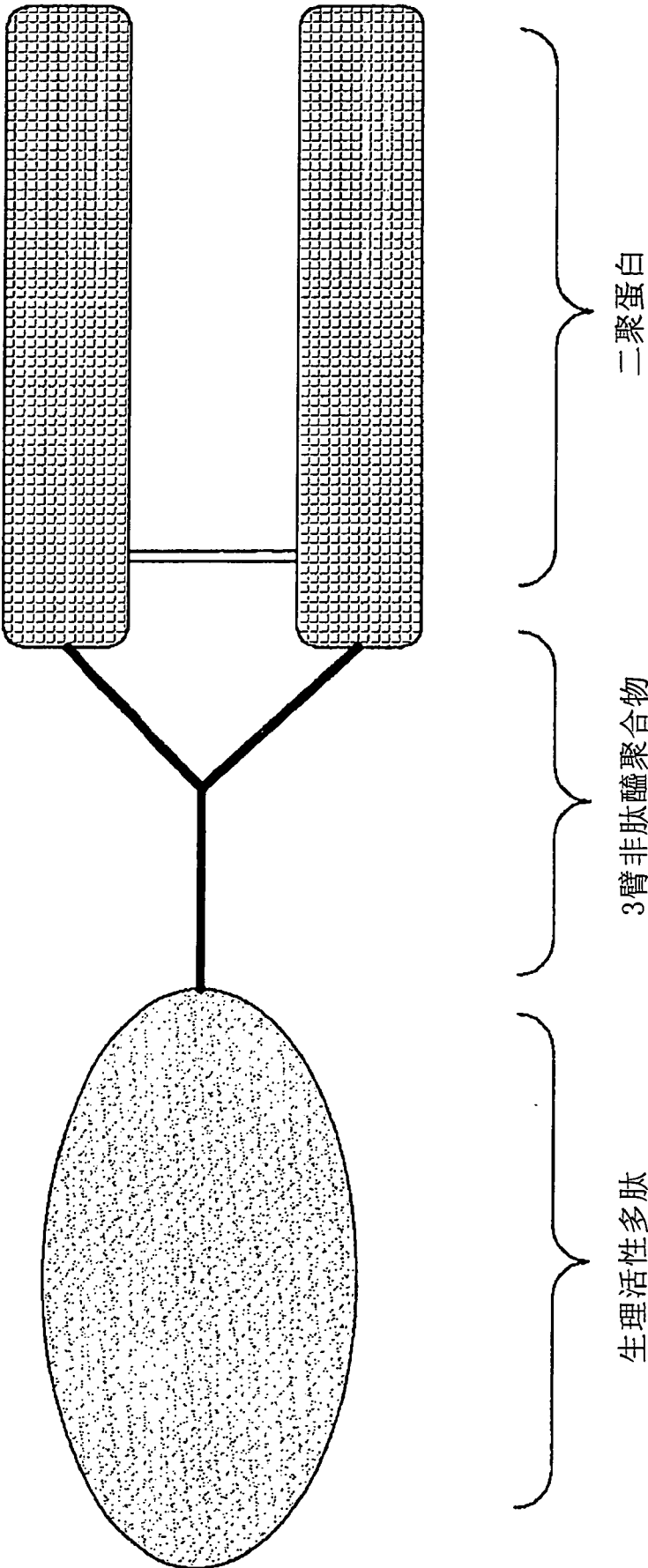


圖1

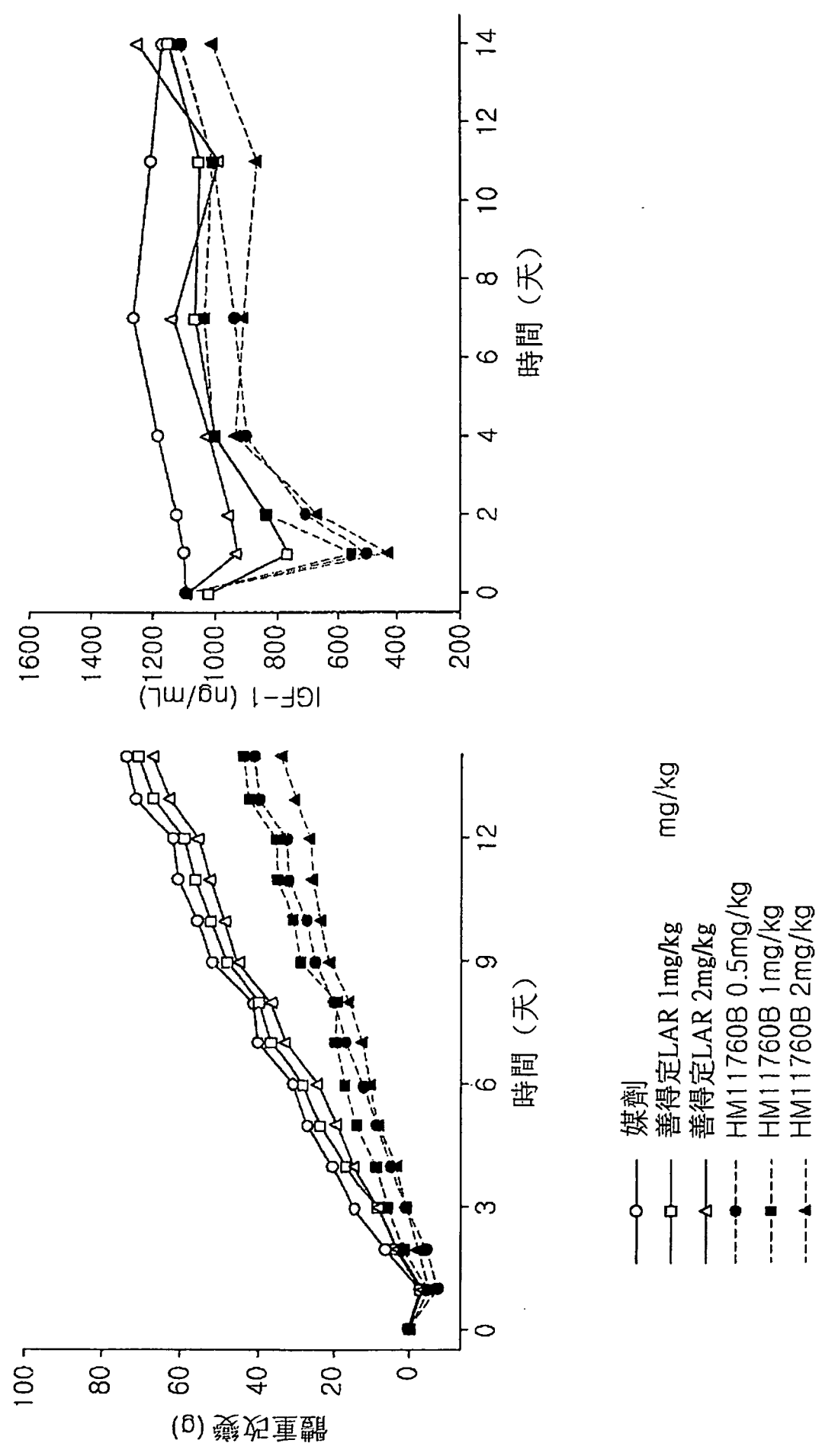


