



(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 I708611 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：105106142

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 03 月 01 日

(51)Int. Cl. : A61K38/20 (2006.01)

A61K47/32 (2006.01)

A61K47/50 (2017.01)

C07K14/54 (2006.01)

(30)優先權：2015/03/03 美國

62/127,748

(71)申請人：香港商南沙生物科技（香港）有限公司（香港地區）NANSHA BIOLOGICS (HONG KONG) LIMITED (HK)

香港

(72)發明人：游國明 YU, KUO MING (TW)；朱桂林 CHOO, QUI-LIM (US)；霍文遜 FOK, MANSON (HK)；劉耀南 LAU, JOHNSON YIU-NAM (US)

(74)代理人：邱珍元

(56)參考文獻：

JP 2005281302A

WO 2013/020079A2

審查人員：詹季蓁

申請專利範圍項數：10 項 圖式數：16 共 45 頁

(54)名稱

聚乙二醇化介白素-11 之組合物及方法

(57)摘要

本發明提供了組合物及方法，在其中重組的介白素-11 係經聚乙二醇化以增進在血清中之半衰期，同時具有所需的治療活性且表現更少的副作用。最佳地，介白素-11 為 N 端經截切之人類的或人化的介白素-11 且具有 20Kd 或 40Kd 分支的聚乙二醇部分(特別是 Y 字形或梳子形)，該聚乙二醇部分與 N 端之胺基偶合。這樣的化合物之特徵在於顯著地增加在血清中之穩定性且維持生物活性，同時顯著地減少血漿擴張。

Compositions and methods are presented in which recombinant IL-11 is PEGylated to achieve improved half-life in serum while having desirable therapeutic activity and presenting less side-effects. Most preferably, the IL-11 is an N-terminally truncated human or humanized IL-11 and has a 20Kd or 40Kd branched PEG moiety, Y- or comb-shaped in particular, coupled to the N-terminal amino group. Such compounds are characterized by substantially increased stability in serum and sustained biological activity while exhibiting significantly reduced plasma expansion.

指定代表圖：

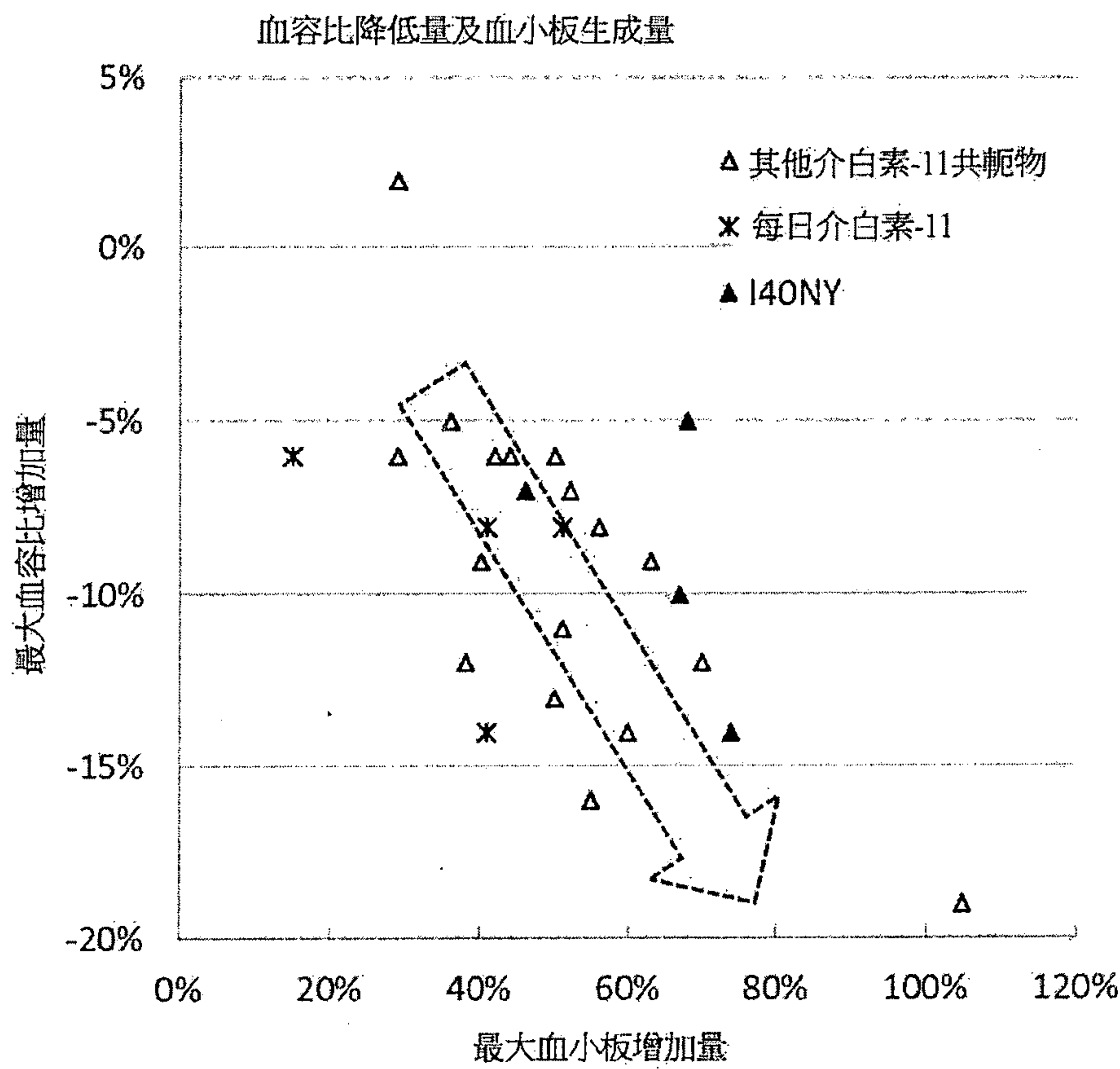


圖 8

I708611

發明摘要

※ 申請案號 105106142

※ 申請日：

※IPC 分類：

【發明名稱】聚乙二醇化介白素-11 之組合物及方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR PEGYLATED IL-11

【中文】

本發明提供了組合物及方法，在其中重組的介白素-11 係經聚乙二醇化以增進在血清中之半衰期，同時具有所需的治療活性且表現更少的副作用。最佳地，介白素-11 為 N 端經截切之人類的或人化的介白素-11 且具有 20Kd 或 40Kd 分支的聚乙二醇部分（特別是 Y 字形或梳子形），該聚乙二醇部分與 N 端之胺基偶合。這樣的化合物之特徵在於顯著地增加在血清中之穩定性且維持生物活性，同時顯著地減少血漿擴張。

【英文】

Compositions and methods are presented in which recombinant IL-11 is PEGylated to achieve improved half-life in serum while having desirable therapeutic activity and presenting less side-effects. Most preferably, the IL-11 is an N-terminally truncated human or humanized IL-11 and has a 20Kd or 40Kd branched PEG moiety, Y- or comb-shaped in particular, coupled to the N-terminal amino group. Such compounds are characterized by substantially increased stability in serum and sustained biological activity while exhibiting significantly reduced plasma expansion.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：圖8。

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

【發明名稱】 聚乙二醇化介白素-11 之組合物及方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR PEGYLATED
IL-11

【技術領域】

【0001】 本申請案主張我們於 2015 年 3 月 3 日遞交之美國臨時申請案第 62/127748 號的優先權，其全部內容以引用的方式納入本文中。

【0002】 本發明領域係關於醫藥組合物及方法，尤其係關於聚乙二醇化介白素-11（IL-11）之醫藥組合物及方法。

【先前技術】

【0003】 背景的敘述包含了有助於理解本發明的資訊。這並非是承認任何在此所提供之資訊係現有技術或是與本申請所要求保護之發明相關，也並非是承認任何具體地或暗示地引用的公開文獻係現有技術。本文中所有的公開文獻係透過引用而納入本文，其程度如同每一個別的公開文獻或專利申請被具體地且個別地指明透過引用而納入本文。在被納入之文獻中之技術用語的使用或定義與本文所提供之技術用語的定義不一致或相反時，適用本文所提供之技術用語的定義，而不適用文獻中之技術用語的定義。

【0004】 化療引起的血小板減少症（Chemotherapy-induced thrombocytopenia）仍然是一個尚未得到滿足的醫療需求，因為目前的治療方案係採用血小板輸注，可能會供應短缺且帶有病毒污染的風險。另一方面，可以給予病患重組的人類介白素-11 以刺激血小板生成。然而，介白素-11 的投藥需要每日給藥，導致微弱的臨床療效及血漿擴張（plasma expansion）。

【0005】 介白素-11（Interleukin 11，IL-11）係一種細胞激素且在造血作用中（特別是在巨核細胞成熟之刺激中）作為主要的訊號物質。介白素-11 的作用通常是由介白素-11 受體及糖蛋白 gp130 與糖蛋白 gp130 後續

的磷酸化／活化所介導的。介白素-11 的臨床用途包括治療與化療相關的副作用，一般認為是增進巨核細胞形成（megakaryocytopoiesis）及增加血小板計數。重組的人類介白素-11 的市售商品名為 NEUMEGA[®]（奧普瑞介白素，Wyeth-Ayerst），且被核准用於預防嚴重血小板減少症及降低患有非骨髓惡性腫瘤的成人病患在骨髓抑制的化療後的血小板輸注需求，該些成人病患發生嚴重血小板減少症的高風險。NEUMEGA[®]通常係以單次使用的小玻璃瓶來提供，其含有 5 毫克的介白素-11 凍乾粉末，以 1 毫升的無菌水復水而用於注射（以 25-50 微克/公斤/日的劑量投藥）。最常見與 NEUMEGA[™]相關的不良事件是血漿擴張，會導致危及生命的心房性心律不整（atrial arrhythmias）、暈厥、呼吸困難、鬱血性心衰竭及肺水腫。

【0006】 介白素-11 係相對快速地自循環系統被清除，因此需要多次注射。例如，在健康男性上經皮下施用的 Neumega[™]具有約為 6.9 小時的末端半衰期（Neumega[™]的產品說明）。不佳的藥物動力學（如快速的腎排泄和蛋白水解分解）以及與其相關的不良效果往往降低了臨床上的普及率。此外，每日注射也意味著住院治療以處理不良事件，這不僅增加醫療費用也損害了病患的生活品質。因此，血小板輸注仍然是治療化療引起的血小板減少症（CIT）的黃金標準。

【0007】 為了增加血清穩定性又同時保持該些組合物的有益治療潛力，本領域已進行了多次嘗試。舉例來說，美國公開號第 2010/0098658 號專利記載了一種與聚合物（PEG）結合的介白素-11 同功異質體（mIL-11），其展現出增強的酸解作用抗性以及增長的血清半衰期。在另一個試圖穩定介白素-11 的嘗試中，如美國 US8133480 號專利所述，製備了介白素-11 的半胱胺酸（cysteine）變體且進一步以聚乙二醇（PEG）修飾所選的突變蛋白，以增加血清穩定性。雖然這些修飾已經至少一定程度地改善了介白素-11 的血清穩定性或半衰期，不過仍存在有一個或多個不利條件，包括在骨髓抑制動物上的療效較小、生產的複雜性、重複給藥以及配製成可注射的溶液。

【0008】 因為介白素-11 缺乏半胱胺酸殘基，美國 US8133480 號專利記載了在 C 端（C 末端）胺基酸序列中插入半胱胺酸殘基，賦予一官能基

使得氫硫基反應性聚乙二醇鏈可共軛接合 (conjugation)。雖然保留了生物活性，但引入半胱胺酸可能會產生分子間二聚體，且昆蟲細胞的生產量可能低於細菌的生產量。此外，當對雄性 SD 大鼠 (Sprague-Dawley rats) 透過靜脈給藥時，經過這樣修飾的介白素-11 的血清半衰期約為 5.6 小時 (就 40 KD 聚乙二醇化而言)，這較所期望的來的少。另外，在利用環磷醯胺 (cyclophosphamide) 處理過之大鼠所進行的動物實驗中，使用每隔一天的給藥方案 (the-other-day dosing scheme) 的療效較小。美國公開號第 US2010/0098658 號專利記載了經由胺鍵結或醯胺鍵結而將 20 KD 聚乙二醇進行聚乙二醇共軛接合至介白素-11 的 N 端截切之序列上。雖然 N 端截切並不會降低其本身的生物活性，但對雄性 SD 大鼠皮下給藥時的血清半衰期約為 8.5 小時，也是未能達到理想的穩定性。此外，在動物疾病模式中其效力不明。

【0009】 現在已有記載將 20 KD 的直鏈或分支的聚乙二醇共軛接合至介白素-11 的胺基上 (Takagi et al. 2007, 「藉由用聚乙二醇的化學修飾來增強重組的人類介白素-11 (rhIL11) 的藥理活性」 *J Control Release*, 119(3):271-278)，這種非特異性的共軛接合往往係透過與離胺酸、組胺酸及酪胺酸殘基還有 N 端胺基的反應而造成複數次聚乙二醇化 (PEGylation)。

【0010】 其它文獻已經顯示了在介白素-11 的「非核心」區域 (如 N 端或環圈) 上某些碳水化合物修飾會增強細胞刺激活性，這表明這些區域可能是設計來限制介白素-11 的生物活性 (Yanaka et al. 2011, 「非核心區域調節介白素-11 的訊息傳遞活性: 同功劑及拮抗劑變體的生成」 *J. Biol. Chem.*, 286:8085-8093)。然而，尚未有文獻記載具有優於未經修飾之介白素-11 的穩定性及活性的理想修飾。

【0011】 因此，即使在本領域中已知有幾種穩定介白素-11 的方法，但所有或是幾乎所有的方法都具有一個或多個缺點，例如療效有限和需要重複給藥。更重要的是，即使是經修飾後的型態也並未減少介白素-11 的不良作用 (例如血漿擴張)。因此，仍然需要改良的組合物和方法，以穩定介白素-11 且同時減輕不良作用。

【發明內容】

【0012】 本發明內容涉及了用於增進介白素-11 在血清中的穩定性及半衰期且同時保持生物活性和減輕副作用的化合物、組合物及方法。在特別較佳的方面，發明人發現了製造穩定且有生物活性的聚乙二醇化介白素-11 (PEGylated IL-11) 的關鍵在於胺基酸位置、連接的方式及聚乙二醇的類型。特別較佳的聚乙二醇化介白素-11 的序列係與天然的人類介白素-11 相同但缺少了 N 端的第一個胺基酸，即脯胺酸。此外，這種介白素-11 將較佳地在 N 端以及或多肽鏈中特定之離胺酸殘基處之可能的二級位置 (secondary site) 被共價修飾。最典型的是，介白素-11 與連接至該介白素-11 的聚乙二醇化合物的平均莫耳比率為 1 : 1。

【0013】 在本發明內容的另一方面中，發明人設想 (contemplate) 了一種經修飾的介白素-11 (IL-11) 化合物，包含了與聚乙二醇部分 (PEG moiety) 共價偶合 (covalently coupled) 的介白素-11 多肽鏈。其中，該聚乙二醇部分 (moiety) 的平均分子量係介於 10-50Kd 之間，且具有不同的第一聚乙二醇段 (portion) 及第二聚乙二醇段，該聚乙二醇部分 (moiety) 係共價結合至 N 端胺基酸，且該介白素-11 多肽鏈為人類的或人化的多肽鏈。

【0014】 最典型的是，介白素-11 多肽鏈為人類的介白素-11 多肽鏈，且／或藉由刪除 N 端脯胺酸而縮短。例如，特別適合的介白素-11 多肽鏈可具有如 SEQ ID NO:1 所示的序列。關於聚乙二醇部分，通常較佳的是，該部分的平均分子量為 20Kd 或 40Kd，且／或該聚乙二醇部分具有一 Y 字形。較佳的是，多肽鏈與聚乙二醇部分的莫耳比率約為 1:1 (例如：0.9 : 1 ~ 1 : 0.9 或 0.8 : 1 至 1 : 0.8)，且本發明的內容不受此限。此外，一第二聚乙二醇部分 (second PEG moiety) 可透過該介白素-11 多肽鏈中之一胺基 (amino group) 而共價偶合至該經修飾的介白素-11。通常較佳的是，聚乙二醇部分係透過胺鍵 (amine bond) 而共價結合至 N 端胺基酸 (然而，也特別設想了醯胺鍵 (amide bond))。

【0015】 從另一個方面來看，發明人還設想了一種醫藥組合物，包括了依據本發明內容之治療有效量的介白素-11 化合物 (例如為上方所述之化合物)，並結合醫藥上可接受的載體。其中可期望的是，該組合物可配製為用於注射，且所包含的介白素-11 化合物之存在量可為對一小兒科病患或成

人病患提供一介於 10-100 微克／公斤 ($\mu\text{g/kg}$) 的劑量單位。此外，該組合物可為凍乾的或是液體形式以用於注射或輸注。最合適的是，該醫藥物組合物可進一步包括一第二醫藥活性化合物，其可以是分離的也可以與介白素-11 化合物混合。因此，本發明亦明確設想了包括有所設想之醫藥組合物與其他成分（例如第二醫藥活性化合物，諸如類固醇、刺激在骨髓中生成血小板的藥劑、抗體、止痛劑、抗發炎藥劑或用於復水（reconstitution）的溶劑）的套組。

【0016】 因此，發明人也設想了在醫藥組合物的製造中本發明內容之介白素-11 化合物的用途。在不限制本發明內容的情況下，所特別設想的治療包括：(a) 核子事故／放射引起的骨和胃腸道損傷；(b) 化療引起的骨和胃腸道損傷；(c) 燒燙傷引起的血小板減少症和胃腸道損傷；(d) 化療引起的血小板減少症；(e) 外傷引起的、癌症引起的或感染引起的胃腸道損傷或發炎性腸道疾病；(f) 自由基引起的肺損傷，以及 (g) 心血管疾病。如前所述，通常設想該醫藥組合物可配製為用於注射及／或該醫藥組合物係凍乾的。

【0017】 在本發明內容的另一方面，發明人亦設想了一種增加介白素-11 (IL-11) 化合物之血清半衰期的方法。較佳的方法將包含將介白素-11 多肽鏈與聚乙二醇部分共價偶合之步驟，其中聚乙二醇部分的平均分子量係介於 10~50 Kd 之間，且具有不同的第一聚乙二醇段 (portion) 及第二聚乙二醇段。其中，聚乙二醇部分係共價結合至一 N 端胺基酸，且其中介白素-11 多肽鏈係一人類的或人化的多肽鏈。最典型的是，介白素-11 多肽鏈係一人類的介白素-11 多肽鏈，及／或介白素-11 多肽鏈係藉由刪除一 N 端脯胺酸而縮短（例如：具有如 SEQ ID NO:1 所示的序列）。

【0018】 在進一步所設想之方法中，該聚乙二醇部分的平均分子量係 20 Kd 或 40 Kd，及／或可具有一 Y 字形。其中所期望的是，多肽鏈與聚乙二醇部分之莫耳比率約為 1：1，且進一步設想該方法可更包括透過介白素-11 多肽鏈中之一胺基，將一第二聚乙二醇部分與介白素-11 多肽鏈共價偶合之步驟。如前，可以設想聚乙二醇部分係透過胺鍵而共價結合至 N 端胺基酸。

【0019】 在進一步設想之方法中，發明人設想了治療對於施用介白素-11 有反應之病症的方法。這些方法通常包括了對於有需要的病患以治療有效量施用所設想之醫藥組合物的步驟。舉例而言，合適的病症可選自由（a）核子事故／放射引起的骨和胃腸道損傷；（b）化療引起的骨和胃腸道損傷；（c）燒燙傷引起的血小板減少症和胃腸道損傷；（d）化療引起的血小板減少症；（e）外傷引起的、癌症引起的或感染引起的胃腸道損傷或發炎性腸道疾病；（f）自由基引起的肺損傷，以及（g）心血管疾病所組成之群組。用於這些方法之示例性且較佳的醫藥組合物可包括介白素-11I40NY 或 I20NY，且進一步設想介白素-11 係以介於 10~100 微克／公斤（ $\mu\text{g/kg}$ ）之劑量施用（例如經皮下施用）。

【0020】 本發明之各種目的、特徵、實施態樣及優點將會因以下較佳實施例之詳細說明與所附之圖式而變得更加明白，圖式中相同的元件符號表示相同之元件。

【圖式簡單說明】

【0021】

圖 1 描繪了不具有 N 端脯胺酸之介白素-11 的一級序列。

圖 2 為 SDS-PAGE 凝膠的圖像，具有分子量標記及如其所標示之不同聚乙二醇化形式的介白素-11。

圖 3 為描繪了在單次靜脈內給藥（*i.v. administration*）之後不同介白素-11 組合物之血漿濃度的圖表。

圖 4 為描繪了在不同介白素-11 組合物單次靜脈內給藥之後血小板增加量的圖表。

圖 5 為未經共軛接合之介白素-11、I40NY 及 I40KY 之胰蛋白酶分解的胜肽圖譜的層析圖（chromatogram）。

圖 6 為描繪了在不同介白素-11 組合物經皮下給藥（連續 14 日每日注射介白素-11，及每周一次注射聚乙二醇化之對應物）之後血小板增加量的圖表。

圖 7 為描繪了在不同介白素-11 組合物經皮下給藥（連續 14 日每日注

射介白素-11，及每周一次注射聚乙二醇化之對應物）之後血容比降低量的圖表。

圖 8 為表明最大血小板誘發量及最大血容比降低量之間之相關性的圖表。

圖 9 為描繪了在 7TD1 試驗中聚乙二醇化之化合物的細胞增殖活性的圖表，並與未經共軛接合之介白素-11 比較。

圖 10 為用銀染色的非還原性 SDS-PAGE 凝膠的圖像，說明在各種裝載量之 I40NY 的純度。

圖 11 為 HPLC 層析圖，描繪 I40NY 單一聚乙二醇化成分之產品純度。

圖 12 為藥物動力學的數據圖表，描繪在單次經皮下給藥後之 I40NY 血漿濃度的動力學，並與單次經皮下施用未經共軛接合之介白素-11 比較。

圖 13 為介白素-11 及 I40NY 之圓二色性光譜的重疊圖。

圖 14 為介白素-11 及 I40NY 之橢圓率曲線圖，為溫度的函數。

圖 15 為藥效動力學的數據圖表，描繪了在骨髓抑制大鼠之動物模式中所設想之化合物的血小板生成量。

圖 16 為描繪了在骨髓抑制大鼠之動物模式中所設想之化合物的血容比降低量的圖表。

【實施方式】

【0022】 本發明人發現了聚乙二醇化合物的類型、共價連接的位置和介白素-11 的一級序列係經這樣修飾的介白素-11 的穩定性及活性的決定因素。在特別較佳且無法預期的方面，發明人發現了當在介白素-11 之 N 端截切了一個胺基酸後再進行聚乙二醇化（PEGylated）時，可顯著地改善介白素-11 的穩定性。此外，發明人亦發現了特定類型及特定分子量的聚乙二醇部分（PEG moiety）係穩定性、活性及毒性的額外決定因素，以下將更詳細地進一步描述。

【0023】 設想的化合物

【0024】 為了研究聚乙二醇（PEG）的類型、分子量及連接位置對於介白素-11 的影響，發明人由重組的人類介白素-11（具有如圖 1 所示之一級

序列，與天然的人類介白素-11 的序列相同但缺少了 N 端的脯胺酸）製備了不同的聚乙二醇化介白素-11（PEGylated IL-11）分子。通常較佳的是，介白素-11 蛋白質係為 N 端經截切的或經修飾的人類介白素-11。舉例而言，特別較佳的經截切形式包括了缺少至少一或二或三（或更多）個 N 端胺基酸的介白素-11 分子。或者，介白素-11 也可經修飾而具有與人類未經修飾之對應物不同的 N 端胺基酸。例如，經修飾的介白素-11 可缺少第一個 N 端胺基酸且可具有第二胺基酸，其非為未經修飾的人類介白素-11 的第二個胺基酸（例如，缺少了 P 且具有替換了 G 的 V）。最典型的是，N 端胺基酸為穩定的胺基酸，因此特別包括 M、G、A、S、T、V 或 P。在進一步設想的方面，不穩定的胺基酸（如 F、Q、N、R 等等）可由穩定的胺基酸替換。從 N 端刪除一個或更多個胺基酸通常會被限制於前 10 個、前 5 個或前 3 個胺基酸。另一方面，在次佳的方面，也可在介白素-11 部分的 C 端實施刪除一個、兩個、三個、四個、五個或更多個胺基酸。作為一般指導，刪除胺基酸通常是限於不影響生物活性及／或穩定性或是僅對於生物活性及／或穩定性溫和地產生不利影響的刪除（例如，損失少於 20% 的活性及／或穩定性，更典型的是少於 10%）。或者，或是額外的，所設想的介白素-11 分子亦包括介白素-11 的融合蛋白（fusion protein），示例性的融合蛋白包括美國公開號第 US 2010/0143973 號專利中所記載之融合蛋白，其透過引用而納入本文。最典型的是，介白素-11 為重組蛋白質，且可表現在合適的表現系統中，最佳係在原核生物系統（如大腸桿菌（*E. coli*））或酵母菌系統（如巴斯德畢赤酵母（*Pichia pasteuris*））。當然，也應了解到介白素-11 之特別較佳的形式為成熟型式（mature forms），即無前導序列（leader sequence）。

【0025】 此外，應當理解的是，合適的介白素-11 分子不必是人類的介白素-11，其可為任何其他來源（通常為哺乳動物）。因此，合適的介白素-11 來源（重組的或天然的）包含靈長類、鼠類、豬類、馬類等等。然後，這些序列可至少部分地人化（humanized），以降低免疫原性（immunogenicity）及／或增加在人類中的穩定性及／或活性。同樣地，本發明亦設想了合成的共通序列（consensus sequences）。

【0026】 所設想之介白素-11 分子的聚乙二醇化（PEGylation）可以

多種方式來執行，包含了共價的方法和非共價的方法。然而，通常較佳的是，聚乙二醇化係利用共價結合至介白素-11。本領域有多種已知的方式可將聚乙二醇基 (PEG group) 與蛋白質共價結合，合適的方法包含使 N 端 (N 末端) 的胺基或 C 端 (C 末端) 的羧酸基與聚乙二醇部分 (PEG moiety) 上合適的反應基 (例如為醛、順丁烯二醯亞胺 (maleimide)、酸氯化物 (acid chloride) 等等) 反應，或與硫氫 (sulfhydryl) 反應基 (例如為順丁烯二醯亞胺、吡啶基二硫化物 (pyridyl disulfide)、乙烯基磺 (vinyl sulfone) 等等) 反應以使與半胱胺酸基團雙硫鍵結，或與胺基反應性試劑反應而與離胺酸胺基酸的 ϵ -胺基反應 (例如為 N-羥基琥珀醯亞胺酯 (NHS-esters)、N-羥基琥珀醯亞胺碳酸酯 (NHS-carbonates)、三嗪基 (triazine groups 等等)。因此，還可設想在 N 端及／或 C 端加入一個或多個胺基酸，以引入適合用於連接聚乙二醇化基團的反應基 (reactive group)。舉例來說，可加入絲胺酸或蘇胺酸以利用 N-乙醯半乳胺糖 (N-acetylgalactosamine) 或聚乙二醇唾液酸衍生物 (PEG sialic derivative) 來醇促連結，或是離胺酸以用於與 ϵ -胺基共價連接，或是苯丙胺酸或蘇胺酸以用於與羥基連接。

【0027】 關於適合在此所用的聚乙二醇分子，通常設想不同分子量的聚乙二醇都是適當的，而設想的分子量係介於 2 Kd 和 200 Kd 之間 (平均或標稱分子量)。然而，特別較佳的分子量 (平均或標稱分子量) 包括了在聚乙二醇化部分中每一直鏈為介於 10~50 Kd 的那些。此外，通常較佳的是，聚乙二醇部分具有單一直鏈的聚乙二醇部分或 Y 字形的聚乙二醇部分，更佳的是，這種聚乙二醇部分具有介於 20~40 Kd 之間的分子量。或者，合適的聚乙二醇部分還可包括樹枝狀的聚乙二醇結構，且聚乙二醇部分具有超過兩個直鏈。其中，該聚乙二醇部分具有超過一個聚乙二醇直鏈，通常較佳的是，這些鏈具有基本上相同的平均分子量 (平均分子量差異小於 15%)。

【0028】 在更佳的方面，聚乙二醇部分係透過介白素-11 的 N 端 (N 末端) 胺基團而共價連接至介白素-11 及／或 (任選的) 共價連接至內部離胺酸的 ϵ -胺基或組胺酸環上的氮。由於 N 端的共價鍵，介白素-11 與聚乙二醇部分的莫耳比率較佳約為 1 : 1 (例如，0.9 : 1 至 1 : 0.9 或 0.8 : 1 至 1 : 0.8 等等)。此外，應當理解的是，中等程度的聚乙二醇化可存在於內部的

胺基酸殘基（例如，介於整體介白素-11 的 10%~20%或介於整體介白素-11 的 1%~10%可帶有額外的聚乙二醇化內部胺基酸）。例如，一第二聚乙二醇部分可連結於內部離胺酸的 ε-胺基或內部組胺酸。如下方更詳細地顯示，聚乙二醇化介白素-11 之特別較佳的形式為 I40NY，包括了人類介白素-11（缺少 N 端脯胺酸），且平均分子量為 40 Kd 的 Y 字形聚乙二醇部分連接於其 N 端。

【0029】 在其他方面，應當理解聚乙二醇化在關於聚乙二醇部分的連接位置及／或連接類型方面可為混合的。因此，介白素-11 可經受隨機的非共價聚乙二醇化以及在 N 端胺基酸之位置專一的聚乙二醇化，或可經受在 N 端胺基酸以及內部胺基酸之不同的位置專一的聚乙二醇化。例如，最佳的是，介白素-11（或其任何經修飾的形式）可在 N 端胺基酸上被聚乙二醇化，且除了 N 端的修飾以外還任選地經由氮原子（例如來自離胺酸或組胺酸）在內部的胺基酸上被聚乙二醇化。

【0030】 舉例來說，使用如圖 1 所示之經截切的介白素-11，發明人利用如表一所示的聚乙二醇（PEG）試劑（其中 n 和 m 獨立地為介於 80 至 1000 之間的整數，取決於化合物的分子量）且依照製造商所提供之實驗方案進行聚乙二醇化，以下將進一步詳細地敘述。

表一

製造商／商品 編號	結構／分子大小
NOF/ SUNBRIGHT ME-200AL	$\text{H}_3\text{CO}-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$ 20 KD
Jenkem/ Y-PLAD-40K	$\begin{array}{l} \text{H}_3\text{CO}-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \text{H}_3\text{CO}-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_n-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C} \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{N}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{C}_2\text{H}_4-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$ 40 KD
NOF/ SUNBRIGHT ME-120TS	$\text{H}_3\text{CO}-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_n-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array}$ 12 KD

NOF/ SUNBRIGHT GL2-400TS	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{CO}-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_n-\text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{CO}-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_n-\text{CH} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \text{O} \\ // \\ \text{C} \\ // \\ \text{O} \end{array} \end{array}$ 40 KD
NOF/ SUNBRIGHT GL2-200AL3	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{CO}-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_n-\text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{CO}-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_n-\text{CH} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{C}_2\text{H}_4-\text{C}(=\text{O})\text{CH} \end{array}$ 20 KD
NOF/ SUNBRIGHT ME-050TS	$\text{H}_3\text{CO}-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_n-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \text{O} \\ // \\ \text{C} \\ // \\ \text{O} \end{array}$ 5 KD
NOF/ SUNBRIGHT GL4-400AL3	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{CO}-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_n-\text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{CO}-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_n-\text{CH} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_m-\text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_m-\text{CH} \\ \\ \text{H}_3\text{CO}-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_n-\text{CH} \\ \\ \text{H}_3\text{CO}-\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_n-\text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{C}_2\text{H}_4-\text{C}(=\text{O})\text{CH} \end{array}$ 40 KD

在聚乙二醇化經截切的介白素-11 之後，純化所得到之化合物，方法詳述如下。不同的聚乙二醇化介白素-11 分子具有如表二所示之下列名稱。

表二

化合物代碼	聚乙二醇大小/KDa	聚乙二醇結構	共軛接合位置（鍵結）
I20NL	單一 20	直鏈	N 端（胺鍵）
I40NY	單一 40	Y 字形	N 端（胺鍵）
I12KL	單一 12	直鏈	N 端（醯胺鍵）
I40KY	單一 40	Y 字形	N 端（醯胺鍵）
I20NY	單一 20	Y 字形	N 端（胺鍵）
I20NL2	20 x 1~3	直鏈	N 端／離胺酸或組胺酸（胺鍵）
I20NY2	20 x 1~3	Y 字形	N 端／離胺酸或組胺酸（胺鍵）

I05KL4	5 x 4~5	直鏈	N 端／離胺酸／組胺酸 (醯胺鍵)
I40NX	單一 40	4 臂	N 端 (胺鍵)

【0031】 值得注意的是，發明人發現了聚乙二醇部份的類型以及連接的位置（以及介白素-11 的序列也一定程度上）意想不到地且顯著地影響著在活體內的生物活性及穩定性。下方的實驗數據更明顯地顯示，特別較佳的聚乙二醇化係利用一單一 Y 字形聚乙二醇部份且發生在 N 端胺基酸，特別是在介白素-11 被截切處。

【0032】 設想的組合物

【0033】 根據發明人發現了所設想之化合物具有延長的生物活性，通常設想的是本發明內容的化合物可配製為用於治療與缺乏介白素-11 相關聯的各種疾病或是特徵在於對於以介白素-11 治療有治療反應的各種疾病。因此，在其他設想的用途之中，發明人特別設想了包含有所設想的化合物的醫藥組合物，其可有效治療或預防：(a) 化療引起的血小板減少症；(b) 核子事故／放射引起的骨和胃腸道 (GI) 損傷；(c) 化療引起的骨和胃腸道損傷；(d) 燒燙傷引起的血小板減少症和胃腸道損傷；(e) 血小板減少症的其他病因；(f) 胃腸道損傷的其他病因，包括發炎性腸道疾病，如克隆氏症 (Crohn's Disease) 和潰瘍性結腸炎 (ulcerative colitis)，以及偽膜性結腸炎 (pseudomembraneous colitis)；(g) 自由基引起的肺損傷，及／或 (h) 心血管疾病，其中所設想的醫藥組合物包括了治療有效量的所設想之化合物（或其醫藥上可接受的鹽類、水合物或前驅藥物）以及醫藥上可接受之載體。例如，在本發明內容之一方面，所設想的組合物係配製為用於治療化療引起的血小板減少症或胃腸道損傷或是放射引起的骨和胃腸道 (GI) 損傷。或者，或是額外地，亦應理解的是所設想的組合物可配製為誘發急性期蛋白質，及／或調節抗原－抗體反應。

【0034】 特別較佳的是，所設想的化合物係包含於一組合物中，其係與一或多種無毒的醫藥上可接受之載體一起配製。合適的醫藥組合物較佳地係配製為用於注射或輸注，或是用於固體或液體形式的口服給藥。因此應當理解的是，本發明內容的醫藥組合物可利用不同途徑（包括非口服地、口服地、腹膜內地、和局部給藥地）施用於人類或其他動物（通常係哺乳