圖2

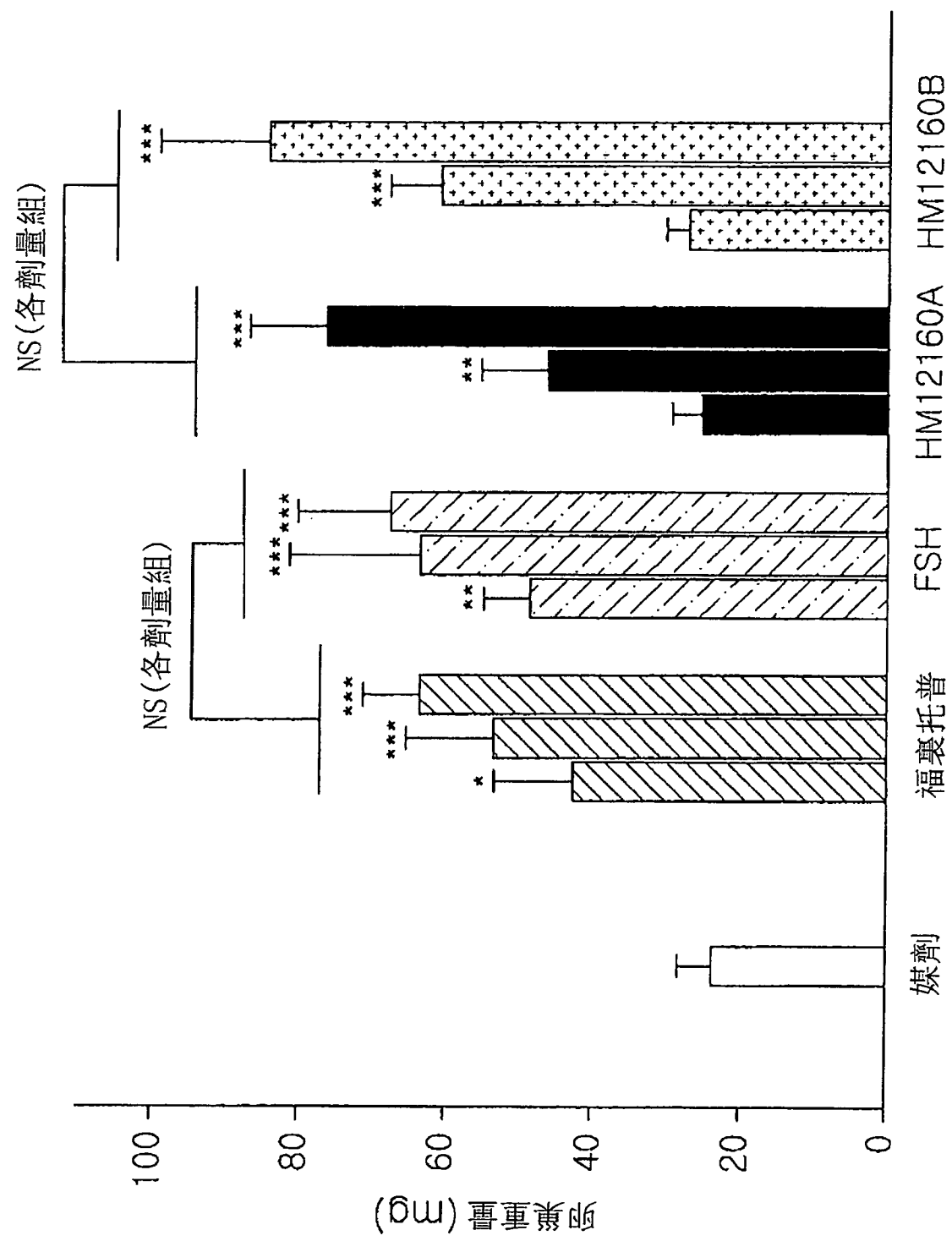


圖3