動物)。

【0035】 舉例而言，適合用於注射的醫藥組合物較佳地包括了醫藥上可接受之無菌水溶液或非水溶液、分散液 (dispersion)、乳狀液 (emulsion) 或懸浮液 (suspension)，還有無菌的粉末，係在使用前用於復水成無菌的可注射溶液或分散液。合適的水性和非水性載體、稀釋劑、溶劑或溶媒的實例包括水、林格氏液、以及等張氯化鈉溶液、乙醇、多元醇 (如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)、以及其合適的混合物、油、以及可注射的有機酯 (例如油酸乙酯)。所設想的組合物還可以含有各種非活性成分，包括防腐劑、潤濕劑、乳化劑、及／或分散劑。可藉由內含抗菌劑及／或抗真菌劑 (例如，對羥基苯甲酸酯、苯酚、山梨酸、氯丁醇等)，還有過濾通過次微米膜 (孔徑可例如為 0.45 微米 (μM) 或 0.22 微米)、高壓蒸氣滅菌法或巴斯德氏滅菌法和輻射 (例如伽瑪射線或電子束) 來確保無菌。在適當情況下，可包括有滲透活性劑 (例如，糖、氯化鈉等)。在不限制本發明內容的情況下，所設想之用於注射的製劑一般係在 3~9 的 pH 值範圍內，更典型地係在 6~8 的 pH 值範圍內，而最典型地係在 7.4 $\pm$ 0.3 的 pH 值範圍內。當然，也應了解到所有的液體製劑可用各種方式保存，以助於長期貯存／儲備。例如，所設想之穩定的方式包含利用冷凍乾燥法 (lyophilization)、噴霧乾燥法、結晶、固相吸附 (較佳係為生物相容的或是醫藥上可接受的) 等方法來移除水／溶劑。

【0036】 本發明內容的組合物可利用不同途徑來施用 (給藥)，包括口服給藥、非口服給藥、透過吸入給藥、局部給藥、直腸給藥、經鼻給藥、或透過植入的儲液器給藥，在此所記載的「非口服給藥」包括皮下、靜脈內、肌肉內、關節內、滑液囊內 (intrasynovial)、鞘內 (intrathecal)、肝內、疾病部位內 (intralesional)、以及顱內給藥 (通常為注射或輸注)。該組合物較佳地可經由注射施用，一般係靜脈注射，而更佳的係皮下注射。所設想的醫藥組合物也可局部 (topically) 給藥，特別是當治療標的包括了易於通過局部施用而接近的區域或器官，包括眼部疾病、皮膚疾病、下部腸道疾病或是外科手術治療期間所暴露的區域。本領域已知有許多局部施用之製劑，這些製劑皆被認為適用於本發明。

【0037】 關於組合物中所設想之化合物的量，應當瞭解的是，具體的量通常將取決於特定的劑型及所需的目的。因此，應當瞭解到所設想之化合物的量將會顯著地變化。然而，通常較佳的是，該化合物是以可有效地在活體外及／或活體內提供治療效果之最小量存在。

【0038】 因此，在一些最佳實施例中，所設想之化合物的存在量可介於約 0.1 微克／毫升 ($\mu\text{g/ml}$) 至約 100 毫克／毫升 (mg/ml) 之間，更典型地係介於約 10 微克／毫升至約 10 毫克／毫升，最典型地係介於約 5 微克／毫升至約 100 微克／毫升。關於劑量單位，一般可以設想，所設想之化合物係以一劑量施用（給藥），該劑量可有效地達到所期望的治療效果，通常為 10~100 微克／公斤 ($\mu\text{g/kg}$)，更佳地係為 30~70 微克／公斤。然而，替代的劑量單可介於 0.1~10 微克／公斤之間，或 50~80 微克／公斤之間，或 80~120 微克／公斤之間，或 120~200 微克／公斤之間，或甚至更高。從不同的角度來看，應當理解的是，所設想之製劑的單次使用單位可包括有介於約 0.3 毫克至 3.0 毫克的聚乙二醇化介白素-11，或介於約 3 毫克至 7 毫克的聚乙二醇化介白素-11，或介於約 7 毫克至 10 毫克的聚乙二醇化介白素-11（最典型為帶有 $7\text{-}9 \times 10^6 \text{ U/mg}$ 的比活性（specific activity））。除非上下文另有相反說明，在此所記載之所有範圍都應解釋為包括其端點，而開放式範圍則應解釋為包含有商業上實用的值。同樣地，除非上下文另有相反說明，所有列舉的數值應被視為包括中間值。

【0039】 此外，應當注意所設想之製劑可包括一種或多種額外的醫藥活性劑，其可存在於同一製劑中，或可單獨提供（以不同類型的製劑或相同類型的製劑），或者以套組來販售。舉例來說，合適的額外醫藥活性劑可包括各種類固醇（例如，皮質類固醇）、刺激在骨髓中生成血小板的藥劑（例如，碳酸鋰、葉酸等等）、抗體、止痛劑以及抗發炎藥劑。

【0040】 設想的用途

【0041】 所設想之化合物作為治療藥劑而單獨或組合使用於治療下列疾病或損傷可為特別有用的：(a) 核子事故／放射引起的骨和胃腸道 (GI) 損傷；(b) 化療引起的骨和胃腸道損傷；(c) 燒燙傷引起的血小板減少症和胃腸道損傷；(d) 血小板減少症的其他病因；(e) 胃腸道損傷的其他病

因，包括發炎性腸道疾病，如克隆氏症和潰瘍性結腸炎，以及偽膜性結腸炎；(f) 自由基引起的肺損傷，以及 (g) 心血管疾病。

【0042】 因此，發明人亦設想了將本發明所提供之化合物用於製造藥物之用途，而該藥物係用於治療：(a) 核子事故／放射引起的骨和胃腸道損傷；(b) 化療引起的骨和胃腸道損傷；(c) 燒燙傷引起的血小板減少症和胃腸道損傷；(d) 血小板減少症的其他病因；(e) 胃腸道損傷的其他病因，包括發炎性腸道疾病，如克隆氏症和潰瘍性結腸炎，以及偽膜性結腸炎；(f) 自由基引起的肺損傷，以及 (g) 心血管疾病。

【0043】 從另一個角度來看，發明人亦設想了對有需要的人類治療下列疾病或損傷的方法：(a) 核子事故／放射引起的骨和胃腸道損傷；(b) 化療引起的骨和胃腸道損傷；(c) 燒燙傷引起的血小板減少症和胃腸道損傷；(d) 血小板減少症的其他病因；(e) 胃腸道損傷的其他病因，包括發炎性腸道疾病，如克隆氏症和潰瘍性結腸炎，以及偽膜性結腸炎；(f) 自由基引起的肺損傷，以及 (g) 心血管疾病，其中係以治療有效劑量來施用所設想的化合物。

【0044】 實驗及實驗數據

【0045】 材料：純化之批量的重組人類介白素-11，來自酵母菌，由杭州九源基因工程有限公司提供 (Lot# 20121005/1006/1007/1008)。7TD1 鼠融合瘤細胞株，自 DSMZ 取得 (No. ACC 23)。Paraplatin®注射液 (通稱：卡鉑 (carboplatin)) 10 毫克／毫升 (Lot：5A03935)，係由必治妥施貴寶公司 (Bristol-Myers Squibb Company) 生產。測序級 (sequencing grade) 的胰蛋白酶，來自牛的胰臟 (Cat. No. 11418025001)，購自羅氏醫療診斷設備股份有限公司 (Roche diagnostics)。小鼠介白素-11 受體 alpha，自 MyBioSource, Inc. 取得 (Cat. No. MBS553276)。CellTiter 96®水性非放射性細胞增殖試驗 (MTS) (Cat. No. G5430)，購自 Promega，用於 7TD1 細胞試驗。用於人類介白素-11 的 DuoSet ELISA 發展套組 (DuoSet ELISA development kit)，係購自 R&D Systems Inc. (Cat. No. DY218)。純化樹脂 MacroCap SP (產品代碼 17-5440-01) 係購自 GE Healthcare Life Sciences。Tris-Glycine 8-16% 聚丙烯醯胺膠係購自 Thermo Scientific。供高效能液相層析 (HPLC) 使用的

三氟乙酸 (Cat. No. 302031) 及乙腈 (Cat. No. 34967) 係購自 Sigma-Aldrich。

【0046】 商品編號為 SUNBRIGHT® ME-120TS、ME-200AL、GL2-400TS、ME-050TS、GL4-400AL3、GL2-200AL3 之不同形式的單官能 (monofunctional) 聚乙二醇係購自 NOF Corporation，而 Y-PALD-40K 係購自 Jenkem Technology USA。聚乙二醇試劑的分子結構顯示於表一。

【0047】 I12KL/I40KY/I05KL4 的製備：將 5 毫克/毫升的蛋白質引入 1 至 2 倍 (fold) 莫耳比率的聚乙二醇試劑 (I12KL 使用 NOF/SUNBRIGHT ME-120TS；I40KY 使用 SUNBRIGHT GL2-400TS) 與 50 mM 碳酸氫鈉 (NaHCO_3) 的混合物，pH 值約為 8。I05KL4 (聚乙二醇試劑：NOF/SUNBRIGHT ME-120TS) 係以相同方式製備，但是聚乙二醇與蛋白質的莫耳比率增加至 12 倍。將反應混合物在室溫下溫育 2 小時，隨後用 2 mM 的甘胺酸中止 (quenching)。利用如下所述的層析純化程序分離聚乙二醇化的產物。聚乙二醇分子係藉由醯胺鍵結 (amide bonding) 連接至蛋白質。

【0048】 I20NL/I40NY/I20NY/I20NL2/I20NY2/I40NX 的製備：將 5 毫克/毫升的蛋白質引入 1 至 2 倍 (fold) 莫耳比率的聚乙二醇試劑 (I20NL 及 I20NL2 使用 NOF/SUNBRIGHT ME-200AL；I40NY 使用 Jenkem/Y-PLAD-40；I20NY 及 I20NY2 使用 NOF/SUNBRIGHT GL2-200AL3；I40NX 使用 NOF/SUNBRIGHT GL4-400AL3)、10 mM 氰基硼氫化鈉 (sodium cyanoborohydride) 與 50 mM 磷酸二氫鈉 (NaH_2PO_4) 的混合物。如需共軛接合 (conjugating) 至兩個位置上，則聚乙二醇的莫耳比率增加至 3.5 至 5.5 倍。pH 值調整至約為 4.5~5.0。將反應混合物在室溫下溫育 24 小時，隨後用 2 mM 的甘胺酸中止 (quenching)。聚乙二醇分子係藉由更穩定的胺鍵結 (amine bonding) 連接至蛋白質。利用如下所述的層析純化程序分離聚乙二醇化的產物。

【0049】 層析純化 (Chromatographic Purification)：利用 1M 的醋酸將蛋白質溶液的 pH 值調整至 4~5，然後離心或過濾以移除顆粒。將四體積的水引入。對於含有超過 20 KDa 聚乙二醇的共軛物 (conjugate)：將蛋白質溶液裝載入 MacroCap SP 管柱 (1x6 公分)，以含有 20 mM 醋酸鈉 pH 5

的緩衝溶液 A 來平衡。以含有 20 mM 醋酸鈉 pH 5 及 1M 氯化鈉的緩衝溶液 B 進行梯度沖提或逐步沖提 (gradient- or step-elution) 來洗提蛋白質。對於含有低於 20 KDa 聚乙二醇的共軛物：將蛋白質溶液裝載入 MacroCap SP 管柱 (1x6 公分)，以含有 20 mM 磷酸鈉 pH 7 的緩衝溶液 A 來平衡。以含有 20 mM 磷酸鈉 pH 7 及 1M 氯化鈉的緩衝溶液 B 進行梯度沖提或逐步沖提 (gradient- or step-elution) 來洗提蛋白質。典型的最終產物在十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠 (SDS PAGE gel) 上的分析如圖 2 所示。其中，左邊電泳道裝載的是分子量標記，其餘電泳道則是裝載不同聚乙二醇化形式的介白素-11。I40NY 跑到了超過 100 Kd 的表觀分子量 (apparent molecular weight)，大於估計的 60 Kd 分子量，這可能係因為其聚乙二醇部分是 Y 字形。在更特別較佳的方面，所設想之化合物係以單步驟純化程序進行純化，這對下游的大量生產 (scale-ups) 提供了額外的優點。

【0050】 藉由逆相高效能液相層析法 (RP-HPLC) 進行純度檢驗：每一 PEGamer 的含量係透過採用 UPLC 與二極體陣列偵檢器 UltiMate 3000 Rapid Separation LC Systems (Thermo Scientific) 的逆相 (RP) 層析法來分析。層析分析程序的進行係使用：管柱：Acquity C18, 1.7 μm, 2.1 x 150 mm, 孔徑 300 Å, 配置有保護柱 (guard cartridge)；流動相 (mobile phase) A：配於 50% (體積／體積) 乙腈 (acetonitrile) 的 0.1% (體積／體積) 三氟乙酸 (TFA)；流動相 B：配於 95% (體積／體積) 乙腈的 0.1% (體積／體積) 三氟乙酸；流速：0.4 毫升／分鐘；管柱溫度：65°C；偵測：214 nm；注射 20 微克，然後運行如下表三所示之梯度。

表三

時間 (分鐘)	A%	B%
0	100	0
2	100	0
9.9	80	20
9.95	0	100
11.3	0	100
11.31	100	0
17.5	100	0

【0051】 蛋白質含量的測定：蛋白質含量係利用 UV/Vis 微量盤以及

比色管分光光度計 Multiskan GO (Thermo Scientific) 進行測定。消光係數 (extinction coefficient) 的單位為 $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ，在 280 nm 下在水中測得為 17,990。或者，蛋白質濃度係透過紫外線分光法 (ultraviolet spectroscopy) 在波長 280 nm 下直接測定，對 0.1% (1 mg/ml) 溶液使用 0.944 的吸光度值 (absorbency value)。利用在 280 nm 下的吸光度所做的蛋白質定量係測量了芳香胺基酸 (如色胺酸及酪胺酸) 的吸光度，而未偵測聚乙二醇部分。因此，在此所記載之蛋白質重量濃度並不包含聚乙二醇分子。

【0052】 在健康的大鼠中所進行的藥物動力學 (pharmacokinetics, PK) 研究：活體內 (*in vivo*) 之操作係執行在經靜脈內或經皮下途徑單一劑量施用所設想之化合物之後的 3 隻雄性 Sprague-Dawley 大鼠上，劑量水平為 100~150 微克/公斤。在多個時間點將血液樣本採集至肝素管 (heparin tube)，隨後進行血漿分離，然後儲存在 -20°C 。免疫反應性的介白素-11 在血漿樣本中的濃度係透過用於人類介白素-11 的 DuoSet ELISA 套組 (R&D Systems Inc. Cat. No. DY218) 進行測定。藥物動力學的參數係透過 WinNonlin 5.3 軟體利用非隔室模型 (non-compartment model) 產生。

【0053】 在健康的大鼠中所進行的藥效動力學 (pharmacodynamics, PD) 研究：藥效動力學的評估係執行在 4 隻雄性的 Sprague-Dawley 大鼠上，經靜脈內或經皮下地施用個別的所設想之化合物，劑量強度為 100~150 微克/公斤。在多個時間點將血液樣本採集至肝素管，隨後進行血漿分離，然後儲存在 -20°C 。血球計數係利用 Cell-DYN 3500 血液學分析儀進行。

【0054】 在骨髓抑制 (myelosuppressive) 的大鼠中所進行的藥效動力學研究：藥效動力學的評估係執行在 4 隻雄性的 Sprague-Dawley 大鼠上，在第 0 天利用靜脈內施用卡鉑 (carboplatin) 40 毫克/公斤來引發骨髓抑制。在第 1 天皮下注射所設想之化合物，劑量為 150 微克/公斤。在多個時間點將血液樣本採集至肝素管，隨後進行血漿分離，然後儲存在 -20°C 。血球計數係利用 Cell-DYN 3500 血液學分析儀進行。

【0055】 胰蛋白酶測繪 (tryptic mapping)：反應溶液係製備於 50 mM Tris pH 8.3 緩衝溶液，含有 2 毫克/毫升蛋白質及 1/50 (重量/重量) 胰蛋白酶。在室溫下溫育 6 小時，隨後加入相同體積的 0.2% 三氟乙酸

(trifluoroacetic acid, TFA) 溶液。在注射至 HPLC 之前，藉由離心除去所有顆粒物質。層析分析程序的進行係使用：管柱：Zorbax 300 SB-C8, 2.1x150 mm, 5 μ m, 孔徑 300Å；流動相 A：0.1% (體積/體積) 三氟乙酸；流動相 B：配於 95% (體積/體積) 乙腈的 0.1% (體積/體積) 三氟乙酸；流速：0.2 毫升/分鐘；偵測：214 nm；注射 10 微克，然後運行如下表四所示之梯度。

表四

時間 (分鐘)	A%	B%
0	100	0
3	100	0
8	95	5
45	55	45
45.1	0	100
52	0	100
52.1	100	0
65	100	0

蛋白質水解肽的辨識係用 HPLC 加上質譜法 (Thermo LCQ Advantage) 進行。

【0056】 在一些實施例中，用於描述及要求保護本發明某些實施例之表示成分的量、特性（例如為濃度）、反應條件等等的數字，應理解為在一些情況下以用語「大約」加以修飾。因此，在一些實施例中，本說明書及所附之申請專利範圍中所記載的數值參數是近似值，其可依據特定實施例所試圖獲得之所需特性而改變。在一些實施例中，應根據所記載之有效位數的數字及應用一般的數值簡化技術來解釋數值參數。儘管闡述本發明一些實施例的廣泛範圍的數值範圍及數值參數是近似值，但在具體實例中所提出的數值則是盡可能地精確記載。在本發明一些實施例中所記載的數值可能包含某些誤差，其係由存在於它們各自試驗測量中的標準差所必然產生的誤差。

【0057】 雖然一般已知聚乙二醇 (PEG) 可以賦予其共軛物血漿穩定性，但是何種連接類型、鏈長及分子結構會產生關於治療效果及/或藥理學參數的特定效果卻是不可預期的。在第一個實例中，對於不同聚乙二醇大小的經截切的介白素-11 共軛物關於血漿穩定性在正常大鼠中進行了研

究。在靜脈內給藥之後，發現了未經聚乙二醇化之介白素-11 (un-PEGylated IL-11) 之所觀察到的血漿半衰期 (plasma half-life) 相較於其聚乙二醇化對應物之血漿半衰期 (3.5~13.7 小時) 來說非常短，少於 10 分鐘。在後者之中，分子量越高的聚乙二醇可以依下列順序賦予越高的血漿穩定性：I40KY (13.7 小時) ~I40NY (8.5 小時) > I20NL (3.8 小時) ~I12KL (3.5 小時)。圖 3 顯示了在單次靜脈內給藥之後，不同形式之聚乙二醇化介白素-11 的血漿濃度。每一樣本係以 100 微克／公斤的劑量施用於大鼠。在本實例中，結論是較大或較長的聚乙二醇鏈可導致較長的血清半衰期。

【0058】 在第二實例中，藥效動力學的評估係在健康 Sprague-Dawley 大鼠上執行，其係在單次靜脈內給藥 (100 微克／公斤) 後，經由靜脈內途徑測量血小板的增加量。如圖 4 所示，40-KD 的共軛物 (I40NY 及 I40KY) 誘發了比 I20NL (50%) 更高的血小板增加量 (60-75%)，其中 Y 代表了 Y 字形的聚乙二醇，而 L 代表直鏈的聚乙二醇。實驗結果亦表示了複數個共軛接合 (I05KL4，5-KD 聚乙二醇接合至 4 個位置) 比起 N 端上單一聚乙二醇長鏈來說效果更差，因為具有複數較短聚乙二醇的共軛物僅具有約為 25% 血小板增加量的有限功效。在本實例中，結論是在單一位置上較長的聚乙二醇鏈可導致在誘發血小板方面較高的效力。這似乎跟對於重組的人類生長激素進行聚乙二醇化之效果相反。

【0059】 在第三實例中，共軛接合位置係藉由胰蛋白酶測繪加上 LC/MS 蛋白質水解肽的辨識來進行研究。圖 5 顯示了介白素-11 (未經共軛接合的)、I40NY、I40KY 的胰蛋白酶測繪，而下表五提供了胰蛋白酶肽。

表五			
質量	位置	肽 #	肽序列 (Peptide Sequence)
773.9	1-8	T1	GPPPGPPR
669.7	9-14	T2	VSPDPR
1217.4	15-25	T3	AELDSTVLLTR
774.9	26-32	T4	SLLADTR
798.9	33-39	T5	QLAAQLR
261.3	40-41	T6	DK
3319.8	42-74	T7	FPADGDHNLDLPTLAMSAG ALGALQLPGVLTR
287.4	75-76	T8	LR

950.1	77-84	T9	ADLLSYLR
839.0	85-90	T10	HVQWLR
174.2	91-91	T11	R
618.7	92-98	T12	AGGSSLK
1327.5	99-110	T13	TLEPELGTLQAR
402.5	111-113	T14	LDR
400.5	114-116	T15	LLR
174.2	117-117	T16	R
860.1	118-124	T17	LQLLSMR
2600.0	125-150	T18	LALPQPPDPAPPLAPPSS AWGGIR
1914.2	151-168	T19	AAHAILGGLHLTLDWAVR
655.9	169-174	T20	GLLLLK
275.3	175-176	T21	TR
131.2	177-177	T22	L

【0060】 這裡可以看出，對應於 T1 肽的峰值在 I40NY 和 I40KY 的胰蛋白酶測繪圖譜中明顯地降低。這表示兩個聚乙二醇共軛物皆係連接至 T1 肽，其中 N 端的胺係化學共軛接合的唯一位置。因此，I40NY 和 I40KY 皆為 N 端連接，唯一的不同之處在於 I40NY 的化學鍵結為胺鍵（amine bond），而 I40KY 為醯胺鍵（amide bond）。值得注意的是，在透過靜脈內給藥的情況下，I40NY 和 I40KY 對於血清半衰期以及血小板誘發皆顯示了類似的效果。

【0061】 因為胺鍵比醯胺鍵更穩定，且就利用還原胺化作用（reductive amination）的選擇性聚乙二醇化而言，單一聚乙二醇化（mono-PEGylated）產物的產率更加均勻，在接下來的研究中，對健康大鼠經由皮下給藥而對不同的 N 端共軛物在血小板生成的功效方面進行了研究，且透過它們各自相關的副作用來進行評價。圖 6 顯示了將六種聚乙二醇化介白素-11 共軛物以 150 微克／公斤的劑量經皮下施用於大鼠所作之藥效動力學研究的結果。介白素-11 係連續 14 天每日給藥，而聚乙二醇化介白素-11 係每周注射一次。聚乙二醇的形狀可影響共軛物的功能。具體來說，非直鏈形狀的聚乙二醇分子相較於其直鏈的對應物而言賦予了較佳的血漿穩定性以及較高的效力。如圖 6 所顯示，相較於 I20NL（46~55%），I20NY 誘發了較高的血小板增加量（58~70%），其中 Y 代表了 Y 字形的聚乙二醇，而 L 代表直鏈的聚乙二醇。這些結果表示，Y 字形的聚乙二醇比相同分子

量的直鏈形式具有更高的效力。然而，I40NY（Y 字形）和 I40NX（4 臂梳子形狀）在血小板生成方面是類似的，皆係增加至約 65~70%，表示聚乙二醇的形狀所造成的影響在聚乙二醇的大小約為 40 KD 或超過 40 KD 時達到飽和。值得注意的是，相同聚乙二醇長度的雙聚乙二醇化降低了在活體內功效，如 I20NL2（直鏈的聚乙二醇接至兩個位置上）及 I20NY2（Y 字形的聚乙二醇接至兩個位置上）相較於它們的單一聚乙二醇化對應物來說具有較低的血小板生成。因此得出的結論是，在各種經 N 端共軛接合的介白素-11 中，I40NY、I40NX 及 I20NY 發揮了更高的功效。此外亦發現了，無論共軛接合位置的數量，較小的聚乙二醇共軛物（如 20-KD 聚乙二醇）的第二次給藥之效果不知怎的有下調（down-regulated）的現象。因此，I40NY 以及 I40NX 係出乎意料有效的化合物，其具有所需的生物特性以及相對溫和的不利作用（特別是血將擴張）。此外，生物數據進一步表明，如此修飾的介白素-11 化合物可較不頻繁地給藥，最佳是每週兩次，每週一次，或甚至更少。當所設想之化合物係用於在大群體中治療血小板減少症（例如，暴露於放射暴露），這種給藥方案係特別適合的。

【0062】發明人亦在健康的大鼠上研究了與介白素-11 共軛物相關的副作用。血容比（hematocrit）狀態係一般用作評估臨床上使用介白素-11 之副作用的標記，因為病患可能因血漿擴張而經歷稀釋性貧血（dilutional anemia）。在動物實驗中，介白素-11 係以 150 微克／公斤的劑量連續 14 天經皮下給藥，而聚乙二醇化介白素-11 係以相同的劑量每週注射一次。如圖 7 所示，所有的藥物皆會造成血容比下降，但 I40NY 比其餘的聚乙二醇化共軛物下降較少同時維持較高的活性。當與其他利用經共軛接合及非經共軛接合之介白素-11 的個別動物實驗在同一張圖表中比較時，給予 I40NY 而緩解稀釋性貧血係較為突出的。圖 8 建立了血小板生成及副作用（體現為血容比之下降）之間的關係，當將不同的經修飾之介白素-11 及未經修飾之介白素-11 繪製於該圖表中時，顯示了副作用隨著增加的且劑量依存（dose-dependent）的功效而加劇的趨勢。不同劑量的 I40NY 明顯位於趨勢的右上側，表示在類似的功效基礎上較其他化合物及未經修飾的介白素-11 有較少的血漿擴張。在產物特性方面，發明人描述了較佳化合物 I40NY 的

物理化學特性和藥理學特性。

【0063】 介白素-11 共軛物之基於細胞的試驗： 經共軛接合之介白素-11 的生物活性係利用 7TD1 細胞株 (DSMZ, 德國) 在細胞增殖試驗 (cell proliferation assay) 中進行檢測。簡言之，7TD1 細胞係以每孔 4000 細胞在 37°C 含有 5% 二氧化碳的潮濕空氣中培養，在 2 微克/毫升鼠介白素-11 受體 (MyBioSource, USA, MBS553276) 存在的情況下對於不同的介白素-11 濃度反應 2 天 (*Biochem.J.*, 318:489-495)。在添加 MTS 之後，劑量反應曲線之 EC50 係藉由將 490 nm 吸光度作為 Y 軸及將介白素-11 的濃度作為 X 軸來作圖後利用 GraphPad software Prism 6 程式來擬合 (fitting) S 形的劑量反應曲線而決定的。在動物實驗之前，新合成之共軛物的生物活性係利用 7TD1 細胞株在細胞增殖試驗中進行檢測。並不是所有的聚乙二醇化製備都能產生類似的產物，實際產物的形成係取決於介白素-11 被共軛接合之胺基酸殘基以及所用之聚乙二醇分子的大小與形狀。7TD1 細胞培養為對不同的共軛物濃度反應。在加入顯影劑 (developers) 後，其化學訊號與細胞數量具有線性關係，在 490 nm 下的吸光度係在 ELISA 盤式分析儀 (ELISA plate-reader) 中讀出。實驗結果顯示於圖 9。

【0064】 相較於未經聚乙二醇化的介白素-11，由於聚乙二醇部分的立體阻礙 (steric hindrance)，所有的共軛物在基於細胞的試驗中皆如預期地表現了生物活性的下降，效力的順序如下：介白素-11 (100%) > I20NL、I20NY (皆約為 16%) > I40NY、I40NX (皆為 11%) > I40KY (6%) > I20NY2 (3%)。值得注意的是，立體干擾 (steric interference) 係決定聚乙二醇化共軛物之生物活性的主要因素，且整體聚乙二醇部分大於 20 KDa 的共軛物在生物活性方面會有急遽的下降。在一些基於細胞的研究中有一篇報導顯示，與連接於其他位置的共軛物相比，小型碳水化合物連接於介白素-11 分子的非核心區域 (如 N 端序列) 會增強生物活性 (*J. Biol. Chem. Vol 286, No. 10, pp 8085-8093*)，這與聚乙二醇分子連接於介白素-11 之 N 端序列而減少生物活性下降的情況相符。雖然 I40NY 的活體外 (*in vitro*) 生物活性僅保留了天然介白素-11 約 11% 的生物活性，但在活體內的效果係被有利地影響且不能由活體外生物活性之數據來預測。下表六示意性示出相對於未經修

飾的介白素-11 而言不同化合物之生物活性的比率。

表六

名稱	相對於未經修飾之介白素-11 的生物 活性比率
介白素-11	1
I20NL	0.13
I20NY	0.16
I20NY2	0.03
I40NY	0.11
I40NX	0.11
I40KY	0.06

【0065】 以聚乙二醇進行蛋白質化學修飾係已經建立的技術且已應用於生物製藥產業以增進蛋白質溶解度及物理化學穩定性。雖然這種化學反應容易進行，但常會導致不同聚乙二醇化形式的複雜混合物，包含 PEGamer 及位置異構物。為以高回收率分離產物而採用複數層析純化步驟。為了發展就成本和產量方面而言商業上可行的製程，有許多因素需要被最佳化，例如蛋白質濃度、聚乙二醇的品質、蛋白質／聚乙二醇比率、反應溫度、緩衝溶液之 pH 值，還有純化過程。

【0066】 I40NY 係透過將 Y 字形之聚乙二醇鏈共軛接合至胺基（amine）而形成穩定的胺鍵而構成的，具有由共軛接合化學（conjugation chemistry）（聚乙二醇部分中醛偶合基團（aldehyde coupling group）的還原胺化作用）所驅動之對 N 端胺基較高的選擇性。另一方面，I40KY 係在 pH 值 8 下利用官能化 NHS 試劑而與可接近的胺基共軛接合而形成對應的醯胺鍵。詳細而言，I40NY 係在酸性條件下透過位置專一性（site-specific）反應而產生的單一聚乙二醇化介白素-11，因為官能化的醛對 N 端的 α 胺基（ α -amine）有很大的選擇性，其 pKa 低於其他的親核物（nucleophile）。聚乙二醇與蛋白質的比率、反應濃度、pH 以及動力學係於共軛接合反應中進行研究。反應係在 10 mM 氰基硼氫化鈉存在下以約 0.05~0.5 毫升之體積小規模地於室溫（22~27°C）下進行 24 小時。被研究之每一反應的產量係以 RP-UPLC 進行測定。對於選定的反應使用不同的 pH 值，最理想的共軛接合產量係在 pH 4.5~5.5 時。此外，發明人注意到反應物的濃度在產物產量方面是個重要的因素，也發現到最佳是在介白素-11 之濃度大於 5 毫克／毫

升時進行共軛接合。同樣地，對於在還原劑存在下以 5 毫克／毫升蛋白質在室溫下所進行之反應的聚乙二醇與蛋白質的比率以及共軛接合動力學進行了研究，最佳的聚乙二醇與蛋白質的莫耳比率為 2，且將反應延長至 16 小時以足夠進行單一聚乙二醇化（mono-PEGylation）。

【0067】 聚乙二醇化蛋白質的純化一般係採用大規模製備的離子交換色層分析法。然而，當習知的離子交換器（ion-exchanger）係在以小至 1 毫克／毫升樹脂的負載量（loading capacity）裝載入反應產物時，無法達到令人滿意的解析度（resolution）以將單一聚乙二醇化（mono-PEGylated）產物與寡聚乙二醇化（oligo-PEGylated）產物分離。這種樹脂的低裝載能力常常限制其應用於較大規模的生產。為了以高純度分離 N 端單一聚乙二醇化介白素-11，測試了各種陽離子交換樹脂。值得注意的是，高孔隙率（porosity）樹脂（例如，GE Healthcare Life Sciences 的 MacroCap SP）提供了高負載量及保持了解析度，且在高負載條件下提供了高純度及高產量的單一聚乙二醇化目標物。純化過程係在 10 mM 氰基硼氫化鈉存在下以 400 毫克批量大小之介白素-11 進行，在含有 2 莫耳比率之醛活化（aldehyde-activated）40-KD 之 Y 字型聚乙二醇試劑的磷酸鈉 pH 4.5~5 緩衝溶液中將介白素-11 製備為 5 毫克／毫升。加入 2M 甘胺酸以中止反應溶液，隨後以 4 倍（4X）體積的去離子水稀釋。在以 0.2 μm 薄膜過濾之後，將所得之粗製品裝載至 MacroCap SP 管柱（2.6（直徑）10（高度）公分，負載量約為 7.5 毫克／毫升樹脂）。充電後，以超過 10 管柱體積之 20 mM 醋酸鈉 pH 5 緩衝溶液沖洗管柱，隨後再以超過 20 管柱體積之含有 0.1 M 氯化鈉的 20 mM 醋酸鈉 pH 5 緩衝溶液沖洗管柱。然後，以含有 0.3 M 氯化鈉的 20 mM 醋酸鈉 pH 5 緩衝溶液洗提（elute）產物。分離出之 I40NY 的總產率為 26.6%。I40NY 的產物純度係以 SDS-PAGE 以及逆相高效能液相層析法（reverse-phase HPLC）進行檢驗。圖 10 顯示了在銀染（silver-stained）SDS-PAGE 凝膠上的 I40NY 純度，而 I40NY 的量如電泳道上方所標示。如圖 11 所示之利用 C18-HPLC 進行測定之層析圖，單一聚乙二醇化介白素-11 的純度係高於 93%。

【0068】 為了測定經由皮下途徑之 I40NY 的藥物動力學參數，3 隻雄

性 Sprague-Dawley 大鼠經由單次皮下給藥以 0.15 毫克／公斤注射聚乙二醇化介白素-11。圖 12 顯示了大鼠在經過單次皮下給藥之後，其免疫反應性介白素-11 的血漿濃度。經共軛接合之介白素-11 的血漿濃度在約 12 小時達到最大程度，且在給藥後超過 50 小時持續有效。相反地，重組的人類介白素-11 約在 2 小時達到最大濃度，且很快地自循環血流中被清除，血漿中的消除半衰期（elimination half-life）約為 1.3 小時。經由皮下途徑之 I40NY 的藥物動力學參數總結於下表七中。

表七

	單位	I40NY	介白素-11
末端半衰期 ($T_{1/2}$, terminal half-life)	小時 (hr)	18.6	1.1
至最大濃度的時間 (T_{max} , time to maximal concentration)	小時 (hr)	12	2
最大血漿濃度 (C_{max} , maximal plasma concentration)	毫微克／毫升 (ng/mL)	142	147
曲線下面積 (AUC_{all} , area under curve)	小時 毫微克／ 毫升(hr*ng/mL)	3947	700
無限的曲線下面積 (AUC_{inf} , area under curve to infinity)	小時 毫微克／ 毫升(hr*ng/mL)	4421	701
相對分布體積 (V_z , relative volume of distribution)	毫升／公斤 (mL/kg)	909	347
相對清除率 (Cl , relative clearance)	毫升／小時／公 斤 (mL/hr/Kg)	33.9	214
平均滯留時間 (MRT , mean residence time)	小時 (hr)	27.2	3.7

【0069】 I40NY 的二級結構係利用圓二色性（circular dichroism）進行研究。在遠紫外區（far-UV region）中所分析的圓二色性色譜（chromatogram）中，發明人證實了 I40NY 維持了與其未經共軛接合之對應物相同之二級結構，這可由圖 13 中兩個光譜之疊合看出。此外，I40NY 的熱穩定性（thermal stability）係透過圓二色性來證明，係藉由測量它們對於熱壓力（thermal stress）反應的二級結構變化（平均殘基橢圓率，mean residue ellipticity）。圖 14 指出了 I40NY 對於溫度升高反應的結構變化係較少的。



【0070】 I40NY 對於骨髓抑制 (myelosuppressive) 大鼠的功效亦在經卡鉑處理 (carboplatin-treated) 的大鼠中證實。雄性 Sprague-Dawley 大鼠經由靜脈內給藥注射了 40 毫克／公斤的卡鉑，以引發骨髓功能受損而導致血小板減少症。利用每日注射介白素-11 (連續 7 天) 或單一劑量的 I40NY 在相同劑量 0.15 毫克／公斤的情形下進行醫療介入，其係在卡鉑處理 24 小時後立即經由皮下給藥。血小板水平如圖 15 所示。如果不進行治療，受試者經歷大約兩天的嚴重血小板減少症 (小於 1/3 正常血小板計數)，這表示未治療者具有危及生命之內出血的高風險。介白素-11 治療的效果是微弱的，因為每日劑量的最低點係極為接近嚴重血小板減少症之臨界值 (threshold)。相反地，單一劑量的 I40NY 不僅可預防嚴重血小板減少症的發生，也可加速血小板水平的恢復，血小板計數比其他兩組早 1.3 天恢復到初始數。

【0071】 同時，如表現在血容比降低上之副作用亦係於骨髓抑制模型中進行研究。在圖 16 中，相較於未經處理組，以介白素-11 進行治療會引起快速地血容比降低。然而，單一劑量之 I40NY 緩和了最低點，表示比每日給予介白素-11 而言較不增強副作用。因此，應當理解 I40NY 已被證明可有效地預防化療引起的嚴重血小板減少症，同時可改善血漿膨脹症候群。

【0072】 I40NY 與另一種形式的聚乙二醇化介白素-11 (如 US8133480 中所記載，未顯示數據) 之間進一步的比較數據揭示了，相較於 US8133480 專利中所記載之其他形式的聚乙二醇化介白素-11，所設想之化合物，特別是 I20NY 以及 I40NY 係顯著地增進了活體內的功效且降低了副作用症候群。

【0073】 除了已記載的之外，可能有更多不偏離本發明概念的修改對本領域技術人員而言係顯而易見的。因此，除了在所附之申請專利範圍中，本發明內容並不被限制。此外，在解釋說明書及申請專利範圍兩者時，所有技術用語應以與上下文一致之最廣的可能方式解釋。特別是用語「包含」及「包括」應解釋為以非排他性的方式指出元件、成分或步驟，表示所指之元件、成分或步驟可與其他未被明確提及之元件、成分或步驟一起存在、使用或結合。其中，說明書之申請專利範圍提及某物的至少其中之一係選

自由 A、B、C…及 N 所組成之群組，該內容應解釋為僅需要該群組中之一元件，而非 A 加 N、或 B 加 N 等等。

【符號說明】

【0074】 無

【序列表】

<110> Nansha Biologics (香港)

<120> 聚乙二醇化介白素-11 之組合物及方法

<130> 102635.0001PCT

<150> US 62/127,748

<151> 2015-03-03

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 177

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 肽

<222> (1)..(177)

<223> 缺少 N 端脯胺酸之人類介白素-11

<400> 1

Gly Pro Pro Pro Gly Pro Pro Arg Val Ser Pro Asp Pro Arg Ala Glu
1 5 10 15

Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Ala Asp Thr Arg
20 25 30

Gln Leu Ala Ala Gln Leu Arg Asp Lys Phe Pro Ala Asp Gly Asp His
35 40 45

Asn Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Ala Met Ser Ala Gly Ala Leu Gly
50 55 60

Ala Leu Gln Leu Pro Gly Val Leu Thr Arg Leu Arg Ala Asp Leu Leu
65 70 75 80

Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Gly Gly Ser Ser
85 90 95

Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Thr Leu Gln Ala Arg Leu Asp
100 105 110

Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu Ala Leu Pro
115 120 125

Gln Pro Pro Pro Asp Pro Pro Ala Pro Pro Leu Ala Pro Pro Ser Ser
130 135 140

Ala Trp Gly Gly Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly Gly Leu His
145 150 155 160

Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr Arg
165 170 175

Leu

申請專利範圍

- 1、一種經修飾的介白素-11（IL-11）組合物，包括：
經單取代之介白素-11-聚乙二醇（PEG）共軛物，其由共價偶合至單一聚乙二醇部分的介白素-11 多肽鏈所組成，其中該聚乙二醇部分的平均分子量係介於 10~50 Kd 之間，且具有不同的一第一聚乙二醇段及一第二聚乙二醇段；
其中，該聚乙二醇部分係共價結合至該介白素-11 多肽鏈的 N 端；
其中，該介白素-11 多肽鏈係一人類的或人化的多肽鏈；以及
其中，該經修飾的介白素-11 組合物包括至少 90%的經單取代之介白素-11 共軛物及少於 10%經雙取代之介白素-11-聚乙二醇共軛物。
- 2、如申請專利範圍第 1 項所述的經修飾的介白素-11 化合物，其中該介白素-11 多肽鏈係一人類的介白素-11 多肽鏈，或者該介白素-11 多肽鏈係藉由刪除一 N 端脯胺酸而縮短，或者該介白素-11 多肽鏈具有一如 SEQ ID NO:1 所示的序列。
- 3、如申請專利範圍第 1 項所述的經修飾的介白素-11 化合物，其中該聚乙二醇部分的平均分子量係 20 Kd 或 40 Kd，且該聚乙二醇部分任選地具有一 Y 字形。
- 4、如申請專利範圍第 1 項所述的經修飾的介白素-11 化合物，其中該聚乙二醇部分係透過胺鍵而共價結合至該 N 端胺基酸。
- 5、一種醫藥組合物，包括一治療有效量的如申請專利範圍第 1 項所述的一介白素-11 化合物，並結合一醫藥上可接受之載體。
- 6、如申請專利範圍第 5 項所述的醫藥組合物，其中該醫藥組合物係配製為用於注射，或者該介白素-11 化合物的存在量係對一小兒科病患或一成人病患提供一介於 10~100 微克/公斤的劑量單位。
- 7、一種增加一介白素-11（IL-11）化合物之血清半衰期的方法，包括：
藉由與 1 至 2 倍莫耳的過量的含聚乙二醇部分之胺-反應性聚乙二醇衍生物反應，將一介白素-11 多肽鏈與一聚乙二醇部分共價偶合，其中該聚乙二醇部分的平均分子量係介於 10 ~50 Kd 之間，且具有不同的一

第一聚乙二醇段及一第二聚乙二醇段；

其中，該聚乙二醇部分係共價結合至該介白素-11 多肽鏈之 N 端胺基酸；以及

其中，該介白素-11 多肽鏈係一人類的或人化的多肽鏈。

- 8、如申請專利範圍第 7 項所述的方法，其中該介白素-11 多肽鏈係一人類的介白素-11 多肽鏈，或者該介白素-11 多肽鏈係藉由刪除一 N 端脯胺酸而縮短，或者該介白素-11 多肽鏈具有一如 SEQ ID NO:1 所示的序列。
- 9、如申請專利範圍第 7 項所述的方法，其中該聚乙二醇部分的平均分子量係 20 Kd 或 40 Kd，且該聚乙二醇部分任選地具有一 Y 字形。
- 10、如申請專利範圍第 7 項所述的方法，更包括：
透過該介白素-11 多肽鏈中之一胺基，將一第二聚乙二醇部分與該介白素-11 多肽鏈共價偶合。

圖式

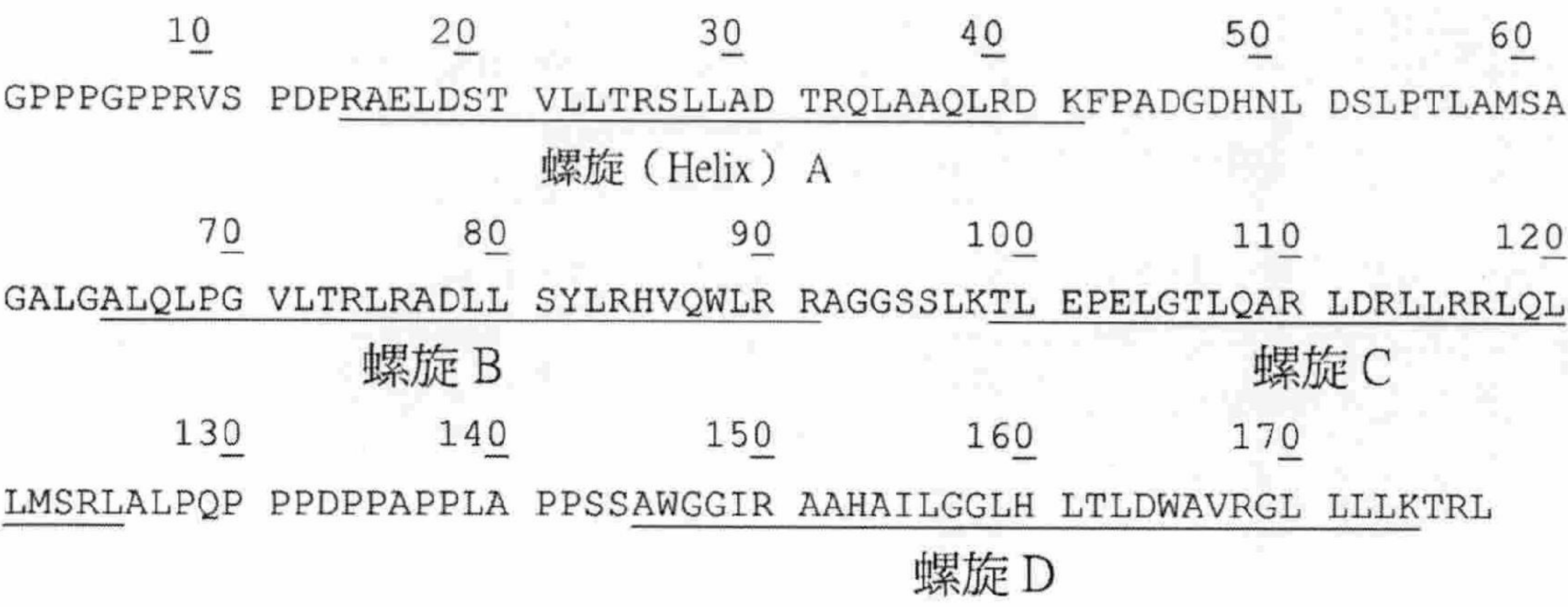


圖 1

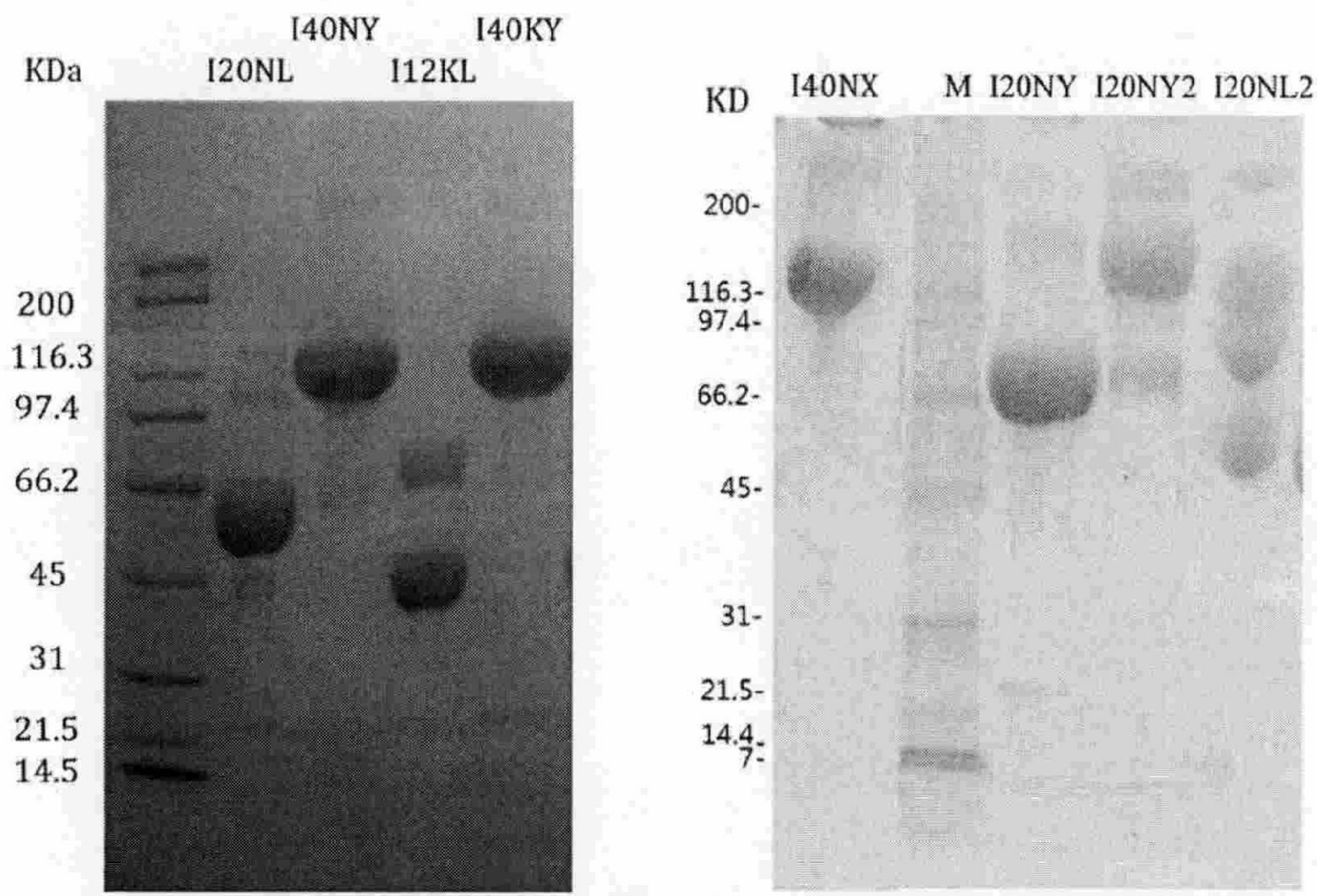


圖 2

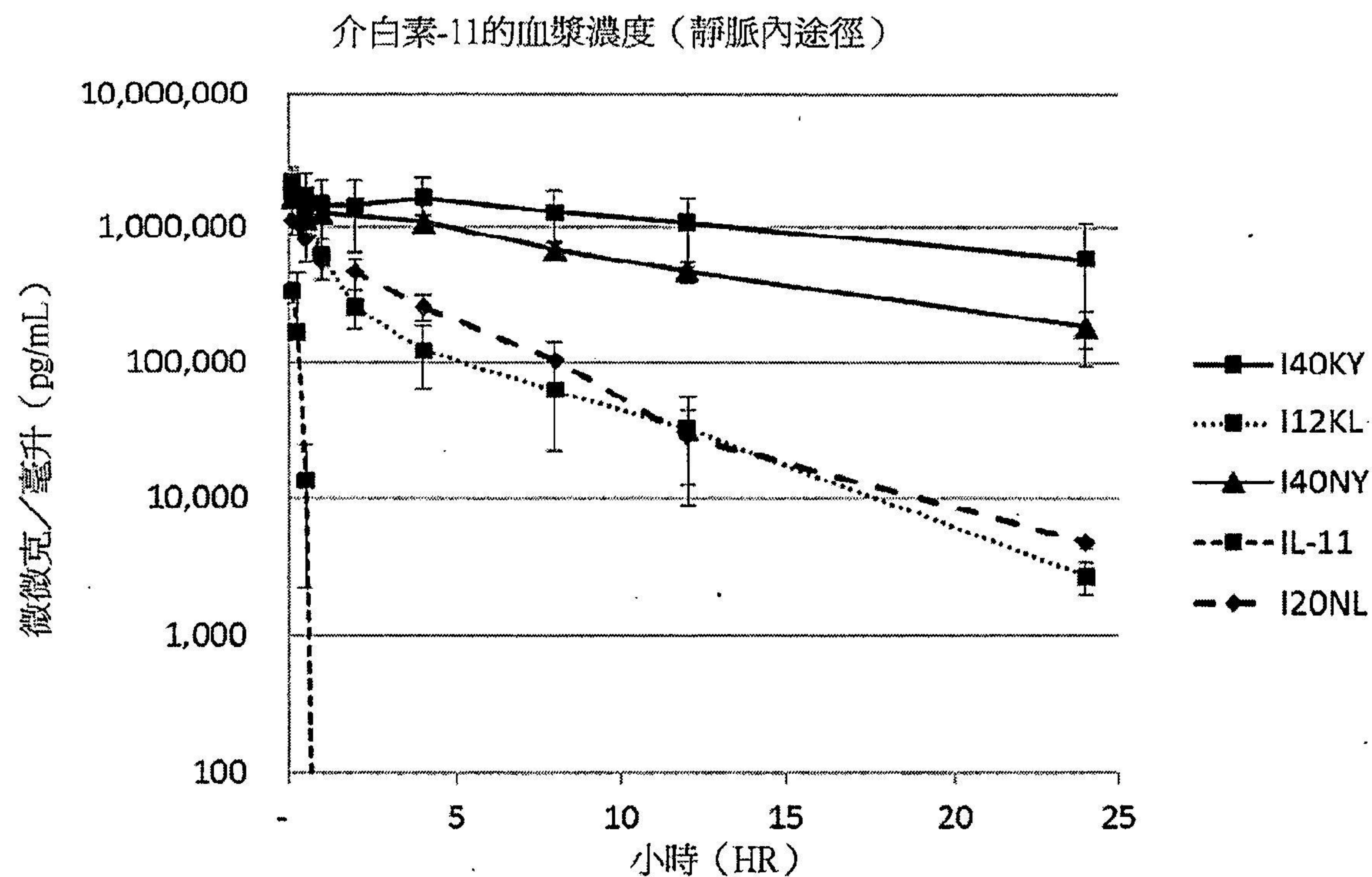


圖 3

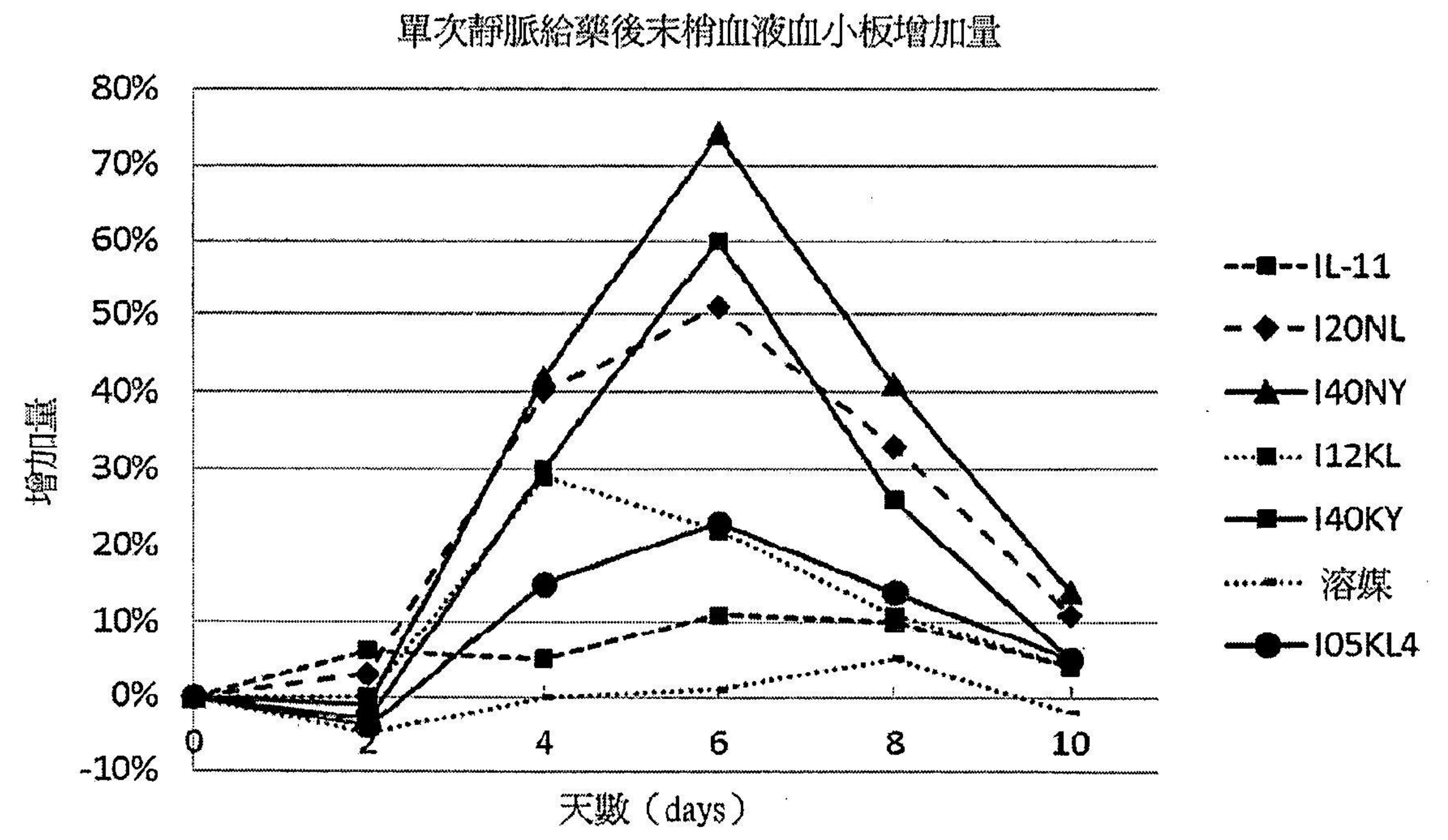


圖 4

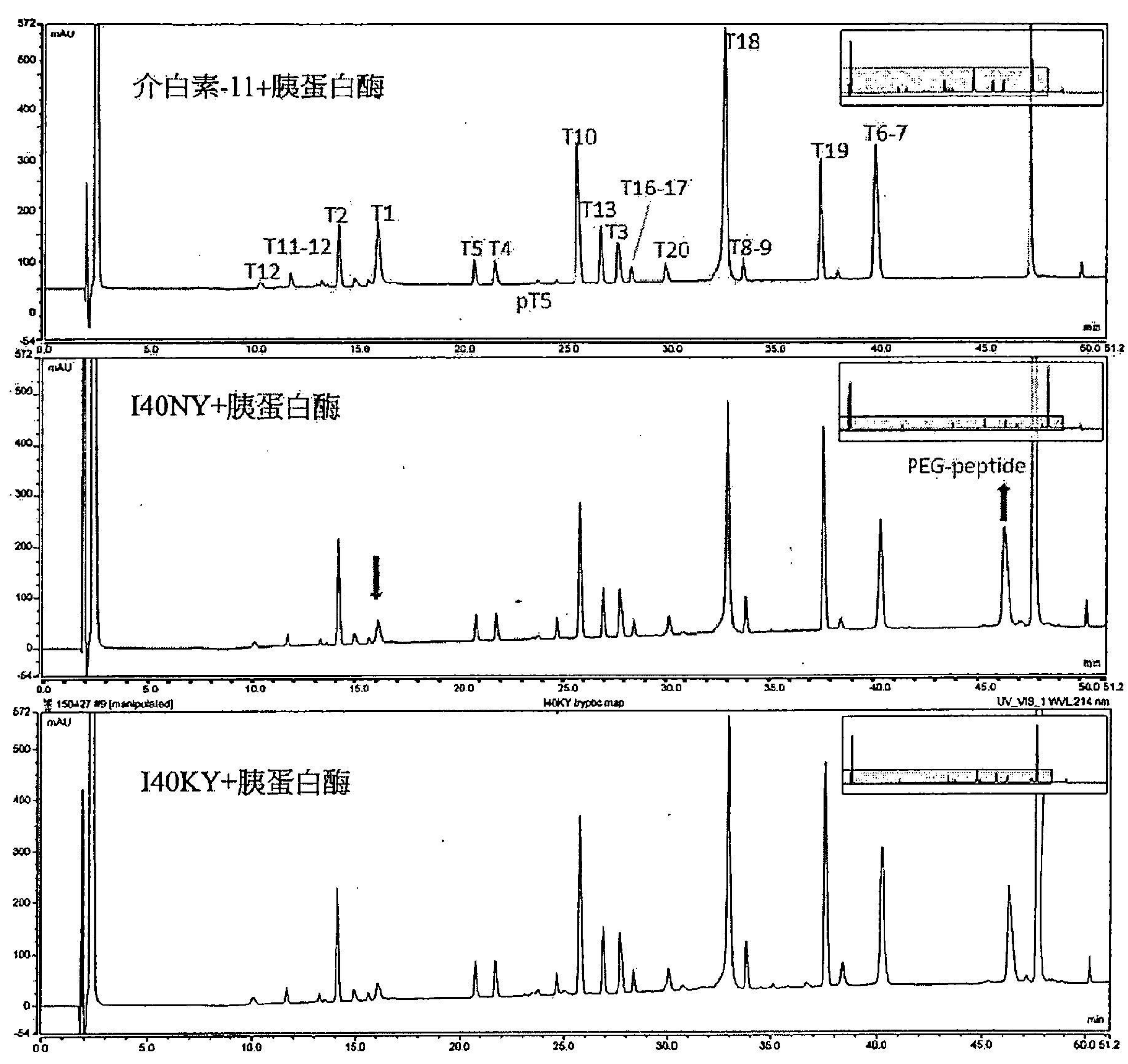


圖 5

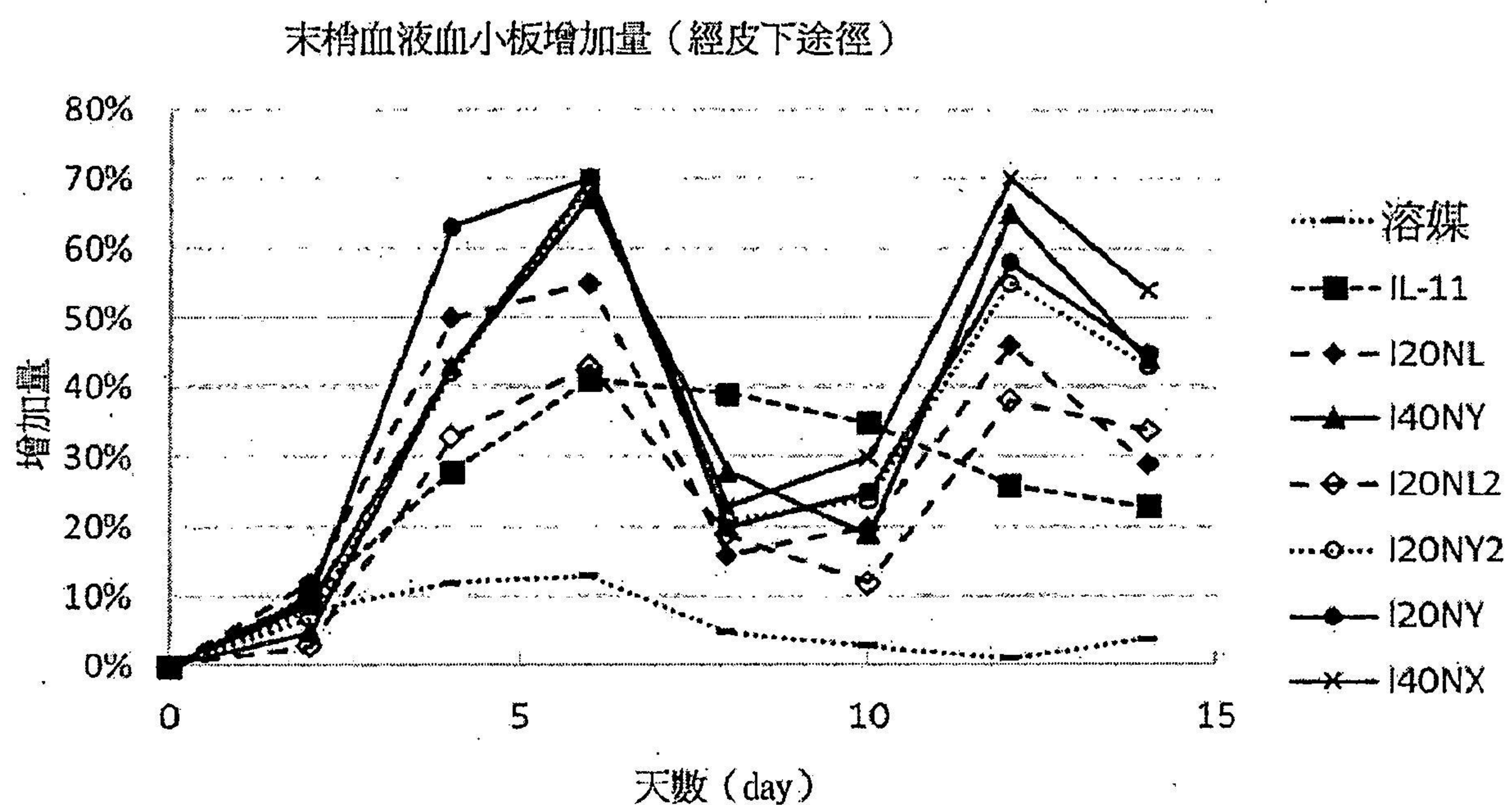


圖 6

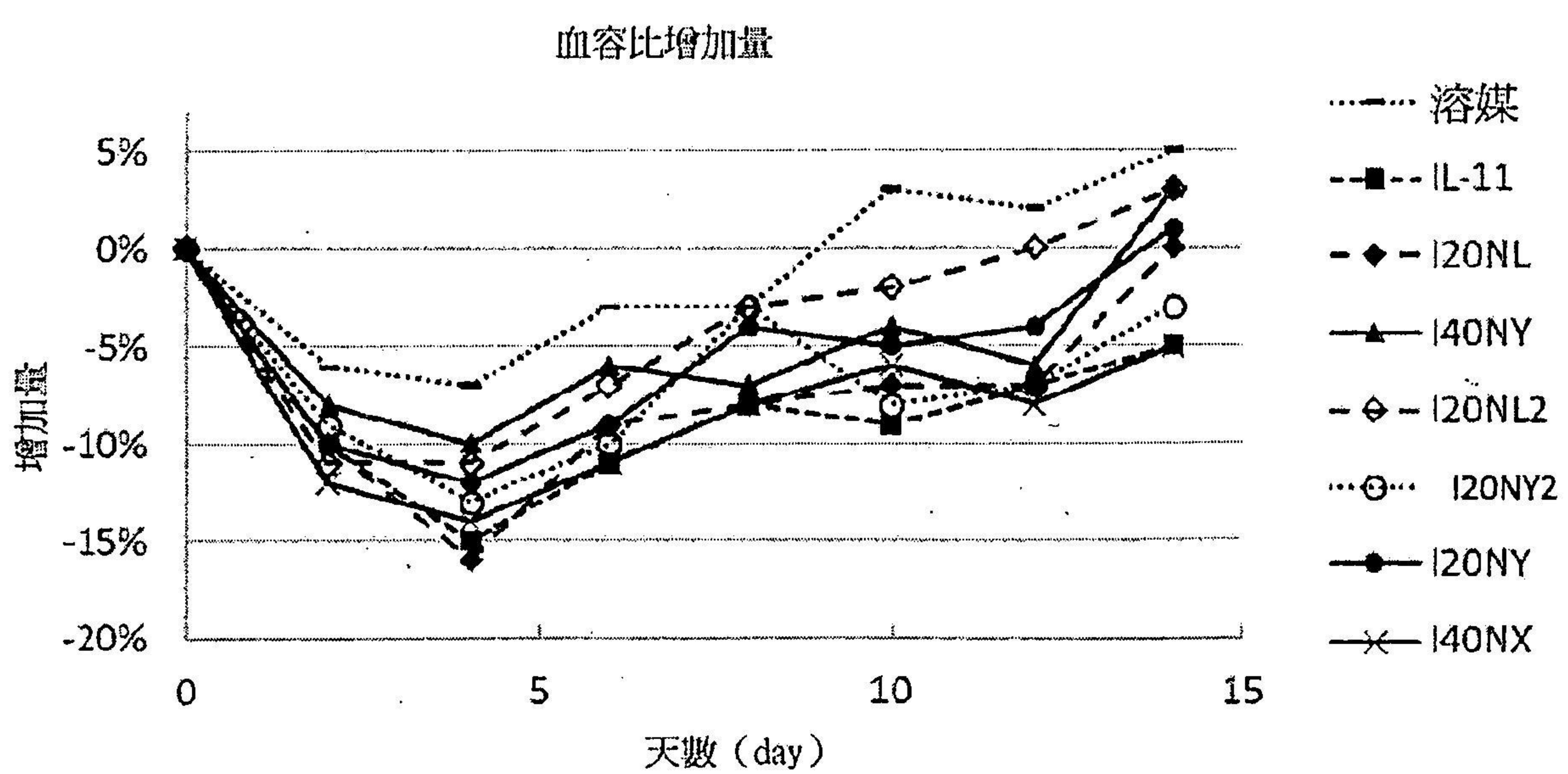


圖 7

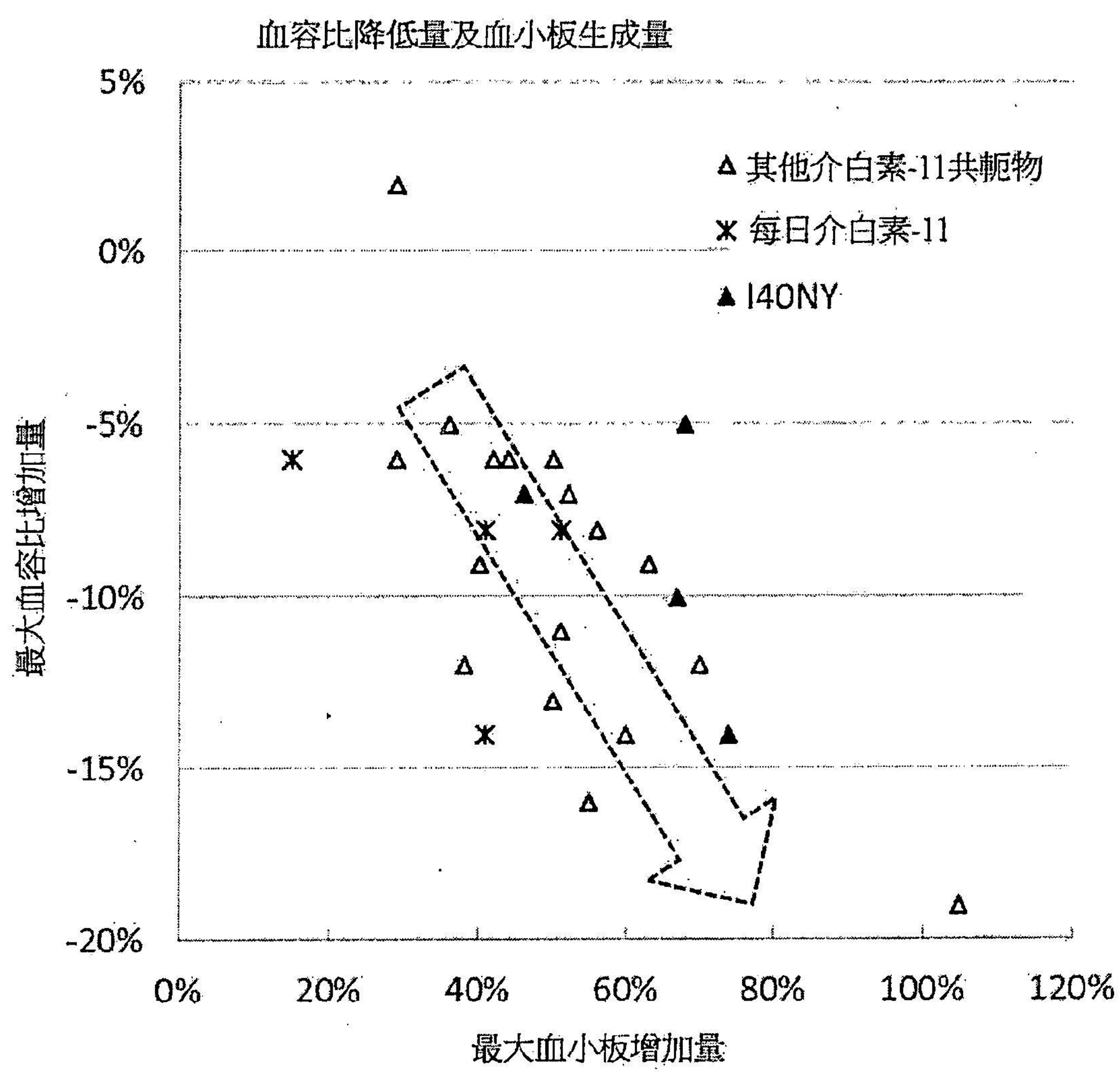
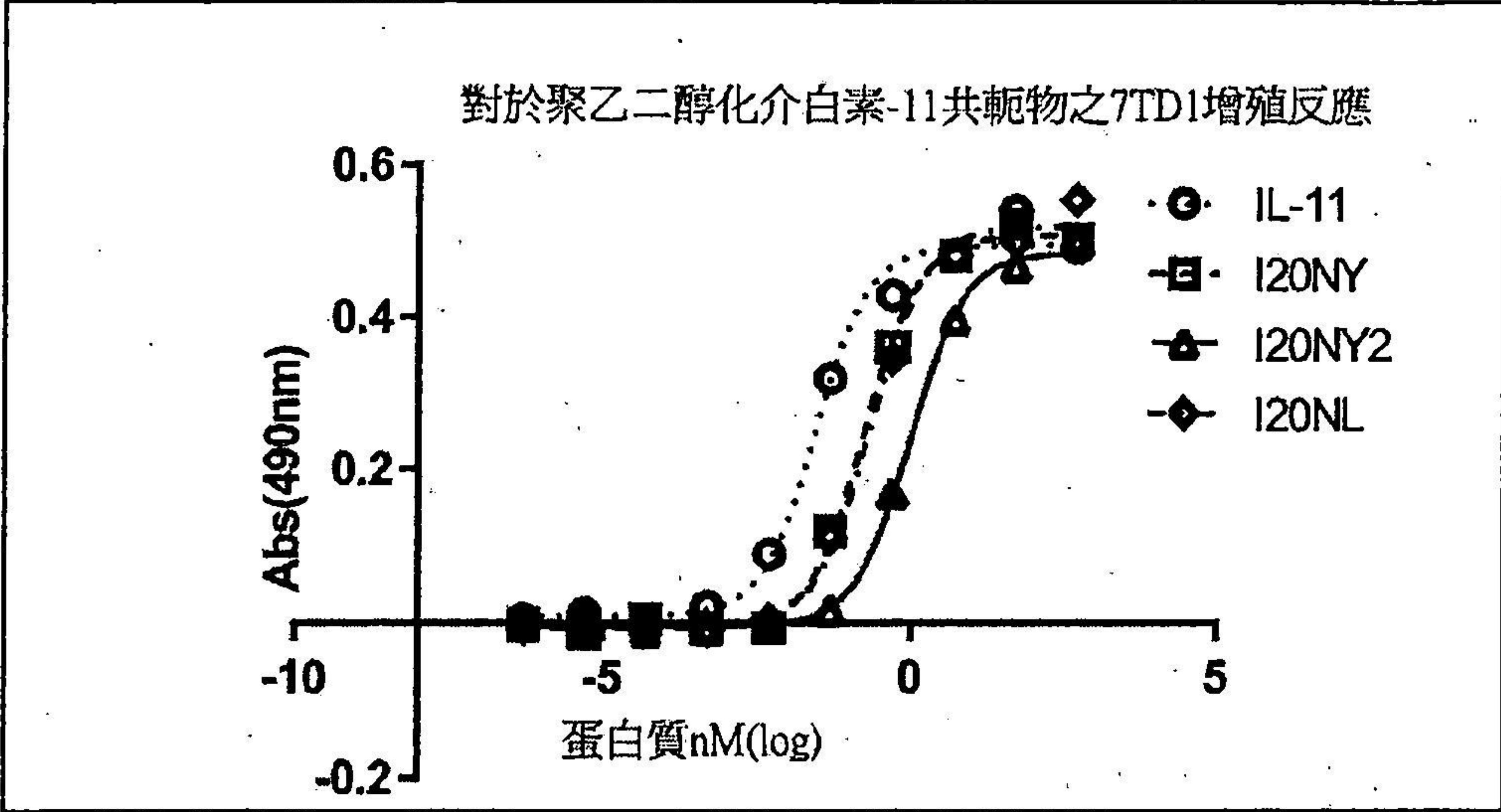
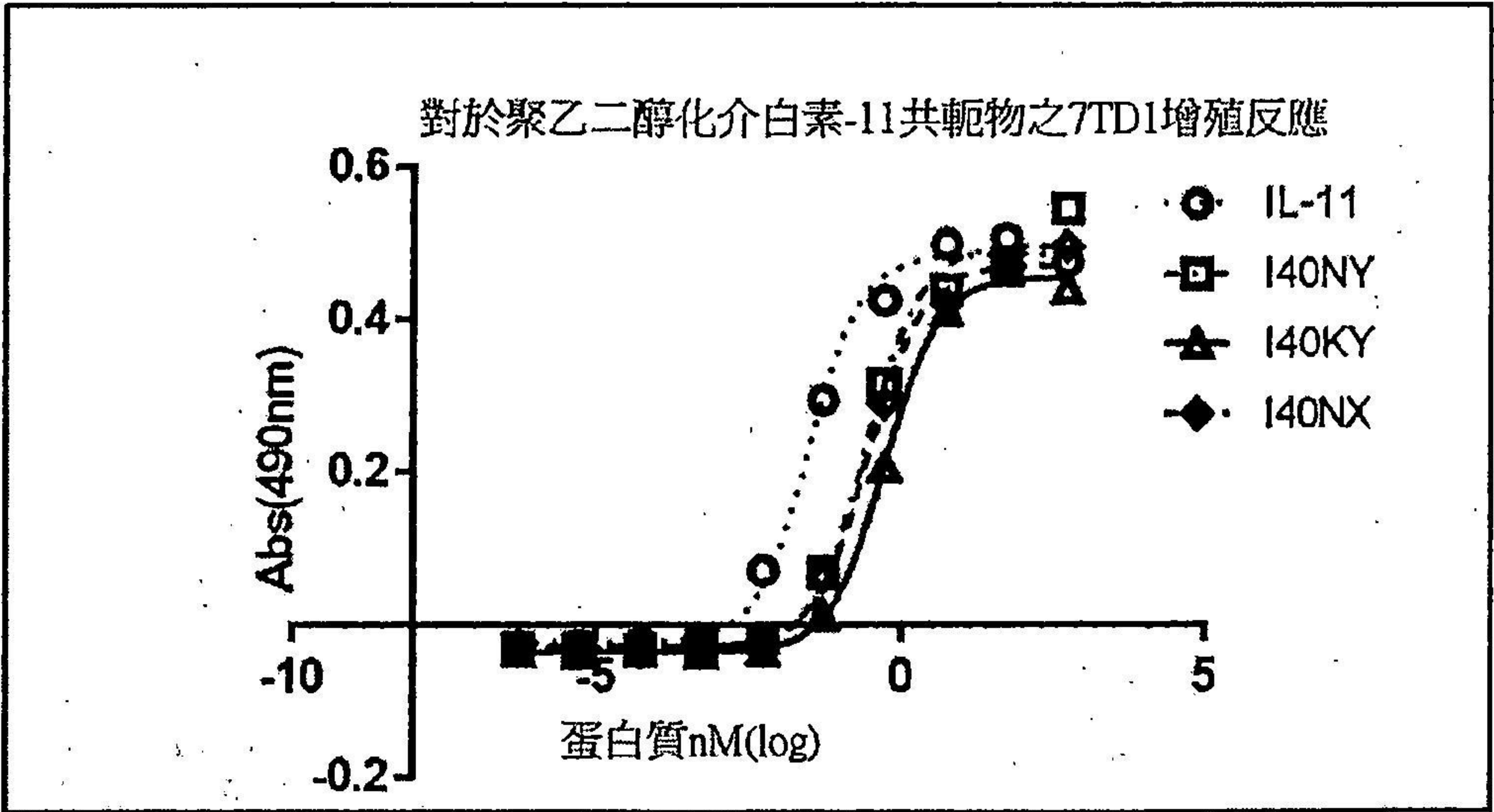


圖 8



	IL-11	I20NY	I20NY2	I20NL
EC50(pM)	30.49	191.60	1012.0	239.80
R平方 (R square)	0.9918	0.9979	0.9988	0.9954
相對於未經修飾之介白素-11的效力比	1	0.16	0.03	0.13



	IL-11	I40NY	I40KY	I40NX
EC50(pM)	30.80	277.20	536.40	292.90
R平方 (R square)	0.9957	0.9926	0.9991	0.9968
相對於未經修飾之介白素-11的效力比	1	0.11	0.06	0.11

圖 9

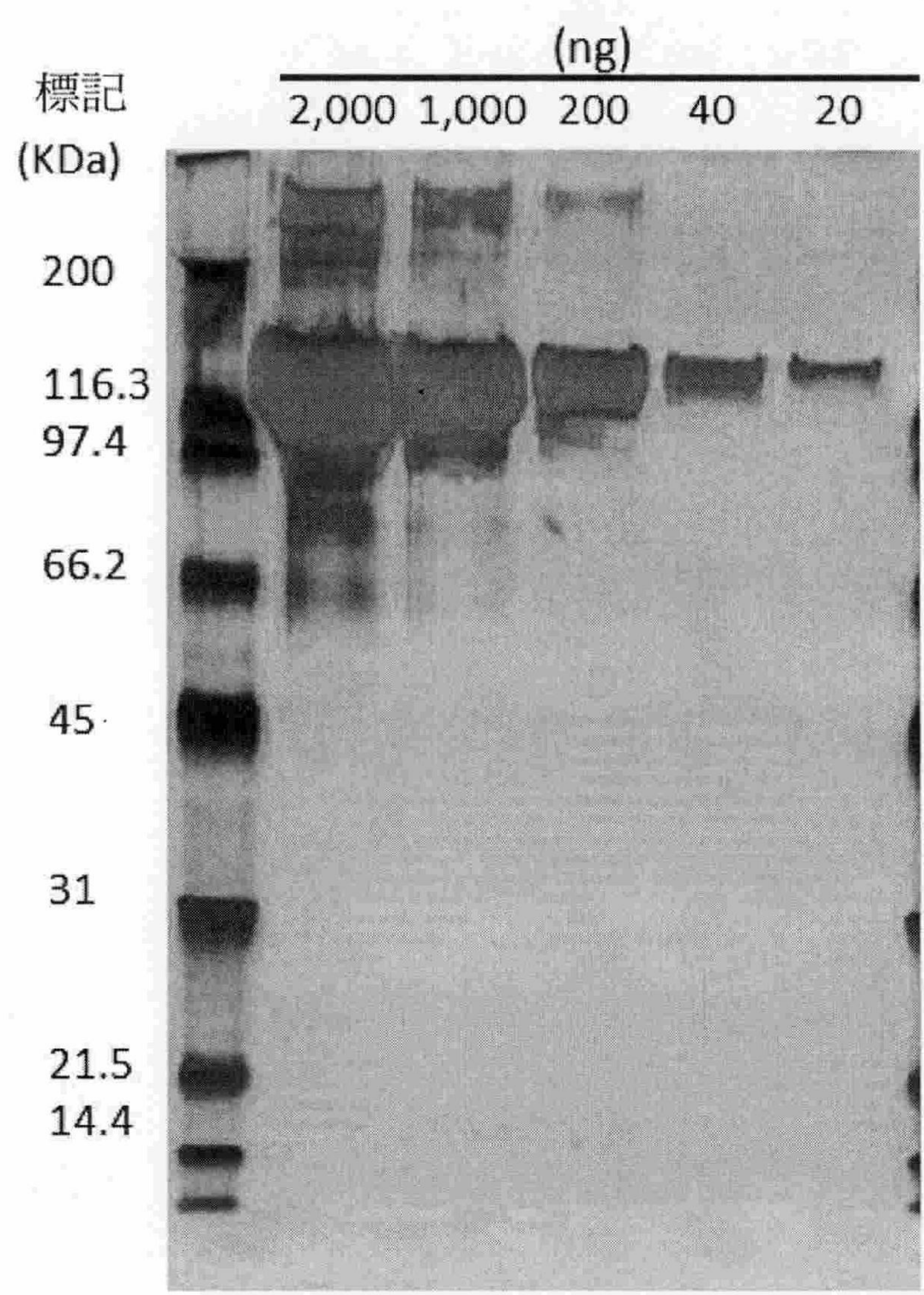


圖 10

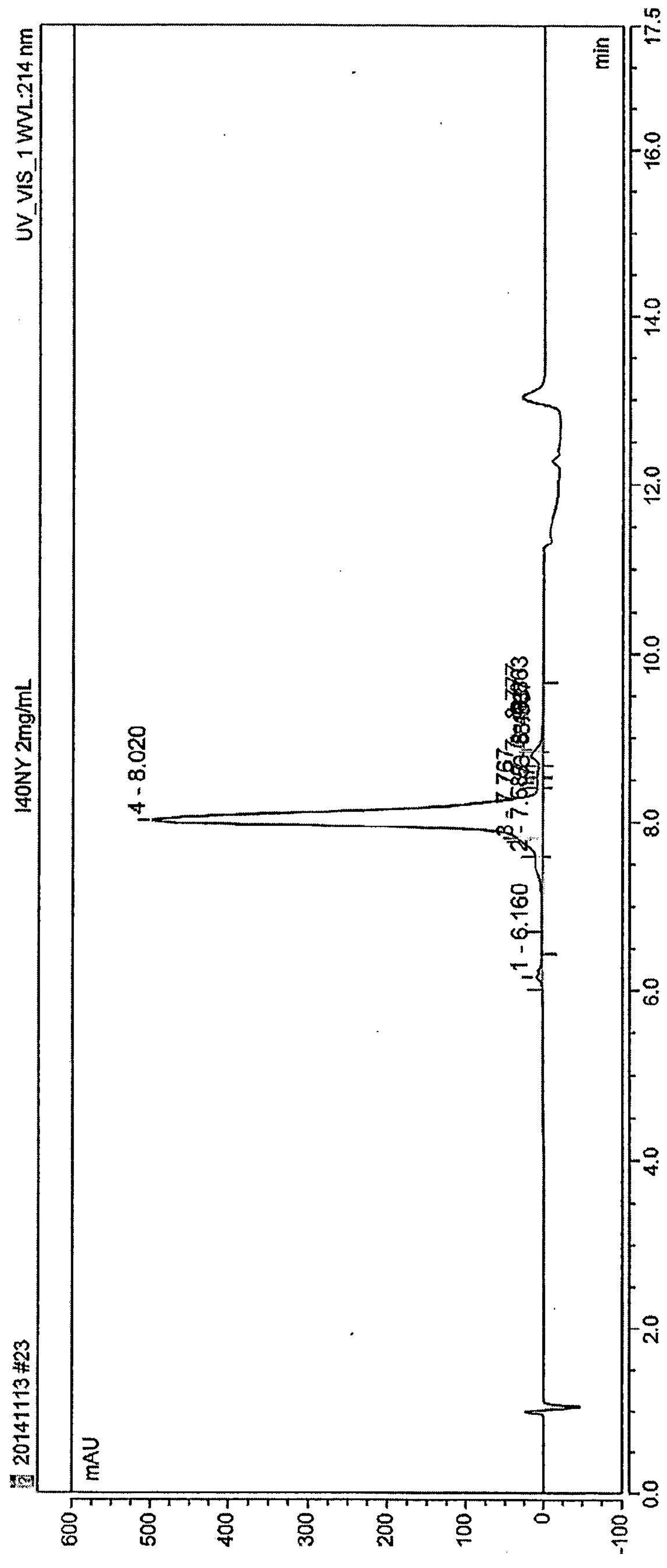


圖 11

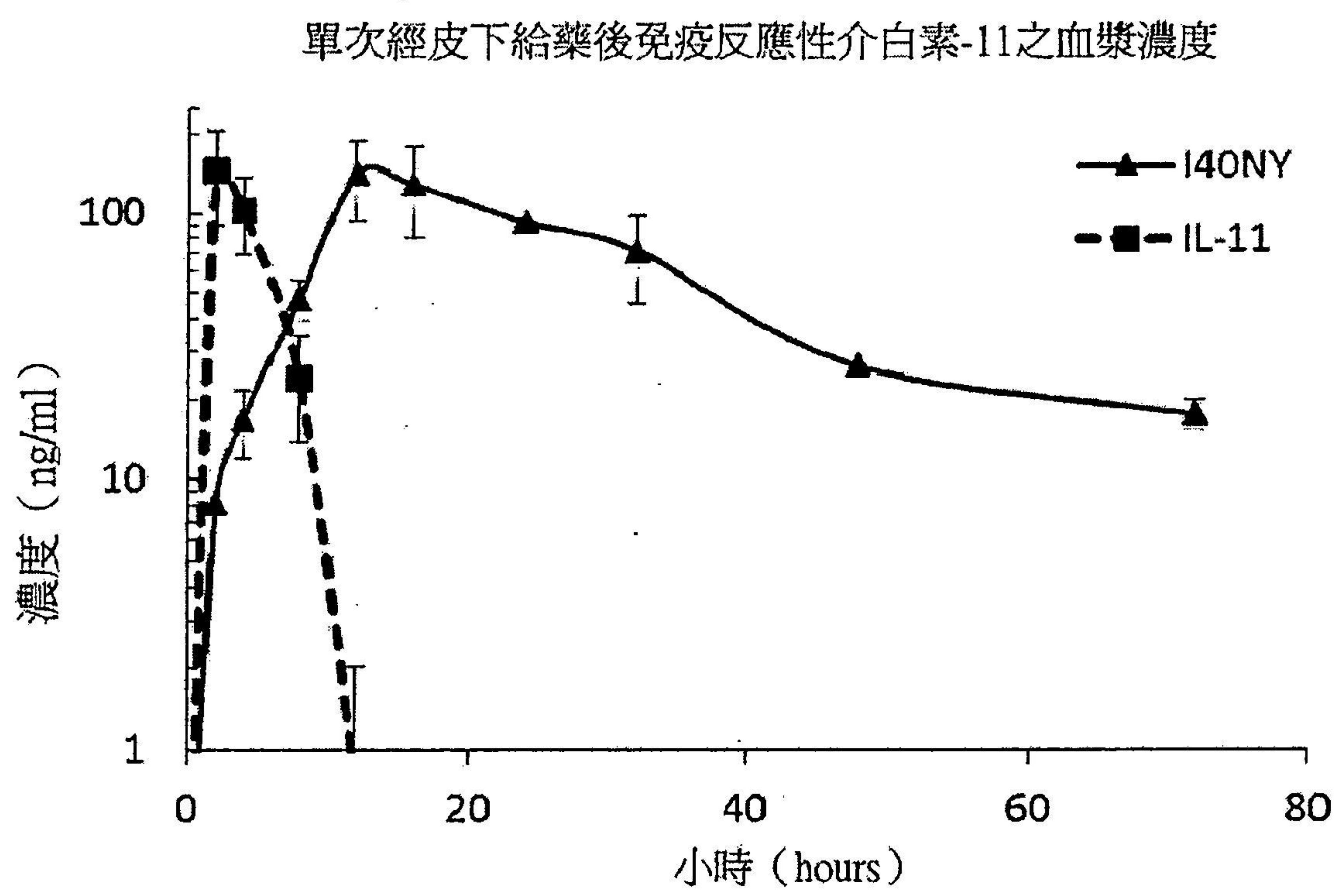


圖 12

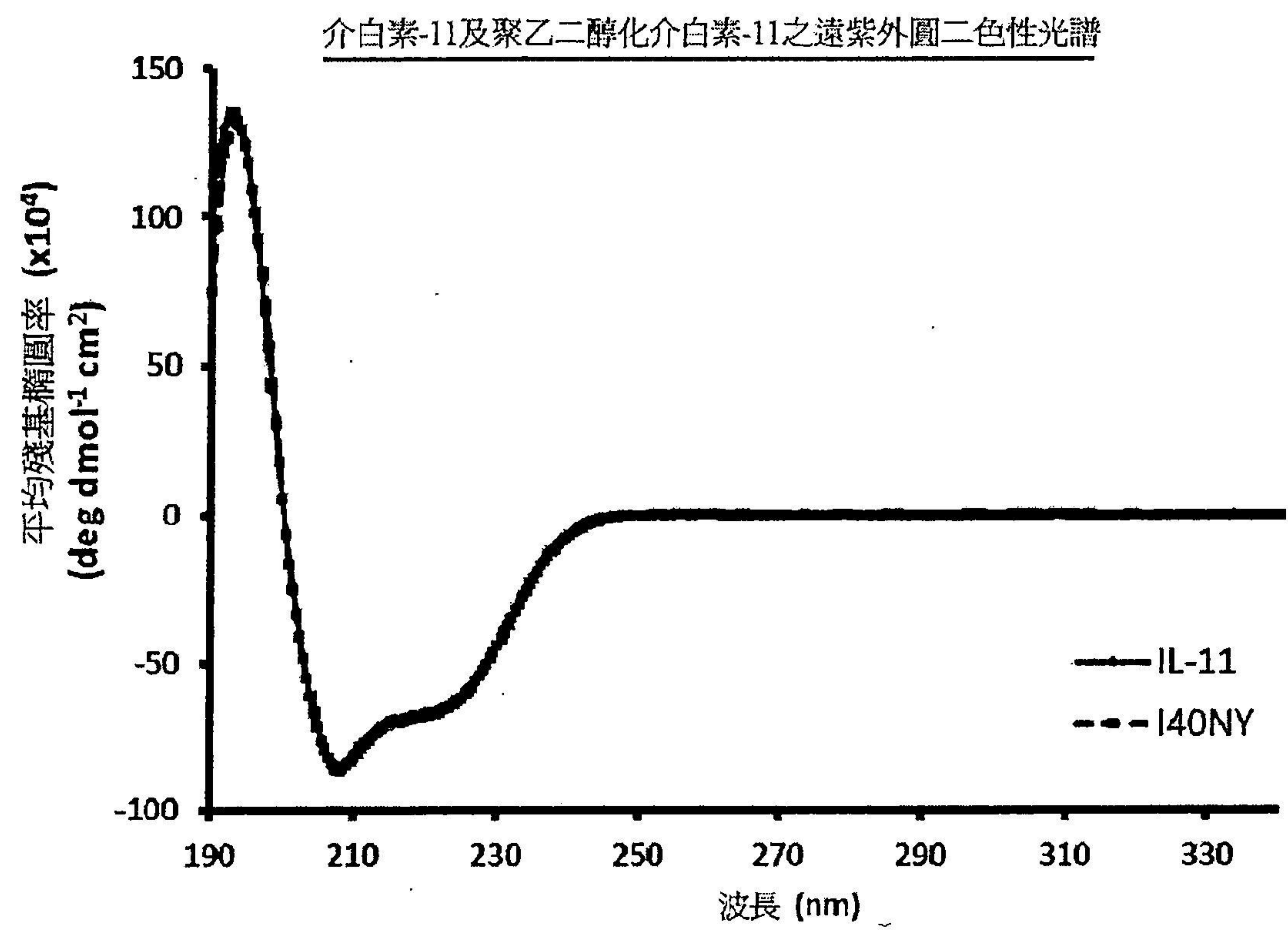


圖 13

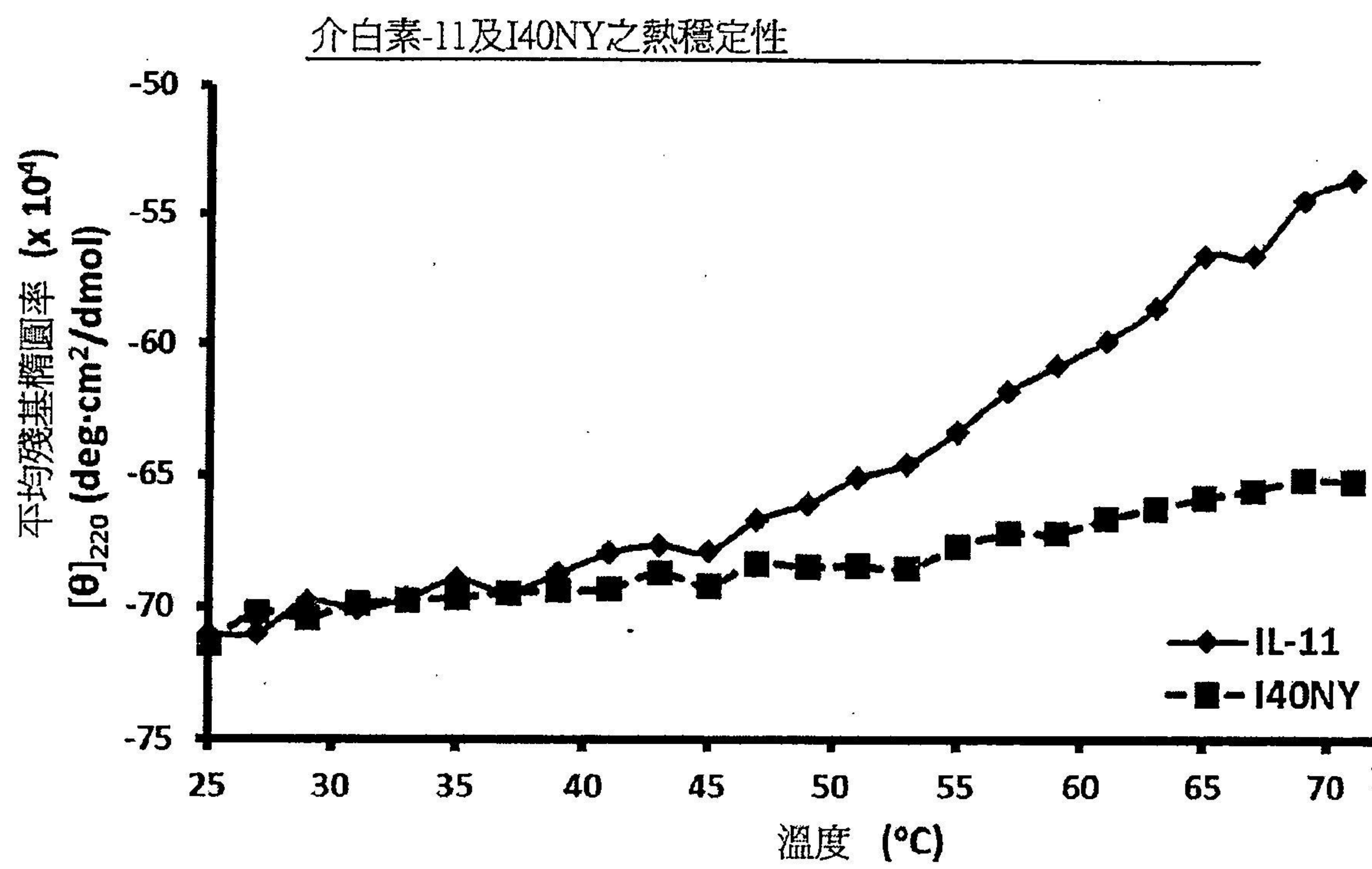


圖 14

末梢血液血小板計數

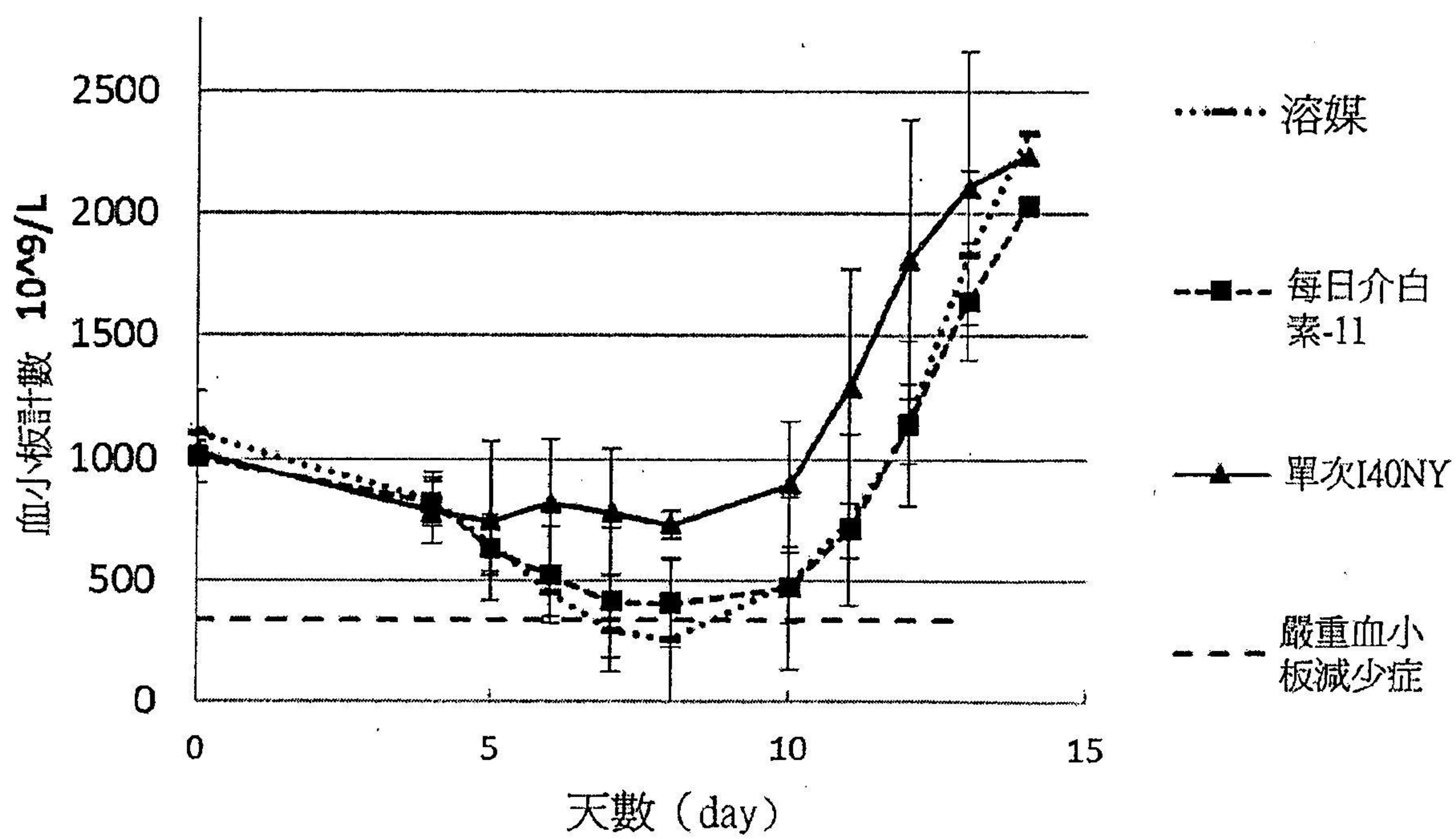


圖 15

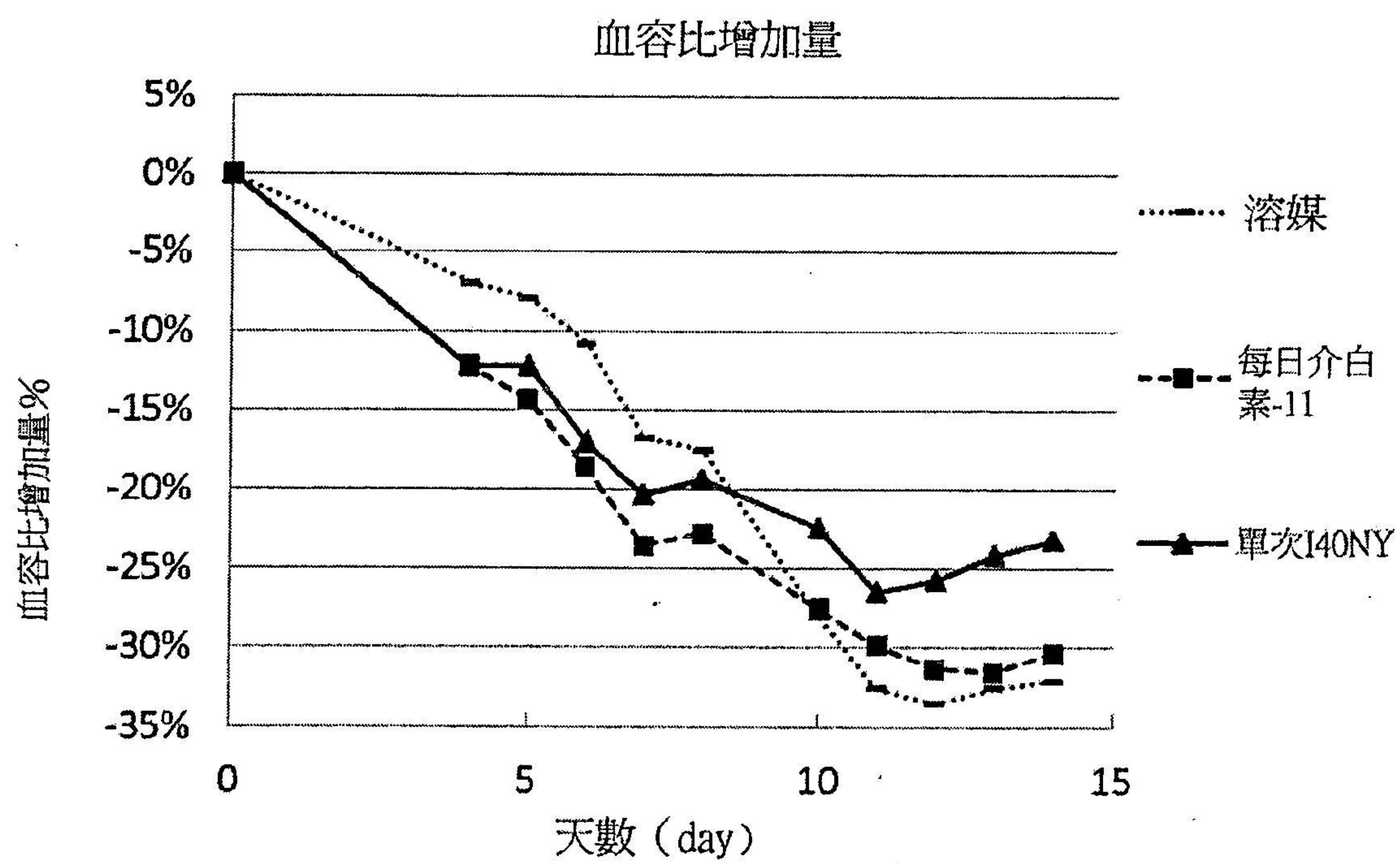


圖 16